

エンテロウイルス70感染の迅速診断 —ビオチン-アビジン ELISA による IgM 抗体の検出—

沢田 春美*, 青木 功喜**

*北海道立衛生研究所, **青木眼科医院

要 約

エンテロウイルス70(EV70)に対する血中 IgM 抗体を検出するために、ビオチン化モノクローナル抗体-アビジン反応を用いる IgM 捕捉間接 ELISA を行った。急性出血性結膜炎患者の回復期血清40例について測定したところ、IgM 抗体陽性率は発病第2週目が92%と最も高く、第5週目では75%であり、全体では85%であった。3回目に採取した血清2例の結果から EV70に対する IgM 抗体は少なくとも発病後45日間は持続することが示された。本法は非ビオチン-アビジン系 ELISA に比べて感度が高く、所要時間は2日で、1日短縮され、EV70感染の迅速診断法として有用である。(日眼会誌 94:1057-1060, 1990)

キーワード: エンテロウイルス70, 迅速診断, IgM 抗体, ビオチン-アビジン ELISA, 急性出血性結膜炎

Rapid Diagnosis of Enterovirus 70 Infection by Detection of IgM Antibodies with a Biotin-Avidin ELISA

Harumi Sawada* and Koki Aoki**

*Hokkaido Institute of Public Health, **Aoki Eye Clinic

Abstract

A biotin-avidin immunoassay was developed to detect IgM antibodies to enterovirus 70 (EV70) in sera from patients with acute hemorrhagic conjunctivitis. Biotinylated monoclonal antibody to EV70 and horseradish peroxidase-streptavidin were used in an indirect IgM capture ELISA. 40 acute- and convalescent-phase serum pairs were tested and 34 sera (85.0%) in the convalescent phase were positive for IgM antibodies. The positive rate of the method was much higher than that of the non-biotin-avidin system for EV70 (55%). Two sera in the acute phase, which were negative for neutralizing antibodies, had IgM antibodies. Two serum specimens which had been collected a third time from 2 patients during the seventh week after onset were positive for IgM, showing that EV70 IgM lasts at least for one month and a half. The biotin-avidin ELISA is sensitive and can be performed in 2 days instead of 3 days for the non-biotin-avidin method, and is useful for rapid diagnosis of EV70 infection. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 94:1057-1060, 1990)

Key words: Enterovirus 70, Rapid diagnosis, IgM antibody, Biotin-avidin ELISA

別刷請求先: 〒060 札幌市北区北19条西12丁目 北海道立衛生研究所 沢田 春美
(平成2年3月5日受付, 平成2年4月13日改訂受理)

Reprint requests to: Harumi Sawada, Ph.D. Hokkaido Institute of Public Health
Kita 19, Nishi 12, Kita-ku, Sapporo 060, Japan

(Received March 5, 1990 and accepted in revised for April 13, 1990)

I 緒 言

エンテロウイルス70 (EV70) は急性出血性結膜炎 (AHC) の主要病原の一つであり¹⁾, 病原診断法としてウイルス分離及び血清中和抗体の測定が行われている。本ウイルスの分離率は非常に低いことから²⁾, 血清診断の占める比重は大きい, AHC 患者の急性期及び回復期の組血清の入手は容易ではなく, また, 結果判明まで長期日を要すること, 一度に多数検体を扱えないなど問題点が多い。最近, Wulff ら³⁾はエンテロウイルス70に対するモノクローナル抗体を用いて, 血中の EV70-IgM 抗体を検出する IgM 捕捉間接 ELISA を行い, 上述の問題を解決する有用な迅速診断法であることを報告した。今回, 我々は ELISA で用いるモノクローナル抗体のビオチン化を行って, アビジン-酵素結合物と反応させることにより, 本法の改良を試みた。

II 実験方法

1. 被検血清

1984年8月~1985年10月に, 札幌市及び帯広市において AHC と臨床診断された患者40例より, 発症7日以内の急性期及び8日以降の回復期の組血清を採取した。更にこのうちの2名より, それぞれ44及び45日後に3回目の血清を入手した。マイクロタイター法によって EV70 に対する中和抗体価を測定し, 回復期の抗体価が急性期よりも4倍以上の値を示したときを有意上昇とし, EV70 感染血清として IgM 検出に供した。

2. ウイルス

EV70 標準株である J670/71 を HeLa あるいは HLF を用いて増殖させ, その感染培養上清を中和抗体測定, あるいは ELISA による IgM 検出用抗原とした。ウイルス非感染細胞の培養上清も同様に作成し, ELISA での対照抗原として用いた。

3. モノクローナル抗体のビオチン化

EV70 に対するモノクローナル抗体⁴⁾ (アフィニティクロマト精製マウス腹水) のビオチン化は, Guesdon ら⁵⁾の方法に準じて次の手順で行った。マウス腹水を NaHCO₃ 緩衝液に対して, 4℃で一昼夜透析を行い, これに N-hydroxysuccinimidobiotin の DMSO 溶液を加え, 室温で4時間反応させた。ビオチン化腹水は PBS に対して4℃で一昼夜透析後, ELISA に供した。

4. ELISA

IgM 捕捉間接 ELISA は Wulff ら³⁾の方法を一部改

良して以下の手順で行った。抗ヒト IgM 抗体を NaHCO₃ 緩衝液で1,000倍に希釈して, 96穴の平底マイクロプレートに1穴当り75 μ l 分注し, 36℃1時間放置後 PBS-Tween (PBS-T) で洗浄した。被検血清を Gelatin 加 PBS-T で100倍に希釈して1穴当り75 μ l 分注し, 36℃1時間反応させ, PBS-T で洗浄後, 至適濃度に希釈したウイルス抗原及び対照抗原を, それぞれ1穴当り75 μ l 分注した。室温で一昼夜放置後, PBS-T で洗浄し, ビオチン化 EV70 モノクローナル抗体を75 μ l ずつ加えて36℃1時間半反応させた。PBS-T で洗浄後, パーオキシダーゼ-ストレプトアビジンを加えて, 室温で15分反応させ, 酵素基質として 3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンチジンを加えて20分放置した。H₂SO₄ で反応を停止後, 490nm の吸光度を測定した。被検血清の吸光度値 (ELISA 値) は, ウイルス抗原 (P) と対照抗原 (N) を加えたものの各吸光度の差 (P-N) とし, P-NZ 0.075 を EV70 に対する IgM 抗体陽性とみなした。

III 結 果

1. IgM 抗体の検出状況

AHC 患者の急性期血清は, 40例中2例を除いて IgM 抗体は陰性であった。陽性であったのは, それぞれ1及び6病日に採取され, 中和抗体はいずれも陰性 (8倍未満) の検体であった。8倍の中和抗体価を有するものが1例あったが, IgM 抗体は検出されなかった。回復期においては, 40例中34例 (85%) に EV70 に対する IgM 抗体が検出された。採取病日別に検出率をみると, 第2週目に採取された検体が92%と最も高かった。検出率は漸次減少したが, 第5週目の検体で75%を示し, 大きな変動はなかった。しかし, ELISA 値は病日の経過とともにやや低下する傾向がみられた。以上の成績を図1に示した。

2. IgM 抗体の持続

2名の AHC 患者より, それぞれ44, 45病日に3回目の血清を入手することができた。いずれも IgM 抗体は陽性であり, 発病後, 少なくとも1カ月半は血中に IgM 抗体が持続することを示す結果であった (図2)。

3. 回復期血清の中和抗体価と ELISA 値

AHC 患者の回復期血清の中和抗体価は16~128倍を示しており, ELISA 値との比較を表1に示した。EV70 に対する IgM 抗体の陽性検体34例中33例の ELISA 値は >0.100 であり, 本法の特異性は高いことが示された。

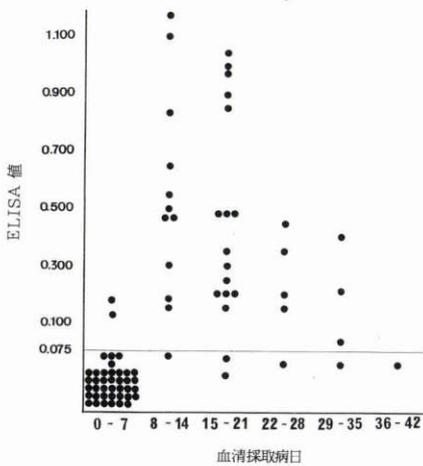


図1 EV70感染者組血清中のIgM抗体

IgM抗体陽性数/例数 2/40 11/12 15/17 5/16 3/4

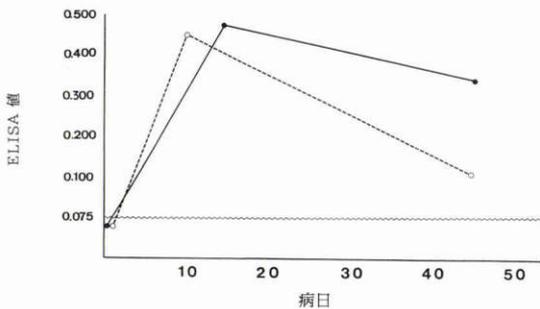


図2 EV70に対するIgM抗体の持続

表1 EV70感染者回復期血清の中和抗体価とELISAの比較

ELISA 値	中和抗体価			
	16	32	64	128
IgM (-)	~0.050	2	2	
	0.050~0.075		2	
IgM (+)	0.075~0.100		1	
	0.100~	8	12	11

数字は例数

IV 考 按

ウイルス性結膜炎における病原迅速診断は、院内感染の防止あるいは多数検体を扱う疫学的研究のために重要であり、従来のウイルス分離から、ウイルス抗原

あるいは抗体の簡便、迅速な検出へと変化してきた⁶⁾。急性結膜炎の病因としてEV70とともに重要なアデノウイルスについては、すでにモノクローナル抗体を用いたELISAが実用化され、抗原検出法としての有用性が確認されている⁷⁾。ここではEV70に対する血清中のIgM抗体検出法として、ビオチン-アビジン系をELISAに導入し、その有用性の検討を行った。この方法はGuedsonら⁵⁾によって報告されて以来、ELISAの感度を高めるために各種のウイルス性疾患の抗原あるいは抗体検出に活用されている^{8)~10)}。我々は回復期血清の85%にIgM抗体を検出し、この方法が通常のELISAによる55%³⁾に比べて、より感度の高い方法であることが示された。Wulffら³⁾の用いた同一検体についての比較試験はできなかったが、我々の検体を用いた両法の比較では、少数例の検討ではあるが、非ビオチン-アビジン法でIgM陰性の検体が、ビオチン-アビジン法ではすべて陽性との結果を得ている。また、結果判明までに3日間を要していたものが、本法では2日間で行うことができ、各ステップでの反応時間も大幅に短縮され、より迅速性が増した。表1に示したように、中和抗体価の低い検体からもIgM抗体を検出しており、中和抗体測定試験によって抗体の有意上昇を認め得ない検体に有利であると思われる。

回復期血清でIgM抗体陰性の6例及び急性期血清で中和抗体が陽性(8倍)であってIgM抗体陰性の1例については、ウイルス感染に対する免疫応答の個人差の面からも検討が必要であろう。

以上述べたように、ビオチン-アビジンを導入したIgM捕捉間接ELISAは、高感度で、迅速性のあるEV70 IgM検出法として、AHCの流行時、あるいは本疾患の疫学的研究に有用であると思われる。

論文の要旨は第93回日眼総会シンポジウム「最近の眼感染症とその対応」にて口演した。

本研究はDr. M.A. Pallansch及びDr. L.J. Anderson(米国CDC)と共同で行われたものである。

文 献

- 1) Kono R, Sasagawa A, Ishii K, et al: Pandemic of new type of conjunctivitis. Lancet 1: 1191-1194, 1972.
- 2) Aoki K, Kawamoto R, Matsumoto I, et al: Viral conjunctivitis with special reference to adenovirus type 37 and enterovirus 70. Jpn J Ophthalmol 30: 158-164, 1986.
- 3) Wulff H, Anderson LJ, Pallansch MA, et al: Diagnosis of enterovirus 70 infection by demon-

- stration of IgM antibodies. *J Med Virol* 21 : 321—327, 1987.
- 4) **Anderson LJ, Hatch MH, Flemister MR, et al**: Detection of enterovirus 70 with monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 20 : 405—408, 1984.
 - 5) **Guesdon JL, Ternynck T, Avrameas S**: The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *J Histochem Cytochem* 27 : 1131—1139, 1979.
 - 6) **Rao NA**: A laboratory approach to rapid diagnosis of ocular infections and prospects for the future. *Am J Ophthalmol* 107 : 283—291, 1989.
 - 7) **青木功喜, 沢田春美**: 眼科領域におけるアデノウイルス感染症の迅速診断, 酵素抗体法と蛍光抗体法. *日眼会誌* 93 : 865—869, 1989.
 - 8) **Kendall C, Ionescu-Matiu I, Dreesman GR**: Utilization of the biotin/avidin system to amplify the sensitivity of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J Immunol Methods* 56 : 329—339, 1983.
 - 9) **Adler-Sterthz K, Kendall C, Kennedy RC, et al**: Biotin-avidin amplified enzyme immunoassay for detection of herpes simplex virus antigen in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 18 : 1329—1334, 1983.
 - 10) **Gary GW Jr, Kaplan JE, Stine SE, et al**: Detection of Norwalk virus antibodies and antigen with a biotin-avidin immunoassay. *J Clin Microbiol* 22 : 274—278, 1985.
-