

(サブタイプ B 7 株、サブタイプ A/E 5 株、サブタイプ A 3 株、F 2 株、C、G 1 株ずつ) を検討用サンプルとして用いた。これら分離株を HIV-1 非感染者の PBMC と 7 日間共培養し、7 日後の培養細胞からプロウイルス DNA を QIAamp DNA mini kit (キアーゲン) を用いて抽出した。これらプロウイルス DNA を TE 溶液で DNA 濃度 50ng/ul に調整し、試料とした。

3) 試薬の調整および PCR 条件

定量 PCR 試薬には TaqMan PCR core reagent キット (アプライドバイオシステムズ) を用いた。反応チューブあたり DNA500ng を用い、50ul ポリウムで PCR 反応を行った。

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

4) 標準 HIV-1DNA を用いた標準曲線の作製

クローン化した既知濃度の pNL432 (79000 copies/ul: サブタイプ B) を標準 HIV-1DNA コントロールとして用い、500、250、50、10、2、0.4 コピー/ul の希釈系列を作製し、各々 10ul を鋳型 DNA とし、標準曲線を作製した。標準 HIV-1 DNA の希釈には HIV 非感染者のプール PBMC から抽出した DNA を用い、最終 DNA 濃度 50ng/ul に調整した。

なお、pNL432 (79000copies/ul) は慶応大加藤先生より供与された。

5) 定量感度および特異性の検討

サブタイプ B 標準株 III B の培養細胞から抽出した HIV-1DNA およびサブタイプ A/E のクローン化 HIV-1DNA (p93JP-NH1) の希釈系列を用いて、定量感度について検討した。

また、HIV 非感染者 40 例の PBMC より抽出した DNA を用いて特異性の検討を行った。

6) 限界希釈法によるプロウイルスの定量 (ポアソン分布法)

19 検体の HIV-1DNA をそれぞれ限界希釈し、gag p24 領域をターゲットとした nested PCR 法で測定した後、ポアソン分布法に従いコピ

一数を算出し、Real time PCR 法での測定値と比較した。

(倫理面への配慮)

患者同意の上、HIV 検査依頼のあった症例より提供されたサンプルを用いて研究を行っており、プライバシーの流出防止など患者の人権保護に十分配慮した。本研究は当研究所の倫理委員会で承認されている。

C. 結果および考察

degenerate プライマー (deSK145、deSKCC1B)、deKK-MGBprobe を用いた Real time PCR 法による HIV-1DNA 定量法について基礎的検討を行った。

標準 HIV-1DNA コントロール pNL432 の希釈系列を用いて標準曲線を作製した結果、4~5000 コピー/0.5ug DNA の範囲で良好な直線性が得られた (slope: -3.43、 $R^2=0.984$ 、図 3)。

サブタイプ B の標準株 III B のプロウイルス DNA およびクローン化したサブタイプ A/E のプロウイルス DNA、p93JP-NH1 の希釈系列を用いて定量限界を検討したところ、サブタイプ B、A/E いずれも 4 コピー/0.5ugDNA 以上で定量が可能であった (図 4、図 5)。

HIV 非感染者 40 例の PBMC から得られた DNA はすべて検出限界以下であった。

19 の臨床分離株培養細胞 (サブタイプ B 7 検体、A/E 5 検体、A 3 検体、F 2 検体、C、G 各 1 検体ずつ) から得られた HIV-1DNA 量を Real time PCR で測定し、ポアソン分布法での計算値と比較した (表 1)。

Real time PCR 法での測定値は 19 検体全てポアソン分布法での値とほぼ一致していた。しかし、19 検体中 4 検体 (サブタイプ A/E 5 検体中 2 検体、サブタイプ A 3 検体中 2 検体) はアンプリコア型プライマー (SK145、SKCC1B) での測定値が著しく低い値となった。

これら 4 検体の forward プライマー領域には SK145 と比べ、4~5 塩基のミスマッチが認められたが、degenerate プライマー deSK145

では mismatches が 0-2 塩基に減少した (図 6)。degenerate プライマーを用いてプライマーとの mismatches を減らすことにより、ポアソン分布法による計算値に近似したより正確な測定値が得られたと考えられた。

degenerate プライマー、deSK145、deSKCC1B および deKK-MGBprobe を用いた本 Real time PCR 法は HIV-1 グループ M に対応可能な有用な方法であると考えられた。

19 検体の degenerate プライマー、プローブでの測定値とポアソン分布法での値には非常に良好な相関性が認められた ($R^2=0.988$ 、回帰係数=0.983、図 7)。

これら 19 検体を各々 3 本ずつ 3 回測定し、再現性の検討を行った (表 2)。分散分析解析の結果、実験内変動係数が 7.0-35.3%、実験間変動係数が 1.0-35.9% と良好な再現性が得られた。

D. 結語

degenerate プライマー (deSK145、deSKCC1B) および deKK-MGBprobe を用いた Real time PCR 法による HIV-1 プロウイルス定量系を確立した。

6 種類の HIV-1 サブタイプ (B、A/E、A、C、F、G)、19 検体の定量値とポアソン分布法による計算値の間には非常に良好な相関が認められた ($R^2=0.988$ 、回帰係数=0.983)。

本法は定量感度、直線性、再現性、正確性に優れており、HIV-1 グループ M のプロウイルスの定量に有用であると考えられた。

E. 研究発表

論文発表

1. Kondo M., Shima T, Sudo K., Takebe U., Imai M. et al: Identification of attenuated variants of HIV-1 Circulating Recombinant Form 01_AE that are associated with slow disease progression due to gross genetic

alteration in the nef/long terminal repeat sequences, J Infect Dis, 192, 56-61 (2005).

学会発表

1. 須藤弘二、近藤真規子、嶋貴子、加藤真吾、今井光信ほか: Evaluation of a real-time PCR assay, HPS COBAS TaqMan HIV-1 RNA in plasma. 第 7 回アジア・太平洋地域エイズ国際会議 (2005 年 7 月 1-5 日、神戸)
2. 宇宿秀三、近藤真規子、今井光信ほか: Long term genotypic discrepancy associated with drug resistance persisted between plasma HIV-1 RNA and HIV-1 proviral DNA in peripheral blood mononuclear cells. 第 7 回アジア・太平洋地域エイズ国際会議 (2005 年 7 月 1-5 日、神戸)
3. 近藤真規子、嶋貴子、武部豊、加藤真吾、今井光信: Real time PCR 法を用いた HIV-1 プロウイルス定量法- 6 種類のサブタイプとプライマー、プローブの反応性の検討、第 53 回日本ウイルス学会学術集会 (2005 年 11 月 20-22 日、横浜)
4. 近藤真規子、須藤弘二、田中理恵、嶋貴子、足立拓也、相楽裕子、岩室紳也、向出雅一、武部豊、加藤真吾、今井光信: 各種サブタイプに対応できる Real time PCR 法による HIV-1 プロウイルス定量法の検討、第 19 回日本エイズ学会学術集会 (2005 年 12 月 1-3 日、熊本)
5. 須藤弘二、嶋貴子、近藤真規子、今井光信: HIV 郵送検査に関する実態調査、第 19 回日本エイズ学会学術集会 (2005 年 12 月 1-3 日、熊本)

図1 The strategy for Real-time PCR Amplification

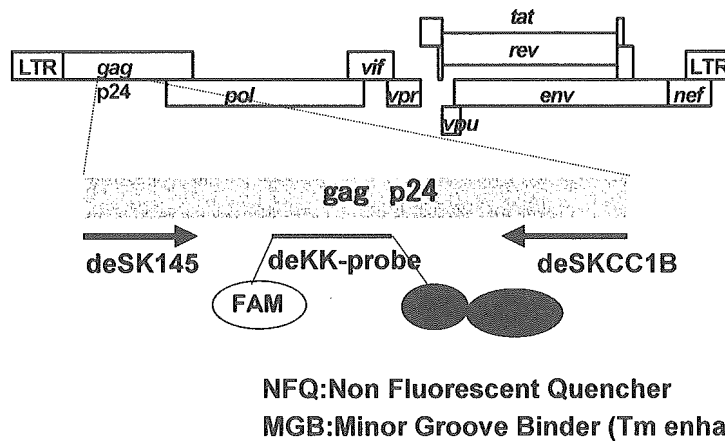


図2 Primer、probe領域の塩基配列の比較

- ◆ forward primer
deSK145 5'- AGTRGGGGGACAYCARGCAGCHATGCARAT - 3'
(SK145 5'- AGTGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAAAT - 3')
- ◆ reverse primer
deSKCC1B 5'- TACTAGTAGTTCCTGCTATRTCACCTTCC - 3'
(SKCC1B 5'- TACTAGTAGTTCCTGCTATGTCACCTTCC - 3')
- ◆ probe
deKK-probe 5'- ATCAATGARGARGCTGCAGAATGGGA - 3'
(SK102 5'- GAGACC ATCAATGAGGAAGCTGCAGAATGGGA TAG - 3')

図3 標準HIV-1DNA (pNL432) のstandard curve

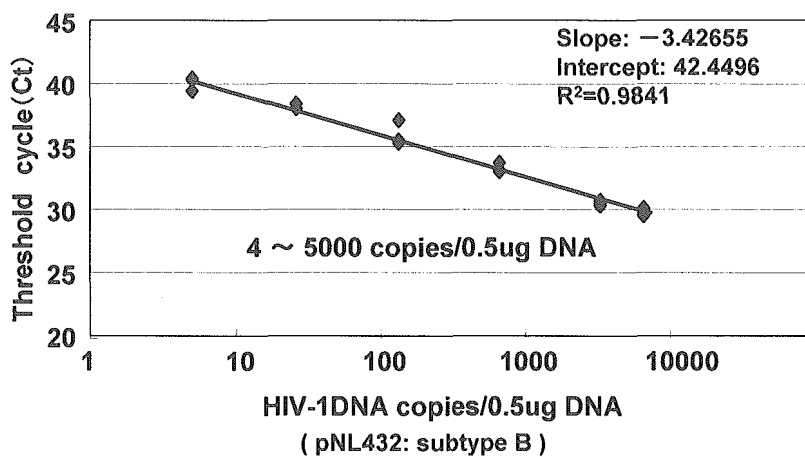


図4 Real-time PCR法の検出感度

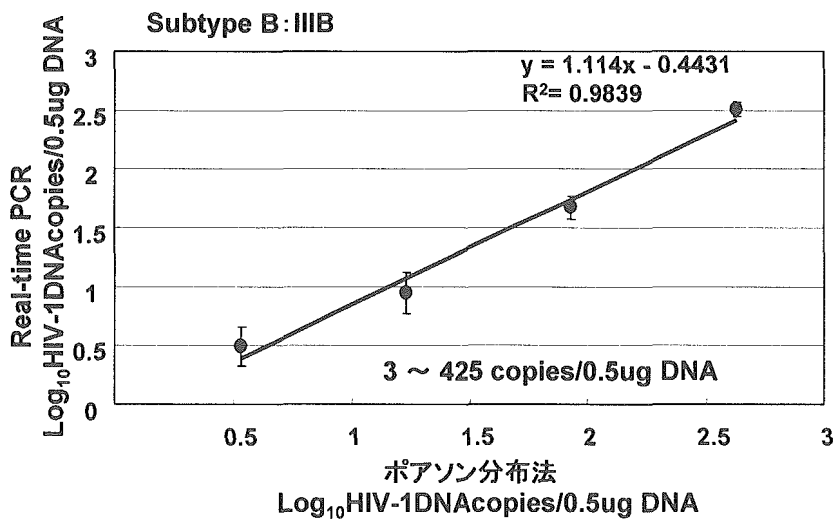


図5 Real-time PCR法の検出感度

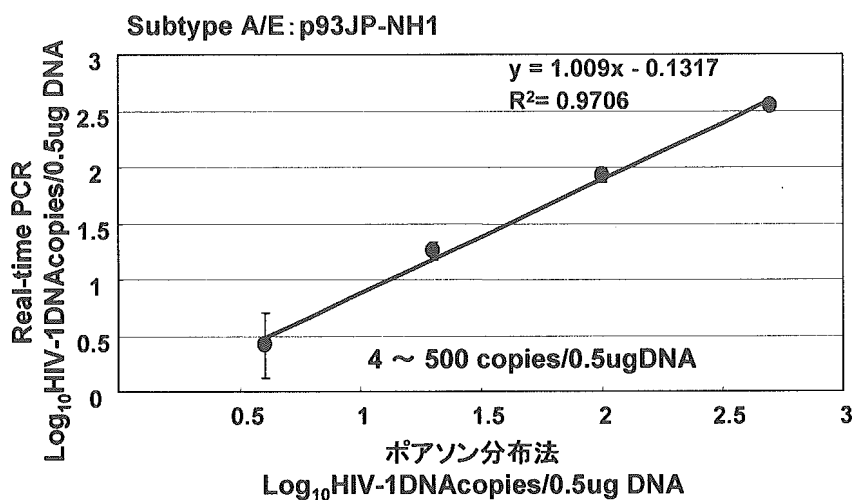


表1 HIV-1プロウイルス定量結果(copies/1ugDNA)
—Real-time PCR法とポアソン分布法との比較—

sample	subtype	Real-time PCR法		ポアソン分布法
		amplicor	degenerate	
Y187	B	34,500	23,600	26,000
GM910-22	B	3,710	2,640	1,900
Y160	B	86,500	11,100	13,000
Y164	B	1,610,000	2,380,000	1,500,000
Y198	B	2,960,000	2,460,000	2,200,000
Y120	B	67,500	67,500	110,000
Y122	B	1,720	1,560	3,000
GM1123	A/E	2,100,000	1,760,000	1,400,000
Y191	A/E	13,300	2,490,000	3,500,000
Y173	A/E	176,000	154,000	98,000
Y176	A/E	67,600	71,700	85,000
Y177	A/E	<4(x100)	39,900	71,000
Y165	A	<4(x30)	17,400	10,700
Y68	A	67	50	32
GM68-42	A	<4	156	130
Y30	C	937,000	1,040,000	1,150,000
GM652-5	F	1,720,000	1,200,000	1,080,000
GM1270	F	396,000	312,000	330,000
Y115	G	69,600	48,800	54,000

図6 forward プライマー領域の塩基配列の比較

deSK145	5'- AGT RGGGGGACA YCA RGC AGC HAT GCA RAT -3'
SK145	5'- AGT GGGGGGACA TCA AGC AGC CAT GCA AAT -3'
B Y187	5'- -----T----- -3'
B GM910-22	5'- -----C----- -3'
B Y160	5'- ----- -3'
B Y164	5'- -----C----- -3'
B Y198	5'- -----T----- -3'
B Y120	5'- -----T----- -3'
B Y122	5'- ----- -3'
A/E GM1123	5'- -----C-G----- -3'
A/E Y191	5'- -----AT--C-G--A----- -3'
A/E Y173	5'- -----C-R--A----- -3'
A/E Y176	5'- -----C-G--A----- -3'
A/E Y177	5'- -----AT--C-G--A----- -3'
A Y165	5'- -----C-G--A---G- -3'
A Y68	5'- -----C-G--T----- -3'
A GM68-42	5'- -----C-G--A---G- -3'
C Y30	5'- ----- -3'
F GM652-5	5'- ----- -3'
F GM1270	5'- ----- -3'
G Y115	5'- -----T----- -3'

図7 Real-time PCRと限界希釈法(ポアソン分布法)との相関

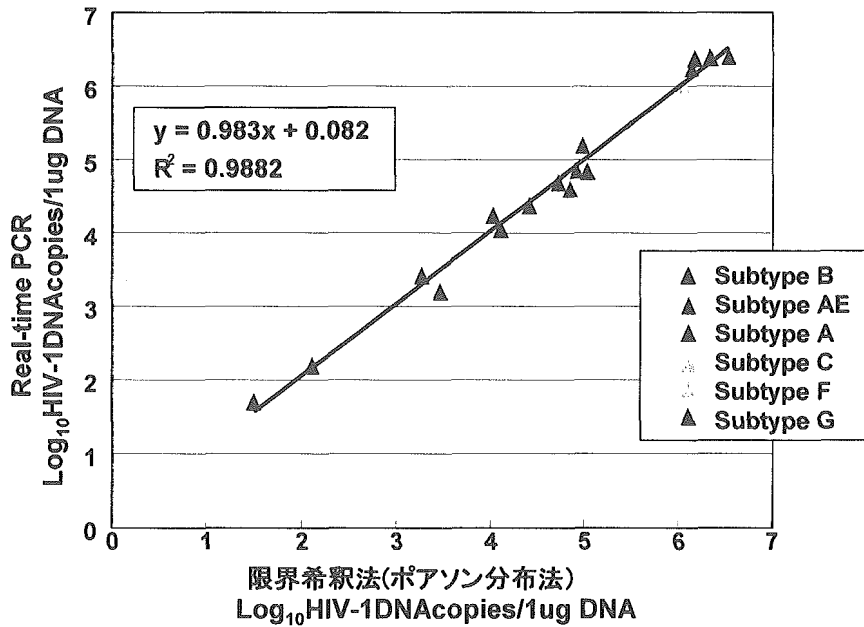


表2 Real-time PCR法の再現性
(各サンプル3本ずつの測定を3回繰り返し測定)

sample	subtype	HIV-17'ロウイルス (copies/1ugDNA)	実験内 変動係数(%)	実験間 変動係数(%)
Y187	B	23,600	19.1	29.6
GM910-22	B	2,640	7.0	20.2
Y160	B	11,100	7.0	24.6
Y164	B	2,380,000	10.2	20.1
Y198	B	2,460,000	16.4	13.3
Y120	B	67,500	20.0	34.5
Y122	B	1,560	29.2	10.2
GM1123	A/E	1,760,000	18.3	11.7
Y191	A/E	2,490,000	12.0	9.6
Y173	A/E	154,000	19.3	19.0
Y176	A/E	71,700	7.7	15.7
Y177	A/E	39,900	15.4	35.9
Y165	A	17,400	7.6	18.9
Y68	A	50	35.3	27.6
GM68-42	A	156	8.5	30.4
Y30	C	1,040,000	11.6	9.2
GM652-5	F	1,200,000	13.6	20.9
GM1270	F	312,000	11.9	31.1
Y115	G	48,800	19.8	1.0

B-2. CRF01_AE を含む複数のサブタイプの HIV-1 定量法の確立

分担研究者 金田次弘 (国立病院機構名古屋医療センター・臨床研究センター)

研究概要

サブタイプBに加えてA、C、D、CRF01_AEなどのHIV-1を、一種類のプライマー、プローブセットを使用したリアルタイムPCR法により定量できるプライマー・プローブセットを開発し、定量法の充実をめざした。

A. 背景・目的

昨年度までに、サブタイプBを対象にしたHIV-1 DNA (プロウイルス) 定量のための通常リアルタイムPCR法、高感度リアルタイムPCR法を確立し、バリデーションを実施してきた。そして、未治療患者、HAART 施行中の感染患者を対象にCD4陽性Tリンパ球中のプロウイルスを定量してきた。本年度はサブタイプBに加えてA、C、D、CRF01_AEなどのHIV-1を、一種類のプライマー、プローブセットを使用したリアルタイムPCR法により定量できるプライマー・プローブセットを開発し、定量法の充実をめざした。

B. 材料および方法

検体：サブタイプA 13症例・サブタイプB 14症例・サブタイプC 8症例・サブタイプD 3症例およびCRF01_AE 14症例の計52検体の凍結血漿検体を用いた。RNAの精製：RNAはQIAamp viral RNA mini kitを用いて血漿より精製し、RT-PCRによりcDNAを増幅し塩基配列を決定した。CRF01_AEを含む複数のサブタイプ用のHIV-1定量法の確立：G+C含量が約40%、Tm値：50~60℃、3'末端側の3塩基以内に mismatches を認めないという条件を満足するプライマーセットとTaqmanプローブを設計した。リアルタイムPCRには

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

C. 結果

プライマーとプローブの設計：図1設計条件を満足して設計できた、定量前PCR用のプライマーセット(PQFとPQR)、リアルタイムPCR用のプライマーセット(RFとRR)およびTaqmanプローブの塩基配列を示した。以下、このプライマーセットとプローブを用いた方法をPan-sub法と略称する。Pan-sub法のバリデーション：Intra-assay, Inter-assayと共に正確性(Accuracy)は高く、Inter-assayの5コピー試料の88.1%を除いて、97.6%から107.9%を示した。CV値についてはIntra-assayでは10%未満、Inter-assayでは20%未満とばらつきも少なく再現性良く測定できることが示された。

D. 考察

Pan-sub法の開発により一種類のプライマー、プローブセットを使用したリアルタイム

PCR法により、サブタイプA、B、C、D、CRF01_AEのHIV-1感染症例に於いてもプロウイルス定量が可能になった。予備的な研究結果であるが、14例の同一検体を用いSub B法とPan-sub法の定量結果の一致性を検討したが、その値は2.3~0.2倍とやや広い範囲に分布した多数の準種より構成されるHIV-1をリアルタイムPCR法で定量する試みは野心的であると同時にリスクも伴う。今後、方法論も含め一層の改良が求められると思われる。さて、血中ウイルス量が検出感度以下に抑制されたHAART著効例でも、プロウイルス陽性細胞の除去には数十年を要するとの結果も得られているが、一方、比較的短期間にプロウイルス量が減少する症例も存在する。臨床応用としては、HAART著効患者の中で低プロウイルス量を示す、いわば、HIV-1残存リザーブの小さい症例に対して治療中断を施行できるかのエビデンスとしてプロウイルス量が利用できるかの可能性を検討することが大切と思われる。

E. 共同研究者

水野善文、永井裕美、加堂真由、萩原智子、服部純子、伊部史朗、藤崎誠一郎、重見麗、濱口元洋、間宮均人（国立病院機構名古屋医療センター・臨床研究センター）、多和田行男（同・検査科）、山本直彦（名古屋大学医学研究科）、稲田頼太郎（セントルークス病院）、森下高行（愛知県衛生研究所）

F. 研究発表

[論文発表]

1. New estimation method for highly sensitive quantitation of human immunodeficiency virus type 1 DNA and its application.
H. Nagai, K. Wada, T. Morishita, M. Utsumi, Y. Nishiyama and T. Kaneda
J. Virol. Methods 124, 157-165 (2005).

2. HPLCによるプロテアーゼ阻害剤アタザナビル血中濃度測定法の開発。
高橋昌明、吉田昌生、大木 剛、奥村直哉、鈴木達男、金田次弘
日本病院薬剤師会雑誌、41、731-734 (2005).
3. カレトラ™投与外来HIV感染患者における脂質異常とロピナビル血中濃度の評価。
高橋昌明、吉田昌生、大木 剛、奥村直哉、鈴木達男、金田次弘
日本病院薬剤師会雑誌、41、873-876 (2005).
4. Conventional HPLC Method Used for Simultaneous Determination of the Seven HIV Protease Inhibitors and Nucleoside Reverse Transcription Inhibitor Efavirenz in Human Plasma.
M. Takahashi, M. Yoshida, T. Oki, N. Okumura, T. Suzuki and T. Kaneda
Biol. Pharm. Bull., 28, 1286-1290 (2005).
5. PNA-In Situ Hybridization Method for Detection of HIV-1 DNA in Virus-Infected Cells and Subsequent Detection of Cellular and Viral Proteins.
T. Hagiwara, J. Hattori and T. Kaneda.
In Situ Hybridization Protocols 3rd edition (edited by I. A. Darby), Humana Press, NJ, pp139-149 (2005).

[学会発表]

1. 未治療患者に検出された薬剤耐性HIV-1のウイルス学的特徴
伊部史朗、澤木 香、金田次弘
第15回抗ウイルス化学療法研究会(屋久島) (平成17年5月-2005)。
2. HIV-1 薬剤耐性遺伝子検査法に関するアンケート調査
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、秦 眞美、溝上康司、
 森 治代、南 留美、渡邊香奈子、岡田
 清美、杉浦 互
 第 19 回日本エイズ学会総会（平成 17 年
 12 月－2005）。
3. 未治療患者由来プロテアーゼ阻害薬剤耐
 性 HIV-1 の増殖能解析
 伊部史朗、藤崎誠一郎、藤崎彩恵子、金
 田次弘
 第 19 回日本エイズ学会総会（平成 17 年
 12 月－2005）。
4. 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
 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、濱口元洋、上
 田幹夫、正兼亜季、大家正義、渡邊香奈
 子、白坂琢磨、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
 第 19 回日本エイズ学会総会（平成 17 年
 12 月－2005）。
5. プロテアーゼ阻害薬 7 剤とエファビレン
 ツの同時血中濃度測定法の開発及びその
 臨床応用
 高橋昌明、伊部史朗、久高祐一、奥村直
 哉、鈴木達男、金田次弘
 第 19 回日本エイズ学会総会（平成 17 年
 12 月－2005）。
6. B、CRF01 AE を含む複数のサブタイプの
 HIV-1 定量法の確立
 水野善文、永井裕美、加堂真由、渡辺朝
 子、森下高行、山本直彦、
 伊部史朗、重見 麗、藤崎誠一郎、稲田
 頼太郎、金田次弘
 第 19 回日本エイズ学会総会（平成 17 年
 12 月－2005）。
7. HAART 著効例 HIV-1 感染患者における残
 存 HIV-1 プロウイルス複製レベルの評価
 永井裕美、水野善文、加堂真由、服部純
 子、濱口元洋、間宮均人、西山幸廣、金
 田次弘
 第 19 回日本エイズ学会総会（平成 17 年
 12 月－2005）。
8. Persistence of protease inhibitor
 -resistant HIV-1 in therapy-naive
 patients
 T. Kaneda, S. Ibe, K. Sawaki, T.
 Morishita, U. Shigemi, N. Mamiya and M.
 Hamaguchi
 2nd International Workshop on HIV
 Persistence during Therapy
 Saint Martin, FWI, December 6-9, 2005

図1. プライマーとTaqManプローブの設計条件

- ・G+C含有量: 約40%
- ・Tm値: 50~60°C
- ・3'末端側の3塩基以内にミスマッチを認めない

	< PQF >	< RF >	< TaqMan >	< RR >	< PQR >
A	1001	1001	1001	1001	1001
	1002	1002	1002	1002	1002
	1003	1003	1003	1003	1003
	1004	1004	1004	1004	1004
	1005	1005	1005	1005	1005
B	1006	1006	1006	1006	1006
	1007	1007	1007	1007	1007
	1008	1008	1008	1008	1008
	1009	1009	1009	1009	1009
	1010	1010	1010	1010	1010
C	1011	1011	1011	1011	1011
	1012	1012	1012	1012	1012
	1013	1013	1013	1013	1013
	1014	1014	1014	1014	1014
	1015	1015	1015	1015	1015
D	1016	1016	1016	1016	1016
	1017	1017	1017	1017	1017
	1018	1018	1018	1018	1018
	1019	1019	1019	1019	1019
	1020	1020	1020	1020	1020
CRF01_AE	1021	1021	1021	1021	1021
	1022	1022	1022	1022	1022
	1023	1023	1023	1023	1023
	1024	1024	1024	1024	1024
	1025	1025	1025	1025	1025

図2. Pan-sub法のバリデーション

	Intra-assay (n=5)			Inter-assay (n=15)		
	Ave±S.D.	CV (%)	Accuracy (%)	Ave±S.D.	CV (%)	Accuracy (%)
HIV-1 DNA (copies/10 ⁶ cells)						
100	98 ± 4.6	4.7	98.2 ± 4.6	99 ± 8.5	11.2	99.1 ± 8.5
50	54 ± 3.1	7.4	107.9 ± 6.2	49 ± 5.7	14.6	97.6 ± 11.4
10	10 ± 0.9	9.2	97.9 ± 9.0	10 ± 1.5	15.5	104.5 ± 15.0
5	5 ± 0.1	2.3	101.2 ± 2.0	4 ± 0.9	19.4	88.1 ± 17.1

B-3. 長期 HAART 施行症例における pDNA の推移とその臨床的意義

分担研究者 吉村和久（熊本大学エイズ学研究センター・病態制御・助手）

研究概要

昨年度まで、本研究班において、血中ウイルス量が測定感度以下の症例の proviral DNA を我々の開発した高感度法で測定を行い、症例の臨床経過や各種マーカーと照らし合わせながら、residual replication の指標となりうるかの検討を行ってきた。本年度は HAART で長期間（4-9 年）ウイルスを抑制できている症例でプロウイルス DNA（pDNA）を測定し、臨床経過との相関を調べた。その結果これまで 5 年以上 HAART を継続しても pDNA の低下は認められないとされていたものが、治療によっては低下しうることがわかった。これらの長期抑制症例に残存しているウイルスはどのようなものであるかを検討するため、経時的にプロウイルスのシーケンスを比較検討した。

A. 研究目的

長期間（4 年一）良好に治療を継続できた症例で、pDNA の推移を高感度法で測定し治療効果との関連を検討する（治療の有効性の判定に使用可能か否か）。長期治療で残存しているウイルスの系統樹解析を行い、残存ウイルスの特徴を考察する。

B. 研究方法

異なった二種類の手法によるプロウイルス DNA（proviral DNA；pDNA）の定量；末梢血単核球を分離精製し DNA を抽出した後、LTR 領域に設定した primer を用いて 1st PCR を行う。得られた増幅産物を template にして 2nd PCR を Real time PCR 法を用いて行った。P17 領域にプライマーとプローブを設定し、Real time PCR 法で pDNA を測定する。これらを用いて測定した結果と臨床経過や HIV-RNA 量、CD4、CD8 陽性細胞数などとの相関を検討した。

エンベロープ（Gp120）領域のシーケンス；HAART 中の症例で pDNA が変化したポイントのプロウイルスの env 領域のシーケンスをクローニング（7-10 クローン）したのち行う。その後、系統樹解析を行い、それぞれ

のウイルス間の関連を検討する。

（倫理面への配慮）

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

C. 研究結果及び考察

本年度までのこの研究班における pDNA の測定の結果、長期間に亘って HAART でウイルスを抑制可能であった症例において、年余に亘って pDNA の減少が見られることが事実となった。これまでは、pDNA の値はある程度まで低下すると後は一定の値で推移するという報告が多かった。確かに、我々の症例でも 4-5 年間の治療に限れば、初めの 1-2 年に比べると pDNA の減少は緩やかになっていた。しかし、5 年から 9 年に亘り HAART 継続可能であった症例には、その後明らかに pDNA の値が低下していくことが確認できた。つまり、HAART 開始 1-2 年で pDNA 量は約 1log 低下し、その後の 3-4 年間は緩徐な低下もしくはほとんど一定の値を示した後、測定感度前後（10-20

copies/106 PBMC)まで緩やかに低下をしていく。一旦測定感度以下になった後も、測定できたりできなかつたりを繰り返していく。実験手技によるものか、ウイルスが一時的に最活性化しているためかは、まだ結論が出ていないが、それぞれの時点でのシークエンスどうしに関連性がありつつも、それぞれが独立したクラスターを形成していることから、再活性化の可能性が充分考えられると言える。現在、系統樹解析から言えることは、治療初期に見られたウイルスの多様性（高 diversity）が pDNA の低下に伴い多様性は低下していく（低 diversity）が、先祖ウイルスからの遺伝的な距離は遠くなる（高 divergence）ことが示唆されている。

D. 結論

1. HAART で長期間(4-9 年)ウイルスを抑制できている症例でプロウイルス DNA (pDNA) を測定し、臨床経過との相関を調べた。
2. pDNA が一旦感度以下になった症例でも、pDNA の再検出が認められることが多かった。
3. 長期に渡り治療を施行しウイルスを抑制できている症例に残存しているウイルスはどのようなものであるかを検討するため、経時的にプロウイルスのシークエンスを比較検討した。その結果、治療期間が長くなるほどウイルスの diversity が低下していくことが分かった。
4. 残存しているウイルスのシークエンスは病初期のウイルスとの関連はあるものの、クラスターを形成する。このことは、長期治療により残存するウイルスは、潜伏ウイルスが周期的に再活性化することによりメンテナンスされている可能性を示唆している。

E. 研究発表

(論文発表)

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

(国際学会発表)

1. Yoshimura, K., Shibata, J., Honda, A., Murakami, T., Mitsuya H., Koito, A., Matsushita, S.: Resistance profile of a novel broadly neutralizing anti-HIV monoclonal antibody, KD-247, that has favorable synergism with anti-CCR5 inhibitors in vitro. 13th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infection. Feb 5-8, 2006, Denver, CO, USA.
2. Shibata, J., Yoshimura, K., Honda, A., Murakami, T., Koito, A., Matsushita, S.: A role of mutations in non-V3 envelope regions for escape from a broad neutralizing anti-V3 monoclonal antibody, KD-247, during in vitro selection. 13th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infection. Feb 5-8, 2006, Denver, CO, USA.
3. Matsushita, S., Honda, A., Shibata, J., Kimura, T., Ikeda, T., Koito, A., Yoshimura, K.: HIV-1 proviral DNA dynamics in patients with long-term successful HAART. 2nd International Workshop on HIV Persistence during Therapy. December 6-9, 2005, Saint Martin, FWI.

4. Yoshimura, K., Shibata, J., Ikeda, T., Honda A., Koito, A., Matsushita, S.: HIV-1 proviral DNA dynamics in patients with long-term successful HAART. International Symposium, The Cooperative research Project on Clinical and Epidemiological Studies of Emerging and Re-emerging Infectious Diseases, 2005. Sep.15-16. Kumamoto.
 5. Shibata, J., Yoshimura, K., Maeda, Y., Murakami, T., Eda, Y., Koito, A., Matsushita, S.: In vitro induction of human immunodeficiency virus type 1 variants resistant to a novel broad neutralizing anti-HIV monoclonal antibody, KD-247. International Symposium, The Cooperative Research Project on Clinical and Epidemiological Studies of Emerging and Re-emerging Infectious Diseases, 2005. 9.15-16. Kumamoto.
 6. Ikeda, T., Shibata, J., Honda A., Yoshimura, K., Koito, A., Matsushita, S.: Relationship of residual HIV-1 and the integration sites in patients on prolonged and effective HAART. International Symposium, The Cooperative research Project on Clinical and Epidemiological Studies of Emerging and Re-emerging Infectious Diseases, 2005. 9.15-16. Kumamoto.
 7. Yoshimura, K., Honda A., Kenai, A., Shibata, J., Koito, A., Matsushita, S.: Proviral DNA and turnover levels in aviremic long-term non-progressors (LTNPs); A temporary goal for patients under HAART. 7th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific. 2005. 7. 1-5. Kobe.
 8. Matsushita, S., Honda A., Kenai, A., Shibata, J., Koito, A., Yoshimura, K.: Long-term follow-up study for the change of the reservoir for HIV-1 on highly active antiretroviral therapy. 7th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific. 2005. 7. 1-5. Kobe.
- (国内学会発表)
1. 吉村和久、柴田潤二、池田輝政、小糸厚、松下修三：HAARTにより長期間ウイルスが抑制された症例のpDNAの推移. 第19回日本エイズ学会学術集会. 2005.12.1-3. 熊本.
 2. 柴田潤二、吉村和久、前田洋助、村上俊夫、小糸厚、松下修三：広範囲HIV-1中和単クローン抗体のin vitro逃避ウイルスの誘導と解析. 第19回日本エイズ学会学術集会. 2005.12.1-3. 熊本.
 3. 池田輝政、柴田潤二、吉村和久、小糸厚、松下修三：長期間HAART有効症例における残存HIVとintegration siteの関連性. 第19回日本エイズ学会学術集会. 2005.12.1-3. 熊本.

B-4. 非サブタイプ B 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（国立国際医療センター・エイズ治療研究開発センター）
	児玉栄一（京都大学ウイルス研究所・感染免疫研究）
	松岡雅雄（京都大学ウイルス研究所・感染免疫研究）
	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）
	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

日本国内で流行しているサブタイプ分布を知るとともに、非サブタイプ B 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、データ構築を試みることを目的とした。2004 年以降 98 名を対象にサブタイプ検査を行ったところ、94%がサブタイプ B、残りの 6%が非サブタイプ B であった。非サブタイプ B では、G、CRF01_AE、CRF03_AB、CRF14_BG、CRF15_AEB が検出された。また非サブタイプ B の耐性獲得症例の中から、NVP に対する genotype、phenotype の結果が乖離する検体が、1 例見つかった。組み換えウイルスによる解析から、この NVP 耐性には非サブタイプ B 特有の変異が関与していることが示唆された。

A. 目的

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 を元に作成されている。しかし世界的な規模からみるとサブタイプ B の感染は少数であり、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。

いくつかの研究で、非サブタイプ B の無治療者で特有にみられる変異は、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。今回の研究では、日本国内での HIV ウイルスのサブタイプの分布を知るとともに、非サブタイプ B を対象に薬剤感受性試験と耐性試験の結果を比較した。乖離が認められたサンプルにつ

いては、さらに詳しくウイルス学的解析を行い、非サブタイプ B 特有の耐性変異を見いだすことを目的とした。

B. 方法

サブタイプ検査：患者 plasma 中の HIV RNA を抽出し、RT-PCR にて *env* 領域（6935F-7329R）を増幅し、DNA シークエンサー（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 ツールを用いて、サブタイプを決定した。
(<http://www.ncbi.gov/projects/genotyping/formpage.cgi>)

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

オスファターゼ)を測定し、薬剤の効果を調べた。

薬剤耐性検査: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 シークエンサー (ABI3730) を用いて塩基配列を決定した。

リコンビナントウイルスの作成:pNL101 をベースとし、RT 前半 (15aa-267aa)、RT 後半 (267aa-560aa) 領域で、それぞれ患者ウイルス遺伝子を含むクローンを作成した。その後 Cos 細胞にトランスフェクトし、ウイルスを回収した。

C. 結果

1) サブタイプ検査結果

2004 年から 2005 年にかけて、当センターに来院した患者 98 人を対象にサブタイプ検査を行った。*env* C2 V3 領域の結果は、サブタイプ B 94%、CRF01_AE 2%、G 1%、CRF03_AB 1%、CRF14_BG 1%、CRF15_AEB 1%であった。

(Table. 1)

昨年と同様、日本国内での感染は、サブタイプ B が主流であった。

2) 非サブタイプ B における薬剤感受性試験、耐性試験の比較

すでに分離されている非サブタイプ B ウイルスのうち、耐性を獲得していたものは 4 例であった。これらの薬剤感受性試験と耐性試験結果を比較すると、NVP に対し乖離する検体が 1 例認められた。またこの患者からは、時期を異なって、4 ポイント分離されており (Fig. 1)、最初の 2 ポイントでは NVP 耐性ウイルスが分離され、残りの 2 ポイント (治療中断中) では、NVP 感受性株が分離された (Table. 2)。最初の 2 ポイントでは、NVP に対し 57、39 倍と高度耐性を示していたにもかかわらず、International AIDS Society 2005 Oct/Nov で報告されたものに基づいた薬剤耐性試験では NVP に対する耐性変異は全く検出

されなかった (Table. 3)。また NNRTI の耐性変異の比較的まれなケース (Table. 4) として報告されているものについて確認したところ、101E と 283I が検出された。しかしどちらの変異も、薬剤感受性試験のパターンと対応しておらず、今回の耐性へのシフトはこれらの変異によるものではないと考えられた。このことから NVP に対する新たな変異もしくは、非サブタイプ B 特有の NVP に対する耐性変異の存在が疑われたため、さらにウイルス学的解析を行った。

3) 組み換えウイルスによる解析 (Fig. 2)

①RT 前半、後半領域を NL と患者由来に置き換えた組み換えウイルスによる解析

NVP 耐性を誘導した責任領域が RT の前半、後半のどちらにあるかを調べるため、pNL101 をベースとし、RT 前半部分 RT15 番~267 番、後半部分 RT267 番~560 番のそれぞれを患者由来のウイルスと組み換えた。また RT 前半、後半どちらも患者由来というウイルスも同時に作成した。RT 前半、もしくは後半だけを患者耐性ウイルスと組み換えた結果、NVP に対し 1.4、2.9 倍と感受性を示し、両方を患者耐性ウイルスに置き換えたものだけが 48 倍と耐性を示した。そのため今回の NVP に関する責任領域は、RT 前半、後半の両者にあると考えられた。

②RT 前半、後半領域を患者耐性株と感受性株に組み換えたウイルスの解析

次に RT 領域を NL ベースにするのではなく、すべて患者由来と置き換えた。つまり前半領域を患者由来の感受性株、後半領域を耐性株にしたもの、また逆に RT 前半領域を耐性株、後半領域を感受性株に組み換えたウイルスを作成し、同様に薬剤感受性試験を行った。その結果、RT 前半を患者耐性株、後半を感受性株にしたものでは NVP に対し 2.8 倍、RT 前半を患者感受性株、後半を耐性株にしたものは 42 倍と耐性を示した。最初の組み換え実験結

果である RT 前半 NL 由来、後半耐性株のクローンが NVP に感受性を示したことから今回の結果を比較すると、RT 前半領域の非サブタイプ B 特有の変異が NVP 耐性に関与していることが示唆された。

また RT 前半感受性株、後半耐性株にしたクローンと、RT 前半後半どちらの領域も感受性株にしたクローンの比較から、NVP の耐性変異箇所は後半にあると考えられた。

つまり RT 前半領域の非サブタイプ B 特有の変異に後半領域の耐性変異が加わると、NVP 耐性となることが認められた。

D. 考察

国内でのサブタイプ分布を調べるとともに、非サブタイプ B での薬剤感受性試験と耐性試験のデータ構築、そしてサブタイプ B による既存の耐性変異データが非サブタイプ B でも対応可能か、検討を行った。

2004 年 10 月から当センターに来院した患者 98 名のうち、94%がサブタイプ B であり、残りの 6%が非サブタイプ B であった。種類としては、CRF01_AE、G、CRF03_AB、CRF14_BG、CRF15_AEB が検出されたが、どれも頻度は低い傾向であった。

非サブタイプ B における耐性獲得症例を薬剤感受性試験と耐性試験で比較したところ、NVP の結果に乖離した症例が見つかった。この患者ウイルスを用いて RT 領域の組み換えを行った解析では、RT 前半領域もしくは後半領域だけを患者由来に置き換えても NVP に耐性を示さなかった。その後 RT 領域を NL でなく患者感受性株と置き換えることにより耐性を示した。つまり、RT 領域がサブタイプ B と患者由来の組み合わせのものでは NVP 耐性を示さないことから、なんらかの非サブタイプ B 特有の変異が、NVP 耐性に関与していることが示唆された。さらに RT 領域の前半、後半を患者由来の感受性株、耐性株に置き換えることによって、RT 後半領域に NVP 耐性変異が存

在していることが示唆された。つまり RT 前半の非サブタイプ B 特有の変異に RT 後半の耐性変異が組合わさると、NVP に耐性を示したことから、これまでのサブタイプ B の耐性変異データでは NVP 耐性を予測出来ない非サブタイプ B ウイルスが見つかった。

近年、様々なプロジェクトにより、発展途上国でも抗 HIV 薬による治療が行われている。つまり今後こういった地域においても、薬剤耐性ウイルス出現の可能性は高く、非サブタイプ B 耐性ウイルスが流行することが懸念される。また先進国では、NVP が使用されるケースは非常に少なくなっているものの、発展途上国では PR に対抗して副作用やコストの面から NVP の使用される頻度はとても高い。今回のように非サブタイプ B 特有の耐性変異が存在することから、非サブタイプ B に対する薬剤耐性変異データ構築の必要性は非常に高いものと思われ、早急に対応していかなければならないと思われた。

E. 研究発表

発表論文

1. H. Gatanaga, A. Hachiya, S. Kimura, S. Oka. Mutations other than 103N in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase emerge from K103R polymorphism under non-nucleoside RT inhibitor pressure. *Virology*. 344:354-362, 2006.

学会発表

1. 橋本 修、吉田隆史、林 明男、蜂谷敦子、巽 正志、岡 慎一、山崎修道、青木 学. 実用的な抗 HIV-1 薬剤耐性フェノタイプ測定法の確立. 第 19 回日本エイズ学会総会、熊本、12 月、2005

Table.1 Env V3領域におけるサブタイプ分布

1998~2003 分離ウイルスを対象			2004.10~2005.12 患者血漿を対象		
subtype	n	%	subtype	n	%
B	178	84.0	B	92	93.8
CRF01 (AE)	17	8.0	CRF01 (AE)	2	2.0
CRF14 (BG)	4	1.9	G	1	1.0
A	2	0.9	CRF03 (AB)	1	1.0
C	2	0.9	CRF14 (BG)	1	1.0
CRF02 (AG)	1	0.5	CRF15 (AE B)	1	1.0
CRF12 (BF)	1	0.5			
不明	7	3.3		98	

212

Fig.1 治療歴およびウイルス分離時期

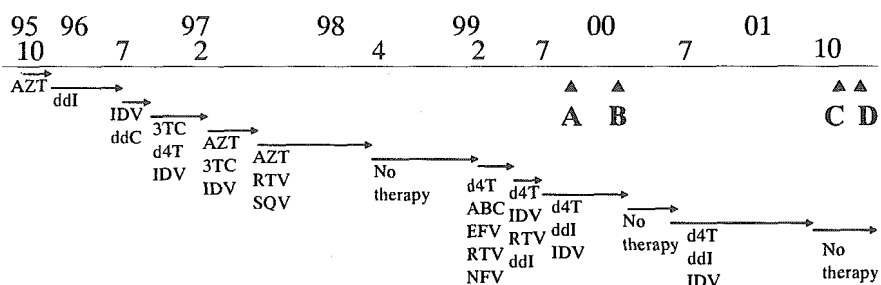


Table.2 薬剤感受性試験

	AZT	3TC	d4T	ABC	NVP	EFV
A	24	2.0	0.6	0.9	57	5.0
B	314	6.9	4.2	4.8	38.8	1.0
C	1.2	0.4	1.0	1.4	0.8	<1
D	1.3	1.1	0.43	1.0	2.1	1.5

Table.3 主な耐性変異の導入状況

NRTI		International AIDS Society 2005 Oct/Nov																
ACC No.	M	E	A	K	D	T	K	L	V	F	Y	V	Q	M	L	T	K	
A	L	—	—	—	N	—	—	—	M	—	—	—	—	—	—	W	Y	—
B	L	—	—	—	N	—	—	—	M	—	—	I	—	—	—	W	Y	—
C	—	—	—	—	—	—	—	—	V/M	—	—	I/V	—	—	L/W	—	—	—
D	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

NNRTI		International AIDS Society 2005 Oct/Nov									
ACC No.	L	K	V	V	Y	Y	G	P	M	P	
A	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
B	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
D	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	

Table.4 比較的まれな耐性変異の導入状況

NNRTI (International AIDS Society 2005以外で報告された変異)

ACC No.	98 G	101 E	135 L/M/TK	138 K/I	139 K/I	141 E	157 S	179 D	189 I	227 L	229 Y	283 I	331 Y	183 Y	396 G
A	—	E ^{a)}	—	—	—	—	—	—	—	—	—	I ^{b)}	—	—	—
B	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	I	—	—	—
C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	I	—	—	—
D	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	I	—	—	—

a) Stanford EFV 5fold (n=1) NVP 12fold (n=1)

b) JV2000 283I NVP 2.01fold 135M/283I NVP 4.05fold

Fig. 2 組み換えウイルスによる薬剤感受性試験結果

WT(NL)		NVP		EFV		上段 μM 下段 耐性度	
RT		NVP		EFV		RT	
前半	後半	NVP	EFV	前半	後半	NVP	EFV
B	— ^{a)}	0.08 1.4	0.002 1	B	C	0.13 2.8	0.001 0.5
C	—	0.31 5.3	0.004 2	C	B	1.9 42	0.03 15
—	B	0.17 2.9	0.009 4.5	B	B	2.2 48	0.006 3
—	C	0.08 1.4	0.003 1.5	C	C	0.094 2	0.002 1

a) —は、NLとの組み換え

B-5. 東海地区における HIV 初感染者の

薬剤耐性変異 (ジェノタイプ) について

榮 賢司 (愛知県衛生研究所)

秦 眞美、續木雅子 (愛知県衛生研究所)

研究概要

HIV感染症の治療は抗HIV薬のプロテアーゼ阻害剤と逆転写酵素阻害剤のコンビネーションによる多剤併用療法により劇的に改善された。しかし、治療からの離脱や中断により耐性ウイルスの出現が確認され、それら耐性ウイルスの未治療者への伝播が問題となってきた。そこで、2005年に愛知県内の保健所及び医療機関でHIV感染が疑われ、愛知県衛生研究所での確認検査によりHIV感染が確認された15名の血清を用いてプロテアーゼおよび逆転写酵素遺伝子の解析を行い、耐性ウイルスの浸淫状況について検討した。その結果、15名中3名からProtease阻害剤のMajor変異であるM46Iおよび1名からD30Nが、さらに、2名から核酸系RT阻害剤に対する薬剤耐性を示すY115FとF77Lがそれぞれ検出された。今回の調査より東海地区においても耐性ウイルスの伝播は着実に広がっていると示唆された。

A. 研究目的

HIV感染症の治療は抗HIV薬の登場により大きく変化した。抗HIV薬のプロテアーゼ (Protease:Pro) 阻害剤と逆転写酵素 (Reverse Transcriptase:RT) 阻害剤のコンビネーションによる多剤併用療法 (Highly Active Anti Retroviral Therapy:HAART) が臨床応用され、HIV感染者の予後は劇的に改善されている。しかし、副作用による治療からの離脱や中断により、耐性ウイルスの出現が確認され問題となっている。我が国に先駆けてHAARTを導入した欧米等では、HIV初感染者の約10%前後に薬剤耐性関連遺伝子が検出されたとの報告がある。

我々は前年度までの3年間の本研究において、1995年から2004年までに愛知県衛生研究所での確認検査によりHIV感染が確認された69名の血清あるいは血漿を用いて、Pro、RT遺伝子について解析を行なった。その結果、

2003年にHIV感染の確認された11名のうち解析可能であった9名のうち1名にPro阻害剤に対する薬剤耐性変異M46Iが検出され、2004年には16名中、1名に多剤の非核酸系RT阻害剤に対する強い薬剤耐性を示すK103Nが検出された。今回はその継続調査として、2005年にHIV感染の確認された15名について耐性ウイルスの浸淫状況について調査した。

B. 研究方法

2005年に愛知県内の保健所及び医療機関でHIV感染が疑われ、当衛生研究所での確認検査によりHIV感染が確認された血清15検体を使用した。血清よりRNAを抽出し、RT-PCR法によりRT及びPro領域の遺伝子を含む約1,300bpsとエンベロープ遺伝子のC2V3領域を増幅した。PCR産物を鋳型として、ダイレクトシーケンスにより遺伝子解析を行なった。Pro遺伝子については全領域を、RT遺伝