

Enzyme-linked immunosorbent assay による B 群溶血 レンサ球菌の IgG, IgM 抗体の測定

田 近 志保子 金 子 克

岩手医科大学歯学部口腔微生物学講座

(主任: 金子 克教授)

[受付: 1988年 6月15日]

抄録: B 群溶血レンサ球菌 (group B streptococci, GBS) 各型の菌体から得た多糖体を精製した型特異抗原を用いて, GBS 感染症小児の血清 immunoglobulin G (IgG) と immunoglobulin M (IgM) 抗体を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) により測定した。対象は虚弱児・慢性疾患児収容施設の小・中学生で, GBS の分離は1985年 3月から1986年 5月まで毎月行い, 血清の採取は1985年 4月, 6月, 11月, 1986年 3月に行った。GBS 分離陽性者の型特異 IgG, IgM 抗体を ELISA で測定した。GBS 分離陽性者は分離陰性者に比べ, 型特異 IgG, IgM 抗体はともに高かった。GBS Ia, Ib, Ic, II, III型の抗体はすべて型特異的であり, 異型抗体の上昇は認められなかった。

GBS 感染症小児の GBS 型特異 IgG, IgM 抗体の経時的推移を見ると GBS をほとんど毎月分離した学童は, 型特異 IgM, IgG 抗体は高かった。また GBS 分離直後は型特異 IgG 抗体よりも型特異 IgM 抗体が高く, GBS が分離できなくなると型特異 IgM, IgG 抗体は低下することを確認した。これらのことから ELISA により GBS 型特異 IgM, IgG 抗体を測定できることが明らかになった。

Key words: ELISA, group B streptococci, IgG and IgM antibodies.

緒 言

近年, 新生児の B 群溶血レンサ球菌 (group B streptococci, GBS) による感染症が注目され, 治療の難渋, 予後の悪さもあいまって臨床的に問題になってきている。これまで化膿レンサ球菌感染症においては antistreptolysin O, antistreptokinase などの血清診断法が臨床的に広く用いられてきたが, GBS 感染症においては血清診断法が行われていない。radioimmunoassay にも匹敵する感度を持つ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) を用いての GBS 感染症の抗体測定^{1~3)}は行われてきてはいるが

まだ確立されておらず, GBS 各型特異 immunoglobulin (IgG), immunoglobulin (IgM) 抗体を測定する方法の開発が望まれていた。

著者らは GBS を分離した学童から血清を採取して, ELISA により GBS 型特異 IgG, IgM 抗体測定法を検討した結果, GBS 感染症の血清学的診断法の一つとして利用できることが明らかになったので報告する。

実 験 方 法

1. 材 料

被検血清

溶血レンサ球菌検索の目的で, 毎月咽頭培養

Immunoglobulin G and immunoglobulin M antibodies to group B streptococci by enzyme-linked immunosorbent assay.

Shihoko TAJIKA and Masaru KANEKO.

(Department of Microbiology, School of Dentistry, Iwate Medical University, Morioka 020)

岩手県盛岡市中央通1丁目3-27 (〒020)

Dent. J. Iwate Med. Univ. 13: 152-161, 1988

を行った虚弱児・慢性疾患児収容施設の小・中学生130名の血清を用いた。

2. GBS の分離と同定

滅菌綿棒で咽頭を拭い、溶血レンサ球菌選択培地〔5%ヒト血球加 Columbia agar base (BBL)1,000ml, nalidixic acid 15mg, colistin 10mg〕の一端に塗抹し、白金耳で塗布したのち37°C24時間ろうそくびん培養を行った。β溶血を指標に釣菌し、Todd-Hewitt broth (T-H broth BBL) に接種した。27°C24時間培養したのち、溶血レンサ球菌群別用血清(デンカ生研)を用いて凝集反応により群別し、さらにB群溶血レンサ球菌型別用血清(デンカ生研)を用いて、凝集法でIa, Ib, II, III, IV, V, Q, R, S, W, X型の型別を行った。

またIc型はIa型に凝集したものについて沈降反応を行ってIc型の型別をした。

3. ELISA 測定法

1) ELISA 用 GBS 抗原の作製

GBS各型(Type Ia "090", Type Ib "H36 B", Type Ic "A909", Type II "18RS21" Type III "6313")の菌株を用いYamawakiら⁹⁾の方法に準じて、T-H brothに1% glucose, 0.8% NaHCO₃, 0.1% Na₂HPO₄を添加した培地で37°C48時間5%炭酸ガス存在下で培養した。培養後、遠心分離(3,000 rpm)して菌体を集め、phosphate-buffered saline(PBS, pH7.2)で3回洗い、PBSで25%浮遊液とした。1N HClを用いてpH2.0に修正して、95°C10分間加熱抽出した。さらに1N NaOHでpH7.2に修正して10,000 rpm 60分間、遠心分離して上清を集め粗抗原とした。

つぎに抗原の精製は、粗抗原をPBSで透析してevapolaterで100分の1に濃縮したのち、さらに0.02M phosphate buffer (pH 8.0)で透析した。

DEAE cellulose column chromatography (DE52, Whatman, 1.5×46cm)で得られた画分の活性はGBS各型の抗血清(ウサギ)を用いて、ゲル内沈降反応により調べた。ついで活性画分を集めCM cellulose column chroma-

tography (CM52, Whatman, 1.7×25cm)を行い、再びGBS各型の抗血清(ウサギ)を用いてゲル内沈降反応により活性画分を調べた。得られた活性画分をSephadex G-200 (Pharmacia, 2.4×96cm)でゲルろ過して多糖体精製抗原とした。

2) ELISA 用抗原の前処理

Anthonyら²⁾の方法に従い、抗原500 μgを含む0.01N NaOH 1.0ml中にcyanogen bromide(半井化学)6.25mgを加え、0.1N NaOHでpH10.8に修正して室温に10分間放置した。つぎにtyramine hydrochloride (Sigma)を5 mg加え、0.1N HClでpH8.5に修正して、精製水と0.01M PBS (pH7.4)とで4°C24時間ずつ透析した。

3) ELISA による血清 IgG, IgM 抗体の測定

ELISAはRoteら¹⁾の方法で、ELISA用 flat-bottom well microtiter plate (ELISA用プレートS, 住友ベークライト)を用い、binding buffer (0.1M carbonate buffer, pH9.6)で希釈した抗原100 μlをすべてのwellに入れ、4°C24時間吸着固相化させたのち3回 washing buffer [0.01M PBS (pH7.2), 0.5% Tween 20 (Sigma)]で洗い乾燥して、これに4倍から8,192倍まで階段希釈した被検血清を100 μlずつ加えた。また対照として被検血清のかわりに diluting buffer [0.01M PBS (pH7.2), 0.5% Tween 20, 0.5% bovine serum albumin (半井化学)]を100 μl添加し、37°C2時間静置して反応させたのち washing bufferで3回洗浄した。ついで diluting bufferで100倍に希釈した peroxidase 標識 goat anti-human IgG (MBL)またはIgM(MBL)を100 μlずつ添加して、37°C2時間静置して反応させたのち3回洗浄した。つぎに substrate [0.05% hydrogen peroxide (関東化学)1対0.08% 5-amino salicylic acid (関東化学)9の割合] 100 μlを添加して、室温で60分間暗所に静置して反応させたのち、1N NaOH 10 μlを加え反応を停止させて、マイクロプレート光度計 (MTP-12型、

コロナ) を使用して 450nm で吸光度を測定した。

結 果

1. ELISA 用 GBS 抗原の精製

DEAE cellulose column chromatography, CM cellulose column chromatography と Sephadex G-200 gel filtration の溶出パターンを Fig.1-a, b, c に示した。各画分のゲル内

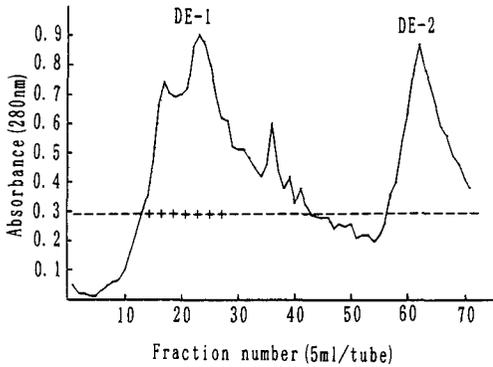


Fig.1-a DEAE cellulose column chromatography for elution pattern and reactive fractions of GBS type III antigen.

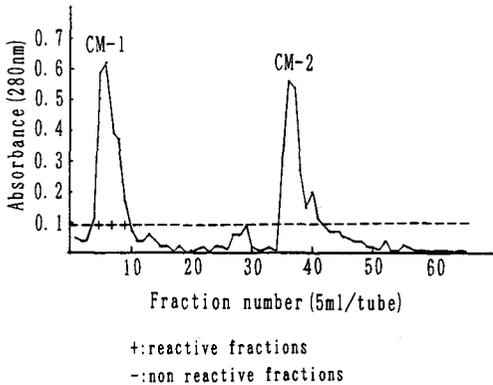


Fig.1-b CM cellulose column chromatography for elution pattern and reactive fractions of GBS type III antigen.

沈降反応による抗原活性の有無を (+) と (-) で示したが, DEAE cellulose column chromatography (Fig.1-a) では No.13 から No.27 画分のピーク DE-1 に, CM cellulose column chromatography (Fig.1-b) では No.4 から

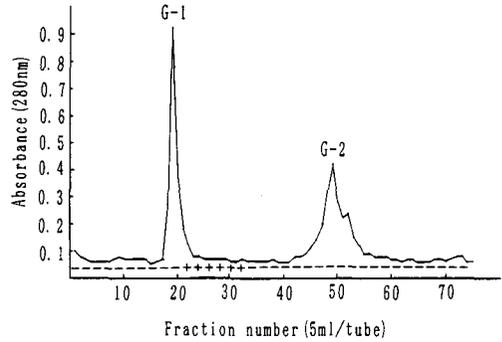


Fig.1-c Sephadex G-200 gel filtration for elution pattern and reactive fractions of GBS type III antigen.

No.9 画分のピーク CM-1 に抗原活性があり, Sephadex G-200 gel filtration (Fig.1-c) ではピーク G-1 からはずれた No.22 から No.32 画分 (分子量 $2 \times 10^6 \sim 6 \times 10^6$) に抗原活性が認められた。

2. ELISA 用 GBS 抗原量の算定

精製して得られた GBS III 型抗原 $400 \mu\text{g/ml}$ から 2 倍階段希釈したものに対して, 抗体陽性, 陰性血清 (希釈倍数 2,048 倍, 4,096 倍, 8,192 倍) の ELISA による titration curve を Fig.2 に示した。

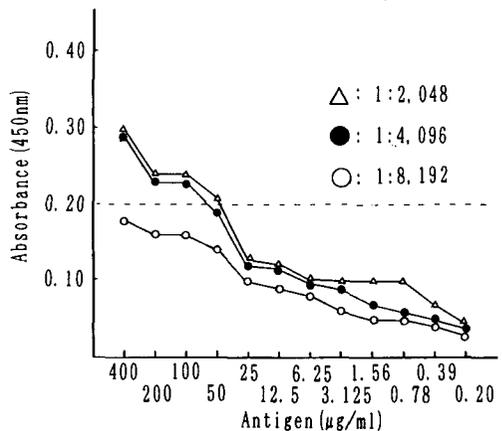


Fig.2 ELISA titration curves of GBS type III antigen against 2,048, 4,096 and 8,192 dilution of a patient serum.

陰性, 陽性限界値を陰性対照吸光度平均値の 2 倍値とすると, 陰性対照吸光度平均値が 0.10

であったので陰性，陽性限界値は0.20となった。

吸光度0.20以上を示したのは血清希釈4,096倍では抗原量 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上，2,048倍では50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上であった。つぎに GBS III型抗原 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とその前後 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の3濃度を用いて，ELISA で titration を行った (Fig.3)。吸光度0.20以上を示したの

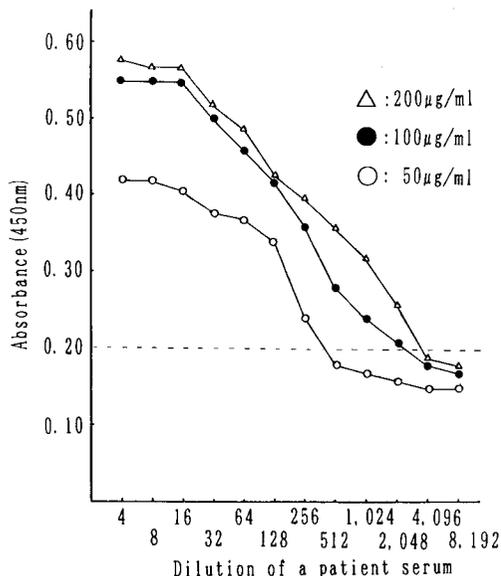


Fig.3 ELISA titration curves of a patient serum against 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ GBS type III antigens.

は抗原量 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では血清希釈が2,048倍，50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では256倍であった。

以上の結果から使用抗原量は抗体陽性血清の最高希釈倍数を示す最小抗原量を取り 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とした。

GBS III型以外の GBS 各型についても，GBS III型と同様の方法で最高血清希釈倍数を示す最小抗原量を算定した。その結果，GBS I a型は100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，I b型は100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，I c型は200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，II型は200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

3. ELISA による GBS 各型に対する血清 IgG, IgM 抗体の測定

GBS 分離陽性者30名，分離陰性者100名の ELISA による血清抗体価の測定結果を Table 1 に示した。GBS 分離陽性者の IgG 抗体は GBS I a型分離陽性者15例では，GBS I a型特異

抗体のみが認められ，抗体価は128倍から4,096倍で異型抗体は認められなかった。GBS III型分離陽性者10例についても同様に GBS III型特異抗体のみが認められ抗体価は256倍から4,096倍であった。その他 GBS I b, I c型分離陽性者各2例，II型分離陽性者1例に，GBS 型特異抗体のみが確認された。

IgM 抗体については IgG 抗体よりも抗体価は低い，型特異抗体のみが確認できた。

また GBS 分離陰性者については GBS 各型特異 IgG, IgM 抗体は確認できなかった。

4. ELISA による血清 IgG, IgM 抗体の吸光度と血清希釈倍数との関係

GBS 分離陽性者10名(III型4名，I a型6名)，分離陰性者5名の IgG と IgM 抗体を ELISA により測定した。Table 2 に IgG 抗体，Table 3 に IgM 抗体の吸光度と血清希釈倍数との関係を示した。吸光度0.20以上を示す血清の最小希釈倍数を抗体価とすると，GBS 分離陽性者の IgG 抗体価は256倍から4,096倍，IgM 抗体価は128倍から2,048倍であった。さらに，この中から GBS III型分離陽性者5名，陰性者2名の吸光度と血清抗体価の関係を調べた(Fig.4-a, b)。

吸光度は血清希釈4倍，8倍で上昇するものもあったが，約16倍でプラトーに達し，吸光度と血清希釈倍数の間ではほぼ直線関係が得られた。血清希釈4,096倍は吸光度0.60以上，2,048倍は吸光度0.50~0.60，1,024倍は吸光度0.40~0.50，そして512倍は吸光度0.30~0.40の間であった。したがって血清を4倍から8,192倍まで階段希釈しなくとも，16倍希釈血清の吸光度を測定することにより抗体価が推定できる。

たとえば吸光度0.54であれば抗体価は2,048倍であるので以後の実験から16倍希釈血清の吸光度で抗体価を表すことにした。

5. GBS 感染症患者の血清 IgG, IgM 抗体の経時的推移

GBS を分離した時期と血清中の IgG, IgM 抗体の経時的推移を Fig.5-a, b, c, d に示した。1985年3月から1986年5月に GBS の分離

Table 2. Absorbance of IgG antibodies against GBS type III or I a antigen for GBS isolated and non isolated.

Human subject	Dilution of sera													
	C ^{*1}	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096	1:8192	
GBS isolated type	^{*2} 233 (^{*3} III)	0.08	0.62	0.62	0.62	0.61	0.60	0.55	0.44	0.35	0.31	0.24	<u>0.22</u>	0.18
	195 (III)	0.08	0.38	0.38	0.38	0.36	0.30	0.28	<u>0.21</u>	0.17	0.15	0.14	<u>0.13</u>	0.13
	368 (III)	0.07	0.56	0.56	0.56	0.56	0.50	0.44	0.36	0.32	0.28	<u>0.22</u>	0.19	0.18
	378 (III)	0.09	0.47	0.47	0.46	0.44	0.38	0.37	0.30	0.22	<u>0.21</u>	0.18	0.16	0.16
	155 (I a)	0.08	0.57	0.57	0.56	0.55	0.48	0.47	0.42	0.38	0.30	<u>0.22</u>	0.19	0.16
	161 (I a)	0.09	0.55	0.54	0.54	0.52	0.50	0.48	0.46	0.40	0.32	<u>0.24</u>	0.18	0.15
	164 (I a)	0.08	0.64	0.64	0.64	0.62	0.58	0.50	0.48	0.46	0.40	0.32	<u>0.21</u>	0.19
	190 (I a)	0.07	0.46	0.46	0.46	0.42	0.40	0.38	0.34	0.26	<u>0.21</u>	0.18	0.16	0.14
	194 (I a)	0.08	0.64	0.64	0.64	0.60	0.54	0.52	0.50	0.46	0.36	0.29	<u>0.22</u>	0.17
	218 (I a)	0.08	0.63	0.63	0.63	0.61	0.60	0.54	0.44	0.35	0.31	0.25	<u>0.22</u>	0.19
GBS non isolated	257	0.08	0.14	0.14	0.14	0.13	0.12	0.11	0.11	0.10	0.10	0.09	0.09	0.08
	258	0.07	0.13	0.13	0.12	0.11	0.11	0.10	0.10	0.09	0.08	0.08	0.07	0.07
	339	0.06	0.15	0.15	0.15	0.14	0.13	0.12	0.11	0.10	0.10	0.09	0.08	0.06
	342	0.05	0.14	0.13	0.13	0.12	0.11	0.11	0.10	0.10	0.09	0.08	0.06	0.05
	366	0.06	0.12	0.12	0.12	0.11	0.10	0.10	0.10	0.09	0.08	0.07	0.07	0.06

*1 : Control [diluting buffer (0.01M PBS,pH 7.2 with 0.5% Tween 20 and 0.5% bovine serum albumin)]

*2 : A number of human subject. *3 : Type of GBS. *4 : Over absorbance 0.20.

Table 3. Absorbance of IgM antibodies against GBS type III or I a antigen for GBS isolated and non isolated.

Human subject	Dilution of sera													
	C ^{*1}	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096	1:8192	
GBS isolated type	^{*2} 233 (^{*3} III)	0.08	0.53	0.52	0.52	0.50	0.48	0.46	0.40	0.32	0.24	<u>0.22</u>	0.19	0.18
	195 (III)	0.09	0.29	0.29	0.28	0.26	0.23	<u>0.21</u>	0.18	0.18	0.16	<u>0.14</u>	0.12	0.12
	368 (III)	0.09	0.47	0.47	0.47	0.44	0.42	0.39	0.34	0.28	<u>0.22</u>	0.19	0.18	0.17
	378 (I a)	0.08	0.39	0.39	0.39	0.38	0.36	0.30	0.27	<u>0.22</u>	0.18	0.16	0.14	0.13
	155 (I a)	0.09	0.46	0.46	0.46	0.44	0.42	0.38	0.32	0.24	<u>0.21</u>	0.19	0.18	0.16
	161 (I a)	0.07	0.48	0.48	0.47	0.46	0.40	0.34	0.28	0.23	<u>0.22</u>	0.18	0.17	0.15
	164 (I a)	0.09	0.54	0.54	0.54	0.51	0.48	0.40	0.39	0.38	0.30	<u>0.22</u>	0.19	0.18
	190 (I a)	0.08	0.39	0.38	0.38	0.32	0.28	0.26	0.22	<u>0.21</u>	0.19	0.17	0.16	0.16
	194 (I a)	0.09	0.56	0.56	0.55	0.53	0.51	0.42	0.36	0.30	0.24	<u>0.21</u>	0.19	0.18
	218 (I a)	0.07	0.53	0.52	0.52	0.50	0.46	0.44	0.40	0.32	0.29	<u>0.22</u>	0.19	0.18
GBS non isolated	257	0.06	0.14	0.14	0.14	0.12	0.11	0.10	0.10	0.09	0.07	0.06	0.06	0.06
	258	0.04	0.12	0.12	0.12	0.11	0.10	0.09	0.09	0.08	0.07	0.05	0.05	0.04
	339	0.07	0.14	0.14	0.14	0.13	0.12	0.11	0.11	0.10	0.09	0.08	0.08	0.07
	342	0.06	0.13	0.13	0.13	0.12	0.10	0.09	0.08	0.08	0.07	0.07	0.06	0.06
	366	0.05	0.13	0.12	0.12	0.11	0.10	0.10	0.10	0.09	0.08	0.06	0.05	0.05

*1 : Control [diluting buffer (0.01M PBS, pH 7.2 with 0.5% Tween 20 and 0.5% bovine serum albumin)]

*2 : A number of human subject. *3 : Type of GBS. *4 : Over absorbance 0.20.

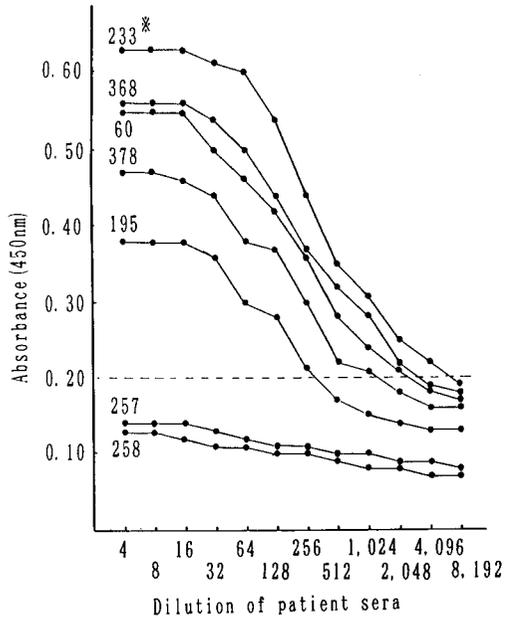


Fig.4-a Absorbance and dilution of patient sera for IgG antibody against GBS type III antigen by ELISA.

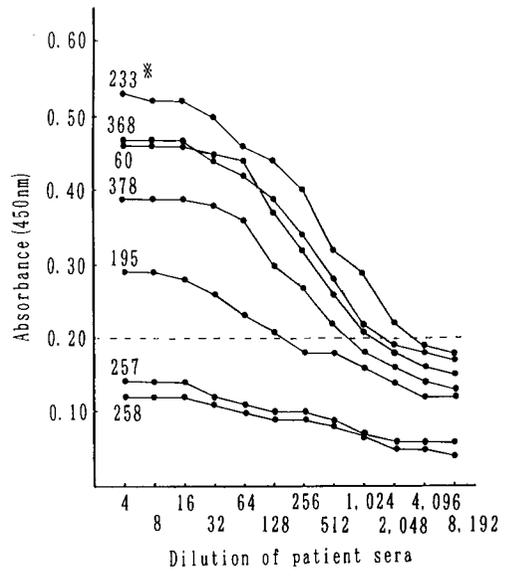


Fig.4-b Absorbance and dilution of patient sera for IgM antibody against GBS type III antigen by ELISA.

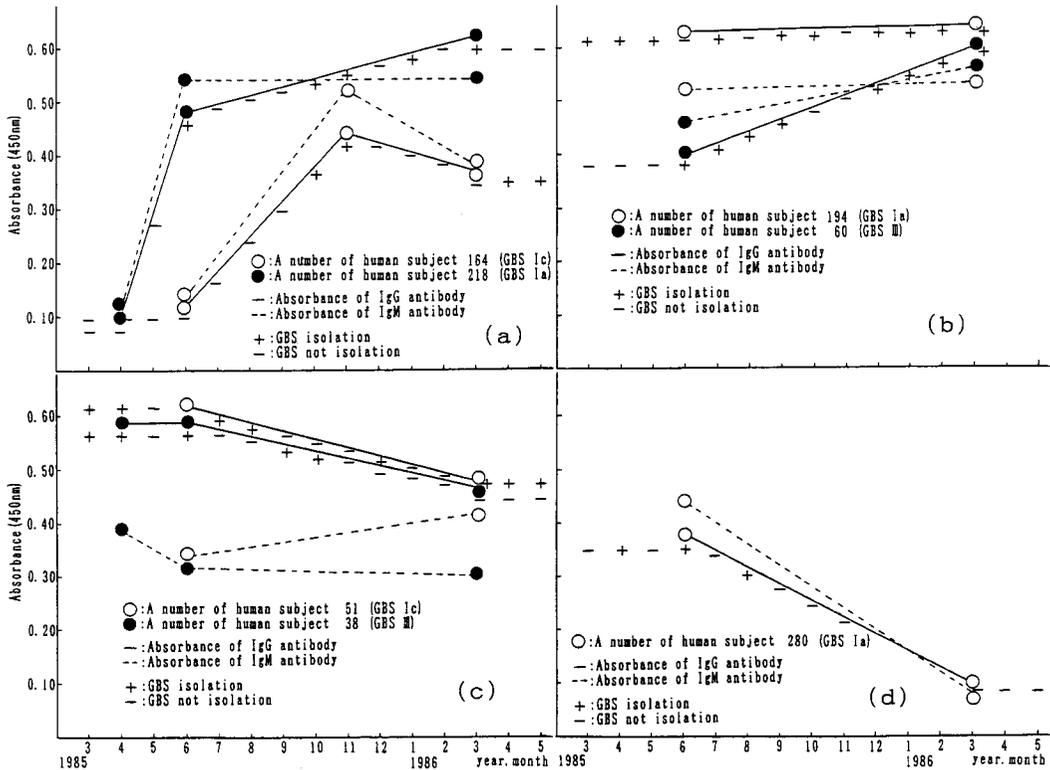


Fig.5 Change for absorbance of IgG and IgM antibodies by ELISA and GBS isolation.

症例51 (Fig.5-c) は, GBS Ic型を分離した例で, 1985年6月にはIgG抗体は0.62, IgM抗体は0.34であったが, しばらくGBSは分離できず, 再び分離した1986年3月には, IgG抗体は0.48と低下したがIgM抗体は0.42と高かった。症例38 (Fig.5-c) もGBSⅢ型が分離できなくなってIgG抗体が低下した例で, 1985年3月にはIgG抗体が0.59, IgM抗体は0.62であったが, 10月以降GBSは分離できず, 1986年3月にはIgG抗体は0.46, IgM抗体は0.30の値を示した。

症例280 (Fig.5-d) ではGBS Ia型を分離した1985年6月には, IgG抗体は0.38, IgM抗体は0.44であったが, 9月以降はGBSは分離できず1986年3月にはIgG抗体は0.10, IgM抗体は0.08と低値になった。

考 察

ELISAはEngvallら¹⁰⁾によって開発されて以来, 感度が高く微量ですむことなど, 非常に有用な方法として利用され, また抗原をflat-bottom well microtiter plateやビーズに吸着固相化させ, 保存に耐えることなどから, いつでもどこでもできて非常に便利な点が多い。GBSについてもELISAを用いての抗体測定の試みはされてきているが, 測定法がまだ確立されていない現時点ではGBSの特定の型に限定して測定している例が多い^{4,5,7)}が, GBS各型を分離した症例についての検討はみられなかった。そこで著者らはGBS各型(Ia, Ib, Ic, II, III)を分離した患者血清についてELISAを用いて型特異抗体の測定法を検討し, GBS分離陽性者とGBS分離陰性者との型特異IgG, IgM抗体との比較, IgG, IgM抗体の経時的な推移を調べた結果, GBS感染症の血清診断法としてその有用性が確認された。

抗原はトリクロル酢酸で抽出する方法¹⁾などもあるが, Yamawakiら⁹⁾の方法に準じて, GBS各型(Ia, Ib, Ic, II, III)を塩酸加熱抽出したものを粗抗原として, これを精製して作製した。

またELISAによる抗体測定法の問題点としては, plateへの抗原吸着固相化の問題があるが, poly-L-lysineを含んだ抗原を用いる方法¹¹⁾やhyper-immune serumで前処理する方法¹²⁾などが試みられており, 著者らはAnthonyら²⁾のtyramine hydrochlorideを作用させることにより非特異結合を引き起こすことなく抗原の吸着をうながす方法を用い, 抗原吸着固相化を行い良い結果を得た。

GBS分離陽性者と分離陰性者の血清中の型特異抗体をELISAにより測定すると, GBS分離陽性者の血清IgG抗体は256から4,096倍, IgM抗体は128から2,048倍であった。これらGBS各型のIgG, IgM抗体はすべて型特異的であり異型GBSの抗体上昇は認められなかった。GBS分離陰性者は血清IgG, IgM抗体ともに各型特異抗体上昇は確認できなかった。保科ら⁸⁾はELISAによるGBSⅢ型に対する血清IgG抗体価の測定で非保菌者よりⅢ型保菌者の抗体価が低い例も見られたと報告しているが, 著者らの成績ではGBS分離陽性者はIgM, IgG抗体ともに分離陰性者よりも高かった。Anthonyら⁴⁾も, GBSⅢ型に対する血清IgG, IgM抗体を, 妊婦とその児についてELISAで測定した結果, IgG抗体はGBSⅢ型保菌者の妊婦とその児では高値を示し, 非保菌者の妊婦とその児では低値を示すと報告している。一方, IgM抗体については児ではほとんど測定できなかったと報告している。さらにAnthonyら⁶⁾はIgG抗体について, 健康な人も含めてGBSⅢ型保菌者は非保菌者より高値を示し, GBS感染症患者血清でも明らかに非保菌者より高かったと報告している。

GBS感染症小児の血清IgG, IgM抗体の経時的推移を見るとGBSを毎月分離した学童ではIgM, IgG抗体は高値を示し, GBS分離直後はIgM抗体がIgG抗体より高かったが, 時間の経過とともにIgM抗体価が低下した例やGBSが分離できなくなって, IgG, IgM抗体は低くなっていく例など, 血清採取時期の関係から抗体変動の詳細は不明であるが, GBSの分

離と IgM, IgG 抗体産生との関係を明らかにすることができた。これまで同一患者で IgG, IgM 抗体を経時的に測定した例はなく, 将来, 臨床的な応用が期待できる。

吸光度と血清抗体価の関係を調べると血清希釈約16倍でプラトーに達し, 吸光度と血清希釈倍数の間ではほぼ直線的な関係が得られ, 16倍希釈血清の吸光度を測定することによって抗体価を推定することも明らかになったので, 多数の血清を取り扱っていく血清疫学においても有用と考える。

ELISA で著者らが用いた標識酵素 horse radish peroxidase は暗所で作用させる不便さがあり, より高感度で安定した alkaline phosphatase を用いる方法もあり, この点に関しては今後さらに検討する必要がある。

また ELISA による抗体価の陰性, 陽性限界値の基準については現在のところ規定したものではなく, 著者らは陰性対照吸光度平均値の2倍値とする Andersen¹⁸⁾, 千葉¹⁹⁾の方法を用いたが, 抗体を1ml 当たりの μg で表している報告^{3, 7)}もあり今後検討したいと考えている。

Abstract : Immunoglobulin G (IgG) and immunoglobulin M (IgM) antibodies were detected in human sera by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), using the type-specific antigens purified from polysaccharide, obtained from each type of group B streptococci (GBS).

The subjects were school children placed in an institution because of weak body condition or chronic diseases.

GBS were examined every month from March, 1985 to May, 1986. Sera were collected in April, June, and November, 1985, and again in March, 1986.

Type-specific IgG and IgM antibodies from GBS-isolated children were measured with ELISA.

Only antibody types GBS-Ia, Ib, Ic, II, and III were recognized to be type specific.

Both levels of type-specific IgG and IgM antibodies from GBS-isolated children were significantly high compared with those from non GBS-isolated children.

Children who were GBS-isolated almost every month during the test period had relatively high levels of IgG and IgM antibodies. Just after GBS isolation, the IgM antibody level was higher than IgG. When GBS isolation was not noted, the levels of IgG and IgM antibodies were low.

These findings demonstrate that an ELISA was effective as a measure for determination of IgM and IgG type-specific antibodies.

結 語

ELISA を用いて虚弱児・慢性疾患児収容施設の小・中学生を対象に GBS を分離し, 血清中の IgG, IgM 抗体を測定した結果, 次のような結論が得られた。

1. ELISA により GBS 型特異 IgG, IgM 抗体の測定が可能である。
2. GBS 分離陽性者は分離陰性者に比べ, 型特異 IgG, IgM 抗体は高かった。
3. 型特異 IgG, IgM 抗体の経時的推移を見ると GBS を常に分離した学童は型特異 IgM, IgG 抗体は高く, GBS 分離直後は IgG 抗体よりも IgM 抗体が高く, GBS が分離できなくなると GBS 型特異 IgM, IgG 抗体は低下することが認められた。

謝 辞

稿を終えるにあたり, 菌株を分与して戴きました神奈川県衛生研究所, WHO レンサ球菌国内レファレンスセンター, 滝沢金次郎博士の御厚意に感謝いたします。また検体採取にご協力戴きましたみどり学園, 石川敬治郎博士, 高砂子祐平博士をはじめ諸先生に感謝いたします。

文 献

- 1) Rote, N.S., Taylor, N.L., Shigeoka, O., Scott, J.R. and Hill, H.R. : Enzyme-linked immunosorbent assay for group B streptococcal antibodies. *Infect. Immun.* 27 : 118-123, 1980.
- 2) Anthony, B.F., Concepcion, N.F., McGeeary, S.A., Ward, J.I., Heiner, D.C., Shapshak, P. and Insel, R.A. : Immunospecificity and quantitation of an enzyme-linked immunosorbent assay for group B streptococcal antibody. *J. Clin. Microbiol.* 16 : 350-354, 1982.
- 3) Eisenstein, T.K., De Cuenninek, B.J., Resavy, D., Shockman, G., Carey, R.B. and Swenson, R.M. : Quantitative determination in human sera of vaccine-induced antibody to type-specific polysaccharide of group B streptococci using an enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Infect. Dis.* 147 : 847-856, 1983.
- 4) Anthony, B.F., Concepcion, N.F., Wass, C.L. and Hiner, D.C. : Immunoglobulin G and M composition of naturally occurring antibody to type III group B streptococci. *Infect. Immun.* 46 : 98-104, 1984.
- 5) Gray, B.M., Pritchard, D.G. and Dillon, H.C., Jr. : Seroepidemiological studies of group B streptococcus type II. *J. Infect. Dis.* 151 : 1073-1080, 1985.
- 6) Anthony, B.F., Concepcion, N.F. and Concepcion, K.F. : Human antibody to the group B *Streptococcus*. *J. Infect. Dis.* 151 : 221-226, 1985.
- 7) Gotoff, S.P., Odell, C., Papierniak, C.K., Klegerman, M.E. and Boyer, K.M. : Human IgG antibody to group B *Streptococcus* type III : comparison of protective levels in a murine model with levels in infected neonates. *J. Infect. Dis.* 153 : 511-519, 1986.
- 8) 保科 清, 鈴木葉子, 天野祐治, 小野川尊 : 新生児 B 群溶連菌感染症の発症予防のためのスクリーニング, 感染症誌, 61 : 561-565, 1987.
- 9) Yamawaki, T., Morita, M., Amano, Y. and Ishida, N. : A passive hemagglutination test for detection of antibodies against M antigen of group A type 12 Streptococci in human sera. *Microbiol. Immunol.* 26 : 611-615, 1982.
- 10) Engvall, E. and Perlmann, P. : Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J. Immunol.* 109 : 129-135, 1972.
- 11) Gray, B.M. : ELISA methodology for polysaccharide antigens : protein coupling of polysaccharides for adsorption to plastic tubes. *J. Immunol. Methods.* 28 : 187-192, 1979.
- 12) Barrett, D.J., Ammann, A.J., Stenmark, S. and Wara, D.W. : Immunoglobulin G and M antibodies to pneumococcal polysaccharides detected by enzyme-linked immunosorbent assay. *Infect. Immun.* 27 : 411-417, 1980.
- 13) Andersen, A. B., Yuan, Z., Hasl ϕ v, k., Vergmann, B. and Bennedsen, J. : Interspecies reactivity of five monoclonal antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* as examined by immunoblotting and enzyme linked-immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 23 : 446-451, 1986.
- 14) 千葉靖男 : ELISA 法によるウイルス抗体の測定, 臨床検査, 28 : 884-888, 1984.