

**B. HIV 検査陽性者(感染者)のケアのためより効果的な
HIV のフォローアップ検査体制を構築するための研究**

B-1. HIV-1 プロウウイルスの定量法に関する研究

分担研究者 加藤真吾 (慶応義塾大学医学部微生物学・免疫学教室)
研究協力者 田中理恵 (慶応義塾大学医学部微生物学・免疫学教室)

研究概要

血中プロウウイルス量は、HAART 療法が奏効している症例では、HIV-1 が潜伏感染した寿命の長いメモリー T 細胞数を反映していると考えられるため、計画的治療中断 (STI) の有効性を予測する指標となる可能性がある。そこで、我々の研究室を含む 4 施設で実施されている各種 HIV プロウウイルス定量法の結果を比較することにより、比較可能で実用的な HIV プロウウイルス定量法を検討した。定量法は大きく分けて competitive nested PCR 法、ポアソン分布法、リアルタイム PCR 法が用いられた。各種定量法の間で、標準 HIV-1 DNA の定量値の平均は 185 から 236 コピー / μg 、実験内誤差は 29%から 47%、実験間誤差は 17%から 77%とよく一致していた。また、用量依存性はいずれも非常に優れた直線性を示した。しかし、患者検体を対象とした場合、プロウウイルス定量値は方法によって大きく異なっていた。ただし、リアルタイム PCR によって同じ gag 遺伝子を増幅部位とする 3 つの方法の間には高い相関がみられた。このことから、施設間で比較可能なプロウウイルス定量値を得るためには、gag 遺伝子を標的とするリアルタイム PCR 法が現時点では望ましいと考えられる。今後、プロウウイルス定量の精度向上を図るととも、その臨床的意義を明らかにすることが重要である。

目的

HAART 療法によって HIV 感染症の治療効果が著しく向上したが、副作用が強く、この治療法を一生続けていくのは困難であると考えられている。そこで、長期にわたって血中ウイルス RNA 量が検出限界以下の症例で計画的治療中断 (STI) が試みられたが、ほとんどの症例で血中ウイルス RNA 量の上昇がみられた。一方、プロウウイルス量は感染細胞数に相当するため、HAART 療法が奏効している症例では、HIV-1 が潜伏感染した寿命の長いメモリー T 細胞数を表していると考えられる。したがって、STI 実施後のウイルス学的反応はプロウウイルス量に依存している可能性が十分ある。たとえば、プロウウイルスが検出限界以下の症例では STI 実施後の血中ウイルス RNA 量の上昇が限定的なものになるかもしれない。すなわち、プロウウイルス量は抗 HIV 療法を中断で

きるかどうかを判定するための指標となることが期待できる。本研究の目的は、我々が独自に開発した competitive nested PCR 法を含めて、研究班に参加する 4 施設で実施されている各種 HIV プロウウイルス定量法の結果を比較することにより、それぞれの方法の特徴と問題点を明らかにし、実用的な HIV プロウウイルス定量法を開発するためのデータを提供することにある。

方法

対象：2001 年 1 月から 2004 年 3 月までの慶応義塾大学病院特殊感染症クリニック外来受診 HIV-1 感染者 34 症例 90 検体、荻窪病院血液科外来受診 HIV-1 感染者 67 症例 172 検体。
PBMC DNA 精製：クエン酸ナトリウム採血液から Ficoll-Paque (Pharmacia) を用いて末梢血単核球 (PBMC) を調製し、この PBMC から

QIAamp DNA Mini Kit を用いて DNA を精製した。

標準 HIV-1 DNA と competitor DNA : 標準 HIV-1 DNA には DNA クローンである pNL432 を用いた。competitor DNA には内部に 123 bp の欠失 (ヌクレオチド番号 7119~7241) をもつ *env* 領域の DNA 配列 (6201~8805) を用いた。標準 HIV-1 DNA と competitor DNA の濃度は後述するポアソン分布によるプロウイルス定量法を用いて決定した。

Competitive nested PCR によるプロウイルス定量 : PBMC DNA 500 ng に 34.4 コピーの competitor DNA を加え、*env* 遺伝子 V3 領域を標的とする外側のプライマー対 [JA9B (5'-CACAGTACAATGTACACATG-3') と JA12B (5'-ACAGTAGAAAAATTCCTC-3')] を用いて 1 回目の PCR (30 サイクル) を行い、その産物の 1/50 を鋳型にし内側のプライマー対 [JA10UB (5'-CTGTAAATGGCAGTCTAGC-3') と JA11LB (5'-AATTTCTGGTCCCCTCCTG-3')] を用いて 2 回目の PCR (25 サイクル) を行った。この PCR 産物をアガロースゲル電気泳動し、UV 照射下で CCD カメラによって撮影し、野生型 HIV-1 DNA と competitor DNA のバンド強度の比を求め、20 コピー、100 コピー、500 コピーの pNL432 から作成した検量線を用いて、元の PBMC DNA 中のプロウイルス量を決定した。

ポアソン分布によるプロウイルス定量法 : PBMC DNA を TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH8.0) で終点まで希釈し、前述した方法で nested PCR を 20 反応行い、陰性反応が出た割合 $P(0)$ をポアソン分布の式 $m = -\ln(P(0))$ に代入し、1 反応あたりに含まれる平均プロウイルス量 (m) を求めた。

各種プロウイルス定量法のバリデーション用試料 : A1 : 20 copies/ μ l の pNL432 を含む 50 ng/ μ l のヒト PBMC DNA 溶液 500 μ l。A2 : 50 ng/ μ l のヒト PBMC DNA 溶液 500 μ l。B1~B6 : 2、5、8、10、20、50 copies/ μ l の pNL432 を含む 50 ng/ μ l のヒト PBMC DNA 溶液各 100

μ l。P1~P5 : HIV-1 感染者の PBMC DNA 溶液各 200 μ l。以上の試料のうち A1、B1~B6 の pNL432 濃度は各施設の研究分担者に知らせなかった。

結果

2001 年度から 2003 年度までに行った 252 検体のプロウイルス定量値のヒストグラフを図 1 にまとめる。最小値は検出限界 (10 コピー/ μ l) 以下、最大値は 593 コピー/ μ l、中央値は 90 コピー/ μ l であった。

標準 HIV-1 DNA (pNL432) 溶液の濃度をポアソン分布で求めた結果を図 2 に示す。20 反応の nested PCR のうち 9 反応が陰性であったことから HIV-1 DNA 濃度は 0.080 copies/ μ l と算出された。

各施設で用いられたプロウイルス定量法を表 1 に示す。ここで施設 A、B、C、D とはそれぞれ慶応義塾大学医学部微生物学・免疫学教室、神奈川県衛生研究所、国立名古屋病院臨床研究部、熊本大学エイズ研究センター病態制御分野を指す。施設 A 以外は基本的にリアルタイム PCR 法を用いており、施設 C と D がリアルタイム PCR の前に通常の PCR で増幅する方法を併用していた。装置は施設 B と D が ABI の PRISM、施設 C が Roche の Light Cycler を用いていた。

標準 HIV-1 DNA 溶液を各施設において、3 回の異なる実験でそれぞれ 5 回以上測定して得られた定量値を表 2 に示す。これらのデータの解析結果を表 3 に示す。標準検体の平均値は 185 から 236 コピー/ μ g で、ポアソン分布法から予想される値 200 コピー/ μ g と非常によく一致していた。これは各施設が濃度の正しい定量用標準 HIV-1 DNA を使用していることを示唆している。標準検体の測定値の実験内誤差は 29% から 47% で施設間でよく一致していた。標準検体の測定値の実験間誤差は 17% から 77% で比較的よく一致していたが、実験間で有意な差のあるデータが A 施設以外の

リアルタイム PCR を用いる方法で認められた。これはリアルタイム PCR の増幅効率が実験ごとに差があるためと考えられる。

次にプロウイルス定量値の用量依存性を調べるために、標準 HIV-1 DNA の濃度を 40 コピー/ μg から 1000 コピー/ μg まで変えた検体を測定した。結果を図 3 に示す。測定値の直線性はいずれの施設も非常に高かった。

患者由来の 5 つの DNA 検体を測定した結果を図 4 に示す。プロウイルス定量値は方法によって大きく異なっていたが、リアルタイム PCR によって同じ *gag* 遺伝子を増幅部位とする 3 つの方法の間には高い相関がみられた。これらの方法に限ると、同じ検体に対する測定値のバラツキは 9% から 67% であった。

考察

標準 HIV-1 DNA を対象とするかぎり、各プロウイルス定量法によってほぼ同等な測定値が得られたが、患者検体 DNA を用いた場合は、測定値が定量法の違いによって大きく異なっており、方法によっては測定不可のものもあった。

A 施設の competitive nested PCR 法は患者 P4 の検体が、他の方法では定量できているのに、検出限界以下であった。これはプライマーとこの患者の HIV-1 DNA との間に大きなミスマッチがあったためではないかと考えられる。その他の患者検体では、A 施設の competitive nested PCR 法もポアソン分布法も他の方法よりも定量値が高い傾向があった。これは、A 施設の方法が *env* 遺伝子を標的としているのに対して、他の方法のほとんどが *gag* 遺伝子を標的にしていることと関係しているのかもしれない。すなわち、逆転写は *env* 遺伝子から *gag* 遺伝子の方向に進むために、*env* 遺伝子をもつ HIV-1 DNA の方が多いかもしれない。

C 施設のリアルタイム PCR 法は nested にしないと測定できなかった。これは Light

Cycler 装置で使える鋳型 DNA の上限が PRISM 装置の 1/5 程度であるためにプロウイルスの検出感度が低くなってしまいうためであると考えられる。D 施設の LTR をプローブにしたリアルタイム法の定量値は他の施設のリアルタイム定量値と負の相関があった。これは LTR に変異が起りやすいことと関係しているのかもしれない。

リアルタイム PCR によって同じ *gag* 遺伝子を増幅部位とする 3 つの方法の間でプロウイルス定量値に高い相関がみられた。このことから、施設間で比較可能なプロウイルス定量値を得るためには、*gag* 遺伝子を標的とするリアルタイム PCR が現時点では望ましいと考えられる。

今後、プロウイルス定量の精度向上を図るとともに、免疫学的反応、薬剤耐性ウイルスの出現、STI との関連を検討することにより、その臨床的意義を明らかにすることが重要である。また、プロウイルスの定量を委託できる検査体制を構築することも本研究班の課題の一つである。

発表論文

1. Tanaka, Y., Kato, S., Tanaka, M., Kuji, N., and Yoshimura, Y. (2003) Structure and expression of the human oocyte-specific histone H1 gene elucidated by direct RT-nested PCR of a single oocyte. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304, 351- 357.
2. 神野正雄、酒井謙、近藤憲一、井上保、山井礼子、小池麻耶、岩下光利、中村幸雄、花房秀次、兼子智、加藤真吾. (2003) 夫 HIV 陽性、妻 HIV 陰性の夫婦に対する洗浄精子 ICSI による本邦最初妊娠例. *日本産婦人科学東京地方部会会誌* 52(1), 100-103.
3. 金田次弘、加藤真吾、山元泰之、千葉智子、杉浦互. (2003) 抗 HIV 療法のモニタリング. *日本エイズ学会誌* 5(1), 109-112.
4. Kato, S., Saito, Y., Tanaka, R.,

Hiraishi, Y., Kitamura, N., Matsumoto, T., Hanabusa, H., Kamakura, M., Ikeda, Y., and Negishi, M. Differential Prevalence of HIV-1 Subtype B and CRF01_AE among Different Sexual Transmission Groups in Tokyo, Japan, as Revealed by Subtype-specific PCR. AIDS Res. Hum. Retroviruses. 19(11), 1057-1063.

その他
なし

学会発表

1. 花房秀次、木内英、田中理恵、太田未緒、和田育子、小島賢一、加藤真吾「2003年における抗HIV療法の有効性と課題」第17回日本エイズ学会学術集会(2003年11月27-29日、神戸)
2. 田中理恵、加藤真吾「プロテアーゼ阻害薬の細胞内停留濃度と抗ウイルス効果」第17回日本エイズ学会学術集会(2003年11月27-29日、神戸)
3. とう学文、照沼裕、山下篤哉、葛西宏威、加藤真吾、齊藤有紀、小田原史知、高嶋能文、花房秀次、酒井道生、白幡聡、藤井輝久、石川正明、岡慎一、高橋義博、池田柊一、松田重三、伊藤正彦、三間屋純一「エイズ未発症から発症にいたる際のウイルス産生動態」第17回日本エイズ学会学術集会(2003年11月27-29日、神戸)
4. 花房秀次、加藤真吾、兼子智、鈴木美奈、高桑好一、久慈直昭、吉村泰典、神野正雄、岩下光利、田中憲一「HIV除去精子を用いた体外授精の臨床成績と今後の課題」第17回日本エイズ学会学術集会(2003年11月27-29日、神戸)
5. 南宮湖、長谷川直樹、田中理恵、築地謙治、根岸昌功、加藤真吾「悪性リンパ腫に対する化学療法施行中にHAARTを中断した後、HIV-1の感受性が回復し再開治療が著効した症例の解析」第17回日本エイズ学会学術集会(2003年11月27-29日、神戸)

表1. 各施設で使用されたプロウイルス定量法

施設	原理	増幅部位	プロウイルス標準品
A	Competitive nested PCR (Nested PCRとポアソン分布)	env V3 (env V3)	pNL432、ポアソン分布によって定量
B	Real time PCR(ABI)	gag、p24	pNL432、ポアソン分布によって定量
C	Real time PCR(Light Cycler) 標準法(single PCR) 高感度法(nested PCR)	gag、p17 gag、p17	pUC118-III B、吸光度から濃度を決定
D	Real time PCR(ABI) Nested PCR (Single PCR)	LTR (gag、p17)	pNL432、吸光度から濃度を決定

()内の方法は患者検体にものみ使用

図1. 2001年度から2003年度の
ウイルス定量

慶應義塾大学病院: 34症例、90検体
荻窪病院: 67症例、172検体

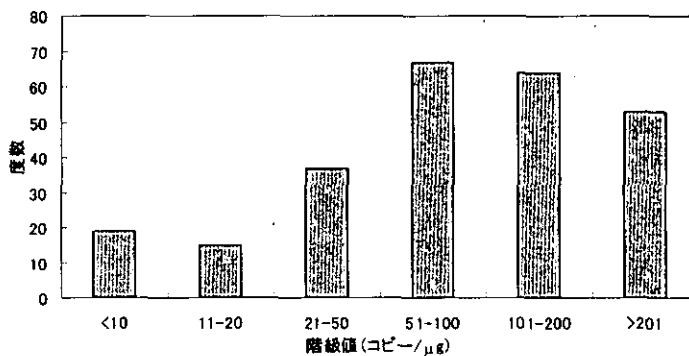
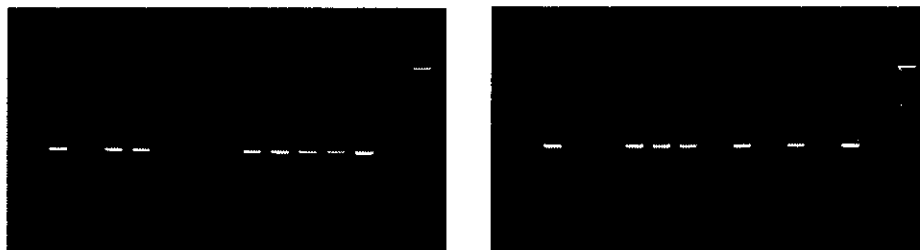


図2. 標準DNA (pNL432) の濃度の算出

10 μlの最終希釈pNL432を用いてポアソン分布を調べた。



$$P(0) = 9/20 = 0.45$$

$$\begin{aligned} m &= -\ln P(0) \\ &= -\ln(0.45) \\ &= 0.80 \end{aligned}$$

∴ pNL432の濃度は0.080 copies/μl

表2. 各施設における標準HIV-1 DNAの定量値

A施設 (copies/μl)									
実験	データ(1)	データ(2)	データ(3)	データ(4)	データ(5)	データ(6)	平均値	標準偏差	変動係数
1	185	180	191	204	177	187	187	11	5.9%
2	178	177	284	224	230	218	218	45	20.4%
3	227	177	199	208	219	206	206	19	9.3%

B施設 (copies/μl)									
実験	データ(1)	データ(2)	データ(3)	データ(4)	データ(5)	データ(6)	平均値	標準偏差	変動係数
1	184	155	155	211	183	154	187	22	13.2%
2	184	195	113	183	212	114	183	42	25.5%
3	248	208	194	179	195	319	224	53	23.5%

C施設(標準法) (copies/μl)									
実験	データ(1)	データ(2)	データ(3)	データ(4)	データ(5)	データ(6)	平均値	標準偏差	変動係数
1	177	181	182	288	155	188	188	55	29.4%
2	249	215	291	288	211	247	247	34	13.9%
3	252	280	349	218	282	272	272	49	18.1%

C施設(高感度法) (copies/μl)									
実験	データ(1)	データ(2)	データ(3)	データ(4)	データ(5)	データ(6)	平均値	標準偏差	変動係数
1	287	333	219	288	295	278	278	42	15.2%
2	187	212	212	216	228	207	207	23	11.1%
3	171	188	183	222	182	177	177	28	14.4%

D施設 (copies/μl)									
実験	データ(1)	データ(2)	データ(3)	データ(4)	データ(5)	データ(6)	平均値	標準偏差	変動係数
1	152	188	135	127	122	140	140	18	13.0%
2	288	283	278	310	242	278	278	25	8.9%
3	298	331	233	308	249	283	283	41	14.5%

表3. 各施設における標準プロウイルスの定量値の実験内と実験間の誤差

	A施設	B施設	C施設(標準法)	C施設(高感度法)	D施設
全平均値	204	185	236	220	233
全標準偏差	30	48	57	52	73
実験内標準偏差	29	41	47	31	30
実験内変動係数	14%	22%	20%	14%	13%
実験間標準偏差	35	83	96	114	180
実験間変動係数	17%	45%	41%	52%	77%
P値	0.27	0.038	0.042	0.00092	7.2E-06

図3. 各施設におけるプロウイルス定量値の直線性

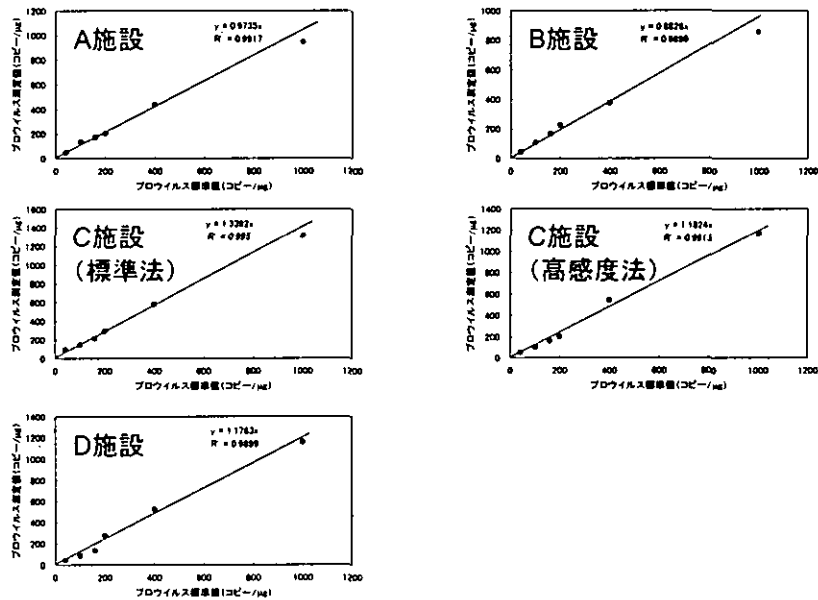


図4. 各施設における患者検体のプロウイルス定量値

患者検体	A施設		B施設	C施設		D施設	
	Competitive法	ポアソン法		標準法	高感度法	プローブLTR	プローブgag
P1*	23	39	10	0	4	22	3
P2	76	43	16	0	17	0	19
P3	94	68	11	0	12	11	2
P4	0	43	34	0	13	0	49
P5	134	34	44	0	27	0	43

相関係数

		A施設		B施設	C施設	D施設	
		Competitive法	ポアソン法			高感度法	プローブLTR
A施設	Competitive法	1.00	-0.14	0.27	0.75	-0.29	-0.03
	ポアソン法	-0.14	1.00	-0.46	-0.61	0.85	-0.59
B施設		0.27	-0.46	1.00	0.78	-0.71	0.93
C施設	高感度法	0.75	-0.61	0.78	1.00	-0.79	0.63
D施設	プローブLTR	-0.29	0.85	-0.71	-0.79	1.00	-0.78
	プローブgag	-0.03	-0.59	0.93	0.63	-0.78	1.00

B-2. 高感度 HIV-1 DNA 定量法のバリデーションとその応用

分担研究者 金田次弘 (国立名古屋病院臨床研究センター)

研究概要

HIV-1 DNA の高感度定量法を LightCycler システムで確立し、この方法のバリデーションを実施した。HIV-1 定量には $\beta 2-M$ の増幅率を利用する評価法 (方法 1) と標準 HIV-1 プラスミド濃度と Crossing point で作る検量線を利用する評価法 (方法 2) が利用可能である。どちらの評価法を用いても、5 コピー/106 細胞の低コピー測定まで良好な正確性と再現性が得られた (Interassay: 方法 1 では accuracy, 81%; Cv, 17%, 方法 2 では accuracy, 92%; Cv, 16%)。本法を用いて HIV-1 感染患者の末梢血 CD4 陽性 T リンパ球中や白血球中の HIV-1 DNA の定量を施行し、ウイルス (潜伏) 感染リザーバーのサイズ推定が可能であることを明らかにした。

A. 研究目的

HIV-1 感染症/エイズ患者のウイルスリザーバーとなっている感染標的細胞の動態を把握することは highly active antiretroviral therapy (HAART) 療法の治療効果の把握と HIV-1 感染細胞の根絶を目指す次世代の治療法の効果判定に必須であると思われる。本研究の第一の目的は高感度 HIV-1 DNA 定量法を LightCycler システムで確立し、この方法のバリデーションを実施することである。また、この方法を用いて HIV-1 感染患者の末梢血 CD4 陽性 T リンパ球中や白血球中の HIV-1 DNA 定量を施行し、本法によりウイルス (潜伏) 感染リザーバーのサイズ推定が可能であることを明らかにすることを第二の目的にした。

B. 研究方法

サブタイプ B の HIV-1 感染患者 15 例の gag 遺伝子 P17 領域の塩基配列を決定し、保存された領域に 2 種類の PCR プライマーセットと Taqman プローブを設計した。外側のプライマーを用い定量前 PCR を施行し、引き続き通常リアルタイム PCR を行う方法で定量法の高感度化を図った (図 1)。HIV-1 定量には $\beta 2-M$

の増幅率を利用する評価法 (方法 1、図 2) と標準 HIV-1 プラスミド濃度と Crossing point で作る検量線を利用する評価法 (方法 2、図 3) を用い、それぞれの方法に対してバリデーションを施行した。Roche LightCycler システムのリアルタイム PCR を用いて測定した。CD4 陽性 T リンパ球は StemSepSTS-14052 を用い、末梢血から精製した。

(倫理面への配慮) HIV-1 感染標的細胞中の HIV-1 DNA コピー数は治療方針に重要な情報を提供するパラメーターの 1 つである旨を十分に患者に説明し、同意を得たうえで検体を採取する。又、検査結果は患者のプライバシーが侵されないよう厳重に管理することを義務とする。

C. 研究結果

- ① 測定法のバリデーション: 表 1 と図 4 に示すごとく、2 種類のいずれの評価法を用いても、5 コピー/106 細胞の低コピー測定まで良好な正確性と再現性が得られた (Interassay: 方法 1 では accuracy, 81%; Cv, 17%, 方法 2 では accuracy, 92%; Cv, 16%)。
- ② 通常法と高感度リアルタイム PCR 法による

同一検体の測定結果の比較：ブラインドテスト用に送付された検体を用い、異なる日に3回、1回につき5回測定を行い検査内誤差と検査間誤差を決定した。表2に示すように、通常法と高感度法でよく一致した結果が得られた。Cv値も1 interassayで両法とも23~24%であり精度よく測定できたことを示している。それぞれの方法で測定した際のリアルタイムPCRのフルオログラムを図5、6に示したが、フルオログラムからも高い再現性が見てとれる。③ 血中ウイルス量が検出感度以下に抑制されているHAART著効例30例を対象にしたCD4陽性Tリンパ球中のHIV-1 DNAの定量：18症例では通常定量法で定量可能であった。残り12例を高感度法で測定したところ全例で定量できた。このうち4例は5コピー/106以下であった。HIV-1 DNAは検出感度以下から5960(中央値830)コピー/106細胞と広い分布を示した(表3)。④ 全血を用いた定量の為の必要量：HAART著効例5例で検討した結果、必要最少量は100 μ lと推定された(表4)。

D. 考察

本研究で確立されたリアルタイムPCR法による高感度HIV-1 DNA定量法は感度、再現性から見てHAART施行中の患者のみならず、血中ウイルス量が検出感度以下に抑制されたHAART著効患者のCD4陽性Tリンパ球中のHIV-1 DNAを的確に測定できると思われる。また、全血試料でも100 μ l用いればHIV-1 DNAを定量できることが判明した。しかも、HIV-1 DNA測定に用いた同じ試料を用いて β 2-Mを測定すれば白血球細胞数が算定できるので少量の全血凍結サンプルさえあれば、106白血球球当たりのコピー数として定量できる。このように、本研究で確立されたHIV-1 DNA高感度定量法は、HIV-1感染患者固有と思われるウイルス潜伏感染リザーブの推定に寄与するものと思われる。

現在用いているプライマー、プローブセットによって全てのサブタイプB HIV-1検体は定量できたがサブタイプEに関しては測定できない検体も存在した。今後、非サブタイプB検体も効率よくを検出する次世代のプライマー、プローブセットの開発が必須と考えている。

E. 共同研究者

(国立名古屋病院臨床研究センター) 永井裕美、和田かおる、萩原智子、伊部史朗、服部純子、水野善文、内海 眞、濱口元洋(同・内科) 間宮均人、山中克郎、(同・検査科) 多和田行男(愛知県衛生研究所) 森下高行

F. 研究発表

[論文発表]

1. Selection of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Variants with an Insertion Mutation in the P6gag and P6pol Genes under Highly Active Antiretroviral Therapy. Shirou Ibe, Naomi Shibata, Makoto Utsumi and Tsuguhiro Kaneda. *Microbiol. Immunol.*, 47, 71-79 (2003).
2. A Simple HPLC Method for Simultaneous Determination of Lopinavir, Ritonavir and Efavirenz. Yoshiko Usami, Tsuyoshi Oki, Masahiko Nakai, Masafumi Sagisaka and Tsuguhiro Kaneda. *Chem. Pharm. Bull.* 51, 715-718 (2003).
3. 抗HIV療法のモニタリング(第16回日本エイズ学会シンポジウム記録). 金田次弘、加藤真吾、山元泰之、千葉智子、杉浦 互. *日本エイズ学会誌* 5, 109-112 (2003).
4. Prevalence of Drug-resistant Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Therapy-naïve Patient and Usefulness of Genotype Testing. Shirou Ibe, Naoto Hotta, Uta Takeo, Yukio Tawada, Naoto

- Mamiya, Katsuo Yamanaka, Makoto Utsumi and Tsuguhiro Kaneda. *Microbiol. Immunol.* 47, 499-505 (2003).
5. Prevalence of infection and genotypes of GBV-C/HGV among homosexual men. Junko Hattori, Shiro Ibe, Hiromi Nagai, Kaoru Wada, Takayuki Morishita, Katsuhiko Sato, Makoto Utsumi and Tsuguhiro Kaneda. *Microbiology & Immunology* 47, 759-763 (2003)
 6. Pharmacokinetics of Lopinavir after Administration of Kaletra in Healthy Japanese Volunteers. T. Oki, Y. Usami, M. Nakai, M. Sagisaka, H. Ito, K. Nagaoka, K. Yamanaka, N. Mamiya, M. Utsumi and T. Kaneda. *Biol. Pharm. Bull.* in press.
 7. HIV 治療遂行のためのモニタリングシステムの進展. 金田次弘、白阪琢磨. 医療印刷中
 8. 薬剤耐性検査-gag 遺伝子内に検出された挿入変異の意義. 伊部史朗、内海 眞、金田次弘. 医療印刷中
 9. HIV-1 薬剤耐性検査の感度改善. 浅黄司、伊部史朗、金田次弘、鈴木博義、手塚文明、西村秀一、佐藤 功、山崎孝文. 医療印刷中
 10. HIV-1 DNA 量のマーカーとしての意義 - PNA-ISH 法との比較. 和田かおる、永井裕美、萩原智子、内海眞、金田次弘. 医療印刷中
 11. ロピナビル/リトナビルおよびエファビレンツの血中濃度同時測定法の確立. 宇佐美好子、大木剛、中井正彦。鷺坂昌史、金田次弘. 医療印刷中

[学会発表]

1. 未治療 HIV-1 感染患者における CD4 陽性細胞数と細胞内 HIV-1 DNA 量の相関性. 和田かおる、永井裕美、萩原智子、内海

眞、金田次弘. 第 17 回日本エイズ学会総会 (平成 15 年 11 月-2003).

2. 高感度リアルタイム PCR 法のバリデーション. 永井裕美、和田かおる、森下高行、内海 眞、西山幸広、金田次弘. 第 17 回日本エイズ学会総会 (平成 15 年 11 月-2003).
3. 男性同性愛者における HIV-1 と GBV-C ジェノタイプの解析. 服部純子、伊部史朗、永井裕美、和田かおる、森下高行、佐藤克彦、内海 眞、金田次弘. 第 17 回日本エイズ学会総会 (平成 15 年 11 月-2003).
4. ペンダント型亜鉛サイクレン錯体の HIV 増殖抑制作用機序に関する研究. 山本直彦、伊部史朗、和田かおる、金田次弘、内海 眞、森下高行、佐藤克彦、大竹 徹、森 治代、川畑拓也. 第 17 回日本エイズ学会総会 (平成 15 年 11 月-2003).
5. 血漿 HIV-1 RNA 及び末梢血 HIV-1 DNA で検出される薬剤耐性変異の比較. 堀田直恵、伊部史朗、金田次弘. 第 17 回日本エイズ学会総会 (平成 15 年 11 月-2003).
6. 未治療 HIV-1 感染症患者における薬剤耐性ウイルス出現頻度の推移. 伊部史朗、堀田直恵、内海 眞、金田次弘. 第 17 回日本エイズ学会総会シンポジウム (平成 15 年 11 月-2003).
7. Activity of HIV-1 provirus in CD4-positive T lymphocytes from patients responding well to HAART. T. Kaneda, H. Nagai, K. Wada, U. Takeo, J. Hattori, T. Hagiwara, S. Ibe, Y. Tawada, M. Utsumi and T. Morishita. 1st International Workshop on HIV Persistence during Therapy. Saint Martin, FWI, December 10-12, 2000

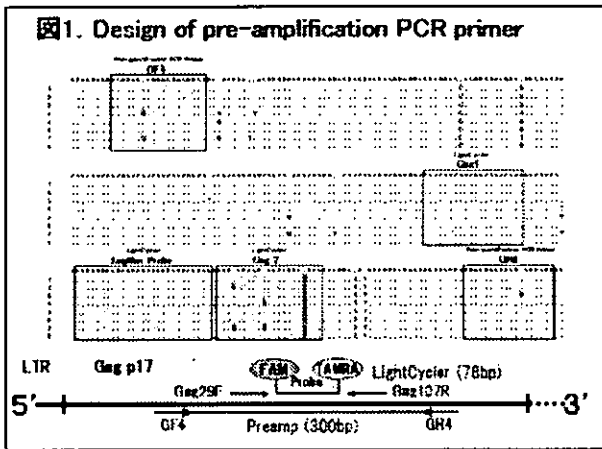


表1. Method 1: β -2増幅率を利用した高感度測定法のバリデーション

ACH2 (copies/assay)	MOULT4	HIV-1 DNA					
		Intra-assay (n=5)			Interassay (n=15)		
		Ave \pm SD	Cv%	Accuracy (%)	Ave \pm SD	Cv	Accuracy (%)
100	1000000	98 \pm 13	13.0	97.7 \pm 12.7	97 \pm 13	13.2	97.4 \pm 12.9
50	1000000	44 \pm 6	12.9	88.3 \pm 11.1	44 \pm 6	13.7	91.7 \pm 12.6
10	1000000	9 \pm 0.7	7.8	87.2 \pm 6.8	9 \pm 1.0	11.0	88.8 \pm 9.5
5	1000000	4 \pm 0.4	11.4	72.4 \pm 8.3	4 \pm 0.7	16.9	80.7 \pm 13.6

図2. Strategy of highly sensitive real-time PCR —Method 1—

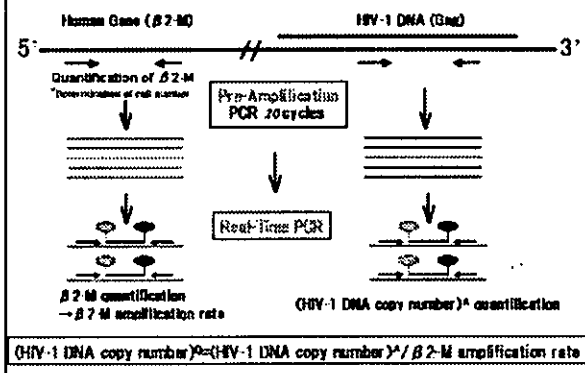
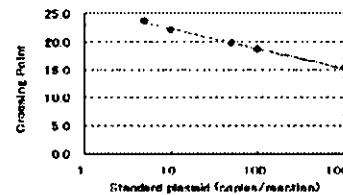


図4. Method 2: Standard PlasmidのCp値から得られる Regression Curveを利用した測定法のバリデーション



ACH2 (copies/assay)	MOULT4	HIV-1 DNA					
		Intra-assay (n=5)			Interassay (n=15)		
		Ave \pm SD	Cv%	Accuracy (%)	Ave \pm SD	Cv	Accuracy (%)
100	1000000	88.25	6.3	88.7 \pm 5.2	88.25	6.8	90.3 \pm 6.6
50	1000000	48.13	6.5	95.7 \pm 5.3	47.23	7.6	94.8 \pm 7.2
10	1000000	91.12	12.9	82.3 \pm 11.9	92.13	14.0	90.2 \pm 12.6
5	1000000	510.5	11.4	82.3 \pm 10.7	650.7	18.0	91.5 \pm 14.7

図3. Strategy of highly sensitive real-time PCR —Method 2—

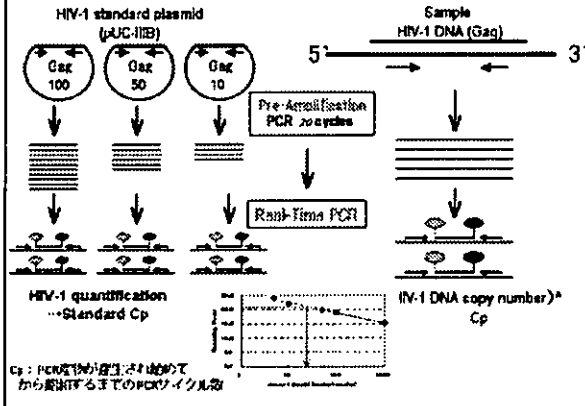


表2. Conventional real-time PCR法とHighly sensitive real-time PCR法の検査内誤差、検査間誤差の比較

【Intra-assay】

Conv.	188.2 \pm 55.3 (copies/ μ g) (Cv 29.4%)
	246.8 \pm 34.3 (Cv 13.9%)
	271.8 \pm 18.1 (Cv 18.1%)
HS	176.9 \pm 25.4 (Cv 14.4%)
	206.8 \pm 22.8 (Cv 11.0%)
	276.0 \pm 41.9 (Cv 15.2%)

【Interassay】

Conv.	235.6 \pm 56.7 (copies/ μ g) (Cv 24.3%)
HS.	219.8 \pm 23.5 (Cv 23.5%)

図5. Conventional real-time PCR法の検査内誤差、検査間誤差の決定—リアルタイムPCRフルオログラム

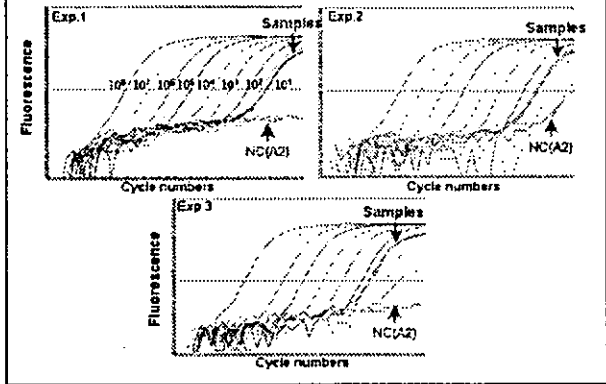


表4. Application 3: Amounts of HIV-1 in whole blood

Patients	Highly Sensitive			Highly Sensitive		
	Copy/100 μ l or (10 ⁶ WBC ⁻¹)	Copy/50 μ l or (10 ⁶ WBC ⁻¹)	Copy/50 μ l or (10 ⁶ WBC ⁻¹)	Copy/100 μ l or (10 ⁶ WBC ⁻¹)	Copy/50 μ l or (10 ⁶ WBC ⁻¹)	Copy/50 μ l or (10 ⁶ WBC ⁻¹)
1	<DL	2(9)	2(7)	<DL	<DL	<DL
2	125(123)	110(262)	117(210)	<DL	34(241)	37(254)
3	<DL	20(24)	21(57)	<DL	1(42)	4(42)
4	<DL	2(8)	3(12)	<DL	<DL	<DL
5	<DL	14(133)	11(136)	<DL	3(83)	4(107)

* DNA were extracted from 50 or 100 μ l volume of whole blood. Pre-quantification PCR was performed using total DNA extract.

** HIV-1 DNA copy numbers were represented per 10⁶ WBC by β 2M copy numbers quantification.

図6. Highly sensitive real-time PCR法の検査内誤差、検査間誤差の決定—リアルタイムPCRフルオログラム

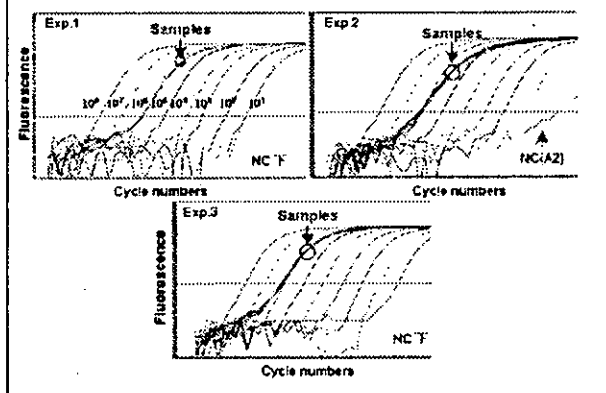


表3. Application 1: HIV-1 amount in CD4+ T lymphocytes from patient responding well to HAART

No.	HIV-1 DNA		Duration (Month)	No.	HIV-1 DNA		Duration (Month)
	copies/10 ⁶ CD4 Conv. ^a	HS ^b			copies/10 ⁶ CD4 Conv. ^a	HS ^b	
1	5960		26	16	640		28
2	3400		7	17	630		20
3	2950		12	18	560		43
4	1510		32	19	<d	407	32
5	1450		6	20	<d	412	2
6	1350		15	21	<d	224	44
7	1230		23	22	<d	109	3
8	1210		1	23	<d	46	24
9	950		1	24	<d	28	42
10	940		8	25	<d	28	1
11	920		1	26	<d	7	4
12	890		27	27	<d	<5	43
13	830		25	28	<d	<5	43
14	770		24	29	<d	<5	4
15	750		10	30	<d	<5	10

B-3. プロウイルス定量法の開発と臨床応用の意義

分担研究者 吉村和久 (熊本大学エイズ学研究センター・病態制御・助手)

研究概要

HIV 感染者に対して現在行われている多剤併用療法(HAART)は、多くの感染者に血中ウイルス量の低下と CD4 陽性細胞数の増加をもたらし、AIDS による死亡者数を減少させてきた。しかし、最近の研究から現在行われている HAART では、血中のウイルス量を感度以下にすることはできても、リンパ節等でのウイルス増殖を完全に抑制することはできないと考えられている。その結果、長期間血中のウイルス量が感度以下の症例でも、治療を中断すると数週間のうちにウイルスが治療前のレベルに戻ってしまうことが多い。すなわち、ウイルス量だけで治療の成否を判断することには、限界があるといえる。そこで我々は、患者さんの末梢血単核球に含まれるウイルスの proviral DNA (pDNA) を高感度に測定する系を確立し、300 をこえる検体の pDNA を測定した。これにより、血中のウイルス量が測定感度以下の症例でも、pDNA の変動を追うことでウイルスの抑制をより詳細にモニタリングすることができることがわかった。これまでに、HAART を強化することで、pDNA が低下しそれに伴い CD4 陽性細胞数の上昇を来した症例を経験した。治療強化によりウイルスの体内での増殖を極限まで押さえ込み、自己免疫力の回復を促し将来 STI などの治療中断療法にまで移行させることが可能となるかも知れない。

1. 研究目的

現在一般的に行われている HAART を施行すると、多くの症例でウイルス量は測定感度以下になり、CD4 の数も上昇してくる。しかし、ウイルス量が測定感度以下であっても、ウイルスの増殖はリンパ節等で続いているといわれている(residual replication)。ところが、現在この residual replication を推測する指標がない。そこで、血中ウイルス量が測定感度以下の症例の proviral DNA を我々の開発した高感度法で測定を行い、症例の臨床経過や各種マーカーと照らし合わせながら、residual replication の指標となりうるかの検討を行っている。

2. 研究方法

プロウイルス DNA (proviral DNA; pDNA) の定量；末梢血単核球を分離精製し DNA を抽出した後、LTR 領域に設定した primer を用いて

1st PCRを行う。得られた増幅産物を template にして 2nd PCR を Real time PCR 法を用いて行った。これらを用いて測定した結果と臨床経過や HIV-RNA 量、CD4、CD8 陽性細胞数などの相関を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究を行うに当たり各症例には研究の概要を説明し同意を得た上で採血し、解析した。なお本研究の倫理的・科学的妥当性は熊本大学病院の先進医療審査委員会で審査され、了承されている。

3. 研究結果及び考察

HAART の potency の問題は、これまで必ずしも評価が十分でなかったが、我々が確立したプロウイルス DNA (pDNA) の測定を行うことにより、HIV RNA の測定よりも鋭敏にウイルスプールの増減の評価が可能となった。その結果、血漿中のウイルス量が測定感度以下(50

コピー/ml 以下) の場合でも、pDNA の量が多いまま経過している症例がいることがわかった。そして、従来慢性感染症例ではほとんど減少しないといわれてきた pDNA 量が、より強力な治療への変更によって明らかに減少する症例があることもわかってきた。しかも、強化療法を行った症例では pDNA の減少に伴いそれまで上昇しなかった CD4 陽性細胞の数が増加し始めた。このことは、現在の治療で充分ウイルスを抑制できてない (pDNA 量の多い) 症例でも、治療の変更 (強化) により、residual replication を減らすことができ、ウイルスの増殖をより完全に押さえ込む可能性があることを意味している。

4. 結論

- 1) HAART 施行症例における病状の指標として、また residual replication の新たな指標として、プロウイルス DNA (pDNA) の定量系を確立し、多くの現在経過観察中の症例で測定し、臨床経過との相関を検索した。
- 2) その結果、pDNA と CD4 陽性細胞数、pDNA と CD4/8 比の間に有意な相関が認められた。また、血中 HIV RNA 量が測定感度以下の症例では、pDNA が低い程 CD4 陽性細胞数が多く、4/8 比が高かった。
- 3) 臨床経過と pDNA コピー数を指標にして強化療法を施行した症例で、pDNA の低下を認め、その後 CD4+ 数が増加した症例があった。

(論文発表)

1. Yoshimura, K., Ido, E., Akiyama, H., Kimura, T., Aoki, M., Suzuki, H., Mitsuya, H., Hayami, M., Matsushita, S. The impact of highly active anti-retroviral therapy by the oral route on the CD8 subset in monkeys infected

chronically with SHIV89.6P. *J. Virol. Methods*, 112:121-128, 2003.

(学会発表)

1. Matsushita, S., Kimura, T., Shirai, N., Koito, A., Yoshimura, K.: Evaluation of residual viral replication for optimization of HAART. 1st International Workshop on HIV Persistence during Therapy, 12.10-12, 2003, Saint Martin, French West Indies.
2. Yoshimura, K., Kimura, T., Matsushita, S.: Proviral DNA (pDNA) and turn over levels in HIV-1-positive long-term non-progressors (LTNPs). 2003 International Meeting of the Institute of Human Virology, 9.29-10.3, 2003, Baltimore, U.S.A
3. Yoshimura, K.: The impact of highly active antiretroviral therapy by the oral route on the CD8 subset and turnover in chronically SHIV89.6P-infected monkeys. 第3回あわじしま感染症・免疫フォーラム, 8.26-28, 2003, 兵庫県津名郡.
4. 吉村和久、木村哲也、松下修三: Proviral DNA (pDNA) and turn over levels in HIV-1-positive long-term non-progressors (LTNPs). 第17回日本エイズ学会学術集会・総会, 11.27-29, 2003, 神戸

B-4. Real time PCR (ABI 7900HT) 法による HIV プロウイルスの定量

分担研究者 近藤真規子 (神奈川県衛生研究所)
研究協力者 田中理恵、加藤真吾 (慶応義塾大医学部)
嶋貴子、須藤弘二、今井光信 (神奈川県衛生研究所)

研究概要

プロウイルス HIV-1 の定量法の開発を目的に、TaqMan プローブを用いた Real time PCR 法の検討を行った。

プライマーおよびプローブには、血中 HIV-1 RNA 定量キット、アンプリコア HIV-1 モニター ver. 1.5 で使用されている SK145、SKCC1B、SK102 と同一のものを使用した。標準 HIV-1 DNA として pNL432 の希釈系列を用いて、同時再現性、日差 (実験間) 再現性、直線性等について検討した。

標準 HIV-1 DNA 試料 A1 (pNL432、200 コピー/DNA1ug) の実験ごとの平均値は 164-224 コピー/DNA1ug、実験内変動係数は 22.0%、3 回の実験間の全平均値は 185 コピー/DNA1ug、実験間変動係数は 45% で良好な同時再現性および日差 (実験間) 再現性が得られた。

試料 B シリーズ (pNL432 の希釈系列 40、100、160、200、400、1000 コピー/DNA1ug の 6 種類) の定量値とポアソン分布法での予測値との相関係数は 0.9899 で、良好な相関が認められた。また、40-1000 コピー/DNA1ug の範囲で良好な直線性が得られた。

HIV 感染者 DNA、試料 P シリーズ (5 検体) について測定した結果、実験 1、2 に比べ実験 3 の測定値が高い傾向にあった。試料 P シリーズの定量値を標準化し、増幅効率との関連を調べた結果、標準 HIV-1 DNA の増幅効率が低いほど試料の定量値が高くなることがわかった。

A. 研究目的

HIV 感染者の末梢血単核球 (PBMC) 中のプロウイルス量は HAART 療法の長期的治療効果やサルベージ療法の治療効果を予測する有力な指標となることが報告されている。我々は、有効なプロウイルス HIV-1 の定量法の開発を目的に、TaqMan プローブを用いた Real time PCR 法の検討を行った。

B. 研究方法

1) プライマーおよびプローブの作製

プライマーおよびプローブは血中 HIV-1 RNA 定量キットアンプリコア HIV-1 モニター ver. 1.5 (ロシュダイアグノスティック社) に用いられている SK145、SKCC1B、SK102 と同

じ塩基配列を用いた。TaqMan プローブとして用いた SK102 の蛍光色素はクエンチャーとして FAM を、レポーターとして TAMRA を用いた (図 1、図 2)。

2) 試薬の調整および PCR 条件 (図 3)

定量 PCR 試薬は TaqMan PCR core reagent キット (アプライドバイオシステムズ) を用いた。サンプル DNA 量は反応チューブあたり 500ng に調整し PCR 反応を行った。

定量 PCR 装置は ABI PRISM 7900HT (アプライドバイオシステムズ) を使用し、50°C 2 分、95°C 10 分の反応後、95°C 15 秒、60°C 1 分のサイクルを 45 回行った。

3) 標準 HIV-1DNA を用いた標準曲線の作製
pNL432 (6930copies/ul : コピー数はポアソン分布により計算) を標準 HIV-1DNA コントロールとして用い、500、100、20、4、0.8 コピー/ul の希釈系列を作製し、各々10ul を template DNA として用いた。

標準 HIV-1 DNA の希釈には HIV 非感染者 20 名のプール PBMC から抽出された DNA (ヒト DNA) を用い、最終 DNA 濃度 50ng/ul に調整した。DNA 抽出はフェノール/クロロフォルム法により行った。

なお、pNL432 (6930copies/ul) は慶応大加藤先生より供与された。

4) 同時再現性、日差 (実験間) 再現性、直線性の検討

本研究班で行われたプロウイルスの定量のバリデーション用に配布された試料を用いて、同時再現性、実験間再現性、直線性について検討した。(バリデーション結果の詳細は慶応大加藤らの項参照)

試料:

A1 : 10 コピー/ul pNL432 を含む
50ng/ul ヒト DNA (200 コピー/DNA1ug)
B1-B6 : pNL432 のコピー数を 2、5、8、10、20、50 コピー/ul に調整 (DNA 濃度はヒト DNA で 50ng/ul に調整)
P1-P5 : HIV 感染者の PBMC 由来 DNA (DNA 濃度は未知)

試料 A1 と B シリーズのコピー数はポアソン分布法により決定された (慶応大加藤らの項参照)。

実験項目:

試料 A1 は 1 回の実験に 6 本同時測定し、同様の実験を 3 回行い、同時再現性、実験間再現性について検討した。

試料 B1-B6 は 1 回の実験に 3 本の同時測

定を 2 回行い、測定値の直線性を調べた。

試料 P1-P5 は DNA 濃度を測定後、1 回の実験に 3 本同時測定を 3 回行い、測定値を DNA1ug あたりのコピー数で表した。

上記試料の濃度はすべてブラインドで測定を行った。

C. 研究結果

pNL432 (6930copies/ul) の希釈系列を用いて測定を行った結果、8-5000 コピー/500ngDNA の範囲で良好な直線性が得られた。この pNL432 の希釈系列を標準 HIV-1DNA コントロールとして用い、試料 A1、B シリーズ、P シリーズの測定を行い、DNA1ug あたりのコピー数を求めた。

試料 A1 の実験ごと測定値の平均値は 164-224 コピー/DNA1ug、標準偏差 22.1-52.5、変動係数 13.2-25.5% で、3 回の実験間の全平均値は 185 コピー/DNA1ug、実験間標準偏差 83、実験間変動係数 45% であり、良好な同時再現性、実験間再現性が得られた (表 1)。

試料 B シリーズの測定結果を表 2 に示した。試料 B シリーズの変動係数は実験 1 で 10.5-14.7%、実験 2 で 1.4-27.2% であり、6 種類のいずれの濃度 (40、100、160、200、400、1000 コピー/DNA1ug) においても良好な同時再現性が得られた。

実験 1、2 の測定値の平均とポアソン分布法での予測値との相関を調べた結果、相関係数は 0.9899 で、良好な相関が得られた。また、40-1000 コピー/DNA1ug の範囲で良好な直線性が得られた (図 4)。

HIV 感染者の検体 P シリーズの測定値を見ると実験 1、実験 2 では 5 検体ともほぼ同様の結果であるが、実験 3 では測定値が高い傾向にあった (表 3)。

また、試料 B シリーズにおいても実験 1 に比べ実験 3 の測定値がいずれの濃度においても高い傾向にあった。そこで、試料 P シリーズの定量値を標準化し、増幅効率との関連を

調べた結果、標準 HIV-1DNA の増幅効率が低いほどサンプルの定量値が高くなることがわかった (図5、表5)。

D. 考察および結語

TaqMan プローブを用いた Real time PCR 法による HIV-1 プロウイルス DNA の定量法を検討した。

試料 A1 (pNL432、200 コピー/DNA1 μ g) の実験内変動係数は 22.0%、実験間変動係数は 45% で良好な同時再現性、日差 (実験間) 再現性が得られた。

試料 B シリーズ (pNL432 の希釈系列 40-1000 コピー/DNA1 μ g の 6 種類) の定量値とポアソン分布法での予測値との相関係数は 0.9899 で、良好な相関および直線性が得られた。

実験 1、実験 2 の測定値に比べ実験 3 の測定値が高い傾向にあった。これは Real time PCR の増幅効率が実験毎に異なることが原因と考えられた。

Real time PCR 用に設計したプライマーおよびプローブは血中 HIV-1 RNA 定量用キット、アンプリコア HIV-1 モニター ver. 1.5 (アンプリコア) で用いられているプライマー、プローブと同様の塩基配列を使用した。アンプリコアは HIV-1 サブタイプ B の他、サブタイプ E、A、C、等の定量も可能なことが報告されている。今回はサブタイプ B のプロウイルスを用いて定量系の検討を行ったが、今後は異性間性行為による感染で激増しているサブタイプ E についての検討も重要と考えられる。

E. 研究発表

論文発表

1. Kurbanov F., Kondo M., Mizogami M., Imai M. et al: Human Immunodeficiency Virus In Uzbekistan: Epidemiological and Genetic Analyses. AIDS Res Hum Retroviruses, 19, 731-738. (2003)

学会発表

1. 近藤真規子、嶋貴子、須藤弘二、岩室紳也、岡部武史、今井光信: 長期にわたり HIV-1 抗体価が低レベルで推移した感染者における血漿中の HIV-1 nef/LTR 領域の経時的解析、第 17 回日本エイズ学会 (2003 年 11 月 27-29 日)
2. 足立拓也、相楽裕子、宇宿秀三、野口有三、近藤真規子、今井光信: 当院における急性 HIV 感染 4 症例の臨床的検討、第 17 回日本エイズ学会 (2003 年 11 月 27-29 日)
3. 嶋貴子、近藤真規子、一色ミユキ、塚田三夫、潮見重毅、今井光信: HIV 検査の普及のための試みー保健所検査への即日検査の導入ー、第 17 回日本エイズ学会 (2003 年 11 月 27-29 日)
4. 近藤真規子、嶋貴子、須藤弘二、岩室紳也、岡部武史、今井光信: HIV 感染後長期間抗体価が低レベルで推移した感染者における HIV-1 遺伝子解析、第 18 回関東甲信静支部ウイルス研究部会 (2003 年 9 月 25-26 日)

図1 TaqMan プローブを用いたReal time PCR法の原理

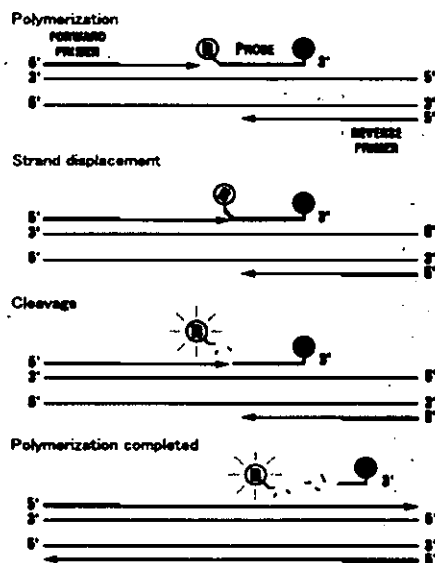
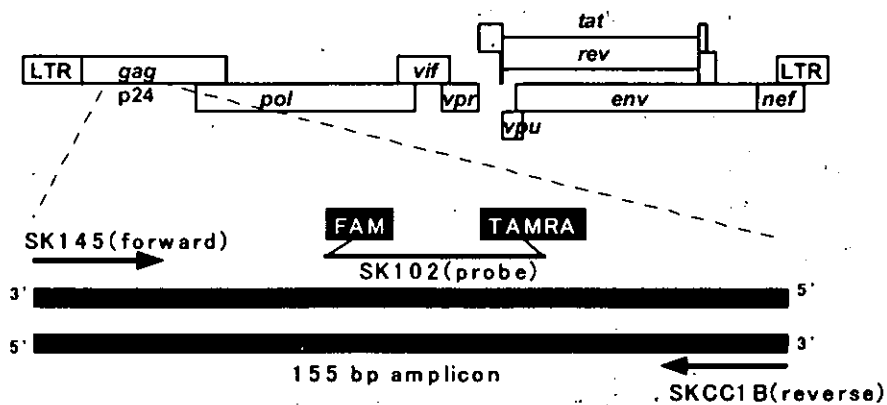


図2 TaqManプローブを用いたReal time PCRによるHIVプロウイルスの定量
—プライマー、プローブの設計—



SK145: 5'-AGTGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAAAT-3'
 SKCC1 B: 5'-TACTAGTAGTTCCTGCTATGTCACCTTCC-3'
 SK102: 5'-ATCAATGAGGAA GCTGCAGAAT GGGATAG-3'

Amplifier HIV-1 Monitor v.1.5(ロシュダイアグノスティック社)の
 プライマー、プローブと同じものを使用