

# 組換え (VP1+VP2) 粒子抗原を用いたヒトパルボ ウイルス B19の血清疫学

<sup>1)</sup>国立予防衛生研究所, <sup>2)</sup>デンカ生研株式会社

松永 泰子<sup>1)</sup> 武田 直和<sup>1)</sup> 山崎 修道<sup>1)</sup>  
鎌田公仁夫<sup>2)</sup> 黒澤 大介<sup>2)</sup>

(平成7年8月14日受付)

(平成7年9月26日受理)

---

Key words: human parvovirus, B19 virus, seroepidemiology,  
recombinant antigen, ELISA

---

## 要 旨

1973年と1984年の調査以来2回の伝染性紅斑の全国的流行を経て、わが国における抗B19ウイルス抗体保有状況がどう変化したかを、新たに開発された組換えVP1+VP2粒子を抗原としたELISA法により調査した。はじめに、この新しいIgG抗体測定法をウイルス陽性血漿より部分精製したB19ウイルス粒子を抗原とした従来法と比較したところ、220検体中212検体(96.4%)が完全に一致し、従来法に代替し得ることを確認した。1993年に収集された宮城、群馬、福岡3県居住者由来の血清900検体における年齢群別抗体保有状況は、0~4歳(10%)、5~9歳(54%)、10~14歳(59%)、15~19歳(46%)、20~29歳(38%)、30~39歳(48%)、40~49歳(64%)、50歳以上(76%)で、男女差はなかった。これらの値を1984年のそれと比較すると、40歳未満の年齢群で20~40%の保有率の上昇が認められ、40歳以上ではほとんど変化がなかった。このことから、1回の伝染性紅斑の全国的流行時には、40歳未満の人口の約10%(約800万人)がB19ウイルスに感染(抗体を獲得)し、感染症サーベイランスからはさらにその約1/10を伝染性紅斑患者として把握したと考えられる。

## 序 文

ヒトパルボウイルスB19(以下B19ウイルスと略す)は伝染性紅斑の抗原として知られているが<sup>1)</sup>、遺伝性球状赤血球症等溶血性貧血の基礎疾患のある人でのAplastic crisis、健常者における一過性の貧血、胎内感染による胎児水腫や死・流産等の原因となる等多様な病像を示す<sup>2)</sup>。B19ウイルスは培養が困難でかつ感染者からのウイルス抗原入手には限度があるため、診断用抗原として遺伝子組換えにより発現させたウイルス構造タンパクを用いる試みがなされている。我々はバキュロウイルスDNAにB19ウイルスの構造タンパク

VP1およびVP2の遺伝子を別々に組込ませ、昆虫細胞中で両者をともに発現させ、ウイルス様中空粒子を形成した。この組換え中空粒子を抗原としてELISA系を構築し、伝染性紅斑患者血清等について、血漿由来のウイルス粒子を抗原とした抗体測定法と比較した結果、一致率の高い成績を得ている<sup>3)~5)</sup>。今回、この新しい抗体測定系が血清疫学的調査にも用い得るかどうかを検討した。

わが国におけるB19ウイルス抗体保有状況は、1973年と1984年に収集した血清について、単クローン抗体と血漿由来のウイルス粒子抗原を用いた抗原捕捉間接法ELISAにより測定した結果をすでに報告した<sup>6)</sup>。しかし、その後1987年と1992年をピークとした2回にわたる伝染性紅斑の全国的流行があった<sup>7)</sup>。これら2回の流行を経て、わが国

---

別刷請求先: (〒162) 東京都新宿区戸山1-23-1

国立予防衛生研究所感染症疫学部

松永 泰子

平成7年12月20日

における抗 B19ウイルス抗体の保有状況がどう変わったかを、この組換え粒子抗原を用いた IgG 抗体測定キット (ヒトパルボ IgG-EIA 「生研」(仮称)) を用いて調査した。

### 材料と方法

(1) 血清: 国立予防衛生研究所血清銀行保管血清の1993年 Collection より提供された宮城, 群馬, 福岡の3県の居住者由来血清, 合計900検体を使用した。血清提供者の年齢構成, 性別を県別に Table 1 に示した。

#### (2) 抗体測定法:

A. 組換えバキュロウイルスの発現によって得られた B19ウイルス構造タンパク VP1 および VP2 から成る精製中空粒子を固相化し, ブロッキング後凍結乾燥したマイクロプレートに, 1/200 希釈血清 100 $\mu$ l/well を 2 穴ずつ加え, 室温で 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 ヤギ抗体液 100 $\mu$ l/well を加え, 室温で 1 時間反応させた。洗浄後, テトラメチルベンチジンを含む基質液 100 $\mu$ l/well を加え, 室温で 30 分反応させた。0.6N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を 100 $\mu$ l/well 加えて反応を停止, 直ちに 450/630nm の吸光度を測定した。各マイクロプレートに強陽性, 弱陽性, 陰性の各対照血清およびブランクを置き, 陰性対照の吸光度が 0.1 以下, 強陽性対照の吸光度が 0.8 以上の条件下で, 検体の平均吸光度を弱陽性対照の平均吸光度で割った商 (index) を求めた。Index が 1.0 以上を陽性, 0.8 以下を陰性とし, 0.8~1.0 の場合は再検

査した。再検査の判定は 1.0 以上を陽性とした。

B. 一部血清については, 従来我々が行ってきたヒト血漿由来のウイルス粒子を抗原とした抗原捕捉間接法 ELISA<sup>6)</sup> (以下従来法と略す) を合わせて行ない, 両方法を比較した。

### 成績

(1) 群馬県由来血清 220 検体について二方法を比較した。血清希釈はキットの指定が 1/200, 従来法が 1/250 であり, それぞれ別々に希釈した。不一致例および保留例については再検査し, 最終判定を行なった。その結果, 212 例 (96.4%) が完全に一致した。不一致例はいずれも Cut off 値近い吸光度値を示す 8 例であり, キットでのみ陽性が 6 例, 従来法でのみ陽性が 2 例であった。Fig. 1 に 1 回目の測定結果を従来法による dOD 値を縦軸に, キットによる index 値を横軸に対数で示した。

(2) 900 血清検体について得られた index 値の分布を Fig. 2 に示した。Index の最低値は 0.2, 最高は 26.71 であった。0.5 未満は 378 例 (42%) であり, 0.8~1.0 の判定保留を示すものは 11 例 (1.2%)

Fig. 1 Comparison of the dOD492 measured using native B19 virus antigen<sup>6)</sup> and the index values obtained with recombinant VP1+VP2 particle antigen in 220 sera (log scale). Number of sera which were negative in both tests were shown in circle.

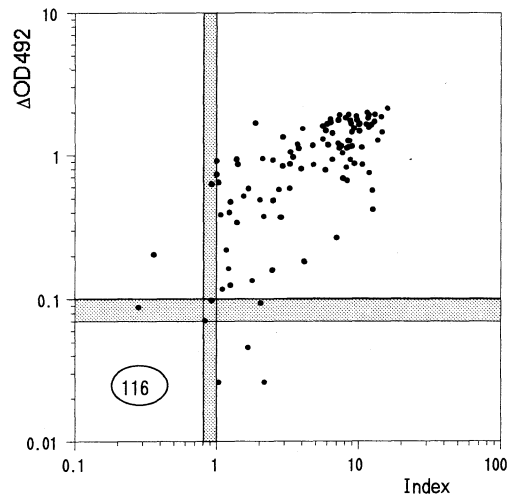
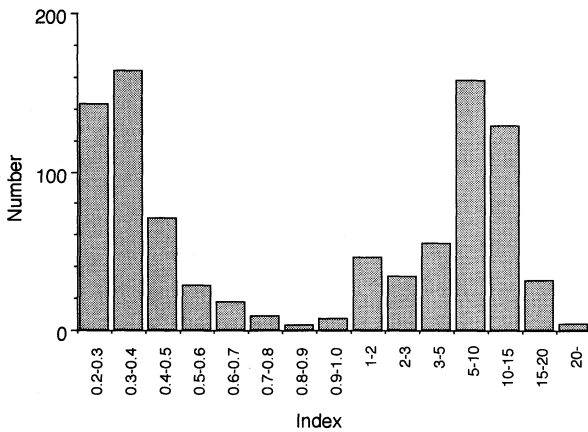


Table 1 Number of examine

Age group	Residence			Sex		Total
	Miyagi	Gunma	Fukuoka	Male	Female	
0-4	8	23	30	22	37	59
5-9	50	25	41	43	73	116
10-14	46	25	33	35	69	104
15-19	39	24	34	26	71	97
20-24	45	7	38	40	50	90
25-29	24	18	26	20	48	68
30-34	37	9	31	19	58	77
35-39	43	16	26	29	56	85
40-49	41	26	27	50	44	94
50-	33	47	30	67	43	110
Total	364	220	316	351	549	900

Fig. 2 Distribution of index values in 900 sera.



であった。陽性検体のうち index 1.0~5.0は135例(15%), 5.0~10.0が158例(17.6%), 10.0~15.0が129例(14.3%), 15.0以上は35例(3.9%)であった。

(3) 3県を合わせた年齢群別抗体保有率は0~4歳(10%), 5~9歳(54%), 10~14歳(59%), 15~19歳(46%), 20~29歳(38%), 30~39歳(48%), 40~49歳(64%), 50歳以上(76%)であった。Fig. 3に全体および男女別の抗体保有状況を示した。25~29歳において男性の、35~39歳において女性の保有率がやや高いが、統計学的には有意でなく、男女差は認められなかった。

(4) Fig. 4に従来法で測定した1973年と1984年における抗体保有状況を、1993年における年齢に合わせてそれぞれ20歳分および10歳分ずつ右にずらして、今回の組換え粒子抗原による1993年の抗体保有率と比較した。1993年の保有率は、40~49歳、50歳以上の年齢群では1973年の20歳以上、1984年の30歳以上とほぼ一致した。一方、39歳までの年齢群では20~40%の上昇が見られた。

(5) 年齢群別抗体保有率は、県により違いが見られた。Fig. 5に示すように福岡では5~49歳の年齢群において60%前後の高い保有率を示したのに対し、宮城では10~19歳に、群馬では5~9歳にピークがあり、それぞれ次の年齢群に保有率の谷が認められた。

Fig. 3 Antibody prevalence to B19 virus by age. □ Male, ■ Female, — Total.

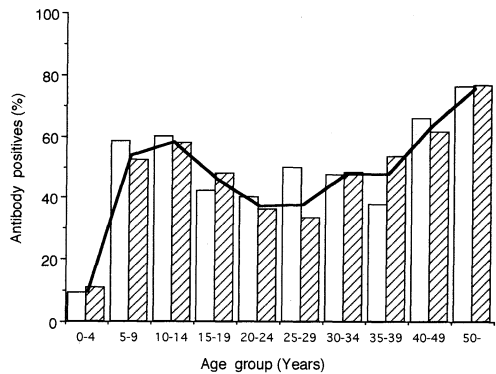


Fig. 4 Change of age specific antibody prevalence to B19 virus after two big epidemics of erythema infectiosum. Antibody prevalence in 1993 were compared to those of 1973 and 1984<sup>9)</sup>. — 1973, ○ 1984, ● 1993

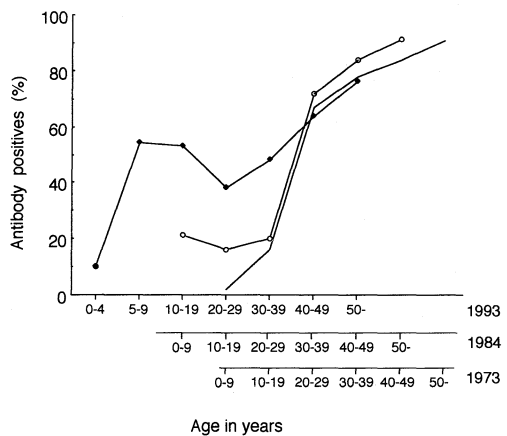
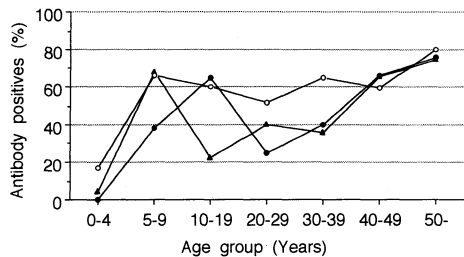


Fig. 5 Difference of age specific antibody prevalence in three prefectures. ● Miyagi, ▲ Gunma, ○ Fukuoka.

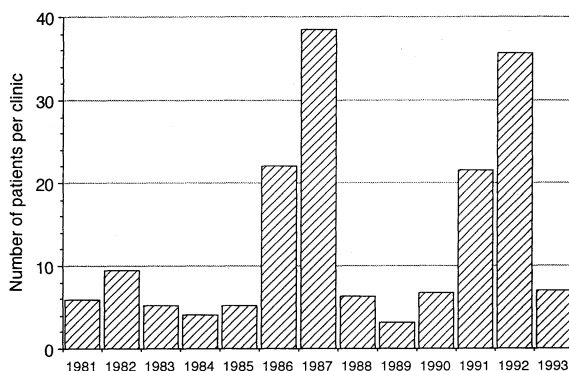


## 考 察

本研究に用いた、組換え B19ウイルス構造タンパク VP1, VP2により形成された中空粒子を抗原とした IgG 抗体測定キットは、従来のウイルス粒子を抗原とした抗体測定法と比較して96.4%と高い一致率を示した。Gay 等は MRL 社のキットを用いて England の6,864件の血清について抗 B19ウイルス IgG 抗体保有状況を調べた結果、45歳以上と45歳未満の年齢群の間で cut off 値を変える(45歳以上では低く設定する)必要があると述べている<sup>8)</sup>。B19ウイルス感染の主体は4~9歳であり、感染後年月を経て抗体価が低下した高齢群で、偽陰性となる可能性は否定できない。今回の我々の測定においても従来法でのみ陽性となった2例はいずれも60歳以上であったので、もしそれらがキットでも陽性であったと仮定すると、50歳以上の年齢群の陽性率は約4%上昇することになる。しかし一方、キットでのみ陽性となった6例は年齢も性別もまちまちであり、それらが偽陽性であるかどうかは断定できない。ELISA 反応の性質上、測定値は実験の都度多少の変動があり、特に Cut off 値近辺では判定結果が異なることもあり得るが、全体的には両方法は高齢群を含め高い一致率を示した。本キットは疫学的調査においても従来法に代用し得ると結論された。

今回の調査で得られた年齢群別抗体保有率を前回調査の1973年、1984年と比較すると(Fig. 4)特徴が2点ある。第1は、40歳以上の年齢群での保有率が1984年での30歳以上、1973年での20歳以上とほぼ一致していることであり、第2は40歳未満での抗体保有率の上昇である。厚生省の感染症サーベイランス<sup>7)</sup>によれば、1986~87年および1992~93年に伝染性紅斑の全国的流行があった(Fig. 6)。年間定点医療機関当たりの患者数は、1986年22.08人、1987年38.50人、1991年21.44人、1992年35.62人であった。罹患年齢分布では、流行年、非流行年ともに5~9歳が約55%、4歳を含めると約70%を占めた。15歳以上の患者の割合は1~2%にすぎなかった。しかし、抗体保有状況からは、40歳未満の成人においてもかなりの数のB19ウイルス感染者があったと推察される。一般

Fig. 6 Number of reported cases of erythema infectiosum per reporting clinic or hospital per year<sup>7)</sup>. Two epidemics in 1986/87 and 1991/92 are obvious. The data of 1981 was obtained only from July to December.



に伝染性紅斑は症状の軽い疾患であり、成人では医者にかからない者が多いこと、成人でのB19ウイルス感染では小児と異なった症状を示し、伝染性紅斑の診断名がつかない場合があること等によるのであろう。また、40歳以上の人については、感染者がなかったわけではないが、抗体保有率に影響するほどには多くはなかったと考えられる。40歳未満での抗B19ウイルス抗体陽性者の割合が10年前と比較して20~40%上昇したことから、単純に計算すると、一回の流行で40歳未満の人口の約10%が感染したことになる。たとえば感染症サーベイランスによる1991、92年流行期間の伝染性紅斑患者総数は〔定点あたりの患者数×定点数×5~6(定点カバー率)÷(21.46+35.62)×2,400×5.5〕およそ75万人と推定されるが、40歳未満の人口は約8,000万人であるので、B19ウイルス感染者の約1/10が伝染性紅斑患者として把握されたことになる。

各県別の抗体保有状況では、宮城県の20~29歳、群馬県の10~19歳群にそれぞれ抗体保有率の谷が認められた(Fig. 5)。これらの結果を感染症サーベイランスによる伝染性紅斑患者発生状況と比較したが、はっきりとした関係は見いだされなかった。これは、患者情報が広い範囲から得られる情報であるのに対し、血清が比較的狭い地域で収集されたものであることによると考えられる。この

ように、各県別の抗体保有率はその県全体の状況を代表しているわけではない。しかし、3県を合計した抗体保有状況は、前回調査と比較した結果からも、わが国における抗 B19抗体保有状況を反映していると考えられる。

抗体保有率の上昇にともなって、今後の伝染性紅斑流行の規模や間隔がどのように変化するか興味を持たれる。

#### 文 献

- 1) Anderson, M.J., Jones, S.E., Fisher-Hoch, S.P., Lewis, E., Hall, S.M., Bartlett, C.R.L., Cohen, B. J., Mortimer, P.P. & Pereira, M.S.: Human parvovirus. The cause of erythema infectiosum (fifth disease)? [letter]. *Lancet*, i: 1378, 1983.
- 2) 布上 董: Parvovirus B19感染, 多彩な臨床像, 日内会誌, 83: 1365—1370, 1994.
- 3) 黒澤大介, 鎌田祥子, 鎌田公仁夫, 桑原 靖, 松永泰子, 武田直和, 井上 栄, 松浦善治: バキュロウイルス発現 B19粒子抗原を用いた EIA 法による抗 B19特異抗体の検出, 感染症誌, 67(臨時増刊): 190, 1993.
- 4) 布上 董: ヒトパルボウイルス B19のバキュロウイルス組み替え抗原 (VP1+VP2) による流行年別抗体の検出法. *ibid*, 69: 546—552, 1995.
- 5) 要藤裕孝, 工藤 亨, 長谷山圭司, 千葉峻三, 松永泰子, 山崎修道: バキュロウイルス発現抗原を用いた EIA によるヒトパルボウイルス B19抗体の測定. *ibid*, 69: 1135—1140, 1995.
- 6) Yamashita, K., Matsunaga, Y., Taylor-Wiedeman, J. & Yamazaki, S.: A significant age shift of the human parvovirus B19 antibody prevalence among young adults in Japan observed in a decade. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, 45: 49—58, 1992.
- 7) 厚生省保健医療局エイズ結核感染症課: 伝染性紅斑. In 平成 4 年 感染症サーベイランス事業年報, 53—56, 1995.
- 8) Gay, N.J., Hesketh, L.M., Cohen, B.J., Rush, M., Bates, C., Morgan-Capner, P. & Miller, E.: Age specific antibody prevalence to parvovirus B19: How many women are infected in pregnancy? *C.D.R.*, 4: R104—R107, 1994.

### Seroepidemiology of Human Parvovirus B19 Using Recombinant VP1 + VP2 Particle Antigen

Yasuko MATSUNAGA<sup>1)</sup>, Naokazu TAKEDA<sup>1)</sup>, Shudo YAMAZAKI<sup>1)</sup>,  
Kunio KAMATA<sup>2)</sup> & Daisuke KUROSAWA<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>National Institute of Health, Japan

<sup>2)</sup>Denka Seiken Co. Ltd.

Antibody prevalence to B19 virus in Japan was previously reported with 1973 and 1984 serum collections. Since then we have had two big epidemics of erythema infectiosum in Japan: 1986–87 and 1991–92. In an attempt to estimate how much those epidemics have affected seroprevalence to B19 virus infection, we studied seroepidemiology in three separate areas using a newly developed ELISA system consisting of recombinant VP1 + VP2 particle antigen. Total of 900 sera obtained in 1993 from healthy individuals living in northern, central and southwest parts of Japan were assayed for the presence of anti B19 IgG antibody. In the first, the new assay system was compared with our conventional assay system in which native B19 virus particles were used as antigen. Of 220 serum samples tested, 212 (96.4%) gave same results in both assays. Remaining 8 samples which gave variable results were those of near cut off values. We concluded that this new ELISA system can be recommended for seroepidemiological use. Antibody prevalence rates were 10% (0–4 y), 54% (5–9 y), 59% (10–14 y), 46% (15–19 Y), 38% (20–29 y), 48% (30–39 y), 64% (40–49y) and 76% (50 y-). No gender difference was observed. Comparison of antibody prevalences in 1973, 1984 and 1993 suggested that approximately 10% (about 8 million people) of the total population under 40 years of age acquired immunity to B19 virus during one epidemic period.