

唾液検体を用いた HIV 遺伝子検査の検体郵送に関する検討

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

唾液は採取に痛みを伴わず、心理的敷居が低いため、唾液を検体として用いた検査は、受検しやすい検査として有用である可能性がある。唾液検体を用いた場合の HIV 遺伝子検査について、感度を保ったまま安全に検体を郵送する方法を開発した。保存液を加えた唾液検体は、2 日室温で経過しても正確な測定が可能であることが示された。また保存液の主成分であるグアニジン塩酸塩は強力な変性剤であり、検体の感染性はほぼなくなることから、ただの液体検体より安全に郵便や宅配便で検体を送付することが可能であると考えられる。

A.研究目的

現在病院や検査機関等で行われている HIV 検査は、検体として血清、血漿、全血と、すべて血液由来の検体を用いられている。しかし受検者にとって採血は痛みを伴い、受検に対する心理的敷居となりうる。唾液は採取に痛みを伴わず、心理的敷居が低いため、唾液を検体として用いた検査は、受検しやすい検査として有用である可能性がある。また HIV 遺伝子検査は感染後最も早く陽性を判定できる方法であり、これまでとは異なる層の受検者の需要が期待される。

本研究の目的は、唾液検体を用いた場合の HIV 遺伝子検査について、感度を保ったまま安全に検体を郵送する方法を開発することである。

B.研究方法

<材料>

HIV-1 唾液検体作成のため、既知の濃度の 8E5 株を用意した。濃度はポアソン分布を用いた定量により測定した。希釈には PBS(-)を用い

た。また唾液は健常人の自然唾液を用い、検体中の RNA を保存・安定化させるため、グアニジン塩酸塩を主成分とした保存液を用いた。

<検体抽出及び測定>

RNA 抽出キットとして、QIAamp MinElute Virus Spin Kit (QIAGEN 社)を用いた。溶出は 60 μ l の AVE (キット添付)で行い、測定には 10 μ l の溶出検体を用いた。測定機材は CFX connect Real-time System(BioRad 社)を用い、測定は以前論文にて発表した方法に準じた。(Yamazaki S, Kondo M, Sudo K, et al.. (2016) A Qualitative Real-time PCR assay for HIV-1 and HIV-2 RNA. Japanese Journal of Infectious Diseases. 69:367-372)

C.研究結果 (表 1)

保存液が RNA 抽出に与える影響を検討するため、①PBS 200 μ l、②保存液 150 μ l+PBS 50 μ l の 2 種類について、それぞれ 600 コピーの RNA を含むウイルス粒子 (8E5 株)を加えた検体を各 3 点作成した。それぞれの検体について RNA 抽出を行い、溶出液 60 μ l の 10 μ l を使用して測

定し、2種類の検体の定量値の平均を比較した。その結果、①PBSのみの定量平均値は84コピー、②保存液入りPBSは101コピーであった。

だ液がRNA抽出に与える影響を検討するため、③PBS 150 µl+だ液 50 µl、④保存液 150 µl+だ液 50 µlの2種類についてそれぞれ600コピーのRNAを含むウイルス粒子(8E5株)を加えた検体を各3点作成した。それぞれの検体についてRNA抽出を行い、溶出液60 µlの10 µlを使用して測定し、2種類の検体の定量値の平均を前実験とあわせて比較した。その結果、③PBS 150 µl+だ液 50 µlの定量平均値は57コピー、④保存液 150 µl+だ液 50 µlは73コピーであった。

検体保存に関する検討を行うため、⑤PBS 200 µl、⑥PBS 150 µl+だ液 50 µl、⑦保存液 150 µl+だ液 50 µlの3種類についてそれぞれ600コピーのRNAを含むウイルス粒子(8E5株)を加えた検体を各3点作成し、2日間室温に静置した。また同様の検体を各3点作成し、2日間4°Cに静置した(⑧PBS 200 µl、⑨PBS 150 µl+だ液 50 µl、⑩保存液 150 µl+だ液 50 µl)。それぞれの検体についてRNA抽出を行い、溶出液60 µlの10 µlを使用して測定し、6種類の検体の定量値の平均を前実験とあわせて比較した。その結果、室温の⑤PBS 200 µlの定量平均値は79コピー、⑥PBS 150 µl+だ液 50 µlの定量平均値は26コピー、⑦保存液 150 µl+だ液 50 µlは99コピーであった。また、4°Cの⑧PBS 200 µlの定量平均値は81コピー、⑨PBS 150 µl+だ液 50 µlは32コピー、⑩保存液 150 µl+だ液 50 µlは77コピーであった。

D.考察

保存液がRNA抽出に与える影響を検討した結果、②保存液入りPBSは101コピーであり、100%RNA抽出した場合の理論値である100コピーにほぼ等しいことから、保存液はRNA抽出を阻害しないことが分かった。

だ液がRNA抽出に与える影響を検討した結果、③のPBS入りだ液と④の保存液入りだ液の定量平均値が①②の検体と比較して3割程度減少していた。このことからだ液がRNA抽出の阻害をしていることが考えられた。

検体保存に関する検討を行った結果、保存液を加えていないだ液のみの検体の場合、室温(⑥)、4°C(⑨)とも保存液を加えただ液検体(⑦、⑩)と比較して半分に減少していた。このことから、2日経過する間にだ液中に存在するRNaseが検体中RNAを温度に関係なく分解していることが示された。また保存液を加えただ液検体(⑦、⑩)は2日経過していない検体(④)と比較してほぼ変わらない値であることから、保存液がだ液中RNaseの働きを阻害して検体中RNAを保存していることが考えられた。

E.結論

今回の研究から保存液を加えた唾液検体は、2日室温で経過しても正確な測定が可能であることが示された。また保存液の主成分であるグアニジン塩酸塩は強力な変性剤であり、検体の感染性はほぼなくなることから、ただのだ液検体より安全に郵便や宅配便で検体を送付することが可能であると考えられる。

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) 加藤真吾. 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.

- 3) 加藤眞吾. 新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) に有効な消毒法. 医学のあゆみ. 274(3), 2020.
 - 4) Murayama M, Yamazaki S, Yamada E, Ikeno R, Nagata M, Takagi R, Kato S. Evaluation of intravirion human immunodeficiency virus type 1 RNA degradation activity in saliva by an RNA cleavage quantification method. Oral Science International. 00: 1-7, 2019. DOI: 10.1002/osi2.1032
 - 5) Kobayashi H, Shinjoh M, Sudo K, Kato S, Morozumi M, Koinuma G, Takahashi T, Takano Y, Tamura Y, Hasegawa N. Nosocomial infection by human bocavirus and human hinovirus among paediatric patients with respiratory risks. Journal of Hospital Infection. 103(3): 341-348, 2019. DOI: 10.1016/j.jhin.2019.05.002
 - 6) 加藤眞吾. HIV感染症の検査：郵送検査を含めて. 呼吸器内科. 36(5)440-446, 2019.
 - 7) Kondo M, Sudo K, Sano T, Kawahata T, Itoda I, Iwamuro S, Yoshimura Y, Tachikawa N, Kojima Y, Mori H, Fujiwara H, Hasegawa N, Kato S. 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.
- 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 流行下におけるウェブサイト「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、井戸田一郎、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.
 - 6) 土屋菜穂、佐野貴子、カエベタ亜矢、関なおみ、城所敏英、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 34 回日本エイズ学会学術集会・総会、2020 年 11 月.
 - 7) 土屋菜穂、佐野貴子、カエベタ亜矢、関なおみ、城所敏英、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

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、井戸田一郎、堅多敦子、須藤弘二、星野慎二、清水茂

- 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34回日本エイズ学会学術集会・総会、2020年11月。
- 8) 小谷宙、西松直美、田中千晶、戸蒔祐子、丸山理恵、須藤弘二、上叢義典、宇野俊介、藤原宏、西村知泰、加藤眞吾、長谷川直樹。組み換えPCRを用いた準完全長HIV-1プロトコル定量法の開発。第34回日本エイズ学会学術集会・総会、2020年11月。
- 9) 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(2019)。第34回日本エイズ学会学術集会・総会、2020年11月。
- 10) 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(2018)。第33回日本エイズ学会学術集会・総会、熊本県、2019年11月。
- 11) 土屋菜歩、佐野貴子、近藤真規子、カエベタ亜矢、関なおみ、城所俊英、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33回日本エイズ学会学術集会・総会、熊本県、2019年11月。
- 12) 土屋菜歩、佐野貴子、近藤真規子、カエベタ亜矢、関なおみ、城所俊英、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33回日本エイズ学会学術集会・総会、熊本県、2019年11月。
- 13) 蜂谷敦子、佐藤かおり、豊嶋崇徳、伊藤俊広、林田庸総、岡慎一、瀧永博之、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、加藤眞吾、谷口俊文、猪狩英俊、寒川整、中島秀明、吉野友祐、堀場昌秀、太田康男、茂呂寛、渡邊珠代、松田昌和、重見麗、岡崎玲子、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、中村麻子、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33回日本エイズ学会学術集会・総会、熊本県、2019年11月。
- 14) 佐野貴子、近藤真規子、土屋菜歩、須藤弘二、星野慎二、井戸田一朗、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、今村顕史。ウェブサイト「HIV検査・相談マップ」を用いたHIV検査相談情報の提供とサイト利用状況の解析。第33回日本エイズ学会学術集会・総会、熊本県、2019年11月。
- 15) 近藤真規子、佐野貴子、長島真美、貞升健志、蜂谷敦子、瀧永博之、吉村幸浩、立川夏夫、岩室紳也、井戸田一朗、今井光信、加藤眞吾、椎野貞一郎、吉村和久、菊池正。日本で流行しているHIV-1 CRF01_AEの分子疫学的特徴の解析。第33回日本エイズ学会学術集会・総会、熊本県、2019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 検査結果まとめ

番号	検体組成	静置日数	静置環境	測定 コピー数
①	PBS 200 μ l	なし	なし	84
②	保存液150 μ l+PBS 50 μ l	なし	なし	101
③	PBS150 μ l+だ液 50 μ l	なし	なし	57
④	保存液150 μ l+だ液 50 μ l	なし	なし	73
⑤	PBS 200 μ l	2日	室温	79
⑥	PBS150 μ l+だ液 50 μ l	2日	室温	26
⑦	保存液150 μ l+だ液 50 μ l	2日	室温	99
⑧	PBS 200 μ l	2日	4°C	81
⑨	PBS150 μ l+だ液 50 μ l	2日	4°C	32
⑩	保存液150 μ l+だ液 50 μ l	2日	4°C	77