

19. 愛知県における HIV 検査結果の解析

皆川洋子（愛知県衛生研究所）

田中正大（愛知県衛生研究所微生物部）

秦 眞美（愛知県衛生研究所微生物部）

研究要旨

2007年に愛知県の公的検査機関における HIV 抗体検査件数は 11,240 件を記録し、7,271 件であった 2006 年より大幅な増加となったが、当所における Western Blot 法による確認検査において陽性を示した検体数は平成 18 年度の 37 件から、平成 19 年度は 24 件と減少した。陽性検体のサブタイプ解析の結果をみると、平成 18 年度は B が 80%を占めていたが、平成 19 年度において B はほぼ半数にとどまり、他に CRF03_AB、4 件 CRF01_AE、2 件、CRF14_BG、2 件、CRF10_CD、1 件、CRF15_01B、1 件が検出された。CRF03_AB は愛知県では昨年初めて検出された型であるが、本年度は 4 件と増加した。以上のサブタイプ解析結果からは、愛知県においてサブタイプの多様化が進行中であると考えられた。

A. 研究目的

愛知県では 2006 年 8 月から HIV 即日検査を導入したが、年間検査数を導入前後で比較すると、約 7 割増加している。

愛知県において、1995 年から 2006 年まで愛知県衛生研究所での確認検査により HIV 感染が確認された 122 名の血清あるいは血漿から RT-PCR 法により増幅・検出した HIV-1 ウイルスの Env、Pro、RT 遺伝子について解析し、サブタイプ及び薬剤耐性変異の調査を行ってきた。調査結果をみると、サブタイプについては B が主流であり、AE も少数認められていた。また、薬剤耐性変異については、2003 年に Pro 阻害剤に対する薬剤耐性変異 M46I が検出され、2004 年には多剤の非核酸系 RT 阻害剤に対して強い薬剤耐性を示す K103N が検出された。2005 年には 15 名中 3 名から M46I、1 名から Pro 阻害剤に対する薬剤耐性変異 D30N が、さらに、2 名から核酸系 RT 阻害剤に対する薬剤耐性を示す Y115F と F77L がそれぞれ検出された。2006 年には M46I が 4 名から検出されている。

本 2007 年度は前年度までの調査を継続して確認検査陽性検体の HIV 遺伝子検査を実施し、流行ウイルスの特徴を明らかにした。

B. 研究方法

平成 19 年度に愛知県内の保健所におけるスクリーニング検査及び医療機関等で HIV 感染が疑われ、当衛生研究所でのウエスタンブロット法による確認検査において HIV-1 抗体陽性を示した血清 24 検体を使用した。血清より RNA を抽出し、RT-PCR 法によりエンベロープ遺伝子の C2V3 領域、及び RT、Pro 遺伝子を含む領域を増幅した。PCR 産物を鋳型として、ダイレクトシーケンスにより遺伝子解析を行なった。サブタイプは C2V3 領域の塩基配列から NCBI の genotyping ツール、(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formpage.cgi>)を用いて決定した。Pro 遺伝子については全領域を、RT 遺伝子については 1~270 番までのアミノ酸配列に対する遺伝子について薬剤耐性変異を解析した。薬剤耐性アミノ酸変異は International AIDS

Society-USA panel Aug/Sep 2007 に基づいた。

C. 研究結果

HIV-1 陽性者 24 名の概要を表 1 に示す。当所に搬入される検体のほとんどは保健所等において実施している匿名スクリーニング検査陽性検体であるため、性別、国籍、年齢等の情報は得られない場合が多い。感染経路は、12 名が男性同性愛者 (Men who have Sex with Men: MSM) による感染と推定されたが、残りの 12 名については不明であった。血清中の HIV-1 ウイルスの遺伝子解析を実施し、現在 21 名の結果が得られている。表 2 に解析した 21 検体の結果を示す。エンベロップ遺伝子解析によるサブタイプの結果では、21 名のうち 11 名がサブタイプ B であった。他は、サブタイプ CRF03_AB が 4 名、CRF01_AE、CRF14_BG が各 2 名、CRF10_CD、CRF15_01B が各 1 名であった。

薬剤耐性関連変異についての解析結果では、21 名中 1 名から Pro 阻害剤に対するメジャー変異である M46I が検出された。RT 阻害剤に対する薬剤耐性変異は検出されなかった。また、Pro 阻害剤のマイナー変異は 16 検体

(76%) に検出された。検出されたのは、L10I, L10V, I13V, G16E, K20R, M36I, I62V, L63P, I64V, I64L, H69K, A71T, A71V, V77I, V82I, I93L, I93M の 17 種類で、12 検体 (57%) は 2 種類以上の変異を持っていた。(表 2)

D. 考察

従来主流であったサブタイプ B が今年度は 21 検体中 11 検体と約半数であり、約 8 割を占めた前年度よりさらに B の占める割合が減少した。サブタイプ CRF03_AB は昨年度愛知県で初めて 1 件検出されたが、今年度は 4 件と増加した。以上から愛知県では非 B サブタイプが増加している傾向が示唆された。

薬剤耐性関連変異については、Pro 阻害剤に対する薬剤耐性変異 M46I が 2006 年は 4 名検出されたのに対し、2007 年は 1 名検出されたのみであった。愛知県保健所における HIV 匿名検査陽性者の多くを占めると考えられる未治療 HIV-1 感染者間において、上に記した薬剤耐性ウイルスが定着しつつあるのではないと思われる。全国的に HIV 陽性者報告数の増加傾向は続いており、今後これら薬剤耐性ウイルスや従来とは異なるサブタイプに属する HIV-1 感染も拡大する可能性も考えられるので、耐性ウイルス監視のための継続的調査が必要と考えられる。

E. 研究発表

学会発表

1. 田中正大. 愛知県においてエイズ検査陽性と確認された HIV 感染者の薬剤耐性 HIV-1 保有状況及びサブタイプ解析. 平成 19 年度愛知県公衆衛生研究会 (平成 20 年 1 月 18-19 日、愛知県大府市)

表1 HIV-1感染者の詳細（感染経路等）

	検体名	性別	年齢	国籍	感染経路
1	19-058	男	20	日本	不明
2	10H-99	不明	不明	不明	不明
3	7023074	不明	不明	不明	不明
4	19 - 140	男	37	日本	不明
5	NLGR 53	男	不明	不明	MSM
6	NLGR 91	男	不明	不明	MSM
7	NLGR168	男	不明	不明	MSM
8	NLGR170	男	不明	不明	MSM
9	NLGR174	男	不明	不明	MSM
10	NLGR215	男	不明	不明	MSM
11	NLGR238	男	不明	不明	MSM
12	NLGR241	男	不明	不明	MSM
13	NLGR276	男	不明	不明	MSM
14	NLGR278	男	不明	不明	MSM
15	NLGR395	男	不明	不明	MSM
16	NLGR474	男	不明	不明	MSM
17	5H-2725	不明	不明	不明	不明
18	15H-1430	男	36	不明	不明
19	19-201	男	28	日本	不明
20	3H-5463	不明	不明	不明	不明
21	7H-0205	不明	不明	不明	不明
22	19-917	男	31	日本	不明
23	3H-6156	男	30	日本	不明
24	3H-6167	男	59	日本	不明

MSM：男性同性愛者

表2 サブタイプおよびHIV薬剤耐性関連変異

検体名	サブタイプ	PRメジャー変異	PRマイナー変異
19-058	B	-	L10I G16E I93M
10H-99	01_AE	-	I13V K20R M36I I62V H69K V77I
7023074	10_CD	-	L10V I13V M36I I62V L63P I64L
NLGR 53	B	-	L63P A71T
NLGR 91	B	-	A71T I93L
NLGR168	B	-	V77I
NLGR170	B	-	I62V V77I
NLGR174	03_AB	-	-
NLGR215	03_AB	-	-
NLGR241	B	-	-
NLGR276	B	-	I13V I64V
NLGR278	B	-	I62V
NLGR395	03_AB	-	I13V
NLGR474	03_AB	-	I13V I62V
5H-2725	01_AE	-	I13V M36I I62V H69K
15H-1430	B	-	I62V
19-201	14_BG	-	I13V V82I I93L
3H-5463	14_BG	-	-
7H-0205	15_01B	M46I	I62V I64V V77I
19-917	B	-	-
3H-6167	B	-	L63P A71V V77I I93L

20. 福岡県の HIV 検査体制と検査結果の解析

研究協力者 千々和勝己（福岡県保健環境研究所）
世良暢之、石橋哲也、中山志幸（福岡県保健環境研究所）
鷺山和幸（さぎやま泌尿器クリニック）

研究要旨

福岡県内では、HIV 感染者・患者報告数が、平成 17 年に大幅に増加し、18 年も増加傾向が続いたが、19 年には僅かに減少した。このような時期の、県内保健所における HIV 検査の状況、民間クリニックでの検査状況について、検討した。

A. 研究目的

福岡県における HIV 感染の実態と、保健所・民間クリニックにおける HIV 検査の状況を把握し、HIV 感染者の早期発見・感染拡大防止に、より効果的な検査体制を検討することを目的とする。

B. 研究方法

(1) 保健所を窓口とするエイズ検査

福岡県内（北九州市、福岡市、大牟田市は除く）13 の保健所で採血された検体について、県内 3 カ所の検査保健所でエイズスクリーニング試験を行っている。そのうち、3 カ所の検査保健所の窓口で採血した検体については、ダイナボット社のダイナスクリーン・HIV-1/2 を用いた迅速検査を実施している。また、その他の 10 カ所の保健所で採血した検体については、ピオメリュー社のバイダスアッセイキット HIV デュオを用いて、EIA 法による抗原抗体の同時検査を行っている。

これらのスクリーニング試験で、陽性または判定保留の場合は、確認試験を福岡県保健環境研究所で行う。確認試験は、富士レビオ社製ラブプロット 1,2 を用いたウェスタンブロット法、及び、ロッシュ社製のアンプリコ

ア HIV-1 モニターを用いた PCR 法による血清中の HIV-1 RNA の検出により行っている。

(2) 民間クリニックにおけるエイズ検査

当研究班の研究協力者である、福岡市内のさぎやま泌尿器クリニックにおいては、エイズの迅速診断を行っている。その方法は、ダイナボット社のダイナスクリーン・HIV-1/2 を用いた迅速検査で、判定保留または陽性の場合には、保健環境研究所で前述の確認検査を実施している。

C. 研究結果

(1) 福岡県内の HIV 感染状況

福岡県が発表した「福岡県 HIV 感染者等情報（平成 19 年下半期）」によると、平成 19 年 1 年間に新たに報告された HIV 感染者は 25 名、AIDS 患者は 11 名で合計 36 名であった。これは、前年の 38 名より僅かに少ない数字であった。過去の感染者・患者報告数の年毎の推移を図 1 に示す。平成 17 年に急激に増加した報告数は、18 年も増加を続けたが、19 年は増加が止まった。

これまでに報告された患者、感染者のそれぞれの推定感染経路の割合を図 2 に示す。患者では、異性間性的接触による感染が最も多

く(43%)、感染者では同性間性的接触による感染が最も多い(53%)。

(2) 保健所を窓口とするエイズ検査

福岡県内(北九州市、福岡市、大牟田市は除く)の保健所を窓口とするエイズ検査の件数の推移と、陽性と確認された件数を図3に示す。検査件数は増加傾向にあり、特に平成18年に大きく増加したが、これは同年6月からの検査保健所において迅速診断を導入した効果によると考えられる。このことは、迅速診断導入前1年間(平成17年6月～18年5月)の3検査保健所での検査数が492件で、導入後1年間(平成18年6月～19年5月)の検査数が998件であり、導入後に約2倍に増加していたことからわかる。一方、陽性例は、平成16年から毎年1～2例見られるようになった。

昨年1年間の、迅速診断を導入している3ヶ所の検査保健所での受付数と、1週後に検査結果を告知する他の10の保健所との受付数の比較を行ったものが、図4である。6月と12月に検査数が増加しているが、これは、エイズ検査普及週間及び世界エイズデーに関連した啓発活動の成果と考えられる。通常は、3検査保健所の件数が、他の10保健所の件数を上回っているが、12月は検査保健所以外の保健所の検査数が、検査保健所の件数を上回っている。

(3) 民間クリニックにおけるエイズ検査

福岡市内の泌尿器クリニックが、当研究班の研究協力者として、迅速診断によるエイズ検査を実施している。平成19年の検査の概要を表1に示す。1年間の受診者数は、414名で、その内訳は、男性325名(78%)、女性89名(22%)であった。また、迅速診断法では、5件が陽性であったが、確認試験では、いずれも陰性であった。従って、迅速診断キットの偽陽性率は、1.2%であった。

D. 考察

福岡県内では、平成17、18年と、感染者・患者報告数の増加が続いたが、19年は前年に比べ僅かに減少した。しかし、さらに感染者の発生が減少するような要因は見いだせず、今後も注意が必要である。

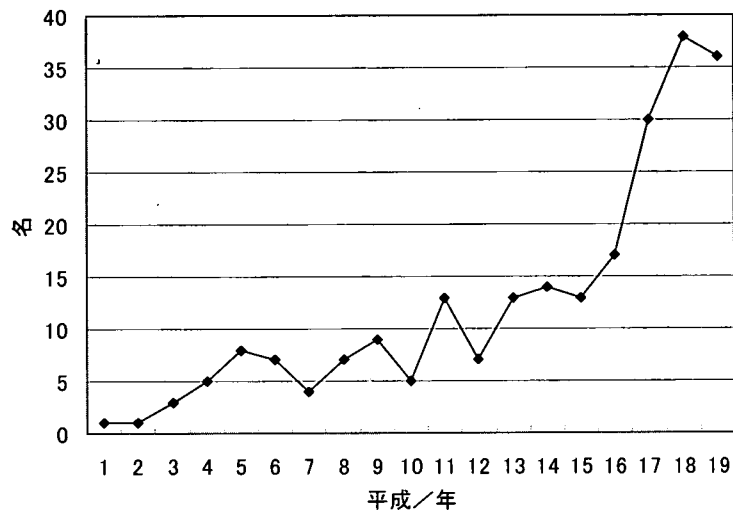
県内の保健所におけるエイズ検査の件数は、近年増加傾向が続いていたが、平成18年に一部保健所で迅速診断を開始したことで、さらに大きく増加した。また、啓発活動の重点期間には、検査数のかなりの増加が見られることから、今後も啓発活動の工夫により、検査数を増やすことは可能だと考えられる。

保健所における検査で、平成16年以降毎年陽性例が見つかるようになった。このことは、実際に県内におけるHIV感染が拡大している証拠であると考えられる。しかし、感染者・患者の報告が多い福岡市内にあるクリニックで、いまだ陽性が見られていないことから、福岡市内において、急激な感染拡大が起きているとは考えられない。

E. 結論

福岡県内では、平成17年から感染者・患者数の報告が増加してきたが、19年は僅かに減少した。しかし、今後感染者が増加する可能性は依然として存在し、重点的な啓発活動や、迅速診断法の活用により、感染の早期発見、早期治療を目指していかなければならない。

図1. 福岡県における感染者・患者の報告数の推移



合計 232名 : 男性209名、女性23名

図2. 患者・感染者の感染経路

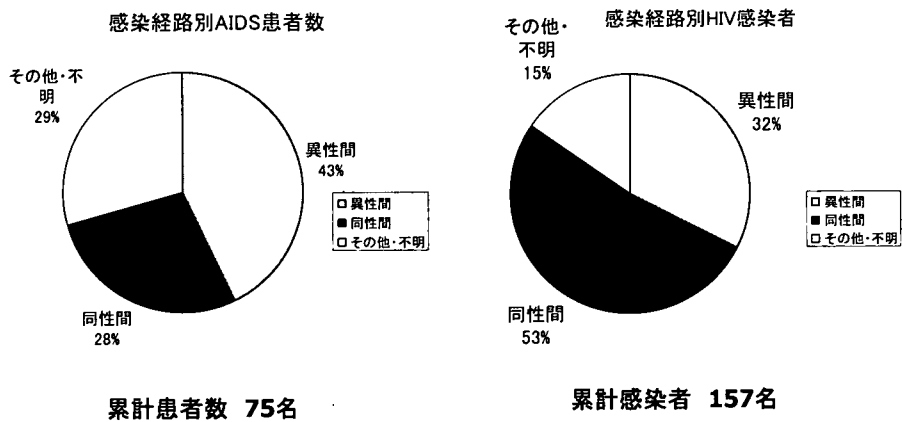


図3. 保健所における陽性者数と検査数の推移

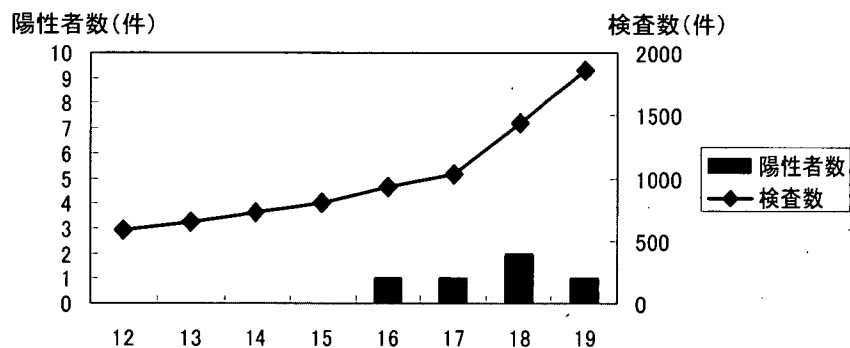


図4. 検査保健所とその他の保健所の受診者数の年間推移

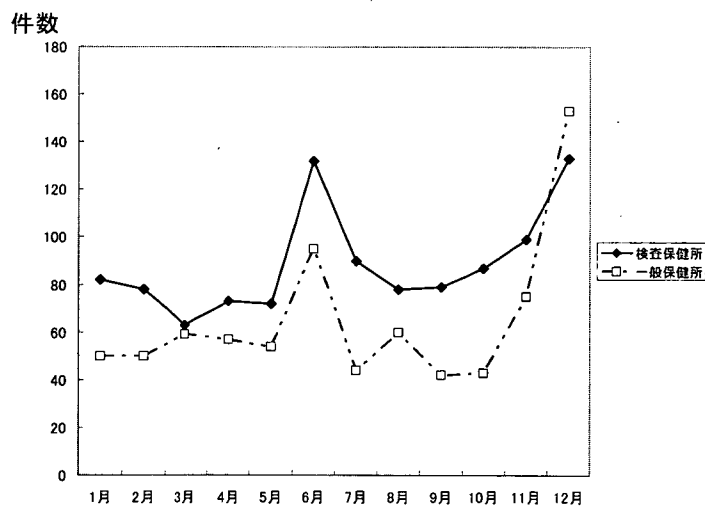


表1. 福岡市内クリニックのエイズ検査実施状況

月	検査数	男	女	迅速陽性	確認陽性
H19.1	40	31	9	0	0
2	25	19	6	1	0
3	26	21	5	0	0
4	29	23	6	0	0
5	32	25	7	0	0
6	40	28	12	2	0
7	35	28	7	0	0
8	37	23	14	0	0
9	34	26	8	0	0
10	39	33	6	1	0
11	29	24	5	0	0
12	48	44	4	1	0
計	414	325	89	5	0

21. ろ紙を用いたドライスポット法による HIV 検査法の検討

宮崎 裕美 (財団法人エイズ予防財団 リサーチレジデント)

佐野 貴子 (神奈川県衛生研究所)

近藤真規子 (神奈川県衛生研究所)

須藤 弘二 (慶応義塾大学医学部微生物学教室)

今井 光信 (神奈川県衛生研究)

研究要旨

【目的】血液をろ紙上に採取し乾燥させたろ紙血液 (Dried Blood Spots ; DBS) を用いて HIV 抗体検査および遺伝子検査の感度および特異性を検討し、ドライスポット法による HIV 検査の妥当性について検討することを目的とした。

【方法】HIV 陰性検体 (250 例) の血液 40 μ l を直径 13mm の採血用ろ紙に滴下し自然乾燥させた後、密閉式ビニール袋にて 5 日間室温保存した。その後、ろ紙の中心を直径 6mm のパンチャーで打ち抜き、希釈溶液 70 μ l を加え室温にて 3 時間振とうして得た DBS 抽出液 (血漿 16 倍希釈相当) を用いて HIV 抗体検査 (PA 法) の特異性を検討した。また、感度を検討するために、HIV 陽性検体 (100 例) についても同様の方法で検査を行い、血漿検体と DBS 検体との PA 抗体価を比較した。

【結果・考察】HIV 陰性検体の DBS を用いた抗体検査では 250 例中 2 例が陽性 (偽陽性) と判定された。また、HIV 陽性検体は DBS でも全例が陽性を示した。さらに、DBS 検体の PA 抗体価は 100 例中 86 例が血漿検体と同じ抗体価を示し、残りの 14 例は 1~2 管差であった。また HIV 遺伝子検査ではウイルス量が 3,000copies/ml 以上であれば検出率は 100% であり、3,000copies/ml 以下であっても約 30%の検出率を示した。これはプロウイルス DNA を検出している可能性が考えられた。

A. 研究目的

欧米等先進国や発展途上国では、HIV 検査に用いる検体を自己採取し、検査会社に検体を郵送して行う検査が HIV のスクリーニング検査や確認検査の一方法として活用されており、AIDS 発症・HIV 感染者の減少に寄与している。また、high-risk 受検者を対象とした HIV 郵送検査の妥当性等についても研究が進められており、郵送法による HIV 検査が感染の早期発見に有用であるだけでなく、感染者に対する長期フォローアップにも簡便な方法であることが示されている。近年わが国においても「HIV 郵送検査」を取り扱う検査会社が増え、その利用者は年々増加傾向にある。

保健所・医療機関等における HIV 検査の増加とは別に、この郵送検査受検数の増加に伴い郵送検査検体の陽性例も増加していることから、郵送法による HIV 検査が、日本においても HIV 検査の受検機会拡大に有用な検査法のひとつである可能性が考えられる。また、各自治体における HIV 即日検査の導入が検査受検者の増加・感染者の早期発見に寄与しているとはいえ未だ十分とは言えず、HIV 検査の普及の遅れが HIV 感染に気づかない感染者からの感染拡大につながっていると考えられ、「HIV 検査相談機会の拡大と質的充実に関する研究」班では、新たな検査法の一つとして HIV 郵送検査の可能性について検討すること

は意義のあるものと考えている。

郵送検査会社による検査の多くが血液をろ紙あるいは専用容器に保存し HIV 抗体検査を実施していることから、本研究では、血液をろ紙上に採取し乾燥させたろ紙血液 (Dried Blood Spots ; DBS) を用いて HIV 抗体検査および核酸増幅検査の感度および特異性を検討し、ドライスポット法による HIV 検査の妥当性について検討することを目的とした。

B. 研究方法

1) DBS を用いた HIV 抗体検査

DBS 抽出液の調製と HIV 抗体検査

ろ紙を用いた HIV 抗体検査法について検討するために、Anti-HIV-1 Seroconversion panel serum (BBI; PRB936, PRB952) に等量の HIV 陰性者洗浄血球を加え、DBS 評価用の血液を作製した。この血液 40 μ l を直径 13 mm の採血用ろ紙 (ADVANTEC) に滴下し自然乾燥させた後、密閉式ビニール袋にて 5 日間室温保存した。HIV 抗体検査の特異性を検討するために HIV 陰性検体 (250 例)、さらに、抗体検査の感度を検討するために HIV 陽性検体 (100 例) についても同様の方法で DBS を作製し保存した。HIV 陰性検体は、保健所から依頼があり血漿を用いた HIV 抗体検査 (PA 法) にて陰性と判定された血液を用いた。また、HIV 陽性検体は、研究班協力クリニックおよび医療機関等に定期的に受診している HIV 感染者のフォローアップ検査依頼検体を用い、血漿中のウイルス RNA 量の測定は MBC 社に依頼した。密閉式ビニール袋にて DBS を 5 日間室温保存した後、ろ紙の中心を直径 6 mm のパンチャーで打ち抜き、Genedia HIV-1/2 PA Mix (富士レビオ) の血清希釈溶液 70 μ l を加え室温にて 3 時間振盪して得た DBS 抽出液 (血漿 16 倍希釈相当) を用いて HIV 抗体検査 (PA 法) を実施した。また、HIV 陽性検体の血漿と DBS の PA 抗体価を比較することにより、検査の感度を検討した。

2) DBS を用いた HIV 遺伝子検査

DBS の作製と核酸の抽出

DBS を用いた RT- nested PCR 法による HIV ウイルスの検出感度を検討するために、HIV 陽性者血漿に HIV 陰性者洗浄血球を等量加え、ウイルス量を 0~100,000 RNA copies/ml に調整した評価用血液を作製し Whatman FTA Gene card (Whatman) に 75 μ l 滴下し、十分乾燥させた後、密閉式のビニール袋に入れ室温にて 5 日間保存した。また、臨床検体での検討をするために、HIV 陽性者血液についても同様の方法で検体を保存した。

5 日間保存した DBS を直径 3.0 mm のパンチャーで 10 枚打ち抜き、Rapid RNA Extraction Solution (Ambion) 200 μ l を加えて室温にて 10 分振盪した後、High Pure Viral RNA kit (Roche) を用いて上清から核酸を精製した。精製法はキットの手順に従って実施し、核酸の溶出には DEPC-Water (75 μ l) を使用した。

RT- nested PCR による HIV-1 gag 遺伝子の増幅

FTA Gene card にスポットした DBS から抽出した核酸を用いて HIV-1 gag 領域を RT-nested PCR にて増幅した。RT-PCR には、SuperScript III One-Step RT-PCR Platinum Taq High Fidelity (Invitrogen) を用い、20 μ l を使用した。RT- nested PCR に用いた核酸は評価用血液ウイルス量の 0.6 % に相当した。nested PCR には TaKaRa Taq Hot Start Version (TaKaRa) を用い、RT-PCR 産物を 5 μ l 使用した。また、 β -globin 遺伝子を内部コントロールとし、gag 遺伝子とともに増幅した。PCR 産物は 2%アガロースゲルで電気泳動を行い目的遺伝子が増幅されているか確認した。

C. 研究結果・考察

1) HIV 抗体検査

Anti-HIV-1 Seroconversion panel serum で作製した評価用血液から DBS 抽出液を調製し

抗体検査を行ったところ、DBS と血清の PA 抗体価にほとんど違いがなかった。臨床検体を用いて DBS における HIV 抗体検査の特異性および感度について検討したところ、HIV 陰性検体 250 例中 2 例が陽性（偽陽性）と判定され、偽陽性率が 0.8% であり HIV 抗体検査の特異性は 99.2% であることが示唆された。また、HIV 陽性検体は全例（100 例）が陽性と判定された（Table 1）。さらに、HIV 陽性検体の DBS-PA 抗体価は 86 例が血漿と同じ抗体価を示し、DBS-PA 抗体価のほうが血漿検体よりも 1~2 管高いものが 8 例、低いものが 6 例あった（Fig. 1）。これらの結果から、DBS 作製に用いたろ紙に滴下した血液量および抽出に用いたディスクに付着している血液量、DBS 抽出液の希釈倍率を十分考慮した上で HIV 抗体検査を実施するならば、DBS は通常の HIV 検査に用いられる検体（血清あるいは血漿）と同程度の検出レベルであり十分検査に耐えうると考えられる。また、微量の血液でも検査が可能であることが示唆された。しかしながら、今回検討した検査法は予め滴下する血液量をコントロールしているため DBS 抽出液を血漿 16 倍希釈相当に調整することができたが、実際に検査受検者がランセットを用いて指尖からろ紙に血液を採取する場合には滴下される血液量が均一にならない可能性が考えられることから、採血用ろ紙への血液採取法について十分説明をする必要がある。

2) HIV 遺伝子検査

ウイルス量を 0~100,000 RNA copies/ml に調製した遺伝子検査評価用血液から DBS を作製し HIV 遺伝子の検出限界について検討したところ、Fig. 2 に示すように $\geq 3,000$ copies/ml まで検出することができた。また、1/3 の確率で 1,000 copies/ml の HIV ウイルスを検出することに成功した。この RT-nested PCR 法による検出感度の検討に用いた評価用血液の血球成分には HIV 陰性者洗

浄血球を用いているため、増幅された gag 遺伝子は全て HIV 陽性者のウイルス RNA に由来するものと考えられ、FTA card を用いた DBS による HIV 遺伝子検査では、 $\geq 3,000$ copies/ml のウイルスが存在すれば検出が可能であることが示された。

今回使用した遺伝子検査用ろ紙の FTA (Fast Technology for Analysis of Nucleic Acids) card は Whatman 社が独自に開発した核酸保存用のろ紙であり、血液をスポットした後、その細胞を溶解し、核酸を放出してセルロース繊維に絡み付けることにより核酸を保護している。このことから、ろ紙から抽出した溶液には RNA だけではなく DNA も同時に抽出されている可能性が十分に考えられる。また、精製に用いた RNA キットではグラスファイバー製フリースに核酸（RNA および DNA）が特異的に結合するよう設計されており、このキットでは結合条件を特に RNA 用に最適化されているが共存する DNA を除去しているわけではないため、DBS を用いた RT-nested PCR 法による HIV 遺伝子の検出には RNA だけではなく DNA の影響もあることが推察された。そこで、精製した鋳型（核酸）に DNA が含まれているか否か確認するために、血漿中のウイルス量が RT-nested PCR の検出限界以下である < 50 copies/ml の HIV 陽性者血液（10 例）を用いて同様の方法で DBS を作製し RT-nested PCR を行ったところ、gag 遺伝子を増幅する検体が 3 例あった。そこで、逆転写を行わない RT (-) nested PCR を行ったところ、RT-nested PCR で gag 遺伝子が検出された DBS は RT(-)でも gag 遺伝子が増幅されていることが明らかとなった。このことは、鋳型とした核酸溶液には RNA だけではなく DNA も含まれていることが示唆され、ウイルス量が検出限界以下であるにもかかわらず RT-nested PCR で増幅した HIV-1 gag 遺伝子は proviral DNA によることが明らかとなった。従って、DBS による HIV 遺伝子検査において

ウイルス量が低値 (<3,000 copies/ml) でウイルス RNA 由来の gag 遺伝子増幅が検出限界以下の DBS でも、プロウイルス DNA を鋳型として gag 遺伝子が増幅され、HIV 陽性と判定できる可能性が示唆された。

そこで臨床検体 (HIV 陽性者検体: 100 例、HIV 陰性者検体: 100 例) の DBS を用いて RT-nested PCR 法による HIV 遺伝子検査を行ったところ、Table 2 に示すようにウイルス量が 3,000 copies/ml 以上の DBS では HIV-1 gag 遺伝子の検出率は 100% であり、また、3,000 copies/ml 以下の DBS においても約 30% の検出率を示した。

ウイルス量が検出限界 (3,000 copies/ml 以下) の DBS で gag 遺伝子を検出した 23 例について、逆転写反応を行わない RT(-) nested PCR を行い gag 遺伝子の増幅が DNA に由来するものか否か確認した。その結果、23 例中 21 例は RT(-) nested PCR でも gag 遺伝子の増幅が確認され、遺伝子検査による gag 遺伝子の検出 (陽性判定) はプロウイルス DNA の寄与があったことが示唆された。また、RT(-) nested PCR で gag 遺伝子を検出できなかった 2 例はウイルス量が 2,800 copies/ml および 1,200 copies/ml の検体であった。また、RT-nested PCR で gag 遺伝子を検出したウイルス量が 3,000 copies/ml 以上の検体 23 例についても同様に RT(-) nested PCR を行ったところ、8 例で gag 遺伝子を検出しプロウイルス DNA の存在が示された。

確立した系で HIV gag 遺伝子を検出する際、プロウイルス DNA の寄与についても考慮しなければならぬため、感染細胞由来のプロウイルス DNA の検出感度を検討する必要がある。そこで、HIV-1 8E5 細胞 (p64 と p34 以外のタンパクを恒常的に発現する欠損 HIV プロウイルスを 1 コピー含む細胞) に HIV 陰性者血液を加えて 0.2~20 copies/ \cdot 1 に細胞濃度を調製した後、Whatman FTA Gene card に血液を滴下し、これまでと同様の方法で核酸を抽

出し RT-nested PCR 法にて gag 遺伝子の増幅を確認しプロウイルス DNA の検出感度について検討中である。

ウイルス RNA のみを検出する系を確立するならば DNase I による DNA の分解ステップを組み込む必要があるが、DBS を用いたドライスポット法による HIV 検査は、受検希望者が HIV に感染しているか否かを判定することが目的であるため、RNA および DNA いずれも検出できる HIV 遺伝子検査法として、今回の検査法は有用であると考えられる。

D. 研究発表

学会発表

1. 宮崎裕美、佐野貴子、近藤真規子、須藤弘二、今井光信. ろ紙を用いたドライスポット法による HIV 検査法の検討. 第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会. (平成 19 年 11 月 28 日-11 月 30 日、広島)

Table 1 Sensitivity and specificity of the gelatin particle agglutination assay on DBS specimens

HIV status	Results of PA tested (DBS)		Sensitivity (%)	Specificity (%)
	POS	NEG		
Infected	100 / 100	0 / 100	100	-
Non-infected	2* / 250	248 / 250	-	99.2

* Confirmatory test; Western blot (negative), RT-nested PCR (negative)

Fig 1 Comparison of the HIV-1/2 PA titration with plasma and DBS specimen

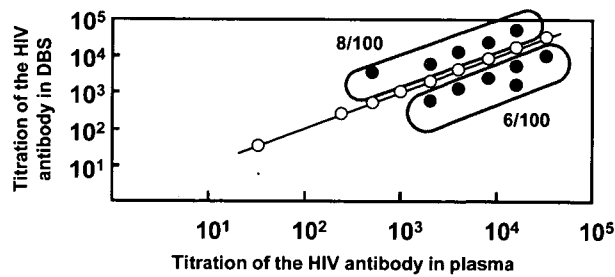


Fig 2 Detection and Sensitivity of HIV-1 gag gene in DBS specimen on FTA filter paper

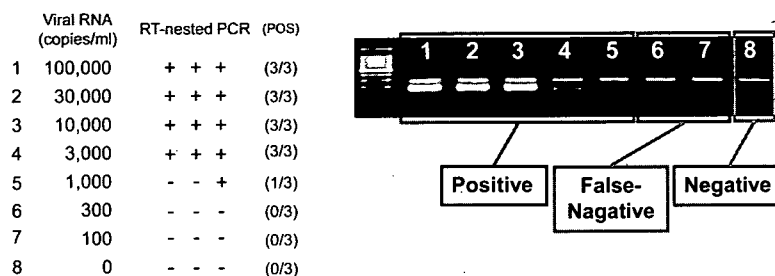


Table 2 Detection of the persistence of HIV-1 gag gene on FTA filter paper by Multiplex RT-nested PCR

HIV status	HIV RNA (copies/ml)	RT- nested PCR		POS (%)
		POS (RT[-])	NEG	
Infected		46 / 100 (29)	54 / 100	46
	10,000 – 100,000	11 / 11 (5)	0 / 11	100
	3,000 – 10,000	12 / 12 (3)	0 / 12	100
	400 – 3,000	4 / 14 (2)	10 / 14	28.6
	< 400	19 / 63 (19)	44 / 63	33.3
Non-infected		0 / 100	100 / 100	-

POG; positive, NEG; negative.

22. HIV-1 RNA 定量キットのコントロールサーベイ

分担研究者 加藤真吾、田中理恵（慶応義塾大学医学部微生物学・免疫学教室）
研究協力者 古谷茂之、真崎夕美子、林 邦彦
（ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社）

研究要旨

HIV感染者およびエイズ患者の治療および病態把握に有用なHIV-1ウイルス量測定法であるアンプリコア HIV-1 モニターv1.5 およびコバス アンプリコア HIV-1 モニターv1.5 の測定精度を調査し、施設間での測定値の差を是正することを目的としてコントロールサーベイを実施した。平成19年1月から平成19年10月までの期間にアンプリコアあるいはコバスアンプリコアを購入したすべての検査センター、公的検査・研究機関、ルーチン検査実施病院を対象とし、参加案内状を送った53施設のうち31施設が参加した。HIV-1パネル血清とアンケートを送付し、一重測定の結果を回収した。測定値が理論値の1/3から3倍の範囲に入っていなかった事例が4施設で6例見られた。これらの許容範囲を外れるデータは、検査頻度が少なく、担当者が2年以上の経験を有する施設で見られた。今後、許容範囲を外れるデータがあった施設には、測定工程確認の実施とフォローアップサーベイへの参加を推奨する予定である。アンケート調査の結果、83.3%の施設で高感度法による測定が可能となっていること、作業エリアの区分けと消毒は全ての施設で行われていることがわかった。機器の保守を定期的、または不定期に行っている施設は9割を超え、昨年度より改善された。全施設の66.7%でコバスアンプリコアの動作不良またはQSの吸光度不足によるトラブルを経験しており、機器の保守あるいはRNA抽出操作との関連が疑われた。参加施設のすべてがコントロールサーベイの継続を希望した。コントロールサーベイは製造者側の品質管理や精度管理を評価するためにも重要であり、今後とも客観性と専門性の高いコントロールサーベイを実行していくことが精度管理の高いHIV定量検査体制を維持していくために重要であると考えられる。

A. 研究目的

HIV感染者およびエイズ患者のHIVウイルス量は治療および病態把握に有用な指標である。本コントロールサーベイの目的は、国内において認可されているHIVウイルス量測定法であるアンプリコア HIV-1 モニターv1.5（以下、アンプリコア）およびコバスアンプリコア HIV-1 モニターv1.5（以下、コバスアンプリコア）使用施設においてパネル血清を用いてその測定精度を調査し、測定結果に問題があった施設に対しては、問題点の指摘、検査手順の見直し、機器の点検整備などの改善指導を行い、測定値の施設間差の是正を行

うことである。

B. 研究方法

平成19年1月から平成19年10月までの期間にアンプリコアあるいはコバスアンプリコアを購入した施設のうち、検査センター、公的検査・研究機関はすべて対象とし、病院はルーチン検査を実施している施設のみを対象として計53施設にコントロール参加案内状を平成19年11月に郵送した。参加希望施設は計32施設であった。参加希望施設にHIV-1パネル血清、アンケートを平成20年1月に送付した。平成20年2月に31施設から結果を

回収した。キット別ではアンプリコアが 16 施設、コバスアンプリコアが 15 施設、方法別では標準法のみが 7 施設、高感度法のみが 12 施設、標準法および高感度法が 12 施設であった。

HIV-1 パネル血清は次のようにして作成した。まず、サブタイプ B である HIV-1 LAI 株をヒト末梢血単核球で増殖させた。配布検体による感染リスクを無くすために、培養上清液に熱処理を行った。熱処理は 58°C40 分間行った。in vitro 実験においてその効果を検討したところ、健康人 PBMC への感染性は共培養 7 日目で p24 抗原量は加熱処理前培養上清液の 1/73000 以下であった。また RT-nested PCR を用いたポワソン法で RNA 定量をすると加熱処理前の 1/1.3 であった。したがって、RNA 量を大きく減少させることなく感染性を無くすことができたと考えられる。

熱処理後の培養上清液（母液）をアンプリコアおよびコバスアンプリコアによって測定したところ、上記ポワソン解析の結果と、これらの結果はよく一致した。そこで、ポワソン解析の結果を元に、母液を HIV-1 陰性であることを確認したヒト血清で希釈し、7 濃度（100、200、1,000、2,000、10,000、50,000、250,000 コピー/mL）に調製した。標準法用には理論値 1,000、2,000、10,000、50,000、250,000 コピー/mL の血清試料と HIV-1 陰性血清試料、高感度法用には理論値 100、200、2,000、10,000、50,000 コピー/mL の血清試料と HIV-1 陰性血清試料からなるパネル血清をキャップの色を変えて用意した。各血清試料の HIV-1 RNA 濃度はブラインドとした。

測定結果およびアンケート結果の統計学的解析はソフトウェアパッケージ Statcel2 を用いて行った。

C. 結果と考察

<測定精度管理>

標準法と高感度法による測定値をそれぞれ図 1 と 2 に示す。標準法では、1 施設で測定値が 50000 コピー/mL の試料の理論値の 3 倍を超え、別の 1 施設で 250000、50000 コピー/mL の 2 種の試料での測定値が理論値の 3 倍を超える結果となった。高感度法では、2000 コピー/mL の 3 倍を超えたものが 1 施設、200 コピー/mL の 3 倍を超えたものが 1 施設、50000 コピー/mL の 1/3 を下回ったものが 1 施設となった。なお、この内の 1 施設は標準法、高感度法ともに要再検となっている。また許容範囲内ではあったが、計算に用いる QS の値を間違えたため、実際の測定値と異なる結果を報告した施設が 1 つあった。今回標準法、高感度法ともに、検出限界の約 2 倍という低値パネル（1000 コピー/mL、100 コピー/mL）を加えたが、許容範囲内で検出できた施設がそれぞれ、12/15（80.0%）、25/26（96.2%）と良好な結果を示した。これら 2 パネルは理論上検出できない場合があるため、それらを除いた全 215 の測定値のうち、許容範囲に入っていなかった測定値は 6 点であり、範囲内に入っていた割合は 97.2% であった。これは昨年度の 96.2%（327/340）を上回っていた。

許容範囲を外れる結果を出したのは 31 施設中 4 施設（12.9%）であった。その出現頻度をアンプリコアとコバスアンプリコアで比較すると、前者が 3/16（18.3%）、後者が 1/15（6.7%）となり、アンプリコアの方がやや高い傾向を示した。標準法と高感度法はそれぞれ 2/15（13.3%）と 3/26（11.5%）で有意差はなかった。検査頻度で分類比較すると（図 3）、検査頻度の低い施設で測定値の異常が出る傾向があった。また、今回要再検となった施設は、検査経験 2 年以上 3 年未満 3 施設、3 年以上 1 施設と経験年数の多い施設のみであった（図 4）。これは例年には見られない傾向であった。異常な測定値が出た原因を吸光度のデータから探ると、検出時の段階希釈ミス（1 施設）、QS の吸光度低下（2 施設）、抽出

時の沈殿回収のロス（1施設）ではないかと考えられた。検査頻度が低い施設が要再検となっていることと合わせて、経験年数の多い実施者ほど、実施頻度低い検査において実験の精密さを欠く傾向があると推測される。施設を公的検査機関、病院、検査センターで分類するとそれぞれの要再検施設の頻度は 1/9（11.1%）、3/19（15.8%）、0/3（0.0%）であった。一般検体はほとんどが検査センターで検査されている実情を考えると、国内における HIV 定量検査は精度良く行われていると推測される。許容範囲を外れるデータのあった施設には、測定工程確認と、フォローアップサーベイへの参加を推奨する予定である。

<アンケート結果>

精度管理と関連する測定環境などの詳細を知る目的で、アンプリコアとコバスアンプリコアの使用に関する 19 問からなるアンケート調査を同時に行った。測定キットの種類はアンプリコア（用手法）が 51.6%、コバスアンプリコア（自動法）が 48.4%であった。月間依頼数は 10 件未満の施設が 33.3%、200 件以上の施設が 16.7%であり、検体処理数が参加施設によって大きく異なっていた（メジアンは 20~29 件）。前回のコントロールサーベイに不参加で今回のサーベイに参加した施設は 2 施設（6.5%）であった。検査回数は月に 1 回以内が 23.3%、1 週間に 1 回以内が 36.7%で、半数以上の施設が多くても 1 週間に 1 回以内であった。83.3%の施設が高感度法を実施しており、実施していない理由は、遠心機がない（2 件）、依頼がない（2 件）、必要がない（1 件）、抗体陽性のみ実施（1 件）であった。担当技師が 1 人の施設は 20.0%であった。経験年数は 3 年以上が 30.0%であった。作業時間は 5 時間以内が 6.9%、5~8 時間が 75.9%、8 時間以上が 17.2%であり、8 割以上が 8 時間以内に作業を終了している。作業エリアはすべての施設がきちんと分けていた。作業エリアの消毒はすべての施設で実

施されており、63.3%が測定前後に行っていた。機器の保守は 50.0%が定期的に、46.7%が不定期に行っており、96.7%の施設で実施されていた。昨年の実施率 92.1%と比較し、改善された。精度管理は、16.7%の施設がプレートごとに、80.0%がアッセイごとに管理用試料を用いて行っていた。管理用試料は 90.0%の施設がキット内のコントロールを用いており、1 施設が市販のコントロールを、1 施設がプール検体を用いていた。66.7%の施設が測定に関するトラブルを経験していた。このトラブルの多くは、コバスアンプリコアの動作不良または QS の吸光度不足であった。HIV 抗体陽性検体の最終確認試験は、WB 法とアンプリコアあるいはコバスアンプリコア（以下、アンプリコア法）を同時に実施する施設が 50.0%で最も多く、次いで WB 法を実施し、陰性または判定保留であった場合にアンプリコア法を実施する施設が 16.7%であった。それぞれ頻度は前者が 0~8 検体/月、後者がほぼ 0~2 検体/月であった。WB 法、アンプリコア法を単独で実施する施設は、それぞれ 0.0%、6.7%であった。その他、WB 法を実施し、陰性または判定保留であった場合に、アンプリコア以外の核酸増幅検査（NAT 検査）を実施する施設が 1 施設あり、その方法はインハウスの NAT 検査を用いていた。確認試験にアンプリコアを用いている施設では、標準法を用いている施設が 26.1%、高感度法を用いている施設が 52.2%、標準法で感度未滿だった場合に高感度法を実施する施設が 17.4%であった。また、担当医の指示により、標準法、高感度法を使い分ける施設が 1 施設あった。現在、試薬が発売中止となっている HIV DNA 検出試験の必要性については、56.7%が必要と回答した。今後検査の精度を高めるために自動化が求められる工程として挙げられていたのは、RNA 抽出が 14 件、増幅 DNA の検出が 8 件、濃度の算出が 4 件であった。100%の施設が今後もコントロールサーベイの必要

性があると回答した。今後とも厚生労働省の研究班に相応しい客観性と専門性の高いコントロールサーベイを実行していくことが、HIV 定量検査体制を維持していくために重要であると考えられる。

D. 研究発表

論文発表

1. Hamatake, M., Nishizawa, M., Yamamoto, N., Kato, S., and Sugiura, W. (2007) A simple competitive RT-PCR assay for quantitation of HIV-1 subtype B and non-B RNA in plasma. *J. Virol. Methods* 142:113- 117.
2. Kinai, E., Hanabusa, H., and Kato, S. (2007) Prediction of the efficacy of antiviral therapy for hepatitis C virus infection by an ultrasensitive RT-PCR assay. *J. Med. Virol.* 79:1113- 1119.
3. Tajima, H., Sueoka, K., Moon, S. Y., Nakabayashi, A., Sakurai, T., Murakoshi, Y., Watanabe, H., Iwata, S., Hashiba, T., Kato, S., Goto, Y, and Yoshimura, Y. (2007) The development of novel quantification assay for mitochondrial DNA heteroplasmy aimed at preimplantation genetic diagnosis of Leigh encephalopathy. *J. Assist. Reprod. Genet.* 24:227- 232.
4. Nakabayashi, A., Sueoka, K., Tajima, H., Sato, K., Sakamoto, Y., Kato, S., and Yoshimura, Y. (2007) Well-devised quantification analysis for duplication mutation of Duchenne muscular dystrophy aimed at preimplantation genetic diagnosis. *J. Assist. Reprod. Genet.* 24:233- 240.
5. 今井光信, 中瀬克己, 小島弘敬, 加藤真吾, 杉浦互, 栗原健, 白坂琢磨. (2007)

HIV 検査および検査体制—技術の進歩と今後の課題. *日本エイズ学会誌* 9(3), 202- 208.

6. Tanaka, R., Hanabusa, H., Kinai, E., Hasegawa, N., Negishi, M., and Kato, S., Intracellular efavirenz levels in peripheral blood mononuclear cells from HIV-infected individuals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52(2):782- 785.
7. Kuji, N., Yoshii, T., Hamatani, T., Hanabusa, H., Yoshimura, Y., and Kato, S. Buoyant density and sedimentation dynamics of HIV-1 in two density-gradient media for semen processing. *Fertil. Steril.* (in press)

学会発表

1. 加藤真吾「教育講演：HIV 定量法の進歩とその臨床応用（生殖医療への応用）」第 21 回日本エイズ学術集会（2007 年 11 月 28-30 日、広島）
2. 花房秀次、小島賢一、加藤真吾、兼子智、高桑好一、久滋直昭、木内英、加藤克則、吉村泰典、田中憲一「HIV 感染者夫婦の生殖補助医療」第 21 回日本エイズ学術集会（2007 年 11 月 28-30 日、広島）
3. 木内英、岩室紳也、近藤真規子、今井光信、花房秀次、加藤真吾「母子感染予防における出生児への HAART の安全性の検討」第 21 回日本エイズ学術集会（2007 年 11 月 28-30 日、広島）
4. 田中理恵、栗原健、杉浦互、加藤真吾「HPLC によるダルナビルの血中濃度測定法の開発」第 21 回日本エイズ学術集会（2007 年 11 月 28-30 日、広島）
5. 須藤弘二、宮崎裕美、佐野貴子、近藤真規子、加藤真吾、今井光信「HIV 郵送検査に関する実態調査と検査精度の調査」

- 第 21 回日本エイズ学術集会 (2007 年 11 月 28-30 日、広島)
6. 加藤真吾、田中理恵、井土美由紀、林邦彦、今井光信「HIV-1 RNA 定量キットのコントロールサーベイ」第 21 回日本エイズ学術集会 (2007 年 11 月 28-30 日、広島)
 7. 加藤真吾、須藤弘二「LC-MS による薬剤耐性変異の検出」第 21 回日本エイズ学術集会 (2007 年 11 月 28-30 日、広島)
 8. 上西理恵、正兼亜季、近藤真規子、長谷彩希、廖華南、小野木成美、今井光信、上田幹夫、相良裕子、花房秀次、加藤真吾、草川茂、武部豊「CRF01 とサブタイプ B からなる新規組換えウイルス株 (URF) の同定とその公衆衛生学上の意義」第 21 回日本エイズ学術集会 (2007 年 11 月 28-30 日、広島)
 9. 杉浦互、瀧永博之、吉田繁、千葉仁志、小池隆夫、伊藤俊広、原孝、佐藤武幸、石ヶ坪良明、上田敦久、近藤真規子、今井光信、貞升健志、長島真美、福武勝幸、山元泰之、田中理恵、加藤真吾、宮崎菜穂子、岩本愛吉、藤野真之、中曾根正、巽正志、椎野禎一郎、岡慎一、林田庸総、服部純子、伊部史朗、藤崎誠一郎、金田次弘、浜口元洋、上田幹夫、正兼亜季、大家正義、下条文武、田邊嘉也、渡辺香奈子、白坂琢磨、栞原健、森治代、小島洋子、中桐逸博、高田昇、木村昭郎、南留美、山本政弘、松下修三、健山正男、藤田次郎「2003-2006 年の新規 HIV-1 感染者における薬剤耐性頻度の動向」第 21 回日本エイズ学術集会 (2007 年 11 月 28-30 日、広島)