

V 資 料

風疹 HI 抗体検査における 血清処理の微量化についての検討

本田 己喜子¹・香月 隆延¹・宮基 良子¹・梶原 一人¹

当所では、昭和56年より成人女性を対象とした風疹 HI 抗体検査を、厚生省伝染病流行予測調査検査術式（予研法）¹⁾に準じて実施してきたが、昭和61年（1986年）に測定法の一部が変更されたのにもない、本法²⁾⁻⁴⁾に準じたやり方に変更し、当所でも少し改良を施して、試薬等の微量化、検査時間の短縮化、抗原力価の安定化などの改善がみられたので報告する。

1. 予研法の変更された主な点を要約すると、下記の4点になる。

1) 血清のカオリン処理がチューブ法かマイクロプレート法かを選択できるようになり、マイクロ法を選択すると血清が25 μ lあれば検査が可能となった。

2) 希釈用緩衝液のベースがペロナル（バルビタール）カリウム緩衝液（PBS）かを選択できるようになった。

3) 使用するガチョウ血球は、馴化用の血球原液が8～10%血球に、HA・HI用が0.2%から0.25%に変更になった。

4) 希釈用緩衝液は抗原と血清の希釈にのみ用い、血球の希釈にはさらにCa・Mg液を追加した専用の血球用希釈液を用いる。

2. このほかに当所で改良したところは下記の2点である。

1) 試薬類は、使いやすい分量に小瓶またはチューブに小分けして使いきる方式にした。

・抗原は、200 μ lずつ分注して-80 $^{\circ}$ Cに保存⁵⁾。（毎回行う抗原の定量も約80倍で安定している）

・PBS（pH6.8）は100mlをメジウム瓶に分注し、4 $^{\circ}$ Cに保存。

・血球希釈液に用いるCa・Mg液と1%ゼラチンは1mlずつチューブに分注し、4 $^{\circ}$ Cに保存。

・BSA（牛血清アルブミン）は5%にして5mlずつチューブに分注、-20 $^{\circ}$ Cに保存。

2) 使用するガチョウ血球は、馴化の時血球原液を使用していたため当日調整を要し繁雑だったが、8%に変更してからは無菌的に作成すれば1週間は使用できるので、検査当日ではなく事前に作っている。

3. 当所における HI 抗体検査の流れ

・96穴平底マイクロプレート（リジット）を用意する。（蓋付きの組織培養用を使用）

・テープを貼り、検体No.を記入する。再検査を考慮し1検体に2穴ずつ使用している。

・25%カオリン液を100 μ l分注する。

・被検血清を25 μ l分注する。（陽性、陰性コントロールを加える）

・ミキサーでよく混ぜる。（予研法ではシールテープをはり天地逆転してはげしくふることになっている）

・室温に20～30分放置。（時々まぜる）

〔この間に希釈液の調整・抗原の希釈・0.25%血球作成・一次定量を終了しておく〕

・マイクロプレート遠心機とローターで1800rpm5分（予研法では1500rpm5分）遠心する。

・PBS（-）を25 μ l、ドロップパーで各穴に落とす。

・8%ガチョウ血球浮遊液を50 μ l、ドロップパーで各穴に落とす。

・ミキサーでよくまぜる。

・ふたをするかシールテープをして4 $^{\circ}$ C（冷蔵庫）に1時間以上おく。（この間2回ほどミキサーをかける）

・再びマイクロプレート遠心機とローターで1800rpm5分遠心。

・遠心上清を1:8希釈血清として使用している。（一穴で約100 μ l採取できる）

4. 変更された予研法を検討してみて感じたこと

風疹検査を、地研で市民からの依頼検査として行っている所はそれほど多くなく、当所でも一年間の件数は平均400件程度で、一回の検査件数は少ない時は1～2件程度のこともある。にもかかわらず以前は血球処理など含めると一日がかりの検査であった。しかもチューブ法による血清処理の繁雑さと、希釈液にペロナルを使用していたため試薬類が長期保存では不安定となり凝集像

1. 福岡市衛生試験所 微生物課

表1 希釈用緩衝液の新旧比較

	旧 法	新 法
抗原・血清の希釈液のベース	VBS (+) ペロナル緩衝食塩水 CaCl ₂ MgCl ₂ ・6H ₂ O	PBS (pH 6.8) NaCl Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄
血球希釈液	上記と同様	上記に CaCl ₂ MgCl ₂ ・6H ₂ Oを加える (Ca・Mg液としてストック)

表2 血清処理法(カオリン・血球吸着)の比較

	変更前 (チューブ法)	※当所独自 のマイクロ法	変更後 (マイクロ法)	現在の 福岡市衛試法
血清	200μl	25μl	25μl	25μl
PBS (-)	600	75	-	-
25%カオリン	800	100	100	100
室温 20～30分感作				
遠心	3000 rpm 10分	1800 rpm 5分	1500 rpm 3分	1800 rpm 5分
PBS (-)	-	-	25	25
ガチョウ血球滴下	血球原液 2滴	血球原液 1滴	10%血球 50μl	8%血球 50μl
	氷浴 1時間以上	4℃ 1時間以上	4℃ 1時間以上	4℃ 1時間以上
遠心	2500 rpm 10分	1800 rpm 5分	1500 rpm 3分	1800 rpm 5分
使用チューブ等	小試験管	96穴リジットプレート	96穴リジットプレート	96穴リジットプレート
HA/HI 使用血球	0.2%ガチョウ	0.2%ガチョウ	0.25%ガチョウ	0.25%ガチョウ

※独自のマイクロ法で試みたが、血球原液を加えるために血球がきれいに混ざらず、現在の方法に変更した。

が乱れて安定した結果が出なかった。

今回、マイクロ法を採用し若干当所でも改良を加えてみたところ、以前のような凝集像の乱れは皆無になった。しかも微量法のため血清量も少量ですみ、チューブ法に比べて血清処理が1枚のプレート上でまとめるため、半日ほどで終了し時間的ロスも少ない。風疹 HI 抗体検査法は予研法のような確立した方法があるが、詳細は不明なところも多く、当所でも細かい部分については何度も試行錯誤をくりかえし、最終的に安定した結果が得られるようになった。風疹抗体検査に用いる HI 検査は、中和・CF に比べ簡便かつ鋭敏で、再現性もよくきわめてすぐれた方法⁶⁾といわれている。検査を実施するにあたっては、担当者の熟練と検査に対する認識が重要である⁷⁾という意識をもって、今後も検査精度を維持していきたいと思う。

文 献

- 1) 厚生省保健医療局結核難病感染症課感染症対策室：風疹の赤血球凝集抑制 (HI) 試験・伝染病流行予測調査術式, 74～85, 1978
- 2) 厚生省保健医療局結核難病感染症課感染症対策室：風疹の赤血球凝集抑制 (HI) 試験・伝染病流行予測調査術式, 81～94, 1986
- 3) 井上 栄：風疹 HI 試験のための血清カオリン処理のマイクロ化, 臨床とウイルス, 特別号: 80～81, 1976
- 4) 加藤茂孝：風疹 HI 抗体価測定術式, 臨床とウイルス, 19 (2): 127～130, 1991
- 5) 中村陽子, 他：抗原力価の安定な風疹ウイルス抗原 (シオノギ) を用いた風疹ウイルス赤血球凝集抑制 (HI) 抗体価測定の検討, 臨床とウイルス, 12 (3): 317～321, 1984
- 6) 須藤恒久：風疹検査は如何にあるべきか—ウイルス性疾患の血清診断における問題点の一例として—, 臨床病理, 33 (2): 140～147, 1985
- 7) 風疹に関する研究会—臨床検査—臨床とウイルス, 5 (2): 83～84, 1977

1) 厚生省保健医療局結核難病感染症課感染症対策室：