

図2 HIVスクリーニング検査実施フローチャート

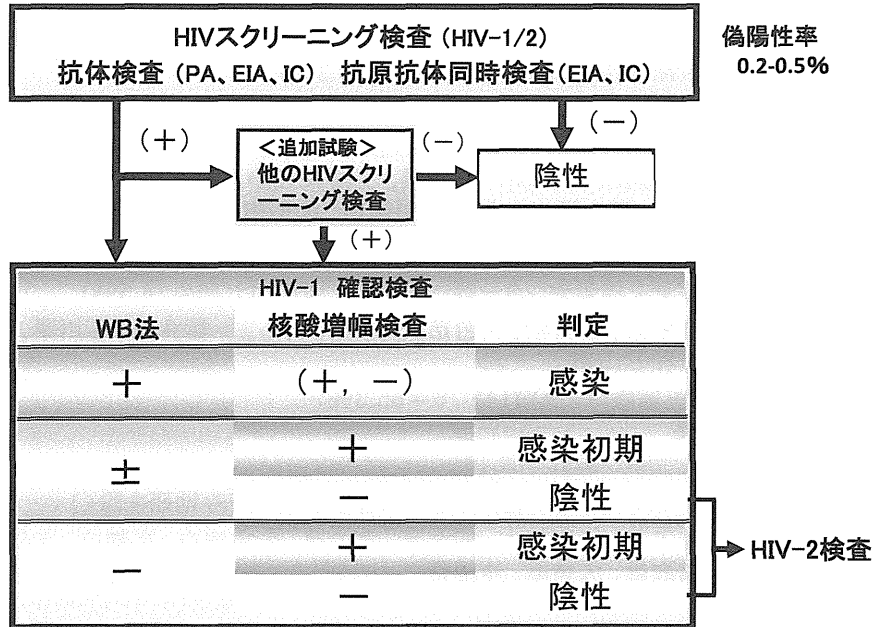


表2 全国保健所HIV検査実態アンケート(H26年)

回収率: 441/577=76%

確認検査方法(通常、即日共通)	保健所数	
WB	152	298 68%
2次スクリーニング+WB	146	
WB+NAT	86	142 32%
2次スクリーニング+WB+NAT	56	
その他	1	1
合計	441	441

表3 全国地方衛生研究所でのHIV確認検査(WB、NAT)実施状況(H26年)

1. 地研でWB+NAT検査:23施設(23/76=30.3%)

NAT方法:KK-TaqMan 19、コバスTaqMan 1、RT-PCR 3

北海道(札幌市、函館市を含む)、山形県、福島県、栃木県、東京都(杉並区含む)、神奈川県、横浜市、川崎市、静岡県、三重県(2か所の保健所で実施)、大阪市、大阪府(堺市、東大阪市を含む)、尼崎市、広島市、福岡県、熊本県、大分県、鹿児島県

2. WB+NAT検査を検査センター等へ委託:11施設(11/76=14.5%)

青森県、岩手県、宮城県、仙台市、茨城県、群馬県、福井県、石川県、兵庫県、和歌山県、和歌山市

3. WBのみ実施施設:42施設(42/76=55.3%)

地研で実施 :38施設

検査センター等へ委託:4施設

4. KK-TaqManコントロール送付状況(13施設、導入済み地研を除く)

千葉県、埼玉県、相模原市、栃木県、富山県、名古屋市、京都府、京都市、姫路市、兵庫県、鳥取県、広島県、沖縄県

*下線は現在KK-TaqMan導入検討中

18. 日本で流行している HIV の遺伝子解析

—日本で検出された CRF01_AE およびサブタイプ B/CRF01_AE 組み換え体の解析—

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

当研究班では HIV 確認検査や HIV 感染者の病態把握等に用いられる HIV 遺伝子検査法の信頼性を確保し、問題が生じた場合には素早い対策を講じられるように、流行株の特徴について解析している。最近の注目すべき HIV 遺伝子の特徴について報告する。

2004 年から 2013 年に登録された HIV-1 感染者 669 例についてウイルス遺伝子の解析を行った結果、2010 年から 2013 年に MSM あるいは感染経路不明の日本男性 11 例から、中国の MSM 間で大流行している CN. MSM. 01-1 バリエントを検出した。11 例のうち 2012 年までに検出された 9 例は同一のクラスター（JP1. CN. MSM. 01-1）を形成し、このうち 2 例は日本の MSM 集団に広く浸淫している欧米型サブタイプ B との間で共感染、あるいは組み換えが起こっていることが明らかになった。JP1. CN. MSM. 01-1 バリエントの日本の MSM 集団への播種は 2006～2009 年と推定された。2013 年に検出した 2 例は先の 9 例とは異なるクラスターを形成した。

この他 B/01AE 組み換えウイルスが 8 例検出され、このうち長期間日本に滞在している東南アジア出身の 4 例は同じ組み換え構造であった。日本国内は現在、集団内のリスク行動、感染ネットワークが組み換えウイルスを生むような状況にあることが示唆された。

当研究班では HIV 遺伝子検査法、KK-TaqMan 法開発し、地方衛生研究所での HIV 確認検査として技術支援を行っているが、日本で検出された CN. MSM. 01-1 バリエントおよび B/01AE 組み換え体の 20 株において、測定に影響を与える変異は認められなかった。

A. 研究背景と目的

日本における HIV/AIDS 報告数は年々増加し、2008 年には報告数はピークを迎え、HIV 感染者 1126 名、AIDS 患者 431 名となった。保健所等無料匿名検査での検査数も陽性数ともに 2008 年がピークであったが、2009 年の新型インフルエンザの大流行、2011 年の東日本大震災の影響等により、2013 年の検査数は

2008 年に比べ 23%減少し、陽性数も 453 名で 9.6%減少した。

一方、2013 年エイズ動向委員会での感染者数は 1106 名で 2008 年(1126 名)とほとんど変わっていないが、AIDS 患者数が若干増加したため患者・感染者の合計は過去最高となった。2008 年以降、毎年 1500 名程度の新規患者・感染者が報告されている状況である。

HIV 感染者の増加を防ぐためには、感染者の早期発見、早期治療が重要であり、HIV 検査体制の一層の充実が求められている。中でも感染初期の確認や患者病態を把握するためには HIV 遺伝子検査が重要な役割を担っている。遺伝子検査は、PCR を原理とする方法が広く使用されているため、ウイルスの変異によっては感染していても遺伝子が検出されないことも予測される。そのため、通常から流行している HIV 遺伝子の特徴を把握しておくことは重要である。

我々は以前より日本で流行している HIV の遺伝子型解析を行っているが、最近国内でサブタイプ B と CRF01_AE の組み換え体が検出されるようになった。日本におけるサブタイプの分布状況、これら組み換え体の特徴について報告する。

B. 研究方法

1. 試料

2004 年から 2013 年に主として神奈川県および東京都内の医療機関に来院した新規 HIV 感染者 669 名の血液を用いた。

2. サブタイプ解析

主としてプロテアーゼ (PR)、RT、インテグラーゼ (IN)、env C2V3 の領域を用いてサブタイプを判定し、必要に応じて他領域の解析も行った。

患者血液より HIV-1 遺伝子を抽出し、PCR で増幅後、ダイレクトシーケンス法 (BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit : アプライドバイオシステムズ) により塩基配列を決定した。Neighbor-joining 法、あるいは Maximum Likelihood 法による系統樹を作成し遺伝子型の解析を行った。

3. サブタイプ B と CRF01_AE 組み換え HIV-1 (B/01AE) の解析

10 例の B/01AE について near full length (NFLG) の塩基配列を決定し、SimePlot ソフトを用いて Bootscan 解析、infomativ site 解

析を行い、break point を決定した。Maximum Likelihood 法による系統樹解析を行い、これら 10 例の関連を解析した。

(倫理面への配慮)

HIV 遺伝子の解析については主治医から患者に研究内容を説明し同意を得ている。患者名は記号化して扱っており、プライバシーの流出防止など患者の人権保護に十分配慮した。なお、本研究は当研究所の倫理委員会で承認されている。

C. 結果および考察

1. 流行ウイルスのサブタイプ解析

2004 年から 2013 年に得られた HIV 感染者 669 名の血液を用いて感染経路別にサブタイプの解析を行った (図 1、2)。669 例中サブタイプ B が最も多く 84% (559 例) を占め、次いで CRF01_AE (01AE) が 11% (75 例)、B/01AE が 1.5% (10 例)、その他、僅かではあるがアフリカ由来のサブタイプ A、C、D、G、CRF02_AG、中国由来 CRF07_BC、南米由来のサブタイプ F、B/F 等が検出された。感染経路は男性同性間性行為感染 (MSM) が 49%、不明 34%、異性間性行為 17%、その他 2% であった (図 1)。

669 例中 587 例 (88%) が日本人で、日本男性が 568 例 (97%)、このうち MSM および感染経路不明は 516 例 (91%) であった。日本男性から検出された遺伝子型のほとんどはサブタイプ B (520/568=92%) で、01AE が 37 例、B/01AE が 6 例検出された (図 2)。

MSM および感染経路不明の日本男性における 01AE について年次別検出率を表 1 に示した。01AE 検出率は 2004 年から 2009 年では 1.8% (4/218) に過ぎなかったが、2010 年から 2013 年では 8.6% (26/301) で有意に増加した ($P < 0.01$)。

これらリスクグループの日本男性における 01AE 増加の要因を探るため、中国および近隣諸国の遺伝子情報を Los Alamos データベース

から抽出し、系統樹解析を行った(表 2、図 3)。2010 年から 2013 年に検出された 01AE 26 例のうち 11 例から中国由来バリエーション CN. MSM. 01-1 が検出された。近年中国の MSM 間では 01AE が大流行しており、これらの 95% 以上は 2 種類のクラスターに分類されている。

2010 年から 2012 年に検出された 9 例は中国で大流行しているクラスターの一つ CN. MSM. 01-1 に属し、このうち 2 例はサブタイプ B との共感染、あるいは組み換え体であった。9 例は系統学上、枝の長さが非常に短いサブクラスターを形成 (JP1. CN. MSM. 01-1) しており、CN. MSM. 01-1 バリエーションの日本への流入はごく最近のことと考えられた。また、2013 年に検出された 2 例は JP1. CN. MSM. 01-1 とは異なるクラスターを形成した (JP2. CN. MSM. 01-1)。

BEAST プログラムにより流行拡大時間軸 Timescale を推定した結果、中国における CN. MSM. 01-1 の出現時期は 1993~1999 年、JP1. CN. MSM. 01-1 の播種は 2006~2009 年と推定された。

また、日本の MSM 間で流行しているサブタイプのほとんどは欧米由来サブタイプ B であるが、そのうち 3 分の 1 は JP. MSM. B-1 クラスターに属している (図 4)。このバリエーションは欧米から 1984~1991 年ごろ日本へ播種したと推定された。興味深いことに中国遼寧省の MSM から分離された 3 株が JP. MSM. B-1 クラスター内でサブクラスターを形成していた。日本と中国の流行が互いに影響しあっており、中国由来 01AE と日本由来サブタイプ B の混合感染も起こっていることが明らかとなった。

2. サブタイプ B と CRF01_AE の組み換え HIV-1 (B/01AE) の増加

2004 年に長期間日本に滞在しているタイ女性 (Y231) から B/01AE (Y231) を検出した。その後しばらくは組み換えウイルスは検出されなかったが、2009 年以降組み換え、あるいは共感染症例が 9 例検出された(表 3)。外国

籍、異性間性行為感染による 3 例 (ラオス 2 例、タイ 1 例) はサブタイプ B および 01AE 領域ともに Y231 と同一のクラスターに属し、現在 Los Alamos データベースに CRF01_66 として登録進行中である (図 5、6)。

Y231 の組み換え構造は日本男性 GM3222 の組み換えパターンともよく似ていたが、系統樹上これら 2 株に関連性は認められなかった (図 5、6、7)。

MSM および感染経路不明の 6 例は全て日本男性であり、このうち 2 例は先に述べた中国の MSM 間で流行している CN. MSM. 01-1 バリエーションとの共感染であった。これら 2 例は用いるプライマーによってサブタイプ B、あるいは 01AE が検出され、B と 01AE の共感染後組み換えが進行していることが強く疑われた。

アジア地域においてサブタイプ B と 01AE の組み換え型流行株 (CRFxx01B) が続々と発見されており、Los Alamos データベースにおいて現在 12 種類の CRFxx01B が登録されている(表 4)。しかし、我々の検出した 10 例の B/01AE は既存の CRF とは異なっており、日本国内で組み換えウイルス形成が進んでいると考えられた。このことは、集団内のリスク行動、感染ネットワークが組み換えウイルスを生むような状況にあることを示唆している。国際的連携のもとに、注意深いモニタリングを継続し、有効な対策を取る必要があると考えられる。

3. 流行株が HIV 遺伝子検査に与える影響

日本で検出された CN. MSM. 01-1 バリエーションおよび B/01AE 組み換え体の 20 株が HIV 遺伝子検査に影響を与えるか否かを調べるため、HIV 検査の確認検査として当研究班で開発した KK-TaqMan 法のプライマーおよびプローブ領域を調べたところ、測定系に影響を及ぼす変異は認められなかった。また、これらは民間検査センターや医療機関等で行われている HIV-1RNA 定量法でも測定可能であった。

D. 結語

中国の MSM 間で大流行している HIV-1 CRF01_AE バリエント (CN.MSM.01-1) が 2010 年以降、日本男性感染者 11 例、滞日中国人 1 例から検出された。このうち 2 例は日本の MSM 集団に広く浸淫している欧米型サブタイプ B との間で共感染、あるいは組み換えが起こっていることが明らかになった。

また、日本の MSM 間で流行しているサブタイプ B のバリエントが、中国遼寧省で 3 株発見され、両国の流行が互いに影響を及ぼしていると考えられた。

アジア地域においてサブタイプ B と 01AE の CRF が続々と発見されているが、我々の検出した 10 例の B/01AE は既存の CRF とは異なっており、日本国内で組み換えウイルス形成が進んでいると考えられ、集団内のリスク行動、感染ネットワークが組み換えウイルスを生むような状況にあることが示唆された。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Takebe Y, Naito Y, Raghvani J, Fearnhill E, Sano T, Kusakawa S, Mbisa JL, Zhang H, Matano T, Brown AJL, Pybus OG, Dunn D, Kondo M: Intercontinental dispersal of HIV-1 subtype B associated with transmission among Men Who have sex with Men in Japan, *J. Virol.* 88, 9864-9876, 2014.

2. 学会発表

1. 近藤真規子、佐野貴子、今井光信、椎野禎一郎、武部豊、加藤真吾：日本における HIV-1 組み換え型流行株 (CRF) および孤立型組み換えウイルス (URF) の新生、第 62 回日本ウイルス学会学術集会・総会 (2014 年 11 月 11~13 日、横浜市)。
2. Saeng-aroon S, Locket R, Plipat T, Sangkitporn S, 近藤真規子、武部豊、中

山英美、武田直和、本村和嗣、塩田達雄：Distribution of HIV-1 subtypes in female sex workers recently infected with HIV-1 in Thailand、第 62 回日本ウイルス学会学術集会・総会 (2014 年 11 月 11~13 日、横浜市)。

3. 近藤真規子、佐野貴子、椎野禎一郎、井戸田一朗、山中晃、岩室紳也、吉村幸浩、立川夏夫、今井光信、武部豊、加藤真吾：日本で検出した HIV-1 組み換え型流行株の解析、第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会 (2014 年 12 月 3~5 日、大阪市)。
4. 武部豊、内藤雄樹、草川茂、加藤真吾、俣野哲郎、近藤真規子：男性同性愛者 (MSM) 間の HIV-1 流行の国際的感染ネットワークの解明に向けて：我が国—中国—世界流行間のこれまで明らかにされてこなかった相互関係について、第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会 (2014 年 12 月 3~5 日、大阪市)。
5. 佐野貴子、近藤真規子、山田里佳、矢永由里子、塚原優己、今井光信、加藤真吾：保健所の HIV 検査相談を利用した妊婦の受検動機等に関する調査、第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会 (2014 年 12 月 3~5 日、大阪市)。
6. 椎野禎一郎、服部純子、瀧永博之、吉田繁、石ヶ坪良明、近藤真規子、貞升健志、横幕能行、古賀道子、上田幹夫、田邊嘉也、渡邊大、森治代、南留美、健山正男、杉浦互：国内感染者集団の大規模塩基配列解析 5：MSM コミュニティへのサブタイプ B 感染の動態、第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会 (2014 年 12 月 3~5 日、大阪市)。
7. 井戸田一朗、星野慎二、佐野貴子、近藤真規子、金子典代：ハッテン場における HIV 感染リスク低減に向けた意識行動調査、第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会 (2014 年 12 月 3~5 日、大阪市)。

8. 岡崎玲子、近藤真規子、蜂谷敦子、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 28 回日本エイズ学会学術集会・総会（2014 年 12 月 3～5 日、大阪市）。
9. 須藤弘二、藤原宏、佐野貴子、加藤真吾、近藤真規子、井戸田一朗、今井光信、長谷川直樹、加藤真吾：次世代シークエンサーを用いた HIV 感染時期推定法の研究、第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会（2014 年 12 月 3～5 日、大阪市）。
10. 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と検査精度調査（2013）、第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会（2014 年 12 月 3～5 日、大阪市）。
11. 渡邊寿美、佐野貴子、伊達佳美、近藤真規子、黒木俊郎：神奈川県で検出されたオセルタミビル耐性インフルエンザウイルス AH1pdm09 株について、地研全国協議会第 29 回関東甲信静支部ウイルス研究会（2014 年 9 月 25～26 日、長野市）。
12. 鈴木理恵子、金城恵子、近藤真規子、黒木俊郎：神奈川県における麻疹ウイルス検出状況、地研全国協議会第 29 回関東甲信静支部ウイルス研究会（2014 年 9 月 25～26 日、長野市）。

図1 HIV-1 感染者の感染経路とサブタイプ(2004~2013)

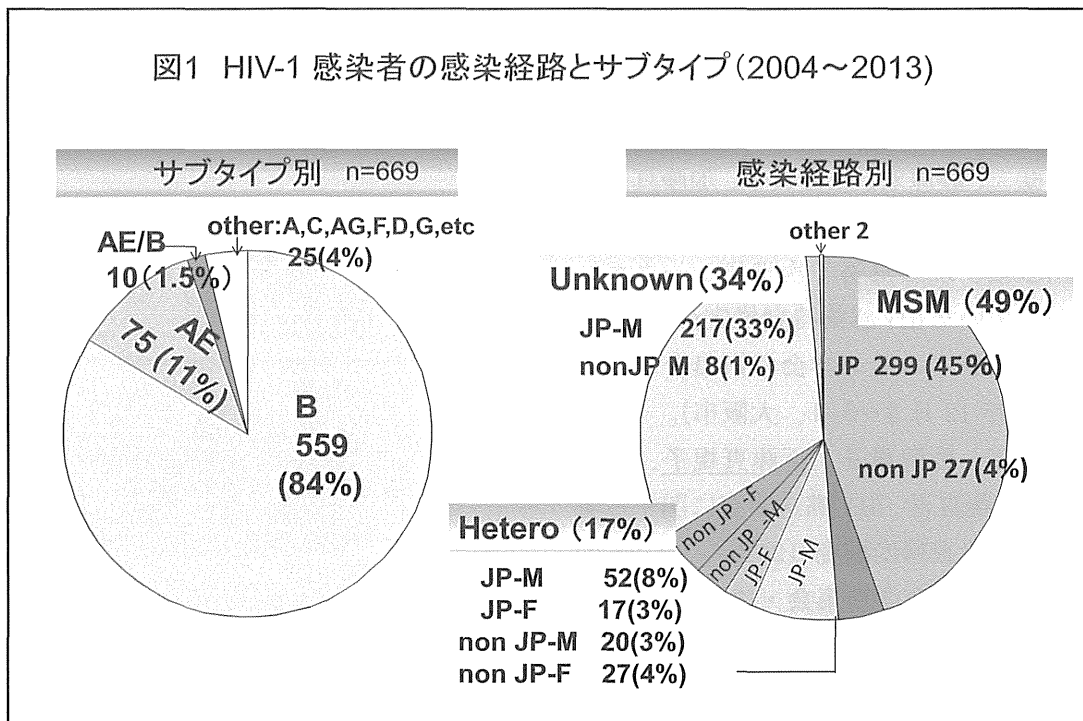


図2 HIV-1 日本人感染者(587名)の感染経路とサブタイプ(2004~2013)

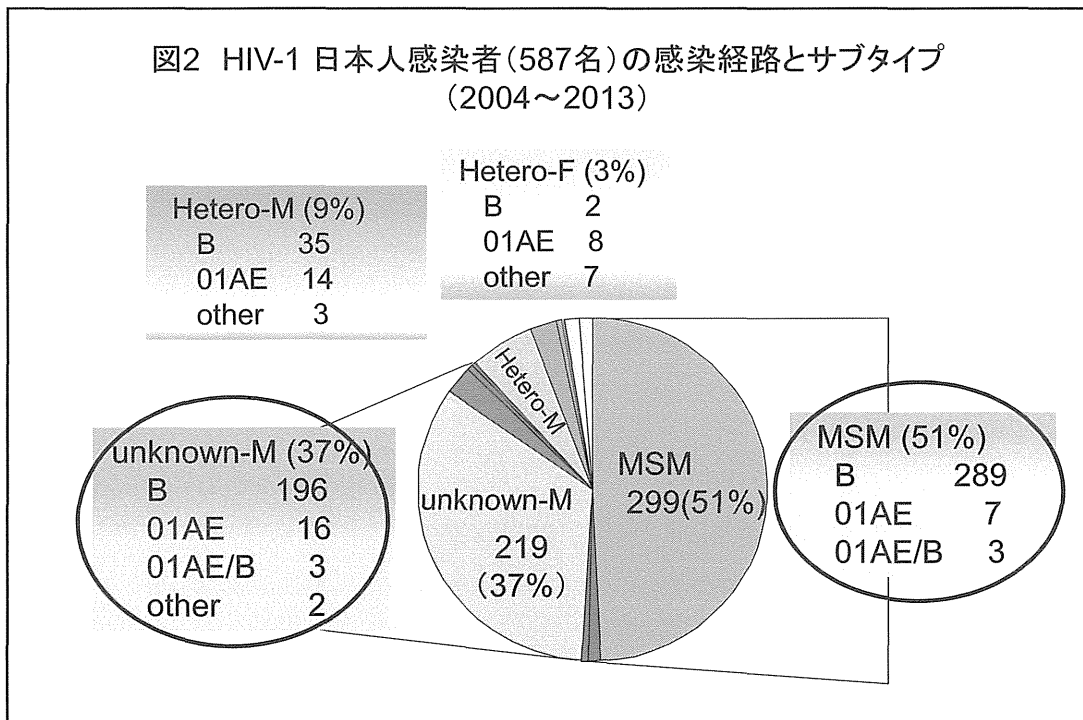


表1 日本男性 (MSM, unknown) におけるCRF01_AEおよび
CN.MSM.01-1バリエント検出率 n=519

Year of collection	CRF01_AE 検出率	CN.MSM.01-1 CRF01_AE
2004-2009	1.8% (4/218)	— (0/4)
2010-2013	8.6% (26/301)	42.3% (11/26)
2010	12.9% (9/70)	44.4% (4/9)
2011	8.1% (6/74)	33.3% (2/6)
2012	5.1% (4/79)	75.0% (3/4)
2013	9.0% (7/78)	28.6% (2/7)

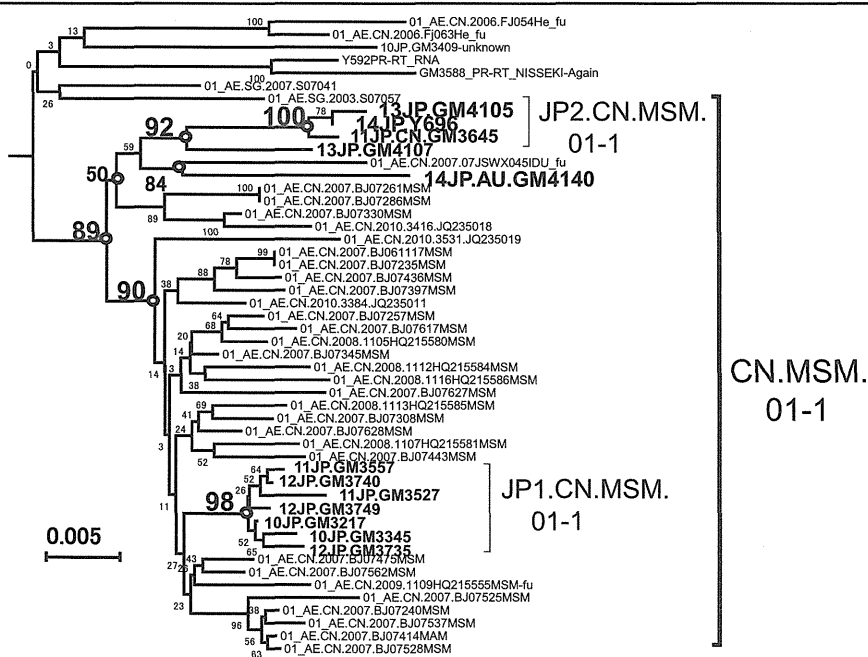


図3 系統樹解析 (1.1 kb PR-RT領域)

表2 日本男性 (MSM,unknown) に検出されたCN.MSM.01-1

	risk	Year of collection	pro-RT 1.1 kb	env C2V3 325 bp	env gp120-gp41 1.4k bp
1	MSM	2010	CN.MSM.01-1	CN.MSM.01-1	CN.MSM.01-1
2	MSM	2010	CN.MSM.01-1	CN.MSM.01-1	CN.MSM.01-1
3	MSM	2010	JP.MSM.B-2	CN.MSM.01-1	CN.MSM.01-1
4	unknown	2010	JP.MSM.B-1	CN.MSM.01-1/ B(US)	CN.MSM.01-1/ B(US)
5	unknown	2011	CN.MSM.01-1	CN.MSM.01-1	CN.MSM.01-1
6	unknown	2011	CN.MSM.01-1	CN.MSM.01-1	CN.MSM.01-1
7	MSM	2012	CN.MSM.01-1	CN.MSM.01-1	CN.MSM.01-1
8	unknown	2012	CN.MSM.01-1	CN.MSM.01-1	CN.MSM.01-1
9	unknown	2012	CN.MSM.01-1	CN.MSM.01-1	CN.MSM.01-1
10	(CN.MSM)	2011	CN.MSM.01-1	CN.MSM.01-1	CN.MSM.01-1
11	unknown	2013	CN.MSM.01-1	CN.MSM.01-1	CN.MSM.01-1
12	MSM	2013	CN.MSM.01-1	CN.MSM.01-1	CN.MSM.01-1

図4 HIV-1 subtype B 89株(2004-2006)の系統樹解析(RT領域)

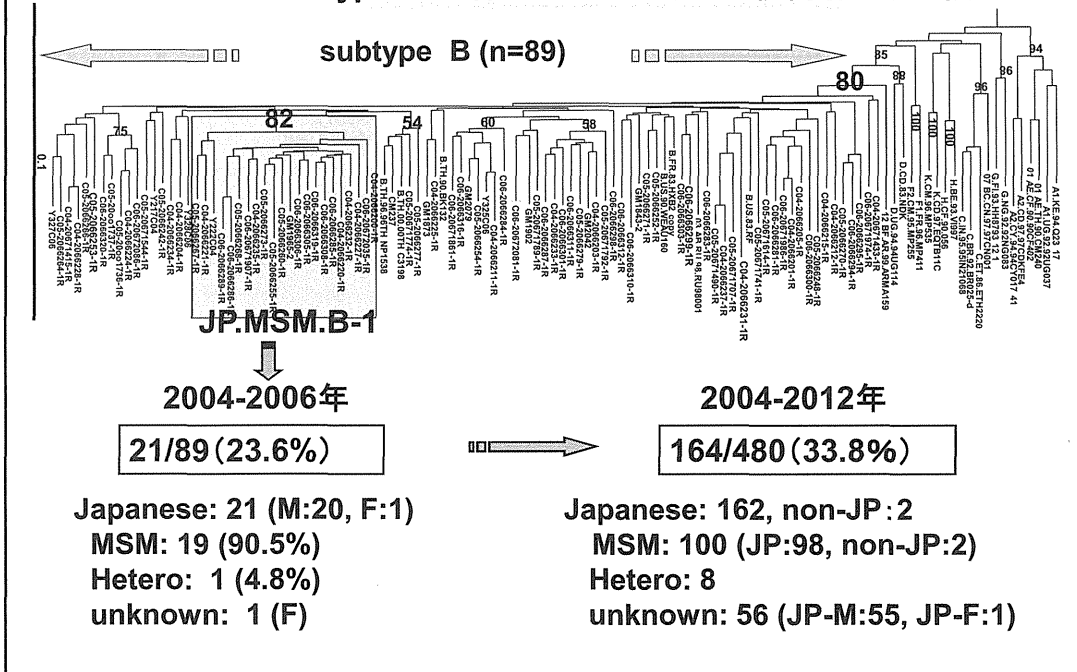


表3 サブタイプBとCRF01_AE組換え例の詳細

Strain	year	na-tion-ality	sex	Risk	HIV-1 subtype				SimPlot form
					NFLG	<i>gag-int</i>	<i>pro-RT</i>	<i>vif-nef</i>	
					HXB2: 796-9417 nt	HXB2: 796-5093 nt	HXB2: 2253-3392 nt	HXB2: 5041-9417 nt	
Y231	2004	TH	F	hetero	AE/B	AE/B	B	AE	Group I
GM3615	2011	TH	F	hetero	AE/B	AE/B	B	AE	Group I
GM3630	2011	LA	M	hetero	AE/B	AE/B	B	AE	Group I
GM3632	2011	LA	F	hetero	AE/B	AE/B	B	AE	Group I
GM3312	2010	JP	M	MSM	AE/B	AE/B	AE/B	AE	AE:Group I
GM3222	2010	JP	M	un-known	AE/B	AE/B	B	AE	Group II
GM3426	2010	JP	M	MSM	AE/B	JP.MSM. B-1	JP.MSM. B-1	CN.MSM. 01-1, B	Group III (dual & 01B)
GM3289	2010	JP	M	MSM	AE/B	AE/B	JP.MSM. B-2	CN.MSM. 01-1	Group III (dual & 01B)
GM3978	2013	JP	M	un-known	AE/B	B	B	AE	Group III
GM3126	2009	JP	M	MSM	AE/B	AE/B	AE/B	AE	group IV
(AA025*)	2006	TH			AE/B	AE/B	AE/B	AE	group IV

図5 HIV-1系統樹解析 (*gag-integrase*, HXB2:796-5093bp)

Maximum likelihood
Tamura-Nei model
Gamma distributed

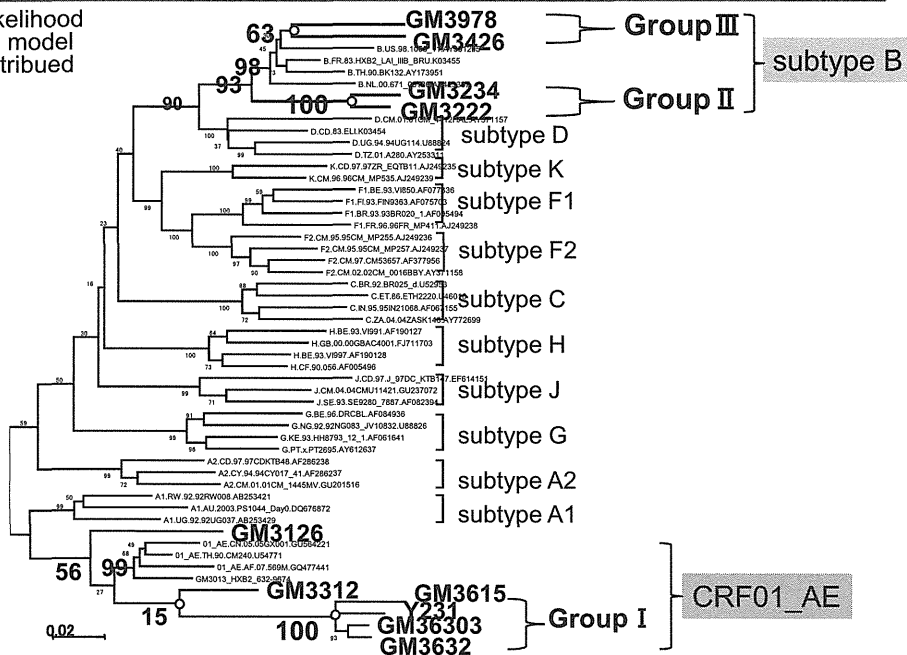


図6 HIV-1系統樹解析 (*vif-nef*, HXB2: 5041-9417bp)

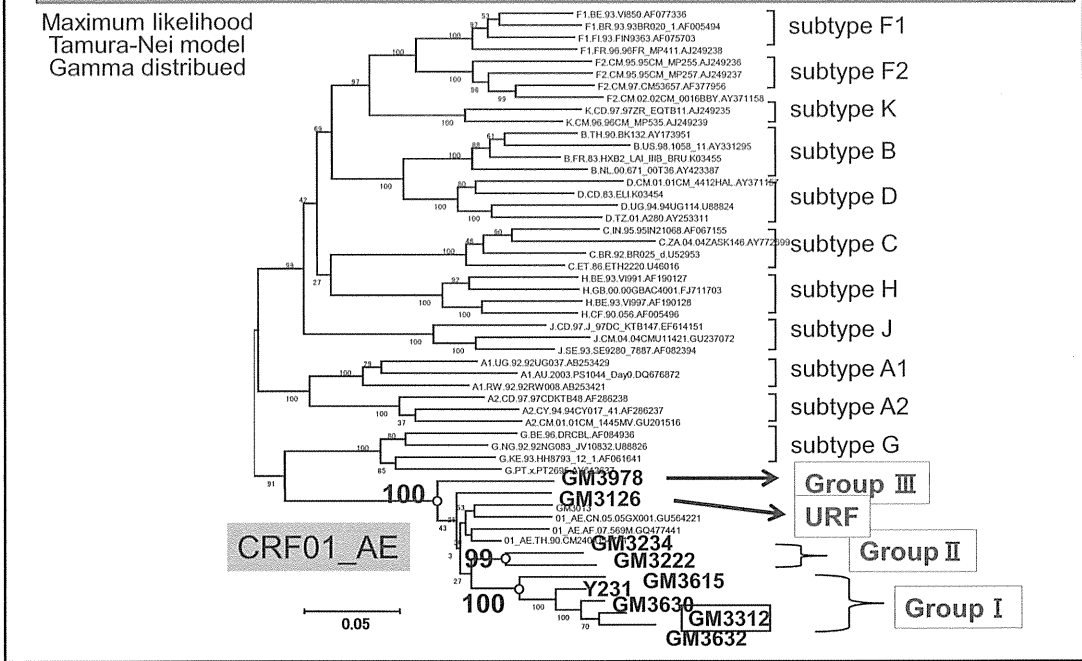
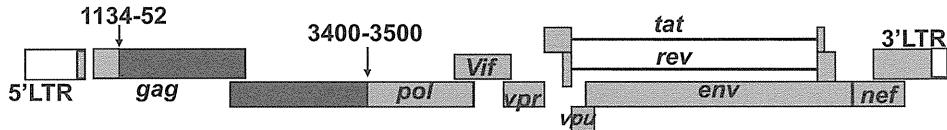
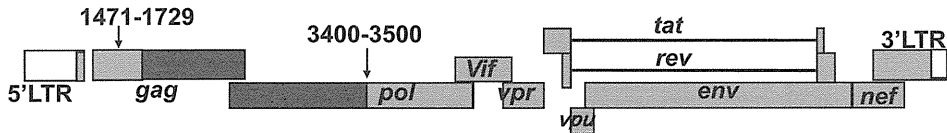


図7 日本で検出されたサブタイプBとCRF01_AEの組換えHIV-1

◆ Y231, GM3630, GM3632 (異性間、東南アジア)



◆ GM3615 (異性間、東南アジア)



◆ GM3222 (感染経路不明、日本男性、2010)

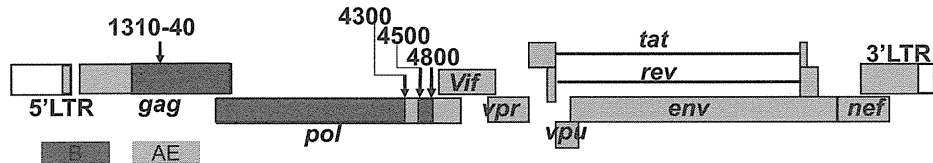


表4 世界で同定されたHIV-1 CRFxx_01B(2014.11現)

同定順	CRF	起源地/ 同定された地域	感染経路	報告年
1	CRF01_AE	中央アフリカ、タイ	異性間	1996
2	CRF15_01B	タイ	異性間/IDU	2003
3	CRF33_01B	マレーシア	IDU	2006
4	CRF34_01B	タイ	IDU	2007
5	CRF48_01B	マレーシア東海岸	IDU	2010
6	CRF51_01B	シンガポール	MSM	2012
7	CRF52_01B	タイ、マレーシア	異性間	2012
8	CRF53_01B	マレーシア	異性間/IDU	2012
9	CRF54_01B	マレーシア	MSM/IDU/異性間	2012
10	CRF55_01B	中国(広東省)	MSM	2013
11	CRF58_01B	マレーシア	IDU	2013
12	CRF59_01B	中国(遼寧省,広東省)	MSM	2013
13	CRF61_01B	中国(広東省,吉林省)	異性間	2013

19. 口腔拭い液および唾液を用いた HIV 検査キットの検討

須藤弘二 (慶応義塾大学医学部微生物学・免疫学教室)

星野慎二 (NPO 法人 SHIP)

井戸田一朗 (しらかば診療所)

藤原 宏 (慶応義塾大学医学部感染制御センター、慶応義塾大学病院呼吸器内科)

長谷川直樹 (慶応義塾大学医学部感染制御センター、慶応義塾大学病院呼吸器内科)

加藤真吾 (慶応義塾大学医学部微生物学・免疫学教室)

研究概要

口腔拭い液や唾液を用いた検査は、採血を伴う血液検査より受検行動への心理的敷居が低いと考えられ、感染者の早期発見の手段の一つとして期待されている。本研究では既に血液検査キットとして市販されている HIV 迅速検査キットについて、検体の適用拡大の可能性を検討するため、口腔拭い液および唾液を用いた抗体検出の検討を行った。HIV 感染者 9 名について、血漿、口腔拭い液、唾液検体を用いてエスプライン HIV Ag/Ab で検査を行った結果、血漿ではすべての検体で抗体が検出されたが、口腔拭い液、唾液では共通する 1 つの検体で抗体が検出されなかった。口腔拭い液、唾液の抗体価は血中抗体価と比較して 1/83~1/667 と数百分の一程度であった。HIV 検査受検者 143 名について、血液検査と並行して口腔拭い液検体を用いたエスプライン HIV Ag/Ab の検査を行った結果、確認検査で陽性が確認された検体 4 例については口腔拭い液検体を用いたエスプライン HIV Ag/Ab の検査でも陽性であった。しかし、血液検査で陰性であった 139 人の内、1 人の口腔拭い液検体を用いたエスプライン HIV Ag/Ab の検査で弱陽性が見られた。同じ口腔拭い液を用いる検査である OraQuick ではすべて血液検査と同じ結果が得られており、エスプラインを口腔拭い液検体による検査法として用いるためにはより感度と特異度を上げてこの問題を解決する必要がある。

A. 目的

HIV 感染者の早期発見は、その後の適切な治療により感染者本人の QOL 向上だけでなく、パートナー等への感染防止、ひいては全体の感染者数減少の効果が期待される。口腔拭い液や唾液を用いた検査は、採血を伴う血液検査より受検行動への心理的敷居が低いと考えられ、感染者の早期発見の手段の一つとして期待されている。

日本において国から認可を受けている検査キットは血液を検体とするキットのみであるが、米国においては、口腔拭い液を用いた迅速検査 OraQuickAdvance Rapid HIV-1/2

Antibody Test (以下 OraQuick) が 2004 年 6 月に認可を受けており、2012 年 7 月には OTC (over-the-counter: 薬局で販売可) 検査キットとして OraQuick In-Home が認可を受けている。

本研究では、既に血液検査キットとして市販されている HIV 迅速検査キット、エスプライン HIV Ag/Ab (富士レビオ) (以下エスプライン) について、検体の適用拡大の可能性を検討するため、口腔拭い液および唾液を用いた抗体検出の検討を行った。

B. 方法

HIV 感染者検体として、慶應義塾大学病院に通院している HIV 感染者 9 人の口腔拭い液と血漿を用いた。その内 4 人については、口腔拭い液と同時に唾液も用いた。口腔拭い液は、液量がおおよそ 150 ul 保持できる綿棒で歯と唇の間の粘膜をぬぐった後、エスプラインインフルエンザ A&B-N の検体処理液（アジ化ナトリウム、界面活性剤、BSA を含むトリス緩衝液）300 ul を用いて溶出し検体とした。唾液は同じ検体処理液を用いて 2、5、10 倍に希釈し検体とした。

口腔拭い液、唾液、血漿検体をそれぞれ 25 ul 使用し、エスプラインで抗体の検出を行った。それぞれの検体について、ジェネディア HIV-1/2mix（富士レビオ）（以下ジェネディア）を用いて抗体価を測定した。また、口腔拭い液を用いる検査キットの比較対照として OraQuick での検査を併せて行った。

HIV 検査受検者検体として、2013 年 12 月から 2015 年 3 月までに NPO 法人 SHIP で行ったアウトリーチ HIV 検査を受検した 143 人の口腔拭い液と全血を用いた（前回の報告書で用いた 2013 年 10 月の 10 人の検体については並行して行っていた他の検討の影響が考えられたため結果から除いた）。口腔拭い液は陽性検体と同様に検体処理液で溶出し検体とした。

口腔拭い液検体を 25 ul 使用し、エスプライン HIV Ag/Ab（富士レビオ）で抗体の検出を行った。対照として口腔拭い液を用いた OraQuick での検査と、全血を用いたダイナスクリン・HIV-1/2（アリーアメディカル）での検査を併せて行った。

（倫理面への配慮）本研究は慶應義塾大学医学部の倫理委員会で審査を行い、感染者および受検者に対して研究の同意を得た上で口腔拭い液、唾液、血液の採取を行った。

C. 結果

HIV 感染者検体として、9 人の口腔拭い液についてエスプラインで検査を行った結果、9

人中 8 人の検体が陽性であり、口腔拭い液検体 FR6 の抗体検出ができなかった。また HIV 感染者 4 人の唾液について検査を行った結果、4 人中 3 人の検体が陽性であり、口腔拭い液と同様に唾液検体 FR6 の抗体検出ができなかった。FR6 について、採取の 1 か月後に口腔拭い液と唾液を再採取し検査を行ったが結果は両検体とも前回同様陰性であった。HIV 感染者 9 人の血漿について検査を行った結果、9 人全員の検体が陽性であった。OraQuick による検査でも同様に 9 人全員の検体が陽性であった（表 1）。

ジェネディアで口腔拭い液の抗体価を測定した結果、FR1 からそれぞれ 40 倍、160 倍、160 倍、400 倍、160 倍、20 倍、160 倍、20 倍、20 倍であった。だ液の抗体価は、FR1 の 2 倍希釈が 40 倍、FR2 の 2 倍希釈が 320 倍、5 倍希釈が 80 倍、10 倍希釈が 40 倍、FR3 の 2 倍希釈が 160 倍、5 倍希釈が 40 倍、10 倍希釈が 20 倍であった。血漿の抗体価は、FR1 からそれぞれ 16000 倍、64000 倍、80000 倍、160000 倍、320000 倍、16000 倍、40000 倍、10000 倍、10000 倍であった。

HIV 検査受検者 143 名の口腔拭い液を用いてエスプラインと OraQuick による検査を行い、同時に全血を用いてダイナスクリンによる検査を行った結果、143 人中 4 人の検体がエスプライン、OraQuick、ダイナスクリン共に陽性、1 人の受検者がエスプラインのみ陽性、138 人の受検者がエスプライン、OraQuick、ダイナスクリン共に陰性であった。すべて陽性となった 4 例について、WB で確認検査を行った結果、4 例すべて陽性であった。口腔拭い液を用いたエスプラインのみ陽性となった 1 例について、同じ受検者の血漿検体を用いてエスプラインで検査した結果、陰性であった（表 2）。

D. 考察

HIV 感染者検体の口腔拭い液と唾液の推定

抗体価は 30 倍から 1200 倍及び 80 倍から 640 倍と同程度かつ低力価であり、算出された口腔拭い液と唾液の推定抗体価と血漿中の抗体価と比較すると 1/83~1/667 と数百分の一度の価であった。

口腔拭い液検体ではキットの規定時間である 15 分で 9 名すべての検体を判定できたが、唾液を 2 倍希釈した検体では 4 名すべての検体について判定するまでに 30 分の時間を要した。これらのことから、口腔拭い液、唾液とも抗体価は同程度であったが、唾液は検体希釈率によって粘性による測定時間の遅延があるため、測定検体としては口腔拭い液が適当と考えられた。

HIV 感染者 9 人の口腔拭い液と血漿検体、並びに 4 人の唾液検体をエスプラインで検査した結果、血漿ではすべての検体で抗体が検出されたが、拭い液、唾液検体では共通する 1 人 (FR6) の検体の抗体が検出されなかった。エスプラインで検出されなかった FR6 の口腔拭い液検体の抗体価は 20 倍と低く、抗体が検出できなかった一つの原因として考えられた。しかし、FR8、9 の口腔拭い液も抗体価が 20 倍であるにもかかわらずエスプラインで検出されており、1 か月後の再検査 (FR6-2) でも同様に検出できなかったことから、抗体価の低さのみでなく、エスプラインで抗体検出に用いている抗原の FR6 抗体に対する感度が低いことため検出できないことが考えられた。

HIV 検査受検者検体 143 例の内、3 種類すべての検査で陽性であった 4 例については、後日血漿を用いて確認検査を行った結果、4 例とも陽性であり、全血でのダイナスクリーンや口腔拭い液での OraQuick と同様に口腔拭い液を用いたエスプラインの検査でも陽性となることが確認された。エスプラインのみ陽性となった 1 例については、その後凍結検体を再検査したところ陰性であり、また同じ受

検者の血漿検体を用いてエスプラインで検査した結果も陰性であったことから、非特異反応での陽性であることが考えられた。

今回の検討で用いた HIV 抗体陽性者は HIV 感染者と血液検査で陽性であった受検者を合わせると 13 人、HIV 抗体陰性者は 139 人であった。これらの口腔拭い液を用いてエスプラインで検査を行った結果、HIV 抗体陽性者 13 例中 12 例が陽性、HIV 抗体陰性者 139 例中 138 例が陰性であり、それぞれ 1 例ずつ血液検査と異なる結果となった。同じ口腔拭い液を用いる検査である OraQuick ではすべて血液検査と同じ結果が得られており、エスプラインを口腔拭い液検体による検査法として用いるためにはより感度と特異度を上げてこの問題を解決する必要がある。

E. 発表

学会発表

1. 須藤弘二、藤原宏、佐野貴子、近藤真規子、井戸田一朗、今井光信、長谷川直樹、加藤真吾：次世代シーケンサーを用いた HIV 感染時期推定法の研究、第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会、2014 年 12 月、大阪
2. 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と検査精度調査 (2013)、第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会、2014 年 12 月、大阪

表1. HIV感染者検体を用いた検討

感染者ID	検体	エスプライン	ジェネティア(抗体価)			OraQuick
			検体	原液 (推定値)	血漿中抗体価 との比	
FR 1	拭い液(およそ3倍希釈)	+	x40	x120	1/133	+
	唾液	+(30分)	x40	x80	1/200	
	血漿	+	x16000	x16000		
FR 2	拭い液(およそ3倍希釈)	+	x160	x480	1/133	+
	2倍希釈	+(30分)	x320			
	唾液	+	x80	x400~x640	1/100~1/160	
	5倍希釈	+	x40			
FR 3	拭い液(およそ3倍希釈)	+	x160	x480	1/167	+
	2倍希釈	+(30分)	x160			
	唾液	+	x40	x200~x320	1/250~1/400	
	5倍希釈	+	x20			
	10倍希釈	+	x20			
FR 4	拭い液(およそ3倍希釈)	+	x400	x1200	1/133	+
	血漿	+	x160000	x160000		
FR 5	拭い液(およそ3倍希釈)	+	x160	x480	1/667	+
	血漿	+	x320000	x320000		
FR 6	拭い液(およそ3倍希釈)	-	x20	x60	1/267	+
	唾液	-(30分)	NT			
	2倍希釈	+	x16000	x16000		
FR 7	拭い液(およそ3倍希釈)	+	x160	x480	1/83	+
	血漿	+	x40000	x40000		
FR 8	拭い液(およそ3倍希釈)	+	x20	x60	1/167	+
	血漿	+	x10000	x10000		
FR 9	拭い液(およそ3倍希釈)	+	x20	x60	1/167	+
	血漿	+	x10000	x10000		
FR 6-2	拭い液(およそ3倍希釈)	-	x10	x30	1/133	+
	唾液	-(30分)	NT			
	2倍希釈	+	x4000	x4000		

表2. HIV検査受検者検体を用いた検討

No.	検査受検日	拭い液 オメガアクリン	拭い液 オメガアクリン	血漿 ダイアスタリオン	No.	検査受検日	拭い液 オメガアクリン	拭い液 オメガアクリン	血漿 ダイアスタリオン	No.	検査受検日	拭い液 オメガアクリン	拭い液 オメガアクリン	血漿 ダイアスタリオン
1		-	-	-	85		-	-	-	100		-	-	-
2		-	-	-	86		-	-	-	101		-	-	-
3		-	-	-	87		-	-	-	102		-	-	-
4		-	-	-	88		-	-	-	103		-	-	-
5		-	-	-	89		-	-	-	104		-	-	-
6		-	-	-	90		-	-	-	105		-	-	-
7		-	-	-	91		-	-	-	106		-	-	-
8		-	-	-	92		-	-	-	107		-	-	-
9		-	-	-	93		-	-	-	108		-	-	-
10		-	-	-	94		-	-	-	109		-	-	-
11		-	-	-	95		-	-	-	110		-	-	-
12		-	-	-	96		-	-	-	111		-	-	-
13		-	-	-	97		-	-	-	112		-	-	-
14		-	-	-	98		-	-	-	113		-	-	-
15		-	-	-	99		-	-	-	114		-	-	-
16		-	-	-	100		-	-	-	115		-	-	-
17		-	-	-	101		-	-	-	116		-	-	-
18		-	-	-	102		-	-	-	117		-	-	-
19		-	-	-	103		-	-	-	118		-	-	-
20		-	-	-	104		-	-	-	119		-	-	-
21		-	-	-	105		-	-	-	120		-	-	-
22		-	-	-	106		-	-	-	121		-	-	-
23		-	-	-	107		-	-	-	122		-	-	-
24		-	-	-	108		-	-	-	123		-	-	-
25		-	-	-	109		-	-	-	124		-	-	-
26		-	-	-	110		-	-	-	125		-	-	-
27		-	-	-	111		-	-	-	126		-	-	-
28		-	-	-	112		-	-	-	127		-	-	-
29		-	-	-	113		-	-	-	128		-	-	-
30		-	-	-	114		-	-	-	129		-	-	-
31		-	-	-	115		-	-	-	130		-	-	-
32		-	-	-	116		-	-	-	131		-	-	-
33		-	-	-	117		-	-	-	132		-	-	-
34		-	-	-	118		-	-	-	133		-	-	-
35		-	-	-	119		-	-	-	134		-	-	-
36		-	-	-	120		-	-	-	135		-	-	-
37		-	-	-	121		-	-	-	136		-	-	-
38		-	-	-	122		-	-	-	137		-	-	-
39		-	-	-	123		-	-	-	138		-	-	-
40		-	-	-	124		-	-	-	139		-	-	-
41		-	-	-	125		-	-	-	140		-	-	-
42		-	-	-	126		-	-	-	141		-	-	-
43		-	-	-	127		-	-	-	142		-	-	-
44		-	-	-	128		-	-	-	143		-	-	-
45		-	-	-	129		-	-	-	144		-	-	-
46		-	-	-	130		-	-	-	145		-	-	-
47		-	-	-	131		-	-	-	146		-	-	-
48		-	-	-	132		-	-	-	147		-	-	-
49		-	-	-	133		-	-	-	148		-	-	-

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
Yoshida S, Hattori J, Matsuda M, Okada K, Kazuyama Y, Hashimoto O, Ibe S, Fujisawa SI, Chiba H, Tatsumi M, Kato S, Sugiura W.	Japanese External Quality Assessment Program to Standardize HIV-1 Drug-Resistance Testing (JEQS2010 Program) Using In Vitro Transcribed RNA as Reference Material.	AIDS Res Hum Retroviruses.		in press	
Tsuchiya K, Hayashida T, Hamada A, Kato S, Oka S, Gatanaga H.	Low raltegravir concentration in cerebrospinal fluid in patients with ABCG2 genetic variants.	J Acquir Immune Defic	15; 66(5)	484-486	2014
Miyoshi, M., Komagome, R., Ishida, S., Kikuchi M., Sato H., Ito H., Nagano, H., Okano, M.	Recent progress toward measles elimination in Hokkaido, Japan, during 2011-2012.	Japanese Journal of Infectious Diseases	67(4)	311-314	2014
Miyoshi, M., Komagome, R., Ishida, S., Nagano, H., Okano, M.	Epidemiology and laboratory diagnosis of rubella in Hokkaido district during the nationwide outbreak in Japan, 2011-2013.	Japanese Journal of Infectious Diseases	67(4)	479-484	2014
Kaneko H, Tsuboi H.	Analysis on Awareness of Functional Dyspepsia and Rome Criteria Among Japanese Internists by the Self-administered Questionnaires.	J Neurogastroenterol Motil.	20(1)	94-103	2014
Navaratna S, Kanda K, Dharmaratne SD, Tennakoon S, Jayasinghe A, Jayasekara N, Nagano K, Obayashi Y, Arai A, Tamashiro H.	Awareness and attitudes towards HIV/AIDS among residents of Kandy, Sri Lanka.	AIDS Care.	27(3)	387-91	2015
Watanabe T, Hamada-Tsutsumi S, Yokomaku Y, Imamura J, Sugiura W, Tanaka Y.	Post-Exposure Prophylactic Effect of HBV-active Antiretroviral Therapy Against Hepatitis B Virus Infection.	Antimicrob Agents Chemother.	59(2)	1292-1298	2015
Shiino T, Hattori J, Yokomaku Y, Iwatani Y, Sugiura W.	Phylogenetic Analysis Reveals CRF01_AE Dissemination between Japan and Neighboring Asian Countries and the Role of Intravenous Drug Use in Transmission.	PloS one.	9(7)	e102633	2014
Kudoh A, Takahama S, Sawasaki T, Ode H, Yokoyama M, Okayama A, Ishikawa A, Miyakawa K, Matsunaga S, Kimura H, Sugiura W, Sato H, Hirano H, Ohno S, Yamamoto N,	The phosphorylation of HIV-1 Gag by atypical protein kinase C facilitates viral infectivity by promoting Vpr incorporation into virions.	Retrovirology.	11	9	2014
Imahashi M, Izumi T, Watanabe D, Imamura J, Matsuoka K, Ode H, Masaoka T, Sato K, Kaneko N, Ichikawa S, Koyanagi Y, Takaori-Kondo A, Utsumi M, Yokomaku Y, Shirasaka T, Sugiura W, Iwatani Y, Naoe T.	Lack of Association between Intact/Deletion Polymorphisms of the APOBEC3B Gene and HIV-1 Risk.	PloS one.	9(3)	e92861	2014
Gu L, Kawana-Tachikawa A, Shiino T, Nakamura H, Koga M, Kikuchi T, Adachi E, Koibuchi T, Ishida T, Gao GF, Matsushita M, Sugiura W, Iwamoto A, Hosoya N.	Development and Customization of a Color-Coded Microbeads-Based Assay for Drug Resistance in HIV-1 Reverse Transcriptase.	PloS one.	9(10)	e109823	2014
Takebe Y, Naito Y, Raghwan J, Fearnhill E, Sano T, Kusakawa S, Mbisa JL, Zhang H, Matano T, Broun A, Pybus OG, Dunn D, Kondo M, on behalf of UK Collaborative Group on HIV Drug Resistance.	Intercontinental Dispersal of HIV-1 subtype B Associated with Transmission among Men Who have sex with Men in Japan.	J.Virol.	88(17)	9864-9876	2014
大多和由美、前田憲昭、溝部潤子、的野慶、池野良、中川裕美子、加藤真吾	院内ポスターを活用したHIV検査へ繋げる歯科診療。	日本エイズ学会誌		印刷中	
矢永由里子、今井光信、加藤真吾.	研修事業の取り組み：研修をデザインすること。	日本エイズ学会誌	16(3)	185-193	2014
井戸田一朗	自動化法によるRPR測定を用いた梅毒患者の治療効果判定について	感染症学雑誌	88	275-278	2014
吉川博政、山本政弘、城崎真弓、長与由紀子、辻麻里子、前田憲昭	九州医療センターにおける歯科医師、歯科衛生士HIV/AIDS研修プログラムについて。	日本エイズ学会誌	16(2)	110-113	2014

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	6章 HIV/エイズと心理臨床1 —HIV/エイズについて:現状と課題— 7章 HIV/エイズと心理臨床2 —HIV検査相談とカウンセリング:予防とケア—	矢永由里子	身体医療と心理臨床	印刷中			