

新規 HIV 診断試薬である Geenius HIV-1/2 Confirmatory assay と

ダイナスクリーン・HIV Combo の検討

研究分担者 加藤 真吾（慶應義塾大学医学部）

研究協力者 佐野 貴子、近藤 真規子（神奈川県衛生研究所）

須藤 弘二（慶應義塾大学医学部）

小谷 宙、西松 直美（慶應義塾大学病院 薬剤部）

藤原 宏、長谷川直樹（慶應義塾大学病院 感染制御センター）

研究要旨

新規 HIV 診断試薬である Geenius HIV-1/2 Confirmatory assay およびダイナスクリーン・HIV Combo の検討を行った。

新規 HIV 確認検査試薬の Geenius において HIV-1 陽性例を測定したところ、WB 法よりも感度の向上が見られた。また、WB-1 と WB-2 が両方とも陽性となった検体では、Geenius で全例が HIV-1 POSITIVE と判定されたことから、結果解釈の個人差が低減すると考えた。HIV 陰性検体では、130 例のうち非特異バンドが出現したものが WB 法で 31 例、Geenius では 2 例であり、特異性の向上が見られた。

新規 HIV 迅速スクリーニング検査試薬であるダイナスクリーン・HIV Combo では、実際の感染初期検体において、従来品で陰性となったが、Combo では抗原を検出することが可能であった。一方、陰性検体の検討では、血漿検体において、従来品ではすべて陰性であったが、Combo では 1 例の抗原陽性が見られた。この検体の全血検体では抗原ラインの出現は見られなかった。特異性についてはさらに検討を進める予定である。

今年度、検討を行った Geenius HIV-1/2 Confirmatory assay およびダイナスクリーン・HIV Combo は、ともに従来品よりも性能に優れ、HIV 診断試薬として非常に有用であることが示唆された。

A.研究目的

HIV 診断試薬は年々改良が進んでおり、近年では、迅速スクリーニング検査試薬の抗原抗体同時検査法の開発や HIV 抗体確認検査試薬としてのイムノクロマト法の開発が行われている。HIV 抗体確認検査については、我が国では現在、測定時間の長いウェスタンブロット法が用いられているが、米国ではすでに短時間で測定が可能なイムノクロマト法が認可され、実際に検査アルゴリズムに組み込まれ使用されている。また、迅速スクリーニング検査試薬については、我が国において HIV 即日検査で広く使用されており、ウインドウ期の短縮が可能な抗原抗体同時検査法の使用拡

大は検査の質の向上に繋がると考える。

今回、我が国に導入される可能性のある新規 HIV 確認検査試薬および新規迅速スクリーニング検査試薬について性能検討を行ったので報告する。

B.研究方法

1. 新規 HIV 確認検査試薬である Geenius HIV-1/2 Confirmatory assay の検討

(1) 使用試薬

検討品：Geenius HIV-1/2 Confirmatory assay（バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社、以下、Geenius と略）

(使用可能検体) 血漿、血清、全血
(検体量) 血漿と血清は 5 μ L、全血は 15 μ L
(操作時間) 30 分

測定方法と結果判定については図 1、図 2 に記した。

対照品：ラブ プロット 1、ラブ プロット 2
(バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社、以下、WB-1、WB-2 と略)

(使用可能検体) 血清
(検体量) 20 μ L
(操作時間) 約 4 時間

測定は添付文書に従い実施した。

(2) 使用検体

保健所あるいは医療機関で HIV 検査を希望し、スクリーニング検査で陰性と判定された HIV 陰性検体 130 例および WB 法あるいは PCR 法で陽性と判定された HIV-1 陽性検体 113 例について測定を行った。今回の検討に当たっては、受検者に研究使用の同意を得た。

(倫理面への配慮) 本研究は、慶應義塾大学医学部の倫理委員会に倫理審査を申請し、承認を得た(承認番号 20150176)。また、神奈川県衛生研究所倫理審査委員会に申請し、承認を得た(平成 28 年 9 月 13 日)。

2. 新規迅速スクリーニング検査試薬であるダイナスクリーン・HIV Combo の検討

(1) 使用試薬

検討品：ダイナスクリーン・HIV Combo
(アリア メディカル株式会社、以下、Combo と略)

(使用可能検体) 血漿、血清、全血
(検体量) 50 μ L
(操作時間) 20 分

対照品：ダイナスクリーン・HIV-1/2

(アリア メディカル株式会社、以下、従来品と略)

(使用可能検体) 血漿、血清、全血
(検体量) 50 μ L
(操作時間) 15 分

測定方法と結果判定については図 7~10 にまとめた。

(2) 使用検体

保健所あるいは医療機関において HIV 検査を希望しスクリーニング検査で陰性と判定された HIV 陰性検体 229 例、WB 法あるいは PCR 法で陽性と判定された HIV-1 陽性検体 30 例およびダイナスクリーンで偽陽性と判定された 7 例について測定を行った。

(倫理面への配慮) 神奈川県衛生研究所倫理審査委員会に申請し、承認を得た(平成 28 年 9 月 13 日)。

C. 研究結果

1. 新規 HIV 確認検査試薬である Geenius HIV-1/2 Confirmatory assay の検討

HIV-1陽性検体113例についてGeeniusで測定したところ、HIV-1 POSITIVEと判定されたものが107例、HIV-1 INDETERMINATEとなったものが4例、HIV NEGATIVEとなったものが2例であった(図3)。

GeeniusでHIV-1 POSITIVEと判定された107例のWB法の結果は、WB-1では陽性が104例、判定保留が3例であり、WB-2では陽性が12例、判定保留が92例、陰性が3例であった。GeeniusのHIV-1 INDETERMINATEと判定された4例では、WB-1は判定保留4例、WB-2では判定保留2例、陰性2例であった。GeeniusでのHIV NEGATIVEの2例では、WB-1とWB-2どちらも陰性であった。

WB-1およびWB-2で陽性となった12例のGeeniusの結果はすべてHIV-1 POSITIVEと判定された(図4)。WB-1での判定保留7例のGeeniusの結果は、3例がHIV-1 POSITIVE、4例がHIV-1 INDETERMINATEとなった(図5)。WB-1の陰性2例ではGeeniusでもHIV NEGATIVEと判定された。

HIV-1陰性検体130例についてGeeniusで測定したところ、128例がHIV NEGATIVE、1例がHIV-1 INDETERMINATE、1例がHIV-2 INDETERMINATEとなった(図6)。GeeniusでHIV NEGATIVEとなった128例では、WB-1とWB-2がどちらも判定保留となった

ものは6例、WB-1のみ判定保留となったものは18例、WB-2のみ判定保留となったものは7例であった。WB-1での非特異の出現バンドは、P68/66が2例、P55が2例、P34/P31が1例、P24/25が16例、P18/17が5例であった。WB-2での非特異出現バンドはP26が8例、P16が4例であった。Geeniusで HIV-1 INDETERMINATEと判定された1例は、GeeniusでP31のバンドの出現が見られ、WB-1、WB-2とも陰性であった。またHIV-2 INDETERMINATEと判定された1例は、GeeniusでGP140のバンドの出現が見られ、WB-1では陰性、WB-2ではP26の非特異バンドが見られた。

2. 新規迅速スクリーニング検査試薬であるダイナスクリーン・HIV Combo の検討

血漿検体と一部全血検体についてComboと従来品との検討を行った。血漿では、HIV陽性検体30例を測定したところ、従来品では陽性が29例、陰性が1例となり、Comboでは抗原のみ陽性が1例、抗原・抗体陽性が2例、抗体のみ陽性が27例と全例が陽性となった（図11）。HIV陰性検体229例では、従来品ではすべて陰性（特異性100%）、Comboでは228例が陰性、1例が抗原陽性となった（特異性99.6%）。また、従来品で偽陽性となった6例についてComboで測定したところ、5例は陰性、1例は抗体のみ陽性となった。Comboで偽陽性となった1例について従来品で測定したところ陰性となった。

全血検体については、HIV陽性検体21例を測定したところ、従来品、Comboともにすべて陽性となった。HIV陰性検体204例でも従来品、Comboともにすべて陰性となった。従来品で偽陽性となった1例についてはComboで測定したところ陰性となった（図12）。

D. 考察

今年度は新規 HIV 診断試薬である Geenius HIV-1/2 Confirmatory assay およびダイナスクリーン・HIV Combo の検討を行った。

新規 HIV 確認検査試薬である Geenius HIV-1/2

Confirmatory assay の検討では、HIV-1 陽性検体において Geenius では 107 例が HIV-1 POSITIVE と判定されたが、WB 法では、WB-1 陽性は 104 例であり、Geenius の感度向上が示唆された。また、WB-1 および WB-2 で陽性となった 13 例の Geenius の結果では、全例が HIV-1 POSITIVE と判定された。これまで WB-1 と WB-2 がともに陽性であった場合、HIV-1 と HIV-2 の重複感染なのか HIV の交差反応なのか、その判定に苦慮することがあったが、Geenius の判定基準に基づき機械的に判定してくれることから、結果の解釈に個人差が生じることは減少すると考えた。HIV 陰性検体では、130 例のうち、WB 法で非特異バンドが出現したものが 31 例あったが、Geenius では 2 例であり、特異性の向上が見られた。今後、HIV-2 陽性検体、治療中の HIV 抗体力価低下例、感染初期例等の検体について検討を行っていく予定である。

新規 HIV 迅速スクリーニング検査試薬であるダイナスクリーン・HIV Combo は HIV-1 p24 抗原が検出できることから、ウインドウ期の短縮が可能である。実際に陽性検体の測定では、感染初期検体 1 例において、従来品では陰性であったが、Combo では抗原を検出することが可能であった。

一方、陰性検体の検討では、血漿検体において、従来品ではすべて陰性であったが、Combo では 1 例の抗原陽性例が見られた。この検体は全血検体では抗原ラインの出現が見られなかった。従来品および Combo の偽陽性例を双方で測定したところ、お互いの偽陽性はほぼ一致しないことが分かった。特異性の検討については、もう少し例数を増やして測定する必要があると考える。

今回、検討を行った Geenius および Combo は、ともに従来品よりも性能に優れ、HIV 診断試薬として非常に有用であることが示唆された。

E. 結論

今年度は新規 HIV 診断試薬である Geenius HIV-1/2 Confirmatory assay およびダイナスクリーン・HIV Combo の検討を行った。どちらの試薬

も従来品よりも性能に優れ、HIV 診断試薬として非常に有用であることが示唆された。

F.健康危険情報

なし

G.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) 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. In press.

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.

H.知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

①特許取得

なし

②実用新案登録

なし

③その他

なし

Geenius HIV1/2 Confirmatory assay: 操作方法

[Geenius cassette]



- ① Serum/Plasma : 5 μ l into well 1
Whole Blood : 15 μ l into well 1

Buffer : 2 Drop into well 1

Wait 5 minutes

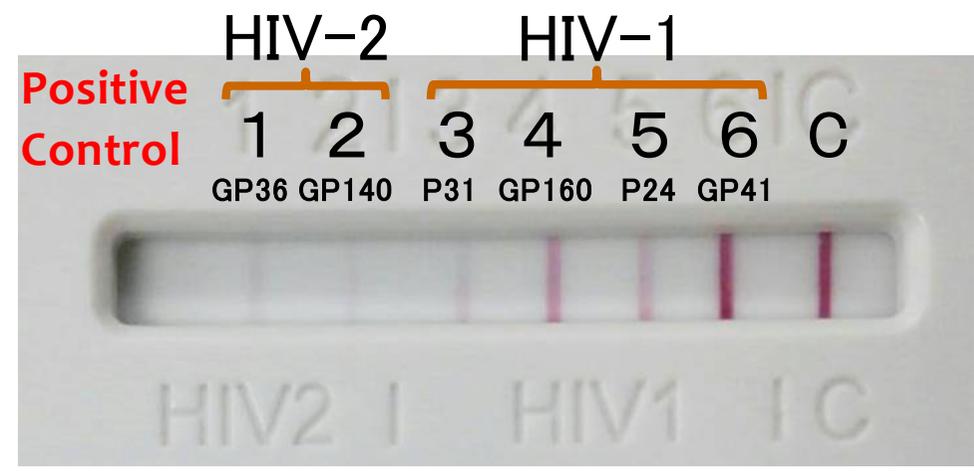
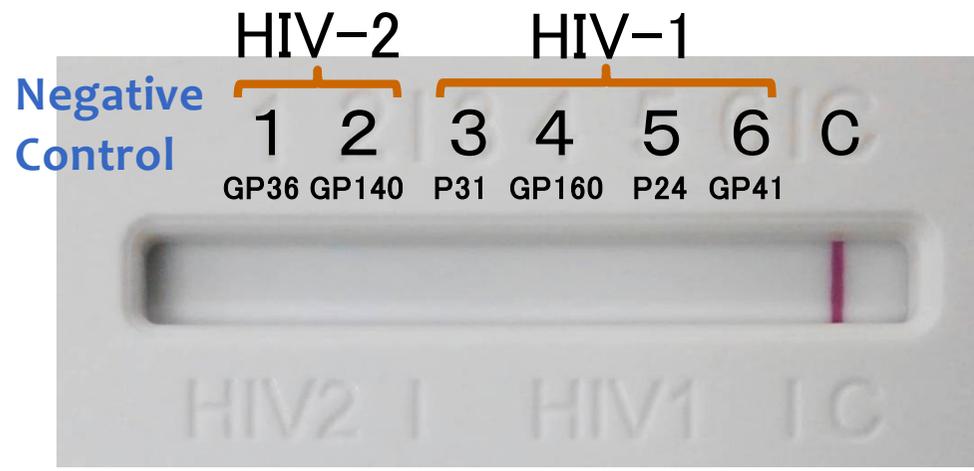
- ② Buffer : 5 Drop into well 2

Wait 20 minutes

[Geenius reader and Notebook]



Geenius HIV1/2 Confirmatory assay: 結果判定



| line | Band | |
|------|---------|----------------------|
| 1 | HIV-2 | GP36: env |
| 2 | HIV-2 | GP140: env |
| 3 | HIV-1 | P31: pol (integrase) |
| 4 | HIV-1 | GP160: env |
| 5 | HIV-1 | P24: gag |
| 6 | HIV-1 | GP41(group M & O) |
| C | control | Protein A |

| 判定 | 判定基準 |
|----------|--|
| 測定系の確認 | コントロールバンドが出現しなければならない |
| HIV陰性 | HIV-1とHIV-2のバンドが出現しない |
| HIV-1 陽性 | 少なくとも1本のENVバンド(GP160またはgp41)を含んだ、少なくとも2つのHIV-1バンドが出現する |
| HIV-2 陽性 | GP140とGP36のHIV-2バンドが両方出現する |
| 判定保留 | HIV-1またはHIV-2陽性基準と一致しないHIV-1またはHIV-2バンドの存在 |

Geenius測定結果 (HIV-1陽性)

< HIV-1陽性検体例 >

| Geenius | | WB-1 | | | WB-2 | | |
|---------------------|-----|------|------|----|------|------|----|
| | | 陽性 | 判定保留 | 陰性 | 陽性 | 判定保留 | 陰性 |
| HIV-1 POSITIVE | 107 | 104 | 3 | 0 | 12 | 92 | 3 |
| HIV-1 INDETERMINATE | 4 | 0 | 4 | 0 | 0 | 2 | 2 |
| HIV-2 INDETERMINATE | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| HIV NEGATIVE | 2 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 2 |

WB-1陽性, WB-2陽性 12例

| sample | PA | | | HIV-1RNA copies/ml | WB-1 | WB-2 | Geenius | | | | | | 判定 |
|--------|--------|-------|---------|-----------------------|------|------|---------|-----|-------|-----|------|---|-------------------|
| | HIV-1 | HIV-2 | HIV-1/2 | | | | HIV-2 | | HIV-1 | | | | |
| | | | | gp36 | | | gp140 | p31 | gp160 | p24 | gp41 | | |
| GM4364 | 102400 | — | 102400 | 4900 | + | + | — | — | + | + | +w | + | HIV-1 POSITIVE |
| GM4366 | 51200 | — | 51200 | 200 | + | + | — | — | + | + | + | + | HIV-1 POSITIVE |
| GM4369 | 51200 | 10 | 25600 | 20000 | + | + | — | — | + | + | +w | + | HIV-1 POSITIVE |
| GM4351 | 204800 | — | 51200 | 17000 | + | + | — | — | +w | + | +w | + | HIV-1 POSITIVE |
| GM4348 | 25600 | 10 | 51200 | 1100 | + | + | — | — | + | + | +w | + | HIV-1 POSITIVE |
| GM4349 | 409600 | — | 204800 | 30000 | + | + | — | — | + | + | — | + | HIV-1 POSITIVE |
| GM4370 | 51200 | 10 | 51200 | 4500 | + | + | — | — | + | + | — | + | HIV-1 POSITIVE |
| GM4322 | 51200 | — | 51200 | 590 | + | + | — | — | + | + | + | + | HIV-1 POSITIVE |
| GM4324 | 25600 | — | 25600 | 4300 | + | + | — | — | +w | + | +w | + | HIV-1 POSITIVE |
| GM4372 | 51200 | — | 51200 | 12000 | + | + | — | — | + | + | — | + | HIV-1 POSITIVE |
| GM4384 | 204800 | — | 204800 | 30000 | + | + | — | — | + | + | +w | + | HIV-1 POSITIVE |
| Y242-3 | 256000 | 6400 | 128000 | 2900 | + | + | + | — | + | + | + | + | HIV-1 POSITIVE |

WB-1判定保留7例、陰性2例

| sample | PA | | | HIV-1RNA copies/ml | WB-1 | WB-2 | Geenius | | | | | | 判定 |
|----------|-------|-------|---------|-----------------------|------|------|---------|-----|-------|-----|------|----|----------------------------|
| | HIV-1 | HIV-2 | HIV-1/2 | | | | HIV-2 | | HIV-1 | | | | |
| | | | | gp36 | | | gp140 | p31 | gp160 | p24 | gp41 | | |
| GM4346 | 1280 | — | 640 | 1200 | ± | ± | — | — | — | + | + | + | HIV-1 POSITIVE |
| GM4334 | 64 | — | 1024 | 3.3×10^6 | ± | ± | — | — | — | +w | — | +w | HIV-1 POSITIVE |
| GM4386 | 80 | — | 1280 | 1200 | ± | ± | — | — | — | +w | — | +w | HIV-1 POSITIVE |
| GM4327 | — | — | 64 | 2300 | ± | — | — | — | — | — | — | +w | HIV-1 INDETERM INATE |
| GM4336 | 128 | — | 256 | 3.3×10^5 | ± | — | — | — | — | — | — | +w | HIV-1 INDETERM INATE |
| GM4373-1 | — | — | 512 | 7.5×10^5 | ± | ± | — | — | — | +w | — | +w | HIV-1 INDETERM INATE |
| PP034 | ND | ND | ND | ND | ± | ± | — | — | — | — | — | + | HIV-1 INDETERM INATE |
| GM4373-0 | — | — | — | 2.8×10^7 | — | — | — | — | — | — | — | — | HIV NEGATIVE |
| Y824 | — | — | — | 1.7×10^6 | — | — | — | — | — | — | — | — | HIV NEGATIVE |

Geenius測定結果 (HIV陰性)

< HIV陰性検体130例 >

| Geenius | | WB-1 | | | WB-2 | | |
|---------------------|-----|------|------|-----|------|------|-----|
| | | 陽性 | 判定保留 | 陰性 | 陽性 | 判定保留 | 陰性 |
| HIV POSITIVE | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| HIV-1 INDETERMINATE | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| HIV-2 INDETERMINATE | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| HIV NEGATIVE | 128 | 0 | 24 | 104 | 0 | 12 | 116 |

HIV迅速スクリーニング検査試薬

抗体検査試薬

ダイナスクリーン・HIV-1/2

(アリーアメディカル 承認1998年)

抗原抗体検査試薬

エスプライン HIV Ag/Ab (富士レビオ 承認2008年)

ダイナスクリーン・HIV Combo

(アリーアメディカル 承認2015年)

ダイナスクリーン試薬

ダイナスクリーン・HIV-1/2



抗体検査法

ダイナスクリーン・HIV Combo

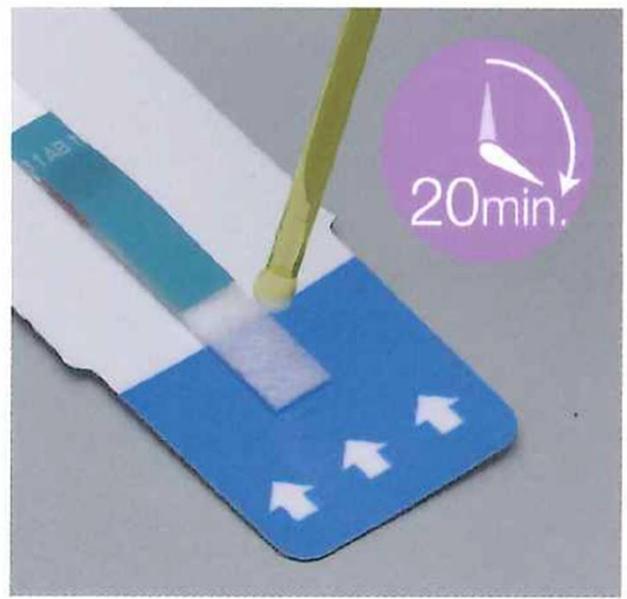


抗原抗体
同時検査法

| | | |
|-------|-----------------|---------------------------------|
| 検出項目 | HIV-1抗体、HIV-2抗体 | HIV-1抗体、HIV-2抗体、 HIV-1 p24抗原 |
| 検体 | 血清、血漿、全血 | 血清、血漿、全血 |
| 血液検体量 | 50 μ L | 50 μ L |
| 反応時間 | 15分 (~1時間) | 20分 (~40分) |
| 判定ライン | 赤色 | 赤色 |

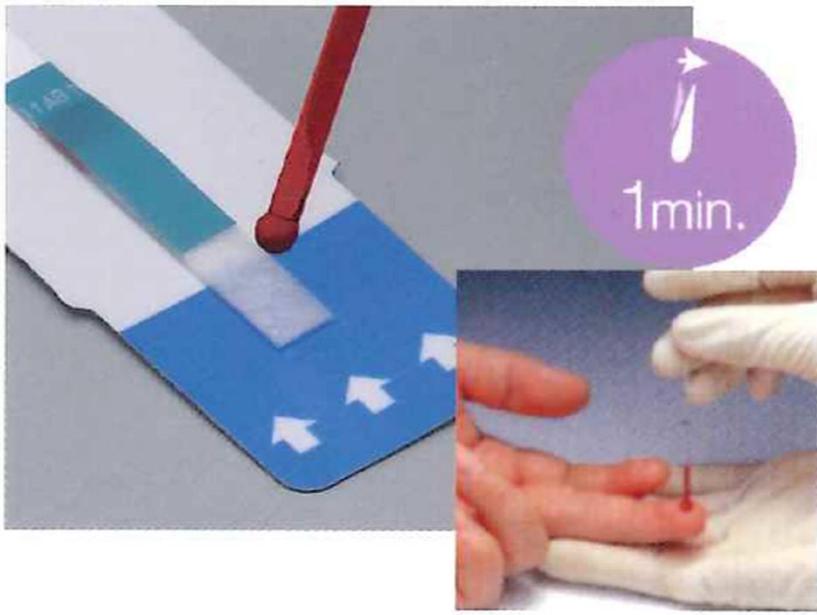
ダイナスクリーン・HIV Combo 操作法

血清・血漿

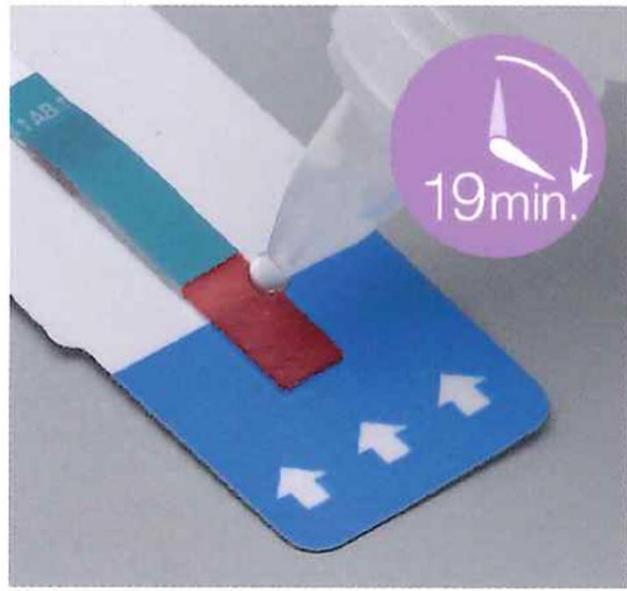


50µLを検体滴下部に滴下後、20分間静置し判定

全血



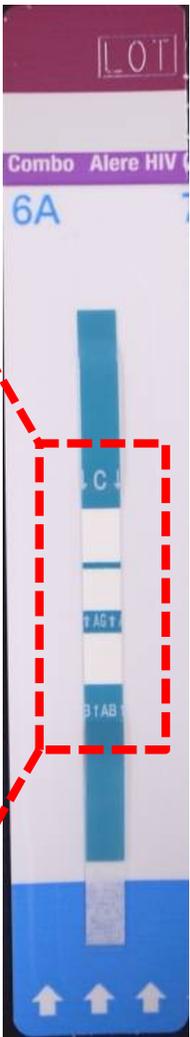
50µLを検体滴下部に滴下し染み込むまで1分間静置



1分後、全血展開液を1滴滴下し、19分間静置

ダイナスクリーン・HIV Combo 判定法

| | 陰性 | 陽性 | | | 無効 | | | |
|------------|----|------|------|--------|----|---|---|---|
| コントロールライン→ | 有 | 有 | 有 | 有 | 無 | 無 | 無 | 無 |
| 抗原判定ライン→ | 無 | 有 | 有 | 有 | 無 | 無 | 無 | 無 |
| 抗体判定ライン→ | 有 | 有 | 有 | 有 | 有 | 有 | 有 | 有 |
| | | 抗体陽性 | 抗原陽性 | 抗原抗体陽性 | | | | |



ダイナスクリーン測定結果(血漿)

(2017年2月28日現在)

| 血漿 | ダイナスクリーン・HIV-1/2 | | ダイナスクリーン・HIV Combo | | | |
|----------------------|------------------|-----|--------------------|-------------|------------|-----|
| | 陽性 | 陰性 | Agのみ 陽性 | Ag/Ab 陽性 | Abのみ 陽性 | 陰性 |
| HIV陽性検体 30例 | 29 | 1 | 1* | 2** | 27 | 0 |
| HIV陰性検体 229例 | 0 | 229 | 1 | 0 | 0 | 228 |
| DS・HIV-1/2 偽陽性 6例 | 6 | 0 | 0 | 0 | 1 | 5 |
| DS・Combo 偽陽性 1例 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |

* HIV-1 RNA 1,700,000 c/mL ** 350,000 c/mL
 ** 30,000 c/mL

ダイナスクリーン測定結果(全血)

(2017年2月28日現在)

| 全血 | ダイナスクリーン・HIV-1/2 | | ダイナスクリーン・HIV Combo | | | |
|----------------------|------------------|-----|--------------------|---------|--------|-----|
| | 陽性 | 陰性 | Agのみ陽性 | Ag/Ab陽性 | Abのみ陽性 | 陰性 |
| HIV陽性検体 21例 | 21 | 0 | 0 | 1* | 20 | 0 |
| HIV陰性検体 204例 | 0 | 204 | 0 | 0 | 0 | 204 |
| DS・HIV-1/2 偽陽性 1例 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |

* HIV-1 RNA 150,000 c/mL