

平成22年7月31日  
岡山HIV診療ネットワーク 第98回研究会

「HIV検査にまつわる最近の進歩」

慶應義塾大学医学部  
微生物学・免疫学教室  
専任講師 加藤真吾

# 感染者・患者報告数と検査数・検査陽性数(2009)

検査希望者

保健所等  
(無料・匿名)  
検査 150,252  
陽性 442 (0.29%)

クリニック  
(即日検査)  
検査 19,418  
陽性 105 (0.54%)

郵送検査  
検査 5.4万  
陽性 (192, 0.36%)

医療機関  
検査数 ?  
(妊婦 100万)  
陽性数 ?

エイズ動向委員会報告  
感染者 1021  
患者 431

血液センター  
献血者 530万  
陽性 102  
(0.00193%)

民間検査センター  
検査 ?  
陽性 ?

HIV感染リスクへの自覚の少ない人

# 感染者・患者報告数と検査数・検査陽性数(2008)

検査希望者

保健所等  
(無料・匿名)  
検査 17万  
陽性 501 (0.3%)

クリニック  
(即日検査)  
検査 2.2万  
陽性 110 (0.5%)

郵送検査  
検査 5万  
陽性 (234)

医療機関  
検査数?  
(妊婦 100万)  
陽性数?

エイズ動向委員会報告  
感染者 1126  
患者 431

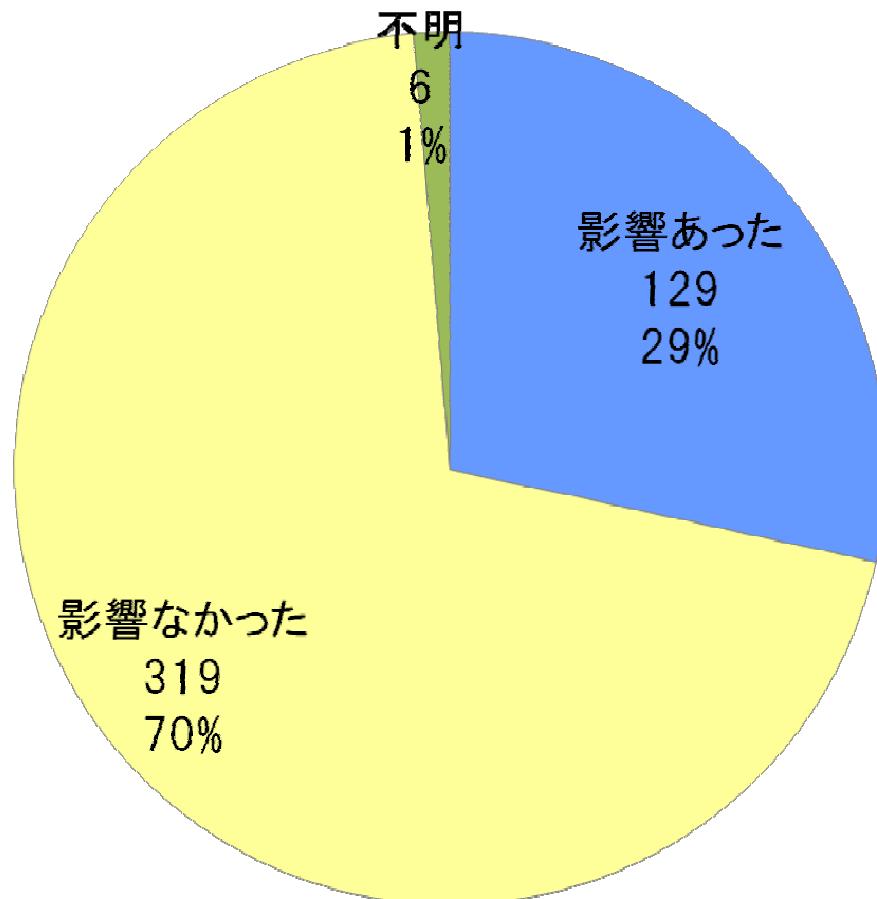
血液センター  
献血者 500万  
陽性 107  
(0.002%)

民間検査センター  
検査 130万  
陽性 1011

HIV感染リスクへの自覚の少ない人

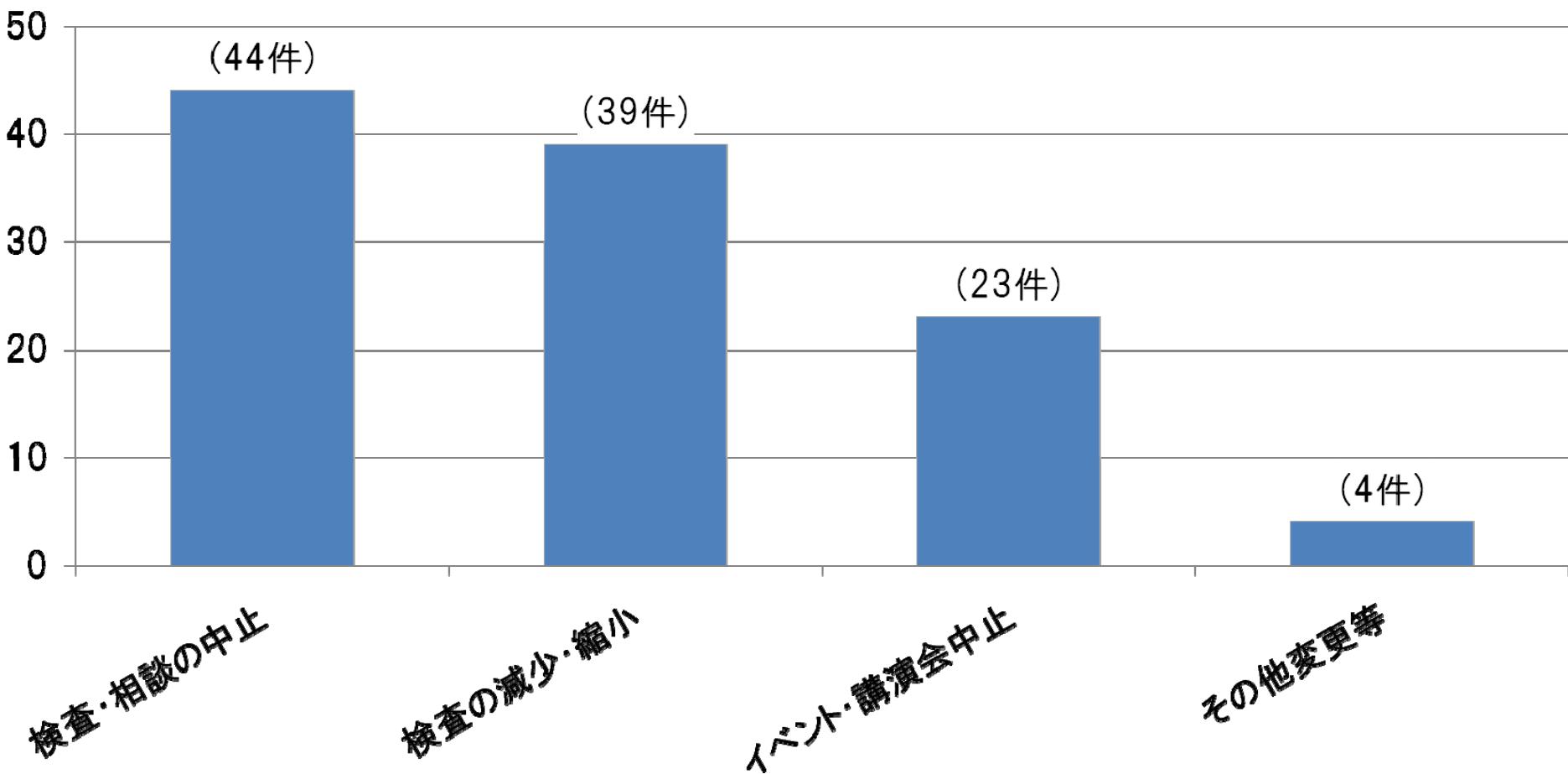
# 新型インフルエンザの流行で 検査相談事業に影響があったか

(2009年)



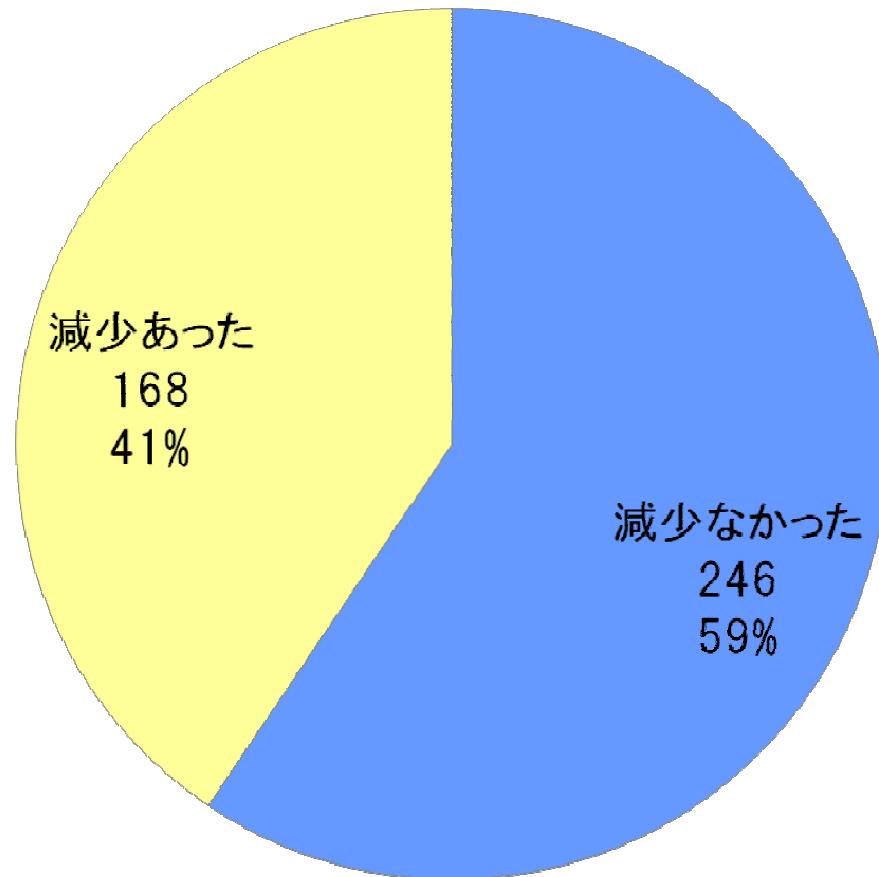
# 新型インフルエンザの流行で 検査相談事業に影響した内容

(2009年)



# 新型インフルエンザの流行で 相談数が減少したか

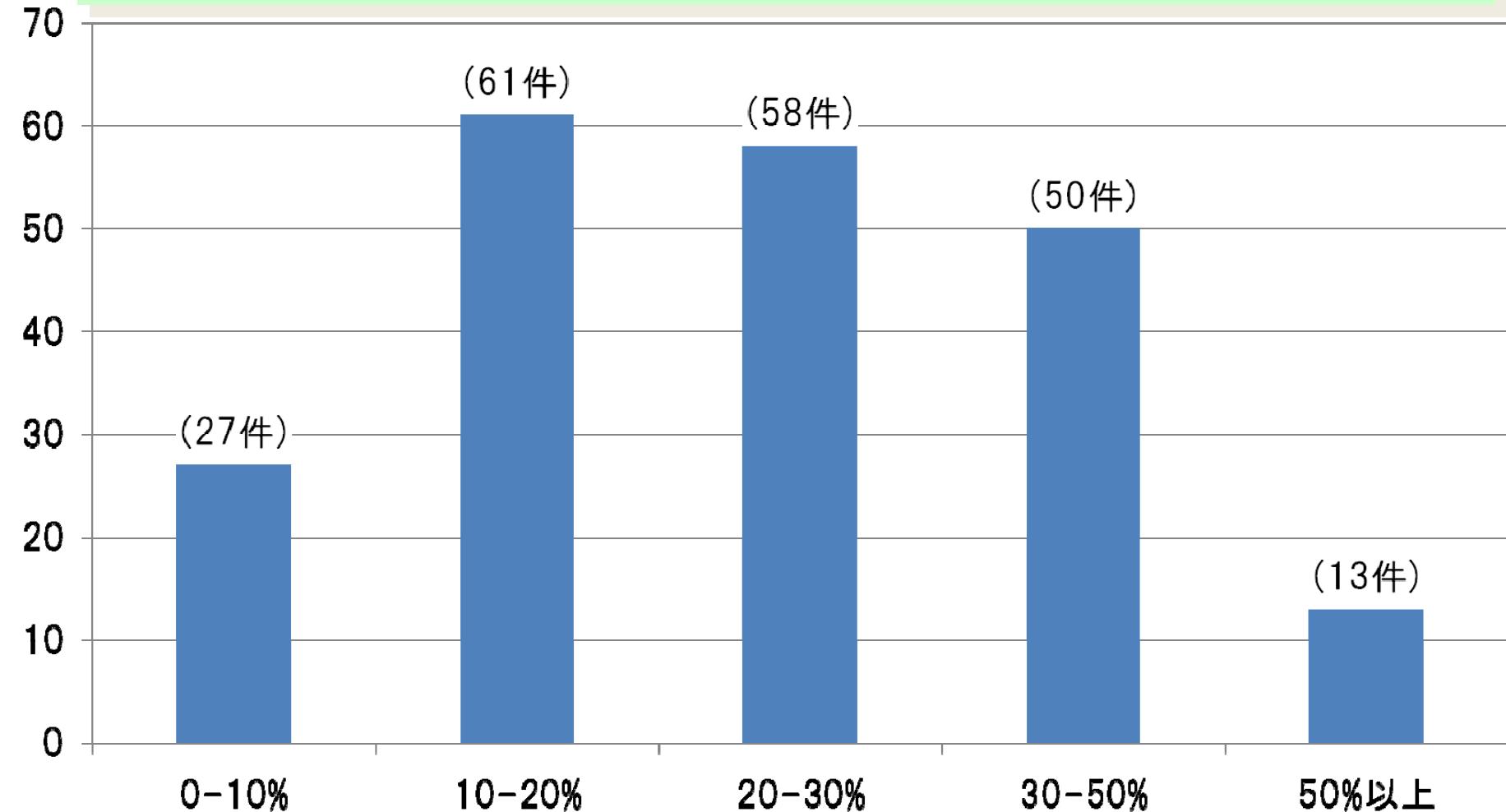
(2009年)



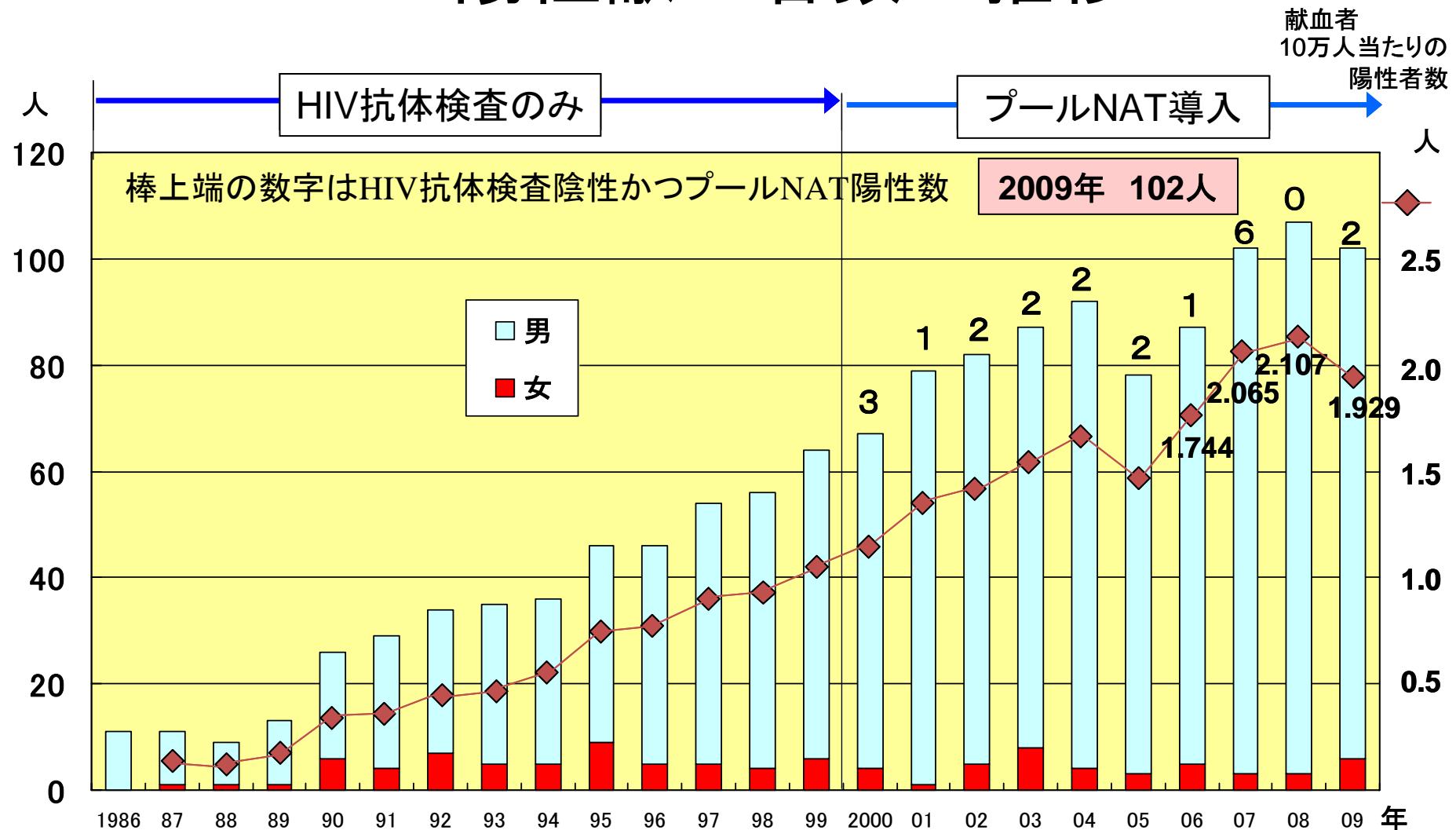
# 新型インフルエンザの流行で 検査数の減少

(2009年)

(n=209)

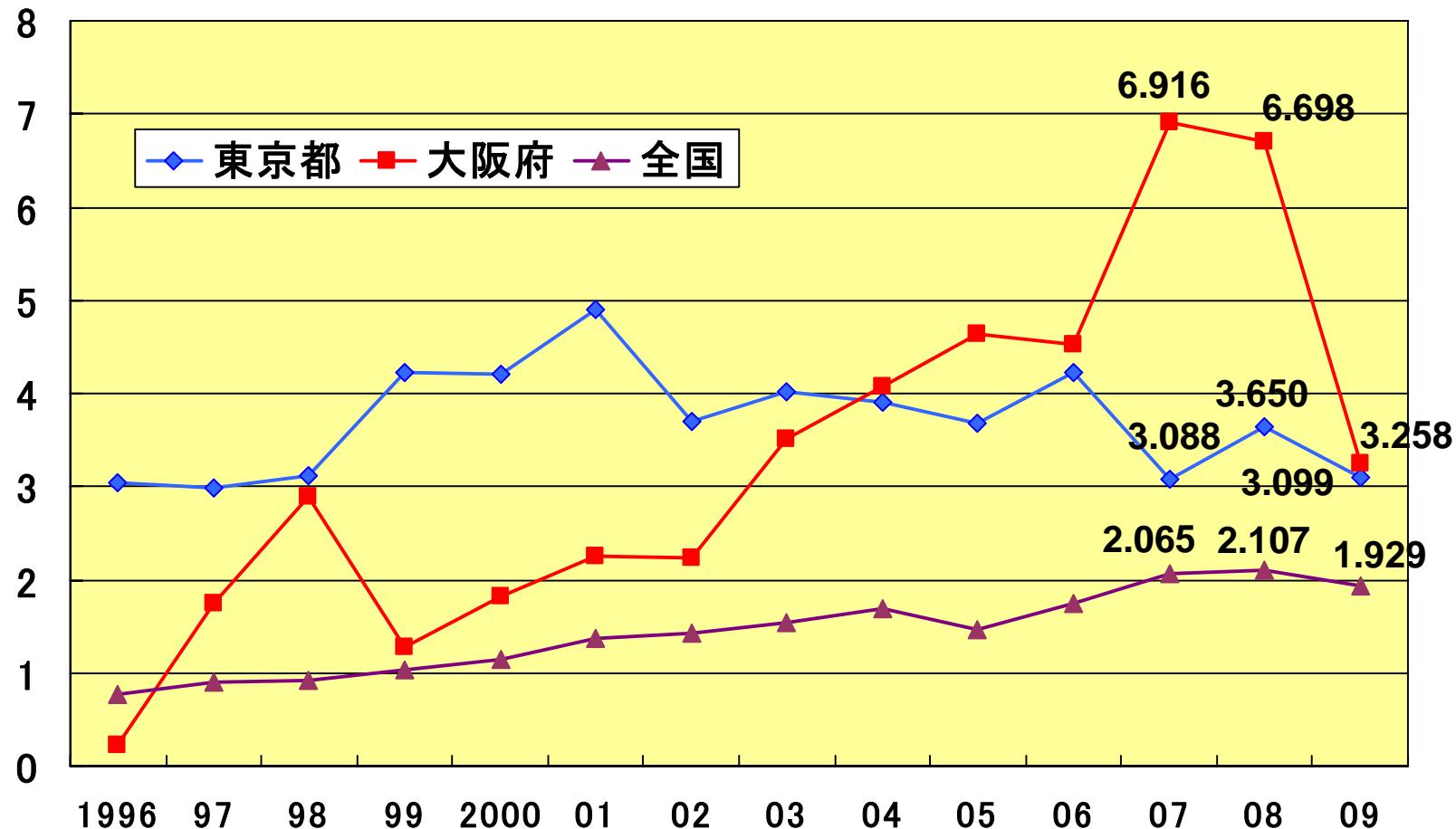


# HIV陽性献血者数の推移



## 献血者10万人当たりのHIV陽性献血者数の推移 (東京・大阪・全国)

人



# TaqScreen s401の性能

	検出感度	平均の検出感度
HBV	3.2 IU/ mL	95%CI: 2.2~5.3
HCV	12.4 IU/mL	95%CI:6.6~71.7
HIV-1 Group M	41.8 IU/mL	95%CI:31.8~63.8
HIV-1 Group O	93.7 copy/mL	95%CI: 59.4~ 262.9
HIV-2	2.0 copy/ mL	95%CI: 1.5~3.1

## セロコンバージョン・パネルによる評価

- (1) HBV Abbott PRISM HBsAg Assay に比較して、個別で18日、20倍希釈で8日早く検出
- (2) HCV Abbott PRISM HCV Assayに比較して、個別で26日、20倍希釈で25日早く検出
- (3) HIV Abbott PRISM HIV O Plus Assayに比較して、個別で16日、20倍希釈で12日早く検出

ロシュ社の参考資料より

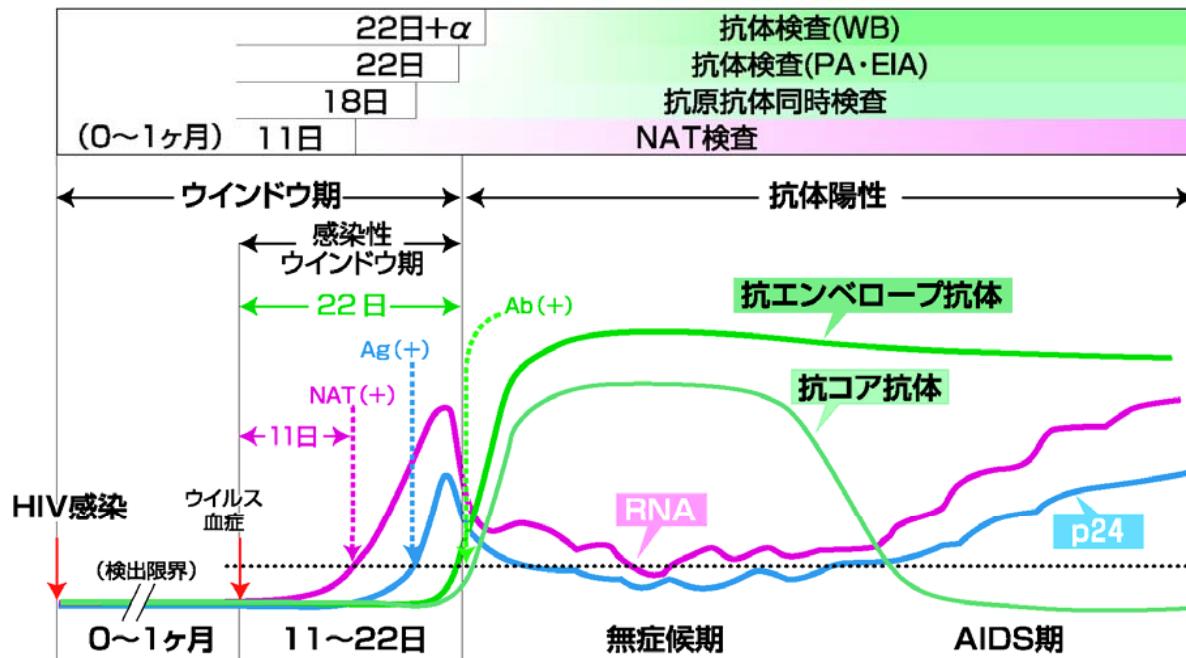
# NATスクリーニング状況(20プール)

期間	検査対象本数	HBV	HCV	HIV
2005年	5,101,519	102(83)	11	2
2006年	4,790,905	92(72)	10	1
2007年	4,766,287	80(59)	5	6
2008年 CL4800 S401導入	4,900,082	80(33)	6	0
2009年 ～2月	819,769	13(2)	0	1

( )内はHBc抗体検査陰性の数

図10

## HIV感染とウインドウ期間



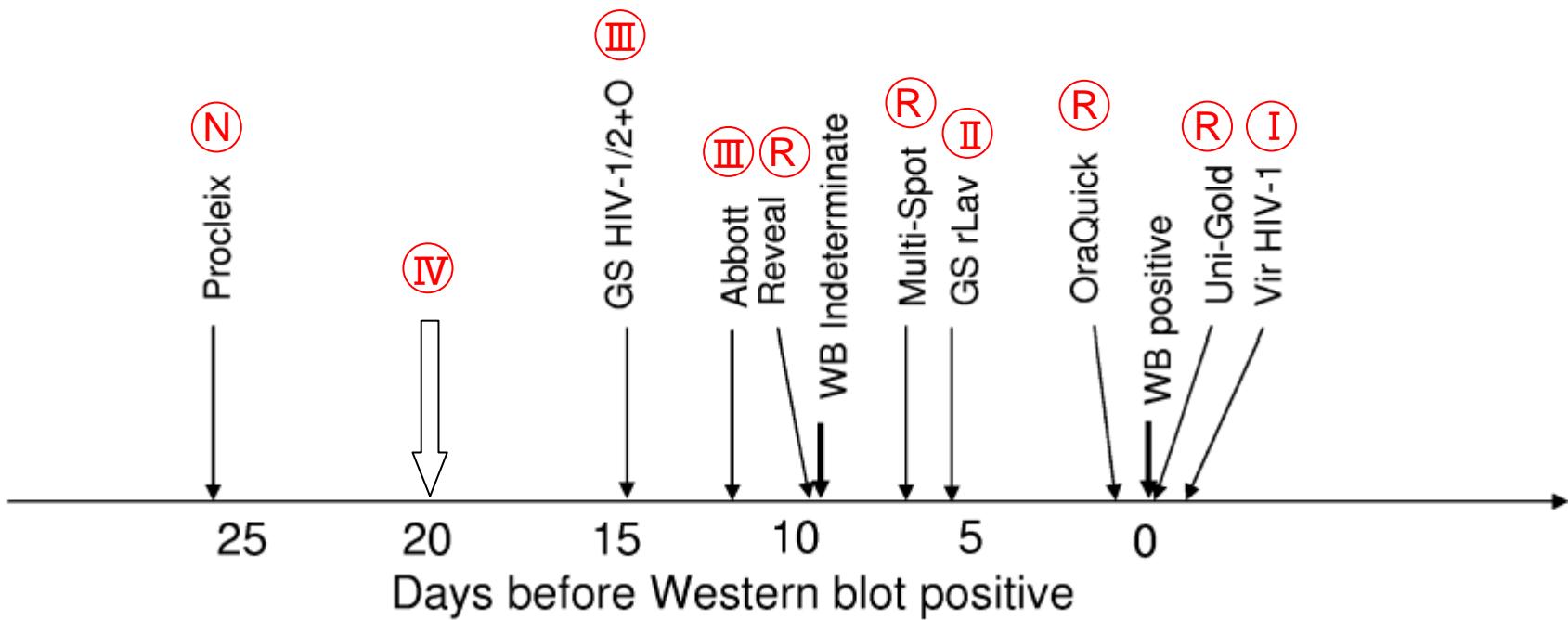
**ウインドウ期** HIV感染初期で、感染していても検査では陰性となる期間。現在の抗体検査では通常1ヶ月で抗体が検出される。従って本来の意味では抗体検査のウインドウ期は1ヶ月と言える。ただし、HIV検査で陰性の時に感染していないと言い切るため、HIV検査では安全をみて長めの3ヶ月という期間が通常用いられている。

**感染性ウインドウ期** ウィンドウ期の中で血中にウイルスが存在し輸血によりHIV感染を起こしうる期間を特に感染性ウィンドウ期という。感染性ウィンドウ期は現在の抗体検査では22日、遺伝子検査 (NAT:Nucleic acid Amplification Test) ではその半分の11日と計算されている。

# スクリーニング検査法の性能が向上

世代	特徴	検出対象
第一世代	ウイルス溶解物を抗原として使用	HIV-1抗体(IgG)
第二世代	ペプチドあるいは組換えタンパク質を抗原として使用	HIV-1抗体(IgG) HIV-2抗体(IgG)
第三世代	サンドイッチ法	HIV-1抗体(IgG+IgM) HIV-2抗体(IgG+IgM)
第四世代	抗原検出を加える  アーキテクトHIVコンボ ジェンスクリーンHIV アキシムHIV Ag/Abコンボアッセイ エンザイグノストHIVインテグラル	HIV-1抗体(IgG+IgM) HIV-2抗体(IgG+IgM) HIV-1抗原

# スクリーニング検査法の性能が向上



# HIV-2感染症の診断も必要

健疾発第 0203001 号

平成 21 年 2 月 3 日

各

都道府県  
政 令 市  
特 別 区

衛生主管部（局）長 殿

厚生労働省健康局疾病対策課長

## 医療機関及び保健所に対する HIV-2 感染症例の周知について（依頼）

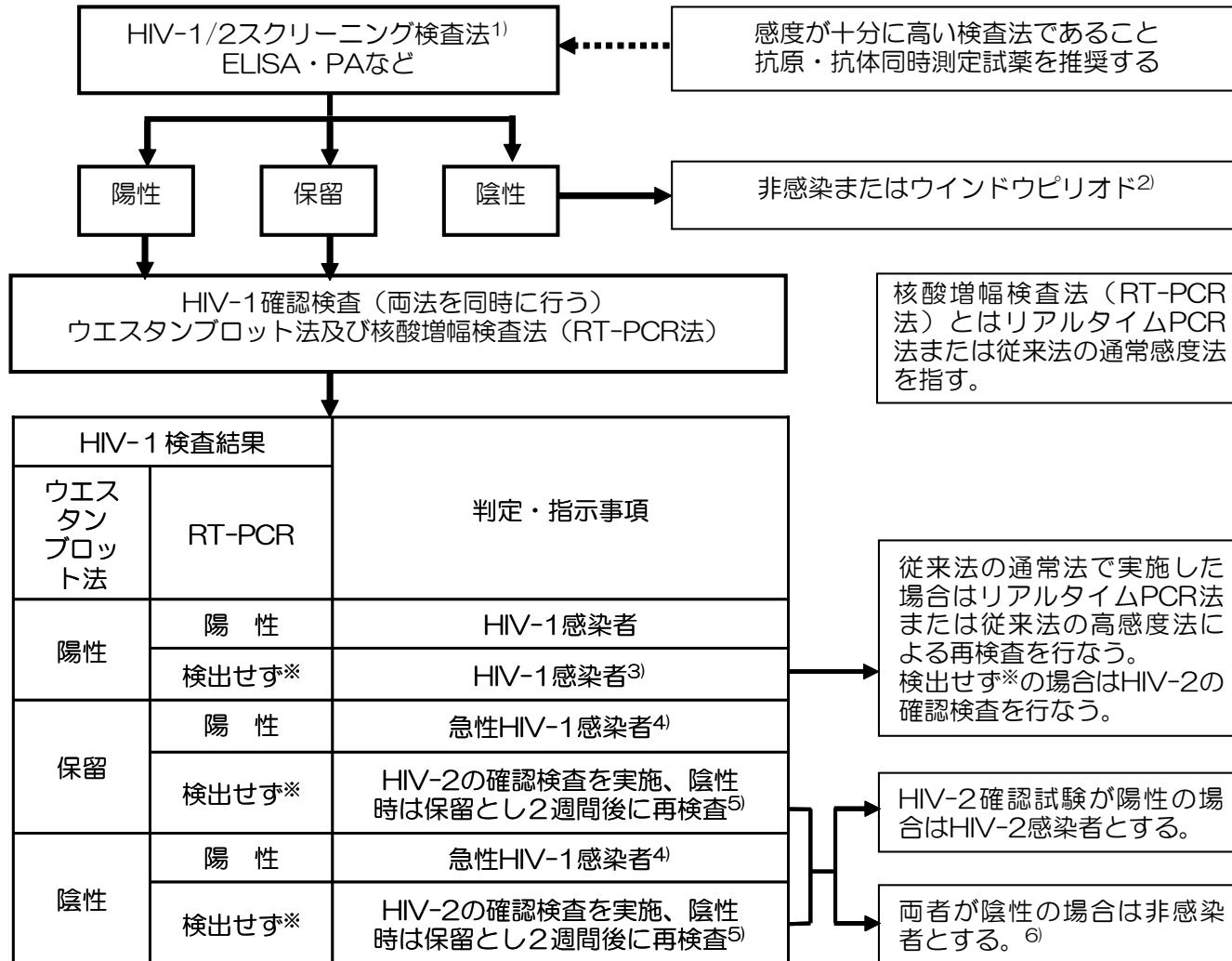
この度、別添のとおり、我が国において国内での感染が疑われるHIV-2感染例が複数確認され、「厚生労働省健康危機管理基本指針」に基づく健康危険情報として厚生労働省に報告されたところである。

平成 14 年に我が国において初めての HIV-2 感染症例の周知（平成 14 年 10 月 24 日付健疾発第 1024001 号厚生労働省健康局疾病対策課長通知「医療機関及び保健所に対する HIV-2 感染症例の周知について」）を行い、平成 18 年には日本人の感染症例の周知（平成 18 年 8 月 11 日付健疾発第 0811001 号厚生労働省健康局疾病対策課長通知「医療機関及び保健所に対する HIV-2 感染症例の周知について」）を行ったところであるが、今回改めて、周知を行うものである。

貴職におかれでは、管内医療機関に対し当該情報の周知とともに、HIV-2 に配慮した適切な HIV 診療の実施を指導されるよう特段の御配慮をお願いする。

また、貴管内保健所においても、当該情報の周知及び HIV-2 抗体検査実施の徹底を図るよう、併せてお願いする。

# HIV-1/2感染症診断のためのフローチャート



# HIV-1/2感染症の診断2008の問題点

- 確認検査において、ウエスタンブロット法(280点)とRT-PCR(520点)を同時に行わないで、連続的に行った方が合理的かつ経済的
  - 同時に行ないと保険が通らない
- スクリーニング検査陽性、確認検査陰性の場合、HIV-2の急性感染を疑って二週間後の高価な再検査(計1310点)が必要か?
  - 我が国の有病率ではスクリーニング検査の偽陽性の可能性の方が高い。
  - 急性感染が強く疑われるか、流行地域との関連がある症例だけでもよいのではないか。
  - 特に、妊婦健診でこのフローチャートを適用すると、妊婦に対する精神的負担が強すぎる。

# 迅速検査キット（ダイナスクリーン・HIV-1/2）測定方法および感度、特異性

血清・血漿 50 $\mu$ l を滴下



15分後



全血 50 $\mu$ l を滴下



全血展開液1滴を滴下

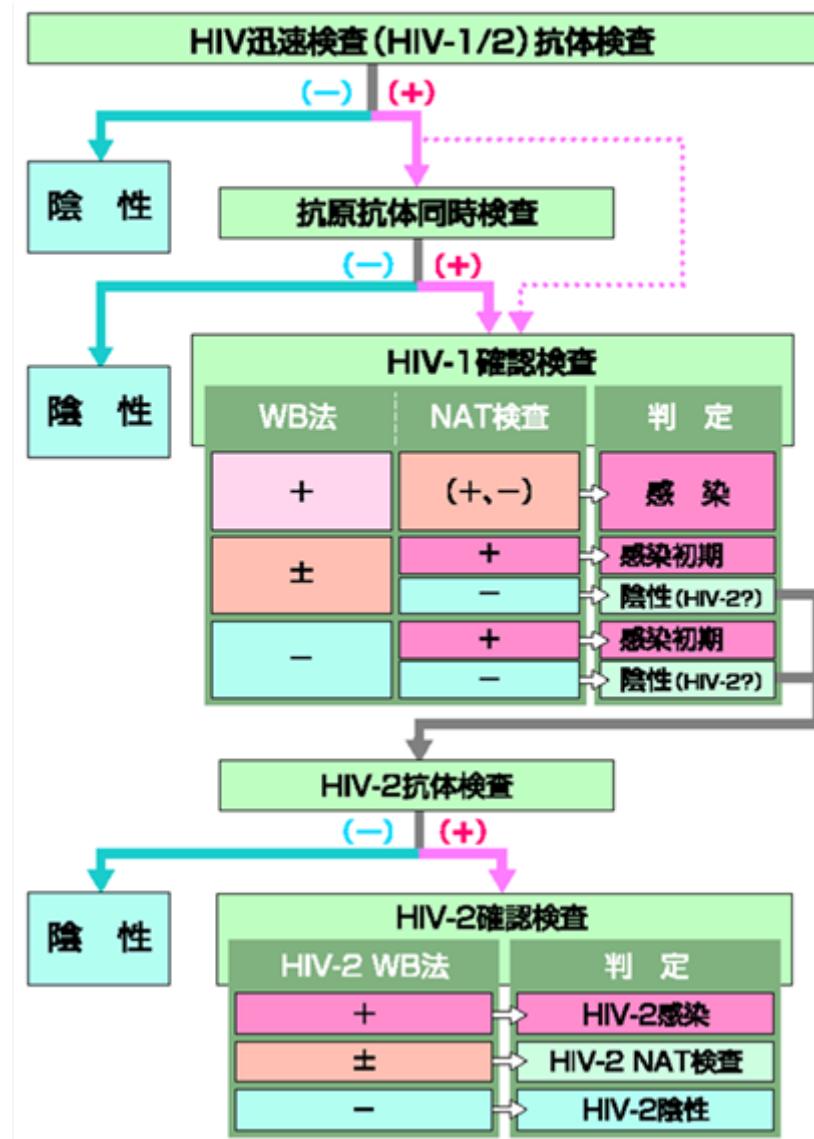


感 度 100% \*

特異性 98.7%~99.4% (偽陽性率 0.6~1.3%)

\*保健所等のHIVスクリーニング検査で陽性となったHIV感染者血清100例について調べた結果、その全例(100%)が迅速検査キット(ダイナスクリーン・HIV-1/2)でも陽性であった。

# HIV迅速検査実施フローチャート



# 新たな迅速検査試薬の検討－抗原抗体同時検出－

## キット本体



## ＜特徴＞

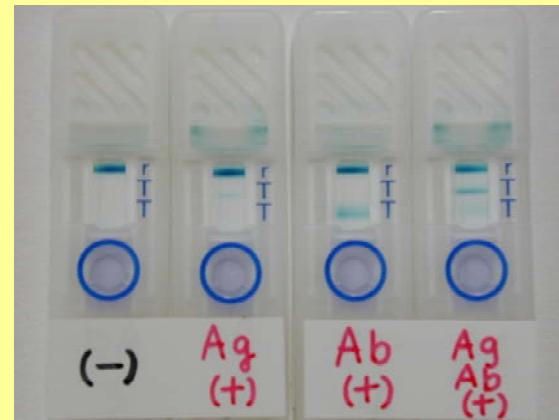
- ◇ HIV抗原・抗体を同時に15分で検出可能
- ◇ 原理: イムノクロマト-酵素標識抗体法
- ◇ 検体: 血漿・血清

## ＜操作法＞

1. 検体 $25\mu\text{l}$ を検体滴下部へ滴下
2. 基質展開用ボタンを押し、反応開始
3. 15分後に反応停止液を2滴滴下
4. 目視判定

## ＜判定＞

陰性    抗原陽性    抗体陽性    抗原  
抗体陽性



# 抗原抗体同時検査キット

<偽陽性率の検討>

◇ 陰性検体 910 例

	ダイナスクリーン HIV-1/2	エスプラン HIV Ag/Ab
偽陽性	8 (0.9%)	2 (0.2%)

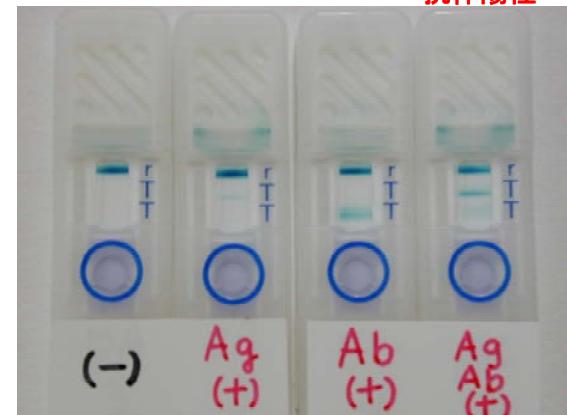
<セロコンバージョンパネルAK (BBI PRB936)>

パネル番号	初回採血からの日数	PA法	迅速抗体検査 ダイナスクリーン	迅速抗原抗体同時検査 エスプラン HIV Ag/Ab			抗原抗体同時検査 ELISA法	抗原検査 pg/ml	HIV-1 RNA コピー/ml
				抗原	抗体	判定			
1	0	-	-	-	-	-	-	<3.0	<400
2	5	-	-	-	-	-	-	<3.0	$4 \times 10^2$
3	7	-	-	-	-	-	-	<3.0	$7 \times 10^3$
4	12	-	-	+/-	-	+/-	+	256.2	$>8 \times 10^5$
5	14	-	-	+	-	+	+	>400	$>8 \times 10^5$
6	19	512	+/-	++	+	+	+	>400	$>8 \times 10^5$
7	21	1024	+	+	+/-	+	+	>400	$>8 \times 10^5$

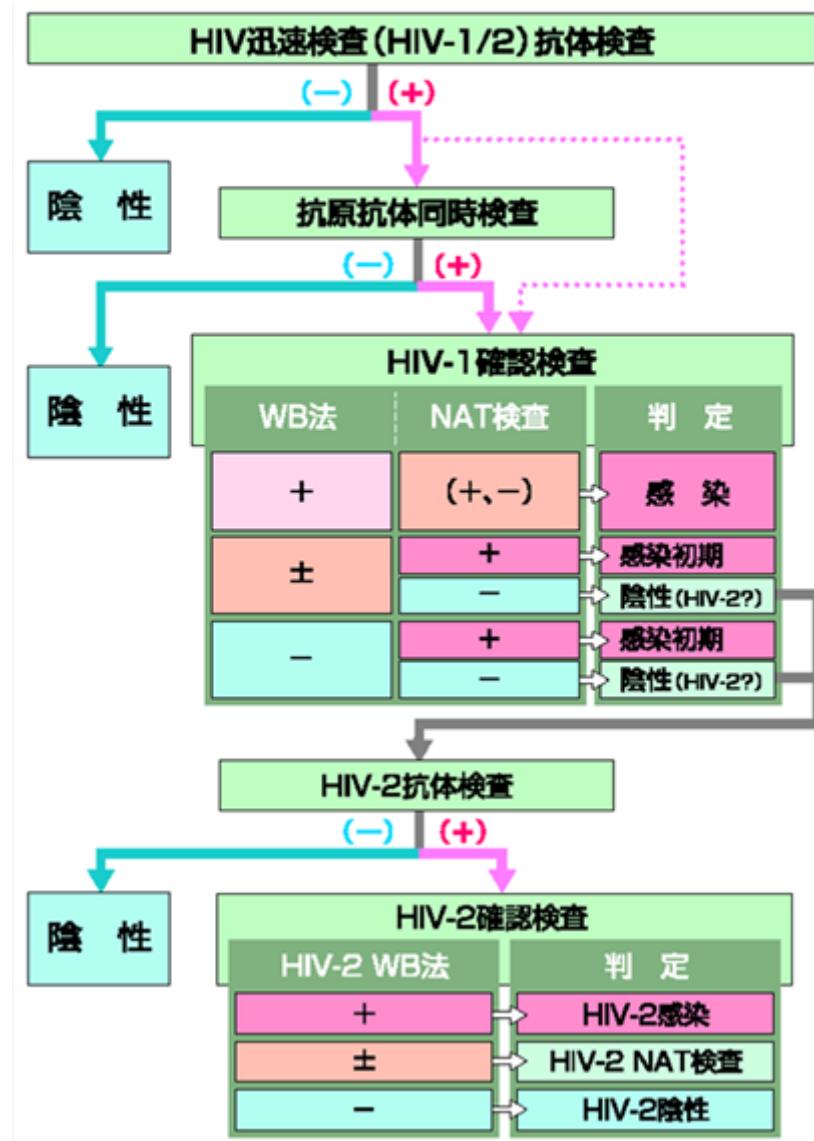
HIV抗原・抗体を同時に15分で検出可能



陰性 抗原陽性 抗体陽性 抗原抗体陽性



# HIV迅速検査実施フローチャート



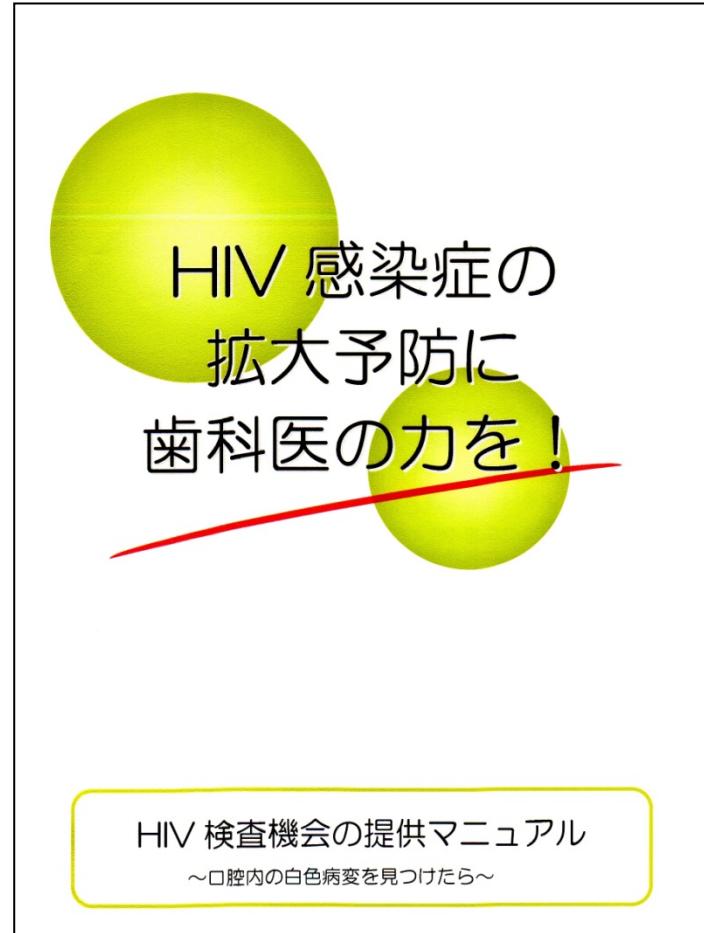
# 歯科受診者に対するHIV検査相談機会の提供

## これまでの成果

- ・ HIV/AIDS関連の口腔日和見疾患（口腔カンジダ症、毛様白板症、口腔カポジ肉腫等）を紹介し、歯科医が患者さんにHIV検査を勧めやすくするための小冊子を作成。、大学講義で歯科学生や千葉県歯科医師会会員などに配布。

## 本年度の計画

- ・ 小冊子の内容の充実、普及・活用を図る。
- ・ 歯科から紹介された症例に関する拠点病院へのアンケート調査
- ・ 迅速唾液検査キット(OraQuick、OraSure社)のわが国への導入を図る。→販売代理店の勧誘



# 唾液によるHIV検査の今後の可能性は？

米国ではFDAが認可しHIV検査相談に利用  
(更に自己検査キットとしての利用を検討中)



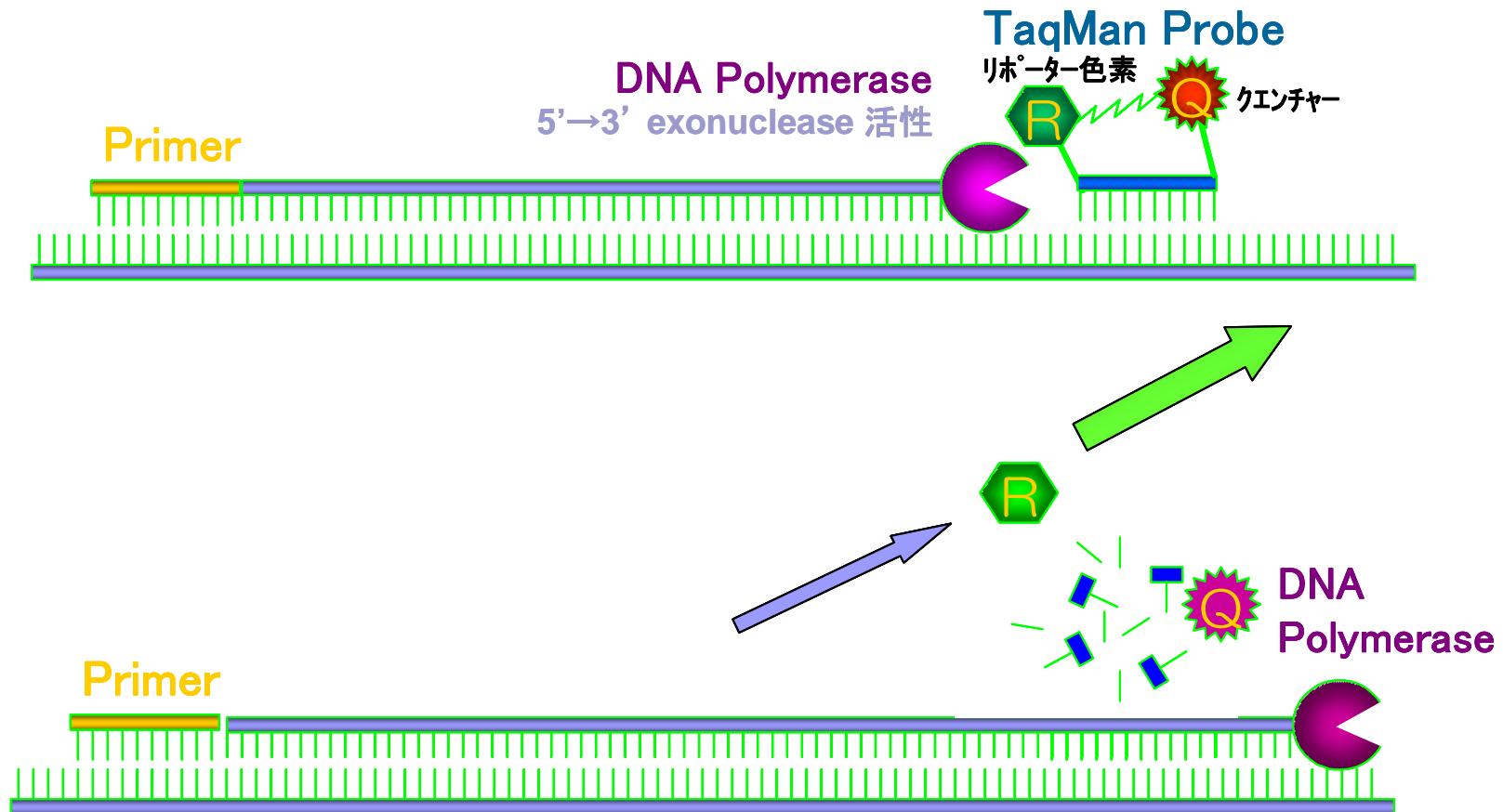
OraQuick Advance HIV-1/2  
(OraSure Technologies社)

# リアルタイムHIV-1 RNA定量法

- 測定の迅速性、自動化、密封化、測定範囲の拡大
- コバスTaqMan HIV-1(ロシュ)
  - 「オート」 3200万円 (AmpliPrep+コバスTaqMan)
  - 「マニュアル」 1000万円 (コバスTaqMan 48)

# TaqMan PCR法の原理

DNA polymeraseは、exonuclease活性を持っている。よって、DNA polymeraseがDNAを伸長していく過程で、クエンチャー、リポーターが結合したプローブを5'末端より分解する。

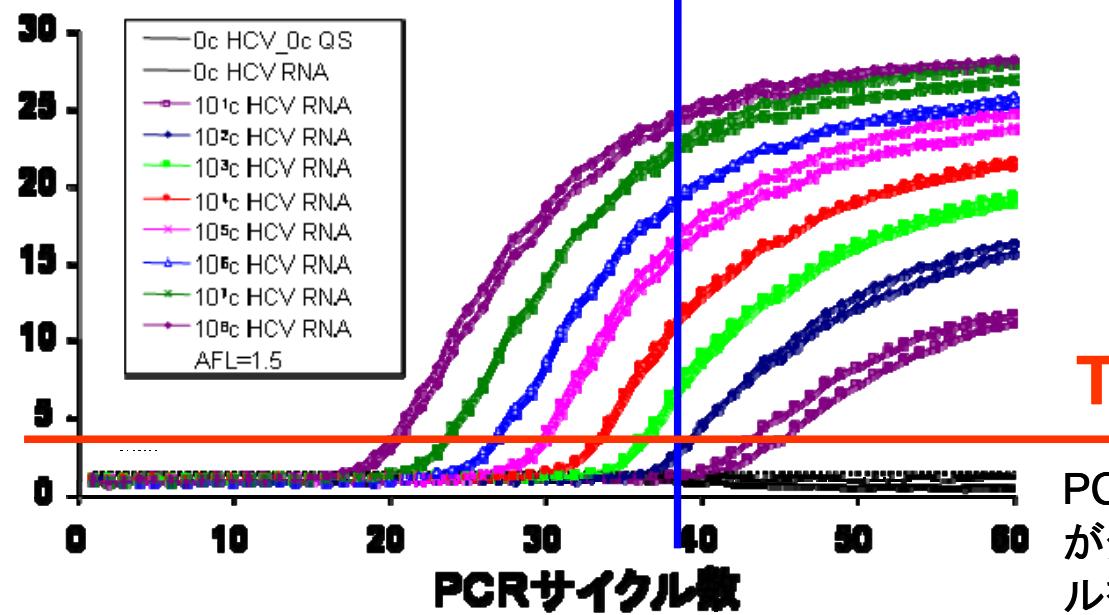


# TaqMan PCR法と従来のPCR法の違い

## これまでのPCR(アンプリコア)

至適サイクルでPCRサイクルを止め、  
増幅産物の収量を定量している

増幅産物の収量



## TaqMan PCR

PCRサイクル毎にTaqManプローブ  
が分解されて発せられる蛍光シグナル  
を検知している。

- 高濃度 : 早いサイクル数で検知
- 低濃度 : 遅いサイクル数で検知

# コナバス TaqMan HIV-1「オート」の概要

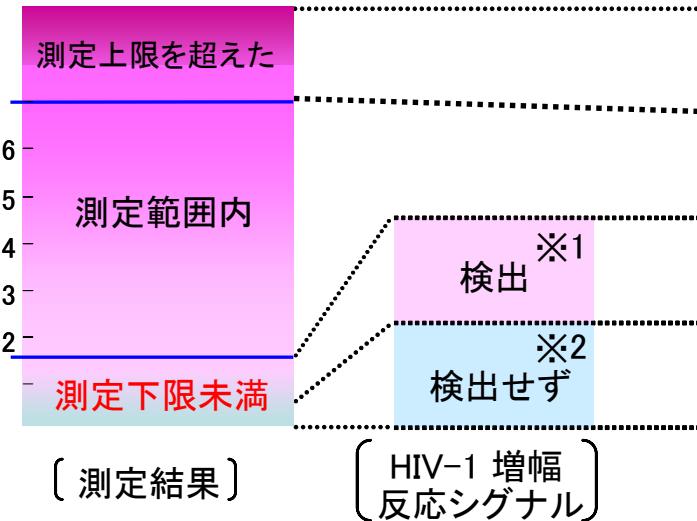
- 測定範囲: 40 ~  $1.0 \times 10^7$  コピー/mL
- 測定検体: 血清 および血漿 (1.0 mL)
- サブタイプ反応性: HIV-1 グループM サブタイプ A~Hで良好な反応性を示す
- 保険区分: D023 微生物核酸同定・定量検査  
10. HIV-1 核酸定量検査
- 保険点数: 520点

# 測定結果の報告例

測定下限未満( $<40$  コピー/ $\text{mL}$ )となった場合でも、HIV-1 RNAの検出を意味する“HIV-1 増幅反応シグナル”を検出した場合と、検出しなかった場合に区別して報告されます。

## 【測定結果の状態】

HIV-1 RNA量 (Log コピー/ $\text{mL}$ )



## 【報告例 ①】

結果
$>1.0 \times 10^7$ コピー/ $\text{mL}$
$X.X \times 10^n$ コピー/ $\text{mL}$
$<4.0 \times 10^1$ コピー/ $\text{mL}$

## 【報告例 ②】

結果	HIV-1 増幅 反応シグナル
$>1.0 \times 10^7$ コピー/ $\text{mL}$	検出
$X.X \times 10^n$ コピー/ $\text{mL}$	検出
$<4.0 \times 10^1$ コピー/ $\text{mL}$	検出

※1 : HIV-1 RNAの検出を意味します。

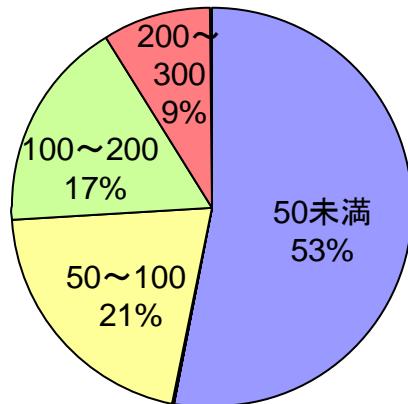
※2 : 必ずしもHIV-1の存在を否定するものではありません。測定結果に基づく臨床診断は、臨床症状や他の検査結果等と併せて担当医師が総合的に判断して下さい。

## 【臨床における検査結果の取り扱いについて】

監修：東京医科大学 臨床検査医学講座 主任教授 福武 勝幸 先生

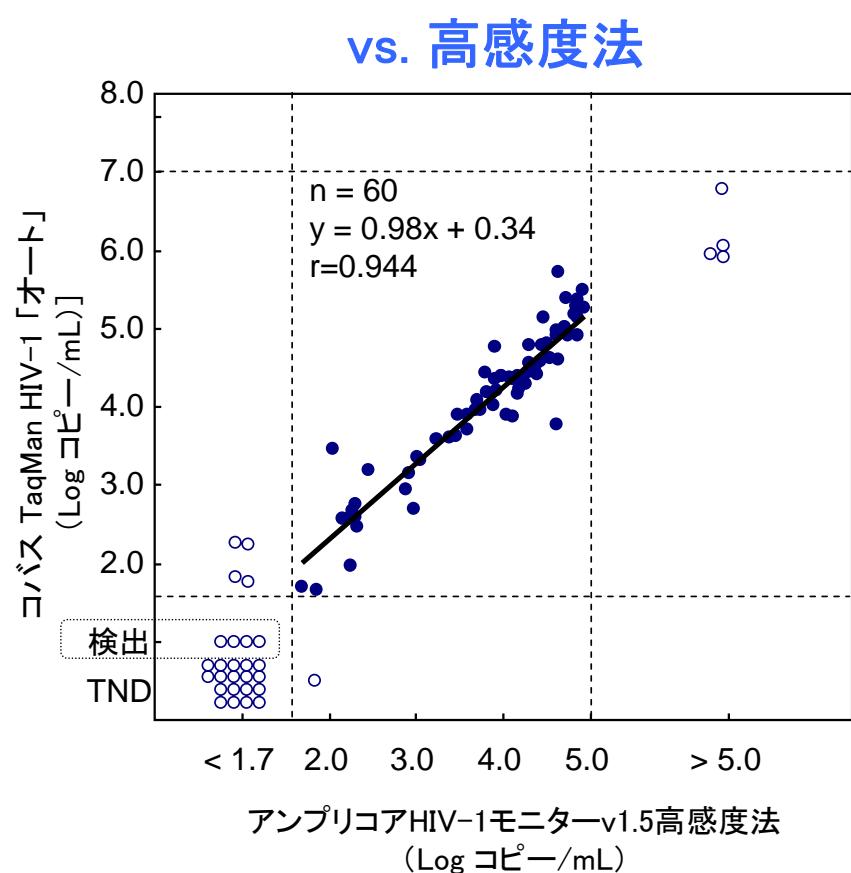
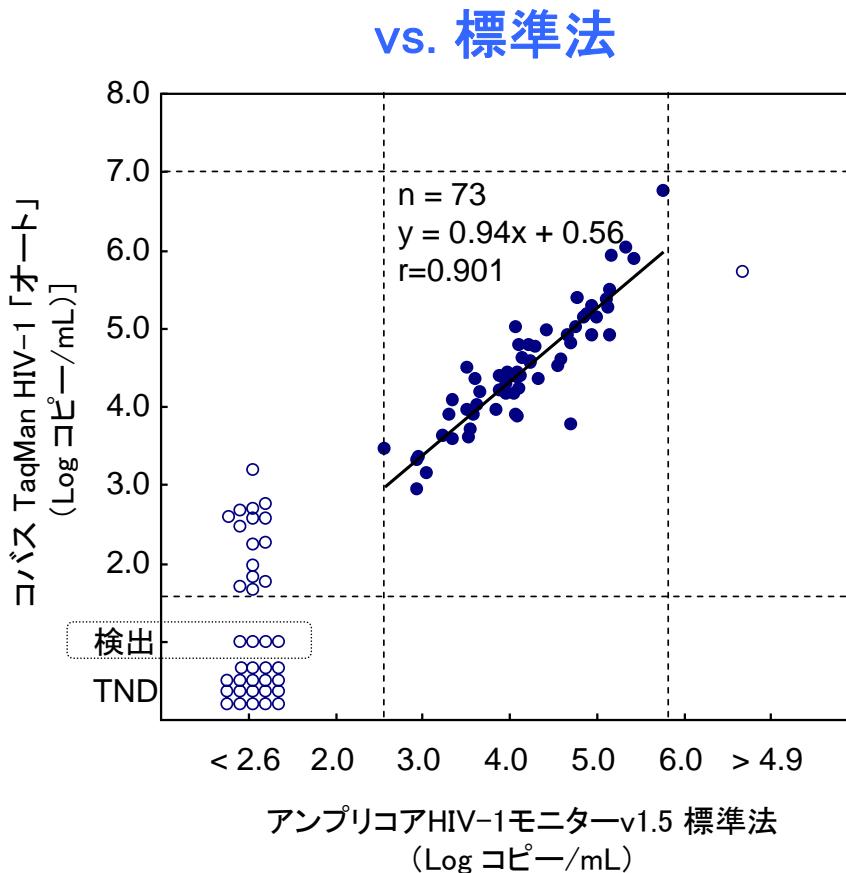
現時点では、このような低濃度のHIV-1 RNAの検出と病気の進行や薬剤耐性の発現などとの関係は明らかではありません。HIV-1 RNAが400コピー/mLを越えて、増加を続けるような事態が発生しない限り、病気の悪化や治療の変更を考える必要はないと考えられています。

アンプリコア(高感度法)50コピー/mL未満におけるTaqManの測定結果  
(n=58, 単位:コピー/mL)



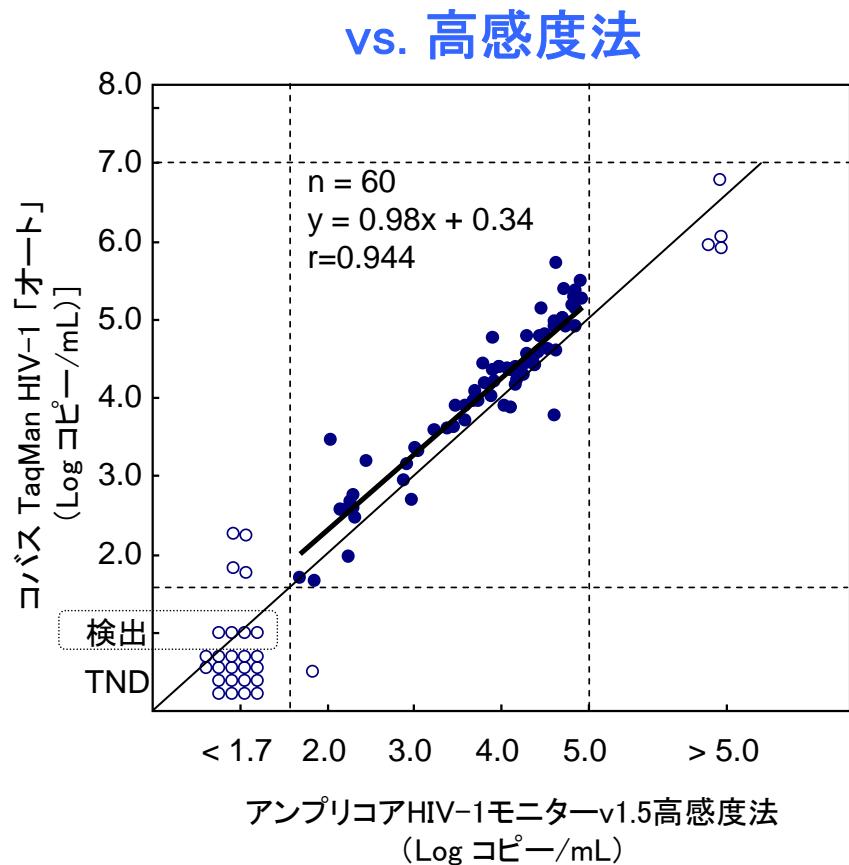
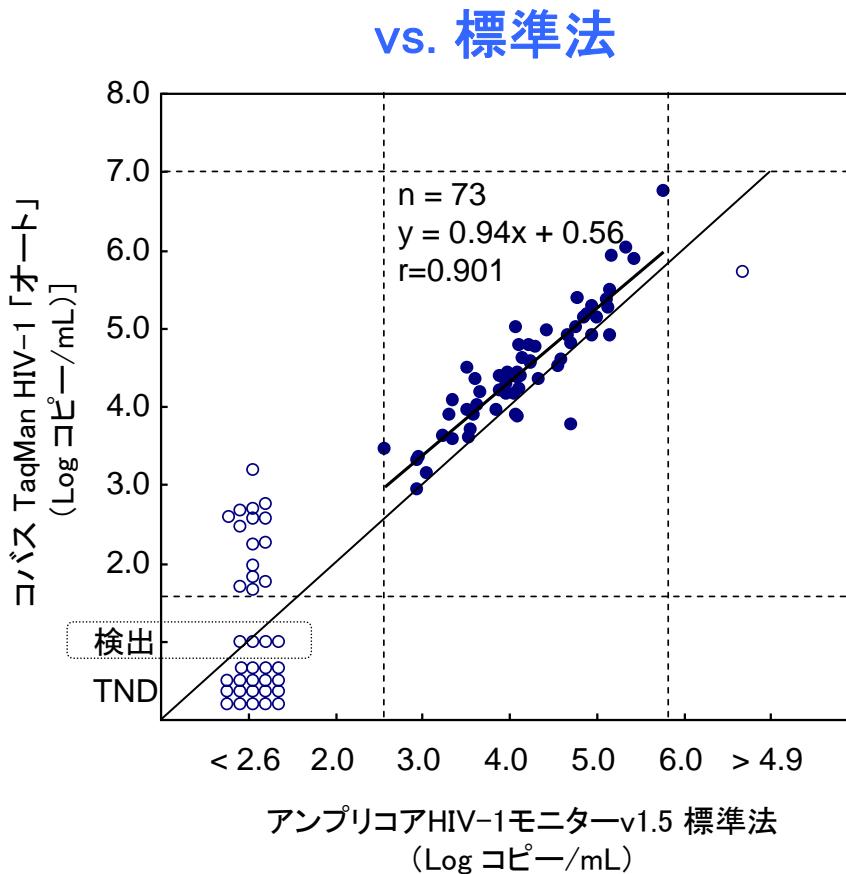
東京医科大学病院データより

# 既存法との相関（血清検体）



(照屋勝治:感染症学会雑誌, 82(1):20-25, 2008より一部改変)

# 既存法との相関（血清検体）

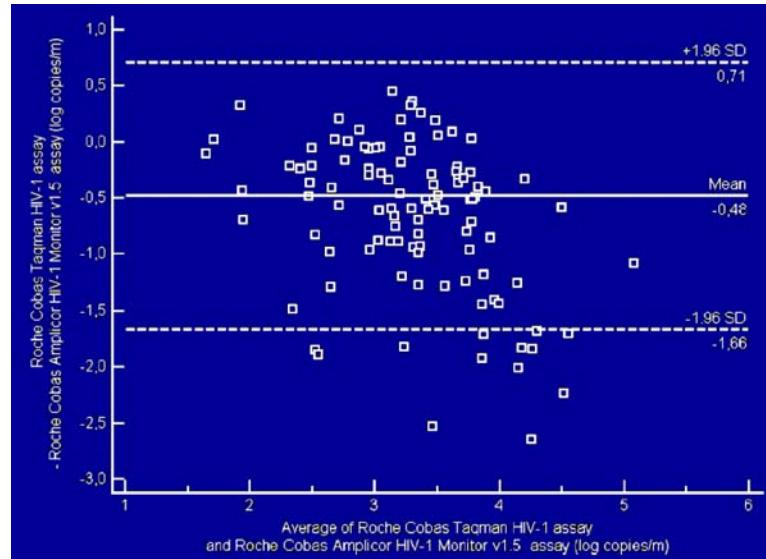


(照屋勝治:感染症学会雑誌, 82(1):20-25, 2008より一部改変)

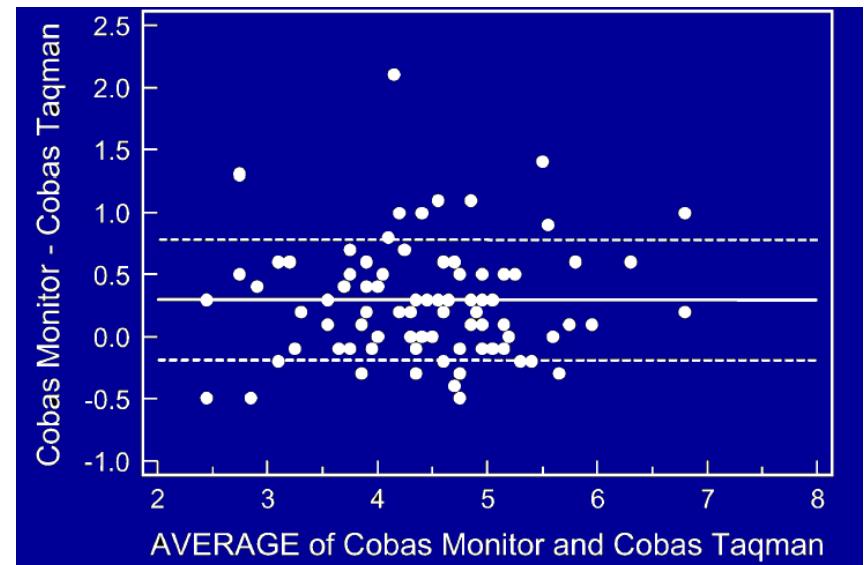
# Discrepancy between Amplicor Monitor and Cobas TaqMan in Europe

## Bland-Altman plot

Damond et al. (2007)



Gueudin et al. (2007)



Taqman < Amplicor

Single point mutations cause >100-fold underestimation of HIV-1 viral load with the COBAS TaqMan HIV-1 real-time PCR assay,  
J.Clin. Microbiol.,47(4),1238-40,2009

### reverse primer

Amplicor:SKCC1B 5'- TACTAGTAGTTCCCTGCTATGTCAC~~T~~CC - 3'  
KK-TaqMan:deSKCC1 **5'**- TACTAGTAGTTCCCTGCTAT**R**TCAC~~T~~CC - **3'**

Consensus	GGAAGTGACATAGCAGGAAC <del>T</del> ACTAGTA
Patient 1 B	--T-----
Patient 2 B	--C-----
Patient 3 AG	--C-----
Patient 4 A1	--C-----G--G-----
Patient 5 F1	--C-----T-----T-----A-----

	Amplicor	コハスTaqMan	KK-TaqMan
Y271-051004	79000	230	25000
Y494-100518		<40(検出せず)	240

# 新しいHIV-1 RNA定量法の開発(背景)

## ◆ 血中HIV-1 RNA定量法の変更

アンプリコアHIV-1モニター

(2009.12で販売停止)

PCR装置:9600、9700(ABI)

血漿  $200\ \mu\text{l}$ (標準法)

$500\ \mu\text{l}$ (高感度

法)



コバスTaqMan HIV-1

(2008.4から大手検査センターで開始)

新たに高価な専用機器が必要

血液  $8\text{ml}$

血漿  $1.5\text{ml}/1\text{回測定}$



問題点: RNA定量が必要な検査・研究が困難

★ スクリーニング検査陽性、感染初期例の確認検査

★ 母児感染の確認検査



目的:汎用リアルタイムPCR装置を用いたHIV-1 RNA定量法の開発

# HIV-1 RNA定量法(KK-TaqMan法)の開発

- ◆ グループMに属する多くのウイルス株に対応可能

Quantitation of HIV-1 group M proviral DNA using TaqMan MGB real-time PCR, Journal of Virological Methods 157(2009)141-146

- ◆ 一般的なリアルタイムPCR装置が使用可能

ABI 7900HT、Step One Plus (Applied Biosystems)

- ◆ 使用血漿量:500  $\mu$ l

- ◆ 定量下限:50copies/ml

- ◆ 精度:40%(CV)以内

# KK-TaqMan法の技術移管

- ◆ NATスクリーニング検査導入機関での検討(2009.10月－)
  - 横浜市衛生研究所(横浜市火曜夜間検査)
  - 川崎市衛生研究所(川崎市日曜検査)
  - 大阪府立公衆衛生研究所(性感染症クリニック)
  - 神奈川県衛生研究所(大和保健福祉事務所)
- ◆ 地方衛生研究所での検討
  - 北海道立衛生研究所(2010.1月－)
  - 東京都健康安全研究センター(2010.1月－)
  - 福岡県保健環境研究所(2010.1月－)
  - 福島県衛生研究所(2010.3月－)
- ◆ その他、地方衛生研究所での導入検討(プロトコール送付)
  - 鹿児島県環境保健センター
  - 栃木県保健環境センター、他6カ所

# RNA抽出試薬とリアルタイムPCR装置

- ◆ RNAの精製 : QIAamp UltraSens Virus Kit (Qiagen, 50回用、¥54000)

検討中キット

High Pure Viral RNA Kit (Roche, 100回用、¥54600)

- ◆ リアルタイムRT-PCR

PCR装置 : ABI 7900HT

Step One Plus (Applied Biosystems)

LightCycler480 (Roch)

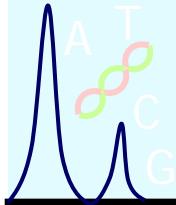
ABI 7500 fast

試薬 : SuperScript III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR System with ROX (invitrogen)

EXPRESS One-Step SuperScript qRT-PCR Kits  
Universal ROX (invitrogen)

# 微少薬剤耐性HIV-1検出の意義

- 初回治療あるいはサルベージ治療における薬剤の選択
- 治療失敗例の原因の追究
  - アドヒアランス
  - 血中薬剤濃度
  - 薬剤耐性ウイルス  
→ 新しい治療法の開発
- 感染個体内におけるウイルス動態の把握  
→ レトロウイルス感染症の病因解明

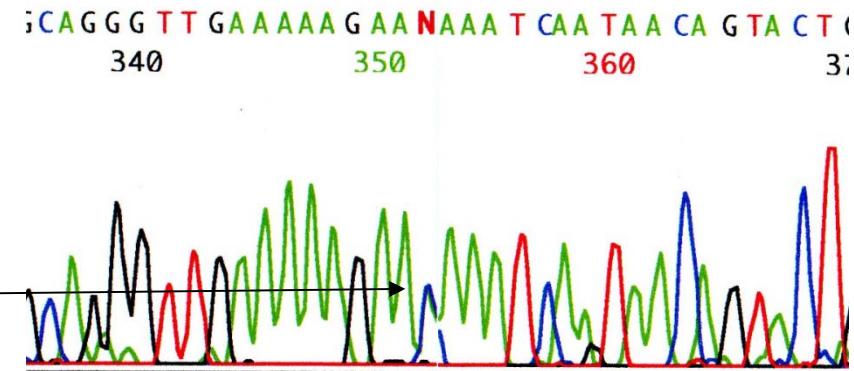


# 現行法の特徴

- ・ダイレクトシークエンス法

- 広範な範囲を測定可能
- ×定量は20%程度

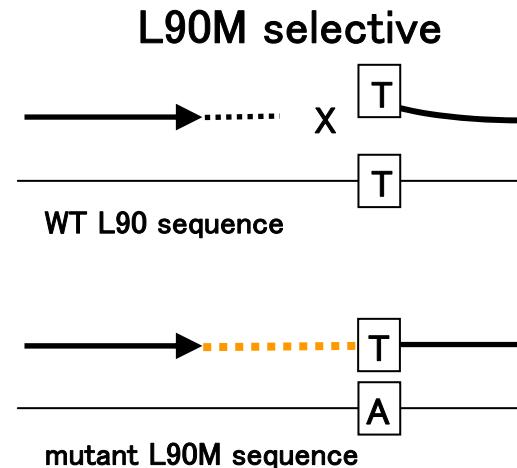
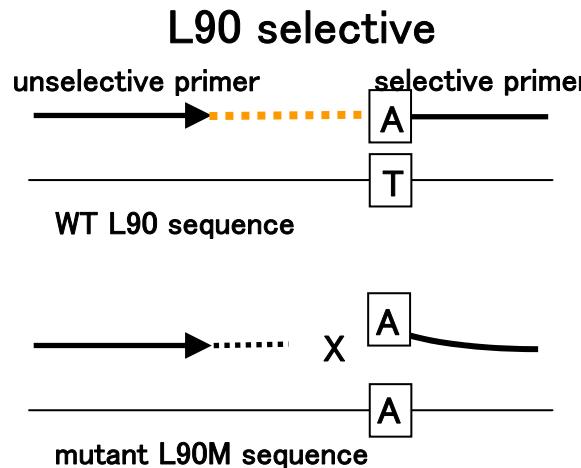
K103K/N NNRTIに対する耐性変異  
50 : 50の場合 (AAA : AAC)



- ・allele-specific real-time PCR法

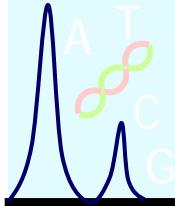
- 微小集団を0.1%まで測定可能

- ×各変異に対応したプライマーが必要、検出できる変異は1塩基



(i)  
AAA → AAN  
AAA, AAC, AAG, AAT  
それぞれ  
プライマーが必要

(ii)  
ACC → TAC ×

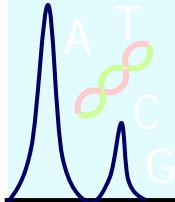


# 目的

---

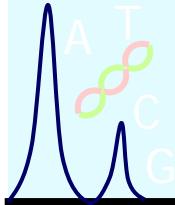
・HIV-1の微小集団を定量する新しい方法を、PCRとクロマトグラフィー・マススペクトロメトリー(LC-MS)を組み合わせることによって開発する。

測定する変異箇所	K103N (RT)
	M184V (RT)
	T215Y (RT)
	L90M (PR)



# 対象HIV-1株

- 以下のウイルス培養上清を対象とした。
  - 野生株 IIIB株
  - 変異株 K2901株
    - M41L, K103N, M184V, T215Y (RT)
    - I54V, G73S, V82A, L90M (PR)
- これらIII株およびK2901株は、シーケンシングと今回 の方法によって、微小集団が検出されないことを確認した。

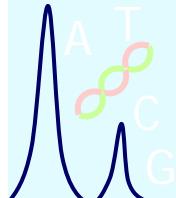


# 方法

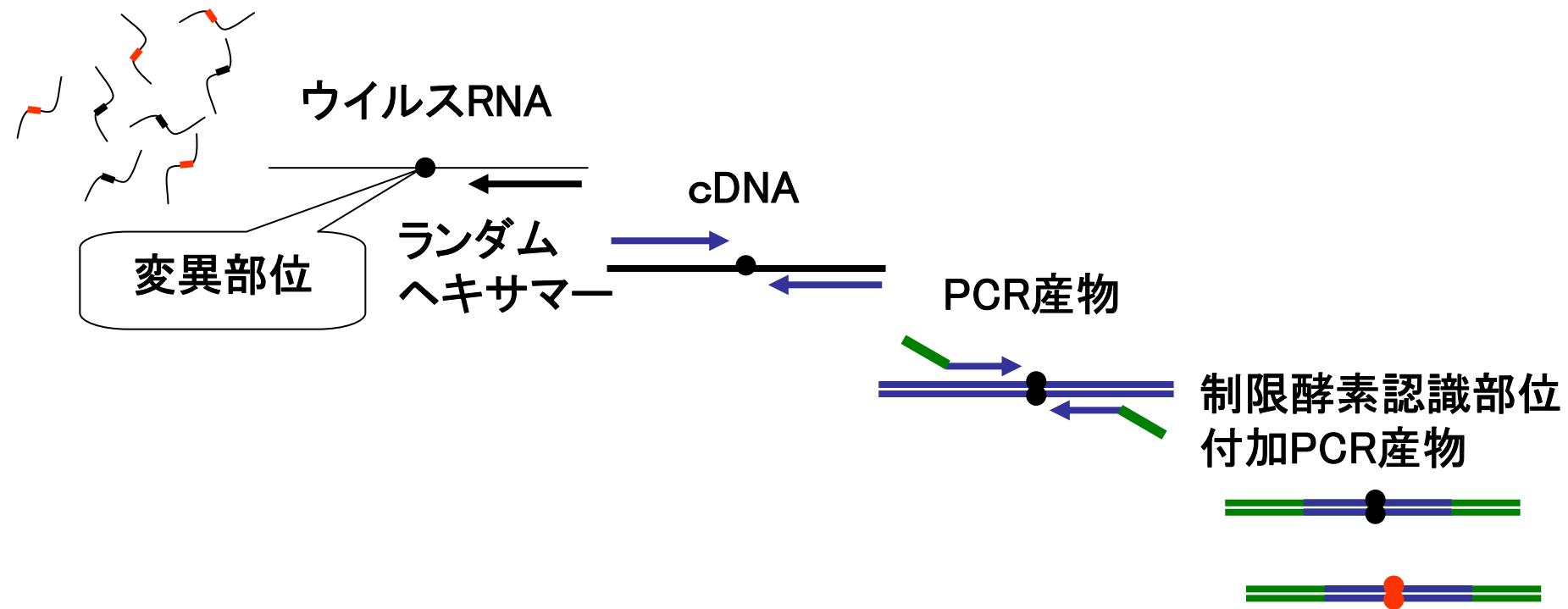
---

1. 野生株と変異株を任意の比で混合
2. RNAを抽出
3. RT-PCR
4. PCR（制限酵素認識部位付加）
5. I型制限酵素切斷
6. LC-MS

脱塩処理（ピペットチップカラム：ZipTip）



# RT-PCRとPCR



RNA抽出

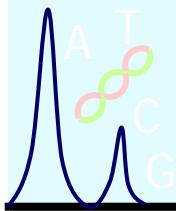
培養上清から  
ウイルスRNAを抽出

RT-PCR

変異の上流と下流に  
プライマーを設定し増幅

PCR

I型制限酵素認識部位  
付加プライマーで再増幅



# 制限酵素切斷

M184Vの場合

野生株

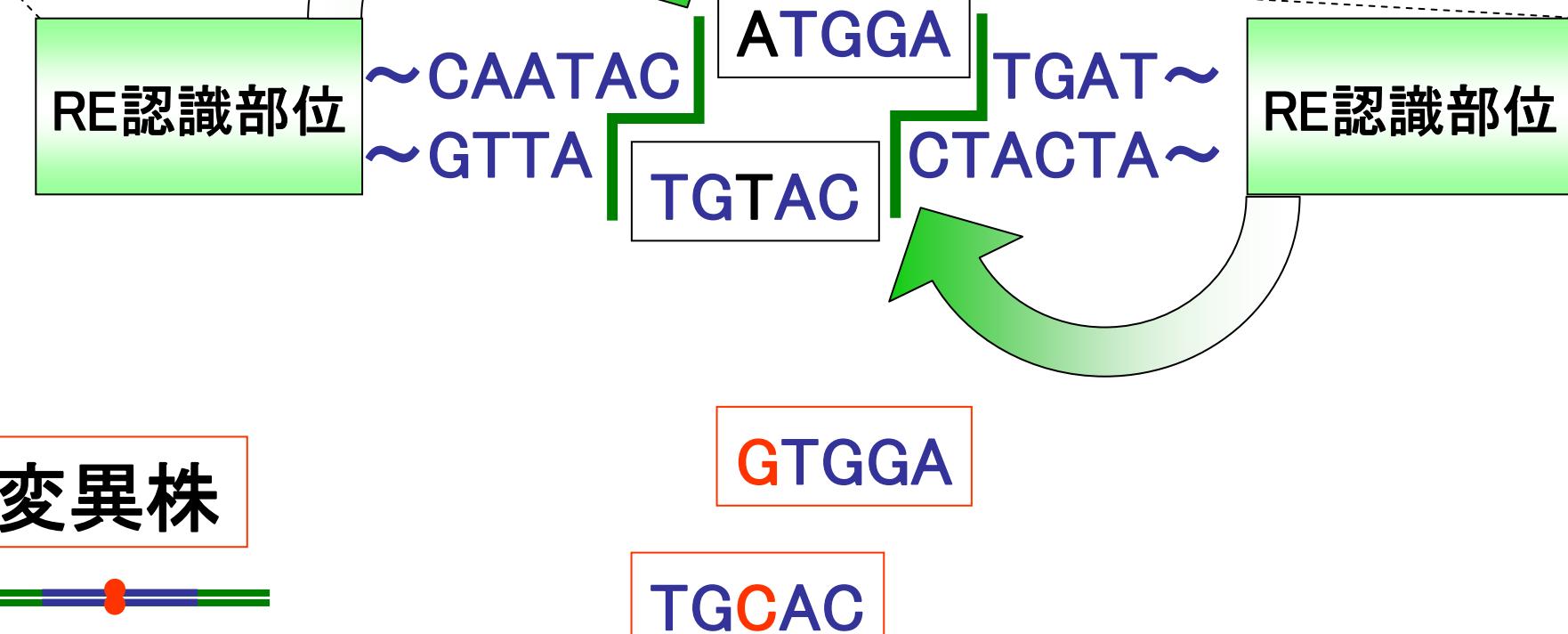
RE認識部位

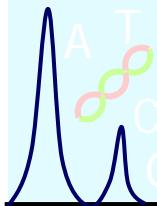
RE認識部位

変異株

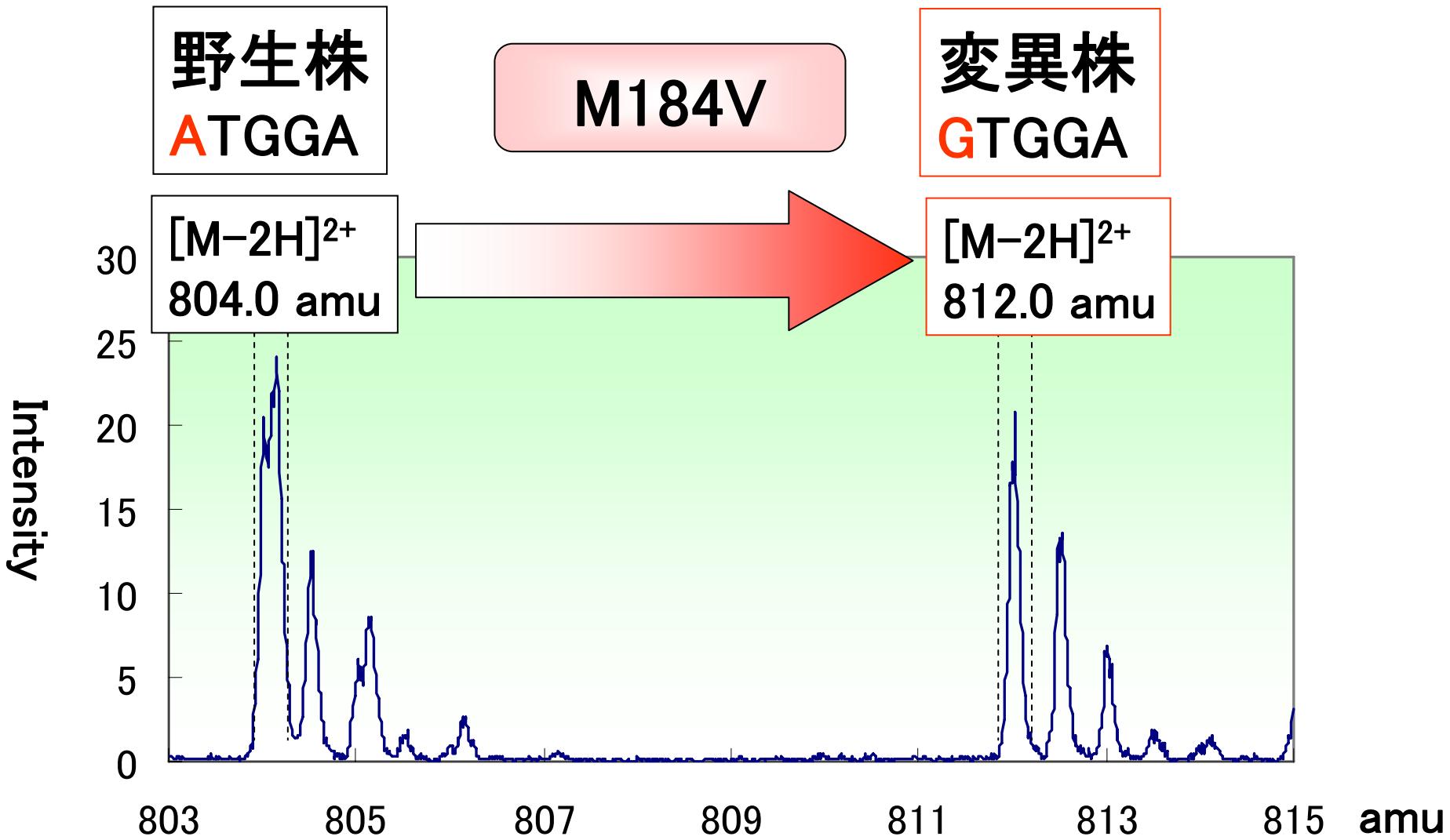
RE認識部位

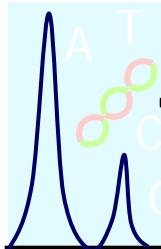
I型制限酵素で切斷



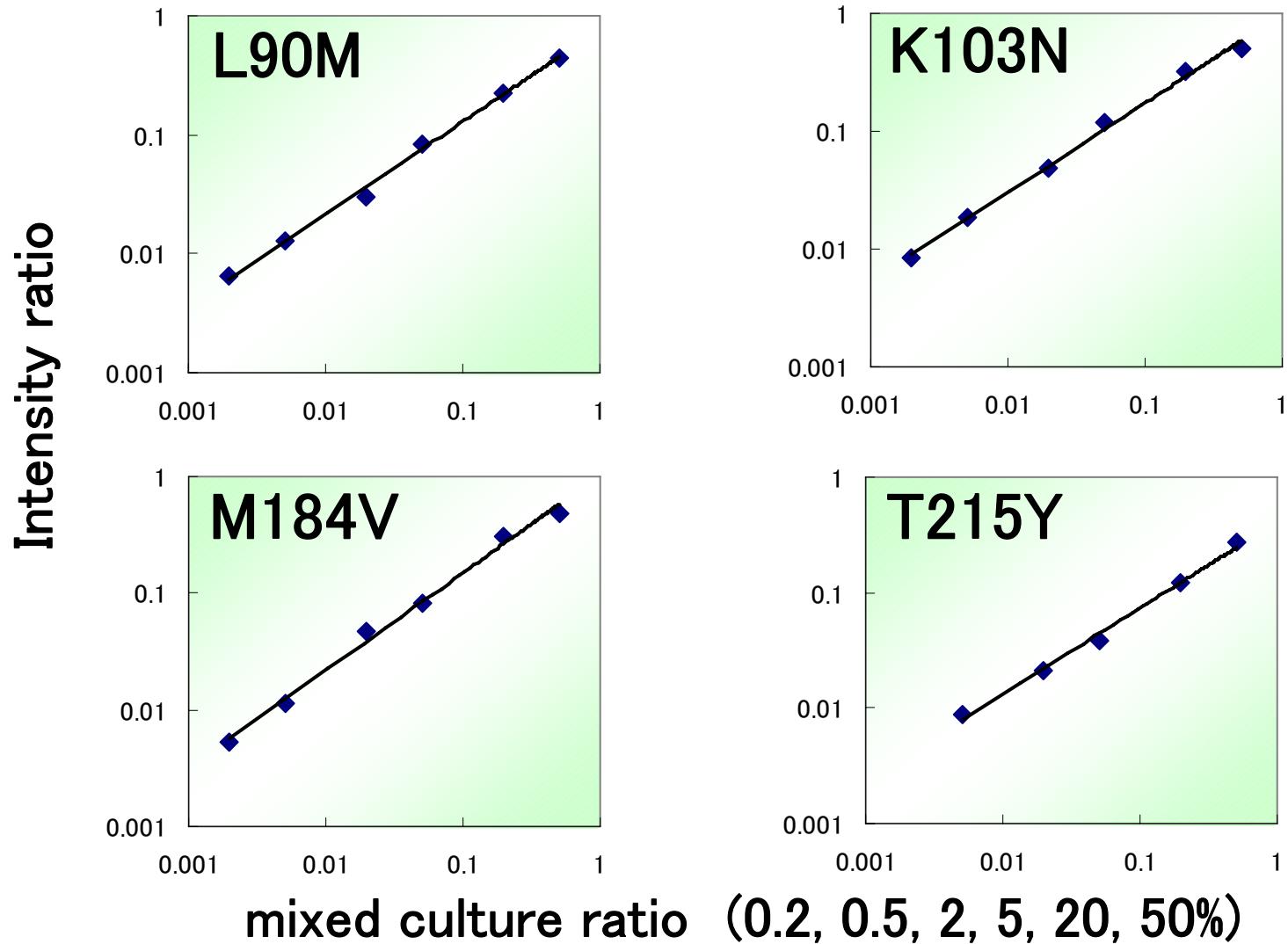


# DNA断片のマス・スペクトログラム





# 耐性変異をもつ微小集団の定量性



# PCR-MSを用いた薬剤耐性微少集団の検出

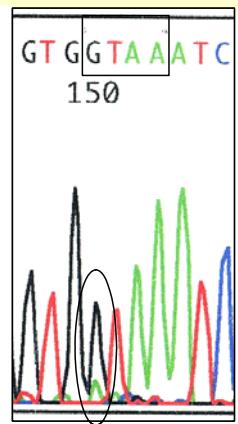
慶應病院に来院した  
HIV新規感染患者について、  
血漿中の薬剤耐性微少集団を測定した。

対象とする薬剤耐性変異

プロテアーゼ: L90

逆転写酵素: K103、M184、T215

No.21のシークエンス



DNA断片

GTAA :T215T  
ATAA :T215I  
(TAAA :T215Y)

2008年新規感染患者: 5例

新規患者 No.	HIV-1 RNA (copies/mL)	耐性変異部位			
		PR	RT	M184	T215
1	44000	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
2	8500	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
3	81000	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
4	93000	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
5	270000	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
6	14000	<0.2	<0.2	ND	ND
7	4900	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
8	60000	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
9	7400	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
10	160000	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
11	32000	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
12	NT	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
13	64000	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
14	100000	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
15	3100	<0.2	<0.2	V: 32%	<0.2
16	120000	M: 0.26%	<0.2	<0.2	<0.2
17	310000	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
18	NT	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
19	74000	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
20	25	ND	<0.2	<0.2	ND
21	NT	<0.2	<0.2	<0.2	I: 28%
22	78000	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
23	120000	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
24	2100	<0.2	N: 7.0%	<0.2	<0.2
25	17000	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
26	11000	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
27	5200	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
28	28000	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
29	24000	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
30	NT	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
31	21000	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
32	31000	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5

# 次世代シークエンサーによる薬剤耐性HIV の遺伝的多様性解析に関する研究

# 目的

- 次世代シークエンサーを用いて、多検体(4~10検体)の逆転写酵素とプレアーゼ領域における薬剤耐性を、微少集団(1%まで)も含めて、一回のランで、定量的に検査できるシステムを構築する。これにより薬剤耐性検査の低コスト化と高感度化を図る。

# 本年度の目標

1. 次世代シーケンサーの出力データから薬剤耐性変異を定量的に解析するためのソフト開発
2. 次世代シーケンサーの固有変異率の測定
3. 人工的混合株を用いたシステムの評価

# RT-PCRのプライマー



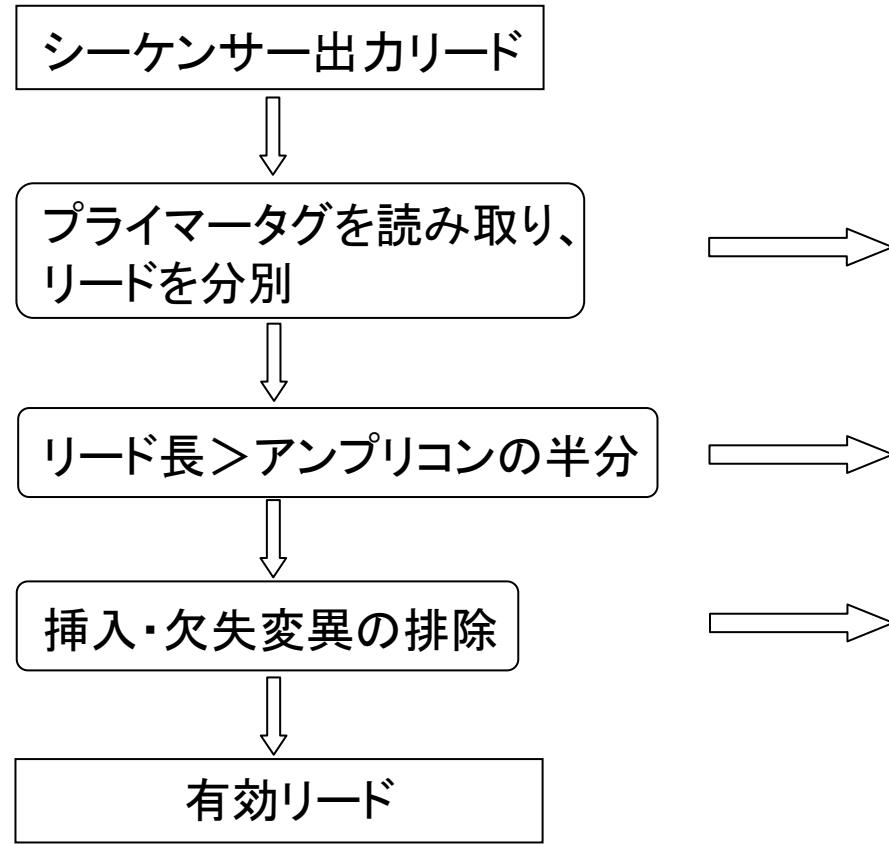
↑  
タグ配列  
プライマーの位置と  
上流・下流、及び検  
体の別を認識

↑  
標的の特異的塩基配列  
RTの上流半分、RTの下流半分、  
PR、及びそれらの上流と下流

# 使用シーケンサー機種

- Roshe GS FLX
- 北海道システム・サイエンス株式会社
- プラン15
  - ~15 Mb
  - 36万円

# 有効リードの選択アルゴリズム





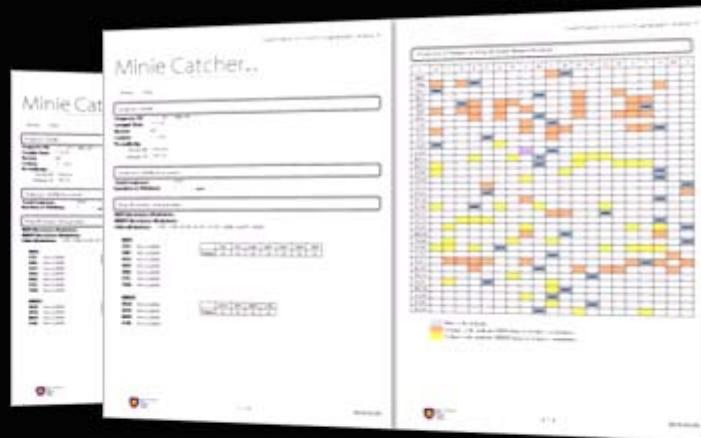
# Minie Catcher

ver 1.0

Quantification of Minority Drug Resistant HIV-1 Variants

Start analysis

Quit program



Keio University  
1858  
CALAMVS  
GLADIO  
INERTIOR



# Minie Catcher

ver 1.0

Quantification of

Start analysis

Quit program

Input profile

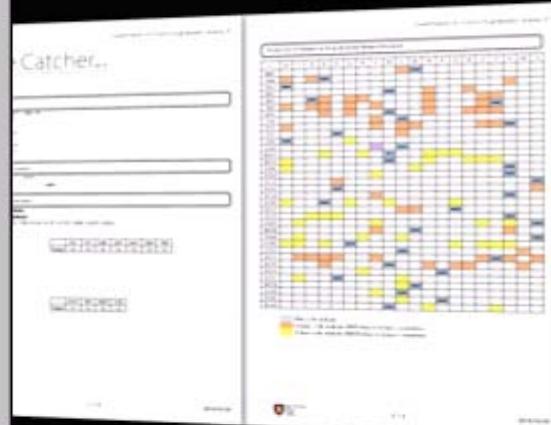
Patient No. C\*\*\*

Sample No. SP\*\*\*

RNA

DNA

Sample date 7/1/10



Keio University  
1858  
CALAMVS  
GLADIO  
FORTIOR



# Minie Catcher

ver 1.0

Quantification of Minority Drug Resistant HIV-1 Variants

Start analysis



Quit program



Keio University  
1858  
CALAMVS  
SACADO  
PORTCAB



# Minie Catcher

ver 1.0

Quantification of Minority Drug Resistant HIV-1 Variants

Start analysis



View results

Quit program

RT

PR



Keio University  
1858  
KALAMON  
SEIYAKU  
PORTER

## Frequency of Variants at Drug Resistant Related Positions

%	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
M41			2.0					2.0		1.3	67.8				2.0		4.6	1.3	18.4	
E44				71.7		10.5			158							1.3				
A62	84.1											11.7				2.8		14		
K65			6.3					91.3							2.4					
D67			49.2	4.1								1.6		7.4	5.7		31.1			
T69										29.4							50.4	1.7	8.4	
K70									49.2	1.7	6.8	30.5								
L74									11.9	7.9	44.6						9.9			
V75										3.0	3.0					10.9	22.8	33.7		
F77			1.0		454			2.1		19.6						5.2	3.1		1.0	
A98	30.0			3.3		16.7									26.7	23.3				
L100						3.3			33.3	30.0						3.3				
K101				6.7					90.0											
K103				20.0					60.0			6.7			6.7				6.7	
V106												20.7		10.3		24.1	20.7	17.2		
V108						3.6			17.9						3.6	3.6	21.4	28.6	14.3	
Y115	19.0	7.9			11.1		19.0	20.6		3.2	4.8					1.6			12.7	
F116	1.5				292		4.6	27.7		1.5	1.5				1.5	1.5	6.2	4.6		
V118	1.4				15.7		1.4	1.4		8.6				5.7	15.7		32.9		11.4	
E138					83.5						3.4	1.9			4.9					
Q151						1.6	3.0							2.0	81.7	6.1		4.4		
V179										4.0								95.1		
Y181								4.1											95.0	
M184											94.5							4.4		
Y188																			99.0	
G190						99.8														
L210		2.2		3.3						49.9								7.8		
T215						11.1				2.8				41.6				35.9		
K219										89.4					6.0			2.2		
P225					1.2					1.4	31.9			5.5	38.1			7.5	12.6	
F227						35.0		5.5	7.6		3.7				11.9			33.1	1.9	
M230						52		1.6	13.4					38.1				1.8		
L234								1.8		1.6				5.6	8.1			31.3	6.1	
P236										2.1	6.1			32.1				41.4		
K238										7.2	39.5	1.3			5.6	30.5	12			
																		1.3		

Orange cells indicate NRTI drug-resistance mutations.

Yellow cells indicate NNRTI drug-resistance mutations.

Quantification of Minority Drug Resistant Variants: PR

Frequency of Variants at Drug Resistant Related Positions

%	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
L10			1.7							7.4			8.6			2.8	78.4			
V11											12			80.0			52	5.3		7.5
L23					6.4					1.3	18.8							71.7		
L24											20.4								77.5	
D30			18.8												1.6	77.1				
V32								1.9										18.9	78.1	
L33											19.0				1.5			77.2		
E35			19.6													77.8				
K43										19.1		78.9								
M46											75.7	19.6			1.8					
I47										21.7	2.3		34.0	37.2				2.3		
G48			34.6				20.9		34.7							7.1				
I50					6.7		70.4		20.4		1.3									
F53					5.5	21.7	36.5					1.7					26.9		6.7	
I54						51.7	3.3		21.1		10.7							1.6	5.9	4.5
Q58					10.2					22.3					21.5	30.5	2.9	4.5	3.0	
A71	22.3							2.5	4.0	40.5	1.3						4.1	1.6		
G73	2.0		16.0				7.1		31.3		4.3						4.5	12		21.7
T74			25.2				5.6		10.1							1.1	21.8	22.8	2.0	5.7
L76									4.6		22.8					4.3		21.6	2.1	30.8
V82		42						4.1			11.2				30.6			1.1	23.6	23.0
N83		21.3										4.3		23.1	2.2	4.3		10.4	2.7	30.4
I84		1.3						4.5	23.3						30.3		21.5		4.0	
N88					15.0		2.1		1.3	25.2					24.4			29.6		1.3
L89			1.1		4.8					10.7	22.2	24.1			29.6			1.7	3.7	
L90			9.6						4.5	1.1	50.7				1.4				16.9	54
																	3.7		4.6	

 Green cells indicate PI drug-resistance mutations.



# Minie Catcher

ver 1.0

Quantification of Minority Drug Resistant HIV-1 Variants

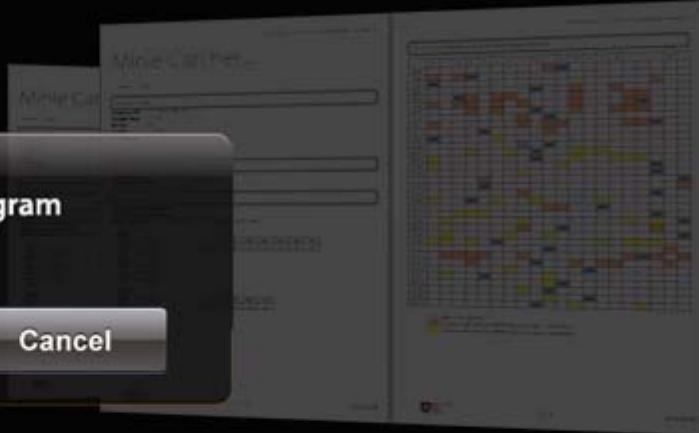
Start analysis

Quit program

Reset program

OK

Cancel



Keio University  
1858  
CALAMUS  
LACRUMES  
FOSTERIA



# Minie Catcher

ver 1.0

Quantification of Minority Drug Resistant HIV-1 Variants

Start analysis

Quit program

X

Select patient ID

<input checked="" type="radio"/>	I
<input type="radio"/>	II
<input type="radio"/>	III
<input type="radio"/>	IV

OK



Keio University  
HIV  
CALAMVS  
Software  
Project

# エラー率の測定

- 限界希釈でクローン化したHIV-1 LAI RNAを用いてエラー率を求めた。
  - 解析リード: 30,000 (全リード47,000)
  - タグ配列欠失: 2,674
  - リード長不足: 12,651 (平均リード長264 nt)
  - 挿入・欠失: 10,401
  - 有効リード: 4,274
- エラー率: 0.21%
  - 2%までの希少変異株を定量可能?

# 第18回国際エイズ会議の報告

From AIDS 2010 in Vienna, Austria



- Rights Here, Right Now
  - For all people
    - Positives; MSM, Gays, and Transgenders; Sex workers; Drug users
  - The Vienna Declaration
- Beginning of the end
  - Treatment for Prevention
    - Test and Treat, confined with human rights
    - When to start ART, <350 cells/ $\mu$ l, adverse effects
  - Microbicide gel with 1% Tenofovir (CAPRISA 004 Trial)
    - Efficacy of Microbicide and PrEP; Women's decision
  - Cure
    - Eradication of Reservoir
  - Combination prevention
    - Behavioral, Biomedical, and Structural
- Global funding for Universal Access



[www.HIVHumanRightsNow.org](http://www.HIVHumanRightsNow.org)



VIENNA  
2010



Prison  
is not a  
treatment

- Rights Here, Right Now
  - For all people
    - Positives; MSM, Gays, and Transgenders; Sex workers; Drug users
  - The Vienna Declaration
- Beginning of the end
  - Treatment for Prevention
    - Test and Treat, confined with human rights
    - When to start ART, <350 cells/ $\mu$ l, adverse effects
  - Microbicide gel with 1% Tenofovir (CAPRISA 004 Trial)
    - Efficacy of Microbicide and PrEP; Women's decision
  - Cure
    - Eradication of Reservoir
  - Combination prevention
    - Behavioral, Biomedical, and Structural
- Global funding for Universal Access