

19. HIV 新規感染率推計アルゴリズムの開発

－HIV クラス別抗体 IgM、IgG、IgA 測定系の開発－

研究分担者 近藤真規子（神奈川県衛生研究所）

協力研究者 佐野貴子（神奈川県衛生研究所）、
岩室紳也（厚木市立病院）、吉村幸浩、立川夏夫（横浜市立市民病院）、
井戸田一朗（しらかば診療所）、山中晃（新宿東口クリニック）、
今井光信（田園調布学園大学）
須藤弘二、加藤真吾（慶應義塾大学医学部微生物学・免疫学教室）

研究要旨

HIV 流行の実態を把握し効果的な予防対策のために、incidence の推計は重要である。日本では感染時期推定には血清学的手法の BED assay が広く用いられているが、incidence の推計に用いるには至っていない。我々は出来るだけ正確な HIV 新規感染率を推定できるアルゴリズムを確立するため、HIV 感染時期推定の血清学的指標として有効と考えられる新しい方法、クラス別抗体（IgM、IgG、IgA）測定系について検討した。

HIV 抗体陰性血漿を用いて特異性を検討した結果、IgA 抗体と IgG 抗体測定系の特異性は良かったが IgM 抗体測定系のバックグラウンドが高値であり、cut off 値の設定について検討する必要があると考えられた。

HIV に感染すると最初に IgM 抗体が出現するが、比較的早期に衰退し、IgM 抗体が減少し始めたところから IgG 抗体が出現し、ある程度の濃度で終生持続することが知られている。HIV 感染初期から 4 年間フォローアップした患者においてもほぼ同様の結果が得られたが、IgA 抗体については予測よりも早く出現し、長期間持続することが明らかになった。

今後は例数を増やして検討するとともに、各種血清学的データと HIV 遺伝子 diversity を組み合わせた incidence 推計アルゴリズムの確立を目指す。

A. 研究背景および目的

感染症の実態を把握し予防対策を講ずるために最も重要な指標は新規感染率（incidence）である。日本では毎年 HIV 感染者数と AIDS 発症者数が報告されているが、これらは流行の実態を反映していない。流行の拡大を防ぐには、感染者の早期発見、効果的なリスク低減のための戦略が必要であるが、そのためには信頼できる incidence の推定が重要となってくる。

Incidence の推計にアメリカ CDC では BED assay を採用し、血清学的検査アルゴリズム

分析（STARHS）を行っているが、アフリカ等の発展途上国では BED assay によって得られた incidence と流行との実態が一致しないかったため、UNAIDS では BED assay 以外の血清学的検査法や疫学的情報を組み合わせたアルゴリズムを検討している。日本では感染時期の推定に BED assay が行われているが、incidence の推計まで至っていない。現在、我々は血清学的手法と遺伝子学的手法を組み合わせた incidence 推計法の確立を目的に研究を行っている（図 1）。今年度は主として血清学的手法による感染時期推定法の検討を行

った。

感染時期推定に広く用いられている BED assay は、抗 HIV 治療中や AIDS 発症者では正しい結果が得られない等の問題点が知られている。我々は新しい血清学的指標の一つとしてクラス別抗体 IgM、IgG、IgA に注目した。一般に感染症に罹患すると一定の期間経過後、IgM、IgG、IgA の順番で抗体が出現する。HIV 感染についても恐らく同様であると考えられる。すなわち、IgG 抗体に対する IgA 抗体の比が大きいほど、感染後の期間が長いと予測され、感染時期推定のパラメーターの一つとなることが期待される。そこで、HIV クラス別抗体 IgM、IgG、IgA 測定系の検討を行った。

B. 研究方法

1. Sample

HIV 抗体陽性血漿 6 検体を用いて HIV クラス別抗体 IgM、IgG、IgA 測定系の基礎的検討（固相抗体濃度、血漿希釈倍数）を行った。

特異性の検討には HIV 抗体陰性血漿 6 検体を用いた。

感染初期からフォローアップしている患者 1 名（GM2855）から 4 年間に亘り、経時的に得られた血漿、10 検体について各クラス別抗体量を測定し、その動向を調べた。

2. 抗ヒト IgM、IgG、IgA 抗体固相プレートの作製

HIV クラス別抗体 IgM、IgG、IgA 測定系の原理を図 2 に示した。

0.5mg/ml の各抗ヒトクラス別抗体（IgM、IgG、IgA）を PBS(-) で $1\mu\text{g/ml}$ 、 $5\mu\text{g/ml}$ に調整し、96 穴マイクロプレートに $100\mu\text{l}$ ずつ分注し、 4°C で 1 晩反応させた。

プレートを 0.05% Tween 20 加 PBS(-) 溶液（T-PBS）で洗浄後、Super Block Blocking Buffer を用いてブロッキングを行い、反応プレートとして使用した。

3. 抗ヒトクラス別抗体（IgM、IgG、IgA）測定 ELISA 法

市販キット、ジェンスクリーン HIV Ag-Ab ULT (BIO・RAD) の試薬を用いた測定系操作マニュアルの詳細を図 3 に示した。

すなわち、ヒト血漿中に存在するクラス別抗体をプレートに固相した抗ヒトクラス別抗体によって捕捉後、HIV-1 gp41 抗原コンジュゲートによって HIV-1 特異クラス別抗体を検出する方法について検討した。抗ヒトクラス別抗体とヒト血漿反応後は市販キット、ジェンスクリーン HIV Ag-Ab ULT (BIO・RAD) の添付試薬を用い、血漿の希釈には 5% スキムミルク加 T-PBS を用いた。

C. 結果

HIV 抗体陽性血漿 6 検体を用いてプレートに固相する抗体量、血漿希釈倍数の検討を行った。一般に IgG 抗体は血漿中に高濃度に存在するため、プレートへの固相量を $1\mu\text{g/ml}$ とし、血漿希釈倍数は 10^5 倍と 10^6 倍希釈の 2 点を用いた。IgM 抗体と IgA 抗体は固相量を $1\mu\text{g/ml}$ 、 $5\mu\text{g/ml}$ 、血漿希釈倍数を 10 倍として以下の実験を行った。

HIV 抗体陰性血漿 6 検体を用いて、特異性について検討した結果、IgG 抗体と IgA 抗体の吸光度は 6 検体ともに 0.100 以下で特異性は良好であったが、IgM 抗体の吸光度は 0.092 から 0.508 まではばらつき、バックグラウンドが高かった。

感染初期から経時的にフォローアップしている患者 GM2855 の血漿について、クラス別抗体を測定し、その消長を調べた（表 1）。本症例の初診時の検査結果は、ジェネディア HIV-1/2mix 抗体価 64 倍、抗原抗体同時検査 VIDAS DUO II 陽性（TV 値 1.75）、WB 法（ペプチラブ 1）で p25 バンドのみ検出、血中 HIV-1・RNA 量 340000 コピー/ml、BED assay 陽性（吸光度 0.033）で、感染後 2～3 カ月以内と推定された（HIV 検査相談体制の充実と活用に関する研究、総合研究報告書「平成 21～23 年度」参照）。

IgM 抗体は初診時 (GM2855-1) の吸光度が最も高く、その後減少し 3 ヶ月後 (GM2855-6) まで検出された。IgG 抗体は 3 ヶ月後には既に高レベル (吸光度 1.023) に出現しており、17 カ月後にピークとなり、その後も高レベルで 4 年後まで維持していた。IgA 抗体は IgG 抗体に若干遅れて出現し、11 カ月後をピークとし、その後徐々に減少していった。

D. 考察

HIV 流行の実態を把握し効果的な予防対策のために、incidence の推計は重要である。日本では感染時期推定には血清学的手法の BED assay が広く用いられているが、incidence の推計に用いるには至っていない。我々は出来るだけ正確な HIV 新規感染率を推定できるアルゴリズムを確立するため、HIV 感染時期推定の血清学的指標として有効と考えられる新しい方法、クラス別抗体 (IgM、IgG、IgA) 測定系について検討した。

測定系は特別な機器を必要とせず、できるだけ多くの施設で導入が可能のように、市販のキットを利用した ELISA 法を考案した。

HIV 抗体陰性血漿 6 検体を用いた特異性の検討では、IgA 抗体と IgG 抗体測定系の特異性は良かったが (吸光度 < 0.100)、IgM 抗体の吸光度は 0.092 から 0.508 までばらつき、バックグラウンドが高値であった。

IgA 抗体や IgG 抗体はアフィニティが高く、抗原との反応はシャープで特異性が高い。一方、IgM 抗体のアフィニティは低く、抗原との反応がブロードなため、交差反応が起きやすいと考えられた。IgM 抗体の測定系ではバックグラウンドを低くする工夫とともに、cut off 値の設定についても検討する必要がある。

一般に HIV に感染すると最初に IgM 抗体が出現するが、比較的早期に衰退し、IgM 抗体が減少し始めたところから IgG 抗体が出現し、ある程度の濃度で終生持続することが知られている。

HIV 感染初期から 4 年間フォローアップした患者においてもほぼ同様の結果が得られたが、IgA 抗体については予測よりも早く出現し、比較的長期間持続することが明らかになった。

今後は例数を増やして検討するとともに、各種血清学的データと HIV 遺伝子 diversity を組み合わせた incidence 推計アルゴリズムの確立を目指す。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kondo M, Lemey P, Sano T, Itoda I, Yoshimura Y, Sagara H, Tachikawa N, Yamanaka K, Iwamuro S, Matano T, Imai M, Kato S, Takebe Y; Emergence in Japan of an HIV-1 variant associated with MSM transmission in China: First indication for the international dissemination of the Chinese MSM lineage. J. Virol. 2013, in press.
- 2) 武部豊、近藤真規子: 中国における男性同性愛者 (MSM) 間の HIV-1 流行の急速な拡大と我が国への流行波及に関する知見: 病原微生物検出情報、34、2013、in press。

2. 学会発表

- 1) Kato S, Murayama M, Kondo M, Takagi R; Anti-HIV-1 activity of saliva through cleavage of viral RNA strands, The XIX International AIDS Conference (22-27 July 2012, Washington, D.C., USA) .
- 2) 武部豊、近藤真規子: 中国における男性同性愛者 (MSM) 間の HIV-1 流行の急速な拡大に関する分子疫学と我が国への流行波及を示す知見、第 60 回日本ウイルス学会学術集会 (2012 年 11 月 13~15 日、大

阪)。

- 3) 近藤真規子、佐野貴子、須藤弘二、立川夏夫、相楽裕子、岩室紳也、井戸田一郎、山中晃、武部豊、今井光信、加藤真吾：日本で流行している HIV-1 サブタイプの変遷、第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会 (2012 年 11 月 24～26 日、横浜)。
- 4) 椎野禎一郎、近藤真規子、杉浦互 他：国内感染者集団の大規模塩基配列解析 3：希少サブタイプとサブタイプ間組換え体の動向、第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会 (2012 年 11 月 24～26 日、横浜)。
- 5) 佐野貴子、小林寛子、杉浦太一、須藤弘二、植田知幸、清水茂徳、近藤真規子、今井光信、加藤真吾：ホームページ「HIV 検査・相談マップ」による HIV 検査機関の情報提供およびサイト利用状況、第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会 (2012 年 11 月 24～26 日、横浜)。
- 6) 須藤弘二、佐野貴子、近藤真規子、今井光信、加藤真吾：HIV 郵送検査に関する実態調査 (2009-2011)、第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会 (2012 年 11 月 24～26 日、横浜)。
- 7) 服部純子、近藤真規子、杉浦互 他：新規 HIV/AIDS 診断症例における薬剤耐性 HIV の動向、第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会 (2012 年 11 月 24～26 日、横浜)。

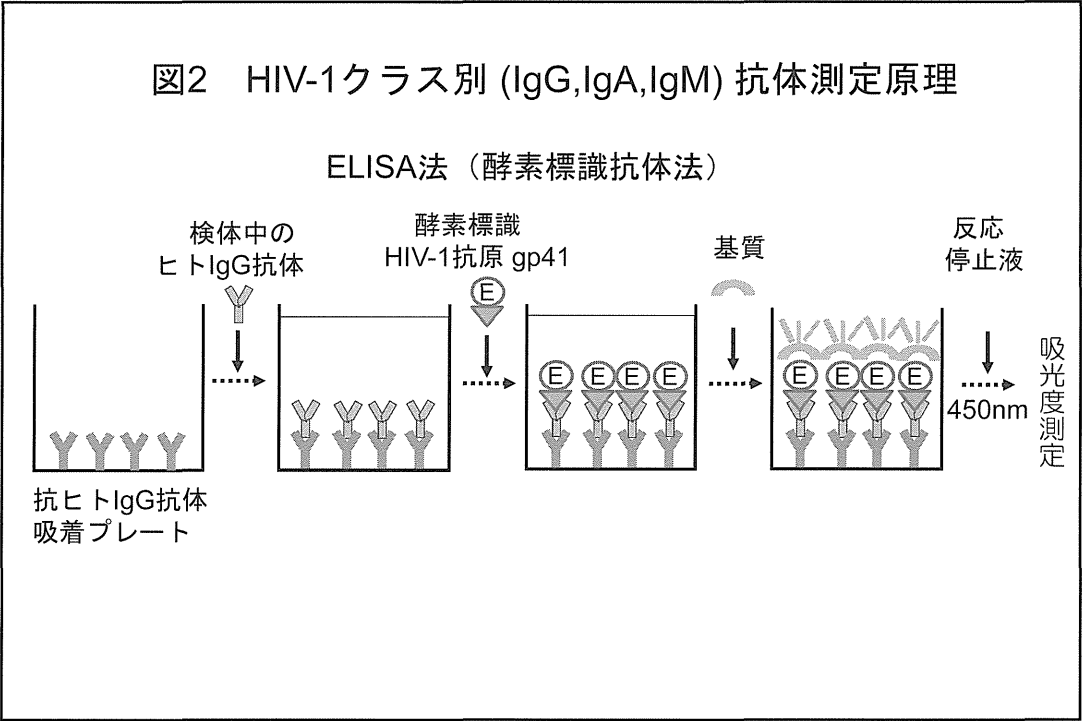
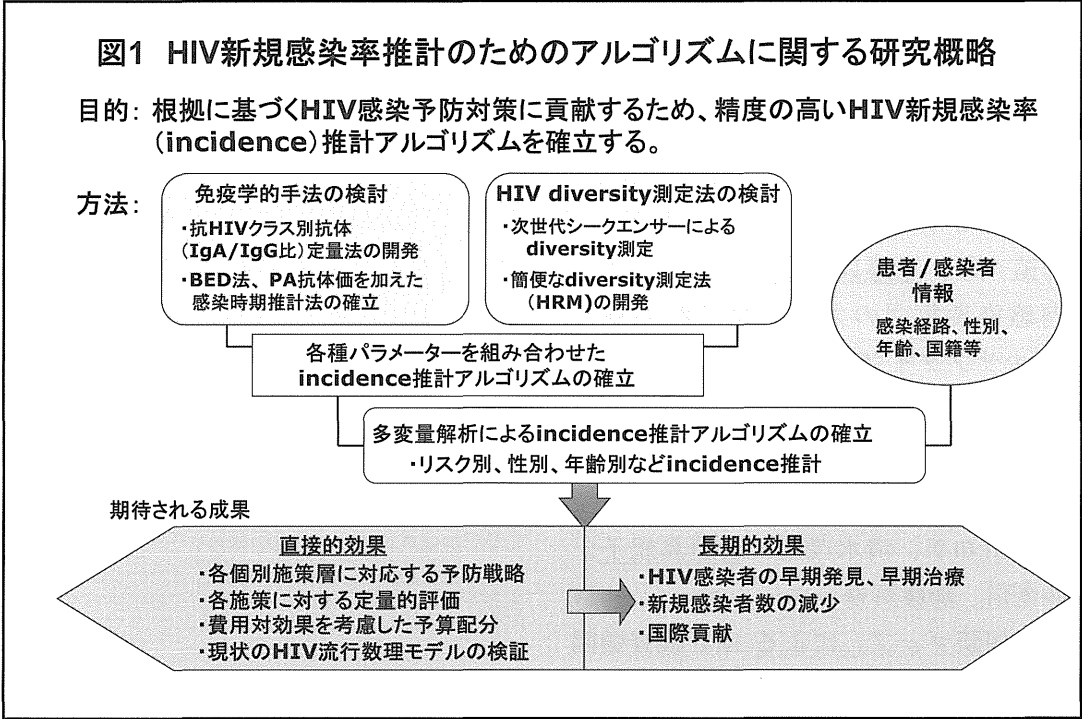


表1 抗HIVクラス別抗体（IgM、IgG、IgA）ELISA法 結果

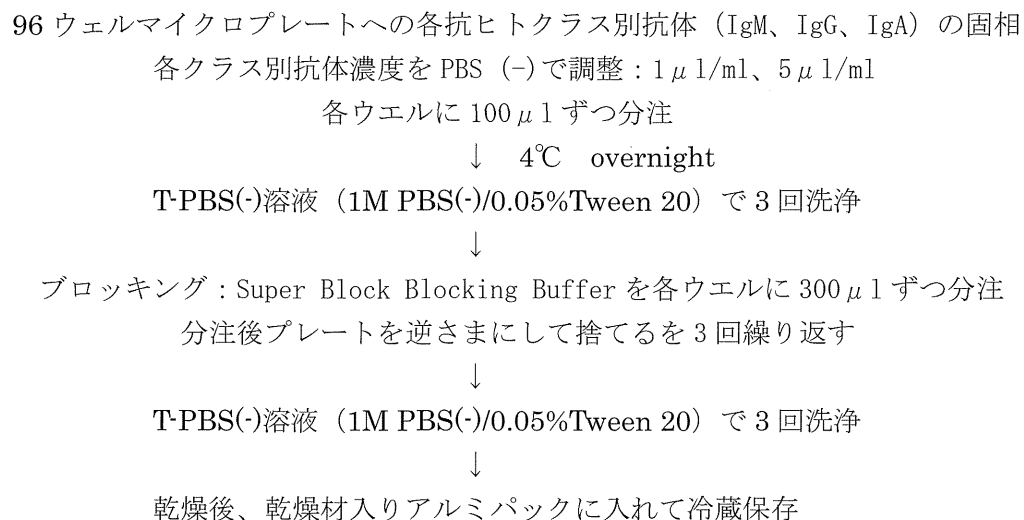
プレート固相抗体量	5μg/ml		1μg/ml		1μg/ml	
クラス別抗体 血漿希釈倍数	IgA X10	IgM X10	IgA X10	IgM X10	IgG X10 ⁵ X10 ⁶	
GM2855-1 (081202)	0.057 0.059	1.521 1.428	0.052 0.052	0.742 0.775	0.054 0.051	0.051 0.049
GM2855-6 (3m)	0.240 0.208	0.784 0.788	0.120 0.117	0.456 0.432	1.092 0.953	0.142 0.134
GM2855-10 (7m)	0.526 0.511	0.569 0.562	0.218 0.224	0.301 0.309	1.438 1.473	0.190 0.182
GM2855-14 (11m)	0.988 1.065	0.561 0.621	0.396 0.401	0.317 0.415	2.055 2.117	0.271 0.253
GM2855-20 (1y5m)	0.961 0.956	0.513 0.515	0.393 0.383	0.293 0.281	2.821 2.849	0.430 0.491
GM2855-25 (2y)	0.433 0.436	0.345 0.339	0.192 0.181	0.207 0.216	2.770 2.662	0.375 0.380
GM2855-30 (2y5m)	0.348 0.326	0.335 0.338	0.166 0.164	0.185 0.195	1.973 1.940	0.224 0.204
GM2855-36 (3y)	0.251 0.273	0.521 0.555	0.126 0.150	0.259 0.261	2.442 2.307	0.417 0.359
GM2855-40 (3y6m)	0.212 0.207	0.379 0.376	0.119 0.098	0.206 0.211	2.017 1.972	0.281 0.290
GM2855-45 (4y)	0.181 0.182	0.333 0.322	0.094 0.093	0.185 0.166	1.769 1.839	0.239 0.259
NC*	0.052 0.060	0.287 0.275	0.052 0.059	0.189 0.202	0.038 0.054	0.041 0.068
NL109B	0.055	0.462	0.064	0.295	0.054	0.065
M2293	0.056	0.092	0.063	0.080	0.056	0.068
M2294	0.050	0.201	0.067	0.131	0.051	0.066
M2295	0.066	0.291	0.061	0.171	0.055	0.055
M2296	0.055	0.508	0.057	0.221	0.052	0.064
M2298	0.065	0.403	0.061	0.334	0.079	0.092

*NC: ジェンスクリーンHIV Ag-Ab ULT (BIO・RAD) 添付 陰性コントロール

*NL109B: 市販ヒト血清

図2 抗ヒト HIV クラス別抗体 (IgM、IgG、IgA) 測定系フロー

1. 抗ヒトクラス別抗体 (IgM、IgG、IgA) の固相



2. 抗ヒトクラス別抗体 (IgM、IgG、IgA) 測定 ELISA 法

血漿の希釈 : M-T-PBS (-) (5% スキムミルク/T-PBS(-)) 溶液で希釈系列作製

↓ 37°C 1 時間

* 以下、ジェンスクリーン HIV Ag-Ab ULT (BIO-RAD) の添付試薬を使用

↓
R2 で洗浄、3 回

↓
コンジュゲート 2 (R7a+R7b)、 $100\mu\text{l}$

↓ $18^{\circ}\text{C}\sim 30^{\circ}\text{C}$ 、30 分

R2 で洗浄、5 回

↓
気質発色液 (R8+R9) $80\mu\text{l}$

↓ $18^{\circ}\text{C}\sim 30^{\circ}\text{C}$ 、30 分

反応停止液 R10 $100\mu\text{l}$

↓
吸光度測定 $450/620\text{nm}$

* 洗浄液 (R2) : トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン塩酸塩

コンジュゲート 2 (R7a) : ペルオキシダーゼ標識合成 HIV 抗原 (HIV-1 gp41)

コンジュゲート 2 溶解液 (R7b) : クエン酸ナトリウム

気質緩衝液 (R8) : 0.015 過酸化水素水

発色剤 (R9) : テトラメチルベンジジン

反応停止液 (R10) : 0.5mol/L 硫酸

NC : 陰性コントロール

PC : HIV 抗体陽性コントロール

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表
雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kondo M, Lemey P, Sano T, Itoda I, Yoshimura Y, Sagara H, Tachikawa N, Yamanaka K, Iwamuro S, Matano T, Imai M, Kato S, Takebe Y.	Emergence in Japan of an HIV-1 variant associated with MSM transmission in China: First indication for the international dissemination of the Chinese MSM lineage.	J Virol.	(in press)		
Yamashina H, Obayashi Y, Kanda K, Silva TK, Wattegama S, Jayasinghe A, Tamashiro H.	A focus group interview of university students' health in Sri Lanka.	Journal of International Health	27(4)	381-385	2012
Kanda K, Jayasinghe A, Silva KT, Priyadarshani NGW, Delpitiya NY, Obayashi Y, Arai A, Gamage CD, Tamashiro H.	Religious leaders as potential advocates for HIV/AIDS prevention among the general population in Sri Lanka.	Global Public Health	8(2)	159-173	2013
Kojima Y, Kawahata T, Mori H, Furubayashi K, Taniguchi Y, Iwasa A, Taniguchi K, Kimura H, Komano J.	Prevalence and epidemiological traits of HIV infections in populations with high-risk behaviours as revealed by genetic analysis of HBV.	Epidemiol Infect.	25	1-8	2013
Bunupuradah T, Imahashi M, Iampornsinsin T, Matsuoka K, Iwatani Y, Puthanakit T, Ananworanich J, Sophonphan J, Mahanontharit A, Naoe T, Vonthanak S, Phanuphak P, Sugiura W.	On Behalf Of The Predict Study Team. Association of APOBEC3G genotypes and CD4 decline in Thai and Cambodian HIV-infected children with moderate immune deficiency.	AIDS Res Ther.	24;9(1)	34	2012
Ode H, Nakashima M, Kitamura S, Sugiura W, Sato H.	Molecular dynamics simulation in virus research.	Frontiers in microbiology.	3	258	2012
Miyamoto T, Nakayama EE, Yokoyama M, Ibe S, Takehara S, Kono K, Yokomaku Y, Pizzato M, Luban J, Sugiura W, Sato H, Shioda T.	The Carboxyl-Terminus of Human Immunodeficiency Virus Type 2 Circulating Recombinant form 01_AB Capsid Protein Affects Sensitivity to Human TRIM5 α .	PloS one.	7(10):e4	7757	2012
Matsunaga S, Sawasaki T, Ode H, Morishita R, Furukawa A, Sakuma R, Sugiura W, Sato H, Katahira M, Takaori-Kondo A, Yamamoto N, Ryo A.	Molecular and enzymatic characterization of XMRV protease by a cell-free proteolytic analysis.	Journal of proteomics.	75(15)	4863-4873	2012
Kitamura S, Ode H, Nakashima M, Imahashi M, Naganawa Y, Kurosawa T, Yokomaku Y, Yamane T, Watanabe N, Suzuki A, Sugiura W, Iwatani Y.	The APOBEC3C crystal structure and the interface for HIV-1 Vif binding.	Nature structural & molecular biology.	19(10)	1005-1010	2012
Jahanbakhsh F, Ibe S, Hattori J, Monavari SH, Matsuda M, Maejima M, Iwatani Y, Memarnejadian A, Keyvani H, Azadmanesh K, Sugiura W.	Molecular epidemiology of HIV-1 infection in Iran: genomic evidence of CRF35_AD predominance and CRF01_AE infection among individuals associated with injection drug use.	AIDS research and human retroviruses.	29	198-203	2012
Hirano A, Ikemura K, Takahashi M, Shibata M, Amioka K, Nomura T, Yokomaku Y, Sugiura W.	Short communication: lack of correlation between UGT1A1*6, *28 genotypes, and plasma raltegravir concentrations in Japanese HIV type 1-infected patients.	AIDS research and human retroviruses.	28(8)	776-779	2012

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
井戸田一朗、星野慎二、沢田貴志、佐野貴子、上田敦久、加藤真吾、今井光信.	コミュニティセンター「かながわレインボーセンターSHIP」の夜間HIV/STIs即日検査相談を受けたmen who have sex with menの特徴及び罹患率	日本公衆衛生雑誌	(in press)		
加藤真吾.	わが国のHIV流行終息にむけて.	IASR	33	237-239	2012
井戸田一朗、加藤康幸、畑寿太郎.	都内診療所における男性性感染症患者のHIV陽性率	日本性感染症学雑誌	23	90-93	2012
武部豊、近藤真規子.	中国における男性同性愛者(MSM)間のHIV-1流行の急速な拡大と我が国への流行波及に関する知見	病原微生物検出情報	(in press)		
都築智之、岩瀬弘明、島田昌明、平嶋昇、日比野祐介、龍華庸光、齋藤雅之、玉置大、神谷麻子、横井美咲、横幕能行、藤崎誠一郎、杉浦互、後藤秀実.	当院におけるhiv、Hcv重複感染症例に対するペグインターフェロン、リバビリン併用療法の治療成績.	日本消化器病学会雑誌.	109(7)	1186-1196	2012

研究成果の刊行に関する一覧表
書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
矢永由里子		矢永由里子、小池眞規子	がんとエイズの心理臨床	創元社	大阪	2012	印刷中
矢永由里子	地域支援という視点	野島一彦、吉岡 久美子、本山 智敬	心理臨床のフロンティア	創元社	大阪	2012	184-193
矢永由里子	HIVとともに生きるということ	神田橋條治	ともにあるⅡ	木星舎	福岡	2012	81-126
玉城英彦			ともに生きるためのエイズー 当事者と社会が克服していくために	溪流社	東京	2012	1-212

平成24年度 厚生労働科学研究費補助金 エイズ対策研究事業
「HIV検査相談の充実と利用機会の促進に関する研究」
平成24年度 研究報告書

発行日 2013年3月31日
発行者 研究代表者 加藤真吾 (慶應義塾大学医学部)
発行所 研究班事務局
慶應義塾大学医学部微生物学・免疫学教室
〒160-8582 東京都新宿区信濃町35

©2013 編集・構成： 須藤弘二、サイモンソン哲子 印刷：(有)長谷川印刷

本報告書に掲載された論文及び図表には
著作権が発生しておりますので
利用にあたりご注意ください。

HIV検査相談の充実と
利用機会の促進に関する研究

平成24年度
研究報告書