

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。また、HIV-1 RNA の平均回収率は 46%、HIV-1 DNA の平均回収率は 64%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 株およびそこから精製物、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

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。

E. 研究発表

1. 論文発表

1) Yamazaki S, Kondo M, Sudo K, Ueda T,

Fujiwara H, Hasegawa N, Kato S. (2016) A Qualitative Real-time PCR assay for HIV-1 and HIV-2 RNA. Japanese Journal of Infectious Diseases. 69:367-372. DOI: 10.7883/yoken.JJID.2015.309

- 2) Kotani H, Sudo K, Naoki H, Fujiwara H, Hayakawa T, Iketani O, Yamaguchi M, Mochizuki M, Iwata S, Kato S. (2016) Possible involvement of distinct phylogenetic clusters of HIV-1 variants in the discrepancies between coreceptor tropism predictions based on viral RNA. Journal of Pharmaceutical Health Care and Sciences. DOI:10.1186/s40780-016-0065-4
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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
- 6) Makiko Kondo, Koji Sudo, Takako Sano, Takuya Kawahata, Ichiro Itoda, Shinya Iwamuro, Yukihiro Yoshimura, Natsuo Tachikawa, Yoko Kojima, Haruyo Mori,

Hiroshi Fujiwara, Naoki Hasegawa, Shingo Kato. (2018) Comparative evaluation of the Geenius™ HIV 1/2 Confirmatory Assay and the HIV-1 and HIV-2 Western blots in the Japanese population. PLoS One. 13(10):e0198924.doi:10.1371/journal.pone.0198924. eCollection . Oct 31, 2018.

2.学会発表

- 1) 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 30 回日本エイズ学会学術集会・総会, 鹿児島, 2016 年 11 月.
- 2) 小谷宙, 加藤真吾, 長谷川直樹ら. NRTI にラルテグラビルおよびダルナビルを含む強化療法を導入した 2 症例. 第 30 回日本エイズ学会学術集会・総会, 鹿児島, 2016 年 11 月.
- 3) 丸山理恵, 加藤真吾ら. 乾燥濾紙血を用いた HIV-1 RNA 検出法. 第 30 回日本エイズ学会学術集会・総会, 鹿児島, 2016 年 11 月.
- 4) 矢永由里子, 加藤真吾ら. 「病院に HIV 検査実施ガイドライン」作成と評価分析について. 第 30 回日本エイズ学会学術集会・総会, 鹿児島, 2016 年 11 月.
- 5) 近藤真規子, 加藤真吾ら. 中国の MSM 間で大流行している HIV-1 CRF01_AE variant の日本国内への拡散. 第 30 回日本エイズ学会学術集会・総会, 鹿児島, 2016 年 11 月.
- 6) 星野慎二, 加藤真吾ら. 全国保健所における梅毒検査体制のアンケート調査. 第 30 回日本エイズ学会学術集会・総会, 鹿児島, 2016 年 11 月.
- 7) 須藤弘二, 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(2015). 第 30 回日本エイズ学会学術集会・総会, 鹿児島, 2016 年 11 月.
- 8) 加藤真吾, 長谷川直樹ら. CDC が推奨する HIV 検査手順の検討と HIV-1/2 鑑別検査キット Geenius の検討. 第 30 回日本エイズ学会学術集会・総会, 鹿児島, 2016 年 11 月.
- 9) 佐野貴子, 加藤真吾, 市川誠一ら. HIV 検査・相談マップを用いた HIV 検査相談施設の情報提供およびサイト利用状況の解析. 第 30 回日本エイズ学会学術集会・総会, 鹿児島, 2016 年 11 月.
- 10) 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.
- 11) 川畑拓也, 小島洋子, 加藤真吾ら. 新しい HIV 確認検査試薬 Geenius™ 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.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) 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.
- 16) 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.
- 17) 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.
- 18) 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.
- 19) 須藤弘二, 佐野貴子, 近藤真規子, 今井光信, 今村顕史, 加藤真吾. HIV 郵送検査に関する実態調査と検査精度調査(2017). 第 32 回日本エイズ学会学術集会・総会, 大阪府, 2018 年 12 月.
- 20) 近藤真規子, 佐野貴子, 長島真美, 貞升健志, 川畑拓也, 加藤真吾, 今村顕史. 全国地方衛生研究所における HIV 検査実施状況. 第 32 回日本エイズ学会学術集会・総会, 大阪府, 2018 年 12 月.
- 21) 土屋菜歩, 佐野貴子, 近藤真規子, 堅多敦子, 石丸雄二, 城所敏英, カエベタ亜矢, 川畑拓也, 貞升健志, 須藤弘二, 加藤真吾, 大木幸子, 今井光信, 今村顕史. 保健所・検査所における梅毒検査実施状況および陽性率に関するアンケート調査. 第 32 回日本エイズ学会学術集会・総会, 大阪府, 2018 年 12 月.
- 22) 小谷宙, 加藤真吾, 親泊あいみ, 須藤弘二, 丸山理恵, 西松直美, 宇野俊介, 上養義典, 藤原宏, 長谷川直樹. 準完全長プロウイルスによる治療効果の新しい評価. 第 32 回日本エイズ学会学術集会・総会, 大阪府, 2018 年 12 月.
- 23) 岡崎玲子, 蜂谷敦子, 佐藤かおり, 豊嶋崇徳, 佐々木悟, 伊藤俊広, 林田庸総, 岡慎一, 湯永博之, 古賀道子, 長島真美, 貞升健志, 近藤真規子, 椎野禎一郎, 須藤弘二, 加藤真吾, 谷口俊文, 猪狩英俊, 寒川整, 加藤英明, 石ヶ坪良明, 中島秀明, 吉野友祐, 太田康男, 茂呂寛, 渡邊珠代, 松田昌和, 重見麗, 岩谷靖雅, 横幕能行, 渡邊大, 小島洋子, 森治代, 藤井輝久, 高田清式, 南留美, 山本政弘, 松下修三, 健山正男, 藤田次郎, 杉浦互, 吉村和久, 菊池正. 国内新規 HIV/AIDS 診断症例における薬剤耐性 HIV-1 の動向. 第 32 回日本エイズ学会学術集会・総会, 大阪府, 2018 年 12 月.
- 24) 丸山理恵, 加藤真吾. HIV RNA と DNA の混合物から RNA を選択的に増幅する RT-PCR 法の開発. 第 32 回日本エイズ学会学術集会・総会, 大阪府, 2018 年 12 月.
- 25) 本田徹郎, 久慈直昭, 丸山理恵, 須藤弘二, 加藤真吾. 健康な HIV 陽性男性が陰性女性との間に子供を持つために: 洗浄精子を用いた顕微授精について. 第 32 回日本エイズ学会学術集会・総会, 大阪府, 2018 年 12 月.
- 26) 土屋菜歩, 佐野貴子, 近藤真規子, 堅多敦子, 石丸雄二, 城所敏英, カエベタ亜矢, 川畑拓也, 貞升健志, 須藤弘二, 加藤真吾, 大木幸子, 今井光信, 今村顕史. 保健所・検査所における HIV 検査・相談実施状況および陽性率に関するアンケート調査. 第 32 回日本エイズ学会学術集会・総会, 大阪府, 2018 年 12 月.
- 27) 佐野貴子, 近藤真規子, 須藤弘二, 今井光信, 加藤真吾, 今村顕史. 民間検査センターにおける HIV 検査実施状況に関するアンケート調査. 第 32 回日本エイズ学会学術集会・総会, 大阪府, 2018 年 12 月.
- 28) 川畑拓也, 井戸田一朗, 小島洋子, 近藤真規子, 貞升健志, 佐野貴子, 須藤弘二, 高田昇, 長島真美, 森治代, 加藤真吾, 今村顕史. エビデンスに基づいた専門職向け HIV 検査 Q&A 集の作成. 第 32 回日本エイズ学会学術集会・総会, 大阪府, 2018 年 12 月.

F.知的所有権の取得状況

- ①特許取得
- ②実用新案登録
- ③その他