

## 風疹ウイルス感染における風疹 IgG 抗体の結合力測定

石川県立中央病院産婦人科

干場 勉 西本 秀明 朝本 明弘 矢吹 朗彦

## Avidity of Rubella IgG Antibody in Rubella Virus Infection

Tsutomu HOSHIBA, Hideaki NISHIMOTO, Akihiro ASAMOTO  
and Yoshihiko YABUKI*Department of Obstetrics and Gynecology, Ishikawa Prefectural Central Hospital, Ishikawa*

**概要** 風疹初感染初期を初感染後期や再感染から鑑別するため、尿素を用いた風疹 IgG 抗体の結合力 (avidity) 測定の有用性について検討した。使用血清は顕性初感染23例の発病7~1,477日後の116血清、不顕性再感染8例の25血清、胎内感染はないが妊娠初期に高赤血球凝集抑制 (hemagglutination inhibition, HI) 抗体価又は風疹 IgM 抗体弱陽性を示した15例の16血清である。尿素洗浄時の吸光度の無処理時の値に対する百分率を avidity index (AI) とした。初感染時の AI は発病後30日以内は30%以下と低く、その後は徐々に上昇し、3カ月後に60~80%のほぼプラトーの状態に達した。一方、再感染後、高 HI 抗体価例、IgM 抗体弱陽性例の血清の AI は、各々  $79.2 \pm 7.5\%$ 、 $93.5 \pm 4.1\%$ 、 $90.6 \pm 5.0\%$  と高値を示し、初感染初期とは明瞭に区別された。以上より、尿素を用いた IgG 抗体の結合力測定は、高 HI 抗体価や IgM 抗体を有する妊婦において初感染初期を診断する点で有用と考えられた。

**Synopsis** The avidity assay of rubella IgG antibody with urea was evaluated to distinguish the early convalescent phase of primary rubella from the late one and reinfection. We examined 116 sera from 23 patients with primary infection collected 7 to 1,477 days after the rash appeared and 25 sera from 8 patients with rubella reinfection and 16 sera from 15 pregnant women without fetal infection having high hemagglutination inhibition (HI) antibody or weak positive rubella IgM antibody. The avidity index (AI) was calculated as the ratio of the optical density from the urea-washed well to that of the non-treated well, expressed as a percentage. In primary infection AI were lower than 30% within 30 days after the rash appeared, then gradually increased and reached a plateau of 60 to 80% three months later, whereas the AIs of patients after reinfection, with high HI antibody and weak positive IgM antibody were as high as  $79.2 \pm 7.5\%$ ,  $93.5 \pm 4.1\%$  and  $90.6 \pm 5.0\%$ , respectively. These results indicate that the measurement of avidity in rubella IgG antibody is valuable in diagnosing recent primary rubella in pregnant women having a high HI antibody or IgM antibody.

**Key words:** Rubella • IgG antibody • Avidity

## 緒 言

風疹初感染の診断には風疹 HI 抗体とともに風疹 IgM 抗体が用いられてきている。HI 抗体では発病後1週間程で高い値を示すが、時には数年間も高値のまま推移することがあるのが欠点であった。これに対して IgM 抗体は感染初期にのみみられるものとして、初感染診断における有用性が期待された。しかし、その IgM 抗体にもまず第1に陽性期間に個人差があり、時には半年以上もの長

期陽性例がいること<sup>1)2)</sup>、第2にキットにより陽性期間に差があること<sup>1)2)</sup>、さらに第3には再感染でも IgM 抗体が出現し得ること<sup>3)4)</sup>などの限界が指摘されてきている。

この点に関し、筆者は既に IgG 抗体価と IgM 抗体価の解離を追跡することで、過去3カ月間の感染を推定し得ることを指摘した<sup>5)</sup>。しかし、その推定には少なくともペア以上の多数の血清が必要なこと、同時測定のため診断までに2週間程度以上を要することや、吸光度が変動しやすいことな

どが問題点であった。

一方、初感染初期のIgG抗体は抗原に対する結合力が弱いという現象を応用する試みが、いくつかの結合阻止作用をもつ物質を用いてなされてきている<sup>6)~8)</sup>。そこで今回IgM抗体による診断を補助するため尿素を用いた簡便な結合力測定法<sup>7)</sup>を風疹初感染例、再感染例、高HI抗体価やIgM抗体弱陽性を有する例に行いその有用性について検討した。

### 研究方法

研究対象である血清は以下に示す初感染群、再感染群、高HI抗体群、IgM陽性群の4群に分けた。すなわち初感染群は妊婦を含めた顕性初感染23例の発病7~1,477日後の116血清、再感染群は不顕性再感染後HI抗体価が256倍以上を示した8例(1,024倍2例, 512倍3例, 256倍3例)の再感染前後の25血清、高HI抗体群は妊娠初期に高HI抗体価(1,024倍8例, 512倍3例)でIgM抗体陰性の11例11血清、IgM陽性群は高HI抗体価(256倍3血清, 512倍2血清)で疑陽性(±)を含めIgM抗体弱陽性の4例5血清である。後2群は妊娠初期の例だが胎内感染はなかった。

風疹IgG抗体の測定はエンザイグノストELISAキットを用いプロセッサ-II(いずれも

ベーリングベルケ社)で測定した。血清希釈濃度選択のため血清希釈曲線を高HI抗体価血清7検体を用いて作成し、これより通常の血清希釈は400倍の単一希釈とした。

測定値の比較の有効性について検討するため、1検体を別々に400倍に希釈し8wellで同時に測定した。

操作手順はキット添付の説明書に従った。すなわち通常ではウイルス抗原固相wellと対照抗原固相wellに400倍希釈血清を加えて37°C 1時間反応後洗浄し、alkaline phosphatase標識抗体を37°C 1時間作用させ、洗浄後基質を加えて37°C 30分反応させた。その後NaOHで反応を停止させ405nmの吸光度を測定し、ウイルス抗原wellと対照抗原wellの差を求めた。一方尿素処理はウイルス抗原wellと対照抗原wellで血清との抗原抗体反応後、8M濃度の尿素(和光純薬)で3回洗浄し、弱い抗原抗体結合を除去した。その後は通常の手順を行い、尿素耐性の残存強結合抗体の測定値を求め、同時に測定した無処理時の測定値に対するその百分率をAIとした。

### 研究成績

1. 高HI抗体価血清の希釈曲線では、吸光度1.0~0.3前後は吸光度と希釈倍数との間にほぼ直線関係が得られ、この範囲では吸光度がほぼ定量的性格を有すると考えられたので、単一希釈倍数としてこの範囲を測定し得る400例を選択した(図1)。

2. 1血清の8回測定時の平均値は0.7339、標準偏差は0.0117でその変動係数は1.6%と小さく、同時測定での吸光度の比較(AI)は有効と考えられた。

3. 各群の吸光度は初感染群、再感染後、高HI抗体群、IgM陽性群では0.4~1.2の範囲でほぼ同様の高値を示し、吸光度からはその鑑別は困難であった。

一方、AIでは初感染時の発病後1週間は数%と低く、その後は徐々に上昇し、15日以内は15%以下、30日以内は30%以下となり、その約3カ月後に60~80%のほぼプラトーに近い状態に達した(図2)。

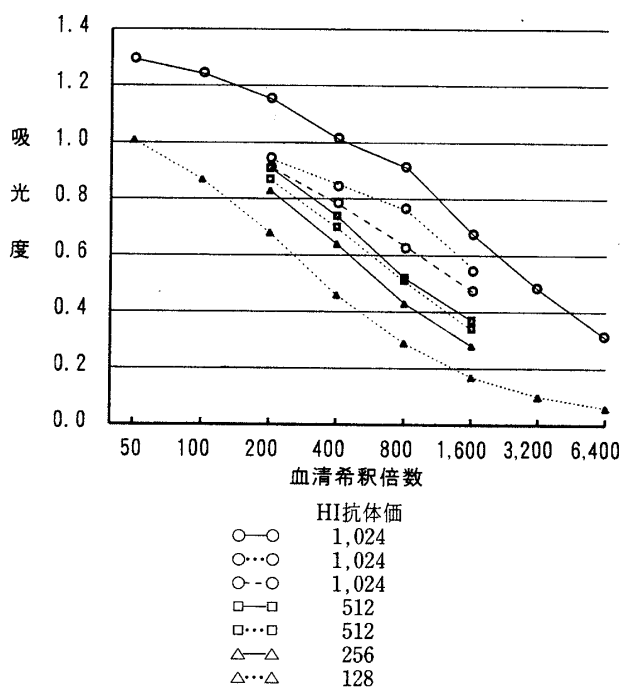


図1 血清希釈曲線

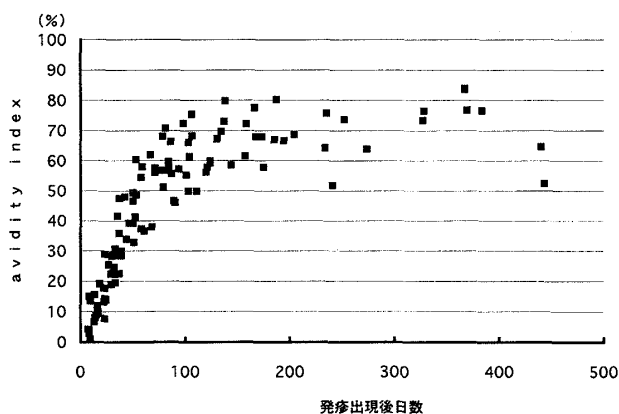


図2 風疹初感染時の avidity index の推移

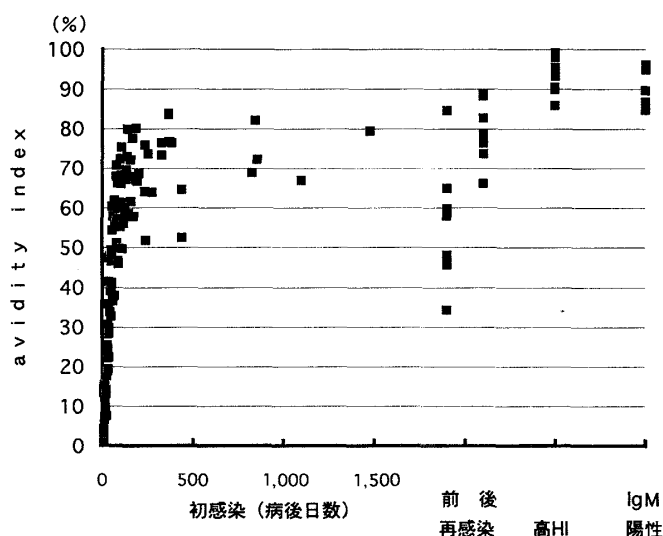


図3 風疹感染各群の avidity index の比較

8例の再感染群のAIでは再感染前の平均±標準偏差は $55.4 \pm 15.2\%$ であったが、再感染後は高値を示した(図3)。また風疹患者接触2~3週後に採取され、かつIgM抗体強陽性となった再感染2例でも各々78%、88%と高かった。この2例ではシリーズ血清で採取されたが各々再感染後4カ月間、8カ月間はほぼ同様の高値で推移し、前者は29カ月後にHI抗体価64倍でAIは60%を示した。

高HI抗体群のAIは $93.5 \pm 4.1\%$ 、またIgM陽性群のAIは $90.6 \pm 5.0\%$ といずれも高値を示した(図3)。

### 考 察

風疹IgG抗体が感染後期と初期とでは結合力が異なることを応用する試みはInouye et al.<sup>6)</sup>に

より最初に報告され、それ以後もいくつかの方法が示されてきている<sup>7)~11)</sup>。

それらの方法は弱い抗原抗体反応を阻害除去する蛋白変性物質を加えること<sup>6)~8)</sup>や、異なる測定方法間の値の比較など<sup>9)~11)</sup>である。前者の方法では阻害剤を加えた場合と加えない場合の値の比較を行うわけであるが、その表現方法にも二通りある。それは阻害剤処理、無処理の二つの場合について希釈曲線を各々作成し両者間の差を測定する方法<sup>6)8)</sup>と、もっと簡便に単一希釈での値の差を測定する方法<sup>7)</sup>である。

希釈曲線を描く方法では、原理的には結合力(阻害の程度)は比較的定量的に測定できるが、1血清の判定にも数回の希釈操作とそれらの測定、さらにグラフの描画から曲線間の差の算出を要し、繁雑で、労力、経済の面からは臨床応用は難しい。

一方、1点測定において吸光度の比(AI)を求めたときは、阻害剤処理で同程度の吸光度の低下がみられても、それは分母である無処理時吸光度が低い程大きく影響を受けるため、厳密に定量的に結合力を表現するには不十分ではあるが、結合力の大小は把握できる。また、1点測定のため操作は簡便である。

そこでこの研究では、できるだけ両方法の長所を取り入れるように行った。すなわち、血清希釈曲線で直線部分を示す位置は吸光度がほぼ定量的性格をもつことを意味するので、希釈曲線間のような定量的意義を単一希釈でももたせるため、得られる測定値がその直線部分に入るような血清希釈倍数に設定した。今回の測定で対象としているような高い抗体価をもつ血清では、吸光度1.0~0.3前後はほぼ直線関係が得られ、この範囲の値は血清希釈400倍で把握し得ることがわかったのでこれを用いた。

無処理時のIgG抗体の吸光度そのものからは初感染と再感染とはほぼ同値で区別がつかない。これは、HI抗体価でもまったく同様である。両者の鑑別はIgM抗体の有無であるが、初感染でもIgM抗体が陰性化した状態や、再感染でもIgM抗体が出現した状態では各々逆の再感染や初感染の状態と誤診される。

しかし、初感染と再感染の AI を測定してみると両者には大きな差がみられた。すなわち、初感染初期では AI は非常に低い値を示したのに反し、再感染症例では66%以上の高い値を示し、なおかつ、IgM 抗体が強陽性となった2例においても高値であった。これは再感染における IgM 抗体出現の場合でも、初感染と区別し得ることを示していた。

再感染で AI が66%と最も低い症例は、HI 抗体価256倍、IgG 抗体測定値0.645と低めの例であり、これは先に単一希釈における特徴として述べた分母となる値が低い理由によるものであろう。なお再感染前の AI が低値となっているのもこのためである。また再感染後の AI の平均値が高 HI 抗体群や IgM 陽性群と比較してやや低いのは、再感染では必ずしも感染時期がはっきりせず、HI 抗体価が低下してきた時期の256～512倍の例が大半を占めているためである。

一方、高 HI 抗体群では AI は非常に高かった。これは抗体値が高いためによるが、これらの症例の既往は不明ながらも、高い AI からは再感染によるものであることを推定させる。事実このうちで胎児感染のあるものはみられなかった。

さらに IgM 抗体が弱陽性の症例は256～512倍の HI 抗体価ながら高い AI を示した。AI の高さからは、これらの症例も再感染によるものであることが推察される。また、この事実は反応の弱い例を含めれば、再感染によってしばしば IgM 抗体が出現する<sup>12)</sup>可能性を示唆している。

通常の産科外来では、HI 抗体を測定し、それが高い場合に IgM 抗体を測定している。しかし、抗体測定の時期が妊娠の3～4カ月となることも多く、奇形臨界期頃の感染でも検査までの間に IgM 抗体が陰性となっていることは否定できない。その時に、この IgG 抗体の結合力が非常に高い値であるならばそれは再感染であることを強く推定させる材料となる。また、IgM 抗体が初感染後長期間持続することがあるが、AI を用いればその場合も初感染初期とは鑑別可能である。

現在妊婦の大半が風疹ワクチン定期接種者で占められるようになったが、妊婦の定期接種の記憶

は曖昧で、接種率も自治体ごとに異なり、さらに接種後の抗体価測定が行われていない現状では、高い HI 抗体価は妊娠継続に依然として不安を与えている。ワクチンによって得られた免疫だけに再感染は多く<sup>13)</sup>、HI 抗体価上昇を示す症例は多いと思われる。高 HI 抗体群がすべて高い AI を示したことは再感染が珍しいものではないことを示している。そのような症例の診断の際に、簡便な IgG 抗体の結合力測定は今後有力な判断材料となるであろう。

また、臨床では既に風疹 IgG 抗体も測定されてきているが、それは免疫の有無のみを判定し得るのであって、その測定値の解釈には HI 抗体価のような値に対する基準はない。しかし、本法を用いれば簡便に結合力測定が行えるので、IgG 抗体測定の意義は増大されたといえる。

#### 文 献

1. Enders G, Knotek F, Pacher U. Comparison of various serological methods and diagnostic kits for the detection of acute, recent, and previous rubella infection, vaccination, and congenital infections. *J Med Virol* 1985; 16: 219-232
2. 干場 勉, 矢吹朗彦. 風疹. 産婦の実際 1991; 40: 939-946
3. Morgan-Capner P, Hodgson J, Hambling MH, Dulake C, Coleman JJ, Boswell P, Watkins RP, Booth J, Stern H, Best JM, Banatvala JE. Detection of rubella specific IgM in subclinical rubella reinfection in pregnancy. *Lancet* 1985; 2: 244-246
4. 干場 勉, 朝本明弘, 矢吹朗彦, 尾西 一, 木村晋亮. 風疹再感染により風疹 IgM 抗体が出現した妊婦の2例. *臨とウイルス* 1991; 19: 131-134
5. 干場 勉. 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. *十全医会誌* 1989; 98: 824-840
6. Inouye S, Hasegawa A, Matsuno S, Katow S. Changes in antibody avidity after virus infections: Detection by an immunosorbent assay in which a mild protein-denaturing agent is employed. *J Clin Microbiol* 1984; 20: 525-529
7. Hedman K, Seppälä I. Recent rubella virus infection indicated by a low avidity of specific IgG. *J Clin Immunol* 1988; 8: 214-221
8. Thomas HIJ, Morgan-Capner P. Rubella-specific IgG subclass avidity ELISA and its role

- in the differentiation between primary rubella and rubella reinfection. *Epidemiol Infect* 1988; 101: 591—598
9. *Hedman K, Salonen E-M, Keski-Oja J, Rähkä K.* Single-serum radial hemolysis to detect recent rubella virus infection. *J Infect Dis* 1986; 154: 1018—1023
10. *Inouye S, Satoh K, Tajima T.* Single-serum diagnosis of rubella by combined use of the hemagglutination inhibition and passive hemagglutination tests. *J Clin Microbiol* 1986; 23: 388—391
11. *Katow S, Sugiura A, Janejai N.* Single-serum diagnosis of recent rubella infection with the use of hemagglutination inhibition test and enzyme-linked immunosorbent assays. *Microbiol Immunol* 1988; 33: 141—145
12. *Cradock-Watson JE, Ridehalgh MKS, Anderson MJ, Pattison JR.* Rubella reinfection and the fetus. *Lancet* 1985; 1: 1039
13. *Horstmann DM, Liebhaber H, LeBouvier GL, Rosenberg DA, Halstead SB.* Rubella: Reinfection of vaccinated and naturally immune persons exposed in an epidemic. *N Engl J Med* 1970; 283: 771—777

(No. 7417 平5・8・6受付)