MTS ゲル遠心法による感染症検査の有用性

吉田 久博* 万木紀美子 伊藤 和彦

京都大学医学部附属病院輸血部 (*現：山口大学医学部附属病院薬剤部)

(平成 6 年 8 月 1 日受付)

EVALUATION OF THE GEL CENTRIFUGATION METHOD FOR INFECTIOUS DISEASE TESTS

Hisahiro Yoshida*, Kimiko Yurugi and Kazuhiko Ito

Department of Transfusion Medicine, Kyoto University Hospital, Kyoto

(*present: Department of Pharmacy, Yamaguchi University Hospital, Ube)

To evaluate the gel centrifugation method for infectious disease tests, basic experiments were performed with various commercial kits by the hemo- or particle-agglutination method. Optimal conditions for the method were considered to be an incubation time of 15 min, an incubation temperature of 24-26°C (room temperature), and a half sensitized-particle concentration.

The gel method was compared with conventional microplate methods for the utility of infectious disease tests with the patients' specimens. There were no discrepancies in the detection tests of HBs-antigen and HCV-, CMV-, HIV, and HTLV-I-antibodies between the gel method and the microplate method, although the gel system detecting HCV-antibody titers was 25% less sensitive than the microplate method. Three of the 83 specimens showed discrepancy in the HBs-antibody detection. They were weak positive by the gel method but negative by the microplate method. We recognized that the test by the gel centrifugation method was reliable, reproducible, and speedy to obtain the results. The gel method could be used as a routine and emergency test for infectious diseases.

緒 言

Micro Typing System ゲル遠心法は、図 1 に示す 6 個のゲルカラムを備えたカードを用いて行う検査である。カラムの上部に血球と血清を滴下して一定時間反応させた後、これを遠心して粒子径の大きい凝集血球をゲル上部または内部に、粒子径の小さい非凝集血球をゲルの下部に分離し、血球のカラム内分布位置より凝集の有無ならびにその強度を判定する。検体量が現在広く用いられている試験管法の 4 分の 1 で済み、血球洗浄操作が不要で、検査結果を客観的に判定できることから、赤血球凝集反応を利用した輸血検査の微量化・標準化に適した検査法として注目を集めている^{1)~5)}。しかしゲル遠心法を利用した各種感染症検査については未だ報告がない。今回、感作血球

(または感作粒子)凝集法による HBs 抗原・抗体、TPHA, CMV, HCV, HIV, HTLV-I 検査にゲル遠心法を利用し、感染症検査の迅速化・微量化について検討したので報告する。

方 法

感染症検査は感作血球(感作粒子)凝集法による各種市販試薬キットを用いて行った。患者検体は輸血部に提出された輸血予定患者および妊産婦の血液で、一部のものについては凍結保存していたものを使用した。検査手順は各試薬キットの添付文書の指示に従って実施した。すなわち、被験血清を希釈液を用いて一定濃度に希釈した後、この希釈血清と感作血球(感作粒子)を Dia Med 社製ゲルカードのカラム上部に 25 μ l ずつ滴下した。これを 37°C、室温(約 24°C)、または 0~4°C で一

図1 ゲルカードの形状と凝集強度

定時間反応させたあと遠心し、感作血球（感作粒子）の分布位置より図1に基づいて凝集の有無及びその強度を判定した。なお、多項目の感染症検査を血液型判定および不規則抗体検査と同時に実施することを前提として、特別な場合を除いて輸血検査と同じ遠心条件（850rpm，10分）に設定した。また、ゲルカードにはゲル中に抗ヒトIgG抗体を含むIgGカードと、低イオン強度緩衝液を含

むバッファーカードを使用した。

結果

1. 非特異反応の有無

各試薬キットの非特異反応の有無を明らかにするため、各試薬キットの感作または未感作血球（粒子）をゲルカードの上部空隙に滴下したあと直ちに遠心した。その結果、一部の試薬キットでは血球や粒子の一部がゲル内に残存し、偽陽性反応（非特異反応）を示した。この偽陽性反応は、検査項目や血球の種類、感作血球・未感作血球に拘わり無く認められた（表1）。IgGカードの方がバッファーカードに比してより顕著であったことから、以下、バッファーカードのみを用いて検討した。

偽陽性反応を示した検査試薬のうちHIV，HTLV-I検査試薬について、偽陽性反応を回避する方法を検討した結果、HIV検査では2倍希釈した感作粒子を用いることにより、またHTLV-I検査では2倍希釈した感作粒子を用い遠心時間を20分に延長することにより、検査上支障のない程度に偽陽性反応が減弱することを認めた。

2. 反応時間と温度の影響

表1 非特異反応の検討

検査項目	メーカー	担体	感作血球(粒子)		未感作血球(粒子)	
			IgG ¹⁾	Buffer ²⁾	IgG ¹⁾	Buffer ²⁾
HBsAg	K社	羊赤血球	0	0	...	...
	F社	鶏赤血球	0	0	0	0
	S社	ポリアミノ酸	0	0	0	0
HBsAb	K社	羊赤血球	0	0	...	...
	F社	鶏赤血球	3+	2+	3+	3+
	S社	ポリアミノ酸	2+	0	0	0
TPHA	K社	シリカゲル	w+	0	0	0
	F社	鶏赤血球	1+	1+	1+	0
	F社	羊赤血球	1+	1+	1+	1+
HCV	D社	人赤血球	0	0	0	0
	O社	ゼラチン粒子	2+	2+	1+	1+
CMV	F社	ゼラチン粒子	0	0	0	0
HIV ³⁾	F社	ゼラチン粒子	2+	2+(0)	1+	1+(0)
HTLV-I ⁴⁾	F社	ゼラチン粒子	2+	2+(0)	1+	1+(0)

1) IgGカード

2) バッファーカード

3) ()内の値は感作及び未感作粒子を2倍希釈したときの成績を示す。

4) ()内の値は感作及び未感作粒子を2倍希釈し、20分間遠心したときの成績を示す。

図2 凝集強度に及ぼす反応時間・温度の影響

感作血球（感作粒子）の凝集強度に及ぼす反応時間及び反応温度の影響について検討した。検査項目及び反応温度により多少差が認められたが、各試薬とも概ね反応時間の経過と共に凝集強度は増強し、37°Cでは反応開始後5分で、0°Cでは反応の遅い試薬でも15分で平衡に到達した。また室温での反応曲線は、HCV検査では37°Cと類似の、CMV検査では0°Cと類似の、その他の検査項目では37°Cと0°Cの中間的なパターンを示した（図2）。以下、反応時間を15分、反応温度を室温に設定して検査を行った。

3. 微量化の検討

感染症検査の微量化を図るため、感作血球（感作粒子）の濃度と目視判定の難易度との関係について検討した。なお、目視判定の難易度は感作血球（感作粒子）の濃度及び色調による相対的な差に基づいて表示した。その結果、試薬キットにより多少差が認められたが（図3）、いずれの検査試薬も感作血球（感作粒子）の濃度をマイクロプレート法の2分の1に希釈しても実用上支障のないこと、またHBs抗原・抗体、HCV、CMV検査に2倍希釈した感作血球（感作粒子）を使用した場合、原液使用時と同等の凝集強度を示すことを認めた。以下、ゲル法による感染症検査は全て2倍希釈した感作血球（感作粒子）を使用した。

4. 患者検体による検討

83名の患者検体について、ゲル法とマイクロブ

図3 目視判定に及ぼす血球量の影響。HTLV-Iのみ遠心時間20分

レート法のHBs抗原・抗体、CMV、HCV、HIV、HTLV-I検査を行った。各検査とも2倍希釈した感作血球（感作粒子）を使用し、患者の希釈血清と15分間反応させたあと、HTLV-I検査のみ20分間、他の検査については10分間遠心した。HBs抗体検査ではゲル法弱陽性・プレート法陰性となる検体が一部認められ、一致率は96%であった（表2）。しかし、HBs抗原、HCV、CMV、HIV、HTLV-I検査ではゲル法及びプレート法間に差は見られず、一致した成績を示した。

一部の検体について再検査を実施した結果、同じ検査成績を示し、再現性の良好なことが確認さ

低い値を示したが、患者血清の希釈倍率を変更することにより対応は十分可能と思われる。また梅毒については抗生剤の投与により対処可能なことから、緊急輸血が必要な場合には省略可能と判断される。

今回ゲル法で検査した試薬キットのうち、一部の検査項目に偽陽性反応を認めたが、HIV および HTLV-I 検査試薬については感作粒子濃度を低くするか遠心時間を延長することにより、偽陽性反応を著しく低下させることができた。偽陽性反応を引き起こした要因については明確ではないが、ゲル粒子が感作血球粒子に吸着するため、あるいはゲル内の低イオン強度溶液によりゼータポテンシャルの低下した感作血球（粒子）同士が会合するためではないかと推察される。詳細については今後更に検討する必要がある。

TPHA 検査では全ての反応条件で陰性となったが、今回用いた試薬粒子は高比重成分（シリカゲル）で構成されており、ゲルカードを遠心した際に抗体と粒子の結合力を上回る大きな遠心力が粒子にかかるために凝集塊が破壊されるものと推察される。因みに同一検体をプレート法で検査した時、強陽性反応を示すことを確認している。

新しい検査法が受け入れられるか否かは、検出感度や反応特異性、検査所要時間や手数、検査費用など様々な要因によって左右される。ゲル法を用いた場合、ゲルカード費用（約500円）が別途必要となるが、2倍希釈した感作血球（粒子）を用いてもマイクロプレート法と同等の検査成績が得られることから、希釈感作血球（粒子）を使用すれば経済的にも十分対応可能である。

結 語

感染症検査へのゲル遠心法の有用性を明らかにするため、感作血球（感作粒子）凝集法による各種市販キットを用いて様々な基礎実験を行った。その結果、至適反応条件は、反応時間15分、反応温度24～26℃（室温）、感作血球（粒子）濃度半量と判断された。

患者検体を用いて各種感染症検査に広く利用さ

れているマイクロプレート法とゲル法を比較した。その結果、HBs 抗原、および HCV, CMV, HIV, HTLV-I 検査では両検査法間に差は見られなかったが、HCV 検査ではゲル法はマイクロプレート法に比して四分の一と低い値を示した。HBs 抗体検査では83検体中3検体に不一致が認められた。これらの検体はゲル法陽性・マイクロプレート法陰性であった。今回、ゲル遠心法による感染症検査について検討した結果、信頼性・再現性に優れ、速やかに検査結果が得られることを認めた。今後ゲル法は感染症のルーチン検査及び緊急検査として汎用されるものと推察される。

文 献

- 1) 吉田久博, 万木紀美子, 伊藤和彦: Micro Typing System ゲル遠心法による輸血検査. 日輸血会誌, 40: 62—67, 1994.
- 2) 押野正次, 吉井久実子, 入江與利子, 堀 勇二, 永尾暢夫, 大久保康人, 山口英夫: Micro Typing System の基礎的検討 (II) —抗体同定試験について—. 機器・試薬, 17: 426—432, 1994.
- 3) Nilsson, B., Hagstrom, U., Englund, A. and Safwenberg, J.: A simplified assay for the specific diagnosis of paroxysmal nocturnal Hemoglobinuria: Detection of DAF (CD55)⁻ and HRF20 (CD59) erythrocytes in microtyping cards. Vox Sang., 64: 43—46, 1993.
- 4) Pinkerton, P.H., Ward, J., Chan, R. and Coovadia, A.S.: An evaluation of a gel technique for antibody screening compared with a conventional tube method. Transfusion Medicine, 3: 201—205, 1993.
- 5) Lapierre, Y., Rigal, D., Adam, J., Josef, D., Meyer, F., Greber, S. and Drot, C.: The gel test: A new way to detect red cell antigen-antibody reactions. Transfusion, 30: 109—113, 1990.
- 6) 蒲池正次, 鈴木由美, 鈴木洋司, 関口 進, 戸谷一英, 長江忠男, 村藤潤子, 神谷正己, 栗谷寿一, 黒野昌庸: ラテックス凝集（スライド）法による HBs 抗原テスト「三和」（Latex）の検討—特に緊急検査への有用性について—. 機器・試薬, 14: 899—904, 1991.
- 7) 林 伸英, 津田佳苗, 大西由佳子, 三島夫美子, 高見壽夫, 山口延男: 酵素免疫測定法による HBs 抗原検出用簡易測定試薬の評価. 機器・試薬, 15: 677—682, 1992.