

Examination of Enzyme-linked Immunosorbent Assay(ELISA) for Detection of Human Cytomagalovirus(HCMV) Specific IgM Antibody and its Applicability to Clinical Screening Program for HCMV Infection in Pregnancy

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/7805

ヒトサイトメガロウイルス特異 IgM 抗体の酵素結合免疫吸着剤検定法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) による検出とその臨床的検査への適用性

金沢大学がん研究所ウイルス部 (主任: 波田野基一教授)

朝 本 明 弘

(昭和60年6月3日受付)

妊婦におけるヒトサイトメガロウイルス (human cytomegalovirus, HCMV) 感染の問題を研究するために、マイクロプレートを用いた酵素結合免疫吸着剤検定法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) の適用性について検討した。ELISA 法は、被検血清、HCMV 感染細胞より調整した核抗原、アルカリホスファターゼ標識抗ヒトイムノグロブリン G (immunoglobulin G, IgG) または IgM ヤギ血清、そして基質を順次反応させた。最初に、1:100 希釈での一点測定における ELISA 値の検討、反応温度および時間、HCMV 抗原および酵素標識抗血清の濃度などの至適条件を検討した。次に、蔗糖密度勾配超遠心法による分画血清およびプロテイン A 処理血清を用いた成績から、HCMV 特異 IgG および IgM 抗体測定における ELISA の特異性が証明された。リュウマチ因子 (rheumatoid factor, RF) による非特異反応については、赤血球凝集試験により妊婦血清の RF の有無をチェックし、陰性を確認した。これらの基礎的検討の後、妊婦 226 名のシリーズ血清、および非妊婦 38 名の対照血清 (合計 725 検体) について、一点希釈血清での ELISA-IgG、-IgM 抗体を測定し、さらに補体結合試験 (complement fixation test, CF test) あるいは蛍光抗体法 (immunofluorescence test, IF test) と比較検討した。CF 抗体陰性の 75 検体中 5.3% に ELISA-IgG 抗体陽性がみられたが、ELISA-IgG 抗体陰性検体はすべて CF 抗体も陰性であった。これは CF 法よりも ELISA の方が感度の高いことを示している。また、ELISA-IgM 抗体陽性率は、非妊婦 38 名中の 29.0% に対し、妊婦では 226 名中 45.1% に達した。この妊婦における予想以上に高い IgM 抗体陽性率は、成人では通常、休止状態にある HCMV 感染の妊娠中における再活性化の頻度の増加を示すものと考えられる。今回の研究中に、妊娠初期の HCMV 単核症の症例に遭遇した。この症例では、HCMV-IgM 抗体は妊娠 6 週でピークに達し、ELISA では妊娠 25 週まで IgM 抗体が検出できたが、蛍光抗体間接法では妊娠 10 週で検出不能になった。この母親から生れた児には、臨床的に HCMV 感染症の徴候はみられていないが、少なくとも学童期までは中枢神経系障害についての経過観察が必要と思われる。以上の結果より、今回用いた ELISA による HCMV-IgM 抗体測定は、妊娠中の HCMV 感染のスクリーニングの一方法として十分利用できると思われる。

Key words human cytomegalovirus, ELISA, IgM antibody, reactivation, pregnancy.

先天性ヒトサイトメガロウイルス (human cytomegalovirus, HCMV) 感染症は、ここ 10 数年来の研究によれば、全出生児の 0.2~2.2%¹⁾ に発生し、先天性

中枢神経系障害の重要な原因の一つと考えられている。本邦の妊娠可能年齢婦人における HCMV 抗体保有率は、欧米の 30~40% に対し、札幌で 94%²⁾、仙台

Abbreviations: ACIF, anti-complement immunofluorescence; BSA, bovine serum albumin; CBB, carbonate bicarbonate buffer; CF, complement fixation; CID, cytomegalic inclusion disease; CPE, cytopathic effect; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; FITC, fluorescent isothiocyanate; HCMV, human cytomegalovirus; HEL, human embryo-

で95%⁶⁾と明らかに高い。そのため、妊娠中に HCMV 初感染のおこる頻度は一般に低いと考えられ、HCMV の子宮内胎児感染に関する検索は、少数の研究機関に限られていた。しかし、HCMV は生体内において一般に潜伏持続感染様式をとり、生体側の状況(たとえば、妊娠、免疫抑制剤や副腎皮質ホルモンの使用)により再活性化されると近年考えられている^{4,5)}。一方、HCMV 抗体保有者においても上述の再活性化による子宮内感染惹起の可能性があり⁶⁾、本邦においてもわかに注目されることとなった。

従来、HCMV 感染症の診断は、ウイルス分離およびその抗体の血清学的検査によってなされてきた。この HCMV 抗体のスクリーニングとしては通常、補体結合試験 (complement fixation test, CF test) が頻用されている。さらに、HCMV 特異イムノグロブリン G (immunoglobulin G, IgG) およびイムノグロブリン M (IgM) の検索には、蛍光抗体法、ラジオイムノアッセイ (radioimmunoassay, RIA)、蔗糖密度勾配超遠心法による分画血清の CF 活性を測定する方法、あるいは免疫グロブリンの分離にプロテイン A や 2-メルカプトエタノールを用いる方法などが用いられる⁷⁾。しかし、これらの方法は、大量の検体を処理する日常の臨床的検査に用いるには繁雑過ぎる難点がある。

一方、酵素抗体染色法と RIA の原理を応用した酵素結合免疫吸着剤検定法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) は、Voller ら⁸⁾によって、様々な感染症の病原体の抗体レベルを評価分析する方法として開発された。この ELISA は、諸抗体検索で高感度と特異性という利点に加えて、操作が簡便でマス・スクリーニングに用いるという特徴がある。そのため、近年各種ウイルス感染症のスクリーニングの手段として、ウイルス特異 IgG 抗体の検出にさかんに利用されつつある。しかし、IgM 特異抗体の検出には、リュウマチ因子 (rheumatoid factor, RF) の影響など非特異反応が起き易いという問題があり、現在、種々の段階で検討が加えられている。

著者らは、ここ数年来、妊娠中の HCMV 潜伏持続感染の再活性化を HCMV 特異抗体検索の面より追究してきた。その中で、本研究は、HCMV 特異 IgM 抗体検出法として ELISA の基礎的検討をおこない、さらに妊娠中の HCMV 特異 IgG および IgM 抗体の変動を本法により観察して、HCMV 潜伏持続感染の妊娠

中における再活性化の有無をみた。その間、たまたま妊娠初期に肝炎を伴った HCMV 単核症の症例に遭遇した。これは、母児の分娩出産前後の経過と ELISA による HCMV 抗体価の推移を関連させつつ長期にわたり追跡しえた稀な 1 例で、ELISA によるウイルス抗体価測定が実用的に有用であることを実証しえた例であり、それらについて以下述べてみたい。

対象および方法

I. 対 象

1981 年 3 月から 1982 年 3 月までの間に石川県立中央病院産婦人科で分娩した妊婦のうち、226 名を無差別に選び、妊娠初期、中期、後期の各三半期に採血した 678 検体をシリーズ血清として実験に供した。妊婦に対する非妊婦対照血清は、石川県立総合看護専門学校の学生 38 名より採血した 38 検体を使用した。さらに、HCMV-CF 抗体陰性妊婦血清 9 検体も加えて総計 725 検体が検討された。HCMV 抗体陰性血清は、CF 抗体陰性妊婦血清を、また陽性血清は、妊娠初期に肝炎を合併した HCMV 単核症症例の急性期の血清を標準血清として用いた。

II. 方 法

1. 血清 HCMV 抗体価の測定

上記の対象につき、HCMV-CF 抗体、ELISA による HCMV 特異 IgG 及び IgM 抗体を下記の方法で検討した。

1) ELISA (間接法)

i) ELISA (間接法) の原理 (図 1)

ELISA 間接法は、2 つの反応系よりなりたっている。1) 第一次反応は、抗原抗体反応であり、担体(マイクロプレート)に固相化された抗原に、2) 被検血清を加え、測定しようとする血清中の抗体を抗原抗体反応で捕捉しておく。3) 次にこの抗原抗体結合体に酵素を標識させた抗体(酵素標識抗ヒト IgG または抗ヒト IgM 抗体)を結合させる。4) 第二次反応は、酵素基質反応であり、この結合した酵素標識抗体に基質を加え、酵素活性を発色により比色計で吸光度として測定する。この吸光度は、上述反応経過から判る様に、被検血清中の抗体量に依存した値となる。

ii) HCMV 核抗原の調整⁹⁾ (表 1)

HCMV 感染細胞質内に誘導される血清抗体の Fc レセプターによる非特異反応を防ぐため、ウイルス抗原は、核を分離して核抗原として用いた。ルービン培

nic lung; IgG, immunoglobulin G; IIF, indirect immunofluorescence; MA, membrane antigen; MEM, minimum essential medium; moi, multiplicity of infection; OD, optical density; PENA, preearly nuclear antigen; PBS, phosphate buffered saline; PGG,

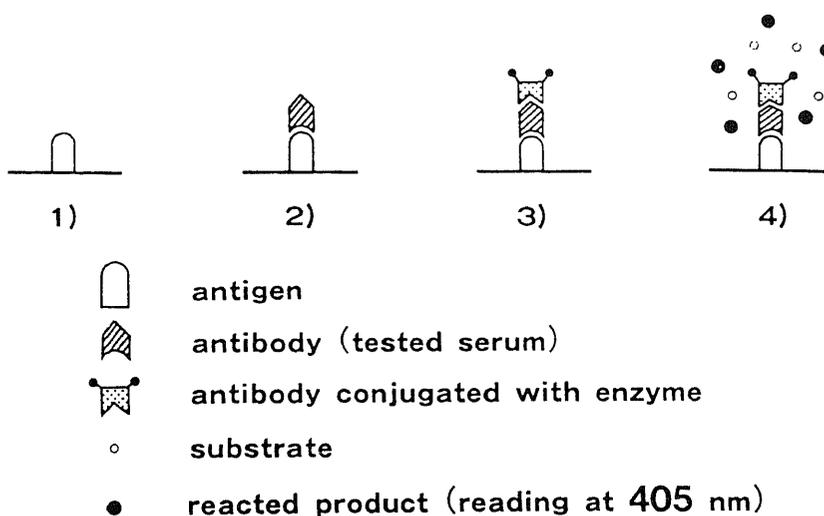


Fig. 1. Principle of indirect microplate ELISA.

- 1) The plate is coated with antigen.
- 2) Antibody in tested serum is bound to antigen on the plate.
- 3) Anti-IgG or -IgM conjugated with enzyme is bound to the antigen-antibody complex.
- 4) Enzyme activity is measured by the optical density (O.D.) of reaction products obtained through enzymatic reaction of substrate. The values of O.D. are depend on the quantities of antibody contained in tested serum.

養した胎児肺細胞 (human embryonic lung cell, HEL) に moi (multiplicity of infection) : 1 以上で HCMV (Towne 株) を感染させ、5 日間培養した。トリプシン処理にて細胞を採集し、リン酸緩衝食塩水 (phosphate buffered saline, pH 7.2, PBS) にて洗浄後、毎分 1,500 回転 5 分間遠心した。沈査は、2 ml の 0.2% Nonidet-P 40 (シエル化学, 英国) を加えたトリス塩酸緩衝液 (0.01M NaCl, 0.0015M MgCl₂, 0.01M Tris-HCl, pH 7.4, reticulocyte standard buffer, RSB) に浮遊して、0 ~ 4 °C で 5 分間軽く攪拌した。次にダウンス型ホモジナイザーで 10 ストローク、ホモジナイズした。毎分 2,000 回転 10 分間遠心した沈査を核分画とし、2 ml の RSB に再浮遊して、一部をギムザ染色にて鏡検し、必要に応じて再度ホモジナイズした。さらに、毎分 2,000 回転 10 分間で再び遠心洗浄した沈査を RSB に浮遊させ、超音波処理 (TOMY SEIKO, 東京, model UR-20P, power control 10 で 30 秒間) したものをウイルス核抗原として -70 °C で凍結保存した。対照抗原は、同じロットの非感染 HEL 細胞より同

Table 1. Preparation of HCMV nuclear antigens

HCMV-infected or non-infected HEL cells (2 × 10 ⁷ /Roux bottle)
↓ trypsinization and washing with PBS
↓ centrifugation (1500 rpm for 5 min)
↓ suspension in 2 ml of 0.2% Nonidet-P 40-RSB (RSB: 0.01M NaCl, 0.0015M MgCl ₂ , 0.01M Tris-HCl, pH 7.4)
↓ incubation in ice bath for 5 min
↓ homogenization in a Dounce homogenizer with 10 strokes
↓ centrifugation (2000 rpm for 10 min)
↓ sediment (nuclear component)
↓ re-suspension in 2 ml of RSB
↓ centrifugation (2000 rpm for 10 min)
↓ nuclear pellets suspension
↓ sonication by sonicator
↓ nuclear antigens

polymerized gammaglobulin; RAHA, rheumatoid arthritis hemagglutination; RF, rheumatoid factor; RIA, radioimmunoassay; RSB, reticulocyte standard buffer; SRID, single radial immunodiffusion.

様の操作で作成した。両抗原の蛋白量は、Lowry 法¹⁰⁾ およびトネイン TP 法 (大塚アッセイ研究所, 徳島)¹¹⁾ により測定した。固相化抗原濃度は、対照陽性血清を用いて ELISA のボックス力価測定を行い、陽性を示す最高濃度を 1 単位として、4 単位 (1:500 希釈) のものを使用ウイルス抗原濃度と決定した。対照抗原は、ウイルス抗原と同濃度蛋白量に調整して用いた。

iii) ELISA の手順 (表 2)

操作手順は、Voller ら⁹⁾ および南嶋ら¹²⁾ の方法に準じた。

抗原の固相化: 96 穴, 平底のマイクロプレート (Linbro EIA microtitration plate, Flow 社, 米国) 各穴に、炭酸重炭酸緩衝液 (carbonate bicarbonate buffer, 0.05M, pH 9.6, CBB) で 1:500 希釈したウイルス抗原, あるいは対照抗原を各々 0.2 ml 加えた。すなわち、横 2 列をペアにし、上段にウイルス抗原, 下段に対照抗原を入れ、4°C で一夜吸着させた後、0.05% Tween 20-PBS を各穴に満たし 3 回洗浄した。以後の洗浄はすべて同様の方法でおこなった。ついで、各穴に 0.2 ml の 10% ホルマリン-PBS を加え、4°C 10 分間で固定した。さらに、3 回洗浄した後水滴を除いて -70°C に保存した。

被検血清: 血清の希釈は、0.1% 牛血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) 加 0.05% Tween 20-PBS (BSA (0.1%)-Tween 20 (0.05%)-PBS) でおこなった。一次抗体として、被検血清を 1:50 より 2 倍階段希釈したもの, あるいは 1:100 一点希釈したものを用いた。プレートを 3 回洗浄後、各希釈血清をウイルス抗原と対照抗原の各穴に 0.2 ml ずつ加え、室温 (20~25°C) で 2 時間反応させた。

酵素標識抗体: 酵素標識抗体は、アルカリホスファターゼ標識抗ヒト IgG (γ 鎖特異的) または IgM (μ 鎖特異的) ヤギ血清 (Sigma 社, 米国) を使用した。上

記の一次抗原抗体反応後、洗浄してから、二次抗体として酵素標識抗体を BSA-Tween 20-PBS で 1:800 に希釈し、各穴に 0.2 ml 加え室温で 3 時間反応させた。

基質: 基質は、p-ニトロフェニルリン酸 (para-nitro-phenylphosphate, 5mg/tablet, Sigma 社, 米国) を使用し、1 mg/ml の濃度で 10% diethanolamine buffer (pH 9.8) に溶解した。上記の二次抗原抗体反応後洗浄し、基質溶液を各穴に 0.2 ml 加え、室温で正確に 45 分間反応させた。反応の停止は、3 モル水酸化ナトリウム 0.05 ml を各穴に加えた。

吸光度の測定: 基質と酵素の反応停止後、すみやかに発色による吸光度 (optical density, OD) の測定をおこなった。判定は、ウイルス抗原穴と対照抗原穴の発色差による肉眼的判定および、比色計による吸光度測定によりおこなった。比色計は、Dynatech 社 (米国), MR 580 Microelisa Auto Reader (405 nm と 490 nm の二波長方式) を用い、波長 405 nm におけるウイルス抗原穴の吸光度と対照抗原穴の吸光度の差を ELISA 値 (ELISA value) とした。

2) 補体結合試験 (CF): Kolmer 法¹³⁾ に準拠し、マイクロプレートを用いた微量法によりおこなった。CF 価 1:4 以上を陽性とした。

3) 蛍光抗体間接法 (indirect immunofluorescence test, IIF): カバースリップに培養した HCMV 感染 HEL 細胞を -20°C アセトンで 10 分間固定した。階段希釈した一次 (被検) 血清を 37°C, 30 分間作用後、1:40 希釈の蛍光色素 (fluorescent isothiocyanate, FITC) 標識抗ヒト IgG あるいは IgM ヤギ血清 (CPL 社, 米国) を 37°C, 30 分間反応させた。なお、HCMV 膜抗原 (membrane antigen, MA)¹⁴⁾ に対する抗体の検出には未固定細胞を用いた。

4) 蛍光抗体補体法 (anti-complement immuno-

Table 2. Procedures of ELISA

- 1) Fixation of antigens
 - ↓ 0.2 ml of antigen solution in CBB into each well of microplate
 - ↓ fixation with 10% formalin-PBS for 10 min at 4°C
- 2) Addition of 0.2 ml of tested sera diluted with BSA (0.1%)-Tween 20 (0.05%)-PBS incubation for 2 hr at room temperature (20-25°C)
- 3) Addition of 0.2 ml of enzyme labelled antibody in BSA-Tween 20-PBS incubation for 3 hr at room temperature
- 4) Enzyme reaction
 - addition of 0.2 ml of phosphatase substrate (para-nitro-phenylphosphate)
 - ↓ solution in 10% diethanolamine buffer, pH 9.8
 - ↓ incubation for 45 min at room temperature
 - ↓ stopping the reaction with 0.05 ml of 3M-NaOH
- 5) Reading of O.D. by Dynatech, MR580 Microelisa Auto Reader
ELISA value=(O.D. of virus antigen)-(O.D. of control antigen)

fluorescence test, ACIF) : HCMV 特異的前初期核抗原 (pre-early nuclear antigen, PENA)¹⁹⁾ に対する抗体の測定に用いた。カバースリップに培養した HEL 細胞に HCMV を感染させ、3 時間後にメタノールとアセトン (1 : 1) 混合液で 5 分間固定した。被検血清、ヒト補体 (HCMV-CF 価 < 1 : 4 の妊婦血清)、FITC 標識抗ヒト C₃ ヤギ血清 (CPL 社, 米国) の順に各々 37°C, 45 分間反応させた後、鏡検した。

2. 血清中の IgG, IgM 分画分離と定量

1) 蔗糖密度勾配超遠心法による分離 : SW 50.1 ローターを用い蔗糖 55~12% (W/V) の密度勾配で毎分 35,000 回転 16 時間遠心により各分画に分離した。19S および 7S のマーカーとしては、市販溶血素 (1 : 10) をのせたチューブを同時に遠心して決定した。

2) 血清のプロテイン A による処理 : プロテイン A (商品名アブソープ G, 化学及血清療法研究所, 熊本) の 10% 浮遊液に PBS を加え毎分 3,000 回転 30 分間遠心し上清を捨てた。10 倍希釈被検血清 0.3 ml をプロテイン A 沈査に加え混合し、室温 (15~30°C) で振盪しながら 1 時間放置した。毎分 3,000 回転 30 分間遠心したのちの上清を IgG 吸収後の被検血清として用いた。

3) 血清 IgG, IgM の定量 : パルチゲン (ヘキストジャパン, 東京) を用いた一次元放射免疫拡散法 (single radial immunodiffusion, SRID) によりおこなった。

3. HCMV 分離

流産胎児 (3 ヶ月) ホモジネートおよびミリポアフィルター (450 μm) にて濾過した患者被検尿を HEL 細胞に 37°C 1 時間吸着させ、5% 牛胎仔血清加 Eagle MEM (minimum essential medium) にて培養した。その後、約 2 週間間隔で継代しながら細胞変性効果 (cytopathic effect, CPE) の出現を 5~6 週間にわたり観察した。CPE の出現した細胞を既知 HCMV 抗体陽性血清を用いた蛍光抗体法にて確認を計った。

4. リウマチ因子 (RF) の測定

本研究に用いた全妊婦血清の RF の有無を市販の RA 赤血球凝集試験 (rheumatoid arthritis hemagglutination test, RAHA, 富士レビオ, 東京) により測定した。

5. 推計学的検索は、回帰分析, Student の t テストを用い、危険率 5% 以下を有意差として判定した。

成 績

I. ELISA (間接法) 至適条件の基礎的検討

1. HCMV 抗原および標識抗体至適濃度

抗原至適濃度としては、抗原または抗体各希釈のボックス力価試験を ELISA で行って、陽性限界の最高希釈を 1 単位として、その 4 単位 (1 : 500 希釈) を用いることとした。この 4 単位の HCMV 抗原至適濃度に対し、アルカリホスファターゼ標識抗体濃度は、1 : 200 から 1 : 3,200 までの 2 倍階段希釈の各濃度で検討をおこない、1 : 800 希釈が至適濃度と決定された。

2. 反応温度と反応時間

各抗原抗体反応を 37°C, 1 時間, 室温 (20~25°C) 2 時間および 3 時間, 4°C 一夜の各条件で検討した。その結果, 37°C, 1 時間では, 全般に反応が強く, 反応むらや穴によるバラツキがみられ, 4°C 一夜では全般に反応が弱く低い値を示した。しかしながら, 室温では安定した反応が得られたので, 一次抗体は室温 2 時間, 二次抗体は室温 3 時間を至適反応時間とした。また, 基質の反応時間は余り短いと反応にバラツキがみられたため, 45 分間正確に測った。

3. ELISA 値の陽性終末点の検討 (図 2)

HCMV-IgM 抗体陽性血清 49 検体について, 2 倍階段希釈での ELISA の肉眼的判定による抗体価 (希釈濃度) とその各陽性終末点の吸光度 (ELISA 値) をプロットしたものが図 2 である。各被検血清の最終希釈濃度と関係なく, 陽性終末点希釈の ELISA 値は一定の範囲に分布していた。即ち, 陽性終末点希釈の ELISA 値は, 平均値 (\bar{X}) 0.187, 標準偏差 (SD) 0.038 を示した。以上より, 本研究の実験条件下では偽陽性の混乱をさけるため, ELISA 値 0.3 (おおよそ $\bar{X} + 3SD$) 以上を ELISA 陽性 (+) とすれば陽性の判定に

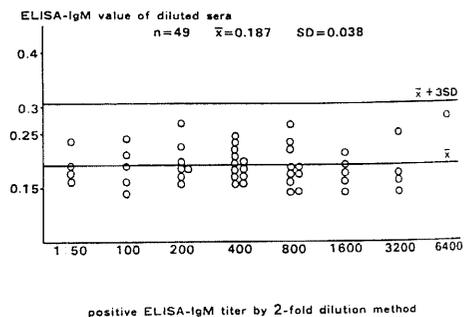


Fig. 2. ELISA-IgM values of serum samples diluted to positive endpoints for HCMV-ELISA. Higher ELISA-IgM values than the mean value ($\bar{X}=0.187$) plus three times values of standard deviations ($3SD=0.114$, $\bar{X}+3SD=0.301$) are considered to be significantly positive by the present 2-fold dilution method.

大きな誤りはないと考えられた。また、ELISA 値の程度を表わすために、ELISA 値 0.25(おおよそ $\bar{X}+2SD$)以下を陰性(-)、0.25~0.3を弱陽性(±)、0.5以上を強陽性(+)と設定した。HCMV-IgG 抗体の判定基準も同様に設定した。

4. ELISA の特異性

1) 蔗糖密度勾配超遠心法による検討(図3)

妊娠初期の HCMV 単核症症例の急性期血清を蔗糖密度勾配超遠心法によって 19 分画に分離した。各分画血清について、HCMV-CF 抗体(図3, 上段), ELISA による HCMV 特異 IgG 抗体および IgM 抗体(図3, 中段), SRID 法による IgG, IgM, IgA の定量(図3,

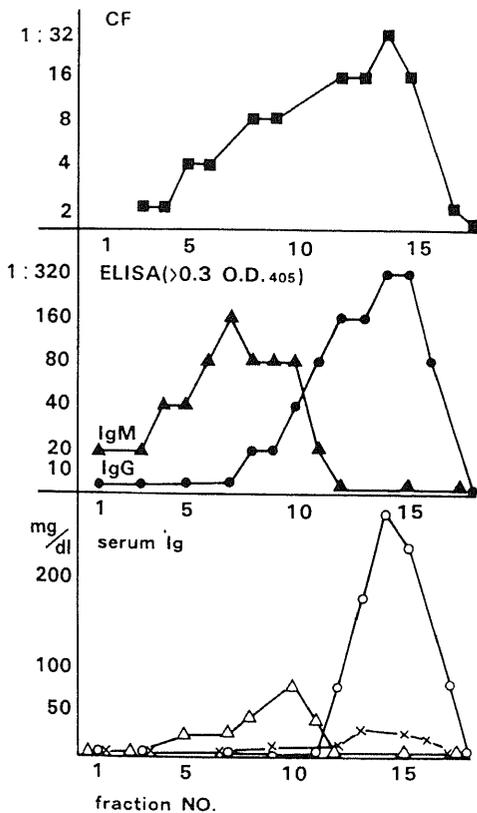


Fig. 3. Examination of HCMV-antibody positive serum by treatment with sucrose gradient ultracentrifugation.

upper, CF titers (■—■) in fractionated sera; middle, HCMV-IgG (●—●) and HCMV-IgM (▲—▲) titers by ELISA in the same fractionated sera; lower, concentration of serum IgG (○—○), IgM (△—△) and IgA (×—×) by SRID in the same fractionated sera.

下段)を測定した。ELISA による HCMV 特異 IgG 抗体 (ELISA-IgG) および HCMV 特異 IgM 抗体 (ELISA-IgM) はそれぞれ、7S, 19S にほぼ一致してピークを示し、これらは IgG, IgM の定量曲線ともおおむね一致した。CF 活性は、主に IgG 分画にピークを示したが、IgM 分画にもそれ相当の分布をしていた。

2) プロテイン A 処理による検討(図4)

ヒト IgG 吸収試薬であるプロテイン A を用いて、吸収操作前後の ELISA-IgM 抗体価の変動を検討した。即ち、HCMV 単核症症例の経過中、経時的に得た血清の HCMV-CF 抗体価およびプロテイン A 無処理および処理後の ELISA-IgG, IgM 抗体価の変化をみた。

図4に示すごとく、ELISA-IgG 抗体価は、プロテイン A 処理によりすべて陰性となった。しかし、ELISA-IgM 抗体価は、プロテイン A 処理によって抗体価の 2~4 倍の低下をみたが、無処理 ELISA-IgM 抗体価とほぼ平行した推移を示した。

5. 一点測定法による ELISA 値(図5)

ELISA-IgM 法で陽性を示す各血清の最高希釈度 (ELISA-IgM 抗体価) と各血清の 1:100 単一希釈での ELISA-IgM 値との間の回帰分析による関係を検討した。即ち、58 の血清を選び、それぞれ 1:50 より 2 倍階段希釈液を調整し、それらにつき ELISA-IgM 抗体価の測定をおこなった。この測定で、ELISA 値 ≥ 0.3 を示したそれぞれの血清の最高希釈度を求め、それを HCMV-ELISA-IgM 抗体価とした。このようにして求められた抗体価の常用対数 (X), ($X = \log_{10}(\text{抗体価})$) と各血清を 1:100 に希釈して一点測定を行った ELISA 値 (Y) との間には、 $Y = 0.6013 X - 0.7627$, 相関係数 $r = 0.945$ ($p < 0.01, n = 50$) の直線関係が成立していた。このことは、本実験条件の正当性を物語っていると思われる。

II. ELISA による妊娠中の HCMV 抗体測定の臨床的意義

上記の HCMV-ELISA の基礎的検討成績に基づき、次に妊婦 226 名の妊娠中半期のシリーズ血清、非妊婦対照血清 38 検体、CF 陰性妊婦血清 9 検体、計 275 検体の検索を行った。これら、HCMV-CF 抗体、および 1:100 一点希釈血清測定による HCMV-ELISA-IgG, IgM 値につき、以下の結果を得た。

1. 妊婦 226 名の RF は、日常臨床検査で用いられている RAHA 法により検査した結果、全例、陰性 ($< 1:40$) であった。

2. ELISA-IgG 値陰性検体は、すべて CF 抗体も陰性であった。全検体中、CF 抗体陰性 ($< 1:4$) の 75 検体を検索したところ、4 検体 (5.3%) が ELISA-IgG

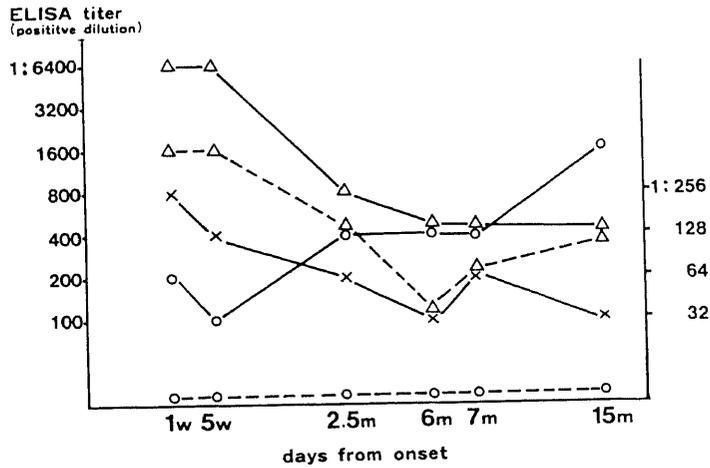


Fig. 4. Effect of serum treatment with Protein A on ELISA-IgG and ELISA-IgM titer of patient's sera with HCMV mononucleosis in pregnancy. x-x, CF titers; o--o, ELISA-IgG titers (Protein A untreated); Δ--Δ, ELISA-IgM titers (Protein A treated); Δ--Δ, ELISA-IgM titers (Protein A treated)

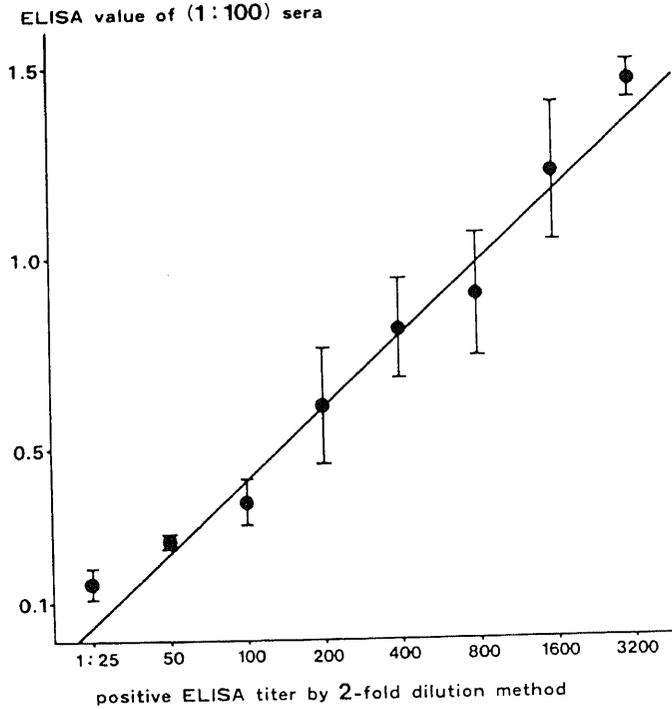


Fig. 5. Relationship between ELISA values of diluted sera (1:100) and positive ELISA titers of the same sera determined by 2-fold dilution method for HCMV-ELISA examination.

Sera with an ELISA titer of <1:50 are arbitrarily assigned to be a titer of 1:25. Each sera group with ELISA positive titer (1:25~1:3200) represents the mean ± standard deviation of ELISA values at 1:100 dilution of respective sera. The regression equation is $Y = 0.6013X - 0.7627$ and the coefficient of correlation is $r = 0.945$ ($P < 0.01$, $n = 50$), where $X = \log$ (ELISA titer) and $Y = \text{ELISA value}$.

Table 3. Frequency of positive antibodies of HCMV-IgG, -IgM by ELISA and those by CF in pregnant and non-pregnant women

nonpregnant (38 donors)		CF antibody	ELISA-IgG	ELISA-IgM
negative		6 (15.8%)	5 (13.0%)	27 (71.0%)
positive*		32 (84.2%)	33 (87.0%)	11 (29.0%)
pregnant (226 donors)		CF antibody	ELISA-IgG	ELISA-IgM
negative		22 (9.7%)	19 (8.4%)	124 (54.9%)
positive during pregnancy*		204 (90.3%)	207 (91.6%)	102 (45.1%)**

* positive; CF titer $\geq 1:4$, ELISA value ≥ 0.3 ** $P < 0.1$ vs nonpregnant positive

値陽性であった。CF 抗体価と ELISA-IgG 値の間には相関はみられなかった。

3. HCMV 抗体保有率 (表 3)

非妊婦 38 名の CF 抗体陽性率は、84.2% (32/38)、ELISA-IgG 値陽性率は、87.0% (33/38) であった。これに対し、妊婦 226 名の抗体保有率は、CF 抗体では、90.3% (204/226)、ELISA-IgG 値では、91.6% (207/226) であり、CF 抗体および ELISA-IgG 値ともに妊婦にやや高い値を示したが有意ではなかった。これに対して、ELISA-IgM 値陽性率は、非妊婦 29.0% (11/38) であるのに、妊婦では 45.1% (102/226) と妊婦の陽性率が約 1.5 倍高値 ($p < 0.1$) を示したが有意差はなかった。また、妊婦の妊娠三半期の各期別の ELISA-IgM 値陽性率をみると、妊娠初期 35.8% (81/226)、中期 35.4% (80/226)、後期 42.0% (95/226) と後期にやや高い陽性率を示したが有意ではなかった。

4. 妊娠中の初感染例 (表 4)

妊婦 226 名のうち、HCMV 初感染例は、後に症例として紹介する妊娠初期の肝炎を伴った単核症の 1 例と症例 No.52 の計 2 例であった。今回の検索における初感染の頻度は、0.9% (2/226) であり、CF 抗体からみた陽転率は 9.1% (2/22 (CF 抗体陰性 22 例)) であった。

No.52 の症例は、妊娠後期に CF 抗体価、ELISA-IgG 値、ELISA-IgM 値がすべて陽転を示した例である。しかし、臨床的には無症候で娩出時、および生後 1 ヶ月検診時の児には、特に先天性 HCMV 感染症の所見は認められなかった。ただ、その後のこの児の予後については追跡できなかった。

5. 妊娠中の CF 抗体と ELISA-IgM 値の関係

妊娠中の HCMV の再活性化を検討するため、CF 抗

Table 4. Significant rise of HCMV specific antibody titers during pregnancy in a case No. 52

	1st trimester	2nd trimester	3rd trimester
CF titer	<1:4	<1:4	1:128
ELISA value			
IgG	0.022(-)	0.019(-)	0.399(+)
IgM	0.156(-)	0.152(-)	0.690(++)

Table 5. Pattern of changes of HCMV-ELISA-IgM values in relation to CF titer changes during pregnancy

Pattern of ELISA-IgM values related to CF titer changes	No. of samples
(-) \rightarrow (-)	9
(-) \rightarrow (±) or (+)	2
(+) \rightarrow (+) or (++)	6

Two of 17 cases in which CF titer was elevated four times during pregnancy became positive also on ELISA-IgM value.

体価の動きとそれに対応する ELISA-IgM 値の変化をみた (表 5)。初感染例以外に CF 抗体価が 8 倍以上上昇した例はなかったが、CF 抗体価 4 倍以上昇例は 226 例中 17 例 (7.5%) あり、これらはいずれも ELISA-IgG 値陽性であった。17 例の CF 抗体価上昇に対する ELISA-IgM 値の動きをみると、ELISA-IgM 値が陰性不変例 ((-) \rightarrow (-)) 9 例、陽転したもの ((-) \rightarrow (±)) あるいは (+) 2 例、上昇をみたもの ((+) \rightarrow (+))

あるいは(+)6例であった。

次に、前項目と逆の関係即ち、ELISA-IgM値の動きに対するCF抗体価の変化を検討した(表6)。妊娠中に、ELISA-IgM値が陽転((-)→(+))したのは31例(13.7%)で、いずれもELISA-IgG値陽性であった。

Table 6. Changes of HCMV-CF antibody titer in relation to changes of ELISA-IgM values during pregnancy (total 31 cases)

Cases with positive change of ELISA-IgM value	No. of change of CF titer	
31/226 (13.7%)	increased*	9
	not changed	17
	decreased*	5

* No cases revealed the change of CF titer more than four times.

この31例に対するCF抗体価の動きをみると、4倍以上の変化を示したものはなく、2倍上昇したものが9例、2倍下降したものが5例あったがいずれも有意の

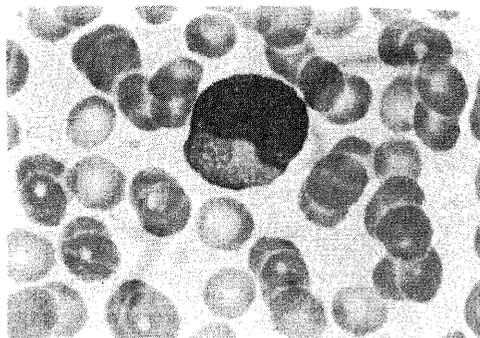


Fig. 6. Atypical lymphocyte observed in the peripheral blood of the patient with HCMV mononucleosis in pregnancy ($\times 400$).

Table 7. Serological data of the patient with HCMV-mononucleosis in pregnancy

RBC	483×10^4	/mm ³	GOT	128	U
hemoglobin	14.3	g/dl	GPT	115	U
hematocrit	45	%	MG	5	
WBC	11300	/mm ³	Al-phosphatase	6.2	KA
hemogram			ZTT	6.8	KU
seg	47	%	TTT	10.8	KU
stab	18		LDH	474	IU
lymph	47		γ -GPT	33	IU
mono	5		amylase	56	SU
eosino	4		BUN	14.2	mg/dl
baso	1		creatinine	0.81	mg/dl
atypical lymph	4		Na	140	mEq/dl
myelo	1		K	3.3	mEq/dl
promyelo	1		Cl	104	mEq/dl
platelet	10.5×10^4	/mm ³	virological examination		
CRP	(+)		antigen		
RA	(-)		hepatitis B		(-)
ASLO	(-)		antibody		
cold agglutination test		1:512	hepatitis virus A		(-)
Paul-Bannel test		(-)	hepatitis virus B		(-)
serum protein	6.3	g/dl	cytomegalovirus		1:256
albumin	59.3	%	herpes simplex virus		(-)
α_1 -globulin	5.2		rubella virus		(-)
α_2 -	9.2		mumpus virus		1:8
β -	7.2		varicella-zoster virus		(-)
γ -	18.5				
A/G	1.46				
serum IgG	1340	mg/dl			
IgA	140	mg/dl			
IgM	370	mg/dl			

動きではなかった。残りの17例は、CF抗体価の変動を示さなかった。

Ⅲ. HCMV 初感染と思われる妊娠初期の HCMV 単核症例について

本研究中、2例のHCMV初感染がみられた。そのうち1例は、妊娠初期にHCMV単核症を起こした症例で、恐らくHCMV初感染と思われるが、分娩をはさんで母児のHCMV抗体価の推移を追跡し、長期にわたる経過を観察できた。このような報告はほとんどなく、妊娠中のHCMV再活性化および胎児感染を考察する上で非常に貴重な例であるとともに、ELISA-IgG、IgM抗体の陽性標準血清としても貴重であった。

1. 臨床像と経過

患者：26歳，初妊婦，保健婦。

初診：昭和55年11月29日。

主訴：無月経，発熱，心窩部痛および咳嗽。

既往歴，家族歴ともに特記すべきことはない。

現病歴：昭和55年10月13日より7日間を最終月経として無月経であったが，11月20日頃より感冒様

症状にはじまり，38°C前後の発熱，咳嗽と心窩部痛を訴えた。11月29日入院し，即日入院となった。

現症：平均的体格で眼瞼結膜に貧血や黄疸は認められなかった。鎖骨上窩リンパ節は軽度に腫脹していたが，心肺に異常はなく，肝脾は触知されなかった。内診では，子宮は軽度に腫大し軟で，付属器は触知されず，子宮腔部はリビド色を呈し，黄色の帯下が認められた。妊娠6週と診断した。

入院時検査成績(表7)：肝機能異常(GOT, 128 U; GPT, 115 U; LDH, 474 IU)，末梢血中異型リンパ球出現(図6)，血清IgM上昇(370 mg/dl)，寒冷凝集反応陽性(1:512)の異常を認め，ウイルス抗体価は，HCMV-CF抗体価が1:256と異常高値であった。胸部X線写真および心電図には異常を認めなかった。

経過：入院後，38°C前後の弛張熱が持続したが，入院10日目頃より咳嗽，発熱などの自覚所見の軽減とともに検査データの改善を認め，約2週間にて退院した。以後，外来通院にて経過観察したが妊娠経過は順調で，昭和56年7月9日，妊娠38週で自然陣痛発来

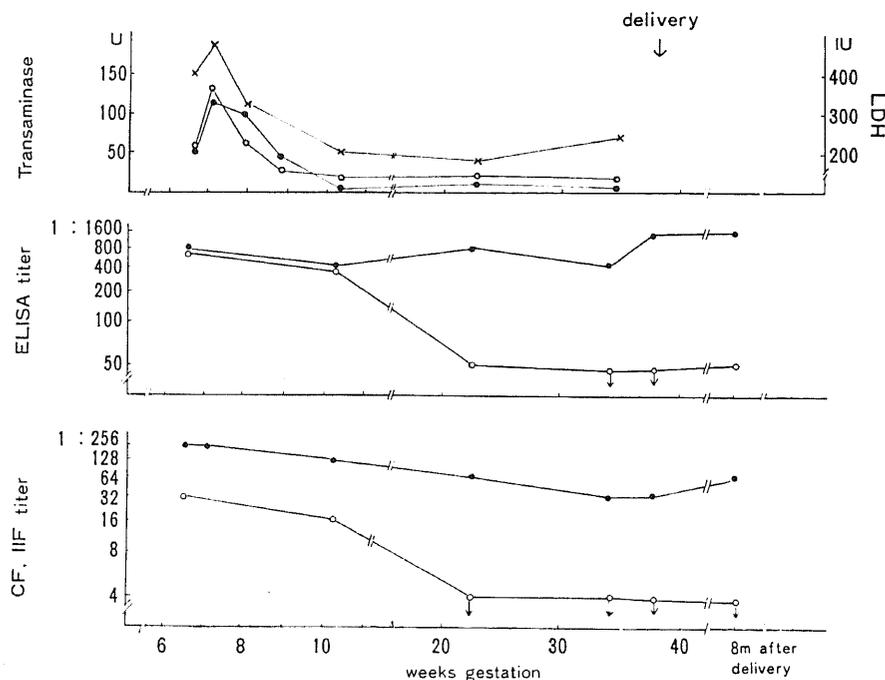


Fig. 7. Clinical course and serological data of the patient with HCMV mononucleosis in pregnancy.

upper: ●—●, GPT; ○—○, GOT; ×—×, LDH;

middle: ●—●, HCMV specific IgG antibody titers by ELISA; ○—○, HCMV specific IgM antibody titers by ELISA;

lower: ●—●, HCMV specific antibody titers by CF test; ○—○, HCMV specific IgM antibody titers by indirect immunofluorescence test (IIF).

し、同日 2680 g の女児を正常分娩した。児はアプガールスコア 9 点、外表奇形はなく頭部 X 線写真にも異常は認めなかった。

2. ウイルス学的検索と母児の予後

1) HCMV 抗体の推移 (図 7)

HCMV-CF 抗体は、入院時 (妊娠 6 週) に 1 : 256 と最高値を呈し、以後漸次低下した。ELISA-IgM 抗体の存在は、蔗糖密度勾配超遠心法による分画血清 (図 3) およびプロテイン A 処理血清 (図 4) で確認した。その抗体価の推移をみると、ELISA-IgM 抗体

価は入院時すでに 1 : 800 とピークに達しており以後急速に減少し、妊娠 25 週までは検出可能であった。一方、ELISA-IgG 抗体価も入院時すでに高値であったが、さらに上昇を続け分娩時には最高 (1 : 1,600) に達し、その後一年以上にわたってその値を持続した。蛍光抗体法による HCMV-IgM 抗体は、妊娠 10 週頃まで観察されたが以後減弱消失した。この蛍光抗体間接法 (IIF) による HCMV-IgM 抗体の特徴¹⁶⁾は、核内に顆粒状の蛍光としてみられ (図 8, a) HCMV-IgG 抗体¹⁷⁾¹⁸⁾ (図 8, b) によるものとは明らかに鑑別され

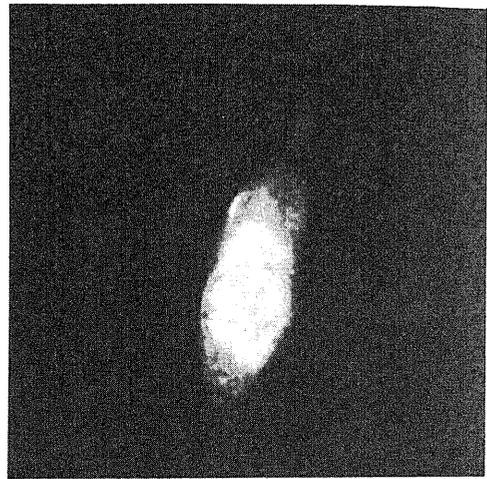
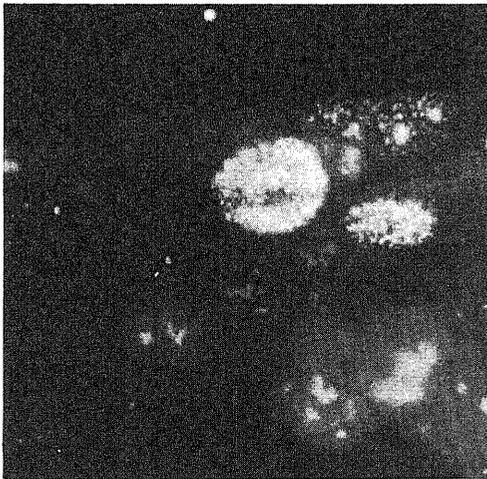


Fig. 8a. Positive HCMV-IgM immunofluorescence in HCMV-infected HEL cells by IIF ($\times 200$).

8b. HCMV-IgG immunofluorescence in HCMV infected HEL cell by IIF ($\times 200$).

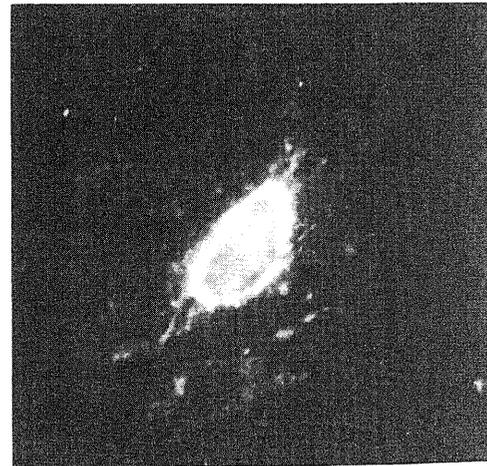


Fig. 9a. HCMV-IgM immunofluorescence against membrane antigens (MA) of HCMV-infected HEL cells by IIF ($\times 200$).

9b. HCMV-IgG immunofluorescence against preearly nuclear antigens (PENA) of HCMV-infected HEL cells by ACIF ($\times 200$).

た。さらに、発病初期の入院時（発病後3週まで）の血清中には、HCMV 特異的膜抗原に対する IgM 抗体（図9, a）および ACIF による HCMV 特異的前初期核抗原に対する抗体（図9, b）も検出可能であった。

なお、HCMV 抗体以外では、ムンプスウイルス抗体が低値（1：8）に認められたが、その他の検索ウイルスに対してはすべて陰性であった（表7）。

2) HCMV 分離の試みと母児の予後

児の予後：臍帯血検査では、IgG, 910 mg/dl; IgM, 16 mg/dl; GOT, 40 U; GPT, 8 U を呈し生後1週の新生児期尿よりの HCMV 分離は陰性であった。しかし、生後8ヶ月の検査では、HCMV の CF 抗体価 1：32, ELISA-IgG 抗体価 1：1,600, IgM 抗体価 1：100 となり、GOT, 38 U; GPT, 13 U を呈し、尿中よりの HCMV が分離された。さらに、1歳時の尿でもウイルスが分離されたが、昭和59年7月（3歳）現在で、精神運動発達遅滞、中枢神経系障害は認められていない。

母の予後：分娩時および産褥8ヶ月後の尿からは HCMV は分離されなかった。なお、妊娠末期の子宮頸管粘液からの HCMV 分離は、細菌汚染のため不成功に終わった。昭和57年7月、2度目の妊娠は、子宮内胎芽死亡のため妊娠3ヶ月で流産となった。このときの尿、子宮頸管粘液および流産胎芽からの HCMV 分離も陰性であった。

考 察

1. ELISA 至適条件の基礎的検討について

ウイルス感染症の診断は、通常、ウイルス分離と異なる時期に採血したペア患者血清の抗体測定によって行われる。しかし、生体内で潜伏持続感染様式をとる HCMV は、再活性化の問題も含め感染動態が複雑で単一の測定方法では感染状態を十分に把握できないことが多い。現在、HCMV 抗体のスクリーニングに用いられている CF 法は、特異性の高い検査法でその活性はほとんど IgG クラスに属するといわれている。しかし、herpes simplex virus¹⁹⁾ および HCMV¹⁸⁾ では IgM 分画にも CF 活性があるとの報告があり、図3に示した HCMV 単核症の分画血清における著者の成績では、ピークは IgG 分画にあるが、IgM 分画にも CF 活性がみられた。したがって、CF 抗体の存在は、感染の証明にはなるが、初感染や潜伏持続感染の再活性化などの最も近い過去における感染を検討する目的には、意義が相当低くならざるを得ない。そこで、最近の感染を知る必要がある場合には、IgM 抗体の証明が求められる。現在、HCMV-IgM 抗体の測定には、蔗糖密度勾配超速心法による分画血清、あるいはプロテイン A で IgG を、2-メルカプトエタノールで IgM をそれぞれ

吸収または不活化した血清を用いて CF 活性を測る方法がある⁷⁾。これらの方法には、血清の前処理が必要で、臨床検査室での大量の検体処理には不向きである。また現在のところ、特異性、感度の面で最もすぐれている蛍光抗体法と RIA も操作技術、設備、安全性などの点で大量の検体を測定するには問題が多い。その点、ELISA は、酵素標識法を利用した免疫測定法で、特異性、感度は前述蛍光抗体法や RIA に匹敵し、さらに操作が簡便で大量の検体処理が可能であるという利点をもつ新しい測定法である。しかし、現在のところ、操作手順や判定基準が統一されていない。そこで、本研究では、妊娠中の HCMV 抗体の推移と潜伏持続感染 HCMV の再活性化の関係を研究する目的で、特に HCMV 特異 IgM 抗体の測定方法として ELISA 間接法の至適条件の基礎的検討から出発した。

最初に、標識酵素の選択の問題がある。ELISA 用の標識酵素としては、一般にペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼなどが用いられている。これら市販されているものの中、ペルオキシダーゼは、アルカリホスファターゼに比べ安価で、492 nm における発色は速かに進行し、1種類の抗グロブリン標識抗体を ELISA の他に光顕的および電顕的免疫ペルオキシダーゼ法にも用い得る利点がある。しかし、反応に遮光を必要とし、酵素はアジ化ナトリウムなどの防腐剤に弱く、変異原性があるとされている。これに対し、アルカリホスファターゼは、発色が緩かに進行し、酵素、基質、反応産物ともに安定で、アジ化ナトリウムにも抵抗し遮光の必要もない²⁰⁾。これらの条件から本研究では、高価ではあるが反応面での安定性を考慮した選択により、アルカリホスファターゼを用いた。

ついで、反応条件の中、反応温度と反応時間については種々の報告がある^{21)~23)}。著者の種々の条件検討結果では、室温で一次抗体（被検血清）2時間、二次抗体（酵素標識抗体）3時間が最も安定した反応を示した。また、結果の分散度を少なくするためには、基質の反応時間は45分間正確に測る必要もあった。

抗原の精製に関しては、粗ウイルス抗原を用いると、HCMV 感染細胞の細胞質内に誘導される Fc レセプターに起因する非特異反応が生じ、結果を混乱させる。このため本研究では、ELISA 用抗原は HCMV 感染 HEL 細胞より核を分画し核抗原とした。さらに対照抗原との蛋白含量に差がありすぎると誤差が大きくなる可能性があり¹²⁾、両抗原の蛋白量も同程度に調整した。Schmitz ら²¹⁾は、市販の HCMV 抗原と作成した核抗原を用いて ELISA-IgM 抗体価を測定比較したところ、核抗原を使用した場合に蛍光抗体間接法による結

果と良い相関を得た。彼らは、非特異反応を生じる要因としてリュウマチ因子(RF)、抗核IgM抗体、細菌の混入をあげ、抗核IgM抗体は対照抗原をとることにより、また細菌の混入に対しては反応液(緩衝液)にアジ化ナトリウムを入れると予防できるとのべている。さらに、抗原固相表面の空白面にIgM抗体が非特異的に吸着するのを防ぐため、牛血清で固相面を前処理する必要があり、また被検血清のIgM濃度が高すぎると非特異反応が生じやすくなるとのべている。本研究では、これらの点を考慮して、緩衝液に0.02%アジ化ナトリウムおよび0.1%牛血清を加え、被検血清は1:50以上の希釈濃度で使用して非特異反応を防ぐことができた。

つぎに、変性IgGに対する抗IgM抗体といわれているRFによる偽陽性反応は、間接法に共通の解決すべき問題点であり、ELISAのみならず蛍光抗体法やRIAにおいても見られている。これへの対策として、全被検血清²²⁾あるいはHCMV-IgM抗体陽性検体のRF²¹⁾を簡易のリュウマチ因子検査法でチェックする方法がある。Krishnaら²³⁾は、全血清をプロテインAあるいはグルタルアルデヒドで重合処理したガンマグロブリン(polymerized gammaglobulin, PGG)で吸収しRFを除去している。しかし、全血清の吸収操作を行うのでは、ELISAの簡便性の特徴が薄れてしまうため、SchmitzらはHCMV-IgM抗体陽性検体のみを選んでRF吸収操作を行い、再検査再確認を行っている。今回は、妊婦症例全部のRFをRAHA法でチェックし、全例の陰性を確認しての結果である。

判定基準について、井上²⁴⁾は、固相抗原を使った場合の判定基準に次の三つの方法を検討している。i) ウイルス抗原固定穴の吸光度を対照抗原固定穴の吸光度で割った商が1.5~2.0以上あれば抗体陽性とする。ii) ウイルス抗原穴と対照抗原穴の吸光度の差がある値以上を陽性とする。iii) ウイルス抗原穴にいれた陰性血清の吸光度の平均値と標準偏差を求め、 $\langle(\text{平均値}) + (3 \times \text{標準偏差})\rangle$ の値を抗体陽性の基準値とする。このやり方では、対照抗原穴を省略する。以上のうち、井上は、ii) が最も良い方法とし、その理由として次のごとく述べている。バックグラウンド値があるRIAの場合には、商をとる意味もあるが、ELISAでは分母が0になる場合が出てくるのでi) は実際的でない。比色計で測定するのは透過率(T)で、吸光度(A)は $-\log_{10}T$ として変換される。Aの相対誤差は、Aが大きくなるかまたは0に近づくほど増大する(Aが0.3付近のとき誤差が最も小さい)。また、iii)の対照抗原穴を欠く方法も免疫グロブリンの非特異的吸着という問題が残されている。そこで、本研究ではii)に従い、

ELISA値は、ウイルス抗原穴と対照抗原穴の吸光度の差から、その陽性基準を設定した。図2のELISA-IgM値測定に示したように、階段希釈による陽性終末点で表わされたIgM抗体価が様々のいずれの血清でも、陽性終末点での吸光度差(ELISA値)は一定の範囲内に集まった。すなわち、平均値(\bar{X})0.187、標準偏差(SD)0.038を得た。以上より、本研究では陽性限界の基準をELISA値0.3以上(おおよそ、 $\bar{X} + 3SD$)とし、ELISA-IgG抗体の判定基準もこれに準じた。

次に、特異性の検討は、蔗糖密度勾配超遠心法による血清中のIgG吸収法(図4)をおこなった。分画血清による分析では、ELISA-IgG、ELISA-IgM抗体の活性は各々、7S、19S分画にピークを示し、これらは同時に血清IgG、IgM濃度値のピークに一致した。CF活性は、IgG分画に主なピークがみられたが、Schmitzら¹⁸⁾の成績同様、IgM分画にも活性が分布していた。次に、同じHCMV単核症患者より経時的に得た血清のプロテインA処理による影響をみた。その結果、ELISA-IgG抗体価は陰性化し、ELISA-IgM抗体価は、処理後2~4倍程低くなったが、処理前とほぼ平行した抗体価を示した。これは、プロテインAがIgGとともにIgMをも20%位吸収することによる²⁵⁾と思われる。したがって、被検血清中にIgMが微量しかない場合には、プロテインA処理によってIgMも吸収されて偽陰性を生じるおそれがある。このためKrishnaら²³⁾は、RFによる非特異反応を除外するために血清をプロテインA処理するよりは、PGGで吸収した方がよいとのべている。本研究では、使用妊婦全血清のRF陰性が確認されたので、RF除去のためのプロテインA前処理などを行わずに測定して得られた成績を示してある。

ELISAの感度の問題として、CF法とELISA-IgG法との比較では、ELISA-IgG抗体陰性検体はすべてCF抗体も陰性であったが、CF抗体陰性検体の5.3%にELISA-IgG抗体陽性が認められた。CF抗体価とELISA-IgG抗体価との間に強い相関を認める報告は多いが²²⁾²³⁾²⁶⁾、相関のない報告もある¹²⁾。今回の検討では、両者間の相関は認められなかった。ELISA-IgG抗体価がCF抗体価と相関しないことに対して南嶋¹²⁾は、ELISA検出抗体とCF検出抗体では、抗原への結合様式および感染後の消長が異なるか、または、HCMV株間の抗原性の差異によるのであろうとのべている。その他にCF活性がIgM分画にも存在する場合には、ELISA-IgG抗体価と相関しなくなる可能性も生じる。他方、ELISA-IgM抗体価と蛍光抗体間接法(IIF)によるIgM抗体価との間には、良い相関が得られている²¹⁾²³⁾。図7にみられるように、HCMV単核症

患者の ELISA-IgM 抗体価と IIF による IgM 抗体価は、ほぼ平行して推移した。しかし、IIF-IgM 抗体は、妊娠 10 週以降検出不能になったのに対し、ELISA-IgM 抗体は妊娠 25 週まで検出でき、抗体価は ELISA-IgM 法が約 20 倍高く得られた。今回の成績では、ELISA-IgG 法は CF 法より、また ELISA-IgM 法は IIF-IgM 法より良い感度が得られた。

さらに、ELISA を検査室レベルで用いる場合、大量の検体の階段希釈による検討が省略できれば、かなりの時間的節約が可能となる。そこで、ELISA-IgM 法の 2 倍階段希釈による抗体価と 1:100 一点希釈血清での ELISA 値の間の相関を調べた。その結果図 5 にみられるように、両者間に、回帰直線： $Y=0.6013X-0.7627$ 、相関係数： $r=0.945$ ($p<0.01$) という高い相関が得られた。したがって、1:100 一点希釈血清で測定された ELISA 値でおおよその抗体価が推量できると考えられた。それで今回の臨床的検討における ELISA 値の判定は、すべて 1:100 一点希釈血清における値を用いた。

II. 臨床的応用および症例検索について

上記の ELISA の基礎的検討に基づき、妊娠中の HCMV の再活性化の動きを把握するのに ELISA-IgM 抗体測定がその指標になるか否かを検討した。

妊婦の 95%以上が HCMV 抗体を保有している本邦では、HCMV 初感染は稀で、HCMV による胎児感染は従来あまり問題にされなかった。しかし、近年の研究では、HCMV 先天性感染は母体の抗体保有の有無に関係なく、0.2~2.2% の高頻度におこっているとされている。これらの事実から考えると、妊婦の初感染により胎児感染、先天性感染の生ずる場合よりもむしろ、潜伏持続感染 HCMV の再活性化に起因する先天性感染の場合が多いと思われる⁶⁾。かかる HCMV 先天感染児の大部分は無症候性に経過し、症候性のものは 12.4%程度といわれている²⁷⁾。Pass ら²⁸⁾は、症候性児の長期予後を観察し、小頭症、知能低下、脳性麻痺、難聴、視力障害などの後遺症を高率に認めている。さらに、新生児乳児期には無症候の児を数年間追跡した Hanshaw らの報告²⁹⁾では、学童期での軽度の知能障害、情緒障害、聴力障害を対照群より高率に認めている。彼らは、このような silent congenital cytomegalovirus infection が先天性の中樞神経系障害の大きな原因になると主張し、HCMV の先天性感染はにわかに注目されるにいたった。

妊娠時の児への感染経路は、経胎盤感染の他に経母乳および産道感染が考えられ、なかでも産道感染による頻度が最も高い³⁰⁾。一般に、妊娠末期の子宮頸管よりの HCMV 分離率は高く、12~27.8%におよんでい

る³¹⁾³²⁾。この問題につき、Reynolds ら³³⁾は、HCMV 非排泄妊婦から生れた児の新生児期尿のウイルス分離率は 4%にすぎないが、妊娠末期ないし産褥期にウイルスが分離された妊婦からの児では、さらに高い 57%にウイルス尿を認めている。また、Numazaki ら³⁴⁾は、生後 9 ヶ月までに 60%の健康児にウイルス尿がみられ、1 才までには 81%が HCMV 抗体をもつとのべ、出生児の約 60%は産道感染をうけると推定している。このような高率に周産期 HCMV 感染がおこるには、妊娠中の初感染によるというよりは、潜伏持続感染している HCMV の高頻度の再活性化が予想される。

しかし、妊娠中の HCMV 再活性化と IgM 抗体に関する報告はほとんどない。Schmitz ら³⁴⁾の蛍光抗体法を用いた成績では、妊娠中 HCMV-IgM 抗体陰性の母親から生れた児の 1.9% (1/54) に臍帯血で HCMV-IgM 抗体が検出された。これに対し、HCMV-IgM 抗体陽性の母親から生れた児では、29% (5/17) に HCMV-IgM 抗体が検出された。この成績は、HCMV-IgM 抗体の測定が HCMV の再活性化の指標になりうることを示唆する。また、腎移植患者における Cappel らの報告²²⁾では、HCMV 抗体陽性 12 例中 4 例に、移植後、HCMV-IgG 抗体価が変化しないのにも拘らず、ELISA による HCMV-IgM 抗体の出現と HCMV 尿を認めている。すなわち、ELISA による HCMV-IgM 抗体は、初感染のみならず再活性化においても検出され、しかも免疫抑制状態にある腎移植患者では、長期にわたって IgM 抗体の検出と HCMV 尿が知られている。同様のことは、妊娠という一種の免疫寛容状態でもおこりうると考えられるが、今までの報告では、妊娠中の HCMV-IgM 抗体陽性率は一般に低いとされている。

しかしながら、Schmitz ら³⁴⁾の蛍光抗体間接法を用いた成績では、非妊婦の HCMV-IgM 抗体陽性率は 2.2%に対し、妊婦では 6.7%で全体に低い傾向にあるが、妊婦の陽性率は非妊婦に比し約 3 倍高い。著者の ELISA による HCMV-IgM 抗体陽性率は、非妊婦 29.0%に対して妊婦では 45.1%と約 1.5 倍の高率 ($p<0.1$) であり、今までの蛍光抗体法による報告に比べ予想以上に高い値が得られた。しかし、周産期における出生児への HCMV 産道感染の高頻度の事実、および免疫抑制状態での IgM 抗体消滅までの長さなどという上述のことを考慮すると、この値は単に蛍光抗体法という検査法の差異による結果のみではないと考えられる。再活性化の頻度についての結論を出すには、今後さらに症例を重ねなくてはならないが、この ELISA-IgM 抗体の高い陽性率は、先に述べた新生児よりの HCMV 分離率や産道感染頻度に近い値である

ことは注目すべきである。従来、HCMV の再活性化あるいは再感染は、CF 抗体価の 4 倍以上の有意の上昇をもって把握されていた。今回、CF 抗体価の動きと ELISA-IgM 抗体の変化の関係を検討し得た症例は、いずれも ELISA-IgG 抗体陽性であったが、CF 4 倍以上昇例 17 例中、ELISA-IgM 抗体が陽転したのは 2 例のみであった。一方、ELISA-IgM 抗体が妊娠中に陽転したのは 31 例あったが、これらに対し、CF 抗体価が 4 倍以上上昇したものはなく、2 倍以上昇例が 9 例あったが有意の上昇ではなかった。このことから、4 倍程度の CF 抗体価の変化では、HCMV の再感染、再活性化を把握する指標にならないと考えられる。

ELISA は、蛍光抗体法にむしろまさる有用な方法で、一点希釈血清測定により大量の検体処理も可能となり、妊娠中の HCMV 再活性化とそれに続く周産期感染に対するスクリーニングに十分利用できることが本研究で証明された。一方、高感度であるために生じる非特異反応の除去、なかでも RF による非特異反応を根本的に解決する必要がのこされている。最近、Schmitz ら³⁵⁾は、抗 IgM 抗体を固相化し、被検血清、酵素標識ウイルス抗原、基質を順次反応させる ELA (enzyme-labelled antigen)-IgM 法を報告している。一方、Yolken ら³⁶⁾は、同じく抗 IgM 抗体を固相化し、被検血清、ウイルス抗原、酵素標識ウイルス特異抗体、基質を加えるサンドイッチ法を用いている。これらの方法は、いずれも IgM 抗体を固相化し、IgG の結合する場をなくすることによって、RF の影響をほとんど除去できるとしている。著者らも、風疹特異 IgM 抗体の検出にマウスのモノクローナル抗 IgM 抗体を固相化したサンドイッチ法を用い RF の除去に成功している。このような改良を加えることによって非特異的因子の影響を除外できれば、ELISA は特異性、高感度、安全性に加え、安価で大量の検体処理が可能という点で蛍光抗体法や RIA をしのぐ検査法になると思われる。さらに操作が簡便であるという利点からも、HCMV のみならず多くの感染症の診断法として検査室レベルに広く普及しうると期待される。

HCMV 抗体保有率の高い本邦での妊娠中の HCMV 初感染率と抗体陽転率それぞれを千葉ら³⁷⁾は、0.77% (7/908) と 12.7% (7/55)；広田ら³⁸⁾は、0.27% (4/1,454) と 4.9% (4/81) とし、著者は、0.9% (2/226) と 9.1% (2/22) と初感染率は一般にいずれも低い値を観察しているが、抗体陰性妊婦の陽転率は高い。一方、HCMV 抗体陰性妊婦における胎内感染率を新生児の HCMV 尿を指標にしてみると、千葉ら³⁷⁾、0% (0/55)、Stern ら³⁹⁾、0.48% (5/1,040)、Gold ら⁴⁰⁾、0.27% (8/3,000) となり、Stagno ら⁹⁾の抗体陽性妊婦

からの胎内感染率 3.37% (7/208) と比較していずれもより低い値であった。しかし、初感染妊婦での胎内感染では、抗体陽性妊婦に比べ、症候性児の出現頻度ははるかに高く²⁷⁾、このことは妊娠中の HCMV 初感染の重要性を物語るものである。古典的 HCMV 症である巨細胞封入体症 (cytomegalic inclusion disease, CID) は、全 HCMV 感染児の約 10% にみられるが、著者例では幸いにも CID は否定された。しかし HCMV 単核症妊婦より生れた児は、生下時の臍帯血 IgM 定量および HCMV 尿は陰性であったが、産道感染が成立し、生後 8 ヶ月でウイルス尿と ELISA で HCMV-IgM 抗体が証明された。これらの例においても、Hanshaw ら²⁹⁾の主張する silent congenital cytomegalovirus infection による先天性中枢神経系障害の出現には注意を払う経過をみまもる必要がある。

最後に、輸血後あるいは臓器移植後の HCMV 感染症を例外とすれば、ほとんどの HCMV 感染は不顕性経過をとるため、妊娠中の HCMV 自然初感染と思われる例に遭遇し、その経過の観察できた例は他に報告をみない。母児の予後を含めその経過を詳細に研究しえた本研究は、その点、極めて貴重な経験例であると思われる。

結 論

酵素標識免疫抗体法である ELISA 間接法による HCMV 特異 IgM 抗体検出の基礎的至適条件を検討し、その方法を用いての測定により、妊娠中の HCMV 潜伏持続感染の再活性化について臨床的検討を行った。

1. HCMV 感染細胞の細胞質に誘導されてくる Fc レセプターによる非特異反応を防ぐため、HCMV 抗原は核抗原を調整して用い、好結果を得た。
2. 標識酵素は、反応の安定性の面よりアルカリホスファターゼを選んだ。反応条件は、常温 (20~25°C) で、一次抗体は 2 時間、二次抗体は 3 時間、基質は正確に 45 分間それぞれ反応させた。
3. アッセイはマイクロプレートを用い、HCMV 抗原穴と対照抗原穴の吸光度の差を ELISA 値とし、ELISA 値 0.3 以上を陽性と設定した。
4. 蔗糖密度勾配超遠心法による分画血清、およびプロテイン A で IgG を吸収処理した血清を用いた成績から、ELISA-IgG、ELISA-IgM 各抗体の特異性が証明された。CF 活性は、IgM 分画にも一部認められた。
5. 2 倍階段希釈による抗体価 ($X = \log_{10}$ (抗体価)) と 1:100 一点希釈血清での ELISA 値 (Y) の間には、回帰直線: $Y = 0.613 X - 0.7627$ の直線的関係が得ら

れ、ELISA 値によっておおよその抗体価を推量できた。したがって、臨床的検討では、1:100 一点希釈血清による ELISA 値を用いて陰、陽性の判定を行った。

6. 今回の研究では、RF は RAHA 法によって陰性を確認したが、RF 陽性検体はその吸収処理が必要であり、大量の検体処理をおこなう場合には、さらに RF を除外できるシステムに改良する必要がある。

7. ELISA-IgG 抗体陰性検体は、すべて CF 抗体も陰性であったが、CF 抗体陰性検体中 5.3% に ELISA-IgG 抗体陽性がみられた。CF 抗体価と ELISA-IgG 抗体価の間には、相関はみられなかった。

8. HCMV 抗体保有率は、CF 抗体、ELISA-IgG 抗体陽性率でみると、非妊婦、妊婦ともにほぼ同率で 90%前後であった。しかし、ELISA-IgM 抗体陽性率は、妊婦が 45.1% と非妊婦の約 1.5 倍高値 ($p < 0.1$) を示したが有意差はなかった。この値は従来の報告よりかなり高い率であるが、周産期の高 HCMV 感染率を考慮すると、妊娠中の HCMV 再活性化の頻度としては起りうる値と考えられた。

9. CF 抗体価の変化と ELISA-IgM 抗体価の変化との間には、相関が認められず、CF 抗体価の変化では HCMV の再活性化を把握することは困難と思われた。

10. 妊娠中に HCMV 単核症を示した患者よりの出生児は、3 歳時点では無症候であるが、HCMV 持続感染状態にあると考えられ、将来にわたって中枢神経系障害についての長期観察が必要と思われる。

以上の成績より、ELISA による HCMV-IgM 抗体測定法は、特異性、高感度、安全性に加え、大量の検体処理が可能であり、RF などの非特異反応を解決することによって、蛍光抗体法や RIA をしのぐ方法になると期待される。加えて、ELISA-IgM 抗体測定が、妊娠中の HCMV 再活性化とそれに続く児の周産期感染のスクリーニングの一方法となりうると思われる。

謝 辞

稿を終るに臨み、御指導、御校閲を賜りました波田野基一教授に心からの謝意を表します。また、臨床ウイルス学への緒を導いていただいた富山県立中央病院、館野政也博士および直接御指導いただいた石川県立中央病院、矢吹朗彦博士の両先生に深く感謝します。さらに終始、御協力を賜りました金沢大学がん研究所、田中淳之助教授ならびに諸先生方、石川県衛生公害研究所、木村晋亮、尾西一、梶哲夫の各先生に深謝します。

本研究の要旨は、第 18 回日本新生児学会総会 (昭和 57 年)、第 34 回日本産科婦人科学会総会 (昭和 57 年)、第 19、20 回日本細菌学会中部支部総会 (昭和 57、58 年)、第 35 回日本産科婦人科学会総会 (昭和 58 年) で発表した。

文 献

- 1) Stagno, Sergio, Pass, Robert F., Dworsky, Meyer E. & Alford, Charles A. Jr.: Congenital and perinatal cytomegalovirus infection, p105-123. In Marvin S. Amstey (ed.), *Virus Infection in Pregnancy*, Grune & Stratton Inc., New York, 1984.
- 2) 鎌田 誠: 本邦における cytomegalovirus 胎内感染に関する研究. 札幌医誌, 49, 529-537 (1980).
- 3) Numazaki, Y., Yano, N., Morizuka, T., Takai, S. & Ishida, N.: Primary infection with human cytomegalovirus; virus isolation from healthy infants and pregnant women. *Am. J. Epidemiol.*, 91, 410-417 (1970).
- 4) Gold, E. & Nankervis, G. A.: Cytomegalovirus, p167-186. In A. S. Evans (ed.), *Viral Infections of Humans Epidemiology and Control*. 2nd ed. Plenum Medical Book Company, New York and London, 1982.
- 5) Rubin, R. H., Cosimi, A. B., Tolckoff-Rubin, N. E., Russell, P. S. & Hirsch, M. S.: Infectious disease syndromes attributable to cytomegalovirus and their significance among renal transplantation recipients. *Transplantation*, 24, 458-464 (1977).
- 6) Stagno, S., Reynolds, D. W., Huang, E. S., Thames, S. D., Smith, R. J. & Alford, C. A. Jr.: Congenital cytomegalovirus; Occurrence in an immune population. *N. Engl. J. Med.*, 296, 1254-1258 (1977).
- 7) Reynolds, D. W., Stagno, S. & Alford, C. A.: Laboratory diagnosis of cytomegalovirus infections, p399-439. In E. H. Lennette & N. J. Schmidt (ed.), *Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections*, 5th ed. Am. Pub. Health Assoc., Washington, 1979.
- 8) Voller, A. & Bidwell, D. E.: Enzyme-immunoassays for antibodies in measles, cytomegalovirus infections and after rubella vaccination. *Br. J. exp. Path.*, 57, 243-247 (1976).
- 9) 藤永 薫・島田活一郎: ウイルス実験学総論 (国立予防衛生研究所学友会編), 改訂二版, 391-392 頁, 丸善, 東京, 1973.
- 10) Lowry, Oliver H., Rosebrough, Nira J., Farr, A. Lewis & Randall, Rose J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275 (1951).
- 11) 勝田祐年: Coomassie Brilliant Blue G250 を用

- いる尿蛋白定量法の検討. *Biochemical Journal*, **4**, 504-579 (1980).
- 12) 南嶋洋一・広瀬美和子: ELISA によるサイトメガロウイルス抗体の測定. *臨床とウイルス*, **8**, 404-407 (1980).
- 13) Hawkes, R. A.: General principles underlying laboratory diagnosis of viral infections, p3-48. In E. H. Lennette & N. J. Schmidt (ed.), *Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections*, 5th ed. Am. Pub. Health Assoc. Inc., Washington, 1979.
- 14) The, T. H. & Langenhuisen, M. M. A. C.: Antibodies against membrane antigens of cytomegalovirus infected cells in sera of patients with a cytomegalovirus infection. *Clin. exp. Immunol.*, **11**, 475-482 (1972).
- 15) Chiba, Shunzo, Motokawa, Taku, Tamura, Tadashi, Hanazono, Hisaaki, Kamada, Makoto, Chiba, Yasuo & Nakao, Tooru.: Seroconversion to virus-specific pre-early nuclear antigens in infants with primary cytomegalovirus infection. *Infection and Immunity*, **30**, 135-139 (1980).
- 16) Langenhuisen, M. M. A. C., The, T. H., Nieweg, H. O. & Kapsenberg, J. G.: Demonstration of IgM cytomegalovirus-antibodies as an aid to early diagnosis in adults. *Clin. exp. Immunol.*, **6**, 387-393 (1970).
- 17) Schmitz, H. & Hass, R.: Erfahrungen mit der fluoreszenzserologischen Bestimmung von Antikörpern gegen Cytomegalie-Virus. *Z. med. Mikrobiol. u. Immunol.*, **155**, 283-296 (1970).
- 18) Schmitz, H. & Hass, R.: Determination of different cytomegalovirus immunoglobulins (IgG, IgA, IgM) by immunofluorescence. *Archiv für die gesamte Virusforschung*, **37**, 131-140 (1972).
- 19) Tokumura, T.: A possible role of IgA-immunoglobulin in herpes simplex infection in man. *J. Immunol.*, **97**, 248-259 (1966).
- 20) 南嶋洋一: ELISA. *臨床検査*, **25**, 966-974 (1981).
- 21) Schmitz, H., Doerr, H. W., Kampa, D. & Vogt, A.: solid-phase enzyme immunoassay for immunoglobulin M antibodies to cytomegalovirus. *J. Clin. Microbiol.*, **5**, 629-634 (1977).
- 22) Cappel, R., DeCuyper, F. & DeBraekeleer, J.: Rapid detection of IgG and IgM antibodies for cytomegalovirus by the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). *Arch. Virol.* **58**, 253-258 (1978).
- 23) Krishna, Rangachar V., Meurman, Olli H., Ziegler, Thedi & Krech, Ulrich H.: Solidphase enzyme immunoassay for determination of antibodies to cytomegalovirus. *J. Clin. Microbiol.*, **12**, 46-51 (1980).
- 24) 井上 栄: ELISA 法を用いた検査法の検討, 吸光度測定に関する問題点. *臨床とウイルス*, **9**, 422-423 (1981).
- 25) Mallinson, H., Roberts, C. & White, G. B. Bruce: Staphylococcal protein A; its preparation and an application to rubella serology. *J. Clin. Pathol.*, **29**, 999-1002 (1976).
- 26) Madore, H. Paul & Baumgarten, A.: Enzyme-linked protein A; an enzyme-linked immunosorbent assay reagent for detection of human immunoglobulin G and virus-specific antibody. *J. Clin. Microbiol.*, **10**, 529-532 (1979).
- 27) Ho, Mont: Cytomegalovirus; biology and infection, p131-149. Plenum Medical Book Co., New York and London, 1982.
- 28) Pass, R. F., Stagno, S., Myers, G. J. & Alford, C. A. Jr.: Outcome of symptomatic congenital cytomegalovirus infection; results of long-term longitudinal follow-up. *Pediatrics*, **66**, 758-762 (1980).
- 29) Hanshaw, J. B., Scheiner, A. P., Moxley, A. W., Gaev, L., Abel, V. & Scheiner, B.: School failure and deafness after "silent" congenital cytomegalovirus infection. *N. Engl. J. Med.*, **295**, 468-470 (1976).
- 30) Stagno, S., Reynolds, D. W., Pass, R. F. & Alford, C. A. Jr.: Breast milk and the risk of cytomegalovirus infection. *N. Engl. J. Med.*, **302**, 1073-1074 (1980).
- 31) Montgomery, R., Youngblood, L. & Medearis, D. N. Jr.: Recovery of cytomegalovirus from the cervix in pregnancy. *Pediatrics*, **49**, 524-531 (1972).
- 32) Stagno, S., Reynolds, D. W., Tsiantos, A., Fuccillo, D. A., Smith, R., Tiller, M. & Alford, C. A. Jr.: Cervical cytomegalovirus excretion in pregnant and non pregnant women; Suppression in early gestation. *J. Infect. Dis.*, **131**, 522-527 (1975).
- 33) Reynolds, D. W., Stagno, S., Hosty, T. S., Tiller, M. & Alford, C. A. Jr.: Maternal cytomegalovirus excretion and perinatal infection. *N.*

Engl. J. Med., 289, 1-5 (1973).

34) Schmitz, H., Kampa, D., Doerr, H. W., Luthardt, T., Hillemanns, H. G. & Würtele, A.: IgM antibodies to cytomegalovirus during pregnancy. Arch. Virol., 53, 177-184 (1977).

35) Schmitz, H., VonDeimling, U. & Flehmig, B.: Detection of IgM antibodies to cytomegalovirus (CMV) using an enzyme-labelled antigen (ELA). J. gen. Virol 50, 59-68 (1980).

36) Yolken, Robert H. & Leister, Flora J.: Enzyme immunoassays for measurement of cytomegalovirus immunoglobulin M antibody. J. Clin. Microbiol., 14, 427-432 (1981).

37) 千葉峻三・鎌田 誠・華岡久彬・元川 卓・岡部 稔・田中文輝・千葉靖男・中尾 亨・平沢 峻・小森

昭：シンポジウムII・サイトメガロウイルス感染，CMVの胎内感染。臨床とウイルス，7，274-277 (1979).

38) 広田清方・渡部旭常・奥村正幸・刈田美和子・玉橋征子・石井アケミ・塚本二郎・大島武子・田中 明・沼崎義夫：シンポジウムII・サイトメガロウイルス感染，妊婦のCMV感染。臨床とウイルス，7，277-278 (1979).

39) Stern, H. & Tucker, S. M.: Prospective study of cytomegalovirus infection in pregnancy. Br. Med. J., 2, 268-270 (1973).

40) Gold, E. & Nankervis, G. A.: Cytomegalovirus, p143-161. In A. S. Evans (ed.), Viral Infections of Humans. Plenum Press, New York, 1976.

Examination of Enzyme-linked Immunosorbent Assay(ELISA) for Detection of Human Cytomagalovirus (HCMV) Specific IgM Antibody and its Applicability to Clinical Screening Program for HCMV Infection in Pregnancy Akihiro Asamoto, Department of Virology, Cancer Reaearch Institute, Kanazawa University, Kanazawa, 920 - J.Juzen Med. Soc.,94, 634-652 (1985)

Key words: human cytomegalovirus, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), IgM antibody, reactivation, pregnancy

Abstract

In order to examine the problems of human cytomegalovirus (HCMV) infection in pregnant women, the applicability of enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) using the microplate method was investigated. The assay system consisted of tested sera, HCMV nuclear antigen newly prepared from HCMV-infected cells, and anti-human immunoglobulin G(IgG) or M(IgM) goat serum labelled with alkaline phosphatase and phosphatase substrate.

At first, the optimal assay conditions such as calculations of ELISA values or titers in one point (single) assay system using 1:100 diluted sera, reaction temperature and time, concentrations of HCMV antigen and enzyme-labelled anti-IgG or -IgM sera were determined. Secondly, the immunological specificity of HCMV-IgG or -IgM antibody in the present ELISA assay was confirmed by the serum samples treated with protein A or fractionated by sucrose gradient ultracentrifugation. Non-specific reactions by rheumatoid factor (RF) were excluded by prior examination of sera by the RF hemagglutination test.

After these fundamental examinations, serial sera of 226 pregnant women and 38 control sera of non-pregnant womem (total 725 samples) were tested by our single assay system in comparison with complement fixation (CF) test or immunofluorescence (IF) test of the same sera. Among these sera, 5.3% of 75 CF-negative specimens showed to be positive in ELISA-IgG antibody. In contrast, no sera shown to be negative in ELISA-IgG antibody did give any positive titer in CF test, indicating higher sensitivity of ELISA than that by CF test. In addition, 45.1%

of 226 pregnant women's sera, as compared with 29.0% of non-pregnant women's sera, clearly showed positive titers in ELISA-IgM antibody. These unexpectedly high incidences of ELISA-HCMV-IgM antibody in pregnant women seemed to explain an increased frequency of HCMV reactivation in pregnancy from dormant HCMV infection usually observed in adult human.

In the course of these experiments, an interesting case with HCMV mononucleosis in early pregnancy was observed. IgM antibody to HCMV reached the highest value in the 6th week of pregnancy. The antibody was positive in follow-up sera until the 25th week of pregnancy by ELISA, whereas it could be no longer detected in the 10th week by indirect IF test. No macroscopic abnormalities were observed in the baby delivered by this patient. However, further follow-up observations on possible later occurrence of disorders in central nervous system may be required at least until children's age.

From the above results, the ELISA techniques employed here should be undoubtedly emphasized as one of routine diagnostic procedures in mass examinations of HCMV infection in pregnant women.