

イムノクロマトグラフ法による HIV-1/2抗体迅速検出キットの評価

小澤 茂 浅川洋美 町田篤彦

Evaluation of Rapid Detection Kit for Anti-HIV-1/2 Antibodies
Based on the Immunochromatographic Assay

Shigeru OZAWA, Hiroyoshi ASAKAWA and Atsuhiko MACHIDA

後天性免疫不全ウイルス(HIV)の感染の診断は、通常、抗体検査により行われている。この検査にはスクリーニング検査と確認検査があり、前者には粒子凝集(PA)法、酵素抗体法(EIA)などが、後者にはウェスタンブロット(WB)法、間接蛍光抗体(IF)法などが広く用いられている。

後天性免疫不全症候群(AIDS)の蔓延を防止するため、1987年から保健所の窓口でAIDSに関する相談とHIV抗体検査が受けられるようになった。山梨県では1つの保健所を除いて、保健所で採血された検体は衛生公害研究所(以下、「当所」)に送付され、スクリーニング検査にはPA法、確認検査にはWB法を用いて抗体検査が実施されている。

最近、イムノクロマトグラフ法によってHIV抗体を検出するキット「ダイナスクリーン・HIV-1/2」が市販された。この検査法は血清ばかりでなく採血したての血液(全血)でも検査ができ、試薬の調整や機器なども特に必要なく、15分で検査結果が判定できる。この方法が現行のPA法に替わってスクリーニング検査法として使用できるなら、各保健所で検査が可能になり、HIV抗体検査希望者に即日に検査結果を渡すことができる。このことにより、検査結果告知のために再度、保健所を訪れなくてはならない現行の検査体制に比べ、検査希望者の精神的な負担を軽減することができ、ひいてはHIV抗体検査をより受けやすい体制にすることができる。そこで、この迅速検査法がPA法に替わってスクリーニング検査法として使用できるかどうかを調べるため、「ダイナスクリーン・HIV-1/2」とPA法とを比較検討したので報告する。

材料および方法

1. 血 清

HIV抗体検査希望者から保健所で採血され、当所でスクリーニング検査を実施した血清と保健所、医療機関

等から当所に確認検査を依頼された血清、計160件を用いた。また、陽性対照血清として、確認検査キットに添付されていたHIV-1およびHIV-2感染ヒト血清3件も使用した。HIVの感染初期の経時的血清として、BBI社(米国)製のHIV-1セロコンバージョンパネル血清のPRB904, PRB928, PRB931, PRB952を使用した。

2. 抗体測定試薬と測定法

(1) イムノクロマトグラフ法

イムノクロマトグラフ法のキットはダイナボット社製「ダイナスクリーン・HIV-1/2」(以下ICA法と略)を用いた。この製品は、検体中のHIV-1抗体(gp41またはgp120領域の合成ペプチドおよびリコンビナント抗原に対する抗体)およびHIV-2抗体(gp36領域の合成ペプチドおよびリコンビナント抗原に対する抗体)を検出するものである。本製品は18×100mmのシート状になっており、その中央に4×58mmのストリップが貼り付けてある。そのストリップの下部の検体滴下部に被検血清50 μ lを滴下した。血清中にHIV抗体があれば、ストリップ下部に塗布されていたセレンウムコロイド標識HIV抗原と結合物を作り、これがストリップ上を移動して、上部に固相化されたHIV抗原と結合し、セレンウムコロイド由来の赤色のラインがストリップの中央部にある判定窓に出現する。

結果は、検体滴下15分後、ストリップの最も上部のコントロール窓に赤色のラインが見られることを確認した。判定窓に赤色のラインが認められたものをHIV抗体陽性、赤色のラインが見られなかったものを陰性と判定した。定量試験は被検血清をHIV抗体陰性の健常人プール血清で2倍段階希釈し、各希釈列についてICA法を実施した。

(2) P A 法

富士レビオ社製の「ジェネディアHIV-1/2ミックスPA」を使用した。本製品はゼラチン粒子にリコンビナ

ント HIV 抗原 (HIV-1/gp41, HIV-1/p24, HIV-2/gp36) を吸着させて作った感作粒子が血中の HIV 抗体と反応して凝集することを応用した試薬である。測定法はキットに添付された説明書に従った。すなわち被検血清 25 μ l を希釈し, 1:8 希釈血清 25 μ l に対照粒子を, 1:16 希釈血清 25 μ l に感作粒子をそれぞれ 25 μ l 加え, 混和後静置し, 2 時間後, 凝集の有無を判定した。

(3) 蛍光酵素免疫測定(ELFA)法

ELFA 法のキットは bioMérieux 製の「VIDAS HIV DUO」(以下 HIV-DUO と略) を用いた。本製品は HIV-1 抗体, HIV-2 抗体, HIVp24 抗原を同時に検出できる HIV スクリーニング試薬である。反応に必要な試薬が封入されている試薬ストリップの検体用ウェルに被検血清 200 μ l を入れた。それとスパー (ピペットチップの内壁に HIV-1 gp41, HIV-1 サブタイプ O の gp41, HIV-2 gp36 のそれぞれの合成ペプチドと抗 p24 モノクロナール抗体を固相化したもの) を自動免疫蛍光測定装置ミニバイダスにセットし, 操作マニュアルに従って測定した。

(4) ウェスタンブロット(WB)法

確認試験として WB 法のラブブロット 1, ラブブロット 2 (富士レビオ) を使用した。測定は試薬添付書類に従って行った。

結 果

1. ICA 法と PA 法との一致率

PA 法で陽性の血清 46 件, 陰性の血清 117 件, 計 163 件について ICA 法を実施し, その結果を表 1 に示した。PA 法で陽性を示す検体の 46 例中 40 例が ICA 法で陽性を示し, また, PA 法で陰性を示した検体 117 例は全て ICA 法でも陰性を示した。従って全体では 163 例中 157 例が一致し, ICA 法と PA 法の一致率は 96.3% であった。

PA 法と ICA 法とが共に陽性であった 40 例は, WB 法の確認検査ではすべて陽性で, HIV 感染者であった。なお, HIV-2 の陽性対照血清として加えた 2 例を除いて, 残りの 38 例は HIV-1 の感染者であった。

表 1 「Dainascreen HIV-1/2」(ICA 法)と「Genedia HIV-1/2 Mix PA」(PA 法)の検出比較

	P A 法		計
	陽性数	陰性数	
ICA 法	陽性数	40	40
	陰性数	6	117
計	46	117	163

表 2 ICA 法と PA 法による HIV 陽性検体の抗体価の比較

検体No.	血清抗体価(2 ⁿ)				HIV-DUO
	ICA法		PA法		
	Lot.1	Lot.2	Lot.1	Lot.2	
1	n=13	n=12	n =16	n=15	n=15
2	12	12	14	14	14
3	13	14	16	16	17
4	12	12	14	14	14
5	13	-	15	-	-
6	14	-	16	-	-
7	10	-	12	-	-
8	13	-	16	-	-
9	13	-	15	-	-
10	13	-	16	-	-

--not tested

一方, PA 法で陽性, ICA 法で陰性の不一致例 6 例については, 全例とも PA 抗体価が 1:32~1:128 と低く, WB 法で陰性, HIV-DUO でも陰性であった。

2. 陽性血清の希釈系列による ICA 法と PA 法との比較

陽性血清 10 例について, 2 倍段階希釈系列を作り, それぞれの希釈系列を ICA 法と PA 法で測定した。陽性を示す最高の血清希釈倍数を抗体価とし, 両法での抗体価を比較した。なお, 10 例の陽性血清中 4 例については PA 法, ICA 法とも製造ロットの異なる 2 種類の製品を用い, HIV-DUO でも測定した。その結果は表 2 に示すように, ICA 法で測定した抗体価の方が PA 法および HIV-DUO で測定したものに比べ, 4~8 倍低かった。

3. HIV 感染初期のパネル血清を用いた ICA 法と PA 法との比較

HIV-1 感染初期に経時的に採血されたセロコンバージョンパネル血清 4 種類を ICA 法と PA 法で測定し, 比較検討し, 結果を表 3 に示した。今回検討した 4 パネル血清中 3 パネル (PRB904, 928, 931) では, HIV 抗体が検出される時期は PA 法でも ICA 法でも同時期で差異がみられなかった。ただ, バンドや凝集像の強さで見ると, PRB928 の No.2 と PRB931 の No.6 の血清では PA 法で共に強い凝集像 (強陽性) を示しているのに対し, ICA 法では薄く弱いバンド (弱陽性) であった。

一方, パネル PRB952 の No.4 の血清は, PA 法では沈降した粒子の外周縁にわずかに凝集がみられ, 判定保留ないしは微陽性と判定されたが, ICA 法では陰性であった。それから 3 日後の No.5 の血清は, PA 法では強陽性になり, ICA 法では弱陽性で初めて抗体陽転化が認め

表3 セロコンバージョンパネル血清を用いたICA法とPA法の感度比較

パネル No.	血清 No.	日数**	測定法				p24HIV抗原* (Abott)	HIV-RNA* (Roche, RT-PCR)
			H I V 抗体		EIA 法* (Abott)	WB 法* (Bio-Rad)		
			ICA法	PA法				
PRB904	1	0	nt	nt	-	-	-	BLD
	2	21	-	-	-	-	-	BLD
	3	49	-	-	-	-	-	+
	4	92	++	++	+	+	-	+
	5	99	++	++	+	+	-	+
PRB928	1	0	-	-	-	-	-	BLD
	2	111	+	++	+	-	+	+
	3	120	++	++	+	-	+	+
	4	125	++	++	+	+	+	+
	5	130	++	++	+	+	+	+
PRB931	1	0	nt	nt	-	-	-	BLD
	2	2	nt	nt	-	-	-	BLD
	3	7	-	-	-	-	-	BLD
	4	9	-	-	-	-	-	BLD
	5	15	-	-	-	-	-	+
	6	28	+	++	+	IND	+	+
	7	33	++	++	+	+	+	+
	8	35	++	++	+	+	+	+
	9	42	nt	nt	+	+	+	+
PRB952	1	0	nt	nt	-	-	-	BLD
	2	7	-	-	-	-	-	+
	3	10	-	-	-	-	+	+
	4	14	-	±~+	+	IND	+	+
	5	17	+	++	+	+	-	+
	6	21	++	++	+	+	-	+

*: パネル血清添付のBBIの検査データ, **: 採血初日からの日数
 -: 陰性, +, ++: 陽性 (ICAとPA法のみ2段階評価, +: 弱陽性), IND: 判定保留,
 BLD: 検出限界以下, nt: not tested

表4 ICA法の同時再現性と日差再現性

検体 No. (希釈倍数)	回数									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
No.8 (1:2 ¹³)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.8 (1:2 ¹⁴)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

検体 No. (希釈倍数)	日数						
	1	2	3	4	5	6	7
No.8 (1:2 ¹³)	+	+	+	+	+	+	+
No.8 (1:2 ¹⁴)	-	-	-	-	-	-	-

られた。以上の結果をパネル血清に添付されていたBBIのHIV抗体検出データと比較してみると、PA法はEIA法 (Abott社 HIV-1/2) とほぼ同時期にHIV抗体が検出でき、それより少し遅れてICA法でも検出可能となり、WB法ではさらに遅い時期に抗体が検出できるようになることが示唆された。

4. ICA法の同時再現性と日差再現性の検討

ICA法でHIV抗体陽性を示す限界まで希釈した陽性血清 (表2のNo.8) とそれをさらに2倍希釈した血清を用いて、10回、ICA法で測定し、同時再現性を検討した。また、同じ2種類の希釈血清を毎日1回、7日間にわたりICA法で測定し、日差再現性の検討した。その結果は表4に示すように、ICA法は同時および日差とも良好な再現性が認められた。

考 察

本稿では、イムノクロマトグラフ法を利用した HIV 抗体の迅速検査キット「ダイナスクリン・HIV-1/2」(ICA 法)について、現在、実施されているゼラチン粒子凝集法(PA 法)と比較し、HIV 抗体スクリーニング検査法としての有用性を検討した。

HIV 感染診断の目的で採血された血清では、ICA 法と PA 法の一致率は 96.3% であった。一致しなかった 6 例は PA 法で陽性で、ICA 法では陰性であった。これらの血清は PA 法で低い抗体価を示したので、感染初期の血清の可能性が考えられた。しかし、感染初期の抗体を PA 法より早く検出できる VIDAS HIV DUO¹⁾ で陰性であることから、これらは PA 法での非特異反応による偽陽性であり、HIV 感染者ではないと考えられた。今回検討した中では、PA 法と WB 法が共に陽性の HIV 感染者の全員が ICA 法で陽性であり、ICA 法の感度は良好であった。

一方、PA 法での陰性例は、全例 ICA 法でも陰性であった。PA 法や EIA 法などの抗体スクリーニング検査では高感度が要求されるので、特異性はやや犠牲にされてきた。そのため、従来の検査法では一般的に 0.2~0.3% の疑陽性がみられている²⁾。ICA 法の本キットの疑陽性率は 0.1% であるという報告³⁾もあるが、1.5% という報告⁴⁾もある。検査キットに対し厳しい認可審査のあるフランスでは疑陽性率 0.5% 以下でないと HIV 検査キットとして認可されない⁵⁾。日本には明確な認可基準がないものの、1% 近く、あるいはそれを越える疑陽性があるのなら、本キットの特異性ははなはだ問題であると考えられる。今回、我々が検討した中では ICA 法には偽陽性がみられなかったが、検査例数を増やし、本キットの特異性についてさらに検討しなくてはならないと考えている。

HIV 抗体スクリーニング法は、確実に感染者を捕捉できる方法でなくてはならない。特に、感染初期における産生され初めの少量の抗体をより早期に、確実に捕らえられるようなキットがスクリーニング法として有用性が高いと言われている⁵⁾。そこで、4 種類の HIV-1 セロコンバージョンパネル血清を用いて、感染初期の抗体をどちらの製品がより早期に捕らえることができるかを検討したところ、比較的採血間隔の長い 3 種類のパネル血清では、ICA 法と PA 法の抗体検出は同時期であった。

しかし、採血間隔が 3~4 日のパネル血清では、ICA 法の方が PA 法より少し遅れて抗体が検出される傾向が認められた。この傾向は、我々とは別の HIV-1 セロコンバージョンパネル血清 (PRB932, PRB937) を使用した吉原⁶⁾ や篠原⁷⁾ らの成績にもみられている。次に HIV 抗体陽性血清を希釈して、検出可能な抗体価を比較すると、PA 法で測定した方が ICA 法で測定したものより少し抗体価が高かった。これは抗原抗体結合物の検出方法の違いによるものとも思われるが、PA 法の方が HIV-1/gp41 に対する抗体ばかりか HIV-1/p24 に対する抗体も捕捉できるように作られていることにも一因があるのではないかと考えられる。

ICA 法の簡便性や迅速性についてみてみると、ICA 法は PA 法に比べ試薬の調整・分注や特別の機器もいらず、操作も簡単であった。また、ICA 法は PA 法で 2 時間かかるところを 15 分間で結果が判定でき、迅速性にも優れ、再現性も良好であった。

以上のように、今回検討した範囲では、ICA 法は、PA 法より若干感度が低いがほぼ良好な感度を有し、特異性、再現性にも問題なく、簡便で、迅速性にも優れているので、保健所での HIV 抗体スクリーニング検査に使用可能であると考えられる。ただし、ICA 法の方が PA 法より感染初期に少し遅れて抗体が検出されるので、ICA 法を使用する場合は、HIV 感染の機会があってから抗体が十分に上昇するまでの期間をおいて検査するなど、検体の採血時期を今以上に厳守する必要であると思われる。

今後はさらに被検血清を増やして感度や特異性について検討を続けるとともに、全血での検討、偽陽性がみられ易い各種の疾病患者や妊婦の検体での検討などを実施する必要があると考えている。

文 献

- 1) 林 孝子ら：感染症誌，73，681~688 (1999)
- 2) 今井光信ら：感染症誌，73，1183~1186 (1999)
- 3) 平成 12 年度厚生労働省エイズ対策研究事業「HIV の検査法と検査体制を確立するための研究」報告書，1~45 (2001)
- 4) 三好正浩ら：道衛研所報，50，68~70 (2000)
- 5) 吉原なみ子：日本醫事新報，3892，1~8 (1998)
- 6) 吉原なみ子：臨床検査，43，843~850 (1999)
- 7) 篠原美千代ら：埼衛研所報，34，78~79 (2000)