

**B. HIV 検査陽性者(感染者)のケアのためより効果的な
HIV のフォローアップ検査体制を構築するための研究**

B-1. HIV-1 RNA 定量キットのコントロールサーベイ

分担研究者 加藤真吾（慶応義塾大学医学部微生物学・免疫学教室）
研究協力者 瀬尾麻美、林邦彦、佐々木政人
（ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社）

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なHIV-1 ウイルス量測定法であるアンプリコア HIV-1 モニターv1.5 およびコバス アンプリコア HIV-1 モニターv1.5 の測定精度の調査し、施設間での測定値の差を是正することを目的としてコントロールサーベイを実施した。平成15年1月から平成16年10月までの期間にアンプリコアあるいはコバスアンプリコアを購入したすべての検査センター、公的検査・研究機関、ルーチン検査実施病院を対象とし、参加案内状を送った50施設のうち33施設が参加した。HIV-1 パネル血清とアンケートを送付し、一重測定の結果をすべての施設から回収した。測定値が目標値の1/3から3倍の範囲に入っていなかった事例が5例、QSの吸光度不足が2例、偽陽性が1例みられた。このような要再検例は検査数の少ない施設ほど起こりやすい傾向があり、大量の一般臨床検体を扱う検査センターでは見られなかった。今後、要再検データがあった施設には、測定工程確認の実施とフォローアップサーベイへの参加を推奨する予定である。アンケート調査の結果、76%の施設で高感度法による測定が可能となっていること、作業エリアの区分けと消毒はほぼすべての施設で行われていることがわかったが、機器の保守を定期的に行っている施設は33%と低かった。全施設の77%でコバスアンプリコアの動作不良またはQSの吸光度不足によるトラブルを経験しており、機器の保守あるいはRNA抽出操作との関連が疑われた。参加施設の94%がコントロールサーベイの継続を希望した。コントロールサーベイは製造者側の品質管理や精度管理を評価するためにも重要であり、今後とも客観性と専門性の高いコントロールサーベイを実行していくことが精度管理の高いHIV定量検査体制を維持していくために重要であると考えられる。

A. 目的

HIV感染者およびエイズ患者のHIVウイルス量は治療および病態把握に有用な指標である。本コントロールサーベイでは、国内において認可されているHIVウイルス量測定法であるアンプリコア HIV-1 モニターv1.5（以下、アンプリコア）およびコバスアンプリコア HIV-1 モニターv1.5（以下、コバスアンプリコア）使用施設においてパネル血清を用いてその測定精度を調査し、測定結果に問題があった施設に対しては、問題点の指摘、検査手順の見直し、機器の点検整備などの改善指導を行い、測定値の施設間差の是正に努める。

B. 方法

平成15年1月から平成16年10月までの期間にアンプリコアあるいはコバスアンプリコアを購入した施設のうち、検査センター、公的検査・研究機関はすべて対象とし、病院はルーチン検査を実施している施設のみを対象として計50施設にコントロール参加案内状を平成16年11月に郵送した。参加希望施設は計33施設で、キット別ではアンプリコアが13施設、コバスアンプリコアが20施設、方法別では標準法のみが9施設、高感度法のみが11施設、標準法および高感度法が13施設であった。各施設に申し込み順に番号を付与

した。参加希望施設に HIV-1 パネル血清、アンケートおよび抽出工程チェックシートを平成 16 年 12 月に送付し、一重測定の結果を平成 17 年 1 月にすべての施設から回収した。

HIV-1 パネル血清は次のようにして作成した。まず、サブタイプ B である HIV-1 LAI 株をヒト末梢血単核球で増殖させた培養上清液の HIV-1 RNA 濃度を RT-nested PCR のポワソン解析、アンプリコアおよびコバスアンプリコアによって測定した。三者の値はよく一致していたので、アンプリコアとコバスアンプリコアの測定値の平均をこの HIV-1 液の濃度とした。次に、この HIV-1 液を HIV-1 陰性であることを確認したヒト血清で希釈して HIV-1 RNA が 200、2,000、10,000、50,000、250,000 コピー/ml の血清試料を調製した。標準法用には 2,000、10,000、50,000、250,000 コピー/ml の血清試料と HIV-1 陰性血清試料、高感度法用には 200、2,000、10,000、50,000 コピー/ml の血清試料と HIV-1 陰性血清試料からなるパネル血清をキャップの色を変えて用意した。各血清試料の HIV-1 RNA 濃度はブラインドとした。

測定結果およびアンケート結果の統計学的解析はソフトウェアパッケージ Starcel2 を用いて行った。

C. 結果と考察

<測定精度管理>

標準法と高感度法による測定値をそれぞれ図 1 と 2 に示す。測定値の目標範囲は理論値の 1/3 から 3 倍とした。標準法では、施設 25 のアンプリコアによる 10,000 コピー/ml の試料と 250,000 コピー/ml の試料の測定値が目標値の 3 倍以上であった。また、施設 30 のアンプリコアによる 10,000 コピー/ml の試料の測定値が目標値の 1/3 倍以下であった。高感度法では、施設 3 のコバスアンプリコアによる 50,000 コピー/ml の試料の測定値が目標値の 3 倍以上であった。また、施設 16 のアンプ

リコアによる 200 コピー/ml の試料の測定値が目標値の 3 倍以上であった。全部で 430 の測定値のうち目標範囲に入っていなかったのは 5 点のみであり、98.8%がこの範囲に入っていた。全体として測定精度は良好であったとみなすことができる。

測定値以外の問題としては、施設 4 と施設 20 で QS の吸光度不足のために測定値が得られなかった。施設 4 はコバスアンプリコアによる高感度法、施設 20 はアンプリコアによる標準法であった。また、施設 31 では陰性試料で検出限界以上の値、すなわち偽陽性の結果が得られた。まとめると、何らかの問題のある測定結果（以下、要再検例）を出したのは 33 施設中 7 施設（21%）であった。

これらの要再検査例の出現頻度をアンプリコアとコバスアンプリコアを比較すると、前者が 5/13（38%）、後者が 2/20（10%）と、いくぶんアンプリコアの方が高いが統計的有意差はなかった。標準法と高感度法はそれぞれ 4/22（18%）と 3/24（12%）で差はなかった。要再検査例の頻度を月間検査数で分類した施設で比較すると（図 3）、検査数の多い施設ほど測定値の異常が少なくなる傾向があった（ $P=0.02$ ）。施設を公的検査機関、病院、検査センターで分類するとそれぞれの要再検査例の頻度は 3/10（30%）、4/25（16%）、0/5（0%）であった。一般検体はほとんどが検査センターで検査されている実情からすると、国内における HIV 定量検査は精度良く行われていると推測される。今後、要再検査データがあった施設には、測定工程確認の実施とフォローアップサーベイへの参加を推奨する予定である。

<アンケート結果>

精度管理と関連する測定環境などの詳細を知る目的で、アンプリコアとコバスアンプリコアの使用に関する 17 問からなるアンケート調査を同時に行った。その結果を表 1 に示す。測定キットの種類はアンプリコア（要手

法)が40%、コバスアンプリコア(自動法)が60%であった。月間依頼数は10件未満の施設が24%、200件以上の施設が18%であり、検体処理数が参加施設によって大きく異なっていた(メジアンは30~49件)。前回のコントロールサーベイに不参加で今回のサーベイに参加した施設は18%であった。検査回数は月に1回以内が9%、1週間に1回以内が42%で、半数の施設が多くても1週間に1回以内であった。76%の施設が高感度法を実施しており、実施していない理由は、遠心機がない(4件)、必要がない(1件)、依頼がない(1件)、経験がない(1件)であった。担当技師が1人の施設は33%であった。経験年数は3年以上が73%であった。作業時間は5時間以内が18%、5~8時間が48%、8時間以上が21%であり、8割以上が8時間以内に作業を終了している。作業エリアは100%の施設がきちんと分けていた。作業エリアの消毒は97%の施設がおこなっており、67%以上が測定前後に行っていた。機器の保守は33%が定期的に、58%が不定期に行っていたが15%の施設が行っていなかった。測定機器類は使用者が責任を持って保守・点検を実施すべきものであることを周知徹底させる必要がある。精度管理は、18%の施設がプレートごとに、79%がアッセイごとに管理用試料を用いて行っていた。管理用試料は97%の施設がキット内のコントロールを用いており、1施設が市販のコントロールを用いていた。73%の施設が測定に関するトラブルを経験していた。このトラブルとはコバスアンプリコアの動作不良またはQSの吸光度不足のいずれかであった。HIV抗体陽性検体の最終確認試験はWB法が76%の施設、アンプリコアあるいはコバスアンプリコアが73%の施設とほぼ同様に利用されていることがわかった。しかし、最終確認を再測定やELISAで行うという見当違いの回答もあった。今後検査の精度を高めるために自動化が求められる工程として挙げられ

ていたのは、RNA抽出が15件、増幅DNAの検出が6件、濃度の算出が6件であった。94%の施設がコントロールサーベイの必要性があると回答した。一方では、このようなコントロールサーベイは製造者の責任で行うべきではないかという疑問もあった。しかし、このコントロールサーベイの結果は製造者側の品質管理や精度管理を評価するためにも重要な情報を与えるものである。今後とも厚生労働省の研究班に相応しい客観性と専門性の高いコントロールサーベイを実行していくことが、HIV定量検査体制を維持していくために重要であると考えられる。

発表論文

- (1) Miyake, A., Enose, Y., Ohkura, S., Suzuki, H., Kuwata, T., Shimada, T., Kato, S., Narayan, O., and Hayami, M. (2004) The quantity and diversity of infectious viruses in various tissues of SHIV-induced monkeys at the early and AIDS stages. *Arch. Virol.* 149, 943- 955.
- (2) Takakuwa, K., Kashima, K., Suzuki, M., Fujita, K., Tamura, M., Kaneko, S., Kato, S., Hanabusa, H., and Tanaka, K. (2004) Studies on the IVF-ET for discordant couples where the man is HIV positive and the woman is negative using sperm washing technique and highly sensitive PCR method. *International Proceedings of IX International Congress of Reproductive Immunology* 11- 15.

学会発表

- (1) Shingo Kato, Rie Tanaka. Antiretroviral effects of intracellular protease inhibitors. *XV International AIDS Conference,*

Abstract WePeA5669. 2004, July 11-16,
Bangkok, Thailand.

- (2) 木内英、花房秀次、小島賢一、加藤真吾、
田中理恵、築地謙治、太田未緒、和田育
子「Tenofovir の効果と副作用」第 18 回
日本エイズ学会学術集会（2004 年 12 月
9-11 日、静岡）
- (3) 花房秀次、木内英、太田未緒、和田育子、
小島賢一、田中理恵、築地謙治、加藤真
吾「Atazanavir を含む抗 HIV 療法の評価」
第 18 回日本エイズ学会学術集会（2004
年 12 月 9-11 日、静岡）
- (4) 築地謙治、根岸昌功、長谷川直樹、木内
英、花房秀次、杉浦亙、加藤真吾「PI 服
用者における毛髪内 PI 定量法の検討」第
18 回日本エイズ学会学術集会（2004 年
12 月 9-11 日、静岡）
- (5) 加藤真吾、田中理恵、杉浦亙「LC-MS/MS
による AZT の細胞内薬物動態の解析」第
18 回日本エイズ学会学術集会（2004 年
12 月 9-11 日、静岡）
- (6) 向出雅一、加藤真吾、田中理恵、近藤真
規子、嶋貴子、須藤弘二、武部豊、今井
光信「LTR、gag、pol 領域を用いた HIV-1
プロウイルス定量法に関する検討」第 18
回日本エイズ学会学術集会（2004 年 12
月 9-11 日、静岡）
- (7) 須藤弘二、嶋貴子、近藤真規子、古谷茂
之、瀬尾麻美、加藤真吾、今井光信「HIV
RNA 測定キット COBAS TaqMan HIV-1 Test
「マニュアル」の基礎的検討」第 18 回日
本エイズ学会学術集会（2004 年 12 月 9-11
日、静岡）

その他

なし

図1. 標準法による測定値

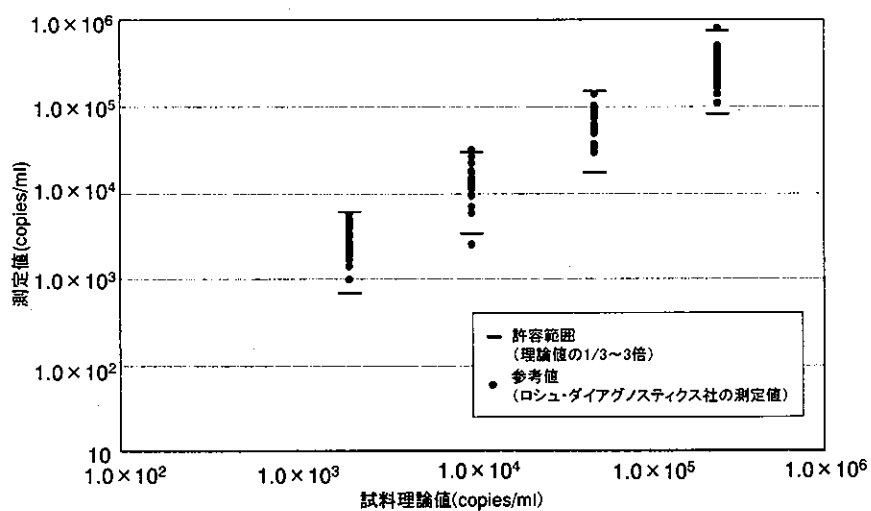


図2. 高感度法による測定値

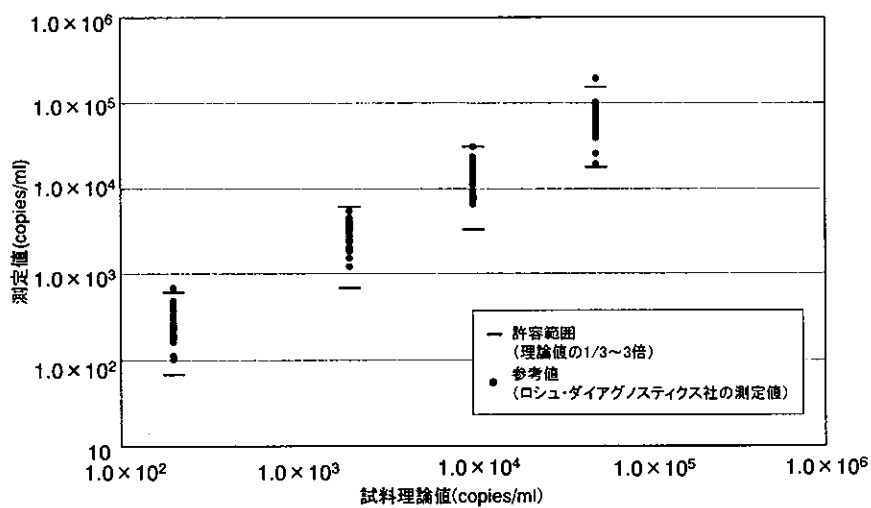


図3. 要再検査例の頻度
 月間検査数で施設を分類したときの比較

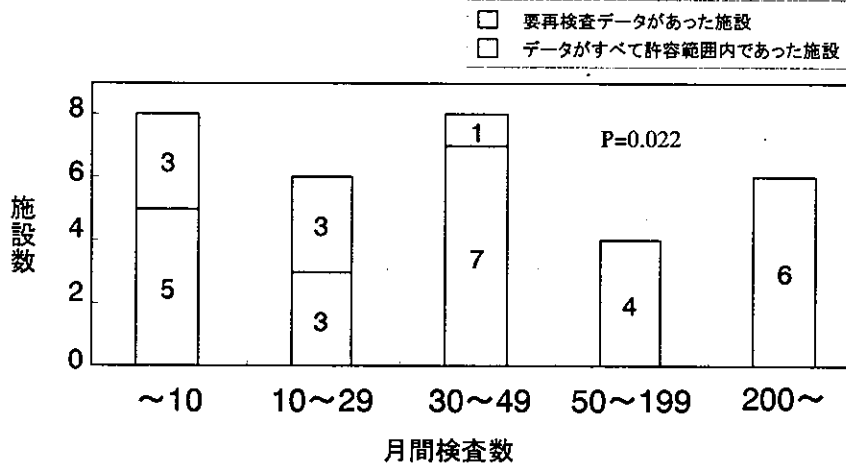


表1. アンケートの集計

質問番号	質問内容と選択項目	選択数
Q1	ご使用の測定キットは次のうちのどちらですか？ <input type="checkbox"/> アンプリコアHIV-1モニターv1.5 <input type="checkbox"/> コパスアンプリコアHIV-1モニターv1.5	13 20
Q2	HIV-1 RNA量測定の月間依頼数はどれくらいですか？（標準法、高感度法併せて） <input type="checkbox"/> 10件未満 <input type="checkbox"/> 10～19件 <input type="checkbox"/> 20～29件 <input type="checkbox"/> 30～39件 <input type="checkbox"/> 40～49件 <input type="checkbox"/> 50～99件 <input type="checkbox"/> 100～199件 <input type="checkbox"/> 200件以上	8 3 3 3 5 3 1 6
Q5	2002年度サーベイに参加されましたか？ <input type="checkbox"/> はい <input type="checkbox"/> いいえ ※「はい」の場合 1) HIV-1 RNA量測定の依頼数は前回サーベイ時と比較して増加しましたか？ <input type="checkbox"/> はい <input type="checkbox"/> いいえ 2) 前回のサーベイ後にキットの操作上、変更した点がありましたら教えてください。 <input type="checkbox"/> 検体の取り扱いについて <input type="checkbox"/> 試薬の取り扱いについて <input type="checkbox"/> 機器のメンテナンスについて <input type="checkbox"/> RNA抽出操作について <input type="checkbox"/> 検出操作に関して <input type="checkbox"/> 精度管理について	27 6 15 12 1(注1) 0 0 0 1(注2) 1(注3)
Q6	HIV-1 RNA量測定の頻度はどれくらいですか？ <input type="checkbox"/> 月に一回以内 <input type="checkbox"/> 週に一回以内 <input type="checkbox"/> 週に二回 <input type="checkbox"/> 週三回以上 <input type="checkbox"/> その他	3 14 7 5 2
Q7	高感度法の測定を貴施設内で行っていますか？ <input type="checkbox"/> はい <input type="checkbox"/> いいえ ※「いいえ」の場合、その理由は何ですか？	25 8 (注4)
Q8	HIV-1 RNA量測定の担当技師は何人ですか？ <input type="checkbox"/> 一人 <input type="checkbox"/> 二人 <input type="checkbox"/> 三人以上	11 8 14
Q9	HIV-1 RNA量測定をはじめからどれくらいですか？ <input type="checkbox"/> 三ヶ月以内 <input type="checkbox"/> 一年以内 <input type="checkbox"/> 二年以内 <input type="checkbox"/> 三年以上	1 6 2 24
Q10	全工程のおおまかな作業時間について教えてください RNA抽出 増幅DNAの検出	(注5) (注6) (注7)

Q11	3つの作業エリアはきちんと分けられていますか？ <input type="checkbox"/> はい <input type="checkbox"/> いいえ ※「いいえ」の場合、具体的にどのように分けて行っていますか？	33 0
Q12	作業エリアの消毒を行っていますか？ <input type="checkbox"/> 測定前に <input type="checkbox"/> 測定後に <input type="checkbox"/> 測定前後に <input type="checkbox"/> 行っていない	2 6 22 1
Q13	HIV-1 RNA量測定に用いる測定機器の定期的な保守は行っていますか？ <input type="checkbox"/> はい <input type="checkbox"/> 定期的ではないが行っている <input type="checkbox"/> いいえ ※「はい」あるいは「定期的でないが行っている」の場合、以下の中で保守を行っているものについてお知らせ下さい。 <input type="checkbox"/> サーマルサイクラー <input type="checkbox"/> プレートウォッシャー <input type="checkbox"/> プレートリーダー <input type="checkbox"/> インキュベーター <input type="checkbox"/> クリーンベンチ <input type="checkbox"/> 安全キャビネット <input type="checkbox"/> ピペット <input type="checkbox"/> 遠心器 <input type="checkbox"/> コパスアンプリコア	11 17 5 8 7 6 6 8 13 11 9 17
Q14	HIV-1 RNA量測定に際し、管理用試料による精度管理を行っていますか？ <input type="checkbox"/> はい <input type="checkbox"/> いいえ ※「はい」の場合、具体的にはどのような方法で行っていますか？ <input type="checkbox"/> プレート毎に <input type="checkbox"/> アッセイ毎に <input type="checkbox"/> その他 ※「はい」の場合、管理用試料は何を使用していますか？ <input type="checkbox"/> キット内コントロール <input type="checkbox"/> 市販のコントロール <input type="checkbox"/> プール検体 <input type="checkbox"/> その他 ※「いいえ」の場合、その理由は何ですか？	32 1 6 26 0 31 1 0 0 (注8)
Q15	測定に関してトラブルの経験はありますか？ <input type="checkbox"/> はい <input type="checkbox"/> いいえ ※「はい」の場合、どのようなトラブルですか？ <input type="checkbox"/> コパスアンプリコア動作不良 <input type="checkbox"/> QSの吸光度不良 <input type="checkbox"/> その他 ※そのトラブルは、どのように解決されましたか	24 9 13 17 0 (注9)
Q16	HIV抗体陽性検体の最終確認試験はどのような試験を実施していますか？(複数回答可) <input type="checkbox"/> WB法 <input type="checkbox"/> アンプリコアHIV-1モニター <input type="checkbox"/> その他の核酸検出法 <input type="checkbox"/> その他	25 21 2 6(注10)

Q17	「アンプリコアHIV-1モニターv1.5」を使用施設のみ 検査の精度を高めるためには、次のどのような操作が特に自動化されれば良い と思いますか？(複数回答可) <input type="checkbox"/> RNA抽出 <input type="checkbox"/> 増幅DNAの検出 <input type="checkbox"/> RNA濃度の算出	15 6 4
Q18	コントロール・サーベイを必要と思いますか？ <input type="checkbox"/> はい <input type="checkbox"/> いいえ	31 1
Q19	このようなコントロール・サーベイを実施すれば次回も参加しますか？ <input type="checkbox"/> はい <input type="checkbox"/> いいえ	31 2
その他ご意見ありましたら、ご記入下さい。		(注11)

- (注1) 抗凝固剤をクエン酸ナトリウム→EDTAに変更
- (注2) マニアル→アンプリコアへ
- (注3) 必ずコントロールをたてる
- (注4) 遠心機がないため(3件)
抗体陽性検体のみ実施しており標準法ですべて陽性となっているため
依頼がないため(2件)
機器整備の関係で行っていないが、今後は検討したい。
未経験のため
- (注5) 3時間1件、3.5時間2件、4時間1件、5時間2件、6時間12件、6.5時間1件、6～7時間1件、7
時間2件、8時間6件、8～9時間1件、不明1件(メジアン6時間)
- (注6) 1時間4件、1.5時間4件、2時間9件、2.5時間6件、3時間4件、3～4時間1件、3.5時間1件、4
時間1件、6時間1件(メジアン2時間)
- (注7) 1時間1件、1.5時間1件、2時間5件、2.5時間6件、3時間2件、3.5時間3件、4時間6件、4.5時
間1件、5時間3件(メジアン3時間)
- (注8) 主に定性を目的としているため
- (注9) ロシマカスタマーサポートへ電話して解決(2件)
コバスアンプリコア動作不良時はカスタマーセンターにて対応。QSの吸光度不良時は再
検。コントロールが入らなかった時も再検
コバスアンプリコアのトラブルシューティングやサポートセンターにて対応して頂き、解決し
ています。
ロッシュのテクニカルサポート
ロシュで対応。電話で手順を聞いて自分で解決
アンプリコア動作不良→ロシュのサービスマンに依頼 QS吸光度不良→抽出操作の改善
メーカーで対応(3件)
測定機器(BEPIII動作不良)→検査のやり直し。機器メーカー修理・点検。
業者に依頼
再検(8件)
凍結されていた検体をしっかり室温へ戻す。試薬及び検体の攪拌をしっかり行う。上清除
去は確実にを行う。
再検時のエタノール除去を確実に実施する
再検査(サーマイクラー保守後) サーマイクラー修理。
- (注10) コバスアンプリコアHIV-1モニター(3件)
再測定
ELISA
- (注11) 測定している検体が少ないので、他の施設での状況などがきいてみたいので、話し合いの
機会があれば、うれしく思います。

<RNAの抽出>の最後[HIV-DIL]を加えて10秒間試験管ミキサーを用いて混和とあるが、沈殿物が多い場合は長めにした方がよいと思う。

経済的に余裕があれば次回も参加します

人事異動のため未経験者ばかりです。また試薬期限が若干切れているのですが参加してもよいでしょうか。

1社のみのキットはメーカーが責任を持ってサーベイをやるべきで厚労者の事業として行うのは疑問である。

B-2. 長期 HAART 施行症例における pDNA の推移とその臨床的意義

分担研究者 吉村和久 (熊本大学エイズ学研究センター・病態制御・助手)

研究概要

昨年度までこの研究班で、血中ウイルス量が測定感度以下の症例の proviral DNA を我々の開発した高感度法で測定を行い、症例の臨床経過や各種マーカーと照らし合わせながら、residual replication の指標となりうるかの検討を行ってきた。しかし、近年 non-B のウイルス感染者の増加にともない、高感度ゆえ特異性が高く、測定できない症例が増加してきた。そのため、現在 p17 領域にプライマーとプローブを設定し、2種類の方法で測定をおこなっている。今回は、治療中断療法を行った症例についての検討と、長期に亘って血中ウイルス量を測定感度以下に抑えている症例における pDNA の blips についての検討を行ったので報告する。

A. 研究目的

昨年度までに、我々の開発した高感度 pDNA 測定法により、長期間 HAART でウイルスを抑制できていた症例について検討を行ってきた。その結果、血中ウイルス量が測定感度以下を長期間継続できていた症例において、pDNA の変化を観察できた。また、LTR 方で測定できなかった症例でも、p17 領域にプライマーを設定することで測定が可能となり、治療中断症例の pDNA の変化とあわせて今回紹介する。

B. 研究方法

プロウイルス DNA (proviral DNA; pDNA) の定量；末梢血単核球を分離精製し DNA を抽出した後、LTR 領域に設定した primer を用いて 1st PCR を行う。得られた増幅産物を template にして 2nd PCR を Real time PCR 法を用いて行った。P17 領域にプライマーとプローブを設定し、Real time PCR 法で pDNA を測定する。これらを用いて測定した結果と臨床経過や HIV-RNA 量、CD4、CD8 陽性細胞数などとの相関を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究を行うに当たり各症例には研究の概要

を説明し同意を得た上で採血し、解析した。

なお本研究の倫理的・科学的妥当性は熊本大学病院の先進医療審査委員会で審査され、了承されている。

C. 研究結果及び考察

昨年度までに、この研究班で多くの症例について、pDNA の測定を行ってきた。その結果、長期間に亘って HAART でウイルスを抑制可能であった症例において、年余に亘って pDNA の減少が見られることが確認された。これまでは、pDNA の値はある程度まで低下すると後は一定の値で推移する報告が多かったが、今回、4年から8年に亘り HAART 継続可能であった症例には、明らかに pDNA の値が低下していくことが確認できた。また、一度も血中ウイルスのリバウンド (blips) が見られない症例においても、pDNA の一時的なリバウンド (pDNA blips) が観察されることがわかった。pDNA blips のオリジンが同じであるかどうか、確認はしていないが、血中ウイルス量にあらわれない程度においてウイルスの reactivation がおこっている可能性が示唆された。また、治療中断症例において1年間

中断している期間のウイルス量と、CD4 数と pDNA 量の推移を調べたところ、CD4 数と pDNA 量に逆相関がみられた。今後の推移を見守る必要があるが、pDNA の急激な上昇が見られない限り、CD4 陽性細胞数も保たれることが予想される。

D. 結論

- 1) 昨年度に引き続き、HAART 施行症例における病状の指標として、また residual replication の新たな指標として、プロウイルス DNA (pDNA) を、多くの現在経過観察中の症例で測定し、臨床経過との相関を検索した。
- 2) 測定値が、低かった症例や、ばらつきがあるものに関して、Gag probe を用いた Real time PCR を行ったところ、安定した測定を得られた症例があった。
- 3) pDNA が一旦感度以下に下がった症例でも、pDNA の blips が認められる症例があった。
- 4) 今後、長期に亘りウイルスを抑制できている症例の経過と pDNA の動きを、より詳細に調べることが必要と考える。

(論文発表)

1. Matsushita, S., Yoshimura, K., Kimura T., Kamihira, A., Takano, M., Eto, K., Shirasaka, T., Mitsuya, H., and Oka, S. Spontaneous recovery of hemoglobin and neutrophil levels in Japanese patients on a long-term Combivir containing regimen. *J. Clin. Virol.* 2005, (in press).
2. Tamiya, S., Mardy, S., Kavlick, M.F., Yoshimura, K., and Mistuya, H. Amino acid insertions near Gag cleavage sites restore the otherwise compromised replication of human immunodeficiency virus type 1 variants resistant to protease inhibitors. *J. Virol.* 2004,

78:12030-40.

(国際学会発表)

1. Yoshimura K. Evaluation of residual viral replication for optimization of highly active antiretroviral therapy (HAART). 5th AIDS seminar in Kumamoto 2004.9.9-10. Kumamoto.
2. Shibata, J., Wang, F.X., Kimura, T., Iwata R., Yoshimura K., Koito, A., Matsushita, S. Involvement of C3 mutation in neutralization sensitivity for anti-V3 antibodies. 5th AIDS seminar in Kumamoto 2004.9.9-10. Kumamoto.
3. Iwata, R., Shibata, J., Kimura, T., Yoshimura K., Koito, A., Matsushita, S. Cross neutralizing activity of serum antibodies with neutralizing activity against autologous HIV. 5th AIDS seminar in Kumamoto 2004.9.9-10. Kumamoto.
4. Kenai, A., Kimura, T., Yoshimura K., Koito, A., Matsushita, S. Efficient induction of both cellular and humoral immune responses by immunization with Tat-Nef fusion protein (tNEF) without adjuvants. [ThPeA6983], XV International AIDS Conference Bangkok, 2004.7.11-16, Bangkok, Thailand.
5. Matsushita, S., Kimura, T., Shirai, N., Koito, A., Yoshimura, K. New approach for optimization of HAART; Evaluation of residual viral replication by monitoring proviral DNA level and T cell turnover rate. [TuPeA4356], XV International AIDS Conference Bangkok, 2004.7.11-16, Bangkok, Thailand.

(国内学会発表)

1. 吉村和久:HAART の最適化のための残存ウイルスの評価[S1-2]. 第18回日本エイズ学会学術集会・総会, 2004.12.9-11, 静岡.

B-3. HIV-1 プロウイルス定量の臨床的意義について

分担研究者 金田次弘（国立病院機構名古屋医療センター・臨床研究センター）

研究概要

昨年度に確立した LightCycler システムを用いた HIV-1 DNA 高感度定量法により未治療 HIV-1 感染患者と HAART 施行中患者を対象に末梢血 CD4 陽性 T リンパ球中のプロウイルスを、長期未発症者に関しては白血球中のプロウイルスを定量した。未治療患者群では HIV-1 DNA は 98120 コピー/ 10^6 細胞～検出感度 (200) 以下の広範囲に分布した。一方、HAART 施行中患者の治療著効例 (VL<50) では 5960～検出感度 (2) (中央値 560)、VL>50 群では 11900～検出感度 (2) 以下 (中央値 1700) に分布した。両者の統計学的有意差は $0.01 < P < 0.02$ であった。また、長期未発症者では 112 コピー/ 10^6 白血球～検出感度 (2) 以下 (中央値 7) に分布した。以上の結果から、HIV-1 DNA の定量は感染病態の把握、T リンパ球リザーバーのサイズを推定する上で有効な指標になると思われる。又、HAART 著効患者に於いては、血中ウイルス量が検出感度以下になってからの治療効果を評価する為の指標になると思われる。

A. 研究目的

これまでに高感度 HIV-1 DNA 定量法を確立し、その方法のバリデーションを実施して確立した方法が、HIV-1 感染細胞中のプロウイルス定量に使用し得る精度と正確性を有していることを明らかにした (H. Nagai et al., J. Virol. Methods)。この高感度測定法と通常法を用いて、未治療患者と HAART 施行中の HIV-1 感染患者を対象に末梢血 CD4 陽性 T リンパ球中のプロウイルスを、長期未発症者に関しては白血球中のプロウイルスを定量し、その臨床的意義を明らかにすることを目的に研究を行った。

B. 材料および方法

検体：未治療患者 25 検体、HAART 治療中患者 70 検体 (内訳は VL>50: 29 検体、VL<50: 41 検体)、長期未発症者 13 検体を対象にした。DNA の精製：未治療患者と HAART 施行中患者については、末梢血より StemSep 14052 を用いて CD4 陽性 T リンパ球を精製し、QIAamp

DNA blood mini kit を用いて DNA を精製した。長期未発症者に関しては全血 $100 \mu\text{l}$ から DNA を抽出した。定量法：通常法と高感度法を用いた (図 1)。(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一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 未治療患者検体は通常法で測定したが、HIV-1 DNA は 98120 コピー/ 10^6 細胞～検出感度 (200) 以下の広範囲に分布した (図 2)。
② HAART 施行中患者：著効例 (VL<50) では 5960～検出感度 (2) (中央値 560)、VL>50 群では 11900～検出感度 (2) 以下 (中央値 1700) に分布した。両者の統計学的有意差は $0.01 < P < 0.02$ であった。
③ 長期未発症者では 112 コピー/ 10^6 白血球～検出感度 (2) 以下

(中央値 7) に分布した。

D. 考察

HIV-1 DNA の定量は感染病態の把握、T リンパ球リザバーのサイズを推定する上で有効な指標になると思われる。又、HAART 著効患者に於いては、血中ウイルス量が検出感度以下になってからの治療効果を評価する為の指標になると思われる。今後の展望であるが、① 長期未発症者に関しては、未治療患者や HAART 施行中患者のデータと比較できるように末梢血 T リンパ球中のプロウイルス量を定量すること ② サブタイプ B に加えサブタイプ A, C, D, AE 等の HIV-1 も定量できるリアルタイム PCR 法を開発すること ③ 定量測定法の普及が重要であると考えている。

長期未発症検体を提供して頂きました山梨大学 照沼 裕、とう学文、伊藤正彦先生に感謝いたします。

E. 共同研究者

(国立病院機構名古屋医療センター・臨床研究センター) 永井裕美、和田かおる、萩原智子、伊部史朗、服部純子、水野善文、濱口元洋、間宮均人(同・検査科) 多和田行男、加藤 稔 (愛知県衛生研究所) 森下高行

F. 研究発表

[論文発表]

1. Pharmacokinetics of Lopinavir after Administration of Kaletra in Healthy Japanese Volunteers.
T. Oki, Y. Usami, M. Nakai, M. Sagisaka, H. Ito, K. Nagaoka, K. Yamanaka, N. Mamiya, M. Utsumi and T. Kaneda.
Biol. Pharm. Bull. 27, 261-265 (2004)
2. HIV 治療遂行のためのモニタリングシステムの進展。
金田次弘 白阪琢磨
医療, 58, 83-84 (2004).
3. 薬剤耐性検査-gag 遺伝子内に検出された挿入変異の意義
伊部史朗、内海 眞、金田次弘
医療, 58, 88-90 (2004).
4. HIV-1 薬剤耐性検査の感度改善
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, 58, 91-93 (2004).
5. HIV-1 DNA 量のマーカーとしての意義 - PNA-ISH 法との比較
和田かおる、永井裕美、萩原智子、内海眞、金田次弘
医療, 58, 96-98 (2004).
6. ロピナビル/リトナビルおよびエファビレンツの血中濃度同時測定法の確立
宇佐美好子、大木 剛、中井正彦、鷺坂昌史、金田次弘
医療, 58, 102-104 (2004).
7. ロピナビルの血中濃度測定: エファビレンツとの同時測定法の確立、健常人における体内動態及び臨床応用への展望
宇佐美好子、間宮均人、大木 剛、中井正彦、金田次弘
新薬と臨床, 53, 449-457 (2004).
8. Delayed HIV-1 Infection of CD4+ T Lymphocytes from Therapy-naive Patients Demonstrated by Quantification of HIV-1 DNA Copy Numbers
K. Wada, H. Nagai, T. Hagiwara, S. Ibe, M. Utsumi and T. Kaneda
Microbiology & Immunology 48, 767-772 (2004).
9. 未治療 HIV-1 感染者における薬剤耐性ウイルスの検出頻度とその特徴
伊部史朗、金田次弘
現代医療, 36, 65-72 (2004).
10. New estimation method for highly

sensitive quantitation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 DNA and its application.

H. Nagai, K. Wada, T. Morishita, M. Utsumi, Y. Nishiyama and T. Kaneda
J. Virol. Methods in press.

[学会発表]

1. 未治療患者に対する HIV-1 遺伝子型薬剤耐性検査の意義。
伊部史朗、多和田行男、間宮均人、山中克郎、濱口元洋、金田次弘
第 14 回抗ウイルス化学療法研究会(平成 16 年 5 月-2004)。
2. HIV 感染症治療のモニタリング — HIV-1 DNA の定量測定一。
永井裕美、和田かおる、西山幸廣、金田次弘
第 14 回抗ウイルス化学療法研究会(平成 16 年 5 月-2004)。
3. 未治療患者の薬剤耐性 HIV-1: 検出頻度、特徴、宿主タンパク質との相互作用。金田次弘
第 2 回「小型シンクロトン光源とその医療・産業応用に関する研究会」(平成 16 年 7 月-2004)。
4. HIV-1 mRNA levels in peripheral CD4+T lymphocytes from patients responding well to HAART. (HAART 著効患者の末梢血 CD4 陽性 T リンパ球中の HIV-1 mRNA レベル) 金田次弘
第 18 回日本エイズ学会総会シンポジウム (平成 16 年 12 月-2004)。
5. HIV-1 感染患者における G 型肝炎ウイルス (GBV-C) 重複感染の影響。服部純子、内山雅宇、加藤 稔、濱口元洋、西山幸廣、金田次弘
第 18 回日本エイズ学会総会 (平成 16 年 12 月-2004)。
6. 未治療患者由来プロテアーゼ阻害剤耐性 HIV-1 の増殖能解析。
伊部史朗、澤木 香、森下高行、佐藤克彦、金田次弘
第 18 回日本エイズ学会総会 (平成 16 年 12 月-2004)。
7. 未治療患者に検出された薬剤耐性 HIV-1 の gag 遺伝子領域内アミノ酸変異の解析。
澤木 香、伊部史朗、金田次弘
第 18 回日本エイズ学会総会 (平成 16 年 12 月-2004)。
8. ケニアにおける未治療 HIV 感染者の薬剤耐性遺伝子とサブタイプの流行状況について。
山本直彦、森下高行、佐藤克彦、金田次弘、伊部史朗、永井洋美、内海 眞、宮城島拓人
第 18 回日本エイズ学会総会 (平成 16 年 12 月-2004)。
9. プロテアーゼ阻害剤アタザナピルの HPLC による血中濃度測定法の開発。
高橋昌明、吉田昌生、大木 剛、奥村直哉、鈴木達男、金田次弘
第 18 回日本エイズ学会総会 (平成 16 年 12 月-2004)。
10. 種々の感染病態における末梢 CD4 陽性 T リンパ球内の HIV-1 DNA レベル。
永井裕美、和田かおる、照沼 裕、水野善文、多和田行男、間宮均人、内海 眞、濱口元洋、とう学文、伊藤正彦、西山幸廣、金田次弘
第 18 回日本エイズ学会総会 (平成 16 年 12 月-2004)。
11. MSG (major surface glycoprotein) を用いた Real-time PCR 法による *Pneumocystis jirovecii* 迅速定量法の確立。
小柏 均、永井裕美、水野善文、堀 洋美、加藤 稔、多和田行男、玉村和栄、間宮均人、濱口元洋、金田次弘
第 18 回日本エイズ学会総会 (平成 16 年 12 月-2004)。

図1. HIV-1 DNA 定量測定法

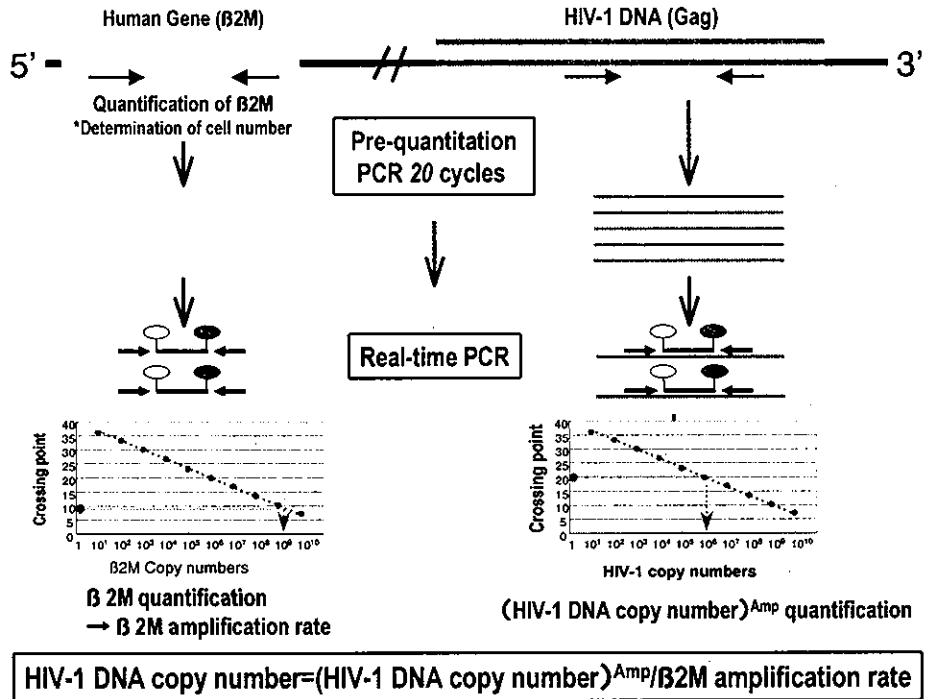
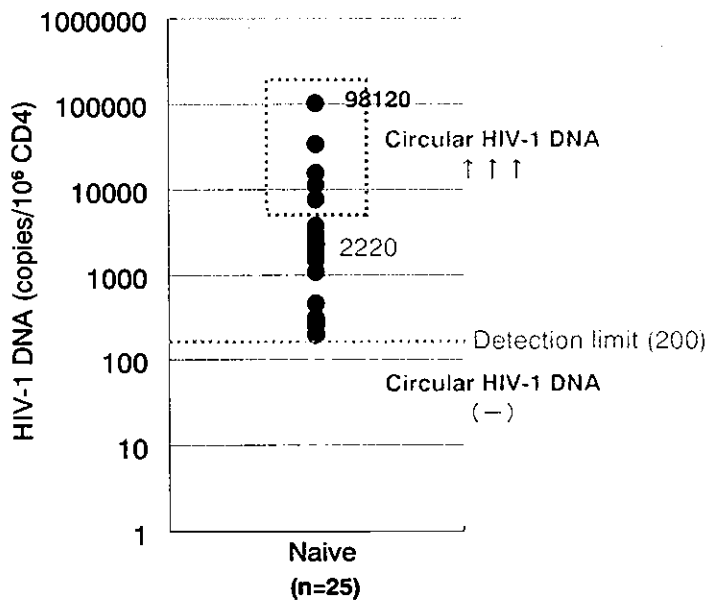


図2. 未治療患者症例での HIV-1 DNA の分布



B-4. Real time PCR を用いた HIV-1 プロウイルス定量法の検討

分担研究者 近藤真規子（神奈川県衛生研究所）
研究協力者 田中理恵、加藤真吾（慶応義塾大医学部）
足立拓也、相楽裕子（横浜市立市民病院）
岩室紳也（厚木市立病院）
嶋貴子、須藤弘二、今井光信（神奈川県衛生研究所）

研究概要

各種 HIV-1 サブタイプに対応できるプロウイルス HIV-1 の定量法の開発を目的に、HIV-1 分離株 12 株（サブタイプ B 6 検体、A/E 2 検体、A、C、F、G 各 1 検体ずつ）の培養細胞を用いて TaqMan プローブ法による Real time PCR の検討を行った。

プライマーおよびプローブには、血中 HIV-1-RNA 定量キット、アンプリコア HIV-1 モニター ver. 1.5 で使用されている SK145 (forward)、SKCC1B (reverse)、SK102 (プローブ) と同じ塩基配列を使用した。また、TaqMan プローブとして、3' 末端に TAMRA を修飾したプローブと MGB を修飾したプローブの 2 種類を作製した。

12 検体中 10 検体は両プローブともほぼ同様の測定値が得られた。しかし、Y165 (サブタイプ A) の 1 検体は、2 種類のプローブでの測定値が培養上清中の p24 抗原量に比べて著しく低い値を示した。Y165 の forward プライマー領域には SK145 に比べ塩基が 4 箇所異なっており、この 4 箇所の塩基の違いが定量結果に大きな影響を与えていると考えられた。

また、Y187 (サブタイプ B) と Y115 (サブタイプ G) の 2 検体は、MGB プローブでの測定値が TAMRA プローブでの測定値に比べ、それぞれ 3.43 倍、6.96 倍高値を示した。これら 2 検体のプローブ領域には SK102 との塩基配列の違い (ミスマッチ) が 2-3 箇所認められ、しかもこの違いは、測定値への影響が大きい 3' 末端側、あるいは 3' 末端と 5' 末端の両側に存在していた。MGB はダブルストランド DNA の結合を強める働きがある。プローブと鋳型 DNA の結合を強固にすることによって、プローブ領域のミスマッチの影響が小さくなり、その結果より正確な測定値が得られたと考えられた。

MGB プローブでの測定値はポアソン分布法での計算値とよく一致していた。HIV-1 プロウイルスの定量に MGB プローブを用いた TaqMan PCR 法は有用であると考えられた。しかしながら、サブタイプ A の Y165 については SK145 プライマー領域に 4 箇所のミスマッチが存在しており、サブタイプ A にも対応できる forward プライマーを検討する必要があると考えられた。

A. 研究目的

HIV 感染者の末梢血単核球 (PBMC) 中のプロウイルス量は HAART 療法の長期的治療効果やサルベージ療法の治療効果を予測する有力な指標となることが報告されている。我々は、有効なプロウイルス HIV-1 の定量法の開発を目的に、昨年度、サブタイプ B の臨床分離株

を用いて Real time PCR の定量法を確立した。

今年度はサブタイプ B だけでなく非サブタイプ B についても対応できるプロウイルス HIV-1 の定量法を開発することを目的に、TaqMan プローブを用いた Real time PCR 法の検討を行った。

B. 研究方法

1) プライマーおよび TaqMan プローブの作製 (図 1)

プライマーおよびプローブは現在日本で唯一認可されている血中 HIV-1 RNA 定量キット、アンプリコア HIV-1 モニター-ver.1.5 (ロシュ・ダイアグノスティックス社) で用いられている SK145 (forward primer)、SKCC1B (reverse primer)、SK102 (プローブ) と同じ塩基配列を用いた。

TaqMan プローブとして SK102 の 5' 末端に蛍光物質 FAM を、3' 末端にクエンチャー物質 TAMRA を修飾した TAMRA プローブを作製した。また、最近開発された MGB (Minor Groove Binder) を 3' 末端に修飾した MGB プローブを作製し、TAMRA プローブでの測定値と比較した。

2) 試料 (表 1)

臨床検体より分離した 12 の HIV-1 分離株 (サブタイプ B 6 株、サブタイプ A/E 2 株、サブタイプ A、C、F、G 各 1 株ずつ) を検討用サンプルとして用いた。これら分離株を HIV-1 陰性のヒト PBMC と 7 日間共培養し、7 日後の培養細胞からプロウイルス DNA をフェノール/クロロフォルム法により抽出した。抽出したプロウイルス DNA を TE 溶液で 50ng/ul に調整した。

3) 試薬の調整および PCR 条件

定量 PCR 試薬には TaqMan PCR core reagent キット (アプライドバイオシステムズ) を用いた。反応チューブあたり DNA 500ng を用い、50ul ボリュームで PCR 反応を行った。

定量 PCR 装置は ABI PRISM[®] 7900HT (アプライドバイオシステムズ) を使用し、50℃ 2 分、95℃ 10 分の反応後、95℃ 15 秒、60℃ 1 分の 2 ステップ反応を 45 回行った。

4) 標準 HIV-1DNA を用いた標準曲線の作製

pNL432 (6000copies/ul: コピー数はポアソン分布により計算) を標準 HIV-1DNA コントロールとして用い、250、50、10、2、0.4 コピ

ー/ul の希釈系列を作製し、各々 10ul を鋳型 DNA として用いた。

標準 HIV-1 DNA の希釈には HIV 非感染者 20 名のプール PBMC から抽出されたヒト DNA を用い、最終 DNA 濃度 50ng/ul に調整した。ヒト DNA の抽出はサンプルと同様にフェノール/クロロフォルム法により行った。

なお、pNL432 (6000copies/ul) は慶応大加藤先生より供与された。

C. 研究結果

12 検体 (サブタイプ B 6 検体、A/E 2 検体、A、C、F、G 各 1 検体ずつ) について、TAMRA プローブおよび MGB プローブで測定した値を表 2 に示した。

12 検体の内 10 検体 (サブタイプ B 5 検体、A/E 2 検体、A、C、F 各 1 検体ずつ) は TAMRA プローブ、MGB プローブ共にほぼ同様の測定値が得られた。しかし、試料 Y165 (サブタイプ A) は TAMRA プローブ、MGB プローブ両方の測定値が、培養上清中の p24 抗原量に比べ著しく低値であった。

また、Y187 (サブタイプ B) と Y115 (サブタイプ G) の 2 検体は、MGB プローブでの測定値が TAMRA プローブでの測定値に比べ 3 倍以上高値を示した (Y187 3.43 倍、Y115 6.96 倍)。

そこで、これら 12 検体のプライマー領域、プローブ領域の塩基配列をプライマー SK145、SKCC1B、プローブ SK102 の塩基配列と比較した (図 2-図 5)。

12 検体の内 Y165 を除く 11 検体については、2 つのプライマー領域 (SK145、SKCC1B) に塩基配列の違いはほとんど認められなかった (図 2、図 3)。しかし、TAMRA プローブおよび MGB プローブ共に測定値が著しく低値であった Y165 には、forward プライマー SK145 の領域に 4 箇所の塩基配列の違い (ミスマッチ) が認められ、その中の一つは測定値に影響を与える可能性が大きい 3' 末端側 (3' 末端