

神運動発達遅延や神経系の問題がわずかながら報告されている。

父母や同胞の感染事実の非感染児への告知は、児の健康にとって直接の関係はなくとも、発育や心の成長に影響を及ぼす可能性があり、ある程度の年齢に達すれば、相応の配慮のもとに行う必要がある。

【感染児 41 例の状況と問題点】

感染児の初診時の訴え・症状は、0歳 17例：検査または無症状 (7)、呼吸障害 (4)、体重増加不良 (2)、反復性中耳炎・カンジダ症・肝機能障害・肝脾腫 (各 1)。1～3歳 12例：検査または無症状 (6)、呼吸障害 (3)、歩行障害 (2)、カンジダ症・被虐待 (各 1)。4～8歳 8例：検査または無症状・呼吸障害 (各 3)、耳下腺とリンパ節の腫脹 (2)、カンジダ症・肝機能障害・肝脾腫・帯状疱疹 (各 1)。9～12歳 4例：呼吸障害 (2)、検査または無症状・反復性中耳炎・カンジダ症 (各 1)。一方、最終観察時臨床病期は、N 21例、A 1例、B 1例、AIDS 3例、死亡 11例、帰国または不明 4例であり、22例に HAART が導入されていた。ウイルス学的・免疫学的に安定を得た今日、水平感染予防・告知・性教育が焦眉の課題とされている。

本人への告知については、7、12、13、16歳の 1例ずつに実施され (4/22:18%)、反応として、理解不十分、内向的・逃避的になった、抑うつ状態、意外に平静、などが報告された。性教育の連関については、小学校高学年、思春期までに告知と合わせ実施すべき、との考えが多い。また、本人の周囲に対する告知は、保育園あるいは幼稚園に対して行った例において、受容が困難であった上に登園制限が課せられたことから、かえってストレスを生む結果になった例も報告された。しかしながら、カウンセリングの実施状況を見ると、本人を除く家族のみ 4例、本人と家族の両方 8例、ともに未 10例である一方、14歳以上では全例両方が受けており、着実に支援体制は浸透していると考えられた。

5. HIV 感染女性の妊娠・出産希望に対する支援の問題

大金美和

近年、HIV 治療の進歩から学業や仕事等の社会生活と治療の両立が可能になり、女性患者では、家庭や子供を持つことを希望するケースが増えている。平成 17 年度に実施した女性患者へのアンケート調査では、「挙児希望あり」は 20 代の 13 人中 6 人 (46%)、30 代の 21 人中 6 人 (29%)、40 代の 11 人中 1 人 (9%) であった。また、挙児希望のあった 13 人の性行動について調べたところ、「性行為なし」が 1 人、「時々コンドーム使用」が 2 人、他 10 人は、

「常にコンドーム使用」であった。この結果から、生殖年齢にある女性患者に挙児希望はあるが、パートナーへの感染予防を講じることが、挙児希望と相反する性行動となり苦慮していることが示唆された。平成 16 年度に実施した看護職へのアンケート調査では、「妊娠 (挙児希望) に関する指導/相談」の実施率が「感染予防・避妊に関する指導/相談」に比べて低いこと、「妊娠 (挙児希望)」に関する知識不足があることから、女性患者に対する情報提供の問題が明らかとなっている。

現在は、女性から男性への感染を回避し妊娠する方法として、女性 HIV 陽性者と男性 HIV 陰性者での配偶者間人工授精 (AIH) が行われている施設がある。これまで挙児について、悩んでいた夫婦が、これらの情報提供を受けることで、即実行にいたらなくとも、将来的な選択の幅を見いだせたことで救われる気持ちになったケースも少なくない。

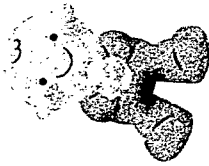
医療者の支援として重要なのは、単なる AIH 実施に関する情報提供や、妊娠を勧めるということではなく、AIH の実施は、HIV 感染症の治療方針や自身の状態と合わせて検討することで、場合によっては、計画的な妊娠が可能になってきているという情報提供と、その意思決定の過程を支援することである。支援内容は、① HIV 感染症の病状や治療状況のモニタリング、② 本人とパートナーに対する HIV 感染症と妊娠・出産・育児に関する情報提供、③ 両者個別の指導や相談の場の提供、④ 提供した情報に対する理解の確認と、個別的な問題に対する助言、⑤ サポートの獲得・環境調整 (人・物・場所) があげられる。

医療者は HIV 感染症の病状や背景が異なる女性患者の全体像を総合的に判断し、妊娠・出産希望に対応することが求められている。また、受診早期から積極的に面接機会を設け、相談しやすい環境や関係を作り、継続して支援することが、リプロダクティブヘルス向上と、HIV 感染症治療・療養生活の安定につながると考えられる。

ま と め

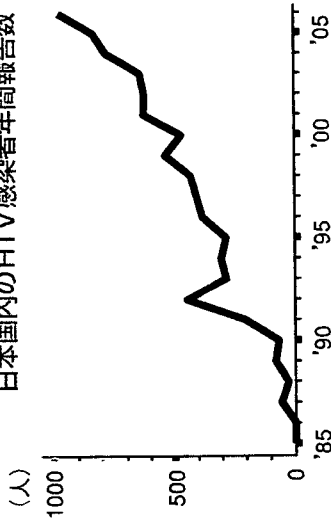
近年の HIV 治療の目覚ましい進歩は、生命予後の改善のみならず、HIV 陽性者の社会生活の幅を格段に広げ、生き方そのものも様々な選択が可能となっている。陽性者の Quality of Life が向上する中で、女性の妊娠・出産・育児を取り巻く環境には、様々な視点・側面から解決すべき問題が数多く残されている。今回は、今まさに感染女性が直面している問題を取り上げ、解決に向けての方向性を検討していただいた。陽性者であっても「結婚し子供を産み育てる」というごく自然な望みが、安心してかなえられる時が一刻も早く訪れることを願ってやまない。

日本のHIV感染の動向



- 日本の感染者数は諸外国に比べて、まだ、きわめて少数ですが、先進国のはかでは唯一、増加傾向にあります。

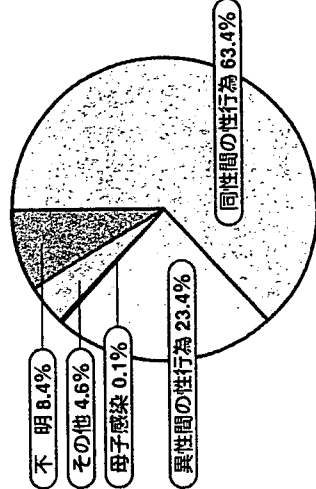
日本国内のHIV感染者年間報告数



厚生労働省：エイズ発生動向年報(2006年)による

- HIVの感染経路は8割が性行為です。女性の感染は若い人に多い傾向にあります。

HIVの感染経路 (2006年までの累計)



厚生労働省：エイズ発生動向年報(2006年)による

HIV感染者の社会生活全般を支援するために、医療・福祉・保健分野でさまざまなサービスが用意されています。たとえば、福祉制度を利用すれば、医療費の負担を軽くすることができます。申請方法など詳しいことは、市区町村の担当窓口や病院のソーシャルワーカーなどが相談のつてくれます。カウンセラーを派遣してくれる自治体もあります。

このほかにも、ボランティア団体・感染者の交流会などが、悩みごとの相談や情報交換の場を提供しています。

HIVについて知りたいときには

- ・エイズ予防情報ネット(API-Net) : <http://api-net.jfap.or.jp/>
- ・HIV検査・相談マップ : <http://www.hivkensa.com>
- ・エイズ予防財団電話相談 : 0120-177-812 (フリーダイヤル)

■このリーフレットはインターネットからもダウンロードできます。エイズ予防情報ネット(API-Net) ⇒ 資料室 ⇒ HIV母子感染予防対策マニュアル ⇒ 「あなた自身の健康と赤ちゃんの健やかな誕生のために」

編集/発行

平成19年度厚生科学研究費補助金エイズ対策研究事業「周産期・小児・生殖医療におけるHIV感染対策に関する集学的研究」班(主任研究者:稲葉憲之)分担研究「わが国独自のHIV母子感染予防対策マニュアルの作成・改訂に関する研究」班(分担研究者:塚原優己)
(問い合わせ先)

〒157-8535 東京都世田谷区大蔵2-10-1
国立成育医療センター・周産期診療部産科 塚原優己

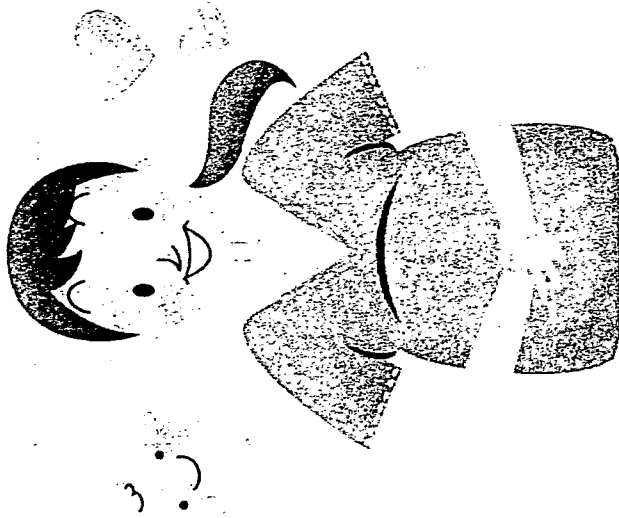
ご妊娠おめでとうございます

あなた自身の健康と
赤ちゃんの
健やかな誕生のために――



当院では

妊娠初期検査の一環として
HIV検査をお勧めしています。



HIV検査とは

エイズの原因となるHIV（ヒト免疫不全ウイルス）に感染していないかどうかを調べる検査です。
妊婦さんの健康を守り、母子感染を防ぐために、梅毒・B型肝炎などの検査とともに実施しています。

妊婦さんのHIV検査が重要な理由

検査を受けてHIV感染を早期発見すれば、それだけ予防・治療効果があります。

- 感染に**
- 赤ちゃんの感染率は約30%
 - お母さんの治療も遅れる
- 妊娠初期に**
- 赤ちゃんの感染率は0.5%
 - お母さんも適切な治療が受けられる

出産は、分娩時の赤ちゃんへの感染を防ぐため、帝王切開が推奨されています。

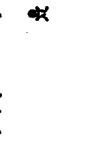
感染しなかった

193人 (99.5%)



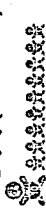
感染した

1人 (0.5%)



感染しなかった

19人 (79.2%)



感染した

5人 (20.8%)



平成18年度厚生労働省研究班報告による

- ◎ お母さんは妊娠中から、赤ちゃんは生後6週間、抗ウイルス薬を内服します。
- ◎ 母乳からの感染を防ぐため、人工栄養(粉ミルク)を用います。

妊婦HIV検査の手順

一次検査

(スクリーニング検査)

採血して、血液中のウイルスやHIV抗体の有無を調べます。

陰性

HIVには感染していません。

陽性

少数ですが、HIVに感染している人が含まれます。

一次検査の陽性は「感染している」という意味ではありません。

- ◎ 感染しているかどうかは二次検査で初めてわかります。必ず二次検査を受けてください。
- ◎ これまでの調査では、一次検査で陽性となった妊婦さんの約95%は、二次検査で「感染していない」ことが確認されています。
- ◎ 日本国内でHIVに感染している妊婦さんは1万人に1人です。一次検査は、このわずかな感染を見落とさないように実施しています。その際、感染していない方も一定の割合(0.3%)で陽性となってしまうことをご理解ください。

一次検査

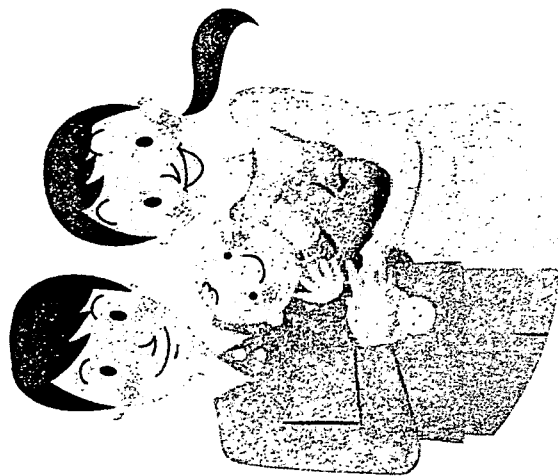
(確認検査)

より精密な検査を行い、HIVに感染しているかどうかを判断します。

★検査結果は本人に直接お伝えします。

★検査にかかる費用や結果がわかるまでの日数は、担当の医師にお聞きください。

★二次検査をどこの医療施設で受けるかは、担当の医師とご相談ください。



もしHIVに感染していたら

- ◎ 治療はめざましい進歩をとげました。現在では、きちんとした治療さえ受ければ、エイズ発症を予防することができます。
- ◎ 日常生活の中でまわりの人に感染することはありません。血液や体液の取り扱いに注意していただくほかは、今までと変わりなく生活することができます。

妊婦HIVスクリーニング検査(一次検査)で 結果が陽性だった方へ

陽性はHIV感染を意味しているわけではありません。
ほとんどの方(約95%)は、このあとの二次検査で
HIVに感染していないことが判明します。

しかし、陽性の方の中には、
わずかながらHIVに感染している方がいらっしゃいます。



必ず、確認検査(二次検査)をお受けください。

確認検査(二次検査)

一次検査で陽性だった方を対象に、
HIVに感染しているかどうかを判定
する精密検査を行います。

- 検査は、少量の血液を採取するだけです。
- 結果がわかるまでには、1~2週間かかります。
- 検査結果はご本人に直接お伝えします。
- 確認検査を実施していないクリニックや病院もありますので、その場合は、一次検査を担当した医師が、確認検査のできる施設をご紹介します。

Q&A

Q なぜ、感染していない人も 一次検査で「陽性」に?

A HIVに感染していないのに「陽性」となってしまう理由
はわかりませんが、1000人の妊婦さんに
HIV一次検査を実施すると3人の割合(0.3%)で、実際には
感染していないのに「陽性」となってしまうことがわか
っています。HIVにかぎらず、ウイルスや細菌に感染して
いるかどうかを調べる検査は、100%正確というわけに
はいかないのです。ただし、HIVに感染している方が「陰
性=感染していない」となることはありません。*

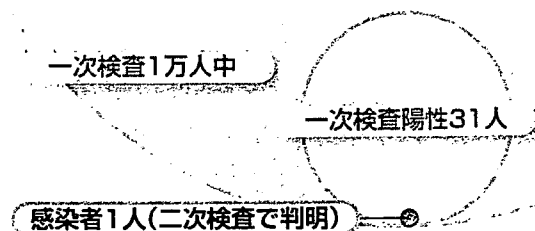
*HIV感染から2か月以内に検査をすると、正確な結果が
得られないことがあります。

Q 二次検査は 受けなくてもいいかしら…

A 確率が低いからといっても、絶対に感
染していないとは言いきれません。必
ず二次検査を受けて、感染しているか感
染していないかをはっきりさせてください。
これは、ご本人だけでなく、お腹の赤
ちゃんのためにも必要なことなのです。

Q 一次検査「陽性」の人のうち、 実際に感染しているのは何人ぐらい?

A 現在のところ、日本国内の妊婦さんのHIV感染は1
万人に1人で、非常に少ないのです。このため、
1万人の妊婦さんに検査をすると、統計上は31人が「陽性」
となり、そのうち実際に感染している方は1人となります。



感染に
気づかないでいると — 赤ちゃんの感染率は約30%
— お母さんの治療も遅れる

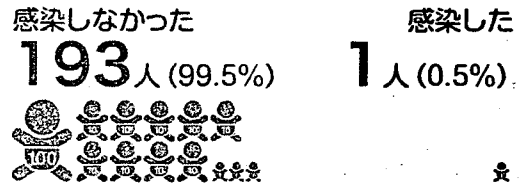
妊娠初期に
感染がわかると — 赤ちゃんの感染率は0.5%程度
— お母さんも適切な治療が受けられる

もし感染していたら

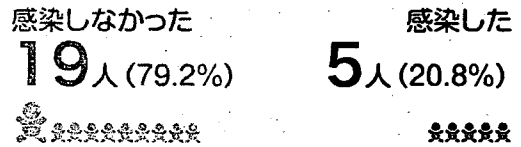
- 感染がわかったら、すぐに治療を開始します。治療法はめざましい進歩をとげました。現在では、きちんとした治療を受けていればエイズ発症を予防することができます。もう「HIV感染=死に至る病」ではありません。
- もちろん出産もできます。出産は分娩時の赤ちゃんへの感染を防ぐため、帝王切開が推奨されています。
- 日常生活の中で、周りの人に感染することはありません。血液や体液の取り扱いに注意していただくほかは、今までと変わりなく生活することができます。
- お母さんは妊娠中から、赤ちゃんは生後6週間、抗ウイルス薬を服用します。
- 母乳からの感染を防ぐため、人工栄養(粉ミルク)を用います。



帝王切開



人工栄養



2007年厚生労働省研究班報告による

必ず、確認検査(二次検査)をお受けください。



HIV感染者の社会生活全般を支援するために、医療・福祉・保健分野でさまざまなサービスが用意されています。たとえば、福祉制度を利用すれば、医療費の負担を軽くすることができます。申請方法など詳しいことは、市区町村の担当窓口や病院のソーシャルワーカーなどが相談にのってくれます。カウンセラーを派遣してくれる自治体もあります。

このほかにも、ボランティア団体・感染者の交流会などが、悩みごとの相談や情報交換の場を提供しています。

HIVについてのご相談は ・エイズ予防財団電話相談：0120-177-812(フリーダイヤル)

HIVについて知りたいときには

- エイズ予防情報ネット(API-Net)：
<http://api-net.jfap.or.jp/>
- HIV検査・相談マップ：<http://www.hivkensa.com>

★この文書はインターネットからもダウンロードできます。
エイズ予防情報ネット(API-Net) ⇒ 資料室 ⇒ HIV母子感染予防対策マニュアル ⇒ 「妊婦HIVスクリーニング検査(一次検査)で結果が陽性だった方へ」

編集/発行

平成19年度厚生科学研究費補助金エイズ対策研究事業「周産期・小児・生殖医療におけるHIV感染対策に関する集学的研究」班(主任研究者：稲葉憲之) 分担研究「わが国独自のHIV母子感染予防対策マニュアルの作成・改訂に関する研究」班(分担研究者：塚原優己)

〈問い合わせ先〉

〒157-8535 東京都世田谷区大蔵2-10-1
国立成育医療センター・周産期診療部産科 塚原優己

蛍光酵素免疫測定法による新しい HIV 抗原抗体同時検出試薬 (第4世代)の検討

¹⁾ 神奈川県衛生研究所, ²⁾ 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科政策科学分野,
³⁾ 横浜市立市民病院感染症部

嶋 貴子¹⁾²⁾ 須藤 弘二¹⁾ 近藤真規子¹⁾
倉井 華子³⁾ 相楽 裕子³⁾ 今井 光信¹⁾

(平成 19 年 4 月 26 日受付)

(平成 19 年 6 月 1 日受理)

Key words: human immunodeficiency virus (HIV), antigen-antibody detection assay,
enzyme-linked fluorescent immunoassay, fourth-generation assay, window period

要 旨

ELFA 法を原理とした抗 HIV-1 抗体, 抗 HIV-2 抗体と HIV-1 p24 抗原を同時検出可能な HIV スクリーニング検査試薬(バイダスアッセイキット HIV デュオ II: 以下, バイダスデュオ II と略)について, 他の HIV 抗原抗体同時検出試薬との比較検討を行った. HIV 抗体陽性血漿 95 検体および HIV 陰性血漿 1,228 検体を用いて検討した結果, 感度は 100%, 特異性は 99.8% であった. 各ジェノタイプとの反応性は HIV-1 グループ M のサブタイプ A, B, B', C, D, A/E, F, G, B/D, グループ O, HIV-2 のすべてを検出可能であった. HIV-1 p24 抗原の検出感度は, バイダスデュオ II では約 5pg/mL から検出が可能であり, 他の抗原抗体同時検出試薬と比べて抗原検出感度が高いことが分かった. また, 感染初期セロコンバージョンパネルを用いた感染初期検出感度の比較では, バイダスデュオ II は他の抗原抗体同時検出試薬と同等あるいはより早い時期からの検出が可能であり, またバイダスの従来品では検出できなかった抗 IgM 抗体の検出も可能となり, セカンドウィンドウ期が解消されていることが確認できた. 以上の結果から, バイダスデュオ II は HIV スクリーニング検査法として十分な感度, 特異性を有するとともに, 他の抗原抗体同時検出試薬と比較して感染初期検出にも優れており, スクリーニング検査法として有用であることが分かった.

[感染症誌 81: 562~572, 2007]

序 文

1986 年に HIV 抗体スクリーニング検査試薬が発売されて以来, スクリーニング検査試薬は HIV 感染をより高感度に検出できるよう改良され続けている. 最初に開発された第 1 世代試薬はウイルス粒子由来の抗原を使用した抗 IgG 抗体検出用試薬であったが, 第 2 世代では組換え抗原および合成ペプチドを用いた抗 IgG 抗体検出用試薬となり, また, HIV-2 についても検出が可能となった. 第 3 世代では, 検出系に抗原-抗体-抗原サンドイッチ法を用いることで, 抗 IgG 抗体に加え抗 IgM 抗体も検出できるようになり, また, HIV-1 グループ O についても検出が可能となっ

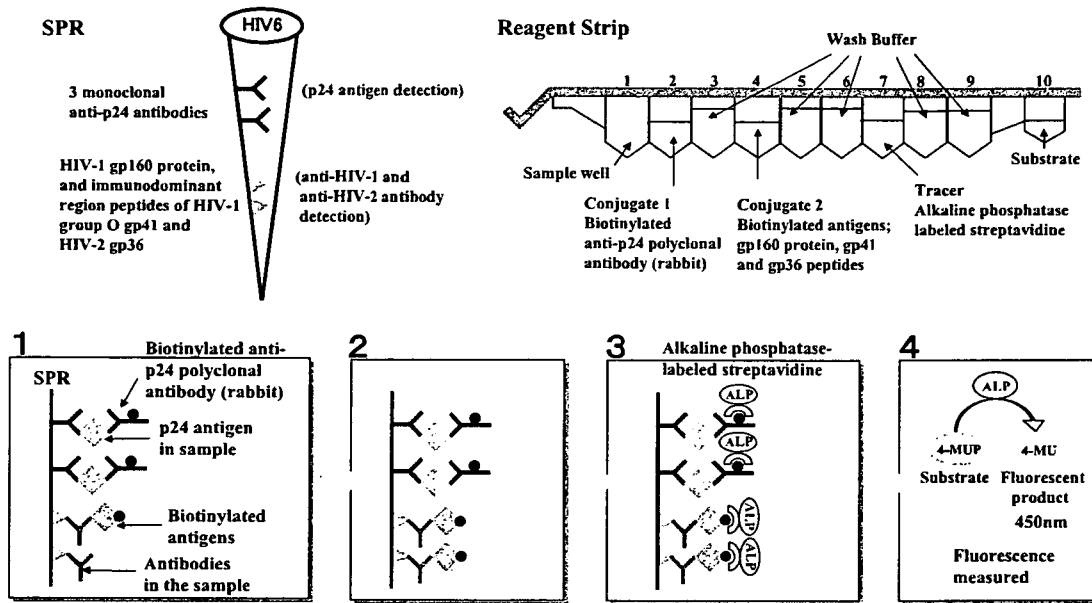
た. さらに, 第 4 世代として, 抗 HIV 抗体と HIV-1 p24 抗原が同時に検出できる HIV 抗原抗体同時検出試薬が開発されたことから, 第 3 世代試薬では HIV 抗体が検出できなかった時期(ウィンドウ期)が 3~4 週間存在したのが, 第 4 世代ではさらに 4 日程度の短縮が可能となり, HIV 抗原のみ陽性の感染初期から抗体陽性期まで幅広い時期の検出ができるようになった^{1)~4)}. 現在, EIA 法を原理とする HIV スクリーニング検査試薬は, 第 3 世代試薬から第 4 世代試薬に切り替わりつつあり, すでに日本においても第 4 世代試薬は広く使用されている.

今回我々は, 蛍光基質を用いた酵素免疫測定法(Enzyme-linked Fluorescent Assay: 以下 ELFA 法と略)を原理とする抗原抗体同時検出試薬を検討する機会を得た. ELFA 法の従来試薬も含めた他の抗原

別刷請求先: (〒253-0087) 神奈川県茅ヶ崎市下町屋 1-3-

1
神奈川県衛生研究所微生物部 嶋 貴子

Fig. 1 Test principle of VIDAS HIV DUOII



抗体同時検出用試薬との比較検討を行い、それぞれの試薬の性能についても検討したので報告する。

材料と方法

1. 検討試薬および対照試薬

(1) 検討試薬の原理および測定方法

今回、ELFA法を原理とし、全自動測定が可能な抗原抗体同時検出試薬であるバイダスアッセイキット HIV デュオ II (日本ビオメリュー社：以下バイダスデュオ II と略) について検討を行った。この試薬は従来使用していたバイダスアッセイキット HIV デュオ (日本ビオメリュー社：以下バイダスデュオと略) に比べ、①抗原-抗体-抗原サンドイッチ法を検出系に用いることで HIV-1、HIV-2 の抗 IgM 抗体の検出が可能、②抗 HIV-1 抗体検出系に gp160 蛋白抗原を使用することで抗体検出感度が上昇、③ HIV-1 p24 抗原の検出感度が 4 倍に上昇、④測定時間が 100 分から 80 分に短縮、⑤結果判定においてグレーゾーン表示を廃止、等の特徴が挙げられる。原理および測定方法を Fig. 1 に示す。

試薬はピベットチップ様のスパー (SPR: solid phase receptacles) および検体ウェルとコンジュゲート等の試薬が 1 つにパッケージされた試薬ストリップのセットで 1 検体測定の仕事となっている。スパー上部には、抗原検出用の抗 p24 マウスモノクローナル抗体、下部には抗体検出用の HIV-1 gp160 蛋白、HIV-1 グループ O gp41 合成ペプチド、HIV-2 gp36 合成ペプチドが固相化されている。試薬ストリップには、検体ウェルおよび抗原検出用コンジュゲートとしてビオチン標識された抗 p24 ウサギポリクローナル抗体、抗

体検出用コンジュゲートとして、ビオチン標識された HIV-1 gp160 蛋白、HIV-1 グループ O gp41 合成ペプチド、HIV-2 gp36 合成ペプチド、検出用トレーサーとしてアルカリフォスファターゼ標識ストレプトアビジン、酵素基質である 4-メチルウンベリフェリリン酸 (以下 4-MUP と略) および洗浄用バッファーがセットされている。

測定の第 1 ステップでは、検体が試薬中の HIV-1 p24 抗原検出用のビオチン標識抗 p24 ウサギポリクローナル抗体および抗 HIV 抗体検出用のビオチン標識 HIV-1 gp160 蛋白、HIV-1 グループ O gp41 合成ペプチド、HIV-2 gp36 合成ペプチド複合物とともに、スパー内に吸引・排出され、スパー上部で抗原検出系、スパー下部で抗体検出系の測定が同時に行われる。反応およびインキュベーション終了後、洗浄され第 2 ステップに移行する。第 2 ステップでは再度、検体とビオチン標識 HIV-1 gp160 蛋白、HIV-1 グループ O gp41 合成ペプチド、HIV-2 gp36 合成ペプチド複合物がスパー下部に吸引・排出され、抗体検出系の反応が行われる。反応終了後、洗浄され第 3 ステップに移行する。第 3 ステップでは、アルカリフォスファターゼ標識ストレプトアビジンがビオチンと結合し、第 4 ステップとして、検出用ウェル内で 4-MUP がアルカリフォスファターゼにより蛍光物質である 4-メチルウンベリフェロン (4-MU) に加水分解され、370nm の励起光を照射して得られる 450nm の蛍光強度を測定する。蛍光強度は検体中の抗 HIV 抗体量、HIV-1 p24 抗原量に比例する。

必要検体量は 200μL であり、検体は血清または血

Table 1 HIV antigen-antibody detection assay

Assay kit	VIDAS HIV DUO II	VIDAS HIV DUO	Genscreen Plus HIV Ag-Ab	Enzygnost HIV Integral	
Method	ELFA	ELFA	ELISA	ELISA	
Solid phase	Antibody detection	HIV-1 gp160 (protein) HIV-1 group O gp41 (synthetic) HIV-2 gp36 (synthetic), biotinylated	HIV-1 gp41, HIV-1 group O gp41 HIV-2 gp36 (synthetic peptide)	HIV-1 gp160 (recombinant) HIV-1 group O gp41 (synthetic) HIV-2 gp36 (synthetic)	HIV-1 gp41 (recombinant and synthetic) HIV-1 group O gp41 (recombinant) HIV-2 gp36 (recombinant)
	Antigen detection	Anti-p24 mouse monoclonal	Anti-p24 mouse monoclonal	Anti-p24 mouse monoclonal	Anti-p24 rabbit polyclonal
Conjugate	Antibody detection	HIV-1 gp160 (protein) HIV-1 group O gp41 (synthetic) HIV-2 gp36 (synthetic), biotinylated	Anti-human IgG mouse monoclonal labeled with ALP	HIV-1 gp41, HIV-1 group O gp41, HIV-2 gp36 (synthetic) labeled with POD	HIV-1 gp41 (recombinant and synthetic) HIV-1 group O gp41 (synthetic) HIV-2 gp36 (synthetic), biotinylated
	Antigen detection	Anti-p24 rabbit polyclonal (biotinylated)	Anti-p24 rabbit polyclonal (biotinylated)	Anti-p24 sheep polyclonal (biotinylated)	Anti-p24 mouse monoclonal (biotinylated)
Sample volume (μL)	200	200	75	100	
Time (min)	80	100	180	180	
Support	VIDAS automated analyzer	VIDAS automated analyzer	Microplate	Microplate	

薬を使用する。今回の測定にはバイダス専用装置であるミニバイダスを用いた。この装置では最大12検体の同時測定が可能である。測定時間は80分であり、測定終了後、測定値および判定結果は自動的に印字される。2週間に一度、添付のスタンダード試薬 (S1) の二重測定によるキャリブレーションおよび HIV 抗体陽性コントロール (C1)、HIV 陰性コントロール (C2) HIV 抗原陽性コントロール (C3) を用いての精度管理を実施する。測定値はスタンダードの相対蛍光強度 (以下 RFV と略) に対する検体の RFV の比である TV (Test Value) 値として表され、TV 値が 0.25 以上であれば陽性、0.25 未満であれば陰性と判定する。

(2) 対照検査法

バイダスデュオ II の性能評価の検討を行うにあたり、対照試薬として以下の検査試薬を用いた。

① 抗原抗体同時検出法

ELFA 法であるバイダスデュオ³⁾、ELISA 法であるジェンスクリーン HIV Ag-Ab (富士レリオ社：以下ジェンスクリーンと略)⁶⁾およびエンザイグノスト HIV インテグラル (デイドベリング社：以下エンザイグノストと略)⁷⁾を使用した (Table 1)。検体必要量はバイダスデュオは 200μL、ジェンスクリーンは 75μL、エンザイグノストは 100μL であった。測定方法は各試薬添付説明書に従った。

② 抗体検査法

スクリーニング検査試薬として PA 法のジェネディア HIV1/2 ミックス PA (富士レリオ社：以下 PA 法と略)、確認検査試薬としてウエスタンブロット法のラブロット 1, 2 (富士レリオ社：以下 WB 法と略) を使用した。測定方法は各試薬添付説明書に従った。

③ 抗原検査法

ELFA 法で抗原の定量が可能であるバイダスアッセキット HIV P24II (日本バイオメリュー社：以下バイダス P24II と略)⁸⁾を使用した。測定方法は試薬添付説明書に従った。

④ 核酸増幅検査法

PCR 法であるアンプリコア HIV-1 モニター Ver.1.5 (ロシュ・ダイアグノスティックス社：以下 NAT 法と略)⁹⁾を使用した。測定方法は試薬添付説明書に従った。

保健所 HIV 抗体・核酸増幅検査希望者検体については、抗体スクリーニング検査で陰性と判定された検体をプールし、それを遠心濃縮して 32 検体までを 1 検体として PCR を行う「プール・遠心濃縮法」¹⁰⁾を用いて核酸増幅検査を行った。

2. 被検検体

(1) HIV 陽性検体

医療機関や保健所等から当所に HIV 検査を依頼され、WB 法により HIV 抗体陽性と判定された HIV 陽性者血漿 131 例を使用した。

(2) HIV 陰性検体

保健所等において HIV 抗体検査、核酸増幅検査 (NAT 法) を希望し、PA 法および NAT 法により HIV 陰性と判定された HIV 検査希望者血漿 1228 例を使用した。

(3) バイダスデュオ偽陽性検体

従来品であるバイダスデュオにより陽性反応を示し、医療機関から当所に確認検査依頼があり、確認検査によって陰性と確認された血漿 13 例を使用した。

上記の医療機関、保健所等からの検体は、当所へ

HIV 検査を依頼された検体であり、医療機関からの依頼は検査受け入れの段階ですべて記号化、保健所検査は保健所での検査受け入れの段階からすべて匿名、記号化されている。今回の検討にあたり、検体番号は新たに記号化し、検討を行った。

(4) HIV-1 III_B株培養上清

HIV-1 III_B実験室株を正常ヒト末梢血単核球を用いて7日間培養した上清を使用した。

(5) 市販パネル検体

市販の HIV 感染者パネル検体として、BBI 社製の Worldwide HIV Performance Panel (WWRB 302), HIV p24 Antigen Mixed Titer Performance Panel (PRA201), HIV-1 Seroconversion Panel AK (PRB 936), AL (PRB937), AM (PRB938), AN (PRB939 (E)), AU (PRB945), BA (PRB951), BB (PRB952), BC (PRB953), BD (PRB954), BE (PRB955) を使用した。

3. 方法

(1) 感度、特異性の検討

HIV 陽性者血漿 131 例および HIV 陰性検体血漿 1228 例を用いて、バイダスデュオ II の感度、特異性の検討を行った。

(2) 従来品偽陽性検体を用いた検討

バイダスデュオの偽陽性検体 13 例について、バイダスデュオ II で測定を行い、交差反応の有無を検討した。

Table 2 Results of HIV-positive and negative specimens by VIDAS HIV DUO II

	Results of VIDAS HIV DUO II	
	Positive	Negative
131 HIV-positive plasma specimens	131	0
1,228 HIV-negative plasma specimens	3	1,225
Sensitivity	100% (131/131)	
Specificity	99.8% (1,225/1,228)	

Table 3 Results of VIDAS HIV DUO II false positive specimens by other assays

sample No.	Antigen-antibody detection assay								Antibody assay		NAT
	VIDAS HIV DUO II		VIDAS HIV DUO		Genscreen Plus HIV Ag-Ab		Enzygnost HIV Integral		PA (GENEDIA HIV 1/2Mix)	WB (LAB BLOT 1.2)	AMPLICOR HIV-1 Monitor Ver.1.5
	TV ^a	judge	TV ^b	judge	C.O.I. ^c	judge	C.O.I.	judge	judge	judge	copies/mL
X1426	0.41	+	0.05	-	0.103	-	0.056	-	-	-	< 400
X1516	0.36	+	0.05	-	0.103	-	0.110	-	-	-	< 400
B36	0.40	+	0.03	-	0.323	-	0.062	-	-	-	< 400

^a TV : test value < 0.25 : Negative, ≥ 0.25 : Positive

^b TV : test value < 0.25 : Negative, 0.25 ≤ TV < 0.35 : Borderline, ≥ 0.35 : Positive

^c C.O.I. : cut off index

(3) HIV ジェノタイプ別の反応性の検討

HIV-1 グループ M のサブタイプ A, B, B', C, D, A/E, F, G, B/D, グループ O, HIV-2 を含んだパネルである Worldwide HIV Performance Panel (WWRB 302) を用いて、ジェノタイプ別の反応性の検討を行った。

(4) HIV ジェノタイプ別の抗体検出感度の比較

WWRB 302 パネルから各ジェノタイプを 1 検体ずつ選択し、HIV 陰性プール血漿を用いて 10⁶ 倍までの 10 倍階段希釈系列を作成し、検討試薬および対照抗原抗体同時検出試薬とのジェノタイプ別の抗体検出感度の比較を行った。HIV-1 については、p24 抗原の存在による測定値への影響がないことを調べるために、あらかじめ 10 倍希釈した検体をバイダス P24II を用いて測定を行い、陰性を確認した。

(5) HIV-1 p24 抗原の反応性の検討

様々な抗原・抗体力価の検体を含んだパネルである HIV p24 Antigen Mixed Titer Performance Panel (PRA201) を用いて、反応性の検討を行った。

(6) HIV-1 p24 抗原の検出感度の比較

HIV-1 III_B 培養上清をバイダス P24II で測定し、p24 濃度が約 150pg/mL および約 100pg/mL になるように調製した試料を母液とした 2 倍階段希釈系列を作成し、検討試薬および対照抗原抗体同時検出試薬の抗原検出感度の比較を行った。また、血漿検体として、HIV-1 Seroconversion Panel AK (PRB936) および HIV p24 Antigen Mixed Titer Performance Panel (PRA 201) の中から、抗体出現前で抗原のみ陽性である PRB 936-04, PRA201-05, PRA201-17 の 3 検体を用いて、HIV 陰性プール血漿で 2 倍階段希釈系列を作成し、検討試薬および対照抗原抗体同時検出試薬の p24 抗原の検出感度を比較した。

(7) HIV 感染初期検出感度の比較

HIV 感染初期に経時的に採血されたパネルである HIV-1 Seroconversion Panel AK (PRB936), AL (PRB 937), AM (PRB938), AN (PRB939 (E)), AU (PRB

Table 4 Results of VIDAS HIV DUO false positive specimens by VIDAS HIV DUO II

Sample No.	VIDAS HIV DUO		VIDAS HIV DUO II		PA (GENEDIA HIV 1/2 Mix)	WB (LAB BLOT 1.2)	NAT (AMPLICOR HIV-1 Monitor Ver.1.5)
	TV ^a	judge	TV ^b	judge	judge	judge	judge
GM676	7.63	+	0.09	-	-	-	-
GM677	2.48	+	0.10	-	-	HIV-1 p68	-
GM678	6.10	+	0.09	-	-	-	-
GM713	4.84	+	0.16	-	-	-	-
GM715	0.45	+	0.08	-	-	-	-
GM769	0.74	+	0.07	-	-	-	-
GM781	0.33	+	0.09	-	-	-	-
GM782	0.75	+	0.34	+	-	-	-
GM1003	3.97	+	0.07	-	-	-	-
GM1025	1.25	+	0.08	-	-	-	-
GM1035	2.89	+	0.10	-	-	-	-
GM1130	0.72	+	0.11	-	-	-	-
GM1143	0.60	+	0.08	-	-	-	-

^a TV : test value < 0.25 : Negative, 0.25 ≤ TV < 0.35 : Borderline, ≥ 0.35 : Positive

^b TV : test value < 0.25 : Negative, ≥ 0.25 : Positive

Table 5 Results of HIV antigen-antibody detection assay, antibody assay, antigen assay, and nucleic acid test (NAT) on Worldwide HIV Performance Panel (WWRB302)

WWRB302		Antigen-antibody detection assay						Antibody assay	NAT
		VIDAS HIV DUO II		Genscreen Plus HIV Ag-Ab		Enzygnost HIV Integral		EIA (Abbott HIV 1/2) ^a	Roche RNA RT-PCR ^c
No.	Genotype	TV ^b	judge	C.O.I. ^c	judge	C.O.I.	judge	judge	judge
1	O	1.32	+	> 15.4	+	> 6.1	+	+	-
2	A	18.01	+	> 15.4	+	> 6.1	+	+	+
3	G	21.01	+	> 15.4	+	> 6.1	+	+	+
4	G	19.51	+	> 15.4	+	> 6.1	+	+	+
5	A	21.09	+	> 15.4	+	> 6.1	+	+	+
6	G	15.32	+	> 15.4	+	> 6.1	+	+	+
7	HIV-2	22.91	+	> 15.4	+	> 6.1	+	+	-
8	G	22.65	+	> 15.4	+	> 6.1	+	+	+
9	A	21.11	+	> 15.4	+	> 6.1	+	+	+
10	negative	0.12	-	0.14	-	0.09	-	-	-
11	HIV-2	23.27	+	> 15.4	+	> 6.1	+	+	-
12	C	21.55	+	> 15.4	+	> 6.1	+	+	+
13	A	14.3	+	> 15.4	+	> 6.1	+	+	+
14	D	11.39	+	> 15.4	+	> 6.1	+	+	+
15	D	17.39	+	> 15.4	+	> 6.1	+	+	+
16	D	19.51	+	> 15.4	+	> 6.1	+	+	+
17	D	18.82	+	> 15.4	+	> 6.1	+	+	+
18	C	20.1	+	> 15.4	+	> 6.1	+	+	+
19	C	12.83	+	> 15.4	+	> 6.1	+	+	+
20	C	18.83	+	> 15.4	+	> 6.1	+	+	+
21	B'	17.88	+	> 15.4	+	> 6.1	+	+	+
22	E	20.75	+	> 15.4	+	> 6.1	+	+	-
23	E	16.04	+	> 15.4	+	> 6.1	+	+	+
24	E	15.07	+	> 15.4	+	> 6.1	+	+	+
25	HIV-2	22.03	+	> 15.4	+	> 6.1	+	+	-
26	B	21.21	+	> 15.4	+	> 6.1	+	+	+
27	B/D	18.06	+	> 15.4	+	> 6.1	+	+	+
28	F	21.22	+	> 15.4	+	> 6.1	+	+	+
29	B	20.83	+	> 15.4	+	> 6.1	+	+	+
30	negative	0.10	-	0.17	-	0.08	-	-	-

^a Data from panel data sheet

^b TV : test value < 0.25 : Negative, ≥ 0.25 : Positive

^c C.O.I. : cut off index

Table 6 Comparison of detection limits by antigen-antibody detection assays using Worldwide HIV Performance Panel (WWRB302)

Genotype Panel No.	Antigen-antibody detection assay	1 : 10	1 : 10 ²	1 : 10 ³	1 : 10 ⁴	1 : 10 ⁵	1 : 10 ⁶
A WWRB302-02	VIDAS HIV DUO II (TV ^a)	+ (19.46)	+ (16.76)	+ (10.41)	+ (2.42)	+ (0.32)	- (0.14)
	VIDUS HIV DUO (TV ^b)	NT ^d	+ (10.51)	+ (1.97)	- (0.14)	- (0.07)	NT
	Genscreen (C.O.I) ^c	+ (> 17.86)	+ (> 17.86)	+ (> 17.86)	+ (5.31)	- (0.77)	NT
	Enzygnost (C.O.I)	NT	+ (> 6.10)	+ (> 6.10)	- (0.67)	- (0.04)	NT
B WWRB302-26	VIDAS HIV DUO II (TV)	+ (22.57)	+ (20.83)	+ (15.17)	+ (3.57)	+ (0.40)	- (0.14)
	VIDUS HIV DUO (TV)	NT	+ (11.07)	+ (3.12)	- (0.16)	- (0.07)	NT
	Genscreen (C.O.I)	+ (> 17.86)	+ (> 17.86)	+ (> 17.86)	+ (> 16.99)	+ (3.16)	- (0.61)
	Enzygnost (C.O.I)	NT	+ (> 6.10)	+ (> 6.10)	- (0.50)	- (0.05)	NT
C WWRB302-12	VIDAS HIV DUO II (TV)	+ (23.46)	+ (21.19)	+ (16.80)	+ (4.19)	+ (0.55)	- (0.15)
	VIDUS HIV DUO (TV)	NT	+ (10.91)	+ (2.59)	- (0.12)	NT	NT
	Genscreen (C.O.I)	+ (> 17.86)	+ (> 17.86)	+ (> 17.86)	+ (> 16.56)	+ (2.44)	- (0.54)
	Enzygnost (C.O.I)	NT	+ (> 6.10)	+ (> 6.10)	- (0.15)	- (0.04)	NT
D WWRB302-14	VIDAS HIV DUO II (TV)	+ (12.43)	+ (7.64)	+ (1.42)	- (0.23)	- (0.12)	- (0.12)
	VIDUS HIV DUO (TV)	NT	+ (2.82)	- (0.19)	- (0.09)	NT	NT
	Genscreen (C.O.I)	+ (> 17.86)	+ (> 17.86)	+ (2.37)	- (0.54)	- (0.32)	NT
	Enzygnost (C.O.I)	NT	+ (> 6.10)	+ (1.35)	- (0.04)	- (0.03)	NT
E WWRB302-23	VIDAS HIV DUO II (TV)	+ (17.58)	+ (11.47)	+ (3.04)	+ (0.39)	- (0.13)	- (0.11)
	VIDUS HIV DUO (TV)	NT	+ (9.79)	+ (1.72)	- (0.12)	NT	NT
	Genscreen (C.O.I)	+ (> 17.86)	+ (> 17.86)	+ (> 17.86)	+ (6.30)	- (0.81)	NT
	Enzygnost (C.O.I)	NT	+ (> 6.10)	+ (> 6.10)	- (0.21)	- (0.04)	NT
F WWRB302-28	VIDAS HIV DUO II (TV)	+ (22.87)	+ (21.27)	+ (14.30)	+ (2.63)	+ (0.36)	- (0.13)
	VIDUS HIV DUO (TV)	NT	+ (10.43)	+ (2.17)	- (0.14)	NT	NT
	Genscreen (C.O.I)	+ (> 17.86)	+ (> 17.86)	+ (> 17.86)	+ (10.37)	+ (1.43)	- (0.42)
	Enzygnost (C.O.I)	NT	+ (> 6.10)	+ (> 6.10)	- (0.24)	- (0.05)	NT
G WWRB302-04	VIDAS HIV DUO II (TV)	+ (20.44)	+ (20.54)	+ (18.85)	+ (9.02)	+ (1.40)	- (0.23)
	VIDUS HIV DUO (TV)	NT	+ (10.98)	+ (4.94)	+ (0.35)	- (0.08)	NT
	Genscreen (C.O.I)	+ (> 17.86)	+ (> 17.86)	+ (> 17.86)	+ (> 15.27)	+ (2.14)	- (0.48)
	Enzygnost (C.O.I)	NT	+ (> 6.10)	+ (> 6.10)	+ (1.72)	- (0.07)	NT
O WWRB302-01	VIDAS HIV DUO II (TV)	+ (2.17)	+ (0.38)	- (0.13)	- (0.12)	- (0.10)	- (0.11)
	VIDUS HIV DUO (TV)	+ (2.48)	- (0.20)	NT	NT	NT	NT
	Genscreen (C.O.I)	+ (> 17.86)	+ (> 17.86)	+ (1.04)	- (0.34)	- (0.32)	NT
	Enzygnost (C.O.I)	+ (> 6.10)	+ (> 6.10)	+ (1.23)	- (0.07)	- (0.04)	NT
HIV-2 WWRB302-11	VIDAS HIV DUO II (TV)	+ (24.92)	+ (23.88)	+ (13.47)	+ (0.65)	- (0.16)	- (0.11)
	VIDUS HIV DUO (TV)	NT	+ (9.49)	+ (1.84)	- (0.11)	NT	NT
	Genscreen (C.O.I)	+ (> 17.86)	+ (> 17.86)	+ (11.79)	- (0.45)	- (0.36)	NT
	Enzygnost (C.O.I)	NT	+ (> 6.10)	+ (> 6.10)	+ (2.97)	- (0.20)	NT

^a TV : test value < 0.25 : Negative, ≥ 0.25 : Positive

^b TV : test value < 0.25 : Negative, 0.25 ≤ TV < 0.35 : Borderline, ≥ 0.35 : Positive

^c C.O.I : cut off index

^d NT : not tested

945), BA (PRB951), BB (PRB952), BC (PRB953), BD (PRB954), BE (PRB955) の計 10 パネルを使用し、検討試薬および対照試薬の感染初期検出感度の比較を行った。

成績

1. 感度、特異性の検討

HIV 陽性者血漿 131 例をバイダスデュオ II で測定した結果、131 例すべてが陽性となり、感度は 100% であった。HIV 陰性検体血漿 1228 例をバイダスデュオ II で測定した結果、1,225 例が陰性、3 例が陽性と判定された (Table 2)。3 例はバイダスデュオ II による再検査においても陽性であったが、他の抗原抗体同

時検査試薬、抗体検査法 (PA 法, WB 法) および NAT 法による再検査ではすべて陰性であった (Table 3)。従って、この 3 例はバイダスデュオ II による偽陽性によるものであることが分かった。特異性は 99.8% (偽陽性率 0.2%) であった。

2. 従来品偽陽性検体を用いた検討

バイダスデュオにより陽性反応を示したが、PA 法、NAT 法により HIV 陰性が確認された検体 13 例についてバイダスデュオ II で測定を行ったところ、12 例が陰性、1 例が陽性となった。バイダスデュオの偽陽性検体はバイダスデュオ II では大部分が陰性となることが分かった (Table 4)。

Table 7 Results of antigen-antibody detection assays and antibody assay on HIV p24 Antigen Mixed Titer Performance Panel (PRA201)

PRA201		Antigen-antibody detection assay				Antigen assay	Antibody assay
No.	group	VIDAS HIV DUO II	VIDAS HIV DUO	Genscreen Plus HIV Ag-Ab	Enzygnost HIV Integral	EIA (Abbott HIV p24 Antigen) ^d	PA (GENEDIA HIV 1/2 Mix)
1	early ^a	+	+	+	+	+	+
2	high ^b	+	+	+	+	+	+
3	early	+	+	+	+	+	+
4	high	+	+	+	+	+	+
5	early	+	+	+	+	+	+
6	high	+	+	+	+	+	+
7	negative ^c	-	-	-	-	-	-
8	early	+	+	+	+	+	+
9	high	+	+	+	+	+	+
10	early	+	+	+	+	+	+
11	high	+	+	+	+	+	+
12	early	+	+	+	+	+	+
13	high	+	+	+	+	+	+
14	high	+	+	+	+	+	+
15	high	+	+	+	+	+	+
16	negative	-	-	-	-	-	-
17	early	+	+	+	+	+	+
18	early	+	+	+	+	+	+
19	early	+	+	+	+	+	+
20	high	+	+	+	+	+	+

^a Early seroconversion sample
^b High titer antibody sample
^c Negative control sample
^d Data from panel data sheet

Table 8 Comparison of HIV p24 antigen detection limit using two-fold diluted specimens of cultured isolate HIV-1III_B

Assay			Two-fold diluted specimen												
Antigen assay	VIDAS HIV P24 II	p24 Ag pg/mL ^a	148.9	75.2	36.9	18.6	10.4	5.1	< 3.0						
			100.4	53.0	26.5	13.4	7.0	3.7							
Antigen-antibody detection assay	VIDAS HIV DUO II	TV ^b	4.83	3.69	2.57	2.04	1.56	1.10	0.77	0.59	0.47	0.38	0.28	0.22	0.20
	VIDAS HIV DUO	TV ^c	1.81	1.38	1.03	0.72	0.53	0.40	0.29	0.22	0.18	0.14	0.12	0.11	0.08
	Genscreen Plus HIV Ag-Ab	C.O.I. ^d	2.11	1.72	1.19	0.88	0.68	0.54	0.38	0.30	0.28	0.30	0.27	0.26	0.17
	Enzygnost HIV Integral	C.O.I.	1.18	0.78	0.67	0.47	0.36	0.25	0.21	0.17	0.14	0.11	0.10	0.08	0.09

^a p24 Ag pg/mL : < 3.0 : Negative, ≥ 3.0 and < 5.0 : Equivocal, ≥ 5.0 : Positive
^b TV : test value < 0.25 : Negative, ≥ 0.25 : Positive
^c TV : test value < 0.25 : Negative, 0.25 ≤ TV < 0.35 : Borderline, ≥ 0.35 : Positive
^d C.O.I : cut off index

3. HIV ジェノタイプ別の反応性の検討

WWRB 302 を用いて、HIV-1 グループ M のサブタイプ A, B, B', C, D, A/E, F, G, B/D, グループ O, HIV-2 の反応性を見たところ、すべてのジェノタイプで陽性となった。パネル中の 2 例の陰性検体は陰性となった (Table 5)。ジェンスクリーンに関しては、既報 6) において、陰性検体の WWRB302-10 が陽性反応を示したと報告したが、今回の検査においては陰性が確認された。

4. HIV ジェノタイプ別の抗体検出感度の比較

WWRB 302 パネルの各ジェノタイプを 10⁶ 倍まで 10 倍階段希釈し、検討試薬および対照抗原抗体同時

検出試薬で測定を行ったところ、HIV-1 サブタイプ A, B, C, E, F, G に関してはバイダスデュオ II とジェンスクリーンがバイダスデュオとエンザイグノストより 10~100 倍抗体検出感度が高く、サブタイプ D については同程度、グループ O についてはジェンスクリーンとエンザイグノストがバイダスデュオ II より 10 倍感度が高かった。HIV-2 についてはバイダスデュオ II とエンザイグノストがバイダスデュオとジェンスクリーンより 10 倍感度が高かった (Table 6)。

5. HIV-1 p24 抗原の反応性の検討

様々な力価の抗原・抗体を含んだパネル検体である

Table 9 Comparison of antigen detection limits by antigen-antibody detection assays using 3 antigen-positive specimens in the panel

Panel No. Ag volume	Antigen-antibody detection assay	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	p24 antigen detection limits	
PRB936-04 (AK) 256.2pg/mL	VIDAS HIV DUO II	TV ^a judge	9.84 +	5.55 +	3.01 +	1.53 +	0.89 +	0.47 +	0.32 +	0.21 -	4.0pg/mL
	VIDAS HIV DUO	TV ^b judge	2.30 +	1.97 +	0.62 +	0.37 +	0.20 -	0.12 -	NT ^d -	NT -	32.0pg/mL
	Genscreen Plus HIV Ag-Ab	C.O.I. ^c judge	5.63 +	3.56 +	2.06 +	1.20 +	0.77 -	0.55 -	NT -	NT -	32.0pg/mL
	Enzygnost HIV Integral	C.O.I. judge	4.52 +	2.32 +	0.90 ±	0.64 -	0.38 -	0.21 -	NT -	NT -	128.1pg/mL
PRA201-05 113.0pg/mL	VIDAS HIV DUO II	TV judge	3.27 +	1.69 +	0.98 +	0.56 +	0.31 +	0.23 -	0.15 -	0.13 -	7.1pg/mL
	VIDAS HIV DUO	TV judge	0.89 +	0.35 +	0.20 -	0.14 -	NT -	NT -	NT -	NT -	56.5pg/mL
	Genscreen HIV Ag-Ab	C.O.I. judge	2.51 +	1.54 +	0.99 ±	0.64 -	0.50 -	NT -	NT -	NT -	56.5pg/mL
	Enzygnost HIV Integral	C.O.I. judge	1.58 +	0.63 -	0.34 -	0.19 -	0.19 -	NT -	NT -	NT -	113.0pg/mL
PRA201-17 79.3pg/mL	VIDAS HIV DUO II	TV judge	2.98 +	1.58 +	0.84 +	0.45 +	0.28 +	0.22 -	0.17 -	NT -	5.0pg/mL
	VIDAS HIV DUO	TV judge	0.82 +	0.30 ±	0.19 -	0.11 -	NT -	NT -	NT -	NT -	79.3pg/mL
	Genscreen HIV Ag-Ab	C.O.I. judge	2.52 +	1.50 +	0.89 -	0.66 -	0.53 -	NT -	NT -	NT -	39.7pg/mL
	Enzygnost HIV Integral	C.O.I. judge	1.77 +	0.78 -	0.36 -	0.19 -	0.19 -	NT -	NT -	NT -	79.3pg/mL

^a TV : test value < 0.25 : Negative, ≥ 0.25 : Positive

^b TV : test value < 0.25 : Negative, 0.25 ≤ TV < 0.35 : Borderline, ≥ 0.35 : Positive

^c C.O.I. : cut off index

^d NT : not tested

HIV p24 Antigen Mixed Titer Performance Panel (PRA201) を用いて反応性の検討を行ったところ、バイダスデュオ II は陰性検体である PRA201-7、16 以外はすべて陽性となり、他の抗原抗体検出試薬とも結果が一致した。抗体検出試薬の PA 法では PRA201-7、16 に加え、PRA201-5、17 も陰性となった。PA 法で検出できなかった PRA201-5、17 は抗体出現前の p24 抗原陽性期の検体であった (Table 7)。

6. HIV-1 p24 抗原の検出感度の比較

HIV-1 IIIB 培養上清をバイダス P24II で測定し、p24 濃度が約 150pg/mL および約 100pg/mL になるように調製した試料を母液として 2 倍階段希釈系列試料を作成し、検討試薬および対照抗原抗体同時検出試薬の抗原検出感度の比較を行った。バイダスデュオ II は p24 濃度が 5.1pg/mL まで陽性となった。他の抗原抗体同時検出試薬では、バイダスデュオは 26.5pg/mL、ジェンスクリーンは 53.0pg/mL、エンザイグノストは 148.9pg/mL まで陽性となった (Table 8)。

また、血漿検体として、HIV-1 Seroconversion Panel AK (PRB936) および HIV p24 Antigen Mixed Titer Performance Panel (PRA201) の中から、抗体出現前で抗原のみ陽性である PRB936-04、PRA201-05、

PRA201-17 の 3 検体を用いて、HIV 陰性プール血漿で 2 倍階段希釈系列試料を作成し、検討試薬および対照抗原抗体同時検出試薬の p24 抗原の検出感度を比較したところ、バイダスデュオ II の抗原検出限界は 4.0~7.1pg/mL (平均 5.4pg/mL)、バイダスデュオは 32.0~79.3pg/mL (平均 55.9pg/mL)、ジェンスクリーンでは 32.0~56.5pg/mL (平均 42.7pg/mL)、エンザイグノストでは 79.3~128.1pg/mL (平均 106.8pg/mL) であった (Table 9)。

7. HIV 感染初期検出感度の比較

HIV 感染初期に経時的に採血されたパネルである HIV-1 Seroconversion Panel AK (PRB936)、AL (PRB937)、AM (PRB938)、AN (PRB939 (E))、AU (PRB945)、BA (PRB951)、BB (PRB952)、BC (PRB953)、BD (PRB954)、BE (PRB955) の計 10 パネルを使用し、検討試薬および対照試薬の感染初期検出感度の比較を行ったところ、バイダスデュオ II は 9 パネルにおいて抗体検査法の陽性時期より 1~3 採血日早く検出が可能であった。NAT 法との比較では、2 パネルでは NAT 法と同時期から陽性となり、残りの 8 パネルでは 1~2 採血日 (最短で 2 日、最長で 7 日) 遅れて陽性となった。抗原抗体同時検出試薬で比較すると、

Table 10 Comparison of the performance of HIV antigen-antibody detection assay, antigen assay, nucleic acid test (NAT) and antibody assay on 10 HIV-1 Seroconversion Panels

Panel No.	Days since 1st bleed	Antigen-antibody detection assay								Antigen assay		NAT	Antibody assay	
		VIDAS HIV DUO II		VIDAS HIV DUO		Genscreen Plus HIVAg-Ab		Enzygnost HIV Integral		VIDAS HIV P24 II	Abbott HIV Ag ^e	Roche RNA RT-PCR ^e	PA (GENEDIA HIV 1/2 Mix)	EIA (Abbott HIV 1/2) ^f
		TV ^b	judge	TV ^c	judge	C.O.I. ^d	judge	C.O.I.	judge	pg/mL ^e	judge	judge	judge	judge
PRB936-01 (AK) 02	0	0.11	-	NT	NT/	0.52	-	0.08	-	NT	-	-	-	-
	5	0.12	-	0.11	-	0.44	-	0.11	-	< 3.0	-	+	-	-
	03 7	0.15	-	0.07	-	0.45	-	0.05	-	< 3.0	-	+	-	-
	04 12	9.84	+	2.30	+	5.63	+	4.52	+	256.2	+	+	-	-
	05 14	16.64	+	5.96	+	14.86	+	> 6.10	+	> 400	+	+	-	-
	06 19	22.26	+	11.11	+	> 20.27	+	> 6.10	+	> 400	+	+	+	+
	07 21	17.00	+	8.27	+	> 20.27	+	> 6.10	+	> 400	+	+	+	+
PRB937-01 (AL) 02	0	0.10	-	NT	NT	0.32	-	0.05	-	NT	-	-	-	-
	02 7	0.11	-	0.08	-	0.34	-	0.05	-	< 3.0	-	+	-	-
	03 9	0.11	-	0.10	-	0.38	-	0.05	-	< 3.0	-	+	-	-
	04 14	1.35	+	0.38	+	1.17	+	0.26	-	39.7	+	+	-	-
	05 16	2.12	+	0.50	+	1.59	+	0.40	-	41.7	+	+	-	-
	06 21	8.95	+	1.82	+	9.50	+	2.51	+	150.0	+	+	±	+
PRB938-01 (AM) 02	0	1.08	+	0.28	±	1.02	+	0.65	-	31.0	+	+	-	-
	02 3	5.20	+	0.85	+	3.80	+	2.49	+	171.0	+	+	-	-
	03 9	19.16	+	5.91	+	> 20.27	+	> 6.05	+	> 400.0	+	+	+	+
PRB939 (E)-04 (AN) 05	9	0.11	-	0.06	-	0.36	-	0.06	-	< 3.0	-	-	-	-
	05 14	0.13	-	0.05	-	0.36	-	0.09	-	< 3.0	-	-	-	-
	06 16	0.45	+	0.09	-	0.55	-	0.19	-	9.3	-	+	-	-
	07 21	13.40	+	3.57	+	10.91	+	> 6.05	+	> 400.0	+	+	-	-
	08 23	18.14	+	6.15	+	18.07	+	> 6.05	+	> 400.0	+	+	-	-
	09 103	15.68	+	16.28	+	> 20.27	+	> 6.05	+	< 3.0	-	+	+	+
PRB945-02 (AU) 03	3	0.18	-	0.03	-	0.35	-	0.05	-	< 3.0	-	-	-	-
	03 7	0.24	-	0.09	-	0.46	-	0.08	-	< 3.0	-	-	-	-
	04 13	2.35	+	0.79	+	3.66	+	1.43	+	52.5	+	+	-	+
	05 15	4.98	+	1.26	+	> 14.3	+	> 4.0	+	94.5	+	+	+	+
	06 20	7.49	+	9.16	+	> 14.3	+	> 4.0	+	60.9	+	+	+	+
PRB951-02 (BA) 03	2	0.10	-	0.02	-	0.35	-	0.06	-	< 3.0	-	-	-	-
	03 8	0.65	+	0.26	±	0.59	-	0.19	-	17.9	+	+	-	-
	04 11	6.34	+	2.33	+	2.91	+	1.38	+	186.3	+	+	-	-
	05 15	17.98	+	8.87	+	> 14.3	+	> 4.0	+	> 400.0	+	+	-	-
	06 19	14.41	+	6.21	+	> 14.3	+	> 4.0	+	> 400.0	+	+	+	+
	PRB952-01 (BB) 02	0	0.11	-	0.04	-	0.44	-	0.06	-	< 3.0	-	-	-
02 7		0.15	-	0.05	-	0.59	-	0.08	-	< 3.0	-	+	-	-
03 10		1.66	+	0.58	+	1.59	+	0.49	-	39.9	+	+	-	-
04 14		0.69	+	0.31	±	5.22	+	0.46	-	17.7	+	+	+	+
05 17		0.77	+	0.14	-	> 14.3	+	3.53	+	< 3.0	-	+	+	+
06 21		0.86	+	4.25	+	> 14.3	+	> 4.0	+	< 3.0	-	+	+	+
PRB953-01 (BC) 02	0	0.12	-	0.04	-	0.43	-	0.06	-	< 3.0	-	+	-	-
	02 3	0.27	+	0.08	-	0.42	-	0.13	-	3.3	-	+	-	-
	03 7	1.75	+	0.52	+	1.77	+	0.81	-	44.8	+	+	-	+
	04 10	4.32	+	1.60	+	> 13.0	+	> 4.0	+	92.3	+	+	+	+
PRB954-03 (BD) 04	7	0.18	-	0.08	-	0.42	-	0.07	-	< 3.0	-	-	-	-
	04 10	0.11	-	0.07	-	0.26	-	0.06	-	< 3.0	-	+	-	-
	05 14	0.23	-	0.12	-	0.32	-	0.06	-	< 3.0	-	+	-	-
	06 17	1.33	+	0.57	+	0.80	-	0.20	-	35.1	+	+	-	-
	07 21	12.48	+	5.36	+	> 13.0	+	3.45	+	> 400.0	+	+	±	-
PRB955-01 (BE) 02	0	0.12	-	0.08	-	0.31	-	0.06	-	< 3.0	-	+	-	-
	02 3	0.42	+	0.19	-	0.49	-	0.10	-	7.2	+	+	-	-
	03 7	2.76	+	1.13	+	2.11	+	0.35	-	81.7	+	+	-	-
	04 12	4.31	+	1.71	+	6.87	+	2.11	+	119.9	+	+	-	+
	05 14	5.49	+	4.81	+	> 13.0	+	> 4.0	+	119.5	+	+	+	+

^a Data from panel data sheet

^b TV : test value < 0.25 : Negative, ≥ 0.25 : Positive

^c TV : test value < 0.25 : Negative, 0.25 ≤ TV < 0.35 : Borderline, ≥ 0.35 : Positive

^d C.O.I. : cut off index

^e p24 Ag pg/mL : < 3.0 : Negative, ≥ 3.0 and < 5.0 : Equivocal, ≥ 5.0 : Positive

^f NT : not tested

バイダスデュオ II はジェンスクリーンよりも 10 パネル中 5 パネルで 1 採血日早く検出が可能であり、エンザイグノストよりも 10 パネル中 8 パネルで 1~2 採血日早く検出が可能であった。バイダスデュオとの比較では、10 パネル中 5 パネルで 1 採血日早く検出が可能であり、かつバイダスデュオで見られたパネル BB の抗 IgM 抗体陽性期のセカンドウインドウ検体 (PRB 952-05) においてバイダスデュオ II では陽性となった (Table 10)。

考 察

今回、ELFA 法を原理とした HIV 抗原抗体同時検出試薬であるバイダスデュオ II について検討を行った。HIV 抗体陽性検体および HIV 陰性検体を用いて検討した結果、感度は 100%、特異性は 99.8% と臨床応用に十分な精度を有していることが分かった。従来品であるバイダスデュオで偽陽性反応を示した検体をバイダスデュオ II で測定したところ、ほとんどの検体で陰性となり偽陽性反応の交差出現はみられなかった。これは従来品では HIV-1 抗体検出系に gp41 合成ペプチドを使用していたが、改良品では gp160 蛋白抗原を使用したこと、また抗 HIV 抗体検出系において標識抗原サンドイッチ法を用いたことで特異性が向上したと考えられる。各ジェノタイプとの反応性は HIV-1 グループ M のサブタイプ A, B, B', C, D, A/E, F, G, B/D, グループ O, HIV-2 においてすべての検出が可能であった。ジェノタイプ別の抗体検出感度は、他の抗原抗体同時検出試薬と比較して A, B, C, A/E, F, G, B/D, HIV-2 では 10~100 倍感度が良かった。HIV-1 p24 抗原の検出感度の比較では、バイダスデュオ II は約 5pg/mL から検出が可能であり、他の抗原抗体同時検出試薬よりも 8~32 倍検出感度が高いことが分かった。また、感染初期セロコンバージョンパネルを用いた感染初期検出感度の比較では、バイダスデュオ II は他の抗原抗体同時検出試薬と同等あるいはより早い時期から検出が可能であり、また従来品では検出できなかった抗 IgM 抗体の検出も可能となったことから、p24 抗原が検出限界以下となり、抗 IgG 抗体が検出されるようになるまでの期間であるセカンドウインドウ期が解消されていることが確認できた。以上の結果から、バイダスデュオ II は抗原検出感度、抗体検出感度ともに他の抗原抗体同時検出試薬よりも優れており、スクリーニング検査法として極めて有用であることが分かった。

本法は検体を検体ウェルに加えて専用自動測定装置にセットするだけで 80 分後には結果が得られ、極めて操作が簡便であり、かつ感染初期検出感度や特異性の結果からも非常に精度が高い検査試薬であることが分かった。検体測定は最大 60 検体まで同時測定可能

なバイダス専用装置があり、1 検体のみの単独測定も可能である。キャリブレーションおよびコントロールによる精度管理は、2 週間に一度に行うことで検体毎の測定は必要がなく、1 検体から必要時に随時測定が可能である。

HIV 抗原抗体同時検出試薬は、抗 HIV 抗体に加え、HIV-1 p24 抗原も検出可能なことから、従来の抗体検査試薬のウインドウ期をさらに 4 日程度短縮が可能であり、HIV 感染の早期診断に有効な方法となっている。ただし、抗原抗体同時検出試薬で陽性となった場合、確認検査の WB 法で陽性であれば HIV 陽性が確認できるが、WB 法が陰性であった場合、抗体出現前の HIV-1 p24 抗原を検出している可能性があるため、確認検査としてさらに NAT 法が必要となる。日本における HIV 感染者の割合は、例えば妊婦集団の場合、HIV 陽性率は約 0.02% であり¹¹⁾、スクリーニング検査試薬の偽陽性率は約 0.2% であることから、妊婦スクリーニング検査においては、スクリーニング検査陽性の 10 人に 9 人は偽陽性例と推測される。これらの検体については確認のため NAT 法を実施する必要がある。受検者には心理的負担や費用負担が課されることになる。バイダスデュオ II は他のスクリーニング検査試薬と比較して感染初期検出感度に優れていることから、他のスクリーニング検査法で陽性となった検体についてバイダスデュオ II を用いて 2 次検査を実施することで、感染初期例が偽陽性例かの判別ができ、偽陽性例の大部分を除外できる可能性も示唆された。今後、偽陽性例をスクリーニング検査の段階で除外することが可能な HIV スクリーニング検査のアルゴリズムについても検討していきたいと考えている。

本研究は、厚生労働科学研究費補助金エイズ対策推進事業「HIV 検査体制の構築に関する研究」の一環として行ったものである。本研究の実施にあたり、ご協力くださいました厚木市立病院泌尿器科の岩室紳也先生に深謝いたします。

文 献

- 1) Saville RD, Constantine NT, Cleghorn FR, Jack N, Bartholomew C, Edwards J, *et al.* : Fourth-Generation Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Simultaneous Detection of Human Immunodeficiency Virus Antigen and Antibody. *J Clin Microbiol* 2001 ; 39 : 2518-24.
- 2) Weber B, Berger A, Rabenau H, Doerr HW : Evaluation of a New Combined Antigen and Antibody Human Immunodeficiency Virus Screening Assay, VIDAS HIV DUO Ultra. *J Clin Microbiol* 2002 ; 40 : 1420-6.
- 3) Ly TD, Marin Lynn, Daghfal D, Sandridge A, West D, Bristow R, *et al.* : Seven Human Immunodeficiency Virus (HIV) Antigen-Antibody

- Combination Assays: Evaluation of HIV Seroprevalence Sensitivity and Subtype Detection. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3122-8.
- 4) Weber B, Gürtler L, Thorstensson R, Michl U, Mühlbacher A, Bürgisser P, *et al.*: Multicenter Evaluation of a New Automated Fourth-Generation Human Immunodeficiency Virus Screening Assay with a Sensitive Antigen Detection Module and High Specificity. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1938-46.
- 5) 林 孝子, 渡邊寿美, 近藤真規子, 斎藤隆行, 今井光信: HIV 抗体・抗原の同時測定試薬の検討—HIV 抗体検査キットとの比較—. *感染症誌* 1999; 73: 681-8.
- 6) 嶋 貴子, 近藤真規子, 斎藤隆行, 川田かおる, 伊藤 章, 坂本光男, 他: マイクロプレート法による HIV-1 抗体, HIV-2 抗体および HIVp24 抗原検出用キット (HIV 抗原抗体同時検出キット) の検討. *感染症誌* 2001; 75: 1014-24.
- 7) 嶋 貴子, 林 孝子, 近藤真規子, 斎藤隆行, 川田かおる, 伊藤 章, 他: マイクロプレートを用いた HIV 抗原抗体同時検出試薬の検討. *医学と薬学* 2000; 43: 1131-40.
- 8) 林 孝子, 斎藤隆行, 近藤真規子, 渡邊寿美, 今井光信: 蛍光免疫測定法による HIVp24 抗原検出キットの評価. *感染症誌* 2000; 74: 709-15.
- 9) Mulder J, Mckinney N, Christopherson C, Shinsky J, Greenfield L, Kwok S: Rapid and simple PCR assay for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma: Application to acute retroviral infection. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 292-300.
- 10) 林 孝子, 近藤真規子, 島崎 緑, 植田昌宏, 今井光信: プール検体の遠心濃縮法による HIV スクリーニング検査の偽陽性出現率に関する調査. 第 80 回日本感染症学会総会学術講演抄録 337. 2006.
- 11) 嶋 貴子, 今井光信, 谷口晴記, 早川 智, 外川正生, 塚原優己, 他: 妊婦集団における HIV スクリーニング検査の偽陽性出現率に関する調査. 第 80 回日本感染症学会総会学術講演抄録 337. 2006.

Evaluation of New Fourth-Generation Human Immunodeficiency Virus Antigen and Antibody Detection Assay with Enzyme-Linked Fluorescent Immunoassay

Takako SHIMA^{1,2)}, Koji SUDO¹⁾, Makiko KONDO¹⁾, Hanako KURAI³⁾, Hiroko SAGARA³⁾ & Mitsunobu IMAI¹⁾
¹⁾Department of Biology, Kanagawa Prefectural Institute of Public Health, ²⁾Department of Health Care Management and Planning, Tokyo Medical and Dental University, Graduate School of Medical and Dental Science, ³⁾Department of Infectious Diseases, Yokohama Municipal Citizen's Hospital

We evaluated the fourth-generation HIV screening assay VIDAS HIV DUOII (DUOII) based on ELFA for simultaneous detection of anti-HIV-1 and anti-HIV-2 antibodies and HIV-1 p24 antigen through comparison with other HIV antigen-antibody detection assays.

Materials were 1228 HIV-negative specimens, 95 HIV-antibody-positive specimens, and HIV commercial panels. The specificity of DUOII was 99.8% and sensitivity 100%, detecting all of HIV-1 group M subtype A, B, B', C, D, A/E, F, G, B/D, HIV-1 group O, and HIV-2. The sensitivity test to HIV-1 p24 antigen was 5pg/mL, higher than other assays. DUOII was equivalent to or superior in detecting results earlier than other assays in an evaluation using 10 commercial HIV-1 seroconversion panels of primary infection. DUOII detects anti-HIV IgM antibody, so no negative sample was found in the second window between p24 antigen disappearance and raised anti-HIV IgG antibody.

DUOII has sufficient specificity and sensitivity for HIV screening, and detects primary infection sooner than other assays. These results indicate that DUOII is useful and reliable in HIV screening.

Real-time PCR を用いた HIV-1 RNA 測定キットの基礎的検討

¹⁾ 神奈川県衛生研究所微生物部, ²⁾ (財) エイズ予防財団リサーチレジデント, ³⁾ 慶應義塾大学医学部微生物学・免疫学教室

須藤 弘二¹⁾²⁾ 嶋 貴子¹⁾ 近藤真規子¹⁾
加藤 真吾³⁾ 今井 光信¹⁾

(平成 18 年 6 月 1 日受付)

(平成 18 年 8 月 3 日受理)

Key words: AIDS, human immunodeficiency virus (HIV), PCR, viral infection

要 旨

第 2 世代の HIV-1 RNA 定量法として新しく開発された, コバス TaqMan HIV-1 「マニュアル」の性能評価のため, 希釈直線性, 検出限界, 再現性および干渉物質の影響を検討した. また, 6 種類のサブタイプの分離株を用いてアンプリコア法と測定値を比較した. 希釈直線性の検討の結果, 測定値の得られた $1.67 \times 10^2 \sim 1.73 \times 10^6$ copies/mL の範囲において良好な直線性が得られた ($r^2 = 0.991$). また, 検出限界の検討の結果, 検出限界は 40 copies/mL であり, 本キットはアンプリコア法よりも高感度で広い測定範囲をもつことが確認された. 再現性は, 実験内変動係数が 27.4~50.8%, 実験間変動係数が 29.3~81.5% であった. アンプリコア法とは良好な相関性を示したが ($r^2 = 0.960$), アンプリコア法での値と比較して, すべてのサブタイプで測定値が有意に高くなることが認められた (平均 3.1 倍, $p = 0.002$). 特にサブタイプ C の試料ではその傾向が強かった (7.1 倍). アンプリコア法から TaqMan マニュアル法に移行する際には, この点に留意する必要があると思われる.

[感染症誌 81:1~5, 2007]

序 文

血中 HIV-1 RNA の定量は, 患者の病期進行や抗 HIV 薬による治療効果を判定するための重要な指標の一つとなっている¹⁾. 現在, 血中 HIV-1 RNA の定量には, ロシュ社が開発したアンプリコア HIV-1 モニター version 1.5 (以下, アンプリコア法) が広く臨床で用いられている²⁾. しかし, この方法で低濃度の検体を測定する場合, ウイルスを遠心によって濃縮する必要がある. 最近, Real-time PCR を原理とする, 測定域の広いコバス TaqMan HIV-1 「マニュアル」³⁾ (以下, TaqMan マニュアル法) が新しく開発された. そこで我々は, このキットの性能を評価するために, 希釈直線性, 検出限界, 再現性, サブタイプ依存性および干渉物質の影響を検討し, 既存のキットであるアンプリコア法と性能を比較した.

材料と方法

1. TaqMan マニュアル法

HIV-1 RNA 定量は, 同キットの添付文書に従って以下のように行った. まず, キットに含まれる High

Pure System (以下 HPS) を用いて血漿検体 500 μ L から RNA を抽出した. HPS の RNA 抽出原理は, キット付属の定量標準 RNA (以下 QS) を含むカオトロピックイオン溶液によりウイルスを溶解し, シリカ・マトリックスを用いて全 RNA を精製するものである. この精製 RNA をキットの増幅試薬に添加し, 専用機器である COBAS TaqMan 48 Analyzer を用いて HIV-1 RNA の定量を行った. この定量法は基本的に TaqMan プローブを用いた Real-time PCR であり, 測定結果は増幅曲線のエルボー値 (C_t) をもとに専用ソフトウェアで自動算出される. 検討に際し, コバス TaqMan HIV-1 「マニュアル」のキットはロシュ社より提供を受けた.

2. 材料

希釈直線性, 再現性および干渉物質の影響の実験には, HIV-1III_B株培養上清を用いた. サブタイプ依存性の検討には, サブタイプ A, B, C, AE, F および G に属するそれぞれ 1 株の臨床分離株の培養上清を用いた. これらの分離株は, 神奈川県衛生研究所へ HIV 検査依頼があり, 研究への同意の得られた患者血液より分離した株であり, サブタイプ A, B, AE, G が

別刷請求先: (〒253-0087) 茅ヶ崎市下町屋 1-3-1

神奈川県衛生研究所微生物部 須藤 弘二

平成19年1月20日

日本人, サブタイプ C, F は外国籍患者より分離された。サブタイプは env V3 領域, gag p24 領域について塩基配列を決定後, Clustal X を用いて決定した。

検出限界の実験は, ポアソン分布式によって濃度を決定した III_B 株 RNA 溶液を用いた。培養上清の希釈は, 抗体検査と NAT 検査の両方で陰性が確認された健康人プール血漿を用いて行った。RNA 溶液の希釈は, RNase フリーの PBS を用いて行った。

3. 方法

1) 希釈直線性の検討

III_B 株培養上清の p24 濃度を VIDAS HIV p24 (ビオメリュー社) で測定し, p24 濃度が 1,000pg/mL になるように調製した試料を母液とし, 10 倍ずつ 6 段階希釈を行った。測定は各濃度で 3 回ずつ行った。

2) 検出限界の検討

ポアソン分布法で定量した III_B 株由来の RNA 液を 10, 20, 40 および 100 copies/mL に希釈した。測定は各濃度で 10 回ずつ行った。

3) 再現性の検討

III_B 株培養上清を p24 濃度が 0.01, 1 および 100pg/mL になるように希釈し, 各濃度について 5 点同時測定を 5 回ずつ行い, 実験内変動係数と実験間変動係数を算出した。

4) 陰性検体の測定

HIV 抗体陰性かつ NAT 検査陰性の血漿 51 検体を 1 回ずつ測定した。

5) 干渉物質の影響

ビリルビン F, ビリルビン C, 溶血ヘモグロビンおよび乳糜 (干渉チェック・A プラス, 国際試薬) のそれぞれが測定値に与える影響を調べた。各試薬で検討した濃度は, ビリルビン F が 18.4mg/dL, ビリルビン C が 19.7mg/dL, 溶血ヘモグロビンが 490mg/dL, 乳糜が 1,470 度 (ホルマジン濁度) とし, 5 回測定を行って, 無添加検体の測定値と比較した。

6) 希釈直線性のサブタイプ依存性

6 種類のサブタイプ (A, B, C, AE, F, G) の分離株培養上清を, p24 抗原濃度 0.01, 1 および 10pg/mL に調製した。測定は各濃度で 3 回ずつ行った。

7) TaqMan マニュアル法とアンプリコア法の比較
上と同じ 6 種類のサブタイプの検体について, アンプリコア法による測定を各濃度で 2 回ずつ行い, TaqMan マニュアル法の値と比較した。

4. 統計解析

希釈直線性の検討, および TaqMan マニュアル法とアンプリコア法の比較は, 測定値の逆数の重みをつけた回帰分析によって行った。再現性の検討は分散分析によって行った。干渉物質の影響の検討はスチューデントの *t* 検定を用いて行った。

Fig. 1 Linearity test of COBAS TaqMan. Data supports good linearity from 1.67×10^2 to 1.73×10^6 HIV RNA copies/mL. Linearity was tested using reference HIV strain III_B diluted with HIV-negative plasma.

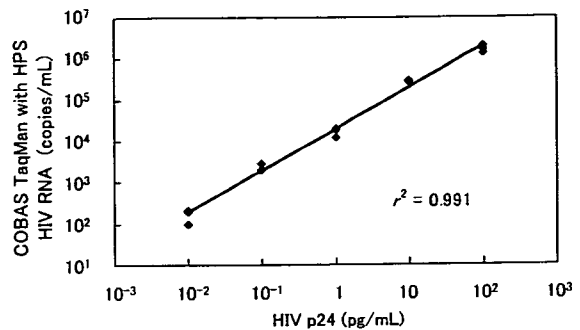


Table 1 Minimum detection of COBAS TaqMan. Sensitivity was 40 copies/mL at a 100% hit rate. The HIV RNA copy number was determined by applying results of RT-nested PCR at endpoint dilution to the null class equation of the Poisson distribution [copy number per reaction = $-\log P(0) : P(0)$, the probability of negative reactions].

HIV RNA (copies/mL)	n	positive	negative	%
10	10	6	4	60
20	10	7	3	70
40	10	10	0	100
100	10	10	0	100

成 績

1. 希釈直線性の検討

p24 濃度 0.001~1,000pg/mL のウイルス試料を測定した結果, 0.001pg/mL の試料では RNA が検出されず, 1,000pg/mL の試料は測定限界以上 ($>1 \times 10^7$ copies/mL) であった。測定値の得られた 0.01~100pg/mL の各濃度に対して測定値 ($1.67 \times 10^2 \sim 1.73 \times 10^6$ copies/mL) をプロットしたものを Fig. 1 に示す。単回帰分析を行った結果, 決定係数 r^2 は 0.991, 回帰係数は 24,900 copies/pg であり, 定量可能範囲内において測定値の直線性は良好であった。

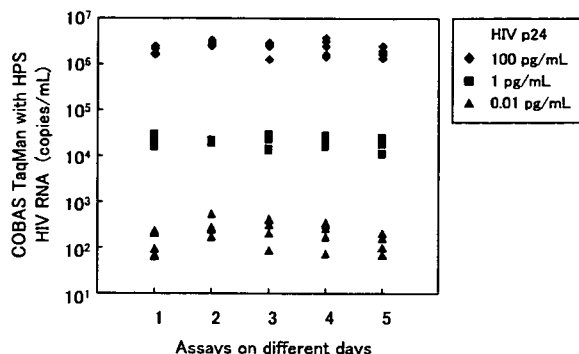
2. 検出限界の検討

低濃度の HIV-1 RNA 試料 (10, 20, 40 および 100 copies/mL) を用いて検出限界を検討した。100 copies/mL の試料と 40 copies/mL の試料は, 10 回の測定すべてで HIV-1 RNA が検出されたが, 20 copies/mL の試料は 10 回のうち 7 回, 10 copies/mL の検体は 10 回のうち 6 回で検出された (Table 1)。

3. 再現性の検討

実験内変動係数は, p24 濃度 0.01pg/mL で 50.8%,

Fig. 2 The precision of COBAS TaqMan was tested using reference HIV strain III B diluted with HIV-negative plasma. Individual data points are shown. Intraexperimental CV at 100, 1, and 0.01pg/mL were 27.4%, 27.6%, and 50.8%. Interexperimental CV were 41.4%, 29.3%, and 81.5%.



1pg/mLで27.6%, 100pg/mLで27.4%であった。また、実験間変動係数は、0.01pg/mLで81.5%, 1pg/mLで29.3%, 100pg/mLで41.4%であった(Fig. 2)。

4. 陰性検体の測定

HIV抗体とNATの両方が陰性の血漿51検体を測定した結果、すべての検体でHIV-1 RNAは検出されなかった。

5. 干渉物質の影響

無添加検体の平均値が301.7 copies/mLであったのに対して、ビリルビンF添加検体の平均値は419.8 copies/mL, ビリルビンC添加検体は413.6 copies/mL, 溶血ヘモグロビン添加検体は469.8 copies/mL, 乳糜添加検体は407.4 copies/mLであった(Fig. 3)。4種類の干渉物質を添加したいずれの検体も、無添加検体に比べて測定値に有意差はみられなかった($p = 0.13 \sim 0.32$)。

6. 希釈直線性のサブタイプ依存性

p24抗原濃度を0.01, 1, 10pg/mLに調製した6種類のサブタイプの分離株のHIV-1 RNA濃度を測定し、サブタイプごとに各濃度の測定値を単回帰分析した。その結果、決定因子 r^2 は0.976~0.999であり、すべてのサブタイプで良好な直線性が得られた。

7. TaqManマニュアル法とアンプリコア法の比較

既存のHIV-1 RNA定量法であるアンプリコア法と比較するため、サブタイプ依存性の検討で用いた6種類のサブタイプの分離株について、アンプリコア法でも同様に測定を行った。その結果、アンプリコア法の測定値も、サブタイプに依存しない良好な希釈直線性を示した($r^2 = 0.970 \sim 0.999$)。そこで、すべてのサブタイプ分離株の試料について、アンプリコア法とTaqManマニュアル法の測定値の関係を調べると

Fig. 3 Interference test of COBAS TaqMan with high bilirubin F, bilirubin C, hemoglobin and chyle. These interference materials did not adversely affect the performance of COBAS TaqMan ($p > 0.05$).

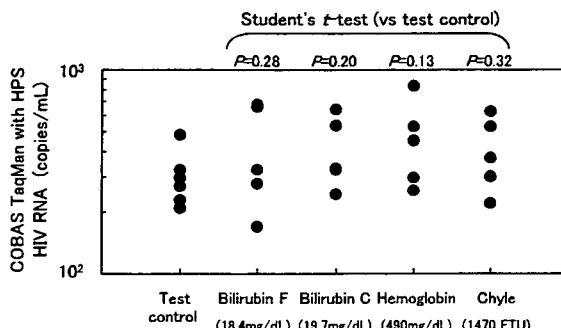
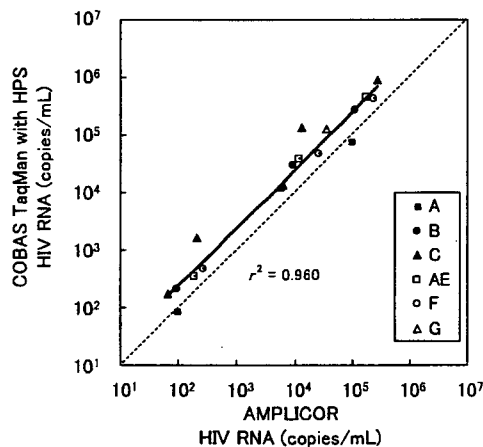


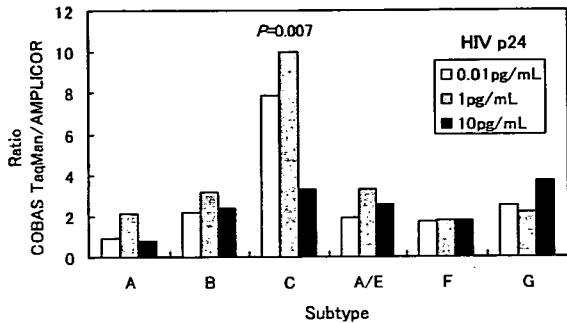
Fig. 4 Correlation of viral loads determined by COBAS TaqMan and AMPLICOR. Correlation was tested using 6 cultured isolates (subtypes A, B, C, AE, F, and G) diluted with HIV-negative plasma. COBAS TaqMan showed an excellent titer correlation with AMPLICOR ($r^2 = 0.960$), but titers determined by COBAS TaqMan were 3.1 times higher than those by AMPLICOR.



(Fig. 4), 両者の間には良好な相関性が得られたが($r^2 = 0.960$), 回帰係数は3.1となり, 1より有意に高かった($p = 0.002$)。測定値の比をサブタイプ試料ごとに分散分析によって解析すると, サブタイプCの検体の測定値の比(7.1)は, 他のサブタイプの測定値の比(1.3~2.8)よりも有意に高かった($P = 0.007$) (Fig. 5)。

TaqManマニュアル法とアンプリコア法の測定値の正確さを検討するために, ポアソン分布法での定量値が100 copies/mLのパネルを二つの方法で測定した。その結果, 前者の測定値は 310 ± 190 copies/mL,

Fig. 5 Ratios of viral load results for COBAS TaqMan and AMPLICOR. The mean titer obtained with COBAS TaqMan was 3.1 times higher than that with AMPLICOR, and 7.1 times higher in a sample of subtype C.



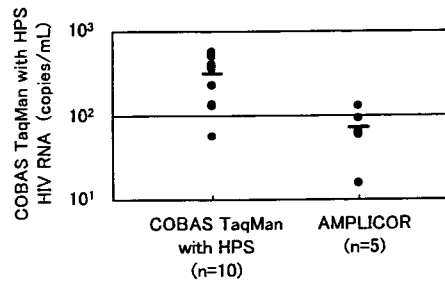
後者の測定値は 72 ± 42 copies/mLであった (Fig. 6).

考 察

アンプリコア法に代わる HIV-1 RNA 測定キットとして開発された TaqMan マニュアル法は、測定域が $40 \sim 10^7$ copies/mL であり、AMPLICOR の $50 \sim 7.5 \times 10^6$ copies/mL に比べて広い範囲の定量が可能とされている。我々の結果でも、検出限界が 40 copies/mL であり、 $1.67 \times 10^2 \sim 1.73 \times 10^6$ copies/mL の範囲で良好な希釈直線性があることが確かめられた。測定値は 6 種類のサブタイプすべてで良好な希釈直線性を示し、再現性に関しては、実験内変動係数が 27.4%～50.8%，実験間変動係数が 29.3%～81.5% であり、既存のアンプリコア法と同程度であった⁹⁾。また、干渉物質の影響は、血漿に存在する可能性のある 4 種の物質、ビリルビン F、ビリルビン C、溶血ヘモグロビンおよび乳糜でまったく認められなかった。

アンプリコア法との比較では、 $r^2=0.960$ と良好な相関を示したが、TaqMan マニュアル法の測定値がアンプリコア法での値よりも有意に 3 倍程度高くなることが認められた。このような傾向は患者血清でもみられることが報告されている⁶⁾。測定濃度の全領域にわたって測定値がアンプリコア法より高めに出自していることから、その原因として、定量基準として用いられている QS に起因している可能性が高いと考えられる。2 つの方法で用いられている QS は一次構造の異なる別な RNA 分子である。2 つの方法ではそれぞれの QS を基準として定量するため、これら QS の基準値に違いがあった場合、それをもとに算出される定量値にも有意差が生じてしまう。別な原因としては、TaqMan プローブを用いる TaqMan マニュアル法と、PCR 産物をプレートハイブリダイゼーションにより定量するアンプリコア法では、プライマー、プローブ、反応条

Fig. 6 Accuracy of COBAS TaqMan and AMPLICOR was tested using 100 copies/mL HIV RNA sample solution (subtype B). Mean \pm SD of measured values for COBAS TaqMan and AMPLICOR were 306 ± 190 copies/mL and 72 ± 42 copies/mL. Results of COBAS TaqMan were about 3 times higher than the concentration of HIV RNA determined by the Poisson distribution.



件などが異なるために、QS および検体中の HIV-1 RNA に対する PCR の増幅効率や検出効率に違いが生じ、その結果、定量値が異なってしまった可能性が考えられる。

TaqMan マニュアル法は、既存のアンプリコア法と比較して広い測定範囲をもつことが確認された。アンプリコア法では、検体中の HIV-1 RNA 濃度によって超遠心機を必要とする高感度法と標準法を使い分ける必要があったが、TaqMan マニュアル法は、すべての測定範囲において同一の方法を用いることができ、作業効率やデータの連続性において優れている。しかし、本検討において、TaqMan マニュアル法はアンプリコア法よりも有意に高い値を示すことが認められたことから、アンプリコア法から TaqMan マニュアル法への移行の際、測定値が 3 倍程度高くなることが予想される。HIV 感染症「治療の手引き」第 9 版では、CD4 陽性リンパ球数が $200 \sim 350/\text{mm}^3$ であり、かつ血中ウイルス量が 100,000 copies/mL 以上の場合、抗 HIV 療法の開始を推奨している。治療開始の参考値として TaqMan マニュアル法の値を用いる場合は、以上の点に留意する必要がある。

文 献

- 1) O'Brien WA, Hartigan PM, Martin D, Esinhart J, Hill A, Benoit S, *et al.*: Changes in plasma HIV-1 RNA and CD4+ lymphocyte counts and the risk of progression to AIDS. Veterans Affairs Cooperative Study Group on AIDS. N Engl J Med 1996; 334: 426-31.
- 2) Mulder J, McKinney N, Christopherson C, Sninsky J, Greenfield L, Kwok S: Rapid and simple PCR assay for quantitation of human immu-