

図1 大阪府内の公的検査数と陽性数

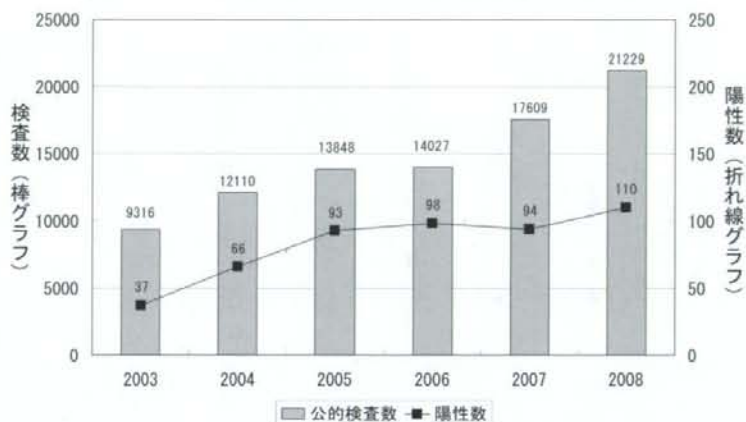


図2 大阪府内の公的HIV検査数・陽性数

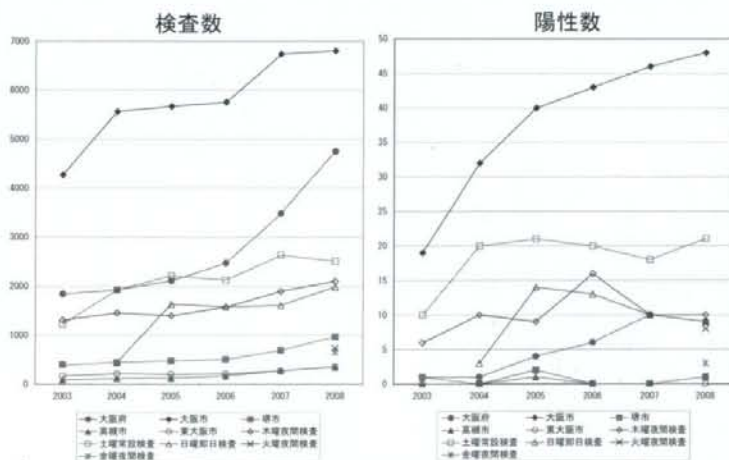


図3 主要公的検査所における陽性率の年次推移

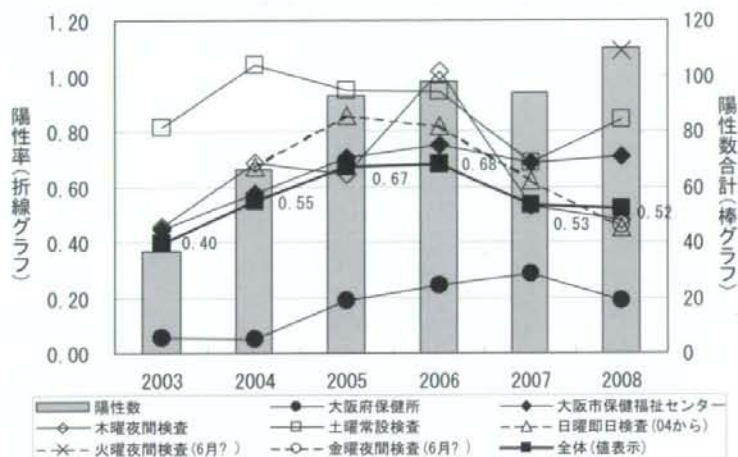


図4 府内公的検査所の月別検査数

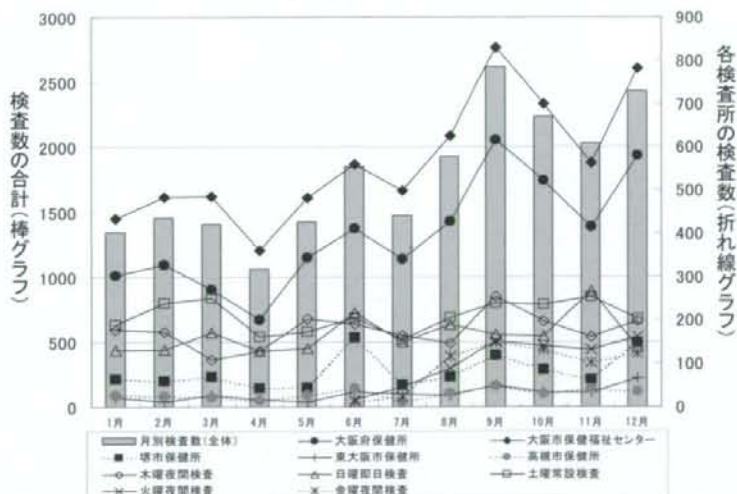


図5 府内公的検査所の月別陽性率

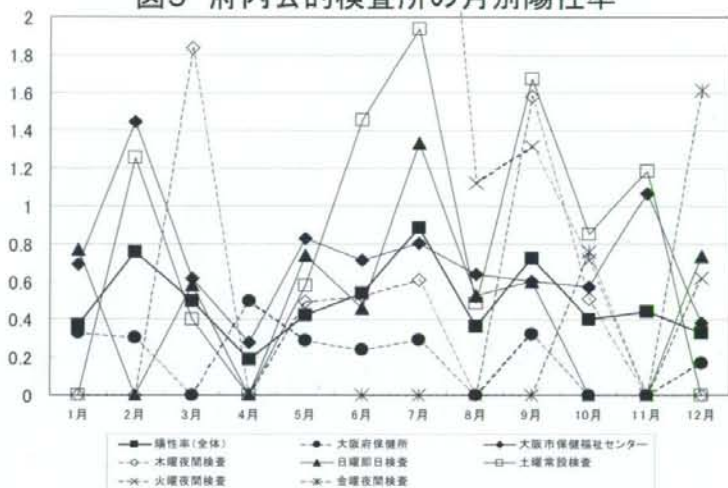


表1 診療所別検査数

診療所	性別			合計
	男性	女性	不明	
A	281 (12)	46	2	329 (12)
B	59	4	0	63
C	0	4	0	4
D	878 (16)	303	0	1,181 (16)
E	0	41	0	41
F	15	218	5	238
合計	1,233 (28)	616	7	1,856 (28)

()内はHIV陽性数

図6 HIV疫学調査における陽性件数の年次推移

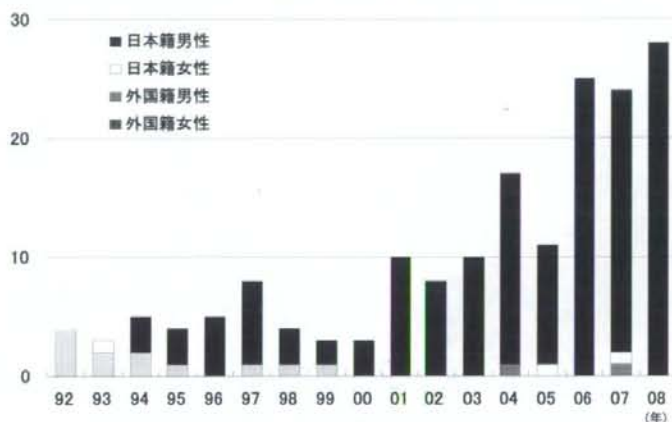


表2 NAT件数

年	診療所						計
	A	B	C	D	E	F	
2000	-	13	-	123	4	-	140
2001	-	85	33	1,649	30	-	1,797
2002	-	73	8	2,966	18	-	3,065
2003	-	49	3	3,226	28	-	3,306
2004	-	62	7	3,660	41	-	3,770
2005	-	53	7	3,058	37	-	3,155
2006	-	42	11	2,901 (1)	27	-	2,981 (1)
2007	484 (2)	66	4	1,348 (1)	44	-	1,946 (3)
2008	318 (1)	63	4	1,168 (3)	41	-	1,594 (4)
合計	802 (3)	506	77	20,099 (5)	270	-	21,754 (8)

2000年12月より2008年末まで。()内は遺伝子のみ陽性数

図7 PA法の併用による偽陽性率の低下

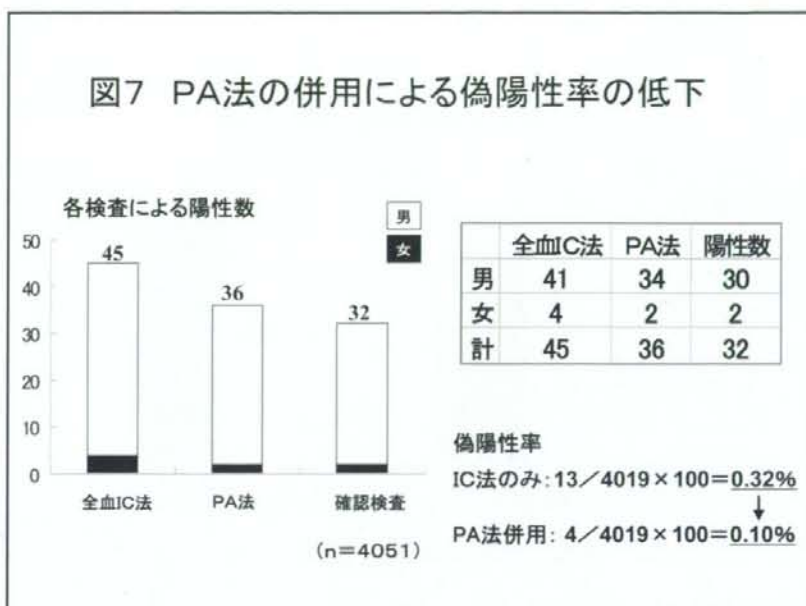


図8 通常月とキャンペーン月(6,9,12月)における、1ヶ月あたりの検査数の比較

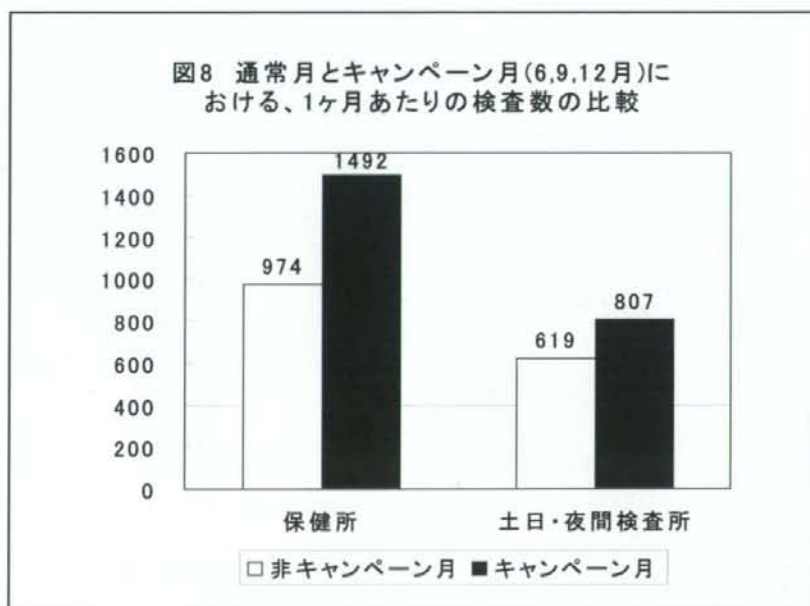


図9 通常月とキャンペーン月(6,9,12月)における、1ヶ月あたりの陽性数の比較

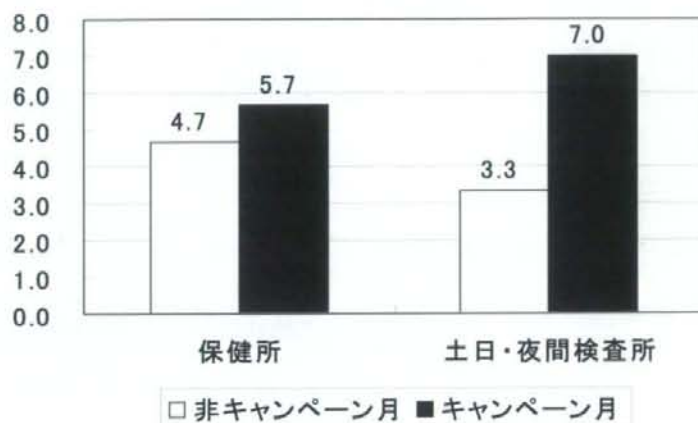


図10 通常月とキャンペーン月(6,9,12月)における、陽性率の比較

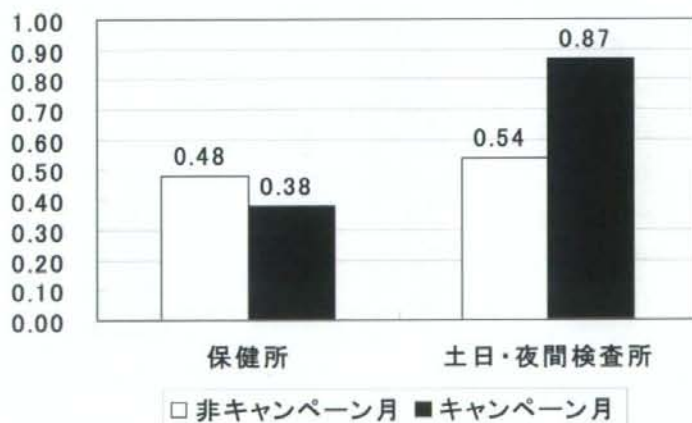


図11 検査数の比較(1ヶ月・1施設当り)

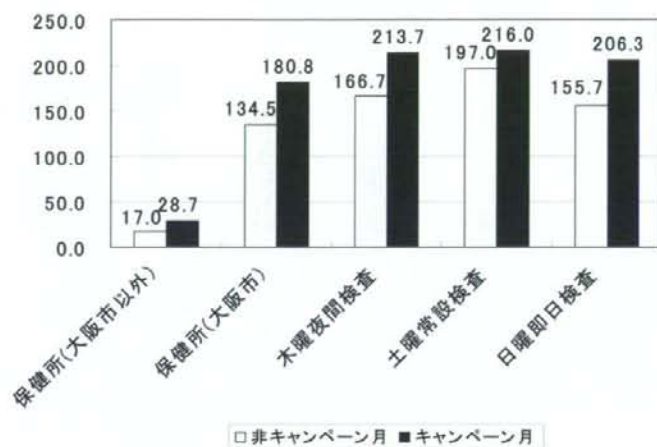


図12 陽性数の比較(1ヶ月・1施設当り)

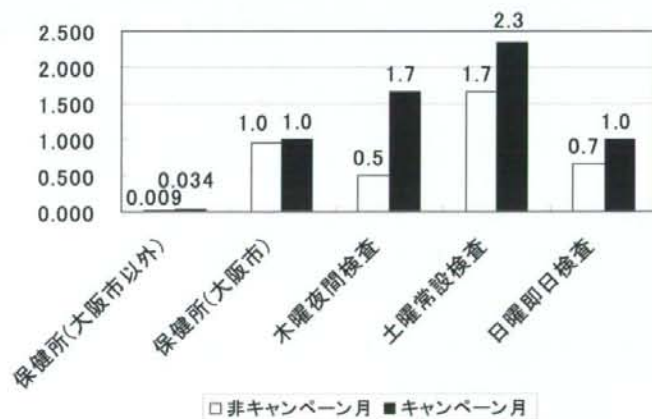
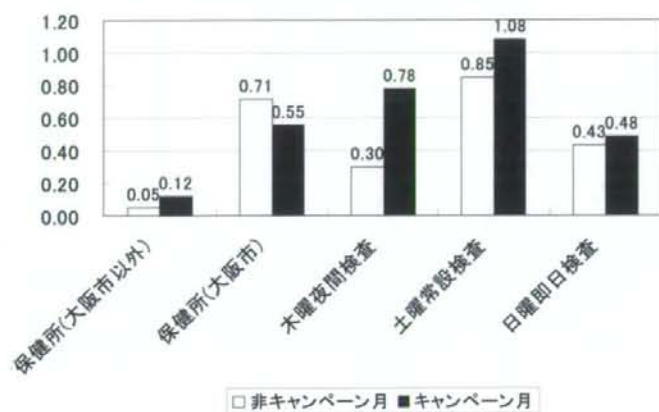


図13 陽性率の比較(1ヶ月・1施設当り)



21. 福岡県における HIV 検査体制と検査結果の解析

研究協力者 千々和勝己、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）

研究概要

福岡県内では、HIV 感染者・患者報告数が平成 17 年に大幅に増加した後、19 年には僅かに減少した。しかし、20 年には再び増加に転じた。このような状況での、県内保健所、及び民間クリニックでの検査状況について解析した。その結果、本県においては、主に同性間性的接触を原因とする男性の間で、HIV 感染が拡大していることが示唆された。

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 HIV 検査

福岡県内（北九州市、福岡市、大牟田市、久留米市は除く）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 HIV 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。なお、迅速検査で陽性または判定保留の場合は、引き続きビ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 法による抗原抗体検査を行い、その結果も即日、受診者に通知している。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、検査保健所に搬送後、EIA 法による抗原抗体検査を行い、結果は 1 週間後に通知している。

EIA 法による抗原抗体検査で、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 HIV 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、HIV の迅速診断を行っている。その方法は、検査保健所における迅速検査と同じであるが、判定保留または陽性の場合は、保健環境研究所で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 20 年下半期）」によると、平成 20 年 1 年間に新たに報告された HIV 感染者は 29 名、AIDS 患者は 12 名で合計 41 名であった。これは、前年の 36 名から 5 名の増加であった。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年はやや減少した。しかし、20年には再び増加に転じた。20年に報告された感染者・患者は全て男性であり、29名(70%)は同性間性的接触によるものであり、5名(12%)が異性間性的接触によるものであった。

これまでに報告された感染者・患者のそれぞれの推定感染経路の割合を図2に示す。感染者では同性間性的接触による感染が最も多く(56%)、患者では異性間性的接触によるものが最も多かった(39%)。

(2) 保健所を窓口とする HIV 検査

福岡県内(北九州市、福岡市、大牟田市、久留米市は除く)の保健所を窓口とする HIV 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。20年はやや減少しているように見えるが、これは4月から久留米市が独自に検査を始め、この集計から外れたためであり、実質的には微増していると考えられる。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り、20年も2例が陽性であり、どちらも男性であった。そのうち1例は迅速診断の受診者で、1例は通常検査の受診者であった。保健所を窓口とする HIV 検査の概要を表1に示す。なお、その他の保健所の検査結果から、EIA法による抗原抗体試験の偽陽性率は、0.24%(2/846)であった。

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の保健所との月別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。平成20年も、3検査保健所の件数が933件で、昨年同様他の10保健所の846件を上回っていた。

(3) 民間クリニックにおける HIV 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 HIV 検査を実施している。平成20年の検査の概要を表2に示す。1年間の受診者数は、455名で、その内訳は、男性332名(73%)、女性123名(27%)であった。また、迅速診断法では10件が陽性であったが、そのうち確認試験で2件が陽性であり、何れも男性であった。5月の陽性例は、19年1月から同クリニックで検査を開始して以来、初の陽性例であった。なお、迅速診断キットの偽陽性は8件で、偽陽性率は1.8%(8/455)であった。

D. 考察

福岡県内では、平成18年まで、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、20年には再び増加に転じた。報告された感染者・患者は全て男性であり、保健所を窓口とする検査、クリニックでの検査で陽性であった例も、全て男性であった。昨年も、報告された感染者・患者における女性の比率は8.3%(3/36)と低かったが、男性が多数を占める傾向がさらに顕著になった。

県内の保健所における HIV 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、重点的な啓発活動の期間には、検査数のかなりの増加が見られることから、今後も有効な啓発活動により、検査数を増やすことは可能だと考えられる。

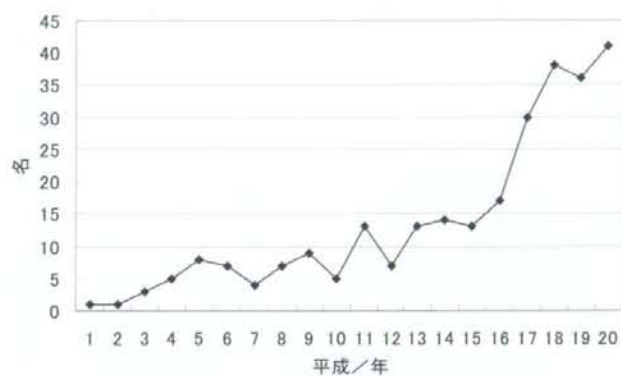
保健所における検査で、平成16年以降毎年陽性例が見つかるようになった。このことは、政令市以外の県部における HIV 感染

も徐々に拡大している証拠であると考えられる。また、感染者・患者の報告が多い福岡市内にある研究協力者のクリニックで、初めて陽性例が見られたことから、福岡市内においても、感染拡大が進行していると考えられる。

E. 結論

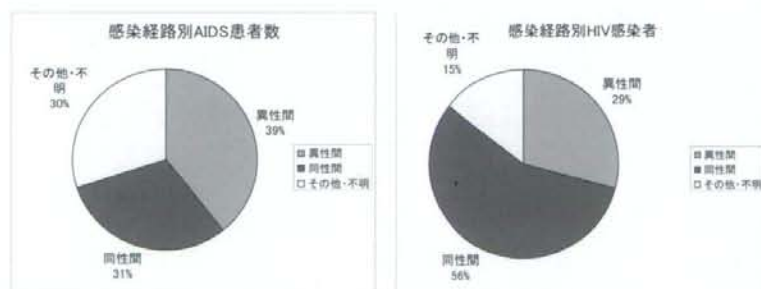
福岡県内では、平成 17 年から感染者・患者数の報告が増加してきたが、19 年は僅かに減少した。しかし、20 年に、感染者・患者が再び増加したことから、さらに重点的な啓発活動により、感染の早期発見、早期治療を目指していかなければならない。特に、本県においては同性間性的接触を主な原因とする男性の感染者が多いため、このグループを対象とする効果的な啓発活動を行い、多くの人々が HIV 検査を受ける機会を増やすことが重要である。

図1. 福岡県における患者・感染者報告数



合計 273名 : 男性250名、女性23名

図2. 患者・感染者の感染経路



累計患者数 87名

累計感染者 186名

図3.保健所における陽性者数と検査数の推移

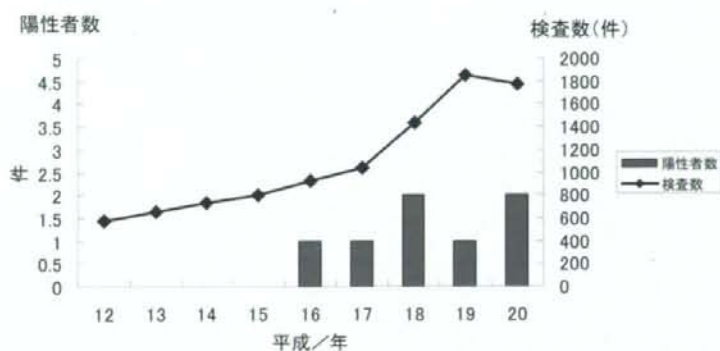


表1. 平成20年 福岡県内保健所におけるHIV検査状況(政令市等を除く)

保健所	数	検査体制	スクリーニング試験	検査件数	スクリーニング陽性数	確認試験陽性数
検査保健所	3	迅速 (即日)	イムノクロマト法→ 抗原抗体EIA法	933	1	1
その他の保健所	10	通常 (1週間後)	抗原抗体EIA法	846	3	1

図4.検査保健所とその他の保健所における受診者数の年間推移

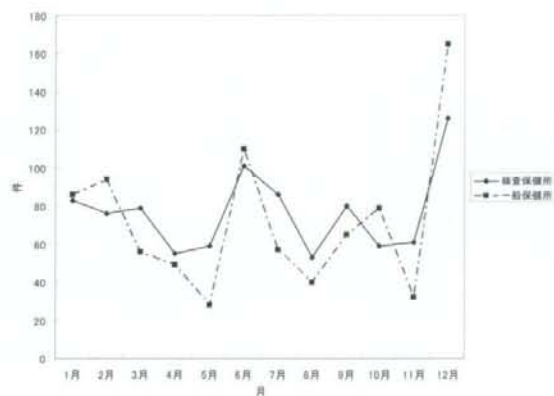


表2.クリニックにおけるHIV検査状況

月	迅速検査数	男	女	確認検査数	陽性数
H20.1	42	34	8	0	0
2	45	33	12	0	0
3	36	26	10	0	0
4	24	15	9	2	0
5	36	28	8	2	1
6	39	26	13	1	0
7	31	27	4	0	0
8	33	26	7	1	1
9	34	24	10	0	0
10	36	23	13	1	0
11	36	24	12	1	0
12	63	46	17	2	0
計	455	332	123	10	2

(3) HIV 検査の質的充実に関する研究

22. 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 (神奈川県衛生研究所)

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、研究班協クリニ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 遺伝子を検出しなかった 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ないため、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

