

平成12年度
厚生労働省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
— 研究報告書 —

平成13年 3月

主任研究者 今井光信

厚生省HIV検査法・検査体制研究班
班員名簿(分担研究者)

班員名	所屬	職名	〒	住所	電話(内線)	FAX
今井 光信	神奈川県衛生研究所 ウイルス部	部長	241-0815	横浜市旭区中尾1-1-1	045-363-1030 (514)	045-363-1037
杉浦 亙	国立感染症研究所 エイズ研究センター 第2研究グループ	室長	208-0011	武蔵村山市学園4-7-1	042-561-0771 (325)	042-561-7746
加藤 真吾	慶応大学 医学部 微生物学研究室	助手	160-8582	新宿区信濃町35	03-3353-1211 (2692)	03-5360-1508
平林 義弘	国立国際医療センター エイズ治療研究開発センター治療開発室	室長	162-8655	新宿区戸山1-21-1	03-3202-7181	03-3208-4244
白阪 琢磨	国立大阪病院 臨床研究部 ウイルス研究室	室長	662-0894	大阪市中央区法円坂2-1-14	06-6942-1331	06-6946-3652
岩本 愛吉	東京大学医学研究所 感染症研究部	教授	108-8639	港区白金台4-6-1	03-5449-5359	03-5449-5427
関根 大正	東京都衛生研究所 微生物部	参事研究員	169-0073	新宿区百人町3-24-1	03-3363-3231 (327)	03-3363-3481
大石 功	大阪府立公衆衛生研究所 病理課	課長	537-0025	大阪市東成区中道1-3-69	06-6972-1321 (402)	06-6972-2393
金田 次弘	国立名古屋病院 臨床研究部	研究員	460-0001	名古屋市中区三の丸4-1-1	052-951-1111 (2763,2766)	052-955-1878
近藤 真規子	神奈川県衛生研究所 ウイルス部	主任研究員	241-0815	横浜市旭区中尾1-1-1	045-363-1030	045-363-1037
吉原 なみ子	国立感染症研究所 エイズ研究センター 第2室	室長	162-0052	新宿区戸山1-23-1	03-5285-1111 (2320)	03-5285-1150
升森 隆	東京都衛生局 医療福祉部 エイズ対策室	係長	163-8001	新宿区西新宿2-8-1	03-5320-4487	03-5388-1432
山中 烈次	日本赤十字社 血液事業部 血液安全課	課長	105-0012	港区芝大門1-1-3	03-3437-7509	03-5402-7627
桜井 賢樹	(財)エイズ予防財団 研修研究部	部長	105-0001	港区虎ノ門1-23-11 寺山パシフィックビル4F	03-3592-1181	03-3592-1182
河原 和夫	東京医科歯科大学 医歯学総合研究科	教授	113-8510	文京区湯島1-5-45	03-5283-5863	03-5283-5864

厚生省HIV検査法・検査体制研究班
班員名簿

班員名	所属	職名	〒	住所	電話(内線)	FAX
山口 剛	東京都南新宿検査・相談室	室長	151-0053	渋谷区代々木2-7-8 東京南新宿ビルディング3F	03-3377-8122	03-3377-0821
大里 和久	大阪府立万代診療所	所長	558-0056	大阪市住吉区万代東3-1-45	06-6693-7660	06-6693-7501
大林 民典	東京都立駒込病院 臨床検査科	部長	113-0021	文京区本駒込3-18-22	03-3823-2101	03-3824-1552
伊藤 章	横浜市立大学医学部 臨床検査部	助教授	236-0004	横浜市金沢区福浦3-9	045-787-2610	045-787-2609
松田 善衛	国立感染症研究所	研究員	208-0011	武蔵村山市学園4-7-1	042-561-0771	042-561-7746
植田 昌宏	SRL研究所ウイルス部	部長	192-0031	八王子市小宮町51	0426-48-4081	0426-48-4041
速水 正憲	京都大学ウイルス研付属 免疫不全ウイルス研究施設	教授	606-8397	京都市左京区正聖護院川原町53	075-751-3982	075-761-9335
市村 宏	金沢大学医学部 国際環境保健学講座	教授	920-8640	金沢市宝町13-1	076-265-2228	076-234-4357
向出 雅一	SRL感染免疫部	研究員	191-0002	東京都日野市新町5-6-50	0426-48-4043	0426-48-3391
木村 和子	金沢大学大学院自然科学研究科 医療薬学専攻 医療薬理学講座	教授	920-0934	金沢市宝町13-1	076-234-4402	076-234-4402
山本 直彦	名古屋大学大学院医学研究科 国際保健医療学	助教授	466-8550	名古屋市昭和区鶴舞町65	052-744-2110	052-744-2114

厚生省HIV検査法・検査体制研究班
班員名簿(地方衛生研究所)

班員名	所屬	職名	〒	住所	電話(内線)	FAX
田村 正秀	北海道衛生研究所	所長	060-0819	札幌市北区北19条西12丁目	011-747-2211 (700)	011-736-9476
吉田 菊喜	仙台市衛生研究所	所長	984-0002	仙台市若林区卸町東2-5-10	022-236-7722 (200)	022-236-8601
土井 幹雄	茨城県衛生研究所	所長	310-0852	水戸市笠原町993-2	029-241-6652	029-243-9550
水口 康雄	千葉県衛生研究所	所長	260-8715	千葉市中央区仁戸名町666-2	043-266-6723	043-265-5544
後藤 敦	埼玉県衛生研究所	副所長	338-0824	浦和市上大久保639-1	048-853-6172	048-840-1041
関根 大正	東京都立衛生研究所 微生物部	参事研究員	169-0073	新宿区百人町3-24-1	03-3363-3231 (327)	03-3363-3481
今井 光信	神奈川県衛生研究所 ウイルス部	部長	241-0815	横浜市旭区中尾1-1-1	045-363-1030 (511)	045-363-1037
野口 有三	横浜市衛生研究所	研究員	235-0012	横浜市磯子区滝頭1-2-17	045-754-9800	045-754-2210
石田 光正	山梨県衛生公害研究所	所長	400-0027	甲府市富士員1-7-31	0552-53-6721	0552-53-5637
飯田 和賢	福井県衛生研究所	所長	910-8551	福井市原目町39-4	0776-54-5630 (100)	0776-52-6109
大石 功	大阪府立公衆衛生研究所 病理課	課長	537-0025	大阪市東成区中道1-3-69	06-6972-1321 (402)	06-6972-2393
川村 隆	兵庫県衛生研究所	所長	652-0032	神戸市兵庫区荒田町2-1-29	078-511-6581 (30)	078-531-7080
池田 義文	広島市衛生研究所	専門員	773-8650	広島市西区商工センター4-1-2	082-277-6998 (200)	082-277-0410
坂本 征則	広島県保健環境センター	所長	734-0007	広島市南区皆実町1-6-29	082-255-7131	082-252-8642
井上 博雄	愛媛県立衛生研究所	所長	790-0003	松山市三番町8-234	089-931-8757	089-947-1262
鈴木 康元	愛知県衛生研究所	所長	462-8576	名古屋市北区辻町字流7-6	052-911-3111 (270)	052-913-3641
千々和勝己	福岡県保健環境研究所 ウイルス課	課長	818-0135	大宰府市向佐野字迎田39	092-921-9945	092-928-1203

目 次

I. 総括研究報告

HIVの検査法と検査体制を確立するための研究1

—総括研究報告（平成12年度）—

主任研究者：今井光信（神奈川県衛生研究所）

II. 分担研究報告

1. 行政におけるエイズ対策としてのHIV検査体制のあり方に関する研究47

分担研究者：河原和夫

分担研究者：桜井賢樹

・海外の献血のドナーセレクトに関する研究67

班員研究者：木村和子

2. 東京におけるHIV検査体制に関する研究68

—HIV検査をより有効にするための試み等—

分担研究者：升森 隆

3. 東日本の衛生研究所への遺伝子検査の導入を中心に74

—東京地区におけるHIV感染の遺伝子血清疫学的研究—

分担研究者：関根大正

4. HIVスクリーニング検査体制の検討88

—西日本の衛生研究所への遺伝子検査の導入に関する研究—

分担研究者：大石 功

5. 地方衛生研究所における HIV 検査体制について	94
—福岡県—	
班員研究者：千々和勝己	
6. 血液センターにおける HIV 検査体制に関する研究	98
—日赤の HIV 検査体制の検討と他機関との連携について—	
分担研究者：山中烈次	
7. HIV サブタイプと HIV 検査体制の確立に関する研究	103
分担研究者：近藤真規子	
・日本における HIV-1 サブタイプの解析	104
分担研究者：近藤真規子	
・既知サブタイプとは異なる HIV-1 の検出法の確立	111
班員研究者：速水正憲	
・ HIV-1 重感染個体内におけるサブタイプ／グループ別ウイルスコピー数の定量	114
班員研究者：市村 宏	
・パキスタンにおける HIV の分子疫学的研究	120
班員研究者：山本直彦	
8. 薬剤耐性変異の解析法の開発改良実用化と技術研修に関する研究	122
分担研究者：杉浦 互	
9. MAGIC-5 細胞を用いたフェノタイプ薬剤耐性検査法の確立と臨床応用	130
分担研究者：平林義弘	
・ MAGIC5A 細胞を用いた HIV-1 の分離法確立に関する研究	134
班員研究者：森下高行	

10. PBMCを用いたHIV-1薬剤感受性試験法の確立に関する研究	138
分担研究者：加藤真吾	
11. バーチャルフェノタイプ、アンチヴィログラムフェノタイプ法の概要と実施結果 ...	144
班員研究者：向出雅一	
12. 薬剤耐性検査法に関する研究.....	153
—治療歴のないHIV感染者における薬剤耐性変異の検出例について—	
分担研究者：大石 功	
13. 薬剤耐性検査の検査体制の構築と評価：薬剤体制検査のガイドラインの作成	156
分担研究者：岩本愛吉	
14. HIV-1プロウイルス検出の為のpeptide nucleic acidプローブを用いた	171
<i>in situ</i> hybridization (PNA-ISH) 法の確立	
班員研究者：金田次弘	
15. アンプリコアHIV-1モニターv1.5のコントロールサーベイ	176
分担研究者：吉原なみ子	

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	185
----------------------	-----

I . 総括研究報告

HIVの検査法と検査体制を確立するための研究

主任研究者 今井光信

— 総括研究報告 —

目的

HIV検査法（スクリーニング検査と薬剤耐性検査）の開発・検討・評価及びそれらの検査法を用いた検査体制の確立

班構成（分担研究者と分担課題）

今井光信（神奈川県衛生研究所）	研究の総括
杉浦 互（国立感染症エイズC）	薬剤耐性検査法（ジェノタイプ検査）
加藤真吾（慶応大学医学部）	薬剤耐性検査法（フェノタイプ検査）
平林義弘（国際医療センター）	薬剤耐性検査法（MAGIC-5の応用）
白阪琢磨（大阪国立病院）	薬剤耐性検査体制（医療機関との連携）
岩本愛吉（東京医科学研究所）	薬剤耐性検査 ガイドラインの作成
金田次弘（国立名古屋病院）	HIV感染細胞の検査法の開発
河原和夫（東京医科歯科大学）	HIVスクリーニング検査のありかた
桜井賢樹（エイズ予防財団）	HIV相談体制のありかた
関根大正（東京都衛生研究所）	衛生研究所のHIV検査体制（東日本）
大石 功（大阪公衆衛生研究所）	衛生研究所のHIV検査体制（西日本）
山中烈次（日赤・事業部）	血液センターのHIV検査体制
近藤真規子（神奈川衛生研究所）	HIV検査とサブタイプ
吉原なみ子（国立感染症エイズC）	HIV検査の精度管理体制

（協力研究者）

升森 隆（東京都医療福祉部エイズ対策室）	田村正秀（北海道衛生研究所）
山口 剛（東京都南新宿検査・相談室）	吉田菊善（仙台市衛生研究所）
大里和久（大阪府立万代診療所）	土井幹雄（茨城県衛生研究所）
大林民典（東京都立駒込病院）	水口康雄（千葉県衛生研究所）
伊藤 章（横浜市立大学医学部）	後藤 敦（埼玉県衛生研究所）
松田善衛（国立感染症研究所）	野口有三（横浜市衛生局衛生研究所）
植田昌宏（SRL研究所）	石田光正（山梨県衛生公害研究所）
速水正憲（京都大学ウイルス研）	飯田和質（福井県衛生研究所）
市村 宏（金沢大学大学院医学研究科）	川村 隆（兵庫県衛生研究所）
向井雅一（SRL研究所）	池田義文（広島市衛生研究所）
木村和子（金沢大学大学院自然科学研究科）	坂本征則（広島県保健環境センター）
山本直彦（名古屋大学大学院医学研究科）	井上博雄（愛媛県立衛生研究所）
	鈴木康元（愛知県衛生研究所）
	千々和勝己（福岡県保健環境研究所）

研究要旨

本年度は下記の項目の研究を重点的に行った。

I HIV スクリーニング検査関連

1 効率的・効果的検査体制を構築するための基礎研究として、HIV 検査に関わる公的検査機関および民間検査機関における HIV 検査数および陽性数の実態調査を行い、HIV 検査の現状解析を行った。(資料1-20)

2 プール遠心濃縮法を開発し東京都、神奈川県、埼玉県等における HIV 検査の一部で試験的に HIV 核酸検査を実施し、その問題点と影響等について検討した。(資料27)

3 迅速診断法・抗原抗体同時検査法等について検出感度・特異度等の検討を行いスクリーニング検査における有用性について検討した。(資料21-26)

4 保健所の HIV 検査の実情と問題点を把握するため全保健所へのアンケート調査を行い、保健所の HIV 業務に関して、実績、認識、活動方針等について多くのことを明らかにできた。(資料28-31)

5 保健所等における HIV 検査をより多くの人に利用してもらうため東京都・神奈川県の HIV 検査機関を、分かりやすい地図付で紹介する検査案内用ホームページを作成した。(資料32-36)

II HIV 薬剤耐性検査関連

1 ジェノタイプ検査法に関しては各種検査法 (in house 法、ABI 法、VIRCO 社法) の比較検討を行い、in house (国立感染研法) については地方衛生研究所を対象に技術講習会を実施しその普及に努めた。また、その検査体制に関しては各医療機関、国立感染症研究所、地方衛生研究所、民間検査センター等との連携のあり方について検討した。(資料37-44)

2 フェノタイプ検査法に関しては各分担研究者が開発中の各検査法 (MAGIC-5 法、PBMC・MAGIC-5 法、PBMC 法、リコンビナント法) に関して、研究室レベルでの確立と臨床応用のための実用化研究を行った。また、SRL との連携により可能となった VIRCO 社のバーチャルフェノタイプ、フェノタイプについて、その検査結果の評価のため比較実験を行った。(資料37-44)

3 HIV 感染細胞の検出および定量法に関して検討した。(分担研究報告参照)

4 血中 HIV 量の定量を実際に行っている公的および民間の検査機関に対してコントロールサーベイを実施し、定量値に問題の見られた機関の指導を行った。(資料57-58)

A. 研究目的

HIV のスクリーニング検査と HIV 感染者のフォローアップ検査（薬剤耐性検査等）に関して、各検査法の開発・改良・実用化により、検査精度の向上を計ると共に、より効率的で効果的な検査体制を確立するため、必要な基礎的研究とモデル実験とを行うことが本研究班の目的である。

3年計画の1年目にあたる本年度は、スクリーニング検査に関しては、

1. 保健所等の HIV 検査の実態把握と問題点の解明
2. HIV 検査体制の機能強化のため、対策の立案と一部試験的实施

を目標に研究を行った。またジェノタイプの薬剤耐性検査に関しては、研究室レベルでの検査法の確立とその臨床応用のための実用化研究を、またフェノタイプの薬剤耐性検査に関しては、それぞれの研究室で開発中の各種検査法の研究室レベルでの確立を本年度の重点目標として研究を行った。

B. 研究方法

全国各地の衛生研究所、民間検査センター、日本赤十字社 NAT センター等の HIV 検査機関の協力により、HIV 検査数および HIV 検査陽性検体に関するデータの解析を行った。スクリーニング検査法に関しては、保健所等の HIV 検査に核酸増幅検査を導入するためより実用的な核酸増幅検査法として「プール遠心濃縮法」を開発し保健所検査への試験的導入を行い、その技術的また行政的問題点と効果等を検討した。また迅速診断法・抗原抗体同時検査法等の検討と評価およびそれら検査法のスクリーニング検査システムへの効果的活用法について検

討した。

保健所の HIV 相談・検査業務の実態、HIV 相談マニュアルの問題点、今後の保健所の活動方向等を把握するため全国の 594 保健所に対してアンケート調査を行い、511 保健所（86%）から回答を得て、その結果を解析した。

ジェノタイプの薬剤耐性検査に関しては、国立感染症研で開発した検査法、市販されている検査キット（ABI 社）を用いた方法、委託による検査（VIRCO 社）等各種方法について比較検討を行うと共に、各地の衛生研究所への検査法の技術移転を行った。

またフェノタイプによる薬剤耐性検査については MAGIC-5 を用いた国際医療センターでの方法、PBMC を用いた方法、遺伝子組替えによる方法等について各分担研究者が各自最も得意とする方法について実用化のための研究を継続すると共に、同一の臨床検体についての解析結果の比較検討も行った。

C. 本年度の研究成果と今後の課題

I スクリーニング検査関連

1. HIV 検査数・HIV 陽性検体等の解析結果

平成12年における、保健所等の無料検査での HIV 抗体陽性数は112例と過去最高であった。地域別では東京が67例と最も多く、神奈川（10例）、大阪（9例）、福岡（9例）、愛知（7）、等の地域でも比較的陽性例が多かった（詳しくは、升森、関根、大石、千々和等の分担研究報告書を参照）。検査機関別では、首都圏の主要駅に近く、且つ、夜間や日曜日にも検査可能な検査・相談機関に検査希望者が集中するこ

とが分かった。また大阪におけるモデル実験からSTDクリニックとの連携によるHIV検査は極めて有効であることが分かった。一方、献血者でのHIV検査陽性数は67例でこの内3例は、抗体陰性で核酸増幅検査でのみ陽性の感染初期例であった。日本赤十字社の3カ所のNATセンターにおいて24時間体制で実施している核酸増幅検査（詳しくは、分担研究報告書“血液センターにおけるHIV検査体制の研究”山中を参照）の成果で3例の感染初期例（抗体ウィンドウ期）が検出でき、輸血後感染を未然に防止できたことの意義は非常に大きい。しかしながら核酸増幅検査においても11日間の感染性ウィンドウ期が残ることを考えると、3例の感染初期例が献血者から検出されたことは極めて憂慮すべき問題であり、感染初期者を受け入れられる検査・相談体制を早急に整備する必要がある。

2. スクリーニング検査法の開発・検討・評価

迅速診断試薬(ダイナスクリン)の評価

試薬の検出感度・特異性等の検討を行った結果、通常の抗体検査でHIV抗体陽性と確認された164検体全てがダイナスクリンを用いた迅速診断でも陽性と判定された。またHIV抗体陰性の1882検体についてダイナスクリンによる検査を行った結果2例が陽性（偽陽性）であった。従ってこれらの検体による評価は、感度100%・特異度99.9%（偽陽性率0.1%）であり、保健所でのHIV抗体スクリーニング検査に使用可能であることが分かった。但し、感染初期のセロコンバージョンパネル血清を用いた検討では通常の抗体検査法に比べ数日遅

れて陽性となることもあることから、本キットの使用に際しては、まれではあるがそのようなこともあり得ることを認識して使用することが必要である。

抗原・抗体同時検査試薬の検討

感染初期パネル血清を用いた検討により、通常の抗体検査で陽性となる数日前から陽性となり、感染初期の検査に特に優れていることが分かった。このため通常の抗体検査で弱陽性であり、感染初期例か偽陽性例であるかが判定困難な場合、抗原抗体同時検査法で陰性であれば抗体検査の偽陽性例と確定できる。このため抗原抗体同時検査法は抗体の二次検査用として極めて優れていることを明らかにした。

核酸検査法の検討

核酸検査法をスクリーニング検査への効率的応用のため、検体のプール遠心濃縮法の開発を行った。32検体までを遠心濃縮により1検体として検査可能であり、多数検体の核酸検査が比較的安価に感度良くできること、また本法が保健所検査に応用可能なことを実証した。

3. 保健所等のHIV検査体制の機能強化 HIV検査の検査案内ホームページの作成

保健所のHIV検査に関する情報をより多くの人に知ってもらうため、HIV検査に関する分かりやすく詳しい地図情報等を含む保健所のHIV検査案内のホームページを作成した。神奈川県の保健所情報については既にホームページに掲載されており東京都・大阪府等の保健所についても順次ホームページに掲載する予定である。

保健所HIV検査への核酸検査の試験的導入

プール遠心濃縮法を用いた核酸増幅検査

を神奈川県・東京都・埼玉県の保健所等 HIV 検査の一部に試験的に導入し、その影響等について現在追跡調査を行っている。

特別検査・相談機関との連携

新宿の検査相談機関への核酸検査の試験的導入を行った結果、検査希望者が28%増加するなどの影響がみられたが、受け入れ能力の限界のためそれ以上の増加は困難であった。

地域の医療機関との連携

保健所でのHIV検査を補完する対策の一つとして、大阪において民間のSTDクリニックとの連携によりHIV検査を実施した。その結果、HIV検査希望者もかなり多く、またHIV抗体陽性率も0.22%とかなり高いことが分かった。このため民間STDクリニックとの連携によるHIV検査は、HIV検査体制の機能強化において極めて重要な役割を果たしうるものと思われる。今後首都圏においても民間STDクリニックとの連携によるHIV検査体制の機能強化を検討中である。

NGOとの連携、木原班・市川グループとの連携

保健所等のHIV検査が本来の目的を達成し、十分その機能を果たすためには各種NGOとの連携が極めて重要であり、現在木原班の市川グループと具体的方法について検討中である。

HIV相談・検査事業の現状把握と検査相談マニュアルの整備のためのアンケート調査

全国の594保健所に対し、HIV相談・検査業務の実態、HIV相談マニュアルの問題点、今後保健所がどのような活動方向を持っているかを把握するためアンケート調査を行ったところ回収率は86.0%（511保健

所）と極めて高かった。年間100検体以下の検査数の保健所が381保健所（74.6%）と多く、500検体以上の保健所は4保健所（0.8%）であった。

HIV相談マニュアルに関しては陽性者への対応事例の充実や早期の内用更新に対する要望が多くみられた。またエイズ対策として保健所が世間から求められていると考えられる事項として、検査・相談体制の整備充実を上げた保健所が最も多い（290保健所）にも関わらず、保健所がこれらについて重点的に活動すべきだと考えている保健所数は比較的少ない（80保健所）ことが分かった。次年度は、今回の調査で明確になった一部の相談や検査機能の高い保健所の実態をさらに詳細に調査し、問題点を整理し、保健所でのHIV相談・検査機能の充実に資する政策提示ができるよう研究成果を役立てたい。（詳しくは、分担研究報告書“行政におけるエイズ対策としてのHIV検査体制のあり方に関する研究”河原を参照）

血液センター（日赤）との連携

2000年における献血者中のHIV検査陽性率は67例で、この中の3例は抗体検査では陰性で核酸増幅検査のみで陽性であった。感染初期例で抗体検査陰性であり、核酸増幅検査によってのみ検出される時期（抗体検査のウインドウ期）の献血が、実際に3例存在したことは極めて重要な問題と思われる。欧米等の先進国に比べ一般成人におけるHIV抗体陽性者が少ないにも関わらず、献血者中のHIV抗体陽性率が欧米等の先進国にほぼ近い値（10万人あたり1人）であることが問題提起されているが、この問題にあわせてHIVの感染初期におけるの献

血の防止のための効果的対策が今後重要である。そのためには、感染初期の疑いがあり検査を希望する人を積極的に受け入れる検査相談機関（医療機関）の整備・充実が重要である。現在、保健所 HIV 検査への核酸増幅検査の試験的導入、民間 STD クリニックとの連携による HIV 検査機会の拡充、検査案内ホームページの開設等の対策を実施中であるが、これに加え日赤との連携による効果的情報提供の方法等についてもさらに検討中である。

海外での HIV 検査体制に関する情報の収集

海外での HIV 検査体制、特に献血におけるドナースクリーニングの方法等に関して海外での状況を知るため欧米の先進国を中心にアンケートによる情報収集を行っている。今後、得られた情報を解析し日本の HIV 検査体制確立のため役立てたい。（詳細は分担研究“海外におけるエイズ感染のドナースクリーニングに関する研究”木村 を参照）

II 薬剤耐性検査関連

1. ジェノタイプ検査法の開発と各種ジェノタイプ検査法の比較検討および評価検査法の検討

in house 法、ABI 法、VIRCO 社法のいずれもおおよそ 2000 コピー/ml 以上ではシーケンスが可能なが分かった。また、プライマーの改良によりサブタイプ E の解析も可能となり、現在各分担研究者が変異のデータを蓄積し解析中である。

治療開始前の薬剤耐性変異

治療前に薬剤耐性変異株が検出される例があり、例としては少ないが日本でも薬剤耐性変異株による感染が拡がりつつあること

が分かった。今後、さらにデータを蓄積しその頻度等についてもモニターしていくことが必要と思われる。

2. フェノタイプによる薬剤耐性検査法の開発と検討

ブランク法、MAGIC-5 法、リンパ球/MAGIC-5 法等を開発し、その特性・実用性等を臨床検体について検討中である。その詳細は各分担研究報告書（“薬剤耐性変異の解析法の開発・改良・実用化と技術研修に関する研究”杉浦、“MAGIC-5 細胞を用いたフェノタイプ薬剤耐性検査法の確立と臨床応用”平林、“PBMC を用いた HIV-1 薬剤感受性試験法の確立に関する研究”加藤）を参照して頂きたい。次年度は各検査法について臨床検体での検査結果を解析しその臨床的意義を明らかにすると共に、検査処理能力、検査コスト等の面でさらに実用化を計る予定である。

3. バーチャルフェノタイプへのアクセスとその評価

SRL との共同研究により、SRL を介して VIRCO 社のバーチャルフェノタイプ検査へのアクセスが可能になった。またフェノタイプ検査との比較により、変異の解析結果が各薬剤に対する耐性度として数値で表示されるバーチャルフェノタイプの有用性を明らかにすると共にその問題点を指摘した。（一致する変異の組み合わせが、今までに多数ある場合は表示される耐性度の数値の信頼性は高いが、一致する変異の組み合わせが少ない場合は数値が出ていてもその信頼性は低い。即ち、実際のフェノタイプの結果と一致しない。）従って、今後も種々

の臨床検体によるコントロールサーベイが必要である。

4. 薬剤耐性検査の研修

11ヶ所の地方衛生研究所を対象に、ジェノタイプの薬剤耐性検査の研修を国立感染症研究所との協力により実施した。各地の衛生研究所を検査拠点としたHIV検査体制の強化・充実のため、今後も他のHIV検査法の研修も含め薬剤耐性検査の研修を継続する予定である。

5. 薬剤耐性検査のガイドラインの作成

抗HIV薬の種類が増え、併用療法による効果が著しい成果を上げている一方、薬剤耐性による治療効果の減弱、喪失がより大きな問題となっている。このため、薬剤耐性検査のより進んだ外国の事情を調査し、日本の事情を考慮に入れ、耐性検査のガイドラインを作成するため研究を進めている。本年は、米国の国際エイズ会議（IAS-USA）の専門家が発表した耐性検査に関する意見書を翻訳し、今後の参考とすると共に耐性検査に関わる医療関係者に配布した。（詳しくは“薬剤耐性検査の検査体制の構築と評価：薬剤耐性検査のガイドラインの作成”岩本 を参照）

6. 感染細胞の検出・定量法の検討（in situ法 HIV-DNA定量）

HIV感染者のウイルス感染標的細胞の感染実態を把握するため、HIV-1プロウイルスを簡便に検出する免疫組織化学的検出法を開発した。DNAプローブの代わりにPNAプローブを選択し、チラミンを用いたシグナル増感により、鋭敏で特異性の高い

ISH法を開発できた。この方法により、抹消血の血液細胞だけでなく、骨髄組織、リンパ節等の組織を対象としたHIV-1の検出が可能となった。（詳細は分担研究報告書“HIV-1プロウイルス検出の為に peptide nucleic acid プローブを用いた in situ hybridization (PNA-ISH)法の確立”金田 を参照）

7. HIV定量検査（PCR）のコントロールサーベイの実施

アンプリコア HIV-1 モニター-v1.5 のコントロールサーベイを行った結果、HIV-1 サブタイプEについてもHIV-1サブタイプBと同等の精度で定量できること、また標準法、高感度法共に従来品と同等の精度であることが分かった。コントロールサーベイに参加した37施設中、標準法では7施設、高感度法では6施設の測定値に問題があり、問題点の指摘と指導により改善が見られた。特に高感度法ではRNA回収不良によるとみられる低値への逸脱が多く見られた。この場合、添付のコントロール値には異常が現れないため、参照品による自己チェックが必要なことが分かった。薬剤投与後のフォローアップ検査として高感度法によるウイルス検査も多く用いられつつあり、コントロールサーベイの重要性が再認識された。（詳細は分担研究報告書“アンプリコアモニターV1.5のコントロールサーベイ”吉原を参照）

D. 考察と結論

本年は3年計画の1年目であり、HIVの各種検査法の開発・比較検討および検査体制の現状把握等に重点をおいた研究が主で

あったが、今後スクリーニング検査と薬剤耐性検査の両検査体制を構築する上で重要な成果が多く得られた。次年度はこれら成果に基づき、保健所等の HIV 検査への核酸検査の導入の拡大、保健所検査を補完するため医療機関や NGO との連携による HIV 検査機能の強化、ホームページの充実や、日赤との連携による情報提供機能の強化等についての研究を重点的に行う計画である。また薬剤耐性検査では、ジェノタイプ検査の臨床応用のための研究を重点に検査体制を整備すると共に、フェノタイプ検査に関してはその検査法の確立のための研究を重点的に行う予定である。

なお下記に示す各分担研究の詳細は、それぞれの分担研究報告書を参照して頂きたい。

1. 行政におけるエイズ対策としての HIV 検査体制のあり方に関する研究(河原和夫、桜井賢樹)
 - ・海外のドナーセレクトに関する研究(木村和子)
2. 東京における HIV 検査体制に関する研究(HIV 検査をより有効にするための試み等)(升森 隆)
3. 東日本の衛生研究所への遺伝子検査の導入を中心に(東京地区における HIV 感染の遺伝子血清疫学的研究)(関根大正)
4. HIV スクリーニング検査体制の検討(西日本の衛生研究所への遺伝子検査の導入に関する研究)(大石 功)
5. 地方衛生研究所における HIV 検査体制について(福岡県)(千々和勝己)
6. 血液センターにおける HIV 検査体制に関する研究(日赤の HIV 検査体制の検

討と他機関との連携について)(山中烈次)

7. HIV サブタイプと HIV 検査体制の確立に関する研究(近藤真規子)
 - ・既知サブタイプとは異なる HIV-1 の検出法の確立(速水正憲)
 - ・HIV-1 重感染個体内におけるサブタイプ/グループ別ウイルスコピー数の定量(市村 宏)
8. 薬剤耐性変異の解析法の開発改良実用化と技術研修に関する研究(杉浦互)
9. MAGIC-5 細胞を用いたフェノタイプ薬剤耐性検査法の確立と臨床応用(平林義弘)
 - ・MAGIC 5 A 細胞を用いた HIV-1 の分離法確立に関する研究(森下高行)
10. PBMC を用いた HIV-1 薬剤感受性試験法の確立に関する研究(加藤真吾)
11. バーチャルフェノタイプ、アンチウイルスプログラムフェノタイプ法の概要と検討結果(向出雅一)
12. 薬剤耐性検査法に関する研究(治療暦のない HIV 感染者における薬剤耐性変異の検出例について)(大石 功)
13. 薬剤検査の検査体制の構築と評価：薬剤体制検査のガイドラインの作成(岩本愛吉)
14. HIV-1 プロウイルス検出の為の peptide nucleic acid プローブを用いた in situ hybridization(PNA-ISH) 法の確立(金田次弘)
15. アンプリコア HIV-1 モニター v1.5 のコントロールサーベイ(吉原なみ子)

<発表論文リスト>

1. Evaluation of Detection Methods of

- HIV Proliferation for the Screening of Anti-HIV Compounds.
Emiko TSUJI, Takayuki SAITO, Satoshi MIZUNO, Mitsunobu IMAI. The Journal of AIDS Research 2 (2) : 79-84, 2000.
2. Lipopolysaccharide-induced HIV-1 expression in transgenic mice is mediated by tumor necrosis factor- α and interleukin-1, but not by interferon- γ nor interleukin-6.
Jun Tanaka, Hidenori Ozaki, Jiro Yasuda, Reiko Horai, Yoichi Tagawa, Masahide Asano, Shinobu Saijo, Mitsunobu Imai, Kenji Sekikawa, Manfred Kopf, Yoichiro Iwakura. AIDS 14 : 1299-1307, 2000.
 3. A novel method for detecting HIV-1 by non-radioactive in situ hybridization: application of a peptide nucleic acid probe and catalyzed signal amplification.
Takaya Murakami, Tomoko Hagiwara, Kazuko Yamamoto, Junko Hattori, Masako Kasami, Makoto Utsumi and Tsuguhiro Kaneda. Journal of Pathology, in press. 2000
 4. Polymorphism in the Interleukin - 4 promoter affects acquisition of human Immunodeficiency virus type 1 syncytium - Inducing phenotype.
EMI E. NAKAYAMA, YOSHIHIKO HOSHINO, XIAOMI XIN, HUANLIANG LIU MIEKO GOTO, NOBUKAZU WATANABE, HITOMI TAGUCHI, AKIHIRO HITANI, AI KAWANA-TACHIKAWA, MASAO FUKUSHIMA, KANEO YAMADA, WATARU SUGIURA, SHIN-ICHI OKA, ATSUSHI AJISAWA, HIRONORI SATO, YUTAKA TAKEBE, TETSUYA NAKAMURA, YOSHIYUKI NAGAI, AIKICHI IWAMOTO, TATSUO SIODA. Journal of Virology 74 : 5452-5429, 2000.
 5. Evidence of a mutually exclusive relationship between the HIV-1 protease Inhibitor resistance mutations D30N and L90M.
W. Sugiura, Z. Matsuda, Y. Yokomaku, K. Hertogs, B. Larder, Y. Nagai. Antiviral Therapy 5 : 33-34, 2000.
 6. Evaluation of ViroseqTM -HIV Version 2 for HIV drug resistance.
Motokazu Mukaide, Wataru Sugiura, Masakazu Matsuda, Shuuzo Usuku, Yuuzo Noguchi, Kazuo Suzuki, Kaoru, Kawata, Akira Ito, Hiroko Sagara, Kaneo Yamada, Makiko Kondo, Mitsunobu Imai. JAPANESE JOURNAL INFECTIOUS DISEASES 53 (5) : 203-205, 2000.
 7. HIV-1 subtype detected during 1991-March in Japan.
M. Kondo and M. Imai. Agents Surveillance Report 21 : 141-142, 2000.
 8. Rapid and simple phenotypic assay for drug susceptibility of human immunodeficiency virus type 1 using CCR5 - expressing HeLa / CD4+ cell clone 1-10 (MAGIC5).
A. Hachiya, S. Aizawa Matsuoka, M. Tanaka, Y. Takahashi, S. Ida, H. Gatanaga, Y. Hirabayashi, A. Kojima, M. Tatsumi and S. Oka. Antimicrob. Agent. Chemother. 45 :

- 495-501, 2001.
9. プール検体の遠心濃縮法による HIV スクリーニング遺伝子検査の検討.
林 孝子, 近藤真規子, 島崎 緑, 植田昌宏, 今井光信. 感染症学雑誌 74(1) : 82-83, 2000.
 10. 免疫蛍光測定法による HIVp24 抗原検出キットの評価.
林 孝子, 齊藤隆行, 近藤真規子, 渡邊 寿美, 今井光信. 感染症学雑誌 74(9) : 709-715, 2000.
 11. マイクロプレートを用いた HIV 抗原抗体同時検出試薬の検討.
嶋 貴子, 林 孝子, 近藤真規子, 斎藤隆行, 川田かおる, 伊藤 章, 相楽裕子, 今井光信. 医学と薬学 43(6) : 1131-1140, 2000.
 12. 献血者における HIV 感染状況.
木原正博, 今井光信, 清水 勝. 病原微生物検出情報 21(7) : 140-141, 2000. 7.
 13. 日本で流行している 1 型ヒト免疫不全ウイルス (HIV-1) サブタイプ.
近藤真規子, 今井光信. 病原微生物検出情報 21(7) : 141-142, 2000. 7.
 14. エイズ検査はこわくない.
今井光信. 健 29(4) : 21-23, 2000. 7.
 15. 性感染症としての hepatitis virus 感染症.
今井光信, 三代俊治. 化学療法の領域 16(12) : 2056-2060, 2000.
 16. 薬剤耐性 HIV-1 の検出および検出法の評価.
森 治代, 小島 洋子, 川畑 拓也, 大竹 徹, 大石 功. 感染症学雑誌 74(5) : 450-457, 2000.
 17. ウイルスの薬剤耐性 3.
杉浦 互. HIV 治療学 Biomedicine & Therapeutics 34 : 57-61, 2000.
 18. 日本における薬剤耐性の現状.
杉浦 互. Confronting HIV 2000 : 4-6, 2000.
 19. 1 型ヒト免疫不全型ウイルス (HIV-1) 治療薬剤に対する薬剤耐性変異の現状と推移.
杉浦 互. 病原微生物検出情報 21 : 142-143, 2000.
 20. 微生物の薬剤耐性「検査法」genotype.
杉浦 互. 臨床と微生物 28 : 3-8, 2001.
 21. HIV の薬剤耐性検査法の開発と治療への応用.
杉浦 互 : カレントセラピー 9 : 51-57, 2001.
- <学会発表リスト>
1. Rapid and sensitive HIV quantification; The real-time PCR based HIV-DNA quantification assay.
M. Motokazu, M. Kondo, K. Suzuki, T. Saito, K. Kawata, A. Ito, T. Shirai, Y. Ishigatsubo, M. Sakamoto, H. Sagara, M. Imai. XIII Inter-national AIDS Conference

- (Durban, South Africa)
2. The molecular epidemiology of HIV-1 in Yokohama, Japan.
M. Kondo, S. Usuku, Y. Noguchi, T. Saito, K. Kawata, A. Ito, T. Shirai, Y. Ishigatsubo, M. Sakamoto, H. Sagara, M. Imai. XIII Inter-national AIDS Conference (Durban, South Africa)
 3. Viral dynamics stage of HIV-1 Infection.
M. Imai, T. Hayashi, M. Kondo, K. Nishioka. XIII International AIDS Conference (Durban, South Africa)
 4. Comparison with the several methods of measurement of HIV-1 RNA viral load in HIV positive patients with subtype E.
K. Kawata, A. Ito, T. Shirai, Y. Ishigatsubo, M. Kondo, T. Saito, M. Imai, M. Sakamoto, H. Sagara. XIII International AIDS Conference (Durban, South Africa)
 5. A MUTUALLY EXCLUSIVE RELATIONSHIP BETWEEN MUTATION FOR NERFINAVIR RESISTANCE D30N AND SAQUINAVIR RESISTANCE L90M IN HIV-1 PR.
Zen Matsuda, Yoshiyuki Yokomaku, Tsuyoshi Oishi, Aiko Okano, Wataru Sugiura. Retroviruses. May.
 6. Evidence of a mutually exclusive relationship between the HIV-1 protease Inhibitor resistance mutations D30N and L90M.
W. Sugiura, Z. Matsuda, Y. Yokomaku, K. Hertogs, B. Larder, Y. Nagai. 4th International Workshop on HIV Drug Resistance & Treatment strategies. Jun.
 7. Status of drug _ resistant HIV-1 In Japan.
Wataru Sugiura, Kaneo Yamada. 12 th Joint Scientific Meeting of the AIDS Panels. Mar.
 8. Phenotypic analysis of HIV-1 protease by virus like particle (VLP) ELISA.
Y. Yokomaku, Z. Matsuda, W. Sugiura, M. Matsuda, K. Sakai & Y. Nagai. Understanding Antiviral Drug Resistance. Dec.
 9. Drug resistant mutation patterns In subtype-E HIV-1 Infected patients who failed to respond to anti-retrovirus therapy.
W. Sugiura, M. Matsuda, H. Miura and K. Ariyoshi. Understanding Antiviral Drug Resistance. Dec.
 10. In vitro human Immunodeficiency virus type 1 protease phenotypic assay using In vitro transcription/translation system.
M. Iga, Z. Matsuda, A. Okayama, W. Sugiura, S. Hashiba, K. Morishita, H. Tsubouchi. Understanding Antiviral Drug Resistance. Dec.
 11. Real -time PCR を用いた簡便で高感度な HIV-1 DNA および episomal 2-Long

- Terminal Repeat DNA 定量法とその臨床的意義。
向出 雅一、近藤 真規子、西澤 雅子、鈴木 一雄、須藤 弘二、齋藤 隆行、嶋 貴子、宇宿 秀三、野口有三、川田 かおる、伊藤 章、坂本 光男、相楽 裕子、植田 昌宏、今井 光信。第14回日本エイズ学会（京都）
12. アンプリコア HIV-1 モニターv1.5 のコントロール・サーベイ。
福嶋 浩一、坂本 優子、吉原 なみ子、加藤 千雅、林 邦彦、今井 光信。第14回日本エイズ学会（京都）
13. アンプリコア HIV-1 モニターv1.5 のコントロール・サーベイ-アンケート調査結果-。
吉原 なみ子、福嶋 浩一、坂本 優子、加藤 千雅、林 邦彦、今井 光信。第14回日本エイズ学会（京都）
14. HIV-1・RNA 検出法の検討 -各種検査材料による Transcription mediated amplification (TMA) 法の評価-。
近藤真規子、嶋 貴子、島崎 緑、斉藤 由美子、合地 研吾、後藤 守孝、松田 重三、川田 かおる、伊藤 章、坂本 光男、三浦 大、相楽 裕子、齋藤 隆行、今井 光信。第14回日本エイズ学会（京都）
15. 横浜市内の1病院でフォローアップ観察中の HIV-1 感染者における SI タイプへ関与する V3 ループの遺伝子変異。
宇宿 秀三、野口 有三、坂本 光男、相楽 裕子、須藤 弘二、西澤 雅子、近藤 真規子、今井 光信。第14回日本エイズ学会（京都）
16. 4 剤併用療法における、protease、RT、p6、cleavage site 領域を含む HIV-1 遺伝子解析の臨床的意義。
鈴木 一雄、向出 雅一、近藤 真規子、今井 光信。第14回日本エイズ学会（京都）
17. HIV-1 薬剤耐性検査のための遺伝子解析に関する検討。
向出 雅一、杉浦 互、松田 昌和、宇宿 秀三、野口 有三、近藤 真規子、鈴木 一雄、植田 昌宏、川田 かおる、伊藤 章、坂本 光男、相楽 裕子、今井 光信。第14回日本エイズ学会（京都）
18. MAGIC-5 細胞を用いた臨床分離株の抗 HIV 剤感受性検査の検討。
須藤 弘二、齋藤 隆行、近藤 真規子、嶋 貴子、西澤 雅子、蜂谷 敦子、岡 慎一、巽 正志、今井 光信。第14回日本エイズ学会（京都）
19. HAART 療法に伴う感染者体内のウイルス phenotype の変化。
森 治代、小島 洋子、川畑 拓也、大竹 徹、大石 功。第14回日本エイズ学会（京都）
20. 凍結昇圧法による HIV の不活性化。
大竹 徹、川畑 拓也、森 治代、小島 洋子、大石 功、早川 潔。第14回日本エイズ学会（京都）
21. 青紫蘇から単離・精製された糖蛋白 Pf-gP6 の抗 HIV 作用機序。
川畑 拓也、大竹 徹、森 治代、小島 洋