

Fig 2 Detection and Sensitivity of HIV-1 gag gene in DBS specimen on FTA filter paper

	Viral RNA (copies/ml)	RT-nested PCR (POS)			
1	100,000	+	+	+	(3/3)
2	30,000	+	+	+	(3/3)
3	10,000	+	+	+	(3/3)
4	3,000	+	+	+	(3/3)
5	1,000	-	-	+	(1/3)
6	300	-	-	-	(0/3)
7	100	-	-	-	(0/3)
8	0	-	-	-	(0/3)

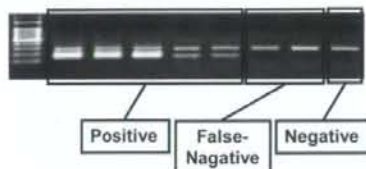


Table 2 Detection of the persistence of HIV-1 gag gene on FTA filter paper by Multiplex RT-nested PCR

HIV status	HIV RNA (copies/ml)	RT- nested PCR		POS (%)
		POS (RT[-])	NEG	
Infected		46 / 100 (29)	54 / 100	46
	10,000 – 100,000	11 / 11 (5)	0 / 11	100
	3,000 – 10,000	12 / 12 (3)	0 / 12	100
	400 – 3,000	4 / 14 (2)	10 / 14	28.6
	< 400	19 / 63 (19)	44 / 63	33.3
Non-infected		0 / 100	100 / 100	-

POG; positive, NEG; negative.

## 23. 新規迅速検査試薬の性能評価

分担研究者 佐野（嶋）貴子（神奈川県衛生研究所）  
研究協力者 須藤弘二、近藤真規子、今井光信（神奈川県衛生研究所）  
倉井華子、相楽裕子（横浜市立市民病院感染症科）  
岩室紳也（厚木市立病院泌尿器科）

### 研究概要

HIV 迅速抗体検査試薬が日本において 1998 年に認可されて以来、その簡便性から医療機関においては緊急検査等で、また、保健所等検査機関や民間クリニックでは HIV 即日検査の場での検査試薬として多く使用されている。しかし、診断薬として認可を受けている迅速検査試薬がダイナスクリーン・HIV-1/2（以下、ダイナスクリーンと略）の 1 種類しかなかったことから検査試薬を選択できない状態にあり、また、ダイナスクリーンの感度は通常のスクリーニング検査試薬とほぼ同等であるが、偽陽性率が約 1% と高いことから、より特異性の高い検査試薬が望まれていた。

これらのことから、既に米国を中心に使用されており、日本に導入の可能性がある HIV 迅速抗体検査 2 試薬について評価を行うとともに、新たに日本において開発された、イムノクロマト EIA 法を原理とし、抗 HIV 抗体と HIV-1p24 抗原を同時に 15 分で検出可能な迅速抗原抗体同時検査試薬について性能検討を行った。

海外で既に使用されている迅速抗体検査試薬である Uni-Gold Recombigen HIV と OraQuick ADVANCE は、ダイナスクリーンと比較し特異性は良い傾向にあったが、感度は若干低い傾向であった。また、感染初期検出感度もダイナスクリーンの方が高いことが分かった。したがって、これらの試薬を使用する際には、検査キットの特性を理解した上で使用する必要があると思われた。

新たに日本で開発された、迅速抗原抗体同時検査試薬であるエスブライン HIV Ag-Ab の検討を行ったところ、感度は 100%、特異性は 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。本検討において、ダイナスクリーンの偽陽性率が 0.9% であったことから、検討品は迅速検査試薬として非常に特異性が高く、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、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 検出が可能であることが分かった。したがって、検討品は 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。

### A. 目的

HIV 迅速抗体検査試薬が日本において 1998 年に認可されて以来、その簡便性から医療機関においては緊急検査等で、また、保健所等検査機関や民間クリニックでは HIV 即日検査の場での検査試薬として多く使用されている。しかし、診断薬として認可を受けている迅速検査試薬がダイナスクリーン・HIV-1/2（以下、ダイナスクリーンと略）の 1 種類しかなかったことから検査試薬を選択できない状態にあり、また、ダイナスクリー

の感度は通常のスクリーニング検査試薬とほぼ同等であるが、偽陽性率が約 1% と高いことから、より特異性の高い検査試薬が望まれていた。

これらのことから、既に米国を中心に使用されており、新たに日本に導入される可能性のある HIV 迅速抗体検査 2 試薬について評価を行った。また、新たに日本において開発された、イムノクロマト EIA 法を原理とし、抗 HIV 抗体と HIV-1p24 抗原を同時に 15 分で検出可能な迅速抗原抗体同時検査試薬について

も性能検討を行った。

## 1. 迅速抗体検査試薬の検討

### B. 方法

(1) 検討試薬 (図 1、図 2)

検討品 1: Uni-Gold Recombigen HIV

(以下、Uni-Gold と略)

(検査可能検体) 全血、血漿、血清

(検体量) 約 45  $\mu$ l (添付スポイト使用)

(反応時間) 10 分

検討品 2: Ora-Quick ADVANCE

(以下、Ora-Quick と略)

(検査可能検体) 全血、血漿、血清、唾液

(検体量) 約 5  $\mu$ l (添付ループ使用)

(反応時間) 20 分

対照品: ダイナスクリーン・HIV-1/2

(以下、ダイナスクリーンと略)

(検査可能検体) 全血、血漿、血清

(検体量) 50  $\mu$ l

(反応時間) 15 分

(2) 被検検体

#### ① HIV 陰性検体

保健所等において HIV 抗体検査、核酸増幅検査 (NAT 法) を希望し、PA 法および NAT 法により HIV 陰性と判定された HIV 検査希望者の全血および血漿を使用した。

#### ② HIV 陽性検体

医療機関や保健所等から当所に HIV 検査を依頼され、WB 法により HIV 抗体陽性と判定された HIV 陽性者の全血および血漿を使用した。

#### ③ 市販パネル検体

市販の HIV 感染者パネル検体として、BBI 社製の Worldwide HIV Performance Panel (WWRB 302)、HIV p24 Antigen Mixed Titer Performance Panel (PRA201)、HIV-1 Seroconversion Panel AK (PRB936)、AM (PRB938)、AN (PRB939(E))、AU (PRB945)、BA (PRB951)、BB (PRB952)、BC (PRB953)、BE (PRB955) の 8 パネルを使用した。

### (3) 検討項目

上記の被検血液検体を用いて、下記の検討を行った。

① HIV 陰性検体を用いた特異性の比較

② HIV 陽性検体を用いた感度の比較

③ HIV 感染初期セロコンバージョンパネル血漿を用いた感染初期検出感度の比較

### C. 結果

#### ① 特異性の比較

HIV 陰性の検体を用いた特異性の検討では、Uni-Gold は全血で 99.5%、血漿では 99.8%、OraQuick は全血、血漿ともに 100%、ダイナスクリーンは全血で 99.4%、血漿で 98.9%であった (図 3)。

#### ② 感度の比較

HIV 陽性検体を用いた感度の検討では、WB 法で HIV 陽性が確認された全血および血漿検体では、検討品、対照品ともに感度は 100%であった (図 3)。

#### ③ HIV 感染初期セロコンバージョンパネル血漿を用いた感染初期検出感度の比較

セロコンバージョンパネル血漿を用いた感染初期検出感度の比較では、BBI パネル AU を用いて、HIV 陽転時期の比較を行ったところ、ダイナスクリーンと Uni-Gold は 5 回目の採血から陽性、OraQuick は 6 回目の採血から陽性となり、OraQuick は若干遅れて陽性となる傾向にあった。従来の抗体検査法である PA 法と EIA 法では 4 回目の採血から陽性となった (図 4)。

同様にセロコンバージョンパネル血漿 8 パネルで比較を行った。表中の数字は各パネル中で最初に陽性となった採血の回数を示しており、数字が小さいほど感度が高く、より早い時期から検出が可能であることを示している。8 パネルの採血回数を合計すると、ダイナスクリーンは 48、Uni-Gold は 50、OraQuick は 57 と、ダイナスクリーンの感度が高いことが分かった。また、従来の抗体検査試薬と比

較すると、迅速検査試薬は若干遅れることが分かった(図5)。

#### D. 考察

検討品である Uni-Gold、OraQuick はダイナスクリーンと比較し、特異性は良い傾向にあったが、感度は若干低い傾向にあった。また、感染初期検出感度もダイナスクリーンの方が高いことが分かった。使用する際には、検査キットの特性を理解した上で使用していくことが必要と思われた。

## 2. 迅速抗原抗体同時検査試薬の検討

### B. 方法

#### (1) 検討試薬(図6)

検討品：エスブライン HIV Ag-Ab

(以下、エスブラインと略)

(富士レビオ社)

(検査可能検体) 血漿、血清

(検体量) 25  $\mu$ l (添付スポイト使用)

(反応時間) 15分

迅速検査対照品1:ダイナスクリーン・HIV-1/2

(以下、ダイナスクリーンと略)

(検査可能検体) 全血、血漿、血清

(検体量) 50  $\mu$ l

(反応時間) 15分

迅速検査対照品2:Uni-Gold Recombigen HIV

(以下、Uni-Gold と略)

(検査可能検体) 全血、血漿、血清

(検体量) 約 45  $\mu$ l (添付スポイト使用)

(反応時間) 10分

迅速検査対照品3:Ora-Quick ADVANCE

(以下、Ora-Quick と略)

(検査可能検体) 全血、血漿、血清、唾液

(検体量) 約 5  $\mu$ l (添付ループ使用)

(反応時間) 20分

抗原抗体同時検査(ELISA)対照品1:

ジェンスクリン HIV Ag-Ab

(検査可能検体) 血漿、血清

(検体量) 75  $\mu$ l

(反応時間) 180分

抗原抗体同時検査(ELISA)対照品2:

エンザイグノスト HIV インテグラル

(検査可能検体) 血漿、血清

(検体量) 100  $\mu$ l

(反応時間) 180分

#### (2) 被検検体

##### ①HIV 陰性検体

保健所等において HIV 抗体検査、核酸増幅検査(NAT法)を希望し、PA法および NAT法により HIV 陰性と判定された HIV 検査希望者凍結血漿 500 例および PA法あるいは IC法により HIV 陰性と判定された HIV 検査希望者未凍結血漿 410 例の合計 910 例を使用した。

##### ②HIV 陽性検体

医療機関や保健所等から当所に HIV 検査を依頼され、WB法により HIV 抗体陽性と判定された HIV 陽性者血漿 95 例(凍結 84 例、未凍結 11 例)を使用した。

##### ③市販パネル検体

市販の HIV 感染者パネル検体として、BBI社製の Worldwide HIV Performance Panel (WWRB 302)、HIV p24 Antigen Mixed Titer Performance Panel (PRA201)、HIV-1 Seroconversion Panel AK (PRB936)、AL (PRB937)、AM (PRB938)、AN (PRB939(E))、AU (PRB945)、BA (PRB951)、BB (PRB952)、BC (PRB953)、BD (PRB954)、BE (PRB955) の計 10 パネルを使用した。

#### (3) 検討項目

##### ①感度、特異性の検討

HIV 陽性者血漿および HIV 陰性検体血漿を用いて、エスブラインの感度、特異性の検討を行った。

##### ②HIV 感染初期検出感度の比較

HIV 感染初期に経時的に採血されたパネルである HIV-1 Seroconversion Panel AK (PRB936)、AL (PRB937)、AM (PRB938)、AN (PRB939(E))、AU (PRB945)、BA (PRB951)、

BB (PRB952)、BC (PRB953)、BD (PRB954)、BE (PRB955) の計 10 パネルを使用し、感染初期検出感度の比較を行った。

### ③ HIV ジェノタイプ別の反応性の検討

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 を含んだパネルである Worldwide HIV Performance Panel (WWRB 302) を用いて、ジェノタイプ別の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 陰性ブール血漿を用いて  $10^6$  倍までの 10 倍段階希釈系列を作成し、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 抗原の検出感度の検討

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、反応性の検討を行った。また、HIV-1 III B 株の培養上清を用い、p24 濃度を 5000pg/ml に調整した試液の 2 倍段階希釈系列、および p24 濃度を 3000pg/ml に調整した試液の 8～13 倍希釈系列を作製し、抗原検出感度の検討を行った。

## 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、エスブラインとダイナスクリーンとで偽陽性率を比較したところ、エスブラインは偽陽性率 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、エスブラインでは 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 (図 9)。

HIV-1 III B 株の培養上清を用い、p24 濃度を 5000pg/ml に調整した試液の 2 倍段階希釈系列を測定したところ、エスブラインは 312.5pg/ml で陽性、156.3pg/ml で陰性であった。さらに、p24 濃度を 3000pg/ml に調整した試液の 8～13 倍希釈系列を作製し、測定したところ、274.1pg/ml では陽性、245.4pg/ml では陰性となった (図 10)

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。

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

エスブラインの感度、特異性は、それぞれ 100%、99.8% であり、臨床应用到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、エスブラインは 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 検出が可能であった。したがって、エスブラインは 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. 研究発表

### 論文発表

1. 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 検査体制を中心に-. 日本臨牀 67(1): 30-36, 2008.
  - 嶋 貴子, 須藤弘二, 近藤真規子, 倉井華子, 相楽裕子, 今井光信. 蛍光酵素免疫測定法による新しい HIV 抗原抗体同時検出試薬(第4世代)の検討. 感染症学雑誌. 81(5):562-572, 2007.
  - 今井光信, 嶋 貴子, 須藤弘二, 宮崎裕美, 近藤真規子. HIV 検査相談体制について-HIV 即日検査の導入から普及まで-. 保健医療科学. 56(3):203-209, 2007.
  - 須藤弘二, 嶋 貴子, 近藤真規子, 加藤真吾, 今井光信. 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, 2007.
  - 塚原優己, 相楽裕子, 喜多恒和, 嶋 貴子, 矢永由里子, 外川正生, 大金美和, 稲葉憲之: 感染女性の妊娠・出産・育児支援. 日本エイズ学会誌. 9(2):116-119, 2007.
  - 今井光信, 嶋 貴子: HIV 感染の診断法. 治療. 88(12): 2865-2874, 2006.
  - 嶋 貴子, 一色ミユキ, 近藤真規子, 塚田三夫, 潮見重毅, 今井光信: 保健所における HIV 即日検査導入の試みとその効果. 日本公衆衛生雑誌. 53(3):167-177, 2006.
  - 中瀬克己, 今井光信, 嶋 貴子. 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. 日本エイズ学会誌 8(4), 327, 2006.
- 学会発表
- 佐野(嶋) 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、大阪.
  - 佐野(嶋) 貴子, 近藤真規子, 須藤弘二, 宮崎裕美, 倉井華子, 相楽裕子, 岩室紳也, 今井光信: 抗 HIV 抗体と HIV-1p24 抗原が同時検出可能な HIV 迅速検査試薬の検討. 第21回日本エイズ学会学術集会・総会, 2007年、広島.
  - 佐野(嶋) 貴子: 在宅検査の現状と課題-郵送検査の現状と今後の課題-. 第21回日本エイズ学会学術集会・総会シンポジウム, 2007年、広島.
  - 佐野(嶋) 貴子, 近藤真規子, 今井光信: 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62回神奈川県感染症医学会, 2007年、横浜.
  - 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, 2006年、東京.
  - 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, 2006年、東京.
  - 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, 2006年、金沢.
  - 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, 2006年、東京.
  - 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、2006 年、東京.

10. 嶋 貴子. HIV 検査の全国の状況—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、2006 年、横浜.
11. 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)

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 $\mu$ l	約45 $\mu$ l (添付スポイト使用)	5 $\mu$ 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% (111/111)	陰性
	血漿	98.9% (349/353)	99.8% (649/650)	100% (111/111)	
感度	全血	100% (10/10)	100% (11/11)	100% (10/10)	WB陽性
	血漿	100% (100/100)	100% (95/95)	100% (33/33)	

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	ジェネティア HIV-1/2 Mix	アボット HIV-1/2
		判定	判定	判定	PA値	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 リーン	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 $\mu$ 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＞**

陰性 抗原陽性 抗体陽性 抗原抗体陽性

(-) Ag (+) Ab (+) Ag Ab (+)

図7

### 感度・特異性の検討

	エスプライン		ダイナスクリン	
	陽性	陰性	陽性	陰性
HIV陽性血漿 95検体	95	0	95	0
感度	100% (95/95)		100% (95/95)	
HIV陰性血漿 910検体	2	908	8	902
特異性	99.8% (908/910)		99.1% (902/910)	

図8

### 各種検査法によるHIV陽転時期の比較

—BBI感染初期セロコンバージョンパネル 10パネルによる—

パネル名	エスプライン	対照品		
		ダイナスクリン	抗原抗体同時検査	
			ジェンスクリン	エンザイグノスト
パネルAK	4*	6	4	4
パネルAL	6	ND (7)	4	6
パネルAM	3	3	1	2
パネルAN	7	9	7	7
パネルAU	4	5	4	4
パネルBA	5	6	4	4
パネルBB	4	5	3	5
パネルBC	4	4	3	4
パネルBD	7	ND (8)	7	7
パネルBE	4	4	3	4
合計	48	57	40	47

一番早い時期から検出した検査試薬

検対品が対照品(迅速)より早い時期から検出したパネル

\* 表中の数字は最初に陽性となった採血回数を示す  
数字が小さいほど感度が高く、より早い時期から検出が可能

図9

### 抗原検出感度の検討1

➤ 感染初期セロコンバージョンパネル中の抗原のみ陽性期  
13検体の測定結果

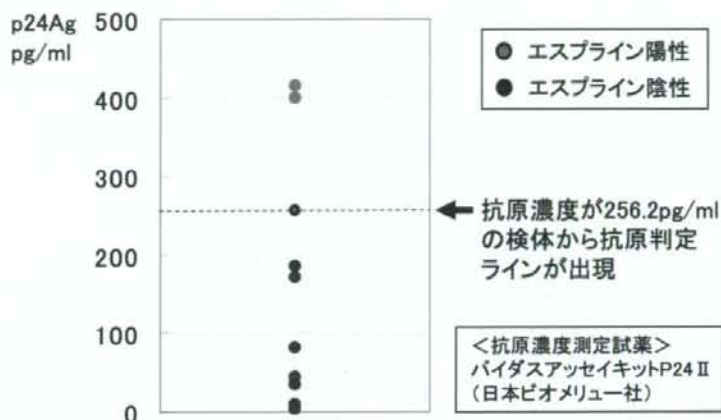


図10

### 抗原検出感度の検討2

➤ HIV-1 ⅢB株培養上清の希釈系列を用いた測定結果

<p24濃度を5000pg/mlに調整したものを2倍段階希釈>

p24濃度 (pg/ml)		2500	1250	625	312.5	156.3	78.1	39.1
検討品		+	+	±	±w	-	-	-
抗原抗体同時検査	A	+	+	+	+	+	+	-
	B	+	+	+	+	+	-	-

<p24濃度を3000pg/mlに調整したものを8倍~13倍希釈>

希釈倍数	×8	×9	×10	×11	×12	×13
p24濃度 (pg/ml) (実測値)	373.2	329.6	302.1	274.1	245.4	234.4
検討品	±w	±w	±w	±w	-	-

## 24. HIV-1 RNA 定量法キット「アンプリコア HIV-1 モニター v.1.5」の

### コントロールサーベイと新しい HIV-1 RNA 定量法の開発

(総括報告書)

- 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)、  
古谷茂之、真崎夕美子、林邦彦  
(ロシュ・ダイアグノステックス株式会社)

#### 研究概要

HIV-1 RNA の定量は患者の病態把握および薬剤の効果判定に重要な検査法である。日本では、HIV-1 RNA の定量にアンプリコア HIV-1 モニター v.1.5、あるいはコバスアンプリコア HIV-1 モニター v.1.5 が多くの施設で用いられてきた。我々は、これらキットの測定精度を調査し、施設間での測定値の差を是正することを目的として、前研究班からコントロールサーベイを実施している。本研究班においても平成18年度、19年度の2年間、HIV-1 モニターキットのコントロールサーベイを実施した。実施に際し、アンプリコアおよびコバスアンプリコアを使用しているすべての施設に案内状を送り、参加意志の得られた機関に、HIV-1 パネル血清を送付し、再現性、精度等の調査を行った。また、精度管理と関連する測定環境等の詳細を知る目的で、同時にアンケート調査も行った。許容範囲を外れるデータがあった施設については、操作行程の見直し等、改善指導を行い、希望施設にはフォローアップサーベイを実施した。

しかし、平成20年にはリアルタイム PCR を原理とする HIV-1 RNA 定量キット、コバス TaqMan 法が認可され、アンプリコアは平成21年12月に販売中止の予定となった。そのため、アンプリコアのコントロールサーベイは平成19年度をもって終了することとした。

コバス TaqMan 法は平成20年4月から大手の民間検査センターに導入されたが、定量値がアンプリコア法に比べ2~3倍高く、特に低濃度域で顕著であること等の問題点も明らかになってきている。また、コバス TaqMan 法を導入するためには、新たに高価な専用機器が必要であり、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。検査を民間検査センターに依頼する場合には、血液 8ml の提出を求められる等、受験者の負担が大きく、特に母児感染の判定においては深刻な問題である。最終年の平成20年度はこれらの問題を解決するため、一般的リアルタイム PCR 装置で測定可能な、検体量 500ul 以内、コバス TaqMan 法と同程度の性能を保つ、独自の HIV-1 RNA 定量法の開発を目的として研究を行った。

## 24. ①HIV-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 古谷茂之、真崎夕美子、林邦彦  
（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 19 年末より HIV-1 RNA 定量法がアンプリコアからコバス TaqMan に移行されたことを受け、平成 16 年度から平成 19 年度までの 4 年間に行なったコントロールサーベイの結果をまとめて報告する。加熱処理した HIV-1 パネルを用いることにより感染性のリスクをなくし、より安全にコントロールサーベイが実施できるようになった。アンプリコアおよびコバスアンプリコアの測定値は、ほとんどの場合目標値の 1/3 倍から 3 倍に入っていた (96.2%以上)。コバスアンプリコアの方がアンプリコアよりも許容範囲を外れた測定値が有意に少なかった ( $p=0.005$ )。作業エリアの区分け、消毒に関してはほぼ全ての施設で実施されていた。許容範囲を外れる測定値は、月間測定検体数の少ない施設や保守点検を行っていない施設で多く見られる傾向があった。使用機器の保守に関しては、定期・不定期に実施している施設が次第に増加していた。HIV-1 RNA 定量を正確に実施するためには、使用機器の保守点検が重要であることがわかった。実際の測定担当者に関しては、3 年以上の経験を持つ担当者が減少していたが、担当者 1 名の施設も減少していた。取扱い検体数の多い検査センターでは、許容範囲を外れる測定値は 4 年間で 1 例のみと非常に良い結果が得られた。また、日差再現性は 14%~23%と良好な値を示し、精度の高い測定が行なわれていたと考えられる。コントロールサーベイの実施により各施設で行なわれている HIV-1 RNA 定量キットの外部精度管理と検査技術の維持・向上を図ってきた。これにより、HIV-1 RNA 定量に関する検査体制の充実に貢献できたものと思われる。

### 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の目的は、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である。

### B. 方法

平成 16 年 4 月から平成 19 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コントロールサーベイ参加案内状を郵

送した。参加希望施設に HIV-1 パネル血清、アンケートを送付し、測定期間として一定期間設けたのちに結果を回収した。

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した。

HIV-1 パネル血清は次のようにして作成した。まず、サブタイプ B である HIV-1 LAI 株をヒト末梢血単核球で増殖させた。平成 18 年度より配布検体による感染リスクを無くすために、培養上清液に熱処理を行った。熱処理は 58°C 40 分間行った。in vitro 実験においてその効果を検討したところ、健康人 PBMC への感染性は共培養 7 日目で p24 抗原量は加熱処理前培養上清液の 1/73000 以下であった。また RT-nested PCR を用いたポワソン法で RNA 定量をすると加熱処理前の 1/1.3 であった。したがって、RNA 量を大きく減少させることなく感染性を無くすことができたと考えられる。

熱処理後の培養上清液（母液）を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、上記ポワソン解析の結果と、これらの結果はよく一致した。そこで、ポワソン解析の結果を元に、母液を HIV-1 陰性であることを確認したヒト血清で希釈し、5 濃度（200、2、000、10、000、50、000、250、000 コピー/mL）に調製した。標準法用には理論値 2、000、10、000、50、000、250、000 コピー/mL の血清試料と HIV-1 陰性血清試料、高感度法用には理論値 200、2、000、10、000、50、000 コピー/mL の血清試料と HIV-1 陰性血清試料からなるパネル血清をキャップの色を変えて用意した。各血清試料の HIV-1 RNA 濃度はブラインドとした。

測定結果およびアンケート結果の統計学的解析はソフトウェアパッケージ Statcel2 を用いて行った。

### C. 結果と考察

平成 16 年度から平成 18 年度は対象施設の

80% 近くの施設が参加したが、平成 19 年度はコバス TaqMan の導入の影響で参加率が下がって 63%（31 施設/49 施設）の参加であった。キット別で平成 16 年度はアンプリコア 13 施設、コバスアンプリコア 20 施設であったが、平成 17 年度から平成 19 年度は両キットともほぼ同施設数の参加であった。測定方法別の参加数は次第に高感度法での参加施設が増加していた。平成 19 年度は標準法で参加していた公的検査機関の参加が減少したため見かけ上高感度法の参加施設の割合が増加していた。アンプリコアとコバスアンプリコアによる測定値を比較すると、いずれのキットも目標値の 1/3 倍から 3 倍の許容範囲内にほとんどの測定値が入っていた。標準法および高感度法の測定方法による有意差も見られなかった。検査頻度で分類比較すると検査頻度の低い施設で測定値が許容範囲を外れる傾向があった。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査施設の頻度は 9/42（21.4%）、15/85（17.6%）、1/16（6.3%）であった。検査センターでは許容範囲を外れるデータはサーベイを行なった 4 年間で 1 件のみと良好な結果が得られた。一般検体はほとんどが検査センターで検査されている実情を考えると、国内における HIV 定量検査は精度良く行われていると推測される。許容範囲を外れる結果を出した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 18/70（25.7%）、後者が 6/73（8.2%）となり、コバスアンプリコアの方が許容範囲を外れる頻度が小さく、 $p=0.005$  と有意な差がみられた。標準法と高感度法ではそれぞれ 12/93（12.9%）と 16/88（18.2%）で有意差はなかった。

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アンケート調査を同時に行った。平成 16 年度から平成 19 年度における測定キットの種類はアンプリコア（手法）

がそれぞれ 39.4%、50.0%、53.8%、51.6%、コバスアンプリコア（自動法）がそれぞれ 60.6%、50.0%、46.2%、48.4%であった。作業エリアに関しては、作業エリアの区分けおよび消毒はほぼすべての施設で実施されており、60%の施設においては作業前後の消毒が実施されていた。機器の保守をおこなっていない施設で要再検査施設の頻度が多い傾向が見られた。機器の保守の年次推移をみると定期および不定期に保守を行なっている施設は平成 16 年度 91%だったが、平成 19 年度は 97%と実施率が増加した。担当者の経験年数に関しては、3 年以上の経験を有する担当者の割合が平成 16 年度は 70%だったが平成 19 年度は 30%と減少していた。また、担当者が 1 名の施設数も減少していた。コバスアンプリコアの動作不良や QS の吸光度異常を経験している施設が 70%から 80%あり、このような測定トラブルの際に身近な相談相手がいる、という環境が整ってきていると推測される。

平成 17 年度および平成 18 年度に検査センターの協力を得て、標準法および高感度法の日差再現性について検討した。血清検体を日を変えて 3 回測定した。測定値の許容範囲は目標値の 1/3 倍から 3 倍とすることは、変動係数の目標範囲を 44.2%とすることに一致する。標準法における変動係数はすべて 44.2%以下であり、平成 17 年度が 5 施設で平均 23%、平成 18 年度は 4 施設で平均 14%と良好であった。一方、高感度法は平成 17 年度は施設 B の 50,000 コピー/mL、平成 18 年度は施設 D の 7,600 コピー/mL の試料を測定した際に変動係数 44.2%を超えたが、それ以外はすべて目標範囲内に収まり、変動係数は平成 17 年度は 5 施設で平均 23%、平成 18 年度は 4 施設で平均 19%と良好な結果が得られた。

平成 16 年度から 19 年度まで、コントロールサーベイの実施により各施設で行なわれている HIV-1 RNA キットの外部精度管理と検査技術の維持・向上を図ってきた。これにより、

HIV-1 RNA 定量に関する検査体制の充実に貢献できたと考えられる。

#### D. 研究発表

##### 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. (2007) A simple competitive RT-PCR assay for quantitation of HIV-1 subtype B and non-B RNA in plasma. *J. Virol. Methods* 142:113-117.
4. Kinai, E., Hanabusa, H., and Kato, S. (2007) Prediction of the efficacy of antiviral therapy for hepatitis C virus infection by an ultrasensitive RT-PCR assay. *J. Med. Virol.* 79:1113-1119.
5. Tajima, H., Sueoka, K., Moon, S. Y., Nakabayashi, A., Sakurai, T., Murakoshi, Y., Watanabe, H., Iwata, S., Hashiba, T., Kato, S., Goto, Y., and Yoshimura, Y. (2007) The development of novel quantification assay for mitochondrial DNA heteroplasmy aimed at preimplantation genetic diagnosis of Leigh encephalopathy. *J. Assist.*



- Reprod. Genet. 24:227- 232.
6. Nakabayashi, A., Sueoka, K., Tajima, H., Sato, K., Sakamoto, Y., Kato, S., and Yoshimura, Y. (2007) Well-devised quantification analysis for duplication mutation of Duchenne muscular dystrophy aimed at preimplantation genetic diagnosis. *J. Assist. Reprod. Genet.* 24:233- 240.
  7. 今井光信, 中瀬克己, 小島弘敬, 加藤真吾, 杉浦互, 栗原健, 白坂琢磨. (2007) HIV 検査および検査体制一技術の進歩と今後の課題. *日本エイズ学会誌* 9(3), 202-208.

#### 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, 太田未緒, 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)
10. 加藤真吾 「教育講演: HIV 定量法の進歩とその臨床応用 (生殖医療への応用)」第 21 回日本エイズ学術集会 (2007 年 11 月 28-30 日, 広島)
11. 花房秀次, 小島賢一, 加藤真吾, 兼子智, 高桑好一, 久滋直昭, 木内英, 加藤克則, 吉村泰典, 田中憲一 「HIV 感染者夫婦の生殖補助医療」第 21 回日本エイズ学術集会 (2007 年 11 月 28-30 日, 広島)
12. 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出生児への HAART の安全性の検討」第 21 回日本エイズ学術集会 (2007 年 11 月 28-30 日, 広島)
13. 田中理恵, 栗原健, 杉浦互, 加藤真吾 「HPLC

によるダルナピルの血中濃度測定法の開発」第 21 回日本エイズ学会 (2007 年 11 月 28-30 日、広島)

28-30 日、広島)

14. 須藤弘二、宮崎裕美、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と検査精度の調査」第 21 回日本エイズ学会 (2007 年 11 月 28-30 日、広島)
15. 加藤真吾、田中理恵、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 21 回日本エイズ学会 (2007 年 11 月 28-30 日、広島)
16. 加藤真吾、須藤弘二「LC-MS による薬剤耐性変異の検出」第 21 回日本エイズ学会 (2007 年 11 月 28-30 日、広島)
17. 上西理恵、正兼亜季、近藤真規子、長谷彩希、廖華南、小野木成美、今井光信、上田幹夫、相良裕子、花房秀次、加藤真吾、草川茂、武部豊「CRF01 とサブタイプ B からなる新規組換えウイルス株 (URF) の同定とその公衆衛生学上の意義」第 21 回日本エイズ学会 (2007 年 11 月 28-30 日、広島)
18. 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、岩本愛吉、藤野真之、中曾根正、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、浜口元洋、上田幹夫、正兼亜季、大家正義、下条文武、田邊嘉也、渡辺香奈子、白坂琢磨、栗原健、森治代、小島洋子、中桐逸博、高田昇、木村昭郎、南留美、山本政弘、松下修三、健山正男、藤田次郎「2003-2006 年の新規 HIV-1 感染者における薬剤耐性頻度の動向」第 21 回日本エイズ学会 (2007 年 11 月

## 24. ②汎用リアルタイム PCR 装置を用いた HIV-1 RNA 定量法の開発

(平成 20 年度)

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）
協力研究者	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 2010 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  $\mu$ 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 8ml 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 $\mu$ 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 IIB 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 TaqMan 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 TaqMan 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な数カ所の塩基を 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 $\mu$ 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 diagnostics) 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 $\times 10^8$  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

IIB 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 TaqMan 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

IIB 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