

から3番目)に位置していた。

TAMRAプローブ、MGBプローブともにほぼ同様の測定値が得られた10検体のプローブ領域には、SK102プローブの塩基配列との違いはほとんど認められなかった(0-1個)。しかし、MGBプローブでの測定値が3倍以上高値であったY187とY115には、プローブ領域に2-3塩基のミスマッチが認められた。しかも、Y187には3'末端から3番目の塩基にミスマッチが(SK102ではT、Y187ではC)、Y115ではこの3'末端側のミスマッチに加え、5'末端から3番目の塩基にミスマッチ(SK102ではC、Y115ではT)が存在した(図4)。

Y197、Y187、GM910-22、GM1123の4検体のReal Time PCR法での測定値を、ポアソン分布法により算出したコピー数と比較した(表3)。Y197、GM910-22、GM1123の3検体はTAMRAプローブおよびMGBプローブともにほぼ同様の測定値であり、ポアソン分布法での計算値とも非常によく一致していた。

ところが、Y187ではMGBプローブでの測定値がTAMRAプローブでの測定値より3.43倍高く、MGBプローブでの測定値がポアソン分布法による計算値により近い値であった。

D. 考察および結語

各種HIV-1サブタイプに対応できるプロウイルスHIV-1の定量法を開発するため、TaqManプローブ(TAMRAプローブ、MGBプローブ)を用いたReal time PCR法の検討を行った。

12検体中10検体はTAMRAプローブ、MGBプローブともほぼ同様の定量値が得られた。しかし、Y165(サブタイプA)の1検体は2つのTaqManプローブでの測定値が、培養上清中のp24抗原量に比べて著しく低い値を示した。この検体のプライマーおよびプローブ領域の塩基配列を確認したところ、forwardプライマー領域の塩基配列に4箇所のミスマッ

チが存在していた。また、4箇所の内1箇所は、3'末端から3番目の塩基のミスマッチ(SK145ではA、Y165ではG)であり、この塩基の違いが定量結果に大きな影響を与えたと考えられた。

MGBプローブでの測定値がTAMRAプローブでの測定値より3倍以上高値となったY187とY115には、プローブ領域に2-3箇所のミスマッチが存在した。これら2検体はいずれも3'末端から3番目の塩基にミスマッチが(SK102ではT、Y187、Y115ともC)存在した。Y115ではこの3'末端側のミスマッチに加え、さらに5'末端から3番目の塩基にもミスマッチ(SK102ではC、Y115ではT)が存在した。

TaqManプローブは5'末端を蛍光物質で、3'末端をクエンチャー物質で修飾したオリゴヌクレオチドである。TaqMan PCRではアニリングステップでTaqManプローブが鋳型DNAにハイブリダイズし、伸長反応ステップでTaq DNAポリメラーゼの5'→3'エキソヌクレアーゼ活性により、ハイブリダイズしたTaqManプローブが分解される(図6)。TaqManプローブが分解されると、蛍光色素が遊離し、クエンチャーによる抑制が解除され蛍光が発せられるようになる。しかし、プローブ領域に塩基のミスマッチが多いとTaqManプローブの分解が阻害される。特に5'末側や3'末側のミスマッチは影響が大きい。

MGBプローブにおいてMGBはダブルストランドDNAの中に入り込んでプローブと鋳型DNAの結合をより強固なものにしている。プローブ領域に多少のミスマッチが存在しても、MGBがプローブの結合を強固にすることによって、プローブ領域のミスマッチの影響が小さくなり、その結果より正確な測定値が得られたと考えられた。

TaqManプローブ法の測定値とポアソン分布法による計算値の結果を比較した結果、MGB

プローブでの測定値はポアソン分布法での計算値とよく一致していた。HIV-1 は変異の多いウイルスであるため、HIV-1 プロウイルスの定量に MGB プローブを用いた TaqMan PCR 法は有用であると考えられた。

しかしながら、本法で用いた forward プライマー SK145 は、サブタイプ A、Y165 の塩基配列が 4 箇所異なっており、その結果、著しく低い測定値を示した。また、サブタイプ A/E の Y191 でも SK145 領域の 5 箇所に複数の塩基が混在しており、測定値が実際より低い可能性も考えられる。forward プライマーについては多種類のサブタイプに対応できるプライマーを作製する必要があると考えられた。

E. 研究発表 論文発表

1. Kondo, M., Shima, T., Nishizawa, M., Sudo, K., Iwamuro, S., Okabe, T., Takebe, U., and Imai, M. Identification of attenuated variants of HIV-1 circulating recombinant form 01_AE that are associated with slow disease progression due to gross genetic alterations in the nef/long terminal repeat sequences. J. Infect. Dis. in press.

学会発表

1. Kondo M., Shima T., Sudo K., Imai M. et al: Epidemiological and molecular characteristics of HIV infection in Uzbekistan, the XV International AIDS Conference (11-16 July 2004, Bangkok)
2. 近藤真規子, 嶋貴子, 武部豊, 今井光信: nef/LTR 欠損 HIV-1 変異株の遺伝子解析について、第 52 回日本ウイルス学会学術集会 (2004 年 11 月 21-23 日、横浜)
3. 近藤真規子, 嶋貴子, 須藤弘二, 足立拓也, 相楽裕子, 岩室紳也, 伊藤章, 今井

光信: HIV 感染者における nef 欠損 HIV-1 変異株について、第 18 回日本エイズ学会学術集会 (2004 年 12 月 9-11 日、静岡)

4. 須藤弘二, 嶋貴子, 近藤真規子, 古谷茂之, 瀬尾麻美, 加藤真吾, 今井光信: HIV RNA 測定キット COBAS TaqMan HIV-1 Test 「マニュアル」の基礎的検討、第 18 回日本エイズ学会学術集会 (2004 年 12 月 9-11 日、静岡)
5. 向出雅一, 加藤真吾, 田中理恵, 近藤真規子, 嶋貴子, 須藤弘二, 武部豊, 今井光信: LTR, gag, pol 領域を用いた HIV-1 プロウイルス定量法に関する検討、第 18 回日本エイズ学会学術集会 (2004 年 12 月 9-11 日、静岡)
6. 菊池嘉, 福武勝幸, 天野景裕, 白阪琢磨, 山本善彦, 今井光信, 近藤真規子, 林邦彦, 古谷茂之, 木村哲, 岡慎一: リアルタイム PCR 法による HIV-1 RNA 定量キット COBAS TaqMan HIV-1 Test (High Pure System) の検討、第 18 回日本エイズ学会学術集会 (2004 年 12 月 9-11 日、静岡)

F. その他 特許出願

1. 発明の名称: 「弱毒型 HIV-1 塩基配列」、
発明者: 近藤真規子, 今井光信, 武部豊、
出願年月日: 平成 17 年 1 月 17 日、出願
番号: 特願 2005-008741

図1 The Strategy for Real-Time PCR Amplification

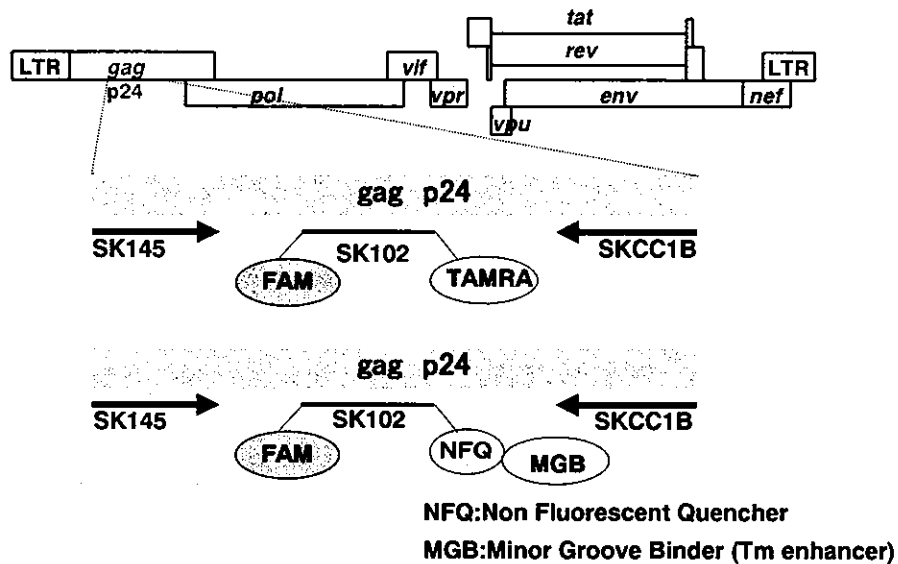


表1 検討に用いたサンプル
(サブタイプB 6株、A/E 2株、他4株)

分離培養株 (培養PBMC)	HIV-1サブタイプ [gag p17-p24 env C2V3]	上清中p24* (pg/ml)
Y197	B	850
Y187	B	34,000
GM910-22	B	7,600
Y160	B	15,000
Y164	B	290,000
Y198	B	320,000
GM1123	A/E	250,000
Y191	A/E	180,000
Y165	A	17,000
Y30	C	24,000
GM652-5	F	36,000
Y115	G	44,000

*VIDAS DUO

表2 HIV-1プロウイルス定量結果(1)

分離培養株 (培養PBMC)	サブタイプ	上清中p24* (pg/ml)	HIV-1プロウイルス		MGB測定値
			TAMRA (コピー/1ugDNA)	MGB	TAMRA測定値
Y197	B	850	86	110	1.28
Y187	B	34,000	2,300	7,900	3.43
GM910-22	B	7,600	710	1,200	1.69
Y160	B	15,000	2,100	2,600	1.23
Y164	B	290,000	520,000	470,000	0.90
Y198	B	320,000	560,000	730,000	1.30
GM1123	A/E	250,000	420,000	490,000	1.17
Y191	A/E	180,000	120,000	110,000	0.92
Y165	A	17,000	270	180	0.67
Y30	C	24,000	130,000	150,000	1.13
GM652-5	F	36,000	260,000	300,000	1.15
Y115	G	44,000	2,300	16,000	6.96

*VIDAS DUO

図2 forward primer領域塩基配列の比較

Primer:SK145 5'- AGT GGGGGG GACA TCA AGC AGC CAT GCA AAT -3'
(forward)

B	Y197	5'-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-3'
B	Y187	5'-	-----	-----	-----	-----	T-----	-----	-3'
B	GM910-22	5'-	---R---	-----	Y-----	-----	R-----	-----	-3'
B	Y160	5'-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-3'
B	Y164	5'-	-----	-----	C-----	-----	-----	-----	-3'
B	Y198	5'-	-----	-----	-----	-----	-----	T-----	-3'
A/E	GM1123	5'-	-----	-----	C--G--	-----	-----	-----	-3'
A/E	Y191	5'-	-----	RW--	Y--R--	-----	-----	W-----	-3'
A	Y165	5'-	-----	-----	C--G--	-----	A-----	G-----	-3'
C	Y30	5'-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-3'
F	GM652-5	5'-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-3'
G	Y115	5'-	-----	-----	-----	-----	-----	T-----	-3'

図3 reverse primer領域塩基配列の比較

Primer: SKCC1B 5'- TACT AGT AGTT CCT GCTAT GTCACT T CC -3'
(reverse)

B	Y197	5'	-----	-3'
B	Y187	5'	-----G-----	-3'
B	GM910-22	5'	----K-----Y-----	-3'
B	Y160	5'	-----Y-----	-3'
B	Y164	5'	-----	-3'
B	Y198	5'	-----	-3'
A/E	GM1123	5'	-----	-3'
A/E	Y191	5'	-----	-3'
A	Y165	5'	-----	-3'
C	Y30	5'	-----R-----	-3'
F	GM652-5	5'	-----A-----	-3'
G	Y115	5'	-----A-----	-3'

図4 Probe領域塩基配列の比較

Probe: SK102 5'- ATCAA TGAGGAAGCTGC AGAAT GGGATAG -3'

B	Y197	5'	-----	-3'
B	Y187	5'	-----G-----C-----	-3'
B	GM910-22	5'	-----Y-----	-3'
B	Y160	5'	-----R-----	-3'
B	Y164	5'	-----	-3'
B	Y198	5'	-----R-----	-3'
A/E	GM1123	5'	-----	-3'
A/E	Y191	5'	-----	-3'
A	Y165	5'	-----T-----C-----	-3'
C	Y30	5'	-----	-3'
F	GM652-5	5'	-----C-----	-3'
G	Y115	5'	---T-----G-----C-----	-3'

図5 Primer, Probe領域の塩基配列の比較 (Y187,Y115,Y165)

Primer: SK145 (forward) 5'- AGTGGGGGGACA T CA A GCAGC C ATGCA A AT -3'

B Y187 5'- AGTGGGGGGACA T CA A GCAGC T ATGCA A AT -3'

G Y115 5'- AGTGGGGGGACA T CA A GCAGC T ATGCA A AT -3'

A Y165 5'- AGTGGGGGGACA C CA G GCAGCA ATGCA G AT -3'

Primer: SKCC1B (reverse) 5'- TACTAGT A GTTCCTGCTAT G TCACTTCC -3'

B Y187 5'- TACTAGT G GTTCCTGCTAT G TCACTTCC -3'

G Y115 5'- TACTAGT A GTTCCTGCTAT A TCACTTCC -3'

A Y165 5'- TACTAGT A GTTCCTGCTAT G TCACTTCC -3'

Probe: SK102 5'- AT C AATGA G GAAGC T GCAGA A TGGGA T AG -3'

B Y187 5'- AT C AATGA G GAAGC G GCAGA A TGGGA C AG -3'

G Y115 5'- AT T AATGA G GAAGC T GCAGA G TGGGA C AG -3'

A Y165 5'- AT C AATGA T GAAGC T GCAGA A TGGGA C AG -3'

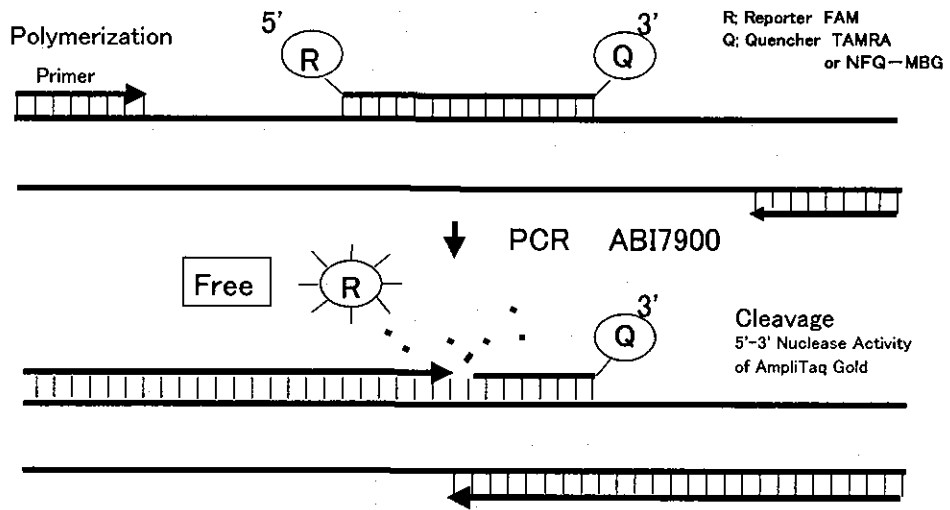
表3 HIV-1プロウイルス定量結果 (2)

—Real Time PCRの定量値とポアソン分布法による定量値の比較—

分離培養株 (培養PBMC)	サブタイプ	上清中p24* (pg/ml)	HIV-1プロウイルス		ポアソン分布 (コピ- /1ugDNA)
			TAMRA (コピ- /1ugDNA)	MGB	
Y197	B	850	86	110	160
Y187	B	34,000	2,300	7,900	36,000
GM910-22	B	7,600	710	1,200	2,300
GM1123	A/E	250,000	420,000	490,000	1,200,000

*VIDA S DUO

図6 Real-Time PCR (Taq Man PCR) の原理



B-5. LTR、gag、pol 領域を用いた HIV-1 プロウイルス定量法の検討

研究協力者 向出雅一（神奈川県衛生研究所、SRL, Inc.）
田中理恵（慶応義塾大学医学部）須藤弘二（神奈川県衛生研究所）
分担研究者 加藤真吾（慶応義塾大学医学部）、
近藤真規子、今井光信（神奈川県衛生研究所）

研究概要

HIV-1 プロウイルス (DNA) 定量法には、Real-time 法を用いた多くの方法が試みられているが、測定に用いる遺伝子領域や、遺伝子型によって測定値に違いがあり、未だ確立された方法はない。そこで、比較的保存性の高い LTR、gag、pol の 3 領域を用い、日本に多い遺伝子型 B と AE 型での定量法の確立を行った。標準物質として HIV-1 DNA クローン pNL432 の希釈サンプルを用い、スタンダードカーブより HIV-1 DNA 定量を行った。標準物質のコピー数の算出は、終点まで希釈を行ったサンプル DNA を用い、nested PCR 法を 20 回行い、陰性反応の割合 $P(0)$ をポアソン分布式 $m = -\ln P(0)$ により 1 反応あたりに含まれる平均コピー数 (m) として算出した。LTR、gag、pol 領域それぞれに HIV-1 DNA 定量法を real-time PCR 法により設計し、標準物質としてポアソン分布にて定量を行った HIV-1 DNA クローン pNL432 と臨床分離株を用い、その測定精度の検討を行った結果、測定領域間の定量値の違い、増幅効率などから gag 領域が最も良好な結果となった。今後、国立感染症研究所、各地衛生研究所、拠点病院と民間が一体となり、全国どこからでも受託可能な精度の高い HIV-1 DNA 定量検査を提供することで、各地で増加しつつある HIV-1 感染者のより効果的なケア・治療が確実に実施できる検査体制を構築する。

目的

近年、強力な HAART 療法に伴い、HIV-1 感染者の治療法は大きく進展しつつある。一方、その効果的なケア・治療法のためには、既存の各種 HIV 検査と共に、あらたな検査法が必要となっている。HIV-1 プロウイルス (DNA) 量は、逆転写酵素阻害薬 (RT 阻害薬) やプロテアーゼ阻害薬を用いた、強力な多剤併用療法 (HAART) 下、血中 HIV-1 RNA 量が検出限界未満となっても PBMC 中に検出され (図 1)、HIV-1 が潜伏感染し、複製 (図 2) を持続する寿命の長いメモリー T 細胞数に相当すると考えられている。そのため、HIV-1 DNA 量は、長期的治療効果や、サルベージ療法の効果判定に有用な指標として注目されている。

HIV-1 DNA 定量法には、real-time 法を用いた多くの方法が試みられているが、測定に用いる遺伝子領域や、遺伝子型によって測定値に違いがあり、いまだ確立された方法はない。本研究の目的は、比較的保存性の高い LTR、gag、pol の 3 領域を用い、日本に多い遺伝子型 B と AE 型での HIV-1 DNA 定量法の確立を行い、その中でもっとも精度性能の高い測定法を用いて全国規模の検査受託体制の構築を行うことにある。

方法

PBMC からの DNA の抽出は、QIAmp DNA Mini kit (キアゲン) を用いて精製を行った。HIV-1 DNA の定量には、500ng の DNA を用いた。LTR、gag、pol 領域それぞれの相同性解析によっ

て、もっとも保存性が高く、real-time 法で最適な primer と TaqMan[®]MGB-probe を設定し、各領域に独自の HIV-1 DNA 定量法を構築した (図 3)。定量装置は ABI7900HT (AB 社) を用いた。

標準物質として HIV-1 DNA クローン pNL432 の希釈サンプルを用い、スタンダードカーブより HIV-1 DNA 定量を行った。

標準物質および臨床分離株のコピー数の算出は、終点まで希釈を行った DNA サンプルを用い、nested PCR 法で 20 回検出を行い、陰性反応の割合 $P(0)$ をポアゾン分布式 $m = -\ln P(0)$ により 1 反応あたりに含まれる平均コピー数 (m) として算出した。

結果

標準物質としてポアゾン分布にてコピー数を算出した HIV-1 DNA クローン pNL432 を用い HIV-1 DNA 定量を行った結果、増幅レンジ 5~625copies/0.5 μ g DNA で、LTR、gag、pol 各領域それぞれに設定した HIV-1 DNA 定量系で、それぞれ良好な測定直線性、増幅効率を得た (図 4)。臨床分離株 (図 5) を用いた実験では、測定条件や測定領域によって HIV-1 DNA 定量値が異なる結果となる場合があった。ポアゾン分布による測定結果との比較、測定内変動係数などから gag 領域が、最も良好な結果となった (図 6)。臨床サンプルを用いた結果から LTR、pol 領域の定量は難しく、この領域での測定値の解釈には注意が必要と考えられた。

今後、国立感染症研究所、各地衛生研究所、拠点病院と民間が一体となり、全国どこからでも受託可能で精度の高い、HIV-1 DNA 定量検査を提供することで、各地で増加しつつある HIV-1 感染者の効果的なケア・治療を確実に実施できる検査体制を構築する。

学会発表

1、LTR、gag、pol 領域を用いた HIV-1 プロウイルス定量法に関する検討。向出雅一、加藤真吾、田中理恵、近藤真規子、嶋貴子、須藤弘二、武部豊、今井光信。第 18 回日本エイズ学会総会 (平成 16 年 12 月-2004)

図1. HIV-1のウイルス量と治療

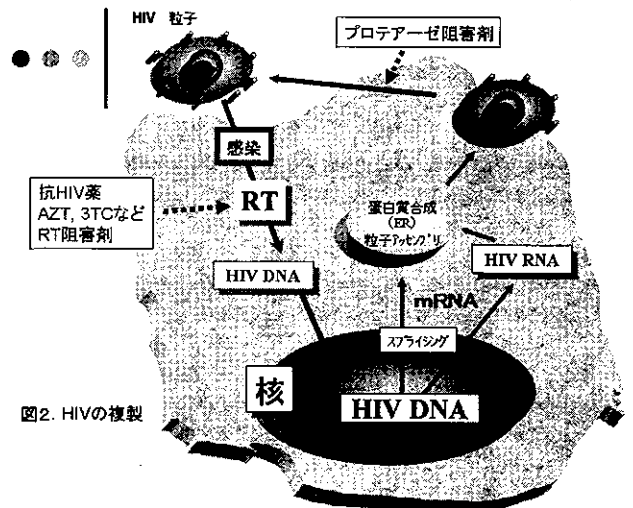
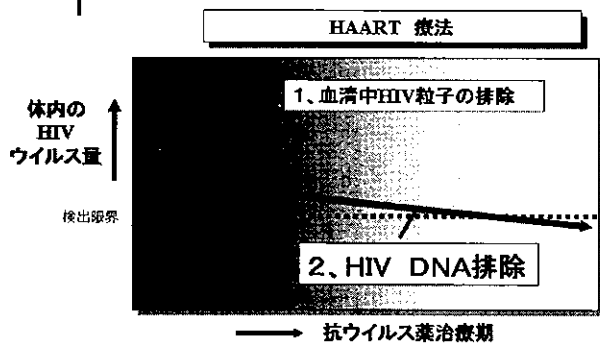
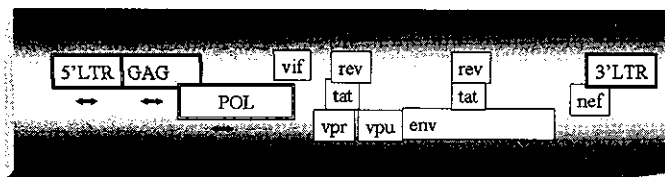


図2. HIVの複製

図3. HIV-ゲノムとRTD-PCRでのプライマーとプローブの位置



プライマーおよびプローブは、HIV Sequence Databaseを用い相同性の高い領域を検索し、さらにprimer express(AB社)を用いて設計した。

図4. pNL42の増幅効率

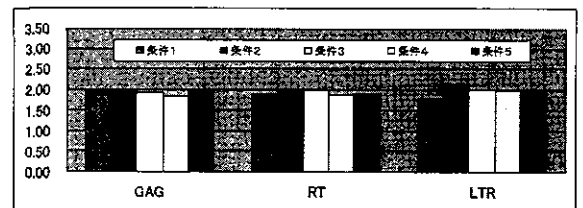
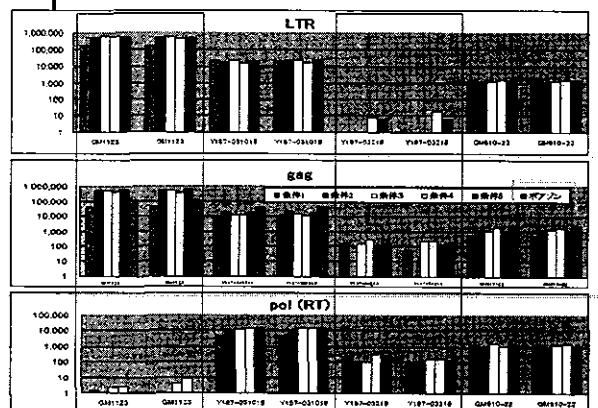


図5. 臨床分離株

	サブタイプ	検出材料	培養期間	感染時 PEMAC数	回収時PEMAC 数	細胞培養時 上清中p24 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
GM1123	E	培養PBMC	7日	1×10^7	1.3×10^7	282793
Y197-031018	B	培養PBMC	7日	1×10^7	1.9×10^7	33940
Y197-031218	B	培養PBMC	7日	1×10^7	1.8×10^7	846
GM910-22	B	培養PBMC	7日	1×10^7	1.9×10^7	7870

図6. 臨床分離株を用いた測定結果



B-6. HIV-1 の多様性に関する研究

—カメルーン（ピグミー族、バンツー族）の HIV-1 遺伝子の解析—

市村 宏 （金沢大学大学院医学系研究科ウイルス感染症制御学）

研究概要

ヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1) の動物 (チンパンジー) からヒトへの感染経路を調べるために、南部カメルーンにおいてピグミー族の狩猟採集生活者 449 人から 3 株と近隣のバンツー族 169 人から 7 株の HIV-1 を分離した。Pol-integrase 領域と env-C2V3 領域の塩基配列を基にした分子系統解析から、ピグミー族から分離された株は CRF02_AG/CRF02_AG, subtype G/CRF02_AG (pol/env) と CRF11_cpx/CRF11_cpx 各 1 株であること、そしてバンツー族から分離された株は CRF02_AG/CRF02_AG 2 株、CRF02_AG/CRF01_AE/A 1 株、CRF02_AG/subtype A 1 株、subtype G/A 1 株、subtype G/CRF02_AG 1 株と unclassified/subtype H 1 株であることが明らかとなった。CRF02_AG と CRF11_cpx は比較的最近カメルーンで同定された CRF (circulating recombinant form) である。これらの結果は、HIV-1 はヒト以外の霊長類 (チンパンジー) から直接狩猟民族であるピグミー族に入ってきたものではなく、近隣のバンツー族を介して入ってきたことを示唆している。

目的

チンパンジーの持つサル免疫不全ウイルス (SIVcpz) は少なくとも 3 回人類に導入され、それぞれヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1) グループ M, N と O になったことがこれまでの研究で明らかにされている。種を超えた SIVcpz の感染は、ヒトが中央アフリカでチンパンジーを狩りし、その肉を解体する時に SIVcpz に感染したチンパンジーの血液に暴露されることで起ったと現在では考えられている。ピグミー族は中央アフリカにおける最も古い民族の一つでありこの地に 2 万年以上生活しているが、野生の猟獣を狩りし、その肉を解体することでサル類と非常に密接な接触を保っている。ピグミー族における HIV-1 の抗体保有率は低いように思われるが、ピグミー族は非常に多様性のあるヒト T リンパ球指向性ウイルス 1 型 (HTLV-1) に感染していることが報告されている。この多様性のある

HTLV-1 株は、チンパンジーの持つサル T リンパ球指向性ウイルス 1 型 (STLV-1) に類似しており、近隣のバンツー族に広がっている。また、ガボンのピグミー族は HTLV-1 サブタイプ D に感染しており、この HTLV-1 サブタイプ D はピグミーと同じ森に住むマンドリルのもつ STLV-1 と実質上区別が不可能であることが報告されている。

非常に多様性のある HIV-1 株 (または SIV 関連株) がピグミー族に存在するのかどうか、そしてその多様性のある HIV-1 が近隣のバンツー族に広がっているのかどうかを明らかにするために、今回、カメルーン南部のピグミー族と近隣のバンツー族から HIV-1 株を分離し、分子系統学的に解析を行った。

対象と方法

倫理委員会の承認とインフォームドコンセントを得た後、カメルーン南部の 10 の田舎

村において、ピグミー族449人（男性219人、女性230人；平均年齢44±2歳）とバンツ族169人（男性72人、女性97人；平均年齢49±6歳）から血液検体を採取した。これらの血液検体から血漿と単核球を分離し、-80℃に保存した。血漿検体を用いて血中抗HIV抗体を微粒子酵素抗体法（AxSYM HIV-1/2、アボットジャパン）とイムノクロマトグラフィー法（Determine HIV-1/2、アボットジャパン）にて調べた。

DNA抽出キット（Qiagen）を用いてゲノムDNAを末梢血単核球から抽出した。インテグラーゼ遺伝子を含むpol領域の一部（約288bp）とV3ループを含むenv領域の一部（約550bp）をnested PCRを用いて増幅した。プライマーは、一回目のPCR用に、それぞれ unipol 5（5'-TGGGTACCAGCACACAAAGGAATAGGAGGAAA-3'）/unipol 6（5'-CCACAGCTGATCTCTGGCCTTCTCTGTAATAGACC-3'）と M5（5'-CCAATTCACATACATTATTGTGCCCCAGCTGG-3'）/M10（5'-CCAATTGTCCCTCATATCTCCTCCTCCAGG-3'）を用い、二回目のPCR用に、それぞれ unipol 1（5'-AGTGGATTCATAGAAAGCAGAAGT-3'）/unipol 2（5'-CCCCTATTCCTTCCCCTTCTTTAAAA-3'）と M3（5'-GTCAGCACAGTACAATGACACATGG-3'）/M8（5'-TCCTGGATGGGAGGGGCATACATTGC-3'）を用いた。DNAの増幅は、95℃10分間を1サイクル、95℃30秒間/45℃（pol領域）または55℃（env領域）30秒間/72℃1分間を35サイクル、72℃10分間を1サイクルで行った。増幅したDNA産物を1.5%アガロースゲル電気泳動した後、エチジウムブルマイド染色し、観察した。増幅したDNA断片をTAクローニングしたのち、ジデオキシ法を用いて塩基配列を決定した。コンセンサス塩基配列を得るためと、重感染の可能性を調べるために、1検体当たり最低5プラスミドクローンの塩基配列を決定した。新たに得られた塩基配列は、Los Alamos データベースの各サブタイプ参照塩

基配列とともに CLUSTAL W (version 1.81) を用いてアラインメントを行った。分子系統樹は近隣接合法を用いて作成し、bootstrap 検定を行った後、TreeViewPPC1.65により視覚化した。

結果

ピグミー族449人中3人（0.7%）がHIV-1抗体とPCRが陽性であった。一方、バンツ族169人中10人（6.0%）がHIV-1抗体陽性であったが、7人のみがPCR陽性であった。HIV-1陽性者の特徴は表1に示した。

Env-C2V3領域とpol-integrase領域の塩基配列を基にした分子系統樹をそれぞれの代表的なサブタイプとCRFとともに作成した（図1AとB）。ピグミー族から分離されたHIV-1株は、CRF02_AG/CRF02_AG, subtype G/CRF02_AG (pol/env)とCRF11_cpx/CRF11_cpx各1株であった。また、バンツ族から分離されたHIV-1株は、CRF02_AG/CRF02_AG 2株、CRF02_AG/CRF01_AE/A 1株、CRF02_AG/subtype A 1株、subtype G/A 1株、subtype G/CRF02_AG 1株と unclassified/subtype H 1株であった（表1）。

env-C2V3領域を基にした分子系統解析により、検体01CM2534が疫学的に無関係な研究由来の他のカメルーン検体CMR53122と有意にクラスターを形成することが明らかとなった（ブートストラップ値98%）。これらのウイルス株はCRF01_AEとsubtype Aとの第二世代の組み替え体である可能性を表しているのかもしれない。01CM2566株は、pol領域を基にした分子系統樹では既知のいかなるサブタイプにも分類されないため、今後全塩基配列の決定が必要とされる。

考察

今回の研究で、ピグミー族の2人がHIV-1 CRF02_AGに、また1人がHIV-1 CRF11_cpxに感染していたことが明らかとなった。ピグミ

一族から HIV-1 が分離され、分子系統学的に検討されたのは初めてのことである。HIV-1 CRF02_AG はカメルーンで同定され、最も流行している HIV-1 株となっている。また、CRF11_cpx は中央アフリカで見つかった別の CRF である。これらの結果は、HIV-1 株は近隣のバンツー族を介してピグミー族に導入されたことを示唆している。以上、HIV-1 の動物からヒトへの感染経路を明らかにするために、また中央アフリカにおける更なる SIVs のヒトへの導入と新型 HIV の出現を阻止するために更なる研究が必要と考えられる。

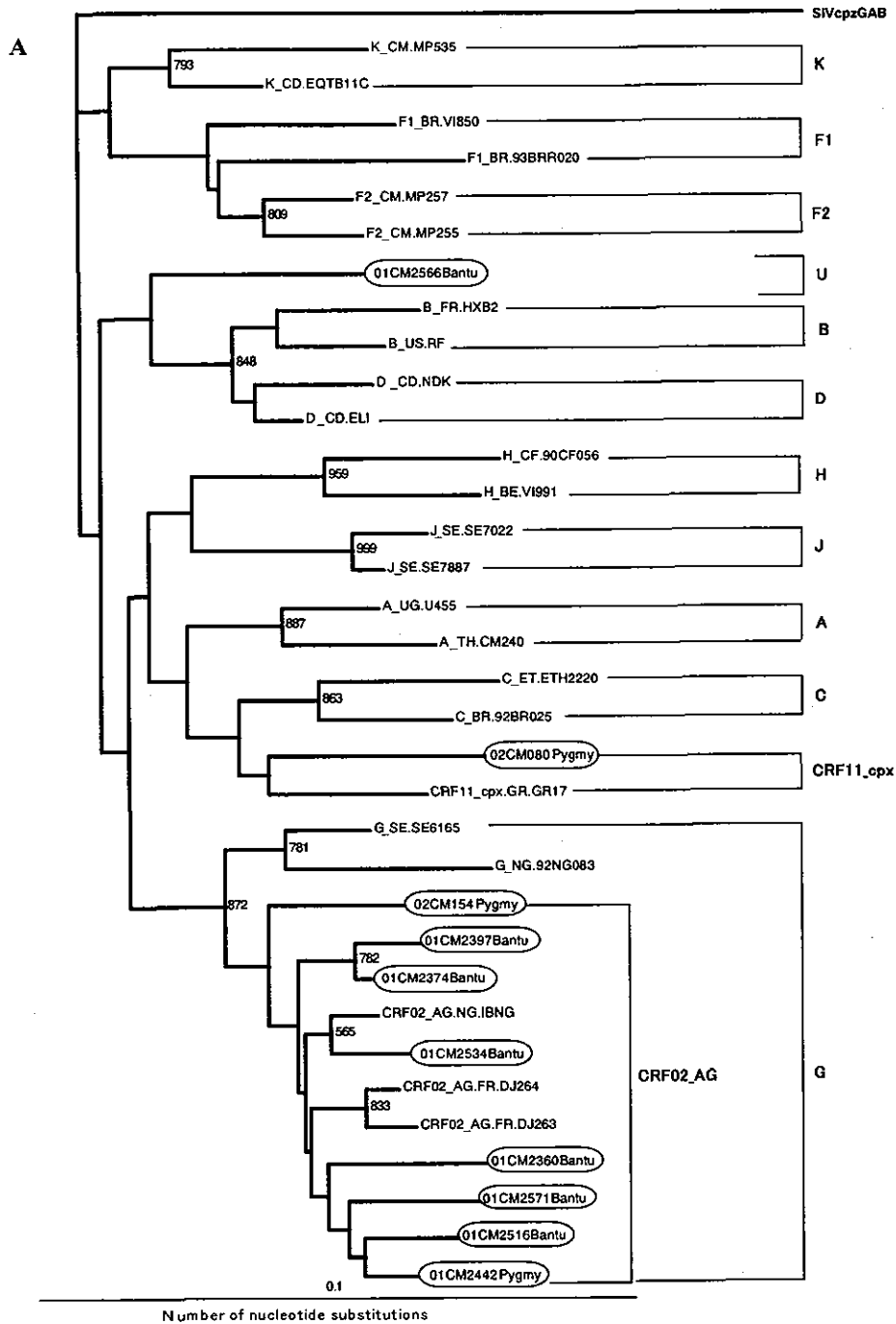


FIG.1 Phylogenetic relationship of Bantus and Pygmies (circled) sequences based on part of *pol*-integrase (288bp) (A) and a part of *env*C2V3 (approximately 550bp) (B) to HIV-1 group M reference sequences.

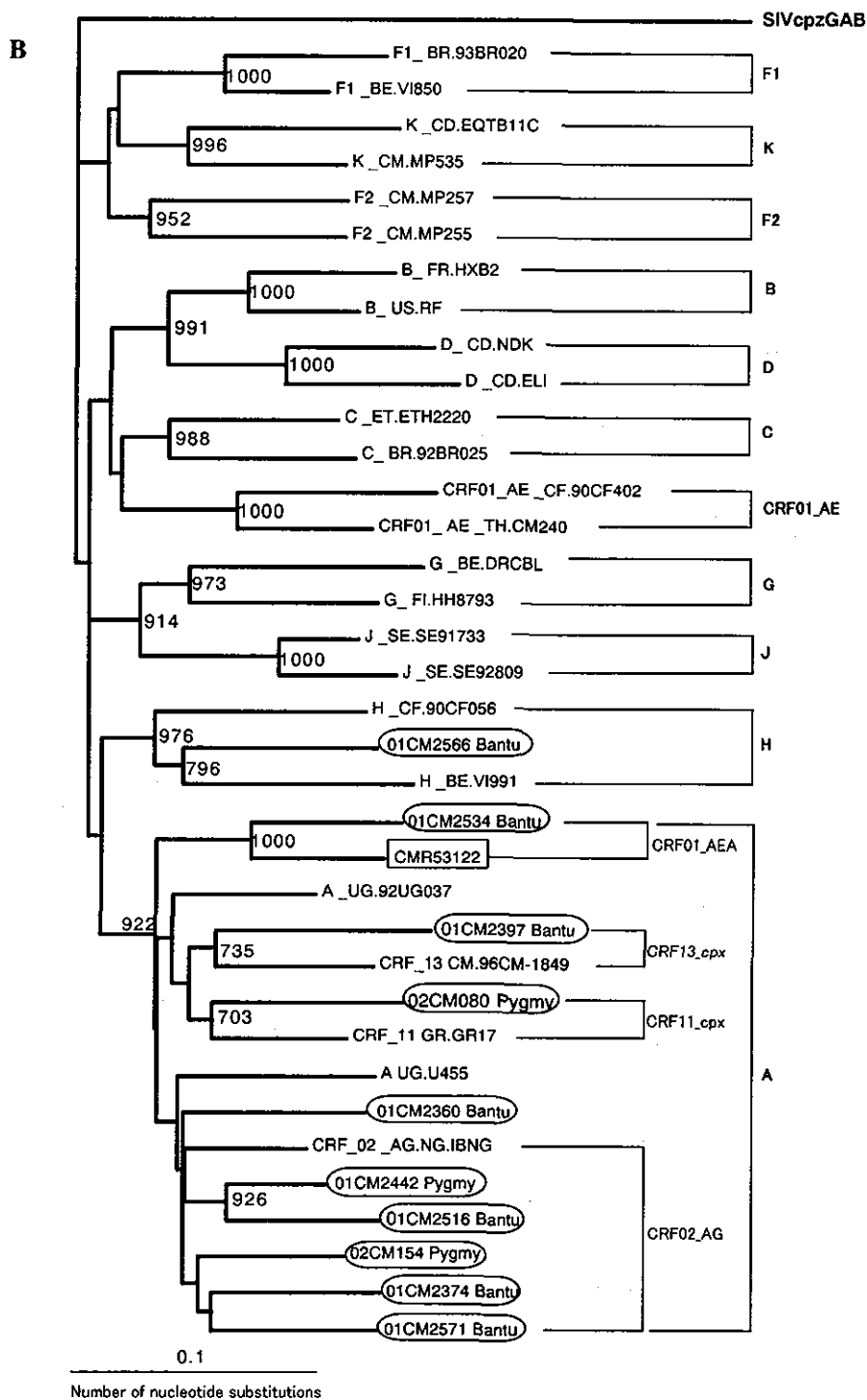


FIG.1Continued.

FIG.1 Phylogenetic relationship of Bantus and Pygmies (circled) sequences based on part of *pol*-integrase (288bp) (A) and a part of *env*C2V3 (approximately 550bp) (B) to HIV-1 group M reference sequences.

Table. Characteristics and genetic informations of HIV-1 subject studied in southern part of Cameroon.

Subject ^a	Sex/Age ^b	Clinical status	Marital status	Ethnicity	Serology		Nested PCR		Genetic subtype	
					AxSYM ^d	Det ^e	pol-IN ^f	env C2V3 ^g	pol-IN	env C2V3
01CM2360	F/23	Asm ^c	Married	Bantu	35.8	+	+	+	CRF02_AG	A
01CM2374	M/41	Asm	Divorced	Bantu	34.8	+	+	+	CRF02_AG	CRF02_AG
01CM2397	F/56	Asm	Divorced	Bantu	53.6	+	+	+	CRF02_AG	CRF13_cpx
01CM2442	M/65	Asm	Widower	Pygmy	17.5	+	+	+	CRF02_AG	CRF02_AG
01CM2466	M/65	Asm	Married	Bantu	12.2	+	-	-	ND	ND
01CM2492	F/47	Asm	Polygamous	Bantu	40.7	+	-	-	ND	ND
01CM2516	M/67	Asm	Married	Bantu	29.6	+	+	+	CRF02_AG	CRF02_AG
01CM2534	F/23	Asm	Married	Bantu	34	+	+	+	CRF02_AG	CRF01_AEA
01CM2546	F/46	Asm	Single	Bantu	35.8	+	-	-	ND	ND
01CM2566	M/24	Asm	Single	Bantu	36.4	+	+	+	U	H
01CM2571	F/16	Asm	Single	Bantu	28.3	+	+	+	CRF02_AG	CRF02_AG
02CM080	F/40	Asm	Married	Pygmy	44.2	+	+	+	CRF02_AG	CRF02_AG
02CM154	F/30	Asm	Married	Pygmy	29.6	+	+	+	CRF-11cpx	CRF-11cpx

(a) Subject identification number is preceded by year of the sample collection, CM : Cameroon and ND :Not detected.

(b) Age in year ; F: Female and M: Male ; (c): Asymptomatic.

(d) AxSYM HIV-1/2: a microparticle EIA (Dainabot, Tokyo, Japan), Signal/Cut-off >1.0 means reactive.

(e) Determine HIV1/2 : an immunochromatography assay (Dainabot ,Tokyo ,Japan).

B-7. nonB HIVにおける薬剤耐性試験と感受性試験の

データの構築について

分担研究者 蜂谷敦子 (国立国際医療センター・エイズ治療研究開発センター)
研究協力者 根岸ふじ江、岡 慎一、木村 哲
(国立国際医療センター・エイズ治療研究開発センター)

研究概要

日本国内で分離されたウイルスのサブタイプ分布を知るとともに、nonB ウイルスを対象に薬剤感受性試験と耐性試験の結果を比較し、データの構築を試みた。1998年から2003年にかけて分離されたウイルスの84%がサブタイプB、残りの13%がnonBであった。未治療例を中心に解析を行ったところ、NRTI、NNRTIは両サブタイプ間において薬剤感受性試験、耐性試験に有意な差は認められなかったが、PRでは耐性変異の出現頻度、薬剤感受性に違いが生じた。しかしながら比較となったサブタイプAEの症例数が少ないため、引き続き検討を行う必要があると思われた。

1. 目的

日本国内では、サブタイプBが流行している。しかし世界的な規模からみるとサブタイプBは少数であり、サブタイプAやC、CRF01_AE、CRF02_AGに感染している数が、圧倒的に多い。そのため近年、日本国内においても海外渡航者からCRF01_AE、CRF02_AGといったいわゆるnonBが検出されるようになった。

現在、薬剤耐性変異の解釈、解析は、先進国で流行しているサブタイプBを元に作成され、nonBを対象にした大規模な研究がほとんどなされていないのが、実状である。いくつかの研究で、nonBの無治療者で特異にみられる変異は、薬剤感受性試験や抗HIV療法の反応にほとんど影響がないと報告されている。一方、これらの変異の違いが治療失敗例においてどのように影響するのかは十分な報告がなされていない。そのため日本国内で分離されたウイルスのサブタイプの分布を知るとともに、nonBウイルスを対象に薬剤感受性試験

と耐性試験の結果を比較し、データの構築を試みた。これらのデータを基にnonBに対する最適な治療法を見出すことを目的とした。

2. 方法

薬剤感受性試験：MAGIC5細胞を用いた方法で行った。既知の濃度の薬剤と一定量のウイルスを培養し、48時間後にβ-ガラクトシダーゼで染色もしくはSEAP(分泌型アルカリフォスファターゼ)を測定し、薬剤の効果を調べた。

genotype検査：分離ウイルス液中のHIV RNAを抽出し、RT-PCRにてpol領域を増幅し、DNAシーケンサー(ABI3730)を用いて塩基配列を決定した。

サブタイプ検査：分離ウイルス液中のHIV RNAを抽出し、RT-PCRにてpol領域(2574F-3334R)、env領域(6935F-7329R)を増幅し、DNAシーケンサー(ABI3730)を用いて塩基配列を決定した。得られたシーケンスは、NCBIのgenotypingにデータを送り、サ

ブタイプを決定した。

(<http://www.ncbi.gov/projects/genotyping/formpage.cgi>)

3. 結果

1) サブタイプ検査結果

1998年から2003年にかけて分離されたウイルスは355例、212名であった。これらのウイルスを対象に、env領域におけるサブタイプ検査を行ったところ、サブタイプB 84%、CRF01_AE 8%、A 0.9%、C 0.9%、CRF02_AG 0.5%、CRF__BF 0.5%、CRF__BG 1.9%、不明 3.3%であった。(Table.1)

サブタイプ不明検体は、①HIV-2であった、②PCRがかからずサブタイプを決定することが出来ないもの、であった。

またenv領域にてAEと判断されたが、pol領域にてBと判断されたものが1例存在した。つまりサブタイプBとAEによるリコンビナントウイルスの感染、もしくはBとAEの混合感染の可能性があると考えられた。

両領域でAEと判断された中で、3例がすでに治療を受けているもの、残りの13例が未治療であった。これらの結果をもとに、未治療例のサブタイプB(109例)とnonB(AEを対象)(13例)の各薬剤に対する感受性、もしくは耐性変異を比較した。

2) NRTI

サブタイプAEとBでは、K219Q/Eを除いて耐性変異の出現頻度に違いは認められなかった(Table.2)。しかしK219Q/Eは、AEで1例しか認められておらず、比較をするには症例数が少ないと思われた。

また薬剤感受性を比較すると、AZT、3TC、d4T、ABCで $p=0.29$ 、 0.39 、 0.50 、 0.80 と、有意な差は得られなかった(Fig.1)。

3) NNRTI

どちらのサブタイプも耐性変異は検出されなかった(Table.2)。耐性変異以外では、サブ

タイプB、AEの両者において、K103RやV106Iが認められたが、変異の出現頻度に差は認められなかった。 $(p=0.48, 0.34)$ また薬剤感受性を調べたところ、NVP $p=0.81$ 、EFV $p=0.87$ と、サブタイプ間における感受性の差は認められなかった(Fig.1)。

3) PR

サブタイプAEではL101/R/V、K20R、M36Iの出現頻度がBに比べ高く、 $p=0.477, 0.0003$ 、 <0.0001 であった。一方、サブタイプBでは、L63P、A71V/T、V77Iの出現頻度が高く、 $p=0.0538$ 、 0.0736 、 0.0025 であった。(Table.3) 薬剤感受性試験を比べると、RTV、SQV、NFV、IDV、APV、LPVで $p=0.048$ 、 0.005 、 0.403 、 0.070 、 0.588 、 0.007 であり、SQVとLPVでAEの方が、薬剤感受性が高く、有意差が認められた(Fig.1)。

4) PRにおける耐性変異が薬剤感受性に及ぼす影響

サブタイプBのSQV、LPVに対する感受性低下が薬剤耐性変異によるものかどうかを調べるために、変異があったもの、なかったもので薬剤感受性を比較した。SQVでは平均値が耐性変異あり2.2倍、変異なし2.3倍、LPVでは耐性変異あり1.4倍、変異なし1.7倍とほぼかわらない結果が得られた(Fig.2)。

4. 考察

nonBに対する最適な治療法を見いだすことを目的とし、薬剤感受性試験と耐性試験の結果を比較、データの構築を試みた。

1998年から2003年にかけて分離されたウイルスの84%がサブタイプBであったが、残りの13%がnonBであった。nonBのほとんどがサブタイプAEであり、東南アジアで流行している株が日本国内に入ってきていることが示唆されたが、これらのウイルス株(nonB)の85%が未治療例であった。そのためサブタイプBとの比較は、未治療例を中心に解析を行った。NRTIやNNRTIでは耐性変異の出現頻

度に差は認められず、また PR はサブタイプ間での耐性変異の出現頻度に違いが認められた。また、薬剤感受性は、NRTI や NNRTI において有意な差は認められなかった。しかし PR については、SQV、LPV で有意な差が認められ、サブタイプ AE では感受性が高いことが示唆された。またサブタイプ B の SQV と LPV の感受性低下は耐性出現頻度に関連しておらず、これまでの報告と同様、無治療者で特有にみられる変異は、薬剤感受性試験にほとんど影響がないと思われた。そのためサブタイプ間の感受性の違いは、耐性変異によるものではなく、自然耐性によるものと考えられた。これまで報告された方法はサブタイプ B を元にした組みかえウイルスで判定したものである。今回は臨床検体から分離されたウイルスそのものであるため、このような差が認められたのかもしれない。しかしながら比較となったサブタイプ AE の症例数が少ないため、今後もう少し数を増やし、引き続き検討を行う必要があると思われた。

WHO が取り組む 3by5 計画の遂行とともに、発展途上国における薬剤耐性ウイルス出現の可能性は高く、nonB の耐性ウイルスが流行する可能性があげられる。そのため nonB に対する薬剤耐性プロファイルのデータ構築の必要性は、高いと考えられた。

発表論文

1. A. Hachiya, H. Gatanaga, E. Kodama, M. Ikeuchi, M. Matsuoka, S. Harada, H. Mitsuya, S. Kimura, S. Oka. Novel patterns of nevirapine resistance-associated mutations of human immunodeficiency virus type 1 in treatment-naive patients. *Virology*. 327:215-24, 2004.

学会発表

1. 蜂谷敦子、瀧永博之、根岸ふじ江、木村

哲、岡 慎一. 新規臨床分離株の抗 HIV 薬に対する累積百分率. 第 18 回日本エイズ学会総会、静岡、12 月、2004

Table.1 当センターで分離されたウイルスの
Env領域におけるサブタイプ分布

subtype	n	%
B	178	84.0
AE	17	8.0
BG	4	1.9
A	2	0.9
C	2	0.9
AG	1	0.5
BF	1	0.5
不明	7	3.3

355検体 (212患者を対象)

Fig.1 サブタイプBとAEの薬剤感受性

