

厚生労働科学研究費補助金【エイズ対策政策研究事業】
HIV 検査体制の改善と効果的な受検勧奨のための研究
HIV 診断・検査法に係る研究（加藤眞吾）総合報告書

乾燥ろ紙血検体を用いた抗体濃縮の検討

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 眞吾 （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、少量の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。その検査の多くは必要検体量の多い自動抗原抗体検査であり、検体量の不足が原因と考えられる感度の低下が報告されている。本研究では、乾燥ろ紙血の抽出液を限界ろ過カラムで濃縮して検査を行うことによる感度向上の可能性を検討した。

HIV 陽性血漿を用いた乾燥ろ紙血を 40 倍量の血清希釈液で抽出した抽出液を対象とし、分画分子量の異なる 2 種類の限界ろ過カラムでそれぞれ 100 μ l の抽出液を処理した。元検体とカラム処理後に得られた回収検体についてそれぞれ PA で抗体価を測定して抗体の濃縮倍率を算定し、濃縮倍率とカラム処理前後の検体量比からおおよその抗体回収率を求めた。

元抽出液の抗体価が 100 倍であったのに対し、カラム A 回収検体は 400 倍、カラム B 回収検体は 4000 倍であり、濃縮倍率はそれぞれ 4 倍と 40 倍であった。またカラム A 回収検体の体積は 25 μ l であり、カラム B 回収検体は 4 μ l であることから、ほぼすべての抗体を回収していた。

今回の検討で、限外ろ過カラムを用いることによって乾燥ろ紙血抽出液を 4 倍あるいは 40 倍濃縮することができ、血清や血漿を用いる検査と同程度の感度が得られることがわかった。抗体検査の判定が難しい場合、カラム濃縮を行えば明確な結果が得られるかもしれない。今後他の乾燥ろ紙血臨床検体、また血清や血漿を対象としても濃縮が可能かどうかを続けて検討したい。

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、少量の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、抗体を抽出する際に血液量より多い抽出液で抽出を行うため、元の血漿と比較して抗体濃度は希釈されてしまう。ま

た検査の多くは必要検体量の多い自動抗原抗体検査であり、検体量の不足が原因と考えられる感度の低下が報告されている。

本研究では、抗体が溶出している乾燥ろ紙血の抽出液を限界ろ過カラムで濃縮して検査を行うことにより、検査感度が向上する可能性を検討した。

B. 研究方法

HIV 陽性の再構成全血を用いて乾燥ろ紙血を作成し、抗体を抽出した乾燥ろ紙血抽出液を検体とした。検体を分画分子量の異なる 2 種類の限界ろ過カラムで処理し、元検体およびカラム回収検体と透過検体の抗体価をそれぞれ PA 法で測定した。

<材料>

以下の HIV 陽性血漿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。

・ SeroDetect HIV-Ab Range Validation Panel KZM024, #10, 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%を加えて再構成全血を作成した。再構成全血の検体量は 100 μ l 作成した。

<乾燥ろ紙血作成>

再構成全血をろ紙に 50 μ l 滴下し、24 時間以上乾燥させて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 μ l の 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 4 倍の乾燥ろ紙血抽出液とした。さらに 4 倍抽出液 50 μ l に対し血清希釈液を 450 μ l 加え、40 倍の乾燥ろ紙血抽出液 500 μ l を検体として用意した。

<限界ろ過カラム処理>

以下の限界ろ過カラム 2 種類を使用して検体処理を行った。検体量は 100 μ l 用いた。処理手順は添付説明書に従った。

・カラム A : Amicon Ultra-0.5ml Centrifugal Filters Ultracel-50k、メルク

・カラム B : Microcon Ultracel YM-100、メルク

<抗体価測定>

カラム処理前の乾燥ろ紙抽出液検体および 2 種類のカラム回収検体と透過検体、計 5 検体の抗体価をそれぞれ PA 法で測定した。PA 法はジェネディア HIV-1/2 ミックス PA（富士レビオ）のキットを使用した。測定方法および判定は、添付説明書に従った。

C. 研究結果

カラム処理前の乾燥ろ紙抽出液検体の抗体価は 100 倍であった。カラム A 処理後に得られた回収検体の抗体価は 400 倍、カラム B 処理後に得られた回収検体の抗体価は 4000 倍であった。両カラムとも透過検体は陰性であった。

カラム A で処理した回収検体の検体量は 25 μ l であり、透過検体は 65 μ l であった。カラム B で処理した回収検体の検体量は 4 μ l であり、透過検体は 95 μ l であった（表 1）。

D. 考察

カラム A、B それぞれについて、回収検体の抗体価から抗体の濃縮倍率を算定し、濃縮倍率とカラム処理前後の検体量比からおおよその抗体回収率を求めた（表 1）。

カラム処理前の抗体価が 100 倍であったのに対し、カラム A 回収検体は 400 倍であり、濃縮倍率は 4 倍であった。またカラム処理前の検体量は 100 μ l で回収量は 25 μ l であることから回収量比は 1/4 であり、抗体回収率は 100%であった。カラム B 回収検体は 4000 倍であり、濃縮倍率は 40 倍であった。また回収量は 4 μ l であることから回収量比は 1/25 であり、抗体回収率は 160%であった。このことから、カラム処理後の抗体はほぼすべて回収されていることがわかった。

今回の検討で、限外ろ過カラムを用いることによって乾燥ろ紙血抽出液を 4 倍あるいは 40 倍濃縮することができ、血清や血漿を用いる検査と同程度の感度が得られることがわかった。また、抗体検査の判定が難しい場合、カラム濃縮を行えば明確な結果が得られるかもしれない。今後他の乾燥ろ紙血臨床検体、また血清や血漿を対象としても濃縮が可能かどうかを続けて検討したい。

E. 結論

乾燥ろ紙血の抽出液を限界ろ過カラムで濃縮

して検査を行うことによる感度向上の可能性を検討した結果、元限外ろ過カラムを用いることによって乾燥ろ紙血抽出液を4倍あるいは40倍濃縮することができ、血清や血漿を用いる検査と同程度の感度が得られることがわかった。抗体検査の判定が難しい場合、カラム濃縮を行えば明確な結果が得られるかもしれない。今後他の乾燥ろ紙血臨床検体、また血清や血漿を対象としても濃縮が可能かどうかを続けて検討したい。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 須藤弘二、加藤眞吾. HIV 郵送検査に関する実態調査と検査精度調査. 病原微生物検出情報、45、10、166-167. 2024.
- 2) 川畑拓也、阪野文也、浜みなみ、長島真美、河上麻美代、貞升健志、佐野貴子、加藤眞吾、須藤弘二、近藤真規子、今村顕史. 地方衛生研究所における HIV 確認検査に関するアンケート調査結果. 病原微生物検出情報、45、10、165-166、2024.
- 3) 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(2023). 第38回日本エイズ学会学術集会・総会、2024年、東京.
- 2) 佐野貴子、土屋菜歩、渡邊大地、須藤弘二、近藤真規子、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」のサイト利用状況および新規ウェブサ

イト「性感染症検査・相談マップ」の開設について. 第38回日本エイズ学会学術集会・総会、2024年、東京.

- 3) 川畑拓也、阪野文哉、浜みなみ、長島真美、河上麻美代、貞升健志、佐野貴子、近藤真規子、須藤弘二、加藤眞吾、今村顕史. 地方衛生研究所における HIV 確認検査に関するアンケート調査結果. 第38回日本エイズ学会学術集会・総会、2024年、東京.
- 4) 土屋菜歩、佐野貴子、城所敏英、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38回日本エイズ学会学術集会・総会、2024年、東京.
- 5) 土屋菜歩、佐野貴子、城所敏英、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38回日本エイズ学会学術集会・総会、2024年、東京.
- 6) 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・総会、2023年、京都市.
- 7) 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・総会、2023年、京都市.
- 8) 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(2021). 第36回日本エイズ学会学術集会・総会、2022年、浜松市.
- 9) 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・総会、2022 年、浜松市．

- 10) 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・総会、2022 年、浜松市．

- 11) 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・総会、2022 年、浜松市．

G. 知的所有権の取得状況

なし

表 1

	およその 回収量	検体体積/ 使用ろ紙 抽出液体積	抗体価	抗体価 上昇倍率
処理前ろ紙抽出液検体	－	1	x100	1
カラムA 回収検体	25ul	1/4	x400	4
カラムA 透過検体	65ul	13/20	－	－
カラムB 回収検体	4ul	1/25	x4000	40
カラムB 透過検体	95ul	19/20	－	－