

## 原 著

プロテアーゼ，逆転写酵素，インテグラーゼを  
対象とした HIV 薬剤耐性検査試薬キット，  
HIV-1 Genotyping Kit with Integrase の性能評価

吉田 繁<sup>1)</sup>，佐藤かおり<sup>2)</sup>，藤澤 真一<sup>2)</sup>，岩崎 澄央<sup>2)</sup>，遠藤 知之<sup>2)</sup>，豊嶋 崇徳<sup>2)</sup>，松田 昌和<sup>3)</sup>，  
今橋 真弓<sup>3)</sup>，蜂谷 敦子<sup>3)</sup>，岡田 清美<sup>4)</sup>，齊藤 浩一<sup>5)</sup>，奥田美那子<sup>6)</sup>，加藤 眞吾<sup>7)</sup>，  
林田 庸総<sup>8)</sup>，椎野禎一郎<sup>9)</sup>，西澤 雅子<sup>10)</sup>，杉浦 互<sup>9)</sup>，吉村 和久<sup>11)</sup>，菊地 正<sup>10)</sup>

<sup>1)</sup> 北海道医療大学，<sup>2)</sup> 北海道大学病院，<sup>3)</sup> 名古屋医療センター，

<sup>4)</sup> 北里大塚バイオメディカルアッセイ研究所，<sup>5)</sup> メディフォード株式会社，<sup>6)</sup> LSI メディエンス，

<sup>7)</sup> 株式会社ハナ・メディテック，<sup>8)</sup> 国立国際医療研究センターエイズ治療・研究開発センター，

<sup>9)</sup> 国立国際医療研究センター臨床研究センター，<sup>10)</sup> 国立感染症研究所，<sup>11)</sup> 東京都健康安全研究センター

**目的：**ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 感染症では HIV 薬剤耐性検査により効果的な抗 HIV 薬剤を選択することが重要となる。今回，プロテアーゼ-逆転写酵素 (PR/RT) 領域とインテグラーゼ (IN) 領域の薬剤耐性遺伝子検査を行う研究用検査試薬キットである HIV-1 genotyping kit with integrase が発売されたため既存検体を用いた性能評価をおこなった。

**方法：**HIV 陽性血漿 14 検体および過去に実施した EQA パネル 11 検体 (うち転写 RNA 8 検体，血漿 3 検体) の一部を用い増幅感度，併行精度，配列一致率，従来法 (HIV 薬剤耐性検査標準化 WG 作製第 3 版の推奨法) との比較を行った。

**結果：**保存血漿を用いた検討のため過小評価の可能性はあるが，増幅感度は subtype や増幅領域により異なり 500~5,000 copies/mL にあった。血漿 12 検体における従来法との平均塩基一致率 (標準偏差) は PR/RT で 99.1% (0.50)，IN で 99.2% (0.49) であった。また 1 検体の IN 領域は一部配列決定できなかった。EQA パネル 11 検体における参照配列との塩基一致率は 99.0% 以上であった。血漿 9 検体と EQA パネル 11 検体のうち，従来法もしくは参照配列による薬剤耐性判定との不一致が 2 検体に認められた。

**結論：**本キットは日常検査法として導入する性能を有していると考えられ，キットの特徴を踏まえた上で活用していくことが重要と考えられた。

**キーワード：**HIV 薬剤耐性検査，研究用検査試薬キット，薬剤耐性変異，一致率，DRM level

日本エイズ学会誌 27: 69-78, 2025

## 序 文

HIV 1 型は後天性免疫不全症候群 (AIDS) の原因ウイルスであり，2022 年の推計では世界の感染者数は約 3,900 万人，年間約 130 万人の新規感染者と約 63 万人の関連死者が報告されている<sup>1)</sup>。HIV/AIDS が発見された 1980 年代初頭では，本疾患は「不治の病」であったが，1985 年に満屋ら<sup>2)</sup>によって最初の抗 HIV 薬剤 (antiretroviral drugs: ARVs) である azidothymidine が開発されて以降，核酸系アナログ逆転写酵素阻害剤 (NRTIs)，プロテアーゼ阻害剤 (PIs)，非核酸系アナログ逆転写酵素阻害剤 (NNRTIs)，インテグラーゼ阻害剤 (INSTIs)，侵入阻害薬，カプシド阻害剤といった作用機序の異なる ARVs が開発され，2023

年 11 月時点で合剤を含め 32 種類が承認されている。そして，これら複数の ARVs を組み合わせ合わせた抗 HIV 療法 (ART) によりウイルス量を検出限界以下にコントロールすることで HIV 感染症の進行の抑制が可能となり，現在では，コントロールされている HIV 感染者と非感染者の平均寿命の差は少なくなり慢性疾患と認識されるまでになった<sup>3)</sup>。また，ART によりウイルス量が検出限界以下となった感染者からは，コンドームを使用せずに性行為を行っても HIV が伝播しないことが報告されている<sup>4)</sup>。したがって，効果的な ART を実施することは HIV 感染者の QOL の向上のみならず，二次感染の防止においても重要である。

レトロウイルスである HIV-1 は逆転写の精度が低い (複製エラー率  $3 \times 10^{-5}$ ) ため<sup>5)</sup>，体内ではゲノム配列が異なる複数の HIV が混在する状態 (quasi-species) が形成されている。そのため，服薬アドヒアランス不良により薬剤耐性関連変異 (drug resistance mutation: DRM) を獲得した HIV

著者連絡先：吉田 繁 (〒002-8072 札幌市北区あいの里 2 条 5-1 北海道医療大学)

2024 年 7 月 12 日受付；2024 年 12 月 16 日受理

が容易に選択, 増殖し治療の障害となる。また, 2000 年頃より DRM を有する HIV 感染者から非感染者への感染を示す伝播性薬剤耐性変異 (transmitted drug resistance: TDR) が検出されている。TDR の検出率は地域によって異なり, 世界的には数%~24.1%<sup>6~12)</sup>, わが国では約 8~9% と報告されている<sup>13~15)</sup>。TDR の多くは過去に使用されていた ARVs に関連するものであったが, 近年の調査では, 現在行われる ART のキードラッグである INSTIs の耐性変異も検出されている<sup>16)</sup>。したがって, 治療開始前および治療効果が不十分な場合, 適切な ARVs を選択することが治療成績の向上につながる<sup>17~19)</sup>。

HIV 薬剤耐性検査は RT-nested PCR とダイレクトシーケンス (サンガー法) により HIV ゲノムのプロテアーゼ (PR), 逆転写酵素 (RT), インテグラーゼ (IN) の塩基配列を決定し, DRM の有無から薬剤感受性を推測する検査である。国内では 1996 年に国立感染症研究所で in-house 検査法が確立され, 2006 年に保険収載となった。藤崎らは本検査の方法に関する調査を実施し, 多くの施設が独自の方法を採用していることを報告した<sup>20)</sup>。また, 吉田らは国内施設を対象とした外部精度評価 (external quality assessment: EQA) を実施し, mixture となった塩基 (ミックス塩基) の判定に施設間差があることを報告した<sup>21)</sup>。国外の EQA から同様の施設間差が報告<sup>21~27)</sup> されている。本検査は RNA 抽出から薬剤感受性の判定までに多くの過程があり, また, 施設により使用するプライマー, 試薬, 機器が異なるため, 本検査の質の維持と向上のためには, EQA による検査方法の評価が必要である。

今回, プロテアーゼ, 逆転写酵素に加えてインテグラーゼ領域を対象とした HIV 薬剤耐性検査試薬キットである HIV-1 genotyping kit with integrase が発売されたことから, 日常検査での本キットの使用の可否を判断することを目的として, HIV 陽性血漿および EQA パネル検体を用いた本検査キットの性能評価を行った。

## 方 法

### 1. 対 象

2015~2023 年に北海道大学病院検査・輸血部に HIV 薬剤耐性検査を目的として提出され検査実施後 -20℃ で保管された HIV 陽性血漿 14 検体 (subtype B 9 検体, CRF01\_AE 2 検体, CRF07\_BC 3 検体) を用いた。また, エイズ対策実用化研究事業「国内流行 HIV 及びその薬剤耐性株の長期的動向把握に関する研究」班で 2012 年, 2016 年, 2020 年, 2022 年に実施された HIV-1 薬剤耐性検査外部精度評価で使用したパネル検体を用いた。2020 年および 2022 年 EQA パネル検体に含まれる HIV 陽性血漿 3 検体は 2015 年もしくは 2016 年に採取された血漿である。なお, 検討に

用いた血漿は採取された検体残量が限られていたため, 各検討において利用可能な検体を使用した。

### 2. 倫理的配慮

本研究は北海道大学自主臨床研究「HIV 薬剤耐性検査の標準化に関する研究」(承認番号: 自 017-0285) の承認の上, 実施された。研究実施に関する同意については, 倫理審査委員会の承認に基づき研究参加者からインフォームドコンセントを受けるか, 公開・オプトアウトの措置を講じた。

### 3. HIV-1 genotyping kit with integrase

HIV-1 genotyping kit with integrase (Thermo Fisher Scientific) (以下, genotyping kit) は RT-PCR, nested PCR およびシーケンス反応の各プレミックス試薬, ポジティブコントロール, ネガティブコントロールで構成されている。PR/RT 領域および IN 領域の増幅反応試薬は RT-PCR が各 1 反応, nested PCR が各 1 反応であり, シーケンス反応試薬は PR/RT 領域が 6 反応 (フォワード, リバースプライマー各 3 反応), IN 領域が 4 反応 (フォワード, リバースプライマー各 2 反応) である。操作方法を簡単に示すと, RNA 抽出には QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用い, 添付のマニュアルに従って血漿 140 μL から RNA 溶液 60 μL を得た。RT-PCR に用いられる添付酵素は SuperScript III One-Step RT-PCR with Platinum Taq High Fidelity Enzyme であり, RNA 溶液 10 μL と RT-PCR Master Mix を混合し総量 50 μL の反応液とした。RT-PCR の反応温度条件は, 50℃ 45 分, 94℃ 2 分の逆転写反応に続き 94℃ 15 秒, 50℃ 20 秒, 72℃ 2 分を 40 サイクルの後, 72℃ 10 分を行った。Nested PCR に用いられる添付酵素は AmpliTaq Gold LD DNA Polymerase であり, RT-PCR 反応液 2.0 μL と Nested PCR Master Mix を混合し総量 50 μL の反応液とした。Nested PCR の反応温度条件は, 94℃ 4 分に続き, 94℃ 15 秒, 53℃ 20 秒, 72℃ 2 分を 40 サイクルの後, 72℃ 10 分を行った。1.5% アガロースゲル電気泳動により PR/RT は約 1.1 kb, IN は約 1.0 kb の特異的なアンプリコンの増幅を確認した。アンプリコンの精製には ExoSAP-IT PCR product cleanup (Applied Biosystems) を用いた。また, シーケンス反応後の未反応ダイの除去には BigDye X Terminator purification kit (Applied Biosystems) を用いた。使用機器は RT-nested PCR およびシーケンス反応には Applied Biosystems Veriti thermal cycler を用い 9600 エミュレーションモードにて反応を行い, DNA シーケンサーは Applied Biosystems 3500 genetic analyzer を用いた。RT-PCR から DNA シーケンサーによる電気泳動までの操作はキット添付のマニュアルに従った。なお, 精度管理にはキット添付コントロールを使用した。DNA シーケンサーより得られた塩基配列リード (1 検体あたり PR/RT は 6 リード, IN は 4 リード) のアライメントには, シーケンス解析 WEB ソフトウェア RECall (<https://recall.bccfe>).

ca)<sup>28)</sup>を用いてPR (282 bp, codon 6-99), RT (720 bp, codon 1-240) およびIN (864 bp, codon 1-288) の塩基配列を決定した。すべての塩基配列リードが得られた場合は、PR/RT 領域およびIN 領域の解析対象領域において2~4種類の塩基配列リードにより塩基配列が決定される(カバレッジ2~4)。ミックス塩基のカットオフ値はRECallの推奨設定値である17.5%とし、波形のズレによる明らかな誤判定を除き、目視による塩基配列の修正は行わなかった。

#### 4. 増幅感度

HIV陽性血漿12検体および希釈系列用HIV陽性血漿3検体(重複1検体を含む)を対象とし、PR/RTおよびINのアンプリコン増幅の有無を確認した。希釈系列の作製は、HIV陽性血漿3検体(subtype B, CRF01\_AE, CRF07\_BC)をAcroMetrix EDTA血漿希釈用マトリックス(Thermo Fisher Scientific)にて希釈し、HIV RNAを5,000, 1,000, 500 copies/mLの3濃度に調整した。増幅反応はHIV陽性血漿が1回、希釈系列は同時3回行い、アガロースゲル電気泳動にてPR/RT, INの増幅の有無を確認した。

#### 5. 併行精度

増幅感度の検討において、希釈検体(HIV RNA 5,000 copies/mL)の同時3回増幅により得られた各アンプリコンの塩基配列を1対1で比較し一致率を算出した。なお、一致率は解析領域の全塩基配列中で一致した塩基の割合であり、完全一致(e.g. "A vs A", "R vs R")を一致とし、部分不一致(e.g. "R vs A")と完全不一致(e.g. "C vs T")はいずれも不一致とした。評価基準は3つの組み合わせの一致率がいずれも98.0%以上とした。

#### 6. 従来法との一致率の比較

HIV陽性血漿9検体およびEQAパネル検体3検体(2020-01, 2022-01, -02)を対象とし、genotyping kitによる塩基配列と研究班で設定した従来法(HIV薬剤耐性検査標準化WG作製第3版の推奨法 <https://www.hiv-resistance.jp/standardization.htm>)による塩基配列との一致率を算出した。なお、従来法による塩基配列はRECallを用いてgenotyping kitと同じ条件にて作製した。評価基準は90%以上の検体(11検体)で一致率が98.0%以上とした。

#### 7. EQAパネル検体による評価

2012年, 2016年, 2020年, 2022年EQAパネル検体11検体(転写RNA 8検体, 凍結乾燥血漿3検体)を用いて、パネル検体の参照配列とgenotyping kitによる塩基配列との一致率を算出した。なお、コントロールとしてPR/RT評価用の市販コントロールであるAcroMetrix Genotyping HIV RT/PR Mutant Control(Thermo Fisher Scientific)を用いた。転写RNA検体の作製については吉田らの報告を参照されたい<sup>21)</sup>。簡単に示すと、PR/RT領域とIN領域を含むDNAフラグメント(nt1480-5264, accession: K03455)を組

み込んだプラスミドからRNAを*in vitro*転写後、RNA濃度を100,000 copies/mLに調整した(2012-07, 2016-03)。また、2012-05, 2016-05, -07, -08, -09, 2022-03はDRMを有さない転写RNAとDRMを有する転写RNAの2種類をコピー数相当で7:3に調整した検体(30%転写RNA検体)である。なお、参照配列とはEQAにおける比較基準となる配列であり、血漿検体の場合、参照配列はTREAT Asia Quality Assessment Scheme (TAQAS)により提案された定義<sup>29)</sup>である参加施設中2施設以上で判定された塩基を採用した配列とし、転写RNA検体の場合、*in vitro*転写に用いたプラスミドの塩基配列を参照配列とし、2種類の転写RNAを混合した検体の場合ではおのおののプラスミドの塩基配列から1つの参照配列とした。評価基準は参照配列との一致率が98.0%以上とした。

#### 8. Drug resistance mutation (DRM) levelの比較

HIV陽性血漿9検体およびEQAパネル検体11検体(転写RNA 8検体, 凍結乾燥血漿3検体)を対象とし、DRM levelの比較を行った。なお、HIV陽性血漿は従来法によるDRM levelとの比較、EQAパネル検体は参照配列によるDRM levelと比較した。DRM levelはStanford HIV drug resistance databaseのHIVdb Program: Mutations Analysis (<https://hivdb.stanford.edu/>)を用いて判定した。比較対象とした抗HIV薬剤はPIsがアタザナビル(ATV/r), ダルナビル(DRV/r), ロピナビル(LPV/r), NRTIsがアバカビル(ABC), エムトリシタピン(FTC), ラミブジン(3TC), テノホビルジソプロキシルフマル酸塩(TDF), NNRTIsがドラビリン(DOR), エトラビリン(ETR), リルピビリン(RPV), INSTIsがビクテグラビル(BIC), ドルテグラビル(DTG), ラルテグラビル(RAL)とした。DRM levelのカテゴリは1がsusceptible, 2がpotential low-level resistance, 3がlow-level resistance, 4がintermediate resistance, 5がhigh-level resistanceの判定である。

## 結 果

#### 1. 増幅感度

HIV陽性血漿12検体(HIV RNA 1,900~551,000 copies/mL)を対象とし、PR/RTおよびINの増幅の有無を確認した(表1)。Subtype B(ID 01~10)ではHIV RNAが1,900 copies/mL以上、CRF01\_AE(ID 11, 12)では2,697 copies/mL以上、CRF07\_BC(ID 13, 14)では4,520 copies/mL以上の検体で検討し、すべての検体において、PR/RTおよびINの増幅が確認された。低濃度HIV RNAでの増幅感度を確認するために3濃度(5,000, 1,000, 500 copies/mL)の希釈系列を同時3回増幅しアンプリコンの有無を確認した(表2)。3回中2回以上で増幅が確認された最低濃度は、ID 15(subtype B)のPR/RTとINが1,000 copies/mL, ID 11

(CRF01\_AE) の PR/RT が 500 copies/mL, IN が 5,000 copies/mL, ID 16 (CRF07\_BC) の PR/RT が 5,000 copies/mL, IN が 1,000 copies/mL であった。

表 1 増幅感度

ID	Subtype	HIV RNA (copies/mL)	PR/RT	IN
01	B	551,000	+	+
02	B	207,000	+	+
05	B	5,200	+	+
06	B	2,460	+	+
07	B	2,377	+	+
08	B	2,093	+	+
09	B	1,940	+	+
10	B	1,900	+	+
11	CRF01_AE	501,000	+	+
12	CRF01_AE	2,697	+	+
13	CRF07_BC	5,210	+	+
14	CRF07_BC	4,520	+	+

+ : 増幅有り。

表 2 希釈系列を用いた増幅感度

ID	Subtype	HIV RNA (copies/mL)	Number of amplification	
			PR/RT	IN
15	B	5,000	3/3	3/3
		1,000	3/3	2/3
		500	1/3	1/3
11	CRF01_AE	5,000	3/3	3/3
		1,000	3/3	0/3
		500	2/3	1/3
16	CRF07_BC	5,000	2/3	3/3
		1,000	0/3	2/3
		500	0/3	0/3

## 2. 併行精度

HIV RNA 5,000 copies/mL の検体を対象とし、同時 3 回検査で得られた塩基配列 (No. 1~3) 間の一致率を算出した (表 3)。ID 15 (subtype B) での塩基配列平均一致率は PR/RT で 99.5%, IN で 98.1%, ID 11 (CRF01\_AE) では PR/RT で 98.5%, IN で 98.4%, ID 16 (CRF07\_BC) では IN で 99.6% となり, PR/RT では No. 1 が増幅しなかったため解析対象外としたが, No. 2 と No. 3 間の一致率は 99.4% であった。

## 3. 従来法との塩基配列一致率の比較

Genotyping kit と従来法による塩基配列の一致率を確認した (表 4)。ID 09 の IN は, genotyping kit により決定できた塩基配列が 804/864 塩基であったため解析対象外とし, これを除き塩基配列平均一致率 (標準偏差) は PR/RT で

表 4 従来法との塩基配列一致率

ID	Subtype	% Concordance	
		PR/RT	IN
01	B	98.3	98.7
02	B	99.5	99.5
05	B	99.5	99.5
06	B	98.6	98.7
09	B	98.3	98.4*
10	B	98.6	99.4
2020-01	B	99.2	98.4
2022-01	B	99.6	99.2
11	CRF01_AE	99.5	99.7
13	CRF07_BC	99.4	99.5
14	CRF07_BC	99.2	98.5
2022-02	CRF07_BC	99.7	99.9
Average		99.1	99.2
SD		0.50	0.49

\* HIV genotyping kit で決定できた 806 塩基 (塩基番号 59~864) を対象とした一致率。

表 3 併行精度

ID	Subtype	Gene	% Concordance			
			No. 1 vs No. 2	No. 1 vs No. 3	No. 2 vs No. 3	Average (SD)
15	B	PR/RT	99.2	99.5	99.7	99.5 (0.21)
		IN	98.0	98.4	98.0	98.1 (0.19)
11	CRF01_AE	PR/RT	98.5	98.1	98.8	98.5 (0.29)
		IN	98.8	98.0	98.5	98.4 (0.33)
16	CRF07_BC	PR/RT	—	—	99.4	—
		IN	99.8	99.4	99.7	99.6 (0.17)

No. 1, 1 回目の塩基配列; No. 2, 2 回目の塩基配列; No. 3, 3 回目の塩基配列。

99.1% (0.50), IN で 99.2% (0.49) であった。また, subtype によらずすべての検体において PR/RT, IN いずれも一致率は 98.0% 以上であった。なお, 解析対象外とした ID 09 の IN について配列が決定できた 804 塩基を対象とした一致率は 98.4% であった。

#### 4. EQA パネル検体での参照配列との一致率

EQA パネル検体を対象とし, 参照配列との一致率を確認した (表 5)。すべてのパネル検体において PR/RT および IN の一致率は 98.0% 以上であった。また, 2016-03 IN を除き, 転写 RNA 検体 (2012-05, -07, 2016-03, -05, -07, -08, -09, 2022-03) およびの市販コントロール検体の一致率は 100% であった。

#### 5. DRM level の比較

従来法もしくは参照配列と DRM level を比較した。HIV 陽性血漿 9 検体 (ID 01, 02, 05, 06, 09, 10, 11, 13, 14) 中 1 検

体 (ID 11) および EQA パネル検体 11 検体中 9 検体 (2012-05, -07, 2016-03, -05, -08, -09, 2020-01, 2022-01, -02) で DRM が検出され, そのうち 2 検体 (2016-03, 2022-01) で DRM level の乖離が確認された (表 6)。2016-03 は転写 RNA 検体, 2022-01 は血漿検体であり, 2016-03 では genotyping kit で in R263K の検出により BIC, DTG, RAL の DRM level が増加, 2022-01 では genotyping kit で pro L90M の未検出により ATV/r, LPV/r の DRM level が低下した。

#### 考 察

効果的な ART を実施するために HIV 薬剤耐性検査の性能評価は重要である。今回, 検討した HIV-1 genotyping kit with integrase は subtype による増幅感度や再現性の違いがみられたものの, 従来法との塩基配列平均一致率, EQA パネル検体での塩基配列一致率は 99% 以上と良好であっ

表 5 EQA パネル検体での参照配列との一致率

ID	Type	HIV RNA (copies/mL)	Subtype	% Minor variant	% Concordance	
					PR/RT	IN
2012-05	転写 RNA	100,000	B	30	100	100
2012-07	転写 RNA	100,000	B	0	100	100
2016-03	転写 RNA	100,000	B	0	100	99.9
2016-05	転写 RNA	100,000	B	30	100	100
2016-07	転写 RNA	100,000	B	30	100	100
2016-08	転写 RNA	100,000	B	30	100	100
2016-09	転写 RNA	100,000	B	30	100	100
2020-01	凍結乾燥血漿	10,000	B	Unknown	99.7	98.0
2022-01	凍結乾燥血漿	10,000	B	Unknown	99.5	99.3
2022-02	凍結乾燥血漿	10,000	07_BC	Unknown	99.7	99.8
2022-03	転写 RNA	100,000	B	30	100	100
Control				0	100	na

Control, AcroMetrix genotyping HIV RT/PR mutant control : na, 解析対象外。

表 6 DRM level が乖離した検体

ID	Protocol	PIs					INSTIs				
		DRM		DRM level			DRM		DRM level		
		Major	Accessory	ATV/r	DRV/r	LPV/r	Major	Accessory	BIC	DTG	RAL
2016-03	Kit	None	None	1	1	1	R263RK	None	4	4	3
	Ref seq	None	None	1	1	1	None	None	1	1	1
2022-01	Kit	M46MI	None	2	1	2	None	None	1	1	1
	Conv	M46MI L90LM	None	4	1	3	None	None	1	1	1

DRM level のカテゴリは, 1 が susceptible, 2 が potential low-level resistance, 3 が low-level resistance, 4 が intermediate resistance, 5 が high-level resistance の判定となる。Kit, genotyping kit ; Ref seq, 参照配列 ; Conv, 従来法 ; Major, メジャー変異 ; Accessory, アクセサリー変異。

たことから従来法や国内で実施されている方法に近い性能を有していると考えられた。

HIV-1 の subtype と組換え型流行株 (CRF) の流行には地域差が報告されている<sup>30)</sup>。日本では subtype B が 87.9%、ついで CRF01\_AE が 8.4% と報告されており<sup>14)</sup>、近年では CRF01\_AE や CRF07\_BC の割合が増加している。Genotyping kit は subtype B, CRF01\_AE, CRF07\_BC で検査が可能であったことから、少なくとも日本国内の 90% 以上の感染者での検査が可能と考えられた。

WHO HIVResNet HIV drug resistance Laboratory operational framework (以下、WHO HIVResNet)<sup>31)</sup> では本検査の増幅感度の評価として HIV RNA 5,000 copies/mL 以上の検体の 95.0% 以上が増幅すること、HIV RNA 1,000~5,000 copies/mL では 90.0% 以上が増幅することがあげられている。今回、HIV RNA 陽性血漿を用いた検討では、HIV RNA 5,000 copies/mL 以上の 5 検体および 1,000~5,000 copies/mL の 7 検体それぞれで PR/RT, IN とともに 100% が増幅した。また、DHHS ガイドライン<sup>32)</sup> では ART 下で HIV RNA が 1,000 copies/mL 以上となった場合の薬剤耐性検査の推奨を AI (推奨の強さ A, エビデンスの質 I で最も高い推奨度) としている。希釈系列による検討では、ID 15 (subtype B) の PR/RT と IN, ID 11 (CRF01\_AE) の PR/RT, ID 16 (CRF07\_BC) の IN で 1,000 copies/mL での増幅 (3 回中 2 回以上) が確認された。しかしながら、ID 11 の IN および ID 16 の PR/RT では 5,000 copies/mL での増幅であり、臨床上求められる性能よりもやや低い感度となった。ただし、希釈系列に用いた血漿検体である ID 15 と 16 は 2016 年から約 7 年間、ID 11 は 2022 年から約 1 年間 -20℃ で保管され、その間に数回の凍結融解があった点を考慮する必要があるため、システムを増やした検討の余地が残されている。今回の結果からは 1,000~5,000 copies/mL の検体が増幅されない場合、従来法など他方法による検査を行える体制を構築しておくことが必要であると考えられた。

WHO HIVResNet では併行精度の評価として、少なくとも 5 回同時測定しペアワイズで 10 組中 9 組以上の塩基配列一致率が 98.0% 以上であることがあげられている。今回、3 回測定 3 組での検討となったが評価対象外を除き、すべて 98.0% 以上の一致率であった。ID 16 の PR/RT は 1 組であったため評価対象外となったが、その一致率は 99.4% であったことを考慮するとおおむね良好な成績であったと考えられた。なお、今回の検討では試薬と検体残量の不足から日差再現性を実施することができなかったため、今後の検討課題としてあげられた。

Genotyping kit と従来法との塩基配列結果の比較では、ID 09 (subtype B) は IN の一部配列が解析できなかったため対象外としたが、それを除き、全検体で 98.0% 以上の塩

基配列一致率であったことから genotyping kit と従来法は近い性能を有していると考えられた。解析対象外となった ID 09 は IN の 4 つの塩基配列リードのうち、1 つの quality score が低くアライメントされなかった。アライメントされた 3 つの塩基配列リードには塩基の挿入や欠失は確認されなかったことからシーケンスプライマーのミスマッチの可能性が考えられたものの、プライマー情報が非開示のため原因解明には至らなかった。

HIV は quasi-species を形成するため minor variant の検出力を評価する必要がある。しかしながら血漿検体では混在割合が不明であるため、われわれが実施してきた EQA では 30% 転写 RNA 検体により評価を行ってきた。今回の検討では、30% 転写 RNA 検体の参照配列と genotyping kit による塩基配列の一致率は PR/RT, IN とともに 100% であったことから混在割合が 30% の minor variant の検出力は良好であると考えられた。EQA パネルの血漿 3 検体では参照配列と比較し 0.2~2.0% の不一致が認められ、いずれも部分不一致であった。塩基配列の決定がなされた血漿検体および EQA パネル検体を用いた DRM level の比較では、2016-03 および 2022-01 の 2 検体で結果の乖離がみられた。2016-03 は genotyping kit で IN に R263RK (AGA → ARA) がミックスとして検出され INSTIs の DRM level が 4 (intermediate resistance) となった。クロマトグラムを確認すると、quality score が低い塩基配列リードのため、263 番のコドン塩基は 1 リードでの判定であったものの、A の割合が 22% であり、目視によっても低い A の波高が確認された。しかしながら本検体は転写 RNA クローンであるため基線の動揺が考えられ、加えて、本来であれば 2 リードによる塩基配列の判定が 1 リード (カバレッジ 1) であったことで誤判定された可能性が高いと考えられた。2022-01 は genotyping kit で pro L90LM (TTG → WTG) が未検出であり PIs の DRM level が 2 (potential low-level resistance) となった。本検体についてもクロマトグラムを確認したが、カバレッジが 3 での判定で L90M となるミックス塩基は確認できなかった。この pro L90LM については EQA 参加 9 施設中 4 施設が報告していたことから L90M が minor variant として存在する可能性は大きいものの、その混在割合がサングーシーケンスの検出限界である 20~25% 付近もしくはそれ以下であったことが推測される<sup>33)</sup>。また、試薬や反応条件、データ解析条件の違いによりミックス塩基の判定に違いが生じた可能性も考えられる。Genotyping kit のデータ解析ソフトウェア Exatype ではミックス塩基のカットオフ値は 15.0% であり、RECall で今回設定した 17.5% より低値である。RECall と Exatype の比較研究では、塩基配列の一致率は 99.8% であり不一致となった 0.2% のうち 99.7% はミックス塩基に関係することが報告されているため<sup>34)</sup>、解

析ソフトウェアやミックス塩基のカットオフ値の違いにより判定結果に違いが生じたことを考え、Exatypeでの解析も行ったが結果は変わらなかった。したがって、増幅過程またはシーケンス過程での原因も考えられた。

HIV 薬剤耐性検査による適切な ARVs の選択は効果的な ART を実施するために必要であり、検査結果の質の担保は患者の QOL を維持するためにも重要である。そのため、われわれは従来法の設定や EQA を実施してきた。今回検討した genotyping kit は EQA による成績から、従来法や国内で実施されている方法に近い性能を持ち、またキット化により試薬の管理が容易となることから日常検査法として実施可能であると考えられた。しかしながら、genotyping kit を導入したとしても、増幅やシーケンス反応の不良、部分不一致、DRM level の乖離は他の検査系同様に起こりうること、また、仕様上の課題としてプライマー配列情報が不明であること、doravirine の DRM である rt Y318F は解析範囲外であり、カプシド阻害剤など新たな ARV の登場による解析領域の追加などに柔軟に対応できないことがあげられる。これらの genotyping kit の特徴を理解し、施設ごとの現状に応じた検査体制の構築が望ましいと考えられた。

#### 謝辞

本研究の遂行にあたり HIV 薬剤耐性検査外部精度評価に参加いただいた以下の先生方（敬称略）に厚く御礼申し上げます。南 留美（国立病院機構九州医療センター）、貞升健志、長島真美（東京都健康安全研究センター）、森治代（大阪健康安全基盤研究所）、佐々木悟（国立病院機構仙台医療センター）、近藤真規子（神奈川県衛生研究所）、名護珠美（琉球大学病院）。

本研究はエイズ対策実用化事業「国内流行 HIV およびその薬剤耐性株の長期的動向把握に関する研究」の分担研究「薬剤耐性検査の外部精度管理」（課題管理番号：24fk0410050h1003）として実施された。

**利益相反：**サーモフィッシャーサイエンティフィック ライフテクノロジーズジャパンより試薬の提供を受けた。

#### 文 献

- 1) Fact sheet—Latest global and regional statistics on the status of the AIDS epidemic. <https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet> (accessed August 31, 2023)
- 2) Mitsuya H, Weinhold KJ, Furman PA, St Clair MH, Lehrman SN, Gallo RC, Bolognesi D, Barry DW, Broder S : 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus *in vitro*. Proc Natl Acad Sci USA 82 : 7096-7100, 1985.
- 3) Gueller A, Moser A, Calmy A, Günthard HF, Bernasconi E, Furrer H, Fux CA, Battegay M, Cavassini M, Vernazza P, Zwahlen M, Egger M : Life expectancy in HIV-positive persons in Switzerland: matched comparison with general population. AIDS 31 : 427-436, 2017.
- 4) Cohen MS, Chen YQ, McCauley M, Gamble T, Hosseinipour MC, Kumarasamy N, Hakim JG, Kumwenda J, Grinsztejn B, Pilotto JH, Godbole SV, Mehendale S, Chariyalertsak S, Santos BR, Mayer KH, Hoffman IF, Eshleman SH, Piwowar-Manning E, Wang L, Makhema J, Mills LA, de Bruyn G, Sanne I, Eron J, Gallant J, Havlir D, Swindells S, Ribaud H, Elharrar V, Burns D, Taha TE, Nielsen-Saines K, Celentano D, Essex M, Fleming TR : Prevention of HIV-1 infection with early antiretroviral therapy. N Engl J Med 365 : 493-505, 2011.
- 5) Coffin JM : HIV population dynamics *in vivo*: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. Science 267 : 483-489, 1995.
- 6) Wensing AM, van de Vijver DA, Angarano G, Asjo B, Balotta C, Boeri E, Camacho R, Chaix ML, Costagliola D, De Luca A, Derdelinckx I, Grossman Z, Hamouda O, Hatzakis A, Hemmer R, Hoepelman A, Horban A, Korn K, Kucherer C, Leitner T, Loveday C, MacRae E, Maljkovic I, de Mendoza C, Meyer L, Nielsen C, Op de Coul EL, Ormaasen V, Paraskevis D, Perrin L, Puchhammer-Stockl E, Ruiz L, Salminen M, Schmit JC, Schneider F, Schuurman R, Soriano V, Stanczak G, Stanojevic M, Vandamme AM, Van Laethem K, Violin M, Wilbe K, Yerly S, Zazzi M, Boucher CA : Prevalence of drug-resistant HIV-1 variants in untreated individuals in Europe: implications for clinical management. J Infect Dis 192 : 958-966, 2005.
- 7) Booth CL, Garcia-Diaz AM, Youle MS, Johnson MA, Phillips A, Geretti AM : Prevalence and predictors of antiretroviral drug resistance in newly diagnosed HIV-1 infection. J Antimicrob Chemother 59 : 517-524, 2007.
- 8) Alteri C, Svicher V, Gori C, D'Arrigo R, Ciccozzi M, Ceccherini-Silberstein F, Sella M, Bardacci SA, Giuliani M, Elia P, Scognamiglio P, Balzano R, Orchi N, Girardi E, Perno CF : Characterization of the patterns of drug-resistance mutations in newly diagnosed HIV-1 infected patients naive to the antiretroviral drugs. BMC Infect Dis 9 : 111, 2009.
- 9) Shet A, Berry L, Mohri H, Mehandru S, Chung C, Kim A,

- Jean-Pierre P, Hogan C, Simon V, Boden D, Markowitz M : Tracking the prevalence of transmitted antiretroviral drug-resistant HIV-1: a decade of experience. *J Acquir Immune Defic Syndr* 41 : 439-446, 2006.
- 10) Kim CO, Chin BS, Han SH, Lee HS, Jeong SJ, Choi HK, Choi JY, Song YG, Lee JS, Kim JM : Low prevalence of drug-resistant HIV-1 in patients newly diagnosed with early stage of HIV infection in Korea. *Tohoku J Exp Med* 216 : 259-265, 2008.
  - 11) Ndembu N, Lyagoba F, Nanteza B, Kushemererwa G, Serwanga J, Katongole-Mbidde E, Grosskurth H, Kaleebu P : Transmitted antiretroviral drug resistance surveillance among newly HIV type 1-diagnosed women attending an antenatal clinic in Entebbe, Uganda. *AIDS Res Hum Retroviruses* 24 : 889-895, 2008.
  - 12) Rodriguez-Rodriguez N, Duran A, Bouzas MB, Zapiola I, Vila M, Indyk D, Bissio E, Salomon H, Dileria DA : Increasing trends in primary NNRTI resistance among newly HIV-1-diagnosed individuals in Buenos Aires, Argentina. *J Int AIDS Soc* 16 : 18519, 2013.
  - 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) Hattori J, Shiino T, Gatanaga H, Yoshida S, Watanabe D, Minami R, Sadamasu K, Kondo M, Mori H, Ueda M, Tateyama M, Ueda A, Kato S, Ito T, Oie M, Takata N, Hayashida T, Nagashima M, Matsuda M, Ibe S, Ota Y, Sasaki S, Ishigatsubo Y, Tanabe Y, Koga I, Kojima Y, Yamamoto M, Fujita J, Yokomaku Y, Koike T, Shirasaka T, Oka S, Sugiura W : Trends in transmitted drug-resistant HIV-1 and demographic characteristics of newly diagnosed patients: nationwide surveillance from 2003 to 2008 in Japan. *Antiviral Res* 88 : 72-79, 2010.
  - 15) Hattori J, Shiino T, Gatanaga H, Mori H, Minami R, Uchida K, Sadamasu K, Kondo M, Sugiura W : Characteristics of transmitted drug-resistant HIV-1 in recently infected treatment-naive patients in Japan. *J Acquir Immune Defic Syndr* 71 : 367-373, 2016.
  - 16) Tzou PL, Rhee SY, Descamps D, Clutter DS, Hare B, Mor O, Grude M, Parkin N, Jordan MR, Bertagnolio S, Schapiro JM, Harrigan PR, Geretti AM, Marcelin AG, Shafer RW : Integrase strand transfer inhibitor (INSTI)-resistance mutations for the surveillance of transmitted HIV-1 drug resistance. *J Antimicrob Chemother* 75 : 170-182, 2020.
  - 17) 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.
  - 18) 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.
  - 19) Meynard JL, Vray M, Morand-Joubert L, Race E, Descamps D, Peytavin G, Matheron S, Lamotte C, Guiramand S, Costagliola D, Brun-Vezinet F, Clavel F, Girard PM : Phenotypic or genotypic resistance testing for choosing antiretroviral therapy after treatment failure: a randomized trial. *AIDS* 16 : 727-736, 2002.
  - 20) Fujisaki S, Fujisaki S, Ibe S, Asagi T, Itoh T, Yoshida S, Koike T, Oie M, Konda M, Sadamasu K, Nagashima M, Gatanaga H, Matsuda M, Ueda M, Masakane A, Hata M, Mizogami Y, Mori H, Minami R, Okada K, Watanabe K, Shirasaka T, Oka S, Sugiura W, Kaneda T : Performance and quality assurance of genotypic drug-resistance testing for human immunodeficiency virus type 1 in Japan. *Jpn J Infect Dis* 60 : 113-117, 2007.
  - 21) Yoshida S, Hattori J, Matsuda M, Okada K, Kazuyama Y, Hashimoto O, Ibe S, Fujisawa S, Chiba H, Tatsumi M, Kato S, Sugiura W : Japanese external quality assessment program to standardize HIV-1 drug-resistance testing (JEQS2010 program) using in vitro transcribed RNA as reference material. *AIDS Res Hum Retroviruses* 31 : 318-325, 2015.
  - 22) Schuurman R, Demeter L, Reichelderfer P, Tijnagel J, de Groot T, Boucher C : Worldwide evaluation of DNA sequencing approaches for identification of drug resistance mutations in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *J Clin Microbiol* 37 : 2291-2296, 1999.
  - 23) Schuurman R, Brambilla D, de Groot T, Huang D, Land S, Bremer J, Benders I, Boucher CA, Group EW : Underestimation of HIV type 1 drug resistance mutations: results from the ENVA-2 genotyping proficiency program. *AIDS Res Hum Retroviruses* 18 : 243-248, 2002.
  - 24) 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.
- 25) Pandit A, Mackay WG, Steel C, van Loon AM, Schuurman R : HIV-1 drug resistance genotyping quality assessment: results of the ENVA7 Genotyping Proficiency Programme. *J Clin Virol* 43 : 401–406, 2008.
- 26) Souza DC, Sucupira MC, Brindeiro RM, Fernandez JC, Sabino EC, Inocencio LA, Diaz RS : The Brazilian network for HIV-1 genotyping external quality control assurance programme. *J Int AIDS Soc* 14 : 45, 2011.
- 27) Parkin N, Bremer J, Bertagnolio S : Genotyping external quality assurance in the World Health Organization HIV drug resistance laboratory network during 2007–2010. *Clin Infect Dis* 54 (Suppl 4) : S266–272, 2012.
- 28) Woods CK, Brumme CJ, Liu TF, Chui CK, Chu AL, Wynhoven B, Hall TA, Trevino C, Shafer RW, Harrigan PR : Automating HIV drug resistance genotyping with RECall, a freely accessible sequence analysis tool. *J Clin Microbiol* 50 : 1936–1942, 2012.
- 29) Land S, Cunningham P, Zhou J, Frost K, Katzenstein D, Kantor R, Chen YM, Oka S, DeLong A, Sayer D, Smith J, Dax EM, Law M, Network TL : TREAT Asia Quality Assessment Scheme (TAQAS) to standardize the outcome of HIV genotypic resistance testing in a group of Asian laboratories. *J Virol Methods* 159 : 185–193, 2009.
- 30) Bbosa N, Kaleebu P, Ssemwanga D : HIV subtype diversity worldwide. *Curr Opin HIV AIDS* 14 : 153–160, 2019.
- 31) WHO HIVResNet HIV drug resistance laboratory operational framework. <https://www.who.int/publications/item/978-92-4-000987-5> (accessed October 28, 2020)
- 32) NIH : Guidelines for the use of antiretroviral agents in adults and Adolescents with HIV. <https://clinicalinfo.hiv.gov/en/guidelines> (accessed February 27, 2024)
- 33) Vandamme A, Houyez F, Bánhegyi D, Clotet B, De Schrijver G, De Smet K, Hall W, Harrigan R, Hellmann N, Hertogs K, Holtzer C, Larder B, Pillay D, Race E, Schmit J, Schuurman R, Schulse E, Sönnnerborg A, Miller V : Laboratory guidelines for the practical use of HIV drug resistance tests in patient follow-up. *Antivir Ther* 6 : 21–39, 2001.
- 34) Kingwara L, Karanja M, Ngugi C, Kangogo G, Bera K, Kimani M, Bowen N, Abuya D, Oramisi V, Mukui I : From sequence data to patient result: a solution for HIV drug resistance genotyping with exatype, end to end software for Pol-HIV-1 sanger based sequence analysis and patient HIV drug resistance result generation. *J Int Assoc Provid AIDS Care* 19 : 2325958220962687, 2020.

## Performance Evaluation of a New HIV-1 Drug Resistance Kit, HIV-1 Genotyping Kit with Integrase

Shigeru YOSHIDA<sup>1)</sup>, Kaori SATO<sup>2)</sup>, Shin-ichi FUJISAWA<sup>2)</sup>, Sumio IWASAKI<sup>2)</sup>, Tomoyuki ENDO<sup>2)</sup>,  
Takanori TESHIMA<sup>2)</sup>, Masakazu MATSUDA<sup>3)</sup>, Mayumi IMAHASHI<sup>3)</sup>, Atsuko HACHIYA<sup>3)</sup>, Kiyomi OKADA<sup>4)</sup>,  
Kouichi SAITO<sup>5)</sup>, Minako OKUDA<sup>6)</sup>, Shingo KATO<sup>7)</sup>, Tsunefusa HAYASHIDA<sup>8)</sup>, Teiichiro SHIINO<sup>9)</sup>,  
Masako NISHIZAWA<sup>10)</sup>, Wataru SUGIURA<sup>9)</sup>, Kazuhisa YOSHIMURA<sup>11)</sup> and Tadashi KIKUCHI<sup>10)</sup>

<sup>1)</sup> Health Sciences University of Hokkaido,

<sup>2)</sup> Hokkaido University Hospital,

<sup>3)</sup> NHO Nagoya Medical Center,

<sup>4)</sup> KITASATO-OTSUKA Biomedical Assay Laboratories Co., Ltd,

<sup>5)</sup> Mediford Corporation,

<sup>6)</sup> LSI Medience Corporation,

<sup>7)</sup> Hanah MediTech Co., Ltd.,

<sup>8)</sup> AIDS Clinical Center, National Center for Global Health and Medicine,

<sup>9)</sup> Center for Clinical Sciences, National Center for Global Health and Medicine,

<sup>10)</sup> National Institute of Infectious Diseases,

<sup>11)</sup> Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

**Objective** : In HIV infection, it is important to select effective anti-HIV drugs by HIV drug resistance testing. Since this test is performed in different ways at different laboratories, external quality assessment (EQA) has been conducted periodically. We evaluated the performance of a new HIV-1 genotyping kit with integrase, a reagent kit for drug resistance mutation testing in the protease-reverse transcriptase (PR/RT) and integrase (IN) regions.

**Methods** : Amplification sensitivity, concordance accuracy, sequence concordance rate, and comparison with the conventional method (the Japanese external quality assessment program to standardize HIV genotyping, 3rd Edition) were performed using 14 HIV-positive plasma samples and a portion of 11 samples from a previous EQA panel (including 8 transcribed RNA samples and 3 plasma samples).

**Results** : Amplification sensitivity ranged from 500 to 5,000 copies/mL, depending on the subtype and amplified region, although there is a possibility of underestimation due to the use of stored plasma. The mean (standard deviation) of nucleotide concordance with the conventional method for 12 plasma samples was 99.1% (0.50) for PR/RT and 99.2% (0.49) for IN. One of 12 samples, IN region could not be partially sequenced. Eleven EQA panel samples showed >99.0% sequence concordance with the reference sequence. Of the 9 plasma samples and 11 EQA panel samples, 2 EQA samples had discrepancies in drug resistance results.

**Conclusion** : Although the kit was considered to have the performance to be carried out as a routine testing method, it was considered important to utilize the kit based on its characteristics.

**Key words** : HIV drug resistance testing, commercial kit, drug resistance mutation (DRM) concordance, DRM level