

## 原 著

## 日本における HIV-1 遺伝子型薬剤耐性検査のコントロールサーベイ

藤崎誠一郎<sup>1)</sup>, 藤崎彩恵子<sup>1)</sup>, 伊部 史朗<sup>1)</sup>, 浅黄 司<sup>2)</sup>, 伊藤 俊広<sup>2)</sup>, 吉田 繁<sup>3)</sup>,  
小池 隆夫<sup>4)</sup>, 大家 正泰<sup>5)</sup>, 渡邊香奈子<sup>6)</sup>, 正兼 亜季<sup>7)</sup>, 上田 幹夫<sup>8)</sup>, 瀧永 博之<sup>9)</sup>,  
松田 昌和<sup>10)</sup>, 貞升 健志<sup>11)</sup>, 長島 真美<sup>11)</sup>, 岡田 清美<sup>12)</sup>, 近藤真規子<sup>13)</sup>,  
秦 眞美<sup>14)</sup>, 溝上 泰司<sup>15)</sup>, 森 治代<sup>16)</sup>, 南 留美<sup>17)</sup>,  
白阪 琢磨<sup>15)</sup>, 岡 慎一<sup>9)</sup>, 杉浦 亙<sup>10)</sup>, 金田 次弘<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>名古屋医療センター臨床研究センター血液免疫研究部, <sup>2)</sup>仙台医療センター臨床検査科, <sup>3)</sup>北海道大学病院検査部, <sup>4)</sup>北海道大学医学部第二内科, <sup>5)</sup>新潟大学大学院医歯学総合研究科, <sup>6)</sup>新潟保健環境科学研究所, <sup>7)</sup>石川県立中央病院中央検査部, <sup>8)</sup>石川県立中央病院血液免疫内科, <sup>9)</sup>国立国際医療センターエイズ治療・研究開発センター, <sup>10)</sup>国立感染症研究所エイズ研究センター, <sup>11)</sup>東京都健康安全研究センター微生物部, <sup>12)</sup>北里大塚バイオメディカルアッセイ研究所, <sup>13)</sup>神奈川県衛生研究所微生物部, <sup>14)</sup>愛知県衛生研究所微生物部, <sup>15)</sup>大阪医療センター HIV/AIDS 先端医療開発センター, <sup>16)</sup>大阪府立公衆衛生研究所ウイルス課, <sup>17)</sup>九州医療センター免疫感染症科臨床研究部

**目的:** 日本で HIV-1 遺伝子型薬剤耐性検査を実施しているほとんどの施設は, 国立感染症研究所が開発した方法を参考にした in-house の手法を用いて検査を行っている。しかし, これらの施設が実施している HIV-1 遺伝子型薬剤耐性検査の質は, 今までに評価を受けたことがない。我々は, 日本で薬剤耐性検査を実施している 15 施設について, 検査の精度と信頼性を調べることを目的としてコントロールサーベイを実施した。

**材料および方法:** HIV-1 遺伝子型薬剤耐性検査を実施している 15 施設で, 2 種類のクローン化薬剤耐性 HIV-1 RNA を用いて薬剤耐性検査を実施し, その検査結果を評価した。

**結果:** HIV-1 遺伝子型薬剤耐性検査の質は, 正解率が 97.3% と, 非常に高いことが明らかとなった。誤答の原因は, 不適切なプライマーの使用, エレクトロフォレグラムの乱れ及び, 人為的誤りなどであった。

**結論:** 日本で実施されている HIV-1 遺伝子型薬剤耐性検査の水準は高い事が明らかになった。しかしその水準をより一層向上させるために, 今回明らかになった問題に対して解決法を提案した。

**キーワード:** AIDS, HIV-1, HIV-1 遺伝子型薬剤耐性検査, コントロールサーベイ

日本エイズ学会誌 9 : 136-146, 2007

## 緒 言

HIV-1 感染症治療において, HAART (highly active anti-retroviral therapy) は, ウイルス複製を強力に抑制し, 長期にわたり血中ウイルス量を検出限度以下に維持することを可能とした<sup>1,2)</sup>。HAART による治療効果は通常, 血中ウイルス量でモニタリングされている。血中ウイルス量が, 検出限度以下に一旦抑制されたにもかかわらず, 再び増加した場合には, 薬剤耐性 HIV-1 の出現が疑われる<sup>3-6)</sup>。この場合, 遺伝子型薬剤耐性検査によって, 治療薬剤の標的酵素であるプロテアーゼおよび逆転写酵素のアミノ酸配列を決定し, HIV-1 が薬剤耐性を獲得しているかどうかを鑑別し

ている。同時に, 変更可能な抗 HIV-1 薬を選択するための情報も得ることができる<sup>7-11)</sup>。最近, 薬剤耐性 HIV-1 が未治療患者からも検出されることから<sup>12,13)</sup>, HAART 開始前にも本検査の実施が推奨されている。このように, 遺伝子型薬剤耐性検査は治療を最適化するために必須の検査である<sup>14,15)</sup>。

現在, 日本で HIV-1 遺伝子型薬剤耐性検査を実施しているほとんどの施設は, in-house の手法を用いて検査を行っている。しかし, これらの施設が実施している HIV-1 遺伝子型薬剤耐性検査の質は, 今までに評価を受けたことがない。我々は将来, HIV-1 遺伝子型薬剤耐性検査を標準化することが重要と考え<sup>16-19)</sup>, 以下の検討を行っている。まず, 各施設で使用している試薬・プライマー・塩基配列解析装置を調査し, 第二段階として, HIV-1 クローンをを用いたコントロールサーベイを実施し, 検査結果の解析を通して改良点を抽出する。第三段階として, 改善された検査条件下で臨床検体を用いたコントロールサーベイを実施し, 本検

著者連絡先: 金田次弘 (〒460-0001 愛知県名古屋市中区三の丸 4-1-1 国立病院機構名古屋医療センター 臨床研究センター血液免疫研究部)  
FAX : 052-955-1878

2006 年 11 月 14 日受付; 2007 年 3 月 20 日受理

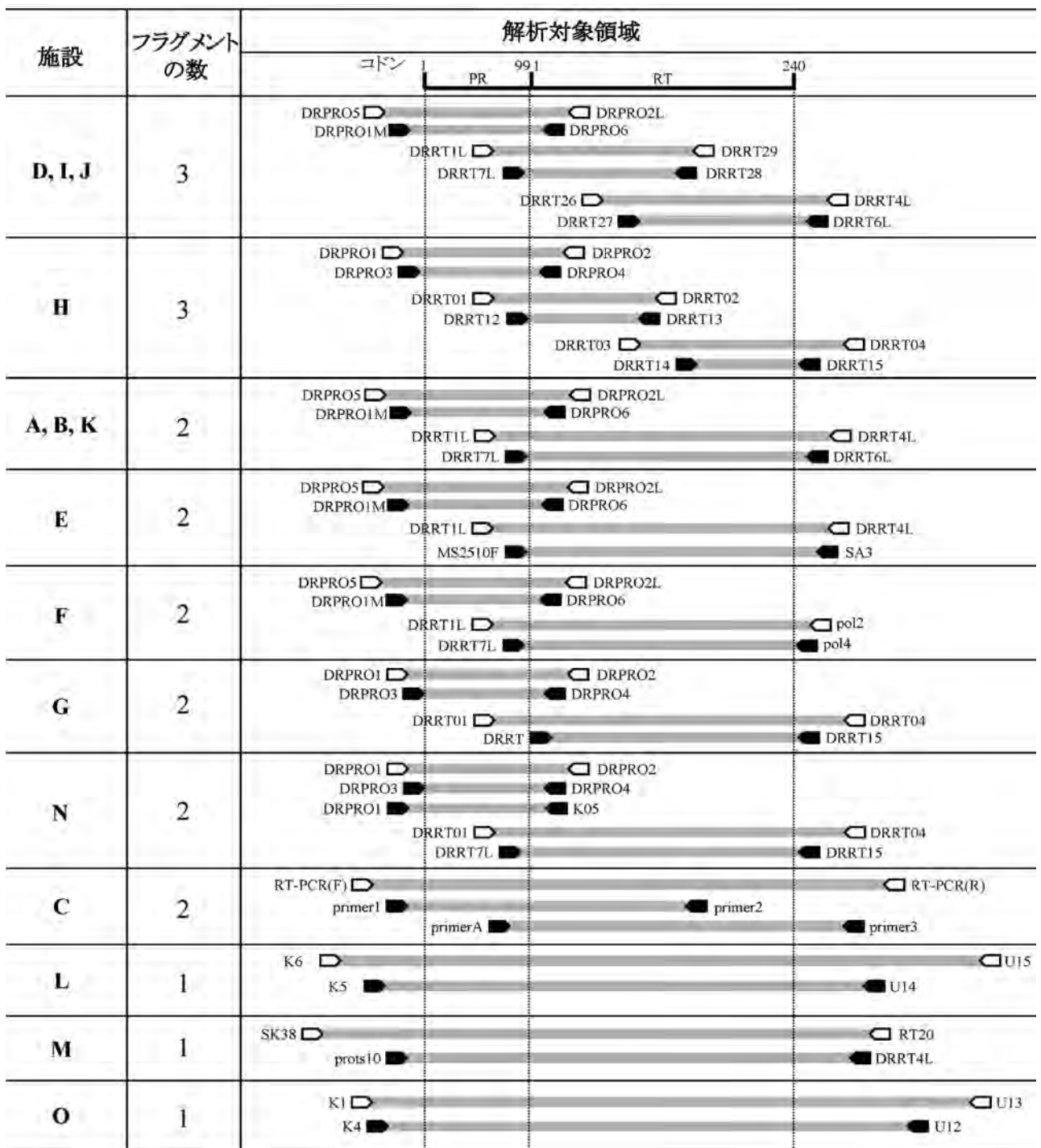


図 1 HIV-1 に対するプライマーの結合位置と、PCR による増幅領域

RT-PCR および、nested PCR に使用されたプライマーをそれぞれ、白および黒の矢印で示した。プライマー名の左に示した A から O のアルファベットは、それらのプライマーを使用した 15 施設を表している。

表 1 各施設で用いられた試薬および塩基配列解析装置

RT-PCR 試薬	施設数
One-step RT-PCR 法	12
・ One Step RT-PCR (TaKaRa)	10
・ SuperScript Onestep RT-PCR for Long Template (Invitrogen)	2
Two-step RT-PCR 法	3
・ RNA PCR Kit (AMV) ver. 3.0 (TaKaRa)/Ex Taq HS (TaKaRa)	1
・ AMV Reverse Transcriptase XL (TOYOBO)/Ampli Taq (Applied Biosystems)	1
・ M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen)/Taq DNA polymerase (Greiner)	1
Nested PCR 試薬	施設数
・ Ex Taq (TaKaRa)	5
・ Ampli Taq (Applied Biosystems)	3
・ LA Taq (TaKaRa)	2
・ KOD polymerase (TOYOBO)	2
・ Ex Taq HS (TaKaRa)	1
・ PCR Master Mix (Promega)	1
・ Taq DNA polymerase (Biotech International)	1
標識試薬	施設数
Big Dye Terminator V1.1 (Applied Biosystems)	8
Big Dye Terminator V3.1 (Applied Biosystems)	5
CEQ Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start kit (Beckman Coulter)	1
Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit (USB)/IRDyeTM 800 v2 Terminator Mixes (LI-COR)	1
標識産物の精製試薬	施設数
CENTRI SEP Spin Columns (Applied Biosystems)	5
Sephadex G-50 (GE Healthcare Bio-Sciences)	3
DyeEx 2.0 Spin Kit (QIAGEN)	1
エタノール沈殿法	6
塩基配列解析装置	施設数
ABI PRISM 310 (Applied Biosystems)	10
BECKMAN COULTER CEQ 8000 (Beckman Coulter)	1
LI-COR 4200 IR2 system (LI-COR)	1
ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems)	1
ABI PRISM 3100 Avant (Applied Biosystems)	1
ABI PRISM 3730S (Applied Biosystems)	1

査の標準化に必須の課題の整理を目指している。本論文では現在までに終了した第一段階および、第二段階の結果について報告する。

表 2 コントロールサーベイの結果

## (a) クローン #1 の結果

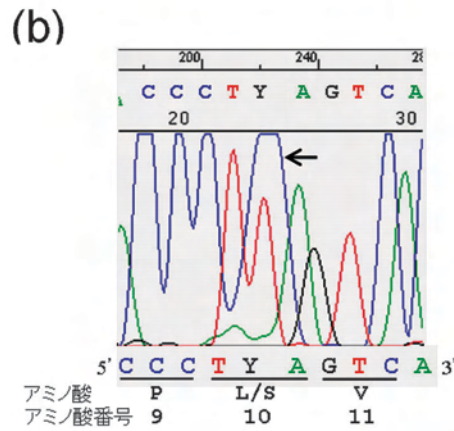
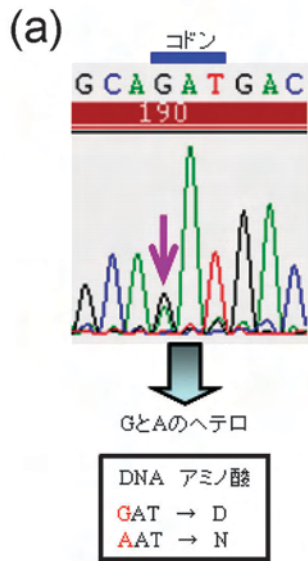
	アミノ酸変異	正解した施設数 (正解率, %)	誤答の内容
PR	V3I	13/15 (86.7)	施設 B は I3V と報告。施設 H は報告無し。 施設 G と H は報告無し。 施設 H は報告無し。 施設 G と H は報告無し。
	E35D	13/15 (86.7)	
	S37N	14/15 (93.3)	
	R41K	13/15 (86.7)	施設 H は報告無し。 施設 A は A71V と報告。施設 G は報告無し。
	L63P*	15/15 (100)	
	K70R	14/15 (93.3)	施設 E と F は D29N および C95W をそれぞれ報告していた。これらはクローン #1 には存在していないアミノ酸変異であった。
	A71T*	13/15 (86.7)	
	V77I*	15/15 (100)	
	Ghost mutations	—	
RT	A62V*	15/15 (100)	施設 C は報告無し。
	S68G	14/15 (93.3)	
	T69V	15/15 (100)	
	V75I*	15/15 (100)	
	F77L*	15/15 (100)	
	F116Y*	15/15 (100)	
	E122K	15/15 (100)	
	Q151M*	15/15 (100)	
	Q197E	14/15 (93.3)	施設 C は報告無し。 施設 C は報告無し。
	R211K	14/15 (93.3)	

## (b) クローン #2 の結果

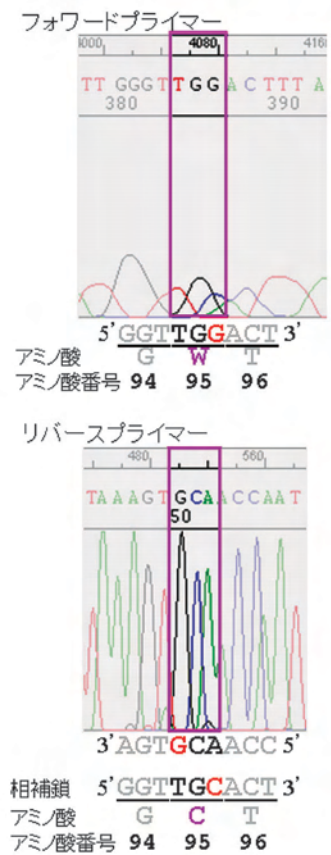
	アミノ酸変異	正解した施設数 (正解率, %)	誤答の内容
PR	V3I	15/15 (100)	施設 F は L10L/S と報告。
	L10I*	14/15 (93.3)	
	I15V	15/15 (100)	
	S37D	15/15 (100)	
	L63P*	15/15 (100)	施設 D は報告無し。 施設 E は E34K を, 施設 F は R41K および T96S をそれぞれ報告していた。これらはクローン #2 には存在していないアミノ酸変異であった。
	V77I*	15/15 (100)	
	L90M*	14/15 (93.3)	
	I93L	15/15 (100)	
Ghost mutations	—		
RT	V35T	14/14 (100)	施設 G は使用したプライマーの組み合わせにより V35T を含む領域が解析対象外であった。 施設 G は使用したプライマーの組み合わせにより T39A を含む領域が解析対象外であった。
	T39A	14/14 (100)	
	M41L*	15/15 (100)	施設 K は T69S-SG 挿入変異を, 薬剤耐性変異ではないアミノ酸変異として報告していた。 施設 H は使用したプライマーの組み合わせにより E122K を含む領域が解析対象外であった。 施設 H は使用したプライマーの組み合わせにより I135T を含む領域が解析対象外であった。
	K43E	15/15 (100)	
	T69S-SG* insertion	14/15 (93.3)	
	E122K	14/14 (100)	
	I135T	14/14 (100)	
	R172K	15/15 (100)	
	D177E	15/15 (100)	
	G190A*	15/15 (100)	
	Q207H	15/15 (100)	
	L210W*	15/15 (100)	
	R211K	15/15 (100)	
	L214F	15/15 (100)	施設 L は報告無し。 施設 N は, クローン #2 には存在していないアミノ酸変異である I31T を報告していた。
	T215Y*	15/15 (100)	
	K238S	14/15 (93.3)	
	Ghost mutations	—	

\*印は薬剤耐性アミノ酸変異

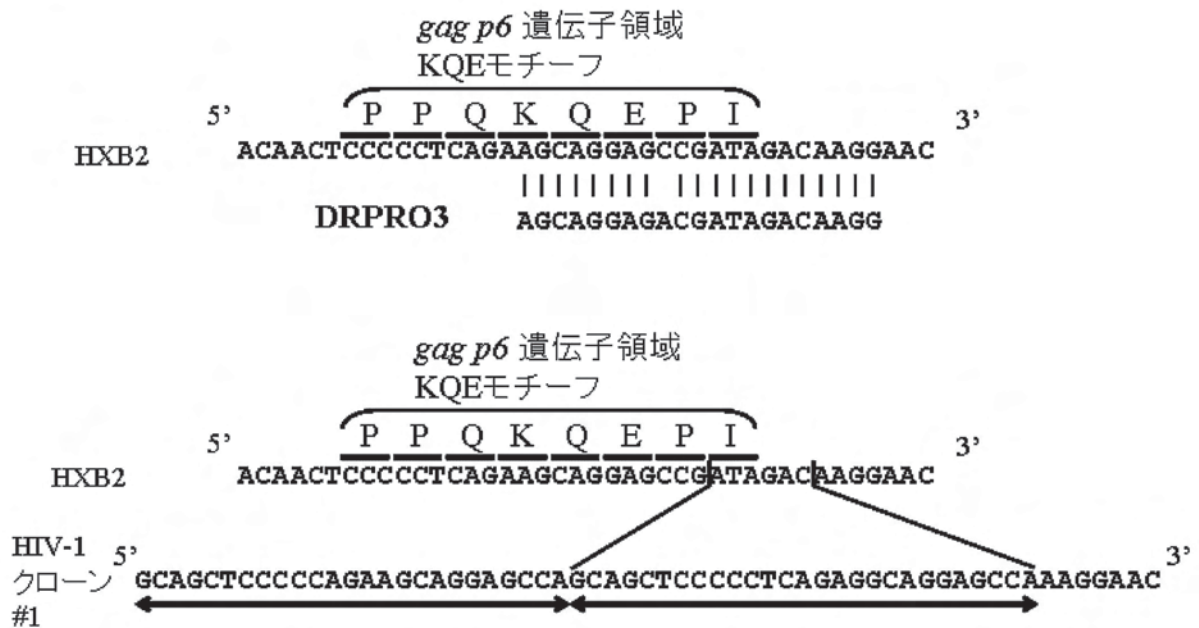
( I )



( II )



( III )



## 材料および方法

### クローン化薬剤耐性 HIV-1 の作製と発現

各施設からの検査結果の正誤を明瞭にするために、単一な RNA ゲノムをもつクローン化薬剤耐性 HIV-1 を 2 種類作製した。まず、多剤耐性 HIV-1 を有する 2 名の患者の血漿検体から HIV-1 RNA を、QIAamp Viral RNA Kit (QIAGEN, CA, USA) を用いて精製した。次に、*gag* (アミノ酸番号 412 番から 500 番)、プロテアーゼ (PR, アミノ酸番号 1 番から 99 番)、逆転写酵素 (RT, アミノ酸番号 1 番から 260 番) の遺伝子領域を含む 1.3kb の DNA 断片を、RT-PCR にて増幅した。RT-PCR は、Superscript One-Step RT-PCR (Invitrogen, CA, USA), K1 (5'-AAG GGC TGT TGG AAA TGT GG-3'), U13 (5'-CCC ACT CAG GAA TCC AGG T-3') プライマーを用いた。Nested PCR は LA Taq (Takara, Shiga, Japan), INF-ApaI (5'-TGC TGG GCC CCT AGG AAA AAG G-3'), INF-NheI (5'-TCT GGC TAG CCC AAT TCA ATT TTC CCA C-3') プライマーを用いて行った。増幅した DNA は ApaI (Takara), NheI (New England Biolabs, MA, USA) で処理し、得られた ApaI-NheI 断片を HXB2 感染性クローンである pSUM9<sup>20)</sup> (National Cancer Institute, 熊本大学, 満屋教授から供与していただいた) に組み込んだ。次いで、Lipofectamin (Invitrogen) を用いて、作製した感染性クローンを 40% コンフルエントの MT-2 細胞に遺伝子導入した。細胞は 10% 仔ウシ血清を含む RPMI1640 を用いて、5% CO<sub>2</sub> 濃度、37°C で培養した。遺伝子導入の 4 日後、0.2 ml の培養上清を、5 × 10<sup>4</sup> 個/4.8 ml の MT-4 細胞に移し、さらに 3 日間培養後、ウイルスを含む培養上清を回収し、-80°C で保存した。

### HIV-1 RNA の調製

HIV-1 粒子を超遠心 (23,000 × g, 1 時間, 4°C) により沈降させ、PBS (-) による洗浄を 2 回行った。次に沈降物を 100 μl の PBS (-) に懸濁し、3 U のデオキシリボヌクレアーゼ (Nippon Gene, Tokyo, Japan) を添加して 37°C, 15 分間 DNA 分解処理を行った。その後、23,000 × g, 1 時間、4°C の条件下で遠心し、沈降物を PBS (-) で洗浄した。RNA は QIAamp Viral RNA Kit を用いて精製し、2 × 10<sup>4</sup> コピー数の HIV-1 RNA を 2 ml PBS (-) に懸濁して -80°C で保存した。凍結した HIV-1 RNA 検体をドライアイスと共に梱包し、15 施設へ送付した。また、HIV-1 RNA のコピー数は Nagai ら<sup>21)</sup> の方法を用いてリアルタイム PCR にて測定した。

### HIV-1 遺伝子型薬剤耐性検査

遺伝子型薬剤耐性検査は、国立感染症研究所、国立国際医療センター、HIV/AIDS ブロック拠点病院 8 施設、地方衛生研究所 4 施設、そして民間臨床検査会社 1 施設で実施した。本研究では、HXB2 株または NL4-3 株のアミノ酸配列と、解析したアミノ酸配列を比較し、薬剤耐性アミノ酸変異については International AIDS Society-USA (IAS-USA) panel, version March/April 2005<sup>22)</sup> に基づいて定義した。各施設からは、薬剤耐性およびその他のアミノ酸変異を示した検査報告書、使用したプライマーの塩基配列、エレクトロフォレグラム、そして解析した塩基およびアミノ酸配列の報告を受けた。各施設から報告されたアミノ酸変異は名古屋医療センターの解析結果を基準として評価した。

## 図 2 誤判定を引き起こした 3 つの原因

(I) (a) ノイズを伴ったエレクトロフォレグラムによって誤判定が引き起こされた例

HIV-1 クローン #1 の PR 遺伝子領域にて、施設 E は本来存在していないアミノ酸 D29N を報告していた。これは、矢印で示した A (緑色) のノイズをシグナルと判定したことにより解析を誤ったためである。

(b) エレクトロフォレグラム上の巨大ノイズシグナルによって誤判定が引き起こされた例

(II) 不明瞭なエレクトロフォレグラムを解析したことによって誤判定が引き起こされた例

リバースプライマーを用いて得たエレクトロフォレグラムは鮮明であり、アミノ酸番号 95 番は TGC と正確に判断できていた。にも拘わらず、不明瞭なエレクトロフォレグラムを解析し、TGG と誤判断していた (施設 F)。

(III) 鋳型に対する結合能を欠失していた PCR プライマーを用いたことにより、誤判定が引き起こされた例

*Gag* 遺伝子の KQE モチーフ領域内に起きた重複により、DRPRO3 プライマーの 3' 側結合部位が欠失していた。重複配列を矢印で示した。

## 結 果

### 試薬、プライマー及び塩基配列解析装置の調査

今回の調査の結果、コントロールサーベイに参加した全15施設で使用されている試薬、プライマー及び塩基配列解析装置は施設によってかなり多様であった。図1にプライマーの名称および、PCRにより増幅される遺伝子領域を示した。RT-PCRおよびnested PCRに使用された試薬、標識試薬、標識産物の精製に用いられた試薬、塩基配列解析装置は表1に示した。

### アミノ酸変異検出についての評価

各施設から提出されたHIV-1アミノ酸変異検出結果を表2に示した。HIV-1クローン#1に含まれている全アミノ酸変異を正しく検出していた施設は、15施設中8施設であり、#2については15施設中7施設であった。そこで、アミノ酸変異が誤判定された事例について、使用されたプライマー、エレクトロフォレグラム、および塩基配列・アミノ酸配列のファイルを精査し、誤判定を引き起こした原因を解明した。

HIV-1クローン#1のPR領域には3つの薬剤耐性アミノ酸変異(L63P, A71T, V77I)と、その他のアミノ酸変異が5つ(V3I, E35D, S37N, R41K, K70R)存在している(表2(a))。9施設はこれら8つのアミノ酸変異を正しく報告していたが、残り6施設の報告には誤答があった。具体的には、施設AはA71TをA71Vとして、またBはV3IをI3Vとしてそれぞれ報告していた。これらの施設が提出したDNAおよびアミノ酸のファイルでは変異が正しく検出されていることから、この誤答は報告書作成時の人為的誤りと判断した。施設EとFは、本クローンには存在しないアミノ酸変異D29NとC95Wを報告していた。施設Eの誤答は、エレクトロフォレグラムに出現した高レベルのノイズシグナルが原因であった(図2(I)(a))。施設Fは、人による編集を経っていない、自動解析による波形データの解析結果を採用し、かつ、正確に解析していたリバースプライマーを用いた解析結果を無視していた(図2(II))。施設GとHは、大きく異なるアミノ酸変異を報告した。これは、nested PCRに用いたフォワードプライマー(DRPRO-3)が不適切であったことに起因している(図2(III))。HIV-1クローン#1のgagタンパク質のアミノ酸番号470番から478番(KQEモチーフを含む)に相当する塩基配列の重複によってDRPRO3の結合部位は欠失していた。このことから、DRPRO3を用いたPCRではHIV-1クローン#1のPR領域のDNA断片を増幅することは不可能であった。

クローン#1のRT領域内には、5つの薬剤耐性アミノ酸変異(A62V, V75I, F77L, F116Y, Q151M)と、その他5つ

のアミノ酸変異(S68G, T69V, E122K, Q197E, R211K)が存在している(表2(a))。14施設はこれらの10アミノ酸変異を正確に報告していた。施設Cは、3つのアミノ酸変異, S68G, Q197E, R211Kについて、DNAおよびアミノ酸配列のファイルでは正しく検出していたにもかかわらず、検査の最終報告書にはこれらの変異を記載していなかった。

HIV-1クローン#2のPR領域には4つの薬剤耐性アミノ酸変異(L10I, L63P, V77I, L90M)と、その他のアミノ酸変異が4つ(V3I, I15V, S37D, I93L)存在している(表2(b))。12施設はこれらのアミノ酸変異を正しく報告していたが、施設D, E, Fの報告には誤答が含まれていた。施設Dは、塩基配列ファイルではアミノ酸番号90番のコード“ATG”を正確に検出していたが、翻訳後のアミノ酸ファイルではL90Mを報告していなかった。施設Eは、クローン#2に存在しないアミノ酸変異E34Kを報告していた。これはエレクトロフォレグラムに出現した高レベルのノイズシグナルによって引き起こされたものであった。施設Fは、エレクトロフォレグラムが乱れていたことにより、クローン#2に存在しないアミノ酸変異R41K, T96Sを報告していた。さらに、エレクトロフォレグラムに現れた、巨大なノイズシグナルによりアミノ酸変異L10IをL10L/Sと報告していた(図2(I)(b))。このピークは、標識反応後の、精製過程で未反応のダイデオキシヌクレオチドの除去が不完全であったことに起因していると判断した。

クローン#2のRT領域内には、5つの薬剤耐性アミノ酸変異(M41L, T69S-SG挿入, G190A, L210W, T215Y)と、その他に11のアミノ酸変異(V35T, T39A, K43E, E122K, I135T, R172K, D177E, Q207H, R211K, L214F, K238S)が存在している(表2(b))。10施設はこれら16アミノ酸変異を正確に報告していた。一方、施設G, H, K, L, Nからの報告書に誤りがあった。まず、施設GとHの誤答についてであるが、使用したプライマーの組み合わせにより施設Gはアミノ酸番号1番から39番の領域を、施設Hはアミノ酸番号122番から135番の領域を増幅することが不可能であった。その結果、施設GはV35TとT39A、施設HはE122KとI135Tを報告していなかった。よって、施設GとHの誤答は評価対象外とした。次に、施設Kは、T69S-SG挿入変異を正しく検出していたが、薬剤耐性ではないアミノ酸変異として報告していた。施設Lは、K238Sについてアミノ酸ファイルでは正しく検出しているのにも拘わらず報告書に記載していなかった。また、施設Nはクローン#2のRT領域内に存在していないアミノ酸変異I31Tを報告しており、この誤答はクローン#1のPR領域内で施設Eが起こした誤りと同様であった。

表 3 誤答を引き起こした原因のまとめ

分類	誤答を引き起こした原因
技術的誤り 9 (1.4%)	不適切なプライマーの使用 ノイズを伴ったエレクトロフォレグラム
人為的誤り 8 (1.3%)	報告書への誤記入 6 (1.0%) アミノ酸変異を分類する際の誤った判断 1 (0.2%) コドンの誤った翻訳 1 (0.2%)
全問題点 17 (2.7%)	

### 誤答の分類

全体をまとめると、17個の誤答があった(表3)。クローン#1と#2を合わせると42個のアミノ酸変異が存在し、また、施設GとHについては、クローン#2のRT領域で4個のアミノ酸変異を評価対象外としていることから、全15施設から報告されるべきアミノ酸変異の総数は626個である。よって、正解率は97.3%であり、誤答率は2.7%であった。誤答を引き起こした原因を分類すると、技術的誤りが1.4%、人為的誤りが1.3%であった。人為的誤りは、報告書への誤記入が1.0%、アミノ酸変異を薬剤耐性変異もしくはその他の変異に分類する際の判断の誤りが0.2%、コドンを翻訳する際の誤りが0.2%であった。技術的誤りは、高いノイズを伴ったエレクトロフォレグラムに起因する不正確な解析と、不適切なプライマーの使用が原因であった。

### 考 察

我々は今回、2種類のHIV-1クローンを試験標本に採用し、コントロールサーベイを実施した。その結果、全検出アミノ酸変異の正答率は97.3%(609/626)という良好な成績を示した。しかし、改善すべき問題点も明らかになった。アミノ酸変異が誤判定された事例については、該当施設が使用したプライマー、エレクトロフォレグラム、および塩基配列・アミノ酸配列のファイルを精査することで、誤答を引き起こした原因を解明した。その結果、誤答の原因を3つに分類することができた。

第一の原因は、使用するプライマーの問題である。Gag p6内のKQEモチーフが重複したHIV-1に対しては結合しない、初期に使用されていたプライマーDRPRO3が現在も2施設で使用されていた。この2施設では、クローン#1に含まれているアミノ酸変異とは大きく異なるアミノ

酸変異を報告していた。第二の原因は、ノイズを伴ったエレクトロフォレグラムを判読したことに起因している。これには3施設が該当した。第三の原因は、人為的誤りである。報告書作成時の誤記入とコドンの誤った翻訳が4施設でみられた。

これら3つの原因に対する解決策を以下に示す。

第一の原因は、初期のプライマーから改良したプライマーの情報について、施設間の情報伝達が徹底されていなかったことに起因している。DRPRO3は1996年に国立感染症研究所が開発したプライマーであるが、KQEモチーフに挿入変異の存在が報告<sup>23-25)</sup>されてからは使用が中止され、新しいプライマーであるDRPRO3Nの使用に変更されている。したがって、DRPRO3Nをプライマーとして用いればこの問題は即解決できる。今後、最新のプライマー情報と塩基配列決定領域内の新規検出変異や挿入、欠失に関するHIV-1塩基配列情報を少なくとも年に一度は全関係施設に配布する等の、検査水準をバックアップする体制を充実することによりプライマー問題は根絶できると思われる。また、注目すべきことに、施設C, L, M, Oで独自に開発されたプライマーも、国立感染症研究所で開発された最新のプライマーと同様に機能していた。

第二の原因は、明瞭なエレクトロフォレグラムを得ることで克服可能である。そのためには、精製度の高いプライマー、すなわち、HPLC精製グレードのプライマーの使用が必須である。また、当然のことであるが、新鮮なバッファー、ゲルを用いて塩基配列解析を実施することが重要である。さらに、フォワードプライマーを用いて解析したエレクトロフォレグラムの質が悪く、解析が不正確になる場合には、リバースプライマーも用いて解析を行うことで、塩基配列決定の正確性を高めることができる。

第三の原因克服は、解析を自動化することによって可能である。例えば、我々が使用しているDNA配列解析ソフトウェアSeqScape (Applied Biosystems)では、エレクトロフォレグラムからDNA配列およびアミノ酸配列を作成し、変異アミノ酸を検出する過程の自動化が可能である。人為的誤りを無くすソフトウェアの普及と充実がこの問題克服に必要である。

なお、異なる試薬、および塩基配列解析装置の機種の違いが誤りの原因と疑われた事例はなかった。

このように今回、HIV-1遺伝子型薬剤耐性検査で起こり得る誤りの原因を追究し、それに対する解決法を提案した。各施設に送付した今回のコントロールサーベイの評価に基づいて種々の改善を図ることにより、HIV-1遺伝子型薬剤耐性検査の精度向上が期待される。次回は、第三段階として臨床検体を用いたコントロールサーベイの実施を計画している。



謝辞 : 本研究は, 厚生労働省エイズ対策事業「薬剤耐性 HIV 発生動向把握のための検査方法・調査体制確立に関する研究」班 (No. H-16-エイズ-002, 杉浦班) の班研究として推進した研究である。藤崎誠一郎, 藤崎彩恵子はエイズ予防財団のリーサーレジデントとして本研究に参画した。

## 文 献

- 1) Hammer SM, Squires KE, Hughes MD, Grimes JM, Demeter LM, Currier JS, Eron JJJr, Feinberg JE, Balfour HHJr, Deyton LR, Chodakewitz JA, Fischl MA : A controlled trial of two nucleoside analogues plus didanosine in persons with human immunodeficiency virus infection and CD4 cell counts of 200 per cubic millimeter or less. AIDS Clinical Trials Group 320 Study Team. *N Engl J Med* 337 : 725-733, 1997.
- 2) Montaner JS, Reiss P, Cooper D, Vella S, Harris M, Conway B, Wainberg MA, Smith D, Robinson P, Hall D, Myers M, Lange JM : A randomized, double-blind trial comparing combinations of nevirapine, didanosine, and zidovudine for HIV-infected patients. *JAMA* 279 : 930-937, 1998.
- 3) Shafer RW, Winters MA, Palmer S, Merigan TC : Multiple concurrent reverse transcriptase and protease mutations and multidrug resistance of HIV-1 isolates from heavily treated patients. *Ann Intern Med* 128 : 906-911, 1998.
- 4) Lucas GM, Chaisson RE, Moore RD : Highly active antiretroviral therapy in a large urban clinic : risk factors for virologic failure and adverse drug reactions. *Ann Intern Med* 131 : 81-87, 1999.
- 5) Perez-Elias MJ, Moreno S, Gutierrez C, Lopez D, Abaira V, Moreno A, Drona F, Casado JL, Antela A, Rodriguez MA : High virological failure rate in HIV patients after switching to a regimen with two nucleoside reverse transcriptase inhibitors plus tenofovir. *AIDS* 19 : 695-698, 2005.
- 6) Zaccarelli M, Tozzi V, Lorenzini P, Trotta MP, Forbici F, Visco-Comandini U, Gori C, Narciso P, Perno CF, Antinori A : Multiple drug class-wide resistance associated with poorer survival after treatment failure in a cohort of HIV-infected patients. *AIDS* 19 : 1081-1089, 2005.
- 7) Durant J, Clevenbergh P, Halfon P, Delgiudice P, Porsin S, Simonet P, Montagne N, Boucher CA, Schapiro JM, Dellamonica P : Drug-resistance genotyping in HIV-1 therapy : the VIRADAPT randomised controlled trial. *Lancet* 353 : 2195-2199, 1999.
- 8) Baxter JD, Mayers DL, Wentworth DN, Neaton JD, Hoover ML, Winters MA, Mannheimer SB, Thompson MA, Abrams DI, Brizz BJ, Ioannidis JP, Merigan TC : A randomized study of antiretroviral management based on plasma genotypic antiretroviral resistance testing in patients failing therapy. CPCRA 046 Study Team for the Terry Bein Community Programs for Clinical Research on AIDS. *AIDS* 14 : F83-93, 2000.
- 9) Cingolani A, Antinori A, Rizzo MG, Murri R, Ammassari A, Baldini F, Di Giambenedetto S, Cauda R, De Luca A : Usefulness of monitoring HIV drug resistance and adherence in individuals failing highly active antiretroviral therapy : a randomized study (ARGENTA). *AIDS* 16 : 369-379, 2002.
- 10) 杉浦互 : HIV-1 の薬剤耐性検査と臨床的意義. *日本臨床* 60 : 703-710, 2002.
- 11) Tural C, Ruiz L, Holtzer C, Schapiro J, Viciano P, Gonzalez J, Domingo P, Boucher C, Rey-Joly C, Clotet B : Clinical utility of HIV-1 genotyping and expert advice : the Havana trial. *AIDS* 16 : 209-218, 2002.
- 12) Ibe S, Hotta N, Takeo U, Tawada Y, Mamiya N, Yamana K, Utsumi M, Kaneda T : Prevalence of drug-resistant human immunodeficiency virus type 1 in therapy-naive patients and usefulness of genotype testing. *Microbiol Immunol* 47 : 499-505, 2003.
- 13) Gatanaga H, Ibe S, Matsuda M, Yoshida S, Asagi T, Kondo M, Sadamasu K, Tsukada H, Masakane A, Mori H, Takata N, Minami R, Tateyama M, Koike T, Itoh T, Imai M, Nagashima M, Gejyo F, Ueda M, Hamaguchi M, Kojima Y, Shirasaka T, Kimura A, Yamamoto M, Fujita J, Oka S, Sugiura W : Drug-resistant HIV-1 prevalence in patients newly diagnosed with HIV/AIDS in Japan. *Antiviral Res* 75 : 75-82, 2007.
- 14) Little SJ, Holte S, Routy JP, Daar ES, Markowitz M, Collier AC, Koup RA, Mellors JW, Connick E, Conway B, Kilby M, Wang L, Whitcomb JM, Hellmann NS, Richman DD : Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV. *N Engl J Med* 347 : 385-394, 2002.
- 15) Grant RM, Hecht FM, Warmerdam M, Liu L, Liegler T, Petropoulos CJ, Hellmann NS, Chesney M, Busch MP, Kahn JO : Time trends in primary HIV-1 drug resistance among recently infected persons. *JAMA* 288 : 181-188, 2002.

- 16) Shafer RW, Hertogs K, Zolopa AR, Warford A, Bloor S, Betts BJ, Merigan TC, Harrigan R, Larder BA : High degree of interlaboratory reproducibility of human immunodeficiency virus type 1 protease and reverse transcriptase sequencing of plasma samples from heavily treated patients. *J Clin Microbiol* 39 : 1522-1529, 2001.
- 17) Huang DD, Eshleman SH, Brambilla DJ, Palumbo PE, Bremer JW : Evaluation of the editing process in human immunodeficiency virus type 1 genotyping. *J Clin Microbiol* 41 : 3265-3272, 2003.
- 18) Sayer DC, Land S, Gizzarelli L, French M, Hales G, Emery S, Christiansen FT, Dax EM : Quality assessment program for genotypic antiretroviral testing improves detection of drug resistance mutations. *J Clin Microbiol* 41 : 227-236, 2003.
- 19) Huang DD, Bremer JW, Brambilla DJ, Palumbo PE, Aldrovandi G, Eshleman S, Brown C, Fiscus S, Frenkel L, Hamdan H, Hart S, Kovacs A, Krogstad P, LaRussa P, Sullivan J, Weinberg A, Zhao YQ ; Pediatric ACTG Sequencing Working Group : Model for assessment of proficiency of human immunodeficiency virus type 1 sequencing-based genotypic antiretroviral assays. *J Clin Microbiol* 43 : 3963-3970, 2005.
- 20) Shirasaka T, Kavlick MF, Ueno T, Gao WY, Kojima E, Alcaide ML, Choekijchai S, Roy BM, Arnold E, Yarchoan R, Mitsuya H : Emergence of human immunodeficiency virus type 1 variants with resistance to multiple dideoxynucleosides in patients receiving therapy with dideoxynucleosides. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 : 2398-2402, 1995.
- 21) Nagai H, Wada K, Morishita T, Utsumi M, Nishiyama Y, Kaneda T : New estimation method for highly sensitive quantitation of human immunodeficiency virus type 1 DNA and its application. *J Virol Methods* 124 : 157-165, 2005.
- 22) Johnson VA, Brun-Vezinet F, Clotet B, Conway B, Kuritzkes DR, Pillay D, Schapiro J, Telenti A, Richman D : Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1. *Top HIV Med* 13 : 51-57, 2005.
- 23) Peters S, Munoz M, Yerly S, Sanchez-Merino V, Lopez-Galindez C, Perrin L, Larder B, Cmarko D, Fakan S, Meylan P, Telenti A : Resistance to nucleoside analog reverse transcriptase inhibitors mediated by human immunodeficiency virus type 1 p6 protein. *J Virol* 75 : 9644-9653, 2001.
- 24) Kaufmann GR, Suzuki K, Cunningham P, Mukaide M, Kondo M, Imai M, Zaunders J, Cooper DA : Impact of HIV type 1 protease, reverse transcriptase, cleavage site, and p6 mutations on the virological response to quadruple therapy with saquinavir, ritonavir, and two nucleoside analogs. *AIDS Res Hum Retroviruses* 17 : 487-497, 2001.
- 25) Gallego O, de Mendoza C, Corral A, Soriano V : Changes in the human immunodeficiency virus p7-p1-p6 gag gene in drug-naive and pretreated patients. *J Clin Microbiol* 41 : 1245-1247, 2003.

## Control Survey of HIV-1 Genotypic Drug-resistance Testing in Japan

Seiichiro FUJISAKI<sup>1</sup>, Saeko FUJISAKI<sup>1</sup>, Shiro IBE<sup>1</sup>, Tsukasa ASAGI<sup>2</sup>, Toshihiro ITOH<sup>2</sup>, Shigeru YOSHIDA<sup>3</sup>, Takao KOIKE<sup>4</sup>, Masayasu OIE<sup>5</sup>, Kanako WATANABE<sup>6</sup>, Aki MASAKANE<sup>7</sup>, Mikio UEDA<sup>8</sup>, Hiroyuki GATANAGA<sup>9</sup>, Masakazu MATSUDA<sup>10</sup>, Kenji SADAMASU<sup>11</sup>, Mami NAGASHIMA<sup>11</sup>, Kiyomi OKADA<sup>12</sup>, Makiko KONDO<sup>13</sup>, Mami HATA<sup>14</sup>, Yasushi MIZOGAMI<sup>15</sup>, Haruyo MORI<sup>16</sup>, Rumi MINAMI<sup>17</sup>, Takuma SHIRASAKA<sup>15</sup>, Shinichi OKA<sup>9</sup>, Wataru SUGIURA<sup>10</sup> and Tsuguhiro KANEDA<sup>1</sup>\*

<sup>1</sup>National Hospital Organization Nagoya Medical Center, Aichi 460-0001, Japan ; <sup>2</sup>Sendai Medical Center, Miyagi 983-8520, Japan ; <sup>3</sup>Department of Health Sciences, Hokkaido University School of Medicine, Hokkaido 060-0812, Japan ; <sup>4</sup>Department of Medicine II, Hokkaido University School of Medicine, Hokkaido 060-8638, Japan ; <sup>5</sup>Department of Virology, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata 951-8510, Japan ; <sup>6</sup>Section of Virus, Niigata Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences, Niigata 950-2144, Japan ; <sup>7</sup>Ishikawa Prefectural Central Hospital (Japanese Foundation for AIDS Prevention), Ishikawa 920-8530 Japan ; <sup>8</sup>Hematology Immunology, Ishikawa Prefectural Central Hospital, Ishikawa 920-8530 Japan ; <sup>9</sup>AIDS Clinical Center, International Medical Center of Japan, Tokyo 162-8655 ; <sup>10</sup>AIDS Research Center, ARC, National Institute of Infectious Diseases, NIID, Tokyo 208-0011 ; <sup>11</sup>Division of Virology, Department of Microbiology, Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, Tokyo 169-0073 ; <sup>12</sup>KITASATO-OTSUKA Biomedical Assay Laboratories Co., Ltd., Kanagawa 228-8555, Japan ; <sup>13</sup>Division of Microbiology, Kanagawa Prefectural Institute of Public Health, Kanagawa 253-0087, Japan ; <sup>14</sup>Department of Microbiology, Aichi Prefectural Institute of Public Health, Aichi 462-8576, Japan ; <sup>15</sup>AIDS Medical Center, National Hospital Organization Osaka National Hospital, Osaka 540-0006, Japan ; <sup>16</sup>Division of Virology, Osaka Prefectural Institute of Public Health, Osaka 537-0025, Japan ; <sup>17</sup>Division of Immunology and Infectious Disease, Clinical Research Institute, National Hospital Organization, Kyushu Medical Center, Fukuoka 810-8563, Japan

\* Corresponding Author : Clinical Research Center, National Hospital Organization Nagoya Medical Center, 4-1-1 Sannomaru, Naka-ku, Nagoya, Aichi 460-0001, Japan

**Objective** : Most laboratories in Japan are performing the HIV-1 genotypic drug-resistance testing with their in-house methods based on the one developed by National Institute of Infectious Diseases. However, the quality of their methods has never been assessed. In this study, we aimed to investigate the accuracy and reliability of the testing performed in 15 laboratories in Japan.

**Materials and Methods** : We assessed the accuracy and reliability of the in-house testing by sending two standard HIV-1 RNA samples to 15 voluntarily participating laboratories and by analyzing the reported results.

**Results** : The assessment revealed that the quality of HIV-1 genotypic drug-resistance testing was very high (97.3% accuracy). But there were sources of error, including human errors, poor electrophoregrams, and use of inadequate primers.

**Conclusion** : We proposed troubleshooting procedures to improve the quality of drug-resistance testing in Japan.

**Key words** : AIDS, HIV-1, genotypic drug-resistance testing, control survey