

ヒトパルボウイルスの母児感染

八重樫伸生¹⁾、間宮良子²⁾、中村正孝²⁾、菅村和夫²⁾

要約

ヒトパルボウイルスは伝染性紅斑の原因ウイルスとして知られているが、母体内感染によって非免疫性胎児水腫を惹き起こすことが報告されている。しかしながらこれまでパルボウイルス感染の血清診断は一部の研究室においてのみ可能であったことから、パルボウイルス感染症の全国的な調査はいまだ行われていない。本研究の目的はパルボウイルス血清診断法を確立し、これをもとにパルボウイルス母児感染の実態を明らかにし、非免疫性胎児水腫 (NIHF) とパルボウイルスの因果関係を解明することにある。数年間にわたる研究の結果、(1) ELISA法による血清診断法がほぼ確立したこと、(2) 原因不明NIHFの少なくとも10%がパルボウイルス母児感染によるものと推定されること、(3) 伝染性紅斑の流行とパルボウイルス母児感染によるNIHFの発生に関連性が認められること、(4) パルボウイルス母児感染によるNIHFの90%以上は妊娠15週から27週までのいわゆる妊娠中期に発生すること、などが明らかになってきた。

研究方法

1、ELISA法によるヒトパルボウイルス血清抗体検査

パルボウイルス感染成人の急性期血清中からパルボウイルスDNAを精製し、常法にしたがってウイルスDNAを抽出した。このDNA中からPCR法を用いてVP-1遺伝子を増幅し、VP-1遺伝子を単離した。大腸菌由来グルタチオンSトランスフェラーゼ遺伝子と単離VP-1との融合遺伝子を発現ベクター (pGEX-2T) に組み込み、大腸菌で融合蛋白を産生させた。融合蛋白の精製は、菌体をホモジネートした後、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) にかき、融合蛋白部分をゲルより切り出し蛋白を溶出させる、という方法をとった。精製蛋白を炭酸緩衝液 (PH 9.6) で0.25µg/wellに希釈し、抗原として96穴のELISA用プレートに37℃一晩コーティングした。2%ウシ血清アルブミン (BSA) 加PBSで非特異反応をブロックした後、ヒ

ト血清 (2% BSA 加 PBS で100倍希釈) を37℃1時間反応させた。洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgGまたは同IgM (カッセル社、2% BSA 加 PBS で1000倍希釈) を37℃60分間反応させた。さらに洗浄後オーフェニレンジアミンで発色させ、吸光度 (OD 492 nm) を測定した。

2、ウエスタンブロット法による抗パルボウイルスIgG抗体の検出

上記組み換えVP-1蛋白を抗原とし、SDS-PAGEにかけた後、ニトロセルロース膜に転写し、ヒト血清 (2% BSA 加 PBS で1000倍希釈) と37℃1時間反応させた。洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgG (カッセル社、2% BSA 加 PBS で1000倍希釈) を37℃60分間反応させ、さらに洗浄後ジアミノベンチジン (DAB) で発色させた。

3、PCR法によるパルボウイルス遺伝子の同定方法の確立

1) 東北大学医学部附属病院産婦人科

2) 東北大学医学部細菌学教室

V P-1 遺伝子の5' 端 3708-3727 と 3' 端 3908-3927 のオリゴヌクレオチドをプライマーとし、PCR (polymerase chain reaction) を施行した。PCR は 94°C 1分、55°C 2分、72°C 3分を 25 サイクルとした。増幅した DNA をサザンブロット法に用いて V P-1 遺伝子をプローブとしてパルボウイルス DNA の有無を検出した。パルボウイルス感染者の急性期血清中から精製したパルボウイルス DNA を段階希釈して PCR にかけたところ、一つのチューブ内に 10 コピーのウイルス DNA があれば検出可能であった。

4、非免疫性胎児水腫の母児血清の収集

東北大学産婦人科およびその関連病院 53 施設の協力を得て、1987年8月より、妊娠中に超音波断層法で非免疫性胎児水腫 (N I H F) と診断された症例の母児の血清を収集した。N I H F の診断は胎児腹水、胎児胸水、胎児皮下浮腫のうちの一ないしそれ以上が存在することとした。原則として母体血清は N I H F と診断された当日またはその後数日以内に採取され、一方、胎児血は出産後の臍帯血より採取された。パルボウイルス胎児感染以外に N I H F の明らかな原因が存在する例、例えば児の染色体異常が確認された例、心奇形が存在すると診断された例、多発奇形がある例、胎盤や臍帯の異常がある例などは除外された。最終的に 44 例 (母体血清は全例より収集、児血清は 24 例から収集) が検討された。

結果

1、E L I S A 法の確立

正常成人 391 名の血清を宮城献血センターの協力で収集し、上記の E L I S A 法で検査した。I g M を検出する系 (I g M-E L I S A) では 2 名を除き全例が吸光度 0.05 以下の値であった (図 1)。そこで 0.05 をカットオフ値として設定し、それ以上のものを陽性とした。成人感染で経時的に採血した血清では発症後 3 から 6 カ月まで陽性であった。I g G を検出する系 (I g G-E L I S A) では図 2 のように値がばらついたため、平均値 + 3 S D (標準偏差) をはずれた標本を除外し、残ったもので再度平均値 + 3 S D (標準偏差) を計算してそれをはずれた症例を除外した。この操作を除外されるものがなくなるまで繰り返す、そのときの平均値 + 3 S D (標準偏差) をカットオフ値として設定した。

その結果カットオフ値は 0.08 に設定され、382 例中 94 例 (25%) が陽性と判定された。次にこの E L I S A の特異性を確認するため、同じ血清をウエスタンブロット法にかけ、抗パルボウイルス I g G 抗体の陽性陰性を判定した。ウエスタンブロットの結果と E L I S A による抗体価 (吸光度) とを比較すると、吸光度 0.05 未満では全例がウエスタンブロット法でも陰性であり、逆に吸光度 0.08 以上では全例がウエスタンブロット法でも陽性であった。しかし吸光度が 0.05 から 0.08 の間を示した標本ではウエスタンブロット法の結果が一定ではなかった (表 1)。そこで、I g G-E L I S A ではカットオフ値 0.08 以上の場合陽性と判定する、0.08 から 0.05 の場合には疑陽性として判定保留しウエスタンブロット法の結果により最終的に判定する、0.05 以下の場合には陰性と判定する、という基準を設けた。

2、胎児水腫症例の検討

原因不明の非免疫性胎児水腫 (N I H F) の母体血清 44 例、胎児血清 24 例を E L I S A 法にかけ、抗パルボウイルス I g G 抗体、I g M 抗体の検出を行った。I g G は母体で 15 例陽性 (34%)、胎児で 9 例 (38%) 陽性であった。母体血清中の I g G 陽性率は以前にわれわれが報告した一般妊婦の陽性率 (八重樫 他、日産婦誌 1990) と有意差は認められなかった。I g M 抗体は母体血清で 5 例 (11%) に陽性を認めた。そのうち 3 例では胎児血も採取されたが 3 例とも I g M 抗体は陰性で、I g G 抗体のみ陽性であった。このうち 1 例で胎児血の PCR 反応でパルボウイルス DNA が陽性であった。PCR 反応は採集された全血清で行われたが、上記の一例を除き全例が陰性であった。

3、パルボウイルス感染による N I H F の発生と伝染性紅斑の流行との関連性の検討

宮城県内の伝染性紅斑の患者数の推移を宮城県感染症サーベイランスの資料を元に図 3 に示した。1986年暮れから 1987年夏頃まで伝染性紅斑の大流行があった後、1989年秋までは比較的沈静化しており、1989年秋から 1992年夏頃まで中規模の流行があったことがわかる。今回検討した N I H F の 44 例をその発生時期で検討すると、パルボウイルス感染がその原因とされた 5 例中 4 例が伝染性紅斑の

流行期に一致して発生したことがわかった。

4、パルボウイルス母体感染による胎児水腫発生時期の検討

これまで文献上臨床経過の詳細が報告された49例と自験例5例をNIHF発生週数で分類して検討した(図4)。発生時期は15週から27週のいわゆる妊娠中期に集中しており、この時期で全体の91%(54例中49例)を占めていた。

考察

1、今回のELISA法による血清診断法は、ウエスタンブロット法との対比により特異性が高い点、抗原として大腸菌に発現させた融合蛋白を簡易精製して用いているため、抗原を比較的安価に簡単にしかも大量に作る事が可能である点、ELISA法であるため大量の検体スクリーニングに適している点、などの利点を有し、パルボウイルスの血清診断法として全国的な調査に使用していくことが現実的に可能であろうと考えている。

2、胎児水腫の母児血清の検討から以下のことが明らかになってきた。(1)伝染性紅斑の流行期にはパルボウイルスの母児感染によるNIHFの発生が増加する危険性が示された。(2)パルボウイルスによるNIHFは妊娠15週から27週のいわゆる妊娠中期に発生することが多く、この時期は胎児造血能が最も盛んな時期に相当し、われわれが以前行った試験管内での感染実験の結果(Yaegashi N. et al, J. Virol. 1989)に一致していた。

3、原因不明の胎児水腫の11%はパルボウイルス感染によるものと推定された。しかしこの割合は今回検討しなかった胎児組織や胎盤組織中のパルボウイルスDNAや抗原の検索をすることによりさらに上昇するのではないかと推測される。(4)母児感染がおこっても胎児側のIgM抗体は陰性の場合が多く、従来の報告と一致していた。

発表論文

1. Yaegashi N., Okamura K., Yajima A., Murai C., Sugamura K. The frequency of human parvovirus B19 infection in nonimmune hydrops fetalis. J. Perinatal Med in press.

2. 八重樫 伸生、矢嶋 聡. パルボウイルス感染と胎児異常. 産婦人科の実際.

42, 695-699, 1993.

表1 IgG-ELISA法による抗体価とウエスタンブロット法による抗体陽性率の比較

ELISA法による抗体価(吸光度)	ウエスタンブロット法による抗体陽性率
~0.04	0% (0/20)
0.05	11% (1/9)
0.06	67% (4/6)
0.07	88% (15/17)
0.08~	100% (21/21)

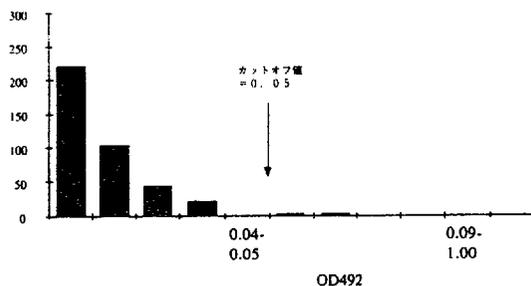


図1 抗パルボウイルスIgM-ELISA法

カットオフ値を0.05に設定すると献血者391人中2例(0.5%)が陽性

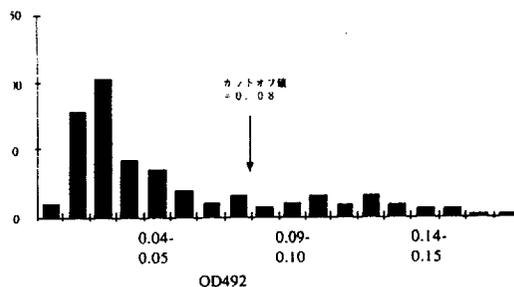


図2 抗パルボウイルスIgG-ELISA法

カットオフ値を0.08に設定すると献血者382人中94例(25%)が陽性

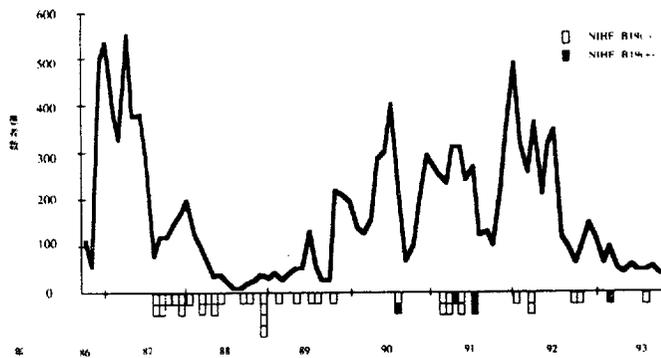


図3 伝染性紅斑の流行と胎児水腫 (1986-1993)

各月毎の患者発生数は宮城県内感染情報(宮城県医師会報)を参考にした

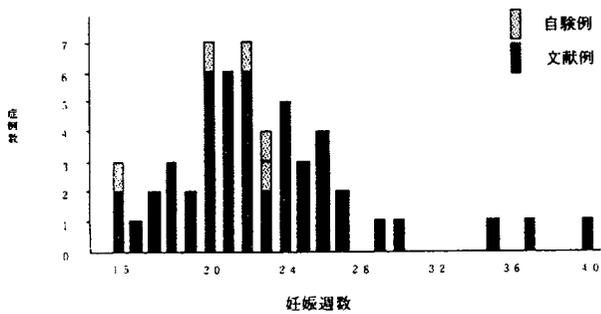


図4 パルボウイルスの母体内感染による胎児水腫症例の発生週数の検討



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は伝染性紅斑の原因ウイルスとして知られているが、母体内感染によって非免疫性胎児水腫を惹き起こすことが報告されている。しかしながらこれまでパルボウイルス感染の血清診断は一部の研究室においてのみ可能であったことから、パルボウイルス感染症の全国的な調査はいまだ行われていない。本研究の目的はパルボウイルス 1 血清診断法を確立し、これをもとにパルボウイルス母児感染の実態を明らかにし、非免疫性胎児水腫(NIHF)とパルボウイルスの因果関係を解明することにある。数年間にわたる研究の結果、(1)ELISA 法による血清診断法がほぼ確立したこと、(2)原因不明 NIHF の少なくとも 10%がパルボウイルス母児感染によるものと推定されること、(3)伝染性紅斑の流行とパルボウイルス母児感染による NIHF の発生に関連性が認められること、(4)パルボウイルス母児感染による NIHF の 90%以上は妊娠 15 週から 27 週までのいわゆる妊娠中期に発生化すること、などが明らかになってきた。