

## HIV 診断・検査法に係る研究

### 乾燥ろ紙血検体を用いた Geenius 測定の感度の検討

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

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。その検査は CLEIA 法等によるスクリーニング検査であり、確認検査はほとんど行われていない。本研究では、確認検査で用いられる Geenius を使用し、検体として再構成全血およびそれをもとに作成した乾燥ろ紙血それぞれの抗体価を調べることにより、乾燥ろ紙血を検体として使用した場合の感度低下の有無を調査し、Geenius の検体として乾燥ろ紙血が使用できる可能性を検討した。はじめに 4 種類の HIV 陽性パネル血漿と健常人血球を混合してそれぞれ再構成全血を作成し、抗体価を測定した。次に再構成全血をろ紙に滴下し 24 時間以上乾燥させて乾燥ろ紙血を作成した。その後、全血の 4 倍量の Geenius 展開液を用いて 3 時間振盪し抗体を抽出することにより乾燥ろ紙血抽出液を作成し、抽出液 60  $\mu$ l を使用して抗体価を測定した。その結果、再構成全血と乾燥ろ紙抽出液の抗体価は 4 種類すべての検体で同じであり、乾燥ろ紙血は再構成全血と同じ感度を得られることが分かった。今後臨床検体を調査することにより、郵送検査陽性の確認検査に Geenius が用いることが可能か調査を行いたい。

#### 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、その検査割合は増加しつつある。

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。その検査は CLEIA 法等によるスクリーニング検査であり、確認検査はほとんど行われていない。

本研究では、確認検査で用いられる Geenius HIV 1/2 キット(バイオ・ラッド、以下 Geenius)を使用し、検体として再構成全血と乾燥ろ紙血それぞれの感度の抗体価を調べることにより、乾燥

ろ紙血の感度低下の有無を調査し、Geenius の検体として乾燥ろ紙血が使用できる可能性を検討した。

#### B.研究方法

パネル血漿と健常人血球を用いて再構成全血を作成した。また再構成全血をろ紙に滴下して乾燥することにより乾燥ろ紙血を作成した。その後、乾燥ろ紙血から乾燥ろ紙血抽出液を作成し、再構成全血と乾燥ろ紙血それぞれについて希釈系列を作成し、Geenius および PA 法による抗体価を測定した。

<材料>

以下の HIV 陽性血漿 4 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 SeroDetect HIV-Ab Range Validation

Panel KZM024, #7, ZeptoMetrix 社

HIV③ SeroDetect HIV-Ab Range Validation

Panel KZM024, #8, ZeptoMetrix 社

HIV④ SeroDetect HIV-Ab Range Validation

Panel KZM024, #9, ZeptoMetrix 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、4 種類のパネル血漿それぞれについて再構成全血を作成した。再構成全血 HIV① の検体量は 200  $\mu$ l、再構成全血 HIV ②、③、④ は各 100  $\mu$ l 作成した。

#### <乾燥ろ紙血作成>

再構成全血 HIV① を 3 枚のろ紙に各 50  $\mu$ l 滴下し、24 時間以上乾燥させて乾燥ろ紙血を作成した。また、再構成全血 HIV②、③、④ を 1 枚のろ紙に 50  $\mu$ l 滴下し、同様に乾燥ろ紙血を作成した。

#### <乾燥ろ紙血抽出液作成>

乾燥ろ紙血を 1.5 ml チューブに入れ、200  $\mu$ l の Geenius 展開液 (測定キットに添付) または PA 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乾燥ろ紙血抽出液とした。

#### <抗体価測定>

Geenius の測定方法および判定は、検体量を除き添付説明書に準拠した。PA 法はジェネディア HIV-1/2 ミックス PA (富士レリオ) のキットを使用した。測定方法および判定は、添付説明書に準拠した。

#### <測定検討>

##### 1. 再構成全血の抗体価測定

再構成全血 4 検体について、Geenius を用いて最終的に陽性となる希釈倍数である抗体価を測定した。希釈は健常人血漿 55%、健常人血球 45% で作成した陰性再構成全血を用いた。検体量は全血検体と同様に 15  $\mu$ l を用いた。

##### 2. 抗体抽出に用いる溶媒の検討

抗体抽出に用いる溶媒の検討のため、Geenius のキットに添付されている Geenius 展開液と、以前の検討で PA による抗体価の低下がほぼ見られなかった PA 血清希釈液の 2 種類の溶媒を用いた。乾燥ろ紙血 HIV① について、2 種類の溶媒で乾燥ろ紙血抽出液を作成し、Geenius を用いてそれぞれの抗体価を測定し、再構成全血の抗体価と比較した。検体希釈はそれぞれ抽出を行った溶媒を用いた。検体量は全血検体と同様に 15  $\mu$ l を用いた。

##### 3. 検体量による影響の検討

検体量による影響の検討のため、乾燥ろ紙血抽出液の検体量を 60  $\mu$ l にした場合の Geenius の抗体価を測定し、再構成全血との抗体価と比較した。検体滴下後の展開液滴下は 15  $\mu$ l とした。検体希釈は Geenius 展開液を用いた。

##### 4. 検体による影響の検討

検体による影響の検討のため、乾燥ろ紙血 HIV ②、③、④ について Geenius 展開液で抗体を抽出し、Geenius を用いてそれぞれの抗体価を測定して再構成全血の抗体価と比較した。検体希釈は Geenius 展開液を用いた。検体量は 60  $\mu$ l 用いた。

##### 5. Geenius と PA 法の抗体価の比較

Geenius と PA 法の抗体価の比較のため、Geenius 展開液で抗体を抽出したろ紙抽出液 4 種類について、PA 法でそれぞれの抗体価を測定し、Geenius との抗体価を比較した。検体希釈は PA 血清希釈液を用いた。

## C. 研究結果

##### 1. 再構成全血の抗体価測定

再構成全血 4 検体について、Geenius 抗体価を表 1 に示した。HIV① の再構成全血抗体価は 100 倍、HIV② と ③ の抗体価は 2 倍、HIV④ の抗体価は 20 倍であった。

##### 2. 抗体抽出に用いる溶媒の検討

HIV① の再構成全血と乾燥ろ紙血抽出液の Geenius 抗体価を表 2 に示した。乾燥ろ紙血抽出液の抗体価は、Geenius 展開液と PA 血清希釈液で抗体を抽出した 2 種類を示した。再構成全血の

抗体価が 100 倍なのに対し、乾燥ろ紙血抽出液の抗体価は Geenius 展開液、PA 血清希釈液とも 25 倍であった。

### 3. 検体量による影響の検討

HIV①の再構成全血と 60  $\mu$ l の検体量を用いた場合の乾燥ろ紙血抽出液の Geenius 抗体価を表 3 に示した。乾燥ろ紙血抽出液の抗体価は、溶媒として Geenius 展開液と PA 血清希釈液で抗体を抽出した 2 種類を示した。再構成全血の抗体価が 100 倍なのに対し、乾燥ろ紙血抽出液の抗体価は Geenius 展開液、PA 血清希釈液とも 100 倍であった。

### 4. 検体による影響の検討

HIV①、②、③、④について、再構成全血と乾燥ろ紙血抽出液の Geenius 抗体価を表 4 に示した。乾燥ろ紙血抽出液の抗体価は、HIV①が 100 倍、HIV②と③が 2 倍、HIV④が 20 倍であり、4 種類すべての検体で再構成全血の抗体価と同じであった。

### 5. Geenius と PA 法の抗体価の比較

HIV①、②、③、④のろ紙抽出液について、Geenius と PA 法の抗体価を表 5 に示した。HIV①の PA 抗体価は 8000 倍であり、Geenius 抗体価の 100 倍と比較すると 80 倍感度が高かった。HIV②の PA 抗体価は 200 倍であり、Geenius 抗体価の 2 倍と比較すると 100 倍感度が高かった。HIV③の PA 抗体価は 400 倍であり、Geenius 抗体価の 2 倍と比較すると 200 倍感度が高かった。HIV④の PA 抗体価は 2000 倍であり、Geenius 抗体価の 20 倍と比較すると 100 倍であった感度が高かった。

## D. 考察

乾燥ろ紙血を用いて Geenius で測定した場合、再構成全血を用いた測定と比較して感度が低下するかを検討するため、以下の実験をおこなった。

はじめに再構成全血を作成し、Geenius による抗体価を測定して基準とした (表 1)。乾燥ろ紙血作成後、4 倍量の溶媒で 3 時間振盪して抗体の抽

出を行い、再構成全血と乾燥ろ紙血抽出液の Geenius による抗体価を比較した結果、2 種類の乾燥ろ紙血抽出液とも再構成全血の 1/4 の抗体価であった (表 2)。乾燥ろ紙血から抗体を抽出する際に 4 倍の溶媒で抽出を行っていることから、2 種類の溶媒ともほぼすべての抗体を回収していることが分かった。

また乾燥ろ紙血抽出液でも全血と同程度の感度で測定できること目的として、検体量を 4 倍にすることによる感度への影響を検討した結果、2 種類の溶媒とも検体量を 4 倍としても感度への影響がなかったことが示された (表 3)。この結果は、4 種類の再構成全血と乾燥ろ紙血抽出液を比較しても同様であった (表 4)。

これらの結果から、乾燥ろ紙血を全血の 4 倍量の Geenius 展開液を用いて 3 時間振盪抽出し、乾燥ろ紙血抽出液を 60  $\mu$ l 使用することにより、全血での測定と同じ感度を得られることが分かった。また Geenius と PA 法の感度を比較した結果、Geenius の感度は PA 法のおよそ 1/80~1/200 であることが分かった (表 5)。

本研究により、確認検査として用いられている Geenius の検体として、乾燥ろ紙血が使用できる可能性が示された。今後郵送検査会社と協力し、臨床検体を調査することにより、郵送検査陽性の確認検査に Geenius が用いることが可能か調査を行いたい。

将来、検体の適用拡大で乾燥ろ紙血が Geenius の検体として認められた場合、受検者が自宅にいてもスクリーニング検査から確認検査まで行うことが可能となる。近年コロナ禍の影響により遠隔医療が普及し始めており、郵送検査による HIV 検査が受検しやすくなる一方、個人情報保護、検査相談、医療機関へのフォローアップ等の支援がより必要になると考えられる。

## E. 結論

郵送検査で用いられる乾燥ろ紙血を検体として、確認検査キットである Geenius で測定した場

合の感度への影響を検討した結果、乾燥ろ紙血から全血の4倍量のGeenius展開液を用いて3時間振盪抽出し、ろ紙抽出液を60 µl 使用することにより、全血での測定と同じ感度を得られることが分かった。

## F.健康危険情報

なし

## G.研究発表

### 1. 論文発表

1) 高木律男、田邊嘉也、須藤弘二、山田瑛子、加藤眞吾。SARS-CoV-2 感染診断のためのPCR 検体採取法および診断精度 一口腔からの検体採取法の検討。日本環境感染学会誌。37(4)、139-142、2022..

### 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(2022)。第36回日本エイズ学会学術集会、浜松市、2022年。

2) 土屋菜歩、佐野貴子、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。COVID-19 流行下での保健所・特設検査所における HIV 検査・相談実施状況と課題及び工夫。第36回日本エイズ学会学術集会、浜松市、2022年。

3) 佐野貴子、近藤真規子、須藤弘二、櫻木淳一、井戸田一朗、今井光信、加藤眞吾、今村顕史。COVID-19 流行下における民間臨床検査センターでの HIV 検査等の実施状況に関する検査。第36回日本エイズ学会学術集会、浜松市、2022年。

4) 近藤真規子、佐野貴子、須藤弘二、井戸田一朗、土屋菜歩、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の2年間(2020-2021年)における HIV 検査体制の実態。第36回日本エイズ学会学術集会、浜松市、2022年。

5) 小島賢一、加藤眞吾、長尾 梓、久慈直昭。精液洗浄技術を利用した挙児希望相談ー最近10年間の傾向ー。第36回日本エイズ学会学術集会、浜松市、2022年。

6) 川畑拓也、浜みなみ、阪野文哉、森 治代、加藤眞吾、今村顕史。Geenius と WB 法の感度・鑑別能の比較。第36回日本エイズ学会学術集会、浜松市、2022年。

## 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

表 1 再構成全血の抗体価測定

検体	検体種類	検体量	希釈検体測定結果										Geenius 抗体価		
			x1	x2	x4	x8	x10	x20	x40	x80	x100	x200			
HIV①	再構成全血	15 ul	+					+				+	±	x100	
HIV②			+	+	±		-							x2	
HIV③			+	+	±		-								x2
HIV④			+				+	+	±			-			x20

表 2 抗体抽出に用いる溶媒の検討

検体	検体種類	抗体抽出溶媒	検体量	希釈検体測定結果										Geenius 抗体価	再構成全血に 対する割合(%)			
				x1	x2	x4	x8	x10	x20	x25	x40	x80	x100			x200		
HIV①	再構成全血	PA血清希釈液	15 ul	+					+					+	±	x100		
	乾燥ろ紙血 抽出液	Geenius展開液							+	+	+	±					x25	25%
		Geenius展開液							+	+	+	±					x25	25%

表 3 検体量による影響の検討

検体	検体種類	抗体抽出溶媒	検体量	希釈倍数										Geenius 抗体価	再構成全血に 対する割合(%)		
				x1	x2	x4	x8	x10	x20	x40	x80	x100	x200				
HIV①	再構成全血	PA血清希釈液	15 ul	+					+					+	±	x100	
	乾燥ろ紙血 抽出液	Geenius展開液	60 ul											+	±	x100	100%
		Geenius展開液												+	±	x100	100%

表 4 検体による影響の検討

検体	検体種類	抗体抽出溶媒	検体量	希釈倍数(全血検体換算)										Geenius 抗体価	再構成全血に 対する割合(%)		
				x1	x2	x4	x8	x10	x20	x40	x80	x100	x200				
HIV①	再構成全血	Geenius展開液	15 ul	+					+					+	±	x100	
	乾燥ろ紙血抽出液	Geenius展開液	60 ul											+	±	x100	100%
HIV②	再構成全血	Geenius展開液	15 ul	+	+	±		-								x2	
	乾燥ろ紙血抽出液	Geenius展開液	60 ul		+	±										x2	100%
HIV③	再構成全血	Geenius展開液	15 ul	+	+	±		-								x2	
	乾燥ろ紙血抽出液	Geenius展開液	60 ul		+	±										x2	100%
HIV④	再構成全血	Geenius展開液	15 ul	+				+	+	±				-		x20	
	乾燥ろ紙血抽出液	Geenius展開液	60 ul						+	±						x20	100%

表 5 Geenius と PA 法の抗体価の比較

検体	検体種類	抗体抽出溶媒	Geenius 抗体価	PA 抗体価	PA/Geenius
HIV①	乾燥ろ紙血 抽出液	Geenius展開液	x100	x8000	80
HIV②			x2	x200	100
HIV③			x2	x400	200
HIV④			x20	x2000	100