

厚生労働科学研究費補助金 【エイズ対策政策研究事業】

HIV 検査受検勧奨に関する研究

分担研究報告書

乾燥濾紙血を用いた HIV-1 RNA 検出法

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)

須藤 弘二 (慶應義塾大学医学部 微生物学・免疫学教室)

藤原 宏 (慶應義塾大学病院 感染制御センター)

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

乾燥濾紙血 (DBS) を用いた信頼性の高い核酸検査法の確立を試みた。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-1 感染患者の血漿と健常人の血球成分を混合した再構成全血を用いて 3 種類の濾紙からの HIV-1 RNA 抽出をおこなった。RNA 回収率は 3 種類の濾紙の間 (903 Protein Saver Card と FTA Elute Micro Card ; Whatman、東洋濾紙) で有意差が見られなかった。リアルタイム PCR での測定についても試みた。測定に MGB プローブを用いることにより強い蛍光強度が得られた。ポアソン実験により本リアルタイム PCR で HIV-1 RNA および DNA の 1 コピーを検出できることがわかった。濾紙血からの HIV-1 RNA 回収率が FTA Card で 27%であったことより、およそ 1500 コピー/mL 以上であれば核酸抽出が可能であると考えられた。

A.研究目的

現在、日本の HIV-1 郵送検査では主に DBS を用いて抗体検査が行われている。また、DBS の利用は医療資源の少ない地域や、採血の困難な新生児において、非常に有用である。しかし、抗体のみによる検査では偽陽性や偽陰性の問題を抑えることができない。そこで我々は、DBS を用いた HIV 検査法の信頼性を高めるため、これによる核酸検査法の確立を試みた。

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。検体として、HIV-1 感染患者

の血漿と健常人の血球成分を混合した再構成全血を用いた。この再構成全血を 3 種類の濾紙 (903 Protein Saver Card と FTA Elute Micro Card ; Whatman、東洋濾紙) 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、QIAGEN MinElute Virus Spin Kit で RNA 抽出をおこなった。回収率はポアソン分布を用いた RT-nested PCR によって求めた。RT-nested PCR で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た。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。

リアルタイム PCR での測定方法も検討した。プローブを neted-PCR の二回目の PCR のプライマー対の内側に設定した。プローブは TAMRA プローブと MGB プローブを比較した。1 コピーが

検出できるかしらべるために MGB プローブを用いて、RNA および DNA のポアソン分布実験をおこなった。1 反応あたり 0.51 コピーの DNA および RNA になるようにし、リアルタイム PCR をおこなった (n=16)。

C. 研究結果

既知濃度の 8E5 株を用いた RNA 回収率は 67% であった。再構成全血から直接抽出した RNA 量を 100% としたとき、濾紙血からの RNA 抽出量は 903 で 20.8%、FTA で 27.1%、東洋濾紙で 18.4% であった (表 1)。3 つの濾紙の間に有意差は認められなかった。リアルタイム PCR のプローブの比較は HIV-1 RNA および DNA の標準試料を用いた検量線で比較した。MGB プローブの方が蛍光強度が強いことがわかった (図 1, 図 2)。本リアルタイム PCR 法で 1 コピーが検出できるか調べるため、MGB プローブを用いてポアソン分布実験をおこなった。1 反応あたり 0.51 コピーの HIV-1 RNA および HIV-1 DNA になるようにし、リアルタイム PCR をおこなった (n=16)。HIV-1 RNA では陽性数が 9 個/16 個、HIV-1 DNA では陽性数が 7 個/16 個と、RT-nested PCR の結果から予測される陽性数 6.4 個/16 個とほぼ同等の結果が得られた (図 3)。このことから本リアルタイム PCR で HIV-1 RNA および DNA の 1 コピーを検出できることがわかった。

表 1 濾紙血からの RNA 抽出率の比較

濾紙		平均回収率
903 Protein Saver Card	Whatman	20.8%
FTA Elute Micro Card	Whatman	27.1%
国内郵送検査用濾紙	東洋紡	18.4%

(n=3)

図 1 リアルタイム PCR のプローブの比較 (HIV-1 RNA)

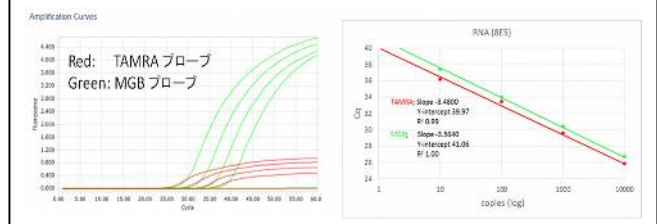


図 2 リアルタイム PCR のプローブの比較 (HIV-1 DNA)

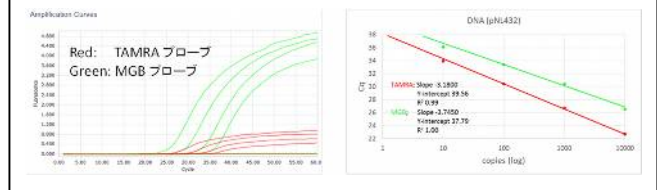
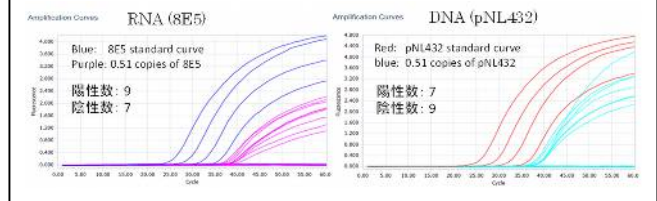


図 3 リアルタイム PCR による 1 コピー HIV-1 RNA/DNA の検出 (ポアソン分布)



D. 考察と結論

本法を用いることにより、使用する濾紙血に含まれる血漿量、濾紙からの RNA 回収率、95% の確率で 1 コピーを検出するためには 3 コピー必要であることを考慮すると、およそ 1500 コピー/mL 以上であれば核酸検出が可能であると考えられる。今後、RNA の回収率をさらに高めるため、濾紙からの抽出法の改良および RNase の不活化操作を検討する必要がある。

HIV-1 は血液中に抗体より RNA の方が早期に出てくることが知られている。郵送検査において、DBS からの核酸検査法を加えることにより、検査の精度が高まるとともに、感染をより早い時期に判定することが可能になると考えられる。

E.健康危険情報

なし

F.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 にラレ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.

G. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

- ① 特許取得
取得予定
- ② 実用新案登録
なし
- ③ その他
なし