

ELISAによる新生児尿中の サイトメガロウイルス抗原の検出

山西 重機・三木 一男

I はじめに

ヒトサイトメガロウイルスは、ときに先天性サイトメガロ症あるいは臓器移植患者、成人T細胞白血病(ATL)、AIDSを含めた免疫不全患者における潜在化ウイルスの活性化など臨床ウイルス学上の重要なウイルスである。またこのウイルスの大部分は不顕性感染¹⁾であるが、その初感染は乳幼児期とくに産道感染の頻度が高く主要な感染経路²⁾と考えられている。

そこで我々はさきに検討し報告³⁾したサイトメガロウイルス抗原の直接迅速検出の酵素抗体法(ELISA)を用いて新生児尿中のウイルス抗原検出を検討し、若干の知見を得たので報告する。

II 材料と方法

1. 新生児尿は、高松市内N病院出生の新生児から採尿パックを用いて1989年3月7日第10週から7月10日第27週までに210例を採取し、実験に供するまで-80℃に凍結保存した。
2. サイトメガロウイルス抗原検出ELISAについては、さきに報告³⁾検討したモノクローナル抗体、CM-3、CM-7(認識ポリペプチド140Kd、抗原の局在は核内、抗原の発現は後期)、CM-10(56Kd、細胞質、後期)、CM-20(60Kd、細胞質、後期)の4種を用いておこなった。
3. サイトメガロウイルスの分離は、HEL(ヒト胎児肺)細胞を用い、常法に従い2週間、回転培養をおこなった。
4. Plaque法⁴⁾については、ウイルスを10段階希釈し、HEL細胞に接種し、寒天培地を重層し、10日間培養し、10%ホルマリン固定し、寒天を除いて0.03%メチレンブルーで染色し、顕微鏡で数えた。

III 結果

1. ELISAによるサイトメガロウイルスの検出限界について

調整したサイトメガロウイルス抗原 (1.0×10^9 PFU/

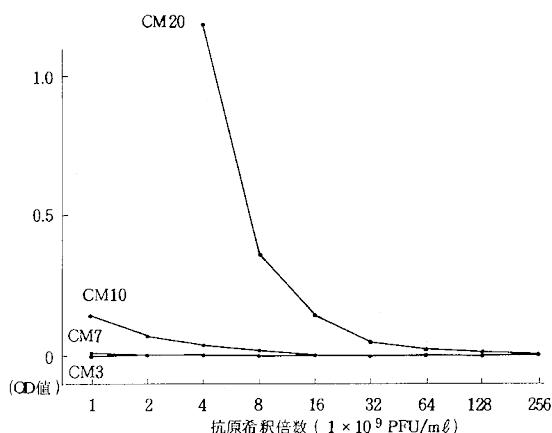


図1 ELISAによるサイトメガロウイルスの検出限界

ml) を 2 段階希釈し、CM-3、CM-7、CM-10、CM-20の各モノクローナル抗体を用いて検出限界を検討した結果は図1のとおりで、CM-20では強く反応し、2倍希釈でOD値1.5以上、4倍希釈で1.189となり、32倍希釈まで確認することができた。CM-10は3倍希釈またCM-7はほとんど反応せず、CM-3は全く反応しなかった。

2. 細胞内増殖のサイトメガロウイルスの回収

図2は、HEL細胞についてウイルス接種後の経過時間毎にウイルスを回収し各モノクローナル抗体のELISAで測定した結果である。反応は、CM-20、CM-10、

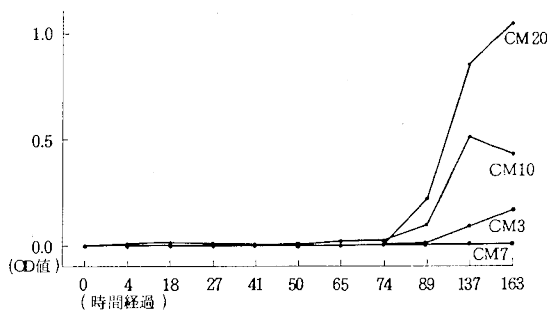


図2 HEL細胞接種後のサイトメガロウイルスの回収

表1 ELISAによる新生児尿中の抗原検出

モノクローナル抗体の種類	新生児尿の材料数	ELISA法測定によるOD値					
		0.1以下	0.1~0.2	0.2~0.3	0.3~0.4	0.4~0.5	0.5以上
CM3	210	210					
CM7	210	153	43	13	1		
CM10	210	130	34	22	13	10	1
CM20	210	210					

CM-3と確認できたが、CM-7は163時間経過でも反応しなかった。またCPEは41時間経過で出現したがこの時点でELISAは各モノクローナル抗体とも陰性で89時間で反応が現れた。

3. 新生児尿中からのウイルス抗原の検出

CM-3, CM-7, CM-10, CM-20の各モノクローナル抗体を用いて210例の新生児尿について測定した結果は、表1のとおりで、CM-3とCM-20は、全例でOD値が0.1以下でウイルス抗原は確認できなかったが、CM-7, CM-10では、高いOD値が確認できた。なかでもCM-10については、0.7以上の高い新生児尿が存在した。

また個々の新生児尿のOD値を各週別にプロットし

て、図3と図4に示した。

4. HEL細胞によるサイトメガロウイルスの分離

新生児尿210全例でウイルス分離を検討したが、CPEを生じた検体はなく分離できなかった。また高いOD値の新生児尿については、培養の継代毎に数値は低下し確認できなかった。

IV 考 察

サイトメガロウイルスの分離同定は、他のウイルスに比べて容易ではなく、多くの時間を要し、このために迅速診断法については蛍光抗体法⁵⁾、酵素抗体法³⁾、DNAハイブリダイゼーション法⁶⁾などの方法が樹立もしくは検討されている。我々は先にサイトメガロウイルス抗原

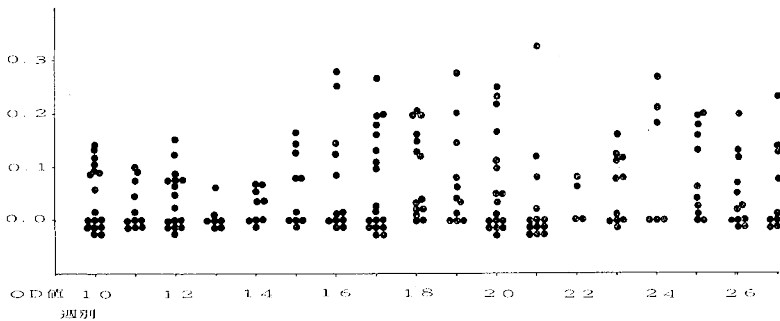


図3 ELISAによる新生児尿中の抗原検出 (CM-7)

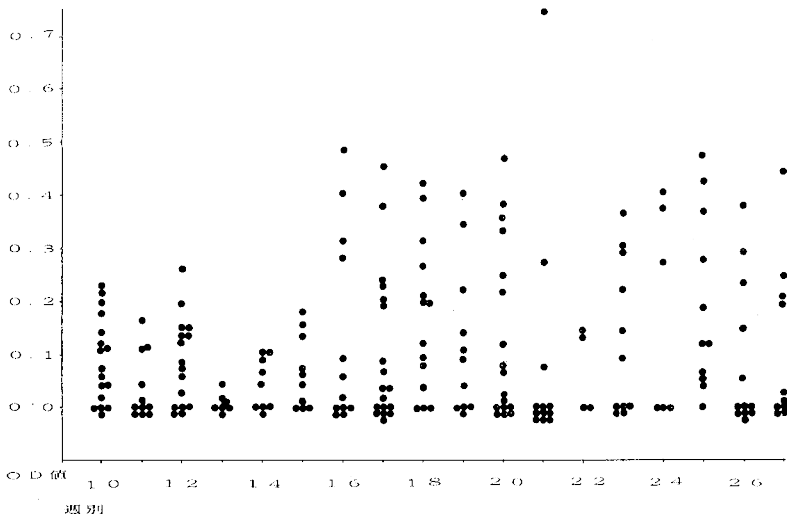


図4 ELISAによる新生児尿中の抗原検出 (CM-10)

を迅速に検出する方法としてもモノクローナル抗体にHRPOを標識した酵素抗体法を検討し報告³⁾した。

今回この方法を新生児尿中からのサイトメガロウイルス抗原検出に応用した。作製し使用したモノクローナル抗体はCM-3, CM-7, CM-10, CM-20の4種類であり、その抗原の局在は蛍光抗体法で、CM-3, CM-7は核内に、またCM-10, CM-20は細胞質内に存在することがあきらかになった。

そのまゝに、検査材料中のウイルス量に対する検出限界をみるために、これら4種類のモノクローナル抗体についてそれぞれ検討した。プラーク法で調整した 10^9 PFU/mlのウイルス抗原を2段階希釈して、各モノクローナル抗体によるELISAで測定するとCM-20では感度よく検出し、32倍希釈 (3.1×10^7 PFU/ml) まで検出可能であったが、CM-10では、4倍希釈 (2.5×10^8 PFU/ml) であり、CM-3, CM-7では検出することができなかった。

このことは、今回検討はしていないが、核内に存在するウイルス抗原は、細胞破壊による細胞フリーの状態でないウイルス粒子も多く存在することが考えられた。

また検査材料中から直接にウイルス抗原を検出する目的で同様にウイルスの回収実験を試みた。HEL細胞にウイルスを接種し、それ以降時間ごとに回収してELISA測定を実施した。結果はウイルス検出限界実験と同様でCM-20, CM-10では89時間以降でよく反応したが、CM-7, CM-3ではよく反応しなかった。これは用いたモノクローナル抗体の抗原の発現が全て後期に特定されることに原因するかも知れない。

これを実際の市内N病院の新生児室で応用し、新生児尿を各モノクローナル抗体のELISAで測定した。

CM-3とCM-20は全例反応せず、よく反応したのは、CM-10、つづいてCM-7であった。CM-10ではOD値、0.746, 0.486, 0.470の高数値のものも存在した。

また同時に新生児尿からサイトメガロウイルス分離を全例についておこなった。HEL細胞に接種し、2代継代まで培養したがウイルスは分離できなかった。

またCM-10とCM-7のOD値の高い新生児尿20例について、パルスフィールド電気泳動⁷⁾によりサイトメガロウイルスDNAの分離を検討したが特定できなかった。

尿中からのサイトメガロウイルスの分離は、妊婦における調査で3~6%⁸⁾、鎌田らの調査で2.6%⁹⁾のウイルス検出があるが新生児尿中からは、千葉ら¹⁰⁾によると札幌市内でA病院0.5%、B病院0.36%の陽性例があり今回の新生児尿中からウイルス分離ができなかったことは調査例数の少ないこともあるが、併せてELISAの検出限界の問題、高いOD値の尿中からDNAが確認できなかったこと、またELISA陽性で他方法で確認できない結果から本法の非特異反応も否定できない。

文 献

- 1) 千葉峻三：ヒトサイトメガロウイルスの臨床と疫学，ウイルス，31，111~121，(1981)。
- 2) 千葉峻三：先天性サイトメガロウイルス感染症，臨床と微生物，12，377~382，(1985)。
- 3) 山西重機，三木一男，山本忠雄：モノクローナル抗体によるサイトメガロウイルス迅速診断法について，香川県衛生研究所報，16，17~22，(1987)。
- 4) BB Wentworth, L French: Plaque Assay of cytomegalovirus Strains of Human Origin, PROC. SOC. EXP. BIOL. MED., 135, 253-259 (1970)。
- 5) 紺野謙治，横田智之，茂田士郎：Micro Trak法によるサイトメガロウイルス感染の迅速診断，臨床とウイルス，17，89-95，(1989)。
- 6) 金崎巧：DNAハイブリダイゼーション法によるサイトメガロウイルス感染症迅速診断の試み，臨床とウイルス，16，188-191，(1988)。
- 7) 荒尾雄二郎，吉田まり子，宇野文夫，新居志郎：フィールドインバージョンゲル電気泳動法を用いた皮膚病巣からの単純ヘルペスおよび水痘・帯状疱疹ウイルスDNAの検出・第37回日本ウイルス学会演説抄録，172，(1989)。
- 8) Hanshaw, J·B: Cytomegalovirus. In Infection Diseases of the Fetus and Newborn Infant. W.B.Saunders., 107-155, (1976)。
- 9) 鎌田誠：本邦におけるCytomegalovirus胎内感染に関する研究，札幌医誌，49，529-537，(1980)。
- 10) 千葉峻三：サイトメガロウイルス，臨床とウイルス，16，453-456，(1988)。