

風疹の血清学的検査法についての検討

時枝 正吉¹⁾ 山辺 靖子¹⁾ 春日 邦子¹⁾
 浅岡 勲¹⁾ 市村 博¹⁾ 曾田 研二¹⁾
 宮沢 博²⁾ 芦原 義守²⁾

Comparative Studies on the Serological Methods in Rubella Infection

Masayoshi TOKIEDA, Yasuko YAMABE, Kuniko KASUGA, Isao ASAOKA, Hiroshi ICHIMURA,
 Kenji SODA, Hiroshi MIYAZAWA and Yoshimori ASHIHARA

I はじめに

千葉県での風疹の流行は、1966年～68年にかけて、県下全域にわたり感染が広まり¹⁾、その後約10年の間隔をもって、全国各地に発生、大きな流行をもたらし、千葉県でも、1975年～76年に東京都に隣接した人口密集地域を中心に県内へ流行が波及していったが²⁾、今回、約5年という前回流行時より半分短い間隔で流行を経験するに至った。

風疹感染において最大の問題は、妊婦の感染によっておこる胎児感染、いわゆる先天性風疹症候群児出産の危険で、国でも予防対策として風疹ワクチンが1977年秋より接種を開始しているが、最初の年次の対象年齢層はまだ20才に達し得ずワクチンの効果にまでは至っていない³⁾。

このような時に、各地域での散発、流行状況の把握を的確に行ない、患者との濃厚な接触を避け、不明な発疹症を確実に診断することが強く求められている。

しかし、適切な時期に採血し得た対血清（急性期、回復期）については検査成績の解釈に問題は生じないが、単一血清の場合、時には対血清においても得られた成績の解釈に苦慮することが多い。

この解釈には新しい感染によるか否かの証拠として、風疹の特異的IgM抗体を証明する必要があり、蔗糖密度勾配遠心法が最も優れた方法といわれるが⁴⁾、超遠心機で36,000 r.p.m.16時間遠心操作後（1台4件が限度）各分画について検査するので多くの血清を流行時に検査するには手軽な方法とはいえない。

そこで、赤血球凝集抑制試験に補体結合反応²⁾、黄色ブ

ドウ球菌 (Cowan 1株) の産生する Protein-A により血清中の IgG を吸収後、抗体を測定する⁵⁾⁶⁾、などの組み合わせが一般に行なわれてきた。

われわれは、対血清において風疹流行を赤血球凝集抑制試験のみでは確認できなかった経験を機会に、最近臨床検査技術の一つとして注目されている酵素免疫測定法 (enzyme linked immunosorbent assay = ELISA と略)⁷⁾⁸⁾を行ない、二、三の知見が得られたので報告する。

II 実験方法

1) 被検血清：健康者及び風疹患者の対血清で、全て -20℃ 以下に凍結保存されていたもの。

2) 風疹の赤血球凝集抑制試験 (以下 HAI)：診断用抗原は東芝化学 K. K. (HA用) 製、術式は微生物検査必携⁹⁾に従った。

3) 黄色ブドウ球菌による IgG 吸収処理：市販試薬 (化血研製) の Cowan 1 株を吉川ら⁹⁾の方法に準じて行なった。

4) 風疹の補体結合反応 (以下 CF)：診断用抗原は東芝化学 K. K. (CF用) 製、術式は微生物検査必携に従いマイクロタイター法⁹⁾によった。

5) 酵素免疫測定法 (以下 ELISA 法)：旭メディカル K. K. の提供による M. A. Bioproducts 製の風疹 IgG 抗体測定 EIA キットにより、単一希釈によるワンポイント測定で、分光光度計 (波長 405nm) によって吸光度を測った。

被検血清対照抗原反応の吸光度を対応する被検血清風疹抗原反応の吸光度から差引いたものをルベライザ吸光度差 (以下ルベライザ値) と記した。

今回は cuvette 式と plate 式の容器を異にする

1) 千葉県衛生研究所
 2) 杏林大学保健学部
 (1981年10月6日受理)

ELISA キットについても比較検討を加えた。

III 実験成績

実験1：

船橋市内某小学校の風疹小流行(第2学年の1クラス)において急性期(第3~10病日)と回復期(第24~32病日)の前後2回採血し得た12組の対血清について、HAI, その他の風疹血清学的検査を行なった。

最初にカオリン処理による標準HAIを行なった結果、急性期に既に全員抗体を保有し、有意の抗体上昇を示すものは皆無という意外な成績で風疹の流行であるとの証明は不能であった。

引続いてCFを行なった結果は、有意の抗体上昇を確認し得たもの3/12(25%)と8倍以上の抗体価を示すもの11/12(91.7%)で、風疹の流行を経過したものであると辛じて確認できた。

さらに実施した黄色ブドウ球菌による被検血清のIgG吸収処理の結果は、有効なHAI抗体価の変動と見做せるものが7/11(63.9%)に認められ、風疹の確認ができた。

以上のような検査の経過を辿った対血清についてELISA法の2方式の比較を実施した結果、cuvette式も

plate式も共に11/12(91.7%)に有効な抗体上昇を認めた。

ただし、本法において単独血清についての、風疹抗体の有無を判断する陽性血清のルベライザ値の下限は0.170であるのに、今回の回復期血清(第24~32病日)では、わずかにplate式1例(8.3%), cuvette式4例(33.3%)が陽性の下限値を越えたのみであった。

実験2：

医療機関で2~4回採血し得た風疹患者の血清13組(No.2=不顕性感染症例, No.7, 8=発病前採血分保存例)についてHAIとELISA(plate式)を行なった結果、全例が両検査法共に有意の抗体上昇を認めた。

HAIでは第4~5病日で既に32~64倍の抗体価に達し、第10~15病日では32~512倍と幅広い抗体価の分布を示した。

ELISA法では第4~5病日で0.005~0.033のルベライザ値、第10~19病日では0.063~0.171のルベライザ値まで上昇したが、陽性血清の下限値0.170に到達したものはNo.3(第16病日)の僅か1例、第40病日を越えてもNo.8, 12の2例を加えるのみであった。

実験3：

健康者の被検血清201検体についてHAI価とELISA法のルベライザ値を比較した結果、ELISA法の定量性は

Table 1 Comparison of HAI, CF and ELISA antibodies in patients with rubella infection

Patient and serum	Days after onset of illness	HAI titer		CF titer	RUBELISA value		
		Control	IgG-treated*		Plate	Cuvette	
1	I	10	64	8	4	.006	.039
	II	31	64	16	4	.111	.139
2	I	8	128	16	64	.080	.096
	II	29	64	<8	16	.149	.180
3	I	8	128	<8	8	.052	.077
	II	29	128	<8	8	.139	.179
4	I	7	128	16	32	.079	.096
	II	28	128	<8	32	.144	.163
5	I	7	64	8	8	.070	.094
	II	28	64	16	8	.128	.195
6	I	7	64	8	8	.035	.043
	II	28	64	<8	16	.106	.164
7	I	6	64	16	16	.053	.051
	II	27	64	<8	16	.155	.184
8	I	6	128	<8	<4	.024	.055
	II	27	128	<8	8	.134	.157
9	I	5	128	8	<4	.145	.060
	II	26	64	<8	8	.186	.113
10	I	5	64	8	16	.045	.056
	II	26	64	<8	16	.129	.062
11	I	4	64	8	4	.041	.056
	II	25	64	ND	8	.125	.142
12	I	3	64	32	<4	.035	.051
	II	24	64	<8	8	.123	.142

* absorbed by *Sta. aureus*

Table 2 Comparison of seroconversion measured by HAI and RUBELISA

Patient and serum	Days after onset of illness	HAI titer	RUBELISA value	Patient and serum	Days after onset of illness	HAI titer	RUBELISA value	
1	I	5	64	9	I	-21	<8	
	II	19	256		II	11	64	.068
2	I	unknown	8	10	III	25	256	
	II	"	256		IV	42	128	.147
3	I	2	16	11	I	1	<8	
	II	16	256		II	14	64	.102
4	I	4	32	12	III	30	128	
	II	15	256		I	0	<8	.000
5	I	4	16	13	II	16	256	
	II	11	256		III	28	128	.109
6	I	2	<8	14	IV	40	64	
	II	32	128		I	4	32	.033
7	I	-47	<8	15	II	32	128	
	II	8	.056		III	48	128	.272
	III	15	.093		I	0	<8	.000
8	I	1	<8	16	II	14	32	
	II	10	.119		III	27	64	.114
	III	41	.263					
	IV	66	.305					

平均ルベライザ値と HAI 抗体価に関する直線回帰分析によって実証され、平均ルベライザ値と HAI 抗体価間には高度の相関が認められる。

しかし個々の被検血清についてみると、平均値のまわりに分散し、HAI 抗体価64倍のものは弱陽性から強陽性までが含まれる。128倍以上では中等度から強陽性までが含まれる。また HAI 抗体陰性の8倍以下群では0.050を越えるものはなく、0.000~0.045の幅に収まっていた。

Table 3 Comparison of HAI and RUBELISA

HAI titer	n	RUBELISA		
		\bar{x}	S.D.	Range
<8	46	.012	±.013	.000 ~ .045
8	14	.131	±.032	.083 ~ .185
16	37	.188	±.052	.102 ~ .330
32	35	.249	±.063	.146 ~ .334
64	38	.286	±.060	.186 ~ .458
128	18	.336	±.069	.239 ~ .446
256	13	.353	±.053	.262 ~ .445

IV 考察

実験1の経験は、ELISA 法に取組む切っ掛けとなったのであるが、幼稚園、学校といった施設内での流行の場合に検査を実施する際、最適病日に検体を採取することは、種々の条件がからんで、きわめて困難なことであり、

流行調査時の当面している問題点であろう。

さらに、今回のクラス内風疹流行のごとく、風疹 HAI のみの検査に依存しては、急性期血清中にすでに抗体が保有されており、感染時期が不明という成績しか得られず、風疹流行の確認も不確かで、心許無いことを示唆している。

そこで、われわれは、風疹の流行、感染確認の手技として、補体結合反応を併用してみたが、被検血清の前処理もなく、極めて簡便であり、風疹流行を推測する結果が得られたと考える。

黄色ブドウ球菌吸収法では、非常によく IgG を吸収するが、IgA, IgM も共に吸収損失する危険があり、簡易な方法であるが、No, 1, 3, 5, 8 のような症例についての成績の解釈は他の検査法に委ねざるを得ない。

ELISA 法の二法(容器の差)は、多数を同時に検査をする場合 plate 式の方が操作が容易であるが、振盪が不十分になりやすいので注意が必要である。一回に20~30件の検査では cuvette 式が経済的で操作ミスも起き難いように思われる。

実施した ELISA 法二法は共に抗体の上昇を極めてよく捕捉し、両者の差は cuvette 式が吸光度差において若干高い傾向(振盪操作による影響ではないかと推測される)を示す程度である。

なお、今回のように風疹患者の対血清について、同時にELISA法による検査を行なって、回復期血清のルベライザ値が下限値0.170に到達していない場合は、ルベライザ値を急性期と比較して回復期血清が1.5倍以上の時に「有効な特異抗体の変動と考えるとよい」と考える。

実験1のグループでは回復期の血清が第24~31日目までのもので、陽性血清の下限値0.170を上回ったものが、plate式で1例、cuvette式で4例(33.3%)と低率であったが、実験2のグループでは第40~60日目まで血清が得られた結果、HAI抗体が平衡状態に達してからも、ELISA法では若干の個体差が認められ、第40病日を越えても測定値の継続的上昇を観察することができた。

この理由として考えられることは、補体結合反応もHAIも共にIgGあるいはIgG+IgMを抗体として、抗原を結合した状態をそのまま測定しているのに、ELISA法は酵素標識抗ヒトIgG抗体を使用したキットで、被検血清と抗原を20~25℃/2時間作用させた後、リン酸緩衝液(PBS-Tween液)で3回洗うという操作が入ることに注目したい。

この洗う操作によって、被検血清は病日が経過して、初期出現のIgMに代ってIgGが大部分を占める1か月後になっても、初期のIgGは完成されたものでないため、affinityが弱く、一旦結合したものが脱落するため、ルベライザ値、即ち測定値が低くなるのではないかと推察される。

このlow affinityの現象は、今回の風疹罹患者から得られた被検血清にのみ認められており、単一血清サンプルで最も判断に苦しむHAI抗体価32~64倍の場合にELISA法を行なって、ルベライザ値が0.100~0.160程度を新しい感染を受けた者と推定し、超遠心などによる精査をすれば、件数の抑制に役立つと考えられる。

V まとめ

風疹のHAIは大変に優れた検査法であるが、万能ではなく、検査の目的に適した各種の検査法を組み合わせることが必要であり、今後望まれるところであろう。われわれは、組み合わせの一つとしてELISA法を紹介した。

稿を終るにあたり、貴重な患者血清を提供していただいた、兵庫県立尼崎塚口病院早川泰博士、国立京都病院沢田茂夫技官、さらに小学校風疹流行時の学童採血に尽力いただいた船橋保健所関係各位に深謝いたします。

文献

- 1) 市村 博, 時枝正吉, 芦原義守: 千葉県における風疹の血清疫学的研究, 日本公衛誌, 19: 418-420, 1972.
- 2) 芦原義守, 時枝正吉, 市村 博, 浅岡 勲, 山辺靖子, 春日邦子, 田所勇次, 大内義智, 岸本圭司: 千葉県における1975~1978年の風疹流行に関する血清疫学的研究, 千葉衛研報告, 3: 1-8, 1979.
- 3) 木村三生夫, 平山宗宏: 予防接種の手びき, 近代出版社(東京), pp. 43-48, 1980.
- 4) Desmyter J, South M. A. and Rawls W. E.: The IgM antibody response in rubella during pregnancy, J. Med. Microbiol., 4: 107-114, 1971.
- 5) Ankerst J. Christesen P., Kjellen L., and Kronvall G.: A routine diagnostic test for IgA and IgM antibodies to rubella virus: absorption of IgG with Staphylococcus aureus, J. Infect. Dis., 130: 268-273, 1974.
- 6) 吉川ひろみ, 大友信也, 野中実夫, 植田浩司, 藤井宏: IgM, IgG 分別測定による風疹感染時期の判定, 臨床とウイルス, 6: 149-152, 1978.
- 7) Voller, A and Bidwell. D. E.: A simple method for detecting antibodies to rubella, Brit. J. Exp. Path., 56: 338-339, 1979.
- 8) Voller, A and Bidwell. D. E.: Enzyme-immunoassays for antibodies in measles, cytomegalovirus and after rubella vaccination, Brit. J. Exp. Path., 57: 243-247, 1976.
- 9) 厚生省監修: 微生物検査必携, ウイルス・リケッチア検査, 日本公衆衛生協会(東京), pp47-356, 1978.