

env tree

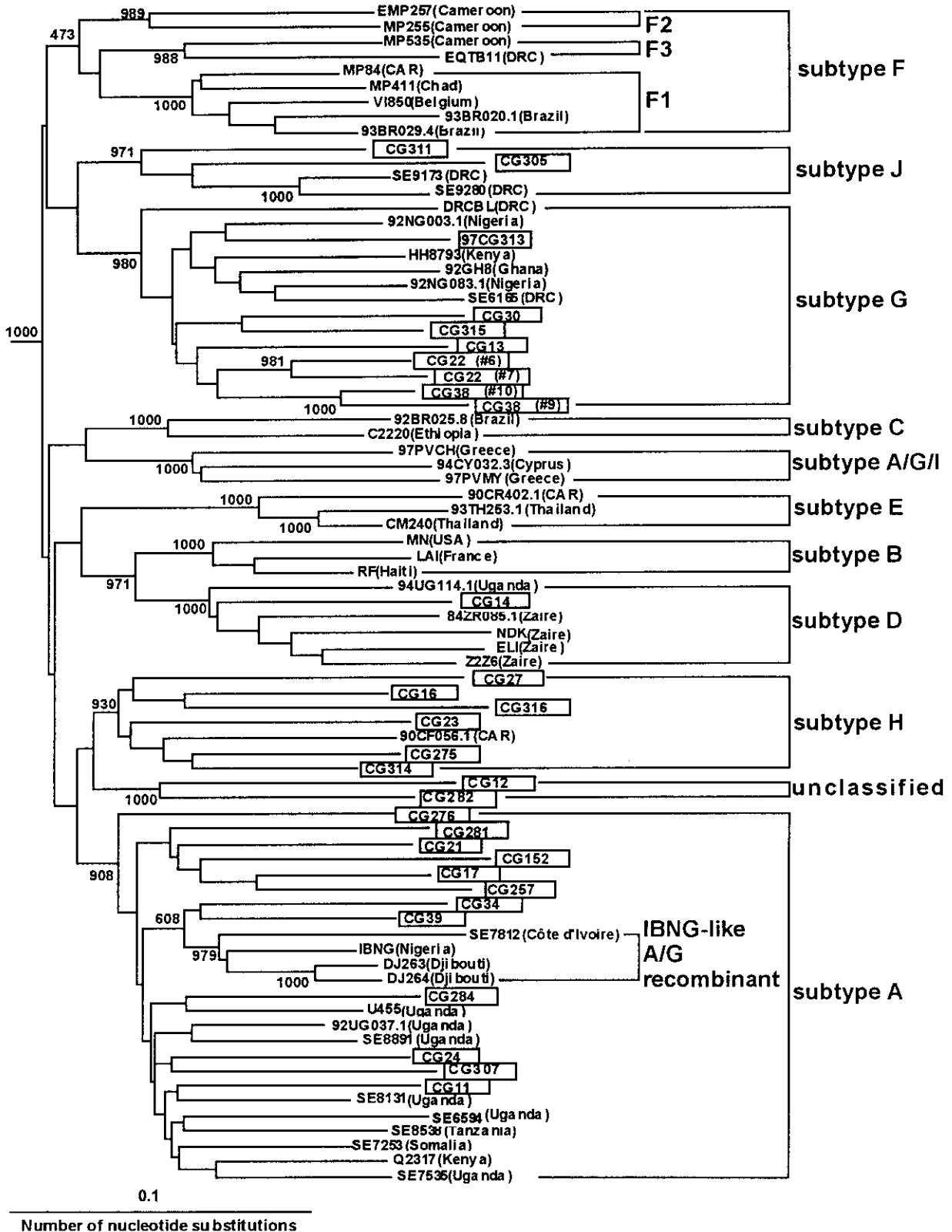


図. コンゴの HIV-1のenv遺伝子に基づく分子系統樹

HIV-1 重感染個体内におけるサブタイプ／グループ別ウイルスコピー数の定量

班員研究者 市村 宏 (金沢大学医学部医学科国際環境保健学講座)

研究協力者 武久 盾 (金沢大学医学部医学科国際環境保健学講座)

研究要旨

血漿中ウイルス量は HIV-1 感染症の進行速度や、感染者の予後を推定する上で重要な指標となっている。現在の検査法ではいずれのサブタイプのウイルスでも、ほぼ同等の感度・定量値で測定が可能であるが、サブタイプを鑑別して測定することはできない。今回、我々は3種類のサブタイプ／グループ別にウイルスコピー数の定量を行うことのできるリアルタイム PCR の系を確立した。複数のウイルスに重感染している症例においては、AIDS 発症過程におけるウイルスコピー数の推移から、発症に関与したサブタイプが特定でき、HIV-1 のサブタイプ／グループ間の病原性の違いを明らかにすることができるものと考えられた。

A. 研究目的

HIV-1 三重感染例において、3種のウイルスそれぞれのプロウイルス DNA/血漿ウイルス RNA の定量を可能とする、リアルタイム PCR の系の作成を目的とした。

B. 研究方法

CRF02_IbNG、サブタイプD、グループ0の3種類の HIV-1 に三重感染したカメルーン人女性から、1994、95、96、98年に経時的に得られた PBMC 中の DNA 及び血漿中の RNA を用いた。感染個体内における3種類のウイルスを区別してそれぞれのウイルスコピー数の定量解析が行える系を設定した。PBMC (末梢単核球) 中のプロウイルス DNA と血漿ウイルス RNA のコピー数をリアルタイム PCR 法で検討した。

C. 研究結果

リアルタイム PCR 用のサブタイプ特異的プライマー／プローブを V3 領域周辺に作成した。それぞれのプライマーでは他の2種類のウイルスが増幅されないことを、各 env 遺伝子がクローニングされたプラスミド DNA を用いて確認した(表1)。解析の結果、以下に述べる知見が得られた。3種のウイルスが、プロウイルス中に占める割合と、(現に体内で複製されている)血漿中に占める割合とは異なっていた(図1、図2)。env 領域に CRF02(IbNG)を持つウイルスのプロウイルス DNA が、全ウイルス集団に占める割合は、漸次増加し1996年に8割を越えた。CRF02の血漿中のウイルス RNA 量は、サブタイプD/グループ0のウイルス量よりも1996年で30倍、1998年で100倍以上多く、個体内での割合も97%-99%を占め

るに至った。env 領域にグループ 0 を持つウイルスのプロウイルス量は 1994 年以降減少し、また血漿中のウイルス RNA は

D. 考察

現在、血漿中ウイルス量の検査には、サブタイプを問わずほぼ同等の感度・定量値で測定可能であるアンプリコア HIV-1 モニター ver1.5 (ロシュ・ダイアグノティックス) が広く用いられている。しかし、このキットでは重感染個体内における各々のウイルス量の測定は不可能である。今回、我々はサブタイプ/グループ毎にリアルタイム PCR 法でウイルスコピー数を定量する系を作成した。本重感染症例において、AIDS 発症過程における 3 種類のウイルス量の推移が明らかにできた。env 領域に CRF02 (IbNG) を持つウイルス集団が発症に関与していることが示唆された。HIV-1 サブタイプ/グループ間の病原性の違いは十分に明らかにされていないが、少なくともこの重感染例においては、CRF02 がサブタイプ D/グループ 0 株に比べて、より病原・性が強かったと考えられる。CRF02 は近年アフリカで爆発的に侵淫していることから、事実、CRF02 は他のサブタイプ/グループよりも病原性が強いのかもしれない。

E. 結論

サブタイプ別にウイルス量の定量を行うことのできるリアルタイム PCR の系を確立した。複数のウイルスに重感染している症例においては、ウイルスコピー数の動態から HIV-1 のサブタイプ/グループ間の病原性の違いを明らかにすること

当初(1994 年)からほとんど検出されなかった。

ができるものと考えられた。

F. 研究発表

論文発表

1. Bikandou B, Takehisa J, Mboudjeka I, Ido E, Kuwata T, Miyazaki Y, Moriyama H, Harada Y, Taniguchi Y, Ichimura H, Ikeda M, Ndolo PJ, Nzoukoudi MY, M'Vouenze R, M'Pandji M, Parra HJ, M'Pele P, Hayami M: Genetic subtypes of HIV type 1 in Republic of Congo. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 2000. 16:613-619.
2. Iida T, Ichimura H, Shimada T, Ibuki K, Ui M, Tamaru K, Kuwata K, Yonehara S, Imanishi J, Hayami M: Role of apoptosis induction in both peripheral lymph nodes and thymus in progressive loss of CD4+ cells in SHIV-infected macaques. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 2000. 16:9-18.
3. Songok EM, Kakimoto K, Genga J, Okello C, Makokha E, Kageyama S, Kobayashi N, Fujiyama Y, Ichimura H: Prenatal short-course Zidovudine reduces mortality in children born to HIV-positive mothers in rural Kenya. *J Infect Dis*, 2001 (in Press).
4. Takehisa J, Harada Y, Ndombi N, Mboudjeka I, Taniguchi Y, Ngansop C, Kuate S, Zekeng Z, Ibuki K, Shimada T, Bikandou B, Miura T, Ikeda M, Ichimura H, Kaptue L,

Hayami M: Natural infection of wild-born mandrills (*Mandrillus sphinx*) with two different types of simian immunodeficiency virus (in submission)

5. 武久 盾、市村 宏: HIV 感染症-HIV の起源と多様性獲得のメカニズム-. 医学のあゆみ、2000. 195:359-365.
6. 武久 盾、市村 宏: HIV-1 とリコンビネーション-サブタイプ E はリコンビナントか? 治療学、2001. 35 (in Press).

学会発表

1. 武久 盾、原田陽介、田丸敬次郎、谷口裕子、原田陽介、速水正憲、市村宏: HIV-1 重感染患者の個体内進化におけるウイルスポピュレーションの推

移とコピー数の定量、第14回日本エイズ学会総会、京都、2000年11月28-30日.

2. 市村 宏、阿知原直子、武久 盾、和田 学、城野浩之、古賀淳一: HIV 感染者における CD8 陽性 T 細胞由来可溶性抗 HIV 因子活性とカテプシン E の発現、第14回日本エイズ学会総会、京都、2000年11月28-30日.
3. Songok EM, Genga IO, Akuku A, Kibaya RM, Takehisa J, Kobayashi N, Fujiyama Y, Ichimura H: Prevalence of infection with HHV-8 and HIV among STD patients in Kenya、第14回日本エイズ学会総会、京都、2000年11月28-30日.

表1. Detection of viruses by PCR with primer pairs specific to each virus

Virus(es)	Detection by primer pair		
	CRF02 subtype D	group O	
CRF02 (IbNG)	+	-	-
subtype D	-	+	-
group O	-	-	+

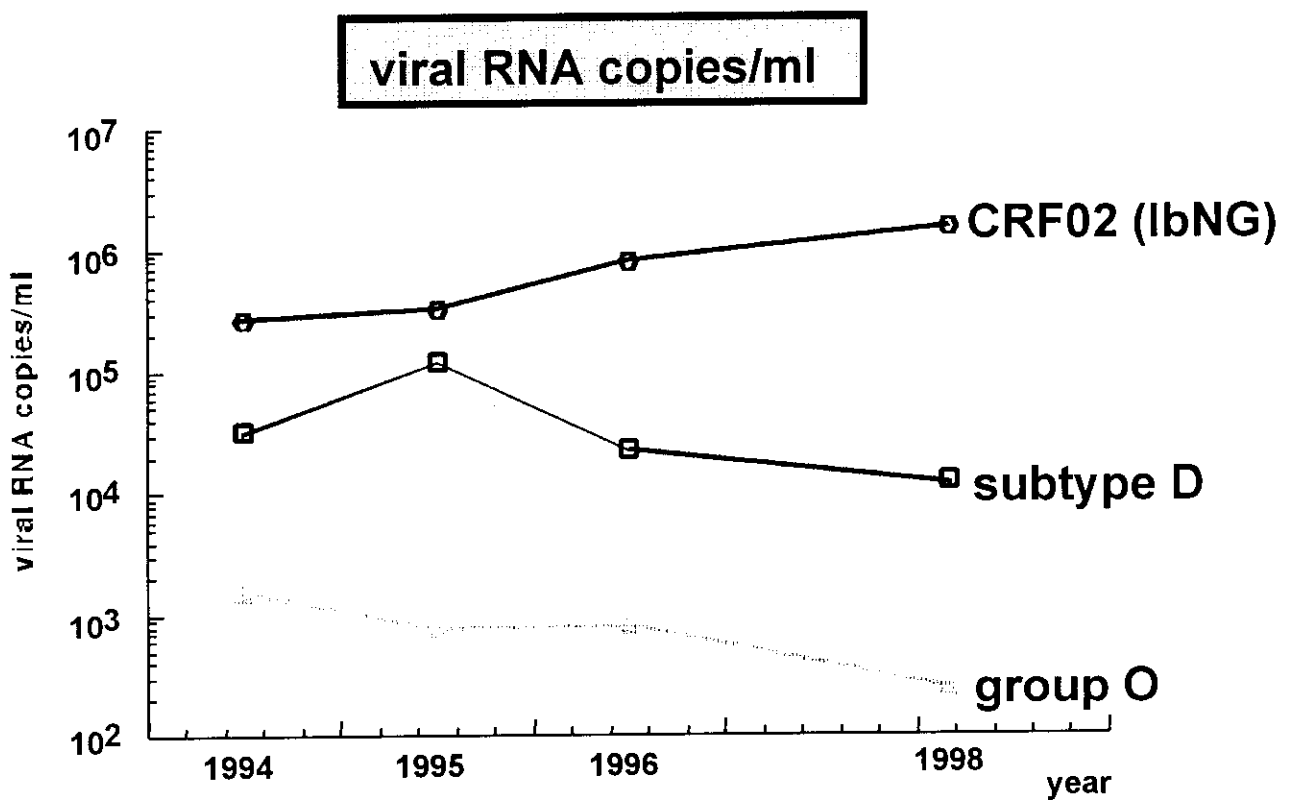
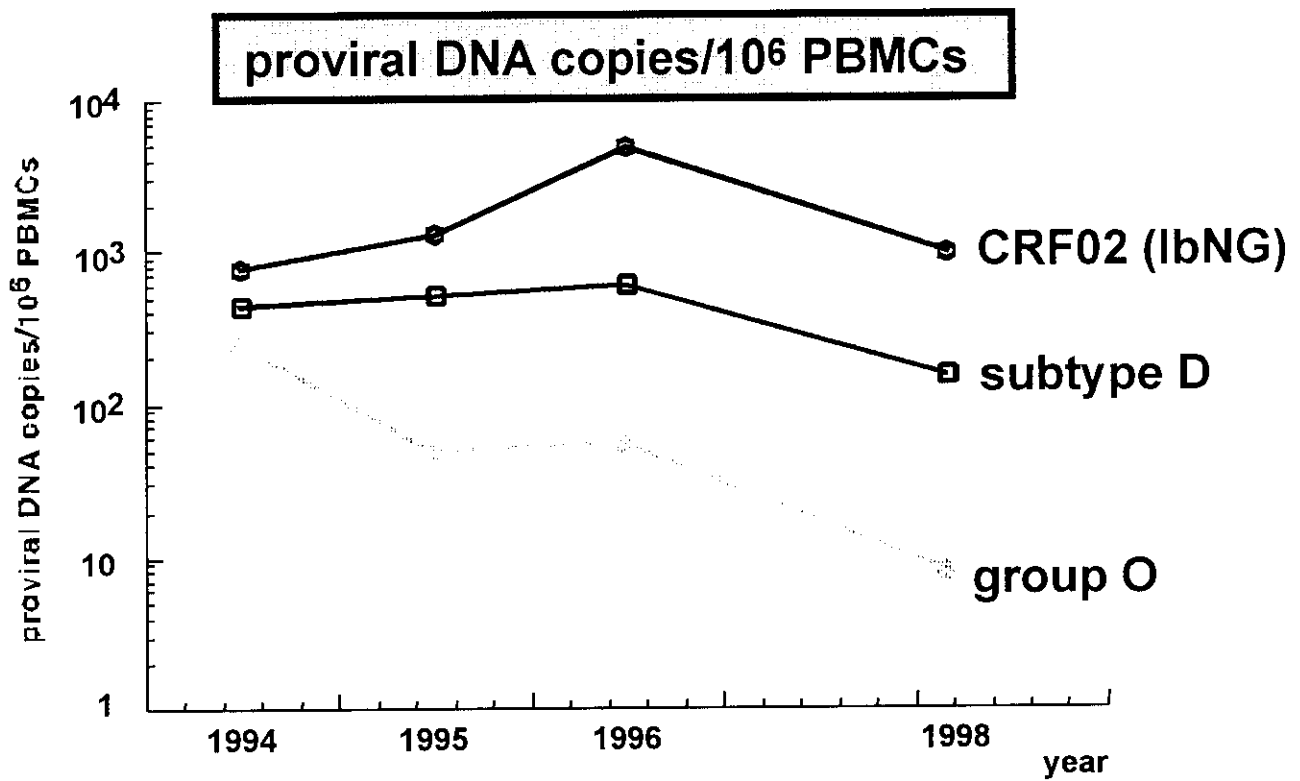


図1. プロウイルスDNA/血漿ウイルスRNAコピー数の定量

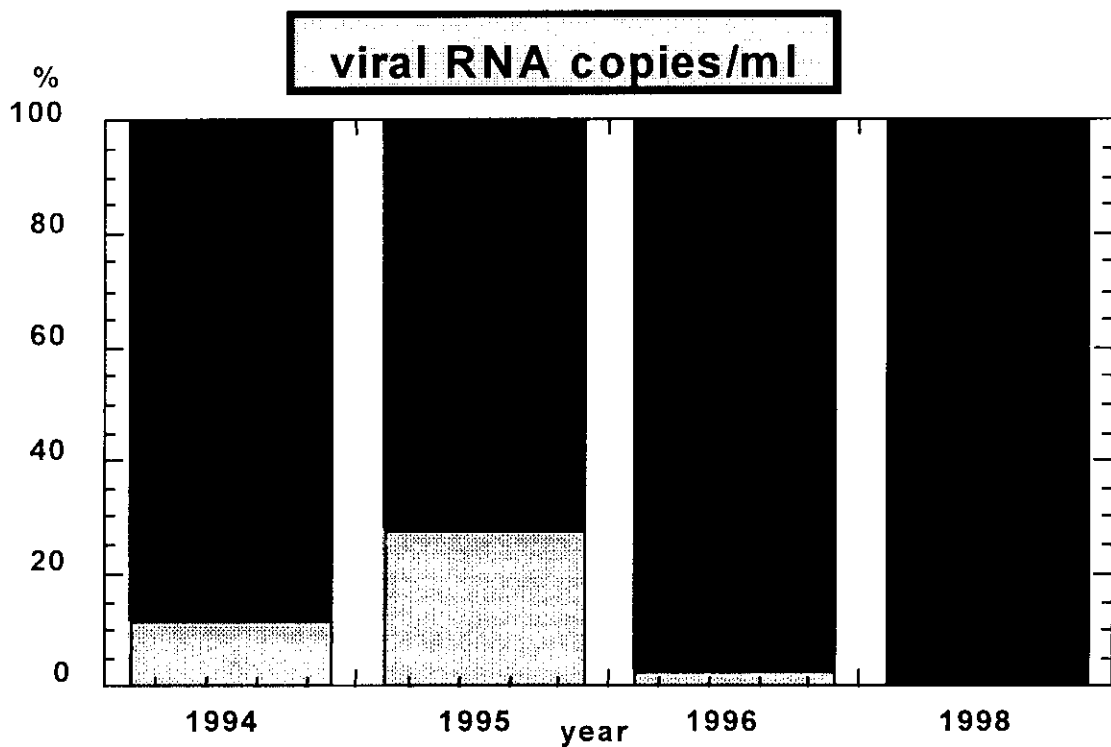
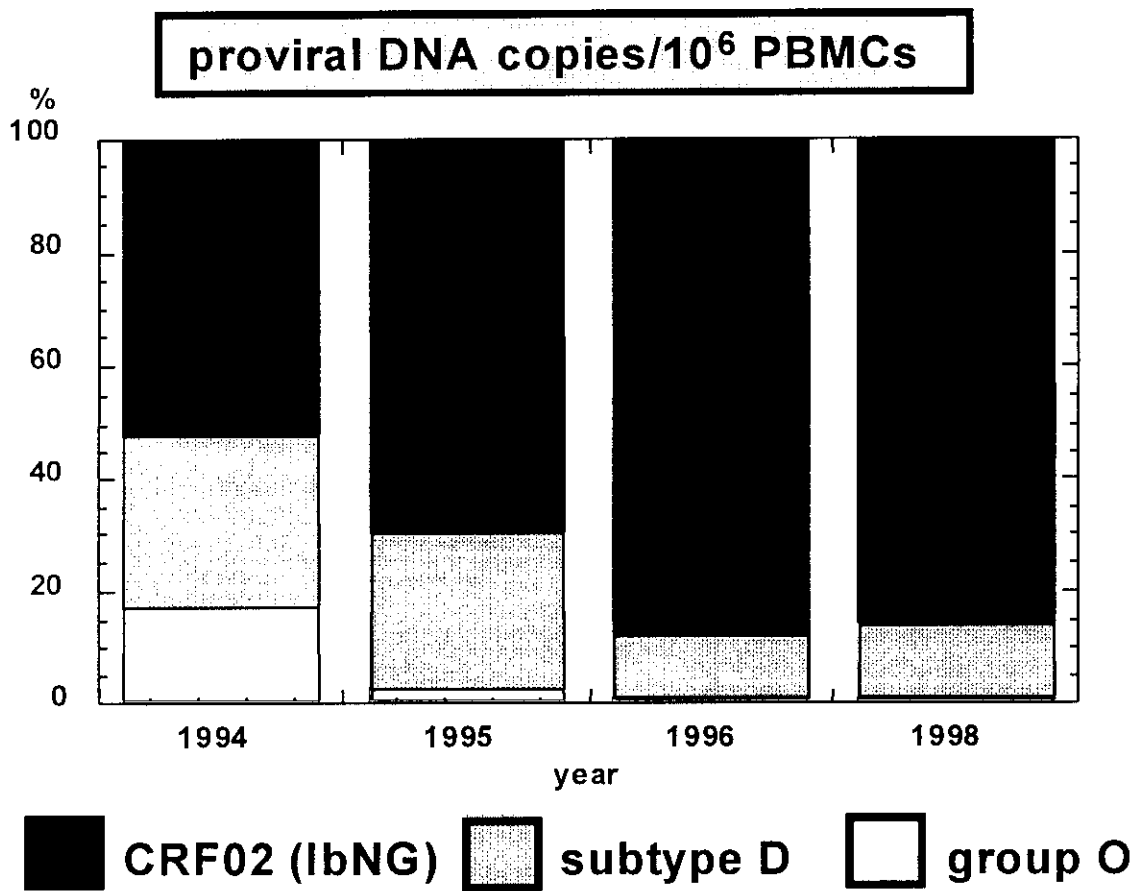


図2. プロウイルスDNA/血漿ウイルスRNA中の各ウイルス集団の占める 割合の推移

パキスタンにおける HIV の分子疫学的解析

班員研究者 山本直彦 (名古屋大学大学院医学研究科・国際保健医療学)
研究協力者 磯村思无 (名古屋大学大学院医学研究科・国際保健医療学)
森下高行、佐藤克彦 (愛知県衛生研究所・微生物部)

A. 研究目的

パキスタンは HIV の感染者数が最も多いとされるインドの西隣に位置しながら、2000 年 11 月の WHO の報告によれば、わずか 173 人の AIDS 患者の報告があるのみである。しかし、この数字は上記報告にも述べているように、サーベイランスの体制の不備によるもので、実際にはおよそ 7 万人以上の感染者がいると予想されている。パキスタンにおいてはイスラム国という宗教的、社会的、政治的理由から今日まで HIV の調査が充分になされておらず、従って、HIV の遺伝型に関する報告もみられていない。今回、我々はパキスタンに在住する HIV 感染者 13 例についてその遺伝型を初めて解析し、パキスタンにおける HIV の遺伝学的特徴を検討したので報告する。

B. 研究目的

HIV 感染者 13 例は全て男性で、国内の他、海外での異性間性的接触による感染である。方法は感染者血清から HIV-RNA を精製し、RT-PCR 法により cDNA を作成し、Env-V3 領域の PCR 産物を direct および cloning により塩基酸配列を解析し、Neighbor Joint 法により、系統樹を作成し、genotype を決定した。

C. 結果および考察

感染者 13 例のうち、7 例は B 型で、2 例に A 型と B 型の混合感染が見られ、C 型が 3 例、E 型が 1 例みられた。パキスタンでは男性が単身で大都市やペルシャ湾岸諸国に働きに出かける事が多く、約 400 万人のパキスタン人が海外で働いているといわれている。一方で、ペルシャ湾岸諸国には東南アジアからの女性出稼ぎ労働者も多く、今回解析した HIV 感染者 13 例のうち、9 例が湾岸諸国で感染したとされていることから、これらの CSW との性的接触による感染が最も考えられる。特に 7 例の B 型について、他の地域の B 型との関連性を検討すると、1 例はアフリカ型であったが、残り 6 例はタイやミャンマーでみられる B 型とは異なり、欧米型と相同性がみられた。このことは欧米型のサブタイプ B が流行している東南アジア地域からの出稼ぎ労働者との接触による感染を示唆するものである。

D. 研究発表

論文発表

1. Naohiko Yamamoto et.al. : The first report of molecular epidemiology of HIV in Pakistan preparation

学会発表

1. 森下高行、佐藤克彦、山本直彦、磯村思无：パキスタンにおける HIV の分子疫学的解析とその伝搬様式について、第 14 回日本エイズ学会 (2000 年 11 月 28 ~30 日)

薬剤耐性変異の解析法の開発改良実用化と技術研修に関する研究

分担研究者 杉浦互 (国立感染症研究所エイズ研究センター)

研究要旨

HIV-1 治療を適切に進める上で薬剤耐性検査の重要性が認識されつつあるが、現時点で検査を受ける機会に恵まれている患者は一部にすぎない。この研究ではより多くの感染者が薬剤耐性検査の恩恵にあずかることができるように感染症研究所エイズ研究センターで開発した遺伝子検査手技を地方衛生研究所に技術移転することを目的としている。本年度は 11 の施設を対象に技術講習会を開催した。また薬剤感受性検査に関しても、より多くの研究所で実施できるような検査手技の開発を試みている。

A. 研究目的

ジェノタイプによる解析法の開発とフェノタイプによる解析法の開発改良を行い、より実用的な薬剤耐性検査法を確率する。

B. 研究方法

ジェノタイプの手技は分担研究者杉浦によりすでに確立しており、他の機関への技術移管が重要な課題である。研究班では技術講習会を計画しており、この講習会を通じて技術の公開、サポートを実施していく。フェノタイプの解析方法は、遺伝子組み換え技術を用いて再構築したウイルスを使用する。組み換えベクターもすでに独自のものを完成させており、課題は技術の熟成と公開である。

(倫理面への配慮)

患者の血液検体を取り扱う際には検査の目的、必要性を十分に説明をし、同意書を作成する。

C. 研究成果

図 1 は感染症研究所で実施しているジェノタイプのタイムテーブルである。この技術を地方衛生研究所に移管するために平成 13 年 1 月 10 から 12 日の 3 日間にわたり遺伝子検査技術講習会を開催した。講習会には表 1 の 11 施設から参加があった。実習は RNA の抽出

から、遺伝子配列を解析し、結果の評価を行うまで全行程を行った。また HIV-1 に関する基本的な知識についても講義を行った (添付実習プログラム参照)。講習会終了時点でのアンケートの結果も良好であった (添付参考資料)。

フェノタイプは homologous recombination を用いた組み換えベクターを使用し、別添図 2 のようなタイムテーブルでの実施を検討している。

D. 考察および結論

講習会参加機関の約 6 割がシーケンサーを保有していず、ソフト面のみならずハード面での整備も重要と思われる。

フェノタイプに関しては技術公開をするまでにさらに手技の細部の改良が必要と思われる。

E. 研究発表

1. 論文発表

2000 年

杉浦 互

ウイルスの薬剤耐性 3

HIV 治療学 Biomedicine & Therapeutics (34)

pp. 57-61

杉浦 互

日本における薬剤耐性の現状

Confronting HIV 2000 pp. 4-6

杉浦 互

I型ヒト免疫不全ウイルス (HIV-1) 治療薬剤に
対する薬剤耐性変異の現状と推移

病原微生物検出情報(21) pp. 142-143

Emi E. Nakayama, Yoshihiko Hoshino, Xiaomi
Xin, Huanliang Liu, Mieko Goto, Nobukazu
Watanabe, Hitomi Taguchi, Akihiro Hitani, Ai
Kawana-Tachikawa, Masao Fukushima, Kaneo
Yamada, Wataru Sugiura, Shin-ichi Oka,
Atsushi Ajisawa, Hironori Sato, Yutaka
Takebe, Tetsuya Nakamura, Yoshiyuki Nagai,
Aikichi Iwamoto, Tatsuo Shioda

Polyorphism in the Interleukin -4 Promoter
Affects Acquisition of Human
Immunodeficiency Virus Type 1 Syncytium -
Inducing Phenotype

Journal of Virology (74) pp. 5452- 5459

W Sugiura, Z Matsuda, Y Yokomaku, K Hertogs,
B Larder, Y Nagai

Evidence of a mutually exclusive
relationship between the HIV-1 protease
inhibitor resistance mutations D30N and
L90M.

Antiviral Therapy (5) pp. 33-34

Motokazu Mukaide, Wataru Sugiura, Masakazu
Matsuda, Shuuzo Usaku Yuuzo Noguchi, Kazuo
Suzuki, Kaoru Kawata, Akira Ito, Hiroko
Sagara, Kaneo Yamada, Makiko Kondo,

Mitsunobu Imai

Evaluation of Viroseq™ -HIV Version 2 for HIV
Drug Resistance

JAPANESE JOURNAL INFECTIOUS DISEASES Vol. 53
(5) pp. 203-205

2001年

杉浦 互

微生物 Earl PL, Sugiura W, Montefiori DC,
Broder CC, Lee SA, Wild C, Lifson J, Moss B
Immunogenicity and protective efficacy of
oligomeric human immunodeficiency virus
type 1 gp140

J. Virol. (75) pp. 645- 653

の薬剤耐性「検査法」 genotype

臨床と微生物 Vol. 28 (1) pp. 3-8

杉浦 互

HIVの薬剤耐性検査法の開発と治療への応用
カレントセラピー Vol. 19 (2) pp. 51-57

杉浦 互

HIV-1 感染症治療における多剤耐性変異ウイル
スの問題

VIRUS INFECTION Vol. 14 No. 1 2001 pp. 10
-11

Earl PL, Sugiura W, Montefiori DC, Broder CC,
Lee SA, Wild C, Lifson J, Moss B

Immunogenicity and protective efficacy of
oligomeric human immunodeficiency virus
type 1 gp140

J. Virol. (75) pp. 645- 653

2.学会発表

杉浦 互、Lay Myint、松田善衛、横幕能行、岡野愛子、松田昌和、鑑英恵、椎野禎一郎、山田兼雄、永井美之

プロテアーゼ阻害剤投与による HIV-1 プロテアーゼ遺伝子の耐性変異獲得とその gag 遺伝子に及ぼす影響

第 48 回日本ウイルス学会 10 月

横幕能行、有吉紅也、三浦秀佳、立川愛、岩本愛吉、杉浦互、永井美之、松田善衛

VSV pseudotyped HIV-1 を用いた CTL アッセイ標的細胞の作成

第 48 回日本ウイルス学会 10 月

Lay Myint, Teiichiro Shiino, Zene Matsuda, Yoshiyuki Yokomaku, Masakazu Matsuda, Hanae Abumi, Aiko Okano, Tomoko Chiba, Noboru Takata, Satoshi Shirahata, Wataru Sugiura
Involvement of Gag cleavage site mutations in Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Resistance to Protease Inhibitors

第 14 回日本エイズ学会 11 月

岡野愛子、松田昌和、鑑英恵、千葉智子、石川正明、福武勝幸、合地研吾、花房秀次、岩本愛吉、三間屋純一、垣下栄三、日笠聡、白幡聡、高田昇、柏木征三郎、高松純樹、三浦琢磨、三宅進、滝正志、小池満、北村勝彦、山田兼雄、吉倉廣、永井美之、杉浦互

長期追跡症例に見る抗 HIV-1 治療の効果と薬剤耐性 HIV-1 が宿主免疫機能に及ぼす影響の解析

第 14 回日本エイズ学会 11 月

清水浩信、滝正志、伝美和子、山田兼雄、杉浦互

種々の抗 HIV 薬による薬疹のため治療に難渋し

ている血友病 B 症例

第 14 回日本エイズ学会 11 月

杉浦 互、岡野愛子、松田昌和、鑑英恵、石川正明、福武勝幸、山元泰之、合地研吾、花房秀次、岩本愛吉、三間屋純一、高松純樹、高田昇、垣下栄三、日笠聡、白幡聡、柏木征三郎、三浦琢磨、三宅進、北村勝彦、滝正志、小池満、山田兼雄

薬剤耐性ウイルスの現状

第 14 回日本エイズ学会 11 月

高野政志、戸谷良造、喜多恒和、井村聡一、大久保秀夫、大場悟、杉浦互、須藤寛人、塚原優己、外川正生、仲宗根正、早川智、本多三男、保田仁介、吉野直人

HIV 母子感染に関する臨床的研究 第 1 報-本邦における妊産婦の HIV-14 抗体検査率の全国調査-

第 14 回日本エイズ学会 11 月

喜多恒和、戸谷良造、井村聡一、大久保秀夫、大場悟、杉浦互、須藤寛人、高野政志、塚原優己、外川正生、仲宗根正、早川智、本多三男、保田仁介、吉野直人

HIV 母子感染に関する臨床的研究 第 2 報-産婦人科領域からの全国調査成績-

第 14 回日本エイズ学会 11 月

大久保秀夫、戸谷良造、喜多恒和、井村聡一、大場悟、杉浦互、須藤寛人、高野政志、塚原優己、外川正生、仲宗根正、早川智、本多三男、保田仁介、吉野直人

HIV 母子感染に関する臨床的研究 第 3 報-小児科領域からの全国調査結果-

第 14 回日本エイズ学会 11 月

戸谷良造、喜多恒和、喜多恒和、井村聡一、大久保秀夫、大場悟、杉浦互、須藤寛人、高野政志、塚原優己、外川正生、仲宗根正、早川智、本多三男、保田仁介、吉野直人
HIV 母子感染に関する臨床的研究 第4報-HIV 母子感染予防対策マニュアルについて-
第14回日本エイズ学会 11月

横幕能行、有吉紅也、三浦秀佳、立川愛、岩本愛吉、杉浦互、松田善衛
GENERATION OF TAILORED CTL TARGETS WITH VSV-PSEUDOTYPED HIV-1
第14回日本エイズ学会 11月

Zene Matsuda, Yoshiyuki Yokomaku, Tsuyoshi Oishi, Aiko Okano, Wataru Sugiura
A MUTUALLY EXCLUSIVE RELATIONSHIP BETWEEN MUTATIONS FOR NERFINAVIR RESISTANCE D30N AND SAQUINAVIR RESISTANCE L90M IN HIV-1 PR Retroviruses. May.

W Sugiura, Z Matsuda, Y Yokomaku, K Hertogs, B Larder, Y Nagai
Evidence of a mutually exclusive relationship between the HIV-1 protease inhibitor resistance mutations D30N and L90M.
4th International Workshop on HIV Drug Resistance & Treatment Strategies. Jun.
Status of Drug - resistant HIV-1 in Japan.

Wataru Sugiura, Kaneo Yamada
Status of Drug - resistant HIV-1 in Japan.
12th Joint Scientific Meeting of the AIDS Panels. Mar.

Y. Yokomaku, Z Matsuda, W Sugiura, M Matsuda, K Sakai & Y Nagai
Phenotypic analysis of HIV-1 protease by virus like particle (VLP)ELISA
Understanding Antiviral Drug Resistance. Dec.

W. Sugiura, M. Matsuda, H. Miura and K. Ariyoshi
Drug Resistant Mutation Patterns in Subtype-E HIV-1 Infected Patients Who Failed to Respond to Anti-Retrovirus Therapy
Understanding Antiviral Drug Resistance. Dec.

M. Iga, Z. Matsuda, A. Okayama, W. Sugiura, S. Hashiba, K. Morishita, h. Tsubouchi
In Vitro Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protease Phenotypic Assay Using in Vitro Transcription/Translation System
Understanding Antiviral Drug Resistance. Dec.

2001年
Yoshiyuki Yokomaku, Koya Ariyoshi, Hideka Miura, Sachiko Tateishi, Ai Tachikawa, Aikichi Iwamoto, Wataru Sugiura, Yoshiyuki Nagai, Zene Matsuda
GENERATION OF TAILORED CTL TARGETS WITH VSV-PSEUDOTYPED HIV-1
An update of HIV-1CTL assay. Bangkok.

G. 知的財産権の出願、登録状況
該当なし

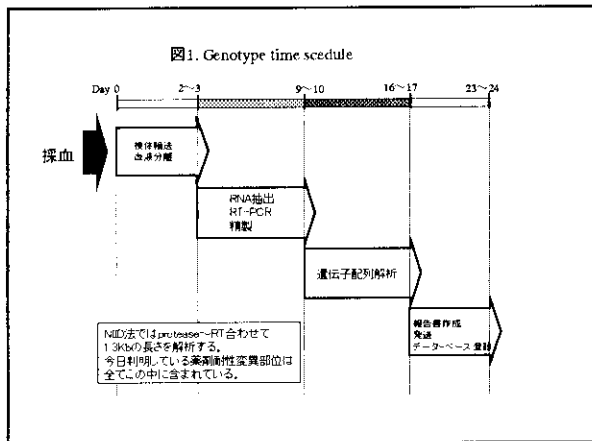
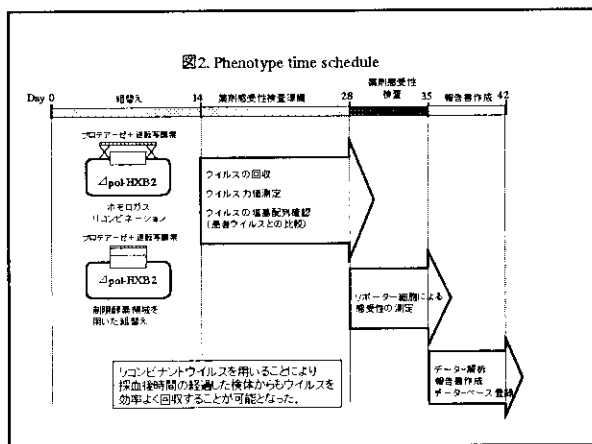


表1. 遺伝子検査技術講習会参加機関および講習内容

参加施設—11施設	
札幌市衛生研究所	青森県環境保健センター
仙台市衛生研究所	岩手県衛生研究所
新潟市衛生試験所	栃木県保健環境センター
埼玉県衛生研究所	長野県衛生公署研究所
岐阜県保健環境研究所	長崎県衛生公署研究所
鹿児島県環境保健センター	
実習内容	
実技	RT-PCR 遺伝子配列解析
講義	HIV-1の基礎知識 薬剤耐性概論 HIV-1治療総論 検査学



講習会アンケート

I. 講義内容について

1. 第1日午前「薬剤耐性検査」講義

講師の話はわかりやすかったか？

a. わかりやすかった 9名 b. ふつう 2名

スライドは見やすかったか？

a. 見やすかった 8名 b. ふつう 3名

内容は理解できたか？

a. よく理解できた 6名 b. ふつう 4名 回答なし 1名

2. 第2日午後「HIV-1の基本知識」

講師の話はわかりやすかったか？

a. わかりやすかった 7名 b. ふつう 4名

(もう少しゆっくり話して欲しかった)

スライドは見やすかったか？

a. 見やすかった 4名 b. ふつう 7名

内容は理解できたか？

a. よく理解できた 4名 b. ふつう 6名 c. 理解できなかった

(HIVの基本知識が私自身あまりなかったので先生の話の内容に追いついていけなかった)

3. 第2日午後「臨床現場における薬剤耐性検査」

講師の話はわかりやすかったか？

a. わかりやすかった 8名 b. ふつう 2名 c. わかりにくかった 1名

(基本的な知識が不足しているので理解が困難でした)

(HIVの基本知識が私自身あまりなかったので先生の話の内容に追いついていけなかった)

スライドは見やすかったか？

a. 見やすかった 6名 b. ふつう 5名

内容は理解できたか？

a. よく理解できた 5名 b. ふつう 4名 c. わかりにくかった 2名

4. 第3日午前講義

講師の話はわかりやすかったか？

a. わかりやすかった 10名 b. ふつう 1名

(実際の現状に即して大変有用でした)

スライドは見やすかったか？

a. 見やすかった 5名 b. ふつう 3名 回答なし 3名

内容は理解できたか？

a. よく理解できた 8名 b. ふつう 3名

5. 第3日午後「データ解釈、総合討論」

講師の話はわかりやすかったか？

a. わかりやすかった 7名 b. ふつう 1名 回答なし 3名

スライドは見やすかったか？

a.見やすかった 5名 b.ふつう 2名 回答なし 4名

内容は理解できたか？

a.よく理解できた 5名 b.ふつう 3名 回答なし 3名

*生データからの解析の過程も体験したかった

6. 講義全般について

講義の数、時間は適当であった

a.適当 11名

取り上げた講義内容は講習会に適当であったか？

a.適当 8名 b.ふつう 3名

(取り上げた方がよいあるいは取り上げて欲しい内容がありましたら書いて下さい。)

*保健所における遺伝子検査を含めた抗体検査 陽性・疑陽性時の対処例

*HIVの基礎についてもう少し

II. 実習について

実習室は使いやすかったか？

a.使いやすかった 4名 b.ふつう 6名 c.使いにくかった 1名

*手洗いがなかった、狭かった、ロッカーもなかった。

実習中の説明はわかりやすかったか？

a.分かりやすかった 11名

説明図は見やすかったか？

a.見やすかった 7名 b.4名

内容は理解できたか？

a.よく理解できた 9名 b.ふつう 2名

III. 実習内容について

今回取り上げた genotyping は実習テーマとして適切だったか？

a.適当 5名 b.ふつう 5名 c.不適當 1名

(不適當の場合適当と思われる課題を上げて下さい。)

*PCR検査を行っていない施設では薬剤耐性の前に基本的な HIV PCR を実習に入れていただけたらありがたかったです。

*現段階では、検査の流れにおける RT-PCR法 (+か-か) が良いのでは？

実習の難易度について

a.難しい 2名 b.ふつう 9名

IV. 講習会全般

今回講習会に参加して良かったか

a.良かった 11名

*HIV 遺伝子検査の実情がよくわかり、今後の対応方針が検討できるようになった

*初めての参加でいろんな先生方といろんなことを相談、知見を得たのですごく良かった

講習会の期間は適当でしたか

a.適切 8名 b.適当でない 2名 (短すぎる1名) 回答なし 1名

今後も機会があれば講習会に参加したいですか

a.したい 11名

(今後講習会で取り上げて欲しいテーマがありましたらあげてください。)

*HIVの基礎についてももう少し時間をとって解説して欲しかった。

*基本的HIV PCR

*HIV対策行政側(厚生省)の方針(検査・他)について問いただしてみる機会を設けて欲しい

(その他の意見)

*1日目の夜、懇親会を開いて欲しかった。

*次回もできたらずっと戸山の方で実習・講義等実施して欲しい(交通の便が良いので)

*さまざまな疑陽性検査(弱陽性検体も含む)を用いた実習

*シークエンサーの使用法を実地研修させて欲しかった

*準備や実習のフォローなどお疲れさまでした。実習も順調に行え、講義も比較的わかりやすかったです。

また機会があれば受講したいと思います。今後何か困ったことがありましたら御面倒をおかけしますがよろしくお願いします。

*シークエンサーの使用他の課のシークエンサー(ゲル板)を借りて、数回使用した程度。検査法の実際のトラブル、注意点を聞くことができ有用であった。

シークエンサー保有 有 7名 無 4名

シークエンス経験 有 6名 無 5名

MAGIC-5 細胞を用いたフェノタイプ薬剤耐性検査法の確立と臨床応用

分担研究者：平林義弘（国立国際医療センター エイズ治療研究開発センター 治療開発室長）

〔研究要旨〕患者血漿から効率良くウイルスを分離できる MAGIC-5 細胞を用いて、逆転写酵素阻害剤、プロテアーゼ阻害剤とも 14 日以内で解析可能な、簡便なフェノタイプ薬剤耐性検査法を開発した。本法の検査結果はジェノタイプ法と概ね相関していたが、ジェノタイプ法では殆んど不可能な耐性の程度の定量化も本法では可能であり、さらに未知の耐性変異の存在を推測し得る可能性も示唆された。結果の再現性も含め、本法は臨床応用に十分耐え得るものと考えられる。多数の耐性変異を有しジェノタイプ法では判定困難な症例などで、本法はとりわけ有用であると期待される。

A. 研究目的

現在、臨床の場で行なわれている HIV の薬剤耐性検査は、時間や労力、費用などの理由から、ウイルスの遺伝子型（ジェノタイプ）の解析による方法が主流となっている。しかしながらジェノタイプ法には、耐性の程度を定量化できないことや、既知の耐性変異以外は同定できないなどの欠点があり、ウイルスの生物学的な表現型（フェノタイプ）による迅速かつ簡便な耐性検査法の確立が強く望まれている。

そこで本研究では、臨床検体からウイルスを効率良く分離できる MAGIC-5 細胞を用いて、迅速で簡便なフェノタイプ耐性検査法の開発を試み、その臨床応用について検討した。

B. 研究方法

臨床検体：当センターを受診中の HIV 感染者から採血し、直ちに血漿を分離して使用した。

細胞と薬剤：MAGI 細胞（HeLa-CD4-LTR- β -gal）に CCR5 遺伝子を導入した MAGIC-5 細胞（clone 1-10）（感染研・巽正志が樹立）を、本研究で使用した。逆転写酵素阻害剤の AZT と d4T は Sigma 社より試薬を購入し、他の逆転写酵素阻害剤（3TC、ABC、NVP）およびプロテアーゼ阻害剤（RTV、SQV、NFV、APV）は各製薬会社より原末の分与を受けた。

ウイルス分離：患者血漿を超遠心し上清を除去後、DEAE-デキストランを加えた培養液（10% ウシ胎児血清、抗生物質含有イーグル培養液）で希釈して、MAGIC-5 細胞に添加した。一晚培養後、新しい培養液に置換し、細胞の状況を見ながら液替えを繰り返した。培養上清を凍結保存し、種ウイルスとして以後の実験に供した。

ウイルス価の測定：DEAE-デキストラン添加培養液で希釈した保存上清の希釈系列を、

MAGIC-5 細胞に加えて 48 時間培養した。細胞を固定後、X-Gal で染色し、顕微鏡下で青色の感染細胞を数えた。100~300 blue focus units (BFU)となるような希釈倍率の保存上清を、以後の耐性検査に使用した。

逆転写酵素阻害剤の耐性検査：培養液で希釈した薬剤の希釈系列を MAGIC-5 細胞に加え、さらに前項の希釈した保存上清を添加して、48 時間培養した。細胞を X-Gal で染色して青色の感染細胞を数え、感染細胞数が薬剤無添加時の 50%となる薬剤添加濃度（IC₅₀）を算出した。同時にコントロールのウイルス株（NL432）でも測定を行ない、患者血漿分離株の IC₅₀ 値とコントロール株の IC₅₀ 値との比によって、臨床分離株の耐性の程度を表現した。

プロテアーゼ阻害剤の耐性検査：薬剤の希釈系列と保存上清を MAGIC-5 細胞に添加し、72 時間培養した。その上清を DEAE-デキストラン添加培養液で希釈して新しい MAGIC-5 細胞に加え、48 時間培養した。以後、前項と同様にして、IC₅₀ 値およびコントロールとの IC₅₀ 値比を求めた。

ジェノタイプ耐性検査：患者血漿から High Pure Viral RNA Kit を用いて RNA を抽出し、One Step RNA PCR Kit により *pol* 領域を増幅した。PCR 産物を濃縮精製後、自動シーケンサーで塩基配列を決定し、アミノ酸配列を推測した。これを既知の耐性変異データと比較した。

倫理面への配慮：研究対象者には、研究の目的および方法、予想される結果、予想される不利益とそれに対する処置、本研究への参加に同意しない場合も不利益を受けないこと、その他人権保護に関する必要事項などについて、事前に十分に説明し自由意志による同意を得た。また本研究の全体を通して、プライバシーの流出

防止など患者の人権保護に十分配慮した。

C. 研究結果

IC₅₀値の再現性：本法で得られた IC₅₀値の再現性を検討するため、コントロール株 (NL432) を用いて、各薬剤とも三重測定で5回測定した。表1に示すように、殆んど薬剤で IC₅₀値の変動は3倍以内であり、最大でも5倍に収まっていた。

未治療患者の血漿分離株の IC₅₀値：過去に治療歴が無くジェノタイプ法で耐性変異が見られない患者血漿 (n=14~22) を用いて、各薬剤の IC₅₀値を測定したところ、概ねコントロール株と同様の値を示した。コントロール株に対する IC₅₀値の比は、SQV (0.1~10倍) と NFV (0.3~10倍) を除き、いずれも0.1~5倍の範囲であった。

以上2項の結果より、コントロール株の10倍を超える IC₅₀値を示す血漿分離株を、薬剤耐性とみなすものと定義した。

治療歴のある患者の血漿分離株の IC₅₀値：治療中もしくは過去に治療歴がある患者の血漿を用いて、各薬剤の IC₅₀値を測定した。結果の一部を図1に示す。コントロール株に対する IC₅₀値の比は、d4Tを除く8薬剤で、検体によって0.01~1000倍の範囲に幅広く分布した。従って、臨床分離株の薬剤耐性の程度を、本法によってある程度定量化し得る可能性が推測された。

ジェノタイプとの比較：本法で測定した血漿分離株の対コントロール IC₅₀値比を、元の血漿のジェノタイプ法による耐性変異の結果と比較した。

- (1)逆転写酵素阻害剤：AZT (図1A) では、RTの41,215番などのAZT耐性変異を持つものは、1例を除きすべてが本法で耐性を示した。またAZT/3TC併用例で、41/184/215の3ヶ所の変異を獲得するとAZT感受性が回復することが報告されているが、これは本法でも確認された。次に3TC (図1B) では、184番の3TC耐性変異を持つものは、本法ですべて高度耐性を示した。また3TCの治療歴がある患者で、ジェノタイプ法で耐性変異を認めないにもかかわらず、本法で軽度ないし中等度の耐性を示す例が複数みられ、未知の3TC耐性変異個所の存在が示唆された。次にd4T (図1C) では、本法で全例が感受性を示したが、ジェノタイプ法でもd4T耐性変異は全例で見られなかった。さらにABCおよびNVPでも、74,184番 (ABC)、103,106,190番 (NVP) などの耐性変異を持つものは、本法で中等度から高度の耐性を示した (データ示さず)。
- (2)プロテアーゼ阻害剤：RTV (図1D) では、

primaryのRTV耐性変異であるPRの82番に変異を持つものは、secondaryの耐性変異数に関係なく本法ですべて高度耐性を示した。一方primaryの変異を持たない例では、secondaryの変異が1ヶ所の場合は殆んどが感受性を示し、2ヶ所以上の場合には中等度から高度の耐性を示した。またSQV (図1E) でも、primaryの耐性変異を持つものは殆んどが本法で高度耐性を示し、primaryの変異を持たずsecondaryの変異1ヶ所のみのもは感受性を示した。次にNFV (図1F) では、primaryの耐性変異を持つ例と、primaryの変異は持たないがsecondaryの変異を3ヶ所持つ例は、本法で中等度から高度の耐性を示した。またprimaryの変異を持たず、多形性によると思われるsecondaryの変異1~2ヶ所持つ未治療例は、全例が感受性を示したが、同じ変異パターンで治療歴を持つ例では、大部分が耐性を示した。APVでは、primaryの耐性変異は全例認めず、secondaryの変異が2ヶ所以上の場合には中等度から高度の耐性を、1ヶ所の場合は1例を除き軽度から中等度の耐性を示した (データ示さず)。

以上2項の結果から、本法においてコントロール株に対する IC₅₀値の比で表現した血漿分離株の耐性の程度は、ジェノタイプ法による耐性変異の結果と概ね相関していると考えられた。

D. 考察

フェノタイプ薬剤耐性検査としては、末梢血単核球を用いた方法がすでに確立されている。しかしこの方法は、検体からのウイルス分離だけでも2~4週間という長期間を要すること、健常人の末梢血単核球の準備が必ずしも容易ではないこと、使用する単核球の個人差によって結果に差が生じる可能性があること、培養上清のウイルスを検出するp24抗原測定キットが高価であることなど、多くの問題点がある。改良法も開発されているものの、臨床検査として行なうのは、現実には困難な状況にある。

我々はこれまでの研究で、CD4に加えてco-receptorであるCXCR4とCCR5を発現したMAGIC-5細胞 (clone 1-10) が、①HIV-1ラボ株および新鮮患者血漿 (HIV RNA 10⁴ copies/ml以上) を用いて高力価のウイルスを分離できる、②しかもM-tropicとT-tropicの両者を分離できる、③分離したウイルスと元の患者血漿のEnv V3領域のアミノ酸配列は、ダイレクトシーケンスでほぼ一致しており、分離によるバイアスは小さいと考えられる、④分離に要する期間は末梢血単核球を用いた場合よりも短期間であることなどを明らかにしてきた。そこで本研究で

は、この MAGIC-5 細胞を用いた新しいフェノタイプ耐性検査法の開発を試みた。

本法では、比較的短期間でウイルス分離が可能であるため、患者血漿を得てから耐性検査を終了するまでの所要日数は、逆転写酵素阻害剤で約 10 日以内、プロテアーゼ阻害剤で約 14 日以内と、従来のフェノタイプ法よりかなり短縮することができた。また培養上清の p24 抗原を測定する代わりに、顕微鏡下で青色の感染細胞を数えるため、検査費用も低減させることができた。さらに、株化細胞を使用するため細胞の準備が容易であるなど、従来法に比して検査時間、費用、労力とも節減でき、臨床検査として好都合であると考えられる。

患者血漿を用いた本法の結果は、逆転写酵素阻害剤およびプロテアーゼ阻害剤ともに、ジェノタイプ法の結果と概ね相関していた。さらにプロテアーゼ阻害剤では、primary の耐性変異を持つ例は高度耐性、secondary の耐性変異のみの場合は変異個所の数によって感受性から耐性まで変わることが本法で明らかになったが、このような耐性の程度の定量化は、ジェノタイプ法では行ない得なかったものである。また逆転写酵素阻害剤の 3TC では、治療歴のある患者の中に、ジェノタイプ法では既知の耐性変異を認めないが本法では耐性を示す例が見られ、本法が未知の耐性変異個所の存在を推測するためにも有用である可能性が示唆された。

以上の結果より、本法はフェノタイプ耐性検査法として、臨床応用に十分耐え得るものと考えられる。特に、多剤併用療法の失敗例などですでに多数の耐性変異を有し、ジェノタイプ法では結果の解釈が困難な症例などでは、本法による薬剤感受性の評価がとりわけ有用であると期待される。今後、ルーチンの臨床検査への応用に向けて、本法のさらなる評価および改良を

進めていきたいと考えている。

E. 結論

MAGIC-5 細胞を用いた迅速かつ簡便なフェノタイプ薬剤耐性検査法を開発した。本法によって、ジェノタイプ法では解析し得なかった耐性の程度などを知ることができ、今後、本法の臨床応用が期待される。

F. 健康危険情報

なし。

G. 本研究成果の発表

1) A. Hachiya, S. Aizawa-Matsuoka, M. Tanaka, Y. Takahashi, S. Ida, H. Gatanaga, Y. Hirabayashi, A. Kojima, M. Tatsumi and S. Oka. Rapid and simple phenotypic assay for drug susceptibility of human immunodeficiency virus type 1 using CCR5-expressing HeLa/CD4+ cell clone 1-10 (MAGIC-5). *Antimicrob. Agent. Chemother.* 45, 495-501, 2001.

2) 蜂谷敦子、相沢佐織、田中真理、土屋亮人、平林義弘、井田節子、岡慎一。Genotype 法と Phenotype 法による HIV 薬剤耐性検査の比較に関する検討。第 74 回日本感染症学会総会。2000 年 4 月。福岡。

H. 知的財産権の出願・登録

なし。

I. 研究協力者

蜂谷敦子、松岡佐織、土屋亮人、田中真理、高橋由紀子、井田節子、岡慎一（国立国際医療センター・エイズ治療研究開発センター）、巽正志（国立感染症研究所・獣医科学部）

表 1. コントロール株 (NL432) を用いた IC₅₀ 値の再現性の検討

薬剤	平均±標準偏差 (μ M)	範囲(μ M)	CV (%)
AZT	0.034±0.016	0.01-0.05	46
3TC	0.838±0.227	0.51-1.13	27
d4T	1.960±0.109	1.80-2.10	6
ABC	1.820±0.356	1.50-2.40	19
NVP	0.052±0.008	0.044-0.066	15
RTV	0.036±0.018	0.021-0.064	51
SQV	0.004±0.001	0.003-0.006	31
NFV	0.002±0.0001	0.002-0.002	5
APV	0.002±0.001	0.001-0.003	43

注：各薬剤とも三重測定で 5 回測定した。