

## ラテックス凝集法による自動分析用抗梅毒抗体試薬の有用性の検討

高野弘紀, 伊瀬郁, 柳川義勢

**Evaluation of utility of reagent for anti- syphilis antibodies using a latex agglutination on an automatic analyzer.**

Hiroki TAKANO, Iku ISE and Yoshitoki YANAGAWA

# ラテックス凝集法による自動分析用抗梅毒抗体試薬の有用性の検討

高野弘紀\*, 伊瀬郁\*, 柳川義勢\*

Evaluation of utility of reagent for anti- syphilis antibodies using a latex agglutination on an automatic analyzer.

Hiroki TAKANO\*, Iku ISE\* and Yoshitoki YANAGAWA\*

**Keywords** : 梅毒 syphilis , STS 法 serologic test for syphilis method , TP 法 TP method , ラテックス凝集法 latex agglutination

## 緒 言

梅毒は *Treponema pallidum* (以下 TP と略す) を病原体として性行為等により感染する性感染症である。この疾患は、戦後ペニシリンの出現により著明に減少したが、1960年代後半に日本を含め世界的な再流行が見られた<sup>1)</sup>。さらに Human immunodeficiency virus をはじめとする他の性感染症との合併症にもなりやすいので本疾患の早期発見、早期治療は重要である<sup>2)</sup>。しかし、TP は培養が不可能なため従来より血清学的検査による抗体検査が行われている。この検査法はウシ心筋から分離精製したリン脂質を抗原として用いる STS 法と TP の菌体成分を抗原として用いる TP 法とに分けられる。STS 法は、治療効果を反映するが生物学的偽陽性や抗体が過剰に存在するとかえって反応が弱くなるプロゾーン現象の問題があるため特異性に欠ける。また、TP 法は特異性は高いが治癒後も抗体を長期間にわたって検出することから、一般的には両者を組み合わせて用いている。しかし、これらの方法は用手法の凝集法であるため検査術者の熟練度や凝集判定時における個人差による誤差が避けられない。

そこでより迅速でかつ特異性の高い方法として、ポリスチレンラテックス粒子に脂質抗原をコーティングした RPRLA 法とポリスチレンラテックス粒子に TP 菌体成分をコーティングした TPLA 法が開発された<sup>3)</sup>。

今回我々は、自動分析装置で測定可能なラテックス凝集法を原理とした抗梅毒抗体試薬を用いて測定を行い、その有用性について検討したので報告する。

## 材料及び方法

### 1. 検査材料

1) **血清検体** : 2000年5月～2006年3月の期間に特別区保健所より梅毒抗体検査依頼のあった血清検体151検体を使用した。

2) **精度管理検体** : 都区衛生検査機関の精度管理調査で血

清精度管理用として2005年、2006年度に用いた梅毒抗体測定用検体10検体を使用した。

### 2. 測定方法

#### 1) ラテックス凝集法

ラテックス凝集法には市販されている試薬キットのメディエース RPR (極東製薬) およびメディエース TPLA (極東製薬) を用いて行った。

#### 2) 従来法

従来法の試薬には RPR テスト三光 (三光純薬) およびセロディア-TP (富士レビオ) を用いて行った。

#### 3) 測定機器

ラテックス凝集法の試験には日立7150型自動分析装置を用いた。また、本装置におけるメディエース RPR 法 (以下 RPRLA 法と略す)、メディエース TPLA 法 (以下 TPLA 法と略す) のパラメーターを表1に示した。

表1. 日立7150における測定パラメーター

項目	RPRLA	TPLA
単位	R.U	T.U
検体量	20 $\mu$ L	16 $\mu$ L
標準血清	20 $\mu$ L <sup>※1</sup>	16 $\mu$ L <sup>※2</sup>
緩衝液量	180 $\mu$ L	175 $\mu$ L
懸濁液量	60 $\mu$ L	25 $\mu$ L
反応時間	14分	14分
測定波長	700nm	700nm

※1 : 標準血清5濃度 (0.0, 1.1, 2.1, 4.1, 7.8)

※2 : 標準血清5濃度 (0.0, 18.0, 37.0, 118.0, 242.0)

#### 4) 判定基準

ラテックス凝集法における判定基準は、試薬の添付資料に従った。すなわち RPRLA 法の判定基準は 1.0 (R.U) 未満を陰性、1.0 (R.U) 以上を陽性とした。TPLA 法の判定

\* 東京都健康安全研究センター微生物部病原細菌研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

基準は 0.0~10.0 (T.U) 未満を陰性, 10.0~20.0 (T.U) 未満を判定保留, 20.0 (T.U) 以上を陽性とした。

## 結 果

### 1. ラテックス凝集法の基礎的検討成績

試薬キットに添付されているコントロール血清を用いて行った測定機器および実験手法における基礎的検討結果を表2に示した。コントロール血清の測定値は RPRLA 法, TPLA 法ともメーカーの示した表示値およびその許容範囲内に測定でき, 使用機器および手法に問題のないことを確認した。また, STS 法および TP 法で高い抗体価を示した検体を段階的に希釈してラテックス凝集法で測定した結果, RPRLA 法の直線性は5.8R.U まで, TPLA 法の直線性は 287.0T.U まで認められた。

つぎに, 3濃度の血清を試料 A, 試料 B, 試料 C として検討した同時再現性の結果を表3に示した。低濃度になるに従い変動係数が高くなる傾向があるがほぼ良好な結果が得られた。

表2. メディエースコントロール表示値と測定値

RPRLA コントロール	表示値 (許容範囲)	測定値
陰性コントロール	0.1 (±0.3)	0.0
陽性コントロール	2.3 (±0.5)	2.2

TPLA 陽性コントロール	表示値 (許容範囲)	測定値
A	22.7 (±7.6)	22.3
B	77.1 (±12.0)	76.9

表3. 同時再現性

	RPRLA (n=10)			TPLA (n=10)		
	試料A	試料B	試料C	試料A	試料B	試料C
平均	1.9	3.5	7.2	2.4	21.3	86.8
標準偏差	0.2	0.3	0.5	0.3	1.8	5.4
変動係数	10.5	8.6	6.9	12.5	8.4	6.2

### 2. 従来法とラテックス凝集法との相関性

従来法である RPR 法 (以下 RPR カード法と略す) に対する RPRLA 法との相関と従来法の TP 法 (以下 TPHA 法と略す) に対する TPLA 法との相関を図1と図2に示した。従来法とラテックス凝集法との相関性は RPRLA 法において相関係数  $r=0.820$ , TPLA 法において相関係数  $r=0.704$  という結果であった。

### 3. 従来法とラテックス凝集法測定値との比較

RPR カード法の抗体価に対する RPRLA 法の測定値の分布を表4に, TPHA 法の抗体価に対する TPLA 法測定値の分布を表5に示した。

RPR カード法と RPRLA 法の成績の比較を表6に, TPHA 法と TPLA 法の成績の比較を表7に示した。RPR カード法に対する RPRLA 法の一致率は94.0% (陽性一致率

97.5%, 陰性一致率100.0%) であった。一方, TPHA 法に対する TPLA 法の一致率は97.4% (陽性一致率97.4%, 陰性一致率97.1%) であった。

RPR カード法において陰性と判定された 24 検体は, RPRLA 法の測定値において 0.0~0.9 (R.U) と全て陰性の値を示した。しかし, RPR カード法で1倍の抗体価を示した 19 検体中 3 検体においては RPRLA 法が陰性の結果となった。TPHA 法の陰性の結果を示した 34 検体は, TPLA 法の測定値において 1 検体だけ 48.5 (T.U) と陽性の値を示した。また, TPHA 法で陽性の結果を示した 117 検体のうち TPHA 抗体価 80 倍を示した 2 検体は判定保留, TPHA 抗体価 160 倍を示した 1 検体は陰性と判定された。

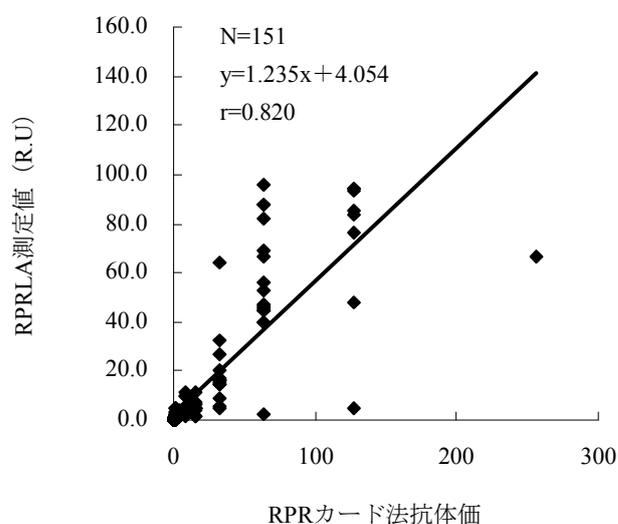


図1. RPR抗体価とRPRLA測定値との相関

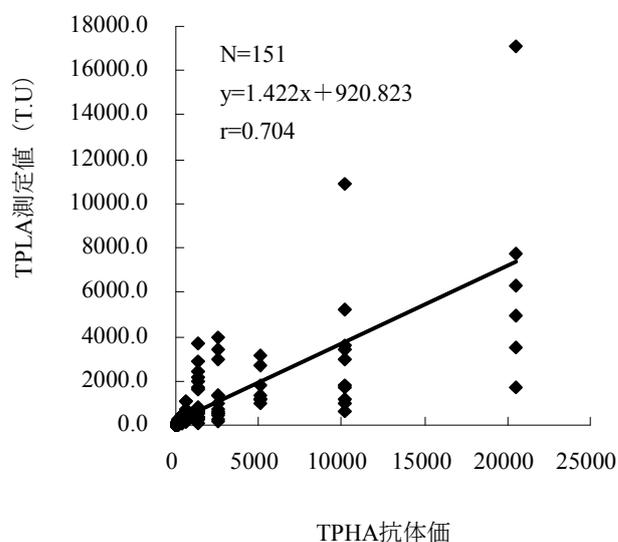


図2. TPHA抗体価とTPLA測定値との相関

表4. RPR カード法の抗体価に対する RPRLA 法の測定値の分布

RPR カード法 (抗体価)	検体数	RPRLA (R.U)	平均値	標準偏差
—	24	0.0~0.9	0.03	0.07
±	6	0.1~2.5	0.23	0.25
1	19	0.0~2.4	1.24	0.54
2	25	1.1~4.9	1.52	0.22
4	16	1.4~4.4	2.49	0.35
8	10	1.6~11.0	4.24	0.54
16	12	1.8~11.0	5.52	0.89
32	14	4.6~64.0	14.90	4.55
64	16	2.1~96.0	52.51	12.12
128	8	4.9~94.0	88.50	4.42
256	1	67.0	—	—

表5. TPHA 法の抗体価に対する TPLA 法の測定値の分布

TPHA 法 (抗体価)	検体数	TPLA (T.U)	平均値	標準偏差
—	34	0.0~48.5	1.55	3.29
80	5	11.0~84.0	37.34	28.52
160	15	9.9~231.2	97.72	49.91
320	12	78.0~490.7	224.55	123.83
640	23	139.5~1054.5	283.85	55.90
1280	24	78.0~3647.0	1036.63	947.93
2560	13	214.0~3998.8	1244.12	206.50
5120	8	1147.0~10009.3	1942.82	305.70
10240	11	643.2~13822.0	3499.89	571.07
20480	6	1692.0~17098.0	10180.38	4224.30

表6. RPR カード法と RPRLA 法との比較

	RPRLA 法			合計	
	+	±	—		
RPRカード法	+	118	0	3	121
	±	0	0	6	6
	—	0	0	24	24
	合計	118	0	33	151

表7. TPHA 法と TPLA 法との比較

	TPLA 法			合計	
	+	±	—		
TPHA法	+	114	2	1	117
	±	0	0	0	0
	—	1	0	33	34
	合計	115	2	34	151

#### 4. 精度管理検体の他施設の測定値との比較

都区衛生検査機関の精度管理調査でラテックス凝集法を用いて試験した検査施設（A保健所）があった。そこで2005年と2006年に使用した血清精度管理用の検体を

RPRLA 法と TPLA 法によりを測定し、A保健所の測定値と比較した（表8）。使用自動分析器機が同一でないため正確な数値の比較はできないが、センターとA保健所の成績はほぼ一致していた。また、RPR カード法、TPHA 法で測定した抗体価と RPRLA 法および TPLA 法の測定値の連動性も認められた。

#### 考 察

自動分析装置を用いて抗梅毒抗体測定試薬の有用性について検討した。

従来法との相関性において RPRLA 法の相関係数 0.820、TPLA 法の相関係数は 0.704 といずれもやや不良だった。供試した検体は 2000 年から 2006 年と長時間経過しているため、相関係数が低かった可能性もある。ちなみに、半年以内の検体 44 検体を用いて行った結果では、RPRLA 法の相関係数 0.920、TPLA 法の相関係数 0.865 と良好な結果が得られている。ラテックス凝集法においては、検体採取後長期間経過した検体は、検体中の脂質、蛋白質の変質や、ブロッキング成分との非特異的吸着・結合を起こす物質に影響を受けることが知られており、また、ラテックス粒子

表 8. 2005年, 2006年に使用した精度管理検体の他施設との測定値の比較

検体 No	RPR カード法 (抗体価)	RPRLA (R.U)		TPHA 法 (抗体価)	TPLA (T.U)	
		センター	A 保健所		センター	A 保健所
1	—	0.0	0.0	—	0.0	0.0
2	1	1.6	1.7	160	210.5	197.2
3	16	33.5	32.0	160	139.9	131.6
4	1	5.9	5.6	2560	1795.0	1749.0
5	—	0.0	0.0	—	0.0	0.0
6	2	3.6	3.9	640	285.5	275.4
7	—	0.0	0.0	—	0.0	0.0
8	16	7.9	7.8	320	275.5	259.8
9	—	0.0	0.0	—	0.0	0.0
10	4	3.8	4.0	1280	565.5	538.6

の均一な分散を阻害する因子の存在等も報告されている<sup>4)</sup>。したがって、これら複雑な要因による非特異現象反応を回避するために、TPLA 法で 250 (T.U) 以上示した陽性検体については中和試験を行い、TP 抗体陽性であることを確認していくことをメーカー側は指示している。

また、従来法で陰性であった検体の中で TPLA 法が陽性値を示したものがあつたが、この理由として検出する抗体の差が考えられる。今回使用した TPLA 試薬では、IgM 抗体との反応性の良い TP47KDa の抗原を主要抗原として使用している。これにより、従来の凝集法よりさらに感染初期を捉えることが可能となることが示唆される。

一方、本検査は免疫化学的検査法であるが、この方法は臨床化学的検査法とは異なる特徴がある。すなわち検量線の多くは曲線であり、今回測定した RPRLA 標準濃度の検量線においても高濃度領域では直線性が失われていた。

さらに、梅毒抗体陽性の検体には極端な異常高値を示す場合があるので、本検査において検体測定値が RPRLA 法では 7.0 (R.U) 以上、TPLA 法が 250 (T.U) 以上示した場合 5 倍希釈を行って再測定を行う方法をメーカー側は推奨している。この方法でデータを求めた場合、極端に高い値では正確なデータが得られないことになる。しかし、現状の梅毒抗体検査の意義は陽性検体の正確な定量値を求めるよりもプロゾーン現象や生物学的偽陽性の問題に対処して陰性、偽陽性を区別していくことができる特異性の高い検査法が重要である。そのためにも、佐藤ら<sup>5)</sup>が提案している方法、すなわち、I 型 (梅毒陰性)、II 型 (梅毒感染初期または BFP)、III 型 (治癒後)、IV 型 (梅毒感染) に分類し、適時ガラス板法を追加使用するなどにより、本検査法の有用性を高めていくことが期待できる。

また、ラテックス凝集法は試薬キットが汎自動分析機器であるためほとんどの臨床化学で使用している自動分析機器で対応が可能であり、多数検体処理において迅速性には優れている。しかし、キット試薬や自動分析機器のランニングコスト等を考慮する必要がある。

#### ま と め

1) 従来法とラテックス凝集法における相関性は RPRLA 法において相関係数=0.820、TPLA 法において相関係数=0.704であり TPLA 法の相関性は低かったが、半年以内の検体を用いて行った結果では、RPRLA 法において相関係数=0.920、TPLA 法において相関係数=0.865となり相関性が高まった。

2) 従来法に対するラテックス凝集法の一致率は RPRLA 法では94.0% (陽性一致率97.5%, 陰性一致率100.0%) で、TPLA 法では97.4% (陽性一致率97.4%, 陰性一致率97.1%) と良好であった。

**謝辞** 本検査にあたり自動分析機器を使用させて頂いた精度管理研究室に対して深謝致します。

#### 文 献

- 1) 中山週一: I DWR, **3**(49), 10-12, 2001.
- 2) 熊本悦明: アニムス, **6**, 33-38, 2001.
- 3) 青山紀昭: 機器・試薬, **17**, 223-227, 1994.
- 4) 片川一之, 木村孝司, 富田真理, 他: 医学検査, **50**, 689-692, 2001.
- 5) 佐藤千秋, 渡辺麻子, 新井祐司, 他: 医学検査, **52**, 959-963, 2003.