

イムノクロマトグラフィー法の原理と特徴

1 はじめに - POCT について

POCT¹⁾ すなわちポイント・オブ・ケア・テストイング (point of care testing) とは、「検査の必要性が生じたその時、被検者がいるその場で、あるいは傍らで行う検査であり、速やかに検査結果が得られ、被検者自身に検査がみえるという利点を活かして、迅速かつ適切な医療・介護・健康管理さらには被検者の quality of life (QOL) の向上に資するための検査」(日本臨床検査自動化学会案)と定義されている。現代医療においては、POCT の必要性を強調される機会が増えている。POCT が備えるべき条件とは、①患者の傍らで行うことができる、②迅速に結果が得られる簡便な装置・測定系である、③日常的に検査に従事していない医療従事者も施行できる、④結果判定が明瞭、⑤特別な精度管理が必要ないか、必要があっても簡単、⑥比較的low価格、などである。POCT に応用される手法のなかでは、近年イムノクロマトグラフィー (immunochromatography: IC) 法^{1,2)} やドライケミストリー法が特に注目されている。

2006 (平成 18) 年 8 月から愛知県もエイズ (後天性免疫不全症候群 acquired immunodeficiency syndrome: AIDS) に対する即日検査³⁾ を導入した。同時に保健所のエイズ検査法を、従来のゼラチン粒子を用いる粒子凝集 (particle agglutination: PA) 法による抗体検出から、IC 法による抗 HIV (human immunodeficiency virus: ヒト免疫不全ウイルス) 抗体検出⁴⁾ に変更した。抗 HIV 抗体検出の場合、IC 法検査は PA 法に比べ、より簡便で短時間に結果判定が可能と

いう長所を備えている。一方で、現在わが国で普及している抗 HIV 抗体迅速検査キットは、HIV 感染初期においては PA 法よりもやや感度が低く、ウィンドウ期 (HIV に感染してから検査結果が陽性となるまでの期間。この期間に受検した場合は既に HIV に感染しているにもかかわらず検査結果は陰性を示す) が長い⁵⁾ ことも報告されている。

今回エイズ即日検査への導入を機会に、IC 法の原理及び特徴を紹介した後、愛知県におけるエイズ即日検査導入の検査件数への影響について述べる。

2 イムノクロマトグラフィー (IC) 法

免疫クロマトグラフィー法ともいう。抗原あるいは抗体を含む被検試料を毛細管現象によりニトロセルロース等のメンブレンフィルター上を移動させながら種々の抗原抗体反応を行わせ、肉眼あるいは機器を用いる場合でも簡易に結果判定を行えるように工夫された画期的な方法である。POCT 及び検査室において、微生物の迅速同定などに幅広く利用されている (表 1, 2)。とくに感染症に関連した緊急検査及びスクリーニング検査の分野では、B 型肝炎ウイルス (HBV) HBs 抗原、抗 C 型肝炎ウイルス (HCV) 抗体、抗 HIV 抗体、インフルエンザウイルス抗原検出迅速診断などの項目では、IC 法が急速に普及している。

IC 法の測定原理 (図 1)

イムノアッセイのサンドイッチ法を基盤としている。すなわち、抗原検出の場合は抗体 (抗体検出の場合は抗原) をニトロセルロース、フッ素樹脂、セ

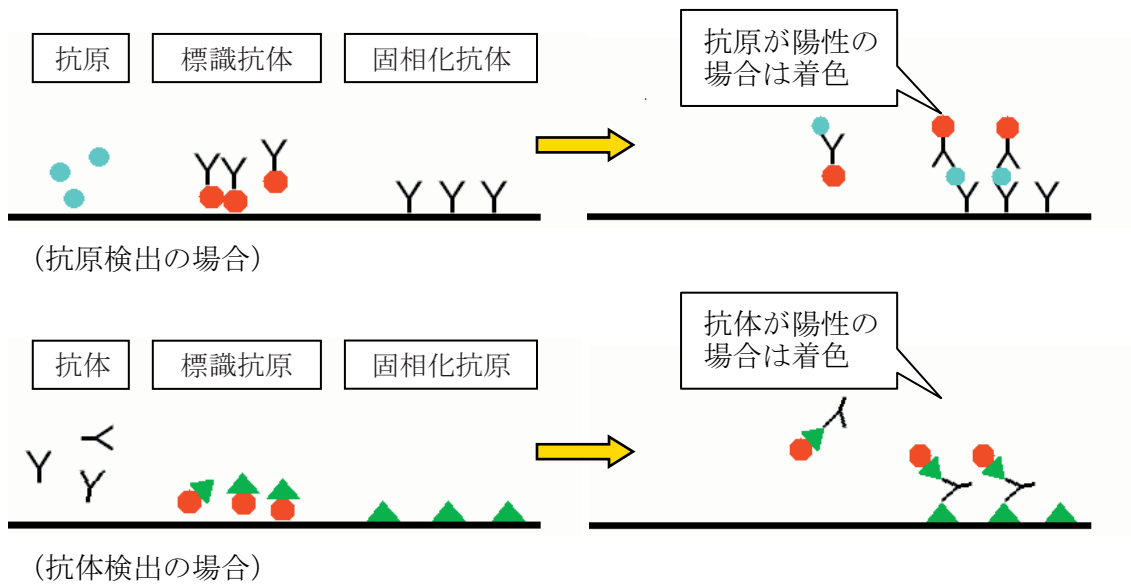


図1 イムノクロマト法の測定原理

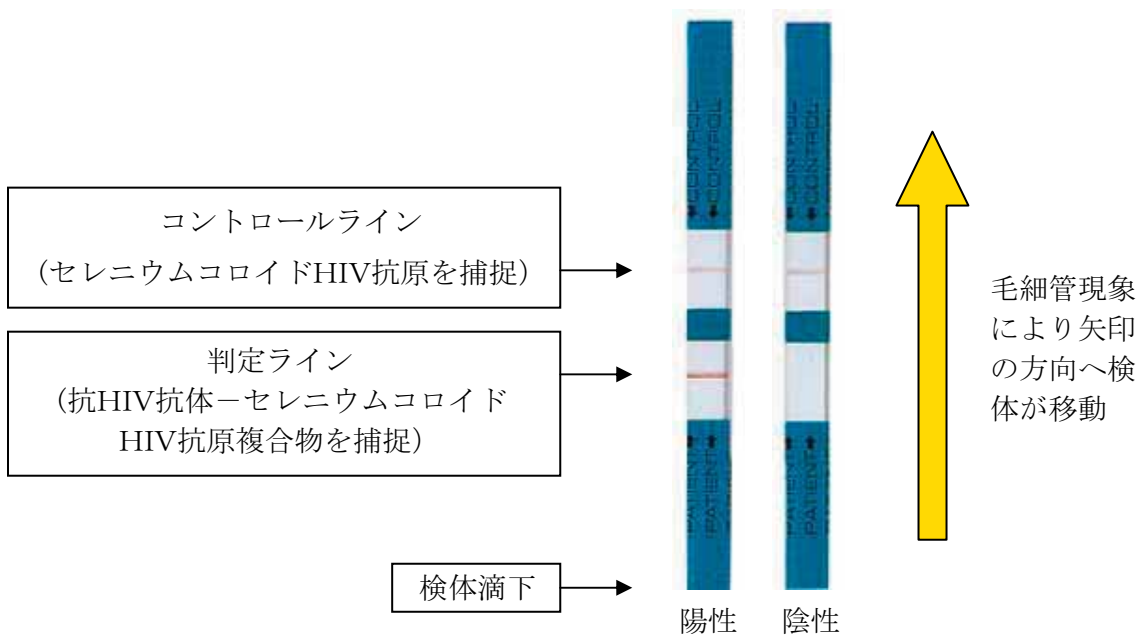


図2-a イムノクロマト法によるHIV抗体検出

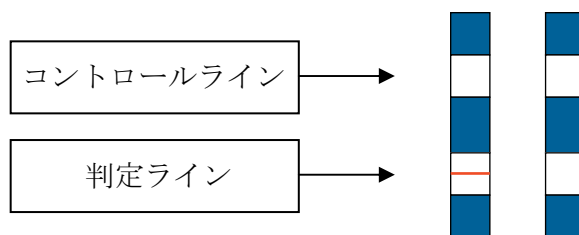


図2-b 再検査の場合(コントロールラインが確認できない)

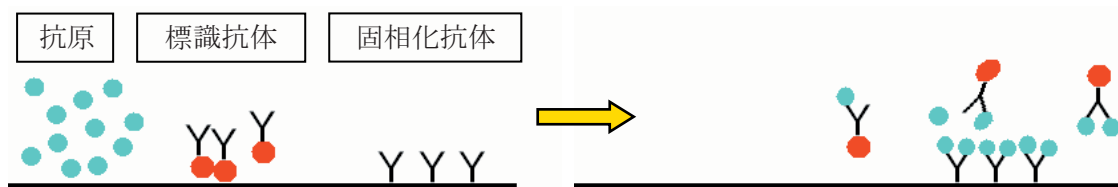


図3 プロゾーン現象²⁾*による偽陰性反応の原理

* プロゾーン現象とは、たとえば抗原量が抗体に対して大過剰に存在するときに反応が陰性化する現象のこと。

メンブレンに固相化された抗原特異的抗体に、標識抗体と複合物を形成していない抗原単体(●)が結合して抗原-標識抗体複合物と競合するために起こる。

ルロースアセテート等を素材とするメンブレンフィルター上に固相化したキット→検体を毛細管現象によりフィルター上を移動させながら抗原抗体反応を行わせる→試料中に目的とする抗原(あるいは抗体)が存在する場合に着色反応が陽性となるよう設計されている。個々のキットにおける発色原理および確認反応法は、表1及び表2にも記載した。着色反応検出系には、酵素(例:ペルオキシダーゼ)、金コロイド、セレンウムコロイド、着色ラテックス粒子などが用いられている。

ここでは、愛知県のエイズ即日検査法として採用された抗HIV1/2抗体測定用IC法(ダイナスクリーンHIV1/2)4)を例に、検査の基本構成と反応原理を示す(図2)。

エイズの病原体HIVには、1型(HIV-1)と2型(HIV-2)が知られている。ウィンドウ期をすぎたHIV感染者の血液中には、抗HIV抗体が検出される。

2007年1月現在、愛知県保健所が行うエイズ一次検査においては、ダイナスクリーンHIV1/2キットを使用した血清中抗HIV抗体の検出が行われている。感染者血清中に存在する抗HIV抗体は、セレンウムコロイド標識HIV抗原と反応し、抗原抗体複合物を形成する。この複合物を構成する抗HIV抗体はさらに、メンブレンフィルター上に固相化されたHIV抗原と結合し、固相化抗原-抗HIV抗体-セレンウムコロイドHIV抗原のサンドイッチ型の複合物を形成する(図1参照)。捕捉されたセレンウムコロイドは、固相化HIV抗原の位置に一致して赤色を呈する(図2)。セレンウムコロイドHIV抗原単体がコントロールラインに到達して捕捉されると生じる着色によって、コントロールラインまで正常にクロマトグラフィーが行われたことが確認できる。

IC法の特徴

(1) IC法の長所

IC法の長所には

- 判定時間が3～30分程度と非常に短い。
- 操作が簡便で特別な措置が不要。
- 検体試料に求められる条件が一般に緩やかで、全血、血清、血漿、鼻腔、咽頭ぬぐい液、尿、便など理論的には多様な検体の検査が可能。などの点があげられる。

IC法がすでに用いられている臨床検査項目は、感染症迅速診断(エイズ、B型肝炎、C型肝炎、インフルエンザ、ロタウイルス、RSウイルス、梅毒など)以外にも、前立腺癌診断(血清PSA)、妊娠診断(尿中hCG)など多岐にわたっている(表1, 2)。

(2) IC法の問題点及び課題

- 通常のプロトコルでは1検体1試料となるため個々の試料に対する精度管理項目は製造時設定からの変更が困難で、ロット管理及び同一ロット内でのランダムな抜き取りによる精度管理以外は実用的でない。この点から、IC法の位置づけは一次スクリーニング検査が適当と思われる。検査体制の構築に際しては、判定に疑問がある検体や検査結果に基づき重大な告知を行う(例:抗HIV抗体陽性)場合には、必ずIC法以外の方法で確認されるシステムとすべきであろう。
- 測定感度に関する規定が現在は定められていないため、製造者間あるいはロット間に検出感度の差を認める場合がある。
- 異好抗体(heterophile antibody)による偽陽性反応: 検出にマウスモノクローナル抗体を使用する系では、検体中にHAMA(human anti-mouse antibody)が存在すると、担体標識抗体と固相抗

体を架橋して偽陽性を示す。

- ブロッキング剤等との非特異反応：試薬中に含まれるブロッキング剤や保護タンパク質と、検体中の物質が反応して異常発色し、偽陽性を示す。
- 酵素標識抗体との非特異反応：検体中に標識酵素と反応する物質が存在すると、バックグラウンドが発色し、判定不能あるいは疑陽性となる。
- 検体中の目的とする抗原（あるいは抗体）濃度が測定可能域を超えて高い場合、プロゾーン現象(図

3) によって偽陰性を示す。

- 溶血の影響：血液由来検体の場合、溶血が強いと判定ラインの発色に影響し、判定が困難になる。
- 試料が便、尿などの場合：検体採取後に増殖した細菌等の存在が結果判定に影響する場合があるため、採取後できるかぎり速やかに検査に供する。また、強度の混濁尿や血尿は検体として不適である。
- 検体の性状による影響：検体の粘性が高い場合の

表1 イムノクロマトグラフィー法を用いた主な抗原検出キット 1, 6, 7)より改変

測定項目	抗体	標識物質	製品名(メーカー略語)	判定時間(分)
HBs抗原	Poly	ALP	エスプライン HBsAg(富)	15
	Mono	金コロイド	クイックチェイサーHBsAg(オ)	15
	Mono	セレンウムコロイド	ダイナスクリン HBsAg(ア)	15
インフルエンザA型B型ウイルス抗原	Mono	金コロイド	キャピリア Flu A、B(B)	15
	Mono	着色粒子	ポクテムインフルエンザ A/B(シ)	20
	Mono	着色粒子	ラピッドビュー	10
ロタウイルス抗原	Mono	金コロイド	イムノカードSTロタウイルス(T)	10
	Mono	金コロイド	ディップステック' 栄研' ロタ(栄)	15
アデノウイルス抗原	Mono	金コロイド	イムノカードSTアデノウイルス(T)	10
	Mono	金コロイド	ディップステック' 栄研' アデノ(栄)	15
	Mono	金コロイド	キャピリアアデノ(B)	15
RSウイルス抗原	Mono	金コロイド	BinaxNOW RSVテスト(栄)	15
	Mono	金コロイド	ディレクティジェン EZ RSV(B)	15
A群β溶連菌抗原	Poly	金コロイド	イムノカードSTストレプトA(T)	15
	Poly	金コロイド	ディップステック' 栄研' ストレプトA(栄)	15
大腸菌ベロ毒素	Mono	金コロイド	キャピリアVT(B)	15 (増菌培養液を 検体とする)
血清PSA	Mono	金コロイド	スマイテスト[PSA]カード(M)	20
尿中LH	Mono (抗β-LH)	青色ラテックス粒子	クリアプラン(関)	3
尿中hCG	Mono (抗α-hCG)	青色ラテックス粒子	クリアビュー-EASY HCG (関)	3
	Mono (抗α-hCG)	着色粒子	クイックビュー-HCG (和)	3

PSA (prostate-specific antigen) : 前立腺特異抗原

LH (luteinizing hormone) : 黄体形成ホルモン

hCG (human chorionic gonadotropin) : ヒト絨毛性ゴナドトロピン

Poly : ポリクローナル抗体

Mono : モノクローナル抗体

ALP : アルカリホスファターゼ

表2 イムノクロマトグラフィー法を用いた主な抗体検出キット

1)より改変

測定項目	抗原	標識物質	製品名(メーカー略語)	判定時間(分)
HBs 抗体	HBs抗原	ALP	エスプライン HBsAb(富)	15
HCV 抗体	リコンビナント HCV 抗原(NS5, c22-3, c200)	金コロイド	クイックチェイサー-HCVAb(オ)	15
HIV-1/2 抗体	HIV 抗原	セレンウムコロイド	ダイナスクリーン HIV-1/2(ア)	15
梅毒抗体	<i>Treponema pallidum</i> 菌体成分	金コロイド	クイックチェイサー-TPAb(オ)	15

ALP：アルカリホスファターゼ

メーカー略語（表1及び表2共通）：

(ア)；アボットジャパン、(オ)；オーソ・クリニカル・ダイアグノティックス、(シ)；シスメックス、
(栄)；栄研化学、(関)；関東化学、(富)；富士レビオ、(和)；和光純薬、
(B)；日本ベクトン・ディッキンソン、(M)；MBL、(T)；TFB

問題点。特にMタンパク質あるいはクリオグロブリン(=4℃に冷却すると白濁またはゲル化し、37℃に戻すと再溶解する血清タンパク質)陽性検体などタンパク質濃度が高い検体は、メンブレン上での拡散が悪くしばしば展開不良となる結果、全体または縞状に発色する。

- ・交差反応が原因の偽陽性：大腸菌等に発現させた「組換え(リコンビナント)」タンパク質抗原を使用する検出系で、しばしば認められる。

3 おわりに－エイズ検査における即日検査導入の背景

エイズ即日検査導入の背景のひとつに、保健所をはじめとする行政機関による従来のエイズ検査が、HIV感染不安をもつ人々に十分利用されていない現状が考えられる。わが国は、先進国の中では例外的に依然として推定HIV感染者数が増加傾向にあるにもかかわらず、全国の保健所におけるHIV検査(1987年に開始)の年間受検者数は、最大を記録した1992年(251,926件)以降減少し、1990年代後半からは1992年の半数程度となっている。

近年HAART(highly active anti-retroviral therapy:抗HIV剤多剤併用療法)導入を嚆矢とするHIV感染症治療法の飛躍的進歩により、早期に適切な抗ウイルス療法を開始すれば長期にわたり病態の悪化を予防できる可能性が絵空事ではなくなったため、HIV感染症対策における早期診断の重要性が再認識されている。HIV感染の早期診

断は、他者への感染拡大抑制のみならず感染者本人の予後改善にもつながるのである⁸⁾。厚生労働省⁹⁾によると、2006年1年間の新規HIV感染者報告数は914件(2005年は832件)、エイズ患者数は390件(同367件)合計1,304件(同1199件)に上り、新規感染者及び合計報告数は、過去最高であった2005年の値を更新した。2006年1年間に全国の保健所等で行われたHIV抗体検査件数は93,497件で、過去最高の1992年には及ばないが、前年の80,899件を16%上回った。同期間の愛知県(政令市を含む)の保健所等におけるHIV抗体検査件数は、7,043件と前年の5,511件を28%も上回った。

行政機関が提供する無料(愛知県では1993年に無料化)・匿名のエイズ検査は、HIV感染拡大抑制や早期治療開始の端緒となることが期待されている。愛知県において、即日検査導入にはHIV感染不安を抱える人々の受検を促す一定の効果があつたと思われる。HIV検査は、試薬・試験システム改良や近い将来唾液等血液以外の検体検査法の参入が予想される分野であるため、今後も必要に応じ新たな技術情報を提供していきたい。

参考文献

- 1) 金井正光(編): 臨床検査法提要(改訂第32版). 金原出版, 2005
- 2) 大沢利昭他(編): 免疫学辞典. 東京化学同人, 2001
- 3) HIV 検査体制の構築に関する研究班: 保健所等における HIV 即日検査のガイドライン(第2版). 2005 <http://www.hivkensa.com/guideline.html>
- 4) アボットジャパン(株): ダイナスクリーン HIV-1/2. 添付文書, 2003
- 5) 吉原なみ子: HIV 感染症診断の検査手順の見直し. 病原微生物検出情報 24:207-208, 2003 <http://idsc.nih.go.jp/iasr/iasr-gg1.html>
- 6) 栄研化学(株): RS ウイルスキット BinaxNOW RSV テスト. 添付文書, 2006
- 7) 日本ベクトン・ディッキンソン(株): ディレクティジェン EZ RSV. 添付文書, 2006
- 8) Branson BM: Point-of-care rapid tests for HIV antibodies. *Journal of Laboratory Medicine* 27:288-295, 2003
- 9) エイズ動向委員会: 平成 18 年 年間報告(速報値) 2007

(文責: 微生物部エイズウイルス科 田中正大、皆川洋子)



愛知衛研技術情報 第30巻第3号 平成19(2007)年 2月26日
照会・連絡先 愛知県衛生研究所
〒462-8576 名古屋市北区辻町字流7番6号
愛知県衛生研究所のホームページ [【http://www.pref.aichi.jp/eiseiken】](http://www.pref.aichi.jp/eiseiken)

所 長 室 : 052-910-5604	毒性部・毒性病理科 : 052-910-5654
次 長 : 052-910-5683	毒性部・毒性化学科 : 052-910-5664
研 究 監 : 052-910-5684	化学部・生活化学科 : 052-910-5638
総 務 課 : 052-910-5618	化学部・環境化学科 : 052-910-5639
企画情報部 : 052-910-5619	化学部・薬品化学科 : 052-910-5629
微生物部・細菌 : 052-910-5669	生活科学部・水質科 : 052-910-5643
微生物部・ウイルス : 052-910-5674	生活科学部・環境物理科 : 052-910-5644

FAX : 052-913-3641