

エキノкокクス症血清診断 ELISA 法における 抗原固相化プレートの保存と使用に関する検討

Retention Period and Stability of Antigen-precoated ELISA Plate for the Serodiagnosis of Alveolar Echinococcosis

山野 公明

Kimiaki YAMANO

Key Words : *Echinococcus multilocularis* (多包条虫); alveolar echinococcosis (多包虫症); enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA: 酵素免疫測定法); serodiagnosis (血清診断)

世界に存在するエキノкокクス属寄生虫のうち、ヒトへの感染が問題となる主な病原種は、南極以外の全大陸で見られる *Echinococcus granulosus* と北半球でのみ見られる *Echinococcus multilocularis* (以下 Em) の 2 種である^{1,2)}。北海道で流行を引き起こしているのは後者であり、多包性エキノкокクス症 (alveolar echinococcosis, 以下 AE)³⁾ の原因となっている。ヒトの AE 患者は、媒介動物であるキタキツネへの感染が全道に拡大したことに伴い、北海道全域から報告されている³⁾。このような状況下、北海道では、AE 対策のひとつとして血清診断を主とした住民健診システムを構築し運用している⁴⁾。はじめに、一次検診 (マスキリーニング) として、マイクロプレートを用いた酵素免疫測定法 (ELISA 法)⁵⁾ で抗体価の測定を北海道臨床衛生検査技師会立衛生検査所で行う。その結果、疑陽性及び陽性判定となった受検者に対しては、改めて二次検診を実施する。この二次検診では、当所において ELISA 法による抗体価の再測定に加え、確認検査としてウェスタンブロット法による血清診断を実施するとともに、医療機関による画像診断が併用実施される⁴⁾。当所で行う ELISA 法はこれまで、検査精度の向上と作業の効率化を目指して発色法⁶⁾ や抗原-抗体反応の条件変更⁷⁾ など種々の検討を重ね、作業工程を短縮した迅速法の確立という形で検診システムに還元してきた。今回、さらなる改良として、あらかじめ抗原を固相化させた ELISA 用マイクロプレート (以下、プレート) を保存・適時使用することで、これまで検査ごとに要していた 4 時間の抗原固相化の工程を省くことができるかについて検討した。

方 法

1. 使用血清

医療機関においてエキノкокクス症血清検査の目的で採

血する際に、当該血液の調査研究への使用について了承した患者及び健常者 (計 10 名) の血清を使用した。

2. 検査用抗原

実験的にコトナラットに感染、増殖させた Em の幼虫組織から抽出・調製した粗抗原をコーティング緩衝液 (0.05 M NaHCO₃/Na₂CO₃, pH 9.6) で希釈して抗原液とした⁸⁾。粗抗原の希釈倍率は、AE 患者と健常者の血清を用いて、Voller の方法⁹⁾ に従いボックスタイトレーションを行い、40,000 倍に設定した。

3. 操作手順

検査用プレートを準備する工程において、検査ごとにプレートを抗原を固相化して直ちに使用する従来法^{5,6)} とあらかじめ抗原を固相化したプレートを一定期間保存の後に使用する新法の 2 つを比較検討した。操作は以下のとおりである。

プレートは Corning 社製の E.I.A./R.I.A.8 well strip を専用ホルダーに組み込んだものを使用した。各ウェルに抗原液 100 μ L を分注し、37°C で 4 時間静置して抗原を固相化させた。0.05% Tween 20 を含むリン酸緩衝生理食塩水 (0.05% Tween 20-PBS, pH 7.4) で 3 回洗浄した。ここで、抗原固相化プレートを保存日数 0 日で直ちに使用する分と一定期間保存の後に使用する分とに分けた。後者のプレートは乾燥後さらに 2 つに分け、それぞれ室温と -30°C で保存した。プレートの保存期間は 3 日、10 日、30 日 (約 1 カ月)、90 日 (約 3 カ月) とした。続く抗原-抗体反応のために、カゼインバッファー (Casein 10.0 g-Tris 2.42 g-NaCl 8.8 g in DDW 3 L, pH 7.6) で 250 倍希釈した血清を 100 μ L ずつ分注し、4°C で 1 晩反応させた。プレートを 3 回洗浄後、二次抗体として 1,000 倍希釈したペルオキシダーゼ標識プロテイン A/G (Prozyme 社製) を 100 μ L 添加し、37°C で 1 時間反応させた。その後、プレー

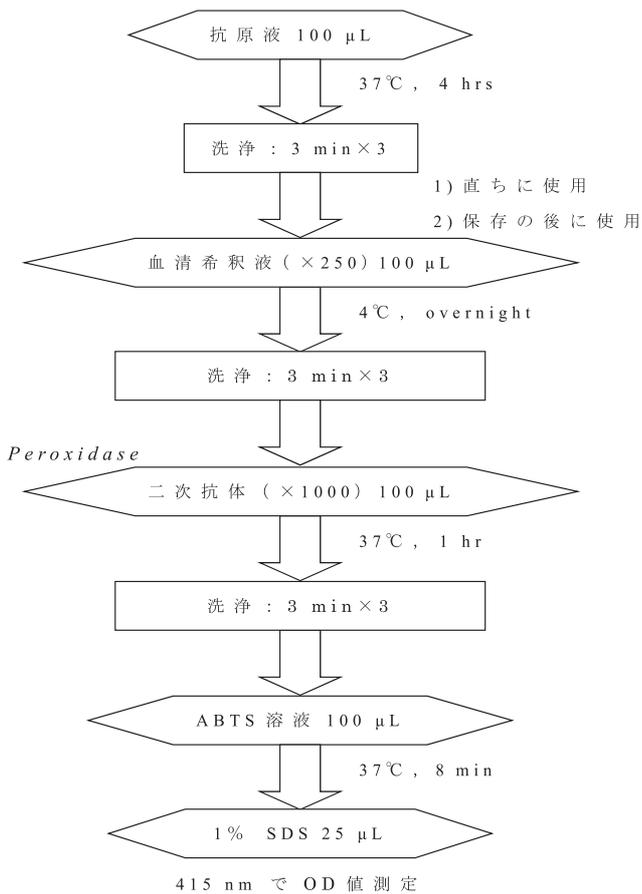


Fig.1 ELISA法の検査工程

トを3回洗浄し、基質となる2,2'-アジノージ-(3-エチルベンズチアゾリン硫酸) (ABTS) 液 (KPL社製, 1-Componentタイプ) を100 μL添加して37°Cで約8分間反応させた。反応の停止には、各ウェルに1% SDSを25 μL添加した。マイクロプレートリーダー (BIORAD社製 Model 680) を用いて、415nmで吸光度 (OD値) を測定した。なお、ELISA値は陽性コントロールのOD値に対する各検体のOD値の相対値と定義し、“ELISA値=検体のOD値/陽性コントロールのOD値”の計算式によって算出する⁵⁾。

結果及び考察

Fig.1に検査工程を示す。既報において検査の迅速化を検討した⁷⁾際、プレートへの抗原の固相化に必要な時間 (37°Cで4時間) の短縮を試み、1時間、2時間、3時間の条件を試したが、測定データのばらつきが大きく、従来法 (4時間) との相関も思わしくなかったため、この部分の時間を短縮できなかった。そこで今回は、あらかじめまとめて抗原固相化プレートを作成・保存しておく方法を検討した。それが可能ならば、日常の検査は血清の希釈液を各ウェルに分注することで抗原-抗体反応から開始することができ、大幅に検査時間を短縮することができる。

Fig.2はあらかじめ抗原を固相化し、乾燥の後に室温で保存しておいたプレートを用いて10検体各々についてプレート保存日数ごとのELISA値の変化をグラフにしたも

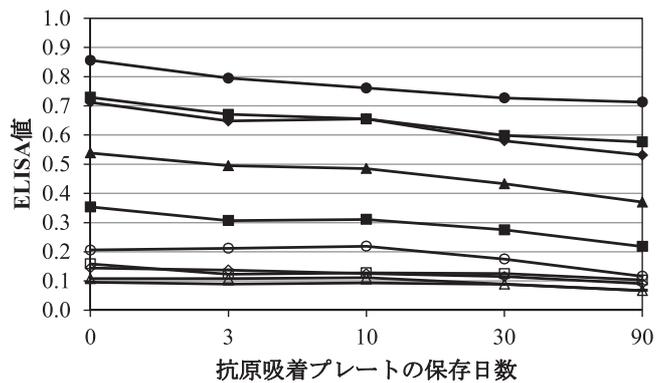


Fig.2 室温保存したプレートのELISA値の変遷

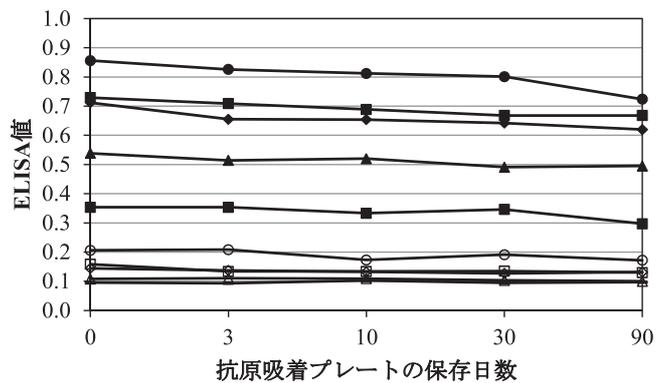


Fig.3 -30°C保存したプレートのELISA値の変遷

のである。いずれの検体も従来法 (プレート保存日数0日) で測定した値と比べて、保存日数が長くなるにつれてELISA値は下降する傾向にあった。Fig.3は抗原固相化済みプレートを-30°Cで保存した場合のものである。この場合も従来法で測定した値と比べて、保存日数が長くなるにつれてELISA値は下降する傾向にはあったが、室温保存時よりは下降の度合いが小さかった。

保存日数が長くなるにつれてELISA値が下降する現象を数値化して評価するため、使用した10検体各々について、従来法のELISA値を100として、それに対する3日、10日、30日、90日の相対値を求め、その平均値を表1にまとめた。その値を抗原劣化の指標とすると、室温保存では30日 (約1カ月) で抗原の力価が約8割に落ちてしまうことがわかった。一方、-30°Cで保存したプレートは90日経過後においても抗原の力価を9割程度維持していたことから、十分に使用可能と考えられた。

そこで、検体全10件について従来法のELISA値と-30°C・90日保存プレートのELISA値について相関性を調べた

表1 従来法の値 (100) に対する相対値の平均

保存日数	0	3	10	30	90
室温保存	100	92.4	92.3	82.5	68.4
-30°C保存	100	96.2	94.0	92.5	89.0

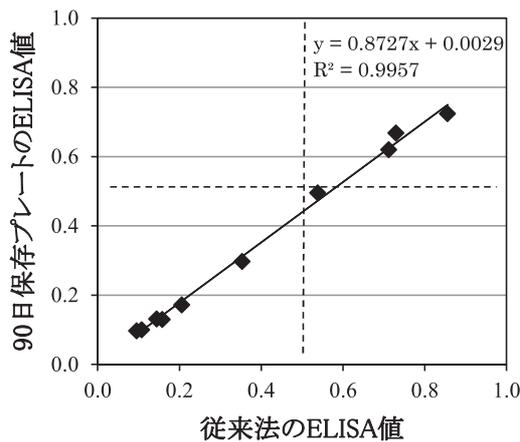


Fig. 4 従来法と -30°C ・90日保存プレートによるELISA値の相関

(Fig. 4). 2つの方法は非常に高い相関 ($r^2=0.9957$) を示した。ただし、90日保存の方で高値域ほど抗原劣化の影響を若干受けるため、値の低下を招き直線の傾きを0.87程度に下げってしまう。けれども、カットオフ値である0.5近辺の中間域を示す検体（患者ではない）は、どちらの手法で測定しても同程度の値を示したことから、ウェスタンプロット法の結果も参考にしながら慎重に判定すれば、診断上、カットオフ値近辺の偽陽性・偽陰性の影響は最小限に抑えることができると考えられた。

本検討により、1年のうち検体の多い時期には、抗原をあらかじめまとめて固相化したプレートを3カ月以内であ

れば -30°C で保存しておくことができ、日常のELISA法の工程を短時間で処理できることがわかった。

文 献

- 1) Rausch RL: *Echinococcus* and Hydatid Disease (ed. Thompson RCA and Lymbery AJ). CAB International, Wallingford, UK, 1995, p. 89
- 2) Schantz P.M, Chai J, Craig P.S, Eckert J, Jenkins DJ, Macpherson CNL, Thakur A: *Echinococcus* and Hydatid Disease (ed. Thompson RCA and Lymbery AJ). CAB International, Wallingford, UK, 1995, pp. 233-331
- 3) 山下次郎 (増補, 神谷正男): エキノコックス その正体と対策, 北海道大学図書刊行会, 札幌, 1997, p. 3
- 4) Kimura H, Furuya K, Kawase S, Sato C, Yamano K, Takahashi K, Uruguchi K, Yagi K, Sato N: Recent epidemiologic trends in alveolar echinococcosis prevalence in humans and animals in Hokkaido. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 52, 117-120 (1999)
- 5) 佐藤秀雄, 三田村弘, 新井純理, 熊谷 満: 酵素抗体法によるヒト包虫症の血清学的診断 (第1報) 多包虫性抗原による酵素抗体法. *道衛研所報*, 33, 8-15 (1983)
- 6) 山野公明, 古屋宏二, 澤田幸治: エキノコックス症血清診断のための Peroxidase-ABTS 発色系 ELISA 法の検討. *道衛研所報*, 55, 73-75 (2005)
- 7) 山野公明: エキノコックス症血清診断のための迅速 ELISA 法の検討. *道衛研所報*, 66, 87-90 (2016)
- 8) 北海道立衛生研究所 (澤田幸治) 編: 重点領域特別研究報告書 (平成13~15年度), 北海道立衛生研究所, 札幌, 平成16年3月, p. 2
- 9) Voller A: *Manual of Clinical Immunology*, 2nd ed., American Society for Microbiology, Washington, D. C., 1980, p. 359