

ELISA法による手足口病ウイルスの迅速診断

山西重機・藤井康三・三木一男

I はじめに

特異な病像を示す発疹性疾患の一つである手足口病は、幼児期の夏期における主要感染症の大きな部分を占める。感染症サーベイランスの定点報告¹⁾からみても、例年、患者数の多少はあるが、起因ウイルスの型をかえて散発もしくは流行を繰り返している。そして、これら疾患の診断には、臨床診断等に加えウイルス分離をおこなうことが重要で、このため一般には細胞培養による方法がおこなわれているが、迅速性、経済性、繁雑性などから常に簡便で迅速なウイルス分離方法が要求されている。

今回我々は、ウイルス感染症の迅速診断法開発の一環として、酵素抗体法(ELISA)と感度のよい蛍光ELISAを利用して、手足口病の主要な起因ウイルスであるCOX A-16型、エンテロ-71型の分離確認方法を開発し、その特異性と併せて実用性について検討したので、その概要について報告する。

II 材料と方法

1. ウイルス分離材料は、感染症サーベイランス定点を受診した手足口病患者の咽頭ぬぐい液、糞便を通常の方法²⁾で採取し、実験に供するまで-80°Cに凍結保存した。
2. 手足口病ウイルス検出のELISA
抗COX A-16型ウイルスIgG (抗うさぎ血清)、抗エンテロ-71型ウイルスIgG (抗うさぎ血清)をコートし、またhoseradish peroxidase(HRPO)をWillsonとNakaneの方法³⁾によって標識し、さきに報告した方法⁴⁾によった。
3. 手足口病ウイルス検出の蛍光ELISA
さきに報告⁵⁾したように、プレートに抗COX A-16型ウイルスIgG、抗エンテロ-71型ウイルスIgGをコートした。次に分離材料等を加え反応後、ビオチン標識⁶⁾

した抗COX A-16型ウイルスIgG、抗エンテロ-71型ウイルスIgGを加え反応、更にベータガラクトシダーゼ標識ストレプトアビジンを加え反応、基質を加え反応後、グリシン-NaOHを加えて反応停止させ自動蛍光光度測定器で蛍光を測定した。

III 結 果

1. ELISAによるCOX A-16型とエンテロ-71型ウイルスの分離法の限界

図1は、COX A-16型の検出限界を検討したもので用いた抗原は標準ウイルスG-10株でウイルス量 7.6×10^5 TCID₅₀/mlでおこなった。たて軸に吸光度(OD値)よこ軸に2段階希釈した抗原の希釈増数を示した。X1でOD値1.305、X32で0.110、X64で0.052となった。また同時に測定したエンテロ-71型を抗原とした場合、全希釈段階で0.03以下で反応しなかった。

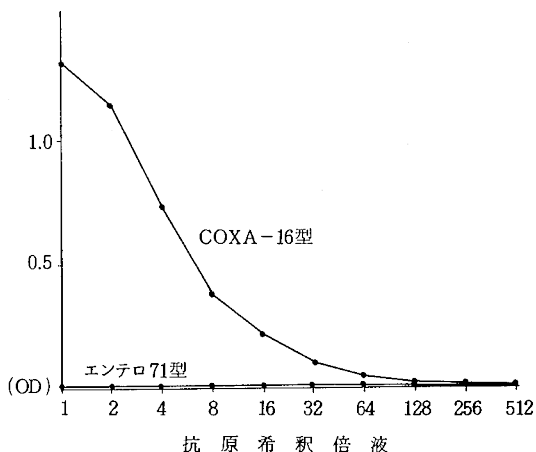


図1 ELISAによるCOX A-16型の検出限界

図2はエンテロ-71型の検出限界を検討したもので使用抗原は標準ウイルスBrCr株でウイルス量 4.2×10^5 TCI

表1 クロロホルム処理によるELISA-OD値の変動

使用した抗原	抗原希釈倍数						
	5	10	20	40	80	160	320
C A 16 未 処 理 抗 原	1,206	836	430	223	129	49	11
C A 16 処 理 抗 原	1,106	622	295	141	55	29	6
E 71 未 処 理 抗 原	770	485	313	169	86	32	8
E 71 処 理 抗 原	724	460	265	151	64	23	1

D_{50}/ml を用いた。

2段階希釈X1でOD値1.00, X32で0.155, X64で0.085であった。

COX A-16型を抗原として同時に測定した場合は, X1でOD値0.126, X2で0.107, X4で0.096で低値であるが反応した。

2. クロロホルム処理によるOD値の変動

クロロホルム処理によるELISAによるOD値の変動をみたのが表1で, COX A-16型とエンテロ-71型の処理抗原では, COX A-16型, エンテロ-71型ともにOD値が低下した。

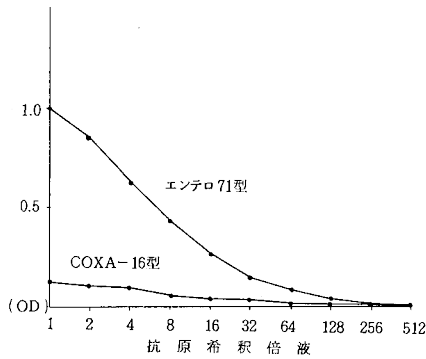


図2 ELISAによるエンテロ-71型の検出限界

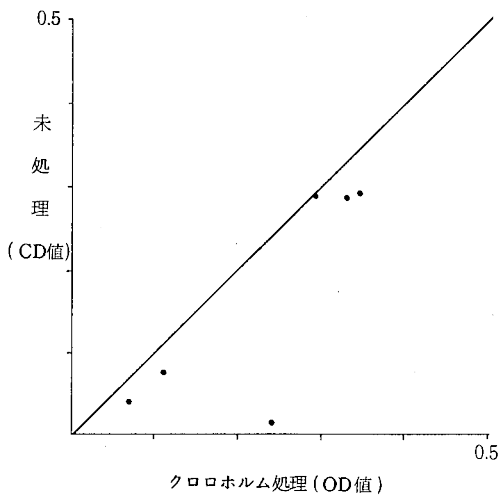


図3 クロロホルム処理をした検査材料からの直接抗原検出.(COX A-16型)

図3は直接分離材料である咽頭ぬぐい液について検討したもので, クロロホルム未処理に較べると, クロロホルム処理抗原が同等もしくはそれ以上となった。

3. 蛍光ELISAによるCOX A-16型とエンテロ-71型ウイルスの分離法の限界

図4に示したのは, 蛍光ELISAによるCOX A-16型の

検出限界について検討したもので, 標準ウイルスG-10株でウイルス量 7.6×10^5 TCID₅₀/mlを2段階希釈をした。X4で蛍光単位4.88, X128で0.91, X256で0.448 X512で0.26, X1024で0.142であった。

この方法で同時に測定したエンテロ-71型では, 低値であり, 限界以下であった。

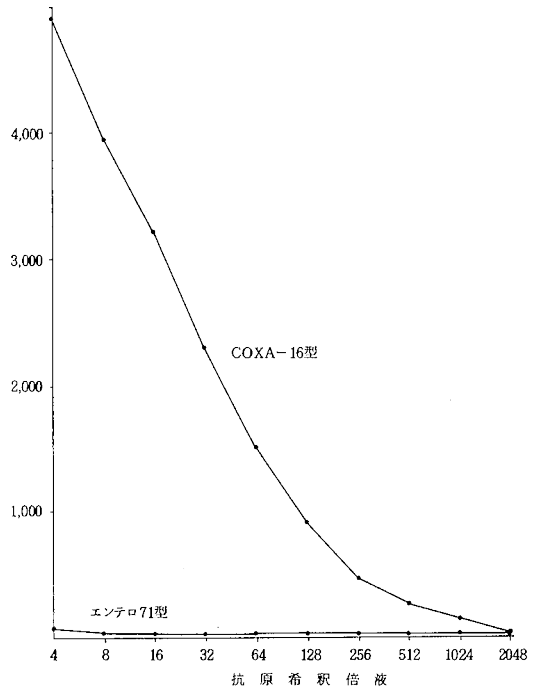


図4 蛍光ELISAによるCOX A-16型の検出限界

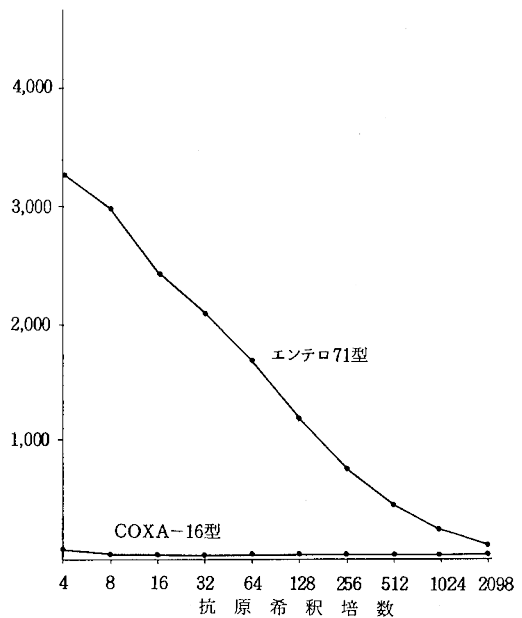


図5 ELISAによるエンテロ-71型の検出限界

図5は、エンテロ-71型の検出限界を検討したもので標準ウイルスBrCr株で 4.2×10^5 TCID₅₀/mlを用い、2段階希釈をして蛍光単位を求めた。X4で3.26, X128で1.18, X256で0.755, X512で0.445, X1024で0.245, X2048で0.12であった。この方法で同時に測定したCOX A-16型は低値であった。

4. ELISAを用いた直接検査材料からの抗原検出

細胞培養によってCOX A-16型が分離された咽頭ぬぐい液74件、エンテロ-71型が分離された咽頭ぬぐい液15件、ウイルスの分離されなかった咽頭ぬぐい液39件計128件について、ELISAで直接抗原検出について検討した。COX A-16型で3株、エンテロ-71型で1株、OD値の高いものが検出された。

表2 直接検査材料からの抗原の検出 (ELISA)

	検査数	ELISAによる直接ウイルス分離			
		COX-A 16	エンテロ 71	分離陰性	
培養による	COX-A 16	74	2	0	72
	エンテロ71	15	0	1	14
	分離陰性	39	1	0	18

5. 蛍光ELISAを用いた直接検査材料からの抗原検出

細胞培養によって、COX A-16型が分離された咽頭ぬぐい液74件、エンテロ-71型が分離された咽頭ぬぐい液15件、ウイルスの分離されなかった咽頭ぬぐい液39件計128検体について直接ウイルス分離を蛍光ELISAで検討した。

COX A-16型が5株、うち2株は培養法でウイルスの分離されなかった咽頭ぬぐい液から検出された。

エンテロ-71型は3株のうち1株がウイルス分離陰性検体から検出された。

表3 直接検査材料からの抗原の検出 (蛍光ELISA)

	検査数	蛍光ELISAによる直接ウイルス分離			
		COX-A 16	エンテロ 71	分離陰性	
培養による	COX-A 16	74	3	0	71
	エンテロ71	15	0	2	13
	分離陰性	39	2	1	36

6. 細胞培養による分離ウイルスの同定

中和反応によって同定されたCOX A-16型74株、エンテロ-71型15株の分離ウイルスとCPE陰性の培養液39件について、ELISAで同定をおこなった。両法による比較では、表4に示したように全て一致した。

表4 中和反応とELISAによる分離ウイルス同定

		ELISAによる同定		
		COX-A 16型	エンテロ 71型	分離陰性
中よ 和反 応同 定	COX-A 16型	74	0	0
	エンテロ71型	0	15	0
	分離陰性	0	0	39

IV 考 察

手足口病患者の発生は、ウイルスの流行型をかえて例年のごとく発生し、感染症サーベイランスにおける疾病中でも主要な位置を占めている。しかしウイルス分離方法は、細胞培養による分離そして中和反応による同定が一般的である。このためウイルス分離確認までには必要以上に時間がかかり、臨床ウイルス学上、問題となる場所である。このため今回、ELISAと蛍光ELISAでのウイルスの検出限界を検討し直接臨床材料(咽頭ぬぐい液、糞便、髄液)からウイルス抗原確認を目的とした。ELISAでの限界はCOX A-16型(0.1以上を陽性限界とすると)⁵⁾でX32希釈、 2.3×10^4 TCID₅₀/ml、エンテロ-71型(0.1以上を陽性限界とすると)は、X32~X64希釈、 $1.3 \times 10^4 \sim 6.5 \times 10^3$ TCID₅₀/mlまで確認することが可能で分離材料中にこれ以上のウイルス粒子が存在する必要があることがわかった。このことから実際に応用してみると、COX A-16型が分離された咽頭ぬぐい液74件中から、COX A-16型で2件体でOD値高く、非特異反応を除外すると陽性を確認できたと考える。また培養による分離が陰性であった検体でも1件体であるが高いOD値を検出することができた。このことは不活化された検体中のウイルスが抗原的に確認されたためと考える。エンテロ-71型では、培養による分離が陽性であった咽頭ぬぐい液15件中1件にOD値の高いものが存在した。

しかし培養分離に比較して分離は低率でこのELISAは実際的には検査方法として応用することは不可能と考えられた。

また中和反応による分離ウイルスの同定の際にエンテロ-71型の分離ウイルスが抗エンテロ-71型血清で中和されない場合のダイフロン、クロロホルム処理による細胞成分由来の中和阻止物質を除去して中和活性を高める方法⁷⁾を用いるが本法にも用いて検討したがよい結果は得られなかった。

そこでELISAより高感度である蛍光ELISA⁸⁾について検討した。この方法で蛍光単位0.2以上を陽性限界とするとCOX A-16型では、X512(1.4×10^3 TCID₅₀/ml)エンテロ-71型でX1024(4.1×10^2 TCID₅₀/ml)まで検出確認することが可能であった。

これを臨床材料からのウイルス分離に応用すると、培養でCOX A-16型が分離された咽頭ぬぐい液74件中3件確認され、また分離陰性の咽頭ぬぐい液からも2件陽性となった。エンテロ-71型15件では2件陽性となり、培養分離陰性からは1株陽性となり、これも不活化されたウイルスが抗原的に確認されたものと考えられる。これは、さきに調査報告⁹⁾したサイトメガロウイルスでも観察された。

この蛍光ELISAはELISAに比較すると、COX A-16型では、16倍以上の感度であり、エンテロ-71型については、20倍以上の感度で確認することができたが、手足口病による臨床材料中で咽頭に含有するウイルス量は通常これ以下と考えられ、本法についても実際的に応用するには、種々問題があり再検討の必要がある。

両法はウイルス分離確認に応用することはできなかったが、ELISAをCOX A群の同定に用いた報告¹⁰⁾などから、細胞培養による分離ウイルスを中和反応にかえて迅速で簡便なELISAで同定に応用した。

培養によって分離し、中和反応によって同定したCOX A-16型74株、エンテロ-71型15株、培養による分離陰性であった培養液39株を用いて検討したが両法は完全に一致し、難易なエンテロ-71型の同定を容易に迅速に同定することができ、本法が実際的に応用できることがわかった。

文 献

- 1) 香川県環境衛生課：感染症の発生状況，香川県感染症サーベイランス報告書，38～39 (1990)。
- 2) 山西重機ほか：県下の手足口病の流行について，香川県衛生研究所報，10，46～49 (1981)。
- 3) Willson, M.B., Nakane, P.K.: Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish-peroxidase (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)。
- 4) 山西重機ほか：ELISAによるヒトおよびイヌロタウイルスの抗原検出とブタ，ウシ及びヒトロタウイルスの抗体測定，香川県衛生研究所報，15，15～19 (1986)。
- 5) 山西重機ほか：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)。
- 6) 井上 栄：衛生物検査必携，ウイルス・クラミジア・リケッチャ検査，54～55 (1987)。
- 7) 高見俊才ほか：エンテロウイルス71型によるHMFD-1978年愛媛県における流行について，臨床とウイルス，7，104～108 (1979)。
- 8) 阪口雅弘ほか：蛍光サンドイッチELISAによる空気中スギ花粉量の測定，アレルギー，30，886～889 (1987)。
- 9) 山西重機ほか：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，香川県衛生研究所報，17，25～27 (1990)。
- 10) 佐藤宏康ほか：ELISA法を用いたCOX A群ウイルスの同定，秋田県衛生科学研究所報，30，74～80 (1986)。