

〈特集：検査技術の新たな展望（1）〉

アーキテクト[®]・HTLV製品紹介 —第3世代試薬の原理と性能—

澤野 薫、須川 聡

Architect HTLV assay — Principle and performance of the third-generation assay —

Kaoru Sawano and Satoshi Sugawa

Summary A screening test of blood transfusion samples for the presence of antibodies to human T-lymphotropic virus, or HTLV was introduced in Japan in 1986. This test was then implemented in Japan as the standard screening test for prenatal care in 2010.

Varieties of the test kits for HTLV have been developed and improved overseas and in Japan which are now categorized into 1st-, 2nd- and 3rd-generation kits. Abbott's ARCHITECT HTLV is a fully automated third-generation chemi-luminescent immunoassay for the detection of antibodies to HTLV-I and HTLV-II. Its principle is a sandwich assay with antigens (recombinant proteins and synthetic peptides) attached both on the solid phase and the detection conjugate, aimed at superior sensitivity and specificity.

As reviewed here, the ARCHITECT HTLV assay has shown an excellent sensitivity and specificity that has greatly improved the quality of the diagnosis of HTLV I / II infection and that of the screening of blood donor samples and the screening for the prenatal care.

Key words: Human T-lymphotropic virus (HTLV), Antibodies, 3rd generation, Chemiluminescent immunoassay (CLIA), Abbott's ARCHITECT HTLV

I. はじめに

成人T細胞白血病ウイルス（HTLV）の感染経路には、母乳による母子感染、性行為感染ならびに輸血による感染が明らかにされている。HTLVの感染の有無を判断する方法としては血中のHTLVに対する抗体の検出が一般的に行われている。

本邦で1986年に献血者のスクリーニング検査にHTLV抗体検査が導入された。また2010年の第2回「HTLV-I 特命チーム」の決定を受け、HTLV-I 抗体検査が妊婦健康診査（妊婦スクリーニング検査）の標準的な検査項目になっている。

1986年当時、スクリーニングに用いられた試薬は不活化したHTLV-I ウイルス粒子溶解抗原

アボット ジャパン株式会社
ビジネスエクセレンス部
〒108-6305 東京都港区三田3-5-27

Business Excellence Department,
Abbott Japan Co., Ltd. Diagnostics Division,
3-5-27 Mita, Minato-ku, Tokyo 108-6305, Japan

を固相化した粒子凝集反応（particle agglutination: PA）法であった。この後しばらくして、このキットの特異性およびプロゾーンを改善したキットが発売された一方で、各社が様々な原理のキットを開発し発売している。現在は、表1に示されるように、PA法、LA-CIA法、CLEIA法ならびにCLIA法などが利用可能となっている。本邦においてはHTLV-I感染が主でありHTLV-II感染の報告例が殆どなかったことから、CLIA法が発売されるまでHTLV-II抗体の検出に積極的に対応した検査キットは流通して来なかった。ただしHTLV-IとHTLV-IIは94%以上のゲノム相同性を持つことから、従来の「HTLV-I検査キット」でも交差反応性によってHTLV-II抗体をかなりの確率で検出しうることが推測される。

一方、海外においてはHTLV-II感染も見られることから、HTLV抗体検査キットは別の進化を遂げてきた。HTLV-Iウイルス粒子溶解抗原を固相に用いた「第二世代」試薬に続き、HTLV-IIに特異的な抗原を添加しHTLV-IIに対する感度を充実させた「第二世代」試薬が誕生した。第二世代試薬では、用いる抗原はウイルス粒子溶解抗原やリコンビナント抗原と多岐にわたるが、検出側は標識抗ヒトIgG抗体を使って検出するものが主流であった。

このような間接検出法は、確立された方法であるため比較的容易に製品化できるという利点がある一方で、一次反応で起きた非特異反応が高頻度に偽陽性につながる、抗IgM抗体を使用しない限りIgM型抗体を検出できない、などの

問題点がある。前者の問題点の結果、偽陽性の頻度が高いキットがあったことは否めない。このことがウエスタンブロット（WB）法による確認試験の結果において判定保留が無視できないレベルで存在するひとつの要因となっていたとも考えられる。

このような問題点を改善したのが、検出試薬に標識抗原を用いることによってHTLV抗体の直接検出を行う「第三世代」試薬である。この「第三世代」フォーマットの特異性および感度における利点はすでに評価済み^{1,2,3)}であり、我々はこの「第三世代」フォーマットを用い、全自動化免疫測定装置「アーキテクト[®]」専用の高感度HTLV抗体試薬を開発し、2011年5月より上市している。

II. アーキテクト[®]・HTLVの測定原理

アーキテクト[®]・HTLVは固相、検出側双方にHTLV抗原を用いて血清又は血漿中の抗HTLV-I抗体および抗HTLV-II抗体を検出する化学発光免疫測定法（CLIA法）である。測定は2ステップで行われる。一次反応で、検体とHTLV固相化磁性粒子を反応させる。未反応物質を洗浄後、二次反応でコンジュゲートを加え反応させると、抗原-抗体-アクリジニウム標識抗原のサンドイッチが形成される。再び未反応物質を洗浄した後にプレトリガー（過酸化水素水）とトリガー（水酸化ナトリウム）を添加し、化学反応の結果生じる発光を発光強度（Relative Light Unit: RLU）として測定する。この発光強度が予

表1 国内HTLVスクリーニング試薬の特徴（文献1より引用）

	アーキテクト・HTLV (ARCH)	ルミバルスHTLV-I		ヒスクルHTLV-I (HISCL)	ランリームHTLV-I (RAN)	セロディアHTLV-I (SERO)
		フォルテ (LU-F)	プレスト (LU-P)			
測定原理	CLIA	CLEIA	CLEIA	CLEIA	LA-CIA	PA
固相抗原	①HTLV-I/II gp46 pept ②HTLV-II rec. gp21	培養精製 HTLV-I		①HTLV-I/II p19 pept ②HTLV-I gp46 pept	①HTLV-I p21 ②HTLV-I p19 ③HTLV-I gp46	培養精製 HTLV-I
標識抗原	①HTLV-I/II gp46 pept-Ac ②HTLV-I rec. gp21-Ac	抗ヒトIgG マウスモノクロ-ALP		抗ヒトIgG マウスモノクロ-ALP	-	-
反応時間	36分	33分	28分	17分	15分	120分
陰性基準値	<1.0 S/CO	<1.0 C.O.I.		<1.0 C.O.I.	<1.0 C.O.I.	<1.0 C.O.I.*1

*1: SEROにおけるすべての測定値は16で除し、基準値を1.0 C.O.I.とした。

め定めたカットオフ値以上（カットオフインデックス1.0以上）であれば陽性、未満であれば陰性と判定する。

本品では固相にHTLV-I合成ペプチド(gp46)、HTLV-II合成ペプチド(gp46)、およびHTLV-IIリコンビナント抗原(gp21)の3種の抗原を磁性粒子上に配し、検出側のアクリジニウム標識抗原(コンジュゲート)にも3種類の抗原、すなわちHTLV-I合成ペプチド(gp46)、HTLV-II合成ペプチド(gp46)、HTLV-Iリコンビナント抗原(gp21)を用いている(図1、2)。gp46、gp21は共にエンベロープタンパクである。我々はこの2種のタンパクで感度よく抗体を検出できることを確認している。

gp46は、海外のウエスタンブロットにおいてHTLV-IとHTLV-IIの鑑別にも用いられる抗原であり、HTLV-IとHTLV-IIの間の相同性は低い。我々は、HTLV-IとHTLV-IIに対応した

gp46ペプチド抗原を固相とコンジュゲートの両方に用い、HTLV-I、HTLV-II共に特異的な抗体を検出している。

gp21は本邦のウエスタンブロットでは判定に使わない抗原である。一方、海外においては糖鎖のないgp21抗原の有用性が以前より認められており、あるウエスタンブロット製品ではウイルス粒子溶解抗原に加えてgp21リコンビナント抗原を使用し、判定基準に加えているほどである。我々の試薬はこれを参考に、gp21リコンビナント抗原をgp46と共に用いている。

このgp21リコンビナント抗原の使用法には多少工夫があり、固相側にHTLV-IIのシークエンスを、コンジュゲート側にHTLV-Iのシークエンスを使用している。gp21はヘリックスに富んだタンパクであり、これが3量体のコイルドコイルを形成する。そのイムノドミナント領域(IDR)は、部分的にN末端側のコイル状部分と

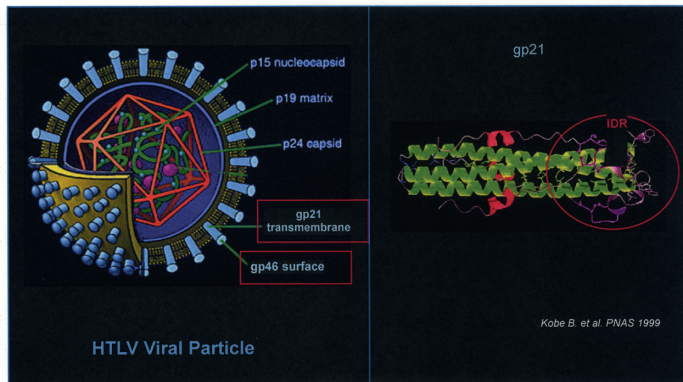


図1 HTLV粒子の構造とアーキテクト®・HTLV使用抗原

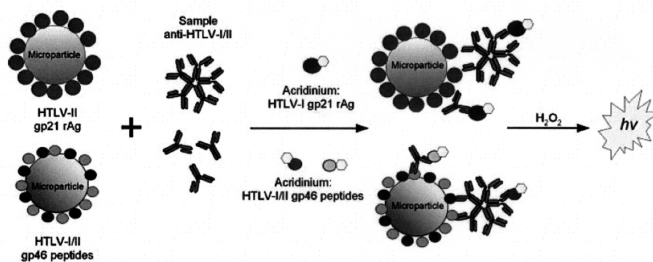


図2 アーキテクト®・HTLVの測定原理

生物試料分析

ジスルフィド結合により形成されたループを含み、その結果、多価のコンフォメーションなエピトープを形成している。このIDR領域はHTLV-IとHTLV-IIで非常によく保存されており相同性は100%である一方、細胞外ドメインの他の部分の相同性はさほど高くなく約75%である。我々は、HTLV-I由来とHTLV-II由来の2

種類のgp21抗原を用いることにより、その共通シークエンス部分にあたるIDRのコンフォメーションなエピトープを保存すると同時に、C末端側の非特異結合を最小化することに成功した。この「ダブル抗原アッセイフォーマット」によって特異性が向上し、その結果、高感度化のために十分な抗原量を投入することができるよ

表2 アーキテクト・HTLV再現性

サンプル	n	平均		測定内再現性		総再現性	
		S/CO	SD	CV (%)	SD	CV (%)	
陰性コントロール	432	0.10	0.02	23.61	0.03	25.44	
陽性コントロール	432	4.05	0.15	3.80	0.17	4.31	
HTLV-I 陽性ヒト血漿	144	1.77	0.06	3.31	0.07	3.72	
HTLV-II 陽性ヒト血漿	144	1.82	0.07	3.66	0.07	3.98	

表3 アーキテクト・HTLVの感度、特異性

	文献5	文献1	文献6	文献7
検討国	日本	日本	米国、日本、ニカラグア	ドイツ、ポルトガル等
感度	100% (102/102)	100%* (31/31)	100% (181/181) 100% (303/303)	100% (406/406)
特異性	100% (118/118)	100% (566/566)	99.99% (9274/9276)	99.95% (5643/5646) 99.86% (691/692)

* ウエスタンブロット判定保留 2例を除く

表4 6種検出試薬およびウエスタンブロットの希釈感度比較（文献1より転載。略語は表1を参照）

No.	希釈倍率	ARCH	LU-F	LU-P	HISCL	RAN	SERO	WB				
								判定	gp46	p53	p24	p19
1	1	+	+	+	+	+	+	陽性	+	+	+	+
2	2	+	+	+	+	+	+	陽性	+	+	+	+
3	4	+	+	+	+	+	+	保留	±	+	+	+
4	8	+	+	+	-	+	+	保留	-	±	+	+
5	16	+	-	-	-	+	+	保留	-	±	+	±
6	32	+	-	-	-	+	+	保留	-	±	±	±
7	64	+	-	-	-	-	±	保留	-	-	±	-
8	128	+	-	-	-	-	-	陰性	-	-	-	-
9	256	-	-	-	-	-	-	陰性	-	-	-	-
10	512	-	-	-	-	-	-	陰性	-	-	-	-

うになった。

Ⅲ. アーキテクト®・HTLVの性能

1. 正確性・再現性

製造元での検討では、専用の陰性コントロール、陽性コントロール、およびHTLV-I陽性ヒト血漿、HTLV-II陽性ヒト血漿を用いて正確性・再現性を評価した結果、S/CO1.0~6.0の範囲の検体において測定内再現性、総再現性（測定内、測定間、日差再現性を含む）はCV10%未満であったことをキットの添付文書に記載している（表2）

2. 感度・特異性

本邦および海外における感度、特異性の評価結果を表3にまとめた。

2-1. 感度

本邦での検討では、有馬らがHTLV陽性102例を測定し感度が100%であったことを報告している⁴⁾。また、出口らも、31例の陽性例で感度100%であったことを報告している⁵⁾。また、彼らはプール血清を用いた希釈感度の検討も行っており、アーキテクト®・HTLVの希釈感度が従来法より4倍~64倍、ウエスタンブロットの陽性判定よりも64倍高いことを報告している（表4）。

海外における検討では、QiuらがHTLV-I陽性75例、HTLV-II陽性106例の測定を行い、感度は100%であった⁵⁾。陽性検体の分布は図3に示す通りであり、いずれの検体もカットオフイン

デクス10以上を示した（カットオフインデクス1以上を陽性と判断する）。さらに、彼らは日本の陽性検体303例を追加検討しており、感度は100%であった。別の報告例では、HTLV-I陽性301例、HTLV-II陽性105例の計406例が検討され、こちらも感度100%と報告されている⁶⁾。

2-2. 特異性

本邦の検討では、有馬らが陰性118例を測定し、特異性は100%であったと報告している。陰性検体の平均値からカットオフ値までの距離は約20SDであった⁵⁾。出口らも、陰性566例を測定したところ特異性は100%であったと報告している⁷⁾。また、比較した6法間で特異性が大きく異なっていることも指摘されている。

海外における検討では、米国、ニカラグア、日本の様々な群（全9276例）で特異性が検討され、結果は99.98%（9274/9276）であった。陰性検体の平均値からカットオフ値までの距離はどの群でも概ね20SD以上であった⁶⁾。また、別の報告では、供血者群において特異性は99.95%（5643/5646）、病院検体群において99.86%（691/692）であった⁷⁾。

3. HTLV-II

本邦での検討では、出口らがHTLV-II感染者15例を測定し感度が100%であったことを報告している⁵⁾。同時に測定された他法でも同様の結果が示され、従来の「HTLV-I検査キット」のHTLV-IIとの交差反応性について指摘している。

海外における検討では、QiuらがHTLV-II陽性

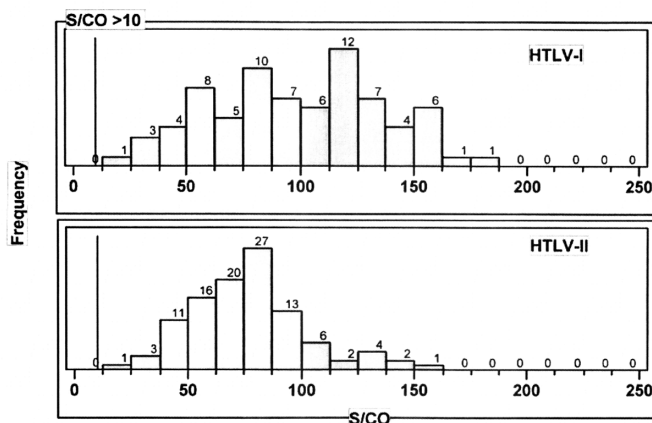


図3 アーキテクト®・HTLVにおける陽性検体の分布（文献7より引用）

106例の測定を行い、KapprellらがHTLV-Ⅱ陽性105例の測定を行い、いずれも感度100%であったと報告されている^{5,7)}。

Ⅳ. おわりに

HTLV-Ⅰの総合対策の施行により、HTLV-Ⅰ抗体検査が妊婦健康診査の標準的検査項目となった。HTLV-Ⅰキャリアであると診断された妊婦は生まれてくる子供への栄養法の選択を迫られるだけでなく、自身のHTLV-Ⅰ関連疾患の発症リスクに不安等を抱えることとなり、非常に大きな心的負担を受けることになる。そのためHTLV-Ⅰ感染の有無を判断する検査の試薬感度・特異性は非常に高い性能を求められる。

アーキテクト®・HTLVは、本邦で初の第三代・ダブル抗原アッセイフォーマットの強みを生かした、高感度、高特異性のHTLV抗体検出試薬である。全国一律の妊婦スクリーニング検査の施行に伴い、本法がスクリーニング検査の選択肢の一つとしてスクリーニング効率の向上に貢献できればと期待している。

また、WB法による確認検査では少なからず判定保留例が認められることから、より高精度にHTLV感染の有無を検出するリアルタイムPCRなどによる確認検査法の開発が望まれる。

なお、本稿は細胞44(8), 2012に掲載したアーキテクト®・HTLVの製品紹介「HTLVの抗体検

出キットの進歩－第3世代試薬の原理と性能－」を一部改訂した。

文献

- 1) 出口, 鍵田, 吉岡ら: 6種HTLV抗体測定試薬の基本性能について. 医学と薬学, 66(6): 1053-1059, 2011.
- 2) Andersson S, Thorstensson R, Ramirez KG, et al: Comparative evaluation of 14 immunoassays for detection of antibodies to the human T-lymphotropic virus types I and II using panels of sera from Sweden and West Africa. Transfusion, 39: 845-851, 1999.
- 3) Vrielink H, Reesink H, Habibuw M. et al: Comparison of four HTLV-I and HTLV-I+HTLV-II ELISAs. Vox Sang, 76: 187-191, 1999.
- 4) Lillehoj E, Alexander S, Dubrule C, et al: Development and Evaluation of a Human T-Cell Leukemia Virus Type I Serologic Confirmatory Assay Incorporating a Recombinant Envelope Polypeptide. Journal of Clinical Microbiology, 28(12): 2653-2658, 1990.
- 5) 有馬, 岸野, 鈴木ら: 化学発光免疫測定法(CLIA法)により新しいT細胞白血病ウイルス(HTLV)抗体全自動検出試薬の評価. 医学と薬学, 65(5): 651-655, 2011.
- 6) Qiu X, Hodges S, Lukaszewska T, et al: Evaluation of a new, fully automated immunoassay for detection of HTLV-I and HTLV-II antibodies. Journal of Medical Virology, 80: 484-493, 2008.
- 7) Kapprell HK, Stieler M, Oer M, et al: Evaluation of a new third-generation ARCHITECT rHTLV-I/II assay for blood screening and diagnosis. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 67: 61-69, 2010.