

抗体検査で保留となったものの PCR 陽性の 7 検体は全て、グループ M であった。抗体検査で保留となったものの、env/unipol 共に PCR 陰性であった 4 検体はグループ 0 特異的 env、gag、gp 4 1 領域における PCR でも増幅されなかった。

HIV-1 抗体陽性でありながら env/unipol 共に PCR で増幅されなかった 25 検体はグループ 0 特異的 env、gag における PCR では増幅されなかったが、gp 4 1 領域ではうち 3 検体が増幅され、それぞれグループ M に属した。

考察

HIV/SIV を増幅する PCR の系と HIV-1 グループ M を特異的に増幅する PCR の系を用いることで、既存の HIV-1 グループ M と判定される検体を効率的に除くことができ、グループ M 以外の HIV を高頻度に検出できた。PCR を用いることで、従来の血清学的診断や、遺伝子解析では見落とされてしまう検体を効率的にスクリーニングすることが可能であると考えられた。

今回のスクリーニングでグループ M として完全に除けなかった 7 検体や抗体陽性であるにもかかわらず、PCR で増幅されない検体もあり、gp41 領域などの追加の PCR による確認が必要である。

結論

HIV は過去 100 年間にサル類の持つ SIV からヒトへの少なくとも 8 回の種間感染を通して生じてきおり、ヒトとサル間でウイルスの伝播は実際に無視できない頻度で起こっていると考えられる。したがって、未同定の HIV がヒトに既に存在する可能性、また、今後新たに出現する可能性は十二分にあると考えられる。PCR を用いたスクリーニングの系を新型ウイルスの同定に応用したのは本研究が初めてである。今回のスクリーニングの結果から新型 HIV の検索には、サルと接触する機会

の多い人を中心として、検体数をさらに増やす必要があると考えられた。

発表論文

1. Songok EM, Fujiyama Y, Tukei PM, Vulule JM, Kiptoo MK, Adungo NO, Kakimoto K, Kobayashi N, Juma E, Genga IO, Mpoke SO, Ichimura H.: Experiences on the use of short course zidovudine to prevent perinatal transmission of HIV in rural Kenya. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* (in press).
2. Ndembu N, Yumo H, Takehisa J, Takemura T, Kobayashi E, Ngansop C, Songok EM, Miura T, Ido E, Hayami E, Kaptue L, and Ichimura H.: HIV-1 infection in Pygmy hunter gatherers is from contact with Bantu rather than with nonhuman primates. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* (in press).
3. Songok EM, Lihana RW, Kiptoo MK, Lwenbe R, Genga IO, Kibaya R, Odhianbo F, Kobayashi K, Ago Y, Ndembu N, Okoth F, Fujiyama Y and Ichimura H.: Identification of Env CRF 10 among HIV Variants Circulating in Rural Western Kenya. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 19(2): 161-165, 2003.
4. Haga, T., Shimizu, Y., Okoba, M., Kumabe, S., Goto, Y., Shinjo, T., Ichimura, H., Kuwata, T., Hayami, M. and Miura, T.: Construction and in vitro properties of chimeric simian and human immunodeficiency virus with the human TNF-alpha gene. *Microbiol. Immunol.* 46 (12): 849-855, 2002.
5. Taniguchi Y, Takehisa J, Bikandou B, Mboudjeka I, N'Doundou-N'Kodia MY, Obengui, M'Pandi M, M'Pele P, Harada Y, Ido E, Hayami M, Ichimura H, Parra HJ.:

Genetic subtypes of HIV type 1 based on the vpu/env sequences in the Republic of Congo. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 18(1):70-83, 2002.

学会発表

1. 小林永治、Nicaise NDEMBI、武久 盾、竹村太地郎、井戸栄治、速水正憲、市村宏：カメルーンにおいてはHIV感染がHBV感染、特に genotype E の感染に影響を与えている、第 50 回日本ウイルス学会学術集会総会、札幌、2002 年 10 月 16-18 日。
2. 武久 盾、Nicaise NDEMBI、竹村太地郎、Elijah SONGOK、喜多佳世子、小林かな、井戸栄治、三浦智行、速水正憲、市村宏：PCR 法を用いた新型 HIV 検出システムの確立、第 16 回日本エイズ学会総会、名古屋、2002 年 11 月 28-30 日。
3. 喜多佳世子、Nicaise NDEMBI、武久 盾、Raphael LIHANA、Elijah SONGOK、小林かな、竹村太地郎、井戸栄治、三浦智行、速水正憲、市村 宏：コンゴ民主共和国における HIV-1 流行株の分子系統解析、第 16 回日本エイズ学会総会、名古屋、2002 年 11 月 28-30 日。
4. Raphael LIHANA、Elijah SONGOK、武久 盾、Nicaise NDEMBI、小林かな、喜多佳世子、大石 功、藤山佳秀、市村 宏：Genetic subtypes of HIV-1 among the patients with sexually transmitted diseases (STD) in Nairobi, Kenya、第 16 回日本エイズ学会総会、名古屋、2002 年 11 月 28-30 日。
5. Nicaise NDEMBI、武久 盾、竹村太地郎、小林永治、井戸栄治、三浦智行、速水正憲、市村 宏：HIV-1 infection in pygmy "hunter gatherers" is from contact with Bnatu rather than from contact with non-human primates、第 16 回日本エイズ学会総会、名古屋、2002 年 11 月 28-30 日。
6. Elijah SONGOK、Rukia KIBAYA、武久 盾、Raphael LIHANA、小林かな、Nicaise NDEMBI、喜多佳世子、小林伸好、藤山佳秀、市村 宏：Evolution of HIV-1 in a dually infected individual: appearance and dominance of intersubtype recombination form、第 16 回日本エイズ学会総会、名古屋、2002 年 11 月 28-30 日。

20. 高感度リアルタイム PCR による HIV-1 DNA 定量法の確立

分担研究者 金田次弘 (国立名古屋病院・臨床研究センター)

研究概要

高感度リアルタイム PCR によるトータル HIV-1 DNA 定量法を確立した。最低検出感度は5コピー/10⁶細胞である。この方法により HAART 治療後に血漿 HIV-1 DNA レベルが検出感度以下に抑えられた症例での HIV-1 残存リザーブの定量が可能になった。

A. 研究目的

HIV-1 感染症/エイズ患者のウイルスリザーブとなっている感染標的細胞の動態を把握することは highly active antiretroviral therapy (HAART) 療法の治療効果の把握と HIV-1 感染細胞の根絶を目指す次世代の治療法の効果判定に必須であると思われる。本研究ではその為のマーカーとして HIV-1 DNA 量を選択し LightCycler 測定系でリアルタイム PCR 法による高感度な HIV-1 DNA の定量法を確立することを目的にした。

B. 研究方法

① 定量前増幅 PCR とリアルタイム PCR をリンクした方法論を採用した(図1)。定量前増幅 PCR の増幅率を決定するために PCR 前後のハウスキーピング遺伝子 β 2-ミクログロブリン(β 2-M)を定量する。同時に β 2-M コピー数より細胞数を算出した。②増幅 PCR 後の HIV-1 DNA コピー数をリアルタイム PCR で決定し、増幅率で除することにより細胞内にもともと存在する HIV-1 DNA コピー数の定量を行う(図2)。③ HIV-1 DNA 定量用のプライマーと Taqman プローブは患者検体 8 症例の gag P17 遺伝子領域の DNA 塩基配列を決定し、保存性の高い領域を検索し、設計した。④ β 2-M 定量用のプライマーとプローブはエクソ

ン 2 内に設計した。

(倫理面への配慮) HIV-1 感染標的細胞中の HIV-1 DNA コピー数は治療方針に重要な情報を提供するパラメーターの1つである旨を十分に患者に説明し、同意を得たうえで検体を採取する。又、検査結果は患者のプライバシーが侵されないよう厳重に管理することを義務とする。

C. 研究結果

①定量前増幅 PCR の至適サイクル数:HIV-1 持続感染培養細胞株 ACH2 を用いた実験で、反応開始時のコピー数が 10~1000 では 30 サイクルまで直線的に増加した。100000 コピー以上では 20 サイクルまでは直線的に増加したが、それ以降の増加率は低下した(図3)。この結果から反応開始時コピー数が高コピーであっても 20 サイクルまでは直線的増幅反応を行えることが判明した。② 定量前増幅 PCR で、 β 2-M と HIV-1 を同時に増幅させたが、 β 2-M PCR による HIV-1 PCR 反応に対する干渉作用は認められなかった(図4)。③ 定量前増幅 PCR のサイクル数を 20 に設定し、その後、リアルタイム PCR を施行することにより 5 HIV-1 コピー/10⁶細胞まで検出が可能であった(図5)。④ レトロスペクティブに 3 年間の治療経過を追跡できた症例の結果(図6): 治療前の血漿 HIV-1 RNA は約 23 万

コピー/ml、抗 HIV 治療 (3TC, d4T, NFV) 開始 6 ヶ月後 100 コピー、1 年後に検出感度 50 コピー以下に減少、その後約 2 年間は検出感度以下で安定に推移。治療前の HIV-1 DNA は約 1300 コピー/ 10^6 白血球、6 ヶ月後は約 600 コピー、一年後は約 450 コピー、その後は減少無く推移した。

D. 考察

定量前増幅 PCR を加えることにより検出感度が 5 コピー/ 10^6 細胞の高感度なりリアルタイム PCR 法によるトータル HIV-1 DNA の定量法を確立した。この方法を用い、HAART 治療が成功している患者を対象にレトロスペクティブに 3 年間の HIV-1 DNA 量の推移を追跡した。治療開始前に 1300 コピー/ 10^6 白血球であった HIV-1 DNA は、血漿 HIV-1 RNA が検出感度以下に抑制された 1 年後の時点では 450 コピーに減少した。しかし、その後の 2 年間は殆ど変動はなかった。HIV-1 DNA は治療開始後約 1 年間に 1log から 0.7log 減少し、その後は極めて緩やかに減少するとの報告もあるが、この症例は類似した結果であった。このように本法は HAART 治療後に血漿 HIV-1 RNA レベルが検出感度以下に抑えられた症例の HIV-1 残存リザーブの定量に有効であると思われる。また、ハウスキーピング遺伝子の $\beta 2-M$ コピー数を定量することにより、細胞数不明の小量全血検体にも応用できるようになった。

E. 共同研究者

永井裕美、和田かおる、竹尾 歌、萩原智子、内海 眞

F. 研究発表

[論文発表]

1. A Simple HPLC Method for Simultaneous Determination of Lopinavir, Ritonavir and Efavirenz.

Y. Usami, T. Oki, M. Nakai, M. Sagisaka and T. Kaneda.

Chem. Pharm. Bull. in press

2. Selection of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Variants with an Insertion Mutation in the P6gag and P6pol Genes under Highly Active Antiretroviral Therapy.

S. Ibe, N. Shibata, M. Utsumi and T. Kaneda

Microbiol. Immunol., 47, 71-79 (2003).

3. 「HIV-1 感染症/エイズ治療遂行のためのモニタリング・システムの構築の進展(シンポジウム記録).

金田次弘、白阪琢磨.

医療 56, 727-728, 2002.

4. HIV-1 薬剤耐性検査の問題点とその克服. 浅黄 司、伊部史朗、金田次弘、鈴木博義、手塚文明、西村秀一、佐藤 功、山崎孝文.

医療 56, 734-735, 2002.

5. PNA-ISH 法による HIV-1 プロウイルス検出法の開発と応用.

金田次弘、萩原智子、服部純子、永井裕美、内海 眞、和田かおる.

医療 56, 738-740, 2002.

6. プロテアーゼ阻害剤血中濃度の測定の実際.

長岡宏一、伊藤洋貴、大木剛、中井正彦、鷺坂昌史、竹田信也、間宮均人、宇佐美好子、金田次弘.

医療 56, 741-742, 2002.

7. 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.

日本臨床、特集「HIV/AIDS 研究の進歩」60, 694-702 (2002).

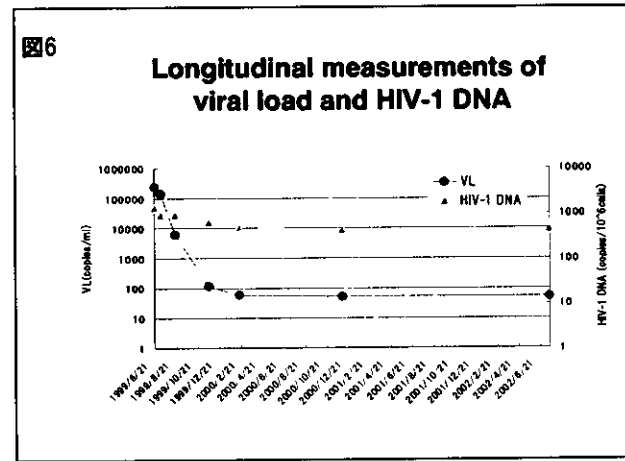
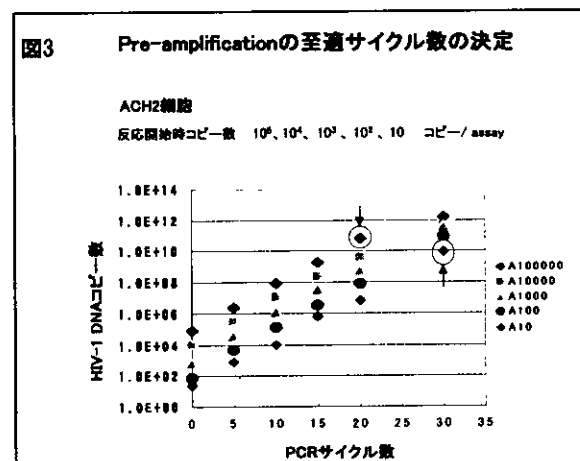
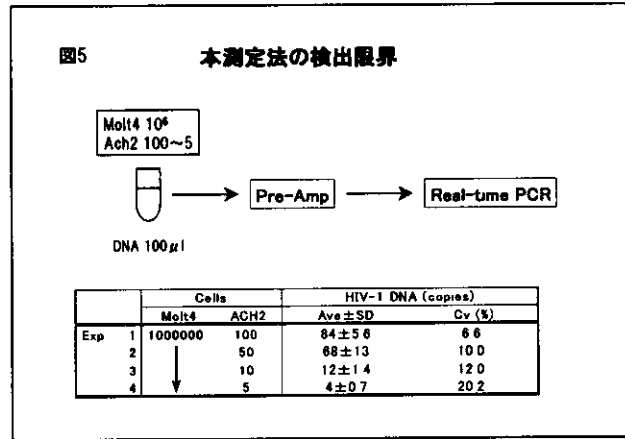
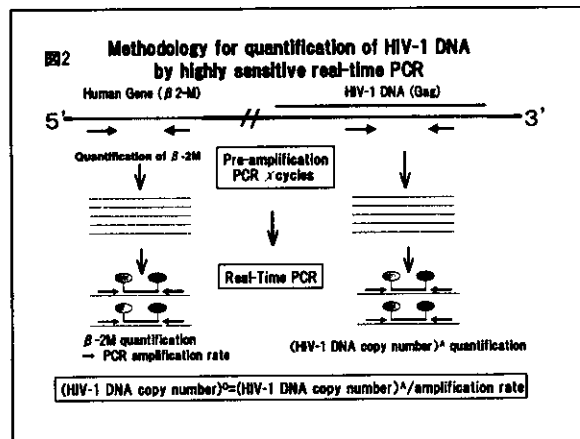
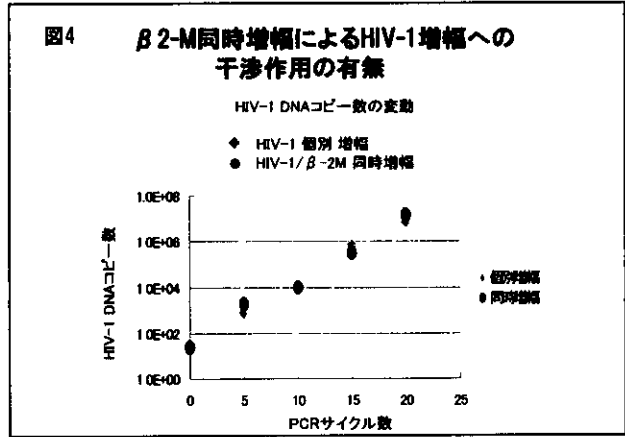
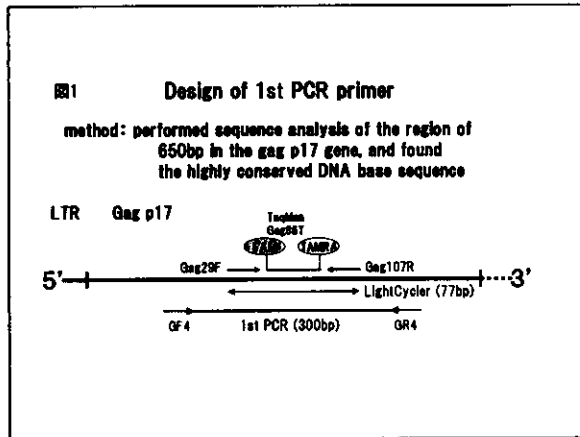
[学会発表]

1. タッチダウン PCR 法によるプロテアーゼ遺伝子の増殖不可能な原因とその改善策.
浅黄司、伊部史朗、金田次弘、鈴木博義、手塚文明、
第 16 回日本エイズ学会総会、平成 14 年 11 月-2002、名古屋。
2. Gag p6 遺伝子に検出された挿入変異の意義.
伊部史朗、森下高行、佐藤克彦、内海 眞、金田次弘、
第 16 回日本エイズ学会総会、平成 14 年 11 月-2002、名古屋。
3. 2001 年次に新規受診した未治療 HIV-1 感染症患者の薬剤耐性検査結果.
伊部史朗、森下高行、竹尾 歌、堀田直恵、佐藤克彦、内海 眞、金田次弘、
第 16 回日本エイズ学会総会、平成 14 年 11 月-2002、名古屋。
4. 新規低分子化合物：ペンダント型亜鉛サイクレン錯体の抗 HIV 活性とその作用機序.
山本直彦、森下高行、佐藤克彦、大竹 徹、森 治代、川畑拓也、金田次弘、内海 眞、
第 16 回日本エイズ学会総会、平成 14 年 11 月-2002、名古屋。
5. 高感度リアルタイム PCR による HIV-1 DNA 定量法の検討.
永井裕美、和田かおる、森下高行、内海眞、西山幸一、金田次弘、
第 16 回日本エイズ学会総会、平成 14 年 11 月-2002、名古屋。
6. PNA-ISH 法で同定された HIV-1 プロウイルス陽性細胞の表現型の決定.
服部純子、萩原智子、内海 眞、金田次弘、
第 16 回日本エイズ学会総会、平成 14 年 11 月-2002、名古屋。
7. HIV プロウイルス測定の意味。
金田次弘、
第 16 回日本エイズ学会総会シンポジウム、平成 14 年 11 月-2002、名古屋。
8. 抗 HIV 薬の血中濃度測定法の確立と体内動態.
宇佐美好子、大木剛、長岡宏一、伊藤洋貴、中井正彦、鷺坂昌史、金田次弘、山中克郎、内海眞、
第 16 回日本エイズ学会総会シンポジウム、平成 14 年 11 月-2002、名古屋。
9. HIV-1 プロウイルスの定量法確立に関する研究.
金田次弘、井田節子、
第 57 回国立病院療養所総合医学会シンポジウム、平成 14 年 10 月-2002、福岡。
10. HIV-1 provirus in the peripheral CD4+ T lymphocytes from the HIV-1 infected patients under highly active antiretroviral therapy.
T. Kaneda, T. Hagiwara, J. Hattori and M. Utsumi,
The 14th International AIDS Conference, July 7-12, 2002, Barcelona, Spain.
11. Establishment of quantitative assay for cellular HIV-1 mRNA by real-time PCR.
H. Nagai, K. Wada, Y. Tawada, T. Morishita, M. Utsumi, Y. Nishiyama and T. Kaneda,
The 14th International AIDS Conference, July 7-12, 2002, Barcelona, Spain.
12. Detection and quantification of HIV-1 provirus by real-time PCR and PNA-ISH.
K. Wada, H. Nagai, T. Hagiwara, N. Hotta, M. Utsumi and T. Kaneda,
The 14th International AIDS Conference, July 7-12, 2002, Barcelona, Spain.
13. RT-nested touchdown PCR is an effective method for gene amplification in genotypic analysis of drug-resistant HIV-1.

T. Asagi, S. Ibe, T. Kaneda, H. Suzuki,
F. Tezuka and S. Nishimura,
The 14th International AIDS Conference,
July 7-12, 2002, Barcelona, Spain.

14. HIV-1 variants with an insertion
mutation in the p6gag and p6pol genes
were selected during highly active
antiretroviral therapy.

S. Ibe, N. Shibata, M. Utsumi and
T. Kaneda,
The 14th International AIDS Conference,
July 7-12, 2002, Barcelona, Spain.



21. HIVRNA 定量のコントロールサーベイと評価

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)

研究概要

HIV感染者およびエイズ患者の治療および病態把握に有用であるHIVウイルス量測定法のアンプリコア HIV-1 モニターの測定精度を明らかにし、施設間での測定値を是正する目的でコントロールサーベイを実施した。1999年および2000年は全国調査を行ったが、2001年は大手検査センター4施設と特定の5施設のみで実施した。今年度は多くの施設からコントロールサーベイ実施の希望があったこと、また全自動機器であるコバスアンプリコアを新規に導入した施設があるため、全国規模の調査を実施した。参加施設は標準法が28施設、高感度法が28施設、そのうち2法採用が19施設であった。現在アンプリコア HIV-1 をルーチンで実施しているほとんどの施設が参加したことになる。標準法および高感度法について各々9サンプルを配布した。全サンプルが目標値範囲内であった施設は標準法で9施設、高感度法で4施設であり、2法とも正確に測定できた施設は2施設しかなかった。多くの間違いは標準法や高感度法の測定範囲を理解しておらず、測定範囲外であっても測定値が計算できればその数値を記載していた。1施設が陰性検体にコンタミをした。また目標値範囲から外れた検体や施設は、高値または低値に偏るなどの一定の傾向は見られなかった。アンケート調査から、作業エリアの区分けや作業前後の消毒は実行されていることがわかったが、機器のメンテナンスは徹底されていないことがわかった。4分の3の施設が測定時に何らかのトラブルを経験しており、主なトラブルはQS吸光度の不良やコバスコア機器の作動不良であった。トラブルは機器のメンテナンスとの関連が考えられた。コントロールサーベイの実施の希望およびアンプリコア HIV-1 の確認試験としての位置づけを公式な見解として公表して欲しいとの要望があった。

A. 目的

アンプリコア HIV-1 モニター v1.5 測定施設の施設間差是正のため、複数のパネル血清の測定により、その測定精度を施設間で明らかにする。なお、測定精度に問題のある施設に対しては、問題点の把握および検査手順の見直しや機器の点検整備など改善の指導を行う。またトレーニングを行い、測定値の施設間差を是正するように努める。

B. 方法

コントロールサーベイ参加希望施設には、測定希望日にあわせて試料およびPCRに関するアンケートを配布した。

1. サーベイに用いた HIV-1 パネル

標準法および高感度法について各9サンプルロシュ・モレキュラー・システムズ(BBI HIV-1 positive panel) から、

サブタイプ B が 50, 1000^{※1}, 3000^{※1}, 40000, 150000, 500000 コピー/mL, Negative、及びサブタイプ E が 2000^{※2}, 10000^{※2} コピー/mL

※1 500000 コピー/mL を希釈して調整

※2 サブタイプ E 血清 No.1720 を希釈して調整

標準法・高感度法で濃度を共通とし、キャップの色を変えてブラインドとした。

2. 実施時期

2003年2月

3. 参加施設

アンプリコア HIV-1 モニター採用施設(表1)

標準法 : 28 施設

高感度法 : 28 施設

(うち2法採用 : 19 施設)

C. 結果

配布パネル血清の cp/mL は以下の通りである。カッコ内は測定のプロを加味した目標値範囲(1/3~3倍)を示す。

No.1 : Negative

No.2 : 50 (17~150)

No.3 : 1,000 (333~3,000)

No.4 : 2,000 (667~6,000)

No.5 : 3,000 (1,000~9,000)

No.6 : 10,000 (3,333~30,000)

No.7 : 40,000 (13,333~120,000)

No.8 : 150,000 (50,000~450,000)

No.9 : 500,000 (166,667~1,500,000)

標準法について(図1)

アンプリコア HIV-1 キットの標準法の測定範囲は $400\sim 750,000\text{ cp}/\text{mL}$ である。したがって、No.1 および No.2 は検出限界以下、No.3 は場合によっては検出限界以下になる。No.9 は $750,000\text{ cp}/\text{mL}$ を超えた場合は $750,000\text{ cp}/\text{mL}$ 以上つまり「High」の表示になる。多くの施設は範囲外でも測定値を計算し記載した。9 サンプルのすべてが目標値範囲内であった施設は28 施設中9 施設であった。記載間違いがなければ4 施設は正解であった。1 検体のみ外れた施設は9 施設であった。また、測定値は高く外れる施設が低く外れる施設よりも多かった。個々のサンプルについて見ると全施設が正解であったのはNo.8 のサンプルのみであった。No.1 の陰性サンプルについて1 施設が $580\text{ cp}/\text{mL}$ と回答し、コンタミを起こした。No.2 のサンプルについては、標準法の

検出限界は $400\text{ cp}/\text{mL}$ であるので検出限界以下と答えるべきだが、14 施設が cp -数を示し検出限界以下と答えた施設は14 施設のみであった。No.3 は3 施設が目標値よりも高く測定した。なお、1 施設が検出限界以下と判定したが目標値範囲内が $333\sim 3,000$ であるので、 $400\text{ cp}/\text{mL}$ 以下の場合にはこれに当たる。No.4 は1 施設が低く、3 施設が高く測定した。No.5 は1 施設が測定に失敗して(QS 吸光度の不良)、数値の計算が出来なかった。No.6 は2 施設が高かった。No.7 は2 施設が目標値範囲を外れた。No.8 は全施設が正解であった。No.9 は1 施設が目標値よりも低い数値であった。なお、3 施設は目標値範囲内であったが、 $750,000\text{ cp}/\text{mL}$ 以上にもかかわらず計算した数値を記載し「High」とはしなかった。

高感度法について(図2)

アンプリコア HIV-1 キットの高感度法の測定範囲は $50\sim 10\text{ 万 cp}/\text{mL}$ である。したがって、No.1 および No.2 (場合によっては)は検出限界以下である。また No.9 は「High」であり、No.7・No.8 も「High」になることがある。9 サンプルのすべてが目標値範囲内であった施設は27 施設中4 施設であった。目標値範囲内に入るが $10\text{ 万 cp}/\text{mL}$ 以上であったため本来「High」とすべきところを $10\text{ 万 cp}/\text{mL}$ 以上の数値を記載した施設のなかでそれ以外のサンプルは目標値範囲内であった施設が6 施設あった。Negative はすべての施設が検出限界以下と答えた。その他の検体はいずれかの施設で目標値範囲内に入らなかった。No.2 は目標値範囲よりも12 施設が高く、1 施設が低かった。No.3 は2 施設が低かった。No.4 は2 施設が低く、1 施設が高かった。うち1 施設がNo.3,4 とともに低かった。No.5 は1 施設が低かったが、この施設はこの検体のみが正解ではなかった。No.6 は1 施設が高かった。No.7 は2 施設が低かった。No.8 は5 施設が低かつ

た。10施設が目標値範囲内であるが10万IU⁻/mL以上の値であった。No.9は16施設が10万IU⁻/mL以上を意味する「High」と記載されていたが残りの11施設は10万IU⁻/mL以上の数値を記載していた。No.4,6,7で各々1施設測れなかったが、これは標準法で測れなかった施設とは違う施設であった。No.4,6は同一の施設で測定値が出なかった。

アンケート調査の結果

アンプリコア HIV-1 モニターを実施に関する18問からなるアンケート調査を行った(表2)。測定キットの種類はアンプリコア(マニュアル)が約60%、コバスアンプリコア(自動機器)が40%であった。月間依頼数は10件未満の施設が30%、10~19件が20%であり、参加施設の半数が月間20件未満であることがわかった。24%の施設が今回初めての参加であった。検査回数は月に1回以内が14%、1週間に1回以内が37%で、半数の施設が多くても1週間に1回以内であることがわかった。4分の3の施設が高感度法を実施しており、実施していない施設の理由は超遠心機がない(4件)、低ウイルス量の結果を必要としていない(2件)、コストがかかる(2件)、依頼がない(1件)であった。作業時間は5時間未満が30%、5~6時間が42%、8時間以上は8%であり、9割以上が8時間以内に作業が終了している。作業エリアは94%の施設がきちんと分けて作業している。作業エリアの消毒はすべての施設がおこなっており、7割以上が測定前後に行っている。機器のメンテナンスは32%が定期的に行っており、49%が不定期ではメンテナンスを行っているが19%の施設が行っていない。測定時に4分の3の施設がプレートごとに、24%がアッセイごとに管理用試料により精度管理を行っている。管理用試料は9割以上がキット内のコントロールを用いており、市販のコントロール、プール血

清、その他が各1施設ずつであった。4分の3の施設が測定時何らかのトラブルを経験しており、そのうち半数はQS吸光度、31%がコバスアンプリコア機器の作動不良であった。4分の3の施設でHIV-1RNA量測定が保険適応になったことを知っていた。HIV抗体陽性検体の最終確認試験はWB法が27施設、アンプリコアが24施設、WBとアンプリコアの2法が13施設であり、WBと同等にアンプリコアが用いられていることがわかった。今後検査の精度を高めるためには自動化が求められる工程はRNA抽出(16件)、増幅DNAの検出(13件)、濃度の算出(6件)であった。全施設がコントロールサーベいの必要性があると答えた。今回のコントロールサーベいにパネル検体が多すぎる、結果をe-mailで返答したいなどの意見があった。また、測定機器の定期的な保守とは何かとの意見や、HIV-1モニターの確認試験としての位置づけを明確にするように学会や厚生労働省などで正式な見解を発表して欲しいとの貴重な意見があった。

D. まとめ

全ての検体の測定値が目標値範囲内であった施設は、標準法では28施設中9施設、高感度法では28施設中4施設しかなかった。標準法の測定範囲は400~75万IU⁻/mL、高感度法は50~10万IU⁻/mLであるがそれらを見逃して計算値を記載する傾向が見られた。測定範囲を外れると直線性がないので、正確なウイルス量を示すことはできない。取り扱い説明書の周知徹底が必要である。標準法と高感度法のすべての検体が目標値範囲内であった施設は2施設しかなかった。目標値範囲からはずれた値においては、サンプルや施設によって高く測定されたり低く測定されたりするなど一定の傾向は見られなかった。アンケート調査の結果からまだHIVRNA量の測定は半数の施設が週1回から月1回程度であることがわかった。作業エリアを分けることや消

毒は徹底されつつあることがわかったが機器のメンテナンスは充分には行われていないことがわかった。4分の3の施設が測定時にトラブルを経験しており、これらの問題は機器のメンテナンスとも関連していると思われる。参加した全施設が、今後もこのようなコントロールサーベイが必要であると答えた。また、HIVRNA 量測定の確認試験としての位置づけの公式見解を求める意見があったことは現場の声として貴重である。

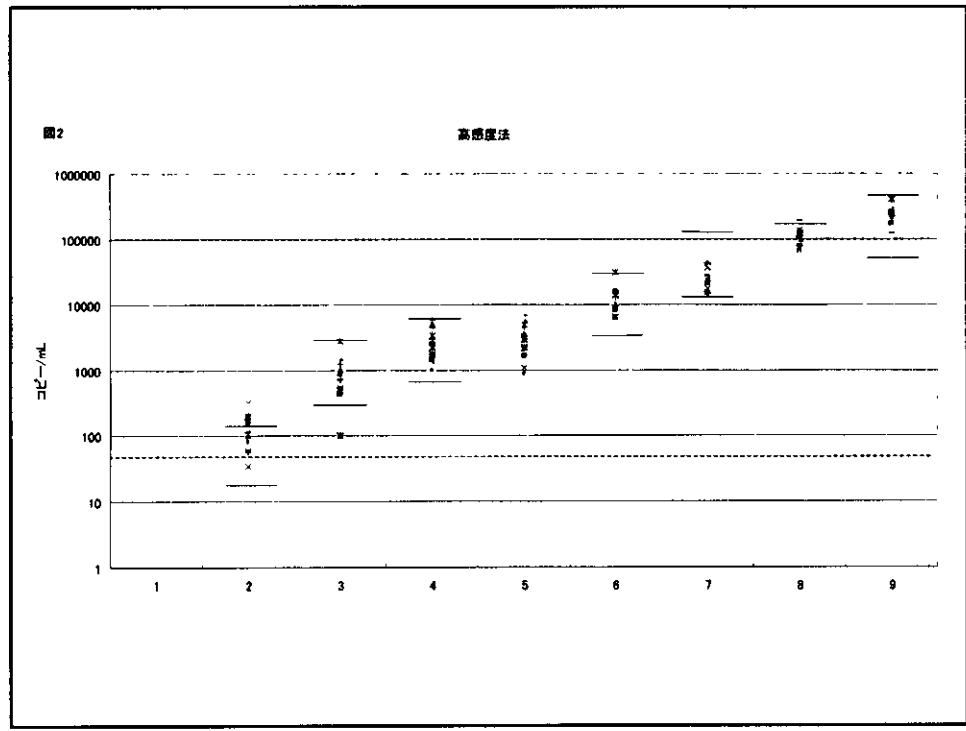
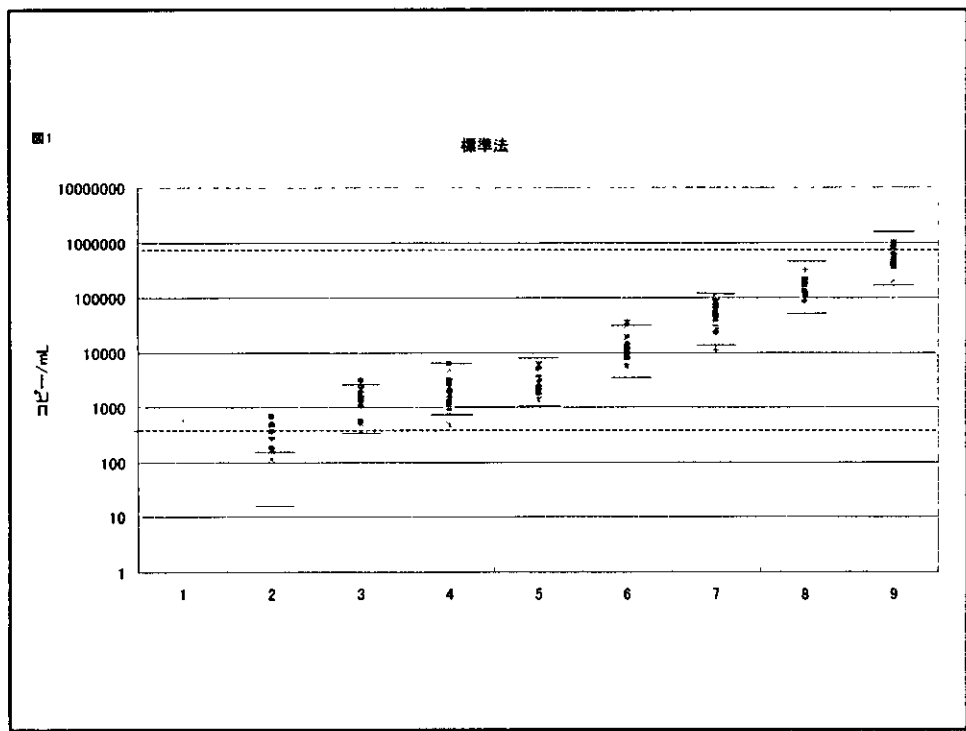
E. 研究報告

学会発表

吉原なみ子、福嶋浩一、今井光信、他9名
：第三回アンプリコア HIV-1 モニターv1.5 コ
ントロールサーベイ、第15回エイズ学会総会、
2001年11月、名古屋市

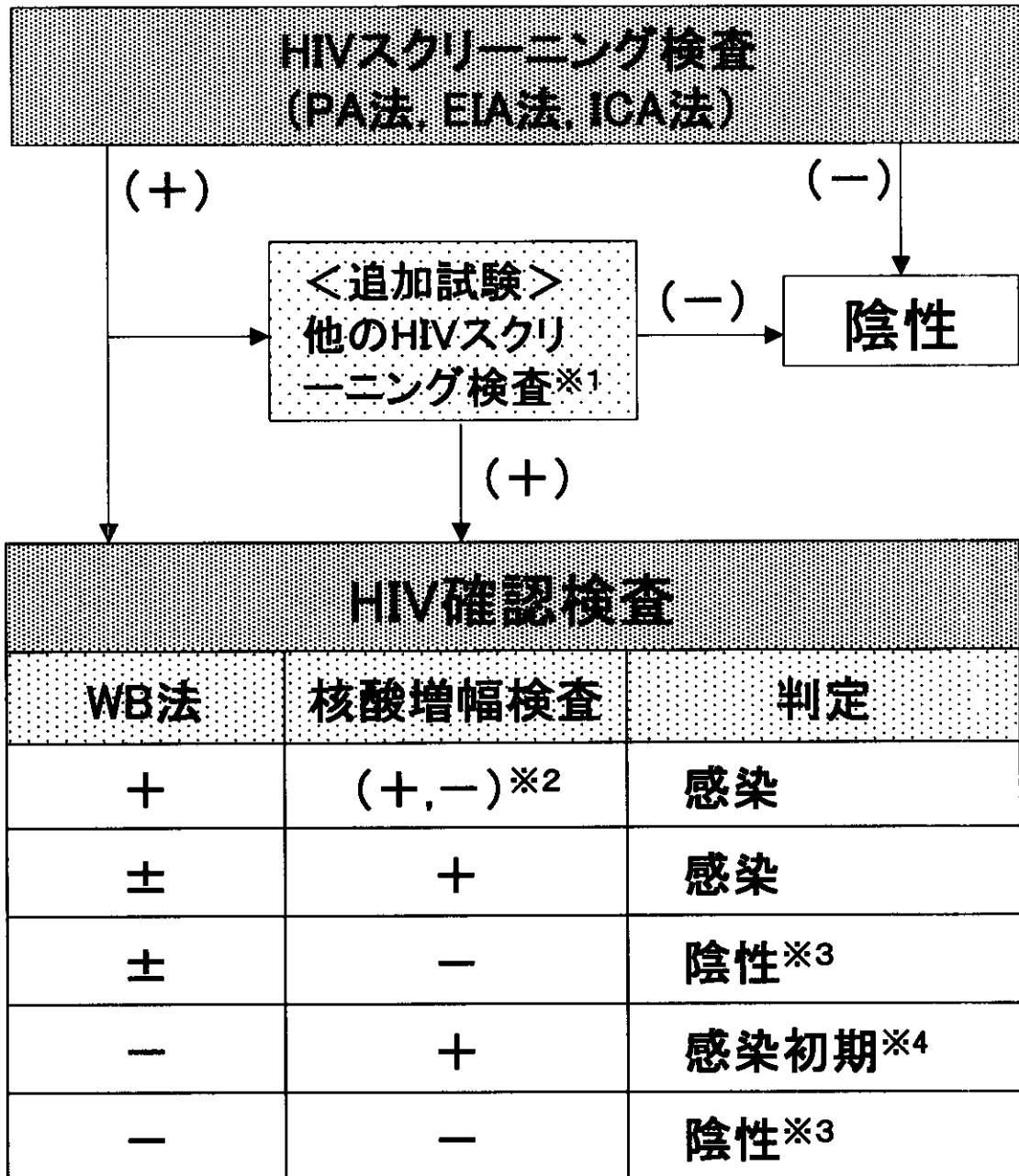
表1.参加施設

施設名	標準法	高感度法
総合病院国民健康保険旭中央病院	○	○
石川県立中央病院	○	○
(株)エスアールエル八王子ラボラトリー	○	○
大阪大学医学部附属病院 感染症	○	○
大阪府立公衆衛生研究所総合臨床検査室	○	○
鹿児島県環境保健センター	○	
川崎医科大学附属病院	○	○
(株)北里大塚バイオメディカルアッセイ研究所	○	○
熊本大学医学部附属病院		○
群馬大学医学部附属病院	○	○
(株)江東微生物研究所微研東北中央研究所	○	○
神戸大学医学部附属病院	○	○
国立大阪病院		○
国立感染症研究所	○	○
国立感染症研究所	○	
国立仙台病院		○
国立名古屋病院		○
国立病院九州医療センター		○
埼玉医科大学附属病院	○	○
札幌医科大学医学部附属病院	○	
静岡県立こども病院		○
仙台市衛生研究所	○	
千葉大学医学部附属病院	○	
東京都立駒込病院	○	○
名古屋大学医学部附属病院		○
新潟市民病院	○	
日本製薬株式会社 成田工場	○	○
浜松市保健環境研究所	○	
(株)ビー・エム・エルBML総合研究所	○	○
広島赤十字・原爆病院		○
広島大学医学部附属病院		○
福岡県保健環境研究所	○	○
富士市立中央病院	○	
北海道大学医学部附属病院	○	○
三重大学医学部附属病院	○	○
(株)三菱化学ビーシーエル中央総合ラボラトリー	○	○
横浜市立大学医学部附属病院	○	
合計	28	28



参考資料. HIV検査マニュアル

HIVスクリーニング検査の実施フローチャート



- ※1 一回目のスクリーニング検査と同等以上の感度の検査
- ※2 WB陽性の場合、HIV感染の確認検査としては不要
- ※3 感染のリスクが高く感染初期の可能性が考えられる場合は follow upする
- ※4 再検査と follow up が必要

- ③ 穴に検体希釈液を連続ピペットで5 μ lずつ入れる。
- ③ 検体を5 μ lとり2倍段階希釈を行う。持ち込みによる希釈誤差を防ぐため3段階希釈(3穴)毎にチップを交換する。
- ④ 検体の希釈が終わったら、感作粒子を連続ピペットで5 μ lずつ滴下する。
- ⑤ プレートミキサーでプレートの中身をよく混和し(軽くプレートの端を指でたたいて混和しても良い)室温で静置する。
- ⑥ 一時間後に結果を判定する。

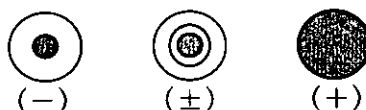
(3) 判定結果

<反応像の読み>

粒子がボタン状に下に沈降したものを(-)、粒子が小さなリングを形成しているものを(±)、凝集が見られるものを(+)とする。

<判定>

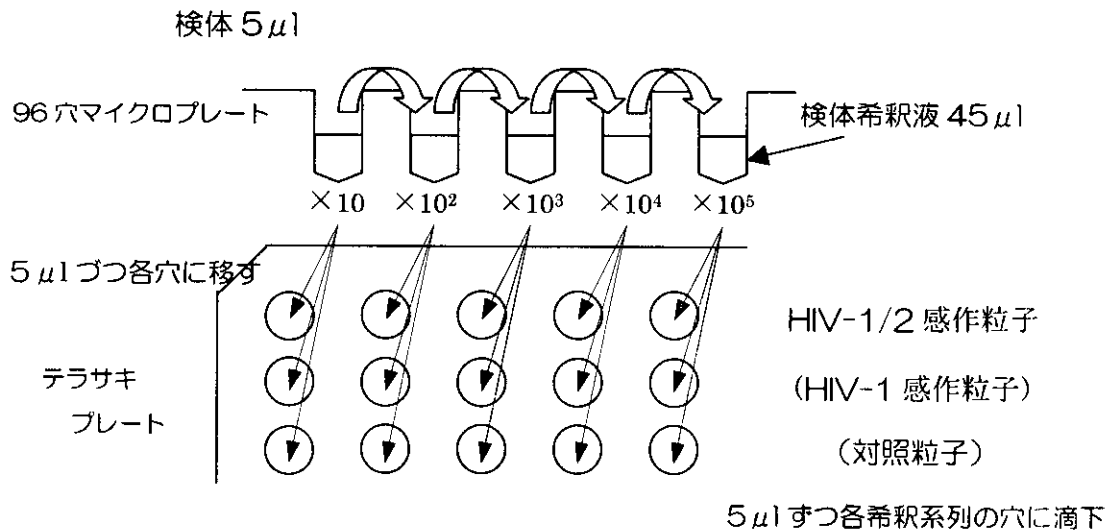
HIV-1、HIV-1/2の感作粒子の凝集がみられた希釈倍数までを2倍段階希釈でのPA価とする。



<10倍希釈系列でのPA価測定>

(1) 検査方法

- ① 検査キット等を準備する(2倍希釈系列の場合を参照)。
- ② 96穴マイクロプレートに検体の希釈段階分($\times 10 \sim 10^5$)5穴に検体希釈液を45 μ l入れる。
- ③ 検体を第1穴に5 μ l入れる(10倍希釈)。
- ④ 第1穴($\times 10$)から第5穴($\times 10^5$)まで10倍段階希釈する。この時、チップは全て交換すること。
- ⑤ 10倍段階希釈したものをテラサキプレートに穴に5 μ lずつ入れていく。
(HIV-1/2感作粒子のPA価のみが必要な場合は、各希釈1穴ずつで良い)
- ⑥ 検体を入れ終わったら、各希釈系列に感作粒子を連続ピペットで5 μ lずつ滴下する(下図参照)。
(HIV-1/2感作粒子のPA価のみが必要な場合は、各検体につき1希釈系列で良い)



⑥ プレートミキサーでプレートの中身をよく混和し（軽くプレートの端を指でたたいて混和しても良い）室温で静置する。

⑦ 1 時間後に結果を判定する。

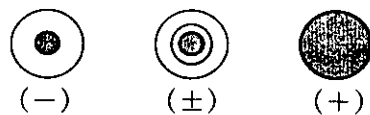
(3) 判定結果

<反応像の読み>

粒子がボタン状に下に沈降したものを（-）、粒子が小さなリングを形成しているものを（±）、凝集が見られるものを（+）とする。

<判定>

対照粒子が陰性像を示すことを確認する。HIV-1、HIV-1/2 の感作粒子の凝集がみられた希釈倍数までを 10 段階希釈での PA 価とする。さらに詳細な PA 価を求めたい時は、適当な 10 倍段階希釈溶液から 2 倍段階希釈していき、PA 価を測定する。



（執筆担当：神奈川県衛生研究所ウイルス部 嶋 貴子 近藤真規子 今井光信）

参考文献： A novel agglutination method for screening of HIV and HCV antibody testing with 5- μ l reagents ; Reduction of cost and time with high sensitivity
Vox Sanguinis 67,315,1994
M.Mizui, T.Moriya, H.Yosizawa, M.Kondo, T.Saito, M.Imai, K.Nishioka