

パルボウイルス感染診断法の開発 と評価

研究協力者

松永 泰子

(国立予防衛生研究所)

I はじめに

ヒトパルボウイルス B 19 (B 19ウイルス) は、1975年に輸血用血液のHBウイルス検査中に偶然発見されたウイルスであるが、その後伝染性紅斑をはじめとして遺伝性溶血性貧血患者の Aplastic crisis、関節炎等の原因となることが判明した。1984年には英国で伝染性紅斑流行後に胎児水腫による死・流産の症例が報告され、妊婦のB 19ウイルス感染に対する注意が喚起された。我が国でも、1986~87年の全国的な伝染性紅斑の流行以来、B 19ウイルスによる胎児障害の報告が続いている。母体がB 19ウイルス感染を受けてから胎児に障害があらわれるまでの期間や、危険な妊娠週令・危険率等に関しては、英国でのIg M抗体陽性の妊婦約200名を追跡した報告がある (Brit. Med. J., 300: 1166~1170, 1990)。それによれば、胎児感染の危険性は全週令にわたるが、特に20週令未満が危険性が高い。胎児障害の危険率は約10%であった。我が

国では、B 19ウイルス感染の実験室診断がまだ一般化されておらず、全国的な調査は行なわれていない。しかし、我が国ではB 19ウイルスに対する抗体保有率が年々低下し、現在35才未満では約20%になっている。伝染性紅斑の流行時には妊婦が感染し、胎児に障害を及ぼす危険性を考慮すべきであろう。

II B 19ウイルス検査法の現状と問題点

1、ウイルス検出法

組織培養によるB 19ウイルスの増殖は、特定のステージにある赤芽球系細胞のみで可能なため、ウイルス検出法としてはあまり用いられない。感受性のある実験動物もない。そこで、ウイルス検出法としては、次の抗原検出またはDNA検出が行なわれている。

a 抗原検出法

単クローン抗体を用いた酵素抗体法（ELISA）、ラジオイムノアッセイ（RIA）が世界各国で行なわれている。これ等は感度も高く（

10⁶ 粒子以上あれば検出可能)、定量化が容易である等の利点がある。筆者は、デンカ生研 k.k. と共同で ELISA による抗原検出キットを試作し、実験室診断に役立てている。

b DNA 検出法

抗原検出より感度が高い(ドットブロッキングで10⁴ 粒子以上、PCR を用いれば数コピーを検出可能)。B19ウイルスは遺伝子DNAの全塩基配列が報告されており、DNA を扱い慣れた施設ではウイルスDNA 検出は比較的容易である。

2、抗体測定法

診断にはIgM 抗体測定が重要である。次の方法が主として行なわれている。

a RIA

b ELISA

c ウェスタンブロッキング(WB)

使用抗原は大きく次の二つに分けられる。

a Native(particle)抗原: 抗原陽性血漿または血清から得る。入手が困難、感染性

がある。

b 遺伝子工学的人工抗原・合成ポリペプチド抗原：抗体との反応性が a と異なる。

3、母子感染を考えた場合の問題点

母体が感染を受けてから胎児に障害が発見されるまで期間があるので、IgM 抗体が検出できないことがある。特に不顕性感染の場合は抗体測定のみでは判断できないことが多い。子の材料からウイルス DNA を検出すれば直接証明になるが、子の材料は採取困難なことがある。剖検例では、肝、脾、肺等からウイルス DNA が検出されやすい。

III 診断法の開発

1、遺伝子工学的手法による抗原の発現

献血血漿からスクリーニングにより B 19 ウイルス抗原陽性血漿を検出する試みでは、数万～数 10 万分の 1 の確率であり、容易ではない。遺伝子工学により発現させた B 19 ウイルス構造タンパクを用いた抗体測定が世界各国

で試みられている。筆者等は既に我が国の伝染性紅斑患者由来の B 19 ウイルス DNA をクローニングし、大腸菌および Baculovirus 系を用いて抗原の発現を試みてきている。今研究では、その発現タンパクを用いた ELISA システムについて従来から行なっている Native (particle) 抗原を用いた ELISA との比較を行なった。

a 大腸菌により発現した VP-1, VP-2, VP-1/ssp1 抗原 : ELISA 系での検討

b Baculovirus による発現 : スケールアップ中。WB では患者血清と反応するタンパクのバンドが、予想される分子量の位置に検出できた。既存の抗原検出 ELISA で検出可能な粒子抗原が得られるかどうか検討する。

2、使用抗原の選択

経時的に得られた患者血清を用いて VP-1, VP-2 および VP-1/ssp1 抗原をそれぞれ単独に固相化したプレートを用いて IgG 抗体測定 ELISA を行なった。その結果、感染初期の血

清では抗VP-2抗体が高かった。しかし、約3月後には抗VP-2抗体は陽性限界程度にまで低下した。抗VP-1抗体は、感染初期ではあまり高くはなかったが、その後上昇し、6月以降も持続した。抗VP-1/ssp1抗体は、中間の動きを示した。(図1参照)発現抗原を用いる場合は、VP-1とVP-2の両方を混ぜて用いたほうが良いと考える。empty particlesを形成できればよりよいであろう。

IV 評価

1、WB法(BML社) : Native 抗原を用いたELISAとの比較ではかなりよく一致した。弱い反応を示す検体での多少の不一致は、VP-1抗原のみを用いているためかもしれない。比較検査した検体数が少ないため、一致率は計算できなかった。

2、ELISA法(ドイツ、IBL社製キット) : IgMとIgG抗体測定を完全に分けて測定するため煩雑である、要再検査が多い、well差が

大きい、Native抗原を用いたELISAとの一致率が低い（特にIgM抗体）等、現時点では推奨できない。現在改良を申し入れている。（表1参照）

3、パネル血清の選択

種々の方法による抗体測定を比較・検討するため、現在伝染性紅斑の流行時に得られた抗体陽性および陰性の血清から46または88検体を抜き出して用いている。今後は、健康者、妊婦、リウマチ患者の血清、抗体価の高いもの、低いもの、感染後の時期の異なる血清等を考慮して準備したい。

表1 ELISAによる抗体測定結果の比較

		I B L 社							
		I g G				I g M			
		+	+-	-	計	+	+-	-	計
粒 子 抗 原	+	26	4	1	31	11	0	1	12
	+-	0	1	2	3	1	2	2	5
	-	0	2	10	12	9	12	8	29
合計		26	7	13	46	21	14	11	46

一致率

37/46 (80.4%)

21/46 (45.6%)

図 1 伝染性紅斑患者回復期血清の B19ウイルス抗原成分に対する抗体の変動

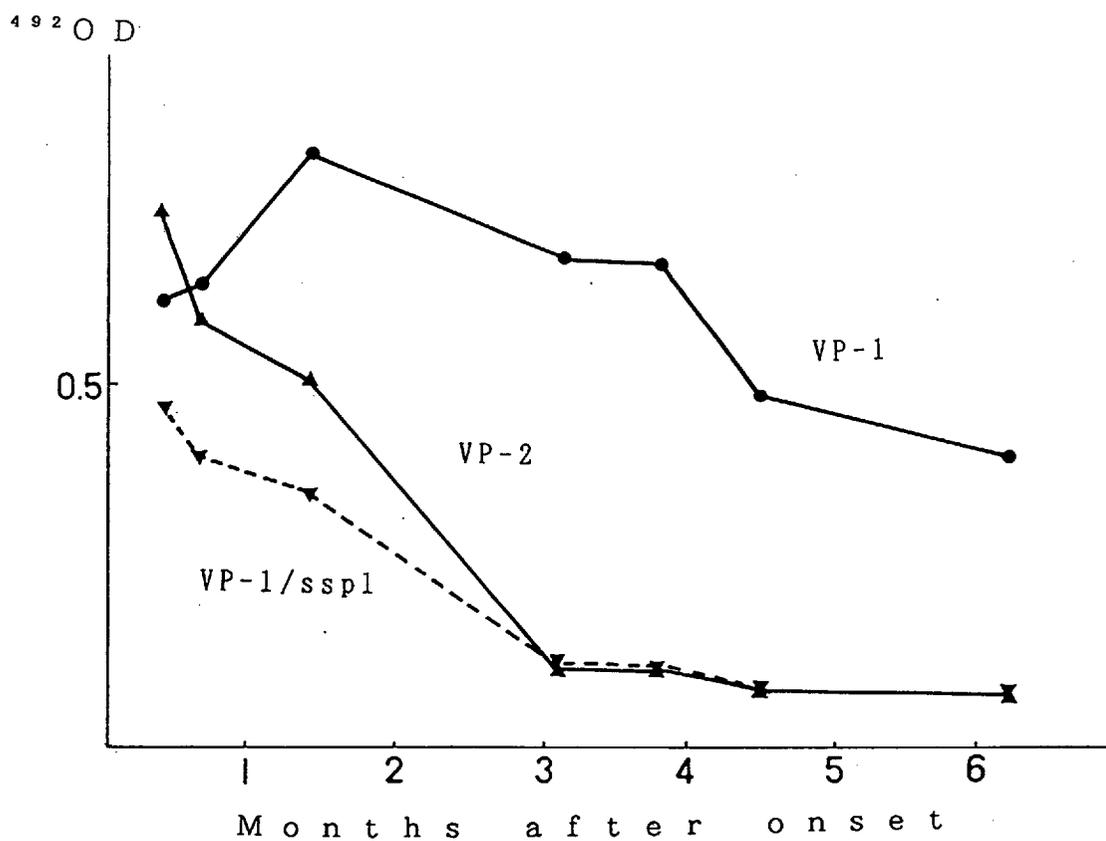
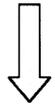


表 1 E L I S A による抗体測定結果の比較

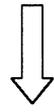
	I B L 社							
	IgG 抗体			計	IgM 抗体			計
	+	±	-		+	±	-	
粒 +	26	4	1	31	11	0	1	12
子 ±	0	1	2	3	1	2	2	5
抗 -	0	2	10	12	9	12	8	29
原 (予 研 法) 計	26	7	13	46	21	14	11	46

一致率 : 37/46 (80.4%) 21/46 (45.6%)



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



1 はじめに

ヒトパルボウイルス B19(B19 ウイルス)は、1975 年に輸血用血液の HB ウイルス検査中に偶然発見されたウイルスであるが、その後伝染性紅斑をはじめとして遺伝性溶血性貧血患者の Aplastic crisis、関節炎等の原因となることが判明した。1984 年には英国で伝染性紅斑流行後に胎児水腫による死・流産の症例が報告され、妊婦の B19 ウイルス感染に対する注意が喚起された。我が国でも、1986-87 年の全国的な伝染性紅斑の流行以来、B19 ウイルスによる胎児障害の報告が続いている。母体が B19 ウイルス感染を受けてから胎児に障害があらわれるまでの期間や、危険な妊娠週令・危険率等に関しては、英国での IgM 抗体陽性の妊婦約 200 名. を追跡した報告がある (Brit. Med. J., 300:1166 ~ 1170, 1990)。それによれば、胎児感染の危険性は全週令にわたるが、特に 20 週令未満が危険性が高い。胎児障害の危険率は約 10%であった。我が国では、B19 ウイルス感染の実験室診断がまだ一般化されておらず、全国的な調査は行なわれていない。しかし、我が国では B19 ウイルスに対する抗体保有率が年々低下し、現在 35 才未満では約 20%になっている。伝染性紅斑の流行時には妊婦が感染し、胎児に障害を及ぼす危険性を考慮すべきであろう。