

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

石川県立中央病院産婦人科

干場 勉 矢吹 朗彦 朝本 明弘

石川県衛生公害研究所

木村 晋亮

金沢大学がん研究所ウイルス部

田中 淳之

Studies on the Management of Pregnant Women Having High
Hemagglutination Inhibition (HI) Antibody
Titer of Rubella Virus in the First Trimester
Examination of Rubella Virus Antibody in the Pregnant
Women Having High HI Titer by Different
Methods and Prognosis of their Infants after Birth

Tsutomu HOSHIBA, Yoshihiko YABUKI and Akihiro ASAMOTO

Department of Obstetrics and Gynecology, Ishikawa Prefectural Central Hospital, Ishikawa

Nobuaki KIMURA

Ishikawa Prefecture Research Laboratory for Public Health and Environment, Ishikawa

Junji TANAKA

Department of Virology, Cancer Research Institute, Kanazawa University, Kanazawa

概要 風疹罹患の不明な高風疹 HI 抗体価保有妊婦の各種測定風疹抗体価とその出生児予後との関連性、及び風疹初感染診断法としての酵素免疫測定法 (ELISA) の有用性について検討した。

1. 外来妊婦628例中、妊娠初期に HI 抗体価が512倍以上を示したものは56例、8.2%であり、この中で4例の自然流産をみたが分娩まで追跡し得た40例に先天性風疹症候群と思われる児の出現はなかった。また新生児尿と1例の中絶例の胎児臓器と胎盤から風疹ウイルスは分離されなかった。

2. CF (補体結合反応) 抗体陽性は26.7% (12/45)、プロテイン A 処理後の HI 抗体陽性は20.0% (9/45) にみられたが、HI 値との間に明確な比例関係は見られなかった。

3. 風疹特異的 IgM 抗体をプロテイン A 処理 HI 法、サンドイッチ法 ELISA 及び蔗糖密度勾配超遠心法を用いて検出を試みたが陽性例はなかった。

4. 間接法 ELISA で陽性または弱陽性の4例もサンドイッチ法 ELISA と蔗糖密度勾配遠心法では風疹特異的 IgM 抗体は陰性となった。

以上から高風疹 HI 抗体保有妊婦の新鮮感染の診断およびその予後診断には、HI やプロテイン A 処理後の HI、CF 等の組合せをもつてもなお不確実であり、ELISA、特に非特異的反応の少ないサンドイッチ法による風疹特異的 IgM 抗体の測定が有用と思われた。

Synopsis Several serological studies of rubella virus (RV) infection were carried out on sera of 45 pregnant women having RV hemagglutination inhibition (HI) antibody titer more than 1:512 in the first trimester, including a follow-up study of these women's pregnancies.

In order to detect RV-specific IgM antibody, various procedures were employed as follows: Complement fixation test (CF), HI test after treatment of the sera with Protein-A (ProA-HI), enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) by indirect or sandwich procedures and several tests using fractionated sera by sucrose density gradient ultracentrifugation (SDG). Positive ratios found with the CF test and ProA-HI were 26.7% and 20.0%, respectively. In indirect ELISA, 4 cases were positive for RV-specific IgM, but all sera were negative in sandwich ELISA and SDG tests. Both RV isolation from urine of some infants and detection of high RV-specific IgM antibody in cord sera failed to be positive. Of 44 pregnancies, 4 cases resulted in spontaneous abortion and all others in normal delivery. These forty normal infants had no sign of congenital rubella syndrome, but one case among them showed polysyndactylia.

The results obtained here seemed to indicate that sandwich ELISA is the most valuable and convenient method among the tested procedures for clinically determined diagnosis of recent RV infection in pregnant women having a high HI antibody titer.

Key words: Rubella • Pregnancy • Hemagglutination inhibition test • Enzyme-linked immunosorbent assay

緒 言

妊娠初期の母体風疹感染が不顕性感染の場合も含め高度の催奇形性を有することは1941年の Gregg¹⁵⁾の報告に始まり、1964年のアメリカ¹⁹⁾や1965年から1966年の沖縄¹⁰⁾における風疹流行後の先天性風疹症候群の発生により良く知られている。

我が国では1977年より中学生女子を対象として風疹生ワクチンの接種が開始されたが接種者の数%になおも抗体の未獲得者の存在が指摘されている⁹⁾。この事実は逆にワクチン接種者で免疫非獲得例の新鮮感染の判定に混乱を来す可能性を生じている。一方、以前まで周期的に流行を繰り返していた風疹も我が国の全世界的な交通網への参入により欧米にみられるごとく散発的、非周期的なものに変化しつつある⁹⁾。

こうした風疹の常在化傾向に加え検査技術の普及により妊娠中の風疹抗体価測定がルーチン化されてきた昨今、妊娠初期で風疹感染の症状もなく風疹 HI 抗体価が高値を呈する妊婦に遭遇する機会も増えている。従つて、それらが臨界期における感染か否かを鑑別することが一層重要となつてきた。我々はこのような妊婦の管理について臨床的に検討したので報告する。

研究方法

1. 研究対象

風疹抗体価測定及びウイルス分離の対象となつたのは1982年1月から1984年3月までに当院産科外来を訪れた妊婦682例と、そのなかで HI 抗体価が512倍以上を呈した56例の妊婦と40例の新生児、

4例の自然流産例及び1例の人工流産例である。なお明らかな風疹感染と臨床的にも判定出来た症例は除いて検討した。

2. 実験方法

1) 風疹赤血球凝集抑制試験 (hemagglutination inhibition test, HI) 及び補体結合試験 (complement fixation test, CF): HI の測定は予研法、CF 法は Kolmer 法に準じて行つた⁶⁾。HI 抗体価16倍以上、CF 抗体価8倍以上を陽性とした。

2) プロテイン A 処理 HI 法: 黄色ブドウ球菌の菌体成分であるプロテイン A を含むヒト IgG 吸収試薬であるアブソープ・G (化学及血清療法研究所) の PBS 洗浄沈渣に10倍希釈被検血清0.3ml を加え、室温で1時間反応させた遠心上清を IgG 吸収後の被検血清とし、その血清で HI 法を行い風疹 IgM-HI 抗体価とした。

3) 酵素免疫測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) (図1): ELISA 法に関する基礎的研究及び問題点は既報で検討した通りである¹⁾。それらをふまえて本研究における風疹 IgG 測定にはデンカ生研で試作されたルベラ IgG-EIA キット (間接法) と M.A. バイオプロダクツ (アメリカ) 製ルベライザテストキット (間接法) を用いた。また、風疹 IgM 抗体の測定はデンカ生研ルベラ IgM-EIA キット (サンドイッチ法) と M.A. バイオプロダクツ製のルベライザ M テストキット (間接法) によつた。実際の操作はキットに添付された指示書に従つたが、カットオフ値の測定はデンカ生研については風疹 HI 抗体価が8倍未満の陰性血清60例を用い各キットごと

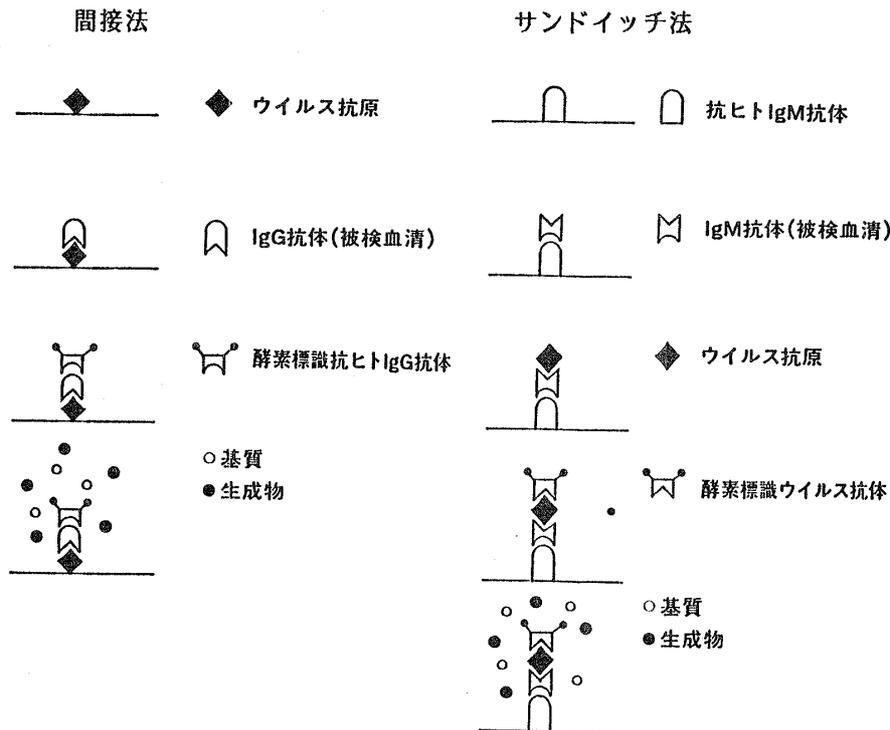


図1 ELISA 間接法とサンドイッチ法の測定原理

に平均吸光度差を求めた。詳細はすでに報告したが³⁾, IgG抗体及びIgM抗体のカットオフ値は各々0.40と0.20に設定した。ルベライザテストキットは説明書のカットオフ値0.17(IgG抗体), 0.24(IgM抗体)をそのまま用いた。測定はすべて100倍希釈の一点測定によつた。

4) 蔗糖密度勾配超遠心法: 被検血清を15~55%の密度勾配で35,000rpm, 16時間遠心し17分画に分け各々の分画についてHI抗体価を測定した。

5) ウイルス分離: 高HI抗体価を有する妊婦より産まれた新生児尿及び中絶例の胎児組織をBHK-21及びVERO細胞に接種し細胞変性効果(cytopathic effect, CPE)の出現の有無を見, 同時に培養上清のHA試験(赤血球凝集反応)を行つてウイルス分離を試みた。

研究成績

1. 産科外来妊婦のHI抗体価分布(図2)

外来患者682名例中で初診時のHI抗体陽性例は519例(76.1%)でその分布は128倍希釈濃度にピークがあり, 1980年の風疹流行を反映していた。一方抗体陰性例は163例(22.7%)と流行後にもか

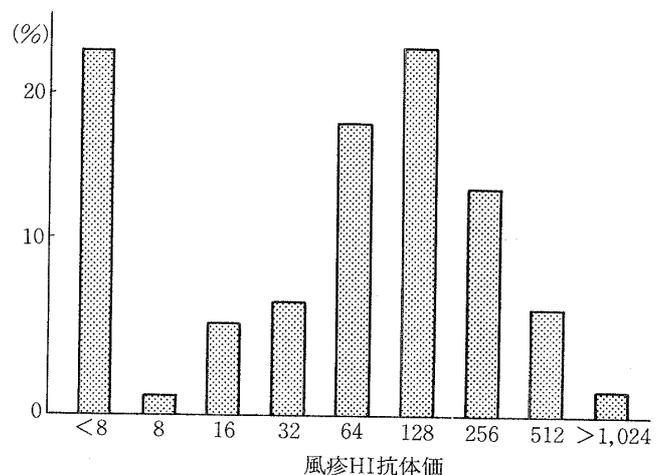


図2 産科外来患者の風疹HI抗体価分布(1982~1984, 3)

かわらず多数見られた。

我々が新鮮感染との鑑別を必要と考え研究対象とした初診時血清抗体価が512倍以上の妊婦は56例, 8.2%を占めていた。

2. 高HI抗体価例とそのプロテインA処理血清HI抗体価, 又はCF抗体価及び予後との関係(図3, 図4)

風疹HI抗体価512倍以上の血清でプロテイン

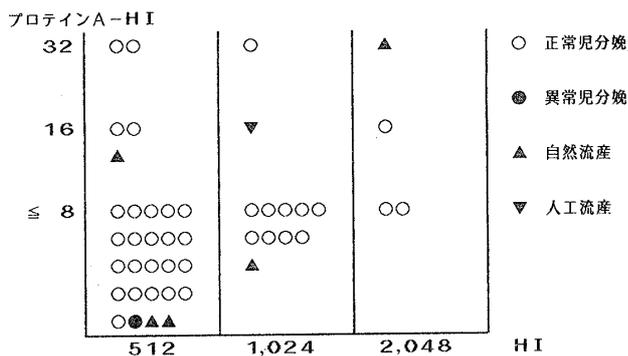


図3 HI抗体価, プロテインA処理HI抗体価と予後

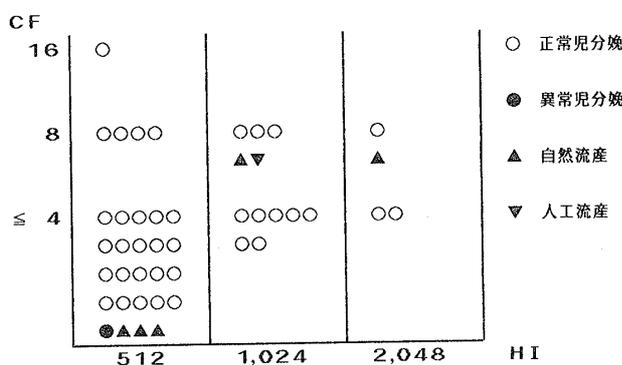


図4 HI抗体価, CF抗体価と予後

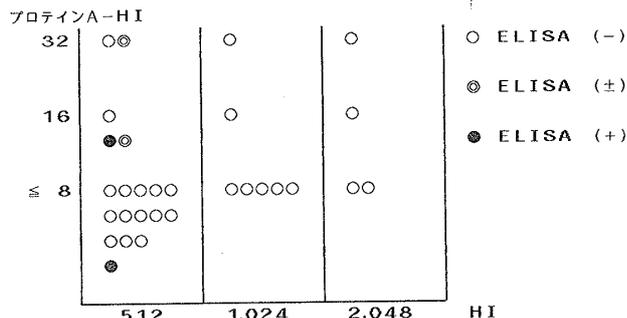


図5 HI抗体価, プロテインA処理HI抗体価と間接法ELISA-IgM抗体価

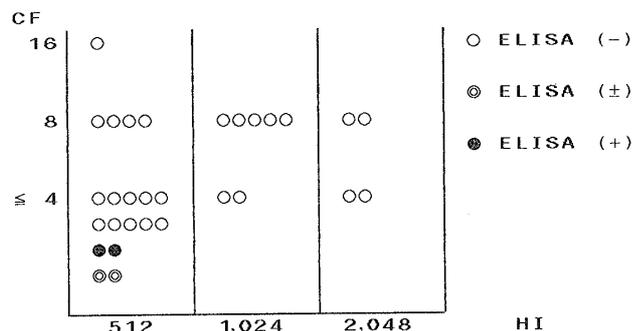


図6 HI抗体価, CF抗体価と間接法ELISA-IgM抗体価

A処理し得たもののHI法が陽性(16倍以上)であったものは20.0% (9/45)であり, 陽性者のうち2例に自然流産が見られたが分娩に至った例には異常はなかつた。

一方, 同血清でのCF価をみるとCF抗体陽性(8倍以上)例は26.7% (12/45)であり, そのうち流産例が2例見られたが先天性風疹症候群と思われる異常児出産はなかつた。

3. 間接法ELISAによる風疹特異的IgM抗体とHI抗体価, プロテインA処理HI抗体価及びCF抗体価との関係(図5, 図6)

高HI抗体価を呈した30例について前項と同様にプロテインA処理HI抗体価, CF抗体価とELISA(間接法)による風疹IgM抗体価との関連性を比較した。図5に示されるようにHI抗体価512倍でプロテインA処理HI抗体価陽性例中に間接法ELISA陽性1例, 弱陽性2例, プロテインA処理HI抗体価陰性例中にELISA陽性1例が見られた。CFではELISA陽性及び弱陽性を呈した例は全て陰性であった。

4. サンドイッチ法ELISAと各検査(間接法ELISA, HI, CF)との比較

間接法ELISA陽性及び弱陽性者計4例と陰性者7例をえらびサンドイッチ法ELISAと比較した。その結果サンドイッチ法ELISAではIgM抗体は全て陰性であった(表1)。更に蔗糖密度勾配遠心法によってもIgM抗体は証明されなかつた。またHI, プロテインA処理HI, 及びCFとの間にも一定の関連性を見出すことは出来なかつた。間接法ELISA強陽性例はリウマチ因子が陽性であり, それによる非特異的反応が生じたものと考えられた。

5. 出生児の予後

今回対象とした40例中1例に多趾症の出産を見たが, その例ではプロテインA処理HI, CF共に陰性であった。同例も含めて新生児血中の風疹IgM抗体及び尿中ウイルス分離検査(表1)において陽性例はなく, 先天性風疹症候群を疑わせる症例は見られなかつた。

表1 高 HI 抗体価を示す妊婦血清の各測定法による風疹抗体価とウイルス分離

症例	HI		CF	ELISA			SDG	ウイルス 分 離
	無処理	P 処理		間接 IgG	間接 IgM	sandIgM		
1	512	16	<4	+	卅	-	-	-
2	512	<8	<4	+	+	-	-	-
3	512	16	4	+	±	-	-	-
4	512	32	4	+	±	-	-	-
5	512	<8	<4	+	-	-	nd	-
6	2,048	32	8	+	-	-	-	-
7	512	32	8	+	-	-	nd	-
8	512	8	8	+	-	-	nd	-
9	1,024	8	8	+	-	-	nd	-
10	1,024	8	4	+	-	-	nd	-

P 処理：プロテイン A 処理 sandIgM：サンドイッチ IgM

SDG：蔗糖密度勾配遠心後の IgM 抗体 nd：未検査

考 察

先天性風疹症候群では妊娠初期の感染ほど重篤な障害が高率に発生し、妊娠週数がすすむにつれて発生率は低下するが¹⁸⁾、5 カ月までの間の感染でも聴力障害や発達遅滞が発生する可能性がある⁴⁾とされている。また風疹感染時の20~40%を占める不顕性感染の際でもその危険性はある¹⁰⁾。

このようなことから我が国でも1977年より中学3年の女子生徒に風疹生ワクチンの接種が開始された。しかし石川県に於て最初のワクチン接種者が20歳となった1982年と1983年の時点での風疹 HI 抗体保有率は93.8%と97.3%であり³⁾全国的に見てもなお数%の陰性者を残す現状である。更に定期予防接種の施行前の年齢層では50~60%という低い抗体保有率が示され、ワクチン接種が制度化された後も妊婦が風疹に罹患する可能性が高い⁹⁾。

また植田ら⁹⁾は1980年からの風疹流行がそれまでの約10年ごとの周期とは異なつて早く到来し、交通機関等の発達などにより日本でも風疹が欧米諸国のように常在して数年ごとに周期的増加を示す傾向を帯びてきたことを報告している。こうしたワクチン接種者に於ける風疹抗体の非獲得者の存在と風疹常在化の傾向の中で典型的な発疹がある例や明らかな抗体上昇が確認される例を除いた場合、HI 抗体価がプラトーに達した時期に於ける風疹の感染時期と臨界期をより正確に関連づけることが非常に重要となつてくる。

我々が今回対象とした不顕性感染を疑わせた40例中には1例の風疹症候群も見出されず、retrospective にも臨界期に於けるウイルスの増殖は否定されたが、初回検査の HI 抗体価が512倍以上ある妊婦の妊娠継続への判断にはかなりの勇気が必要であつた。すなわち風疹抗体検査で最も一般的な HI 法でその価がプラトーの状態になつた際にはどうしても他の方法を併用して初感染の診断を試みる必要がでてきた。CF 抗体価は HI 抗体価よりその上昇時期が遅れ、数年内に消えるものとされているが²⁰⁾、その感度が低く、その抗体価の推移も感染後の時間的経過と一致しない場合がよく見られた⁷⁾。

一般に風疹初感染の証明には IgM 抗体を証明することとされている。その方法としては2MEで IgM を除去する方法、プロテイン A で IgG を吸収する方法、蔗糖密度勾配超遠心法で分画する方法や ELISA 等があげられている²⁾。蔗糖密度勾配による分画法は最も確実な方法であり我々の成績とも一致したが、その手技は煩雑で多数の検体を処理する必要のある臨床応用は困難と思われた。

より簡単な方法として Ankerst et al.¹²⁾はプロテイン A 処理法を報告し、初感染の診断を可能とした。吉川¹¹⁾は顕性感染例の追跡により IgM 及び IgA 風疹 HI 抗体が風疹感染後長期に持続するためその価値は限定されるとしながらも、プロテイン A 処理 HI 抗体価が32倍以上は感染後3カ月以内、8倍未満は3日以内か3カ月以上である

が、16倍、8倍では感染時期の推定が困難としている。しかし本法では添加するプロテインAが多いとIgMまで吸収され⁶⁾、逆に少ないとIgGが残存してその結果に影響を与える可能性が生じる。今回の成績でも蔗糖密度勾配超遠心法やELISA法とは結果が一致せず確実性に乏しく高HI抗体価の示す症例の初感染を否定するには不十分であつた。また更にHI価、CF価及びプロテインA処理後のHI価の間に一定の関連性を見出せずこのことが高HI抗体価の意義判定の難度を増加させた。

しかし最近従来の方法に比べて感度が高く遠心分画のような煩雑さもなく多量の検体の処理が可能で、IgG、IgM抗体の分別測定が可能でELISA法が各方面の検査として普及してきている。ELISAの感度の高さは木村ら³⁾の報告にあるようにワクチン接種例で正確にその抗体の消長を示し、1年後においてもその存在を示し、従来からの多くの報告にあるように測定感度の上昇により長期にIgM抗体の存在することが確認された。

一方ELISA法の欠点としてまずその定量性が困難な点にある。すなわちELISAの定量には倍数希釈した各血清においてELISA反応を行わなくてはならず、ルーチンの検査としてはその点では不可能であつた。しかし、我々は先に報告したように¹⁾サイトメガロウイルスの免疫抗体測定研究において100倍希釈一点測定時の吸光度差(ELISA値)の定量性を証明し臨床応用が可能と判断しELISAを用いている。

次にELISA法には非特異的反応の問題があり、リュウマチ因子²⁰⁾、不純物や細菌の混入⁸⁾などがその原因とされている。後二者についてはその抗原の精製、アジ化ナトリウム等の使用により予防され、またリュウマチ因子に対してはRAHA法でのチェックやプロテインAや抗IgGの添加による血清よりのIgGの吸収、除去が必要とされている。

ELISAには種々の方法があるが、今回我々は抗原を固相化した間接法と抗IgM抗体を固相化した前者よりは1段階操作の多いサンドイッチ法を用いた。これはDuermeyer et al.¹³⁾、Vejtorp²⁰⁾や

Yolken et al.²¹⁾が使用しリュウマチ因子の影響を除く事が可能とされ近年ますます広く用いられてつあり、その有用性が期待されている¹⁴⁾¹⁷⁾。今回の成績で間接法にて3例に弱陽性～陽性、1例に強陽性を見たが、サンドイッチ法では陰性となり、強陽性例ではリュウマチ因子の影響も除外することが出来た。またサンドイッチ法のほうが蔗糖密度勾配超遠心法とその結果は一致しより信頼性があつた。更に、佐藤ら⁵⁾は風疹特異的IgM抗体の検出にマウスのモノクローナル抗IgM抗体が固相化された方法の特異性の高さを報告しており、この本法によりELISAがより簡便で信頼性の高い検査として用いられる可能性を示唆している。

以上より高HI抗体価を示す妊婦にはサンドイッチ法ELISAを使用して風疹IgM抗体の有無を検索し初感染か否かの診断を慎重に下す事が最も良い方法と思われた。

稿を終えるにあたり、終始御懇篤なる御指導、御校閲を賜りました恩師、波田野基一教授に深甚なる謝意を捧げます。また、本研究に御協力いただいた尾西一、梶哲夫両先生に心より感謝の意を表します。

なお本論文の要旨は、第37回日本産科婦人科学会学術講演会にて発表した。

文 献

1. 朝本明弘：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検査への適応性。十全医会誌, 94: 643, 1985.
2. 井上 栄：IgM抗体検出の意義とその方法。臨床病理, 特集35: 190, 1978.
3. 木村晋亮, 尾西 一, 梶 哲夫, 杉浦幸一, 干場勉, 朝本明弘, 矢吹朗彦：弱毒風疹生ワクチン接種後における血清中IgM及びIgG抗体の推移。石川県衛公署研年報, 22: 196, 1985.
4. 佐久川肇：先天性風疹症候群の発達神経学的研究。精神誌, 78: 587, 1976.
5. 佐藤俊則, 中島 実, 長 道雄, 木村晋亮, 尾西一：モノクローナル抗体を用いた風疹IgM EIA検査法。日細菌誌, 40: 616, 1985.
6. 宍戸 亮：ウイルス, リケッチア検査。微生物検査必携(第2版)(厚生省監修), HI 352, CF 73, 日本公衆衛生協会, 東京, 1976.
7. 須藤恒久：風疹免疫検査における基本要項とその解釈における問題点。産婦の実際, 32: 585, 1983.
8. 武田久雄：ウイルス感染症の血清学的診断への

- ELISA の応用. 臨床とウイルス, 8: 401, 1980.
9. 植田浩司, 佐々木フサ, 瀬川和子, 久永幸生, 斉藤ヒサ子, 正本宗子, 野中実男, 吉川ひろみ: “風疹” 流行周期の変化? と予防対策. 臨床と研究, 58: 2226, 1981.
 10. 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, 1967.
 11. 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法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, 1978.
 12. Ankerst, J., Christensen, P., Kjellen, L. and 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, 1974.
 13. Duermeyer, W. and Van der Veen, J.: Specific detection of IgM-antibodies by ELISA applied in hepatitis A. Lancet, 2: 684, 1978.
 14. Enders, G. and Knotek, F.: Detection of IgM antibodies against rubella virus: Comparison of two indirect ELISA and anti-IgM capture immunoassay. J. Med. Pathol., 19: 377, 1986.
 15. Gregg, N.M.: Congenital cataract following German measles in mother. Trans. Ophthalmol. Soc. Aust., 3: 35, 1941.
 16. Mallinson, H., Roberts, C. and Bruce White, G. B.: Staphylococcal protein A; its preparation and an application to rubella serology. J. Clin. Pathol., 29: 999, 1976.
 17. Mortimer, P.P. and Tedder, R.S.: Screening for anti-rubella IgM ad libitum. J. Hyg., 90: 1, 1983.
 18. Peckham, C.S.: Clinical and laboratory study of children exposed in utero to maternal rubella. Arch. Dis. Child., 47: 571, 1972.
 19. Sever, J.L., Nelson, K.B. and Gilkeson, M.R.: Rubella epidemic, 1964: Effect on 6000 pregnancies. Amer. J. Dis. Child., 110: 395, 1965.
 20. Vejtorp, M.: Serodiagnosis of postnatal rubella. Dan. Med. Bull., 30: 53, 1983.
 21. Yolken, R.H. and Leister, F.J.: Enzyme immunoassays for measurement of cytomegalovirus immunoglobulin M antibody. J. Clin. Microbiol., 14: 427, 1981.

(No. 6203 昭62・6・2 受付)