

Immune Adherence Hemagglutination (IAHA) 法による 水痘ウイルス抗体の測定

聖マリアンナ医科大学医学部小児科学教室

中島 夏樹 箕原 豊 五島 文恵 有本 寛

加久 浩文 五島 敏郎 加藤 達夫

SRL ウイルス課

深澤 糾 浅野 泰弘 山内 寿靖 小山 明

同 二課

池 谷 宏 造

(平成5年2月23日受付)

(平成5年5月10日受理)

Key words: IAHA, VZV, CF, IFA, ELISA

要 旨

感度が良く、手技が簡便な IAHA (immune adherence hemagglutination) 法で、水痘抗体の測定を行い、各反応条件について検討し、CF 法、IFA 法、ELISA 法と比較検討した。IAHA 法は、微研法に準じて行った。ヒト O 型赤血球は、試みた 5 名の志願者全員が、使用可能であった。補体は、モルモット血清を使用した。抗原抗体反応温度は 37℃ が至適であり、また血清の非働化も必須と思われた。他法の結果と比較すると、IAHA 法は、IFA 法、ELISA 法と同程度、CF 法の 2～4 倍高い感度を示し、それらとの陽性、陰性一致率も良好であった。また、水痘ワクチン接種前後の検体でみた、各検査法による抗体陽転率は、CF 法で 76.0%、IFA 法で 56.0%、ELISA 法で 100% であったのに対し、IAHA 法は、100% であった。このように、IAHA 法による水痘抗体測定は、手技が簡便で、特別な器具を必要とせず、また感度、特異性も良好で、一般の検査室で充分測定可能な、優れた検査法と思われた。

序 文

小児期における最も一般的な急性ウイルス性発疹症である、水痘に対する予防対策の一つとして、水痘生ワクチンが開発され、昭和 62 年 4 月よりハイリスクの児を対象に接種が開始され、現在は健康児にも広く接種が行われている。水痘ワクチン接種後の抗体獲得と、罹患時の診断には従来、Complement Fixation (CF) 法、Neutralization (NT) 法、Fluorescent Antibody to Membrane Antigen (FAMA) 法、Enzyme-Linked Im-

munosorbent Assay (ELISA) 法等が行われているが、操作が繁雑であったり、感度に問題があるものもあり、ルーチン検査としては実用的ではなく¹⁾、特にワクチン接種後の検体では感度が不良である。今回我々は、一般の検査室でも測定可能な簡便な IAHA 法により、水痘抗体価の測定を行い、幾つかの反応条件について検討し、CF 法、Indirect Immuno-fluorescent Antibody (IFA) 法、ELISA 法と比較したので報告する。

材料と方法

被検血清は、聖マリアンナ医科大学小児科予防接種外来における、水痘生ワクチン接種者 (1 歳 1 カ月から 6 歳) の、ワクチン接種前、および 4

別刷請求先: (〒211) 川崎市中原区小杉町 3-435

聖マリアンナ医科大学東横病院小児科

中島 夏樹

週間後の血清58検体(29ペア)と, SRL 水痘ウイルス抗体(CF 法, IFA 法, ELISA 法)測定依頼の血清を用いた。

1) IAHA 法操作手順(微研法)

希釈液を96穴リジッドU底マイクロプレートに25 μ l ずつ滴下し, 1 検体につき2 系列, 血清を25 μ l ずつ滴下し, 2nd希釈する。次に, VZV 抗原, ノーマル抗原を各列に25 μ l ずつ滴下し, 37 $^{\circ}$ Cで60 分間インキュベート。補体を25 μ l ずつ滴下し, 37 $^{\circ}$ Cで40 分間インキュベート。次いで DTT 液(3 mg/ml)を25 μ l ずつ滴下し, 最後にプレートをミキシングしながら, 1.5%O-RBC を25 μ l ずつ滴下, 室温で2 時間以上静置し, 判定した。

① 希釈液(すべての反応液として用いる)

5 $\times$ VBS	40ml	} 滅菌蒸留水で200ml とする
BSA	0.2g	
1%ゼラチン	0.4ml	

② 補体

* IAHA 用モルモット補体: 目黒研究所 Lot Au 1,789g

* 乾燥補体“生研”: デンカ生研 Lot 62005

* モルモット血清

③ ヒトO型血球

採血し, 0.85%NaCl で3 回洗浄後, 希釈液で1.5%に調整。

④ DTT

3mg/ml の割合で, 希釈液に溶解して使用。

⑤ VZV 抗原(岡株, 河口株, バドソン株)

HE 細胞に VZV 感染細胞を10:1 の割合で接種し, CPE が80~90%出現した時点で, EDTA で感染細胞を集め, PBS(-)に浮遊させ, 超音波処理を3 分間行った。その後3,000rpm/15 分の遠心を行い, その上清を抗原として用いた。

2) CF 法

デンカ生研製 VZV CF 抗原を用い, 50%溶血法で実施した。

3) IFA 法

VZV 抗原(バドソン株)をスライドガラス上に塗抹し, 血清を反応後, FITC 標識抗ヒト IgG 抗体を反応させ, 蛍光顕微鏡下で判定した。

4) ELISA 法

ヘキスト EIA キット(エンザイグノスト V 水痘 IgG[®])を用い, 添付説明書にしたがって実施した。

成 績

1: IAHA 法の反応条件に関する検討

1) 使用O型赤血球の選別

IAHA 法で安定したデータを得るためには反応に適した血球を選定する必要がある。そこで今回, 常時採血が可能な志願者5 名の採血を行い, それぞれの血球を用いた Box Titration を行い, 個々の反応性を比較検討した。その結果, 5 名全員の血球で IAHA 反応性が確認された。そこで, 他の4 名に比較して最も良好な反応性力価を示した血球を, 以後用いることとした。

2) 使用補体の選別および補体濃度の検討

IAHA 法にはモルモット補体を使用するが, その補体は高力価で非特異反応の少ないものが要求される。そこで今回, IAHA 反応に適した補体選定の為, ①目黒研究所製 IAHA 用モルモット補体, ②デンカ生研製乾燥補体“生研”, ③モルモット血清, の三者を用いて, それぞれ60 $\times$, 80 $\times$, 100 $\times$, 120 $\times$, の希釈倍率にて使用し, その力価, 反応性等を比較, 検討した。その結果, 目黒研製 IAHA 用補体とモルモット血清は, ほぼ同程度の力価を示したのに対し, デンカ生研製補体は管数で約2 管程低い値を示した。そこで今回は, 入手のしやすさからモルモット血清を使用することとした。また, 目黒研製 IAHA 用補体もモルモット血清も60 $\times$, 80 $\times$ の希釈倍率では, やや非特異的な反応を示すため, 100 $\times$ 希釈のモルモット血清を用いることとした。

3) 抗原抗体反応温度の検討

IAHA 法の操作手順の中で, 被検血清と抗原との反応温度が, 報告者により室温と37 $^{\circ}$ Cに分かれ, 一定していない。そこで今回我々は, 水痘抗体陽性血清(IFA で320 $\times$)を用いて Box Titration を行い, 抗原抗体反応37 $^{\circ}$ C 1 時間と室温 1 時間での差異を比較検討した。結果は Fig. 1 に示したが, 室温に比べ37 $^{\circ}$ C 反応の方が1 管程高い値を示し, 抗原抗体反応は37 $^{\circ}$ C が至適であると思われた。

4) 血清非働化の有無による IAHA 反応への影

Fig. 1 Comparison of box titrations in different temperatures

● 37℃

		Serum dilution →												Control
		2 ×	4 ×	8 ×	16 ×	32 ×	64 ×	128 ×	256 ×	512 ×	1024 ×	2048 ×		
Antigen dilution ↓	1 ×	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	—	
	2 ×	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	± _w	—	
	4 ×	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	
	8 ×	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	—	
	16 ×	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	—		
	32 ×	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—			
	64 ×	+	+	+	+	+	+	+	—					
Control	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		

Room temperature

		Serum dilution →												Control
		2 ×	4 ×	8 ×	16 ×	32 ×	64 ×	128 ×	256 ×	512 ×	1024 ×	2048 ×		
Antigen dilution ↓	1 ×	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	
	2 ×	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	
	4 ×	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	
	8 ×	+	+	+	+	+	+	+	+	± _w	±	—		
	16 ×	+	+	+	+	+	+	+	+	± _w	—	—		
	32 ×	+	+	+	+	+	+	+	+	±	—	—		
	64 ×	+	+	+	+	+	± _w	± _w	±	—	—	—		
Control	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		

響

IAHA 法では、検査に先立ち血清を非働化 (56℃120分) するが、この有無によりどのような影響があるか、6 例の血清を用いて比較検討した。結果は Fig. 2 に示したが、非働化血清ではすべて正常抗原陰性であったが、非働化をしていない血清では、非働化血清よりも高めの抗体価を示すと共に、正常抗原にも反応を示し、非特異反応の存在が示唆された。

2: IAHA 法と他法とのデータ比較

1) IAHA 法と CF 法のデータ比較

水痘 CF 抗体測定依頼血清 65 検体を用いた、IAHA 法と CF 法の比較を Fig. 3 に示した。CF 法に比べ IAHA 法の抗体価は 2 ~ 4 倍程度高い傾向を示した。

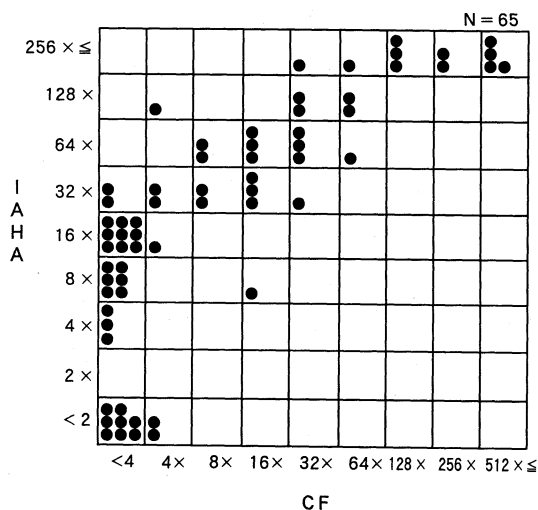
2) IAHA 法と IFA-IgG 法とのデータ比較

水痘 IFA-IgG 抗体測定依頼血清 74 検体を用い

Fig. 2 Comparison of VZV IAHA titers with or without inactivation

No		2 4 8 16 32 64 128 256 512 1024												
		Ag	+	+	+	±	—	—	—	—	—	—	—	
No - 1	Ag	+	+	+	±	—	—	—	—	—	—	—	—	Inactivation
	N-Ag	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	Ag	+	+	+	+	± _w	—	—	—	—	—	—	—	No Inactivation
	N-Ag	± _w	± _w	± _w	± _w	—	—	—	—	—	—	—	—	
No - 2	Ag	+	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	N-Ag	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	Ag	+	+	+	+	± _w	—	—	—	—	—	—	—	
	N-Ag	± _w	± _w	± _w	± _w	—	—	—	—	—	—	—	—	
No - 3	Ag	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	N-Ag	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	Ag	+	+	+	+	±	—	—	—	—	—	—	—	
	N-Ag	± _w	± _w	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	
No - 4	Ag	+	+	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	N-Ag	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	Ag	+	+	+	+	±	—	—	—	—	—	—	—	
	N-Ag	± _w	± _w	± _w	+	—	—	—	—	—	—	—	—	
No - 5	Ag	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	
	N-Ag	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	Ag	+	+	+	+	+	± _w	—	—	—	—	—	—	
	N-Ag	±	±	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
No - 6	Ag	+	+	+	+	+	±	—	—	—	—	—	—	
	N-Ag	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	Ag	+	+	+	+	+	± _w	—	—	—	—	—	—	
	N-Ag	± _w	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	

Fig. 3 Comparison of VZV CF titers with VZV IAHA titers



た, IAHA 法と IFA-IgG 法の比較を Fig. 4 に示した. IFA 法で陽性を示した血清は IAHA 法でもすべて陽性を示し, その抗体価はほぼ同程度であった.

3) IAHA 法と ELISA 法とのデータ比較

水痘 EIA-IgG 抗体測定依頼血清59検体を用い

Fig. 4 Comparison of VZV IFA titers with VZV IAHA titers

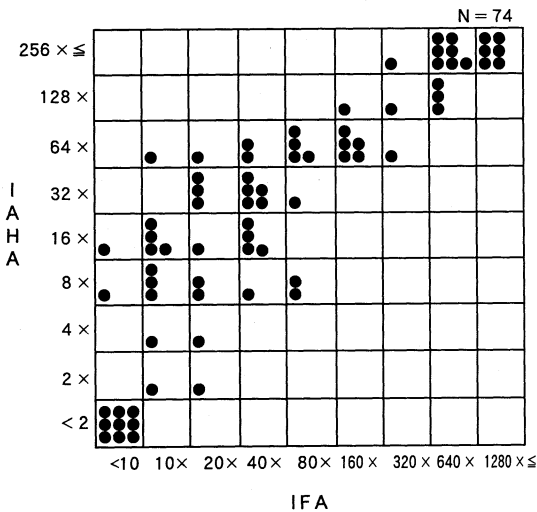
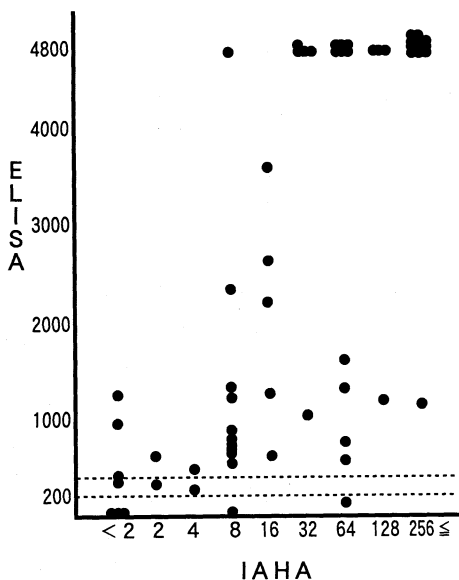


Fig. 5 Comparison of VZV ELISA titers with VZV IAHA titers



た, IAHA 法と ELISA 法の比較を Fig. 5 に示した. 陽性, 陰性の結果一致率は59例中51例, 86.4%であった.

3: 水痘ワクチン接種前後における各検査法による水痘抗体価

1) IAHA 法

29ペアについて測定を行ったが, 接種前既に陽性を示すものが1例認められた. 接種前陰性であった28例は, 接種後全例陽性を示し, その抗体価は, 4~128倍(平均 $2^{5.07}$ 倍)であった(Fig. 6).

2) CF 法

25ペアについて測定を行ったが, 接種後19例が抗体陽性を示し, その抗体価は4~64倍(平均 $2^{4.28}$ 倍)であった(Fig. 6).

3) IFA-IgG 法

25ペアについて測定を行ったが, 接種後14例が抗体陽性を示し, その抗体価は10~80倍(平均 $2^{5.1}$ 倍)であった(Fig. 6).

Fig. 6 Comparison of antibody titers to VZV by CF IFA ELISA and IAHA before and after vaccination

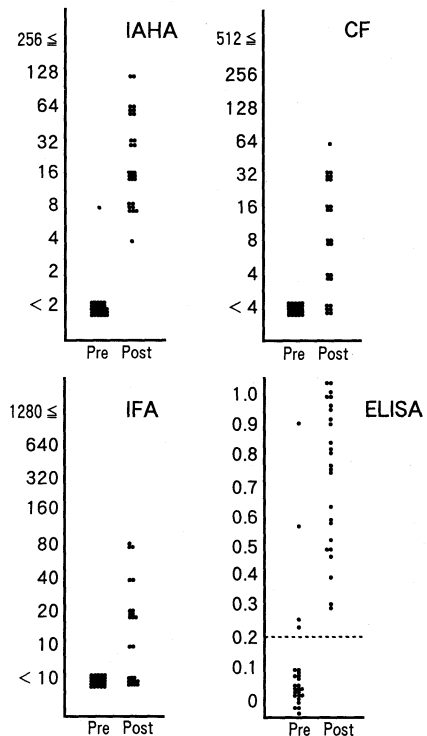


Table 1 Seroconversion rates by IAHA CF IFA and ELISA in VZV vaccinees

IAHA	28/28	100%
CF	19/25	76%
IFA	14/25	56%
ELISA	21/21	100%

4) ELISA 法

25ペアについて測定を行ったが、接種前既に陽性を示すものが4例認められた。接種前陰性であった21例は、接種後全例抗体陽性を示した(Fig. 6)。

5) 各検査法の水痘ワクチン接種前後の抗体陽転率の比較

水痘ワクチン接種前抗体陰性であった例の接種後の抗体陽転率を4つの検査法について比較した(Table 1)。IAHA法とELISA法では全例陽転したのに対し、IFA法は、陽転率56%と最も低い値を示した。

考 察

水痘抗体の測定には従来、CF法が用いられてきたが、感度が低く、また抗体反応が長時間持続しないという欠点を持っている。同抗体の測定にはそのほか、NT法、IFA法、FAMA法、ELISA法等が行われているが、NT法は、操作が煩雑で判定に時間を要し、IFA法は、同時に多数の抗体判定が困難である。FAMA法は、操作がやや煩雑であり、また時には血清の低希釈で非特異的な蛍光のため、低い抗体価の測定が難しいことがあり、ELISA法は、やはり操作が煩雑で、また使用するウイルス抗原が高度に精製されていないと、感度が悪かったり、非特異的反応が出やすいなど、それぞれ欠点を有している¹⁾。

IAHA法は、1966年、伊藤・多ヶ谷²⁾により初めて行われ、1971年、真弓ら³⁾が凝集パターンを安定化させるためにDTTを用いることにより実用化された、ウイルス抗体測定に適した検査法である。水痘抗体測定法としては、1976年、Gershonら⁴⁾により報告されて以来、徐々に実用化されてきたが、一般の検査室でルーチンに行うには、未だ幾つかの問題があると思われる。その一つは、使用する

赤血球の選定であるが、今回我々が試用した、5人の赤血球は全て使用可能であった。O型、Rh+赤血球が用いられるが、個人によりindicator cellとしての赤血球の感受性に大きな差異がある⁵⁾と言われている。しかし、日本人は他に比べ使用可能な赤血球を持つ個人の確率が高い⁶⁾とする意見もあり、事前に慎重に選択を行えば、入手に苦勞することは少ないと思われた。補体は3種類について検討したが、市販の補体にやや力価の低いものがみられ、入手のし易さもあり、モルモット補体を用いた。希釈濃度は、60×、80×では若干の非特異的反応が見られ、他の報告同様100×が至適と思われた。抗原抗体反応温度は、報告者により37℃^{7,8)}と、室温^{4,6)}、または4℃⁵⁾に分かれているため比較してみたが、37℃の方が抗体価がやや高い結果であった。またIAHA法では、被検血清は事前に非働化するという報告が多いが、今回の我々の結果でも、非働化していない血清では非特異的反応が認められ、非働化が必須であると思われた。

IAHA法と他法との比較では、CF法に比べ2～4倍高い抗体価を示し、これはWongら⁵⁾の報告と同様であった。一方、IFA法とはほぼ同様の抗体価を示した。そして、ELISA法に比べると、抗体価はほぼ同様であり、また陽性、陰性の一致率は46例中38例、82.6%で、これは尾崎ら⁹⁾のワクチン接種前後のELISAとIAHAの陽性、陰性一致率、91.9%よりやや低い結果であったが、これは臨床検体とワクチン接種前後の検体と差である可能性もあると思われた。水痘ワクチン接種前後の検体での比較では、IAHA法とELISA法では全例抗体価が陽転したのに対し、CF法とIFA法では陽転率が低く、この2つの方法はワクチン接種後の抗体の測定には、感度がやや低すぎる事が考えられた。また、ワクチン接種前に陽性を示した検体が、IAHA法で1例、ELISA法で4例認められたが、IAHA法の1例はELISA法でも陽性を示し、偽陽性反応ではないと思われた。一方、IAHA法で陰性、ELISA法で陽性を示した残りの3例は、CF法、IFA法ではIAHA法同様陰性で、これらはELISA法の偽陽性反応の可能性が示唆された。この様に、IAHA法による水痘抗体

価の測定は、CF 法、IFA 法より感度に優れ、ELISA 法とほぼ同様の感度を有し、偽陽性反応も認められなかった。また操作も簡便で、特別な器具も必要とせず、使用する赤血球、補体、および反応条件に注意すれば、一般の検査室でも行い得るすぐれた検査法であると思われた。

稿を終えるにあたり、ご指導賜りました、阪大微研高橋理明名誉教授に、深謝致します。

文 献

- 1) 高橋理明：ウイルスワクチン接種後の抗体測定法の選択と結果の解釈, SRL 宝函, 13: 26—30, 1989.
- 2) Ito, M. & Tagaya, I.: Immune adherence hemagglutination test as a new sensitive method for titration of animal virus antigens and antibodies Jpn. J. Med. Sci. Biol., 19: 109, 1966.
- 3) Mayumi, M., Okochi, K. & Nishioka, K.: Detection of australia antigen by means of Immune Adherence Hemagglutination test. Vox Sang., 20: 178—181, 1971.
- 4) Gershon, A.A., Kalter, Z.G. & Steinberg, S.:

Detection of antibody to Varicella Zoster virus by immune adherence hemagglutination. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 151: 762—765, 1976.

- 5) Wong, C.L., Castriciano, S., Chernesky, M.A. & Rawls, W.E.: Quantitation of antibodies to Varicella-Zoster virus by immune adherence hemagglutination. J. Clin. Microbiol., 7: 6—11, 1978.
- 6) 井上 栄：IAHA. 臨床検査, 25: 959—965, 1981.
- 7) Kositanont, U., Suvatte, V., Wasi, C. & Thongcharoen, P.: Detection of Varicella Zoster antibody by immune adherence hemagglutination test. Southeast. Asian. J. Trop. Med. Pub. Hlth., 15: 342—347, 1984.
- 8) Gillani, A. & Spence, L.: Immune adherence hemagglutination test applied to the study of Herpes Simplex and Varicella Zoster virus infections. J. Clin. Microbiol., 7: 114—117, 1978.
- 9) 尾崎隆男, 長谷川誠一, 近藤 久, 松井省治, 市川孝行, 槻館由美子, 浅野喜造, 山西弘一, 高橋理明：水痘ワクチンの血清調査. 臨床とウイルス, 14: 220—224, 1986.

Detection of Antibody to Varicella Zoster Virus by Immune Adherence Hemagglutination

Natsuki NAKAJIMA, Yutaka MINOHARA, Fumie GOSHIMA, Yutaka ARIMOTO,
Hirohumi KAKU, Toshiroh GOSHIMA & Tatsuo KATOH

Department of Pediatrics, St Marianna University School of Medicine
Tadashi FUKAZAWA, Yasuhiro ASANO, Toshiyasu YAMAUCHI,
Akira KOYAMA & Kouzou IKEGAYA

SRL Inc.

Anti varicella-zoster virus (VZV) antibodies were detected by an immune adherence hemagglutination (IAHA) test, and were compared with the CF test, IFA test and ELISA test, respectively. Type O, Rh-positive RBC for IAHA was obtained from five healthy volunteers. All five RBCs had sufficient sensitivity as the indicator cell. Optimum incubation temperature was 37°C in the serum and in the complement. The complement was obtained from guinea pig sera, and the most suitable concentration was 1:100. The convalescent VZV antibody titers were similar to the values obtained from any of the methods previously mentioned. However, mean titers measured by CF were about two- to fourfold lower than in the values of IAHA. Seroconversion rates of the live VZV vaccine, as detected by CF and IFA were relatively low (CF; 76%, IFA; 56%). In contrast, those obtained from ELISA and IAHA showed perfectly (100%). These results indicate that IAHA has sufficient sensitivity and specificity in the detection of VZV antibodies. In addition, the IAHA test is thought to be a rapid and easy test to perform in ordinary laboratories.