

図1. 本法とジェノタイプ法による患者血漿のAZT (A)、3TC (B)、d4T (C)、RTV (D)、SQV (E) および NFV (F) の耐性パターンの比較。縦軸は、本法で測定した血漿分離株のコントロール株 (NL432) に対する IC₅₀ 値の比を示す。(A)~(C)の横軸の項目は、上から順に検体数(n)、治療歴の有無、ジェノタイプ法での薬剤耐性変異の個所と有無を示す。(D)~(F)の横軸の項目は、上から順に検体数(n)、治療歴の有無、ジェノタイプ法での primary の薬剤耐性変異の有無、secondary の耐性変異個所の数を示す。図中の数字はそれぞれ左側の検体の耐性変異個所を、図中の短い線は各グループの IC₅₀ 値比の平均値を示す。

MAGIC5A細胞を用いたHIV-1の分離法確立に関する研究

班員研究者 愛知県衛生研究所・微生物部 森下高行
研究協力者 国立名古屋病院・臨床研究部 金田次弘

研究要旨

我々は、マクロファージ指向性HIV-1とT細胞指向性HIV-1が共に感染可能なMAGIC5A細胞を用いた薬剤感受性テストの確立を目指している。その第一段階として、MAGIC5A細胞を用いたHIV-1の分離の条件を検討した。その結果、①血漿HIV-1を用いたウイルスの分離の確立は極めて悪い。②HIV-1感染症／エイズ患者のPBMCとMAGIC5A細胞との共培養により高率にHIV-1が分離できる。③凍結保存したbuffy coatとの共培養でも約5割の確立でウイルスを分離できることが明らかになった。得られたHIV-1を用いて、種々の薬剤感受性テスト(PBMC法、MAGIC5A、感染性クローン法)へのリンクが可能であると思われる。

A. 研究目的

臨床的に薬剤耐性HIV-1の出現が疑われた症例を対象に、HAARTの標的遺伝子であるHIV-1の逆転写酵素遺伝子とプロテアーゼ遺伝子の解析を行ない、薬剤耐性関連アミノ酸変異の出現の有無を解析している。この遺伝子解析の有用性は、疑いの無いところであるが、耐性関連アミノ酸変異の検出頻度は意外と低く、結果の解釈に苦しむケースもある。この点を克服するためにも薬剤耐性をより直接的に評価する方法としての薬剤感受性テストの確立が望まれている。我々は、マクロファージ指向性HIV-1とT細胞指向性HIV-1が共に感染可能なMAGIC5A細胞を用いた薬剤感受性テストの確立を目指している。その第一段階として、MAGIC5A細胞を用いたHIV-1の分離の条件を検討した。検討に用いた試料はHIV-1感染症／エイズ患者の血漿HIV-1、新鮮末梢血単核球(PBMC)と凍結保存buffy coatの3種類である。

B. 研究方法

①MAGIC5A細胞に対する血漿HIV-1の感染

性の検討: 図1に方法を示した。血漿中のHIV-1を遠心操作にて分離し、 $1.2 \sim 5.0 \times 10^4$ コピーのHIV-1を用いMAGIC5A細胞に感染させ、2日間培養した後に感染細胞からHIV-1ウイルスが培養液中に放出されるかをみた。

②末梢血単核球とMAGIC5A細胞の共培養に夜HIV-1の分離: 図2に本研究の方法を示した。ficol-paqueを用いて無菌的に分離した。PBMC約 5×10^6 cellsをフラスコに附着させたMAGIC5A細胞と共培養を開始する。2日後に培養上清を集めた後に新しい培養液を加え、更に4日間培養を続行した。Day2培養上清とDay6培養上清を用いHIV-1の検出を行なった。

③凍結保存したbuffy coatとMAGIC5A細胞の共培養によるHIV-1の分離: 検体は約3 mLの全血より採取したbuffy coatを用い、②と同じ方法で実験を行なった。

ウイルスコピー数はアンプリコアモニター(Roche Diagnostics K. K.)で、p24量はELISA法(富士レビオ)で測定した。MAGIC5A細胞は国立感染症研究所の巽博士より供

与を受けた。検査対象はHIV-1感染症／エイズ患者26例である。採血時の血中ウイルス量はTable1-3に示した。

(倫理面への配慮) HIV-1ウイルスの分離は薬剤感受性テストに先だつ重要なステップであることの重要性を説明し、同意の上で検体を採取する。

C. 研究結果

①MAGIC5A細胞に対する血漿HIV-1の感染性の検討: 保存状態は -30°C で保存したものの2検体、 4°C 一晚保存の2検体、採血後直ちに用いた2検体である。培養液中のHIV-1は高々 10^3 コピーレベルであり、p24量は、全て検出感度($0.5\text{pg}/\text{mL}$)以下であった。一方、III_Bを用いた実験では、 10^6 コピーを超えるHIV-1が検出された(Table1)。

②末梢血単核球とMAGIC5A細胞の共培養によるHIV-1の分離: (1)Day2medium中のHIV-1: patient7、13、16の3例のp24抗原量はcut off値であった。残りの8例は1.2~5.0の値を示し、少量ながらもHIV-1がmediumに放出されていることを示していた。(2)Day6medium中のHIV-1: Day2でcut off値を示していた3例の内patient7については3.2へ上昇したがpatient13と16については変化は無かった。このうち、Patient16についてはHAART有効例であり、血中ウイルス量は検出感度以下であった。Patient8、9、15、17、18の5例はDay2からDay6にかけて大量のウイルスが放出されたが、patient10、12、14の3例のp24抗原量はやや低下した。(3)HIV-1RNAの増幅: patient8、9、15、17、18の様にDay6medium中に高濃度のHIV-1RNAが検出された例でも、patient7、10、11、12、13、14などDay6mediumに

②MAGIC-5A細胞を用いた薬剤感受性試験の確立

比較的低濃度のHIV-1RNAしか検出されなかった例においても、Day6medium中のMAGIC5A細胞をセルパッセージして更に培養を続行することにより、 $10^8\sim 10^{10}$ コピー/mLレベルの高濃度のHIV-1RNAを得ることが可能であった。結果はTable2に示した。

③凍結保存したbuffy coatとMAGIC5A細胞の共培養によるHIV-1の分離: 結果はTable3に示す。Patient20、22、23、25の4例に於いて、Day6培養液中に、新鮮末梢血単核球を用いた実験に比べ、効率は低下しているものの、ウイルスの存在が証明された。血中濃度 $2.5\times 10^4\sim 7.8\times 10^5$ コピー/mLの症例である。一方、残りの例中、3例(patient19、21、24)ではウイルスは全く分離されなかった。Patient26ではVL 1.6×10^3 /mL、p24抗原量は cut off値であり、擬陽性と判定した。

D. 考察

以上の結果より、①血漿HIV-1を用いたウイルスの分離の効率は極めて悪い。②HIV-1感染症／エイズ患者のPBMCとMAGIC5A細胞との共培養により高率にHIV-1が分離できる。③凍結保存したbuffy coatとの共培養でも約5割の確立でウイルスを分離できることが明らかになった。得られたHIV-1を用いて、種々の薬剤感受性テスト(PBMC法、MAGIC5A、感染性クローン法)へのリンクが可能であると思われる。

E. 学会発表

①薬剤感受性テストの確立に向けて—MAGIC-5A細胞を用いたHIV-1の分離
佐藤克彦、森下高行、多和田行男、岩尾文彦、伊部史朗、内海眞、金田次弘
第21回国立病院療養所血液同好会
佐藤克彦、村上貴哉、森下高行、多和田行男、羽根田進、巽正志、金田次弘

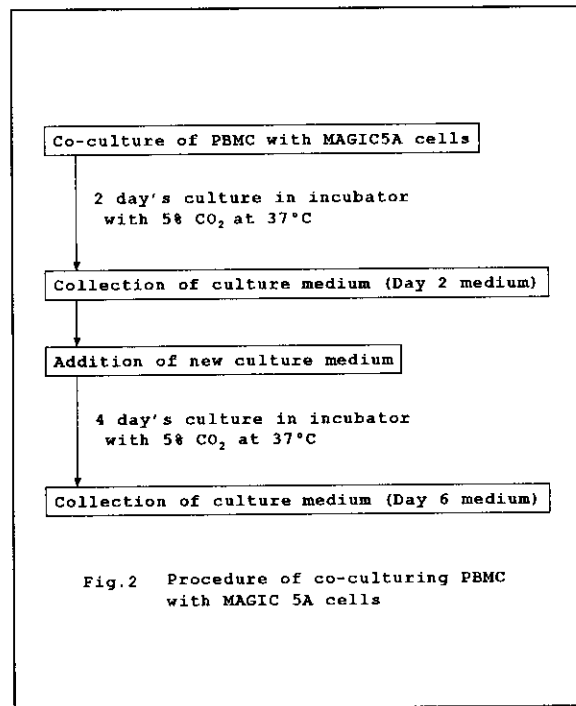
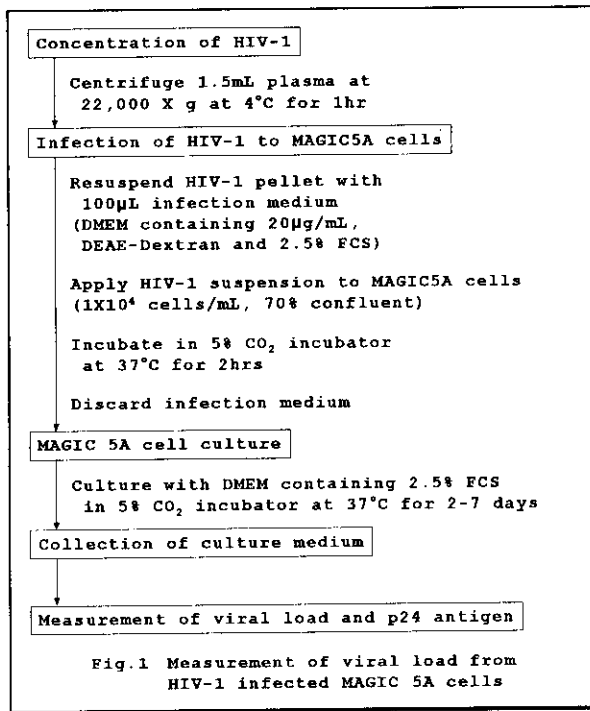


Table 1. Viral Amount in HIV-1 Infected MAGIC5A Culture (Plasma HIV-1 usage)

patient#	viral load(copies/mL)		p24 antigen	preservation
	plasma	culture sup	culture sup	
1	1.9X10 ⁴	9.3X10	negative	Freeze at -30°C
2	unknown	1.5X10 ³	negative	
3	9.1X10 ⁴	1.0X10 ²	negative	
4	9.0X10 ⁴	4.7X10 ²	negative	4°C over night
5	1.2X10 ⁴	1.4X10 ²	negative	
6	8.0X10 ³	3.5X10 ²	negative	
5	1.2X10 ⁴	2.9X10 ³	negative	not done
6	8.0X10 ³	4.5X10 ²	negative	

Table 2. Amount of HIV-1 in Day 2 and 6 culture medium
(Fresh PBMC usage)

patient#	Viral Load (copies/ml)				p24 antigen		
	plasma	infected after		passage after	infected after		passage after
		2 days	6 days	2 days	2 days	6 days	2 days
7	1.6X10 ⁴	N.D.	N.D.	3.0X10 ⁴	1.0	3.2	2.4
8	1.6X10 ²	N.D.	N.D.	1.3X10 ⁴	1.2	200.0	32.6
9	1.1X10 ⁴	N.D.	N.D.	N.D.	3.2	52.4	16.8
10	1.0X10 ⁴	N.D.	N.D.	N.D.	5.0	1.2	1.6
11	8.9X10 ³	N.D.	N.D.	5.7X10 ⁵	1.2	N.D.	9.0
12	1.0X10 ⁵	7.3X10 ⁴	6.4X10 ⁴	2.0X10 ⁴	2.2	1.8	1.6
13	1.4X10 ⁵	6.6X10 ³	3.1X10 ³	2.2X10 ⁴	1.0	1.0	1.0
14	4.5X10 ⁴	3.2X10 ⁴	9.1X10 ³	4.6X10 ⁴	2.6	2.2	1.6
15	1.2X10 ⁴	2.9X10 ⁴	1.2X10 ⁵	N.D.	1.6	28.2	N.D.
16	<50	<50	<50	<50	1.0	1.0	1.0
17	1.2X10 ⁵	8.4X10 ³	3.1X10 ⁵	3.0X10 ⁴	1.2	42.0	1.0
18	3.5X10 ⁴	N.D.	10 ⁶ <		N.D.	70.4	

Table 3. Amount of HIV-1 in Day 2 and 6 culture medium
(Frozen buffy coat usage)

patient#	Viral Load (copies/ml)				p24 antigen		
	plasma	infected after		passage after	infected after		passage after
		2 days	6 days	2 days	2 days	6 days	2 days
19	1.2X10 ²	8.4X10	<50	2.9X10	negative	negative	negative
20	7.8X10 ⁵	5.2X10 ⁵	4.4X10 ⁴	1.5X10 ⁴	1.6	1.8	1.2
21	1.5X10 ⁴	5.0X10 ²	<50	5.4X10	1.2	negative	negative
22	2.5X10 ⁴	2.0X10 ³	2.4X10 ⁴	N.D.	negative	1.0	N.D.
23	4.2X10 ⁴	2.0X10 ³	9.6X10 ³	N.D.	negative	1.4	N.D.
24	1.2X10 ⁴	3.7X10 ²	<50	<50	negative	negative	negative
25	1.5X10 ⁵	2.8X10 ³	3.8X10 ³	N.D.	negative	1.0	N.D.
26	2.9X10 ⁴	1.2X10 ⁴	1.6X10 ³	N.D.	negative	1.0	N.D.

PBMC を用いた HIV-1 薬剤感受性試験法の確立に関する研究

分担研究者 加藤 真吾 (慶應義塾大学医学部微生物学教室助手)

研究要旨

抗レトロウイルス療法において、薬剤耐性 HIV-1 の出現は治療失敗の主要な原因の一つとなっている。したがって、HIV-1 の薬剤感受性を正確に測定できる方法を確立することは、治療効果を監視する上で極めて重要と考えられる。そこで我々は、PBMC を被感染細胞とする薬剤段階希釈法の測定誤差を検討するとともに、この方法によって求めた HIV-1 臨床株の薬剤感受性の結果を Virco 社による検査結果と比較した。我々のプロトコールでは、LAI 株に対する NFV の EC₅₀ 測定値の変動係数は 33% であった。また、PBMC の提供者を変えたときの測定値の差は、最大 2.5 倍しかなく、誤差範囲内と考えられた。Virco 社による薬剤耐性の判定結果とはまずまずの一致をみたが、LAI 株を比較対照とする相対値は両者の間でかなりの差があった。将来、血中薬剤濃度と比較しながら薬剤感受性のデータを活用するためには、薬剤感受性の相対値ではなく、EC₅₀ そのものを提供できる方法が望ましいと考えられる。

A. 研究目的

抗レトロウイルス療法において、薬剤耐性 HIV-1 の出現はアドヒアランスや薬物動態の問題と並んで治療失敗の主要な原因の一つとなっている。したがって、HIV-1 の薬剤感受性を正確に測定することは、治療効果を監視する上で極めて重要である。一方、HIV-1 の薬剤感受性を遺伝型によって推定する方法が商業ベースで使われている (Virtual Phenotype、Virco 社)。このような方法がどの程度正しい結果を出しているのかを検討することも、HIV-1 薬剤耐性の検査体制を確立するために重要である。

HIV-1 の薬剤感受性を求めるときに用いる被感染細胞としては、代謝系が大きく変化している株化細胞よりも、健常人由来の PBMC を用いた方が *in vivo* に近い薬剤効果濃度 (EC₅₀) が得られると考えられる。そこで、PBMC を用いたときの EC₅₀ 値のバラツキと、提供者の異なる PBMC を用いたときの各薬剤に対する EC₅₀ 値の差異を検討するとともに、ある HIV-1 臨床株について求めた薬剤感受性の結果を Virco 社による検査結果と比較した。

B. 研究方法

HIV-1 の標準株である LAI と、抗レトロウイルス療法を受けた経験のある感染者の中から神奈川県衛生研究所ウイルス部で分離された臨床分離株 (H197) を用いた。

対象薬剤を、AZT、ddI、ddC、d4T、3TC、NVP、IDV、NFV、SQV、及び RTV の 10 種とした。

ウイルス液 100 μ l を 1×10^6 個/ml の PBMC (CD8 細胞を除去してから PHA で刺激し 3 日間培養したもの) 懸濁液 1 ml に加えて CO₂ インキュベーターで 1 時間保温した後、細胞を 2 回洗浄し、4 ml の培地 (30% FCS と 70 U/ml IL-2 を含む RPMI 1640) に懸濁して 2 日間培養した (翌日に培地を加えて体積を 2 倍にした)。そして、薬剤を段階的に 10 倍希釈した液 150 μ l に、 1×10^6 個/ml の感染 PBMC 懸濁液を 150 μ l 加え、さらに 3 日間培養し (培養 2 日目に 150 μ l を捨て、新たに 150 μ l の培地を加えた)、上清中の p24 抗原濃度をバイダスアッセイキット HIV p24 抗原 II と自動免疫蛍光測定装置 (miniVIDAS、日本ビオメリュー社) を用いて測定した。こうして得られた p24 抗原濃度を薬剤濃度に対してプロッ

トし EC₅₀ を求めた。

(倫理面への配慮)

本研究で用いた HIV-1 臨床分離株は、神奈川県衛生研究所ウイルス部から供与されたものである。したがって、血液提供者に対して当方からインフォームドコンセントをとる措置は行っていない。

C. 研究結果

まず、我々の方法による EC₅₀ 測定値のバラつきを調べるために、LAI 株に対する NFV による阻害曲線の再現性を調べた (図 1)。4 回の繰り返し実験において得られた EC₅₀ 値は、0.63 nM、0.27 nM、0.54 nM、及び 0.45 nM で、変動係数 (CV) は 33% であった。変動係数の 3 倍を誤差範囲内と考えれば、6 倍以上の EC₅₀ 値の差を有意差とみなすことができる。

次に、PBMC の提供者が異なった場合、各薬剤に対する EC₅₀ 値にどの程度の影響が出るのかを調べるために、提供者 O と提供者 U の PBMC を用いて LAI 株に対する 10 種の薬剤による阻害効果を調べた (図 2 と図 3)。これらの阻害曲線から得られた EC₅₀ 値を表 1 に示す。EC₅₀ 値の差が最大でも d4T の 2.5 倍であったことから、本実験においては、PBMC の提供者による差は誤差範囲内であると考えられる。

我々の方法による薬剤感受性の結果を Virco 社の検査結果と比較するために、臨床分離株 H197 に対する 10 種の薬剤による阻害効果を調べた (図 4)。これらの阻害曲線から得られた EC₅₀ 値、LAI 株での値との比、及び Virco 社による推定値を表 2 に示す。Virco 社が耐性と判定した薬剤については、我々の結果でも EC₅₀ 値が LAI 株よりも 35 倍以上高まっており、両者の間で比較的よい一致がみられた。しかし、EC₅₀ 値の比そのものには、3TC、NFV、RTV の場合のように、かなり大きな差があった。

D. 考察

HIV-1 の薬剤感受性を検査する場合、測定値の

誤差が変動係数で 40% 以下となることが国際的に要求されている (岡慎一先生より私信)。今回、同じ提供者の PBMC を用いて LAI 株に対する NFV の EC₅₀ 値の誤差を求めたところ、変動係数で 33% であった。また、提供者の異なる PBMC を用いて LAI 株に対する 10 種の薬剤に対する EC₅₀ 値を求めたところ、最大で 2.5 倍の差しかなかった。しかし、これらは同日に行った実験によるデータである。また、ウイルス液の TCID₅₀ を揃えて実験を行っていない。今後、我々の方法を臨床に応用するためには、測定日を変えたときの誤差や TCID₅₀ の違いによる測定値への影響を検討する必要がある。

Virco 社による薬剤耐性の判定結果とはまずまずの一致をみた。しかし、LAI 株を比較対照とする相対値に関しては、両者の間でかなりの差がみられた。これが被感染細胞の違いによるものなのか (Virco 社は株化細胞を使っている)、それとも感染細胞の培養方法の違いによるものなのかは今のところ不明である。この問題を追求する上で、Virco 社が EC₅₀ 値そのものではなく、LAI 株に対する比だけを回答することが一つの障害となっている。将来、血中薬剤濃度と比較しながら薬剤感受性のデータが活用されていくと予想されるが、そのためにも EC₅₀ 値そのものを測定あるいは推定する方法が望ましいと思われる。

E. 結論

我々の薬剤感受性検査法は EC₅₀ を比較的正確に測定できることが分かった (変動係数 33%)。この方法による結果と Virco 社による検査結果を比較した結果、薬剤耐性の判定は両者でよく一致していたが、薬剤感受性の相対値にはかなりの差があった。血中薬剤濃度と関連させて薬剤感受性のデータを活用するためには、正しい EC₅₀ を求めることが必要であると考えられる。

F. 健康危険情報

HIV-1 を用いて行う実験はすべて P3B2 レベルの実験室で行った。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Takizawa, Y., Kato, S., Matsunaga, J., Aozaki, R., Tomita, Y., Nishikawa, T., and Shimizu, H. Electron microscopic DOPA reaction test for oculocutaneous albinism. *Arch. Dermatol. Res.* 292, 301–305 (2000).
2. Oida, T., Suzuki, K., Nanno, M., Kanamori, Y., Saito, H., Kubota, E., Kato, S., Itoh, M., Kaminogawa, S., and Ishikawa, H. Role of gut cryptopatches in early extrathymic maturation of intestinal intraepithelial T cells. *J. Immunol.* 164(7), 3616–3626 (2000).
3. Hanabusa, H., Kuji, N., Kato, S., Tagami, H., Kaneko, S., Tanaka, H., Yoshimura, Y. An evaluation of semen processing methods for eliminating HIV-1. *AIDS* 14(11), 1611–1616 (2000).
4. Miyama, J., Tatsunami, S., Taki, M., Yamamoto, Y., Hanabusa, Y., Fujimura, Y., Terunuma, H., Kato, S., and Yoshida, T. Condition of HIV-1-infected long-term non-progressors in Japan. *The Journal of AIDS Research* 2(2), 89–95 (2000).
5. Nishimura, N., Nakayama, T., Tonoike, H., Kojima, K., and Kato, S. Direct PCR from whole blood without DNA isolation. *Ann. Clin. Biochem.* 37, 674–80 (2000).

2. 学会発表

1. 花房秀次、田上尚道、杉田哲佳、加藤真吾. HIV 感染者のトータルケア. 第 14 回エイズ学会総会、京都、2000 年 11 月.
2. 齊藤有紀、杉田哲佳、松本智子、高野八百子、鎌倉光宏、小林芳夫、根岸昌功、加藤真吾. 都内 2 医療施設における HIV-1 サブタイプ別感染状況. 第 14 回エイズ学会総会、京都、2000 年 11 月.
3. 杉田哲佳、田上尚道、花房秀次、有吉紅也、加藤真吾. 感染者由来 HIV-1 のクローンレ

ベルにおける薬剤感受性. 第 14 回エイズ学会総会、京都、2000 年 11 月.

4. 加藤真吾、杉田哲佳、田上尚道、花房秀次. 抗 HIV-1 治療におけるプラーク法による薬剤感受性試験の意義. 第 14 回エイズ学会総会、京都、2000 年 11 月.
5. 加藤真吾、杉田哲佳、齊藤有紀、田上尚道、花房秀次、瀧正志、三浦琢磨、三間屋純一. LTNP における遺伝的多様性とプロウイルス量. 第 14 回エイズ学会総会、京都、2000 年 11 月.
6. 田上尚道、花房秀次、杉田哲佳、加藤真吾. 末梢血単核球における HIV-1 RNA-DNA hybrid 生成の速度論. 第 14 回エイズ学会総会、京都、2000 年 11 月.
7. 立浪忍、三間屋純一、瀧正志、山本泰之、花房秀次、藤村吉晴、照沼裕、加藤真吾、吉田孝人. 発症予防治療班 1999 年度調査における LTNP の検索とその retrospective analysis. 第 14 回エイズ学会総会、京都、2000 年 11 月.
8. 三宅在子、榎瀬良美、大倉定之、加藤真吾、速水正憲. SHIV 感染サルでの AIDS 発症期における感染性ウイルスの定量と遺伝子解析. 第 14 回エイズ学会総会、京都、2000 年 11 月.
9. 加藤真吾、清水香代子、小林芳夫. 当院で分離されたアルペカシン耐性黄色ブドウ球菌の分子疫学的検討. 第 16 回日本環境感染学会総会. 東京、2001 年 2 月.
10. 加藤真吾、田上尚道、鎌倉光宏. Kinetics of the creation of HIV-1 RNA-DNA hybrid in PBMC. 第 13 回日米エイズ会議、熊本、2001 年 3 月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

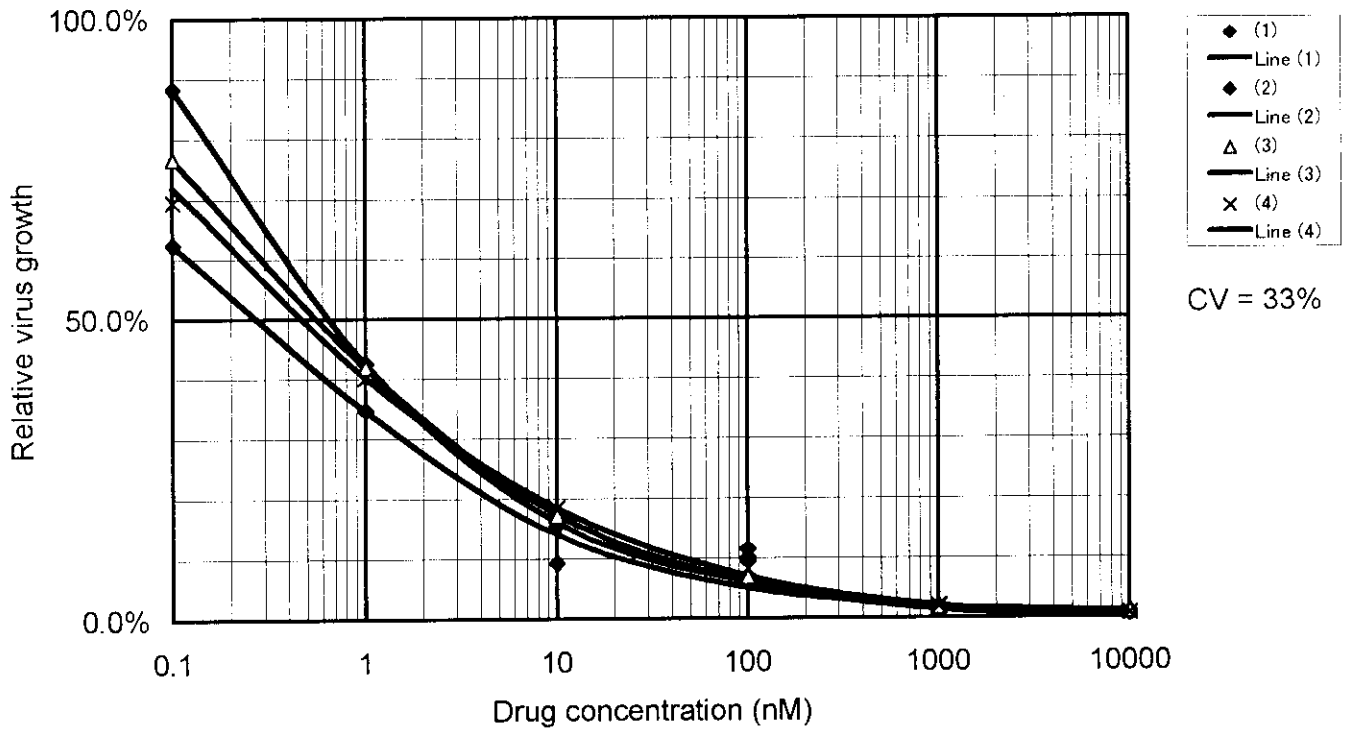
表 1 . Drug susceptibility test of the LAI strain using PBMC from different donors.

Donor	EC ₅₀ (nM)									
	AZT	ddl	ddC	d4T	3TC	NVP	IDV	NFV	SQV	RTV
O	3.0	800	280	60	110	0.9	1.6	1.1	2.6	140
U	1.9	800	170	24	240	1.5	4.0	1.4	4.0	240
Ratio	1.6	1.0	1.6	2.5	2.2	1.7	2.5	1.3	1.5	1.7

表 2 . Drug susceptibility test of a clinical isolate from a treated patient H197.

Isolate	EC ₅₀ (nM)									
	AZT	ddl	ddC	d4T	3TC	NVP	IDV	NFV	SQV	RTV
LAI	1.9	800	170	24	240	1.5	4.0	1.4	4.0	140
H197	2.8	300	50	50	>10 ⁵	13	140	300	30	>10 ⁵
Ratio	1.5	0.4	0.3	2.1	>400	8.7	35	210	7.5	>700
Ratio (Virco)	4.8	1.5	1.8	1.1	58.2	1.4	17.8	34.4	5.4	65.4

☒ 1. Reproducibility of NFV susceptibility assay, LAI



☒ 2. Drug susceptibility assay of LAI, Donor O

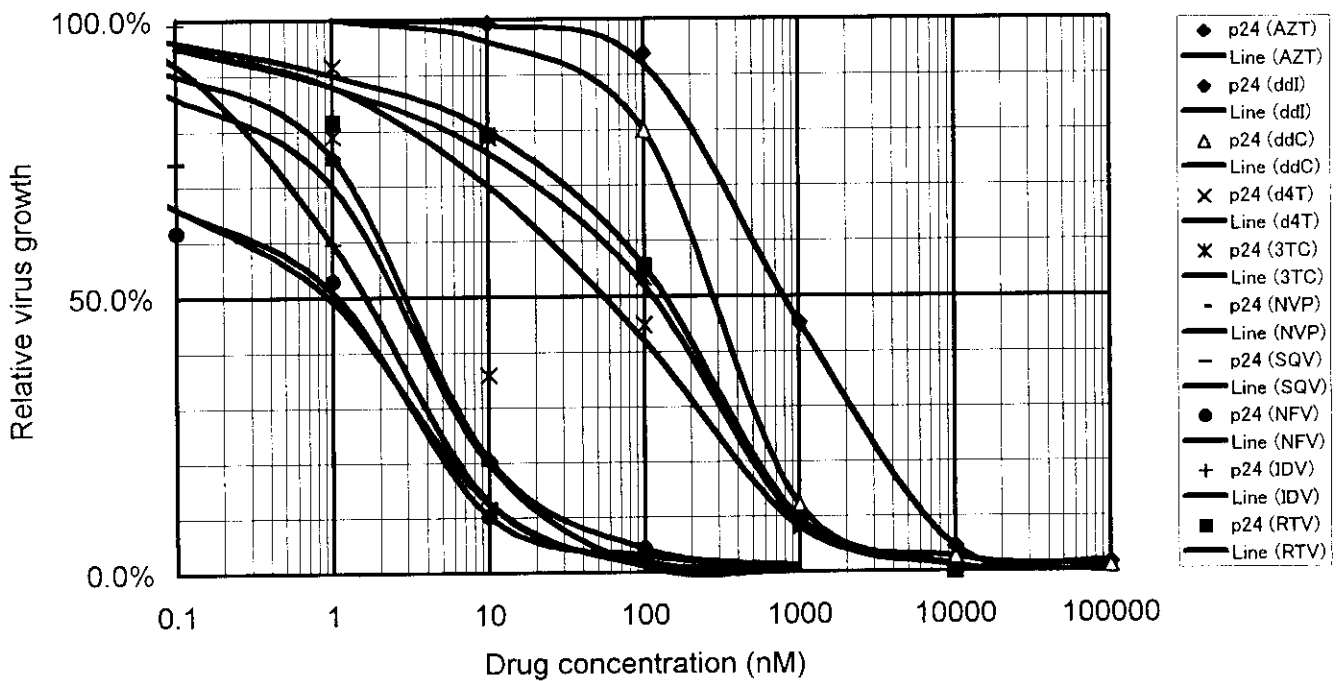


Figure 3. Drug susceptibility assay of LAI, Donor U

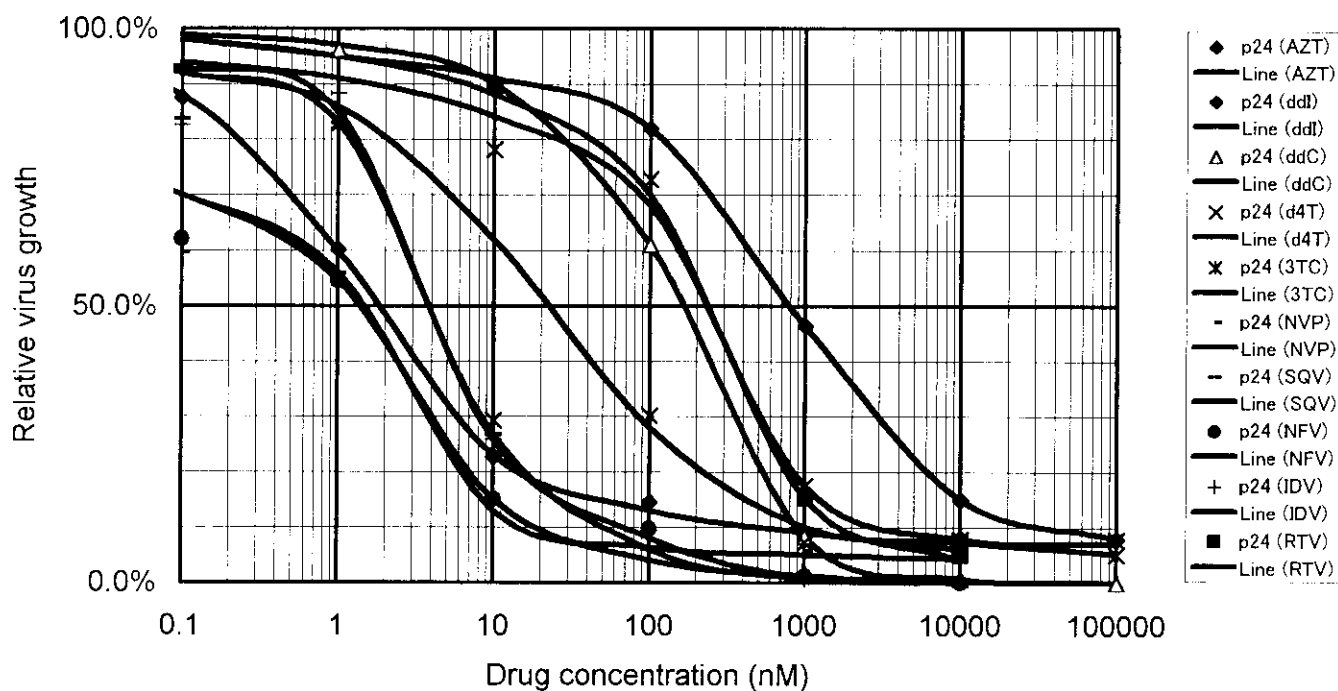
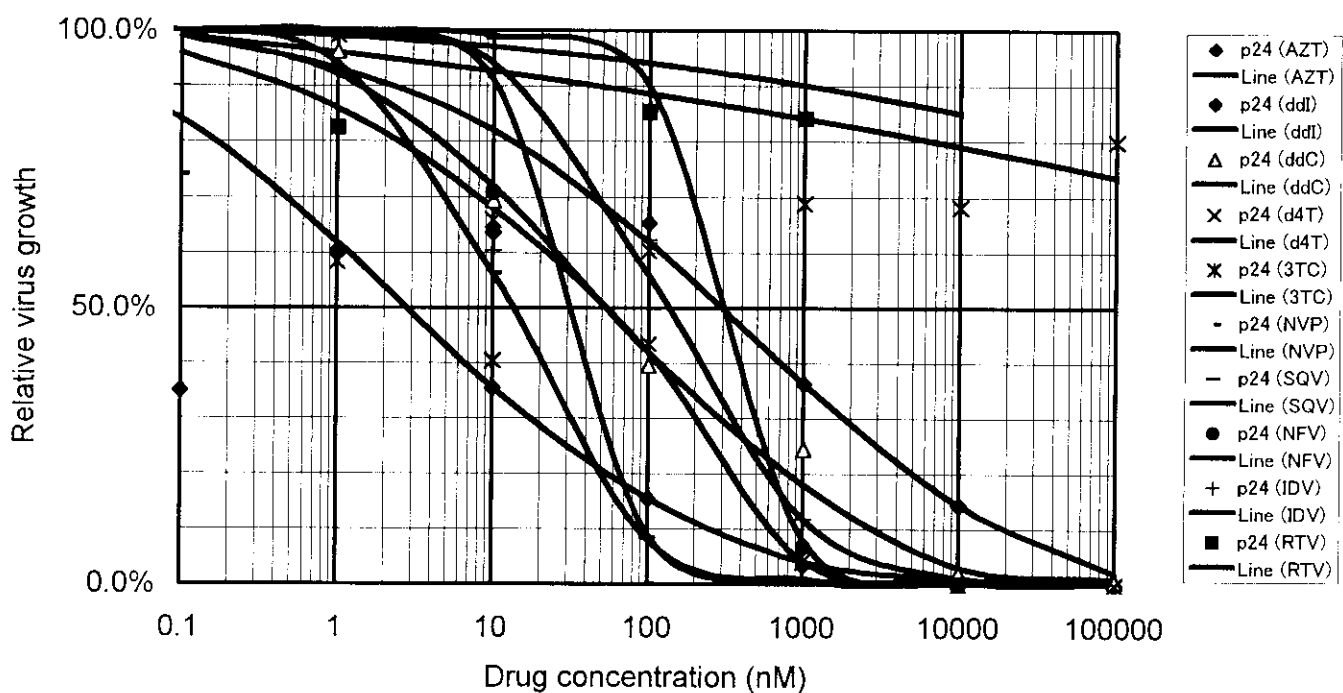


Figure 4. Drug susceptibility assay of HIV-1 from H197



バーチャルフェノタイプ、アンチヴィログラムフェノタイプ法の概要と実施結果

班員研究者 向出 雅一 (㈱エスアールエル、神奈川県衛生研究所)
研究協力者 近藤 真規子 (神奈川県衛生研究所)
須藤 弘二 (神奈川県衛生研究所、横浜市立大学医学部)
西澤 雅子 (神奈川県衛生研究所、エイズ予防財団リサーチレジデント)
今井 光信 (神奈川県衛生研究所)

研究要旨：

HIV 薬剤耐性検査を専門とする Virco 社と日本の検査センター (SRL) との連携により可能となった HIV 薬剤耐性検査 (バーチャルフェノタイプ、フェノタイプ) についてその現状と問題点およびその可能性等について検討した。日本の各研究室での耐性検査の結果とバーチャルフェノタイプ、フェノタイプ等との結果は概ね一致したが、比較的複雑な耐性変異を有する臨床株については、不一致点もみられ今後さらに比較検討の必要があることが分った。公的研究機関の充実・整備と共に民間検査センターの活用も含めた検査体制の確立に今後努めたい。

研究目的：

抗 HIV 薬の治療を受けつつある感染者が年々確実に増加しつつある現状を考えると、今後必要となる HIV 薬剤耐性検査を確実に実施できる検査体制の確立のためには、公的機関による HIV 検査体制の充実と共に、民間の検査センター等との連携による検査体制の拡大・整備も極めて重要である。このため、HIV 薬剤耐性検査を専門とし、極めて多数の薬剤耐性検査の経験を有する Virco 社と日本の検査センター (SRL) との連携による HIV 薬剤耐性検査の現状を把握し、その活用による検査体制の拡大・整備の可能性について検討した。

1. 概要

HIV 薬剤耐性検査は、HIV 治療方針決定において重要な検査である。患者 (医療機関) が必要とする薬剤耐性検査が効率良く実施できる検査体制を構築することが極めて重要である。HIV 薬剤耐性検査には、大きくジェノタイプとフェノタイプに分かれる。ジェノタイプは、薬剤耐性に関する HIV の変異を検出し、フェノタイプは実際にウイルスを薬剤存在かで培養し薬剤感受性を検査する点で異なる。しかし、ジェノタイプは、変異部位の組み合わせが複雑で各薬剤に対する薬剤耐性の程度を推測する事が難しい場合が多く、フェノタイプは、費用と検査に要する時間がジェノタイプに比べ2倍以上かかることなど問題点がある。

平成13年1月に、Virco社（ベルギー）では、約100,000症例のジェノタイプとフェノタイプのリレーショナルデータベースを確立し（図1）、ジェノタイプの変異パターンが一致するデータベース上の症例のフェノタイプ結果に基づき、各薬剤に対するフェノタイプをコンピューター上で推測する「バーチャルフェノタイプ」を完成させた。

平成13年1月から、Virco社と臨床検査センター（SRL）との連携で「バーチャルフェノタイプ」の受託体制が確立され（図2）、フェノタイプについては、Recombinant Virus Assay（アンチビログラムフェノタイプ）を用い、平成12年7月から同様の受託体制が確立された。

2. 薬剤耐性検査の流れ

患者・感染者から血漿を医療機関で採取し、直接、または、研究機関（衛生研究所など）を通して臨床検査センターへ血漿を送り、薬剤耐性検査を依頼する（図2、3、4、5）。検査センターでは、核酸抽出、遺伝子増幅、塩基配列決定を行い、塩基配列データをVirco社（ベルギー）へ送り、データベース解析によるバーチャルフェノタイプ（仮想フェノタイプ）解析を実施する。解析結果が検査センターに報告され、直接、または、研究機関を通じて医療機関に返され、患者に診断結果を説明する。フェノタイプ（アンチビログラムフェノタイプ）は、遺伝子増幅産物をVirco社（ベルギー）に空輸し、Recombinant Virus Assayを実施

する。

3. バーチャルフェノタイプ（図6）

血漿0.14mlよりHIVのRNAを抽出し、RT-PCR法にてHIV治療薬のターゲット領域であるHIV-1のプロテアーゼ（PI codon1-99）領域と逆転写酵素（RT codon1-400）領域を増幅する。次に、このPCR産物を用いてダイレクトシーケンス法により遺伝子配列を決定し、その配列データをVirco社に送ります。

Virco社では、約100,000症例のジェノタイプとフェノタイプを含むリレーショナルデータベースを用い、14種類の抗HIV薬に対する薬剤耐性度（Fold change in IC50）を予測します。患者・HIV感染者のジェノタイプとデータベース中で一致したジェノタイプを持つ症例のフェノタイプの薬剤耐性度の平均値がそれぞれの薬剤での生物学的カットオフ値より大きい場合は、薬剤耐性と判定します。また、データベース中での一致数、一致した症例の薬剤耐性株の比率も結果に示されます。生物学的カットオフは、1000例の未治療患者と数千例の野生株（耐性変異を持たない株；ラボ株）から決定されている。

4. フェノタイプ（アンチビログラムフェノタイプ）（図7、8、9、表1）

血漿0.14mlよりHIVのRNAを抽出し、RT-PCR法にてHIV治療薬のターゲット領域であるHIV-1のプロテアーゼ（PI codon1-99）領域と逆転写酵素（RT

codon1-400)領域を増幅します。次に、この領域を欠失した HIV クローンと混合しリポータージーンを持つ CD4+細胞に導入します。この Recombinant Virus を生産する細胞を用いて、384 マイクロタイタープレートに 15 種類の異なった濃度の薬剤を加え、HIV 複製量を測定します。ウイルスの増殖を 50%抑制する薬剤濃度 (IC50) を計算します。この値が変異のない HIV 野生株の IC50 の何倍であるか (Fold change of IC50) を計算します。生物学的カットオフ値より大きい場合は、薬剤耐性と判定します。

5. 臨床株を用いた検討 (図 10、表 2)

各種フェノタイプ検査との比較研究からその有用性を現在検討中です。PBMC-MAGIC5 法 (神奈川県衛研法、図 10)) で、いずれかの抗 HIV 剤に 10 倍以上耐性が見られ複雑な変異を持つ臨床分離株 2 株と、変異が無く、かつ、感受性である臨床分離株 2 例について、Virco 社のバーチャルフェノタイプ検査とアンチヴィログラムフェノタイプ検査を行った。その結果、抗 HIV 剤感受性検査で 10 倍以上の耐性が見られた検体は、バーチャルフェノタイプ検査、アンチヴィログラムフェノタイプ検査でもほとんどの検体で 10 倍以上、幾つかは 4 ~ 10 倍の耐性があった。

また、感受性株では PBMC-MAGIC5 法 (神奈川県衛研法) とバーチャルフェノタイプ検査とアンチヴィログラムフェノタイプ検査では、耐性度もほぼ同様な結果で感受性を示した。しかし、6 薬剤のうち 5 薬剤に耐

性を持ち、また、変異の複雑な症例 129 株 (サブタイプ E) では、データベース中に一致する遺伝子変異パターンが少なく、定量的なデータが一部の薬剤で得られなかった。

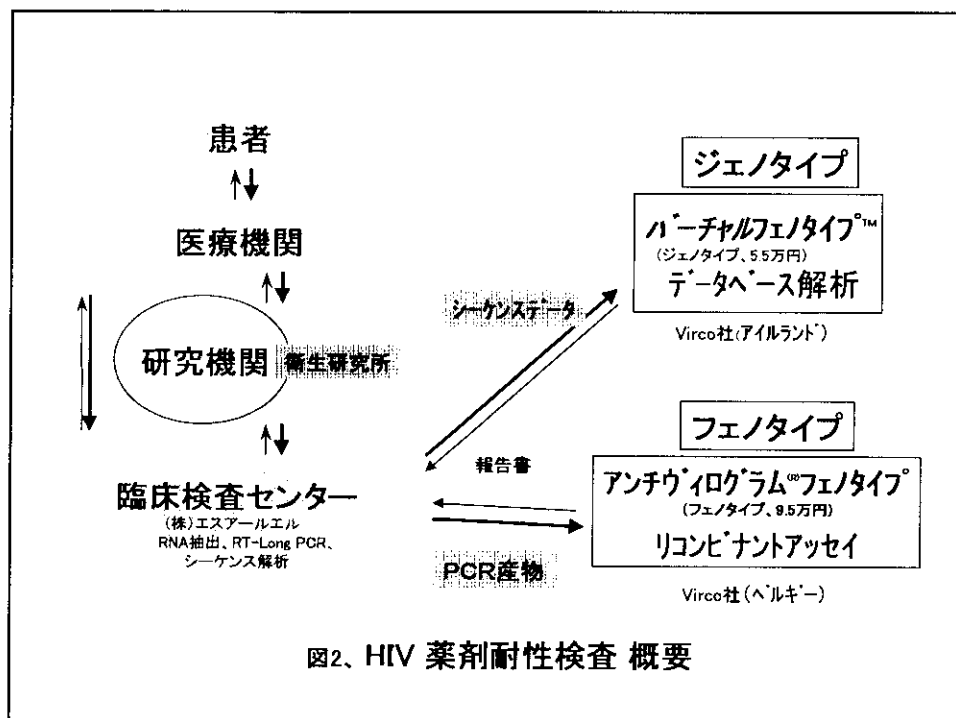
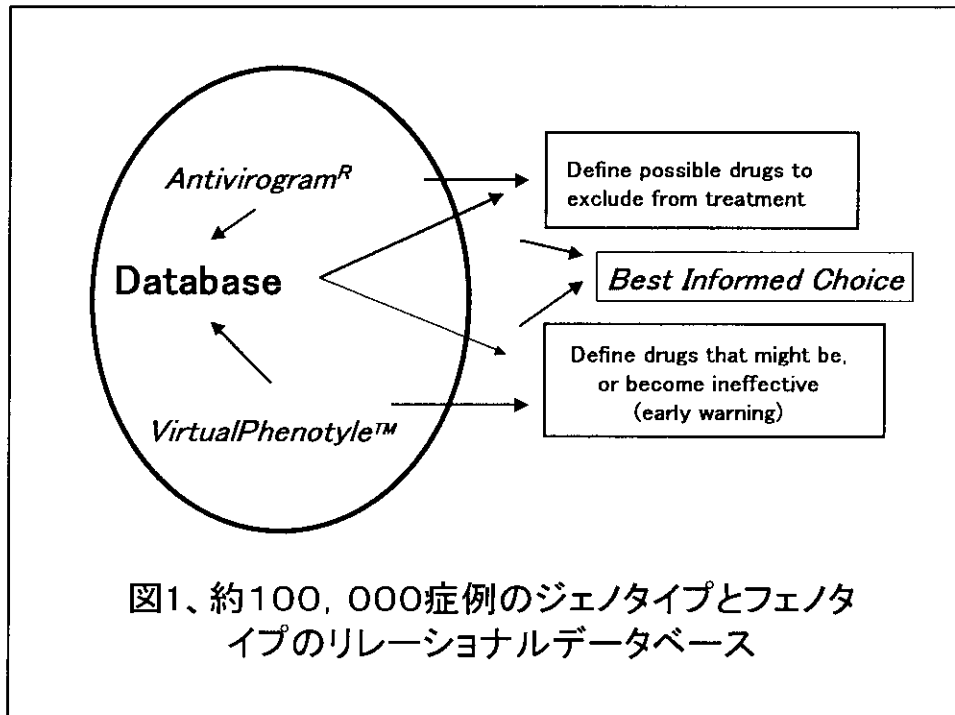
今後、データベースの症例数の充実、日本人株のデータの蓄積、各種フェノタイプ検査との比較研究がさらに必要であると思われる。

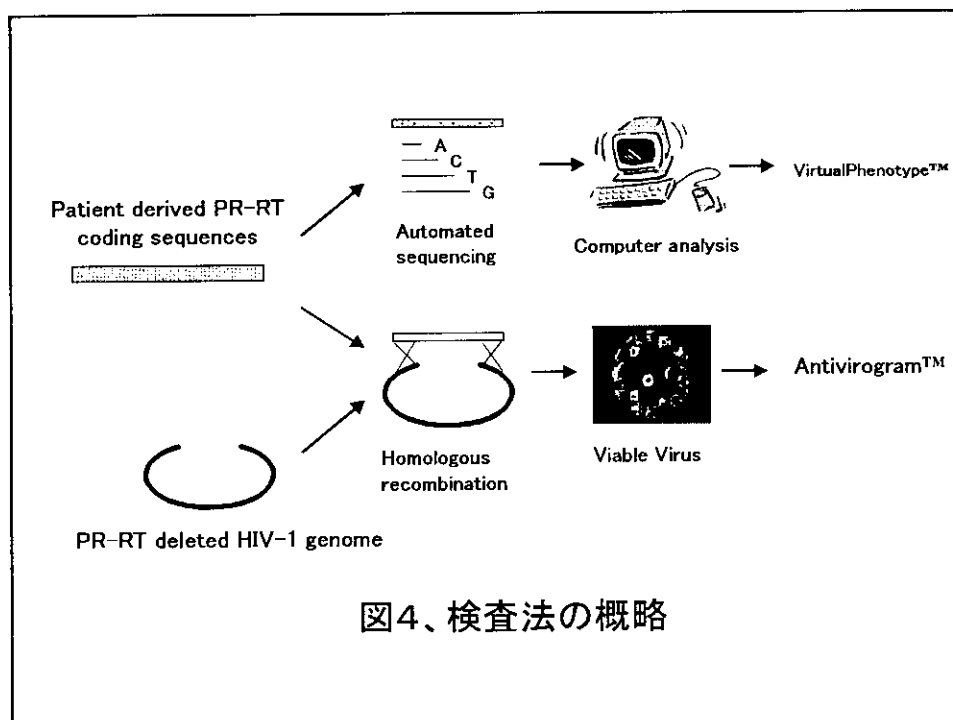
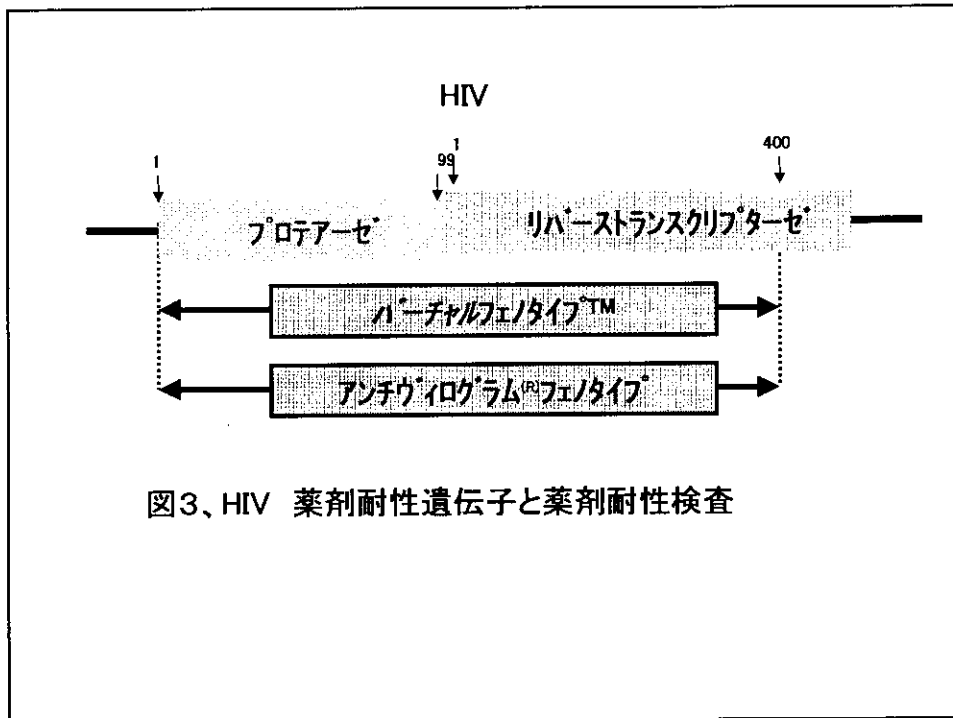
6. 結論 :

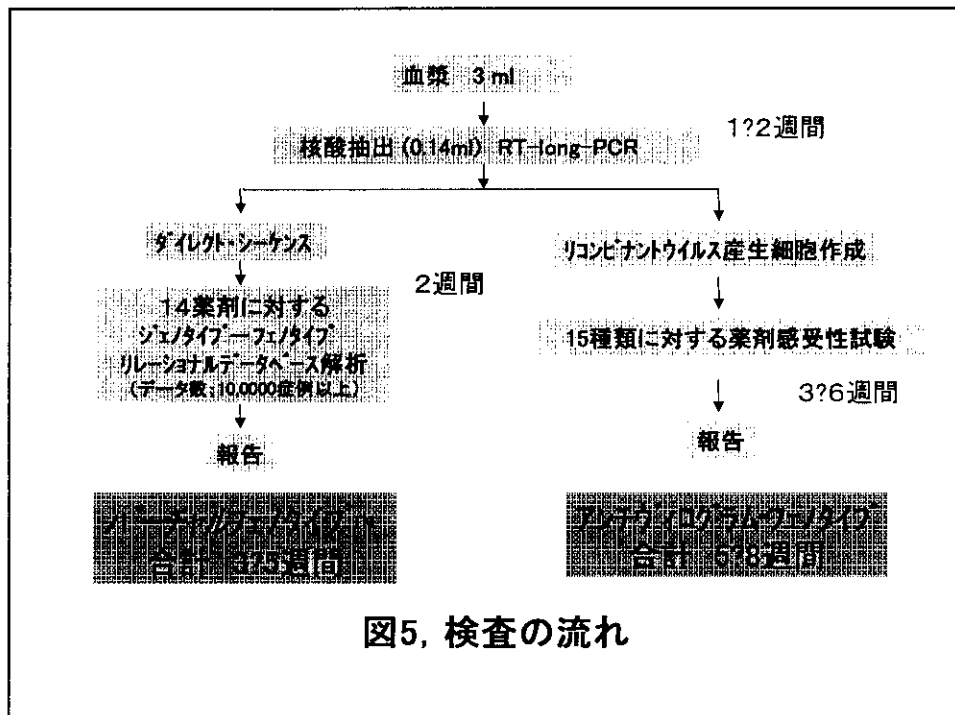
今後さらに必要数の増加する薬剤耐性検査を確実に実施できる検査体制を確立するためには、検査の質の向上と共に検査数の処理能力の向上も重要な課題となる。今回検討した、バーチャルフェノタイプ・フェノタイプの検査システムは、今後さらに検討すべき問題も一部にあるが、薬剤耐性検査体制の確立に極めて有用な検査システムの一つであることが分かった。

6、文献

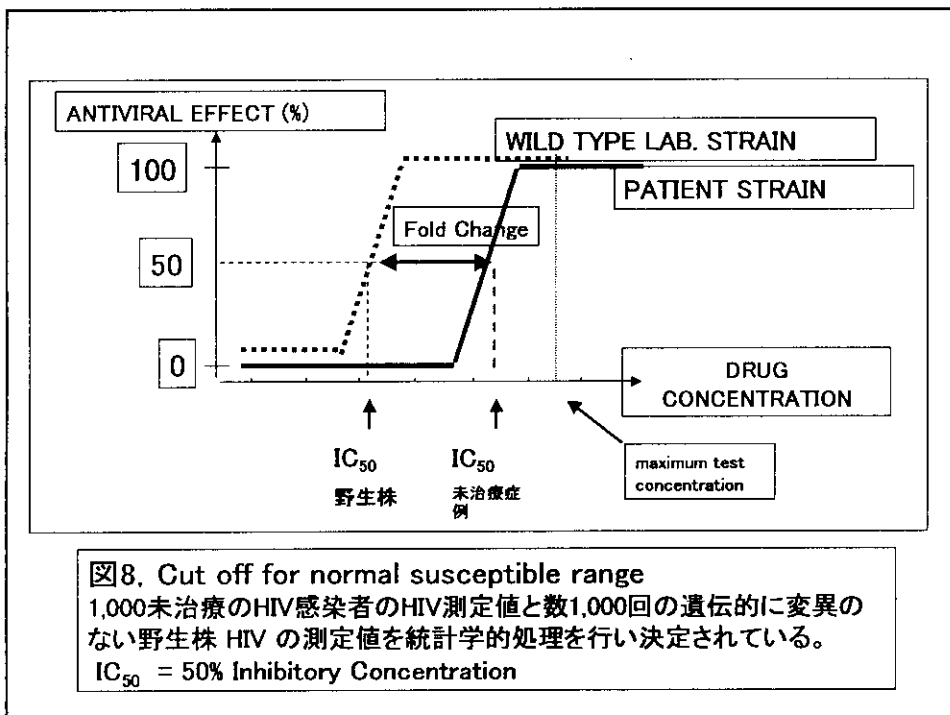
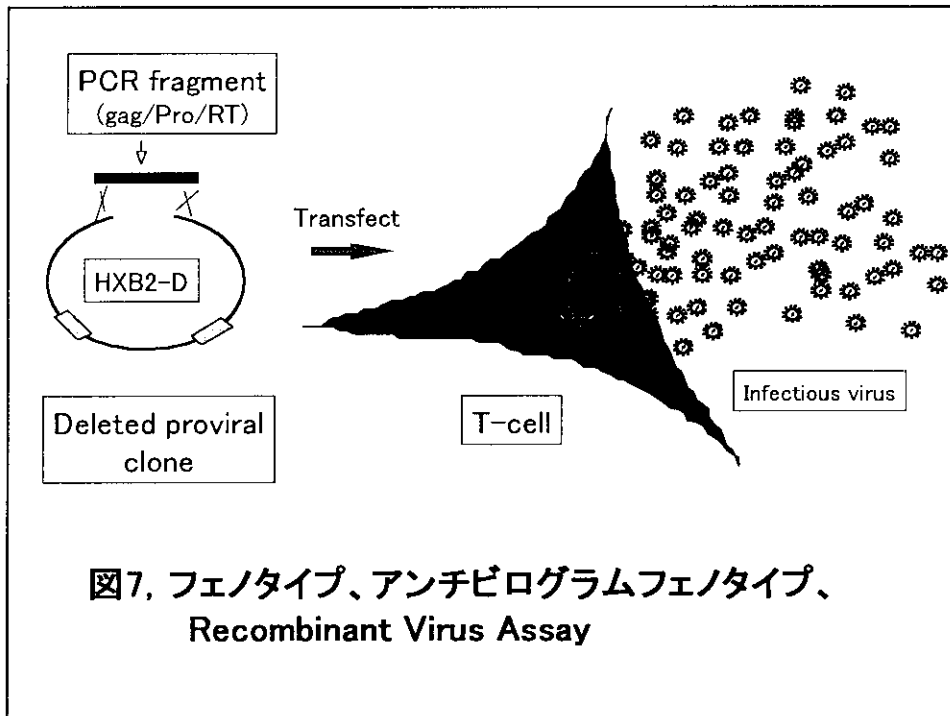
Larder BA, Kemp SD & Hertogs K. Quantitative prediction of HIV-1 phenotypic resistance from genotypes: the virtual phenotype. *Antiviral Therapy* 2000; 5 (Suppl 3): 49







1. 血漿からRNAの抽出 - SRL
 2. cDNA合成とLong RT PCR (Pro-RT 1.8kb) -SRL
 3. ダイレクトシーケンス - SRL
 4. リレーショナルデータベース解析
14薬剤- 約100,000症例のジェノタイプ-フェノタイプデータ
-Virco社, VircoNET™
- Larder BA, Kemp SD & Hertogs K.
Quantitative prediction of HIV-1 phenotypic resistance from genotypes: the virtual phenotype. *Antiviral Therapy*2000;5
(Suppl 3): 49
- 図6, バーチャルフェノタイプ™



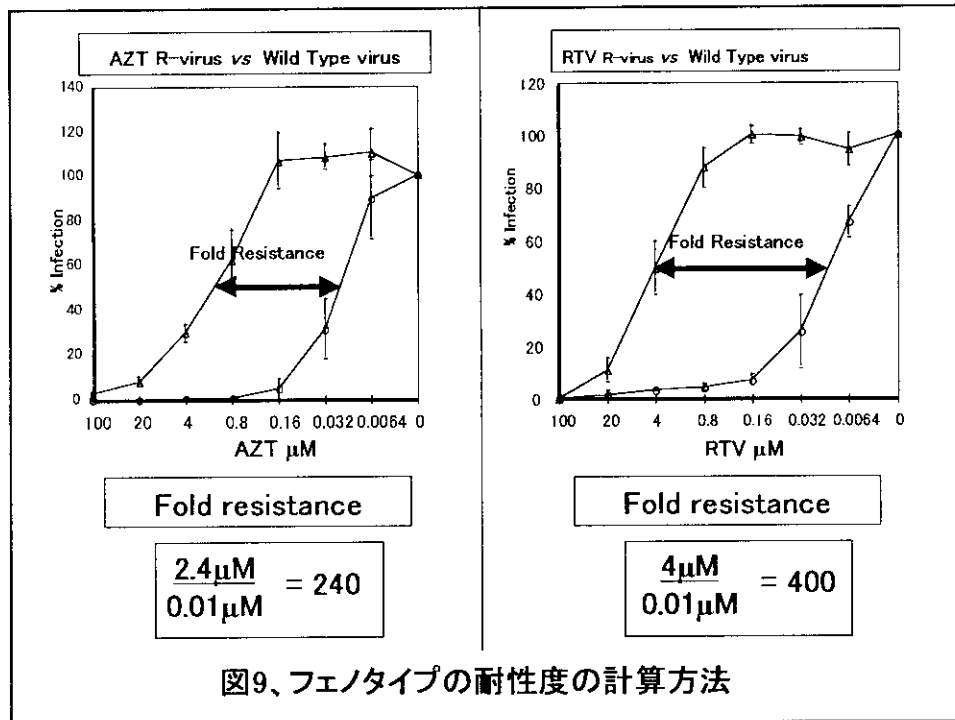


図9、フェノタイプの耐性度の計算方法

表1、生物学的カットオフ値
Cut-off for normal susceptible range
from the Antivirogram®

NNRTI Cut-off		NNRTI Cut-off		PI Cut-off	
3TC	4.5	NVP	8.0	IDV	3.0
ddI	3.5	DLV	10.0	RTV	3.5
ddC	3.5	EFV	6.0	NFV	4.0
d4T	3.0			SQV	2.5
ABC	3.0			APV	2.5
				LPV	2.5

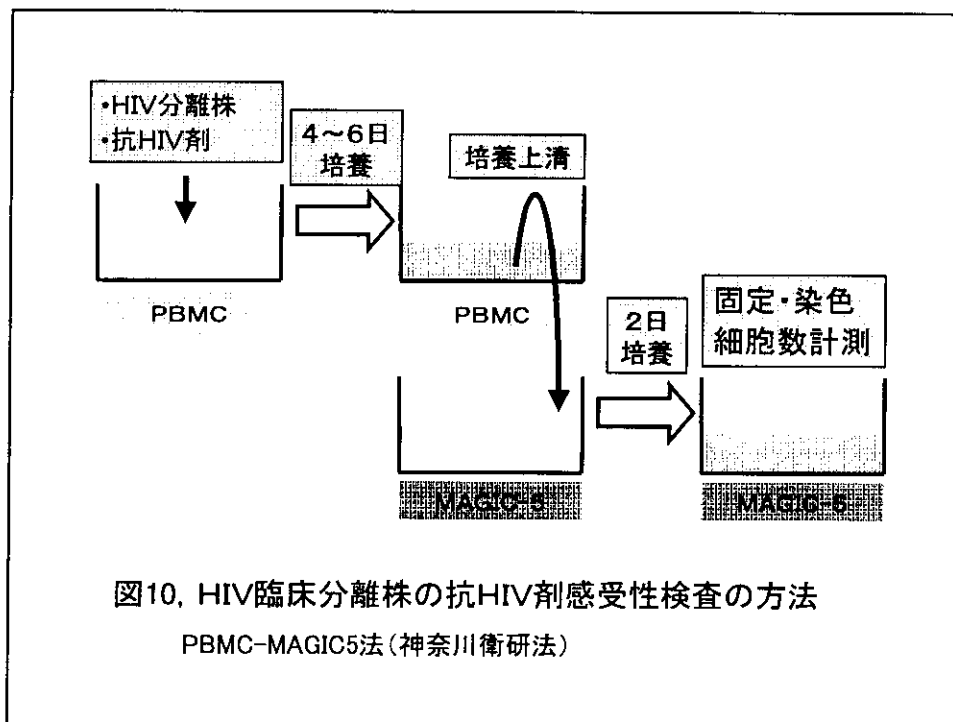


表2. PBMC-MAGIC5法(神奈川衛研法)、パーチャルフェノタイプ、アンチウイログラム[®]フェノタイプの比較

臨床分離株	薬剤感受性検査方法	抗HIV剤					
		AZT	ddI	ddC	d4T	IDV	NFV
GM68-42	MAGIC-5	1.5	0.58	0.5	1.2	1	2.3
	VP(virco)	1.1	0.8	0.9	0.9	0.7	1
	P(virco)	1.3	0.8	1.6	0.9	1.2	0.3
Y105	MAGIC-5	1.2	0.8	3.3	1.2	1.3	3
	VP(virco)	1.1	0.8	0.9	0.9	0.7	1
	P(virco)	0.7	0.9	1.5	0.7	0.6	0.4
H197-12	MAGIC-5	1.1	2.3	2.6	0.6	4.6	4.8
	VP(virco)	4.8	1.5	1.8	1.1	1.7	3.4
	P(virco)	21.2	2.3	1.6	1.6	7.9	8.9
H129-54	MAGIC-5	5.9	2.0	6.9	1.5	4.3	1.8
	VP(virco)	12.7	*	*	*	7.4	16.7
	P(virco)	4.3	1.2	3.4	0.8	6.3	ND

感受性 中間 耐性

ND:測定不能 *:データベース不足であったため定性的な解析結果となった。