

# トリ医者の誤診記録

その15

## — ELISA 試験について —

株式会社ピーピーキューシー 加藤 宏光



先月号でELISAという抗体を測定する試験方法について触れました。昨今ELISAという試験方法がポピュラーでないままに、「ELISA抗体」という名前が先行している傾向があります。そこで、ここにELISAという検査方法の概略とその結果の特性を解説します。

ELISA (ENZYMELINKED IMMUNOSSORBENT ASSAY) というのは和名では酵素抗体法と呼ばれ抗体の検査方法をルーチン化できるように改善されたものです。原理は以下ようになります。

①一定レベルの抗原（多くはウイルス）を定着させたマイクロウエルの列に段階希釈した被検血清を反応させます。

②これを洗い流して、抗原と反応した所以外の血清はなくします。

③検査対象の動物（この場合はニワトリ）の抗体で免疫された血清をかけますが、この血清にちょうどした仕掛けがしてあります。その仕掛けとは、特殊な試薬（ペ

ルオキシダーゼなどの酵素）での標識です。この酵素に対して酵素基質を反応させることによって発色します。

④最終段階で酵素基質を加えたうえで紫外線で濁度（オプティカル・デンシティ）を測定して血清中の抗体の有無を調べます。実際に野外での応用を簡単にす

るためには、抗原（精製ウイルスかウイルスに感染した培養細胞）を平底のマルチタイタートレイの底面に固定したものが市販されています。このプレートの各穴（ウェル）に検査したい血清を予備希釈したもの（一定量ずつ（一穴一サンプル）分注して一定時間感作させます。その後十分に水洗したから、あらかじめ標識された市販ラベル血清を加えます。次いで発色試薬（TMB溶液）を加えて発症反応させた後に反応を停止させ（停止用の試薬で処理）、OD値を測定し陰性血清のOD値と被検サンプルのそれと対比して抗体の有無を計算します。

表1にはあるメーカーのELI

SAキットの使用方法を例示しました。

ELISA検査は市販のキットがある限り被検血清中の抗体の力を測定するのは極めて容易ですが、その反応が敏感に過ぎるため、野外の事例にあてはめるとなかなか役立ちません。ELISAを野外に応用しようという動きは二〇年も前に始まりました。当時はキットが市販されていなかったために、ELISA抗原を自作して使用せざるをえないのが実情で、だからこそ「ELISA法を使って抗体を検査している」というのはある意味で技術の高さを誇示できるといった側面がありました（いわば素人相手のコケ脅しといった意味合いがありました……）。

当時にドイツのワクチンメーカーで野外における鶏病診断も並行して実施していた研究所を視察に行ったときのことです。研究所長で獣医師である先生が、「当社では最新技術であるELISA法を用いて抗体を調べ鶏病の診断を実

表1 市販IB・ELISAキット説明書

**使用方法**

**STEP1 ワークシートの作成**  
 a: ワークシートを作成する。(エリザプレートの使用計画をたてる。)  
 \* ウェル(図1参照)A1, A2は指示陽性血清用, A3, A4は指示陰性血清用なので空けておくこと。  
 図1 エリザプレートのウェル番号

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	N	N	P	P	O	O	O	O	O	O	O	O
B	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
C	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
D	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
E	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
F	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
G	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
H	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O

(注) N: 指示陽性血清 P: 指示陰性血清

**STEP2 被検血清の予備希釈(前処理として被検血清を125倍に希釈する。)**  
 b: 希釈用プレートを用意する。  
 c: ウェル番号A1~A4以外のすべてのウェルに血清希釈液を250μl(0.25ml)ずつ分注する。  
 d: ワークシートに従って被検血清を2μl(0.002ml)ずつ所定のウェルに加え、2分間置とうする。

**STEP3 被検血清の最終希釈(被検血清は500倍に希釈したものを使用する。)**  
 e: エリザプレートのウェル番号A1~A4以外のすべてのウェルに血清希釈液を75μl(0.075ml)ずつ分注する。  
 f: エリザプレートのA1, A2のウェルには指示陽性血清を, A3, A4のウェルには指示陰性血清をそれぞれ100μl(0.1ml)ずつ分注する。  
 g: エリザプレートに「g」で予備希釈した被検血清を所定のウェルに25μl(0.025ml)ずつ移し、2分間置とうする。

**STEP4 エリザプレートの抗原と血清中の抗体を反応させる。**  
 h: 30分間室温にて反応させた後、蒸留水で4回洗う。

**STEP5 ラベル血清を加える。**  
 i: すべてのウェルにラベル血清を100μl(0.1ml)ずつ分注する。  
 j: 30分間室温にて反応させた後、蒸留水で4回洗う。  
 \* 反応停止液の「ステップ6」で使用するTMB溶液を調製する。  
 TMB溶液はエリザプレート1枚につきTMB濃厚液6mlにTMB希釈液6mlの割合で希釈し、調製する。

**STEP6 TMB溶液を加える。**  
 k: すべてのウェルにTMB溶液を100μl(0.1ml)ずつ加える。  
 l: 15分間室温にて反応させる。

**STEP7 反応停止液(0.12%ふっ化水素酸)を加える。**  
 m: すべてのウェルに反応停止液を100μl(0.1ml)ずつ加える。  
 n: 2分間置とうする。

**STEP8 OD値を測定する。**  
 o: 650nmの干渉フィルターを用いてOD値を測定する。  
 \* この際、指示陽性血清の平均OD値は0.15以下でなくてはならない。

**STEP9 S/P比を計算する。**  
 p: 次の式によりS/P比を求める。

$$S/P = \frac{S(A650) - NC\bar{x}}{PC\bar{x} - NC\bar{x}}$$

S/P比  
 S(A650): 被検血清のOD値  
 PC $\bar{x}$ : 指示陽性血清の平均OD値  
 NC $\bar{x}$ : 指示陰性血清の平均OD値

**STEP10 判定**  
 q: 判定基準は次のとおりである。  
 S/P ≤ 0.20の場合は陰性と判定する。  
 S/P > 0.20の場合は陽性と判定する。

「施しています」と、その機械を呈示しながら幾分得意気に説明されました。しかし、ELISAの反応が余りにも敏感であるために、一般的なワクチネーションで処理された鶏群ではすべてが陽性という結果がでて、鶏病診断には役立つ結果が多いことを指摘したところ、「ばれたか!!」といった風情で、「実はそうなんだよね。だけど、ELISAを使っていると、言ってしまうと感心してきてくれるもんで……まあ、看板ですよ、現実には!!」と内情を打ち明けてくれたものでした。

しかし、それから時が流れ、ELISAの検査結果が野外に流れる頻度が多くなると、われ関せずでは済ませられませんか。感度が高すぎるからといって応用できないのではお話になりませんか、PQCでも応用を初めています。

この応用に際して、どのような数値処理をすることで現実の鶏病の流れと検査データを対比することができのでしょうか。

●業界トピックス

**四五年のあゆみを振り返る**  
 —(株)中央畜産会創立四五周年記念式典—

東京タワーの隣、芝の東京プリンスホテルで十月十二日、(株)中央畜産会創立四五周年記念式典が開催された。

昭和三十年の設立以来、畜産の発展に寄与することを第一義として活動を続けてきた同会。式典ではこれまでの活動を振り返る意味で、功労者を表彰するとともに、二十一世紀へ向けて畜産業をさらに発展させるために、一致団結していくことを確認した。

まず、山中貞則会長が挨拶。畜産経営は現在、さまざまな困難を抱えているが、中央畜産会は総合的・中核的畜産団体として業務を進め、二十一世紀へ乗り出す所存である……と話した。思い切った意訳するならば、「中央畜産会は畜産の東京タワーたれ」というところだ。

その後半は、鳥取県畜産会の花本美雄会長へ農林水産大臣感謝状が贈られたのをはじめ、中央畜産会の発展に寄与した功労者計五二人へ畜産局長感謝状や中央畜産会感謝状が贈られた。

## ELISA検査結果の実際

表2・表3を参照してみてください。前者はELISA検査の数値です。また、後者は計算式に当てはめて出てきた判定のための数値です。表1のS/Pとある項目を判定するのですが、表2の最終判定ではすべての例で陽性と判断せねばなりません。図1はこのロットの産卵成績を顕したものです。明らかに産卵

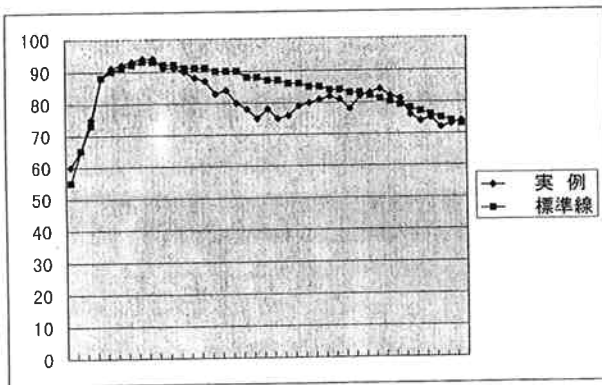
表2 ELISA (IB)の生データ

IB	S/P	SAMPLE	PCX	NCX
1	10.85	2.871	0.311	0.051
2	8.86	2.354	0.311	0.051
3	4.54	1.231	0.311	0.051
4	5.60	1.508	0.311	0.051
5	4.86	1.315	0.311	0.051
6	9.93	2.634	0.311	0.051
7	5.22	1.409	0.311	0.051
8	10.28	2.723	0.311	0.051
9	7.80	2.078	0.311	0.051
10	4.76	1.288	0.311	0.051

表3 ある農場におけるIB・ELISA抗体の推移

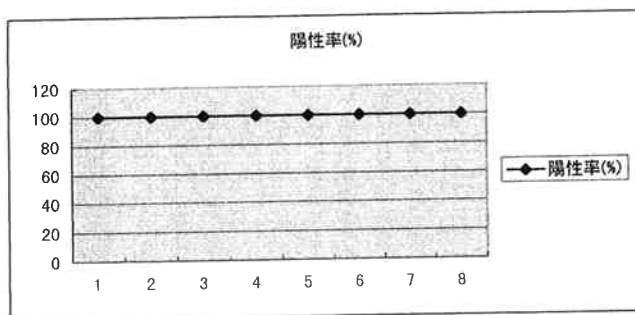
日齢	241	603	455	505	360
個体NO					
1	10.85	9.93	7.60	2.97	1.62
2	8.86	5.22	0.03	9.93	1.34
3	4.54	10.28	5.26	1.62	3.31
4	5.60	7.80	9.36	5.95	1.01
5	4.86	4.76	8.68	なし	2.49
陽性率	5/5	5/5	5/5	4/4	5/5

注: 0.21以上 陽性と判定する



産卵低下以外に明確な産卵を欠く。(140~520日齢まで1日産10日間)

図1 IBと思われる産卵障害例



注1: 141~470日齢までの追跡  
注2: 各日齢は表示の日齢時点

図2 IB・ELISA 陽性率推移

低下と開口呼吸や喘鳴などの顕著な呼吸器症状から判定するに、IBと思われるなりません。図2はこのロットのIB・ELISA検査の結果を前提としたIB抗体陽性率の推移を経時的に示したものです。残念ながらすべて期間を通じてIB抗体100%陽性ですから、この結果ではIBが動いていたかどうかさえ明らかにはできません。一般にIB抗体

が陽性であれば感染を防御するものだ、といった考え方がされていますから、この結果で「IB抗体があるのだから感染が起きるわけがない」と考えて、IB感染が産卵低下の原因ではない、と断じる人が現実にはいました。しかし、私は違った考え方をしています。「IBというウイルスは確かに前に触れたように、学術的にはモ

ノタイプかも知れませんが現実の生産現場では抗体が下がれば不全感染を起こし、本来の産卵低下率に比べれば軽度といえる、10~30%程度の産卵低下を示す。この程度の産卵低下でも採卵農場の存続を脅かすに充分と言える」でしょう。

## IBの諸症状と現状

① 開口呼吸・喘鳴などの呼吸器症状  
② 比較的鮮明で黄色味を帯びた緑色下痢便の排泄

ND(ニューカッスル病)のよ

うなウイルス性伝染病でもアジア型のように強病原性(致死性が高い株)では、宿主のワクチネーションが不完全な場合には不完全感染を起こします(アジア型のNDの場合、ワクチネーションが施されていないと、激しい呼吸器症状や顔面の浮腫を呈し、急速な死への転機をたどり、死亡率も高い。一方、不完全感染では脳神経への侵襲が起るため神経症状が顕れ、頸部の捻転や脚弱で衰弱死するものが頻発する)。IBについては致死性がうんぬんされることはありませんので感染性の強弱があまり明確でなく、IBの本態をかえって不鮮明にしていますが、免疫性が十分に獲得されていない鶏群では当然不全感染を起こします。

本来のIB諸症状についてはすでに述べましたが、その典型的な症状を次に列挙します。

③ 発熱とそれによる食欲不振  
④ 産卵停止(無ワクチンでは○%産卵になることもあった)

⑤ 回復期の奇形卵産出

⑥ (弱齢ひなでは発熱による死亡)

これらのどれかが発現し、どれかが欠けるのが不全発症です。弱齢ひなの死亡が見られるほどにワクチネーションが実施されていない鶏群は現在では見られませんので、⑥はまず観察されません。これらの症状の中で最も問題とされるのは④の産卵停止です。今日ではいずれかのワクチネーションを実施されているのが常識ですから、産卵が○%まで低下する例は見られませんが、時には九〇%が六〇%台まで落ち込む例に遭遇します。また、この被害と同様に大きな問題とされるものに、感染の後遺症があります。卵形の異常(奇形卵)もさることながら卵白の異常

(ゆでても固まらないもしくは固まりにくい)です。これは外觀ではわからないため商品のイメージを大きく阻害し、特に昨今のよう  
にブランド卵・付加価値卵として流通しているものに関してはイメージダウンの影響が大きいです。その他の症状は健全な卵が生産される限りは問題とされませんが(実際には顕著な症状が出れば産卵への影響は避けられませんが……)。

野外では種々のIBワクチンが市販され、その効果が宣伝されています。なかでも一二年前に関東領域で大きな問題となった、いわゆる千葉型のIBは呼吸器症状は明確ではありませんでしたが、産卵率の異常(一五から二〇%低下と回復不良)に加えて産卵直後でも濃厚卵白が見られず産卵直後の割卵でもタマゴがだらりと流れる状況を示すものが多発して大きな問題となりました。

このタイプのIBに対してのワクチンが一社のメーカーから開発・市販されて以降、数社から同

様の株のものとして似たような製品が市場に出現してきました。とはいえ、野外でどのような場合にも十分な効果を表すような普遍的なワクチンとはいえず、時にはワクチンを使用したがかえって大きな被害をもたらしたことを疑わせる症例も経験しています。

にもかかわらず、こうした株が市場で望まれ、またメーカーも競って市販するのも野外における生産性の阻害因子としてはIBが最も大きいと受け止められ、さらには(IB感染をワクチネーションでコントロールすることが極めて難しい)というのが生産現場の常識であるからでしょう。

## IBの検査とELISA試験

さて、図2症例の原因が何であるかを極めないと対策の立てようがありません。IBの検査には前にも述べたように①中和試験、②寒天内ゲル沈降反応(AGPテスト)とELISA試験があります。35

表4 IB 様産卵低下を呈した群の ELISA 抗体推移

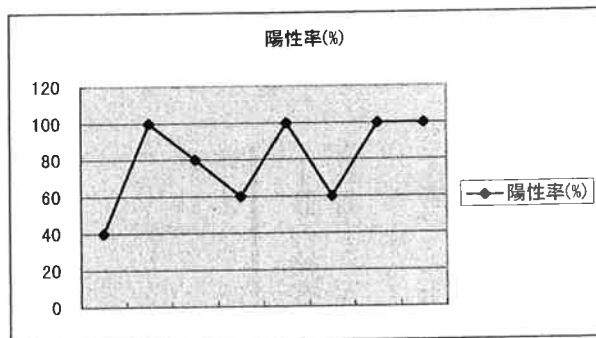
個体NO 日齢	1	2	3	4	5	陽性率
141	4.68	2.15	2.85	4.23	2.14	
判定	+	+	+	+	+	5/5
151	2.97	4.10	4.89	5.62	3.88	
判定	+	+	+	+	+	5/5
157	4.94	2.34	1.83	3.58	6.76	
判定	+	+	+	+	+	5/5
180	8.53	10.20	8.55	5.55	4.23	
判定	+	+	+	+	+	5/5
320	7.28	5.70	6.59	1.37	1.42	
判定	+	+	+	+	+	5/5
400	3.63	5.25	4.66	5.54	2.01	
判定	+	+	+	+	+	5/5
435	6.06	5.63	5.16	7.03	0.05	
判定	+	+	+	+	+	5/5
470	4.58	4.80	4.47	6.42	3.50	
判定	+	+	+	+	+	5/5

注: 0.21以上 陽性と判定する

表5 IB 様産卵低下を呈した群の ELISA 抗体推移

個体NO 日齢	1	2	3	4	5	陽性率
141	4.68	2.15	2.85	4.23	2.14	
判定	+	-	-	+	-	2/5
151	2.97	4.10	4.89	5.62	3.88	
判定	+	+	+	+	+	5/5
157	4.94	2.34	1.83	3.58	6.76	
判定	+	-	-	+	+	3/5
180	8.53	10.20	8.55	5.55	4.23	
判定	+	+	+	+	+	5/5
320	7.28	5.70	6.59	1.37	1.42	
判定	+	+	+	-	-	3/5
400	3.63	5.25	4.66	5.54	2.01	
判定	+	+	+	+	-	5/5
435	6.06	5.63	5.16	7.03	0.05	
判定	+	+	+	+	+	5/5
470	4.58	4.80	4.47	6.42	3.50	
判定	+	+	+	+	+	5/5

注1: 0.21以上 陽性と判定する  
注2: 2.5以下のものを陰性と判定する



注1: 141~470日齢までの追跡  
注2: 各目盛は表示の日齢時点  
注3: 180日齢では抗体価が高くそろっているが、産卵の低下を示している時期には抗体価が不揃いである

図3 IB・ELISA 陽性率推移

このなかで、ウイルスの株差を調べることができるのは中和試験のみですが、中和試験そのものが手間とコストの関係で容易に実用されません。AGPテストは簡便ですが株差は判然としません。ELISA試験も敏感であるといった特徴はありますが、株の差が追跡できるような試薬が市販されていません。(にもかかわらず反応が

敏感であるという点と試験方法が目新しいということ、この試験が一番信頼性が高いようなイメージがもたれていることはいわば懸うべきことといえるでしょう)。では野外ではどのように判定すればよいのでしょうか  
表4と表5は図1の症例のELISA抗体を示したのですが、表4にはスタンダードに従って陰

陽を判定したもので、表5のそれは、私が野外における経験を元に、以下の抗体はワクチンなどの基礎抗体とみなして足切りをして(一定以下のものはあえて陰性と判断する)それ以上の数値の例のみを陽性と判定した結果です。  
表4を図2に表5を図3示しましたが、図1の産卵率の推移に一致していることから、本症例の主

要な原因がIBであったことを裏付けるものと考えていいでしょう。このように、敏感であるがゆえに役立てにくいということはことELISAに限らずよくあります。「木を見て森を見ず」とは言い古されたことわざですが、こうしたときにも思い出したい古人の知恵でしょう。

