

原 著

HIV-1 感染の早期検査を可能とする HIV-1 p24 抗原検出
イムノクロマトキット今村志穂子^{1,2)}, 田中 礼子¹⁾, 田中 勇悦¹⁾¹⁾ 琉球大学大学院医学研究科免疫学講座²⁾ 株式会社トロピカルテクノセンター

目的: HIV に感染すると血清が陽転する前にウイルス血症が起こる。この時期は他者への伝染の危険度が最も高い。しかし、我が国における現在の血液検査では、HIV に対する抗体を検出する簡易検査法であるイムノクロマト (IC) が広く使用されているためこの感染性の高い時期は抗体陰性と判定される。そこで、HIV の抗原を検出する IC キットの開発と普及は、HIV 感染の早期発見と感染拡大阻止に寄与すると期待される。本研究は我々の HIV-1 p24 特異的単クロン抗体パネルを応用して HIV-1 p24 抗原 IC キットを開発することを目的とした。

方法・結果: ラテラルフロー型 IC 法で、マウス及びラット由来の単クロン抗体群から HIV-1 p24 抗原をサンドイッチできる最適な組み合わせを選択し、IC のプロトタイプを作製した。この新規 IC はサンプルの添加後 30~60 分後の判定で 8 pg/ml の p24 を検出した。

結論: 検出感度は通常の ELISA に比べやや劣るが、洗浄が不要で、かつ迅速・簡便であるため HIV-1 感染早期の血液スクリーニングキットとしてのメリットは非常に大きいと考えられる。このキットに既存の HIV 抗体検出用 IC を組み込んだハイブリッドキットは新規 HIV 検査キットとして国内外のエイズ対策に寄与するものと期待される。

キーワード: HIV-1 p24, イムノクロマト法 (IC), HIV 抗原検出 IC, 早期発見, 簡易スクリーニング

日本エイズ学会誌 12: 179-183, 2010

1. 緒 言

平成 21 年 1 月~12 月までの 1 年間に全国の保健所等で行われた無料 HIV 検査の総数は約 122,500 件¹⁾ である。現在、HIV 感染診断に使われている迅速簡便法は、HIV 抗体のみを検出するイムノクロマト (IC) 法であることから、陽転までのウインドー期が 4~8 週間と長く、HIV 感染初期の検査には適していない。そのため、保健所等では「感染が疑われた時から 2~3 ヶ月後」の検査を勧めているのが現状である。抗体ができるまでのバイレミア期 (ウイルス血症期) は最も HIV の感染性が高いので、抗原検査は感染防止の手段ともなり得る。イムノクロマト法と ELISA 法を比較すると、使用する抗体にもよるが、一般的に ELISA 法のほうが高感度である。しかし、操作においてはイムノクロマト法が簡易であり、短時間で、肉眼で結果を判定できる。また、必要な検体量が少量 (25~100 μl) であることから、イムノクロマトキットのほうが検査を希望する人への負担が少ないことが長所である。

このイムノクロマト法の原理は簡単である。まず、滴下

部 (サンプルパッド) に滴下された検体中の被検物質 (抗原) がコンジュゲートパッドに乾燥含有されている金コロイド標識抗体と抗原-抗体複合体となり、毛細管現象によりメンブレン上を移動する。この抗原-抗体複合体が検出部 (テストライン) に到達すると、検出部に固相化されている捕捉抗体粒子 (同じ抗原のエピトープを認識する抗体) に結合し、抗体-抗原-抗体のサンドイッチ状の複合体を形成し、検出部に金コロイド粒子の線が出現する。さらに、余剰の金コロイド標識抗体がメンブレン状を移動し、コントロール検出部 (コントロールライン) に固相化した抗体 (例えばヤギ抗ラット IgG など) に結合し、金コロイド色素による線が出現する。このコントロールラインの形成により、正常に反応が進行していることが確認できる²⁾ (図 1)。イムノクロマトキットを作製するにあたり、メンブレンに塗布する捕捉抗体および金コロイドに標識する抗体ペアの選択と、それらが乾燥した状態においても活性を十分に保持できるかどうかを最も重要なポイントとなる。そこで本研究では、我々が既に開発した ELISA キットのサンドイッチ反応系を応用し、一般的に使用されているラテラルフロー型のイムノクロマト法を採用した HIV 抗原検出イムノクロマトキットを開発することを目的とした。今回、我々が紹介するイムノクロマトキットは操作が

著者連絡先: 今村志穂子 (〒901-2234 沖縄県うるま市宇州崎 5-1 (株)トロピカルテクノセンター 研究開発部)

2010 年 5 月 26 日受付; 2010 年 9 月 3 日受理

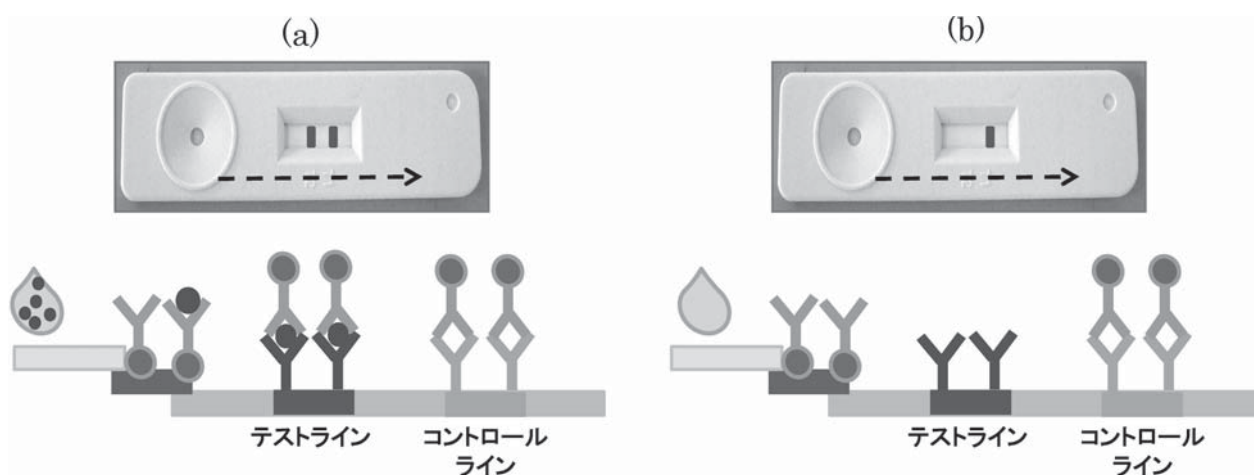


図1 イムノクロマト法の原理
(a) 陽性反応, (b) 陰性反応

サンプルパッドに滴下された検体は右側へ展開し、15~30分後に判定が可能となる。反応が陽性の場合、検体中の被検物質を感作抗体が捕捉する。捕捉された被検物質はメンブレン上を左から右へ流れ、テストラインの捕捉抗体により捕捉される。また、感作金コロイドはコントロールラインで捕捉され、反応が正しく行われていることを示す。

簡便で短時間で結果がわかることから、現在市販されている抗体検査イムノクロマトキットに加えて、広く世界に普及することが期待される。

2. 方法

①コントロールラインおよびテストラインに使用する抗体ペアの選択

テストラインには Capture としてマウス IgG1 : Ab-Mo1 を、Detector としてラット IgG2 : Ab-Rt2 を用いた。また、コントロールラインの抗体候補としてウサギ抗体 OVA および Goat IgG : GARAT (goat anti-rat IgG) の 2 種類について検討を行った。Ab-Rt2 および OVA は金コロイド (BBI, 40 nm) に感作させ、さらに異好抗体による非特異的反応を阻止する抗体としてマウス IgG1 : Ab-Mo3 を添加した。全ての単クローン抗体は琉球大学で作製された (田中ら未発表)。

②イムノクロマトキットの作製

②-1 メンブレンへの抗体塗布

テストライン用抗体 Ab-Mo1 およびコントロールライン用 GARAT は市販のニトロセルロースメンブレン (Millipore Corp.) にそれぞれ塗布量 $1 \mu\text{l}/\text{cm}$ となるように専用の塗布機 (Bio Dot) を用いて塗布した。抗体は Ab-Mo1 : $1 \text{ mg}/\text{ml}$, ウサギ抗体 OVA : $1 \text{ mg}/\text{ml}$, GARAT : $1 \text{ mg}/\text{ml}$ に超純水でそれぞれ調製した。調製した抗体溶液は、塗布前

にポアサイズ $0.2 \mu\text{m}$ のフィルターで濾過した。抗体を塗布したメンブレンは 50°C で 30 分間乾燥した後、室温で 30 分間ブロッキング (0.5% カゼイン, 50 mM ホウ酸 ; pH 8.5), 洗浄・安定化 (0.5% スクロース, 0.05% コール酸ナトリウム, 50 mM Tris-HCl ; pH 7.5) 処理を室温で 30 分間行った。その後、 50°C で 30 分間乾燥させ反作用メンブレンとした。

②-2 金コロイドへの抗体感作

Ab-Rt2 を金コロイドに感作させるために必要な条件を検討した。まず、感作用バッファーである 50 mM KH_2PO_4 の至適 pH を検定するため、50 mM KH_2PO_4 溶液の pH を 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0 にそれぞれ調製し、至適 pH を検討した。各 pH の 50 mM KH_2PO_4 を $10 \mu\text{l}$, 金コロイド (40 nm, BBI) を $90 \mu\text{l}$, $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ に調製した Ab-Rt2 を $10 \mu\text{l}$ ずつ混合し、室温で 2 分静置後、10% NaCl を $10 \mu\text{l}$ 添加した。この混合液を室温で 5 分静置した後、マイクロプレートリーダーを使って測定波長 580 nm を測定し、実測値が最小の pH を至適 pH とした。次に、決定した至適 pH の 50 mM KH_2PO_4 条件下における Ab-Rt2 の最小被覆タンパク量を算出した。はじめに、Ab-Rt2 を超純水で $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ に調製し、 $10 \sim 100 \mu\text{g}/\text{ml}$ の希釈系列を各 0.1 ml ずつ調製した。次に、室温に戻した金コロイド溶液 10.8 ml に決定した至適 pH の 50 mM KH_2PO_4 を 1.2 ml 添加し、pH を調製した。各濃度に調製した抗体溶液に pH 調

製した 50 mM KH_2PO_4 を 1 ml 添加し室温で 2 分静置した。そこに、10% NaCl を 0.1 ml 加え、室温で 5 分静置後、吸光度 580 nm を測定し、Ab-Rt2 の最小被覆タンパク量を決定した。さらに、HIV 非関連可溶性マウス IgG の添加によるヒト血清の好異種抗体反応性の阻止もあわせて検討した。

このように 2 つの条件で抗体感作した金コロイドを抗原検出に最適な濃度に調製し、阻止可溶性マウス IgG を添加後、グラスファイバーのパッド (Millipore Corp.) に染みこませ、真空乾燥機で十分に乾燥させてコンジュゲートパッドとした。

②-3 イムノクロマトキットの組み立て

検出用メンブレン、コンジュゲートパッド、吸収パッド (Millipore Corp.) および血漿分離膜 (PALL) はバックinghamシート (Adhesives Research) の決められた位置にそれぞれ配置し組み立てた後、専用のカッター (Bio Dot) で 5 mm 幅に裁断し、検討用のイムノクロマトとした。

③検出感度の検討

補足抗体 (Ab-Mo1) を塗布した検討用のイムノクロマトキットを用いて、0, 8, 16, 32, 62.5, 125, 250, 500, 1000 pg/ml の 9 段階濃度の標準 HIV-1 p24 溶液を用いて感度を検討した。各濃度の標準 p24 溶液を 50 μl 添加後、室温で 30 分後および 60 分後に、目視でバンドの有無およびバンドの濃さを 3+, 2+, 1+, \pm , - で評価した。

④ HIV パネル血清を用いた検討

市販の HIV 検査用パネル血清 (Seracare Life Science (BBI), PRB935, PRB951) を用いて作製したイムノクロマトで試験し、添付の各検査法の結果と比較した。さらに、市販の抗体検出用イムノクロマトも同時に使用し、有用性についても検討した。抗体検出用イムノクロマトの操作方は指示書に従い反応および判定を行った。また、作製した抗原検出用イムノクロマトの操作方は各血清を 50 μl 添加後、室温で 30 分間静置し、目視による判定を行った。

3. 結 果

①イムノクロマトキットの作製

①-1 コントロールライン用抗体の選択

マウスとラット IgG 単クローン抗体に対する好異種抗体が検討した検体の 1~2 割程度に見られた。そこで、非関連マウス単クローン抗体を添加することによりこの反応は阻止された。この阻止抗体を使うと、コントロールライン用に抗マウス IgG を使用することができない。そこで、ウサギ抗 OVA と OVA を使うのか、抗ラット IgG を使うかを次に検討した。その結果、ウサギ抗体 OVA と OVA の系では反応ラインが薄く使用できないことが確認された。一方で GARAT はコントロールラインとしての反応性が非

常に良好であったことから、塗布濃度を検討した。0.1 mg/ml, 0.05 mg/ml, 0.01 mg/ml にそれぞれ調製したヤギ抗ラット IgG (GARAT) を準備し、メンブレンに塗布した。塗布後は先述の工程を経た後、ラインの濃さを確認した。その結果、0.05 mg/ml の濃度でメンブレンに塗布したときが目視での判定もしやすく、テストラインとのバランスもよかつたことから、コントロールライン用の抗体は GARAT とし、塗布濃度は 0.01 mg/ml とした。

①-2 金コロイドへの感作

Ab-Rt2 を金コロイドに感作させる際の至適 pH および最小被覆タンパク量は、至適 pH : pH 8.0, 50 mM KH_2PO_4 で、最小被覆タンパク量 : 40 $\mu\text{g/ml}$ であった。そこで、これらの条件でコンジュゲートパッドを作製し、メンブレンや吸収パッドなどと組み合わせて HIV-1 p24 抗原検出用イムノクロマトキットを作製した。

①-3 検出感度およびパネル血清における検査結果の比較

テストライン抗体 Ab-Mo1 のみ塗布し、組み立てたイムノクロマトキットを用いて感度を検討した結果、サンプル滴下後 30 分での判定で、標準 p24 溶液 16 pg/ml まで目視による判定が十分可能であった (図 2)。さらに、1 時間後の判定では 8 pg/ml においても陽性の判定が可能であった。

また、HIV-1 検査用のパネル血清 (PRB935, PRB951) を用いて各種検査結果と比較したところ、パネル血清 PRB935 では、抗体陽転する 15 日前の血清において p24 陽性の結果が、また、パネル血清 PRB951 では、抗体陽転の 4 日前の血清に p24 陽性の結果が得られた (表 1)。これらの結果は HIV-1 p24 ELISA キットでの検査結果と合致した。さらに、この p24 検出能は HIV-1 陰性ヒト血清では阻止されなかった。加えて、抗体感作金コロイド溶液に添加した可溶性マウス IgG (HIV 非関連抗原に対する抗体) は 10~30 $\mu\text{g/ml}$ においてヒトの血清中に存在する異種抗体反応性を阻止することも併せて確認することができた。

4. 考 察

我々は、国産の HIV-1 抗原検出イムノクロマトキットのプロトタイプの作製に成功した (図 3)。現在のところ、プロトタイプの検出感度は、HIV-1 p24 サンドイッチ ELISA キットの 1/5 程度であるが、迅速で簡便な操作方法であるため、HIV の早期感染スクリーニング用キットとしてのメリットは非常に大きいと思われる。抗体陰性ウィンドー期をより短縮する目的で HIV-1 p24 抗原を検出する方法が重要視され、HIV 抗体検出法と同様に簡便で迅速な抗原検出法が模索されている。例えば Shon Workman らは、金コロイドの代わりに磁気ビーズを使用して HIV-1 p24 抗原を検出するイムノクロマト法について報告している³⁾。また、HIV 用パネル血清を用いた検討についても抗

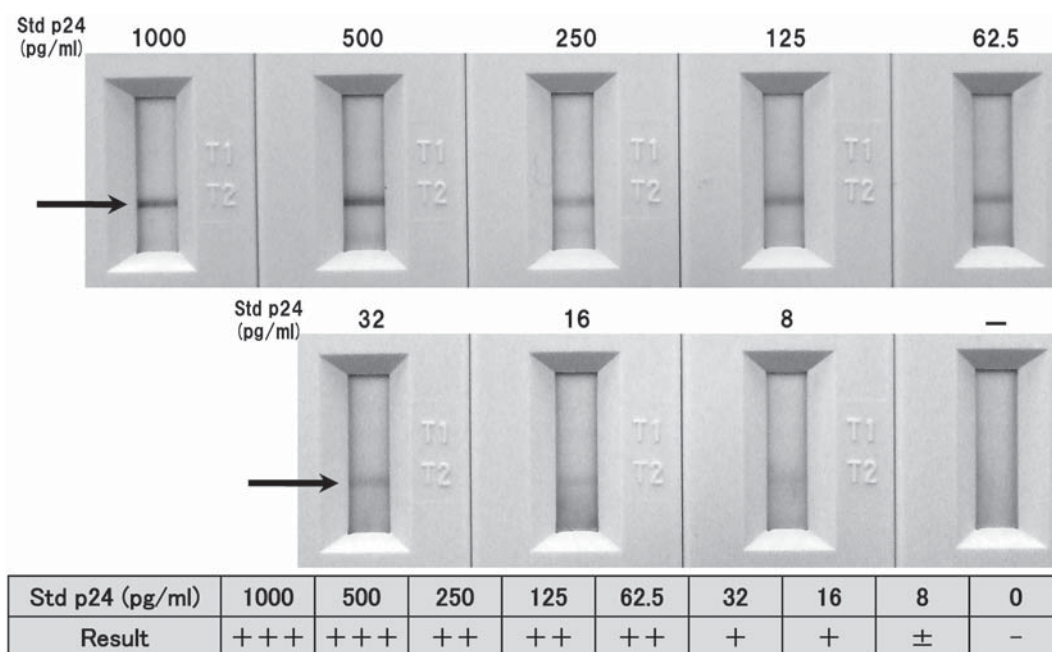


図 2 感度の検討

HIV-1 p24 標準液を各濃度に調製し、テストラインの抗体 (Ab-Mo1) を塗布した試作品 IC で感度を検討した。サンプル滴下後 30 分で 16 pg/ml まで目視による判定が可能であった。(写真: 30 分後)

表 1 Panel 血清を使用したイムノクロマトの評価

パネル	Sample No.	経過日数	抗体 検出 (市販品)	抗原 検出	Abbott 社 HIV-1/2 抗体検査 (COI)	Abbott 社 HIV-1 p24 検査 (COI)	HIV 遺伝子検査 (判定もしくは copies/mL)
AJ	PRB935-01	0	-	-	0.1	0.4	BLD
	PRB935-02	10	-	-	0.1	0.6	BLD
	PRB935-03	16	-	-	0.1	0.5	BLD
	PRB935-04	21	-	-	0.1	0.5	BLD
	PRB935-05	24	-	-	0.1	0.6	4×10^3
	PRB935-06	28	-	±	0.1	6.1	7×10^5
	PRB935-07	43	+	+	3.9	5.4	5×10^5
パネル	Sample No.	経過日数	抗体 検出 (市販品)	抗原 検出	Abbott 社 HIV-1/2 抗体検査 (COI)	Abbott 社 HIV-1 p24 検査 (COI)	HIV 遺伝子検査 (判定もしくは copies/mL)
BA	PRB951-01	0	-	-	0.2	0.5	BLD
	PRB951-02	2	-	-	0.2	0.5	BLD
	PRB951-03	8	-	-	0.3	1.0	2×10^5
	PRB951-04	11	-	-	0.2	5.7	1×10^6
	PRB951-05	15	-	++	0.4	22.0	5×10^6
	PRB951-06	19	-	+	8.4	14.9	2×10^6

抗原検出: 試作品 IC

パネル AJ では、30 分の反応では経過日数 28 日目で判定保留であった。パネル BA では抗体陽転の 4 日前には陽性の反応が確認できた。

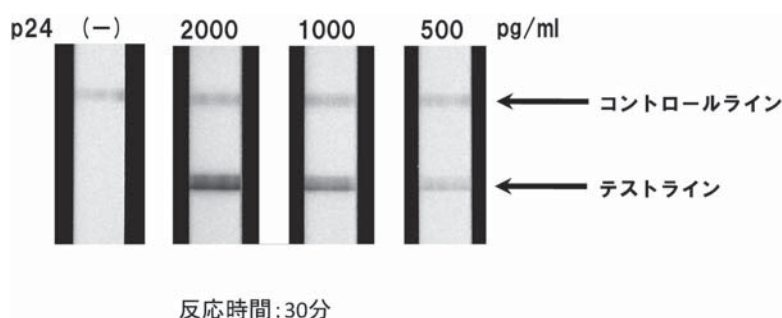


図3 HIV-1 p24 抗原検出用イムノクロマト (試作品)

テストラインには Ab-Mo1 をコントロールラインには GARAT を塗布した試作品 IC を作製した。左は展開液 (PBS) のみ, 右は PBS に p24 標準溶液を 2000~500 pg/ml に調製し展開, 反応させた。上記は反応開始から 30 分後の写真である。

体陽転より前の段階で検出が可能であることが示唆された。現時点では 2 ロットのみのパネル血清で試験した結果しか得られていないため, 今後さらに多くのパネル血清を用いて検討をする必要がある。また, HIV 陽性, HIV 陰性のサンプルを数多く試験し, データの蓄積を行っていくことも重要であると考えられる。また, 本キットの特徴として HIV-2 型 (HIV-2) p26 の検出も可能であるため, HIV-2 感染が広がるアフリカなどの地域での有用性も高いと考えられる (未発表)。

現在, 我々は, 抗原抗体検出用ハイブリッドタイプのイムノクロマトキットの研究・開発も進めており, イムノクロマトの作製条件の検討や感度, さらに HIV-1 p24 抗原

IC と同様に多くのサンプルを用いた検討を行っているところである。

文 献

- 1) エイズ発生動向年報 : <http://api-net.jfap.or.jp/mhw/survey/09nenpo/bunseki.pdf>
- 2) 原哲朗, 前田正彦 : イムノクロマト法の原理と応用. 臨床検査 54 : 79-83, 2010.
- 3) Workman S, Wells SK, Pau C-P, Owen SM, Dong XF, LaBorde R, Granade TC : Rapid detection of HIV-1 p24 antigen using magnetic immune-chromatography (MICT). Journal of Virological Methods, 160 : 14-21, 2009.

Development of a Rapid and Easy Semi-quantitative IC Kits for Detection of HIV-1 p24

Shihoko IMAMURA^{1,2)}, Reiko TANAKA¹⁾ and Yuetsu TANAKA¹⁾

¹⁾ Department of Immunology, University of Ruykyus

²⁾ Tropical Technology Center Ltd.

Objective & Methods : A number of rapid/easy immuno-chromatography tests (IC) for screening of HIV antibody have been commercially developed. However, these assays result in non-reactivity during the diagnostic window period between the actual infection by HIV and the production of antibodies by the infected persons. If the assays can simultaneously detect both anti-HIV antibodies and HIV antigens, the diagnostic window will be shortened by 1-3 weeks. Our laboratory has been successful in generating several anti-HIV-1 p24 mAbs from mice and rats. Using a pair of these mAbs, we have succeeded in preparation of the in-house p24 ELISA. This ELISA detects not only major HIV-1 types but also O-type HIV-1 as well as HIV-2 strains. In addition, a pair of mAbs can be used for IC using a colloidal gold method.

Result & Conclusion : Thus, by combining the commercial antibody-detecting IC, our p24 assay system may provides with new generation of IC with excellent capacity to detect antigens of various HIV-1 and HIV-2 strains. The prototypes of these new IC are ready and under validation for specificity and sensitivity.

Key words : HIV-1 p24, immuno-chromatography tests (IC), HIV antigen detecting IC, screening