

10. 微量法を用いた日本脳炎ウイルス赤血球凝集抑制反応の2, 3の検討

小 沢 茂

Microtiter method (微量法, 以下Micro法と略す) が Takatsy¹⁾ によって考案され, その後, Sever²⁾ により改良されて以来, この本法が, 従来の Macro-titer method (標準法, 以下Macro略す) にかわって, 種々のウイルスの血清的検査に応用されて来た。我が国においても, 風疹・麻疹ウイルス等のMicro法による赤血球凝集抑制反応 (以下HI反応と略す) の術式が全国的に確立されている。しかし, インフルエンザ及び日本脳炎ウイルスのHI試験にはMicro法が標準法として認められておらず, 従来のMacro法によって行なわれている。その主たる理由はMicro法ではパラツキが大きいことである。最近, 芦原ら³⁾ により, 本法を普及させるための問題点があげられ, 標準法と各自検討する必要性が提唱された。

Micro法を用いた日本脳炎ウイルスHI試験は, すでに数カ所でガチョウ赤血球を使用して実施されている。筆者は鶏の1日ピナ赤血球を使用して日本脳炎ウイルスのHI反応を行ない, Macro法とMicro法との相関について検討したので報告する。

材料及び方法

- 1) 血清: 昭和47年度日本脳炎流行予測事業のため採取された豚血清を利用し, 予研法⁴⁾ に従って血清処理した。
- 2) 抗原: 武田薬品製 JaG Ar #01 株を使用した。
- 3) 赤血球: 鶏1日ピナ赤血球を用い, Alseverで3回洗浄後, 最終遠心2000 rpm, 10分で得られた packed cell を Alseverで8%血球浮遊液として, 4°Cに保存した。使用の都度, Bürker Türkの血球計算板にて血球数を数え, VAD 6.8で稀釈し, 1 ml 当り 2.3×10^7 個の赤血球に調整し, 0.33%血球浮遊液とした。
- 4) 微量検査器具: Microtray, Loop及びDropperは富永製を用いた。Microtrayはdisposable U型の未使用 tray (new plate) を使用した。
- 5) Macro法によるHI試験: 予研法⁴⁾ に従って行なった。
- 6) Micro法によるHI試験: 一部を除いて風疹のMicro法術式⁵⁾ に準拠して行なった。すなわち, 抗

原, 血清稀釈液は0.4%EAを使用した。血清は倍数稀釈し, これに0.025 mlの抗原を加え, 4°Cに一昼夜おいたのち, 0.33%血球浮遊液0.05 mlを加え, 37°Cに1時間静置後判定した。なお, HI抗体価は完全非凝集(-)を示す血清の最高稀釈倍数で表われ, 沈降した血球の周囲に凝集が認められるもの(±)については, 便宜的に(-)と(±)の中間のHI価を用いた。

結果及び考察

1) 血球濃度の選定

Micro法に使用する鶏1日ピナ血球の至適濃度を選定するために, 種々の血球濃度における赤血球凝集反応 (以下HA反応) を行なった。

図1に示す如く, 0.2%のHA価が最も高いが, HAのパターンの判別に困難であり, 0.4%以上になると, パターンは明瞭であるが, HA価が低下した。ところが0.33%の場合はHA価が0.2%の場合の $\frac{1}{2}$ になるが, パターンはより明瞭であったので, このことから, 以後

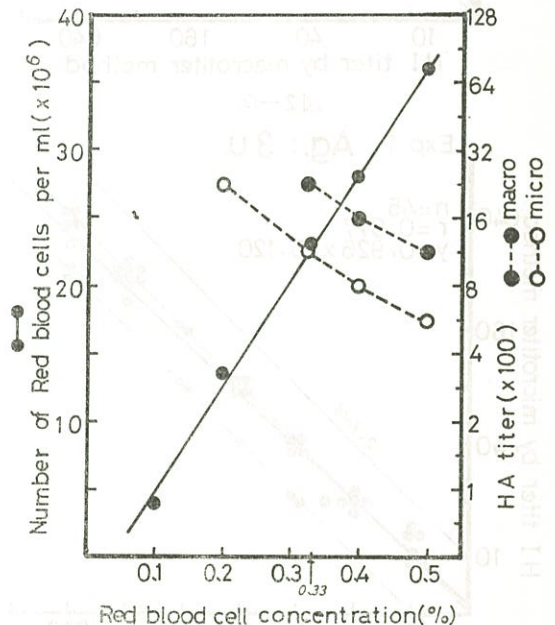


図1 種々の血球濃度におけるHA価

の実験には、0.33%鶏1日ビナ血球浮遊液を用いることにした。

2) 抗原濃度の選定

基準となる Macro 法の HI 価と一致するような Micro 法に適した抗原の濃度を選定するため、予備実験として3種類の血清を用い、種々の抗原濃度における HI 反応を行なった。その結果は表 1 に示す如く、8 単位抗原を使用した場合、Macro 法を基準にすると、Micro 法による HI 価は $1/2-1/3$ の低下を認めた。4 単位抗原を使用した場合、抗体量が少いと Macro 法による HI 価と一致するが、抗体量が多いと Macro 法に比べ $1/2$ に低下し

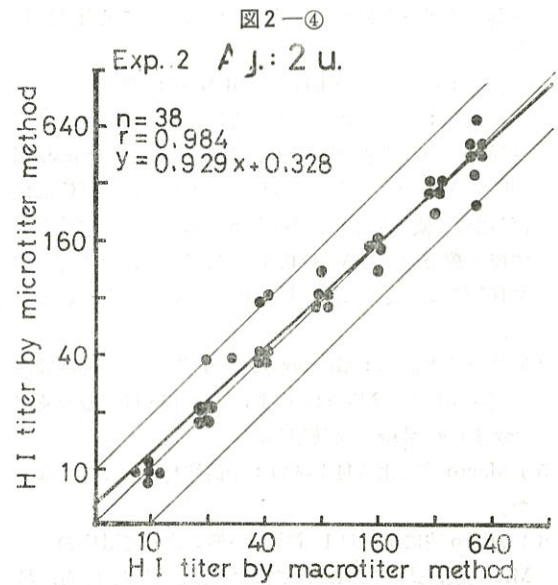
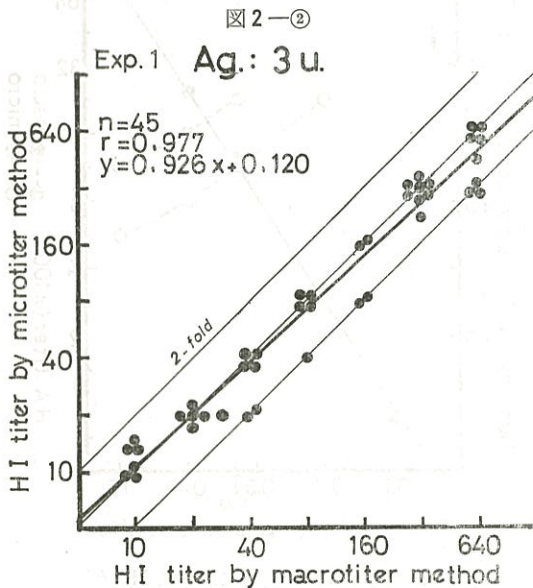
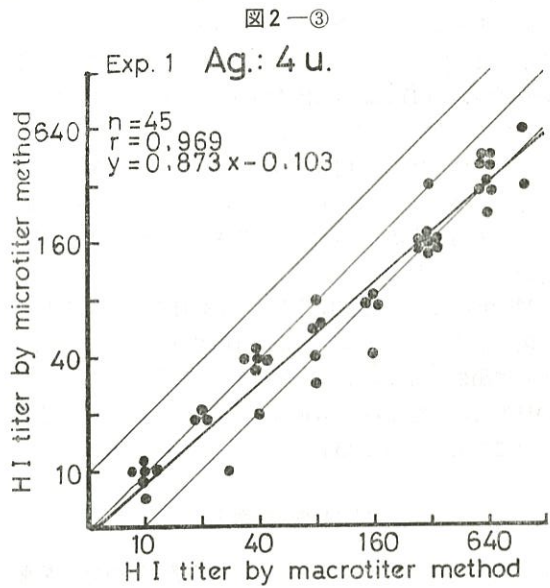
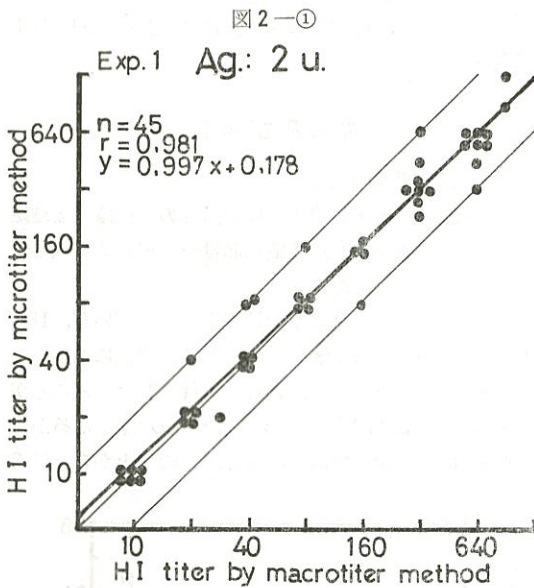
表 1 種々の抗原の濃度による HI 価

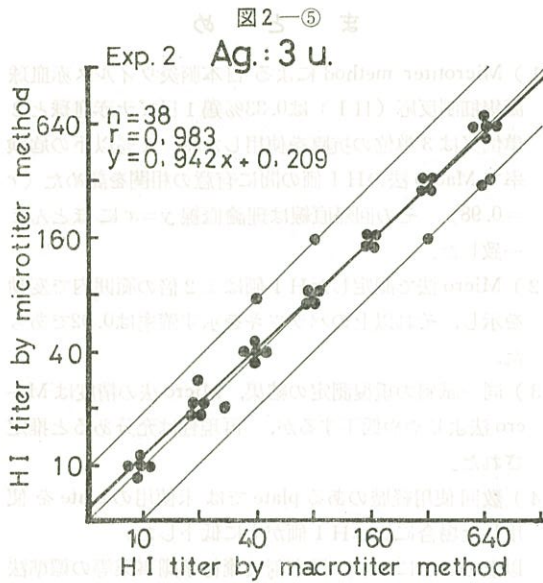
Serum. No.	Method Antigen	Microtiter method				
		8 u	1 u	2 u	4 u	8 u
1		1:1,280	1:1,280 ~2,560	1:1,280	1:640	1:160
2		1:80	1:320	1:160	1:80	1:40
3		1:10	1:40	1:20	1:10	non test

RBC : 0.33% one day chick

た。一方、2 単位抗原を使用した場合は、抗体量が多い

図 2 Macro 法と Micro 法の相関関係



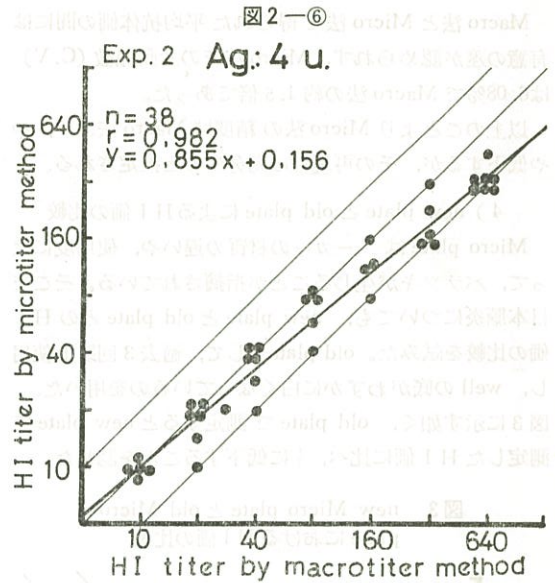


と一致したが、抗体量が少ないと一致しなかった。そこで2単位、4単位及びその中間の3単位抗原を使用し、2回の本実験（実験1と実験2）を行ない、Macro法とMicro法との相関について検討した。その結果は、図2に示す如く、使用した抗原の濃度にかかわらず、いずれも相関係数0.97以上で、1%以下の危険率で両法の抗体価の間に有意の相関が認められた。回帰直線が ideal line ($y=x$) に一番近接するのは、実験1においては、2単位抗原系 ($y=0.972x+0.178$) であり、実験2においては、3単位抗原系 ($y=0.942x+0.209$) であった。なお、実験1の使用抗原濃度は実験2の抗原濃度より僅かに高かった。

1:320以上の抗体を含む血清の場合、Micro法4単位抗原系でのHI価はMacro法を測定したHI価の $\frac{1}{2}$ に低下した。そのため、4単位抗原系の回帰直線は ideal line より、かなり下側に shift した。各系での回帰直線が、ideal line に比べ勾配がやや小さくなるのは、Loopによる誤差などが稀釈倍数を増すにつれて積算されるためと考えられる。他の系に比べ、4単位系の回帰直線が ideal line より、かなり下側に shift するのは、Loopの稀釈誤差だけのためだけでなく、抗原と抗体及び血球の濃度の相互関係が至適でないためだと思われる。

一方、2単位系と3単位系を比べてみると、分散は2単位系の方が小さかったが、両単位系のHI抗体価の間には1%以下の危険率で有意な差は認められなかった。

以上の結果より、Micro法に使用する抗原の濃度は2単位、及び3単位が適していた。ただし、2単位抗原を用いた場合、抗体価が低いとMacro法で測定したHI価より2倍高めに出ることがしばしば認められるので、3単位の抗原を使用した方が望ましいと考えられた。



3) Micro法によるHI価の変動と再現性について
Micro法で行なわれた場合のLoopの稀釈誤差等で生じるHI価の変動を知るために、HI価1:640の豚血清を用いてMacro法との同時に重複測定を行なった。なお、Micro法は0.33%血球濃度と3単位抗原系を用い、Loopは精度検定により、容量0.025 ml \pm 0.2%に調整されたものを用いた。表2に示す如く、Macro法でHI価1:640を示すのは20回中14回(70.0%)に対し、Micro法では45回中26回(54.2%)であった。Micro法はMacro法に比べバラツキの範囲は大きかったが、得られたHI価は大部分、 \pm 2倍の範囲内にあり、それ以上の場合は2%にすぎなかった。このことは、図2の散布図の点のすべてが2-fold line内に存在する事実と符合する。

表 2 重 復 測 定

		Macro 法		Micro 法	
		回 数	頻度(%)	回 数	頻度(%)
H I 価	640	14	70	26	54.2
	320	6	30	18	37.5
	—640	0	0	3	6.2
	320 —320	0	0	1	2.1
計		20		48	
平均抗体価		$2^{5.85} \times 10$		$2^{5.72} \times 10$	
S . D		0.229		0.348	
C . V		3.92%		6.08%	

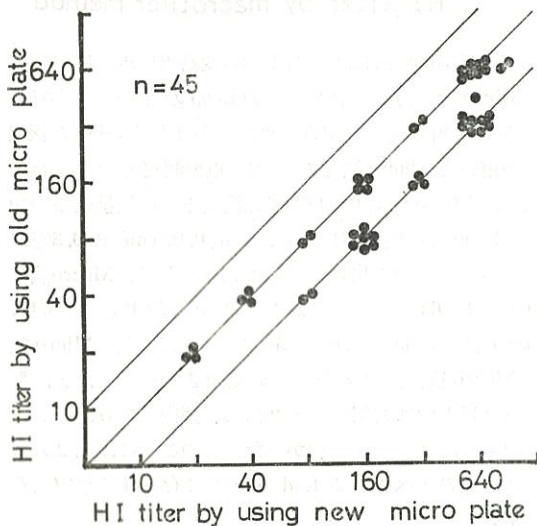
Macro 法と Micro 法で得られた平均抗体価の間には有意の差が認められず、Micro 法での変動係数 (C. V) は 6.08% で Macro 法の約 1.5 倍であった。

以上のことより Micro 法の精度は Macro 法より、やや低下するが、その再現性は充分であると推定される。

4) new plate と old plate による HI 価の比較

Micro plate はメーカーの材質の違いや、使用度によって、バラツキが生じることが指摘されている。そこで日本脳炎についても、new plate と old plate との HI 価の比較を試みた。old plate として、過去 3 回以上使用し、well の底がわずかに白くなっているのを用いた。図 3 に示す如く、old plate で測定すると new plate で測定した HI 価に比べ、 $\frac{1}{2}$ に低下することを認めた。

図 3 new Micro plate と old Micro plate における HI 価の比較



ま と め

- 1) Microtiter method による日本脳炎ウイルス赤血球凝集抑制反応 (HI) は 0.33% 鶏 1 日ビナ赤血球と 2 単位又は 3 単位の抗原を使用した時、1% 以下の危険率で Macro 法の HI 価の間に有意の相関を認めた ($r=0.98$)。その回帰直線は理論直線 $y=x$ にほとんど一致した。
- 2) Micro 法で測定した HI 価は ± 2 倍の範囲内で変動を示し、それ以上のバラツキを示す確率は 0.02 であった。
- 3) 同一試料の重複測定の結果、Micro 法の精度は Macro 法よりやや低下するが、再現性は充分であると推定された。
- 4) 数回使用経歴のある plate では未使用の plate を使用した場合に比べ HI 価が $\frac{1}{2}$ に低下した。

以上のことにより、日本脳炎流行予測事業等の標準法として、従来の Macro 法にかわって Micro 法を用いても、HI 価の変動も比較的少なく、再現性があると考えられる。

文 献

- 1) G. Takatsy et al : Acta Physiol Hung 5 241 (1954)
- 2) J. L. Sever : J. Immunol 88, 320 (1962)
- 3) 芦原義守 : 第 13 回臨床ウイルス談話会 (1972)
- 4) 国立予防衛生研究所学友会編「ウイルス実験学 各論」p. 141 (1967)
- 5) 国立予防衛生研究所編 : マイクロタイター法による風疹 HI 試験の術式指針 (1970)