HTLV-I 抗体測定におけるゼラチン粒子凝集法の特異性

矢野美佐子 権 吉源 池田 久實 関口 定美

北海道赤十字血液センター

(昭和61年12月10日受付)

SEROLOGICAL SPECIFICITIES OF GELATIN PARTICLE AGGLUTINATION METHOD FOR THE DETECTION OF HTLV-I ANTIBODIES

Misako Yano, Kil-Won Kwon, Hisami Ikeda and Sadayoshi Sekiguchi

Hokkaido Red Cross Blood Center

Three methods, indirect immunofluorescence test (IF), gelatin particle agglutination (PA) and enzyme immunoassay (EIA) were examined for the detection of anti-HTLV-I. Of 57,816 donor sera tested, 1,320 PA⁺ samples were also tested by IF and EIA. Only 306 of those samples were positive both by IF and EIA. Additional 3 samples were IF-EIA⁺ and 2 were IF-EIA⁻.

The serological specificities of PA⁺IF-EIA⁻ samples were then tested by the PA inhibition test. Specific PA inhibition by HTLV-I positive antigens were observed in 89 of 114 such samples.

Since most of positive samples by IF with MT-2 which is a strongly positive cell line for HTLV-I antigens, were also positive with MT-1, a standard test cell of IF, the low positive rate by IF did not appear due to the antigen deficiency of the MT-1.

Thus, a large number of PA⁺IF-EIA⁻ samples appeared to contain anti-HTLV-I.

1. はじめに

成人 T 細胞白血病 (ATL) の原因ウイルスとして human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) が報告され¹⁾, このウイルスに対する抗体の保有者は同時に HTLV-I の感染個体である²⁾ことが判っている. HTLV-I 抗体 (ATLA 抗体) の測定法としては, 間接蛍光抗体法 (IF)³⁾, 酵素免疫抗体法 (EIA)⁴⁾⁵⁾, ゼラチン粒子凝集法 (PA)⁶⁾が一般によく用いられ, さらに Western Blot 法, 免疫沈降法 (RIP) 等が確認試験として使用されている. 各法は, 手技的なもの, 操作反応時間, 判定の客観性などについてそれぞれ一長一短があるが, その中で PA 法は操作が簡単で, 短時間に大量検体が処理でき, さらに IgG 抗体と IgM 抗体が同時に検出できるなどスクリーニング法としては有利と考えられる点が多い. しかし, この PA 法と他の測定法の検査結果との間に不一致が生ずることが以前より指摘されており, 他法と比較した場合, 陽性と判定する検体が多くなる傾向にある. それゆえ, PA 法のみで反応する検体が真の陽性

であるかどうか問題となっている. 今回われわれは, PA 法で陽性と判定された検体のうち, 他法と不一致を示したのものについて, HTLV-I ウイルス粒子および感染細胞から調製した抗原液を用いて凝集抑制試験を試み, PA 法の特異性について検討したので報告する.

2. 材料と方法

1) 被検血清

1986年1月から3月までの3カ月間に, 北海道赤十字血液センターで採取した57,816人の献血者血清及び, 1985年8月から10月の間に採血したうちの16,083検体について検討した. また, ATL 患者血清は大阪府赤十字血液センターより分与されたものを用いた.

2) 抗体測定

HTLV-I 抗体は, ゼラチン粒子凝集法 (PA), 間接蛍光抗体法 (IF), 酵素免疫抗体法 (EIA) の3法により検査した. PA 法は, 富士レビオ社「セロディアーATLA」(Lot, RP1007, RP10101)を用い自動輸血検査装置 PK7100 (Olympus 社) で

スクリーニング後、富士レビオのマニュアルに従い手法で再度検査を行った。IF 法は、日沼ら³⁾の方法に準じ IUdR 処理 MT-1細胞⁷⁾と MT-2細胞⁸⁾の2種を標的抗原としアセトン固定して用い、二次抗体に FITC 標識抗ヒト IgG 及び、IgM(Dako 社)を用いた。血清希釈は5倍で行った。また、EIA 法は、エーザイ社「エイテスト ATL」(Lot. 6201)を使用し、反応した検体の一部については確認用試薬(Lot. T86022701)を用いて検討した。これは培養上清から精製した HTLV-I による吸収試験を原理としたもので、検体と確認用試薬(精製 HTLV-I)とをあらかじめ37℃または40℃、30分間反応させ、以降「エイテスト ATL」の操作法に従って HTLV-I 抗体を測定するものであり、HTLV-I 抗体陽性の検体は確認試薬中の精製 HTLV-I 関連抗原によって抗体が吸収され発色しなくなるが、非特異反応の場合は吸収されずに偽陽性を示す。

3) 抑制試験

抑制試験に用いる抗原液の調製には、HTLV-I 陽性の培養細胞である MT-2、HUT102⁹⁾、OKM-2¹⁰⁾細胞と、ウイルス陰性の培養細胞である Molt-4、TALL-1を使用した。10%ウシ胎児血清を含む RPMI 1640培地で培養したそれぞれの細胞株を、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で低速遠心2回洗浄しそのペレットに9倍容の PBS を加えて再浮遊させ30分間超音波破碎した後、超遠心(10万 G、10分間)を行いその上清を抑制試験用抗原とした。

PA 法における凝集抑制試験の方法は、上記抗原液12.5 μ l と適当の抗体価となるように希釈した血清12.5 μ l を混和し4℃一晩反応させた後、ウイルス感作ゼラチン粒子を25 μ l 加え、3時間後に凝集抑制の有無を判定した。なお、対照として抗原の代わりにキット添付の血清希釈用 buffer を使用して同様に検査を実施した。

また、参考として沢田ら⁵⁾の方法に準じ、デオキシコール酸ナトリウム (DOC) で可溶化して得た MT-2由来抗原と、MT-2細胞の培養上清を0.45 μ m のフィルターに通し細胞残渣を除去した後37,000G、20時間超遠心して得た HTLV-I を蛋白量0.7mg/ml になるよう tris-HCl buffer (0.01

M, pH 7.5)で調製した HTLV-I 抗原による凝集抑制についてもそれぞれ検討した。

3. 結 果

1) PA 法, IF 法, EIA 法の比較

1986年1月から3月までの献血者57,816例について抗体スクリーニングをPA法で行ったところ、1,320例(2.3%)が陽性であった。そのうちIF法、EIA法ともに陽性であったのが306例(0.5%)で、残りの1,014例が3法での判定不一致ということになり、その大部分がPA法でのみ陽性と判定されるものであった(表1)。

これら3法で不一致な結果を示した検体のうち、IF法、EIA法が陰性の1,009例中114検体と、IF法陰性EIA法陽性となった3検体、及びIF法陽性EIA法陰性となった2検体について凝集抑制試験を行った。またこれら計119検体はいずれも抗ヒトIgM抗体を二次抗体としたIF法で陰性であった。

2) 凝集抑制試験用抗原の特異性

抑制試験に用いた抗原のうち、HTLV-I 陽性培養細胞からのものは、ATL 患者血清及び、MT-2細胞でマウスを免疫して得た抗p19モノクローナル抗体による凝集を特異的に抑制した。またこれらの抗原を用いEIA法において抑制試験を行った場合も、HTLV-I 陽性細胞由来抗原ではコントロールに比べて有意に吸光度が低くなっていた(表2)。

3) PA (+), EIA (-), IF (-) 例の特異性
被検血清の HTLV-I に対する特異性の判定は、その PA 法における凝集反応が HTLV-I 陽性細胞からの抗原全てで抑制され、かつ陰性細胞由来の抗原で抑制されないものを特異的とした。一方、HTLV-I 陽性細胞由来抗原でも陰性細胞由来抗

表1 PA 法, IF 法, EIA 法の比較

PA	IF	EIA	No. of samples
+	+	+	306
+	-	+	3
+	+	-	2
+	-	-	1009
Total			1320

表 2 凝集抑制試験用抗原液の特異性

Assay	Sample	Control	HTLV-I positive			HTLV-I negative	
			MT-2	HUT102	OKM-2	Molt-4	TALL-1
PA	ATL serum	++	—	—	—	++	++
	anti-p19	+	—	—	—	+	+
EIA	ATL serum	0.287	0.071* (75.3)	0.136 (52.6)	0.068 (76.3)	0.274 (4.5)	0.301 (-4.9)
	anti-p19	0.190	0.051 (73.2)	0.116 (38.9)	0.054 (71.6)	0.227 (-19.5)	0.230 (-21.0)

++, + : 凝集 — : 非凝集
*Absorbance 405nm (% Inhibition)
 $\% \text{ Inhibition} = 100 \times (1 - \frac{\text{sample} - \text{negative control}}{\text{positive} - \text{negative control}})$
negative control : PA(-) IF(-) EIA(-) のヒト血清またはマウス血清

表 3 PA 法のみ陽性例の HTLV-I の特異性

PA(+), IF(-), EIA(-)

PA titer	No. of Sample	Inhibition test		
		Specific	Equivocal	Nonspecific
× 16	31	25(80.6%)	5	1
× 32	39	27(69.2%)	4	8
× 64	31	28(90.3%)	0	3
×128	9	7(77.8%)	0	2
>×256	4	2(50.0%)	1	1
Total	114	89(78.1%)	10	15

原でも抑制がなかった場合は非特異凝集と判定した。

PA 法, IF 法, EIA 法の 3 法で陽性と判定された healthy carrier 血清 (図 1, No. 1~3) 及び, ATL 患者血清 (図 1, No. 4) による凝集は, HTLV-I 陽性抗原や HTLV-I ウイルス抗原によって抑制され, Molt-4, TALL-1細胞由来の抗原では抑制されなかった。

次に, PA 法のみで陽性であった114検体について抑制試験を行った結果, 89検体 (78.1%) が healthy carrier 血清や ATL 患者血清と全く同じ凝集抑制像を示し, HTLV-I 特異的であることが示唆された。また, PA 法での抗体価と抗体の特異性との間には, 特に相関は認められなかった (表 3)。

判定保留とした例(図 1, No. 5~8)は, HTLV-I 陰性抗原では抑制されていないが, HTLV-I 陽性抗原の中でも HUT102だけ抑制がかからな

図 1 PA 法における凝集抑制試験の判定像

かったり(図 1, No. 5), MT-2のみで抑制されたり(図 1, No. 6)したものである。また, 同じ MT-2細胞由来の抗原でも超音波破碎して調製したものと DOC で可溶化したものでは抑制に差がみられたり(図 1, No. 7), 培養上清由来 HTLV-I 液についても他の抗原液に比べて抑制があまりかからない例があった(図 1, No. 8)。なお, No. 9は, HTLV-I 陽性細胞由来抗原, 陰性細胞由来抗原共に抑制がかかっており非特異凝集であった。

4) その他の不一致例の特異性について

表4 PA法, EIA法陽性例のHTLV-I特異性

PA(+), IF(-), EIA(+)						
Specimen	PA		IF		EIA	
	Titer	Inhibition	MT-1	MT-2	A 405	% Inhibition
A	× 32	+	-	-	0.305	47.2
B	× 64	+	-	-	1.624	62.4
C	× 256	-	-	-	1.754	26.5
Control*	× 64	+	+	+	0.948	94.4

*PA(+) IF(+) EIA(+)のヒト血清

PA法とEIA法で陽性となった3検体のうち2検体が凝集抑制試験で特異的反応を示し、同時に行ったEIA法での確認用試薬による再検査でもHTLV-I特異的と判定された(表4)。また、表には示していないが、確認用試薬のかわりに凝集抑制試験に用いた抗原を使いEIA法でのinhibitionテストを行った結果、この2検体(specimen A, B)は、超音波破碎MT-2, DOC可溶化MT-2, 培養上清由来HTLV-I抗原で50%以上抑制されたが、残りの1検体(specimen C)については有意な抑制は認められなかった。

一方、PA法とIF法で陽性と判定された検体は、2例(specimen D, E)とも3種のHTLV-I陽性抗原で特異的に抑制され、またDOC可溶化MT-2やHTLV-Iウイルス液でも抑制された(表5)。

5) IF法における標的抗原としてのMT-1, MT-2細胞の比較

PA法陽性, IF法陰性の検体が多数観察された理由としてわれわれがIF法に使用しているMT-1細胞のHTLV-I抗原発現が何らかの理由で弱まっている可能性が考えられた。そこでPA陽性の検体を検討する際、従来のMT-1のほかにHTLV-I抗原が100%近く発現しているMT-2をIF法の標的抗原として使用した。

1985年8月から10月の間に採血した16,083名の血清中、PA法が陽性でMT-2細胞を用いたIF法が陰性を示したのは56検体であった。これらについて凝集抑制試験を行ったところ、HTLV-I特異的と判定されたのは45検体(80.4%)で、このうち2例を除きMT-2細胞でのIF法で陰性のものはMT-1を使用しても陰性であった(表6)。この

表5 PA法, IF法陽性例のHTLV-I特異性

PA(+), IF(+), EIA(-)					
Specimen	PA		IF		EIA
	Titer	Inhibition	MT-1	MT-2	
D	× 16	+	+	+	-
E	× 256	+	+	+	-

表6 MT-1, MT-2細胞を用いたIF法の比較

PA	PA inhibition	IF		No. of samples
		MT-1	MT-2	
+	+	+	-	2
+	+	-	-	43
+	-	-	-	11
Total				56

ことからMT-1細胞を用いたIF法は、HTLV-I抗原発現率が100%近いMT-2細胞を用いた場合と同等の感度を有することが示された。

4. 考 察

1981年、日沼ら³⁾によってATL患者血清中にATLA抗体が存在することが報告され、ATLの病因にC型レトロウイルスが密接に関係している¹⁾ことが明らかになった。また、ATLA抗体保有者は同時にウイルスのキャリア²⁾であり、大河内ら¹¹⁾によってATLA抗体陽性者の細胞成分を輸血することによりHTLV-Iの感染が起こることが報告されている。この輸血による感染を防ぐ必要から、献血者のHTLV-I抗体のスクリーニングが望まれ、そのスクリーニング方法が検討されてきた。

HTLV-I抗体の測定法には、IF法, EIA法, PA法, Western Blot法等があり、その中でもIF法

は最も標準的な検査法として用いられている。EIA 法は、田口⁴⁾により開発された方法で、大量検体の迅速処理が可能であり、IF 法の判定ともよく一致することが報告されているが、ごく一部に不一致を示す検体があることがわかっている^{12)~14)}。PA 法も同様に大量検体のスクリーニングに適している方法であるが、一方、血清希釈倍数の低いところで反応する血清に PA 法陽性 IF 法陰性となるケースが多く¹⁵⁾¹⁶⁾、その様な検体の HTLV-I に対する特異性が問題となってきた。

実際に、今回 HTLV-I 抗体を検索した献血者 57,816 人中、陽性となったのは PA 法で 1,320 人 (2.3%)、IF 法で 308 人 (0.5%) と大きく違い違った。先に著者らは、北海道全域にわたって IF 法により HTLV-I 抗体保有状況を調査し、その陽性率を 0.75% と報告¹⁷⁾したが、その値は今回の IF 法の結果に近似している。それゆえ、PA 法でのみ陽性と判定された血清の特異性を明らかにする必要があると考えられた。

今回、試みた凝集抑制試験は、HTLV-I 感染細胞として MT-2、HUT102、OKM-2 の 3 種、ウイルス非感染 T 細胞株として Molt-4、TALL-1 の 2 種を用い、各細胞から調製した HTLV-I 陽性抗原、ウイルス陰性抗原それぞれと血清とをあらかじめ反応させ、その後の凝集抑制像を総合的に判断したものである。ATL 患者血清や、healthy carrier 血清については、いずれの場合も HTLV-I 陽性抗原液でのみ明瞭に抑制される結果となった。また、Molt-4 や TALL-1 で抑制がかかる場合を非特異と判定したが、これについては HTLV-I 以外の何らかの細胞成分に対する抗体の関与が考えられる。吉田¹⁸⁾は、EIA 法では各種細胞株から産生されるウイルス蛋白間に特異性の違いが認められなかったが、PA 法では明らかにウイルス蛋白の特異性に違いが認められたと報告している。われわれの結果でも、判定保留例の中には HUT102 由来抗原で抑制のかからないものがしばしば観察された。HUT102 由来抗原については抗原の量的な違いによる可能性もあるが (表 2 参照)、血清中の抗体が認識しているウイルス構成蛋白の質的な違いが関係している可能性もある。

今回の凝集抑制試験の結果、PA 法で陽性と判定され、他法で陰性となった検体のうち約 80% が HTLV-I 抗原液で特異的に抑制されたことにより、PA 法のみ陽性となる血清中に HTLV-I 関連抗原に対する抗体が存在することが強く示唆された。これらの血清が IF 法で陰性を示したのは、IF 法に使用した MT-1 細胞の HTLV-I 関連抗原の発現度が低いためではない。なぜならば 100% 近く HTLV-I 関連抗原が発現していると考えられる MT-2 細胞を IF 法に使用した場合でも、これら PA 法のみ陽性血清の大部分は陰性であった。この PA 法のみで検出される抗体の臨床的意義は不明であるが、この抗体の存在は HTLV-I 感染後の一時的な状態であっていずれ IF 法でも検出できるようになるのか、それとも IF 法で検出される抗体とは全く別の特異性をもつものなのかどうかは興味深く、今後さらに検討する必要がある。

現在、血液センターでは安全な輸血用血液を供給するために、献血者の HTLV-I 抗体スクリーニングを PA 法によって行なっているが、現時点で PA 法はその目的を達成するために最も適切な HTLV-I 抗体測定法と考えられる。

5. まとめ

HTLV-I 抗体測定法として IF 法、PA 法、EIA 法を比較検討した。献血者血清 57,816 例を PA 法でスクリーニングしたところ 1,320 例 (2.3%) が陽性となり、そのうち IF 法、EIA 法も陽性となったものは 306 例 (0.5%) であった。その他 IF 法陰性 EIA 法陽性が 3 例、IF 法陽性 EIA 法陽性 EIA 法陰性が 2 例あった。

PA 法陽性で他法が陰性となった検体についてその特異性をみるために、HTLV-I 陽性培養細胞より調製した抗原液を用い凝集抑制試験を行ったところ、検討した 114 検体中 89 例 (78.1%) でその凝集が特異的に阻止された。

また、HTLV-I 強陽性である MT-2 細胞を用いた IF 法で陽性の検体のほとんどは、MT-1 に対しても陽性反応を示したので、IF 法による低い陽性率 (0.5%) が MT-1 細胞自身に起因するものではないと考えられた。従って、PA 法のみ陽性の検体中に HTLV-I 特異抗体が存在することが示唆さ

れた。

文 献

- 1) Yoshida, M., et al.: Isolation and characterization of retrovirus from cell line of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 79: 2031—2035, 1982.
- 2) Gotoh, Y., et al.: Healthy carriers of a human retrovirus, adult T-cell leukemia virus (ATLV): Demonstration by clonal culture of ATL V-carrying T-cells from peripheral blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 79: 4780—4782, 1982.
- 3) 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. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 78: 6476—6480, 1981.
- 4) Taguchi, H., et al.: Enzyme-linked immunosorbent assay of antibodies to adult T-cell leukemia-associated antigens. *Gann*, 74: 185—187, 1983.
- 5) 沢田高志, 他: 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. 1. 測定試薬の開発と測定条件の検討. *臨床免疫*, 17: 246—254, 1985.
- 6) Ikeda, M., et al.: A new agglutination test for serum antibodies to adult T-cell leukemia virus. *Gann*, 75: 845—848, 1984.
- 7) Miyoshi, I., et al.: A novel T-cell line derived from adult T-cell leukemia. *Gann*, 71: 155—156, 1980.
- 8) Miyoshi, I., et al.: A T-cell line derived from normal human cord leucocytes by co-culturing with human leukemic T-cells. *Gann*, 72: 978—981, 1981.
- 9) Gazdar, A.F., et al.: Mitogen requirements for the in vitro propagation of cutaneous T-cell lymphomas. *Blood*, 55: 409—417, 1980.
- 10) 宮本寛治, 他: 未発表.
- 11) 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.
- 12) 山崎修道, 他: 酵素免疫測定 (EIA) 法と蛍光抗体間接 (IF) 法による ATLA 抗体測定の比較研究. *臨床とウイルス*, 13: 92—96, 1985.
- 13) 吉村敬次, 他: 酵素免疫測定法 (EIA 法) による ATLA 抗体の検出. *臨床と研究*, 62: 1025—1029, 1985.
- 14) 池田柊一, 他: 酵素抗体法による ATLA 抗体の検索—蛍光抗体法との比較および ATL 周辺疾患について—. *臨床と研究*, 62: 283—286, 1985.
- 15) 宮本寛治, 他: 成人 T 細胞性白血病ウイルス抗体検出法としてのゼラチン粒子凝集法における 1 つの問題—cutt off 値に関して. *医学のあゆみ*, 134: 377—378, 1985.
- 16) 吉田 勉, 他: ATLA 抗体測定におけるゼラチン粒子凝集法の問題点—蛍光抗体法との不一致—. *医学のあゆみ*, 136: 387—388, 1986.
- 17) 権 吉源, 他: 非多発地北海道における成人 T 細胞白血病ウイルス抗体の検索. *北海道医学雑誌*, 60: 871—875, 1985.
- 18) 吉田 勉, 他: ATL V および ATLA 抗体の測定法. *日本臨床*, 44: 2256—2262, 1986.