

20. 汎用リアルタイム PCR 装置を用いた HIV-1 RNA 定量法の開発

- 研究分担者 加藤真吾、田中理恵（慶應義塾大学医学部微生物学・免疫学教室）
近藤真規子（神奈川県衛生研究所）
- 研究協力者 須藤弘二（慶應義塾大学医学部微生物学・免疫学教室）
佐野貴子、今井光信（神奈川県衛生研究所）、
岩室紳也（厚木市立病院）
倉井華子、相楽裕子、立川夏夫（横浜市立市民病院）

研究要旨

血中 HIV-1 RNA 定量には、従来アンプリコア HIV-1 モニター（アンプリコア法）が用いられていたが、現在リアルタイム PCR を原理とするコバス TaqMan 法に置き換わりつつあり、アンプリコア法は 2009 年末には販売中止予定である。コバス TaqMan 法は新たに高価な専用機器を購入する必要があり、1 回の測定に約 1.0 ml の血漿を用いるため、RNA 定量が必要な検査・研究を実施することが困難になっている。そこで、一般的リアルタイム PCR 装置でも測定可能な、必要検体量が 500 μ l 以下、コバス TaqMan 法と同程度の性能を保つ、独自の HIV-1 RNA 定量法（KK-TaqMan 法）の開発を行った。

8E5 細胞培養上清を用いて作製した標準曲線は、50～500,000 $\text{コピー}/\text{ml}$ の範囲で良好な直線性を示した（ $\text{slop} = -3.411$, $R^2 = 0.9819$ ）。また、サブタイプ B（IIIB）と CRF01_AE のどちらのウイルス株を用いても 50～500,000 $\text{コピー}/\text{ml}$ の範囲で良好な希釈直線性が得られた。IIIB 株の 5,000、500,000 $\text{コピー}/\text{ml}$ での実験間変動係数は 30% 以内、定量下限濃度 50 $\text{コピー}/\text{ml}$ で 61.8%、精度（accuracy）は 15% 以内であり、良好な再現性、精度が得られた。また、患者血漿 45 検体の測定値は、コバス TaqMan 法での測定値と良好な相関を示した。KK-TaqMan 法はコバス TaqMan 法とほぼ同等の再現性、精度を保っており、臨床への応用が期待される。

A. 研究目的

血中 HIV-1 RNA 量測定は患者のフォローアップ検査として、また感染初期症例や母児感染の判定に重要な検査である。HIV-1 RNA 定量には、従来アンプリコア HIV-1 モニターキット（Roche Diagnostics）が用いられていたが、リアルタイム PCR を原理とする定量法が開発され、2008 年 4 月から民間検査センターの多くはこのコバス TaqMan 法（Roche Diagnostics）を使用するようになった。一方、アンプリコア HIV-1 モニターキットは 2009 年 12 月で販売停止の見込みである。

しかしながら、コバス TaqMan 法は高価な

専用機器が必要なため、多くの研究機関や医療機関では導入が難しく、HIV-1 RNA 定量が必要な検査・研究を実施することが困難になっている。また、民間検査センターにコバス TaqMan 法を依頼すると、再々検査分も含めて血液 8 ml の提出を求められる等、受験者の負担が大きくなり、特に母児感染の判定においては深刻な問題が生じている。

我々は、これらの問題を解決するため、汎用的リアルタイム PCR 装置で測定可能な、必要検体量が 500 μ l 以下、コバス TaqMan 法と同程度の性能を保つ、独自の HIV-1 RNA 定量法（以下 KK-TaqMan という）の開発を行った。

B. 研究方法

1. 試料

コントロール HIV-1 RNA として 8E5 細胞培養上清を用い、標準曲線の作製、RNA 精製および回収率の検討を行った。

希釈直線性、再現性の検討にはサブタイプ B の標準株 IIIB 株と、患者から分離された CRF01_AE に属する株の培養上清を用いた。これら培養上清の希釈には市販の管理血清（三光純薬）を使用した。

HIV-1 感染者血漿 45 検体（サブタイプ B 30 例、CRF01_AE 13 例、サブタイプ F 2 例）を用いて、新法、KK-TaQMan 法とコバスタ QMan 法の相関について検討した。サブタイプは *env*C2V3 領域の塩基配列を決定後、Clustal X により決定した。

特異性の検討には、HIV 抗体陰性、コバスタ QMan 法陰性血漿 22 検体を用いた。

2. リアルタイム RT-PCR 用プライマーおよびプローブ

我々は、以前の研究班（平成 15 年～17 年：HIV 検査体制の構築に関する研究）でリアルタイム PCR 法による HIV-1 グループ M のプロウイルス定量系を開発した。この系を応用し HIV-1 RNA 定量法の開発を試みた。すなわち、HIV-1 グループ M の遺伝子型に対応できるように数カ所の塩基を degenerate にしたプライマー（deSK145 と deSKCC1B）と TaqMan MGB プローブ（deKK-probe）を使用した（図 1、2）。

3. 方法

3-1. RNA 精製およびリアルタイム RT-PCR の条件

サンプル 500 μ l を 4 $^{\circ}$ C、15000rpm、1 時間遠心濃縮し、上清を除去後、QIAamp UltraSence Virus Kit (Qiagen)、あるいは High pure viral RNA kit (Roche-diagnosics) を用いて RNA 精製を行った。精製後、エタノール沈殿により RNA を濃縮し、沈殿をリアルタイム RT-PCR

試薬で再溶解後、反応を行った。リアルタイム PCR 試薬には SuperScript III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR System with Rox (Invitrogen) を用いた。リアルタイム PCR 装置はアプライドバイオシステムズの 7900HT と Step One Plus の 2 種について検討した。RT-PCR 条件は 7900HT では 50 $^{\circ}$ C 15 分、95 $^{\circ}$ C 2 分の反応後、95 $^{\circ}$ C 15 秒、60 $^{\circ}$ C 1 分の 2 ステップ反応を 45 サイクル行った。One-Step Plus では、Fast-mode の標準プログラムに従った。

3-2. HIV-1 RNA 回収率の検討

8E5 細胞培養上清中の HIV-1 RNA 量をポアソン分布法により求め (2.9×10^8 コピー/ml)、その値を基準として 150、5,000、500,000 コピー/ml のウイルス希釈液を作製し、QIAamp UltraSence Virus Kit で HIV-1 RNA を精製後、再びポアソン分布法によりコピー数を計算し、回収率を算出した。

3-3. 標準曲線の作製

8E5 ウイルス溶液から 50、150、500、5,000、50,000、500,000 コピー/ml の 6 つの希釈系列を作製し、各濃度 3 本ずつ測定した。

3-4. 希釈直線性の検討

IIIB 株および臨床分離株 (CRF01_AE) の培養上清中の HIV-1 RNA をコバスタ QMan 法で測定し、その値を基準に 50～500,000 コピー/ml の 6 つの希釈系列を作製した。各濃度について 3 本ずつ測定し、希釈直線性の検討を行った。

3-5. 再現性の検討

IIIB 株培養上清の 3 つの濃度 50、5,000、500,000 コピー/ml について、4 点同時測定を、3 回行い、分散分析により再現性を解析した。

3-6. 特異性の検討

HIV 抗体陰性、コバスタ QMan 法陰性血漿 22 検体を用いて、特異性の検討を行った。3-7. KK-TaQMan 法とコバスタ QMan 法との比較

HIV-1 感染者血漿 45 検体を KK-TaQMan 法で

測定し、コバス TaqMan 法での測定値と比較した。

3-8. 限界希釈法による HIV-1 RNA 定量 (ポアソン分布法)

8E5 細胞培養上清を限界希釈し、gag p24 領域をターゲットとした RT-nested PCR 法で測定した後、ポアソン分布法に従いコピー数を算出した。

(倫理面への配慮)

主治医から患者に研究内容を説明し、同意の得られた症例について研究を実施した。特異性の検討に用いた HIV 陰性血漿は、HIV 遺伝子検査を希望する受検者から得られたものである。患者名はすべて記号化して扱っており、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。なお、本研究は当研究所の倫理委員会で承認されている。

C. 研究結果

1. HIV-1 RNA 回収率

8E5 細胞培養上清から調整した、150、5,000、500,000 コピー/ml の 3 つの濃度の HIV-1 RNA 回収率は 31%~34% でほぼ同程度であった (表 1)。

2. KK-TaqMan 法における標準曲線と希釈直線性

8E5 細胞培養上清から調製した 6 つの濃度の希釈系列を用いて標準曲線を作製した結果、50~500,000 コピー/ml の範囲で良好な直線性が得られた (slope=-3.411, $R^2=0.9819$, 図 3)。

IIIB 株、臨床分離株 (CRF01_AE) の希釈系列の測定値は 50~500,000 コピー/ml 範囲で良好な直線性を示し、コバス TaqMan 法との相関も良好であった (IIIB 株: $y=1.016x+0.1652$, $R^2=0.9968$ 、図 4; CRF01_AE 分離株: $y=1.003x+0.0268$, $R^2=0.9994$, 図 5)。

3. KK-TaqMan 法の精度と再現性

分散分析解析の結果、IIIB 株の希釈系列、500,000、5,000、50 コピー/ml での実験内変動

係数はそれぞれ 12.8%、10.2%、56.7%、実験間変動係数は 29.9%、25.6%、61.8% であった。各濃度の精度 (accuracy) は 2.2%、11.1%、14.9% であった (表 2)。

4. KK-TaqMan 法の特異性

HIV 抗体陰性および HIV-1 遺伝子陰性血漿 22 検体を測定した結果、すべての検体で HIV-1 RNA は検出できなかった。

5. KK-TaqMan 法とコバス TaqMan 法の相関

HIV-1 感染者検体 45 検体の測定値は、コバス TaqMan 法での測定値と良好な相関を示した ($y=0.968x+0.0605$, $R^2=0.9765$, 図 6)。両方法での測定値の関係を調べると、KK-TaqMan 法とコバス TaqMan 法の測定値の比は範囲 0.882~1.093、平均 0.977、標準誤差 0.108 であり、二つの測定値の間に有意差がなかった (図 7)。

D. 考察

我々は以前 HIV-1 グループ M に属する遺伝子型が検出可能な HIV-1 プロウイルス定量法を開発した。今回、この測定系を応用し、リアルタイム PCR 法による HIV-1 RNA 定量法の開発を試みた。

本測定法では、サブタイプ B (IIIB)、CRF01_AE ともに、50~500,000 コピー/ml の範囲で良好な希釈直線性が得られた。IIIB 株、5,000、500,000 コピー/ml での実験間変動係数は 30% 以内、定量下限 50 コピー/ml で 61.8% であり、再現性も優れていた。また、患者血漿 45 検体の測定値は、コバス TaqMan 法での測定値と良好な相関を示した。KK-TaqMan 法はコバス TaqMan 法とほぼ同等の再現性、精度を保っており、臨床への応用が期待される。

KK-TaqMan 法で用いているプライマーおよびプローブは、HIV-1 グループ M に属する遺伝子型を幅広く測定出来るように、それぞれ 1~5 箇所の塩基を degenerate (縮重型) に設計した。我々は、以前これらプライマー、プローブを用いたプロウイルス定量法の検討にお

いて、6種のサブタイプ (B、A、C、F、Gと CRF01_AE) の測定値が、ポアソン分布法での計算値とほぼ一致することを確認した。今回、HIV-1 RNA定量法の検討に用いたサンプルのほとんどはサブタイプBとCRF01_AEであったが、他のサブタイプについても有用な測定法であると考えられる。

今後、さらに感度、特異性の検討、サブタイプ非依存性の確認を行い、出来るだけ速やかにKK-TaqMan法を地方衛生研究所等の研究機関に移管し、HIV-1確認検査や基礎研究に役立てたいと考えている。

E. 結語

一般的なリアルタイムPCR装置を用いた HIV-1 RNA定量法を確立した。本法 (KK-TaqMan法) はコバスタTaqMan法とほぼ同程度の感度、再現性を保っており、両方法の測定値には良好な相関が認められた。

KK-TaqMan法はHIV-1グループMの遺伝子型に対応できるように degenerateプライマーおよびプローブを用いている。今回、RNA定量系の検討に用いたサンプルのほとんどはサブタイプBとCRF01_AEであったが、他のサブタイプについても有用な方法と考えられ、臨床検体への応用が期待される。

F. 研究発表

論文発表

1. Kuji, N., Yoshii, T., Hamatani, T., Hanabusa, H., Yoshimura, Y., and Kato, S. Buoyant density and sedimentation dynamics of HIV-1 in two density-gradient media for semen processing. *Fertil. Steril.* (in press)
2. Kondo, M., Sudo, K., Tanaka, R., Sano, T., Sagara, H., Iwamuro, S., Takebe Y., Imai, M., and Kato, S. :Quantification of HIV-1 group M proviral DNA using TaqMan MGB real-time PCR, *J. Virol.*

Methods (in press)

3. Tanaka, R., Hanabusa, H., Kinai, E., Hasegawa, N., Negishi, M., and Kato, S. Intracellular efavirenz levels in peripheral blood mononuclear cells from HIV-infected individuals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52(2):782- 785(2008).

学会発表

1. Kato S, Sudo K, Tanaka R :Novel assay using PCR and mass spectrometry for quantification of minor populations of HIV-1 carrying drug-resistant mutations, XVII International AIDS Conference. 3-8 August, 2008, Mexico city, Mexico.
2. Kondo M, Sudo K, Sano T, Sagara H, Iwamuro S, Imai M :The genetic diversity of HIV-1 subtype B in Tokyo and Yokohama area, Japan, XVII International AIDS Conference. 3-8 August, 2008, Mexico city, Mexico.
3. Shingo Kato, Mitsuhiro Kamakura. Quantification of minor populations of drug-resistant HIV-1 variants by PCR and mass spectrometry. United States-Japan Cooperative Medical Science Program, 21st Joint Meeting of the AIDS Panels. 2008, September 10 - 12, Awaji Island and Tokyo, Japan.
4. 加藤真吾. サテライト公演「HIV感染症診のガイドライン」、保健所等におけるHIV検査のガイドライン—妊婦検診を含めて、第22回日本エイズ学会学術集会・総会 (2008年11月26～11月28日、大阪)。
5. 植田知幸、加藤真吾. 休止期CD4+T細胞におけるHIV-1感染防御機構の解析、第22回日本エイズ学会学術集会・総会 (2008年11月26～11月28日、大阪)。

6. 花房秀次、小島賢一、加藤真吾、兼子 智、高桑好一、久慈直明、木内 英、加嶋克則、吉村泰典、田中憲一、和田裕一。HIV感染夫婦の生殖補助医療の実績と安全性：HIV陽性同士の生殖補助医療プロトコール、第22回日本エイズ学会学術集会・総会（2008年11月26～11月28日、大阪）。
7. 田中理恵、古谷茂之、林 邦彦、今井光信、加藤真吾：HIV-1 RNA定量キットのコントロールサーベイ、第22回日本エイズ学会学術集会・総会（2008年11月26～11月28日、大阪）。
8. 近藤真規子、田中理恵、須藤弘二、佐野貴子、岩室紳也、倉井華子、立川夏夫、相楽裕子、加藤真吾、今井光信：汎用リアルタイムPCR装置を用いたHIV-1 RNA定量法の検討、第22回日本エイズ学会学術集会・総会（2008年11月26～11月28日、大阪）。
9. 木内英、岩室紳也、相楽裕子、大木茂、元重京子、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出生児のAZT薬物動態と副作用、第22回日本エイズ学会学術集会・総会（2008年11月26～11月28日、大阪）。
10. 須藤弘二、加藤真吾：PCRとLC-MSを組み合わせた薬剤耐性変異定量法の検討、第22回日本エイズ学会学術集会・総会（2008年11月26～11月28日、大阪）。
11. 佐野貴子、山中晃、金子恵、井戸田一朗、平井由児、岩室紳也、須藤弘二、近藤真規子、今井光信：唾液で検査可能なHIV迅速検査試薬の検討、第22回日本エイズ学会学術集会・総会（2008年11月26～11月28日、大阪）。
12. 須藤弘二、佐野貴子、近藤真規子、加藤真吾、今井光信：HIV郵送検査に関する実態調査および検査制度の調査、第22回日本エイズ学会学術集会・総会（2008年11月26～11月28日、大阪）。
13. 池野 良、高木律男、児玉泰光、田邊嘉也、手塚貴文、佐藤みさ子、加藤真吾。リアルタイムPCR法（TaqMan法）を用いた唾液中HIV-1 RNA/DNA量と血清中HIV-1 RNA量の比較検討、第22回日本エイズ学会学術集会・総会（2008年11月26～11月28日、大阪）。
14. 加藤真吾、榎本 茜、田中理恵。正しい血中ウイルス量を求める方法の検討、第22回日本エイズ学会学術集会・総会（2008年11月26～11月28日、大阪）。
15. 杉浦 互、瀧永博之、吉田 繁、千葉仁志、小池隆夫、伊藤俊広、原 孝、佐藤武幸、石ヶ坪良明、上田敦久、近藤真規子、今井光信、貞升健志、長島真美、福武勝幸、山元泰之、田中理恵、加藤真吾、宮崎菜穂子、藤井 毅、岩本愛吉、藤野真之、仲宗根正、巽 正志、椎野禎一朗、岡 慎一、林田庸総、服部純子、伊部史朗、藤崎誠一郎、金田次弘、浜口元洋、上田幹夫、大家正義、田邊嘉也、渡辺香奈子、渡邊 大、白阪琢磨、柴原 健、森 治代、小島洋子、高田 昇、木村昭郎、南 留美、山元政弘、松下修三、健山正男、藤田次郎：2003-2007年の新規HIV-1感染者における薬剤耐性頻度の動向、第22回日本エイズ学会学術集会・総会（2008年11月26～11月28日、大阪）。

G. 知的財産権の出願・登録

特許出願

1. 発明の名称：遺伝子変異検出システム及び遺伝子変異検出方法、発明者：加藤真吾、須藤弘二、発願年月日：2008年05月19日、出願番号：特願2008-131243号。

図1 Real-time RT-PCR法の概要

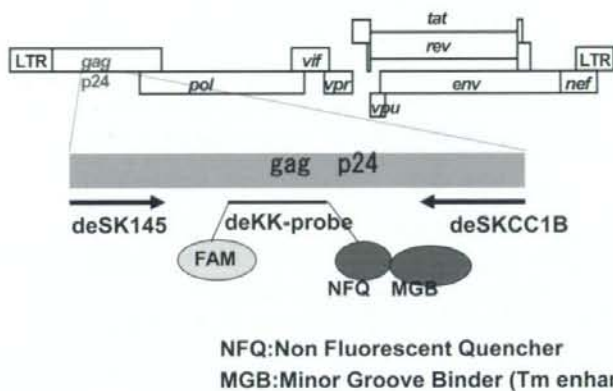


図2 縮重プライマーおよびプローブの塩基配列

◆ forward primer: deSK145

5'-AGTRGGGGGACAYCARGCAGCHATG CARAT-3'

◆ reverse primer: deSKCC1B

5'-TACTAGTAGTTCCTGCTATRTC ACTTCC-3'

◆ probe deKK-probe

5'-ATCAATGARGARGCTGCAGAATGGGA-3'

表1 8E5ウイルスRNA 回収率

Nominal conc. (copies/ml)		Recovery Mean±SD
High QC	500,000	34%±16%
Middle QC	5,000	31%±11%
Low QC	150	33%±20%

*QIAamp UltraSence Virus Kit (Qiagen) 使用

図3 標準曲線 (8E5細胞培養上清)

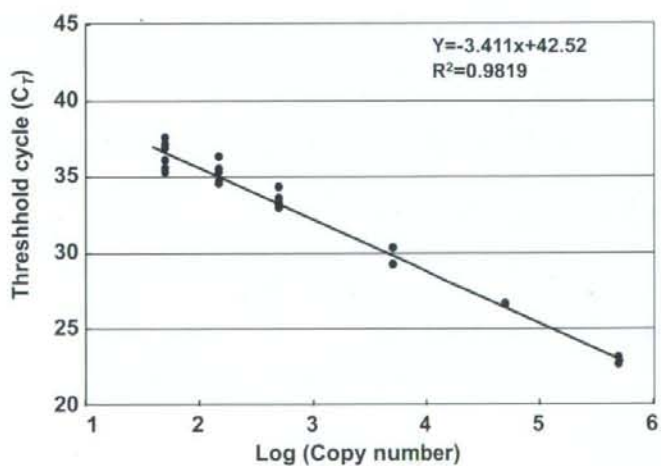


図4 希釈直線性: IIB培養上清

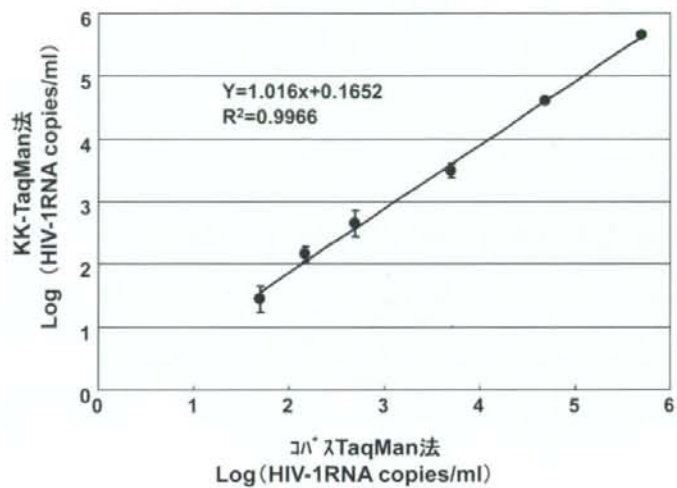


図5 希釈直線性: CRF01_AE(臨床分離株)

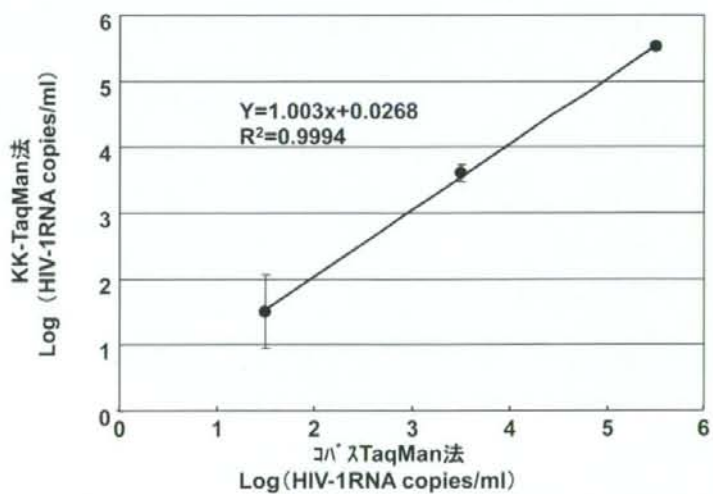


表2 再現性 (KK-TaqMan)

III B* (copies/ml)	Intra-assay (n=4)		Inter-assay (n=3)		
	mean	SD (CV%)	mean	SD (CV%)	accuracy
500000	599000	76900(12.8%)	511000	153000(29.9%)	2.2%
5000	4110	420(10.2%)	4500	1150(25.6%)	11.1%
50	45.5	25.8(56.7%)	43.5	26.9(61.8%)	14.9%

*コハスTaqMan測定値を基準とし希釈系列を作製

図6 患者血漿におけるKK-TaqMan法とコハスTaqMan法の相関

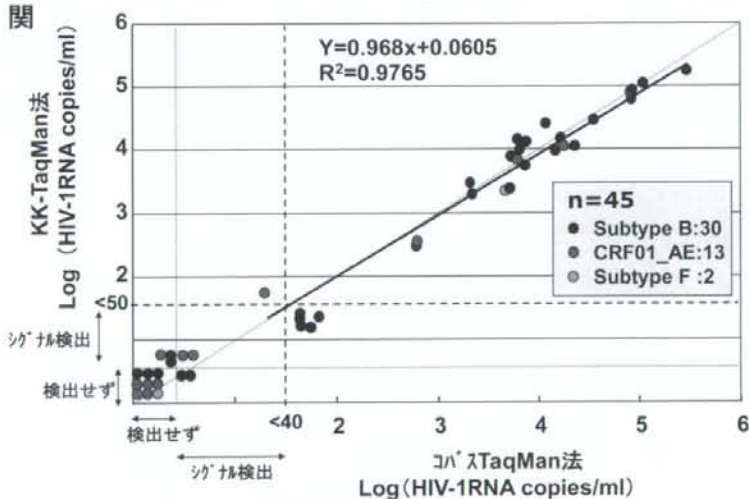
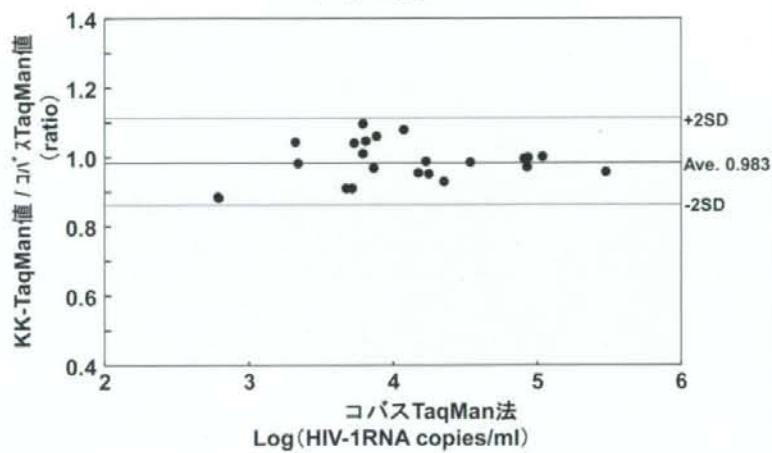


図7 KK-TaqMan法とコバスTaqMan法測定値の比率
 — 患者血漿 (n=23) —



21. 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

研究分担者	杉浦 互	(国立感染症研究所エイズ研究センター)
研究協力者	濱口元洋	(国立病院機構 名古屋医療センター)
	湯永博之	(国立国際医療センターACC)
	加藤真吾	(慶応大学医学部微生物学免疫学教室)
	山本直彦	(名古屋大学医学部)
	近藤真規子	(神奈川県衛生研究所)
	椎野禎一郎	(国立感染症研究所エイズ研究センター)
	岩谷靖雅	(国立病院機構名古屋医療センター)
	横幕能行	(国立病院機構名古屋医療センター)
	伊部史朗	(国立病院機構名古屋医療センター)
	藤崎誠一郎	(国立病院機構名古屋医療センター)
	服部純子	(国立病院機構名古屋医療センター)
	須藤弘二	(慶応大学医学部微生物学免疫学教室)
	田中正大	(愛知県衛生研究所)

研究要旨

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 18-20 年、各年 3 日間の日程で国立感染症研究所あるいは名古屋医療センター講義室・実習室において開催した。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。

A. 研究目的

多剤併用療法は患者の予後を改善したが、一方で薬剤耐性 HIV の出現が治療を進めていく上で障害となっている。薬剤耐性 HIV の問題は治療を受けている患者だけでなく、新規に HIV・AIDS と診断された患者にも散見されるようになってきている。その頻度は欧米諸国で 10~20%といわれており、我が国では 2003~04 年に実施された調査で約 5%と報告されている。今後保健所等で把握される HIV 症例においても薬剤耐性 HIV-1 感染症例が検出されると予想され、新規 HIV/AIDS 診断症例における薬剤耐性 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。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、薬剤耐性 HIV 遺伝子検査の技術移管を実施した。

B. 研究方法

平成 20 年 10 月 8 日から 10 日の 3 日間の日程で、名古屋医療センター講義室・実習室において HIV 検査技術講習会を開催した。全国 13 施設から 13 名の参加者があり(資料 1-2)、資料 1-1 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。実習ではバイオセーフティー上のレギュレーションから事前に調製・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。さらに昨年我が国において HIV-2 感染症例が報告されたことを受けて、HIV-2 についても抗議を実施した。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(資料2参照)、実習・講義ともに80%以上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。

D. 考察

アンケートの結果をみると実習に比べて講義の難易度が高い傾向にあるようである。今回の結果をもとに講義内容について吟味したい。

また今後の課題として、コンピューターを用いた遺伝子配列のデータ解析の質の向上を検討したい。参加者が研修会によって得た検査技術をその後職場でどのように生かし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必要であるとおもわれ、次年度以降の追跡調査の実施を検討したい。

E. 結論

全13施設から13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、参加者全員より本研修会の実習と講義が価値あるものであったとの回答を得た。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、本研究の目的は達成した。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

論文発表

1. Deforche K, Camacho RJ, Grossman Z, Soares MA, Van Laethem K, Katzenstein DA, Harrigan PR, Kantor R, Shafer R, Vandamme AM: non-B Workgroup. Bayesian network analyses of

resistance pathways against efavirenz and nevirapine. *AIDS*. 18:22(16):2107-15. Oct 2008

2. Furuya K, Omura M, Kudo S, Sugiura W, Azuma H.: Recognition profiles of microsporidian *Encephalitozoon cuniculi* polar tube protein 1 with human immunoglobulin M antibodies. *Parasite Immunol*. 2008 Jan;30(1):13-21.
 3. S Yoshida, H Gatanaga, T Itoh, M Fujino, M Kondo, K Sadamasu, T Kaneda, F Gejyo, T Shirasaka, H Mori, M Ueda, N Takata, R Minami, W Suigura and the Japanese Drug Resistance HIV-1 Surveillance Network.: Prevalence of drug resistance associated mutations in newly diagnosed HIV/AIDS patients in Japan from 2003-2007. *Antiviral Therapy*. 13(3):A162, 2008
 4. Okuma K, Tanaka R, Ogura T, Ito M, Kumakura S, Yanaka M, Nishizawa M, Sugiura W, Yamamoto N, Tanaka Y.: Interleukin-4-Transgenic hu-PBL-SCID Mice: A Model for the Screening of Antiviral Drugs and Immunotherapeutic Agents against X4 HIV-1 Viruses. *J Infect Dis*. Jan 1;197(1):134-41, 2008
 5. Rajintha M Bandaranayake, Moses Prabu-Jeyabalan, Junko Kakizawa, Wataru Sugiura, and Celia Schiffer. :Structural Analysis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 CRF01_AE Protease in Complex with the Subtype p1-p6. *Journal of Virology*, 82(13),2008
- 学会発表
1. S Yoshida, H Gatanaga, T Itoh, M Fujino, M Kondo, K Sadamasu, T Kaneda, F Gejyo, T Shirasaka, H Mori, M Ueda, N Takata, R Minami, W Suigura and the Japanese

- Drug Resistance HIV-1 Surveillance Network: Prevalence of drug resistance associated mutations in newly diagnosed HIV/AIDS patients in Japan from 2003-2007. XVII International HIV Drug Resistance Workshop. Jun. 10-14, 2008, Sitges, Spain.
2. Rajintha Bandaranayake, M Prabu-Jeyablab, J Kakizawa, W Sugiura and C Schiffer.: The Effect of Sequence Polymorphisms on CrF01_AE Protease Structure. 15th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Feb.3-6,2008, Boston, USA.
 3. 岩谷靖雅、吉居廣朗、武田 哲、杉浦 互: HIV-1 Vif 依存的な APOBEC3G のユビキチン化サイトの同定. 第 56 回日本ウィルス学会学術集会. 2008 年 10 月 26~28 日,岡山
 4. 宮崎菜穂子、松下修三、藤井 毅、岩本愛吉、杉浦 互: 既治療患者における薬剤耐性(多剤耐性) HIV の現状調査. 第 22 回日本エイズ学会学術集会. 2008 年 11 月 26~28 日,大阪
 5. 巽 正志、梅木優子、竹川菜穂、松田昌和、橋本 修、西澤雅子、石古博昭、杉浦 互、山本直樹: 薬剤耐性ウィルスの感染性分子クローンを軸にした Genotype と Phenotype をつなぐ実験解析系. 第 22 回日本エイズ学会学術集会. 2008 年 11 月 26~28 日,大阪
 6. 岩谷靖雅、吉居廣朗、武田 哲、杉浦 互: APOBEC3G の HIV-1 Vif に依存したユビキチン化サイトに関する研究. 第 22 回日本エイズ学会学術集会. 2008 年 11 月 26~28 日,大阪
 7. 柴田潤子、岩谷靖雅、任 鳳蓉、田中 博、杉浦 互: HIV-1 ゲノム RNA における poly (A) 付加部位に関する研究. 第 22 回日本エイズ学会学術集会. 2008 年 11 月 26~28 日,大阪
 8. 大出裕高、横山 勝、佐藤裕徳、伊部史朗、藤崎誠一郎、間宮均人、濱口元洋、杉浦 互、横幕能行: HIV-1 プロテアーゼにおける耐性変異 L89V の立体的影響. 第 22 回日本エイズ学会学術集会. 2008 年 11 月 26~28 日,大阪
 9. 椎野禎一郎、貞升健志、長島真美、杉浦 互: HIV-1 薬剤耐性変異の感染者集団における固定/消失時間の解析. 第 22 回日本エイズ学会学術集会. 2008 年 11 月 26~28 日,大阪
 10. 正岡崇志、梁 明秀、巽 正志、杉浦 互、森下 了、澤崎達也、山本直樹: 酵素活性を指標とした新規 HIV プロテアーゼ薬剤耐性検査法の開発. 第 22 回日本エイズ学会学術集会. 2008 年 11 月 26~28 日,大阪
 11. 星野忠次、辰巳絢子、篠原祐子、大出裕高、杉浦 互: コンピューターによる薬剤耐性 HIV-1 に対する薬効予測の試み. 第 22 回日本エイズ学会学術集会. 2008 年 11 月 26~28 日,大阪
 12. 横幕能行、大出裕高、間宮均人、濱口元洋、伊部史朗、藤崎誠一郎、藤崎菜穂子、金田次弘、杉浦 互: Enfuvirtide (T-20) +raltegravir (RAL) +darunavir (DRV) +etravirine(TMC125)+lamivudine (3TC) の多剤高度耐性 HIV-1 感染症に対する治療効果.第 22 回日本エイズ学会学術集会. 2008 年 11 月 26~28 日,大阪
 13. 杉浦 互、湯永博之、吉田 繁、千葉 仁志、小池隆夫、伊藤俊広、原 孝、佐藤武幸、石ヶ坪良明、上田敦久、近藤真規子、今井光信、貞升健志、長島真美、福武勝幸、山本泰之、田中理恵、加藤真吾、宮崎菜穂子、藤井 毅、岩本愛吉、藤野真之、仲宗根 正、巽 正志、椎野禎一郎、岡 慎一、林田庸総、服部純子、伊部史朗、藤崎誠一郎、金田次弘、濱口元洋、上田幹夫、大家正泰、田邊嘉也、渡辺香奈子、渡邊 大、白阪琢磨、栗原 健、森 治代、小島洋子、高田 昇、木村昭郎、南 留美、山本政弘、松下修三、健山正男、藤田次郎: 2003-2007 年の新規 HIV-1 感染者における薬剤耐性頻度の動向. 第 22 回日本エイズ学会学術集会. 2008 年 11 月 26~28 日,大阪

資料1

1) 19回 HIV 検査法 (PCR 法等) 技術研修会日程表

第1日 平成20年10月8日(水)

実習

RNA抽出、RT-PCR (服部、伊部、藤崎、田中、須藤)

nested-PCR (服部、伊部、藤崎、田中、須藤)

PCR産物の確認、精製、シーケンス反応(服部、伊部、藤崎、田中、須藤)

講義

「HIV-1の遺伝子診断」(伊部)

「HIVの基礎知識」(岩谷)

「HIV-1の疫学調査について」(杉浦)

第2日 平成20年10月9日(木)

実習

シーケンス反応物の精製から泳動(服部、伊部、藤崎、田中、須藤)

データの回収(椎野、杉浦、服部、伊部、藤崎)

講義

「シーケンスの原理」(藤崎)

「HIV-1感染症治療と薬剤耐性」(国立国際医療センター 湯永)

「系統樹解析とサブタイピング」(椎野)

「薬剤耐性の解析・総合討論」(横暮、杉浦、椎野、伊部、服部、藤崎)

「HIVの臨床について」(濱口)

第3日 平成20年10月10日(金)

実習

HIV-1、HIV-2の検査法(今井、近藤、須藤)

講義

「HIV検査法概要」(今井)

「HIVの遺伝子検査について」(加藤)

「発展途上国におけるHIV/AIDSの現状」(名古屋大学 山本)

2) 参加施設

新潟県保健環境科学研究所

千葉県衛生研究所

愛知県衛生研究所

名古屋市衛生研究所

岐阜市衛生試験所

三重県津保健福祉事務所総合検査室

滋賀県衛生科学センター

京都府保健環境研究所

鳥取県衛生環境研究所

島根県保健環境科学研究所

広島県立総合技術研究所

香川県環境保健研究センター

福岡市保健環境研究所

資料2

参加者アンケート集計結果

1) 講義全般について

a. 講義内容について

極めて価値あり・・・8
価値あり・・・・・・・・5
評価少ない・・・・・・・・0
評価なし・・・・・・・・0

b. 講義の難易度について

難しすぎる・・・1
やや難しい・・・5
適当・・・・・・・・7
やや易しい・・・0
易しすぎる・・・0

c. 講義の時間について

過多・・・・・・・・0
やや多い・・・・・・2
適当・・・・・・・・9
やや少ない・・・・・・1
過小・・・・・・・・1

2) 実習全般について

a. 実習の内容について

極めて価値あり・・・6
価値あり・・・・・・・・7
評価少ない・・・・・・・・0
評価なし・・・・・・・・0

b. 実習の難易度について

難しすぎる・・・0
やや難しい・・・・・・0
適当・・・・・・・・11
やや易しい・・・・・・2
易しすぎる・・・・・・0

c. 実習の時間について

過多・・・・・・・・0
やや多い・・・・・・0
適当・・・・・・・・10
やや少ない・・・・・・3
過小・・・・・・・・0

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表
雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kondo M, Sudo K, Tanaka R, Sano T, Sagara H, Iwamuro S, Takebe Y, Imai M, Kato S.	Quantitation of HIV-1 group M proviral DNA using TaqMan MGB real-time PCR.	J.V.Meth.		in press.	
Sato, K. & Tamashiro, H.	Gender differences in the relationships between obesity and lifestyle risk factors in a small farming town in Japan.	Asian Pacific Journal of Public Health.	20	236-43	2008
Excler, JL., Ditangco, RA., Tamashiro, H., Osmanov, S.	Expanding Capacity and Accelerating AIDS Vaccine Development in Asia.	Journal of International Health	23(1)	43-51	2008
Kuji, N., Yoshii, T., Hamatani, T., Hanabusa, H., Yoshimura, Y., and Kato, S.	Buoyant density and sedimentation dynamics of HIV-1 in two density-gradient media for semen processing.	Fertil. Steril.		in press.	
Tanaka, R., Hanabusa, H., Kinai, E., Hasegawa, N., Negishi, M., and Kato, S.	Intracellular efavirenz levels in peripheral blood mononuclear cells from HIV-infected individuals.	Antimicrob. Agents Chemother	52(2)	782-785	2008
S Yoshida, H Gatanaga, T Itoh, M Fujino, M Kondo, K Sadamasu, T Kaneda, F Gejyo, T Shirasaka, H Mori, M Ueda, N Takata, R Minami, W Suigura and the Japanese Drug Resistance HIV-1 Surveillance Network.	Prevalence of drug resistance associated mutations in newly diagnosed HIV/AIDS patients in Japan from 2003-2007.	Antiviral Therapy.	13(3)	A162	2008

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
山田里佳、嶋 貴子、今井光信、谷口晴記、和田裕一、塚原優己、稲葉憲之	妊婦HIVスクリーニング検査の偽陽性に関する検討	日本性感染症学会誌	19(1)	122-126	2008
塚原優己、山田里佳、嶋 貴子、外川正生、喜多恒和、稲葉憲之、和田裕一	性感染症における母子感染対策—HIV—	日本性感染症学会誌	19(1)	63-68	2008
中瀬克己、佐野(嶋)貴子、今井光信	性感染症の検査体制の現状と課題—保健所等におけるHIV検査体制を中心	日本臨牀	67(1)	30-36	2008
中瀬克己	HIV検査相談“その充実と今後の方向を考える”保健所の立場から	日本エイズ学会誌	10(4)	314	2008
立川夏夫	HIV抗体検査と告知について	医薬の門	48(1)	15-22	2008
立川夏夫	HIV/AIDS治療の現状と課題	公衆衛生	72(6)	456-460	2008
貞升健志、長島真美、新開敬行、尾形和恵、仲真晶子、矢野一好	東京都における2007年HIV検査陽性例の遺伝子学的、血清学的解析	日本エイズ学会誌		投稿中	
小島洋子、川畑拓也、森 治代、大石 功、大竹 徹	Recent Diversity of HIV-1 in Individuals who visited STI-related clinics in Osaka, Japan.	Journal of Infection and Chemotherapy	14	51-55	2008
森 治代、小島洋子、川畑拓也、後藤哲志	V108I変異がefavirenz耐性誘導に及ぼす影響	日本エイズ学会誌	10	184-190	2008
森 治代、小島洋子、川畑拓也	HIV感染と疫学調査(2007年)	平成19年度 感染症流行予測調査結果	第43報	31-34	2008
川畑拓也、小島洋子、森 治代	HIV-1急性感染期検出のためのHIV-1抗原イムノクロマトグラフィー法の検討	大阪府立公衆衛生研究所 研究報告	46	17-19	2008
川畑拓也	大阪府内のHIV感染者における性感染症の罹患状況調査と伝播形態の解明	財団法人 大同生命厚生事業団 第13回「地域保健福祉研究助成」報告		235-239	2008
長野秀樹、地主勝、岡野素彦、工藤伸一	北海道立保健所のHIV検査相談システムに導入された即日検査の効果について	北海道立衛生研究所報		印刷中	
長野秀樹、地主勝、工藤伸一、岡野素彦	北海道におけるインフルエンザの流行について—2004/05～2007/08シーズン—	北海道立衛生研究所報		印刷中	
地主勝、長野秀樹、工藤伸一、横山裕之、中野道晴、岡野素彦、田邊寛樹、山口亮、矢野公一	2007年度の北海道における麻疹発生状況	病原微生物検出情報	29(5)	12-13	2008

平成20年度 厚生労働省エイズ対策研究事業
「HIV検査相談機会の拡大と質的充実に関する研究」
総括研究報告書

発行日 2009年3月31日
発行者 研究代表者 今井 光信 (神奈川県衛生研究所)
発行所 研究班事務局
神奈川県衛生研究所微生物部
〒253-0087 神奈川県茅ヶ崎市下町屋1-3-1

©2009

編集・構成： 須藤弘二 嶋 貴子

印刷：(有)長谷川印刷

本報告書に掲載された論文及び図表には
著作権が発生しておりますので
利用にあたりご留意ください。



HIV検査相談機会の拡大と
質的充実に関する研究

平成20年度
研究報告書