

EIA法, inhibition EIA法, PA法, WB法, IF法による キャリアの検索方法の検討

(分担研究: HTLV-I母子感染予防対策——近畿・沖縄——)

一 條 元 彦, 安 藤 良 弥

要約 妊婦におけるヒトT細胞白血病ウイルス(HTLV-I)に対する抗体(抗HTLV-I抗体)の測定をPA法, EIA法, inhibition EIA法, ウエスタンブロット法(WB法), IF法により行った。健常妊婦11863例を一次スクリーニングとしてEIA法により検索した結果、うち69例が陽性と判定されたが、これらの検体をinhibition EIA, WB法により再度検討を加えると、カットオフ・インデックス5以上の検体は全てWB法も陽性であり、カットオフ・インデックス1~5の検体についてはinhibition rateが70%以上の検体ではWB法でも陽性であった。また、IF法による検討でもこれらは陽性であり、EIA法ではカットオフ・インデックス5以上の検体はWB法IF法等の確認試験を実施しなくても陽性と断定でき、この値が1~5の検体についてはinhibition EIAによるinhibition rateが70%以上の検体は同じく確認試験をすることなく陽性と断定可能と考えられた。inhibition EIAにおけるinhibition rateが70%未満の検体にはtrue positive/false positiveが混在しておりこの範疇にはいる検体についてのみ確認試験が必要であるが、これを必要とする検体は極少数の検体となることが判明した。一方、沖縄において4641名の妊婦をHTLV-I抗体のfirst screeningとしてPA法により検索した結果は、このうちの318名がpositiveという結果を与えたが、IF法により全例を再検討した場合には、このうち293名が抗体陽性となった。PA法陰性検体にはIF法によって陽性と判定された検体は存在しなかった。したがって、PA法では偽陰性の存在がない成績が得られた。しかし、PA法により陽性となった318例中25例はIF法で陰性であり、PA法における偽陽性率は0.54%を示した。産婦人科においてはHTLV-Iの母児感染防止の観点から妊婦における抗HTLV-I抗体のスクリーニングが広く実施されつつあるが、いかに簡略に正確な結果が得られるかが重要な課題となりつつある。以上に述べたごとく、2つの方法をfirst screeningに使った場合の問題点を考慮すると、EIA法を使用した方法が妊婦における抗体スクリーニングから確認試験にいたる一連のシステムとして利用しやすいと考える。

見出し語: 成人T細胞白血病(ATL) 抗HTLV-I抗体(Anti HTLV-I antibody) 妊娠(pregnancy) 酵素抗体法(Enzyme immunoassay) 確認試験(confirmatory test)

研究方法 妊娠初期における定例検査時に採血し、この検体についてEIA法(エイテストATL エーザイ)により一次スクリーニングを行った。ここで陽性と判定された検体については、確認試験をエイテストATL用特異性確認試薬を用いたinhibition EIAならびにMT-2 (HTLV-I 感染細胞株)の可溶性抗原を用いたWB strip assayにより行った。検体は妊娠の初期検査を実施するとき同時に採血し、この血清についてEIA法を行いカットオフ値1.0以上の検体を陽性としてこれらの検体についてinhibition EIAを実施した。またこれらの検体はすべてWB法により抗体の特異性ととも抗体のクラス(IgG・IgM)について検索した。対照として、妊娠初期に採血した非HTLV-Iキャリアの血清を用い同様に検討を加えた。また一部の検体についてはIF法も実施し、IF法とEIA法の相関についても検討を加えられるよう留意した。WB法についてはMT-2のデオキシコル酸可溶性分画をSDS-PAGEにより展開し、ニトロセルロース膜に転写したものをを用いた。WB法の判定はHTLV-Iに特異的な蛋白のうちp19, p24, p28の3種の抗原蛋白と反応する抗体が存在するか否かによった。しかし、WB法では上記のすべての蛋白と反応する場合だけがpositiveというわけではなく、この3種の蛋白のうちのあるものにだけ反応する場合もある。このため、上記の3種全ての蛋白に対する抗体が揃わない検体については、先に精製HTLV-I抗原と反応させた後、再度被検血清と反応させ発色の程度が減弱した場合には陽性と判定した。IF法では、MT-1細胞を抗原として5倍希釈血清と反応させ特異的蛍光がみとめられた場合陽性と判定した。沖縄においては、定例妊婦検診時に採血した血清を用いPA法、IF法により同時に検索した。PA法はキットに記された方法で16倍希釈における凝集の有無により判定し、IF法では上記の判定基準により抗体の有無を判定した。

結果 1. EIA法のカットオフ・インデックスによる判定

今回、我々が検索した地域における成績では検体11863検体中65検体が陽性であり、陽性率は0.55%であった。このうち、一次スクリーニングでは11863検体中69例がEIA法により陽性と判定されたが、確認試験で一次ス

クリーニングにおける陽性検体より振るい落とされた検体は4検体で、これらの検体の吸光度より算出されたカットオフ・インデックスは最大のもので2.2であった。EIA法により陽性とされた検体69例のうちカットオフ・インデックスが3以上の検体は47例で確認試験を実施した結果からも全例陽性と判断された。EIA法ではカットオフ・インデックスによっては確認試験を省略しうる可能性があることを踏まえて検討すると、この値が3以上の検体では他の抗体検査法によっても全ての検体が陽性を示した。妊婦においては非特異反応が多いと言われるため、false positiveを避けるため確認試験の省略が可能なこの値を5以上として、以後検討を進めた。すなわち、妊婦においてはカットオフ・インデックスが5以上の検体にはfalse positiveが存在することはないとの前提にたつて、カットオフ・インデックスが1~5の検体については、inhibition EIA法・WB法・IF法による成績を検討した。

2. inhibition EIAによる抑制率

一般成人におけるinhibition EIAの抑制率の成績では、この値が30%以下はnegativeであり50%以上はpositiveという判定基準が示されている。しかし、妊婦における抑制率をみた結果からは、カットオフ・インデックス1.0以上で抑制率が70%以上の検体は全てtrue positiveと判定されたが、抑制率が70%未満の妊婦血清における結果を検討すると、この値が50%を越える検体においてもnegative症例(IF法・WB法ともにnegative)が存在することがあることが判明した。このことは、inhibition EIA法の判定基準を、妊婦においては多少変更する必要があることを示唆している。すなわち、inhibition EIA法を使用することにより確認試験であるWB法を省略できる基準として、カットオフ・インデックス1~5であり、かつinhibition EIA法による抑制率が70%以上とすることを提唱したい。

3. EIA法・inhibition EIA法によっても判定保留とされた検体におけるWB法・IF法による抗HTLV-I抗体の確認

いままでの判定(確認試験として使用可能と考えられる)によっても、判定保留とせざるを得なかった検体について、WB法・IF法で検討してみると9検体のうち5検体のみがWB法により陽性で4検体が陰性と判定され、ま

たIF法においても5 検体は陽性、4 検体は陰性と判定されWB法の成績と一致した。

以上、今回の成績は妊婦血清であってもEIA法においてカットオフ・インデックス値が5以上のものは確認試験をしなくてもtrue positiveと判定できること、カットオフ・インデックス値が1以上5未満の検体についてはinhibition EIAを実施し70%以上の抑制がかかる検体についてはtrue positiveと判定してもよいことが明らかになった。カットオフ・インデックス値が1以上5未満のもので、抑制率が70%未満の検体では、その中に陽性検体と陰性検体が混在しており、このような検体においてはWB法、IF法などの確認試験により最終的な判定を必要とする。

4. 妊婦におけるHTLV-I抗体(IgM・IgG)の有無
妊娠初期に検査をした場合に、夫婦間感染早期である可能性が存在している。そこで、すべての検体についてWB法でHTLV-I IgG, IgM抗体を検索したが、妊婦においてはすべての検討症例でIgG抗体が陽性であった。一部の検体で、とくにカットオフ・インデックス値が高いものにIgM抗体が同時に存在している例が多く認められたが、IgM抗体のみの症例は存在しなかった。また、EIA法のカットオフ・インデックス値が1.0未満でHTLV-I抗体IgGがnegativeと判定された59例についてWB法によりIgG抗体・IgM抗体を測定した結果、これらの検体からはどちらのクラスの抗体も検出できず、妊婦においてはIgM抗HTLV-I抗体のみ陽性と判定される症例はなかった。

5. endemic areaの沖縄での検査では、妊婦4641例中PA法(+) IF法(+) 検体は293例で、PA法(+) IF法(-) 検体は25例であった。すなわち、この成績ではPA法における疑陽性率は25/4641で0.54%であった。また、non-endemic areaの奈良県での成績は被検者300例中PA法(+) は7例であったが、このうち6例はIF法(-) で偽陽性率が高い印象であった。これらに関しては今後の検討が必要である。

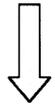
考察 EIA法を一次スクリーニングとして行った場合には、確認試験としてのWB法、またはIF法まで実施すべき検体はかなり少なくなり、かつ結果の判定が早急にできるようになる可能性が判明した。今回のわれわれの成績からも、EIA法により陽性とされた検体69例

のうちカットオフ・インデックスが5以上の検体42例は確認試験を必要としない検体であり、残りの27検体についてもinhibition EIAによって検討すると抑制率70%以上の検体18例については確認試験を実施する必要のない陽性症例と考えられる。このことは、EIA法によりHTLV-I抗体キャリアを検索するシステムを想定した場合においては、WB法、IF法などの確認試験を省略することが可能になる。今回の成績からは、最終的にWB法なりIF法なりで判定せざるをえない症例は、我々の症例のなかでも全検体11863例中わずかに9例(0.076%)にすぎなかった。これらの9検体のうちtrue positiveと判定された検体は5例であったが、このようにEIA/EIA inhibition testを実施することによりHTLV-I抗体陽性キャリアの検索が極めて簡単なシステムとして可能になると考えられる。輸血による感染例の報告を参考にすると輸血後2~4週でIgM抗体が産生され、その後次第にIgG抗体が検出できるようになることが述べられているが、妊婦においてはキャリアと判定されたすべての症例でIgG抗体は陽性であるものの、IgM抗体のみが陽性と判断された症例は認められなかった。したがって、妊婦における抗HTLV-I抗体の一次スクリーニングをIgG抗体の検索により行っても問題はないと考えられた。

文献

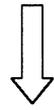
- 1) Takatsuki K et al: Adult T-cell leukemia in Japan. Topics in hematology. Excerpta Medica. Amsterdam 73-77, 1977.
- 2) Hinuma Y et al: Adult T-cell leukemia: Antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. Proc Nat Acad Sci 78: 6476-6480, 1981.
- 3) Okochi K et al: A retrospective study on transmission of adult T-cell leukemia virus by blood transfusion: seroconversion in recipients. Vox Sang 46: 245-253, 1984.
- 4) 一條元彦ほか: 成人T細胞白血病の母子感染について. 日本医事新報. 3267: 11-14, 1986.

- 5) Taguchi H et al: Enzyme-linked immunosorbent assay of antibodies to adult T-cell leukemia-associated antigen. *Gann* 74:185-187, 1983.
- 6) 植松俊昭ほか: 抗ATLA抗体測定におけるELISA法による特異性確認法の検討. *臨床とウイルス*. 14:189-193, 1986
- 7) 伊藤和彦ほか: エイテストATLを使ったATLA抗体測定の偽陽性反応の検討. *臨床免疫*. 19:267-272, 1987.
- 8) Yamaguchi K et al: Comparison of immunoperoxidase staining with indirect immunofluorescence, ELISA and Western blotting assays for detecting anti-HTLV-I antibodies in systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Pathol*, 41:57-61, 1988.
- 9) 上平 憲ほか: HTLV-I 持続感染者のIgM抗ATLA抗体について. *日内会誌*. 77:481-486, 1988.



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 妊婦におけるヒトT細胞白血病ウイルス(HTLV-1)に対する抗体(抗HTLV-1抗体)の測定をPA法・EIA法・inhibitionEIA法・ウエスタンブロット法(WB法)・IF法により行った。健康妊婦11863例を一次スクリーニングとしてEIA法により検索した結果、うち69例が陽性と判定されたが、これらの検体をinhibitionEIA, WB法により再度検討を加えると、カットオフ・インデックス5以上の検体は全て旧法も陽性であり、カットオフ・インデックス1~5の検体についてはinhibition rateが70%以上の検体ではWB法でも陽性であった。また、IF法による検討でもこれらは陽性であり、EIA法ではカットオフ・インデックス5以上の検体はWB法・IF法等の確認試験を実施しなくても陽性と断定でき、この値が1~5の検体についてはinhibitionEIAによるinhibition rateが70%以上の検体は同じく確認試験をすることなく陽性と断定可能と考えられた。inhibitionEIAにおけるinhibition rateが70%未満の検体にはtrue positive/false positiveが混在しておりこの範疇にはいる検体についてのみ確認試験が必要であるが、これを必要とする検体は極少数の検体となることが判明した。一方、沖縄において4641名の妊婦をHTLV-1抗体のfirst screeningとしてPA法により検索した結果は、このうちの318名がpositiveという結果を与えたが、IF法により全例を再検討した場合には、このうち293名が抗体陽性となった。PA法陰性検体にはIF法によって陽性と判定された検体は存在しなかった。したがって、PA法では偽陰性の存在がない成績が得られた。しかし、PA法により陽性となった318例中25例はIF法で陰性であり、PA法における偽陽性率は0.54%を示した。産婦人科においてはHTLV-1の母児感染防止の観点から妊婦における抗HTLV-1抗体のスクリーニングが広く実施されつつあるが、いかに簡略に正確な結果が得られるかが重要な課題となりつつある。以上に述べたごとく、2つの方法をfirst screeningに使った場合の問題点を考慮すると、EIA法を使用した方法が妊婦における抗体スクリーニングから確認試験にいたる一連のシステムとして利用しやすいと考える。