

ELISA法による香川県住民の日本脳炎ウイルス抗体保有状況の検討

山本忠雄

I はじめに

日本脳炎の流行監視の立場から、地方衛生研究機関においては、毎年、日本脳炎流行期にブタの抗体保有状況を調べ、また地域住民の抗体保有状況を把握して、日本脳炎発生予測に役立てている。現在、日本脳炎流行予測調査には、中和反応、赤血球凝集阻止(HI)反応などによる抗体価の測定法が用いられている¹⁾。しかし、血清学的検査法としては、その迅速性、簡便性、定量性及び感度の点で優れたELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)法が有用な検査法である^{2)~6)}。

本論文では、ELISA法を用いて香川県住民の日本脳炎ウイルスに対する抗体価を測定し、年代層別抗体保有状況を調べた成績を報告する。

II 材料と方法

1 被検血清

昭和61年1月より6月までの期間に、M中学校、K短期大学、T大学の生徒、学生から静脈採血を行い、血清を分離し、検査に供した。また、香川県内の医療機関における残余血清の供与を受け、被検血清とした。

2 抗体価の測定

ELISA IgG 抗体の測定はIgarashi et al⁷⁾の方法に従った。即ち抗原はホルマリン不活化日本脳炎ワクチン精製濃縮液(財)阪大微研観音寺研究所製)を使用し、0.05 M炭酸重炭酸緩衝液(pH9.6)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-Tween 20で洗浄し、稀釈液で100倍稀釈した被検血清を100 μ l加えて反応させた。酵素標識抗グロブリン抗体はペルオキシターゼ標識抗ヒトIgG(ヤギ)(E.Yラボラトリーズ社)を用い、吸光度の測定にはMicroelisa Auto Reader MR 580(ダイナテック社)を使用し、490nmの波長で測定した。一方Igarashi et al⁷⁾の方法によりELISA抗体価を決定した血清を標準血清として用い、その吸光度とELISA抗体価の検量線を作成した。この検量線を基準にして被検血清のELISA抗体価を求めた。

H I 抗体価は厚生省の伝染病流行予測調査検査術式⁸⁾に従って測定した。

III 成績

1 ELISA IgG抗体価のCut off値の設定

198名の生徒・学生の血清を被検血清としてH I 抗体価及びELISA IgG 抗体価を測定した(図1)。両測定法による測定値の相関係数は0.89であった。

H I 抗体陰性者は44名で、これらのELISA IgG 抗体価は300から5,500であった。H I 抗体価が10倍であったものは46名で、これらのELISA IgG 抗体価は3,000

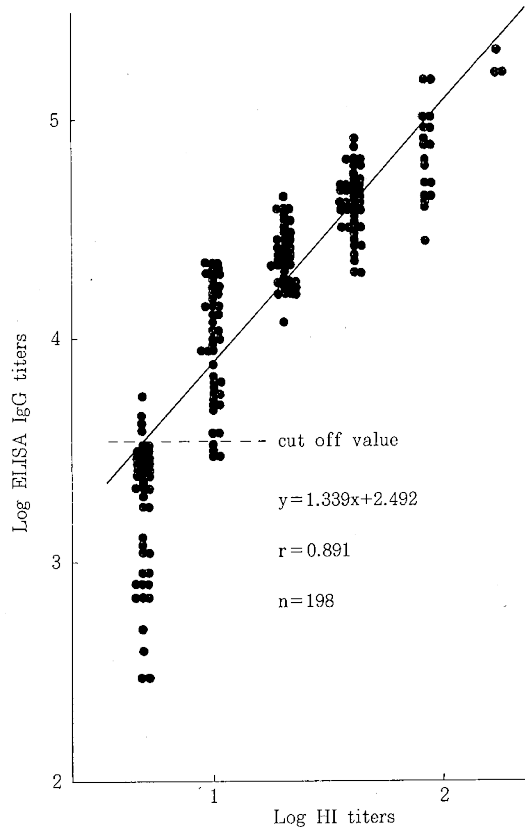


Fig.1 Correlation between ELISA IgG and HI titers

から22,000であった。ELISA抗体価のCut off値を3,000にするとH I抗体陰性者では25%がELISA抗体陽性となる。もし、Cut off値を3,500にすると、H I抗体陰性者では9.1%がELISA抗体陽性となる。さらにCut off値を4,000にすると、6.8%がELISA抗体陽性となる。この場合、Cut off値を3,500に設定し、H I抗体価10倍の検体についてみると、Cut off値未満の検体数は8.7%となる。またCut off値を4,000に設定するとCut off値未満は13.1%となる。これらの成績からCut off値を3,500に設定すると、H I抗体陰性でELISA抗体陽性者の割合と、H I抗体価10倍でELISA抗体陰性者の割合はほぼ一致する。一方、H I抗体価とELISA抗体価の回帰直線について、H I抗体価陰性(抗体価10倍以下)をプロットした点のELISA抗体価は3,500を示した(図1)。本調査では、このCut off値を用いてELISA抗体価を測定した。

2 香川県住民の年代層別ELISA IgG抗体保有状況

香川県内の医療機関等から共与された680名の血清を被検血清としてELISA IgG抗体価を測定し、先に設定したCut off値を用いて香川県住民の年代層別ELISA IgG抗体保有率を調べた(表1)。

Table 1. Percentage of the positive cases carrying ELISA IgG antibodies to Japanese encephalitis virus in each age-group.

Age-group (years)	Sample No	No of positives	% of positives
0 ~ 3	44	0	0
4 ~ 9	98	72	73.5
10 ~ 19	52	39	75.0
20 ~ 29	73	29	39.7
30 ~ 39	63	21	33.3
40 ~ 49	75	38	50.6
50 ~ 59	102	43	42.1
60 ~ 69	74	39	52.7
70 ~	99	56	56.5
Total	680	337	49.5

3歳未満のワクチン未接種年代層のELISA IgG抗体保有率は0%であった。4~9歳が73.5%、10~19歳が75.0%、20~29歳が39.7%、30~39歳が33.3%、40~49歳が50.6%、50~59歳が42.1%、60~69歳が52.7%、70歳以上が56.5%で、全年代層の平均は49.5%であった。

ワクチン未接種年代層(0~3歳)44名のELISA IgG抗体価は100~2,600であり、大部分は1,000未満であり、1,000以上がわずかに3名であった。ELISA IgG抗体価が50,000以上の高値を示すものが680名中7名いた。5名までがワクチン接種年代層(8~14歳)で、残りのうち1名は75歳、あとの1名は62歳であった。

IV 考 察

ELISA抗体価とH I抗体価および中和抗体価との相関性の高いことについては、概に報告した^{9),10)}。今回、香川県住民のELISA IgG抗体の平均保有率が49.5%(337/680)であることが明らかになり、この値は昭和53年にH I法で調査した抗体保有率62.3%(354/569)¹¹⁾より更に低い値を示した。低年代層(学童群)の抗体保有率は4~9歳では73.5%、10~19歳では75.0%と高いが、この年代層の保有抗体の大部分はワクチン接種に依存したものと考えられる^{12),13)}。20歳代から抗体保有率の低下がみられるが、この原因はワクチン効果持続年限を反映しているものと思われる¹³⁾。40歳代から加齢と共に再び抗体保有率の上昇傾向がみられ、これはワクチン未接種の者が自然感染により免疫を獲得し、ワクチン接種者では自然感染により追加免疫が得られるためであろう。

自然感染で獲得した免疫抗体は、ワクチン接種で得たものより長く持続するため、抗体陽性者が徐々に蓄積されて、加齢と共に抗体保有率が上昇していくものと考えられる。現在、患者発生数が激減していることから、学童のワクチン接種率は一般に低下している。さらに、日本脳炎の流行が少ないため、自然感染の機会が減少し、感受性者が増加する傾向にある。一方、コガタアカイエカが高い殺虫剤抵抗性を獲得しているとの報告がなされており^{14)~16)}。気象条件によっては急激な有毒蚊の発生も考えられ、昭和53年及び54年のような流行の可能性が十分に考えられる。今回の調査成績は香川県住民の抗体保有率の低いことを明らかにしており、このような事態を考慮した対応を考えておく必要がある。

ELISA法は、本調査で用いたようにH I法との相関性が高く、その上H I法に比べて迅速且つ簡便であることから、一度に多数の検体を扱う疫学調査に便利である。今回、ELISA法のCut off値として3,500を設定することによりH I抗体陰性の約9%がELISA抗体陽性と判定される。他方、H I抗体価10倍の検体では9%がELISA抗体陰性と判定される。したがってCut off値3,500はH I抗体陽性と陰性の判定限界に相当することになる。このCut off値はH I抗体価とELISA抗体価の回帰直線を外挿したH I抗体価陰性値のELISA抗体価(血清稀釈5倍に相当する点)に一致していた。本調査の成績は、H I法の代りにELISA法を抗体測定に應用できることを明らかにした。

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。

文 献

- 1) 厚生省医薬局感染症対策課：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) 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.
- 4) Bundo, K., Morita, K., & Igarashi, A. : Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) on Japanese Encephalitis Virus. III. Assay on Antibody Titers in Swine Sera. *Trop. Med.*, 24 : 87-102, 1982.
- 5) 山崎謙治, 上羽昇, 峯川好一：酵素免疫測定法 (ELISA) によるヒト血清中の日本脳炎ウィ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.
- 6) 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, 臨床とウィルス, 13(2)217-221, 1985.
- 7) Igarashi, A., Bundo, K., Matsuo, S., Makino, Y. & Lin, W. J. : Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) on Japanese encephalitis virus. I. Basic conditions of the assay on human immunoglobulin. *Trop. Med.*, 23 : 49-59, 1981.
- 8) 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.
- 9) 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ィルスELISA抗体価の測定, 感染症学雑誌, 59 : 1135-1141, 1980.
- 10) 山本忠雄, 山西重機, 岡崎秀信：ELISA法 (酵素免疫測定法) における日本脳炎抗体の測定, 香川県衛生研究所報, 11 : 74-78, 1982.
- 11) 山本忠雄, 山西重機, 岡崎秀信, 高樹正浩：香川県における日本脳炎の疫学的研究について, 香川県衛生研究所報, 7 : 26-29, 1978.
- 12) 厚生省公衆衛生局保健情報課, 国立予防衛生研究所血清情報管理室：日本脳炎, 昭和56年度伝染病流行予測調査報告書, 63-77, 1982.
- 13) 三輪好伸, 中津川修二, 佐野文彦, 杉枝正明：静岡県における日本脳炎の疫学的調査, 静岡県衛生環境センター報告, 27 : 29-35, 1984.
- 14) 上村清, 丸山由紀子：数種殺虫剤に対するコガタイエカ幼虫の感受性について, 衛生動物, 34(1) : 33-37, 1983.
- 15) 渡辺護, 竹部幸子, 荒川良, 上村清, 小橋恭一：コガタイエカの殺虫剤抵抗性に関する研究第1報, 抵抗性の実態とコリンエステラーゼ活性および2, 3の薬剤によるその阻害, 富山県衛生研究所年報, 8 : 33-37, 1985.
- 16) 国立予防衛生研究所昆虫部：コガタイエカの殺虫剤抵抗性調査報告, 1-13, 1984.
(本論文は感染症学雑誌63年4月号に掲載)