

HTLV-1抗体測定法の比較研究——特に改良型 PA法の評価を中心に

山崎修道¹⁾、宮村紀久子¹⁾、山下和子^{1),2)}、荻野利夫¹⁾、武部 豊^{1),2)}、
前川みどり²⁾、三谷幸之助²⁾、若宮真紀³⁾、丹生谷博⁶⁾、下遠野邦忠⁶⁾、
渡辺準之助⁴⁾、馬場宏一⁵⁾

要約

輸血用血液とHTLV-1感染キャリアーの抗体スクリーニングテストとして広く用いられている現行PA法と改良型PA法とを比較した結果、改良型PAはいわゆるgray samples(その大部分は現行PAで1:16~1:32を示す疑陽性検体)の約80%を陰性と判定し、更に現行PAでプロゾン反応を示した検体(疑陰性)を陽性と判定した。現行PAで陽性、改良型PAで陰性を示した検体(152例)の中、3例のみがエイテストEIAで陽性を示したが、FAを含む他の抗体検査法では全て陰性であった。従って改良型PAは非特異反応を大幅に減らしたが、偽陰性を生じる確率は極めて低いと推定される。

またPCRによるDNA増幅法で陽性を示したHTLV-1キャリアー22例の内、1例を除く21例がPAで抗体陽性、その中19例がr-envELISAで陽性、16例がエイテストEIAでも陽性を示した。更にPAとWBの両方で抗体陽性と判定された8例のうち、エイテストEIAで陽性を示したのはわずか2例であったのに対して、r-envELISAでは、7例が陽性を示した。これらの結果から、r-envELISAは感度と特異性に優れた抗体検査法として、HTLV-1キャリアーの診断に有用であることが示唆された。

見出し語

HTLV-1抗体測定、PA法、ELISA、
FA、PCR

研究方法

1)改良型PA試薬キット(セロディアHTLV-1、富士レビオ)の評価を目的として、現

行PAキット(セロディアATLA、富士レビオ)との比較試験を行った。

被検血清：①日赤中央血液センターのgray samples(現行PA法で1:16~1:32)300検体、
②阪大小児科のHTLV-1感染が疑われるキャリアーあるいはその家族などの血清86検体、

1)国立予防衛生研究所ウイルス中央検査部、2)国立予防衛生研究所エイズ疫学室、3)東京大学医学部保健学科、4)日赤中央血液センター、5)阪大医学部小児科、6)国立ガンセンターウイルス部

③現行PA法でプロゾーン反応を示した8検体。
2) HTLV-1感染の確認診断法の確立を目的として、上記2つのPA法、EIAキット(エイテスト、エーザイ)、Western Blot(WB:エーザイ)、recombinant envELISA(パキエロウイルスベクター発現系、自家製)並びにプロウイルスDNA増幅法(PCR)を使用して、計40人の検体についてHTLV-1感染診断の検査法を比較検討した。

検査対象:HTLV-1感染を疑うキャリアーとその家族などで、妊産婦19例、子供15例、夫3例、母1例、腎移植者2例の計40例から得られた血清及び末梢リンパ球(1.5×10^5 細胞/サンプル)で各々42サンプル(阪大医)。

結果

1. 現行PAと改良型PAの比較試験(表1、表2)

1) 日赤のgray samples 300検体についてHTLV-1の抗体測定を行ったデータを表1に、その解析結果を表2にまとめた。その結果を要約すると:

①Gray samplesの33%(99/300)が現行PA法による再検で陰性を示した。

②現行PA法による再試験で陽性を示した201検体の中の152(76%)が改良型PAで陰性を示した。これらの検体の中、3例がエイテストEIAのみで陽性を示したが、FA、r-envELISA、カルバスでは陰性であった。結果として、Gray samples全体の82.7%(24

8/300)が改良型PAで陰性と判定された。

③現行PA(-)で、改良型(+)が3例(3%)あった。しかし、この3検体は全て、EIA(エイテスト)で陰性(cutt-off index < 1.0)、WB(IgG)で陰性、FAでも陰性であった。

④両PA法で陽性を示した49例中1例のみがFAで陽性を示し、その検体は、現行PA(1:32)、改良型PA(1:64)、EIA(3.287)で全て陽性を示した。

2) 阪大サンプル86検体について、HTLV-1の抗体測定を行ったデータを表3に、その解析結果を表4に示した。これによると、現行PAと改良型PAの陽性一致率は47%(29/62)で、結果として現行PA(+)
の53%(33/62)が改良型PAで陰性と判定された。この33例についての確認試験は現在進行中である。更に、現行PA(-)で改良PA(+)と判定された1例については、r-envELISA(-)、WB(-)であった。

3) 現行PA法と改良PA法の抗体価の相関。上記の日赤サンプルと阪大サンプルの計386検体について、現行PAと改良PAによって得られた抗体価の相関を図1に示した。現行PA法に対する陽性一致率は30%(78/263)、陰性一致率は97%(119/123)で、全サンプルの陰性率が改良PAで2.5倍増加した〔現行PA=32%(123/386)、改良PA=79%(304/386)〕。更に、両方で陽性を示した78検体の中、43検体

(55%)が改良PA値の方が低かった。

4) プロゾーン検体の試験

現行PAによる定性的スクリーニング(1:16で判定)でprozone反応を示したため偽陰性を生じた8検体は、改良PAでは全て陽性反応を呈した。

2. HTLV-1感染の確認診断法の検討。

HTLV-1感染者及びその家族40例について、「研究方法」の項で述べた各種検査法を用いて試験した結果を表5に示した。その結果を要約すると:

①PA法による判定結果は、現行法と改良法で良く一致した。

②PA法で13検体が陰性を示し、それらは全て、他の抗体測定法でも陰性であった。しかし、No. 35(PCR陽性の母親の子、9ヶ月)だけは、LTRをプライマーとして用いたPCRのみ陽性であった。

③PCR陽性の22例について、各種抗体測定法の感度を比較すると、PA(-)は上記の1例(No. 35)のみで、感度が最も良く、次にr-envELISA(陰性3例のみ)、エイテストEIA(陰性5例)であった(表6)。r-envELISA(-)の3例(No. 17、29、35)は全てエイテストEIAでも陰性であった。また、この3例の中1例(No. 17)はWBで陽性を示した。

④PCR陰性18例の中、抗体がいずれかの方法で検出されたのは5例のみで、その内訳は、

PAのみ陽性が1例(No. 25)、PAとr-envELISAの両方陽性が4例(No. 12、32、42(3)、No. 46)であった。この4例の中、エイテストEIAが陽性は2例のみ、WBで陽性は3例であった。

PCRと抗体との不一致がみられた9例について、各検査法の成績を表7に示した。

考察

HTLV-1感染の実験室診断法の一つとして、輸血用血液、ウイルスキャリアー、並びにATL患者の血清抗体スクリーニングに最も広く利用されている現行PA法(ゼラチン凝集法)は、簡便で高感度の検査試薬キット(セロディアATLA)を用いて行われているが、2つの欠点が指摘されている。第1点は、特異性に問題があり、相当数の疑陽性を生じることである。即ち現PA法で低力価(1:16~1:32)を示した血清(gray serum samples)のほとんどが、他の抗体測定法を組み合わせた確認検査で陰性と判定され、おそらく非特異反応による疑陽性と判断される。第2点は、比較的抗体価の高い血清において、稀にプロゾーン現象を生じるため、スクリーニング用の定性試験において陰性と判定されることである(偽陰性の問題)。従って、非特異反応並びにプロゾーン反応をできるだけ減らし、HTLV-1抗体のみを感度よく検出するPA試薬の改良が望まれている。

今回、そのような目的で富士レビオ社が新しく開発した改良型PA試薬キット(セロディア

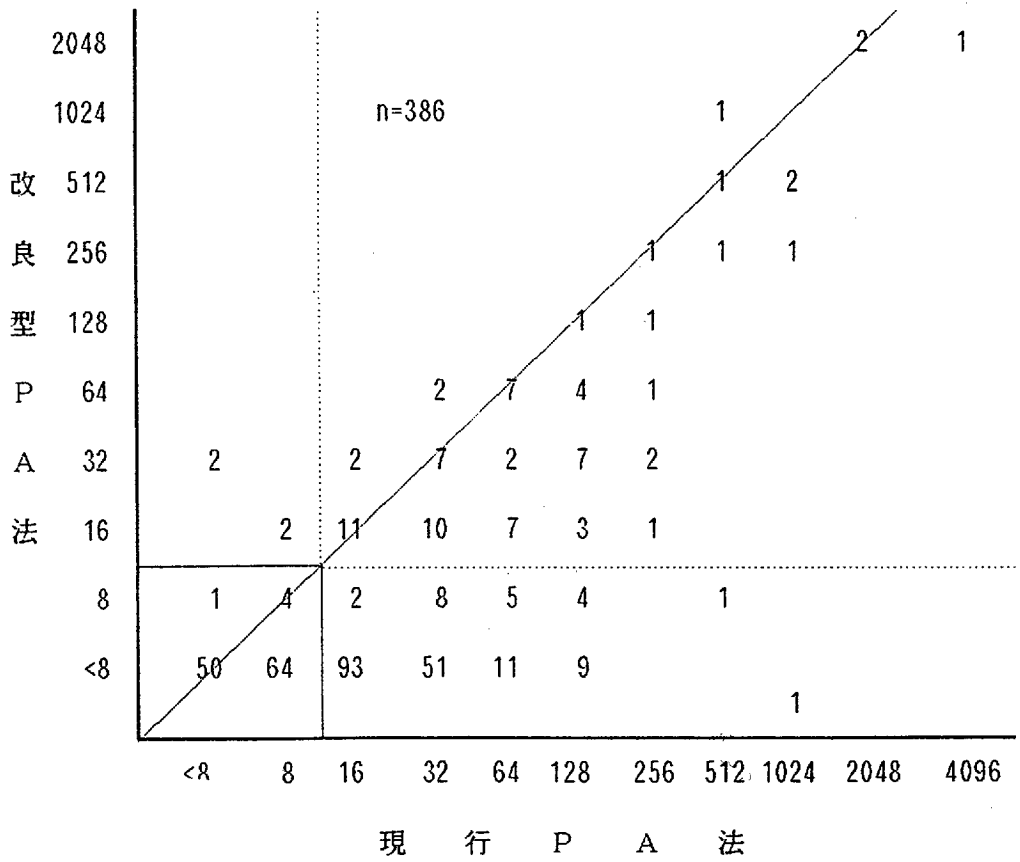
HTLV-1)の評価を目的として、現行PAと改良型PAの比較試験を中心に、HTLV-1抗体測定法の検討を行った。

まず、日赤中央血液センターにおいて、輸血用血液を現行PA法によってスクリーニングした結果、いわゆるgray seraとして除外した300検体の提供を受けた。この検体について、改良型PAで検査した結果、その約83%が陰性と判定された。これらの検体は全てFAで陰性、更にその一部はカルバス試薬(HTLV-1感染細胞をスライドに固定した診断用抗原を用いてHTLV-1抗体をEIAで検出)による再試験でも陰性であった。また現行PAの再試験で陽性、改良型PAで陰性を示した152検体の中、3例がエイテストEIAでのみ陽性を示したが、他の検査法(FA、カルバス、r-envELISA)では全て陰性であった。これらの結果から、改良型PAは非特異反応による疑陽性を大幅に減らし、これによって陰性と判定された血清はおそらく偽陰性を含まないものと推定される。しかし全般に、改良型PAによる測定結果は、現行PAによる抗体価より低値を示すことから、今後更に多くの検体を用いて偽陰性の有無を検討してゆくことが望ましい。

HTLV-1キャリアーの診断に当たっては、一般に2種類以上のスクリーニング法(e.g. PAとEIA)によって抗体検査を行った後、繰り返し陽性を示した検体について更に他の特異性の高い検査法(e.g. WBあるいはFAなど)によって確認するやり方が一般に用いられている。本研究

では、PCRによって末梢リンパ球からHTLV-1プロウイルスDNAが検出された22例(HTLV-1キャリアー)を対象として、PA法(現行PA及び改良型PA、富士レビオ)、エイテストEIA(エーザイ)、WB(エーザイ)並びに予研で新たに開発したr-envELISAの抗体検出感度を比較した。その結果、PA法はいずれも100%の高率で陽性を示し、次いでr-envELISAの感度が高いことが見いだされた。更にPAとWBの両方で抗体陽性が確認された8例のうち7例がr-envELISAでも陽性を示した。現在のWBはenv抗体を検出できないという欠点をもつので、r-envELISAとの組合せによる抗体検査は感度と特異性に優れ、HTLV-1キャリアーの診断に有用であると思われる。

図1 現行PA法と改良型PA法の抗体価の相関



		改良型PA法		合計
		陰性 (≤1:8)	陽性 (≥1:16)	
現行PA法	陰性	119	4	123
	陽性	185	78	263
合計		304	82	386

表 1. 現行 P A と改良 P A の比較試験成績

被検血清：日赤 gray samples (1:16~1:32) ; 300
 判定基準：陰性 $\leq 1:8$ 、陽性 $\geq 1:16$

現行 P A と改良型 P A の比較定量試験 (日赤サンプル)

現行 P A 希釈倍数	改良型 P A 希釈倍数				計
	≤ 8	16	32	64	
≤ 8	96	1	2	0	99
16	94	11	2	0	107
32	51	9	7	2	69
64	4	4	2	4	14
128	3	1	6	1	11
計	248	26	19	7	300

表 2.

	改良型 P A		合計
	陰性	陽性	
現 陰性	96	3	99
行 P A 陽性	152	49	201
合計	248	52	300

表 3. 現行 P A と改良型 P A の比較試験成績

被検血清：HTLV-1 感染を疑われた者の血清（阪大サンプル）

判定基準：陰性 $\leq 1:8$ 、陽性 $\geq 1:16$

現行 P A 希釈倍数	改良型 P A 希釈倍数										計
	≤ 8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	
≤ 8	23	1	0	0	0	0	0	0	0	0	24
16	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
32	8	1	0	0	0	0	0	0	0	0	9
64	2	3	0	3	0	0	0	0	0	0	18
128	10	2	1	3	1	0	0	0	0	0	17
256	0	1	2	1	1	1	0	0	0	0	6
512	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	4
1024	1	0	0	0	0	1	2	0	0	0	5
2048	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2
4096	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
計	56	8	3	7	2	3	3	1	3	3	86

表 4.

		改良型 P A		合計
		陰性	陽性	
現 行 P A	陰性	23	1	24
	陽性	33	29	62
合計		56	30	86

表5. PCRと各種抗体測定法による検査成績の比較

NO.	年齢	性別	P C R		rENV ELISA			EIAキット		W B		P A			
			DOT	SOUTH	N147	C182	C.I.	抑制率	IgG	IgM	CONV.	NEW			
2	28Y	F	+	+	0.88	+	0.09	-	2.7+	88%+			512	512	
4	35Y	F	+	+	0.42	+	-0.02	-	4.8++	ND			2048	512	
5	40Y	F	+	+	0.65	+	0.03	-	4.4++	ND			512	256	
6	14Y	F	子	-	ND	-	-0.01	-	0.3-	ND			<8	<8	
7	30Y	F	-	ND	-0.02	-	0.01	-	0.6-	89%+	-	-	<8	<8	
11	34Y	F	+	+	1.91	+	0.33	+	4.6++	ND			2048	2048	
12	29Y	F	-	ND	0.19	+	0.02	-	0.6-	70%+	+	保留	128	64	
13	30Y	F	腎臓症	+	+	1.75	+	0.04	-	2.1+	83%+		1024	2048	
14	30Y	F	+	+	1.92	+	0.83	+	5.0++	ND			8000	8000	
15	32Y	F	+	+	0.58	+	0.03	-	4.1++	90%+			512	256	
16	4Y	F	子	-	ND	0.01	-	0.02	-	0.3-	ND		<8	<8	
17	60Y	F	母	+	+	0.03	-	0.05	-	0.5-	ND	+	+	128	64
18	30Y	F	+	+	0.79	+	0.03	-	1.7+	ND			1024	512	
19	30Y	M	夫	-	-	-0.00	-	-0.00	-	0.2-	ND		<16	<16	
20	1Y	M	子	+	+	0.40	+	0.03	-	2.9+	ND	+	保留	512	512
20	23Y	F	+	-	0.26	+	0.04	-	0.7-	52%+	+	-	128	64	
21	24Y	F	子	+	+	0.20	+	-0.00	-	0.8-	61%+	+	-	128	128
22	1Y	F	子	-	ND	-0.00	-	-0.00	-	0.2-	ND		<16	<16	
24	32Y	F	子	+	+	0.41	+	0.01	-	0.8-	83%+	+	-	512	512
25	2M	F	子	-	ND	0.08	-	-0.00	-	0.4-	ND	保留	-	128	128
29	42Y	F	子	+	+	0.12	-	-0.01	-	0.6-	>100%+	保留	保留	64	128
30	1M	M	子	-	ND	-0.03	-	-0.01	-	0.2-	ND		<16	<16	
31	?	F	+	+	1.02	+	-0.00	-	1.1+	83%+			1024	512	
32	3M	M	子	-	ND	0.16	+	-0.02	-	0.2-	ND	-	-	32	64
33	2Y	M	子	-	ND	0.00	-	0.07	-	0.2-	ND		<16	<16	
34	24Y	F	+	+	1.45	+	0.54	+	2.9+	ND			>8192	>8192	
35	9M	?	子	LTR	LTR	-0.05	-	-0.07	-	0.2-	ND	-	-	<16	<16
36	5Y	M	子	-	ND	-0.03	-	-0.03	-	0.2-	ND		<16	<16	
37	4Y	F	子	-	ND	-0.08	-	-0.08	-	0.2-	ND		<16	<16	
38	26Y	F	姉	+	+	1.16	+	0.04	-	2.8+	ND		256	512	
39	2Y	F	子	-	ND	-0.00	-	-0.00	-	0.3-	ND		<16	<16	
40	30Y	F	子	+	+	0.80	+	0.10	-	2.5+	ND		1024	1024	
41	29Y	M	夫	-	ND	0.00	-	0.00	-	0.3-	ND		<16	<16	
3	32Y	F	子	-	ND	0.76	+	0.02	-	3.6++	ND	+	-	1024	256
42	32Y	F	子	-	ND	0.77	+	0.00	-	2.1+	ND	+	-	1024	512
44	5M	F	子	-	ND	0.01	-	-0.02	-	0.2-	ND		<16	<16	
43	38Y	M	夫	+	+	0.30	+	0.01	-	2.9+	ND		512	1024	
45	23Y	F	子	+	+	1.58	+	0.10	-	3.1++	ND		2048	4096	
46	1M	F	子	-	ND	1.03	+	-0.13	-	3.1++	ND	+	保留	2048	1024
47	36Y	F	子	+	+	1.39	+	0.52	+	3.0++	ND		512	1024	
48	11M	F	子	-	ND	-0.07	-	-0.02	-	0.5-	ND		<16	<16	
49	42Y	F	腎臓症	+	+	1.29	+	0.02	-	2.8+	ND		1024	2048	

[] は同一人の検体：2例（No.10とNo.21及びNo.3とNo.42）。

1) GAGとLTRのプライマーを使用してPCRで増幅（20-30サイクル）したDNA断片をdot blot hybridization及びSouthern blot hybridizationで解析。No. 35はLTRでのみ陽性で、他はGAG、LTRの両方共陽性。

2) 本報では、N147抗原を用いたrENV ELISAの結果のみを解析に用いた。

3) C.I.=cut-off index;陰性<1.0, 陽性 \geq 3.0で、 $1 \leq C.I. < 3$ は吸収試験の抑制率で判定; \geq 50%の抑制率を陽性と判定。

表6. PCRとrENV ELISA、EIAキット、PAとの比較

		P C R (-)	(+)	TOTAL
TOTAL		18	22	40
rENV (N147)	(-)	14	3*	17
ELISA	(+)	4*	19	23
エイテスト	(-)	16	5*	21
EIAキット	(+)	2*	17	19
PA	(-)	14	1*	15
	(+)	4*	21	25

表7 PCRと抗体との不一致例

L T R	P C R		P A		r - e n v	エイテスト	W B	
	G A G	現行	改良	ELISA	C. I.	I g G	I g M	
+	+	128	64	-	-	+	+	
+	+	64	128	-	-	保留	保留	
+	+	512	512	+	-	+	-	
+	+	128	128	+	-	+	-	
+	-	<16	<16	-	-	-	-	
-	-	128	64	+	-	+	保留	
-	-	1024	512	+	+	+	-	
-	-	2048	1024	+	+	+	保留	
-	-	32	64	+	-	-	-	



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 輸血用血液と HTLV-1 感染キャリアーの抗体スクリーニングテストとして広く用いられている現行 PA 法と改良型 PA 法とを比較した結果・改良型 PA はいわゆる gray samples(その大部分は現行 PA で 1:16 ~ 1:32 を示す疑陽性検体)の約 80%を陰性と判定し、更に現行 PA でプロゾーン反応を示した検体(疑陰性)を陽性と判定した。現行 PA で陽性、改良型 PA で陰性を示した検体(152 例)の中、3 例のみがエイテスト EIA で陽性を示したが、FA を含む他の抗体検査法では全て陰性であった。従って改良型 PA は非特異反応を大幅に減らしたが、偽陰性を生じる確率は極めて低いと推定される。

また PCR による DNA 増幅法で陽性を示した HTLV-1 キャリアー 22 例の内、1 例を除く 21 例が PA で抗体陽性、その中 19 例が r-envELISA で陽性、16 例がエイテスト EIA でも陽性を示した。更に PA と WB の両方で抗体陽性と判定された 8 例のうち、エイテスト EIA で陽性を示したのはわずか 2 例であったのに対して、r-envELISA では、7 例が陽性を示した。これらの結果から、r-envELISA は感度と特異性に優れた抗体検査法として、HTLV-1 キャリアーの診断に有用であることが示唆された。