マイクロタイター法による B 群アルボウイルス の中和抗体測定法

橋 本 信 夫 ・ 山 田 堅 一 郎 ・ 金 光 正 次

A MICROTITER METHOD FOR ASSAY OF NEUTRALIZING ANTIBODIES AGAINST GROUP B ARBOVIRUSES.

Nobuo HASHIMOTO, Kenichiro YAMADA and Masatsugu KANAMITSU.
Department of Hygiene, Sapporo Medical College, Sapporo, Japan.

〔受付：10 月 5 日，1971 年〕

序 文

マイクロタイター法による中和抗体の測定は Sever¹⁾
(1962) 以来各種のウイルスで広く応用されている²⁻¹⁰⁾。
しかし，日本脳炎ではブラック法が主に用いられている
ために，多数の血清の抗体調査は費用と労力の上で容易
でない。

最近，De Madrid and Porterfield (1969)¹¹⁾は PS 細
胞，carboxymethyl-cellulose(CMC)重層液および pers-
pex HI tray を用いて各種 B 群アルボウイルスの中和抗
体価の測定を行なった。

われわれは我国で分離された数種の B 群アルボウイル
スの血清疫学的調査の目的で PS 細胞，CMC 重層液お
よびマイクロタイター法を組合せて，簡便で経済的な中
和抗体の測定法を検討した。

材 料

ウイルス：日本脳炎ウイルスの JaGAR-01 株と中山
株，ダニ脳炎ウイルスの根岸株と Langat(TP-21) 株，
およびアポウイルスの 5 株を用いた。ウイルスはいず
れも予研，大谷博士から分与受けたもので，感染マウス
脳で working stock を作った。

細胞：京大ウイルス研，井上博士から分与された PS
細胞¹²⁾を用いた。

メジウム：マイクロタイター用メジウムは Salim¹³⁾
(1967)の方法に準じて作成した。

細胞培養液，ウイルス稀釈液および血清稀釈液は同一
メジウムであつて，Eagle MEM (Nissan ①) に tryp-
tose phosphate broth と非働化犢血清を 10%づつ加え
て作った。

CMC 重層液の組成は次のごとくである。

A	Eagle MEM	4 ×	25.0ml
	L-glutamin	100 ×	1.0 "
	DDW		21.6 "
	NaHCO ₃	5 %	2.4 "
B	CMC 液	3 %	50.0ml
C	Tryptose phosphate broth		11.0 "
	Fungizon (1000γ/ml)		0.25 "

CMC (岸田) は DDW で 3 % に溶解して 15 lbs 10 分
間高圧滅菌し，これと 2 倍濃縮 Eagle 液を等量に混合
してから tryptose phosphate broth を 10%加えて作つ
た。

プレートではメジウムと CMC 重層液が等量で混和
されるので最終の CMC 濃度は 0.75%，また，血清濃
度は 5 % となる。

細胞消化液は PBS の A 液に EDTA を 0.2%とトリ
プシン (Difco) を 0.1%加えて作った。

固定液：Zenker 液を用いたが，ウイルス不活化を考
慮して昇汞濃度を 0.1%とした。

染色液：0.1% trypan blue 液を用いた。

器具の洗滌と滅菌：マイクロタイターの器具とデスポ
マイクロプレート (U 型) は富永製を使用した。

デスポプレートはクロム硫酸液に数時間漬けてから洗
滌し，乾燥後紫外線あるいはエチレンオキシドガスで
滅菌した。

ループ (0.025ml) とドロップパー (0.025ml) は水洗後
99%エチルアルコールに漬けてから乾燥させ，軽く火焰
滅菌して使用した。

方 法

1. 感染価測定法

マイクロタイター法による感染価測定の術式は次のごとくである。

1. 感染：稀釈液 1 滴 (0.025ml)
 ウイルス液 " "
 細胞液 " " } 混合
2. 静置：室温15分間
3. 重層：CMC 重層液添加 (0.075ml)
4. 培養：37°C, CO₂ 孵卵器, 4~5 日間
5. 固定：Zenker 液で30分間→水染
6. 染色：Trypan blue 液で30分間→水染
7. 判定：

マイクロプレートの各カップに稀釈液 (培養液) を 1 滴ずつ分注する。次に試験管でウイルスの階段稀釈列を作り、これを 1 稀釈あたり 5 コ以上のカップを用いてドロップで 1 滴ずつ添加する。各プレートにはウイルス液の代りに稀釈液を加えた細胞対照をおく。このプレートを室温で 15 分間静置して細胞を沈降させた後、CMC 重層液を 0.075ml ずつ手動分注器で静かに重層する。次にプレートを軽く重ね、アルミ箔で覆い、37°C の高湿度の CO₂ 孵卵器に収めて 4~5 日間培養する。

培養プレートを倒立顕微鏡で観察して細胞シートの形成と CPE の発現を確認してからプレートを傾けて重層液を棄てる。次にこれを Zenker 液に 30 分間漬けて細胞の固定とウイルスの不活化を行なつてから軽く水洗する。続いて染色液に移して 30 分間染色後水洗し、ブラックあるいは CPE による細胞シートの脱落を検査する。

ブラックは青色に染つた細胞シートを背景にして脱落細胞のスポットとして示される。

固定、染色されたプレートは乾燥後標本として長く保存できる。

判定

Clear plaque type のウイルスではブラックカウントにより endpoint を求めることができる。しかし、シートの面積が小さく、カウントし得るブラック数も少ないために、多数のカップを用いなければ正確な感染価は得られない。そこでブラックあるいは CPE の有無をもとにして Reed & Muench 法¹⁴⁾ (1938) により感染価を求めた。

Large clear plaque type の JaGAR-01 株や根岸株では 3 日目でブラックを形成し、6 日目には 1 コのブラックでもシートの完全脱落をおこす。しかし、Langat やアポイ株のブラックサイズは小さく、4~5 日目でブラックを形成するが、完全変性には 1 週間以上の培養を要する。

ブラック形成の初期において細胞シートの変性脱落はウイルス濃度に依存して変動するために、細胞脱落の程

図 1 ウイルス濃度と細胞シートの脱落
(日脳 JaGAR-01: 4 日目判定)

図 2 細胞濃度と感染価

度を指標にして早期に大凡の感染価を推定することができる。

第 1 図は JaGAR-01 株についてウイルス濃度と細胞シートの脱落の関係を示したものである。判定は 4 日目で行なつた。

ウイルス濃度と変性脱落する細胞シートの面積は正比例し、稀釈が、 $10^{-0.5}$ 進むごとにシートの脱落は約 $1/4$ ずつ減少した。

感染価測定のための条件の検討。

a. 細胞濃度

種々の濃度の細胞浮遊液を用いて JaGAR-01 株の感染価を測定し、細胞シートとブラック形成のための至適細胞濃度を検討した (第 2 図)。

至適濃度は $2 \sim 8 \times 10^5/\text{ml}$ の範囲にあつて、これ以下ではシート形成が悪く、濃過ぎると細胞の overgrowth にもとづくメジウム pH の低下によつてウイルスの CPE が減少する。また、細胞濃度が濃ければブラックサイズは小さく、薄ければ大きい。

b. ウイルス吸着時間

JaGAR-01 株についてウイルス液と細胞液を室温で混合した後直ちにプレートを vibrator で振盪し、時間毎に CMC 重層液を加えて感染価を比較した。しかし、

混合直後と振盪 6 分目までの間に有意差は認められなかった。このため、ウイルス—細胞混合液を軽く振盪して静置した。

c. CMC 重層液添加の時期

細胞液に半流動の CMC 重層液を加えた場合、細胞は沈降せずシートを形成しない。このために、シート形成に要する静置時間の検討を試みた。

カップに稀釈液を 2 滴ずつ取り、これに細胞液を 1 滴ずつ加えて室温に静置し、時間毎に重層液を加えて培養した。

細胞は混合後数分以内でカップ底に沈降し、5 分目で 40 分目と同程度のシートを形成した。また、室温 1 時間と 37°C、CO₂ 孵卵器 1 時間の比較でも両者に有意差は認められなかった。しかし、37°C、CO₂ 孵卵器 5 時間の静置ではシートサイズが明らかに縮小した。このために、多数のプレートを取扱うことを考慮して静置時間を室温 15 分間とした。

2. 中和抗体測定の術式

マイクロプレートに稀釈液を 1 滴ずつ分注し、次いで被検血清をループで取って 2 倍から始まる 2 倍階段稀釈列を 2 例作る。これに細胞シートを 4 日目で完全に脱落させる最少量の 2 倍濃いウイルス液を 1 滴ずつ加えて vibrator で良く混和し、37°C、CO₂ 孵卵器で 2 時間中和する。次に 4×10^5 /ml の細胞液を 1 滴ずつ滴下して軽く混和し、室温で 15 分間静置した後 CMC 重層液を 0.075ml ずつ重層する。

各プレートには正常血清にウイルス液を加えたウイルス対照とウイルス液の代りに稀釈液を加えた細胞対照をおく。また、使用ウイルスの感染価と既知抗血清の抗体価を測定して再現性を検討する。

プレートを 37°C、CO₂ 孵卵器で 4～5 日間培養した後、倒立顕微鏡でウイルス対照における cpe の発現を確認してから型のごとく固定と染色を行なう。

抗体価の判定：細胞対照群のシートが完全に形成され、同時にウイルス対照群シートが $\frac{3}{4}$ (卅) 以上脱落したプレートについて判定を行なう。

中和群の同一血清稀釈の 2 カップのシートが共に半分以上 (< 卅) 生残する血清稀釈倍数の逆数を抗体価とした。

3. 中和抗体測定のための条件の検討

a. ウイルス濃度と抗体価：

第 3 図は JaGAR-01 株と抗 JaGAR-01 家兎血清 ($1/100$ 稀釈) を用いて Boxtitration を行なった成績である。ウイルス対照群において、 $10^{-3.5}$ 稀釈が標準ウイルス濃度であつて、この場合の中和抗体価は 400 倍 (4×100) と判定される。また、ウイルス液を $10^{-0.5}$ 稀釈すると

図 3 JaGAR-01 株と抗 JaGAR-01 家兎血清による Box titration

表 1 50% ブラック減少法とマイクロタイター法による根岸株の中和抗体価の比較測定

抗根岸モルモット血清	50% ブラック減少法 PFU/(%)	マイクロタイター法				
		卅	卅	卅	+	(%)***
血 清 稀 釈	40	0	0	0	0	8
	80	0	0	0	1	7
	160	0.7*	0.7	0	0	1
	320	1	1.0	0	0	2
	640	7	7.3	0	2	4
	1,280	14.7	15.2	4	2	0
対 照	2,540	35.3	36.6	2	2	0
	5,120	76.0	68.8			
対 照	110.4**100.0	7	1	0	0	0
抗体価	2,540				320	
比 率	8				1	

* シャーレ 3 枚の平均。 ** シャーレ 10 枚の平均。

*** 卅以上の CPE を示すカップのパーセント。

に抗体価はほぼ 2 倍ずつ上昇する。このため、中和ウイルスに濃淡のあつた場合、抗体価測定と同時に感染価の測定成績をもとにして標準ウイルス濃度を用いた場合の恒常抗体価を求めることができる。しかし、ウイルス濃度が薄くウイルス対照のシートの脱落が半分以下 (< 卅) の場合、判定はできない。

b. 50% ブラック減少法とマイクロタイター法による中和抗体価の比較：

i. 第 1 表は根岸株と抗根岸モルモット血清を試験管内で混合して 37°C、2 時間中和した後、ウイルス—抗血

清混合液を PS 細胞のシャーレとマイクロプレートに分けて接種し、同一サンプルの抗体価の同時測定を試みた成績である。

plaque assay のための PS 細胞の平板培養は $3.5 \times 10^5/\text{ml}$ の細胞液を 7 cm シャーレに 8 ml ずつ分注して 37°C で 3 日間培養して用いた。培養シャーレにはウイルス液を 0.4 ml ずつ接種して 37°C 、90 分間吸着後、形のごとく寒天重層液を重層した。寒天重層液は Eagle 液に犢血清を 5% と Bact agar を 1% 加えて作った。ブラック法では血清希釈当り 3 枚のシャーレを、またマイクロタイター法では 8 コのカップを使用し、50% に最も近い血清希釈倍数を抗体価とした。

マイクロタイター法による抗体価はブラック法の $1/8$ 倍であつた。

マイクロタイター法を用いて大ブラック型である JaGAR-01 株や根岸株の感染価を測定した場合、図 1 でみられるごとく、中和の陽性限界であるシートの半分の脱落に要するウイルス量は中和ウイルス量〔細胞シートを完全に変性脱落させる最少ウイルス量 (冊)〕の $1/10$ 倍である。すなわち、本法の判定基準は 90% ブラック減少法に相当することになる。したがって、両法における抗体価の差は中和術式の相違のみならず判定基準の相違からも由来するものと考えられる。

ii. 第 2 表は供試した 5 株のウイルスに対する抗血清の抗体価を PS-50% ブラック減少法とマイクロタイター法で比較測定した成績である。

日脳とダニ脳炎の各株は寒天重層液のもとで clear plaque を形成するがアポイ株は hazy pin point plaque を示し、カウントが難しい。しかし、CMC 重層液を使用した場合 clear plaque を形成して平板効果も上昇する。このため、アポイ株については CMC 重層液を用いて plaque assay を行なつた。

両法における中和抗体価の差は大ブラック型の JaGAR-01 株や根岸株に比べて小ブラック型の Langat 株やアポイ株においてやや大きくなる傾向がある。

ブラック減少法ではブラック数のみを数え、ブラックサイズは必要でない。しかし、マイクロタイター法のごとく、一定面積の細胞シートの完全脱落に要するウイルス量は小ブラック型よりも大ブラック型ウイルスの方がより多い。すなわち、小ブラック型では大ブラック型より濃いウイルスを中和に使用するために、抗体価が低目に判定され易いと考えられる。

考 察

PS 細胞が B 群アルボウイルスに幅広い感受性を有することは Westaway (1966)¹⁵⁾ や De Madrid ら¹¹⁾ (1969) によつて報告されている。供試した 5 株の B 群アルボウイルスについて PS, Vero および鶏胎児細胞 (CE) に対する感受性を比較したわれわれの実験でも、日脳の 2 株はいずれの細胞でもブラックを示したが、ダニ脳炎の 2 株は PS と CE で、またアポイウイルスは PS でのみブラックを形成した。このように PS 細胞を用いることによつて同一条件下で B 群アルボウイルスの感染価や中和抗体価の比較測定が可能である。

これまで、Schulze and Schlesinger (1963)¹⁶⁾¹⁷⁾ は methyl cellulose (MC) 重層液を用いて各種 B 群アルボウイルスのブラック形成を行なうと共に、寒天インヒター感受性株のブラックの形成できることを報告している。

MC や CMC 液は高圧滅菌に耐え、またこれらの重層液は常温で重層でき、しかも凍結保存も可能なために寒天重層液よりはるかに取扱易いものである。

細胞は CMC 重層液下で良く増殖し、液体培養と同様のシートを形成する。また寒天重層液に較べて細胞の維持日数も長く、寒天重層液よりも大型の clear plaque を形成する。しかし、CMC 重層液は半流動培地なために、重層液を棄てなければ細胞シートの観察が難しい。また、重層液を棄てる際のウイルスの汚染を避けるためにウイルスの不活化が必要である。Zenker 液はフォルマリンやアルコール可溶性の材質のプレートを変質させ

表 2 50% ブラック減少法とマイクロタイター法による B 群アルボウイルスの中和抗体価の比較

ウ イ ル ス	家兎免疫血清	中 和 抗 体 価		比 率 マイク／プラ ロ法／ック法	ブラック* サイズ (mm)
		50% ブラック減少法	マイクロタイター法		
JaGAR-01 株	抗-JaGAR-01	8,000	800	1/10	1.5~2.5
中 山 株	抗-中 山	2,000	160	1/12.5	1.0~2.0
根 岸 株	抗-根 岸	1,600	128~160	1/10~1/12.5	1.5~3.0
Langat 株	抗-Langat	1,600	64~128	1/12.5~1/25	1.0~1.5
ア ポ イ 株	抗-ア ポ イ	1,600**	64~128	1/12.5~1/25	0.5~1.0

* マイクロタイター法による (4 日目判定)。

** CMC 重層液を使用

ることなく細胞を固定すると同時に醋酸と昇汞によつて短時間でウイルスを不活化する。

CO₂ 孵卵器の代りに、プレートプラスチックテープでシールして高温の普通孵卵器に収めて培養しても良い成績が得られる。しかし、今後は通気性でも細胞維持に優れた Leibovitz L-15 液¹⁸⁾ などを加えた重層液を用いる必要があろうと考えられる。

本法による中和試験は前もつて細胞シートの形成や培養液の交換を要しないために著しく簡便である。しかし、実験中プレートを大気に暴露する時間が長いために慎重な無菌操作を必要とする。

附 記

本報は第6回(1970)日本ウイルス学会北海道支会で報告した。

終わりに、ウイルスを分与された予研大谷明博士とPS細胞を分与された京大ウイルス研井上幸重博士に厚く感謝致します。

文 献

- 1) Sever, J. L.: Application of a microtechnique to viral serological investigations. *J. Immunol.*, 88, 320-329, 1962.
- 2) Rosenbaum, M. J., Phillips, I. A., Sullivan, E. J., Edwards, E. A. & Miller, L. F.: A simple method for virus-tissue culture procedures in microtitration plates. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 113, 224-229, 1963.
- 3) Schmidt, N. J., Lennette, E. H. & Hanahoe, M. F.: A micro method for performing parainfluenza virus neutralization tests. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 122, 1062-1067, 1966.
- 4) Schmidt, N. J., Lennette, E. H. & Hanahoe, M. F.: Microneutralization test for the reoviruses. Application to detection and assay of antibodies in sera of laboratory animals. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 122, 1268-1275, 1966.
- 5) Smith, C. B., Canchola, J & Chanock, R. M.: A micromethod for assay of neutralizing antibodies against parainfluenza virus type 1 and 3. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 124, 4-7, 1967.
- 6) Pauls, F. P. & Dowdle, W. R.: A serologic study of herpesvirus hominis strains by microneutralization tests. *J. Immunol.*, 98, 941-947, 1967.
- 7) Sullivan, E. J. & Rosenbaum, M. J.: Methods for preparing tissue culture in disposable microplates and their use in virology.

- Am. J. Epid., 85, 424-437, 1967.
- 8) Kriel, R. L., Wulff, H. & Chin, T. D. Y.: Microneutralization test for determination of rhinovirus and coxsackievirus antibody in human deploid cells. *Appl. Microbiol.*, 17, 611-613, 1969.
- 9) Fuccillo, D. A., Catalano, L. W. Jr., Moder, F. L., Debus, D. A. & Sever, J. L.: Minicultures of mammalian cells in a new plastic plate. *Appl. microbiol.*, 17, 619-622, 1969.
- 10) 松田宗之, 香取幸治, 松浦久美子, 中山喬, 久保田憲太郎: miniculture system を用いたポリオウイルスの血清中和試験に関する研究. *ウイルス*, 20, 312-316, 1970.
- 11) De Madrid, A. T. & Porterfield, J. S.: A simple micro-culture method for the study of group B arboviruses. *Bull. WHO.*, 40, 113-121, 1969.
- 12) Inoue, Y. K. & Ogura, R.: Studies on Japanese B encephalitis virus. III. Propagation and assay of Japanese B encephalitis virus in a stable line of porcine kidney cells. *Virology*, 16, 205-207, 1962.
- 13) Salim, A. R.: Neutralization of a phlebotomus (sandfly) fever virus in boby hamster kidney (BHK 21) tissue culture. Introduction of a simple microculture for plaque reduction tests. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 61, 259-264, 1967.
- 14) Reed, L. J. & Muench, H.: A simple method of estimating 50 per cent endpoints. *Am. J. Hyg.*, 27, 493-497, 1938.
- 15) Westaway, E. G.: Assessment and application of a cell line from pig kidney for plaque assay and neutralization tests with twelve group B arboviruses. *Am. J. Epid.*, 84, 439-456, 1966.
- 16) Schulze, I. T. & Schlesinger, R. W.: Plaque assay of dengue and other group B arthropod-borne viruses under methyl cellulose overlay media. *Virology*, 19, 40-48, 1963.
- 17) Schulze, I. T. & Schlesinger, R. W.: Inhibition of infectious and hemagglutinating properties of type 2 dengue virus by aqueous agar extracts. *Virology*, 19, 49-57, 1963.
- 18) Leibovitz, A.: The growth and maintenance of tissue-cell cultures in free gas exchange with the atmosphere. *Am. J. Hyg.*, 78, 173-180, 1963.