抗 ATLA 抗体測定における酵素免疫測定法 (EIA 法) と ゼラチン粒子凝集法 (PA 法) との比較検討

小松 文夫 四方 学 古関 節子

東京医科歯科大学輸血部

(昭和61年 7 月25日受付)

COMPARATIVE STUDY AMONG ENZYME IMMUNOASSAY (EIA) AND GELATIN PARTICLE AGGLUTINATION TEST (PA TEST) FOR ANTIBODY SCREENING TO ADULT T-CELL LEUKEMIA-ASSOCIATED ANTIGEN (ATLA)

Fumio Komatsu, Manabu Shikata and Setsuko Koseki

The Blood Transfusion Service, School of Medicine, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo

EIA and PA test are simple, rapid and reliable methods for detection of anti-ATLA antibodies and suitable for mass screening of sera from blood donors. These methods, however, have some non-specific reactions in the procedures and sometimes show discrepancies in the detection rate. In this report comparative study using these methods and Western blotting method are performed.

EIA and PA test showed coincidence in the detection of sera with relatively high titer antibodies, whereas discrepancy was observed in the screening of sera with low titer reactions. Only PA test gave positive reactions in the early phase of seroconversion after transfusions. Non-specific reactions were recognized in the sera with antinuclear antibodies and in the sera of patients with malignant tumor. In EIA, inhibition tests are required on the sera among cut off index (usually 0.10 OD) and 0.30 OD. In PA test, re-examinations using Western blotting method or other method are required in the sera with antibody titer among 1:16 and 1:64.

成人T細胞白血病 (adult T-cell leukemia, ATL)の原因ウイルスは、家族内感染¹⁾²⁾や輸血によって感染する³⁾ことがあり、抗 ATLA (ATL-associated antigen) 抗体の検索は ATL の診断ばかりでなく、感染源となるキャリアを発見するのにきわめて重要である。近年、抗 ATLA 抗体検出法として酵素免疫抗体法 (enzyme immunoassay, EIA 法)⁴⁾およびゼラチン粒子凝集法 (gelatin particle agglutination test, PA 法)⁵⁾が開発されたことは喜ばしい。抗体の検索は特異性が高く、簡便で、短時間に大量の検体を処理できる方法が望ましいが、上記の2法はこれらの必要条件をほぼ満たしており、一般に用いられつつある。ただし、2法を併用した場合若干の不一致がみられ、非特異的反応を示すことがある。今回、これらの2法

を Western blot 法 (WB 法)⁶⁾と比較検討したので報告する。

方 法

検査の対象は、東京都内またはその周辺に在住する献血者および本学・本学関連病院に入院する患者で、上記の EIA 法 (「Eitest-ATL」(エーザイ KK)) および PA 法 (「セロディア-ATL」(富士レビオ KK)) を用いて抗体の検索を行い、各々の検出状況を比較した。PA 法については指示書に従い16倍以上を陽性とした。EIA 法についてはほぼ指示書に従ったが、低力価の検体については確認試験を行った。すなわちキットの製造元から供給されたインヒビジョン抗原液 (Lot No. T6011) を用い、37℃、60分検体を中和し、その後再度 EIA 法を行い、吸光度の抑制率が50%を越える場合を

陽性、それ以下を示す場合を陰性とした。抑制率は以下のごとく計算した。

抑制率＝

$$\frac{\text{中和前の吸光度} - \text{中和後の吸光度}}{\text{中和前の吸光度}} \times 100$$

EIA 法または PA 法で陽性と判定されたものについては WB 法を行った。WB 法は、MT-2細胞をデオキシコール酸ナトリウムにて溶解抽出して得られた抗原を12.5%SDS-PAGEで展開し、ニトロセルロース膜に転与した。これに被検血清を室温で1時間反応させ、つぎにCappel社製抗ヒトIgGヤギ血清または抗ヒトIgMヤギ血清を作し、さらに抗ヤギIgGウサギ血清、ペルオキシダーゼ標識プロテインAを順に反応させた後、4-クロール-1-ナフトールにて発色させた。

結 果

1. 献血者の抗 ATLA 抗体スクリーニング

献血者5,200例についてまずEIA法を実施した。そのうちカットオフ値（通常は0.10を示す）以上の吸光度を示したものは33例あった。これらについて上記の確認試験およびPA法、WB法を行った。吸光度0.30以上を示した24例は確認試験で抑制率が50%を越え、PA法はすべて128倍以上、WB法はすべて陽性を示した。

カットオフ値～0.30未満の9例については、抑制率50%以上を示したものは3例で、PA法はこれら3例を含め6例が16～64倍を示した。またWB法では抑制率50%を越えたもののみが陽性を示した。

カットオフ値以下の例については、無作為抽出した300例について確認試験を行ったが、すべて抑制率50%以下であった。また、1,000例についてPA法を行ったところ、1例のみが32倍の値を示した。ただしこの1例はWB法では陰性であった。

以上より、EIA法で吸光度0.30以上を示す例は陽性と考えられ、またカットオフ値～0.30未満のものは確認試験で抑制率50%以上を示す例も陽性として扱い、50%以下のものは陰性として扱うべきと考えられた。PA法で128倍以上のものは陽性と考えられるが、16～64倍のものは判定に注意し、

表1 患者における抗 ATLA 抗体陽性率

	検査例数	抗体陽性例数
一般患者	2,012	56(2.8%)
人工透析患者	176	17(9.7%)
抗白血球抗体陽性者 (頻回輸血患者)	47	14(29.8%)

表2 抗 ATLA 抗体陽性患者の疾患別分類

1. 一般患者(60例)			
○悪性腫瘍	20	○良性腫瘍	1
○急性白血病	6	○胃潰瘍	2
○肝硬変	6	○慢性腎不全	2
○慢性気管支炎	4	○慢性活動性肝炎	1
○再生不良性貧血	3	○胆石症	1
○免疫疾患	3	○高血圧	3
○ATL	2	○脳軟化症	2
○ATL(疑)	1	○外傷その他	3
2. 人工透析患者(17例)			
○悪性腫瘍合併	2		
3. 抗白血球抗体陽性患者(14例)			
○悪性腫瘍	1	○再生不良性貧血	1
○急性白血病	10	○心弁膜症	1
○前白血病	1		

WB法その他の方法で確認する必要があると思われる。

なお、東京都内およびその周辺に在住する献血者の確認試験後の抗体検出率は約0.5%と考えられた。

2. 患者についての抗 ATLA 抗体の検査

(1) 抗 ATLA 抗体の検出率

入院患者についてはすべてEIA法およびPA法を行い、EIA法は上記の確認試験を行ってから判定し、PA法は一応16倍以上を陽性とした。EIA法またはPA法で陽性と判定された例数を表1に示す。表のうち抗白血球抗体陽性者とは、入院中すでに頻回の輸血を受け抗白血球同種抗体を産生した患者のことである。一般患者の場合も輸血歴を有するものは含まれるが輸血量は比較的少なかった。一般患者は献血者より抗体陽性率は高く、人工透析患者はかなり高く、また抗白血球抗体陽性者はさらに高い陽性率を示した。

陽性を示した例の疾患別分類を表2に示す。

(2) EIA法とPA法の不一致例(表3)

一般患者ではEIA法とPA法で不一致をきた

表3 EIA 法, PA 法の不一致例

							WB		
							IgM	IgG	
1.	N.M.	56	M	(-)	16	(-)	(-)	(-)	L. Cirrh.
2.	H.T.	54	F	(-)	16	(-)	(-)	(-)	C.A. Hepat.
3.	S.T.	46	F	(-)	16	(-)	(-)	(-)	CRF, SLE
4.	S.K.	54	M	(-)	16	(-)	(-)	(-)	C. Hepat.
5.	S.K.	54	F	(-)	16	(-)	(-)	(-)	Hypertension
6.	I.Y.	79	F	(-)	16	(-)	(-)	(-)	Gastr. Ca.(?)
7.	I.F.	59	M	(-)	16	(-)	(-)	(-)	L. Ca.
8.	S.S.	55	M	(-)	16	(-)	(-)	(-)	Gastr. Ulcer
9.	B.K.	76	F	(-)	16	(-)	(-)	(-)	Splenic Ca.
10.	S.K.	64	F	(-)	32	(-)	(-)	(-)	Gastr. Ulcer
11.	O.J.	32	F	(-)	32	(-)	(-)	(-)	Gastr. Ca.
12.	M.M.	82	F	(-)	32	(-)	(-)	(-)	Aplast. A.
13.	Y.S.	58	M	(-)	64	(-)	(-)	(-)	Tongue Ca.
14.	N.M.	40	M	(-)	64	(-)	(-)	(-)	Careb. Ca.
15.	I.K.	64	F	(-)	64	(-)	(-)	(-)	C. Bronchitis
16.	K.S.	86	M	(-)	64	(-)	(-)	(-)	Gastr. Ca.
17.	A.H.	60	F	(-)*	1024	(-)	(-)	(+) ^w	Aplast. A.
18.	T.T.	56	M	(+)	(-)	(+) ^{GP}	(+) ^{GP}	(+) ^{GP}	L. Cirrh.
19.	H.N.	56	M	(+)	(-)	(-)	(-)	(+) ^w	Trauma
20.	Y.H.	13	F	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	Aplast. A.

(*後に陽性となった)

表5 悪性腫瘍患者の抗体陽性例

	EIA	PA	WB	
1. O. C. 68 M	(+)	(-)		Liver Ca.
2. B. K. 76 F	(-)	16	(-)	Splenic Ca.
3. S. S. 55 M	(-)	16	(-)	Gastr. Ca.
4. I. F. 59 M	(-)	16	(-)	Liver Ca.
5. I. Y. 79 F	(-)	16	(-)	Gastr. Ca.
6. T. S. 43 F	(+)	32		輸血歴有 Liver Ca.
7. O. J. 32 F	(+)	32	(-)	Gastr. Ca.
8. N. M. 40 M	(-)	64	(-)	Cereb. Ca.
9. K. S. 86 M	(-)	64	(-)	Gastr. Ca.
10. Y. S. 58 M	(-)	64	(-)	Tongue Ca.
11. F. S. 71 F	(+)	64	(+)	Rectum Ca.
12. K. I. 44 F	(+)	128	(+)	輸血歴有 Lung Ca.
13. U. A. 30 F	(+)	512	(+)	Gastr. Ca.
14. M. M. 62 M	(+)	1024	(+)	Liver Ca.
15. K. Y. 53 M	(+)	1024	(+)	Maxil. Ca.
16. C. H. 81 M	(+)	1024	(+)	Uterine Ca.
17. I. S. 76 F	(+)	2048		輸血歴有 Uterine Ca.
18. O. T. 42 F	(+)	8192↑	(+)	Maxil. Ca.
19. K. Y. 60 M	(+)			Maxil. Ca.
20. K. Y. 67 F				Rectum Ca.
21. M. K. 55 M				輸血後に Blad. Ca.
22. S. M. 50 M				陽転化 Gastr. Ca.
23. G. S. 59 M				Maxil. Ca.

表4 人工透析患者の抗体陽性例

	EIA	PA	WB	透析年数	輸 血 歴
1. S. T. 53 M	(-)	16	(-)	3 ヶ月	30(単位)SLE
2. K. I. 44 M	(+)	128	(+)	13年	10 Lung Ca.
3. S. M. 38 M	(+)	256	(+)	1年	2
4. H. K. 81 F	(+)	256		4年	14
5. Y. S. 39 M	(+)	512	(+)	3年	46
6. S. A. 42 M	(+)	512	(+)	19年	10
7. M. S. 27 M	(+)	512	(+)	9年	10
8. S. I. 40 M	(+)	512	(+)	8年	20
9. T. K. 66 F	(+)	1024	(+)	1年	0
10. M. Y. 65 M	(+)	1024	(+)	3年	6
11. O. C. 69 F	(+)	1024	(+)	5 ヶ月	0
12. I. S. 76 F	(+)	2048		3年	6 Uterine Ca.
13. A. H. 44 F	(+)	4096	(+)	3 ヶ月	0
14. T. I. 51 M	(+)	4096	(+)	10年	0
15. Y. H. 64 F	(+)	8192↑	(+)	15年	61
16. E. H. 43 M	(+)	8192↑	(+)	16年	0
17. N. T. 55 M	(+)	8192↑	(+)	3年	46

す例が多かったが、人工透析患者では不一致例は1例のみ(表4)、抗白血球抗体陽性者では不一致例はみられなかった。また抗白血球抗体が抗ATLA検体の検出に非特異的反応を示すことはなかった。

今回の検査では抗核抗体陽性例が8例含まれて

いた。そのうち2例が吸光度0.16, 0.19を示した。ただしこれらは確認試験で陰性と判定され、PA法、WB法はともに陰性であった。また抗核抗体の力価と吸光度の高さとの関連はなかった。

EIA法またはPA法で陽性と判定されたものについてHBs抗原、HBs抗体を検査したところ、HBs抗原陽性1例、HBs抗体陽性15例がみつかった。HBs抗体陽性例が比較的多かったがHBs抗体による抗ATLA抗体の非特異的反応はみられなかった。

表3をみると、不一致を示す例は悪性腫瘍に多かった。そこで今回陽性を示した悪性腫瘍の例をすべて表5にまとめてみた。この表でみると、PA法で16~64倍を示す例は大部分不一致であった。悪性腫瘍患者でこのように不一致をきたす原因は今のところ不明である。

今回の検査ではたまたま抗体陽性血を輸血されたと判明した患者が17例あった。いずれも血球成分を含んだ血液の輸血である。このうち輸血後の経過が観察されたものは13例で、うち7例が抗体が陽転化した(図1)。陽転化した例はまずPA法

図1 抗 ATLA 抗体陽性血輸血患者の輸血後の経過

で16倍を示し、力価が上昇するにつれてやがて EIA 法でも陽性化した。この EIA 法で陽性を示す前の一時期は PA 法と EIA 法が不一致としてとらえられた。なお、この時期は WB 法では IgM 抗体が検出され、とくに小数例でははじめに gp68 がとらえられた。

考 察

EIA 法⁴⁾も PA 法⁵⁾も抗 ATLA 抗体の検出法としては優れた方法と思われるが、低力価を示す検体の場合不一致となることがあり、2 法はある程度非特異的反応を示すことがある。今回はこれらの 2 法と WB 法⁶⁾とを比較し検討した。

まず EIA 法については、吸光度 0.30 以上を示す例は陽性とみなしてよいが、カットオフ値～0.3 未満の例については PA 法および WB 法と一致しないことがあるので確認試験をする必要があると思われる。確認試験を行う目安は吸光度 0.30 が適当と考えられる。一方、PA 法については 128 倍以上を示す例は陽性として誤りはないが、16～64 倍は EIA 法および WB 法と一致しない例がかなりあるので、この範囲を示す検体については WB 法を行うか、その他の方法で確認する必要があると思われる。

実際に低力価を示す検体や不一致をきたす検体については判定が難しい。低力価で、一法でのみ陽性を示す検体でも、その検体のリンパ球を長期間培養すると、やがて ATLA (抗原) が誘導されることがある⁷⁾。そのためこのような検体の判定は慎重にならざるを得ない。一般に献血者の選択

にあたっては、疑わしい反応を示す例は献血者から除外するのが得策と思われる。しかしそれはそれとして、検査にあたってはできるだけ正確に判定すべきであり、またどのような例が不一致となりやすいのかを知っておくことは大切である。

EIA 法と PA 法で不一致となりやすい例についてみる。まず、抗核抗体を有する患者は EIA 法で非特異的反応を起こしやすいといわれている。EIA 法は MT-2 細胞を界面活性剤で処理して抗原として用いている⁴⁾からである。今回の検査では 8 例中 2 例がカットオフ値を越える値を示し、確認試験によって陰性と判定された。確認試験を行わなければ陽性とされたかも知れない。ただし抗核抗体の力価の高い例が高い吸光度を示すとはかぎらないので、むしろ抗原抗体複合体がウエルの表面に付着し、それによって非特異的反応を起こすのかも知れない。

頻回の輸血を受けたため抗白血球抗体を産生した患者では高率に抗 ATLA 抗体が検出されたが、これらは抗体価が高く、不一致となる例はなかった。抗白血球抗体が抗 ATLA 抗体の検出に非特異的反応をおよぼすことはないと考えられる。

HBs 抗原・抗体と抗 ATLA 抗体の検出の関連もみてみたが、特に関連は認められなかった。

抗 ATLA 抗体陽性例は表 2 に示すように悪性腫瘍、急性白血病患者および人工透析患者が多かった。このうち急性白血病患者に不一致をみることはほとんどなかった。急性白血病患者の場合は輸血回数が多いため輸血による感染例が多いものと思われる。急性白血病患者の 10 例は抗白血球抗体を産生していた。

人工透析患者も不一致を示す例は少なく、抗体陽性者は比較的高い抗体価を示した。人工透析患者では抗体陽性率はとくに高くはなく、高い場合は輸血歴が多いためとされている⁸⁾。今回の例の場合表 4 に示すようにそれほど輸血歴は多くはなかった。これらはもともとキャリアだったのかも知れない。ATL の患者の糸球体に ATLA の抗原抗体複合体が沈着することがある⁹⁾といわれるが、人工透析患者にキャリアが多いとすれば、キャ

リアと腎炎の発生に関連があるか否か興味ある問題である。

不一致をきたす例はとくに悪性腫瘍に多かった(表3)。悪性腫瘍以外の疾患ではとくに一定の傾向はみられなかった。悪性腫瘍の場合、PA法で16~64倍を示す例が不一致となりやすかった(表5)。これらは非特異的反応と考えられるが、悪性腫瘍患者で何故このような反応が多いのか、現在のところ不明であり、今後追求してみたい。

抗体陽性血を輸血されて抗体陽転化を起こす場合も、ある一時期は不一致となることがある。この場合は非特異的反応ではない。EIA法はIgG抗体をとらえるが、PA法はIgG抗体とIgM抗体をともにとらえるので¹⁰⁾、ごく初期のIgM抗体が産生されて、未だIgG抗体が産生されていない時期はPA法のみが陽性を示し、不一致となる。今回の検査でも図に示すようにPA法が先行した。PA法の16倍以上を陽性とする、PA法はきわめて早期に抗体の陽転化をとらえることができるといえる。

結 論

EIA法およびPA法による抗ATLA抗体の検出状況をWB法と比較し、不一致となりやすい例について検討した。EIA法については吸光度0.30以上を示す場合陽性と考えられるが、カットオフ値~0.30未満の例については確認試験を行ってから判定するようにし、一方PA法については128倍以上の例は陽性としてよいが16~64倍の例についての判定は慎重を要し、WB法を行うか、何らかの方法で確認すべきと思われた。抗核抗体を有する検体および悪性腫瘍疾患の検体は非特異的反応を生ずることがある。輸血後の抗体陽転化の初期はPA法のみが陽性を示すので不一致となることがある。

文 献

- 1) Nakano, S., Ando, Y., Ihijo, M., Moriyama, I., Saito, S., Sugimura, K. and Hinuma, Y.:

Search for possible routes of vertical and horizontal transmission of adult T-cell leukemia virus. *Gann*, 75: 1044—1045, 1984.

- 2) Kinoshita, K., Yamanouchi, K., Ikeda, S., Momita, S., Amagasaki, T., Soda, H., Ichimaru, M., Moriuchi, K., Katamine, S., Miyamoto, T. and Hino, S.: Oral infection of common marmoset with human T-cell leukemia virus Type-1 (HTLV-1) by inoculating fresh human milk of HTLV-1 carrier mothers. *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, 7: 1147—1153, 1985.
- 3) Okochi, K., Sato, H. and Hinuma, Y.: A retrospective study on transmission of adult T-cell leukemia virus by blood transfusion: Seroconversion in recipients. *Vox Sang.*, 46: 245—253, 1984.
- 4) 沢田高志, 守本富昭, 田口博國, 藤下雅敏, 三好勇夫: 酵素免疫測定法(EIA法)による成人T細胞白血病ウイルス関連抗原(ATLA)に対する抗体の測定. *臨床免疫*, 17: 246—254, 1985.
- 5) Ikeda, M., Fujino, R., Matsui, T., Yoshida, T., Komoda, H. and Imai, T.: A new agglutination test for serum antibodies to adult T-cell leukemia virus. *Gann*, 75: 845—848, 1984.
- 6) Yamamoto, N., Schneider, J., Koyanagi, Y., Hinuma, Y. and Hunsman, G.: Adult T-cell leukemia (ATL) virus-specific antibodies in ATL patients with healthy virus carriers. *Int. J. Cancer*, 32: 281—287, 1983.
- 7) 宮本寛治, 富田徳子, 近行正昭, 岡 千世, 内山英一, 石井昭夫, 西崎太計夫: 成人T細胞白血病ウイルス(HTLV-1)抗体偽陰性者リンパ球のウイルス抗原(ATLA)誘導. *日本輸血会誌*, 32: 291—291, 1986.
- 8) Shimase, K., Ichimura, H., Tamura, I., Kaneto, E., Kurimura, O., Nanba, K., Hino, N., Ono, T., Kawai, J. and Takasugi, T.: Risk of HTLV infection in patients on haemodialysis. *Lancet*, i: 565—566, 1984.
- 9) Miyoshi, I., Yoshimoto, S., Ohtsuki, Y., Fujishita, M., Akagi, T., Yoshiki, T. and Koike, T.: Adult T-cell leukemia antigen in renal glomerulus. *Lancet*, ii: 768—769, 1983.
- 10) 吉田 勉, 小林 進, 山本直樹: ATLA抗体測定におけるゼラチン粒子凝集法の問題点. *医学のあゆみ*, 136: 387—388, 1986.