

図3.保健所における陽性者数と検査数の推移  
(政令市等を除く)

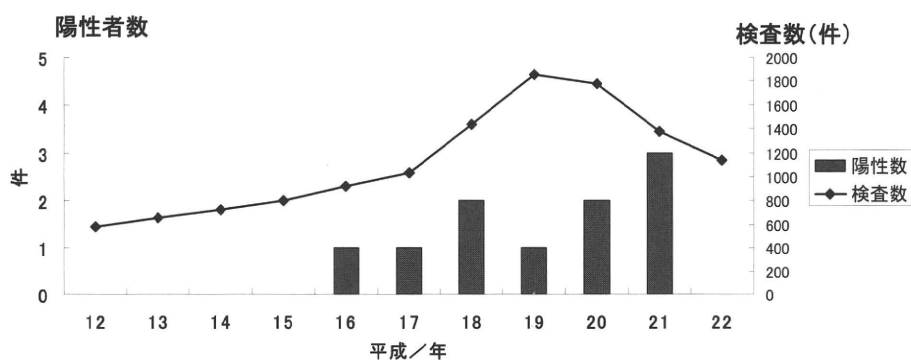


表1.クリニックにおけるHIV検査状況

月	件数	男	女	外国	確認	男	陽性	女
H22.1	32	30	2	0(1)	0	0	0	
2	35	31	4	0(2)	0	0	0	
3	35	32	3	0	0	0	0	
4	34	29	5	0	1	1	0	
5	28	23	5	1	0	0	0	
6	28	23	5	2	0	0	0	
7	39	29	10	0	0	0	0	
8	26	16	10	1	0	0	0	
9	32	22	10	0	1	0	0	
10	25	18	7	0	0	0	0	
11	24	17	7	0	0	0	0	
12	23	19	4	0(2)	1	1	0	
計	361	289	72	4(5)	3	2	0	

( ): 国籍不明者

表2. クリニックにおける過去4年間の検査状況

年	件数	男	女	性不明	外国	確認	陽性	
							男	女
H19	414	325	89	0	6	5	0	0
20	455	332	123	0	2(3)	10	2	0
21	461	363	97	1	10(12)	4	3	0
22	361	289	72	0	4(5)	3	2	0

( ): 国籍不明者

## 18. 汎用リアルタイム PCR 装置を用いた HIV-1RNA 定量法 (KK-TaqMan) の地方衛生 研究所への技術支援と KK-TaqMan 増幅領域における変異のモニタリング

研究分担者	近藤真規子 (神奈川県衛生研究所)
協力研究者	吉村幸浩、相楽裕子、立川夏夫 (横浜市立市民病院) 岩室紳也 (厚木市立病院) 井戸田一朗 (しらかば診療所) 山中晃 (新宿東口クリニック) 佐野貴子、今井光信 (神奈川県衛生研究所) 須藤弘二、加藤真吾 (慶應義塾大学医学部微生物学・免疫学教室)

### 研究要旨

血中 HIV-1 RNA 測定は保健所等の無料匿名検査での確認検査においても重要な検査の一つである。確認検査の多くは地方衛生研究所で行われているが、HIV-1RNA 測定キットがリアルタイム PCR を原理とするコバス TaqMan 法へ切り替わったことに伴い、高価な専用機器の購入が必要になり、全国の地方衛生研究所での実施が困難になった。そのため、本研究班では汎用リアルタイム装置を用いた in house の HIV-1RNA 測定法 (以下、KK-TaqMan) を開発した。昨年までの研究で、KK-TaqMan はコバス TaqMan とほぼ同様の精度であること、プライマー領域の 1 塩基の変異によりコバス TaqMan に低反応性を示した 1 症例についても問題なく測定できることが分かった。本年度は、保健所等での無料匿名 HIV 検査における確認検査をサポートするため、全国の地方衛生研究所を対象に KK-TaqMan の普及と技術移管を行った。感染者の多い地域を中心に技術移管を行い、現在、東京都安全健康センター、大阪府立公衆衛生研究所、神奈川県衛生研究所、横浜市衛生研究所、川崎市衛生研究所、埼玉県衛生研究所、福岡県保健環境研究所、北海道立衛生研究所、福島県衛生研究所、鹿児島県環境保健センター、大分県衛生環境研究センターにおいて KK-TaqMan の実施が可能である。

また、コバス TaqMan ではプライマーやプローブ領域の変異による低反応性検体が昨年の我々の症例以外にも報告されているが、詳細は明らかにされていない。そのため、HIV-1 陽性 186 症例を用いて KK-TaqMan、コバス TaqMan 増幅領域の遺伝子変異を調べ、測定値の信頼性について解析した。その結果、KK-TaqMan の下流プライマーと比べ 3' 末端から 3 番塩基の A から C への変異が 2 例認められ、これらはコバス TaqMan に低反応性を示したが、KK-TaqMan の測定値に影響は認められなかった。

### A. 研究背景

血中 HIV-1 RNA 測定は患者のフォローアップ検査としてだけでなく、各自治体で行っている保健所等の無料匿名検査での確認検査においても重要な検査の一つである。

HIV 確認検査の多くは各自治体の運営する衛生研究所が行っており、従来は HIV-1RNA

測定には市販のアンプリコア HIV-1 モニターキット (以下、アンプリコア) が用いられていた。しかし、2009 年末にアンプリコアが販売中止となり、リアルタイム PCR 法を原理としたコバス TaqMan HIV-1 (以下、コバス TaqMan) に切り替わった。しかし、コバス TaqMan では高価な専用装置が必要なため、地

方衛生研究所への導入は非常に難しく、また民間検査センターに依頼する場合でも、新たに8mlの採血が必要となった。これら問題を解決するため、我々は昨年までの研究において、血漿量500ulで汎用リアルタイム装置を用いたin houseのHIV-1RNA測定法（以下、KK-TaqMan）を開発し、本法がコバスTaqManとほぼ同様の精度であること、コバスTaqManに低反応性を示した1症例についても問題なく測定できることを報告した。（「HIV検査機会の拡大と質的充実に関する研究：平成18～20年報告書」および本研究班の「平成21年度報告書」参照）。

本年度は、保健所等での無料匿名HIV検査における確認検査をサポートするため、全国の地方衛生研究所を対照にKK-TaqManの普及と技術移管を行った。またHIV-1陽性186症例を用いてKK-TaqMan、コバスTaqMan両方の増幅領域について遺伝子変異を調べ、測定値の信頼性について解析した。

## B. 研究方法

### 1. KK-TaqManの地方研究所への普及と技術移管

#### ① NATスクリーニング検査実施機関

当研究班との協力により、保健所の無料匿名検査で3カ所（横浜市火曜夜間検査、川崎市日曜検査、神奈川県夜間検査）、大阪府の定点調査医療機関5カ所、計8カ所が、スクリーニング検査にNATを導入しており、これら施設のNAT検査は、それぞれ横浜市衛生研究所、川崎市衛生研究所、神奈川県衛生研究所、大阪府公衆衛生研究所が行っている。これら4カ所の衛生研究所については2009年10月にKK-TaqManのマニュアルおよび試薬、コントロールHIV-1RNAを送付し、検討を依頼した。

#### ② 地方衛生研究所への導入

本研究班の平成21年度第2回班会議（2009

年12月22日）、平成22年度地方衛生研究所HIV検査グループ会議（2010年5月24日）、全国の地方衛生研究所を対象にした衛生微生物技術協議会第31回研究会（2010年5月25日）等において、KK-TaqMan法を公開し、導入希望機関に操作マニュアル、コントロールHIV-1RNAを送付した。

KK-TaqManの操作マニュアルのフロー等を資料1に示した。

### 2. KK-TaqMan増幅領域の遺伝子解析

HIV-1感染者血漿186例を用いてHIV-1遺伝子のgag p17-p24領域を増幅し、ダイレクトシーケンス法（BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit：アプライドバイオシステムズ）により塩基配列を決定し、プライマーおよびプローブ領域の解析を行った。

（倫理面への配慮）

HIV遺伝子の解析については主治医から患者に研究内容を説明し同意を得ている。患者名は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、HIV遺伝子解析により流行株の特徴を調べることは、当研究所の倫理委員会で承認されている。

## C. 結果および考察

### 1. KK-TaqManの地方研究所への普及と技術移管

NATスクリーニング検査を導入している横浜市衛生研究所、川崎市衛生研究所、大阪府立公衆衛生研究所、神奈川県衛生研究所の4施設については、KK-TaqManの検討を2009年10月より行い、2010年4月以降は各施設での対応が可能となった。

次に地方衛生研究所HIV検査グループに属している東京都安全健康センター、北海道立衛生研究所、福岡県保健環境研究所において、2010年1月からKK-TaqMan導入のための検討

を開始し、3施設共に良好な標準曲線が得られており、アンプリコアとKK-TaqManの測定値間には良好な相関が得られた。

この他、2010年3月以降順次、福島県衛生研究所、埼玉県衛生研究所、鹿児島県環境保健センター、大分県衛生環境研究センターに操作マニュアル、コントロールHIV-1RNAを送付し、各施設で検討が行われている。

KK-TaqManの開発において、リアルタイムPCR装置はアプライドバイオシステムズ(ABI)の7900HT、StepOnePlusの2機種を使用した。各施設での検討の結果、ABIの7500通常モードおよびFastモード、ロシュダイアグノスティックズのLightCycler480においても良好な結果が得られた。

また、栃木県保健環境センター、千葉県衛生研究所、愛知県衛生研究所、兵庫県立健康生活科学研究所、広島市衛生研究所、愛媛県立衛生環境研究所については、平成22年度地方衛生研究所HIV検査グループ会議で操作マニュアルを配布した。本法は全国の地方衛生研究所を対象にした衛生微生物技術協議会第31回研究会(2010年5月25日)でもアナウンスしており、要望があれば随時技術支援を行う予定である。

## 2. KK-TaqMan増幅領域の遺伝子解析

アンプリコア下流プライマー領域の3'末端から3番目塩基のAからCへの変異により、コバスTaqManの反応性が著しく低下することが報告されている(J. Clin. Microbiol., 47, 1238-40, 2009)。我々も同様の症例を1例(表1、図1)経験したが、我々の症例Y271はKK-TaqMan法で問題なく測定できることを報告した(HIV検査相談体制の充実と活用に関する研究平成21年度報告書)。

この他にもコバスTaqManでの低反応性検体が他施設からも報告されているが、これら検体の塩基配列やコバスTaqManのプライマー、プローブの位置および塩基配列が公開さ

れていないため、低反応性の原因が明らかでない。そこで、Y271の他、HIV-1RNA定量値の信頼性を確保するため、HIV-1感染者185例(サブタイプB:130、AE:29、A:4、C:3、D:1、F:3、BE:3、AG:2、検査中10)のHIV-1遺伝子gag領域について解析した。

その結果、185例中184例には測定値に影響を与えられると思われる変異は認められなかった。しかし1例(Y494)に、アンプリコア下流プライマー領域の3'末端から3番目塩基が野生型Aの他に変異型Cが若干混在していた。Y494は未治療にもかかわらず、コバスTaqManの定量値は40コピ-/ml未満(シグナル検出せず)であったが、KK-TaqManの測定値は240コピ-/mlであった(表2)。Y494はgag領域の他、protease、RT、envC2V3領域についても解析でき、コバスTaqManに低反応検体である可能性が高いと考えられた。

我々は以前、WB法でHIV-1陽性が確認できた新規感染者303例の血中ウイルス量をコバスTaqManで測定した結果、40コピ-/ml未満が、4例(1.3%)あった。4例とも血漿残量が少なく、KK-TaqManを実施できなかったが、これら4例は血漿の他、PBMC中HIV-1プロウイルスDNAを用いたgag、env、protease、RT、nef領域の5カ所のPCRにおいても増幅できず、コバスTaqMan低反応検体の可能性は少ないと考えられた。また、これら4例はBED-assay陽性であり、BED-assay陽性例の約4%を占めていた。感染後6ヶ月以内の比較的感染初期の症例では、未治療の場合でも血中ウイルス量が検出限界以下となることがあると考えられた。

## D. 結語

保健所等での無料匿名HIV検査における確認検査をサポートするため、汎用リアルタイム装置を用いたin houseのHIV-1RNA測定法、KK-TaqManを開発し、全国の地方衛生研究所を対象にKK-TaqManの普及と技術移管を行っ

た。感染者の多い地域を中心に技術移管を行い、現在、東京都安全健康センター、大阪府立公衆衛生研究所、神奈川県衛生研究所、横浜市衛生研究所、川崎市衛生研究所、埼玉県衛生研究所、福岡県保健環境研究所、北海道立衛生研究所、福島県衛生研究所、鹿児島県環境保健センター、大分県衛生環境研究センターにおいて KK-TaqMan の実施が可能である。

#### 1. 論文発表

領域のいくつかの変異が測定値に影響を及ぼすことが分かっている。そのため、HIV-1 陽性 186 症例を用いて 2 法の増幅領域の遺伝子変異を調べ、測定値の信頼性について解析した。その結果、アンプリコアや KK-TaqMan の下流プライマーと比べ 3' 末端から 3 番塩基の A から C への変異が 2 例認められ、これらはコバス TaqMan に低反応性を示したが、KK-TaqMan の測定値に影響は認められなかった。

### E. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Sano T, Yamada R, Sekita K, Hankins RW, Hori H, Seto H, Sudo K, Kondo M, Kawahara K, Tsukahara Y, Inaba N, Kato S, Imai M: A Human Immunodeficiency Virus Screening Algorithm to Address the High Rate of False-Positive Results in Pregnant Women in Japan. PLoS ONE, 5, e9382 (2010).
- 2) Hattori J, Kondo M, Sugiura W, *et. al.* : Trends in transmitted drug-resistant HIV-1 and demographic characteristics of newly diagnosed patients: Nationwide surveillance from 2003 to 2008 in Japan. Antiviral Research, 88, 72-79 (2010).

#### 2. 学会発表

- 1) Kondo M, Tanaka R, Sudo K, Sano T, Tachikawa M, Sagara H, Iwamuro S, Imai

M, Kato S: The development of quantitative HIV-1 RNA assay using general real time PCR machines, XVIII International AIDS Conference. MOPE0090 (18-23 July, 2010, Vienna, Austria).

- 2) 服部純子、近藤真規子、杉浦互 他：2003-2009 年の新規 HIV/AIDS 診断症例における薬剤耐性頻度の動向、第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会（2010 年 11 月 24～11 月 26 日、東京）。

## 資料 1

### リアルタイム PCR による HIV-1 RNA 定量法 (KK-TaqMan) の操作フロー

#### I. RNA 抽出

QIAamp UltraSens Virus Kit (QIAGEN) を用いる。

1.5 mL チューブ 使用。

サンプル 500  $\mu$ L  
スタンダード 500  $\mu$ L  
コントロール 500  $\mu$ L

} 4°C、15,000 rpm、1 時間遠心

(チューブの背に印を入れ、印側に沈殿が集まるように遠心する)

↓  
上清を約 20  $\mu$ L 残して除去 (先細スポイトを使用し、沈殿を除去しないように注意)

↓  
15,000 rpm、5 分間遠心し、ピペットチップ (20  $\mu$ L 用) で血清を完全に除去

↓  
Buffer AR 300  $\mu$ L  $\times$  検体数  $\times$  1.1      60°C で温めておく  
Protease K 20  $\mu$ L  $\times$  検体数  $\times$  1.1      使用直前に混合し、5 秒間 vortex  $\times$  2 回

↓  
各チューブに 320  $\mu$ L 加える  
蓋に carrier RNA 5.6  $\mu$ L

← 以下、QIAamp UltraSens Virus Kit  
のプロトコールどおり。

転倒混和後、15 秒間 vortex (5 秒間  $\times$  3 回 ~ 5 回: ペレットが再懸濁するまでよく混ぜる)

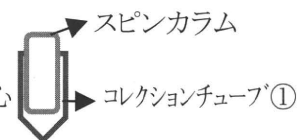
↓  
スピンドウン

↓  
40°C、10 分 (長すぎないように):      5 分後、5 秒間 vortex  
さらに 5 分後、5 秒間 vortex

↓  
スピンドウン

↓  
Buffer AB 300  $\mu$ L、10 秒間 vortex

↓  
スピンカラムをコレクションチューブ①に入れ、6,000 rpm、1 分間遠心



↓  
カラムに AW1 を 500  $\mu$ L 加え、8,000 rpm、1 分間遠心 (新しいコレクションチューブ②使用)

↓  
カラムに AW2 を 500  $\mu$ L 加え、15,000 rpm、3 分間遠心 (新しいコレクションチューブ③使用)

↓  
(カラムに濾液がついたら、新しいコレクションチューブ④を用いて再遠心、15,000 rpm、1 分)

↓  
カラムを 1.5ml チューブ② 設置し、AVE を 30  $\mu$ L 加え、8,000 rpm、1 分間遠心  
(この操作を 2 回繰り返す、計 60  $\mu$ L)



## II. エタノール沈殿

60  $\mu$ L 溶出液  
↓  
3 M 酢酸ナトリウム 6  $\mu$ L, エタノール 200  $\mu$ L を(検体 $\times$ 1.1)分作っておき、200  $\mu$ L ずつ加える(10 秒間 vortex)  
↓  
4 $^{\circ}$ C、15,000 rpm、10 分間遠心(沈殿確認)  
(チューブの背に印を入れ、印側に沈殿が集まるように遠心する)  
↓  
上清を除去(先細スポイトを使用し、沈殿を除去しないように注意)  
↓  
70%エタノール 100  $\mu$ L を加える(10 秒間 vortex)  
↓  
4 $^{\circ}$ C、15,000 rpm、2分間遠心(沈殿確認)  
(チューブの背に印を入れ、印側に沈殿が集まるように遠心する)  
↓  
上清を除去し、蓋を開けたまま、安全キャビネット内で約 10 分間放置(空気乾燥)  
または、15,000 rpm、1 分間再遠心し、上清を完全に除去、約 10 分間放置  
↓  
氷冷した Master mixture\*を 50  $\mu$ L あるいは 20  $\mu$ L 加え、10 秒間 vortex、スピンドウン  
↓  
この反応液を氷上のリアルタイムプレートへ移す

## III. リアルタイム RT-PCR

### 1) リアルタイム装置 ABI 7900;スタンダードモード

試薬: SuperScript III Platinum One-step Quantitative RT-PCR System with ROX (Invitrogen)

#### \*Master mixture

2 $\times$ Reaction Mix with ROX	25.0 $\mu$ L
20 $\mu$ M deSK145	1.25 $\mu$ L
20 $\mu$ M deSKCC1B	1.25 $\mu$ L
5 $\mu$ M deKK-MGB	2.0 $\mu$ L
Water	19.5 $\mu$ L
SuperScript III RT/Platinum Taq Mix	1.0 $\mu$ L
Total	50.0 $\mu$ L

### 2) リアルタイム装置 ABI Step One plus; スタンダードモード

試薬: EXPRESS Step One SuperScript qRT-PCR Kits (Universal ROX) (Invitrogen)

#### \*Master mixture

Express qPCR SuperMix with Premixed ROX	10.0 $\mu$ L
10 $\mu$ M deSK145	1.0 $\mu$ L
10 $\mu$ M deSKCC1B	1.0 $\mu$ L
4 $\mu$ M deKK-MGB	1.0 $\mu$ L
Water	5.0 $\mu$ L
Express SuperScript Mix for One-Step qPCR	2.0 $\mu$ L
Total	20.0 $\mu$ L



RT-PCR 条件: 1)、2)とも同じ条件で行う。

50°C、15 分  
95°C、2 分  
95°C、15 秒 } 40 cycles  
60°C、1 分

#### IV. 判定

##### 1) HIV 抗体陰性者について

- ・ シグナルが認められない場合は HIV-1 陰性と判定する。

定量下限は 50 コピー/mL

- ・ <50 コピー/mL で特異的な増幅カーブが認められた場合は再検査を行う。  
再検査でシグナルが認められない場合は陰性と判定する。  
再検査でも特異的な増幅カーブが認められた場合は、1 週間後の再検査を勧める。
- ・ >50 コピー/mL は初期感染と判定する。抗体検出までフォローアップすることが望ましい。

注意: 非特異的なピークであっても、定量値は計算されるので、反応終了後は必ず増幅曲線を確認する。

#### appendix 1. コントロール HIV-1RNA 希釈系列の作製

1. 8E5 細胞培養上清 (071225:ポアソン値  $6.0 \times 10^7$  コピー/mL) の希釈
  - ・ 500000、50000、5000、500、150、50 コピー/mL の希釈系列を作製し、1.5ml チューブに 500ul ずつ分注し、-80°C のフリーザーで保存する。
2. 標準曲線の作成
  - ・ 実験ごとにスタンダードとして 500000、5000、150 コピー/mL、各 1 本ずつを用いて標準曲線を作成する。
3. コントロール
  - ・ 実験ごとに陽性コントロールとして 50000、500、50 コピー/mL を、陰性コントロールとして希釈用血清を測定する。

#### appendix 2. 主な試薬および機器

1. RNA 抽出試薬
  - 1) QIAamp Ultra Sence Virus: QIAGEN, No.53704
2. リアルタイム PCR 試薬 (装置によってどちらかを選択)
  - 1) ABI7900HT : SuperScript III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR System with ROX, Invitrogen, No.11745-100
  - 2) ABI Step One Plus : EXPRESS One-Step SuperScript qRT-PCR Kits (Universal ROX), Invitrogen, No.11791-200
3. プライマーおよびプローブ (HTLP 精製)
  - ・ deSK145: 5'-AGTRGGGGGACAYCARGCAGCHATG CARAT-3'
  - ・ deSKCC1B: 5'-TACTAGTAGTTCCTGCTATRTCACTTCC-3'
  - ・ deKK-MGBprobe: 5'-ATCAATGARGARGCTGCAGAATGGGA-3',  
(5'末端側に FAM を修飾)
4. その他の試薬
  - ・ 8E5 細胞上清希釈用血清: 三光純薬, SC1318 EXA Liquid 3 Nomal
  - ・ 3M 酢酸ナトリウム、H<sub>2</sub>O (どちらも遺伝子検査用)、エタノール (特級)

表1 各種HIV-1RNA定量法による測定値の比較

Patient no.	KK-TaqMan*	コパス TaqMan*	Amplicor* v1.5	Abbott*	Versant*	HIV-1 subtype
Y271-051004	25000	550	79000	n.a.	n.a.	B
# 1		90	70000	52000	24000	B
2		<40	n.a.	n.a.	2400	B
3		<40	29000	13000	1200	CRF02_AG
4		210	10800	19300	n.a.	A1
5		<40 (nd)	<50	4000	n.a.	F1
Control						
6		3100	3600	2600	8200	B
7		3200	n.a.	1500	1000	B

\*copies/ml, n.a.:not available, nd:not detectable

# 1~7はJ.Clin. Microbiol.,47,1238-40,2009より抜粋

図1 Amplicor HIV-1 Monitor ver.1.5 とKK-TaqMan法の下流プライマー領域

```

Consensus B  ACCAAGGGGA AGTGACATAG CAGGAACTAC TAGTACC
Amplicor:      GGA AGTGACATAG CAGGAACTAC TAGTACC
KK-TaqMan:    GGA AGTGAYATAG CAGGAACTAC TAGTA

Y271  B  -----C-----
Control
GM2563 B -----

*Patient 1 B -----T-----A-
Patient 2 B  C-----C-----
Patient 4 A1 -----C-----
Patient 3 AG -----A-C-----G-G-----
Patient 5 F1 -----C-----T-----T-----A-----G-
    
```

\* Patient1~5はJ.Clin. Microbiol.,47,1238-40,2009より抜粋

表2 各種HIV-1RNA定量法による測定値の比較

Patient no.	KK- TaqMan*	コハス TaqMan*	Amplicor* v1.5	HIV-1 subtype
Y271-051004	25000	550	79000	B
Y494-100518	240	<40 (nd)	n.a.	B
control				
GM2563	400	600	n.a.	B
GM1086-34	11000	18000	n.a.	CRF01_AE
GM1272-42	2200	4800	n.a.	F1
GM2670-3	85000	87000	n.a.	D

\*copies/ml, n.a.:not available, nd:not detectable

## 19. 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	国立病院機構 名古屋医療センター
研究協力者	瀧永博之	国立国際医療センターACC
	加藤真吾	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
	森 治代	大阪府公衆衛生研究所
	椎野禎一郎	国立感染症研究所感染情報センター
	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
	吉居廣朗	国立病院機構名古屋医療センター
	前島雅美	国立病院機構名古屋医療センター
	正岡崇志	国立病院機構名古屋医療センター
	須藤弘二	慶應義塾大学医学部微生物学免疫学教室
	親泊あいみ	慶應義塾大学医学部微生物学免疫学教室

### 研究要旨

全国の衛生研究所等の施設において HIV-1 検査を担当する技官を対象に、技術研修会を平成 22 年 9 月 15 日～17 日の日程で名古屋医療センター講義室・実習室において開催した。この研修会では名古屋医療センターで実施している HIV 薬剤耐性検査方法について技術移管を行うことを目的とし、さらに内外より講師を招待して HIV-1 の薬剤耐性検査に関する基礎知識から臨床的意義について講義も行った。

### 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おり、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る。そのため、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、検査手技を HIV 検査担当技官に公開し、より多くの患者が耐性検査の恩恵にあずかることができる検査体制を確立することを目的とす

る。

### B. 研究方法

平成 22 年 9 月 15 日から 17 日の 3 日間、名古屋医療センター講義室・実習室において HIV 検査技術研修会を開催した。全国 16 施設から 17 名の参加者があり（表 1）、表 2 に示すプログラムに従って薬剤耐性検査の実習と講義を行った。バイオセイ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-1 RNA を実習に用いた。RNA サンプルは、国立感染症研究所で開発したプライマーを用いて 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 *gag* 領域および *env* 領域についても同様に RT-PCR による増幅・塩基配列解析を行い、サブタイピングを試みた。加えて名古屋医療センター、国立国際医療研究センター、国立感

感染症研究所、慶應義塾大学、神奈川衛生研究所の講師による HIV に関する基礎、臨床、薬剤耐性検査法、検査結果解析についての講義を行った。研修終了後、実習と講義につい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

3 日間の研修会は無事に終了した。事後評価のアンケート調査の結果 (図 1)、実習・講義は受講者全員から価値のある内容という回答を得られた。実習に関しては、実務経験者が多かったこともあり技術習得に難しいと感じる受講生は少なかった。講義に関して、昨年と同様に 4 割近くの受講生が難しいと回答した。中でも耐性検査で得られた結果の解析が難しいという内容が複数みられた。

### D. 考察

アンケート結果より、意義のある研修会が行われ、検査技術の移管という目的は達成できたと思われる。しかし、講義内容 (特に検査結果の解析) において難しいと判断されたものについては、今後研修会を続けていく中で講義の仕方に工夫が必要と思われた。さらに今後は、地方衛生研究所での積極的な HIV 検査体制の確立とエイズ拠点病院との連携について考慮すべきと考える。

### E. 結論

全 16 施設から 17 名の参加者を対象に、HIV 検査技術研修会を 3 日間の日程で開催して HIV 検査技術の公開および普及と薬剤耐性 HIV に関する講義を行って知識の向上を図った。参加した HIV 検査担当技官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。

### G. 研究発表

#### 1. 原著論文

#### 欧文

1. Ibe S, Sugiura W. Clinical significance of HIV reverse transcriptase inhibitor-resistant mutations. *Future Microbiology*. 2011 (in press)
2. Junko Shibata, Wataru Sugiura, Hirotaka Ode<sup>e</sup>, Yasumasa Iwatani, Hironori Sato, Hsinyi Tsang, Masakazu Matsuda Naoki Hasegawa, Fengrong Ren and Hiroshi Tanaka. Within-host co-evolution of Gag P453L and protease D30 N/N88D demonstrates virological advantage in a highly protease inhibitor-exposed HIV-1 case *Antiviral Res.* 2011 Feb 04. [Epub ahead of print]
3. Fujisaki S, Yokomaku Y, Shiino T, Koibuchi T, Hattori J, Ibe S, Iwatani Y, Iwamoto A, Shirasaka T, Hamaguchi M, Sugiura W. Outbreak of hepatitis B virus genotype A and transmission of genetic drug resistance in cases coinfecting with HIV-1 in Japan. *J Clin Microbiol.* 2011 Jan 19. [Epub ahead of print]
4. Hattori J, Shiino T, Gatanaga H, Yoshida S, Watanabe D, Minami R, Sadamasu K, Kondo M, Mori H, Ueda M, Tateyama M, Ueda A, Kato S, Ito T, Oie M, Takata N, Hayashida T, Nagashima M, Matsuda M, Ibe S, Ota Y, Sasaki S, Ishigatsubo Y, Tanabe Y, Koga I, Kojima Y, Yamamoto M, Fujita J, Yokomaku Y, Koike T, Shirasaka T, Oka S, Sugiura W. Trends in transmitted drug-resistant HIV-1 and demographic characteristics of newly diagnosed patients: nationwide surveillance from 2003 to 2008 in Japan. *Antiviral Res.* 88(1):72-9, 2010.
5. Hirano A, Takahashi M, Kinoshita E, Shibata M, Nomura T, Yokomaku Y, Hamaguchi M, Sugiura W. High performance liquid chromatography using UV detection for the simultaneous quantification of the new non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor etravirine (TMC-125), and 4 protease inhibitors in human plasma. *Biol Pharm Bull.* 33(8):1426-9, 2010.
6. Bandaranayake RM, Kolli M, King NM, Nalivaika EA, Heroux A, Kakizawa J, Sugiura W, Schiffer CA. The effect of clade-specific sequence polymorphisms on HIV-1 protease activity and inhibitor resistance pathways. *J Virol.* 84(19):9995-10003, 2010.
7. Suzuki S, Urano E, Hashimoto C, Tsutsumi H, Nakahara T, Tanaka T, Nakanishi Y, Maddali K, Han Y, Hamatake M, Miyauchi K, Pommier Y, Beutler JA, Sugiura W, Fuji H, Hoshino T, Itotani K, Nomura W, Narumi T, Yamamoto N,

Komano JA, Tamamura H. Peptide HIV-1 integrase inhibitors from HIV-1 gene products. *J Med Chem.* 53(14):5356-60, 2010.

8. Ibe S, Yokomaku Y, Shiino T, Tanaka R, Hattori J, Fujisaki S, Iwatani Y, Mamiya N, Utsumi M, Kato S, Hamaguchi M, Sugiura W. HIV-2 CRF01\_AB: first circulating recombinant form of HIV-2. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 54(3):241-7, 2010
9. Saeng-aroon S, Tsuchiya N, Auwanit W, Ayuthaya PI, Pathipvanich P, Sawanpanyalert P, Rojanawiwat A, Kannagi M, Ariyoshi K, Sugiura W. Drug-resistant mutation patterns in CRF01\_AE cases that failed d4T+3TC+nevirapine fixed-dosed, combination treatment: Follow-up study from the Lampang cohort. *Antiviral Res.* 87(1):22-9, 2010.
10. Matsuyama S, Aydan A, Ode H, Hata M, Sugiura W, Hoshino T. Structural and energetic analysis on the complexes of clinically isolated subtype C HIV-1 proteases and approved inhibitors by molecular dynamics simulation. *J Phys Chem B.* 114(1):521-30, 2010.

#### 和文

1. 服部純子、杉浦 互、薬剤耐性検査の現状と課題、27(3), 2011(in press)
2. 伊部史朗、杉浦 互、薬剤耐性 HIV の現状と対策、*日本臨牀* 68(3): 476-79, 2010.
3. 服部純子、杉浦 互、我が国における薬剤耐性 HIV の現状、*感染・炎症・免疫* .39(4) : 361-63, 2010.
4. 吉居廣朗、杉浦 互、ラルテグラビルの耐性、*医薬ジャーナル* .46(8) : 2054-58, 2010.
5. 杉浦 互、5th International Workshop on HIV Transmission/ 18th International AIDS Conference、HIV 感染症と AIDS の治療. 1(2) 71-73, 2010.
6. 杉浦 互、HIV 感染—最新の疫学・臨床・治療、*内科* 106(5) : 781-87, 2010.
7. 伊部史朗、横幕能行、杉浦互. 本邦における HIV-2 の疫学動向と新たな組換え流行株 CRF01\_AB の同定. *IASR* .31(8):232-233, 2010.
8. 宮崎菜穂子\* 杉浦 互. わが国における抗 HIV 治療と多剤耐性症例の現状 *IASR* .31(8):233-234, 2010.

#### 2. 口頭発表 海外

1. Hiroaki Yoshii, Shingo Kitamura, Wataru Sugiura, Yasumasa Iwatani.

Constitutive activation of Stat1 causes spontaneous APOBEC3G expression, which determines permissive phenotype against vif-deficient HIV-1 replication in T-cell lines. *CSHL RETROVIRUSES.* (24-29 May, 2010, Cold Spring Harbor Laboratory, USA.)

2. Yasumasa Iwatani, LinLiu, Denis S Chan, Hiroaki Yoshii, Judith G Le vin, Angela M Gronenborn, Wataru Sugiura. Structure-guided mutagenesis of APOBEC3G reveals four lysine residues critical for HIV-1 Vif-mediated ubiquitination. *CSHL RETROVIRUSES.* (24-29 May, 2010, Cold Spring Harbor Laboratory, USA.)
3. H Suzuki, J Hattori, M Nishizawa, S Ibe, Y Iwantani, Y Yokomaku, W Sugiura. Previous antiretroviral exposure enhances accumulation of mutations in the integrase region and affects acquisition of raltegravir resistance. *The International HIV & Hepatitis Virus Drug Resistance Workshop & Curative Strategies.* (8-12 June 2010, Dubrovnik, Croatia)
4. T Masaoka W Sugiura, Y Iwatani, T Sawasaki, S Matsunaga, Y Endo, M Tatsumi, N Yamamoto, A Ryo. A high-throughput phenotypic assay for HIV-1 protease drug resistance using a wheat cell-free protein production system. *The International HIV & Hepatitis Virus Drug Resistance Workshop & Curative Strategies.* (8-12 June 2010, Dubrovnik, Croatia)
5. J Hattori, H Gatanaga, M Kondo, K Sadamasu, S Kato, H Mori, R Minami, W Sugiura, the Japanese Drug Resistance HIV-1 Surveillance Network. Characteristics of drug-resistant HIV-1 transmission: analysis of drug resistance in recently and non-recently infected treatment-naive patients in Japan. *The International HIV & Hepatitis Virus Drug Resistance Workshop & Curative Strategies.* (8-12 June 2010, Dubrovnik, Croatia)
6. S. Ibe, Y. Yokomaku, T. Shiino, R. Tanaka, J. Hattori, S. Fujisaki, Y. Iwatani, N. Mamiya, M. Utsumi, S. Kato, M. Hamaguchi, W. Sugiura. Molecular epidemiology of HIV-2 in Japan: identification of the first circulating recombinant form of HIV-2, CRF01\_AB. *5th International Workshop on HIV Transmission.* (15-16 July, 2010, Vienna, Austria)
7. M. Nishizawa, J. Hattori, W. Heneine, J.A. Johnson, W. Sugiura. Sensitive testing identifies a greater prevalence of transmitted HIV drug resistance in Japan. *5th International*

- Workshop on HIV Transmission. (15-16 July, 2010, Vienna, Austria)
8. W. Sugiura, J. Hattori, S. Yoshida, H. Gatanaga, M. Kondo, K. Sadamasu, T. Shirasaka, H. Mori, R. Minami, M. Tateyama, M. Ueda, S. Kato, T. Ito, M. Oie, A. Ueda. A nationwide surveillance study on the prevalence of drug-resistance mutations among newly diagnosed individuals in Japan from 2003 to 2008 5th International Workshop on HIV Transmission. (15-16 July 2010, Vienna, Austria)
  9. S. Ibe, Y. Yokomaku, R. Tanaka, J. Hattori, S. Fujisaki, Y. Iwatani, S. Kato, M. Hamaguchi, W. Sugiura. Development of a highly sensitive and reproducible plasma HIV-2 RNA copy quantification method for monitoring antiretroviral treatment. XVIII International AIDS Conference. (18-23 July, 2010, Vienna, Austria)
  10. Naoko Miyazaki, Shuzo Matsushita, Takeshi Fujii, Aikichi Iwamoto, Wataru Sugiura, Japanese HIV-MDR Study Group. Drug-Resistant Genotyping to Guide Selection of Etravirine, Darunavir and Raltegravir in Salvage Therapy for Multi-Drug-Resistant Cases Improves Outcomes. XVIII International AIDS Conference. (18-23 July, 2010, Vienna, Austria)
  11. Characteristics of Drug-Resistant Hiv-1 Transmission: Analysis of Drug Resistance in Recently and Not-Recently Infected Treatment-Naïve Patients in Japan. J Hattori, H Gatanaga, M Kondo, K Sadamasu, S Kato, H Mori, R Minami, W Sugiura, and the Japanese Drug Resistance HIV-1 Surveillance Network 11th Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance. (7-10 November, 2010, Hershey PA)
  12. First Case of Hiv-2 Crf01\_Ab Infection Treated with Combination Antiretroviral Therapy. Shiro Ibe, Yoshiyuki Yokomaku, Junko Hattori, Yasumasa Iwatani and Wataru Sugiura. 11th Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance. (7-10 November, 2010, Hershey PA)
  13. Wataru Sugiura. Characterization and phylodynamic analysis of Drug-Resistant HIV-1 Transmission in Japan. US-Japan Joint AIDS Panel: Resistance Meeting. December (8-9 December, 2010, Singapore)
- 国内
1. 伊部史朗、横幕能行、服部純子、杉浦 互. 定量PCR法を用いたHIV-2 viral load測定系の確立とその臨床応用. 第84回日本感染症学会総会. 平成22年4月5-6日. 京都
  2. 岩谷靖雅、杉浦互. Structure-guided mutagenesis of APOBEC3G reveals four lysine residues critical for HIV-1 Vif-mediated ubiquitination near the C-terminal end. 第5回日独エイズシンポジウム. 平成22年5月10-11日. 東京
  3. 吉居廣朗、岩谷靖雅、杉浦互. Spontaneous APOBEC3G expression which determines permissive phenotype against Vif-deficient HIV-1 replication, is caused by constitutive activation of Stat1 in T-cell lines. 第5回日独エイズシンポジウム. 平成22年5月10-11日. 東京
  4. 岩谷靖雅、杉浦互. 抗HIV宿主因子APOBEC3Gの発現制御と分解. 第12回白馬シンポジウム, 徳島5月14日-5月15日
  5. 服部純子、重見麗、杉浦互. BEDアッセイを用いた未治療HIV感染者の動向調査. 第12回白馬シンポジウム in 徳島~最先端のエイズ研究を徹底討論する~. 平成22年5月14-15日. 徳島
  6. Wataru Sugiura. A Nationwide Surveillance Study on the Prevalence of Drug-Resistance Mutations among Newly Diagnosed Individuals in Japan from 2003 to 2009, Joint Meeting of AIDS Panel for U. S. Japan Cooperative. 14Sept 2010. Awaji, Japan
  7. 北村紳悟、吉居廣朗、前島雅美、横幕能行、杉浦 互、岩谷靖雅. APOBEC3CにおけるHIV-1Vifに対する感受性を決定する領域の探索. 第58回日本ウイルス学会学術集会. 2010年11月7日
  8. 正岡崇志、杉浦 互、澤崎達也、松永智子、遠藤弥重太、巽 正志、Robert Shafer、山本直樹、梁 明秀. 酵素活性を指標としたHIVプロテアーゼ薬剤耐性新規検査法の開発. 第58回日本ウイルス学会学術集会. 2010年11月7日
  9. 吉居廣朗、北村紳悟、前島雅美、杉浦 互、岩谷靖雅. リンパ球由来細胞株におけるvif欠損HIVに対する異なる感受性はStat1活性化状態に関する. 第58回日本ウイルス学会学術集会. 2010年11月9日
  10. 木下枝里、平野淳、柴田雅章、高橋昌明、野村敏治、脇坂達郎、横幕能行、杉浦 互. リファンピシン併用下におけるインテグラーゼ阻害剤ラルテグラビルの投与量に関する検討. 第24回日本エイズ学会学術集会. 東京. 2010年11月24日
  11. 横幕能行、今村淳治、平野淳、伊部史朗、岩谷靖雅、杉浦 互. 名古屋医療センターにおけるetravirineの使用状況と効果および適応に関する検討. 第24回日本エイズ学会学術集会. 東京. 2010年11月24日
  12. 高橋昌明、平野淳、木下枝里、柴田雅章、野村敏治、横幕能行、杉浦 互. HPLC

- using UV detection for the simultaneous quantification of etravirine(TMC-125), And 4 protease inhibitors in human plasma. 第24回日本エイズ学会学術集会. 東京. 2010年11月24日
13. 平野淳、木下枝里、柴田雅章、高橋昌明、野村敏治、横幕能行、杉浦 互. Tipranavirtide 併用患者に対する TDM の有効例. 第24回日本エイズ学会学術集会. 東京. 2010年11月24日
  14. 吉居廣朗、前島雅美、北村紳悟、横幕能行、杉浦 互、岩谷靖雅. 抗 HIV 宿主因子 APOBEC3 ファミリーの細胞依存的な発現調節機構の解明. 第24回日本エイズ学会学術集会. 東京. 2010年11月24日
  15. 西澤雅子、服部純子、横幕能行、Jeffrey Johnson、Walid Heneine、杉浦 互. 高感度薬剤耐性検査法を用いた新規未治療 HIV/AIDS 症例における微小集族薬剤耐性 HIV 調査研究. 第24回日本エイズ学会学術集会. 東京. 2010年11月25日.
  16. 奥村かおる、横幕能行、三和治美、山田由美子、杉浦 互、岩谷靖雅、平野 淳、木下枝里. ベナンボックス吸入時の苦味の軽減に対するハッカ飴の使用とその効果 第2報-他の有効な手段を探すためのハッカの有効性の検証-. 第24回日本エイズ学会学術集会. 東京. 2010年11月25日
  17. 柴田雅章、平野 淳、木下枝里、高橋昌明、野村敏治、横幕能行、杉浦 互. 薬剤師のための HIV 研修会開催についての事前アンケート調査結果. 第24回日本エイズ学会学術集会. 東京. 2010年11月25日
  18. 正岡崇志、杉浦 互、澤崎達也、松永智子、遠藤弥重太、巽 正志、Shafer Robert、山本直樹、梁 明秀. コムギ無細胞合成 HIV プロテアーゼを用いた薬剤耐性高速検査法の開発. 第24回日本エイズ学会学術集会. 東京. 2010年11月25日
  19. 椎野禎一郎、貞升健志、長島真美、服部純子、杉浦 互. 国内感染者集団の大規模塩基配列解析 1: CRF01\_AEの動向と微小系統群の同定. 第24回日本エイズ学会学術集会. 東京. 2010年11月25日
  20. 今村淳治、横幕能行、服部純子、岩谷靖雅、杉浦 互. 新規 HIV/AIDS 診断症例におけるトロヒスムに関する検討. 第24回日本エイズ学会学術集会. 東京. 2010年11月25日
  21. 谷 麗君、立川-川名 愛、椎野禎一郎、細谷紀彰、鯉渕智彦、藤井 毅、三浦聡之、杉浦 互、岩本愛吉 配列特異的オリコプローブを用いた HIV-1 薬剤耐性変異検出法の開発. 第24回日本エイズ学会学術集会. 東京. 2010年11月25日
  22. 木村雄貴、藤野真之、正岡崇志、服部純子、横幕能行、岩谷靖雅、鈴木淳巨、渡邊信久、杉浦 互. HIV-1のタルナヒル耐性獲得機構の酵素 学的構造学的解明. 第24回日本エイズ学会学術集会. 東京. 2010年11月25日



表1. 研修会参加施設

1	北海道立衛生研究所
2	さいたま市健康科学研究センター
3	静岡県環境保健研究所
4	石川県保健環境センター
5	愛知県衛生研究所
6	岐阜市衛生試験所
7	和歌山市衛生研究所
8	広島市衛生研究所
9	福岡県保健環境研究所
10	福岡市保健環境研究所
11	熊本県保健環境科学研究所
12	宮崎県衛生環境研究所
13	鹿児島県環境保健センター
14	大阪医療センター 臨床研究センター エイズ先端医療研究部
15	大阪医療センター 臨床検査微生物遺伝子検査室
16	石川県立中央病院検査部
17	琉球大学附属病院検査部

表2. プログラム

第1日 平成22年9月15日(水)

【講義】  
HIV-1の遺伝子診断  
HIVの基礎知識  
「シーケンスの原理」  
【実習】  
RNA抽出、RT-PCR RNA抽出、RT-PCR  
Nested-PCR

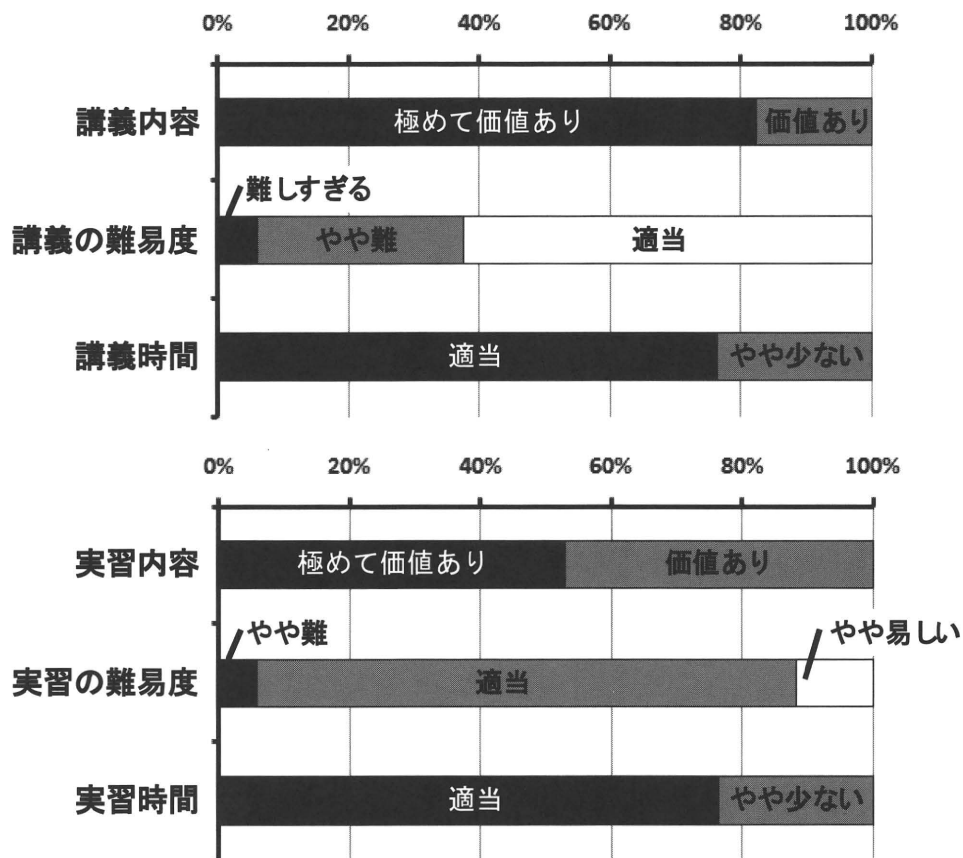
第2日 平成22年9月16日(木)

【講義】  
HIV-1感染症治療と薬剤耐性  
「系統樹解析とサブタイピング  
HIVの臨床について」  
【実習】  
PCR産物の確認、精製  
・シーケンス反応  
・シーケンス反応物の精製、泳動  
・データの回収  
・薬剤耐性の解析

第3日 平成22年9月17日(金)

【講義】  
HIV検査法概要  
HIVの遺伝子検査について  
「日本におけるHIV/AIDSの現状」  
総合討論とまとめ  
【実習】  
HIV-1、HIV-2の検査法

図1. 参加者へのアンケート調査



### 表3. 参加者へのアンケート調査（意見・要望について原文のまま抜粋）

- ・ HIVについて、現在取り組まれている研究について紹介もあると良いかなと思いました。
- ・ 系統樹を実際につくる実習までであるとより理解できると感じました。
- ・ キット、反応条件は今後の参考となりよかった。
- ・ シークエンス...自分でとったデータの解析をしたかった。
- ・ PCR、シークエンス、WB等のケーススタディが多くあると、役立つのではないかと思います。（事例と対処法など...）
- ・ 遺伝子解析については、実際にコンピューターを使用した実習ができればさらに理解が深まると思います。
- ・ 講義のスライドを頂き、とてもありがとうございます。可能であれば事前に頂けると、受講中に適切にメモをとることができると思うのでお願いしたいです。
- ・ 講義の順番にもう少しご配慮を頂けたら良かったと思います。

### 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
Takako Shima-Sano, Rika Yamada, Kazuyo Sekita, Raleigh W. Hankins, Hiromasa Hori, Hiroshi Seto, Koji Sudo, Makiko Kondo, Kazuo Kawahara, Yuki Tsukahara, Noriyuki Inaba, Shingo Kato, and Mitsunobu Imai.	A Human Immunodeficiency Virus Screening Algorithm to Address the High Rate of False-Positive Results in Pregnant Women in Japan.	PLoS ONE	5(2)	e9382	2010
Hattori J, Shiino T, Gatanaga H, Yoshida S, Watanabe D, Minami R, Sadamasu K, Kondo M, Mori H, Ueda M, Tateyama M, Ueda A, Kato S, Ito T, Oie M, Takata N, Hayashida T, Nagashima M, Matsuda M, Ibe S, Ota Y, Sasaki S, Ishigatsubo Y, Tanabe Y, Koga I, Kojima Y, Yamamoto M, Fujita J, Yokomaku Y, Koike T, Shirasaka T, Oka S, Sugiura W.	Trends in transmitted drug-resistant HIV-1 and demographic characteristics of newly diagnosed patients: nationwide surveillance from 2003 to 2008 in Japan.	Antiviral Res.	88(1)	72-79	2010
Ibe S, Yokomaku Y, Shiino T, Tanaka R, Hattori J, Fujisaki S, Iwatani Y, Mamiya N, Utsumi M, Kato S, Hamaguchi M, Sugiura W.	HIV-2 CRF01_AB: first circulating recombinant form of HIV-2.	J Acquir Immune Defic Syndr.	54(3)	241-247	2010
Mizusawa, Y., Kuji, N., Tanaka, Y., Tanaka, M., Ikeda, E., Komatsu, S., Kato, S., and Yoshimura, Y.	Expression of human oocyte-specific linker histone protein and its incorporation into sperm chromatin during fertilization.	Fertil. Steril.	93(4)	134-141	2010
Tee KK, Lam TT, Chan YF, Bible JM, Kamarulzaman A, Tong CY, Takebe Y, Pybus OG.	Evolutionary genetics of human enterovirus 71: origin, population dynamics, natural selection, and seasonal periodicity of the VP1 gene.	J Virol.	84(7)	3339-3350	2010
Han X, Dai D, Zhao B, Liu J, Ding H, Zhang M, Hu Q, Lu C, Goldin M, Takebe Y, Zhang L, Shang H.	Genetic and epidemiologic characterization of HIV-1 infection in Liaoning Province, China.	J Acquir Immune Defic Syndr.	53 Suppl 1	S27-33	2010
Li, Y., Tee, K.K., Liao, H., Hase, S., Uenishi, R., Li, X.-J., Tsuchiura, T., Yang, R., Govindasamy, S., Yean Kong Yong, Y. K., Hong Yien Tan, H. Y., Pybus, O. G., Kamarulzaman, A. and Takebe, Y.	Identification of a novel second-generation circulating recombinant form (CRF48_01B) in Malaysia: a descendant of the previously identified CRF33_01B.	J Acquir Immune Defic Syndr.	54(2)	129-136	2010
Li, Y., Uenishi, R., Hase, S., Liao, H., Li, X.-J., Tsuchiura, T., Tee, K.K., Yang, R., Pybus, O. G. and Takebe, Y.	Explosive HIV-1 subtype B' epidemics in Asia driven by geographic and risk group founder events.	Virology.	402(2)	223-227.	2010
Takebe, Y., Liao, H., Hase, S., Uenishi, R., Li, Y., Li, X.J., Han, X., Shang, H., Kamarulzaman, A., Yamamoto, N., Pybus, O.G., and Tee, K.K.	Reconstructing the epidemic history of HIV-1 circulating recombinant forms CRF07_BC and CRF08_BC in East Asia: the relevance of genetic diversity and phylodynamics for vaccine strategies.	Vaccine	28 Suppl 2	B39-44.	2010
Arita M, Takebe Y, Wakita T, Shimizu H.	A bifunctional anti-enterovirus compound that inhibits replication and the early stage of enterovirus 71 infection.	J Gen Virol.	91 (Pt 11)	2734-2744.	2010
Ma CM, Kawahata T, Hattori M, Otake T, Wang L, Daneshmand M.	Synthesis, anti-HIV and anti-oxidant activities of caffeoyl 5,6-anhydroquinic acid derivatives.	Bioorganic & Medicinal Chemistry	18	863-869	2010
Sanekata T, Fukuda T, Miura T, Morino H, Lee C, Maeda K, Araki K, Otake T, Kawahata T, Shibata T.	Evaluation of the Antiviral Activity of Chlorine Dioxide and Sodium Hypochlorite against Feline Calicivirus, Human Influenza Virus, Measles Virus, Canine Distemper Virus, Human Herpesvirus, Human Adenovirus, Canine Adenovirus and Canine Parvovirus	Biocontrol Science	15	2	2010
Hirano A, Takahashi M, Kinoshita E, Shibata M, Nomura T, Yokomaku Y, Hamaguchi M, Sugiura W.	High performance liquid chromatography using UV detection for the simultaneous quantification of the new non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor etravirine (TMC-125), and 4 protease inhibitors in human plasma.	Biol Pharm Bull	33(8)	1426-1429	2010