

薬剤感受性試験も行い、薬剤耐性の判断をする必要がある。

遺伝子解析を中心とした現在の薬剤耐性検査により、当面の臨床の要望に応えながら、より有効な耐性検査法の開発のため今後とも努力を続けたい。

また治療法の進歩と患者の増加に伴い、病院、研究所、民間検査センターの連携の重要性が増しつつある。即ち、研究機関で明らかとなった検査法の問題点、新たに開発された検査法などがより迅速に多くの患者の検査に活用されるよう、病院検査部、民間検査センターと研究機関とが緊密に連携を取りその実施にあたることが重要である。

今後、医療機関、国立の研究機関、各地の衛生研究所、民間の検査機関が協力して、どの地域においても必要なHIV検査が実施できるような検査システムを構築すべく努力を続けたい。

研究発表

- 1) 近藤真規子、川田かおる、伊藤章、齋藤隆行、今井光信：HIV-1 サブタイプ E および血中 HIV・RNA 定量法の検討，感染症学雑誌 1998;72:609-614
- 2) 今井光信、近藤真規子、須藤弘二、齋藤隆行、佐藤裕徳、武部豊、野口有三、川田かおる、伊藤章、相楽裕子、木原正博：PCRによるHIV-1 サブタイプ(BとE)の鑑別，感染症学雑誌 1997;71:918-923
- 3) 川田かおる、満田年宏、近藤真規子、齋藤隆行、今井光信、伊藤章：PCRによるHIV-1 RNA 定量法の基礎的検討，感染症学雑誌 1998;72:1041-1045
- 4) Kato, S., Hiraishi, Y., Nishimura, N., Sugita, T., Tomihama, M., and Takano, T. (1998)
A plaque hybridization assay for quantifying and cloning infectious human immunodeficiency virus

type 1 virions. J. Virol. Methods 72 (1), 1-7.

5) Kato, S. (1998) Drug susceptibility test for HIV. BIC Forum 3 (3), 67-73.

6) 今井光信：薬剤耐性変異とその検査，BME 1998;12:27-35

ワークショップ

“HIV 関連検査の確立と問題点”

HIV 定量キットの現状と問題点 (吉原なみ子) 資料1

図1

最近のHIV検査の傾向

高感度化
 自動化
 簡便化
 抗原と抗体同時測定
 遺伝子検査 (定性、定量)

図2

定量キットの種類

アンプリコア HIV-1 モニター
 NASBA
 分岐 DNA 法

図3

現行法とver1.5の比較

サブタイプ^oの反応性に関して

現行法

サブタイプ^o B, C, Dは同等だがA, E, Fは
 均一に反応しない。

改良法 (ver1.5)

primerの改良

Master mixの至適化

改良primer用にQSの改良

正常ヒト血漿添加量の変更

サーマルサイクリングの設定の至適化

図4

アンプリコアHIV-1モニター測定上の留意

- 測定範囲は400~75万copies/ml
- サブタイプ^o A, Eでは測定値が低い可能性
- 測定値は1/3~3倍の範囲の再現性
- 例: 前回は3,000 copies/mlの患者
 次回が1,000~9,000copies/mlは測定誤差の可能性
- ヘパリンはPCR反応を阻害するので、
 EDTAまたはクエン酸で採血する
- 血清は血漿に比べて測定値が低くなる傾向

図5

測定感度の向上

Ultrasensitive法の採用により10倍の高感度化

血漿サンプル量が2.5倍(500ul) 必要

検体希釈量が1/4

standard法: 400 - 750,000 copies/ml

ultrasensitive法: 50 - 75,000 copies/ml

図6

まとめ

種々のサブタイプ^oに対する対応の向上。

測定範囲が広がった。(50 - 750,000 copies/ml)

高感度にするために検体量が多く必要。

自動化の開発。

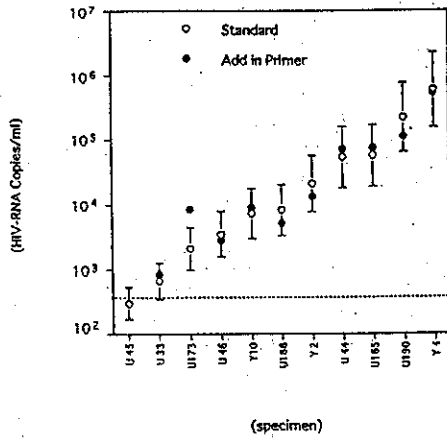
ワークショップ

"HIV 関連検査の確立と問題点"

HIV 定量キットの現状と問題点 (吉原なみ子) 資料-1

図9

サブタイプBにおけるstandard法とAdd in Primer法との比較



サブタイプEにおけるstandard法とAdd in Primer法との比較

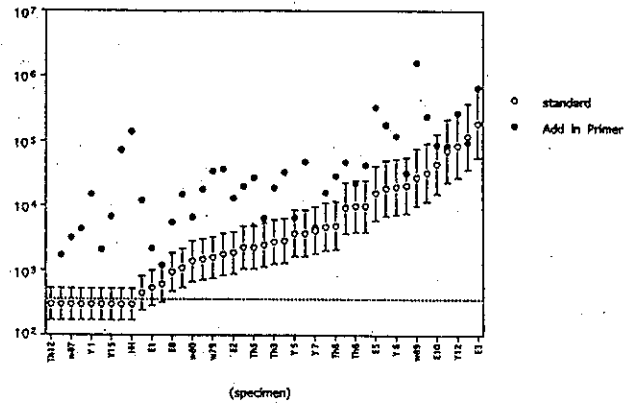
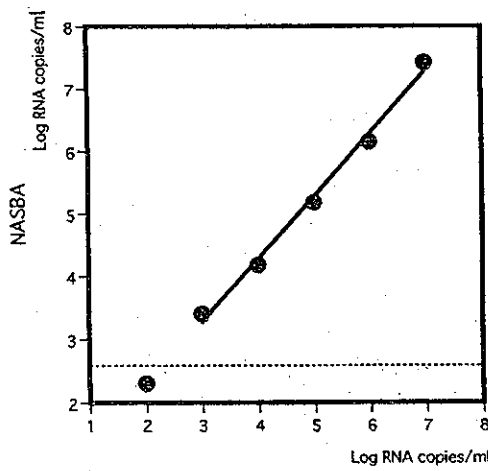
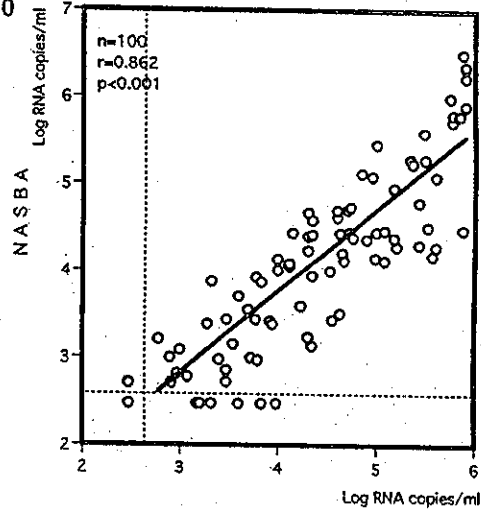


図10



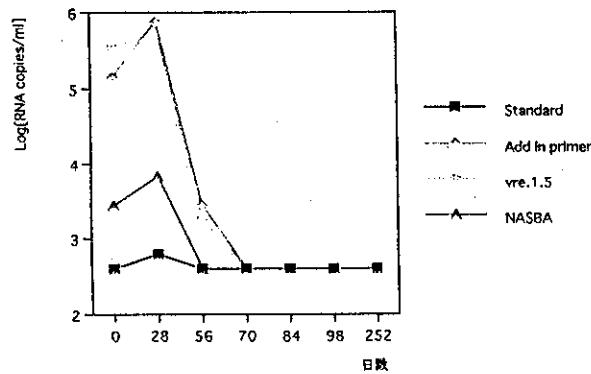
NASBA直線性



アンプリコアHIV-1モニター

NASBAとアンプリコアHIV-1モニターの関係 (サブタイプB)

図11



アンプリコアHIV-1モニター (standard, Add in primer, ver.1.5) と NASBAの定量値の違い

図1 組み換えウイルス法 (RVA)

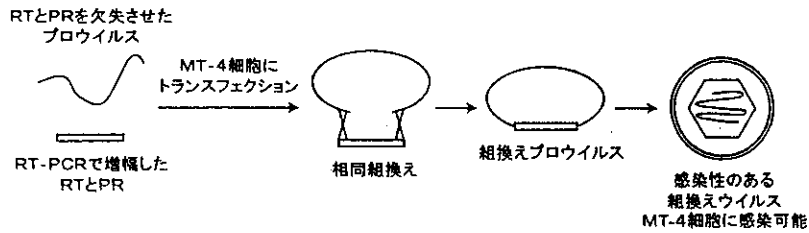


図2 表現型による薬剤耐性検査 (ACTG法)

1. 感染者のPBMCよりcocultureによってHIV-1を分離する.
2. HIV-1分離株の力価を段階希釈によって測定する
3. 一定の力価のHIV-1分離株を段階希釈した薬剤の存在下で培養し, 上清中の抗原量を定量することによってIC₅₀を求める.

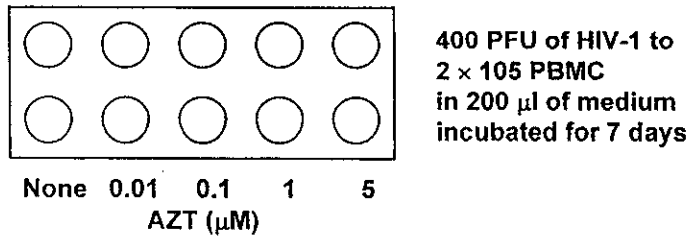


図3

プラーク法による薬剤耐性検査

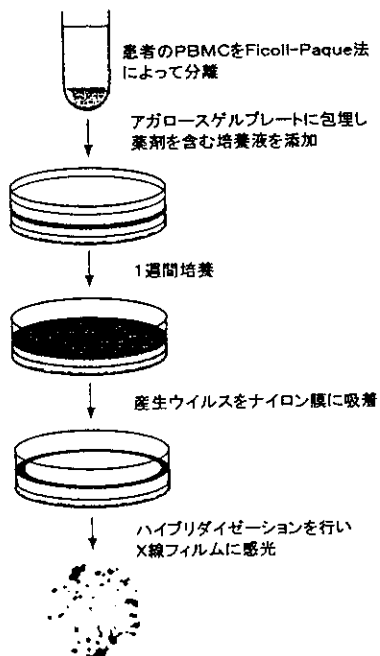
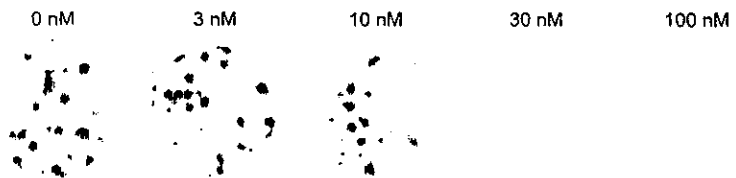


図4 NFVに対するLAI株の薬剤感受性



ワークショップ

“HIV 関連検査の確立と問題点”

薬剤耐性検査 (フェノタイプ) の現状と問題点 (加藤真吾) 資料-2

図5

遺伝型とブランク法による耐性検査の比較

Virus source	Period of HAART (weeks)	Amino acid in protease													Clone number
		10	20	30	36	46	54	63	71	77	82	84	88	90	
Plasma virion	-5, 25, 38	(I)	K	D	M	M	I	(P)	A	V	V	I	N	L	
	45	(I)	K	D	I	M	I	(P)	A	V	A	I	N	L	
Provirus	-5, 25, 38, 45	(I)	K	D	M	M	I	(P)	A	V	V	I	N	L	
	71	(I)	K	D	I	M	I	(P)	A	V	A	I	N	L	
Infectious virus	38	(I)	K	D	M	M	I	(P)	A	V	A	I	N	L	2/3
		L	K	D	M	M	I	(P)	A	V	V	I	N	L	1/3
	45	(I)	K	D	M	M	I	(P)	A	V	A	I	N	L	3/4
NFV sensitive		(I)	K	D	I	M	I	(P)	A	V	V	I	N	L	1/4

図6 表現型による薬剤耐性検査の利点と欠点

- 利点
- ・個々の薬剤に対する耐性を直接評価できるため、遺伝型よりも信頼できる。
 - ・複雑な変異パターンを解釈する必要がない。
 - ・新しい薬剤に対しても対応できる。
 - ・薬剤の選択に利用できる。
 - ・耐性のレベルを評価できる。(血中薬剤濃度と関連付けられる)
- 欠点
- ・費用がかかる(遺伝型では200-400ドル、表現型では900ドル)。
 - ・時間がかかる(遺伝型では5-10日間、表現型では2-5週間)。
 - ・特殊な封じ込め施設が必要(P3B2レベル?)。
 - ・PBMCは提供を受けにくく、個人差がある(PBMC法)。
 - ・ウイルス分離ができないと検査できない(PBMC法)。
 - ・RVA法は本質的に酵素分析である。
 - ・細胞株の薬剤代謝はPBMCと異なっている可能性がある。
 - ・研究室ごとに方法が異なるため、結果を比較しにくい。

遺伝型と表現型による二つの方法を組み合わせるのが良いのかもしれない。
例えば、遺伝型で耐性ウイルスの出現を知り、表現型で薬剤の選択を行う。

図7 国内において表現型による薬剤耐性検査を試験的に行っている医療施設

- ・国立感染症研究所 (ACTG法、新規の方法)
- ・国立国際医療センター (新規の方法)
- ・神奈川県衛生研究所 (ACTG法)
- ・慶応義塾大学医学部 (ブランク法、新規の方法)

・
・
・

(国外ではVIRCO社がRVA法によって商業的に行っている)

ワークショップ

“HIV 関連検査の確立と問題点”

薬剤耐性検査（ジェノタイプ）の現状と問題点（杉浦互）資料-3

図1

今後解決すべき問題

Genotypingは

治療変更の時期を決定しうるか？

次の投与薬剤を選択する指標になるのか？

患者の予後改善に有効か？

図2 Genotypingの利点と問題点

利点

P2実験室とPCR, Sequenceの設備があれば可能。
比較的安価である。
多量検体にも対応しうる。

問題点

Genotypingは間接的な感受性の評価方法である
必ずしも臨床経過と一致しない場合がある。
PCRで増幅するためコンタミネーションの危険を伴う。

図3

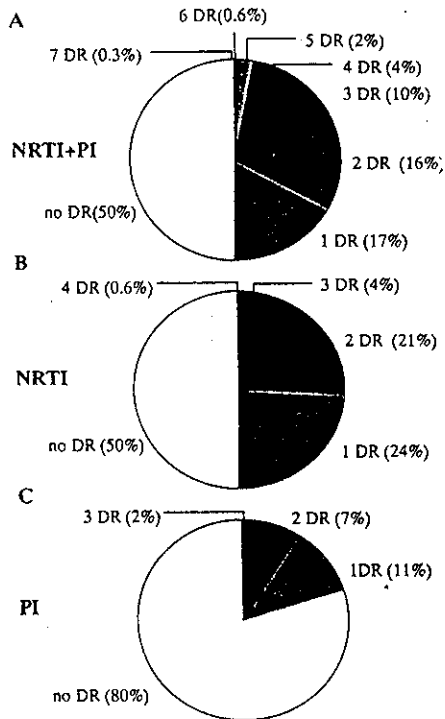


図4

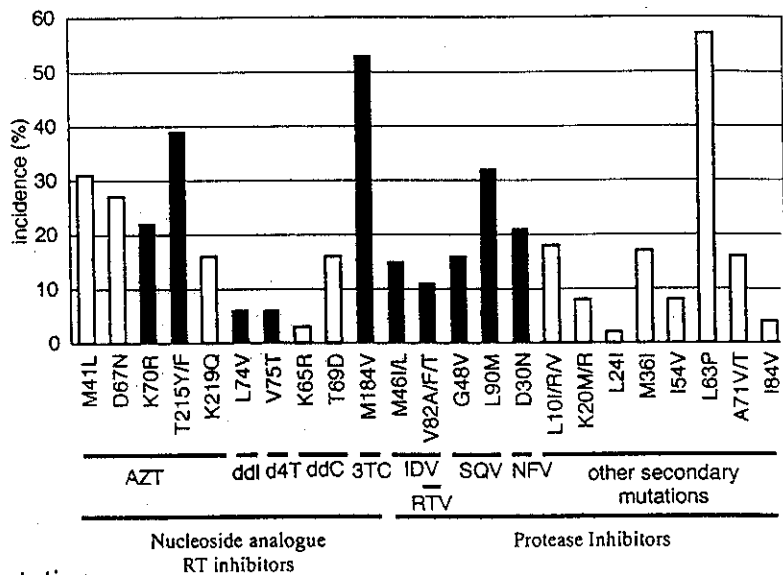


図5

Incidence of drug resistant mutations

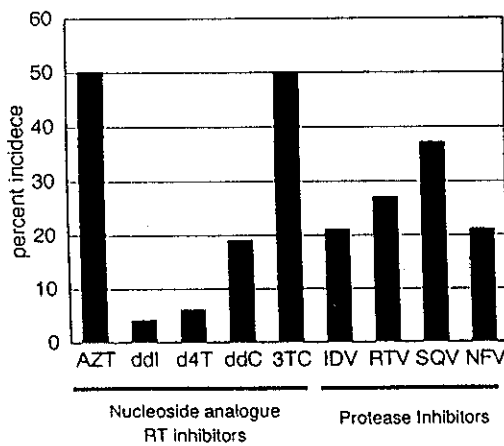


図1 HIV 関連検査と実施場所

検査項目	院内	院外	研究施設
スクリーニング抗体検査	◎	○	☆
確認検査 (WB法、IFA法)	○	○	☆
HIV-1 RNA量	◎	○	☆
プロウイルス定性	◎	○	☆
ウイルス分離			☆
Subtypeの鑑別		△	☆
耐性検査		△	☆

ワークショップ

“HIV 関連検査の確立と問題点”

病院検査室における HIV 検査の現状と問題点 (伊藤章) 資料-4

図2 Subtype E 感染 HIV 感染者における AMPLICOR HIV-1 MONITOR® と Add in primer Mix との比較
症例 1 35歳 Hetrosexual (Subtype E)

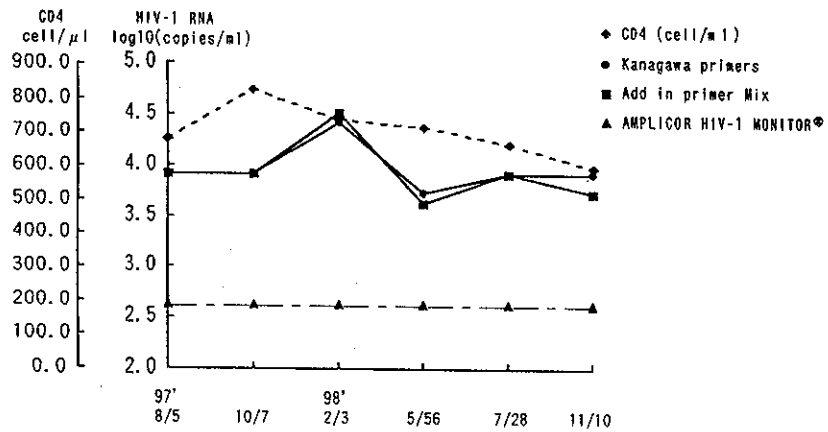


図3 HIV 感染者とサブタイプ

血液製剤以外の原因による感染者で
1993 年以降 55 名の HIV 感染者のうちで
サブタイプを調べることができた 29 例

Subtype B 14
Subtype E 14
Subtype G 1

図4 国内のアンプリコア使用施設

アンプリコア HIV-1 モニター 33施設
アンプリコア HIV-1 (プロウイルス) 41施設
Add in primer Mix 34施設
(ロシュ・ダイアグノスティックス調べ)

Add in primer Mix は殆ど1回だけの提供であった

- ・ 試しに使ってみた
- ・ 保健請求はできない
- ・ 日常には使っていない (殆どが研究目的)

- ・ 臨床側が Subtype E の RNA 量が低くなることの認識があるか
- ・ 臨床側が患者の Subtype を把握しているか

ワークショップ

“HIV関連検査の確立と問題点”

地方衛生研究所におけるHIV検査の現状と問題点（大石功）資料-5

図1

HIV感染症における衛生研究所の役割

感染の診断

1. 抗体スクリーニング検査（PA法、EIA法）
2. 抗体確認検査（ウエスタンブロット法など）
3. 遺伝子診断（PCR法、RT-PCR法）

母子、医療現場での針さし事故など

疫学調査

ハイリスクグループの抗体調査
産婦人科・泌尿器科・性病科などに協力を依頼

HIV感染者のフォローアップ

1. 血中HIV-1量の測定（RT-PCR法など）
2. 薬剤耐性試験（遺伝子解析法、感受性試験）
3. ウイルス分離（分離の成否、変異株の出現など）

図2

HIV感染者のフォローアップ検査項目

血中HIV・RNA量の測定

アンプリコアHIV-1モニター、RT-PCR法(自前)

ウイルス分離指標

- ・ウイルス分離の成否
- ・分離に必要な培養期間
- ・分離されたウイルスのT細胞株への感染性

薬剤耐性の獲得

- ・遺伝子解析
- ・薬剤感受性試験

図3

HIV感染者のフォローアップの問題点

検査費用

- ・臨床検査項目として確立していない
- ・予算措置がない
- ・行政による対応の限界

処理数に限度

：人員・予算に限界がある

医療システム

- ・HIV医療のバックアップシステムにおける衛生研究所の役割が公的に確立していない
- ・検査のレベルに地域差がある
- ・拠点病院の検査部門との関わりが明確ではない

ワークショップ
 “HIV 関連検査の確立と問題点”

民間検査センターにおける HIV 検査の現状と問題点 (植田昌宏) 資料-6

図1 HIVスクリーニング検査依頼数推移

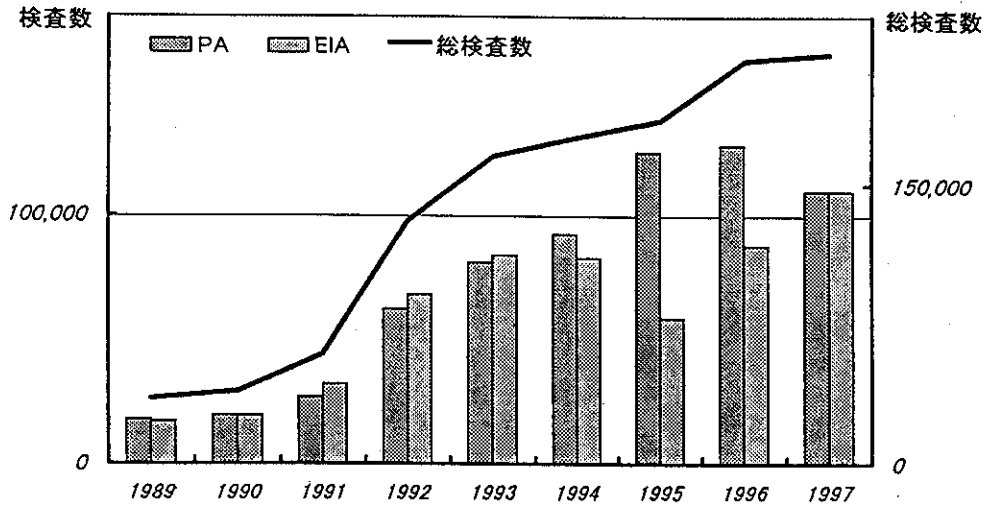


図2 HIVスクリーニング検査の現状

—SRLにおける1998年の検査結果一部抜粋—

スクリーニング検査			確認検査		備考
EIA	PA	報告数	WB	報告数	
+	+	36	+	28	PCR2例実施し2例共+
			±	7	
			-	1(極々希)	
+	-	34	+	0	PCR1例実施し+
-	+		±	3	
			-	31	

図3 HIV-1 PCR 検査

1. 定性検査
 プロウイルスDNA(PCR)
 RNA(RT-PCR)
2. 定量検査
 アンプリコア®モニター
 アンプリコア®モニター(Add-inn)
3. 鑑別検査
 サブタイプB/E

H I V R N A 定量キットの評価について

吉原なみ子、鈴木寿子、福嶋浩一、古谷崇子、中村太一、坂本優子
国立感染症研究所、エイズ研究センター 第二室

[研究要旨]

現在、血漿中のH I V - 1 R N A 定量にはアンプリコアH I V - 1 モニターが重要な検査法の一つとなっている。しかし、特異性の面において、一部のサブタイプでの反応性が低いことが問題となっているため、この対策としてアンプリコアH I V - 1 モニターVer1.0とこれにAdd in Primerを加えた方法、Ver1.0とは一部異なったプライマーを利用しているVer1.5、更にR N A 増幅による定量法であるN A S B A を用いて、各サブタイプによるR N A 量の検出感度について比較検討した。その結果、R N A 量はサブタイプBについては、それぞれのキット間に有意な差はみられなかった。しかし、アンプリコアH I V - 1 モニターVer1.0で検出限界以下と判定されたサブタイプA・Eの5検体が、Add in Primerを加えた方法とVer1.5では 10^3 コピーから 10^6 コピーの範囲で検出が可能となった。また同じ検体についてN A S B A により検討したところ、2検体が検出可能であった。これらの結果よりAdd in Primerを加えたアンプリコアH I V - 1 モニターおよびN A S B A は広範囲のサブタイプに応用ができ、有用な方法であると思われる。

[研究目的]

血漿中のH I V - 1 R N A 定量にはRoche社のアンプリコアH I V - 1 モニターVer1.0が承認化されており、重要な検査法の一つとなっている。しかし、特異性の面において、一部のサブタイプ(A/E)での反応性が低いことが問題となっている。日本ではサブタイプBの陽性率が最も高いが、サブタイプA・Eなどの他のサブタイプの報告もあり、臨床面でのアンプリコアH I V - 1 モニターの重要性を考慮すると、更に広範囲のサブタイプに対応可能な検査法が望まれている。今回はこの対策として開発された、Ver1.0にAdd in Primerを加える方法およびVer1.5と、従来のアンプリコアH I V - 1 モニターVer1.0との感度の違いについて比較した。更にR N A 増幅による定量法であるN A S B A についても検討した。また、アンプリコアH I V - 1 モニターに使用した各プライマーとH I V 感染者検体との遺伝子配列の違いについても比較をおこなった。

[研究方法]

(1) 対象キット

現在承認されているRoche社のアンプリコアH I V - 1 モニターVer1.0と、これにAdd in Primerを加えた方法、Ver1.0とは一部異なったプライマーを利用しているVer1.5、およびR N A 増幅によりコピー数を定量するOrganon Teknika社のN A S B A について比較した。

(2) 対象検体

日本のH I V 感染者血漿9検体、タイのH I V 感染者血漿25検体、およびU S A のH I V 感染者血漿8検体を用いた。これら各検体のg a g、e n v 領域についてシークエンスを行い、それぞれのサブタイプに分類した。

(3) R N A 定量

アンプリコアH I V - 1 モニターVer1.0は通常の操作法に従った。Add in Primer法は、Ver1.0にAdd in Primerを加える操作以外は通常の方法でおこない、

Ver1.5については指示書どおりの操作法で測定を実施した。またNASBAについても指示書どおりの操作法で測定した。

(4) 遺伝子配列の比較

シーケンスにより、HIV感染者検体とアンプリコアHIV-1モニターで使用する各プライマー部分との遺伝子配列の比較を行った。

[研究結果]

各サブタイプによる検出感度、RNA量の違いを比較検討したところ、日本、タイおよびUSAの検体のうちサブタイプBに分類されたものは、アンプリコアHIV-1モニターVer1.0と、Add in Primerを加えた方法、およびVer1.5との間に有意な差は認められなかった(図1・2)。NASBAでは若干のばらつきがみられるが、アンプリコアHIV-1モニターVer1.0と一致した結果となった(図3)。一方、サブタイプA、Eに分類された検体について比較したところ、アンプリコアHIV-1モニターVer1.0で検出限界以下と判定された5検体のうち4検体が、Add in Primerを加えた方法で 10^3 コピーから 10^6 コピーの範囲で検出が可能となった(図4)。他の16検体についてはコピー数がVer1.0よりも高く測定された。またVer1.5についても、Ver1.0で検出限界以下となった5検体のうち4検体が 10^3 コピーから 10^6 コピーの範囲で検出が可能となった(図5)。Add in Primerを加えた方法とVer1.5とを比べると、コピー数はVer1.5の方が高く検出される傾向があることが認められた。NASBAについては、アンプリコアHIV-1モニターVer1.0で検出限界以下と判定された5検体のうち2検体が 10^2 コピーから 10^4 コピーの範囲で検出でき、14検体がVer1.0と同じかそれ以上、2検体が低めに検出され、1検体が検出限界以下となった(図6)。

これらのHIV感染者検体の遺伝子配列をシーケンスにより検出し、アンプリコアHIV-1モニターで使用する各プライマーの配列と比較したところ、サブタイプBではVer1.0とのミスマッチが3塩基から5塩基(図7)、Add in Primerでは1塩基から3塩基(図8)、Ver1.5では0から2塩基であった(図9)。一方、サブタイプA、Eの検体ではVer1.0のプライマーとのミスマッチが6塩基から10塩基であったのに対し(図10)、Add in Primerでは4塩基から8塩基に(図11)、Ver1.5のプライマーでは2塩基から6塩基となり(図12)、プライマーと検体との配列の差が減少していることが認められた。

[考察]

以上の結果より、サブタイプBと分類された検体についてはアンプリコアHIV-1モニターの各キット間に有意な差は認められなかった。これはアンプリコアHIV-1モニターVer1.0のプライマーがもともとサブタイプBをもとに設計されているためであると考えられる。サブタイプA・EについてはアンプリコアHIV-1モニターVer1.0と比べて、Add in Primer、Ver1.5では検出感度、コピー数ともに上昇した。Add in Primer、Ver1.5とを比べると、全体的にVer1.5の方が高いコピー数で検出されたのは、検体とプライマーとのミスマッチがより減少しているためであると考えられる。一方、NASBAではAdd in Primer、Ver1.5と比べて、サブタイプA・Eの測定値にばらつきがみられ、1検体は検出限界以下となった。NASBAは広範囲のサブタイプに応用できるようにプライマーが設計されているがアンプリコアHIV-1モニターとは異なった領域をターゲットにしていることと、アンプリコアHIV-1モニターのようなPCRによるDNA検出ではなく、RNA量を直接検出する原理からこのような差がみられたと思われる。しかし、モニターVer1.0で検出限界以下だった2検体が検出できたため、明らかに感度は上昇していることが認められた。以上より、従来のアンプリコアHIV-1モニターVer1.0の問題点は、これらのキットを利用することによって大幅に軽減されることが考えられ、今後も重要な検査法になると思われる。

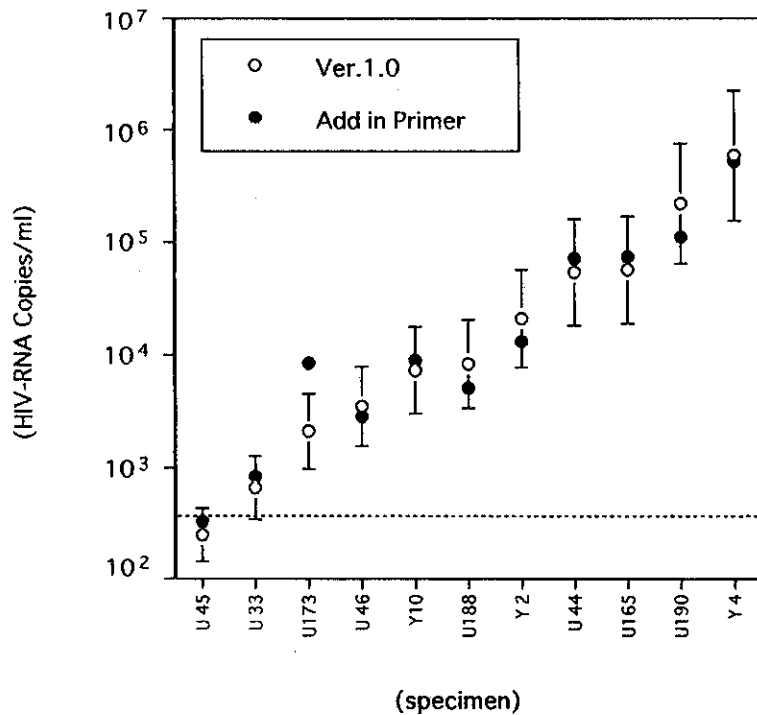


図1. サブタイプBにおけるVer1.0とAdd in Primer法との比較

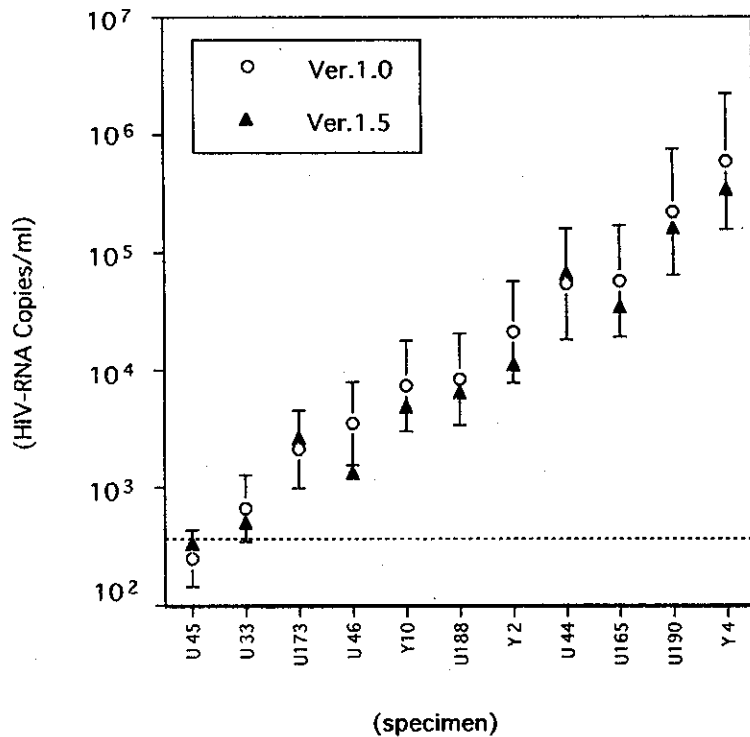


図2. サブタイプBにおけるVer1.0とVer1.5との比較

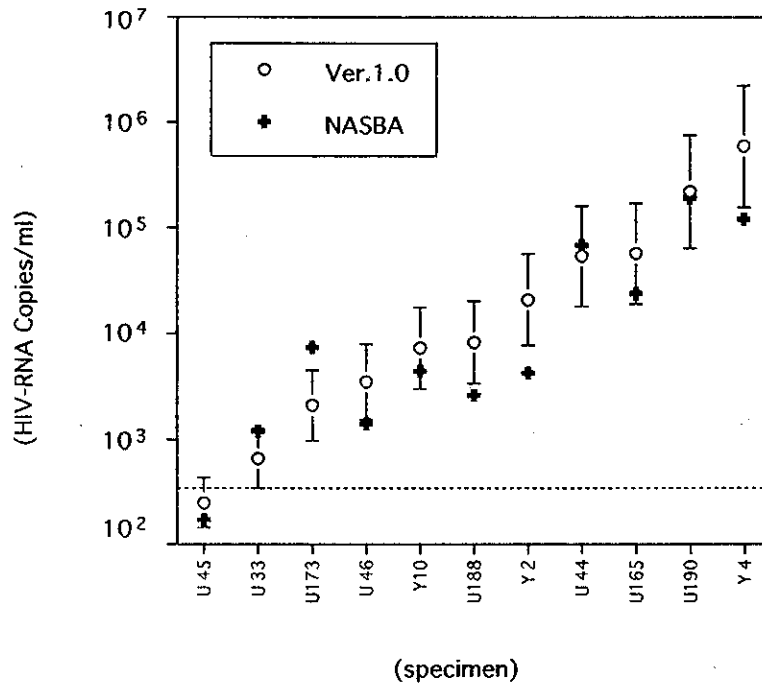


図3. サブタイプBにおけるVer1.0とNASBAとの比較

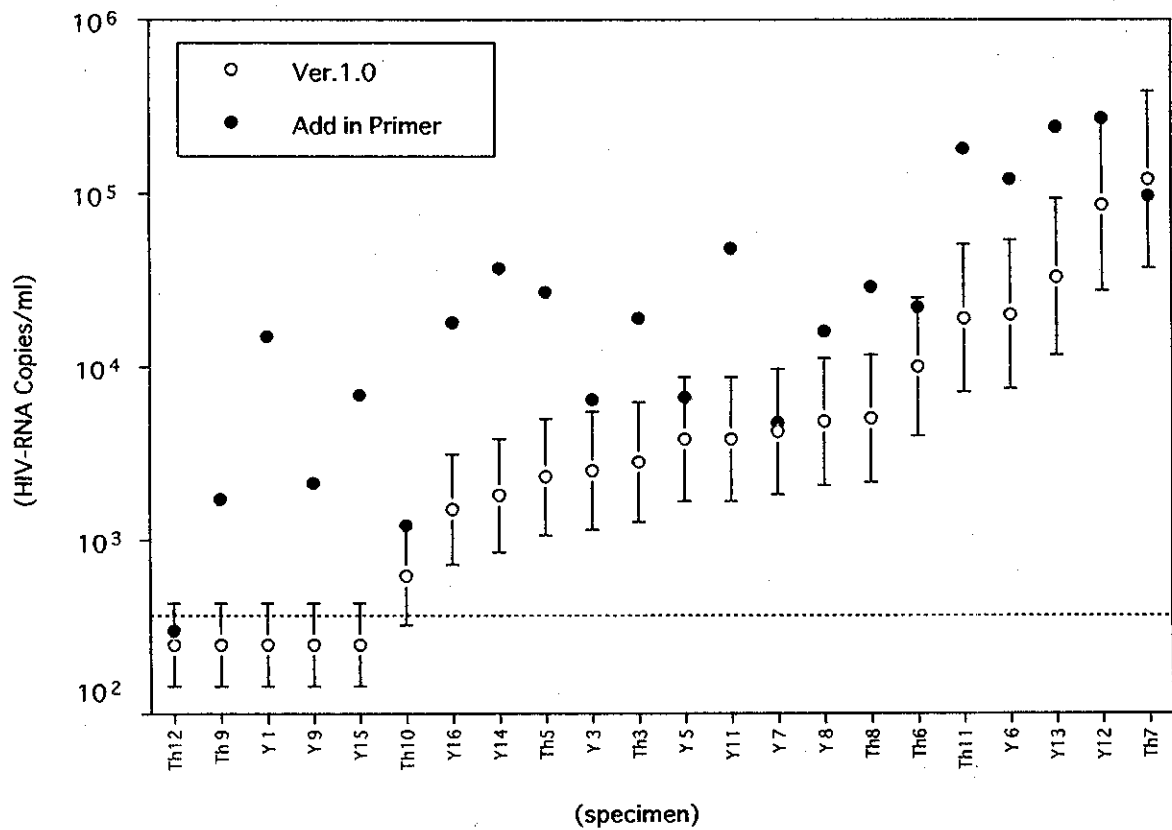


図4. サブタイプEにおけるVer1.0と Add in Primer法 との比較

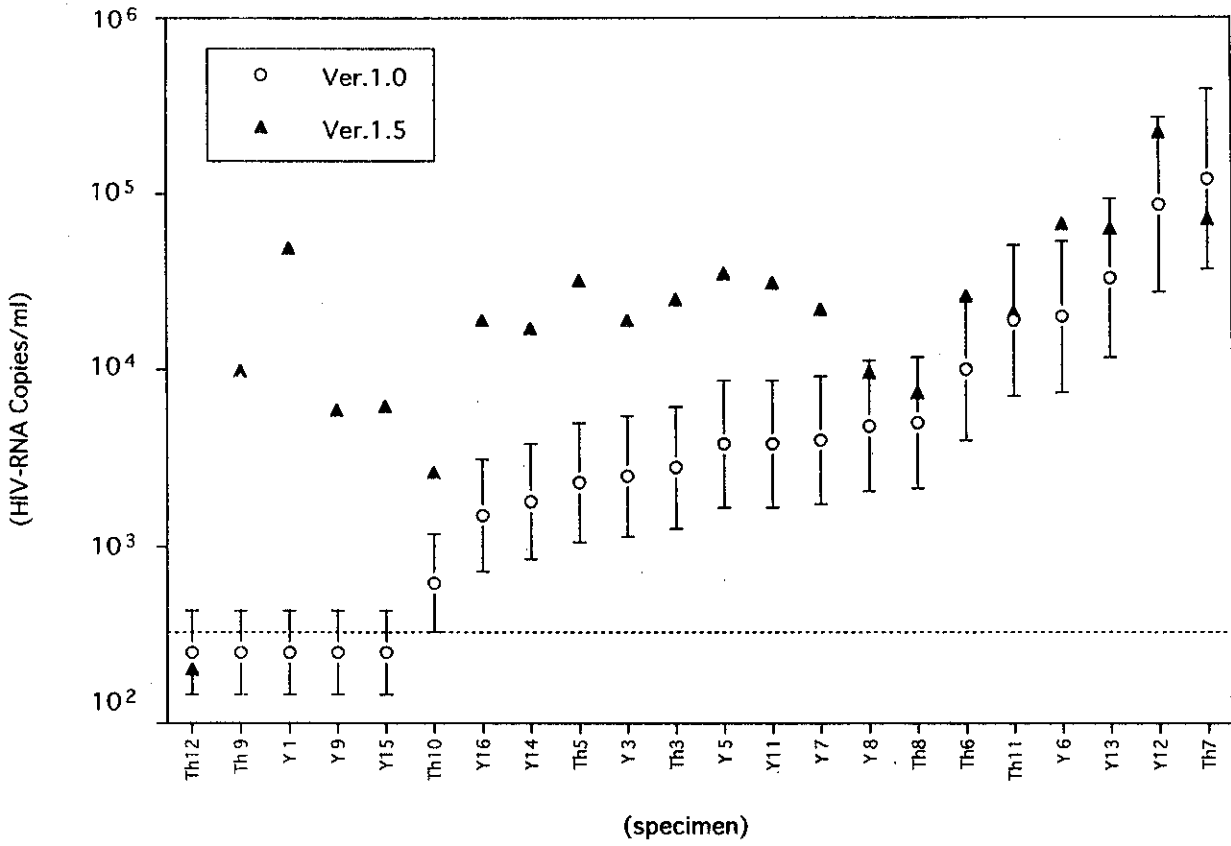


図5. サブタイプEにおけるVer1.0とVer1.5との比較

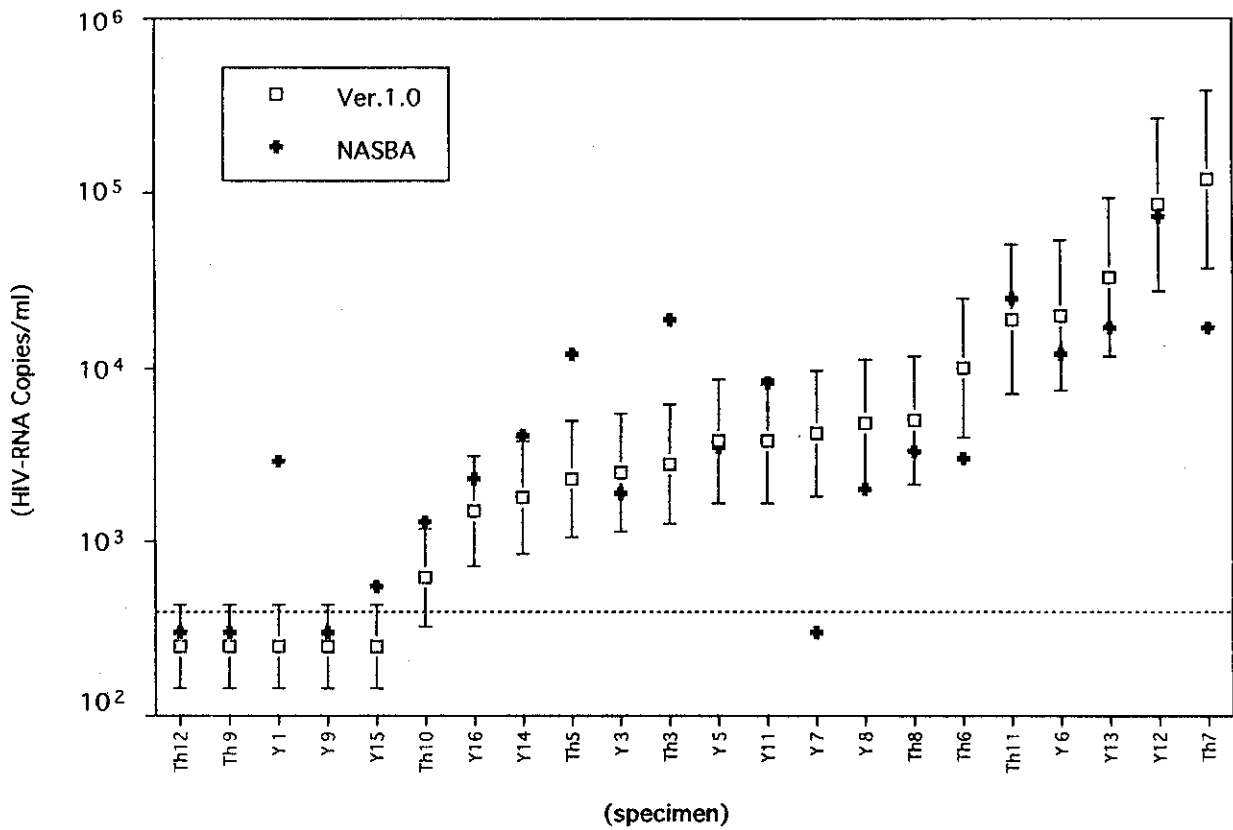


図6. サブタイプEにおけるVer1.0とNASBAとの比較

	(sk 462)	(sk 102)	(sk 431)
	AGTTGGAGGACATCAAGCAGCCATGCAAAT	GAGACCATCAATGAGGAAGCTGCAGAATGGGAT	AGAGAACCAAGGGGAAGTGCATAGCA
U33	---G--G--G-----	-----	--G-----G-----
U173	---G--G-----	-----T-----	-----G-----
U46	---G--G---C-----	-----T-----G-----	-----G-----
Y10	---G--G-----	--A-----	-----G-----
U188	---G--G-----	--A-----	-----G-----
Y2	---G--G-----G--	-----G-----	-----G-----
U44	---G--G-----	-----G-----	-----G-----
U165	---G--G-----	-----T-----	-----G-----
U190	---G--G-----	-----	-----G--T-----
Y4	---G--G-----G--	--A-----	-----GC-----

図 7. サブタイプ B における Ver.1.0 での Primer 領域

	(sk 145)	(sk 102)	(sk 151)
	AGTGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAAAT	GAGACCATCAATGAGGAAGCTGCAGAATGGGAT	CGAGAACCAAGGGGAAGTGCATAGCA
U33	-----G-----	-----	A-G-----
U173	-----	-----T-----	A-----
U46	-----C-----	-----G-----	A-----
Y10	-----	--A-----	A-----
U188	-----	--A-----	A-----
Y2	-----G--	-----G-----	A-----
U44	-----	-----G-----	A-----G-----
U165	-----	-----T-----	A-----
U190	-----	-----	A-----T-----
Y4	-----G--	--A-----	A-----C-----

図 8. サブタイプ B における Add in Primer 法での Primer 領域

	(sk 145)	(sk 102)	(sk ce19)
	AGTGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAAAT	GAGACCATCAATGAGGAAGCTGCAGAATGGAT	GGAAGTGACATAGCAGGAAGTACTAGTA
U33	-----G-----	-----T-----	-----
U173	-----	-----	-----
U46	-----C-----	-----G-----	-----
Y10	-----	-----A-----	-----
U188	-----	-----A-----	-----
Y2	-----G-----	-----G-----	-----
U44	-----	-----G-----	-----
U165	-----	-----T-----	-----
U190	-----	-----	-----T-----
Y4	-----G-----	-----A-----	-----C-----

図9. サブタイプBにおけるVer.1.5でのPrimer領域

	(sk 462)	(sk 102)	(sk 431)
	AGTGGGAGGACATCAAGCAGCCATGCAAAT	GAGACCATCAATGAGGAAGCTGCAGAATGGAT	AGAGAACCAAGGGGAAGTGCATAGCA
Th9	--G--G--A--C--G--G--G--	--A-----	--G-----G-----
W88	--G--G--C--G--A-----	--A-----	--G-----G-----
Y1	--G--G--C--G--G--A-----	--A-----	--G-----G-----
Y9	--G--G--C--G--G-----	--A-----	--G-----G-----
Y15	--G--G--C--G--A-----	--A-----	--G-----G-----
HH	--G--G--C--G--A--G--	--A-----T-----C-----	--G-----G-----
MX	--G--G--C--G--A--G--	--T-----T-----C-----	--G-----G-----
W83	--G--G--C--G--A-----	--A-----	--G-----G-----
E1	--G--G--C--G--A-----	--A-----	--G-----G-----
Th10	--G--G--C--G--A-----	--A-----C-----	--G-----G-----
B8	--G--G--C--G--A-----	--A-----A-----	--G-----A--G--G-----
Y16	--G--G--C--G--A-----	--A-----	--G-----G--G-----
Y14	--G--G--C--G--A-----	--C-----	--G-----G-----
E2	--G--G--C--G--A-----	--A-----	--G-----G--G-----
Th5	--G--G--C--G--A-----	--A-----T-----C-----	--G-----G-----
Y3	--G--G--C--G--A-----	--A-----G-----	--G-----G-----
Th3	--G--G--C--G--A-----	--A-----	--G-----G-----
Y5	--G--G--C--G--A-----	--A-----	--G-----G-----
Y11	--A--G--C--G--A--G--	--A-----	--G-----G--T-----
Y7	--G--G--C--G--A-----	--A-----	--G-----G-----
Y8	--G--G--C--G--A-----	--A-----	--G-----G-----
Th8	--G--G--C--G--A-----	--A-----	--G-----G-----
E9	--G--G--C--G--A-----	--A-----	--G-----G-----
E5	--G--G--A--G--A-----	--A-----	--G-----G-----
E6	--A--G--C--G--A-----	--A-----	--G-----G-----
Th6	--G--G--C--G--A-----	--A-----	--G-----G-----
Th11	--G--G--C--G--A-----	--A-----	--G-----G--T-----
Y6	--G--G--C--G--A-----	--A-----	--G-----G--T-----
Y13	--G--G--C--G--A-----	--A-----	--G-----G-----
Y12	--G--G--C--G--A-----	--A-----C-----	--G--G--G-----
Th7	--G--G--C--G--A-----	--A-----	--G-----G-----
E3	--A--G--C--G--A-----	--A-----	--G-----G-----

図10. サブタイプA・EにおけるVer.1.0でのプライマー領域

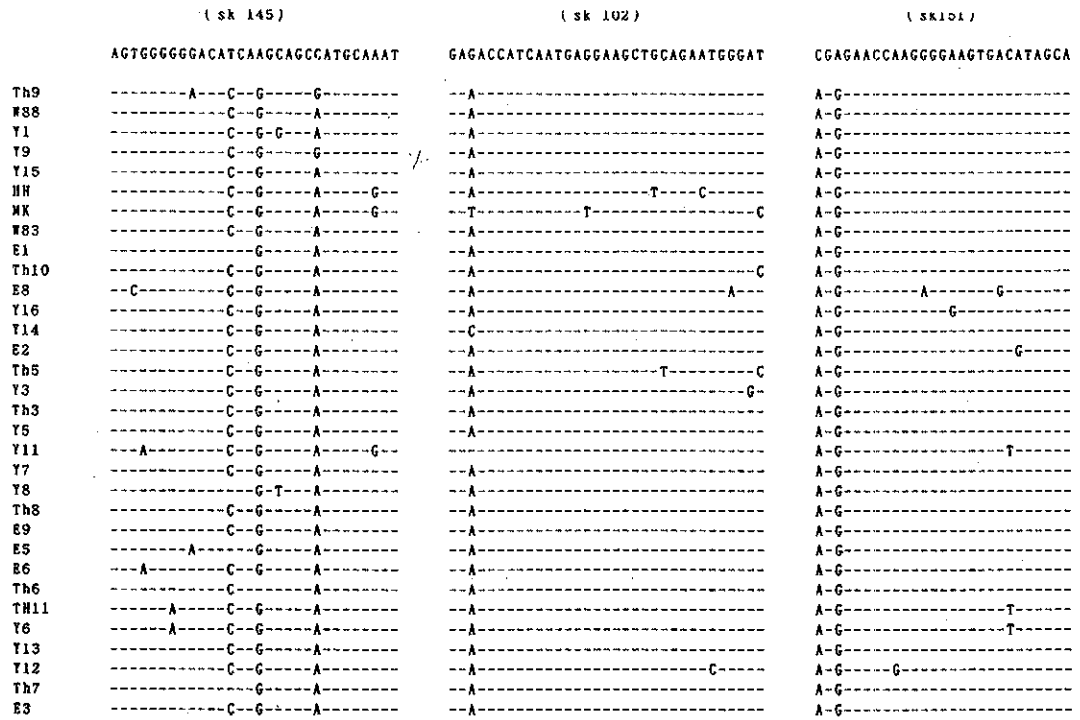


図 1 1 . サブタイプ A・Eにおける Add in Primer法での Primer領域

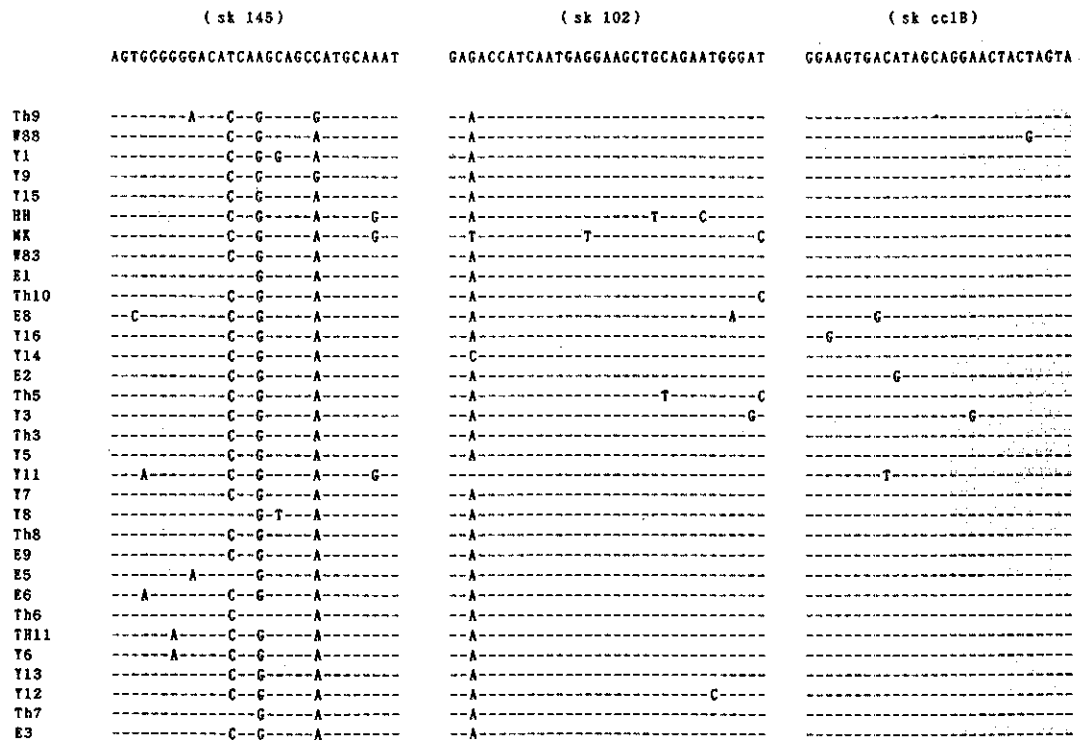


図 1 2 . サブタイプ A・Eにおける Ver.1.5での Primer領域

HIV感染者のフォローアップ検査に関する研究

分担研究者 大石 功

共同研究者 大竹 徹 森 治代 泉本洋子 川畑拓也

(大阪府立公衆衛生研究所)

HIV-1感染者の病態および抗HIV剤治療効果の把握ためのマーカーとしての、ウイルス分離によるHIVフェノタイプの変化、血中ウイルスコピー数、遺伝子解析による薬剤耐性検査の問題点について検討した。コンビネーション治療法の発達が見られた97～98年におけるウイルス分離のデータには大きな変化が見られ、これらが薬剤治療マーカーとして優れていることが示唆された。また薬剤耐性を検出するためには遺伝子解析が有用であることが判明したが、まれに臨床マーカーとの矛盾があり、薬剤感受性試験を実施する必要性があることが示された。

研究目的

HIV感染者のフォローアップにおいて、病態の把握と抗HIV剤の効果判定が重要な情報となるが、著者らは、1987年より感染者からのウイルス分離を開始し、検出される体内のウイルスのフェノタイプ（細胞トロピズム）の変化がエイズ発症の指標になることを見出ししている^{1)~3)}。さらに、1995年からは血中HIV量の測定、および薬剤耐性試験を加え、より正確で簡便なフォローアップシステムの確立を目指してきた。前年度は検査体制の経過と現状の概要を報告したが、今回は、各々の検査法における新たな知見について述べる。

研究方法

ウイルス分離：すでに報告した方法^{1,2)}に

てウイルス分離を行った。ウイルス分離による病態の判定は、分離の成否、分離に要する培養期間（週）および分離されたHIV-1のMT-2およびMT-4細胞への感染性の有無により判定した。

血中HIV-1RNAコピー数の測定はロッシュ社のアンプリコアHIV-1モニターを用いて測定した。

抗HIV剤の耐性ウイルスの検出：感染者の末梢血単核球よりDNAを抽出し、HIV-1の逆転写酵素およびプロテアーゼ領域についてnested PCRを行い増幅後、ダイレクトシーケンス法にて塩基配列を決定した。
抗体の分析：HIV-1の各成分に対する抗体の変化をウエスタンブロット法により観察した。

研究成績および考察

フォローアップ検査数（表）

1998年、1年間に大阪府をはじめ近畿の全府県にまたがる14カ所の医療機関より、フォローアップ検査の依頼があった。感染者数は70名、検査回数は延187回であった。ウイルス分離、抗体検査(WB法)、血中ウイルスコピー数の測定および薬剤耐性試験各々の検査数は前年より減少したが、これは予算と人手の限られた状況において、優先的に実施すべき検査項目を絞り込んだ結果である。

ウイルス分離によるフォローアップ

無症候性キャリア(AC)における1997年および1998年2年間の平均ウイルス分離率は39%であり、1988~1996年の8年間の平均64%に比べ大幅に低下した。さらに分離されたウイルスの悪性化タイプ(T細胞株へ感染するタイプ)出現率も同様に21%から8%へと急激な低下を見せた。また、図1はCD4+細胞値により病態を分類し、ウイルス分離との関連を示したグラフである。1988~1996年までのデータではCD4+細胞数が低下するに従い、ウイルス分離率は上昇し、分離に要する培養期間は短縮し、分離ウイルスのMT-4細胞へ感染性を持つSIタイプ株の比率は上昇を見せた。しかし、最近2年間(1997、1998年)のデータでは同様な傾向は見られるものの、ウイルス分離率全体は以前より低下し、分離に要する培養期間は延長し、分離ウイルスのうちSIタイプの出現は極端に減少し、CD4+細胞が99

以下の群にしか認められなくなった。

これらの現象は、この1~2年間に発達した逆転写酵素阻害剤およびプロテアーゼ阻害剤を3~4剤併用するコンビネーション療法の影響によるものであることが強く示唆された。

さらに個々の感染者についてウイルス分離のデータを検討してみると、薬剤による治療が効を奏して血中ウイルス量が減少し、CD4陽性細胞数が上昇した例では、治療開始以前に悪性化タイプのウイルスが検出されていたものでも、ウイルスが分離されなくなったり、分離に要する培養期間が延長し、さらに悪性化タイプのウイルスが消失したりする例が少なからず見られた。

治療が効を奏した典型的な例を図2に示した。この例は治療開始時期にはSIタイプのウイルスが分離されていた。薬剤治療、特に20週目から開始したAZT、3TC、インディナビル剤の3剤併用療法が効果を表した結果、血中ウイルスコピー数が激減し、CD4+細胞数の劇的な回復が見られた。これらの過程において、ウイルス分離に要する培養期間は2週から5週へと延長し、MT-4細胞への感染性も消失し、ついに治療開始60週にはウイルスは分離されなくなった。この例では、当初、逆転写酵素領域の215番目のアミノ酸(AZT耐性)に変異が見られたが経過において消失し、プロテアーゼ領域の薬剤耐性に関わる変異も認められなかった。

以上、ウイルス分離によるデータにおい