

ELISA 法によるイヌパルボウイルス抗体の検出

石渡 陽子*・桐沢 力雄*
小沼 操*・川上 善三*

Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Detection of Antibody to Canine Parvovirus

Yoko ISHIWATA*, Rikio KIRISAWA*, Misao ONUMA*
and Yoshimi KAWAKAMI*

(May, 1986)

緒 論

イヌパルボウイルス (CPV) は 1970 年 Binn ら⁴⁾ により健康なイヌの糞便から分離されたが、病原性は不明であった。1978 年に至り Appel ら¹⁾ によりイヌに出血性下痢や嘔吐をおこすことが報告されて以来、世界各国でその病原性が確認された。わが国でも 1979 年 Azetaka ら²⁾ をはじめとし相次いで CPV の感染が報告されその実態が明らかにされた^{3), 8)}。ところが血清学的診断については主として、血球凝集抑制 (HI) 反応によって抗体の検出が試みられているが¹⁾、イヌ血清は非特異反応が高く、低い価の抗体を検出するのに不適な場合が多い。北嶋ら⁷⁾ はブラック法を用いた中和試験で抗体価を測定した結果、中和試験は HI 反応に比べ感度良く抗体を検出できることを報告している。しかし、ブラック法を用いた中和試験は手技の繁雑さや迅速性という点で問題点があった。そこで、近年、多くの感染症の診断に用いられている酵素抗体 (ELISA) 法を CPV 抗体の検出に応用し、その有用性を HI 反応と比較検討し以下の成績を得た。

材料および方法

1. 抗 原

CPV は下痢をおこしたイヌの糞便から北嶋ら⁷⁾ が分離した RCP-8 株をネコ肺株化細胞 (FLF-3) を用いて増殖させ、水越ら⁹⁾ の方法に従って精製した。CPV 培養上清を 2,500 rpm

* 獣医学科, 家畜微生物学教室
Department of Veterinary Medicine (Veterinary Microbiology), Rakuno Gakuen University,
Ebetsu, Hokkaido 069, Japan

15分遠心して細胞成分を除去した。その上清を30,000 rpm 2時間遠心し、沈渣を0.01 M-TEN 緩衝液 (0.01 M-Tris, 0.001 M-EDTA, 0.1 M-NaCl, pH 7.2) で4°C 24時間スターーで搅拌浮遊させた。再び30,000 rpm 2時間遠心し、沈渣を同様の方法でTEN 緩衝液に再浮遊させ、さらに10,000 rpm 5分遠心し、上清をウイルス液とした。

2. 検査血清

血清は酪農大学家畜病院の患畜および札幌市野犬抑留場のイヌ118例より得た。また被検血清の一部は北海道大学獣医学部家畜病院戸尾祺明彦教授より分与された。血清は56°C 30分非働化し試験に用いた。

3. HI 反応

V型マイクロプレートを用いてCarmichaelら⁵⁾およびAzetakaら²⁾の方法に従った。すなわち、非働化した被検血清1容にpH 7.0のPBS 3容、25%カオリン4容を加え室温2時間放置後、遠心し、上清を分離した。この上清にさらに10%豚血球1容を加え4°Cに一夜放置し、遠心上清を検査血清として用いた。抗原は4単位にし、グルタルアルデヒド固定1%豚血球を用い反応は4°Cで行った。

4. ELISA 法

Fiscusら⁶⁾の方法に従った。ポリビニールプレートに0.05 M-TEN 緩衝液 (0.05 M-Tris, 0.001 M-EDTA, 0.15 M-NaCl, pH 7.2) で希釈したCPV濃縮精製ウイルス50 μ l (5 μ g/ml) 加え、37°Cに18時間おいて吸着させた。次にプレートの抗原非吸着部位を除去するため、2%ウシ血清アルブミン (BSA) 加0.05 M-TEN 緩衝液を50 μ l加え、37°C 1時間放置した。これに0.05 M-TEN 緩衝液で10倍希釈した非働化イヌ血清を50 μ l加え、37°C 1時間抗原と抗体とを反応させた。次に、ペルオキシンダーゼ標識抗イヌIgG (Cappel社) を2% BSA 加0.05 M-TEN 緩衝液で2,000倍に希釈したものを50 μ l加え、37°C 1時間反応させた。各反応ごとに0.05% Tween 20加0.15 M-NaCl溶液200 μ lで5回洗浄した。最後に、基質として0.05 M-クエン酸・クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0) 10 mlに対し、40 mM-2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid) (ABTS) 50 μ l, 1% H₂O₂ 40 μ lを混合したものを200 μ l加え、室温で反応させ、30分後吸光度 (OD) を405 nmで測定した。

結 果

ELISA法を実施する予備実験としてイヌ血清のプレートへの非特異吸着を調べた。CPV抗原が吸着していないプレートを2% BSA 加0.05 M-TEN 緩衝液で処理し、イヌ血清を加えて37°C 1時間反応させた後洗浄し基質を加え10~60分の後のOD値を測定した。基質を加えてからの反応時間の経過とともにOD値が高くなり、標準偏差も大きくなったので

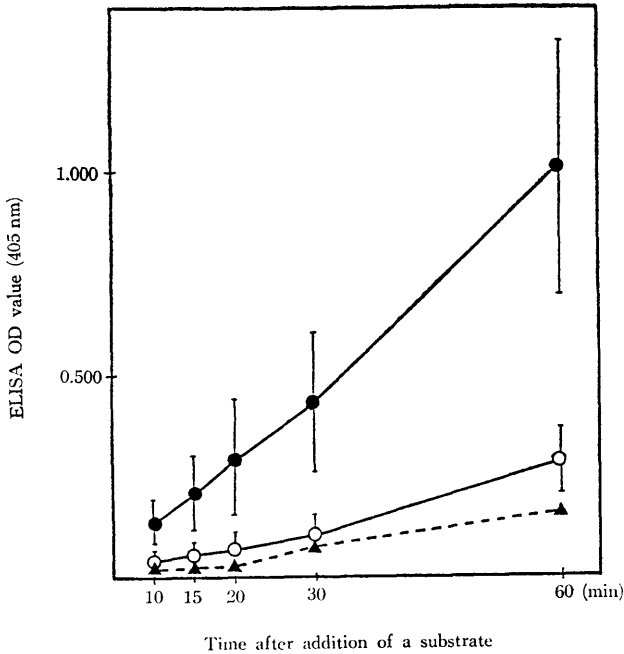


Fig. 1. Nonspecific absorbance of dog and bovine sera to ELISA plate.

Nonspecific absorbance of dog sera which showed OD₄₀₅ value more than 0.2 (●) or less than 0.2 (○) and that of bovine sera (▲) at 30 min incubation times. A vertical line was a range of OD₄₀₅ values.

本試験では基質添加後30分で測定した。検査した118例の血清中、OD値が0.2以上の高いものが44例にみられた (Fig. 1)。これらの血清は溶血したものおよび食餌性混濁を示した血清であった。対照に用いたウシ血清ではほとんど非特異吸着が認められなかった。ELISA法はOD値0.2以下の非特異吸着の少ない74例のイヌ血清について行った。

イヌ血清74例のHI価を基準に1:40以下の9例を陰性とし、1:80~1:160の低い値のもの11例、1:320以上の高い値のもの54例の3つのグループに分け、ELISA法を行い結果をFig. 2に示した。HI反応で抗体が陰性9例のOD値は0.320~0.450であったので、その値の平均に標準偏差の2倍を加えた0.506をELISA法での陽性限界とした。HI価1:320以上の血清すべてがELISA値0.6以上で陽性と判定され、なかにはOD値1.0を超えるものも多数みられた。低いHI価を示すもののOD値は11例中8例が0.506以上を示し陽性と判定された。

考 察

ELISA法は抗原・抗体の検出法・定量法として感度が高く、一度に多量の検体を処理

することができるので広く用いられている。

今回、著者らは濃縮CPVを用いてELISA法を行い、イヌ血清中のCPV抗体検出を試み、HI反応の結果と比較した。

予備試験でイヌ血清中には非特異吸着を示し高いOD値を示す例があること、および時間の経過とともにOD値が上昇する傾向がみられたので、ここでは主として低いOD値を示すものについて、しかも短かい測定時間で反応を試みた。同様のことはFiscusら⁶⁾も指摘し、彼らは測定時間を10～15分としている。

HI反応で高い値を示した血清はもちろん、低いHI価を示すものの中にELISA法で陽性と判定されたものが多かったことから、本反応はHI反応よりさらに感度が高い抗体検出法といえよう。Fiscusら⁶⁾も、CPV-HAタンパクに対するモノクローナル抗体を用いてイヌ血清中のCPV抗体をELISA法で測定し中和抗体価やHI価と比較検討している。それによるとELISA値は両価とよく相関したことからELISA法はCPV抗体検出に有効であると報告している。

血清のみで高いOD値を示した血清について50%飽和硫酸で塩析し γ -グロブリン画分を得、ELISA法を行った(データ示さず)。塩析前後でHI価は1～2管の低下にとどまったのに対し、非特異吸着はいちじるしく低下し、ELISA法で特異CPV抗体検出が可能となった。イヌ血清中の非特異吸着物質の除去の方法についてはさらに検討を要すると思われる。

ELISA法の要点はプレートに吸着させる抗原の精製度であるので、純度の高いものを用いたならば、反応陽性と陰性の差が大きくなりさらに抗体検出感度が高くなると考えられ、今後CPV抗体の簡易測定法としての有用性は高まるであろう。

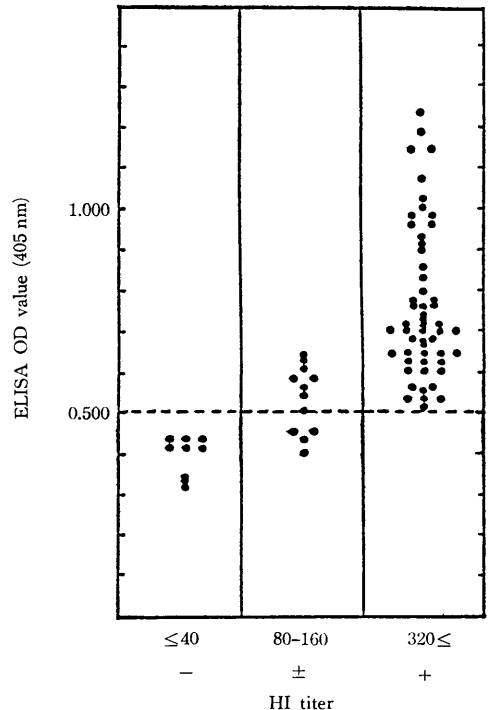


Fig. 2. Comparison of sensitivity for detection of CPV antibodies in dog sera by ELISA and HI test.

要 約

イヌパルボウイルス (CPV) の抗体検出のために酵素抗体 (ELISA) 法を検討した。イヌ血清は血清のみで ELISA 用プレートに吸着し、高い OD 値を示す血清が 44/118 例 (37%) に認められた。非特異吸着の低い 74 例の血清 (OD 値 0.2 以下) について CPV 抗体検出を ELISA 法で行いその結果を HI 価と比較した。CPV HI 価 1:40 以下の 9 例を陰性と考へ、その OD 値の平均に標準偏差の 2 倍を加えた値を ELISA 法の陽性限界としたとき、HI 価 1:320 以上の HI 陽性血清 54 例はすべて ELISA 法で陽性を示した。1:80~1:160 の HI 疑陽性の血清 11 例中 8 例が ELISA 法で陽性であった。このことから ELISA 法は CPV の簡易抗体測定法として、特に低い抗体価を測定するのによい方法であることが明らかになった。

文 献

- 1) Appel, M. J. G., B. J. Cooper, H. Greisen and L. E. Carmichael, 1978. Status report: Canine viral enteritis. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, **173**: 1516-1518.
- 2) Azetaka, M., T. Hirasawa, S. Konishi and M. Ogata, 1981. Studies on canine parvovirus isolation, experimental infection and serologic survey. *Jpn. J. Vet. Sci.*, **43**: 243-255.
- 3) 安食政幸・高松恵三・平松計久・中井正久・佐々木文存・大熊俊一, 1983. わが国で分離されたイヌパルボウイルスの性状と抗体調査. *日獣会誌*, **36**: 68-73.
- 4) Binn, L. N., E. C. Lazer, G. A. Eddy and H. Kajima, 1970. Recovery and characterization of a minute virus of canines. *Infect. Immun.*, **1**: 503-508.
- 5) Carmichael, L. E., J. C. Joubert and R. V. H. Pollock, 1980. Hemagglutination by canine parvovirus: Serologic studies and diagnostic application. *Am. J. Vet. Res.*, **41**: 784-791.
- 6) Fiscus, S. A., M. M. Mildbrand, C. J. Gordon, Y. A. Teramoto and S. Winsten, 1985. Rapid enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies to canine parvovirus. *Am. J. Vet. Res.*, **46**: 859-863.
- 7) 北嶋豊治・比留間俊美・桐沢力雄・小沼 操・川上善三, 1985. 犬の糞中に検出される豚赤血球凝集性物質と犬パルボウイルスとの関係. *北獣会誌*, **29**: 15-19.
- 8) 前出吉光・東原朋子・石橋和樹・見上 彪, 1981. 実験用ネコ飼育室で発生した子イヌのパルボウイルス性腸炎. *日獣会誌*, **34**: 111-115.
- 9) 水越紀子・桐沢力雄・小沼 操・川上善三, 1986. 逆受身赤血球凝集反応を用いた犬パルボウイルスの犬糞便からの検出. *日獣会誌*, **39**: 39-43.

Summary

Application of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibody against canine parvovirus (CPV) in dog sera was investigated on the basis of hemagglutinin inhibition (HI) titers. Forty-four out of 118 dog sera were nonspecifically absorbed to ELISA plate without a coating of CPV antigens and showed high OD₄₀₅ value (more

than 0.2). Therefore, 74 dog sera which showed no nonspecific absorbance (OD_{405} value less than 0.2) were used for ELISA. An OD_{405} value greater than 0.506 (two fold of standard deviation plus the mean value of 9 CPV negative sera which had HI titers below 1:40) was considered positive for ELISA. All of 54 dog sera having HI titers over 1:320, positive for HI test, were positive by ELISA. Eight out of 11 dog sera having HI titers between 1:80 to 1:160, questionable for HI test, also showed positive reaction by ELISA. These results indicated that ELISA was a sensitive and simple technique for detection of CPV antibody in dogs especially for the detection of low antibody titers.