

#### 4. 治療にともなう副作用

現在まで治療が継続できている1例では、治療9ヶ月での値はCD4数115/mm<sup>3</sup>・HIVRNA検出感度未満であった。この1例ではsaquinavir導入以前の8ヶ月前にritonavir800mgを1ヶ月内服した既往があるが、肝機能障害にてritonavirの治療は中断となっていた。またこの症例(SQV+3TC)ではd4T60mgの併用も試みられたが、消化器症状が強くなり2日間にて中断されている。

治療中断3例での中断原因は、全身倦怠感の進行(総ビリルビンが5mg/dlまで上昇)・肝機能障害(総ビリルビンが21mg/dlまで上昇)・消化管出血(胃静脈瘤からの頻回の出血)であった。肝機能障害は治療の中止により症状は軽快している。胃静脈瘤からの頻回の出血は、内視鏡的食道静脈瘤結紮術施行後に合併した胃静脈瘤の悪化と時期が重なっている可能性もある。

#### 5. Saquinavirの血中濃度

4例全例においてsaquinavirの血中濃度測定を施行した。血中濃度測定はsaquinavirの開始より平均162日後(50-401)にtrough値を測定した。結果は平均295ng/ml(181.5-555.0)であった。2例においては2時間後の値も測定し、178.3 ng/mlと399.5 ng/mlという結果であった。

#### 考 察

HIV/AIDSの臨床における近年の驚異的な予後の改善は、多剤併用療法と強力な抗レトロウイルス効果をもつプロテアーゼ阻害剤の登場である。しかしこの治療法にも問題点が幾つか存在する。その問題の1つが肝機能障害である。プロテアーゼ阻害剤治療時の肝機能障害には、薬剤自体の肝細胞への負担とプロテアーゼ阻害剤使用による

表2 SQVを含んだ抗HIV療法の経過

症例	1	2	3	4
治療歴				
逆転写酵素阻害剤	AZT+ddl	AZT	AZT	AZT/ddl
プロテアーゼ阻害剤	なし	RTV800mg	SQV1200mg	なし
直前の治療	AZT/ddl	なし	なし	d4T40/3TC150
SQV治療				
SQV投与量	1800mg	1200mg	1200mg	1200mg
他の逆転写酵素阻害剤	3TC300mg d4T60mg	3TC300mg		3TC150mg d4T40mg
SQV治療前				
CD4(/mm <sup>3</sup> )	130	104	0.5	103
HIVRNA(copy/ml)	4500	1500	32000	1500
治療後4週目				
CD4(/mm <sup>3</sup> )	120	103	12.7	79
HIVRNA(copy/ml)	UD	UD	440	UD
中断前				
CD4(/mm <sup>3</sup> )	95	*115	25	60
HIVRNA(copy/ml)	UD	*UD	43000	UD
治療中断の有無	(+)	(-)	(+)	(+)
治療期間(週)	66	65	9	45
SQV血中濃度測定				
治療開始からの期間(日)	401	80	50	116
SQV濃度				
trough(ng/ml)	258.8	555	181.5	185.6
peak(ng/ml)	178.3	399.5		
SQV療法における副作用	全身倦怠感 腹水出現	なし	黄疸(T-bil 21mg/dl)	胃静脈瘤からの出血症状 が頻回化
その他		RTV投与にて肝機能障害 ALT412/T-bil3.9	前回SQVでは胃潰瘍から の出血	

HCVの再活性化による肝細胞障害の2つの可能性が考えられる。HCV合併肝硬変の場合には特にこの肝機能障害が問題となる。他の問題点は血友病患者における出血傾向の増悪の可能性である。肝硬変患者においては食道静脈瘤合併の問題も存在する。プロテアーゼ阻害剤の使用による食道静脈瘤からの出血の可能性は十分考慮にいれなければならない。

### 1. HIV・HCV・肝硬変合併の血友病患者におけるプロテアーゼ阻害剤の使用の適応について

そもそもこのような患者(HCV・肝硬変合併の血友病患者)において抗HIV療法の適応があるのかどうか問題となる。ここで治療の是非に関して重要な要素はCD4数と考えられる。CD4数が低下した段階では、HIV感染症に関係する日和見疾患の合併症により予後が決定されてしまう。CD4数が $500/\text{mm}^3$ 以上においては肝硬変に伴う予後がHIVによる予後より深刻である可能性が高い。このような段階では、肝障害の可能性のある抗HIV療法の適応は強いものとは考えられない。1つのCD4数の目安は $200/\text{mm}^3$ と考えられる。この値は米国のAIDSの診断基準でもある。即ち $200/\text{mm}^3$ 未満ではAIDSに関連する日和見感染症が多発してくることが予測できる。カリニ肺炎に対する予防の開始も必要となる。しかし本邦において特に重篤・重症な日和見疾患がある患者に累積的に発症してくるのはCD4数が $50/\text{mm}^3$ 以下の状態である。最近ではこのCD4数が $50/\text{mm}^3$ 以下の状態では非定型抗酸菌症の予防が必要と考えられている(尚トキソプラズマ抗体陽性患者においてはCD4数が $100/\text{mm}^3$ 以下ではST合剤2gの予防が必要である)。CD4数が $200/\text{mm}^3$ 未満においてもまだ何とか余裕はあるが、CD4が $50/\text{mm}^3$ 以下の状態ではHIV感染症に関連する疾患の危険性が非常に高い。この段階での代表的な日和見疾患である非定型抗酸菌症において、マクロライド系を含んだ治療と含まなかった治療での予後の比較の報告では、median survivalはマクロライド系を含んだ治療において8.7ヶ月であり含まない治療では5.2ヶ月であった<sup>4)</sup>。無治療ではより予後は不良と考えられ、また通常の治療としては、Clarithromycin 1000mg/

(Rifabutin 300mg)/Ethambutol 750-1250mg/Ciprofloxacin 750mgなどの併用が必要となり、多量の抗菌薬が必要となる。しかも、抗HIV療法がなければ結局予後不良である。他の代表的な日和見疾患はCytomegalovirus感染症(特にCMV網膜炎)であり、これは患者のQOLへの影響も大きく予後不良な疾患である。治療の導入療法は $10\text{mg}/\text{kg}$ のGanciclovir(GCV)全身投与を2~3週後維持療法となる。維持療法もGCV眼内植え込み術やGCVの眼内注射等の局所療法でなければ、 $5\text{mg}/\text{kg}$ のGanciclovir(GCV)全身投与を生涯続けなければならない。この疾患も同様に抗HIV療法がなければ結局予後不良である。他に予後不良の日和見疾患の合併(悪性リンパ腫・進行したカポジ肉腫・繰り返す細菌性肺炎・クリプトコッカス髄膜炎・食道カンジタ症・進行性多巣性白質脳症・トキソプラズマ脳炎・アスペルギルス感染症等)が累積的に発症し、これに対して長期大量の治療薬の使用が不可避となる。

以上述べたように、CD4数が $50/\text{mm}^3$ の付近ではこのような日和見疾患の合併の危険性が高いことより、プロテアーゼ阻害剤による治療の目安として、CD4数が $100/\text{mm}^3$ を1つの指標と考えた。今回治療を試みた患者のCD4数は $103/104/0.5/103/\text{mm}^3$ であり、患者の同意とともに、上記理由より抗HIV療法としてプロテアーゼ阻害剤の使用の適応があると考えられた。特にCD4数が $0.5/\text{mm}^3$ の症例3の場合、既にAIDSの状態であり、さらに他の日和見疾患の合併の危険性は非常に高いと考えられる症例であった。

### 2. プロテアーゼ阻害剤の効果について

4例中3例においてHIVRNA量は検出感度未満となり、この検出感度未満の状態は2例においては治療中断まで持続し、1例においては現在まで持続している。症例3では治療開始4週目をボトムにHIVRNA量の再上昇が認められた。症例3のみSQVの単剤療法であった。この症例3においては数日間のSQV投与歴が半年前にあったが、その投与歴が及ぼした影響に関しては不明であった。CD4数の上昇は症例2と3で認められ、症例1と4では認められなかった。症例2でのCD4の上昇が有意なものかどうかは不明であるが、症例3で

の CD4 の上昇 ( $0.5/\text{mm}^3$  から  $25/\text{mm}^3$ ) は、繰り返す細菌性肺炎の軽快が認められ有意な上昇と考えられた。しかしこの症例は肝機能障害のため9週にて治療の中断を余儀なくされた。

### 3. プロテアーゼ阻害剤による治療の副作用について

副作用により4例中3例が治療中断となった。治療中断までの期間は9週から66週であり、症例1: 全身倦怠感の進行・症例2: 黄疸 (T-bil 21mg/dl)・症例3: 繰り返す胃静脈瘤からの出血が中断の原因であった。症例1ではSQVの治療中に腹水の出現も認められた。症例3では内視鏡的食道静脈瘤治療の既往があり、SQV治療開始時から胃静脈瘤の存在が問題となっていた。この症例においてはSQVの治療開始後より数回の胃静脈瘤からの出血が認められた。他の症例にも食道静脈瘤が存在したが、これらの症例ではSQV治療期間中に明らかな食道静脈瘤からの出血の頻度の上昇は認められなかった。治療の継続ができていない症例2では8ヶ月前の ritonavir 投与にて4週目に肝酵素の上昇が認められていたが、SQVでは経過観察65週以上で肝酵素上昇は認められていない。SQVがritonavirよりも肝細胞への負担の少ない薬剤である可能性が考えられた。

### 4. Saquinavirの血中濃度について

4例に関してSQVの血中濃度測定を早朝のtrough値として施行した。治療開始後50～401日後に測定を施行した。2例では2時間後の測定も施行した。SQV単独の血中濃度はtrough値で100ng/ml程度と考えられている。4症例においてはtrough値は181.5-555ng/mlであり、肝機能障害にともなうSQV血中濃度の上昇が考えられた。SQVはritonavirとの併用療法により血中濃度が上昇することが知られている。その場合のSQVのtrough値は1000ng/ml以上(3000ng/ml前後)であることが報告されている<sup>5)</sup>。今回検討した4症例においては、SQVの濃度はritonavirとの併用療法ほどの強い上昇は認められていない。この結果からは、肝硬変に伴う異常なSQV血中濃度上昇により副作用が認められたわけではないと考えられた。

## 結 論

4例のHIV・HCV・肝硬変合併の血友病患者に抗HIV療法であるSQVの治療を試み、HIVRNA量の低下は3/4例に認められたが、CD4の回復は1/4例にしか認められなかった。4例中1例は全身倦怠感増強、1例は肝機能障害、1例は出血傾向の増悪のため治療中止となった。4例にsaquinavirの血中濃度測定を試み、全例において軽度の血中濃度の上昇が認められた。合併症の重症度からは、HIV・HCV・肝硬変合併の血友病患者でのprotease inhibitor (saquinavir) の治療は慎重に考慮すべき方法であると考えられた。

尚今回の症例検討に協力していただいた、社会保険総合中央病院内科浜田勉医師、新潟市民病院内科真田雅好医師、福井赤十字病院内科豊岡重剛医師に深謝いたします。

## 参考文献

- 1) 白幡聡, 宮川隆之, 高山成伸, 目黒崇: 肝炎 Biochemical Perspectives 4:245-251,
- 2) Zylberberg H, Pol S.: Reciprocal Interaction Between Human Immunodeficiency Virus and Hepatitis C virus Infections. Clin Infect Dis 23:1117, 1996.
- 3) Vento T, Garofano C, Renzini F, et al.: Enhancement of hepatitis C virus replication and liver damage in HIV-coinfected patients on antiretroviral combination therapy. AIDS 12: 116-117, 1997.
- 4) Shafran SD, Singer J, Phillips P, The Canadian MAC Study Group: Canadian randomized open-label trial of combination therapy for MAC bacteremia: final results (Abstract LB-20). 35th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Francisco, CA, 1995.
- 5) Merry C, Barry MG, Mulcahy F, et al.: Saquinavir pharmacokinetics alone and in combination with zidovudine in HIV-infected patients. AIDS 11:F29-F33, 1997.



## トランスジェニックマウスを用いた C型肝炎ウイルスによる肝発癌機構の解明

小池 和彦<sup>1)</sup>、森屋 恭爾<sup>2)</sup>、藤江 肇<sup>2)</sup>、新谷 良澄<sup>1)</sup>、木村 哲<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>東京大学大学院医学系研究科 感染症内科

<sup>2)</sup>東京大学医学部附属病院 内科

### 研究要旨

- (1) C型肝炎ウイルス(HCV)コア遺伝子、エンベロープ遺伝子をもつトランスジェニックマウスの独立した系統をそれぞれ2系統ずつ樹立した。
- (2) コア遺伝子トランスジェニックマウスでは、3か月齢から肝において著明な脂肪化 (steatosis)の出現をみた。
- (3) このトランスジェニックマウス肝における脂肪化は、ヒト慢性C型肝炎における組織上の特徴である脂肪化を再現していると考えられる。ヒト慢性C型肝炎における脂肪化にコア蛋白が重要な役割を果たしていることが示唆された。
- (4) エンベロープ遺伝子トランスジェニックマウスにおいては、肝に24か月間にわたって、炎症、腫瘍等の変化は見られなかった。
- (5) コア遺伝子トランスジェニックマウスでは、16か月齢以降に、肝にアデノーマおよび肝細胞癌を発生した。

分担研究者：木村 哲

研究協力者：小池和彦、森屋恭爾、藤江 肇、新谷良澄

### The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice

Kazuhiko Koike<sup>1)</sup>, Kyoji Moriya<sup>2)</sup>, Hajime Fujie<sup>2)</sup>, Yoshizumi Shintani<sup>1)</sup>, Satoshi Kimura<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Infectious Diseases, Graduate School of Medicine, University of Tokyo

<sup>2)</sup>Department of Internal Medicine, University of Tokyo Hospital

## 目 的

ヒト慢性C型肝炎における肝発癌の機序はまだ全く不明である。チンパンジー以外にC型肝炎の疾患モデルがないことも、その解明の妨げとなっている。我々はHCVのコア遺伝子、エンベロープ遺伝子をそれぞれ導入してトランスジェニックマウスを作製し、C型肝炎における病態の解明、肝発癌機序の解明を行なう。

## 方 法

HCVのコア遺伝子とエンベロープ遺伝子を以下のようにマウス受精卵に導入した。

## 結 果

- (1) B型肝炎ウイルス(HBV)のエンハンサー、X遺伝子のプロモーター、ポリ A シグナルを用いて、HCV コア遺伝子、エンベロープ遺伝子を発現させるプラスミドを作製する。これらのプラスミドは培養細胞にて、その蛋白の発現を確認してある。
- (2) コア遺伝子、エンベロープ遺伝子のそれぞれについて、5~6匹のファウンダーマウスが得られた。これらからそれぞれ3~4コピーの導入遺伝子をもつマウスを3匹選び、掛合わせを行ない、F1 マウスを得た。
- (3) これらのF1 マウスにおける各導入遺伝子の発現をチェックして発現の良好なマウスをコア、エンベロープのそれぞれについて2系統ずつ選び、独立したトランスジェニックマウスのラインを樹立した。
- (4) エンベロープ遺伝子トランスジェニックマウスにおいては、肝に24か月間にわたって、炎症、腫瘍等の変化は見られなかった。
- (5) これに、対してコア遺伝子マウスでは、3か月齢から肝において脂肪滴の著明な蓄積を認めた。この脂肪化 (steatosis) は進行性であり、9か月齢では肝重量の50%が脂肪となっていた。炎症所見は全く認められなかったが、16か月齢以降に肝にアデノーマ、肝細胞癌を発生した。

## 考 察

HCVのコア遺伝子、エンベロープ遺伝子をもつトランスジェニックマウスを作製したところ、エンベロープにおいては肝は全く正常であった。一方、コア遺伝子トランスジェニックマウスにおいては初期より脂肪肝が発生し、マウスの寿命の後半において肝細胞癌が発生した。肝腫瘍は、脂肪化した正常肝細胞の中から生じ、それを圧排するように存在した。さらに、脂肪化の強い比較的良性的な腫瘍の中から、悪性度の高い肝癌が「結節中結節」の形で発生してきたが、後者にはほとんど脂肪が認められなくなっていた。肝の脂肪化、早期肝癌の脂肪化、「結節中結節」としての悪性度の上昇と脂肪化の消失は、ヒトC型肝炎関連肝癌における性状と酷似している。今回の我々の結果は、HCV コア蛋白が肝発癌に関与していること、HCVその者が肝発癌に直接的に関与している可能性を示すものである。また、本マウスは肝癌発生の分子病理学的イベントを明らかにするのに、最適なモデルと考えられる。

## 結 論

HCVはトランスジェニックマウスにおいて肝細胞癌を誘発する。肝発癌へのHCVの直接的な関与が実験的に初めて示された。

## 発 表

- 1) H. Yotsuyanagi, K. Moriya, Y. Shintani, H. Fujie, K. Bandai, M. Makuuchi, S. Kimura, K. Koike. Hepatitis G virus in the liver and serum of patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 8:21-27, 1997.
- 2) K. Koike, K. Moriya, H. Yotsuyanagi, Y. Shintani, H. Fujie, K. Ishibashi, Y. Matsuura, K. Kurokawa, T. Miyamura. Sialadenitis resembling Sjogren's syndrome in hepatitis C virus envelope gene transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:233-236, 1997.
- 3) K. Moriya, H. Yotsuyanagi, Y. Shintani, H. Fujie, K. Ishibashi, Y. Matsuura, T. Miyamura, K. Koike. Hepatitis C virus core protein induces hepatic steatosis in transgenic mice. *J Gen Virol* 78:1527-1531, 1997.

- 4) K. Moriya, H. Fujie, H. Yotsuyanagi, Y. Shintani, T. Tsutsumi, Y. Matsuura, T. Miyamura, S. Kimura, K. Koike. Subcellular localization of hepatitis C virus structural proteins expressed in transgenic liver. *Jpn J Med Sci Biol* 50:169-177, 1997.
- 5) T. Maruyama, S. Kuwata, K. Koike, S. Iino, K. Yasuda, H. Yotsuyanagi, K. Moriya, H. Maekawa, H. Yamada, Y. Shibata, DR. Milich. Pre-core wild type DNA and immune complexes persist in chronic hepatitis B after seroconversion: no association between genome conversion and seroconversion. *Hepatology* 27:245-253, 1998.
- 6) H. Yotsuyanagi, K. Moriya, Y. Shintani, H. Fujie, T. Tsutsumi, S. Kimura, K. Koike. Regulation of Fas gene expression in HeLa cells as determined by modified RT-PCR. *Cell Mol Life Sci* 54:186-190, 1998.
- 7) H. Yotsuyanagi, K. Yasuda, S. Iino, K. Moriya, Y. Shintani, H. Fujie, T. Tsutsumi, S. Kimura, K. Koike. Persistent viremia after recovery from self-limited acute hepatitis B. *Hepatology* 27:1377-1382, 1998.
- 8) H. Yotsuyanagi, K. Koike, M. Meng, I. Ogata, K. Kimura, A. Okubo. Exacerbation of autoimmune chronic hepatitis by hantaviral infection. *Scand J Infect Dis* 30:81-83, 1998.
- 9) Y. Koike, A. Yoneyama, J. Shirai, T. Ishida, E. Shoda, K. Miyazaki, S. Sunaga, R. Horie, K. Koike, I. Ogata, T. Tahara, T. Kato, K. Nakahara, K. Kariya, M. Higashihara. Evaluation of thrombopoiesis in thrombocytopenic disorders by simultaneous measurement of reticulated platelets of whole blood and serum thrombopoietin concentrations. *Thromb Haemostasis* 79:1106-1110, 1998.
- 10) K. Moriya, H. Fujie, Y. Shintani, H. Yotsuyanagi, T. Tsutsumi, Y. Matsuura, S. Kimura, T. Miyamura, K. Koike. Hepatitis C virus core protein induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nature Med* 4:1065-1068, 1998.
- 11) K. Koike, K. Moriya, H. Yotsuyanagi, Y. Shintani, H. Fujie, T. Tsutsumi, S. Kimura. Compensatory apoptosis in preneoplastic liver of transgenic mouse model for hepatocarcinogenesis. *Cancer Lett* 134:181-186, 1998.
- 12) H. Fujie, H. Yotsuyanagi, K. Moriya, Y. Shintani, T. Tsutsumi, T. Takayama, M. Makuuchi, Y. Matsuura, T. Miyamura, S. Kimura, K. Koike. Steatosis and intrahepatic hepatitis C virus in chronic hepatitis. *J Med Virol* 1999, in press.



# HIV感染症に対する化学療法下での 薬剤耐性変異株出現についての ウイルス学的検討とその対応

満屋 裕明<sup>1)</sup>、谷口 泉<sup>1)</sup>、松岡 雅雄<sup>1)</sup>、松下 修三<sup>2)</sup>、高松 純樹<sup>3)</sup>、岡 慎一<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup>熊本大学医学部 免疫病態学・内科学第二講座

<sup>2)</sup>熊本大学 エイズ学研究センター

<sup>3)</sup>名古屋大学医学部附属病院 輸血部

<sup>4)</sup>国立国際医療センター エイズ治療・研究開発センター

## 研究要旨

HIV-1感染症患者の治療は多剤併用療法の導入に伴い著しい進歩を見ているが、薬剤耐性 HIV-1 変異株の出現は治療上最も深刻な問題となっている。我々は日本人における HIV-1 の逆転写酵素、プロテアーゼ遺伝子領域の変異の解析を行い使用薬剤との関連について検討した。

抗ウイルス剤投与中の患者より末梢血単核球を分離し、genomic DNA を抽出後、プロウイルス DNA の逆転写酵素、プロテアーゼ部分を PCR で増幅し直接法にて塩基配列の決定を行った。その結果逆転写酵素阻害薬の服用歴と薬剤耐性変異の出現及び化学療法の効果に相関を認めた。逆転写酵素をコードする遺伝子部分の塩基配列を決定したところ M41L、D67N、T69D、K70R、L74V、M184V、L210W、T215Y、K219Q などのアミノ酸置換を認めた。プロテアーゼ部分に関しても L10I、V32I、M36I、M46I、A71V、A71T、V77I、V82T、I84V、L90M などのアミノ酸変異を認めた。治療後のウイルスコピー数との関連はウイルス量が 40 コピー/ml 以上の群では 40 コピー/ml 未満の群に比較して耐性変異数が多い傾向が認められた。治療期間との関連を検討してみると治療期間が長期になると耐性変異数が多くなる傾向を認めた。逆転写酵素領域の 215 番に変異をもつリコンビナントクローンを作成し検討すると T215Y 株は薬剤耐性を付与するが増殖能は低下するが、更に T215S に変異すると増殖能は改善することが明らかになった。

これらの結果は欧米諸国と同様に薬剤耐性株が増加しつつあり、今後更に、そうした臨床例が増加していくことを示唆している。加えて HIV ウイルスは環境に適応するようその薬剤耐性と複製能を変化させることが明らかとなってきている。今回のデータはウイルスコピー数を最大限抑制することによって耐性変異の出現を抑制し得るという欧米でのデータに一致している。血漿 HIV RNA が早期に検出限界以下となるような多剤併用療法を行うことが何よりも必須である事が強調される。

## 目 的

現在HIV-1感染症患者の治療は多剤併用療法の導入に伴い著しい進歩を見ているが、臨床経過において薬剤の急性及び慢性毒性、薬剤耐性株の出現、日和見感染症といった解決しなければならない多くの問題点がある。その中でも薬剤耐性HIV-1変異株の出現は治療上最も深刻な問題となっている。耐性の出現は薬剤の効果を減弱し臨床経過を悪化させるためその多剤耐性の出現状況の解析が強く求められている。我々は日本人におけるHIV-1の逆転写酵素、プロテアーゼ遺伝子領域の変異の解析を行い使用薬剤との関連について検討した。

## 対象および方法

熊本大学医学部付属病院、国立国際医療センター、名古屋大学医学部付属病院の3施設で経過観察中のHIV患者93人を対象とした。平均年齢は29歳、男性91人、女性2人であった。抗ウイルス剤投与中の患者血液よりFicolを用いて末梢血単核球を分離し、genomic DNAを抽出した。その後プロウイルスを含むgenomicDNA0.2 $\mu$ lをtemplateとしてそれぞれ逆転写酵素、プロテアーゼ部分をPCRで増幅し直接法にて塩基配列の決定を行った。

Site-directed mutagenesis法を用いて種々のT215変異レコンビナント感染性クローン(T215Y, T215S, T215N)を作製して野生株と薬剤耐性変異株の性状についてウイルス学的検討を加えた。

## 結 果

3施設での93症例について逆転写領域をコードする遺伝子部分の塩基配列を決定したところM41L、D67N、T69D、K70R、L74V、M184V、L210W、T215Y、K219Qなどのアミノ酸置換を認めた。プロテアーゼ部分に関してもL10I、V32I、M36I、M46I、M71V、A71TV77I、V82T、I84V、L90Mなどのアミノ酸変異を認めた。

この耐性変異数と治療後のHIV RNA copy数の関連について、治療後のHIV RNA copy数が40コピー/ml未満の群と40コピー/ml以上の群に分け耐性変異数との関連を検討した。

その結果2群間で逆転写酵素領域の変異数に有意差(Wilcoxon signed rank test  $p=0.04$ )を認めた。プロテアーゼ領域に関してはRNAコピー数の多い患者に耐性変異が多い傾向が認められたが統計的有意差は認められなかった。(図1)

また逆転写酵素阻害薬に関して抗ウイルス薬の投与期間と耐性変異数の関連について検討した。その結果は3施設において抗ウイルス薬の投与期間と耐性変異数には投薬期間が長くなると変異数が増える傾向が認められた。(図2)

プロテアーゼ阻害薬に関して抗ウイルス薬の投与期間と耐性変異数の関連について検討した。その結果は現段階では投与期間が短く確かな傾向を認めるまでにはいたっていない。(図3)

逆転写酵素のT215の変異を来している3症例を検討するとAZTによる治療期間中にはT215Y株の出現を認めるが治療中止後にはT215S株が優位となっている。(図4)

分担研究者：満屋 裕明、岡 慎一

研究協力者：谷口 泉、松岡雅雄、松下修三、高松純樹

## Analysis of and Strategy against the Emergence of Drug -resistant HIV-1 Variants during Antiviral Therapy

Hiroaki Mitsuya<sup>1)</sup>, Izumi Taniguchi<sup>1)</sup>, Masao Matsuoka<sup>1)</sup>, Shuzo Matsusita<sup>2)</sup>, Junki Takamatsu<sup>3)</sup>, Shin-ichi Oka<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Internal MedicineII, Kumamoto University School of Medicine, <sup>2)</sup>AIDS Reserch Center of Kumamoto University, <sup>3)</sup>The First Division of Internal Medicine Nagoya University School of Medicine, <sup>4)</sup>AIDS Clinical Center International Medical Center of Japan



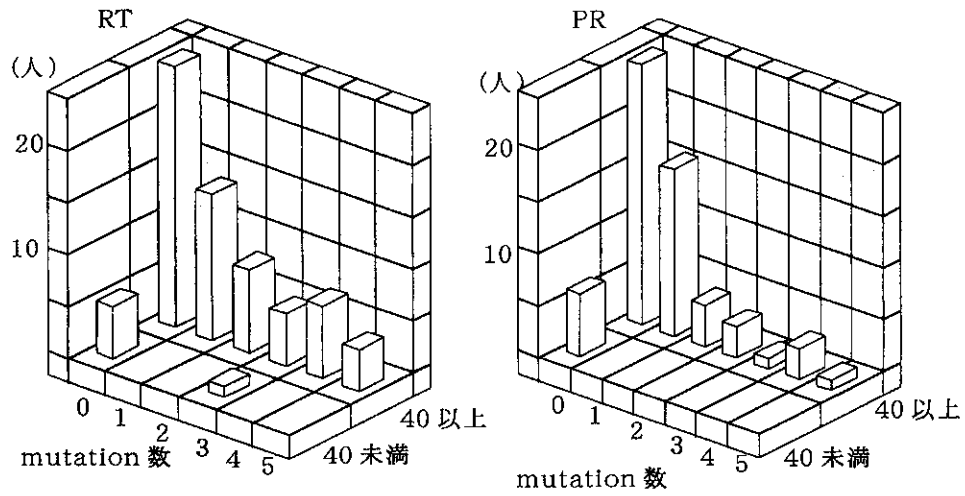


図1 HIV RNA copy 数と耐性変異数の関連

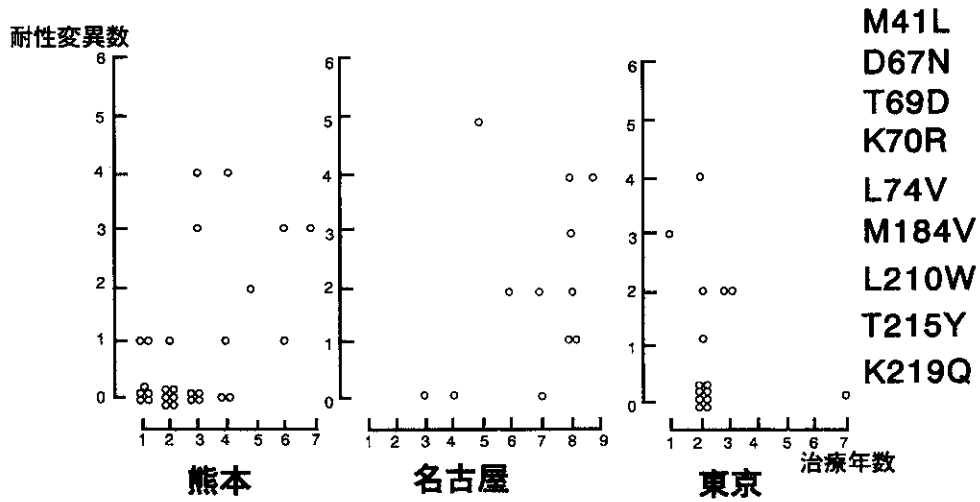


図2 RT 領域の治療年数と薬剤耐性変異数

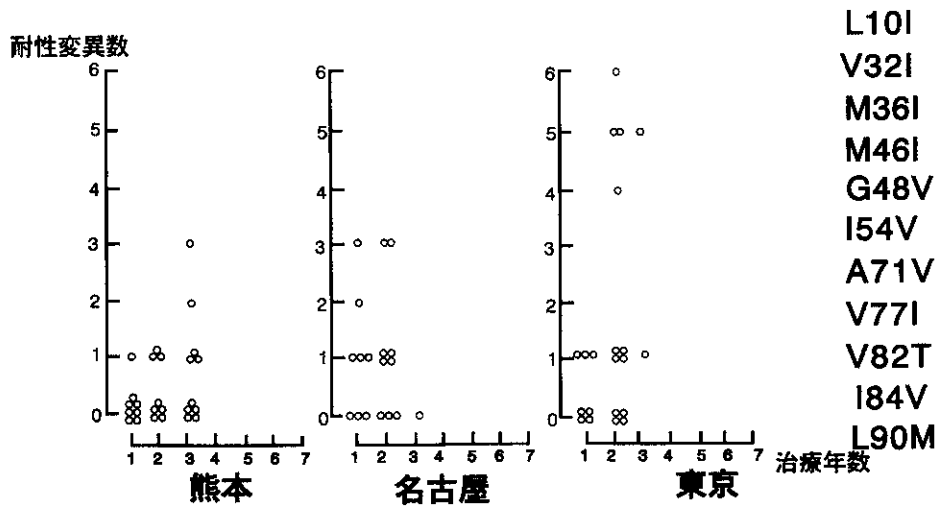


図3 PR 領域の治療年数と薬剤耐性変異数

		<b>210</b>		<b>220</b>
		<b>KIEELRQHLL</b>		<b>RWGLTTPDKK</b>
<b>1005-980910</b>	.....		...FY.....	
<b>1005-981113</b>	.....		...FS.....	
<b>1012-980501</b>	.....	<b>K..F.....</b>		
<b>1012-980626</b>	.....	<b>K..FY.....</b>		
<b>1012-980918</b>	.....	<b>K..F<sub>75</sub>.....</b>		
<b>1032-980508</b>	.....	<b>...F.....</b>		
<b>1032-981002</b>	.....	<b>...F<sub>75</sub>.....</b>		
<b>1032-981113</b>	.....	<b>...FS.....</b>		

図4 HIV-1T215Sの出現

そこでT215変異レコンビナント感染性クローンを作成し薬剤耐性変異と増殖能に関して検討してみると、T215Y株はワイルドタイプと比較して高度のAZT耐性となる。しかしT215Y株の増殖能は著しく低下する。しかしこの215番がさらにT215Sに変異すると、低下していた複製能が回復する。生体内でのAZT投与中はAZT耐性のT215Y株が優勢となるが、AZTの投与が中止されると、T215Y株より増殖能が高いT215S株が増加してくる理由と考えられる。

分担研究者らはかねてから、多剤併用療法を長期にわたって受けている症例のHIV-1複数のヌク

レオシド系逆転写酵素阻害剤に対して高い薬剤耐性(MDR)を付与する一連のアミノ酸置換が起こることを明らかにしてきているが、今回そうしたMDRを起こすアミノ酸置換を単独または組み合わせでsite-directed mutagenesis法を用いて作成し、野生株などその増殖能についてウイルス学的検討を加えた。最も高いMDRはV75I, F77L, F116Y, Q151Mの4つのアミノ酸置換によってもたらされるが(表1)、このHIV-1<sub>75/77/116/151</sub>の増殖能はA62Vが加わって5つとなったHIV-1<sub>62/75/77/116/151</sub>や3つしかアミノ酸置換を有していないHIV-1<sub>77/116/151</sub>よりも劣っていた。HIV-1<sub>62/75/77/116/151</sub>の増殖能はHIV-1<sub>77/116/151</sub>のそれよりも高かった。薬剤耐性の程度をIC<sub>50</sub>(ウイルスの増殖を50%ブロックする薬剤の濃度)で比較すると:HIV-1<sub>75/77/116/151</sub> > HIV-1<sub>62/75/77/116/151</sub> > HIV-1<sub>77/116/151</sub> > HIV-1<sub>151</sub>であった、薬剤の存在下(生体内での条件に類似した状態)でのウイルスの増殖速度の順列はHIV-1<sub>62/75/77/116/151</sub> > HIV-1<sub>77/116/151</sub> > HIV-1<sub>75/77/116/151</sub> > HIV-1<sub>151</sub>であった。これらのデータはHIV-1が薬剤耐性を発現する場合、複数のアミノ酸置換を起こすことで増殖能を犠牲にしながらも耐性を獲得するが、更にアミノ酸置換を付加して、一旦損なわれていた増殖能を回復し、結果的に薬物の存在下でも野生株と同様の増殖能を得ることを強く示唆している(図5、図6)。

表1 Generation of various infectious HIV-1 clones and their sensitivity to zidovudine, didanosine, and zalcitabine in MAGI assay.

Infectious clone	Amino acid							IC <sub>50</sub> (μM)*		
	62	75	77	116	151	74†	215†	Zidovudine	Didanosine	Zalcitabine
HIV-1 <sub>wt</sub>	Ala	Val	Phe	Phe	Gln	Leu	Thr	0.043 ± 0.020	2.1 ± 0.4	0.31 ± 0.01
HIV-1 <sub>62</sub>	Val	—	—	—	—	—	—	0.040 ± 0.004	1.3 ± 0.4	0.29 ± 0.05
HIV-1 <sub>75</sub>	—	Ile	—	—	—	—	—	0.054 ± 0.020	2.1 ± 0.5	0.59 ± 0.32
HIV-1 <sub>77</sub>	—	—	Leu	—	—	—	—	0.076 ± 0.042	2.3 ± 0.5	0.40 ± 0.26
HIV-1 <sub>116</sub>	—	—	—	Tyr	—	—	—	0.054 ± 0.020	2.2 ± 0.4	0.32 ± 0.10
HIV-1 <sub>151</sub>	—	—	—	—	Met	—	—	0.67 ± 0.26	8.8 ± 3.8	2.4 ± 0.8
HIV-1 <sub>77/116/151</sub>	—	—	Leu	Tyr	Met	—	—	4.8 ± 2.3	18 ± 6	4.9 ± 2.4
HIV-1 <sub>75/77/116/151</sub>	—	Ile	Leu	Tyr	Met	—	—	18 ± 3	63 ± 33	18 ± 3
HIV-1 <sub>62/75/77/116/151</sub>	Val	Ile	Leu	Tyr	Met	—	—	12 ± 1	19 ± 6	4.6 ± 0.2
HIV-1 <sub>74</sub>	—	—	—	—	—	Val	—	0.075 ± 0.020	9.6 ± 1.2	0.88 ± 0.46
HIV-1 <sub>215</sub>	—	—	—	—	—	—	Tyr	0.29 ± 0.05	3.0 ± 1.5	1.2 ± 0.3
HIV-1 <sub>151/215</sub>	—	—	—	—	Met	—	Tyr	0.26 ± 0.07	4.8 ± 1.8	0.81 ± 0.27

NOTE. Dash denotes wild type amino acid. IC<sub>50</sub>s of zidovudine, didanosine, and zalcitabine against various HIV-1 clones were compared with variance method. P<sub>s</sub> for zidovudine IC<sub>50</sub>s were, against HIV-1<sub>75/77/116/151</sub> vs. HIV-1<sub>62/75/77/116/151</sub>, HIV-1<sub>77/116/151</sub>, and HIV-1<sub>151</sub>: .6, .008, and <.0001, respectively; against HIV-1<sub>62/75/77/116/151</sub> vs. HIV-1<sub>77/116/151</sub> and HIV-1<sub>151</sub>: .045 and <.001, respectively; against HIV-1<sub>77/116/151</sub> vs. HIV-1<sub>151</sub>: .0011. P<sub>s</sub> for didanosine IC<sub>50</sub>s were, against HIV-1<sub>75/77/116/151</sub> vs. HIV-1<sub>62/75/77/116/151</sub>, HIV-1<sub>77/116/151</sub>, and HIV-1<sub>151</sub>: .083, .078, and .006, respectively. P<sub>s</sub> for zalcitabine IC<sub>50</sub>s were, against HIV-1<sub>75/77/116/151</sub> vs. HIV-1<sub>62/75/77/116/151</sub>, HIV-1<sub>77/116/151</sub>, and HIV-1<sub>151</sub>: .007, .006, and .0004, respectively.

\* Mean IC<sub>50</sub> values (±SD) of 3 separate experiments are shown.

† Mutations at codons 74 and 215 have been associated with viral resistance to didanosine and zidovudine, respectively.

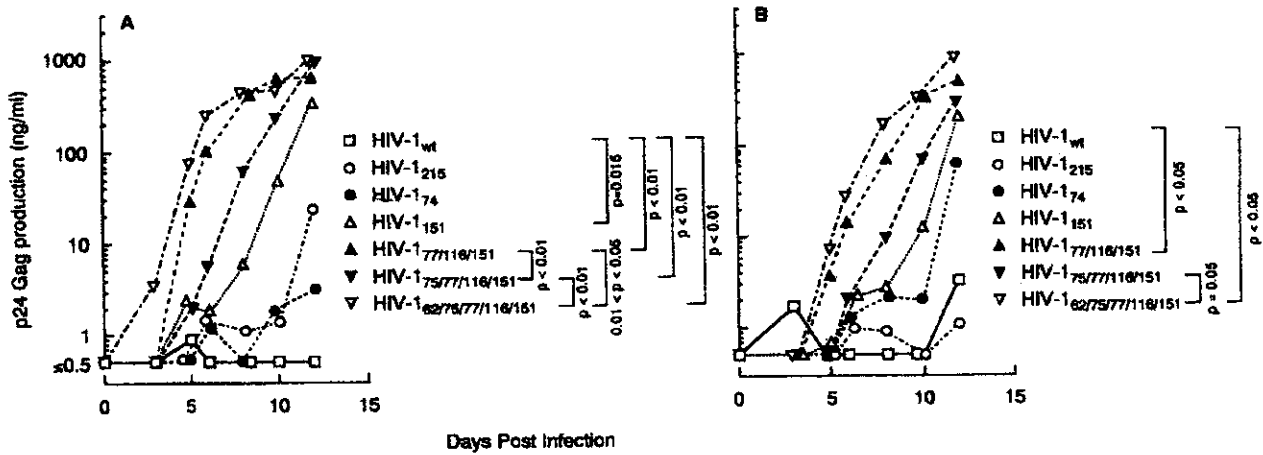


図 5

Replication profiles of infections clones carrying various mutations in presence of zidovudine or didanosine. H9 cells were exposed to each infectious clone at infectious dose that gave 1000 blue cells in MAGI assay and cultured in presence of 2 mM zidovudine (A) or 10 mM didanosine (B). Amount of p24 Gag protein released from infected H9 cells into culture medium was determined by RIA at various time points.

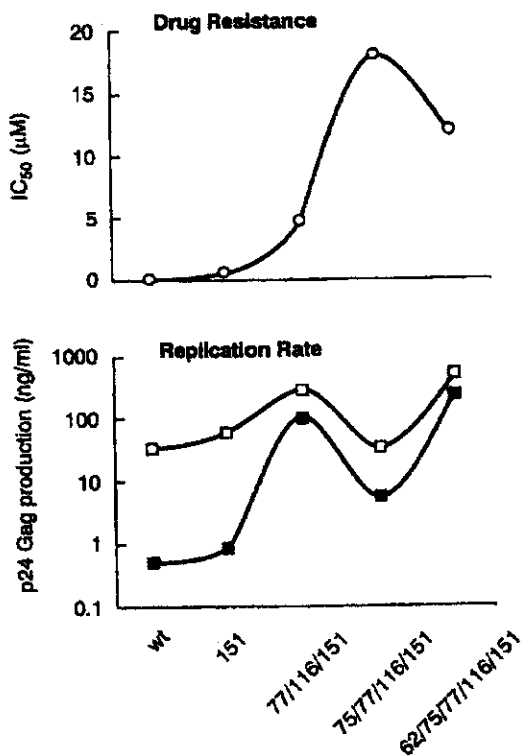


図 6

Proposed model of evolution of multiple dideoxynucleoside-resistant HIV-1 variants during combination chemotherapy. Data points were derived from data on day 6 of culture in figures 1A and 2A. Drug resistance (○) is represented by IC<sub>50</sub>s; replication rate is represented by amounts of p24 Gag production in presence (■) or absence (□) of 10 mM zidovudine. Wild type p24 Gag production in absence of drug on day 6 of culture was 33.7 ng/mL. Numbers in abscissa represent codons where amino acid substitutions occurred.

### 考 察

本研究において多剤併用療法中の患者の薬剤耐性変異の出現状況とそのウイルス学的特徴について検討した。抗ウイルス薬で経過観察中の患者の provirus DNA の RT 領域、PR 領域に関して検討してみると、複数の薬剤耐性変異をもつ症例は少ないものこれまで報告されているものと同様の薬剤耐性変異を認めた。また治療期間が長くなると耐性変異数が増加していく傾向を認めた。これは今後欧米諸国でも問題となっているように薬剤耐性株が増加し治療抵抗性となる臨床例が増加していくことを示唆する。

ウイルス RNA コピー数に注目して個々の症例について検討すると血清中のウイルス RNA コピー数の少ない症例に関しては逆転写酵素領域およびプロテアーゼ領域の耐性変異の出現が少ない傾向が認められる。これは抗ウイルス薬による治療を行う上で、ウイルスコピー数を抑制することにより耐性変異の出現を抑制し、臨床経過を改善しうることを意味する。逆転写酵素領域の 215 番目の変異に注目してみると AZT の投与によりワイルドタイプであるスレオニンからチロシンへの変異が起こって耐性を獲得し、薬剤中止後はより優れた複製能をもつセリンへのさらなる変異を認める。これは、HIV-1 ウイルスが環境に適応するよ

うその薬剤耐性と複製能を変化させているというこのウイルスの特性を示している。

## 結 論

本邦においても欧米で報告されている薬剤耐性変異を逆転写酵素領域、プロテアーゼ領域にそれぞれ認める。今後は治療期間の長期化に伴い複数の耐性変異を持つ症例が増加してくるものと思われる。治療後の血漿 HIV RNA コピー数が40 コピー/ml 以下の症例では耐性変異数が少ない。そのため HIV 陽性者では血漿 HIV RNA が検出限界以下となるような多剤併用療法を早期に施行すべきで、その場合は強力な併用療法によって検出限界以下に迄HIVの増殖を抑制できる治療の組み合わせを選択すべきである。

## 参考文献

- 1) Kavlick, M.F., Wyvell, K., Yarchoan, R., and Mitsuya, H. (1998) Emergence of multi-dideoxynucleoside resistant HIV-1 variants, viral sequence variation, and disease progression in patients receiving antiretroviral chemotherapy. *J. Infect. Dis.* 98:1506-1513.
- 2) Gao, W.-Y., Zhou, B.-S., Johns, D.G., Mitsuya, H., and Yen, Y. (1998) Role of the M2 subunit of ribonucleotide reductase in potentiation by hydroxyurea of the anti-HIV-1 agent 2',3'-dideoxyinosine. *Mol. Pharmacol.* 56:105-112.
- 3) Mueller, B.U., Anderson, B., Farley, M.Q., Murphy, R., Zuckerman, J., Jarosinski, P., Godwin, K., McCully, C.L., Mitsuya, H., Pizzo, P.A., and Balis, F.M. (1998) Plasma and cerebrospinal fluid pharmacokinetics of the protease inhibitor KNI-272 in non-human primates after intravenous dosing and in children with HIV infection after intravenous and oral dosing. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:1815-1818.
- 4) Rezende, L.F., Curr, K., Ueno, T., Mitsuya, H., and Prasad, V.R. (1998) The impact of nucleoside analog resistance mutations in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase on mutation rates and error specificity. *J. Virol.* 72: 2890-2895.
- 5) Maeda, Y. and Mitsuya, H. (1998) Altered drug sensitivity and fitness of HIV-1 with pol gene mutations conferring multi-dideoxynucleoside resistance. *J. Infect. Dis.* 177:1207-1213.
- 6) Marquez, V.E., Ezzitouni, A., Russ, P., Siddiqui, M.A., Feldman, R.J., Mitsuya, H., George, C., and Barchi, J.J., Jr. (1998) HIV-1 reverse transcriptase discriminates between two conformationally locked carbocyclic AZT-triphosphate analogues. *J. Am. Chem. Soc.* 120: 2780-2789.
- 7) Roth, J.S., Ford, H., Tanaka, M., Mitsuya, H., and Kelley, J.A. (1998) Determination of 2'-b-fluoro-2',3'-dideoxyadenosine, an experimental anti-AIDS drug in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 712:199-210
- 8) Mitsuya, H. and Erickson, J. (1999) Discovery and development of antiretroviral therapeutics for HIV infection. In: *Textbook of AIDS medicine*, edited by Merigan, Bartlett, and Bolgnesi, Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 751-780, 1998.
- 9) Humphrey, R.W., Wyvill, K.M., Nguyen, B.-Y., Shay, L., Kohler, D.R., Steinberg, S.M., Ueno, T., Fukasawa, T., Shintani, M., Hayash H., Mitsuya, H., and Yarchoan, R. (1999) A phase I trial of the pharmacokinetics, toxicity, and activity of KNI-272, an inhibitor of HIV-1 protease, in patients with AIDS or symptomatic HIV infection. *Antivirus Res.* (in press)
- 10) Davis, D.A., Yusa, K., Gillim, L.A., Newcomb, F.M., Mitsuya, H., and Yarchoan, R. (1999) The conserved cysteines of the human immunodeficiency virus protease are involved in redox regulation of polyprotein processing and viral maturation of immature virions. *J. Virol.* (in press)
- 11) Rabkin, C.S., Yang, Q., Goedert, J.J., Nguyen, G., Mitsuya, H., and Sei, S. (1999) AIDS protective SDF1 chemokine gene variant paradoxically increases risk of non-Hodgkin's lymphoma in HIV-infected persons. *Blood* (in press)



## 長期AZT投与患者の種々剖検組織における HIV-1薬剤耐性-サブタイプE感染例

竹内 勤<sup>1)</sup>、山下 直哉<sup>2)</sup>、平石 佳之<sup>3)</sup>、杉田 哲佳<sup>3)</sup>、加藤 真吾<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>慶應義塾大学医学部 熱帯医学・寄生虫学教室

<sup>2)</sup>慶應義塾大学医学部 小児科学教室

<sup>3)</sup>慶應義塾大学医学部 微生物学教室

### 研究要旨

HIV-1感染者の様々な組織におけるプロウイルス量や遺伝的多様性、さらに薬剤耐性の出現時期の違いなどを調べることは、病期進行の判定や薬剤選択などの治療方針の決定に重要であると考えられる。本研究では、慶應義塾大学病院で死亡したサブタイプEのHIV-1感染者の病理解剖において摘出された血液、リンパ節、脾臓、肝臓からDNAを抽出し、それぞれの組織中のHIV-1プロウイルス量を限界希釈法により定量した。その結果、各組織の $10^6$ 細胞中に血液で140コピー、リンパ節で2500コピー、脾臓で540コピー、肝臓で20コピーを検出した。リンパ節で非常にコピー数が多いことは、感染者体内において最も増殖が盛んな組織であることを示唆している。また、本症例は、HIV-1逆転写酵素阻害剤であるAZTが、長期投与されていた。そこで、各組織中のAZTに対する耐性を遺伝子的に解析した結果、全ての組織でこれまでに報告のあるAZT耐性特異的アミノ酸変異6部位のうち4個が耐性型に変異していることが判った。本国においてサブタイプEについてのこのような詳細なウイルス学的報告はこれまでにないと思われる。

分担研究者：竹内 勤

研究協力者：山下直哉、平石佳之、杉田哲佳、加藤真吾

**Drug resistance of HIV-1 subtype E in four types of tissues autopsied from infected patient treated with a long-term AZT regimen.**

Tsutomu Takeuchi<sup>1)</sup>, Naoya Yamashita<sup>2)</sup>, Yoshiyuki Hiraishi<sup>3)</sup>, Tetsuyoshi Sugita<sup>3)</sup>, Shingo Kato<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Tropical Medicine and Parasitology, Keio University School of Medicine, <sup>2)</sup>Department of Pediatrics, Keio University School of Medicine, <sup>3)</sup>Department of Microbiology, Keio University School of Medicine

## 目 的

HIV-1感染者の様々な組織におけるプロウイルス量や遺伝的多様性の差異を調べることは、それぞれの組織中でウイルスがどのように変化し、病期進行に関与していくかを明らかにする上で重要である。さらにそれらの組織における薬剤耐性の出現時期の違いなどを調べることは、薬剤選択などの治療方針の決定に重要であると考えられるが、詳しい分析はほとんど行われていない。我々は、これまでに血漿中に存在するHIV-1RNAと血液中の単核細胞中のHIV-1プロウイルスでは、それぞれの遺伝的多様性が異なっており、病期の進行にともなってそれらの多様性が変化することを明らかにしてきた。昨年の本報告においても、血漿中のHIV-1RNAと髄液中のHIV-1RNAには遺伝的多様性に差があることを報告した。一方、病期の進行にともなうHIV-1のウイルス学的変化や、様々な組織におけるHIV-1の薬剤動態についてはいくつかの報告がなされている。これまで我が国においては、感染者のほとんどが血友病患者であるため、サブタイプBのHIV-1に注目が集まっていた。そのため、検査や解析に用いられるPCRのプライマーはサブタイプB特異的であった。本研究では、慶應義塾大学病院で死亡したサブタイプEのHIV-1感染者の病理解剖において抽出された血液、リンパ節、脾臓、肝臓からDNAを抽出し、それぞれの組織中のHIV-1プロウイルス量を限界希釈法により定量した。その結果、それぞれの組織でウイルスコピー数に大きな差があった。また、この症例では抗ウイルス剤のAZTが長期間投与されていたが、各組織において高度の耐性ウイルスが観察された。

## 方 法

症例は、慶應義塾大学病院において、平成9年5月に死亡した47歳の男性である。死因は、敗血症による多臓器不全であった。平成7年12月から抗ウイルス剤であるAZTの投与が行なわれ、死亡時まで投与が続けられた。平成8年9月から2ヶ月のみDDIの投与が行なわれたが、副作用によりAZT投与に戻した。死亡時のCD4陽性細胞数は、

1/μlであった。死亡時に当医学部病理学教室にて病理解剖が行なわれた。その際に家族の了解を得て脾臓、肝臓、リンパ節が摘出された。さらに心臓内から血餅を摘出し、PBMCとして解析を行なった。ついで、それぞれの組織よりDNAを抽出した。方法は、各組織をペトリ皿上で解剖用はさみを用いて、細かく切り刻み、そこへ細胞溶解液(0.1M EDTA, 0.5% SDS, 0.1 mg/ml Protease K, 0.1 mg/ml RNase A)を加え、15ml遠心管へ移し、一晩室温で振盪混和を行なった。この後、フェノール抽出を2回行い、この抽出液からQIAamp DNA Blood Mini Kit(QIAGEN社)を用いてDNAを抽出した。

各組織から抽出したDNAを用いて、プロウイルスの量を測定した。方法は、それぞれのDNAを2倍づつ希釈し、限界希釈を行ない、その希釈液について、PCRでバンドが検出された最大希釈数からコピー数を算定した。PCRは、nested PCR法を用いた。すなわち、プライマーJA9AEとJA12Eを用いて、1回目のPCR(30サイクル、1サイクルは94℃ 15秒、60℃ 30秒、72℃ 60秒)を行い、その産物の1/50量を鋳型してプライマーJA10とJA11QEを用いて2回目のPCR(25サイクル、1サイクルは94℃ 15秒、64℃ 30秒、72℃ 60秒)を行った。ついで、PCR産物を2%アガロースゲルで電気泳動し、臭化エチジウムで染色後、UV写真撮影をし、バンドの検出を確認した。

各組織中のHIV-1が薬剤耐性型変異を起こしているかを逆転写領域の遺伝子配列を決定することによって観察した。各組織から抽出したDNA100ngを用いて逆転写領域をnested PCRによって増幅した。1回目のPCR(30サイクル、1サイクルは94℃ 15秒、60℃ 30秒、72℃ 60秒)は、RT-5 EoとRT-3 Eoをプライマーとして用い、その産物の1/50量を鋳型してプライマーRT-5 EiとRT-3 Eiを用いて2回目のPCR(25サイクル、1サイクルは94℃ 15秒、64℃ 30秒、72℃ 60秒)を行なった。これで得られたPCR産物の1/250量を鋳型にして、2回目のプライマー対のそれぞれ上流にユニバーサルプライマーあるいはM13リバープライマーの配列をつないだプライマー対(M13RPRT5Ei、-21M13RT3Ei)を用いて3回目のPCRを行った。このPCR産物を鋳型にして、蛍光色素が結合したプ

プライマー対(M13RP1、-21M13)を用いてジデオキシ反応を行い、自動塩基配列分析装置(DNA Sequencer 370A、Perkin Elmer)によって塩基配列を決定した。PCRに用いたすべてのプライマーの塩基配列を以下に示す。括弧内の数字はHIV-1 DNA クローンNL4-3における塩基番号を表す。

#### 定量用プライマー

JA9E: CACAGTACAATGCACACATG (6943-6962)

JA10: AAATGGCAGTCTAGCAGAAG (6997-7016)

JA11QE: CTCCTGAGGGTGGTTGAAAG (7294-7313)

JA12E: GCAATAGAAAAATTCCCCTC (7369-7350)

#### 逆転写領域塩基配列決定用プライマー

RT-5Eo: TAGGACCTACACCTGTCAAC (2482-2501)

RT-5Ei: GTTGACTCAGATTGGTTGTAC  
(2519-2539)

RT-3Ei: TATCTGTTAGTGCTTTGGCTC  
(3403-3423)

RT-3Eo: TCCCTGTTCTCTGCCAATTC (3453-3472)

M13RPRT5Ei: CAGGAAACAGCTATGACC  
GTTGACTCAGATTGGTTGTAC

M13RP1: CAGGAAACAGCTATGACC

-21M13RT3Ei: TGTA AAAACGACGGCCAGT  
TATCTGTTAGTGCTTTGGCTC

-21M13: TGTA AAAACGACGGCCAGT

## 結果

本症例のそれぞれの組織から抽出したDNAを用いて、サブタイプB用のプライマーあるいは、本研究で開発したサブタイプE用のプライマーでPCRを行なった結果を図1に示す。サブタイプが

Bであることが分かっているDNA検体をサブタイプB用のプライマーでPCRを行なった第1レーンでは、目的のバンドが検出されるが、サブタイプE用のプライマーを用いた第7レーンではバンドが検出できなかった。本症例の各組織を同様にそれぞれのプライマーを用いてPCRを行なったところ、サブタイプE用のプライマーを用いた時のみバンドが検出された。さらにそれぞれの組織中のプロウイルス量を限界希釈法によって測定した結果を図2に示す。各組織の $10^6$ 細胞中にPBMCで140コピー、リンパ節で2500コピー、脾臓で540コピー、肝臓で20コピーであった。リンパ節で非常にコピー数が多いことは感染者体内において最も増殖が盛んな組織であることを示唆している。

本症例は、HIV-1逆転写酵素阻害剤であるAZTが長期投与されていた。そこで、各組織中のAZTに対する耐性を遺伝子的に解析した。各組織中のHIV-1逆転写領域の遺伝子配列を表1に示した。AZT特異的耐性変異部位として41番目、67番目、70番目、210番目、215番目、219番目のアミノ酸が報告されており、本症例でも67番目、70番目、215番目、219番目の変異が観察された。このような4つの部位の耐性変異が同時に存在すると、 $IC_{50}$ が感受性株よりも約120倍高くなることが報告されている。したがって、本症例のHIV-1は高度耐性を獲得していると考えられる。加療中に約2ヶ月間、同様の逆転写酵素阻害剤であるDDIが投与されていた。DDI特異的な耐性変異部位である65番目、74番目75番目、184番目については特異的変異が検出されなかった。これは、投与期間が短いためであると考えられる。

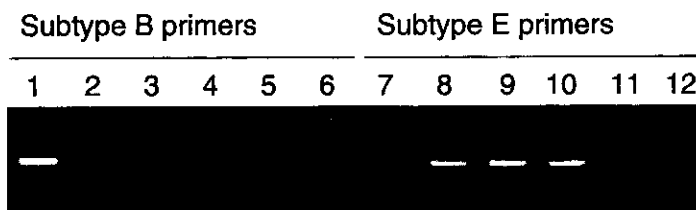


図1 サブタイプB用およびE用のプライマーを用いた各組織中HIV-1の検出

第1-6レーンは、サブタイプB用のプライマー、第7-12レーンはサブタイプE用のプライマーを用いて、PCRを行なった。1、7レーンはサブタイプBである感染者PBMCから抽出したDNAを用いた。その他は、本症例のそれぞれの組織から抽出したDNAを用いた。2、8レーンはPBMC、3、9レーンはリンパ節、4、10レーンは脾臓、5、11レーンは肝臓、6、12レーンはHIV-1DNAを含まない陰性コントロールである。サブタイプB用プライマーは、以下のものを用い、nested-PCRによって検出した。

JA9: CACAGTACAATGTACACATG (6943-6962)

JA10: AAATGGCAGTCTAGCAGAAG (6997-7016)

JA11L: AATTTCTGGGTCCCCTCCTG (7308-7327)

JA12: ACAGTAGAAAAATTCCCCTC (7369-7350)

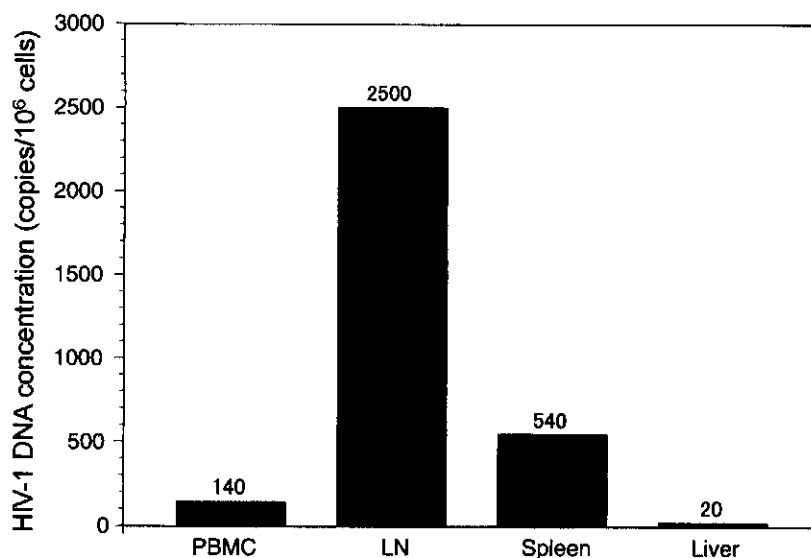


図2 PBMC、リンパ節、脾臓、肝臓中のHIV-1プロウイルスのコピー数  
各組織から抽出したDNAを用いて、限界希釈法によってHIV-1のコピー数を算出した。

表1 各組織中のHIV-1逆転写領域におけるAZT耐性特異的変異部位のアミノ酸変化

Tissue	Amino acid position in RT									
	AZT-resistance related						DDI-resistance related			
	41	67	70	210	215	219	65	74	75	184
Wild-type	Met	Asp	Lys	Leu	Thr	Lys	Lys	Leu	Val	Met
PBMC	Met	<u>Asn</u>	<u>Arg</u>	Leu	<u>Tyr</u>	<u>Gln</u>	Lys	Leu	Val	Met
Lymph node	Met	<u>Asn</u>	<u>Arg</u>	Leu	<u>Tyr</u>	<u>Gln</u>	Lys	Leu	Val	Met
Spleen	Met	<u>Asn</u>	<u>Arg</u>	Leu	<u>Tyr</u>	<u>Gln</u>	Lys	Leu	Val	Met
Liver	Met	<u>Asn</u>	<u>Arg</u>	Leu	<u>Tyr</u>	<u>Gln</u>	Lys	Leu	Val	Met

各組織中のHIV-1逆転写領域内のAZT耐性特異的変異部位およびDDI耐性特異的変異部位におけるアミノ酸を示した。Wild-typeはNL4-3に対応するアミノ酸を示した。下線を引いた部位のアミノ酸が耐性変異部位である。

## 考 察

感染者の様々な組織においてHIV-1の活動状況を把握し、薬剤の親和性やそれに伴う薬剤耐性ウイルスの出現速度など知ることは、病期進行の解明や、薬剤動態を考える上で重要である。組織中のHIV-1の観察では、無症候感染時期で血中にHIV-1RNAが検出できない症例であってもリンパ節においては盛んにウイルス増殖が行なわれていると報告されており<sup>2)</sup>、リンパ節がHIV-1の感染

巣部位であると考えられている。本症例でもリンパ節がもっともウイルス量が多かった。次に多い脾臓では、血中の感染マクロファージが含まれていると考えられる。PBMC中のウイルス量は少ないが、死亡時のCD4陽性細胞数は1個/μl以下なので、50%以上のCD4陽性細胞が感染していたことになる。

Gatanagaら<sup>3)</sup>は、HIV-1脳炎の患者でAIDS脳症に移行する患者でHIV-1のAZT耐性アミノ酸変化



に違いがあることを報告している。これは、症状の違いをもとに薬剤耐性ウイルスの出現の仕方を観察したものであり、感染者は、病期の進んだ症例であった。実際には様々な病期の感染者の様々な組織を得ることは非常に困難である。Cavert<sup>4)</sup>は、National Tissue Bank設立の必要性を説いている。これは、交通事故などの偶発的事故の際に、感染者の様々な組織を摘出し、ウイルス学的解析を行ない、今後の治療に役立てようとするものである。通常HIV-1感染者の剖検例は、症状がかなり進んだものになってしまうため、ウイルス変異の過程が正確に反映されない可能性が常にある。本症例においてもAZT投与が18ヶ月と非常に長く、病期もかなり進んでいた。そのために各組織間で薬剤耐性度の差がみられなかったと考えられる。

現在、世界中で流行しているHIV-1は、その地域によって、サブタイプが異なっていることが知られている。欧米では、サブタイプBが主であり、アフリカではサブタイプAが多く、東南アジアではサブタイプEが多いことが知られている。日本においては、もともと欧米から輸入した血液製剤による感染からサブタイプBが主であった。しかし、近年異性間交渉によるサブタイプAおよびサブタイプEの増加が目立ってきた。本研究の症例は、東南アジアでの異性間交渉で感染したことがわかっており、サブタイプEであった。当研究室で通常用いられているPCRプライマーはサブタイプB用に設定されていたため、当初本症例のHIV-1を検出することができなかった。そこで、サブタイプE用のenv領域を増幅する検出用のプライマーと薬剤耐性ウイルス検出用のプライマーを開発し、本研究に用いた。今井ら<sup>5)</sup>は、サブタイプBとサブタイプAおよびEとを区別するためのプライマーを作成した。しかし、このプライマーはサブタイプAとサブタイプEを区別することができない。今回われわれが開発したサブタイプE用のプライマーはサブタイプEを増幅するものであり、サブタイプBおよびAは増幅することができない。今回検討したのは、サブタイプB、E、Aだけであったが、今後本国においても観察されるであろう他のサブタイプ、例えばC、D、F、Gについても検討していくことが必要であろう。これま

で、各サブタイプ間での病期進行の違いなどの報告はないが、薬剤耐性の出現速度や症状の違いなどを検討していく上で、感染者のサブタイプを正確に把握することは非常に重要であると考えられる。

## 結 論

本研究では、慶應大学病院で死亡したHIV-1感染者の病理解剖時に摘出された組織におけるウイルス学的解析を行なった。症例は、HIV-1サブタイプE感染例であり、本研究においてサブタイプE検出用のプライマー、およびサブタイプE逆転写領域増幅用のプライマーが開発されPCRに用いられた。摘出組織はPBMC、リンパ節、脾臓、肝臓で、各組織中のHIV-1プロウイルスのコピー数はそれぞれ140コピー/10<sup>6</sup>細胞、2500コピー/10<sup>6</sup>細胞、540コピー/10<sup>6</sup>細胞、20コピー/10<sup>6</sup>細胞であった。さらに本症例では抗ウイルス剤であるAZTが長期投与されていたので、薬剤耐性を調べるために逆転写領域のアミノ酸配列を決定した。その結果、これまでに報告されているAZT耐性特異的変異部位である6個のアミノ酸のうち、4個が耐性変異していた。今後、日本でも増加が考えられるサブタイプAやEについて対応できる検査キットやPCRプライマーの開発が必要であると考えられる。

## 参考文献

- 1) Schinazi, R., Larder, B.A., Mellors, J.W.: Mutations in retroviral genes associated with drug resistance., *International Antiviral News*. 5: 129-142, 1997
- 2) Pantaleo, G., Graziosi, C., Demarest, J.F., et al: HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease., *Nature*. 362: 355-358, 1993
- 3) Gatanaga, H., Oka, S., Ida, S., et al: Active HIV-1 redistribution and replication in the brain with HIV encephalitis., *Arch. Virol.* 144: 29-43, 1999
- 4) Cavert, W., Haase, A.T.: A National Tissue Bank to Track HIV Eradication and Immune Reconstitution., *Science*. 280: 1865-1866, 1998
- 5) 今井光信, 近藤真規子, 須藤弘二, 他: PCRによるHIV-1サブタイプ(BとE)の識別. *感染症学雑誌*. 71: 918-923, 1997



## CD8陽性T細胞より産生される 可溶性抗HIV活性物質

土江 秀明<sup>1)</sup>、西本 憲弘<sup>2)</sup>、吉崎 和幸<sup>2)</sup>、

<sup>1)</sup>大阪大学微生物病研究所 ウイルス感染制御分野

<sup>2)</sup>大阪大学 健康体育部 健康医学第一部門

### 研究要旨

HIV感染者のエイズ発症阻止にはCD8陽性T細胞のHIV-1複製抑制活性が重要な役割を果たしており、その候補としてCCケモカイン(RANTES、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ )、IL-16、CAF、SHIF、MDCが報告されている。HIV-1-LTRの下流にSEAP (Secreted form of alkaline phosphatase)遺伝子を挿入したSEAPレポーターアッセイを使用し、SHIFはHIV-1-LTRの転写を抑制することを明らかにした。CD8陽性T細胞培養上清中のSHIF活性レベルは、CCケモカイン、IL-16のレベルとは異なり、SHIFはCCケモカイン、IL-16とは異なると考えられた。HIV-1感染日本人血友病患者から経時的に得られたプラズマ中のCCケモカイン(RANTES、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ )、IL-16のレベルを測定した結果、病期の進行との関連はみられなかった。

分担研究者：吉崎和幸

研究協力者：土江秀明、西本憲弘

### Soluble HIV inhibitory factor produced by CD8<sup>+</sup> T cells

Kazuyuki Yoshizaki<sup>1)</sup>, Hideaki Tsuchie<sup>2)</sup> and Norihiro Nishimoto<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Medical Science I, School of Health and Sports Sciences, Osaka University, <sup>2)</sup>Department of Viral Infections, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University

## 目 的

HIV-1に感染してからエイズ発症に至る過程において、HIV-1感染に対する宿主免疫応答では細胞性免疫が重要な役割を果たしているが、その中で、CD8陽性T細胞はCTLとしてウイルス感染細胞の傷害を介してHIV-1複製を抑制するとともに、細胞抑制を伴わない機序によってもHIV-1複製を抑制する。HIV-1複製を抑制するサイトカインがCD8陽性T細胞から産生されることが明らかとなっており、CCケモカイン(RANTES、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ )、IL-16、CAF、SHIF、MDCが報告されている。SHIFの性状を明らかにする目的で、SHIF活性を有するCD8陽性T細胞をHTLV-Iで不死化し、そのSHIF活性とCCケモカイン(RANTES、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ )およびIL-16のレベルを検討した。また、HIV-1の病期の進行におけるCCケモカインおよびIL-16の役割を解析する目的で、HIV-1感染日本人血友病患者から経時的に得られたプラズマ中のCCケモカイン(RANTES、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ )、IL-16のレベルを測定し検討した。

## 方 法

### 1. CD8陽性T細胞の不死化

エイズ長期未発症者であるHIV-1感染者のCD8陽性T細胞を、 $\gamma$ 線照射したMT-2細胞と混合培養し、1ヶ月後にクローン化した。

### 2. CD8陽性T細胞培養上清の抗HIV-1活性

感染性HIV-1 DNA クローン (pNL-432) を TALL-1細胞にトランスフェクトして得られたHIV-1持続感染細胞にCD8陽性T細胞培養上清を加えて、培養上清中に産生されるHIV-1p17抗原量を比較検討した。その際に、SDF-1 (200 ng/ml)あるいはCCケモカイン(RANTES、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ それぞれ200 ng/ml)を加えて、その抗HIV-1活性を検討した。また、HIV-1-LTRの下流にSEAP (secreted form of alkaline phosphatase) 遺伝子を挿入したプラスミドを使用したSEAPレポーターアッセイにより、CD8陽性T細胞培養上清のHIV-1-LTRの転写抑制活性を検討した。

### 3. CD8陽性T細胞培養上清あるいはHIV-1感染者プラズマ中のCCケモカイン(RANTES、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ )、IL-16のレベルの測定

CCケモカイン(RANTES、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ )およびIL-16の測定には、市販のELISAキットを使用した。

## 結 果

### 1. CD8陽性T細胞培養上清の抗HIV-1活性

HIV-1持続感染細胞にCD8陽性T細胞培養上清あるいはSDF-1 (200 ng/ml)あるいはCCケモカイン(RANTES、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ それぞれ200 ng/ml)を加えて、その培養上清中に産生されるHIV-1p17抗原量を比較検討した(図1)。CD8陽性T細胞培養上清は濃度依存性に抗HIV-1活性を示したが、SDF-1 (200 ng/ml)あるいはCCケモカイン(RANTES、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ それぞれ200 ng/ml)には抗HIV-1活性がみられなかった。HUT78細胞とU937細胞を使用したSEAPレポーターアッセイにより、クローン化CD8陽性T細胞(クローン62、15)の培養上清にHIV-1-LTRの転写抑制活性がみられた(図2)。

### 2. CD8陽性T細胞培養上清中の抗HIV-1活性、CCケモカイン(RANTES、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ )およびIL-16のレベル

エイズ長期未発症者のCD8陽性T細胞を不死化して得られたクローンの中には、抗HIV-1活性が高レベルのものとCD8陽性T細胞培養上清中の低レベルのものがみられた。抗HIV-1活性とCCケモカイン(RANTES、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ )およびIL-16のレベルとの間には相関関係はみられなかった(表1)。

### 3. HIV-1感染者の病期とプラズマ中のCCケモカイン(RANTES、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ )、IL-16のレベル

3人のエイズ長期未発症者と4人の発症者から経時的に得られたプラズマ中のCCケモカイン(RANTES、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ )、IL-16のレベルを測定し、CD4細胞数の推移との関連を検討したが、全例に共通するような明らかな関連は認められなかった(図3)。

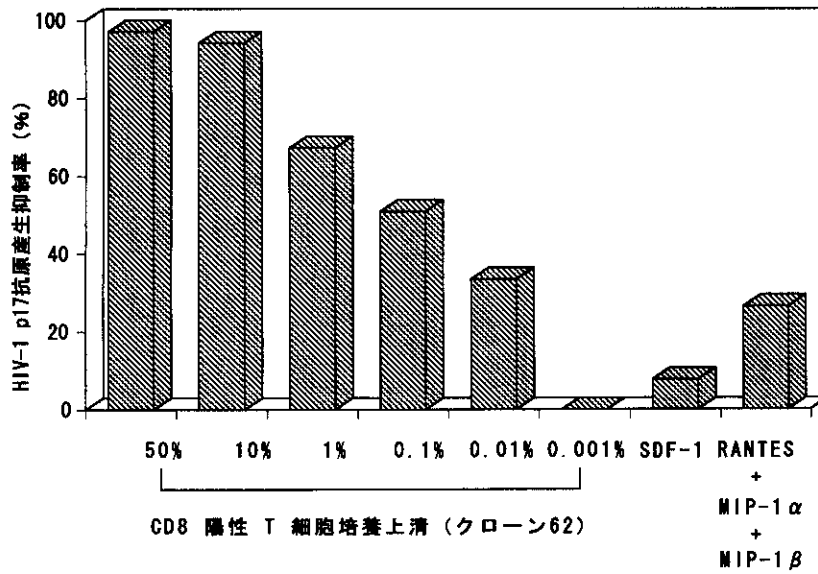


図1 CD8 陽性T細胞培養上清の抗 HIV 活性

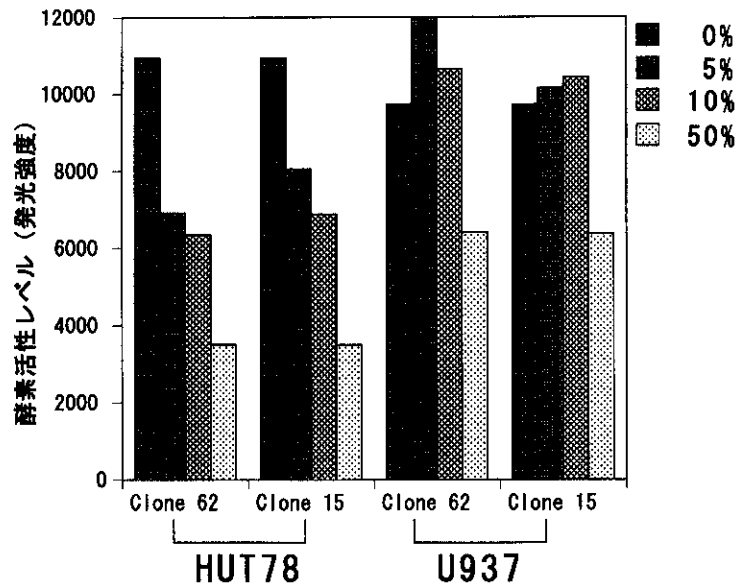


図2 CD8 陽性T細胞培養上清の HIV-LTR 転写抑制活性

表1 CD8 陽性T細胞培養上清の HIV 活性、CC ケモカインおよび IL-16 レベル

	% suppression of HIV replication	RANTES (ng/ml)	MIP-1α (ng/ml)	MIP-1β (ng/ml)	IL-16 (pg/ml)
medium	0	<0.03	<0.03	<0.02	<200
Clone 15	32	19.4	8.0	1.4	890
Clone 23	41	36.0	15.3	2.7	1370
Clone 36	40	45.1	36.4	2.8	670
Clone 49	100	7.8	22.7	1.3	2670
Clone 62	100	9.3	23.1	1.3	700
Clone 72	100	1.2	5.0	1.0	<200
Clone 85	-3	32.6	32.5	2.9	560
Clone 90	10	48.7	60.7	2.5	<200