

◇RT領域耐性関連変異 M41L, K70R, T215Y の場合

	<i>AZT</i>	<i>d4T</i>	<i>3TC</i>
M41L	15	12	0
K70R	20	0	0
T215Y	35	25	0
合計	70	37	0 (点)
耐性度	High-level resistance	Intermediate resistance	Susceptible

0 ~ 9 点	Susceptible
10 ~ 14 点	Potential low-level resistance
15 ~ 29 点	Low-level resistance
30 ~ 59 点	Intermediate resistance
60点以上	Hige-level resistance

図3. スタンフォードシステムによる耐性度の算出方法

C	AZT	D4T	TDF	ABC	DDI	3TC
30						
48						
50						
52						
54						
56						
58						
60						
62						
64						
66						
68						
70						
72						
74						
76						
78						
80						
82						
84						
86						
88						
90						
92						
94						
96						
98						
100						
102						
104						
106						
108						
110						
112						
114						
116						
118						
120						
122						
124						
126						
128						
130						
132						
134						
136						
138						
140						
142						
144						
146						
148						
150						
152						
154						
156						
158						
160						
162						
164						
166						
168						
170						
172						
174						
176						
178						
180						
182						
184						
186						
188						
190						
192						
194						
196						
198						
200						
202						
204						
206						
208						
210						
212						
214						
216						
218						
220						
222						
224						
226						
228						
230						
232						
234						
236						
238						
240						
242						
244						
246						
248						
250						
252						
254						
256						
258						
260						
262						
264						
266						
268						
270						
272						
274						
276						
278						
280						
282						
284						
286						
288						
290						
292						
294						
296						
298						
300						

- High Level Resistance
- Intermediate Resistance
- Low Level Resistance
- Contributes to Resistance
- No Resistance
- Unknown
- Hypersensitivity

Updated 11/19/01. Note: DDC is not listed because its resistance profile is similar to DDI and it is used less frequently than the other NRTIs. Several additional mutations are discussed in the notes below

Updated 11/19/01.

C	NVP	DLV	ERV
30			
48			
50			
52			
54			
56			
58			
60			
62			
64			
66			
68			
70			
72			
74			
76			
78			
80			
82			
84			
86			
88			
90			
92			
94			
96			
98			
100			
102			
104			
106			
108			
110			
112			
114			
116			
118			
120			
122			
124			
126			
128			
130			
132			
134			
136			
138			
140			
142			
144			
146			
148			
150			
152			
154			
156			
158			
160			
162			
164			
166			
168			
170			
172			
174			
176			
178			
180			
182			
184			
186			
188			
190			
192			
194			
196			
198			
200			
202			
204			
206			
208			
210			
212			
214			
216			
218			
220			
222			
224			
226			
228			
230			
232			
234			
236			
238			
240			
242			
244			
246			
248			
250			
252			
254			
256			
258			
260			
262			
264			
266			
268			
270			
272			
274			
276			
278			
280			
282			
284			
286			
288			
290			
292			
294			
296			
298			
300			

- High Level Resistance
- Intermediate Resistance
- Low Level Resistance
- Accessory
- No Resistance
- Unknown
- Hypersensitivity

Updated 11/19/01.

図 4. スタンフォードシステムにおける主要な薬剤耐性関連変異に対応する耐性度の一覧 <http://hivdb.stanford.edu> の drug resistance notes を参照

表1. 算出された薬剤耐性度とフェノタイプ検査の結果一覧

培養上清 検体名	主要な耐性変異		検査法	フェノタイプ検査での薬剤耐性度と算出された薬剤耐性度の結果													
	RT領域	PR領域		AZT	ddI	ddC	d4T	3TC	ABC	NVP	EFV	DLV	IDV	NFV	SQV	RTV	APV
GM68-42	無し	無し	スタンフォードシステム	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
			パーチャルフェノタイプ	1.1	0.8	0.9	0.9	0.9	0.7	1.8	1.3	2.1	0.7	1.0	0.6	0.8	0.6
			フェノタイプ	1.3	0.8	1.6	0.9	0.3	0.3	0.7	0.7	2.9	1.2	0.3	0.6	0.6	0.2
Y34-000626	無し	無し	スタンフォードシステム	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
			パーチャルフェノタイプ	1.1	0.8	0.9	0.9	0.9	0.7	1.4	1.1	1.6	0.7	1.0	0.6	0.8	0.6
			フェノタイプ	0.3	0.5	0.5	0.2	0.5	-	-	-	-	0.2	1.4	3.5	0.8	-
Y105	無し	無し	スタンフォードシステム	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
			パーチャルフェノタイプ	1.1	0.8	0.9	0.9	0.9	0.7	1.4	1.1	1.6	0.7	0.9	0.6	0.7	0.7
			フェノタイプ	0.7	0.9	1.5	0.7	0.5	0.9	1.3	1.8	5.7	0.6	0.4	0.3	0.7	0.3
Y115-010402	無し	無し	スタンフォードシステム	L	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
			パーチャルフェノタイプ	1.9	0.9	0.9	0.9	1.0	0.8	1.4	1.1	1.6	0.7	1.0	0.6	0.8	0.6
			フェノタイプ	1.0	0.4	0.3	0.7	1.0	0.6	1.5	2.7	1.9	1.0	1.1	1.0	<0.3	1.0
H093-53	M184V	無し	スタンフォードシステム	I	L	L	L	H	I	P	P	P	S	S	S	S	
			パーチャルフェノタイプ	3.1	1.4	1.4	0.9	59	2.1	3.6	1.6	1.9	0.7	0.9	0.6	0.7	0.7
			フェノタイプ	2.6	4.1	1.5	0.7	>23.0	4.4	2.4	2.9	5.1	0.9	1.9	1.2	0.6	<0.3
H199-5	M184V	V82A L90M	スタンフォードシステム	S	L	L	S	H	I	S	S	S	H	H	H	H	
			パーチャルフェノタイプ	0.9	1.3	1.6	0.7	48	1.7	1.4	1.1	1.6	14	25	7.8	74	2.4
			フェノタイプ	1.0	4.6	1.5	1.1	>23.0	3.9	0.7	0.7	1.4	46	>41.3	14	118	3.1
H172-45	T215Y	無し	スタンフォードシステム	I	L	L	I	S	L	S	S	S	S	S	S	S	
			パーチャルフェノタイプ	9.7	1.0	1.0	1.2	1.8	1.2	1.4	1.1	1.6	0.7	0.9	0.6	0.7	0.7
			フェノタイプ	4.4	0.2	0.5	1.4	0.7	<0.2	1.0	1.0	1.4	0.5	0.4	0.3	0.4	0.5
Y48-16 (000621)	T215Y Y188L	I84V L90M	スタンフォードシステム	H	P	P	I	S	I	H	H	L	I	H	H	I	
			パーチャルフェノタイプ	24	1.1	1.0	1.5	2.9	1.7	62	107	17	10	18	18.0	17	4.7
			フェノタイプ	49	0.4	0.4	0.8	2.0	1.3	>55.1	61	6.1	4.2	10	9.7	12	3.2
H220-56	M184V T215Y K103N	無し	スタンフォードシステム	I	I	I	I	H	I	H	H	H	S	S	S	S	
			パーチャルフェノタイプ	2.2	1.5	1.8	0.9	48	2.4	46	57	49	0.7	1.0	0.6	0.8	0.6
			フェノタイプ	6.3	0.9	2.1	0.4	>37.3	1.5	>46.0	385.8	117.4	0.8	1.8	0.4	0.4	0.3
H127-6	M184V T215Y	D30N	スタンフォードシステム	I	I	I	I	H	H	S	S	S	P	H	S	P	
			パーチャルフェノタイプ	12	1.7	1.9	1.5	51	3.5	1.4	1.1	1.6	1.4	38	1.2	1.2	0.7
			フェノタイプ	2.2	3.0	1.9	1.5	>19.4	2.7	4.0	0.3	1.2	0.4	7.5	1.0	0.6	0.3
H129-54	M184V T215F	L90M	スタンフォードシステム	H	I	H	I	H	H	P	P	P	I	H	I	I	
			パーチャルフェノタイプ	13	*	*	*	55	*	3.6	1.3	1.9	7.4	19	4.0	9.3	1.9
			フェノタイプ	4.3	1.2	3.4	0.8	30	2.6	39	3.3	8.1	6.3	160	1.6	14	2.0
H197-12	M184V T215Y	V82A L90M	スタンフォードシステム	I	I	I	I	H	I	S	S	S	H	H	H	H	
			パーチャルフェノタイプ	4.8	1.5	1.8	1.1	58	2.8	1.4	1.1	1.6	18	34	5.4	65	6.9
			フェノタイプ	21	2.3	1.6	1.6	30	2.6	3.6	0.7	1.0	7.9	6.9	0.9	107	4.0
パーチャルフェノタイプ カットオフ値				(4.0)	(2.0)	(2.0)	(1.8)	(4.5)	(3.0)	(8.0)	(6.0)	(10.0)	(3.0)	(4.0)	(2.5)	(3.5)	(2.0)
フェノタイプ(Virco) カットオフ値				(4.0)	(3.5)	(3.5)	(3.0)	(4.5)	(3.0)	(8.0)	(6.0)	(10.0)	(3.0)	(4.0)	(2.5)	(3.5)	(2.5)

スタンフォードシステム

RTとプロテアーゼ領域で

薬剤耐性に関連がある変異に対応して配点し、
その合計によって耐性度を算出する

- S : Susceptible (0-9 点)
- P : Potential low-level resistance (10 - 14 点)
- L : Low-level resistance (15 - 29 点)
- I : Intermediate resistance (30 - 59 点)
- H : High-level resistance (60 点以上)

パーチャルフェノタイプ

耐性度は分離株と標準株との
EC₅₀の比(FoldResistance)として算出され、
設定されたカットオフ値を超えたものを耐性とする

フェノタイプ

(通常に標記したものはVirco社で実施

斜体で標記したものは神奈川衛研で実施)

[Y34-010402,H093-53(ddI),Y48-16(AZT),H129-54(NFV)]

Virco社

分離株と標準株とのEC₅₀の比(FoldResistance)が
設定されたカットオフ値を超えたものを耐性とする

神奈川衛研

分離株と標準株とのEC₅₀の比(FoldResistance)が
10倍を超えたものを耐性とする

-: 未検査

*: 測定不能

12. 薬剤耐性検査体制(医療機関との連携)

白阪 琢磨 (国立大阪病院 臨床研究部)

研究要旨

HIV 感染症の治療の進歩を支えるのは診断技術の開発である。RT-PCR 法の開発は血中のウイルス量測定を可能とし、HAART 導入を確実なものとした。HAART によって HIV 感染者は慢性感染症となったが、薬剤耐性 HIV の出現が治療の障害となり、血中 HIV ウイルス量定量は現時点の治療状況を示すものであり治療のゴールではない事も明らかとなってきた。HIV 感染症の治療の確立のためには、この様な課題を克服のために新たな技術開発が望まれている。今回、我々はエイズ診療拠点病院で HIV 診療に携わる医師が、HIV 感染症の治療、特に HAART の実施において開発段階の検査にどのようなニーズがあるのか、さらに、その場合に検査へのアクセスがあるかどうかの実態を把握するためアンケート調査を実施し結果を得たので報告する。

A. 研究目的

拠点病院で HIV 診療に携わる医師が、HIV 感染症の治療、特に HAART の実施において開発段階の検査にどのようなニーズがあるのか、さらに、その場合に検査へのアクセスがあるかどうかの実態を把握する。

B. 研究方法

わが国の拠点病院である全施設にアンケート(別紙参照、無記名)を郵送し、回収した結果を集計した。

C. 研究結果

全国エイズ診療拠点病院 365 施設に調査票を郵送し 258 施設から調査票を得、回収率は 70.7%であった。重複施設は 4 施設であり回答票数は 262 枚であった。以下、設問にそって回答をまとめた。

1) 各施設の HIV 診療担当者に症例経験について(図-1)

症例経験は『あり』が 207 名(79.0%)で、『なし』が 55 名(21.0%)であった(平均症例数 25.0 名)。詳細は、1-5 例経験が 96 名(36.6%)で、6-10 例が 39 名(14.9%)、11-20 例が 25 名(9.5%)、21-50 例が 28 名(10.7%)、51-100 例が 10 (3.8%)、101 例以上が 8 名(3.1%)、記載なしが 1 名(0.4%)であった。

以後の症例数別では記載なしの一名は除いた。
2) 遺伝子型薬剤耐性検査について(図 2-a, -b)

必要性については『あり』が 183 名(69.8%)、『なし』が 50 名(19.1%)、『無回答』が 29 名(11.1%)であった。必要性が『あり』と回答した 183 名中で依頼先が『あり』が 106 名(57.9%)、『なし』が 72 名(39.3%)、『無回答』が 5 名(2.7%)であった。必要性について症例数別に比べると、必要性が『あり』と回答したものは、0 例が 25.5%、1-5 例が 68.8%、6-10 例が 97.4%、11-20 例が 84.0%、21-50 例は 92.9%、51 例以上が 94.4%であっ

た。本検査を必要性ありと回答した中で依頼先が「あり」が57.9% (図2-b)であった。

3) 表現型薬剤耐性検査について(図3-a, -b) 必要性については『あり』が179名(68.3%)、『なし』が55名(21.0%)、『無回答』が28名(10.7%)であった。必要性が『あり』と回答した179名中で依頼先が『あり』が75名(41.9%)、『なし』が94名(52.5%)、『無回答』が10名(5.6%)であった。必要性について症例数別に比べると、必要性が『あり』と回答したものは、0例が23.6%、1-5例が68.8%、6-10例が92.3%、11-20例が76.0%、21-50例は100%、51例以上が88.9%であった。

4) プロウイルス検査について(図4-a, -b) 必要性については『あり』が142名(54.2%)、『なし』が78名(29.8%)、『無回答』が42名(16.0%)であった。必要性が『あり』と回答した142名中で依頼先が『あり』が49名(34.5%)、『なし』が89名(62.7%)、『無回答』が4名(2.8%)であった。必要性について症例数別に比べると、必要性が『あり』と回答したものは、0例が30.9%、1-5例が53.1%、6-10例が69.3%、11-20例が48.0%、21-50例は71.4%、51例以上が77.8%であった。

5) 薬剤血中濃度測定について(図5-a, -b) 必要性については『あり』が167名(63.7%)、『なし』が62名(23.7%)、『無回答』が33名(12.6%)であった。必要性が『あり』と回答した167名中で依頼先が『あり』が58名(34.7%)、『なし』が103名(61.7%)、『無回答』が6名(3.6%)であった。必要性について症例数別に比べると、必要性が『あり』と回答したものは、0例が25.5%、1-5例が64.6%、6-10例が79.5%、11-20例が72.0%、21-50例は89.3%、51例以上が88.9%であった。

6) 検体輸送方法について

検体の郵送方法(重複回答)について、

『検査センターを利用』が173名(66.0%)、『運送業者』が34名(13.0%)、『郵送』が6名(2.3%)、『その他』が11名(4.2%)、無回答が57名(21.8%)であった。

7) 初期感染を疑う患者での検査など対応について

感染の初期症状を自ら疑って来院した者への対応を尋ねたところ回答(重複回答)は、『抗体検査を実施』が135名(51.5%)、『ウイルス量測定』が54名(20.6%)、『その他』が12名(4.6%)、『他施設紹介』が2名(0.8%)、『無回答』が97名(37.0%)であった。

D. 考察

調査票を送付した365施設の258施設から262名の回答が得られた。寄せられた回答によれば55施設(回答施設の21.3%)は診療経験がなかった。今回、必要性と依頼先の有無について尋ねた保険適応外検査は近年、エイズ関連学会や医学誌などで情報提供されていると考えられるいくつかのものに限った。診療経験のある施設からの回答では薬剤耐性検査の必要性が『遺伝子型』で81.6%、『表現型』で80.0%であったが、ニーズがあると回答した者で依頼先があるものは、それぞれ57.9%、42.0%であった。両検査のニーズの高さに比べ、依頼先があるという回答が約半数を占めた。依頼先が「ない」との回答の理由については今回、尋ねていないので今後の検討課題と考えるが、検査施設の情報提供も含めた検査体制の確立が望まれる。『プロウイルス検査』の必要性は54.2%が「あり」と回答し、有診療経験医では59.9%が「必要あり」とした。しかし、必要ありとの回答者で依頼先「あり」と回答したものは35.2%であった。薬剤の血中濃度測定は必要性『あり』が63.7%で、症例経験ありの医師で73.4%であった。必要ありとの回答者で依頼先「あり」と回答したものは34.7%であった。これらの検査のニーズは前二者程ではなかったが、必

要と回答したもので依頼先があるものは3割程度にとどまり、今後の課題と考えた。検体の運搬については結果の通りであった。最後の設問の趣旨は、『HIVに感染したかもしれない機会があり体内にHIV抗体が産生されるまでの期間、いわゆるwindow periodにあつて感染を疑って受診した者への対応』につき尋ねた。回答（重複回答あり）は、抗体検査の実施が51.5%で、ウイルス量測定が20.6%であったが、無回答が37.0%、他施設紹介の回答もあり、統一した対応がない様に見受けられた。

E. 結論

全国の拠点病院365施設に調査票（無記名）で送付し70.7%の回収率であった。今回尋ねた保険適応外検査は薬剤耐性検査（遺伝子型）、薬剤耐性検査（表現型）、プロウイルス検査、

血中薬剤濃度検査の必要性は69.8%～63.7%であった。診療経験ありの回答者では、それぞれ81.6%、80.0%、59.9%、73.4%と必要性が高かった。依頼先については検査にもよるが遺伝子型薬剤耐性検査が半数を超えたが、他は半数以下であった。今後、依頼先を中心とした詳細な検討が必要である。

F. 健康危険情報

該当しない。

G. 発表

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

いずれもない。

図-1 症例経験数の分布

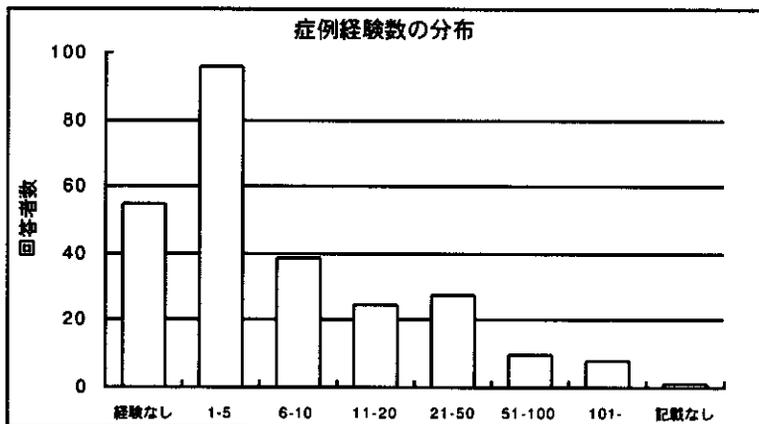


図 2-a 薬剤耐性検査（遺伝子型）の必要性（症例数別）

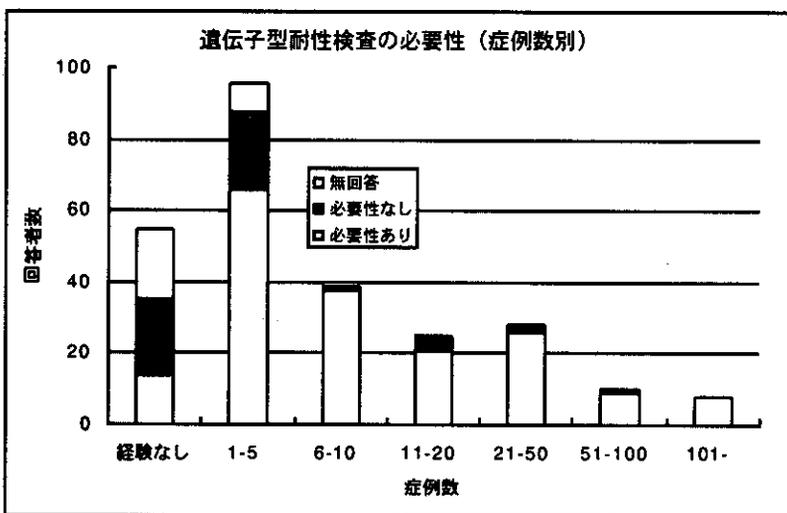


図 3-a 薬剤耐性検査（表現型）の必要性（症例数別）

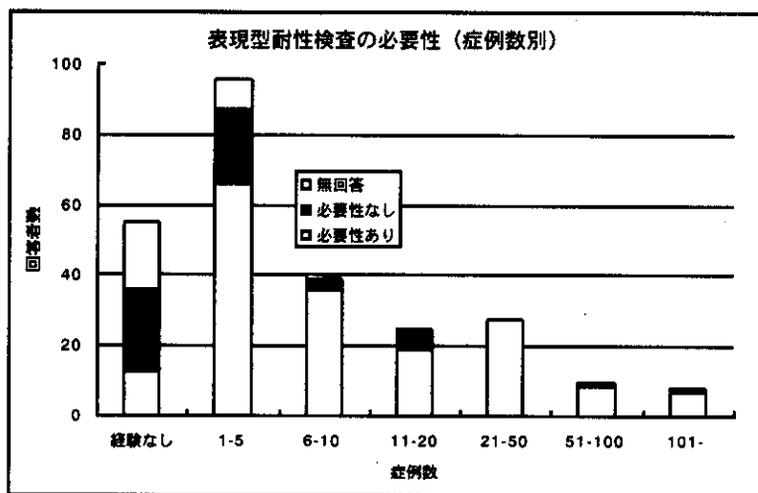


図 2-b 同検査の依頼先の有無

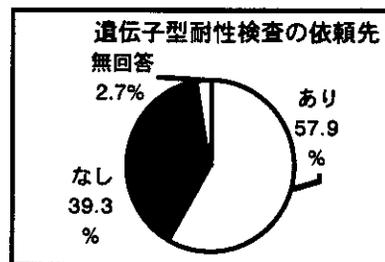


図 3-b 同検査の依頼先の有無

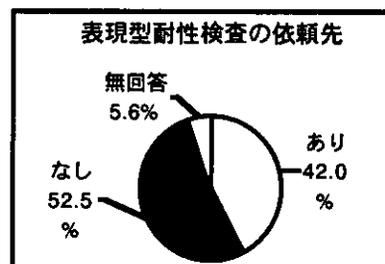


図 4-a プロウイルス検査の必要性 (症例数別)

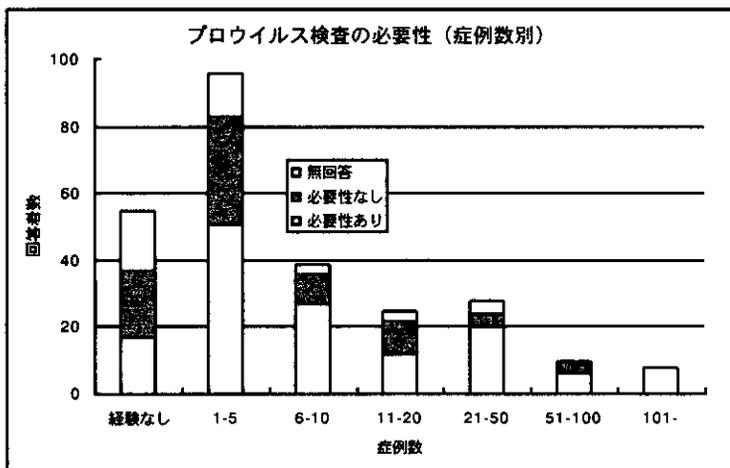


図 4-b 同検査の依頼先の有無

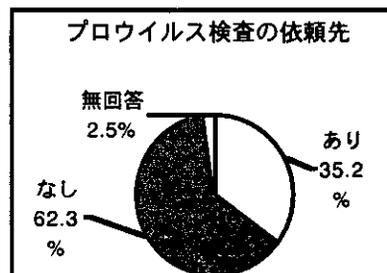


図 5-a 薬剤血中濃度検査の必要性 (症例数別)

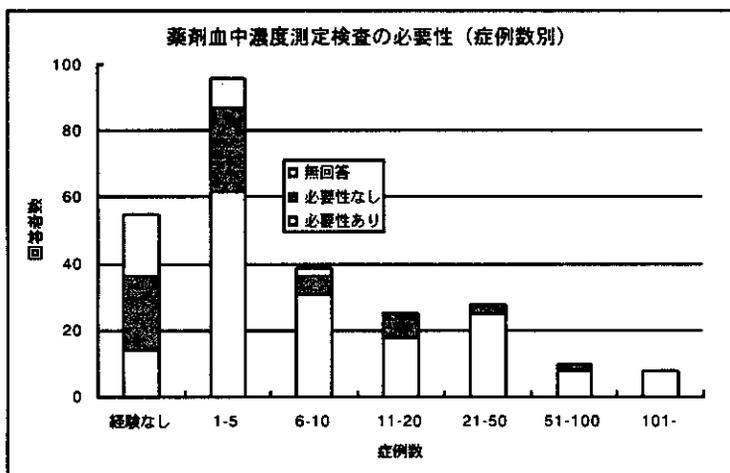
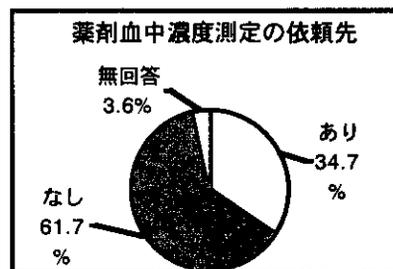


図 5-b 同検査の依頼先の有無



アンケート調査票

質問 1) 先生の HIV 診療経験についてお尋ねします。

症例経験 有 (約 名) ・ 無

質問 2) 下記検査は保険未収載であり、検査も研究レベルのものがあります。

先生は診療において下記検査を実施した (したい) 事がありますか?

検査の依頼先 (大学、病院、研究所、研究施設、検査センター等) がありますか?

	必要性	検査依頼先
1. 薬剤耐性検査 (遺伝子型)	有 ・ 無	有 ・ 無
2. 薬剤耐性検査 (表現型)	有 ・ 無	有 ・ 無
3. プロウイルス DNA 定量	有 ・ 無	有 ・ 無
4. 薬物血中濃度	有 ・ 無	有 ・ 無
5. その他、希望される検査がありましたらお書きください。		

質問 3) HIV 陽性の方の検体輸送方法でよく利用する方法をお尋ねします。

1. 検査センターの運搬システムを利用
2. 郵送
3. 運送会社 () を利用
4. その他 ()

質問 4)

1) 初期症状を訴え HIV 感染を心配して受診した方を診療した事がありますか? 有 ・ 無

2) 有 とお答えの先生に伺います。その時、どう対応されましたか?

1. 抗体検査のみ実施。
2. ウイルス量定量を検査。
3. 他施設を紹介。
4. その他 ()

今回の調査結果を御希望の有無を下記に印を付けてください。

調査結果の報告を希望 (□する。 □しない。)

ご協力有り難うございました。

13. HIV 感染細胞検査法の開発と応用

分担研究者 金田次弘 (国立名古屋病院臨床研究部)

研究要旨

昨年度確立した HIV-1 プロウイルスを検出する PNA-ISH 法を用い、その臨床応用の検討を行った。62 名の HIV-1 感染症患者の CD4 陽性 T リンパ球の HIV-1 プロウイルス陽性率を決定した。また、HIV-1 感染標的細胞になり得ない末梢血白血球中のプロウイルスを検出することにより、骨髄における前駆細胞への HIV-1 の感染をモニターできる可能性も示唆された。

A. 研究目的

HIV-1 感染症/エイズ患者における HIV-1 の感染実態の把握や HAART に対する治療効果の判定は末梢血中の HIV-1 (RNA) 量の測定により実施している。しかし、HAART に用いられている逆転写酵素阻害剤とプロテアーゼ阻害剤は薬剤の作用の性質上、HIV-1 感染細胞からのウイルスの産生は抑制しても、プロウイルスを保持している細胞を殺傷する作用を持っている訳ではない。ひとたび薬剤がなくなれば HIV-1 感染細胞はウイルス産生を再開する。本研究は、ウイルス感染標的細胞の感染実態を把握する為、昨年度に確立した HIV-1 プロウイルスを簡便かつ鋭敏に検出できる分子病理学的検出法 (PNA-ISH 法) を用い、その臨床応用の適用につき検討することを目的に実施した。

B. 研究方法

研究対象： ①HIV-1 持続感染細胞株 ACH2 と MOLT4-IIIB ②62 名の HIV-1 感染症患者より精製した末梢血 CD4 陽性 T リンパ球 ③エイズ患者末梢血より精製した CD4、CD8、及び CD15 陽性細胞。PNA プローブ：FITC-00-CTGGCTTTAATTTTA-CONH₂。塩基配列は HIV-1 pol 遺伝子領域の 2557~2571 に対

応している。CD4 陽性細胞の精製とその固定：CD4 陽性 T リンパ球分離用の StemSep STS-14032 を用いてネガティブセレクションにより精製した。細胞の固定は 4%パラホルムアルデヒド溶液 (pH 7.4) を用い、10 分間室温で固定した。固定サンプルの前処理と FITC 標識 PNA プローブの検出：固定したスメア標本は標的核酸を賦活化した後、FITC-標識 PNA プローブと反応させた。93°C で 5 分熱変性を行い、45°C で 90 分ハイブリダイズさせ、57°C で洗浄した。ハイブリッド形成後、HRP 標識抗 FITC 抗体を反応させ、チラミンを用いた catalyzed signal amplification 法によりシグナルを増感した。最終的にストレプトアビジンを標識した Alexa488 の蛍光検出により HIV-1 プロウイルスの存在を確認した。

C. 研究結果

PNA-ISH 法による HIV-1 プロウイルスの検出

MOLT4-IIIB と ACH2 では、ほぼ全ての細胞が HIV-1 陽性であった。陽性シグナルは核内に局在して検出された。シグナルの数は MOLT4-IIIB では 1~4 個、ACH2 では 1~3 個であった。HIV-1 感染症患者の CD4 陽性 T

リンパ球においては HIV-1 陽性シグナルは 1~2 個のドットして認められた。

HIV-1 感染症患者の CD4 陽性 T リンパ球の プロウイルス陽性率

62 検体の血漿ウイルス量は検出感度以下 (<50 コピー/ml) が 30 検体、32 検体は $1.1 \times 10^2 \sim 2.1 \times 10^5$ コピー/ml であった。PNA-ISH 法で検出した HIV-1 プロウイルスは Fig. 1 に示した。CD4 陽性 T リンパ球の HIV-1 プロウイルス陽性率は血漿ウイルス量が検出感度以上の検体では 0.3~7.9 (平均 2.7) % であり、検出感度以下の検体でも 0.8~6.1 (平均 2.7) % であった。即ち、HAART 成功例においても高ウイルス血症を呈する患者に匹敵する比率で、プロウイルスを保持した CD4 陽性 T リンパ球が存在することが判明した。このことは同時にプロウイルス陽性率は血漿 HIV-1 ウイルス量と相関していないことを意味している。またプロウイルス陽性率は CD4 陽性 T リンパ球数とも相関関係は見られなかった。HAART 治療にともなうプロウイルス陽性細胞率の変化についてであるが、約一年間に 3 回測定しえた患者 3 人のプロウイルス陽性率は何れも経時的に平均 5% から 1% へと減少を示した。

エイズ患者末梢血 CD15 陽性細胞と CD8 陽性細胞に検出された HIV-1 プロウイルス

症例は汎血球減少症を呈した患者である。CD4, CD8, CD15 陽性細胞を末梢血よりイムノビーズ法で精製し、抽出した DNA を用い、逆転写酵素 (RT) 遺伝子とプロテアーゼ (P) 遺伝子領域を PCR 法により増幅した。全てのケースで PCR 産物が得られたので、塩基配列の決定を行ったところ、Table 1 に示すようにいくつかのコードン部位でナンセンス変異を起こしていることが分かった。一方、PNA-ISH 法により HIV-1 プロウイルスを検出したところ、11% の CD4⁺細胞、7% の CD8⁺細胞、6% の CD15⁺細胞がプロウイルス陽性であった。HIV-1 プロウイルス関連シグナルが核内に局在していることは共焦点

レーザー顕微鏡により確認した (Fig. 2 ; a : CD8⁺細胞, b : CD15⁺細胞, c : 陰性対照 MOLT4 細胞)。末梢血中の CD8⁺細胞や CD15⁺細胞は HIV-1 が吸着可能なリセプターを有していない。したがって恐らくこれらの細胞の分化途上にある前駆細胞に HIV-1 が感染し、その後ウイルス複製に必要な遺伝子に終止コードンが入り HIV-1 遺伝子が宿主遺伝子の意味を持たない短いインサートと化した。その後それらの前駆細胞は引き続き増殖分化したと解釈した。

D. 考察

PNA-ISH 法による HIV-1 プロウイルス陽性細胞検出法は血漿ウイルス量が感度以下に抑制された HAART 有効例の残存リザーバーの大きさを推定するのに有効である。しかし、方法論的限界性からリアルタイム PCR 法による HIV-1 プロウイルスコピー数の定量法に比べ感度は低い。応用としては、HIV-1 の感染標的細胞になり得ない末梢血白血球中のプロウイルスを検出することにより骨髄における前駆細胞への感染をモニターする事などが可能である。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. A novel method for detecting HIV-1 by non-radioactive in situ hybridization : application of a peptide nucleic acid probe and catalysed signal amplification.

T. Murakami, K. Yamamoto, T. Hagiwara, M. Kasami, M. Utsumi and T. Kaneda

J. Pathol., 194, 130-135 (2001).

2. Defective HIV-1 provirus found in peripheral T lymphocytes and granulocytes in an AIDS patient imply viral infection of progenitor cells .

T. Kaneda, T. Murakami, T. Hagiwara,

- J. Hattori, K. Yamamoto, K. Sato, T. Morishita, and M. Utsumi
AIDS, 15, 939-940 (2001).
3. ウィルス耐性検査の方法と読み方
金田次弘、内海眞
治療学 35, 34-38 (2001).
 4. PNA-ISH 法による HIV-1 の検出
萩原智子、金田次弘
DAKO Newsletter, No.17, 2-3 (2001).
 5. プロウイルス DNA 量のマーカーとしての意義
金田次弘、和田かおる、萩原智子、永井裕美、白阪琢磨
日本臨・特集「HIV/AIDS 研究の進歩」
4月号 印刷中
2. 学会発表
1. HIV-1 感染症/エイズ患者の CD4 陽性 T リンパ球中の HIV-1 プロウイルスの検出
金田次弘、萩原智子、内海眞
第 63 回日本血液学会総会 (平成 13 年 4 月-2001).
 2. 薬剤耐性変異が検出された治療歴のない HIV-1 感染症患者
伊部史朗、柴田直美、内海眞、金田次弘、佐藤克彦、森下高行
第 22 回国立病院療養所血液同好会 (平成 13 年 11 月-2001).
 3. PNA-ISH 法による HIV-1 プロウイルス検出法の開発とその応用
金田次弘、萩原智子、内海眞
第 56 回国立病院療養所総合医学会シンポジウム (平成 13 年 11 月-2001).
 4. タッチダウン PCR 法導入による薬剤耐性遺伝子検査成功率の著明な改善
浅黄司、鈴木博義、山崎孝文、手塚文明、佐藤功、金田次弘、伊部史朗
第 15 回日本エイズ学会総会 (平成 13 年 11 月-2001).
 5. HAART 施行中の患者から見つかった p6⁸⁹⁸ 遺伝子に挿入変異を起こした HIV-1 群
伊部史朗、内海眞、金田次弘
第 15 回日本エイズ学会総会 (平成 13 年 11 月-2001).
 6. HIV-1 の薬剤耐性変異が検出された治療歴のない HIV-1 感染症患者
伊部史朗、森下高行、佐藤克彦、柴田直美、内海眞、金田次弘
第 15 回日本エイズ学会総会 (平成 13 年 11 月-2001).
 7. 東海地区における HIV 初感染者のプロテアーゼ、逆転写酵素遺伝子の解析
森下高行、佐藤克彦、伊部史朗、金田次弘、山本直彦
第 15 回日本エイズ学会総会 (平成 13 年 11 月-2001).
 8. リアルタイム PCR 法を用いた CD4 陽性細胞中の HIV-1 プロウイルス コピー数の定量
和田かおる、永井裕美、萩原智子、内海眞、金田次弘
第 15 回日本エイズ学会総会 (平成 13 年 11 月-2001).
 9. リアルタイム PCR 法による HIV-1 感染細胞内ウィルス RNA 定量法の確立
永井裕美、和田かおる、多和田行男、内海眞、西山幸・、金田次弘
第 15 回日本エイズ学会総会 (平成 13 年 11 月-2001).
 10. HIV-1 感染症患者の末梢血 CD4 陽性 T リンパ球の HIV-1 プロウイルス陽性率
萩原智子、内海眞、金田次弘
第 15 回日本エイズ学会総会 (平成 13 年 11 月-2001).
 11. インドにおける HIV 初感染未治療患者にみられた薬剤耐性関連遺伝子の出現
山本直彦、森下高行、佐藤克彦、金田次弘、伊部史朗
第 15 回日本エイズ学会総会 (平成 13 年 11 月-2001).

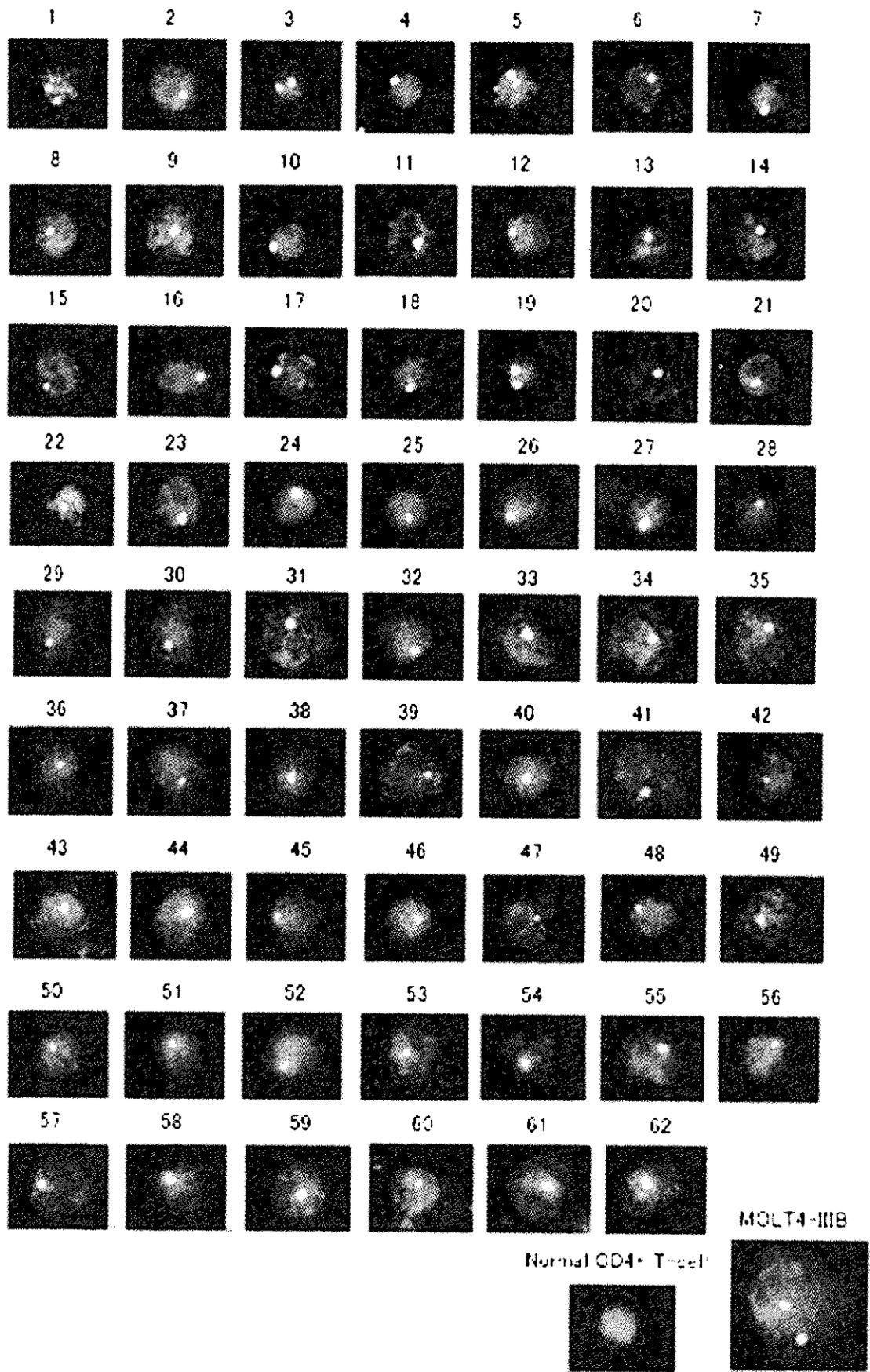


Fig.1 HIV-1 感染症患者の CD4 陽性Tリンパ球に検出された HIV-1 プロウィルス

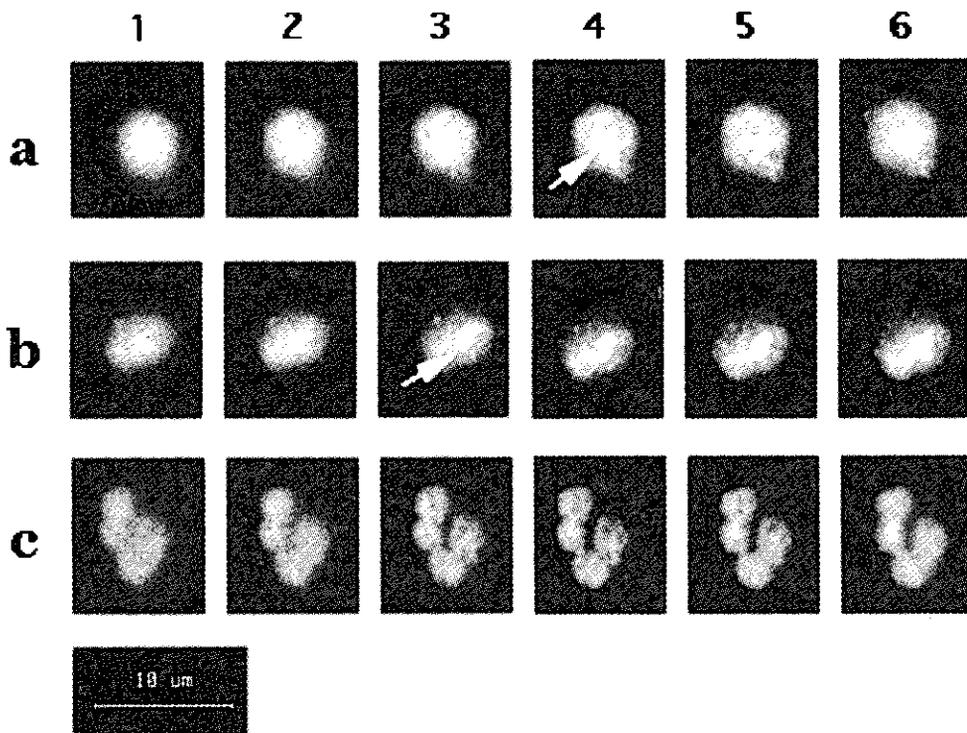


Fig. 2 共焦点レーザー顕微鏡による
シグナルの局在性についての検討

Table 1 Stop codons found in the RT or protease gene
of HIV-1 proviral DNA

	RT gene			P gene
	K70# *	W212#	W229#	W42#
	(aaa → <u>a</u> aa)	(tgg → <u>t</u> ag)	(tgg → <u>t</u> ga)	(tgg → <u>t</u> ga)
CD4+ cell	-	+ 4/5 clones	+ 4/5 clones	+ 4/5 clones
CD8+ cell	+ 1/5 clones	-	-	-
CD15+ cell	-	-	-	+ 4/5 clones

Amino acids are represented by one letter codes. K70# means the codon coding for lysine(K) at codon #70 of the RT gene was change to the stop codon. Changed nucleotide bases are shown in parentheses with underlines.*

indicates stop codon.

14. アンプリコア HIV-1 モニターv1.5 に関する精度管理の再調査結果

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）

研究要旨

平成12年4月に承認された「アンプリコア HIV-1 モニターv1.5」キットは HIV 感染者および AIDS 患者のウイルス量のモニタリングのための日本では唯一のキットである。「アンプリコア HIV-1 モニターv1.0」で正確に測定できなかったサブタイプ E などが種々の抗原を追加することによって測定できるようになった。また測定限界が標準法（400 copies/ml）に加えて、50 copies/ml までが測定できる高感度法が追加されるなど改良された。昨年は「アンプリコア HIV-1 モニターv1.5」を使用している全施設を対象にコントロールサーベイを実施した。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、このうち測定値に問題があった施設が6（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、同様の問題があった施設は7（25%）であった。これらの施設の問題点を把握し、改善することによって、パネルを再送付した再検査および再々検査では測定値のばらつきが目標値範囲内（理論値の1/3～3倍）に抑えることができた。

今年度は多数の検体を扱っている5つの検査センターと昨年目標値範囲を逸脱した施設のうち4施設、合計9施設にサンプルを配布して、昨年と同様にコントロールサーベイを実施し、測定値が目標値範囲内であるかどうかを調査した。その結果、すべての検査センターは標準法および高感度法で目標値範囲内の測定値であった。また、昨年問題のあった施設は、昨年の再検査または再々検査では目標値範囲内の測定値の結果であったにもかかわらず、今回はすべての施設が標準法か高感度法で目標値範囲を逸脱した（標準法が2施設、高感度法が2施設）。これらの施設はルーチン検査をしていないかまたは検査数が少ない施設であった。今回の結果から正確なウイルス量の測定値を得るためにコントロールサーベイの重要性が確認された。

A. 目的

現在日本において体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・ダイアグノスティックス株式会社の「アンプリコア HIV-1 モニターv1.5」のみである。このキットで測定したウイルス量が HIV 感染者および AIDS 患者の治療や薬剤効果のモニタリングに使われており、臨床上重要な検査キットである。最初に開発された「アンプリコ

ア HIV-1 モニターv1.0」の測定限界は400 copies/ml であったが改良品の「アンプリコア HIV-1 モニターv1.5」は検出限界が標準法の400 copies/ml と高感度法の50 copies/ml の2法を選択することができる。昨年度は「アンプリコア HIV-1 モニターv1.5」を使用している全施設を対象にコントロールサーベイを行い、検査の手技的な問題や機器の問題点を把握し、目標値範囲を逸脱した施

設にはパネルを再送付して再検査および再々検査を実施し、すべての施設が正しい測定値が得られるようになった。今回はこれらの施設が再々検査で一過性に正しい測定値であったのではなく、継続的に正しい測定値であることを知る目的でコントロールサーベイを実施した。なお、日本はHIV感染者およびAIDS患者のウイルス量測定は検査センターに外注している病院が多い。検査センターが目標値範囲内の測定値であるかどうかを知る目的で検査センターも対象にした。また、同時にアンケート調査も行い、検査の状況を把握した。

B. 方法

コントロールサーベイ試料：

標準法用および高感度法用のために2種類のパネルを作成した。各パネルは8本で構成され、内容はウイルス量の異なるサブタイプBまたはEを含んだ7サンプルと陰性1サンプルであった。パネル内にBBI(Boston Biomedical Inc)において濃度設定がされているものを標準法には3本、高感度法には4本加えた。その他はHIV感染血清サンプルを希釈して調整した。

パネルの配布；

パネルの配布は各参加施設の検査予定日に合わせてクール便で輸送した。参加施設は検査センターが5施設、昨年のサーベイで測定値が逸脱した施設が4施設であり、合計9施設であった。標準法または高感度法のみが各1施設、その他7施設は2法を実施した(表1)。

C. 結果

異常値棄却検定によって、正常値平均を算出したのち、その値の1/3～3倍を目標値範囲内の値とした。コントロールサーベイ結果を表2に示す。標準法ではサンプルNo.1は平均 $1.1E+03$ copies/ml、CVが37.6%、No.2は平均 $9.20E+03$ copies/ml、CVが58.8%、No.3は平均 $3.7E+03$ copies/ml、CVが38.2%、

No.4は平均 $3.0E+04$ copies/ml、CVが28.1%、No.5は平均 $8.20E+04$ copies/ml、CVが50.5%、No.6は平均 $9.0E+04$ copies/ml、CVは40.4%、No.7は平均 $3.3E+05$ copies/ml、CVは47.3%であった。No.2のCVが58.8%と高めであるがこの理由は1施設が $1.7E+04$ と飛びぬけて高い測定値を示したためである。この施設はNo.5のサンプル以外はすべて高い測定値であった。

また、高感度法ではNo.1は平均 $1.2E+02$ copies/ml、CVが51.9%、No.2は平均 $2.60E+02$ copies/ml、CVが77.8%、No.3は平均 $4.5E+02$ copies/ml、CVが48.5%、No.4は平均 $9.8E+02$ copies/ml、CVが58.8%、No.5は平均 $1.2E+03$ copies/ml、CVが61.3%、No.6は平均 $4.9E+03$ copies/ml、CVは53.1%、No.7は平均 $5.0E+04$ copies/ml、CVは53.2%であった。CVは48.5%から77.8%までと標準法よりもCV値が大きかった。高感度法は遠心操作が加わるため、ばらつきが大きくなるのかもしれない。

なお、陰性検体については標準法および高感度法ともにすべての施設が検出限界以下と判断した。従って、すべての施設がコンタミネーションは見られなかった。

標準法の個々の施設の測定値をプロットしたものを図1に示した。測定値の逸脱は2施設、合計9サンプルであった。F施設はNo.5のサンプル以外はすべて高く測定した。H施設はNo.5、6、7のサンプルをすべて低く測定した。特にどのサンプルは高くはかれるとか低く測れるとかサンプルによる一定の傾向は見られなかった。

サンプルの種類の違いよりも目標値範囲よりも高い測定値の施設はほとんどのサンプルが高く、低い施設は低い傾向であることがわかった。

高感度法の個々の施設の測定値をプロットしたものを図2に示した。測定値の逸脱は2施設であり、それぞれ異なったサンプルで合計

3 サンプルであった。G 施設および I 施設はともに低い測定値であった。標準法および高感度法の両方を逸脱した施設はなかった。

測定値が目標値範囲から逸脱した施設の担当者の経験年数は2年以上であるが測定回数が1週間に1回以下であり、検体数が10未満の施設であった。すべての検査センターは目標値範囲内であった。

I 施設は微量遠心機がないことや依頼がないので高感度法を行っていない。一方、H は高感度法のみで標準法は行っていない。

D. まとめ

今回サーベイに参加したすべての検査センターは標準法および高感度法の2法ともに目標値範囲内であった。一方、昨年のサーベイで目標値範囲を逸脱した全施設が今回のサーベイでも標準法または高感度法のいずれかで目標値範囲を逸脱した。高感度法で低い値を示したG施設とI施設は昨年も同様に低い値であった。また、標準法で高い値の結果であったF施設は昨年サーベイでも高い値であった。今回低い値であったH施設は昨年のサーベイ結果では高い値で逸脱していた。F, G, I 施設は昨年と今回の検査担当者は同じであったがH施設は違う人が測定した。なお、すべての施設が検査を担当者の経験年数は2年以上であった。

4施設は昨年のサーベイでは問題点を改良することよりの再検査および再々検査では目標値範囲内になったはずであったが改良され

ていないことがわかった。また、これらの施設は昨年のコントロールサーベイ以外は測定に関してトラブルの経験がないと答えている。昨年のサーベイでは測定値の計算ミスが約4分の1の施設に見られたので計算ファイルを配布した。今回は計算ミスの施設はなかった。毎回の検査に内部コントロールを置き、PCRのための部屋の区分わけや機器の定期的なメンテナンスなど改良したにもかかわらず、目標値範囲内の値ではなかった。アンケートの結果からも問題点は見つからなかった。したがって、今回の結果から正確なウイルス量の測定値を得るためには外部精度管理、コントロールサーベイの重要性が確認された。

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ー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. 参加施設

	参加施設	標準法	高感度
A	検査センター	○	○
B		○	○
C		○	○
D		○	○
E		○	○
F	病院または衛生研究所	○	○
G		○	○
H		○	-
I		-	○

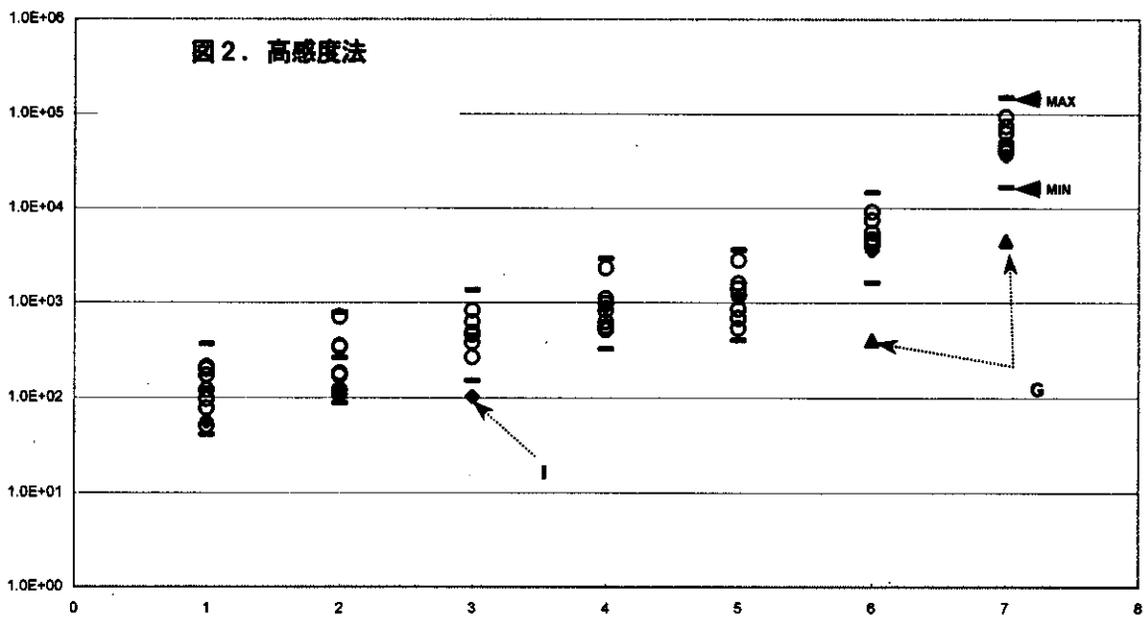
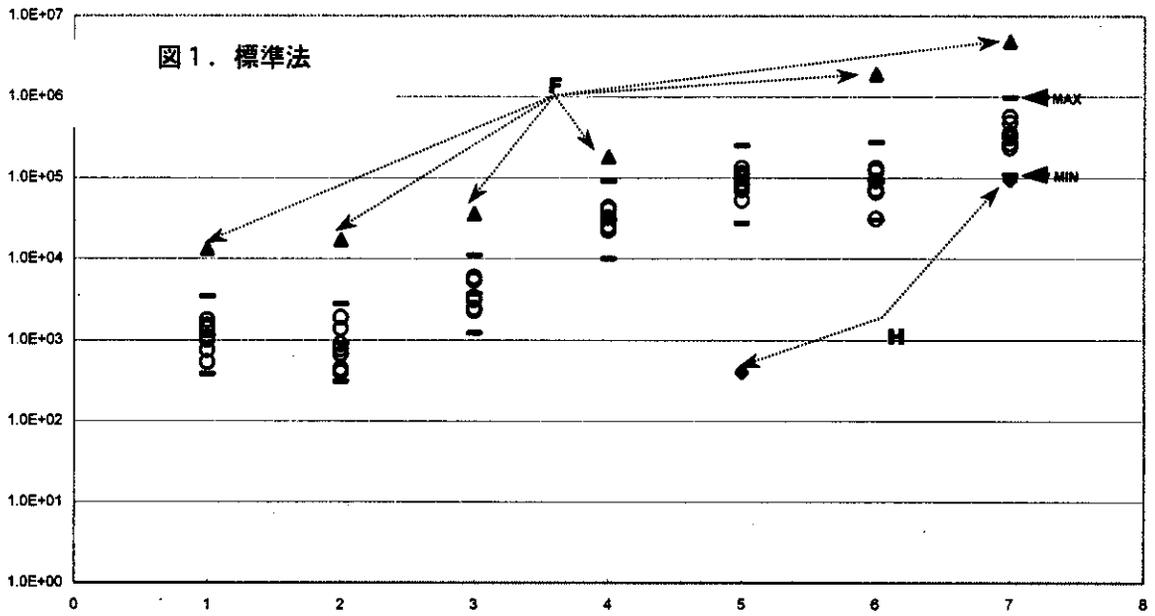
表2. コントロールサーベイ結果

(標準法)

	1	2	3	4	5	6	7
AVG	1.1E+03	9.2E+02	3.7E+03	3.0E+04	8.2E+04	9.0E+04	3.3E+05
SD	4.3E+02	5.4E+02	1.4E+03	8.4E+03	4.2E+04	3.6E+04	1.5E+05
CV%	37.6%	58.8%	38.2%	28.1%	50.5%	40.4%	47.3%
max	3.4E+03	2.8E+03	1.1E+04	9.0E+04	2.5E+05	2.7E+05	9.8E+05
min	3.8E+02	3.1E+02	1.2E+03	1.0E+04	2.7E+04	3.0E+04	1.1E+05

(高感度法)

	1	2	3	4	5	6	7
AVG	1.2E+02	2.6E+02	4.5E+02	9.8E+02	1.2E+03	4.9E+03	5.0E+04
SD	6.3E+01	2.0E+02	2.2E+02	5.7E+02	7.4E+02	2.6E+03	2.7E+04
CV%	51.9%	77.8%	48.5%	58.8%	61.3%	53.1%	53.2%
max	3.7E+02	7.8E+02	1.4E+03	2.9E+03	3.6E+03	1.5E+04	1.5E+05
min	4.1E+01	8.7E+01	1.5E+02	3.3E+02	4.0E+02	1.6E+03	1.7E+04



標準法	青	オレンジ	0003281 ~	0004428 ~	茶	紫	0009001 ~	黒
	1	2	3	4	5	6	7	8
A	1.5E+03	1.9E+03	5.4.E+03	3.2.E+04	1.1E+05	1.3E+05	5.6.E+05	4.0E+02
B	1.1E+03	6.7E+02	3.1.E+03	2.2.E+04	7.0E+04	7.0E+04	3.1.E+05	4.0E+02
C	1.0E+03	4.4E+02	2.3.E+03	4.3.E+04	8.3E+04	9.1E+04	2.6.E+05	4.0E+02
D	7.5E+02	4.0E+02	5.9.E+03	4.0.E+04	1.0E+05	1.2E+05	4.7.E+05	4.0E+02
E	1.4E+03	7.7E+02	3.3.E+03	2.5.E+04	5.2E+04	1.2E+05	3.5.E+05	4.0E+02
F	1.3E+04	1.7E+04	3.6.E+04	1.8.E+05	1.3E+05	1.9E+06	4.9.E+06	4.0E+02
G	5.3E+02	8.9E+02	2.5.E+03	2.4.E+04	1.1E+05	6.6E+04	2.3.E+05	4.0E+02
H	1.8E+03	1.4E+03	3.3.E+03	2.5.E+04	4.0E+02	3.1E+04	9.3.E+04	4.0E+02
AVG	2.7E+03	2.9E+03	7.7E+03	4.9E+04	8.2E+04	3.2E+05	9.0E+05	4.0E+02
SD	4.3E+03	5.7E+03	1.1E+04	5.4E+04	4.2E+04	6.5E+05	1.6E+06	0.0E+00
AVG (正常値平均)	1.1E+03	9.2E+02	3.7E+03	3.0E+04	8.2E+04	9.0E+04	3.3E+05	4.0E+02
SD	4.3E+02	5.4E+02	1.4E+03	8.4E+03	4.2E+04	3.6E+04	1.5E+05	0.0E+00
CV%	37.6%	58.8%	38.2%	28.1%	50.5%	40.4%	47.6%	0.0%
max *3	3.4E+03	2.8E+03	1.1E+04	9.0E+04	2.5E+05	2.7E+05	9.8E+05	1.2E+03
min *1/3	3.8E+02	3.1E+02	1.2E+03	1.0E+04	2.7E+04	3.0E+04	1.1E+05	1.3E+02

異常値検定で棄却されたもの
 正常値平均 異常値棄却後の平均
強調+斜体 正常値平均を基準にした有効範囲から外れたもの

高感度法	0000740 ~	0000133 ~	0001987 ~	赤	黄	0002881 ~	緑	0002459 ~
	1	2	3	4	5	6	7	8
A	2.1E+02	3.5E+02	8.3E+02	2.3E+03	2.8E+03	9.1E+03	9.3E+04	5.0E+01
B	1.7E+02	3.4E+02	4.6E+02	1.1E+03	1.4E+03	7.4E+03	7.4E+04	5.0E+01
C	7.7E+01	1.7E+02	3.8E+02	8.3E+02	6.8E+02	4.4E+03	4.0E+04	5.0E+01
D	1.2E+02	1.1E+02	4.7E+02	9.8E+02	8.5E+02	5.5E+03	4.4E+04	5.0E+01
E	9.6E+01	1.8E+02	6.3E+02	6.3E+02	6.9E+02	4.7E+03	6.3E+04	5.0E+01
F	2.0E+02	1.2E+02	4.9E+02	5.6E+02	1.6E+03	4.0E+03	4.7E+04	5.0E+01
G	5.0E+01	7.1E+02	2.7E+02	5.1E+02	5.4E+02	4.1E+02	4.6E+03	5.0E+01
I	5.6E+01	1.2E+02	1.0E+02	9.0E+02	1.1E+03	3.6E+03	3.6E+04	5.0E+01
平均	1.2E+02	2.6E+02	4.5E+02	9.8E+02	1.2E+03	4.9E+03	5.0E+04	5.0E+01
標準偏差	6.3E+01	2.0E+02	2.2E+02	5.7E+02	7.4E+02	2.6E+03	2.7E+04	0.0E+00
正常値平均	1.2E+02	2.6E+02	4.5E+02	9.8E+02	1.2E+03	4.9E+03	5.0E+04	5.0E+01
SD	6.3E+01	2.0E+02	2.2E+02	5.7E+02	7.4E+02	2.6E+03	2.7E+04	0.0E+00
CV%	51.9%	77.8%	48.5%	58.8%	61.3%	53.1%	53.2%	0.0%
*3	3.7E+02	7.8E+02	1.4E+03	2.9E+03	3.6E+03	1.5E+04	1.5E+05	1.5E+02
*1/3	4.1E+01	8.7E+01	1.5E+02	3.3E+02	4.0E+02	1.6E+03	1.7E+04	1.7E+01

異常値検定で棄却されたもの
 正常値平均 異常値棄却後の平均
強調+斜体 正常値平均を基準にした有効範囲から外れたもの