

乾燥ろ紙血臨床検体を用いた Geenius 測定の検討

◎研究協力者 須藤 弘二（株式会社ハナ・メディテック）
研究分担者 加藤 真吾（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、検体として実際に郵送検査会社で検査を行った乾燥ろ紙血の残渣を用いることにより、乾燥ろ紙血を用いた確認検査の可能性を検討した。

郵送検査会社で、陰性と判定された 5 例と、陽性と判定された 5 例、計 10 例の乾燥ろ紙血を検体として、その残渣から抗体の抽出を行い、Geenius による測定を行った。また陽性 5 検体について PA 法により抗体価を測定し、うち残渣が多かった 3 検体について RT-nested PCR による定性遺伝子検査を行った。

Geenius で測定した結果、郵送検査陰性 5 検体はすべて陰性、郵送検査陽性 5 検体中 4 例は陽性であった。郵送検査陽性で Geenius で陽性であった 4 例は PA でも抗体価 320 倍～16000 倍と陽性であり、残渣が多かった 2 例については遺伝子検査でも陽性であった。郵送検査陽性で Geenius 陰性であった 1 例は、PA の抗体価が 32 倍で、遺伝子検査が陰性であることから判定保留とした。

今後より多くの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どうかを続けて調査したい。

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 IC 法による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、検体として実際に郵送検査会社で検査を行った乾燥ろ紙血の残渣を用いることにより、乾燥ろ紙血を用いた確認検査の可能性を検討した。

B.研究方法

郵送検査会社で、陰性と判定された 5 例と、陽性と判定された 5 例、計 10 例の乾燥ろ紙血を検体として、その残渣から抗体の抽出を行い、Geenius による測定を行った。また陽性 5 検体について PA 法により抗体価を測定し、うち残渣が多かった 3 検体について RT-nested PCR による定性遺伝子検査を行った。

<材料>

郵送検査会社 A 社で検査を行い、陽性と判定

された乾燥ろ紙血の残渣 5 検体と陰性と判定された 5 検体、計 10 検体を対象とした。

<Geenius 測定>

陰性乾燥ろ紙血 5 検体を N1-N5、陽性乾燥ろ紙血 5 検体を P1-P5 とし、それぞれ残渣の面積を測定して 1.5 ml チューブに入れた。各検体に対し、残渣面積より推定される血液量の 4 倍の Geenius 展開液（キットに添付）を加えた後、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 4 倍希釈の乾燥ろ紙血抽出液とした。

Geenius の測定方法として抽出液を 60 μ l、Geenius 展開液を 15 μ l 滴下し、その後の測定方法および判定は、添付説明書に準拠した。

<PA 法による抗体価測定>

陽性 5 検体（P1-P5）の乾燥ろ紙血抽出液について、PA 法により抗体価測定を行った。PA 法のキットとしてジェネディア HIV-1/2 ミックス PA（富士レビオ）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。抗体価測定の方法をとして、血清希釈液（キットに添付）を用いて各検体の希釈を行い、陽性と判定された最終希釈倍数を検体の抗体価とした。

<RT-nested PCR による定性遺伝子検査>

乾燥ろ紙血の残渣量が多かった陽性 3 検体（P1、P3、P5）について、それぞれ 1.5 ml チューブに入れた。各検体に対し、グアニジン塩酸塩溶液を主成分とした溶液を 200 μ l 加えた後、室温で 3 時間以上振盪して核酸を抽出し、QIAamp MinElute Virus Spin Kit (QIAGEN) を用いて核酸精製を行って、RT-nested PCR に用いる検体とした。RT-nested PCR は、論文（Yamazaki S, Kondo M, Sudo K, Ueda T, Fujiwara H, Hasegawa N, Kato S. Qualitative Real-Time PCR Assay for HIV-1 and HIV-2 RNA. Jpn J Infect Dis. 2016 Sep 21;69(5): 367-72. doi: 10.7883/yoken.JJID.2015.309. Epub 2016 Jan 8.）に記述した方法で行った。

C.研究結果

1. Geenius 測定結果

陰性 5 検体（N1-N5）、陽性 5 検体（P1-P5）の乾燥ろ紙血について、Geenius で測定した結果を表 1、Geenius 判定の列に示した。陰性検体である N1-N5 はすべて陰性であった。また陽性検体のうち、P1 は陰性、P2-P5 は陽性であり、5 検体中 4 例が陽性となった。

2. PA 法による抗体価測定

陽性 5 検体（P1-P5）の乾燥ろ紙血抽出液について、PA 法で抗体価を測定した結果を表 1、PA 抗体価の列に示した。Geenius で陰性であった P1 の抗体価は 32 倍、Geenius で陽性であった P2 の抗体価は 320 倍、P3 が 800 倍、P4 が 3200 倍、P5 が 16000 倍であった。

3. RT-nested PCR による定性遺伝子検査

陽性 3 検体（P1、P3、P5）の乾燥ろ紙血について、RT-nested PCR の結果を表 1、RT-nested PCR の列に示した。Geenius で陰性であった P1 は陰性、Geenius で陽性であった P3 と P5 は陽性であった。

4. 総合判定

陰性 5 検体（N1-N5）、陽性 5 検体（P1-P5）の検査結果をもとにした総合判定を表 1、総合判定の列に示した。陰性検体である N1-N5 はすべて陰性、陽性検体である P1 は判定保留、P2-P5 は陽性であった。

D.考察

前年開発した乾燥ろ紙血検体を用いた Geenius 測定法を用いて、実際に郵送検査会社で検査を行った乾燥ろ紙血の残渣を測定することにより、乾燥ろ紙血を用いた確認検査の可能性を検討した。

Geenius を用いて郵送検査会社で陰性と判定された 5 検体（N1-N5）を測定した結果、すべて陰性であった。また、陽性と判定された 5 検体（P1-P5）を測定した結果、5 検体中 4 例（P2-P5）が陽性であり、1 例（P1）が陰性で

あった。Geenius で陽性であった 4 例（P2－P5）は PA でも陽性であり、残渣量の多かった検体（P3、P5）は遺伝子検査でも陽性が確認された。

郵送検査で陽性と判定された P1 を検査した結果、PA の抗体価は 32 倍でスクリーニング検査陽性であったが、Geenius の判定は陰性、また RT-nested PCR による定性遺伝子検査は陰性であり、偽陽性の可能性が高いと考えられた。しかし乾燥ろ紙血を用いた遺伝子検査は感度が低下することがわかっている。すなわち直径 5.5mm の乾燥ろ紙血を切り出した場合の HIV-1 RNA が 95%検出可能な血中濃度は 3700 コピー/mlであることを報告している（加藤眞吾、丸山理恵、乾燥濾紙血を用いた HIV-1 RNA および DNA 検査法、HIV 検査受検勧奨に関する研究、平成 29 年度報告書）。そのため、P1 の検体に関しても感染初期あるいは薬剤服用中の感染者の可能性が否定できず、血漿・血清による遺伝子検査を行うか、あるいは 2 週間後の再検査が必要であると考えられる。

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。HIV 郵送検査数に対する陽性数と判定保留数を併せた数の割合は、2023 年で 153,037 件に対し 153 例でおよそ 0.1%であり、郵送検査で用いられる検査キットの偽陽性率を鑑みると、陽性または判定保留とされた検体の多くが偽陽性である可能性が考えられる。また HIV 郵送検査の内、団体検査の受検者は女性の占める割合が高いと考えられるが、2022 年の推定団体検査陽性数が 22 例であるのに対し、2022 年の女性 HIV 感染者数が 23 例であることから、偽陽性数の多さが推定される。今後より多くの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どうかを続けて調査したい。

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た乾燥ろ紙血を陰性 5 例、陽性 5 例を検体として、確認検査キットである Geenius で測定した結果、陰性 5 検体はすべて陰性、陽性 5 検体中 4 例は陽性であった。郵送検査陽性で Geenius 陰性であった 1 例は、PA の抗体価が 32 倍で陽性、遺伝子検査が陰性と偽陽性の可能性が高いと考えられるが、遺伝子検査の感度の低さから判定保留とした。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。今後より多くの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どうかを続けて調査したい。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

1. 論文発表

- 1) Uno S, Gatanaga H, Hayashida T, Imahashi M, Minami R, Koga M, Samukawa S, Watanabe D, Fujii T, Tateyama M, Nakamura H, Matsushita S, Yoshino Y, Endo T, Horiba M, Taniguchi T, Moro H, Igari H, Yoshida S, Teshima T, Nakajima H, Nishizawa M, Yokomaku Y, Iwatani Y, Hachiya A, Kato S, Hasegawa N, Yoshimura K, Sugiura W, Kikuchi T. Virological

outcomes of various first-line ART regimens in patients harbouring HIV-1 E157Q integrase polymorphism: a multicentre retrospective study. J Antimicrob Chemother. 2023 Dec 1;78(12): 2859-2868. doi: 10.1093/jac/dkad319.

- 2) Otani M, Shiino T, Hachiya A, Gatanaga H, Watanabe D, Minami R, Nishizawa M, Teshima T, Yoshida S, Ito T, Hayashida T, Koga M, Nagashima M, Sadamasu K, Kondo M, Kato S, Uno S, Taniguchi T, Igari H, Samukawa S, Nakajima H, Yoshino Y, Horiba M, Moro H, Watanabe T, Imahashi M, Yokomaku Y, Mori H, Fujii T, Takada K, Nakamura A, Nakamura H, Tateyama M, Matsushita S, Yoshimura K, Sugiura W, Matano T, Kikuchi T: Japanese Drug Resistance HIV-1 Surveillance Network. Association of demographics, HCV co-infection, HIV-1 subtypes and genetic clustering with late HIV diagnosis: a retrospective analysis from the Japanese Drug Resistance HIV-1 Surveillance Network. J Int AIDS Soc. 2023 May;26(5): e26086. doi: 10.1002/jia2.26086.

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 37 回日本エイズ学会学術集会、京都市、2023 年.
- 2) 佐野貴子、近藤真規子、須藤弘二、櫻木淳一、今井光信、加藤眞吾、今村顕史. 民間臨床検査センターにおける HIV 検査等の実施状況及び確認 IC 法検査試薬導入に関する調査. 第 37 回日本エイズ学会学術集会、京都市、2023 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 乾燥ろ紙血検査結果まとめ

検体名	Geenius 判定	Geenius 陽性バンド	PA抗体価	RT-nested PCR	総合判定
N1	陰性	なし			陰性
N2	陰性	なし			陰性
N3	陰性	なし			陰性
N4	陰性	なし			陰性
N5	陰性	なし			陰性
P1	陰性	なし	x32	陰性	判定保留
P2	HIV-1陽性	5,6	x320		陽性
P3	HIV-1陽性	3,4,6	x800	陽性	陽性
P4	HIV-1陽性	3,4,6	x3200		陽性
P5	HIV-1陽性	4,5,6	x16000	陽性	陽性