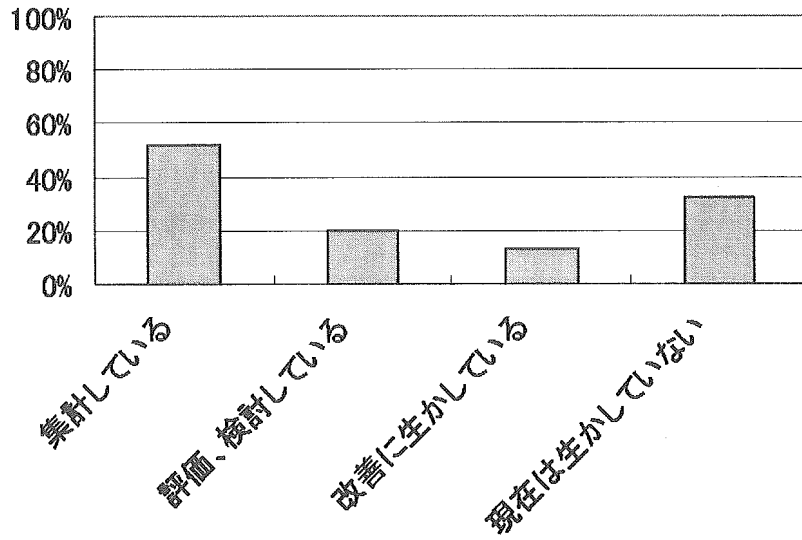


図9 把握している項目を、HIV事業の改善
に生かしている割合 13%
県・市保健所 N=424



A-15. 海外をモデルとした HIV 検査体制の構築に関する研究

— イングランドと米国の検査体制 —

分担研究者 木村和子（金沢大学大学院自然科学研究科）
研究協力者 小野俊介、本間隆之、柏 宗伸、中出順也
（金沢大学大学院自然科学研究科）

研究概要

英国では毎年新規感染者が増加し、米国でも 4 万人が新規に感染している。さらに両国とも多数の感染未認識者が推定されており、HIV 検査の普及は急務である。英国（イングランド）では、すべての尿生殖器科の初診検査に HIV 検査を導入することや家庭医の HIV 検査提供が推進されている。米国では、HIV 検査を医療施設における日常的検査と位置づけ、また、一定基準に合致した迅速検査は CBO での実施を認めるなどが図られている。両国とも多分野の科学的研究成果を政策の基礎としている。日本でも平成 18 年の「後天性免疫不全症候群に関する特定感染症予防指針」で検査相談体制の充実は重要な施策となっており、英国米国の方策は示唆に富む。

また、米国では食品医薬品庁（FDA）が家庭用 HIV 検査キットの効果と安全性の検証に必要な基準を明確にしたことによって、今後これを満たす申請があれば、承認され販売される可能性が開かれた。

最後に、HIV 検査推進事業推進が医療費に与える影響について費用対効果の分析を行い、HIV 対策を評価するツールになりえることを示唆した。

研究目的

英国（イングランド）、米国（主にニューヨーク市）で HIV 検査の普及方策について調査し、わが国の検査体制の強化に資する。

方法

訪問面接調査、文献調査、カウンターパートとのメールでの質疑

結果及び考察

1. 検査の意義と課題

日本、イングランド、米国で HIV 検査の意義に対する認識は共通である。すなわち、自己の HIV 感染状況を知ることにより、発症・重症化を防止するだけでなく、行動変容により公衆衛生の推進にも重要であり、HIV 検査は予防活動の中核と考えられている。

しかし、英国では毎年新規感染者は増加し¹⁾、米国でも 4 万人が新規感染している。²⁾ 感染者のうち未診断者（あるいは感染に気づいていない者）の割合は日本では 78%³⁾、英国で 34%¹⁾、米国で 25%⁴⁾ に上ると推計されており、予防、治療の重大な障壁となっている。さらに、米国の調査によると従来法では陽性者の 31%に結果が返されていない⁵⁾。そこで各国とも受検者の拡大と確実な結果告知が急務となっている。

このような背景に対して、HIV 検査の普及方策の進め方は 3 カ国で少しずつ異なるところがある。

2. 検査方法（表参照）

検査方法については、イングランドでは、家庭用郵送検査は過去に法令で禁止した。現在はインターネットで海外から購入する者も

おり、法改正の必要性が認識されている。

米国、日本では郵送検査キットが市販されている。家庭で自己判定する HIV 検査キットの承認基準も米国食品医薬品庁 (FDA) で作成されている。(後述 4. 参照)

迅速検査はイングランドではコミュニティ組織 (CBO) のクリニックで提供されているが、病院では行われていない。一方、米国では従来は医療施設や検査機関で行っていたが、操作や保存法の簡単な迅速検査は非医療施設でも提供できることとなった。日本では保健所やエイズ治療拠点病院での普及が図られている。^{6,7)}

3. 検査機会の拡大

検査機会の拡大も各国それぞれで積極的に講じられている。イングランドではすべての尿生殖器科 (GUM) が HIV 検査を提供し、最初の性感染症検査では HIV 検査が必須とされている。さらに、これまでは HIV 検査を行っていなかった家庭医 (GP) に対しても HAART の出現により詳細な検査前カウンセリングが必ずしも関係なくなったことから、患者の症候や病歴を把握している一般医の能力で十分対応でき、すべきこととし HIV 検査提供を英国 HIV 協会は推奨している。しかし、このガイドラインでは陽性の可能性のある者に対しては 15 分の立寄り検査ではなく、別途予約をとって話すことを薦めている。⁸⁾

また、イングランドでは妊婦検査においても HIV 検査を日常的に行う検査として取り込むことを推奨している。このため HIV 感染している 92% の女性は出産に先立って診断され、母子感染は減少している。わが国でも妊婦抗体検査実施率は 80-90% に上っている。⁹⁾

米国では他の診断やスクリーニング検査と同様にすべての医療者が自発的検査として HIV 検査を取り込み、日常医療として提供することが勧められている。⁵⁾ また、非医療施設での検査提供や陽性者のパートナーカウンセリング・紹介も重視されている。

4. OTC 家庭用 HIV 検査キットの承認基準

米国 FDA の血液製剤諮問委員会は、家庭用 HIV 検査キットの承認基準として効果と安全性を検証するフェーズ I、フェーズ II、フェーズ III 試験が必要であるとした。フェーズ I は検査法の分析学的、臨床的パフォーマンスの検証、フェーズ II はコントロールされた環境下で予想される使用者による臨床試験、フェーズ III は使用が予定される環境における非コントロール下での予想使用者による臨床試験である。今後この基準を満たす製品の販売承認が申請されれば、家庭用 HIV 検査キットが市販される可能性がある。¹⁰⁾

5. 検査に係る研究の推進

英国では未認識者や未診断者数の推定研究、米国でも新たな検査法の成績、結果返し率など検査に係る社会疫学的研究、臨床研究が基礎研究とともに集積されており、これらが、施策を立案し評価する基礎となっている。^{1,11,12)}

6. HIV 検査推進事業推進の評価

最後に、HIV 検査推進事業推進が医療支出に与える影響についてマルコフ過程を用いた状態遷移モデルにより費用対効果の分析を試みた。HIV 対策事業推進を評価するツールになりえることを示唆した。¹³⁾

結論

HIV 検査の普及は各国が HIV の流行状況や過去の経緯、医療制度のうえにたって進めるものであり、一律のゴールデンストラティジを打ち立てることはできないが、英国、米国の積極的な検査提供拡大策には、わが国にとっても検討に値するものが含まれていると考える。

文献

1. Health Protection Agency, Mapping the Issues, November 2005, P17, ISBN:0

- 901144 77 0
2. CDC, Cases of HIV infection and AIDS in the United States 2004, HIV/AIDS Surveillance Report, 16, DHHS/CDC
 3. 橋本修三他、エイズ発生動向調査に基づく HIV 感染者数の推計、HIV 感染症の動向と予防モデルの開発・普及に関する社会疫学的研究、主任研究者木原正博、厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業平成 15 年度研究報告書、P25-29,
 4. P.L.Fleming, et al., HIV Prevalence in the United States, 2000、Conf Retroviruses Opportunistic Infect 2002 Feb 24-28;9:abstract no 11
 5. RS Janssen et al., Advancing HIV Prevention:New Strategies for a Changing Epidemic---Unites States, 2003,MMWR 52(15);329-332, 2003
 6. 厚生労働省健康局疾病対策課長、保健所におけるエイズストップ作戦関連事業の実施についての改廃について (HIV 抗体検査に係る迅速な検査方法の導入推進) 健疾発第 1029003 号平成 16 年 10 月 29 日
 7. 厚生労働省健康局疾病対策課長、エイズ拠点病院における HIV 抗体検査の実施についての改廃について (HIV 抗体検査に係る迅速な検査方法の導入推進) 健疾発第 1029004 号平成 16 年 10 月 29 日
 8. B Gazzard , British HIV Association(BHIVA) guidelines for the treatment of HIV-infected adults with antiretroviral therapy(2005), HIV Medicine, 6(2),1,2005
 9. 和田裕一、HIV 母子感染の全国アンケート調査、HIV 感染妊婦の早期診断と治療及び母子感染予防に関する基礎的・臨床的研究、主任研究者稲葉憲之、厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業平成 15 年度研究報告書
 10. 木村和子他、OTC 家庭用 HIV 検査キットの米国における動向、HIV 検査体制の構築に関する研究、主任研究者今井光信、厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業平成 17 年度研究報告書
 11. Branson B., Changes in HIV Testing Practices and Counseling Recommendations USFDA Blood Products Advisory Committee, November, 3-4, 2005, <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/05/slides/2005-4190s2-index.html>
 12. Branson B.,Clinical Experience with Approved Rapid HIV Tests, USFDA Blood Products Advisory Committee, March 9-10, 2006, <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/06/slides/2006-4206S2-index.pdf>
 13. 木村和子他、ニューヨーク市の HIV 迅速検査の普及及び検査事業の推進の評価法に関する考察、 HIV 検査体制の構築に関する研究、主任研究者今井光信、厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業平成 16 年度研究報告書
 14. 木村和子他、海外をモデルとする HIV 検査体制の構築について-イングランド- HIV 検査体制の構築に関する研究、主任研究者今井光信、厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業平成 15 年度研究報告書
 15. 川崎二郎、後天性免疫不全症候群に関する特定感染症予防指針、平成 18 年 3 月 2 日厚生労働省告示第 89 号

表) 日本、イングランド、米国の検査体制の概要 ^{10,13-15)}

	日本	イングランド	米国
検査法	-通常検査 -迅速検査 -郵送検査	-通常検査 -迅速検査 (家庭用検査は郵送検査も違法)	-通常検査 -迅速検査 -郵送検査 (家庭用 HIV 検査キットは未承認。)
検査提供施設	-保健所・保健福祉センター -エイズ診療拠点病院 -一部の病院・診療所	-すべての尿生殖器科 (GUM) -HIV 専門診療科を有する病院 -一般医 (推進中) -HIV 関連コミュニティ組織 (CBO) のクリニック	-公立医療施設 -民間病院 -開業医 -矯正施設 -薬物依存治療センター -CBO
検査費用	-匿名無料検査(保健所等) -国庫負担(特定感染症検査等事業対象のエイズ診療拠点病院) -健康保険の適用(自覚症状、血液凝固因子製剤投与などの場合)	国民保健サービス (NHS) により無料	-連邦予算による無料化(公立医療施設、認定 CBO など) -民間保険の適用(民間病院、開業医) -MEDICAID(生活困窮者)
倫理的配慮	人権の尊重と個人情報の保護	インフォームドコンセントの励行	パートナーへの通告と秘密保持
研修	-エイズ予防財団 -ブロック拠点病院による提供		-連邦政府がガイドライン作成、州・市政府による実施、
推進政策	「後天性免疫不全症候群に関する特定感染症予防指針 2006」: 利用者の利便性に配慮した検査体制の充実 産婦人科: 妊婦検査での HIV 検査の推進 ・迅速検査の推進	「性の健康と HIV 国家戦略 2001」: 未認識感染者の減少 ・すべての GUM で初診スクリーニング検査で HIV 検査 ・妊婦検査の推進 ・一般医 (GP) による検査の推奨	HIV 予防推進イニシアティブ 2003 (CDC): ・ HIV 検査の医療での日常化 ・新たな迅速検査の推進 ・ CBO での検査提供 ・ パートナー通告

**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 グループMのプロウイルス定量法の開発

分担研究者 近藤真規子（神奈川県衛生研究所）
加藤真吾（慶應義塾大学医学部）
今井光信（神奈川県衛生研究所）

研究協力者 嶋貴子、須藤弘二（神奈川県衛生研究所）
田中理恵（慶應義塾大医学部）
相楽裕子（横浜市立市民病院）
岩室紳也（厚木市立病院）
向出雅一（エスアールエル）、武部豊（国立感染症研究所名前）

研究概要

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が、その定量は一部の研究機関で研究レベルで行われているに過ぎない。また、今までのプロウイルス定量法のほとんどはHIV-1サブタイプBを対象としている。しかしながら、日本ではサブタイプBの他、特に、異性間の性行為による感染でサブタイプA/Eが増加しており、その他少数ではあるが、サブタイプAやC等も検出されている。我々はこれら多様化するHIV-1サブタイプのプロウイルス定量法の開発を目的として研究を行った。

初年度、我々はReal time PCR法によるHIV-1プロウイルスの定量系を確立し、HIV-1サブタイプBについてのバリデーション（当研究班でHIV-1プロウイルス定量を行っている4施設について実施）を実施した。その結果、本定量法では良好な定量値が得られ、希釈直線性、再現性も良好であった。

しかしながら、2年目、本定量法について、非サブタイプB（サブタイプA/E、A、C、F、G）の臨床分離株を用いて検討を行った結果、サブタイプA/EおよびサブタイプAにおいて株によっては、実際の値に比べ著しく低い値となることが判明した。

そこで、最終年度にはHIV塩基配列データベース検索により、プライマー、プローブ領域について再検討し、HIV-1グループMに対応できるよう数カ所の塩基をdegenerateにしたプライマー、プローブを設計し、6種のサブタイプを用いてReal time PCR法によるプロウイルス定量法の基礎的検討を行った。その結果、degenerateプライマー、プローブを用いた本定量法は感度、特異性、直線性、再現性、正確性に優れており、HIV-1グループMのプロウイルス定量法として有用と考えられた。

HIV-1 グループ M のプロウイルス定量法の開発

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）
相楽裕子（横浜市立市民病院）、岩室紳也（厚木市立病院）
向出雅一（エスアールエル）、武部豊（国立感染症研究所）
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 定量法の開発を目的に、degenerate プライマー（deSK145、deSKCC1B）、TaqMan MGB プローブ（deKK-MGBprobe）を用いた Real time PCR 法の検討を行った。

既知濃度の HIV-1DNA の希釈系列を用いた検討により、本法は 4～5000 コピーの範囲で良好な直線性（slope: -3.43、 $R^2=0.984$ ）が認められ、定量限界はサブタイプ B、A/E ともに 4 コピー/0.5ugDNA であった。

6 種類の HIV-1 サブタイプ（B、A/E、A、C、F、G）、19 検体の Real time PCR 法による定量値は、ポアソン分布法での計算値とほぼ一致しており、両方法の間には非常に良好な相関が認められた（ $R^2=0.988$ 、回帰係数=0.983）。これら 19 検体について再現性を検討した結果、実験内変動係数は 7.0～35.3%、実験間変動係数は 1.0～35.9% であった。

本法は定量感度、直線性、再現性、正確性に優れており、HIV-1 グループ M のプロウイルスの定量に有用であると考えられた。

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効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 の定量法の検討を行い、昨年度までに、サブタイプ B について Real time PCR の定量法を用いたプロウイルス HIV-1 の定量系を確立した。今年度はサブタイプ B だけでなく非サブタイプ B についても測定可能なプロウイルス HIV-1 の定量法を開発することを目的に、TaqMan MGB 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 MGB プローブの

作製（図 1、図 2）

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）で使用しているプライマー（SK145、SKCC1B）およびプローブ（SK102）領域について、Los Alamos の HIV データベース検索を行い、HIV-1 グループ M に対応できるよう数箇所の塩基を degenerate にしたプライマー（deSK145、deSKCC1B）、プローブ（deKK-probe）を作製した。

deKK-probe は 5' 末端に蛍光物質 FAM を、3' 末端に Tm エンハンサーである MGB (Minor Groove Binder) を修飾し、TaqMan MGB プローブ（deKK-MGBprobe）とした。

2) 試料

患者 PBMC より分離した 19 の HIV-1 分離株

(サブタイプ B 7 株、サブタイプ A/E 5 株、サブタイプ A 3 株、F 2 株、C、G 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 非感染者の 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 QIAamp DNA mini kit (キアーゲン) を用いて抽出した。これらプロウイルス DNA を TE 溶液で DNA 濃度 50ng/ul に調整し、試料とした。

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 サイクル行った。

4) 標準 HIV-1DNA を用いた標準曲線の作製

クローン化した既知濃度の pNL432 (79000 copies/ul : サブタイプ B) を標準 HIV-1DNA コントロールとして用い、500、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、標準曲線を作製した。標準 HIV-1 DNA の希釈には HIV 非感染者のプール PBMC から抽出した DNA を用い、最終 DNA 濃度 50ng/ul に調整した。

なお、pNL432 (79000copies/ul) は慶応大加藤先生より供与された。

5) 定量感度および特異性の検討

サブタイプ B 標準株 IIIB の培養細胞から抽出した HIV-1DNA およびサブタイプ A/E のクローン化 HIV-1DNA (p93JP-NH1) の希釈系列を用いて、定量感度について検討した。

また、HIV 非感染者 40 例の PBMC より抽出した DNA を用いて特異性の検討を行った。

6) 限界希釈法によるプロウイルスの定量(ポアソン分布法)

19 検体の HIV-1DNA をそれぞれ限界希釈し、gag p24 領域をターゲットとした nested PCR 法で測定した後、ポアソン分布法に従いコピ

一数を算出し、Real time PCR 法での測定値と比較した。

(倫理面への配慮)

患者同意の上、HIV 検査依頼のあった症例より提供されたサンプルを用いて研究を行っており、プライバシーの流出防止など患者の人権保護に十分配慮した。本研究は当研究所の倫理委員会で承認されている。

C. 結果および考察

degenerate プライマー (deSK145、deSKCC1B)、deKK-MGBprobe を用いた Real time PCR 法による HIV-1DNA 定量法について基礎的検討を行った。

標準 HIV-1DNA コントロール pNL432 の希釈系列を用いて標準曲線を作製した結果、4~5000 コピー/0.5ug DNA の範囲で良好な直線性が得られた (slope: -3.43, R²=0.984, 図 3)。

サブタイプ B の標準株 IIIB のプロウイルス DNA およびクローン化したサブタイプ A/E のプロウイルス DNA、p93JP-NH1 の希釈系列を用いて定量限界を検討したところ、サブタイプ B、A/E いずれも 4 コピー/0.5ugDNA 以上で定量が可能であった (図 4、図 5)。

HIV 非感染者 40 例の PBMC から得られた DNA はすべて検出限界以下であった。

19 の臨床分離株培養細胞 (サブタイプ B 7 検体、A/E 5 検体、A 3 検体、F 2 検体、C、G 各 1 検体ずつ) から得られた HIV-1DNA 量を Real time PCR で測定し、ポアソン分布法での計算値と比較した (表 1)。

Real time PCR 法での測定値は 19 検体全てポアソン分布法での値とほぼ一致していた。しかし、19 検体中 4 検体 (サブタイプ A/E 5 検体中 2 検体、サブタイプ A 3 検体中 2 検体) はアンプリコア型プライマー (SK145、SKCC1B) での測定値が著しく低い値となった。

これら 4 検体の forward プライマー領域には SK145 と比べ、4~5 塩基のミスマッチが認められたが、degenerate プライマー deSK145

ではミスマッチ箇所が 0-2 塩基に減少した (図 6)。degenerate プライマーを用いてプライマーとのミスマッチを減らすことにより、ポアソン分布法による計算値に近似したより正確な測定値値が得られたと考えられた。

degenerate プライマー、deSK145、deSKCC1B および deKK-MGBprobe を用いた本 Real time PCR 法は HIV-1 グループ M に対応可能な有用な方法であると考えられた。

19 検体の degenerate プライマー、プローブでの測定値とポアソン分布法での値には非常に良好な相関性が認められた ($R^2=0.988$ 、回帰係数=0.983、図 7)。

これら 19 検体を各々 3 本ずつ 3 回測定し、再現性の検討を行った (表 2)。分散分析解析の結果、実験内変動係数が 7.0-35.3%、実験間変動係数が 1.0-35.9% と良好な再現性が得られた。

D. 結語

degenerate プライマー (deSK145、deSKCC1B) および deKK-MGBprobe を用いた Real time PCR 法による HIV-1 プロウイルス定量系を確立した。

6 種類の HIV-1 サブタイプ (B、A/E、A、C、F、G)、19 検体の定量値とポアソン分布法による計算値の間には非常に良好な相関が認められた ($R^2=0.988$ 、回帰係数=0.983)。本法は定量感度、直線性、再現性、正確性に優れており、HIV-1 グループ M のプロウイルスの定量に有用であると考えられた。

E. 研究発表

論文発表

1. Kurbanov F., Kondo M., Mizogami M., Imai M. et al : Human Immunodeficiency Virus In Uzbekistan: Epidemiological and Genetic Analyses. AIDS Res Hum Retroviruses, 19, 731-738 (2003)

2. 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. 近藤真規子、嶋貴子、須藤弘二、岩室紳也、岡部武史、今井光信 : 長期にわたり HIV-1 抗体価が低レベルで推移した感染者における血漿中の HIV-1 nef/LTR 領域の経時的解析、第 17 回日本エイズ学会学術集会 (2003 年 11 月 27-29 日)
2. 足立拓也、相楽裕子、宇宿秀三、野口有三、近藤真規子、今井光信 : 当院における急性 HIV 感染 4 症例の臨床的検討、第 17 回日本エイズ学会学術集会 (2003 年 11 月 27-29 日)
3. 嶋貴子、近藤真規子、一色ミユキ、塚田三夫、潮見重毅、今井光信 : HIV 検査の普及のための試み- 保健所検査への即日検査への導入-、第 17 回日本エイズ学会学術集会 (2003 年 11 月 27-29 日)
4. 近藤真規子、嶋貴子、須藤弘二、岩室紳也、岡部武史、今井光信 : HIV 感染後長期間抗体価が低レベルで推移した感染者における HIV-1 遺伝子解析、第 18 回関東甲信静支部ウイルス研究部会 (2003 年 9 月 25-26 日)
5. Kondo M., Shima T, Sudo K., Imai M. et al : Epidemiological and molecular characteristics of HIV infection in Uzbekistan, the XV International AIDS Conference (11-16 July 2004, Bangkok)
6. 近藤真規子、嶋貴子、武部豊、今井光信 :

- nef/LTR 欠損 HIV-1 変異株の遺伝子解析について、第 52 回日本ウイルス学会学術集会（2004 年 11 月 21-23 日、横浜）
7. 近藤真規子、嶋貴子、須藤弘二、足立拓也、相楽裕子、岩室紳也、伊藤章、今井光信：HIV 感染者における nef 欠損 HIV-1 変異株について、第 18 回日本エイズ学会学術集会（2004 年 12 月 9-11 日、静岡）
 8. 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）
 9. 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）
 10. 菊池嘉、福武勝幸、天野景裕、白阪琢磨、山本善彦、今井光信、近藤真規子、林邦彦、古谷茂之、木村哲、岡慎一：リアルタイム PCR 法による HIV-1RNA 定量キット COBAS TaqMan HIV-1 Test (High Pure System) 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）
 11. 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）
 12. 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）
 13. 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）
 14. 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）
 15. 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）

F. その他

特許出願

1. 発明の名称：「弱毒型 HIV-1 塩基配列」、
発明者：近藤真規子、今井光信、武部豊、
出願年月日：平成 17 年 1 月 17 日、出願
番号：特願 2005-008741

図1 The strategy for Real-time PCR Amplification

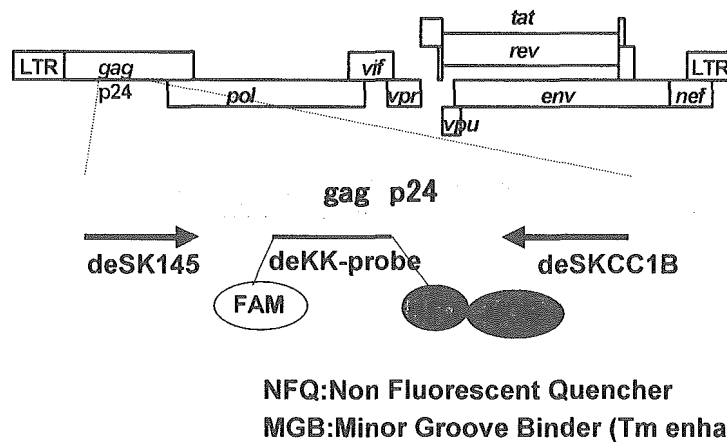


図2 Primer、probe領域の塩基配列の比較

- ◆ forward primer
deSK145 5'- AGTRGGGGGACAYCARGCAGCHATGCARAT - 3'
(SK145 5'- AGTGGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAAAT - 3')
- ◆ reverse primer
deSKCC1B 5'- TACTAGTAGTTCCTGCTATRTCACCTCC - 3'
(SKCC1B 5'- TACTAGTAGTTCCTGCTATGTCACCTCC - 3')
- ◆ probe
deKK-probe 5'- ATCAATGARGARGCTGCAGAATGGGA - 3'
(SK102 5'- GAGACC ATCAATGAGGAAGCTGCAGAATGGGA TAG - 3')

図3 標準HIV-1DNA (pNL432) のstandard curve

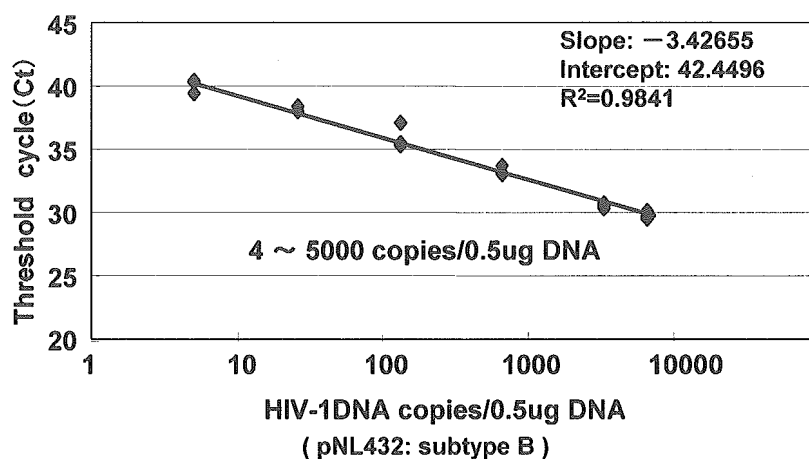


図4 Real-time PCR法の検出感度

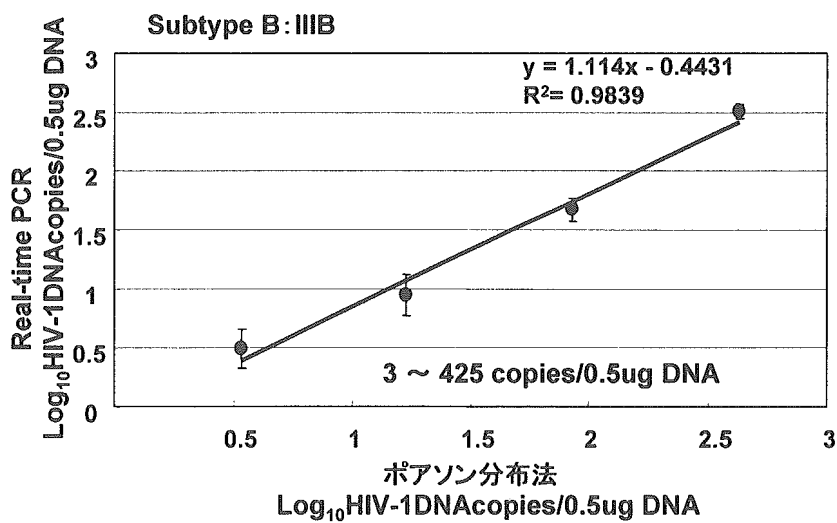


図5 Real-time PCR法の検出感度

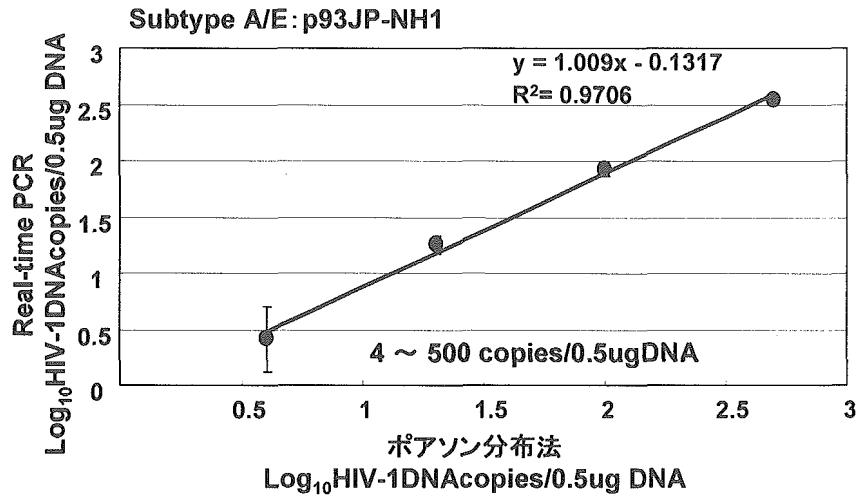


表1 HIV-1プロウイルス定量結果(copies/1ugDNA)
— Real-time PCR法とポアソン分布法との比較 —

sample	subtype	Real-time PCR法		ポアソン分布法
		amplicor	degenerate	
Y187	B	34,500	23,600	26,000
GM910-22	B	3,710	2,640	1,900
Y160	B	86,500	11,100	13,000
Y164	B	1,610,000	2,380,000	1,500,000
Y198	B	2,960,000	2,460,000	2,200,000
Y120	B	67,500	67,500	110,000
Y122	B	1,720	1,560	3,000
GM1123	A/E	2,100,000	1,760,000	1,400,000
Y191	A/E	13,300	2,490,000	3,500,000
Y173	A/E	176,000	154,000	98,000
Y176	A/E	67,600	71,700	85,000
Y177	A/E	<4(x100)	39,900	71,000
Y165	A	<4(x30)	17,400	10,700
Y68	A	67	50	32
GM68-42	A	<4	156	130
Y30	C	937,000	1,040,000	1,150,000
GM652-5	F	1,720,000	1,200,000	1,080,000
GM1270	F	396,000	312,000	330,000
Y115	G	69,600	48,800	54,000

図6 forward プライマー領域の塩基配列の比較

deSK145	5'- AGT RGGGGGACA YCA RGC AGC HAT GCA RAT -3'
SK145	5'- AGT GGGGGGACA TCA AGC AGC CAT GCA AAT -3'
B Y187	5'- -----T----- -3'
B GM910-22	5'- -----C----- -3'
B Y160	5'- ----- -3'
B Y164	5'- -----C----- -3'
B Y198	5'- -----T----- -3'
B Y120	5'- -----T----- -3'
B Y122	5'- ----- -3'
A/E GM1123	5'- -----C-G----- -3'
A/E Y191	5'- -----AT--C-G---A----- -3'
A/E Y173	5'- -----C-R---A----- -3'
A/E Y176	5'- -----C-G---A----- -3'
A/E Y177	5'- -----AT--C-G---A----- -3'
A Y165	5'- -----C-G---A---G----- -3'
A Y68	5'- -----C-G---T----- -3'
A GM68-42	5'- -----C-G---A---G----- -3'
C Y30	5'- ----- -3'
F GM652-5	5'- ----- -3'
F GM1270	5'- ----- -3'
G Y115	5'- -----T----- -3'

図7 Real-time PCRと限界希釈法(ポアソン分布法)との相関

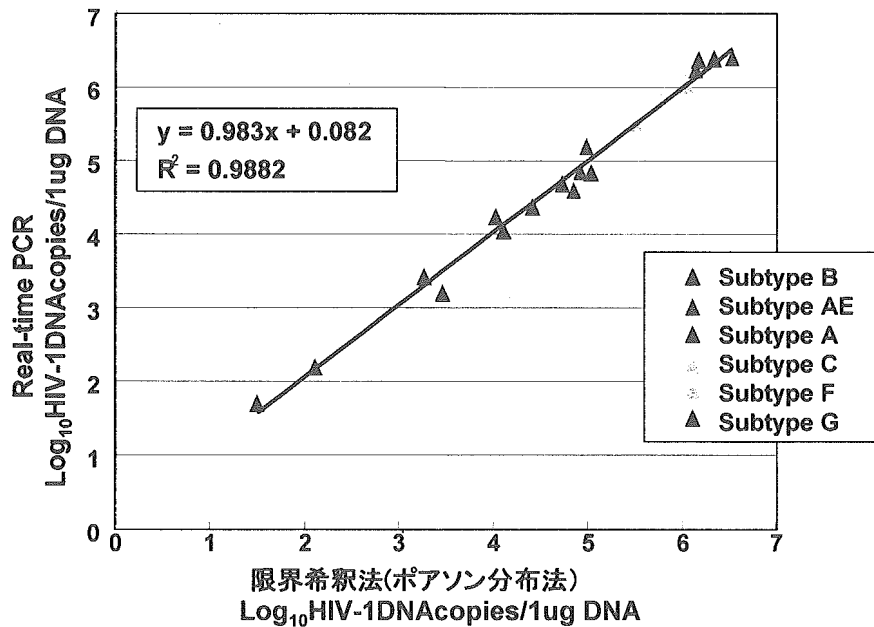


表2 Real-time PCR法の再現性
(各サンプル3本ずつの測定を3回繰り返し測定)

sample	subtype	HIV-1 ⁺ ウイルス (copies/1ugDNA)	実験内 変動係数(%)	実験間 変動係数(%)
Y187	B	23,600	19.1	29.6
GM910-22	B	2,640	7.0	20.2
Y160	B	11,100	7.0	24.6
Y164	B	2,380,000	10.2	20.1
Y198	B	2,460,000	16.4	13.3
Y120	B	67,500	20.0	34.5
Y122	B	1,560	29.2	10.2
GM1123	A/E	1,760,000	18.3	11.7
Y191	A/E	2,490,000	12.0	9.6
Y173	A/E	154,000	19.3	19.0
Y176	A/E	71,700	7.7	15.7
Y177	A/E	39,900	15.4	35.9
Y165	A	17,400	7.6	18.9
Y68	A	50	35.3	27.6
GM68-42	A	156	8.5	30.4
Y30	C	1,040,000	11.6	9.2
GM652-5	F	1,200,000	13.6	20.9
GM1270	F	312,000	11.9	31.1
Y115	G	48,800	19.8	1.0

B-2. HIV プロゲノムの定量法の確立・普及

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

サブタイプ A、B、C、D、CRF01_AE の HIV-1 DNA 定量を可能にするリアルタイム PCR 法を確立できた。引き続き患者検体の測定により以下のことがわかった。①未治療患者のうち、CD4 数が 200 以下の症例では HIV-1 DNA 量は多いが、CD4 高値群にはリザーブの極めて小さい一群が存在することが分かった。②HAART 著効症例ではプロウイルス量は 5960 コピー/ 10^6 細胞から 2 コピー/ 10^6 細胞と広範囲に分布し中央値は 560 であった。③HAART により血中ウイルス量が 50 コピー/ml 以下に抑制されるに伴い、ヒト DNA にインテグレートされていないフリーの HIV-1 DNA は減少する。その後はプロウイルス量は横ばいになるか、極めて緩やかに減少する。④長期末発症者のプロウイルス中央値は HAART 著効例中央値の約 1/7 であった。

A. 研究目的

HIV-1 DNA（プロウイルス）定量のための通常リアルタイム PCR 法、高感度リアルタイム PCR 法を確立し、HAART 施行中の感染患者や未治療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定量し定量測定の意味を明らかにすることを目的にした。

B. 材料および方法

高感度リアルタイム PCR 法の確立：Sub-B 法：サブタイプ B の HIV-1 感染患者 15 例の gag 遺伝子領域の塩基配列を決定し、保存された領域に 2 種類の PCR プライマーセットと Taqman プローブを設計した。外側のプライマーを用い定量前 PCR を施行し、引き続き通常リアルタイム PCR を行う方法で定量法の高感度化を図った。HIV-1 定量には β 2-M の増幅率を利用する評価法と標準 HIV-1 プラスミド濃度と Crossing point で作る検量線を利用する評価法を用い、それぞれの方法に対してバリデーションを施行した。Roche LightCycler システムのリアルタイム PCR を用いて測定した。**Pan-sub 法：**サブタイプ A 13 症例・サブタ

イプ B 14 症例・サブタイプ C 8 症例・サブタイプ D 3 症例および CRF01_AE 14 症例の計 52 検体の凍結血漿検体を用い塩基配列を決定し保存された領域に 2 種類の PCR プライマーセットと Taqman プローブを設計した。**DNA および RNA の精製：**CD4 陽性 T リンパ球は StemSepSTS-14052 を用い末梢血から精製し、QIAamp DNA blood mini kit を用いて DNA を精製した。長期末発症者に関しては全血 100 μ l から DNA を抽出した。RNA は QIAamp viral RNA mini kit を用いて血漿より精製した。**細胞検体：**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）、長期末発症者 13 検体を対象にした。**ウイルス検体：**サブタイプ A 13 症例・サブタイプ B 14 症例・サブタイプ C 8 症例・サブタイプ D 3 症例および CRF01_AE 14 症例の計 52 検体の凍結血漿検体を用いた。（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した。又、検査結果は患者のプライバシー

ーが侵されないよう厳重に管理することを義務とした。

C. 結果

Sub-B 法のバリデーション：2 種類のいずれの評価法を用いても、5 コピー/106 細胞の低コピー測定まで良好な正確性と再現性が得られた (Interassay:方法 1 では accuracy, 81%; Cv,17%, 方法 2 では accuracy, 92%; Cv,16%)。Pan-sub 法のバリデーション：Intra-assay, Inter-assay と共に正確性 (Accuracy)は高く、Inter-assay の 5 コピー試料の 88.1%を除いて、97.6%から 107.9%を示した。CV 値については Intra-assay では 10%未満、Inter-assay では 20%未満とばらつきも少なく再現性良く測定できることが示された。

患者検体での測定結果：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/106 細胞～検出感度 (200) 以下の広範囲に分布した。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/106 白血球～検出感度 (2) 以下 (中央値 7) に分布した。④ 全血を用いた定量の為の必要量:HAART 著効例 5 例で検討した結果、必要最小量は $100 \mu\text{l}$ と推定された。

D. 考察

3 年間の研究で、サブタイプ A、B、C、D、CRF01_AE の HIV-1DNA 定量を可能にするリアルタイム PCR 法を確立できた。引き続き患者検体の測定により以下のことがわかった。① 未治療患者のうち、CD4 数が 200 以下の症例では HIV-1 DNA 量は多いが、CD4 高値群にはリザバーの極めて小さい一群が存在すること。② HAART 著効症例ではプロウイルス量は

5960 コピー/106 細胞から 2 コピー/106 細胞と広範囲に分布し中央値は 560 であった。③ HAART により血中ウイルス量が 50 コピー/ml 以下に抑制されるに伴い、ヒト DNA にインテグレートされていないフリーの HIV-1 DNA は減少する。その後はプロウイルス量は横ばいになるか、極めて緩やかに減少する。④ 長期未発症者のプロウイルス中央値は HAART 著効例中央値の約 1/7 であった。⑤ HAART 著効例を対象にした結果から、50 コピー以下に抑制された時点で、HIV-1 DNA 量を測定することにより、プロウイルスのセットポイント値を決定できる。その値は症例ごとに広範囲に分布していたが、プロウイルス低値群に予後良好症例が存在すると思われる。今後、T リンパ球中の HIV-1 リザバーのみならず、単球中のリザバーを評価するかの検討も重要だと思われる。

E. 共同研究者

永井裕美、水野善文、加堂真由、萩原智子、服部純子、伊部史朗、藤崎誠一郎、重見麗、濱口元洋、間宮均人 (国立病院機構名古屋医療センター・臨床研究センター)、多和田行男 (同・検査科)、山本直彦 (名古屋大学医学研究科)、稲田頼太郎 (セントルークス病院)、森下高行 (愛知県衛生研究所)

F. 研究発表

[論文発表]

1. Selection of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Variants with an Insertion Mutation in the P6gag and P6pol Genes under Highly Active Antiretroviral Therapy. Shirou Ibe, Naomi Shibata, Makoto Utsumi and Tsuguhiko Kaneda Microbiol. Immunol., 47, 71-79 (2003).
2. A Simple HPLC Method for Simultaneous Determination of Lopinavir, Ritonavir

- and Efavirenz. Yoshiko Usami, Tsuyoshi Oki, Masahiko Nakai, Masafumi Sagisaka and Tsuguhiro Kaneda. *Chem. Pharm. Bull.* 51, 715-718 (2003).
3. 抗 HIV 療法のモニタリング(第 16 回日本エイズ学会シンポジウム記録) 金田次弘、加藤真吾、山元泰之、千葉智子、杉浦 互 *日本エイズ学会誌* 5, 109-112 (2003).
 4. Prevalence of Drug-resistant Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Therapy-naive Patient and Usefulness of Genotype Testing. Shirou Ibe, Naoe Hotta, Uta Takeo, Yukio Tawada, Naoto Mamiya, Katsuo Yamanaka, Makoto Utsumi and Tsuguhiro Kaneda *Microbiol. Immunol* 47, 499-505 (2003).
 5. Prevalence of infection and genotypes of GBV-C/HGV among homosexual men. Junko Hattori, Shiro Ibe, Hiromi Nagai, Kaoru Wada, Takayuki Morishita, Katsuhiko Sato, Makoto Utsumi and Tsuguhiro Kaneda *Microbiology & Immunology* 47, 759-763 (2003)
 6. 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)
 7. 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).
 8. 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).
 9. 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).
 10. 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).
 11. 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).
 12. 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).
 13. 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).
 14. 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).
 15. 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* 124, 157-165 (2005).
 16. HPLC によるプロテアーゼ阻害剤アタザナビルの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 *日本病院薬剤師会雑誌*, 41, 731-734 (2005).

17. カレトラ™投与外来HIV感染患者における脂質異常とロピナビル血中濃度の評価 高橋昌明、吉田昌生、大木 剛、奥村直哉、鈴木達男、金田次弘
 18. Conventional HPLC Method Used for Simultaneous Determination of the Seven HIV Protease Inhibitors and Nucleoside Reverse Transcription Inhibitor Efavirenz in Human Plasma. M. Takahashi, M. Yoshida, T. Oki, N. Okumura, T. Suzuki and T. Kaneda Biol. Pharm. Bull., 28, 1286-1290 (2005).
 19. PNA-In Situ Hybridization Method for Detection of HIV-1 DNA in Virus-Infected Cells and Subsequent Detection of Cellular and Viral Proteins. T. Hagiwara, J. Hattori and T. Kaneda. In Situ Hybridization Protocols 3rd edition (edited by I. A. Darby), Humana Press, NJ, pp139-149 (2005).
- [学会発表]
1. 未治療 HIV-1 感染患者における CD4 陽性細胞数と細胞内 HIV-1 DNA 量の相関性. 和田かおる、永井裕美、萩原智子、内海眞、金田次弘 第 17 回日本エイズ学会総会 (平成 15 年 11 月-2003)
 2. 高感度リアルタイム PCR 法のバリデーション. 永井裕美、和田かおる、森下高行、内海眞、西山幸廣、金田次弘 第 17 回日本エイズ学会総会 (平成 15 年 11 月-2003)
 3. 男性同性愛者における HIV-1 と GBV-C ジェノタイプの解析. 服部純子、伊部史朗、永井裕美、和田かおる、森下高行、佐藤克彦、内海眞、金田次弘 第 17 回日本エイズ学会総会 (平成 15 年 11 月-2003)
 4. ペンダント型亜鉛サイクレン錯体の HIV 増殖抑制作用機序に関する研究. 山本直彦、伊部史朗、和田かおる、金田次弘、内海眞、森下高行、佐藤克彦、大竹 徹、森 治代、川畑拓也 第 17 回日本エイズ学会総会 (平成 15 年 11 月-2003)
 5. 血漿 HIV-1 RNA 及び末梢血 HIV-1 DNA で検出される薬剤耐性変異の比較. 堀田直恵、伊部史朗、金田次弘 第 17 回日本エイズ学会総会 (平成 15 年 11 月-2003)
 6. 未治療 HIV-1 感染症患者における薬剤耐性ウイルス出現頻度の推移. 伊部史朗、堀田直恵、内海眞、金田次弘 第 17 回日本エイズ学会総会シンポジウム (平成 15 年 11 月-2003)
 7. Activity of HIV-1 provirus in CD4-positive T lymphocytes from patients responding well to HAART. T. Kaneda, H. Nagai, K. Wada, U. Takeo, J. Hattori, T. Hagiwara, S. Ibe, Y. Tawada, M. Utsumi and T. Morishita 1st International Workshop on HIV Persistence during Therapy Saint Martin, FWI, December 10-12, 2003.
 8. 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)
 9. HIV 感染症治療のモニタリング — HIV-1 DNA の定量測定 — 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)
 10. 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「小型シンクロトロン光源とその医療・産業応用に関する研究会」 (平成 16 年 7 月-2004)
 11. HIV-1 mRNA levels in peripheral CD4+T