技術報告

ルベラ抗体 RIA キットの基礎的検討†

金森勇雄, 松尾定雄, 木村得次, 市川秀男, 樋口ちづ子,

中野 哲*, 綿引 元*, 武田 功*

大垣市民病院特殊放射線センター *同病院第二内科

503 大垣市南瀬町4-86

1982年9月9日 受理

Key Words: rubella-antibody, immunoglobulin G anti rubella, immunoglobulin M anti rubella, radioimmunoassay, hemagglutination inhibition method

1. はじめに

わが国における風疹の大流行は1975~77年のみでも患者数は200万人にものぼり, 先天性風疹症候群は39例であり, 1981年現在, 風疹ワクチンの接種実績は40万人に至っている¹⁾。

風疹ウイルスの血清学的検査は, 小児の発疹性疾患の鑑別, 妊婦および妊娠予定者の免疫保有状況の察知に主として用いられる。とくに妊娠初期の妊婦が風疹ウイルスの初感染を受けた場合, 先天性風疹症候群児出生の可能性があり, 人工妊娠中絶の決定も考慮する必要があるなど, 血清学的検査はなくてはならない検査法である^{2)~4)}。この血清学的検査法には補体結合試験, 中和試験のほか, 1967年に Stewart により報告され, 現在最も広く繁用されている赤血球凝集抑制試験(HI試験)がある。

今回われわれは HI 試験について, 今回開発されたヒト IgG 風疹ウイルス抗体測定用ラジオイムノアッセイ(RIA)キットを入手する機会を得, その基礎的検討を行ったので報告する。

2. 対象および方法

2.1 対象

大垣市民病院に来院した患者血清302例(男性44例, 女性258例)を対象とした。なお, 採血は肘静脈にて行い, 可及的速やかに血清を分離し-20°Cで保存, 測定

Fig. 1 RIA kit of assay procedure for rubella antibody.

時に室温に戻し, 三重測定にて測定した。

2.2 方法

試験管固相法であり, Fig. 1に示すごとく, アッセイ用緩衝液200 μlをまず試験管に入れ, 標準血清と陰, 陽性コントロール血清, または被検血清をおのおの10 μlずつ試験管に添加する。軽く混合し, 室温で60分インキュベーション後に内容物を吸引除去し, アッセイ用緩衝液を500 μl添加後振盪し, 内容物を吸引除去後に¹²⁵I-標識 protein A トレーサ 200 μlを添加する。

† Fundamental Studies of RIA Kit for Anti Rubella. Isao KANAMORI, Sadao MATSUO, Tokuji KIMURA, Hideo ICHIKAWA, Chizuko HIGUCHI, Satoshi NAKANO*, Hajime WATAHIKI* and Isao TAKEDA*: Dept. of Radionuclear Medicine, *Second Dept. of Internal Medicine, Ohgaki Municipal Hospital, 4-86, Minaminokawa-machi, Ohgaki-shi 503.

ついで、インキュベーションを37°Cで90分実施し、試験管内容物を吸引除去し、アッセイ用緩衝液で洗浄、再度試験管内容物を吸引除去し、オートウエルカウンタで試験管の放射能を測定する。

計算は $\bar{x}$ (cpm sample) / $\bar{x}$ (cpm reference) × 100 で結合比を求め、negative, low positive, mid. positive, high positive の4段階の半定量を行う。

2.3 検討方法

2.3.1 インキュベーション時間の検討

第1回インキュベーション温度は24°C、第2回インキュベーション温度は37°Cと一定に保ち、第1回インキュベーション時間の検討では第2回インキュベーション時間を90分と一定にし、インキュベーション設定時間を10, 30, 60, 90分, 2, 3, 4, 5, 24時間と変化させた。また第2回インキュベーション時間の検討では第1回インキュベーション時間を3時間と一定にし、インキュベーション設定時間を30分, 90分, 3時間, 4時間, 24時間と変化させ、各設定時間が結合率(B/T %)に及ぼす影響について検討した。

2.3.2 インキュベーション温度の検討

第1回および第2回インキュベーション時間ともに3時間と一定に保ち、第1回インキュベーション温度の検討では設定温度を4°C, 24°C, 37°Cと変化させ、第2回インキュベーション温度の検討では4°C, 24°C, 37°C, 45°Cと変化させ、各設定温度が B/T (%)に及ぼす影響について検討した。

2.3.3 同時再現性

ルベラ抗体濃度の異なる試料血清A, Bについて15回測定にて検討した。

2.3.4 日差再現性

4つの異なるロット番号のキットを使用し、測定日を変えての6回測定で、ルベラ抗体濃度の異なる試料血清C, Dにて検討した。

2.3.5 希釈試験

検体血清を緩衝液とルベラ抗体0濃度血清にて2, 4, 8, 16, 32倍の希釈倍率にて希釈測定した。

2.3.6 HI法と本法との相関

検体血清302例について、本法とHI法との相関について比較検討した。

3. 結 果

3.1 インキュベーション時間

(1) 第1回インキュベーション時間

設定時間10~30分の間での B/T (%)は急激に上昇

Fig. 2 Incubation time.

する検体が大半であり、1~5時間の間ではほぼ安定したプラトー状態を示す。しかし、設定時間24時間ではプラトー状態より B/T (%)はわずかに減少している。

(2) 第2回インキュベーション時間

Negative controlに近いルベラ抗体濃度検体の B/T (%)は設定時間の影響をほとんど受けない。しかし、ルベラ抗体中、高濃度検体では設定時間の延長に伴い、 B/T (%)が上昇する傾向が認められる。また、90分~4時間の間では、その傾向が最も緩やかであり安定状態であることを示している (Fig. 2)。

3.2 インキュベーション温度

(1) 第1回インキュベーション温度

ルベラ抗体高濃度検体の B/T (%)は設定時間の影響をほとんど受けない。しかし、ルベラ抗体低、中濃度検体では設定温度の上昇に伴い、 B/T (%)が上昇する傾向が認められる。

(2) 第2回インキュベーション温度

Negative controlに近いルベラ抗体濃度の検体を除き他の検体では、設定温度の上昇に伴い B/T (%)が上昇する傾向が認められる (Fig. 3)。

3.3 同時再現性

Table 1 に示すごとく、試料A, Bの同時再現性の変動係数(C.V.)はおおの6.4%, 11.1%であった。また、試料Aは15回測定とも測定結果の判定は陰性であったが、ルベラ抗体濃度が低、中濃度の限界にある試料Bでは15回測定のうち、測定結果の判定が3回はmid. positiveに、12回はlow positiveの判定であった。

3.4 日差再現性

Table 2 に示すごとく、試料C, Dの日差再現性のC.V.はおおの30.5%, 20.5%であった。しかし、両検体とも測定結果の判定には変化はなかった。

Fig. 3 Incubation temperature.

Table 1 Intraassay variance

Tube No.	Sample A		Sample B	
	Ratio	Judgement	Ratio	Judgement
1.	8.0	Negative	75.7	Low positive
2.	10.8	Negative	81.0	Mid. positive
3.	11.1	Negative	80.6	Mid. positive
4.	9.8	Negative	71.5	Low positive
5.	8.9	Negative	74.1	Low positive
6.	10.8	Negative	65.8	Low positive
7.	11.0	Negative	76.3	Low positive
8.	9.8	Negative	73.8	Low positive
9.	10.6	Negative	72.9	Low positive
10.	8.1	Negative	67.8	Low positive
11.	11.0	Negative	82.1	Mid. positive
12.	10.6	Negative	76.3	Low positive
13.	9.3	Negative	72.2	Low positive
14.	9.8	Negative	78.2	Low positive
15.	9.0	Negative	70.1	Low positive
Mean	9.9		74.6	
S. D.	4.8		1.1	
C. V. (%)	6.4		11.1	

Table 2 Interassay variance

Assay day	Sample C		Sample D	
	Ratio	Judgement	Ratio	Judgement
1.	6.3	Negative	52.7	Low positive
2.	11.0	Negative	73.2	Low positive
3.	11.1	Negative	73.6	Low positive
4.	6.4	Negative	44.8	Low positive
5.	5.5	Negative	69.1	Low positive
6.	8.7	Negative	78.7	Low positive
Mean	8.2		65.4	
S. D.	2.5		13.4	
C. V. (%)	30.5		20.5	

3・5 希釈試験

いずれの検体も、緩衝液および血清希釈ともに双曲線を示した。

Fig. 4 Correlation between RIA (binding ratio) and HI methods.

Fig. 5 Correlation between RIA (semiquantitative method) and HI methods.

3・6 RIA と HI 法の相関

(1) RIA (結合比) と HI 法の相関

両者間の相関係数は $r=0.375$ ($p<0.01$, $n=302$), 回帰直線 $y=0.07x+38.4$ であった (Fig. 4)。

(2) RIA(半定量) と HI 法の相関

HI 法陰性, RIA で弱陽性を示した検体は 10.2% (9/88) 認められた。しかし, RIA 陰性で HI 法陽性の検体は, HI 法の抗体価が 16 倍では 33.3% (9/27), 32 倍で 6.7% (3/45), 64 倍で 10.4% (5/48), 128 倍で 10% (4/40), 256 倍では 3.7% (1/27) 認められた。また, HI 法での抗体価が 512 倍と 1024 倍の検体では, RIA の半定量判定との相関で, 陰陽判定にて判定の異なった検体は認めなかった。

4. 考 案

風疹ウイルス抗体の測定は赤血球凝集抑制試験 (HI 試験) により急性発疹症の診断, 女性風疹に対する免疫の有無の判定, 妊婦が風疹患者に接触したとき, 風疹ワクチンの効果の判定, 先天異常時の診断に IgM 抗体, IgG 抗体が測定されてきている⁴⁾。これに伴い, わが国でもワクチンの開発がなされ, 先天性風疹

症候群の発生を防止する目的に中学女子生徒を対象として広く実施されている¹⁾。

この風疹ウイルス抗体測定をより感度よく測定しようとの試みは, RIA にてもなされようとしている。われわれも IgG-ルベラ RIA キットを入手し基礎的検討を行った。

本法はバウンドとフリーを測定用試験管で行うことができる試験管固相法であり, 被検血清も HI 法の 0.2 ml に比し 1/20 の 0.01 ml で測定できる。反面, HI 法は IgM を 2-メルカプトエタノール (2ME) で処理し, 不活化することにより風疹ウイルスの初期感染の推定が可能である特徴を有する²⁾。しかし, 風疹の潜伏期は 14~21 日と長く, HI 抗体価は発疹出現後急速に上昇し, 7~10 日でピークに達するが, このときすでに IgG 抗体の力価が IgM 抗体の力価を越えていることから, 2ME 処理は診断的価値がないという報告もある³⁾。今回われわれが検討したルベラ抗体 RIA キットは IgG のみを測定するキットである。

RIA キットの基礎的検討の第一歩であるインキュベーション条件のうち, インキュベーション時間の検討で第 1 回インキュベーションは 1~5 時間の間でプラトー状態を示すことから時間的余裕を持って測定作業ができる。しかし, 第 2 回インキュベーション時間は, ルベラ抗体中, 高濃度検体で設定時間の延長に伴い, $B/T(\%)$ が上昇する傾向が認められることから, 操作手順を常に一定にしてある程度一定のインキュベーション時間を守る必要があると考える。

また, インキュベーション温度の検討で, 第 1 回, 第 2 回インキュベーションともに設定温度の上昇に伴い $B/T(\%)$ は上昇する傾向を示すことから, 室温でのインキュベーションではなく保温器でのインキュベーション条件が好ましいと考える。

同時再現性は非常に良好であるが, 日差再現性ではキット間での結合比がある程度異なることから, 半定量法において, 判定境界に接する検体の判定には慎重を期する必要がある。

希釈曲線はいずれの検体でも双曲線を示すが, 10 倍以上の希釈であれば, ある程度の希釈効果が認められることから, 半定量的判定法のみへの適用ならば, 希釈測定もある程度の範囲で可能であると考ええる。

本法 (半定量法) と HI 法との相関の検討で, HI 法陰性, RIA 弱陽性が 10.2% 認められることから, わずかながら RIA は HI 法に比し感度が優れていると考えられる。

しかし, RIA 陰性で HI 法陽性の検体が HI 法の抗体価 16 倍で 33.3%, 32 倍で 6.7%, 64 倍で 10.4%, 128 倍で 10% で 187 例中 22 例に認められた。この 22 例の大半はベア血清測定での初期血清であり, HI 法で 2 回目採血の血清抗体価に 4 倍以上の上昇³⁾が認められることから風疹と診断されている。初期血清は IgM の検出であると考えられ, HI 法で陽性, RIA では陰性になったのではないかと考える。RIA でも IgG 抗体のみでなく, IgM 抗体の測定も可能なキットの開発が強く望まれる。

5. 結 び

今回われわれは, ヒト IgG 風疹ウイルス抗体測定用 RIA キットの基礎的検討を行いつぎの結論を得た。

(1) インキュベーション条件

第 1 回インキュベーション; 1~5 時間, 室温。

第 2 回インキュベーション; 90 分~4 時間, 37°C。

この条件で両者とも良好なる測定値が得られる。

(2) 同時再現性の変動係数は 6.4~11.4% であった。

(3) 日差再現性の変動係数は 20.5~30.5% であった。

(4) 希釈曲線は双曲線を示した。

(5) RIA (結合比) と HI 法の相関

両者間の相関係数は $r=0.375$ ($p<0.01, n=302$), 回帰直線 $y=0.07x+38.4$ であった。

(6) RIA (半定量) と HI 法の相関

HI 法で陰性, RIA で陽性を示した検体は 10.2% (9/88) 認められた。また, RIA 陰性, HI 法で陽性の検体は 11.8% (22/187) 認められた。

以上のごとく, 本法による IgG 風疹ウイルス抗体の測定は, HI 法とともにルーチンワークとして十分応用でき得る測定法であると考ええる。

最後にキットを提供していただいた日本トラペノール社に深謝します。

文 献

- 1) 出口雅経, 他: 日本医事新報, **3029**, 31~34 (1982)
- 2) 梶岡実雄, 他: 衛生検査, **25**, 1366~69 (1967)
- 3) 井上栄: *Medical Technology*, **5**, 201~05 (1976)
- 4) 植田浩司, 吉川ひろみ: 臨床検査, **19**, 1269~73 (1975)