EIA 法による AIDS ウイルス (HIV) 抗体測定 —ELAVIA キットの評価と実用性について—

小 林 進 山 本 直 樹

山口大学医学部寄生虫学教室

(昭和61年7月25日受付)

THE DETECTION OF ANTI-HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS (HIV) ANTIBODIES WITH ENZYME IMMUNOASSAY (EIA): Evaluation and Practical Use of the ELAVIA Kit

Susumu Kobayashi and Naoki Yamamoto

Department of Virology and Parasitology, Yamaguchi University School of Medicine
Ube, Yamaguchi-ken, Japan 755

The recent studies demonstrated that anti-human immunodeficiency virus (HIV) antibodies and acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) were prevalent in recipients or hemophilia patients transfused or treated with blood or its products from anti-HIV positive donors. The HIV transmission with blood transfusion or blood products can be prevented with elimination of anti-HIV positive blood from donors.

For this purpose, we evaluated a test kit for anti-HIV antibodies, ELAVIA-Ac-Ab-Ak developed by Diagnostics Pasteur (France), using sera from various sources. Comparative studies were carried with indirect immunofluorescence (IF) assay. The frequencies of anti-HIV with EIA method in 116 samples of Japanese hemophiliacs, in 119 samples of American AIDS or ARC patients, in 54 samples of homosexual men and in 130 samples of control were shown to be 37.1%, 97.5%, 16.7% and 0.0%, respectively. While those with IF method were shown to be 36.2%, 96.8%, 14.8% and 0.0%, respectively. The coincidence rate for antibody positive samples was 98.3% with EIA and IF methods. All of the positive sera by IF were also positive by the EIA method.

In ELAVIA assay treatment of the sera with 56°C, 30 min did not affect the final results significantly.

はじめに

後天性免疫不全症候群 (AIDS; acquired immunodeficiency syndrome) は1981年に初めて米国で報告された¹⁾. この病気の high risk group は男性同性愛者, 薬物常用者 (静脈注射), アフリカ人, ハイチ人 (現在は否定されている) などであった. また AIDS 患者との性的接触者, 頻回輸血を受けた者, 血液製剤の治療を受けた者でも発症が報告されている²⁾.

アメリカではすでに患者が21,000人を越え, その半数は死亡していること, さらに欧州, 豪州など全世界に拡がっていることが知られている. 日

本でも本年6月現在16名の患者が確認されている. また血友病患者の中には AIDS ウイルスに対する抗体を保有するものが多数検出されている^{3)~5)}.

AIDS は HIV (human immunodeficiency virus) の感染の結果起こる感染症であることが確実視されている. HIV の汚染, 拡散を防ぐにはウイルス保有者の発見に努めることが重要である. 特に輸血や血液製剤などの医療行為に伴う AIDS ウイルスの感染はウイルスに汚染された血液を輸血や血液製剤の原料から排除すれば防ぐことが可能である.

抗 HIV 抗体の検出法としては、Western blot (WB) 法、Radioimmunoprecipitation (RIP) 法、間接蛍光抗体 (IF) 法、酵素免疫測定 (EIA) 法などがある。輸血用供血者のスクリーニングを行う場合は短時間に多数の検体を検査する必要がある。この目的にかなう方法としては EIA 法が適している。EIA 法はすでに数社で検査キットとして開発されている⁶⁾。今回、Diagnostics Pasteur (フランス) の開発した ELAVIA[®]・Ac・Ab・Ak キットを入手する機会が得られたので、AIDS 患者、男性同性愛者、血友病患者などの血清について、IF 法と比較し、EIA 法の評価を行った。さらに供血者、健常人、種々の疾患患者血清などを用いて実用性についても検討を行った。

材料と方法

1. 血清

日本人血友病患者血清116検体、アメリカ人 AIDS および ARC (AIDS-related complex) 患者血清119検体、アメリカ人男性同性愛者血清54検体、当教室に検査依頼のあった日本人疑 AIDS 患者および男性同性愛者血清19検体、対照血清として医学部学生および教室員血清130検体、合計438検体について、IF 法と EIA 法を実施し、両者の結果について比較検討した。さらに実践に即した方法で実用性を検討するため、日本人供血者血清360検体、アメリカ人供血者血清1,070検体、成人健診血清400検体、頻回輸血歴のある透析患者血清85検体、急性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、悪性リンパ腫などを含む悪性疾患患者血清57検体、全身性エリテマトーデス (SLE) 血清26検体、ATLA (adult T-cell leukemia associated antigen) 抗体陽性血清390検体、HB 抗原陽性血清94検体、HB 抗体陽性血清407検体、免疫不全患者、頻回輸血者、血友病患者家族などを含む、その他血清26検体、合計2,915検体について、EIA 法でスクリーニングを行い、陽性値を示した検体は EIA 法の再検査と IF 法を実施し、EIA 法の評価と実用性について検討した。血清はすべて -20℃ に凍結保存したものをを用いた。

2. EIA 法

Diagnostics Pasteur の開発した ELAVIA[®]

キットは輸入販売元、イムニス社から提供された。この検査キットの測定原理は96穴マイクロプレートの well に LAV (Lymphadenopathy associated virus) 感染細胞から調整したウイルス抗原を固相化したもの (赤マーク：LAV・Ag 陽性抗原) とウイルス未感染細胞から調整した対照抗原を固相化したもの (黒マーク：LAV・Ag 陰性抗原) の2種類を用いたサンドイッチ法による EIA キットである。

この検査キットには96検体分の試薬類がセットされている。

検査方法は使用説明書に従って実施した。その概要は表1に示した。

被検血清の希釈は96穴平底マイクロプレートを用いて、1:10倍前希釈を行なった。抗原を固相化したプレートの全穴に血清希釈液を90 μ l ずつ分注し、8連マルチマイクロピペッターを用いて、10倍前希釈した被検血清を10 μ l ずつ、赤マーク、黒マーク各列に加え、終濃度100倍希釈とした。この場合は1枚のプレートに被検血清を分注するのに要する時間を3分間程度に短縮できた。第一次反応の時間差による誤差を少なくすることができた。

プレートの洗浄はマイクロプレート洗浄機を用いて行ない、洗浄終了後、プレートをペーパータオル上に倒置し、完全に水切りを行ない、試薬類の残留による非特異反応を少なくするように努めた。

酵素反応は使用10分前に調整した酵素基質液を用い、室温、暗所で、正確に30分間反応し、直ちに反応停止液を加え、酵素反応時間差による誤差を少なくするように努めた。

測定：EIA マイクロプレート用分光光度計 (オートリーダー) を用いて吸光度 (OD₄₉₂) を反応停止後30分以内に測定する。吸光度測定には Diagnostics Pasteur LP 200を使用した。

結果の判定：抗 HIV 抗体の判定は LAV・Ag 陽性 (赤マーク) と LAV・Ag 陰性 (黒マーク) の well の吸光度を比較して行う。陽性対照血清の吸光度差 ($\Delta A = \text{LAV} \cdot \text{Ag 陽性 OD}_{492} - \text{LAV} \cdot \text{Ag 陰性 OD}_{492}$) が 0.500 以上を示し、陰性対照血清の

表1 ELAVIA による HIV 抗体測定法

操 作	操 作 内 容
1. 洗 淨	洗浄液 (R2) で 2 回洗浄, 250 μ l/well
2. 血清希釈	検体希釈液 (R5) で100倍希釈, 分注 100 μ l/well, <div>陰性対照血清 (R3) 100希釈, 赤マーク 2 穴 黒マーク 2 穴 陽性対照血清 (R4) 100希釈, 2 穴 2 穴 被検血清 100希釈, 1 穴 1 穴</div>
3. 一次反応	37 $^{\circ}$ C, 90 $\pm$ 5 分, (粘着フィルムでシール) 40 $^{\circ}$ C, 80 $\pm$ 5 分
4. 洗 淨	洗浄液 (R8) で 3 回洗浄, 250 μ l/well
5. 二次反応	ペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG 抗体 (R6) 100 μ l/well 分注, (粘着フィルムでシール) 37 $^{\circ}$ C, 60 $\pm$ 5 分 40 $^{\circ}$ C, 50 $\pm$ 5 分
6. 洗 淨	洗浄液 (R2) で 4 回洗浄, 250 μ l/well
7. 酵素反応	酵素基質液 (R8+R9), 使用10分前調整, 100 μ l/well 分注, 室温, 暗所, 30分
8. 反応停止	反応停止液 (R10), 50 μ l/well 分注
9. 測 定	OD ₄₉₂ 吸光度測定 (反応停止後30分以内) EIA マイクロプレート用分光光度計使用

OD が0.300以下であることを確認し, 被検血清の ΔA が0.300以上であれば, 抗 HIV 抗体陽性, 0.300以下であれば陰性と判定した.

3. 間接蛍光抗体 (IF) 法

HTLV-III 感染 H9細胞⁷⁾を抗原として, 初検血清を PBS で 1 : 10倍希釈し, FITC 標識抗ヒト IgG 抗体を用いて, 日沼ら⁸⁾の方法に従って行った. HTLV-III 感染 H9細胞は全細胞数の 5 ~10%の細胞のみがウイルス抗原を発現しており, 抗 HIV 抗体陽性血清と反応し, 特異的蛍光像を示し, 大部分 (95~90%) の細胞は陰性像を示す. これらのことから HTLV-III 感染 H9細胞株は未知検体の特異蛍光像を判定するのに適した細胞である. なお IF 法には抗 HIV 抗体陽性の血友病患者血清を陽性対照として用いて同時に同様に処理した.

4. Radioimmunoprecipitation (RIP) 法

HTLV-III 感染 Molt-4細胞⁹⁾を50 μ Ci/ml, ³H-leucine 存在下で16時間培養後, 培養上清から³H-標識ウイルスを蔗糖濃度勾配遠心法で精製し, 小柳ら¹⁰⁾の方法に従って RIP 法を行った. 判定は HTLV-III のエンベロップ蛋白, gp 160又は gp 120に対する特異反応を指標にした.

結 果

1. EIA 法と IF 法による抗 HIV 抗体陽性率

日本人血友病患者血清116検体, アメリカ人 AIDS および ARC 患者血清119検体, アメリカ人男性同性愛者血清54検体, 日本人男性同性愛者血清19検体, 対照血清として医学部学生と教室員血清130検体, 合計438検体について EIA 法と IF 法の両者を用いて抗 HIV 抗体測定を行った結果を表 2 に示した.

血友病患者血清116検体の抗 HIV 抗体陽性率は1985年以前に採血された検体では EIA 法で 9 (17.0%)例, IF 法で 9 (17.0%)例が陽性を示し, 1985年以後に採血された検体ではそれぞれ, 34 (54.0%), 33 (52.4%) が陽性を示し, 全体ではそれぞれ43例 (37.1%), 42例 (36.2%) が陽性であった.

アメリカ人 AIDS および ARC 患者血清119検体では EIA 法で116例 (97.5%), IF 法で115例 (96.6%) が陽性を示した.

アメリカ人男性同性愛者54検体では EIA 法で 9 例 (16.7%), IF 法で 8 例 (14.8%) が陽性を示した. 当教室に検査依頼された疑 AIDS 患者および男性同性愛者血清19検体では EIA 法 3 例

表 2 EIA 法と IF 法の検出比較

検 体 名	検体数	EIA 法			IF 法		
		陽 性	陰 性	陽性率 (%)	陽 性	陰 性	陽性率 (%)
血反病患者, 1985以前 (日本人) 1985以後	53	9	44	17.0	9	44	17.0
	63	34	29	54.0	33	30	52.4
計	116	43	73	37.1	42	74	36.2
AIDS 及び ARC 患者 (アメリカ人)	119	116	3	97.5	115	4	96.6
男性同性愛者 (アメリカ人)	54	9	45	16.7	8	46	14.8
男性同性愛者 (日本人)	19	3	16	15.8	3	16	15.8
医学部学生・教室員	130	0	130	0.0	0	130	0.0
合 計	438	171	267	39.0	168	270	38.4

表 3 EIA 法と IF 法の一致率

検 体 名	IF 法 EIA 法			計 (%)	一致率 (%)
		陽 性	陰 性		
血反病患者 (日本人) (n=116)	陽 性	42	1	43(37.1)	97.7
	陰 性	0	73	73(62.9)	100.0
	計 (%)	42 (36.2)	74 (63.8)	116 (100.0)	99.1
AIDS 及び ARC 患者 (アメリカ人) (n=119)	陽 性	115	1	116(97.5)	99.1
	陰 性	0	3	3(2.5)	100.0
	計 (%)	115 (96.6)	4 (3.4)	119 (100.0)	99.2
男性同性愛者 (アメリカ人) (n=54)	陽 性	8	1	9(16.7)	88.9
	陰 性	0	45	45(83.3)	100.0
	計 (%)	8 (14.8)	46 (85.2)	54 (100.0)	98.2
男性同性愛者 (日本人) (n=19)	陽 性	3	0	3(15.8)	100.0
	陰 性	0	16	16(84.2)	100.0
	計 (%)	3 (15.8)	16 (84.2)	19 (100.0)	100.0
医学部学生・教室員 (n=130)	陽 性	0	0	0(0.0)	
	陰 性	0	130	130(100.0)	100.0
	計 (%)	0 (0.0)	130 (100.0)	130 (100.0)	100.0
全検体 n=438	陽 性	168	3	171(39.0)	98.3
	陰 性	0	267	267(61.0)	100.0
	計 (%)	168 (38.4)	270 (61.6)	438 (100.0)	99.3

(15.8%), IF 法でも 3 例が陽性を示した。対照血清に用いた医学部学生および教室員血清130検体では EIA 法, IF 法共にすべて陰性を示した。

2. EIA 法と IF 法の一致率
各検体別に EIA 法陽性検体と陰性検体に分け、IF 法の結果との一致率を表 3 に示した。

血友病患者血清ではEIA法で陽性を示す検体の43例中42例がIF法で陽性を示し、両法の一致率は97.7%を示し、EIA法陰性を示す検体はすべてIF法陰性を示した。IF法で陽性を示す検体はすべてEIA法陽性を示した。血友病患者血清のEIA法とIF法との全体の一致率は99.1%（42+73/116）であった。

アメリカ人AIDSおよびARC患者血清ではEIA法で陽性を示す検体のIF法との一致率は99.1%であり、EIA法とIF法の全体の一致率は99.2%であった。アメリカ人男性同性愛者では、EIA法陽性検体のIF法との一致率は88.9%であり、全体の一致率は98.2%であった。日本人男性同性愛者では、EIA法陽性検体のIF法との一致率は100%であり、全体の一致率も100%であった。対照血清の医学部学生・教室員血清ではすべてEIA法、IF法共に陰性であり一致率は100%であった。

今回、EIA法とIF法の両法で検査した全検体438例についてみると、EIA法で陽性を示した検体のIF法との一致率は98.3%であった。IF法で陽性を示す検体はすべてEIA法陽性を示し、EIA法で陰性を示す検体はすべてIF法陰性を示し、EIA法とIF法の全体の一致率は99.3%を示した。

以上の結果からIF法で陽性を示す検体はすべてEIA法陽性を示し、IF法陽性EIA法陰性を示す検体（false negative, 偽陰性）は1例も検出されなかった。

3. EIA法の吸光度分布

各検体別にEIA法吸光度分布を表4に示した。

ELAVIA®キットはLAV感染細胞から調整したLAV・Ag陽性（赤マーク）とウイルス未感染細胞から調整した対照抗原（黒マーク）を固相化した2本立になっており、LAV・Ag陽性の吸光度から対照抗原の吸光度を差引いた値（ΔA）が0.3

表4 EIA法吸光度の分布

検体名 吸光度差	血友病患者 (日本人)	AIDS及び ARC患者 (アメリカ人)	男性同性愛者 (アメリカ人)	男性同性愛者 (日本人)	医学部学生 ・教室員	合 計
-1.00~-0.50						
-0.50~-0.40						
-0.40~-0.30						
-0.30~-0.20						
-0.20~-0.10	7	1	2	1	2	13
-0.10~-0.05	5				3	8
-0.05~ 0.00	29		11	8	58	106
0.00~ 0.05	26		17	6	60	109
0.05~ 0.10	4	1	13	1	7	26
0.10~ 0.20	2	1	1			4
0.20~ 0.30			1			1
0.30~ 0.40	1/1**		1/0			2/1 (1)*
0.40~ 0.50						
0.50~ 0.75	3/2					3/2 (1)*
0.75~ 1.00	3/3	2/2	1/1			6/6
1.00~ 1.50	12/12	20/19	3/3	2/2		37/36(1)*
1.50~ 2.00	11/11	39/39	1/1			51/51
2.00~ 2.50	8/8	23/23	2/2	1/1		34/24
≥2.50	5/5	32/32	1/1			38/38
Total	116	119	54	19	130	438
EIA (+)	43	116	9	3	0	171
IF (+)	42	115	8	3	0	168(3)*

()*: EIA法陽性、IF法陰性を示す検体。
1/1**: EIA法陽性検体数/IF法陽性検体

以上を示す検体を陽性、0.3未満を陰性と判定している。吸光度差 (ΔA) が負の値を示した検体は LAV・Ag 陽性 well よりも対照抗原 Well との反応(非特異的反応)が強いことを示している。EIA 法陰性を示す検体は吸光度差(ΔA)が $-0.050 \sim +0.050$ を中心に分布を示し、EIA 法陽性を示す検体は $1.50 \sim 2.00$ を中心に分布を示し、全体では2峰性の分布を示した。IF 法陽性検体は吸光度差 0.300 以上に分布を示した。EIA 法と IF 法で不一致を示す検体 (EIA (+), IF (-)) は血友病患者、AIDS 患者および男性同性愛者の血清においてそれぞれ1例ずつ計3例が検出されており、それらの吸光度差はそれぞれ、 $0.727, 1.084, 0.389$ であった。これらの検体はEIA法の再検査を行った結果、血友病患者、男性同性愛者血清は陰性を示し、AIDS患者血清は3回繰返したが3回とも陽性を示した。

4. EIA法の吸光度とIF抗体価

IF法の抗体価測定は10倍希釈血清で陽性を示した検体については、さらに2倍階段希釈を行い、陽性を示す最大希釈倍数をIF抗体価とした。

EIA法の吸光度とIF抗体価との相関は図1に示したように相関関係が認められ、47検体の相関

係数 $r=0.342$ であった。

5. 各種疾患患者、健康人、輸血用供血者血清へのEIA法の応用。

血友病患者、AIDS および ARC 患者、男性同性愛者血清でのEIA法とIF法との一致率は99.3%と非常に高い一致を示した。IF法で陽性を示す検体はすべてEIA法陽性を示し、IF法陽性EIA法陰性を示す検体 (false negative) は1例も検出されなかったこと。これらのことから ELAVIA®キットは抗HIV抗体のスクリーニング法として有効な方法であると考えられる。次に実践に即した方法で本キットの評価する目的で、各種疾患患者、成人健診血清、輸血用供血者血清などの多数の検体について、EIA法でスクリーニングを行い、陽性を示した検体についてはEIA法での再検査とIF法で確認する方法を行った。その結果を表5に示した。

アメリカ人供血者血清では high risk donor 548 検体中31例が陽性値を示し、再検査では13例が陽性値を示した。IF法で確認した結果、31例中9例が明らかな陽性を示し、2例は非特異反応が強く判定が困難であり、1例は陽性細胞の一部に極く弱い陽性像が認められ、EIA法再検査で陰性を示

図1 IF抗体価とEIA吸光度の相関

表5 EIA法によるスクリーニングの結果

検体名	検体数	EIA法		IF法陽性	RIP法
		初回	再検		
アメリカ人供血者					
risk donor	548	31	13	12*/31	7/26
healthy donor	522	4	1	1/4	1/4
日本人供血者	360	2	2	0/2	
成人健診血清	400	6	2	0/6	
透析患者血清	85	1	1	0/1	
悪性疾患患者	57	0			
SLE患者	26	0			
ATLA抗体陽性	390	3	3	0/3	
HB抗原陽性	94	2	0	0/2	
HB抗体陽性	407	1	0	0/1	
その他	26	0			
合計	2915	50	22	13/50	8/30

*は本文参照

した検体を含む19例は陰性を示した。

EIA 法陽性で IF 法陰性を示した19例を含む26 検体について、IF 法より感度、特異性の高い RIP 法で確認を行なった結果、IF 法で判定困難であった 2 例、一部に極く弱い陽性像を示した 1 例、IF 法陽性を示した 4 例、合計 7 例が陽性を示し、IF 法で陰性を示した19例はいずれも陰性を示した。

healthy donor では522検体中 4 例が陽性値を示し、再検査では 1 例が陽性を示し、IF 法で確認した結果、 1 例が陽性、 3 例は陰性であった。

日本人供血者血清は山口県赤十字血液センターから当大学輸血部に送付された360検体中 2 例が陽性値を示し、再検査でも陽性を示したが、IF 法ではいずれも陰性を示した。

成人定期健康診断血清では400検体中 6 例が陽性値を示し、再検査では 2 例が陽性を示したが、IF 法ではいずれも陰性であった。

頻回輸血歴のある透析患者血清では85検体中 1

例が陽性値を示し、再検査でも陽性を示したが、IF 法では陰性であった。

急性白血病、慢性白血病、悪性リンパ腫などの悪性疾患患者血清57検体、SLE 患者血清26検体はいずれも EIA 法で陰性を示した。

ATLA 抗体陽性血清では390検体中 3 例が陽性値を示し、再検査でも陽性を示したが、IF 法ではいずれも陰性を示した。

HB 抗原陽性血清94検体、HB 抗体陽性血清407 検体ではそれぞれ 2 例、 1 例が陽性値を示したが再検査ではいずれも陰性を示し、IF 法でもすべて陰性を示した。

免疫不全、頻回輸血者、血友病患者家族などを含む、その他血清26検体はいずれも陰性を示した。

全体では2915検体中50検体が陽性値を示し、再検査では22例が、IF 法では13例が陽性を示した。IF 法で陽性を示した検体はいずれもアメリカ人供血者血清であり、日本人血清はすべて陰性で

表 6 EIA 法スクリーニングによる吸光度の分布

検体名 吸光度差	アメリカ人 供血者 risk Donor	アメリカ人 供血者 healthy Donor	日本人健康人 （供血者 成人健診者）	各種疾患患者	HB 抗原・抗体 ATLA 抗体 陽性血清	合 計
-1.00~-0.50	2				1	3
-0.50~-0.40		2	2			4
-0.40~-0.30	2	1	1		1	5
-0.30~-0.20	7	4	12	1	2	26
-0.20~-0.10	28	10	34	1	24	97
-0.10~-0.05	47	34	90	13	45	229
-0.05~ 0.00	186	203	326	76	378	1169
0.00~ 0.05	163	194	220	86	341	1004
0.05~ 0.10	42	46	43	13	49	193
0.10~ 0.20	31	20	19	2	32	104
0.20~ 0.30	9	4	5	1	12	31
0.30~ 0.40	8/0/0*		3/0/0		2/1/0	13/1/0
0.40~ 0.50	5/0/0		2/1/0	1/1/0	1/0/0	9/2/0
0.50~ 0.75		1/0/0	2/2/0			3/2/0
0.75~ 1.00	3/2/1		1/1/0		1/0/0	5/3/1
1.00~ 1.50	5/1/1	3/1/1			1/1/0	9/3/2
1.50~ 2.00	5/5/5				1/1/0	6/6/5
2.00~ 2.50	5/5/5					5/5/5
≥2.50						
Total	548	522	760	194	891	2915
EIA (+) 1st.	31	4	8	1	6	50
EIA (+) 2nd.	13	1	4	1	3	22
IF (+)	12	1	0	0	0	13

8/0/0* : EIA (+)1st/EIA (+)2nd/IF (+)

表 7 56℃, 30分の加熱処理の EIA 法への影響

成人健診血清 (n=100)	未 処 理	加熱処理	差	比 率
ウイルス抗原陽性 (赤マーク, A)	0.154±0.101	0.263±0.115	0.109	1.71
対照抗原 (黒マーク, B)	0.159±0.075	0.303±0.128	0.144	1.90
吸光度差(ΔA) (ΔA=A-B)	-0.04±0.077	-0.039±0.073	-0.035	-0.19

あった。

次にこれら検体の EIA 吸光度分布を表 6 に示した。吸光度差 (ΔA) -0.05~0.05を中心にしてほぼ正規分布曲線に近い分布状態を示した。IF 法陽性を示す検体は0.75以上に分布し、EIA 法陽性 IF 法陰性を示す検体は0.75以下に分布し、特に EIA 法初回陽性で再検査で陰性を示した検体は cut off 値をわずかに越えた0.30~0.50の範囲に集中して分布していた。

6. 加熱処理と EIA 法

当教室の原田ら¹¹⁾は HIV は56℃, 30分加熱処理すると感染性が完全に消滅することを明らかにしている。56℃, 30分の加熱処理が EIA 法におよぼす影響について検討した。成人健診血清100検体を用いて、56℃, 30分加熱処理前後の血清を同時に EIA 法で測定した結果を表 7, 表 8 に示した。

ELAVIA®キットは LAV・Ag 陽性 (赤マーク) と LAV・Ag 陰性 (黒マーク) の 2 本立になっているので、それぞれの抗原別に検討した。成人健診血清100検体の平均吸光度は未処理血清では赤マークは0.154±0.101, 黒マークは0.159±0.075であり、加熱処理血清ではそれぞれ、0.263±0.115, 0.303±0.128を示した。加熱処理血清の平均吸光度は未処理血清のそれと比較すると赤マークでは1.7倍、黒マークでは1.9倍の上昇が認められた。しかし本キットの判定は赤マークと黒マークの吸光度差 (ΔA) によって行うので加熱処理による吸光度の上昇は相殺され、判定結果には影響を与えなかった。成人健診血清100検体の56℃, 30分加熱処理前後の吸光度分布を表 8 に示した。未処理血清では吸光度差 (ΔA) が-0.05~0.05の範囲に集中して高いピークを示した。加熱処理血清

表 8 56℃, 30分加熱処理前後の EIA 法吸光度分布

吸光度差	未処理	熱処理
-0.40~-0.30		
-0.30~-0.20	2	2
-0.20~-0.10	2	15
-0.10~-0.05	13	24
-0.05~ 0.00	43	30
0.00~ 0.05	30	19
0.05~ 0.10	5	7
0.10~ 0.20	2	2
0.20~ 0.30	1	0
0.30~ 0.40	2	0
0.40~ 0.50		
Total	100	100

では-0.20~0.05の範囲に広く丘状の分布を示し、平均値で0.04ほど負の方向に移行していた。未処理血清では 2 例が陽性値を示したが加熱処理血清ではすべて陰性値を示した。この 2 例は再検査では陰性を示し、IF 法でも陰性を示した。

7. EIA 法による測定所要時間

マイクロプレートを用いた 2 段階希釈法を採用し、8 連マルチピペッターを使用し、各操作間のロスタイムも入れて計った結果、同時に3キット分 (288検体) を測定するのに 5 時間15分を要した。一次反応中に次の前希釈を行うなどの工夫をすると 1 日 2 回、500~550検体を測定することが可能であった。

8. EIA 法による再現性テスト

本キットに添付されている陽性および陰性対照血清をそれぞれ26回 (52穴) テストした平均吸光度は陽性対照血清では1.815±0.194, 陰性対照血清では0.017±0.046であった。陽性対照血清の標準偏差は平均吸光度の10.7%であった。

考 察

AIDSはHIVの感染に起因する感染症であること、HIVの感染はウイルス保有者との性的接触、汚染血液又は血液製剤の輸注が主たる感染経路であることなどが明らかにされている。汚染血液や血液製剤による伝播は供血者のHIV抗体スクリーニングを行い、抗体陽性者の血液を輸血や血液製剤の原料から排除すれば少なくとも医療行為に伴うHIVの伝播を防ぐことが可能である。この目的にかなう抗HIV抗体測定法としてEIA法によるキットが開発され、欧米諸国では1985年から供血者のスクリーニングが実施されている。わが国でもAbbott社のキットが輸入許可があり、本年2月から東京、大阪を中心にスクリーニングが開始されている。今回Diagnostics Pasteurの開発したELAVIA®キットについて、血友病患者、AIDSおよびARC患者、男性同性愛者などのhigh risk者の血清308検体と対照として医学部学生・当教室員血清130検体を用いてEIA法とIF法の結果を比較検討した。

EIA法で陽性を示した検体のIF法との一致率は98.3%と高い一致率を示し、EIA法で陰性を示した検体はすべてIF法で陰性を示し、EIA法とIF法の全体の一一致率は99.3%と非常に高い一致を示した。またIF法で陽性を示す検体はすべてEIA法陽性を示し、IF法陽性EIA法陰性を示す検体(false negative)は1例も検出されなかった。

このキットは供血者血液スクリーニング用に開発されたものであり、その目的は充分はたしている。しかし、本キット用いて抗HIV抗体の診断を行なう場合はIF法、WB法、RIP法など別の方法を併用して確認する必要がある。

次に実践に即した方法で本キットの実用性について検討するために、アメリカ人供血者、日本人供血者、成人健診血清、透析患者、悪性疾患患者、SLE患者、ATLA抗体陽性血清、HB抗原および抗体陽性血清など2,915検体を用いて、使用説明書に従って抗HIV抗体測定を行い、陽性値を示した検体はEIA法の再検査とIF法での確認を行った。アメリカ人供血者では1,070検体中35例(3.3%)が陽性を示し、再検査では14例(1.3%)、

IF法では12例(1.1%)が陽性を示した。日本人血清では1,845検体中15例(0.8%)が陽性値を示し、再検査では8例(0.4%)が陽性を示したがIF法ではいずれも陰性であった。EIA法では初回に陽性値を示した検体を再検査すると約半数が陰性を示した。これはEIA法の感度が高く、操作法が煩雑であることからtechnical errorを生じ易いことを示している。

加熱処理の影響について、原田ら¹¹⁾は56℃、30分加熱処理するとHIVの感染性は完全に消滅することを報告している。技術者の安全性を考慮すると被検血清を56℃、30分加熱処理することが望ましい。小林らはAbbottのHTLV-III・EIAキット⁵⁾、およびエーザイのEI test®-ATL・EIAキット¹⁵⁾を用いて、加熱処理のEIA法におよぼす影響について報告している。それによるとEIA法は加熱処理前後で吸光度が1.7~1.9倍上昇し、false positive(偽陽性)を生ずる原因になることからEIA法では加熱処理血清は使用できないことを指適している。ELAVIA®キットについて加熱処理の影響を検討した結果、本キットはLAV・Ag陽性(赤マーク)とLAV・Ag陰性(黒マーク)の2本立になっており、各抗原別に吸光度を見ると加熱処理によってそれぞれ、1.7倍、1.9倍の上昇が認められたが、加熱処理による影響は相殺され判定結果には影響しないことが明らかにされた。従ってELAVIA®キットを用いて抗HIV抗体測定する場合は技術者の安全性を考慮すると検体を56℃、30分加熱処理後に実施することが望ましい。

日本人における抗HIV抗体陽性率についてみると、血友病患者および男性同性愛者の血清中に陽性例が検出されている。血友病患者では1985年以前に採集された検体の17%が陽性であったのに対して、1985年以後に採集された検体、52名(63検体)中22名(33検体)が陽性を示し、明らかに増加傾向が認められる。アメリカの血友病患者の陽性率75%¹²⁾と比較すると低値であるが、AIDSウイルスの潜伏期を考えるとまだ数年間はHIV抗体陽性者およびAIDS又はARC患者数は増加するものと思われる。しかし1985年後半から1986

年にかけて加熱処理第 VIII 因子および第 IX 因子製剤が認可され、臨床応用が開始されている¹³⁾ので今後新たな感染者の発生は減少するものと考えられる。日本人男性同性愛者血清については、当教室に医療機関および検査センターから検査および確認依頼のあった検体、直接本人から検査依頼のあった検体であり、日本男性同性愛者の実体を示しているものではない。血友病患者および男性同性愛者を除いた日本人血清は IF 法ですべて陰性であった。HTLV-I と HIV が免疫学的に交差反応を示すという報告¹⁴⁾があったが、多数の ATLA 抗体陽性血清について抗 HIV 抗体を調べたがいずれも陰性であった。

要 約

1. Diagnostic Pasteur の開発した ELAVIA® キットを用いて、血友病患者、AIDS および ARC 患者、男性同性愛者などの血清中の抗 HIV 抗体測定を行い、IF 法の結果と比較検討した。対照として医学部学生・教室員血清を用いた。

2. EIA 法で陽性を示す検体の FI 法との一致率は 98.3% であり、IF 法陽性検体はすべて EIA 法陽性を示し、IF 法陽性 EIA 法陰性を示す検体 (false negative) は 1 例も検出されず、EIA 法と IF 法の全体の一致率は 99.3% であった。

3. 本キットは 56°C, 30 分加熱処理血清においても判定結果には影響が認められなかった。

4. 本キットは再現性もよく、供血者血清など大量の検体のスクリーニングに適した方法である。

5. 本キットはスクリーニング用に開発されたキットであり、診断用を使用する場合は IF 法、WB 法、RIP 法などの特異性の高い方法によって必ず確認しなければならない。

謝辞：血清を提供いただきました小倉記念病院、藤田一之博士、門司クリニック、渡辺和彦博士、山口大学医学附属病院小児科、中央検査部、輸血部の関係諸先生方、並びに RIP 法の協力をいただきました吉田 勉氏に深謝致します。

文 献

- 1) Center for Disease Control: Pneumocystic pneumonia in Los Angeles. M.M.W.R., 30: 250, 1980.
- 2) Curran, J.W., Morgan, M., Hardy, H.A., Jaffe,

H.W., Darrow, W.W., Dowdle, W.R.: The epidemiology of AIDS: Current status and future prospects. Science, 229: 1352-1357, 1985.

- 3) Tsuchie, H., Kurimura, T. and Hinuma, Y.: Survey of the prevalence of AIDS-associated virus (LAV) infection in Japan. J. Infect., 10: 272-276, 1985.
- 4) 栗村 敬, 土江秀明, 桑田愛子, 杉山秀徳, 片峰茂, 宮本 勉, 小林 進, 山本直樹, 池上信子, 今井浄子, 日沼頼夫, 森川 茂, 佐藤浩司, 北村敬, 渡辺準之助, 徳永栄一: EIA 法による抗 HTLV-III 抗体保有者の調査. 臨床とウイルス, 14: 50-54, 1986.
- 5) 小林 進, 山本直樹: EIA 法を用いた AIDS ウィルス抗体測定. 臨床とウイルス, 14: 231-236, 1986.
- 6) 吉原なみ子, 東海林寿子: 抗体測定キッドの検討. 日本輸血学会雑誌, 32: 207, 1986.
- 7) Hahn, B.H., Shaw, G.M., Arya, S.K., Popovic, M., Gallo, R.C. and Wong-Staal, F.: Molecular cloning and characterization of the HTLV-III virus associated with AIDS. Nature, 312: 166-169, 1984.
- 8) Hinuma, Y., Nagata, K., Hanaoka, M., Nakai, M., Matsumoto, T., Kinoshita, K., Shirakawa, S. and Miyoshi, I.: Adult T-cell leukemia: Antigen in the ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 78: 6476-6480, 1981.
- 9) Koyanagi, Y., Harada, S., Takahashi, M., Uchino, F. and Yamamoto, N.: Selective cytotoxicity of AIDS virus infection toward HTLV-I transformed cell lines. Int. J. Cancer, 36: 445-451, 1985.
- 10) Koyanagi, Y., Hinuma, Y., Schneider, J., Chosa, T., Hunsmann, G., Kobayashi, N., Hatanaka, M. and Yamamoto, N.: Expression of HTLV-specific polypeptides in various human T-cell lines. Med. Microbiol. Immunol., 173: 127-140, 1984.
- 11) Harada, S., Koyanagi, Y. and Yamamoto, N.: Infection of HTLV-III/LAV in HTLV-I-carrying cells MT-2 and MT-4 and application in a plaque assay. Science, 229: 563-566, 1985.
- 12) Jason, J., McDougal, J.S., Holman, R.C., Stein, S.F., Lawrence, D.L., Nicholson, J.K.A., Dixon, G., Doxey, M., Evatt, B.L. and the Hemophilia/AIDS Collaborative study Group: Human T-lymphotropic retrovirus type III/lymphadenopathy-associated virus antibody: Association with hemophiliacs immunostatus

- and blood component usage. J.A.M.A., 253: 3409—3415, 1985.
- 13) 小室勝利: 血液製剤による AIDS の感染. Immunohaematology, 8: 173—178, 1986.
- 14) Essex, M., McLane, M.F., Lee, T.H., Falk, L., Howe, C.W.S., Mullins, J.I., Cabbadilla, C. and Francis, D.P.: Antibodies to cell membrane antigens associated with human T-cell leukemia virus in patients with AIDS. Science, 220: 859—862, 1983.
- 15) 小林 進, 吉田 勉, 広重幸雄, 山本直樹: 健康人の ATSA 抗体スクリーニングにおける PA 法, EIA 法の評価. 日本血液学会誌, (印刷中) 1987.
-