

## 山口県下住民のムンプスウイルスに対する ELISA抗体保有状況

山口県衛生公害研究センター (所長: 田中一成)

岩崎 明・松村 健道・中尾 利器・吹屋 貞子  
遠藤 隆二・田中 一成

### A Seroepidemiology of Mumps Virus Infection by ELISA Method in Yamaguchi Prefecture

Akira IWASAKI, Kendo MATSUMURA, Toshiki NAKAO  
Sadako FUKIYA, Ryuji ENDO, Kazushige TANAKA

*Yamaguchi Prefectural Research Institute of Health (Director: Dr. Kazushige TANAKA)*

#### はじめに

ムンプス感染症は、“流行性耳下腺炎、おたふくかぜ”とも呼ばれ耳下腺の腫脹を特徴とする小児の疾患で、しばしば髄膜炎、精巣炎その他の合併症を伴うことがあり軽視できない。1980年“ムンプス(おたふくかぜ)ワクチン”の製造、使用基準が告示され、任意接種が始まり、1989年4月から麻疹、風疹と共に3種混合ワクチン(MMRワクチン)接種が開始された。我々は、ワクチン使用開始時の住民の免疫状況を把握するために、1981年から県下住民の血清疫学的調査を赤血球凝集抑制反応(HI)法を用いて行ってきた<sup>1,2,3)</sup>。ところが、HI法では他のウイルスとの交差反応、非特異的凝集抑制因子(インヒビター)の問題、ワクチン接種後の微量抗体が測定できない等の問題が起こってきた。また、中和抗体法(NT法)は、感度及び特異性に優れているが、多数の検体を取り扱う血清疫学調査の場合には、多額の経費、時間、労力を要する等難点がある。そこで、比較的操作が簡単で感度も高い酵素免疫測定法(ELISA法)の応用が、近年多くのウイルスで試みられている。今回、我々は国立予防衛生研究所で調整された抗原及び標準血清を用いて、ムンプスウイルスに対するELISA法を検討すると共に、山口県下住民の抗体保有状況を調査したのでその成績を報告する。

#### ELISA法について

##### 1 試薬及び材料

- (1) Coating Buffer: 炭酸緩衝液 (pH9.6)  
(NaCO<sub>3</sub> 1.59g, NaHCO<sub>3</sub> 2.93g, 蒸留水1000ml)
- (2) 洗浄液: りん酸緩衝液-Tween (PBS/T)  
(pH7.4)(NaCl 8.0g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 12H<sub>2</sub>O 2.9g, KCl 0.2g, Tween20 0.5ml, 蒸留水1000ml)
- (3) 希釈液: 0.1%ウシ血清アルブミン(BSA)加PBS/T (PBS/TにBSAを0.1%になるように用時調整)
- (4) 酵素標識抗体: ペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgG (H鎖特異的)(Capel社製)
- (5) 基質溶液: O-Phenylendiamine (OPD)  
(和光純薬KK製) 40mg, りん酸-クエン酸緩衝液100ml, 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 40μl [りん酸-クエン酸緩衝液 (pH5.0): 0.1Mクエン酸24.3ml, 0.2Mリン酸2ナトリウム25.7ml, 蒸留水50ml]
- (6) 反応停止液: 4N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- (7) 抗原: ムンプスウイルス (Enders 株) 感染ふ化鶏卵尿膜液を蔗糖密度勾配遠心法で精製したもの
- (8) 標準血清: 国立予防衛生研究所において以下の要領で調整されたもので、陽性血清はELISA法で高いOD値を示すヒト血清をプールし、吸光度が極めて低いサル血清 (ELISA陰性サル血清 (F)) で2倍階段希釈し、任意に単位を、

A = 3200 単位 (U), B = 1600 U, C = 800 U, D = 400 U, E = 200 U と定めたもの。A ~ F は、予め 0.1% BSA-PBS/T で 200 倍に希釈、分注し凍結保存、使用時にそれを溶解し標準血清として用いた。

上記、抗原及び標準血清は国立予防衛生研究所坂田宏子先生より分与を受けた。

(9) ELISA 用プレート: DYNATECH-MICROELISA SYSTEM 129A を使用した。

## 2 方法

(1) ムンプス抗原を Coating Buffer で至適濃度に希釈し、ELISA 用プレートの各 well に 100  $\mu$ l 入れ 4  $^{\circ}$ C 一夜吸着後、PBS/T で 3 回洗浄

(2) 検体並びに標準血清を 0.1% BSA-PBS/T で各々 200 倍, 800 倍に希釈し ELISA 用プレートに 100  $\mu$ l 加える。各希釈共検体は 2 Wells, 標準血清は 3 Wells 使用, 室温で 2 時間反応後、PBS/T で 4 回洗浄

(3) 至適濃度に 0.1% BSA-PBS/T で希釈した酵素標識抗体を 100  $\mu$ l 加え、室温で 1 時間反応させる。反応後 PBS/T で 4 回充分洗浄

(4) 基質溶液を 100  $\mu$ l 加え、暗所に 30 分静置後、4 N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 25  $\mu$ l 添加し反応を停止

(5) プレートリーダー (コロナ社製 MTP-12) を用いて 492nm の吸光度を測定し、標準血清で作製した検量線から抗体価 (単位) を求めた。血清希釈 200 倍で scale over する血清については、800 倍希釈の OD 値から単位を求めた。

## 3 成績

(1) 抗原及び酵素標識抗体濃度の検討: 抗原のたん白濃度を 1.0  $\mu$ g/ml (640 倍希釈), 0.5  $\mu$ g/ml, 0.25  $\mu$ g/ml の 3 段階, 酵素標識抗体の希釈を 2000 倍, 4000 倍, 6000 倍の 3 段階作り検討した。図 1 に示すように抗原及び酵素標識抗体が濃い場合は、陽性血清の OD 値は非常に高い (1.194) が、これに伴って陰性血清の OD 値も高くなる (0.342)。血清検体の陽性、陰性が判別しやすい抗原、酵素標識抗体の至適濃度条件は、抗原のたん白濃度 0.5  $\mu$ g/ml (1280 倍希釈)、酵素標識抗体 4000 倍が適当であった。以後の試験はこの条件で行った。

(2) 検量線: 標準血清 (A, B, C, D, E, F) を用いて作成した検量線は図 2 (実線) に示したように直線性は良好であった。

また、参考までに標準血清 A を希釈液を用いて 2 倍階段希釈し、その OD 値を測り終末点法により抗体価を求めた (図 2 点線)。同様に希釈した陰性血清の OD 値の 2 倍以上を示す最高希釈倍数を終末点とすると、標準血清 A の抗体価は 3200 倍であった。

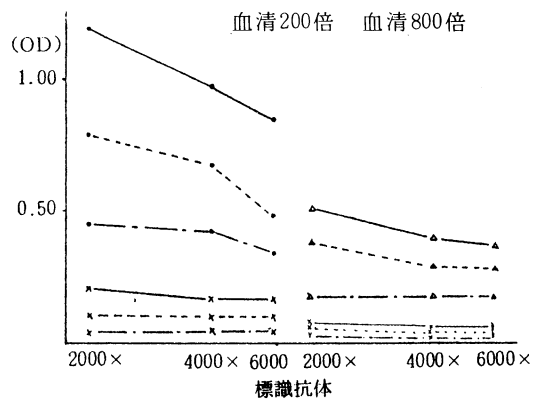


図 1 抗原及び標識抗体の条件

抗原たん白濃度 1.0  $\mu$ g/ml ———  
0.5  $\mu$ g/ml .....  
0.25  $\mu$ g/ml - - -

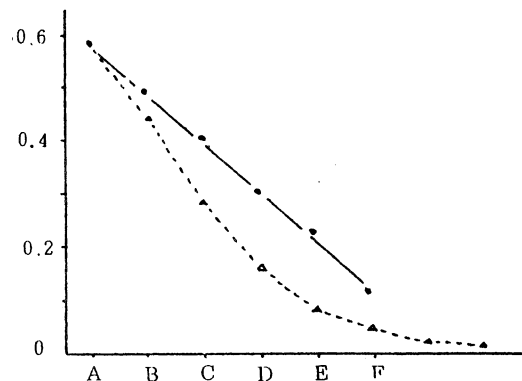


図 2 検量線 (標準血清)

A : 3200 U, B : 1600 U, C : 800 U  
D : 400 U, E : 200 U, F : 陰性  
— : 標準血清, ..... : 終末点法

抗体測定について

1 被検血清：1983年9月に山口県防府市(161名) 同県美祢郡秋芳町 (64名) の住民を対象に各年齢別に採血した血清計225件について行った(年齢別検査数は表1参照)。

表1 年齢別検査件数

年齢	件数	年齢	件数
0～6月	10	6歳	10
7～12月	19	7	15
1歳	6	8	15
2	18	9	10
3	18	10～19	30
4	21	20～29	34
5	19	計	225

2 方法

(1) ELISA抗体価の測定は、前記の方法で行った。

(2) HI抗体測定は、抗原としてムンプス診断用HA抗原(デンカ生研KK製)を用い、予研法で行い抗体価4倍以上を陽性とした。即ち、インヒビターの除去はRDEを、血球はモルモット赤血球を使用した。

3 成績

(1) HI価とELISA価の比較：0～30歳の健康人血清225例の、HI価とELISA価を比較検討し、図3に示すような関係がみられた。

縦軸をELISA価、横軸をHI価とし、実線はELISA価の平均値を示したものである。HI価の上昇と共にELISA平均値も上昇しており、両者はよく相関していた(相関計数 $r=0.857$ )。詳細にみると、HI価4倍未満(陰性)104例中ELISA価200U未満(陰性)97例、200U以上(疑陽性以上)7例(6.7%)みられた。また、逆にELISA価200U未満(陰性)100例中HI価4倍未満(陰性)97例(97%)、4倍以上(陽性)3例(3%)で、一部不一致例もみられたが、ELISA価の方が高い値を示す傾向にあった。

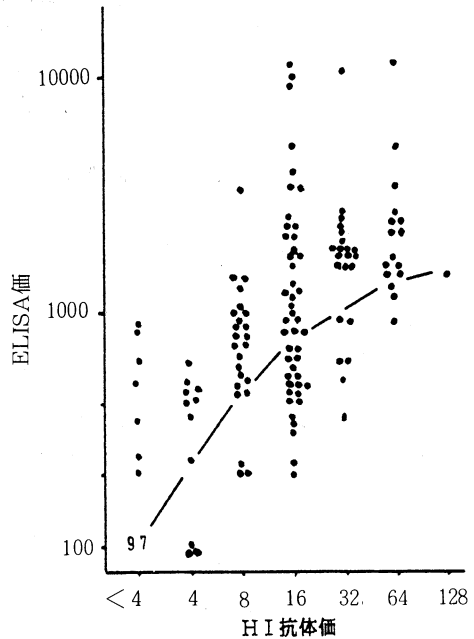


図3 HI抗体価とELISA価の比較

(2) 年齢別抗体保有率：ELISA価400U以上の抗体保有率は、図4に示すように、0歳2/29(6.0%)、1歳0/6(0%)、2歳1/18(5.6%)、3～5歳26/58(44.8%)、6～7歳18/25(72.0%)、8～9歳21/25(84.0%)、以後10歳代で約66.7%、20歳代で85.3%であった。即ち、2歳以下では極めて低率であるが、3歳から急増しはじめ8～9歳で80%台、20歳代で85%の保有率であった。

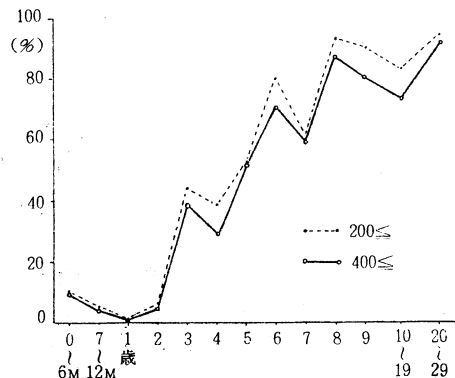


図4 年齢別ELISA抗体保有率

(3) 年齢別抗体価分布状況：図5に示すように2歳以下では800U 1例、1400U 1例、2350U 1例で残る50例は200U未満であった。3歳児以上では200Uから12800Uまで幅広く分布しその平均値は、3歳児1204U、4歳児966U、5歳児1570U、6歳児963U、7歳児1152U、8歳児934U、9歳児875U、10歳代1234U、20歳代1008Uであった。

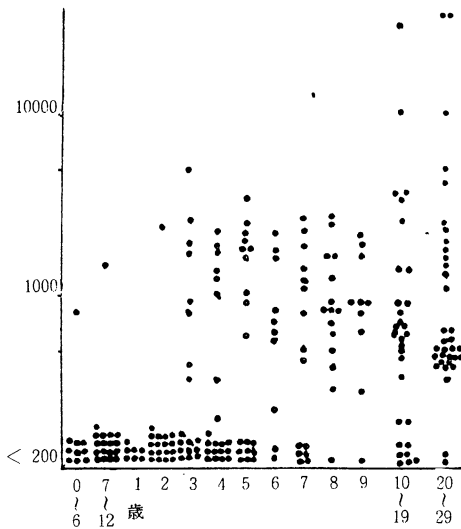


図5 年齢別ELISA抗体価分布

### 考察

ELISA法によるムンプスの抗体測定について、水谷ら<sup>6)</sup>はIgM抗体を検出することにより患者の早期診断に役立つこと、また、村岡ら<sup>7)</sup>はワクチン抗体等の微量抗体の検出に有効なこと等を述べている。ELISA法は、ラジオイムノアッセイ(RIA)に匹敵する感度があり、かつ特異性が高いことから各種ウイルス検査に活用されている。しかし、感度が高い反面では使用する抗原、標識抗体、試薬、反応温度、時間等の反応条件によってその結果が左右され易い一面がある。特に、抗体測定では使用抗原により捕捉する抗体も異なってくるのが考えられ、血清疫学調査等全国的なデータの比較検討をするには難点がある。そこで国立予防衛生研究所で調整された抗原及び標準血清を用いてELISA抗体を測定することを試みた。今回使用した抗原はふ化鶏卵培養ウイルスを

密度勾配遠心法で精製したもので、抗原のたん白濃度は $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ が最適であった。即ち水谷ら<sup>1)</sup>の使用した抗原(たん白濃度 $30\mu\text{g}/\text{ml}$ )に比較して $1/60$ の濃度であり、精製度が高いものであったと言える。

HI価とELISA価に一部不一致例があったが、これらはHI法ではインヒビターの残存、感度等の問題、ELISA法では鶏卵培養した抗原であるため卵に対する抗体、標識抗体に抗ヒトIgG抗体を使用しているためIgM抗体の未測定、抗原性の相違等が考えられる。しかし両者は良く相関しており( $r=0.857$ )。また、標準血清を用いることにより全国的データの比較検討が可能と考えられる。

### まとめ

ELISAによるムンプスウイルス抗体測定法を検討し、本県における血清疫学調査を行い次の結果を得た。

- 1 ふ化鶏卵培養精製抗原のたん白濃度は $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 、酵素標識抗体は4000倍が適当であった。
- 2 HI価とELISA価は良く相関していた( $r=0.857$ )。
- 3 年齢別抗体保有率は、2歳以下では極めて低率であるが、3歳から急増し始め8~9歳で80%、20歳代で85%の保有率であった。
- 4 統一した抗原及び標準血清を用いた検量線により抗体価を相対力価で表現することにより全国的データの比較検討が可能と考えられる。

### 謝辞

稿を終るに当たり、ムンプスELISA抗原及び標準血清を分与頂いた国立予防衛生研究所坂田宏子先生に深甚の謝意を表します。

### 文献

- 1) 岩崎明ら：山口県衛生研究所年報。24、45~46 (1981)
- 2) 岩崎明ら：山口県衛生研究所年報。25、42 (1982)
- 3) 岩崎明ら：山口県衛生研究所年報。27、43~44 (1984)
- 4) ムンプスワクチン研究会：ムンプスワクチン開発に関する研究報告。47 (1973)

5) 速水正憲：臨床とウイルス． 8 (3),  
62～69 (1980)

32～34 (1980)

6) 水谷裕迪ら：臨床とウイルス． 8 (4),

7) 村岡良昭ら：臨床とウイルス． 8 (4),  
34～36 (1980)