

# HIV 抗原抗体同時測定（第四世代）試薬の 全自動免疫測定装置 HISCL-2000i による 基礎的検討

斧 研 洋 幸, 鈴 木 昌 行, 井 野 ち さ と, 佐 藤 恵 利 子,  
小 林 千 尋, 渡 会 義 弘, 山 崎 哲

聖マリアンナ医科大学病院 臨床検査部：神奈川県川崎市宮前区菅生 2-16-1（〒 216-8511）

## 要 旨

現在, 世界のヒト免疫不全ウイルス (Human Immunodeficiency Virus; HIV) 感染者数は約 3,400 万人と推定されている。原因ウイルスである HIV の検査法, 治療法は日々進歩を重ねてきた。HIV 感染の有無を早期に診断し治療することにより, 後天性免疫不全症候群 (Acquired Immunodeficiency Syndrome; AIDS) を発症せずに延命できる時代へと変化してきた。

今回, 新たに開発された化学発光酵素免疫測定法 (CLEIA 法) を原理とする抗 HIV-1/2 抗体と HIV-1p24 抗原の同時検出が可能な第四世代 HISCL<sup>®</sup> HIV Ag+Ab 試薬 (以下, 本試薬; シスメックス社) について, 全自動免疫測定装置 HISCL-2000i (シスメックス社) を用いて基礎的検討を行い, 従来の第二世代 HISCL<sup>®</sup> HIV Ab 試薬 (以下, 従来試薬; シスメックス社) と比較検討した。

両試薬の比較結果では, 従来試薬に比較して本試薬は非特異陽性例の減少を認めた (n=670)。両試薬の一致率は 96% であり, 陽性検体の一致率は 100% であった。また, 従来試薬もしくは本試薬で陰性であった検体の C.O.I. 値ヒストグラムでは, 従来試薬に比較して本試薬は有意に低値を示しクリアカットであった。以上の結果となった要因は, 本試薬のヒト化モノクローナル抗体が HAMA (Human Anti Mouse Antibody) 等による非特異的な反応を原的に起こりにくくしていることが考えられた。このことから, 本試薬は陰性例をより低値な C.O.I. 値として判別が可能で, C.O.I.1.0 における判別を向上させるものと考えられた。

今回の比較検討から, 本試薬は従来試薬に比較して特異性に優れ日常検査に有用であることが示された。

**キーワード** HIV- 抗原 / 抗体同時測定, AIDS, HIV-1p24 抗原

## はじめに

ヒト免疫不全ウイルス (Human Immunodeficiency Virus; HIV) が後天性免疫不全症候群 (Acquired Immunodeficiency Syndrome; AIDS) の原因ウイルスとして分離されてから 30 年を経過した。その間, HIV 治療法, 検査法は進歩を重ね, HIV 感染の有無を早期に診断し治療することにより AIDS を発症せずに延命できる時代へと変化してきた。検査法についても HIV-1 抗体のみを検出する測定系から, 早期診断のためのウィンドウ期の短縮を目的とした HIV-1/2 抗体と

HIV 抗原タンパクを同時検出する測定系へと発展してきた<sup>1)</sup>。今回, 新たに開発された化学発光酵素免疫測定法 (CLEIA 法) を原理とする抗 HIV-1/2 抗体と HIV-1p24 抗原の同時検出が可能な第四世代 HISCL<sup>®</sup> HIV Ag+Ab 試薬 (以下, 本試薬; シスメックス社) について, 全自動免疫測定装置 HISCL-2000i (以下, HISCL-2000i; シスメックス社) を用いて基礎的検討を行い, 従来の第二世代 HISCL<sup>®</sup> HIV Ab 試薬 (以下, 従来試薬; シスメックス社) と比較検討した (本検討は聖マリアンナ医科大学・生命倫理委員会の承認を得て実施した。承認番号 第 2273 号)。

## 対象および方法

### 1. 測定原理

本試薬は、HIV-1/2 抗体測定系と HIV-1p24 抗原の抗原／抗体測定系からなり、いずれも 2 ステップサンドイッチ法を原理としている。検出系には標識酵素のアルカリフォスファターゼによって分解される化学発光基質の CDP-star® を用いている (図 1)。

### 2. 測定機器

HISCL-2000i で測定した。本機は、全 27 項目の測定を 17 分間で終了できる迅速測定な機器であり、血清および血漿使用量 30 μL 程度であるため微量検体測定が可能である。

### 3. 対象

まず、本試薬について市販の専用精度管理用コントロールのヴィラトロールにて HIV1/2 抗体の同時および日差再現性の基礎的検討を行った。ヴィラトロールは、陽性ドナープール血清を原料とした異なる 2 つの濃度 (Level1 および Level2) からなるコントロールである。また、HIV-1p24 抗原については新たに開発された同様の専用試薬 HIV-1p24 抗原陽性コントロール血清 (以下、

p24 抗原コントロール; シスメックス社) を用いた。

次に、従来試薬で HIV 抗体のカットオフインデックス値 (以下、C.O.I. 値) が陽性域にあった 29 検体および非特異的陽性を示した 24 検体の凍結保存血清と、従来試薬と本試薬の同日測定が可能であった 617 検体の合計 670 検体を対象とし評価した。

## 結果

### 1. 同時再現性

精度管理用 HIV1/2 抗体コントロールのヴィラトロール Level1, Level2 を各 10 回および p24 抗原コントロールを 20 回測定した。Level1 の C.O.I. 値は、平均 20.28 で CV 値 1.66%, Level2 では平均 46.24 で CV 値 0.79%, また p24 抗原コントロールは平均 5.64, CV 値 1.06% と良好であった (表 1)。

### 2. 日差再現性

両精度管理用コントロール試薬を 22 日間連日測定した。Level1 の C.O.I. 値は、平均 19.6 で CV 値 3.14%, Level2 では平均 45.2 で CV 値 2.46%, また p24 抗原コントロールは平均 5.53, CV 値 2.18% と良好であった (表 2)。

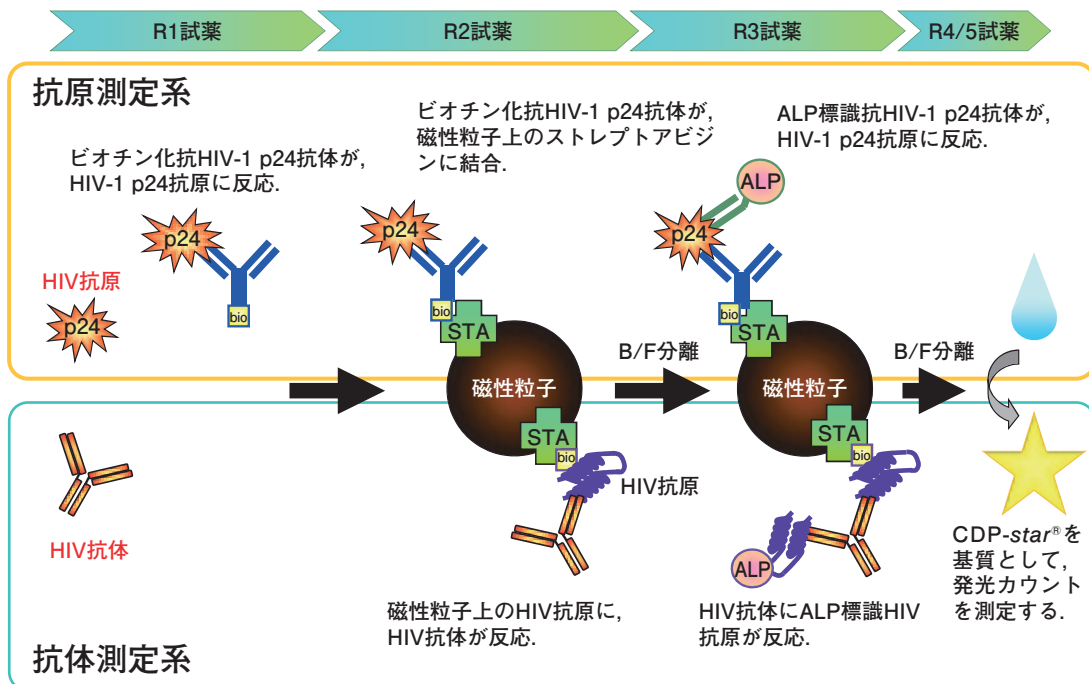


図 1. 本試薬の測定原理

表 1. 同時再現性

	ヴィラトロール Level 1	ヴィラトロール Level 2	p24コントロール
N	10	10	20
Max (C.O.I.)	20.9	46.8	5.8
Min (C.O.I.)	19.7	45.7	5.6
Mean (C.O.I.)	20.28	46.24	5.64
SD	0.335	0.365	0.059
CV (%)	1.66	0.79	1.06

表 2. 日差再現性

	ヴィラトロール Level 1	ヴィラトロール Level 2	p24コントロール
Day	22	22	22
Max (C.O.I.)	20.8	46.5	5.7
Min (C.O.I.)	18.3	42.6	5.3
Mean (C.O.I.)	19.6	45.2	5.53
SD	0.62	1.11	0.12
CV (%)	3.14	2.46	2.18

### 3. 従来試薬と本試薬の比較結果

従来試薬にて C.O.I. 値を超える値を示した凍結保存血清 (n = 53) での検討では、陽性と確認された 29 検体は本試薬でも全て陽性であった (陽性一致率 100%)。なお、確認法としては、ウエスタンブロット法 (以下、WB 法) または RT-PCR 法にて行った (表 3)。

また、従来試薬で陽性域の C.O.I. 値を示したものの、WB 法にて非特異陽性例と判定された 24 検体についての比較では、従来試薬での C.O.I. 値が平均 2.32 であったのに対し本試薬では全例が “0.0” と陰性を示し、非特異陽性例は、明らかに減少した (表 4)。

### 4. 従来試薬と本試薬の一致率

以上の 53 検体と同日測定検体を含めた全 670 検体での一致例は 645 例 (一致率 96%) であった。前

述した従来試薬陽性／本試薬陰性の凍結保存血清 24 検体に加えて同日測定にて認められた同様の 2 検体の計 26 検体は、全て WB 法にて陰性であり、また、従来試薬陰性／本試薬陽性の 1 検体は WB 法では陰性で、HIV-1p24 抗原または RT-PCR 法の確認は実施不能であった (表 5)。

### 5. 従来試薬もしくは本試薬で陰性であった検体の C.O.I. 値ヒストグラム比較

従来試薬での陰性例分布は C.O.I.0.05 ~ 0.85 (606/613 : 99%) であったのに対し、本試薬では 638 検体中 99% (631/638) が C.O.I.0.0 と有意に低値を示し (p < 0.0001 : Mann-Whitney U test), 従来試薬に比較して本試薬の C.O.I. 値は明らかにクリアカットであった (図 2)。

表3. 陽性検体における確認検査と従来試薬および本試薬の C.O.I. 値比較

Seq	従来試薬 (C.O.I.)	本試薬 (C.O.I.)	確認検査
1	>50.00	>100.0	WB法 (+)
2	>50.00	>100.0	WB法 (+)
3	>50.00	68.1	WB法 (+)
4	>50.00	>100.0	WB法 (+)
5	>50.00	>100.0	WB法 (+)
6	>50.00	>100.0	WB法 (+)
7	>50.00	>100.0	WB法 (+)
8	>50.00	>100.0	WB法 (+)
9	>50.00	>100.0	WB法 (+)
10	>50.00	>100.0	WB法 (+)
11	>50.00	73.5	WB法 (+)
12	>50.00	99.7	WB法 (+)
13	>50.00	26.9	WB法 (+)
14	>50.00	>100.0	WB法 (+)
15	>50.00	31.7	WB法 (+)
16	>50.00	63.1	WB法 (+)
17	>50.00	45.2	WB法 (+)
18	>50.00	>100.0	WB法 (+)
19	>50.00	92.5	WB法 (+)
20	>50.00	>100.0	WB法 (+)
21	>50.00	23.5	WB法 (+)
22	>50.00	95.5	RT-PCR法 (+)
23	>50.00	>100.0	WB法 (+)
24	>50.00	>100.0	WB法 (+)
25	>50.00	>100.0	WB法 (+)
26	>50.00	>100.0	WB法 (+)
27	>50.00	86.7	WB法 (+)
28	>50.00	36.1	WB法 (+)
29	>50.00	>100.0	WB法 (+)

表4. 非特異陽性検体における確認検査と従来試薬および本試薬の C.O.I. 値比較

Seq	従来試薬 (C.O.I.)	本試薬 (C.O.I.)	確認検査
1	2.25	0.0	WB法 (-)
2	2.79	0.0	WB法 (-)
3	2.76	0.0	WB法 (-)
4	1.52	0.0	WB法 (-)
5	1.61	0.0	WB法 (-)
6	9.14	0.0	WB法 (-)
7	1.02	0.0	WB法 (-)
8	1.41	0.0	WB法 (-)
9	2.15	0.0	WB法 (-)
10	1.13	0.0	WB法 (-)
11	1.85	0.0	WB法 (-)
12	2.07	0.0	WB法 (-)
13	1.09	0.0	WB法 (-)
14	1.19	0.0	WB法 (-)
15	1.09	0.0	WB法 (-)
16	4.28	0.0	WB法 (-)
17	4.37	0.0	WB法 (-)
18	4.18	0.0	WB法 (-)
19	1.52	0.0	WB法 (-)
20	1.21	0.0	WB法 (-)
21	2.54	0.0	WB法 (-)
22	1.71	0.0	WB法 (-)
23	1.63	0.0	WB法 (-)
24	1.23	0.0	WB法 (-)

表5. 全検体における本試薬および従来試薬の結果比較と一致率

		本試薬	
		陽性	陰性
従来試薬	陽性	31	26
	陰性	1	612

一致率：96%

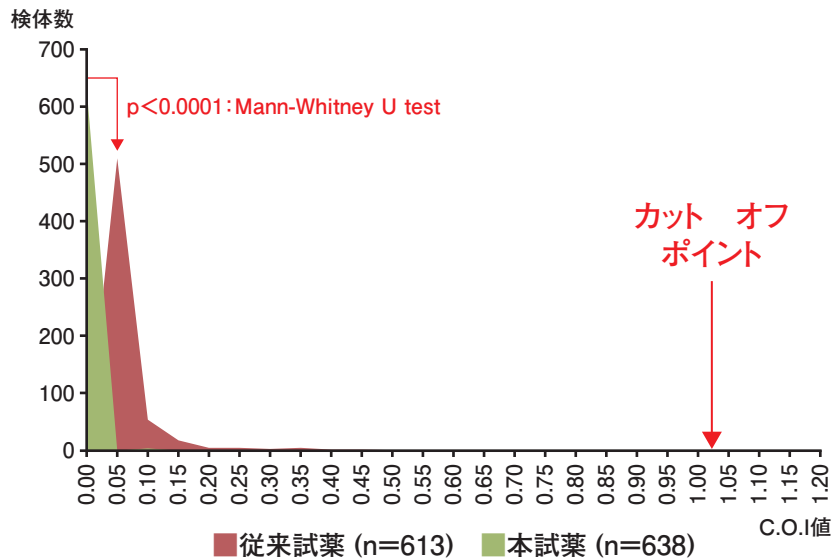


図2. 従来試薬もしくは本試薬で陰性であった検体の C.O.I. 値ヒストグラム比較

## 考 察

HIV 感染症のスクリーニング検査は、HIV-1 抗体のみを検出していた第一世代試薬から、HIV-1 および HIV-2 抗体を検出する第二世代試薬（ウインドウ期 40 ～ 50 日）、IgM 型 HIV-1/2 抗体検出を加えた第三世代試薬（ウインドウ期 20 ～ 30 日）、さらに第三世代試薬の抗体検出に HIV-1p24 抗原検出を追加した第四世代試薬へと進化し、ウインドウ期を最短で 20 日前後まで短縮化してきた。いずれも HIV 抗体陽性の確認には WB 法が、第四世代試薬の確認には WB 法と RT-PCR 法による確認試験が必要である。近年では HIV 感染のスクリーニング試薬には第四世代試薬が推奨されている<sup>2,3)</sup>。

今回、第四世代試薬である本試薬について検討を行った。従来の第二世代試薬との一致率は 96% (n = 670) で、従来試薬では、除外できなかった非特異例の 26 検体は全て本試薬で陰性を示した。この理由として、本試薬の HIV-1p24 抗原測定系は、ヒト化モノクローナル抗体を使用していることから HAMA (Human Anti Mouse Antibody) 等による非特異的な反応は原理的に起こりにくいことが考えられた。

また、この本試薬の特徴は、得られる C.O.I. 値に反映され、陰性例が示したより低値な C.O.I. 値は、C.O.I.1.0 における相対的な判別を向上させるものと考えられた。

現在、HIV-1 の遺伝子型については M, N, O の

グループに分類され、さらに M グループは 11 種類のサブタイプに分類されている<sup>4)</sup>。土屋らによる、HIV パフォーマンスパネルを用いた評価の検討で、本試薬が HIV-1 グループ M サブタイプや HIV-2 とも反応した成績を併せて考慮すると、本試薬はスクリーニング試薬として有用であると考えられる<sup>5)</sup>。

## 結 語

本試薬は、従来試薬と比較して特異性に優れ日常検査に有用である。

## 参考文献

- 1) 山下順香, 柴田弘俊, 出口松夫: HIV-1, 2 抗体測定法. 検査と技術. 1999; 27 (13): 1481-1487
- 2) 抗 HIV 治療ガイドライン 2012 年 3 月  
<http://api-net.jfap.or.jp/library/guideLine/images/guideline2012.pdf>
- 3) 日本エイズ学会: 診療における HIV-1/2 感染症の診断ガイドライン. 2008
- 4) 国立感染症研究所: 感染症情報センター  
<http://idsc.nih.go.jp/iasr/index-j.html>
- 5) 土屋亮人, 岡慎一: 全自動化学発光免疫測定装置 "HISCL-2000i" を用いた HIV 抗原抗体同時測定試薬の基礎性能評価. 医学と薬学. 2011; 66 (6): 1091-1098

# Fundamental Examination of 4<sup>th</sup> Generation Detection Kit for HIV Antigen and Antibody by Using Fully Automated Chemical-Luminescent Immunoassay System HISCL-2000*i*

Hiroyuki ONOTOGI, Masayuki SUZUKI, Chisato INO, Eriko SATO,  
Chihiro KOBAYASHI, Yoshihiro WATARAI and Satoshi YAMAZAKI

Clinical Laboratory, St. Marianna University School of Medicine Hospital2-16-1, Sugao, Miyamae-Ku, Kawasaki, Kanagawa 216-8511

## SUMMARY

---

At present, an estimated 34 million people worldwide are infected with human immunodeficiency virus (HIV) . Day-to-day advancements in methods of testing for and treating HIV, the virus that causes the condition, have compounded, ushering in an era where early diagnosis and treatment of HIV infection allows infected individuals to live longer without developing acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) .

In this study, an HISCL-2000*i* automated immunochemical analyzer (Sysmex) was used to conduct a fundamental study of HISCL-Ag/Ab (hereinafter, the studied kit), a newly-developed fourth-generation assay kit based on the principle of chemiluminescence enzyme immunoassay (CLEIA) that can simultaneously detect anti-HIV-1/2 antibodies and HIV-1p24 antigen, and this kit was compared with a conventional second-generation anti-HIV-1/2 antibody assay kit (hereinafter, the conventional kit) .

When the two kits were compared, the studied kit produced fewer nonspecific positive results than the conventional kit. The concordance rate of the two kits was 96% overall and 100% for positive specimens. Additionally, on the histogram of cut-off index (C. O. I. ) values of specimens determined to be negative by either kit, values for the studied kit were significantly lower than those of the conventional kit, thus making the result clear. The reason underlying these results is likely that the humanized monoclonal antibodies in the studied kit are in principle designed to make them less likely to have a nonspecific reaction such as the development of human anti-mouse antibodies (HAMA) . This indicates that the studied kit improves differentiation based on a C. O. I. of 1.0 because it can differentiate negative specimens at lower C. O. I. values.

The results of this comparative study indicate that the studied kit has excellent specificity compared to a conventional kit and is useful in routine testing.

**Key Words** Simultaneous detection of HIV antigen and antibodies, AIDS, HIV-1p24 antigen

---