

遺伝子型による HIV 薬剤耐性検査法の検討 —プライマーの検討及び検査材料 (HIV・RNA とプロゲノム) の比較—

分担研究者：今井 光信

共同研究者：近藤真規子、向出 雅一、川田かおる、伊藤 章

目的

遺伝子型による HIV の薬剤耐性検査を行うにあたり、遺伝子増幅に用いるプライマーの設定は極めて重要であり、遺伝子解析の感度および精度に大きな影響を与える。今回は、検査材料として血中の HIV・RNA とリンパ球中の HIV・DNA を用いて、プライマーにより解析結果がどのような影響を受けるかを調べる目的で研究を行った。

試料と方法

試料

長期間に亘り抗 HIV 剤の投与を受けていた患者 Y7 (サブタイプ B)、GM4 (サブタイプ B)、H129 (サブタイプ E) の 3 名から経時的に血液を採取し、血漿および末梢血単核球 (PBMC) から HIV 遺伝子を抽出し試料として用いた。

方法

HIV-1 のサブタイプ B、E について薬剤耐性変異を解析するため、プロテアーゼ (Pro) 遺伝子から逆転写酵素 (RT) 遺伝子までの約 1.1~1.8Kbase を増幅できる 5 種類のプライマーを作製した (図 1)。これらプライマーを用いて患者のリンパ球中プロゲノムおよび血中 HIV・RNA を増幅し、クローニングなしに直接法により塩基配列を決定し、耐性変異の解析を行った。

結果

3-1. 血漿中 HIV・RNA の薬剤耐性変異の解析 (表 1 A, B)

5 種類のプライマーセットを用いて血漿中の HIV・RNA 遺伝子を増幅後、塩基配列を決定し、薬剤耐性との関与が報告されている RT 遺伝子の変異について解析した。患者 Y7、H129 共に 5 種類のプライマーセットでほぼ同一の結果が得られたが、プライマーによって一部異なる結果が認められた。患者 Y7 では RT 阻害剤の一次変異 215 番ア

ミノ酸 (AZT 耐性に関与 Thr→Tyr or Phe) においてどのプライマーセットを用いても変異型のみを検出していたが、同じ変異型でもプライマーセット③では Tyr のみを検出し、プライマーセット④-1、④-2 では Phe のみを検出した (表 1 A)。

また、患者 H129 では H129-19、H 129-34 ではプライマーによる違いは認められなかったが、H 129-41 ではプロテアーゼの 46 番 (一次変異) と、20 番および RT の 69 番でプライマーセットによる違いが認められ、感受性型のみ、変異型のみ、あるいは両方の混合型を検出する場合があった (表 1 B)。

3-2. 血漿中 HIV・RNA と PBMC 中 HIV プロゲノムとの比較 (表 2 A, B, C)

血漿中の HIV・RNA の解析では患者 Y7, H129 ともにどのプライマーを用いても比較的均一な結果が得られたが、PBMC 中のプロゲノムの解析では同じサンプルでもプライマーの組み合わせにより解析結果が異なり、変異型のみ検出される場合、逆に感受性型のみが検出される場合、あるいは両者の混合型を検出される場合とがあり、結果は複雑であった。

結論

血中 HIV・RNA の解析ではプライマーによる違いはほとんど認められなかった。血中ではその時点での状況に最も適応した HIV 株が優勢となっているため、薬剤耐性検査においても比較的均一な結果が得られたと考えられる。

一方、PBMC 中には薬剤投与前および投与後に生じたいろいろな変異がプロゲノムとして蓄積されており、用いる PCR プライマーによりその中の特定の HIV 遺伝子が選択増殖されるものと考えられる。

血中 HIV・RNA には耐性変異のみが検出される場合でも PBMC 中には感受性のプロゲノムも多数存在している可能性があり、耐性変異の検査結果

の評価や薬剤の選択・変更に際してはこれらの可能性にも十分留意することが必要である。

図1 プライマー位置

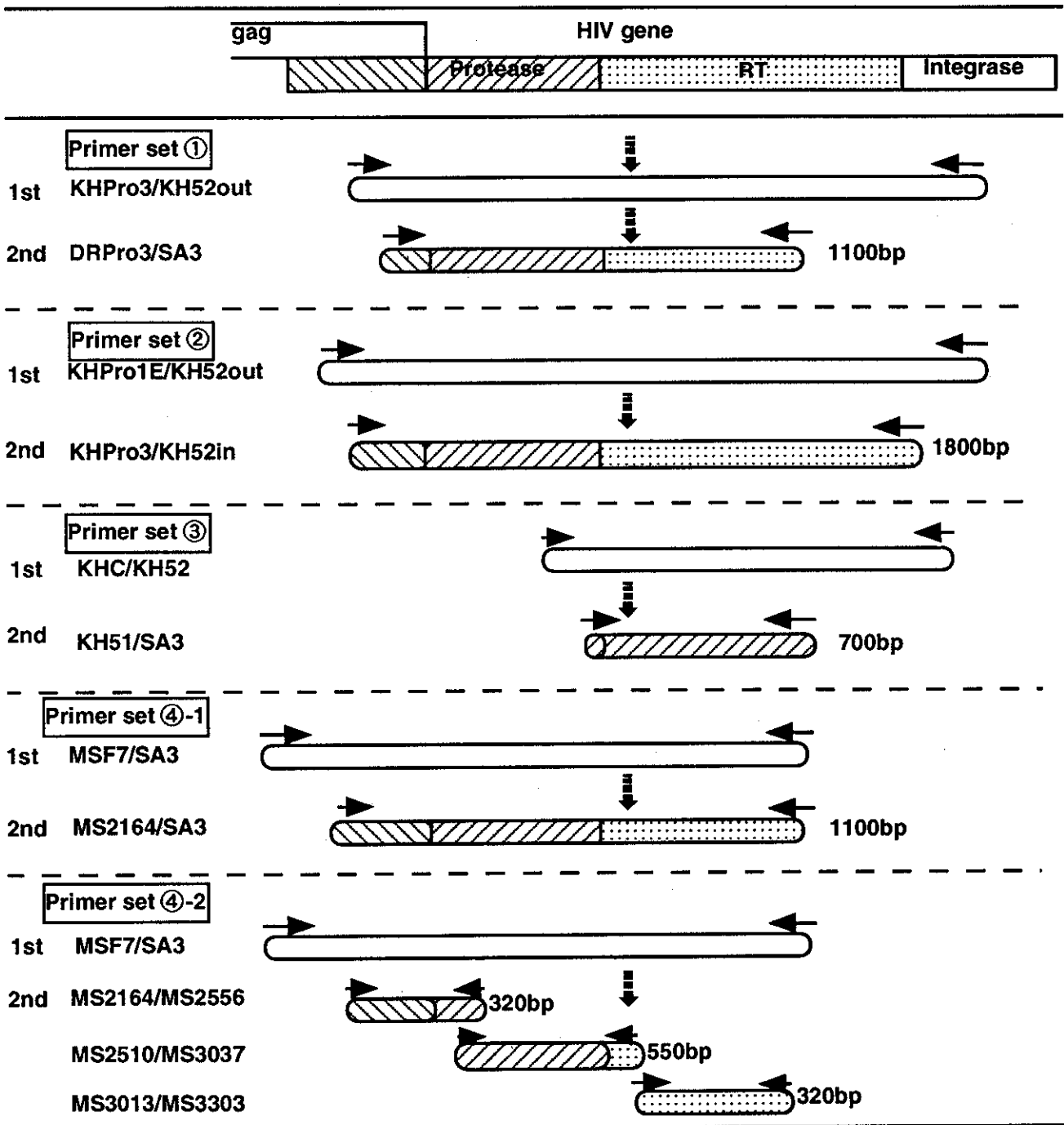


表1 血漿中HIV-RNAの薬剤耐性変異の解析

A

Sample	Primer set	PCR	Protease *							Reverse transcriptase*				
			10 Leu	36 Met	63 Leu	71 Ala	73 Gly	90 Leu	41 Met	70 Lys	184 Met	210 Leu	215 Thr	
Y7-11 (1998.8)	①	-												
	②	-												
	③	+	-	-	-	-	-	-	Leu	Arg	Val	Trp	Tyr	
	④-1	+	Ile	wt/Ile	wt	wt	wt	Met	Leu	Arg	Val	wt	Phe	
	④-2	+	Ile	wt/Ile	wt	wt	wt	Met	Leu	Arg	Val	wt	Phe	
Y7-101 (1999.5)	①	-												
	②	-												
	③	+	-	-	-	-	-	-	Leu	Arg	Val	Trp	Tyr	
	④-1	+	Ile	wt	wt	Thr	Ser	Met	x	x	Val	Trp	Phe	
	④-2	+	Ile	wt	wt	Thr	Ser	Met	Leu	Arg	Val	Trp	Phe	

表1 血漿中HIV-RNAの薬剤耐性変異の解析

B

Sample	Primer set	PCR	Protease*					Reverse transcriptase*					
			10 Leu	20 Lys	46 Met	63 Leu	90 Leu	41 Met	69 Thr	70 Lys	103 Lys	184 Met	215 Thr
H129-19 (1997.10)	①	-											
	②	-											
	③	-											
	④-1	+	wt	wt	wt	Pro	wt	Leu	Asp	wt	wt	Val	Phe
	④-2	+	wt	wt	wt	Pro	wt	Leu	Asp	wt	wt	Val	Phe
H129-34 (1998.12)	①	-											
	②	-											
	③	-											
	④-1	+	x	x	x	x	x	Leu	wt	wt	wt	Val	Phe
	④-2	+	wt	wt	wt	Pro	wt	Leu	wt	wt	wt	Val	Phe
H129-41 (1999.6)	①	+	Val	Arg	Ile	Pro	Met	Leu	wt	wt	wt	Val	Phe
	②	-											
	③	+	-	-	-	-	-	Leu	wt	wt	wt	Val	Phe
	④-1	+	Val	Arg/Thr	wt/Ile	Pro	Met	Leu	wt/Asp	wt	wt	Val	Phe
	④-2	+	Val	Arg/Thr	wt/Ile	Pro	Met	Leu	wt/Asp	wt	wt	Val	Phe

* ; 耐性との関与が報告されているアミノ酸のうち、変異のあったものを記載.

■ は一次変異のアミノ酸を表す. wt;wild type,感受性型を示す.

x ; 解析ができなかったことを示す.

表2 血漿中のHIV-RNAとPBMC中のHIVプロゲノムの比較

A

Sample	Primer set	Protease*						Reverse transcriptase*				
		10 Leu	36 Met	63 Leu	71 Ala	73 Gly	90 Leu	41 Met	70 Lys	184 Met	210 Leu	215 Thr
Y7-11 PBMC	①	x	x	x	x	x	Met	Leu	Arg	Val	wt	Phe
	②	Ile	Ile	wt/Pro	wt	wt	Met	x	Arg	Val	wt	Phe
	③	-	-	-	-	-	-	Leu	Arg	Val/wt	wt	Phe/Tyr
	④-1	wt/Ile	wt/Ile	wt/pro	wt	wt	wt	Leu	Arg	Val	wt	Phe
	④-2	wt/Ile	wt/Ile	wt/Pro	wt	wt	wt/Met	Leu	Arg	Val/wt	wt	Phe/Tyr
RNA	③	-	-	-	-	-	-	Leu	Arg	Val	Trp	Tyr
	④-1	Ile	wt/Ile	wt	wt	wt	Met	Leu	Arg	Val	wt	Phe
	④-2	Ile	wt/Ile	wt	wt	wt	Met	Leu	Arg	Val	wt	Phe
Y7-101 PBMC	③	-	-	-	-	-	-	wt	Arg	wt	wt	Tyr
	④-1	Ile	Ile/wt	Pro/wt	wt/Val	Ser/wt	Met	Leu	Arg	Val	wt/Trp	Phe
	④-2	wt/Ile	Ile/wt	Pro/wt	wt/Val	Ser/wt	Met	Leu	Arg	Val	wt/Trp	Phe
	③	-	-	-	-	-	-	Leu	Arg	Val	Trp	Tyr
	④-1	Ile	wt	wt	Thr	Ser	Met	x	x	Val	Trp	Phe
RNA	④-2	Ile	wt	wt	Thr	Ser	Met	Leu	Arg	Val	Trp	Phe

表2 血漿中のHIV-RNAとPBMC中のHIVプロゲノムの比較

B

Sample	Primer set	Protease*					Reverse transcriptase*					
		10 Leu	20 Lys	46 Met	63 Leu	90 Leu	41 Met	69 Thr	70 Lys	103 Lys	184 Met	215 Thr
H129-19 PBMC	①	x	x	x	x	x	x	wt	wt	wt	Val	Phe
	④-1	wt	wt/Thr	wt	wt/Pro	wt	Leu	Asn	Arg	wt	Val	Phe/wt
	④-2	wt	Arg	wt	Pro	wt	Leu	Asn/wt	Arg	wt	wt	wt
RNA	④-1	wt	wt	wt	Pro	wt	Leu	Asp	wt	wt	Val	Phe
	④-2	wt	wt	wt	Pro	wt	Leu	Asp	wt	wt	Val	Phe
H129-34 PBMC	①	x	x	x	wt	wt	wt	wt/Ala	wt	wt/Asn	wt/Val	wt
	②	wt	Arg	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
	④-1	x	x	x	x	wt	wt	Asp	wt	wt	Val	Phe
	④-2	wt	Arg	wt	Pro	wt	Leu	Asp	wt	wt	Val/wt	Phe
RNA	④-1	x	x	x	x	x	Leu	wt	wt	wt	Val	Phe
	④-2	wt	wt	wt	Pro	wt	Leu	wt	wt	wt	Val	Phe
H129-41 PBMC	②	x	x	x	x	x	x	Asp	wt	wt	Val	Phe
	④-1	Val/Ile/wt	Arg	wt	Pro	Met/wt	Leu	Asn/Asp	wt	wt/Asn	Val	Phe
	④-2	Ile/wt	Arg	wt	pro	wt	Leu	wt	wt	wt	Val	Phe
	①	Val	Arg	Ile	Pro	Met	Leu	wt	wt	wt	Val	Phe
RNA	③	-	-	-	-	-	Leu	wt	wt	wt	Val	Phe
	④-1	Val	Arg/Thr	wt/Ile	Pro	Met	Leu	wt/Asp	wt	wt	Val	Phe
	④-2	Val	Arg/Thr	wt/Ile	Pro	Met	Leu	wt/Asp	wt	wt	Val	Phe

MAGIC-5 細胞を用いた HIV 薬剤耐性検査の検討

分担研究者：今井 光信

協力研究者：須藤 弘二 齋藤 隆行 近藤真規子 蜂谷 敦子
岡 慎一

目的

フェノタイプ(表現型)による薬剤耐性検査は、薬剤耐性を調べるための最も直接的で確実な方法であるが、細胞(PBMC)の入手が必ずしも容易ではなく、また、判定に時間を要するなど、様々な困難があり、実用化されていない。最近、国立感染症研究所の巽らにより、開発されたMAGIC-5細胞は、HIVの培養とHIV感染細胞の検出が容易にできる工夫がされているため、フェノタイプの薬剤耐性変異への応用が期待された。今回、MAGIC-5細胞を用いた薬剤耐性検査の実用性に関して、実際の臨床分離HIV株を用いて検討した。

試料と方法

試料：MAGIC-5細胞

MAGIC-5細胞は国立感染症研究所の巽らによって樹立された細胞株で、今回の実験には国立国際医療センターの岡研究室から分与を受けた細胞株を用いた。

(MAGIC-5細胞はMAGI細胞にCCR-5を発現させた細胞で、HIV感染に必要なレセプターとコレセプターを発現している(図1)。MAGI細胞と同様に感染したHIVが転写・翻訳されると同時に β -galactosidase遺伝子を転写・翻訳するという性質を持っており、X-galで処理することにより青色を呈する。)

HIV株

HIV株は遺伝子検査でAZT耐性に対応する変異が認められない株としてH199-3株(臨床分離株)とHTLV-III_B株の2株を用い、遺伝子検査でAZT耐性に対応する変異が認められた株としてH197-5株(臨床分離株)を用いた。

方法

96穴プレートに 1×10^5 cells/wellずつMAGIC-5細胞を分注し、翌日に培地を取り除き、100-300 PFU

に濃度調整したHIVを50 μ l感染させ、2時間後にAZT入りの培地を200 μ l加えた。2日後にX-galで呈色反応を行い、感染細胞数を測定した(図2)。また、それぞれの検体の測定はduplicateで行った。(AZT存在下での感染細胞数) / (AZT非存在下での感染細胞数)のパーセントの値をグラフ上にプロットし、50%ラインとの交点から感染細胞数を50%におさえる薬剤の濃度(IC₅₀)を求めた。

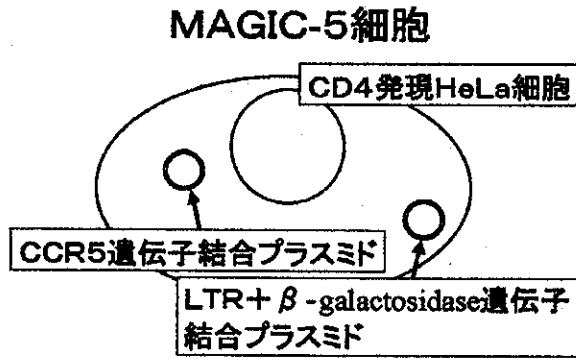
結果

HTLV-III_B株では、AZTなしの時の感染細胞数が平均151.5であり、AZT濃度10nMの時には感染細胞数が67(44.2%)であった。H199-3株(AZT感受性と思われる株)では、AZTなしの時の感染細胞数が157.5であり、AZT濃度10nMの時に感染細胞数が91.5(58.1%)であった。H197-5株(AZT耐性と思われる株)では、AZTなしの時の感染細胞数が195.5であるのに対し、AZT濃度1,10,100nMではほとんど感染細胞数が減少せず、1 μ Mの時に感染細胞数が67(53.5%)であった。(図3)。それぞれのIC₅₀はHTLV-III_B株では8nM、H199-3株では17nMに対し、H197-5株では800nMであった。AZTのIC₅₀はH199-3株とH197-5株との間で47倍、HTLV-III_B株とH197-5株との間で100倍の差がみられた(図4)。

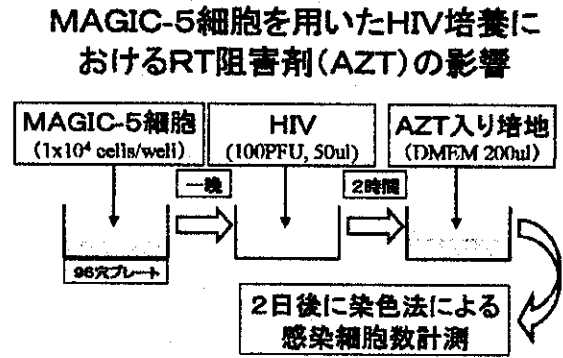
結論

MAGIC-5細胞では、感染後2日目にHIV感染を確認できるため従来法に比べ薬剤耐性の判定に要する時間を大幅に短縮できることが分かった。また β -galactosidaseによる発色系を用いることから、比較的簡便且つ低コストで定量判定できることも確認できた。但し、今回はAZTを用いて検討を行ったが、他の抗HIV剤に対する測定条件については今後さらに検討を要する。

(図 1)



(図 2)



(図 3)

MAGIC-5細胞を用いたHIV培養におけるRT阻害剤(AZT)の影響

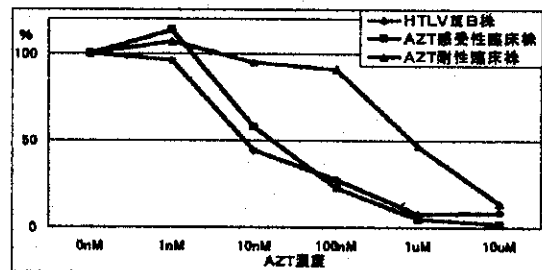
	0nM	1nM	10nM	100nM	1uM	10uM
HTLV3B	151.5	146	67	41.5	11.5	12.5
	100	96.4	44.2	27.4	7.6	8.3
H199-3	157.5	179	91.5	36	7	2.5
	100	113.7	58.1	22.9	4.4	1.6
H197-5	195.5	209.5	185.5	178	91	27
	100	107.2	94.9	91.0	48.5	13.8

上段: duplicateでみた感染細胞数の平均

下段: (AZT存在下での感染細胞数) / (AZT非存在下での感染細胞数) (%)

(図 4)

MAGIC-5細胞を用いたHIV培養におけるRT阻害剤(AZT)の影響



我が国における薬剤耐性変異の推移

協力研究者：杉浦 亘（国立感染症研究所エイズ研究センター）

背景

今日、日本においては抗HIV-1治療薬剤は8種類の逆転写酵素阻害剤と5種類のプロテアーゼ阻害剤の合わせて13種類が使用可能である。これらの薬剤はいずれも薬剤耐性変異を誘導することが知られている。薬剤耐性ウイルスの出現は抗HIV-1治療の失敗の大きな原因であり、治療薬剤選択の指標としての薬剤耐性検査の必要性がいわれている。

方法

長期にわたり追跡されているHIV-1感染者201名を対象に遺伝子型による耐性変異の推移を調査した。遺伝子型は全て患者血清中ウイルス由来のウイルスRNAより行なった。

結果

図1はコドン別に見た薬剤耐性変異の症例数である。白棒と黒棒はそれぞれ各症例の調査開始時点と終了時点の変異数を集計したものである。ここに示すようにいずれのコドンをも耐性変異数が増加している。図2は図1の結果を薬剤ごとに分かりやすくまとめたものである。薬剤ごとにまとめてみるとAZT, 3TCに対する耐性変異症例数が著しく高くまた増加率ではプロテアーゼ阻害剤に対する変異が大きく増加していることが明らかになった。

図3は多剤耐性の点からまとめてみたものである。3剤以上を多剤耐性変異とすると調査

開始時点の集計では全体の15%であったものが調査終了時点では50%近くに達している

ことが明らかになった。

結論

今回の調査が示したように薬剤耐性症例数はプロテアーゼ阻害剤などの使用可能薬剤が増えた以後急増している。多剤耐性症例も確実に増えており深刻な事態となりつつある。新たな薬剤の実用

化を期待するとともに、適切な薬剤を選択するためには薬剤耐性検査を行なうことが必要と思われる。

（この研究は感染症研究所エイズ研究センターと医薬品機構との共同研究で行われた）

図1 コドン別に見た耐性変異の推移

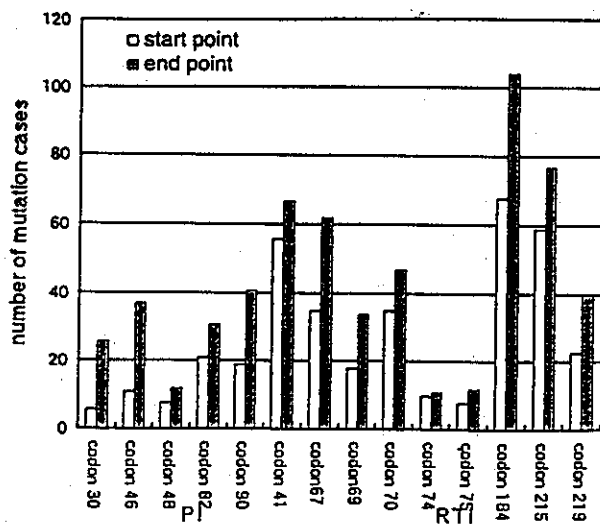


図2 薬剤別に見た耐性症例の推移

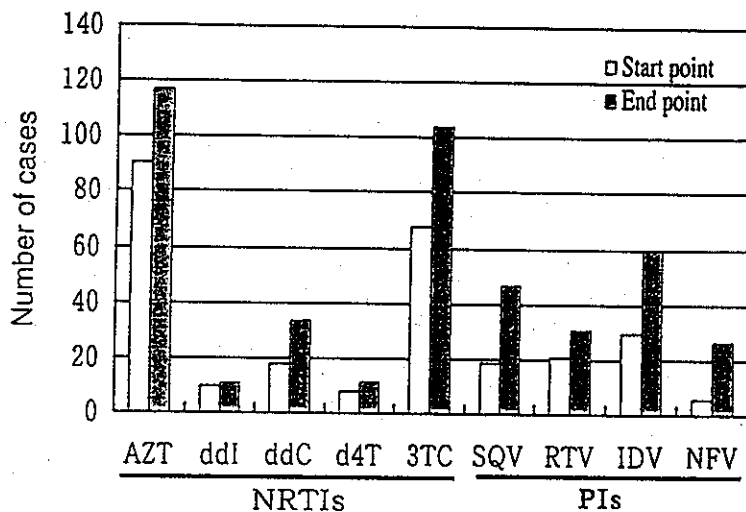
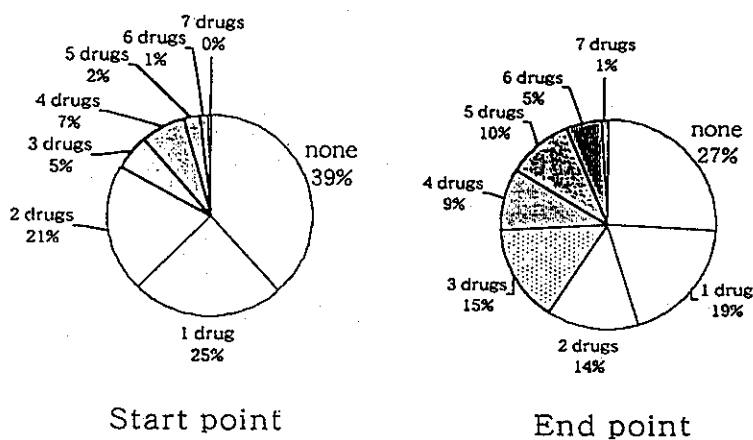


図3 多剤耐性変異の推移



PBMC を用いたブランク法による薬剤耐性 HIV-1 の検出

協力研究者：加藤 真吾（慶應義塾大学医学部微生物学教室）

A. 要旨

HIV-1 感染者の末梢血単核球 (PBMC) 中感染性ウイルスの薬剤耐性を直接検査するために、PBMC を用いたブランクハイブリダイゼーション法を応用した。抗レトロウイルス療法を受けている 17 人の感染者を経時的に検査した結果、8 人から薬剤耐性 HIV-1 が検出された (逆転写酵素阻害剤耐性が 8 例、プロテアーゼ阻害剤耐性が 4 例)。そのうち、交差耐性がプロテアーゼ阻害剤に対して 3 例見つかったが、逆転写酵素阻害剤に対してはなかった。対象症例の二次的治療における薬剤の選択は検査結果を参考に行ったが、変更後の薬剤に対しても耐性を獲得する現象が 6 例で認められた。以上の結果から、サルベージ療法では同じクラスの薬剤をなるべく避けて多剤耐性ウイルスの出現を極力抑えるべきであることが示唆された。また、表現型による薬剤耐性試験は、薬剤耐性 HIV-1 の出現を的確に判定できるが、サルベージ療法における薬剤選択に利用するためにはさらに検討する必要があると考えられた。

B. 目的

HAART 療法の導入によって HIV-1 感染症に対する抗レトロウイルス治療が飛躍的に向上した。しかし一方では、HAART 療法を受けている患者から薬剤耐性 HIV-1 が次々に分離されている。この薬剤耐性 HIV-1 の出現は、アドヒアランスや薬物動態の問題と並んで、抗レトロウイルス治療失敗の主要な原因の一つとなっている。したがって、感染個体内の HIV-1 の薬剤耐性を正確に判定することは、HIV-1 感染症の治療を効果的に進めるために極めて重要と考えられる。

HIV-1 の薬剤耐性を調べる方法は遺伝型によるものと表現型によるものに大別される。遺伝型による薬剤耐性検査は簡便であるが、アミノ酸変異の解釈が難しく、新薬に対応できないという欠点がある。表現型による方法はウイルスそのものの薬剤耐性を調べるためデータの信頼性が高いといえ

る。本研究では、PBMC を用いたブランクハイブリダイゼーション法を応用し、抗レトロウイルス療法を受けている感染者の血中 HIV-1 の薬剤耐性を表現型によって検査し、その結果をいかに治療に活用すべきかを検討した。

C. 方法

感染者の PBMC と 3 日間培養した健常人の PBMC を 1:2 の割合で混合し、アガロースゲルに包埋した後、その上に薬剤を含む培地を加えて 7 日間培養し、産生した HIV-1 をナイロン膜にプロットし、ハイブリダイゼーションによって感染中心を計数した。まず、HIV-1 野性株 (LAI) による感染中心の形成を完全に抑える薬剤濃度を各種薬剤に対して求めて薬剤耐性濃度とし、この濃度の薬剤存在下で感染中心を形成した感染者由来 HIV-1 を薬剤耐性と判定した。

D. 結果

HIV-1 LAI 株を用い nelfinavir 濃度を変えてブランクハイブリダイゼーション法を行った結果を図 1 に示す。100 nM で活性中心の形成が完全に抑制されたので、この濃度を耐性判定濃度とした。他の薬剤に対しても同様の実験を行い耐性判定濃度を求めた。その結果は、AZT が 0.05 μM 、ddI が 10 μM 、ddC が 3.0 μM 、3TC が 3.0 μM 、d4T が 1.0 μM 、nevirapine が 0.3 μM 、saquinavir が 0.1 μM 、indinavir が 0.1 μM 、ritonavir が 0.3 μM 、nelfinavir が 0.1 μM であった。

以上の方法を用いて、抗レトロウイルス療法を受けている 17 人の感染者を対象に薬剤耐性 HIV-1 を経時的に検査した。その結果、8 人から薬剤耐性 HIV-1 が検出された。抗レトロウイルス治療歴と薬剤耐性 HIV-1 出現との関係を表 1 にまとめる。逆転写酵素阻害剤耐性は 8 例、プロテアーゼ阻害剤耐性は 4 例で認められた。そのうち、交差耐性 (使用中のある薬剤に対して耐性を獲得した HIV-1 が他の未使用の薬剤に対しても同時に耐性となる現

象)がプロテアーゼ阻害剤で3例見つかったが、逆転写酵素阻害剤では見られなかった。薬剤耐性 HIV-1 が検出された症例では、検査結果を参考に二次的薬剤の選択を行った。しかし、変更後の薬剤に対しても耐性を獲得する現象が6例で認められた。

E. 考察

プロテアーゼ阻害剤に対する薬剤耐性では4例中3例で交差耐性が認められたことから、最初の治療が失敗したあと薬剤を変更する治療、すなわちサルベージ療法では、同じクラスの薬剤をなるべく避けるべきであることが示唆された。本研究で検査対象とした症例では、検査結果を参考に二次的治療の薬剤選択を行ったが、変更後の薬剤に対して耐性となる現象が7例中6例で求められた。したがって、表現型による薬剤耐性試験は、薬剤耐性 HIV-1 の出現を的確に判定できるが、サルベージ療法における薬剤選択に利用するためにはさらに検討を重ねる必要があると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Negishi, M., Umezawa, A., Katayama, M., Kanda, T., Oguma, T., Maruyama, H., Murata, M., Ohata, Y., Hiraishi, Y., Sugaita, T., Kato, S., and Hata, J. HIV Autopsy - Characterization of zidovudine-resistant subtype E HIV-1 from autopsy tissue suggests the route of infection and an alternative protocol of therapy - Keio Journal of Medicine 48(1), 44-52, 1999

2. 学会発表

1. 清水香代子、平石佳之、杉田哲佳、小林芳夫、加藤真吾. HIV-1 サブタイプの迅速同定法. 第12回臨床微生物迅速診断研究会総会、松江、1999年6月
2. 加藤真吾、清水香代子、根岸昌功、山下直哉、鎌倉光宏、杉田哲佳、小林芳夫. HIV-1のサブタイプと遺伝子診断. 日本感染症学会第48回東日本地方会総会、東京、1999年10月
3. 照沼裕、楊栄閣、Handema Ray、何麗敏、花房秀次、滝正志、山本泰之、藤村吉博、立浪忍、吉田孝人、加藤真吾、伊藤正彦、三間屋純一. HIV-1長期未発症者でのCCR-5とSDF-1の遺伝子多型およびケモカインレセプター表出細

胞の割合の検討. 第13回エイズ学会、東京、1999年12月

4. 花房秀次、田上尚道、杉田哲佳、加藤真吾. 1999年における抗HIV療法の評価と課題. 第13回エイズ学会、東京、1999年12月

図1. プラークハイブリダイゼーション法によるLAI株の感染中心数のnelfinavir濃度依存性.

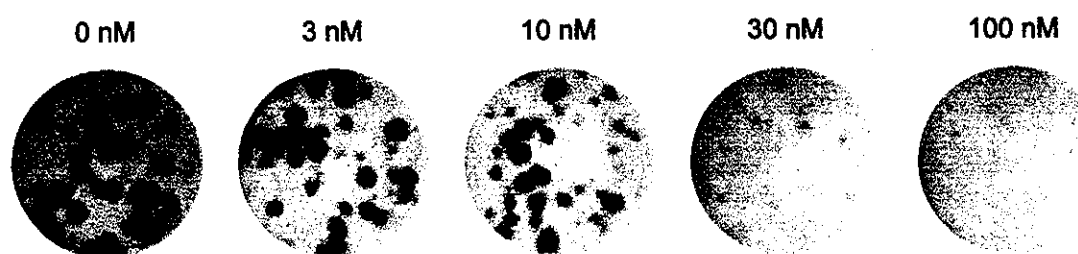


表 1. 感染者の抗レトロウイルス治療歴と薬剤耐性 HIV-1 の検出

Patient	Antiretroviral therapy*	Drug resistance [†]
H18	AZT (0) → ddi (21) → d4T/ddI (53)	AZT (29), ddi (29)
H22	AZT (0) → ddi (27) → d4T (38) → RTV/ddC (46) → NFV/d4T/3TC (57)	d4T (44), RTV (54) [‡]
H33	AZT (0) → ddi (16) → d4T (23) → RTV/ddC (31) → SQV/ddC (35) [§] → AZT/3TC (40) → d4T/3TC (45)	AZT (9), ddi (21), d4T (28), 3TC (42)
H47	AZT (0) → AZT/3TC (56) → NFV/d4T/3TC (70)	AZT (41)
H102	AZT (0) → ddi (4) → SQV/ddC (14) → NFV/d4T/3TC (23) [¶]	AZT (0.5), ddi (7), SQV (21), RTV (23)
H112	AZT (0) → ddC (4) → AZT/ddC (12) → d4T (23) → IDV/ddI (33)	AZT (21)
H211	AZT (0) → AZT/ddI (30) → RTV/AZT (40) → SQV/AZT/3TC (45) → NFV/AZT/3TC (51) → SQV/RTV/d4T (54) → ddi/d4T/3TC (58) [¶]	AZT (24), RTV (43), IDV(44), SQV (46), NFV (46), 3TC (49), d4T (56), ddi (59)
H225	AZT (0) → d4T (14) → SQV/ddC (28) → NFV/d4T/3TC (37)	AZT (13)

括弧内の数字は抗レトロウイルス治療を開始してからの週数を示す。

AMPLICOR HIV-1 MONITOR™ Test, version 1.5 の基礎的検討

研究協力者：伊藤 章（横浜市大医学部付属病院臨床検査部）

共同研究者：川田かおる、小川 登、満田 年宏、近藤真規子、
今井 光信

目的

血中 HIV-1 RNA 量を正確に把握することは HIV-1 感染者の経過観察および抗 HIV 薬による治療効果の判定には必要不可欠である。しかし、現在我が国で使用されている AMPLICOR HIV-1 MONITOR™ Test, version 1.0 (Roche 社) はサブタイプ B をもとにプライマーが設計されているため、サブタイプ E や A では測定できないか測定値が低値となることが知られている。

今回これらの問題を解決するため改良された version 1.5 について、同時再現性・希釈直線性・version 1.0 との関連の検討を行った。

材料と方法

1. 材料

神奈川県衛生研究所において分離された HIV-1 subtype B および E ウイルスと横浜市立大学医学部附属病院外来通院中の HIV 感染者から同意を得て採取した血清を使用した。

2. 方法

測定方法は Standard 法と Ultra Sensitive 法で、ともにキットの説明書に従って実施した。version 1.5 キットで改良されたものはプライマーで、version 1.0 では SK462 (forward) と SK431 (reverse) とを使用していたが、version 1.5 では SK145 (forward) と SKCC1B (reverse) を使用しており、reverse プライマーの位置が SK431 の外側である。また、増幅反応においてもサイクル数や温度が若干異なっている。

同時再現性と希釈直線性はウイルス希釈液を、version 1.0 と version 1.5 の関連は患者血清を使用した。

成績

1. 同時再現性

Subtype B の Standard 法では対数変換値の C.V.% が 1.2 から 3.1 であった (Table 1)。Subtype E の Standard 法では対数変換値の C.V.% が 2.2 から 5.9 であった (Table 2)。Subtype E の Ultra Sensitive 法は対数変換値の C.V.% が 2.5 から 22.5 であった (Table 3)。

2. 希釈直線性

Standard 法の希釈直線性では Subtype E、Subtype B とも良好な直線が得られた (Fig 1)。Ultra Sensitive 法の希釈直線性でも Subtype E、Subtype B とも良好な直線が得られた (Fig 2)。

3. 相 関

version 1.0 で 400 コピー/ml 以上を示した臨床検体を用いて、version 1.5 との関連を調べた。黒丸で示した Subtype B では $n=27$, $r=0.9320$, $Y=1.011X-0.033$ と良好な相関が得られた。

結 論

同時再現性の C.V.% は Subtype B、E とも 30% 前後と version 1.0 での変動係数と大差はなかった。また、version 1.0 と version 1.5 の Subtype B の測定値の相関は $n=27$, $r=0.9320$, $Y=1.011X-0.033$ と良好な相関であった。一方、Subtype E では version 1.5 の測定値が 1 オーダーから 2 オーダー高く測定された。これらの事より、version 1.0 から version 1.5 に変更するにあたり Subtype B においては継続して経過観察が行えるとともに、Subtype E ではより、臨床症状を反映するデータとして活用する事ができるキットであると思われた。

Table 1 Standard法での同時再現性 (Subtype B)

	HIV-1 RNA load					
	High		Middle		Low	
	copies/ml	log 10	copies/ml	log 10	copies/ml	log 10
1	728269	5.9	46315	4.7	2277	3.4
2	515943	5.7	22740	4.4	1569	3.2
3	711447	5.9	30477	4.5	1754	3.2
4	696531	5.8	24902	4.4	2341	3.4
5	664712	5.8	37216	4.6	1451	3.2
6	820336	5.9	19024	4.3	1424	3.2
7	767465	5.9	26241	4.4	2568	3.4
8	966365	6.0	36363	4.6	1694	3.2
9	704372	5.8	36600	4.6	1317	3.1
10	823139	5.9	43657	4.6	1900	3.3
n	10	10	10	10	10	10
mean	739857.9	5.9	32353.5	4.5	1829.5	3.3
S.D.	118012.6	0.1	9110.1	0.1	431.3	0.1
C.V.	16.0	1.2	28.2	2.9	23.6	3.1

Table 2 Standard法での同時再現性 (Subtype E)

	HIV-1 RNA load					
	High		Middle		Low	
	copies/ml	log 10	copies/ml	log 10	copies/ml	log 10
1	611101	5.8	8399	3.9	284	2.5
2	615236	5.8	4439	3.6	434	2.6
3	398027	5.6	4713	3.7	719	2.9
4	544756	5.7	5101	3.7	553	2.7
5	492277	5.7	4686	3.7	613	2.8
6	431207	5.6	5174	3.7	316	2.5
7	483683	5.7	2802	3.4	658	2.8
8	302980	5.5	3457	3.5	773	2.9
9	406348	5.6	3802	3.6	466	2.7
10	254493	5.4	4057	3.6	323	2.5
n	10	10	10	10	10	10
mean	454010.8	5.6	4663.0	3.6	513.9	2.7
S.D.	120089.7	0.1	1508.9	0.1	175.9	0.2
C.V.	26.5	2.2	32.4	3.7	34.2	5.9

Table 3 Ultrasensitive法での同時再現性 (Subtype E)

	HIV-1 RNA load					
	High		Middle		Low	
	copies/ml	log 10	copies/ml	log 10	copies/ml	log 10
1	460	2.7	114	2.1	194	2.3
2	479	2.7	111	2.0	37	1.6
3	783	2.9	10	1.0	22	1.3
4	979	3.0	92	2.0	89	1.9
5	1561	3.2	90	2.0	7	0.8
6	1459	3.2	49	1.7	47	1.7
7	939	3.0	98	2.0	20	1.3
8	682	2.8	51	1.7	8	0.9
9	902	3.0	49	1.7	73	1.9
10	465	2.7	54	1.7	24	1.4
n	10	10	10	10	10	10
mean	870.9	2.9	71.8	1.8	52.1	1.5
S.D.	390.2	0.2	33.9	0.3	56.7	0.5
C.V.	44.8	6.7	47.2	17.6	108.8	30.0

Fig 1 Standard法での希釈直線性

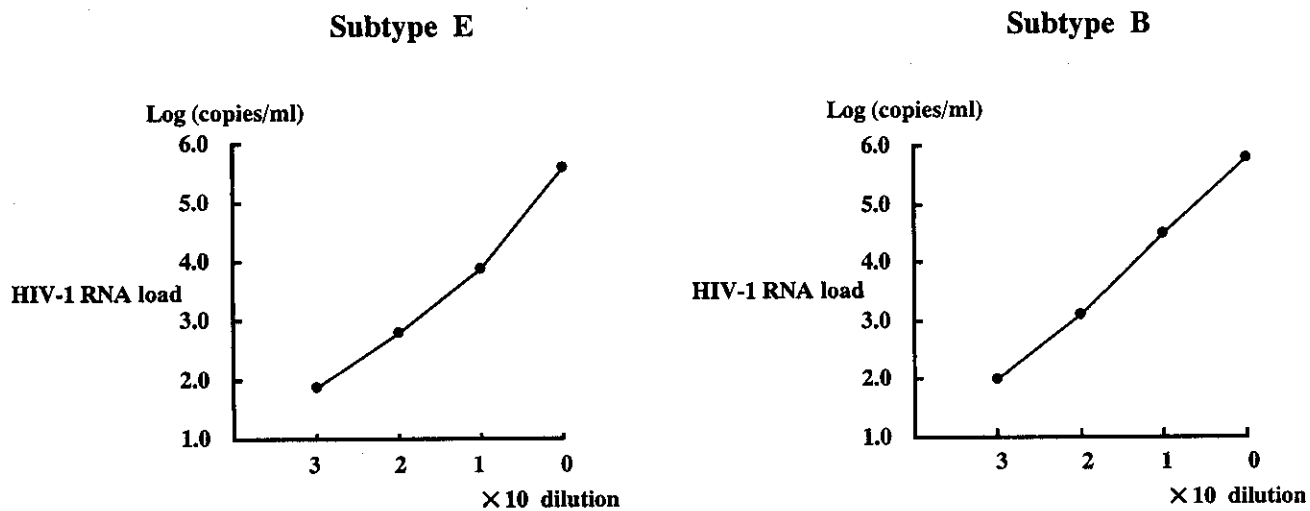


Fig 2 UltraSensitive法での希釈直線性

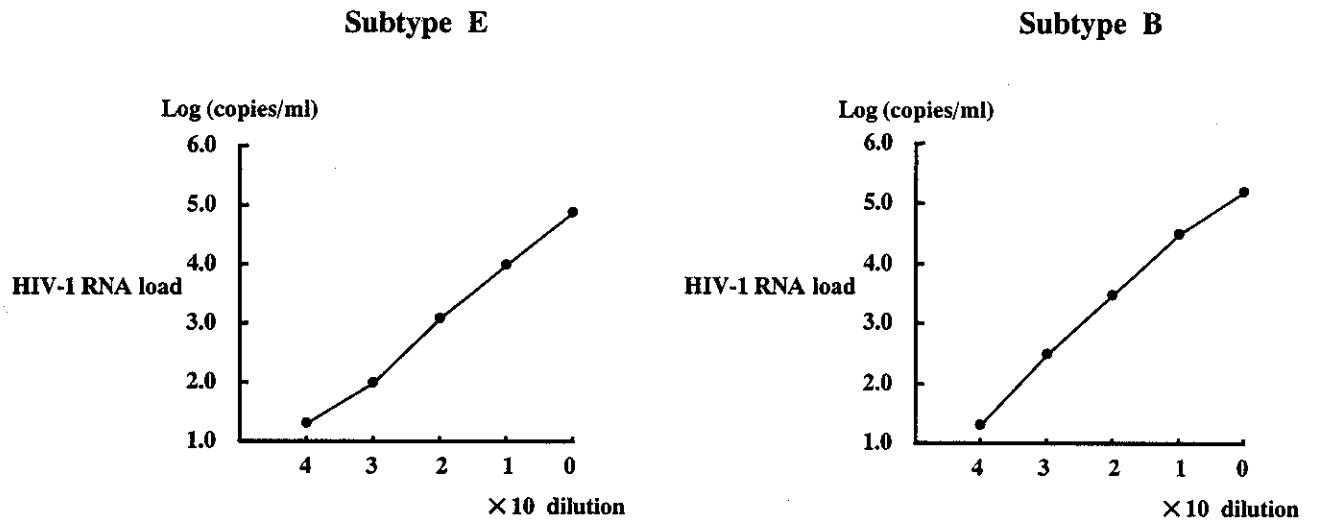
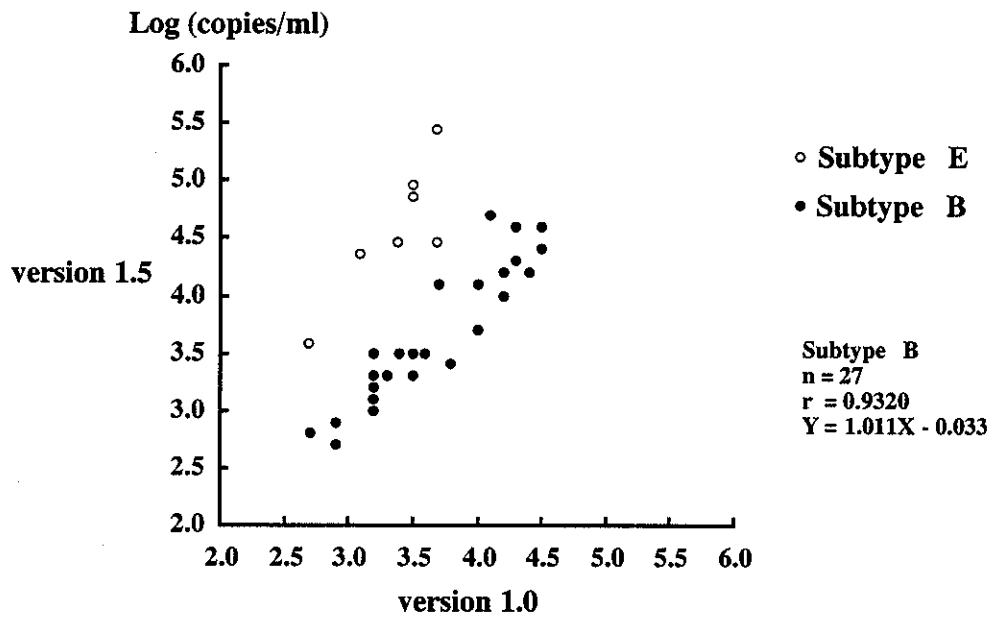


Fig 3 相関図



高感度法による HIV-1RNA 定量法の検討

研究協力者：吉原なみ子（国立感染症研究所エイズ研究センター）

目的

現在HIVRNA定量に広く用いられているアンプリコア HIV-1 モニターの検出感度は400copies/mlが限界である。しかしながら、治療薬等の格段の進歩により患者の血液中のHIVRNA量が低く抑えられるようになり、検出限界以下となっている例が多くなっている。

アンプリコア HIV-1 モニターでは新たに高感度法が導入され、この方法は50copies/mlまで測定可能であることが唱われている。今回我々は、高感度法の基礎的な評価を行い、臨床検査における高感度法の意義について検討した。

方法

アンプリコア HIV-1 モニター ver1.5 の使用説明書に従って行った。

抽出

検体500ulを16400rpm、4℃で1時間超遠心し上清を除去した後、定量標準RNAを加えたモニター Lysis Reagent を600ul加え、室温で10分間反応させた。続いてイソプロピルアルコール沈殿、エタノール沈殿を行いHIV-1RNAと定量標準RNAを抽出した（図1）。

増幅反応

55℃、2分間、60℃、30分間逆転写反応を行いHIVRNA、定量標準RNAに相補的なcDNAを合成し、95℃、10秒、52℃、10秒、72℃、10秒を8サイクル、90℃、10秒、55℃、10秒、72℃、10秒で

23サイクルでPCRを行い、それぞれのDNAを増幅させた。

検出

PCR後、モニター変性試液を加え増幅産物を1本鎖DNAにアルカリ変性し、これをHIV用DNAプローブおよび定量標準用DNAプローブの固相化されたマイクロウェルに加えハイブリダイゼーションを行った。この時、最終的な発色により得られる吸光度を測定可能範囲に調整するためにHIV用ウェルでは1～3125倍、定量標準用ウェルでは1～5倍まで5倍段階希釈を行った。検出には酵素発色を用い、得られた吸光度により1ml当たりのHIVRNAを定量した。

結果

測定毎のばらつきを見るために各検体をn=6で測定した結果を表1に示す。

検体25では測定値の平均が289copies/ml、対数変換したばらつき（SD%）が4.2%、検体45では平均264copies/ml、SD%が12.2%であった。この結果からは高感度法の測定値のばらつきは標準法に比べ特に大きい差は見られなかった。

次にHIVRNA量が 10^5 copies/ml代の患者血漿を希釈して測定した結果 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 倍希釈でそれぞれ30000copies/ml、3600copies/ml、820copies/ml、28copies/mlとなった。標準法の測定再現性がおよそ1/3～3倍の範囲内であり、高感度法でも同様の再現性であるので直線性は良好と考えられた。（図2）

表1 高感度法のばらつき

検体 ID	25	45
平均（測定値）copies/ml	289	264
平均（対数変換）	2.449	2.343
SD%	4.2%	12.2%

標準法で検出限界以下であった検体の高感度法での測定結果を表2に示す。今回測定した検体で標準法で検出限界以下（400copies/ml未満）でとなったものは242検体有り、201検体（83%）で高感度法を用いてもHIV-1RNAを検出できなかった。

標準法で400copies/ml以上であった検体を高感度法で測定した結果を図3に示す。標準法と高感度法の測定値を比較すると、4検体が高感度法で低値となったもののおおむね標準法での測定再現性（1/3から3倍）に含まれており、400copies/ml以上でも再現性良く測定できることがうかがえた。一方、アンプリコアHIV-1モニターの高感度法の測定上限は75000copies/mlとされている。今回標準法で100000copies/ml以上の検体を2検体高感度法で測定したが、このうち1検体（図3の検体ID16）は標準法で600000copies/ml、高感度法で200000copies/mlと約1/3低い値であった。残りの1検体は標準法で550000copies/mlであったが、高感度法ではHIVウェルの発色が測定範囲を越えてしまい測定不能となった。したがって100000cop-

ies/mlを越すような症例では、高感度法では測定できない可能性も示された。

考 察

高感度法を用いることで、標準法で検出限界以下（400copies/ml）の検体でも定量することができたが、それでも8割以上が高感度法でも検出限界（50copies/ml）以下であった。50copies/ml以下の検体の扱いについては、今後臨床と絡めて検討していく必要があると思われる。

高感度法の測定再現性は標準法と同様であることが分かった。また400copies/ml以上を示した検体では高感度法と標準法とほぼ一致した値となり、高感度法は標準法と同等に扱える。しかし検出上限である75000copies/ml以上では低値または、測定不能となる傾向が見られたことから、高感度法は血中HIV-1RNAの多い症例では不向きであることが示された。更に、超遠心器の使用、それに伴う操作手技の煩雑さを考慮に入れて標準法と高感度法を使い分ける必要があるだろう。

表2 高感度法での測定結果

	<50 コピー	50-100 コピー	>100 コピー	合計
検体数	201 (83%)	18(7.5%)	23(9.5%)	242

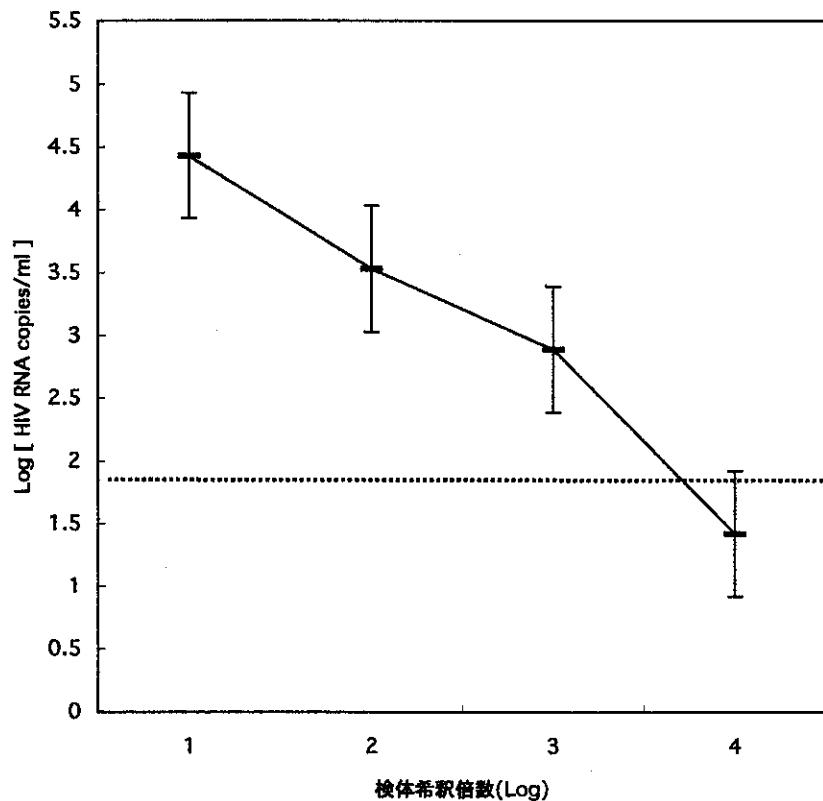


図2 アンプリコアHIV-1モニター高感度法の直線性

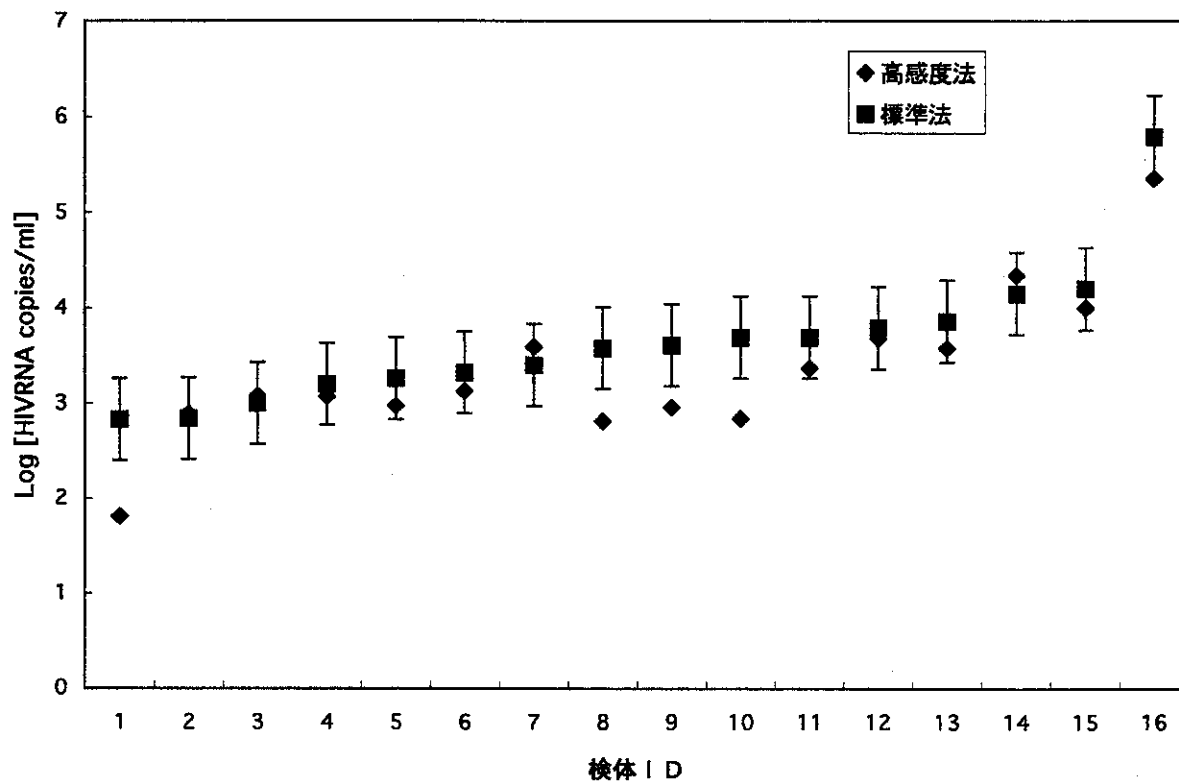


図3 標準法と高感度法の比較

HIV 検査キットの再点検と精度管理の意義について

協力研究者：吉原なみ子（国立感染症研究所）

研究目的

すべての診断用キットは厚生省の薬事審議会で承認されてものだけが販売できることになっている。診断用医薬品には治療薬のように数年後に市場調査を行い、効能を評価する再評価制度はない。すなわち、一度承認されればメーカー側からの申し出がなければ販売を続けることができる。しかしながら、昨今遺伝子学的手法が診断用試薬にも応用されるようになり、特異性の良い、高感度な診断用試薬の開発競争によって日進月歩の感がある。したがって、数年前のキットと最近のものでは精度がかなり違っていることもある。

HIV感染の診断は抗体検査が一般的である。検査は市販のキットが使われている。フランスでは2～3年毎にすべてのHIVスクリーニング検査試薬を再評価（reevaluation）して、一定基準に満たないキットは販売停止や改良の勧告を求めている。1999年2月に再評価が実施され、6月に結果がその発表された。販売停止や改良の勧告を受けたキットの中に日本で販売されていたキットが含まれていた。そこで1999年夏の時点において日本で市販しているすべてのHIV検査キットについて再点検をおこなった。これらの結果は厚生省に報告し、今後の行政政策に反映させることを目的とした。

方法および評価に用いたパネル血清

流通しているすべてのHIVスクリーニングキット（16キット）について共通のパネル血清を用いて、感度および特異性を検討した。評価は感染初期をなるべく早期に捕らえられることおよび感染者の全期間を通じて捕らえられることを主な目的とした。感度評価は国際的評価ができるようにBBI（BOSTON BIOMEDICA INC.）の5種類のセロコンバージョンパネルおよび2種類の感染初期自家製パネルを用いた。特異性は陰性検体を用いた（表1）。すべての検査は国立感染症研究所エイズ研究センターが実施した。

結果

14検体の陰性血清は17キットすべてが陰性と判定した。2種類の感染初期自家製血清はすべてのキットで陽性であった。

セロコンバージョンパネルを用いることにより方法の違いおよび同じ方法でもメーカーのちがいによって感度に差があった（表2）。

複数のセロコンバージョンパネルで調べることによって、市販のキットに感度の違いがあることがわかった。

また、同じメーカーでは製造年代順に感度が良くなった（表3）。抗原・抗体同時検出キット（第4世代と呼ぶ）は抗体検査キットに比べて10日から2週間早く検出できることがわかった（表4）。これらの結果から表5に示すように17キットのうち①販売の継続が9キット、②HIV抗体陽性検体のHIV-1またはHIV-2の型分類用が1キット、③販売停止が6キットとなった。なお、HIV-1抗体だけしか検出しないキットは販売停止となったので現在市販のキットはすべてHIV-1とHIV-2が検出できるキットのみとなった。

考察

HIV感染診断には検査キットの感度が重要である。厚生省の認可を受けたキットであっても感度に差が見られたが今回の再点検により現在市販されているキットは同等の感度であるものだけになった。より高感度なキットが開発されれば感度の基準はおのずと違ってくるので現在の感度の基準を満たしているキットでも今後は感度が不十分となることは起こり得る。再点検を定期的を実施することにより市場に常に精度の良い製品だけが出回るようになる。なお、再評価には適切な評価用パネル血清が必要である。また、評価も複数の施設で実施することが望ましい。今後、再点検を行う際には専門家による委員会を組織してパネル血清の作成および評価施設の選定など実施方法を含めて検討することが望ましい。

表1 再点検に使ったパネル血清

試験検体	検体数
Seroconversion panel PRB909	8
Seroconversion panel PRB917	7
Seroconversion panel PRB931	9
Seroconversion panel PRB932	9
Seroconversion panel PRB935	7
感染初期検体	2
陰性検体	14
合計	57

表2 Re-evaluation of Licensed HIV Test Kits in Japan (1999)

Manufacturer		A			B			C			D	E			
Panel ID	Days since 1st Bleed	PA	PA	CLEIA	ELISA	ELISA	ELISA	PHA	EIA	EIA	ICA	ELISA	ELISA	ELISA	
		Lysate	rDNA	rDNA	Lysate	rDNA	rDNA	Lysate	Lysate	rDNA	rDNA	Peptide	Peptide	rDNA	
		1:gp41,p24 2:gp36	1:gp41,p24 2:gp36	1:gp41,p24 2:gp36		1:gp160 Peptide 1:gp41 2:gp36	1:gp160,p25 Peptide 1:gp41 2:gp36			1:gp41,p24 2:gp36 Peptide 1:gp41 2:gp36	1:gp41,p24 2:gp36 Peptide 1:gp41 2:gp36	1:gp41 GroupO-gp41 2:gp36	1:gp41 2:gp36	1:gp41 GroupO-gp41 2:gp36	
PRB917(Q)	1	0	-	-	0.10	0.13	0.15	0.54	-	0.08	0.45	-	0.01	0.13	0.14
	2	53	-	-	0.10	0.07	0.16	0.44	-	0.07	0.40	-	0.00	0.15	0.14
	3	57	-	-	0.10	0.01	0.15	0.85	-	0.08	0.42	-	0.00	0.12	0.21
	4	60	-	2 ⁺	1.10	0.04	0.30	18.90	-	0.74	1.37	+	0.02	0.15	5.52
	5	65	2 ⁺	2 ⁺	8.80	0.44	4.38	19.50	2 ⁺	4.24	8.37	+	1.79	1.30	7.83
	6	67	2 ⁺	2 ¹⁰	13.30	4.05	7.23	21.15	2 ⁺	4.75	4.88	+	8.41	3.16	7.79
	7	72	2 ⁺	2 ¹⁰	16.30	4.64	17.55	19.49	2 ¹⁰	5.21	4.77	+	12.10	8.85	7.33

表3 Re-evaluation of Licensed HIV Test Kits in Japan (1999)

Panel ID	Days since 1st Bleed	1 (ELISA)	2 (ELISA)	3 (ELISA)	4 (ELISA)	
		Lysate	rDNA p24 Peptide gp41,gp36	rDNA gp160 Peptide gp41,gp36	rDNA gp160,p25 Peptide gp41,gp36	
PRB917(Q)	1	0	0.13	0.38	0.15	0.54
	2	53	0.07	0.36	0.16	0.44
	3	57	0.01	0.37	0.15	0.85
	4	60	0.04	0.44	0.30	18.90
	5	65	0.44	12.07	4.38	19.50
	6	67	4.05	26.42	7.23	21.15
	7	72	4.64	101.61	17.55	19.49