

流行期におけるブタの日本脳炎ウイルス ELISA抗体検出の検討

山本 忠雄

I はじめに

日本脳炎の流行予測は、流行期におけると畜場のブタの血清中の日本脳炎ウイルスに対するIgM抗体を測定して行われる。この抗体測定には赤血球凝集抑制(HI)反応が用いられている¹⁾。他方、血清学的検査法としては、ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)法が技術的に迅速且つ簡便であり、定量性に富み、感度が高く有用な方法として広く応用されている^{2)~11)}。著者は、採血用ろ紙に微量血液を吸収させ、これをELISA法に用いて抗体の溶出を行なうと同時に抗原抗体反応を進行させるELISA法(ろ紙片)を考案し、既に報告した¹²⁾。この方法によるELISA抗体価の再現性は極めて高く、常用のELISA法による抗体価とも、またHI法により得られた抗体価とも高い相関性を示した。ELISA法では、酵素標識抗体の特異性に従ってIgM、またはIgG抗体を区別できるので、容易にIgM抗体を検出して、初感染を知ることができる。本論文では、日本脳炎流行前期及び流行期に10頭のブタより経時的に採血してELISA IgM抗体価を測定し、個体毎に抗体価の変動を調べ、HI法により測定されるIgM抗体の消長と比較した。また非流行期、流行前期及び流行期のブタ集団のELISA IgM抗体価を調べ、抗体上昇の推移をHI法による成績と比較した。これらELISA法とHI法の成績の比較により、日本脳炎流行予測におけるELISA IgM抗体価測定の有用性について検討した。

II 材料と方法

1 被検血清

生後約4カ月の特定飼育豚10頭について、夫々番号を付け、昭和61年7月から10月にかけて経時的に8回(Noは7回)静脈採血を行ない、一部を代謝異常検査用採血ろ紙C(東洋ろ紙製)に吸収させ、既報¹²⁾の方法に従い乾燥後、フリーザーに保存し、また、残りの血液からは血清分離を行ない、被検血清とした。と畜場豚については、4月から9月にかけて香川県内のK食肉衛生検査所に搬入された生後約6カ月のブタを用い、放血時に血液

を採取し、血清分離を行ない被検血清とした。と畜場豚はN飼育場からのものが主で、一定の集団を構成するとみてよい。

2 抗体価の測定

抗体価の測定は既報^{12),13)}に従い、採血用ろ紙片を用いるELISA法(ろ紙片)及び稀釈血清を用いる常用ELISA法によった。抗原はホルマリン不活化日本脳炎ワクチン精製濃縮原液(財)阪大微研観音寺研究所製)を使用し、0.05M炭酸重碳酸緩衝液(pH 9.6)を稀釈液として160倍に稀釈した抗原をImmulon U型マイクロプレートに固相化した。プレートをPBS-Tween20で洗浄し、ELISA法(ろ紙片)ではプレートの穴に100 μ lの稀釈液を入れておき、この中に直径3mmに打ち抜いた小円板状のろ紙片を入れて血清を溶出すると同時に反応を進行させた。常用ELISA法では、稀釈液で100倍稀釈した被検血清100 μ lを加えて反応させた。ブタIgM抗体の測定には、ペルオキシダーゼ標識抗ブタIgM(Fc)(ノルデック社)を用いた。

HI抗体価は厚生省の伝染病流行予測調査検査術式に従って測定した¹⁴⁾。IgM抗体は2-メルカプトエタノール(2-ME)処理した被検血清のHI抗体価の減少によって測定した¹⁴⁾。

III 成績

1 特定飼育豚の個別的抗体変動

7月から10月にかけて、特定飼育豚の10頭について、継続8回にわたり採血し、日本脳炎ウイルスに対するELISA IgM抗体及びHI抗体の出現状況を調べた(図1)。ELISA法(ろ紙片)によるIgM抗体の測定では、7月25日まですべての個体についてELISA IgM抗体価は低く、 10^3 以下(150~320)であり、HI抗体価も陰性($<1:10$)であった。8月1日には、ELISA抗体価はNo. 1, 7, 9の個体では 10^4 以上(18,500~48,000)に上昇し、No. 3及び5の個体でもほぼ 10^4 に近い抗体価(7,900及び9,200)を示した。これらの個体についてはHI抗体も夫々陽転し、IgM抗体(血清の2-ME処理によるHI抗体価の1/8以下の減少)が認められた。

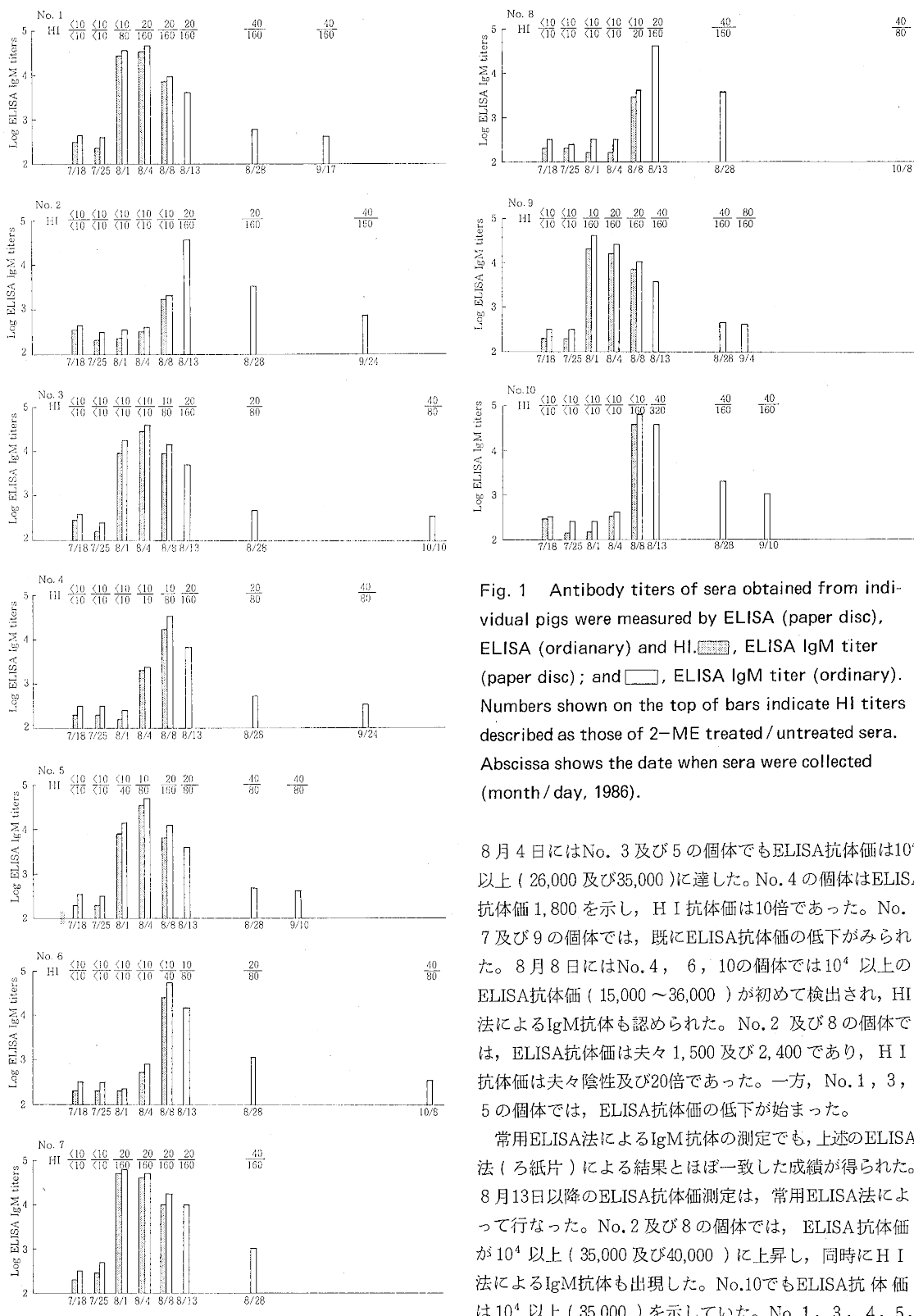


Fig. 1 Antibody titers of sera obtained from individual pigs were measured by ELISA (paper disc), ELISA (ordinary) and HI (paper disc), ELISA IgM titer (paper disc); and (hatched bar), ELISA IgM titer (ordinary). Numbers shown on the top of bars indicate HI titers described as those of 2-ME treated / untreated sera. Abscissa shows the date when sera were collected (month/day, 1986).

8月4日にはNo. 3及び5の個体でもELISA抗体価は 10^4 以上(26,000及び35,000)に達した。No. 4の個体はELISA抗体価1,800を示し、HI抗体価は10倍であった。No. 7及び9の個体では、既にELISA抗体価の低下がみられた。8月8日にはNo. 4, 6, 10の個体では 10^4 以上のELISA抗体価(15,000~36,000)が初めて検出され、HI法によるIgM抗体も認められた。No. 2及び8の個体では、ELISA抗体価は夫々1,500及び2,400であり、HI抗体価は夫々陰性及び20倍であった。一方、No. 1, 3, 5の個体では、ELISA抗体価の低下が始まった。

常用ELISA法によるIgM抗体の測定でも、上述のELISA法(ろ紙片)による結果とほぼ一致した成績が得られた。8月13日以降のELISA抗体価測定は、常用ELISA法によって行なった。No. 2及び8の個体では、ELISA抗体価が 10^4 以上(35,000及び40,000)に上昇し、同時にHI法によるIgM抗体も出現した。No. 10でもELISA抗体価は 10^4 以上(35,000)を示していた。No. 1, 3, 4, 5,

9ではELISA抗体価は3,400～6,000の範囲にあるが、No.1, 3, 4 (ELISA抗体価は夫々3,400:5,100:6,000)ではHI法のIgM抗体は陽性であり、No.5及び9 (ELISA抗体価4,000及び3,400)では疑陽性(2-ME処理によるHI抗体価の1/4の減少)であった。8月28日以降はすべてについてELISA抗体価の低下がみられ、No.1, 3, 4, 5, 9では 10^3 以下(440～550)。No.6, 7, 10では 10^3 台(1,200～2,000)であった。これらはHI法によるIgM抗体が疑陽性であった。No.2及び8のELISA抗体価は夫々3,000及び3,400であったが、HI法のIgM抗体はNo.2が陽性、No.8が疑陽性であった。9月4日以降はELISA抗体価はすべて 10^3 以下で、HI法のIgM抗体も疑陽性または陰性であった。

2 と畜場豚の抗体価の変動

昭和61年4月から9月にかけて、K食肉衛生検査所に搬入されてきたと畜場豚の180頭について、日本脳炎ウイルスに対するIgM抗体を常用ELISA法及びHI法で測定した(図2)。日本脳炎非流行期の4月では、ELISA抗体価はすべてほぼ 10^3 以下で、抗体価が 10^3 を越える場合でも最高1,100であり、その数も20頭中1頭であった。これらのHI抗体はすべて陰性であった。7月7日、14日、28日及び8月4日に夫々20頭づつ抗体価を調べ、ELISA抗体価はすべて 10^3 以下を示し、またHI抗体価もすべて陰性であった。8月11日には20頭中16頭はELISA抗体価が 10^4 以上に上昇し、残りの1頭はELISA抗体価4,600を示し、2頭は2,000及び1,900で、1頭1,000以下であった。ELISA抗体価 10^4 以上の例については、HI抗体価は80～640倍を示し、ELISA抗体価4,600の例ではHI抗体価は40倍でIgM抗体が認められた。ELISA抗体価2,000及び1,900の2例については、HI抗体価は20倍あるいは陰性であった。またELISA抗体価 10^3 以下では、HI抗体は陰性であった。8月25日には、20頭中16頭がELISA抗体価 10^4 以上であったが、抗体価は前回より低い値を示す例が多かった。残りの4頭については、 10^4 近くのELISA抗体価(6,000～8,500)を示した。これらすべてHI抗体価は80～320倍で、IgM抗体であった。9月10日にはELISA抗体価 10^4 以上のものは20頭中9頭で、残りは 10^3 台を示した。HI抗体価は80～320倍であり、ELISA抗体価 10^4 以上の例はHI抗体はIgMで、ELISA抗体価 10^3 台の3例(2,200～2,600)ではHI抗体のIgM抗体は疑陽であった。9月19日にはELISA抗体価 10^3 台は20頭中13頭で、残りは 10^2 台であった。HI抗体はすべての例にみられ、抗体価は80～320倍であった。HI反応のIgM抗体が証明されたものは4例(ELISA抗体価1,700～2,500)であり、他はIgM疑陽性または陰性であった。

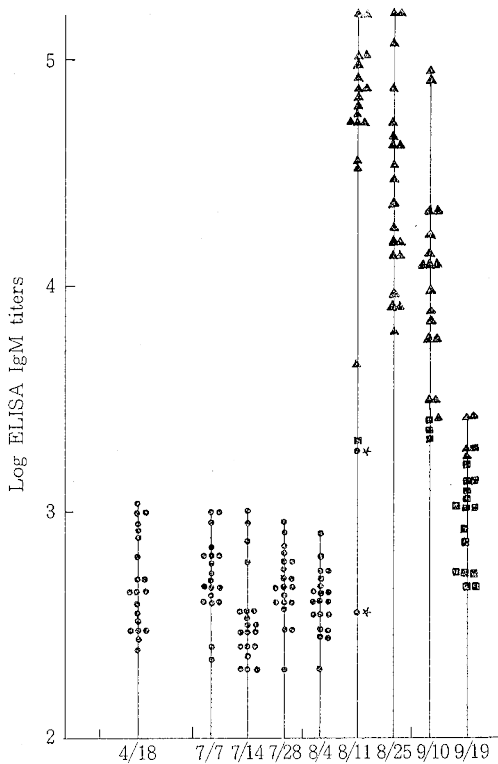


Fig. 2 ELISA IgM titers of sera collected from pigs during the nonepidemic, preepidemic and epidemic seasons. All sera that were collected after August 11, 1986, showed the positive HI reaction except two cases shown with ☆. ●, negative HI reaction; ▲, positive HI reaction and positive IgM antibody; ■, positive HI reaction but negative IgM antibody. Abscissa shows the date when sera were collected (month / day, 1986).

IV 考 察

日本脳炎の流行監視のため、地方衛生研究機関では流行期に定期的(10日毎)にと畜場のブタの血液を採取してIgM抗体を調べている。抗体保有率が50%を越えるとその地区は日本脳炎ウイルス汚染推定地区に指定される。抗体検査はHI法で行われ、血清の2-ME処理による抗体価の減少が1/8以下であれば、IgM抗体による反応とみなす¹⁴⁾。近年、血清学的検査法としてはELISA法が汎用されており、本法は技術的に迅速且つ簡便で、定量性に富み、感度が高い。日本脳炎の流行予測にはIgM抗体の検出を行なうので、ELISA法で酵素標識抗ブタIgM抗体を用いれば、容易に検査を実施することができる。このELISA法に比べて、2-ME未処理及び処理血清に

ついて抗体価を比較するH I法は操作が煩雑である。本論文では、日本脳炎流行予測のため、既報^{12),13)}のELISA法(ろ紙片)及び常用ELISA法により、ブタ血清中のIgM抗体を測定し、その有用性を検討した。

日本脳炎ウイルスに対する抗体の出現を調べるに当たり、個体別に検査する群(特定飼育豚)と集団から任意に抽出される個体を検査する群(と畜場豚)を設定し、IgM抗体を測定した。

特定飼育豚の10頭について、流行前期(7月18日)のELISA IgM抗体価をみると 10^3 以下で、H I抗体も陰性であった。7月25日も同じ成績が得られた。感染から抗体検出が可能となる期間及び以下の成績を考慮すると7月25日は流行開始直前あるいは流行開始に当たると思われる。8月1日には50%の個体がH I法のIgM抗体陽性で、既に流行期に入っていたことが分かる。これらのELISA抗体価は 10^4 以上を示す例が30%で、 10^4 近傍が20%であった。残りの50%はH I抗体陰性であり、ELISA抗体価は 10^3 以下であった。8月4日でもH I法のIgM抗体陽性の個体は50%であったが、これらのELISA抗体価はすべて 10^4 以上であった。8月8日にはH I法のIgM抗体陽性は80%に達し、これらのELISA抗体価は5,500以上であった。その他、H I抗体価20倍でIgM抗体が疑陽性の1例では、ELISA抗体価は2,400であり、またH I抗体陰性の1例ではELISA抗体価は1,500であった。これらはELISA法(ろ紙片)による成績であるが常用のELISA法でもほぼ一致した成績を得た。8月13日以降の成績は常用ELISA法によるが、ELISA抗体価5,100以上の個体ではH I法のIgM抗体が検出されている。ELISA抗体価3,400の2例では、一方はH I法のIgMが陽性であり、他方は疑陽性であった。この時点でH I法によるIgM抗体陽性率は80%に低下し始めていた。

ELISA抗体価5,000以上の例では、H I法によるIgM抗体は陽性であった。ELISA抗体価1,500以下では、H I抗体は陰性であった。ELISA抗体価2,000から4,000の間ではH I法のIgM抗体が疑陽性または陽性で、丁度、H I法のIgM抗体検出の限界とみられる。即ち、ELISA抗体価3,000をcut off値とし、それ以上のELISA抗体価を陽性とする、H I法に対応した成績が得られる。

個別的にELISA IgM抗体価の消長をみると、No.1, 3, 5, 7, 9の個体のように、抗体陽転後約2週間IgM抗体を検出できる。この期間はH I法によるIgM抗体もほとんど陽性である。この群では、8月1日にH I法のIgM抗体(ELISA抗体価3,000以上)が検出されておりまた、No.2のように8月13日に初めてH I法のIgM抗体が検出される例もある。したがって、検査個体数を増加すると、次に述べる集団についての成績のように、集

団としてのIgM検出期間は約1カ月程度になるであろう。なお、今回の実験ではELISA IgM抗体並びにH I法によるIgM抗体の検出される期間が約2週間であり、この成績は大塚ら^{15),16)}のH I法による2-ME感受性抗体の持続期間が約2週間であったという成績と一致する。

と畜場豚については、主に一つの飼育場から送られてくるので、同一集団に属するとみてよい。集団から個体を抽出して抗体価を測定する場合、これは無作為の標本であり、検体数の多い程精度が高い。通常、毎回20頭について抗体価を調べている。非流行期及び流行前期のELISA抗体価はほとんどが 10^3 以下で、最高値でも1,100の1例であり、すべてH I抗体陰性である。また、8月4日もELISA抗体価は 10^3 以下であった。個体別抗体検査群では、ELISA値のcut off値を3,000とした。集団についての抗体検査群で、H I抗体陰性の標本中ELISA抗体価の最高値は1,100であったので、その2.7倍がcut off値に相当する。8月11日の成績について、ELISA抗体価3,000以上の検体は17例で85%を占め、すべてH I法でIgM抗体を検出した。ELISA抗体価2,000及び1,900の2例については、H I抗体価20倍または陰性であり、IgM抗体は検出されていない。8月25日のELISA抗体価はすべて3,000以上であり、H I法のIgM抗体は検体の100%にみられた。9月10日の検体では、H I法のIgM抗体陽性例は85%に当たる17例にみられ、その16例はELISA抗体価3,000以上である。9月19日の検体では、ELISA抗体価は3,000以下で、すべてにH I抗体を認めたが、この多くはIgG抗体であった。

集団におけるELISA IgM抗体及びH I法のIgM抗体の検出期間は約1カ月である。この期間より個体内IgM存続期間(約2週間)を差し引いた期間が流行期間(幅)であろう。流行開始時点は、感染後初めて抗体が検出されるまでの期間を考慮して決める必要がある。ELISA法でもH I法でも、同時にIgM抗体を検出しているので、感度ではいずれも同程度とみてよい。通常、抗体検出の1週間頃に感染があったとみられるので、今回の流行は7月25日頃に始まったと思われる。

個体別抗体検査群では、8月1日に50%がIgM抗体陽転を示したが、集団の抗体検査群では8月4日でも陰性で、11日に85%がIgM抗体陽性を示した。これら2群の流行開始には3~5日の時間的ずれがある。個体別抗体検査群のブタは特定飼育場に飼われていた。と畜場豚が飼われていた飼育場と特定飼育場との距離は約40kmであるが、特定飼育場は山林の近くにあり、と畜場豚の飼育場は田圃の中にあり、日本脳炎ウイルスのベクターとしての蚊の発生条件は異なり、恐らく特定飼育場では早期に有毒蚊の発生が起きていたものと思われる。そのこと

が流行開始のずれとして現われているのであろう。

以上の成績から、一定のcut off値を設定すれば、HI法より簡便且つ迅速なELISA法により日本脳炎の流行監視が可能であることが明らかとなった。

稿を終えるにあたり、終始御指導並びに論文の御校閲を賜った徳島大学医学部ウイルス学教室の内田孝宏教授に深甚なる謝意を表します。また、香川県食肉衛生検査所の鎌倉守係長、寒川豊土主査並びに香川県畜産試験場の増川進主席研究員の協力に感謝します。

文 献

- 1) 厚生省医療局感染症対策課：日本脳炎・伝染病流行予測調査実施要領，22-28，1985。
- 2) Voller, A. & Bidwell, D. E. : Enzyme-immunoassay for antibodies in measles, cytomegalovirus infection and after rubella vaccination. *Br. J. Exp. Pathol.*, 57 : 243-247, 1976.
- 3) Gilman, S. C. & Docherty, J. J. : Detection of antibodies specific for herpes simplex virus in human sera by the enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Infect. Dis.*, 136 : s286-293, 1977.
- 4) Yolken, R. H., Wyatt, R. G., Zissis, G., Brandt, C. D., Rodriguez, W. J., Kim, H. W., Parrott, R. H., Urritia, J. J., Mata, L., Greenberg, H. B., Kapikian, A. Z. & Chanock, R. M. : Epidemiology of human-rotavirus types 1 and 2 studied by enzyme-linked immunosorbent assay. *N. Engl. J. Med.*, 299 : 1156-1161, 1978.
- 5) Bishai, F. R. & Galli, R. : Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to influenza A and B and parainfluenza type 1 in sera of patients. *J. Clin. Microbiol.*, 8 : 648-656, 1978.
- 6) Forghani, B., Schmidt, N. J. and Dennis, J. : Antibody assay for varicella-zoster virus: Comparison of enzyme immunoassay with neutralization, immune adherece hemagglutination and complement fixation. *J. Clin. Microbiol.*, 8 : 545-552, 1978.
- 7) 南嶋洋一，広瀬美和子：ELISAによるサイトメガロウイルス抗体の測定。臨床とウイルス，8：404-408，1980。
- 8) 水谷裕迪，水谷弘子，長根尾京子：ELISAのムンプスにおける実用性と問題点。臨床とウイルス，8：408-410，1980。
- 9) 村岡良昭，加藤富保，玉川重徳，南谷幹夫：ムンプス抗体価測定における測定法の比較検討。臨床とウイルス，8：410-412，1980。
- 10) 山崎謙治，上羽昇，峯川好一：酸素免疫測定法（ELISA）によるヒト血清中の日本脳炎ウイルス抗体の検出について。大阪府公衛研所報（公衆衛生編），20：65-69，1982。
- 11) 河野喜美子，南嶋洋一：ELISA試薬（Enzygnost Rubella）による風疹IgGおよびIgM抗体の測定。臨床とウイルス，13(2)217-221，1985。
- 12) 山本忠雄，高木光生，ろ紙片使用による微量血の日本脳炎ウイルスELISA抗体価の測定，感染症誌，59：1135-1141，1985。
- 13) Igarashi, A., Bundo, K., Matsuo, S., Makino, Y. & Lin, W. J. : Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) on Japanese encephalitis virus. 1. Basic conditions of the assay on human immunoglobulin. *Trop. Med.*, 23 : 49-59, 1981.
- 14) 厚生省公衆衛生局保健情報課：日本脳炎・伝染病流行予測調査検査術式，60-73，1978。
- 15) 大塚悟，真子憲治，森良一，国広英文，木村一郎：抗日本脳炎ウイルス血清の2-mer-captoethanol感受性に関する研究(Ⅱ)。日細菌誌，23：200-203，1968。
- 16) 小田和正，吉田芳哉，古屋由美子：日本脳炎ウイルス感染ブタにおけるIgM抗体の出現とその持続。神奈川県衛研所報8：1-4，1978。

(本論文は感染症学雑誌63年3月号に掲載)