

## HIV RNA と DNA の混合物から RNA を選択的に増幅する RT-PCR 法の開発

研究分担者 加藤 真吾 (慶應義塾大学医学部 微生物学・免疫学教室)  
研究協力者 丸山 理恵 (慶應義塾大学医学部 微生物学・免疫学教室)  
長谷川 直樹 (慶應義塾大学病院 感染制御センター)  
藤原 宏 (慶應義塾大学病院 感染制御センター)

### 研究要旨

今回、我々は使用するプライマーに標的配列に相補的でない配列を組み込むことで、DNA と RNA の混合物から RNA のみを増幅することができる RT-PCR 法の開発を試みた。プライマーは gag 領域に設定し、逆転写には 3'側にターゲットと相補的な短い配列部分と 5'側にターゲットと相補的でない配列を持つプライマーを用いた。HIV-1 RNA の標準試料として 8E5 株およびそこから精製物、HIV-1 DNA の標準試料として pNL43 を用いた。従来から用いられているプライマーおよび開発したプライマーでの 8E5 RNA の検量線はいずれも良好な直線が得られた。一方、pNL43 の検量線は、従来のプライマーで良好な検量線が得られたが、今回開発したプライマーでは 10000 コピーの RNA があっても増幅しなかった。今回開発したプライマーを用いれば、同一検体を用いて、DNA と RNA の混合物から RNA を選択的に検出できると考えられた。

### A.研究目的

近年、抗 HIV 治療の治療効果を反映するリザーバーの量的指標として、細胞内の HIV DNA 量と RNA 量が注目されている。しかし、細胞から抽出した DNA と RNA の混合物を用いて RT-PCR を行うと、RNA だけでなく DNA も増幅するため、RNA のみを直接定量することは困難である。従来、試料中の RNA のみを定量したい場合、逆転写の前に DNA を DNA 分解酵素によって分解しておく方法が主に用いられてきたが、煩雑で時間もかかるという問題があった。今回、我々は使用するプライマーに標的配列に相補的でない配列を組み込むことで、DNA と RNA の混合物から RNA のみを増幅することができる RT-PCR 法の開発を試みた。

### B.研究方法

HIV-1 RNA の標準試料として、8E5 株およびそこから精製物、HIV-1 DNA 標準試料として pNL432 を用いた。プライマーは gag 領域に設計をし、順方向のプライマーは従来の PCR で使用するものと同様のものを用いた。一方、逆方向のプライマーは 3'側にターゲットと相補的な短い配列部分と 5'側にターゲットと相補的でない配列を持つプライマーを用いた。リアルタイム PCR を用いて、逆方向のプライマーの相補的な短い配列部分の長さを変えた数種類のプライマーで、HIV-1 RNA は増幅するが DNA は増幅しないような長さを検討した。HIV-1 DNA と RNA の混合液の混合比率を変えて 4 種類の検体を作成し、従来使用されていたプライマーと今回開発したプライマーで比較した。さらに HIV-1 感染未治療患者の DNA 検体、3 症例を用いて、DNA 中の HIV-1 DNA と RNA の検出を試

みた。

### C.研究結果

1000 コピーの HIV-1 RNA を用いて、逆方向のプライマーの相補的な短い配列部分の長さを変えた数種類のプライマーを用いてリアルタイム PCR で RT-PCR を行った。RNA の増幅曲線は相補的な配列が 7 個であっても増幅することが確認できた。一方、1000 コピーの HIV-1 DNA を用いて、数種類のプライマーを用いて PCR を行くと、相補的な配列が 12 個以下になると増幅しなくなった。

10 コピーから 10000 コピーの HIV-1 RNA の検量線を相補的な配列が 9 個のプライマー(gag-FA/gag-RA(9-18))を用いて検討すると、従来使用されていたプライマー (gag-FA/gag(27-0)) と同様に良好な直線が得られた(図 1)。同じプライマーを用いて、10 コピーから 10000 コピーの HIV-1 DNA の検量線を増幅させると、10000 コピーの DNA があっても増幅が確認できなかった(図 2)。

同一検体中の HIV-1 RNA と DNA の合計コピー数が 1000 コピー、RNA と DNA の混合比を変えた検体を 4 種類用意し、従来使用されていたすべて相補的な塩基配列を持つプライマーと 9 塩基のみ相補的な配列を持つプライマーで増幅させた。従来のプライマーでは、RNA と DNA の合計した 1000 コピーでの増幅曲線となったが、相補的な配列が短いプライマーでは RNA の量に応じた増幅曲線となった(図 3)。

未治療 HIV 感染患者の臨床検体を 3 症例用いて、開発した方法で HIV-1 DNA と RNA の測知を試みた。3 症例中、2 症例で PBMC 由来 DNA 内から HIV-1 RNA を検出することができた(表 1)。

### D.考察

従来使用されているプライマーで RT-PCR を行くと HIV-1 RNA もしくは DNA が 10 コピー

以上あれば、再現性良く増幅できた。一方、我々が開発した方法では、HIV-1 DNA が 10000 コピーあっても増幅が認められなかった。DNA 量と RNA 量の割合を変えた混合試料を測定すると、従来のプライマーでは DNA 量と RNA 量を合わせた量での増幅曲線となっていたが、我々の方法では、RNA 量にのみ依存した増幅曲線が得られた。

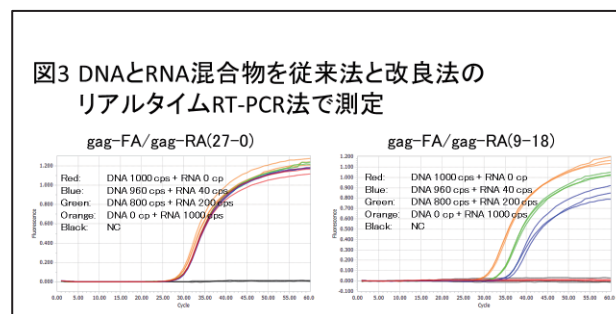
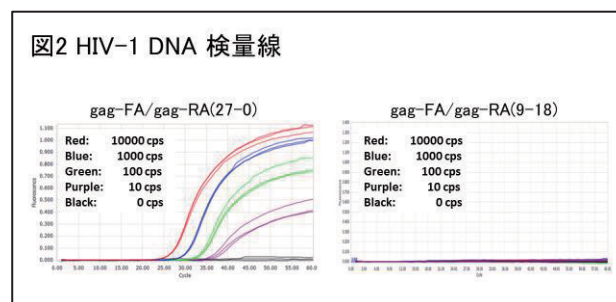
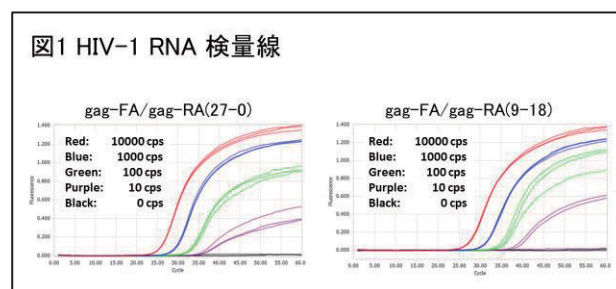


表1 臨床検体を用いた検討

No.	結果 (cps/1 $\mu$ g DNA)		臨床データ	
	HIV-1 DNA	HIV-1 RNA	CD4	VL
1	17000	150	16	1,000,000
2	32	130	2	580,000
3	3.6	ND	319	240,000

## E. 結論

今回、我々が開発した方法を用いることによって、HIV-1 RNA と DNA の混合物から RNA のみを選択的に増幅することができた。未治療患者の細胞内 HIV-1 RNA 量の測定を行ったが、今後、治療後の患者検体を用いても同様に細胞内の HIV-1 RNA 量を調べ、治療効果を明らかにすることが重要だと考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Yamazaki S, Kondo M, Sudo K, Ueda T, Fujiwara H, Hasegawa N, Kato S. (2016) A Qualitative Real-time PCR assay for HIV-1 and HIV-2 RNA. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 69:367-372. DOI: 10.7883/yoken.JJID.2015.309
- 2) Kotani H, Sudo K, Naoki H, Fujiwara H, Hayakawa T, Iketani O, Yamaguchi M, Mochizuki M, Iwata S, Kato S. (2016) Possible involvement of distinct phylogenetic clusters of HIV-1 variants in the discrepancies between coreceptor tropism predictions based on viral RNA. *Journal of Pharmaceutical Health Care and Sciences*. DOI:10.1186/s40780-016-0065-4
- 3) Ikeno R, Yamada E, Yamazaki S, Ueda T, Nagata M, Takagi R, Kato S. (2017) Factors contributing to salivary human immunodeficiency virus type-1 levels measured by a Poisson distribution-based PCR method. *Journal of International Medical Research*. DOI:10.1177/0300060517728652. e-pub: November 9, 2017
- 4) 加藤真吾. (2017) 1.1 免疫の特徴. 1.2 免疫担当細胞と器官. 臨床免疫検査技術教本:2-11

- 5) Yamada E, Takagi R, Tanabe Y, Fujiwara H, Naoki H, Kato S. (2016) Plasma and saliva concentrations of abacavir, tenofovir, darunavir and raltegravir in HIV-1-infected patients. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*. DOI: 10. 5414/CP202789. e-pub: April 21, 2017
- 6) Makiko Kondo, Koji Sudo, Takako Sano, Takuya Kawahata, Ichiro Itoda, Shinya Iwamuro, Yukihiko Yoshimura, Natsuo Tachikawa, Yoko Kojima, Haruyo Mori, Hiroshi Fujiwara, Naoki Hasegawa, Shingo Kato. (2018) Comparative evaluation of the Geenius™ HIV 1/2 Confirmatory Assay and the HIV-1 and HIV-2 Western blots in the Japanese population. *PLoS One*. 13(10):e0198924.doi:10.1371/journal.pone.0198924. eCollection . Oct 31, 2018.

### 2. 学会発表

- 1) 岡崎玲子, 加藤真吾, 吉村和久ら. 国内新規 HIV/AIDS 診断症例における薬剤耐性 HIV-1 の動向. 第 30 回日本エイズ学会学術集会・総会, 鹿児島, 2016 年 11 月.
- 2) 小谷宙, 加藤真吾, 長谷川直樹ら. NRTI にラルテグラビルおよびダルナビルを含む強化療法を導入した 2 症例. 第 30 回日本エイズ学会学術集会・総会, 鹿児島, 2016 年 11 月.
- 3) 丸山理恵, 加藤真吾ら. 乾燥濾紙血を用いた HIV-1 RNA 検出法. 第 30 回日本エイズ学会学術集会・総会, 鹿児島, 2016 年 11 月.
- 4) 矢永由里子, 加藤真吾ら. 「病院に HIV 検査実施ガイドライン」作成と評価分析について. 第 30 回日本エイズ学会学術集会・総会, 鹿児島, 2016 年 11 月.
- 5) 近藤真規子, 加藤真吾ら. 中国の MSM 間で大流行している HIV-1 CRF01\_AE variant の日

- 本国内への拡散. 第 30 回日本エイズ学会学術集会・総会, 鹿児島, 2016 年 11 月.
- 6) 星野慎二, 加藤真吾ら. 全国保健所における梅毒検査体制のアンケート調査. 第 30 回日本エイズ学会学術集会・総会, 鹿児島, 2016 年 11 月.
- 7) 須藤弘二, 加藤真吾ら. HIV 郵送検査に関する実態調査と検査精度調査(2015). 第 30 回日本エイズ学会学術集会・総会, 鹿児島, 2016 年 11 月.
- 8) 加藤真吾, 長谷川直樹ら. CDC が推奨する HIV 検査手順の検討と HIV-1/2 鑑別検査キット Geenius の検討. 第 30 回日本エイズ学会学術集会・総会, 鹿児島, 2016 年 11 月.
- 9) 佐野貴子, 加藤真吾, 市川誠一ら. HIV 検査・相談マップを用いた HIV 検査相談施設の情報提供およびサイト利用状況の解析. 第 30 回日本エイズ学会学術集会・総会, 鹿児島, 2016 年 11 月.
- 10) 佐野貴子, 近藤真規子, 加藤真吾ら. 新規 HIV 抗体確認検査試薬である Geenius HIV Confirmatory Assay の検討. 第 31 回日本エイズ学会学術集会・総会, 東京都, 2017 年 11 月.
- 11) 川畑拓也, 小島洋子, 加藤真吾ら. 新しい HIV 確認検査試薬 Geenius™の性能評価. 第 31 回日本エイズ学会学術集会・総会, 東京都, 2017 年 11 月.
- 12) 吉田繁, 加藤真吾, 吉村和久ら. 2016 年度 HIV 薬剤耐性検査外部精度評価の報告. 第 31 回日本エイズ学会学術集会・総会, 東京都, 2017 年 11 月.
- 13) 岡崎玲子, 加藤真吾, 吉村和久ら. 国内新規 HIV/AIDS 診断症例における薬剤耐性 HIV-1 の動向. 第 31 回日本エイズ学会学術集会・総会, 東京都, 2017 年 11 月.
- 14) 近藤真規子, 加藤真吾, 吉村和久ら. 日本で流行する HIV-1 CRF01\_AE と周辺アジア諸国における流行株との関連. 第 31 回日本エイズ学会学術集会・総会, 東京都, 2017 年 11 月.
- 15) 佐野貴子, 加藤真吾, 今井光信ら. 保健所等公的検査機関を対象とした HIV 検査相談体制に関するアンケート調査. 第 31 回日本エイズ学会学術集会・総会, 東京都, 2017 年 11 月.
- 16) 丸山理恵, 須藤弘二, 加藤真吾ら. 乾燥濾紙血を用いた HIV-1 RNA および DNA 検査法. 第 31 回日本エイズ学会学術集会・総会, 東京都, 2017 年 11 月.
- 17) 須藤弘二, 佐野貴子, 加藤真吾ら. HIV 郵送検査に関する実態調査と検査精度調査(2016). 第 31 回日本エイズ学会学術集会・総会, 東京都, 2017 年 11 月.
- 18) K. Sudo, T. Sano, M. Kondo, T. Kawahata, S. Kato, et al. Comparative Evaluation of the Bio-Rad Geenius™ HIV-1/2 Confirmatory Assay and the New LAV Blot 1 and 2 in the Japanese Population. 28th Regional Congress of the International Society of Blood Transfusion (ISBT), Guangzhou(広州), China, 2017.
- 19) 須藤弘二, 佐野貴子, 近藤真規子, 今井光信, 今村顕史, 加藤真吾. HIV 郵送検査に関する実態調査と検査精度調査(2017). 第 32 回日本エイズ学会学術集会・総会, 大阪府, 2018 年 12 月.
- 20) 近藤真規子, 佐野貴子, 長島真美, 貞升健志, 川畑拓也, 加藤真吾, 今村顕史. 全国地方衛生研究所における HIV 検査実施状況. 第 32 回日本エイズ学会学術集会・総会, 大阪府, 2018 年 12 月.
- 21) 土屋菜歩, 佐野貴子, 近藤真規子, 堅多敦子, 石丸雄二, 城所敏英, カエベタ亜矢, 川畑拓也, 貞升健志, 須藤弘二, 加藤真吾, 大木幸子, 今井光信, 今村顕史. 保健所・検査所における梅毒検査実施状況および陽性率に関するアンケート調査. 第 32 回日本エイズ学会学術集会・総会, 東京都, 2018 年 12 月.

- ズ学会学術集会・総会，大阪府，2018年12月。
- 22) 小谷宙，加藤真吾，親泊あいみ，須藤弘二，丸山理恵，西松直美，宇野俊介，上蓑義典，藤原宏，長谷川直樹．準完全長プロウイルスによる治療効果の新しい評価．第32回日本エイズ学会学術集会・総会，大阪府，2018年12月。
- 23) 岡崎玲子，蜂谷敦子，佐藤かおり，豊嶋崇徳，佐々木悟，伊藤俊広，林田庸総，岡慎一，湯永博之，古賀道子，長島真美，貞升健志，近藤真規子，椎野禎一郎，須藤弘二，加藤真吾，谷口俊文，猪狩英俊，寒川整，加藤英明，石ヶ坪良明，中島秀明，吉野友祐，太田康男，茂呂寛，渡邊珠代，松田昌和，重見麗，岩谷靖雅，横幕能行，渡邊大，小島洋子，森治代，藤井輝久，高田清式，南留美，山本政弘，松下修三，健山正男，藤田次郎，杉浦互，吉村和久，菊池正．国内新規HIV/AIDS診断症例における薬剤耐性HIV-1の動向．第32回日本エイズ学会学術集会・総会，大阪府，2018年12月。
- 24) 丸山理恵，加藤真吾．HIV RNA と DNA の混合物から RNA を選択的に増幅する RT-PCR 法の開発．第32回日本エイズ学会学術集会・総会，大阪府，2018年12月。
- 25) 本田徹郎，久慈直昭，丸山理恵，須藤弘二，加藤真吾．健康な HIV 陽性男性が陰性女性との間に子供を持つために：洗浄精子を用いた顕微授精について．第32回日本エイズ学会学術集会・総会，大阪府，2018年12月。
- 26) 土屋菜歩，佐野貴子，近藤真規子，堅多敦子，石丸雄二，城所敏英，カエベタ亜矢，川畑拓也，貞升健志，須藤弘二，加藤真吾，大木幸子，今井光信，今村顕史．保健所・検査所における HIV 検査・相談実施状況および陽性率に関するアンケート調査．第32回日本エイズ学会学術集会・総会，大阪府，2018年12月。
- 27) 佐野貴子，近藤真規子，須藤弘二，今井光信，加藤真吾，今村顕史．民間検査センターにおける HIV 検査実施状況に関するアンケート調査．第32回日本エイズ学会学術集会・総会，大阪府，2018年12月。
- 28) 川畑拓也，井戸田一朗，小島洋子，近藤真規子，貞升健志，佐野貴子，須藤弘二，高田昇，長島真美，森治代，加藤真吾，今村顕史．エビデンスに基づいた専門職向け HIV 検査 Q&A 集の作成．第32回日本エイズ学会学術集会・総会，大阪府，2018年12月。

## G.知的所有権の取得状況

- ①特許取得
- ②実用新案登録
- ③その他