

越冬日本脳炎ウイルス解明のための研究

—ELISAによる豚血漿中からの抗原の検出—

山西重機・三木一男・山本忠雄

I はじめに

日本脳炎の流行は、1968年頃から急激に減少したものの例年、流行期になるとウイルス保有蚊のコガタアカイエカが確認されるなど、またこの蚊が有機燐剤およびカーバメイト剤に対して高い抵抗性をもつことなど、今後とも注意が必要である。

このため毎年、ブタ血中の日本脳炎ウイルス(JEV)抗体価の測定が行われているが¹⁾、血中より直接JEVの検出が可能であれば、ブタにおけるウイルス血症の状態を把握することができ、日本脳炎を早期に予測することが可能となり、その疫学的重要性は更に高まるものと考えられる。従来、検体からのJEV検出には、哺乳動物脳内接種²⁾ およびC6/36細胞(ヒトスジマカ由来細胞株)³⁾ などによるウイルスの分離が行われているが、分離同定にかなりの時間を要するため、多量の検体を扱う疫学調査では、必ずしも適した方法とは言えない。そこでJEV検出をより簡便かつ迅速に行うため、すでにロタウイルス⁴⁾、B型肝炎ウイルス⁵⁾の抗原検出に用いられているenzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)をJEV抗原検出に応用し、この方法の有用性を確認した。またこの応用で、越冬ウイルス解明のために豚血漿中のJEV抗原を測定した。この結果、現在までに得られた知見について報告する。

II 材料と方法

1) ELISAによるJEV抗原の測定

(1) 抗JEVブタIgG

感染マウス脳乳剤より精製し、ホルマリン不活化したJEV中山株を抗原としてブタを常法により過免疫した抗血清を作製し、硫酸分画したものを、阪大微生物病研究会観音寺研究所から分与され、これをSephacryl S 200カラムクロマトグラフィーで再分画した。

(2) ペルオキシダーゼ標識抗体

horseradish peroxidase (HRPO, 東洋紡) を用い、抗JEVブタIgGとWillsonとNakaneの方法⁶⁾により標識した。HRPO標識抗体はSephacryl S 200カラムクロマ

トグラフィーを用いて分画し、蛋白と酵素の最適比(0.3~0.6)を採取して実験に供した。

(3) 測定法

図1の方法でおこった。標準抗原のウイルス液を同時に測定し、このOD値で検体OD値を除いたものを、抗原OD値とした。

2) ELISAによるJEV抗原検出限界の検討

哺乳動物にJEV中山株を脳内に接種し、発症後脳を採取し脳乳剤を調整、4℃ 3,000 rpm10分の遠沈上清を原液として常法によりVero細胞にてブラック法を行い感染価を測定した。原液をPBS-Tで100倍希釈から2倍段階希釈を行い、各希釈段階のJEV抗原をELISAで測定した。

対照として非感染マウス脳乳剤を同様の方法で作製し各希釈段階のJEV抗原をELISAで測定した。

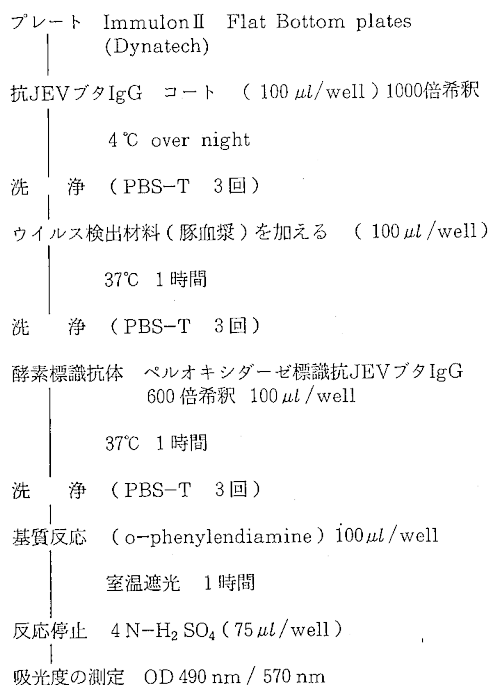


図1 日本脳炎ウイルス抗原検出ELISAの手順

3) ELISAによるJEV抗体の測定

図2の方法でおこなった。標準陽性血清を定め、検体と同時に測定し、これで検体ODを除いたものを抗体ODとした。

4) HI抗体価の測定

一日令ヒヨコ赤血球を用いたHI反応により、厚生省伝染病流行予測検査術式⁷⁾に従って行った。

5) ブタ血漿からのウイルス分離

(1) C6/36細胞によるJEVの分離

既報の方法⁸⁾によりC6/36細胞に接種し28°Cで培養した。接種後上清を3回継代し細胞の観察をつづけた。また継代毎に上清中のJEV抗原をELISAで測定した。

(2) 哺乳マウスによるJEVの分離

生後48時間以内の哺乳マウスの脳内に接種して経過を観察した。発症したマウスについて脳乳剤の遠沈上清を用いて、常法により1日令ヒヨコ赤血球を用いて赤血球凝集反応を行った。陽性例については、さらに抗JEVブタIgGを用いたHI反応によって同定した。

6) 豚血漿の採取

四国地方で飼育されていた生後6~7カ月のと殺豚から、ヘパリン-EDTA加試験管に1985年7月から1987年5月の期間にわたって採血し、振盪後低速遠心しこれを実験に供した。

III 結 果

1) ELISAによるJEV抗原検出限界の検討

JEV感染マウス脳乳剤上清の100倍希釈における感染価は 1.1×10^7 PFU/mlであり、そのときの抗原検出ELISAによるOD値は0.790であった。OD値は希釈につれて急速に低下し、1,600倍希釈で0.060、3,200倍希釈で0.035、1,280倍希釈で0.010となった。一方非感染対照脳乳剤では100倍希釈のOD値が0.050となり、以後希釈につれて徐々に低下して、3,200倍希釈で0.012となった(図3)。

これらの結果より、少なくとも非感染脳乳剤100倍希釈におけるOD値0.050(約 5.5×10^5 PFU 1 ml相当)以上のウイルスを含まないとELISAによる検出が困難であることが示された。

2) 豚血漿中のELISAによるJEV抗原の検出

1985年7月から1987年5月までに採血した豚血漿1354例について、ELISAで測定した結果は表1のとおりで、OD値0.05以上の豚血漿については、図4に示した。検出率が高いのは例年8月から12月であり、また冬期間においても高いOD値の抗原を確認することができた。

3) JEVの分離

同時におこなったC6/36細胞によるELISA陽性の豚血漿中からのウイルス分離では、ウイルス保有のコガタアカイエカ存在の夏期間では、容易に増殖分離が可能であったが、それ以外の期間では不可能であった。その継代培養で各段階毎にELISAで抗原測定すると、接種豚血漿移行抗原が継代毎に減少するのが観察できた。

またOD値で1.0以上の冬期間の豚血漿を哺乳マウスに接種したが分離できなかった。

4) 各月のJEV-HI抗体の保有状況

HI抗体は、冬期になると保有率は低下するものの、年間を通じて検出することができ、高い保有率は保有蚊出

プレート Immulon II Flat Bottom plates
(Dynatech)
抗原コート (ホルマリン不活化精製濃縮ワクチン原液)
4°C over night
洗 浄 (PBS-T 3回)
血清反応 (200倍希釈血清 100 μ l/well)
37°C 1時間
洗 浄 (PBS-T 3回)
酵素標識抗体 ペルオキシダーゼ標識抗ブタIgGヤギ抗体
— IgG検出
ペルオキシダーゼ標識抗ブタIgMウサギ抗体
— IgM検出 100 μ l/well
37°C 1時間
洗 浄 (PBS-T 3回)
基質反応 (o-phenyldiamine) 100 μ l/well
室温遮光 1時間
反応停止 4N-H₂SO₄ (75 μ l/well)
吸光度の測定 OD 490 nm / 570 nm

図2 日本脳炎ウイルス抗体IgGとIgM検出ELISA

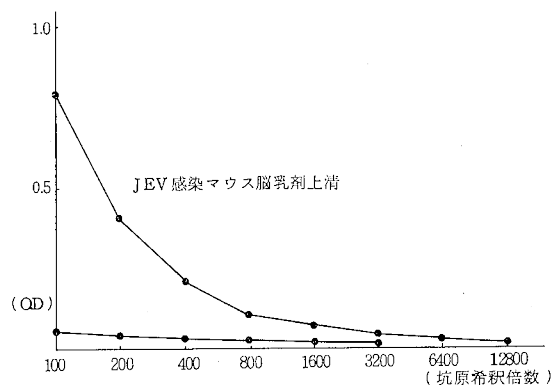


図3 ELISAによるJEV抗原検出限界の検討

現以降であり、1985年は8月12日から12月11日、1986年は8月27日から1月7日であり、また夏を経験した豚血漿以外の期間でも、HI抗体価で1,280倍を示したものも存在した(図5)。

5) 各月のJEV-IgM抗体の検出

1986年5月から1987年5月までの豚血漿についてELISAでIgM抗体を測定した結果は図6のとおりで、8月の保有較存在中には多く検出された。また夏期間以外でも少数ではあるが10月1例、11月3例、12月6例、1月2例、4月2例、確認することができた。また再確認のためにIgM抗体の検出された豚血漿を蔗糖密度勾配遠心法

によって介画し、その各フランクシオンについてELISAでIgGとIgMを測定した結果、それぞれの位置で確認することができた(図7)。

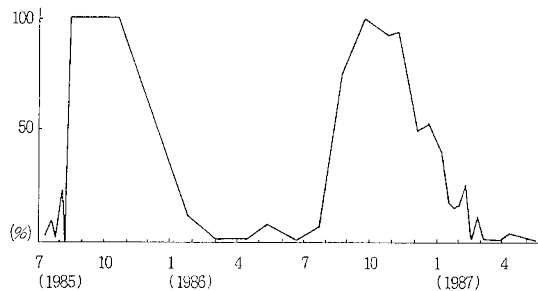


図5 各月におけるHI抗体の保有率の状況

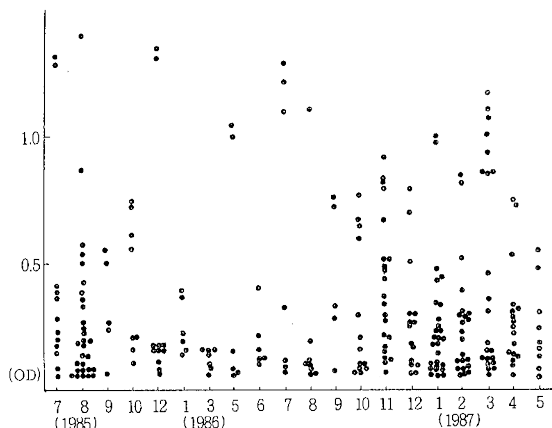


図4 各月の豚血漿中からのELISAによるJEV抗原の検出状況

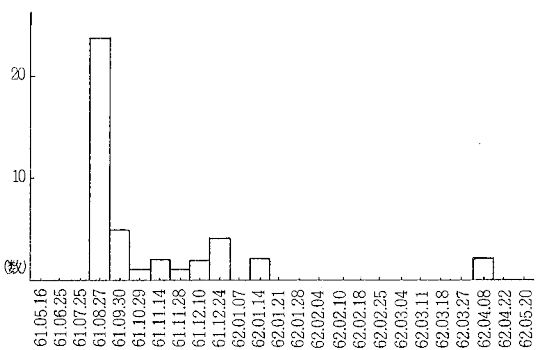


図6 各月におけるELISAによるIgG抗体の検出

表1 豚血漿からのELISAによるJEV抗原の検出

	検査数	吸光度				Cut 0.05	off値 0.20
		0.05以下	~0.2	~1.0	1.0以上		
1985. 7	60	47	5	6	2	21.6	13.3
8	100	67	19	11	1	31.0	12.0
9	20	15	1	4		25.0	20.0
10	40	32	2	6		20.0	15.0
12	40	29	9		2	27.5	5.0
1986. 1	40	34	3	3		15.0	7.5
3	40	33	7			17.0	0
5	50	44	4		2	12.0	4.0
6	40	34	4	2		15.0	5.0
7	40	33	3	1	3	17.5	10.0
8	40	32	7		1	20.0	2.5
9	40	35	1	4		12.5	10.0
10	40	26	9	5		35.0	12.5
11	80	58	6	16		27.5	20.0
12	80	66	6	8		17.5	10.0
1987. 1	160	134	13	13		16.2	8.1
2	160	138	11	11		13.7	6.8
3	164	142	11	7	4	13.4	6.7
4	80	63	7	10		21.2	12.5
5	40	31	5	4		22.5	10.0
合計	1,354	1,095	133	111	15	19.1	9.3

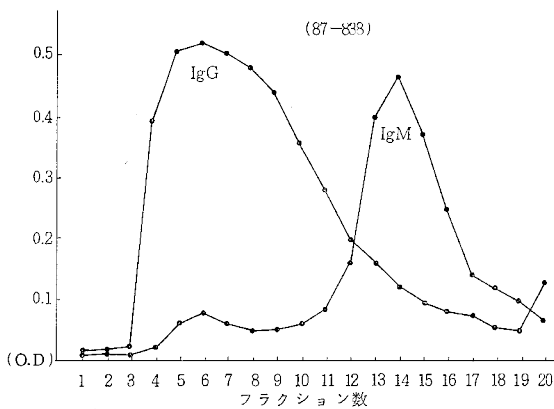


図7 豚血漿の蔗糖密度勾配遠心法によるグロブリン分画

IV 考 察

検体中のウイルス抗原のELISAによる検出は、いくつかのウイルスについてすでに行われているが^{4) 9)} JEVについては未だ報告されていない。そこで今回著者らは、豚血漿中からJEVを直接検出する目的でELISAを検討したが、培養細胞、哺乳マウス脳内接種法などに較べると細胞内での増殖の過程がないために検出感度は低く、検査材料はウイルス血症をおこした豚の血液等に現在のところ限定されているが短時間に簡単に検出することができ期待できる方法と考えられた⁹⁾。

また今回の実験では、抗原の検出限界は 5.5×10^5 PFU/mlまで確認することができた。これらを利用した実際の応用で各月に採血した豚血漿中の抗原検出については、年間を通じて検出することができた。これを越冬ウイルスとの関連で冬期間についてみると、高いOD値が1986年4株、1987年4株とそれぞれ検出できた。この豚血漿は、C6/36細胞、哺乳マウス脳内接種によって増殖分離が不可能であったため、ウイルス抗原の再確認のために、豚血漿とJEVブタ抗体を混和し、そしてその後ELISAによってOD値の低下を確認し、抗体によって抗原のブロックができ、ウイルス抗原であることが同定できた。

また本実験中、豚血症中のJEVが培養細胞中で増殖分離できたのは、県下のウイルス保有蚊存在期間中にはほぼ一致した夏期間に限られた。このことから冬期間のELISA陽性で高いOD値の豚血漿中のウイルス存在の証明のため、ウエスタンブロット法によって抗原の確認を検討したが、JEV表面抗原の58Kの位置に不明瞭な発色をみましたが、血清アルブミンの妨害もあり同定できなかった。

冬期中のJEVの活動を示唆する報告は、中村ら¹⁰⁾の母豚の死流産胎児の感染時期を3月から5月と推定してい

るものがあるが、ウイルス分離できない冬期豚血漿中のELISA検出抗原が非感染性の抗原もしくはELISAの非特異反応の可能性等今後の検討課題である。

しかしながら、今回冬期ウイルスの存在を豚血漿中のJEV抗体からも併せて検討したが、冬期でも高いHI抗体価をもつ豚が存在した。これについてELISAでIgMを測定すると、少数ではあるが検出できた。またこの豚血漿を蔗糖密度勾配遠心法で分画すると、特定のフラクションにIgMを証明することができた。この結果から一概にはいえないが冬期間でも豚間で散発的にそして限定された範囲で日本脳炎ウイルスの活動がみられることを示し、そしてウイルス越冬の一つの方法が推察できる。

文 献

- 1) 山西重機, 山本忠雄, 高樹正浩: 香川県下における日本脳炎の疫学について, 岡山医学会雑誌, 96巻別巻, 日本脳炎特集号XXV, 25~33, 1984.
- 2) 大谷明, 清水文七: アルボウイルス, ウイルス実験学各論, 国立予防衛生研究所編, 183~224, 丸善株式会社, 東京, 1982.
- 3) 五十嵐章: ヒトスジシマカ培養細胞クローンC6/36を用いた野外採集コガタアカイエカから日本脳炎ウイルスの分離方法, 熱帯医学, 22, 225~264, 1980.
- 4) 勝島矩子, 坂本美千代, 五十嵐直子, 加藤幸之助, 鈴木宏: 糞便中のヒトロタウイルス検出法の比較 — 電子顕微鏡, 免疫酵素法, 逆受身赤血球凝集反応, ラテックス凝集反応について, 臨床とウイルス, 11, 247~251, 1983.
- 5) 勝原徳直, 天木秀一, 荒川泰行, 松尾裕, 本田利男, 祐川百合子, 星野茂角, 雨宮洋一: 酵素免疫測定法(EIA法)によるHBe抗原抗体の検出について, 医学のあゆみ 122, 1058~1062, 1982.
- 6) Willson, M.B. and Nakane, P.K.: Recent developments in the periodate method of conjugating horseradishperoxidase(HRPO) to antibodies. In Immunofluorescence and related staining techniques, ed. Knapp, W., Holuber, K. and Wick, G., Elsevier/North Holland Biomedical Press. Amsterdam, 215~224, 1978.
- 7) 厚生省保健医療局: 日本脳炎, 伝染病流行予測検査術式. 厚生省, 東京, 60~73, 1986.
- 8) 山西重機, 宇野文夫, 山田雅夫, 筒井潔, 新居志郎, 赤塚和也: 日本脳炎ウイルスによるヒトスジシマカ由来細胞系(C6/36細胞)における細胞変性効果 — 走査型電子顕微鏡による観察, 岡山医学会雑誌, 94巻別巻, 日本脳炎特集号XXIII, 23~97, 1982.
- 9) 山西重機, 山本忠雄, 鎌倉守: Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA法)による豚血中からの日本脳炎ウイルス抗原検出の試み, 岡山医学会雑誌, 98巻別巻, 日本脳炎特集号XXVII, 21~25, 1986.
- 10) 中村肇: 冬期~春期におけるブタの日本脳炎ウイルス感染, 第21回日本脳炎ウイルス生態学研究会演題要旨, 1986.