

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

Maximum likelihood
Tamura-Nei model
Gamma distributed

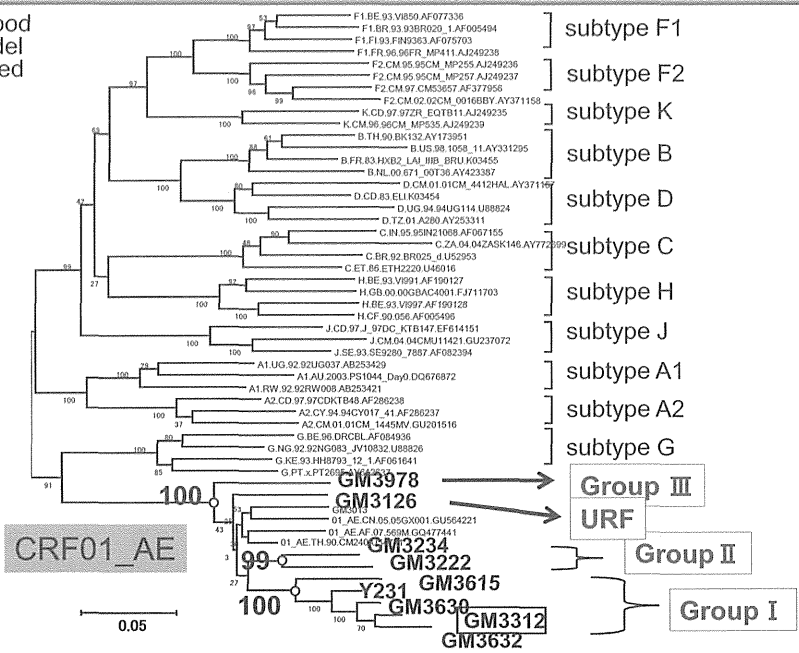
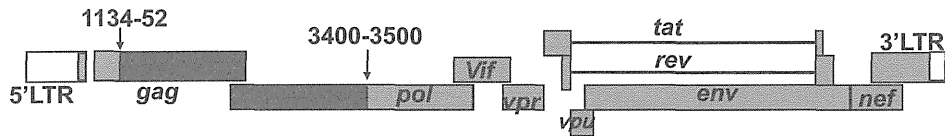
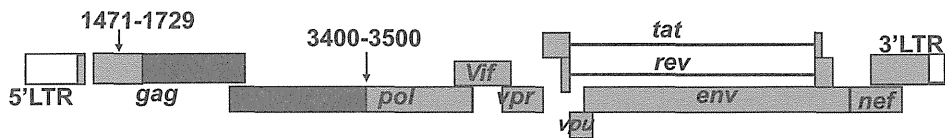


図7 日本で検出されたサブタイプBとCRF01_AEの組換えHIV-1

◆ 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)

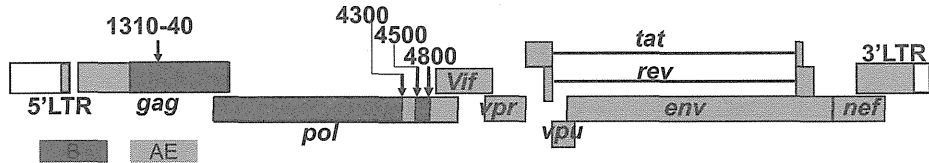


表4 世界で同定されたHIV-1 CRFxx_01B (2014.11現)

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

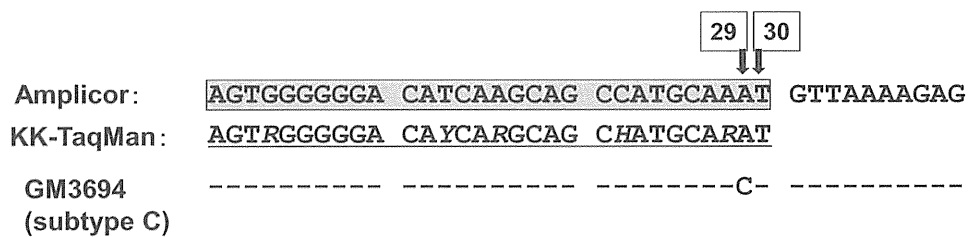
図8 Amplicor HIV-1 Monitor ver.1.5 とKK-TaqMan法のreverse primer位置

```

Amplicor:  ACCAAGGGGA AGTGACATAG CAGGAACTAC TAGTACC
KK-TaqMan:      GGA AGTGAYATAG CAGGAACTAC TAGTA
Y271  B  -----C -----
Control
GM2563 B  -----
-----
*Patient 1 B  -----T -----A-
Patient 2 B  C-----C -----
Patient 4 A1  -----C -----
Patient 3 AG  -----A--C ----- -G--G-----
Patient 5 F1  -----C -----T----- -T-----A-- -----G-
    
```

* 下段はJ.Clin. Microbiol.,47,1238-40,2009より抜粋

図9 KK-TaqMan法のforward primer位置



Los Alamos データベース検索

	検索数	29変異	30変異
Subtype B	6875	2(0.03%)	0
Subtype C	6545	4(0.06%)	1(0.02%)
01_AE	1037	0	0
その他	3446	0	0
合 計	17903	6(0.03%)	1(0.006%)

20. HIV 感染時期を推計するための抗体検査法の検討

(3年間のまとめ)

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

感染時期推定の血清学的手法として BED 法が広く用いられているが、incidence の推計までには至っていない。我々は 2004 年から 2013 年の 10 年間に於いて、当研究班と協力関係にある民間クリニックでの新規感染者 669 例について、BED 法及び PA 法により HIV 抗体価を測定し、年次別の感染初期割合を調査した。

BED 法の ODn 値が 0.8 未満（抗体陽転後 155 日）の割合は、10 年間の平均が 38%であった。年次別に見てみると 2004 年は 47%と高く、2011 年には 28%まで低下したが、10 年を通してほぼ 40%前後で推移していた。PA 法(1000 倍以下)による感染初期例の割合も BED 法とほぼ同様の推移を示した。年次別検査数と HIV 陽性率及び感染初期割合との関連を解析したところ、BED 法、PA 法ともに 2004 年の感染初期割合が最も高かった。これは 2004 年から HIV 即日検査が全国保健所や協力民間クリニックに導入され始め、検査への関心が高まったことが一因と考えられた。その後の感染初期割合は毎年 40%前後で推移しており、HIV 陽性率も 0.5~0.7%とほとんど変わっていないが、しかし検査数は大きく変動しており、2008 年の検査数に比べ 2012 年は 81%まで減少していた。

新しい免疫学的指標としてクラス別抗体（IgM、IgA、IgG）測定系の検討を行い、感染時期推定の血清学的パラメーターとしての有効性について検討した。

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ころから IgG 抗体が出現し高濃度で持続する。今回感染初期から 4 年間フォローアップした患者においても同様の結果が得られた。しかし、IgM と IgA 及び IgG 出現の差は 1 週間程度しかなく、また IgA は感染 4 年後も低濃度ではあるが検出された。また、AIDS 発症時には IgG は低下することが知られている。一度の匿名検査において、これらクラス別抗体による感染時期の推定は困難と思われた。

今後、免疫学的感染時期推計法として、主として BED 法、PA 法を採用し、感染実態の把握にどのように応用できるかさらに検討していきたい。

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 法を採用し、血清学的検査アルゴリズム分析 (STARHS) を行っている。ところがアフリカ等の発展途上国では BED 法によって得られた incidence と流行との実態が一致せず、抗 HIV 治療を行っていた人や AIDS 発症者を最近の感染と間違えて分類する等の問題点が明らかとなった。そのため、UNAIDS では BED 法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も検討している。日本では感染時期の推定に BED 法が行われているが、一部の医療機関で行われているに過ぎず、全体の incidence 推計まで至っていない。

我々は、平成 21 年度から 23 年度の本事業での研究において、BED 法および凝集法 (PA 法) の検討を行い、BED 法は感染後 6 カ月以内を示す指標として、PA 法での抗体価 1000 倍未満が 2.5 カ月以内を示す指標として有効であることを報告した (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)。

この 3 年間では、これら 2 法を用いて 2004 年から 2013 年の新規感染者について HIV 抗体価を測定し、年次別感染初期の割合を調査した。また、新しい免疫学的指標としてクラス別抗体 (IgM、IgA、IgG) 測定系の検討を行い、感染時期推定の血清学的パラメーターとしての有効性について検討した。

B. 研究方法

1. BED 法及び凝集法 (PA 法) による HIV-1 抗体価の測定

(1) 被検検体

2004 年から 2013 年に研究協力機関から HIV 確認検査を依頼され WB 法、あるいは遺伝子検査 (NAT) で HIV-1 感染と判定された検体 699

例 (2004 年 32 例、2005 年 48 例、2006 年 49 例、2007 年 55 例、2008 年 80 例、2009 年 83 例、2010 年 109 例、2011 年 76 例、2012 年 85 例、2013 年 82 例) を用いた。感染ウイルスの遺伝子型はサブタイプ B が約 90%、CRF01_AE (01AE) が 7%、01AE と B の組換え体 (01B) 1.5%であった。

(2) 試薬

① Calypte HIV-1 BED Incidence EIA (BED 法)

② セロディア・HIV-1/2 (富士レビオ社、型別用 PA 試薬、PA 法)

2. クラス抗体別測定方法の検討

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 4 年間に亘りフォローアップしている患者 GM2855 から、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た。

(1) 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 1 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 μ g/ml、5 μ g/ml に調整し、96 穴マイクロプレートに 100 μ 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。

(2) 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 2 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を加えて 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。血漿の希釈には 5% スキムミルク加 T-PBS を用い、希釈血漿と抗ヒトクラス別抗体との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、添付マニュアルに従い測定した。

C. 結果

1. BED 法及び凝集法 (PA 法) による HIV-1 抗体価の測定

2004 年から 2013 年の HIV 新規感染者 699 例の血漿を用いて、BED 法、PA 法による抗体価を測定した。BED 法での吸光度値 (ODn 値) が 0.8 以下、PA 抗体価 < 1000 倍の年次推移を図 3 に示した。BED 法の ODn 値が 0.8 未満 (抗体陽転後 155 日) の割合は、10 年間の平均が 38% であった。年次別に見てみると 2004 年が最も高く 47% で、2011 年が最も低く 28% であったが、10 年を通してほぼ 40% 前後で推移していた。PA 法 (1000 倍以下) による感染初期例の割合も BED 法とほぼ同様の傾向を示した。

PA 法と BED 法の抗体価を比較すると、PA 抗体価が 1000 倍未満 (抗体陽転後 46 日) の検体は 92 例あり、その内 91 例 (99%) は BED 法の ODn 値も 0.8 未満であった。PA 抗体価 1000 倍以上 10000 倍未満 99 例のうち、ODn 値 0.8 未満は 73 例 (74%) であった (図 4)。

BED 法の ODn 値が 0.8 未満の検体は 267 例であり、このうち PA 抗体価 1000 倍未満は 91 例 (34%)、10000 倍未満が 170 例 (64%) であったが、10000 倍以上でも 97 例 (36%) 存在した。

2. クラス抗体別測定値の検討

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 抗体の固相量を $1 \mu\text{g/ml}$ 、 $5 \mu\text{g/ml}$ 、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 までばらつき、バックグラウンドが高くなる傾向が認められた (表 1)。

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、セロディア HIV-1 抗体価 < 2 倍、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 で、BED 法陽性 (ODn 値 : 0.033) で、感染後 1~2 カ月と推定された。

IgM 抗体の吸光度は初診時 (GM2855-1) にはすでに高値を示し、その 2 週から 6 週後にピークとなったが、5 か月以降 (GM2855-8) はバックグラウンドとほとんど同じ値となった。IgA 抗体は IgM 抗体に若干遅れて出現し、1~2 年後にピークとなり、その後徐々に減少していったが、約 4 年間検出された。IgG 抗体は初診時には検出されなかったが、2 週間には高濃度で検出され、4 年後も高レベルで維持していた。

D. 考察

HIV 流行の実態を把握し効果的な予防対策を講ずるために、incidence の推計は重要である。日本では感染時期推定には BED 法が広く用いられているが、個々の医療機関で行われているに過ぎず、incidence の推計にまで至っていない。我々は免疫学的手法による incidence 推計法の確立を目指し、平成 21~

23 年度の本研究事業において、BED 法と PA 法を組み合わせた感染時期推計アルゴリズムの可能性を報告した。

この 3 年間の研究ではこれら 2 法を用いて 2004 年から 2013 年の新規感染者について抗体価を測定するとともに、新しい指標としてクラス別抗体 (IgM、IgA、IgG) 測定系の検討を行った。

クラス別抗体測定系の特異性について、IgA 抗体と IgG 抗体測定系の特異性は良好であったが (OD_n 値 < 0.100)、IgM 抗体測定系の吸光度は 0.092 から 0.508 までばらつき、バックグラウンドが高値となった。

一般的に 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 抗体はアフィニティが低く、抗原との反応がブロードなため、非特異的反応が起きやすいと考えられた。また 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。

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ころから IgG 抗体が出現し、その後高濃度で持続する。しかし AIDS 発症時にも IgG 抗体は低下することが知られている。

今回感染初期から 4 年間フォローアップした患者においても同様の結果が得られた。しかし、IgM 抗体と IgA 及び IgG 抗体出現の差は 1 週間程度しかなく、また IgA 抗体は低濃度ではあるが感染 4 年後も検出されており、1 度の匿名検査で感染時期を推定することは困難と思われた。

HIV 陽性検体の BED 法による感染初期割合の平均は 38%であったが、年次別割合をみると、2004 年は 47%で他の年と比べて高い傾向が見られた。

これは 2004 年から HIV 即日検査が全国保健所や即日検査協力民間クリニック (民間クリニック) に導入され始め、またマスコミ等の

情報により HIV 検査に関心が集まり、より早い時に HIV 検査にアクセスする人が増えたことが一因と考えられる。

民間クリニックにおける 2004 年から 2013 年までの 10 年間の検査数と HIV 陽性率及び感染初期割合との関連を図 5 に示した。HIV 陽性率は 0.5~0.7%、感染初期割合はこの 10 年間ほぼ 40%で推移していた。

しかし、検査数は大きく変動しており、2008 年は過去最高で 20113 件であったが、2009 年には新型インフルエンザ大流行の影響で検査数が減少し、2012 年には協力クリニック数が増えているにもかかわらず、検査数は 2008 年比 81%まで減少した。

すなわち、検査数の減少にもかかわらず、陽性率と感染初期割合がほとんど変わっていない。これらは感染リスクの高い人々の受検数の減少を、あるいは行動変容が起こっていることを示唆しているのかもしれない。今後、これら免疫学的感染時期推計法が感染実態の把握にどのように応用できるかさらに検討していきたい。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takebe Y, Naito Y, Raghwani 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) 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 transmission among Men Who have Sex with Men (MSM) in China: First

indication of the international dissemination of the Chinese MSM lineage. J. Virol. 87(10), 5351-5361, 2013.

- 3) 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、72-73、2013。
- 4) 鈴木理恵子、近藤真規子他：神奈川県風疹流行状況と麻疹疑い患者からの風疹ウイルスの検出：病原微生物検出情報、34 (4)、96-97、2013。
- 5) 近藤真規子、佐野貴子、今井光信、加藤真吾：保健所等における無料匿名 HIV 検査の現状とその課題：病原微生物検出情報、34 (9)、253-254、2013。
- 6) 鈴木理恵子、木村睦未、金城恵子、近藤真規子、丹羽加代子：麻しん疑い患者からの風疹ウイルス検出状況と遺伝子解析、神奈川県衛生研究所研究報告、43、10-13、2013。

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 組換え型流行株 (CRF) および孤立型組換えウイルス (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, Loket 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、鴻永博之、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 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部会 (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部会 (2014 年 9 月 25～26 日、長野市)。
 - 13) 武部豊、近藤真規子、内藤雄樹：中国における HIV-1 CRF01_AE 流行を形成すファウンダー株の同定：我が国および周辺アジア諸国における流行との相互関係の解析、第 61 回日本ウイルス学会学術集会 (2013 年 11 月 10～12 日、神戸)。
 - 14) 鈴木理恵子、渡邊寿美、佐野貴子、近藤真規子：神奈川県における風疹ウイルス検出状況と遺伝子解析、第 61 回日本ウイルス学会学術集会 (2013 年 11 月 10～12 日、神戸)。
 - 15) 近藤真規子、佐野貴子、井戸田一朗、吉村幸浩、立川夏夫、山中晃、岩室紳也、今井光信、武部豊、加藤真吾：中国の MSM 間で大流行している HIV-1CRF01_AE variant の日本への流入、第 27 回日本エイズ学会学術集会 (2013 年 11 月 20～22 日、熊本)。
 - 16) 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 27 回日本エイズ学会学術集会 (2013 年 11 月 20～22 日、熊本)。
 - 17) 武部豊、近藤真規子：中国における CRF01_AE 流行の動因となっているファウンダー株の分析：我が国および周辺アジア諸国における流行との相互関係、第 27 回日本エイズ学会学術集会 (2013 年 11 月 20～22 日、熊本)。
 - 18) 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 4: サブタイプと感染リスクによる伝播効率、第 27 回日本エイズ学会学術集会 (2013 年 11 月 20～22 日、熊本)。
 - 19) 佐野貴子、井戸田一朗、川畑拓也、千々和勝己、須藤弘二、近藤真規子、今井光信、加藤真吾：民間クリニックにおける HIV 即日検査の導入支援および結果解析、第 27 回日本エイズ学会学術集会 (2013 年 11 月 20～22 日、熊本)。
 - 20) 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 (2012)、第 27 回日本エイズ学会学術集会 (2013 年 11 月 20～22 日、熊本)。
 - 21) 山崎さやか、近藤真規子、加藤真吾：リアルタイム PCR を用いた HIV-1 と HIV-2 の同時検査法の開発、第 27 回日本エイズ学会学術集会 (2013 年 11 月 20～22 日、熊本)。
 - 22) 重見麗、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 27 回日本エイズ学会学術集会 (2013 年 11 月 20～22 日、熊本)。
 - 23) 渡邊寿美、佐野貴子、伊達佳美、近藤真規子、黒木俊郎、2012/2013 シーズンの神奈川県におけるインフルエンザ検出状況、第 28 回関東甲信静支部ウイルス研究部会、(2013 年 9 月 26～27 日、千葉市)
 - 24) 鈴木理恵子、木村睦未、近藤真規子、黒木俊郎、神奈川県における麻疹疑い患者

からの風疹ウイルス検出状況と遺伝子解析、第 28 回関東甲信静支部ウイルス研究部会、(2013 年 9 月 26~27 日、千葉市)。

- 25) 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) .
- 26) 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)。
- 27) 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)。
- 28) 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)。
- 29) 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)。
- 30) 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)。
- 31) 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)。

図1 HIV-1クラス別 (IgG, IgA, IgM) 抗体測定原理

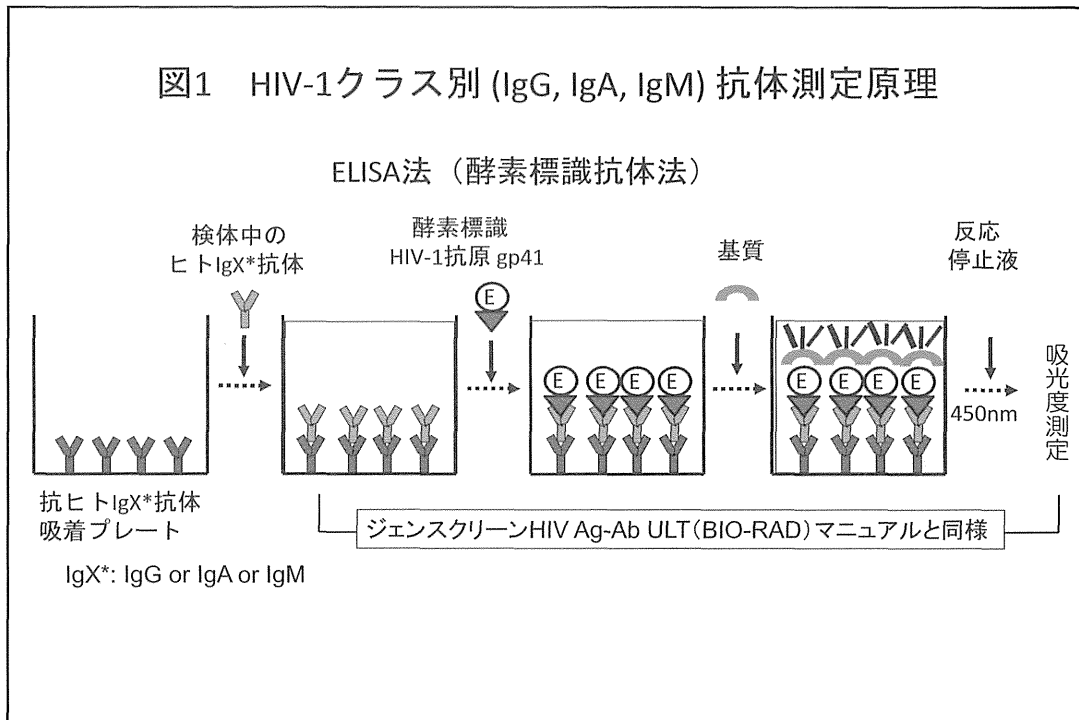


図3 BED法とPA抗体価の年次別割合 (2004-2013)

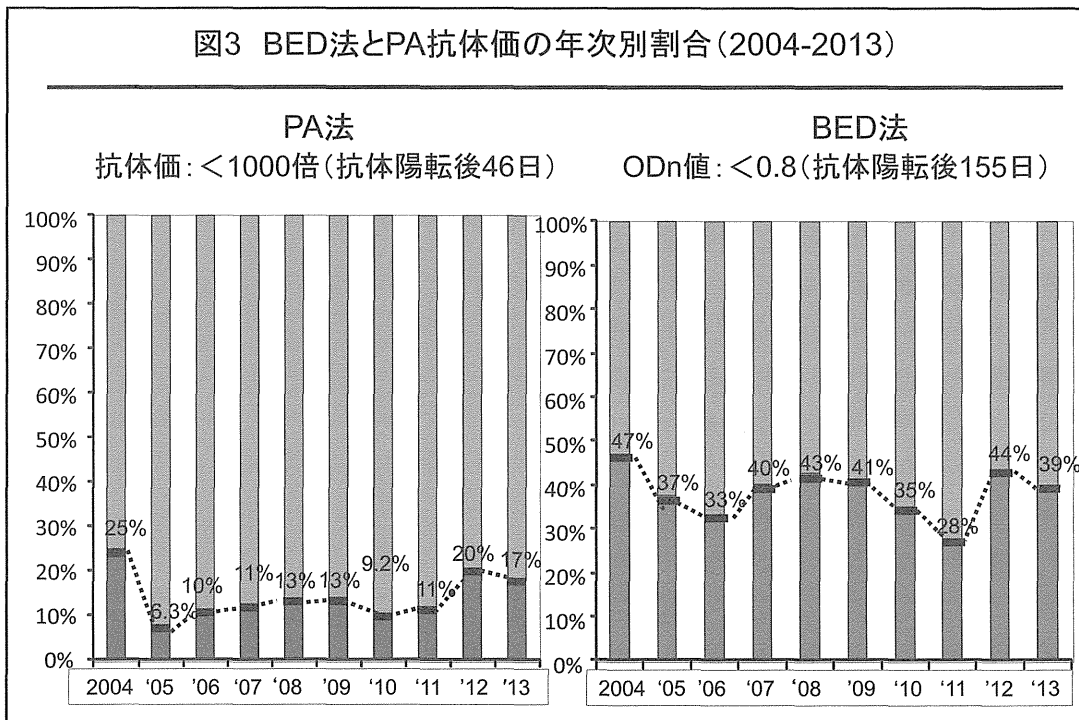


図4 BED法Odn値とPA抗体価の比較(2004-2013)

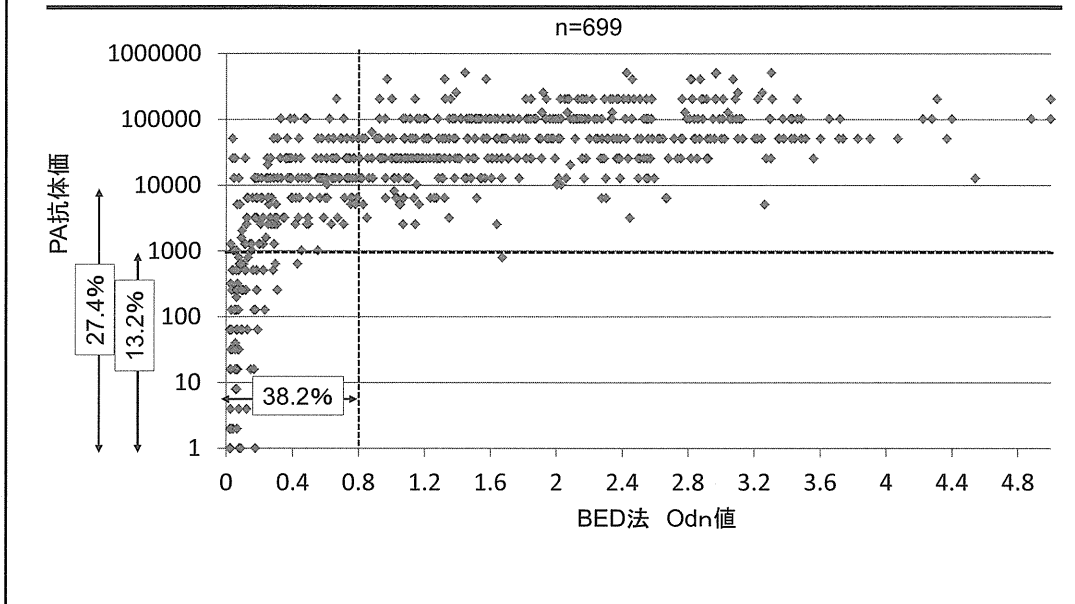


図5 STIクリニック検査数、陽性率、BED陽性数の推移 (2004-2013)

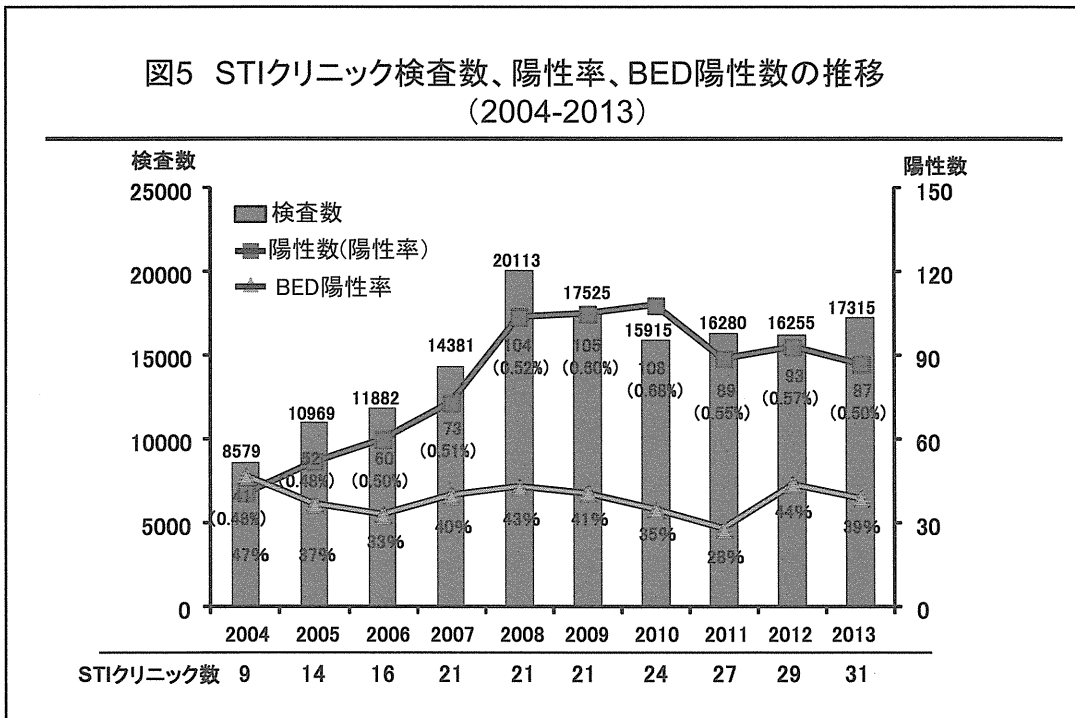


図2 抗ヒト HIV クラス別抗体 (IgM、IgG、IgA) 測定系フロー

1. 抗ヒトクラス別抗体 (IgM、IgG、IgA) の固相

96 ウェルマイクロプレートへの各抗ヒトクラス別抗体 (IgM、IgG、IgA) の固相
各クラス別抗体濃度を PBS (-) で調整 : $1\mu\text{l/ml}$ 、 $5\mu\text{l/ml}$
各ウェルに $100\mu\text{l}$ ずつ分注
↓ 4°C overnight
T-PBS(-)溶液 (1M PBS(-)/0.05%Tween 20) で 3 回洗浄
↓
ブロッキング : Super Block Blocking Buffer を各ウェルに $300\mu\text{l}$ ずつ分注
分注後プレートを逆さまにして捨てるを 3 回繰り返す
↓
T-PBS(-)溶液 (1M PBS(-)/0.05%Tween 20) で 3 回洗浄
↓
乾燥後、乾燥材入りアルミパックに入れて冷蔵保存

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

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 クラス別抗体 血漿希釈倍数	5ug/ml		1ug/ml		1ug/ml	
	IgA X10	IgM X10	IgA X10	IgM X10	IgG X10 ⁵ X10 ⁶	
GM2855-1 (081202)	0.057	1.521	0.052	0.742	0.054	0.051
	0.059	1.428	0.052	0.775	0.051	0.049
			0.049	0.864	0.035	0.035
			0.082	1.067	0.039	0.037
GM2855-2 (1W)			0.144	2.310	0.049	0.039
			0.137	2.141	0.050	0.039
GM2855-3 (2W)			0.222	3.375	0.384	0.065
			0.276	3.443	0.376	0.080
GM2855-4 (6W)			0.079	2.989	0.493	0.075
			0.165	2.859	0.496	0.099
GM2855-5 (10W)			0.084	1.203	1.126	0.147
			0.093	1.709	1.117	0.156
GM2855-6 (3m)	0.240	0.784	0.120	0.456	1.092	0.142
	0.208	0.788	0.117	0.432	0.953	0.134
GM2855-7 (4m)			0.194	0.647	2.320	0.336
			0.180	0.468	2.338	0.382
GM2855-8 (5m)			0.223	0.447	2.409	0.342
			0.362	0.434	2.367	0.396
GM2855-10 (7m)	0.526	0.569	0.218	0.301	1.438	0.190
	0.511	0.562	0.224	0.309	1.473	0.182
GM2855-14 (11m)	0.988	0.561	0.396	0.317	2.055	0.271
	1.065	0.621	0.401	0.415	2.117	0.253
GM2855-20 (1y5m)	0.961	0.513	0.393	0.293	2.821	0.430
	0.956	0.515	0.383	0.281	2.849	0.491
GM2855-25 (2y)	0.433	0.345	0.192	0.207	2.770	0.375
	0.436	0.339	0.181	0.216	2.662	0.380
GM2855-30 (2y5m)	0.348	0.335	0.166	0.185	1.973	0.224
	0.326	0.338	0.164	0.195	1.940	0.204
GM2855-36 (3y)	0.251	0.521	0.126	0.259	2.442	0.417
	0.273	0.555	0.150	0.261	2.307	0.359
GM2855-40 (3y6m)	0.212	0.379	0.119	0.206	2.017	0.281
	0.207	0.376	0.098	0.211	1.972	0.290
GM2855-45 (4y)	0.181	0.333	0.094	0.185	1.769	0.239
	0.182	0.322	0.093	0.166	1.839	0.259
NC* (キット添付)	0.052	0.287	0.052	0.189	0.038	0.041
	0.060	0.275	0.059	0.202	0.054	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

21. 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 と数百分の一程度の価であった。

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、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	エスブライン	ジェネティア(抗体価)			OraQuick
			検体	原液(推定値)	血清中抗体価との比	
FR 1	拭い液(およそ3倍希釈)	+	x40	x120	1/133	+
	唾液	+(30分)	x40	x80	1/200	
	血清	+	x16000	x16000		
FR 2	拭い液(およそ3倍希釈)	+	x160	x480	1/133	+
	唾液	+(30分)	x320	x400~x640	1/100~1/160	
	2倍希釈	+	x80			
	5倍希釈	+	x40			
血清	+	x64000	x64000			
FR 3	拭い液(およそ3倍希釈)	+	x160	x480	1/167	+
	唾液	+(30分)	x160	x200~x320	1/250~1/400	
	2倍希釈	+	x40			
	5倍希釈	+	x20			
血清	+	x80000	x80000			
FR 4	拭い液(およそ3倍希釈)	+	x400	x1200	1/133	+
	血清	+	x160000	x160000		
FR 5	拭い液(およそ3倍希釈)	+	x160	x480	1/667	+
	血清	+	x320000	x320000		
FR 6	拭い液(およそ3倍希釈)	-	x20	x60	1/267	+
	唾液	-(30分)	NT			
	血清	+	x16000	x16000		
FR 7	拭い液(およそ3倍希釈)	+	x160	x480	1/83	+
	血清	+	x40000	x40000		
FR 8	拭い液(およそ3倍希釈)	+	x20	x60	1/167	+
	血清	+	x10000	x10000		
FR 9	拭い液(およそ3倍希釈)	+	x20	x60	1/167	+
	血清	+	x10000	x10000		
FR 6-2	拭い液(およそ3倍希釈)	-	x10	x30	1/133	+
	唾液	-(30分)	NT			
	血清	+	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 エスブライン	拭い液 オナスクリンク	血清 デュオスクリーン	No.	検査受検日	拭い液 エスブライン	拭い液 オナスクリンク	血清 デュオスクリーン	No.	検査受検日	拭い液 エスブライン	拭い液 オナスクリンク	血清 デュオスクリーン
1					80					100				
2					81					101				
3					82					102				
4					83					103				
5					84					104				
6					85					105				
7					86					106				
8					87					107				
9					88					108				
10					89					109				
11					90					110				
12					91					111				
13					92					112				
14					93					113				
15					94					114				
16					95					115				
17					96					116				
18					97					117				
19					98					118				
20					99					119				
21					100					120				
22					101					121				
23					102					122				
24					103					123				
25					104					124				
26					105					125				
27					106					126				
28					107					127				
29					108					128				
30					109					129				
31					110					130				
32					111					131				
33					112					132				
34					113					133				
35					114					134				
36					115					135				
37					116					136				
38					117					137				
39					118					138				
40					119					139				
41					120					140				
42					121					141				
43					122					142				
44					123					143				
45					124					144				
46					125					145				
47					126					146				
48					127					147				
49					128					148				

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表