

子については 1~270 番までのアミノ酸配列に対する遺伝子について解析を行なった。サブタイプ決定は NJ 法による系統樹解析により決定した。

C. 研究結果および考察

HIV 初感染者 15 名の概要を表 1 に示す。匿名検査のため性別、国籍、年齢等不明である場合が多い。感染経路は、9 名が男性同性愛者 (Men who Sex with Men:MSM) による感染と推定されたが、残りの 6 名については不明であった。これら検体のサブタイプは、エンベロープ遺伝子の系統樹解析の結果、全て B 型であった。次に、薬剤耐性関連変異についての解析結果を表 2 に示した。15 名中 3 名から Pro 阻害剤に対するメジャー変異である M46I、1 名から D30N が検出された。さらに 2 名から核酸系 RT 阻害剤に対する薬剤耐性を示す Y115F と F77L がそれぞれ検出された。また、Pro 阻害剤のマイナー変異は 8 検体 (50%) に検出された。検出されたのは、L10I、M36I、L63P、A71T、V77I の 5 種類で、5 検体 (33.3%) は 2 種類以上の変異を持っていた。サブタイプと薬剤耐性関連変異との相関を見ると、検出された Pro 遺伝子マイナー変異は昨年までの調査から B 型に多く検出されており、これらの変異は薬剤耐性関連変異とは関係なくサブタイプ B 型の Polymorphism (多形性) と考えられた。

一昨年までの調査結果から、東海地区における HIV 初感染者間での耐性ウイルスの伝播は低い状態で推移していたが、2003 年に Pro 阻害剤に対するメジャー変異 (M46I) が検出され、さらに 2004 年に多剤の非核酸系 RT 阻害剤に対する強い薬剤耐性を示す K103N が検出された。本年度の調査でも、15 名中 4 名から Pro 阻害剤に対するメジャー変異である M46I または D30N、さらに 2 名から核酸系 RT 阻害剤に対する薬剤耐性を示す変異である F77L および Y115F が検出された。東海地区

における HIV 初感染者間の耐性ウイルスの伝播は着実に広がっていると示唆された。今後、HIV 初感染者間での耐性ウイルスの伝播が定着し、さらに拡大する可能性も考えられるので、耐性ウイルスに関する監視を継続することが重要であると考えられた。

表1 HIV感染者の詳細(感染経路等)

	検体名	性別	年齢	国籍	感染経路
1	21H1152	男	45	日本	不明
2	NLGR28	男	不明	不明	MSM
3	NLGR77	男	不明	不明	MSM
4	NLGR99	男	不明	不明	MSM
5	NLGR212	男	不明	不明	MSM
6	NLGR221	男	不明	不明	MSM
7	NLGR314	男	不明	不明	MSM
8	NLGR326	男	不明	不明	MSM
9	NLGR407	男	不明	不明	MSM
10	NLGR184	男	不明	不明	MSM
11	6H2367	男	28	日本	不明
12	12H1560	男	46	日本	不明
13	15H1216	不明	不明	不明	不明
14	6H2383	男	37	不明	不明
15	8H909	男	33	不明	不明

MSM : 男性同性愛者

表2 HIV感染者の血清・血漿検体のPR領域およびRT領域での遺伝子変異

	検体名	PRメジャー変異	PRマイナー変異	RT変異
1	21H1152		L63P, A71T	
2	NLGR28		M36I	
3	NLGR77	M46I	M36I, L63P	
4	NLGR99	M46I	M36I, L63P	
5	NLGR212		M36M/I	Y115Y/F
6	NLGR221		L10I, L63P	
7	NLGR314			F77F/L
8	NLGR326		V77I	
9	NLGR407			
10	NLGR184			
11	6H2367			
12	12H1560	M46I		
13	15H1216			
14	6H2383	D 30D/N		
15	8H909		L10I, M36I	

PR:Protease

RT:Reverse Transcriptase

B-6. 薬剤耐性変異の解析法の開発・改良・技術研修に関する研究：

薬剤耐性検査の実用化と衛生研究所等への技術移管

分担研究者 杉浦 互（国立感染症研究所エイズ研究センター第2研究グループ長）

研究概要

全国の衛生研究所等の施設において HIV-1 検査を担当する技術者を対象にした技術研修会を3日間の日程で開催した。この研修会では国立感染症研究所で行っている HIV 薬剤耐性検査の技術について技術移管を行うとともに、内外から講師を招待し HIV-1 の薬剤耐性に関する基礎的な知識から臨床における薬剤耐性検査の意義について講義を行った。

A. 研究目的

1995 年の多剤併用療法 (HAART) の導入により HIV 感染症に対する治療は大きく改善したが、一方で薬剤耐性を獲得した HIV の出現が治療に対する大きな問題として注目されるようになった。新規 HIV-1 感染者調査グループの報告によると、2003 年から 2004 年の間に新たに HIV 感染を診断された症例の約 5% に逆転写酵素阻害剤あるいはプロテアーゼ阻害剤に対する耐性変異が認められたとされている。この知見は薬剤耐性 HIV-1 が新規感染患者に伝播する危険性が拡大している現状を強く示唆して保健所等で把握される HIV 症例において薬剤耐性 HIV-1 感染症例が今後増加することを予想させる。新規診断における薬剤耐性 HIV の状況を正しく把握し迅速な対策を講じるためにも、各地の拠点病院・衛生研究所等で HIV 検査業務を担当する技官等が HIV の薬剤耐性検査法や薬剤耐性について正しい技術と知識を習得している事が望ましい。そこで本研究では HIV 検査担当者に対して HIV 検査技術研修会を開催し、技術移管と知識の習得を実施した。

B. 研究方法

平成 17 年 10 月 5 日から 7 日の 3 日間の日程で、国立感染症研究所村山分室において HIV 検査技術講習会を開催した。全国 17 施設から 17 名の参加者があり (図 1)、図 2 に示すプログラムに従い薬剤耐性検査の実習と講義を行った。実習では事前に調製・解析済みの HIV RNA をサンプルとした。この RNA サンプルを国立感染症研究所で開発したプライマー (図 3) を用い、RT-PCR で逆転写酵素領域とプロテアーゼ領域を増幅し、塩基配列解析を行った。また *env* 領域についても同様に PCR による増幅・塩基配列解析を行いサブタイプ決定した。研修終了後実習と講義に対してアンケート調査を行い研修参加者の満足度と次年度以降の要望について調査した。

C. 研究結果

事後評価のアンケート調査の結果、実習については約 80%、講義については約 85% の受講者が満足と回答し、参加者の要求にはほぼ応えることができたと思われる (図 4)。今年度は昨年アンケート調査の結果を踏まえて実験開始前に実習の全体像について説明する

時間を設け、実習参加者の理解度の向上に努めた。しかしフリーコメントの中から、得られたシーケンス情報を元にして系統樹解析を行う方法の理解度が低い傾向が見られた。これまでに HIV 検査の経験を持たない参加者にとっては作業が複雑であったため実験手技の意味を理解しにくい点があったと思われた。一方これまでに HIV 検査の経験を持つ参加者からは、自分で準備したシーケンスデータを実際に解析する時間を取れたため非常に参考になったという意見も聞かれた。

D. 考察

実習開始前に研修の全体像の説明を行った事は、実習生の理解度を深めるために効果があったと思われた。しかし一方で、コンピューターを使用した解析方法の難しさを指摘する意見も聞かれた。実習生の経験レベルを一定に保つのは難しいため、経験を持たない実習生の理解度をさらに上げる事が今後の課題であろう。今回は以前同じ研修を受講した研修生の参加があり、研修後に研修生が得た知識をどのように生かしたのか、どのような技術や知識を新たに得たいと考えているのかを知る機会があり、今後の実習計画の参考にしたい。また今後も参加者が研修会によって得た検査技術を実地でどのように生かせたのか追跡調査することが今後の研修会改善や各地域での HIV 検査への取り組みの実態を知るために重要であるのでこれについても次年度以降の課題として検討したい。

E. 結論

全 17 施設から 17 名の参加者を対象にして HIV 検査技術研修会を 3 日間の日程で開催し HIV 検査技術の移管と薬剤耐性 HIV の講義を行い知識の向上を図った。アンケート調査を行った結果参加者の 85%以上が研修会が有意義であったと回答し、参加した HIV 検査担当者に有効な検査技術移管と教育を行う事が

出来た。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

(1) 論文発表

- 1) Joke Snoeck, Rami Kantor, Robert W. Shafer, Kristel Van Laethem, Koen Deforche, Ana Patricia Carvalho, Brian Wynhoven, Marcel A. Soares, Patricia Cane, John Clarke, Candice Pillay, Sunee Sirivichayakul, Koya Ariyoshi, Africa Holguin, Hagit Rudich, Rosangela Rodrigues, Maria Belen Bouzas, Francoise Brun-Vezinet, Caroline Reid, Pedro Cahn, Luis Fernando Brigido, Zehava Grossman, Vincent Soriano, Wataru Sugiura, Praphan Phanuphak, Lynn Morris, Jonathan Weber, Deenan Pillay, Amilcar Tanuri, Richard P. Harrigan, Ricardo Camacho, Jonathan M. Schapiro, David Katzenstein, and Anne-Mieke Vandamme: Discordances between Interpretation Algorithms for Genotypic of Human Immunodeficiency Virus Are Subtype Dependent. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 50(2): 694-701, 2006
- 2) Hua Yan, Tomoko Chiba Mizutani, Nobuhiko Nomura, Tadakazu Takakura, Yoshihiro Kitamura, Hideka Miura, Masako Nishizawa, Masashi Tatsumi, Naoki Yamamoto, Wataru Sugiura: A novel small molecular weight compound with a carbazole structure that demonstrates potent human immunodeficiency virus type-1

- integrase inhibitory activity. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*. Vol.16: 363-373, 2005
- 3) T Ueda, L Myint, M Nishizawa, M Matsuda, W Sugiura: Analysis of interference and co-evolution between protease inhibitor resistant mutations and gag mutations. *Antiviral Therapy*. Vol.10:s116, 2005
- 4) N Hasegawa, W Sugiura, M Matsuda, K Mogushi, H Tanaka, F Ren: Inference of evolutionary forces driving HIV-1 drug-resistance acquisition under HAART using longitudinal HIV-1 protease gene samples. *Antiviral Therapy*. Vol.10:s114, 2005
- 5) K. Shiomi, R. Matsui, M. Isozaki, H. Chiba, T. Sugai, Y. Yamaguchi, R. Masuma, H. Tomoda, T. Chiba, H. Yan, Y. Kitamura, W. Sugiura, S. Omura, H. Tanaka: Fungal phenalenones inhibit HIV-1 integrase. *J. Antibiot.* Vol.58: 65-68, 2005
- 6) Hirotaka Ode, Masami Ota, Saburo Neya, Msayuki Hata, Wataru Sugiura, and Tyuji Hoshino: Resistant Mechanism against Nelfinavir of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Proteases. *J Phys Chem B*. Vol.109: 564-574, 2005
- 7) Miyauchi K, Komano J, Yokomaku Y, Sugiura W, Yamamoto N, Matsuda Z: Role of the specific amino acid sequence of the membrane-spanning domain of human immunodeficiency virus type 1 in membrane fusion. *J Virol*. Vol 79,4720-4729, 2005
- 8) Rami Kantor, David A. Katzenstein, Brad Efron, Ana Patricia Carvalho, Brian Wynhoven, Patricia Cane, John Clarke, Sunee Sirivichayakul, Marcelo A. Soares, Joke Snoeck, Candice Pillay, Hagit Rudich, Rosangela Rodrigues, Africa Holguin, Koya Ariyoshi, Maria Belen Bouzas, Pedro Cahn, Wataru Sugiura, Vincent Soriano, Luis F. Brigido, Zehava Grossman, Lynn Morris, Anne-Mieke Vandamme, Amilcar Tanuri, Praphan Phanuphak, Jonathan N. Weber, Deenan Pillay, P. Richard Harrigan, Ricardo Camacho, Jonathan M. Schapiro, Robert W. Shafer. Impact of HIV-1 Subtype and Antiretroviral Therapy on Protease and Reverse Transcriptase Genotype : Results of a Global Collaboration. *PLoS Medicine*. Vol. 2: 325-337, 2005
- 9) 杉浦 互:抗 HIV-1 薬剤の現状と薬剤開発の新たな展開. *ウイルス*第 55: 85-94, 2005
- 10) 西澤雅子, 杉浦 互: HIV-1 の薬剤耐性についての知見. *BIO Clinica*. Vol.20:51-57, 2005
- 11) 杉浦 互: 新規感染者における薬剤耐性 HIV 拡散の危機—Alert for Outbreak of Drug Resisitance HIV-1 Newly Infected Population—*日本エイズ学会誌* Vol. 7: 117-120, 2005
- 12) 杉浦 互、渦永博之、田宮貞宏、松田昌和、松見信太郎、蜂谷敦子、John Coffin、満屋裕明: シンポジウム 7. 「薬剤耐性の知見、基礎から臨床へ」を終えて. *日本エイズ学会誌*. 7(3), 2005
- (2) 学会発表
- 1) Kato Shingo, Tsuji Kenji, Tanaka Rie, Kinai Ei, Hanabusa Hideji, Negishi Masayoshi, Sugiura Wataru: Quantitation of Antiretroviral Drugs in Hair with LC/MS/MS for

- Assessment of Medication Adherence. 7th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific. July 1-5. 2005, Kobe.
- 2) Saeng-aroon Siriphan, Myint Lay, Pathipvanich Panita, BAriyoshi Koya, Wichukchinda Nuanjun, Rojanawiwat Archawin, Matsuda Masakazu, Sawanpanyalert Pathom, Sugiura Wataru, Auwanit Wattana: Mutagenically-Separated PCR as a Tool for Monitoring Lamivudine (GPOvir) Resistant CRF01_AE in Thailand(GPOvir). 7th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific. July 1-5. 2005, Kobe.
 - 3) N Hasegawa, W Sugiura, M Matsuda, K Mogushi, H Tanaka, F Ren: Inference of evolutionary forces driving HIV-1 drug-resistance acquisition under HAART using longitudinal HIV-1 protease gene samples. 14th International HIV Drug Resistance Workshop. June 7-11. 2005, Quebec, Canada.
 - 4) T Ueda, L Myint, M Nishizawa, M Matsuda, W Sugiura: Analysis of interference and co-evolution between protease inhibitor resistant mutations and gag mutations. 14th Internatioal HIV Drug Resistance Workshop. June 7-11. 2005, Quebec, Canada.
 - 5) Wataru Sugiura, Masakazu Matsuda, Junko Kakizawa, Hideka Miura, Satoshi Takeda, Masayuki Fujino, Masako Nishizawa, Naoki Yamamoto: Changes in Prevalence and Patterns of Drug Resistant Mutations in JAPAN-Summary of Nine Years Nationwide HIV-1 Drug Resistance Monitoring Study (1996-2004) . 6th Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance. Nov.13-16, 2005, Virginia
 - 6) Wataru Sugiura: Virological and Statistical Analyses of Interference between Protease Inhibitor Resistant Mutations and Gag Mutations. 13th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Feb. 5-9. 2006, Denver, USA
 - 7) Wataru Sugiura: Multi-Center Nationwide Survey of Drug Resistant HIV-1 in Newly Diagnosed HIV/AIDS Patients in Japan from 2003 to 2004. 13th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Feb 5-9. 2006, Denver, USA
 - 8) 杉浦 互: 日本における薬剤耐性 HIV-1 の動向と対策. 第 62 回岡山H I V 診療ネットワーク 2005 年 5 月 31 日 岡山
 - 9) Wataru Sugiura, Masakazu Matsuda, Junko Kakizawa, Hideka Miura, Satoshi Takeda, Masayuki Fujino, Masako Nishizawa and Naoki Yamamoto: Changes in Prevalence and Patterns of Drug Resistant Mutations in Japan - Summary of Nine Years Nationwide HIV-1 Drug Resistance Monitoring Study from 1996 to 2004. 第 1 回日独エイズ公開シンポジウム. 2005 年 11 月 9 日 名古屋
 - 10) 杉浦 互: HIV-1 CRF01_AE における Nelfinavir 耐性変異 N88S の耐性化機序の解析. 第 53 回日本ウイルス学会学術集会. 2005 年 11 月 20 日~22 日, 横浜
 - 11) Myint Lay, 植田知幸, 西澤雅子, 松田

- 昌和、三浦秀佳、杉浦 互：プロテアーゼ阻害剤耐性変異と Gag 変異間に見る相互干渉と共進化の解析. 第 53 回日本ウイルス学会学術集会. 2005 年 11 月 20 日～22 日, 横浜
- 12) 杉浦 互: 薬剤耐性の獲得に見る Gag と Protease の共進化. 第 7 回白馬シンポジウム. 2005 年 11 月 3 日～4 日, 鹿児島
- 13) 小池 満、三好 洋、井上靖之、高橋正知、山口洋子、奥瀬千晃、杉浦 互、中島秀喜: HIV/HIB Coinfection における HBV 耐性の検討. 第 19 回日本エイズ学会学術集会. 2005 年 12 月 1 日～3 日, 熊本
- 14) 浅黄 司、金田次弘、伊部史朗、松田昌和、吉田 繁、津畑千佳子、大家正泰、近藤真規子、貞升健志、瀧永博之、正兼亜季、佐藤克彦、奏 眞美、溝上康司、森 治代、南 留美、渡邊香奈子、岡田清美、杉浦 互: HIV-1 薬剤耐性遺伝子検査法に関するアンケート調査. 第 19 回日本エイズ学会学術集会. 2005 年 12 月 1 日～3 日, 熊本
- 15) 西澤雅子、Urvi Parikh、藤野真之、松田昌和、三浦秀佳、加藤真吾、山本直樹、杉浦 互: ヒト末梢血単核球を用いた K65R 獲得 HIV-1 の逆転写酵素阻害剤に対する感受性の解析. 第 19 回日本エイズ学会学術集会. 2005 年 12 月 1 日～3 日, 熊本
- 16) 石川暢恒、高田 昇、河部康子、喜花伸子、大江昌恵、大下由美、畝井浩子、藤井輝久、木村昭郎、杉浦 互: 半年以内に感染したと推定される HIV 感染症の 9 例. 第 19 回日本エイズ学会学術集会. 2005 年 12 月 1 日～3 日, 熊本
- 17) 杉浦 互、瀧永博之、吉田 繁、千葉仁志、浅黄 司、松田昌和、岡 慎一、近藤真規子、今井光信、貞升健志、長島真美、伊部史朗、金田次弘、浜口元洋、上田幹夫、正兼亜季、大家正義、渡邊香奈子、白阪琢磨、山本善彦、森 治代、小島洋子、中桐逸博、高田 昇、木村昭郎、南 留美、山本政弘、健山正男、藤田次郎: 新規 HIV-1 感染者における薬剤耐性の頻度に関する全国疫学調査-2003 年から 2004 年にかけての報告-. 第 19 回日本エイズ学会学術集会. 2005 年 12 月 1 日～3 日, 熊本
- 18) 大出裕高、杉浦 互、星野忠次: コンピューター・シミュレーションによる CRF01_AE NH1 N88S HIV-1 PR の NFV 耐性機構の解明. 第 19 回日本エイズ学会学術集会. 2005 年 12 月 1 日～3 日, 熊本
- 19) 仲宗根 正、高松純樹、杉浦 互、佐藤裕徳、山本伸二、Heneine Walid、山本直樹: HIV-RT 薬剤感受性迅速試験法 (半日) の開発. 第 19 回日本エイズ学会学術集会. 2005 年 12 月 1 日～3 日, 熊本
- 20) 駒野 淳、宮内浩典、Lay Myint、二橋悠子、浦野恵美子、松田善衛、千葉智子、三浦秀佳、杉浦 互、山本直樹: Rapid propagation of low-fitness drug resistant mutants of HIV-1 by a-1 frameshift enhancer sparsomycin. 第 19 回日本エイズ学会学術集会. 2005 年 12 月 1 日～3 日, 熊本
- 21) 加藤真吾、田中理恵、根岸昌功、杉浦 互: AZT は血漿中及び細胞内において確かに d4T に変換される. 第 19 回日本エイズ学会学術集会. 2005 年 12 月 1 日～3 日, 熊本
- 22) 小池 満、鈴木貴雄、井上靖之、山口洋子、小池淳樹、杉浦 互、高橋正知: HIV 関連リンパ腫における自己造血幹細胞採取の経験. 第 19 回日本エイズ学会学術集会. 2005 年 12 月 1 日～3 日, 熊本

- 23) 小池 満、高橋正知、井上靖之、山口洋子、杉浦 亙、中島秀喜: 当院における新規受診者の検討. 第19回日本エイズ学会学術集会. 2005年12月1日~3日, 熊本
- 24) 山元泰之、山中 晃、内田泰斗、尾形享一、福武勝幸、杉浦 亙: 判定保留 HIV-1 抗体確認検査で確定し得ないとき. 第19回日本エイズ学会学術集会. 2005年12月1日~3日, 熊本
- 25) Wataru Sugiura: Changes in prevalence and patterns of drug resistant mutations in Japan-Summary of nationwide HIV-1 drug resistance monitoring study (1996-2004) in Japan. 第19回日本エイズ学会学術集会. 2005年12月1日~3日, 熊本
- 26) 杉浦 亙、瀧永博之、田宮貞宏、松田昌和、松見信太郎、蜂谷敦子、John Coffin、満屋裕明: シンポジウム 7. 「薬剤耐性の新知見、基礎から臨床へ」を終えて. 第19回日本エイズ学会学術集会. 2005年12月1日~3日, 熊本

H. 知的財産権の出願・登録

無し

第16回技術研修会参加施設 全17施設

平成17年10月5日～7日

於国立感染症研究所村山分室



図1

第16回技術研習会プログラム

実習

1. RNA抽出、RT-PCR、nested-PCR
2. PCR産物の確認・精製、シーケンス反応
3. データー回収、薬剤耐性の解析

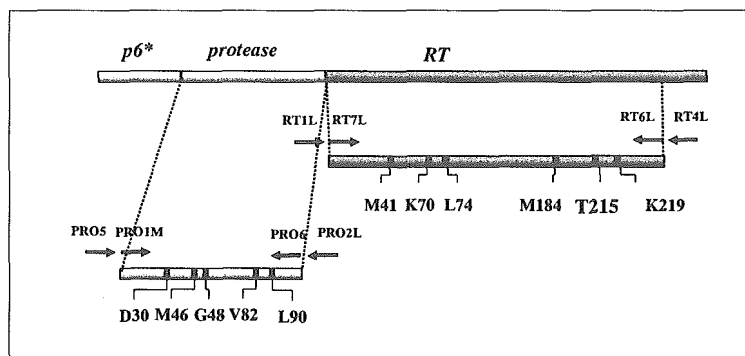


講義

- | | |
|-------------------------|-------------------|
| 1. 薬剤耐性遺伝子検査 | (国立感染症研究所 西澤雅子) |
| 2. HIV-1の基礎知識 | (国立感染症研究所 松田善衛) |
| 3. 薬剤耐性感受性検査 | (慶応大医学部 加藤真吾) |
| 4. HIV感染症治療と薬剤耐性 | (国立国際医療センター 湯永博之) |
| 5. アフリカにおけるHIV/AIDSの現状 | (国立感染症研究所 石川晃一) |
| 6. 系統樹解析とサブタイピング | (国立感染症研究所 椎野 禎一郎) |
| 7. 遺伝子検査結果の解釈 | (国立感染症研究所 杉浦 互) |
| 8. 即日検査を含むHIV検査に関する情報提供 | (神奈川県衛生研究所 今井光信) |

図2

Drug Resistance Genotyping



技術研修会で使用したPrimer一覧

name	sequence	5' end location	orientation and usage
DRPRO5	5-AgACAggYTAATTTTTTAaggA	2074	PR/outer forward
DRPRO2L	5-TATggATTTTCAggCCCAATTTTgA	2716	PR/outer reverse
DRPRO1M	5-AgAgCCAACAagCCCCACCAg	2148	PR/inner forward
DRPRO6	5-ACFTTTgggCCATCCATTCC	2611	PR/inner reverse
DRRT1L	5-ATgATAgggggAATTTgAggTTT	2388	RT/outer forward
DRRT4L	5-TACTTCgTAgTgCTTTggTTCC	3425	RT/outer reverse
DRRT7L	5-gACCTACACCTgTCAACATAATTgg	2485	RT/inner forward
DRRT6L	5-TAATCCCTgCATAAATCTgACTTgC	3372	RT/inner reverse

図3

技術研修会受講者アンケート

	不満～やや不満	普通	やや満足～満足
実習全般	3.9 %	15.7 %	80.4 %
講義全般	2.9 %	11.8 %	85.3 %

その他の要望・コメントなど

- ・薬剤耐性を読み取る作業があったのでわかりやすかったが、もう少し時間をとってほしい。
- ・シーケンスデータをどう処理したらよいか(系統樹の描き方等)基本から教えてほしい。
- ・解析ソフトの使い方をしっかり教えてほしい。
- ・実習のレベルと講義のレベル(高い)に格差があった。
- ・講義で基本的な概念を学べてよかった。
- ・即日検査、スクリーニング検査の部分の講義を増やしてほしい。
- ・薬剤耐性(genotype)は研究所でできることがよくわかった。
- ・幅が広く日程が足りない。

図4

B-7. HIV 薬剤耐性検査数および薬剤耐性変異について

(アンケートのまとめ)

分担研究者	近藤真規子、今井光信	(神奈川県衛生研究所)
研究協力者	工藤伸一、長野秀樹	(北海道立衛生研究所)
	勝見正道、橋本渉	(仙台市衛生研究所)
	原 孝、 増子京子	(茨城県衛生研究所)
	三瓶憲一、岡田峰幸	(千葉県衛生研究所)
	篠原美千代、内田和江	(埼玉県衛生研究所)
	貞升健志、長島真美	(東京都健康安全研究センター)
	嶋貴子、 須藤弘二	(神奈川県衛生研究所)
	野口有三、宇宿秀三	(横浜市衛生研究所)
	小澤茂、 山上隆也	(山梨県衛生公害研究所)
	中村雅子	(福井県衛生環境研究センター)
	榮賢司、秦眞美、続木雅子	(愛知県衛生研究所)
	大竹徹、 森治代	(大阪府立公衆衛生研究所)
	近平正嗣	(兵庫県立健康環境科学研究センター)
	池田義文、野田衛	(広島市衛生研究所)
	大瀬戸光明、山下育孝	(愛媛県立衛生環境研究所)
	千々和勝巳、江藤良樹	(福岡県保健環境研究所)

研究概要

本研究班では共同研究の一環として、HIV 感染者の依頼検体について薬剤耐性変異の解析を行っている。今回、HIV 薬剤耐性検査状況（ジェノタイプ）や薬剤耐性変異株の浸淫状況を把握するために、16 カ所の地方衛生研究所等の協力のもと、過去 6 年間にわたる薬剤耐性検査数、未治療の HIV 感染者の耐性検査等のアンケート調査を実施した。

アンケート調査の結果、2005 年末までにジェノタイプ検査を実施した経験のある地方衛生研究所は 12 施設あり、計 2080 件の検査を実施した。

未治療の HIV 感染者における薬剤耐性検査（ジェノタイプ）は 2005 年末までに 12 施設で 1011 名の検査が行われており、その内 51 名に何らかの薬剤に対する耐性変異が認められた。

これら 51 名の耐性変異について年別に見ると、2000 年以前に検出された変異では逆転写酵素阻害剤の AZT や 3TC に関する変異が多かったが、2001 年以降は非核酸系逆転写酵素阻害剤、プロテアーゼ阻害剤の耐性変異が多数検出されるようになり、薬剤の使用状況を反映していると考えられた。

プロテアーゼ領域に IDV の耐性変異 M46IL が 12 名から検出され、内 11 名は M46I の単独変異であった。この変異は他のプロテアーゼ阻害剤のマイナー変異としても報告されており、これらは遺伝子の多型である可能性も考えられる。

AZT 耐性変異 T215YF のリバータントとして報告されている T215C/D/E/L/S 変異が単独で検出された例が、2002 年以降 16 名に認められた。これら変異が耐性変異 T215YF のリバータントの場合には、他の耐性変異を伴うことが多いという報告もあり、結果の解釈には注意を要する。

多剤耐性変異を有する症例が 3 名確認された。抗 HIV 薬の治療の普及とともに多剤耐性変異株による感染例が増加する懸念もあり、今後ともその動向には注意が必要と考えられる。

A. 研究目的

本研究班では共同研究の一環として、HIV感染者の依頼検体について薬剤耐性変異の解析を行っている。今回、HIV 薬剤耐性検査状況（ジェノタイプ）や薬剤耐性変異株の浸淫状況を把握するため、地方衛生研究所の協力のもと過去6年間にわたる薬剤耐性検査数、未治療のHIV感染者の耐性検査等のアンケート調査を実施した。

B. 研究方法

16カ所の地方衛生研究所（北海道立衛生研究所、仙台市衛生研究所、茨城県衛生研究所、千葉県衛生研究所、埼玉県衛生研究所、東京都健康安全研究センター、神奈川県衛生研究所、横浜市衛生研究所、山梨県衛生公害研究所、福井県衛生環境研究センター、愛知県衛生研究所、大阪府立公衆衛生研究所、兵庫県立健康環境科学研究所、広島市衛生研究所、愛媛県立健康環境研究所、福岡県保健環境研究所）の協力を得て、各々の施設で行った薬剤耐性検査数（ジェノタイプ検査数）および未治療のHIV感染者におけるジェノタイプ検査数と耐性変異出現数、変異の種類等について調査した。

検査数は1999年以前と2000年～2005年の1年ごと（1月～12月）に集計した。

また、未治療のHIV感染者で薬剤耐性関連変異（プロテアーゼについてはメジャー変異）の検出された症例については変異の種類、サブタイプ、感染経路、性別、国籍についても調査した。

薬剤耐性変異は The International AIDS Society- USA Drug Resistance Mutations Groups review 2005 に従った。

C. 結果

1. HIV 薬剤耐性検査数（ジェノタイプ）

各施設で2005年12月までに行った薬剤耐

性検査数を表1に示した。

地方衛生研究所グループ16施設の内12施設がジェノタイプ検査を実施していた。2000年以降では2002年の検査数が最も多く、2003年には検査数が減少傾向にあった。2005年は282件に増加したが、検査施設は6施設に減少していた。

2. 未治療のHIV感染者における薬剤耐性検査（ジェノタイプ）と耐性変異

2005年12月までに行った未治療のHIV感染者のジェノタイプ検査数は1011件で、内51件（5.0%）に何らかの薬剤耐性関連変異が検出された（表2）。

未治療のHIV感染者のジェノタイプ検査は12カ所の地方衛生研究所で実施しており、2002年以降検査数が年々増加し、2005年には238件となった。しかし、検査施設は12施設から6施設に減少していた。

施設別耐性変異出現頻度を表3に示した。検査数は東京都健康安全研究センターが347件と最も多く、続いて大阪府立公衆衛生研究所が282件、横浜市衛生研究所が124件であった。しかし、耐性変異出現頻度は愛知県衛生研究所が11.0%（8/73）と最も多く、検査数の最も多かった東京都は2.6%（9/347）と少なく、平均の半分程度であった。

年別の耐性変異出現頻度は2003年までは4～5%であったが、2004年以降6～7%に漸増した（表4）。

薬剤耐性変異の認められた51名の感染経路は同性間性行為による感染が33名（64.7%）、不明18名（35.3%）、であった。性別は51名全て男性で、国籍は日本人38名、不明13名であった。サブタイプはサブタイプBが50名、サブタイプA/Eが1名であった（表5）。

薬剤耐性変異の詳細について表6に示した。逆転写酵素領域において2000年以前と

2001年以降で特徴が認められた。2000年以前は核酸系逆転写酵素阻害剤（NRTI）の AZT や 3TC の耐性関連変異が 10 名中 8 名（80.0%）に認められた。しかし、2001年～2004年の間には NRTI の耐性関連変異は減少し、非核酸系逆転写酵素阻害剤（NNRTI）の耐性変異 K103N、V106A、V108I、Y181C が 26 名中 7 名（26.9%）に認められたが、2005年には NNRTI 耐性変異は検出されなかった。2002年以降、薬剤耐性変異が検出された 39 名の内、AZT 耐性に関与する 215 番アミノ酸変異 T215YF のリバータントと考えられる T215C/D/E/L/S の変異のみ認められた症例が 16 名（41.0%）あった。

プロテアーゼ領域においては 51 名中 16 名（21.4%）にプロテアーゼ阻害剤の耐性に関与するメジャー変異が検出された。この内、プロテアーゼ阻害剤である IDV のメジャー変異 M46IL が 12 名と最も多く、内 11 名には M46IL の変異以外の変異は認められなかった。

51 名中多剤耐性変異を有する症例が 3 名あり、1999 年に NRTI の AZT 耐性変異 T215Y と 3TC の耐性変異 M184V を有する症例が 1 名、2002 年にプロテアーゼ阻害剤の SQV、NFV の耐性変異 M46I、L90M と NRTI の ddI、ddC、ABC の耐性変異 L74V を有する例が 1 名、2003 年に NFV 耐性変異（D30N、N88D）と 3TC 耐性変異（M184V）を有する例が 1 名確認された。

D. 考察および結語

2005 年 12 月までに 16 カ所の地方衛生研究所で HIV 薬剤耐性検査（ジェノタイプ検査）は 2080 件行われた。

未治療の HIV 感染者についてジェノタイプ検査は 1011 名について行われ、51 名に薬剤耐性に関与する変異が検出された。

2000 年以前では NRTI の AZT や 3TC の耐性関連変異が多かったが、2001 年以降は NNRTI の耐性変異 K103N、V106A 等やプロテアーゼ阻害剤の耐性関連変異が多数検出されるようになり、HIV 感染者の薬剤治療状況を反映して

いると考えられた。

プロテアーゼ領域に M46IL の変異が認められた 12 名中 11 名には M46IL 以外の耐性関連変異は認められなかった。M46IL は IDV のメジャー変異であるが、他のプロテアーゼ阻害剤のマイナー変異としても報告されており、これらは遺伝子の多型である可能性も考えられる。

AZT 耐性に関与する 215 番アミノ酸変異 T215YF のリバータントとして報告されている T215C/D/E/L/S 変異のみの検出例は、2001 年までには認められなかったが、2002 年以降 16 名に検出された。T215C/D/E/L/S 変異が耐性変異 T215YF のリバータントの場合には、他の耐性変異を伴うことが多いという報告もあり、これら変異が単独で検出される場合には結果の解釈に注意を要する。

多剤耐性変異を有する症例が 3 名確認された。抗 HIV 薬の治療の普及とともに多剤耐性変異株による感染例が増加する懸念もあり、今後ともその動向には注意が必要と考えられる。

E. 研究発表

論文発表

1. Kondo M., Shima T, Sudo K., Takebe U., Imai M. et al: Identification of attenuated variants of HIV-1 Circulating Recombinant Form 01_AE that are associated with slow disease progression due to gross genetic alteration in the nef/long terminal repeat sequences, J Infect Dis, 192, 56-61 (2005).

学会発表

1. 須藤弘二、近藤真規子、嶋貴子、加藤真吾、今井光信ほか: Evaluation of a real-time PCR assay, HPS COBAS TaqMan HIV-1 RNA in plasma. 第 7 回ア

ジア・太平洋地域エイズ国際会議（2005年7月1～5日、神戸）

2. 宇宿秀三、近藤真規子、今井光信ほか：
Long term genotypic discrepancy associated with drug resistance persisted between plasma HIV-1 RNA and HIV-1 proviral DNA in peripheral blood mononuclear cells. 第7回アジア・太平洋地域エイズ国際会議（2005年7月1～5日、神戸）
3. 近藤真規子、嶋貴子、武部豊、加藤真吾、今井光信：Real time PCR 法を用いた HIV-1 プロウイルス定量法- 6種類のサブタイプとプライマー、プローブの反応性の検討、第53回日本ウイルス学会学術集会（2005年11月20～22日、横浜）
4. 近藤真規子、須藤弘二、田中理恵、嶋貴子、足立拓也、相楽裕子、岩室紳也、向出雅一、武部豊、加藤真吾、今井光信：各種サブタイプに対応できる Real time PCR 法による HIV-1 プロウイルス定量法の検討、第19回日本エイズ学会学術集会（2005年12月1～3日、熊本）
5. 須藤弘二、嶋貴子、近藤真規子、今井光信：HIV 郵送検査に関する実態調査、第19回日本エイズ学会学術集会（2005年12月1～3日、熊本）

表1 HIV薬剤耐性検査数(ジェノタイプ検査)

検査機関	ジェノタイプ検査数(件)							合計
	1999年以前	2000年	2001年	2002年	2003年	2004年	2005年	
北海道立衛生研究所	63	16	8	10	3	4	4	108
東京都健康安全研究センター	66	38	0	50	55	51	87	347
茨城県衛生研究所	5	6	4	4	2	2	0	23
埼玉県衛生研究所	2	0	4	2	1	0	0	9
神奈川県衛生研究所	200	13	16	6	19	34	33	321
横浜市衛生研究所*	-	-	-	200	38	30	30	298
愛知県衛生研究所	14	2	6	9	9	19	14	73
大阪府立公衆衛生研究所	417	71	39	52	64	68	114	825
兵庫県立健康環境科学研究所	12	6	2	0	1	3	0	24
広島市衛生研究所	0	0	0	0	0	2	0	2
愛媛県立衛生環境研究所	0	2	1	0	2	0	0	5
福岡県保健環境研	29	2	1	8	1	4	0	45
合計	808	156	81	341	195	217	282	2080

* 横浜市衛研2002年ジェノタイプ検査数は2002年以前のデータを含む。

表2 未治療HIV感染者における薬剤耐性検査数(ジェノタイプ検査)

検査機関	ジェノタイプ検査数(人)							合計
	1999年以前	2000年	2001年	2002年	2003年	2004年	2005年	
北海道立衛生研究所	2	1	1	3	1	3	2	13
東京都健康安全研究センター	66(3)	38(2)	0	50	55	51(2)	87(2)	347(9)
茨城県衛生研究所	5	6	4	4	2	2	0	23
埼玉県衛生研究所	2	0	4	2	1	0	0	9
神奈川県衛生研究所	0	0	5	6	11	32(2)	32(1)	86(3)
横浜市衛生研究所	12(1)	15(1)	13	13	30(2)	21(1)	20	124(5)
愛知県衛生研究所	14	2	6	9	9(1)	19(1)	14(6)	73(8)
大阪府立公衆衛生研究所	20(1)	13	20(2)	40(6)	52(5)	54(4)	83(6)	282(24)
兵庫県立健康環境科学研究所	12	6	2	0	1	0	0	21
広島市衛生研究所	0	0	0	0	0	2	0	2
愛媛県立衛生環境研究所	0	2	1	0	2	0	0	5
福岡県保健環境研	21(2)	1	1	0	0	3	0	26(2)
合計	154(7)	84(3)	57(2)	127(6)	164(8)	187(10)	238(15)	1011(51)

()内は耐性1次変異を有する症例数

表3 未治療HIV感染者における薬剤耐性変異出現数(施設別)

検査機関	患者数 (人)	耐性変異 出現数(人)	耐性変異頻度 (%)
北海道立衛生研究所	13	0	0
東京都健康安全研究センター	347	9	2.6
茨城県衛生研究所	23	0	0
埼玉県衛生研究所	9	0	0
神奈川県衛生研究所	86	3	3.5
横浜市衛生研究所	124	5	4.0
愛知県衛生研究所	73	8	11.0
大阪府立公衆衛生研究所	282	24	8.5
兵庫県立健康環境科学研究所	21	0	0
広島市衛生研究所	2	0	0
愛媛県立衛生環境研究所	5	0	0
福岡県保健環境研	26	2	7.7
	1011	51	5.0

表4 未治療HIV感染者における薬剤耐性変異出現数(採血年別)

採血年	患者数 (人)	耐性変異 出現数(人)	耐性変異頻度 (%)
1999年以前	154	7	4.5
2000年	84	3	3.6
2001年	57	2	3.5
2002年	127	6	4.7
2003年	164	8	4.9
2004年	187	10	5.3
2005年	238	15	6.3
合計	1011	51	5.0

表5 未治療HIV感染者の耐性変異
 —耐性変異の認められた51例について—

感染要因	国籍	合計	HIV-1サブタイプ	
			B	A/E
男性同性間性行為	日本	29	29	
	不明	4	4	
不明	日本	9	8	1
	不明	9	9	
合計		51	50	1

表6 未治療HIV感染者における薬剤耐性変異(ジェノタイプ)
 - 薬剤耐性変異の認められた51例の変異の詳細 -

採血年	国籍	性別	感染経路	耐性変異部位(1次変異)		サブタイプ
				Pro	RT	
1996年	日本	男	同性間	M46I	-	B(V3,gag)
1997年	日本	男	同性間	G48V	-	B(V3,gag)
1998年	日本	男	同性間	-	K70R, T215D	B(envV3)
1999年	日本	男	同性間	NT	M41L,D67N,T215D	B(envV3)
	日本	男	同性間	NT	K70R, T215D	B(envV3)
	日本	男	同性間	NT	M41L, M184V, T215Y	B(envV3)
	日本	男	同性間	-	M184V	B(pol)
2000年	日本	男	同性間	-	M41L, T215H	B(envV3)
	日本	男	同性間	NT	V75L	B(envV3)
	日本	男	同性間	NT	M41L,T215D	B(envV3)
2001年	日本	男	同性間	M46I	-	B(envV3)
	日本	男	不明	-	V106V/A	B(envV3)
2002年	日本	男	不明	-	T215L	B(envV3)
	日本	男	同性間	-	Y181C	B(pol)
	日本	男	同性間	M46L, L90M	L74L/V	B(envV3)
	日本	男	同性間	M46I	-	B(envV3)
	不明	男	不明	-	V108I	B(pol)
	日本	男	不明	M46M/I	-	AE(envV3)
2003年	日本	男	同性間	-	T215D	B(pol)
	日本	男	同性間	D30N,N88D	M184V	B(pol)
	日本	男	不明	M46I	-	B(envV3)
	日本	男	同性間	-	T215S	B(envV3)
	日本	男	同性間	-	V106A	B(env)
	日本	男	同性間	M46I	-	B(pol)
	日本	男	同性間	-	V106A	B(pol)
	不明	男	不明	-	V108I	B(pol)
2004年	日本	男	同性間	-	T215D	B(pol)
	日本	男	同性間	-	V118I,K219Q	B(envV3,pol)
	日本	男	同性間	-	T215D	B(envV3,pol)
	不明	男	不明	-	T215D	B(pol)
	不明	男	不明	-	T215D	B(pol)
	日本	男	同性間	-	K103N	B(envV3)
	日本	男	同性間	-	T215L	B(envV3)
	日本	男	同性間	M46I	-	B(envV3)
	日本	男	不明	M46I	-	B(envV3)
	不明	男	不明	-	M184V	B(envV3)
2005年	日本	男	同性間	-	T215D	B(envV3,pol)
	不明	男	不明	I50V	-	B(pol)
	不明	男	不明	-	T215D	B(pol)
	不明	男	同性間	M46I	-	B(envV3)
	不明	男	同性間	M46I	-	B(envV3)
	不明	男	同性間	-	Y115YF	B(envV3)
	不明	男	同性間	-	F77FL	B(envV3)
	日本	男	不明	M46I	-	B(envV3)
	日本	男	不明	D30DN	-	B(envV3)
	日本	男	不明	-	T215D	B(envV3)
	日本	男	不明	-	T215L	B(envV3)
	不明	男	不明	-	T215E	B(envV3)
	日本	男	同性間	-	T215C	B(envV3)
	不明	男	不明	-	T215D	B(envV3)
	日本	男	同性間	-	T215D	B(envV3)

耐性変異はIAS-USA Drug Resistance Mutation group review 2005に従った。

B-8. 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 井土美由紀、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16年11月から平成17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53施設のうち41施設が参加した。HIV-1 パネル血清とアンケートを送付し、検査センターからは日差再現性調査のため三重測定、他の施設からは一重測定の結果を回収した。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8例、誤操作による測定値無効が1例みられた。このような許容範囲を外れるデータは、月間検査数が少なく、担当技師数の多い施設に多く見られ、測定機器の定期的な保守を実施していない施設ほど起こりやすい傾向があった。大量の一般臨床検体を扱う検査センターでは、データはすべて許容範囲内におさまっており、日差再現性も目標範囲となる44.2%をほぼ下回っていた。今後、許容範囲を外れるデータがあった施設には、機器の定期的な保守、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、68.3%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43.9%と低かった。全施設の73.2%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。参加施設のすべて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を行うことを目的とする。

大量の一般臨床検体を扱う検査センターについては、測定値の日差再現性も調査し、安定した測定値が得られているか否かを確認する。

B. 方法

平成16年11月から平成17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53施設にコントロール参加案内状を平成17年11月に郵送した。参加希望施設は計42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、アンケートを平成17年12月に送付した。その際、検査センター5施設には標準法、高感度法、それぞれ3回測定分のパネル血清を送付した。平成18年1月に41施設から結果を回収した。キット別ではアンプリコアが21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14施設、高感度法のみが11施設、標準法および高感度法が16施設であった。

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。これらの結果をもとに、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となるよう血清試料を調製した。調製した試料について、アンプリコアおよびコバスアンプリコアで、標準法、高感度法にて、9重測定を実施し、それぞれの平均値を目標値とした。なお、標準法と高感度法の測定値に有意差がなかった試料については、両方のデータの平均値を目標値とした。各試料の目標値を表1に示す。標準法用には理論値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、高感度法用には理論値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。許容範囲を外れたのは、すべてアンプリコアの測定値であった。標準法では、施設2の2,000コピー/mlの試料と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57の2,000コピー/mlの試料の測定値が目標値の3倍以上であった。高感度法では、施設2の2,000コピー/mlの試料の測定値が目標値の3倍以上であった。施設23の200コピー/mlの試料と10,000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34の10,000コピー/mlの試料の測定値が目標値の3倍以上であった。全部で385の測定値のうち目標範囲に入っていなかったのは8点のみであり、97.9%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34で誤操作のために測定値が得られなかった。まとめると、許容範囲を外れる結果を出したのは41施設中4施設(9.8%)であった。

検査センターからは、標準法、高感度法、それぞれ3回分のデータを回収した。検査センターのデータは、すべて許容範囲内に収まっていた。各施設について、試料ごとにデータの変動係数を求めた(表2)。測定値の許容範囲は目標値の1/3から3倍とすることは、変動係数の目標範囲を44.2%未満とすることに一致する。施設Bが高感度法で50,000コピー/mlの試料を測定した際にこれを超え