

3. 未治療、治療の定義

c. 未治療感染者

サンプリング時未治療の感染者

d. 治療感染者

サンプリング時治療を受けている感染者。新規登録者だが何らかの理由により治療薬投与前のサンプリングが出来なかった症例についても対象とする。

4. サンプリング

a. 対象

参加施設を受診した感染者のうち新規登録患者(含む確認後未治感染者あるいは急性感染者)全例を対象とする。

b. ポイント

検体のサンプリングポイントは以下のとおりとする。

- ①初診時
- ②治療開始時
- ③治療開始後 3 ヶ月目の時点で VL が 50 コピー以下に達していない場合。以後検出限界以下に到達するまで 3-4 ヶ月ごとに

注: ③はオプション

c. 必要臨床情報

- ①性別 (M、F)
- ②生年月日 (西暦表記 yyyy/mm/dd)
- ③施設患者 ID もしくは匿名コード
- ④血清検査陰性が確認されている最終年月日 (西暦表記 yyyy/mm/dd、dd が明らかでないときは 15 と入力)
- ⑤陽転が初めて確認された年月日 (西暦表記 yyyy/mm/dd、dd が明らかでないときは 15 と入力)
- ⑥推定感染時期 (yyyy/mm)
- ⑦推定感染経路 (異性間、同性間、同性異性のいずれか、母子感染、IVDU、輸血、そのほか、不明)
- ⑧推定感染場所 (国内、国外 (具体的にあげられる場合は表記)、不明)
- ⑨国籍 (日本人、外国人 (具体的にあげられる場合は表記)、不明)

d. 採血方法

EDTA 採血管を使用。5-7mlスピッツ

d. サンプルのナンバリング

サンプルのナンバリングは以下のルールに従うこととする

ブロック番号(別表1参照)-電話市外局番一年(西暦下 2 桁)-施設番号(別表2)-患者番号(通し番号が望ましい)-提出回数

例 「2004 年に把握した北海道ブロックの北海道大学病院を受診した 12 番目の新患」の場合

HKD-011-04-2010-12-1

となる。

e. ストック

- ①細胞成分と血漿成分に分離する。
- ②血漿 薬剤耐性検査後の残りは 2 本に分注して-25~-80°Cで保存する
残りが2ml未満の場合 2 本に均等
残りが2ml以上の場合 1ml 2 本保存し残りは廃棄

③細胞成分の保存は buffy coat でも可 2 本に分注して-25~-80°C

5. 検査サンプル送付先

所属するブロック拠点病院検査担当者(別表3)に事前に連絡を取った上で専用コンテナに梱包の上、宅急便もしくはU-PACにて送付。
あるいは感染症研究所エイズ研究センター 杉浦まで連絡のうえ契約をしている業者による専用輸送システムを用いて搬送する。

6. 薬剤耐性遺伝子検査

プライマー、使用酵素、PCR条件などに関しては各施設に原則として任せるが、国立感染症研究所で作成したものを標準法として別添したので必要に応じて参照すること。

増幅範囲に関しては少なくとも次の領域を含むこと

- ①protease 領域:アミノ酸 1 から 99 番までを必ず含むこと
- ②逆転写酵素領域:1 から 240 番までを必ず含むこと

薬剤耐性変異の判定はIAS-USA2003年版の一覧に準ずる。

7. サブタイピング (実施が可能な施設のみ)

サブタイピングについては *Env C2V3* 領域および *Gag p17* 領域の遺伝子配列解析で行う。
Env C2V3 および *Gag p17* サブタイピングのプロトコルは別添プロトコルを参照のこと。

8. 収集するデータ

以下のデータの取りまとめを行う

- a. シークエンスの electropherogram → 各施設で保管(研究班終了時に取りまとめる)
- b. エディティング後の塩基配列テキストファイル → 感染研に提出
- c. 感染者情報 → 感染研に提出

9. 遺伝子配列データの取り扱い

標準 IUB/IUPAC に従う

使用できる文字は A, T, G, C, Y, R, M, K, S, W, B, V, D, H, N

ギャップにはハイフンを使用する

10. 遺伝子データの質的要求

a. 薬剤耐性検査(protease および逆転写酵素)

以下のデータの場合にはクローニングを要する

- ①薬剤耐性変異部位のコードンに不確定な箇所があり一つのアミノ酸を同定できない場合。野生株との混合あるいは synonymous のときは良しとする。
- ②解析したアミノ酸全配列の 10% 以上のアミノ酸が不確定な場合。

以下のデータの場合には再検を要する(RT-PCRより)

- ①フレーム内に stop codon が入っている場合
- ②フレームがずれる1もしくは2塩基欠損あるいは挿入が認められる場合

b. サブタイピング(*env C2V3*は必須、可能な施設は*gag p17*領域についても実施)

以下のデータの場合にはクローニングを要する

解析したアミノ酸全配列の 10% 以上のアミノ酸が不確定な場合。

以下のデータの場合には再検を要する(RT-PCRより)

- ①フレーム内に stop codon が入っている場合
- ②フレームがずれる1もしくは2塩基欠損あるいは挿入が認められる場合

11. 遺伝子データのフォーマット

FASTA 形式のファイルとする

FASTA ファイルは > から始まるヘッダ行の後にシークエンスが記述されている。補足情報は “ | ” で区切って記入することが出来る。但し、ヘッダ行は一行以内とする

>サンプル番号 | 領域 | 種類 | 感染タイプ | 治療状況 | 配列の長さ(bp)

サンプル番号: 上記項3dを参照

領域: プロテアーゼ protease
逆転写酵素 rt
envelope C2V3 C2V3
envelope その他 env
Gag gag

種類: nucleotide DNA
amino acid AA

感染タイプ:

新規登録 newly registered
新規急性 newly acute

治療状況

未治療 untreated
治療中 treated

例 >HKD011-04-2010-12-1 | protease | DNA | newly acute | untreated | 350 bps

VI. 研究成果の公表・論文執筆の際の著者に関して

この研究班で実施した研究成果の学会発表および論文発表の際の著者権は原則次の基準に従うものとする。

①薬剤耐性の解析を実施した施設は2名(検査担当者と責任者)とする。首班施設は3名(検査担当者、データマネージャー、研究班長)とする。

②著者数制限を求められた場合は各施設1名とする。それでも多い場合は提出検体数およびデータ取りまとめへの貢献度を基準に上位から選別。著者から外れた者については謝辞欄にフルネームで記載する。

③薬剤耐性検査実施機関以外の研究協力施設(検体提出機関等)については Japanese Drug Resistance HIV-1 surveillance Network として記載

④First author、Last author 等に関しては研究への貢献度などを基準にしたうえで研究班長がこれを判断する。

VII. 事務局

藤野真之 fmasa@nih.go.jp
杉浦 互 wsugiura@nih.go.jp

国立感染症研究所エイズ研究センター
第二研究グループ

〒2080011 東京都武蔵村山市学園 4-7-1
Tel 042-561-0771 Fax 042-561-7746

別表1 ブロックコード

	ブロック名	コード
1	北海道ブロック	HKD
2	東北ブロック	THO
3	関東甲信越ブロック	KTK
4	北陸ブロック	HKR
5	東海ブロック	TOK
6	近畿ブロック	KIN
7	中国四国ブロック	CSI
8	九州沖縄ブロック	KSO

別表3 ブロック別検査担当者一覧

ブロック名	担当者	施設	Tel	Fax	e-mail
北海道 (HKD)	吉田 繁	北海道大学病院検査部 札幌市北区北14条西5丁目	011-706-5714	011-716-3048	shiyoshi@med.hokudai.ac.jp
東北 (THO)	浅黄 司	独立行政法人国立病院機構仙台医療センター 仙台市宮城野区宮城野2丁目8-8	022-293-1172	022-293-1149	asagit@sendai.hosp.go.jp
関東甲信越 (KTK) (新潟、長野、群馬)	渡辺香奈子	新潟保健環境科学研究所ウイルス科 新潟市曾和314-1	025-263-9414	025-263-9410	domobs@hotmail.com
	須貝めぐみ	新潟大学医歯学総合病院感染管理部 新潟市旭町1-754	025-227-0841	025-227-0727	megumi@med.niigata-u.ac.jp
関東甲信越 (KTK) (東京、千葉、埼玉、 神奈川、茨城、栃木)	杉浦 互	国立感染症研究所村山分室 東京都武蔵村山市学園4-7-1	042-561-0771	042-561-7746	wsugiura@nih.go.jp
関東甲信越 (KTK) (東京)	貞升健志	東京健康安全研究センター 新宿区百人3-24-1	03-3363-3231	03-3363-3263	kenji_sadamasu@member.rr etro.tokyo.jp
東海 (TOK)	金田次弘	独立行政法人国立病院機構名古屋医療センター・臨床研究センター 名古屋市中区三の丸4-1-1	052-951-1111 内 2763	052-955-1580	kanedat@nnh.hosp.go.jp
北陸 (HKR)	正兼亜季	石川県立中央病院 金沢市鞍月東2-1	076-237-8211	076-238-5253	aki-masa8@ipch.jp
近畿 (KIN)	森 治代	大阪府立公衆衛生研究所 大阪市東成区中道1-3-69	06-6972-1321	06-6972-2393	mori@iph.pref.osaka.jp
中国四国 (CSI)	杉浦 互	国立感染症研究所村山分室 東京都武蔵村山市学園4-7-1	042-561-0771	042-561-7746	wsugiura@nih.go.jp
九州沖縄 (KSO)	南 留美	独立行政法人国立病院機構九州医療センター 福岡市中央区地行1-8-1	092-852-0700	092-847-8801	rrhh@qmed.hospgo.jp

追記1

データの収集のタイムテーブル

別添調査票のほかに FASTA 形式の配列ファイルをお願いします

平成16年度予定

平成16年12月8日:

平成15年データおよび平成16年上半期(1月から10月まで)の提出締め切り

平成16年12月16日

班総会で一次集計結果の発表

平成17年2月1日

平成16年下半期(11月と12月分)

平成17年2月

評価委員会において15-16年度集計結果の発表

平成17年度予定

平成17年7月:

班会議および実務者会議

平成17年上半期(1月から6月)のデータ提出締め切り

平成18年1月

総会

平成17年下半期(7月から12月)のデータ提出締め切り

平成17年2月

評価委員会において15-17年度集計結果の発表

平成18年度予定

平成17年7月:

班会議および実務者会議

平成17年上半期(1月から6月)のデータ提出締め切り

平成18年1月

総会

平成17年下半期(7月から12月)のデータ提出締め切り

平成18年2月

評価委員会において15-17年度集計結果の発表

調査票記入にあたっての手引き

データ集計上各項目に記入する選択肢は以下の範疇でお願いしたい

1. No: 施設における検体の通し番号
2. サンプルコード:
サンプルのナンバリングのうち施設番号までの部分
ブロック番号(別表1参照)-電話市外局番一年(西暦下2桁)-施設番号(別表2)-
3. 施設患者 ID:
サンプルのナンバリングのうち患者番号以降
患者番号(通し番号が望ましい)-提出回数
4. サンプルングポイント
初診時
治療開始時
治療開始後 x ヶ月後
その他(具体的に記載)
5. 性別
M
F
不明
(注 性転換者の場合は生物学的性を記載)
6. 生年月日
西暦 yyyy/mm/dd
不明
7. 陰性確認最終年月日
西暦 yyyy/mm/dd
不明
8. 陽転確認年月日
西暦 yyyy/mm/dd
不明
9. 推定感染時期
西暦 yyyy/mm
不明
10. 感染分類
新規登録
急性感染
その他(具体的に)
11. 治療
未治療
治療
12. 感染経路
同性間
異性間
同性異性いずれか
母子感染
IVDU
輸血
その他(具体的に)
不明
13. 推定感染場所
国内
国外(国名が明らかな場合は具体的に記載)
不明

14. 国籍

日本人
外国人(国名が明らかな場合は具体的に記載)
その他

15 薬剤耐性変異の記載

IAS-USA2003 年版の一覧に準じて記載
耐性変異を認めない場合は“なし”と記載
耐性変異を認めた場合は protease, RT それぞれについて記載

例: protease L10I、L90M
RT M41L、K70R

厚生労働科学研究費補助金(エイズ研究事業)

分担研究報告書

薬剤耐性遺伝子検査のヴァリデーションに関する研究

分担研究者名

浅黄 司 仙台医療センター 主任

共同研究者 松田 昌和 杉浦 亙 (国立感染症研究所)

共同研究者 伊部 史朗 金田 次弘(名古屋医療センター)

研究要旨

我国における HIV-1 薬剤耐性遺伝子検査法は、国立感染症研究所や国立国際医療センターで開催された研修会に準じた方法と、各施設で独自に開発した方法が混在した状態で実施されている。

一方これまでの HIV-1 薬剤耐性遺伝子検査の経験からは、検査方法が異なった場合には「得られた薬剤耐性遺伝子の塩基配列に違いが認められる場合がある」ことが知られている。しかし、これまでに全国で HIV-1 薬剤耐性遺伝子検査を実施している各施設の検査方法や解析結果についての調査は実施されていない。そこで平成 16 年度の分担研究「薬剤耐性遺伝子検査のヴァリデーションに関する研究」では、全国の HIV-1 薬剤耐性遺伝子検査施設の実務担当者を対象として、HIV-1 薬剤耐性遺伝子検査方法や検査の運用実態に関する内容のアンケート調査をおこない現状の把握を目的とした。アンケート調査の結果からは、殆どの施設で内部精度管理が実施されていないことが分かった。また内部精度管理を実施している施設でも「他に適当なものが無いから」としながら、独自に「前回薬剤耐性遺伝子検査をおこなった検体」や「培養上清」を標準サンプルと設定して内部精度管理に用いていることが分かった。また各施設における薬剤耐性遺伝子増幅法では、塩基配列に影響を及ぼす可能性があると考えられる、プライマー、酵素試薬類、ラベリング試薬、シークエンサー自体も複数の種類が使用されていることなどが分かった。

今後は、各施設で実施されている HIV-1 薬剤耐性遺伝子検査法の塩基配列決定がどのように行われているかの検証をおこない解析状況の整備を図ることや、HIV-1 感染患者由来の検査材料を用いた外部精度管理サーベイランスを行い、施設間での塩基配列解析結果の比較などを行うことが必要である。また HIV-1 薬剤耐性遺伝子検査の運用の実態では、感染性検査材料の梱包や搬送に関することや、HIV-1 薬剤耐性遺伝子検査結果の報告内容などについての検討が必要と思われる。

A. 研究目的

抗 HIV-1 薬剤療法に伴い薬剤耐性を獲得した HIV-1 ウイルスが現れ viral load の増加する患者や、新規の HIV-1 感染患者でも既に薬剤耐性遺伝子変異を持つ HIV-1 ウイルスが認められる症例が現れており、HIV-1 薬剤耐性遺伝子検査はサルベージ療法の治療薬剤選択のみならず、新規の HIV-1 感染患者への投薬開始前の検査としても必要性が増してくるものと考えられる。しかし、これまでの HIV-1 薬剤耐性遺伝子検査の経験から、検査方法が異なった場合には

HIV-1 薬剤耐性遺伝子の塩基配列が異なる事のあることが知られている。しかし、これまでに全国の HIV-1 薬剤耐性遺伝子検査を実施している施設間での、検査方法や検査成績、精度管理方法に関する調査や、同一標準サンプルを用いた各施設間での薬剤耐性遺伝子検査結果を比較するなどの調査研究は実施されていない。

そこで研究課題である「薬剤耐性 HIV 発生动向調査のための検査方法・調査確立に関する研究」の平成 16 年度の分担研究「薬剤耐性遺伝子検査のヴァリデーションに関する研究」では、

HIV-1 薬剤耐性遺伝子検査の実務担当者を対象とした、HIV-1 薬剤耐性遺伝子検査の実務内容に関するアンケート調査を行い、わが国における HIV-1 薬剤耐性遺伝子検査の現状把握と、運用の実態を把握することを目的とした。

B. 研究方法

アンケート調査対象施設の選択

全国の HIV/AIDS 治療ブロック地区から HIV-1 薬剤耐性遺伝子検査を日常的業務としている、北海道ブロック 1 施設、東北ブロック 1 施設、関東甲信越 5 施設（新潟県 1 施設、神奈川県 1 施設、東京都 3 施設）、北陸 1 施設、東海 2 施設、近畿 2 施設、九州 1 施設（研究施設 8 施設、医療施設 5 施設）の計 13 施設を選択した。別途に 2 施設（神奈川県内委託検査所 1 施設、新潟県研究所 1 施設）から、本アンケート調査への参加希望があった。

アンケート調査の依頼と回収

アンケート調査への協力を依頼する依頼状（別添資料.1）を作成して「HIV-1 薬剤耐性遺伝子検査方法と精度管理に関するアンケート」調査票（別添資料.2）と共に送付し、アンケート調査を実施した。調査実施中に本アンケート調査に参加希望のあった 2 施設（神奈川県内委託検査所 1 施設、新潟県研究所 1 施設）にも、同様の依頼状とアンケート調査票を送付してアンケート調査を実施した。アンケートの回答用紙は平成 16 年 12 月 27 日までに回収した。

（倫理面への配慮）

アンケート調査対象とした施設名は、HIV/AIDS 治療ブロック地区名又は都道府県名で取り扱った。また個人名、個人情報などは取り扱われていない。アンケート調査施設には、「回答しない、あるいは全ての項目に回答しなくても不利益が生じない」ことを明記した文書を添付して回答を求めた。

C. 研究結果

アンケート調査票発送施設数 15 施設、アン

ケート調査票回収施設数 15 施設で、調査票回収率は 100%であったが、設問により回答数が異なることから括弧内に回答率を記した。

内部精度管理・外部精度管理

1. 内部・外部精度管理の実施状況（回答率 100%）；（表 1）内部精度管理の実施施設は、15 施設中 3 施設（20%）であり、他の 12 施設（80%）では実施されてなかった。外部精度管理への参加経験は、全施設でなかった（0%）。

2. 内部精度管理の内容（内部精度管理実施 3 施設 回答率 100%）；（表 2）標準サンプルとして何を使用しているかでは、臨床検体が「適当なものが無いため」として挙げられ、培養上清が「自作が可能」として挙げられていた。検査結果の記録保存では、増幅遺伝子の写真記録やラベリング試薬添付のコントロールの解析記録が挙げられていた。管理限界の設定については viral load 値と増幅産物の量やシグナルの高さが挙げられ、精度管理限界から外れた場合の対応では、必要に応じた場合の対応が挙げられていた。

採血・梱包・搬送方法

3. 検体採取採血管（回答率 80%）；（表 3）採血管は、2 つの研究施設では「特定せず」であった。「記載なし」の 3 施設中の 2 施設は研究施設で、他の 1 施設は医療施設であった。

4. 抗凝固剤（回答率 77.3%）；

抗凝固剤は、EDTA が 9 施設であった。その他 CPD 液（血液保存液）が 1 施設、「なし」が 1 施設であった。

5. 梱包・搬送方法（回答率 66.7%）；（表 4）

梱包では、2 重式感染性材料輸送容器（州間病原体輸送：The Interstate Shipment of Etiologic Agents・42CFRPart72 に準じた容器）の使用は 2 施設であった。その他の施設では、発泡スチロール箱、専用バッグ、クッション封筒、外注先に依頼が、各 1 施設あった。搬送方法は、（4℃）宅急便・郵便パックが 4 施設あり、その他では、専用の交換便（車）施設、外注先に委託、指定の業者（検査委託施設）が各

1施設であった。

核酸抽出・遺伝子増幅法

6. 核酸抽出 (回答率 100%) ; (表 5)

全15施設が血清又は血漿を材料としてviral RNAを用いていたが、1施設はDNAも対象としていた。抽出試薬は、殆どが市販の試薬キットであったが、フェノール抽出法の施設とRoche社のviral load測定用KITのRNA抽出試薬を用いている施設が各1施設であった。

7. 遺伝子増幅法 (回答率 100%) ; (表 6)

15施設中14施設(99.3%)が特異的プライマーを用いていた。ランダムプライマーを用いた1施設では、RT-PCR (AMV) (TaKaRa) Ver3.0でcDNAを合成した後、Ex. Taq HS (TaKaRa)で1stPCRを行なう方法を採用していた。特異的プライマーによるRT反応の後に1st PCRを行う2施設では、RT反応をRT (AMV) (TOYOBO)で行いPCR反応はAmpli Taq (ABI)を用いる方法と、RT反応にはM-MLV (Invitrogen)を用い、PCR反応にはTaq DNA polymerase (Biotech)を用いる方法を採用していた。特異的プライマーでRT-^{1st} PCRを行っている12施設中、10施設ではONE STEP RT-PCR KIT (TaKaRa)を用い、他の2施設ではONE STEP RT-PCR KIT (Invitrogen)を用いており、2nd PCR試薬(表7)は、EX. Taq (TakaRa)、LA. Taq (TakaRa)、AmpliTaq (ABI)のいずれかを使用している施設が10施設、その他にはKOD DNA polymerase (TOYOBO)、Ex. Taq HS (TaKaRa)、Taq DNA polymerase (Biotech)、PCR Master Mix (Promega)が各1施設で用いられていた。

8. 薬剤耐性遺伝子検査増幅成功率(回答率 93.4%) ; (表 8)

各施設から寄せられた遺伝子増幅成功率は80%~100%であった。

9. PCR以外の遺伝子増幅 (回答率 26.7%) ; (表 8)

回答した4施設ではPCR以外の方法は行っていないかった。その他の施設は「記載なし」であった。

10. 特異的プライマーの選定(回答率 93.4%) ; (表 9)

国立感染症研究所設計プライマーのみを用いている施設が7施設(46.7%)で、国立感染症研究所設計プライマーに文献や他の施設から紹介のあったプライマーを用いている施設が5施設、全く独自に設計した施設が2施設であった。

11. プライマー設計の基礎とした標準株(塩基配列) (独自設計施設4施設、回答率 100%) ; (表 10)

解析した臨床検体や解析集積データを用いたとの回答が2施設とSubtype Bの共通配列(Los Alamos National lab.)と、HX2Bを用いたとの回答が各1施設であった。

12. 独自設計プライマーでの増幅塩基部位(独自設計施設4施設、回答率 75%) ; (表 11)

1施設ではRT-^{1st} PCRでプロテアーゼ遺伝子領域から逆転写酵素遺伝子領域(2125-3555)の増幅を行い、2nd PCRでは、プロテアーゼ遺伝子領域(2148-2569)と逆転写酵素遺伝子領域(2466-2875)又は、逆転写酵素遺伝子領域(2707-3132又は3009-3389)の3種類の増幅塩基部位が示されていた。他の1施設ではプロテアーゼ遺伝子領域から逆転写酵素領域(2020-3792/1872-3769/2039-3622)の3種類の増幅塩基が示され、2nd PCRでも同様にプロテアーゼ遺伝子領域から逆転写酵素遺伝子領域(2039-3622/2013-3582/2135-3339)の3種類の増幅塩基部位が示されていた。また他の1施設はRT-^{1st} PCRは文献参考としていたが、2nd PCRではプロテアーゼ遺伝子領域(2136-2633)と逆転写酵素遺伝子領域(2582-3338)とプロテアーゼ遺伝子領域から逆転写酵素遺伝子領域(2136-3336)の増幅塩基が示されていた。

13. ラベリング反応・精製法・シーケンサー(回答率 100%) ; (表 12)

シーケンサーは、1施設がBECKMAN COLUTER CEA 8000で、他の施設はABI PRISM 310が11施設、ABI 3100 Avantが1施設、ABI 3730S

が1施設、ABI 3100とABI 3730の併設が1施設であった。ラベリング反応試薬は1施設がCEA Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start kit (BECKMAN COLUTER) を用いていた。

ラベリング反応試薬にBig Dye Terminator v 1.1を使用していたのは7施設で、他の4施設はBig Dye Terminator v 3.1を使用していた。他の1施設ではBig Dye Terminator FSをラベリング反応試薬として挙げていた。精製法では、エタノール沈殿法が6施設、その他9施設はカラム精製法であった。

HIV-1 薬剤耐性遺伝子検査結果報告

14. 標準パネルの選択と何年版 (回答率:標準パネル86.7%, 年版73.3%) (表13)

標準パネルをISA-USA Panelとした11施設では2003年又は2004年、或いは最新版との回答であった。Stanford DBとした施設は2施設であった。

15. 薬剤耐性遺伝子検査報告書内容 (回答率100%) 変異コドンと変異アミノ酸報告している施設が7施設、変異コドンと変異アミノ酸に耐性化した薬剤名を報告しているとの答えが5施設であった。その他の施設では、変異コドンと変異アミノ酸の報告にStanford大学のホームページから β -Check解析を加えた報告が2施設、変異コドンと変異アミノ酸に耐性化した薬剤名と変異アミノ酸判定の一覧表添付をして報告をしている1施設があった。

16. 薬剤耐性遺伝子検査業務上の問題 (回答率20%) (表14) 3施設から、HIV-1ウイルスのポピュレーションとプライマー、遺伝子増幅検査の妥当性に関する疑問。2つの波形が重なった場合の判定方法をどうするべきか。結果解釈をある程度統一化するべきではないか、などの問題点が挙げられていた。

その他

外部精度管理サーベイランスへ参加希望:
(回収率100%)

全施設から参加希望が得られた。

D. 考察

HIV-1 薬剤耐性遺伝子検査の妥当性の検証

各調査対象施設で使用している、プライマー、遺伝子増幅酵素試薬、ラベリング反応試薬、シーケンサーの検出能力の違いや、組み合わせが多岐に亘っていることから、まずは各施設のHIV-1 薬剤耐性遺伝子検査法を用いて、塩基配列が明らかなHIV-1 RNA クローンサンプルの塩基配列決定を行い、既知の塩基配列が得られているかの検証を行うことが必要であり、また解析法の安定性の検証の為に塩基配列の同時再現性や日差変動についての検討が必要と考えられる。

更に、実際のHIV-1感染患者の中から、未治療患者や既に薬剤耐性遺伝子変異を持った患者由来のサンプルを何本かをを用い、各施設のHIV-1 薬剤耐性遺伝子検査法で解析を行う外部精度管理サーベイランスを行い、臨床検体を用いた場合の判読された塩基配列では、どの程度の変動幅があるのかの確認も必要と考えられる。

なお、実際の塩基配列の判読する際には、ヘテロザイゴートの取り扱い方についてなどの判定基準を統一することが重要と考えられる。

検査体採取採血管

検体採取採血管についての回答では、一部「特定せず」との回答があった。しかし薬剤耐性遺伝子検査の対象となる患者が免疫不全状態であることを考慮すると、採血時の感染リスクが低く、DNA/RNA free とされている γ 線照射処理済の真空採血管の使用が望まれる。

また採血時のコンタミネーションを避ける為には、採血は他の検体容器とは別個の真空採血管で単独に採血され管理されるべきと考えられる。

HIV-1 薬剤耐性遺伝子検査検体の梱包

感染性検査材料の梱包には、2重感染性材料輸送容器(州間病原体輸送:The Interstate Shipment of Etiologic Agents・42CFRPart72に準じた容器)等の使用が望まれている。今回

の調査からは、施設独自の梱包・搬送系を設けている施設もあったが、容器破損が起きた場合の環境汚染を考慮した梱包容器の採用が少なかった。梱包と搬送には実務的なレベルで実施が可能で持続性のある安全な基準の整備が必要と思われた。

薬剤耐性遺伝子検査報告書

薬剤耐性遺伝子検査報告書には、殆どの施設が変異コドンと変異アミノ酸のみか、耐性化した薬剤名を報告している。また施設によってはStanford大学の β -Check解析を加えた報告書や、変異アミノ酸判定の一覧表を添付して報告をしている施設などの違いがあった。今後は、臨床医の希望を取り込みながら、使いやすい報告書のあり方を検討したい。

アンケート調査の不十分な点に関する対応

このアンケート調査の設問で不十分な点は、

- 1.) 遺伝子増幅成功率に関する設問では、HIV-1 viral load 値を規定しなかったことから一定の基準での遺伝子増幅成功率の回答が得られなかった。
- 2.) プライマーに関する設問では、約半数の施設が使用している「国立感染症研究所設計のプライマー」には、数種類のプライマーがあり内容の特定が出来なかった。
- 3.) 遺伝子増幅試薬やラベリング反応試薬の回答で、既に発売されていない試薬名を回答している施設があった。

これらの点については、今後新たに設定しなおしてアンケート調査を実施する予定である。

またプライマーの塩基配列や酵素試薬調整法、サイクリングコンディション等の遺伝子増幅法を明らかにできるだけの設問ではなかったことから、再度設問を適切に設定して明らかにしていく予定である。

今後、アンケート調査の結果を発表するに際しては、アンケート回答の各施設で協力をいただいた先生方も共著にして発表したいと考えている。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

なし

2. 実用新案特許

なし

3. その他

なし

関係各位

平成 16 年 10 月 29 日

「HIV-1 薬剤耐性検査法と精度管理に関するアンケート」へのご協力をお願い

拝啓

抗 HIV-1 薬剤が開発され HAART 療法が臨床に導入されてから HIV-1 感染患者の血中 viral load 値は極めて低く抑える事が可能となり合併症の発生率も極めて低くなりました。

一方、抗 HIV-1 薬剤治療の網を掻い潜り薬剤耐性を獲得した HIV-1 ウイルスが現われ、再び viral load の増加する患者や、新規の HIV-1 感染患者にも既に薬剤耐性遺伝子変異を持つ HIV-1 ウイルスが認められています。従って、今後は抗 HIV-1 薬剤投与を受けた患者の薬剤耐性確認や、サルベージ療法の薬剤選択の為にばかりではなく、新規の HIV-1 感染患者であっても抗 HIV-1 薬剤投与を開始する前に薬剤耐性遺伝子検査を行い、投与薬剤を選択する必要性が増してくるものと考えられます。

そこで、平成 16 年度厚生労働科学研究 エイズ対策研究事業「薬剤耐性 HIV 発生動向のための検査方法・調査確立に関する研究班(主任研究者:杉浦互)」では「薬剤耐性遺伝子検査のヴァリデーション」を実施する予定にしております。そこで研究に先立ち、薬剤耐性遺伝子検査法と精度管理に関するアンケート調査を実施する事に致しました。

また、アンケート調査と同時に、第一回目の外部精度管理(標準サンプルを設定して参加希望施設にお送りし、各施設で日常的に行っている薬剤耐性遺伝子検査法で解析をしていただき、得られた塩基配列と翻訳したアミノ酸の結果を比較検討する)の参加施設を募集いたしますので、趣意をご理解いただきご参加ご協力を頂けますようお願い申し上げます。

また、ご多忙のところ申し訳ございませんが、アンケートにご回答をいただき、同封の封書にて平成 16 年 11 月 20 日(必着)で、ご返送を戴けますよう重ねてお願い申し上げます。

念の為申し添えますが、本アンケートに回答しない、あるいは全ての項目に回答しなくても、不利益が生じる事はございません。

敬具

HIV-1 薬剤耐性遺伝子検査ヴァリデーション実施責任者

国立病院機構仙台医療センター 臨床検査科

浅黄 司

国立病院機構名古屋医療センター 臨床研究センター

金田 次弘

ご不明な点等がございましたら金田までご連絡ください。

E-mail:kanedat@nnh.hosp.go.jp

薬剤耐性遺伝子検査ご担当者名：_____

電話番号：_____ ファックス番号：_____

電子メールアドレス：_____

精度管理に関するご質問

I. HIV 薬剤耐性遺伝子検査に内部精度管理法を導入していますか？

(はい、 いない)

語意；内部精度管理法とは、検査の為の標準サンプルを設定し、常に検体と同時に、同様の行程で取り扱い、検査の正確度・精密度を管理・検証する方法。

● 内部精度管理を実施している施設にお伺いします。

① 内部精度管理の為の「標準サンプル」として、何を使用していますか？

(例：患者血漿、患者血球、持続感染細胞、培養上清、市販品(名称： _____)
その他 _____)

② 上記の材料を標準サンプルと定めた理由は何故ですか？

(_____)

③ 内部精度管理の結果を記録・保存していますか？

(_____)

④ 管理限界の判定基準をどの様に設定していますか？

(_____)

⑤ 管理限界を外れた検体は、どの様な処理を(再検査など)していますか？

(_____)

II. 薬剤耐性遺伝子検査の外部精度管理サーベイランスへの参加経験がありますか？

(はい：主催者(_____)、いいえ _____)

検査方法に関するご質問

Ⅲ.検体採取・梱包・搬送方法について

① 採用されている採血管についてお答えください。

製品名: _____ メーカー名: _____ 使用抗凝固剤: _____

その他:(特定していない場合など) _____

② 他の施設に検体を搬送する場合には、どのような梱包法を行っていますか？

(_____)

③ どのような搬送方法(手段)をお使いですか？

(_____)

Ⅳ.核酸抽出・遺伝子増幅について

① 核酸抽出に用いる試料は何ですか？

イ. 血漿/血清 (RNA の抽出)

ロ. 全血/ バフィーコート /PBMC /CD4 陽性細胞 (DNA の抽出)

ハ. その他

② 核酸抽出の為の試薬/キットは何をお使いですか？

キット名: _____ 製造・販売元 _____

● ①で「イ。」と答えられた施設にお伺いします

③ 逆転写反応(RT)から nested PCR までにお使いの試薬についてお答えください。

<スペシフィックプライマーをご使用の場合>

イ. RT-1st PCR(試薬・キット名: _____)

ロ. nested PCR(試薬・キット名: _____)

<ランダムプライマーをご使用の場合>

ハ. RT(試薬・キット名: _____)

ニ. 1st PCR 及び nested PCR(試薬・キット名: _____)

● ①で「ロ。」と答えられた施設にお伺いします

③ PCR の試薬・キットは何をお使いですか？

(試薬・キット名: _____)

④ 現在実施している薬剤耐性遺伝子検査法での遺伝子増幅成功率は、およそ何パーセントですか？ (およそ _____ %)

⑤ 通常の PCR 法以外で遺伝子増幅を行っている場合は、その方法名をお示してください。

(_____)

⑥ 遺伝子増幅に用いるスペシフィックプライマーはどの様に選定されましたか？ 以下から選んでください。

イ. 国立感染症研究所や国立国際医療センターで開催された薬剤耐性遺伝子検査研修会で使用したプライマーを使用している。

ロ. 独自に設計したプライマーを使用している。

ハ. 他施設からの紹介や文献を参考にしたプライマーを使用している。

ニ. その他(_____)

● ⑥で「ロ。」と答えられた施設にお伺いします

⑦ 設計に用いた HIV 標準株名,アクセッションナンバー,塩基配列の年版をお示し下さい。

標準株名(例:HXB2) _____ アクセッションナンバー(例:K03455) _____

年版(例:1999年) _____

⑧ プライマーの組み合わせと増幅領域をお示してください。

(例1: PR 1st, forward: DRPR01 - reverse: DRPR02, 2151-2711 _____)

(例2: PR 2nd, forward: DRPR03 - reverse: DRPR04, 2212-2592 _____)

(_____)

(_____)

(_____)

(_____)

(_____)

(_____)

V. ラベリング反応・反応産物の精製について

① ラベリング反応の試薬は何をお使いですか？

メーカー名 _____ 試薬名 _____

② ラベリング反応後の精製法をお示し下さい。

イ. エタノール沈殿法

ロ. 使用キット名: _____ メーカー _____

ハ. その他 _____

③ 塩基配列を解析するシークエンサーは何をお使いですか？

メーカー名 _____ 型番 _____

VI. 薬剤耐性遺伝子変異の解析・判読・報告について

① 薬剤耐性遺伝子変異と判定する為に用いている標準パネルは何をお使いですか？

名称: 例: IAS-USA Panel _____ 年版 例: October, 2003 _____

名称: _____ 年版 _____

② 検査結果報告書に記載している項目を選択してください(複数選択可)。

a. 薬剤耐性変異部位のコード番号と変異アミノ酸。

b. 耐性化している薬剤名。

c. 変更可能な薬剤名。

d. その他(_____)

VII. 薬剤耐性遺伝子検査業務上で問題とお考えの事がありましたらお書きください。

ご協力をありがとうございました。外部精度管理に関するご希望・意見等がございましたら御遠慮なくお寄せください。今後ともご協力を宜しくお願いいたします。

アンケートのご回答は平成 16 年 11 月 20 日(必着)までに

同封の封筒でご返送をお願いいたします。

.....

現在予定している外部精度管理:

杉浦班(精度管理担当者)からプロテアーゼと逆転写酵素遺伝子領域の塩基配列及びアミノ酸配列既知の HIV-1 を 3-5 サンプル送付します。それらを対象にして各施設で薬剤耐性遺伝子検査を施行していただき、その結果を精度管理担当者に提出していただきます。精度管理担当者は、コントロールパネルと比較検討をいたします。

結果のまとめは、個別的に各施設に送付し、全体のまとめはエイズ学会等で公表する予定です。

なお、検体送付時期は来年の春(3-5月)を予定しております。

外部精度管理サーベイランス に参加を

①希望します。 ②希望しません。 (○をつけてください。)

表1.精度管理の実施状況

I : HIV薬剤耐性遺伝子検査に			
内部精度管理法を導入していますか？			
回	答	(はい	3/15施設 20.0%)
		(いいえ	12/15施設 80.0%)
II : HIV薬剤耐性遺伝子検査の			
外部精度管理サーベイランスへの			
参加経験がありますか？			
回	答	(はい	0施設 0.0%)
		(いいえ	15施設 100.0%)

表 1.精度管理の実施状況

表2. 内部精度管理の内容

- ①標準サンプルとして何を使用？
 - ・前回薬剤耐性遺伝子検査を行った臨床検体を陽性コントロールとして使う。
 - ・PCRは患者血清。シークエンシングは、CEQ Dye (Beckman COULTER)。
 - ・培養上清
- ②標準サンプルと定めた理由？
 - ・(他に) 適当なものが無い為。
 - ・自分で作成できる。
- ③結果記録保存？
 - ・増幅産物の電気泳動写真
 - ・新たなシークエンスキット開封時に解析結果を記録
 - ・実験ノートに記録
- ④精度管理限界の設定？
 - ・Viral load値と増幅産物の有無。前回の塩基配列と同様か確認。
 - ・増幅産物の特異性とシグナルの強さを確認。
- ⑤管理限界から外れた場合？
 - ・必要に応じて血漿の濃縮・再抽出又は再度RT-1st PCRから再検する。
 - ・必要に応じ再検さ(定量を含む)する。

表 2. 内部精度管理の内容