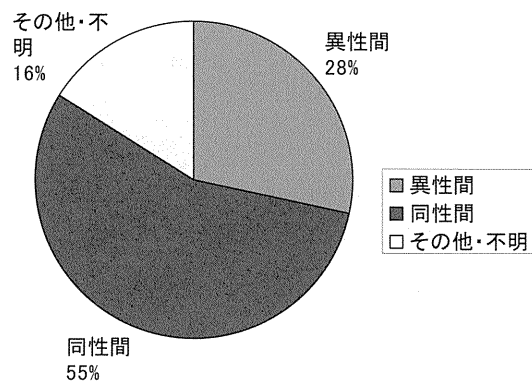


図3. 感染経路別報告者数の推移(平成21-23年)

図4. 感染者・患者の感染経路(累計)



累計患者・感染者数 447名

図5.保健所における検査数と陽性者数の推移
(保健所設置市を除く)

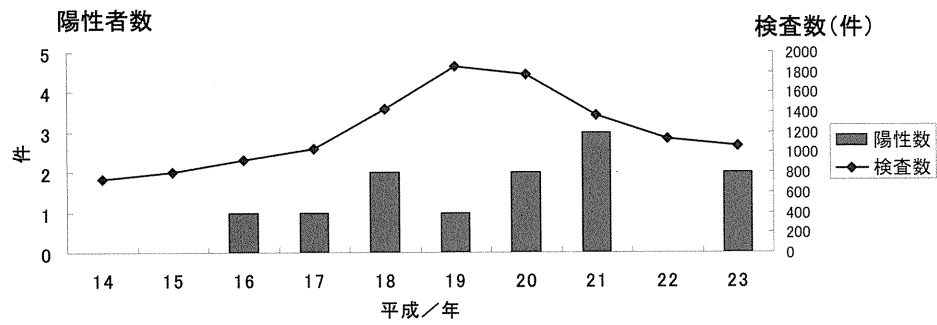


表1. Sクリニックにおける検査状況(平成23年)

月	迅速	陽性		外国	確認	陽性	
		男	女			男	女
H23.1	27	24	3	1	0	0	0
2	28	23	5	1	0	0	0
3	27	22	5	0	0	0	0
4	19	16	3	0(1)	0	0	0
5	28	20	8	1	0	0	0
6	31	21	10	0(1)	0	0	0
7	24	17	7	0	0	0	0
8	37	31	6	0(1)	1	1	0
9	38	27	11	0(1)	0	0	0
10	39	31	8	0(1)	0	0	0
11	18	16	2	0	0	0	0
12	23	17	6	1	0	0	0
計	339	265	74	4(5)	1	1	0

外国 (): 国籍不明者

表2. Sクリニックにおける過去5年間の検査状況

年	件数	男	女	性不明	外国	確認	陽性数	陽性率(%)
H19	414	325	89	0	6	5	0	0
20	455	332	123	0	2(3)	10	2	0.4
21	461	363	97	1	10(12)	4	3	0.7
22	361	289	72	0	4(5)	3	2	0.6
23	339	265	74	0	4(5)	1	1	0.3

(): 国籍不明者

表3. Yクリニックにおける検査状況(平成23年)

月	迅速	男	女	外国	確認	男 陽性	女
H23.10.	2	2	0	0	0	0	0
11	12	11	1	0(2)	0	0	0
12	17	13	4	0(1)	0	0	0
計	31	26	5	0(3)	0	0	0

平成23年10月より検査開始

(): 国籍不明者

19. 新しく開発した汎用リアルタイム 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及び市販の HIV-1RNA 定量法(コバス TaqMan HIV-1ver. 1.0)の問題点の解明と KK-TaqMan の有用性 (3年間のまとめ)

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(横浜市立市民病院)
	相楽裕子(横浜市立市民病院)
	立川夏夫(横浜市立市民病院)
	岩室紳也(厚木市立病院)
	井戸田一郎(しらかば診療所)
	山中晃(新宿東口クリニック)
	佐野貴子 (神奈川県衛生研究所)
	今井光信 (神奈川県衛生研究所)
	貞升健志 (東京都健康安全研究センター)、
	川畑拓也 (大阪府立公衆衛生研究所)
	長野秀樹 (北海道立衛生研究所)
	加藤真吾 (慶應義塾大学医学部微生物学・免疫学教室)
	須藤弘二 (慶應義塾大学医学部微生物学・免疫学教室)

研究概要

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 HIV-1 ver. 1.0 (以下、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。そこで我々は、前回の研究班「HIV検査機会の拡大と質的充実に関する研究(平成18~20年)」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)を開発した。

大手の民間検査センターにおいてHIV遺伝子検査は、2008年4月からコバスTaqManに切り替わったが、2009年にコバスTaqManに低反応性の症例があることが報告され、日本においてもほぼ同時期に血中ウイルス量と症状に乖離の見られる症例が発見された。研究班1年目の2009年度は、この症例について原因究明を行い、KK-TaqMan法の有用性を明らかにした。

地方衛生研究所ではHIV確認検査として、用手法のアンプリコアモニターHIV-1 ver. 1.5 が用いられていたが、本キットは2009年末に販売中止となったため、感染者の多い地域の基幹となる衛生研究所6カ所でKK-TaqMan導入のための検討を行った。6施設共に良好な

結果が得られたため、2010年、2011年の全国微生物協議会等でKK-TaqManを紹介し、導入を希望する施設には操作マニュアル、コントロールRNAの配布及び技術支援を行った（2010年から2011年度）。

コバスTaqMan ver. 1.0に見られたプライマー、プローブ領域の変異による低反応性の問題は、PCRを原理とする方法では避けられない。KK-TaqManについても同様の問題が生ずる可能性は皆無ではない。KK-TaqManの信頼性を担保するため、流行しているHIV遺伝子の解析を行い、サブタイプや増幅領域、特にプライマー、プローブ部分の変異について解析した（2010年から2011年度）。

① コバス TaqMan HIV-1 ver1.0 での HIV-1RNA 測定値がアンプリコア HIV-1 モニターに比べ著しく低値であった症例の原因究明と in house 法 KK-TaqMan 法の有用性 (2009 年度)

研究分担者 近藤真規子 (神奈川県衛生研究所)
協力研究者 加藤真吾 (慶應義塾大学医学部微生物学・免疫学教室)
田中理恵 (慶應義塾大学医学部微生物学・免疫学教室)
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 (神奈川県衛生研究所)
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 (横浜市立市民病院)
相楽裕子 (横浜市立市民病院)
立川夏夫 (横浜市立市民病院)

研究要旨

HIV-1RNA定量には、従来のアンプリコアHIV-1モニターキット (以下、アンプリコア) が使用されていたが、2008年4月以降、リアルタイムPCR法を原理としたコバス TaqMan HIV-1 ver. 1.0 (以下、コバス TaqMan) に切り替わった。我々は以前これら2法の検討を行い、コバスTaqMan の測定値はアンプリコアに比べ2~3倍高いが、2法の測定値間には良好な相関が認められることを報告したが、今回コバスTaqManでの測定値がアンプリコアに比べ 100倍以上低い症例Y271を経験した。この原因を明らかにするため、我々はこれら2法の増幅領域について塩基配列を解析すると共に、昨年までの研究班、「HIV検査機会の拡大と質的充実に関する研究 (平成18~20年)」で開発したHIV-1RNA定量法 (KK-TaqMan)の有用性について検討した。

遺伝子解析の結果、Y271はアンプリコアのreverseプライマー領域の3' 末端から3番目の塩基AがC に変異していた。コバスTaqManでの測定値が他法に比べ著しく低い例はヨーロッパでも5例報告されており、5例とも本症例と同じ塩基に変異が認められている。コバスTaqManのプライマー、プローブの位置および塩基配列は非公開であるため、他の要因も否定できないが、この変異がコバスTaqManでの低値に関与している可能性が考えられた。Loa Alamosのデータベースによると、この変異はHIV-1グループMの約2%に存在しており、特に確認検査や薬剤の効果判定の際には注意が必要である。

また、昨年度の報告においてKK-TaqManはコバスTaqManとほぼ同様の精度であることを報告したが、本症例のようにコバスTaqManの定量値と病態に乖離のある症例においても有用であることが確認できた。

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、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-1RNA 定量に

は、従来アンプリコア HIV-1 モニターキット（以下、アンプリコア）が使用されていたが、2008年4月以降、リアルタイム PCR 法を原理としたコバス TaqMan HIV-1 ver. 1.0（以下、コバス TaqMan）に切り替わり、アンプリコアは2009年12月に販売中止となった。

我々は以前これら2法の検討を行い、コバス TaqMan の測定値はアンプリコアに比べ2～3倍高いが、2法の測定値間には良好な相関が認められることを報告した（感染症学雑誌 81：1-5, 2007）。

しかし今回、アンプリコアでの測定値に比べコバス TaqMan の値が著しく低い症例を経験した。日本ではほとんどの施設でコバス TaqMan を使用しているため、このような症例においては検証が難しく、判定を誤る可能性も否定できない。

我々は、コバス TaqMan で実際より著しく低くなる原因を明らかにするため、これら2法の増幅領域について塩基配列を解析すると共に、昨年までの研究班、「HIV 検査機会の拡大と質的充実に関する研究（平成 18～20 年度）」で開発した HIV-1RNA 定量法（KK-TaqMan）の有用性について検討した。

B. 研究方法

1. 試料

アンプリコアに比べコバス TaqMan の測定値が著しく低値となった症例 Y271 の HAART 開始前の保存血漿および HAART 後の血漿を用いた。

2. HIV-1RNA 測定方法

1) アンプリコア HIV-1 モニター-ver. 1.5（ロシュ・ダイアグノスティックス社）：RT-PCR 後プレートでのハイブリダイゼーションにより定量。2009年12月末販売中止。

2) コバス TaqMan HIV-1（ロシュ・ダイアグノスティックス社）：リアルタイム PCR を原理とする定量法。

3) KK-TaqMan 法：リアルタイム PCR を原理とする定量法（図 1）。昨年までの研究班「HIV 検査機会の拡大と質的充実に関する研究」において開発した。詳細は平成 18～20 年度報告書を参照。

3. 塩基配列の解析

患者血漿より HIV-1 遺伝子を抽出（ハイピュア Viral RNA 抽出キット：ロシュ・ダイアグノスティックス社）し、RT nested PCR 法（One step RNA PCR キット：タカラバイオ）により、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た。

（倫理面への配慮）

主治医から患者に研究内容を説明し、同意を得た。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、本研究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

患者 Y271 の HIV-1RNA 量はアンプリコアで測定していた 2008 年 3 月までは 10^5 コピー/ml レベルであったが、コバス TaqMan に変更後 10^3 コピー/ml レベルに低下した。しかし、CD4 数は減少し続け、臨床的にも改善が認められなかったため、2008 年 12 月より HAART を開始した。

HAART 開始前の血漿（2005 年 10 月採血）の測定値は、アンプリコアで 79000 コピー/ml、KK-TaqMan で 25000 コピー/ml で、この2法の値はほぼ同じであったが、コバス TaqMan では 550 コピー/ml であり、アンプリコアに比べ 100 倍以上低い値を示した（表 1）。

コバス TaqMan の増幅領域とアンプリコアおよび KK-TaqMan のプライマー、プローブ位置を図 2 に示した。アンプリコアと KK-TaqMan

のプライマーは全く同じ位置であるが、アンプリコアの塩基配列はサブタイプ B のコンセンサスシーケンスであり、forward プライマーにはサブタイプ A、CRF01_AE、CRF02_AG のコンセンサスシーケンスと 3 から 4 塩基のミスマッチが存在する。しかし、PCR 反応系の工夫により測定値に影響はないことが確認されている。

コバス TaqMan の増幅領域はアンプリコアとほぼ同じ箇所であるが、プライマー、プローブの位置、塩基配列は非公開である。

KK-TaqMan は HIV-1 グループ M の出来るだけ多くの株を測定できるように、forward プライマーに 5 か所、reverse プライマーに 1 か所、プローブの 2 か所の塩基を縮重型に設計した。

Y271 と同様にコバス TaqMan での測定値が他の方法に比べ著しく低い症例がヨーロッパでも 5 例報告された（表 2；J. Clin. Microbiol., 47, 1238-40, 2009）。この原因を明らかにするため、患者 Y271 の HIV-1 遺伝子について解析し、ヨーロッパの 5 例と比較した。

アンプリコアおよび KK-TaqMan の forward プライマーとプローブ領域には、これら 6 例に共通の変異は認められなかった（図 3、図 4）が、reverse プライマー領域には、6 例に共通してプライマーの 3' 末端から 3 番目の塩基 A が、5 例は C に、1 例は T に変異していた（図 5）。この変異はアンプリコアや KK-TaqMan には影響を及ぼさないが、コバス TaqMan 低反応性に関係している可能性が高いと考えられた。

Los Alamos データベースによると、この変異は HIV-1 グループ M の約 2% に存在している。このような HIV 遺伝子の多様性に対応するためには、複数の測定法が利用できる状況にあることが望ましいが、日本ではほとんどの医療機関でコバス TaqMan を使用しており、代わりとなる市販の定量法を併用して導入す

ることは困難である。しかし、我々の開発した KK-TaqMan は専用の高価な機器を必要とせず、一般に普及している汎用のリアルタイム PCR 装置の利用ができ、小規模の施設でも導入が可能である。

我々は、KK-TaqMan はコバス TaqMan とほぼ同様の精度であることを昨年度報告したが、Y271 のようにコバス TaqMan の定量値と病態に乖離のある症例においても有用であることが確認できた。

D. 結語

コバス TaqMan での測定値がアンプリコアに比べ 100 倍以上低い症例 Y271 について原因を解析した結果、アンプリコアの reverse プライマー領域の 3' 末端から 3 番目の塩基 A が C に変異していた。コバス TaqMan での測定値が著しく低い症例はヨーロッパでも 5 例報告され、5 例とも本症例と同じ塩基に変異が認められており、この変異がコバス TaqMan での測定値に影響している可能性が高いと考えられた。Loa Alamos データベースによると、この変異はサブタイプに依存せず、HIV-1 グループ M の約 2% に認められる。確認検査や薬剤の効果判定の際には注意が必要である。

我々は、KK-TaqMan はコバス TaqMan とほぼ同様の精度であることを昨年度報告したが、KK-TaqMan はコバス TaqMan の定量値と病態に乖離のある症例においても有用であることが確認できた。

E. 研究発表

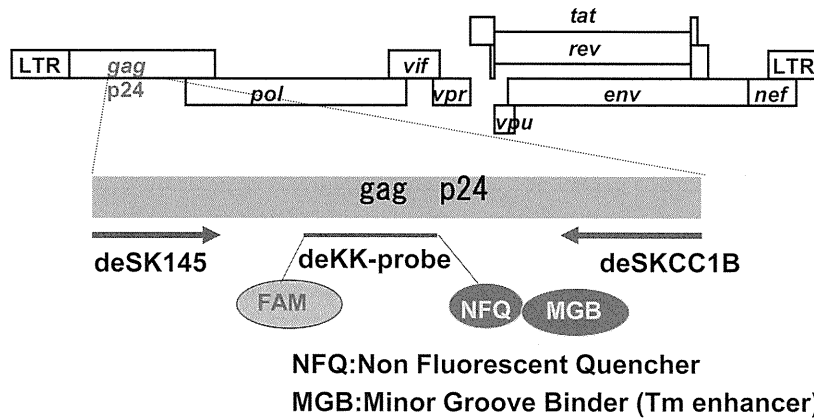
1. 論文発表

1) [Kondo M](#), Sudo K, Tanaka R, Sano T, Sagara H, Iwamuro S, Takebe Y, Imai M, Kato S: Quantitation of HIV-1 group M proviral DNA using TaqMan MGB real-time PCR, J. V. Meth, 157, 141-146 (2009).

2. 学会発表

- 1) 近藤真規子、須藤弘二、佐野貴子、倉井華子、立川夏夫、相楽裕子、岩室紳也、加藤真吾、今井光信：コバス TaqManHIV-1 での RNA 定量値がアンプリコア HIV-1 モニターに比べ 100 倍以上低値であった症例の解析、第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会（2009 年 11 月 26～11 月 28 日、名古屋）。
- 2) 佐野貴子、西大條文一、井戸田一朗、須藤弘二、加藤真吾、近藤真規子、今井光信：抗 HIV 抗体量により感染時期を推測するための検査法の検討、第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会（2009 年 11 月 26～11 月 28 日、名古屋）。
- 3) 川畑拓也、森治代、小泉洋子、秋吉京子、近藤真規子、中澤よう子、宇宿秀三、貞升健志、長島真美、矢永由里子、今井光信、加藤真吾：HIV 検査体制相談における新型インフルエンザ流行の影響、第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会（2009 年 11 月 26～11 月 28 日、名古屋）。
- 4) 井戸田一朗、加藤朋子、畑寿太郎、島川真知子、佐野貴子、近藤真規子、須藤弘二、加藤真吾、今井光信：急速な進行と多彩な合併症を伴い、初期治療に早期に失敗した急性 HIV 感染症の一例、第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会（2009 年 11 月 26～11 月 28 日、名古屋）。
- 5) 服部純子、近藤真規子、加藤真吾、杉浦 互 他：2003-2008 年の新規 HIV/AIDS 診断症例における薬剤耐性頻度の動向、第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会（2009 年 11 月 26～11 月 28 日、名古屋）
- 6) Hattori J, Yoshida S, Gatanaga H, Kondo M, Sadamasu K, Mori H, Minami R, Sugiura W: Increasing prevalence of Drug-Resistance Mutation among Treatment-Naïve HIV-infected Patients in Japan from 2003 to 2007. The 16th Conference on Retroviruses and Opportunistic infections (Jul. 19-22, 2009, Cape Town).

図1 KK-TaqMan法の原理



特徴: HIV-1グループMを測定できるようにdegenerate プライマー、プローブを設計

表1 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
Y271-090212	230	<40 (ND)	n.a.	B
Y271-090317	120	<40 (ND)	n.a.	B
Y271-090604	<50 (ND)	<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

図2 コバスTaqManの増幅領域(gag p24)とAmplicor HIV-1 Monitor ver.1.5およびKK-TaqManのプライマー、プローブ位置

Consensus	Amplicor forward primer	Amplicor probe
B	AGTGGGGGA CATCAAGCAG CCATGCAAAT GTTAAAAGAG	ACCATCAATG AGGAAGCTGC AGAATGGGAT AGATTGCATC
AE	AGTRGGGGGA CAYCARGCAG CHATGCARAT	ATCAATG ARGARGCTGC AGAATGGGA
A1	-----C-G-----A-----	-----GG-A--C-
A2	-----C-G-----T-----	-----C--G--A--
AG	-----C-G-----A--G--	-----C--GG-A--
C	-----A-----T-----	-----A-----
F1	-----C-----	-----C--A--
G	-----G-----T-----C--G--T	-----G--C--GA--
D	-----	-----G--A--

Consensus	Amplicor reverse primer
B	CAGTGCATGC AGGGCCTATT GCACCAGGCC AGATGAGAGA ACCAAGGGA AGTGACATAG CAGGAACTAC TAGTACC
AE	-----A-----C-----G-----
A1	-----A-----C-----
A2	-----A-----C-----
AG	-----A-----C-----G-----
C	-----A-----A-----
F1	-----C-----G-----T-----T-----T-----
G	-----C-A--G--C-----A-----T-----
D	-----G-----T-----

表2 各種HIV-1RNA定量法による測定値の比較

Patient no.	KK-TaqMan*	コバス 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

下段はJ.Clin. Microbiol.,47,1238-40,2009より抜粋

図3 Amplicor HIV-1 Monitor ver.1.5 とKK-TaqMan法のforward primer位置

Amplicor: AGTGGGGGGA CATCAAGCAG CCATGCAAAT GTTAAAAGAG
 KK-TaqMan: AGTRGGGGGA CAYCARGCAG CHATGCARAT

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

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

* 下段はJ.Clin. Microbiol.,47,1238-40,2009より抜粋

図4 Amplicor HIV-1 Monitor ver.1.5 とKK-TaqMan法のprobe位置

Amplicor: GTTAAAAGAG ACCATCAATG AGGAAGCTGC AGAATGGGAT
 KK-TaqMan: ATCAATG ARGARGCTGC AGAATGGGA

Y271 B -----T-----G-----
 Control
 GM2563 B -----T--A-----

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

* 下段はJ.Clin. Microbiol.,47,1238-40,2009より抜粋

図5 Amplicor HIV-1 Monitor ver.1.5 とKK-TaqMan法のreverse primer位置

Amplicor: ACCAAGGGGA 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-

* 下段はJ.Clin. Microbiol.,47,1238-40,2009より抜粋

②. 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 (2010 年から 2011 年)

研究分担者 近藤真規子 (神奈川県衛生研究所)
協力研究者 佐野貴子 (神奈川県衛生研究所)
今井光信 (神奈川県衛生研究所)
貞升健志 (東京都健康安全研究センター)
川畑拓也 (大阪府立公衆衛生研究所)
長野秀樹 (北海道立衛生研究所)
加藤真吾 (慶應義塾大学医学部微生物学・免疫学教室)
須藤弘二 (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確認検査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。2009 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症例についても問題なく測定できることが分かった。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、2010 年度から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開始した。

感染者の多い地域の衛生研究所を中心に技術支援を行い、現在、東京都健康安全研究センター、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、富山県衛生研究所、千葉県衛生研究所の 13 施設において KK-TaqMan の実施が可能である。

栃木県保健環境センター、佐賀県衛生薬業センター、名古屋市衛生研究所、広島県保健環境センター、新潟県保健環境科学研究所の 5 施設には操作マニュアルを配布し、横須賀市健康安全科学センター、相模原市衛生研究所については技術研修を行った。また、KK-TaqMan 法を「病原体検出マニュアル改定版」に掲載する予定である。

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 ver. 1.0 (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)。

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、2010 年度から全国の地方衛生研究所を対象に KK-TaqMan の普及と技術支援を開始した。

B. 研究方法

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(核酸増幅検査)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

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、32 回研究会(2010 年、2011 年)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 の送付、希望施設には技術研修を行った。

3. 病原体検出マニュアルの改定

全国衛生微生物協議会で監修している「病原体検出マニュアル、エイズ/HIV 感染症」の改定版を作成した。

(倫理面への配慮)

KK-TaqMan は主として保健所等での HIV 無料匿名検査の確認検査として用いている。受検者名は記号化されており、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。

C. 結果および考察

1. KK-TaqMan の地方研究所への普及と技術支援

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健康安全研究センター、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た。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 月以降希望のあった施設に順次、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、富山県衛生研究所に操作マニュアル、コントロール HIV-1RNA を送付し、各施設で検討が行われた。

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 7900 HT、Step OnePlus 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、ロシユダイアグノスティックスの LightCycler480 においても良好な結果が得られた。

2011 年度は新たに千葉県衛生研究所の希望に応じ、コントロール HIV-1RNA を送付した。横須賀市健康安全科学センター、相模原市衛生試験所については技術研修を行った。

また、2010 年度には地方衛生研究所 HIV 検査グループの愛知県衛生研究所、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の 5 施設に、2011 年度には要望のあった栃木県保健環境センター、佐賀県衛生薬業センター、名古屋市衛生研究所、広島県保健環境センター、新潟県保健環境科学研究所の 5 施設へ「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、32 回研究会(2010 年、2011 年)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。

「病原体検出マニュアル、エイズ/HIV 感染症」の改定版に、新たに HIV-1 RNA 定量法 KK-TaqMan 法を追加した(資料 1)。本マニュアルは国立感染症研究所と本研究班の協力により作成され、特に HIV 検査手順、HIV-2 の検査、HIV 遺伝子検査、HIV 分離法等について充実させた。詳細については国立感染症研究所ホームページ内の病原体検出マニュアルを参照していただきたい。

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 の普及と技術支援を行った。感染者の多い地域を中心に技術支援を行い、現在、東京都健康安全研究センター、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、富山県衛生研究所、千葉県衛生研究所の 13 施設において KK-TaqMan の実施が可能である。

本法は「病原体検出マニュアル、エイズ/HIV 感染症」の改定版に掲載される予定である。

資料 1

HIV-1 RNA 定量法 (KK-TaqMan)

1) 背景

HIV-1 RNA 定量法は、HIV-1 感染者のフォローアップ検査として薬剤治療効果の判定、病態把握等に重要な検査であるが、HIV-1 RNA 定量法を確定診断に使用することで HIV-1 感染をより早期に診断することが可能になった。我が国では、HIV-1 RNA 定量検査法としてロシュ・ダイアグノスティックス社（以下、ロシュ社）のアンプリコア HIV-1 モニター（以下、アンプリコア）が長期間使用されてきたが、2008 年 4 月頃から、同じロシュ社のリアルタイム PCR を原理とするコバス TaqManHIV-1（以下、コバス TaqMan）が販売されるようになった。その後、同じリアルタイム PCR を原理とするアキュジーン m-HIV-1（アボット社）が販売されている。これらはアンプリコアに比べ自動化が進み、定量範囲が広いなどの特徴があるが、2 法とも高価な専用装置が必要であるため、多くの公的検査・研究機関において導入が困難となっている。

本項では HIV 検査体制研究班（厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業）で開発した汎用リアルタイム PCR 装置を用いた HIV-1 RNA 定量法である KK-TaqMan 法を記載する。

2) KK-TaqMan 法の概要

本法は汎用のリアルタイム PCR 装置を用いた HIV-1RNA 定量法で、定量下限は 50 コピー/mL、定量範囲は 50～500,000 コピー/mL で、市販のキットに比べ狭いが、検体を希釈することによって 500,000 コピー/mL 以上の定量も可能である。なお、本法は主としてアプライドバイオシステムズ (ABI) のリアルタイム PCR 装置 7900HT と StepOnePlus で基礎的検討を行ったが、ABI の 7500、ロシュの Light Cycler 480 も使用可能であることを確認している。しかし、使用する装置、試薬、反応容器等により最適な反応条件が異なるため、本法導入の際には、施設毎に必ず条件検討を行う必要がある。

本法のターゲット領域は gag p24 領域で、Los Alamos HIV データベースによる検索を行い、HIV-1 グループ M のサブタイプおよび CRF に対応できるように数カ所の塩基を degenerate (縮重) したプライマー、プローブを用いている。本法はサブタイプ B、A、C、D、F、G、CRF01_AE について良好な反応性を示し、コバス TaqMan との相関も良好であった^{1, 2}。

3) KK-TaqMan 法プロトコール

(1) 検査材料

血漿（抗凝固剤は EDTA、あるいは CPD が推奨される。ヘパリンは PCR を阻害するため、使用不可）または血清の 500 μ L を用いる。

(2) スタンダード HIV-1RNA 希釈系列の作製

スタンダードとして HIV-1 cell line 8E5 培養上清を用いる。KK-TaqMan 法導入施設には既知濃度の培養上清を配布する（連絡先：神奈川県衛生研究所）。8E5 培養上清中の HIV-1 粒子は、逆転写酵素とインテグラーゼが欠損しているため感染性がなく、カテゴリーは Biosafety level 2 である (<http://www.atcc.org>)。

市販血清（三光純薬，SC1318 EXA Liquid 3 Normal）を用いて、8E5 培養上清の希釈系列 500,000、50,000、5,000、500、150、50 コピー/mL を作製する。各希釈系列は 1.5mL チューブに 500 μ L ずつ分注し、使用時まで -80°C で保存する。

標準曲線は 500,000、5,000、150 コピー/mL の 3 点を用いて作製し、高濃度、中濃度、低濃度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用いる。

(3) ウイルス RNA の抽出

RNA 抽出キット：QIAamp UltraSens Virus Kit（QIAGEN、No. 53704）

使用機器：微量高速冷却遠心機、高温槽（1.5mL チューブ用）

使用器材：1.5mL チューブ、先細トランスファースポイト、

マイクロピペット、フィルター付きチップ（1000P、200P、20P）

【操作フロー】

(a) サンプルの前処理とスピンカラム法による RNA 抽出

サンプル、スタンダード、陽性および陰性コントロール、各 500 μ L を 1.5mL チューブに準備する。

↓

4 $^{\circ}\text{C}$ 、15,000 rpm、1 時間、遠心する。

（1.5mL チューブに印を入れ、印側に沈殿が集まるように遠心する。）

↓

上清を約 20 μ 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する。）

↓

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

↓

Buffer AR 300 μ L \times 検体数 \times 1.1 を 60 $^{\circ}\text{C}$ で温めておき、使用直前に Protease K 20 μ L \times 検体数 \times 1.1 を加え、よく攪拌する。

↓

Buffer AR と Protease K の混合液を各チューブに 320 μ L 加える。蓋に carrier RNA を 5.6 μ L 入れ、2~3 回転倒混和後、vortex する。

↓

5 秒間 vortex を 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の高温槽で10分間反応する。

5分後、5秒間 vortex を2回

10分後、5秒間 vortex を3回



スピンドウン



Buffer AB 300 μ L、10秒間 vortex



スピнкаラムをコレクションチューブにセットし、反応液を全量スピнкаラムに移し、6,000 rpm、1分間遠心する



スピнкаラムを新しいコレクションチューブに移し、スピнкаラムに AW1 を500 μ L 加え、8,000 rpm、1分間遠心する。



スピнкаラムを新しいコレクションチューブに移し、スピнкаラムに AW2 を500 μ L 加え、14,000 rpm、3分間遠心する。



(スピнкаラムの縁に濾液がついたら、新しいコレクションチューブを用いて、14,000 rpm、1分間遠心し、完全に濾液を除く。)



スピнкаラムを1.5ml チューブに設置し、AVE を30 μ L 加え、8,000 rpm、1分間遠心する。(この操作を2回繰り返す、計60 μ L)

(b) エタノール沈殿による RNA 濃縮

60 μ L 溶出液



3 M 酢酸ナトリウム 6 μ L、エタノール 200 μ L を (検体数 \times 1.1) 分作っておき、各チューブに200 μ L ずつ加え、5秒間 vortex する。



4°C、15,000 rpm、10分間遠心する。

(チューブに印を入れ、印側に沈殿が集まるように遠心する)



先細トランスファースポイトで上清を除去する。

(沈殿を除去しないように注意)



70%エタノール 100 μ L を加え、5秒間 vortex する。



4°C、15,000 rpm、2分間遠心する。

(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分間放置し、エタノールを蒸発させる。



氷冷したリアルタイム RT-PCR 用 Master mixture*¹ を50 μ L、あるいは20 μ L 加え、10秒間 vortex、スピンドウン後、反応液を氷上のリアルタイムプレートへ移す。

(*1. 使用するリアルタイム PCR 装置によって液量が異なる。次項 (4) を参照)

(4) リアルタイム RT-PCR

試薬：PCR 装置によりどちらかを選択する。

- SuperScript III Platinum One-step Quantitative RT-PCR System with ROX (Invitrogen, No.11745-100)
- EXPRESS One-Step SuperScript qRT-PCR Kits (Universal ROX) , (Invitrogen, No11791-200)

プライマー、プローブ (HPLC 精製) :

- deSK145 : 5'-AGTRGGGGACAYCARGCAGCHATGCARAT-3'
- deSKCC1B: 5'-TACTAGTAGTTCCTGCTATRTCACTCC-3'
- deKK-MGB-probe : 5' 末端側に FAM、3' 末端側に MGB を修飾
5'-ATCAATGARGARGCTGCAGAATGGGA-3'

① リアルタイム装置 ABI 7900HT ; スタンダードモード

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

Master mixture* ¹	
2×Reaction Mix with ROX	25.0 μL
20 μM deSK145	1.25 μL
20 μM deSKCC1B	1.25 μL
5 μM deKK-MGB	2.0 μL
Water	19.5 μL
SuperScript III RT/Platinum Taq Mix	1.0 μL
Total	50.0 μL

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 One Step SuperScript qRT-PCR Kits (Universal ROX)

Master mixture* ¹	
Express qPCR SuperMix with Premixed ROX	10.0 μL
10 μM deSK145	1.0 μL
10 μM deSKCC1B	1.0 μL
4 μM deKK-MGB	1.0 μL
Water	5.0 μL
Express SuperScript Mix for One-Step qPCR	2.0 μL
Total	20.0 μL