

[ノート]

兵庫県立衛生研究所(現兵庫県立健康環境科学研究所センター)

における過去 16 年間の HIV 抗体検査の推移
(1986 - 2001 年)

近平雅嗣* 藤本嗣人 増田邦義 楠田 均
木村英二 小林 稔 川村 隆

Annual Transition of HIV Antibody Survey for the Past 16 Years
(1986 - 2001) at Hyogo Prefectural Institute of Public Health and
Environmental Sciences

Masatsugu Chikahira*, Tsuguto Fujimoto,
Kuniyoshi Masuda, Hitoshi Kusuda, Eiji Kimura,
Minoru Kobayashi, Takashi Kawamura

SUMMARY

HIV-antibody in the serum samples was surveyed for the past 16 years between 1986 and 2001 at the Hyogo Prefectural Institute of Public Health(present name: the Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences). For the screening test, the enzyme-linked immunosorbent assay was used in the early period, and particle agglutination assays were adopted since 1988. The serum samples showing the positive HIV-antibody reaction in the screening test were subjected to the confirmatory test using western blotting or indirect immunofluorescent methods. The yearly number of the serum samples examined varied year by year and was around 2,000 cases in 12 years of the 16-year survey period. However, the significant increase in number was seen in 1987 and 1992, and amounted to 8,324 and 5,069 cases, respectively. In addition, the serum samples of 3,916 cases were examined in 1993. The abrupt increase in number observed in 1987 might be due to the fact that the a woman patient with AIDS in Kobe was detected for the first time in Japan. The total number of examination in these 16 years was 38,534, among which 244 sera gave the positive HIV-antibody reaction shown by the screening test. Upon confirmatory tests, 28 out of 244 sera were positive for HIV-antibody. According to the information from the Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare, the proportion of HIV-antibody positive cases among the blood donors is increasing recently in Japan. The governmental institution such as public health institutes or health centers are expected to carry out a convenient examination for HIV-antibody detection in early stages of HIV infection.

感染症部

* 別冊請求先 : 〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町 2-1-29

兵庫県立健康環境科学研究所センター

感染症部 近平雅嗣

はじめに

兵庫県立衛生研究所(現兵庫県立健康環境科学研究所センター)ではHIV抗体検査を1986年6月から2001年末までに38,497件について行い、28件の抗体陽性例を確認した。

依頼検体数は検査を開始した 1986 年は 75 検体であったが、1987 年には 8,324 件に達し、その後は減少傾向をたどっている。現在までの本県における HIV 抗体陽性者は血液製剤による感染を除いて 63 名、AIDS 患者は 40 名¹⁾と比較的少ない。ところが、最近新たに見いだされる HIV 抗体陽性者には、すでに AIDS を発症している例があり、当事者が感染を知らないまま発症に至るケースが増えていることがうかがえる。このため、保健所を含めた検査機関での HIV 抗体検査を推進することが急務と思われる。県下の HIV 抗体検査の受診者や抗体陽性者の動向を把握することは、保健所などでのカウンセリングや抗体検査推進による HIV 感染防止策の立案に必須である。

材料と方法

1. 検査検体

本県での HIV 抗体検査は 1986 年 6 月 10 日に定められた「兵庫県エイズ対策実施要領」に基づいて兵庫県立衛生研究所(衛研)において開始した。当初は県医師会の協力により医療機関からの検査検体を受け入れた。1987 年 1 月 19 日からは県下の全ての保健所において県民から採血された検体についての検査を受け入れた。1987 年 1 月下旬から神戸市、1993 年 6 月から尼崎市、1994 年 10 月からは姫路

市が独自に検査を始めたため、衛研での検査数にはそれ以後これらの保健所からの依頼検体は含まれていない。

2. 検査法

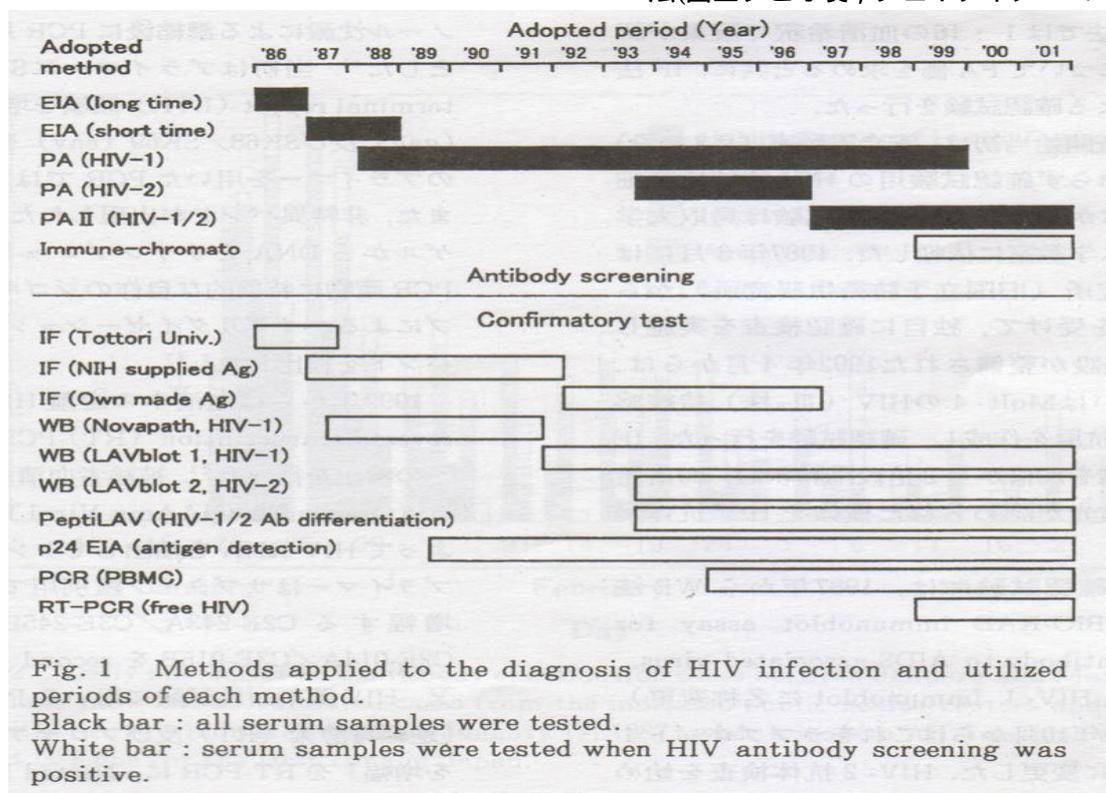
HIV 抗体のスクリーニングとその確認試験に用いた検査法と使用期間を Fig.1 に示した。

1) 抗体スクリーニング

スクリーニング検査は 1986 年の検査開始当初は ELISA(EIA)法(ダイナボット製, HTLV- \cdot EIA「アボット」)で行った。本キットは、1987 年 4 月からは血清の希釈倍率を下げ、反応時間を短縮したプロトコルが用いられるようになった(EIA short 法)。

ELISA 法では偽陽性が多く、本法により陽性となった検体は再測定を行って陽性を確認する必要がある。スクリーニングに最短でも 2 日間を要する。このため、1988 年からは検査の迅速化と偽陽性率を少なくするために、粒子凝集(PA)法(セロディア HIV, 富士レビオ製)に変更した。1993 年 8 月からは HIV-1 に加えて PA 法による HIV-2 抗体のスクリーニングキット(富士レビオ製, セロディア HIV-2)を併用して、HIV-1 及び HIV-2 両抗体を検出した。

1996 年からは、セロディア HIV-2 に代えて第 2 世代 PA 法(富士レビオ製, ジェネディア HIV-1/2)を用い、セ



ロディア HIV-1 と併用した。従来のキットでは抗体捕捉に精製ウイルスの可溶性抗原を用いていたが、第2世代 PA 法ではこれをリコンビナン法で作成した gp41, p24, 及び gp36 抗原に変更し, HIV-1 及び HIV-2 抗体を同時に検出できるように改良された。また, リコンビナント抗原のため偽陽性率が低くなる利点を有している。さらに, ゼラチン粒子に多量の抗原を結合させて検出感度を鋭敏化させたことによりウィンドウ期を短縮できるなどの利点もある²⁾。

1999 年からはジェネディア HIV-1/2 で凝集が認められた検体は, イムノクロマト法 (ダイナボット製, ダイナスクリーン・HIV-1/2) で抗体を確認し, 両方の測定で陽性となった検体について確認試験を行った。イムノクロマト法は ELISA 法の変法で, その検出原理が PA 法と異なるため PA 法と組み合わせることで, 偽陽性反応をより少なくすることができると考えられる。

2) 確認試験

ELISA 法によるスクリーニングでは陽性となった同一検体を再測定し, 2 回連続して陽性となった検体について, 蛍光抗体 (IF) 法あるいはウエスタンブロット (WB) 法による確認試験を行った (Fig.1)。PA 法では 1:16 の血清希釈で凝集が認められた検体について PA 価を求めると共に, IF 法及び WB 法による確認試験を行った。

HIV 抗体検査開始当初は, 安全実験室 (P3 施設) が整備されておらず確認試験用の HIV 持続感染細胞を培養できなかったため³⁾, 確認試験は鳥取大学医学部ウイルス学教室に依頼した。1987年3月には国立感染症研究所 (旧国立予防衛生研究所) から IF 抗原の供給を受けて, 独自に確認検査を実施した。又, P3 施設が整備された 1992年4月からは, TALL-1 あるいは Molt-4 の HIV (B株) 持続感染細胞から IF 抗原を作成し, 確認試験を行った。IF 法では被検血清を 20 倍から 2 倍段階希釈し, 20 倍希釈以上で特異蛍光が認められた検体を HIV 抗体陽性とした。

HIV-1 抗体確認試験には, 1987 年から WB 法 (BioRad 製, BIO-RAD Immunoblot assay for detection of antibody to AIDS-associated virus, 後に Novapath HIV-1 Immunoblot に名称変更) を用いた。1991 年 10 月からはこれをラプブロット 1 (富士レビオ) に変更した。HIV-2 抗体検査を始めた 1993 年 8 月からは, HIV-2 抗体確認にラプブロット 2 (富士レビオ), HIV-1 と HIV-2 の抗体鑑別にペプチラブ (富士レビオ) を追加し

た。WB 法の判定は WHO の判定基準を準用したキットの基準に従った。すなわち, HIV-1 の env 蛋白である gp160, gp120, gp41 の 3 本のバンドのうちいずれか 2 本が出現した場合を抗体陽性, それら 3 本のうち 1 本あるいは他の HIV-1 関連のバンドが出現した場合を判定保留, HIV-1 に関連するバンドが全く出現しないときを抗体陰性と判定した。HIV-2 抗体は env 蛋白の gp140, gp105, gp36 について HIV-1 と同様の基準で判定した。

WB 法での結果が「判定保留」となり, 再採血が必要な場合には全血採血 (抗凝固剤添加) を行い, 血漿から抗体と p24 抗原測定を, 細胞培養用に分離した末梢血単核球 (PBMC) から polymerase chain reaction (PCR) による HIV 遺伝子検出を行った。感染が確認された検体からはウイルス分離を行った。

3) PCR

被験者の PBMC に組み込まれている HIV プロウイルスから HIV 遺伝子を検出するために PCR 法を用いた。HIV 分離用に調整した PBMC に proteinase K (5mg/ml) 及び 1% SDS を含む Tris-HCl 溶解液を加え, 55 で 60 分間保温後, 95 で 5 分間加熱, フェノール・クロロホルム法で DNA を抽出, エタノール沈澱による濃縮後に PCR 用のテンプレートとした⁴⁾。当初はプライマーに SK29 / SK30 [long terminal repeat (LTR) 領域を増幅], SK38 / SK39 (gag) 及び SK68 / SK69 (env) を用いた⁴⁾。これらのプライマーを用いた PCR では増幅効率が低く, また, 非特異バンドが出現したため, 電気泳動後のゲルから DNA をサザンブロットし, 転写膜に各 PCR 産物に特異的な自作のジゴキシゲニン・プローブによるハイブリダイゼーションを行い, HIV 特異バンドを検出した^{5,6)}。

1999 年からは血清中の遊離 HIV を対象として, reverse transcription (RT) -PCR により HIV 遺伝子の検出を行った⁷⁾。被験者血清から RNA 抽出キット (Qiagen 製, QIAamp Viral RNA mini kit) によって HIV-RNA を抽出してテンプレートとした。プライマーはサブタイプ鑑別用で C2 / V3 領域を増幅する C2E-243A / C3E-245B を RT-PCR に, C2E-014A / C3E-015B を second PCR に用いた⁸⁾。又, HIV 薬剤耐性試験に用いる PROT-1 / RT-P2 [逆転写酵素 (RT) 及びプロテアーゼ (pro) 領域を増幅] を RT-PCR に, Nested PCR には RT 領域を増幅する RTs10/RTs20 とプロテアーゼ領域を増幅する Prots10/ Prots20⁸⁾ を併用した。

4) HIV 抗原検出

PA 価が低い陽性血清は HIV 抗原・EIA 「アボット」を用いて、p24 抗原を検出した。

5) HIV 分離⁹⁾

被験者から採取した凝固防止血液を等量の PBS(-)で希釈し、これを Ficoll-Paque (ファルマシア)に重層、2,000rpm で 20 分間遠心し、PBMC 層を採取した。PBMC を PBS(-)で 2 回、RPMI-1640 (Flow)で 1 回洗浄し HIV 分離用検体とした。被験者 PBMC に、フィトヘマグルチニン(PHA, Difco)で幼若化した健常人の PBMC, IL-2 (100U/ml, Genzyme), PHA (5^μg/ml)を添加し、10%牛胎児血清を加えた。RPMI-1640 (Flow)培地中で培養し、3~4 日ごとに培養上清を半量交換、1 週間ごとに培養液を半量交換すると共に健常人の幼若化 PBMC を添加した。このとき、取り出した培養液中の HIV-p24 抗原を調べ、ウイルス増殖をモニターした。培養は p24 抗原が陽性になるまで、あるいは 5~7 週間継続し、この時点で p24 抗原が陰性の場合には分離陰性とした。

結果及び考察

1. HIV 抗体検査件数の推移

1986 年から 2001 年末までに保健所から 26,956 検体、医療機関から 11,503 検体の合計 38,493 検体について抗体を測定した。1986 年には 75 件あり、その全ては医療機関からの依頼で、この中の 1 検体が陽性であった。この陽性例は、1987 年 1 月 17 日に厚生省エイズサーベイランス委員会が確認した性行為感染により発症した日本人女性で初めての AIDS 患者で、兵庫県が公表するとマスコミに大きく取り上げられた。このため、AIDS に関する問い合わせや検査依頼が保健所に殺到した。兵庫県はこの事態をあらかじめ予測し、県民の不安に応え AIDS の感染拡大を防止するため保健所での有料 HIV 抗体検査の受け入れを決定し、衛研がその検査に当たった。この時点で HIV 抗体検査可能な機関は県下では衛研に限られていたことから、医療機関からの依頼数も急増し、これに保健所採血分も含めて 3 月までの 3 か月間に 6,186 検体(保健所 4,823 検体、医療機関 1,363 検体)の検査依頼があった。Fig.2 に 1987 年 1 月から 3 月までの県保健所、県下の各政令市保健所及び医療機関からの検体数の推移を日別に示した。検体数は日によって大きく変動したが、1 月 19 日から急増した後、1 月末から徐々に減少した。

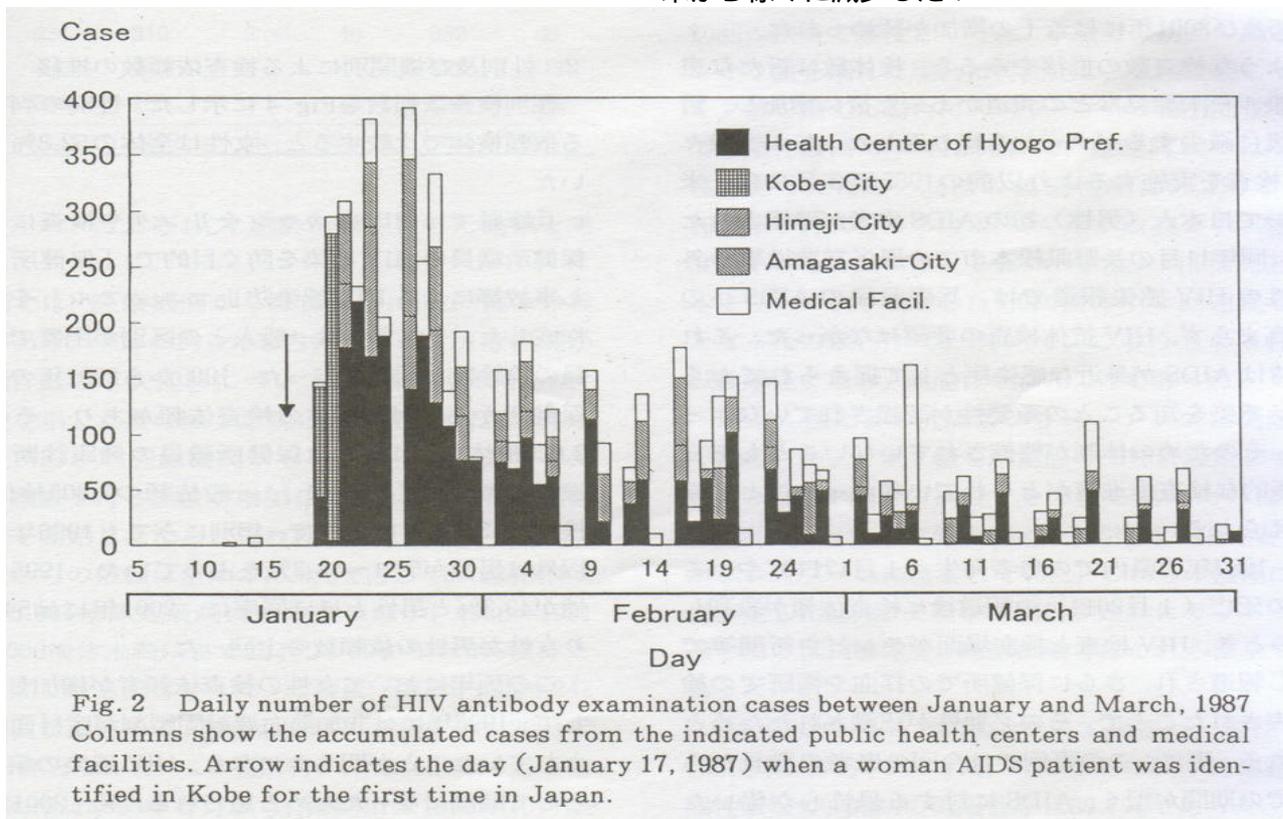


Fig. 2 Daily number of HIV antibody examination cases between January and March, 1987. Columns show the accumulated cases from the indicated public health centers and medical facilities. Arrow indicates the day (January 17, 1987) when a woman AIDS patient was identified in Kobe for the first time in Japan.

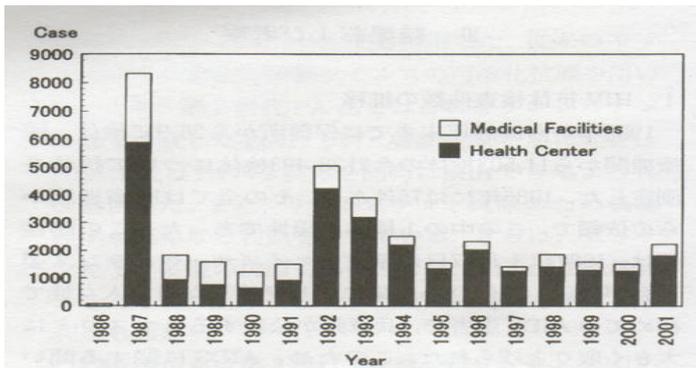


Fig. 3 Yearly number of HIV antibody examination cases
The largest number of samples in the past 16 years was seen in 1987 when the first woman AIDS patient of Japan was identified in Hyogo Prefecture.

その動きを週別に見ると1月19~24日の週に1,571と最高値に達したが、3月最終週には179検体にまで減少した。この頃にはいわゆるAIDSパニックは沈静化した。

年別の検査件数をFig.3に示した。依頼総数は1987年に8,324検体(保健所5,904検体,医療機関2,420検体)と最高値を示した後、翌年の1988年には1,822検体に急減し、1991年までこのレベルで持続した。1992年には再び5,069検体に増加したが、翌年からは再び漸減し、1995~2001年には1,553~2,326検体の範囲で変動した。この間、1996及び2001年には若干の増加が認められた。

このような検査数の推移をみると、検体数は新たな患者や感染ルート発見などの報道があった後に増加し、暫時経過後に減少するパターンを繰り返した。なお、我々がHIV検査を実施するより以前の1985年3月には、米国において日本人(男性)初のAIDS患者が確認されたことや、同年11月の長野県松本市での風俗営業従事の外国人女性のHIV感染報道では、兵庫県民のAIDSへの関心は高まらず、HIV抗体検査の要望はなかった。これは、当時はAIDSが身近な感染症として捉えられておらず、HIV感染を知ることの重要性が認識されていなかったこと、そのための体制が整備されていないこともあって、積極的な検査推進策がとられていなかったことも原因と考えられる。

一方、1987年の県内での患者発生(1月17日)や、この患者の死亡(1月20日)の報道後に検査依頼が殺到した。このとき、HIV検査と採血場面がテレビや新聞等で繰り返し報道され、さらに保健所での採血や衛研での検査が公表されたことで、その必要性が認識されたためと考えられる。更に、この事例では今回の患者の発見から死亡までの期間が短く、AIDSに対する恐怖心が働いたことも検査数の激増

につながったものと思われる。また、この事例のすぐ後も、高知県での妊婦のHIV感染(2月17日)や政府がエイズ予防に関する法整備を目指していることなど、この時期にはAIDSに関する報道が相次いでおり、これらが県民の関心をAIDSへ向かわせたと思われる。

1992年の検体数の増加は、12月1日の世界エイズデーに呼応して行政がマスコミによるAIDSキャンペーンを実施すると共に、従来有料であった検査料を同年12月第1週に限り無料としたことなどによる効果があったと思われる。1993年5月からはHIV抗体検査手数料の常時無料化や、検査結果の告知を1週間以内にするなど、保健所あるいは衛研(公的検査機関)における検査推進策を実施した。しかし、これらの効果は一時的で検査件数の減少は1995年まで続き、それ以降は検査件数の大幅な増加は認められなかった。その後、非加熱血液凝固因子製剤が血友病患者以外にも使用されていたこと(HIV感染の第4ルート)が明らかになり、1996年には厚生省が同製剤を使用していた医療機関を公表して抗体検査を勧めた。更に、同ルートによるC型肝炎ウイルス(HCV)の感染が明らかになり、2001年には全国の公的検査機関でのHCV抗体検査を開始し、期間を限定してHIV抗体検査とセットで受検するHCV抗体検査を無料としたことで、各々2,326及び2,228検体と若干の増加が認められた。

2. 性別及び機関別による検査依頼数の推移

性別検査依頼数をFig.4に示した。性別の判明している依頼検体と比較すると、女性は全体の52.8%を占めていた。

兵庫県ではHIVのカウンセリングや検査に従事する保健所職員のHIV感染を防ぐ目的で、「保健所での針刺し事故等によるHIV感染防止マニュアル」を1995年に作成した。それまでは一般人との区別が困難であった職員の検診数が明確になった。1995から2001年の7年間に保健所から10,425検体の検査依頼があり、そのうちの2,620検体(25.1%)は保健所職員の健康診断に関わる検査であった(Table 1)。一般依頼の7,805検体中4,321検体(55.7%)は男性で、年別にみても1996年と2001年以外は男性が57.1~63.3%を占めていた。1995年には女性が49.3%と男性とほぼ同率に、2001年には54.1%となり女性が男性の依頼数を上回った。

この両年において女性の検査依頼者が増加した理由として、1996年には非加熱血液凝固製剤が産科領域で多用されていたことが明らかになり、HIV感染の第4ルートとして問題になったためと思われる。又、2001年についても、同ルートによるHCV感染が顕在化した結果と考えられる。

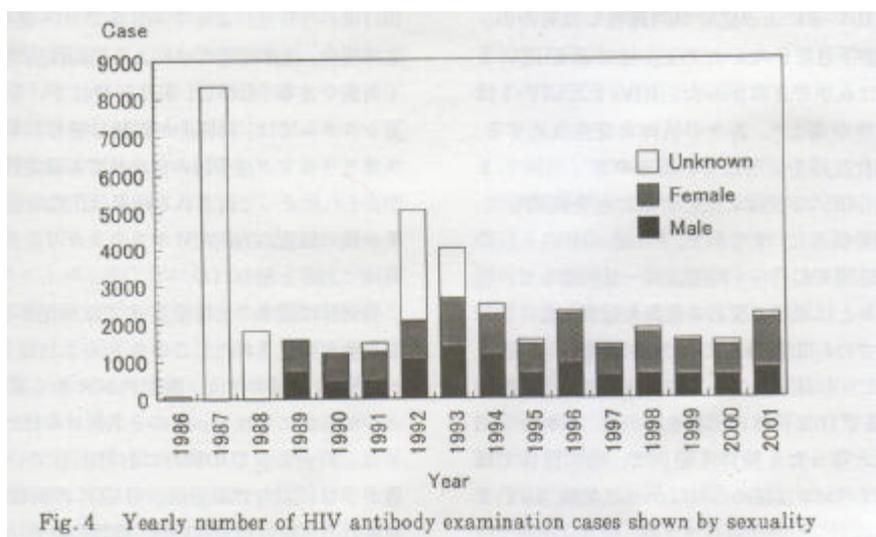


Fig. 4 Yearly number of HIV antibody examination cases shown by sexuality

Table 1 Yearly number of HIV antibody examination cases of the public and the health center staff during the period between 1995 and 2001

Year	Public			Health center staff		
	Male	Female	Unknown	Male	Female	Unknown
1995	635	478	11	20	112	94
1996	874	851	14	30	229	41
1997	559	361	14	24	248	57
1998	565	367	2	37	352	86
1999	526	310	2	40	332	88
2000	496	287	1	44	322	115
2001	666	785	1	22	221	106
Total	4,321	3,439	45	217	1,816	587

機関別では、医療機関からは16年間に9,263検体の検査依頼があり、全体の24.1%を占めていた。医療機関からの依頼件数の年次推移については、1987年に2,420件で最高値を示した後は減少し続け、1997年には156件となった(Fig.3)。医療機関からの依頼件数が減少したのは自ら検査を行う施設が増加したことや、民間検査機関が検査を開始したためと思われる。

保健所からの依頼は全体の75.9%を占め(29,234検体)、1987年の5,904検体を最高にその後は減少、1988~1991年には1,000検体未満にまで低下し、1990年は645検体となり16年間で最も少なかった。

その後、1992年には4,242件まで回復したものの、翌年からは再び減少し、2001年には1,801件となった。この間、神戸市は1987年1月下旬から、尼崎市は1993年6月から、姫路市は1994年10月から独自に抗体検査を始めており、これが1988年あるいは1992年からの検査数減少の一因と思われる。1995年以降の検体数は低値で推移したが、その値は同様に少なかった1988~1991年に比べると増加し、保健所における抗体検査が定着しつつあると思われた。

3. スクリーニングによる HIV 抗体陽性数

1986年の抗体スクリーニングの開始当初に用いたアボット社製のELISAキットでは、5,704件のうち105検体が初回の検査で陽性となった。本法では初回の測定でカットオフ値を越えた場合に再測定し、2回連続してカットオフ値を越えた場合にスクリーニング陽性とする。同法での陽性数は70件(1.2%)で、確認試験では3件が陽性であったため、同法の偽陽性率は95.7%であった。1987年3月30日からはELISA法が改良され、血清希釈度を下げると共にインキュベーション時間が短縮された。本キットにより測定した2,020検体中2回連続して陽性となったのは12件(0.6%)で、このうちの3件が確認試験陽性となり、偽陽性率は75.0%であった。

ELISA法による抗体スクリーニングでは偽陰性を防ぐため、カットオフ値を所定値の80%に設定して再検査を行った。1回目の検査でその値を越えたのは225検体で、真のカットオフ値を越えた105検体を除くと120検体がグレーゾーンに含まれていた。これらの検体について再測定した結果、2及び3回目測定共にカットオフ値に達したのは14検体で、確認試験ではこれらは全て陰性であった。

PA法では30,773検体について測定し、陽性は145件(陽性率0.5%)であった。そのうちの22件は確認試験で陽性となり、同法の偽陽性率は89.7%であった。

1992年にはHIV-2による感染が問題化したものの、厚生省の認可が下りていないためPA法によるHIV-2抗体検査試薬は入手できなかった。HIV-2とHIV-1は抗原性の類似性が高く¹⁶⁾、各々の抗体と交差反応する。HIV-1の可溶性抗原を使用しているセロディア HIV-1が弱いながらもHIV-2抗体に反応することを利用して、HIV-2の検出を試みた。すなわち、PA法(HIV-1)の2時間の判定時間を45分~1時間後に一旦判定して、陰性コントロールとは異なる反応の有無を観察した。1992年4~12月までの4,173検体をこの方法で調べ、HIV-2陽性が疑われた90検体(このうち22検体は通常の陽性像)についてWB法でHIV抗体の出現を調べた。しかし、HIV-1抗体陽性となった1検体を除いて、他の検体ではWB法で明瞭なバンドは認められなかったため、HIV-2陰性と判定した。

PA法によるHIV-2抗体スクリーニングは6,117件について行い、20件が陽性(陽性率0.3%)であったものの、WB法ではすべて陰性でHIV-2抗体は確認できなかった。

1997~1999年は第1世代のPA法(HIV-1)と第2世代PA法を併用し、4,855検体について測定し、双方で2件のHIV-1抗体陽性例を確認した。また、両キットで同一検体が偽陽性になることはなかったため、PA法による偽陽性反応は担体のゼラチン粒子に対するものではなく、抗体検出用の抗原に起因すると考えられた。1997~1999年の3年間に第1世代と第2世代のPA法を併用してその性能を調べた結果、第2世代PA法は抗体の検出感度や非特異反応の出現頻度において第1世代と同等以上の性能が認められたため、2000年からのHIV抗体スクリーニングには第2世代のみを用いた。第2世代PA法はHIV-1及びHIV-2両抗体に反応するため、本キット単独のスクリーニングで陽性となった場合は、HIV-1/HIV-2両抗体についてWB法による確認試験を行うと共に、WB陽性となった場合にはその鑑別を行った。本スクリーニング法では8,595検体を測定し、42件が陽性となったが、確認試験後の最終判定では5件がHIV-1抗体陽性となり、偽陽性率は88.1%であった。

1999年からは第2世代PA法で陽性となった25検体について、イムノクロマト法で再度測定した。第2世代PA法を含めた抗体スクリーニング法は改良によりその感度が一層高くなっている。このため、この方法で陽性を示しても、感染初期などの抗体価の上昇が弱い血清では、WB法による確認試験で陰性あるいは判定保留となることがあった。PA価が1:2⁸で、イムノクロマト法陽性であったにも関わらず、WB法で極めて弱いgp160と、弱いp24とp18バンドが出現した1999年の事例では、10日後の再採血に

よってWB法でHIV感染を確認した。この場合、抗体測定だけによる初回採血時の確定診断は不可能である。しかし、現在行われている匿名による検査システムでは、再採血が困難な場合が多い。2種類のスクリーニング法を組み合わせても確定診断はできないが、それによって得られる結果は比較的信頼性が高く、その後の検査の方向付けやカウンセリングを行うことは有用であると思われる。

1995年に従来の抗体検査法では検出が困難なHIV感染患者が発見された。このウイルスは従来のgroup A~FとV3領域のアミノ酸配列が大きく異なっていることが明らかになりgroup Oと名付けられた¹⁷⁾。現在のキットはこのgroup Oの検査にも対応している。HIV感染者が少ない国内ではgroup O以外の新種ウイルスが発見される可能性は少ないが、複数の検査法を組み合わせることは、最近のキットに抗原として使用されている合成ペプチドやリコンビナント蛋白が狭い感受性スペクトルであるという欠点を補うと考えられる。

Table 2に年別のHIV抗体の検査結果を総括した。1986年からの16年間に38,497検体についてHIV抗体のスクリーニングを行い、244検体がスクリーニング試験陽性となった。スクリーニングで陽性となった件数は検査開始当初の1987年にもっとも多く、全体の31.6%を占めていた

Table 2 Yearly number of HIV antibody examination, confirmatory examination and HIV antibody positive cases

Year	Screening examination	Confirmatory examination	HIV antibody positive
1986	75	5	1
1987	8,324	77	8
1988	1,822	15	7
1989	1,577	12	0
1990	1,229	4	1
1991	1,499	5	2
1992	5,069	22	1
1993	3,916	15	1
1994	2,512	14	1
1995	1,553	9	0
1996	2,326	24	1
1997	1,418	5	1
1998	1,852	12	0
1999	1,585	7	1
2000	1,512	12	2
2001	2,228	6	1
Total	38,497	244	28

が、この時期に使用した試薬 (ELISA 法) では偽陽性反応が出やすいためと考えられた。1988 年からは偽陽性検体数は減少したが、これは検体数が減少したことに加えて、スクリーニングに偽陽性反応が少ない PA 法を導入したことによると思われる。

HIV 抗体検査に関しては、献血者の問題がある。欧米の献血者の 10 万人あたりの HIV 抗体陽性率をみると、フランスでは 1993 年の 4.7 人から 1998 年には 1.7 人へ、イタリアでも同様に 6.1 から 1.9 人へと減少しており、他の欧米諸国でも同様の傾向を示した¹⁰⁾。ところが、日本では 1987 年に献血者 10 万人あたり抗体陽性者は 0.134 人であったが、徐々に上昇し 2001 年には 1.368 人に達し¹¹⁾、これは欧米諸国の動きと逆行している。この抗体陽性率を首都圏に限定すると 1999 年のそれは 2.64 人で、フランスやイタリアを越えている。これは、日本の HIV 感染者の増加を反映した結果と考えられる。

フランスやイタリアでは新たな AIDS 患者の発生は減少傾向にあるものの 2001 年の患者総数は両国とも 5 万人を超えており¹⁰⁾、日本の 2002 年 6 月時点における 2,388 人と比較しても 20 倍以上と多い。献血者が HIV の感染やそのリスクファクターを認識せずに献血したと仮定すると、国内での献血者の陽性率は単純計算しても、現状よりも 1 桁少なくなると推定される。このように、欧米各国に比べて現実には国内の献血において抗体陽性率が高いのは、検査目的の献血が多いことと推測される。これは、血液の安全性確保に重大な障害である。特に、2010 年には国内の AIDS 患者累積数が 8,000 人、年間 HIV 感染数が 8,500 人に達すると推計されており¹²⁾、患者及び感染者の増加によってさらに陽性率が上昇すると考えられる。

日本赤十字血液センターでは、感染初期で血液中にウイルスが存在するにもかかわらず、抗体が出現しないウィンドウ期に献血された血液からの感染を防ぐ目的で、1999 年から核酸増幅検査 (NAT) を導入した¹³⁾。NAT を導入することでウィンドウ期は抗体検査に比べて 11~16 日程度短縮されるもの¹⁴⁾、依然としてウィンドウ期は存在することから、検査目的の献血を阻止することが重要である。そのためには、供血者の自覚を促す教育と共に、受け皿として公的検査機関における検査を活用する必要がある。しかし、公的検査機関の検査窓口は献血のように移動することができず、又検査日も限定されるなど、必ずしも容易に検査を受けることができる体制にはなっていない。このため、公的検査機関が HIV 検査希望者の真の受け皿となるには、休日及び時間外や公的検査機関以外の窓口での受け付けなどの方法についても検討する必要があるかもしれない。

一部の自治体では試験的に保健所採血について、NAT を

行うことを公表した上で、抗体検査を実施したところ、被験者の関心が高く、導入前に比べて 30% の検体数増加が認められたと報告している¹⁵⁾。NAT 検査を導入することで検査数が増加するマグネット効果があるとすれば、公的検査機関での検査でもこれを積極的に導入し、検査数の増加を図る必要があると考えられる。

4. 確認試験による HIV 抗体陽性数

1986 年からの依頼検査では 28 件の HIV 抗体陽性例を確認した (Table 2)。HIV 抗体の確認試験で陽性となった検体の依頼は、検査開始当初の 1987 年と 1988 年に集中しており、その後は散発的であった。

1986 年の 5 検体と 1987 年の 58 検体については確認試験を鳥取大学に依頼した。その結果は 5 例が HIV 抗体陽性であった。1987 年 3 月からは衛研でも IF 法による確認試験を開始したが、同年 7 月までは同大学への依頼を併行して実施した。この間に鳥取大学で 3 名の抗体陽性例を検出したが、我々もこれを独自に確認したため、同年 8 月からは衛研単独で IF 法による確認試験を始めた。1988 年からは WB 法を併用した。

衛研が行った IF 法による確認試験は、外部委託した初期の 63 検体を除いて、1994 年までに 106 検体であった。この内、18 検体が陽性となり、IF 価は概ね 1:40~1:640 の範囲に分布していた。二次抗体を用いる間接 IF 法では非特異蛍光が出やすいことが知られているが、HIV の持続感染 TALL-1 細胞を IF 抗原とした場合でも、細胞の辺縁部と核の陥凹部で発する特異蛍光以外に、細胞質内で瀰漫性に粒子状の蛍光が観察されるなど、特異的とは思えない所見を呈する検体が認められた。これらは後にあるいは同時に行った WB 法によって非特異反応であることが確認され、その判別は比較的容易であることが判明した。

これまで我々が検出した 28 検体全ての HIV 陽性血清について、WB 法による確認を行った結果、HIV 感染の判定の基準となる env 蛋白 (gp160, gp120, gp41) と、その他の構成蛋白である p52, p34, p24 のバンドがすべての検体で検出された。一方、それ以外の HIV 特異バンドである p68, p55, p40, p18 の出現は検体によってまちまちであった。

ELISA 法によるスクリーニング試験で陽性あるいは判定保留とされた 82 検体で確認試験によって陽性となった 6 検体を除いて、3 検体で p24 あるいは p18 のバンドが検出された。

PA 法で陽性となった 145 検体については、確認試験で 22 検体が HIV-1 陽性となり、24 検体で様々なバンドが出現し判定保留となった。この 24 検体について、最も出現頻度が高いバンドは p24、次いで p18 であった。gp160 に

対しては4検体が弱く反応し、この中には判定保留として10日後の再採血でHIV-1感染を確認した1事例が含まれている。

確認試験で陽性あるいは判定保留となった55検体は、可能な限り全血採血による再採血を依頼した。しかし、再採血できたのは31件で、この内の6件は血清であった。このうち1検体が初回検査でWB法でgp160とp24が検出され判定保留であったが、再採血した検体ではWB法でgp160、gp120及びgp41が検出されHIV感染が確認された。再採血検体でHIV陽性が確認された4検体を除く、残りの27検体の大半の検体では初回検査の際に検出されたバンドと同一のバンドが出現していたが、一部の検体ではそのバンドは消失していた。また、初回検査で生じたバンドと同一バンドが検出された再採血検体については、同時に検査した初回検体と比較して、反応が強くなることはなく、新たな特異バンドも出現しなかった。再採血検体については通常の抗体検査に加えてp24抗原検出とPCRあるいはRT-PCR試験を実施した。その結果、これらの検体ではp24抗原も検出されず、PCR検査でも陰性となったことから、最終的に27検体はHIV感染陰性と判定した。HIV抗体陽性の4検体ではWB法およびPCR法が陽性となったものの、p24抗原は陰性であった。

1987年以降の陽性検体についてペプチラブによるHIV-1/HIV-2の鑑別を行った結果、28検体全てがHIV-1に対する抗体であり、HIV-2感染は認められなかった。

5. PCR 検査結果

再採血血液からPBMCを得ることが出来た25検体の内の18検体についてPCRでHIV遺伝子の検出を試みた。SK29/SK30、SK38/SK39、SK68/SK69による1st PCRでは明瞭なバンドは確認されず、各々に特異的なプローブによるハイブリダイゼーションでは、3件が陽性となった。PCR陽性の3検体では、LTRを増幅するSK29/SK30とそれに対応したプローブによるハイブリダイゼーションでは陰性となった。これは、プローブ作成時にテンプレートに用いたプラスミドに組み込んだHIV遺伝子の塩基配列が検体のそれと一致していなかったのか、あるいはプライマーが一致しなかったことが原因であると考えられるが、詳細は不明である。

RT-PCRでは血清中の遊離HIVの遺伝子を検出できるため、1999年以降にPA法で陽性となった25検体の血清について本法による遺伝子検出を行い、確定診断の一助とした。その結果、WB法でHIV感染が確認された4検体から逆転写酵素、プロテアーゼあるいはV3領域が増幅され、RT-PCR法の確認試験法としての有用性が確かめられた。

また、1991年以後のHIV陽性の保存血清7検体についてもウイルスRNAを抽出しRT-PCRを行った結果、4検体が陽性となり、3検体が陰性であった。RT-PCR陽性となった検体の保存期間は比較的短かったことから、RT-PCRに対しては検体(血清)の保存による影響があるのかもしれない¹⁸⁾。

6. HIV 分離

HIV感染が確認された4検体から得られたPBMCについてHIVの分離を行った。この内の2検体の培養上清でp24抗原が検出され、さらにそれらの培養細胞がIF法でもHIV抗原が陽性となり、ウイルスの分離が確認された。この2検体は共に医療機関からの依頼で、1名は既にAIDSを発症、他の1名は無症候性キャリアーと診断され、採血時点では両名共に抗HIV薬の投与は受けていなかった。

結 論

兵庫県立健康環境科学研究所では1986年6月より2001年末までに38,493検体のHIV抗体スクリーニングを行い、28件の陽性例を検出した。検体数は国内初の女性AIDS患者の発生した1987年に8,324件の最大数を示した後は漸減し、近年は毎年1,500~2,000件を推移している。国内では新たなHIV感染者が徐々に増加しており、AIDS拡大へのターニングポイントへと着実に向かっているように思われる。AIDS制圧のためにも、今後公的検査機関におけるHIV検査体制を見直し感染者の早期発見による新たな感染抑止と既感染者の早期治療によるAIDS発症抑制に務めることが急務である。

謝 辞

本調査に当たり、検体の採取にご協力を頂いた兵庫県県民生活部医療課疾病対策室結核感染症係及び健康福祉事務所の関係者の皆様に深謝いたします。

文 献

- 1) 厚生労働省健康局疾病対策課：日本のAIDS患者・HIV感染者の状況. 病原微生物検出情報, 23, 207-209 (2002)
- 2) 速水正憲, 奥村恭司, 水野顕子, 伊吹謙太郎, 岡田峰幸, 金明鎬, 井戸栄治: HIV-1/2PAコンビネーションタイプによるHIV-1抗体及びHIV-2抗体の検出. 医学と薬学, 31, 943-951 (1994)

- 3) Butler, P.J.G. : Biological safety when working with HIV. *in* Karn, J. (ed.), *HIV Virology and Immunology*, vol.1, p.3 20, IRL Press, New York (1995)
- 4) Ou, C.-Y., Kwok, S., Mitchell, S.W., Mack, D.H., Sninsky, J.J., Krebs, J.W., Feorino, P., Warfield, D. and Schochetman, G. : DNA amplification for direct detection of HIV-1 in DNA of peripheral blood mononuclear cells, *Science*, **239**, 295 297 (1988)
- 5) 久保田俊一郎, 武部 豊 : ジゴキシゲニン標識プローブによる遺伝子発現の検出. *蛋白質核酸酵素*, **41**, 486 493 (1996)
- 6) He, Y., Coutlee, F., Saint-Antoine, P., Olivier, C., Voyer, H. and Kessous-Elbaz, A. : Detection of polymerase chain reaction amplified human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA with a digoxigenin labeled RNA probe and an enzyme linked immunoassay, *J.Clin.Microbiol.*, **31**, 1040 1047 (1993)
- 7) Krogstad, P. and Zack, J.A. : Detection of viral DNA by the polymerase chain reaction (PCR). *In* Karn, J. (ed.), *HIV Virology and Immunology* vol.1, p.143 150, IRL Press, New York (1995)
- 8) 大阪府立公衆衛生研究所 感染症解析プロジェクト委員会 : 感染症検査マニュアル, p.129 156, (2000)
- 9) Tersmette, M., Koot, M., Goede, R.Y., Kootstra, N. and Schuitemaker, H. : Isolation and biological characterization of primary HIV-1 isolate. *In* Karn, J. (ed.), *HIV Virology and Immunology*, vol.1, p.48 61, IRL Press, New York (1995)
- 10) European Center for the Epidemiological Monitoring of AIDS : HIV / AIDS Surveillance in Europe, End-year report 2001, **66**, p.13 -24, EuroHIV, Saint-Maurice (2002)
- 11) 清水 勝 : 一般集団における HIV 感染のモニタリング成績. 木原正博編, 平成 11 年度厚生科学研究費補助金エイズ対策事業 HIV 感染症の疫学研究 研究報告書, p. 393 409, (2000)
- 12) 橋本修二 : HIV 感染者数と AIDS 患者数の将来予測に関する研究. 木原正博編, 平成 11 年度厚生科学研究費補助金 エイズ対策事業 HIV 感染症の疫学研究 研究報告書, p. 17 18, (2000)
- 13) 横山繁樹 : わが国の血液事業における核酸増幅検査 (NAT) の現状と血液事業への影響. *日本輸血学会雑誌*, **48**, 279 285 (2000)
- 14) Morandi, P.-A., Schockmel, G.A., Yerly, S., Burgisser, P., Erb, P., Matter, L., Sitavanc, R. and Perrin, L. : Detection of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) RNA in pools of sera negative for antibodies to HIV-1 and HIV-2. *J.Clin.Microbiol.*, **36**, 1534 1538 (1998)
- 15) 関根大正 : HIV スクリーニング検査体制と検査結果に関する研究. 今井光信編, 厚生科学研究費補助金エイズ対策研究事業 HIV の検査法と検査体制を確立するための研究 平成 13 年度研究報告書, p.73 84, (2002)
- 16) Essex, M. and Kanki, P.J. : Human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2). *In* Broder, S., Merigan Jr, T.C. and Bolognesi, D. (ed.), *Text book of AIDS Medicine*, p.873 886, Williams & Wilkins, Baltimore (1994)
- 17) Loussert-Ajaka, F., Chaix, M. L., Korber, B., Letourneur, F., Gomas, E., Allen, E., Ly, T. D., Brun-Vezinet, F., Simon, F. and Saragosti, S. : Variability of human immunodeficiency virus type 1 group O strains isolated from Cameroonian patients living in France. *J.Virol.*, **69**, 5640 5649 (1995)
- 18) Ginocchio, C.C., Wang, X.-P., Kaplan, M.H., Mulligan, G., Witt, D., Romano, J.W., Cronin, M. and Carroll, R. : Effects of specimen collection, processing, and storage conditions on stability of human immunodeficiency virus type 1 RNA levels in plasma. *J.Clin.Microbiol.*, **35**, 2886 2893 (1997)

(受理 2002 年 12 月 5 日)