

乾燥濾紙血を用いた HIV-1 RNA および DNA 検査法

研究分担者 加藤真吾 慶應義塾大学医学部微生物学・免疫学教室

研究協力者 丸山理恵 慶應義塾大学医学部微生物学・免疫学教室

研究要旨

昨年報告した乾燥濾紙血 (DBS) を用いた核酸検査法について、抽出法の改良を行なった。DBS の処理にグアニジン塩酸塩溶液を用いることにより、より感度の高い検出方法に改善することができた。また、HIV-2 の核酸検出法についても検討を行なった。

HIV-1 RNA の精度を 3 つの濃度 Low (1×10^4 コピー/mL)、Middle (1×10^5 コピー/mL)、High (1×10^6 コピー/mL) で検討した。Inter-assay ではそれぞれ 27.5%、39.9%、12.3%。Intra-assay ではそれぞれ 32.5%、19.1%、18.3%であった。FDA*1 の定量法の基準では LLOQ で CV 値が 20% 以内、それ以上の濃度では 15%以内とあることから本検出法は半定量法であると考えられる。プロビットアッセイの結果から 95%検出可能濃度は HIV-1 RNA で 3700 コピー/mL、HIV-2 RNA で 7300 コピー/mL であった。

WHO*2 によると全血を用いた場合、血漿中のウイルス量の 3 倍の核酸が検出されると報告されていることから、実際の患者検体を用いた場合の検出感度は今回の結果よりも高くなる可能性がある。

*1 Guideline for Industry Bioanalytical Method Validation, U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, September 2013

*2 The 2013 consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection. Geneva: World Health Organization

A.研究目的

現在、日本の HIV-1 郵送検査では主に DBS を用いた抗体検査が行われている。しかし、抗体のみによる検査では、偽陰性や偽陽性の問題を抑えることができない。そこで我々は、昨年報告した DBS からの抽出法を改善し、より感度の高い方法を開発した。また、HIV-2 RNA の核酸検査法についても確立を試みた。

B.研究方法

HIV-1 RNA の標準試料として 8E5 株およびここからの精製物、HIV-1 DNA 標準試料として pNL432 を用いた。HIV-2 RNA の標準株として NIH-Z RNA を用いた。使用する濾紙は 3 種類

の濾紙 (903 Protein Saver Card と FTA Elute Micro Card [Whatman]、新生児スクリーニング採血濾紙[東洋紡、以下東洋紡濾紙]) を比較した。DBS 検体は標準株を含む再構成全血を濾紙に染み込ませ、一晚乾燥させた。濾紙から直径 5.5mm のディスクを切り出し、グアニジン塩酸塩溶液で処理した後、QIAGEN MinElute Virus Spin Kit で RNA 抽出をおこなった。検出はリアルタイム RT-PCR を用い、使用したプライマーは、gag 遺伝子の p24 コーディング領域に設定し、グループ M の 99%以上の変異株が増幅するように設計した。

C.研究結果

3種類の濾紙を比較すると、903 Protein Saver Cardと東洋紡濾紙はほぼ同等の結果が得られた。FTA cardはDNA検出用の濾紙であり、DNAでは高い回収率が得られたが、RNAはほとんど回収できなかった。このことから、濾紙からの回収率およびプロビットアッセイは東洋紡濾紙を用いて検討した。

HIV-1 RNAの $10^4\sim 10^7$ コピー/mLの直線性は $R^2=0.9903$ と良好な直線性が得られた。HIV-1 RNAの濾紙からの回収率は3つの濃度で求めた。Lowで64%、Middleで34%、Highは39%だった。平均回収率は46%であった。HIV-1 DNAの濾紙からの回収率はLowで57%、Middleで69%、Highは66%だった。平均回収率は64%であった。HIV-1 RNAの精度および正確度をLow、Middle、Highの3つの濃度で測定した。精度はInter-assayがそれぞれ27.5%、39.9%、12.3%。Intra-assayがそれぞれ32.5%、19.1%、18.3%であった。正確度はそれぞれ+10%、+38%、+24%だった。HIV-1 RNAのプロビットアッセイを行なった。95%検出可能濃度は3700コピー/mLであると算出された。

HIV-2についても検討した。 $10^5\sim 10^7$ コピー/mLの範囲では $R^2=0.9921$ と良好な直線性が得られた。95%検出可能濃度は7300コピー/mLであった。

D.考察

DBSの処理にグアニジン塩酸塩溶液を用いることにより、より感度の高い検出方法に改善することができた。精度及び正確度がFDA⁽¹⁾の定量法の基準を越えていたことから本検出方法は半定量法であると考えられる。プロビットアッセイの結果から95%検出可能濃度はHIV-1 RNAで3700コピー/mL、HIV-2 RNAで7300コピー/mLであった。WHO⁽²⁾によると全血を用いた場合、血漿中のウイルス量の3倍の核酸が検出されると報告されていることから、実際の患者検

体を用いた場合の検出感度は今回の結果よりも高くなる可能性がある。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

1. 論文発表

1) Ikeno R, Yamada E, Yamazaki S, Ueda T, Nagata M, Takagi R, Kato S. (2017) Factors contributing to salivary human immunodeficiency virus type-1 levels measured by a Poisson distribution-based PCR method. Journal of International Medical Research. DOI:10.1177/0300060517728652. e-pub: November 9, 2017

2) 加藤真吾. (2017) 1.1 免疫の特徴. 1.2 免疫担当細胞と器官. 臨床免疫検査技術 教本:2-11

3) Yamada E, Takagi R, Tanabe Y, Fujiwara H, Naoki H, Kato S. (2016) Plasma and saliva concentrations of abacavir, tenofovir, darunavir and raltegravir in HIV-1-infected patients. International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics. DOI: 10.5414/CP202789. e-pub: April 21, 2017

2. 学会発表

1) 佐野貴子, 近藤真規子, 加藤真吾ら. 新規 HIV 抗体確認検査試薬である Geenius HIV Confirmatory Assay の検討. 第31回日本エイズ学会学術集会・総会, 東京都, 2017年11月.

2) 川畑拓也, 小島洋子, 加藤真吾ら. 新しい HIV 確認検査試薬 GeeniusTMの性能評価. 第31回

日本エイズ学会学術集会・総会，東京都，2017年11月。

3) 吉田繁，加藤真吾，吉村和久ら。2016年度HIV薬剤耐性検査外部精度評価の報告。第31回日本エイズ学会学術集会・総会，東京都，2017年11月。

4) 岡崎玲子，加藤真吾，吉村和久ら。国内新規HIV/AIDS診断症例における薬剤耐性HIV-1の動向。第31回日本エイズ学会学術集会・総会，東京都，2017年11月。

5) 近藤真規子，加藤真吾，吉村和久ら。日本で流行するHIV-1 CRF01_AEと周辺アジア諸国における流行株との関連。第31回日本エイズ学会学術集会・総会，東京都，2017年11月。

6) 佐野貴子，加藤真吾，今井光信ら。保健所等公的検査機関を対象としたHIV検査相談体制に関するアンケート調査。第31回日本エイズ学会学術集会・総会，東京都，2017年11月。

7) 丸山理恵，須藤弘二，加藤真吾ら。乾燥濾紙血を用いたHIV-1 RNAおよびDNA検査法。第31回日本エイズ学会学術集会・総会，東京都，2017年11月。

8) 須藤弘二，佐野貴子，加藤真吾ら。HIV郵送検査に関する実態調査と検査精度調査(2016)。第31回日本エイズ学会学術集会・総会，東京都，2017年11月。

9) K. Sudo, T. Sano, M. Kondo, T. Kawahata, S. Kato, et al. Comparative Evaluation of the Bio-Rad Geenius™ HIV-1/2 Confirmatory Assay and the New LAV Blot 1 and 2 in the Japanese Population. 28th Regional Congress of the International Society of Blood Transfusion (ISBT), Guangzhou(広州), China, 2017

H.知的所有権の出願・登録状況

①特許取得

1) 発明の名称：核酸の検出方法

出願者：東京都港区三田2丁目15番45号

学校法人慶應義塾

発明者：加藤真吾

出願番号：PCT/JP2018/002824

出願年月日：平成30年1月30日

2) 発明の名称：PCR成否判定法

出願者：東京都港区三田2丁目15番45号

学校法人慶應義塾

発明者：加藤真吾

出願番号：PCT/JP2018/6551

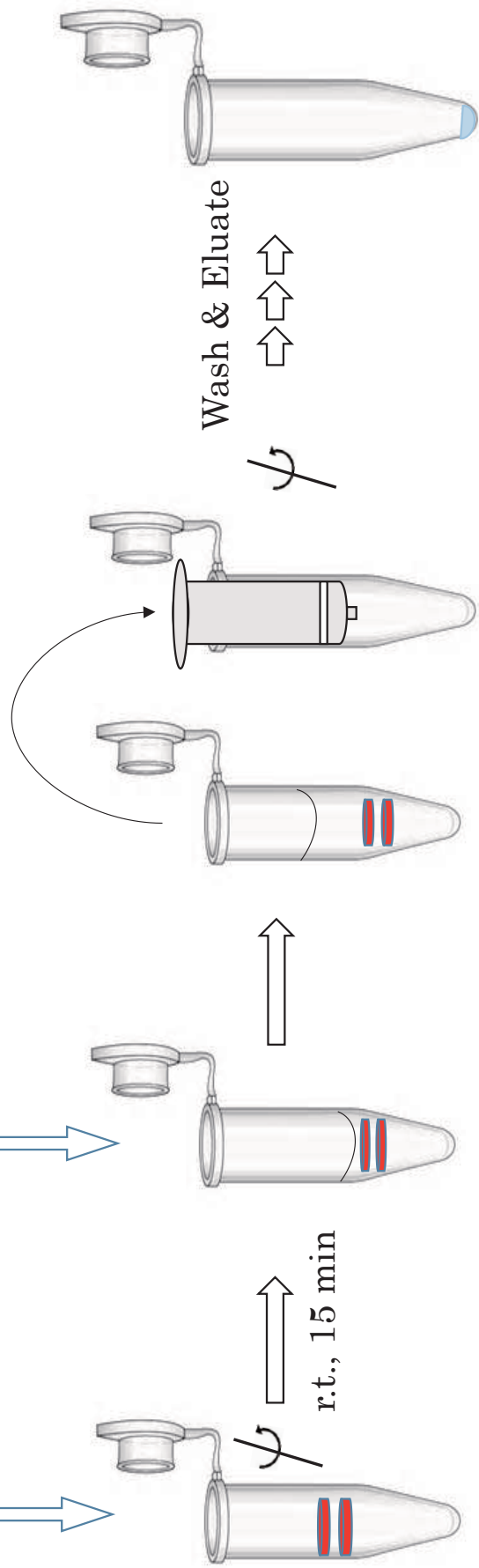
出願年月日：平成30年2月22日

抽出法

Gdn-HCl, 200 μ L

AL Mixを加える

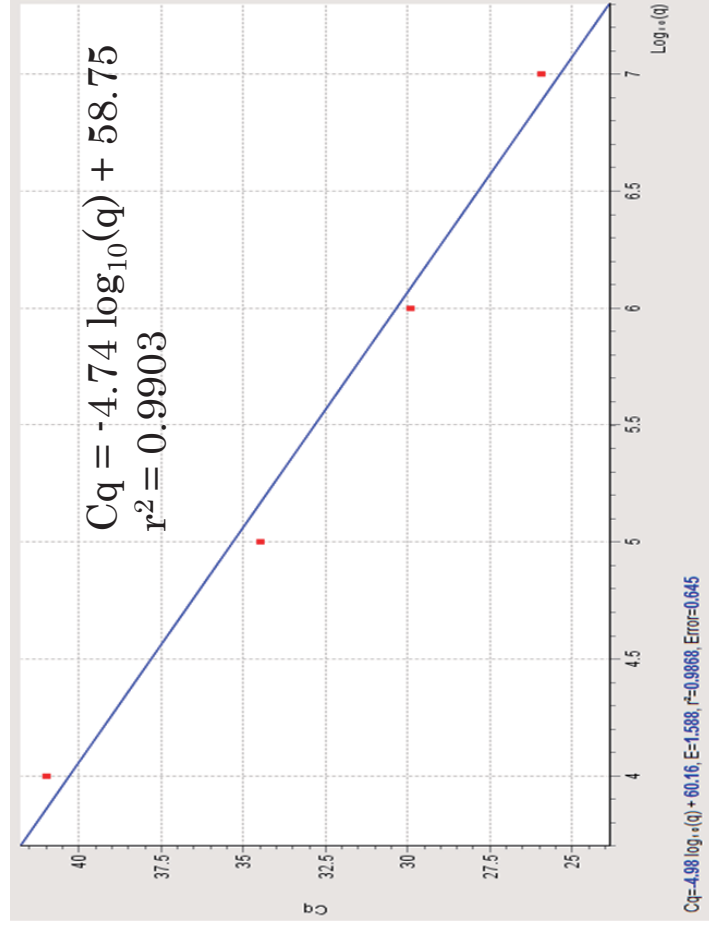
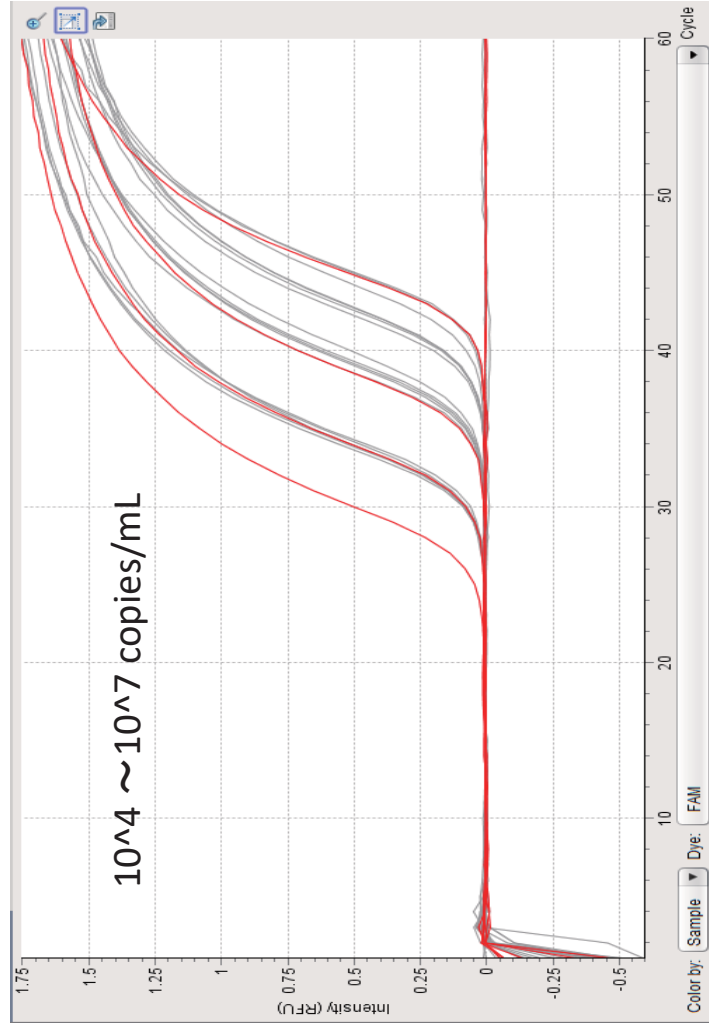
上清をカラムに移す



QIAGEN
MinElute スピンカラム

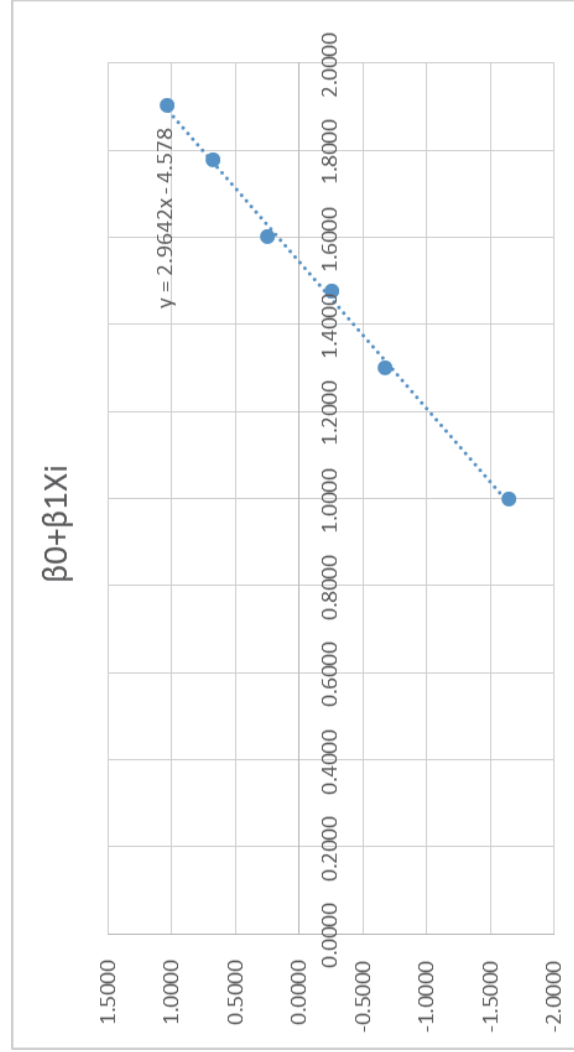
※ディスク直径: 5.5mm

直線性(HIV-1)



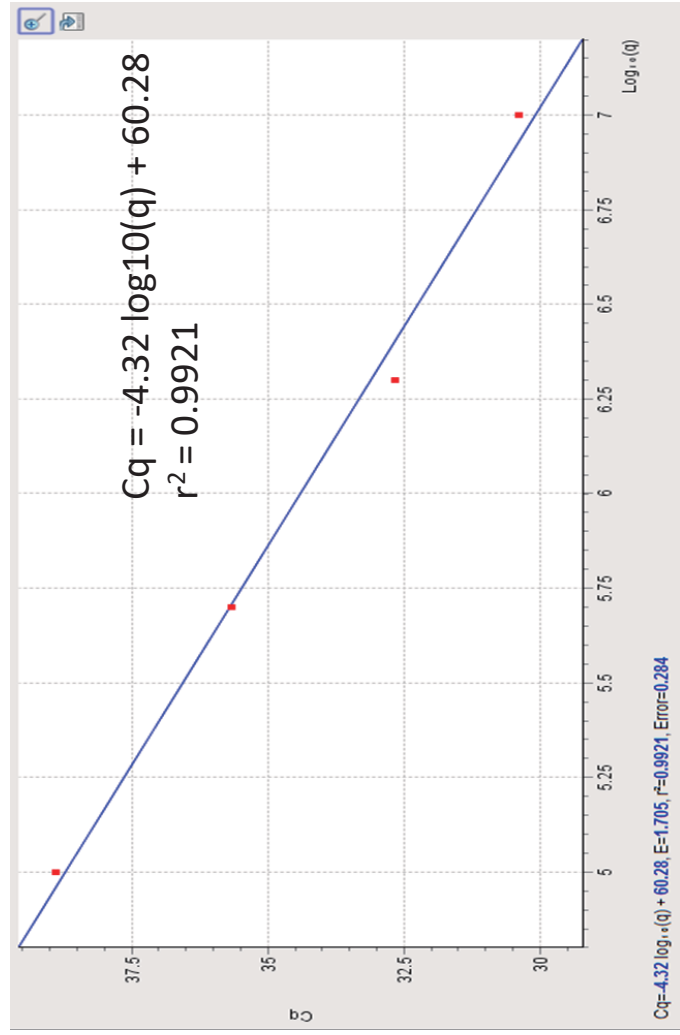
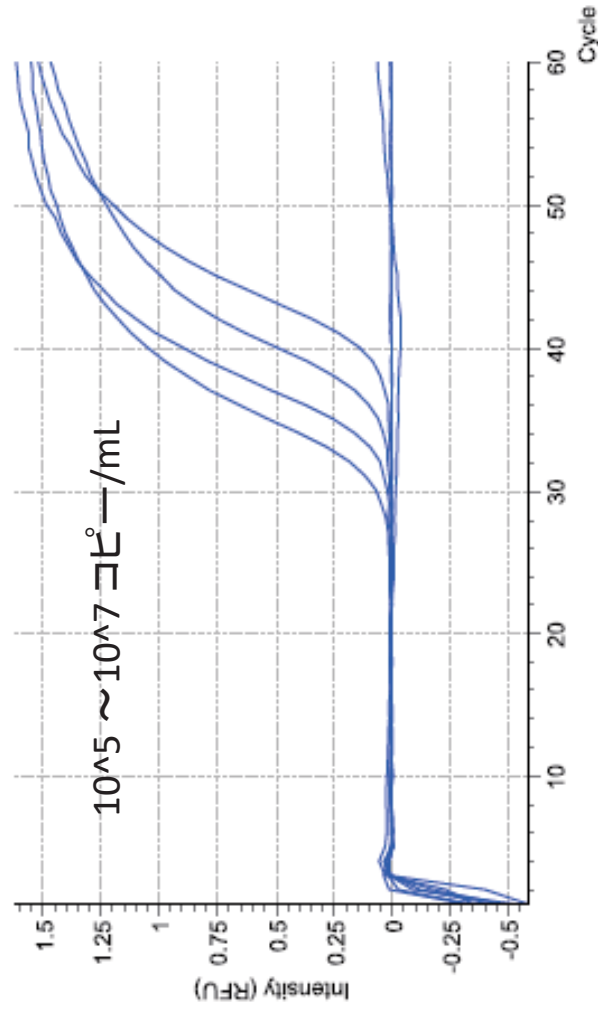
プロビットアッセイ(HIV-1)

| コピー/mL | 陽性数 |
|--------|-------|
| 500 | 1/20 |
| 1000 | 5/20 |
| 1500 | 8/20 |
| 2000 | 12/20 |
| 3000 | 15/20 |
| 4000 | 17/20 |
| 5000 | 20/20 |



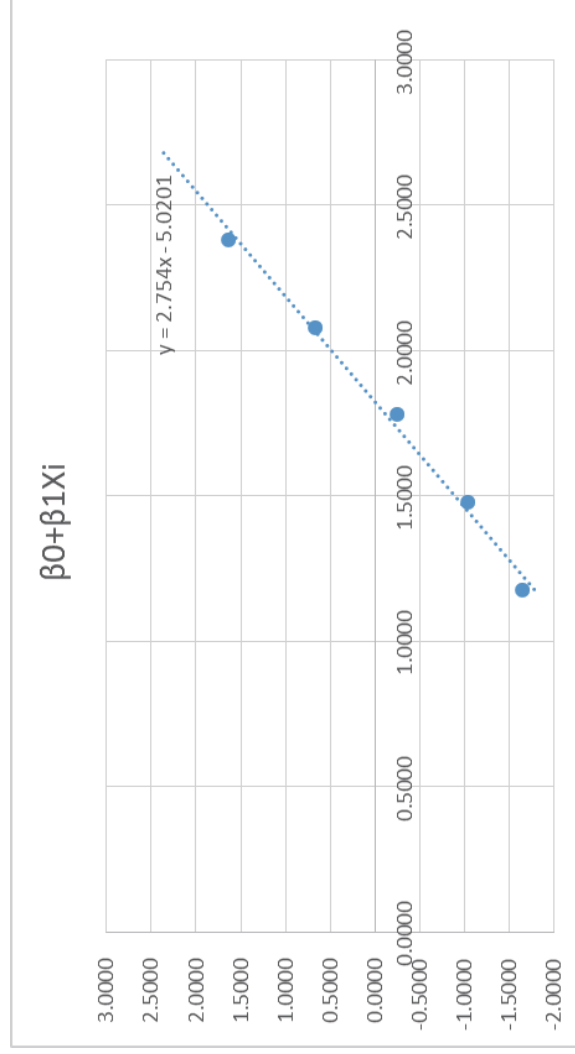
95% 検出可能濃度 → 3700 コピー/mL

直線性 (HIV-2, NIH-Z株)



プロビットアッセイ(HIV-2)

| コピー/mL | 陽性数 |
|--------|-------|
| 750 | 1/20 |
| 1500 | 3/20 |
| 3000 | 8/20 |
| 6000 | 15/20 |
| 12000 | 19/20 |
| 24000 | 20/20 |



95% 検出可能濃度 → 7300 コピー/mL