

新しいムンプスウイルス IgM 検出 EIA 試薬の評価について

内田 立志¹⁾, 寺田 喜平²⁾, 尾内 一信²⁾

1) さとう記念病院小児科, 〒709-4312 岡山県勝田郡勝央町黒土45

2) 川崎医科大学小児科学, 〒701-0192 岡山県倉敷市松島577

抄録 ムンプスウイルスは、流行性耳下腺炎の原因ウイルスであり、無菌性髄膜炎、難聴、睪炎、睪丸炎、卵巣炎を併発することも少なからずあり、多彩な臨床症状を呈する。ムンプスウイルス感染症の確診には、保険診療の制約により、EIA法による抗ムンプスウイルスIgMの検出のみを実施することが多いが、健常人において抗ムンプスウイルスIgM抗体陽性例が観察されることや、ムンプスウイルス感染症回復後の長期にわたる抗体陽性者の存在が観察され、困惑をきたす例が報告されていた。今回検討したデンカ生研製の新しい抗ムンプスIgM型抗体検出キット(ウイルス抗体EIA「生研」ムンプスIgM(Ⅱ))は、「IgMキャプチャー法」を測定原理としており、操作再現性は高いものであった。健常者でのIgM抗体陽性率は、0.3%(1/336)と改善し、ムンプスウイルス感染症とウイルス学的に確診された症例では、IgM抗体陽性率は、92.1%(128/139)であった。また、ムンプスウイルス感染症発症後、5ヵ月以上経過した症例については、IgM抗体陽性と判定されるものは存在しなかった。このことから、今回検討したEIAキットは、現在、提起がされた問題を解決し、ムンプスウイルス感染症の診断を正確にするだけでなく、ムンプスウイルスの血清疫学に寄与するツールとなりうると思われる。

(平成21年3月5日受理)

キーワード：ムンプスウイルス、EIA法、IgM抗体、再感染

緒言

流行性耳下腺炎はムンプスウイルスが引き起こす全身性のウイルス感染症として知られている。ムンプスウイルスは、無菌性髄膜炎の原因ウイルスの一つであることも知られているが、難聴、睪炎、睪丸炎、卵巣炎を続発する症例もあるなど、多彩な臨床症状により近年注目されているウイルスの一つである。基本的にはワクチンでコントロールできる感染症であるが、学校保健法で取り扱われているウイルスであるにもかかわらず、1993年にMMRワクチンが中止されてから3～4年周期で流行が見られるようになってきている。流行性耳下腺炎の診断において

は、臨床症状の特徴である耳下腺腫脹の病因はムンプスウイルスのみではないため、ムンプスウイルス特異的な血清抗体価の測定やウイルス分離またはウイルス遺伝子検出による診断が重要となる。ムンプスウイルスの血清学的診断法には、CF法、HI法、NT法、EIA法があるが、感度、特異性、経済性、簡便性の面からEIA法が使用されることが多い。今回、デンカ生研株式会社が新たに発表した抗ムンプスウイルスIgM抗体検出キット「ウイルス抗体EIA「生研」ムンプスIgM(Ⅱ)」を使用する機会を得たため、そのキットの特性をムンプスウイルス感染症の血清診断の観点により報告する。

別刷請求先
寺田喜平
〒701-0192 倉敷市松島577
川崎医科大学小児科学

電話：086(462)1111
ファックス：086(462)1199
Eメール：kihei@med.kawasaki-m.ac.jp

材料と方法

対象および検体

この研究について、川崎医科大学倫理委員会の承諾を得た。2003年～2006年のムンプス流行シーズンにおいて、急性耳下腺腫脹の臨床症状でさとう記念病院を受診した182例について、診断のため使用した血清と唾液検体の残りを使用し、検討を行った。唾液検体は、RT-PCR法試行時に使用するが、以下PCR検体と記載する。その調製法は、口腔内の唾液を綿棒で採取し、0.5%BSA及び0.08%の NaN_3 を含有する0.01 mol/l リン酸緩衝液 (pH=7.2) で浮遊、RNA抽出まで -80°C で保存したものである。また、この症例中の、急性耳下腺腫脹が軽快した後に別の症状で再来院した14例の検査残血清を経時血清検体として検討した。この経時血清検体は初診時においてはすべて抗ムンプスウイルスIgM抗体が陽性であった。さらに健常成人336例の凍結保存血清についても検討を行った。なお、健常人検体症例のhistoryはすべて不明である。

抗ムンプスウイルス抗体の測定

抗ムンプスウイルスIgM抗体は「ウイルス抗体EIA「生研」ムンプスIgM(II)」, IgG抗体は「ウイルス抗体EIA「生研」ムンプスIgG」にてそれぞれの添付文書に従って測定し、判定を行った。なお、一連の操作は、用手法にて実施した。

同一検体反復測定による変動係数の検討

「ウイルス抗体EIA「生研」ムンプスIgM(II)」につき、キットの再現性を検討する目的で、抗体が陽性となる血清2検体ずつについて1血清あたり8回同時に測定し、測定値の変動を変動係数(CV値(%))にて、試薬3ロットについて検討した。血清1は吸光度が0.4前後となるもの、血清2は吸光度が1.5前後となるものを検討に用いた。CV値は(抗体指数の標準偏差値/抗体指数の平均値)×100で算出した。

RT-PCR法

PCR検体よりのムンプスウイルスRNAの抽出はISOGEN-LS(日本ジーン社)を、添付文書に従い使用した。cDNA合成からPCR反応及びムンプスウイルス遺伝子の検出はINOUEらの方法¹⁾に従い、nested-PCRを用いSH領域とHN領域を増幅した。なお、cDNAの合成には1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR(AMV)(Roche社)を用いた。ここでムンプスウイルス遺伝子の、SHまたはHNのどちらかの領域が増幅された患者をムンプスウイルス確診例と定義した。

結果

同一検体反復測定による変動係数の検討

今回、新たに発表された、抗ムンプスウイルスIgM抗体検出キット、「ウイルス抗体EIA「生研」ムンプスIgM(II)」の性能を調べるため、試薬3ロットにつき2種類の血清を各8回ずつ測定し、そのばらつきを変動係数(CV値)として、評価した結果、どの試薬ロットも変動係数は1.1%～2.9%と極めて高い精度を示す結果であった(表1)。

健常人検体におけるIgM抗体陽性率

「ウイルス抗体EIA「生研」ムンプスIgM(II)」では、抗体指数=1.20が陽性判定のカットオフ値と設定されている。これは抗体指数=1.00が健常人検体の吸光度の平均値+6SDと定義され、その前後20%に、カットオフ付近の診断に、より正確性を持たすため(測定者間の操作誤差の考慮及び感染ステージを確認するため)判定保留域を設けてあるためである。本検討で用いた健常人336検体を測定したときの抗

表1 ウイルス抗体EIA「生研」ムンプスIgM(II)の試薬3ロットにおける測定値のばらつき

	lot.A	lot.B	lot.C
血清1	2.3%	1.3%	2.3%
血清2	2.1%	2.9%	1.1%

各試薬ロット毎に血清1および血清2の2検体を同時に8回ずつ測定したときのCV値(%)を示す。

抗体指数分布を図1に示す。わずかに1検体のみ、IgM抗体陽性と判定される検体が存在し、陽性率は0.3%であった。なお、判定保留とされた検体は10検体存在した。

流行性耳下腺炎流行期の血清診断

流行性耳下腺炎流行期に耳下腺腫脹を主訴として来院した患者検体182症例におけるRT-PCR法とIgMの関係を表2に示す。182症例中の4症例は発症後10~14日の外来初診であったため、本検討より除外し、178症例を急性期症例として解析を行った。なお、この4症例はすべてIgM抗体陽性、RT-PCR法では陰性と判定された。初診時が第1病日:70症例、2~3

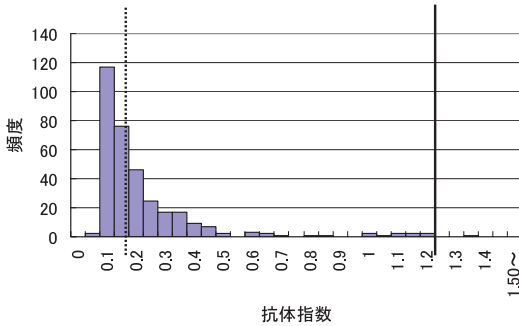


図1 ウイルス抗体EIA「生研」ムンプスIgM(II)の健常人検体における抗体指数分布
健常人検体336例の抗体指数分布を示す。
図中の点線は健常人検体336例の平均値、実線は陽性カットオフ値(健常人検体の平均+6SD x 1.2)を示す。
このキットの判定基準は、抗体指数>1.20:陽性、抗体指数<0.80:陰性、0.80≤抗体指数≤1.20:判定保留である。

病日:85症例、4~8病日:23症例について、RT-PCR法でムンプスウイルス確認例とされたものは139例(139/178:78.1%)であった。また、RT-PCR法、IgM抗体ともに陰性と判定された症例のうち、IgG抗体についても陰性と判定された症例、すなわち、耳下腺腫脹にムンプスウイルスは関連しないと考えられる症例は、5例(5/178:2.8%)存在した。また、RT-PCR法で陽性と判定された、ムンプスウイルス確認例中IgM抗体陽性と判定された症例は128症例(128/139:陽性一致率92.1%)であった。病日を第1病日、2~3病日、4~8病日に分けて解析すると、RT-PCR法とIgM抗体の一致率は変化しないが、IgM抗体陽性症例でRT-PCR法が陰性の症例の割合は、病日が進むにつれ増加する(3/59:5.1%→9/68:13.2%→8/21:38.0%)傾向を示した。また図2にRT-PCR法で陽性と判定された139症例の抗ムンプスウイルスIgM抗体とIgG抗体の関連性を示す。今回の検討においては、明確な関連性は認められなかったが、IgG抗体が高値でIgM抗体が比較的低値(2.00>抗体指数)の群とその他の群が見られた。また、RT-PCR法で陰性と判定された39症例についても、IgM抗体とIgG抗体の関連性が2群に分類された。すなわち、IgM抗体が陰性でIgG抗体が比較的高値を示す群と、IgM抗体が高値になるにつれ、IgG抗体が緩やかに上昇する分布を示す群である(図3)。

表2 ムンプスウイルス流行時の急性耳下腺腫脹症例におけるIgM抗体とRT-PCR法および発症病日の比較

1病日	RT-PCR法		total	
	+	-		
IgM	+	56	3	59
	±	1	0	1
	-	2	8	10
total	59	11	70	

2~3病日	RT-PCR(法)		total	
	+	-		
IgM	+	59	9	68
	±	2	0	2
	-	5	10	15
total	66	19	85	

4~8病日	RT-PCR法		total	
	+	-		
IgM	+	13	8	21
	±	1	0	1
	-	0	1	1
total	14	9	23	

total	RT-PCR法		total	
	+	-		
IgM	+	128	20	148
	±	4	0	4
	-	7	19	26
total	139	39	178	

+ : 陽性, ± : 判定保留, - : 陰性 を示す。

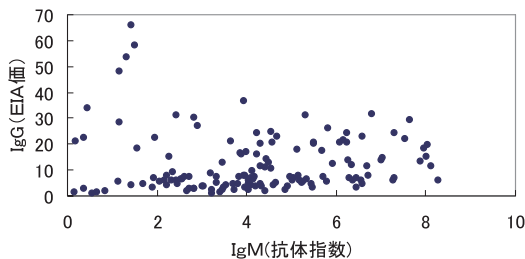


図2 ムンプス確診例（139症例）における，抗ムンプス IgM 抗体と IgG 抗体の関係

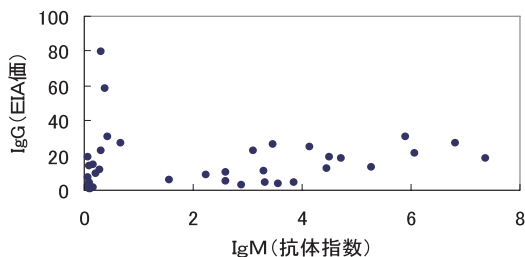


図3 RT-PCR 法陰性例（39症例）における，抗ムンプス IgM 抗体と IgG 抗体の関係

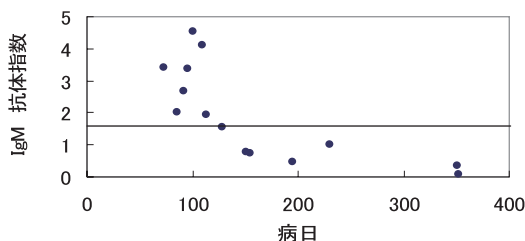


図4 ムンプスウイルス感染症の発症よりの病日と抗ムンプスウイルス IgM 抗体の関係
図中の横線は陽性閾値（陽性カットオフ値）を示す。

IgM 抗体と病日の関係

初診時に抗ムンプス IgM 抗体が陽性であり，その後来院した14例をペア血清とし，抗ムンプス IgM の抗体推移を検討した（図4）．2回目の来院は，発症より86日～352日と幅があるが，本検討では耳下腺腫脹発症後5ヶ月（151日）以上経過した症例（ $n=6$ ）については，抗ムンプス IgM 抗体が陽性と判定される症例は見られなかった（陰性5症例，判定保留1症例）．

考察

ムンプスウイルスの血清学的診断においては，中和抗体価を測定するのが理想的ではあるが，設備，手技，測定の煩雑さ等の要因により，測定可能施設が限定されている．またCF法やHI法は感度が低いため，EIA法による抗ムンプスウイルス IgM 抗体及び IgG 抗体を測定することが現在では一般的となっている．しかしながら，保険適用の制約上，抗ムンプスウイルス IgG 抗体と IgM 抗体を同時に測定することが不可能なため，診療上に不都合が生じる場合がある．抗ムンプスウイルス IgM 抗体を測定する際に，本邦ではデンカ生研社製のキットを使用する機会が多い．デンカ生研社製の測定系は抗ムンプスウイルス IgM 抗体を，高感度かつ特異的に検出するために理想とされる「IgM キャプチャー法」^{2,3)}を用いているが，その反応特性に起因すると見られる現象，すなわち，健常人において4%ほどの抗体陽性者が観察される^{4,5)}こと，ムンプスウイルス不顕性難聴⁵⁾やムンプス髄膜炎⁶⁾後の長期間にわたる IgM 抗体持続陽性患者の存在が指摘され，診断に困惑をきたす例も報告されていた．

今回使用した改良キット「ウイルス抗体 EIA 「生研」ムンプス IgM (II)」(以下本キット)の基本性能として，測定時のばらつきを変動係数(CV値)にて検討した(表1)ところ，その変動幅が試薬ロット内及び試薬ロット間においても非常に狭く，きわめて安定した抗体測定試薬と考えられる．さらに，本キットは，抗体指数=1.00近辺に判定保留域を設定し，抗体指数=1.20が陽性判定のカットオフ値と設定されているため，操作誤差や測定誤差による判定の食い違いを防ぐようなデザインとなり，抗体検出の面では信頼のおける結果を導くと思われる．

上述した「健常人検体における IgM 抗体保有率」の問題については，今回の新キットの検討結果は0.3%の陽性率と，現行キットより大幅に改善された(図1)．本検討で用いた健常人検体の家族歴を含む history は不明であるが，発熱や耳下腺腫脹等の臨床症状はないことか

ら、自然感染との接触等によりブーストがかけられ、IgM抗体が検出された可能性もあると考えられる。IgM抗体の消失時期には、免疫応答の個体差も考慮に入れた場合、ある程度の幅があることが考えられるが、抗ムンプスウイルスIgM抗体は、初感染後2~6ヶ月間持続することが報告されている⁷⁾。本検討で用いた症例は14例と限られているが、発症後5ヶ月以上経過した症例すべてにおいてIgM抗体が陽性と判定されず、本キットのIgM抗体検出が妥当なものとして推測された。なお、データは示さないが、これらの症例は、デンカ生研製の改良前のキットでは1症例を除きIgM抗体がすべて陽性を示していた。

ムンプス流行期の検体を、本キット及びRT-PCR法やIgG抗体(EIA法)などを用いて総合的に検討した(表2)。急性期の症例中ではRT-PCR法によりムンプス確定と定義された検体は78%(139/178)であった。ムンプス確定症例においては92%(128/139)の症例でIgMが陽性であったが、IgM陰性例では再感染例が考慮された。ウイルス分離とIgM抗体検出及び病日との関連性については、ワクチン歴を含め、落合ら⁸⁾が詳細な解析を行っているが、耳下腺腫脹急性期検体におけるウイルス分離率、IgM抗体が検出された検体中のウイルス分離率は本検討とほぼ同等であった。さらに、病日が進むにつれムンプスウイルス検出率が低下する傾向も既報告⁸⁾と同様であった。しかし、本検討で用いたRT-PCR法は感染性ウイルスの分離についての報告であり、ウイルス遺伝子を感染性の有無に関わらず検出するという点では、厳密には異なっている。われわれが検索しえた文献にはムンプスウイルス感染症の感染ステージとウイルス遺伝子の検出についての報告はなかった。しかし、今回の結果を見る限り、ウイルス分離とRT-PCR法によるウイルス遺伝子検出には、大きな差はないものと考えられる。したがって、ムンプスウイルス感染症の急性期の症例中においては、再感染例ではウイルス検出率は100%ではない^{9, 10)}ことも考慮すると、

今回の検討結果は、流行性耳下腺炎流行期に、急性期の耳下腺腫脹検体で抗ムンプスウイルスIgMが検出された場合、そのほとんどがムンプスウイルス起因によるものと考えられる。しかし、初診時に抗ムンプスIgM抗体及びRT-PCR法で陰性となる症例は19例(10.6%: 19/178)、そのうち、抗ムンプスウイルスIgGも陰性の症例、すなわちムンプスウイルス以外の起因による耳下腺腫脹症例は5例(2.8%: 5/178)存在した(表2)。ムンプスウイルス流行期とはいえ、ムンプスウイルス以外に起因する耳下腺腫脹症例の存在は、臨床症状のみの診断によらない、ウイルス学および血清学的検査結果を踏まえた確定診断の重要性を示している。

今回の検討においては、抗ムンプスウイルスIgM抗体とIgG抗体の明確な関連性は認められなかった(図2)。しかし、分布に初感染の典型的パターンであるIgM抗体高値と、IgG抗体陽性の他に2次ワクチンフェラーまたは再感染の典型的パターンであるIgG抗体高値、IgM抗体低値の2群が存在した。このことは、ムンプスウイルスの流行期には、初感染、再感染¹¹⁾、ワクチンフェラー後の再感染など、ムンプスウイルス感染症の病因が非常に複雑であることを示唆する。また、本検討でRT-PCR法で陰性と判定された39症例についても、IgM抗体とIgG抗体の関連性は同様に初感染と再感染によるものと類似していた(図3)。この結果は、特にRT-PCR法が陰性と判定された場合でも、ムンプスウイルス初感染、再感染のどちらもあることを示している。ムンプスウイルスまたはウイルス遺伝子の検出は、検体採取時期、検体輸送等の検体由来の問題、およびワクチン接種の有無、感染ステータス(初感染/再感染)等の患者由来の問題により、大きく検出率が異なることが考えられる。より確実な確定診断およびムンプス感染症の疫学研究のためには、これらを含めたウイルス検出法の標準化および抗ムンプスウイルス抗体の存在ステータスとウイルスまたはウイルス遺伝子の検出の有無を盛り込んだ診断基準の確立、さらには保険診療における

IgG 抗体および IgM 抗体の同時測定が可能となるような適用が今後の課題となるであろう。

以上の点より、本検討で使用した「ウイルス抗体 EIA「生研」ムンプス IgM (Ⅱ)」は現行キットの問題点を解決したものと考えられ、診断の場において有用なツールとなることは間違いないが、ムンプスウイルス関連の他の測定項目と組み合わせることで、さらにムンプスウイルス感染症の血清疫学的調査にも貢献するものと期待できる。

この研究は川崎医科大学 IRB の承認に基づきデンカ生研株式会社と治験契約を締結し、受託研究費「ムンプス抗体価測定キットにおける IgM 抗体長期陽性の原因に関する研究 (C-900018)」によって実施された。

引用文献

- 1) Inou Y, Nakayama T, Yoshida N, et al. : Molecular epidemiology of mumps virus in Japan and proposal of two new genotypes. *J. Med. Virol.* 73: 97-104, 2004
- 2) Tuokko H: Comparison of nonspecific reactivity in indirect and reverse immunoassays for measles and mumps immunoglobulin M antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 20: 972-976, 1984
- 3) Sakata H, Tsurudome M, Hishiyama M, Ito Y, Sugiura A: Enzyme-linked immunosorbent assay for mumps IgM antibody: comparison of IgM capture and indirect IgM assay. *J. Virol. Meth.* 12: 303-311, 1985
- 4) 寺田喜平, 新妻隆広, 加藤篤: ムンプス IgG および IgM 抗体 EIA 測定キットにおける問題点. *臨床とウイルス* 31: S49, 2003
- 5) 内田真哉, 鈴木敏弘, 久育男: 健常者および急性感音難聴患者の抗ムンプス IgM 抗体陽性率. *Audiology Japan* 46: 291-292, 2003
- 6) 小笠原幸裕, 寺田喜平: ワクチン株によるムンプス髄膜炎後 IgM 抗体が持続陽性を示した一例. *臨床とウイルス* 29: S62, 2001
- 7) Carbone KM, Rubin S: Mumps Virus. *In Fields Virology*. 5th ed (Knipe DM, Howley PM, eds). Philadelphia USA, LIPPINCOTT WILLIAMS and WILKINS, 2007, pp1527-1550
- 8) 落合仁, 庵原俊昭, 中野貴司: ワクチン歴によるムンプス発症時の IgM 抗体・IgG 抗体の比較検討. *小児科臨床* 60: 501-506, 2007
- 9) 庵原俊昭, 落合仁, 中野貴司, 神谷齊: ムンプスウイルスを含むワクチンの接種歴を有する児の耳下腺腫脹時におけるムンプスウイルス分離の検討. *小児感染免疫* 12: 79-83, 2000
- 10) 庵原俊昭: ムンプス. *臨床とウイルス* 30: 28-32, 2002
- 11) Gut JP, Lablashe C, Behr S, Kirn A: Symptomatic mumps virus reinfection *J. Med. Virol.* 45:17-23, 1995

Evaluation of the new EIA kit for detection of anti-mumps IgM antibody

Tatsushi UCHIDA¹⁾, Kihei TERADA²⁾, Kazunobu OUCHI²⁾

1) Satou Memorial Hospital, 45 Kurotsuchi, Sho-ohchou, Katsuta-gun, 701-0192, Japan

2) Department of Pediatrics, Kawasaki Medical School, 577 Matsushima, Kurashiki, 701-0192, Japan

ABSTRACT As efforts have been directed to progress in the diagnosis and elimination of mumps virus infection, laboratory confirmation of mumps has become more and more important. However, high IgM-positive rates of mumps among healthy individuals and the long persistence of IgM after the convalescent phase of mumps virus-related diseases are sometimes reported. Until now, there have been no kits that can be fully assessed by clinically defined relative

performance. However, in this study, we evaluated a new enzyme-immunoassay (EIA) kit for the detection of anti-mumps virus IgM antibody. This method is based on the IgM-capture EIA for clinical serodiagnosis of recent mumps virus infection. Among healthy individuals, the IgM-seropositivity rate was 0.3% (1/336). Using sera collected during mumps prevalent seasons, the rate for IgM positivity was 92.1% (128/139) in acute phase parotiditis patients with mumps virus (detected with the RT-PCR). Anti-mumps IgM antibody persisted for five months from the time of being clinically defined as mumps-related parotiditis. This EIA kit can distinguish parotiditis and meningitis-causing mumps virus infection from other causes.

(Accepted on March 5, 2009)

Key words : Mumps virus, EIA, IgM antibody, Re-infection

Corresponding author

Kihei Terada

Department of Pediatrics, Kawasaki Medical School, 577
Matsushima, Kurashiki, 701-0192, Japan

Phone : 81 86 462 1111

Fax : 81 86 462 1199

E-mail : kihei@med.kawasaki-m.ac.jp