

## HTLV-I血清診断についての検討

小野哲郎, 小河正雄, 大友信也

要約: 現在抗HTLV-I抗体の検出に用いられているWB法ではenv蛋白の抗体が検出しにくい傾向にあり、使用する抗原によっても差をみる事が知られている。これに関する実験として、部分精製抗原によるWB法の試みを行っている。すなわち、硫酸化セルロフィンおよびConA-Sepharoseゲルカラムを用い、HTLV-I抗原の精製を行い、これら2通りの部分精製抗原をブレンドし、SDS-PAGEにて展開後、WB法にてニトロセルロース膜に転写し、抗体検出用抗原とした。この抗原は、キャリア血清、ATL患者血清との反応でそれらの抗体と反応しgag蛋白及びenv蛋白のバンドを明瞭に示すことが判った。

見出し語: HTLV-I 精製、HTLV-I 抗体、硫酸化セルロフィン  
ConA-Sepharoseゲル

研究方法: 抗HTLV-I抗体の検出には、抗原由来の異なる蛋白を用いた複数の検査法が考案され、それにともない検査キットもいくつか開発されているが、程度の差はあるにしてもいずれの検査法においても特異性に問題があることが知られている。また、WB法では抗gag蛋白の抗体はよく検出されるが抗env蛋白の抗体は検出しにくいことも指摘されている。

前報において、吸着アフィニティ法により部分精製した抗原を用いたWB法について報告した。そこでの検討では、WB法では血清検体の性状によってはバンドの出現状況が異なり、使用する感染細胞の種類や性状によって非特異性の反応バンドが現れることを報告した。

今回、MT-2細胞培養上清を硫酸化セルロフィンおよびConA-Sepharoseゲルによる吸着アフィニティ法で部分精製した抗原、およびそれらをブレンドした抗原を用い、SERODIA-HTLV-Iによる抗HTLV-I抗体スクリーニングで陽性と判定された妊婦血清及び

大分県公害衛生センター (Oita Prefectural  
Institute of Health & Environment)

ATL患者血清を対象に検討した。

HTLV-I抗原の部分精製は、MT-2細胞培養上清を硫酸化セルロフィンカラムに吸着後、NaCl濃度のグラディエント溶出によりウイルスを回収し、透析の後ポリエチレングリコールにより濃縮した。ConA-Sepharoseゲルカラムでは、MT-2細胞培養上清を吸着後、0.5M methyl- $\alpha$ -D-mannosideを含むbufferで溶出し、透析の後ポリエチレングリコールで濃縮した。これらの液を部分精製抗原とし、それぞれ単独又はブレンドしSDS-PAGEにて展開後、WB法によりニトロセルロース膜に転写し、抗体検出用抗原とした。部分精製抗原についてはPA反応抑制法とIF反応抑制法でその抗原性を確かめ、さらに用意した参照血清（PA抗体価 2048倍以上、IF抗体価 1280倍以上）で反応性について検討した。

結果：

#### 1) PA法、IF法、WB法の成績比較

SERODIA HTLV-Iで16~128倍の抗体価を示すキャリア血清について、IF法で再検査を実施した結果では、そのうちの16.9%がIF法で陰性を示した（SERODIA ATLA との比較では約40%が陰性であった）。この16.9%の検体を更にWB法で調べると反応バンドの特徴からそのうちの8%は判定保留となった。上記キャリア血清のIF法とWB法の比較において、IF法、WB法の両方で一致して陽性を示した検体は95.5%、不一致の4.5%はIF法陽性でWB法陰性であった。

また、IF抗体価40倍未満のものは、その約

9.5%がWB法において主要抗原バンドの発現が弱いため判定保留となった。即ち、厳密な検討と判定が可能であるIF法に非特異反応がないとすると、WB法における反応がまだ不十分であることが示されたことになる。

#### 2) 部分精製抗原による比較

MT-2細胞産生HTLV-Iウイルス由来抗原を部分精製したものの反応は次のようであった。

a) MT-2細胞溶解液の超遠心上清をそのまま抗原としたWB法では、p15、p19、p24、p28、p53、gp46、gp62、gp68と多数の抗体を検出する成績が得られるが、抗env抗体に対する発現は弱く、検出しにくかった。

b) 硫酸化セルロフィンによる部分精製抗原はp19、p24、p28、p53、gp46、gp62、gp68に相当するバンドを発現する。その中でもp19、p24、p28、p53などgag蛋白に対しては比較的強く反応することが確認されたが、gp46、gp62、gp68などenv蛋白に対する反応は弱く検出しにくい。

c) ConA-Sepharoseカラムによる部分精製抗原はp40とgp46の蛋白の含有が多く、強い反応性が認められたが、抗gag蛋白に対する反応は弱かった。

d) 硫酸化セルロフィンによる部分精製抗原（1.3mg/ml）とConA-Sepharoseによる部分精製抗原（1.2mg/ml）を1:1の比にブレンドした抗原では、抗gag抗体に対する反応は強く認められるが、抗env抗体に対する反応は弱く検出し

にくい。しかし、そのブレンドの比を1:2にしたところ抗gag抗体および抗env抗体に対するその反応性は共に強く認められた。このブレンド比で調整した抗原を用いたWB法によって、HTLV-Iキャリア妊婦血清を再び検討した結果、表に示すような反応パターンとしてまとめることが出来た。一方同様にして患者血清11例を用いて検討して得られた反応パターンも表に示したが、現在のところキャリアと患者の抗体パターンで著明な差は認められていない。

考察：WB法において、血清検体の性状によってはバンドの出現状況が異なり、使用する細胞の種類や性状によっては非特異性の反応バンドが現れることが知られている。そのような理

由で我々は精製抗原の必要性を認めた。MT-2細胞増殖ウイルス抗原を精製する目的で、種々の方法を検討したが、HTLV-Iウイルス抗原の全てを確実に分離回収することは極めて困難であった。しかし、報告のように硫酸化セルロフィンカラムではgag蛋白抗原を、ConA-Sepharoseカラムではenv蛋白抗現をやや選択的に回収できることを見出した。さらに、これら両抗原を混合するとほぼ期待通りgag蛋白、env蛋白の両方を同時に検出しうる抗原を作成することが出来た。しかし、より確実に厳密な確定診断法としてのWB法を行うためには、抗原抗体の両面よりさらに種々の検討を加えて行く必要がある。

表 部分精製抗原における反応パターン

| 抗 原                |                  | W B 法    |     |     |     |     |      |      |      |   |
|--------------------|------------------|----------|-----|-----|-----|-----|------|------|------|---|
|                    |                  | P15      | P19 | P24 | P28 | P53 | gp46 | gp62 | gp68 |   |
| a)MT-2細胞溶解液の超遠心上清  |                  | +        | +   | ++  | ++  | ±   | ±    | ±    | +    |   |
| MT-2<br>細胞培養<br>上清 | b)硫酸化セルロフィン      | +        | ++  | ++  | +   | +   | ±    | ±    | ±    |   |
|                    | c)ConA-Sepharose | -        | ±   | ±   | ±   | -   | ++   | +    | ±    |   |
|                    | d) 1) b)+c)      | キャリア血清2) | +   | ++  | ++  | +   | ±    | ++   | +    | ± |
|                    |                  | 患者血清 3)  | +   | +   | ++  | +   | +    | ++   | +    | ± |

- 1) 硫酸化セルロフィン/ConA-Sepharose(1:2)混合抗原
- 2) 121例による平均的な反応パターン
- 3) 11例による平均的な反応パターン



## 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:現在抗 HTLV-1 抗体の検出に用いられている WB 法では env 蛋白の抗体が検出しにくい傾向にあり、使用する抗原によっても差をみることが知られている。これに関する実験として、部分精製抗原による WB 法の試みを行っている。すなわち、硫酸化セルロファインおよび ConA-Sepharose ゲルカラムを用い、HTLV-1 抗原の精製を行い、これら 2 通りの部分精製抗原をブレンドし、SDS-PAGE にて展開後、WB 法にてニトロセルロース膜に転写し、抗体検出用抗原とした。この抗原は、キャリア血清、ATL 患者血清との反応でそれらの抗体と反応し gag 蛋白及び env 蛋白のバンドを明瞭に示すことが判った。