

C. 研究結果

分担研究者はケモカインレセプター(CCR5)に対する一群のアンタゴニストを同定 (Maeda & Mitsuya, *J Biol Chem.* 276:35194-200, 2001)、平成 15/16 年度にはその1つである AK602/aplaviroc (AVC) (図 1) が試験管内で強力な活性を示し(IC₅₀: 0.2 nM)、既存の抗 HIV 剤 [逆転写酵素阻害剤(RTIs), プロテアーゼ阻害剤(PIs)] と全く交差耐性を認めず (Maeda & Mitsuya, *J.Virol.* 78: 8654, 2004)、動物モデル(huPBL-NOG-SCID マウス)の系でも強力な抗 HIV 活性を示すこと (Nakata & Mitsuya, *J.Virol.* 79:2087, 2005) を報告した。

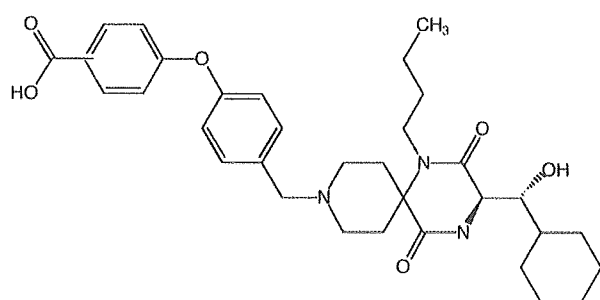


図 1. Aplaviroc (AVC)の構造

本年度、分担研究者のグループは AVC が逆転写酵素阻害剤(AZT、NVP)、プロテアーゼ阻害剤(IDV)、侵入阻害剤 (AMD3100、sCD4)、融合阻害剤(T-20)などとの併用で多くの薬剤との強い相乗効果を認め、CCR5 阻害剤が多剤併用療法で有効な効果を持つ事を示した(Nakata & Mitsuya, 投稿準備中)。

また、AVC は CCR5 に対する強力な結合親和性 (K_D 値: ~3 nM) を持ちながら、ケモカイン (RANTES) の CCR5 への結合にはわずかしか影響を与えず、RANTES が CCR5 を介してもたらす生理的作用についても完全には阻害しないことを示した (Maeda & Mitsuya, *J.Virol.* 78: 8654, 2004)。AVC のこのような特徴を構造学的に解析するために ³H ラベル CCR5 阻害剤と変異 CCR5 発現細胞株を用いた生物学的結合能解析実験系に CCR5・CCR5 阻害剤のコンピューターモデリングの手法を組み合わせた構造解析系を用いた解析を進めてい

ることを以前に報告したが、本年度の詳細な解析により、AVC は CCR5 (図 2) の細胞外ドメインと上部膜貫通ドメインで形成される疎水性ポケットに結合しており (赤矢印)、その結合部位は他の構造を有する CCR5 阻害剤 (SCH-C, TAK-779) ともおおよそ一致するもののいくつかの領域でその結合様式が異なっていることを見出した (図 3)。既に複数の CCR5 阻害剤の詳細な結合様式解析 (ドッキングモデリング作成) を終了 (Maeda & Mitsuya, *J Biol Chem.*, Published on-line; Feb, 13, 2006) 現在、より詳細なモデル構築を進めている。

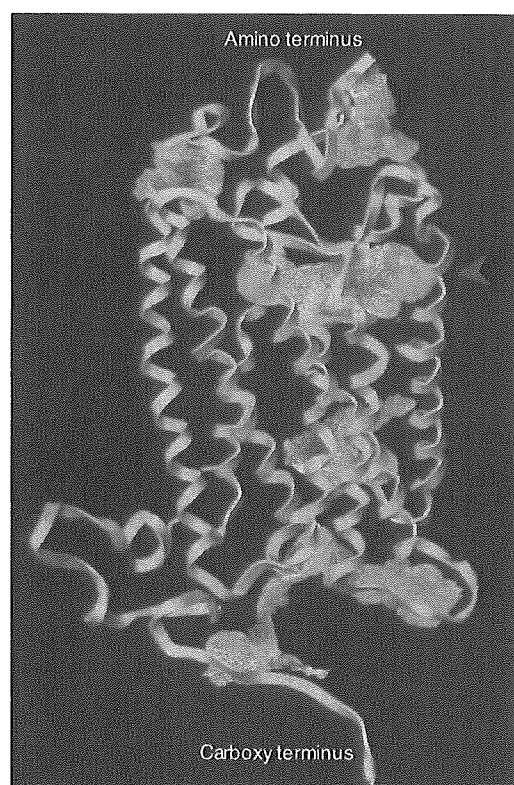


図 2. ウシロドプシンの結晶構造を基にしてモデリングしたヒト CCR5 の構造。

今回、AVC を含む CCR5 阻害剤の結合に重要な CCR5 のポケットがケモカイン作用および HIV 感染に与える影響についてアミノ酸レベルでの詳細な検討も行った。その結果、ポケットの一部 (第 4-5 膜貫通ドメイン近傍) に HIV 感染に重要でありながらケモカイン作用へはほとんど影響しない領域があることを明ら

かにした (図 3; Gly163, Ile198 など)。

図 3-A

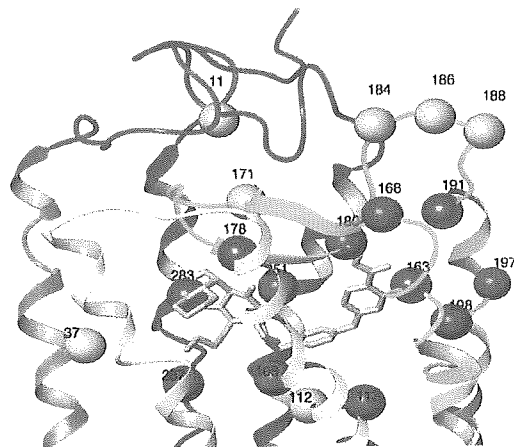


図 3-B

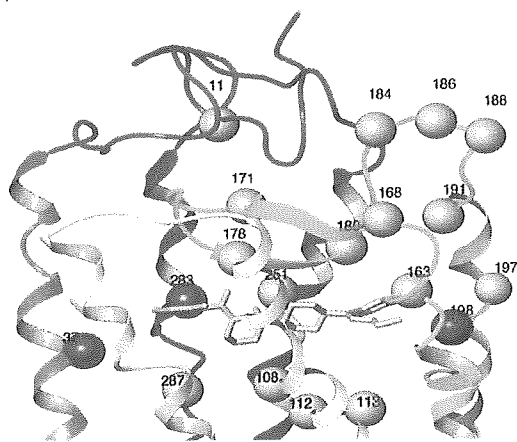


図 3-C

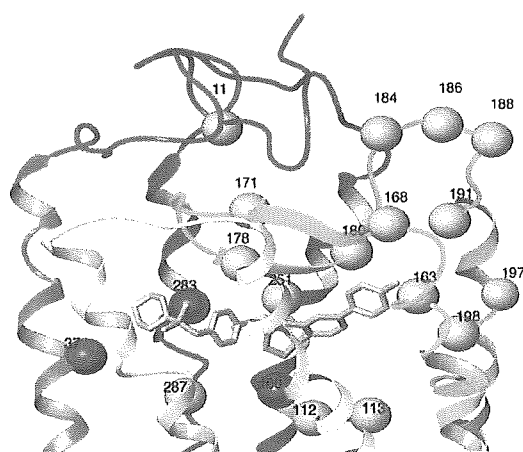


図 3. 異なる CCR5 阻害剤の CCR5 との結合モデル。
AVC (図 3-A)、SCH-C (図 3-B)、TAK-779 (図 3-C)

C) のいずれも共通のポケットに結合するが、結合に重要なアミノ酸は異なる (赤: 結合に非常に重要なアミノ酸、ピンク: 結合に重要なアミノ酸)。一方でポケットの一部にケモカインへの影響が少なく HIV のみに重要な部位 (例えば Gly163, Ile198) が存在することが分かった。

更に AVC を含む CCR5 阻害剤の結合に重要な CCR5 のポケットがケモカイン作用および HIV 感染に与える影響についてアミノ酸レベルでの詳細な検討も行った。その結果、ポケットの一部 (第 4-5 膜貫通ドメイン近傍) に HIV 感染に重要でありながらケモカイン作用へはほとんど影響しない領域があることを明らかにした (図 3; Gly163, Ile198 など)。このような HIV 感染のみに重要な構造をターゲットとした低分子化合物をデザインすることでケモカインレセプターの生理的作用を阻害しない抗 HIV 薬のモデリングが可能である事を示した (Maeda & Mitsuya, *J Biol Chem.* Published on-line; Feb. 13, 2006)。

D. 考察

分担研究者 (満屋) は抗 AIDS 薬の研究・開発および耐性発現メカニズムの解析に早い時期から精力的に取り組んできたが、今回の CCR5 をターゲットとした抗 HIV 剤開発もその 1 つである。ケモカインレセプター阻害剤は既存の抗 HIV 薬と異なり生体 (細胞) の分子を標的とした薬剤であるため、長期に亘りケモカイン作用を阻害する事による生体への影響は否定できない。実際に CCR5 を含むケモカインレセプターが各種感染症に対する免疫応答や移植片拒絶反応に関与しているという報告がされている。今回の研究成果は薬剤の作用機序の詳細な構造学的解析により免疫系を含む生体への影響の少ない新規薬剤の計画的デザインの可能性を示唆するものである。AVC は米国での臨床試験 (第 3 相試験) で AIDS 患者に単剤および併用で投与されて、強力な抗 HIV 活性を発揮することが示されたが、不測の肝障害が一部の患者で見られて臨床試験への新しい患者の enrollment は中断 (2005 年 12 月現在)、現在我々が検討した多数の類似体 (congeners)

の中から back-up の SDP 誘導体を選定中である。一方で、上述の通り分担研究者はこれ迄に蓄積した生物学的・構造学的解析結果を基に信頼性の高い CCR5 と低分子化合物の構造モデルの構築を終えており、既にこのモデルを用いて新たな化合物のデザインを始めている。このように実証的データに基づいた新規化合物のデザインが有望な薬剤の開発に繋がる可能性は高いと期待できる。

E. 結論

本研究は構造学的データから、より特異的・選択的な薬剤のデザインを図るという最近の分子標的のアプローチに即した研究といえる。今回の研究成果がより新しい、免疫系を含む生体への影響の少ない抗 HIV 作用に特化した新しい治療薬の同定、開発へとつながる可能性は高いと評価してよいと思われる。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakata, H., Maeda, K., Miyakawa, T., Shibayama, S., Matsuo, M., Takaoka, Y., Ito, M., Koyanagi, Y., and Mitsuya, H. (2005) Potent anti-R5 human immunodeficiency virus type 1 effects of a CCR5 antagonist, AK602/ONO4128/GW873140, in a novel human peripheral blood mononuclear cell nonobese diabetic-SCID, interleukin-2 receptor γ -chain-knocked-out AIDS mouse model. *J. Virol.* 79: 2087-2096.

2. Ghosh, A.K., Swanson, L.M., Cho, H., Leshchenko, S., Hussain, K.A., Kay, S., Walters, D.E., Koh, Y., and Mitsuya, H. (2005) Structure-Based Design: Synthesis and biological evaluation of a series of novel cycloamide-derived HIV-1 protease inhibitors. *J Med Chem* 48:3576-3585.

3. Matsushita, S., Yoshimura, K., Kimura, T., Kamihira, A., Takano, M., Etoh, K., Shirasaka, T., Mitsuya, H., and Oka, S. (2005) Spontaneous recovery of hemoglobin and neutrophil levels in Japanese patients on a long-term Combivir® containing regimen. *J. Clin. Virol.* 33:188-193.

4. Depboylu, C., Schafer, M.K., Schwaeble, W.J., Reinhart, T.A., Maeda, H., Mitsuya, H., Damadzic, R., Rausch, D.M., Eiden, L.E., and Weihe, E. (2005) Increase of C1q biosynthesis in brain microglia and macrophages during lentivirus infection in the rhesus macaque is sensitive to antiretroviral treatment with 6-chloro-2',3' dideoxyguanosine. *Neurobiol Dis* 20:12-26.

5. Gatanaga, H., Das, D., Suzuki, Y., Yeh, D.D., Hussain, K.A., Ghosh, A.K., and Mitsuya, H. (2006) Altered HIV-1 gag protein interactions with cyclophilin A (CypA) on the acquisition of H219Q and H219P substitutions in the CypA binding loop. (2006) *J. Biol. Chem.* 281, 1241-1250.

6. Maeda, K., Das, D., Ogata-Aoki, H., Nakata, H., Miyakawa, T., Tojo, Y., Norman, R., Takaoka, Y., Ding, J., Arnold, E., and Mitsuya, H. (2006) Structural and molecular interactions of CCR5 inhibitors with CCR5. *J. Biol. Chem.* Published on-line on February 13, 2006.

7. Ghosh, A.K., Schiltz, G., Perali, R. S., Leshchenko, S., Kay, S., Walters, D. E., Koh, Y., Maeda, K., Mitsuya, H. (2006) Design and synthesis of novel HIV-1 protease inhibitors incorporating oxyindoles as the P2'-ligands. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 76: 1869-1873.

8. Yin, P.D., Das, D., and Mitsuya, H. (2006)

Overcoming HIV Drug Resistance through Rational Drug Design Based on Molecular, Biochemical, and Structural Profiles of HIV Resistance. *Cell Mol Life Sci.* (In press)

2. 学会発表

1. Hiroto Nakata, Y Koh, E Kodama, G Yang, S Kohgo, H Hayakawa, H Ohrai, M Matsuoka, Y C Chen and H Mitsuya
2. Intracellular metabolism of 2'-deoxy-4'-C-ethynyl-5-fluoroadenosine, a novel 4'-C-ethynyl nucleoside analog potent against multidrug-resistant HIV-1 variants. The 13th conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Denver, Colorado, Feb.5-8, 2006
3. Yasuhiro Koh, H Nakata, H Ogata-Aoki, M Nakayama, S Leschenko, A Ghosh and H Mitsuya
4. Determination of resistance profile of GRL-02031, a novel nonpeptidic protease inhibitor containing a cyclopentanyltetrahydrofuran moiety. The 13th conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Denver, Colorado, Feb.5-8,

2006

5. Manabu Aoki, H Aoki and H Mitsuya
TTNTRNS: An amino acid insert near the p17/p24 Gag cleavage site associated with resistance to protease inhibitors. The 13th conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Denver, Colorado, Feb.5-8, 2006

H. 知的所有権の出願・登録状況

1.特許取得

- 1) 特願 2000-137975 整理番号 YP2000-007 (平成 12 年) 4'-C-エチニルピリミジンヌクレオシド化合物
- 2) 特願 2001-079611 整理番号 ONP3741 (平成 13 年) トリアザスピロ [5, 5] ウンデカン誘導体を有効成分とする HIV 感染の予防および/または治療剤

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（国際医学協力研究事業）
分担研究報告書

HIV-CTL エピトープが CTL 認識を回避する分子機構

分担研究者：岩本愛吉 東京大学医科学研究所附属病院長

研究要旨

日本人に高頻度な HLA-A24 陽性者において *nef* 遺伝子内の CTL エピトープ Nef138-10 に着目し、選択圧存在下（HLA-A24 陽性者）におけるエスケープ変異体の出現速度および選択圧非存在下（HLA-A24 陰性者）における復帰変異体の出現速度について検討した。その結果、HLA-A24 による選択圧の無い環境において、変異体 Nef138(Y2F)から野生型が優勢となるまでには年余の長時間を要することが判明した。逆に、HLA-A24 陽性急性感染者 3 症例全てにおいて、調べたもっとも早期のサンプルにおいてすでに Nef138(Y2F)変異体のみが検出されたため、HLA-A24 の選択圧によりエスケープ変異体が出現するまでに要する期間についてはさらに研究を要する。

A.研究目的

抗 HIV 薬の進歩、多剤併用療法（HAART）の導入により HIV 感染症は「コントロール可能な慢性感染症」的な側面を持つようになってきた。しかしながら薬剤耐性ウイルスの出現、長期服用による副作用、医療費増加といった深刻な問題点も多々存在し、抗 HIV 薬のみに依存しない HIV コントロール法の開発が急務である。HIV は感染個体において非常に強い免疫応答を誘導することが知られており、特に HIV 特異的細胞性免疫が HIV のコントロールに重要であることが知られている。我々のグループでは HAART の効果を補填するような治療ワクチンの開発を目指しているが、その基礎として日本で流行している HIV について細胞傷害性 T 細胞（CTL）の標的となる配列（CTL エピトープ）の解析を行った。

HIV は変異を起こしやすいウイルスであり、宿主の免疫応答に対応した変異体が選択される可能性がある。CTL は HLA class I 分子によって提示された抗原ペプチド（CTL エピトープ）を認識するが、多型性に富む HLA は民族によって異なった分布を示す。遺伝的背景を異にする集団においてどのような特徴を持った HIV

が流行しているかを解析することは、治療ワクチンあるいは予防ワクチンの開発において極めて重要な基礎的データを提供すると考える。本研究では日本人の約 70%が発現する HLA class I 分子（HLA-A24）により提示される HIV の CTL エピトープに注目し、日本で流行している HIV の遺伝子解析を行った。

B.研究方法

医科学研究所附属病院で経過観察した HIV サブタイプ B に感染している日本人 HIV 感染者の血漿を用いた。HLA-A24 陽性者が 38 名、HLA-A24 陰性者が 33 名であった。また感染経路は性感染が 43 名、（HLA-A24 陽性 23 人、陰性 20 人）と汚染血液製剤による感染（血友病患者）（HLA-A24 陽性 15 人、陰性 13 人）であった。血漿から HIV ゲノム RNA を含むトータル RNA を抽出し HLA-A24 に提示されることの知られている *nef* 遺伝子内の CTL エピトープ（Nef138-10）を含む領域を RT-PCR 法により増幅し、シーケンス反応により塩基配列を決定した。その結果からアミノ酸配列を推定しエピトープ同定に使われた標準株（SF2 株）のアミノ酸配列と比較した。

(倫理面への配慮)

文部科学省、厚生労働省合同の『疫学研究に関する倫理指針』を遵守した。

C. 研究結果

Nef138-10 と名づけられた CTL エピトープにおいて、HLA-A24 陽性 HIV 感染者で高頻度に見られるアミノ酸変異が明らかになった。Nef138-10 では 2 番目のタイロシン (Y) がフェニルアラニン (F) への変異(Nef138(Y2F))が高頻度に認められ、HLA-A24 陽性感染者における出現頻度は Nef138(Y2F)は 93%であった。それに対して世界的なデータベース上の HIV サブタイプ B における出現頻度 27%であり、日本人 HLA-A24 陽性感染者で見られた出現頻度に比べて有意に低かった。HLA-A24 陽性 HIV 感染者では Nef138(Y2F)の変異は年余に渡って維持されていた。

CTL による選択圧をさらに解析するため、HLA-A24 陽性の急性感染者 3 名の血漿中 HIV の経時的変化を解析するとともに、HLA-A24 陰性で初期のサンプルで Nef138(Y2F)変異を認めた 2 症例における経時的変化を解析した。

【A24 陽性急性感染症例】

1) A24-J023

2001 年 8 月 6 日の検査にて ELISA 法および PCR 法により HIV 陽性と判明したが、WB 法では陰性であった。2001 年 9 月 3 日になっても WB 法で 4 本のバンドだけが陽性で、結果の解釈は判定保留であった。8 月 6 日のサンプルを解析することができたが、Nef138(Y2F)陽性であった。

2) A24-J024

1998 年 10 月 1 日に高熱、発疹で急性レトロウイルス症候群を発症した。10 月 27 日に初診したが、Nef138(Y2F)陽性であった。

3) A24-J025

2000 年 10 月 31 日の検査で抗 HIV 抗体陰性と考えられた症例。2001 年 4 月 2 日に高熱、関節痛で急性レトロウイルス症候群を発症し

た。2001 年 5 月 16 日に検査で HIV 陽性と判明し、紹介され 6 月 7 日に当院を初診したが、Nef138(Y2F)陽性であった。

【A24 陰性症例】

1) NA24-J015

1998 年 4 月 20 日の検査で HIV 陽性と判明した。無症候の慢性感染期であったが、感染時期については情報が無い。1998 年 6 月 26 日の当院初診時のサンプルでは Nef138(Y2F)陽性であった (12 クローン調べのうち 12 クローンとも Nef138(Y2F)陽性)。1999 年 7 月のサンプルでは、11 クローン中 11 クローンとも Nef138Y の野生型に復帰していた。興味深いことに Nef138-10 CTL エピトープの近傍 -1 では、1998 年 6 月 26 日から 2001 年 4 月 16 日のサンプルまで T 変異が残存しており、2003 年 1 月 16 日のサンプルで野生型の I に復帰していた。

2) NA24-J018

1992 年 4 月 10 日に当院を初診して HIV 陽性と判明した症例。この時点ですでに無症候の慢性感染期にあったものと思われる。1996 年 4 月 8 日すなわち初診からほぼ 4 年たった時点で 11 クローン中 10 クローンが Nef138(Y2F+T5C) 変異であった。1998 年 4 月 6 日すなわち初診から 6 年たった時点でも 10 クローン中 2 クローンが Nef138(Y2F+T5C)変異、8 クローンで第 2 位が野生型の Y に変異した復帰変異していた。

D. 考察

急性感染期の A24 陽性症例 3 例を調べたが、3 例ともすでに Nef138(Y2F)変異を有していた。日本人には HLA-A24 陽性者が多いため、Virus donor の中で選択された変異体に感染したのか、Nef138(Y2F)の変異が急速に選択されるのかについては結論を得られなかった。

A24 陰性で Nef138(Y2F)に関する選択圧が働いていないと考えられる慢性感染期の症例 2 例において経過とともに CTL エピトープの復帰変異を追及したところ、*nef* 遺伝子内の Nef138-10 CTL エピトープにおいては復帰変異に年余の時間がかかることが判明した。

E. 結論

HLA-A24 によって拘束される *nef* 遺伝子内の Nef138-10 CTL エピトープにおいて、選択圧のある A24 陽性者においては、非常に高い

頻度で第 2 位の Y が F に変異しており、エスケープ変異体と思われる。A24 による選択圧の無い環境において変異体 Nef138(Y2F)から野生型が優勢となるまでには年余の長時間を要することが判明した。逆に、HLA-A24 の選択圧により Nef138(Y2F)変異体が出現するまでに要する期間については、調べた 3 症例で調べたもっとも早い時期にすでに変異体となっていたためさらに研究を要する。

F.健康危険情報

特記すべきこと無し

G.研究発表

別紙

1. Rojanawiwat, A., Miura, T., Thaisri, H., Pathipvanich, P., Umnajsirisuk, S., Koibuchi, T., Vongheree, S., Iwamoto, A., Ariyoshi, K., and Sawanpanyalert, P. Frequent detection of Epstein-Barr virus and cytomegalovirus but not JC virus DNA in cerebrospinal fluid samples from human immunodeficiency virus-infected patients in northern Thailand. *J. Clin. Microbiol.* 43:3484-3486, 2005.
2. Tomonari, A., Takahashi, S., Shimohakamada, Y., Ooi, J., Takasugi, K., Ohno, N., Konuma, T., Uchimaru, K., Tojo, A., Odawara, T., Nakamura, T., Iwamoto, A., and Asano, S. Unrelated cord blood transplantation for a human immunodeficiency virus-1-seropositive patient with acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplantation* 36:261-262, 2005.

H.知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

なし

平成 17 年度厚生労働科学研究費補助金（国際医学協力研究事業）「HIV 感染症における免疫応答の解析とその臨床応用に関する研究 (H17-国医-3)」

分担研究報告書（平成 17 年度）

分担テーマ：樹状細胞を用いた抗 HIV-1 感染防御免疫応答の誘導

分担研究者 田中勇悦 琉球大学・医学部・免疫学分野 教授

研究要旨：HIV 感染病態制御には種々の機能的ヘルパー T 細胞による免疫応答が必須である。その誘導と調節を行なう樹状細胞(DC)に注目し、ヒト DC の分化培養方法の工夫を試みその機能を解析した。DC の前駆体である単球の CCR5 または CXCR4 をプレートに固相化した特異的単クロン抗体で架橋すると、単球は一晩でプレートに強く接着した。そして他のサイトカインを加えることなく IL-4 を加えて培養し、最終的に IFN- β で成熟させることにより Th1 を優位に誘導する機能的 DC に分化した。このようにして培養した DC には、細胞表面上の CD4 と CCR5 発現の down-modulation が観察された。

A. 研究目的

HIV 感染およびエイズ発症阻止を目的とする免疫誘導・免疫療法の研究において、DC の役割が注目されている。そこでヘルパー T 細胞誘導活性の高い DC の分化培養方法を研究することを目的に研究を開始した。通常、DC は末梢血単球を DC 誘導サイトカインである GM-CSF と IL-4 を混合した培地で培養することによって調製される。培養にあたって単球は、プラスチック付着性で粗精製するか、あるいは抗体を用いて negative あるいは positive 選択法で精製されている。私達は、本研究に先立ち、自家製の抗 CCR5 または CXCR4 単クロン抗体をコートしたプレートで単球を培養すると単球がプレート上にフレアを伸ばし強力に接着するこ

とを発見した。CCR5 および CXCR4 は HIV-1 の重要な受容体であり、かつ特定のケモカインが結合し種々の刺激を細胞に伝達する機能を持つ。本年度は、このような CCR5 または CXCR4 の架橋が DC の分化等にどのような影響を与えるかを検討した。

B. 研究方法（倫理面への配慮）

1. DC 培養：単球は PBMC から抗体 negative selection 法で分離するか、あるいはプラスチック付着性をもとに分離した。その後試験管内でサイトカイン添加により DC に分化させる方法を用いた。この DC は未熟なので最終成熟には IFN- β を用いた。単球の CCR5 および CXCR4 架橋には、プラスチックプレートに固相化した自家製特異的単クロン抗体(抗 CCR5

T312、および抗 CXCR4 A120)を用いた。この場合は、IL-4のみ添加の条件も検討した。

2. 得られた DC の表現系は、CD80, CD83, CD86, HLA-DR, CD14, CXCR4, CCR5 等に対する単クローン抗体による染色後、Flowcytometry で解析した。

3. DC の機能は、in vitro においてはアロナイーブ CD4+T 細胞との混合培養における細胞増殖およびサイトカイン産生能で検討した。in vivo における機能解析には、hu-PBL-SCID (RAG2/c γ 欠損 SCID) マウスを使った。

4. 種々のサイトカインの定量には市販の ELISA キットを用いた。

すでにこのような動物実験を含む一連の研究は、琉球大学の動物実験倫理委員会・感染微生物取り扱い安全管理委員会で審査され、許可されている。

C. 研究結果

免疫応答誘導に用いるための活性の高い DC の分化培養方法を研究する中で、新たな試みとして CCR5 及び CXCR4 分子の架橋の効果を検討した。この研究のきっかけとなったのは、単球をこれらの分子を架橋するプレート上で培養すると強力にプレート上に接着することを観察したことである (Tanaka ら未発表)。架橋による変化は単球の Fc 受容体の架橋によるものでなく、ケモカイン受容体がエピトープ依存性に架橋されることが必要であっ

た。細胞の接着は、CD18 抗体で阻止されたことより β 2 インテグリンの活性化が示唆された。さらに、接着は PI3K 阻害剤で阻止されたことより G 蛋白からの細胞活性化シグナル伝達が関与することも示唆された。

これらのケモカイン受容体を架橋された単球は、大量の M-CSF を産生し、他にも RANTES, MIP-1 α /beta などの β ケモカインを産生した。予想通り、他のサイトカインを加える必要なく、通常の培地のみでこの架橋単球は食作用のあるマクロファージに分化した。

さらに CCR5 または CXCR4 を架橋した単球を GM-CSF+IL-4 または IL-4 のみを加えて培養してみた。1 週間の培養でこれらの細胞は形態的に DC 様で、CD80/83/86/HLA-DR 陽性であった。LPS と IFN- γ で刺激すると IL-12(p70) を産生したが、非架橋下で誘導した DC と比較すると IL-12 産生はやや低かった。また、架橋誘導 DC の細胞表面上では CD4 ならびに CCR5 の発現が down-modulation されていた。

次に両者の DC を IFN- β で成熟させて免疫誘導機能を比較した。架橋培養 DC は、非架橋培養 DC と比較し、in vitro でナイーブアロ CD4+T 細胞の Th1 への誘導活性が強かった。さらに、hu-PBL-SCID マウスを用いた in vivo における OVA に対するヒトの T 細胞免疫応答の誘導能を比較すると、架橋 DC の方が IFN- γ 産生を強く誘導した。つまり、単球上の CCR5 ま

たは CXCR4 を架橋すると、GM-CSF を加える必要なく IL-4 のみで Th1 免疫刺激に優れる機能的 DC が誘導されることが明らかとなった。

D. 考察

本年度の研究では、未だ十分に確立されていないヒトの機能的 DC の培養方法とそれを用いて抗原特異的免疫誘導について研究を行なった。これまで我々が用いてきた方法は、CD14-negative selection 方法で分離した単球を GM-CSF と IL-4 で培養誘導し、IFN- β で最終段階に分化させる方法である。このようにして分化させた DC は、抗原特異的免疫応答賦活作用を持つこと、特に HIV-1 感染症の個体シミュレーションを可能とする動物モデルである hu-PBL-SCID マウスでは、不活化 HIV-1 で感作した DC による免疫で R5 HIV-1 の感染を阻止する免疫応答を誘導することを証明した。

今回、新たな DC の分化培養法として、単球のケモカイン受容体を架橋することにより、IL-4 のみで Th1 誘導性 DC が培養誘導できることを明らかにできた。この方法を使うと、単球を PBMC から接着法により簡単に分離させることも可能になる。hu-PBL-SCID マウスを使った *in vivo* 免疫試験でも OVA と KLH に対する Th1 誘導性が証明された。

さらに、この方法で誘導された DC の細胞表面には明らかな CD4 と CCR5 分子の down-modulation が見られる。つまり、

他の DC よりも架橋培養 DC は、CCR5 親和性 HIV-1 感染に対し感染しにくいことが伺われる。実際、JR-CSF 株 HIV-1 を感染させても架橋しないで培養した DC に比べて HIV-1 の産生量のはるかに低かった (未発表)。このような観察は、架橋培養 DC のもう一つのアドバンテージであり、HIV-1 感染症を人為的免疫操作で制御するための DC の有力な候補であると考えている。

E. 結論

免疫賦活性 Th1 の誘導機能的 DC の新たな分化誘導方法を見いだした。実際にこの新規 DC が HIV-1 感染抑制免疫応答を誘導できるかどうか、感染実験で検討する必要がある。

F. 健康危険情報

HIV-1 の感染実験、ウイルスの保管は全て琉球大学医学部で定める感染微生物取り扱い安全管理委員会の規定に基づき、P3 実験施設で行われている。

G. 研究発表

1. 論文発表

Nimura F, Zhang L, Okuma K, Tanaka R, Sunakawa H, Yamamoto N and Tanaka Y. : Cross-linking cell surface chemokine receptors leads to isolation, activation and differentiation of monocytes into potent DC's. *Exp. Biol. Med.* 2006, in press.

2. 学会発表

- (1) 芳田剛, 河野祐治, 青木淳, 三浦義治, 田中勇悦, 小柳義夫: 抗 HIV 因子の単離: CXCR4 細胞膜移行阻害分子の同定. 第 53 回日本ウイルス学会学術集会, 2005. 11. 20: 横浜
- (2) 大隈和, 吉田篤司, 田中礼子, 田中勇悦: エイズウイルス感染細胞を標的とし攻撃する新規組換えウイルスベクター. 第 19 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2005. 12. 2: 熊本
- (3) 吉田篤司, 大隈和, 田中礼子, 山本直樹, 田中勇悦: 不活化 HIV-1 感作樹状細胞免疫と CXCR4 アンタゴニスト投与による R5 および X4 HIV-1 感染防御. 第 19 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2005. 12. 3: 熊本
- (4) 田中勇悦, 吉田篤司, 大隈和, 田中礼子, 山本直樹: HIV-1 感染防御を目的とする単球のマニピュレーション: 単球の CXCR4, CCR5 架橋を介する HIV-1 受容体の発現抑制と HIV-1 免疫誘導樹状細胞の分化培養. 第 19 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2005. 12. 3: 熊本

H. 知的所有権の出願・取得状況

なし

免疫賦活療法により誘導された CTL からの HIV の逃避

分担研究者 岡 慎一 国立国際医療センターエイズ治療研究開発センター部長

研究要旨

免疫賦活を目的とした急性期 HIV 感染者に対する計画的治療中断療法(STI療法)が終了した。一部の患者においては、一時的にウイルス抑制を示す患者が見られ CTL も誘導できていた。しかし、2年間の経過観察にて CTL からの escape mutant が出現していた。この治験は、今後の治療ワクチンを考える上で、エピトープの重要性を示唆する結果であった。

A. 研究目的

HIV 感染の急性期に、低いレベルのウイルス血症を作り免疫賦活をすることにより長期未発症者に近い状態へ誘導することが可能かもしれないという症例報告と動物実験の結果が2000年前後に相次いで報告された。この仮説を検証する目的で、急性期 HIV 感染者に対する計画的治療中断療法(STI療法)を prospective study として行った。

B. 研究方法

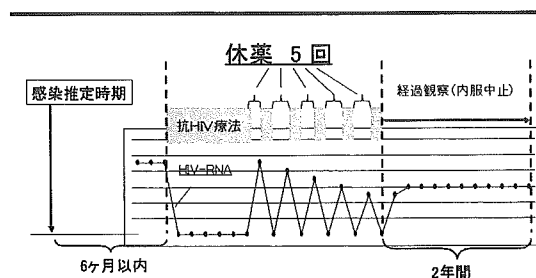
2000年11月から2002年12月までに国立国際医療センター外来を受診した HIV 感染者のうち、感染から6ヶ月以内であることが確認できた患者のみを対象とした。研究概要は、図1の通りで5回の STI を行った。経時的に、特に治療終了後の CD4, viral load(VL), CTL を観察した。CTL については、患者に HLA-A24 保有者が多かったために、A24 のエピトープについてテトラマー解析した。

(倫理面への配慮)

本臨床試験を行うに当たり、国立国際医療センターの倫理委員会の承認を受け、臨床研究に関する倫理指針にのっとりたプロトコールにて行った。個人のプライバシーに関しては、厳重に守られるよう最大限努力した。

< 図 1 >

治療概要(シエーマ)

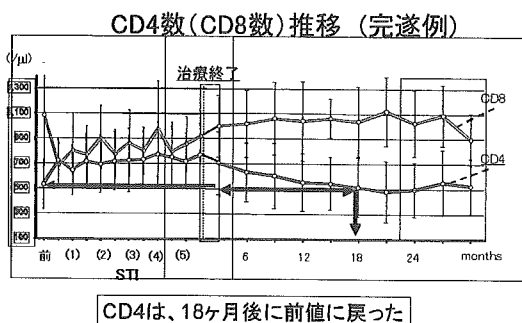


C. 研究結果

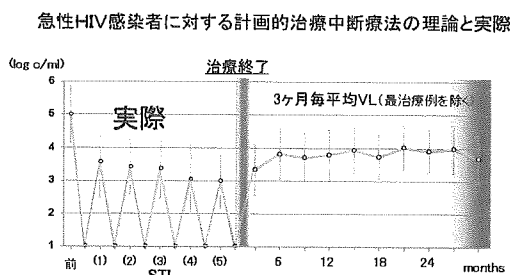
この期間中に、432名の新患があり、このうち32名が感染から6ヶ月以内の急性期と判定された。このうち26名から同意を取得でき、臨床試験への組み入れを行った。このうちプロトコールを

完遂できたのは15名であった。この15名のうち12名が HLA-A24 保有者であった。15名の CD4 の推移を図2に、VL の推移を図3に示す。

< 図 2 >



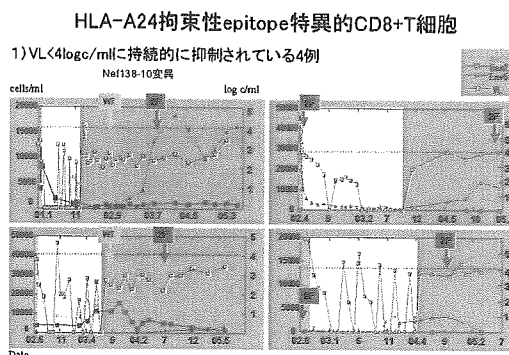
< 図 3 >



15名の平均値で見ると図のように徐々に CD4 の低下と VL の上昇が認められた。しかし、個々のケースを見ると、図4のように確かに VL を抑制できている例が見られた。特に、この中で、nef の epitope に注目すると、STI 後に上昇した後、低下していることがわかった。この、原因を検討するためにこの epitope の sequence を検討したところ、N 末より2番目が F 変異している mutant が出現していた(図4)。この、mutant に対する CTL の killing 活性は、wild type に比べ10分の一に低下して

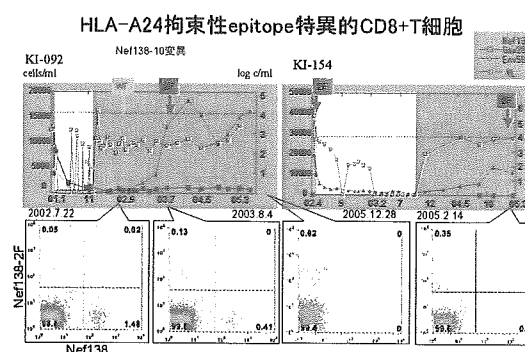
おり、CTL からの escape mutant であると考えられた。

< 図 4 >



このことをさらに確認するために wild type と 2F-mutant に対するテトラマーを作成し CTL を経時的に観察したところ、予想通り 2F の変異に伴い wild type への CTL は減少していた(図5)。

< 図 5 >



D. 考察

免疫賦活療法により、一時的に確かに CTL は誘導できていた。しかし、2年間の経過観察にて CTL からの escape mutant が出現していた。このことは、抗 HIV 薬を単剤で治療していたときと同じ結果であった。この治験は、今後の

治療ワクチンを考える上で、エピトープ質および数の重要性を示唆する結果であった。

E. 結論

免疫賦活を目的とした急性期 HIV 感染者に対する計画的治療中断療法(STI 療法)が終了した。一部の患者においては、一時的にウイルス抑制を示す患者が見られ CTL も誘導できていたが、長期未発症者への誘導は不可能であった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Bi X, Gatanaga H, Tanaka M, Honda M, Ida S, Kimura S, and Oka S. Modified Dynabeads method for enumerating CD4+ T cell count for widespread use in resource-limited situations. *JAIDS* 38: 1-4, 2005.
2. Yamanaka H, Teruya K, Kikuchi Y, Takahashi T, Kimura S, Oka S, and the HIV/Influenza Vaccine Study Team. Efficacy and immunologic responses to influenza vaccine in HIV-1-infected persons. *JAIDS* 39: 167-173, 2005.
3. Hirabayashi Y, Tsuchiya K, Kimura S, Oka S. Simultaneous determination of six HIV protease inhibitors (amprenavir, indinavir, lopinavir, nelfinavir, ritonavir, and saquinavir), the active metabolite of nelfinavir (M8) and non-nucleoside reverse

transcriptase inhibitor (efavirenz) in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Biomed Chromatogr* 20: 28-36, 2006.

4. Gatanaga H, Hachiya A, Kimura S, and Oka S. Other mutations than 103N in HIV-1 reverse transcriptase (RT) emerged from K103R polymorphism under non-nucleoside RT inhibitor pressure. *Virology* 344: 354-362, 2006.
5. Matsuoka AS, Gatanaga H, Sato H, Koike K, Kimura S, and Oka S. Cooperative contribution of Gag substitutions to nelfinavir-dependent enhancement of precursor cleavage and replication of human immunodeficiency virus type-1. *Antiviral Res* (in the press)

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

H. 謝辞

本研究は、国立国際医療センター田沼順子氏、照屋勝治氏、熊本大学エイズ学研究センター藤原守氏、滝口雅文氏を共同で行われた。

研究要旨

プロテアーゼ阻害剤耐性の獲得機構を理解することを目的にプロテアーゼ阻害剤耐性変異と Gag 変異間の連鎖不平衡解析を行った。その結果 Gag 基質領域にプロテアーゼ阻害剤耐性変異と連鎖した3つの変異（Y132F, L449V, R452K）があることが新たに明らかにされた。今回の解析よりプロテアーゼ阻害剤耐性変異と gag 領域の配列には密接な関連があることが改めて確認された。薬剤耐性の評価を正確に行うためには gag の変異についても考慮する必要性が強く示唆された。

A. 研究目的

HIV-1 はプロテアーゼ阻害剤による治療によるプロテアーゼ阻害剤耐性を示す変異が生じた場合、標的である pr55Gag タンパク質も二次的に変異が生じる事が知られている。両者の関連について詳細に調査することはプロテアーゼ阻害剤耐性の獲得機構を理解する手がかりになると考えられる。

このことから、gag 全領域にわたりその塩基配列を解析し、プロテアーゼ耐性変異との関連性を見出すことを目的とした。

B. 研究方法

国立感染症研究所エイズ研究センターにおいて薬剤耐性遺伝子検査を実施したものを対象とした。

患者血漿 200 μ l よりウイルス RNA を抽出し、RT-PCR により gag 全長と、protease 全長を含むおよそ約 1.9kb ウイルス塩基の増幅を行い、塩基配列解析を行った。塩基配列解析結果から、サブタイプ B、薬剤耐性変異の有無の同定そして gag 領域全長のアミノ酸配列を決定した。同定した protease の薬剤耐性変異と pr55^{Gag} のアミノ酸変異を、統計的手法である連鎖不平衡解析を行うことで評価した。この解析は、2つの遺伝子座間の連鎖の有無を、図1に示した様に理論値と観察値でのずれを数値化することにより判定する。このずれの大きさを見ることで互いの連鎖の強さを確認することが出来る。今回の解析では連鎖不平衡解析を、既知の薬剤耐性変異と gag 領域全長のアミノ酸配列対し

て網羅的に行った。同定に当たっては算出された D 値が 0.01 以上であり、その時 χ^2 乗検定を行って有意水準が 1% 以下だったものを、有意な変異として取り上げた。

C. 研究結果

対象症例の解析を行った結果、ウイルスサブタイプ B が 132 例、CRF01_AE が 26 例、その他が 5 例であった。このうち、統計的解析に十分な症例数が確保できたサブタイプ B について連鎖不平衡解析を行った。

表1は連鎖不平衡解析の結果、プロテアーゼ領域の薬剤耐性に対して現れたと考えられる gag の変異を示している。括弧の中はそれぞれ観測された症例数を示している。表に示した以外にも薬剤耐性変異が存在したが、症例数が5未満のものは有効な統計解析が行えないため、表には示さなかった。表中下線で示されているものは、特に gag で機能的に重要な基質領域（切断部位）を表しており、アスタリスクはそれぞれの有意水準を示している。表1に示すように、V82A、L90M、L10I、I54V、A71V に共通する有意の基質領域の変異として、Y132F の変異を確認した。次に M46I、M46L、V82A、L90M、L10I、L10F、L24I、L33F、I54V に対する A431V を確認した。もう一つ共通する変異として、D30N、N88D に対する R452K が確認された。A431V の変異については既に報告されているが、Y132F については今回の私たちの解析で初めて確認された。L449 のコ

ドンについては既にM46IとL449Fとの関連性が報告されているが、今回認められたL90M、L10Iに対するL449Vの変異も新たなものである。

結論としてpr55^{Gag}の基質領域に現れた変異は、従来より知られていたA431VあるいはL449Fに加えて、新たに3つの変異(Y132F, L449V, R452K)があることが明らかにされた。

D. 考察

今回のプロテアーゼの薬剤耐性変異とgagの変異間の相互干渉を網羅的に調査した結果、プロテアーゼ阻害剤耐性獲得に伴って、pr55^{Gag}タンパク質の基質領域に変異が生じることが改めて確認された。またそれ以外の領域においてもプロテアーゼ阻害剤耐性と連鎖するアミノ酸変異が生じることが明らかにされ、プロテアーゼ阻害剤耐性変異の獲得機序の理解にはgag領域の解析も行うことが必要であると考えられた。

E. 結論

今回の解析よりプロテアーゼ阻害剤耐性変異とgag領域の配列には密接な関連があることが改めて確認された。薬剤耐性の評価を正確に行うためにはgagの変異についても考慮する必要が強く示唆された。

F. 研究発表

(1)論文発表

- 1) Joke Snoeck, Rami Kantor, Robert W. Shafer, Kristel Van Laethem, Koen Deforche, Ana Patricia Carvalho, Brian Wynhoven, Marcel A. Soares, Patricia Cane, John Clarke, Candice Pillay, Sunee Sirivichayakul, Koya Ariyoshi, Africa Holguin, Hagit Rudich, Rosangela Rodrigues, Maria Belen Bouzas, Francoise Brun-Vezinet, Caroline Reid, Pedro Cahn, Luis Fernando Brigido, Zehava Grossman, Vincent Soriano, Wataru Sugiura, Praphan Phanuphak, Lynn Morris, Jonathan Weber, Deenan Pillay, Amilcar Tanuri, Richard P. Harrigan, Ricardo Camacho, Jonathan M. Schapiro, David Katzenstein, and Anne-Mieke Vandamme: Discordances between Interpretation Algorithms for Genotypic of Human Immunodeficiency Virus Are Subtype Dependent. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 50(2): 694-701, 2006
- 2) Hua Yan, Tomoko Chiba Mizutani, Nobuhiko Nomura, Tadakazu Takakura, Yoshihiro Kitamura, Hideka Miura, Masako Nishizawa, Masashi Tatsumi, Naoki Yamamoto, Wataru Sugiura: A novel small molecular weight compound with a carbazole structure that demonstrates potent human immunodeficiency virus type-1 integrase inhibitory activity. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*. Vol.16: 363-373, 2005
- 3) T Ueda, L Myint, M Nishizawa, M Matsuda, W Sugiura: Analysis of interference and co-evolution between protease inhibitor resistant mutations and gag mutations. *Antiviral Therapy*. Vol.10:s116, 2005
- 4) N Hasegawa, W Sugiura, M Matsuda, K Mogushi, H Tanaka, F Ren: Inference of evolutionary forces driving HIV-1 drug-resistance acquisition under HAART using longitudinal HIV-1 protease gene samples. *Antiviral Therapy*. Vol.10:s114, 2005
- 5) K. Shiomi, R. Matsui, M. Isozaki, H. Chiba, T. Sugai, Y. Yamaguchi, R. Masuma, H. Tomoda, T. Chiba, H. Yan, Y. Kitamura, W. Sugiura, S. Omura, H. Tanaka: Fungal phenalenones inhibit HIV-1 integrase. *J. Antibiot.* Vol.58: 65-68, 2005
- 6) Hirotaka Ode, Masami Ota, Saburo Neya, Msayuki Hata, Wataru Sugiura, and Tyuji

- Hoshino: Resistant Mechanism against Nelfinavir of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Proteases. *J Phys Chem B*. Vol.109: 564-574, 2005
- 7) Miyauchi K, Komano J, Yokomaku Y, Sugiura W, Yamamoto N, Matsuda Z: Role of the specific amino acid sequence of the membrane-spanning domain of human immunodeficiency virus type 1 in membrane fusion. *J Virol*. Vol 79,4720-4729, 2005
- 8) Rami Kantor, David A. Katzenstein, Brad Efron, Ana Patricia Carvalho, Brian Wynhoven, Patricia Cane, John Clarke, Sunee Sirivichayakul, Marcelo A. Soares, Joke Snoeck, Candice Pillay, Hagit Rudich, Rosangela Rodrigues, Africa Holguin, Koya Ariyoshi, Maria Belen Bouzas, Pedro Cahn, Wataru Sugiura, Vincent Soriano, Luis F. Brigido, Zehava Grossman, Lynn Morris, Anne-Mieke Vandamme, Amilcar Tanuri, Praphan Phanuphak, Jonathan N. Weber, Deenan Pillay, P. Richard Harrigan, Ricardo Camacho, Jonathan M. Schapiro, Robert W. Shafer. Impact of HIV-1 Subtype and Antiretroviral Therapy on Protease and Reverse Transcriptase Genotype : Results of a Global Collaboration. *PLoS Medicine*. Vol. 2: 325-337, 2005
- 9) 杉浦 互 : 抗 HIV-1 薬剤の現状と薬剤開発の新たな展開. *ウイルス* 第 55: 85-94,2005
- 10) 西澤雅子, 杉浦 互: HIV-1 の薬剤耐性についての知見. *BIO Clinica*. Vol.20:51-57,2005
- 11) 杉浦 互: 新規感染者における薬剤耐性 HIV 拡散の危機~Alert for Outbreak of Drug Resitance HIV-1 Newly Infected Population~ *日本エイズ学会誌* Vol. 7: 117-120, 2005
- 12) 杉浦 互、瀧永博之、田宮貞宏、松田昌和、松見信太郎、蜂谷敦子、John Coffin、満屋裕明: シンポジウム 7. 「薬剤耐性の知見、基礎から臨床へ」を終えて. *日本エイズ学会誌*.7(3),2005
- (2)学会発表
- 1) Kato Shingo, Tsuji Kenji, Tanaka Rie, Kinai Ei, Hanabusa Hideji, Negishi Masayoshi, Sugiura Wataru: Quantitation of Antiretroviral Drugs in Hair with LC/MS/MS for Assessment of Medication Adherence. 7th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific. July 1-5. 2005, Kobe.
- 2) Saeng-aroon Siriphan, Myint Lay, Pathipvanich Panita,BAriyoshi Koya,Wichukchinda Nuanjun, Rojanawiwat Archawin, Matsuda Masakazu, Sawanpanyalert Pathom, Sugiura Wataru, Auwanit Wattana: Mutagenically-Separated PCR as a Tool for Monitoring Lamivudine (GPOvir) Resistant CRF01_AE in Thailand(GPOvir). 7th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific. July 1-5. 2005, Kobe.
- 3) N Hasegawa, W Sugiura, M Matsuda, K Mogushi, H Tanaka, F Ren: Inference of evolutionary forces driving HIV-1 drug -resistance acquisition under HAART using longitudinal HIV-1 protease gene samples. 14th International HIV Drug Resistance Workshop. June 7-11. 2005, Quebec, Canada.
- 4) T Ueda, L Myint, M Nishizawa, M Matsuda, W Sugiura: Analysis of interference and co-evolution between protease inhibitor resistant mutations and gag mutations. 14th Internatioal HIV Drug Resistance Workshop. June 7-11. 2005, Quebec, Canada.
- 5) Wataru Sugiura, Masakazu Matsuda, Junko Kakizawa, Hideka Miura, Satoshi Takeda, Masayuki Fujino, Masako Nishizawa, Naoki Yamamoto: Changes in

- Prevalence and Patterns of Drug Resistant Mutations in JAPAN-Summary of Nine Years Nationwide HIV-1 Drug Resistance Monitoring Study (1996-2004). 6th Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance. Nov.13-16, 2005, Virginia
- 6) Wataru Sugiura: Virological and Statistical Analyses of Interference between Protease Inhibitor Resistant Mutations and Gag Mutations. 13th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Feb. 5-9. 2006, Denver, USA
 - 7) Wataru Sugiura: Multi-Center Nationwide Survey of Drug Resistant HIV-1 in Newly Diagnosed HIV/AIDS Patients in Japan from 2003 to 2004. 13th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Feb 5-9. 2006, Denver, USA
 - 8) 杉浦 互: 日本における薬剤耐性 HIV-1 の動向と対策. 第 62 回岡山 HIV 診療ネットワーク 2005 年 5 月 31 日 岡山
 - 9) Wataru Sugiura, Masakazu Matsuda, Junko Kakizawa, Hideka Miura, Satoshi Takeda, Masayuki Fujino, Masako Nishizawa and Naoki Yamamoto: Changes in Prevalence and Patterns of Drug Resistant Mutations in Japan - Summary of Nine Years Nationwide HIV-1 Drug Resistance Monitoring Study from 1996 to 2004. 第 1 回日独エイズ公開シンポジウム. 2005 年 11 月 9 日 名古屋
 - 10) 杉浦 互: HIV-1 CRF01_AE における Nelfinavir 耐性変異 N88S の耐性化機序の解析. 第 53 回日本ウイルス学会学術集会. 2005 年 11 月 20 日~22 日, 横浜
 - 11) Myint Lay, 植田知幸, 西澤雅子, 松田昌和, 三浦秀佳, 杉浦 互: プロテアーゼ阻害剤耐性変異と Gag 変異間に見る相互干渉と共進化の解析. 第 53 回日本ウイルス学会学術集会. 2005 年 11 月 20 日~22 日, 横浜
 - 12) 杉浦 互: 薬剤耐性の獲得に見る Gag と Protease の共進化. 第 7 回白馬シンポジウム. 2005 年 11 月 3 日~4 日, 鹿児島
 - 13) 小池 満, 三好 洋, 井上靖之, 高橋正知, 山口洋子, 奥瀬千晃, 杉浦 互, 中島秀喜: HIV/HIB Coinfection における HBV 耐性の検討. 第 19 回日本エイズ学会学術集会. 2005 年 12 月 1 日~3 日, 熊本
 - 14) 浅黄 司, 金田次弘, 伊部史朗, 松田昌和, 吉田 繁, 津畑千佳子, 大家正泰, 近藤真規子, 貞升健志, 瀧永博之, 正兼亜季, 佐藤克彦, 奏 眞美, 溝上康司, 森 治代, 南 留美, 渡邊香奈子, 岡田清美, 杉浦 互: HIV-1 薬剤耐性遺伝子検査法に関するアンケート調査. 第 19 回日本エイズ学会学術集会. 2005 年 12 月 1 日~3 日, 熊本
 - 15) 西澤雅子, Urvi Parikh, 藤野真之, 松田昌和, 三浦秀佳, 加藤真吾, 山本直樹, 杉浦 互: ヒト末梢血単核球を用いた K65R 獲得 HIV-1 の逆転写酵素阻害剤に対する感受性の解析. 第 19 回日本エイズ学会学術集会. 2005 年 12 月 1 日~3 日, 熊本
 - 16) 石川暢恒, 高田 昇, 河部康子, 喜花伸子, 大江昌恵, 大下由美, 畝井浩子, 藤井輝久, 木村昭郎, 杉浦 互: 半年以内に感染したと推定される HIV 感染症の 9 例. 第 19 回日本エイズ学会学術集会. 2005 年 12 月 1 日~3 日, 熊本
 - 17) 杉浦 互, 瀧永博之, 吉田 繁, 千葉仁志, 浅黄 司, 松田昌和, 岡 慎一, 近藤真規子, 今井光信, 貞升健志, 長島真美, 伊部史朗, 金田次弘, 浜口元洋, 上田幹夫, 正兼亜季, 大家正義, 渡邊香奈子, 白阪琢磨, 山本善彦, 森 治代, 小島洋子, 中桐逸博, 高田 昇, 木村昭郎, 南 留美, 山本政弘, 健山正男, 藤田次郎: 新規 HIV-1 感染者における薬剤耐性の頻度に関する全国疫学調査 -2003 年から 2004 年にかけての報告-. 第 19 回日本エイズ学会学術集会. 2005 年 12 月 1 日~3 日, 熊本
 - 18) 大出裕高, 杉浦 互, 星野忠次: コンピュータ

- ー・シミュレーションによる CRF01_AE NH1 N88S HIV-1 PR の NFV 耐性機構の解明. 第 19 回日本エイズ学会学術集会. 2005 年 12 月 1 日～3 日, 熊本
- 19) 仲宗根 正、高松純樹、杉浦 互、佐藤裕徳、山本伸二、Heneine Walid、山本直樹: HIV-RT 薬剤感受性迅速試験法(半日)の開発. 第 19 回日本エイズ学会学術集会. 2005 年 12 月 1 日～3 日, 熊本
- 20) 駒野 淳、宮内浩典、Lay Myint、二橋悠子、浦野恵美子、松田善衛、千葉智子、三浦秀佳、杉浦 互、山本直樹: Rapid propagation of low-fitness drug resistant mutants of HIV-1 by a-1 frameshift enhancer sparsomycin. 第 19 回日本エイズ学会学術集会. 2005 年 12 月 1 日～3 日, 熊本
- 21) 加藤真吾、田中理恵、根岸昌功、杉浦 互: AZT は血漿中及び細胞内において確かに d4T に変換される. 第 19 回日本エイズ学会学術集会. 2005 年 12 月 1 日～3 日, 熊本
- 22) 小池 満、鈴木貴雄、井上靖之、山口洋子、小池淳樹、杉浦 互、高橋正知: HIV 関連リンパ腫における自己造血幹細胞採取の経験. 第 19 回日本エイズ学会学術集会. 2005 年 12 月 1 日～3 日, 熊本
- 23) 小池 満、高橋正知、井上靖之、山口洋子、杉浦 互、中島秀喜: 当院における新規受診者の検討. 第 19 回日本エイズ学会学術集会. 2005 年 12 月 1 日～3 日, 熊本
- 24) 山元泰之、山中 晃、内田泰斗、尾形享一、福武勝幸、杉浦 互: 判定保留 HIV-1 抗体確認検査で確定し得ないとき. 第 19 回日本エイズ学会学術集会. 2005 年 12 月 1 日～3 日, 熊本
- 25) Wataru Sugiura: Changes in prevalence and patterns of drug resistant mutations in Japan-Summary of nationwide HIV-1 drug resistance monitoring study (1996-2004) in Japan. 第 19 回日本エイズ学会学術集会. 2005 年 12 月 1 日～3 日, 熊本
- 26) 杉浦 互、渦永博之、田宮貞宏、松田昌和、松見信太郎、蜂谷敦子、John Coffin、満屋裕明: シンポジウム 7. 「薬剤耐性の新知見、基礎から臨床へ」を終えて. 第 19 回日本エイズ学会学術集会. 2005 年 12 月 1 日～3 日, 熊本

F. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

図1 連鎖不平衡解析の概念と計算

例) proteaseのコードンX 野生A: 変異a=9:1
 gagのコードンY 野生B: 変異b=9:1 で存在したとき

理論値		gagY	
		B	b
Protease X	A	81	9
	a	9	1

観察値		gagY	
		B	b
Protease X	A	90	0
	a	0	10



理論値と観察値にはずれ(D)が生じる



$$D = \frac{1}{100} \times \frac{81}{100} - \frac{9}{100} \times \frac{9}{100} = 0$$

$$D = \frac{10}{100} \times \frac{90}{100} - \frac{0}{100} \times \frac{0}{100} = 0.09$$

D=0 の時、連鎖平衡

D>0 または D<0 の時、連鎖不平衡