

会にて協議され、2000年1月に承認済である。すべてのコホート参加者から、サイン入り同意書が得られている。特に、生存調査は、基本的に病院内あるいは保健局内の記録調査をベースに行い、病院外へ郵送した質問票についてはすべて病院長名で郵送し、HIV外来からの郵便物であること判明しないような工夫を行った。

3. 研究結果：

a) 生存追跡調査結果：

コホート参加時のみ情報収集を行った299名のうち、2003年10月1日時点の生存状態が確認されたのは250名(83.6%)であった。うち116名(46.4%)が死亡していた。一方、3ヵ月毎の積極的追跡を行った457名の内、10月1日時点の生存状態が確認されたのが431名(94.3%)であった。うち147名(34.1%)が死亡していた。総合すると、756名のうち681名(90.1%)について、2003年10月1日時点の生存状態が確認され、うち263名(38.6%)が死亡していた。死亡していた263名のうち11名(4.2%)については死亡した月が特定できず追跡データから除いた。一方、2003年10月1日時点の生存が確認出来なかった75名のうち、再来しコホート参加時から最終外来受診時までを追跡データに加えることが出来た症例が58名あった。その結果、756名のうち、728名(96.3%)について追跡データが得られた。追跡期間の中央値(25パーセンタイル、75パーセンタイル；範囲)は、602日(338日、1002日；5日～1183日)であり、追跡期間の合計は、456,274日、1250 person-year-observation (PYO)であった。この観察期間の死亡数は252であったので、100 PYOあたりで計算した場合の死亡率は20.2であった。

上記追跡情報が得られた728名について、各リスクグループの生存解析結果を表1にまとめた。さらに、各リスクグループのKaplan-Meier生存推測曲線を図1に示した。さらにCox比例ハザードモデルを用いてそれぞれの死亡リスク因子を補正した解析を行った結果、臨床症状{AIDS、その他HIV関連症状の有無}、CD4値、ウイルス量と死亡との間に独立した関連があった。本年度行った患者臨床データの検証により、有症状患者510名のうち227名がエイズ患者と診断されたことが判明した。さらに、その診断基準となったエイズ定義疾患の頻度(図2)が明らかになった。

b) ランパン病院レトロスペクティブコホートの抗HIV薬治療ガイドラインへの応用

初診時のHIV関連症状とCD4値で分類した各臨床ステージにある患者群の生存解析結果を表2と図3にまとめた。100PYOあたりの死亡数を比較したところ、初診時CD4値が200/ μ l以上あるにもかかわらずHIV関連症状を呈していた患者は、初診時CD4値が100～200/ μ lであったが、HIV関連症状がなかった患者に比べて死亡率が高いことが判明した(図3)。この関係は、Cox比例ハザードモデルにより性別、年齢、HIV外来登録年および抗HIV薬治療歴を補正した後も、その関係は保たれた。死亡に関するハザード比の観点から、治療を必要とする患者の優先順位は、CD4値100未満の有症状患者、CD4値100未満の無症状患者、CD4値100以上200未満の有症状患者、CD4値200以上の有症状患者であり、初診時CD4値が200未満であっても100以上であればHIV関連症状のない患者の死亡率は、CD4値が200以上の患者と統計的に明らかな有意差は見られなかった。

c) ランパンコホートの基礎医学研究への応用

上記患者情報が基礎となり、同コホート患者検体を用いて行った遺伝子医学実験、細胞性免疫実験、薬剤耐性検査結果を臨床経過などに関連させることが可能になった。

c-1) ホスト遺伝子因子多型とHIV伝播およびエイズ進行との関連

昨年度は、2001年7月までにコホートへ参加した感染者489名について、ホスト遺伝子多型解析が行われたが、本年度はさらに、2002年10月15日まで参加した患者のうち、夫婦で参加した患者およびその配偶者106名のホスト遺伝子多型解析が解析に加えられた。その結果、薬剤投与歴のない、しかも女性患者に限って、IL4-589T異型アレルをホモ接合体として有するものは、ヘテロ接合体あるいは野外型アレルのホモ接合体を有するものよりも、ウイルス量が有意に低く、また、CD4値が有意に高かった(4.870 vs 5.081 logRNA copies/ml, $p=0.0097$ ； 301 vs 253 / μ l, $p=0.036$, by Kruskal-Wallis test)。また、未治療の患者群で、HLA-B*56アレルを有するものが、そうでないものよりも有意にウイルス量が高く、さらにはHLA-B*57

アリールを有するものが、そうでないものよりも有意にウイルス量が低かった (5.58 vs 5.16 logRNA copies/ml, p=0.006) (4.58 vs 5.16 log RNA copies/ml, p=0.040)。さらに、HLA-A 遺伝子座と B 遺伝子座の双方のアリールがホモ接合体である群が、そうでない群よりも有意にウイルス量が高かった (5.71 vs 5.14 log RNA copies /ml, p=0.006)。昨年度に報告した CCR2 64I アリールと低ウイルス量との関係は、症例を増やした今年度の解析でも有意な差として観察され、その関係は、興味あることに、昨年度の解析結果と同様に薬剤投与群のみに見られた。いずれのホスト遺伝子多型も HIV 夫婦間伝播と有意な関連はなかった。

このコホート研究の特色のひとつに夫婦の双方を対象にしていることがある。双方が HIV に感染したカップル 118 組の HLA を比較検討したところ、HLA-A 遺伝子座について夫の HLA-A アリールと 0,1,2 マッチした妻 3 群の間で妻のウイルス量にまったく差は見られなかったが、HLA-B 遺伝子座について見ると夫の HLA-B アリールと両方がマッチした妻 3 名は、そうでない妻に比べ有意に高いウイルス量であることが判明した。この傾向は、薬剤未治療で CD4 値が 200 以上の初期感染者群に限った場合さらに明確であった (5.530 vs 4.529 RNA copies / ml, p=0.008)。

c-2) 抗 HIV 細胞性免疫 (CTL を含む) と HIV 伝播およびエイズ進行との関連

本年度は、ランパン HIV コホートによって同定された CD4 値が 200/ul 以上の感染者 50 名および暴露されたが抗 HIV 抗体陰性配偶者 19 名について調べたところ、一本以上の Gag ペプチドに反応したものは、感染者で 33 名 (66%)、抗 HIV 抗体陰性配偶者で 5 名 (26%) 認められた。反応した感染者 33 名のうち 24 名 (73%) は、複数の Gag ペプチドを認識していたのに対し、反応細胞を有する抗 HIV 抗体陰性配偶者 5 名のうち、複数の Gag ペプチドを認識したのは 2 名 (40%) で、3 名はそれぞれ異なるペプチドを一本のみ認識していた。興味あることに、これらの陰性配偶者によって認識されたペプチドは、感染者によって高頻度に認識されるペプチドとは異なっていた。ペプチド認識の強さ・パターンとウイルス量との明らかな関連は見出されなかった。

c-3) CRF01_AE 薬剤耐性変異についての研究

2001年7月までに参加した感染者のうち、AZT および DDI もしくは DDC による 2 剤併用療法にて治療を受けてきた患者は、112 名おり、治療期間の中央値 (範囲) は、621 日 (28~1600 日) であった。うち 76 名は、採血時に治療を受けており、36 名は、治療中止中であった。99 名について、RT 領域のシーケンス結果が得られたが、13 名については、ウイルス量が低くシーケンス結果が得られなかった。後者を治療成功例と見なし、薬剤耐性変異がないと仮定した場合、RT 阻害剤に対して何らかの変異を有する感染者の頻度は、57 名 (51%) であることが判明した。しかし、薬剤治療中に採血を行った 76 名に限ると、耐性変異の有する感染者は、48 名 (63.2%) であった。耐性変異のうち最も頻度の高かったのは、D67N で、続いて K70R、T215Y/F であり、他にもコドン 41、210、219 における変異の頻度が高かった。しかし、Q151M 変異は一例も見られなかった。そのほかにも、薬剤耐性変異数と治療期間との間に、また、薬剤耐性変異数とウイルス量との間に有意な相関が認められた。

4. 考察:

本年度は、ランパン HIV コホート開始以来 3 年が過ぎたが、高い追跡率を維持し、Kaplan-Meier 生存解析や Cox 比例ハザードモデルなど詳しい生存解析が可能であることを示すことが出来た。今後は、各基礎医学実験結果にこれら継時的情報を加え、さらに生存との関連について解析を行うことが可能となった。本コホート研究の追跡率が高いひとつの理由として、本コホートは、大都市で行われるコホートとは異なり、患者の出身地にある拠点病院内にサイトを設置したことにより、患者家族と病院との連携もより容易に行うことが出来る地域密着型であることがひとつの利点であると思われる。また、ランパン県内住民の死亡届けを過去 4 年以上にわたりコンピュータ管理しているランパン県保健局のインフラも大きな要因である。また、本分担研究者の経験から、同姓同名の患者が多数存在し、患者年齢の同定も不確定なアフリカでのコホート追跡に比べ、姓名が複雑ゆえに年齢・姓名でほぼ個人が確定できるタイは、コホートを運営する上で非常に有利である。

初診時 CD4 値が 200 未満・100 以上で HIV 関連症状のない患者の死亡率と、CD4 値が 200 以上の無症状患者の死亡率との間に統計的に有意差は認められなかった。ひ

とつ理由として、この群の症例数が少ないことがあげられるが、同様に症例数が少なかった CD4 値 200 以上の有症状患者の死亡率は、有意に高いことを考慮すると、CD4 値が 200 未満でも、無症状の患者は、CD4 値に関係なく HIV 関連症状のある患者に比べ、死亡率の観点から薬剤治療開始させる緊急度が低いことが言える。タイ国内にこのようなデータはなく、国内の臨床医が薬剤治療を開始する際の指標となることが期待される。

昨年度に報告した CCR2 64I 遺伝型多型とウイルス量との関連に加えて、IL4-589T とウイルス量との関連が示された。本年度は、HLA 解析がさらに進み、特にサブタイプ B に感染した欧米人においても見られた B*56, B*57 とウイルス量との関連が、CRF01_AE に感染したアジア人種でも見られたことは、その機序を考察する上で興味深い。これらの HLA アリールによって認識されるウイルス抗原が、サブタイプ間で保存されている可能性もあるが、HLA 近傍の遺伝子多型が関連している可能性も否定できない。さらに、夫婦間で HLA アリールが一致している場合、コンタクト症例である妻のウイルス量が著しく高くなることを示唆する結果が得られたことは重要である。これが確認されると、インデックス症例の HLA 環境下に適応・進化したウイルスが、その性質を維持したまま異性間伝播することを意味するデータとなり、この発見は、今後のワクチン開発に重要な意味を含む。この現象が多様性の低い HLA-A 遺伝子座においては見られなかった点も重要である。これらのことは、ウイルスを制御する細胞性免疫として、頻度が比較的まれな HLA-B 遺伝子座によって拘束・認識される CTL が重要であることを示唆すると考えられる。

オーバーラッピングペプチドは、比較的对象感染者の HLA とは関係なく感染者群を比較検討できる点で優れていると思われた。しかし、そのペプチドを用いて比較しても、ウイルス量とペプチド認識との間に顕著な差は見られなかった。今後、たとえば B*57 と B*56 によって拘束されている CTL エピトープに限って比較検討するなど、HLA を考慮した比較検討が必要となる。本年度は、HIV に暴露されたが抗 HIV 抗体が陰性の配偶者に特有のペプチド認識パターンが見られたことは意義深い。特に、3 症例で、3 つのことなるペプチドが同定され

ており、そのうち 2 つの 15-mer ペプチドには、アフリカの HIV に暴露されたが感染していない抗 HIV 抗体陰性者群によって認識すると報告された CTL エピトープを含んでおり、大変興味深い。

CRF01_AE における AZT,DDI,DDC 耐性が、サブタイプ B と同様の変異パターンを取ることが改めて確認された。母子感染予防対策を通じて、タイ国内には AZT を単剤で投与された患者が多く、AZT 耐性ウイルスが拡大している可能性がある。今後、Mutagenically Separate PCR などの手法を用いて、これらの耐性ウイルスを容易にモニターする方法の開発が必要となるであろう。

5. 自己評価

1) 達成度について

コホート開始以来 3 年が過ぎ、当初の目的であったコホート研究の維持は達成できている。今回の生存調査により、積極的追跡を行わなかった感染者群も含めて、追跡期間の中央値が約 1 年半を経ても高い追跡率を維持でき、正確な生存解析が可能であることが実証された。また、本研究の遺伝子医学分野、免疫学分野、薬剤耐性分野への応用については、順調に進み成果が上がっている。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

本コホートは、アジア人を対象にしている点、CRF01_AE サブタイプを対象にしている点、抗 HIV 抗体陰性配偶者を含めた夫婦を対象にしている点において、特色があり、今後も様々なラボラトリー実験結果と関連させることにより、さらに、学術的に新しい事実が、多数発見される可能性が高いことが、本年度の成果から明らかになってきた。

本コホート研究は、本分担研究者ならびに共同研究者らの技術指導、および JICA など日本からの資金援助によって開発され運営・維持されてきたが、本コホート研究は、ODA プロジェクトの一環であるという性格から、「タイ国内の医学研究課題は、タイ人の手によって解決されるべきである」という理念を持って取り組んできた。従って、実際のコホート研究およびそれに由来するラボラトリー実験の 9 割以上は、本分担研究者および協力研究者によって訓練・技術指導を受けたタイ人医療スタッ

フ・タイ人研究者によって、タイ国内にて実行されたものである。レベルの高い医学研究を自らの手で行わせることは、タイ人研究者の研究能力を飛躍的に向上させ、研究者としての自覚・自信を植え付ける上で、最も有効であると考えられることから、国際協力の点においても、大変意義がある。ただし、データ解析においては、本分担研究者に依存している割合が高く、今後、生データから解析用データの作成と実際の統計解析を行えるタイ人研究者の育成が急務である。

社会的には、新たな遺伝子と HIV 抵抗性との関連が発見されれば、新薬の開発につながる。また、分子レベルでの免疫学的観察は、将来の効果的ワクチン開発につながる。特に今回発見された抗 HIV 抗体陰性配偶者に特有の細胞性免疫反応パターンは、ワクチン開発にひとつのヒントを与える結果となるであろう。また、これらの知見は、世界で最も数多くの HIV ワクチン臨床試験が行われているタイにおけるワクチン評価システムの確立・改善に大いに役立つ。加えて、今年度やり直したレトロスペクティブコホート研究の生存解析は、タイ国内の治療開始時期についてのガイドライン作成に役立つ情報を提供した。

3) 今後の展望について

2000 年にコホートを開始して以来 3 年が過ぎたが、国際レベルのコホートとして認識されるには、最低 5 年の追跡期間が必要であろう。今後さらに地道な追跡活動を行う必要がある。しかし、2003 年から急速に普及したジェネリック薬により、患者の生命予後が劇的に改善されるのは明らかであり、死亡を End-point とする自然経過観察に大きな影響が出る。一方で、抗 HIV 薬開始時期が CD4 値(<200 / μ l 以下)を指標にしていることから、今後 End point を死亡から低 CD4 値に変更させて行く必要がある。また、CD4 値が低い感染者については、ジェネリック薬投与患者の生命予後に関する研究へと発展させることが可能である。

本コホートの基礎医学研究への応用として、本年度に、遺伝子学研究、免疫学研究、薬剤耐性ウイルス研究に応用させてきたが、今後、今年度の生存調査によって完成しつつある生存データを用いて、これらの実験結果と生存を関連させる解析を進める展望が開けた。本コホートは、さらに日和見感

染症研究、薬剤治療に関する行動学研究、液性免疫研究へと多岐にわたる学術的研究へと発展される高いポテンシャルがある。

本コホート研究の遺伝子医学分野への応用については、これまでの結果では、既知の HIV 感染抵抗性に関与する領域との関連は見つかっておらず、今後さらに多くの領域の遺伝子解析を行う必要がある。また、新たな遺伝子が関与している可能性を残している。

6. 結論:

北タイランパン県病院 HIV 外来をサイトとした HIV 感染者およびその配偶者を高い追跡率で追跡することが可能であることが判明した。

本コホートから得られた患者情報をコンピュータ入力し、解析可能なかたちに整備することにより、このコホートから得られた臨床検体を用いた遺伝子医学研究、免疫学研究、およびウイルス学研究は、臨床的背景とより系統的な解析が可能となり、有益な結果をもたらすことを示した。

7 研究発表

論文発表 (外国雑誌)

1) Yokomaku Y, Miura H, Tomiyama H, Kawana-Tachikawa A, Takiguchi M, Kojima A, Nagai Y, Iwamoto A, Matsuda Z, Ariyoshi K. Impaired Processing and Presentation of Cytotoxic-T-Lymphocyte (CTL) Epitopes Are Major Escape Mechanisms from CTL Immune Pressure in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. J Virol. 2004 Feb; 78(3): 1324-32.

2) Ariyoshi K, Berry N, Cham F, Jaffar S, Schim van der Loeff M, Jobe O, N'Gom PT, Larsen O, Andersson S, Aaby P, Whittle H. Quantification of Human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) provirus load in a rural West African population: no enhancement of human immunodeficiency virus type 2 pathogenesis, but HTLV-I provirus load relates to mortality. J Infect Dis. 2003 Dec 1; 188(11): 1648-51.

3) Schim Van Der Loeff MF, Hansmann A, Awasana AA, Ota MO, O'Donovan D,

Sarge-Njie R, Ariyoshi K, Milligan P, Whittle H. Survival of HIV-1 and HIV-2 perinatally infected children in The Gambia. AIDS. 2003 Nov 7; 17(16): 2389-2394.

4) Ariyoshi K, Matsuda M, Miura H, Tateishi S, Yamada K, Sugiura W. Patterns of point mutations associated with antiretroviral drug treatment failure in CRF01_AE (subtype E) infection differ from subtype B infection. J Acquir Immune Defic Syndr. 2003 Jul 1; 33(3): 336-42.

5) Alabi AS, Jaffar S, Ariyoshi K, Blanchard T, Schim van der Loeff M, Awasana AA, Corrah T, Sabally S, Sarge-Njie R, Cham-Jallow F, Jaye A, Berry N, Whittle H. Plasma viral load, CD4 cell percentage, HLA and survival of HIV-1, HIV-2, and dually infected Gambian patients. AIDS. 2003 Jul 4; 17(10): 1513-20.

6) Pathipvanich P, Ariyoshi K, Rojanawiwat A, Wongchoosie S, Yingseree P, Yoshiike K, Warachit P, Sawanpanyalert P. Survival benefit from non-highly active antiretroviral therapy in a resource-constrained setting. J Acquir Immune Defic Syndr. 2003 Feb 1; 32(2): 157-60.

論文発表 (国内雑誌)

1) 有吉紅也 「東南アジアにおける HIV・エイズ対策の取り組み」 臨床とウイルス 2003; 31(4): 283-291

2) 有吉紅也 「第16回日本エイズ学会シンポジウム記録 タイにおける取り組みと日本の協力」 日本エイズ学会誌 2003; 5(3): 194-196

学会発表(国内)

1) 横幕能行 ジラワン・シーサワット、ブサラワン・シーワンタナ、松田善衛、有吉紅也 「タイ流行株臨床検体由来 gag-pol 発現 CTL 標的細胞パネル作成の試み」 第51回日本ウイルス学会学術集会 2003年10月(京都)

2) 梅田知幸 有吉紅也 三浦秀佳 松田昌和 千葉智子 巖華 Myint Lay 柿沢淳子 濱武牧子 西澤雅子 杉浦互 「CRF01_AE 感染症例に見出された新たな薬剤耐性獲得機序」 第17回日本エイズ学会学術集会 2003年11月27日~29日(神戸)

知的財産権の出願・登録状況

該当なし

表 1

| | Patient's categories | Patients (N) | Deaths/PYO | Death/100PYO | Adjusted hazard ratio (95% CI) | P value multivariate (univariate)analysis | from |
|----|----------------------|--------------|-------------|--------------|--------------------------------|---|------|
| 1 | CD4 値(μl) | | | | | | |
| | <100 | 324 | 193 / 366.6 | 52.6 | 1.0 | - | |
| | 100-199 | 97 | 23 / 175.5 | 13.1 | 0.369 (0.233-0.583) | <0.001 (<0.001) | |
| | 200-349 | 130 | 26 / 290.6 | 8.9 | 0.319 (0.201-0.505) | <0.001 (<0.001) | |
| 22 | ≥350 | 173 | 8 / 413.0 | 1.9 | 0.084 (0.039-0.179) | <0.001(<0.001) | |
| | ウイルス量 | | | | | | |
| | 400-999 | 42 | 7 / 85.7 | 8.2 | 1.455(1.177-1.798) | <0.001 (<0.001) | |
| 1 | (copies / ml) | | | | | | |
| | 1,000-9,999 | 65 | 2 / 153.1 | 1.3 | (one log 増毎) | | |
| | 10,000-99,999 | 200 | 40 / 397.9 | 10.1 | - | | |
| 1 | ≥100,000 | 420 | 203 / 613.1 | 33.1 | - | | |
| | 性別 | | | | | | |
| 1 | 男性 | 307 | 145 / 427.1 | 34.0 | 1.0 | - | |
| | 女性 | 421 | 107 / 823.0 | 13.0 | 0.845 (0.646-1.104) | 0.217 (<0.001) | |
| 1 | HIV 関連症状 | | | | | | |
| | エイズ | 365 | 62 / 760.8 | 8.2 | 1.0 | - | |
| | その他 HIV 疾患 | 145 | 58 / 243.1 | 23.9 | 1.470 (1.011-2.135) | 0.044 (<0.001) | |
| 1 | 無症状 | 218 | 132 / 246.2 | 53.6 | 2.120 (1.500-2.993) | <0.001(<0.001) | |

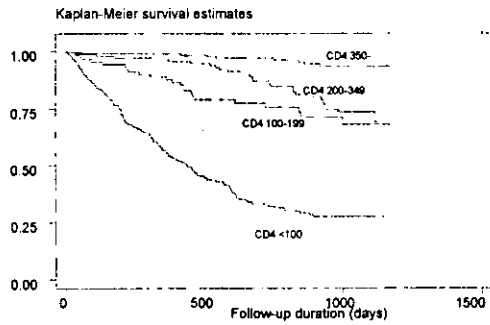
表 2

| Patient's categories | Patients (N) | Deaths/PYO | Hazard ratio (95% CI) | Adjusted hazard ratio (95% CI)* | P value (univariate)analysis | from |
|-----------------------------|--------------|------------|-----------------------|---------------------------------|------------------------------|------|
| Asymptomatic CD4 \geq 200 | 224 | 18 / 389.9 | 1.0 | 1.0 | - | |
| Asymptomatic CD4 100-199 | 28 | 3 / 49.1 | 1.35 (0.40, 4.58) | 2.1 (0.62, 7.27) | 0.237 (0.632) | |
| Symptomatic CD4 \geq 200 | 28 | 10 / 50.4 | 4.22 (1.95, 9.15) | 4.53 (2.05, 10.01) | <0.001 (<0.001) | |
| Symptomatic CD4 100-199 | 49 | 24 / 75.7 | 7.04 (3.82, 12.98) | 7.71 (4.10, 14.51) | <0.001(<0.001) | |
| Asymptomatic CD4 0 - 99 | 16 | 10 / 20.5 | 11.35 (5.22, 24.69) | 16.79 (7.43, 37.96) | <0.001(<0.001) | |
| Symptomatic CD4 0 - 99 | 329 | 242/ 296.2 | 21.09 (12.91, 34.45) | 21.02 (12.44, 35.52) | <0.001(<0.001) | |

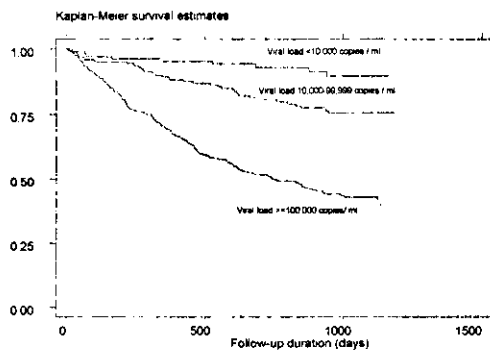
*Hazard ratio was adjusted for sex, age group, registered year and antiretroviral drug use according to the previous report (pathipvanich 2003); PYO, person-years of observation; CI, confidence interval

図1 カプラン-メイヤー生存推定曲線による解析結果

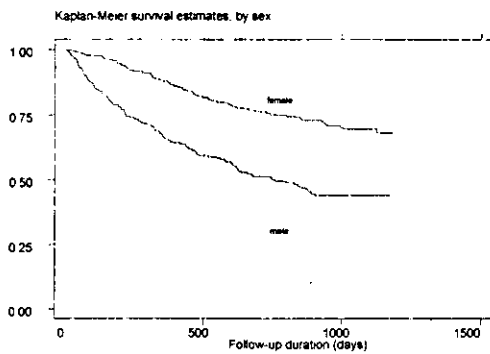
A) 初期 CD4 値と生存との関連



B) 初期ウイルス量と生存との関連



C) 性別と生存との関連



D) 初期臨床状態と生存との関連

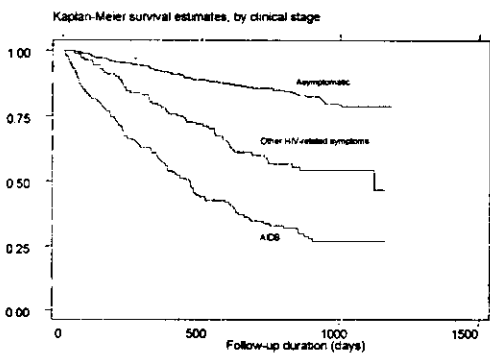


図2 エイズ定義疾患の頻度

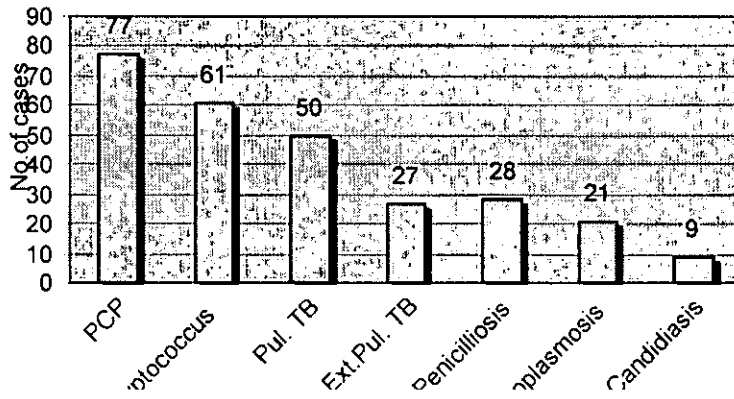
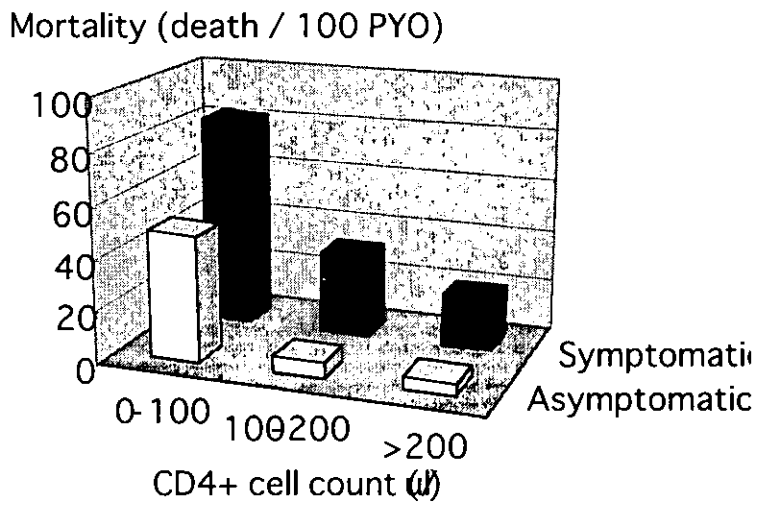


図3 臨床ステージ分離と死亡率との関連



研究課題： HIV-1 CRF08_BC 感染性分子クローンの樹立とその性状に関する研究

分担研究者： 草川 茂（国立感染症研究所エイズ研究センター・主任研究官）

研究要旨

HIV-1 感染者の急速な増加が報告されている中国広西省、雲南省の主要な流行株 CRF08_BC の分離株 HH040 から 2 クローンの感染性分子クローンを樹立した。ともに CCR5 をコレセプターとして使用したが、細胞種により増殖性が異なっていた。各アミノ酸配列の比較から、増殖性の差が gp120 の差によることが疑われた。また HH040 には LTR の TCR-1 alpha site が 2 つある準種が存在し、分子クローンに組み込むことによってウイルスの増殖性が高まった。Western blot を用いて免疫学的交差性を検討した結果から、サブタイプ B の Env とは交差性が低いことが分かった。

A. 研究目的

これまで我々は、東南アジア諸国における HIV-1 流行株がサブタイプは B' (アジア型サブタイプ B)、C、CRF01_AE とその組換体であることを報告してきた。一方でこれまでウイルス学研究に用いられてきた HIV-1 感染性分子クローンのほとんどがサブタイプ B (欧米型サブタイプ B) であり、東南アジアにおいて流行している HIV-1 を用いたウイルス学的研究の報告は限られている。CRF08_BC は、中国南西部に位置する広西省および雲南省南部における主要な流行株である。この地域は、中国国内で最も早く HIV-1 流行が報告された地域であり、現在も注射薬物乱用者 (IDU) を中心に感染者数が急速に増加している。CRF08_BC の感染性分子クローンを樹立することは、ウイルス学的解析を進めるだけでなく、この地域における流行の制御を進める上でも重要であると考え、雲南省において分離された CRF08_BC 分離株 HH040 から感染性分子クローンの樹立を試みた。

B. 研究方法

分離株 HH040 は、雲南省 Honghe の IDU による感染者から 2000 年に収集した全血から、PBMC 共培養法により分離した。ゲノム全長のクローンを得るため、HH040 分離株感染 PBMC から DNA を抽出、精製し、これを鋳型として、ゲノムの 5' LTR から pbs までの約 800 bp および pbs から 3' LTR までの約 9000 bp を PCR 法によって増幅後 TA クローニングした。pbs の NarI サイトを

用いてこれらのフラグメントを結合させ、ゲノム完全長を含むプラスミドを作製した。さらにクローンを得るため、NarI から nef に存在する XhoI サイトまでの領域を、新たに PCR で増幅した DNA と置き換えたクローンを作製した。得られたプラスミドを HeLa 細胞に transfect し、ウイルスの産生が確認できたものを PBMC に感染させ、感染性を検討した。ウイルスゲノムのサブタイプ構造は、系統樹解析、similarity plot 法と bootscanning plot 法を用いた組換え構造解析によって同定した。PBMC への感染性の比較するためには、 2×10^5 PBMC に 5×10^5 cpm のウイルスを感染させ、3 日ごとに培養上清を回収して産生されたウイルス量を検討した。coreceptor usage は、CD4 および CXCR4 または CCR5 を発現させた NP2 細胞におけるシンシチウム形成とウイルス産生を指標として決定した。免疫学的交差性は、各分子クローンを transfect した HeLa 細胞の lysate を抗原に、各サブタイプの感染者血清を抗体に用いた western blot 法により検討した。サブタイプ B のコントロールとして AD8 を、サブタイプ C のコントロールとして IndieCI を用いた。

C. 研究結果

CRF08_BC 感染性分子クローンを作成するための材料として、中国で収集した検体の中から、gag 遺伝子から pol 遺伝子 RT 領域までの約 2.6 kb および env 遺伝子の解析から CRF08_BC と同定され、かつ PBMC ウイルス増殖能

が高い HH040 を選択した。

最初に 5' LTR から pbs までの約 800 bp および pbs から 3' LTR までの約 9000 bp を結合させて得た 12 クローンをスクリーニングしたところ、HeLa 細胞への transfect でウイルスを産生するものはあったが、それらは PBMC に感染しなかった。そこで、transfection でウイルスが産生されたクローンでは LTR が active であると考えて、そのクローンの gag から nef までの領域を、新たに PCR で増幅した DNA と置き換えたクローンを作製し、スクリーニングを続けた。その結果 22 クローンから PBMC に感染しウイルスを産生する 2 種類の感染性分子クローン NX4 と NX22 を得た。

これらのクローンの遺伝子構造を検討するために全塩基配列を決定し、系統樹を作製したところ、いずれのクローンも既に報告されている CRF08_BC とクラスターを形成した (図 1)。また similarity plot 法と bootscanning plot 法を用いてサブタイプ間組換え構造を調べたところ、いずれのクローンもその組換えパターンが CRF08_BC の標準株 98CN006 と一致していたので、得られたクローンは CRF08_BC であると同定した。

NX4、22 の感染性について検討した (図 2)。まず PBMC への感染性を検討したところ、いずれのクローンも感染性を有するが、NX22 の方がより早い kinetics でより多くのウイルスを産生した。T cell line には感染しなかったが、CCR5 を発現させた T cell line には感染し、ウイルスを産生した。

NP2 を用いて co-receptor usage を検討したところ、いずれのクローンも CXCR4 は使用せず CCR5 のみを使用した (図 2)。この性質は、分離株 HH040 と一致していた。また 2 つのクローンの NP2 への感染性を比較すると、PBMC の場合とは逆に NX4 の方がより強い細胞変性を伴って良く増殖することが分かった (図 2)。

NX4 と 22 の間に見られた感染性の差異を決定する要因を調べるために、2 つのクローンの塩基配列、およびアミノ酸配列を比較した (表 1)。gag、pol および env 遺伝子の gp41 では、塩基置換、アミノ酸置換は 1% 以下

であったのに対して、env 遺伝子の gp120 では、塩基置換が 2.0%、アミノ酸置換が 4.0% で、塩基置換の 87.1% がアミノ酸変異を伴っていた。アミノ酸置換は、V3 ループを除く V1 から V5 までの領域にかたよりなく見られた (図 3)。NP2 細胞において細胞変性の様子に差が見られることから、env 遺伝子の gp120 のアミノ酸変異が NX4 と 22 の間の感染性の差異を決定していることが疑われた。

ところで、PCR により得られたクローンの 5' および 3' LTR の塩基配列を調べたところ、HH040 には cis acting element の一つといわれている TCF-1 alpha site が 2 つあるクローンがあることが分かった (図 4)。TCF-1 alpha site の duplication がウイルスの複製におよぼす影響について検討するために、NX22 の 5' LTR および 3' LTR を、2 つの TCF-1 alpha をもつ LTR に置換したクローン NX22L を作製した。これを transfect してウイルスを作製し、その感染性について検討したところ、PBMC、NP2 のいずれの細胞を用いた場合でも、NX22L は NX22 よりより早い kinetics で増殖することが分かった (図 5)。

CRF08_BC と他のサブタイプのウイルスとの gp160 および gp120 の血清学的交差性をみるために、HH040NX22 とサブタイプ B の感染性分子クローン AD8、サブタイプ C の感染性分子クローン IndieC1 を transfect した HeLa 細胞の lysate を抗原に western blot を行った (図 6)。サブタイプ C と CRF08_BC 感染者の血清では HH040NX22 と IndieC1 が、サブタイプ B 感染者の血清では AD8 が強く反応しており、CRF08_BC とサブタイプ C の間では血清学的に交差性があるものの、サブタイプ B との間では交差性が低いことが示唆された。

D. 考察

これまで PCR 法を用いて感染性分子クローンを構築する時には、ゲノムの 5' LTR から pbs までの約 800 bp および pbs から 3' LTR までの約 9000 bp を PCR 法によって増幅後これらのフラグメントをランダムに結合させて得たゲノム完全長を含むプラスミドをスクリーニング

する方法が取られてきたが、今回LTRが active なクローンをベースに2つのLTRに挟まれた領域をクローニング・スクリーニングする方法を取ったことで、比較的効率良く感染性分子クローンを樹立することに成功した。得られた2つのクローンは細胞によって感染性が異なっており、その差が env gp120 にある可能性が高いことが分かった。今後さらに絞り込むための研究を行う予定である。ウイルス学的研究に用いる目的のためには、より高い感染性を有するクローンを樹立する必要があるが、今回 HH040 の一部の quasispecies に存在する TCF1 alpha site の duplication がウイルスの感染性を高める作用があることを見いだした。血清学的交差性の結果からも、中国における HIV-1 の流行株の研究および将来のワクチン開発のために有用な分子クローンであると考えられる。

E. 結論

今回 CRF08_BC の感染性分子クローンを樹立したことは、当地における流行株のウイルス学的研究、並びに今後進められる感染制御の研究にとって重要な成果であった。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Yang, R., Kusagawa, S., Zhang C., Xia, X., Ben, K., Takebe, Y. Identification and characterization of a new class of human immunodeficiency virus type 1 recombinants comprised of two circulating recombinant forms, CRF07_BC and CRF08_BC, in China.

J. Virol., 2003, 77(1), 685-695.

2) Motomura, K., Kusagawa, S., Lwin, H. H., Thwe, M., Kato, K., Oishi, K., Yamamoto, N., Zaw, M., Nagatake, T., Takebe, Y. Different subtype distributions in two cities in Myanmar: evidence for independent clusters of HIV-1 transmission. AIDS, 2003, 17(4): 633-636.

3) Takebe, Y., Motomura, K., Tatsumi, M., Lwin, H. H., Zaw, M., Kusagawa, S. High prevalence of diverse

forms of HIV-1 intersubtype recombinants in Central Myanmar: geographical hot spot of extensive recombination. AIDS, 2003, 17(4): 2077-2087.

2. 学会発表

草川茂、楊栄閣、武部豊：HIV-1 CRF08_BC 感染性分子クローンの樹立とその性状の解析。第51回日本ウイルス学会学術集会総会、2003年10月

武部豊、今村裕子、草川茂：HIV-1 サブタイプB'の起源に関する進化的解析。第51回日本ウイルス学会学術集会総会、2003年10月

武部豊、横田侑子、上原理恵子、今村裕子、草川茂：HIV-1 遺伝子組換えの特異点：in vivo 組換え点の微細マッピング。第51回日本ウイルス学会学術集会総会、2003年10月

草川茂、楊栄閣、武部豊：HIV-1 CRF07_BC および CRF08_BC 感染性分子クローンの樹立とその性状解析。第17回日本エイズ学会学術集会総会、2003年11月

武部豊、今村裕子、草川茂：サブタイプB'の起源とアジアにおける流行拡大に果たす役割。第17回日本エイズ学会学術集会総会、2003年11月

武部豊、馬艶玲、楊朝軍、今村裕子、横田侑子、上原理恵子、山室雅一、楊栄閣、草川茂、BenKunlong：中国におけるエイズ流行の巨大危機とその形成のメカニズム。第17回日本エイズ学会学術集会総会、2003年11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
3. その他 なし

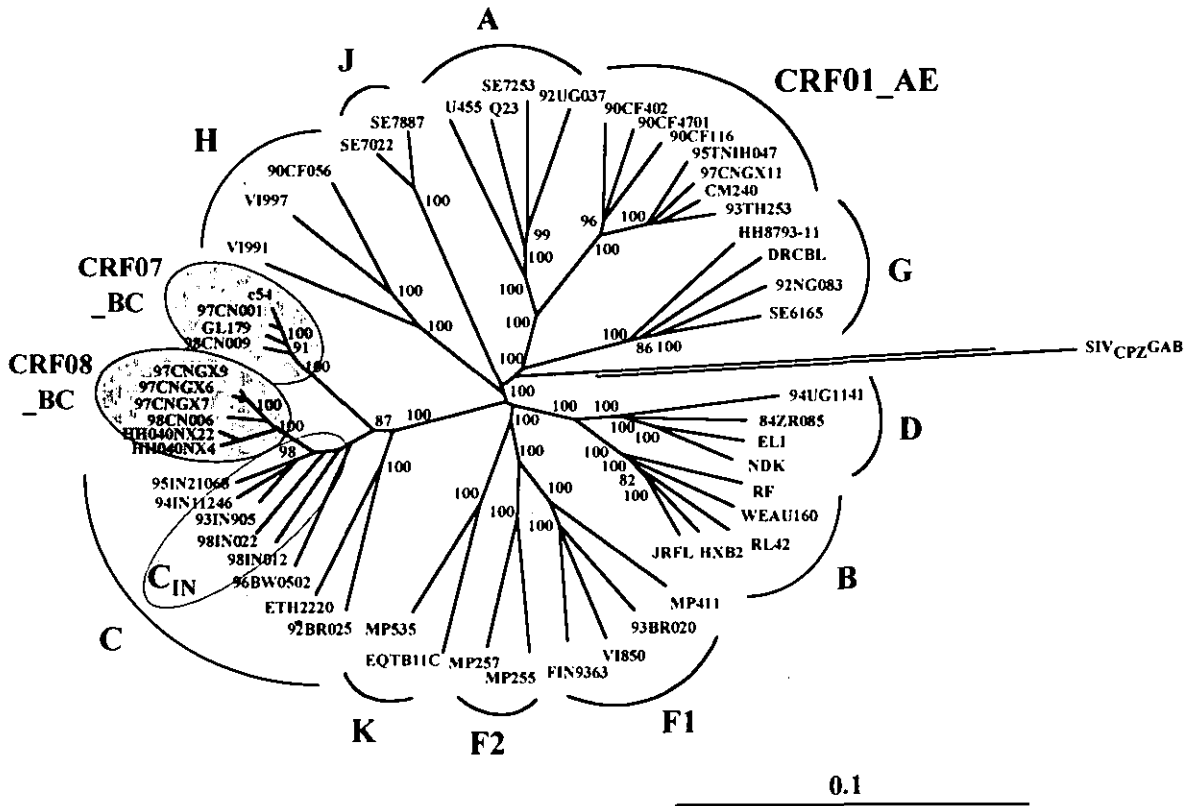


図1：分離株HH040から得られた2つのクローンはいずれもCRF08_BCであった。

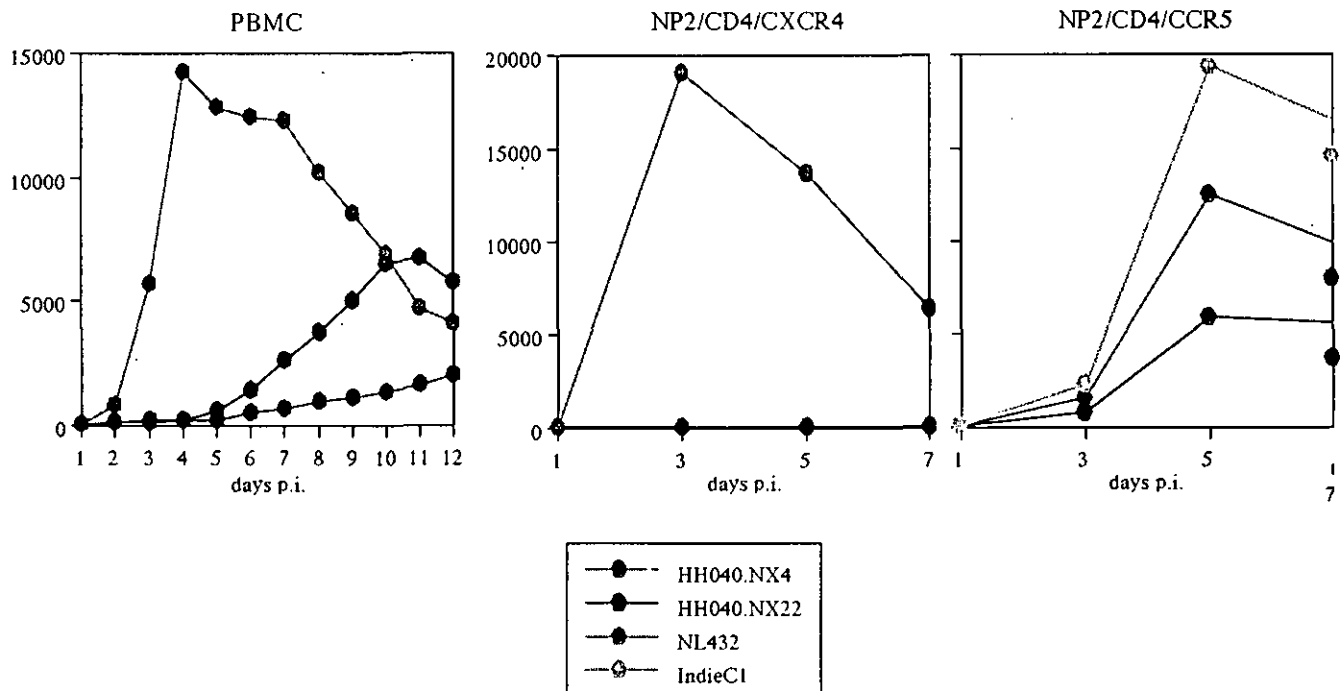


図2：CRF08_BC分離株HH040から、NX4、NX22の2つの感染性分子クローンを得た。NX22はNX4よりPBMCでより増殖が良かったが、CCR5を発現させたNP2/CD4細胞では、NX4の方が強い細胞変性を伴いながらよく増殖した。

```

NX4 1* MRVMGTLRNYPPQWNIWGLGFHMLMNCNVGGNLWVTYYVGPVWKEAKTTLFCASDAKAYETEVHNVWATHACVPTDPNPQEVLENVTENFMKNDMNVNQMHEDVLSLWDESLKPCVK
NX22 1* MRVMGTLRNYPPQWNIWGLGFHMLMNCNVGGNLWVTYYVGPVWKEAKTTLFCASDAKAYETEVHNVWATHACVPTDPNPQEVLENVTENFMKNDMNVNQMHEDVLSLWDESLKPCVK
NX4 121* LTPLCVTLKCGNVNGTYNGAYDESMNEIKNEFENATLLSRKKSYYALFYRLDIVPLDENSGNSSGKNSDYRLINCHNTSAITQACPKYFDPPIHYCAPAGYVILKCNDKMFNGTGO
NX22 121* LTPLCVTLKCGNVNGTYNGAYNESMNEIKNEFENATLLRDKKKTYVALFYRLDIVPLDENSGNSSGKNSSEYRLINCHNTSAITQACPKYFDPPIHYCTPAGYVILKCNDKMFNGTGO
V1 V2
NX4 241* CHNVSTVQCTHGIKPVVSTQLLNGSLAESEVIRSENLTNNVKTIIIVHLNESVEITITRPNNTRKSRIRIGPGQTFYATGDIIGDIRQAHCHNISADRWNETLQWVGKLAERFPNKTIIN
NX22 241* CHNVSTVQCTHGIKPVVSTQLLNGSLAESEVIRSENLTNNVKTIIIVHLNETVEIVITRPNNTRKSRIRIGPGQTFYATGDIIGDIRQAHCHNISADRWNETLQWVGKLAERFPNKTIIN
V3
NX4 361* FTSSSGDLEITTHSFNCRGEFFYCHNTSGLFNGTYNPNITKSDSNSTIITPCLRIKQIVNMMQEVGRAMYAPPIAGNITCRSNITGLLLVRDGGTGPNDTESNKEVFRPGGDMRDNMR
NX22 361* FTSSSGDLEITTHSFNCRGEFFYCHNTSGLFNGTYNPNITKSNSTSATITLPCRIKQIVNMMQEVGRAMYAPPIAGNITCRSNITGLLLVRDGGTGPNDTESNTEVFRPGGDMRDNMR
V4 V5
NX4 481* SELYKYKVEIKPLGVAPTEAKRRVVEREKRVGLGAVFLGFLGAAGSTMGAASTITLVQARQLLSGIVQQSNLLRAIEAQQHMLQLTVWGIKQLQTRVLAIERYLKDQQLLGINGCSG
NX22 481* SELYKYKVEIKPLGVAPTEAKRRVVEREKRVGLGAVFLGFLGAAGSTMGAASTITLVQARQLLSGIVQQSNLLRAIEAQQHMLQLTVWGIKQLQTRVLAIERYLKDQQLLGINGCSG
gp120 gp41
NX4 601* RLICTTAVPMSSWSNKSQHEIWDNMTMWDKEISNYNTIYKLLLEDSONQERNEKDLLALDSWKNLWSWFDITNMLWYIRIFIMVGGIGLRIIFAVLSIVNVRQGYSPLLFQTL
NX22 601* RLICTTAVPMSSWSNKSQHEIWDNMTMWDKEISNYNTIYKLLLEDSONQERNEKDLLALDSWKNLWSWFDITNMLWYIRIFIMVGGIGLRIIFAVLSIVNVRQGYSPLLFQTL
NX4 721* TPNPEGPSRLRRIEEEGGEQKDRSIRLVNGFLALAMDDLRLNCLFSYHRLRDFILLTARGVELLGRNSLRGLQKWEALKYLGSLAQYNGLELKKSTISLVDITAIJVAEGTDWIINIV
NX22 721* TPNPEGPSRLRRIEEEGGEQKDRSIRLVNGFLALAMDDLRLNCLFSYHRLRDFILLTARGVELLGRNSLRGLQKWEALKYLGSLAQYNGLELKKSTISLVDITAIJVAEGTDWIINIV
NX4 841* QRVCRAIRNVPRRIROGFEEAALK
NX22 841* QRVCRAIRNVPRRIROGFEEAALQ

```

図3：envに見られるアミノ酸変異はV1からV5までの領域に散見されたが、V3の塩基配列は一致していた。

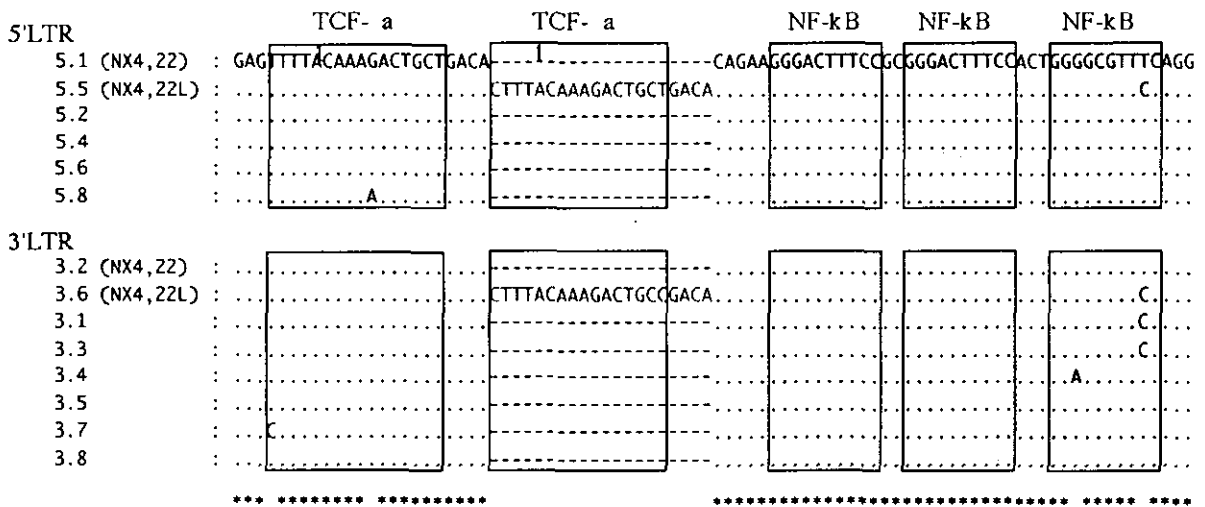


図4：分離株HH040には、TCF-1aサイトが2つあるQuasispeciesが存在した。

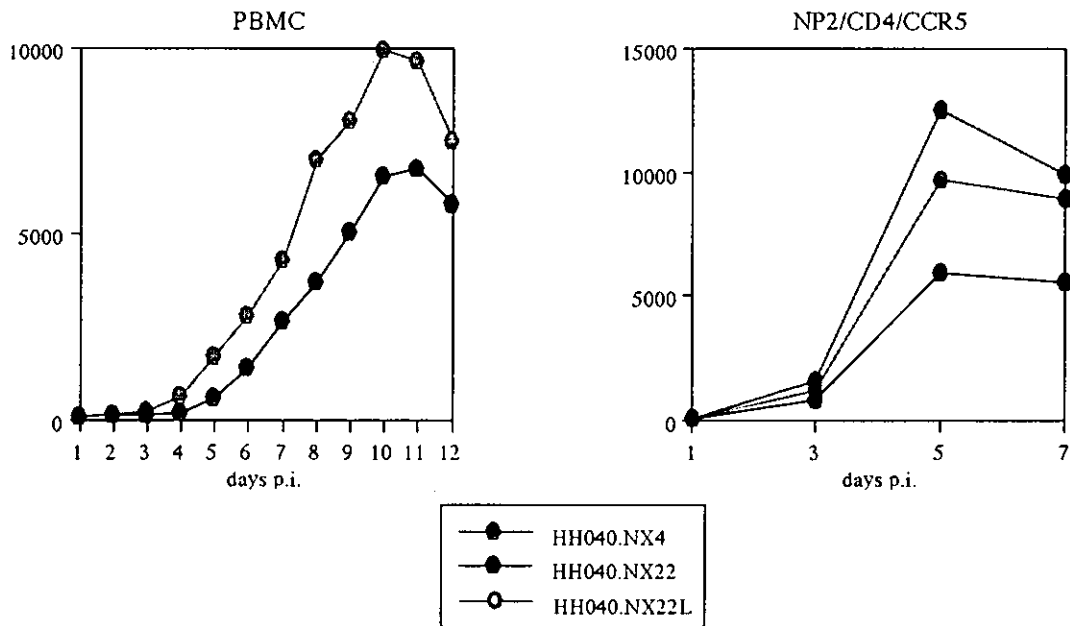


図5：LTRを2つのTCF-1aを持つLTRと置換したクローンNX22Lは、PBMC、NP2/CD4/CCR5細胞のいずれにおいても、もとのクローンNX22より早い kineticsでよく増殖した。

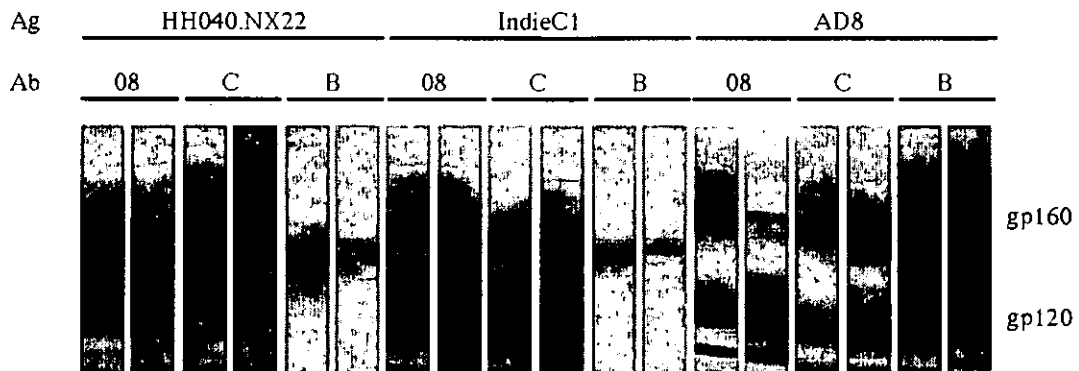


図6：CRF08_BCとサブタイプCのenv蛋白の間には血清学的交差性を認めたが、サブタイプBとの交差性は低かった。

表 1 : NX4-NX22 間のアミノ酸変異を伴う塩基置換が env gp120 領域に集中してみられた。

| 遺伝子 | gag | pol | env | (gp120) | (gp41) |
|----------------------------------|-----------|-----------|------------|------------|-----------|
| 全塩基数 | 1473 | 2997 | 2589 | 1536 | 1053 |
| NX4-NX22 間で異なる塩基 | 13 (0.9%) | 23 (0.8%) | 36 (1.4%) | 31 (2.0%) | 5 (0.5%) |
| 全アミノ酸数 | 491 | 999 | 863 | 512 | 351 |
| NX4-NX22 間で異なるアミノ酸 | 1 (0.2%) | 8 (0.8%) | 22 (2.5%) | 20 (4.0%) | 2 (0.6%) |
| NX4-NX22 間の変異塩基のうちアミノ酸変異に関わる変異塩基 | 3 (23%) | 8 (34.8%) | 29 (80.6%) | 27 (87.1%) | 2 (40.0%) |

(塩基数またはアミノ酸数 / %)

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

平成 15 年度分担研究報告書

研究課題：タイ型 HIV-1 ヴァリアント CRF01_AE の高度薬剤耐性変異に関する分子進化学的解析とそれを用いたレトロウイルス組換え解析系の開発の試み

分担研究者：椎野 禎一郎（国立感染症研究所エイズ研究センター・主任研究官）

研究要旨

我々は、タイに起源をもつ CRF01_AE の国内の家族内感染例 [NH1（父親）→NH2（母親）→NH3（子供）] のうち HAART 中に薬剤耐性の兆候を現した NH3 より、特殊な多剤耐性変異ウイルスを分離した。この多剤耐性は、逆転写酵素のフィンガー領域に起った 11 アミノ酸からなる挿入変異（69Ins）によって引き起こされていることが明らかとなった。NH3 より経時的に採取した検体を用いた逆転写酵素領域の分子進化学的解析から、この高度多剤耐性形質は 69Ins を含むフィンガー領域の変異群（M41L, 69Ins, T69I）とパーム領域の変異群（L210W, T215Y）間の遺伝子組換えによって生まれた可能性がある。

我々は、この高度多剤耐性の表現型を利用してフィンガー領域とパーム領域の間で組換えが生じたウイルスを検出できることに注目し、組換えウイルスのみを選択培養することによって、この領域に生じた交叉の位置を正確にマップするための実験系の開発を目指している。現在までに、L210W, T215Y を持った CRF01_AE 感染性クローンのフィンガーとパーム領域間の約 400 ヌクレオチドの領域に存在する 20 個の制限酵素サイトに、それぞれアミノ酸配列を変えないように変異を導入した変異ウイルスを作成中である。このウイルスと、M41L, 69Ins, T69I を持った CRF01_AE 感染性クローンの共感染によって得られた組換えウイルスを大量に解析することで、HIV-1 の組換えの特性を探る予定である。

A. 研究目的

HIV-1 には、塩基配列によって系統的に分類可能なサブタイプのほかにサブタイプ間の組換えで生じたと思われるウイルスが存在する。こうした組換えウイルスの中には、従来のサブタイプと同様に感染を広げている型（circulating recombinant form: CRF）も見つかっている。特に東南アジアから東アジア地域ではこうした

CRF が疫学的に重要な型となっており、HIV ゲノムが感染過程で組換えを起こす機構に注目が集まっている。最近、武部らはミャンマーや中国雲南省で組換えパターンの大きな多型性を持つ HIV-1 が感染した集団を見出した。こうした多型性は、HIV-1 の組換えがある条件下ではかなりの頻度で生じることを示している。これらのウイルスのゲノム構造には、組換えの際に交叉

が生じるサイトに共通点があるように見える。本研究は、HIV-1 の組換えの起きるゲノム上の位置を遺伝学的に解析し、ウイルスゲノムの組換えの機構を知ることが目的とする。

B. 研究方法

組換えの位置と頻度を遺伝学的に知るためには、ゲノム上に組換えが起こったことを示すマーカー遺伝子を置く必要がある。また、配列レベルでの解析を容易にするためには組換えを観察するゲノム領域は短いほうが良いが、1回の塩基配列解析で解析可能な領域で交叉が起きる確率は、低いことが予測される。そのため、必要に応じて組換えを起こしたウイルスのみを的確に選択できる系が要求される。本研究では、疫学的調査で明確な組換えが観察されている逆転写酵素領域 (RT 領域) に注目し、マーカー遺伝子として制限酵素切断サイトに同義置換変異を導入する。さらに、RT の抗ウイルス剤耐性変異の組み合わせを応用して、400bp 弱の領域に組換えが生じた時のみ次代のウイルスが採取できるような系を構築する。こうした組換え HIV-1 を用いて、さまざまな条件下での組換えのパターンを観察する。

実験に利用するウイルス株は、佐藤らによって作成された CRF01_AE の感染性クローン (93JP-NH1) を改変したものをを用いた。我々は、このクローンと同系統のウイルス株に感染し抗ウイルス剤療法を受けた感染者 (NH3) の血液検体の提供を受け、その RT 領域の変異を塩基配列と薬剤耐性の両面から観察した。薬剤治療後の検体にある耐性ウイルス株は、佐藤らによって報告された活性部位の大きな挿入配列と点突然変異 (M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y) によって、複数の NRTI に対して高い耐性を獲得している。多重薬剤に対する高耐性を発現するためには、これらの変異のすべてがそ

ろう必要がある。挿入配列 Ins69 は、多剤耐性を得るために M41L, T69I, L210W, T215Y を必要とするが、そのうち M41L, T69I は挿入部位の比較的近傍に存在する。一方で L210W, T215Y との間には約 400bp の配列が横たわっている。したがって、M41L, Ins69, T69I のみを持つウイルス株と、L210W, T215Y のみをもつウイルス株を作成し、両者を複数の NRTI 存在下で共感染させれば、これらの突然変異のおよそ 400bp の間に組換えが生じるか、または複数の点突然変異が生じた場合のみ、感染が成立する。組換えと新たな点突然変異を区別するために、これらのウイルス株では、K70R の 30bp 下流と L210W の 7bp 上流に存在する SacI の切断部位を同義置換で切断不能に改変した。さらに、L210W, T215Y を持つクローンを元に、400bp の中間部に存在し同義置換での改変が可能な 17 箇所の制限酵素切断部位をすべて改変したウイルスを作成した (図 1)。これらのウイルスを用いて、組換え交配実験を行う。

C. 研究結果

NH3 の経時採取検体の塩基配列解析 (図 2) は、多剤薬剤耐性ウイルスの出現以前に、既知の耐性変異を持つ一連のウイルスが存在していたことを示唆している。特に、挿入配列 (Ins69) と M41L, T69I を持つウイルスと、L210W, T215Y を持つウイルスはいずれも PBMC 中にその痕跡を認めることができる。こうしたウイルスが共感染することによって、多剤耐性変異株が発生した可能性が高い。

感染者 NH3 の血清中および PBMC より見出された RT 領域の塩基配列を元に、NH3 に存在した耐性変異の組み合わせを持つ 9 種類の 93JP-NH1 変異株を作成した。これらのウイルスの NRTI に対する耐性を MAGIC5 への感染性を用いて調べた結果、点突然変異は単独で AZT と 3TC

への耐性獲得に効果があること、挿入変異は点突然変異の存在するウイルスにおいて耐性を若干上昇させることがわかった（表 1）。前半の変異（M41L, D67N, 挿入配列, T69I）を持つウイルスと、後半の変異（L210W, T215Y）を持つウイルスは、いずれも AZT には野生型の約 6 倍、3TC は 3~4 倍、ddl は約 3 倍の耐性を示した。また、41L・挿入変異・69I・210W・215Y の 5 つの変異を持つ場合には、AZT, 3TC への極めて高い耐性が発現され、同時に d4T, ddl, ddC への耐性が獲得されることがわかった。

41L・挿入変異・69I の 3 つの NRTI 耐性変異と直後の Sacl サイトの欠失変異を持つ変異クローンと、210W・215Y の 2 つの NRTI 耐性変異と直前の Sacl サイトの欠失変異を持つ変異クローンを作成し、感染性のあるウイルスが得られることを確認した。現在、後者のクローンを元に 17 箇所の制限酵素切断部位を欠失したウイルスの作成に取り掛かっている。

1. D. 考察

組換え交配実験の親株とする予定のウイルスの薬剤耐性は、AZT, 3TC, ddl で野生型より高い耐性を示しているが、すべての変異がそろったウイルスに比べるとその耐性は明らかに低い。また、すべての変異がそろったウイルスは、d4T や ddC に対しても耐性を示す。したがって、複数の NRTI の濃度を注意深く設定することで、400bp の中間配列に組換えの生じたウイルスのみを効率的に選択することが可能と思われる。一方、こうした耐性は親株に少数の点突然変異が加わることでも獲得可能かもしれない。しかし、すべての NRTI に対する耐性を点突然変異のみで獲得するためには、多くの塩基置換が起こる必要がある。したがって、多剤薬剤耐性を選択の指標とすれば、点突然変異による残存ウイルスを除ける可能性が高い。さらに本実験では、

耐性変異の近傍に野生型にはない Sacl サイトの欠失変異を設けているため、これを用いた選択を併用することで、点突然変異と組換えウイルスを区別することが可能である。このシステムを完成させ、組換えの生じる位置の詳細なマッピングを行いたい。

E. 結論

感染者 NH3 の体内には、過去に HAART 中に蓄積した点突然変異や単独の挿入変異を持つ耐性ウイルスが数種類存在していた。これらの変異ウイルスで組換えが生じることによりフィンガー側の変異（M41L, 挿入配列, T69I）とパーム側の変異（L210W, T215Y）を持つ多剤耐性ウイルスが生まれた可能性がある。フィンガー側の変異またはパーム側の変異のみを持つウイルスは、両方の変異を併せ持つウイルスに比べて明らかに薬剤感受性が高い。この感受性の差は、選択実験に利用できると思われる。41L・挿入変異・69I の 3 つの NRTI 耐性変異と直後の Sacl サイトの欠失変異を持つ変異クローンと、210W・215Y の 2 つの NRTI 耐性変異と直前の Sacl サイトの欠失変異を持つ変異クローンは、すでに感染性のあるウイルスが得られている。現在、さらにマーカーを増やしたウイルスを作成中である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Figure 1. Fine mapping of breakpoints of the viral recombination

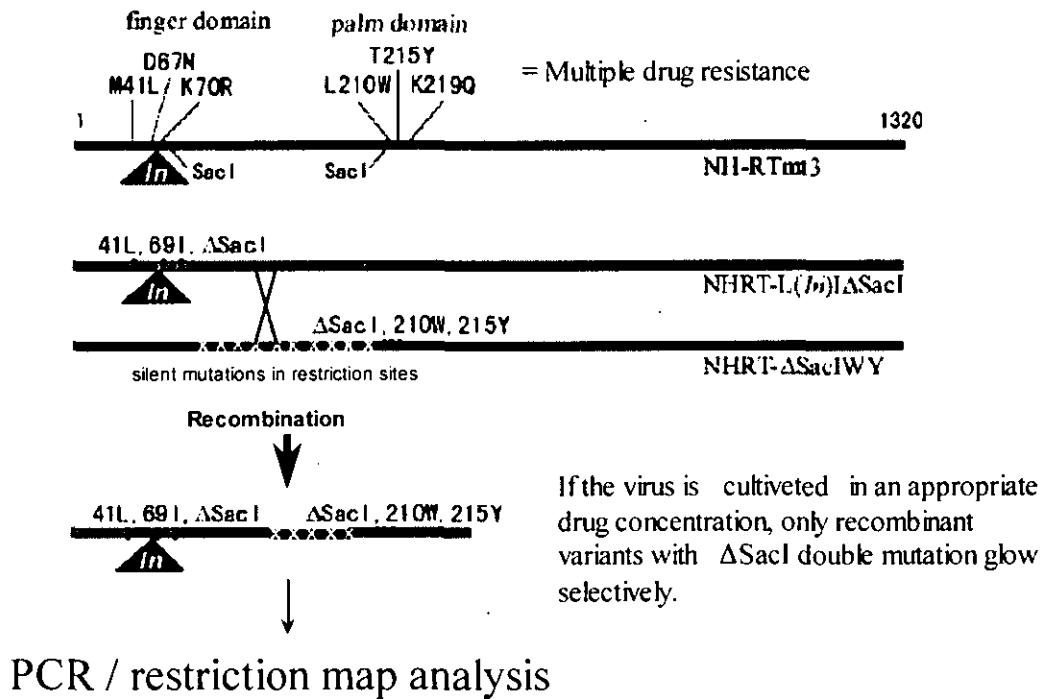


Figure 2. Phylogenetic relationship of RT gene in NH3

