

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（慶應義塾大学微生物学・免疫学教室）

研究協力者 植田知幸（慶應義塾大学微生物学・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 U5 と 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 及び DNA 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 は高価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 の DNA、RNA、HIV-2 の RNA を 1000～10 コピーに調整し 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 2 領域（U5、gag）と HIV-2 の 1 領域（U5）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 NaOH によって変性させた後、中和と DNA の標識を行う処理液を加えた。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に結合

す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）

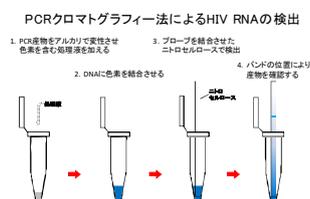


図 1

（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 2 領域（U5、gag）及び HIV-2（U5）の RNA を RT-PCR した結果、10copy まで増幅可能であった。HIV-1 の 2 領域の DNA も同様に 10 コピーまで PCR が可能であった。

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、全ての領域の判定が可能であった。(図 2)

PCRクロマトグラフィーの結果

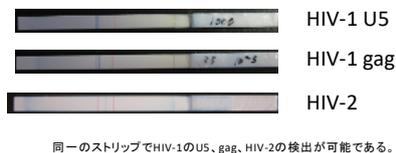


図 2

D.考察

PCR クロマトグラフィー法によって、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.健康危険情報

なし

G.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) 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. In press.

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．

H.知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

- ①特許取得
取得予定
- ②実用新案登録
なし
- ③その他
なし