

2. 学会発表

①PNA-ISH法によるHIV-1の検出

萩原智子、山本和子、服部純子、永井裕美、  
和田かおる、内海眞、金田次弘

第21回国立病院療養所血液同好会。

②Peptide Nucleic Acid(PNA)プローブを用いたインサイチュウハイブリダイゼーション(ISH)法によるHIV-1の検出

萩原智子、村上貴哉、山本和子、服部純子、  
内海眞、金田次弘

第14回日本エイズ学会総会。

第14回日本エイズ学会総会。

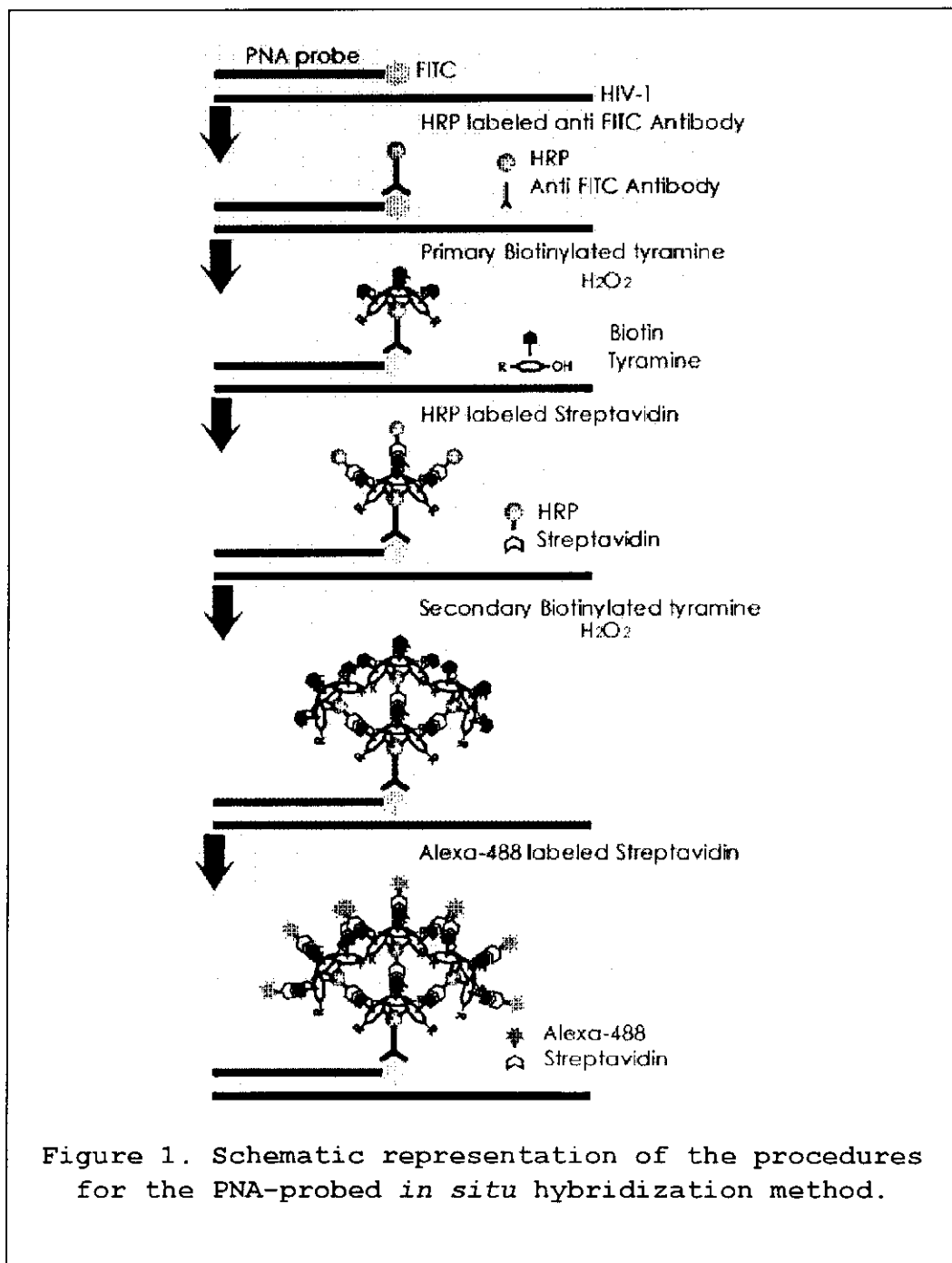
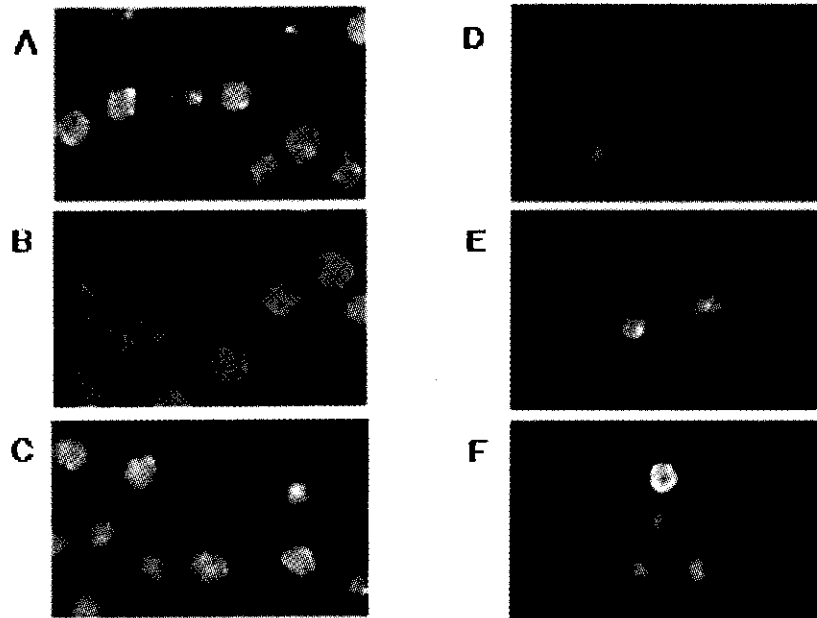
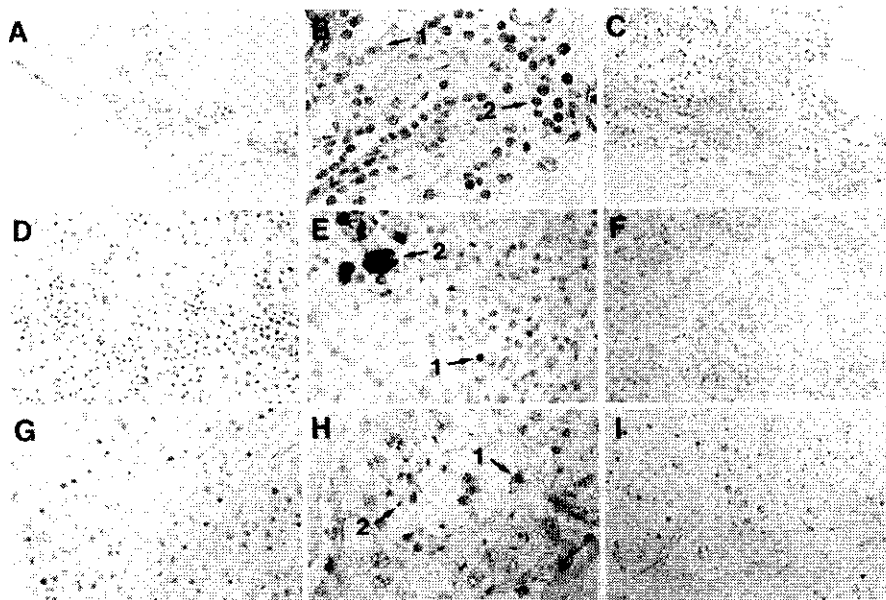


Figure 1. Schematic representation of the procedures for the PNA-probed *in situ* hybridization method.



**Figure 2.** HIV-1 detected in smeared CD4-positive T lymphocytes from AIDS patients. (A)MOLT4-III<sub>B</sub> cells. (B)HIV-1-uninfected MOLT4 cells. (C)ACH-2 cells. (D)Lymphocytes from a normal volunteer (negative control). (E)CD4-positive lymphocytes from AIDS patient 1. (F)CD4-positive lymphocytes from AIDS patient 2.



**Figure 3.** HIV-1 detected in paraffin-embedded section of various organs from an AIDS patient (A, B, D, E, G, and H) and a normal individual (C, F, and I). (A) H&E staining of thymus. (B) PNA-ISH staining of thymus. Arrows 1 and 2 show an epithelial cell and a lymphocyte, respectively. (C) PNA-ISH staining of thymus (normal individual). (D) H&E staining of a lympho node. An arrow shows haemophagocytosis. (E) PNA-ISH staining of a lympho node. Arrows 1 and 2 show an HIV-1 positive lymphocyte and macrophage, respectively. (F) PNA-ISH staining of a lympho node (normal individual). (G) H&E staining of testis. (H) PNA-ISH staining of testis. Arrows 1 and 2 show a spermatocyte and a spermatozoon, respectively. (I) PNA-ISH staining of testis (normal individual).

## 研究成果

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	番号	ページ	出版年
T. Murakami T. Hagiwara K. Yamamoto J. Hattori M. Kasami M. Utsumi T. Kaneda	A novel method for detecting HIV-1 by non-radioactive <i>in situ</i> hybridisation: Application of peptide nucleic acid probe and catalyzed signal amplification	J. Pathol	194(1)	in press	2001
T. Kaneda T. Murakami T. Hagiwara J. Hattori K. Yamamoto K. Sato T. Morishita M. Utsumi	Defective HIV-1 provirus found in peripheral T lymphocytes and granulocytes in an AIDS patient imply viral infection of progenitor cells	AIDS		in press	2001

## 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

分担研究者 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)

### 研究要旨

平成12年4月に「アンプリコア HIV-1 モニターv1.5」が新たに承認された。このキットはサブタイプに対する反応性が改良され、さらに高感度測定が可能となった。今回「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実施したところ、精度については標準法、高感度法共に従来品と同等であり、HIV-1 サブタイプEについては HIV-1 サブタイプBと同様の精度であることが分かった。標準法のコントロールサーベイに参加したのは37施設であり、このうち測定値のばらつき具合に問題があると思われたのは6施設(16.2%)、高感度法のコントロールサーベイには28施設が参加し同様の問題があると思われたのは7施設(25%)であった。これらの施設で再検査、問題点のチェックを行ったところ、抽出等の手技上の問題や機器のメンテナンスの問題などが挙げられ、これらを改善することで測定値のばらつきが抑えられた施設もいくつかみられた。さらに高感度法では不適切な操作による RNA 回収不良と考えられる低値への逸脱が多くみられた。また、これら測定値の逸脱のみられたケースでは測定された吸光度や添付のコントロールの値には異常は見られなかったことから、より良い精度で RNA 定量を行うためにも添付のコントロール以外にも参照品をおく必要性が認められた。

### A. 目的

現在わが国において対外診断用医薬品の承認を受けた HIV RNA 定量用キットはロシュ・ダイアグノスティクス株式会社の「アンプリコア HIV-1 モニター」のみであったが、HIV-

E, F および G に対しての反応性に問題があることが指摘されていた。平成12年4月にこれらの問題点を改良し、更には高感度法測定が可能となった「アンプリコア HIV-1 モニターv1.5」が新たに承認された。今回「アンプリコア HIV-1 モニターv1.5」の導入を期にキットの精度および施設間のばらつきの程度を知り、さらには改良点であるサブタイプの反応性の確認および高感度法に測定の精度を調べる目的で本キットを日常検査に使用している施設を対象にコントロールサーベイを実施した。

### B. 方法

コントロールサーベイ試料：標準法用はパネルA (6,500 コピー/mL: サブタイプ E)、パネルB (2,500 コピー/mL)、パネルC (25,000 コピー/mL)、パネルD (250,000 コピー/mL)、パネルE (陰性血漿) の5試料を作成した。高感度法用はパネルF (685 コピー/mL: サブタイプ E)、パネルG (5,700 コピー/mL)、パネルI (450 コピー/mL)、パネルJ (160 コピー/mL)、パネルK (100 コピー/mL)、パネルL (陰性血漿) の6試料を作成した。

標準法のみ参加は12施設、高感度法のみ参加は3施設、標準法及び高感度法の両方に参加は25施設あり各施設に該当パネルを配布しコントロールサーベイを行った。また結果が目標値の1/3-施設には対しては再検査を依頼し、問題点の把握につとめた。

## C. 結果

標準法のコントロールサーベイの結果、パネルAは平均8,200コピ-/mL、CVは65.2、パネルBは平均3,600コピ-/mL、CVは66.6、パネルCは36,000コピ-/mL、CVは59.5、パネルDは平均280,000コピ-/mL、CVは57.7であった。すべての検体で平均値と目標値に差はなく、ばらつきも従来品の「アンプリコア HIV-1 モニター」と比べて問題はなかった。高感度法のコントロールサーベイの結果はパネルFは平均910コピ-/mL、CVは105.0、パネルGは平均5,000コピ-/mL、CVは38.3、パネルHは平均490コピ-/mL、CVは48.9、パネルIは平均180コピ-/mL、CVは52.3、パネルJは平均110コピ-/mL、CVは58.5であった。パネルFで特に大きくばらついているが、これは1施設が飛び抜けて逸脱(5,100コピ-/mL)していたためこれを除くとCVは61.8となる。この施設は後述の再検査では範囲内の収まっている。また陰性検体として加えたパネルEおよびパネルKはいずれも検出限界以下でありコンタミネーションは見られなかった。サブタイプE検体(パネルAおよびパネルF)は他の検体(サブタイプB)と同等の精度で測定されていた。今回のコントロールサーベイの結果では標準法と高感度法の間で精度に差はみられなかった(表1)。

個々の施設の測定値をプロットしたものを図1-標準法で6施設でみられ、いずれも目標値の3倍を越えた値であった。その内訳はNo.3の施設がパネルA、No.7の施設がパネルB、No.10の施設がパネルA、B、No.18の施設がパネルB、C、D、No.21の施設がパネルB、No.42の施設がパネルCでありRNA量の少ないもの(数千コピ-/mL)で想定範囲を越える傾向がみられた。これらの再検査で結果の出た施設は4施設でNo.3、No.18、No.42の各施設では遠心後あるいはエタノール洗浄後の放置時間の短縮、自動洗浄機の導入など手技上の問題点を解決したところ想定範囲に収まったが、No.10の施設は手技上の問題は特にみられないにもかかわらず再検査の結果も高値に逸脱した。またこの施設で調整した検体を別施設で測定したところ測定値に問題は

なく、このことから抽出等の手技上の問題ではなくサーマルサイクラー、自動洗浄機などの機器のメンテナンスの問題が指摘された。今回測定値の逸脱があった検体では同時に測定しているQS(内部標準)の吸光度が低い傾向もみられた。

高感度法ではNo.4の施設がパネルJ、No.6の施設がパネルJ、No.10の施設がパネルF、No.21の施設がパネルF、No.34の施設がパネルF、I、J、No.40の施設がパネルG、I、No.42の施設がパネルJと合計7施設で測定値の逸脱がみられた。再検査を行いNo.2、21、42の3施設では測定値が想定範囲におさまった。No.34の施設は再測定結果も低値となり問題点を検討した結果、抽出に用いるチューブの形状により超遠心によるRNA回収が不十分であったことが指摘された。No.40の施設も同様に低値となったが、この施設では超遠心機が無い変法にて高感度法を実施した。高感度法の傾向としては数百コピ-/mLの検体を検出限界以下とすること多く、超遠心や抽出によるRNAの回収不良が測定値に大きな影響を及ぼしていることが考えられた。

今回コントロールサーベイに参加した40施設のうち9施設で計算ミスがあった。また測定値の逸脱や手技上のミス等と経験年数、測定頻度には関連性は認められなかった。

## D. まとめ

アンプリコアHIV-1モニターv1.5は従来品(アンプリコアHIV-1モニター)と同等の精度(1/3- HIV-1サブタイプEに対してもHIV-1サブタイプBと同様の精度で測定が可能であった。高感度法は標準法と同等の精度であったが、RNA回収不十分となる問題が指摘されたため超遠心および抽出時には十分な注意が必要と思われた。

今回は測定値が逸脱した施設では手技の見直し、再検査等により標準法は3施設、高感度法は3施設の測定値が改善されたことから、測定値のばらつきを抑えるためには、実施者のトレーニング強化する一方、手技上の問題点を把握・改善するための詳

細なマニュアルの作成が望まれる。測定値の改善の見られなかった施設では機器（サーマルサイクラー・洗浄機など）の問題や超遠心機の不備が指摘され、定期的な器機のメンテナンスや充実した設備の必要性が感じられた。なお、これら測定値の改善の見られなかった施設および再検査の出来なかった施設については現在もフォローアップ中である。

測定値に問題のあったケースでは、キット添付のコントロールには問題が無く、QS（内部標準）についても計算可能な吸光度を示しており、このような外部精度管理に参加しないとばらつきがどれだけ大きいかかわからないこと意味している。したがってより高い精度で測定するためにはこのような精度管理を定期的実施する、あるいは個々の施設で添付のコントロール以外の参照品（前回測定時の陽性検体、市販のパネルなど）をおく必要があると思われた。

#### E. 研究報告

学会発表

福嶋浩一、坂本優子、吉原なみ子、加藤千雅、林邦彦、今井光信：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、第14回エイズ学会総会、2000年11月京都

吉原なみ子、坂本優子、福嶋浩一、加藤千雅、林邦彦、今井光信：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一、第14回エイズ学会総会、2000年11月京都

表1 コントロールサーベイ集計結果

	標準法				
	Panel	Panel	Panel	Panel	Panel
Target value	6.5E+03	2.5E+03	2.5E+04	2.5E+05	<400
AVG	8.2E+03	3.6E+03	3.6E+04	2.8E+05	<400
SD	5.3E+03	2.4E+03	2.1E+04	1.6E+05	-
CV	65.2	66.6	59.5	57.7	-
MAX	3.0E+04	1.1E+04	1.2E+05	1.2E+05	<400
MIN	2.7E+03	1.2E+03	8.8E+03	8.8E+03	<400

	高感度法					
	Panel	Panel	Panel	Panel	Panel	Panel
Target value	6.9E+02	5.9E+03	4.5E+02	1.6E+02	1.0E+02	<50
AVG	9.1E+02	5.0E+03	4.9E+02	1.8E+02	1.1E+02	<50
SD	9.5E+02	1.9E+03	2.4E+02	9.2E+01	6.2E+01	-
CV	105.0	38.3	48.9	52.3	58.5	-
MAX	5.1E+02	9.5E+03	1.1E+03	4.9E+02	2.4E+02	<50
MIN	2.3E+02	1.9E+03	1.8E+02	3.1E+01	2.6E+01	<50

図1 標準法のコントロールサーバイ結果

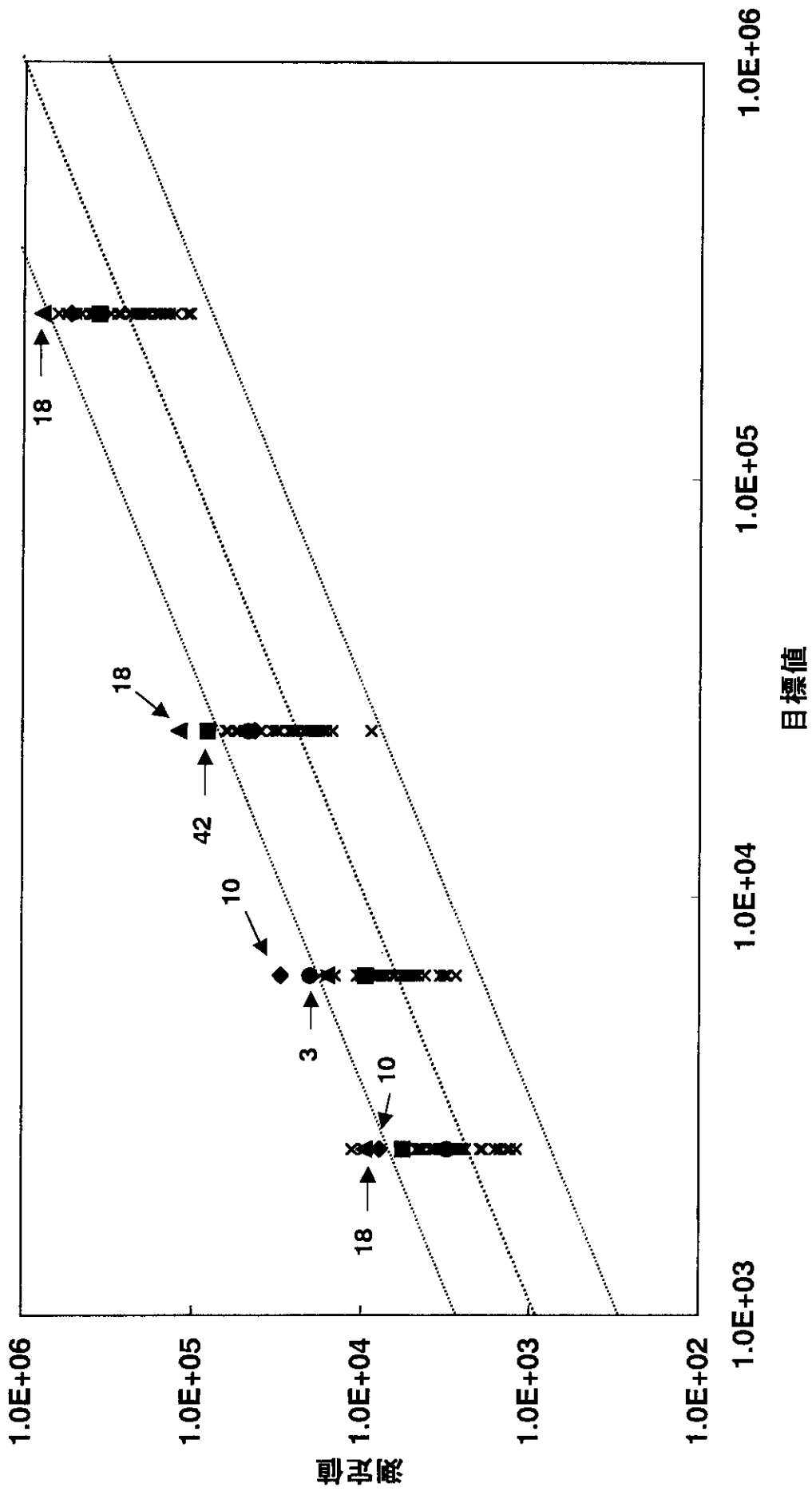




図2 標準法のコントロールサーベイ・再検査

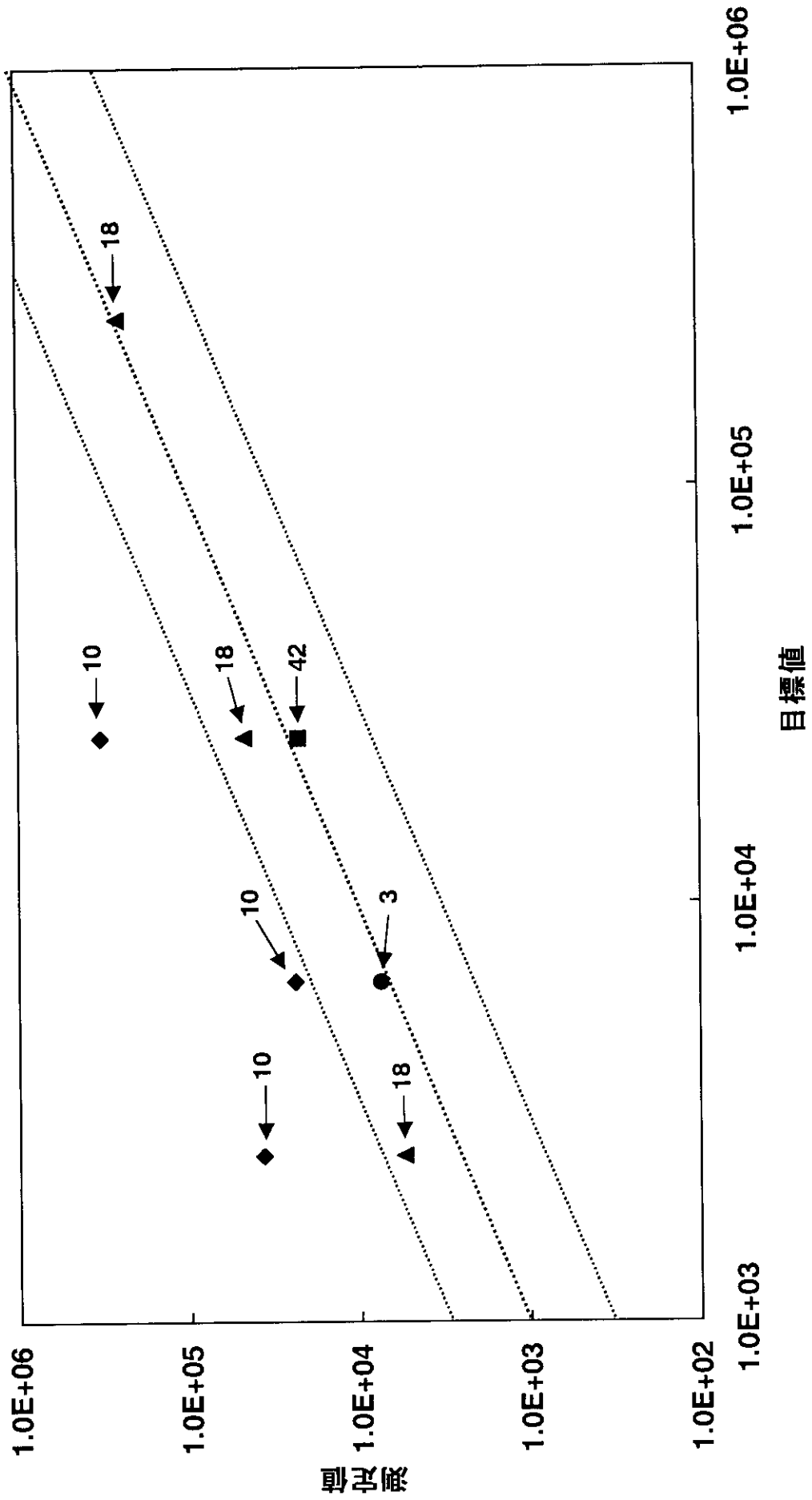


図3 高感度法のコントロールサーベイ結果

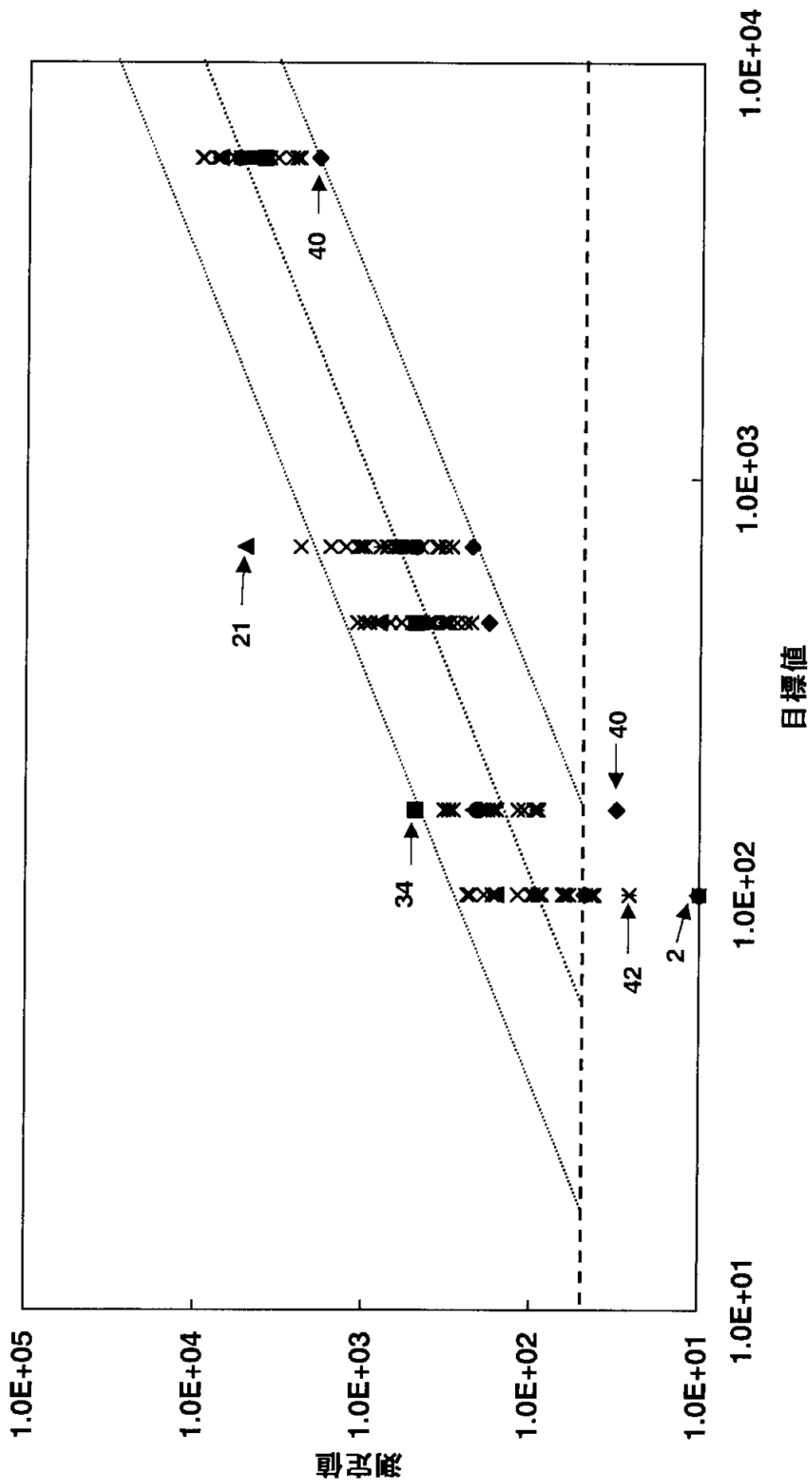
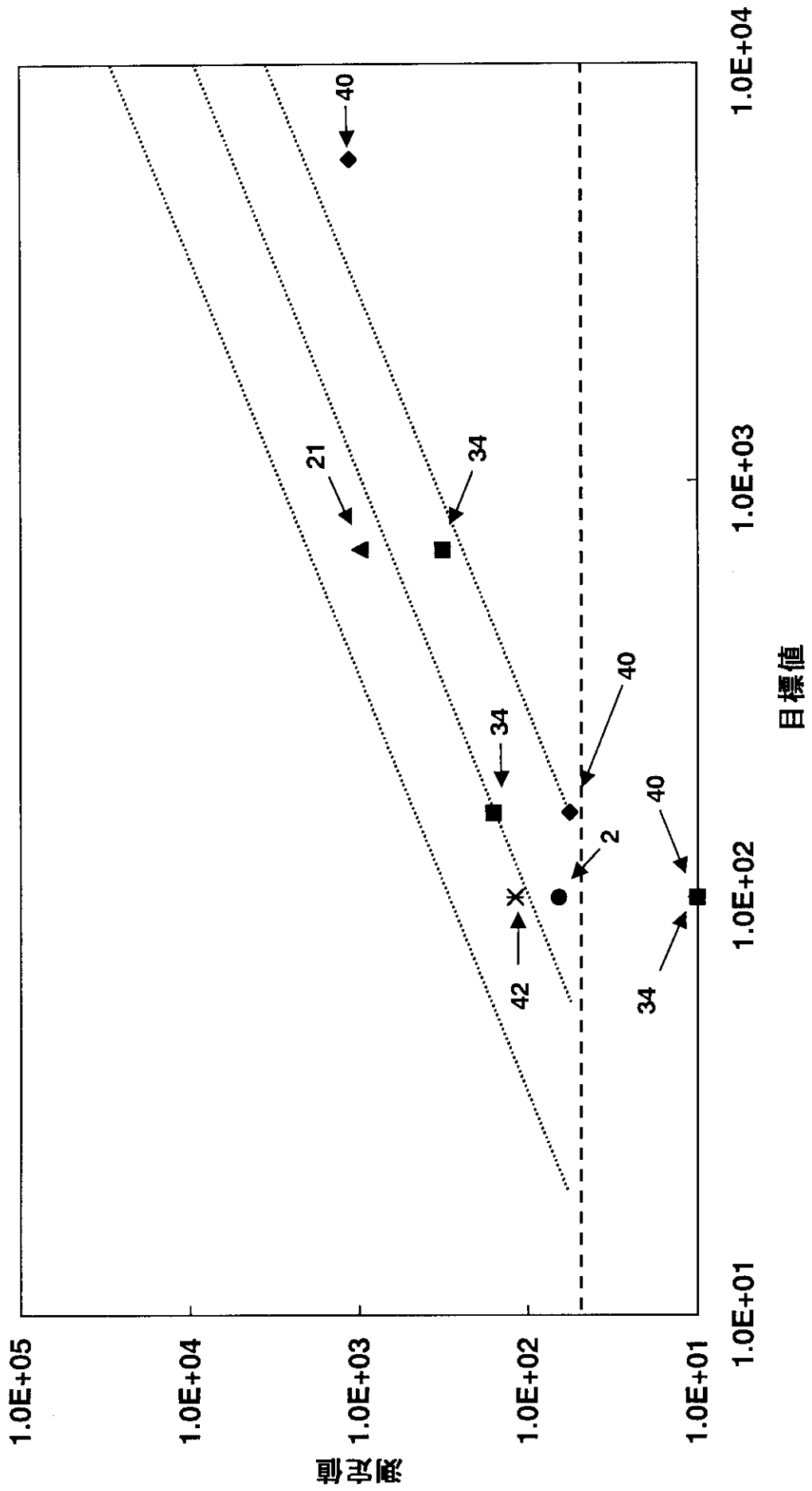


図4 高感度法のコントロールサーベイ・再検査



### 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
E. Tsuji, T. Saito, S. Mizuno, M. Imai	Evaluation of Detection Methods of HIV Proliferation for the Screening of Anti-HIV Compounds.	The Journal of AIDS Research	2(2)	79-84	2000
T. Murakami, T. Hagiwara, K. Yamamoto, J. Hattori, M. Kasami, M. Utsumi T. Kaneda	A novel method for detecting HIV-1 by non-radioactive in situ hybridization: application of a peptide nucleic acid probe and catalyzed signal amplification.	Journal of Pathology	in press		2000
W. Sugiura, Z. Matsuda, Y. Yokomaku, K. Hertogs, B. Larder, Y. Nagai.	Evidence of a mutually exclusive relationship between the HIV-1 protease Inhibitor resistance mutations D30N and L90M.	Antiviral Therapy	5	33-34	2000
M. Mukaide, W. Sugiura, M. Matsuda, S. Usuku, Y. Noguchi, K. Suzuki, K. Kawata, A. Ito, H. Sagara, K. Yamada, M. Kondo, M. Imai.	Evaluation of Viroseq™ -HIV Version 2 for HIV drug resistance.	JAPANESE JOURNAL INFECTIOUS DISEASES	53 (5)	203-205	2000
M. Kondo M. Imai.	HIV-1 subtype detected during 1991-March in Japan.	Agents Surveillance Report	21	141-142	2000
A. Hachiya, S. Aizawa-Matsuoka, M. Tanaka, Y. Takahashi, S. Ida, H. Gatanaga, Y. Hirabayashi, A. Kojima, M. Tatsumi S. Oka.	Rapid and simple phenotypic assay for drug susceptibility of human immunodeficiency virus type 1 using CCR5 - expressing HeLa / CD4+ cell clone 1-10 (MAGIC5).	Antimicrob. Agent. Chemother.	45	495-501	2001
林孝子, 近藤真規子, 島崎緑, 植田昌宏, 今井光信.	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.	感染症学雑誌	74(1)	82-83	2000
林孝子, 齊藤隆行, 近藤真規子, 渡邊寿美, 今井光信	免疫蛍光測定法によるHIVp24抗原検出キットの評価.	感染症学雑誌	74(9)	709-715	2000
嶋貴子, 林孝子, 近藤真規子, 齋藤隆行, 川田かおる, 伊藤 章, 相楽裕子, 今井光信.	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.	医学と薬学	43(6)	1131-1140	2000

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
木原正博, 今井光信, 清水 勝.	献血者におけるHIV感染状況.	病原微生物検出 情報	21(7)	140 -141	2000
近藤真規子, 今井光信	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.	病原微生物検出 情報	21(7)	141 -142	2000
今井光信	エイズ検査はこわくない.	健	29(4)	21-23	2000
森 治代, 小島洋子, 川畑 拓也, 大竹徹, 大石 功	薬剤耐性HIV-1の検出および検出法の評価.	感染症学雑誌	74(5)	450 -457	2000
杉浦 互	ウイルスの薬剤耐性 3.	HIV治療学 Biomedicine & Therapeutics	34	57-61	2000
杉浦 互	日本における薬剤耐性の現状.	Confronting HIV 2000		4-6	2000
杉浦 互	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.	病原微生物検出 情報	21	142 -143	2000
杉浦 互	微生物の薬剤耐性「検査法」genotype.	臨床と微生物	28	3-8	2001
杉浦 互	HIVの薬剤耐性検査法の開発と治療への応 用.	カレントセラピー	9	51-57	2001

---

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」報告書

発行日 2001年3月31日  
発行者 主任研究者 今井 光信（神奈川県衛生研究所）  
発行所 研究班事務局  
神奈川県衛生研究所ウイルス部  
〒241-0815 横浜市旭区中尾 1-1-1

---

©2001

印刷 (株)長谷川印刷

本報告書に掲載された論文及び図表には  
著作権が発生しておりますので  
利用にあたりご留意ください。