

後天性免疫不全症候群（エイズ） /HIV 感染症  
病原体検出マニュアル

(2019 年 11 月改訂)

## 目次

1. はじめに
2. HIV 検査の概要
  - 2-1 HIV 体外診断薬の進歩
  - 2-2 HIV 検査フローチャート
3. HIV 検査プロトコール
  - 3-1 HIV スクリーニング検査
  - 3-2 HIV 確認検査（抗体）
4. HIV 核酸増幅検査
  - 4-1 PCR 検査室の設置
  - 4-2 定性法と定量法
  - 4-3 コンベンショナル RT-PCR とリアルタイム RT-PCR
  - 4-4 血漿検体からの RNA 抽出・精製法、濃縮法
  - 4-5 定性（コンベンショナル）RT-PCR 法
  - 4-6 定量（リアルタイム）RT-PCR 法
  - 4-7 HIV-2 の核酸増幅検査
  - 4-8 その他の核酸増幅検査
5. HIV 検査の精度管理
  - 5-1 NAT の標準品
  - 5-2 定性 NAT の管理検体（ランコントロール検体）
  - 5-3 定性 NAT の最小検出感度の決定と定性 NAT 陽性管理検体の作成法
  - 5-4 定量 NAT の定量可能範囲の決定
  - 5-5 定量 NAT 用管理検体（定量スタンダード）の作製

執筆者一覧

## 1. はじめに

後天性免疫不全症候群（AIDS）はヒト免疫不全ウイルス（Human Immunodeficiency Virus, HIV）を病原体とする慢性感染症である。HIVはHIV-1とHIV-2に分類されるが、日本におけるHIV感染者のうち99.9%以上はHIV-1による感染である。日本においては1984年からエイズ発生動向調査が開始され、日本国内で診断されたHIV感染者数が把握されている。1999年4月からは感染症法の改訂に伴い全数報告の五類感染症として扱われている。地方衛生研究所においては1987年から保健所又は医療機関からの検査依頼に対応するため、スクリーニング検査（ELISA法又はPA法）及び確認検査（IFA法又はWestern Blot法）を実施する体制の整備が開始された。1993年からはHIV検査が無料化され、特設検査の開設、即日検査、土日検査、夜間受付等の導入により広く国民にHIV検査機会が提供されるとともに、地方衛生研究所はこれらの検査対応の一翼を担っている。

2014年9月に国連合同エイズ計画（UNAIDS）は、2020年までに、全HIV感染者（未診断者を含む）の診断率を90%以上とし、そのうちの90%を定期的な受診に結びつけ、そのうち90%が有効な治療結果を得られることを目標とする「90-90-90」という行動目標を設定した。地方衛生研究所の立場としては、保健所等を中心としたHIV検査を正確かつ確実に実施し、医療機関の受診へと繋げなければならない。

本マニュアルでは2011年に作成したマニュアルを全面的に改訂し、保健所や特設検査場（保健所等）の無料匿名検査をバックアップするために、時代に即した検査マニュアルとして、地方衛生研究所で実施されるHIV検査の手順、検査法を中心に記載した。さらに、2018年末に新たな確認検査試薬（Geenius HIV 1/2キット）が承認されたため、その方法を加筆した。

## 2. HIV 検査の概要

### 2-1. HIV 体外診断薬の進歩

HIV の検査試薬はスクリーニング検査試薬と確認検査試薬に分かれる。スクリーニング検査試薬は、より高い感度・正確性を求めて開発が進められてきており、スクリーニング検査試薬の多くがこれに当たる（図 1）。一方で、確認検査試薬は、抗体検出試薬のもの、核酸増幅試薬のものがあり、それぞれについて原理と特徴を説明する。

スクリーニング検査試薬は第 1 世代から現在の第 4 世代まで改良が進んでいる。第 1 世代・第 2 世代試薬は、特異抗体の検出には酵素標識抗ヒト IgG が用いられ、抗原は第一世代ではウイルスが、第二世代では組換え抗原が用いられた。（図 1）。第 3 世代は、特異抗体の検出に酵素標識 HIV 抗原を用いる抗体検出試薬で、洗浄後に残存した非特異的ヒト IgG の検出によるバックグラウンドが低下したことと、IgG だけでなく IgM も検出できるようになったことで、正確性と感染初期の検出感度が飛躍的に高まった（図 1）。第 4 世代は、第 3 世代の試薬に HIV-1 p24 抗原の検出能を加えたもので、セロコンバージョン前のウイルス血症の時期も検出が可能になった（図 1）。

現在、国内で体外診断薬として承認を受け、スクリーニング検査試薬として一般に入手可能なものは、第 3 世代の粒子凝集（particle agglutination）法（PA 法）を除いて第 4 世代となっている。ただし、酵素免疫測定法（ELISA）あるいは化学発光免疫測定法（CLIA）を検出原理とする試薬の HIV-1 p24 抗原の検出感度が 10pg/mL 近傍（HIV-1 RNA コピー数で  $1 \times 10^5$  copies/mL 程度）であるのに対し、イムノクロマト法（IC）を検出原理とするものはその 1/5 以下で感染急性期の検出感度は必ずしも高くないため、検査試薬の選択の際に注意が必要である。

確認検査試薬として今まで用いられてきたウェスタンブロット（Western Blot, WB）試薬は、抗原としてウイルスタンパク質を用い、酵素標識ヒト IgG を用いて抗 HIV 特異的バンドの有無を判定する。（図 1）。HIV-1/HIV-2 のタンパク特異的な反応を検出できるゆえ正確性を求められる確認検査に適しているが、現在のスクリーニング検査試薬と比べて著しく感度が劣るばかりでなく、非特異的なバンドが検出されることがあり、結果の解釈には熟練を要する。また、イムノクロマト法を原理とする確認検査試薬（Geenius™ HIV-1/2 Confirmatory Assay、以下 Geenius HIV 1/2 キット）が WB 法に代わる検査法として新たに承認された。ウェスタンブロット法と比較し検出感度、特異性は向上し、検査に要する時間、機械を利用した検査結果の判定や結果保存（迅速性および精度の面）の面で HIV 確認検査法（抗体）として大きく進歩した。（3-2 「HIV 確認検査（抗体）について」

の項目に詳細に記載したので、ご一読いただきたい。）

核酸増幅検査（Nucleic acid Amplification Test, NAT）試薬は、PCR 法等を検出原理とする試薬である。高い感度と正確性を有する反面、コンタミネーションや少しの条件の差が測定結果に大きく反映される。現在は体外診断薬（定量試薬）として 3 品目が製造販売承認を受けている。

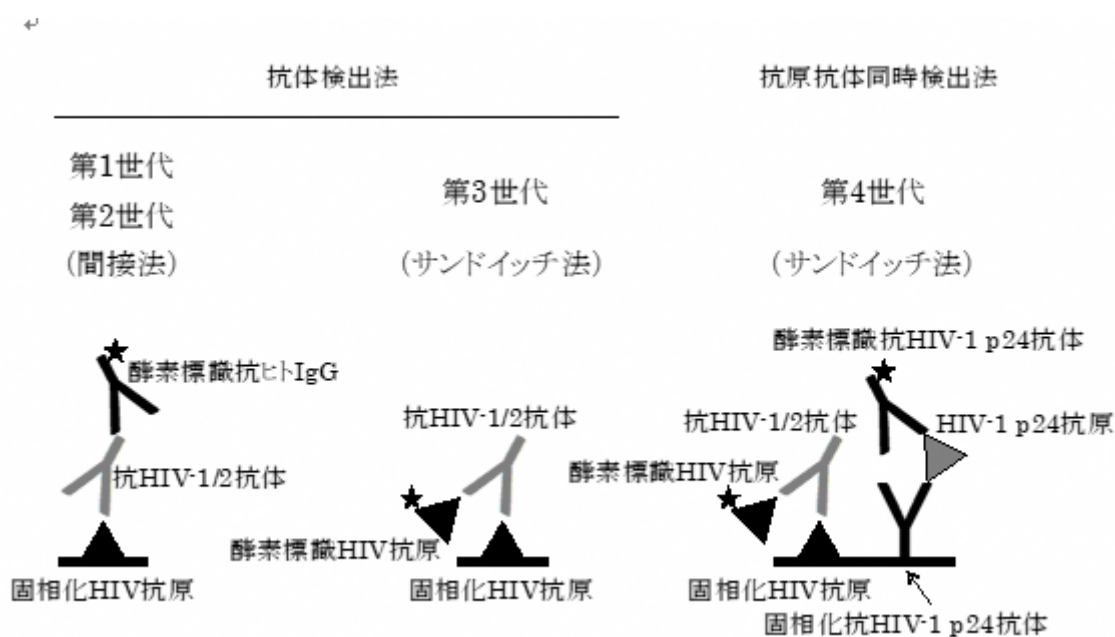


図 1. HIV スクリーニング検査試薬の進化

一般的に検査に使用されている検査試薬は、審査を経て製造販売承認を受けている。（表、添付文書に製造販売承認番号が記載されていることで確認できる。）これらの製品については、添付文書に従って使用している限り、その検査精度についてはメーカーによって担保されていると考えて良い。研究用試薬や in-house の検査法を用いる場合、その成績の取り扱いについて各施設で定めておくとともに、その検査の性能について外部に説明ができるよう、各検査施設で精度管理することが求められている。

薬事申請において、表 1 のスクリーニング検査試薬である【迅速診断用試薬】と、【確認検査用試薬】は区分される。確認検査用試薬はスクリーニング検査陽性検体から HIV-1/2 陽性検体を確認し偽陽性検体を排除する能力を中心に評価されるため、スクリーニン

グ検査試薬に求められる検出感度は必ずしも担保されていない。 正確な HIV 診断にむけ各施設において、次節「2.2. HIV 検査フローチャート」に沿った検査フローチャートを策定すべきである。

表 1：国内で製造販売承認を受けている HIV 診断用試薬

販売名	製造販売	検出原理
<b>【迅速診断用試薬】</b>		
ダイナスクリーン HIV Combo	アリアメディカル株式会社	イムノクロマト(IC)法
エスプライン HIV Ag/Ab	富士レビオ株式会社	イムノクロマト(IC)法
<b>【スクリーニング検査用試薬】</b>		
ジェネディア HIV-1/2 ミックス PA	富士レビオ株式会社	粒子凝集反応(PA)法
ランリーム HIV-1/2	シスメックス株式会社	粒子凝集反応(PA)法
エンザイグノスト HIV インテグラル II	シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス株式会社	酵素免疫測定(ELISA)法
エンザイグノスト HIV インテグラル IV	シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス株式会社	酵素免疫測定(ELISA)法
ジェンスクリン HIV Ag-Ab ULT	バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社	酵素免疫測定(ELISA)法
HIV Ag/Ab コンボアッセイ・アポット	アポット ジャパン株式会社	化学発光免疫測定(CLIA)法
エクルーシス試薬 HIV combi PT	ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社	電気化学発光免疫測定(ECLIA)法
ケミルミ Centaur-HIV-1,2 抗体	シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス株式会社	化学発光免疫測定(CLIA)法
ケミルミ Ag/Ab コンボ HIV	シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス株式会社	化学発光免疫測定(CLIA)法
ビトロス HIV Combo	オーソ・クリニカル・ダイアグノスティクス株式会社	化学発光酵素免疫測定(CLEIA)法
ルミパルス I HIV-1p24	富士レビオ株式会社	化学発光酵素免疫測定(CLEIA)法
ルミパルス HIV-1/2	富士レビオ株式会社	化学発光酵素免疫測定(CLEIA)法
ルミパルス HIV Ag/Ab	富士レビオ株式会社	化学発光酵素免疫測定(CLEIA)法
ルミパルスプレスト HIV-1/2	富士レビオ株式会社	化学発光酵素免疫測定(CLEIA)法
ルミパルスプレスト HIV Ag/Ab	富士レビオ株式会社	化学発光酵素免疫測定(CLEIA)法
HISCL HIV Ab 試薬	シスメックス株式会社	化学発光酵素免疫測定(CLEIA)法
HISCL HIV Ag+Ab 試薬	シスメックス株式会社	化学発光酵素免疫測定(CLEIA)法
バイダス アッセイキット HIV デュオ II	ビオメリュー・ジャパン株式会社	蛍光酵素免疫測定(ELFA)法
スフィアライト HIV Ag/Ab	三洋化成工業株式会社	化学発光酵素免疫測定(CLEIA)法
アキュラシード HIV Ag/Ab	三洋化成工業株式会社	化学発光酵素免疫測定(CLEIA)法
<b>【確認検査用試薬】</b>		
Geenius HIV 1/2 キット	バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社	イムノクロマト (IC) 法
ラブプロット 1	バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社	ウエスタンブロット(WB)法
ラブプロット 2	バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社	ウエスタンブロット(WB)法
<b>【HIV-1 RNA 増幅定量用試薬】</b>		
アキュジーン m-HIV-1	アポット ジャパン株式会社	リアルタイム PCR 法
コバス TaqMan HIV-1 「オート」 v2.0	ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社	リアルタイム PCR 法
コバス 6800/8800 システム HIV-1	ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社	リアルタイム PCR 法
アプティマ HIV-1	ホロジックジャパン株式会社	核酸増幅 (TMA) 法

## 2-2. HIV 検査フローチャート

HIV 検査はスクリーニング検査と確認検査の2段階で行われる。従来はスクリーニング検査から確認検査までを地方衛生研究所で実施していたが、迅速検査等の普及により確認検査のみ実施する地方衛生研究所が増加している。各自治体の検査数、各施設の設備等に応じて様々な検査フローが想定されるが、ここでは代表的なものを上げ、基本的な方針、解釈をまとめておく（図2）。

### （1）スクリーニング検査

保健所等の即日検査等で陽性となり確認検査を依頼された場合であってもスクリーニング検査からの実施を推奨する。追加スクリーニング検査試薬は保健所等ですでに実施された検査と同等以上の感度を有するものが望ましい。その理由として、即日検査に用いられるイムノクロマトグラフィ法（IC法）は目視により判定する方法であるため判定が人により異なる可能性があること、またスクリーニング検査法では0.3～1.0%の偽陽性が認められることが挙げられる。追加スクリーニング検査を実施し、結果が陰性の場合には確認検査を実施せずに陰性と判定し、追加スクリーニング検査が陽性または判定保留の場合には確認検査に進む。

### （2）確認検査

確認検査には、ウエスタンブロット（WB）法（HIV-1、HIV-2）、Geenius HIV 1/2 キット、核酸増幅検査（NAT）法がある。

HIV 感染初期はウイルスが盛んに産生されるが特異的 IgG の産生は充分でないため WB や Geenius HIV 1/2 キット（抗体確認検査法）での検出が困難であるのに対し、NAT では HIV ゲノムが検出可能である。一方、ウイルスの複製が制御されている時には NAT での検出は難しいが、抗体確認検査では陽性となる。すなわち抗体確認検査と NAT を同時に実施しかついずれか一方が陰性であった場合には、スクリーニング検査の結果及び方法論を含め、検査結果を精査する必要がある。

日本においては HIV 感染者の 99.9%以上が HIV-1 の感染であり、HIV-2 流行地への渡航歴、被検者もしくはパートナーの国籍が HIV-2 流行地域である等のケースを除いては、HIV-1/2 の共感染の可能性は極めて低いと考えられる。（詳細は 3-2.HIV 確認検査（確認検査）、4-7.HIV-2 の核酸増幅検査の項を参照していただきたい。）



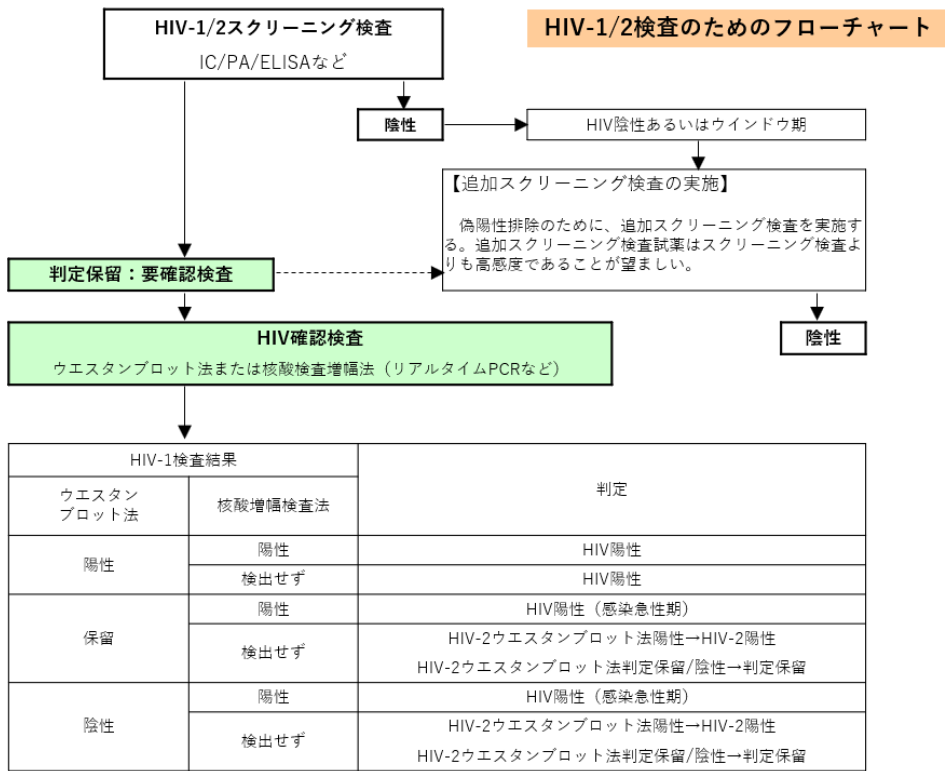


図 2 - 1. HIV 検査フローチャート（抗体確認検査として WB 法 を使用の場合）

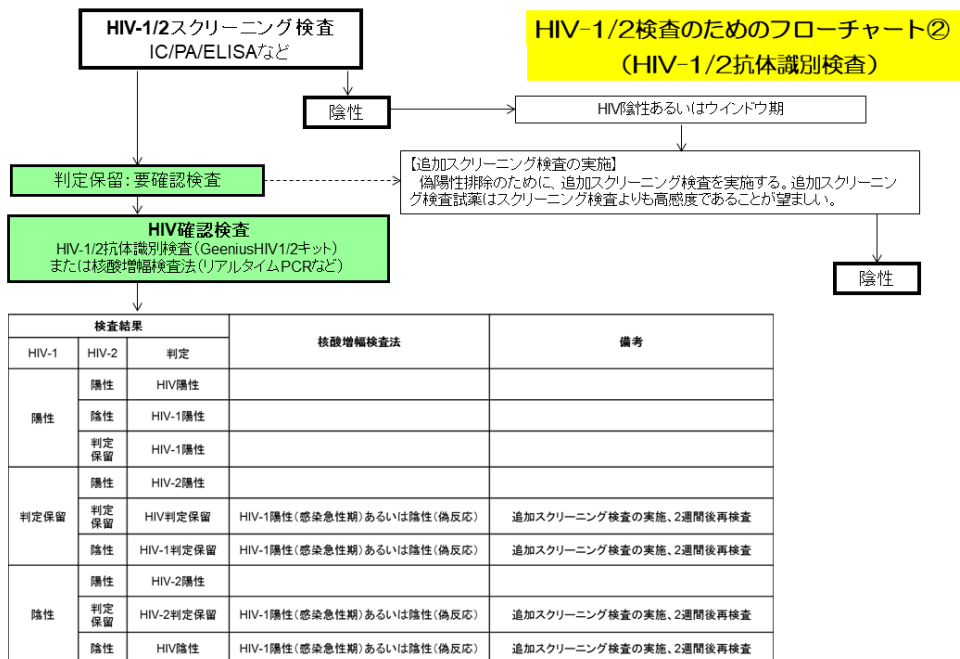


図 2 - 2. HIV 検査フローチャート（抗体確認検査として Geenius HIV 1/2 キット を使用の場合）

### 3. HIV 検査プロトコール

地方衛生研究所で行われる HIV 検査は、①地方衛生研究所でスクリーニング検査から確認検査まで実施する場合と、②保健所等で IC 法などによるスクリーニング検査で陽性となった検体を対象に確認検査を実施する場合に大別される。どちらの場合であっても、**3-1.HIV スクリーニング検査**から読み進めて頂きたい。

#### 基本的な考え方

- (1) スクリーニング検査（追加スクリーニング検査を含む）を実施し、陰性の場合には確認検査を実施せずに、陰性と判定する。追加スクリーニング検査は最初に用いた検査試薬と同等以上の感度の試薬を推奨する。
- (2) スクリーニング検査を実施し、陽性の場合には確認検査に進む。確認検査は①ウエスタンブロット (WB) (HIV-1、HIV-2) あるいは **Geenius HIV 1/2** キットを行い、次に②核酸増幅検査 (NAT) (HIV-1) を行うか、もしくは①および②を同時に行う方法がある。ウイルス量が多く HIV 特異的抗体の産生が充分でない感染初期検体では、WB 法や **Geenius HIV 1/2** キットでの抗体検出／判定が困難な場合があるのに対し、NAT での検出が可能な場合がある。一方で、ウイルス量が極端に少ない場合は NAT では検出できないが、WB や **Geenius HIV 1/2** キットでは抗体陽性となり確定できる場合がある。抗 HIV 治療中で血中 HIV 量が検出限界以下の HIV 陽性者が知人に誘われて断りきれなかった、梅毒検査を受けたかった等、何らかの事情により検査を受けることもありうるため、NAT のみ実施することは推奨しない。

#### 3-1. HIV スクリーニング検査

##### (1) HIV 検査試薬の選択

HIV スクリーニング検査には、IC 法、ELISA 法、CLIA 法等を検出原理とするものが用いられる。保健所等の即日検査では、利用者の利便性を高め、受検者数を増やすため、IC 法が広く用いられている。

追加スクリーニング検査では、スクリーニング検査で用いた試薬と同等以上の感度を有する ELISA 法、CLIA 法、ECLIA 法、ELFA 法等が推奨される。多検体処理を求められる施設では、ELISA 法か CLIA 法が望ましいが、専用の反応・測定装置を購入可能であれば、CLIA 法がより簡便で早く結果を得ることが可能である。PA 法も検出装置を必要ないことから追加スクリーニング試薬として候補に挙がる。しかしながら使用の際は検出感度の観点から、第 4 世代の IC 法で抗原陽性・抗体陰性という結果が得られた検体は、PA

法では陰性と判断される可能性が高いことを留意すべきである。

## (2) IC法の感度・特異性

IC法は近年、感度の向上、偽陽性率が改良され、現在は広く用いられる検査試薬の一つとなっている。その反面、目視による判定であることから、判定に迷う場合や結果の解釈が異なる場合も有りうる。前述のように一定の偽陽性もあるため、IC法でバンドが不明瞭な場合にはIC法以外の検査試薬による追加スクリーニング検査の実施が望ましい。

IC法も p24 抗原と抗体の同時検出が可能になっているが、ELISA法やCLIA法の検査試薬に比べ p24 抗原の検出感度は劣る。しかしながら IC法の抗原検出感度の上昇に伴い、近年ではIC法にて抗原のみ陽性となる例も増えつつある。抗体検出感度についてはPA法と同程度である<sup>1)</sup>。

## (3) 追加スクリーニング検査の必要性

スクリーニング検査ではそれぞれの検査法により 0.3%~1%の偽陽性が認められる<sup>1,2)</sup>。保健所等の検査における確認検査後の平均 HIV 陽性率は 0.38% (2017 年) であることを考慮すると、スクリーニング検査で陽性と判定された検体は多くの偽陽性を含んでいる可能性が高い<sup>2)</sup>。また、スクリーニング反応で偽陽性を示す検体は抗体確認検査についても同様に偽反応を示すことが多く、結果として最終的な診断結果に結びつかない検体が少なくない。HIV 陽性率の低い集団において効率よく検査を進めていくためには、確認検査の前に感度の高い追加スクリーニング検査を実施し、偽陽性検体の HIV 感染を否定しておくことが有効である。

(注) 2015 年東京都内で実施した即日検査 (IC 法) 陽性 (判定保留) 例のうち確認検査陽性率は 71.4%であった<sup>3)</sup>。その一方、妊婦においてはスクリーニング検査結果が陽性となった妊婦の確認検査陽性率は数%にすぎないと報告がある (スクリーニング検査陽性検体中の確認検査陽性率: 2003 年 3.8%<sup>4)</sup>、2012 年 6.5%<sup>5)</sup>)。

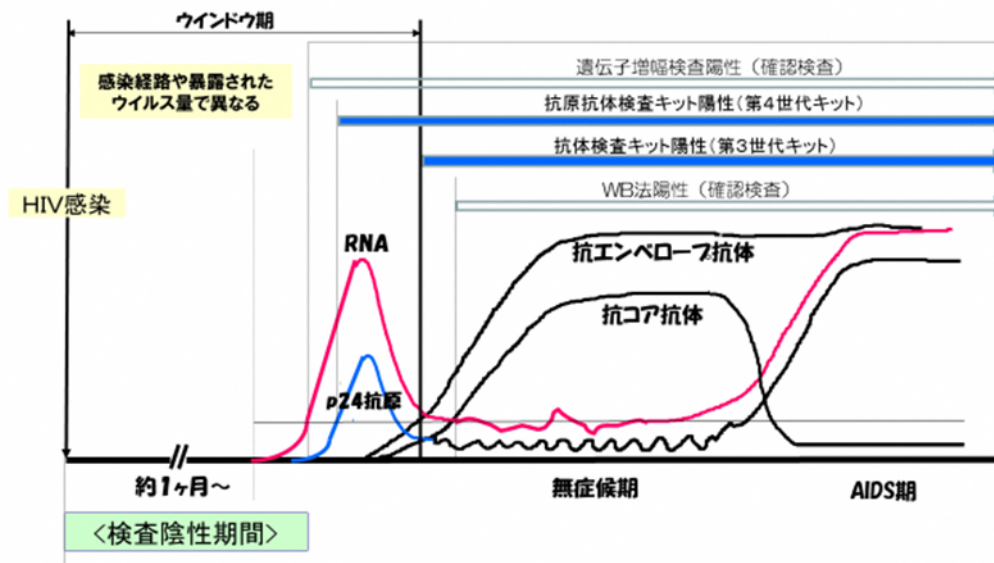


図3 HIV感染における抗原・抗体の推移とHIV検査

#### (4) 感染急性期検体の場合

感染急性期の事例では血中ウイルス量が多く、HIV特異的抗体の産生が充分でない。この場合、抗体のみを検出する第3世代検査試薬の測定値は低値となることが多いが、第4世代検査試薬は抗原と抗体の測定値を合算するため必ずしも低値とは限らない。また、このような検体は後述する抗体のみを検出する検査（WBまたはGeenius HIV 1/2キット）を実施した場合、陰性もしくは判定保留となることが多い。そのため、「スクリーニング検査陽性、追加スクリーニング検査陽性、かつWBあるいはGeenius HIV 1/2キットが、陰性または判定保留」の場合には、NATが必要となる。（図2-1、2）。

### 3-2. HIV 確認検査（抗体）

スクリーニング検査で陽性の場合、確認検査を行う。後述する偽陽性の問題や治療中のHIV感染者が検査対象に含まれる可能性等を考慮すると、特殊な場合を除き、追加スクリーニング検査を実施せずに確認検査を行うべきではない。確認検査の依頼であっても、追加スクリーニング検査を実施することで、最終判定に役立つ。

確認検査法として、抗体を検出するWB法およびGeenius HIV 1/2キットとHIV遺伝子を検出するNAT法があるが、地方衛生研究所で実施する検査手順としては、コスト面を考慮すると初めにWBあるいはGeenius HIV 1/2キットを用いて検査を行い、判定できなかった検体についてNATの実施を推奨する。

Geenius HIV 1/2 キットは WB 法に比べ感度が高く判定保留が少なくなることが期待されるが、偽反応も報告されている<sup>6,7)</sup>。

## (1) ウェスタンブロット (WB) 法

- ・ラブブロット 1 (バイオ・ラッド) [WB1 法]
- ・ラブブロット 2 (バイオ・ラッド) [WB2 法]

### 1) 判定基準

陽性コントロールのバンドの見え方を図 4 に示す。検査試薬の説明書によると、WB1 では「ENV に対するバンド 3 本中 2 本以上検出された場合 (WHO 判定基準) : HIV-1 陽性」、WB2 では「ENV、GAG、POL のバンドすべてが検出された場合 : HIV-2 陽性」と判定基準が示されている。ただし、後述するが、WB は交差性による影響が表れやすく、HIV-1 陽性者の WB2 の検出バンドを甘く読むと判定基準を満たしてしまう場合がある。HIV-1 の WB2 における交差性や日本における HIV-2 の流行がみられない現状を考えると、HIV-2 陽性の可能性は低いと考え、WB2 の判定は WHO の判定基準に従い「ENV に対するバンド 3 本中 2 本以上検出された場合 (WHO 判定基準) : HIV-2 陽性」とすることを推奨する<sup>8)</sup>。

ENV に対するバンドとは、HIV-1 では GP160,GP120,GP41 であり、HIV-2 では GP140,GP105,GP36 である。

### 2) 判定時に考えること - 交差反応性とは

HIV-1 および HIV-2 ではアミノ酸配列の相同性が高い領域が存在する。WB 法は各ウイルスを電気泳動しニトロセルロース膜に転写したものであるため、類似の立体構造をとる領域では抗体がエピトープを認識し偽陽性バンドとして現れる。それゆえ WB における HIV-1, HIV-2 の交差反応は完全に排除することはできない。

例えば、図 4 の中央に示す画像は、WB1 では判定基準を満たすバンドが検出され「HIV-1 陽性」と判定できるが、WB2 でもバンドが複数検出されている。交差反応によるバンドは GAG や POL にみられることが多く、POL のバンド (P34) を ENV のバンド (GP36) としてとらえてしまうと、検査試薬の判定基準では「HIV-2 陽性」の基準を満たしてしまう。この検体の場合、WB2 では ENV (GP140, 105) のバンドは見られておらず、HIV-2 に対する抗体の WB2 における交差反応性を示すものである。

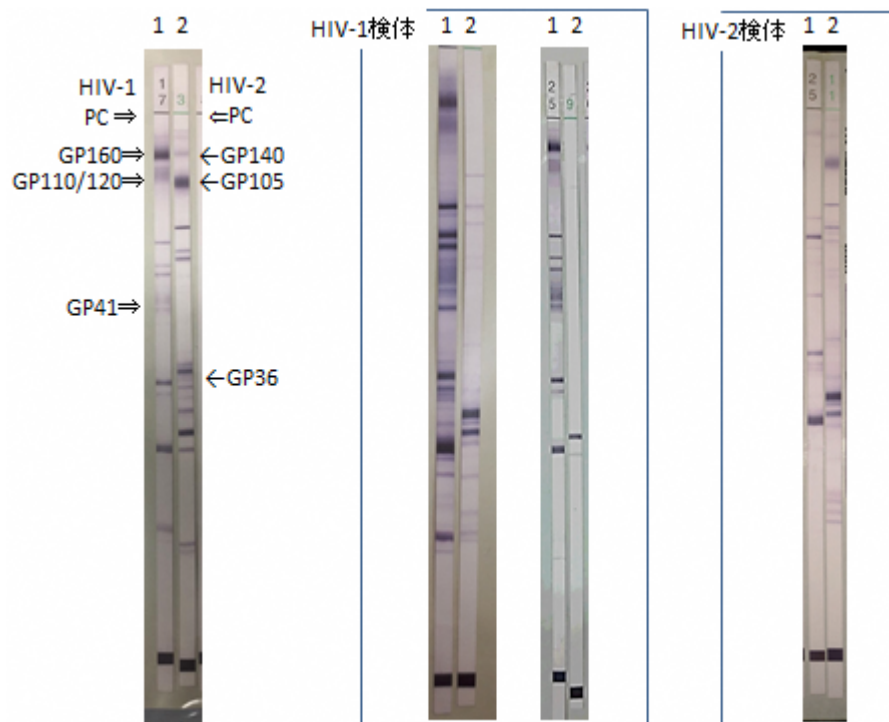


図4 WB法によるバンドパターン

図4の右側に示す画像は、HIV-2検体のWBである。WB2ではENVのバンドであるGP140,GP105,GP36が確認され「HIV-2陽性」と判定できるが、WB1法ではGP160のバンドやp24等が確認されるものの「HIV-1陽性」とは判定できない。

日本における感染者の99.9%以上はHIV-1であり、WB2に対し交差性がみられないHIV-1陽性血清は非常に稀である。このことから、HIV-2のWBの判定においても、WHO判定基準「ENVに対するバンド3本中2本以上検出された場合:HIV-2陽性」ことを推奨する。繰り返しになるが、交差反応を考慮し、WB1とWB2のどちらが優位に検出されているか(=陽性なのか)という視点を考慮して総合判定を考える必要がある。

### 3) ウエスタンブロット (WB) の感度と特異性

WBの感度はスクリーニング検査試薬よりも低いため、追加スクリーニング検査陽性で、WBで判定がつかない場合(「判定保留」または「陰性」)、単純に「HIV陰性」とはしない。このような検体の多くは感染初期の可能性が疑われることから、HIV-1のNATの実施を推奨する。感染急性期で抗HIV抗体の産生が不十分のためWB法では陰性であっても、HIV-1のNATで陽性となる。また、第4世代HIVスクリーニング検査試薬等の抗原検査では

HIV-2 は検出できないことから、HIV-2 の感染初期例が検出される可能性は低い。実際に血清学的に HIV-2 感染が確認された例でも約半数は血中ウイルス量が検出限界以下との報告もあるゆえ、HIV-2 の感染診断として NAT が必ずしも有効ではない。HIV-1 か HIV-2 かの判断も重要であるが、HIV 感染の有無を正確に判定することを優先すべきである。

WB の特異性に関しては、HIV 陰性の検体のうち約 10%にはなんらかのバンドが検出されるため、スクリーニング検査の段階で十分に精査された上で WB を実施することが重要である（注）。

（注） 発売されている WB 試薬のニトロセルロース膜上には crude（粗精製）な状態で HIV 抗原タンパク転写されている。そのため HIV 抗体陰性の検体でも 10%程度はメンブレン上の蛋白と反応し、何らかのバンドを示すことが報告されている。

## （2）Geenius HIV 1/2 キット

・ Geenius HIV 1/2 キット（バイオ・ラッド）

HIV-1 抗体及び HIV-2 抗体の有無を判断するデバイス状のイムノクロマト法を原理としたキットである。テストエリアとして 6 本、コントロールエリアとして 1 本のバンドの有無で判定する。HIV-2 についてはバンド 1、2 の 2 本（gp36、gp140）、HIV-1 についてはバンド 3～6 の 4 本（p31、gp160、p24、gp41）、そして検査コントロールとして 1 本である。

### 1) 判定基準

各判定基準は次の通りであり（表 2）、目視判定も可能とされるが、検査の精度管理上（判定結果の解釈、保存等）、専用機器の Geenius リーダーを用いて判定することを推奨する。検査日、ロット番号、検査結果（各バンドの有無、判定、デバイス画像、判定結果）が PC 内に PDF として保存され、WB でみられる検査術者間でしばしば発生する判定の違いは避けられる。検査例として図に示したので、参照されたい（図 5-1～5-5）。また、機器の管理として、内蔵コントロールや外部コントロール等（試薬のロットが変わった場合等）を使用した精度管理を実施することが可能である。

表2 Geenius HIV 1/2 キットの判定規準

HIV-1 抗体の判定基準	
陽 性	バンド3、4、5、6のうち、4 (gp160) 又は6 (gp41) のいずれかを含む2本以上のバンドが認められる場合。
陰 性	バンド3、4、5、6のいずれも認められない。
判定保留	上記、陽性及び陰性でない場合。
HIV-2 抗体の判定基準	
陽 性	バンド1、2のうち、2本すべて (1:gp36、2: gp140) のバンドが認められる。
陰 性	バンド1、2が認められない。
判定保留	上記、陽性及び陰性でない場合。

表3 Geenius HIV 1/2 キットでの最終結果判定

HIV-1 結果	HIV-2 結果	最終結果判定
陰性	陰性	HIV 陰性
陰性	判定保留	HIV-2 判定保留
判定保留	陰性	HIV-1 判定保留
判定保留	判定保留	HIV 判定保留
陽性	陰性	HIV-1 陽性
陽性	判定保留	HIV-1 陽性
陰性	陽性	HIV-2 陽性
判定保留	陽性	HIV-2 陽性
陽性 Case 1: 1本のENVバンド+GAGあ るいはPOLバンドが1本 Case 2: 2本のENVバンド +/- GAG and/or +/- POL	陽性	Case 1: HIV-2 陽性 (HIV-1 交差反応) Case 2: HIV 陽性 型別不能



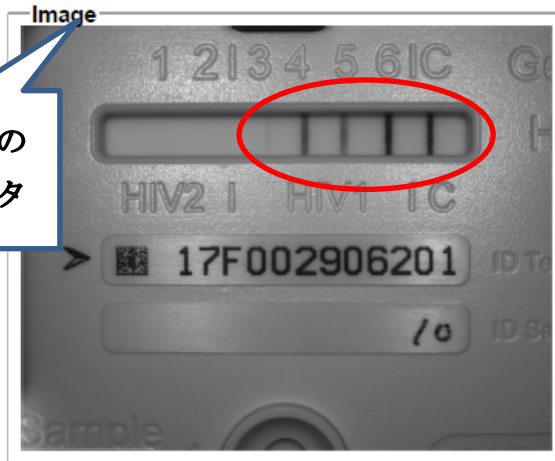
## Geenius HIV 1/2

Sample ID: 10  
 Cassette ID: 17F002906201  
 Kit Lot - Exp. Date: 7F0029 - 5/2/2019  
 Order date: 12/12/2018 17:18:53  
 Analysis date: 12/12/2018 17:18:55  
 Test run by: Supervisor -  
 Test version: 1.2-OUS  
 Rule(s): HIV-2 Criteria - HIV-1 Criteria

Reader S/N: DP6H011108  
 Geenius version: 1.2.201.001  
 Last Calibration: 12/12/2018 15:37:45

### Controls

Lot number: NC18A0033190109  
 Last run on: 12/12/2018 11:20:19  
 Lot number: PC18A0033190109  
 Last run on: 12/12/2018 11:21:01



### Interpretation

Interpretation type: Automatic

Band analysis:

#	Name	Result
1	gp36	Absent
2	gp140	Absent
3	p31	Present
4	gp160	Present
5	p24	Present
6	gp41	Present
7	CTRL	Present

Conclusion: HIV-1 POSITIVE

Status: Validated by: Supervisor -

最終結果判定

図 5-1 Geenius リーダーを用いた判定結果の例 (HIV-1 陽性例)

HIV-1 WB で陽性の検体である。リーダーではバンド 3-6 を検出し、最終判定は「HIV-1 POSITIVE」である。検出画像データではバンド 4 から 6 がはっきりと見えるが、バンド 3 (p31) は薄い。

## Geenius HIV 1/2

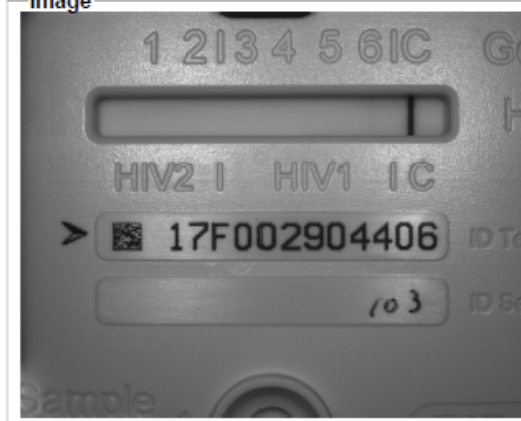
Sample ID: 103  
Cassette ID: 17F002904406  
Kit Lot - Exp. Date: 7F0029 - 5/2/2019  
Order date: 12/14/2018 18:04:07  
Analysis date: 12/14/2018 18:04:09  
Test run by: Supervisor -  
Test version: 1.2-OUS  
Rule(s): HIV-2 Criteria - HIV-1 Criteria

Reader S/N: DP6H011108  
Geenius version: 1.2.201.001  
Last Calibration: 12/14/2018 17:22:16

### Controls

Lot number: NC18A0033190109  
Last run on: 12/12/2018 11:20:19  
Lot number: PC18A0033190109  
Last run on: 12/12/2018 11:21:01

### Image



### Interpretation

Interpretation type: Automatic

### Band analysis:

#	Name	Result
1	gp36	Absent
2	gp140	Absent
3	p31	Absent
4	gp160	Absent
5	p24	Absent
6	gp41	Present
7	CTRL	Present

**Conclusion:** HIV-1 INDETERMINATE

Status: Validated by: Supervisor -

図 5-2 Geenius リーダーを用いた判定結果の例 (HIV-1 判定保留)

WB で陰性、HIV-1 核酸増幅検査陽性の検体である。リーダーではバンド 6 のみ (gp41) を検出し、最終判定は「HIV-1 INDETERMINATE」である。検出画像データではバンド 6 がはっきりとは見えない。

## Geenius HIV 1/2

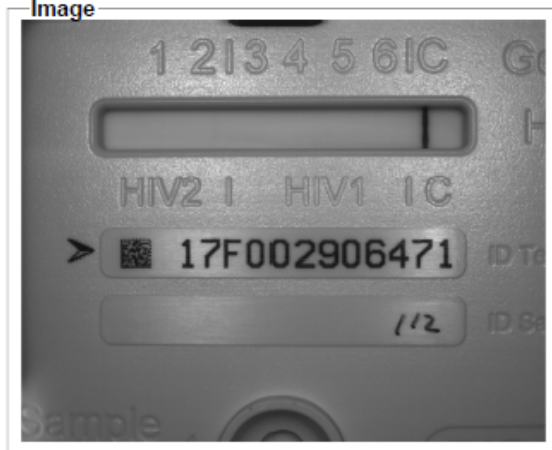
**Sample ID:** 112  
**Cassette ID:** 17F002906471  
**Kit Lot - Exp. Date:** 7F0029 - 5/2/2019  
**Order date:** 12/14/2018 18:27:25  
**Analysis date:** 12/14/2018 18:27:27  
**Test run by:** Supervisor -  
**Test version:** 1.2-OUS  
**Rule(s):** HIV-2 Criteria - HIV-1 Criteria

**Reader S/N:** DP6H011108  
**Geenius version:** 1.2.201.001  
**Last Calibration:** 12/14/2018 17:22:16

### Controls

**Lot number:** NC18A0033190109  
**Last run on:** 12/12/2018 11:20:19  
**Lot number:** PC18A0033190109  
**Last run on:** 12/12/2018 11:21:01

### Image



### Interpretation

**Interpretation type:** Automatic

### Band analysis:

#	Name	Result
1	gp36	Absent
2	gp140	Present
3	p31	Absent
4	gp160	Absent
5	p24	Absent
6	gp41	Absent
7	CTRL	Present

**Conclusion:** HIV-2 INDETERMINATE

**Status:** Validated **by:** Supervisor -

### 図 5-3 Geenius リーダーを用いた判定結果の例 (HIV-2 偽反応例)

ICによる検査陽性（追加スクリーニング検査陰性）、HIV-1 核酸増幅検査陰性、WB 陰性の検体である。リーダーではバンド2のみ（gp140）を検出し、最終判定は「HIV-2 INDETERMINATE」である。検出画像データではバンド2ははっきりとは見えない。本結果は偽反応と思われる。HIV-2の核酸増幅検査は、感染診断に必ずしも有効ではないため（4-7参照）、追加スクリーニング検査の実施を考慮する（3-1(3)）。

## Geenius HIV 1/2

**Sample ID:** 256  
**Cassette ID:** 17F002906269  
**Kit Lot - Exp. Date:** 7F0029 - 5/2/2019  
**Order date:** 2/22/2019 19:31:37  
**Analysis date:** 2/22/2019 19:31:39  
**Test run by:** Supervisor -  
**Test version:** 1.2-OUS  
**Rule(s):** HIV-2 Criteria - HIV-1 Criteria

**Reader S/N:** DP6H011108  
**Geenius version:** 1.2.201.001  
**Last Calibration:** 2/22/2019 19:16:16

### Controls

**Lot number:** NC18A0033190109  
**Last run on:** 12/12/2018 11:20:19  
**Lot number:** PC18A0033190109  
**Last run on:** 12/12/2018 11:21:01

### Image



### Interpretation

**Interpretation type:** Automatic

**Band analysis:**

#	Name	Result
1	gp36	Absent
2	gp140	Absent
3	p31	Absent
4	gp160	Absent
5	p24	Absent
6	gp41	Absent
7	CTRL	Present

**Conclusion:** HIV NEGATIVE

**Status:** Validated **by:** Supervisor -

### 図 5-4 Geenius リーダーを用いた判定結果の例 (Geenisu 陰性、HIV-1NAT 陽性例)

IC による検査陽性 (追加スクリーニング検査陽性)、HIV-1 核酸増幅検査陽性、WB 陰性の検体である。バンドが検出されず陰性の結果であるが、第 4 世代スクリーニング検査陽性の場合には、HIV-1 核酸増幅検査の実施が必要である。IC のみの結果で、Geenius HIV-1/2 キットを実施し本結果の場合、追加スクリーニング検査 (第 4 世代キット) を実施する。

## Geenius HIV 1/2

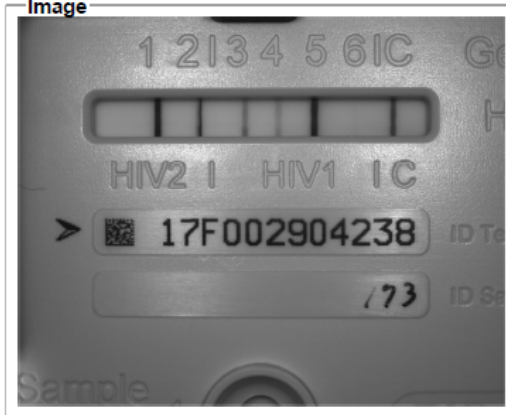
**Sample ID:** 173  
**Cassette ID:** 17F002904238  
**Kit Lot - Exp. Date:** 7F0029 - 5/2/2019  
**Order date:** 12/26/2018 14:59:35  
**Analysis date:** 12/26/2018 14:59:38  
**Test run by:** Supervisor -  
**Test version:** 1.2-OUS  
**Rule(s):** HIV-2 Criteria - HIV-1 Criteria

**Reader S/N:** DP6H011108  
**Geenius version:** 1.2.201.001  
**Last Calibration:** 12/26/2018 14:38:39

### Controls

**Lot number:** NC18A0033190109  
**Last run on:** 12/12/2018 11:20:19  
**Lot number:** PC18A0033190109  
**Last run on:** 12/12/2018 11:21:01

### Image



### Interpretation

**Interpretation type:** Automatic

**Band analysis:**

#	Name	Result
1	gp36	Present
2	gp140	Present
3	p31	Present
4	gp160	Present
5	p24	Present
6	gp41	Present
7	CTRL	Present

**Conclusion:** HIV POSITIVE - UNTYPABLE

**Status:** Validated **by:** Supervisor -

### 図 5-5 Geenius リーダーを用いた判定結果の例 (HIV 陽性-型別不能)

リーダーではバンド 1 から 6 を検出し、最終判定は「HIV POSITIVE - UNTYPABLE」である。検出画像データではバンド 6 (gp41) は薄い。このような検体の依頼の場合、まずは HIV 陽性として報告する。

## 2) Geenius HIV 1/2 キットの感度と特異性

文献報告<sup>6,7)</sup>によると Geenius HIV 1/2 キットは WB 法と比べ感度、特異性共に高い。ただし WB 法同様に抗体検査試薬であり、抗原の検出はできない。従って抗原抗体同時スクリーニング検査試薬陽性で、本試薬で陰性または判定保留の場合には核酸増幅検査 (HIV-1) が必要である。

また、WB 法と比較し頻度は低いものの WB 法でも認められる HIV 陰性検体においてもバンドが散見される (図 5-3)。Geenius HIV 1/2 キットを実施する前、もしくは当試薬で陰性または判定保留の場合、さらには HIV 核酸増幅検査が陰性の場合には追加スクリーニング検査 (抗原抗体同時スクリーニング検査) の実施を推奨する。

- 1) 川畑拓也ら、感染症学誌、87, 431-434, 2013
- 2) HIV 感染症「治療の手引き」第 22 版 (<http://www.hiv.jp.org/>)
- 3) 長島真美ら、病原微生物検出情報、37, 169-171, 2016
- 4) 山田里佳、嶋 貴子ら、日性感染症会誌、19, 122-126, 2008
- 5) HIV 母子感染予防対策マニュアル  
([http://api-net.jfap.or.jp/library/guideLine/boshi/images/H25\\_manual.pdf](http://api-net.jfap.or.jp/library/guideLine/boshi/images/H25_manual.pdf))
- 6) Kondo M, et al., PLoS ONE, 2018. 13(10): e0198924.
- 7) Nagashima M., et al. JJID (unpublished)
- 8) 草川茂 感染症学雑誌、93, 12-19, 2019

## 4. HIV 核酸増幅検査

HIV のウイルス遺伝子検査法として、核酸増幅検査 (Nucleic Acid Amplification Test, NAT) が行われる。市販の体外診断薬として「コバス TaqMan HIV-1 「オート」 V2.0、コバス 6800/8800 システム HIV-1 (以上ロシュ・ダイアグノスティックス)、アキュジーン m-HIV-1 (アボットジャパン) の 3 品目が定量試薬として製造販売承認を受けている。HIV-1 抗原・抗 HIV-1/2 抗体同時検出のいわゆる第 4 世代スクリーニング検査試薬が主流となった昨今、感染急性期でスクリーニング検査陽性・確認検査判定保留又は陰性となる例が増えており、高い検出感度と特異性を持つ NAT が必要になる例が増えている。

国内で製造販売承認を受けている ELISA を検出原理とする第 4 世代スクリーニング検査試薬の添付文書を見ると、ジェンスクリーン HIV Ag-Ab ULT (バイオ・ラッドラボラトリーズ) の HIV-1 p24 抗原検出感度は 25pg/mL 未満 (フランス国内標準品)、エンザイグノスト HIV インテグラル IV は 0.5IU/mL (WHO 国際標準品,  $\approx 12.5\text{pg/mL}$ )、12pg/mL (Bio-Rad 標準品)と記されている。CLIA を検出原理とする試薬もほぼ同等である。HIV-1 p24 抗原 10pg は HIV-1 RNA  $1 \times 10^5 \text{copies/mL}$  に相当する。HIV-1 核酸増幅定量試薬の定量値のばらつき ( $\pm 0.5\text{Log}$ ) を考慮しても、概ね  $5 \times 10^3 \text{copies/mL}$  の検体から抽出した HIV-1 RNA が安定して検出できる系であれば、感染急性期の確認検査法として有用であると考えられる。

NAT は高検出感度であるため、コンタミネーションによる偽陽性に十分注意を払う必要があると同時に、感染者の血漿に含まれる HIV-1 コピー数は、in-house 法で一般的に使用される血漿からの RNA 抽出検査試薬の使用では検出限界に近い数値になることも多いため、検査法の精度管理に十分な注意を払う必要がある。

市販の体外診断薬は、その添付文書の指示に従って精度管理を行う。本稿では、国立感染症研究所エイズ研究センターにおける行政検査、および NAT 検査用国際標準品制定協力の業務に対応する際に用いている、PCR 法を原理とする in-house NAT の紹介とその精度管理について概説する。

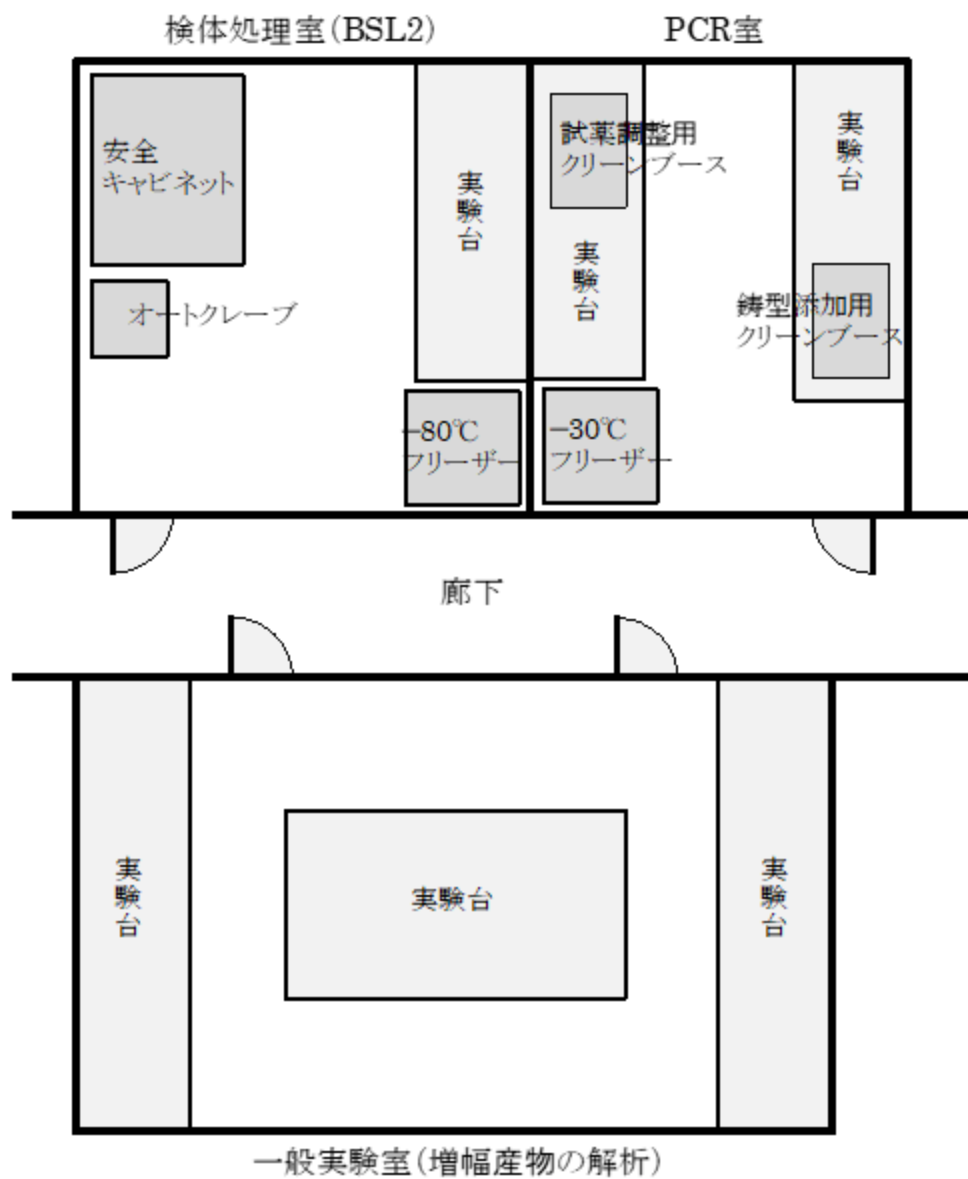
### 4-1. PCR 検査室の設置

PCR 検査を行う実験室では、①RNA 抽出用、②試薬調整用、③テンプレート添加用、④アガロースゲル電気泳動等の PCR 後の解析を行うスペースを設ける (図 5)。

RNA 抽出は臨床検体を用いるため、クラス II の安全キャビネットで行う。試薬調整用、テンプレート添加用の場所は、部屋を分けるのが理想的ではあるが、それぞれ専用の UV 照射が可能なクリーンブースを設置して、独立した場所を設ければ良い。PCR 後の解析を行うスペースは一般実験室で構わないが、PCR 検査室とは独立した場所に設定する。マイクロピペット等の器具やチップ等の消耗品も、それぞれの場所に専用のものを準備する。



(a)



(b)

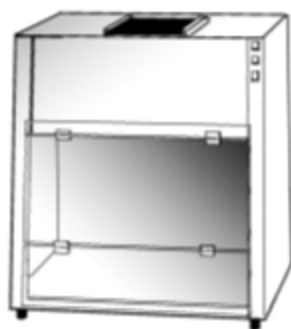


図 5 : 実験スペースの配置の 1 例(a)とクリーンブース(b)

## 4-2. 定性法と定量法

HIV の核酸増幅検査法には、病原診断に用いる定性（検出）法と、主に HIV 感染者の病態の進行や治療効果の確認等に用いられる定量（測定）法がある。

HIV のウイルス遺伝子定性検査法には、血漿中のウイルス RNA を検出する方法と、末梢血単核細胞(PBMC)由来 DNA を鋳型として用いるプロウイルスを検出する方法がある。一般的には血漿中 HIV-1 RNA を検出する方法を用いるが、新生児等で抗体検査が有効でなく、かつ検査に必要な血液量が採取できなかった場合には、プロウイルスの検出法が用いられることがある。いずれも国内で製造販売承認を受けた製品は無く、検査室レベルでの対応となる。

一方、HIV のウイルス RNA 定量法は、上記のようにリアルタイム PCR 法を原理とする 3 品目が体外診断薬として承認され市販されている。いずれも HIV-1 RNA 専用試薬であり、HIV-2 RNA には対応していないことに留意する必要がある。汎用のリアルタイム PCR 装置があれば、in-house の定量系を構築することも可能である。（詳細は 4-6. 定量（リアルタイム）RT-PCR 法で後述する。）

注：国内で販売されている核酸増幅検査試薬は、すべて定量試薬としての承認であり、法令上、感染診断を使用目的とした承認ではないので、結果の取り扱いについては各検査室において定めておく必要がある。「診療における HIV-1/2 感染症の診断ガイドライン 2008（日本エイズ学会・日本臨床検査医学会標準推奨法）」（日本エイズ学会誌 2009; 11: 70-72）では、確認検査（血清診断）陰性で HIV-1 RNA が検出された場合でも、確認検査（血清診断）が陽転するまでフォローアップすることが推奨されている。米国では「Aptima HIV-1 RNA Qualitative Assay（ホロジック社）」が定性試薬として FDA の認可を受けたため、CDC は HIV スクリーニング検査陽性、追加検査（抗体検査）で HIV-1 陰性あるいは判定保留、HIV-2 陰性となった場合の使用を推奨している。しかしながら、本キットは日本では販売されていない(2019 年 11 月時点)。

## 4-3. コンベンショナル RT-PCR とリアルタイム RT-PCR

コンベンショナル RT-PCR は検出法であり、一般的な RT-PCR 用試薬、サーマルサイクラー、アガロースゲル電気泳動装置と染色したゲルの撮影装置があれば実施でき、比較的安価な方法である。リアルタイム RT-PCR は検出法、定量法のいずれにも対応可能

であり、一般的により高感度であること、データ解析が自動的に行われて保存されるためトレーサビリティに優れていること、増幅産物確認作業を密閉した状態のまま増幅反応と並行して行うため、増幅後の PCR 産物によるコンタミネーションのリスクを低減することに有用である等、多くの利点がある。しかしながら、専用の反応測定装置の購入が必要で、機器のバリデーションや定期的な部品交換の必要があり相応のコストがかかる。各検査室の実情に応じて方法を選択する。

#### 4-4. 血漿検体からの RNA 抽出・精製法、濃縮法

国立感染症研究所エイズ研究センターでは、定性法・定量法のいずれの場合も同じ方法で抽出・精製・濃縮を行っている。使用法の詳細は各キットの添付文書を参照のこと。

##### 1) 検査検体の採取とコントロール

血液検体は EDTA 採血して得た血漿が望ましいが、ACD-A、CPD を使って採血した検体でも可能である。

定性法では陽性・陰性コントロール、定量法ではあらかじめ準備した陰性コントロールや定量スタンダードを用いる。(作製法は「5. 核酸増幅検査の精度管理」を参照。)

##### 2) RNA 抽出・精製キット

Nucleospin RNA Virus (タカラバイオ、マッハライナーゲル) と QIAamp Viral RNA Mini Kit (キアゲン) の簡易プロトコルを示した。国立感染症研究所エイズ研究センターでは、いずれも血漿検体 200 $\mu$ L から抽出するため、それに比例して検体の溶解に必要な溶液量を増やして使用している。試薬の準備や保存可能期間等の注意事項、トラブルシューティング等はキットの添付文書を参照のこと。

※ キットは各検査室で慣れたものを使用し、適切な陽性・陰性コントロール検体を用いて性能を確認しておく。キットにより回収効率や精製度が異なり、NAT の検出感度や定量可能範囲に影響を及ぼすため、キットを変更する時には、性能を再度確認する必要がある。

※ Nucleospin RNA Virus は High Pure Viral RNA Kit (ロシュ) と比べて手順が複雑であるが、RNA 回収効率に優れ、より低いコピー数まで検出できる。ただしキアゲン社とロシュ社のキットの方が低コピー数から高コピー数までの回収効率にばらつきが少ないなどの理由から、定量検査の時に常に適切な検量線が得られる傾向に

ある。

#### <方法>

##### **a. Nucleospin RNA Virus**

1. 2mL スクリューキャップチューブに検体各 200 $\mu$ L に RAV1 溶液 800 $\mu$ L を加え 10 秒間ボルテックス後スピンドウン。70 $^{\circ}$ C 5 分間インキュベーション。
2. スピンドウン後エタノール 800 $\mu$ L を加え、転倒混和後スピンドウン。
3. 2 を 600 $\mu$ L カラムに入れて遠心 8,000xg 1 分、コレクションチューブを交換。この操作を 3 回繰り返す、全量を 1 本のカラムにロードする。
4. カラムに RAW 溶液 500 $\mu$ L を入れて遠心 8,000xg 1 分、コレクションチューブを交換。
5. カラムに RAV3 溶液 600 $\mu$ L を入れて遠心 8,000xg 1 分、コレクションチューブを交換。
6. カラムに RAV3 溶液 200 $\mu$ L を入れて遠心 11,000xg 5 分、コレクションチューブを捨て、カラムを 1.5mL 回収用チューブにセット。
7. あらかじめ 70 $^{\circ}$ C にしておいた dH<sub>2</sub>O 50 $\mu$ L を入れて 2 分間静置後、11,000xg 1 分遠心し RNA を溶出。使用まで 4 $^{\circ}$ C、すぐに使用しない場合は -80 $^{\circ}$ C で保管。

##### **b. QIAamp Viral RNA Mini Kit**

1. 2mL スクリューキャップチューブに検体各 200 $\mu$ L にキャリア RNA を含む AVL 溶液 800 $\mu$ L を加え 15 秒間ボルテックス後スピンドウン。室温で 10 分間インキュベーション。
2. スピンドウン後エタノール 800 $\mu$ L を加え、転倒混和後スピンドウン。
3. 2 を 630 $\mu$ L カラムに入れて遠心 6,000xg 1 分、コレクションチューブを交換。この操作を 3 回繰り返す、全量を 1 本のカラムにロードする。
4. カラムに Buffer AW1 を 500 $\mu$ L 入れて遠心 6,000xg 1 分、コレクションチューブを交換。
5. カラムに Buffer AW2 を 600 $\mu$ L 入れて遠心 20,000xg 3 分、コレクションチューブを交換。
6. そのまま遠心 20,000xg 1 分遠心、コレクションチューブを捨て、カラムを 1.5mL 回収用チューブにセット。
7. Buffer AVE を 60 $\mu$ L 入れて 1 分間静置後、6,000xg 1 分遠心し RNA を溶出。使用まで 4 $^{\circ}$ C、すぐに使用しない場合は -80 $^{\circ}$ C で保管。

(注) 低コピー数のため RNA 抽出後に濃縮が必要となる検体に対し、国立感染症研究所エイズ研究センターでは 1 検体当たり 5 本のカラムを使用し、濾液を後述の RNA 濃縮キットを用いて濃縮しているが、1mL の検体からの RNA 抽出に対応しているキットとして、QIAamp Ultrasens Virus Kit (キアゲン) がある。ウイルスを含む沈殿を得る操作と沈殿物を溶解させる最初のステップにおいて、正確な操作が求められる。検体をあらかじめ高速冷却遠心 (一般的なマイクロチューブ用遠心機で 12,000-15,000rpm、1 時間、4℃) し、ウイルスをペレットダウンしてから RNA を抽出する方法も有効であるが、遠心後の上清を除去する際にペレットも除去してしまうリスクがあることを承知しておくべきである。

### 3) RNA 濃縮キット

**RNeasy MinElute Cleanup** (キアゲン) の簡易プロトコルを示しておく。詳細はキットの添付文書を参照のこと。

#### <方法>

1. RNA 抽出キットのろ液 200 $\mu$ L に対し Buffer RLT を 700 $\mu$ L 加えて混和。
2. スピンドアウン後エタノール 500 $\mu$ L を加え、ピペッティングにより混和、そのまま約 700 $\mu$ L をカラムに入れて遠心 8,000xg 15 秒、コレクションチューブを交換。この操作を 2 回繰り返す、全量を 1 本のカラムにロードする。
3. カラムに Buffer RPE を 500 $\mu$ L 入れて遠心 8,000xg 15 秒、コレクションチューブを交換。
4. カラムに 80%エタノールを 500 $\mu$ L 入れて遠心 8,000xg 2 分、コレクションチューブを交換。
5. そのまま遠心 20,000xg 5 分遠心、コレクションチューブを捨て、カラムを 1.5mL 回収用チューブにセット。
6. RNase free dH<sub>2</sub>O を 14 $\mu$ L 入れて 1 分間静置後、20,000xg 1 分遠心し RNA を溶出。使用まで 4℃、すぐに使用しない場合は-80℃で保管。

注 エタノールあるいはイソプロパノール沈殿法により濃縮しても構わないが、特に濃縮を必要とするような低コピー数 RNA の回収は技術的に難しいので、教育訓練を通じ同一検体の測定間誤差について検討しておくべきである。

#### 4-5. 定性（コンベンショナル）RT-PCR 法

##### 1) RNA の準備

臨床検体から抽出した RNA。

陽性・陰性管理コントロール用検体由来 RNA。

RNA 溶出に用いた緩衝液または dH<sub>2</sub>O（RNA 抽出操作は行わない）

※ 陽性コントロールとして、最小検出感度の 3 倍から 5 倍コピー数を含む臨床検体を用いる。RNA 抽出過程を含めた一連の操作のコントロールを目的としているため、常に臨床検体と陽性・陰性コントロールからの RNA 抽出操作を同時に行うこと。（陽性・陰性コントロールの作製方法は「5. 核酸増幅検査の精度管理」を参照。）

##### 2) プライマー

Forward primer:

gag-580A 5'-GAT GGG TGC GAG AGC GTC-3' (789-806 HXB2)

Reverse primer:

gag-581B 5'-TTC YAR CTC YCT GCT TGC CCA-3' (915-895 HXB2)

※ HIV-1 Group M だけでなく HIV-1 Group O にも対応できることを確認しているが HIV-2 には対応していない。

※ プライマーは一例で、各検査室で検討・準備されたもので構わないが、そのプライマーを用いる科学的合理性（判定一致率、サブタイプ/CRF への対応等）を明らかにしておくこと。

注 上記のプライマーペアを SYBR Green 試薬を用いたリアルタイム PCR 法に適用した場合、35 サイクル前後でバックグラウンドのシグナルが出現するので、リアルタイム PCR 法を原理とする臨床検体の HIV-1 RNA 検出・定量用としては推奨しない。

##### 3) RT-PCR キット

PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver. 2（タカラバイオ）

※ キットは各検査室で慣れたものを使用し、参照品を用いて最小検出感度の測定を行っておく。結果がばらつくリスクを減らすため、プレミックスタイプで逆転写反応と PCR を連続して行う事ができる試薬を推奨する。試薬を変更する時には、反応条件と最小検出感度を再検討する必要がある。（方法は「5. 核酸増幅検査の精度管

理」を参照。)

#### 4) 反応機器

PCR Thermal Cycler Dice Touch TP350 (タカラバイオ)

※ サーマルサイクラーは、日常各検査室で使用されているもので良い。機器の定期的な検査と陽性コントロールの検出結果により性能を担保する。機器を変更する時には、反応条件と最小検出感度をあらためて検討しておくこと。

#### <方法>

※ 詳細はキットに添付のプロトコルを参照のこと。

1. 以下のように RT-PCR 混合液を作製する。チューブ間の試薬濃度の誤差を少なくするため、検体数に応じてマスターミックスを作製し分注する。

dH <sub>2</sub> O	5.9μL
2x 1step buffer	10.0μL
10μM Forward primer	0.4μL
10μM Reverse primer	0.4μL
PrimeScript 1step Enzyme Mix	0.8μL
検体 RNA	2.5μL

2. サーマルサイクラーにセットし、以下の条件で反応を行う。

50℃ 15分→94℃ 2分→(94℃ 30秒→60℃ 15秒→72℃ 30秒) x 40 サイクル  
→72℃ 7分→4℃

3. 反応後に 5μL を 2%アガロースゲル電気泳動し、増幅産物を確認する。陽性コントロールが陽性、陰性コントロールが陰性である事を確認し、臨床検体の結果を判定する。

#### 4-6. 定量 (リアルタイム) RT-PCR 法

KK-TaqMan 法の条件を改変した方法を含む 2 種類の方法を紹介する。KK-TaqMan 法の詳細については次のリンクを参照されたい。

([http://www.chieiken.gr.jp/manual01/HIV/KK-TaqMan\\_hiv\\_2011.pdf](http://www.chieiken.gr.jp/manual01/HIV/KK-TaqMan_hiv_2011.pdf))

##### 1) RNA の準備

臨床検体から抽出した RNA。

定量スタンダード検体由来 RNA、または定量スタンダード核酸と管理検体由来 RNA。

※ 国立感染症研究所エイズ研究センターでは、定量スタンダード検体を、RNA 抽出過程を含めた一連の操作のコントロールとして位置付け、得られた検量線の Slope 値、決定係数 ( $R^2$ )、直線性をもって毎回の検査の妥当性を評価し、常に臨床検体と定量スタンダード検体からの RNA 抽出操作を同時に行っている。定量スタンダードとして、あらかじめ抽出・精製した核酸を用いている場合には、RNA 抽出過程を含めた操作のコントロールとして、定量上限及び下限に近いコピー数の高値陽性及び低値陽性コントロールを設定して臨床検体と同時に RNA 抽出と PCR を行い、定量結果の妥当性を確認すること。(定量スタンダード検体と管理検体の作製方法は「5. HIV 核酸増幅検査の精度管理」を参照。)

## 2) プライマー・プローブ

TaqMan MGB 遺伝子発現検出キット (アプライドバイオシステムズ) を用いている。

**Set 1 (KK-TaqMan 法と同じプライマー・プローブ、J Virol Methods (2009), 157(2): 141-146.)**

Forward primer:

deSK145 5'-AGTRGGGGGACAYCARGCAGCHATG CARAT-3' (1359-1388 HXB2)

Reverse primer:

deSKCC1B 5'-TACTAGTAGTTCCTGCTATRTCACTTCC-3' (1513-1486 HXB2)

Taqman probe:

deKK-MGB 5'-FAM-ATCAATGARGARGCTGCAGAATGGGA-MGB-3' (1402-1427 HXB2)

**Set 2 (PLoS One (2014), 9: e89826)**

Forward primer:

Gag183UF 5'-CTAGCAGTGGCGCCCGAACAG-3' (629-649 HXB2)

Reverse primer:

Gag187LR 5'-CCATCTCTCTCCTTCTAGCCTCCGCTAGTCA-3' (793-763 HXB2)

Taqman probe:

Gag187P-MGB 5'-FAM-TCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTGCTG-MGB-3' (682-708 HXB2)

※ いずれも HIV-1 Group M を広く定量できることを確認しているが、HIV-1 Group



O や HIV-2 には対応していない。またプライマー・プローブは、各検査室で検討・準備されたもので構わないが、そのプライマーを用いる科学的合理性（市販 HIV-1 RNA 定量試薬との相関性、サブタイプ/CRF への対応等）を明らかにしておく必要がある。

### 3) リアルタイム RT-PCR キット

TaqMan® RNA-to-Ct™ 1-Step Kit (アプライドバイオシステムズ)

※ 各検査室で通常使用しているもので構わないが、参照品を用いてあらかじめ定量可能範囲の検討を行っておくべきである。また試薬を変更する時には、反応条件と定量可能範囲を再検討する必要がある。（方法は「5. 核酸増幅検査の精度管理」を参照）。

### 4) 反応・測定機器

StepOne Plus (アプライドバイオシステムズ)

※ 他の機種でも構わない。ただし使用する機種により性能が異なるので、参照品や適切なコントロールを用いて最適な反応条件と定量可能範囲をあらかじめ検討しておくこと。機器を変更する時には、反応条件と定量可能範囲を再検討することが求められる。（「5. 核酸増幅検査の精度管理」を参照。）

## <方法>

※ 詳細はキットに添付のプロトコルを参照のこと。

1. 以下のように混合液を作製する。チューブ間の試薬濃度の誤差を少なくするため、検体数に応じてマスターミックスを作製し分注する。

dH <sub>2</sub> O	4.7μL
2x TaqMan RT-PCR Mix	10.0μL
20μM Forward primer	0.9μL
20μM Reverse primer	0.9μL
10μM MGB-Probe	0.5μL
40x TaqMan RT Enzyme Mix	0.5μL
Template RNA	2.5μL

2. 1 をよく混合してスピンドウンした後、StepOne Plus にセットし、以下の条件で反応を行う。

50°C 15分→95°C 10分→(95°C 10秒→60°C 1分) x 40 サイクル

3. 解析終了後、検量線の妥当性の確認（Slope 値、決定係数（ $R^2$ ）等）や管理検体の定量値が規格の範囲にあるかどうか（例えば値付け値の $\pm 0.5\text{Log}$ ）等、あらかじめ定めた規格を満たしている事を確認し、得られた臨床検体の値を測定結果とする。

#### 4-7. HIV-2 の核酸増幅検査

市販認可の HIV-2 RNA NAT 試薬はなく、国立感染症研究所で HIV-2 NAT 検査用国際標準品制定協力を行うための NAT の実施体制を整備しているが、一般的に HIV-2 感染者の RNA コピー数は低いため、NAT は感染診断に必ずしも有効ではない。近年、HIV-2 流行地域への渡航者やそのパートナーの HIV-2 感染例が散発的に報告されているが、これまでの症例では、血清診断による確認検査で HIV-2 陽性の判定が可能であった。詳しくは 3-2. HIV 確認検査（抗体）の項目を参照いただきたい。

#### 4-8. その他の核酸増幅検査

- ① コバス TaqMan HIV-1 「オート」 V2.0、コバス 6800/8800 システム HIV-1（以上ロシュ・ダイアグノスティックス）

定量試薬として製造販売承認を受けている試薬であるが専用機器の設置が必要である。HIV スクリーニング検査が陽性の場合の確認診断に用いた場合は保険適応となる。

- ② アキュジーン m-HIV-1（アボットジャパン）

定量試薬として製造販売承認を受けている試薬であるが専用機器の設置が必要である。HIV スクリーニング検査が陽性の場合の確認診断に用いた場合は保険適応となる。

- ③ KK-TaqMan 法

神奈川県衛生研究所の近藤真規子氏と慶應義塾大学医学部の加藤真吾氏が構築したリアルタイム PCR である。機器は ABI のリアルタイムシリーズが使用可能である。詳細は、記載のリンクを参照されたい。

([http://www.chieiken.gr.jp/manual01/HIV/KK-TaqMan\\_hiv\\_2011.pdf](http://www.chieiken.gr.jp/manual01/HIV/KK-TaqMan_hiv_2011.pdf))

- ④ Virus Test Kit(HIV-1pol,HIV-1 LTR,HIV-2 等) (TaKaRa)

研究用試薬として市販されている HIV-1 および HIV-2 のリアルタイム PCR 用のキットで、診断用には使用しないこととなっている。タカラバイオ社をはじめ、サー

モフィッシャー社 ABI のリアルタイムシリーズなどの機器で使用が可能である。

注：前述のように HIV 検査においては NAT が重要な鍵となっている。保険適応となっている NAT は高額な機器が必要であり、それ以外の NAT を用いる場合には各施設の責任において内部精度管理を実施することが求められている。

## 5. HIV 検査の精度管理

検査においては、同じ検体を同じ測定法で測定した時に常に正しい結果を示すことが求められる。検査法の品質管理のことを「精度管理」という。「外部精度管理 (External Quality Assurance, EQA)」とは、外部精度調査に参加し、各検査室で行われている試験法や試験操作が適切であるかどうか、結果が真の値を示しているかどうかを確認することをいう。一方「内部精度管理 (Internal Quality Assurance, IQA)」とは、検査室（施設）内で適切な管理検体を用いて、行っている試験法の正確性や再現性を確認することをいう。

HIV-1 RNA 増幅定量用体外診断薬として製造販売承認を受けている診断薬では、最小検出感度や測定可能範囲がメーカーによって調べられ担保されているのに対し、in-house 法を用いる場合には、参照品を用いた最小検出感度の測定（定性法）や定量可能範囲の検討（定量法）を各検査室で検討し、それに合わせた管理検体の作製や測定結果の規格の設定を行い、精度管理を行う必要がある。

本稿では、国立感染症研究所エイズ研究センターで行っている in-house NAT の精度管理に用いる参照品の調整法と内部精度管理の方法について紹介する。

### 5-1. NAT の標準品・参照品

標準品・参照品とは、測定値の算出や正確性を確認するために用いられる、あらかじめ値付けされたコントロールのことをいう。NAT の導入時や試薬・機器変更時に、最小検出感度（定性法）や検量線の直線性（定量法）を検討するために用いられる。

HIV-1 NAT の精度管理のための国際標準品（英国・国立生物学的製剤研究所（National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC）から入手可能）があり、それをもとに各検査施設において値付けしたコピー数既知の参照品（二次標準物質）を精度管理に使用するのが一般的である。

参照品は、高いコピー数の HIV-1 陽性血漿があればそれを材料として作製する。国立感染症研究所エイズ研究センターでは、細胞に感染させて得たウイルスの培養上清を 60℃1 時間加熱することによって不活化し、HIV 陰性血漿にスパイクした検体を用いているが、調整に BSL3 実験室を必要とする。BSL3 実験室を持たない検査室では、BSL2 実験室で培養可能な、非感染性ウイルス粒子を産生する 8E5 細胞の培養上清をスパイクした検体を用いることができる。

参照品は-80℃で長期保存が可能であるが、凍結融解やフリーザーの管理状況によって測定結果にばらつきが出ることがあるので、一度融解した検体は使い切るようにし、加えて一定期間ごとのコピー数測定を行い、測定値が規格の範囲内にあることを確認する。参照品が必要な場合は国立感染症研究所エイズ研究センターにご相談ください。

## 5-2. NAT の管理検体（ランコントロール）

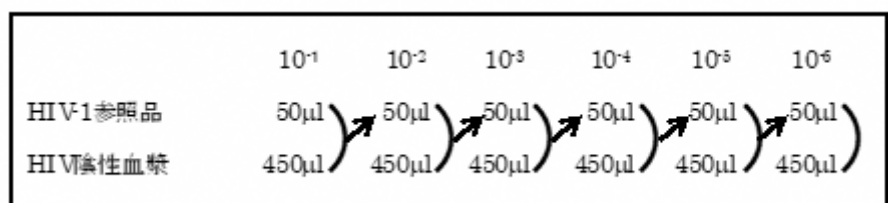
HIV-1 陽性管理コントロール（陽性コントロール）として、定性 NAT では最小検出感度の3倍から5倍程度の RNA コピー数になるように、HIV 陰性が確認されている血漿（以下、HIV 陰性血漿）で希釈した HIV-1 陽性血漿を用意する。定量 NAT では定量可能範囲の下限および上限に近い HIV-1 RNA コピー数の HIV-1 陽性血漿（HIV-1 をスパイクした血漿検体で可）を含む、複数のコントロールを用意する。陰性管理用コントロール（陰性コントロール）は HIV 陰性が確認された血漿（プール血漿で可）を用いる。陰性コントロールの作製では、コンタミネーションによる偽陽性判定が出ないように調整・分注作業に細心の注意を払い、より高感度な市販 HIV-1 RNA 定量試薬でシグナルが出ないことを確認する。検体保存・管理の注意点は参照品と同様である。

## 5-3. 定性 NAT の最小検出感度の決定と定性 NAT 陽性管理検体の作製法

※ 管理検体の調整を目的とした、エンドポイント法を紹介する。

1. HIV 陰性血漿を用いて参照品の 10 倍希釈系列を作製し、RNA 抽出と RT-PCR を行う。同じ希釈操作と RNA 抽出、RT-PCR を 3 回独立に行い、陽性と判定される最大希釈倍数を決定する。

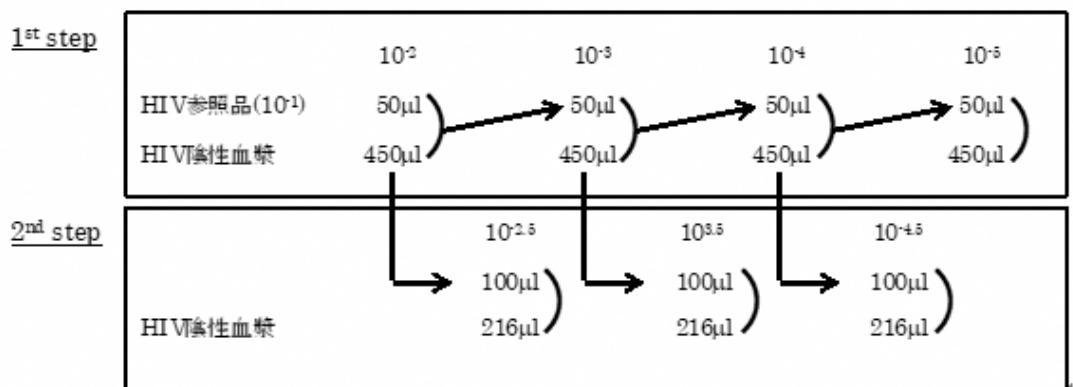
(例)



2. 1 で得られたエンドポイントを中心に、HIV 陰性血漿を用いて参照品の 10<sup>0.5</sup> 倍希釈系列を作製し、RNA 抽出と PCR を行う（下の希釈列作製例は、1 で得られた希釈倍数が 10<sup>3</sup> から 10<sup>4</sup> の間と推測された場合）。同じ希釈操作と測定を 3 回独立に行い、陽性と判定された最大希釈倍数を最小検出感度とする。参照品のコピー数が値付けさ

れている場合は、最小検出感度をコピー数で記す。

(例)



3.2 で得られたエンドポイントの 3 倍から 5 倍の希釈倍数の検体を作製・分注し、 $-80^{\circ}\text{C}$  に保存する。

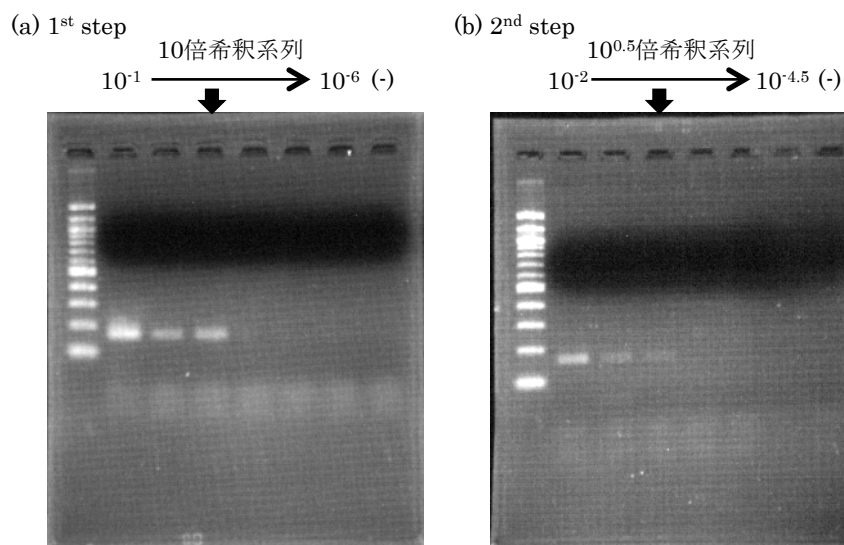


図 5：参照品の段階希釈系列解析結果の一例、エンドポイントは  $10^{-3}$  希釈と判定した

#### 5-4. 定量 NAT の定量可能範囲の決定

1. HIV 陰性血漿を用いて参照品の 10 倍希釈系列を作製し、RNA 抽出と定量 NAT を行う。
2. ①得られた検量線の傾きと決定係数 ( $R^2$ ) が規格の範囲内にあるかどうか、②得ら

れた検量線の参照品の理論値との誤差が規格の範囲内（例えば $\pm 0.5\text{Log}$ ）にあるかどうか、多重測定を行う検査室では、平均値と標準偏差から変動係数（CV 値）を算出し、値が規格の範囲内かどうか（例えば 35%）等を確認する。

3. 同じ希釈操作と測定を 3 回以上独立に行い、同様の解析を行う。さらに同一検体の測定間の誤差が規格の範囲内（例えば中央値の $\pm 0.5\text{Log}$ ）にあるかどうかを確認する。
4. 2 と 3 の両方の規格を満たした最小から最大までのコピー数を定量可能範囲とする。

#### 5-5. 定量 NAT 用管理コントロール（定量スタンダード）の作製

※ 不活化 HIV-1 をスパイクして作製する方法を紹介する。

※ コピー数既知の残余臨床検体を高値陽性及び低値陽性コントロールとして使用できる場合には、それを使用する。

1. HIV<sub>LAI</sub> を MT2 細胞に感染させ、ウイルスを Expand する。（ウイルス株と細胞は各検査室で用いている組み合わせでよい。）培養上清を遠心、さらに  $0.45\mu\text{m}$  シリンジフィルターで濾過し 1mL に小分け後、使用時まで  $-80^{\circ}\text{C}$  に保存する。（ウイルスストック）
2. 融かしたウイルスストックを  $60^{\circ}\text{C}$  で 1 時間加熱処理する。
3. ウイルスの感染性が失われていることを確認するために、熱処理ウイルス 200 $\mu\text{L}$  をあらかじめ 24well プレートに準備した MAGIC5 細胞に接種、一晚吸着させた後に新しい培地と交換して培養する。残りの熱処理ウイルスは、小分けにして  $-80^{\circ}\text{C}$  に保存する。接種後 2 週間まで、コンフルエントになる毎に複数のプレートに継代して、細胞変性の観察と  $\beta\text{-gal}$  染色によりウイルスが増殖していないことを確認する。
4.  $-80^{\circ}\text{C}$  保存の熱処理ウイルスを HIV-1 陰性血漿で 10 倍希釈し、さらに 4 段階の 10 倍希釈系列を作製する。これらを定量 NAT で測定し、定量可能範囲の測定値からウイルスストックのコピー数を決定する。
5. 決定したコピー数をもとに、HIV-1 陰性血漿を用いて、参照品を用いて定めた定量可能範囲内の 5 段階の希釈系列の管理検体（定量スタンダード）を作製し、小分け後に  $-80^{\circ}\text{C}$  に保存する。

※ 確認のため国立感染症研究所エイズ研究センターでは作製した管理用コントロールを市販 HIV-1 RNA 定量体外診断薬で測定し、理論値と測定値の誤差が規格の範囲内

( $\pm 0.3\text{Log}$ ) である事を確認した上で、理論値を採用し、定量 NAT 用スタンダードとしている。

注 定量スタンダードとして精製した核酸を用いている検査室では、ステップ 5 で定量上限及び下限に近いコピー数の高値陽性及び低値陽性コントロール、さらに必要に応じてその中間のコピー数を示す管理コントロールを作製する。

不明な点は国立感染症研究所エイズ研究センターにお問い合わせ下さい。



## 執筆者一覧（敬称略）

長島 真美 東京都健康安全研究センター

貞升 健志 東京都健康安全研究センター

川畑 拓也（地独）大阪健康安全基盤研究所

近藤 真規子 神奈川県衛生研究所

佐野 貴子 神奈川県衛生研究所

草川 茂 国立感染症研究所

立川 愛 国立感染症研究所

松岡 佐織 国立感染症研究所