

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等政策研究事業）

分担研究報告書

HAM 患者髄液中抗 HTLV-1 抗体価の PA 法、CLIA 法、CLEIA 法による測定法 における判定基準の検討（2）

研究分担者 出雲 周二 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 教授

研究協力者 児玉 大介、久保田 龍二 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科

HAM 診断基準に用いられている抗 HTLV-1 抗体価測定法は近年第一世代の PA 法から CLIA 法、CLEIA 法などの第三世代の測定法へ代わっている。HAM の臨床診断への影響の検討を昨年に引き続き行った。血清検体では CLIA 法、CLEIA 法とも PA 法同様に問題なく置き換え可能だが、髄液検体については CLIA 法では特異度に、CLEIA 法では感度に問題があり、特徴を考慮の上置き換え可能と考えられた。また HAM、HC の鑑別目的にカットオフ値を設定可能かどうかを ROC 分析を行い検討したが感度、特異度両方とも 90% 程度を満足できるカットオフ値はなく、PA 法でも新世代でも設定しない方が良いと考えられた。

A. 研究目的

血清検体中の抗 HTLV-1 抗体陽性/陰性の判定は、従来用いられてきた PA 法のキット（セロディア、富士レピオ）ではなく、第三世代の CLIA 法（アーキテクト、アボットジャパン）CLEIA 法（ルミパルス・フォルテ、ルミパルス・プレスト、いずれも富士レピオ）など自動化検査機器対応の検出法と検査試薬が近年は標準的に使用されている。

昨年我々は、PA 法に基づいている HAM の診断基準の抗 HTLV-1 抗体価が、近年の新しい抗体価測定法を採用していても血清・髄液中抗体価のデータは PA 法と極めて強い相関性が得られること、および変換式を示した。また相関は実測値よりも対数化したデータで行うとより良い相関が得られることも示した。

今回我々は、それぞれの抗体価測定法について対数化した抗 HTLV-1 抗体価を用いてすべて検討しなおした。

また診断基準では、血清・髄液中とも抗 HTLV-1 抗体が陽性となっているが、髄液中の抗 HTLV-1 抗体価のみで HAM の診断がつけられるのか、つまりキャリアと鑑別可能なカットオフ値があるのかどうか決まっていない。本研究では HAM 患者診断基準に寄与する補助検査としての髄液中の妥当な抗体価のカットオフ値の有無についても検討する。

B. 研究方法

対象：2004～2014年に鹿児島大学病院神経

内科に同一日に凍結保存された血清・髄液で WHO 診断基準で診断された HAM47 例、キャリア（HC）15 例、陰性対照（NC）18 例。抗 HTLV-1 抗体価測定方法：以下の 3 つの方法でそれぞれ血清、髄液検体の抗 HTLV-1 抗体価を測定し比較する。

- 1) PA 法：セロディア HTLV-1（富士レピオ）
- 2) CLIA 法：アーキテクト・HTLV-1（アボット・ジャパン）
- 3) CLEIA 法：ルミパルス f HTLV-1（富士レピオ）

HTLV-1 の確定診断：PBMC 由来 genomic DNA を用いた TaqMan 法¹⁾（プロウイルス量測定）または nested PCR 法²⁾

統計処理：

HAM および HC の血清、髄液でそれぞれ PA 法と CLIA 法、PA 法と CLEIA 法間で単回帰分析を行った。また HAM、HC 間での血清中および髄液中抗 HTLV-1 抗体価の比較は Student t 検定を行った。ROC 分析は GraphPad Prism (GraphPad software, Inc. CA, USA)を使用した。

（倫理面への配慮）

臨床検体採取はインフォームドコンセント下に行い、検体は匿名化非連結下で検討した。本研究での検体、遺伝子の検討は鹿児島大学倫理委員会承認下に行われた。

C. 研究結果

(1) CLIA 法、CLEIA 法の感度、特異度は血清検体では良好だが、髄液検体では前者は特異度に、後者は感度にやや問題がある

PA 法での抗体陽性・陰性の判定はほぼ 100%と考えるとよいので、これで判定された結果を真の陽性として CLIA 法、CLEIA 法について血清、髄液検体における感度、特異度を算出した(図 1(A)、(B))。血清検体については PA 法と同様、CLIA 法、CLEIA 法とも感度、特異度とも 100%と申し分ない結果だった。しかし髄液検体に対しては、感度、特異度は CLIA 法でそれぞれ 98.2%、25.0%、CLEIA 法ではそれぞれ 74.1%、100.0%となり、CLIA 法では感度に優れ特異度に問題が、CLEIA 法では特異度に優れ感度に問題があるという特徴を持つと考えられた。これは髄液が血清検体に比べ抗体濃度が薄いことと関連していると推測される。髄液検体の判定にはこの特徴を考慮に入れて使用すべきである。CLEIA 法は髄液検体の判定で特異度が高いことを考慮すると HAM の診断基準には CLEIA 法の方が良いのかもしれない。

(2) HAM 血清、髄液において PA 法抗体価(対数化)と CLIA 法、CLEIA 法抗体価(対数化)は良好な回帰を示し換算可能である

HAM 患者血清、髄液を PA 法、CLIA 法、CLEIA 法で抗体価を測定し、PA 法での抗 HTLV-1 抗体価を 2 を底に対数化し、CLIA 法、CLEIA 法での抗体価を 10 を底に対数化して、単回帰解析すると、HAM 血清での CLEIA 法抗体価は PA 法抗体価により決定係数(寄与率、 R^2) 0.50373132、CLIA 法抗体価は同 0.248956104(図 2(A)、(B))、HAM 髄液では CLEIA 法では決定係数 0.645639944、CLIA 法では 0.56575059(図 3(A)、(B))と良好あるいは比較的良好的な相関を PA と示すことがわかった。PA 法に代わって CLIA 法、CLEIA 法を標準的方法として血清、髄液中抗 HTLV-1 抗体価を測定しても、以前の PA 法による抗体価データを望みの方法によるデータへ変換するためにこれらの回帰式を使用することができる。

(3) HC 髄液においては PA 法抗体価(対数化)と CLIA 法、CLEIA 法抗体価(対数化)は良好な回帰を示し換算可能であるが、HC 血清においては回帰不能である

HC については、HC 血清での CLIA 法抗体

価は有意な回帰は得られず、CLEIA 法抗体価は正規分布に従わず単回帰分析不能だった(データは示さない)。しかし HC 髄液での CLIA 法抗体価は決定係数 0.61667501、CLEIA 法抗体価は同 0.69534344 と PA 法抗体価と良好な回帰を得た(図 4(A)、(B))。

(4) HAM と HC の比較では、血清中および髄液中抗 HTLV-1 抗体価(対数化)ともに PA 法、CLIA 法、CLEIA 法すべてで有意差が認められる

この比較は昨年報告では検討が終了していなかったもので一部のみを示していた。

HAM、HC 間で血清中、髄液中抗体価(実測値)を比べても差はないというのが HAM の診療に従事している者の通念であるが、抗体価を対数化するとこの通念とは異なり群間では明らかな有意差が認められる(図 5(A)、(B))。血清、髄液中とも HAM において HC よりも有意に抗体価が高い。

また PA 法抗体価(対数化)、CLEIA 法抗体価(対数化)では HAM 群最小値、HC 群最大値間で差があるので Cut-off value を設定して分離可能なのではないかと推測が成り立つ。

D. 考察

(1) HAM の診断基準に用いる血清・髄液の抗 HTLV-1 抗体価測定法には、診断基準作成時の標準的方法であった PA 法に代わり、現在標的となっている CLEIA 法、CLIA 法を用いてもよいが髄液抗体価の判定には特異度の高い CLEIA 法、感度の高い CLIA 法という特徴を考慮に入れておく必要がある

結果で示したように、HAM の血清・髄液は PA 法と CLIA、CLEIA 法と、HC の髄液は同様に PA 法と CLIA、CLEIA 法と良好な回帰を示し、換算可能である。HAM の診断基準に用いる抗体価測定法として血清検体については PA 法でなく CLIA、CLEIA 法を用いても何ら問題はないと考えられる。しかしながら髄液検体の抗体価測定法としては結果(1)で示したように CLIA 法は特異度に、CLEIA 法は感度に問題があるので、これを考慮に入れておく必要があると考えられる。PA 法の場合には血清検体でも髄液検体でも何ら問題はない。

(2) HAM と HC を鑑別するカットオフ値は設定しない方がよい

HAM、HC を血清・髄液中抗 HTLV-1 抗体価 (対数化) で比較した結果 (図 5(A)、(B)) から、75 パーセントイル、25 パーセントイル値が HAM、HC の血清で重なっている CLIA 法を除外して、PA 法、CLEIA 法による HAM、HC の鑑別における血清・髄液中抗 HTLV-1 抗体価の ROC 分析を試みた (図 6(A)、(B))。

血清中抗 HTLV-1 抗体価の ROC 分析では、血清中抗 HTLV-1 抗体価 (PA 法対数化) の ROC 曲線下面積 (AUC) は 0.8837 と血清中抗 HTLV-1 抗体価 (CLEIA 法対数化) の AUC 0.8809 よりも良好で、印は PA 法対数化 ROC 曲線でのカットオフ値 12.5 で最大感度 86.7% および特異度 78.7% だった。

髄液中抗 HTLV-1 抗体価の ROC 分析では、PA 法対数化による抗体価の ROC 曲線下面積 (AUC) は 0.8369 と CLEIA 法対数化による抗体価の AUC 0.5326 よりも著明に良好ではあるが、印は PA 法対数化 ROC 曲線でのカットオフ値 7.5 で最大感度 86.7% および特異度 66.0% だった。

血清、髄液中抗 HTLV-1 抗体価ともカットオフ値は PA 法 (対数化) で設定可能ではあるが髄液検体では特異度が非常に低く、血清検体でも特異度は 80% 弱と満足すべきものではないと考えられた。以上から HAM と HC を鑑別する抗 HTLV-1 抗体価のカットオフ値は設定しない方がよいと結論できる。

E. 結論

1) 抗 HTLV-1 抗体価は PA 法と新世代の診断法、CLIA 法、CLEIA 法共に相関は高く、換算 (読み替え) が可能である。よって HAM の診断基準に用いる抗体価測定法として PA 法から CLIA 法、CLEIA 法へと変更可能である。

2) HAM と HC の血清・髄液中抗体価のみによる血清学的鑑別診断は PA 法でも新世代の抗体検査法を用いても満足すべきカットオフ値を設定することは困難である。やはり臨床的診断基準を用いて HAM と HC の鑑別を行うべきであり、診断基準の重要性は変わらないことを認識すべきである。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定含)

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

参考文献

Nagai M et al, J NeuroVirol 1998. 4: 586-593. Analysis of HTLV-I proviral load in 202 HAM/TSP patients and 243 asymptomatic HTLV-I carriers: high proviral load strongly predisposes to HAM/TSP.

Matsumoto C et al. J Virol. 1990 64(11):5290-4. Detection of human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) provirus in an infected cell line and in peripheral mononuclear cells of blood donors by the nested double polymerase chain reaction method: comparison with HTLV-I antibody tests.

化学発光免疫測定法 (CLIA 法) による新しいヒト T 細胞白血病ウイルス (HTLV) 抗体全自動検出試薬の評価
有馬直道ら. 医学と薬学 65(5): 651-655. 2011

6 種 HTLV 抗体測定試薬の基本性能について
出口松夫ら. 医学と薬学 66(6): 1053-1059. 2011

HAM 患者髄液における抗 HTLV-1 抗体の意義. Recombinant Gag-Env hybrid protein を用いた ELISA 法と particle agglutination 法の比較検討.
末原雅人ら. 臨床病理 40(3): 311-316. 1992

Active production of anti-human
T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) IgM
antibody in HTLV-I-associated myelopathy.
Nagasato K. et al. J Neuroimmunol. 1991
May;32(2):105-9.

Presence of serum anti-human
T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) IgM
antibodies means persistent active
replication of HTLV-I in HTLV-I-associated
myelopathy.
Nagasato K. et al. J Neurosci. 1991
Jun;103(2):203-8.

(A) 血清検体におけるCLIA法、CLEIA法の感度、特異度

		PA法(真の陽性)		計
		陽性	陰性	
CLIA法	陽性	62	0	62
	陰性	0	18	18
計		62	18	80

感度62/62=100.0%、特異度18/18=100.0%

		PA法(真の陽性)		計
		陽性	陰性	
CLEIA法	陽性	62	0	62
	陰性	0	18	18
計		62	18	80

感度62/62=100.0%、特異度18/18=100.0%
(N=80(HAM47、HC15、NC18検体))

(B) 髄液検体におけるCLIA法、CLEIA法の感度、特異度

		PA法(真の陽性)		計
		陽性	陰性	
CLIA法	陽性	53	6	62
	陰性	1	2	3
計		54	8	62

感度53/54=98.2%、特異度2/8=25.0%

		PA法(真の陽性)		計
		陽性	陰性	
CLEIA法	陽性	40	0	40
	陰性	14	8	22
計		54	8	62

感度40/54=74.1%、特異度8/8=100.0%
(N=62(HAM47、HC15検体))

図1. 血清・髄液検体におけるCLIA法、CLEIA法の感度、特異度

- (A) 血清検体におけるCLIA法、CLEIA法の感度、特異度
- (B) 髄液検体におけるCLIA法、CLEIA法の感度、特異度

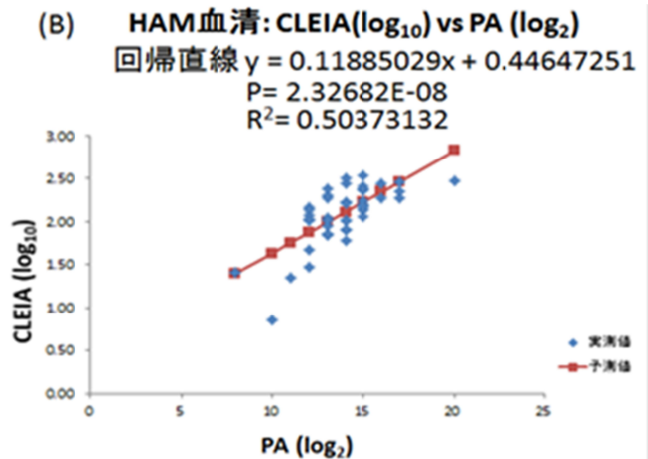
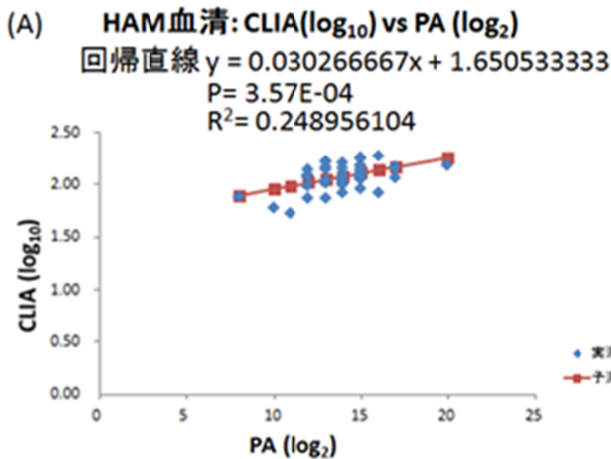


図2. HAM患者血清中抗HTLV-1抗体価のPA法、CLIA法、CLEIA法の比較

- (A) HAM患者血清中抗HTLV-1抗体価のPA法(2を底として対数化)、CLIA法(10を底として対数化)の単回帰解析。
- (B) HAM患者血清中抗HTLV-1抗体価のPA法(2を底として対数化)、CLEIA法(10を底として対数化)の単回帰解析。

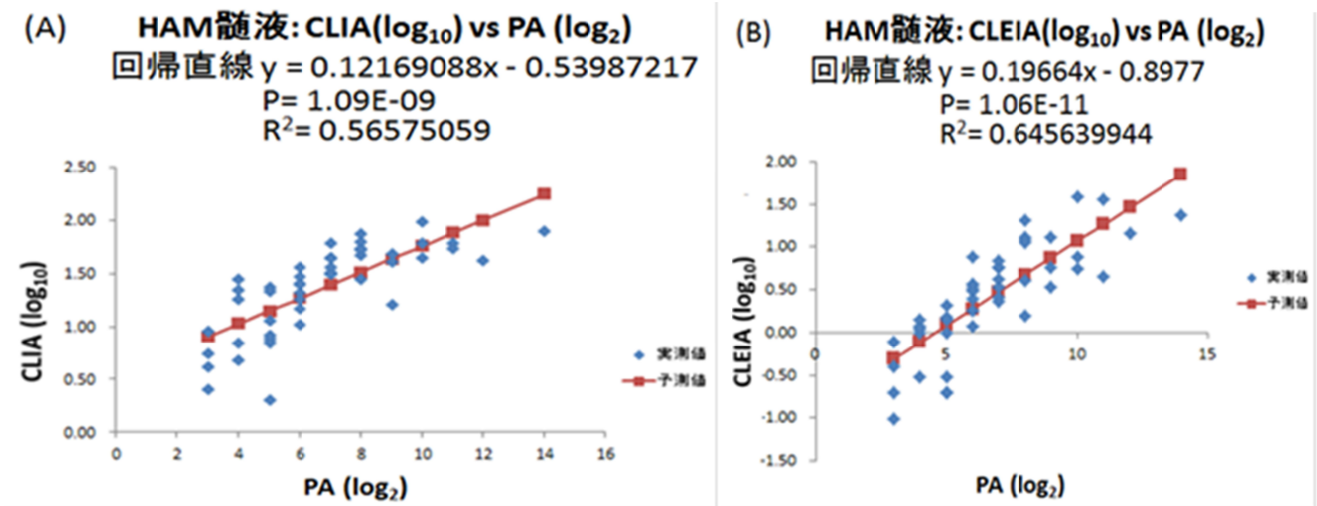


図3. HAM患者髄液中抗HTLV-1抗体価のPA法、CLIA法、CLEIA法の比較

(A) HAM患者髄液中抗HTLV-1抗体価のPA法(2を底として対数化)、CLIA法(10を底として対数化)の単回帰解析。
 (B) HAM患者髄液中抗HTLV-1抗体価のPA法(2を底として対数化)、CLEIA法(10を底として対数化)の単回帰解析。

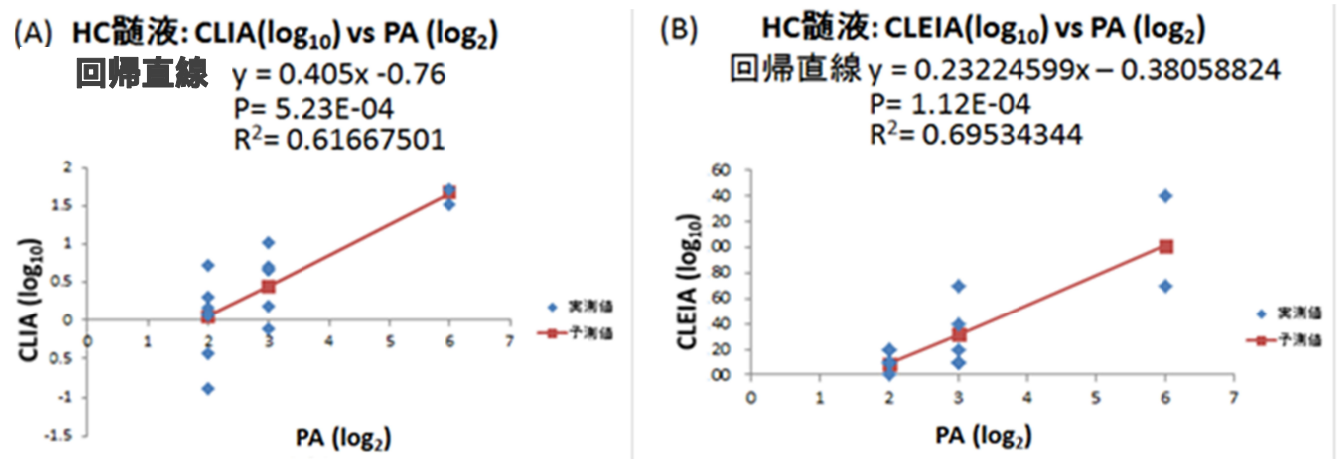
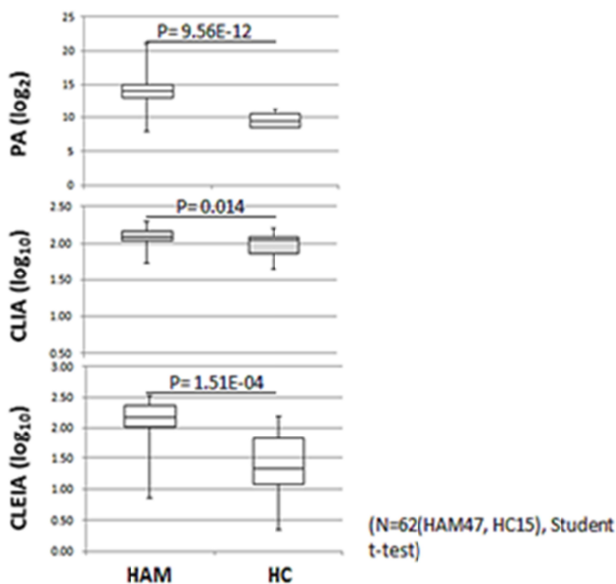


図4. HCの髄液中抗HTLV-1抗体価のPA法、CLIA法、CLEIA法の比較

(A) HCの髄液中抗HTLV-1抗体価のPA法(2を底として対数化)、CLIA法(10を底として対数化)の単回帰解析。
 (B) HCの髄液中抗HTLV-1抗体価のPA法(2を底として対数化)、CLEIA法(10を底として対数化)の単回帰解析。

(A) 血清中抗HTLV-1抗体価の比較



(B) 髄液中抗HTLV-1抗体価の比較

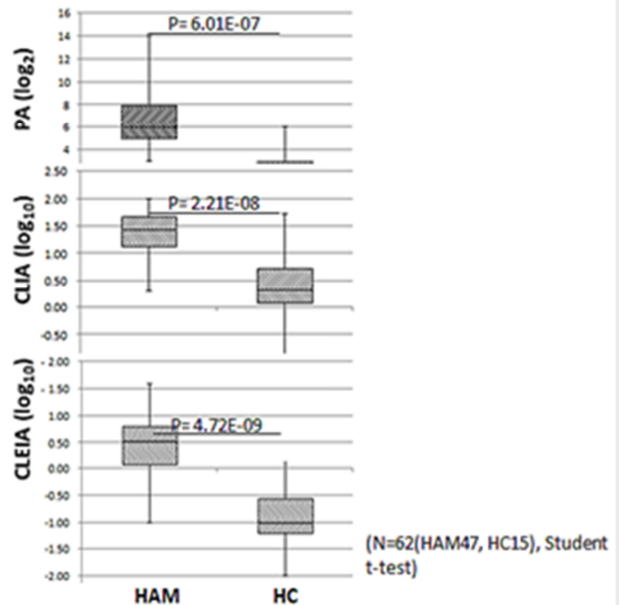
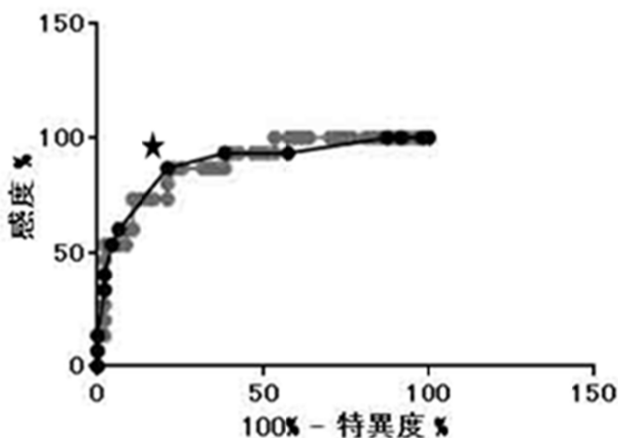


図5. HAM、HCでの血清・髄液中抗HTLV-1抗体価 (PA法、CLIA法、CLEIA法) の比較

(A) HAM、HCでの血清中抗HTLV-1抗体価 (PA法、CLIA法、CLEIA法) の比較

(B) HAM、HCでの髄液中抗HTLV-1抗体価 (PA法、CLIA法、CLEIA法) の比較

(A)



(B)

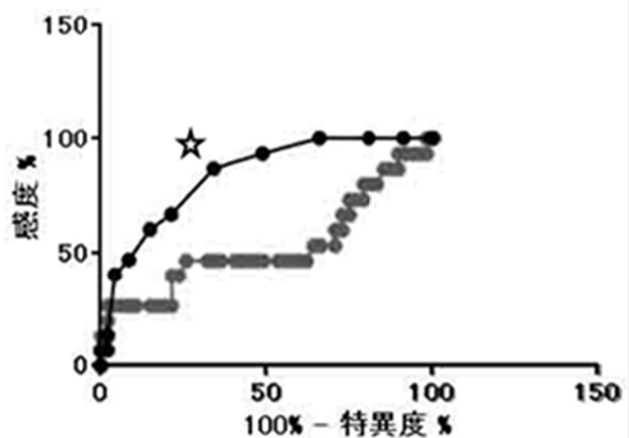


図6. HAM、HCの鑑別における血清・髄液中抗HTLV-1抗体価 (PA法、CLEIA法) のROC分析

(A) HAM、HCの鑑別における血清中抗HTLV-1抗体価 (PA法、CLEIA法) のROC分析

血清中抗HTLV-1抗体価 (PA法対数化) のROC曲線下面積 (AUC) 0.8837と血清中抗HTLV-1抗体価 (CLEIA法対数化) のAUC0.8809よりも良好で、印はPA法対数化ROC曲線でのカットオフ値12.5で最大感度86.7%および特異度78.7%だった。

(B) HAM、HCの鑑別における髄液中抗HTLV-1抗体価 (PA法、CLEIA法) のROC分析

PA法対数化による抗体価のROC曲線下面積 (AUC) は0.8369とCLEIA法対数化による抗体価のAUC0.5326よりも著明に良好ではあるが、印はPA法対数化ROC曲線でのカットオフ値7.5で最大感度86.7%および特異度66.0%だった。

黒い丸印、黒い実線はPA法 (log₂) による抗体価、灰色の丸印、灰色の実線はCLEIA法 (log₁₀) による抗体価。