

原 著

日本における HIV-1 遺伝子型薬剤耐性検査のコントロールサーベイ

藤崎誠一郎¹⁾, 藤崎彩恵子¹⁾, 伊部 史朗¹⁾, 浅黄 司²⁾, 伊藤 俊広²⁾, 吉田 繁³⁾,
小池 隆夫⁴⁾, 大家 正泰⁵⁾, 渡邊香奈子⁶⁾, 正兼 亜季⁷⁾, 上田 幹夫⁸⁾, 鴻永 博之⁹⁾,
松田 昌和¹⁰⁾, 貞升 健志¹¹⁾, 長島 真美¹¹⁾, 岡田 清美¹²⁾, 近藤真規子¹³⁾,
秦 真美¹⁴⁾, 溝上 泰司¹⁵⁾, 森 治代¹⁶⁾, 南 留美¹⁷⁾,
白阪 琢磨¹⁵⁾, 岡 慎一⁹⁾, 杉浦 互¹⁰⁾, 金田 次弘¹⁾

¹⁾名古屋医療センター臨床研究センター血液免疫研究部, ²⁾仙台医療センター臨床検査科, ³⁾北海道大学病院検査部, ⁴⁾北海道大学医学部第二内科, ⁵⁾新潟大学大学院医歯学総合研究科, ⁶⁾新潟保健環境科学研究所, ⁷⁾石川県立中央病院中央検査部, ⁸⁾石川県立中央病院血液免疫内科, ⁹⁾国立国際医療センターエイズ治療・研究開発センター, ¹⁰⁾国立感染症研究所エイズ研究センター, ¹¹⁾東京都健康安全研究センター微生物部, ¹²⁾北里大塚バイオメディカルアッセイ研究所, ¹³⁾神奈川県衛生研究所微生物部, ¹⁴⁾愛知県衛生研究所微生物部, ¹⁵⁾大阪医療センター HIV/AIDS 先端医療開発センター, ¹⁶⁾大阪府立公衆衛生研究所ウイルス課, ¹⁷⁾九州医療センター免疫感染症科臨床研究部

目的: 日本で HIV-1 遺伝子型薬剤耐性検査を実施しているほとんどの施設は, 国立感染症研究所が開発した方法を参考にした in-house の手法を用いて検査を行っている。しかし, これらの施設が実施している HIV-1 遺伝子型薬剤耐性検査の質は, 今までに評価を受けたことがない。我々は, 日本で薬剤耐性検査を実施している 15 施設について, 検査の精度と信頼性を調べることを目的としてコントロールサーベイを実施した。

材料および方法: HIV-1 遺伝子型薬剤耐性検査を実施している 15 施設で, 2 種類のクローン化薬剤耐性 HIV-1 RNA を用いて薬剤耐性検査を実施し, その検査結果を評価した。

結果: HIV-1 遺伝子型薬剤耐性検査の質は, 正解率が 97.3% と, 非常に高いことが明らかとなった。誤答の原因は, 不適切なプライマーの使用, エレクトロフォレグラムの乱れ及び, 人為的誤りなどであった。

結論: 日本で実施されている HIV-1 遺伝子型薬剤耐性検査の水準は高い事が明らかになった。しかしその水準をより一層向上させるために, 今回明らかになった問題に対して解決法を提案した。

キーワード: AIDS, HIV-1, HIV-1 遺伝子型薬剤耐性検査, コントロールサーベイ

日本エイズ学会誌 9: 136-146, 2007

緒 言

HIV-1 感染症治療において, HAART (highly active anti-retroviral therapy) は, ウイルス複製を強力に抑制し, 長期にわたり血中ウイルス量を検出限度以下に維持することを可能とした^{1,2)}。HAART による治療効果は通常, 血中ウイルス量でモニタリングされている。血中ウイルス量が, 検出限度以下に一旦抑制されたにもかかわらず, 再び増加した場合には, 薬剤耐性 HIV-1 の出現が疑われる³⁻⁶⁾。この場合, 遺伝子型薬剤耐性検査によって, 治療薬剤の標的酵素であるプロテアーゼおよび逆転写酵素のアミノ酸配列を決定し, HIV-1 が薬剤耐性を獲得しているかどうかを鑑別し

ている。同時に, 変更可能な抗 HIV-1 薬を選択するための情報も得ることができる⁷⁻¹¹⁾。最近, 薬剤耐性 HIV-1 が未治療患者からも検出されることから^{12,13)}, HAART 開始前にも本検査の実施が推奨されている。このように, 遺伝子型薬剤耐性検査は治療を最適化するために必須の検査である^{14,15)}。

現在, 日本で HIV-1 遺伝子型薬剤耐性検査を実施しているほとんどの施設は, in-house の手法を用いて検査を行っている。しかし, これらの施設が実施している HIV-1 遺伝子型薬剤耐性検査の質は, 今までに評価を受けたことがない。我々は将来, HIV-1 遺伝子型薬剤耐性検査を標準化することが重要と考え¹⁶⁻¹⁹⁾, 以下の検討を行っている。まず, 各施設で使用している試薬・プライマー・塩基配列解析装置を調査し, 第二段階として, HIV-1 クローンをを用いたコントロールサーベイを実施し, 検査結果の解析を通して改良点を抽出する。第三段階として, 改善された検査条件下で臨床検体を用いたコントロールサーベイを実施し, 本検

著者連絡先: 金田次弘 (〒460-0001 愛知県名古屋市中区三の丸 4-1-1 国立病院機構名古屋医療センター 臨床研究センター血液免疫研究部)
FAX: 052-955-1878

2006年11月14日受付; 2007年3月20日受理

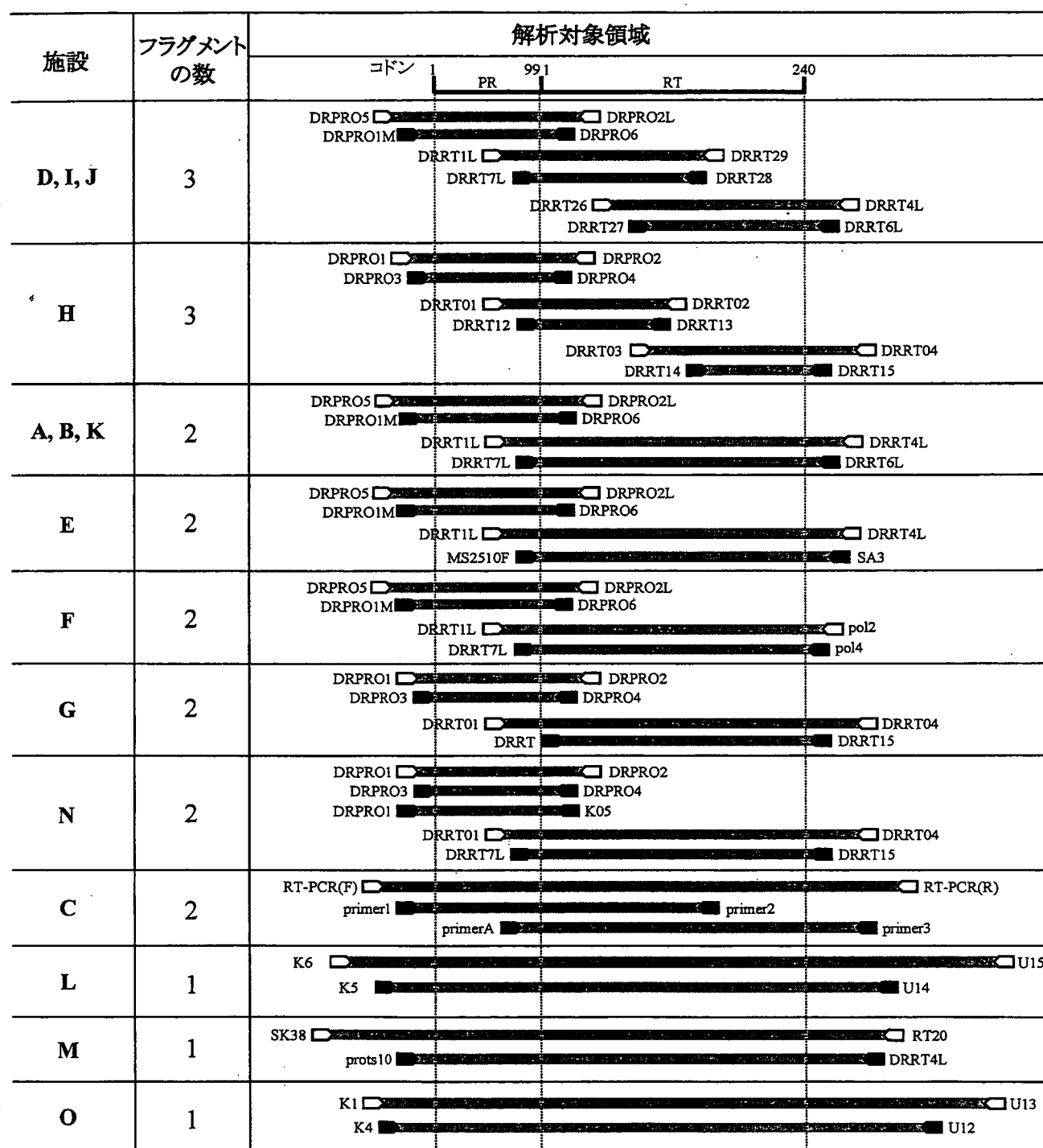


図 1 HIV-1 に対するプライマーの結合位置と、PCR による増幅領域
 RT-PCR および、nested PCR に使用されたプライマーをそれぞれ、白および黒の矢印で示した。プライマー名の左に示した A から O のアルファベットは、それらのプライマーを使用した 15 施設を表している。

表 1 各施設で用いられた試薬および塩基配列解析装置

RT-PCR 試薬	施設数
One-step RT-PCR 法	12
・ One Step RT-PCR (TaKaRa)	10
・ SuperScript Onestep RT-PCR for Long Template (Invitrogen)	2
Two-step RT-PCR 法	3
・ RNA PCR Kit (AMV) ver. 3.0 (TaKaRa)/Ex Taq HS (TaKaRa)	1
・ AMV Reverse Transcriptase XL (TOYOBO)/Ampli Taq (Applied Biosystems)	1
・ M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen)/Taq DNA polymerase (Greiner)	1
Nested PCR 試薬	施設数
・ Ex Taq (TaKaRa)	5
・ Ampli Taq (Applied Biosystems)	3
・ LA Taq (TaKaRa)	2
・ KOD polymerase (TOYOBO)	2
・ Ex Taq HS (TaKaRa)	1
・ PCR Master Mix (Promega)	1
・ Taq DNA polymerase (Biotech International)	1
標識試薬	施設数
Big Dye Terminator V1.1 (Applied Biosystems)	8
Big Dye Terminator V3.1 (Applied Biosystems)	5
CEQ Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start kit (Beckman Coulter)	1
Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit (USB)/IRDye TM 800 v2 Terminator Mixes (LI-COR)	1
標識産物の精製試薬	施設数
CENTRI SEP Spin Columns (Applied Biosystems)	5
Sephadex G-50 (GE Healthcare Bio-Sciences)	3
DyeEx 2.0 Spin Kit (QIAGEN)	1
エタノール沈殿法	6
塩基配列解析装置	施設数
ABI PRISM 310 (Applied Biosystems)	10
BECKMAN COULTER CEQ 8000 (Beckman Coulter)	1
LI-COR 4200 IR2 system (LI-COR)	1
ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems)	1
ABI PRISM 3100 Avant (Applied Biosystems)	1
ABI PRISM 3730S (Applied Biosystems)	1

査の標準化に必須の課題の整理を目指している。本論文では現在までに終了した第一段階および、第二段階の結果について報告する。

表 2 コントロールサーベイの結果

(a) クローン #1 の結果

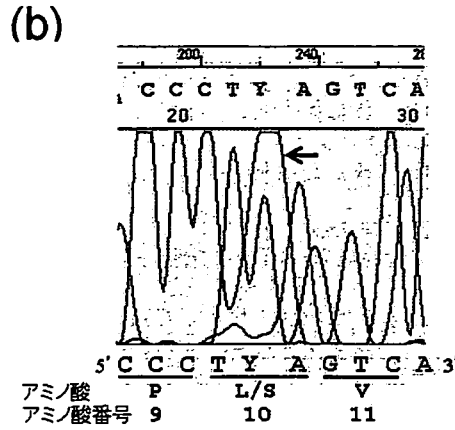
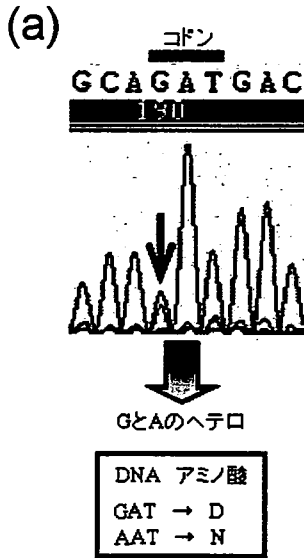
	アミノ酸変異	正解した施設数 (正解率, %)	誤答の内容
PR	V3I	13/15 (86.7)	施設 B は I3V と報告。施設 H は報告無し。 施設 G と H は報告無し。 施設 H は報告無し。 施設 G と H は報告無し。
	E35D	13/15 (86.7)	
	S37N	14/15 (93.3)	
	R41K	13/15 (86.7)	
	L63P*	15/15 (100)	施設 H は報告無し。 施設 A は A71V と報告。施設 G は報告無し。 施設 E と F は D29N および C95W をそれぞれ報告していた。これらはクローン #1 には存在していないアミノ酸変異であった。
	K70R	14/15 (93.3)	
	A71T*	13/15 (86.7)	
	V77I*	15/15 (100)	
Ghost mutations	—		
RT	A62V*	15/15 (100)	施設 C は報告無し。 施設 C は報告無し。 施設 C は報告無し。
	S68G	14/15 (93.3)	
	T69V	15/15 (100)	
	V75I*	15/15 (100)	
	F77L*	15/15 (100)	
	F116Y*	15/15 (100)	
	E122K	15/15 (100)	
	Q151M*	15/15 (100)	
	Q197E	14/15 (93.3)	
	R211K	14/15 (93.3)	

(b) クローン #2 の結果

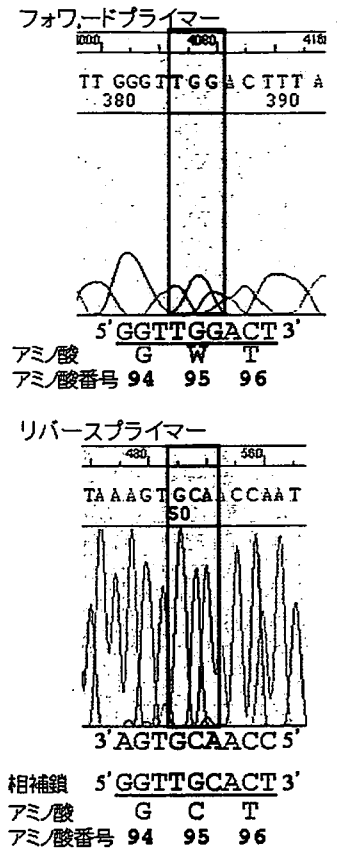
	アミノ酸変異	正解した施設数 (正解率, %)	誤答の内容
PR	V3I	15/15 (100)	施設 F は L10L/S と報告。 施設 D は報告無し。 施設 E は E34K を、施設 F は R41K および T96S をそれぞれ報告していた。これらはクローン #2 には存在していないアミノ酸変異であった。
	L10I*	14/15 (93.3)	
	I15V	15/15 (100)	
	S37D	15/15 (100)	
	L63P*	15/15 (100)	
	V77I*	15/15 (100)	
	L90M*	14/15 (93.3)	
	I93L	15/15 (100)	
Ghost mutations	—		
RT	V35T	14/14 (100)	施設 G は使用したプライマーの組み合わせにより V35T を含む領域が解析対象外であった。 施設 G は使用したプライマーの組み合わせにより T39A を含む領域が解析対象外であった。 施設 K は T69S-SG 挿入変異を、薬剤耐性変異ではないアミノ酸変異として報告していた。 施設 H は使用したプライマーの組み合わせにより E122K を含む領域が解析対象外であった。 施設 H は使用したプライマーの組み合わせにより I135T を含む領域が解析対象外であった。 施設 L は報告無し。 施設 N は、クローン #2 には存在していないアミノ酸変異である I31T を報告していた。
	T39A	14/14 (100)	
	M41L*	15/15 (100)	
	K43E	15/15 (100)	
	T69S-SG* insertion	14/15 (93.3)	
	E122K	14/14 (100)	
	I135T	14/14 (100)	
	R172K	15/15 (100)	
	D177E	15/15 (100)	
	G190A*	15/15 (100)	
	Q207H	15/15 (100)	
	L210W*	15/15 (100)	
	R211K	15/15 (100)	
	L214F	15/15 (100)	
	T215Y*	15/15 (100)	
	K238S	14/15 (93.3)	
	Ghost mutations	—	

*印は薬剤耐性アミノ酸変異

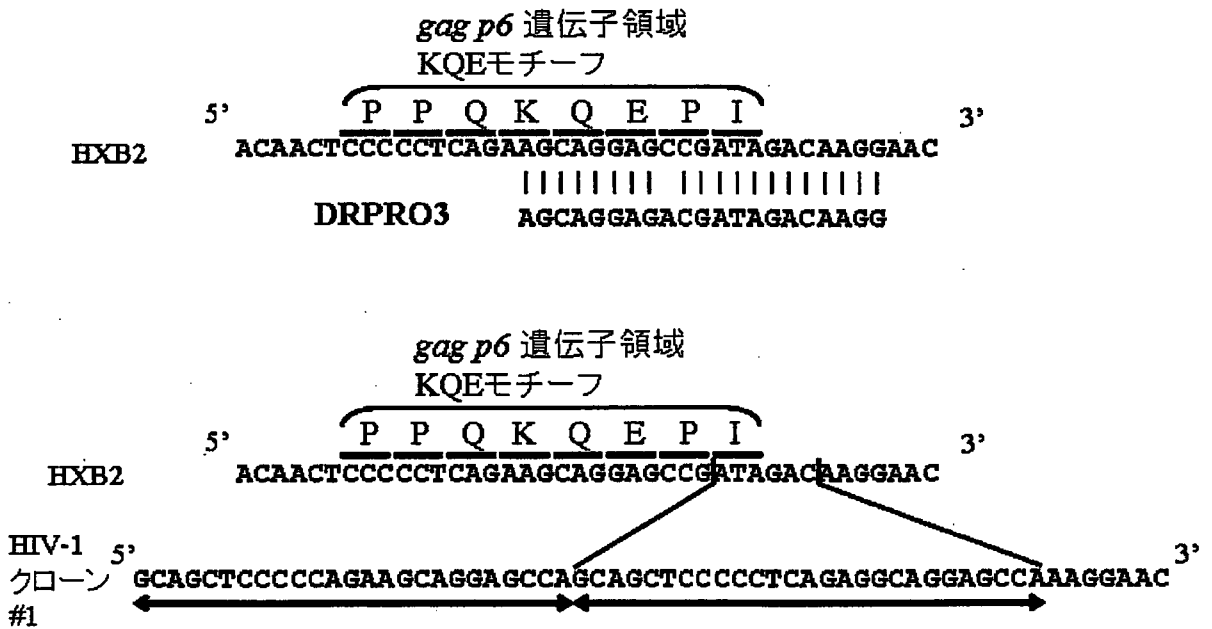
(I)



(II)



(III)



材料および方法

クローン化薬剤耐性 HIV-1 の作製と発現

各施設からの検査結果の正誤を明瞭にするために、単一な RNA ゲノムをもつクローン化薬剤耐性 HIV-1 を 2 種類作製した。まず、多剤耐性 HIV-1 を有する 2 名の患者の血漿検体から HIV-1 RNA を、QIAamp Viral RNA Kit (QIAGEN, CA, USA) を用いて精製した。次に、*gag* (アミノ酸番号 412 番から 500 番)、プロテアーゼ (PR, アミノ酸番号 1 番から 99 番)、逆転写酵素 (RT, アミノ酸番号 1 番から 260 番) の遺伝子領域を含む 1.3kb の DNA 断片を、RT-PCR にて増幅した。RT-PCR は、Superscript One-Step RT-PCR (Invitrogen, CA, USA), K1 (5'-AAG GGC TGT TGG AAA TGT GG-3'), U13 (5'-CCC ACT CAG GAA TCC AGG T-3') プライマーを用いた。Nested PCR は LA Taq (Takara, Shiga, Japan), INF-ApaI (5'-TGC TGG GCC CCT AGG AAA AAG G-3'), INF-NheI (5'-TCT GGC TAG CCC AAT TCA ATT TTC CCA C-3') プライマーを用いて行った。増幅した DNA は ApaI (Takara), NheI (New England Biolabs, MA, USA) で処理し、得られた ApaI-NheI 断片を HXB2 感染性クローンである pSUM9²⁰⁾ (National Cancer Institute, 熊本大学, 満屋教授から供与していただいた) に組み込んだ。次いで、Lipofectamin (Invitrogen) を用いて、作製した感染性クローンを 40% コンフルエントの MT-2 細胞に遺伝子導入した。細胞は 10% 仔ウシ血清を含む RPMI1640 を用いて、5% CO₂ 濃度、37°C で培養した。遺伝子導入の 4 日後、0.2ml の培養上清を、5×10⁴ 個/4.8ml の MT-4 細胞に移し、さらに 3 日間培養後、ウイルスを含む培養上清を回収し、-80°C で保存した。

HIV-1 RNA の調製

HIV-1 粒子を超遠心 (23,000×g, 1 時間, 4°C) により沈降させ、PBS (-) による洗浄を 2 回行った。次に沈降物を 100μl の PBS (-) に懸濁し、3U のデオキシリボヌクレアーゼ (Nippon Gene, Tokyo, Japan) を添加して 37°C, 15 分間 DNA 分解処理を行った。その後、23,000×g, 1 時間、4°C の条件下で遠心し、沈降物を PBS (-) で洗浄した。RNA は QIAamp Viral RNA Kit を用いて精製し、2×10⁴ コピー数の HIV-1 RNA を 2ml PBS (-) に懸濁して -80°C で保存した。凍結した HIV-1 RNA 検体をドライアイスと共に梱包し、15 施設へ送付した。また、HIV-1 RNA のコピー数は Nagai ら²¹⁾ の方法を用いてリアルタイム PCR にて測定した。

HIV-1 遺伝子型薬剤耐性検査

遺伝子型薬剤耐性検査は、国立感染症研究所、国立国際医療センター、HIV/AIDS ブロック拠点病院 8 施設、地方衛生研究所 4 施設、そして民間臨床検査会社 1 施設で実施した。本研究では、HXB2 株または NL4-3 株のアミノ酸配列と、解析したアミノ酸配列を比較し、薬剤耐性アミノ酸変異については International AIDS Society-USA (IAS-USA) panel, version March/April 2005²²⁾ に基づいて定義した。各施設からは、薬剤耐性およびその他のアミノ酸変異を示した検査報告書、使用したプライマーの塩基配列、エレクトロフォログラム、そして解析した塩基およびアミノ酸配列の報告を受けた。各施設から報告されたアミノ酸変異は名古屋医療センターの解析結果を基準として評価した。

図 2 誤判定を引き起こした 3 つの原因

(I) (a) ノイズを伴ったエレクトロフォログラムによって誤判定が引き起こされた例

HIV-1 クローン #1 の PR 遺伝子領域にて、施設 E は本来存在していないアミノ酸 D29N を報告していた。これは、矢印で示した A (緑色) のノイズをシグナルと判定したことにより解析を誤ったためである。

(b) エレクトロフォログラム上の巨大ノイズシグナルによって誤判定が引き起こされた例

(II) 不明瞭なエレクトロフォログラムを解析したことによって誤判定が引き起こされた例

リバースプライマーを用いて得たエレクトロフォログラムは鮮明であり、アミノ酸番号 95 番は TGC と正確に判断できていた。にも拘わらず、不明瞭なエレクトロフォログラムを解析し、TGG と誤判断していた (施設 F)。

(III) 鋳型に対する結合能を欠失していた PCR プライマーを用いたことにより、誤判定が引き起こされた例

Gag 遺伝子の KQE モチーフ領域内に起きた重複により、DRPRO3 プライマーの 3' 側結合部位が欠失していた。重複配列を矢印で示した。

結 果

試薬、プライマー及び塩基配列解析装置の調査

今回の調査の結果、コントロールサーベイに参加した全15施設で使用されている試薬、プライマー及び塩基配列解析装置は施設によってかなり多様であった。図1にプライマーの名称および、PCRにより増幅される遺伝子領域を示した。RT-PCR および nested PCR に使用された試薬、標識試薬、標識産物の精製に用いられた試薬、塩基配列解析装置は表1に示した。

アミノ酸変異検出についての評価

各施設から提出された HIV-1 アミノ酸変異検出結果を表2に示した。HIV-1 クローン #1 に含まれている全アミノ酸変異を正しく検出していた施設は、15施設中8施設であり、#2については15施設中7施設であった。そこで、アミノ酸変異が誤判定された事例について、使用されたプライマー、エレクトロフォレグラム、および塩基配列・アミノ酸配列のファイルを精査し、誤判定を引き起こした原因を解明した。

HIV-1 クローン #1 の PR 領域には3つの薬剤耐性アミノ酸変異 (L63P, A71T, V77I) と、その他のアミノ酸変異が5つ (V3I, E35D, S37N, R41K, K70R) 存在している (表2 (a))。9施設はこれら8つのアミノ酸変異を正しく報告していたが、残り6施設の報告には誤答があった。具体的には、施設AはA71TをA71Vとして、またBはV3IをI3Vとしてそれぞれ報告していた。これらの施設が提出したDNAおよびアミノ酸のファイルでは変異が正しく検出されていることから、この誤答は報告書作成時の人為的誤りと判断した。施設EとFは、本クローンには存在しないアミノ酸変異D29NとC95Wを報告していた。施設Eの誤答は、エレクトロフォレグラムに出現した高レベルのノイズシグナルが原因であった (図2 (I) (a))。施設Fは、人による編集を経していない、自動解析による波形データの解析結果を採用し、かつ、正確に解析していたリバースプライマーを用いた解析結果を無視していた (図2 (II))。施設GとHは、大きく異なるアミノ酸変異を報告した。これは、nested PCR に用いたフォワードプライマー (DRPRO-3) が不適切であったことに起因している (図2 (III))。HIV-1 クローン #1 の gag タンパク質のアミノ酸番号470番から478番 (KQEモチーフを含む) に相当する塩基配列の重複によってDRPRO3の結合部位は欠失していた。このことから、DRPRO3を用いたPCRではHIV-1 クローン #1 の PR 領域のDNA断片を増幅することは不可能であった。

クローン #1 の RT 領域内には、5つの薬剤耐性アミノ酸変異 (A62V, V75I, F77L, F116Y, Q151M) と、その他5つ

のアミノ酸変異 (S68G, T69V, E122K, Q197E, R211K) が存在している (表2 (a))。14施設はこれらの10アミノ酸変異を正確に報告していた。施設Cは、3つのアミノ酸変異、S68G, Q197E, R211Kについて、DNAおよびアミノ酸配列のファイルでは正しく検出していたにもかかわらず、検査の最終報告書にはこれらの変異を記載していなかった。

HIV-1 クローン #2 の PR 領域には4つの薬剤耐性アミノ酸変異 (L10I, L63P, V77I, L90M) と、その他のアミノ酸変異が4つ (V3I, I15V, S37D, I93L) 存在している (表2 (b))。12施設はこれらのアミノ酸変異を正しく報告していたが、施設D, E, Fの報告には誤答が含まれていた。施設Dは、塩基配列ファイルではアミノ酸番号90番のコードン“ATG”を正確に検出していたが、翻訳後のアミノ酸ファイルではL90Mを報告していなかった。施設Eは、クローン #2 に存在しないアミノ酸変異E34Kを報告していた。これはエレクトロフォレグラムに出現した高レベルのノイズシグナルによって引き起こされたものであった。施設Fは、エレクトロフォレグラムが乱れていたことにより、クローン #2 に存在しないアミノ酸変異R41K, T96Sを報告していた。さらに、エレクトロフォレグラムに現れた、巨大なノイズシグナルによりアミノ酸変異L10IをL10L/Sと報告していた (図2 (I) (b))。このピークは、標識反応後の、精製過程で未反応のダイデオキシヌクレオチドの除去が不完全であったことに起因していると判断した。

クローン #2 の RT 領域内には、5つの薬剤耐性アミノ酸変異 (M41L, T69S-SG 挿入, G190A, L210W, T215Y) と、その他に11のアミノ酸変異 (V35T, T39A, K43E, E122K, I135T, R172K, D177E, Q207H, R211K, L214F, K238S) が存在している (表2 (b))。10施設はこれら16アミノ酸変異を正確に報告していた。一方、施設G, H, K, L, Nからの報告書に誤りがあった。まず、施設GとHの誤答についてであるが、使用したプライマーの組み合わせにより施設Gはアミノ酸番号1番から39番の領域を、施設Hはアミノ酸番号122番から135番の領域を増幅することが不可能であった。その結果、施設GはV35TとT39A、施設HはE122KとI135Tを報告していなかった。よって、施設GとHの誤答は評価対象外とした。次に、施設Kは、T69S-SG挿入変異を正しく検出していたが、薬剤耐性ではないアミノ酸変異として報告していた。施設Lは、K238Sについてアミノ酸ファイルでは正しく検出しているのにも拘わらず報告書に記載していなかった。また、施設Nはクローン #2 の RT 領域内に存在していないアミノ酸変異I31Tを報告しており、この誤答はクローン #1 の PR 領域内で施設Eが起こした誤りと同様であった。

表 3 誤答を引き起こした原因のまとめ

分類	誤答を引き起こした原因
技術的誤り 9 (1.4%)	不適切なプライマーの使用 ノイズを伴ったエレクトロフォレグラム
	報告書への誤記入 6 (1.0%)
人為的誤り 8 (1.3%)	アミノ酸変異を分類する際の誤った判断 1 (0.2%)
	コドンの誤った翻訳 1 (0.2%)
全問題点 17 (2.7%)	

誤答の分類

全体をまとめると、17個の誤答があった(表3)。クローン#1と#2を合わせると42個のアミノ酸変異が存在し、また、施設GとHについては、クローン#2のRT領域で4個のアミノ酸変異を評価対象外としていることから、全15施設から報告されるべきアミノ酸変異の総数は626個である。よって、正解率は97.3%であり、誤答率は2.7%であった。誤答を引き起こした原因を分類すると、技術的誤りが1.4%、人為的誤りが1.3%であった。人為的誤りは、報告書への誤記入が1.0%、アミノ酸変異を薬剤耐性変異もしくはその他の変異に分類する際の判断の誤りが0.2%、コドンを翻訳する際の誤りが0.2%であった。技術的誤りは、高いノイズを伴ったエレクトロフォレグラムに起因する不正確な解析と、不適切なプライマーの使用が原因であった。

考 察

我々は今回、2種類のHIV-1クローンを試験標本に採用し、コントロールサーベイを実施した。その結果、全検出アミノ酸変異の正答率は97.3% (609/626) という良好な成績を示した。しかし、改善すべき問題点も明らかになった。アミノ酸変異が誤判定された事例については、該当施設が使用したプライマー、エレクトロフォレグラム、および塩基配列・アミノ酸配列のファイルを精査することで、誤答を引き起こした原因を解明した。その結果、誤答の原因を3つに分類することができた。

第一の原因は、使用するプライマーの問題である。Gag p6内のKQEモチーフが重複したHIV-1に対しては結合しない、初期に使用されていたプライマーDRPRO3が現在も2施設で使用されていた。この2施設では、クローン#1に含まれているアミノ酸変異とは大きく異なるアミノ

酸変異を報告していた。第二の原因は、ノイズを伴ったエレクトロフォレグラムを判読したことに起因している。これには3施設が該当した。第三の原因は、人為的誤りである。報告書作成時の誤記入とコドンの誤った翻訳が4施設でみられた。

これら3つの原因に対する解決策を以下に示す。

第一の原因は、初期のプライマーから改良したプライマーの情報について、施設間の情報伝達が徹底されていなかったことに起因している。DRPRO3は1996年に国立感染症研究所が開発したプライマーであるが、KQEモチーフに挿入変異の存在が報告²³⁻²⁵⁾されてからは使用が中止され、新しいプライマーであるDRPRO3Nの使用に変更されている。したがって、DRPRO3Nをプライマーとして用いればこの問題は即解決できる。今後、最新のプライマー情報と塩基配列決定領域内の新規検出変異や挿入、欠失に関するHIV-1塩基配列情報を少なくとも年に一度は全関係施設に配布する等の、検査水準をバックアップする体制を充実することによりプライマー問題は根絶できると思われる。また、注目すべきことに、施設C, L, M, Oで独自に開発されたプライマーも、国立感染症研究所で開発された最新のプライマーと同様に機能していた。

第二の原因は、明瞭なエレクトロフォレグラムを得ることで克服可能である。そのためには、精製度の高いプライマー、すなわち、HPLC精製グレードのプライマーの使用が必須である。また、当然のことであるが、新鮮なバッファー、ゲルを用いて塩基配列解析を実施することが重要である。さらに、フォワードプライマーを用いて解析したエレクトロフォレグラムの質が悪く、解析が不正確になる場合には、リバースプライマーも用いて解析を行うことで、塩基配列決定の正確性を高めることができる。

第三の原因克服は、解析を自動化することによって可能である。例えば、我々が使用しているDNA配列解析ソフトウェアSeqScape (Applied Biosystems) では、エレクトロフォレグラムからDNA配列およびアミノ酸配列を作成し、変異アミノ酸を検出する過程の自動化が可能である。人為的誤りを無くすソフトウェアの普及と充実がこの問題克服に必要である。

なお、異なる試薬、および塩基配列解析装置の機種の違いが誤りの原因と疑われた事例はなかった。

このように今回、HIV-1遺伝子型薬剤耐性検査で起こり得る誤りの原因を追究し、それに対する解決法を提案した。各施設に送付した今回のコントロールサーベイの評価に基づいて種々の改善を図ることにより、HIV-1遺伝子型薬剤耐性検査の精度向上が期待される。次回は、第三段階として臨床検体を用いたコントロールサーベイの実施を計画している。

謝辞：本研究は、厚生労働省エイズ対策事業「薬剤耐性 HIV 発生動向把握のための検査方法・調査体制確立に関する研究」班 (No. H-16-エイズ-002, 杉浦班) の班研究として推進した研究である。藤崎誠一郎、藤崎彩恵子はエイズ予防財団のリサーチレジデントとして本研究に参画した。

文 献

- 1) Hammer SM, Squires KE, Hughes MD, Grimes JM, Demeter LM, Currier JS, Eron JJJr, Feinberg JE, Balfour HHJr, Deyton LR, Chodakewitz JA, Fischl MA : A controlled trial of two nucleoside analogues plus indinavir in persons with human immunodeficiency virus infection and CD4 cell counts of 200 per cubic millimeter or less. AIDS Clinical Trials Group 320 Study Team. *N Engl J Med* 337 : 725-733, 1997.
- 2) Montaner JS, Reiss P, Cooper D, Vella S, Harris M, Conway B, Wainberg MA, Smith D, Robinson P, Hall D, Myers M, Lange JM : A randomized, double-blind trial comparing combinations of nevirapine, didanosine, and zidovudine for HIV-infected patients. *JAMA* 279 : 930-937, 1998.
- 3) Shafer RW, Winters MA, Palmer S, Merigan TC : Multiple concurrent reverse transcriptase and protease mutations and multidrug resistance of HIV-1 isolates from heavily treated patients. *Ann Intern Med* 128 : 906-911, 1998.
- 4) Lucas GM, Chaisson RE, Moore RD : Highly active antiretroviral therapy in a large urban clinic : risk factors for virologic failure and adverse drug reactions. *Ann Intern Med* 131 : 81-87, 1999.
- 5) Perez-Elias MJ, Moreno S, Gutierrez C, Lopez D, Abaira V, Moreno A, Dronda F, Casado JL, Antela A, Rodriguez MA : High virological failure rate in HIV patients after switching to a regimen with two nucleoside reverse transcriptase inhibitors plus tenofovir. *AIDS* 19 : 695-698, 2005.
- 6) Zaccarelli M, Tozzi V, Lorenzini P, Trotta MP, Forbici F, Visco-Comandini U, Gori C, Narciso P, Perno CF, Antinori A : Multiple drug class-wide resistance associated with poorer survival after treatment failure in a cohort of HIV-infected patients. *AIDS* 19 : 1081-1089, 2005.
- 7) Durant J, Clevenbergh P, Halfon P, Delgiudice P, Porsin S, Simonet P, Montagne N, Boucher CA, Schapiro JM, Dellamonica P : Drug-resistance genotyping in HIV-1 therapy : the VIRADAPT randomised controlled trial. *Lancet* 353 : 2195-2199, 1999.
- 8) Baxter JD, Mayers DL, Wentworth DN, Neaton JD, Hoover ML, Winters MA, Mannheimer SB, Thompson MA, Abrams DI, Brizz BJ, Ioannidis JP, Merigan TC : A randomized study of antiretroviral management based on plasma genotypic antiretroviral resistance testing in patients failing therapy. CPCRA 046 Study Team for the Terry Beinr Community Programs for Clinical Research on AIDS. *AIDS* 14 : F83-93, 2000.
- 9) Cingolani A, Antinori A, Rizzo MG, Murri R, Ammassari A, Baldini F, Di Giambenedetto S, Cauda R, De Luca A : Usefulness of monitoring HIV drug resistance and adherence in individuals failing highly active antiretroviral therapy : a randomized study (ARGENTA). *AIDS* 16 : 369-379, 2002.
- 10) 杉浦互 : HIV-1 の薬剤耐性検査と臨床的意義. *日本臨床* 60 : 703-710, 2002.
- 11) Tural C, Ruiz L, Holtzer C, Schapiro J, Viciano P, Gonzalez J, Domingo P, Boucher C, Rey-Joly C, Clotet B : Clinical utility of HIV-1 genotyping and expert advice : the Havana trial. *AIDS* 16 : 209-218, 2002.
- 12) Ibe S, Hotta N, Takeo U, Tawada Y, Mamiya N, Yamana K, Utsumi M, Kaneda T : Prevalence of drug-resistant human immunodeficiency virus type 1 in therapy-naive patients and usefulness of genotype testing. *Microbiol Immunol* 47 : 499-505, 2003.
- 13) Gatanaga H, Ibe S, Matsuda M, Yoshida S, Asagi T, Kondo M, Sadamasu K, Tsukada H, Masakane A, Mori H, Takata N, Minami R, Tateyama M, Koike T, Itoh T, Imai M, Nagashima M, Gejyo F, Ueda M, Hamaguchi M, Kojima Y, Shirasaka T, Kimura A, Yamamoto M, Fujita J, Oka S, Sugiura W : Drug-resistant HIV-1 prevalence in patients newly diagnosed with HIV/AIDS in Japan. *Antiviral Res* 75 : 75-82, 2007.
- 14) Little SJ, Holte S, Routy JP, Daar ES, Markowitz M, Collier AC, Koup RA, Mellors JW, Connick E, Conway B, Kilby M, Wang L, Whitcomb JM, Hellmann NS, Richman DD : Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV. *N Engl J Med* 347 : 385-394, 2002.
- 15) Grant RM, Hecht FM, Warmerdam M, Liu L, Liegler T, Petropoulos CJ, Hellmann NS, Chesney M, Busch MP, Kahn JO : Time trends in primary HIV-1 drug resistance among recently infected persons. *JAMA* 288 : 181-188, 2002.

- 16) Shafer RW, Hertogs K, Zolopa AR, Warford A, Bloor S, Betts BJ, Merigan TC, Harrigan R, Larder BA : High degree of interlaboratory reproducibility of human immunodeficiency virus type 1 protease and reverse transcriptase sequencing of plasma samples from heavily treated patients. *J Clin Microbiol* 39 : 1522-1529, 2001.
- 17) Huang DD, Eshleman SH, Brambilla DJ, Palumbo PE, Bremer JW : Evaluation of the editing process in human immunodeficiency virus type 1 genotyping. *J Clin Microbiol* 41 : 3265-3272, 2003.
- 18) Sayer DC, Land S, Gizzarelli L, French M, Hales G, Emery S, Christiansen FT, Dax EM : Quality assessment program for genotypic antiretroviral testing improves detection of drug resistance mutations. *J Clin Microbiol* 41 : 227-236, 2003.
- 19) Huang DD, Bremer JW, Brambilla DJ, Palumbo PE, Aldrovandi G, Eshleman S, Brown C, Fiscus S, Frenkel L, Hamdan H, Hart S, Kovacs A, Krogstad P, LaRussa P, Sullivan J, Weinberg A, Zhao YQ ; Pediatric ACTG Sequencing Working Group : Model for assessment of proficiency of human immunodeficiency virus type 1 sequencing-based genotypic antiretroviral assays. *J Clin Microbiol* 43 : 3963-3970, 2005.
- 20) Shirasaka T, Kavlick MF, Ueno T, Gao WY, Kojima E, Alcaide ML, Chokekijchai S, Roy BM, Arnold E, Yarchoan R, Mitsuya H : Emergence of human immunodeficiency virus type 1 variants with resistance to multiple dideoxynucleosides in patients receiving therapy with dideoxynucleosides. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 : 2398-2402, 1995.
- 21) Nagai H, Wada K, Morishita T, Utsumi M, Nishiyama Y, Kaneda T : New estimation method for highly sensitive quantitation of human immunodeficiency virus type 1 DNA and its application. *J Virol Methods* 124 : 157-165, 2005.
- 22) Johnson VA, Brun-Vezinet F, Clotet B, Conway B, Kuritzkes DR, Pillay D, Schapiro J, Telenti A, Richman D : Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1. *Top HIV Med* 13 : 51-57, 2005.
- 23) Peters S, Munoz M, Yerly S, Sanchez-Merino V, Lopez-Galindez C, Perrin L, Larder B, Cmarko D, Fakan S, Meylan P, Telenti A : Resistance to nucleoside analog reverse transcriptase inhibitors mediated by human immunodeficiency virus type 1 p6 protein. *J Virol* 75 : 9644-9653, 2001.
- 24) Kaufmann GR, Suzuki K, Cunningham P, Mukaide M, Kondo M, Imai M, Zaunders J, Cooper DA : Impact of HIV type 1 protease, reverse transcriptase, cleavage site, and p6 mutations on the virological response to quadruple therapy with saquinavir, ritonavir, and two nucleoside analogs. *AIDS Res Hum Retroviruses* 17 : 487-497, 2001.
- 25) Gallego O, de Mendoza C, Corral A, Soriano V : Changes in the human immunodeficiency virus p7-p1-p6 gag gene in drug-naive and pretreated patients. *J Clin Microbiol* 41 : 1245-1247, 2003.

Control Survey of HIV-1 Genotypic Drug-resistance Testing in Japan

Seiichiro FUJISAKI¹⁾, Saeko FUJISAKI¹⁾, Shiro IBE¹⁾, Tsukasa ASAGI²⁾, Toshihiro ITOH²⁾, Shigeru YOSHIDA³⁾, Takao KOIKE⁴⁾, Masayasu OIE⁵⁾, Kanako WATANABE⁶⁾, Aki MASAKANE⁷⁾, Mikio UEDA⁸⁾, Hiroyuki GATANAGA⁹⁾, Masakazu MATSUDA¹⁰⁾, Kenji SADAMASU¹¹⁾, Mami NAGASHIMA¹¹⁾, Kiyomi OKADA¹²⁾, Makiko KONDO¹³⁾, Mami HATA¹⁴⁾, Yasushi MIZOGAMI¹⁵⁾, Haruyo MORI¹⁶⁾, Rumi MINAMI¹⁷⁾, Takuma SHIRASAKA¹⁵⁾, Shinichi OKA⁹⁾, Wataru SUGIURA¹⁰⁾ and Tsuguhiro KANEDA¹⁾*

¹National Hospital Organization Nagoya Medical Center, Aichi 460-0001, Japan ; ²Sendai Medical Center, Miyagi 983-8520, Japan ; ³Department of Health Sciences, Hokkaido University School of Medicine, Hokkaido 060-0812, Japan ; ⁴Department of Medicine II, Hokkaido University School of Medicine, Hokkaido 060-8638, Japan ; ⁵Department of Virology, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata 951-8510, Japan ; ⁶Section of Virus, Niigata Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences, Niigata 950-2144, Japan ; ⁷Ishikawa Prefectural Central Hospital (Japanese Foundation for AIDS Prevention), Ishikawa 920-8530 Japan ; ⁸Hematology Immunology, Ishikawa Prefectural Central Hospital, Ishikawa 920-8530 Japan ; ⁹AIDS Clinical Center, International Medical Center of Japan, Tokyo 162-8655 ; ¹⁰AIDS Research Center, ARC, National Institute of Infectious Diseases, NIID, Tokyo 208-0011 ; ¹¹Division of Virology, Department of Microbiology, Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, Tokyo 169-0073 ; ¹²KITASATO-OTSUKA Biomedical Assay Laboratories Co., Ltd., Kanagawa 228-8555, Japan ; ¹³Division of Microbiology, Kanagawa Prefectural Institute of Public Health, Kanagawa 253-0087, Japan ; ¹⁴Department of Microbiology, Aichi Prefectural Institute of Public Health, Aichi 462-8576, Japan ; ¹⁵AIDS Medical Center, National Hospital Organization Osaka National Hospital, Osaka 540-0006, Japan ; ¹⁶Division of Virology, Osaka Prefectural Institute of Public Health, Osaka 537-0025, Japan ; ¹⁷Division of Immunology and Infectious Disease, Clinical Research Institute, National Hospital Organization, Kyushu Medical Center, Fukuoka 810-8563, Japan

* Corresponding Author : Clinical Research Center, National Hospital Organization Nagoya Medical Center, 4-1-1 Sannomaru, Naka-ku, Nagoya, Aichi 460-0001, Japan

Objective : Most laboratories in Japan are performing the HIV-1 genotypic drug-resistance testing with their in-house methods based on the one developed by National Institute of Infectious Diseases. However, the quality of their methods has never been assessed. In this study, we aimed to investigate the accuracy and reliability of the testing performed in 15 laboratories in Japan.

Materials and Methods : We assessed the accuracy and reliability of the in-house testing by sending two standard HIV-1 RNA samples to 15 voluntarily participating laboratories and by analyzing the reported results.

Results : The assessment revealed that the quality of HIV-1 genotypic drug-resistance testing was very high (97.3% accuracy). But there were sources of error, including human errors, poor electrophoregrams, and use of inadequate primers.

Conclusion : We proposed troubleshooting procedures to improve the quality of drug-resistance testing in Japan.

Key words : AIDS, HIV-1, genotypic drug-resistance testing, control survey

東海・北陸地域におけるフローサイトメーターを用いた CD4陽性Tリンパ球測定に関するアンケート調査 および模擬精度管理調査

正兼 亜季¹⁾ 小川 哲²⁾ 森下英理子³⁾
谷内江昭宏³⁾ 上田 幹夫⁴⁾

¹⁾石川県立中央病院 (財団法人エイズ予防財団リサーチレジデント)

²⁾石川県立中央病院中央検査部

³⁾金沢大学大学院医学系研究科保健学専攻

⁴⁾石川県立中央病院血液免疫内科

要 旨

フローサイトメーターを用いたCD4陽性Tリンパ球数測定は、HIV感染症診療において、病状の把握や治療開始の指標とされるなど極めて重要な検査項目である。しかし、現在フローサイトメーターを用いた検査には、明確な標準法や精度管理体制が確立されていない。そこで、フローサイトメーターを使用したCD4陽性細胞数測定についての現状把握を目的に、アンケートおよび模擬精度管理調査を行った。アンケートの結果、回答のあった49施設のうち、36.7%の施設が自施設で測定していた。用いる抗体試薬は3カラーや4カラー法を実施している施設もみられたが、CD4/CD8の2カラー法が約半数を占めた。精度管理の実施状況は、機器の精度管理は88.9%が行なっていると答えたが、試薬の精度管理は35.3%であった。今後、施設間差を無くし、精度の高いデータの提供を行なうために、測定方法の標準化や定期的な外部精度管理が望まれる。

緒 言

CD4陽性Tリンパ球は、正常末梢血中において700~1,000/ μ lあり、他の細胞を活性化する働

きを持つ¹⁾。Human immunodeficiency virus (HIV)は主としてCD4に感染するレトロウイルスである。感染したHIVは活発に増殖し、身体的に無症状であっても、CD4陽性Tリンパ球を破壊し続けている^{2,3)}。CD4が少なくなると、ニューモシスチス肺炎などの日和見感染症やカポジ肉腫などの日和見腫瘍を併発しやすくなり、AIDSを発症する。以前は感染すれば死に至る病気であったが、現在は多剤併用療法により、死亡率や日和見感染症の発症は著明に減少している。しかし、CD4数が200/ μ lを下回ってから治療を開始すると、200/ μ l以上で治療を開始した場合と比較して、死

Masakane Aki

(〒920-8530 石川県金沢市鞍月東2-1)

アドレス: aki-masa8@ipch.jp

キーワード: フローサイトメトリー, CD4, アンケート, 精度管理

受付日: 2007年1月1日

受理日: 2007年2月26日

亡率が3倍以上高くなるとの報告があり⁴⁾, そのため, 厚生労働省科学研究費補助金エイズ対策事業「HIV感染症の医療体制の整備に関する研究」班が作成したガイドラインでも, CD4が200/ μ を下回る前に多剤併用療法を開始することが推奨されている⁵⁾. このように, CD4陽性細胞数は, HIV感染者の免疫状態を把握し, 治療開始時期を決定するためや, 治療効果を判定するために重要な検査項目となっている. 当院は北陸ブロックエイズ治療拠点病院であり, 円滑なエイズ診療のためにCD4陽性Tリンパ球数をフローサイトメーターを用いて測定している. フローサイトメトリーによる末梢血リンパ球表面抗原検査に関しては, 2000年にガイドラインが出されている⁶⁾が, 明確な標準法は無く, 他の検査項目では日常的に行なわれている外部精度管理調査も行われていないため, 施設ごとに測定値が異なることが懸念される.

そこで今回, CD4を多く測定していると思われる東海・北陸地域エイズ診療拠点病院を対象にCD4数測定の実施状況や測定方法を把握するため, アンケート調査を行なった. さらに協力が得られた施設を対象に, 模擬外部精度管理を行った. アンケート調査, 精度管理調査の結果から, 現在の測定精度, 測定方法の標準化や外部精度管理の必要性について検討した.

方 法

1. アンケート調査

東海・北陸内の全エイズ治療拠点病院58施設(ブロック拠点病院2施設, 拠点病院56施設)にアンケート用紙を配布した. アンケートの内容は, 図1に示す.

2. 模擬外部精度管理調査

模擬外部精度管理調査は, 参加を希望すると答えた院内測定可能な施設と, 協力の得られた検査センターを対象とし, 精度管理用試料としては, ベックマンコールター社製内部精度管理用コントロール血球を用いた.

結 果

1. アンケート調査

アンケートの回収率は84.5% (49/58施設)であった. 回答のあった49施設のうち, 「施設内で測定可能」と回答したのは18施設(36.7%, 外部委託することもあると答えた2施設を含む), 「外部に委託」は30施設(61.2%)であった(図2-a). 1施設ではHIV感染患者がいないため検査していなかった.

院内測定している18施設では, 測定件数は「10件未満/月」が最も多く7施設(38.9%)であった(図2-b). 検体に加える抗凝固剤はEDTAが11施設(61.1%), ヘパリンが7施設(38.9%)であった(図2-c). 用いる抗体試薬はCD3と組み合わせる方法(CD3/CD4, CD3/CD8)や, 4カラー法(CD45/CD3/CD4/CD8)を実施している施設も合わせて8施設(44.4%)あったが, CD4/CD8の2カラー法が半数(9施設)を占めた(図2-d).

精度管理の実施状況については, 機器の精度管理は16施設(88.9%)が行なっていると答えたが(図2-e), 試薬の精度管理を行なっているとは答えたのは6施設(35.3%)にとどまった(1施設無回答)(図2-f). 外部へ委託している32施設での依頼件数は, 78.1%(25施設)が「10件未満/月」と依頼件数が少なかった(1施設無回答).

2. 模擬精度管理調査

模擬精度管理に参加したのは院内測定可能な18施設のうち, 14施設(77.8%)であった. 参加理由としては, 「精度を確かめたい」, 「他の施設と比較したい」等, 自施設のデータの確認をしたいというものが多かった. 外部へ委託している施設でも, 委託先の精度を確かめたいと答えた施設があったため, 協力の得られた検査センター3施設にも模擬精度管理に参加してもらった.

参加を希望した14施設と協力の得られた検査センター3施設, 合計17施設で精度管理調査を行なった. 測定方法は, 2カラー法が10施設, 4カラー法が9施設であった. 結果は, 表1に示す(ここでの期待値は精度管理試料製造業者が定めた値である).

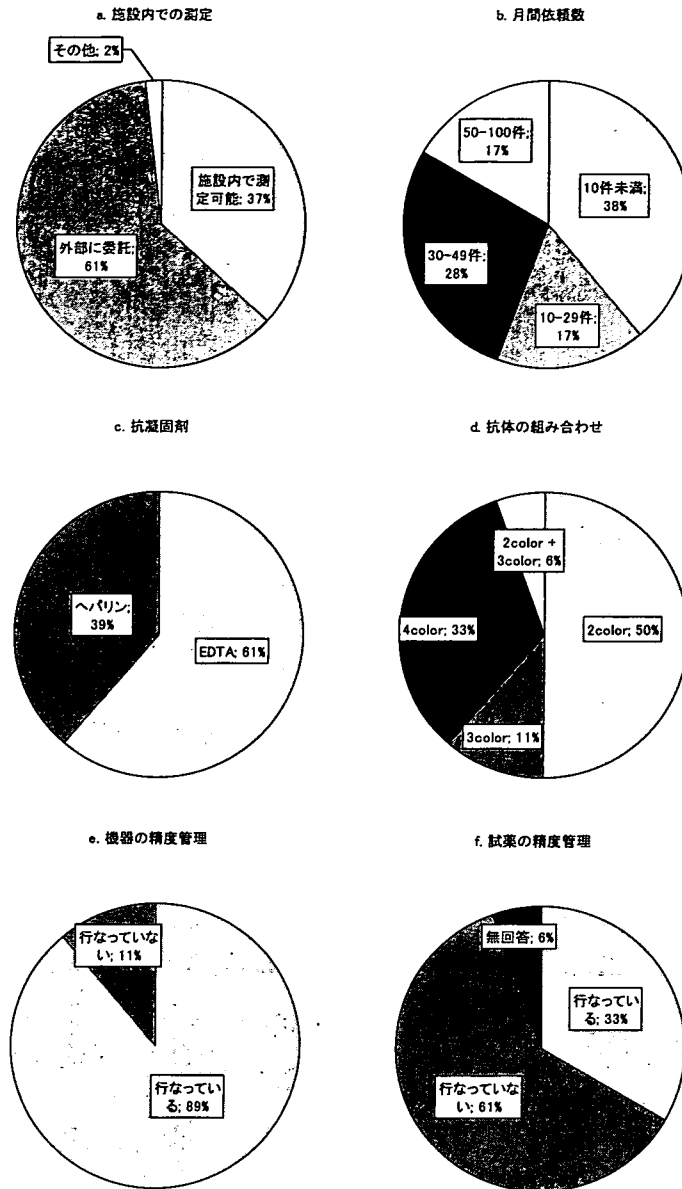


図2. アンケート結果

考 察

フローサイトメーターによるCD4陽性Tリンパ球測定を自施設で測定可能な施設は18施設/49施設(36.7%)と少なかった。添加する抗凝固剤は、EDTAが61.1%、ヘパリンも38.9%の施設で使用されており、統一されていない。測定法にお

いては、リンパ球領域にゲーティングし、1つの抗体の陽性率で測定する2カラー法(CD4+, CD8+)を用いている施設が10施設とほぼ半数を占めていたものの、CD45, CD3を組み合わせた4カラー法(CD45+CD3+CD4+, CD45+CD3+CD8+)で実施している施設が6施設あり、測定している施設の1/3以上を占めていた。2003年に

表 1. 模擬精度管理結果

	CD4		CD8	
	CD4	CD3/CD4	CD8	CD3/CD8
期待値	47	47	27	24
平均	45.8	46.5	25.9	23.6
最大値	49.5	47.7	27.8	24.8
最小値	43.4	45.5	23.0	22.1
SD	1.83	0.60	1.62	0.89
CV	0.013	0.005	0.021	0.010

(期待値は精度管理試料製造業者が定めた値である)

我々が行なった全国調査⁹⁾では、3カラー、4カラー法が合わせて9.5%であったことから、より精度の高い4カラー法が普及してきていると考えられる。

正確なデータを得るためには、どの検査項目でも精度管理が重要であるが、フローサイトメーターは、機器系と試薬系の精度管理が必要とされている⁷⁾。機器系は、標準ビーズを用い、光学系や流路系を、試薬系は陽性コントロールを用い、抗体試薬の活性や染色手技を含めた分析系全体の確認のために行う。調査の結果、内部精度管理の実施率は、機器系は88.9%と高いことがわかったが、試薬系の実施率は低かった(35.3%)。これは測定件数が少ないにも関わらず、試薬が高価であることなどが関与していると思われる。

模擬外部精度管理調査の結果は、全施設で許容範囲内にありおおむね良好であった。しかし、標準偏差(SD)を比較すると、2カラー法では、CD4で1.83、CD8で1.62、4カラー法では、CD4で0.60、CD8で0.89であり、4カラー法の方が結果のばらつきが少ないことが示された。その原因としては、2カラー法ではCD3-CD8+のNK細胞も同時に検出してしまい、ばらつきが大きくなった可能性が考えられる。したがって、より正確なCD8陽性リンパ球数を測定するためには、日本臨床検査標準協議会のガイドライン⁹⁾が推奨するようにCD3と組み合わせた4カラー法等を用いることが望ましいといえる。

結 語

HIV感染者が増加し続けている現状では、CD4/CD8の測定件数は今後さらに増えることが予想される。機械や試薬が高価であること、測定件数が多い等の問題もあるが、施設間差を無くし、精度の高いデータを常に提供するためには、測定方法の標準化や定期的な外部精度管理が必要と思われる。

謝 辞

アンケートおよび模擬精度管理調査にご協力いただきましたエイズ治療拠点病院の先生方に心より御礼申し上げます。

文 献

- 1) Charles A, Janeway JA, Trabvers Jr P: 免疫系の正常と病理. 免疫生物学 笹月健彦監訳, p126, 南江堂, 東京, 1998.
- 2) Wei X, et al: Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* 373: 117-122, 1995.
- 3) Ho DD, et al: Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 373: 123-126, 1995.
- 4) Hogg RS, et al: Rates of disease progression by baseline CD4 cell count and viral load after initiating triple-drug therapy. *JAMA* 286: 2568-2577, 2001.
- 5) 平成17年度厚生労働省科学研究費補助金エイズ対策研究事業 HIV感染症の医療体制の整備に関する研究班: 抗HIV治療ガイドライン, 2006.
- 6) 正兼亜季, 他: CD4陽性細胞数算定に関する全国調査結果, *日本エイズ学会誌* 5: 331, 2003.
- 7) Schwartz A, et al: Standardizing flow cytometry: construction of a standardized fluorescence calibration plot using matching spectral calibrators. *Cytometry* 26: 22-31, 1996.
- 8) Schwartz A, et al: Standardizing flow cytometry: a classification system of fluorescence standards used for flow cytometry. *Cytometry* 33: 106-114, 1998.
- 9) 日本臨床検査標準協議会 (JCCLS) 他: フローサイトメトリーによる末梢血リンパ球表面抗原検査に関するガイドライン(H1-P V2.0), *日本臨床検査標準協議会誌* 15: 123-136, 2000.

Abstract

Questionnaire and simulation of quality control survey for measurement of CD4+ T lymphocytes using flow cytometry in Tokai and Hokuriku areas

Aki MASAKANE¹⁾, Satoshi OGAWA²⁾, Eriko MORISHITA³⁾, Akihiro YACHIE³⁾, Mikio UEDA⁴⁾

¹⁾Ishikawa Prefectural Central Hospital (Japanese Foundation for AIDS Prevention Research Resident),

²⁾Ishikawa Prefectural Central Hospital, ³⁾Graduate School of Medical Science, Kanazawa University,

⁴⁾Department of Hematology and Immunology Medicine, Ishikawa Prefectural Central Hospital

The CD4+ T cell count is an important tool for monitoring HIV progression as well as the effect of anti-retroviral therapy (ART). However, CD4+ T cell estimations by flow cytometry have not been standardized and control survey systems are not in place. Thus, to evaluate the current status of CD4+ T lymphocyte measurements using flow cytometry, we applied a questionnaire and a simulated quality control survey in the Hokuriku and Tokai areas of Japan. Forty-nine institutions provided responses to the questionnaire, among which 36.7% measured CD4. Almost half of them used the 2-color antibody method, and the others used 3-or 4-color methods. Furthermore, 88.9% and 35.3% of the 49 institutions performed quality control measures on their instruments and reagents, respectively. To eliminate differences among facilities and to provide accurate data, the protocol should be standardized and external quality controls should be routinely surveyed.

Key words: Flow cytometry, CD4, Questionnaire, Quality control survey

免疫再構築症候群とその対応

濱口 元洋

国立病院機構名古屋医療センター

臨床研究センター止血・血栓研究部/第一内科（血液内科）

強力な抗 HIV 療法（HAART）によって HIV 感染症/AIDS の予後は一段と改善されたが、一方で免疫不全が改善する過程で、免疫再構築症候群（IRS）と呼ばれる病態が起こることが知られている。今回、名古屋医療センターで治療した AIDS 症例において IRS を併発した症例について検討し、IRS の対処法、予防法などにつき報告する。

【対象および方法】

2004 年 1 月から 2006 年 10 月までに受診された新規患者 267 名中、初診時 AIDS と診断された 82 症例を対象とした。IRS の頻度、AIDS 指標疾患、HAART 開始時の CD4 陽性リンパ球数・HIV ウイルス量、IRS への対応などを検討した（带状疱疹は除外とした）。

【結果と症例】

AIDS82 症例は、ニューモシスティス肺炎（PCP）35 例、食道カンジダ 15 例、非定型抗酸菌症（MAC）ならびに結核 8 例、サイトメガロウイルス感染症・網膜症 8 例、HIV 脳症 5 例、トキソプラズマ脳症 4 例など（重複感染を含む）であった。IRS の評価可能症例は AIDS82 例中 64 例、うち

10 例（16%）に IRS を併発した。10 例の AIDS 指標疾患は粟粒結核を含む結核関連・MAC7 例（8 例中 7 例：88% IRS 発症）、PCP4 例（1 例は MAC と重複合併）（評価可能 31 例中 4 例：13% IRS 発症）であった。

PCP4 例中 IRS により実際 PCP が悪化したのは 2 例であり、PCP 治療終了から ART 導入までの日数がそれぞれ 1 日、12 日と短く、また導入前の β D グルカンが不明、1,860 pg/mL、導入前の CD4 が 60/ μ L、5/ μ L と低値、HIV ウイルス量が 1.5×10^5 、 1.3×10^6 とかなり高値であった。症状は 2 例とも ART 7 日目に高熱を来し、NSAID または ART 続行+PSL 1 mg/kg の投与にて軽快した。一方、IRS を発症しなかった 27 例は、PCP 治療終了から ART 導入までの日数が中央値 37 日（10-83 日）であり、導入前の β D グルカンも中央値 151 pg/mL（6-2250）と低かった（導入前の CD4：中央値 17/ μ L（12-149）、HIV ウイルス量、中央値 2.9×10^5 copies/mL（ 2.4×10^4 - 3.9×10^6 ））であった。

症例 1（図 1）：62 歳、男性。主訴：呼吸困難。現病歴：咳が続き呼吸困難にて総合病院に入院。PC 肺炎、CMV 肺

臨床経過（症例 1）

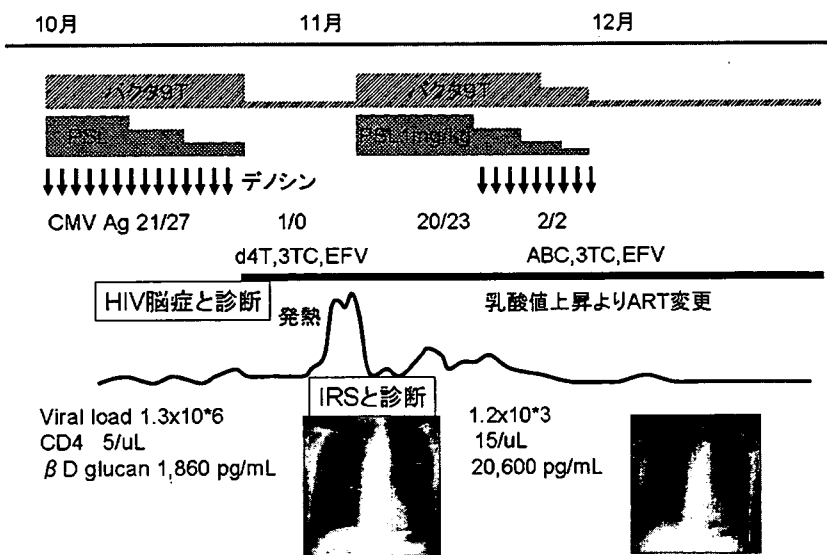


図 1 症例 1（PCP, HIV 脳症）の臨床経過

IRS にはバクタ 9T, プレドニゾロン（PSL）1 mg/kg 投与にて対処し、抗 HIV 療法後、顕著に意識レベル改善、会話も可能となった。PCP も軽快した。

表 1 結核・非定型抗酸菌症で発症した免疫再構築症候群

症例	CD4 値 (/ μ L)	HIV-RNA	臨床経過
36 歳, 男性	19	9.2×10^5	粟粒結核にて近医入院。TB 軽快後当院へ転院。ART 導入してより血球貪食症候群, クリプトコッカス髄膜炎など IRS 発症し, ART 中断, mPSL パルスも奏効せず死亡。
34 歳, 男性	60	7.6×10^5	MAC 敗血症として治療, ART 開始していたが, 6 カ月後皮下に結核性膿瘍 (ガフキー 2 号) を発症し, TB 治療に変更。
27 歳, 男性	154	50>	症例提示 (症例 2)
57 歳, 男性	15	5.8×10^5	結核性リンパ節炎。血液培養も陽性。HIV 脳症を疑い, ART。ART 開始後 8 日目より高熱, リンパ節腫大のため IRS と診断し, NSAID 投与も改善せず, PSL 投与 (1 mg/kg) し軽快。以後漸減。
51 歳, 男性	4	2.1×10^5	HIV 脳症と MAC 敗血症。ART を当初より開始。12 日目より高熱呈し, NSAID にて軽快。HIV 脳症も改善。
21 歳, 男性	7	2.0×10^6	PCP に MAC 敗血症・CMV 脳脊髄炎合併。ART 開始後 12 日目より高熱出現。IRS と診断し, NSAID 投与するも改善せず, PSL (1 mg/kg) にて軽快。以後漸減。
63 歳, 男性	90	2.1×10^5	右結核性胸膜炎。胸水細胞診で PEL (primary effusion lymphoma) の疑いがあり ART を早期から開始。胸水増量・高熱を来たすが, 抗結核療法で改善。

臨床経過 (症例 2)

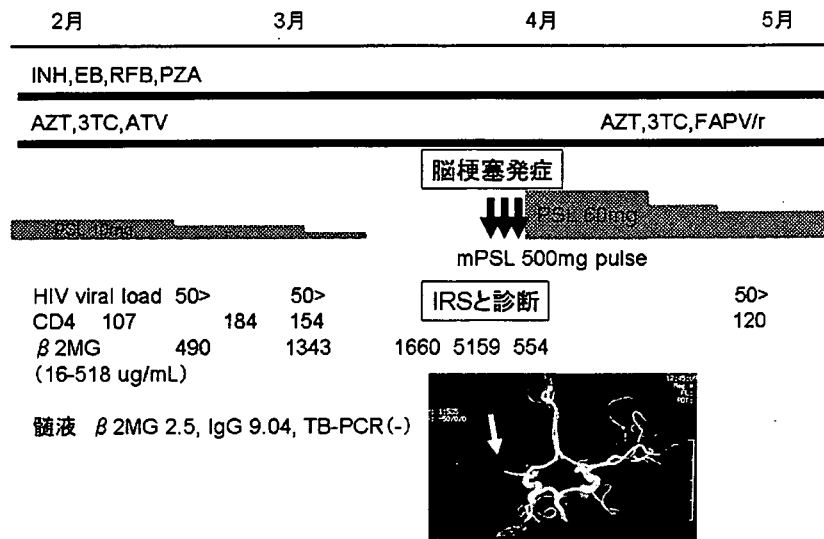


図 2 症例 2 (結核) の臨床経過と頭部 MRI

右中大脳動脈 (MCA) 水平部で血管造影が途絶し, また末梢の描出があり, 他の血管病変を認めず, 動脈硬化の危険因子もなく, プレドニゾロン (PSL) 減量・中止後に発症し, 発熱などの症状が先行していたこと, 髄液および血清の β 2 ミクログロブリンが上昇, 結核腫が右シルビウス裂付近に多発していたことから, 結核性髄膜炎が PSL 減量・中止によって悪化し, 右中大脳動脈付近に血管炎を起こし, 梗塞を発症と判断した。メチルプレドニゾロン 500 mg のパルス療法つづいて PSL 1 mg/kg 投与により, 左片麻痺は改善を認め, MR 血管造影検査でわずかに右中大脳動脈の血流の再開が認められた。

炎と診断された。HIV 抗体検査陽性が判明し、名古屋医療センターに転院。著明なうそを認め、日時、場所など正答できなかった。四肢運動機能、発語は顕著な障害を認めなかった。 β D グルカン $797 \mu\text{g/mL}$ 。CD4 = $5/\mu\text{L}$ 、HIV ウイルス量 $1.3 \times 10^6 \text{ copies/mL}$ 、CMV 抗原 (C10, 11) 21, 27/150,000 cells であった。CMV 脈絡網膜炎の所見は認めなかった。HIV 脳症と診断し、その治療を優先、IRS を覚悟で ART (d4T+3TC+EFV) を開始した。

結核・播種性非定型抗酸菌 (MAC) 感染症の場合は、高率 (88%) に IRS を発症した (表 1)。原因として結核菌または MAC の培養結果に時間がかかるため、そして他の合併症を有することが多く、余儀なく抗 HIV 療法 (ART) を開始せねばならない状況であることが挙げられる。

症例 2 (図 2) : 27 歳、男性。主訴 : 左半身の脱力。現病歴 : PCP にて総合病院入院したが、血液培養で結核菌が検出され、結核専門病院に移り治療を受けた。軽快後当院転院 (頭部 MRI で結核腫あり)。初診医で HAART 導入され、IRS 生じたため ART 中断となっていた。当院でプレドニゾロン (PSL) 併用 ART 再導入。PSL 減量すると発熱、頭痛があった。10 ヶ月かけて漸く PSL 中止したが、発熱が間歇的にあり、2006 年 4 月突然左上下肢の脱力が出現し、救急入院となる。意識は清明。軽度の構音障害と顔面を含む左半身麻痺を認めた。プレドニゾロン減量・中止し

たことによる IRS, すなわち血管炎による脳梗塞と診断し、メチルプレドニゾロン 500 mg のパルス療法について PSL 1 mg/kg を投与した。6 月になり左片麻痺は改善 (上肢伸展挙上と手指は協同屈曲運動可能、下肢は伸展挙上) を認め、排泄もトイレで自立した。MR 血管造影検査でわずかに右中大脳動脈の血流の再開が認められた。

【考 察】

名古屋医療センターでは ART 後の免疫再構築症候群発症を AIDS 64 例中 10 例 (16%) に認めた。PCP 症例で IRS 発症を認めたのは、PCP 治療終了後 1 日目と 12 日目の極めて早期に ART を導入したケースであり、それぞれ 7 日目に高熱症状が出現した。PCP の治療終了後 ART 導入しても IRS 発症が認められなかったのは、導入までの間隔が中央値 37 日であった。十分な間隔または β D グルカンの低値が確認されれば ART 導入後の IRS は予防できると考えられた。一方で結核、播種性 MAC 感染症では極めて高率 (88%) に IRS を発症した (ほとんどの症例で ART 開始 8-12 日目に症状出現)。結核、MAC 症例では TB、MAC の培養結果が判明する前に他の合併症のため、ART を導入せざるを得ない症例が多かった。IRS には NSAID、高熱が持続すれば PSL (0.5-1 mg/kg) 投与にて対処した。ART 中断は 1 例のみだった。IRS が長期化する症例も認められ、PSL の長期投与が必要となる場合があった。