

資料 2

研究計画・方法

どのくらいの期間でどこまで実施するか、また得られた結果をいつまでにどのような方法で公開するのか具体的に記入してください。希望する風疹パネル、必要量についてはその理由を明確に記載してください。

研究活動の状況

風疹パネル血清を使用して行う実験の社会的、学術的意義、同様の研究との比較、血清の提供を受けられなかった場合と提供を受けた場合の実験計画への影響について具体的に記載してください。

資料 2

倫理面への配慮（他の倫理委員会へ提出した書類のコピーでも結構です）

倫理委員会への提出状況：

1. 申請中（申請日 年 月 日）
2. 承認済（承認日 年 月 日）
（承認倫理委員会名； ）
（提出番号； ）
3. 未申請の場合はその理由と根拠を示してください。

資料2

風疹パネル血清運営委員会 記載欄 委員名()
(採用 ・ 不採用) (いずれかに○をつけてください)

委員コメント:

資料 3

背景

体外診断用医薬品の依頼検査について、公衆衛生上特に重要な体外診断用医薬品（HIV, HTLV-1, HBV, HCV, HAV, クラミジア、風疹、梅毒、血液型判定）の「規格および試験方法」の適否を承認前検査として国立感染症研究所でおこなっている（医薬審発第 0611007 号）。このため感染研では検査のために我が国で流行するウィルス型を反映する血清パネルを常備管理することが求められている。

目的

日本赤十字社医療センターに協力をいただき、我が国で流行するウィルス型を反映する血清パネルを整備し感染研での依頼検査に使用するとともに、体外診断用の品質管理に役立てる。

使用(案)

- ① 感染研承認前検査に使用する。
- ② 日本赤十字社医療センターで使用する。
- ③ 製造業者での事故点検 ④検査会社における技術管理

整備するパネル(案)

- ① HIV 抗体・抗原血清パネル clade C B etc (100 検体)
- ② HBs 抗原血清パネル (30 検体)
- ③ HCV 抗原血清パネル (30 検体)
- ④ HBV 遺伝子型パネル B, C, A (30 検体)
- ⑤ HCV 遺伝子型パネル 1b, 2a, 2b (30 検体) に必要な血液検体

血清パネル整備の手順(案)

200ml 血液（あるいは 100ml 血液）を感染研にて評価、分注、整備。

Boston Biomedica Inc. (BBI)に準じて資料を作製する（標準品整備に関わる予算は厚生労働省審査管理課により支援される）。

保管管理(案)

感染研で保管管理を行う。運営は委員会形式とし、感染研、日本赤十字社医療センター、厚生労働省審査管理課、地研等その他関係団体により構成される。

風疹パネル血清の評価

分担研究者 海野幸子¹、庵原俊昭²、浅野喜造³、岡田賢司⁴、

協力研究者 堀内善信¹、大槻紀之¹、免疫部¹、田代真人¹

¹ 国立感染症研究所、² 国立病院機構三重病院

³ 藤田保健衛生大学医学部小児科学、

⁴ 国立病院機構福岡病院

研究要旨

88 検体の風疹パネル血清候補の抗体価を HI 法、EIA 法により評価した。3 検体が抗体陰性で、11 検体が HI 抗体陽性だが EIA-IgG 抗体陰性となり、74 検体が両者陽性であった。ワクチン接種群 42 検体の平均 HI 抗体価は $2^{5.4}$ となり、罹患歴のある 22 検体の $2^{6.1}$ に比べ低かった。1.2 倍希釈で測定した HI 抗体価と EIA によって得られた IU は、良く相関し、1 次式で両者の関係を表すことが出来、両抗体価の変換が相互に可能であると考えられた。これら検体は EIA キットの評価に使用できる抗体を有していた。

A. 研究目的

妊婦が妊娠初期に風疹に感染すると出生児が先天性風疹症候群（CRS）となる危険性があることから、実験室検査による風疹の確定診断は主として妊婦を対象に行われている。一方、多くの小児の風疹感染は臨床症状によって診断されているが、今後ワクチン接種により風疹の発生が大幅に抑制される時には、実験室検査によって確定された正確な風疹患者数の把握が、サーベイランスには重要となる。実験室検査法には、風疹に対する HI 抗体や IgM 抗体あるいは IgG 抗体の

検出による方法があり、そのための体外診断薬には高い特異性と感度が要求される。また、同時に検査施設における精度管理も正確な診断を導くために重要である。診断薬の品質管理や技術の精度管理を行うためには、あらかじめ抗体価が十分に評価された標準血清やパネル血清が必要である。そのために収集された血清の抗体価の評価を行うことが本研究の目的である。

B. 研究方法

血清は全てインフォームドコンセ

ントにより使用目的が了承されて採取されたものである。血清取り扱い上の安全性を確認した 88 検体の抗体価を測定した。HI 抗体は感染症研究所による流行予測調査の術式を用いて 2 倍階段希釈および 1.2 倍希釈を行って測定した。IgG 及び IgM 抗体はデンカ生研の EIA キットを用いて測定した。IgG 抗体については、インデックス値、EIA 価（デンカ生研の EIA の検量線作成用コントロール血清を使用）、IU を 3 回の測定結果から平均値として算出した。また、国内標準品との相対抗体価（IU/ml）を平行線定量法によって測定した。

C. 研究結果

1. 88 検体の 98%が女性から採取された血清でその平均年齢は 21 歳であった。88 検体の血清を 0.2ml/バイアルに分注し、 -80°C の超低温槽に保管した。検体によって 48-89 本の分注数となった。

2. 検体は全て EIA による IgM 抗体が陰性だった。3 検体は HI 及び EIA-IgG 両抗体陰性となり、その内 1 例はワクチン接種ありとアンケートに回答されていた。HI 抗体が低値（ 2^{3-5} ）で EIA-IgG が陰性だった 11 検体に、ワクチン接種歴が有る 8 例が含まれていた。HI 及び EIA-IgG 抗体陽性の 74 検体のうち、罹患歴あるいは

ワクチン接種歴がある例が半数以上（48 例）を占めたが、罹患及びワクチン接種歴がないと回答した 2 例も含まれていた。

3. HI 抗体価の測定は他所への委託を含めて 3 回測定したが、試験毎に 2 倍の振れが観察されたため、平均値を算出しなかった。アンケートに記載された罹患年齢およびワクチン接種年齢の別で保有 HI 抗体価を比較した。罹患年齢は 2-9 歳で、その 22 検体の平均 HI 価は $2^{6.1}$ となり、ワクチン接種歴ありの 42 検体の平均抗体価 $2^{5.4}$ に比べ幾分高かった。更に、ワクチン接種年齢を 0-6 歳（10 検体）、12-15 歳（27 検体）、19-21 歳（5 検体）の 3 群に分けて平均抗体価を比較すると、それぞれ $2^{4.9}$ 、 $2^{5.7}$ 、 $2^{4.5}$ となった。HI 抗体の陽性率は 96.6%となり、罹患歴およびワクチン接種歴に関わらず HI 抗体陽性の 85 検体の平均抗体価は $2^{5.6}$ であった。

4. EIA による抗体価と HI 抗体価の相関性を調べると、EIA-IgG インデックス値、EIA 価、IU のいずれの抗体価もこれまでと同様に 2 倍希釈の HI 価に対し広く分布した。HI 価に対し低いあるいは高い EIA 抗体価を示すのは検体に含まれる抗体の性質の違いによるものかどうかを確認するために HI 価を 1.2 倍希釈で測定し、EIA による抗体価との相関性を更に調べ

た。IU は EIA 価からデンカ生研の内部資料である WHO 国際標準品と EIA 価との検量線を用いて求めた。IU は HI 価に対し 2 倍希釈で測定した場合よりも狭く一定の幅に収まるように分布した。その時の相関係数は 0.9 となった (図 1)。更に、平行線定量法によって求めた IU で同様な解析を進めている (図 2)。

D. 考察

抗体価の傾向からアンケートの回答の一部は信頼性があると推測された。風疹の流行予測調査で観察されている傾向と同様に、ワクチン接種群の抗体は、接種年齢に関わらず罹患群に比べ低い傾向が認められた。HI 抗体陽性で EIA 抗体陰性の検体にワクチン接種群が多いことにもその傾向が現れていると考えられた。また、EIA において抗原に反応性を示す抗体の減衰が HI 抗体よりも早いために HI 価との矛盾をうむ原因となっている可能性も考えられた。しかし、総じて検体の HI 価は EIA による抗体価と高い相関性を示した (図 1)。この結果から IU と HI 価の関係を 1 次式 ($\log IU/ml = 0.105 + 0.234 \times \log_2 HI$ (1.2 倍希釈)) で表示できることが示された。この式を用いて HI 価から IU へ或いはその逆の変換が可能になるだろう。HI 法から EIA 法へ、更に IU 表示へ

の足がかりとなると思われた。一次式については平行線定量法による結果と合わせて最終的な検討が必要である。また、HI 価と IU の相関範囲から外れて分布する検体はパネル血清の組みあわせには用いない方がよいと考えた。

E. 結論

今回得られた検体は、感染後あるいはワクチン接種後長期間を経過した血清であるため、EIA 法による診断薬の HI 価と IU との相関性を調べるために使用することができる。そのために少なくとも異なる検体 60 本を最終的に選んでパネルを構成することにする。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

該当する事項なし

図 1

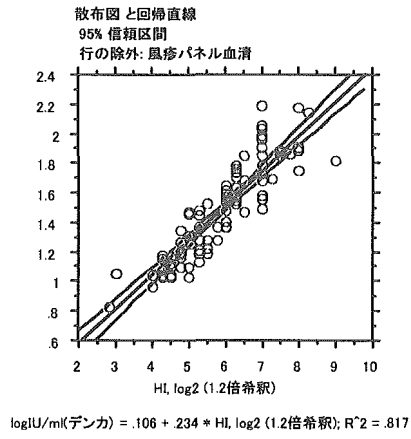
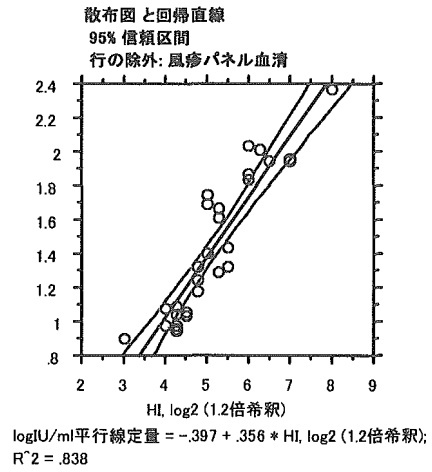


図 2



厚生労働科学研究費補助金
医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業
「体外診断薬に関する標準品に関する研究」班
分担研究報告書

閉鎖集団における風しんワクチン接種後 3 2 年間の風しん抗体価追跡調査と
ワクチン再接種後の抗体反応に関する研究

分担研究者 岡田賢司 (国立病院機構福岡病院小児科)
研究協力者 植田浩司 (西南女学院大学)
旭 隆宏 (国立病院機構別府医療センター)
西間三馨 (国立病院機構福岡病院)

研究要旨

風しんワクチン接種により獲得された HI 抗体価の推移を自然感染による追加免疫効果がきわめて少ない閉鎖集団において観察した。接種 23 年後には 8.3%、32 年後では 23.1% の接種者の HI 抗体価が陰性となっていた。風しんワクチン 2 回目接種により抗体価が再上昇することが確認できたが、二次応答で上昇した抗体価は比較的早く減衰していく可能性が示唆された。

A. 研究目的

風しんワクチンの最大の目的は、先天性風しん症候群 (congenital rubella syndrome : CRS) の予防である。ワクチン接種による免疫が妊娠可能年齢まで存続することが期待されているが、これまでの抗体持続の報告は野生の風しんウイルスが流行している環境における観察である。近年風しん流行規模が小さくなり、自然感染による追加免疫が期待できない状況となってきた。自然感染がきわめて少ない閉鎖集団で過去に接種された風しんワクチン接種後の長期の免疫持続を調査することは、ワクチン接種のみで獲得した抗体の持続が解析できる。さらに一部の対象者には風しんワクチン再接種を行っている。再接種後の

抗体価の推移をみることで、2006 年 4 月から開始される麻しん・風しん混合ワクチンの 2 回接種法の有用性も検討できる。

B. 研究方法

(1) 対象

国立病院機構福岡病院重症心身障害児・者病棟において、1972 年に風しんワクチン松葉株の接種を受けた、当時 3~16 歳 (平均 9.5 歳) の入院児。ワクチン接種後 7 年、12 年、15 年、19 年、23 年目に抗体価が測定され、今回 32 年目で抗体測定を行った。感染やワクチン再接種のなかった 13 名を 1 回接種群、接種後 24 年目で風しんワクチン再接種を行い今回検査ができた 6 名を 2 回接種群とした。

(2) 血清抗体価

風しん抗体価は、これまでの抗体価測定と同様に赤血球凝集抑制(hemagglutination inhibition : HI)試験により測定した。

(倫理面への配慮)

採血および風しん抗体価測定は、事前に保護者に文章で同意が得られた患者のみを対象とした。

C. 研究結果

32年目まで観察できた1回接種群の風しんワクチン松葉株接種後の抗体価の推移を示す。接種後、風しん HI 抗体価は全例陽転し5~8か月後には32倍~256倍に分布し、幾何平均値は $2^{6.3}$ であった。その後HI抗体価は徐々に下降し、7年後に $2^{5.2}$ 12年後 $2^{4.1}$ 15年後 $2^{3.5}$ 19年後 $2^{3.9}$ 23年後 $2^{3.1}$ となり、32年後の今回は $2^{2.8}$ となっていた。12年後にはHI抗体陰性例(8倍未満)が認められるようになり、23年後には8.3%、接種後32年目では23.1%がHI抗体陰性となっていた。

1996年に保護者の同意が得られた43例に風しんワクチン松葉株の2回目接種が行われた(1回目接種から24年目)。当時、2回目接種前HI抗体価が8倍未満および8倍の全例(26例)、HI抗体価16倍の7例中5例(71.4%)は再接種により4倍以上の有意な抗体価上昇が認められた。接種前HI抗体価32倍以上の10例は再接種で有意な抗体上昇は認められなかった。2回目接種により上昇したHI抗体価は、6か月後には10例中5例(50%)が4倍以上の有意の下降を示したが、陰性化した例は認められな

かったと報告されている1)。

今回、この2回目接種群の中で32年目まで観察できた6例の抗体価を検討した。この群の1回目接種後の幾何平均抗体価は7年後 $2^{5.1}$ 12年後 $2^{4.5}$ 15年後 $2^{4.1}$ 19年後 $2^{4.0}$ 23年後 $2^{3.0}$ と再接種しなかった群と差がなかった。24年目の時点で2回目接種を受けた。2回目接種半年後に $2^{5.0}$ と上昇したが、その2年後には $2^{3.1}$ 8年後は $2^{4.0}$ となっていた。追加接種2年後では6例中3例が有意な抗体価の低下がみられ、1例は検出感度以下となっていた。8年後は4倍以上抗体価が低下した症例はなく、陰性化した症例も認められなかった。

D. 考察

風しんワクチン松葉株接種により獲得されたHI抗体に関して、自然感染刺激のきわめて少ない閉鎖集団において32年間の推移を検討した。接種12年後には検出感度以下の症例が認められるようになり、23年後には8.3%、接種後32年目では23.1%がHI抗体陰性となっていた。風しんワクチン松葉株2回目接種により抗体価が再上昇することが確認できたが、二次応答で上昇した抗体価は初回接種後の抗体価減衰より、比較的早く減衰していく可能性があった。

ワクチン再接種により上昇した抗体の持続に関しては、いくつかの報告がある2), 3)。Balfour は、再接種により上昇した抗体価はその後10週間は持続したと報告している。Serdula らは、再接種後24~27か月の観察期間で15例中6例が4倍以上の抗体価の低下がみられたと報告している。本研究の再接種群では、再接種6か月後では6例中3例の抗体価が4倍以上低下していたが、8年後にはさ

らに低下した症例は認められなかった。再接種により二次応答した抗体価は早期に上昇するが、減衰も一次応答に比較して早い可能性が考えられた。

今後、風しんの “elimination” をめざして、麻しん・風しん混合(MR)ワクチンとして就学前1年の幼児に2回目が接種されようとしている。流行規模が小さくなった場合、風しんワクチン接種のみで獲得した抗体価の長期持続の調査の必要性は高まっている。このようなコホート集団での長期的な追跡調査は今後の予防接種施策を考慮する上での貴重な資料となると考えられる。

参考文献

- 1) Asahi T, Ueda K, Hidaka Y, et al : Twenty-three-year follow-up study of rubella antibodies after immunization in a closed population, and serological response to revaccination. *Vaccine*. 1997. 15(16) : 1791-1795
- 2) Balfour HH Jr. Rubella reimmunization now. *AJDC*. 1979. 133 : 1231-1233,

- 3) Serdula MK, Halstead SB, Wiebenga NH et al : Serological response to rubella revaccination. *JAMA*. 1984 251: 1974-1977

E. 結論

風しんワクチン接種により獲得された HI 抗体価は自然感染による追加免疫がなければ接種後 32 年目では 23.1% が HI 抗体陰性となっていた。風しんワクチン 2 回目接種により抗体価が再上昇することが確認できたが、二次応答で上昇した抗体価は比較的早く減衰していく可能性があった。

F. 健康危険情報

現在、2 歳以上で風しんワクチン未接種児は 2006 年 3 月末までに接種を完了しておかないと定期接種としてのワクチン接種ができなくなる。広く啓発していく必要がある。

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

とくに出願・登録は行っていない

妊娠中の風疹再感染における血清抗体の変化に関する研究

分担研究者 池田智明 国立循環器病センター周産期科 部長

研究要旨

妊娠前に風疹抗体を有している6例の妊婦において、風疹 HI 抗体価の上昇から妊娠中の再感染が疑われた6症例を免疫学的に検討した。IgM が陽転したのは2例のみであり、IgG avidity index も全て70%以上であった。1例に先天性風疹症候群(CRS)の児が出生した。再感染例において、血清学的検査のみでは児の予後予測の判定は難しいことが示唆された。

宮崎大学医学部附属病院周産母子センター
金子政時、古田 賢、鮫島浩、池ノ上克
愛泉会日南病院疾病制御研究所
楠元和美、峰松俊夫
国立循環器病センター周産期科
池田智明

研究目的

我国において、1976年に風疹ワクチンが導入され、その普及に伴い全国的な風疹の流行はみられなくなった。しかしながら、依然として地域における小流行は発生し、先天性風疹症候群（CRS）の症例も毎年数例ながら報告されている。また、近年の大規模な流行の消失は、ワクチン接種後のブースター効果をなくし、その結果妊娠可能な年齢層における低抗体価保有者の増加につながっていることが懸念されている。このような状況下で、風疹再感染後の CRS の発生も報告されてきているが、その母体の臨床像は不明な点も多い。そこで今回、風疹ワクチン接種既往のある妊婦における風疹

再感染後の臨床所見、血清抗体の反応および風疹 IgG avidity index (A.I.) について検討した。

対象および方法

対象は、2004年に徳之島の1産科施設で取り扱った妊婦のうち、前回妊娠時に風疹抗体を保有していることが確認され、今回の妊娠で風疹 HI 抗体価が1024倍以上の上昇を認めた妊婦6人とした。これら妊婦の疫学的背景を妊婦との面接および診療録から調査した。さらに風疹特異的 IgG と IgM の感染後の反応および風疹 IgG A.I. について検討した。風疹特異的 IgG および IgM は、BML 社の酵素抗体法 (EIA; enzyme-linked immunosorbent assay) にて測定した。IgG は、抗体指数にて2.0未満を陰性、2.0~3.9を偽陽性、4.0以上を陽性と判断した。IgM は、同じく抗体指数で0.8未満を陰性、0.8~1.2を偽陽性、1.21以上を陽性と判断した。風疹 IgG A.I. は、エンザイグノストルベラ/IgG キットを用いて測定した。具体的

には、まず2つのELISAプレート上の固相抗原に被検血清を反応させた。次にそれぞれのELISAプレートを、ひとつはPBS-Tween液で他方は8M尿素を含んだPBS-Tween液で3分間2回洗浄した。再度、それぞれのプレートをPBS-Tween液で3分間洗浄した後は、添付マニュアルに従って反応させた。反応終了後に波長450nmで各プレートのウェルの吸光度を測定した。A.I.(%)は、8M尿素添加PBS-Tween液で洗浄したウェルの吸光度を尿素無添加のPBS-Tween液で洗浄したウェルの吸光度で除して求めた。

また、分娩時の臍帯血を用いて風疹特異的IgM測定およびRT-nested PCRを用いて風疹ウイルスRNAの検出を行った。

結果

6人の妊婦は、1968年から1979年に出生していた。6人中4人にワクチン接種歴があり、残り2人は不明であった。6人中1人に、発疹が妊娠13週に出現していた。6人中4人は家族内に風疹患者(内1人は夫)がいた。他の2人は家族内に発症者はいなかったが、その内1人の職業は看護師であり、風疹患者と接触する機会があった。

前回妊娠時(2000年~2002年)の風疹HI抗体価は、16倍~64倍の間であった。初回検査2~10週後に再検した風疹HI抗体価は、512倍~4096倍であった。妊娠13週に発疹を認めた症例では、風疹HI抗体価は、妊娠13週に256倍で、その後妊娠15週に再検した時には、4096倍とさらに高値を示した。

母体風疹特異的IgG抗体は、風疹HI抗体価測定後2週間以上経過した時点で測定

した結果、全例128倍以上の強陽性であった。また、母体風疹特異的IgM抗体は、2例が陽性(症例2, 3)であった。このうち1人のIgMの上昇の程度は軽く初回検査時は偽陽性で、さらに1週間後の検査でも1.13程度までしか上昇しなかった。A.I.は、測定した妊娠週数はそれぞれの妊婦で異なるが全例70%以上であった。

6例中2例(症例2, 3)において羊水中から風疹ウイルスゲノムが検出された。症例2においては、臍帯血風疹特異的IgM陽性で、臍帯血および新生児尿から風疹ウイルスゲノムを検出しCRSと診断した。

考察

今回の検討では、ワクチン接種既往のある妊婦の自然感染では、HIおよびIgGは著明な高値を示したが、IgMは2例が陽性で、そのうち1例が高値を示したのみであった。風疹再感染後の抗体価の推移を捉えることは、不顕性感染が多いことから困難な場合が多い。Asahiらは、風疹HI抗体価の低いグループでは、再ワクチン接種にてHI抗体価の著明な上昇とequivocalなIgMの反応を観察している¹⁾。自然感染とワクチンという違いがあるものの抗体の反応は、今回の我々の経験した症例と同じような反応を示していた。

一般に再感染時は血中抗体価の急激な上昇によってウイルス血症が生じないためCRSの発生の危険は極めて低いと考えられている²⁾。一方Horstmannらは、風疹流行時において自然感染後の再感染率は3.4%であるのに対して、ワクチン接種後の再感染が80%と高率となり、さらにウイルス分離がなされる例も存在することを報告し、ワ

クチンによって産生される抗体の質および量が再感染を防ぐことに悲観的であることを示唆している 3)。

CRS の発生の予測という点では、再感染においても IgM が陽性であればその可能性が高くなるように思われた。しかしながら、CRS の発生した症例では、初回の IgM 値は偽陽性程度の応答であった。このような症例では、IgM の再検を行い、さらなる上昇があればウイルスゲノムの検索の必要性があるのかもしれない。

風疹再感染妊婦の取り扱いに関して、明らかな指針は示されていない。しかしながら、風疹はワクチンによって防ぐことが可能な感染症である。ワクチンの 2 回接種の導入あるいは風疹低抗体価妊婦における分娩後のワクチン接種の推奨等で予防ができるものと思われる。

参考文献

1. Asahi T, Ueda K, Hidaka Y, et al. Twenty-three-year follow-up study of rubella antibodies after immunization in a closed population, and serological response to revaccination. *Vaccine* 15 (6), 1791, 1997.
2. Davis WJ, Larson HE, Simsarian JP, et al. A study of rubella immunity and resistance to infection. *J.A.M.A.* 215: 600. 1971.
3. Horstmann DM, Liebhaber H, LeBouvier G, et al. Rubella: Reinfection of vaccinated and naturally immune persons exposed in an epidemic. *New Engl J Med*, 283: 771, 1970.

風疹IgM抗体陽性妊婦のAvidity Indexによる管理

分担研究者 川名 尚 帝京大学医学部附属溝口病院産婦人科客員教授

研究要旨

風疹HI抗体256倍以上の妊婦についてIgM抗体を測定することがすすめられているが、IgM抗体が陽性の場合には風疹ウイルスの暴露のリスクを疫学的によく検討すると共にAvidity Indexを参考にして感染時期の推定がすすめられる。Avidity Indexが60%以上であれば3~6ヶ月以上前の感染と考えたい。

A. 研究目的

厚生労働省の風疹流行にともなう母児感染の予防対策構築に関する研究班の指針では、妊婦の風疹HI抗体価が256倍以上ある場合はIgM抗体が感染後の3~6ヶ月位続き、その後陰転化するという従来からの考えによりIgM抗体を測定し感染の時期を推定して妊婦の指導を行うことがすすめられている。しかし、IgM抗体は必ずしも3~6ヶ月以内に陰転化するとは限らないので別の検査法による判断の目安が求められてきた。そこで、我々はIgG抗体のAvidity Index測定法を開発し、IgMの値とAvidity Indexを組み合わせて評価する方法を昨年の当研究班で発表した。そのマネージメントの正当性を臨床例を集めて評価することを本年度の目的とした。

B. 研究方法

2000~2005年の間に風疹HI抗体が高くIgM抗体が陽性であるため帝京大学医学部附属溝口病院産婦人科に紹介された32例41検体を対象とした。2003年以前は年間2~3例であったが、2004~2005年では1年間に10例の紹介症例があった。紹介患者については当科で改めてIgG抗体、IgM抗体、IgG抗体のAIを測定した。デンカ生研製ルベラIgG(II)-EIA「生研」、ルベラIgM(II)-EIA「生研」を用いた。

AIは予め被検血清を吸光度1.0~1.5になるように希釈したものをを用い、抗原抗体反応をさせた後に8M尿素処理15分作用させたものとさせない対照について通常のように酵素反応を行いOD値を測った。8M尿素処理のOD値を対照のOD値で除し100をかけて%表示したものをAIとした。

C. 研究結果

1. IgM抗体値の分布

紹介された32例のうちでIgM抗体が陽性または判定保留の検体は19例であった。17例は3.0以下であったが、2例は7.0以上の高値であった。

2. IgM値異常高値の1例

33才の1回経産婦。妊娠13週でHI256倍あり、IgM抗体を測定した所9.09と異常高値であり紹介された。この妊婦は風疹を思わせる症状はなかった。また、夫・子供にも異常はなかった。ただ、子供の送迎で幼稚園に行っていたがそこで流行があったかも知れないとの情報であった。2週間おいた2回の検体でIgM抗体は11.1以上といずれも高かったが、AIは94.1%、85%と高値を示した。以上から初感染は否定的であったが両親の強い希望により中絶した。両親の許可を得て羊水と胎児血について国立感染研海野幸子氏、加藤宏幸氏に依頼してPCRで風疹遺伝子の検査を行ったがいずれも陰性であった。更に2ヶ月後に母体

血について再検した所、IgM 値はやはり 11.1 以上と高く AI も 88% で高かった。IgM 値は非特異反応かもしれないと考え、リウマチ因子を調べたが陰性であった。

3. AI 値の分布

41 検体のうち AI が 60% 以上のものが 35 検体 (85%) で 6 検体が 60% 以下であった。この 6 例のうち、2 例は 59.2、59.4% とほぼ 60% に近く、2 検体は同一患者で 51.9% と 50.3%、1 例は 44% であったが IgM 値 0.11 であった。残る 1 例は AI が 44.4%、IgM 1.77 であった。

4. IgM 抗体陽性だが AI が高いため妊娠継続した症例の予後

7 例のうち 4 例について出生した児について検討した。IgM 抗体はすべて陰性、児体重も正常範囲、CRS を疑わせる症状はなかった。

D. 考察

妊娠中に風疹の症状はないが風疹 HI 抗体 256 倍以上の妊婦について IgM 抗体を測定することにした指針に従って測定された IgM 抗体の評価を AI を用いて行った。

IgM 抗体陽性検体のうち 85% は AI が 60% と高く、恐らく 3~6 ヶ月以上前の感染ではないかと考えられた。そのほとんどは IgM 値 3.0 以下であった。以上より IgM 抗体陽性のみで数ヶ月以内の初感染とすることは問題で AI も併用することがすすめられる。60% 以下の 6 例のうち 2 例がやや低かったが、1 例は IgM 値陰性、もう 1 例は IgM 値も 1.77 と比較的低いものであった。IgM 抗体が陽性でも AI が高いため妊娠を継続した 7 例のうち児の情報が判っている 4 例については胎内感染はなかった。IgM 抗体値が異常に高い値であった症例についてデンカ生研研究所において検討した所、非特異的な反応の可能性が示唆された。

今後の課題としては以下の点がある。

①IgM 抗体の非特異反応の原因、②IgG 抗体の

AI の基礎的な研究、③多くの検体を用いて判断基準の確立。

E. 結論

妊婦の風疹 IgM 抗体陽性者については、風疹の暴露のリスクについての疫学的状況をよく検討すると同時に感染時期の推定には AI を併用することが奨められる。

謝辞：本研究に当たり、武久クリニック(千葉) 武久 徹氏、森川クリニック(千葉) 森川義郎氏の協力並びに検体測定を行った帝京大学医学部附属溝口病院産婦人科 西澤美香氏に深謝します。

F. 研究発表

1. 論文

1) 川名 尚

風疹の今日的課題 — 先天性風疹症候群予防への戦略 — 産婦人科の実際 54:139-144;2005.

2) 川名 尚

高感度化測定による臨床的問題 — 風疹抗体を中心に —

日本臨床検査自動化学会誌 30: 149-152;2005.

3) 川名 尚 他

母子感染の立場からみた本学学生の抗体保有率の評価 帝京平成短期大学紀要 15:3-5;2005.

4) 川名 尚

周産期ウイルス感染症の変遷と今後の展望 産科と婦人科 8:965-972;2005.

2. 学会発表

1) 川名 尚

「風疹流行および先天性風疹症候群の発生抑制に関する緊急提言について」

第 23 回日本産婦人科感染症研究会, 平成 17 年 5 月 28 日, 東京

2) 川名 尚 他

「風疹 IgM 抗体陽性妊婦の管理」

日本産婦人科学会千葉地方部会,平成 17 年度冬期
学術講演会,平成 18 年 1 月 28 日,幕張

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
なし
2. 実用案
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)
分担研究報告書

体外診断薬に関する標準品に関する研究
分担課題：風疹ウイルス遺伝子診断標準化と整備

分担研究者 種村光代
名古屋市立大学大学院医学研究科
生殖遺伝医学講座生殖発生医学分野講師

研究要旨

風疹ウイルス RNA の検出方法の標準化をはかる目的で、複数のプロトコールを検討して相違を明らかにするとともに、検査が実施された症例数や臨床経過を見直して診断基準を明らかにして標準化を検討した。妊娠初期に風疹を疑われた妊婦の臨床対応と追跡調査も行き、本検査の適応についても検討した。主たる原法は、AGPC 法を用いて RNA を抽出し、逆転写反応にて cDNA を作成、PCR 法を用いてウイルスの構造遺伝子 E1 領域の 5' 側の SITE3 (369bp)、その内部領域 SITE31 (283bp) を二重に増幅する (nested-PCR)。各種変法の感度や判定基準にばらつきが生じている原因の一つには、PCR 増幅過程に用いられる機器の原理の違いによる PCR 条件の変更の必要性であることが示唆された。原法の RNA 抽出については、キットを用いても同様の検出結果が得られることが、過去の保存良好検体にて確認されたが、新たな臨床症例での追加検討が必要である。原法を用いた場合と、他施設にて実施されている異なるプライマーを用いた方法でも培養ウイルスでは同様の検出感度であることが確認された。プライマーは、原法により最も多くの臨床症例が正確に診断されたことを考慮すれば変更の必要性は低い、ウイルス検出の困難な新たな臨床症例への別プライマーセットの導入の必要性は残される。本年度は大きな風疹の流行は認められず、新たな症例による各種臨床検体についての比較検査は実施困難であった。相談を受けた妊婦の臨床症例は多数あったが、詳細な問診の結果からは先天性風疹症候群の危険性は極めて低い症例ばかりであり、これらの症例からの先天性風疹症候群患児の出生は存在しなかった。母体 IgG 親和性の測定を導入することで妊娠中の初感染が否定できて安心感を得られた症例も確認された。今後も風疹の流行そのものの阻止が可能ならば、妊婦への問診の強化、抗体価の解釈に関する適切なサポート、IgG 親和性の測定の追加などにより妊娠中の女性に対する先天性風疹症候群の危険は十分に軽減可能であると思われた。先天性風疹症候群を疑う新生児が出生した場合には、院内感染予防の見地からも早急にウイルス排出の有無を確認できるメリットがあり、今後も原法の改良、簡易化の必要性は残る。本検査の標準化と同時に風疹ワクチン接種の徹底がもっとも期待される。

A. 研究目的

2004年に風疹の局地的流行があり、先天性風疹症候群（CRS）の報告例が増加した。ウイルス培養が困難な CRS 症例や流死産児の検体の精査、胎児を対象とした診断方法として、Polymerase Chain Reaction（PCR）を用いた風疹ウイルス RNA の検出方法が既に開発されている。流行状況に応じた対応を迅速に行う目的で、本検査の標準化をはかる。

B. 研究方法・対象

現在実施されている複数のプロトコールを検討して、その相違を明らかにするとともに、検査が実施された症例数や臨床経過を見直して、それぞれの診断基準を明らかにして、標準化を検討した。また、妊娠初期に風疹を疑われた妊婦の臨床対応と追跡調査も行い、本検査の適応についても検討した。本研究は、日本産科婦人科学会をはじめとする日本医学会分科会、及び関連組織の倫理規定やガイドラインの元に実施された。過去の臨床検体については、研究目的のための保存、利用についての説明、理解・同意（インフォームドコンセント）を得ているものを使用した。なおヒトゲノムの解析や遺伝子解析には相当せず、実験動物の使用もない。

C. 研究結果

主たる原法は、AGPC 法を用いて RNA を抽出し、逆転写反応にて cDNA を作成、PCR 法を用いてウイルスの構造遺伝子 E1 領域の 5' 側の SITE3（369bp）、その内部領域 SITE31（283bp）を二重に増幅する（nested-PCR）。アガロースゲルで電気泳動、エチジウムブロマイドで染色後、UV 照射することにより蛍光 DNA バンドとして検出する。原法を含め、

遺伝子診断はごく一部の研究施設で実施されているに過ぎない上、RNA の抽出がキット化されたり、異なるプライマーが使用されている場合もあり、各種変法が存在して感度や判定基準にばらつきが生じている可能性が示唆された。その原因の一つには PCR 増幅過程に用いられる機器の原理の違いによる PCR 条件の変更の必要性であることが示唆された。原法の RNA 抽出のステップについては、RNA 抽出キットを用いても同様の検出結果が得られることが、過去の風疹胎児感染症例の保存良好検体にて確認された。また、この原法を用いた場合と、他の研究施設にて実施されている異なるプライマーを用いた方法でも培養ウイルスでは同様の検出感度であることが確認された。しかし、各種臨床検体についての確認検査は、本年度は新たな臨床検体が得られず比較検査は実施困難であった。

なお、本年度は幸い大きな風疹の流行は認められなかった。HI 高値あるいは風疹特異的 IgM 抗体が陽性であるため相談を受けた妊婦の臨床症例は多数あったものの、発疹なし、患者接触なしにて先天性風疹症候群の危険性は極めて低い症例ばかりであった。追跡調査の結果でも、これらの症例からの先天性風疹症候群患児の出生例は存在しなかった。また母体 IgG 親和性の測定を導入することで妊娠中の初感染が否定できて安心感を得られた妊婦の症例も確認された。

D. 考察

原法は RNA 抽出のステップが煩雑でコンタミネーションの危険性が高いなどの問題点があったが、多数の臨床症例での診断実績があることも確認されている。プライマーは、原法により最も多くの臨床症例が正確に診断さ

れたことを考慮すれば変更の必要性は低い。しかし、流行ウイルス株の変化も予想され、ウイルス検出困難な新たな臨床症例への別プライマーセットの導入の必要性は残される。原法への RNA 抽出キットの導入の可能性は示されたが、さらに新たな臨床症例での追加検討が必要であろう。

ただし、昨年度のワクチン接種啓蒙が功を奏したのか、本年度は風疹の流行も沈静化し、2005 年の先天性風疹症候群の報告例は 2 例にとどまった。今後も風疹の流行そのものの阻止が可能ならば、妊婦への問診の強化、抗体価の解釈に関する適切なサポート、IgG 親和性の測定の追加などにより妊娠中の女性に対する先天性風疹症候群の危惧は十分に軽減可能であると思われる。実際のところ、これまでの当施設での過去の症例の追跡調査では母体の風疹特異的 IgM 抗体が陽性であっても、発疹なし、接触なし、ワクチン歴ありの妊婦からの先天性風疹症候群は皆無であった。やはり妊娠可能女性へのワクチン接種の啓蒙は必要不可欠である。

E. 結論

風疹ウイルス RNA の検出方法の標準化という点では、原法については引き続き RNA 抽出キットの導入について臨床検討が必要であるが、プライマーに関しては多様性を残すことの意義も大きいだろう。しかし、妊娠中に風疹を疑われた女性への対応では、母児への侵襲のない母体 IgG 親和性の測定の導入が先決であると思われた。一方、先天性風疹症候群を疑う新生児が出生した場合には、院内感染予防の見地からも早急にウイルス排出の有無を確認できるメリットがあり、今後も原法の改良、簡易化の必要性は残る。いずれにして

も、本検査の標準化と同時に、やはり風疹ワクチン接種の徹底がもっとも期待される。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

成人女性における風疹対策

チャイルドヘルス 8(9), 25-29, 2005

種村光代

2. 学会発表

1) 第 57 回日本産科婦人科学会学術講演会
(4月2日-5日、京都)

先天性風疹症候群の発生に関するリスク因子の検討

種村光代、鈴森薫

2) 第 79 回日本感染症学会総会

(4月14-15日、名古屋)

予防できる先天異常—先天性風疹症候群の撲滅に向けて

種村光代

3) 第 108 回日本小児科学会学術集会

(4月23日、東京)

特別講演「風疹の流行と先天性風疹症候群増加の危機における緊急提言」妊婦における先天性風疹症候群への対応

種村光代

4) 第 23 回日本産婦人科感染症研究会学術講演会 (5月28日、東京)

シンポジウム 先天性風疹症候群の発生に関するリスク因子の検討

種村光代

5) 第 45 回日本先天異常学会学術集会

(7月14~16日、東京)

シンポジウム 4「出生前診断と臨床対応」