

厚生労働科学研究研究費補助金

エイズ対策研究事業

非サブタイプB型HIVにおける薬剤耐性ジェノタイプ解析
アルゴリズムに関する研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山本直彦

平成17（2005）年4月

目次

I. 総括研究報告書	
非サブタイプ B 型 HIV における薬剤耐性ジェノタイプ解析アルゴリズムに関する研究	・・・ 1
山本直彦	
II. 分担研究報告書	
1. ケニアにおける非サブタイプ B 型 HIV 薬剤耐性関連遺伝子に関する研究	・・・ 4
市村 宏	
2. 未治療感染者における非サブタイプ B 型 HIV 薬剤耐性関連遺伝子に関する研究	・・・ 6
森下 高行	
3. 非サブタイプ B 型 HIV 薬剤耐性関連遺伝子に関する研究（名古屋地域）	・・・ 8
金田 次弘	
4. 非サブタイプ B 型 HIV 薬剤耐性関連遺伝子に関する研究（大阪地域）	・・・ 10
大竹 徹	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	・・・ 12
IV. 研究成果の刊行物・別冊	・・・ 13

厚生労働科学研究費補助金(エイズ対策研究事業)

総括研究報告書

非サブタイプ B 型 HIV における薬剤耐性ジェノタイプ解析アルゴリズムに関する研究

主任研究者 山本 直彦 名古屋大学大学院医学研究科助教授

研究要旨

ケニアにおいて抗 AIDS 療法を受け、治療に抵抗性を示した患者について解析をしたところ、逆転写酵素領域の Q11N と K20R (subtype A1), I135L/M (subtype G), R135T, T139K, C181Y (subtype D) の 5 ケ所において、サブタイプ B には報告されていない耐性に関連していると思われる新たな変異がみられた。また、未治療感染者 156 例の薬剤耐性関連遺伝子を解析したところ、逆転写酵素領域において、Y69S/P/L がサブタイプ A と D に 3 例、V106I がサブタイプ AE に 2 例、Y115G と Y181D がサブタイプ A に、K103S, V118C, L210S がサブタイプ C にみられた(サブタイプ B ではそれぞれ、T69D, V106A/M, Y115F, Y181C/L, K103N, V118I, L210W)。また、プロテアーゼ領域において、V82I がサブタイプ C と D に 3 例みられた(サブタイプ B では V82A/F/T/S/L)。さらに、インドのサブタイプ C1 例の逆転写酵素領域において、V118C, L210S/L がみられた(サブタイプ B では、それぞれ V118I, L210W)。また、国内において、サブタイプ AE の逆転写酵素領域において、V106I (サブタイプ B では V106M) の変異がみられた。

分担研究者

市村 宏(金沢大学大学院医学系研究科 教授)
金田 次弘(国立名古屋病院 臨床研究センター
室長)
大竹 徹(大阪府立公衆衛生研究所 ウイルス課
課長)
森下 高行(愛知県食品衛生検査所 微生物課
主任研究員)

A. 研究目的

近年、HAART 療法が導入されて以来、薬剤耐性 HIV に対する対策が大きな課題となっている。アジアやアフリカの開発途上国においては十分な服用指導が行なわれないうまま、抗 AIDS 薬を安価に提供したり、また、ある地域では中身が不確かな製剤が広まっており、そ

の事がいっそう薬剤耐性 HIV の出現を助長しているのが現状である。一方で、現在広く利用されている薬剤耐性に関するデータはサブタイプ B におけるものであり、開発途上国に多いサブタイプ A や C、日本の性的接触による感染に多いサブタイプ AE などいわゆる non-B 型の HIV におけるデータに乏しいのが現状である。本研究の目的は、非サブタイプ B のデータから導かれたジェノタイプ解析アルゴリズムの必要性が急務と考え、永年我々と研究協力関係にあるインド、パキスタン、およびアフリカ・ケニアの政府関係者、病院、大学の医師らと協力し、これらの地域に多く流行する非サブタイプ B を中心に、薬剤耐性 HIV の遺伝学的特徴 (genotype) と感染性 (phenotype) との関連を構築し、開発途上国における将来の薬物治療など、AID 対策に必要な基礎的および臨床的データを提供することを目

的とする。

B. 研究方法

アフリカ・ケニアにおいては Kenya Medical Research Institute の Ochieng 博士と Pumwani village の Alifaman 博士の、インドにおいては Sanjay Gandhi Postgraduate Institute Medical Sciences の Dhole 博士の協力を得て、また、国内においては非サブタイプ B として流行しているサブタイプ AE を中心に、患者血清を採取し、逆転写酵素およびプロテアーゼ領域の変異部位を解析した。その結果と、関連する臨床的データおよびサブタイプ B を基にした薬剤耐性のデータと比較検討し、新たに得られた逆転写酵素あるいはプロテアーゼ領域の変異部位における genotype を検討した。

(倫理面への配慮)

調査研究実施国の実情にあわせ、その国の方針を尊重しつつ、原則としてわが国の基準すなわち「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成13年3月29日文科科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)」を遵守して研究を遂行する。すなわち、検体収集にあたっては、現地側共同研究者によるインフォームドコンセントを確認後、被検者に遺伝子解析の研究目的であり、被検者のプライバシーの守秘義務に十分配慮する旨、説明し同意を得た上で血液を採取する。論文作成にあたっては被検者の氏名や年齢等、個人が同定できるような記載を避け、個人情報は全て現地側共同研究者の管理とする。得られた検体は日本に持ち帰り、遺伝子解析で得られたデータは全て現地側共同研究者に提供する。

C. 研究結果

ケニアの Nyumbani エイズ孤児院において抗 AIDS 療法を受けている HIV 感染者/AIDS 患者17例の血清を経時的に採取した。これまでに、逆転写酵素阻害剤

である AZT, Efavirenz (3TC), Vireamune (Nevirapine) の3剤投与を受けている4例について解析を行ない、治療に抵抗性を示した検体について解析をしたところ、逆転写酵素領域の Q11N と K20R (subtype A1), I135L/M (subtype G), R135T, T139K, C181Y (subtype D) の5ヶ所において、サブタイプ B には報告されていない両性に関連していると思われる新たな変異がみられた。プロテアーゼ領域においても、いくつかの変異がみられたが、これらの症例ではプロテアーゼ阻害剤を投与されていないことから、minor (secondary) mutation あるいは polymorphism と考えられる。

また未治療感染者156例のうち、逆転写酵素領域において、Y69S/P/L がサブタイプ A と D に3例、V106I がサブタイプ AE に2例、Y115G と Y181D がサブタイプ A に、K103S, V118C, L210S がサブタイプ C にみられた(サブタイプ B ではそれぞれ、T69D, V106A/M, Y115F, Y181C/L, K103N, V118I, L210W)。また、プロテアーゼ領域において、V82I がサブタイプ C と D に3例みられた(サブタイプ B では V82A/F/T/S/L)。

さらにインドのサブタイプ C が7例の薬剤耐性変異を解析したところ、サブタイプ C 6例の逆転写酵素領域において、K103N, V118C, M184V, G190A がみられ、1例において V118C, L210S/L (サブタイプ B では、それぞれ V118I, L210W) の変異がみられた。なお、プロテアーゼ領域においては minor mutation (M36I/V) のみであった。

また、国内において非サブタイプ B として流行しているサブタイプ AE の逆転写酵素領域で V106I の変異がみられた(サブタイプ B では V106M)。

D. 考察

治療継続中の患者で治療に抵抗性を示した症例で今回解析したのは、わずか4例であったが、逆転写酵素領域の5ヶ所にサブタイプ B には報告されて

いない変異部位が見られたことから、こうした変異部位がさらに増える可能性がある。残りの11例について現在解析中である。このようにサブタイプによって異なるアミノ酸変異が生じる原因として、野生株におけるアミノ酸の nucleotide の構成がサブタイプにより異っている場合、1つの nucleotide が置換することによって、異なるアミノ酸に置き換わるためと考えられる。

サブタイプCの逆転写酵素領域にみられるV106Mは、Brennerらによって、NNRTIに対して交叉耐性を示すという報告がみられており(AIDS, 17(1):F1-5, 2003 Jan 3)、今回みられた他の変異についても、それぞれのサブタイプに特徴的な耐性関連変異である可能性がある。

今後、さらに症例数を重ねると共に、こうした非サブタイプBにみられる新たな変異がどの程度耐性に関与しているか、その phenotype についての検討していく予定である。

E. 結論

抗 HIV 療法を行ない、治療に抵抗性を示した非サブタイプBの検体について、薬剤耐性関連遺伝子を解析

をしたところ、逆転写酵素領域の5ヶ所にサブタイプBには報告されていない変異部位が見られた。

また、未治療感染者の逆転写酵素領域において、Y69S/P/LがサブタイプAとD、V106IがサブタイプAEに、Y115GとY181DがサブタイプAに、K103S、V118C、L210SがサブタイプCにみられた。また、プロテアーゼ領域において、V82IがサブタイプCとDにみられた。これらも non-B サブタイプにみられる新しい薬剤耐性関連変異である可能性がある。今後症例を重ねることにより、さらに多くのサブタイプBに見られない non-B サブタイプに特徴的な耐性関連変異および関連遺伝子が見出される可能性がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

研究成果の刊行に関する一覧表参照

H. 知的所有権の出願・登録状況

特になし。

厚生労働科学研究費補助金(エイズ対策研究事業)

分担研究報告書

ケニアにおける非サブタイプ B 型 HIV 薬剤耐性関連遺伝子に関する研究

分担研究者 市村 宏 金沢大学大学院医学系研究科環ウイルス感染症制御学分野 教授

研究協力者 R. ルエンベ 同上 大学院生

研究要旨

ケニアのNyumbaniにおいて抗AIDS療法を受けているHIV感染者/AIDS患者17例の血清を経時的に採取した。これまでに、逆転写酵素阻害剤であるAZT, Efavir (3TC), Virmune (Nevirapine)の3剤投与を受けている4例について解析を行ない、治療に抵抗性を示した検体について解析をしたところ、逆転写酵素領域の Q11N と K20R (subtype A1), I135L/M (subtype G), R135T, T139K, C181Y (subtype D) の5ヶ所において、サブタイプ B には報告されていない耐性に関連していると思われる新たな変異がみられた。

A. 研究目的

アフリカに広く流行する非サブタイプ B 型 HIV に感染し、抗 HIV 療法をうけている患者を対象に、薬剤耐性関連遺伝子(genotype) と感染性(phenotype)との関連を構築し、non-B subtype の AID 治療に重要な基底的および臨床的データを提供する事を目的とする。

B. 研究方法

ケニアのナイロビにあるエイズ孤児院(Nyumbani)において抗 AIDS 療法を受けている HIV 感染者および AIDS 患者から血清を採取し、Env 領域、逆転写酵素およびプロテアーゼ領域の塩基配列およびアミノ酸配列を解析し、これらの領域における変異部位と関連する臨床的データおよびサブタイプ B を基にした薬剤耐性のデータと比較検討し、非サブタイプ B に特徴的と考えられる薬剤耐性関連遺伝子を選定した。

(倫理面への配慮)

本研究のプロポーザルはケニア中央医学研究所

(KEMRI, Kenya Medical Research Institute) の Scientific Committee および Ethical Committee と金沢大学医学部の倫理委員会の承認を受けている。本研究を実施するに当たり、調査研究実施国の実情にあわせ、その国の方針を尊重するとともに、わが国の基準すなわち「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成13年3月29日文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)」を遵守している。すなわち、検体収集にあたっては、現地側共同研究者によるインフォームドコンセントを確認後、被検者に遺伝子解析の研究目的であり、被検者のプライバシーの守秘義務に十分配慮する旨、説明し、同意を得た上で血液を採取している。データの公表にあたっては被検者の氏名や年齢等、個人が同定できるような記載を避け、個人情報とは全て現地側共同研究者の管理とする。得られた検体は日本に移送し、ケニア人が中心となって解析を行っている。得られたデータは全て現地側共同研究者に提供する。

C. 研究結果

Nyumbani エイズ孤児院において抗 AIDS 療法を受けている HIV 感染者/AIDS 患者17例の血清を経時的に採取した。これまでに、逆転写酵素阻害剤である AZT, Efavir (3TC), Virmune (Nevirapine) の3剤投与を受けている4例について解析を行ない、治療に抵抗性を示した検体について解析をしたところ、逆転写酵素領域の Q11N と K20R (subtype A1), I135L/M (subtype G), R135T, T139K, C181Y (subtype D) の5ヶ所において、サブタイプ B には報告されていない耐性に関連していると思われる新たな変異がみられた。プロテアーゼ領域においても、いくつかの変異がみられたが、これらの症例ではプロテアーゼ阻害剤を投与されていないことから、minor (secondary) mutation あるいは polymorphism と考えられる。

D. 考察

解析した症例がわずか4例であるにも拘わらず、治療に抵抗性を示した検体において、逆転写酵素領域の5ヶ所にサブタイプ B には報告されていない変異部位が見られたことから、こうした変異部位がさらに増える可能性がある。このようにサブタイプによって異なるアミノ酸変異が生じる原因として、野生株におけるアミノ酸の nucleotide の構成がサブタイプによ

り異っている場合、1つの nucleotide が置換することによって、異なるアミノ酸に置き換わるためと考えられる。

今後、残る13例について解析を進め、さらに症例数を重ねると共に、こうした非サブタイプ B にみられる新たな変異がどの程度耐性に関与しているか、その phenotype についての検討が必要である。

E. 結論

抗 HIV 療法を行ない、治療に抵抗性を示した非サブタイプ B の検体について、薬剤耐性関連遺伝子を解析をしたところ、逆転写酵素領域の5ヶ所にサブタイプ B には報告されていない変異部位が見られた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

研究成果の刊行に関する一覧表参照

H. 知的所有権の出願・登録状況

特になし。

なお、本研究は、Mr. W. Ochieng, Dr. M. Songok (KEMRI), Dr. R. Musoke (Nairobi Uni), Nyumbani 孤児院との共同研究である。

厚生労働科学研究費補助金(エイズ対策研究事業)

分担研究報告書

未治療感染者における非サブタイプ B 型 HIV 薬剤耐性関連遺伝子に関する研究

分担研究者 森下 高行 愛知県食品衛生検査所 主任研究員

研究要旨

アフリカ・ケニアの非サブタイプ B 型 HIV の未治療感染者156例の薬剤耐性関連遺伝子を解析した。逆転写酵素領域において、Y69S/P/L がサブタイプ A と D に3例、V106I がサブタイプ AE に2例、Y115G と Y181D がサブタイプ A に、K103S, V118C, L210S がサブタイプ C にみられた(サブタイプ B ではそれぞれ、T69D, V106A/M, Y115F, Y181C/I, K103N, V118I, L210W)。また、プロテアーゼ領域において、V82I がサブタイプ C と D に3例みられた(サブタイプ B では V82/A/F/T/S/L)。

A. 研究目的

アフリカ・ケニアに流行する非サブタイプ B 型 HIV の未治療感染者を対象に、薬剤耐性関連遺伝子(genotype) と感染性(phenotype)との関連を構築し、non-B subtype の AID 治療に重要な基礎的および臨床的データを提供することを目的とする。

B. 研究方法

ケニアのナイロビにあるスラム地区に住む未治療感染者から血清を採取し、Env 領域、逆転写酵素およびプロテアーゼ領域の塩基配列およびアミノ酸配列を解析し、これらの領域における変異部位と関連する臨床的データおよびサブタイプ B を基にした薬剤耐性のデータと比較検討し、非サブタイプ B に特徴的と考えられる薬剤耐性関連遺伝子を選定した。

(倫理面への配慮)

調査研究実施国の実情にあわせ、その国の方針を尊重しつつ、原則としてわが国の基準すなわち「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成13年3月29日文科科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)」を遵守して研究を遂行する。すなわち、検体収集

にあたっては、現地側共同研究者によるインフォームドコンセントを確認後、被検者に遺伝子解析の研究目的であり、被検者のプライバシーの守秘義務に十分配慮する旨、説明し同意を得た上で血液を採取する。論文作成にあたっては被検者の氏名や年令等、個人が同定できるような記載を避け、個人情報とは全て現地側共同研究者の管理とする。得られた検体は日本に持ち帰り、遺伝子解析で得られたデータは全て現地側共同研究者に提供する。

C. 研究結果

今回、Pol 領域が解析できた156例の感染者のなかで、逆転写酵素領域において、Y69S/P/L がサブタイプ A と D に3例、V106I がサブタイプ AE に2例、Y115G と Y181D がサブタイプ A に、K103S, V118C, L210S がサブタイプ C にみられた(サブタイプ B ではそれぞれ、T69D, V106A/M, Y115F, Y181C/I, K103N, V118I, L210W)。また、プロテアーゼ領域において、V82I がサブタイプ C と D に3例みられた(サブタイプ B では V82/A/F/T/S/L)。

D. 考察

逆転写酵素領域にみられた V106M は、Brenner らによって、サブタイプ C において、NNRTI に対して交叉耐性を示すという報告がみられており(AIDS. 17(1):F1-5, 2003 Jan 3)、今回みられた他の変異についても、それぞれのサブタイプに特徴的な耐性関連変異である可能性がある。今後、recombinant virus を用いて phenotype を詳細に検討したい。

E. 結論

サブタイプ B で報告のある薬剤耐性変異とは別に、今回、逆転写酵素領域において、Y69S/P/L がサブタイプ A と D、V106I がサブタイプ AE に、Y115G と

Y181D がサブタイプ A に、K103S, V118C, L210S がサブタイプ C にみられた。また、プロテアーゼ領域において、V82I がサブタイプ C と D にみられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

研究成果の刊行に関する一覧表参照

H. 知的所有権の出願・登録状況

特になし。

厚生労働科学研究費補助金(エイズ対策研究事業)

分担研究報告書

非サブタイプ B 型 HIV における薬剤耐性関連遺伝子に関する研究(名古屋地域)

分担研究者 金田 次弘 名古屋医療センター臨床研究センター 部長

研究要旨

名古屋医療センターにおいて非サブタイプ B 型 HIV 患者を対象に、逆転写酵素領域およびプロテアーゼ領域の薬剤耐性変異の部位を解析した。サブタイプ AE が4例、A が1例、C が1例であった。耐性変異は、逆転写酵素領域において M184V, T215F が、プロテアーゼ領域において D30N, L90M がみられたが、非サブタイプ B 型に特有な major (primary) な変異はみられなかった。

A. 研究目的

近年、国際化の中で日本国内においても、サブタイプ B 以外の HIV が多く流行している。多くは東南アジアからのサブタイプ AE であるが、サブタイプ A や C などアフリカやインド、中国で多く流行しているものも散見されている。昨年度に引き続いて、名古屋医療センターに受診した HIV 感染者のうち、非サブタイプ B の患者の薬剤耐性関連遺伝子を解析した。

B. 研究方法

国立名古屋病院に受診した非サブタイプ B 型 HIV 患者から患者血清を採取し、Env 領域、逆転写酵素およびプロテアーゼ領域の変異部位を解析する。その結果と、関連する臨床的データおよびサブタイプ B を基にした薬剤耐性のデータと比較検討し、新たに得られた逆転写酵素あるいはプロテアーゼ領域の変異部位における genotype を解析した。

(倫理面への配慮)

調査研究実施国の実情にあわせ、その国の方針を尊重しつつ、原則としてわが国の基準すなわち「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成13年3

月29日文科科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)」を遵守して研究を遂行した。

C. 研究結果

国立名古屋病院に受診した HIV 感染者のうち、非サブタイプ B 型 HIV 患者は6例で、サブタイプ AE が4例、A が1例、C が1例であった。これらの症例について、逆転写酵素領域およびプロテアーゼ領域の薬剤耐性変異の部位を解析したところ、抗 AIDS 薬を投与中の患者において、逆転写酵素領域において M184V, T215Y が、プロテアーゼ領域において D30N, L90M がみられたが、未治療者においては、逆転写酵素領域において薬剤耐性変異はみられず、プロテアーゼ領域において、secondary mutation の L10I, K20R, M36I, V77I のみであった。以上の4例共、サブタイプ B にはみられない非サブタイプ B 型に特有と思われる変異はみられなかった。

D. 考察

日本国内においては、まだサブタイプ B に比べて、非サブタイプ B の症例数が少なく、従って、見られた

変異はすべてサブタイプ B 型に見られる変異と同様なものであった。今後、さらに non-B サブタイプの症例を重ねて解析を行なう予定である。

E. 結論

今回、新たに解析した4例の非サブタイプ B 型 HIV で見られた major (primary) な薬剤耐性変異はすべてサブ

タイプ B 型に見られる変異と同様なものであった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

研究成果の刊行に関する一覧表参照

H. 知的所有権の出願・登録状況

特になし。

厚生労働科学研究費補助金(エイズ対策研究事業)
分担研究報告書

非サブタイプ B 型 HIV における薬剤耐性関連遺伝子に関する研究(大阪地域)

分担研究者 大竹 徹 大阪府公衆衛生研究所、ウイルス課、課長

研究要旨

大阪府公衆衛生研究所で解析した非サブタイプ B 型 HIV 感染者の逆転写酵素領域およびプロテアーゼ領域の薬剤耐性変異の部位を解析した。解析した非サブタイプ B はサブタイプ C が7例、AE が1例であった。薬剤耐性変異は、逆転写酵素領域において、サブタイプ C で、K103N, V118C, Y181C, M184V, G190A, L210S/L、サブタイプ AE で、V106I がみられた。サブタイプ B では、それぞれ V118I, L210W, V106M との報告がされているが、今回のサブタイプでは、V118C, L210S/L, V106I となっていた。なお、プロテアーゼ領域においては minor mutation のみであった。

A. 研究目的

非サブタイプ B のデータから導かれたジェノタイプ解析アルゴリズムの構築を目的とし、非サブタイプ B における薬剤耐性 HIV の遺伝学的特徴 (genotype) と感染性 (phenotype) との関連を解析する。

B. 研究方法

非サブタイプ B 型 HIV 患者から患者血清を採取し、Env 領域、逆転写酵素およびプロテアーゼ領域の変異部位を解析する。その結果と、関連する臨床的データおよびサブタイプ B を基にした薬剤耐性のデータと比較検討し、新たに得られた逆転写酵素あるいはプロテアーゼ領域の変異部位における genotype を解析した。

(倫理面への配慮)

調査研究実施国の実情にあわせ、その国の方針を尊重しつつ、原則としてわが国の基準すなわち「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成13年3月29日文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1

号)」を遵守して研究を遂行した。

C. 研究結果

大阪府公衆衛生研究所で解析した非サブタイプ B はサブタイプ C が7例、AE が1例であった。薬剤耐性変異を解析したところ、サブタイプ C 6例の逆転写酵素領域において、K103N, V118C, M184V, G190A がみられ、1例において V118C, L210S/L の変異がみられた。また、サブタイプ AE で、V106I の変異がみられた。なお、今回はプロテアーゼ領域においては minor mutation (M36I/V) のみであった。

D. 考察

今回、サブタイプ C 1例において、V118C, L210S/L、サブタイプ AE において、V106I の変異が逆転写酵素領域にみられたが、これまでサブタイプ B の耐性変異は、V118I, L210W, V106M とされている。今回みられたこれらの変異の phenotype については、今後の研究課題としたい。

E. 結論

サブタイプ C7例、AE1例について、薬剤師性変異を解析したところ、逆転写酵素領域において、サブタイプ Cで、K103N, V118C, M184V, G190A, L210S/L、サブタイプ AEで、V106I がみられた。サブタイプ Bでは、それぞれV118I, L210W, V106Mとの報告がされているが、今回のサブタイプでは、V118C, L210S/L, V106Iと

なっていた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

研究成果の刊行に関する一覧表参照

H. 知的所有権の出願・登録状況

特になし。

研究成果の刊行に関する一覧表

1. Kayoko Kita, Nicaise Ndembi, Michel Ekawalanga, Eiji Ido, Rigobert Kazadi, Blaise Bikandou, Jun Takehisa, Taichiro Takemura, Seiji Kageyama, Junji Tanaka, Henri Joseph Parra, Masanori Hyamai, and Hiroshi Ichimura: Genetic Diversity of HIV Type 1 in Likasi, Southeast of the Democratic Republic of Congo. *AIDS Res Hum Retroviruses* 20(12):1352-7.
2. Elijah M. Songok, Raphael M. Lwembe, Rukia Kibaya, Kana Kobayashi, Nicaise Ndembi, Kayoko Kita, John Vulule, Isao Oishi, Fredrick Okoth, Seiji Kageyama and Hiroshi Ichimura.: Active generation and selection for HIV intersubtype A/D recombinant forms in a co-infected patient in Kenya. *AIDS Res Hum Retroviruses* 20(2):255-8, 2004
3. Nicaise Ndembi, Jun Takehisa, Leopold Zekeng, Eiji Kobayashi, Charlotte Ngansop, Elijah M. Songok, Seiji Kageyama, Taichiro Takemura, Eiji Ido, Masanori Hayami, Lazare Kaptue and Hiroshi Ichimura.: Genetic Diversity of HIV Type 1 in Rural Eastern Cameroon. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2004;37(5):1641-1650.
4. K. Wada, H. Nagai, T. Hagiwara, S. Ibe, M. Utsumi and T. Kaneda. Delayed HIV-1 Infection of CD4⁺ T Lymphocytes from Therapy-naïve Patients Demonstrated by Quantification of HIV-1 DNA Copy Numbers. *Microbiology & Immunology* 48, 767-772 (2004).
5. H. Nagai, K. Wada, T. Morishita, M. Utsumi, Y. Nishiyama and T. Kaned. New estimation method for highly sensitive quantitation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 DNA and its application. *J. Virol. Methods*, in press.
6. D.Turner, B. Brenner, D.moisi, M.Detorio, R.Cesaire, T.kurimura, H.mori, m.Essex, S.Maayan and M.A.wainberg Nucleotide and Amino acid Polymorphisms at Drug Resistance Sites in Non-b-Subtype Variants of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *AntiMicro. Agents chemothr.* Aug. 2004, p2993-2998

Sequence Note

Genetic Diversity of HIV Type 1 in Likasi, Southeast of the Democratic Republic of Congo

KAYOKO KITA,¹ NICAISE NDEMBI,¹ MICHEL EKWALANGA,² EIJI IDO,³ RIGOBERT KAZADI,²
BLAISE BIKANDOU,⁴ JUN TAKEHISA,¹ TAICHIRO TAKEMURA,³ SEIJI KAGEYAMA,¹
JUNJI TANAKA,⁵ HENRI JOSEPH PARRA,⁴ MASANORI HAYAMI,³ and HIROSHI ICHIMURA¹

ABSTRACT

To investigate the prevalence of subtypes A and C, and the existence of recombinants of both subtypes in the southeast of the Democratic Republic of Congo (DRC), blood samples were collected from 27 HIV-infected individuals in Likasi, located in an area bordering close to Zambia, and analyzed phylogenetically. Out of the 24 strains with a positive PCR profile for *pol-1N* and *env-C2V3*, 15 (62.5%) had a discordant subtype or CRF designation: one subtype A/G (*pol/env*), four A/U (unclassified), three G/A, one G/CRF01, three H/A, one J/C, one CRF02 (G)/A, and one U/A. Nine (37.5%) strains had a concordant subtype or CRF designation: five subtype A, two C, one D, and one CRF02/G. The remaining three samples negative for PCR with *env-C2V3* primers used in this study were further analyzed with *env-gp41* primers and revealed the presence of two profiles: two J/J (*pol-1N/env-gp41*) and one C/G. These data highlight the presence of a high proportion (16/27, 59.3%) of recombinant strains and a low prevalence (4.1 and 7.4%) of subtype C based on *env-C2V3* and *pol-1N* analyses, respectively, in Likasi. In addition, this is the first report that CRF02_AG exists in DRC, though the epidemiological significance of the existence of CRF02_AG in DRC remains unknown.

HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE-1 (HIV-1) has been classified into three major phylogenetic groups, termed M (major), N (non-M, non-O), and O (outlier).¹ The vast majority of variants found worldwide and responsible for the AIDS pandemic belong to group M.^{2,3} Phylogenetic analysis of group M has further led to its subclassification into nine pure subtypes, A–D, F–H, J, and K and subsubtypes A1, A2, F1, and F2.² Recently, it was realized that a significant fraction of HIV-1 isolates, 10–40% or more, exhibit a shift in subtypes when different regions of their genome are analyzed.³ Currently, some of the mosaic HIV-1 genomes play a major role in the global AIDS epidemics and are designated as circulating recombinant forms (CRFs), CRF01–CRF16. Although subtypes

A, C, and CRF02_AG are most prevalent in Africa, the distribution of CRF/subtype is very heterogeneous.^{2–7} The proportion of CRF02_AG among subtype A strains based on *env* sequences decreases from west to central Africa, with an absence of CRF02_AG in the Democratic Republic of Congo (DRC).^{2,8,9} The profile of HIV-1 endemic in DRC, such as high number of cocirculating HIV-1 subtypes, possible recombinant viruses, and unclassified strains, is consistent with that of an old and mature epidemic of HIV-1.⁵

The DRC is bordered on the southeast by Zambia. The majority (95%) of the HIV-1 strains circulating in Zambia are subtype C, although HIV-1 group M subtypes A, D, G, and J as well as group O have been identified.^{2,3,10,11}

¹Department of Viral Infection and International Health, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640, Japan.

²Laboratoire de virologie, INRB, Kinshasa, République Démocratique du Congo.

³Laboratory of Viral Pathogenesis, Institute for Virus Research, Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan.

⁴Cité Louis Pasteur-Laboratoire National de Santé Publique, Brazzaville 120, Congo.

⁵Department of Laboratory Science, School of Health Sciences, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640, Japan.

The purpose of this study was to investigate the prevalence of subtypes A and C, and the existence of the recombinants of both subtypes in Likasi, located in the southeast of the DRC, 200 km from Lubumbashi in an area bordering Zambia.

Blood samples (10 ml) were collected from 27 HIV-1 infected individuals in February and September 2001. Plasma and buffycoat were separated and stored at -80°C until use. The plasma samples were screened for HIV antibodies with a commercial particle agglutination (PA) test kit (Serodia-HIV, Fujirebio, Tokyo, Japan).

Genomic DNA was extracted from buffycoat of the seroreactive samples using a Qiagen DNA extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany). A part of the *pol* gene coding integrase (IN) (corresponding to 4493–4780 nt in HIV-1_{HXB2}) and *env* gene covering C2V3 (corresponding to 6975–7520 nt in HIV-1_{HXB2}) was amplified with nested polymerase chain reaction (PCR) using the primers unipol 5 (5'-TGGGTACCAGCACACAAAGGAATAGGAGGAAA-3')/unipol 6 (5'-CCA-CAGCTGATCTCTGGCCTTCTCTGTAATAGACC-3') and M5 (5'-CCAATCCCATACATTATTGTGCCCCAGCTGG-3')/M10 (5'-CCAATTGTCCTCATATCTCCTCCTCCAGG-3'), respectively, in the first round, and unipol 1 (5'-AGTGGATT-CATAGAAAGCAGAAGT-3')/unipol 2 (5'-CCCCTATTCC-TTCCCCTTCTTTAAA-3'), and M3 (5'-GTCAGCACAG-TACAATGACACATGG-3')/M8 (5'-TCCTTGGATGGAG-GGGCATAACATTGC-3'), respectively, in the second round.¹¹ Nested PCR was performed with an AmpliTaq Gold PCR kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) according to the manufacturer's instructions. Amplification was done with one cycle at 95°C for 10 min, and 35 cycles at 95°C for 30 sec, 45°C for 30 sec (for the *pol* region) or 55°C for 30 sec (for the *env* region), and 72°C for 1 min, with a final extension of 72°C for 10 min. Samples that could not be amplified with the *env*-C2V3 primers were analyzed with *env*-gp41-specific primers.¹² PCR amplification was confirmed by visualization with ethidium bromide staining of the gel. The PCR products were cloned by using a TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) and plasmid DNA for sequencing was prepared by a plasmid miniprep kit (Sigma, Hilden, Germany). DNA sequencing was carried out using dye-deoxy terminator chemistry on an ABI 310 automatic sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA). We sequenced at least 12 clones to obtain a consensus sequence. Sample DNA sequences were aligned with subtype reference sequences from the Los Alamos database by CLUSTAL W (version 1.81) with subsequent inspection and manual modification. The frequency of nucleotide substitution in each base of the sequences was estimated by the Kimura two-parameter method.¹³ Phylogenetic trees were constructed by the neighbor-joining method, and its reliability was estimated by 1000 bootstrap replications.¹⁴ All alignments were gap stripped for the generation of trees. The profile of the tree was visualized by Treeview version 1.6.5.

The phylogenetic trees based on *env*-C2V3 and *pol*-integrase sequences were constructed with representative HIV-1 strains of each subtype and CRF as a reference (Fig. 1). Out of the 27 samples from Likasi, 24 (88.9%) were found to be positive for HIV-1 PCR with *pol*-IN and *env*-C2V3 primers. The remaining 3 (11.1%) samples were negative for PCR with the *env*-C2V3 primers used in this study. The phylogenetic tree based on *env*-C2V3 sequences (Fig. 1A) showed that out of the 24

samples 13 were subtype A, three C, one D, two G, one CRF01_AE, and four U (unclassified). The outcome of the phylogenetic analysis of the *pol*-IN gene is shown in Figure 1B, and revealed that 10 were subtype A, three C, one D, four G, three H, three J, two CRF02_AG, and one U. Thus, 15 (62.5%) had a discordant subtype or CRF designation: one subtype A/G (*pol/env*), four A/U, three G/A, one G/CRF01, three H/A, one J/C, and CRF02/A, and one U/A (Tables 1 and 2). Nine (37.5%) strains had a concordant subtype or CRF designation: one subtype A, two C, one D, and one CRF02/G (Tables 1 and 2). In 14 of these 15 strains, subtype A was involved in recombination events, and among the strains with a discordant subtype or CRF designations A/U (*pol/env*) was by far the most common, followed by H/A and G/A recombination. Additional PCR analyses on three samples with a *pol/env* (+/-) profile were carried out with groups M, N, and O primers for *env*-gp41. Phylogenetic analysis based on *env*-gp41 sequences revealed the presence of two profiles: two J/J (*pol*-IN/*env*-gp41) and one C/G (Tables 1 and 2).

In the current study we found that a high proportion (16/27; 59.3%) of HIV-1 strains in Likasi were intersubtype recombinants. This is higher than that reported in other regions of the country (29–44%).^{5,8,15} In Lubumbashi, a city on the southeast border of the DRC with Zambia, subtype C was reported to be predominant (51.9%), followed by subtype A (22.1%).¹⁵ Our data highlight a high prevalence of subtype A (37.0% and 52.5%) and low prevalence of subtype C (7.4% and 12.5%) in Likasi based on *env*-C2V3 and *pol*-IN analyses, respectively. The persisting civil war and population displacement from the east on the border with Ruanda and Burundi to the southern area close to Zambia could be linked to the change of HIV-1 distribution in the southeast of the DRC.¹¹

Two HIV-1 strains from Likasi (00CD009 and 01CD208) significantly clustered with CRF02_AG reference strains (with 97.4% bootstrap value) (Fig. 1B). This is the first report of CRF02_AG in the DRC, suggesting that CRF02_AG is spreading into Central Africa. CRF02_AG and subtype A represent 70–80% of circulating HIV-1 strains in West and West-Central Africa.² However, the epidemiological significance of CRF02_AG in the DRC is yet to be investigated. The high proportion of unclassified strains (16.6%) and intersubtypic recombinants (52.3%) among HIV-1 strains circulating in the DRC indicates an old and mature epidemic of HIV-1 in the DRC.

SEQUENCE DATA

The nucleotide sequences in this study were submitted to GenBank and are available under the following accession numbers: *pol*-IN (288 bp), AY661750–AY661776; *env*-C2V3 (approximately 550 bp), AY675589–AY675612; and *env*-gp41 (405 bp), AY673112–AY673114.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by International Scientific Research Program Grants 12376002 and 14256005 from Monbukagakusho (Ministry of Education and Science).

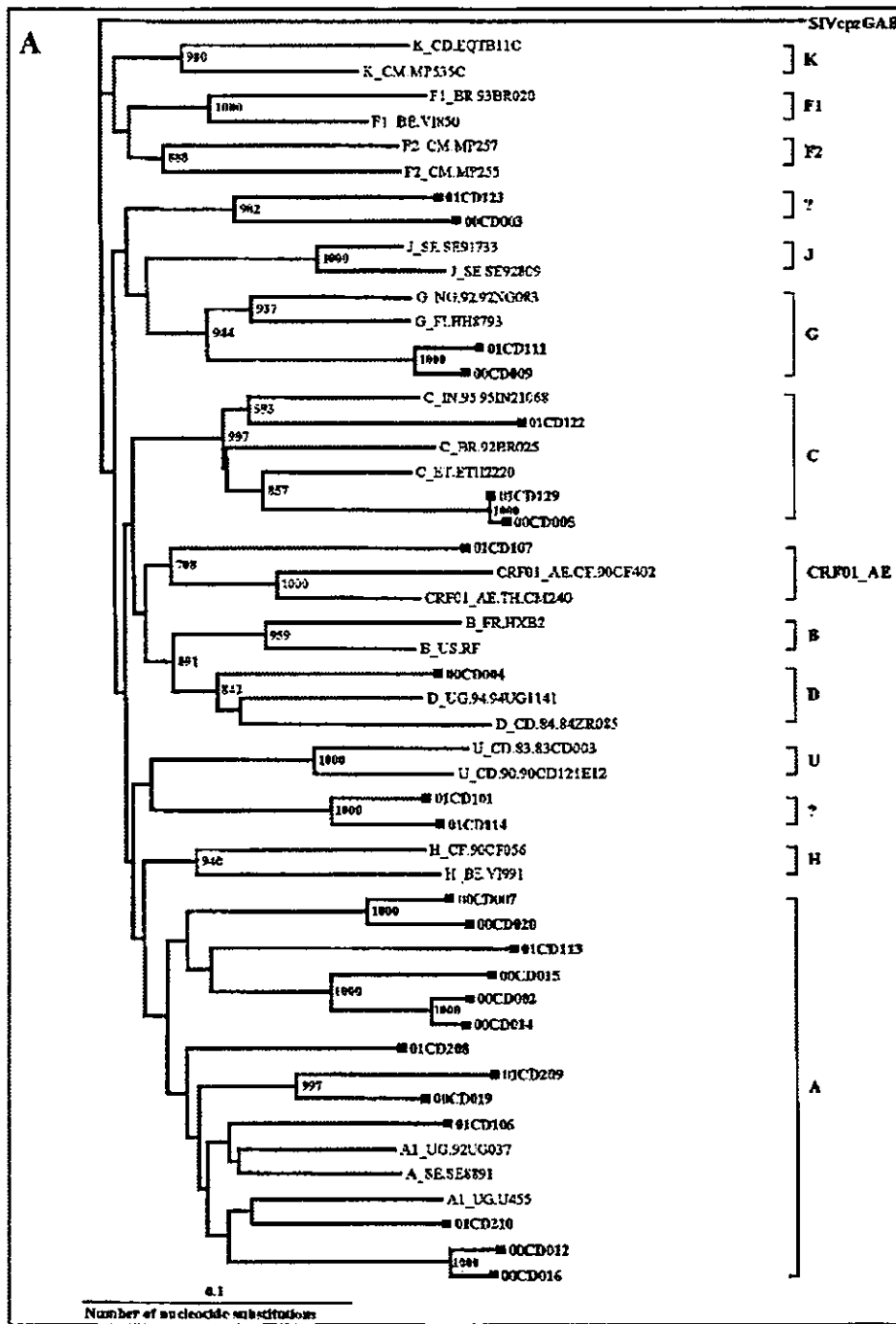


FIG. 1. Phylogenetic trees based on a part of the *env*-C2V3 gene (approximately 550 bp) (A) and *pol*-IN gene (288 bp) (B) of 24 HIV-1 strains from the southeastern Democratic Republic of Congo with reference sequences of representative subtypes/CRF. The bootstrap value at each node represents the number among 1000 bootstrap replicates that supports the branching order. Bootstrap values of 70% or higher are shown. Brackets on the right represent the major group M subtypes. Newly derived sequences (shown in bold) are marked with a filled square (■).

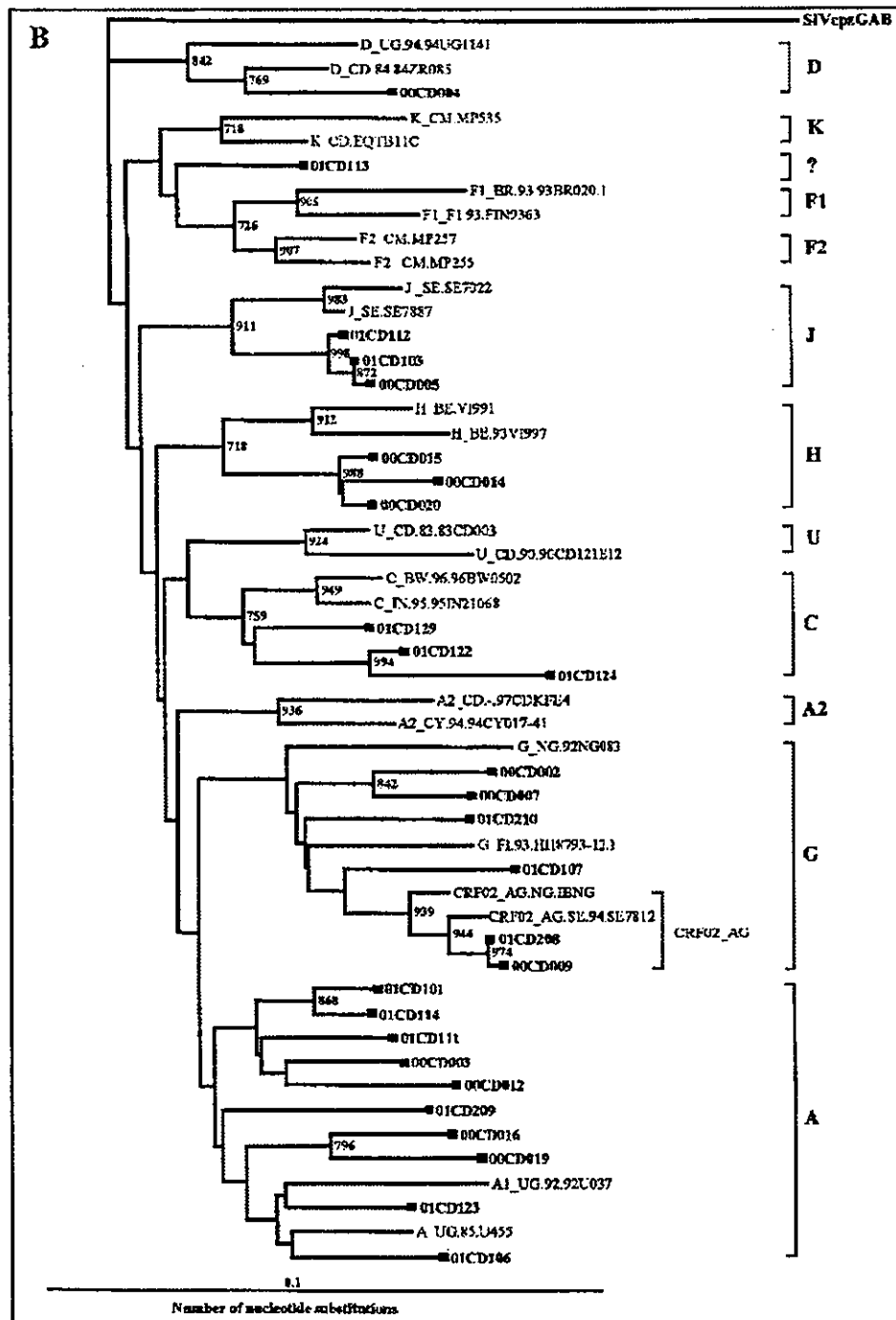


FIG. 1. Continued

TABLE 1. SUBTYPES IN *pol*-INTEGRASE AND *env*-(C2V3/ OR -gp41) FOR 27 HIV-1 STRAINS

ID number DRC	<i>pol-IN</i> (288 bp)	<i>env-C2V3</i> (550 bp)	<i>env-gp41</i> (405 bp)
00CD002	Subtype G	Subtype A	
00CD003	A	U	
00CD004	D	D	
00CD005	J	C	
00CD007	G	A	
00CD009	CRF02_AG (G)	G	
00CD012	A	A	
00CD014	H	A	
00CD015	H	A	
00CD016	A	A	
00CD019	A	A	
00CD020	H	A	
01CD101	A	A	
01CD103	J	ND ^a	J
01CD106	A	A	
01CD107	G	CRF01_AE (E)	
01CD111	A	G	
01CD112	J	ND	J
01CD113	U	A	
01CD114	A	A	
01CD122	C	C	
01CD123	A	U	
01CD124	C	ND	G
01CD129	C	C	
01CD208	CRF02_AG (G)	A	
01CD209	A	A	
01CD210	G	A	

^aND, not detected.

TABLE 2. SUBTYPES IN *pol*-INTEGRASE AND *env*-(C2V3) AND/OR -(gp41) GENE FOR 27 HIV-1 STRAINS

Genotypes	<i>pol-IN</i>	<i>env-C2V3</i>	n	Total (%)
Concordant	A	A	5	11 (40.7)
	C	C	2	
	D	D	1	
	J	J ^a	2	
	CRF02 (G)	G	1	
Discordant	A	U	4	16 (59.3)
	A	G	1	
	C	G ^a	1	
	G	A	3	
	G	CRF01 (E)	1	
	H	A	3	
	J	C	1	
	CRF02 (G)	A	1	
	U	A	1	

^a*env-gp41* (approximately 405 bp).

REFERENCES

- Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, *et al.*: HIV-1 nomenclature proposal. *Science* 2000;288:55-56.
- Peeters M, Toure-Kane C, and Nkengasong JN: Genetic diversity of HIV in Africa: Impact on diagnosis, treatment, vaccine development and trials. *AIDS* 2000;17:2547-2560.
- Papathanasopoulos MA, Hunt GM, and Tiemessen CT: Evolution and diversity of HIV-1 in Africa—a review. *Virus Genes* 2003;26:151-163.
- Janssens W, Buve A, Nkengasong JN, *et al.*: The puzzle of HIV-1 subtypes in Africa [editorial]. *AIDS* 1997;11:705-712.
- Vidal N, Peeters M, Mulanga-Kabeya C, *et al.*: Unprecedented degree of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) group M genetic diversity in the Democratic Republic of Congo suggests that the HIV-1 pandemic originated in Central Africa. *J Virol* 2000;74:10498-10507.
- Mokili JL, Wade CM, Burns SM, *et al.*: Genetic heterogeneity of HIV type 1 subtypes in Kimpese, rural Democratic Republic of Congo. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1999;15:655-664.
- Mokili JL, Rogers M, Carr JK, *et al.*: Identification of a novel clade of human immunodeficiency virus type 1 in Democratic Republic of Congo. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002;18:817-823.
- Vidal N, Koyalta D, Richard V, *et al.*: High genetic diversity of HIV-1 strains in Chad, West Central Africa. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003;33:239-246.
- Trask SA, Derdeyn CA, Fideli U, *et al.*: Molecular epidemiology of human immunodeficiency virus type 1 transmission in a het-

- erosexual cohort of discordant couples in Zambia. *J Virol* 2002; 76:397-405.
10. Handema R, Terunuma H, Kasolo F, *et al.*: Emergence of new HIV-1 subtypes other than subtype C among antenatal women in Lusaka, Zambia. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2001;17:759-763.
 11. Mulanga C, Bazepeo E, Mwamba J, *et al.*: Political and socioeconomic instability: How does it affect HIV? A case study in the Democratic Republic of Congo. *AIDS* 2004;18:833-834.
 12. Yang C, Pieniazek D, Owen SM, Fridlung C, *et al.*: Detection of phylogenetically diverse human immunodeficiency virus type 1 groups M and O from plasma by using highly sensitive and specific generic primers. *J Clin Microbiol* 1999;37:2581-2586.
 13. Kimura M: A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotides sequences. *J Mol Evol* 1980;16:111-120.
 14. Saitou N and Nei M: The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987;4:406-425.
 15. Vidal N, Mulanga C, Bazepeo E, *et al.*: A constant and extremely high genetic diversity of HIV-1 group M strains in the Democratic Republic of Congo, between 1997-2002 (Abstract No. 246: S243). Proceedings of the 2nd International AIDS Conference on HIV Pathogenesis and Treatment, Paris, 13-16 July 2003.

Address reprint requests to:

Hiroshi Ichimura
Department of Viral Infection and International Health
Graduate School of Medical Science
Kanazawa University
13-1 Takara-machi
Kanazawa 920-8640, Japan

E-mail: ichimura@med.kanazawa-u.ac.jp