

**厚生労働科学研究費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)
分担研究報告書**

**Real-time PCR を使ったウイルス定量技術の標準化と
第四世代検出試薬の体外診断薬審査への応用**

研究分担者： 草川 茂 (国立感染症研究所エイズ研究センター・主任研究官)

研究要旨

現在 HIV スクリーニング検査の主流となっている、第四世代試薬の体外診断薬審査試験における抗原の検出能を試験する検体の作製のために、あらゆるサブタイプ・CRF・グループの HIV-1 量を定量するための Real-time PCR 法の検討を行った。方法は、安価で操作方法の至適化が容易な SYBR Green 法を選択した。HIV-1 gag MA 領域に 127bp を増幅するプライマーを設計した。NarI 消化した pNL432 および 6 種類のサブタイプ・4 種類の CRF・グループ O のゲノム完全長を含むプラスミド 22 クローンを鋳型として用いた。増幅効率を、全プラスミドが有するアンピシリン耐性遺伝子領域増幅の結果と比較した。全ての鋳型で、これらの領域は同等な効率で増幅し、使用した全てのサブタイプ・CRF・グループの HIV-1 ゲノムの増幅効率はほぼ同じであることがわかった。この方法が、多様なサブタイプ・CRF・グループの HIV-1 分離ウイルスの定量に有用である可能性が示された。

A . 研究目的

HIV の検査室レベルでの診断は、スクリーニング検査と確認検査に大別される。現在市販されているスクリーニング検査用の試薬は、抗体検出試薬である第三代試薬と抗原抗体同時検出試薬である第四世代試薬に分けられる。抗原を検出できることによって、セロコンバージョン前の感染初期の検体を検出可能なことから、現在は第四世代試薬が HIV スクリー

ニング検査の主流となっている。第四世代試薬の性能試験は、市販のセロコンバージョンパネルを用いた第三代試薬との検出採血日数の比較によって行われるが、これらのパネルに関し、市販の検出試薬による測定結果以外の情報は明らかでない。また実際に検査の現場で使用されている第四世代試薬の抗原検出感度が期待通りではなかった、あるいはサブタイプ/CRF 毎に抗原検出感度にばらつき

が見られたということも報告されている。本研究では、第四世代試薬の体外診断薬審査試験において、感染初期の検出に重要な抗原の検出能を定性的、定量的に試験できる系を検討する。試験用検体の作製にあたって、ウイルス量の標準化が必要になるが、現在研究用として市販されている HIV-1 定量試薬は、ウイルス株ごとに検出感度にばらつきがあるため、本年度は、あらゆるサブタイプ・CRF・グループの HIV-1 量を定量するための Real-time PCR 系の樹立を行った。

B . 研究方法

分離ウイルスの定量では、比較的高コピー数の定量が出来れば良いので、より安価で操作方法の至適化が容易な SYBR Green 法を用いることにした。まず、ロスマス研究所の HIV Sequence Database に掲載されている HIV-1 塩基配列のアライメントをもとに、すべての HIV-1 サブタイプ・CRF・グループで相同性が高い領域を調べ、HIV-1 gag MA 領域に 127bp を増幅するプライマーを設計した。その感度と特異度を検討するために、NarI 消化して線状化した HIV-1 pNL432 および 6 種類のサブタイプ・4 種類の CRF・グループ O のゲノム完全長を含むプラスミド 22 クローン(図 2)を鋳型として用い、全プラスミドが有するアンピシリン耐性遺伝子を検出するプライマーペアによる増幅の結果と比較した。

(倫理面への配慮)

なし。

C . 研究結果

まず HIV-1 標準株としてよく用いられる、サブタイプ B のプラスミド pNL432 を用い、HIV-1 MA 及びアンピシリン耐性遺伝子を増幅するプライマーペアの増幅効率の確認を行った。pNL432 は定量値と塩基数からコピー数を算出、 10^4 から 10^1 まで 10 倍段階希釈し、鋳型として用いた。HIV-1 MA 領域・アンピシリン耐性遺伝子領域ともに、典型的な増幅曲線を示した。融解曲線から非特異的な増幅によると思われるピークは見られなかった。反応後、各サンプルをアガロースゲル電気泳動し、増幅の特異性を確認した。それぞれの Ct 値をもとに検量線を描き、増幅効率と相関係数を調べた。Slope 値からの計算される増幅効率はいずれもほぼ 100%で、いずれの領域においても、各コピー数における Ct 値はほぼ直線上にあり、相関係数もほぼ 1 であった。同一コピー数を鋳型に用いた時の、それぞれの領域の Ct 値をグラフにプロットし、その相関性を検討した。同一コピー数の鋳型を用いた時の Ct 値はほぼ同じで、相関係数 (R^2) はほぼ 1 となった。以上の結果から、用いたプライマーおよび反応条件が適切であること、2 種類プライマーペアの増幅効率がほぼ同じであることが示された。

次にこの系を使って、各サブタイプ・CRF・グループの HIV-1 を同じ効率で増

幅できるかどうかを確認する実験を行った。プラスミドは1反応当たり 1.4 フェムトグラム (約 100 コピー) を鋳型として用いた。全ての鋳型において典型的な増幅曲線が得られ、融解曲線から非特異的な増幅は観察されなかった。各鋳型の2つの領域の Ct 値を比較したところ、いずれの鋳型においてもほぼ同じ値となり、その値は 17.4 から 19 の間に分布していた。それぞれの領域の Ct 値をグラフにプロットしたところ、得られた近似曲線の相関係数 $R^2=0.93$ であった(図3)。アンピシリン耐性遺伝子の塩基配列は全てのプラスミドで 100%一致するので、その増幅効率もプラスミド間で同じであると考えられる。用いた全てのプラスミドで、HIV-1 MA 領域の Ct 値がアンピシリン耐性遺伝子の Ct 値とほぼ一致していたことから、今回設計した HIV-1 MA 領域を増幅するプライマーは、使用した全てのサブタイプ・CRF・グループを同じ効率で増幅することがわかった。

D . 考察

本研究では、様々なサブタイプ・CRF・グループの HIV-1 分離ウイルスをスパイクした試験用検体を用いて第四世代試薬の HIV-1 抗原検出感度の性能調査を行う系を確立することを目的としている。試験用検体を作製するにあたって、ウイルス量を標準化しておく必要がある。いくつかのメーカーから HIV-1 定量のための HIV-1 p24 抗原定量試薬が研究用試薬と

して販売されているが、サブタイプ・CRF・グループにより感度が異なることが指摘されている。

SYBR Green を用いた Real-time PCR 法は、培養上清中のウイルス定量のような高感度の検出を求められないウイルス RNA の検出を比較的安価に行うのに有効な方法である。今回すべての HIV-1 サブタイプ・CRF・グループを同じ効率で増幅できることを目標とし、新たに設計したプライマーの検出感度と PCR の条件を検討した。その結果、6種類のサブタイプ・4種類の CRF・グループ O をほぼ同じ効率で増幅できることが確認でき、様々な HIV-1 定量に適用できることが示された。塩基配列の相同性から、他のサブタイプや CRF、グループも同じように増幅できると予想される。

E . 結論

今回検討した SYBR Green を用いた Real-time PCR 法は、すべてのサブタイプ・CRF・グループの HIV-1 分離ウイルスの定量に有用である可能性が示された。現在、RNA の抽出と Real-time RT-PCR プロトコルの標準化および第四世代試薬性能試験用の分離ウイルスの調整が進行中である。今回の方法で値付けされた HIV-1 分離ウイルスをスパイクした検体の作製を行い、コピー数で値付けされた抗原検出感度測定用検体を作製、第四世代試薬の抗原の検出能を試験する系の確立へと進める予定である。

G . 研究発表

1. 論文発表

Huang L, Kusagawa S, Zeng H, Yang G, Sun B, Miura T, Yang R: Development of a novel rhesus macaque model with an infectious R5 simian-human immunodeficiency virus encoding HIV-1 CRF08_BC env. J Med Primatol (2014) 43, 11-21.

2. 学会発表

該当なし。

H . 知的財産権の出願・登録状況

該当なし。

No.	Classification	Clone Name
1	Subtype A	92UG031_A2
2	Subtype A	92RW025_A17
3	Subtype B	DH001f_19
4	Subtype B	PRD320_06B2
5	Subtype C	PRD320_08C15
6	Subtype C	IndieC1
7	Subtype D	PRD320_09D25
8	Subtype D	PRD320_10D02
9	Subtype F	PRD320_13F52
10	Subtype F	PRD320_14F45
11	Subtype G	PRD320_16G41
12	Subtype G	GH_NJ175_G19
13	Group O	PRD320_18O04
14	Group O	PRD320_19O02
15	CRF01_AE	PRD320_11AE61
16	CRF01_AE	93JP_NH1
17	CRF02_AG	PRD320_03AG06
18	CRF02_AG	97GH_AG1
19	CRF07_BC	99CN013_13
20	CRF07_BC	HH043_3M11
21	CRF08_BC	WS035_BC51
22	CRF08_BC	DL001_BC06

図 2: Real-time PCR の鑄型として用いたプラスミド

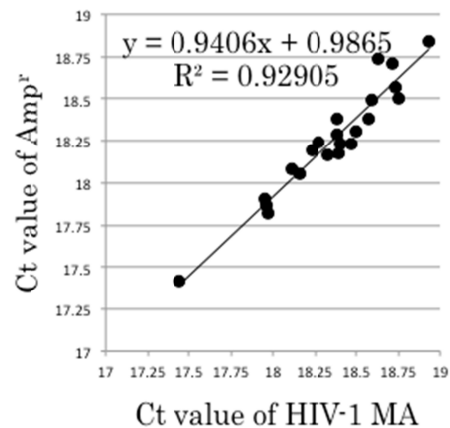


図 3: 各サブタイプ・CRF・グループに対する HIV-1 MA 及びアンピシリン耐性遺伝子を増幅するプライマーペアの増幅効率の比較