

反応性の検討を行った。

(4) HIV ジェノタイプ別の抗体検出感度の比較

WWRB 302 パネルから各ジェノタイプを1～2 検体選択し、HIV 陰性プール血漿を用いて 10^6 倍までの 10 倍段階希釈系列を作成し、検討品および対照試薬とのジェノタイプ別の抗体検出感度の比較を行った。

(5) HIV-1 p24 抗原の反応性の検討

様々な抗原・抗体力価の検体を含んだパネルである HIV p24 Antigen Mixed Titer Performance Panel (PRA201) を用いて、検討品および対照試薬の反応性の検討を行った。

C. 結果

HIV 陽性検体、HIV 陰性検体を用いた感度・特異性の検討では、感度は 100%、特異性は 99.8%であった。また、検討試薬とダイナスクリーンとで偽陽性率を比較したところ、検討試薬は偽陽性率 0.2%、ダイナスクリーンでは 0.9%であった (図 7)。

感染初期セロコンバージョンパネルの検討では、対照品の迅速検査試薬と比較して、10 パネル中 7 パネルで早期からの HIV 検出が可能であることが分かった (図 8)。今回使用したセロコンバージョンパネルの抗原濃度より、エスプラインでは 186.3pg/ml で陰性、256.2pg/ml では陽性であったことから、抗原検出可能濃度は 186.3～256.2pg/ml の間であることが分かった。

ジェノタイプパネル血漿の検討では、HIV-1 グループ M のサブタイプ A、B、B'、C、D、A/E、F、G、B/D、グループ O、HIV-2 について検出が可能であることが分かった。

また、ジェノタイプ別抗体検出感度は対照品の迅速検査試薬と比較して、同等あるいは高いことが分かった。

D. 考察

検討品の感度、特異性は、それぞれ 100%、

99.8%であり、臨床応用に十分な精度を有していることが分かった。また、対照品の迅速検査試薬であるダイナスクリーンの偽陽性率が 0.9%であったことから、検討品は HIV 迅速検査試薬として非常に特異性が高いことが分かった。また、感染初期セロコンバージョンパネルの結果において、検討品は抗原検出も可能なことから、他の迅速検査試薬と比較してより早期の HIV 検出が可能であり、HIV 迅速スクリーニング検査キットとして非常に有用であることが示唆された。

E. 発表

学会発表

1. T. Shima, M. Isshiki, M. Tsukada, S. Shiomi, R. Yasunari, H. Watanabe, H. Ueyama, K. Sudo, M. Kondo, K. Nakase, M. Imai: Implementation and Effectiveness of Rapid HIV Testing at Publicly Funded Voluntary HIV Counseling and Testing (VCT) Sites in Japan. XVI International AIDS Conference. (13-18 August, 2006, Toronto, Canada)
2. K. Nakase, T. Shima, M. Imai, T. Tachibana: Introduction of rapid test to VCT and continuous evaluation systems in Japan. XVI International AIDS Conference. (13-18 August, 2006, Toronto, Canada)
3. M. Kondo, K. Sudo, R. Tanaka, T. Shima, H. Sagara, S. Iwamuro, Y. Takebe, S. Kato, M. Imai: A quantification of HIV-1 group M proviral DNA using a TaqMan MGB realtime PCR. XVI International AIDS Conference. (13-18 August, 2006, Toronto, Canada)
4. R. Yamada, T. Shima, M. Imai, I. Genka, M. Ogane, M. Kawado, H. Taniguchi, Y. Tsukahara, N. Inaba: The false

- positive rate of antenatal HIV screening is very high in Japan. XVI International AIDS Conference. (13-18 August, 2006, Toronto, Canada)
5. 嶋 貴子：妊婦 HIV 検査実施率および検査偽陽性とその対応. 日本性感染症学会第 19 回学術大会シンポジウム. (平成 18 年 12 月 9-10 日, 金沢)
 6. 谷口晴記、塚原優己、川戸美由紀、源河いくみ、山田里佳、大金美和、嶋 貴子、和田裕一、喜多恒和、稲葉憲之：我が国の HIV 感染妊娠の将来予測 (中・長期展望)：日本性感染症学会第 19 回学術大会シンポジウム. (平成 18 年 12 月 9-10 日, 金沢)
 7. 嶋 貴子：スクリーニング検査偽陽性の現状と対策. 第 20 回日本エイズ学会学術集会・総会. (平成 18 年 11 月 30 日-12 月 2 日, 東京)
 8. 嶋 貴子、近藤真規子、須藤弘二、相楽裕子、今井光信：新しい HIV 迅速抗体検査キットの検討. 第 20 回日本エイズ学会学術集会・総会. (平成 18 年 11 月 30 日-12 月 2 日, 東京)
 9. 中瀬克己、嶋 貴子、今井光信：自発的 HIV 検査相談における即日検査導入の影響と効果評価の体制. 第 20 回日本エイズ学会学術集会・総会. (平成 18 年 11 月 30 日-12 月 2 日, 東京)
 10. 近藤真規子、須藤弘二、嶋 貴子、高橋華子、相楽裕子、武部 豊、今井光信：日本で検出された CRF01_AE/B リコンビナント HIV-1 の解析. 第 20 回日本エイズ学会学術集会・総会. (平成 18 年 11 月 30 日-12 月 2 日, 東京)
 11. 井戸田一朗、藤純一郎、平井由児、安並 毅、嶋 貴子、今井光信、戸塚恭一：HIV 陽性 MSM における不活化 A 型肝炎ワクチンに対する抗体反応. 第 20 回日本エイズ学会学術集会・総会. (平成 18 年 11 月 30 日-12 月 2 日, 東京)
 12. 嶋 貴子：HIV 検査の全国状況—即日検査を中心に—. 第 52 回神奈川県公衆衛生学会シンポジウム. (平成 18 年 11 月 14 日, 横浜)
 13. 嶋 貴子、今井光信、谷口晴記、早川智、外川正生、塚原優己、稲葉憲之：妊婦集団における HIV スクリーニング検査の偽陽性出現率に関する調査. 第 80 回日本感染症学会総会・学術講演会. (平成 18 年 4 月 20-21 日, 東京)

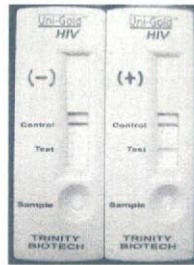
図1

検討に用いた迅速抗体検査試薬

ダイナスクリーン・HIV-1/2

Uni-Gold HIV

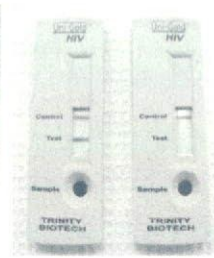
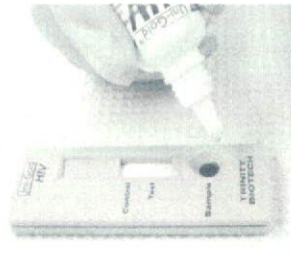
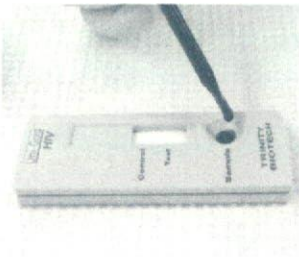
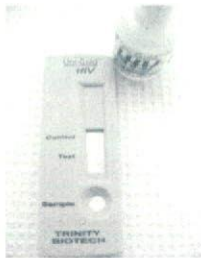
OraQuick ADVANCE



反応時間	15分	10分	20分
検体	血清、血漿、全血	血清、血漿、全血	血清、血漿 全血、だ液
血液検体量	50 μ l	約45 μ l (添付スポイト使用)	5 μ l (添付ループ使用)
認可	認可(1998年)	申請中	検討中

図2

Uni-Gold HIV

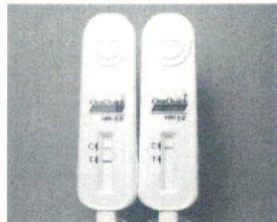
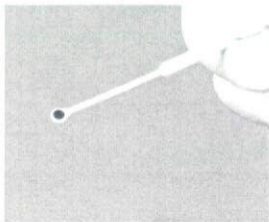


添付のスポイトで血液を1滴入れる

展開液を4滴加える

10分後に判定

OraQuick ADVANCE



添付のループで血液を展開液のバイアルに入れる

キットデバイスを立てる

20分後に判定

図3

迅速抗体検査キットの特異性、感度の比較

	検体	ダイナスクリーン	Uni-Gold	OraQuick
特異性	全血	99.4% (351/353)	99.5% (594/597)	100% (1111/1111)
	血漿	98.9% (349/353)	99.8% (649/650)	100% (1111/1111)
感度	全血	100% (10/10)	100% (11/11)	100% (10/10)
	血漿	100% (100/100)	100% (95/95)	100% (33/33)

陰性

WB陽性

図4

セロコンバージョンパネル血清を用いた感度比較

<BBI Seroconversion Panel AU (PRB945)>

検体番号	最初の採血日からの日数	迅速抗体検査キット(IC)			PA	EIA
		ダイナスクリーン	Uni-Gold	OraQuick	ジェネディア HIV-1/2 Mix	アボット HIV-1/2
		判定	判定	判定	PA価	C.O.I
1	0	-	-	-	-	0.1
2	3	-	-	-	-	0.1
3	7	-	-	-	-	0.1
4	13	-	-	-	16	2.9
5	15	+	+/=	-	256	>17.9
6	20	++	++	+/-	32768	>17.9
最初に陽性となった検体番号		5*	5	6	4	4

* 数字が小さいほど感度が高く、より早い時期から検出可能

図5 セロコンバージョンパネル血清を用いた感度比較

＜8つのセロコンバージョンパネルを使用＞

Panel No.	迅速抗体検査キット			PA	EIA
	ダイナスク リール	Uni-Gold	OraQuick	ジェネディア HIV-1/2 Mix	アボット HIV-1/2
PRB936 (Panel AK)	6*	7	(8)	6	6
PRB938 (Panel AM)	9	9	(10)	9	9
PRB939(E) (Panel AN)	9	9	9	9	9
PRB945 (Panel AU)	5	5	6	4	4
PRB951 (Panel BA)	6	6	(7)	6	6
PRB952 (Panel BB)	5	5	6	4	4
PRB953 (Panel BC)	4	4	(5)	4	3
PRB955 (Panel BE)	4	5	(6)	4	4
合計	48	50	57	46	45

*数字が小さいほど感度が高く、より早い時期から検出可能

図6 新たな迅速検査試薬の検討 — 抗原抗体同時検出 —

キット本体



- ＜特徴＞
- ◇ HIV抗原・抗体を同時に15分で検出可能
 - ◇ 原理: イムノクロマト-酵素標識抗体法
 - ◇ 検体: 血漿・血清

- ＜操作法＞
1. 検体25 μ lを検体滴下部へ滴下
 2. 基質展開用ボタンを押し、反応開始
 3. 15分後に反応停止液を2滴滴下
 4. 目視判定

＜判定＞

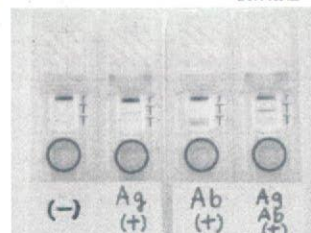


図7 新たな迅速検査試薬の検討 — 抗原抗体同時検出 —

<偽陽性率の検討>

◇対照品(ダイナスクリーン)との比較 陰性検体 910 例

	ダイナスクリーン HIV-1/2	検討品
偽陽性	8 (0.9%)	2 (0.2%)

<セロコンバージョンパネルAK (BBI PRB936)>

パネル 番号	初回 採血 からの 日数	PA法	迅速抗体 検査 ダイナス クリーン	迅速抗原抗体同時検査 検討試薬			抗原抗体 同時検査 ELISA法	抗原 検査 pg/ml	HIV-1 RNA コピー /ml
				抗原	抗体	判定			
1	0	-	-	-	-	-	-	<3.0	<400
2	5	-	-	-	-	-	-	<3.0	4×10^2
3	7	-	-	-	-	-	-	<3.0	7×10^3
4	12	-	-	+/=	-	+/=	+	256.2	$>8 \times 10^5$
5	14	-	-	+	-	+	+	>400	$>8 \times 10^5$
6	19	512	+/=	++	+	+	+	>400	$>8 \times 10^5$
7	21	1024	+	+	+/-	+	+	>400	$>8 \times 10^5$

図8 新たな迅速検査試薬の検討 — 抗原抗体同時検出 —

感染初期セロコンバージョンパネルを用いた検出感度比較

BBI Panel No.	最初の採血日から陽性検出までの日数			
	検討試薬	ダイナスク リーン	ジェンスク リーン	エンザイグノ スト
PRB936	12	19	12	12
PRB937	21	-	14	21
PRB938	9	9	0	3
PRB939	21	103	21	21
PRB945	13	15	13	13
PRB951	15	19	11	11
PRB952	14	17	10	17
PRB953	10	10	7	10
PRB954	21	-	21	21
PRB955	12	12	7	12
検査法	Rapid Ag-Ab	Rapid Ab	ELISA Ag-Ab	

一番早い時期から
検出した検査試薬

検討試薬とダイナ
スクリーンとを比較し、
ダイナスクリーンより
早い時期から検出
したパネル

* 数字が小さいほど感度が高く、より早い時期から検出可能

20. 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、田中理恵（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17年11月から平成18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た。参加案内状を送った51施設のうち39施設がコントロールサーベイに参加した。各施設に熟失活させたHIV-1パネル血清とアンケートを送付し、結果を回収した。検査センターには日差再現性調査のために三重測定用のHIV-1パネル血清を送った。測定値が標準値の1/3から3倍の範囲に入っていない事例が13例みられた。このような許容範囲を外れるデータは、検査頻度の少ない施設、担当者の経験年数の少ない施設に多く見られる一方、担当者が3年以上の経験を有する施設でも見られた。大量の一般臨床検体を扱う検査センターでは、1施設のみ許容範囲を外れるデータがあった。日差再現性は目標範囲となるCV値の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、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、61.5%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。機器の保守を定期的、または不定期に行っている施設は9割を超え、昨年度より改善された。全施設の71.8%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。HIV抗体陽性検体の最終確認試験は、WB法とアンプリコアあるいはコバスアンプリコアを同時に実施する施設が37.8%で最も多く、次いで、WB法を実施し、陰性または判定保留であった場合に（コバス）アンプリコア法を実施する施設が27.0%であった。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施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した。

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した。

B. 方法

平成 17 年 11 月から平成 18 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 51 施設にコントロール参加案内状を平成 18 年 11 月に郵送した。参加希望施設は計 40 施設であった。参加希望施設に HIV-1 パネル血清、アンケートを平成 18 年 12 月に送付した。その際、検査センター 4 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 19 年 1 月に 39 施設から結果を回収した。キット別ではアンプリコアが 20 施設、コバスアンプリコアが 19 施設、方法別では標準法のみが 13 施設、高感度法のみが 13 施設、標準法および高感度法が 13 施設であった。

HIV-1 パネル血清を以下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、得られた培養上清を 58°C で 40 分間熱処理した。この熱処理の過程はパネル血清の感染性を無くすために本年度から導入したものである。この加熱処理後の培養上清液（母液）の HIV-1 RNA 濃度を RT-nested PCR によるポワソン解析、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ところ、三つの方法による結果はそれぞれ 7.0×10^8 コピー/ml (30 反応)、 $7.8 \pm 2.3 \times 10^8$ コピー/ml (9 回測定)、および $7.2 \pm 1.7 \times 10^8$ コピー/ml (9 回測定) で、三者の間でよく一致していた。そこで、ポワソン解析の結果を元に、HIV-1 陰性であ

ることを確認したヒト血清で母液を希釈し、5 濃度 (150、1,500、7,600、38,000、190,000 コピー/ml) に調製した。標準法用には HIV-1 RNA 濃度 1,500、7,600、38,000、190,000 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 HIV-1 RNA 濃度 150、1,500、7,600、38,000 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 Statcel2 を用いて行った。

C. 結果と考察

<ウイルス液の加熱処理>

今年度は、配布する HIV-1 パネル血清の感染リスクを無くすために、ウイルス液に対して熱処理を施し、*in vitro* 実験においてその効果を検討した。健常人 PBMCs に対する感染実験を行ったところ、培養 7 日目まで p24 抗原量の上昇がまったく見られなかった。p24 の測定限界を考慮すると、感染性は加熱処理前の培養上清に比べて 1/73000 以下であると推定される。一方、加熱処理によってウイルス液の p24 抗原濃度が 18% に低下した。また、RT-nested PCR を用いたポワソン法による RNA 定量値は加熱処理前の 77% であった。これらの結果から、熱処理によるウイルスの失活は主にタンパク質の変性によるものであり、ウイルス RNA 量はほとんど変わらないことが分かった。すなわち、今回の熱処理操作は感染性の無い HIV-1 RNA 定量用標準ウイルス液の調製法として適していると考えられる。

<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。標準法では、施設 28 で 7,600 コピー/ml の試料の測定値が標準値の 3 倍を超えていた。施設 36、39 では 190,000 コピー/ml の測定値が標準値の 3 倍を超えていた。

施設 37 では 190,000 コピー/ml の測定値が標準値の 1/3 を下回っていた。高感度法では、施設で 13、24、27 の 150 コピー/ml の試料の測定値が標準値の 1/3 を下回っていた。施設 15、28 では 1,500 コピー/ml の測定値が標準値の 3 倍を超えていた。施設 4、24、27 では 38,000 コピー/ml の測定値が標準値の 1/3 を下回っていた。また、施設 33 では 38,000 コピー/ml の測定値が標準値の 3 倍を上回っていた。ある試料の測定値が標準値の 3 倍以上あるいは 1/3 以下になった場合、他の試料の測定値も許容範囲内でそれぞれ高めあるいは低めになる傾向があった。このことは、測定値の異常が出る原因が突発的なものではないことを示唆している。測定値の計算、記載方法の誤りにより、報告された全ての測定値が標準値と大きく乖離している施設が 1 施設で見られた。まとめると、許容範囲を外れる結果を出したのは 39 施設中 10 施設 (25.6%) であった。また、全部で 340 の測定値のうち許容範囲に入っていた割合は 96.2% であった。これは昨年度の 97.9% (377/385) を下回っており、測定精度低下を防ぐため、検査環境の整備、手技の確認、検査キットのロット差の検討などを進めていく必要があると考えられる。

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。施設 C で実施された 3 回分のデータのうち、1 回のみ許容範囲を外れる測定値がみられた。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 1)。測定値の許容範囲は標準値の 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 D が高感度法で 7,600 コピー/ml の試料を測定した際にこれを超えたが、それ以外はすべて目標範囲内に収まった。検査センターにおける測定値の日差再現性は、良好であったといえる。

許容範囲を外れるデータのあった施設 (以

下、要再検施設) の出現頻度をアンプリコアとコバスアンプリコアで比較すると、前者が 6/20 (30.0%)、後者が 4/19 (21.1%) となり、試薬間での差は見られなかった。標準法と高感度法はそれぞれ 4/26 (15.4%) と 7/26 (26.9%) で有意差はなかった。検査頻度で分類比較すると (図 3)、有意差はないものの、検査頻度の高い施設ほど測定値の異常が少なくなる傾向があった。また、検査担当者の経験年数が少ない施設に要再検施設が多く見られる一方で、3 年以上の経験を有する担当者の施設でも 25.0% (4/16) が要再検施設となった (図 4)。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施設の頻度は 4/12 (33.3%)、5/23 (21.7%)、1/4 (25.0%) であった。許容範囲を外れるデータのあった施設には、測定工程確認と、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 19 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 2 に示す。測定キットの種類はアンプリコア (的手法) が 51.3%、コバスアンプリコア (自動法) が 48.7% であった。月間依頼数は 10 件未満の施設が 34.5%、200 件以上の施設が 17.2% 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 20~29 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 2.6% であった。検査回数は月に 1 回以内が 23.1%、1 週間に 1 回以内が 35.9% で、半数の施設が多くても 1 週間に 1 回以内であった。61.5% 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 (6 件)、依頼がない (1 件)、必要がない (1 件)、人手がない (1 件) であった。担当技師が 1 人の施設は 35.9% であった。経験年数は 3 年以上が 41.0% であっ

た。作業時間は 5 時間以内が 10.3%、5~8 時間が 79.5%、8 時間以上が 10.3%であり、8 割以上が 8 時間以内に作業を終了している。作業エリアはすべての施設がきちんと分けていた。作業エリアの消毒は 97.4%の施設で実施されており、64.1%が測定前後に行っていた。機器の保守は 52.1%が定期的に、40.0%が不定期に行っており、9 割以上の施設で実施されていた。昨年の実施率 78.0%と比較し、改善された。精度管理は、23.7%の施設がプレートごとに、73.7%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 96.0%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。71.8%の施設が測定に関するトラブルを経験していた。このトラブルの多くは、コバスアンプリコアの動作不良または QS の吸光度不足であった。HIV 抗体陽性検体の最終確認試験は、WB 法とアンプリコアあるいはコバスアンプリコア（以下、アンプリコア法）を同時に実施する施設が 37.8%で最も多く、次いで WB 法を実施し、陰性または判定保留であった場合にアンプリコア法を実施する施設が 27.0%であった。WB 法、アンプリコア法を単独で実施する施設は、それぞれ 5.4%、8.1%であった。その他、アンプリコア法が検出感度未満であったら WB 法（HIV-2 を含む）を実施する施設が 2 施設、WB 法で陰性または判定保留であったらアンプリコア法以外の核酸増幅法（他の NAT 法）を実施する施設が 1 施設、WB 法と他の NAT 法を同時に実施する施設が 1 施設あった。現在、試薬が発売中止となっている HIV DNA 検出試験の必要性については、68.4%が必要と回答した。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 16 件、増幅 DNA の検出が 14 件、濃度の算出が 9 件であった。100%の施設が今後もコントロールサーベイの必要性があると回答した。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。

D. 発表

論文発表

1. Kato, S., Hanabusa, H., Kaneko, S., Takakuwa, K., Suzuki, M., Kuji, N., Jinno, M., Tanaka, R., Kojima, K., Iwashita, M., Yoshimura, Y., and Tanaka, K. (2006) Complete removal of HIV-1 RNA and proviral DNA from semen by the swim-up method: Assisted reproduction technique using spermatozoa free from HIV-1. *AIDS* 20(7):967-973.
2. 須藤弘二, 嶋貴子, 近藤真規子, 加藤真吾, 今井光信. (2007) Real-time PCR を用いた HIV-1 RNA 測定キットの基礎的検討. *感染症学雑誌* 81(1), 1-5.
3. Hamatake, M., Nishizawa, M., Yamamoto, N., Kato, S., and Sugiura, W. A simple competitive RT-PCR assay for quantitation of HIV-1 subtype B and non-B RNA in plasma. *J. Virol. Methods* (in press)

学会発表

1. Shingo Kato, Rie Tanaka, Hideji Hanabusa, Ei Kinai, Masayoshi Negishi. Quantification of intracellular efavirenz in HIV-1-infected patients by LC-MS/MS. XVI International AIDS Conference. 2006, August 13-18, Toronto, Canada.
2. 浜武牧子, 浦野恵美子, 花房秀次, 加藤真吾, Tee Kok Keng, 武部豊, 山本直樹, 駒野淳 「血友病患者におけるエイズ長期未発症例における高力価中和抗体の存在と標的部位の同定」第 20 回日本エイズ学会学術集会 (2006 年 11 月 30 日-12 月 2

- 日、東京)
3. 木内英、岩室紳也、近藤真規子、今井光信、花房秀次、加藤真吾「母子感染予防における AZT 血中濃度」第 20 回日本エイズ学会学術集会 (2006 年 11 月 30 日-12 月 2 日、東京)
 4. 田中理恵、加藤真吾、井土美由紀、林邦彦、今井光信「HIV-1 RNA 定量キットのコントロールサーベイ」第 20 回日本エイズ学会学術集会 (2006 年 11 月 30 日-12 月 2 日、東京)
 5. 須藤弘二、田中理恵、近藤真規子、今井光信、加藤真吾「HIV 感染者 PBMC 中プロウイルスの multiplex nested PCR による構造解析」第 20 回日本エイズ学会学術集会 (2006 年 11 月 30 日-12 月 2 日、東京)
 6. 花房秀次、木内英、太田末緒、和田育子、小島賢一、加藤真吾「血友病 HIV/HCV 肝炎の現状と PEG IFN 治療の課題」第 20 回日本エイズ学会学術集会 (2006 年 11 月 30 日-12 月 2 日、東京)
 7. 加藤真吾、田中理恵、栗原健、田上正、前田憲昭「唾液を用いた抗 HIV 薬の薬物動態の検討」第 20 回日本エイズ学会学術集会 (2006 年 11 月 30 日-12 月 2 日、東京)
 8. 西澤雅子、加藤真吾、三浦秀佳、山本直樹、杉浦互「細胞内における抗 HIV 薬 (プロテアーゼ阻害剤) の薬剤濃度のモニタリング」第 20 回日本エイズ学会学術集会 (2006 年 11 月 30 日-12 月 2 日、東京)
 9. 田上正、北川善政、連利隆、池田正一、加藤真吾、田中理恵、前田憲昭「唾液中の HIV DNA の定量」第 20 回日本エイズ学会学術集会 (2006 年 11 月 30 日-12 月 2 日、東京)

E. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
細胞内薬剤検出法に関する特許出願準備中
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

図1. 標準法による測定値

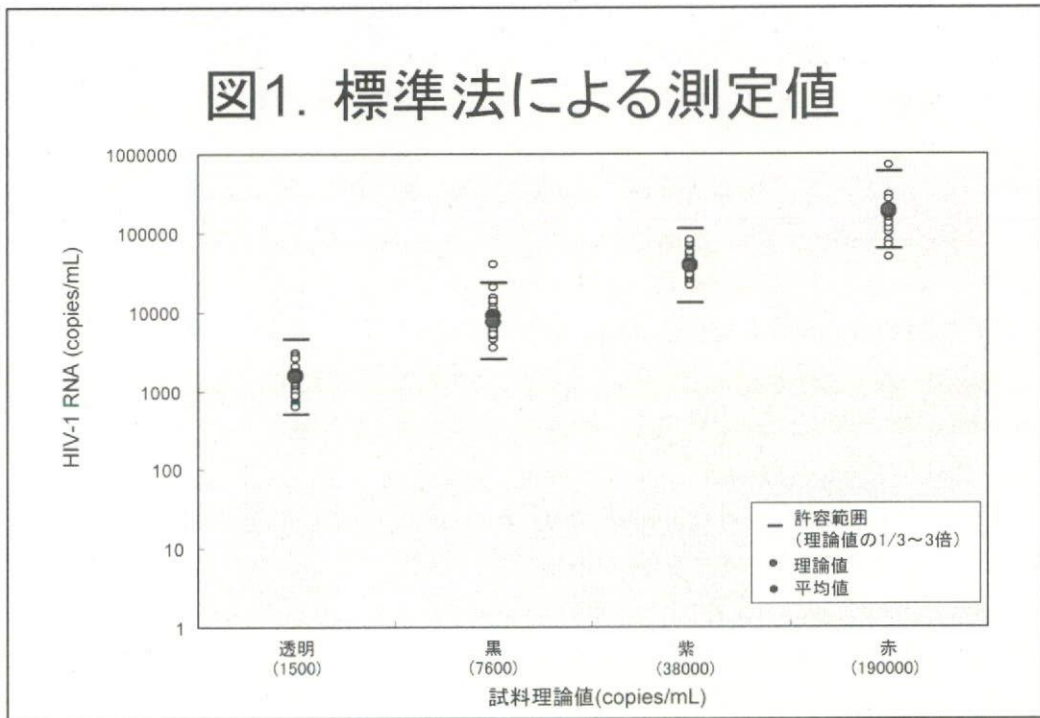


図2. 高感度法による測定値

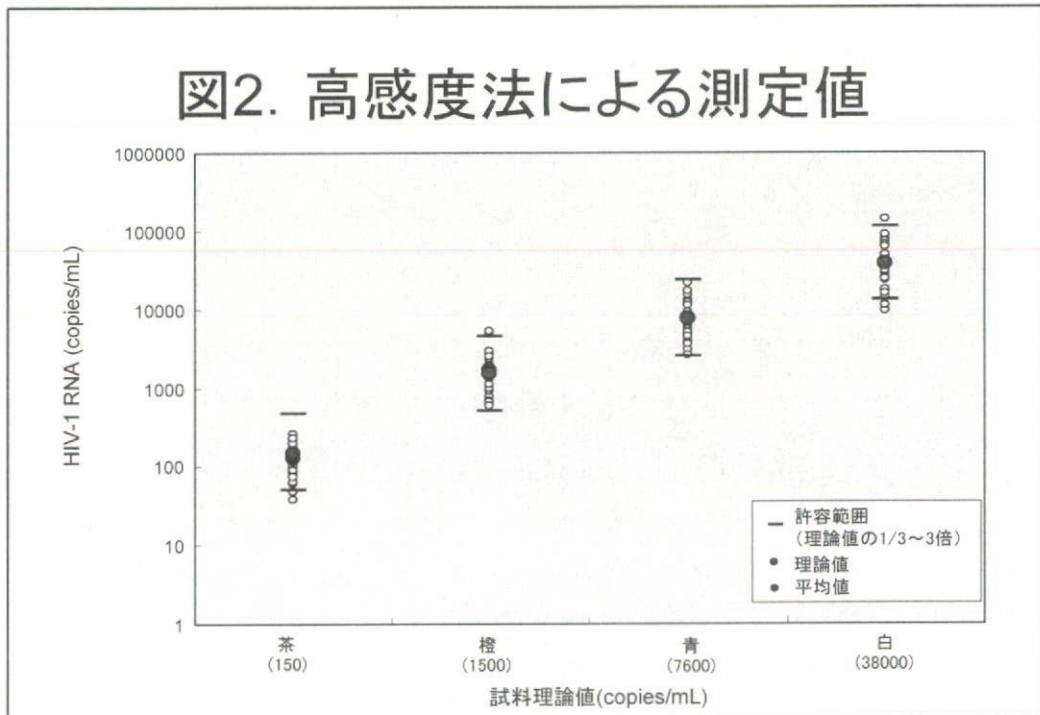


図3. 要再検査施設の頻度
検査頻度による比較

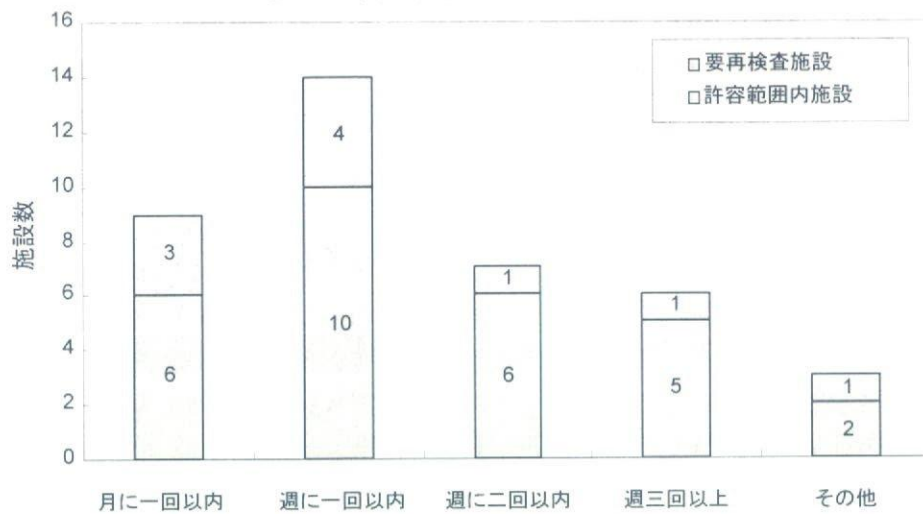


図4. 要再検査施設の頻度
担当者の経験年数の比較

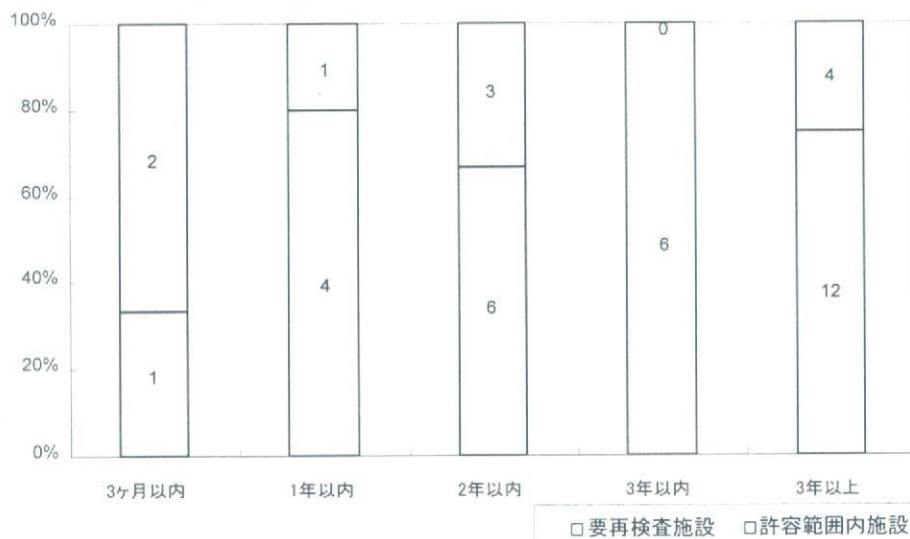


表1. 日差再現性

• 標準法

	検体理論値 (コピー/mL)	施設			
		A	B	C	D
変動係数	1,500	12.06%	5.68%	25.31%	20.35%
	7,600	13.47%	8.45%	21.96%	9.93%
	38,000	9.09%	24.97%	3.85%	9.96%
	190,000	11.18%	35.69%	9.90%	3.77%

平均 14.10%

• 高感度法

	検体理論値 (コピー/mL)	施設			
		A	B	C	D
変動係数	150	17.16%	26.57%	21.82%	25.49%
	1,500	4.33%	10.83%	20.15%	30.89%
	7,600	1.26%	16.43%	13.09%	55.97%
	38,000	6.66%	3.77%	28.43%	22.77%

平均 19.10%

21. HIV 検査技術の技術研修と普及

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 検査を担当する技術者を対象にした技術研修会を平成 18 年 10 月 18 日から 20 日の 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 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。また HIV-1 に加え HIV-2 の検査法についても実習・講義を行った。

A. 研究目的

多剤併用療法(HAART)によって HIV 感染症治療は劇的な効果を上げられるようになったが、薬剤耐性を獲得した HIV の出現が大きな問題として注目されるようになった。また新規感染患者の中には薬剤治療を受けた事が無いにもかかわらず、すでに薬剤耐性 HIV-1 に感染していた症例が報告されており、新規診断における薬剤耐性 HIV-1 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-1 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。また平成 18 年 9 月には日本人で初めての HIV-2 感染患者が国内で報告され、検査業務担当者は HIV-1 だけではなく HIV-2 についても知識や検査技術の習得が求められている。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 18 年 10 月 18 日から 20 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 12 施設

から 12 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-1 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、塩基配列解析を行い、薬剤耐性変異及びサブタイプを決定した。また HIV-1 抗体陽性血清・HIV-2 抗体陽性血清及び HIV 陰性血清を材料とし、PA 法による HIV-1 及び HIV-2 のスクリーニング検査の実習を行った実習にはジェネディア HIV-1/2 Mix PA(富士レビオ)とセロディア・HIV-1/2(型別用)(富士レビオ)をそれぞれ使用した。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

事後評価アンケート調査の結果、実習については約 90%、講義については約 73%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)。しかし講義内容が前年度までとは異なり HIV-2 検査法も網羅するなど多岐に渡ったことと、

研修期間が3日間と短かったことから、講義内容がやや難解・講義のスピードが速いといった意見が寄せられた。また講義に使用したプレゼンテーションの一部が英語で作成されていたため日本語で作成されたプレゼンテーションを希望する意見があった。また確認検査としてロシュのアンプリコア HIV-1 モニター ver. 1.5 の実習を希望する意見が複数あった。今年度は研修会終了後に講義のハンドアウトを資料として研修生に配布した。

D. 考察

今年度は前年度までの研修会とは異なり HIV-1 に加えて HIV-2 も研修範囲とした為、検査経験の少ない研修生から講義内容に関してやや難解であったとの意見が聞かれた。しかしその一方で非常に満足したとの意見もあり、全体として研修生の理解度・習得度は十分であったと思われる。今年度は前年度以前と比較して研修生の人数が少なかったため、実験中の待ち時間が少なく、またきめ細かく指導する事が可能だったため、前年度に比べて実習や実習アシスタントに対する満足度は高かった。今年度も実習生の経験レベルが一定ではなかったため、HIV 検査経験の少ない研修生にとってはやや難解な部分もあったが、2人の研修生に対して1人の実習アシスタントがつく事が可能だった今回は研修生の理解度を上げる上で大きな効果があったと思われる。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る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12施設から12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-1 および HIV-2 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約90%が研修会の実習が、約73%が講義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

論文発表

1. Tomoko Chiba-Mizutani, Hideka Miura, Masakazu Matsuda, Zene Matsuda, Yoshiyuki Yokomaku, Kosuke Miyauchi, Masako Nishizawa, Naoki Yamamoto, Wataru Sugiura: New T-Cell-Based Lines with Two Luciferases for Accurately Evaluating Susceptibility to HIV-1 Drugs. *J Clinical Microbiology*, in press.
2. Hiroyuki Gatanaga, Shiro Ibe, Masakazu Matsuda, Shigeru Yoshida, Tsukasa Asagi, Makiko Kondo, Kenji Sadamasu, Hiroki Tsukada, Aki Masakane, Haruyo Mori, Noboru Takata, Itsuhiro Nakagiri, Rumi Minami, Masao Tateyama, Takao Koike, Toshihiro Itoh, Mitsunobu Imai, Fumitake Gejyo, Mikio Ueda, Motohiro Hamaguchi, Yoko Kojima, Takuma Shirasaka, Akiro Kimura, Masahiro Yamamoto, Jiro Fujita, Shinichi Oka, and Wataru Sugiura: Nationwide Survey of Drug-Resistant HIV-1 Prevalence in Patients Newly Diagnosed with HIV/AIDS in Japan. *Antiviral Research*, in press.
3. Afework Kassu, Masayuki Fujino, Masakazu Matsuda, Masako Nishizawa, Fusao Ota, Wataru Sugiura: Molecular Epidemiology of HIV-1 in Treatment

- Naive Patients in North Ethiopia. *AIDS Research and Human Retroviruses*, in press.
4. Kousuke Miyauchi, Jun Komano, Lay Myint, Yuko Futahashi, Emiko Urano, Zene Matsuda, Tomoko Chiba, Hideka Miura, Wataru Sugiura and Naoki Yamamoto: Rapid propagation of low-fitness drug-resistant mutants of human immunodeficiency virus type 1 by a streptococcal metaboite sparsomycin. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*, 17(4):167-174, 2006
 5. Hirotaka Ode, Saburo Neya, Masayuki Hata, Wataru Sugiura, Tyuji Hoshino: Computational Simulations of HIV-1 Proteases-Multi-drug Resistance Due to Nonactive Site Mutation L90M. *J. AM. Chem. Soc.*, 128:7887-7895, 2006
 6. 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
 7. Deforche K, Camacho R, Grossman Z, Silander T, Soares MA, Moreau Y, Shafer RW, Van Laethem K, Carvalho AP, Wynhoven B, Cane P, Snoeck J, Clarke J, Sirivichayakul S, Ariyoshi K, Holguin A, Rudich H, Rodrigues R, Bouzas MB, Cahn P, Brigido LF, Soriano V, Sugiura W, Phanuphak P, Morris L, Weber J, Pillay D, Tanuri A, Harrigan PR, Shapiro JM, Katzenstein DA, Kantor R, Vandamme AM. : Bayesian network analysis of resistance pathways against protease inhibitors., *Infect Genet Evol.* 2006 Nov 24
 8. Koga I, Odawara T, Matsuda M, Sugiura W, Goto M, Nakamura T, Iwamoto A. : Analysis of HIV-1 sequences before and after co-infecting syphilis., *Microbes Infect.* 2006 Oct 23
 9. Omura M, Furuya K, Kudo S, Sugiura W, Azuma H. : Detecting IgM antibodies against microsporidian *Encephalitozoon cuniculi* polar tubes in sera from healthy and HIV-infected Japanese., *Clin Vaccine Immunol.* 2006 Nov 15
 10. 杉浦 互: 新規 HIV/AIDS 診断症例における薬剤耐性 HIV-1 の動向調査 (2003~2004 年) . 病原微生物検出情報 27(5):119-120, 2006
学会発表
 1. Wataru Sugiura: Drug Resistance assays. *International Conference on Molecular and Cellular Biology of Therapeutics of HIV and Associated Viral Infections.* Jan.12-14, 2007, Hyderabad, India
 2. Hua Yan, Kazuro Shiomi Nobuhiko Nomura, Tomoko Chiba-Mizutani, Hideka Miura,

- Tadakazu Takakura, Haruo Tanaka Wataru Sugiura: New HIV-1 integrase inhibitors identified from small molecule chemical library and microbial metabolites. International Workshop on Discovery of antiviral compounds. Apr. 26-29, 2006, Lubeck, Germany
3. T Ueda, M Itaya, K Tusge, K Fujita, M Matsuda, M Nishizawa, W Sugiura: Reconstruction of HIV-1 full genome clones with *Bacillus subtilis*. HIV Drug Resistance Workshop. Jun 13-17, 2006, Spain
 4. Rajintha M. Bandaranayake, Moses Prabu-Jeyabalan, Junko Kakizawa, Wataru Sugiura, Celia Shiffer: Structural Analysis of HIV-1 CRF01_{AD} Protease in Complex with the Substrate p1-p6. 7th Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance. Nov. 12-15, 2006, Virginia.
 5. Junko Shibata, Masako Nishizawa, Masakazu Matsuda, Wataru Sugiura, Fengrong Ren, Hiroshi Tanaka: Analysis of Co-Evolution Between Mutations in Protease Inhibitor Resistance and in Gag. 7th Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance. Nov. 12-15, 2006, 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. Hua Yan, Nobuhiko Nomura, Tomoko Chiba-Mizutani, Hideka Miura, Tadakazu Takakura, Satoshi Takeda, Wataru Sugiura: New HIV-1 integrase inhibitors identified from small molecule chemical library. 第16回抗ウイルス化学療法研究会. 2006年5月26-27日, 福島
 9. 岩谷靖雅, レビンジュディス, 杉浦 互: APOBEC3GのHIV-1の逆転写阻害メカニズム. 第54回日本ウイルス学会学術集会. 2006年11月19日~21日, 名古屋
 10. 三浦秀佳, 千葉智子, 滝澤万里, 松田昌和, 西澤雅子, 本多三男, 杉浦 互: ヒト細胞由来レポーター細胞 MARRBLE を用いた臨床分離株薬剤感受性検査の評価. 第54回日本ウイルス学会学術集会. 2006年11月19日~21日, 名古屋
 11. 柴田潤子, 西澤雅子, 松田昌和, 長谷川直紀, 吉田いづみ, 杉浦 互, 任 鳳蓉, 田中 博: 抗 HIV 剤治療下における Protease と Gag の相互干渉と共進化に関する解析. 第54回日本ウイルス学会学術集会. 2006年11月19日~21日, 名古屋
 12. 杉浦 互: HIV 遺伝子検査の進歩と今後の課題-本邦における薬剤耐性検査の現状と今後の展望-. 第20回日本エイズ学会学術集会. シンポジウム 1, 2006年11月30日, 東京
 13. 小池 満, 三好 洋, 山口洋子, 奥瀬千晃, 中島由紀子, 井上靖之, 鈴木貴雄, 高橋正知, 三浦偉久男, 杉浦 互, 中島秀喜: HIV/HIB 重複感染例の検討-. 第20回日本エイズ学会学術集会. 2006年11月30日-12月2日, 東京
 14. 古賀一郎, 小田原 隆, 松田昌和, 杉浦

互, 後藤美江子, 中村哲也, 岩本愛吉: 良好な HIV 治療中に合併した梅毒感染前後での HIV プロウィルス塩基配列の変化. 第 20 回日本エイズ学会学術集会. 2006 年 11 月 30 日-12 月 2 日, 東京

15. 大出裕高, 松山 翔, 柿澤淳子, 杉浦 互, 星野忠次: CRF01_AE HIV-1 における NFV 耐性変異 N88S の出現メカニズムに関する構造学的知見. 第20回日本エイズ学会学術集会. 2006 年 11 月 30 日-12 月 2 日, 東京
16. 藤崎誠一郎, 藤崎彩恵子, 伊部史朗, 浅黄 司, 吉田 繁, 正兼亜季, 大家正泰, 渡邊香奈子, 瀧永博之, 松田昌和, 貞升健志, 岡田清美, 近藤真規子, 奏 眞美, 溝上泰司, 森 治代, 南 留美, 杉浦 互, 金田次弘: HIV-1 遺伝子型薬剤耐性検査のバリデーション. 第20回日本エイズ学会学術集会. 2006 年 11 月 30 日-12 月 2 日, 東京
17. 西澤雅子, 加藤真吾, 三浦秀佳, 山本直樹, 杉浦 互: 細胞内における抗 HIV 薬 (プロテアーゼ阻害剤) の薬剤濃度のモニタリング. 第20回日本エイズ学会学術集会. 2006 年 11 月 30 日-12 月 2 日, 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表