

上したうえ、DNA PCRと違い自動化されているため検査会社で正確な検査を行える。このため、多くの病院ではRNA定量検査を行っている。複数の小規模で不完全な研究では、感染者の検出率はDNA、RNA検査とも差がないか、RNAのほうが若干優れていると報告している⁷⁾。

2. 検査の時期⁵⁾

1) 出生直後

HIV母子感染の多くは経産道感染だが、胎盤由来の感染も起こる。この場合、生後48時間以内の検査でHIV DNAが陽性になると考えられている。また子宮内感染があった場合は、出生時点で免疫不全が進行している可能性があり、できるだけ早期のHIV感染の診断が必要となる。多くのHIV専門家がこのタイミングでの検査を行っている⁵⁾。

2) 生後14～21日

一般に、HIVに感染してから高感度核酸増幅検査でウィルスが検出できるまで(これをwindow期という)、約2～3週間かかる。従って産道感染が起きた場合、生後14～21日でHIVが検出できると計算される。この時期にHIV DNAあるいはRNAの検査を行った場合、感染児の90%以上が検出できる^{6,7)}。乳児に対する予防はAZT単剤投与であり、感染していた場合はHIVを抑制できず、耐性ウィルスを誘導しやすくなり、症状が急速に進行する恐れがある。また、出生児へのAZT予防投与は貧血などの副作用が強く、途中で予防投与を中止せざるを得ないことも多い。以上より、この時期にHIV DNAもしくはRNAの検査は非常に重要である。

3) 1～2カ月

経産道感染のwindow期は個人によって差があるため、検出が遅れる可能性がある。また、児へのAZT予防投与が6週間続いたため、生後14～21日でのHIV RNAやDNA検査に影響を与える可能性は否定できない。そこで、ガイドラインでは生後1～2カ月で再度

検査をやり直して、陰性であればHIV感染をほぼ完全に否定でき、カリニ肺炎の予防などを開始する必要がないとしている。

4) 4～6カ月

母乳栄養さえ行わなければ、ほとんどの症例で生後14～21日と生後1～2カ月の2回の検査でHIV母子感染の有無を確定できる。しかし、アフリカや貧困層などでは経済面・衛生面の問題から母乳栄養が完全に遮断されることは少ないため、その後も感染リスクは残されている。こうした実情に配慮して、ガイドラインでは、HIV感染の完全な否定のために、この時期の再検査を推奨している。

5) 生後12～18カ月

一部のHIV感染者では極めて低いレベルのウィルス量のまま経過する例がある。従って、HIV RNAやDNAで検出感度以下であっても感染を完全には否定できない。一方、この時期は母体からの移行抗体が消失してくる時期と考えられている。従って、多くの専門家が18カ月時点でHIV抗体の消失を確認することで最終的にHIV感染を否定している。しかし、国内での多くの症例で、18カ月におけるHIV抗体の残存が散見され、くり返し検査を行う必要がある。

IV 抗HIV治療

1. 開始基準

米国の治療開始ガイドラインを表3に示す⁵⁾。以前は、治療開始をできるだけ遅らせる方向にあったが、CD4細胞数が一定以上低下すると予後が悪くなることが明らかとなったこと、抗HIV治療薬の副作用が改善され、比較的長期内服が可能になってきたことなどから、最近ではやや早期に治療を開始する傾向になっている。特に1歳未満の乳児例(母子感染例)ではAIDS発症までの進行が早く、予後が悪いことが知られているため、最近では症状の有無や免疫状況に関係なく開始

I 感染症の種類別に小児感染症を考える

表3 小児 HIV の治療開始基準

| 臨床分類 | | CD4 (%) | 血清ウイルス量 | 治療の適否 |
|--------------------------|-----|-------------------------------------|---------------------|--------------------|
| < 1歳未満 > | | | | |
| 症状の有無や免疫状態に関係なく | | | | 治療 |
| < 1歳以上～5歳未満 > | | | | |
| 有症状 ¹⁾ | 或いは | < 25% ²⁾ | どんな値でも | 治療 |
| 無症状もしくは軽症状 ³⁾ | かつ | ≥ 25% | ≥ 100,000 copies/mL | 治療を考慮 |
| 無症状もしくは軽症状 ³⁾ | かつ | ≥ 25% | < 100,000 copies/mL | 経過観察 ⁴⁾ |
| < 5歳以上 > | | | | |
| 有症状 | 或いは | < 350/mm ³ ⁵⁾ | どんな値でも | 治療 |
| 無症状もしくは軽症状 ³⁾ | かつ | ≥ 350/mm ³ | ≥ 100,000 copies/mL | 治療を考慮 |
| 無症状もしくは軽症状 ³⁾ | かつ | ≥ 350/mm ³ | < 100,000 copies/mL | 経過観察 ⁴⁾ |

従来は治療が待機される傾向だったが、近年、治療開始が早まる傾向にある。特に1歳未満の乳児は診断がつきしだい抗 HIV 療法の開始が推奨されている。

¹⁾ CDC カテゴリー C もしくは B (ただし単回の重症細菌感染やリンパ性間質性肺炎を除く)。

²⁾ CD4 < 20%のほうが CD4 21～24%より高い致死率、AIDS 発症率になる。

³⁾ CDC カテゴリー N もしくは A もしくは B の一部 (単回の重症細菌感染やリンパ性間質性肺炎)。

⁴⁾ 検査データは 3～4 カ月ごとに再検査するべきである。

⁵⁾ CD4 < 200/mm³のほうが、CD4 200～350/mm³より致死率、AIDS 発症率が高くなる。

(文献5より引用)

する傾向にある。1歳以降は CD4 細胞率あるいは CD4 細胞数に応じて治療を開始するが、以前は治療開始基準が 15%未満もしくは 200/mm³だったのに対し、最近では 25%未満もしくは 350/mm³と、治療開始基準がくり上がる傾向にある。

2. 薬剤

HIV 治療の原則は、3種類の抗 HIV 薬を組み合わせる多剤併用療法 (Highly Active Antiretroviral Therapy : HAART) である。

現在使用可能な抗 HIV 薬は 3種類に大別される。

- ① ヌクレオシド系逆転写酵素阻害薬 (NRTI)
- ② 非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害薬

(NNRTI)

③ プロテアーゼ阻害薬 (PI)

HAART はこれらのうち、NNRTI 1 剤 + NRTI 2 剤もしくは PI 1 剤 + NRTI 2 剤のいずれかの 3 剤を組み合わせる場合が多い。表 4 に米国ガイドラインにおける推奨レジメンを示す⁵⁾。成人ではプロテアーゼ阻害薬は少量の RTV (リトナビル) と組み合わせることで血中濃度を高める (Boost という) 方法が優れていることが分かっているため、小児でも Boosted PI が推奨されるようになってきた。しかし、RTV 液剤のアルコール濃度が非常に高く飲みにくいという点、RTV の用量も ATV (アタザナビル) では 80～

HAART (Highly Active Antiretroviral Therapy ; 多剤併用療法)

NRTI (ヌクレオシド系逆転写酵素阻害薬)

PI (プロテアーゼ阻害薬)

NNRTI (非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害薬)

RTV (リトナビル)

表4 小児の抗 HIV 療法

| | |
|---------------------------|--|
| NNRTI-based regimen 推奨 | 3 歳以上 : 2 NRTIs + EFV (注 1) 3 歳以下 or カプセルが飲めない児 : 2 NRTIs + NVP (注 1) |
| 代替 | 3 歳以上 : 2 NRTIs + NVP (注 1) |
| PI- based regimen 推奨 | 2 NRTIs + LPV/r |
| 代替 | 2 NRTIs + ATV + 低用量 RTV (注 2) (6 歳以上) 2 NRTIs + FPV + 低用量 RTV (注 2) (6 歳以上) 2 NRTIs + NFV (2 歳以上の児) |
| 2 NRTI の組み合わせ 推奨 | ABC + (3TC or FTC) ddI + (3TC or FTC) TDF + (3TC or FTC) Tanner 4 以上の児 AZT + (3TC or FTC) |
| 代替 | ABC + AZT AZT + ddI |
| 限定使用 | d4T + (3TC or FTC) |
| 限られたケースで使用可能 | 2 NRTIs + FPV (RTV なし) (2 ~ 5 歳) 2 NRTIs + ATV (RTV なし) 2 NRTIs + SQV + 低用量 RTV (注 2) AZT + 3TC + ABC |
| データ不十分 | 低用量 RTV (LPV/r を除く) PI 2 剤併用 NRTI + NNRTI + PI Tanner 1 ~ 3 児に対する TDF Emfuvirtide (T-20) 13 歳未満もしくは体重 39kg 未満に対する unboosted ATV DRV TPV Maraviroc Raltegravir Etravirine |

近年、成人での実績をもとに大幅に推奨薬剤が変更された。しかし、EFV、NVP、LPV/r、NFV 以外は小児投与実績がほとんどないため、慎重に運用されるべきである。

薬剤略号：薬理名 (商品名)

EFV：エファビレンツ (ストックリン®)、NVP：ネビラピン (ピラミューン®)、ATV：アタザナビル (レイクタツツ®)、FPV：フォスアンプレナビル (レクシヴァ®)、RTV：リトナビル (ノービア®)、NFV：ネルフィナビル (ピラセプト®)、ABC：アバカビル (サイアジェン®)、3TC：ラミブジン (エピビル®)、FTC：エムトリシタピン (エムトリバ®)、ddI：ジダノシン (ヴァイデックス®)、TDF：テノフォビル (ヒリアード®)、AZT：ジドブジン (レトロビル®)、d4T：サニルブジン (ゼリット®)、SQV：サキナビル (フォートベイス®)。

注 1) EFV はカプセル剤のみ。3 歳以上もしくは 10kg 以上の児に使用可能。3 歳未満もしくはカプセルが飲めない児には NVP が推奨される。CD4 細胞数 > 250/mm³ の女児では NVP による肝毒性のリスクが高く、原則禁忌である。EFV には催奇形性があるため、思春期以降で性的に活発な女児には推奨されない。

注 2) LPV/r 以外の 6 歳以上に対する Boosted PI (PI + 低用量 RTV) は、十分なデータがない。ATV + RTV の用量は 15 ~ 25kg : 150mg + 80mg, 25 ~ 32kg : 200mg + 100mg, 32 ~ 39kg : 250mg + 100mg, 39kg 以上 : 300mg + 100mg の分 1。FPV + RTV の用量は 36mg/kg/ L (max.1,400mg) + 6mg/kg/ 日 (max.200mg) の分 2。分 1 は推奨されない。Boosted SQV (SQV + 低用量 RTV) は成人量が内服できる 2 次性徴終了後の児に限定される。(文献 5 より引用)

I 感染症の種類別に小児感染症を考える

100mg/日、FPV(フォスアンプレナビル)では6 mg/kg/日、LPV/r(ロピナビル・リトナビル)では8 mg/kg/日などさまざまであり、PIの血中濃度や副作用に不明な点が多い。EFV(エファビレンツ)は海外での使用実績が豊富であり、現時点では第一選択と考えられる。NVP(ネビラピン)はEFVが飲めない児に適応される。また、NRTIについても、成人で一般的な薬剤が推奨薬剤となったが、剤形が限られていたり小児用量が不明な薬剤もある。それぞれの薬剤の年齢別用法用量は複雑であり、ガイドラインを参照されたい。

さらに、最近ではインテグラーゼ阻害剤やCCR5阻害剤などの新しい作用機序を持つ薬剤も出てきている。これらの新薬は成人では使用されているが、小児では十分なデータがなく、一般的には推奨されない。単剤投与・2剤のみの投与は抗ウイルス作用が弱く、耐性化の原因となるので推奨されていない。HAARTでウイルスが抑えられない場合、3剤以上の薬剤を使用するMultidrug RegimenやNNRTIとPIを組み合わせる方法もある。

V 副作用

抗HIV薬は副作用が多く、同じ薬を数年以上飲み続けることが困難なことも多い。近年、飲みやすく副作用が少ない薬が増えてきたが、小児におけるデータは不十分である。

1. 嘔気・嘔吐、下痢

NRTI、PIいずれも嘔気・嘔吐や下痢などの胃腸症状が高頻度に起こる。特にRTV、LPV/rは液剤の中に約40%のアルコールを含むため、嘔気が強く出ることが多い。一回

の量が多くはないので急性アルコール中毒の報告例はないが、嘔気のために中断した例は多い。またNRTIも下痢が強くなることが多い。

2. 乳酸アシドーシス・ギランバレー症候群様症状・末梢神経障害

NRTI長期内服で無症候性高乳酸血症の発生率は32%であるが⁹⁾、致死率の高い重症乳酸アシドーシスを起こすことはまれである。しかし、周産期に抗HIV薬の曝露を受けた児の0.4%でミトコンドリア障害(死亡2例)を認めた⁹⁾。周産期のNRTI投与が成人以上の確率で重症乳酸アシドーシスをもたらす可能性があるため、出生後の予防投与中も慎重な経過観察が必要である。

3. リポジストロフィー、体脂肪分布異常・脂質異常症¹⁰⁾

HAARTの導入に伴って、体脂肪分布異常(腹部内臓脂肪の増加と手足・顔面の皮下脂肪減少)の発生が報告されている。最近の報告では26%の体脂肪分布異常、27%で高コレステロール血症、21%で高トリグリセライド血症が認められた。おもなリスク因子として病期進行、d4T(サニルブジン)、ddI(ジダノシン)の使用、PIの使用(特にRTV)、HAARTの長期化(3年以上)、女児などが挙げられている。

4. 肝機能異常

全ての抗HIV薬は肝機能異常を起こす可能性があり、肝炎の有無に関わらずAST(アスパラギン酸アミノ基転移酵素)、ALT(アラニンアミノ基転移酵素)、γGTP(グルタミントランスペプチターゼ)が基準値上限の3~5倍以上を示すことがある。重度の肝障害発生率はNVP 2~3%、EFV 0.5%、検査値異

ATV(アタザナビル)
LPV/r(ロピナビル・リトナビル)
NVP(ネビラピン)
ddI(ジダノシン)
ALT(アラニンアミノ基転移酵素)

FPV(フォスアンプレナビル)
EFV(エファビレンツ)
d4T(サニルブジン)
AST(アスパラギン酸アミノ基転移酵素)
γGTP(グルタミントランスペプチターゼ)

常は NVP 8～13%、EFV 5%であり、特に NVP は CD4 細胞数 $> 250/\text{mm}^3$ の女性で肝毒性のリスクが高く、原則禁忌である⁵⁾。

5. 過敏症

NVP や ABC (アバカビル) は過敏症を起こしやすい。NNRTI の過敏症は軽症から中等度が多く、投与開始後 2～3 週前後に多く見られる⁵⁾。高度肝機能異常を伴う重度の場合は直ちに投与を中止すべきである。ABC 過敏症は内服者の 2～3%で、90%以上が内服開始後 6 週間以内に発生し、発熱・疲労感・胃腸症状や呼吸器症状を伴い、致死となる場合もある。HLA-B*5701 と強い相関があるため¹¹⁾、治療開始前に HLA (human leukocyte antigen) タイピング検査が推奨されているが、白人に比べてアジア・ヒスパニック系では HLA-B*5701 保有者が 0.1～2%と少ないため、必ずしも必要とはされていない。しかし小児、特に乳児における過敏症の臨床像や発症率は十分に判明しておらず、使用には注意を要する。

6. 腎機能障害

TDF (フマル酸テノホビル) による急性尿細管壊死や Fanconi 症候群などが多数報告されている。TDF の腎毒性の主体は尿細管機能低下であり、一部の患者では尿細管におけるリンや低分子タンパクの再吸収低下が進行する¹²⁾。二次性徴が完了していない小児では骨塩量への影響が懸念されるため、TDF の使用は原則 Tanner Stage 4 以上の年長者に限られる。

VI 薬剤耐性

HIV 遺伝子の変異速度が速く、抗 HIV 薬がウイルスを十分に抑制できないと、残存ウイルスに薬剤耐性変異が発生する。薬剤耐性の検査としては、薬剤の標的酵素の責任遺伝子

のアミノ酸配列を解析する genotyping と、さまざまな濃度の薬剤を投与してウイルス培養を行い、ウイルス増殖阻止能を測定する phenotyping の 2 種類がある。Phenotyping ができる施設は国内でも限られているが、genotyping は 2006 年 4 月 1 日より保険適用となった。一般に薬剤耐性検査は、以下のタイミングで行うことが推奨される⁵⁾。

- ① 診断時 (急性感染症例を含む)。
- ② 治療開始時、再開時。
- ③ 抗 HIV 療法中にウイルス学的効果が失われた場合 (一旦検出感度以下に到達後、再びウイルス量が 1,000 コピー/mL 以上に上昇した場合)。
- ④ 治療開始後のウイルス抑制が不十分な場合 (3～6 カ月経過しても血中ウイルス量が 1,000 コピー/mL 以下に達しない場合)。
- ⑤ 母子感染予防開始時。

VII 心理的・社会的問題

1. 服薬アドヒアランス

HIV の治療で最も重要なのは、アドヒアランス (きちんと薬を飲み続けること) である。抗 HIV 薬は HIV を抑えることはできるが消滅することはできず、患者は薬を半永久的に飲み続ける必要がある。しかも、服薬率が 95% 以上を維持することが大切だが、小児では意外に難しい。以下の諸点に注意する必要がある。

- ① 保護者の教育 (特に HAART の初回治療の重要性)。
- ② 家族や関係者、医療チーム全体で感染児を支援する。服薬表の記録。
- ③ 治療開始直後の数カ月の綿密なフォローアップ。
- ④ 苦い薬を避ける。苦痛なく飲む方法の

ABC (アバカビル)

TDF (フマル酸テノホビル)

HLA (human leukocyte antigen)

I 感染症の種類別に小児感染症を考える

工夫。

- ⑤ 内服回数や錠数の少ない組み合わせの選択。
- ⑥ 生活習慣・生活リズムに合わせた薬剤の選択。
- ⑦ 保護者と感染児の信頼関係。
- ⑧ 思春期以降になると、内服が煩雑で副作用が強いわりに、明らかな症状がないと薬の継続が困難になる。本人への告知も重要な課題である。

2. 感染の告知

わが国では母子感染の大半が1990年代に発生している。現在、その子供たちが成長して思春期にさしかかっており、親だけでなく周囲との関わりも増え、告知を検討すべき時期にきている。感染の告知は以下の点で極めて重要かつ慎重に扱うべき問題である。

- ① 薬を毎日飲み続けることは難しい。苦痛になると服薬への疑問が生じ、感染を詳しく知りたがるようになる。単に親から命令されて飲むことに納得できなくなる。また、告知されても感染が受容できない場合、逆に服薬を拒否することもある。
- ② 児が母子感染の経緯を知った場合、話し方次第では両親への怒りや嫌悪・憎悪などを一気に誘発しかねない。特に思春期では両親との葛藤が激しくなる時期であり、注意が必要である。
- ③ 思春期では感情の起伏が激しく、自己嫌悪・自己否定が続き、衝動的な行動が出やすくなる。こうした不安定な時期に告知を行うのは危険である。
- ④ 異性との性的な付き合いがみられるようなら、相手への感染リスクについて正確な情報を与えなければならない。性的接触を禁ずるのではなく、正確な感染予防知識を持たせることが必要である。
- ⑤ 学校の職員などに、児の感染を告知するかどうかは非常に難しい。HIVに対する差別・偏見は極めて強く、医療側がどれ

ほどHIVの感染リスクが少ないかを説明しても、告知することによって入学を拒否される可能性もある。学校が障害児や慢性疾患児を受け入れた実績や、両親と学校側との面接などを通して、告知が正しく受け止めてもらえそうか、慎重に見極める必要がある。

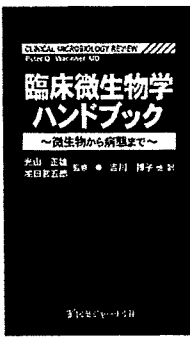
VIII おわりに

近年、小児のHIV感染症についてガイドラインが大きく変わってきている。診断のための検査時期・方法がより明確にされる一方、推奨薬剤については成人の実績を参考に大きく変更された。ただし、これらの薬剤は小児での使用実績は十分でなく、日本人においては使用経験すらないのが実情であり、副作用に十分注意する必要がある。1990年代に多く発生したHIV感染児が思春期を迎えつつあるが、感染の告知についての正答はない。本人に感染を受容させ、周囲の偏見からいかに支えていくか、真剣に考えるべき時期に来ている。

文 献

- 1) 「周産期・小児・生殖医療におけるHIV感染対策に関する集学的研究」班(主任研究者:和田裕一, 分担研究者:塚原優己):平成19年度母子感染予防対策マニュアル第5版
- 2) HIV Paediatric Prognostic Markers Collaborative Study Group: *Lancet* 362: 1605-1611, 2003
- 3) Gray L, et al: Fluctuations in symptoms in human immunodeficiency virus-infected children: the first 10 years of life. *Pediatrics* 108: 116-122, 2001
- 4) Puthanakit T, et al: Hospitalization and mortality among HIV-infected children after receiving highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect* 44 (4): 599-604, 2007
- 5) Working Group on Antiretroviral Therapy and Medical Management of HIV-Infected

- Children : Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in Pediatric HIV Infection. July 29, 2008. <http://www.aidsinfo.nih.gov/guidelines>
- 6) Dunn DT, et al : The sensitivity of HIV-1 DNA polymerase chain reaction in the neonatal period and the relative contributions of intra-uterine and intra-partum transmission. *AIDS* 9 : F7-F11, 1995
 - 7) Simonds RJ, et al : Sensitivity and specificity of a qualitative RNA detection assay to diagnose HIV infection in young infants. Perinatal AIDS Collaborative Transmission Study. *AIDS* 12 : 1545-1549, 1998
 - 8) Desai N, et al : Lactate levels in children with HIV/AIDS on highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 17 (10) : 1565-1567, 2003
 - 9) Blanche S, et al : Persistent mitochondrial dysfunction and perinatal exposure to antiretroviral nucleoside analogues. *Lancet* 354 : 1084-1089, 1999
 - 10) European Paediatric Lipodystrophy Group : Antiretroviral therapy, fat redistribution and hyperlipidaemia in HIV-infected children in Europe. *AIDS* 18 : 1443-1451, 2004
 - 11) Mallal S, et al : Association between presence of HLA-B *5701, HLA-DR7, and HLA-DQ3 and hypersensitivity to HIV-1 reverse-transcriptase inhibitor abacavir. *Lancet* 359 : 727-732, 2002
 - 12) Kinai E, Hanabusa H : Progressive renal tubular dysfunction associated with long-term use of tenofovir DF. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2008, accepted on Dec. 11, 2008



臨床微生物学ハンドブック

～微生物から病態まで～

聖マリアンナ医科大学・昭和薬科大学客員教授 嶋田甚五郎 監修
 京都大学大学院医学研究科微生物感染症学教授 光山 正雄
 新潟市民病院感染症担当医 吉川 博子 他 訳

B 6 変型判 412頁 定価 4,095円 (本体 3,900円 + 税 5%) 送料実費
 ISBN4-7532-1893-7 C3047

おもな内容

I. 基礎

1. 基本用語解説

II. 細菌

2. グラム陽性球菌
3. グラム陽性桿菌および常在菌でない嫌気性菌
4. 常在嫌気性菌
5. グラム陰性球菌
6. グラム陰性桿菌 (呼吸器関連菌)
7. グラム陰性桿菌 (尿路関連菌)
8. グラム陰性桿菌 (消化器関連菌)
9. 人畜共通感染菌
10. 節足動物媒介性細菌
11. 抗酸菌および抗酸性菌
12. スピロヘータ
13. クラミジア
14. マイコプラズマとウレアプラズマ
15. 性状別細菌一覧

III. ウイルスとプリオン

16. DNAウイルス
17. RNAウイルス
18. プリオン
19. ウイルス一覧表

IV. 真菌

20. 真菌 : 真菌症
21. 性状別真菌一覧


V. 寄生虫

22. 寄生虫
23. 寄生虫一覧表

VI. 総一覧

24. 全微生物総合一覧表

○訳者註一覧


株式会社 医薬ジャーナル社 〒541-0047 大阪市中央区淡路町3丁目1番5号・淡路町ビル21 電話 06(6202)7280(代) FAX 06(6202)5295 (振替番号)
 〒101-0061 東京都千代田区三崎町3丁目3番1号・TKIビル 電話 03(3265)7681(代) FAX 03(3265)8369 (03)10-1-33353
<http://www.iyaku-j.com/> 書籍・雑誌バックナンバー検索、ご注文などはインターネットホームページからが便利です。

最新医学・別冊 新しい診断と治療の ABC 65 (別刷)

HIV 感染症と AIDS

第 4 章 治療と管理・対応

HIV 検査と検査相談体制

加藤真吾 今井光信

最新医学社

第4章 治療と管理・対応

HIV 検査と検査相談体制

要旨

HIV 検査技術は飛躍的に進歩し、スクリーニング検査には抗原抗体同時検査や迅速検査、確認検査にはウェスタンブロット (WB) 法に加えて遺伝子検査法が導入され、HIV 感染をより早期に診断できるようになった。このような技術的進歩のもと、保健所や病院での HIV 検査は順調に広がっておりつつある。しかしながら、新規感染数は増加の一途をたどっており、HIV 感染の早期診断・早期治療の普及と感染拡大の抑制のためには、より一層の受検しやすい検査相談体制の整備・拡充が重要となっている。

はじめに

HIV 感染を調べるための検査は、基本的にスクリーニング検査と確認検査の2段階により行われる。スクリーニング検査には抗原抗体同時検出法やイムノクロマト法などが使用されている。確認検査にはウェスタンブロット (WB) 法が広く使用されているが、急性期感染の確認には遺伝子検査法が重要な役割を果たしている。

本稿の前半では、HIV に関する最新の免疫学的検査法と遺伝子検査法を紹介した後、さまざまな医療の場におけるこれらの活用法と問題点について解説する。後半では、我が国における検査相談体制の現状と今後の取り組むべき課題について述べる。

● キーワード

EIA
迅速検査
リアルタイムPCR
VCT
PITC

免疫学的検査法

HIV スクリーニング検査に用いる酵素免疫測定法 (EIA) は、HIV が AIDS の原因であると確認されて以来、飛躍的な進歩を遂げてきた。現在、我が国の検査センターなどでは、HIV-1 と HIV-2 に対する抗体 (IgG と IgM) と HIV-1 の p24 抗原を同時に検出できる、いわゆる HIV-1/2 抗原抗体同時検出スクリーニング検査法 (HIV-

2 については抗体のみ検出) が標準的に使用されている。初期の頃の検査法に比べると、検出の感度と特異度が高まっただけでなく、ウィンドウ期間が大幅に短縮され、HIV-1 に加えて HIV-2 感染にも対応できるようになった。

一方、検査法の簡易化と迅速化に関しても急速に進歩し、血液または血清を 1 滴加えて 15 分間静置するだけで結果の得られる迅速検査法 (イムノクロマト法) が開発された。現在、国内で市販されている迅速検査キットはインバネス社のダイナスクリーン[®] だけであるが、近々、抗原と抗体の両方を 1 つのキットで個別のラインとして検出可能な迅速キットが販売される予定である。米国などでは唾液を用いて検査のできる迅速検査キットが市販されており、国内でも利用可能となることが期待される。

HIV スクリーニング検査では、抗原-抗体の交差反応や反応試薬の非特異的反応により、およそ 0.3% 程度の人で、感染していないにもかかわらず陽性反応が出る場合がある (偽陽性)。このため、スクリーニング検査で陽性となった場合には、感染による真の陽性が偽陽性かを鑑別するため確認検査が必要となる。抗体の確認検査法としては、HIV の構成タンパクそれぞれに対する抗体の有無を調べる WB 法が広く使われている。ただし、WB 法の結果が判定保留となる場合や、陰性であっても感染初期が疑われる場合では、遺伝子検査により感染初期か否かを確認する必要がある。

遺伝子検査法

血漿 HIV-1 RNA 量は感染個体内のウイルス複製レベルを反映しており、病期の進行予測や抗 HIV 治療の効果判定の重要な指標であることから、HIV 感染のモニタリングのために広く使用されている。血漿 HIV-1 RNA 定量法の原理としては、PCR/ハイブリダイゼーション、リアルタイム PCR、転写増幅法 (TMA)、枝分かれ DNA (bdNA) などがある。国内で現在利用可能なのはロシュ社のコバス TaqMan HIV-1[®] とアボット社のアキュジーン m-HIV-1[®] で、どちらもリアルタイム PCR を原理としており、その特性を生かして広範囲の定量性、迅速性、コンタミネーション防止のために重要な密封性を実現している。以前は PCR/ハイブリダイゼーションを原理とす

るアンプリコア HIV-1 モニター[®]がロシュ社から販売されていたが、2009 年末で販売が中止された。

ロシュ社のコバス TaqMan HIV-1[®] に関しては、以前使われていたアンプリコア HIV-1 モニター[®]に比べて測定値が2～3倍高くなったという問題が指摘されていた。同社の最近の報告によると、血液検体を凍結保存して運搬していたため、解凍時に細胞成分が血漿成分に混入したことがおそらくその原因で、このような凍結操作を止めることにより測定値の乖離が軽減されるとのことである。

HIV 粒子は抗体よりも2週間ほど早く血中に出現するため、血漿 HIV-1 RNA 定量法を確認検査に使用することで HIV-1 感染をより早期に診断することが可能となる。しかし、血漿 HIV-1 RNA 定量法を確認検査に用いた場合のデータの蓄積がまだ十分ではないため、血漿 HIV-1 RNA 定量法が陽性で WB 法が陰性の場合には HIV の急性期感染と判定しても良いが、適当な時期に WB 法による再検査を行って、抗体検査による陽性を確認することが望ましい。

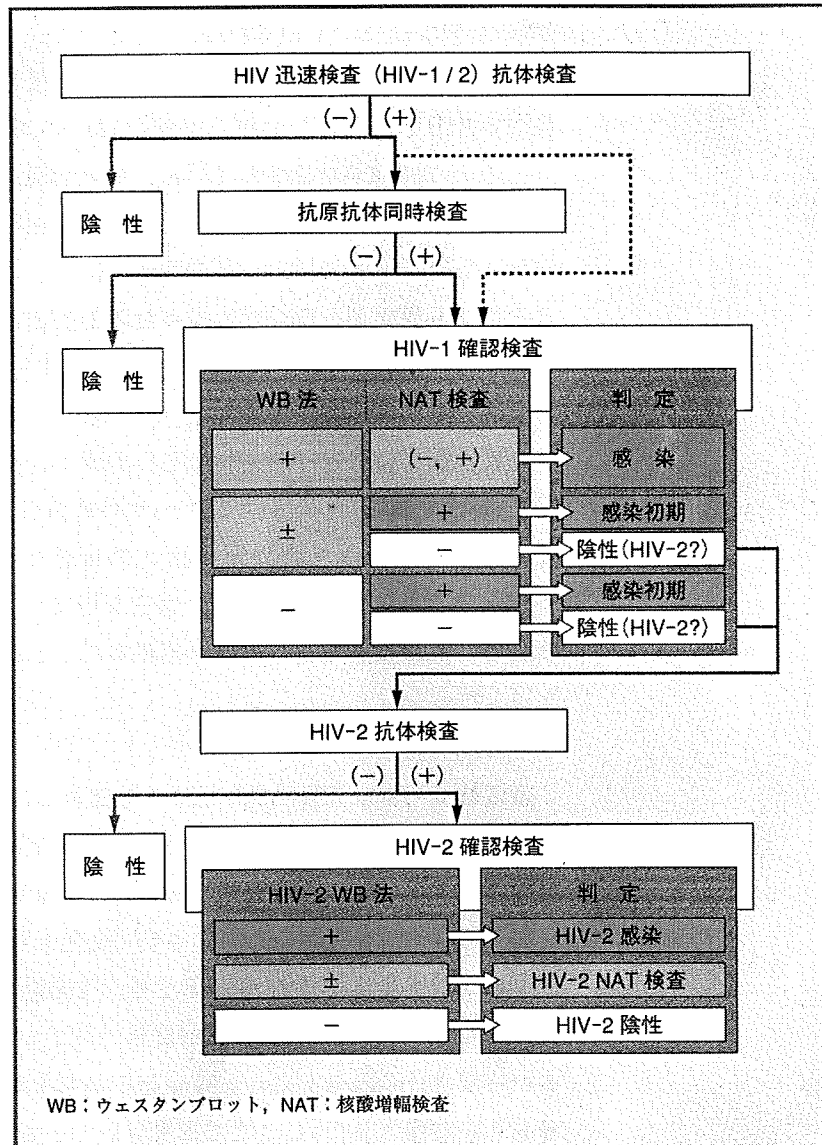
HIV 検査フローチャート

前述のように、HIV 感染を調べる検査はスクリーニング検査と確認検査の2段階で行われるが、その具体的な実施方法は検査の目的や対象者の違いなどにより必ずしも一定ではない。

一般的な診療の場における HIV 検査としては、『診療における HIV-1/2 感染症の診断 ガイドライン 2008』（日本エイズ学会・日本臨床検査医学会 標準推奨法）が発表されている¹⁾。エイズ学会のホームページ <http://www.jaids.umin.ac.jp/> から入手可能なので、詳しくはそちらを参照されたい。ここで提案されている検査フローチャートは、急性感染例や HIV-2 感染にも対応できるよう工夫されている。しかし、スクリーニング検査が偽陽性であった場合、確認検査が陰性であっても判定保留となり、2週間後の再検査を必要とするため、妊婦のような有病率の低い集団が検査対象の場合、偽陽性と陰性と判断するまでの過程が煩雑で時間を要するため、混乱が生じる可能性がある。

多くの保健所に HIV 抗体迅速検査キットを用いた即日検査が導入されており、陰性の場合はその日のうちに結果を知ることができるという点で利便性が高く、受検者数の増大に役立っている²⁾。図1に迅

図1 HIV迅速検査実施フローチャート



速検査の実施フローチャートを示す。迅速検査キットの偽陽性率 0.5～1% と通常のスクリーニング検査に比べて高いため、確認検査で陰性と判定される検体が多くなる。その対策として、陽性検体に対して抗原抗体同時検査を追加検査として確認検査の前に実施することで、偽陽性例を効率的に除外することが可能となる。

現在、日本で使用されている HIV スクリーニング検査はすべて HIV-2 抗体を検出できる。したがって、HIV スクリーニング検査が

陽性で HIV-1 確認検査が陰性の検体については、HIV-2 感染の可能性を考慮し、HIV-2 抗体の確認が必要となる。通常 HIV-2 の WB 法を行い、陽性であれば HIV-2 感染、陰性であれば HIV-2 の感染は否定される。ただし、HIV-2 の検査で判定保留となった場合や、HIV-2 の初期感染の可能性が高いと思われる場合には、HIV-2 の遺伝子検査で HIV-2 感染の確認を行う必要がある。現在、この HIV-2 遺伝子検査は商業的に利用できないため、このような症例に遭遇した場合は、各地の衛生研究所、国立感染症研究所や専門の研究機関に相談する必要がある。

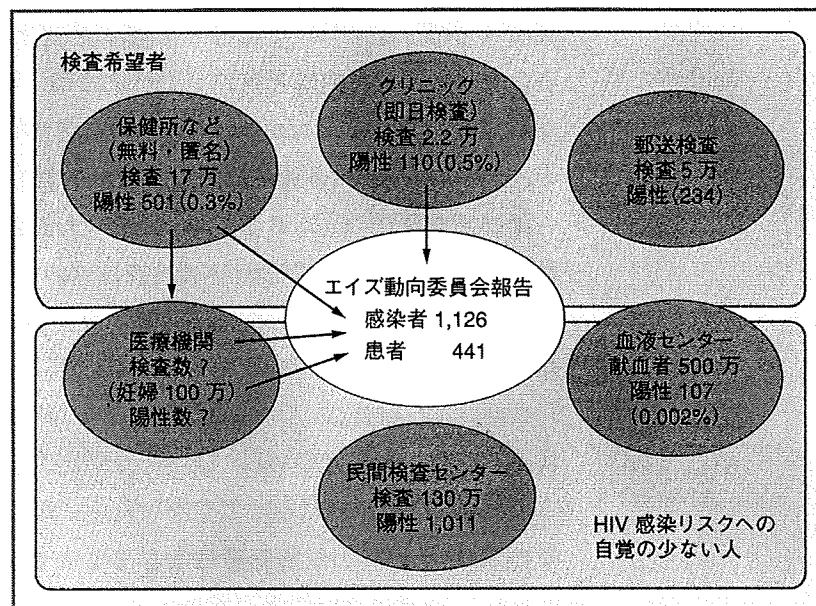
妊婦 HIV 検査は、陽性妊婦の抗 HIV 治療と母子感染予防のために非常に重要な検査である。最近の全国調査によると、我が国における妊婦 HIV 感染者は極めて少ないため、現行のスクリーニング検査での陽性結果のうち真の陽性者は 2% と少なく、偽陽性の割合が 92.2% と非常に高いことが報告されている³⁾。このような偽陽性妊婦は適切な情報提供を受けずに拠点病院などに紹介されることが多く、無用な精神的ストレスを受けている。この問題に対処する方策の 1 つは、前述のように、最初のスクリーニング検査と同等以上の感度を持つ抗原抗体同時検査を追加検査として実施することにより、偽陽性例の減少を図ることである。もう 1 つの方策は、スクリーニング検査時に確認検査用の検体も同時に採取し、スクリーニング検査陽性検体は自動的に確認検査を行うというものである（栃木方式³⁾。この方式は、採血量が増えることに対する忍容度、検査料、確認検査の方法など、幾つかの検討すべき課題が残されているが、スクリーニング検査偽陽性の結果を妊婦に返すことがなくなるので、問題解決のための有効な方法と成りうる。

我が国における検査相談体制

保健所など（保健所とそれ以外の特設検査施設）における、匿名の無料による検査・相談体制の充実は、感染に関する正しい知識の普及啓発と並んで、我が国における HIV 感染予防対策の重要な柱として位置づけられている⁴⁾。

保健所などにおける HIV 抗体検査数はここ数年着実に増加し、平成 20 年は 17.7 万件（前年比 15% 増）と過去最高であった。このう

図2 感染者・患者報告数と検査数・検査陽性数



ち、特設検査施設での検査件数は2.6万件であった。毎年行われている全国アンケート調査によると⁹⁾、保健所などのうち、即日検査を実施している施設は59%、夜間検査は29%、土日検査は14%であり、通常検査と平日の組み合わせの施設は30%であった。すなわち、かなり多くの施設で利便性の高い検査相談を提供していることが示されている。また、保健所などの76%でHIV検査以外の性感染症(STD)検査を実施されており、ほかのSTD対策との連携が図られている。一方、民間クリニックにおける自発的な有料による即日検査の普及も進んでおり、全国25施設での検査数は2.2万件であった。

平成20年におけるエイズ動向委員会へのHIV感染者患者・AIDS患者報告数と、保健所などや民間クリニックなどにおけるHIV確認検査陽性数の関係を図2に示す。保健所などで501件（陽性率0.28%）の陽性者が見つかるが、特設検査施設がそのうちの164件（0.63%）を占める。民間クリニックにおける陽性判明者数は104件（0.47%）であった。合わせると、平成20年の新規HIV感染・AIDS患者報告数1,557件のうち、39%が自発的HIV検査で見られたことになる。陽性判明者の医療機関への受診割合は、保健所などが75%、民間クリニックは90%であった。一方、民間の郵送

HIV 検査を約5万人が利用し、そのうち234人がスクリーニング検査陽性であった。一般に郵送検査は匿名で行われているため、確認検査の実施や医療機関などへのつながりについてほとんど把握されていない。この問題に取り組むことが今後必要である。

HIV 感染率の高い地域においては、予算や人員などによる制約から検査数をこれ以上増やすことが困難な保健所などが少なくない。今後は、地域の実情の応じた特設検査施設の充実・活用や、主に HIV 感染症や STD 診療にかかわる民間クリニックでの HIV 検査の拡大を図ることが重要であると考えられる。

自発的検査相談 (VCT) と医療提供者主導による検査 (PITC)

HIV 検査相談の実施形態は大きく2つに分類することができる。1つは、受検者主導による検査相談で、自発的検査相談 (VCT) とも呼ばれる。この場合における検査前後の受検者への対応については、エイズ予防財団、非営利団体 (NPO)、保健所などにおける実践と検討を通じて包括的な手引きが整備されている²⁶⁾。もう1つは医療提供者 (医師) 主導による検査相談で、PITC と呼ばれる²⁷⁾。PITC には、HIV 感染を疑わせる症状や関連疾患がある受診者に対して HIV 感染症を診断するために行われるものと、症状の有無にかかわらず HIV 感染のスクリーニングのために行われるものがある。急性感染期症状やほかの性感染症がある場合の検査が前者にあたり、母子感染予防のための妊婦 HIV 検査が後者にあたる。近年、感染自認率が低くとどまっていることや、AIDS 発症後に初めて HIV 陽性が判明する例が多いことなどから、感染者の早期治療と HIV 感染拡大の抑制を目的に、医療施設を受診したすべての成人・若者を対象に HIV 検査をルーチン検査として提供するという方針が、米国を中心に提案されている。このような HIV スクリーニングを目的とした PITC を我が国にも導入すべきかどうかについて考えてみる。我が国の HIV 感染者数は現段階では米国に比べて非常に少ないため、一般集団を対象としたスクリーニング検査での陽性的中率は、数%以下と極めて低いことが予想される。また、HIV 感染者を診療した経験のある医師が少ないため、偽陽性者や陽性者に対する対応で混乱が生じることが危惧

される。医療費抑制が重要課題となっている中、膨大な HIV 検査費用をだれが負担するかという問題もある。人権や個人情報の保護に関しても、我が国の歴史は浅く、欧米諸国に比べて脆弱な面がある。これらのことを考慮すると、現在の我が国における PITC は、HIV 感染率が特に高い性感染症罹患者にターゲットを絞って、まずは実施すべきであると考えられる。

加藤 真吾・今井 光信

文 献

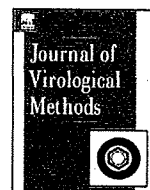
- 1) 山本直樹, 他: 診療における HIV-1/2 感染症の診断 ガイドライン 2008 (日本エイズ学会・日本臨床検査医学会 標準推奨法). 日エイズ会誌 11: 70-72, 2009.
- 2) 今井光信, 他: 保健所等における HIV 即日検査のガイドライン 第2版, 厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業, 「HIV 検査体制の構築に関する研究」, 2005.
- 3) 和田裕一, 他: 厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業「周産期・小児・生殖補助医療における HIV 感染対策に関する集学的研究」総合研究報告書 (平成 17~19 年度)
- 4) 厚生労働省: 後天性免疫不全症候群に関する特定感染症予防指針, 2006.
- 5) 今井光信, 他: 厚生労働科学研究費補助金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」総合研究報告書 (平成 18~20 年度)
- 6) 財団法人 エイズ予防財団: エイズ相談マニュアル, 2008.
- 7) UNAIDS and WHO: Guidance on provider-initiated HIV testing and counseling in health facilities. 2007.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Virological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jviromet

Quantitation of HIV-1 group M proviral DNA using TaqMan MGB real-time PCR

Makiko Kondo^{a,*}, Koji Sudo^b, Rie Tanaka^b, Takako Sano^a, Hiroko Sagara^c, Shinya Iwamuro^d, Yutaka Takebe^e, Mitsunobu Imai^a, Shingo Kato^b

^a Division of Microbiology, Kanagawa Prefectural Institute of Public Health, 1-3-1 Shimomachiya, Chigasaki, Kanagawa 253-0087, Japan

^b Department of Microbiology and Immunology, Keio University School of Medicine, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan

^c Department of Infectious Diseases, Yokohama Municipal Citizen's Hospital, 56 Okazawacho, Hodogaya-ku, Yokohama, Kanagawa 240-8555, Japan

^d Atsugi City Hospital, 1-16-36 Mizuhiki, Atsugi, Kanagawa 243-8588, Japan

^e AIDS Research Center, National Institute of Infectious Disease, 1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan

ABSTRACT

The level of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) proviral DNA is likely to be an important marker of the long-term effectiveness of highly active antiretroviral therapy. A new method was developed for quantifying HIV-1 group M proviral DNA using TaqMan real-time PCR, in which degenerate primers and an MGB probe were used to resolve the difference in amplification efficiencies among different subtypes. The present assay provided good linearity and accuracy in the range of 4–5000 copies of proviral DNA in 0.5 µg of cellular DNA. The intra-assay and inter-assay coefficients were <31.6% and <30.1%, respectively. In 19 HIV-1 clinical isolates of six subtypes (A, B, C, CRF01_AE, F, and G), quantitation values by the real-time PCR assay matched closely those by Poisson distribution analysis of PCR results at endpoint dilution ($R^2 = 0.988$). This assay is characterized by the use of degenerate primers and having been validated by comparing with a Poisson distribution-based assay. The present real-time PCR assay is highly sensitive, linear, reproducible, accurate, and independent of group M subtypes. The assay will be useful for studying the relationship between HIV-1 proviral loads and the long-term efficacy of antiretroviral therapy for subtype B as well as non-B subtype strains.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

Article history:

Received 12 February 2008

Received in revised form 5 December 2008

Accepted 9 December 2008

Available online 10 March 2009

Keywords:

Real-time PCR

HIV-1 DNA quantitation

Degenerate primer

1. Introduction

Individuals infected with the human immunodeficiency virus (HIV-1) are generally followed by monitoring the plasma viral RNA loads and CD4+ cell counts, which are markers of viral replication and immune function, respectively (Mellors et al., 1996; Pantaleo et al., 1993). The plasma viral RNA level predicts minimally the rate of subsequent CD4+ cell decline (Rodríguez et al., 2006) and is used commonly as a marker of the outcome of highly active antiretroviral therapy (HAART). Although the plasma viral RNA level in the majority of patients receiving HAART declines below the detection limit within a few months after the start of therapy (Gallant et al., 2006), proviral DNA is detected persistently in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) or lymphoid tissue (Chun et al., 1997; Sonza et al., 2001). Several studies have suggested that measuring the proviral DNA level may be important for evaluating the long-term effectiveness of HAART (Burgard et al., 2000; De Milito et al.,

2003; Pellegrin et al., 2003), while this is sometimes conflicting (Soriano-Sarabia et al., 2007).

Real-time PCR is recognized widely as being superior to other DNA quantitation methods with regard to specificity, dynamic range, throughput, and the prevention of cross-contamination (Zhao et al., 2002). Several real-time PCR assays for HIV-1 proviral DNA quantitation have been described (Carr et al., 2007; Désiré et al., 2001; Gibellini et al., 2004; Kabamba-Mukadi et al., 2005; Saha et al., 2001; Yun et al., 2002; Zhao et al., 2002).

However, these assays have used primers and a probe that are identical to the consensus sequences of subtype B, which is distributed predominantly in the United States and European countries, and have not been validated extensively for non-B subtypes, which are widespread in developing countries. A new method was developed for quantifying HIV-1 group M proviral DNA by using TaqMan real-time PCR in which degeneration was introduced into primers and a probe to overcome the reduction in amplification and detection efficiencies caused by variation in the nucleotide sequences among different subtypes. The accuracy of the quantitation values were then evaluated by Poisson distribution analysis of PCR results at endpoint dilution.

* Corresponding author. Tel.: +81 467 83 4400; fax: +81 467 83 4457.
E-mail address: kondo.dvqy@pref.kanagawa.jp (M. Kondo).

2. Materials and methods

2.1. Study patients

Blood samples were collected from 33 patients who were HIV-1 positive and 40 anonymous individuals who were negative at two hospitals (Yokohama Municipal Citizen's Hospital and Atsugi City Hospital) in Japan. Blood samples from 19 patients were subjected to virus isolation and those from 18 patients (4 also served for virus isolation) were applied directly to the present HIV-1 DNA quantitation assay. In the latter 18 patients, 13 had received HAART, in 4 of whom blood samples prior to HAART were also assayed, and 5 patients had not been treated with antiretroviral agents. The patients provided written informed consent for the study, and this study was approved by the ethics committees of the two hospitals and the public health institute.

2.2. Sample preparation

HIV-1 was isolated from the PBMCs of patients by co-culture with PBMCs from healthy donors (Kondo et al., 2005). Propagation of HIV-1 in the co-cultures was confirmed by detection of p24 antigen in the culture fluid (VIDAS HIV p24 antigen kit, BioMérieux). DNA was extracted from the cultured cells or blood samples using a QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN) and diluted to a concentration of 50 ng/ μ l with TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA). The concentration of DNA was determined by spectrometry at 260 nm.

2.3. Sequencing and subtyping

The *env* C2V3 and *gag* p17–p24 regions were amplified by nested PCR. Primers used for *env* C2V3 were KH650, 5'-AATGTCAGCACAGTACAATGTACAC-3' (corresponding to nucleotides 6945–6969 of the HXB2 strain), and KH462 M, 5'-GCCCATAGTGCTTCTGCTGCT-3' (7796–7817) in a first-round PCR, and KH41, 5'-TCAACTCAACTGCAGTAAAT-3' (6995–7010), and KHC3E, 5'-AGAAAAATCCCTCTACAATTA-3' (7351–7374) in a second-round PCR; primers for *gag* p17–p24 were KHgag1, 5'-ATGGGTGCGAGAGCGTCACTATT-3' (790–812), and KHgag3E, 5'-CTCTGCTGGTGGGGCTGTGGCTG-3' (2149–2172) in a first-round PCR, and KHgag2, 5'-GGCAAGCAGGGAGCTGGAAAGA-3' (897–918), and KHgag4, 5'-GAAGGCCAAATTTCCCTAA-3' (2089–2108) in a second-round PCR. Both first-round and second-round PCRs were performed in a 50- μ l solution consisting of 0.5–1.0 μ g of DNA from PBMCs; 400 nM primers; 200 μ M dNTP; 1.25 U of Ex Taq polymerase (Takarabio, Otsu, Japan); and 1 \times PCR buffer (2 mM Mg²⁺ plus) supplied by the manufacturer. Following an initial denaturation step at 95°C for 3 min, 40 cycles of three-step PCR at 95°C for 30 s, at 55°C for 1 min, and 72°C for 2 min were carried out. Five microliters of a first-round PCR product was applied to a second-round PCR. PCR products were sequenced directly on both strands using an ABI Prism 3100 Avant automatic sequencer and an ABI Prism BigDye terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems). Accession numbers of nucleotide sequences of HIV-1 strains obtained in this study were AB453711 to AB453729.

The HIV-1 subtype was determined based on the *env* C2V3 sequences and, for some variants, the *gag* p17–p24 sequences. The sequences obtained were then aligned with reference sequences (HIV sequence database, <http://www.hiv.lanl.gov>) using the CLUSTAL X multiple sequence alignment program. A phylogenetic tree was constructed by the neighbor-joining method included in the PHYLIP 3.5c package (Felsenstein, 1989), and the subtype of the viral strains was assigned based on the bootstrap analysis.

2.4. Primers and probe for TaqMan real-time PCR

The primers and TaqMan probe were designed in the *gag* p24 region, which is the least variable among all the HIV-1 group M isolate sequences obtained from the Los Alamos HIV database (HIV sequence database, <http://www.hiv.lanl.gov>). To overcome the inhibitory effects of mismatching with template DNA, degenerate nucleotides were incorporated into the primers and probe at the positions in which variation of more than 10% was indicated among all the HIV-1 sequences. The forward primer deSK145 was 5'-AGTRGGGGGACAYCARGCAGCHATGCARAT-3', corresponding to nucleotides 1358–1387, and the reverse primer deSKCC1B was 5'-TACTAGTAGTTCCTGCTATRTCACTTCC-3', corresponding to nucleotides 1485–1512; these primers have been modified from the primers SK145 and SKCC1B that have been used for quantitation of HIV-1 RNA (Michael et al., 1999).

The TaqMan probes KK-MGB and deKK-MGB were oligonucleotides 5'-ATCAATGAGGAAGCTGCAGAATGGGA-3' (1400–1425) and 5'-ATCAATGARGARGCTGCAGAATGGGA-3' (1400–1425), respectively, coupled with a reporter dye [6-carboxy fluorescein (FAM)] at the 5' end and a non-fluorescent quencher and a minor groove binder (MGB), which is a Tm enhancer, at the 3' end.

2.5. Quantitation of the proviral HIV-1 DNA using TaqMan real-time PCR

Real-time PCR was performed using a TaqMan PCR Core Reagent kit (Applied Biosystems). The 50- μ l PCR mixture consisted of 10 μ l of extracted DNA solution (50 ng/ μ l); 200 nM primers (deSK145 and deSKCC1B); 200 nM deKK-MGB probe; 200 μ M dATP, dCTP, and dGTP; 400 μ M dUTP; 4 mM MgCl₂; 0.5 U of uracil DNA glycosylase; 1.25 U of AmpliTaq Gold polymerase; and 1 \times PCR buffer. Following two thermal steps at 50°C for 2 min and at 95°C for 10 min, 45 cycles of two-step PCR at 95°C for 15 s and at 60°C for 1 min were carried out. PCR amplification and data analysis were performed using the ABI PRISM[®] 7900HT (Applied Biosystems).

The standard curve for each run was generated with the plasmid pNL432 (5000, 2500, 500, 100, 20, and 4 copies per PCR reaction) which contains the entire length of proviral DNA from subtype B isolates NY5 and LAV (Adachi et al., 1986). The sensitivity and linearity were examined using dilution series of the plasmid p93JP-NH1 which contains proviral DNA from a CRF01_AE isolate (Kusakawa et al., 2002) and DNA extracted from cultured PBMCs infected with the strain IIIB belonging to subtype B. The concentrations of these three HIV-1 DNA standards were determined by Poisson distribution analysis of PCR results at endpoint dilution as described in Section 2.6. The specificity was tested using DNA extracted from the PBMCs of 40 individuals who were HIV-1 negative.

The variation and accuracy of intra-assay and inter-assay were assessed using 5000, 100, and 10 copies of IIIB proviral DNA which was diluted with 50 ng/ μ l DNA solutions from three different HIV-1-negative donors. DNA samples extracted from cultured cells or PBMCs were assayed in triplicate at each run, and the assay was repeated three times. Some of DNA samples were diluted such that the concentration be within the dynamic range (4–5000 copies per reaction). The average quantitation values for DNA samples from cultured cells were compared with the results obtained by the Poisson distribution analysis.

2.6. Quantitation of proviral HIV-1 DNA using the Poisson distribution method

The HIV-1 DNA concentration was determined by analyzing statistically the results of nested PCR of the sample diluted to near

the endpoint, as previously described (Kato et al., 2006; Kinai et al., 2007). Briefly, the DNA solution was first diluted serially ten-fold with 5 ng/ μ l human DNA and assayed using nested PCR. Then, the diluted solution that had conferred the second-last positive band was diluted serially two-fold and tested again using nested PCR. Finally, the DNA solution diluted at a ratio where the last positive signal was obtained in a series of two-fold dilutions was assayed in 20 replicates. Assuming that a single copy of HIV-1 DNA was detectable, the HIV-1 DNA concentration can be calculated from the proportion of negative reactions (P_0) using the null class equation of the Poisson distribution (Simmonds et al., 1990). The formula is as follows: HIV-1 DNA concentration = $-\ln P_0/V \times d$ (copies/ μ l), where V and d are the sample volume (μ l) assayed and the dilution ratio, respectively.

2.7. Statistical analysis

Standard curves and the linearity of real-time PCR quantitation were analyzed using simple linear regression. Reproducibility was evaluated by the analysis of variance. The correlation between the quantitation values obtained by real-time PCR and those obtained by the Poisson distribution method was analyzed using the Pearson's correlation test after logarithmic transformation. Difference in the average proviral loads between the treated and untreated groups was analyzed by the Student's *t*-test after logarithmic transformation.

3. Results

3.1. Necessity of degeneration in primers and probe

In preliminary experiments, a set of primers (SK145 and SKCC1B) and a probe (KK-MGB) SK145 were used for real-time PCR and it was found that four of the 19 DNA samples from six subtypes (A, B, C, CRF01_AE, F, and G) were below the lower quantitation limit: two were subtype A and two were CRF01_AE (see below). Comparison of the nucleotide sequences of the primers and probe with those of their binding sites of proviral DNA in all the samples showed more mismatches in the four samples that were not quantifiable (Fig. 1). Thus, degenerate nucleotides were incorporated into the primers and TaqMan MGB probe under the criterion as described in Section 2. Consequently, the maximum number of mismatches between the primer and virus isolates examined was reduced from five to two (Fig. 1). The following experiments were conducted using these degenerate primers and probe.

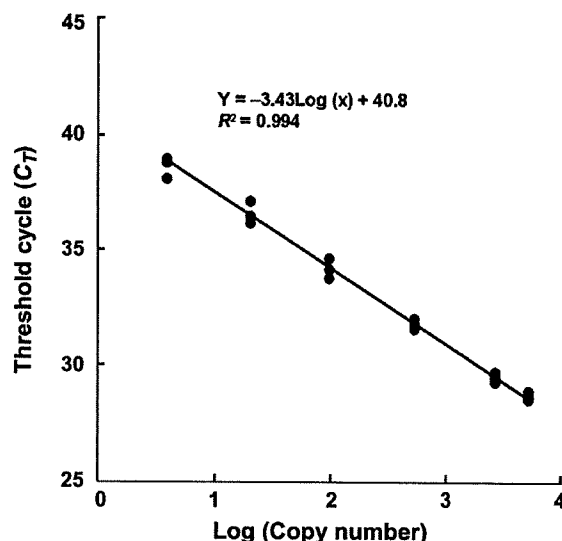


Fig. 2. Standard curve for HIV-1 DNA quantitation in the real-time PCR assay. A representative standard curve is shown, which was generated with 5000, 2500, 500, 100, 20, and four copies of pNL432 molecules in triplicate.

3.2. Standard curve and dynamic range of the TaqMan real-time PCR

Standard curves were generated for each run of real-time PCR at six dilutions of an HIV-1 DNA clone, pNL432, in the range of 4–5000 copies per reaction in the presence of 0.5 μ g of PBMC DNA from a healthy donor. The slopes of the standard curves were between -3.23 and -3.56 , the *y*-axis intercepts were between 40.0 and 41.0, and R^2 was between 0.991 and 0.995. A representative standard curve is shown in Fig. 2.

Serial dilutions of IIIB (subtype B) and p93JP-NH1 (CRF01_AE) were quantified using pNL432 as a standard, with good linearity and accuracy obtained in the range of 4–5000 copies of HIV-1 DNA of both subtypes ($y=0.977x - 0.068$ and $R^2 = 0.9995$ for IIIB; $y=0.986x - 0.005$ and $R^2 = 0.9997$ for p93JP-NH1) (Fig. 3). All of the 40 HIV-1 negative samples tested showed no increase in fluorescence signals during 40 PCR cycles. For some negative samples, fluorescent signals increased above the threshold when PCR was performed more than 40 times, but a value of more than four copies were never obtained.

| Strain | Subtype | Forward primer deSK145 | Probe deKK-MGB | Reverse primer deSKCC1B |
|--------|----------|--------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| | | <u>AGTGGGGGACAYCARGCAGCHATGCARAT</u> | <u>ATCAATGARGARGCTGCAGAAATGGGA</u> | <u>TACTAGTAGTTCCTGCTATRTCACTTCC</u> |
| IIIB | B | <u>AGTGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAAT</u> | <u>ATCAATGAGGAAGCTGCAGAAATGGGA</u> | <u>CCTTCACTGTATCGTCTTGATGATCAT</u> |
| 1 | B | -----T----- | -----G----- | -----G----- |
| 2 | B | -----C----- | -----R----- | -----Y-----K----- |
| 3 | B | -----C----- | -----R----- | -----Y----- |
| 4 | B | -----C----- | -----R----- | -----Y----- |
| 5 | B | -----T----- | -----K-----A-----Y-----W----- | -----S----- |
| 6 | B | -----T----- | -----K-----A-----Y-----W----- | -----S----- |
| 7 | B | -----T----- | -----K-----A-----Y-----W----- | -----S----- |
| 8 | CRF01_AE | -----C-----G----- | -----K-----A-----Y-----W----- | -----S----- |
| 9 | CRF01_AE | -----AT-----C-----G-----A----- | -----K-----A-----Y-----W----- | -----S----- |
| 10 | CRF01_AE | -----C-----R-----A----- | -----K-----A-----Y-----W----- | -----S----- |
| 11 | CRF01_AE | -----C-----G-----A----- | -----K-----A-----Y-----W----- | -----S----- |
| 12 | CRF01_AE | -----AT-----C-----G-----A----- | -----K-----A-----Y-----W----- | -----S----- |
| 13 | A | -----C-----G-----A-----G----- | -----K-----A-----Y-----W----- | -----S----- |
| 14 | A | -----C-----G-----T----- | -----K-----A-----Y-----W----- | -----S----- |
| 15 | A | -----C-----G-----A-----G----- | -----K-----A-----Y-----W----- | -----S----- |
| 16 | C | -----C-----G-----A-----G----- | -----K-----A-----Y-----W----- | -----S----- |
| 17 | F | -----C-----G-----A-----G----- | -----K-----A-----Y-----W----- | -----S----- |
| 18 | F | -----C-----G-----A-----G----- | -----K-----A-----Y-----W----- | -----S----- |
| 19 | G | -----T----- | -----K-----A-----Y-----W----- | -----S----- |

Fig. 1. Nucleotide sequences of the 19 HIV-1 isolates in the regions of the primers and probe used for the real-time PCR assay. The degenerate nucleotides incorporated into the primers and probe are underlined. The isolates 9, 12, 13, and 15 had more mismatches with the strain IIIB sequence than the other isolates. The nucleotide sequence of the deSKCC1B primer is shown in the inverse orientation. Only the mutations relative to the IIIB strain sequence are indicated. R, A/G; Y, C/T; H, A/C/T; K, G/T; W, A/T; M, A/C; S, C/G.

Table 1
Accuracy and reproducibility of intra-assay and inter-assay using different DNAs as diluent.

| Diluent DNA ^a | Input HIV-1 DNA ^{b,c} | Intra-assay (n = 5) | | Inter-assay (n = 3) | |
|--------------------------|--------------------------------|---------------------|----------------------|---------------------|----------------------|
| | | Mean ^c | SD ^c (CV) | Mean ^c | SD ^c (CV) |
| A | 5,000 | 4,770 | 260 (5.5%) | 4,790 | 850 (17.8%) |
| | 100 | 90.8 | 5.5 (6.1%) | 80.5 | 24.2 (30.1%) |
| | 10 | 8.8 | 2.2 (25.0%) | 8.1 | 1.6 (19.8%) |
| B | 5,000 | 4,980 | 190 (3.8%) | 5,250 | 540 (10.3%) |
| | 100 | 97.0 | 7.4 (7.6%) | 102.8 | 30.5 (29.7%) |
| | 10 | 10.6 | 2.6 (24.5%) | 10.7 | 1.4 (13.1%) |
| C | 5,000 | 5,070 | 190 (3.8%) | 5,060 | 690 (13.6%) |
| | 100 | 93.8 | 13.6 (14.5%) | 91.1 | 13.0 (14.3%) |
| | 10 | 7.6 | 2.4 (31.6%) | 8.0 | 2.4 (30.0%) |

^a Each of three DNA solutions (50 ng/μl) derived from different healthy donors was used as diluent for the standard HIV-1 DNA.

^b The HIV-1 IIB proviral DNA that had been quantified by the Poisson distribution method was added to each assay with an indicated copy number.

^c Expressed in copies per reaction.

3.3. Reproducibility and accuracy of the TaqMan real-time PCR

Reproducibility and accuracy were evaluated by measuring the IIB proviral DNA at 5000, 100, and 10 copies per reaction, which was prepared by using as a diluent three different donor DNA solutions (Table 1). The coefficient of variation (CV) was between 3.8 and 31.6% for intra-assay and between 10.3 and 30.1% for inter-assay; CV tended to decrease with an increase of input DNA. The accuracy was between –24.0 and 6.0% for intra-assay and between –20.0 and 7.0% for inter-assay.

3.4. Comparison of the TaqMan real-time PCR assay and Poisson distribution method

Proviral HIV-1 DNA in cultured cells from the 19 isolates of six subtypes (A, B, C, CRF01_AE, F, and G) was quantified by the real-time PCR assay using degenerate primers and a degenerate probe (Table 2). DNA samples were diluted to the proviral DNA concentrations between 19 and 585 copies per reaction, in which the CV for intra-assay was between 7.0 and 35.3% and that for inter-assay was between 1.0 and 35.9%. To evaluate the accuracy of the present assay, the same DNA samples were also measured by the Poisson distribution method, which is considered the gold standard for nucleic acid quantitation. Although the real-time assay with non-degenerate primers and probe did not

detect four of the 19 DNA samples (two were subtype A and two were CRF01_AE), the results of the real-time assay with degenerate primers and probe were equivalent to those of the Poisson distribution method. A comparison of these two sets of quantitation values showed a good linear relationship ($y = 0.983x + 0.082$, $R^2 = 0.988$).

3.5. Proviral DNA quantitation in clinical samples

Twenty four DNA samples from PBMCs of 18 individuals who were HIV-1 positive were measured by the present real-time PCR assay (Table 3). Twelve samples were obtained from 12 patients receiving HAART and had viral loads of <50 copies/ml; 12 samples were obtained from 10 patients who were not treated at sampling time and had viral loads of >1000 copies/ml. It was shown that HIV-1 DNA loads in the treatment group were significantly lower than those in the untreated group ($P = 0.004$). And also, it was shown that the proviral load decreased after start of HAART in four patients, P9, P27, P31, and P32, and increased after termination of HAART in one patient, P17. Reproducibility in these clinical samples which could be calculated was in the range of 6–50% for intra-assay

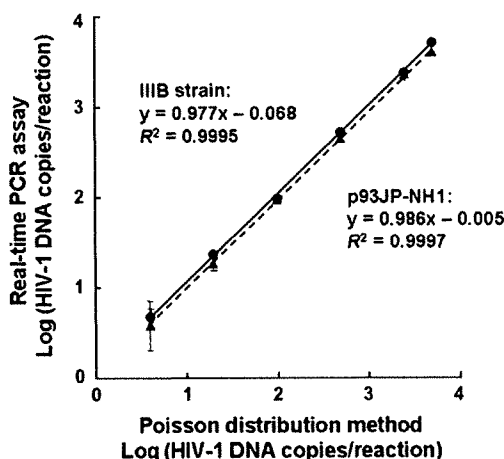


Fig. 3. Comparison of quantitation values obtained by the real-time PCR and the Poisson distribution method. Dilution series of cultured cell DNA of the strain IIB of subtype B (closed circles) and p93JP-NH1 of CRF01_AE (closed triangles) in the range of 4–5000 copies per reaction were measured in triplicate.

Table 2
Comparison of results from the real-time PCR assay and the Poisson distribution method.

| Sample ^a | Subtype | HIV-1 DNA level (copies/μg DNA) | | |
|---------------------|----------|---------------------------------|--------------------|-----------|
| | | Real-time PCR | | Poisson |
| | | Degenerate | Non-degenerate | |
| P1 | B | 23,600 | 34,500 | 26,000 |
| P2 | B | 2,640 | 3,710 | 1,900 |
| P3 | B | 11,100 | 8,650 | 13,000 |
| P4 | B | 2,380,000 | 1,610,000 | 1,500,000 |
| P5 | B | 2,460,000 | 2,960,000 | 2,200,000 |
| P6 | B | 67,500 | 67,500 | 110,000 |
| P7 | B | 1,560 | 1,720 | 3,000 |
| P8 | CRF01_AE | 1,760,000 | 2,100,000 | 1,400,000 |
| P9 | CRF01_AE | 2,490,000 | <LLOQ ^b | 3,500,000 |
| P10 | CRF01_AE | 154,000 | 176,000 | 98,000 |
| P11 | CRF01_AE | 71,700 | 67,600 | 85,000 |
| P12 | CRF01_AE | 39,900 | <LLOQ | 71,000 |
| P13 | A | 17,400 | <LLOQ | 10,700 |
| P14 | A | 50 | 67 | 32 |
| P15 | A | 156 | <LLOQ | 130 |
| P16 | C | 1,040,000 | 973,000 | 1,150,000 |
| P17 | F | 1,200,000 | 1,720,000 | 1,080,000 |
| P18 | F | 312,000 | 396,000 | 330,000 |
| P19 | G | 48,800 | 69,600 | 54,000 |

^a Denotes a patient code.

^b LLOQ, the lowest limit of quantitation