

# Serodiagnosis of Microbiosis in Mice with a Quantitative Assay of Immunoglobulins by Microcomputer Introduced ELISA System

## 1. Anti-Sendai Virus Antibodies in Naturally Infected Mouse Sera

Makoto YANABE\*,\*\* and Takato O. YOSHIDA\*

\* Department of Microbiology and Immunology, Hamamatsu University School of Medicine, 3600 Handa-cho, Hamamatsu 431-31, Japan, and

\*\* Shizuoka Laboratory Animal Center, 1616 Koike-cho, Hamamatsu 435.

(Received 22 October 1985/Accepted 14 January 1986)

An enzyme-linked immunosorbent assay system combined with microcomputer data analysis was established as a quantitative assay method of immunoglobulins. The assay system was applied to measure IgG and IgM levels of anti-microbe antibodies in animals, especially mouse and rat. And now the measurement of IgG and IgM levels (ng/ml) of anti-Sendai virus (HVJ) antibodies in naturally infected mice is available. The assay system could improve serodiagnosis in the specificity and sensitivity and in the rapid treatment of many serum samples. The operation of this system was performed by a microcomputer, FM 8 connected Titertek Multiskan MC. The limited sensitivity of this assay for IgG and IgM was 10 ng/ml and 30 ng/ml, respectively. Ninety-one of serum samples were positive for IgG and/or IgM (45 samples for IgG and IgM, 44 samples for IgG, 2 samples for IgM) to Sendai virus in the tested 279 mouse sera, and serum titers were ranged from 1: 10 to 1: 12,800 in the IgG, and from 1: 20 to 1: 160 in the IgM. In these titers, serum IgG and IgM amounts were estimated to be 0.1 to 154 µg/ml and 0.5 to 4.8 µg/ml, respectively. Relationships of serum titers and antibody amounts were almost consisted, being judged like that approximately 10 µg/ml is 1: 400, 30 µg/ml is 1: 1,600 in IgG, and 2.4 µg/ml is 1: 80, 4 µg/ml is 1: 160 in IgM.

---

## マイクロコンピュータを導入した ELISA 法での 免疫グロブリン定量によるマウス感染症の診断

### 1. Sendai virus 感染症の血清学的診断法

矢 鍋 誠\*,\*\*・吉 田 孝 人\*

\*浜松医科大学医学部微生物学教室

\*\*静岡県実験動物農業協同組合

実験小動物の微生物モニタリングの一方法としての血清学的診断法は、診断が特異的かつ簡便で、多数検体の処理が可能であるなどの理由から、ひろく内外で実施さ

れている。その反面、非特異的な反応などにより判定に苦慮させられることも多い。血清学的診断技術はいかなる術式であれ、感度とともに特異性が高く、しかも客観

的でなければならない。抗体を微量の単位まで鋭敏にしても特異性をもって検出する技術として開発された Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) は、これらの点を満足させる診断的価値の高い方法として注目されている。事実、Sendai virus 感染症 (SV 症) をはじめ、Rat corona virus 感染症, Kilham rat virus 感染症, *Mycoplasma pulmonis* 感染症, *Corynebacterium kutscheri* 感染症の診断に応用されはじめている [1-4, 6, 8, 9]。

著者等も実験小動物の微生物モニタリングに ELISA 法を取り入れることにし、ELISA 法の優れた特性をさらに高める方策として、微生物の感染に起因する抗体を微量な単位まで特異的に定量し、その抗体量を基にした判定基準を決め、特異性と客観性を高めた血清学的診断法を確立した。さらにコンピューター解析を導入して多数検体の迅速処理を可能とした。

この論文では ELISA 法を用いた新しい血清学的診断法での抗体の定量法とコンピューター解析の導入法について述べ、この方法を利用して、マウスの SV 症の血清学的診断を実施して得た成績を報告する。

### 材料および方法

ELISA 法および免疫グロブリン定量法: Fig. 1 に示したポリスチレンプレート (Coster, Serocluster 96-well EIA Plate Half-area No. 3690) の第 1 列をブランクとし、第 2 列をマウスの免疫グロブリン量を算出する

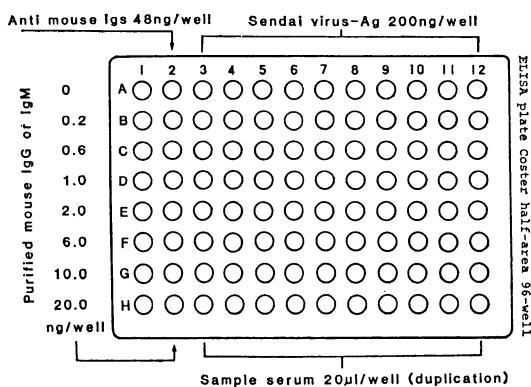


Fig. 1. A quantitative method of Sendai virus antibodies (IgG and IgM classes) in mouse sera by ELISA. Serum IgG and IgM amounts were computed on comparison with ELISA optical density value of mouse purified IgG or IgM standard curve.

ための IgG あるいは IgM 標準曲線用 Well とした。この well には 2,400ng/ml 濃度に希釈された抗マウス immunoglobulin ウサギ抗体 (Dakopatts, titer 1,200μg/ml) を 20μl/well ずつ加えた。第 3 列以後の 80 well には蔗糖密度勾配遠心で精製され蛋白濃度 10μg/ml に調製された Sendai virus 抗原 [3] (SV-Ag) を 20μl/well 加え、室温に 1 時間静置することによって固相化させた。このプレートを 0.1% Tween 20 加リン酸緩衝液 (Tw-PBS) で 3 回洗浄後、すべての well に血清の非特異的吸着を防止する目的で 5% Bovine Calf Serum-PBS (BCS-PBS) を約 180μl/well 加え、室温で 20 分間保つ block 処理を行った。5% BCS-PBS を除去後、標準曲線用の well には 1% BCS-PBS で 8 段階の濃度に調製された standard purified mouse IgG または IgM (Miles Laboratories.) をそれぞれ 20μl/well 加えた。8 段階の濃度は上段 well より、0ng/ml, 10ng/ml, 30ng/ml, 50ng/ml, 100ng/ml, 300ng/ml, 500ng/ml, 1,000ng/ml とした。SV-Ag を固相化した well には 5% BCS-PBS で希釈された検体を 20μl/well 加えた。抗体量の定量精度を高めるために、1 検体の 1 希釈濃度について 2 well を使用した。この後、室温で 1 時間反応させ、Tw-PBS で 3 回洗浄した。2 次抗体は、IgG 抗体を検出するためにパーオキシダーゼ標識抗マウス IgG (γ 鎖特異的, 5% BCS-PBS で 1:2,000 希釈) の、IgM 抗体を検出するためにパーオキシダーゼ標識抗マウス IgM (μ 鎖特異的, 5% BCS-PBS で 1:500 希釈) の、いずれもウサギ抗体 (Zymed Laboratories.) を用い、ブランク well を除いたすべての well にそれぞれ 20μl ずつ加えた。室温で 1 時間反応させた後、Tw-PBS で 5 回洗浄した。酵素反応には Phosphate citrate buffer (0.1M citric acid + 0.2M dibasic sodium phosphate, pH 5.0) 10ml に 10mg の O-Phenyldiamine を加えた液に 0.02% になるように H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を加えたものを基質液として使用した。この液をすべての well に 20μl ずつ加え、遮光しながら室温で 5~10 分間発色させた後、2M 硫酸で反応を停止させた。吸光度 (O.D.) は Titertek Multiskan MC (Flow Laboratories.) を使用し、492nm の波長で O.D. を自動的に測定し全データをマイクロコンピューターに入力した。検体の IgG あるいは IgM 抗体の量は同一プレートでの標準曲線に照して検体が示した O.D. 値から算出された。この解析はすべて Titertek Multiskan MC に直結したマイクロコンピューター (Micro 8 Fujitsu) を用い、Fig. 2 に示す MC curve によって行われた。この解析にかかる

Fig. 2

10-12-85 PAGE 1

Yanabe &amp; Yoshida

```

10 * *****
20 * *****
30 * ***** MC CURVE FITTING PROGRAM V.1.0 *****
40 * *****
50 * ***** Copyright <C> by ITSUKI OSHIMA & YUJI TSUBOTA *****
60 * *****
70 * ***** ( 1983# 6M 108 ) *****
80 * *****
90 * *****
100 CLEAR 2000
110 DEFDBL A,B,C,K,L,P,R,S,Y,Z:AS="####":CS="###":XS=" No. of SAMPLES
120 DIM A(10,10),R(10,10),L(18),B(10),C(10),K(10),X(10),Y(10),XD(10),YD(10),XX(1000),YY(1000),YDD(10),XDD(10),D(7,8),CAL(6,8)
130 DIM U$(12),Ds(12,8)
140 DEFINT U
150 CONSOLE 0,20:WIDTH 80,20
160 OPEN "O",L,"LPT0":PRINT #1,CHR$(&H1B);"O":CLOSE 1
170 *-----MENU-----
180 *
190 OPEN "I",#1,"COM1:"
200 COM(1) ON
210 CLS:LOCATE 15,10:INPUT " YOUR NAME=";UN$
220 PRINT:LOCATE 15,13:INPUT " PLATE MEMO ...";UM$
230 LOCATE 15,15:INPUT " DATE=";UV$
240 LPRINT UV$;" ";UN$;" ";UM$:LPRINT:LPRINT
250 CLS:LOCATE 5,10:COLOR 4
260 PRINT@ (300,50),&H234D,&H2345,&H234E,&H2355
270 COLOR 7
280 PRINT@ (150,70),&H2433,&H244E,&H2420,&H2350,&H2352,&H234F,&H2347,&H2352,&H2341,&H234D,&H244F,&H2122,&H2332,&H2444,&H244E,&H3521,&H473
D,&H2472,&H3B7D,&H2443,&H2446,&H2424,&H245E,&H2439,&H2123
290 PRINT@ (170,90),&H2331,&H2340,&H2340,&H234D,&H2343,&H244E,&H2344,&H2341,&H2354,&H3272,&H404F
300 PRINT@ (170,110),&H2332,&H2340,&H2340,&H2340,&H3C6A,&H467E,&H244B,&H2468,&H2344,&H2341,&H2354,&H3272,&H404F
310 PRINT@ (130,140),&H2449,&H2441,&H2469,&H244B,&H2437,&H245E,&H2439,&H242B,&H2129
320 LOCATE 5,18:INPUT "1 OR 2 ";A
330 IF A<1 OR A>2 THEN GOTO 320
340 IF A=2 THEN GOTO 520
350 FRG=1: CLS:LOCATE 5,10:PRINT@ (90,40),&H2350,&H234C,&H2341,&H2354,&H2345,&H2472,&H2122,&H2350,&H2355,&H2348,&H2437,&H2446,&H32
3C,&H2435,&H2424,&H2123
360 ON COM(1) GOSUB 2180
370 *COM(1) OFF
380 IF FRG=1 THEN 380 ELSE GOTO 390
390 XD(1)=10:XD(2)=30:XD(3)=50:XD(4)=100:XD(5)=300:XD(6)=500:XD(7)=1000
400 FOR I=1 TO 7 :YD(I)=D(1,I+1):NEXT I
410 FOR I=1 TO 7 :XD(I)=XD(1):YD(I)=YD(1):NEXT I
420 FOR I=1 TO 7 :XD(I)=LOG(XD(I)):NEXT I
430 IF YD(7)>1.9 THEN ND=6 ELSE ND=7
440 GOSUB 960
450 GOSUB 1270:GOSUB 3040
460 GOSUB 1730
470 GOSUB 2880
480 OPEN "O",2,"LPT0:"
490 PRINT #2,CHR$(&H1B);"N":CHR$(6)
500 CLOSE #2
510 END
520 *-----MAIN-----
530 GOSUB 610

```

Yanabe &amp; Yoshida

10-12-85

PAGE 2

```

540 GOSUB 960
550 GOSUB 1270
560 LOCATE 10,18 :INPUT "コノ さいふ いくばくを いくらに しますか (0) 9 Data 9 ルナタナ ナ (1) 9 INPUT シタタナ" Y1;OK
570 IF OK<0 AND OK>1 THEN 560
580 IF OK=0 THEN LOCATE 10,18 :PRINT SPACE$(79):GOSUB 2020:GOSUB 2530:GOSUB 1730:GOSUB 2880:ELSE GO TO 530
590 LOCATE 15,20:INPUT " OK ----- 0. AGAIN ----- 1 " :CS2
600 IF CS2=1 THEN 550 ELSE OPEN "O",1,"LPT0":PRINT #1,CHR$(4H1B);"N";CHR$(6):CLOSE 1:END
610 "----- SUB. INPUT -----
620
630 PRINT X$::INPUT NO
640 CLS:PRINT "INPUT X & Y "
650 FOR I=1 TO ND:PRINT "X(";I;") ";:INPUT XD(I):CSA=CSRLIN-1:CSB=POS(O)+25:LOCATE CSB,CSA:PRINT "Y(";I;") ";:INPUT YD(I):NEXT I
660 CLS:WIDTH 80,20:CONSOLE 0,20
670 LOCATE 1,14:PRINT "DATA LIST"
680 COLOR 4:LOCATE 10,3:PRINT "NO. X Y"
690 COLOR 7:FOR I=1 TO ND
700 LOCATE 9,4+I:COLOR 5:PRINT I:LOCATE 19,4+I:COLOR 7:PRINT USING "#####" #,### "X";XD(I),YD(I)
710 NEXT I
720 LOCATE 1,14:INPUT "マシヤイ 7ルナ (1) 9 シタタナ (0) 9 INPUT シタタナ" Y1;FT
730 IF FT<1 AND FT<0 THEN 720
740 IF FT=0 THEN GO TO 930
750 LOCATE 1,14:PRINT SPACE$(79)
760 LOCATE 1,14:INPUT "マシヤイ 7ルナ (X) マシヤイ (Y) マシヤイ " :MD$
770 IF MD$<"Y" AND MD$<"Y" AND MD$<"X" AND MD$<"X" THEN 760
780 IF MD$="Y" OR MD$="X" THEN 790 ELSE 810
790 INPUT "マシヤイ / Dataマシヤイ ";XN
800 LOCATE 1,16:PRINT "X(";XN;")=";:INPUT XD(XN)
810 IF MD$="Y" OR MD$="Y" THEN 820 ELSE 840
820 LOCATE 1,17:INPUT "マシヤイ / Dataマシヤイ ";YN
830 PRINT "Y(";YN;")=";:INPUT YD(YN)
840 CLS
850 COLOR 6:LOCATE 15,1:PRINT "DATA LIST"
860 COLOR 4:LOCATE 10,3:PRINT "NO. X Y"
870 COLOR 7:FOR I=1 TO ND
880 LOCATE 9,4+I:COLOR 5:PRINT I:LOCATE 19,4+I:COLOR 7:PRINT USING "#####" #,### "X";XD(I),YD(I)
890 NEXT I
900 LOCATE 1,18:INPUT "Data / マシヤイ 7ルナ (0) 9 シタタナ (1) 9 INPUT シタタナ" Y1;CE
910 IF CE=1 THEN LOCATE 1,18:PRINT SPACE$(79):GO TO 760
920 IF CE=0 THEN LOCATE 1,18:PRINT SPACE$(79):GO TO 930
930 FOR I=1 TO ND:XDD(I)=XD(I):YDD(I)=YD(I):XD(I)=LOG(XD(I)):NEXT I
940 CLS
950 RETURN
960 "----- SUB. CURVE FITTING CAL. -----
970
980 WIDTH 80,25:CONSOLE 0,25,0
990 WIDTH 40,20:LOCATE 5,10:COLOR 3:PRINT "Wait A Moment Please !!"
1000 IF GS=1 THEN GO TO 1070
1010 FOR I=1 TO 10:FOR J=1 TO 10:R(I,J)=0:NEXT J:K(I)=0:NEXT I:YB=0
1020 FOR ID=1 TO ND:X=XD(ID):Y=YD(ID)
1030 L(I)=X:FOR K1=2 TO 18:L(K1)=L(K1-1)*X:NEXT K1
1040 FOR I=1 TO 10:FOR J=1 TO 10:R(I,J)=R(I,J)+L(I+J-2):NEXT J
1050 K(I)=K(I)+Y:FOR J=2 TO 10:K(J)=K(J)+L(J-1)*Y:NEXT J
1060 X(ID)=X:Y(ID)=Y:YB=YB+Y:NEXT ID:YB=YB/ND:MX=ND-1:IF MX>9 THEN MX=9
1070 R(I,1)=ND:CLS:IF UA=2 THEN 1080 ELSE N=3:GOTO 1090

```

```

1080 LOCATE 0,14:INPUT" POWER OF THE FUNCTION ";N
1090 WIDTH 80,25:COLOR7:CONSOLE 14,11:FOR T=1 TO 1000:NEXT T:CLS:LOCATE 0,14
1100 N=N+1:FOR I=1 TO N:FOR J=1 TO N:A(I,J)=R(I,J):NEXT J,I:GOSUB 1210
1110 FOR I=1 TO N:L(I)=0:FOR J=1 TO N:L(I)=L(I)+A(I,J)*K(J):NEXT J:NEXT I
1120 PRINT"Y=";PRINT USING A$;L(I):FOR I=2 TO N:PRINT" +";PRINT USING A$;L(I):PRINT" * LN(X) ** ";I-1:NEXT I
1130 PRINT"PRINT" No. X
1140 P1=0:P2=0:FOR I=1 TO ND:PRINT USING C$;I:PRINTUSING A$;XDD(I),Y(I)::Y=L(I):Z=1:FOR J=2 TO N:Z=Z*A(X(I):Y=Y+L(J)*Z:NEXT J
1150 PRINT USING A$;Y:YD=Y(I)-Y:PRINTUSING A$;YD
1160 P1=PI+YD*YD:YD=Y(I)-YD:P2=P2+YD*YD:NEXT I
1170 PRINT" -":PRINT" COEFFICIENT of DETERMINATION ";PRINT USING A$;1-P1/P2
1180 FOR T=1 TO 3000:NEXT T:CONSOLE 0,25
1190 RETURN
1200
1210 FOR I=1 TO N:FOR J=1 TO N:B(J)=A(I,I):A(I,I)=0:NEXT J
1220 A(I,I)=1:FOR J=1 TO N:C(J)=A(I,J)/B(I):NEXT J:FOR J=1 TO N:FOR K=1 TO N:A(J,K)=A(J,K)-C(K)*B(J)
1230 NEXT K:NEXT J
1240 FOR J=1 TO N:A(I,J)=C(J):NEXT J:NEXT I
1250 SM=0:FOR I=1 TO N:FOR J=1 TO N:SM=SM+A(I,J)*R(J,I):NEXT J,I
1260 IF ABS(CSM-N)>.01*N THEN PRINT"<<< MATRIX IS SINGULAR : FOLLOWING RESULT IS NOT ACCURATE >>>":RETURN ELSE RETURN
1270 '----- SUB. GRAPH -----
1280
1290 CLS:CONNECT(50,0)-(50,100)
1300 CONNECT(50,100)-(500,100)
1310 LINE(50,0)-(500,0):PSET,1
1320 LINE(50,25)-(500,25):PSET,1
1330 LINE(50,50)-(500,50):PSET,1
1340 LINE(50,75)-(500,75):PSET,1
1350 XX=(LOG(10)/LOG(10))*150+50:LINE(XX,0)-(XX,100):PSET,1
1360 XX=(LOG(50)/LOG(10))*150+50:LINE(XX,0)-(XX,100):PSET,1
1370 XX=(LOG(100)/LOG(10))*150+50:LINE(XX,0)-(XX,100):PSET,1
1380 XX=(LOG(500)/LOG(10))*150+50:LINE(XX,0)-(XX,100):PSET,1
1390 XX=(LOG(1000)/LOG(10))*150+50:LINE(XX,0)-(XX,100):PSET,1
1400 SYMBOL(20,97),0,1,1,7,0
1410 SYMBOL(20,72),0,5,1,1,7,0
1420 SYMBOL(20,47),1,0,1,1,7,0
1430 SYMBOL(20,22),1,5,1,1,7,0
1440 SYMBOL(20,0),2,0,1,1,7,0
1450 XX=(LOG(50)/LOG(10))*150+40:SYMBOL(XX,110),1,1,7,0
1460 XX=(LOG(100)/LOG(10))*150+40:SYMBOL(XX,110),1,1,7,0
1470 XX=(LOG(500)/LOG(10))*150+40:SYMBOL(XX,110),1,1,7,0
1480 XX=(LOG(1000)/LOG(10))*150+40:SYMBOL(XX,110),1,1,7,0
1490 XX=(LOG(10000)/LOG(10))*150+40:SYMBOL(XX,110),1,1,7,0
1500 FOR I=1 TO ND
1510 XX=(XD(I)/LOG(10))*150+46
1520 YY=100-YDD(I)*50
1530 SYMBOL(XX,YY-4),"*",1,1,4,0
1540 NEXT I
1550 XX=50:YY=100:
1560 FOR X=10 TO 30
1570 XX=(LOG(X)/LOG(10))*150+50
1580 Y=L(1):Z=1:FOR J=2 TO N:Z=Z*LOG(X):Y=Y+L(J)*Z:NEXT J
1590 YY=100-Y*50
1600 PSET(XX,YY):IF X=10 THEN 1620
1610 CONNECT(XX,0)-(XX,YY)

```

Yanabe &amp; Yoshida

10-12-85

PAGE 4

```

1620 XXO=XX:YYO=YY
1630 NEXT X
1640 FOR Y=30 TO 1000 STEP 10
1650 XX=(LOG(X)/LOG(10))*150+50
1660 Y=L(1):Z=1:FOR J=2 TO N:Z=Z*LOG(X):Y=Y+L(J)*Z:NEXT J
1670 YY=100-Y*50
1680 PSET(XX,YY)
1690 CONNECT(XXO,YYO)-(XX,YY)
1700 XXO=XX:YYO=YY
1710 NEXT X
1720 RETURN
1730 SUB Y-X EXCHANGE
1740 LOCATE 15,18:COLOR 3:PRINT"***** COFFEE BREAK ( 6 MINS. ) *****" :COLOR 7
1750 Y=L(1):Z=1:FOR J=2 TO N:Z=Z*LOG(1000):Y=Y+L(J)*Z:NEXT J:MAXY=Y
1760 FOR JJ=2 TO 6:FOR II=1 TO 8
1770 YC=D(JJ,II)
1780 IF YC>MAXY THEN CAL(JJ,II)=-1:COTO 2000
1790 YS(O)=0:FOR I=1 TO 10
1800 Y=L(1):Z=1:FOR J=2 TO N:Z=Z*(LOG(1*100)):Y=Y+L(J)*Z:NEXT J
1810 YS(I)=Y
1820 IF YS(I-1)<=YC AND YC<YS(I) THEN IC(1)=I-1
1830 NEXT I
1840 YS(O)=0:FOR I=1 TO 10
1850 Y=L(1):Z=1:FOR J=2 TO N:Z=Z*(LOG(100*IC(1)+10*1)):Y=Y+L(J)*Z:NEXT J
1860 YS(I)=Y
1870 IF YS(I-1)<=YC AND YC<YS(I) THEN IC(2)=I-1
1880 NEXT I
1890 YS(O)=0:FOR I=1 TO 10
1900 Y=L(1):Z=1:FOR J=2 TO N:Z=Z*(LOG(100*IC(1)+10*IC(2)+1)):Y=Y+L(J)*Z:NEXT J
1910 YS(I)=Y
1920 IF YS(I-1)<=YC AND YC<YS(I) THEN IC(3)=I-1
1930 NEXT I
1940 FOR I=1 TO 10
1950 Y=L(1):Z=1:FOR J=2 TO N:Z=Z*(LOG(100*IC(1)+10*IC(2)+IC(3)+1*1)):Y=Y+L(J)*Z:NEXT J
1960 YS(I)=Y
1970 IF YS(I-1)<=YC AND YC<YS(I) THEN IC(4)=I-1
1980 NEXT I
1990 CAL(JJ,II)=(IC(1)*100+IC(2)*10+IC(3)+IC(4)*.1)
2000 NEXT II:NEXT JJ
2010 RETURN
2020 SUBROUTINE HARDC.
2030
2040 LOCATE 10,18:INPUT"カマヲ PRINTOUT する (1) カ タイ / ナ (0) ヲ INPUT シテ クル"カマ:HC
2050 IF HC<>0 AND HC<>1 THEN 2040
2060 LOCATE 10,18:PRINT SPACE$(79)
2070 IF HC=1 THEN HARDC 2 ELSE 2160
2080 LPRINT"Y="
2090 LPRINT USING AS:L(1):FOR I=2 TO N:LPRINT" + "
2100 LPRINT USING AS:L(1):LPRINT" * X **";I-1:NEXT I
2110 LPRINT:LPRINT" No. Y
2120 P1=0:P2=0:FOR I=1 TO ND:LPRINT USING C$;I:LPRINTUSING AS;XDD(I),Y(I):Y=L(1):Z=1:FOR J=2 TO N:Z=Z*(1):Y=Y+L(J)*Z:NEXT J
2130 LPRINT USING AS;Y:YD=Y(1)-Y:LPRINTUSING AS;YD
2140 P1=P1+YD*YD:YD=Y(1)-YD:P2=P2+YD*YD:NEXT I
2150 LPRINT" :LPRINT" COEFFICIENT of DETERMINATION ";LPRINT USING AS;1-P1/P2

```

Yanabe &amp; Yoshida

10-12-85

PAGE 5

```

2150 RETURN
2170 ----- SUB. DATA LOAD -----
2180 PRINT "Data loading ...."
2190 LINE INPUT #1, UAS(O)
2200 IF LEN(UAS(O)) > 10 THEN PRINT "MODE=1": UII=11 ELSE PRINT "MODE=1": UII=12
2210 FOR UI=1 TO UII
2220 LINE INPUT #1, UAS(UI)
2230 NEXT UI
2240 IF UII=11 THEN UTI=0
2250 FOR UI=UTI TO UII
2260 UB$=LEFT$(UAS(UI), 2)
2270 UB=VAL(UB$)
2280 IF 1>UB OR UB>12 THEN PRINT "error-140"
2290 PRINT "column number = ", UB
2300 UL=LEN(UAS(UI))-2
2310 IF UL<56 THEN PRINT "error-170"
2320 FOR UK=1 TO 8
2330 UC$=MID$(UAS(UI), 3+7*(UK-1), 7): UL=UL-7
2340 D$(UB, UK)=UC$
2350 NEXT UK
2360 NEXT UI
2370 FOR UT=1 TO 8
2380 D(1, UT)=VAL(D$(2, UT))
2390 NEXT UT
2400 FOR UI=2 TO 6
2410 FOR UT=1 TO 8
2420 UK=UI*2-1
2430 D(UI, UT)=(VAL(D$(UK, UT))+VAL(D$(UK+1, UT)))/2
2440 NEXT UT
2450 NEXT UI
2460 FOR UI=1 TO 6
2470 FOR UT=1 TO 8
2480 PRINTD(UI, UT);:
2490 NEXT UT:PRINT
2500 NEXT UI
2510 FRG=0:COM(1) OFF
2520 RETURN 380
2530 -----
2540 FOR J=2 TO 6
2550 CLS:PRINT "INPUT Y1 & Y2"
2560 FOR I=1 TO 8:PRINT "Y1"; I;:PRINT "Y2"; I;:INPUT Y1(I):CSA=CSRLIN-1:CSB=POS(O)+25:LOCATE CSB, CSA:PRINT "Y2"; I;:PRINT "Y2(I):MD(I)=(Y1(I)+Y2(I))/2:NEXT I
2570 CLS:WIDTH 80:20:CONSOLE 0,20
2580 COLOR 6:LOCATE 15,1:PRINT "DATA LIST"
2590 COLOR 4:LOCATE 10,3:PRINT "NO."
2600 COLOR 7:FOR I=1 TO 8
2610 LOCATE 9,4+I:COLOR 5:PRINT I:LOCATE 19,4+I:COLOR 7:PRINT USING "###.###" Y1; Y2; MEAN
2620 NEXT I
2630 LOCATE 1,14:INPUT "データ入力" Y1; (1) 7 77777777 (0) 7 INPUT "データ入力" Y2; FT
2640 IF FT<>1 AND FT<>0 THEN 2630
2650 IF FT=0 THEN GO TO 2840
2660 LOCATE 1,14:PRINT SPACE$(77)
2670 LOCATE 1,14:INPUT "データ入力" Y1; (Y1) 77777777 (Y2) 77777777:MD$
2680 IF MD$<>"Y1" AND MD$<>"Y2" AND MD$<>"Y2" THEN 2670
2690 IF MD$="Y1" OR MD$="Y2" THEN 2700 ELSE 2720

```

Yanabe &amp; Yoshida

10-12-85

PAGE 6

```

2700 INPUT " シンパシメ / Dataシマシマ ";XN
2710 LOCATE 1,16:PRINT "Y1(*:XN:)=:"; INPUT Y1(XN)
2720 IF MD$="Y2" OR MD$="Y2" THEN 2730 ELSE 2750
2730 LOCATE 1,17:INPUT " シンパシメ / Dataシマシマ ";YN
2740 PRINT "Y2(*:YN:)=:"; INPUT Y2(YN)
2750 CLS
2760 COLOR 6:LOCATE 15,1:PRINT"DATA LIST"
2770 COLOR 4:LOCATE 10,3:PRINT"NO. Y1 Y2 MEAN "
2780 COLOR 7:FOR I=1 TO 8
2790 LOCATE 9,4+I:COLOR 5:PRINT I:LOCATE 19,4+I:COLOR 7:PRINT USING "#.###"
2800 NEXT I
2810 LOCATE 1,18:INPUT" Data / シマシマ カンリョウシマシマ (0) シマシマ カンリョウシマシマ ";CE
2820 IF CE=1 THEN LOCATE 1,18:PRINT SPACES(77):GO TO 2670
2830 IF CE=0 THEN LOCATE 1,18:PRINT SPACES(77):GO TO 2840
2840 FOR I=1 TO 8 :D(I,1)=MD(I):NEXT I
2850 INPUT " END-----0. CONTINUE-----1 " ;CS:IF CS=0 THEN RETURN
2860 NEXT J:CLS
2870 RETURN
2880 '-----SUB. PRINT OUT HARDC2-----
2890 CLS:WIDTH 80,20
2900 LINE@(0,0)-(639,199).PSET,5,B
2910 FOR I=0 TO 4:LINE@(44+I*120,0)-(44+I*120,199).PSET,5:NEXT I
2920 LINE@(0,33)-(639,33).PSET,5
2930 COLOR 6:FOR I=0 TO 4:LOCATE 9+I*15,1:PRINT"C.":3+I*2:4+I*2:NEXT I
2940 FOR I=0 TO 4:LOCATE 9+I*15,2:PRINT"Y XCAL:NEXT I
2950 COLOR 7
2960 FOR I=1 TO 8
2970 LOCATE 2,4+(I-1)*2:PRINT
2980 FOR I=0 TO 4:LOCATE 6+I*15,4+(I-1)*2:PRINTUSING"#.###" ;D(2+I,T);CAL(2+I,T)::NEXT I
2990 NEXT I
3000 OPEN "O", 2,"LPT0:";PRINT #2,CHR$(8)HOC:CLOSE #2
3010 HARDC 2
3020 RETURN
3030 END
3040 '-----SUB. HARDC2 -----
3050 HARDC 2
3060 LPRINT"Y= ";;LPRINT USING A$;L(1):FOR I=2 TO N:LPRINT" + ";;LPRINT USING A$;L(1)::LPRINT" * LN(X) ** ";I-1:NEXT I
3070 LPRINT:LPRINT" No. Y' ERROR "
3080 PI=0:P2=0:FOR I=1 TO N:LPRINT USING C$;I::LPRINTUSING A$;XDD(I),Y(I)::Y=L(1):Z=1:FOR J=2 TO N:Z=Z*X(I):Y=Y+L(J)*Z:NEXT J
3090 LPRINT USING A$;Y::YD=Y(I)-Y:LPRINTUSING A$;YD
3100 PI=PI+YD*YD:YD=Y(I)-YD:P2=P2+YD*YD:NEXT I
3110 LPRINT" - :LPRINT" COEFFICIENT of DETERMINATION ";;LPRINT USING A$;1-PI/P2
3120 RETURN
3130 END

```



時間は、人手での計算で1プレートあたり約3時間必要なのに対し、マイクロコンピュータで計算して判読値を打ち出してくる時間は6分であった。

定量方法の精度確認：この方法による定量値がマウスの免疫グロブリン量を正しく測定できているかどうかの確認のため、BALB/cCrSlc と C57BL/6CrSlc(SPF) 6カ月齢、雄各10匹の血清中 IgG 量と IgM 量を測定した。この測定にあたっては SV-Ag のかわりに抗マウス immunoglobulin ウサギ抗体を前述の濃度で固相化したプレートをを用いた。IgG 量は 2,000, 4,000, 8,000, 10,000 倍希釈血清で、IgM 量は 500, 1,000, 2,000, 4,000 倍希釈血清の4濃度で測定した値に希釈倍数を乗じ、その平均したものを 1ml 中の IgG および IgM 量とした。この値は夏梅[7], KIUCHI et al.[5] が報告しているマウス免疫グロブリン量と比較検討した。

判定基準：Sendai virus に感染していないことが補体結合反応で確認されている6系統のマウス、BALB/cCrSlc, C3H/HeSlc, C57BL/6CrSlc, DBA/2CrSlc, Slc: ddY, Slc: ICR(SPF) の6カ月齢、雄雌、各系統20匹の1:10希釈血清濃度における IgG と IgM の O.D. 値を測定し、Sendai virus 非感染血清における背景データーとした。また、IgG あるいは IgM の平均標準曲線(20曲線分)の O.D. 値から測定限界低値を決め、この2つの成績を基にして判定基準を決めた。

被検血清：8機関より入手したマウス原血清あるいは1:5希釈血清の279検体を用いた。これらの血清は数系統のマウスから採取したが、一部のマウスは系統名不明であった。

ELISA スクリーニング：279検体の血清を1:10および1:20希釈血清とし、SV-Ag に対する IgG 抗体は1:10, IgM 抗体は1:20希釈血清でスクリーニングを行った。陽性と判定されたものについては抗体価と免疫グロブリン量を測定した。

ELISA 抗体価および免疫グロブリン量：IgG 抗体は1:100希釈から2段階倍数希釈で8段階、IgM 抗体は1:20希釈から2段階倍数希釈で8段階までの ELISA 価を調べた。また、IgG 抗体が1:100希釈濃度で陰性と判定された検体は1:10希釈から2段階倍数希釈で再試験を行った。IgG および IgM に低力価(1:10~1:80)であった検体については BCS 対照 well を置くことによって非特異的な反応と区別した。IgG と IgM 抗体量は各希釈濃度で測定された定量値に希釈倍数を乗じ、その平均値を血清 1ml 中の抗体量とした。IgG 抗体が高力価(1:≧3,200)の検体はエンドポイントより

5管上までの値を平均して抗体量とした。

抗体量から抗体価の推定：血清1希釈濃度で測定した抗体量から抗体価の推定を試みた。IgG と IgM の ELISA 価が判明しているそれぞれ16検体の血清について、IgG は1:400希釈濃度で、IgM は1:20希釈濃度の1濃度で測定した抗体量から ELISA 価を推定し、既知抗体価と比較検討した。

## 成 績

1) 定量方法の精度確認：BALB/c および C57BL/6 (6カ月齢、雄)の血清中 IgG と IgM 量を Table 1 に示した。BALB/c の IgG 量は 1,111 $\mu$ g/ml (830-1,348 $\mu$ g/ml), IgM 量は 352 $\mu$ g/ml (286-390 $\mu$ g/ml), C57BL/6 の IgG 量は 984 $\mu$ g/ml (633-1,818 $\mu$ g/ml), IgM 量は 316 $\mu$ g/ml (229-458 $\mu$ g/ml) と測定された。この値は夏梅[7]が報告している BALB/c および C57BL/6 (6カ月齢、雄)の血清中 IgG 量がそれぞれ 1,956 $\mu$ g/ml と 1,015 $\mu$ g/ml, IgM 量がそれぞれ 171 $\mu$ g/ml と 265 $\mu$ g/ml の値と、Kiuchi et al.[5] が報告している *E. coli*-monocontaminated マウスの血清中 IgG 量 50mg/dl, また Conventional マウスの血清中 IgG 量 180mg/dl の値からみて、SPF マウスの血清に含有されている IgG と IgM 量の範囲にあるものと考えられ、この方法による測定がマウス免疫グロブリン量を適切に定量し得るものと判断された。

2) 判定基準：Sendai virus 非感染血清における背景データーを Table 2 に示した。1:10希釈血清での各系統の平均 O.D. 値は IgG が6系統ともに0.1以下の値であったのに対し、IgM は BALB/c が0.118, C3H/He が0.103, C57BL/6 が0.108, ICR が0.102 の値を示した。これらの値は IgM 標準曲線から 20~30ng/ml と判読されるものであった。また、IgM に対して高い O.D. 値を示した血清は BCS 対照 well でもほぼ同等の O.D. 値を示した。

Fig. 3 に IgG および IgM の平均標準曲線を示す。

Table 1. Serum IgG and IgM content of 6 month-old mice (male) estimated by ELISA method

Mouse	IgG content $\mu$ g/ml	IgM content $\mu$ g/ml
BALB/c	1111 (830-1348)	352 (286-390)
C57BL/6	984 (633-1818)	316 (229-458)

Mean value of 10 mice, with range in parenthesis.

Table 2. Background data of Sendai virus negative serum in 6 strain mice by ELISA method

Strain	1 : 10 dilution serum	
	IgG	IgM
BALB/c <sup>a)</sup>	0.088±0.032 <sup>b)</sup>	0.118±0.025
C3H/He	0.087±0.035	0.103±0.040
C57BL/6	0.073±0.023	0.108±0.039
DBA/2	0.065±0.014	0.071±0.024
ddY	0.046±0.016	0.070±0.051
ICR	0.062±0.032	0.102±0.033

a) Mice were 6 month-old, male and female (N=20)  
b) Mean of Optical Density (O.D.<sub>492</sub>) value±S.D.

IgG 標準曲線では 10ng/ml の O.D. 値が 0.121±0.023, IgM 標準曲線では 30ng/ml の O.D. 値が 0.122±0.039 の値であった。この値と背景データの成績を比較すると、この方法での測定限界低値は IgG が 10ng/ml, IgM が 30ng/ml と判断された。

この成績からスクリーニングで IgG が 10ng/ml 以上, IgM が 30ng/ml 以上と判読されたものを一応陽性とし、最終的には抗体価を測定して判定した。低力価のものについては非特異的な反応と区別し難い場合があるので次の基準をもうけて判定した。①、被検血清 1 : 10希釈 (IgG), 1 : 20 希釈 (IgM) で対照の BCS が 0 ng/ml と判読された場合、抗原加 well が陽性を示した最高希釈をもって抗体価とした。②、①の BCS 対照が 1ng/ml 以上と判読された場合、BCS 対照が 0ng/ml と判読された希釈濃度で、抗原加 well が陽性を示し、その差が 1 管以上ある最高希釈をもって抗体価とした。③、被検血清を希釈したにもかかわらず、BCS 対

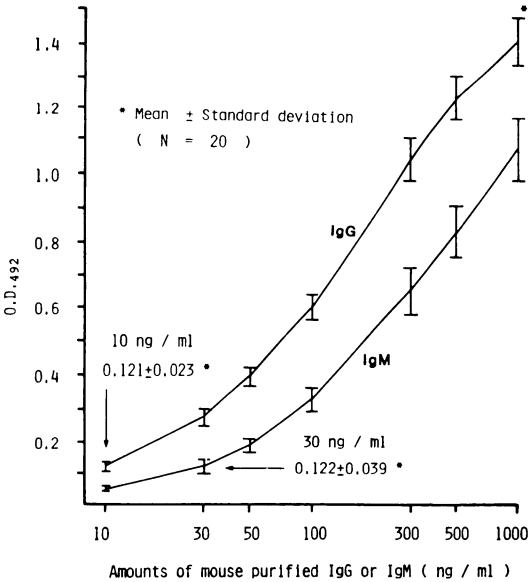


Fig.3 Mean standard curve of mouse purified IgG and IgM. The sensitivity limit of this determination for IgG and IgM was 10ng/ml, 30ng/ml, respectively, comparing with the results of table 2.

照および抗原加 well において同値を示した場合は、判定不能とした。

3) ELISA スクリーニング：8 機関より入手した 279 供試血清のスクリーニングの結果を Table 3 に示す。8 機関のうち 6 機関より入手した 95/240 検体が IgG と IgM 抗体あるいはそのどちらかに陽性と判定された。IgG 抗体に陽性と判定されたものは 89 検体, IgM 抗体に陽性と判定されたものは 51 検体であった。

Table 3. Results of ELISA screening for anti-Sendai virus antibody in mouse sera

Group	Sample (No.)	Negative (No.)	Positive (No.)			
			IgG and/or IgM	IgG and IgM	IgG only	IgM only
A	150	105	45	30	9	6
B	20	2	18	7	11	0
C	27	20	7	2	5	0
D	19	9	10	3	7	0
E	6	1	5	2	3	0
F	18	8	10	1	9	0
G	35	35	0			
H	4	4	0			
Total	279	184	95	45	44	6

Table 4. Results of ELISA titration for anti-Sendai virus antibody in naturally infected mouse sera

Group	Positive for IgG	ELISA titer											
		1 : 10	20	40	80	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800
A	39*	1	2		1		3	6		11	11	2	2
B	18					1			3	2	8	4	
C	7									1	3	3	
D	10							1	1	6	2		
E	5						2			2	1		
F	10			1				1	2	5		1	
Total	89	1	2	1	1	1	5	8	6	27	25	10	2

Group	Positive for IgM	ELISA titer					* No. of positive. ** Nonspecific reaction.
		1 : 20	40	80	160	NS**	
A	36*	13	13	3	3	4	
B	7	1	5	1			
C	2	1	1				
D	3	2	1				
E	2		2				
F	1	1					
Total	51	18	22	4	3	4	

Table 5. Relationship of ELISA titer and antibody amounts in Sendai virus positive mouse sera

IgG titer		N*	IgG amount $\mu\text{g/ml}$		IgM titer		N*	IgM amount $\mu\text{g/ml}$	
1 :	10	1	0.1**						
	20	2	0.3		1 :	20	18	0.7	( 0.5- 0.9)
	40	1	0.4			40	22	1.2	( 0.9- 1.8)
	80	1	0.8			80	4	2.4	( 2.2- 2.9)
	100	1	1.6			160	3	4.0	( 3.4- 4.8)
	200	5	4.9 ( 3.0- 6.9)						
	400	8	11.4 ( 8.5- 14.4)						
	800	6	17.3 ( 15.9- 21.2)						
	1,600	27	30.1 ( 22.7- 38.4)						
	3,200	25	52.9 ( 36.1- 76.2)						
	6,400	10	97.5 ( 82.3-126.8)						
	12,800	2	152.7 (151.0-154.3)						

\* Number of positive sera.

\*\* Mean value of IgG or IgM amount, with range in parenthesis.

4) ELISA 抗体価および免疫グロブリン量との関係: 95検体の抗体価を Table 4 に示す。IgG 抗体に陽性と判定された 89 検体の抗体価の範囲は 1 : 10~1 : 12,800 であった。このうち 91.0% (81検体) のものが 1 : 200 ~1 : 6,400の範囲に, 58.4% (52検体) が 1 : 1,600 と

1 : 3,200 の中に含まれていた。一方 IgM 抗体に陽性と判定された51検体の抗体価の範囲は 1 : 20~1 : 160 まであり, 78.4% (40検体) のものが 1 : 20 : 1 : 40 の力価であった。また IgM 抗体のみに陽性と判定された 6 検体のうち 4 検体が, BCS 対照 well でもほぼ同等

Table 6. Relationship of ELISA titer obtained at titration and predict titer at one dilution test in Sendai virus naturally infected mouse sera

No.	A		B		No.	C		D	
	IgG titer	( $\mu\text{g/ml}$ )	IgG titer	( $\mu\text{g/ml}$ )		IgM titer	( $\mu\text{g/ml}$ )	IgM titer	( $\mu\text{g/ml}$ )
1.	1 : 6,400	(101.3)	1 : 6,400	( 91.0)	1.	1 : 160	( 3.7)	1 : 160	( 3.6)
2.	3,200	( 64.9)	6,400	( 98.0)	2.	160	( 3.4)	160	( 3.1)
3.	3,200	( 66.4)	3,200	( 77.1)	3.	80	( 2.3)	80	( 2.1)
4.	3,200	( 49.8)	3,200	( 47.1)	4.	40	( 1.1)	40	( 1.0)
5.	3,200	( 57.0)	3,200	( 71.6)	5.	40	( 1.6)	40	( 1.6)
6.	3,200	( 41.9)	3,200	( 63.7)	6.	40	( 1.1)	40	( 1.0)
7.	3,200	( 36.1)	1,600	( 28.7)	7.	40	( 1.5)	40	( 1.5)
8.	1,600	( 33.9)	3,200	( 45.8)	8.	40	( 1.4)	40	( 1.1)
9.	1,600	( 28.1)	1,600	( 23.6)	9.	40	( 1.7)	40	( 1.5)
10.	1,600	( 23.4)	800	( 17.3)	10.	40	( 1.8)	40	( 1.8)
11.	1,600	( 27.7)	800	( 19.9)	11.	40	( 1.0)	20	( 0.8)
12.	400	( 12.0)	400	( 14.8)	12.	20	( 0.5)	20	( 0.5)
13.	400	( 12.4)	400	( 15.8)	13.	20	( 0.8)	20	( 0.8)
14.	200	( 4.6)	200	( 5.5)	14.	20	( 0.6)	20	( 0.6)
15.	200	( 4.9)	200	( 7.5)	15.	20	( 0.5)	20	( 0.6)
16.	200	( 3.0)	200	( 4.2)	16.	20	( 0.8)	20	( 0.8)

A : ELISA IgG titer and average value of antibody amount.

B : Predict titer and IgG amount at 1: 400 dilution serum.

C : ELISA IgM titer and average value of antibody amount.

D : Predict titer and IgM amount at 1: 20 dilution serum.

の O.D. 値を示し、非特異的な反応として処理された。この結果 IgM 抗体のみに陽性と判定されたものは 2 検体となり、最終的には 91 検体が SV-Ag に対する抗体陽性と判定された。

IgG と IgM 抗体価の関係をみると IgG 抗体が高力価なのに対し、IgM 抗体は低力価であった。IgG と IgM 抗体ともに陽性と判定されたものについてみても A グループの 2 検体を除きすべて IgG 抗体が高い値を示した。IgM 抗体の方が高い値を示した 2 検体の抗体価は 1 検体が IgG 1: 10, IgM 1: 20, 残り 1 検体が IgG 1: 80, IgM 1: 160 の力価であった。また、このグループには IgM 抗体のみ陽性と判定された 2 検体が含まれており、ともに 1: 20 の抗体価であった。

Table 5 に抗体価と免疫グロブリン量との関係を、各抗体価で測定された抗体量の範囲とその平均値で示した。IgG 抗体量は  $0.1\mu\text{g/ml}$  から  $154.3\mu\text{g/ml}$  まで、IgM 抗体量は  $0.5\mu\text{g/ml}$  から  $4.8\mu\text{g/ml}$  までと測定され、抗体価と抗体量との間には相関が認められた。すなわち、抗体価が 1 管高いものは抗体量もほぼ 2 倍の量で測定されるものであった。しかし IgG 抗体と IgM 抗

体とでは同じ抗体価でも測定量に差が認められた。IgG と IgM 抗体の定量値は各希釈濃度で測定された値の平均値で示したが、低希釈濃度では低く、高希釈濃度では高く測定される傾向が認められた。

5) 既知抗体価と推定抗体価との比較: Table 6 には既知抗体価と 1 希釈濃度で測定した抗体量から推定した抗体価との比較を示した。この推定にあたっては Table 5 の成績の平均抗体量を基にした。IgG 抗体価は既知抗体価よりも 1 管高く推定されたものが 2/16 検体、1 管低く推定されたものが 3/16 検体であった。IgM 抗体価は既知抗体価より高く推定されたものではなく、1/16 検体のみが 1 管低く推定された。この成績から IgG 抗体価は 1: 400 希釈で、IgM 抗体価は 1: 20 希釈の 1 濃度で測定された抗体量で抗体価を推定し得るものと判断された。

## 考 察

今回、われわれが確立した血清学的診断技術の特徴は、ELISA 法の優れた特性に、微生物の感染に起因す

る IgG 抗体および IgM 抗体を ng/ml の単位まで特異的に定量する技術を確認して、判定基準を明確にし、診断の精度と客観性を高めたこと、それに加えマイクロコンピュータ解析を導入し、多数検体の迅速処理を可能にしたことである。

実験小動物の感染症の血清学的診断技術の中で、抗体量をもって感染の有無を診断する技術の報告は見当らない。従来の方法では抗体の相対的な量を単位または力価として表示し、その判定基準は非特異反応の最高値をわずかに越える血清希釈倍数をもって特異抗体の陽性限界としているのが通常である。しかし、われわれの方法は特異抗体の陽性限界を特異的な抗体を定量することにより、少しでも向上させ、血清学的診断技術に常につきまとう非特異的な反応を特異的な反応から区別する試みでもある。これは、標準曲線と背景データから割り出した測定限界低値を基にした判定基準から、ある程度達成された。その結果、精度と客観性の高い診断が実施可能になったのである。さらに IgG 抗体と IgM 抗体レベルで血清学的診断を実施するのも精度を高めた 1 要因と考えられる。

ELISA 法へのコンピュータ解析の導入を検討した報告も実験小動物の感染症の血清学的診断技術の中には見当らない。抗体を定量する技術はコンピュータ解析の導入により初めて多数の検体を迅速に処理可能なものとした。

更に、この SV 症の診断実施で得た成績から、精度の高い血清学的診断を実施できることが確認された。供試された 279 検体のうち IgG 抗体に対して非特異的に反応していると考えられる血清は 1 例も認められなかった。しかし IgM 抗体に対しては 4 検体の血清が非特異的と思われる反応により判定不能として処理された。この原因は IgM 抗体の背景 O.D. 値が高いことにある。今後、IgM 抗体の背景 O.D. 値を下げることでより精度をさらに高めることが可能と思われ、これは次の課題となろう。また、今回の成績の中で、A グループの IgM 抗体が高率で、しかも単独で検出されている検体が認められた成績は、感染初期抗体を検出していることを示している。感染初期抗体の確認可能な診断技術は血清学的診断を実施する上で重要なことであることは言及するまでもない。

一方、抗体量と抗体価の間に相関が認められた成績、および血清の 1 希釈濃度で測定した抗体量から抗体価を推定し得た成績は、抗体定量技術の利点といえ、今後、検査手技を簡便にする 1 手段として利用できることを示

唆している。また、これらの成績と体験を基礎にして他の感染症の血清学的診断を開発することが可能になった。

しかしながら、われわれの目的は、より鋭敏で特異性の高い診断技術を実験小動物の微生物モニタリングへ導入することであり、今後、検査項目を増やし、更に、この方法に改良を加えて行き、血清学的診断法を用いた微生物モニタリングの指針を作製したい。

## 要 約

微生物の感染に起因する抗体をコンピュータ解析を導入した ELISA 法で定量することによって、新しい診断法を確立した。マウス Sendai virus 自然感染例での診断を実施したところ、多数の検体処理が迅速に、より精度の高いものとして可能となった。Sendai virus に対するマウスの IgG と IgM 抗体の定量は standard purified mouse IgG または IgM の定量曲線に照して検体が示した O.D. 値から算出された。この操作はすべて Titertek Multiskan MC に直結したマイクロコンピュータ (Micro 8) で行われた。測定限界低値は IgG で 10ng/ml, IgM で 30ng/ml であった。Sendai virus 抗体陽性と判定された 91 検体のうち 45 検体が IgG と IgM 抗体陽性、44 検体が IgG 抗体のみ、2 検体が IgM 抗体のみ陽性で、抗体価は IgG が 1:10~1:12,800, IgM が 1:20~1:160 であった。この抗体価での抗体量は IgG で 0.1~154 $\mu$ g/ml, IgM で 0.5~4.8 $\mu$ g/ml と判読された。抗体価と抗体量の間には相関関係が認められ、IgG 量が約 10 $\mu$ g/ml と判読された時は 1:400, 30 $\mu$ g/ml の時は 1:1,600, IgM 量が約 2.4 $\mu$ g/ml の時は 1:80, 4 $\mu$ g/ml の時は 1:160 の抗体価と判定された。

## 謝 辞

本研究において、MC curve fitting program (F basic) の作製に御協力いただいた名古屋大学 農学部、大学院生、大島五紀、坪田裕司両氏ならびに天城康明氏 (マイクロコンピュータシステムコンサルタント) に深謝します。また、種々の御指導、御助言をいただいた静岡県実験動物農業協同組合、品質管理部長、田中利男博士、技術的な御指導いただいた浜松医科大学、医学部、微生物学教室、原口惣一、實川友史、石原英幹各氏に深く感謝します。

## 文 献

- [1] Ackerman, J. I., Fox, J. G., and Murphy, J. C (1984). An enzyme linked immunosorbent assay for detection of antibodies to *Corynebacterium kutscheri* in experimentally infected rats. *Lab. Anim. Sci.*, **34**, 38-42.
- [2] Cassell, G. H., Lindsey, J. R., Davis, J. K., Davidson, M.K., Brown, M.B., and Mayo, J.G. (1981) Detection of natural *Mycoplasma pulmonis* infection in rats and mice by an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). *Lab. Anim. Sci.*, **31**, 676-682.
- [3] Ertl, H.C.J., Gerlich, W., and Koszinowski, U.H. (1979). Detection of antibodies to Sendai virus by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J Immunol. Methods.*, **28**, 163-176.
- [4] Iwai, H., Yamaguchi, R., Otsuka, Y., Ueda, K., and Saito, M. (1984). Immunoglobulin classes of anti-Sendai virus antibody detected by ELISA in infected nude mouse serum. *Microbiol. Immunol.*, **28**, 481-491.
- [5] Kiuchi, Y., Maejima K., Fujiwara, K., and Tajima, Y. (1972). Serum IgG in Germfree, Gnotobiotic and Conventional mice of different ages. *Jpn. J. Exp. Med.*, **42**, 53-65.
- [6] 松原純子・神山恒夫・斉藤学・中川雅郎 (1985). Enzyme-linked immunosorbent assay 法によるマウスおよびラットの *Mycoplasma pulmonis* 感染症の血清学的診断. 実験動物, **34**, 49-55.
- [7] 夏梅俊之助 (1974). マウスの免疫グロブリン. 免疫実験操作法. pp. 751-758, 日本免疫学会編.
- [8] Peters, R. L., and Collins Jr. M. J. (1981). Use of mouse hepatitis virus antigen in an enzyme-linked immunosorbent assay for Rat Coronaviruses. *Lab. Anim. Sci.*, **31**, 472-475.
- [9] Singh, S. B., and Lang, C. M. (1984). Enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis of Kilham rat virus infection in rats. *Lab. Anim.*, **18**, 364-370.