

## クラミジア トラコマチス抗体測定 酵素抗体法における不安定要因

伊 瀬 郁

### Unstableness of ELISA Method for *Chlamydia trachomatis* Antibody

IKU ISE

**Keywords:** 酵素抗体法 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), 不活化 inactivation, クラミジア トラコマチス *Chlamydia trachomatis* (CT)

#### はじめに

平成11年4月から開始された性感染症(STI)相談・検査事業に伴う検査項目は淋菌核酸同定, 梅毒抗体, クラミジア トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*: CT) 抗体及びヒト免疫不全ウイルス (HIV) 抗体検査の4項目であるが, このうちCT抗体検査は, 無症状感染者のスクリーニングとして有用であるばかりでなく, 相談者にとってその他のSTI罹患リスクの重要な指標になっている<sup>1,2,3)</sup>.

細菌第二研究科におけるCT抗体検査は, 血清を用いて酵素抗体法 (ELISA法) を測定原理とした試薬キットヒタザイムクラミジア™ (以下ヒタザイム: 製造元・日立化成(株)) を用いて検査を行っていたが, 血清を56 30分加熱する不活化が検査結果に多大な影響をもたらすことが明らかになった. 血清の不活化は梅毒抗体検査のうち脂質抗原凝集法のひとつガラス板法を行うにあたって不可欠な前処理である.

ヒタザイムと同じマイクロプレートを用いたELISA法CT抗体検査試薬キットは, 現在数社から販売されている. そこでヒタザイムと固相に用いる抗原が異なるペプタイドクラミジア™ (以下ペプタイド: 製造元・Labsystems oy (Finland) 販売元・明治乳業) を用い, ELISA法CT抗体検査試薬キットにおける不安定要因の一つと考えられた不活化の影響について検討した.

#### 材料及び方法

**1. 被検血清** 性感染症 (STI) 相談・検査事業により特別区保健所よりCT抗体検査依頼があった84件の血清を用いた. 各血清は2分し, 一方は56 30分加熱処理 (不

活化) 後1時間以内に検査に用い, 他方は不活化をしないで検査に用いた.

#### 2. 酵素抗体法(ELISA)によるCT抗体の測定

**1) ヒタザイムクラミジア** 本キットはマイクロプレート固相抗原として菌体由来の属特異的抗原であるheat shock protein 60 (HAP60) やlipopolysaccharide (LPS)を除去した精製菌体外膜蛋白を使用している<sup>4)</sup>. 測定方法は使用説明書に従い, 検体希釈用緩衝液を用いて被検血清を免疫グロブリンA(IgA)測定用は21倍, 免疫グロブリンG(IgG)測定用は210倍に希釈し, 試薬キット付属の対照血清と共にマイクロプレートの各ウェルに加えた. 37 で1時間反応させた後, 洗浄しアルカリフォスファターゼ標識抗ヒトIgA抗体またはIgG抗体を加え37 で1時間反応させた. 洗浄後, 発色基質 (*p*-ニトロフェニルリン酸) を加え室温で10分間反応させた後, 反応停止液を加え405nmにおける吸光度を測定した. 測定結果の判定は陽性対照血清の表示値と実測した平均吸光度から補正係数を求め, 陰性対照血清と検体の吸光度を補正した. カットオフ値(COV)は陰性対照血清補正值に0.12を加えた値である. 検体の吸光度をCOVで除した値がカットオフ インデックス (COI) で1.10以上が陽性, 0.90~1.09が判定保留, 0.89以下が陰性である.

**2) ペプタイドクラミジア** 本キットの特徴は人工合成ポリペプチドを固相抗原に使用していることである. すなわちCTの主要抗原である分子量約40KDaの主要外膜蛋白(MOMP)を合成したもので, MOMPの可変領域に存在する約30アミノ酸からなるペプチド領域はCTに特異

\* 東京都立衛生研究所微生物部細菌第二研究科 169-0073 東京都新宿区百人町3 - 24 - 1

\* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
3 - 24 - 1, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan

的である<sup>5)</sup>。測定は使用説明書に従いIgA用IgG用ともに血清と試薬キット付属の対照血清を希釈液で10倍に希釈し、マイクロプレートの各ウェルに加え、37℃で30分間反応させた後、洗浄した。次にペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgA抗体またはIgG抗体を加えて37℃30分反応させた。洗浄後、発色基質(3,3',5,5'-テトラメチルベンチジン)を加え室温で15分反応させた後、反応停止液を加えて450nmにおける吸光度を測定した。測定結果の判定は陽性対照血清の吸光度に0.3を乗じてCOVとし、COIが1.11以上が陽性、0.90~1.10が判定保留、0.89以下が陰性である。

## 成 績

### 1. 血清の不活化による判定の変動

血清84件について不活化後測定した結果と不活化せずに測定した結果を比較した。表1に示したようにヒタザイムLot H 096で測定した結果、IgAにおいて不活化しなかった血清では陽性数が19例、判定保留はなかったが、不活化血清では陽性数が18例になり、判定保留数が9例に増えた。それに伴って陰性数は65例から57例に減少した。IgGにおいては陽性数が28例から26例に、判定保留数が4例から3例に減り、陰性数が52例から55例に増加した。

表1 ヒタザイムクラミジアにおける血清の不活化が判定におよぼす影響と不活化血清におけるLot間差

N=84	IgA			IgG		
	不活化なし	不活化済み		不活化なし	不活化済み	
	H 096	H 096	H 098	H 096	H 096	H 098
陽 性	19	18	16	28	26	16
判定保留	0	9	14	4	3	9
陰 性	65	57	54	52	55	59

不活化血清をヒタザイム2Lot を用い測定し、その結果を比較すると、IgAにおいては、Lot H 096では陽性数18例、定保留数は9例、陰性数は57例であったが、Lot H 098ではそれぞれ16例、14例、54例であり、特に判定保留数が1.5倍になったことが目立つ結果であった。IgGにおいては、Lot H 096ではそれぞれ26例、3例、55例であったが、Lot H 098ではそれぞれ16例、9例、59例であり陽性数が約5分の3に激減し判定保留数が3倍に増加した。

ペプチドでは表2のとおりIgA, IgG共に不活化による影響はほとんど見られず、判定保留数の極端な増加もなく、陽性が1件ずつ減り陰性数が増えた。

### 2. カットオフインデックス (COI) の分布の変動

84検体のCOIの分布を図1に示し、不活化の影響を比

表2 ペプチドクラミジアにおける血清の不活化が判定におよぼす影響

N=84	IgA		IgG	
	不活化なし ATF 1-1	不活化済み ATH 2-1	不活化なし GTD 1-1	不活化済み GTJ 1-1
陽 性	15	14	17	16
判定保留	2	1	1	1
陰 性	67	69	66	67

較した。ヒタザイムLot H 096 を用いた場合、陰性群のCOIの分布はIgA, IgG共に不活化により陽性側に移動した。その結果、IgAでは不活化をしないで測定した場合、陰性群と陽性群が明らかに分離していたが、血清を不活化することによって連続的分布になり判定保留が増えた。IgGでは判定に特に影響をおよぼさなかったが、IgAと同様にCOIの分布は連続的になった。Lot H 098で不活化血清を測定した結果は、Lot H 096の場合よりさらに陰性群が陽性側に移動したため、IgA IgGともに陰性群と陽性群が完全に連続し、陽性と陰性の判定は困難となった。

ペプチドでは陰性群に若干の陽性側への移動はあるものの、COIの分布状況は大きく変化しなかった。

### 3. 不活化の回数をもたらず吸光度の変化

6検体について不活化回数を1回、2回、3回と行い、不活化しない場合とCOIの変動を比較した。測定は同一マイクロプレート上で同時測定した。2回目以後の不活化は梅毒抗体検査ガラス板法と同じ56℃10分間とした。

図2に示すようにヒタザイム、ペプチド共に不活化を行うとCOIが大きくなり、また不活化を重ねるとともにCOIがさらに大きくなる傾向があった。ヒタザイムではその変化はIgA, IgG共に大きく、陰性域から判定保留域あるいは陰性域から陽性域に一挙に変動する場合もあった。ペプチドでは検体6のIgGが陰性から1回目の不活化で判定保留に、2回目の不活化で陽性域に変化した1例を除き、全体として大きな変化は見られなかった。検体4は3回目の不活化後陰性化した。

## 考 察

ヒタザイムは固相抗原に属特異的抗原を除去した菌体外膜成分を精製して用いることにより、他のクラミジア属菌との交差反応性が低く押さえられているとの報告<sup>4)</sup>がある。また使用説明書には、非特異反応についてもクラミジア感染細胞に起因する自己抗体に対するものについては無いと記載されている。

しかし、今回の実験成績から血清を不活化した場合には明らかに非特異反応が認められた。ペプチドの場合、

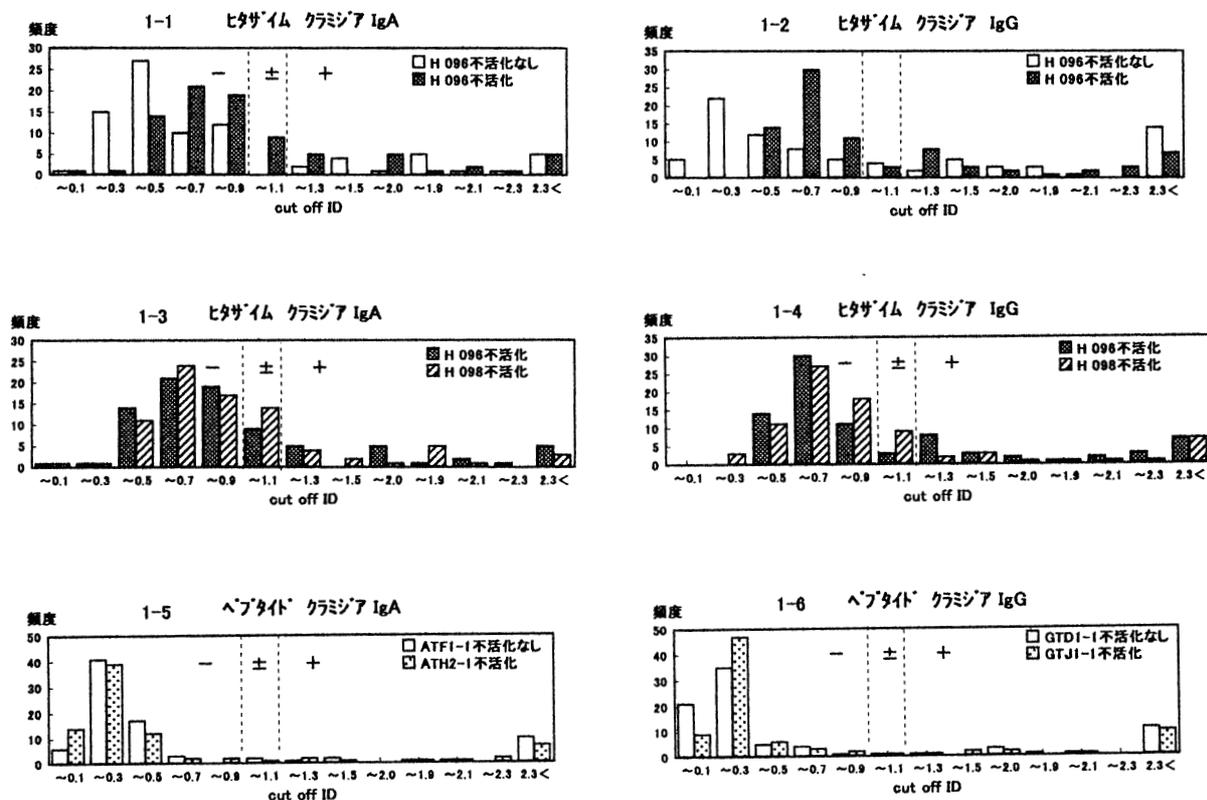


図1 血清の不活化によるCOI分布の変化

- 1-1, 1-2, ヒタザイム クラミジア Lot HO96における血清不活化の有無によるCOIの分布の違い  
 1-3, 1-4, ヒタザイム クラミジア Lot HO96とLot HO98の不活化血清のCOIの分布  
 1-5, 1-6, ペプタイト クラミジアにおける血清不活化の有無によるCOIの分布の違い

人工合成ポリペプチドであるため非特異反応を起こす要素は少なく、他のクラミジア属菌との交差反応性のない優れた特異性を有しているとの報告<sup>5)</sup>がある。反面、感染によって血中に現れる抗体のすべてを検出できないため、擬陰性が存在する可能性は否定できないし<sup>6)</sup>、合成ポリペプチドに対応する抗体は極端に効率よく検出する可能性もありうる。このことは図2に示す検体4及び5のように不活化をしないで測定したときのヒタザイムとペプタイトの測定結果の乖離に現れている。

平成11年4月から性感染症相談・検査事業におけるSTI関連検査の一つとしてCT抗体検査をELISA法試薬キットであるヒタザイムを用いて開始した。不活化を必要とする梅毒抗体検査ガラス板法を先に実施する作業工程の場合には、不活化血清でCT抗体検査も行うことになる。当初ヒタザイムの使用説明書には血清の不活化についての「注意書」が記載されていなかった。そのためヒタザイムを使用して検査を行ったところ判定保留が数多く出現した。再検査に不活化を2回行った検体を用いたところ、判定保留数がさらに増加した。このような現象の原因については、不活化により熱変性した血清成分が固相に含まれる何らかの物質と非特異反応を起こしたの

ではないかと考察された。またこのとき使用したLotの判定保留率は、IgAが10.1%、IgGは8.5%あり、その前に使用していたLotの判定保留率はIgA、IgGとも3.7%であったことからLot間にも差があることが明らかになった。これらのデータ提示に対して、製造元の日立化成も独自の実験結果から不活化血清を使用すると非特異反応により吸光度が高くなる現象を認めた。それ以後現在市販されている試薬の使用説明書には不活化血清の使用を禁じているが、日立化成による原因の追求結果はまだ出ていない。なお当研究所では、現在CT抗体検査のELISA試薬キットは安定性を重視してペプタイトを使用し、血清は不活化せず検査に供している。また感染によって血中に現れる抗体を広く検出するヒタザイムとの比較実験も継続しており、性感染症相談・検査事業のスクリーニング検査に用いる試薬としての適性を検討しているので、追って報告したい。

## 文 献

- 1) 小島弘敬：日本医事新報，(3956)，122，2000。
- 2) 熊本悦明，塚本泰司，岩澤晶彦：臨床と微生物，24，387～396，1997。
- 3) 濱砂良一，南島洋一：知っておきたい現代感染症事

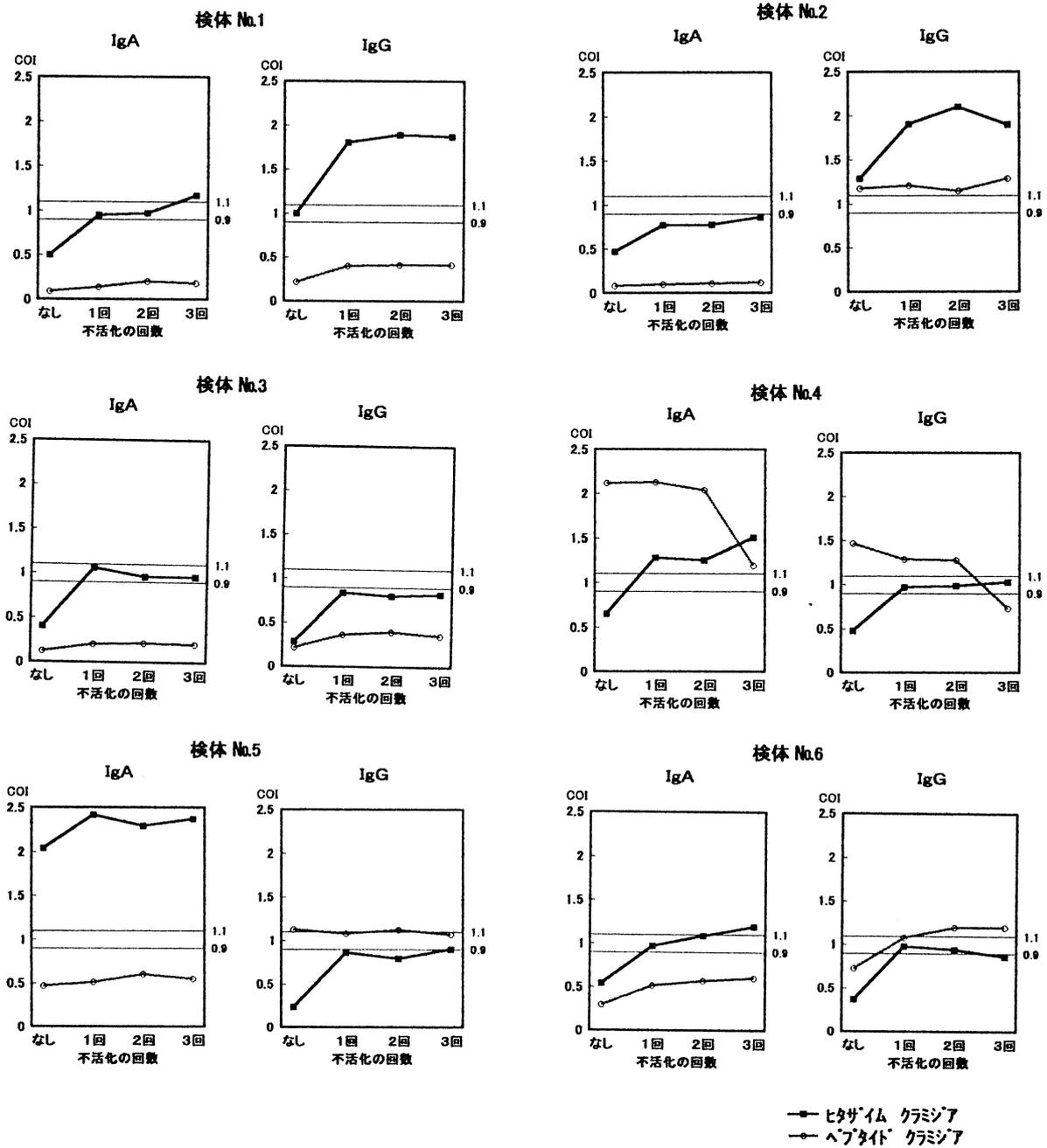


図2 血清を重ねて不活化したときのCOIの変動  
 血清の不活化 1回目: 56 30分, 2回目以降: 56 10分

- 情2, 第1版, 18~24, 1999, 医歯薬出版株式会社, 東京.
- 4) 岸本寿男, 松島俊春: 日本性感染症学会誌, 10, 139~146, 1999.
- 5) 坂内久一, 菰田照子, 秋田博伸, 他: 感染症学雑誌, 73, 633~639, 1999.
- 6) 尾内一信, 長谷川恵子, 牧隆司, 他: 感染症学雑誌, 72, 249~257, 1998.