赤血球凝集 (HA) ならびに同抑制 (HI) 試験 に用いる赤血球の新しい固定法

元 田 昭 策^{*,**} 佐 藤 征 也^{*,**} 岩 瀬 勇 雄^{*}
落 合 宏^{**} 庭 山 清 八 郎^{**}

^{*}東芝生物理化学研究所¹⁾

^{**}富山医科薬科大学医学部ウイルス学教室²⁾

(1981年2月12日: 受付)

赤血球をホルマリン^{1,2)}あるいはグルタルアルデヒド³⁾で処理すると長期保存が可能な赤血球が得られるが、一般に赤血球をアルデヒドで処理すると赤血球が茶褐色となりウイルスの HI 試験に用いたとき新鮮赤血球とくらべ結果判定がしにくいなどの欠点があった。Ito ら⁴⁾は、1日齢ひな赤血球にあらかじめ CO ガスを吹きこんで CO ヘモグロビンとしたのちホルマリンで処理する、赤血球が変色しない固定法を報告した。われわれは、このたび低濃度のグルタルアルデヒドで赤血球を処理すると変色することなく固定安定化できることを見出し、この方法を1日齢ひな(以下単にひな)ならびにミドリザル赤血球を用いる風疹、インフルエンザ、ムンプスならびに麻疹ウイルスの HA ならびに HI 試験に応用し、新鮮赤血球と比較検討した。

ひなならびにミドリザル赤血球は0.01M 磷酸緩衝食塩水 (PBS) pH 7.2で3回洗滌したのち、PBS で2%に浮遊した。この2%赤血球浮遊液に PBS で0.03%に希釈したグルタルアルデヒドを等量加え、25°C で時々かくはんしながら60分間反応させ赤血球を固定した。固

定赤血球は3%サッカロース水溶液で5回洗浄してグルタルアルデヒドを完全に除いたのち、10%サッカロース水溶液に20%になるように浮遊し、パイアルに0.5ml ずつ分注して凍結乾燥を行い4°C に保存した。使用時、精製水1mlを加えて再浮遊(10%)し、目的ウイルスに応じた希釈液で所定の濃度(風疹0.25%, 他のウイルス0.5%)に希釈した。被検血清中に存在する自然凝集素吸収には10%赤血球浮遊液を使用した。

固定赤血球用希釈液は風疹ウイルスには CaCl₂ 0.04%, MgCl₂·6H₂O 0.02%, ゼラチン0.005%, 牛血清アルブミン (BSA) 0.1%を加えた0.025M HEPES(N-2-hydroxyethyl piperazine-N'-2'-ethanesulfonic acid)緩衝食塩水 pH 6.2~6.4, インフルエンザならびにムンプスウイルスには BSA 0.05%を加えた0.005M PBS pH 7.2~7.4を使用した。また、麻疹ウイルスには0.005M ペロナール緩衝食塩水 pH 7.0~7.2を用いた以外は風疹ウイルスの場合と同じ組成の希釈液を使用した。新鮮赤血球用希釈液は風疹ウイルスには Ca²⁺, Mg²⁺, ゼラチンおよび BSA 加ペロナール緩衝食塩水⁵⁾, 麻疹ウイルスにはゼラチンおよび BSA 加 PBS⁶⁾, インフルエンザならびにムンプスウイルスには0.005M PBS pH 7.2~7.4をそれぞれ使用した。

風疹、インフルエンザ、ムンプスならびに麻疹ウイルス HA 抗原は市販品(東芝化学)を使用した。

血清の前処理は風疹ならびに麻疹ウイルスはカオリン法⁷⁾, インフルエンザならびにムンプスウイルスは RDE 法⁸⁾で行った。

HA ならびに HI 試験はマイクロタイター法で行ない、プレートは固定赤血球にはV型、新鮮赤血球にはU

A new method to stabilize erythrocytes for hemagglutination and hemagglutination inhibition test, by Shosaku MOTODA^{*,**}, Seiya SATO^{*,**}, Isao IWASE^{*}, Hiroshi OCHIAI^{**} and Seihachiro NIWAYAMA^{**}

^{*} Toshiba Institute of Biological Science Gosen-shi, Niigata, Japan

^{**} Department of Virology, Faculty of Medicine, Toyama Medica and Pharmaceutical University Sugitani, Toyama, Japan

1) 〒959-16 新潟県五泉市南本町1丁目2番2号

2) 〒930-01 富山市杉谷 2630

図1 固定ひな赤血球と新鮮ひな赤血球によるヒト血清での風疹ウイルス HI 価の比較
○の中の数字は検体数を示す

図2 固定ミドリザル赤血球と新鮮ミドリザル赤血球によるヒト血清での麻疹ウイルス HI 価の比較
○の中の数字は検体数を示す

型 (いずれもリジットタイプ, Cooke 社) をそれぞれ使用した。

固定ひな赤血球による風疹ウイルスの HA 反応は新鮮ひな赤血球と比較して同等か若干弱かった。インフルエンザならびにムンプスウイルスの HA 反応は新鮮ニ

ワトリ赤血球と比較して同等であった。また、固定ミドリザル赤血球による麻疹ウイルスの HA 反応は新鮮ミドリザル赤血球と比較して 1 管弱かった。ヒト血清を用いて固定赤血球と新鮮赤血球による風疹および麻疹ウイルスの HI 試験を行ったところ、図 1、図 2 に示すごとく固定赤血球による HI 価は新鮮赤血球による HI 価と 1 管以内の差で一致した。なお、インフルエンザおよびムンプスウイルスについても同様な結果が得られた。凍結乾燥した固定赤血球は 4°C に 8 箇月以上保存しても HA 抗原に対する被凝集性、色調などにほとんど変化が認められずきわめて安定であることが確かめられた。

ひなおよびミドリザル赤血球を変色させることなく固定する方法を検討したところ、CO ガスを使用しなくても低濃度のグルタルアルデヒドを赤血球に作用させることによって簡単に目的を達成することができた。しかし、ホルマリン、グリオキザル、メチルグリオキザル等による固定では赤血球は変色し、しかも固定には 2% 以上の濃度が必要であった。このようにグルタルアルデヒドは低濃度で赤血球を固定安定化できるため被凝集性の低下や非特異的凝集反応も少なく、優れた固定試薬として広く利用できると思われる。また、風疹をはじめとする多くのウイルス HA 抗原に対して被凝集性を有するひな赤血球ならびに貴重なミドリザル赤血球を固定して凍結乾燥を行い、ウイルスの血清診断に用いることは有用と思われる。

文 献

- 1) Flick, J. A.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **68**, 448 (1948).
- 2) 山地幸雄, 高橋昌巳, 宮永嘉隆, 留目優子, 木村義民: 日細菌誌, **22**, 260 (1967).
- 3) 元田昭策, 三瓶恒雄, 岩瀬勇雄: 医学のあゆみ, **103**, 574 (1977).
- 4) Ito, H. and Iwasa, S.: J. Clin. Microbiol., **4**, 188 (1976).
- 5) 国立予防衛生研究所: マイクロタイター法による風疹 HI 試験の術式指針, (1970).
- 6) 山内一也: 麻疹ウイルス, 微生物検査必携ウイルス・リケッチア検査, 388, 日本公衆衛生協会 (1978).
- 7) Rosen, L.: Am. J. Hyg., **71**, 120 (1960).
- 8) 厚生省編: 衛生検査指針, **1**, 7 (1957).