

平成13年度

# エイズ医薬品等開発研究

## 重点研究報告書

## 第3分野

抗エイズ薬開発のための基盤技術の開発等に関する研究

## 新規HIV感染価測定細胞株に基づく迅速簡便な実用的 薬剤耐性試験法の確立

所 属 国立感染症研究所獣医科学  
研 究 者 巽 正志

### 分担研究者

- |                              |      |
|------------------------------|------|
| (1) 国立感染症研究所獣医科学部            | 巽 正志 |
| (2) 国立国際医療センター エイズ治療研究開発センター | 岡 慎一 |
| (3) (株) 三菱化学ピーシーエル           | 石古博昭 |

### 要旨

新規 HIV 感染価測定細胞株 MAGIC-5/SEAP 細胞を樹立した。この新規細胞株は、HIV-1 感染により誘導される培養上澄中の SEAP 酵素活性を、化学発光基質を添加するだけで迅速簡便さらに高感度にて HIV 感染を検出することから、薬剤耐性 Phenotype Assay, 抗 HIV 薬剤スクリーニング等、多検体処理が必要とされる High Throughput な側定実験系の構築に有用であると考えられた。

### 1. 研究目的

HIV 感染症の治療において今や耐性発現という問題は臨床・基礎医学の分野で避けて通る事の出来ない基本的な課題であり、耐性発現はこれからの HIV-1 に対する新規の治療薬開発で最重要課題と掲げられるようになった。現在多種多様な薬剤を用いて多様化する HIV 治療法における有効な薬剤選択の判定基準の一つとして Genotyping と Phenotyping の薬剤耐性試験があげられる。Genotyping は既に Kit が販売され実用化しているが、実際の患者ウイルスの耐性を反映していないなどの問題がある。一方 Phenotyping は患者ウイルスの耐性度を反映しているものの、現在推奨されている PBMC を用いる標準法は手技的に複雑で、費用がかさみ結果が得られるのに時間がかかる。なにより多検体処理は困難であることから一般に行われていない。しかしながら実際の患者ウイルスの生物学的耐性を表現することからその必要性は認められている。本研究はウイルス分離増殖を PBMC ではなく、発想を転換し、新規の感染価測定細胞株に基づいて測定する。すなわち HIV のレセプター及びコレセプターを発現し、汎用性のあるレポーター遺伝子を組み込み、HIV-1 感染によりレポーター遺伝子が駆動する迅速簡便な HIV-1 感染価測定細胞株を樹立し、それを用いた迅速簡便で実用的な薬剤耐性試験 Phenotypic Assay の確立をめざす。さらに実際の臨床検体を用いて現在普及している Genotypic Assay との比較をして、Phenotypic Assay による薬剤選択および変更の有効性を解析し、最適な治療方針を探索する際の臨床判断基準を確立することを最終目的とする。

### 2. 研究方法

HIV-1 LTR の下流に Transcriptional Blocker とともに Reporter Gene として分泌型アルカリホスファターゼ(SEAP)を組み込み、Zeocin 耐性遺伝子を載せた発現ベクター pHIV-LTR/tb-SEAP-Zeo を構築した。この発現ベクターを MAGIC-5A 細胞株に Transfection 後、500 µg/ml の Zeocin で選択培養し生残したコロニーを2等分し、一方は非感染対照として、もう一方は HIV を感染させ、それぞれ分泌された SEAP を発色反応基質 4-Nitrophenyl phosphate と混ぜ合わせ 37°C30 分インキュベート後に 405 nm における OD 値を比色反応で測定した。生残コロニーのうち非感染対照では OD 値が低く、HIV-1 感染により高い OD 値を示した2コロニー群を選択し、さらに2回の選択薬剤非存在下での限界希釈法により MAGIC-5/SEAP 3-1-1 を樹立した。この細胞株の HIV 感受性を比色反応、蛍光発光及び化学発光測定系で、段階希釈した HIV-1 もしくは一定量の HIV-1 と段階希釈した逆転写酵素阻害剤 AZT と

ともに2日間培養し上澄中の SEAP 酵素活性を測定した。また X4 ウイルスである HIV-1 Laboratory Strain HIV-1<sub>NL432</sub>を用いて感染後上澄中に遊離される SEAP 活性を経時的に計測した。また段階希釈した HIV-1<sub>NL432</sub>を MAGIC-5/SEAP 細胞に感染させ2日後の SEAP 活性と同時に同じ Well の Blue Cell Count 値を計測し両測定の間接性を比較検討した。

また臨床応用を視野に入れ、実際の患者検体を用いた薬剤耐性試験への応用を試みた。

**臨床検体**：国立国際医療センター エイズ治療研究開発センターを受診中の HIV 感染者からインフォームドコンセントを得て採血し、直ちに血漿を分離して使用した。

**ウイルス分離**：患者由来の plasma 1ml を 15000rpm 90min にて遠心し、上清を取り除いた。Infection Medium (Complete Medium containing 20ug/ml DEAE-Dextran) を 300ul 加え、MAGIC5A と培養し、細胞の発育が 90%の状態となったら液換えを行った。感染が認められていれば、上清を-80℃で保存した。

**感染価の測定**：感染当日、ウイルスを×1から×1000 に Infection medium で希釈し、MAGIC5-SEAP に加え、37℃、5%CO<sub>2</sub> インキュベーターにて48時間培養した。

**逆転写酵素阻害剤**：一定濃度のウイルスを Infection Medium にて希釈し、100μl ずつ加えた。さらに10倍希釈系列を作成した抗ウイルス薬を 100μl ずつ加え、37℃、5%CO<sub>2</sub> インキュベーターにて培養した。48h 後、X-gal 染色または SEAP のレポータージーンアッセイを行い、薬剤を加えていないウイルスを 100%とし、50%発育阻止が出来たところを IC<sub>50</sub>とした。

**プロテアーゼ阻害剤**：一定濃度のウイルスを Infection Medium にて希釈し、100μl ずつ加えた。さらに10倍希釈系列を作成した抗ウイルス薬を 100μl ずつ加え、37℃、5%CO<sub>2</sub> インキュベーターにて培養した。72h 後、前日用意しておいた 96well プレートに上清 100μl と Infection Medium 100μl を加え、培養した。48h 後、X-gal 染色または SEAP のレポータージーンアッセイを行い、薬剤を加えていないウイルスを 100%とし、50%発育阻止が出来たところを IC<sub>50</sub>とした。

**genotype (遺伝子型) での耐性検査**：患者血漿中から RNA の抽出を行い、塩基配列を Autosequencer を用いて決定した。アミノ酸配列は、塩基配列より推定し、耐性の有無を調べた。

### 3. 研究成果

#### (1) MAGIC-5/SEAP 細胞株の樹立

発現ベクター pHIV-LTR/SEAP-Zeo および pHIV-LTR/tb-SEAP-Zeo を MAGIC-5A に Transfection 後生残した殆どのコロニー (陽性コロニー数 / 検査コロニー数 ; 163 個 / 165 個) は HIV 感染の有無にかかわらず高い SEAP を分泌していた。数少ない HIV 感染により SEAP を分泌する細胞群 (2コロニー) から2度にわたる限界希釈法で安定した HIV 感受性を示したクローン MAGIC-5/SEAP 3-1-1 を樹立した。この細胞株は HIV-1 Laboratory Strain HIV-1<sub>NL432</sub>, HIV-1<sub>Ba-L</sub> および HIV-1<sub>Lai</sub> のみならず臨床分離株 HIV-1 に対してその感受性において MAGIC-5A と高い相関を示した。

MAGIC-5A 細胞株における BFU(Blue Focus Unit/ml)を測定した分子クローンウイルスである Indie-C1 と NL432 株を段階希釈後感染させ2日後の SEAP 活性を 4-Nitrophenyl phosphate を基質とする発色反応で測定したところ、希釈段階に応じて OD 値が減少し、概略 50 ~ 100BFU のウイルス感染価において 50% OD<sub>Max</sub> になることが判明した。また 300 BFU の HIV-1<sub>NL432</sub>を段階希釈した AZT (初濃度 : 500 μM) の存在下で培養すると 10<sup>4</sup>希釈まで HIV-1<sub>NL432</sub> の AZT 感受性が観察されたことから、これらの培養上澄中に分泌される SEAP 活性は HIV-1<sub>NL432</sub> 感染により特異的に誘導されたことが判明した。

次に予め MAGIC-5A 細胞株で感染価を測定した HIV-1 Laboratory Strain である X4 HIV-1<sub>NL432</sub>, R5 HIV-1<sub>Ba-L</sub> と臨床検体から分離した Primary Isolate Case 1 (X4)および Case 2 (R5)を MAGIC-5/SEAP に感染させ2日後の培養上澄中に分泌された SEAP 活性を化学発光基質である CSPD を用いて測定したところ、ウイルスの希釈段階に応じて発色反応よりも広い範囲で計測が可能であることが示された。また段階希釈した X4 HIV-1<sub>NL432</sub>を感染させ経時的に同じ Well の培養上澄中に分泌される SEAP 活性を測定したところ、CSPD を基質として用いた化学発光反応 Chemiluminescence は 500 ~ 10<sup>6</sup> RLU/sec の広い Range で SEAP 活性が測定でき、なおかつ感染1日後では殆ど検出限界であった培養でも、1日の培養延長で数十倍もの感度の上昇が得られることが判明した。次に段階希釈した X4 HIV-1<sub>NL432</sub>を

感染させて2日後の MAGIC-5/SEAP 細胞の培養上澄中の SEAP と X-Gal 染色による $\beta$ -Gal 陽性青染核細胞数(BFU) の同じ培養 Well における測定値を比較して SEAP 値と BFU 値の相関関係を調べたところ良好な相関が認められ、この実験条件では1個当たりの感染性ウイルス粒子が約 250 RLU の発光を誘導することがグラフプロットから求められた。このことは実験に用いるウイルス株が一定ならば、その標準曲線を予めプロットすることにより測定資料中のウイルス感染価が化学発光値 RLU から容易に推定できることを示していた。

### (3) 薬剤耐性試験への応用

表現型 (phenotype) と遺伝子型 (genotype) の比較

MAGIC5A を用いて、各薬剤の耐性検査を行った。臨床分離株は、AZT46 検体、d4T47 検体、3TC48 検体、ABC29 検体、NVP39 検体、RTV41 検体、SQV41 検体、NFV43 検体、APV44 検体について、遺伝型との解析結果と比較した。

核酸系逆転写酵素阻害剤：AZT 耐性変異である M41L、T215YF の単独もしくは、両者の変異が認められた場合、2.6 倍～106 倍 (平均 70 倍) と耐性に傾いた。しかし M41L、T215YF、M184V が同時に変異すると 0.53～14 倍 (平均 6.7 倍) と感受性を取り戻していることが確認された。3TC 耐性変異 M184V や d4T 耐性変異 V75T が wild type であっても、他の逆転写酵素阻害剤の治療歴がある場合では低い耐性が認められた。

非核酸系逆転写酵素阻害剤：NVP の primary mutation K103N が見られると 367 倍以上と高度耐性が確認され、EFV に対しても 300 倍以上耐性となり、交差耐性が確認された。逆に NVP のみに耐性を示す V106A は、NVP に 131 倍以上の高度耐性、EFV に 5 倍と感受性を示すことが確認された。

プロテアーゼ阻害剤：全体的に primary mutation の加算はもちろんのこと secondary mutation の蓄積に伴い耐性度は増す傾向にあった。無治療で見られた NFV の secondary mutation M36I、L63P、V77I の単独変異もしくは L63P+V77I の変異については、ウイルスの polymorphism であり、無治療群では secondary mutation があっても感受性を示していたしかし治療群については、単独変異 0.6～103 倍 (平均 21.3 倍)、L63P+V77I では 10.6～333 倍 (平均 115 倍) と中等度耐性から高度耐性を獲得していた。APV に対して感受性が戻ることが知られている N88S の変異が、2 例について見つかった。これらの耐性度がやや感受性であることも確認された。

### MAGIC5A 法と SEAP 法の相関

NL432 の IC<sub>50</sub> の再現性 5 回を AZT、NVP、NFV の薬剤において MAGIC5A 法と SEAP 法で比較したところ、平均値、レンジ、CV において両者の方法ではほぼ同様の結果が得られた。

また MAGIC5A を用いて臨床検体から分離した 30 例、(無治療 12 例、治療 18 例) を使用し同様に Fold resistance での値を比較した。Fold resistance についてはそれぞれのアッセイでの NL432 の IC<sub>50</sub> を 1 倍とし算出した。決定係数(R<sup>2</sup>)は AZT、NVP、NFV それぞれ 0.934、0.935、0.963 であった。相関係数はそれぞれ 0.957、0.994、0.999 であった。作用機序の異なる 3 剤において高度耐性株、中等度耐性株、感受性株において SEAP 法は検出が可能であり、MAGIC5A 法との相関についても良好な結果が得られた。

## 4. 考察

従来 HIV-1 感染の測定系は、HIV-1 の構造蛋白である gag 蛋白 p25 の ELISA による測定と、逆転写酵素活性の測定に基づくものが多く用いられてきたが、ウイルスの感染価そのものを反映した定量系とは言いがたかった。現在用いられる感染価測定系として既に Emmermann らは CD4 発現 HeLa 細胞に HIV-1 の LTR 下流に SV40 の核移行シグナルを付け加えた $\beta$ -Galactosidas を入れた発現ユニットを組み込んだ細胞株 MAGI を母体として CCR5 を発現した Indicator Cells が開発されている。我々も MAGI 細胞に Elongation Factor 1 $\alpha$  の Promoter 下流に CCR5 を組み込み、Blasticidine により選択できる発現ベクターを Transfection し、選択後限界希釈により CCR5 発現 MAGI 細胞である MAGIC-5 細胞株を樹立した。MAGIC-5 は T 細胞指向性 HIV-1 である HIV-1NL432 のみならずマクロファージ指向性 HIV-1 である HIV-1JR-SF の感染価をも計数しえることが判明し、この細胞株は国内外において薬剤耐性 Phenotype Assay および抗 HIV 薬剤スクリーニングに応用されてきているが、この細胞株による HIV 感染価測定は顕微鏡下における X-gal により青染した細胞核の計数によるので多検体迅速処理

には向かないことから、より迅速簡便な測定系が求められていた。そこで HIV 感染により培養上澄中に分泌される Alkali Phosphatase (SEAP) を Reporter Gene として組み込んだ Indicator Cell の樹立を目的に、MAGIC-5 細胞の改変を試みたところ安定な MAGIC-5/SEAP 細胞株を樹立することに成功した。

この細胞株の樹立過程で HIV-LTR/SEAP の組込まれた細胞コロニー 165 個のうちわずか 2 個のコロニーのみが HIV-1 感染により特異的に高い SEAP 産生が誘導され、殆どのコロニー群では HIV-1 感染がない条件でも無視できない量の SEAP 活性が培養上澄中に検出された。このことは HIV-1 の LTR そのものが低いながらも構成的なプロモーター活性を有し、子宮頸癌細胞由来である HeLa 細胞自身の胎盤性アルカリホスファターゼの分泌と相俟って無視しえない SEAP 産生を来したものと考えられた。HeLa 細胞由来の内在性アルカリホスファターゼは熱感受性であることから熱処理によりそのノイズを減らすことが可能である。なにより HIV-1 感染特異的に SEAP 誘導が認められる極く僅か 2 細胞コロニーは、どちらも HIV-LTR と reporter gene としての SEAP との間に人工合成の Transcription Blocker を挿入した発現ベクターを Transfection した MAGIC-5A 細胞からのみ樹立されたことから、HIV-LTR の Promoter 活性は組み込まれた細胞ゲノムの近傍の領域に偶々存在する Promoter なり Enhancer などの影響を受けやすく、さらに SEAP と発光基質の CSPD との反応が高感度であるがゆえ無視できない程の SEAP 産生を来すことによることが示唆された。しかしながら上記の構成的な SEAP 産生量は選択樹立した細胞株では HIV-1 感染により誘導される大量の SEAP 産生量に比較して無視しえるほど低く、なにより SEAP 分泌は感染細胞の経時的培養が可能なることから実用的には問題ないと考えられる。

この MAGIC-5/SEAP 細胞株を用いた HIV-1 感染価測定系は培養上澄に反応基質を添加するだけで迅速簡便に高感度にて HIV 感染を検出することから、薬剤耐性 Phenotype Assay, 抗 HIV 薬剤スクリーニング等、多検体処理が必要とされる実験系において High Throughput な側定系の構築に有用であると考えられた。

現在、薬剤耐性変異ウイルスを検出するためには、(1)薬剤作用領域の塩基配列の変異を調べる遺伝子型 (genotype 法) と (2) 直接 HIV を薬剤存在下で培養し、増殖を抑えることのできる濃度 (IC50, IC90) を求めて評価する表現型 (phenotype 法)、そして (3) 組みかえ (recombinant) DNA 技術を利用し、患者由来の感染性 recombinant HIV を作り、phenotype 法を行う recombinant virus assay の 3 つが挙げられる。この中で新規薬剤に対する耐性変異の出現や複数の変異が蓄積した場合、phenotype 法が有用とされている。今回 genotype 法と MAGIC-5/SEAP 細胞を用いた本法の比較から、primary mutation があるものは本法でも検出でき、また secondary mutation の蓄積により耐性が高まるという結果が得られ、今まで報告されているような profile とほぼ同様の結果が得られた。また N88S や M184V のように感受性が戻るような変異や複数の変異が蓄積した場合、genotype 法で判断できなかった耐性の度合いを明確にし、交差耐性も検出することが可能となった。本法は今後の多剤併用療法で使用する薬剤選択の判断の一つとして有用であると考えられた。

さらに多検体迅速処理を目的とした MAGIC-5/SEAP 細胞は、今までの報告されている phenotypic assay と比べ、非常に優れている点がいくつか上げられる。すなわち①従来までの PBMC 法では 4～8 週間ほど日数を要するが、本法は、約 2 週間でアッセイが終了する。②検出段階で化学発光を用いているため、多検体処理でも短時間で処理が可能である。③SEAP は通常のレポーターアッセイに必要な細胞溶解処理が不要であり、安定した結果が得られる。④培養上清を採取するだけで測定が可能であるため、HIV 感染時の経時的な変化を観察することができる。⑤発光安定性は 30～90 分まで安定した結果が得られる。(データ示さず)⑥検出感度は優れており、従来までのウイルス量で薬剤感受性試験が可能である。さらに本法は、作用機序の異なる 3 剤において MAGIC5A で得られた結果とほぼ同様であり、Fold resistance で示した相関係数についても 0.9 以上と非常に優れた相関性を示していた。この結果は MAGIC5A を親株として MAGIC5-SEAP が、HIV 感染により SEAP を細胞外に分泌するように作成しているためと示唆された。今回の SEAP を用いた化学発光による phenotypic assay は、迅速、簡便、安定であり、多検体を処理するに向いており、ルーチンでの臨床検査が可能であると考えられた。

## 5. まとめ

HIV-1 感染により、HIV-1 tat により駆動される LTR 下流に SEAP を組込んだ MAGIC-5A 細胞株

MAGIC-5/SEAP 細胞株を樹立した。この新規 HIV 感染価測定細胞株は、HIV-1 感染により誘導される培養上澄中の SEAP 酵素活性を、化学発光基質を添加するだけで迅速簡便さらに高感度にて HIV 感染を検出することから、薬剤耐性 Phenotype Assay, 抗 HIV 薬剤スクリーニング等、多検体処理が必要とされる実験系において High Through-put な測定系の構築に有用であると考えられた。

日本においても薬剤耐性ウイルスの新規感染者への拡散が報告され、初回治療前の薬剤感受性試験は必要となり、さらに薬剤感受性試験の結果が治療後を予測するという報告もなされている。このように薬剤感受性試験の有用性が指摘されているが、今日の薬剤感受性試験は臨床検査として認可はされておらず、あくまで臨床研究と位置づけられている。今後、薬剤感受性試験をルーチンでの臨床検査への移行を考えなければならない。新たに樹立した MAGIC-5/SEAP 細胞株により多検体処理が可能となるためルーチン検査が実用視野に入り、今後最適サルベージ療法等の実質的な薬剤耐性 Phenotype Assay 構築に欠かせない新規 HIV 感染価測定細胞株として抗 HIV 戦略様々な領域への応用が期待される。

## 6. 研究発表

1. Hachiya A., S. Aizawa, M. Tanaka, Y. Takahashi, S. Ida, H. Gatanaga, Y. Hirabayashi, A. Kojima, M. Tatsumi, 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(MAGIC5). *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001;45:495-501
2. Takahoko M., Tobiume M., Ishikawa K, Ampofo W, Yamamoto N, Matsuda M and Tatsumi M. Infectious DNA clone of HIV type 1 A/G recombinant (CRF02\_AG) replicable in peripheral blood mononuclear cells. *AIDS Res. Hum Retroviruses* 17: 1083 – 1087, 2001
3. Kusagawa S, Takebe Y, Yang R, Motomura K, Ampofo W, Brandful J, Koyanagi Y, Yamamoto N, Sata T; Ishikawa K, Nagai Y and Tatsumi M Isolation and characterization of a full-length molecular DNA clone of ghanaiian HIV type 1 intersubtype A/G recombinant CRF02\_AG, which is replication competent in a restricted host range *AIDS Res. Hum Retroviruses* 17 :649 – 655, 2001
4. Tobiume M., Tokunaga K., Kiyokawa E., Takahoko M., Mochizuki N., Tatsumi M. and Matsuda M.: Requirement of Nef for HIV-1 infectivity is biased by the expression levels of Env in the virus-producing cells and CD4 in the target cells. *Arch. Virol.* 146: 1739-1751, 2001.
5. Tobiume M., Takahoko M., Tatsumi M. and Matsuda M Establishment of a MAGI-derived indicator cell line that detects the Nef enhancement of HIV-1 infectivity with high sensitivity. *J.Virol.Meth:* 97: 151 – 158, 2001.
6. Sato H., Tomita Y., Ebisawa K. Hachiya A., Shibamura K., Shiino T., Yang R., Tatsumi M., Gushi K., Umeyama H., Oka S., Takebe Y. and Nagai Y. Augmentation of human immunodeficiency virus type 1 subtype E (CRF01\_AE) multiple-drug resistance by insertion of a foreign 11-amino-acid fragment into the reverse transcriptase. *J.Virol.* 75:5604 – 5613, 2001.
7. Tsuchiya K., S. Matsuoka, A.Hachiya, A. Yasuoka, N. Tachikawa, Y. Kikuchi, I. Genka, K. Teruya, S. Kimura, S. Oka. Accumulation of lopinavir resistance-associated mutations over 3years follow-up of patients on highly active antiretroviral therapy: implication in salvage therapy. *AIDS.* 2001;15:9:1183-1184.

## 7. 知的所有権の取得状況

- 1)特許取得 HIV の薬剤耐性の試験方法 A20165A 出願番号 2000-319189

---

平成13年度

エイズ医薬品等開発研究  
重点研究報告書

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号  
共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社