

## HIV-1 及び HIV-2 の PCR クロマトグラフィー法の開発

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 植田知幸 (慶應義塾大学医学部 微生物学・免疫学教室)

### 研究要旨

現在、HIV-1 及び HIV-2 の遺伝子核酸検査は、主にリアルタイム PCR で行われている。しかし、リアルタイム PCR は高価な装置とプローブを必要とするため、資源の乏しい環境では利用しにくい。本研究では PCR DNA クロマトグラフィー法を原理とする簡便な HIV-1 及び HIV-2 核酸検査法を開発した。標的部位には HIV-1 の gag 領域及び HIV-2 の U5 領域を用いた。この方法により 10 コピーまでの HIV-1 及び HIV-2 の RNA を検出することができた。ここで開発した方法はアウトリーチでの HIV 感染症診断に有効であると考えられる。

### A.研究目的

現在行われている HIV-1 及び HIV-2 の遺伝子検査は主に特異的プローブを用いたリアルタイム PCR で行われている。リアルタイム PCR は高額な装置とプローブを用いるため、検査のコストが高い欠点がある。本研究では高価で機器の固定が必要なリアルタイム PCR を用いず、単純なサーマルサイクラーを使用した PCR を行い、その PCR 産物を電源を必要としない PCR DNA クロマトグラフィーによって安価に判定する方法の開発を目的とした。

### B.研究方法

HIV-1 及び HIV-2 の RNA を、1 反応あたり 1000~10 コピーに調製し PCR あるいは RT-PCR を行い PCR 産物を得た。増幅させる領域は HIV-1 の gag 領域と HIV-2 の U5 領域とした。PCR プライマー及び特異的プローブは各領域で最も保存されている領域を目標として用いた。

得られた PCR 産物を DNA の標識を行う処理液に加えた。DNA はビオチン化した PCR プライマーとアビジンが固相化されているラテックスビーズと結合させることによって標識され

た。標識された DNA の溶液に特異的プローブを固相化させたストリップを浸し、クロマトグラフィーによって DNA とプローブを結合させ、その際に現れるバンドの有無によって判定をする。(図 1)

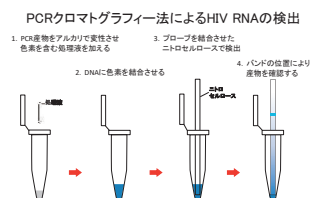


図 1

### (倫理面への配慮)

本研究は、基礎研究段階にあり、今後臨床検体を用いた応用研究を行う際には、慶應義塾大学医学部の倫理委員会に倫理申請を行う予定である。

### C.研究結果

1000~10copy の HIV-1 の gag 領域及び HIV-2 の U5 領域の RNA を RT-PCR した結果、10copy まで増幅可能であった。

これらの PCR 産物を PCR クロマトグラフィーによって判定したところ、各領域特異的な位

置にバンドが現れた。PCR クロマトグラフィーによって、HIV-1 と (図 2) HIV-2 (図 3) の判定が可能であった。

HIV-1のPCR クロマトグラフィーの結果

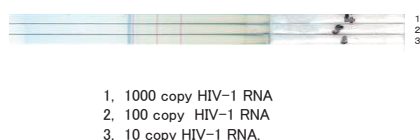


図 2

HIV-2のPCR クロマトグラフィーの結果

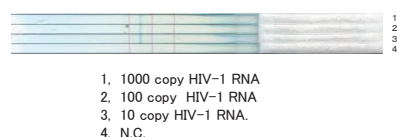


図 3

#### D.考察

PCR クロマトグラフィー法によって、1 反応あたり 10 コピーまでの HIV-1 および HIV-2 の遺伝子検査が可能となった。

リアルタイム PCR 装置は高価であるため、設置されている施設は限られている。また光学的検出装置を備えるため、装置を水平に保ち振動を与えないなど細心の注意を払って取り扱う必要がある。

一方で通常のサーマルサイクラーは、小型で持ち運びができバッテリー駆動するものが、安価に市販されている。このようなサーマルサイクラーを自動車のバッテリー等に接続することによって、非電化地域や屋外など移動先でも PCR を行う事が可能である。

本研究によって開発された PCR DNA クロマトグラフィーは電源を必要としないため、バッテリー駆動のサーマルサイクラーと組み合わせ

ることで、電化されていない発展途上国などで検体を検査機関に送付することなく、核酸検査による診断を行うことができると考えられる。

#### E.結論

PCR クロマトグラフィー法によって電気泳動を行わずに、目的の PCR 産物の検出が可能であった。

#### 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.
- 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.
- 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

- 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，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，上叢義典，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，瀧永博之，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.

27) 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

なし