

郵送検査の検体郵送条件に関する検討

研究分担者 加藤 眞吾 (株式会社ハナ・メディテック)
研究協力者 須藤 弘二 (株式会社ハナ・メディテック)

研究要旨

郵送検査に用いられる乾燥ろ紙血の安定性を調べるため、保存期間、温度、湿度、ろ紙乾燥時間が抗体価に与える影響を検討した。HIV 陽性血漿 4 種類と梅毒陽性血漿 1 種類の再構成全血 5 種類を用いて乾燥ろ紙血を作成し、上記の条件下に静置した後に、ろ紙から抗体を抽出して抗体価を測定した。その結果、乾燥ろ紙血を 45℃で 8 日間保存した場合のみ、5 種類中 3 種類の陽性血漿で抗体価の低下がみられ、それ以外の温度、湿度、ろ紙乾燥時間の条件では抗体価の低下はみられなかった。すなわち乾燥ろ紙血は、40℃であれば 8 日間、45℃であれば 2 日間は抗体価の低下が起こらないことが分かった。このことから、乾燥ろ紙血検体を仮に通常郵送で送付した場合、抗体価の低下が起こる可能性が低いと考えられる。

A.研究目的

現在 HIV 検査は、土曜・日曜・夜間検査、即日検査や NAT 検査等の検査希望者のニーズに合わせた検査が、保健所・病院・民間クリニック等の検査・医療機関で行われている。それらに加えて、インターネット上では、検査希望者が検査機関に行くことなしに HIV 検査を受検することができる“HIV 郵送検査”を取り扱う Web サイトが存在し、その検査数は増加しつつある。

HIV 郵送検査の多くは、血液をろ紙に採取し乾燥させた、乾燥ろ紙血を検体として用いている。乾燥ろ紙血は、4℃または-20℃で保管した場合、10 年以上の長期間にわたって抗体価が低下しないことが報告されているが(Hannon WJ et al. A quality assurance program for human immunodeficiency virus seropositivity screening of dried-blood spot specimens. Infect Control Hosp

Epidemiol 1989; 10:8-13.)、どのような環境条件で乾燥ろ紙血の抗体価が低下するのかは報告されていない。

本研究では、郵送検査に用いられる乾燥ろ紙血の安定性を調べるため、保存期間、温度、湿度、ろ紙乾燥時間が与える影響を検討することを目的とした。

B.研究方法

パネル血漿を用いた再構成全血で乾燥ろ紙血を作成し、保存期間、温度、湿度、ろ紙乾燥時間が異なる条件下に静置した後にろ紙から抗体を抽出して抗体価を測定した。

<材料>

以下の HIV 陽性血漿 4 種類と梅毒陽性血漿 1 種類のパネル血漿を用いて、再構成全血および乾燥ろ紙血を作成した。

HIV① SeroDetect HIV-Ab Range Validation Panel KZM024, #10, ZeptoMetrix 社

HIV② AccuVert HIV-1 Seroconversion panel

0600-0250, #10, seracare 社

HIV③ AccuVert HIV-1 Seroconversion panel

0600-0251, #10, seracare 社

HIV④ AccuVert HIV-1 Seroconversion panel

0600-0271, #8, seracare 社

TP① Accuset Suphilis Performance panel

0820-0422 #5, seracare 社

<再構成全血作成>

健常人血液を 200 x g で 5 分間遠心し、血漿を除いて健常人血球を分離した。パネル血漿 55% に対し健常人血球 45% を加えて、5 種類のパネル血漿それぞれについて再構成全血 5 検体を作成した（再構成全血 HIV①、②、③、④、TP①）。

<乾燥ろ紙血作成>

再構成全血を 50 μ l ろ紙に滴下し、乾燥させて乾燥ろ紙血を作成した。検体数は再構成全血 HIV①を 3 検体（乾燥ろ紙血 HIV①a、①b、①c）、再構成全血 HIV②、③、④、TP①を各 1 検体（乾燥ろ紙血 HIV②、③、④、TP①）、合計 7 検体作成した。

<乾燥ろ紙血抽出>

乾燥ろ紙血を 1.5 ml チューブに入れ、200 μ l の血清希釈液（測定キットに添付）を加えて室温で 3 時間以上振盪して抗体を抽出し、ろ紙を除いた溶液を 8 倍血漿希釈検体として用いた。

<抗体価測定>

HIV①、②、③、④に対してはジェネディア HIV-1/2 ミックス PA（富士レビオ）、TP①に対してはセロディア-TP・PA（富士レビオ）のキットを使用した。抗体価の測定は、添付説明書の方法に準拠した。

<条件検討>

1. 再構成全血の測定

再構成全血 5 検体について、200 x g で 5 分間遠心して陽性血漿を分離し、抗体価を測定した。

2. 保存期間の検討

保存期間の検討のため、乾燥ろ紙血の当日作

成検体、作成後室温で 2 日保存した検体、作成後室温で 8 日保存した検体について、それぞれの条件下に置いた乾燥ろ紙血の抗体価と再構成全血の抗体価を比較した。

3. 温度条件の検討

温度条件の検討のため、4°C、45°C の条件で 2 日、また 4°C、40°C、45°C の条件で 8 日保存した検体について、それぞれの条件下に置いた乾燥ろ紙血の抗体価と再構成全血の抗体価を比較した。低温条件設定には冷蔵庫を、高温設定にはインキュベーターを用いた。

4. 湿度条件の検討

湿度条件の検討のため、室温の低湿度と高湿度の条件で 2 日および 8 日保存した検体について、それぞれの条件下に置いた乾燥ろ紙血の抗体価と再構成全血の抗体価を比較した。低湿度にはデシケーターを、高湿度には湿箱を用いた。

5. ろ紙乾燥時間の検討

ろ紙血検体を乾燥させる時間の検討のため、再構成全血を滴下した後すぐ検体郵送袋（密封ポリ袋）へ封入した検体と 1 時間乾燥させた後封入した検体について、それぞれの条件の乾燥ろ紙血の抗体価と再構成全血の抗体価を比較した。

C. 研究結果

1. 再構成全血の測定

再構成全血 5 検体について、抗体価を表 1 上段に示した。HIV①の抗体価は 16000 倍、HIV②の抗体価は 3200 倍、HIV③の抗体価は 3200 倍、HIV④の抗体価は 320 倍、TP①の抗体価は 12800 倍であった。

2. 保存期間の検討

作成当日、作成後 2 日、作成後 8 日室温で保存した乾燥ろ紙血 7 検体について、検体作成時の条件（温度、湿度、ろ紙乾燥時間、静置日数）と抗体価を表 1 の条件番号 1、2、3 に示した。作成当日検体の抗体価は、HIV①a、①b、①c がすべて 16000 倍、HIV②が 3200 倍、

HIV③が 1600 倍、HIV④が 320 倍、TP①が 12800 倍であり、再構成全血と比較して HIV③のみ抗体価の低下がみられた。作成後 2 日と 8 日保存した検体の抗体価は、再構成全血と比較して抗体価の低下がみられなかった。

3. 温度条件の検討

作成後 4℃で 2 日、4℃で 8 日、40℃で 8 日、45℃で 2 日、45℃で 8 日保存した乾燥ろ紙血 7 検体について、検体作成時の条件と抗体価を表 1 の条件番号 4、5、6、7、8 に示した。4℃で 2 日と 8 日、40℃で 8 日、45℃で 2 日保存した検体の抗体価は、再構成全血と比較して抗体価の低下がみられなかった。

45℃で 8 日保存した検体の抗体価は、HIV① a、①b、①c がすべて 16000 倍、HIV②が 1600 倍、HIV③が 1600 倍、HIV④が 160 倍、TP①が 12800 倍であり、7 検体中 3 検体（5 種類中 3 種類）の検体で抗体価の低下がみられた。

4. 湿度条件の検討

低湿度で 2 日、低湿度で 8 日、高湿度で 2 日、高湿度で 8 日保存した乾燥ろ紙血 7 検体について、検体作成時の条件と抗体価を表 1 の条件番号 9、10、11、12 に示した。湿度を変化させた条件では、再構成全血と比較して抗体価の低下がみられなかった。

5. ろ紙乾燥時間の検討

再構成全血を滴下した後すぐ封入した検体と 1 時間乾燥させた後封入した検体について、検体作成時の条件と抗体価を表 1 の条件番号 13、14 に示した。ろ紙乾燥時間がなしの検体と 1 時間の検体の両方とも、再構成全血と比較して抗体価の低下がみられなかった。

D. 考察

郵送検査に用いられる乾燥ろ紙血の安定性を調べるため、保存期間、温度、湿度、ろ紙乾燥時間が抗体価に与える影響を検討した結果、乾燥ろ紙血を 45℃で 8 日間保存した場合のみ、5 種類中 3 種類（7 検体中 3 検体）の陽性血漿で

抗体価の低下がみられ、それ以外の温度、湿度、ろ紙乾燥時間の条件では抗体価の低下はみられなかった。乾燥ろ紙血は、40℃であれば 8 日間、45℃であれば 2 日間は抗体価の低下が起らないことが分かった。

保存日数の検討で抗体価の低下がみられ存日数 0 日の乾燥ろ紙血 HIV③検体について、再度検体を作成し抗体価を測定したところ、抗体価は 3200 倍であり、再構成全血検体の結果と一致した。このことから初回の検体作成または抽出時の手技による問題が考えられた。

温度条件の検討で、低温で保存した検体については、既知のとおり抗体価の低下がみられなかった。高温で保存した検体のうち、45℃で 8 日間保存した検体のみ抗体価の低下がみられたが、より高い温度で検体保存を行った場合、より早く抗体価が低下する可能性がある。今回は、夏季の郵送検査を想定し 40℃と 45℃で検討を行ったが、これ以上の温度で検体が送付される可能性を踏まえ、より高い温度での検討も行いたい。

低湿度と高湿度で保存した乾燥ろ紙血を用いた検討では、2 日間と 8 日間保存した検体で抗体価の低下がみられず、乾燥ろ紙血の保存は、低湿度・高湿度とも、少なくとも 8 日間は抗体価に影響を与えないことが分かった。

ろ紙乾燥時間を短くした乾燥ろ紙血を用いた検討について、乾燥時間を短くし、室温で保存した検体では抗体価の低下がみられなかった。乾燥時間を短くした検体を高温で保存した場合、保存できる期間が短くなる可能性が考えられるので、今後そのような条件下での検討も行いたい。

E. 結論

郵送検査で多く用いられる乾燥ろ紙血は、45℃で 8 日間保存した場合のみ 5 種類中 3 種類の陽性血漿で抗体価の低下がみられ、それ以外の温度、湿度、ろ紙乾燥時間の条件では抗体価の低下はみられなかった。すなわち 40℃であれ

ば8日間、45℃であれば2日間は抗体価の低下が起こらないことが分かった。このことから、乾燥ろ紙血検体を仮に通常郵送で送付した場合、抗体価の低下が起こる可能性が低いと考えられる。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamada E, Takagi R, Moro H, Sudo K, Kato S. Saliva as a potential matrix for evaluating pharmacologically active dolutegravir concentration in plasma. PLoS One. 2021 Feb 18;16(2): e0246994. 2021.
- 2) 加藤眞吾. 新型コロナウイルス流行に関する疫学的考察. BIO EX-press秋号. 1-4, 2021.

2. 学会発表

- 1) 須藤弘二、佐野貴子、近藤真規子、今井光信、今村顕史、加藤眞吾. HIV 郵送検査に関する実態調査(2020). 第35回日本エイズ学会学術集会・総会、2021年11月.
- 2) 佐野貴子、近藤真規子、土屋菜穂、井戸田一朗、堅多敦子、須藤弘二、星野慎二、清水茂徳、生島嗣、岩橋恒太、今井光信、加藤眞吾、市川誠一、白阪琢磨、櫻木淳一、今村顕史. COVID-19 流行下におけるウエ

ブサイト「HIV 検査・相談マップ」のサイト利用状況と公的 HIV 検査縮小による影響. 第35回日本エイズ学会学術集会・総会、2021年11月.

- 3) 土屋菜穂、佐野貴子、カエベタ亜矢、城所敏英、関なおみ、根岸潤、堅多敦子、川畑拓也、貞升健志、須藤弘二、加藤眞吾、大木幸子、生島嗣、今井光信、今村顕史. 保健所・検査所における HIV 検査・相談体制と実施状況および課題に関するアンケート調査. 第35回日本エイズ学会学術集会・総会、2021年11月.
- 4) 土屋菜穂、佐野貴子、カエベタ亜矢、城所敏英、関なおみ、根岸潤、堅多敦子、川畑拓也、貞升健志、須藤弘二、加藤眞吾、大木幸子、生島嗣、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35回日本エイズ学会学術集会・総会、2021年11月.
- 5) 近藤真規子、佐野貴子、須藤弘二、井戸田一朗、土屋菜穂、貞升健志、今井光信、加藤眞吾、櫻木淳一、中澤よう子、今村顕史. 新型コロナウイルス感染症流行禍における HIV 検査体制の実態. 第35回日本エイズ学会学術集会・総会、2021年11月.

H.知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

表 1 郵送検査の検体郵送条件検討結果一覧

検体の種類	条件番号	乾燥ろ紙血 環境条件				検体 PA抗体価						
		温度	湿度	保存 日数	ろ紙 乾燥時間	HIV①a	HIV①b	HIV①c	HIV②	HIV③	HIV④	TP①
再構成全血						x16000			x3200	x3200	x320	x12800
乾燥ろ紙血	1	室温(18℃)	62%	0	6時間	x16000	x16000	x16000	x3200	x1600(x3200)	x320	x12800
	2	室温(15-18℃)	53-62%	2	6時間	x16000	x16000	x16000	x3200	x3200	x320	x12800
	3	室温(14-18℃)	53-81%	8	6時間	x16000	x16000	x16000	x3200	x3200	x320	x12800
	4	4℃	53-62%	2	6時間	x16000	x16000	x16000	x3200	x3200	x320	x12800
	5	4℃	53-81%	8	6時間	x16000	x16000	x16000	x3200	x3200	x320	x12800
	6	40℃	51-86%	8	6時間	x16000	x16000	x16000	x3200	x3200	x320	x12800
	7	45℃	53-62%	2	6時間	x16000	x16000	x16000	x3200	x3200	x320	x12800
	8	45℃	53-81%	8	6時間	x16000	x16000	x16000	x1600	x1600	x160	x12800
	9	室温(15-18℃)	低湿度(16%)	2	6時間	x16000	x16000	x16000	x3200	x3200	x320	x12800
	10	室温(14-18℃)	低湿度(16-18%)	8	6時間	x16000	x16000	x16000	x3200	x3200	x320	x12800
	11	室温(15-18℃)	高湿度(85%)	2	6時間	x16000	x16000	x16000	x3200	x3200	x320	x12800
	12	室温(14-18℃)	高湿度(85-87%)	8	6時間	x16000	x16000	x16000	x3200	x3200	x320	x12800
	13	室温(14-18℃)	53-81%	8	なし	x16000	x16000	x16000	x3200	x3200	x320	x12800
	14	室温(14-18℃)	53-81%	8	1時間	x16000	x16000	x16000	x3200	x3200	x320	x12800