

ヒトパルボウイルス感染診断法の開発と評価

松永泰子¹⁾・鎌田公仁夫²⁾・黒澤大介²⁾

要約： ヒトパルボウイルスB19（B19ウイルス）感染の血清診断用抗原として、組換え抗原（ウイルス構造タンパクVP1、VP2の全部または一部を発現）を用いることを検討してきた。それらの組換え抗原に対する免疫応答は、血漿由来のウイルス粒子抗原に対するそれと同じではない。抗VP2抗体は抗VP1抗体よりも早期には高く上昇するが、約6ヵ月で検出できなくなる。感染後非常に早い時期の抗体上昇は、ウイルス粒子抗原によってのみ検出できた。パキユロウイルス発現系では、ウイルス様粒子を形成することができる。この粒子抗原を用いて伝染性紅斑流行期血清についてELISAを行なったところ、血漿由来のウイルス粒子抗原を用いた場合と結果がよく一致した。西ドイツIBL社作製のELISAキットについて検討した結果、リウマチ因子除去法が不十分であった。

見出し語： ヒトパルボウイルス、B19ウイルス、血清診断

研究方法

1、組換えB19抗原による抗体測定

B19ウイルス感染後経時的に得られた複数の患者血清および伝染性紅斑流行に際して得られた24名の流行時およびその4ヵ月後のペア血清を用いた。大腸菌で発現させた組換えB19-VP1、VP2およびVP/Ssp-1抗原、パキユロウイルス発現系により粒子形成されたVP1、VP2ミックス抗原、および従来用いているウイルス粒子抗原

に対する抗体応答を、ELISAにより測定し比較した。ELISAの方法は、大腸菌発現組換え抗原の場合は、精製した抗原を固相化したマイクロプレートを用いた間接法で行い、ウイルス粒子抗原の場合は抗体捕捉法で行なった。パキユロウイルス発現系により得られた粒子抗原の場合は、IgM抗体は抗体捕捉法で、IgG抗体は間接法で行なった。ペルオキシダーゼ標識抗体を反応させた後、OPD-H₂O₂で発色、492nmの吸光度をブ

¹⁾ 国立予防衛生研究所 感染症疫学部、²⁾ デンカ生研（株）研究部

ロットした。

2、IBL社のキットについて

このキットは大腸菌発現タンパクのVP1をIgG抗体測定用に、VP2をIgM抗体測定用に固相化したプレートを用いて間接法ELISAで測定するものである。パネル血清として、伝染性紅斑流行時のペア血清（2ヵ月間隔）、B19ウイルス感染の発病直後から経時的に得られたシリーズ血清、リウマチ患者血清等を用いた。対照試験はウイルス粒子抗原を用いた抗体捕捉ELISAおよび単クローン抗体を用いてウイルス粒子抗原を捕捉して抗体と反応させる間接サンドイッチ法を行なった。

結果

1、大腸菌発現組換え抗原による抗体測定

昨年度に引き続き大腸菌発現組換えVP1、VP2およびVP/Ssp-1抗原に対する抗体応答を追跡した。伝染性紅斑流行時およびその4ヵ月後に得られた24名のペア血清での成績を図1に示した。抗VP1抗体は4ヵ月後の方が高い右上がりのパターンを示すものが多く、抗VP2抗体は4ヵ月後には大部分がCut off値近くまで低下する右下がりのパターンを示した。抗VP/Ssp-1抗体は、中間のパターンを示した。さらに、感染後早い時期からの血清が得られた2症例で、抗組換え抗原抗体と抗ウイルス粒子抗体（IgMおよびIgG抗体捕捉ELISA）を測定した。図2および3に示すように、抗ウイルス粒子抗体は、感染後6～7日目から

検出され、その後やや低下したのち再び上昇するのに対し、抗組換え抗原抗体（IgG）は3種類とも、2度目の上昇時に顕著な上昇が見られた。この2症例においても早期には抗VP2抗体が抗VP1抗体より高いレベルで検出された。

前年度の結果および以上の結果から、感染後の比較的早い時期の抗体はVP2抗原で検出し、胎児水腫の症例等感染後4ヵ月以上経過した場合や感染時期不明の抗体はVP1抗原で検出するために、血清診断用の組換え抗原は、VP1とVP2の両方を合わせて用いるのがよいと考える。VP/Ssp-1抗原については、抗体検出感度が他の2種の抗原より低く、メリットが見いだされないので、今後は検討から除外することとした。

2、バキュロウイルス発現系によるウイルス様粒子抗原の作製

バキュロウイルス遺伝子にVP1、VP2遺伝子をそれぞれ組み込み、昆虫細胞に重感染させ、B19抗原を産生させた。感染細胞抽出液を塩化セシウム密度勾配中で遠心すると、比重約1.31g/ccの画分にELISAの抗原性のピークがあり、電子顕微鏡により直径約20nmの中空ウイルス様粒子が認められた。この組換え粒子抗原を精製してELISAを行なうと、ナチュラルなウイルス粒子抗原を用いたELISAの結果と非常によく一致した。この抗原は将来B19ウイルス感染の診断用抗原として有望である。

3、IBL社のキットについて

IgG抗体キットについて： 患者血清は

高い吸光度を示し、対照試験の結果とよく一致した。感染時期不明の血清では若干の不一致が見られた。Cut off値が高く、吸光度にばらつきのあることがあるが、診断用としては合格と判定した。

IgM抗体キットについて： シリーズ血清を用いての結果は対照試験とよく一致した。ペア血清（2ヵ月間隔）では若干の不一致が見られた。リウマチ患者血清では不一致が多かった。キットの説明書に、リウマチ因子についての注意が書かれてはいるが、B19ウイルス感染では関節症状のことがしばしば見られ、かつ、関節炎症状が持続する例があることから、このままではキットとしては不十分であると判定した。

その他： このキットの基質液は、非常に高感度であり、温度の影響を受けやすいのではないかとの印象を受けた。発色がブルーであることと合わせて、特に夏期には反応停止のタイミングが難しかった。九州大学の布上教授がこのキットについて詳細に検討している¹⁾。

考察

遺伝子組換え技術を用いて培養困難なB19ウイルス構造タンパクを発現させ、診断用抗原として用いる試みが世界各国でなされている。大腸菌を用いた場合、大量培養を含めてノウハウが確立されていることが利点であろう。しかしヒト血清の中には大腸菌成分に対して抗体を持つものがあり、抗原を精製するには高い技術を要する。これに対して昆虫

細胞を用いるバキュロウイルス発現系では、産生されるタンパクがよりナチュラルに近くまた、細胞成分に対して抗体を持つヒトがほとんどないため、診断用抗原産生系としてもすぐれている。

IBL社のキットは、問題点はあるものの他に変わるものがない現状では、ELISAに習熟した人が注意深く用いれば有効なキットであろう。

参考文献

- 1) 布上 董；パルボウイルスB19抗体測定用ELISA（IBL製）の検討：臨床とウイルス 20、424-428、1992

図1 伝染性紅斑流行時および4ヵ月後の各種組換えB19抗原に対する抗体応答

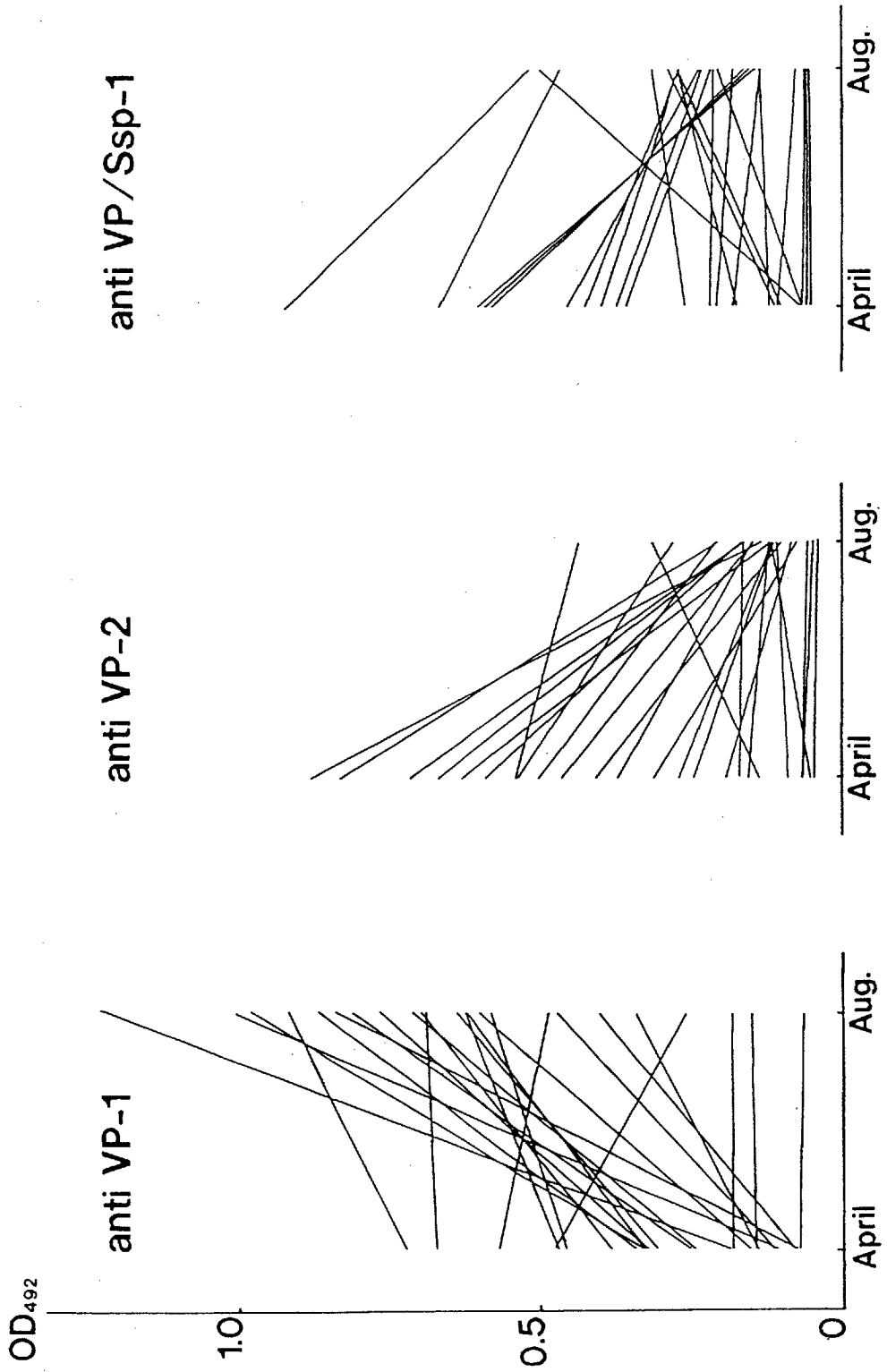


図2 膝の手術後に赤芽球癆を起こした28才男性での各種抗原に対する抗体価の変動

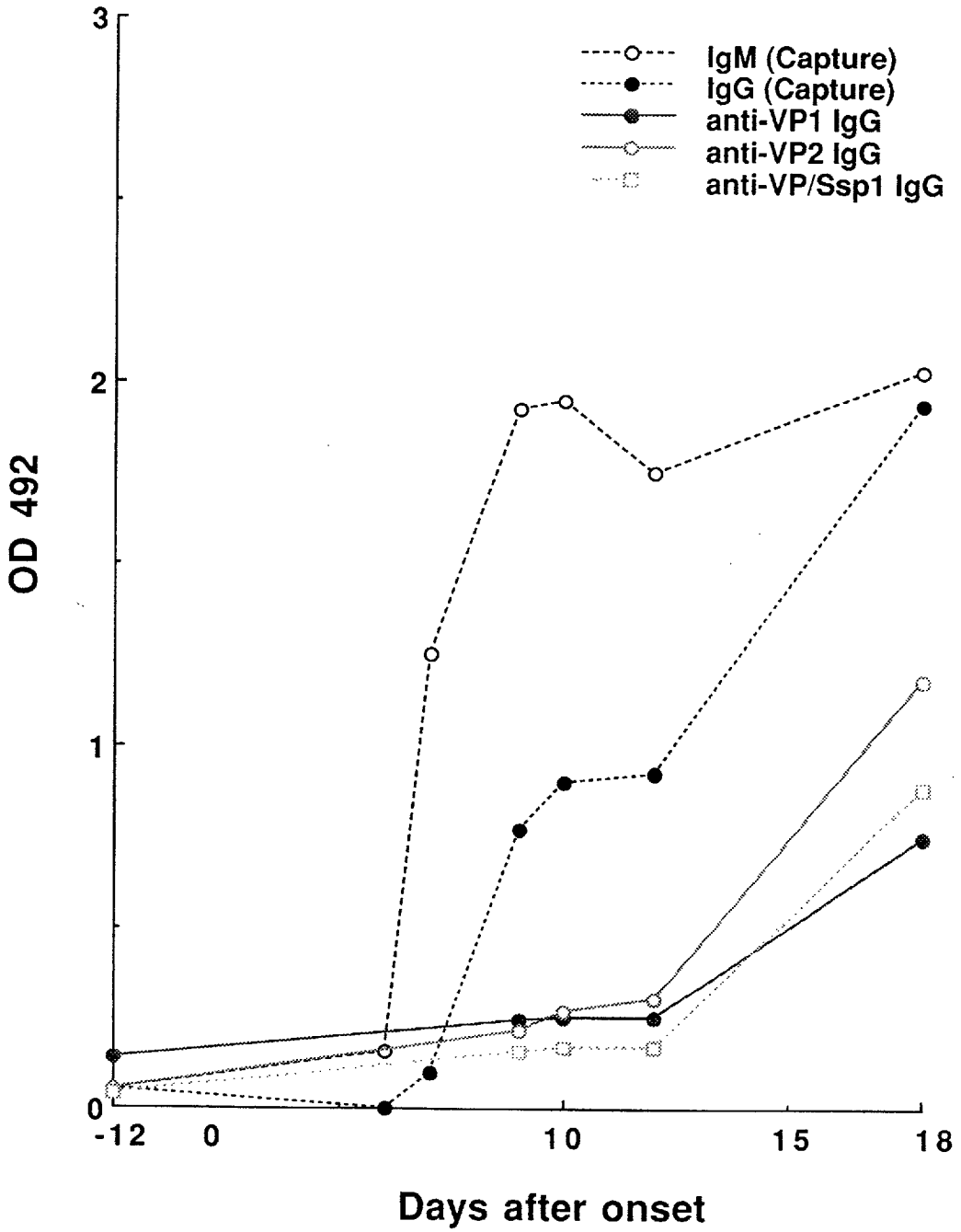
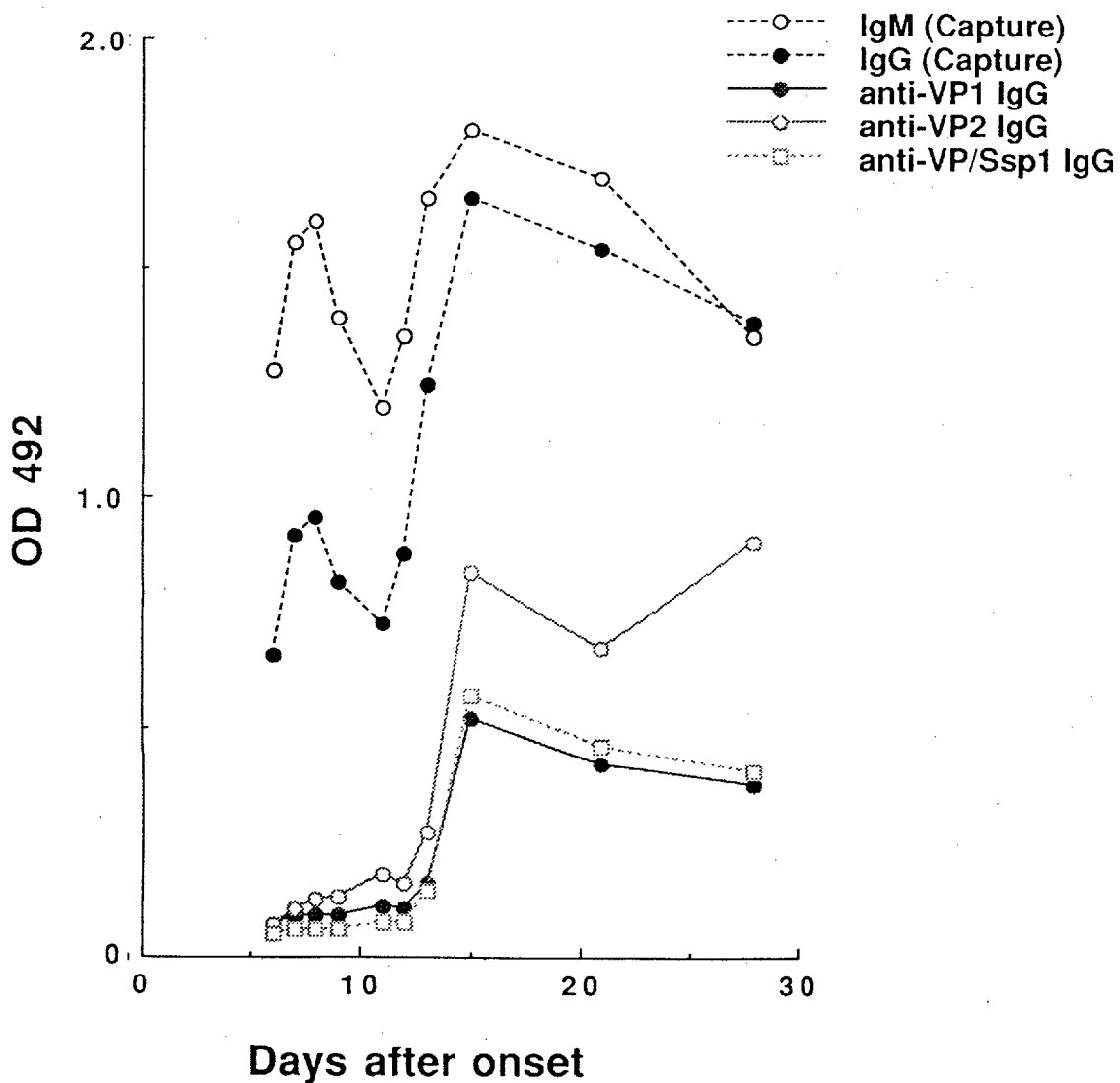
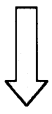


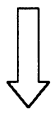
図3 凡血球減少症を呈した26才男性での各種抗原に対する抗体価の変動





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



要約:ヒトパルボウイルス B19(B19 ウイルス)感染の血清診断用抗原として、組換え抗原(ウイルス構造タンパク VP1、VP2 の全部または一部を発現)を用いることを検討してきた。それらの組換え抗原に対する免疫応答は、血漿由来のウイルス粒子抗原に対するそれと同じではない。抗 VP2 抗体は抗 VP1 抗体よりも早期には高く上昇するが、約 6 ヶ月で検出できなくなる。感染後非常に早い時期の抗体上昇は、ウイルス粒子抗原によってのみ検出できた。バキュロウイルス発現系では、ウイルス様粒子を形成することができる。この粒子抗原を用いて伝染性紅斑流行期血清について ELISA を行なったところ、血漿由来のウイルス粒子抗原を用いた場合と結果がよく一致した。西ドイツ IBL 社作製の ELISA キットについて検討した結果、リウマチ因子除去法が不十分であった。