

Study on Serological Diagnosis for Recent Rubella Virus Infection in Pregnant Women with High Rubella Antibody Titer

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/2297/8136

高風疹抗体価を有する妊婦における風疹ウイルス感染時期の血清診断に関する研究

金沢大学医学部微生物学講座 (主任：中村信一教授)

干 場 勉

(平成1年7月21日受付)

赤血球凝集抑制試験 (hemagglutination inhibition test, HI 試験) による抗風疹ウイルス抗体価 (風疹 HI 抗体価) が高い妊婦における風疹ウイルス感染時期の血清診断について検討した。基礎実験に基づき風疹 IgM, IgG 抗体の測定には酵素結合抗体免疫測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) を用いた。まず、風疹ウイルス感染時の抗風疹ウイルス抗体価の変動の特徴をみるために、風疹 HI 抗体陰性者22例と陽性者25例について風疹生ワクチン接種後の血中風疹 IgM, IgG 抗体価をワクチン接種後1年にわたり検討した。風疹 HI 抗体陰性例では、風疹 IgM 抗体はワクチン接種3週後より出現し、抗体価は4週後で最高値を示した後、3か月後まで急減し、以後は漸減した。風疹 IgG 抗体はワクチン接種3週後より出現し、抗体価は3か月後にまで及ぶ緩やかな上昇が見られた。風疹 HI 抗体陽性例では接種後2週で IgM, IgG 抗体価にわずかな変化がみられた。IgM, IgG 抗体いずれにおいても抗体価の上昇例ではワクチン接種1か月以後は抗体価が低下する傾向がみられた。次に、風疹ウイルス顕性感染 (初感染) 例36例、および自然再感染例6例について風疹抗体価の変動を検討した。初感染例の風疹 IgM 抗体は発疹出現日 (感染2週後) から4日後までに全例で陽性となり、抗体価は発疹出現1週後 (感染3週後) にピークを呈した後は感染約3か月後まで急速に低下した。また、風疹 IgG 抗体は発疹出現5日後までに全例で陽性となり、抗体価は急激な上昇の後に緩やかに上昇してプラトーに達するのに感染後約3か月を要した。自然再感染例については6例中2例が IgM 抗体陽性となったが、IgG 抗体は顕性感染例とは異なり早期に最高値に達した後低下した。以上より風疹ウイルス初感染では感染3週後から3か月後までは IgM 抗体価と IgG 抗体価の解離 (IgM 抗体価は低下, IgG 抗体価は上昇) がみられることがわかった。この ELISA を用いた IgM, IgG 抗体の解離という特徴的推移の検出は、高い風疹 HI 抗体価を持つ妊婦の風疹ウイルスの3か月以内の初感染診断に有用であることが示唆された。

Key words rubella, pregnancy, ELISA, IgM antibody, diagnosis

妊娠初期における母体への風疹ウイルス感染が、胎児に深刻な種々の奇形を生ずることは1944年に Gregg¹⁾により報告されたが、1964年にアメリカにおいて約2万人にも及ぶ先天性風疹症候群 (congenital rubella syndrome, CRS) 児の出生が見られ、にわかには注目をあびることとなった²⁾。本邦でも1965年に沖縄県において多数の CRS 児が出生したことは今なお記

憶に新しい³⁾。この経験を教訓としてわが国では1977年より風疹ワクチンが中学女子を対象として定期接種されるようになり⁴⁾、また、厚生省からの赤血球凝集抑制試験 (hemagglutination inhibition test, HI 試験) による風疹抗体 (風疹 HI 抗体) の測定に基づく風疹診断に関する指針⁵⁾が示されてからは、産科外来においても風疹 HI 抗体価検査がほぼ常用検査として取

Abbreviations: CRS, congenital rubella syndrome; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; HA, hemagglutination reaction; HI, hemagglutination inhibition test; ME, mercaptoethanol; RF, rheumatoid factor; RIA, radioimmunoassay; RV, rubella virus

り入れられるに至っている。

しかし、HI 抗体価は発疹出現後早期に高いプラトーに達してしまうために256倍以上の高抗体価を示す際は感染時期の推定は困難とされ⁹⁾、妊婦がこの様な高い風疹 HI 抗体価を示した場合には患者、医師共に深刻な局面に立たされることになる。従来、このような高い HI 抗体価を示す場合には、初感染初期にのみ出現するとされる風疹 IgM 抗体の存在を証明する等により感染時期を推定することが試みられてきた。IgM 抗体の証明方法としては、プロテインA処理により血清の IgG 抗体を除去し IgM 抗体による HI 抗体を証明する方法⁹⁻⁹⁾、また蔗糖密度勾配超遠心法で IgM 抗体を分画して HI 抗体価を測定する方法¹⁰⁾等があるが、これらはその値の評価や手技の複雑さの点で臨床への応用は容易ではない。近年簡便で感度が良く、IgM、IgG 抗体のクラス別の抗体測定が可能なラジオイムノアッセイ (radioimmunoassay, RIA)¹¹⁾や酵素結合抗体免疫測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)¹²⁾等の方法が出現してきたが、著者は先に各種の風疹 IgM 抗体測定法を子宮内感染の有無の見地から比較検討し、ELISA が臨床に応用可能で有用な精査方法であることを明らかにした¹³⁾。

本研究では高い風疹 HI 抗体価を持つ妊婦について、ELISA を用い IgM、IgG 抗体価を測定することにより風疹ウイルス感染時期を推定することを試みた。まず、風疹感染モデルとして風疹生ワクチンを風疹 HI 抗体陰性者および陽性者へ接種した後の風疹 IgM、IgG 抗体の消長を観察し、これより風疹感染時の抗体の推移の特徴を推測した。次に、1987年の風疹流行時に実際の自然初感染及び再感染例の抗体の推移を観察することにより、風疹ウイルス感染時期の推定の可能性について検討した。

対象および方法

1. 対象

18~21歳の健康な看護学院女子学生を風疹ワクチンの接種の対象とした。接種前の風疹 HI 抗体が陰性の22例および陽性の25例に乾燥弱毒生風疹ワクチン「ピケン」(田辺製薬、大阪)を0.5ml皮下に接種した後、1年にわたって1週~数か月毎に血清を採取した。また特殊例として「ピケン」ワクチン接種81日後まで数日毎に15回にわたり血清が採取された症例(23歳、女性、N.T.)を加えた。

更に、自然感染例では1987年の風疹流行の際の顕性自然感染例(初感染例)36例の女性(年齢22~39歳、うち妊婦は25例)を対象とし、数日~数週毎に血清を採

取した(250検体)。また妊婦で不顕性自然再感染を示した6症例については感染前と抗体上昇が見られた感染後とに血清を採取し、このうち2例については抗体上昇後1~4か月毎に採取した。

II. 各種血清風疹抗体価の測定

1. HI 抗体価

風疹 HI 抗体価測定は予研法¹⁴⁾に準じU型マイクロプレート(三光純薬、東京)を用いてマイクロタイター法により行った。各々25 μ lとなる血清の2倍階段希釈列を作成し、次いでウイルス抗原液25 μ lを加えた。マイクロミキサーで混和後、室温で60分反応させ、0.25%ヒナ血球浮遊液50 μ lを加え、4 $^{\circ}$ C、60分静置後判定した。HI 抗体価は凝集を完全に抑制した最高血清希釈倍数で表し、HI 抗体陽性は16倍以上とした。抗体価測定時には同時に行った血球および血清対照が陰性であり、かつ赤血球凝集反応(hemagglutination reaction, HA)抗原価測定で使用抗原液が4 HA 抗原価(抗原液の血球凝集最高希釈倍数が4倍となる抗原量)であることを確認して行い、また反応の再現性の確認には陰性および陽性対照血清を用いた。被検血清中からの非特異的凝集抑制物質の除去は冷アセトンで2回抽出する方法¹⁵⁾を用い、また自然血球凝集素は50%ヒナ血球浮遊液を加えて除去した。凝集血球(ヒナ血球)は1日齢のニワトリヒナから採取した赤血球を、HA 抗原は凍結乾燥風疹ウイルス HI 試薬「生研」HA 抗原(デンカ生研、東京)を用い、4 HA 抗原価となるよう使用直前に調整した。血清希釈にはペロナール緩衝液(pH7.0, μ = 0.145)を用いた。

2. 蔗糖密度勾配による血清分画

被検血清をsw50.1ローター(Beckman, Palo Alto, U.S.A.)、超遠心機 Model L5-75(Beckman)を用いて15~55%(W/V)の蔗糖密度勾配で35,000rpm、16時間遠心し、17分画に分け、各々についてELISAを用いて抗体価を測定した。IgM抗体(19s)およびIgG抗体(7s)のマーカーとしては、溶血素(1:10)(Sigma, St. Louis, U.S.A.)をのせたチューブを同時に遠心して決定した。

3. ELISA

ELISAによる風疹抗体の測定にはルベラ IgM、IgG-EIA 生研(デンカ生研)を使用した。測定の際はプレート毎にキット添付の陰性、弱陽性、強陽性コントロール血清を測定し、自然感染例では弱陽性コントロールの測定値(IgMでは0.30, IgGでは0.50)をカットオフ値としそれ以上を陽性とした。生ワクチン接種例では、反応抗体量が少なく、自然感染を対象と

した弱陽性コントロール値では陰性と判定されることが多いために、風疹 HI 抗体陰性血清60例の平均吸光度値にその標準偏差の3倍の値を加えた吸光度値 (IgM では0.20, IgG では0.40)をカットオフ値とした¹⁶⁾¹⁷⁾。

1) 風疹 IgM 抗体測定

使用したルベラ IgM-EIA 生研は IgM 捕捉法である。マウス抗ヒト IgM モノクローナル抗体が固相化されたマイクロプレートの各ウェルに、100倍希釈被検血清 100 μ l を加えて5°Cで60分反応させ、洗浄液 (Tween 20 0.05%を含む 5mM リン酸緩衝生理食塩水, pH7.4) を用いて洗浄した。洗浄後風疹ウイルス抗原液、あるいは対照抗原液 100 μ l を加えて5°Cで60分反応させた。その後ペルオキシダーゼ標識モルモット抗風疹ウイルス抗体 100 μ l を加え、洗浄後基質 (150mM o-フェニレンジアミン) 100 μ l を加えて室温で遮光して30分反応させることにより発色させた。その後 1.5N 硫酸を 100 μ l 加えて反応を停止させ、各ウェルの吸光度 (波長, 490nm) を測定し、風疹ウイルス抗原ウェルと対照抗原ウェルとの吸光度の差 (吸光度値) を ELISA 値あるいは IgM 抗体価とした。比色計は MTP-22 形マイクロプレート光度計 (コロナ電気, 東京) を用いた。

2) 風疹 IgG 抗体測定

風疹 IgG 抗体測定には間接法であるルベラ IgG-EIA 生研を用いた。風疹ウイルス抗原、あるいは対照抗原が固相化されたマイクロプレートの一対のウェルに、100倍希釈被検血清 50 μ l を加え37°Cで60

分反応させた。次にプレートを洗浄液 (Tween 20 0.05%を含む 5mM リン酸緩衝生理食塩水, pH7.4) で洗浄後にペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト IgG 抗体 50 μ l を加えて37°Cで60分反応させ、洗浄した後、基質 (150mM o-フェニレンジアミン) を 100 μ l 加えて室温で遮光して30分反応させた。その後 1.5N 硫酸を 100 μ l 加えて反応を停止させ、各ウェルの吸光度 (波長, 490nm) を測定し、風疹抗原ウェルの値から対照抗原ウェルの値を差し引いた値 (吸光度値) をその被検血清の ELISA 値または IgG 抗体価とした。特にことわりのないかぎりカットオフレベルの抗体検出が目的である通常の100倍希釈血清で測定した際の吸光度値を IgG 抗体価とした。しかし、自然感染初期のように IgG 抗体が多量に存在する場合は100倍希釈では測定値が高値となり、抗体価変動の判別が困難となるため1600倍希釈での測定も試み、その吸光度値を ELISA₁₆₀₀ 値または IgG₁₆₀₀ 抗体価とした。

III. 統計学的検討

回帰分析, Student's t test を用い $p < 0.05$ を有意差として判定した。

成 績

I. ELISA の基礎的検討

ルベラ IgM-, IgG-EIA 生研について以下の基礎的検討を行った。

1. 蔗糖密度勾配超遠心分離血清での抗体特異性の検討

風疹生ワクチン接種症例 N.T. の生ワクチン接種23

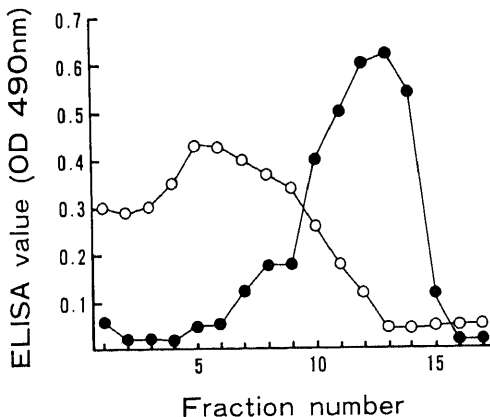


Fig. 1. Rubella IgM and IgG antibodies in sucrose density gradient fractions of a serum obtained 23 days after vaccination. ●, rubella IgM antibody; ○, rubella IgG antibody.

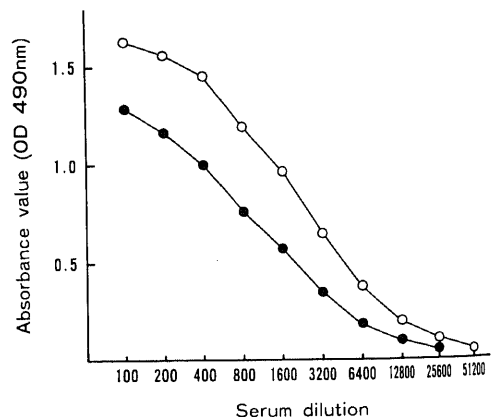


Fig. 2. Relationship between absorbance value and serum dilution for rubella antibody. ●, rubella IgM antibody; ○, rubella IgG antibody.

日後の血清を蔗糖密度勾配超遠心により17分画に分け、各分画について ELISA を用いて風疹 IgM, IgG 抗体価を測定した。風疹 IgM 抗体, IgG 抗体の ELISA 値は各々 No.12, 13 分画, および No.5, 6 分画で最高値を示した (図 1)。No.12, 13 分画, および No.5, 6 分画は, 各々同時に超遠心した溶血素の溶血分画から決定した 19s (IgM 抗体分画), 7s (IgG 抗体分画) に一致しており, 使用キットは風疹 IgM, IgG 抗体に特異的に反応することを確認した。

2. 測定精度の検討

キット添付の陰性, 弱陽性, 強陽性のコントロール血清の ELISA 値を各々 8 回測定し, その変動率 (標準偏差/平均値) (%) を求めた。風疹抗体陰性, 弱陽性, 強陽性コントロール血清の ELISA 値の変動率は IgM 抗体では各々 7.31%, 3.67%, 3.75%, IgG 抗体では各々 10.9%, 3.19%, 3.47% であり, 使用 ELISA キットはほぼ良好な測定精度を示した。以上の結果に基づきペア血清間で 10% 以上の ELISA 値の差を呈した場合に IgM 抗体価, IgG 抗体価に変動があったものとした。

3. 一点測定による定量性の検討

まず, 高い ELISA 値を示す血清について希釈倍数

と吸光度値との関係を見た (図 2)。吸光度値が IgM 抗体測定では 0.30~1.20, IgG 抗体測定では 0.40~1.40 の範囲では両者にほぼ直線関係が得られた。

次に, 風疹 IgM, IgG 抗体それぞれについて, 吸光度値が弱陽性コントロール血清の ELISA 値 (IgM, 0.30; IgG, 0.50) 以上を示す各血清の最高希釈倍数 (ELISA 価) と, 各血清の通常測定に用いる 100 倍希釈時の ELISA 値との間の回帰分析を行い, 一点測定による定量性を検討した。この際, IgM 抗体では 30 検体, IgG 抗体では 25 検体の血清を用いた。また IgG 抗体測定では高値測定のための 1600 倍希釈濃度での ELISA₁₆₀₀ 値を求め, 100 倍希釈時と同様に求めた ELISA 価との関係を 20 血清検体を用いて検討した。このようにして求められた ELISA 価の常用対数 ($X = \log_{10}$ ELISA 価) と ELISA 値 (Y) との間の回帰直線, 相関係数は IgM 抗体価, IgG 抗体価および IgG₁₆₀₀ 抗体価において各々 $Y = 0.59X - 0.84$, $r = 0.94$ ($p < 0.01$); $Y = 0.65X - 0.63$, $r = 0.88$ ($p < 0.01$); $Y = 0.64X - 1.39$, $r = 0.87$ ($p < 0.01$) (図 3, 4) であり, 上記の一定希釈倍率での測定値が一定範囲内では定量性をもつことを示していた。

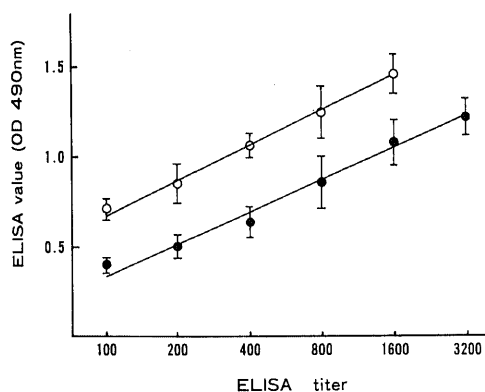


Fig. 3. Relationship between ELISA values of diluted sera (1:100) and ELISA titers of the same sera determined by two-fold dilution method. ELISA titer is the reciprocal of the highest dilution resulting in absorbance value of 0.30 for IgM and 0.50 for IgG. Each ELISA value represents the mean \pm S.D. ($n=5$). ●, rubella IgM antibody; ○, rubella IgG antibody. The regression equations and the coefficient of correlation in IgM and IgG examinations are $Y = 0.59X - 0.84$, $r = 0.94$ ($p < 0.01$), $Y = 0.65X - 0.63$, $r = 0.88$ ($p < 0.01$), respectively, where X and Y are log (ELISA titer) and ELISA value, respectively.

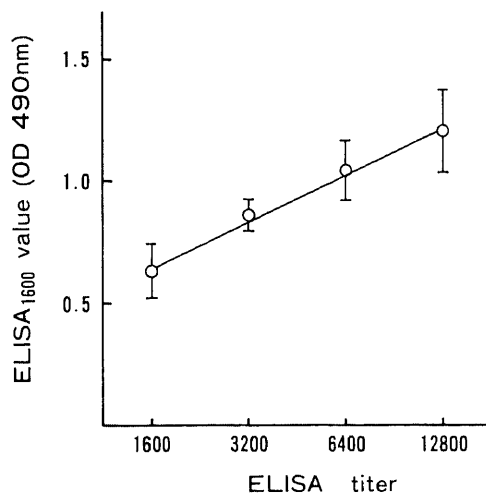


Fig. 4. Relationship between ELISA₁₆₀₀ values of rubella IgG antibody of diluted sera (1:1600) and ELISA titers of the same sera determined by two-fold dilution methods. ELISA titer is the reciprocal of the highest dilution resulting in absorbance value of 0.50. The regression equation and the coefficient of correlation in IgG examination are $Y = 0.64X - 1.39$, $r = 0.87$ ($p < 0.01$), where X and Y are log (ELISA titer) and ELISA value, respectively.

II. 生ワクチン接種後の抗体価の推移

1. 風疹 HI 抗体陰性者の生ワクチン接種後の血中抗体価の推移

風疹 HI 抗体陰性者22例について風疹生ワクチン接種を行い、接種1, 2, 3, 4週, 2, 3, 4, 5か月, 1年後に風疹ウイルスに対する HI 抗体価, IgM 抗体価, IgG 抗体値を測定した。

接種1週後では HI 抗体, IgM 抗体, IgG 抗体いずれも認められなかった。HI 抗体の陽性化の時期は IgM 抗体, IgG 抗体より早く、接種2週後には既に被検22例中5例(23%)が HI 抗体陽性を示した(表1)。HI 抗体はワクチン接種3週後には1例を除き21例(95%)が陽性を示し、接種4週後には全例が陽性を示した。以後接種1年にわたり全例共に HI 抗体陽性を維持していた。

IgM 抗体陽性者の出現は HI 抗体のそれよりやや遅れ、接種3週後に初めて出現した(IgM 抗体陽性率: 73%)。接種4週後には IgM 抗体陽性率は100%に達したが、その後陽性率は徐々に低下した。接種1年後においても被検9例中1例が IgM 抗体陽性を示し、長期間 IgM 抗体が残存する場合があることがわかった。

IgG 抗体の出現も IgM 抗体と同様に HI 抗体と比べるとやや遅れ、接種3週後からであった。しかし IgM 抗体と異なり陽性率の上昇は緩慢で接種3週, 4週後においても各々18, 55%の陽性率を示したにすぎなかった。接種3か月後でも1例は陰性を示し、接種5か月後ようやく全例陽性となった。また接種1年後では全例 IgG 抗体陽性であった。

HI 抗体価は、1例を除き全例が HI 抗体

陽性を示した接種3週後に、ほぼ最高値(2.6 ± 1.3 (平均値 \pm 標準偏差))を示し、この値は1年にわたり持続した(図5)。

IgM 抗体価の上昇は、接種2週後には見られなかったが、IgM 抗体陽性率が73%を示した接種3週後に、ほぼ最高値(0.37 ± 0.23 (平均値 \pm 標準偏差))に達した。接種4週後の IgM 抗体価は 0.39 ± 0.16 であり、接種3週後とほぼ同じであったが、その後抗体価は低下した。1例においては接種1年後でも0.21であった。

IgG 抗体価は接種3週後より徐々に上昇し、IgG 抗体陽性率がほぼ100%を示した接種3か月後に最高値(0.88 ± 0.35)に達した。その後抗体価は接種後1年間にわたり持続した。

上述の風疹ワクチン接種後の HI 抗体価, IgM 抗体価, IgG 抗体価の変動をより詳細に症例 N.T. について検討した(図6)。N.T. では生ワクチン接種21日後に HI, IgM, IgG 各抗体価は急激に上昇した。HI 抗体価は23日後に最高値(HI 抗体価: 2^6)に達した後、ほとんど増減は見られなかった。IgM 抗体価は26日後を最高値(0.38)として漸減したが、81日後でも初期値(0.07)よりは高い値(0.15)を示していた。IgG 抗体価は接種18日以後23日後までは急激な上昇を示した後、81日後まで緩慢な上昇を続け IgM 抗体との消長に明確な解離がみられた。

以上の成績から、風疹ウイルスの初感染の際には、HI 抗体価がほぼ最高値に達する感染約3週後までは IgM, IgG 抗体価は共に上昇するが、3週以後約3か月後までは IgM 抗体価は低下するのに反して、IgG 抗体価は上昇するという IgM, IgG 抗体価の解離が見ら

Table 1. Detection of rubella antibodies in serial sera of seronegative women* after inoculation with rubella vaccine

Rubella antibody	Before vaccination** (22)***	Number (%) of rubella antibody-positive women								
		1 week (22)	2 weeks (22)	3 weeks (22)	4 weeks (22)	2 months (22)	3 months (22)	4 months (22)	5 months (20)	1 year (9)
HI	0 (0)	0 (0)	5 (23)	21 (95)	22 (100)	22 (100)	22 (100)	22 (100)	20 (100)	9 (100)
IgM	0 (0)	0 (0)	0 (0)	16 (73)	22 (100)	nt****	14 (64)	9 (41)	7 (35)	1 (11)
IgG	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (18)	12 (55)	nt	21 (95)	21 (95)	20 (100)	9 (100)

* Women with negative reaction in hemagglutination inhibition (HI) test for rubella virus.

** One week before vaccination.

*** Number of women tested.

**** Not tested.

れることが予想された。このことはまた、風疹ウイルス初感染症例において、HI 抗体価が高値に達してしまつた後に感染時期を推定する際、IgM、IgG 抗体価の測定が有用であることを示唆するものであった。

2. 風疹 HI 抗体陽性者の生ワクチン接種後の血中抗体価の推移

風疹 HI 抗体陽性者25例 (抗体価 2^6 , 9例; 2^7 , 6例; 2^8 , 10例) について風疹生ワクチン接種を行い接種2, 3, 4, 5, 9, 13週後に風疹ウイルスに対する HI 抗体価, IgM 抗体価, IgG 抗体価を測定した。

HI 抗体, IgG 抗体は観察期間中常に陽性であった。

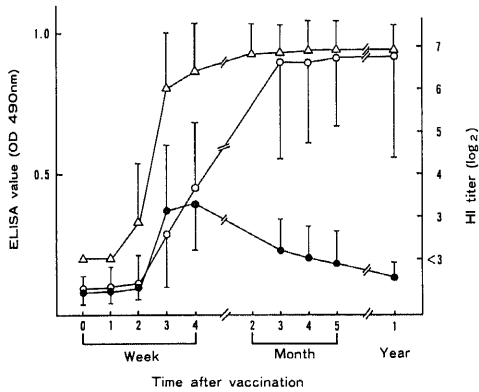


Fig. 5. Rubella antibody responses after vaccination in rubella HI antibody-negative women. Each value represents the mean \pm S.D. (n=22). ●, rubella IgM antibody; ○, rubella IgG antibody; △, rubella HI antibody.

IgM 抗体陽性率はワクチン接種前は16%であったが、接種2週後には56%に上昇した (表2)。その後 IgM 抗体陽性率は低下し接種5週後には12%となり、以後13週後に至るまで変化しなかった。

HI 抗体価の明らかな変動は観察期間を通じて見られなかったが、IgM、IgG 抗体価の変動は、HI 抗体陰性者の場合よりは早く接種2週後に既に見られ、また抗体価の変動は症例により幾分異なり、接種2週後の IgM、IgG 抗体価の上昇、あるいは低下により4群に群別された。すなわち、両抗体価が共に上昇 (A群, 12例)、IgM 抗体価上昇と IgG 抗体価低下 (B群, 8例)、IgM 抗体価低下と IgG 抗体価上昇 (C群, 3例) および両抗体価が共に低下 (D群, 2例) した4群である (図7)。

A群では IgM、IgG 抗体価は各々接種前 0.13 ± 0.04 , 0.66 ± 0.14 から2週後には 0.23 ± 0.07 , 0.99 ± 0.16 に上昇した。その後両抗体価は共に低下し、IgM 抗体価は5週後に 0.15 ± 0.05 , IgG 抗体価は13週後に 0.73 ± 0.15 の値を示し共に接種前に近い抗体価にまで低下した。

B群では IgM 抗体価は接種前 0.12 ± 0.04 から2週後には 0.21 ± 0.03 にまで上昇し、その後13週後まで低下した。IgG 抗体価は接種前 1.12 ± 0.19 から2週後には 0.88 ± 0.26 にまで低下し、5週後に 1.01 ± 0.16 と軽度上昇したが、その後低下し、13週後ではA群とほぼ同様の抗体価 (0.88 ± 0.23) を示した。

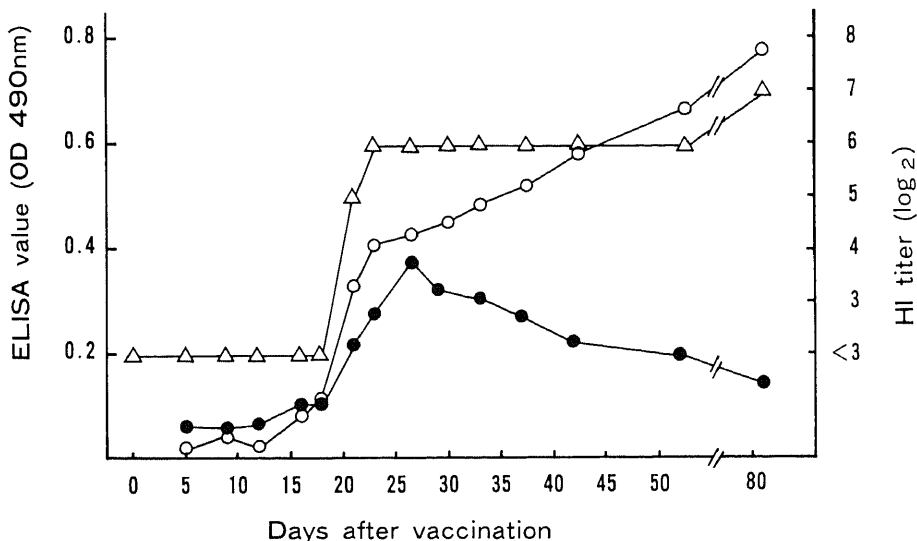


Fig. 6. Rubella antibody responses after vaccination in a case N. T. ●, rubella IgM antibody; ○, rubella IgG antibody; △, rubella HI antibody.

C群ではIgM抗体価は接種前 0.22 ± 0.07 から2週後には 0.18 ± 0.08 に低下し、3週後に上昇した(0.21 ± 0.09)が、4週後には更に低下し(0.15 ± 0.05)その後は低値のまま経過した。IgG抗体価は接種前 0.63 ± 0.06 から2週後に 1.03 ± 0.05 に上昇した後は低下し、A群と同様の経過をとった。D群の両抗体価は2週後に低下し、3、4週後には軽度上昇が見られた後に

徐々に低下した。

以上の4群のいずれにおいてもHI抗体陰性例へのワクチン接種時の様なはっきりとした両抗体価の解離は見られなかった。この成績から、風疹の再感染時には初感染時に見られたIgG抗体価の緩慢な上昇はなく、また、IgM、IgG抗体共に、上昇した抗体価は感染後約1か月以後は低下することが示唆された。

Table 2. Detection of rubella antibodies in serial sera of 25 seropositive women* after inoculation with rubella vaccine

Rubella antibody	Before vaccination**	Number (%) of rubella antibody-positive women					
		2	3	4	5	9	13
HI	25(100)	25(100)	25(100)	25(100)	25(100)	25(100)	25(100)
IgM	4(16)	14(56)	13(52)	8(32)	3(12)	3(12)	3(12)
IgG	25(100)	25(100)	25(100)	25(100)	25(100)	25(100)	25(100)

* Women with positive reaction in HI test for rubella virus.

** One day before vaccination.

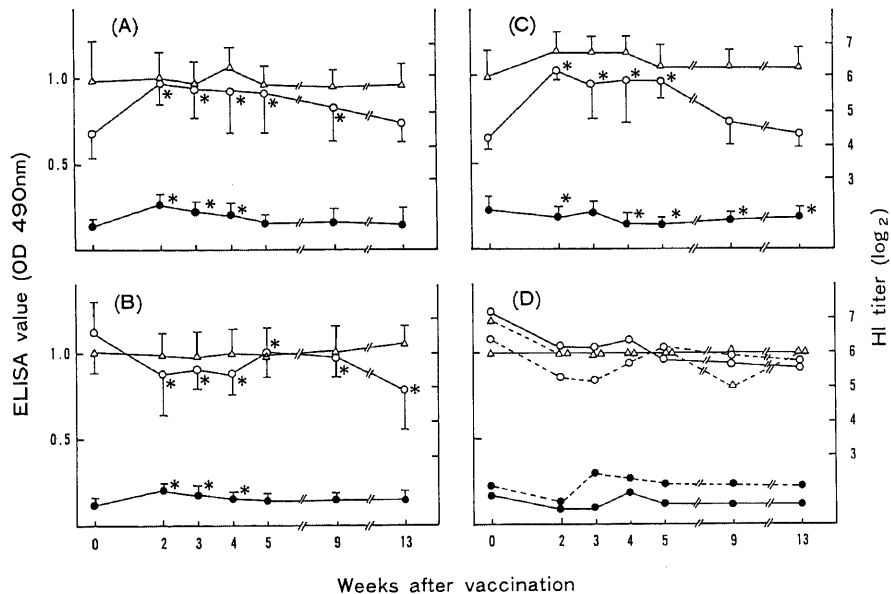


Fig. 7. Rubella antibody responses after vaccination in rubella HI antibody-positive women. Vaccinees were divided into 4 groups according to the response two weeks after vaccination: (A), increased IgM and IgG antibodies (12 cases); (B), increased IgM and decreased IgG antibodies (8 cases); (C), decreased IgM and increased IgG antibodies (3 cases); and (D), decreased IgM and IgG antibodies (2 cases). Each value represents the mean \pm S.D. ●, rubella IgM antibody; ○, rubella IgG antibody; △, rubella HI antibody. (D): —, case No 4; ---, case No 7. *, Significantly different from the initial value ($p < 0.05$).

Ⅲ. 自然感染例の抗体価の推移

1. 顕性自然感染の発疹出現後の血中抗体価の推移
 風疹の既往がなく、発疹出現日の明らかな顕性感染例36例を初感染例として風疹 HI, IgM, IgG 抗体価の推移を発疹出現後一定期間中毎に検査を施行することにより175日後に至るまで検討した。この際各被検期間中同一被検者に複数回の検査を施行した場合、各被検期間中における抗体保有率の判定にはその最初の結果を採用し、各検査の平均値を該当期間中の被検者の抗体価とした。

22症例では発疹出現1日前から数年前に血清が得られていたが、それらの血清には風疹 HI 抗体, IgM 抗体, IgG 抗体はいずれも認められなかった(表3)。HI 抗体は発疹出現2日後では被検17例中5例(29%)が陽性であった。発疹出現3日後まで陰性例が見られたが、4日後以後は被検全例陽性であった。

IgM 抗体出現は HI 抗体出現よりやや遅れ、発疹出現2日以内では被検17例中2例(12%)のみが陽性であった。発疹出現3日後まで陰性例がみられたが、発疹出現4日後、1週後、2週後では被検全例陽性となった。39日後より陰性例が出現して、その後徐々に陽性率が低下したが、5か月後(141~175日後)でも12例中3例(25%)が陽性であり、HI 抗体陰性例のワクチン接種時と同様に長期間 IgM 抗体が残存する場合があることが確認された。

IgG 抗体の出現はワクチン接種時と同様 HI 抗体や IgM 抗体よりは遅く、発疹出現2日以内では見られなかった。発疹出現3日後によく陽性例が出現し、4日後にはまだ陰性例が存在していたが、それ以後には被検全例が陽性となっていた。

HI 抗体価は、発疹出現1週後(5~10日後)にはほぼ最高値($2^{9.0 \pm 0.9}$, n=21)を示し、2週後以後若干の低下を示したが22週後(141~175日後)でも高値($2^{7.8 \pm 1.0}$, n=12)を示していた(図8)。

IgM 抗体長期持続(発疹出現後120日以上陽性)例4例を除いた32例の IgM 抗体価は、全例が陽性を示した発病1週後(5~10日後)には最高値(1.17 ± 0.12 , n=19)に達した(図9-A)。2週後(11~17日後)もほぼ同様の値(1.05 ± 0.26 , n=16)であったが、その後急速に低下し、14週後(85~112日後)に陰性となった(0.24 ± 0.10 , n=13)。

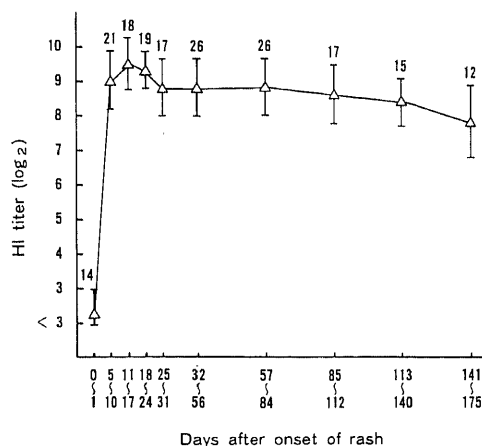


Fig. 8. Rubella HI antibody response after onset of rash in 36 women with primary rubella virus infection. Each value represents the mean \pm S.D. Figure in the upside of each mark indicates the number of cases tested during each period.

Table 3. Detection of rubella antibodies of 36 rubella patients after onset of rash

Rubella antibody	Number* (%) of rubella antibody-positive patients												
	Before rash**	Days after rash											
		0	1	2	3	5	11	18	25	32	57	85	113
	(22)***	(5)	(17)	(6)	(21)	(18)	(19)	(17)	(26)	(26)	(17)	(15)	(12)
HI	0	1	5	5	21	18	19	17	26	26	17	15	12
	(0)	(20)	(29)	(83)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)
IgM	0	1	2	5	21	18	19	17	23	14	7	3	3
	(0)	(20)	(12)	(83)	(100)	(100)	(100)	(100)	(88)	(54)	(41)	(20)	(25)
IgG	0	0	0	3	21	18	19	17	26	26	17	15	12
	(0)	(0)	(0)	(50)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)

* When tests were performed two or three times in a patient in each period, the result from the first test was adopted.
 ** One day to several years before rash.
 *** Number of patients tested.

特殊な例であった IgM 抗体長期持続例 4 例中 3 例の IgM 抗体価は、発疹出現後 3 か月後も 0.60 以上の ELISA 値を示し、また 1 例は 0.30 以上の陽性値を持続し抗体価の低下が遅延した (図9-B)。しかしながら、いずれにおいても IgM 抗体価は発疹出現 1 週後に最高値に達し、以後 3 か月後まで低下し続ける傾向は認められた。

IgG 抗体価が早期に上昇した 2 例と長期間上昇を続けた 2 例の計 4 例を除いた IgG 抗体価は、6 週後 (32~56 日後) にほぼ最高値 (1.62 ± 0.08 , $n=22$) に達したが、22 週後 (141~175 日後) では低下を見た。しかし、IgG₁₆₀₀ 抗体価では発疹出現後抗体価は徐々に上昇し、10 週後 (57~84 日後) にほぼ最高値 (1.04 ± 0.17 , $n=22$) に達して、22 週後 (141~175 日後) には低下し

た (0.94 ± 0.26 , $n=11$) (図10-A)。

IgG₁₆₀₀ 抗体価が 1 か月以内の早期に最高値に達した 2 例では発疹出現 2 か月以後から抗体価が緩やかに低下した。他の 2 例では発疹出現時より 3 か月以上にわたって緩やかな抗体価の上昇が見られた (図10-B)。

以上の ELISA を用いた IgM 抗体価と IgG₁₆₀₀ 抗体価の観察から、初感染時では 36 例中 2 例を除き発疹出現 1 週後までは両抗体価は同時に上昇するが、その後感染約 3 か月後までは両抗体価が解離する現象がとらえられることがわかった。

2. 自然再感染例の血中抗体価の推移

ペア血清の風疹 HI 抗体価が 4 倍以上の上昇を呈した無症候性の 6 症例を風疹ウイルス自然再感染例として、風疹 HI 抗体、IgM 抗体、IgG 抗体の推移を観察

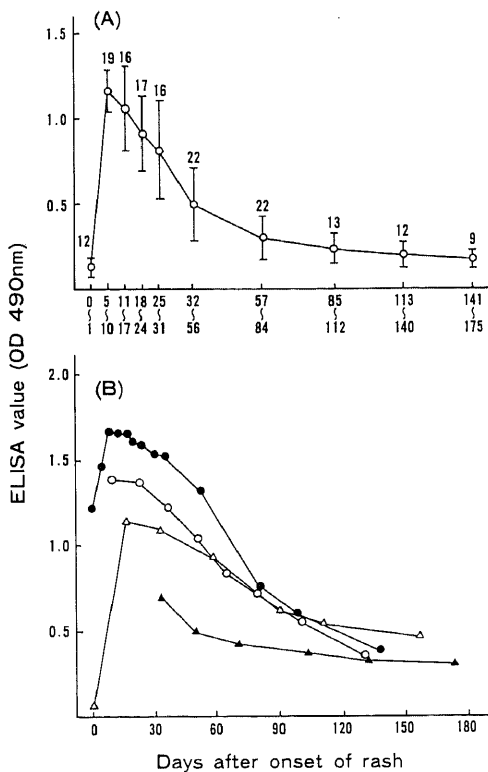


Fig. 9. Rubella IgM antibody response after onset of rash in women with primary rubella virus infection. (A) Thirty-two cases except 4 cases of (B). Each value represents the mean \pm S.D. Figure in the upside of each mark indicates the number of cases tested during each period. (B) Three cases with high IgM antibody titers (\bullet , \circ , \triangle) and a case with slow decrease of the titer (\blacktriangle).

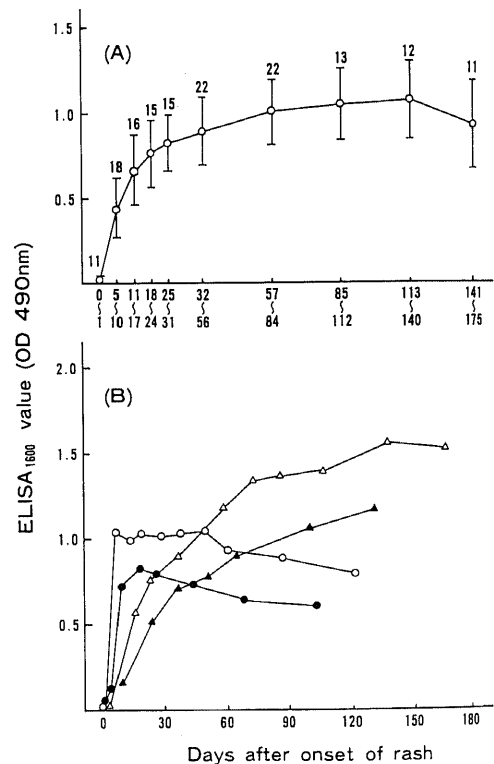


Fig. 10. Rubella IgG antibody response after onset of rash in women with primary rubella virus infection. (A) Thirty-two cases except 4 cases of (B). Each value represents the mean \pm S.D. Figure in the upside of each mark indicates the number of cases tested during each period. (B) Four cases showing the maximum IgG titers within 2 weeks (\circ , \bullet) or later 3 months (\triangle , \blacktriangle).

した。6症例の上昇前の HI 抗体価は 2^5 が 3 例 (症例 1, 2, 4), 2^6 が 1 例 (症例 3), 2^7 が 2 例 (症例 5, 6) であり, 症例 4 を除いた 5 例では, 上昇後の HI 抗体価は 2^9 以上であった。この 6 例は全例経産婦であり, そのうち 3 例 (症例 2, 3, 5) は 3~6 年前

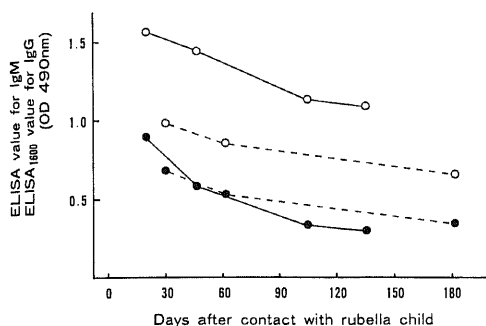


Fig. 11. Rubella antibody responses after contact with rubella patients in 2 cases (—,···) of rubella virus reinfection. ●, rubella IgM antibody; ○, rubella IgG antibody.

に生ワクチン接種を受けていた (表 4)。

症例 1, 6 では, IgM 抗体の明らかな出現が見られた。症例 1 は HI 抗体価の上昇が見られた約 3 週間前 (妊娠 7 か月) に, 症例 6 は約 1 か月前 (最終月経頃) に共に子供に風疹が発病していた。これらの症例について IgG 抗体価の変動を詳細に検討するために IgG₁₈₀₀ 抗体価を測定した (図 11)。これらいずれの症例においても風疹患者との接触後 IgM, IgG 抗体価は共に上昇したが, IgG₁₈₀₀ 抗体価は初感染例とは異なり風疹患者との接触後 1 か月以内の早期に上昇し, かつ早期に低下し, IgM, IgG₁₈₀₀ 抗体価の解離は見られなかった。

このように再感染では, IgM 抗体が陽性となっても初感染とは異なり IgM, IgG 両抗体価は解離することなく互いに類似した経過を取ることが示された。

考 察

高い風疹 HI 抗体価を示す場合には風疹の初感染, 再感染, 感染後数年以内の 3 者が考えられる。本邦に

Table 4. Antibody responses in 6 pregnant women with rubella reinfection

Case Number	Date of collection of sera	Date of vaccination	Rubella antibody		
			HI (log ₂)	ELISA value* of	
				IgM	IgG
1	Jan. 26, 1987	—**	5	0.07	0.72
	June 8, 1987		10	0.90	1.66
	July 6, 1987		9	0.59	1.66
	Aug. 31, 1987		8	0.34	1.60
	Oct. 1, 1987		8	0.31	1.57
2	Feb. 23, 1987	April 27, 1984	5	0.07	0.55
	June 18, 1987		9	0.09	1.67
3	Sept. 2, 1985	Aug. 10, 1981	6	0.09	0.74
	July 14, 1987		9	0.09	1.61
4	Feb. 19, 1987	—	5	0.07	0.52
	June 19, 1987		8	0.10	1.54
5	April 6, 1987	July 4, 1981	7	0.05	0.77
	Aug. 17, 1987		10	0.08	1.69
6	Sept. 28, 1981	—	7	0.07	1.03
	May 18, 1987		9	0.68	1.60
	June 18, 1987		9	0.54	1.70
	Oct. 15, 1987		9	0.35	1.59

* ELISA value on 1 : 100 serum dilution.

** Not vaccinated.

においては HI 試験が一般的な風疹感染検査法⁹⁾であるが、その感度は良いものの抗体価が発病後余りに早期にピークに達し、かつそれが持続するために、高い抗体価を示した場合に感染初期かどうかの診断が不可能に近くなるところに同法による風疹診断の大きな限界が存在している。

厚生省の指針によれば HI 抗体価が256倍以上の時は最近の感染が疑われるが、その感染時期の推定は困難であり、更に512倍以上の時は症状がなくても最近3か月以内の感染が疑われるとされている⁹⁾。

HI 抗体価のこの限界による臨床面での障害は重大であり、20~40%を占める不顕性感染においても CRS が生ずること²¹⁾⁹⁾も手伝って、本邦では特に風疹流行時には単に HI 抗体価が高いという理由のみで人工妊娠中絶が行われていることが少なくない¹⁹⁾²⁰⁾。しかし、この様な高い HI 抗体価を呈する妊婦の新生児予後では正常児が出生している報告もされており¹³⁾²⁰⁾²¹⁾、妊娠初期に産科的臨床に適した有効な風疹感染診断法の確立が望まれていた。

風疹 HI 抗体価が高い場合を含めて、感染初期の診断には従来風疹 IgM 抗体の存在を証明する試みがなされてきている。HI 試験を用いた方法では、血清中の IgM を 2-メルカプトエタノール (2-mercaptoethanol, 2ME) で除去し、HI 抗体価の低下を見る方法²²⁾や、プロテイン A による IgG 除去後の IgM 抗体の存在を確認する方法^{9)~8)}が簡便なものとして提唱されてきている。

Ankerst ら⁹⁾や Mallinson ら⁷⁾はプロテイン A 処理法を用い、各々発病14日後、84日後の残存 HI 抗体を検出し、容易に風疹の感染初期を証明できるとしている。一方、吉川⁸⁾は IgM、IgA 抗体の長期存続のためにその価値は限定されるとしながらも、プロテイン A 処理後の HI 抗体価が32倍以上は感染後3か月以内、8倍未満は3日以内か3か月以上であるが、16倍、8倍は感染時期の推定が困難であるとしている。しかし、著者らの同法での成績では8~16倍の症例が多く、確実な答を要求される場においては診断は容易ではなかった¹³⁾。

また、2ME 法では有意な抗体価の低下を得るには全風疹抗体量の少なくとも75%以上が IgM 抗体でなくてはならず¹⁰⁾、従ってこの方法では IgM 抗体の存在を証明できる期間が数日間と短く実際用いるのは困難である。

確実な方法は蔗糖密度勾配超速心法を利用して血清の IgM 分画での HI 抗体の存在を見る方法とされている²³⁾¹⁰⁾。しかし、その手技は非常に複雑であり多数の

検体の処理が要求される臨床への応用は不可能である。これらに比べ、ELISA は手技も簡単で RIA のような特別な設備も必要としないことから有用な方法と思われた。

ELISA は1976年に Voller ら¹²⁾が最初に報告し、RIA と酵素染色法の特徴を備え、高感度で簡便であることから急速に発展し、風疹抗体検査等の各種ウイルス抗体の検査においても種々のキットが市販されるに至っている²⁴⁾。その感度については今まで最も確実な方法とされてきた蔗糖密度勾配超速心法による方法に勝るものともされ²⁵⁾、Sever²⁴⁾は TORCH 症候群 (toxoplasma-rubella virus-cytomegalovirus-herpes simplex virus) の診断に極めて有用なものとしている。米国においては現在では複雑な HI 試験は余り用いられず、ELISA などが風疹抗体検査で繁用されており²⁴⁾、近い将来本邦においても同様の傾向をとることが予想される。しかし、ELISA では高感度なるが故に非特異的反応による偽陽性の恐れがあり、その原因として不十分なウイルス抗原の精製やリウマチ因子 (rheumatoid factor, RF) 等が挙げられてきている¹⁰⁾。IgM 抗体測定において、IgG 抗体に対する IgM 分画である RF は、固相したウイルス抗原と結合した風疹 IgG 抗体に反応することで陽性の結果を示す。ELISA では当初から間接法が用いられてきているが、間接法では特に IgG 抗体が多量に存在する場合には少量の RF であってもその影響を受け易いという欠点が指摘されている¹⁰⁾²⁶⁾。RF による影響を除く方法としてはプロテイン A²⁶⁾や抗 IgG 抗体²⁷⁾により血中の IgG 抗体を除去する方法等がとられてきているが、依然として理想的な方法は示されていない¹⁰⁾。

これに対し、その後抗ヒト IgM 抗体を固相した IgM 捕捉法が RF の影響を除き、より高感度で特異的な方法として登場してきている。この方法では、全 IgM 抗体量に対する特異的 IgM 抗体の割合によりその感度はある程度影響されうが、対照抗原の使用で RF の影響はほとんど心配する必要がない¹⁰⁾。風疹 IgM 抗体測定では Vejtorp²⁷⁾が IgM 捕捉法を用いて良好な成績を得ている。同法を用いた風疹抗体検査キットは本邦ではデンカ生研社からルベラ IgM-EIA 生研として1985年に製品化されるに至っている。また、Chantler ら²⁸⁾は固相化抗体にモノクローナル抗体を用いた方がポリクローナル抗体を用いるよりも特異性が向上するとしているが、ルベラ IgM-EIA 生研では固相抗体に抗ヒトモノクローナル抗体が使用されている。以上の点から著者は、特異性の高い IgM 捕捉法を用いた。

また更に、今回使用した ELISA の定量性の検討では、100倍希釈濃度、あるいは1600倍希釈濃度での一点測定のみでも一定範囲ではほぼ定量性がある事が示された。また、生ワクチン接種および自然感染における各症例の時間経過を追った抗体価測定では、IgM 抗体のピーク以後の低下および IgG 抗体のプラトーまでの上昇が明瞭に捕えられた。従ってペアあるいはシリーズ血清の一定濃度における同時測定で、抗体価の変動を HI 試験を用いたときよりも詳細に捕えることが可能と考えられた。

ウイルス感染のモデルである生ワクチン接種時の抗体価は IgM, IgG 抗体共に自然感染時と比べると小さいものの、その抗体価の推移はほぼ自然感染時と類似することが蔗糖密度勾配超遠心法による HI 試験で示されている²⁹⁾。

本研究では、まず自然初感染および再感染の実験モデルとして、風疹 HI 抗体陰性者および陽性者に風疹生ワクチンの接種を行い、風疹抗体価の推移を見た。陰性例の抗体価の推移では、接種後 3 か月までの IgM 抗体価の低下と IgG 抗体価の上昇という両者の解離が特徴として注目された。更に同様の所見は自然感染例の抗体推移でも得られた。

しかし、同時にその抗体価には大きな個人差も特徴として捕えられた。接種 5 か月後で 35% に、1 年間という長期間の後にも 9 例中 1 例に IgM 抗体が見られ、その長期の存続はカットオフレベルの設定が容易ではないことを示していた。生ワクチン接種後の IgM 抗体は、Ogra らの蔗糖密度勾配超遠心法による HI 試験²⁹⁾では、接種後 2～4 週間でピークに達し、4 か月後には全例陰性となっている。しかし測定法の感度の向上に伴い、ELISA では Enders らは²⁸⁾生ワクチン接種 3 か月以後も 30% 程度の IgM 抗体陽性率を見、さらに RIA では接種 3 年後でも IgM 抗体陽性例が報告されている³⁰⁾。

一方、自然感染における風疹 IgM 抗体の持続期間は測定方法によって異なるが、蔗糖密度勾配超遠心分画を用いた HI 試験では 4 か月³⁰⁾、または 12 か月³¹⁾、プロテイン A 処理では 430 日⁸⁾、または 480 日³²⁾や長いものでは 4～5 年³³⁾等のように長期に及んで検出されている。ELISA では 100 病日³⁴⁾や 196 病日³⁵⁾までの陽性例が報告されている。

今回の成績でも、発疹出現 173 日後も IgM 抗体陽性例が存在していた。また、使用したキットではカットオフ値の±20% を判定保留の領域に定めているが、この基準を用いた場合、3～4 か月後においても 6～7 割の血清に IgM 抗体陰性の所見が得られないことに

なる。実際の診断の場においては、判定保留値は高い HI 抗体価と同じように妊婦にとっては危険な情報として受け取られ、感染後長期間経過しているにもかかわらず感染初期と間違われて誤った処置となる可能性がある。更に、発疹出現後数か月を経た IgM 抗体価のいずれも感染前の抗体価よりは高かったが、これは IgM 抗体が早期に完全には消失しないことを示唆しているものであろう。

この陰性、陽性を判定するカットオフ値は、その値を上げると検査の感度が低下し、逆に下げると特異性が低下するためにその設定は難しい。井上¹⁶⁾は HI 抗体陰性血清の平均値+(3×標準偏差)をコントロールとする方法を挙げている。Vejtorp ら¹⁷⁾も同様な値を間接法では用いているが、その後 IgM 捕捉法の場合には平均値+(5×標準偏差)を用いている²¹⁾。しかし、後者の報告では 200 例のコントロール血清で平均値+(3×標準偏差)を越えたものは風疹 IgM 抗体を含んでいた 1 例にしか見られていない。

また妊婦の風疹 IgM 抗体測定でのカットオフ値は感染初期を診断する目的のものであって、抗体の存在の有無とは異なることに留意すべきである。そのため実際のキットではカットオフ値は陰性血清の平均値+(3×標準偏差)より高いものとなっている。

このように個人差、すなわち長期の IgM 抗体存続やカットオフ値の問題があるために、単一血清の IgM 抗体測定による感染初期診断では限界が存在する。しかし、定量性のある検査法を用いた経時的な測定では、同じ IgM 抗体陽性血清でも感染初期血清間では IgM 抗体の低下がみられるが、感染後長期間を経た血清間では変動がないという違いが両者の鑑別点として利用できる。

一方、生ワクチン接種例では IgG 抗体が緩慢に上昇していくのが観察されたが、この感染初期における抗体価の低い原因の一つには初期の IgG 抗体が未熟であり、その親和性が低いことが考えられている³⁶⁾。自然感染例でも HI, IgM 抗体に比べて IgG 抗体陽性化は遅く、また抗体上昇後もその値がプラトーに達するにはやはりワクチン接種時と同様に感染後 3 か月を要していた。

従来感染初期の診断では IgM 抗体のみが注目されてきたが、今回の成績から IgG 抗体もその経時的な測定値の比較を診断時に考慮すれば、より診断精度の向上が望めると思われた。例えば長期 IgM 抗体持続例では感染後長期間を経ると IgM 抗体は弱陽性でも IgG 抗体は上昇を示さず、感染初期と鑑別される。

高い HI 抗体価では再感染の可能性を同時に考える

必要がある。再感染においては無症状であることが多く、従ってその抗体価の変動はなかなかウイルス侵入後の時間経過と共に捕えにくい。その点で今回の HI 抗体陽性例への生ワクチン接種後の抗体価の推移は興味ある所見であり、この様な抗体陽性例への生ワクチン接種後の風疹 IgM, IgG 抗体の推移が経時的に測定されたものはほとんどない³⁶⁾。

接種前の ELISA 値が高い症例で接種後にその値が低下したのは、ウイルスに暴露されて血中抗体が中和により消費されたためと思われる。しかし接種前の抗体が少ないと新たに抗体が産生されており、この事から著者は自然再感染でも IgM 抗体の出現する可能性を予測したが、実際に自然再感染の2例に初感染と同様な IgM 抗体の出現を観測することができた。

従来再感染では IgM 抗体が出現しないとされ、これが初感染との鑑別にも用いられてきた³⁷⁾³⁸⁾。しかし、これは再感染では不顕性感染が多く、感染時期が不明なために、IgM 抗体がたとえ出現したにしても適当な時期で測定がなされない事によるとも考えられる。こうした不顕性再感染の妊婦に Strannegard ら³⁹⁾は蔗糖密度勾配超遠心後の HI 試験を用いて1例の妊婦に、また Morgan-Capner ら⁴⁰⁾は RIA を用いて7例の妊婦に低いレベルではあるが IgM 抗体を検出し、Cradock-Watson ら⁴¹⁾も34例中9例に同様な所見を見ている。

しかし、今回の初感染と同程度の IgM 抗体陽性の再感染例は、特に一点測定での IgM 抗体の有無による初感染診断を脅かすものであり、初感染となんらかの鑑別方法を求めなければならない。その点で、HI 抗体陽性例へのワクチン接種後の IgM, IgG 抗体上昇例や自然再感染例の変動にみられたように、再感染例には初感染時のような IgM 抗体と IgG 抗体の解離がみられず、IgG 抗体は早期に上昇した後に低下する推移を示した点が注目される。すなわちシリーズ血清の測定における解離の有無によって両者の鑑別が可能となる。

この点から見ると、顕性感染例で発疹出現後最も早く19、14日後にプラトーに達した2症例は、再感染例でみられたようにその後早期の IgG 抗体価の低下が測定され、また年齢も30歳と35歳の看護婦であることから今回の発病は再感染である可能性も考えられた。

妊婦の再感染では胎児への影響が懸念されるが、一般に再感染ではウイルスが侵入しても血中抗体が急上昇するために感染が局所のみ限局するとされてきた⁴²⁾。Boué ら³⁶⁾は3例の IgM 抗体が陰性であった再感染妊婦例でも正常な新生児が出生したことから、

IgM 抗体の存在をウイルス血症と関連づけているが、Cradock-Watson ら⁴¹⁾はたとえ IgM 抗体が陽性でも再感染では CRS は生じないとしている。しかし、顕性再感染はウイルス血症の存在を疑わせ、Northrop ら⁴³⁾は IgM 抗体が検出されず顕性再感染と思われる症例で流産物からウイルス分離がなされた報告をしている。また、Levine ら⁴⁴⁾は顕性再感染例で CRS 児の出生を報告している。さらには、生ワクチンが接種された後の自然の不顕性再感染により、IgM 抗体が出現した妊婦の新生児に、無症候性ではあるが胎内感染の認められた症例も報告されている⁴⁵⁾。今回の IgM が検出された再感染例では、感染時期が妊娠7か月や最終月経頃ということもあつてか、臍帯血および新生児尿の検査では胎内感染は否定された。

本邦では風疹生ワクチン接種制度施行後約10年が経過しているが、出口ら⁴⁾はその生ワクチン接種例の抗体価測定から生ワクチンによる免疫の持続が良く、生涯に渡って風疹感染が阻止されることを予測している。しかし、この報告の抗体価は32~64倍のものが多く、今回の成績からみると容易に再感染を生ずる可能性が考えられる。今回の顕性感染例のうちの一例は中学校で定期生ワクチン接種を受けていた例である。Horstmann ら⁴⁶⁾は風疹流行の際における再感染率は、自然感染により獲得された抗体を持つ者が3.4%に過ぎなかったのに対し、生ワクチン接種経験者では80%もの高い率を示したと報告している。また Wilkins ら⁴⁷⁾は生ワクチン接種のなされた小児24人において、その後強毒野生株の接種あるいは風疹患者への暴露により12人に不顕性再感染を生じ、4例にはウイルス分離がなされたという。この際当初の HI 抗体価は8~256倍にあつたものが128~2048倍にまで達しており、高い抗体価を保有していても再感染を生ずることが注目される。また、IgM 抗体のみを指標とした単一血清による診断に関しては、今後、感度の高い ELISA 等の検査法の普及により、再感染においても IgM 抗体陽性となる症例が出現することも予想される。このような定期生ワクチン接種経験者で高い HI 抗体価を示す場合の感染初期の診断、および再感染での胎児の予後については更に今後の研究が必要と思われる。

結 論

高い風疹 HI 抗体価を示す妊婦の風疹ウイルス感染時期をより正確に診断するために、風疹生ワクチン接種および風疹ウイルス自然感染での風疹抗体価の変動を探り、初感染の診断法について検討した。

1. 基礎実験により ELISA は風疹 IgG 抗体、

IgM 抗体の測定には有効な方法であることを確認し、本法を両抗体価の測定に用いた。

2. 風疹 HI 抗体陰性例への生ワクチン接種後の風疹 IgM 抗体は3週後より出現し、抗体価は4週後で最高値を示し、その後急速に低下した。風疹 IgG 抗体も3週後より出現したが、抗体価は3か月後まで緩徐に上昇した。

3. 風疹 HI 抗体陽性例への生ワクチン接種で2週後にすでに IgM, IgG 抗体の変化が見られ、IgM 抗体は56%が陽性となった。また IgG 抗体価が上昇した例ではその後抗体価が低下するのが観察された。

4. 風疹ウイルス自然感染例では IgM 抗体は発疹出現日(感染2週後)から4日後までに陽性となり、抗体価は約1週間(感染3週後)でピークに達し、その後感染3か月後まで急速に低下した。IgG 抗体は発疹出現5日後までに陽性となったが、抗体価はその後緩徐に上昇しプラトーに達するには感染後3か月間を要した。

5. 風疹ウイルス再感染例6例中2例は IgM 抗体が初感染と同様の高値を示し、再感染でも IgM 抗体が出現することが示されたが、風疹 HI 抗体陽性例への生ワクチン接種で観察されたように IgG 抗体は早期の上昇後の低下を見た。

以上の結果より、高い風疹 HI 抗体価保有妊婦の風疹ウイルス初感染後3か月以内の診断は、ELISA を用いたシリーズ血清による IgM, IgG 抗体の解離(IgM 抗体価は低下、IgG 抗体価は上昇)という特徴的な推移の観察からほぼ診断可能なことが示された。

謝 辞

稿を終えるにあたり御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました中村信一教授に深甚なる謝意を表します。また、直接の御指導を頂いた福井県衛生研究所所長波田野基一博士、石川県立中央病院矢吹朗彦、朝本明弘両博士に深く感謝致します。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並びに諸先生方、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致しますとともに、研究に協力して頂いた方々に感謝致します。

本研究の主旨は第36, 37回日本産科婦人科学会総会(1984, 1985年)、第24回日本細菌学会中部支部総会(1987年)、第40回日本産科婦人科学会総会(1988年)、第36回ウイルス学会総会(1988年)で発表した。

文 献

- 1) Gregg, N. M.: Congenital cataract following German measles in mother. *Trans. Ophthalmol. Soc. Aust.*, **3**, 35-46 (1941).
- 2) Sever, J. L., Nelson, K. B. & Gilkeson, M. R.: Rubella epidemic, 1964: Effect on 6000 pregnancies. *Amer. J. Dis. Child.*, **110**, 395-407 (1965).
- 3) 植田浩司, 高林一明, 加藤裕久, 西尾重行, 木元浩一, 西田之昭, 加納正昭, 永山徳朗: 1965年~1966年沖縄地方に多発した先天性風疹症候群について. *小児科*, **8**, 834-841 (1967).
- 4) 出口雅経, 平山宗宏, 星野正雄, 岡右之, 甲野礼作: 国産風疹ワクチン(TO336株)接種後10年間の抗体追跡調査. *日本医事新報*, **3029**, 31-34 (1982).
- 5) 風疹の胎児に及ぼす影響に関する研究班: 風疹について. *日本医事新報*, **2706**, 99-101 (1976).
- 6) Ankerst, J., Christensen, P., Kjellen, L. & Kronvall, G.: A routine diagnostic test for IgA and IgM antibody to rubella virus: Absorption of IgG with staphylococcus aureus. *J. Infect. Dis.*, **130**, 268-273 (1974).
- 7) Mallinson, H., Roberts, C. & Bruce White, G. B.: Staphylococcal protein A; its preparation and an application to rubella serology. *J. Clin. Pathol.*, **29**, 999-1002 (1976).
- 8) 吉川ひろみ: 風疹ウイルス感染症における血清学的研究—特にクラス別免疫グロブリン抗体の測定とその消長について. II. 風疹ウイルス感染症における IgM 及び IgA 風疹赤血球凝集抑制抗体の消長. *ウイルス*, **28**, 95-102 (1978).
- 9) Caul, E. O., Hobbs, S. J., Roberts, P. C. & Clarke, S. K. R.: Evaluation of a simplified sucrose gradient method for the detection of rubella-specific IgM in routine diagnostic practice. *J. Med. Virol.*, **2**, 153-163 (1978).
- 10) Meurman, O.: Detection of antiviral IgM antibodies and its problems—a review. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **104**, 101-131 (1983).
- 11) Kangro, H. O., Pattison, J. R. & Heath, R. B.: The detection of rubella-specific IgM antibodies by radioimmunoassay. *Brit. J. exp. Pathol.*, **59**, 577-583 (1978).
- 12) Voller, A. & Bidwell, D. E.: A simple method for detecting antibodies to rubella. *Brit. J. exp. Pathol.*, **56**, 338-339 (1975).
- 13) 干場 勉, 矢吹朗彦, 朝本明弘, 木村晋亮, 田中淳之: 妊娠初期に高風疹 HI (赤血球凝集抑制反応) 抗体価を呈する妊婦の管理に関する研究—高 HI 抗体価妊婦の各測定法による抗体価比較とその出生児の予後について. *日産婦誌*, **39**, 1993-1999 (1987).

- 14) 宍戸 亮: ウイルス, リケッチア検査, 微生物検査必携 (厚生省監修), 第2版, 352-354頁, 日本公衆衛生協会, 東京, 1976.
- 15) 南谷幹夫: 血球凝集抑制反応-風疹. 総合臨床, **31**, 425-429 (1982).
- 16) 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).
- 17) Vejtorp, M., Fnoe, E & Leerhoy, J.: Diagnosis of postnatal rubella by the enzyme-linked immunosorbent assay for rubella IgM and IgG antibodies. Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B., **87**, 155-160 (1979).
- 18) Avery, G. B., Monif, G. G. R., Sever, J. L. & Leikin, S. L.: Rubella syndrome after inapparent maternal illness. Amer. J. Dis. Child, **110**, 444-446 (1965).
- 19) 橋本和子, 平山宗宏: 風疹流行時の妊婦の被害状況の実態調査. 母性衛生, **18**, 75-77 (1977).
- 20) 澤田清子: 妊婦の風疹感染に関する疫学的研究. 新潟医学会誌, **97**, 343-357 (1983).
- 21) 落合 寛, 丸山 浩, 明石敏男, 横倉恒雄, 高橋明, 井上正人, 西迫平雄: 最近6年間の当院における妊産婦及び新生児の風疹 HI 抗体保有状況と1975年来の風疹流行について: 産婦人科治療, **34**, 493-500 (1977).
- 22) Banatvala, J. E., Best, J. M., Kennedy, E. A., Smith, E. E. & Spence M. E.: A serological method for demonstrating recent infection by rubella virus. Br. Med. J., **3**, 285-286 (1967).
- 23) Enders, G., Knotek, F. & Pacher, U.: Comparison of various serological methods and diagnostic kits for the detection of acute, recent, and previous rubella infection, and congenital infections. J. Med. Virol., **16**, 219-232 (1985).
- 24) Sever, J. L.: TORCH tests and what they mean. Am. J. Obstet. Gynecol., **152**, 495-498 (1985).
- 25) Meurman, O. H. & Ziola, B. R.: IgM-class rheumatoid factor interference in the solid-phase radioimmunoassay of rubella-specific IgM antibodies. J. Clin. Pathol., **31**, 483-487 (1978).
- 26) Chantler, S., Devries, E., Allen, P. R. & Hurn B. A. L.: A rapid immunofluorescent procedure for the detection of specific IgG and IgM antibody in sera using Staphylococcus aureus and latex-IgG as absorbents. J. Immunol. Methods, **13**, 367-380 (1976).
- 27) Vejtorp, M.: Solid phase anti-IgM ELISA for detection of rubella specific IgM antibodies. Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B., **89**, 123-128 (1981).
- 28) Chantler, S. & Evans, C. L.: Selection and performance of monoclonal and polyclonal antibodies in an IgM antibody capture enzyme immunoassay for rubella. J. Immunol. Methods, **87**, 109-117 (1986).
- 29) Ogra, P. L., Kerr-Grant, D., Umama, G., Dzierba, J. & Wernstroub, D.: Antibody response in serum and nasopharynx after naturally acquired and vaccine induced infection with rubella virus. New Engl. J. Med., **285**, 1333-1339 (1971).
- 30) Banatvala, J. E., Best, J. M., O'Shea, S. & Dudgeon, J. A.: Persistence of rubella antibodies after vaccination: Detection after experimental challenge. Rev. Inf. Dis., **7**, s86-s90 (1985).
- 31) Al-Nakib, W., Best, J. M. & Banatvala, J. E.: Rubella specific serum and nasopharyngeal immunoglobulin responses following naturally acquired and vaccine-induced infection. Prolonged persistence of virus-specific IgM. Lancet, **1**, 182-185 (1975).
- 32) 木村英二: 風疹の疫学的研究. 神戸大医紀, **43**, 861-900 (1982).
- 33) 河野喜美子, 山本正悟, 川畑紀彦, 福田武夫, 南嶋洋一: HI 抗体価に基づく風疹感染時期推定に関する問題点. 臨床とウイルス, **9**, 260-264 (1982).
- 34) 秋山和夫, 白地良一, 石田名香雄: 風疹患者血清中の特異 IgM 抗体の消長とその意義. 臨床とウイルス, **10**, 349-352 (1982).
- 35) 宮沢 博, 芦原義守, 時枝正吉, 山辺靖子: 赤血球凝集抑制試験と酵素免疫測定法の併用による風疹血清診断の試み. 臨床病理, **30**, 269-272 (1982).
- 36) Harcourt, G. C., Best, J. M. & Banatvala, J. E.: Rubella-specific serum and nasopharyngeal antibodies in volunteers with naturally acquired and vaccine-induced immunity after intranasal challenge. J. Infect. Dis., **142**, 145-155 (1980).
- 37) Herrmann, K. L.: Rubella virus. In E. H. Lenette & N. J. Schmidt (eds.), Diagnostic Procedure for Viral, Rickettial and Chlamydial Infections, 5th ed., p725-766 Amer. Pub. Health Ass., New York, 1979.

- 38) Boué, A., Nicolas, A & Montagnon, B.: Reinfection with rubella in pregnant women. *Lancet*, **1**, 125-126 (1971).
- 39) Strannegard, O., Holm, S. E., Hermodsson, S., Norrby, R. & Lycke, E.: Case of apparent reinfection with rubella. *Lancet*, **1**, 240-241 (1970).
- 40) Morgan-Capner, P., Hodgson, J., Hambling, M. H., Dulake, C., Coleman, J. J., Boswell, P., Watkins, R. P., Booth, J., Stern, H., Best, J. M. & Banatvala, J. E.: Detection of rubella specific IgM in subclinical rubella reinfection in pregnancy. *Lancet*, **2**, 244-246 (1985).
- 41) Cradock-Watson, J. E., Ridelhalgh, M. K. S., Anderson, M. J. & Pattinson, J. R.: Rubella reinfection and the fetus. *Lancet*, **1**, 1039 (1985).
- 42) Editorial: Rubella reinfection and the fetus. *Lancet*, **1**, 978 (1973).
- 43) Northrop, R. L., Gardner, W. M., & Geitmann, W. F.: Rubella reinfection during early pregnancy. A case report. *Obstet. Gynecol.*, **39**, 524-526 (1972).
- 44) Levine, J. B., Berkowitz, C. D. & St. Geme, J. W.: Rubella virus reinfection during pregnancy leading to late-onset congenital rubella syndrome. *J. Pediatr.*, **100**, 589-591 (1982).
- 45) Forsgren, M. & Sörén, L.: Subclinical rubella reinfection in a successfully vaccinated woman followed by transmission of virus to the fetus. *Scand. J. Infect. Dis.*, **17**, 337-341 (1985).
- 46) Horstmann, D. M., Liebhaber, H., LeBouvier, G. L., Rosenberg, D. A. & Halstead, S. B.: Rubella: Reinfection of vaccinated and naturally immune persons exposed in an epidemic. *New Engl. Med.*, **283**, 771-777 (1970).
- 47) Wilkins, J., Leedom, J. M., Portnoy, B. & Salvatore, M. A.: Reinfection with rubella virus despite live vaccine induced immunity. *Amer. J. Dis. Child*, **118**, 275-294 (1969).

Study on Serological Diagnosis for Recent Rubella Virus Infection in Pregnant Women with High Rubella Antibody Titer Tsutomu Hoshiba, Department of Microbiology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. *Juzen Med. Soc.*, **98**, 824—840 (1989)

Key words rubella, pregnancy, ELISA, IgM antibody, diagnosis

Abstract

This study was performed to investigate serological diagnostic procedures for recent rubella virus (RV) infection in pregnant women having high rubella antibody titer estimated by hemagglutination inhibition test (rubella HI antibody titer). On the basis of fundamental experiments, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used for measurement of rubella IgM and IgG antibody titers. First, for observation of the dynamics of rubella antibody in RV infection, rubella vaccine was given to 22 rubella HI antibody-negative and 25 rubella HI antibody-positive females, and rubella IgM and IgG antibody titers of them were examined periodically for one year after the vaccination. In the antibody-negative group, positive response of IgM antibody was first observed at 3 weeks, showing the maximum titer at 4 weeks and thereafter a rapid decline of the titer until 3 months after the vaccination. IgG antibody response occurred at 3 weeks and the antibody titer gradually increased until 3 months after the vaccination. In the antibody-positive group, slight changes in both IgM and IgG antibody titers were found at 2 weeks after the vaccination. The increase in both antibody titers, when detected, was followed by decline one month after the vaccination. Second, changes in rubella antibody

titers of 36 female patients with apparent RV infection (primary infection) and 6 female patients with RV reinfection were examined. In the cases of the primary infection, rubella IgM antibody appeared in all cases tested by 4 days after the onset of rash (2 weeks after rubella virus infection), and the IgM antibody titers reached the maximum levels one week after the onset of rash, followed by rapid decrease until 3 months after the infection. Rubella IgG antibody titers appeared in all cases tested by 5 days after the onset of rash and the IgG antibody titers increased slowly, reaching the maximum levels in 3 months after the infection. In the cases of RV reinfection, two cases showed high IgM antibody titers but the IgG antibody titers reached the maximum levels more rapidly and decreased earlier than those of patients with the apparent infection. These results revealed that in the primary infection with RV the dissociation of decreasing IgM antibody and increasing IgG antibody was observed from 3 weeks to 3 months after the infection. This indicates that detection of the characteristic dissociation of IgM and IgG antibody titers in serial sera by ELISA is valuable for diagnosis of RV infection within the preceding 3 months in pregnant women having high rubella HI antibody.