

梅毒 TP 抗体検出用試薬のゼラチン粒子凝集法 (TPPA 法)

における偽陽性反応

畑 川 清 美, 岩 本 佳 子, 木 代 和 美

はじめに

梅毒血清反応には通常 STS (serological tests for syphilis) と呼ばれるカルジオリピン・レシチンのリン脂質を抗原とする脂質抗原試験と, *Treponema Pallidum* (TP) 菌体又は菌体成分を抗原とする TP 抗原試験がある。脂質抗原試験で検出される梅毒抗体は, 抗脂質抗体又はレアジンと呼ばれ梅毒に対して非特異的な反応であり偽陽性も多い。しかし感染初期での陽性化が早く抗体価変動も臨床経過と一致することから臨床的意義は高い¹⁾。

一方 TP 抗原試験は梅毒の病原体に対する抗体, すなわち TP 抗体を検出する特異的な反応であり, fluorescent treponema antibody absorption (FTA-ABS) 法や *treponema pallidum* hemagglutination (TPHA) 法がある。最近では人工粒子を用いた受身凝集反応の *treponema pallidum* particle agglutination (TPPA) 法²⁾, immunochromatography assay (ICA), 自動分析装置による免疫比濁法, 蛍光免疫測定法なども普及している。

当院では梅毒の感染有無を調べる定性法, すなわちスクリーニング検査として見落としがなく, かつ偽陽性反応をできるだけ除外するために津上らの double check plan に準じた組み合わせにより³⁾, STS から Rapid Plasma Reagin Card Test (以下 RPR) と TP 抗原試験から TPHA 法を採用し実施してきた。1997 年から TPHA 法の非特異反応の改善を目的に, ゼラチン粒子担体を用いた TPPA 法に変更したが, 本法での非特異反応に

ついては報告が見当たらない。

我々は TPPA 法における偽陽性頻度について, TP 抗原による吸収確認試験を用いて調査したので報告する。

材料および方法

1. 試料

1998 年 11 月～1999 年 10 月までに当院の健診を含む各科から梅毒血清検査依頼のあった 6,645 名を対象とした。高 IgM 血症例については凍結保存血清の 3 例を用いた。

2. 測定方法

1) TPPA 法

本法はゼラチンを粒型化した人工担体に病原性 *T. pallidum* (Nichols 株) の菌体成分を感作させたいわゆる感作粒子と, 適切な溶媒で希釈した被検血清中の *T. pallidum* 抗体とが反応する間接粒子凝集法である。用いた試薬は富士レビオ社のセロデア TPPA (以下セロデア PA) で, スクリーニング及び力価測定との操作と判定方法は能書に従った。

2) RPR (Rapid Plasma Reagin Card Test)

本法はカルジオリピン・レシチン抗原と炭末粒子を組み合わせたもので, スライド凝集反応を原理とする。用いた試薬は日本ベクトンデッキンソン社製で, 使用法は能書に従った。

3) immunochromatography assay (ICA)

被検血清中の抗 TP 抗体は, 膜に固定化された細胞膜蛋白のリコンビナント抗原上を浸透作用によって移動し, 固定化 TP 抗原と結合する酵素免疫測定法である。用いた試薬は富士レビオ社のエスプライン TP で, 使用法は能書に従った。

試験管	A	B
患者血清(μl)	180	180
TP抗原液(μl)		20
対照液(μl)	20	
混和静置したものを試料とする		
	試料A	試料B

TPPA(TPHA)									
A列	試験管No	1	2	3	4	5	6	7	8
	希釈液(μl)	100	25	25	25	25	25	25	25
	試料A	25	25	25	25	25	25	25	25
	希釈倍数	5	10	20	40	80	160	320	640
	感作粒子(μl) (TPHA)		25	25	25	25	25	25	25
振とう混和、静置									
B列	試料Bを用いてA列と同様に実施								
※A列とB列の最終凝集管差をもって判定する									

図1. 非特異反応確認のための吸収試験の検査手順

4) 吸収確認試験

抗 TP 抗体確認用吸収液(シスメックス社製)を用い、使用操作は図1に準じて実施した。判定基準は試験希釈系列と吸収希釈系列の凝集管差に2管以上を認めれば陽性と判定し、凝集管差が1管の場合判定保留、凝集管差のない場合を陰性とした。

5) 上記1), 2)の試薬を用い、梅毒血清反応のスクリーニング検査を実施した。スクリーニングの結果がセロデアPA陽性、RPR陰性の検体については3)のICAによる再検査と4)の吸収確認試験による非特異反応のチェックを行った。

結 果

1) 梅毒血清反応スクリーニングの結果

1998年11月から1999年10月までの1年間に梅毒検査依頼があった6,645検体について、セロデアPAとRPRでスクリーニング検査を実施した。スクリーニング検査の結果2法とも陰性及び陽性と一致したのは合わせて約99%、不一致は1.12%であった。不一致例にはRPRだけが陽性のもの37検体、セロデアPAだけが陽性のもの37検体と同数みられた。セロデアPAの陽性数は133検体(2.1%)でその年齢分布を見ると70代を中心にはほぼ正規性分布をしており、約80%は60歳以上の高齢者であった(図2)。また、セロデアPA陽性の133検体中ではRPRの陽性96検体

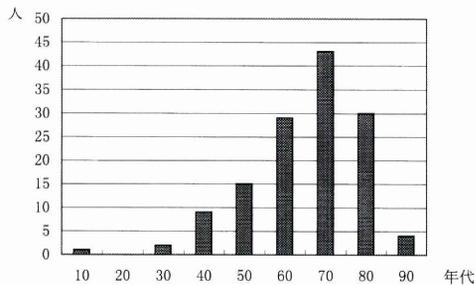


図2. セロデアPAにおける年代別陽性者数

表1. 梅毒血清反応スクリーニングの結果(平成10年11月~平成11年10月)

		RPR テスト	
		(-)	(+)
TPPA	(-)	6,475 (97.44%)	37 (0.56%)
	(+)	37 (0.56%)	96 (1.44%)

(1.44%), RPRの陰性37検体(0.56%)であった。(表1), (表2)

2) 吸収確認試験の結果

セロデアPA陽性・RPR陰性の37例について吸収確認試験を実施した。図3に吸収確認試験のセロデアPA反応凝集像判定例を示す(検体の希釈は左から右に進む)。No13Aの反応系列、No13BのTP抗原吸収系列の凝集像では双方とも左から4穴目まで凝集を認める、すなわちTP抗原で中和されないことを示す。No14Aの反応系列では4穴目まで凝集しているが、No14BのTP抗原吸収系列では1穴目から凝集は見られない、すなわちTP抗原によって中和されたことを示す。この吸収方法による判定基準を用いたセロデアPA陽性、RPR陰性37例の判定結果は、37例中31例(83.8%)に2管以上の吸収管差を認めたため陽性と判定、残り6例(16.2%)はTP抗原で吸収されなかったため非特異的な反応による偽陽性反応と判定し、TP抗体陰性とした(表3)。その判定結果はICAの結果と一致していた。

偽陽性と判定された6例中2例は健診受診者と外来ドック受診者であり、年齢は1名が10代の女

表2. TPPA 陽性・RPR 陰性の不一致例一覧

No	氏名	受診科	性別	年齢	TPPA	RPR テスト	TP 定量	ガラス板	凝集法
1	S.M	健診	男	60	(+)	(-)	320	<1	<1
2	S.T	9F	女	71	(+)	(-)	160	<1	<1
3	S.E	健診	男	36	(+)	(-)	80	<1	<1
4	F.K	健診	女	68	(+)	(-)	80	<1	<1
5	S.Y	3W	男	84	(2+)	(-)	160	<1	<1
6	S.T	10F	女	78	(+)	(-)	80	<1	<1
7	I.T	3W	男	79	(+)	(-)	160	<1	<1
8	W.K	10F	男	69	(+)	(-)	160	<1	<1
9	H.R	外科	女	64	(2+)	(-)	2,560	<1	<1
10	I.T	8W	女	91	(+)	(-)	160	<1	<1
11	T.T	循環器	女	81	(+)	(-)	160	<1	<1
12	A.T	皮膚	男	61	(+)	(-)	160	<1	<1
13	I.M	健診	女	18	(2+)	(-)	160	<1	<1
14	I.M	神経	女	73	(+)	(-)	160	<1	<1
15	Y.T	泌尿器	女	88	(2+)	(-)	5,120	<1	<1
16	T.E	10F	女	88	(+)	(-)	80	<1	<1
17	T.M	整形	男	58	(±)	(-)	80	<1	<1
18	G.S	3E	女	87	(+)	(-)	160	<1	<1
19	T.K	6E	男	80	(+)	(-)	80	<1	<1
20	S.N	外科	女	51	(±)	(-)	80	<1	<1
21	S.T	耳鼻	男	81	(2+)	(-)	320	<1	<1
22	O.H	7W	男	79	(2+)	(-)	320	<1	<1
23	G.K	婦人	女	64	(2+)	(-)	2,560	<1	<1
24	I.T	救急	男	69	(2+)	(-)	1,280	<1	<1
25	S.H	神内	男	56	(+)	(-)	160	<1	<1
26	S.N	7W	男	73	(2+)	(-)	320	<1	<1
27	D.H	8W	女	67	(+)	(-)	320	<1	<1
28	S.N	消化	女	59	(+)	(-)	160	<1	<1
29	H.M	健診	男	50	(±)	(-)	80	<1	<1
30	A.K	6E	女	68	(+)	(-)	80	<1	<1
31	S.J	消化	男	63	(+)	(-)	80	<1	<1
32	A.S	内科	男	42	(+)	(-)	80	8	<1
33	T.K	消化	男	64	(+)	(-)	80	<1	<1
34	I.A	内科	女	49	(2+)	(-)	1,280	1	<1
35	T.K	泌尿	男	76	(+)	(-)	160	<1	<1
36	K.B	9F	男	84	(2+)	(-)	320	<1	1
37	T.S	眼	女	75	(+)	(-)	160	2	2

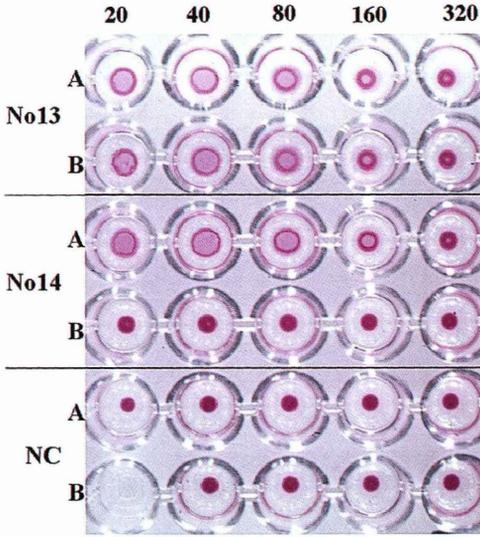


図3. セロデア PA による吸収確認試験反応凝集像
 No13: 非吸収例 (セロデア PA で偽陽性)
 No14: 吸収例 (セロデア PA で陽性)
 NC: 陰性コントロール
 A: 反応対照系列, B: 吸収系列 (図上の数字は血清希釈倍数)
 No13 では A・B 列とも血清希釈倍数の 80 倍まで凝集がみられた。
 No14 では A 列に 80 倍まで凝集がみられるが B 列には 20 倍でも凝集はみられない。

性もう 1 名は 50 代の男性であった。他の 4 名は入院患者で、外科系 1 名、内科系 3 名であった。また 6 例のうち免疫グロブリンを測定し得た 4 例の内 2 例は、IgM に異常高値を示した (表 4)。

3) 高 IgM 血症保存血清 3 例とセロデア PA の反応
 セロデア PA の異常免疫グロブリンとの反応性

表 4. TP 吸収試験で陰性となった 6 例の免疫グロブリン濃度

(mg/dl)

No	受診科	性別	年齢	エスブライン TP	IgG	IgA	IgM
13	健診	女	18	陰性	998	178	227
29	健診	男	50	陰性	NT	NT	NT
30	6E	女	68	陰性	1,580	406	292
31	消化	男	63	陰性	764	75	3,540
32	内科	男	42	陰性	2,700	276	1,240
33	消化	男	64	陰性	NT	NT	NT

表 3. TPPA 陽性・RPR 陰性の不一致例における確認試験の判定結果 (年代別)

年代	例数	陽性	陰性	
10 代	1		1	※健診
20 代	0			
30 代	1	1		
40 代	2	1	1	※内科
50 代	5	4	1	※健診
60 代	11	8	3	※外科, 消化器 (2)
70 代	8	8		
80 代	8	8		
90 代	1	1		
計	37	31	6	
(%)		83.8	16.2	

※は確認試験で陰性と判定された検体依頼科

を確認するために、血清中 IgM 濃度が異常高値を示した患者血清 (-20°C で凍結保存してあった) 3 例を用いてセロデア PA を実施したが何れも凝集は認めなかった (表 5)。

4) 偽陽性反応検出のきっかけとなった症例検体 No13 の精査結果

症例は 18 歳女性で進学のため、当院で健康診断を受診した高校生である。既往歴及び家族歴に梅毒感染に関する特記事項はなかった。感染症関連検査結果で梅毒血清反応のセロデア PA 以外には特に陽性反応を認めなかった。また、1 週間後と 1 ヶ月後に再採血し、セロデア PA とその他 4 種類

表 5. 高 IgM 血清における TPPA 法の反応

	IgM (mg/dl)	TPPA	エスプライン TP
A	6,020	陰性	陰性
B	2,540	陰性	陰性
C	8,260	陰性	陰性

表 6. 症例 No 13 の各種梅毒抗体検査結果

検査日	11月19日	11月26日	12月16日
検査試薬名			
セロデア TPPA	(++)	(++)	(+)
定量価	160	160	80
RPR テスト	(-)	(-)	(-)
ガラス板法	(-)	(-)	(-)
凝集法	(-)	(-)	(-)
エスプライン TP	(-)	(-)	(-)
TPHA	(-)	(-)	(-)

の TP 抗体検査試薬で再検査を実施したが、やはり陽性反応を示したのはセロデア PA のみであった。しかしセロデア PA の反応力価は1ヶ月目で80倍に下がり、セロデア PA に対する非特異反応物質の消失傾向が伺われた (表 6)。

図 4 にはセロデア PA と TPHA のスクリーニング時のマイクロプレート内凝集像を示した。比較のために陽性コントロール (PC) と陰性コントロール (NC) も検査した。上段はセロデア PA の反応であるが血清希釈の 20 倍に対照未感作粒子、40 倍に感作粒子を滴下、下段は TPHA の反応で血清希釈の 10 倍に対照未感作粒子、20 倍と 40 倍に感作粒子を滴下した。セロデア PA での凝集像は PC と患者血清で同様の反応像であるが、TPHA での凝集像は NC と同様の反応像を示した。

5) 各種成分を用いた吸収試験結果

精査のため試薬メーカーの研究所において各種成分を用いた吸収試験を実施した。その結果によると粗精製及び精製 TP 抗原ならびに抗ヒト IgM 抗体により吸収され、ライター株、ウサギ辜

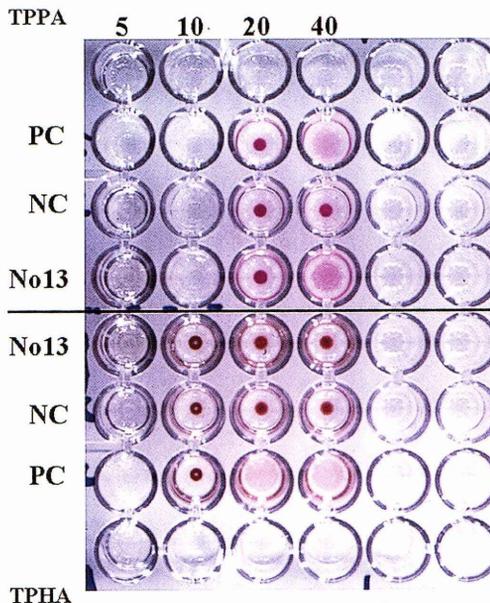


図 4. 症例 No 13 のスクリーニング検査

上段: セロデア PA (TPPA), 下段: TPHA
PC : 陽性コントロール
NC : 陰性コントロール
(図上の数字は血清希釈倍数)

上段セロデア PA では 20 倍に未感作粒子, 40 倍に感作粒子を滴下。症例は PC と同様の凝集像である。

下段 TPHA では 10 倍に未感作粒子, 20 倍と 40 倍に感作粒子を滴下。症例は NC と同様の凝集像である。

丸成分, ヒト IgG では吸収されなかった (図 5)。

考 察

従来から梅毒抗体検査については、原理の異なる方法による総合的な評価が慣習となっている。特に STS 法と TPHA 法の組み合わせによる判定基準が示されていることから、当院でも STS 法の RPR と TP 抗原試験の TPHA 法を同時に実施している。これは早期の抗体検出と鑑別診断、治療効果判定の目的を同時にスクリーニングする利点があり、臨床的にも有用として今日至っているのが現状である。中にはスクリーニング検査に TPHA 法を用いることの問題を指摘し、TPHA 法はあくまでも確認試験の 1 法とするべきとの意見もある⁴⁾。TPHA 法で検出される TP 抗体は IgG 分画に属し、治療によって陰性化することは

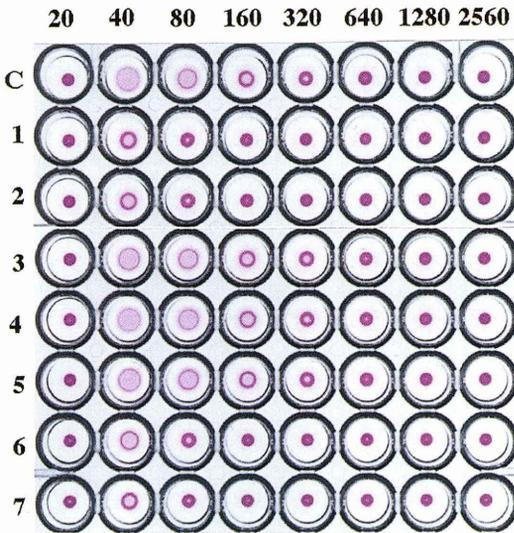


図5. セロデア PA による各種成分を用いた吸収試験反応像

- C: コントロール
 1: 粗精製 TP 抗原 2.0%
 2: 精製 TP 抗原 2.0%
 3: ライター株 2.0%
 4: ウサギ睾丸成分 2.0%
 5: 抗ヒト IgG 4.0%
 6: 抗ヒト IgM 2.0%
 7: 抗ヒト IgM 4.0%

(図上の数字は血清希釈倍数。20 倍のところは未感作粒子, 40 倍から 2560 倍に感作粒子を滴下)

コントロールと比較して 1, 2, 6, 7 で凝集力価が下がっている。

まれであり, 感染既往性抗体として持続するのがその理由である (tailing 現象)。そのため抗原の消失とともに陰転化するような IgM 抗体の検出反応系が望まれ, 検討されてきたが実用化には至っていない⁵⁾⁶⁾。

最近, 各種の方法による治験結果報告で, IgM 抗体の検出, あるいは感染早期の抗体を検出可能な感度を有する等とした報告も散見されるがいずれも IgG 抗体の tailing 現象は改善されていない^{7)~11)}。

TP 抗原試験としての人工粒子を担体とする粒子凝集反応系は, 動物の赤血球と異なり抗原性も無く, 化学的にも安定であることから非特異的な反応や困難な判定が少ない等のメリットがあり, 当院でも 1997 年に TPHA からセロデア PA に

替えて使用している。

1998 年 10 月に当院で健康診断を受診した 10 代の女性に, セロデア PA のみ陽性反応を示し, 再現性, 反応凝集像からはまったく偽陽性が疑われなかったため, 既往症抗体と判断し報告した。患者と家族からの申告により, 精査をした結果セロデア PA の非特異反応であることが確認された。STS による非特異反応は良く経験するが, それは一般的に生物学的偽陽性 (BFP) と呼ばれ, ある特定の疾患または病態でおることから問診において鑑別される。TP 抗原を用いた反応系での非特異反応も, 梅毒病原菌以外のトレポネーマ属の感染, 伝染性単核球症, レブラ, SLE, 慢性関節リウマチ, 全身性硬化症等でまれに起こることは知られているが臨床診断により鑑別され得るものである¹²⁾。特殊な例として *T. pallidum* の培養基であるウサギ睾丸成分に対する抗体を持っている場合, TP 抗原による吸収試験での鑑別が必要との報告はされているが¹³⁾ 一般健常者での非特異反応の報告はない。

TPHA での非特異反応に関する村社らのデータによると¹⁴⁾, TPHA 陽性群の中で TP 抗原吸収試験で吸収されず FTA-ABS が陰性となった例が 2.3% 程度見られている。年代層や対象群が異なるため単純な比較はできないが, 今回我々が調査した結果によると陽性 133 例中 6 例 (4.5%) にセロデア PA の非特異反応を示し, これは試薬導入当初の予想を大きく上回っている。今回偽陽性を示した 18 歳の症例は, 各種成分での吸収試験から IgM 抗体の存在が疑われるが特定できなかった。梅毒抗体スクリーニング検査は基本的に現行の 2 法で充分であるが, セロデア PA 陽性・RPR 陰性例にも TP 抗体の非特異反応があることを念頭に置き, 吸収試験又は原理の異なる他の方法で再検査を実施して判定することを推奨する。特に自動分析機を用いる試薬系では確認用 TP 抗原液による吸収試験を行う必要がある。

大阪府の 1996 年の調査報告書¹⁵⁾ によると性行為感染症が増加する中で梅毒感染者は少なくなっているとはいえ, 感染者の減少にもかかわらず, 新生児顕性梅毒の頻度の高さを指摘している。梅毒

は疾病としての問題性よりも、古くから社会的側面でのイメージが大きな問題であり、患者の中には抗体が陽性であるということで悩み続け、人と言えないなどの精神的負担を背負っていることが多いと思われる。このことから、患者にとって言われの無い検査結果が報告されないように、特異度の高い梅毒血清反応を採用し実施しなければならないことは当然である。検査試薬の改良は日々進歩し、抗原の精製に遺伝子技術を利用した開発も多くなってきたが、免疫学的抗体検出法による非特異反応の撲滅にはまだ時間がかかりそうである。

ま と め

セロデア PA と RPR による梅毒抗体スクリーニングでセロデア PA 陽性・RPR 陰性例は 0.56% あった。またセロデア PA 陽性 133 例中での偽陽性反応は 6 例 (4.5%) で、その殆どは入院患者であったが 2 例は 18 歳と 50 歳の健康人であった。

今回の検討によって特異性に優れていると思われたセロデア PA でも、比較的非特異反応が多いことがわかった。このことからセロデア PA 陽性・RPR 陰性例には吸収試験又は他の方法による再検査が必要である。

謝 辞

症例の精査に当たって御協力下さった内科の秋保直樹先生に深謝致します。

文 献

1) 水岡慶二：梅毒血清反応の臨床的意義。検査と技術 **21**：549-555, 1993

2) 出口松夫 他：梅毒 *Treponema Pallidum* 抗体測定におけるゼラチン粒子凝集法の評価。感染症学雑誌 **68**：1271-1277, 1994

3) 津上久弥：梅毒の臨床と血清反応検査との関係。皮膚 **15**：86-99, 1973

4) 高橋朋子 他：梅毒トレポネーマ。日本臨床 **53**：216-220, 1995

5) 津上久弥：梅毒治療の指標としての梅毒 IgM 抗体の検出——梅毒治癒判定の目安として——。日本医事新報 **3002**：43-47, 1981

6) 大谷道廣 他：梅毒 IgM 抗体の検査法とその意義。皮膚科 *MooK* **4**：37-47, 1986

7) 児玉隆成 他：イムノクロマトグラフィー法による抗 TP 抗体検出用試薬の基礎的検討。臨床検査機器・試薬 **21**：327-334, 1998

8) 大里和久 他：イムノクロマトグラフィー法による抗 TP 抗体迅速検出用試薬の基礎的検討。医学と薬学 **39**：1263-1269, 1998

9) 出口松夫 他：自動分析装置 COBAS MIRA Plus による梅毒 *Treponema Pallidum* 抗体測定。JJCLA **20**：148-154, 1995

10) 齊藤雅一 他：日立 7070 型自動分析装置を用いた「メデイエース TPLA」の検討。医学と薬学 **32**：1013-1020, 1994

11) 三上恵世 他：ELISA 競合法 (Enzygnost Syphilis) による梅毒トレポネーマ抗体の測定。医学と薬学 **31**：701-704, 1994

12) 菅原孝雄：梅毒トレポネーマ。日本臨床 **48**：409, 1990

13) 大橋葉子 他：ウサギ嚢丸成分に対して非特異反応を示した TPHA 偽陽性例。医学検査 **40**：747, 1991

14) 村社恵子 他：LX-3000 を用いたラテックス凝集反応による梅毒抗 TP 抗体の検出。JJCLA **20**：814-819, 1995

15) 大阪府環境保健部：平成 7 年度大阪府における性感染症動態調査概要：19-21, 1996