

● AIA-CL 用 HIV 抗原／抗体同時検出試薬の開発

バイオサイエンス事業部 第一開発部 試薬グループ 大野 侑香
北岡 憲二

1. 序論

HIV (Human Immunodeficiency Virus: ヒト免疫不全ウイルス) はヒトの免疫細胞に感染して AIDS (Acquired Immunodeficiency syndrome: 後天性免疫不全症候群) を発症させるレトロウイルスである。HIV は血液暴露や性行為を介して感染することが知られており、検査による早期発見は治療効果を高めるとともに HIV の感染拡大防止の観点からも重要である [文献 1, 2]。

HIV 感染症のスクリーニング検査は感染の早期発見を目標として改良が重ねられてきた。HIV に感染するとウイルスはリンパ組織の中で急速に増殖し、血中にはまずウイルス抗原が現れる。その後、免疫反応が立ち上がってくると血中ウイルス抗原は減少に転じ、IgM 型の抗 HIV 抗体が増加し始め、さらに IgG 型抗 HIV 抗体が出現するという経過を辿る。第一、第二世代の検査試薬では検出対象は IgG 型抗体のみであったが、第三世代で IgM 型抗体、第四世代では抗原も同時に検出することが可能になりウィンドウピリオドが短縮されてきた。現在では感染の初期から慢性期までの幅広い段階において感染の有無を判定することができるスクリーニング検査として抗原と抗体を同時に検出する第四世代の試薬が市場の主流となっている。 [文献 3, 4, 5]。

また HIV はその遺伝子型によって複数のグループやサブタイプに分類される。これらは流行地域が異なっているものの、西アフリカで主流である HIV-2 の感染例が日本国内でも確認されるなど、同一地域内の全ての HIV が同じ遺伝子型であるとは限らない。また本試薬は世界中の多様な地域で使用されることを想定しており、幅広い遺伝子型の感染を検出可能であることが求められる [文献 4, 6]。

今回我々は全自動化学発光酵素免疫測定装置 (AIA®-CL2400 又はそれと同等の性能を有する専用機器) を用いて HIV-1 抗原および抗 HIV-1/2 抗体を同時に検出する試薬の開発を行ったので、その基本性能について報告する。なお、本技術は適切な診断及び治療を提

供する一助として医療に貢献することを目指したものである。

2. 測定原理と材料

今回の開発品では HIV-1 p24 抗原、抗 HIV-1 groupM、抗 HIV-1 groupO、抗 HIV-2 抗体を検出対象とした。測定原理としては HIV-1 p24 抗原は抗 HIV-1 p24 ヒトモノクローナル抗体と抗 HIV-1 p24 マウスモノクローナル抗体を用いて抗原を挟み込む抗体サンドイッチ法、それぞれの抗体については各種の HIV リコンビナント抗原を用いた抗原サンドイッチ法を採用し、これらの材料を全て同一試薬の中に封入することにより、幅広い段階と種類の HIV 感染を検出することが可能となった [図 1]。

反応試薬の試薬カップには 2 つのセル (セル (1)、セル (2)) がある。セル (1) には磁性微粒子に固定化された HIV-1 gp41 (groupM) リコンビナント抗原、HIV-2 gp36 リコンビナント抗原、HIV-1 (groupO) リコンビナント抗原及び抗 HIV-1 p24 ヒトモノクローナル抗体を含む凍結乾燥体が、セル (2) には HIV-1 gp41 (groupM) リコンビナント抗原-ビオチン-ストレプトアビジン-アルカリ性ホスファターゼ結合物、HIV-2 gp36 リコンビナント抗原-ビオチン-ストレプトアビジン-アルカリ性ホスファターゼ結合物、HIV-1 (groupO) リコンビナント抗原-ビオチン-ストレプトアビジン-アルカリ性ホスファターゼ結合物及び抗 HIV-1 p24 マウスモノクローナル抗体アルカリ性ホスファターゼ結合物の凍結乾燥体が封入されている。この試薬カップのセル (1) に分注水と検体を、セル (2) には分注水を加え、それぞれ凍結乾燥試薬を溶解する。検体が注入されたセル (1) においては凍結乾燥試薬が溶解すると同時に第一反応が開始する。一定時間、一定温度でインキュベートした後、洗浄水で洗浄することにより、未反応物を除去する (B/F 分離)。B/F 分離後、セル (2) の内容物を一定量、セル (1) に移すことにより第二反応が開始される。一定時間、一定温度でインキュベートした後、洗浄水

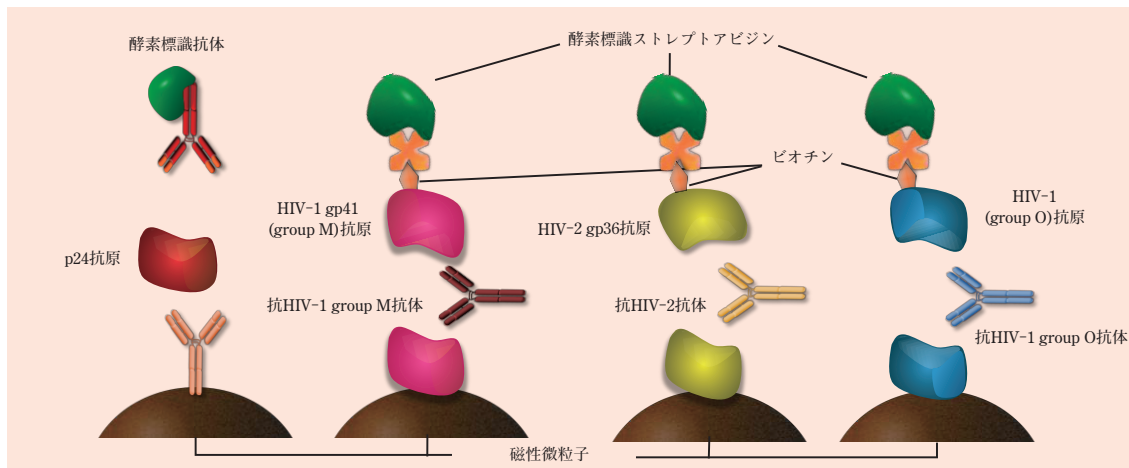


図1 抗原と抗体の検出原理

で洗浄することにより、未反応物を除去する。その後、磁性微粒子に結合した酵素活性を測定するために化学発光基質として3-（5-tert-ブチル-4,4-ジメチル-2,6,7-トリオキサビシクロ[3.2.0]ヘプト-1-イル）フェニルリン酸エステルジナトリウム塩（DIFURAT[®]）を添加し、酵素による分解で得られる発光強度を測定することにより、検体中の抗HIV-1抗体、抗HIV-2抗体及びHIV-1 p24抗原の陽性又は陰性を判定する。

測定の際、検体のカップへの分注、一定時間下での抗原抗体反応、B/F分離、基質分注、発光強度の測定は全自動化学発光酵素免疫測定装置により自動で行われ、測定開始から約25分後に結果が得られる。（試薬の主な仕様を表1に示す）

3. カットオフ値の設定

カットオフ値の設定には海外から購入したHIV非感染検体1,008例を用いた。これらの検体を開発品の試薬で測定し、平均値 $\pm 6 \times SD$ （標準偏差）に相当する発光強度を求め、これをカットオフ値として1.0 Indexに設定した〔図2〕。

次に設定したカットオフ値の妥当性を確認するため、海外および国内から入手したHIV非感染検体（80例）及びHIV感染検体（97例）を開発品の試薬で測定してIndex値を算出した。得られた結果を基にROC分析を行った結果、全ての検体において陰性と陽性を正確に識別し、感度と特異度はともに100%であった〔表2、図3〕。

表1 試薬仕様

試薬名称	AIA-パックCL [®] HIV Ag/Ab
測定原理	2ステップサンドイッチ化学発光酵素免疫測定法
反応関与成分	固相：
	抗HIV-1 p24ヒトモノクローナル抗体 HIV-1 gp41 (group M) リコンビナント抗原 HIV-2 gp36 リコンビナント抗原 HIV-1 (group O) リコンビナント抗原
標識：	標識：
	抗HIV-1 p24マウスモノクローナル抗体 HIV-1 gp41 (group M) リコンビナント抗原 HIV-2 gp36 リコンビナント抗原 HIV-1 (group O) リコンビナント抗原
測定装置	全自動化学発光酵素免疫測定装置
対象検体種	血清または血漿（ヘパリン、EDTA）
検体量	30 μ L
カットオフ値	1.0 Index
結果報告時間	25 min

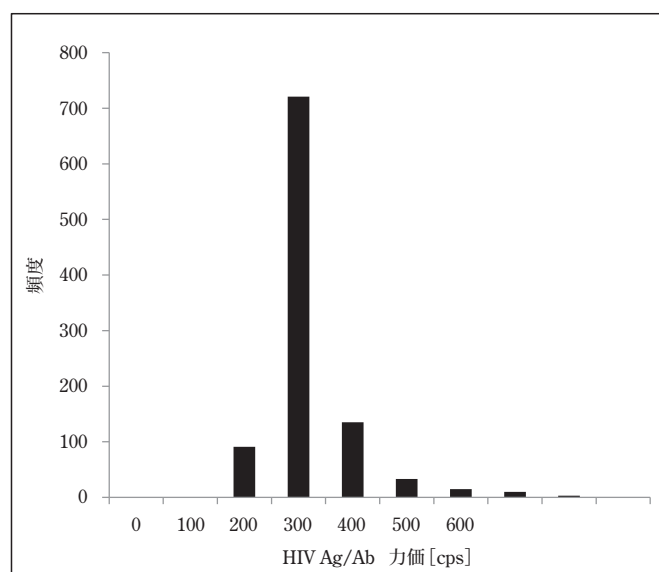


図2 カットオフ値の設定根拠

表2 感度と特異度

カットオフ値 (Index)	感度 (%)	特異度 (%)
0.2	100	85.0
0.4	100	96.3
0.6	100	97.5
0.8	100	97.5
1.0	100	100
1.2	100	100
1.4	100	100
1.6	100	100
1.8	100	100
2.0	100	100

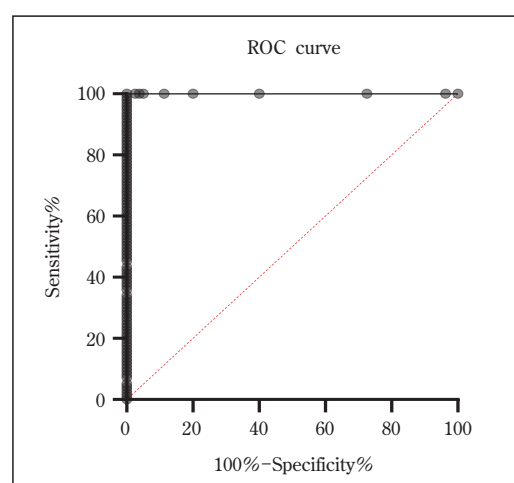


図3 感度と特異度

以上の結果より、設定したカットオフ値は妥当であることを確認した。

4. 基本性能評価

[1] 再現性

測定内再現性、測定間再現性試験を5種のプール血清およびプール血漿（ヘパリン、EDTA）を用いて行った。使用した5種（陰性、HIV-1 p24 抗原陽性、抗 HIV-1 groupM 抗体陽性、抗 HIV-1 groupO 抗体陽性、抗 HIV-2 抗体陽性）は1回の測定分を小分け分注し使用まで凍結保存した。5重同時測定による測定内再現性試験の結果、陰性試料は全て陰性と判定され、各陽性試料の測定値の変動係数（coefficient of

variation ; CV）は1.3～3.7%であった。各試料を試薬、装置を変えずに1日4回測定し、それを20回繰り返して行った測定間再現性試験の結果（検量線作成後98日間に渡って合計80回測定）、陰性試料は全て陰性と判定され、各陽性試料の測定値のCVは3.6～6.9%であった〔表3〕。

[2] 共存物質および抗凝固剤の影響

検体中に含まれる可能性のある各物質をプール血清およびプール血漿（ヘパリン、EDTA）へ添加し、測定値への影響を確認した〔表4〕。共存物質としてはヘモグロビン、遊離型ビリルビン、抱合型ビリルビン、脂質、ヒト血清アルブミン、アスコルビン酸、ビオチンを、凝固剤としてはヘパリンとEDTAを各々

表3 測定内および測定間再現性

プール血清											
測定内再現性 (n=5)						測定間再現性 (n=80, 98日間)					
	Nega	p24	M	O	2	Nega	p24	M	O	2	
mean [Index]	全て陰性	3.48	4.07	3.64	4.01	全て陰性	3.35	3.25	2.82	5.34	
SD	—	0.05	0.10	0.06	0.09	—	0.14	0.15	0.16	0.23	
CV [%]	—	1.3	2.4	1.6	2.2	—	4.1	4.5	5.7	4.2	
プール血漿 (ヘパリン)											
測定内再現性 (n=5)						測定間再現性 (n=80, 98日間)					
	Nega	p24	M	O	2	Nega	p24	M	O	2	
mean [Index]	全て陰性	3.41	3.83	3.41	3.62	全て陰性	3.28	2.89	2.33	5.18	
SD	—	0.08	0.13	0.06	0.10	—	0.2	0.2	0.1	0.2	
CV [%]	—	2.4	3.4	1.7	2.8	—	5.5	5.5	6.4	3.6	
プール血漿 (EDTA)											
測定内再現性 (n=5)						測定間再現性 (n=80, 98日間)					
	Nega	p24	M	O	2	Nega	p24	M	O	2	
mean [Index]	全て陰性	3.56	3.44	3.48	3.51	全て陰性	3.40	2.72	2.51	5.05	
SD	—	0.09	0.13	0.11	0.07	—	0.2	0.2	0.1	0.2	
CV [%]	—	2.4	3.7	3.1	1.9	—	4.7	6.9	5.4	4.1	

表4に記載の濃度まで添加し測定した。その結果、未添加条件に対して陰性検体は陰性判定(1.0 Index未満)を示し、陽性検体(1.0 Index以上)の測定値はいずれも±10%以内であったため、これら物質は表4に記載の濃度まで添加しても影響しないと判断した。

[3] 相関性試験

東京慈恵会医科大学附属病院の協力のもと〔文献7〕、本試薬(y)と1種他社既存CLIA法(x)、他社既存ECLIA法(x)および2種他社既存CLEIA法(x)との相関性を確認した〔図4〕。その結果、他社CLIA法、ECLIA法およびCLEIA法-1との相関性はn=120で陽性・陰性の全ての一致率が100%であった。他社CLEIA法-2についてはn=120、陽性一致率98.3%、陰性一致率100%、全体一致率99.2%であった。

他社CLEIA法-2と不一致であった検体についてはその他の他社キットでも陰性判定であり、HIV-RNA検査でも陰性判定であったため、他社CLEIA法-2の偽陽性の可能性が高いと考えられる。

[4] 血清と血漿の相関性試験

東京慈恵会医科大学附属病院の協力のもと〔文献7〕、本試薬について血清(x)とヘパリン血漿(y)およびEDTA血漿(y)との相関性を確認した〔図5〕。その結果、血清とヘパリン血漿との相関性はn=332、陽性一致率100%、陰性一致率100%、全体一致率100%、血清とEDTA血漿についてはn=324、陽性一致率100%、陰性一致率100%、全体一致率100%であった。

表4 共存物質の影響

		プール血清	プール血漿 (ヘパリン)	プール血漿 (EDTA)
ヘモグロビン	[mg/dL]	450	450	450
遊離型ビリルビン	[mg/dL]	18	18	18
抱合型ビリルビン	[mg/dL]	18	18	18
脂質	[mg/dL]	1,600	1,600	1,600
ヒト血清アルブミン	[g/dL]	5.0	5.0	5.0
アスコルビン酸	[mg/dL]	20	20	20
ビオチン	[ng/mL]	3,500	3,500	3,500
ヘパリン	[U/mL]	100	100	100
EDTA	[mg/mL]	5.0	5.0	5.0

		他社 CLIA 法		
		陽性	陰性	計
AIA-バック CL HIV Ag/Ab	陽性	61	0	61
	陰性	0	59	59
	計	61	59	120

		他社 ECLIA 法		
		陽性	陰性	計
AIA-バック CL HIV Ag/Ab	陽性	61	0	61
	陰性	0	59	59
	計	61	59	120

		他社 CLEIA 法-1		
		陽性	陰性	計
AIA-バック CL HIV Ag/Ab	陽性	61	0	61
	陰性	0	59	59
	計	61	59	120

		他社 CLEIA 法-2		
		陽性	陰性	計
AIA-バック CL HIV Ag/Ab	陽性	61	0	61
	陰性	1	58	59
	計	62	58	120

図4 他社既存試薬との相関性試験

		ヘパリン血漿		
		陽性	陰性	計
血清	陽性	214	0	214
	陰性	0	118	118
	計	214	118	332

		EDTA 血漿		
		陽性	陰性	計
血清	陽性	206	0	206
	陰性	0	118	118
	計	206	118	324

図5 血清と血漿の相関性試験

[5] セロコンバージョンパネルおよびパフォーマンスパネルの測定

他社キットとのウインドウピリオドの比較およびサブタイプの異なる HIV 陽性に対する検出性能を評価するため、それぞれ2種類のセロコンバージョンおよびパフォーマンスパネルを測定した [図6, 7]。他社キットの測定結果については各パネル検体の添付文書を参照した。

セロコンバージョンパネル PRB961 については陰性から血中に HIV 抗原が増加する病態が反映されてい

る。本試薬の検出タイミングは EIA 法の抗原検査および他社抗原抗体検出キットと同等であった。0600-0271 については陰性から血中に HIV 抗原が増加後、免疫反応が立ち上がって抗原が陰性化し抗 HIV 抗体が陽性となっていると推測される。本試薬の検出タイミングは他社キットと同等であり、抗原検出キットが陰性化した後も陽性を維持しており、抗体陽性を検出できていることが確認された。

パフォーマンスパネル 0800-0362 は複数ドナーの抗原陽性パネルである。本試薬と他社キットおよび抗原

パネルID	番号	初回採血 からの 経過日数	HIV 抗原／抗体同時検出試薬				HIV抗原検査 (EIA法)		HIV RNA
			AIA-バック CL HIV Ag/Ab		他社CLIA法				
			Index	判定	S/CO	判定	S/CO	判定	判定
PRB961 (0600-0243)	01	0	<0.1	-	0.1	-	0.1	-	-
	02	5	<0.1	-	0.1	-	0.2	-	-
	03	7	<0.1	-	0.1	-	0.3	-	-
	04	12	<0.1	-	0.1	-	0.2	-	-
	05	14	<0.1	-	0.1	-	0.2	-	-
	06	19	<0.1	-	0.1	-	0.2	-	-
	07	21	<0.1	-	0.1	-	0.2	-	+
	08	27	14.3	+	8.8	+	9.5	+	+
	09	29	53.5	+	28.7	+	27.4	+	+
0600-0271	01	0	<0.1	-	0.1	-	0.1	-	+
	02	3	0.7	-	0.6	-	0.7	-	+
	03	7	85.3	+	39.7	+	39.8	+	+
	04	10	52.5	+	25.2	+	24.6	+	+
	05	14	132.7	+	64.9	+	61.4	+	+
	06	18	13.5	+	13.1	+	7.7	+	+
	07	21	4.3	+	11.2	+	1.0	+	+
	08	25	13.9	+	19.0	+	0.3	-	+

図6 セロコンバージョンパネル測定結果

パネルID	番号	タイプ	グループ	サブタイプ	HIV 抗原／抗体同時検出試薬				HIV抗原検査 (EIA法)			
					AIA-バックCL HIV Ag/Ab		他社CLIA法					
					Index	判定	S/CO	判定	S/CO	判定		
0800-0362	01	HIV-1	-	-	27.5	+	50.8	+	7.5	+		
	02	HIV-1	-	-	1.3	+	1.3	+	1.3	+		
	03	HIV-1	-	-	5.1	+	7.3	+	3.7	+		
	04	HIV-1	-	-	22.2	+	34.8	+	3.2	+		
	05	HIV-1	-	-	9.5	+	10.4	+	4.3	+		
	06	HIV-1	-	-	11.3	+	5.3	+	2.0	+		
	07	HIV-1	-	-	38.5	+	110.2	+	1.3	+		
	08	HIV-1	-	-	31.8	+	77.4	+	39.1	+		
	09	Negative	-	-	< 0.1	-	0.2	-	0.1	-		
	10	HIV-1	-	-	153.7	+	99.9	+	37.7	+		
	11	HIV-1	-	-	36.4	+	13.2	+	10.2	+		
	12	HIV-1	-	-	44.1	+	83.4	+	1.4	+		
	13	HIV-1	-	-	5.1	+	4.7	+	2.3	+		
MSP-HIV-001	01	HIV-1	M	A1	315.9	+	405.3	+				
	02	HIV-1	M	A1	316.9	+	743.6	+				
	03	HIV-1	M	B	333.8	+	726.9	+				
	04	HIV-1	M	B	278.4	+	945.4	+				
	05	HIV-1	M	C	92.6	+	707.7	+				
	06	HIV-1	M	C	131.9	+	780.6	+				
	07	HIV-1	M	D	301.7	+	720.2	+				
	08	HIV-1	M	D	152.6	+	227.0	+				
	09	HIV-1	M	F1	254.1	+	464.0	+				
	10	HIV-1	M	G	258.4	+	799.3	+				
	11	HIV-1	M	K	5.1	+	482.6	+				
	12	HIV-1	M	CRF01_AE	87.8	+	487.4	+				
	13	HIV-1	M	CRF01_AE	150.9	+	159.5	+				
	14	HIV-1	M	CRF02_AG	347.8	+	925.9	+				
	15	HIV-1	M	CRF02_AG	120.1	+	510.8	+				
	16	HIV-1	M	CRF03_AB	255.3	+	538.7	+				
	17	HIV-1	M	CRF11_cpx	225.0	+	591.7	+				
	18	HIV-1	O	-	4.9	+	7.8	+				
	19	HIV-2	-	A	111.9	+	226.4	+				
	20	HIV-2	-	A	85.3	+	176.9	+				
	21	Negative	-	-	< 0.1	-						
	22	Negative	-	-	< 0.1	-						

図7 パフォーマンスパネル測定結果

検出キットとの判定は全て一致しており、多様な抗原を検出可能であった。また MSP-HIV-001 は様々なタイプ、グループ、サブタイプの患者検体を集めたミックスパネルである。本試薬では全ての陽性検体を陽性と判定することができており、様々な種類の HIV 陽性を幅広く検出可能であることが示された。

[6] 抗原検出感度

HIV-1 p24 抗原の標準物質である、WHO International Standard HIV-1 P24 Antigen (90/636) を用いて本試薬の抗原に対する検出感度を確認し、他社キットと比較した [図8]。購入した WHO 標準品を HIV 陰性ヒト血清で希釈し、標準品の表示値と希釈倍率から 2.0、

抗原濃度 [U/mL]	AIA-バックCL HIV Ag/Ab		他社CLIA法		他社ECLIA法		他社CLEIA法	
	測定値 [Index]	判定	測定値 [S/CO]	判定	測定値 [COI]	判定	測定値 [C.O.I]	判定
0	-0.02	—	**	—	0.2	—	**	—
0.25	0.48	—	**	—	0.6	—	**	—
0.50	0.74	—	**	—	1.0	+	**	—
0.75	1.35	+	**	—	1.4	+	**	+
1.0	1.89	+	1.10	+	1.8	+	**	+
2.0	3.41	+	2.06	+	3.4	+	**	+

図8 抗原検査感度

		AIA-CL1200		
		陽性	陰性	計
AIA-CL2400	陽性	50	0	50
	陰性	0	50	50
	計	50	50	100

		AIA-CL300		
		陽性	陰性	計
AIA-CL2400	陽性	50	0	50
	陰性	0	50	50
	計	50	50	100

図 9 機種間差

1.0、0.75、0.5、0.25 U/mL になるように希釈系列を作製した。これを本試薬および他社の既存 CLIA 法、ECLIA 法および CLEIA 法のキットにて測定した。本試薬は 0.75 U/mL からのサンプルを陽性と判定した。

[7] 機種間差

AIA-CL2400 (x) と、準大型機の AIA-CL1200 (y)、および小型機である AIA-CL300 (y) との機種間差を確認した [図 9]。その結果、AIA-CL2400 と AIA-CL1200 の機種間差は n=100、陽性一致率 100 %、陰性一致率 100 %、全体一致率 100 %、であり、AIA-CL2400 と AIA-CL300 では n=100、陽性一致率 100 %、陰性一致率 100 %、全体一致率 100 %であった。

5. 総括

今回、我々は HIV 感染のスクリーニングに用いられる HIV 抗原/抗体同時検出試薬を開発した。本試薬は測定機器として全自動化学発光酵素免疫測定装置 AIA-CL シリーズを用いて、迅速（約 25 分）かつ多検体の測定が可能であり、試薬有効期間が 25 ヶ月と長期にわたって安定であることが大きな特徴となっている。試薬の基本性能として、測定内、測定間再現性は陽性試料で 7% 以下であり、陰性試料は全て陰性と判定されており良好であった。また検体中の共存物質や凝固剤の影響を受けにくいことが確認された。

既存の体外診断用医薬品 4 キットとの相関性は良好であり、セロコンバージョンパネルやパフォーマンスパネルを用いた検討および HIV-1 p24 抗原の国際標準品を用いた評価結果より、本試薬の検出感度は他社と同等以上であり、幅広い遺伝子型の陽性例を検出可能であることが示された。

我々の免疫検査システムは 1 テスト分の試薬をカップに封入して凍結乾燥するというモノテスト方式を採用しており、検査数の少ない施設であっても試薬の無駄が少なく運用しやすいという特徴がある。さらに本試薬では血清とヘパリン血漿および EDTA 血漿が同等に測定可能であり、大型機である AIA-CL2400 と準大型機の AIA-CL1200、および小型機の AIA-CL300 の

同等性も確認できた。これにより大病院から個人経営のクリニックまで幅広い用途、検体種を用いるユーザーの要望に応えることができる仕様となっている。

以上より、本試薬は抗原抗体の同時検出によって感染初期からのウイルス検出が可能であり、多様な遺伝子型に合わせた材料を用いることで幅広い種類の HIV 陽性を検出できることが示された。このことにより本試薬は HIV スクリーニング検査として有用であり、HIV の早期発見や感染拡大防止に貢献することが期待される。

6. 謝辞

本開発において、臨床評価、基礎評価ならびに多くの助言を頂きました東京慈恵会医科大学附属病院中央検査部・池田勇一技師長、宮本博康検査技師（現：東京慈恵会医科大学附属第三病院中央検査部技師長）、榎田彩希検査技師に心より感謝を申し上げます。

7. 文献

- 1) 渡邊大、四本美保子、抗 HIV 治療ガイドライン、2025 年 3 月版
- 2) 岡慎一、モダンメディア、**69** (6)、137-146 (2023)
- 3) 松下修三、村上正巳、診療における HIV-1/2 感染症の診断ガイドライン 2020 版
- 4) 上道文昭、山元泰之、医学と薬学、**63** (3)、537-546 (2010)
- 5) Nora E. Rosenberg et al, The Journal of Infectious Diseases, **205**, 528-534 (2012)
- 6) Joris Hemelaar, Trends in Molecular Medicine, **18** (3), 182-192 (2012)
- 7) 榎田彩希、宮本博康、医学と薬学、**81** (9)、447-457 (2024)

