

厚生労働科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

# アジア・太平洋地域における HIV 感染症の疫学に関する研究

平成15年度～17年度 総合研究報告書

主任研究者

武 部 豊

平成18（2006）年3月

厚生科学研究費補助金総合研究報告書目次

I. 総括研究報告書	-1-
「アジア・太平洋地域における HIV 感染症の疫学に関する研究」 武部 豊	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-9-
III. 研究成果の刊行物・別刷り	-13-

# I. 総括研究報告書

アジア及び太平洋沿岸地域におけるHIV感染症の疫学に関する研究

主任研究者 武部 豊 国立感染症研究所エイズ研究センター 室長

研究要旨

本研究班は平成 15-17 年度の期間、アジアにおける流行形成のメカニズムに関する分子疫学研究を主要な柱として、我が国を含むアジア・大太平洋地域における HIV-1 感染症の疫学とそれに関連する基礎研究を推進し、次の成果を得た。

（柱 I）「アジアにおけるエイズ流行の全容解明に向けた分子疫学研究」（武部班員）

A. 海外をフィールドとする分子疫学研究：

これまでの研究によって、ミャンマーおよび隣接する雲南省西部に、多様な組換えウイルスが新生する世界的にも類例のないユニークなホットスポットが存在することを見出した。これらの成果に基づいて、さらに詳細な分子疫学研究を展開した。

①組換え点の詳細な検討の結果、ミャンマーに見い出される多様な新型組換えウイルス（unique recombinant form, URF）と中国型の組換え型流行株（CRF07\_BC と CRF08\_BC）のもつ組換え点の多くが両者で共有されており、両地域の流行が少なくとも一部が起源を共有している可能性があることを示した。

②また、ミャンマーに分布する組換えが疑われるウイルス株から、タイに起源をもつ CRF01\_AE と中国に由来する CRF07\_BC の間の新しいタイプの組換えウイルス（inter-CRF recombinant, ICR\_0701）を疫学的に関連性のない 3 名の感染者から見い出した。

これら両知見は、中国およびミャンマー両地域の流行が密接不可分の関係にあることを示唆するはじめての証拠と考えられる。

③マレーシアは近年流行の急速な拡大が見られるアジア諸国の一つであるが、この地域におけるエイズ流行の拡大に関与すると推測される新型の組換え型流行株（CRF33\_01B）を見い出した。CRF33\_01B は我が国研究機関が報告する最初の CRF として、2006 年 1 月に、国際的 HIV sequence database より正式承認された。

B. 我が国における HIV-1 感染症の最新動向とその分子疫学：

①我が国における感染者・患者報告数が昨年度はじめて 1000 名の大台を越えるなど、感染者の増加傾向がさらに加速している。このような動向を反映して、国内症例ではじめて、異なる系統の HIV-1 株間の共感染例や新型組み換えウイルスを見出した。これらの知見は、我が国における HIV 感染症が公衆衛生上予断を許さないフェーズに入りつつあることが示唆される。

②感染者・患者報告数の著しい増加傾向の見られる我が国において、新規感染者の過半数を占める男性同性愛者においては欧米型のサブタイプ B が圧倒的なファウンダー株となっているが、異性間感染者の間では東南アジアに起源をもつ CRF01\_AE がサブタイプ B に拮抗する割合にまで増加しているという傾向が明かとなった（研究協力者 加藤真吾）。

（II）「アジア型 HIV-1 流行株に関する基盤的研究資源の開発・整備」

①われわれは、分子疫学研究の成果を礎として、アジアにおける爆発的エイズ流行の原因になっているアジア型流行株に関する基礎研究やワクチン開発研究のための重要なツールの一つである感染性分子クローンの完全なセットの樹立を目指している。本研究班における研究活動を通じて、中国南東部の薬物乱用者との流行に関与する CRF08\_BC と東南アジア地域の注射薬物乱用者や中国内陸部の供血者における HIV アウトブレイクに重要な役割を果たしている HIV-1 subtype B' の感染性分子クローンの樹立に成功した（草川班員）。

②一方、これまでの研究によって、アジアでは、多様な組換えウイルスが絶えず新生していることを明らかにしてきたが、HIV-1 の遺伝子組換えのメカニズムを解析するために、逆転写酵素遺伝子のフィンガーとパーム領域の変異間の組換えによって高度多剤耐性形質が獲得されるという系を利用した、組換え機構の解析システムを開発した（椎野班員）。

③また、これまでに蓄積してきたアジア型流行株に関する研究資源を利用して、ヒトパラインフルエンザ 2 型ウイルス(hPIV2)を用いた新規粘膜ワクチンの開発を試みた。マウスに経鼻投与したところ全身および粘膜で env 特異的細胞性および液性免疫が誘導され、粘膜免疫誘導可能な新規ワクチンベクターとして有効であることが示唆された（研究協力者 保富康宏）。

(III) 「エイズ発症に関与する宿主、ウイルス側因子の探索に関する分子疫学研究」

①我が国の HIV-1 感染血友病患者の中には、感染後 20 年を経過したにもかかわらず、未治療のまま、なおエイズ発症から免れている患者群が存在する。これら患者群における発症遅延機序を解明する目的で HIV-1 複製調節に関連する可能性のある遺伝子の発現を RNA レベルで解析し、その結果、HIV-1 複製関連遺伝子の一つに関して、epigenetic な制御により転写産物から特定のエクソンが欠失する現象を見い出した。また完全長の transcript よりも splice variant が多く発現している症例が、健常者群に比較して長期未発症患者群で有意に高い頻度に見られることを明らかにされた。新発見の防御的遺伝子多型として今後の研究の展開が注目される（駒野班員）。

②北タイにおける HIV 感染者および配偶者コホートに基づいて、ジェネリック抗 HIV 薬 “GPOvir” のインパクト評価を行い、死亡率が 7~9% (Death/100Person-Years) (2001 年上半期から 2002 年下半期) から 1.3% (2004 年上半期) と急激に減少していることを確認した。また、HIV の感染初期群をより多く含む女性群に絞って解析した場合に、IL4-589T アリールおよび RANTES-28G アリールにおいて、低ウイルス量・高 CD4 値ならびにより良好な生存率との関連性を見い出した（有吉班員）。

これらの成果は、アジアと日本における HIV 感染症の最新動向の把握に加え、アジアの流行の成立ち、流行拡大の背景にある宿主側・ウイルス側の要因の解明に重要な意義があると考えられる。また我が国を含むアジア HIV 感染の予防策とワクチン開発を進めるにあたっては、アジアに特徴的な遺伝子型の分布とその流行パターンを考慮することが重要であり、本研究で得られた成果はその基礎情報を与えるものと考えられる。

分担研究者：所属施設

草川 茂	国立感染症研究所エイズ研究センター 主任研究官
椎野禎一郎	国立感染症研究所エイズ研究センター 主任研究官
駒野 淳	国立感染症研究所エイズ研究センター 主任研究官
有吉 紅也	国立感染症研究所エイズ研究センター 主任研究官 (現長崎大)

研究協力者

保富 康宏	三重大学大学院医学系研究科 助教授
加藤 信吾	慶応義塾大学医学部微生物学・免疫学 教室 助手

A. 研究目的とその背景

アジアにおけるエイズ流行は現在重要な転換期を迎えつつある。特に中国では 90 年代中頃より毎年 30%もの割合で感染者数が増加しており、有効な対策がとられない場合 2010 年までには、感染者数が 1,000 万人を突破する可能性があるなど、アジアにおいてさらに深刻なエイズ危機の到来が危惧される。

このような状況を背景として、本研究班は、本年度、我が国を含むアジア地域におけるエイズ流行に関する分子疫学的研究およびアジア型 HIV-1 ヴァリアントに関するウイルス学的研究を主要な柱として、研究を推進し、我が国およびアジアでの流行動向・将来動向を探ると共に、アジアにおける流行制圧と予防に向けた研究の「科学的基盤」の構築を目指した。

B. 研究方法

(柱 I)「分子疫学研究」(武部・草川班員)

① [海外研究] アジア各地域(中国雲南省、ミャンマー、マレーシアなど) および我が国の感染者血液から、2.6-kb gag-RT 領域および *env* (C2/V3)領域の塩基配列を決定し、系統樹解析によって遺伝子型の帰属の決定と領域間での遺伝子型不一致例の検索を行った。

② 一方、共培養法によって HIV-1 株を分離。組換えウイルスであることが推定される検体に関しては、ほぼ完全長の HIV-1 ゲノムをクローニングして、全塩基配列を決定。近隣結合法による系統樹解析および各種組換え点解析プログラム (bootscanning analysis, informative site analysis, subregion tree analysis) を用いた組換え点の微細マッピングを行い、流行ウイルス株の系統関係、相互関係を検討した。

③ [国内研究] 都内 2 病院を受診する患者・感染者から、informed consent を得た後、年齢、性別、国籍、推定感染経路に関するインタビューを行い、血液検体を収集し、*env* (C2/V3)、一部検体に関してはプロテアーゼおよび逆転写遺伝子領域の塩基配列を参考として遺伝子型を決定した。

(柱 II)「アジア型 HIV-1 流行株に関する基盤的研究資源の開発・整備」(草川・椎野班員)

① longPCR 法によって、アジア型 HIV-1 ヴァリアントの完全長 HIV-1 クローンを構築、PBMC での感染性を指標として感染性の分子クローンを樹立し、そのウイルス学的性状を検討した。

② 逆転写酵素のフィンガー・パーム領域の変異が共存する場合高度多剤耐性をもたらす系を利用し、マーカー遺伝子として制限酵素切断サイトに同義置換変異を導入し、両領域の組換えを高度多剤耐性出現で評価する *in vitro* 系の構築を行った。

③ アジア型感染性分子クローンをを用いたヒトパラミクソウイルスベクター・ワクチンの開発：hPIV2 の NP 領域の Not I サイトに NL43、中国での分離株 NH1.1、SIVgag 遺伝子を挿入した。コントロールとして同一部位に GFP 遺伝子挿入 rhPIV2 も作成し、Balb/c マウス気管内に rhPIV2 (5x10<sup>6</sup>) を投与して、HIVenv 特異的 T 細胞を CD8<sup>+</sup>細胞の特異的 IFN- $\gamma$  産生細胞の ELISPOT によって測定した (研究協力者 保富康宏)。

(柱 III)アジアにおけるエイズ流行の背景にある宿主側・ウイルス側要因の解析：

① 「北タイ・コホートに基づく解析」：ランパン県病院 HIV 専門外来にて、同外来受診者全員を対象にリクルートし、特に HIV 感染した夫婦は、3ヶ月毎追跡、6ヶ月毎に血液検体分離・保存、患者情報のコンピューター二重入力、検証を行った。②コホート検体を用いて HIV 伝播・エイズ病態に関連する遺伝子領域における SNIP を PCR-RFLP により、また、HLA Class I アリールを PCR-MPH (Microtiter plate hybridization) 法により解析、患者データと比較検討した (有吉班員)。

② 「血友病長期未発症者における発症遅延機序に関する研究」：ウイルス複製に関連することが報告されているが、発症との関連が不明である宿主因子のうち、ヒト細胞における遺伝子産物発現等による抗ウイルス状態の誘導を実験的に証明できることが可能なものを解析対象とし、長期未発症に分類される末梢血 CD4 リンパ球数 200 以下で未治療の患者群から末梢血リンパ球の RNA を抽出し、RT-PCR により各種ウイルス複製制御遺伝子を増幅し、これらの ORF の塩基配列を検討した (駒野班員)。

(倫理面への配慮)

本研究計画は協力医療機関および国立感染症研究所倫理委員会からの承認済み。いずれも研究協力の意思を同意書をもって確認されている。またアジア各国エイズ研究機関との共同研究に関しては各国政府所轄機関の指示する倫理規程に従って遂行された。なお、タイ国におけるコホート研究は、1999 年 12 月にタイ政府保健省医学研究倫理委員会にて協議され、2000 年 1 月に承認済。すべてのコホート参加者から、サイン入り同意書が得られている。

C. 研究結果

(柱 I)「分子疫学研究」(武部班員)

A. 海外研究

① 中国雲南省西部に新生している新規組換えウイルス (unique recombinant form, URF) の詳細な構造解析の結果、中国に固有な組換え型流行株 (CRF07\_BC および CRF08\_BC) と組換え点を共有するものが高頻度に検出されること。

② また、中国型 CRF は、ミャンマー中部で検出される URF と直接的な構造的関連性があることを明らかにした。

③ ミャンマーの首都ヤンゴンの STD 感染者 40 名の中から、塩基配列が決定された全長のウイルスゲノムの 5'-領域が中国に起源をもつ CRF07\_BC、3'-領域がタイに起源をもつ CRF01\_AE の間の新しいタイプの組換えウイルス 3

株を同定した。この新種の組換えウイルスは、CRF 間の第2世代の組換えウイルス (Inter-CRF recombinant, ICR) としては、先に我々が中国雲南省東南部の IDU から分離した CRF07\_BC と CRF08\_BC の間の組換えウイルス (ICR\_0708) に次ぐ第2の例となった。

④ マレーシアに出現した新規組換え型流行株 (CRF33\_01B) : 疫学的に関連性のない4症例から分離したウイルス株の全塩基配列を決定し、それらが CRF01\_AE とサブタイプ B/B'からなる同一の組換え構造をもつ組換えウイルスであり、また先にタイにおいて報告された CRF15\_01B とは異なることから、新型の組換え型流行株 (CRF33\_01B) であることが、正式に承認された (HIV sequence database, 2006年1月)。CRF33\_01B はマレーシアにおける感染者全体の19% (35/184) を占める。その比率はとりわけ注射薬物乱用者 (IDU) の間で高い (42%, 21/50) が、性的ルートによる感染者にも10-19%の割合で見出されることから、CRF33\_01B は、おそらく最初に IDU 集団で生まれ、ついで異なるリスク集団へ伝播している可能性が推定された。

**B. 国内研究** : 我が国における HIV-1 感染症の分子疫学の新動向 (研究協力者 加藤真吾など)

① 1999-2003年に主に首都圏・東関東地域から収集された我が国の HIV 感染者に関して遺伝子型分析を行った結果、日本人 (n=27) の中にサブタイプ B と CRF01\_AE の間の新規の組換えウイルス感染例4例を同定した。これは国内症例において新しいタイプの組み換えウイルスが同定された最初の例と考えられる。CRF01\_AE は40%を占めた。残りはサブタイプ B であった。

② 都内2病院の日本人感染者120例に関してみると、サブタイプ B が98例 (81.7%)、CRF01\_AE が15例 (12.5%)、サブタイプ A が4例 (3.3%)、サブタイプ C が2例 (1.7%)、CRF02\_AG が2例 (1.7%) であった。男性ではサブタイプ B が96例、CRF01\_AE が13例と圧倒的にサブタイプ B が多かったのに対して、女性ではサブタイプ B が2例、CRF01\_AE が3例とあまり変わらなかった。異性間性交渉で感染したと推測される34人 (うち女性8人) のうち、14人 (女性2人) はサブタイプ B に、14人 (女性3人) は CRF01\_AE に感染していた。一方、同性間性交渉で感染したと推測される57人 (全員男性) はすべてサブタイプ B に感染しており、その他のサブタイプによる感染はみられなかった。

**(柱 II) 「アジア型 HIV-1 流行株に関する基盤的研究資源の開発・整備」**

④ 広い宿主域をもつ HIV-1 subtype B' 感染性分子クローンの作出 : T cell line やマクロファージに対する感染性を T しこう組換え実験決定するサブタイプ B' の T cell line やマクロファージでよく増殖する感染性分子クローンが得られたことで、より幅広いウイルス学的研究への応用が期待される (草川班員)。

**(柱 III) アジアにおけるエイズ流行の背景にある宿主側・ウイルス側要因の解析 : 「血友病長期未発症者における発症遅延機序に関する研究」** (駒野班員)

CCR5、CyclophilinA や TRIM5alpha のウイルス複製関連ドメインには異常を認めなかったが、HIV-1 複製関連遺伝子の一つ (not disclosed) において興味深い変異を同定した。長期未発症者群において、完全長と予想される転写産物から約164nt短い mRNA 転写産物が存在することが RT-PCR にて確認された。患者によって短い転写産物しか検出できないもの、完全長と予想される転写産物と異なる比率

で共存するものが存在した。当該遺伝子のスプライスバリエーションはこれまで報告されていない。健康人 (7例) と比較すると、短い転写産物の割合が多い割合は長期未発症群 (11例中7例) に有意に多いことが判明した (P=0.04、健康人は7例中1例)。

**(柱 III) 「ウイルス学的研究」** (草川・椎野班員)

① 先に確立した両側の LTR を含むベクターを用いた高効率の感染性 HIV-1 分子クローンの構築技術を用い、本年度あらたに中国の経血液ルートでの流行の重要な動因となっている HIV-1 subtype B' (subtype B のタイ型ヴァリエーション) に関して非常に良好な複製能力を示す感染性分子クローンの作出に成功した。このクローンは CCR5 と CXCR4 の両者をコレセプターとして用いる X4R5 型であることを確認した。

② 組換えウイルスゲノムを大量に構造解析するため、96well-microtiter plate を用いた細胞・上清からの RT 領域の RT-PCR〜クローニング〜塩基配列決定の手順を確立した。RT-PCR を用いたクローニング手法は、PCR 反応中に組換えが生じてしまうが、これの大半は部分的に増幅した断片が次の増幅過程に介在して生じる現象であり、伸長反応を十分に長くすることで回避することができた。得られた組換え体の塩基配列解析から、RT のこの領域 (約400bp) では組換えの生じにくい領域が2箇所検出されたが、乗換え点の分布は塩基長とほぼ比例関係にあり組換えが極端に生じやすい領域は存在しなかった。この実験系では、得られたウイルスはすでに何世代かを経過しておりその間の自然選択や機会的浮動の影響を受けているため、サンプル集団の誤差分布を再検討する必要があるものの、組換えは特定のホットスポットで生じてはいないように見える (椎野班員)。

**D. 考察**

**(柱 I) 「分子疫学研究」** (武部班員)

① ミャンマー北中部と雲南省西部に分布する組換えウイルスの組換え点の中には相互に共通するものが多いことから、この地域の流行株が過去における共通の組換えに起源をもち、その後に行った2次的、3次的な組換えの結果、現在の URF が発生したものと示唆される。

① 雲南省西部地域は中国における IDU 流行の起源地と考えられ、この地域に新生した URF の中から現在の CRF07 と CRF08\_BC の共通祖先が生まれたと推定される。

② アジアにおける多様な組換えウイルスの検出は、極めて高いリスク行動をしている集団と急速なウイルス伝播を可能とする社会的ネットワークの存在を示唆する。

③ マレーシアにおいて見いだされた新型の組換え型流行株 (CRF33\_01B) はとりわけ IDU 集団においてその prevalence が高いことから、IDU 集団において最初に生まれたと推測される。また CRF33\_01B に関連する類縁の組み換えウイルスの存在は、マレーシア国内で新たな遺伝子組換えが継続的に起っていることを示唆するものと考えられる。これらの知見はアジアにおける流行の新動向を反映するものと考えられる。

④ 我が国における重感染例・新規組み換えウイルス感染例に関して : 国内症例58例の中から同定されたサブタイプ不一致例 (discordant subtype) 4例のうち少なくとも2例は CRF01 と欧米型のサブタイプ B 間の組換えウイルス株の感染者であることが確認されたが、一方、近年東南アジア地域で見いだされているものは、CRF01 と東南アジア特有のサブタイプ B' との組み合わせである。このことは、今回同定された組み換えウイルスが国内で生まれたものである可能性を強く示唆するものである。さらにまた、このことは、我が国においても、様々なタイプのウイルスに感

染する危険性のある（性）行動をしている集団の存在を推測させる事実であると言えます。

⑤ また HIV-1 サブタイプの分布は 2 つの日本人リスクグループの間で大きく異なり、男性同性愛者間ではサブタイプ B が圧倒的に優勢であるのに対して、異性間感染者間では男女ともサブタイプ B と CRF01\_AE がほぼ拮抗して流行していることが示された。わが国の HIV 感染の予防策とワクチン開発を進めるにあたっては、以上述べたような、わが国特有のサブタイプ流行パターンを考慮することが重要であると考えられる。

#### (柱 III)「ウイルス学的研究」(草川・椎野班員)

タイやミャンマーで注射薬物乱用者の間に発見されたものであるが、東南アジア地域における注射薬物乱用者の間の爆発的流行にだけでなく中国内陸部の供血者の間に起った悲劇的アウトブレイクの原因ウイルスとして重要性が再認識されている HIV-1 サブタイプ B' ヴァリエントの感染性分子クローンが確立されたことは、今後の東アジア地域を標的とするワクチン開発に向けた基盤的研究ツールを開発する上で重要な一歩となると期待される。また、HIV-1 組換え現象を現実のフィールド株をベースにして解析するシステムの構築されたことは意義深いと考えられる。

#### (柱 III)アジアにおけるエイズ流行の背景にある宿主側・ウイルス側要因の解析：

① 本北タイ・コホートは、抗 HIV 薬剤治療が開始される以前から継時的に患者死亡率を追跡していた故に、コホート開始 2 年後より徐々に普及した抗 HIV 薬剤治療が、北タイにおける市中病院 HIV 外来を受診するエイズ患者の生存にどのようなインパクトがあったのか、克明に記録する機会となった

② 我々の見出した HIV-1 複製関連遺伝子のエクソン 7 欠失転写産物の存在はエイズ発症と関連するものなのかは现阶段では明かではない。文献的には、遺伝子 A のエクソン 7 は、ウイルス遺伝子産物と相互作用するドメインであることが知られている。発症関連因子である可能性をテストするために、この短い転写産物をクローニングしてほ乳類発現プラスミドに導入し、T 細胞株に恒常的に発現させ、HIV-1 複製が抑制されるかを検証しようと計画している。

#### E. 結論

① 組換えウイルスの詳細な構造解析から中国南西部が中国における IDU 流行のエピセンターであること、また中国とミャンマーにおける流行が相互に密接な関連性をもつことが組換えウイルスの構造の詳細な解析の結果明らかにされた。

② マレーシアにおける近年のエイズ流行の加速に関与すると推測される新型の組換え型流行株 (CRF33\_01B) を見出した。アジア諸地域においてはエイズ流行が急速に拡大しているが、新規組換えウイルスの出現はこのような流行の最新動向を反映するものと考えられる。

③ 感染者・患者報告数の著しい増加傾向の見られる我が国において、新規感染者の過半数を占める男性同性愛者においては欧米型のサブタイプ B が圧倒的なファウンダー株となっているが、異性間感染者の間では東南アジアに起源をもつ CRF01\_AE がサブタイプ B に拮抗する割合にまで増加しているという傾向が明かとなった。

④ アジアを標的とするワクチン開発の基盤整備のため、アジア型流行株の中で、とりわけ中国内陸部の供血者の間のアウトブレイクの原因となっている HIV-1 サブタイプ B' の広い宿主細胞域を示す感染性分子クローンを樹立するなどアジア型 HIV-1 ヴァリエントに関する基礎研究・ワクチ

ン開発などに資する基盤的研究資源の開発整備が進んだ。また高度多剤耐性変異を用いた試験管内の HIV-1 遺伝子組換えの解析システムを樹立した。

④ 北タイランパン病院 HIV コホートは、成功裏に維持・発展しており、同コホートから得られた臨床情報・検体は、臨床的研究のみならず、宿主遺伝子研究・免疫研究・ウイルス研究など基礎医学の発展、さらに現地のタイ人研究者の育成に貢献した。

⑤ 我が国の HIV 感染血友病患者の間にみられる未治療のままエイズ発症を免れている感染者におけるエイズ発症遅延機序の解析を進め、HIV-1 複製関連遺伝子の一つに関してスプライシング制御などの epigenetic な効果により転写産物からエクソン 7 が欠失する現象を見出した。健常者群に比較すると長期末発症患者群に有意に高い頻度で観察されることから、長期末発症の原因遺伝子として非常に魅力的な候補であると考えられる。

#### F. 健康危険情報

本年度、当班よりの報告はありません。

#### G 研究発表

##### 論文発表

(欧文)

武部 豊 (主任研究者)・草川 茂 (分担研究者), 椎野 禎一郎 (分担研究者), 保富康宏 (協力研究員), 加藤 信吾 (協力研究員)

1. Kusagawa, S., Imamura, Y., Yasuoka, A., Hoshino, H., Oka, S., and Takebe, Y. (2003). Identification of HIV-2 subtype B transmission in East Asia. *AIDS Res Hum Retroviruses*, **19** (11): 1045-1049.
2. Takebe, Y., Motomura, K., Tatsumi, M., Yang, R., Lwin, H. H., Zaw, M, and Kusagawa, S. (2003). Geographical hot spot of extensive recombination of HIV-1s in Myanmar: high prevalence of diverse forms of intersubtype recombinants. *AIDS* **17**: 2077-2087.
3. Kaizu, M., Sato, H., Ami, Y., Isumi, Y., Nakasone, T., Tomita, Y., Someya, K., Takebe, Y., Kitamura, K., Tochikubo, O., and Honda, M. (2003). Infection of macaques with an R5-tropic SHIV bearing a chimeric envelope carrying subtype E V3 loop among subtype B framework. *Archives of Virology. Arch Virol*, **148** (5): 973-88.
4. Motomura, K., Kusagawa, S., Lwin, H. H., Thwe, M., Kato, K., Ohishi, K., Yamamoto, N., Zaw, M., Nagatake, T., and Takebe, Y. (2003). Different subtype distribution in the two cities in Myanmar: Evidence for independent clusters of HIV-1. *AIDS* **17** (4): 14-17.
5. Yang, R., Kusagawa, S., Zhang, C., Xia, X., Ben, K., Takebe, Y. (2003). Identification and characterization of new class of HIV-1 recombinants comprised of two circulating recombinant forms, CRF07\_BC and CRF08\_BC, in China. *J. Virol.* **77** (1): 685-695.
6. Matsuoka-Aizawa, S., Sato, H., Hachiya, A., Tsuchiya, K., Takebe, Y., Kimura, S., and Oka, S. (2003). Nelfinavir (NFV) can potentiate the infectivity and replication capacity of human immunodeficiency virus type 1 whose fitness is otherwise compromised upon the acquisition of mutations in Gag p17 in association with protease mutations conferring NFV resistance. *J. Virol.* **77** (1): 318-327.
7. Takamura, S., Niikura, M., Li, T.-C., Takeda, N., Kusagawa, S., Takebe, Y., Miyamura, T., and Yasutomi, Y. (2004). DNA vaccine-encapsulated virus-like particles derived from an



- orally transmissible virus stimulates mucosal and systemic immune responses by oral administration. *Gene Ther*. 11: 628-635.
8. Takebe, Y., Kusagawa, S., and Motomura, K. (2004). Molecular epidemiology of HIV: Tracking AIDS Pandemic. *Pediatrics International* 46: 236-244.
  9. Takebe, Y., Kusagawa, S., Yokota, Y., Ma, Y., Yang, C., Li, X., Hoshina, Y., Wang, Q., Li, X., Imamura, Y., Uehara, R., Motomura, K., Yang, R., Shiino, T., Xia, X., Ben, K., Thwe, M., Aung, T., Aye, K. T., Oo, K. Y., and Lwin, H. H. (2004). Geographical hotspots of extensive intersubtype recombination in Asia: "Melting pot" that generates diverse forms of HIV-1 unique recombinants. Proceeding of XV International AIDS Conference (Bangkok, Thailand). pp. 35-38. Medimond. Italy.
  10. Kusagawa, S., Yang, R., and Takebe, Y. (2004). Isolation and biological characterization of an infectious molecular clone of HIV-1 CRF08\_BC from China. Proceeding of XV International AIDS Conference (Bangkok, Thailand). pp. 39-42. Medimond. Italy.
  11. Hidaka, C., Norose, Y., Nakagawa, Y., Shimizu, M., Takahashi, M., Ohwaki, A., Nohtomi, K., Toda, M., Kusagawa, S., Sakaguchi, M., Kudo, S., Takebe, Y., and Takahashi, H. (2004). Dermal dendritic cells sensitized with plasmid DNA encoding immunostimulatory sequence by gene gun efficiently prime murine HIV-1 -specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *Biomedical Research* 25 (2): 83-91.
  12. Kondo, M., Shima, T., Sudo, K., Nishizawa, M., Iwamuro, S., Okabe, T., Takebe, Y., Imai, M. (2005). Identification of attenuated HIV-1 CRF01\_AE variant associated with slow disease progression due to gross genetic alterations in the *nef*-LTR sequences. *J. Inf Dis*. 192: 56-6
  13. Mori, K., Sugimoto, C., Ohgimoto, S., Shioda, T., Kusagawa, S., Takebe, Y., Kano, M., Matano, T., Yuasa, T., Kitaguchi, D., Miyazawa, M., Takahashi, Y., Yasunami, M., Kimura, A., Yamamoto, N., Suzuki, Y., and Nagai, Y. (2005). Influence of glycosylation on the efficacy of an Env-based vaccine against SIVmac239 in a macaque AIDS model. *J. Virol.* 79 (16): 10386-10396.
  14. Takamura, S., Matsuo, K., Takebe, Y., and Yasutomi, Y. (2005). Ag85B of mycobacteria elicits effective CTL responses through activation of robust Th1 immunity as a novel adjuvant in DNA vaccine. *J. Immunol.* 175: 2541-2547.
  15. Li, X.-J., Kusagawa, S., Xia, X., Yang, C., Wang, Q., Yokota, Y., Imamura, Y., Hoshina, Y., Nohtomi, K., Shiino, T., Onogi, T., Yang, R., Yamamoto, N., Ben, K., and Takebe, Y. (2005). Molecular Epidemiology of the Heterosexual HIV-1 Epidemic in Kunming, Yunnan Province, China, Suggests Origin from the Local IDU Epidemic. *AIDS Res and Human Retroviruses* 21: 977-980.
  16. Takebe, Y. and Telesnitsky, A. (2006). Evidence for the acquisition of multidrug resistance by an HIV clinical isolate via human gene transduction. submitted to *Nature Med*.
  17. Tee, K. K., Li, X.-J., Nohtomi, K., Ng, K. P., Kamarulzaman, A., and Takebe, Y. (2006). Emergence of Novel Circulating Recombinant Form (CRF33\_01B) Disseminating Widely among Various Risk Populations, Malaysia. submitted to *Emerging Infectious Dis*.
  18. Li, X.-J., Kusagawa, S., Aye, K.T., Hoshina, Y., Yokota, Y., Xia, X., Ben, K., Oo, K. Y., Aung, T., Thant, K. Z., Moe, K., Thwe, M., and Takebe, Y. (2006). Dual infections with multiple lineages of HIV-1 strains in unique geographical recombination "hotspots" in Asia. submitted to *AIDS*.
- 有吉紅也 (分担研究者)
1. Yokomaku Y, Miura H, Tomiyama H, Kawana-Tachikawa A, Takiguchi M, Kojima A, Nagai Y, Iwamoto A, Matsuda Z, Ariyoshi K. Impaired Processing and Presentation of Cytotoxic-T-Lymphocyte (CTL) Epitopes Are Major Escape Mechanisms from CTL Immune Pressure in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *J Virol*. 2004 Feb; 78(3): 1324-32.
  2. Ariyoshi K., Berry N, Cham F, Jaffar S, Schim van der Loeff M, Jobe O, N'Gom PT, Larsen O, Andersson S, Aaby P, Whittle H. Quantification of Human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) provirus load in a rural West African population: no enhancement of human immunodeficiency virus type 2 pathogenesis, but HTLV-I provirus load relates to mortality. *J Infect Dis*. 2003 Dec 1; 188(11): 1648-51.
  3. Schim Van Der Loeff MF, Hansmann A, Awasana AA, Ota MO, O'Donovan D, Sarge-Njie R, Ariyoshi K., Milligan P, Whittle H. Survival of HIV-1 and HIV-2 perinatally infected children in The Gambia. *AIDS*. 2003 Nov 7; 17(16): 2389-2394.
  4. Ariyoshi K., Matsuda M, Miura H, Tateishi S, Yamada K, Sugiura W. Patterns of point mutations associated with antiretroviral drug treatment failure in CRF01\_AE (subtype E) infection differ from subtype B infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2003 Jul 1; 33(3): 336-42.
  5. Alabi AS, Jaffar S, Ariyoshi K., Blanchard T, Schim van der Loeff M, Awasana AA, Corrah T, Sabally S, Sarge-Njie R, Cham-Jallow F, Jaye A, Berry N, Whittle H. Plasma viral load, CD4 cell percentage, HLA and survival of HIV-1, HIV-2, and dually infected Gambian patients. *AIDS*. 2003 Jul 4; 17(10): 1513-20.
  6. Pathipvanich P, Ariyoshi K., Rojanawiwat A, Wongchoosie S, Yingseree P, Yoshiike K, Warachit P, Sawanpanyalert P. Survival benefit from non-highly active antiretroviral therapy in a resource-constrained setting. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2003 Feb 1; 32(2): 157-60.
  7. Pathipvanich P, Rojanawiwat A, Ariyoshi K., Miura T, Pumpradit W, Wongchoosie S, Yingseree P, Warachit P, Sawanpanyalert P. Mortality analysis of HIV-1 infected patients for prioritizing antiretroviral drug therapy. *J Med Assoc Thai*. 87: 951-4, 2004.
  8. Saeng-Aroon S, Wichukchinda N, Myint L, Pathipvanich P, Ariyoshi K., Rojanawiwat A, Matsuda M, Sawanpanyalert P, Sugiura W, Auwanit W. Study of Antiretroviral Drug-Resistant HIV-1 Genotypes in Northern Thailand: Role of Mutagenically Separated Polymerase Chain Reaction as a Tool for monitoring Zidovudine-Resistant HIV-1 in Resource-Limited Settings. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 36:1051-56, 2004
- (和文論文・総説)
- 武部 豊 (主任研究者)・草川 茂 (分担研究者), 椎野 禎一郎 (分担研究者), 駒野 淳 (分担研究者), 保富 康宏 (協力研究員), 加藤信吾 (協力研究員)
1. 武部 豊 (2004). アジアの HIV・エイズ最前線 Vol. 1 ① 中国 (インタビュー記事). *AIDS Report* 63: pp. 6. (厚生労働省エイズストップ作戦本部監修, エイズ予防財団編集) 中央法規出版. 東京.

[<http://idsc.nih.gov/jasr/index-j.html>].

3. 武部 豊 (2004). 「第 11 回国際レトロウイルス・日和見感染症会議—Oversea congress report」 「Confronting HIV 2004」 26: McCann Healthcare Publishing (2004).
4. 武部 豊 (2004). (分担執筆) ヒト後天性免疫不全症候群 (エイズ) 「感染症の事典」 pp. 90-93. 朝倉書店. 東京.
5. 武部 豊. 「HIV の特徴」 特集「子どもの HIV 感染症の諸問題」小児内科 37 (3): 東京医学社. 東京 (2004).
6. 武部 豊. (分担訳) 「ハリソン内科 第二版」 HIV 感染症: エイズと関連疾患 (Anthony S. Fauci & H. Clifford Lane). メディカル・サイエンス・インターナショナル. 東京. (2004). (in press).
7. 武部 豊 (2004). 「アジアにおける HIV 流行の分子疫学: 流行はいかにして形成されたか」 「Confronting HIV 2005」 28: 5-7. McCann Healthcare Publishing (2004).

有吉班員

- 1) 有吉紅也 「発展途上国における HIV・エイズ対策の現状と未来」 科学 74: 949-953, 2004

学会発表

武部 豊 (主任研究者)・草川 茂 (分担研究者), 椎野 禎一郎 (分担研究者), 駒野 淳 (分担研究者), 保富 康宏 (協力研究員), 加藤信吾 (協力研究員)

1. 武部豊, 草川茂, 安岡彰, 岡慎一 (2003). HIV-2 感染国内症例の同定とその解析. 第 77 回日本感染症学会. (2003. 4. 17-18. 福岡)
2. 武部豊, 楊榮閣, 今村裕子, 本村和嗣, 草川茂, Kunlong Ben. (2003). 中国における HIV 流行はいかにして形成されたか: 流行のエピセンターとしての中国南西部 (雲南省). 第 77 回日本感染症学会 (2003. 4. 17-18. 福岡)
3. 武部豊. (2003). アジアにおける HIV 流行の分子疫学—新たな HIV-1 組換えウイルスについて. 平成 15 年度 微生物生物技術協議会第 2 回研究会 シンポジウム「HIV」(2003.7.11 福岡)
4. 武部豊. (2003). アジアにおけるエイズ危機—流行形成のメカニズムを探る—. 合同学術集会ワークショップ「基礎と臨床の調和と融合」—「日本の AIDS, 世界の AIDS」 (平成 15 年 10 月 30 日, 横浜)
5. 武部豊, 横田侑子, 上原理恵子, 今村裕子, 草川茂. (2003). HIV-1 遺伝子組換えの特異点: *in vivo* 組換え点の微細マッピング. 第 51 回日本ウイルス学会 (2003.10.27-29. 京都)
6. 武部豊, 今村裕子, 草川茂. (2003). HIV-1 サブタイプ B' の起源に関する進化的解析. 第 51 回日本ウイルス学会 (2003.10.27-29. 京都)
7. 草川茂, 楊榮閣, 武部豊. (2003). HIV-1 CRF08\_BC 感染性分子クローンの樹立とその性状の解析. 第 51 回日本ウイルス学会 (2003.10.27-29. 京都)
8. 武部豊, 今村裕子, 草川茂. (2003). HIV-1 サブタイプ B' の起源とアジアにおける流行拡大に果たす役割. 第 17 回日本エイズ学会 (2003.11.27-29. 神戸)
9. 武部豊, Ma Yanling, Yang Chaojun, 今村裕子, 横田侑子, 上原理恵子, 草川茂, Yang Rongge, Ben Kunlong. (2003). 中国におけるエイズ流行の巨大危機と

その形成のメカニズム. 第 17 回日本エイズ学会 (2003.11.27-29. 神戸).

10. Yutaka Takebe, Yuko Yokota, Shigeru Kusagawa, Yuko Imamura, Rieko Uehara, Yanling Ma, Chaojun Yang, Xiaojie Li, Xinming Li, Masakazu Yamamuro, Min Thwe, Tin Aung, Khin Yi Oo, and Hla Htut Lwin. (2004). Precise mapping of recombination breakpoints of HIV-1 unique recombinant forms circulating in Myanmar: *in vivo* sequence preference for recombination and the biological implications. XVIth Joint Scientific Meeting of the AIDS Panels, U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program (March 8-11, 2004 Nashville, USA).
11. Takebe, Y., Yokota, Y., Kusagawa, S., Imamura, Y., Uehara, R., Thwe, M. and Lwin, H. H. Precise mapping of recombination breakpoints of HIV-1 unique recombinant forms emerging in Myanmar: *in vivo* sequence preference for recombination. 11th International Workshop on HIV Dynamics & Evolution (April 29-May 2, 2004, Stockholm, Sweden).
12. Shimizu, N., Tanaka, A., Que, A., and Takebe, Y. and Hoshino, H. (2004). G protein-coupled receptors, CCR9B, D6, FML1 and XCR1, have capacity to mediate the CD4-dependent infection of HIV-1, HIV-2, and SIV as coreceptors. XIth International AIDS Conference (Poster presentation) (July 13, 2004, Bangkok, Thailand).
13. 武部豊, 横田侑子, 小泉寛和, Xi Xiao-Jie, 滝口雅文, 岡慎一. (2005). HIV-1 スーパー感染: レジデント・ウイルスとスーパー感染ウイルス間の組換えウイルスの急速な出現とその生物学的意義. 第 53 回日本ウイルス学会 (2005.11.20-22. 横浜)
14. 近藤真規子, 嶋貴子, 武部豊, 加藤真吾, 今井光信. (2005). Real-time PCR 法を用いた HIV-1 プロウイルス定量法—6 種類の HIV-1 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 (2005.11.20-22. 横浜)
15. 草川茂, 武部豊. (2005). 広い宿主域と高い増殖能を持つ HIV-1 CRF08\_BC 感染性分子クローンの構築. 第 53 回日本ウイルス学会 (2005.11.20-22. 横浜)
16. 清水佐紀, 駒野淳, 浦野恵美子, 二橋悠子, 宮内浩典, 磯貝まや, 松田善衛, 納富香子, 小野木利成, 武部豊, 山本直樹. (2005). HIV-1 感染細胞における Tat を介した P-TEFb の活性化を抑制する細胞内因子の解析. 第 53 回日本ウイルス学会 (2005.11.20-22. 横浜)
17. 武部豊, 納富香子, 小野木利成, 西郷薫, 内藤雄樹. (2005). バイオインフォマティクスの手法に基づいた抗 HIV-1 至適汎用 siRNA の設計とそれによる HIV-1 増殖阻害効果の評価. 第 53 回日本ウイルス学会 (2005.11.20-22. 横浜)
18. 武部豊, Xi Xiao-Jie, Ma Yanling, Xia Xueshan. (2005). HIV-1 遺伝子組換えにおけるサブタイプ C LTR の selective advantage (選択優位性). 第 19 回日本エイズ学会 (2005.12.1-3. 熊本)
19. 駒野淳, 二橋悠子, 浦野恵美子, 青木徹, 貝の瀬由成, 宮内浩典, 磯貝まや, 松田善衛, 山本直樹. (2005). Cell surface expression of CXCR4 is regulated by a non-tyrosine-based diacidic motif within the cytoplasmic tail. 第 19 回日本エイズ学会 (2005.12.1-3. 熊本)
20. 清水佐紀, 駒野淳, 浦野恵美子, 二橋悠子, 宮内浩

- 典、磯貝まや、松田善衛、納富香子、小野木利成、武部豊、山本直樹. (2005). T-type cyclin/ CDK9 複合体の活性化を抑制する細胞因子による HIV-1 複合制御. 第19回日本エイズ学会 (2005.12.1-3. 熊本)
21. 武部豊、横田侑子、小泉寛和、Xi Xiao-Jie、滝口雅文、岡慎一. (2005). HIV-1 スーパー感染とウイルスの個体内進化に関する解析. 第19回日本エイズ学会 (2005.12.1-3. 熊本)
22. Tee Kok-Keng, Li Xiao-Jie, Nohtomi Kyouko, Pon Chee Keong, Kamarulzaman Adeeba, Ng Kee Peng, Takebe Yutaka. (2005). Emergence of new HIV-1 recombinant forms in Malaysia. 第19回日本エイズ学会 (2005.12.1-3. 熊本)
23. 近藤真規子、須藤弘二、田中里恵、嶋貴子、足立拓也、設楽裕子、岩室紳也、向出雅一、武部豊、加藤真吾、今井光信. (2005). 各種サブタイプに対応できる real-time PCR 法による HIV-1 プロウイルスの定量法の検討. 第19回日本エイズ学会 (2005.12.1-3. 熊本)
24. Yutaka Takebe. (2005). Precise mapping of recombination breakpoints of HIV-1 recombinants in Asia: Insight into *in vivo* recombination mechanism. The 12th International Workshop on HIV Dynamics and Evolution (April 23-26, 2005 Cleveland, Ohio, USA).
25. Yutaka Takebe. (2005). Selective advantage of LTR of HIV-1 subtype C over that of subtype B in *in vivo* recombination event. 6th Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance (November 13-16, 2005 Chantilly, Virginia, USA).
26. Yutaka Takebe. (2006). Selective advantage of HIV-1 subtype C LTR in inter-subtype recombination *in vivo*. 13th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. (February 5-8, 2006 Denver, Co, USA).
27. Yutaka Takebe. (2006). Inter-CRF recombinants (ICRs): New class of HIV-1 recombinants and its epidemiological implications. (February 5-8, 2006 Denver, Co, USA).

#### H 知的財産権の出願・登録状況

(主任研究者 武部 豊)

1. 「弱毒型 HIV-1 塩基配列」(特願 2005-08741、平成 17 年 1 月 17 日出願) (神奈川衛生研究所 今井光信・近藤真規子博士と共同出願)
2. 「高度のゲノム多様性をもつ病原性微生物に対する機能性オリゴヌクレオチドの設計アルゴリズムと高い有効性と汎用性をもつ抗 HIV-1 オリゴヌクレオチド塩基配列」(特願 2005-55064、2/28/05 出願; 東京大学理学部と共同出願)

## Ⅱ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表（2003年4月～2006年3月）

論文発表（欧文誌）

（武部豊・草川茂・椎野禎一郎・駒野淳）

1. Matsuoka-Aizawa, S., Sato, H., Hachiya, A., Tsuchiya, K., Takebe, Y., Gatanaga, H., Kimura, S., and Oka, S. (2003). Isolation and molecular characterization of a Nelfinavir (NFV)-resistant human immunodeficiency virus type 1 that exhibits NFV-dependent enhancement of replication. *J. Virol.* **77** (1): 318-327.
2. Yang, R., Kusagawa, S., Zhang, C., Xia, X., Ben, K., Takebe, Y. (2003). Identification and characterization of new class of HIV-1 recombinants comprised of two circulating recombinant forms, CRF07\_BC and CRF08\_BC, in China. *J. Virol.* **77** (1): 685-695.
3. Motomura, K., Kusagawa, S., Lwin, H. H., Thwe, M., Kato, K., Ohishi, K., Yamamoto, N., Zaw, M., Nagatake, T., and Takebe, Y. (2003). Different subtype distribution in the two cities in Myanmar: Evidence for independent clusters of HIV-1 transmission. *AIDS* **17** (4): 14-17.
4. Kaizu, M., Sato, H., Ami, Y., Isumi, Y., Nakasone, T., Tomita, Y., Someya, K., Takebe, Y., Kitamura, K., Tochikubo, O., and Honda, M. (2003). Infection of macaques with an R5-tropic SHIV bearing a chimeric envelope carrying subtype E V3 loop among subtype B framework. *Archives of Virology* **148** (5): 973-988.
5. Takebe, Y., Motomura, K., Tatsumi, M., Lwin, H. H., Zaw, M., and Kusagawa, K. (2003). High prevalence of diverse forms of intersubtype recombinants in Central Myanmar: geographical hot spot of extensive recombination. *AIDS* **17**: 2077-2087.
6. Kusagawa, S., Imamura, Y., Yasuoka, A., Hoshino, H., Oka, S., and Takebe, Y. (2003). Identification of HIV-2 subtype B transmission in East Asia. *AIDS Res and Human Retroviruses* **19** (11): 1045-1049.
7. Takamura, S., Niikura, M., Li, T.-C., Takeda, N., Kusagawa, S., Takebe, Y., Miyamura, T., and Yasutomi, Y. (2004). DNA vaccine-encapsulated virus-like particles derived from an orally transmissible virus stimulates mucosal and systemic immune responses by oral administration. *Gene Ther.* **11**: 628-635.
8. Takebe, Y., Kusagawa, S., and Motomura, K. (2004). Molecular epidemiology of HIV: Tracking AIDS Pandemic. *Pediatrics International* **46**: 236-244.
9. Takebe, Y., Kusagawa, S., Yokota, Y., Ma, Y., Yang, C., Li, X., Hoshina, Y., Wang, Q., Li, X., Imamura, Y., Uehara, R., Motomura, K., Yang, R., Shiino, T., Xia, X., Ben, K., Thwe, M., Aung, T., Aye, K. T., Oo, K. Y., and Lwin, H. H. (2004). Geographical hotspots of extensive intersubtype recombination in Asia: "Melting pot" that generates diverse forms of HIV-1 unique recombinants. Proceeding of XV International AIDS Conference (Bangkok, Thailand), pp. 35-38. Medimond. Italy.

10. Kusagawa, S., Yang, R., and Takebe, Y. (2004). Isolation and biological characterization of an infectious molecular clone of HIV-1 CRF08\_BC from China. Proceeding of XV International AIDS Conference (Bangkok, Thailand). pp. 39-42. Medimond, Italy.
11. Hidaka, C., Norose, Y., Nakagawa, Y., Shimizu, M., Takahashi, M., Ohwaki, A., Nohtomi, K., Toda, M., Kusagawa, S., Sakaguchi, M., Kudo, S., Takebe, Y., and Takahashi, H. (2004). Dermal dendritic cells sensitized with plasmid DNA encoding immunostimulatory sequence by gene gun efficiently prime murine HIV-1 -specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *Biomedical Research* **25** (2): 83-91.
12. Kondo, M., Shima, T., Sudo, K., Nishizawa, M., Iwamuro, S., Okabe, T., Takebe, Y., Imai, M. (2005). Identification of attenuated HIV-1 CRF01\_AE variant associated with slow disease progression due to gross genetic alterations in the *nef*-LTR sequences. *J. Inf Dis.* **192**: 56-61.
13. Mori, K., Sugimoto, C., Ohgimoto, S., Shioda, T., Kusagawa, S., Takebe, Y., Kano, M., Matano, T., Yuasa, T., Kitaguchi, D., Miyazawa, M., Takahashi, Y., Yasunami, M., Kimura, A., Yamamoto, N., Suzuki, Y., and Nagai, Y. (2005). Influence of glycosylation on the efficacy of an Env-based vaccine against SIVmac239 in a macaque AIDS model. *J. Virol.* **79** (16): 10386-10396.
14. Takamura, S., Matsuo, K., Takebe, Y., and Yasutomi, Y. (2005). Ag85B of mycobacteria elicits effective CTL responses through activation of robust Th1 immunity as a novel adjuvant in DNA vaccine. *J. Immunol.* **175**: 2541-2547.
15. Li, X.-J., Kusagawa, S., Xia, X., Yang, C., Wang, Q., Yokota, Y., Hoshina, Y., Onogi, T., Nohtomi, K., Imamura, Y., Shiino, T., Yang, R., Yamamoto, N., Ben, K., and Takebe, Y. (2005). Molecular Epidemiology of the Heterosexual HIV-1 Epidemic in Kunming, Yunnan Province, China, Suggests Origin from the Local IDU Epidemic. *AIDS Res and Human Retroviruses* **21** (11): 977-980.

(有吉班員)

1. Yokomaku Y, Miura H, Tomiyama H, Kawana-Tachikawa A, Takiguchi M, Kojima A, Nagai Y, Iwamoto A, Matsuda Z, Ariyoshi K. Impaired Processing and Presentation of Cytotoxic-T-Lymphocyte (CTL) Epitopes Are Major Escape Mechanisms from CTL Immune Pressure in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *J Virol.* 2004 Feb; **78**(3): 1324-32.
2. Ariyoshi K, Berry N, Cham F, Jaffar S, Schim van der Loeff M, Jobe O, N'Gom PT, Larsen O, Andersson S, Aaby P, Whittle H. Quantification of Human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) provirus load in a rural West African population: no enhancement of human immunodeficiency virus type 2 pathogenesis, but HTLV-I provirus load relates to mortality. *J Infect Dis.* 2003 Dec 1; **188**(11): 1648-51.
3. Schim Van Der Loeff MF, Hansmann A, Awasana AA, Ota MO, O'Donovan D, Sarge-Njie R, Ariyoshi K, Milligan P, Whittle H. Survival of HIV-1 and HIV-2 perinatally infected children in The Gambia. *AIDS.* 2003 Nov 7; **17**(16): 2389-2394.

4. Ariyoshi K, Matsuda M, Miura H, Tateishi S, Yamada K, Sugiura W. Patterns of point mutations associated with antiretroviral drug treatment failure in CRF01\_AE (subtype E) infection differ from subtype B infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2003 Jul 1; 33(3): 336-42.
5. Alabi AS, Jaffar S, Ariyoshi K, Blanchard T, Schim van der Loeff M, Awasana AA, Corrah T, Sabally S, Sarge-Njie R, Cham-Jallow F, Jaye A, Berry N, Whittle H. Plasma viral load, CD4 cell percentage, HLA and survival of HIV-1, HIV-2, and dually infected Gambian patients. *AIDS*. 2003 Jul 4; 17(10): 1513-20.
6. Pathipvanich P, Ariyoshi K, Rojanawiwat A, Wongchoosie S, Yingseree P, Yoshiike K, Warachit P, Sawanpanyalert P. Survival benefit from non-highly active antiretroviral therapy in a resource-constrained setting. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2003 Feb 1; 32(2): 157-60.
7. Pathipvanich P, Rojanawiwat A, Ariyoshi K, Miura T, Pumpradit W, Wongchoosie S, Yingseree P, Warachit P, Sawanpanyalert P. Mortality analysis of HIV-1 infected patients for prioritizing antiretroviral drug therapy. *J Med Assoc Thai*. 87: 951-4, 2004
8. Alabi AS, Jaffar S, Ariyoshi K, Blanchard T, Schim van der Loeff M, Awasana AA, Corrah T, Sabally S, Sarge-Njie R, Cham-Jallow F, Jaye A, Berry N, Whittle H. Plasma viral load, Saeng-Aroon S, Wichukchinda N, Myint L, Pathipvanich P, Ariyoshi K, Rojanawiwat A, Matsuda M, Sawanpanyalert P, Sugiura W, Auwanit W. Study of Antiretroviral Drug-Resistant HIV-1 Genotypes in Northern Thailand: Role of Mutagenically Separated Polymerase Chain Reaction as a Tool for monitoring Zidovudine-Resistant HIV-1 in Resource-Limited Settings. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 36:1051-56, 2004 .

論文発表（邦文誌）

（武部班員）

1. 武部 豊（分担執筆）. HIV-1 の組換え型流行株（CRF）. <特集>内科キーワード 2003. 内科 91（6）: 1250-1251（2003）.
2. 武部 豊. 「第10回国際レトロウイルス・日和見感染症会議」学会印象記 「臨床と微生物」 30（4）: 407（071）. 近代出版. 東京（2003）.
3. 武部 豊. HIV-1 感染症への分子疫学的アプローチ. 総説. 特集「エイズ」. 臨床とウイルス 31（4）: 251-263. 日本臨床ウイルス学会. 東京（2003）.
4. 武部 豊. 後天性免疫不全症候群（エイズ）の分子予防医学. 「分子予防環境医学—生命科学研究の予防・環境医学への統合」（松島綱治 編集）各論2）感染症.（分担）pp. 170-186. 本の泉社. 東京（2003）.
5. 武部 豊, 馬 艶玲, 楊 朝軍. 中国におけるエイズ流行：迫り来る巨大危機とその分子疫学 特集・中国におけるエイズ対策の現状. 日中医学 18（4）: 14-20（財）日中医学協会. 東京（2003）.
6. 武部 豊. ケモカインと HIV 感染. 「サイトカイン・ケモカインのすべて—基礎から最新情報まで—」（笠松新平・松島綱治編集）第52章. pp. 572-583. 日本医学館. 東京（2004）.

7. 武部 豊 (2004). アジアの HIV・エイズ最前線 Vol. 1 ① 中国 (インタビュー記事). AIDS Report 63: pp. (厚生労働省エイズストップ作戦本部監修, エイズ予防財団編集) 中央法規出版. 東京.
8. 武部 豊 (2004). トピックス「HIV サブタイプの最新分類とその世界分布」. 病原微生物検出情報 Infectious Agents Surveillance Report (IASR) [<http://idsc.nih.go.jp/iasr/index-j.html>].
9. 武部 豊 (2004). 「第 11 回国際レトロウイルス・日和見感染症会議—Oversea congress report」 「Confronting HIV 2004」 26: McCann Healthcare Publishing (2004).
10. 武部 豊 (2004). (分担執筆) ヒト後天性免疫不全症候群 (エイズ) 「感染症の事典」 pp. 90-93. 朝倉書店. 東京.
11. 武部 豊. 「HIV の特徴」特集「子どもの HIV 感染症の諸問題」小児内科 37 (3): 東京医学社. 東京 (2004).
12. 武部 豊 (2005). 「アジアにおける HIV 流行の分子疫学: 流行はいかにして形成されたか」 「Confronting HIV 2005」 28: 5-7. McCann Healthcare Publishing (2004).
13. 武部 豊. (分担訳) 「ハリソン内科 第二版」 HIV 感染症: エイズと関連疾患 (Anthony S. Fauci & H. Clifford Lane). 173: 9-16. メディカル・サイエンス・インターナショナル. 東京. (2005).

(有吉紅也)

1. 有吉紅也 「発展途上国における HIV・エイズ対策の現状と未来」科学 74: 949- 953, 2004.



### Ⅲ. 研究成果の刊行物・別刷

## Isolation and Molecular Characterization of a Nelfinavir (NFV)-Resistant Human Immunodeficiency Virus Type 1 That Exhibits NFV-Dependent Enhancement of Replication

Saori Matsuoka-Aizawa,<sup>1</sup> Hironori Sato,<sup>2,3</sup> Atsuko Hachiya,<sup>1</sup> Kiyoto Tsuchiya,<sup>1</sup>  
 Yutaka Takebe,<sup>2</sup> Hiroyuki Gatanaga,<sup>1</sup> Satoshi Kimura,<sup>1</sup>  
 and Shinichi Oka<sup>1\*</sup>

*AIDS Clinical Center, International Medical Center of Japan,<sup>1</sup> and AIDS Research Center<sup>2</sup> and  
 Division of Molecular Genetics,<sup>3</sup> National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan*

Received 24 May 2002/Accepted 30 September 2002

During the use of a phenotypic anti-human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) drug resistance assay in a large set of clinical virus isolates, we found a unique variant (CL-4) that exhibited a high level of nelfinavir (NFV) resistance and rather enhanced replication under subinhibitory concentrations of NFV (0.001 to 0.1  $\mu$ M). Comparison of *gag-pol* sequences of the CL-4 variant and its predecessor virus isolates showed a stepwise accumulation of a total of 19 amino acid substitutions in protease (PR) and Gag p17 during 32-month NFV-containing antiretroviral therapy, while other Gag regions including the cleavage sites of the p55 precursor remained highly conserved. To understand the relationship between the genetic and phenotypic changes in CL-4, we constructed chimeric viruses using pNL4-3, replacing the PR, p24PR, or p17PR gene segment of CL-4 or its predecessor. A series of tissue culture infections with the chimeras in the absence or presence of increasing concentrations of NFV demonstrated that only the p17PR segment of CL-4 could confer the NFV-dependent replication enhancement phenotype on NL4-3. Our data suggest a novel adaptation mechanism of HIV-1 to NFV, in which coevolution of Gag and PR genes generates a variant that replicates more efficiently in the cellular environment in the presence of NFV than without the drug.

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) protease (PR) is essential for maturation of virus particles. During or after budding of virus particles from the plasma membrane, PR cleaves Gag and Gag-Pol precursor proteins into the multifunctional Gag proteins (matrix [MA; p17], capsid [CA; p24], and nucleocapsid [NC; p7]) and three enzymes (reverse transcriptase [RT], integrase, and PR), which are indispensable for *de novo* retroviral replication (13, 26). Protease inhibitors (PIs) are designed to bind into the active site of the PR homodimer, a functional entity of PR, and block its catalytic activity. Consequently, PI treatment of infected cells results in accumulation of morphologically immature, replication-incompetent viral particles, leading to prevention of *de novo* infection. Various PIs, such as indinavir, saquinavir (SQV), zidovudine, zalcitabine, and zalcitabine, are now widely used clinically as the main drug in highly active antiretroviral therapy (HAART), in combination with other classes of anti-HIV-1 drugs.

When suppression of HIV-1 replication by PI-containing therapy is incomplete, variants with reduced sensitivity to the PI can emerge by accumulating nonsynonymous mutations in the PR gene (4, 14, 17, 20), causing a serious reduction in the clinical efficacy of HAART (1, 5, 10). PI resistance-associated mutations often affect the substrate specificity of PR (8) and

can impair enzyme function, resulting in reduction of the replicative capacity of the variants (2, 7, 16–18, 28). In some *in vivo* infection cases, however, the impaired growth capacity recovers partially by accumulation of secondary mutations at the cleavage sites in the Gag-Pol precursor (6, 16, 21, 29) or at non-cleavage sites in Gag (11). Thus, under selective pressures of PIs, HIV-1 seems to evolve through stepwise accumulation of amino acid substitutions to increase the replicative advantages under the PI environment.

While the assumption is conceivable, no study has thus far addressed a variant(s) that replicates better in the presence of a PI than without the drug. Here, we report a remarkable HIV-1 NFV-resistant case, in which HIV-1 had evolved after prolonged administration of an NFV-containing regimen to display not only a high level of NFV resistance but also enhanced replication under subinhibitory concentrations of NFV. Molecular characterization of the variant suggested that coevolution of Gag and PR genes had provided the predecessor virus in the host the ability to replicate better in the presence of NFV than in the absence of the drug. Our data illustrate a novel mechanism, i.e., NFV-dependent replication enhancement, for HIV-1 adaptive evolution under the selective pressure of NFV.

### MATERIALS AND METHODS

**Clinical specimens and ethical considerations.** A Japanese homosexual man infected with HIV-1 had consulted the AIDS Clinical Center, International Medical Center of Japan, since 1997. Plasma samples and clinical isolates were obtained serially from the patient. The patient had been treated with various

\* Corresponding author. Mailing address: AIDS Clinical Center, International Medical Center of Japan, 1-21-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8655, Japan. Phone and fax: 81-3-5273-5193. E-mail: oka@imcj.hosp.go.jp.

anti-HIV agents, including zidovudine, zalcitabine (ddC), and SQV, before treatment with lamivudine plus stavudine combined with NFV. The Institutional Ethics Committee approved this study (IMCJ-H13-80), and a written informed consent was obtained from the patient.

**Virus isolates.** Clinical HIV-1 isolates CL-1, CL-2, CL-3, and CL-4 were obtained from the serial plasma samples obtained from our patient by using a CCR5-expressing HeLa/CD4<sup>+</sup> cell clone 1-10 (MAGIC-5) (12). Briefly, MAGIC-5 cells grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% fetal calf serum (FCS) in a 48-well plate for 24 h were incubated with 1 ml of fresh plasma. The culture medium was changed every 2 or 3 days until a cytopathic effect was observed. Spread of HIV infection in the culture was confirmed by staining the cells with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (X-Gal) and measuring HIV-1 p24 antigen in the culture supernatant. The virus isolates were kept at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use.

Cells. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) obtained from HIV-1-seronegative healthy donors were stimulated with 1  $\mu\text{g}$  of phytohemagglutinin (PHA)/ml for 72 h and grown in RPMI 1640 with 10% FCS and 10 U of interleukin-2 (Gibco-BRL, Grand Island, N.Y.) per ml for 24 h before infection. Transformed T-cell lines (MT-2 and PM-1 [15]) were maintained in RPMI 1640 with 10% FCS.

**Drug susceptibility assay with MAGIC-5 cells.** NFV was kindly provided by the Japan Tobacco Co. (Tokyo, Japan). The drug susceptibility of the virus isolates to NFV was determined with MAGIC-5 cells (12). Briefly, MAGIC-5 cells ( $10^4$ ) were infected with the diluted virus stock (300 blue cell-forming units [BFU]) in increasing concentrations of NFV (0, 0.001, 0.01, 0.1, and 1  $\mu\text{M}$ ) and incubated for 78 h. The culture supernatant was transferred to a new well containing MAGIC-5 cells without NFV and incubated for 48 h, fixed and stained with X-Gal, and counted under a microscope to assess the magnitude of de novo infection. The 50% inhibitory concentration ( $\text{IC}_{50}$ ) of NFV was calculated based on the dose-response curve. This experiment was performed in triplicate and repeated twice.

**Sequence analyses of gag and pol genes.** Viral RNA was extracted from HIV-1 isolates with a High-Pure viral RNA kit (Boehringer, Mannheim, Germany), followed by RT-PCR with a One-Step RNA PCR kit (TaKaRa Shuzo, Otsu, Japan) to amplify the HIV-1 gag-pol DNA segment (2,341 bp). The first RT-PCR was conducted with a F641-R2982 primer pair (F641, 5'-GCCCGAACAGGGA CTTGAAAGCG, pNL4-3 primer binding site at position 641 to 662; R2982, 5'-GATATCTAATCCCTGGTGTCT, pNL4-3 pol at position 2961 to 2982). The second PCR was performed with a F671-R2961 primer pair (F671, 5'-CC AGAGGAGATCTCTCGACGC, pNL4-3 noncoding positions 671 to 692; R2961, 5'-TCTTGTTTACTAGGTATG, pNL4-3 pol position 2940 to 2961). The PCR products were purified with SUPREC-02 (TaKaRa Shuzo) and subjected to direct sequencing with an ABI Prism 377 automated DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, Calif.). The primers used for the sequencing reaction were F671, F990 (5'-CCTTCAGACAGGATCAGAAAG, pNL4-3 gag position 990 to 110), F1283 (5'-GCCCGAAGTAATACCCATG, pNL4-3 gag position 1283 to 1302), F1741 (5'-ACAGAAACCTTGTGGTCCCA, pNL4-3 gag position 1741 to 1760), F2012 (5'-CTAGGAAAAGGCTGTGG, pNL4-3 gag position 2012 to 2031), and DRPR3 (5'-AGCAGGAGACGATAGACAA GG, pNL4-3 gag position 2228 to 2248). Amino acid sequences were deduced with the Genetyx-Win program version 4.1 (Software Development, Tokyo, Japan).

**Construction of gag-pro recombinant DNA clones.** pUC18 containing the SacI-Sse8387I fragment (2,357 bp) of pNL4-3 (pUC18-NL4-3-SaSa) was constructed first to facilitate molecular cloning of the gag-pro segment. The DNA fragments amplified by PCR from the primary isolates were digested with BssHII and BclI (BssHII-BclI; 1,908 bp), and the fragment covering the entire gag and PR gene was cloned into pUC18-NL4-3-SaSa. A subclone designated p17PRmt-BsBa, with a sequence identical to that of each clinical isolate determined by the direct-sequencing method, was selected as a representative clone of the virus isolate. Subsequently, the EcoT22I-BclI fragment (1,372 bp) and the ApaI-Bal fragment (615 bp) of p17PRmt-BsBa covering the gag p24-PR and PR genes, respectively, were cloned into pUC18-NL4-3-SaSa. These two clones were designated p24PRmt-EcBa and PRmt-ApBa. Lastly, three pUC18-NL4-3-SaSa constructs carrying cloned p17PRmt-BsBa, p24PRmt-EcBa, and PRmt-ApBa were digested with BssHII and Sse8387I. Then, the digests (2,133 bp) were cloned back into pNL4-3 to generate full-length HIV-1 molecular clones of NL4-3PRmt, NL4-3p24PRmt, and NL4-3p17PRmt. The nucleotide sequences of the PCR-amplified fragments and around the recombinant sites of p17PRmt, p24PRmt, and PRmt were verified with an automatic sequencer.

**Preparation of cell-free virus stocks of gag-pro recombinants by transfection.** HeLa cells ( $5 \times 10^5$  cells) were grown in DMEM with 10% FCS in a T25 flask for 24 h and transfected with 3  $\mu\text{g}$  each of pNL4-3, pNL4-3PRmt, pNL4-

3p24PRmt, and pNL4-3p17PRmt plasmid DNA using FuGENE 6 transfection reagent (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). The cells were incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  for 24 h, washed once with DMEM, and cultured in 3 ml of DMEM containing 10% FCS. The culture supernatant containing the chimera virus was collected at 48, 72, and 96 h after transfection, respectively, filtered (0.45- $\mu\text{m}$  pore size), analyzed for RT activity (27), and kept at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use.

**Effects of NFV on HIV replication.** The method used to infect cells has been described previously (23-25). Briefly, PHA-stimulated PBMCs ( $2 \times 10^5$  cells), MT-2 cells ( $2 \times 10^4$  cells), and PM-1 cells ( $2 \times 10^4$  cells) were infected with 0.2 ml of cell-free supernatant containing HIV-1 ( $2 \times 10^5$   $^{32}\text{P}$  cpm of RT activity) in the absence or presence of NFV (0.1 and 1  $\mu\text{M}$ ) at  $37^{\circ}\text{C}$  for 16 h, washed once, and cultured in 0.2 ml of culture medium with the same concentration of NFV. In all infections, half of the culture medium volume was changed every 2 or 3 days, and the supernatant was kept at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use. Each experiment was carried out in duplicate and repeated three times.

**Western blot analysis.** HeLa cells were transfected with 3  $\mu\text{g}$  each of pNL4-3, pNL4-3p17PRmt, or pNL4-3PRmt plasmid DNA in the absence or presence of 0.1  $\mu\text{M}$  NFV. The culture supernatant was harvested at 48 h after transfection and centrifuged at  $37,800 \times g$  for 90 min at  $4^{\circ}\text{C}$  to pellet virus particles. Transfected HeLa cells were washed once with phosphate-buffered saline and prepared for protein analysis as described previously (22). The virion pellet ( $6 \times 10^5$  cpm of RT activity) and cellular protein (25  $\mu\text{g}$  of protein) resolved in Laemmli sample buffer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.) were fractionated with sodium dodecyl sulfate gradient gel (10 to 20%) electrophoresis (Bio-Rad Laboratories) and transferred to a nitrocellulose membrane (Millipore, Bedford, Mass.). The membrane was incubated with serum from an HIV-1-seropositive patient and hybridized with anti-protein A antibody conjugated with horseradish peroxidase (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). The immune complex was visualized with an ECL system (Amersham Pharmacia Biotech) according to the instructions provided by the manufacturer. The level of p24 in the loading sample was measured using Lumipulse Ortho HIV-1/2 (Fuji-Rebio, Tokyo, Japan).

**Nucleotide sequence accession number.** The nucleotide sequence data reported here have been submitted to the DDBJ database under the accession numbers AB083565 through AB083568.

## RESULTS

**Identification of an HIV-1 variant CL-4 exhibiting NFV-dependent enhancement of replication.** We have recently established a rapid and simple assay for assessing the drug susceptibility of HIV-1 using the CCR5-expressing HeLa/CD4<sup>+</sup> cell clone 1-10 (MAGIC-5) (12). In conducting the phenotypic anti-HIV-1 drug resistance assay using this system for a large set of clinical virus isolates, we noticed that some PI-resistant variants appeared to replicate better in the presence of the corresponding PI used in the treatment (data not shown). To better understand the underlying mechanism(s) of this observation, we selected a representative case treated with an NFV-containing regimen for the present study.

The clinical history and phenotypic drug resistance profile of the patient are summarized in Table 1. The nadir of the CD4-positive T-cell count was  $68/\mu\text{l}$ , and the plasma HIV-1 RNA level was  $2.1 \times 10^5$  copies/ml 8 months before commencement of treatment with the NFV-containing regimen. At the time of obtaining clinical isolate 1 (CL-1), the patient was being treated with ddC and SQV. Clinical isolates 2 (CL-2), 3 (CL-3), and 4 (CL-4) were obtained 11, 23, and 32 months after commencement of HAART, respectively. Although CD4 counts were increased to  $>100/\mu\text{l}$ , suppression of the viral load was incomplete during such treatment. Coinciding with a sustained high viral load, CL-3 exhibited high levels of resistance to SQV and NFV (increases in  $\text{IC}_{50}$ s of SQV and NFV were more than 100-fold). After receiving 9 months of the same NFV-containing regimen, a variant CL-4 was isolated from the patient which was found to be extremely resistant to NFV, as

TABLE 1. Clinical data and time of isolation of clinical isolates<sup>a</sup>

Isolate	Regimen	Mos after NFV	CD4/ $\mu$ l	Viral load (copies/ml)	Fold resistance ( $IC_{50}/\mu$ M)	
					NFV	SQV
— <sup>b</sup>	AZT	—8	68	$2.1 \times 10^5$	NT	NT
CL-1	ddC, SQV	—2	84	$8.5 \times 10^4$	NT	NT
CL-2	d4T, 3TC, NFV	11	246	$1.6 \times 10^4$	NT	NT
CL-3	d4T, 3TC, NFV	23	192	$1.9 \times 10^4$	107 (0.22)	156 (0.59)
CL-4	d4T, 3TC, NFV	32	166	$3.6 \times 10^4$	600 (>1)	128 (0.48)

<sup>a</sup> The phenotypic drug resistance assay was performed using MAGIC-5 cells. Fold resistance was calculated by dividing the  $IC_{50}$  of the clinical isolate by the  $IC_{50}$  of NL4-3. AZT, zidovudine; ddC, zalcitabine; SQV, saquinavir; d4T, stavudine; 3TC, lamivudine; NFV, nelfinavir; NT, not tested.

<sup>b</sup> —, no isolate employed.

evidenced by the significantly increased  $IC_{50}$  (from 107- to 600-fold). On the other hand, the  $IC_{50}$  of SQV remained similar during this period (from 156- to 128-fold).

In the drug resistance assay system using MAGIC-5 cells (12), CL-3 displayed a typical dose-response curve to NFV, similar to that usually seen in most PI-resistant clinical isolates (Fig. 1A). In contrast, the dose-response curve of CL-4 to NFV was quite unique. Counts of blue cells derived from HIV-1 infection were consistently high in repeated experiments in the presence of 0.001 to 0.1  $\mu$ M NFV, reaching up to 119% of that without NFV, suggesting that CL-4 replicates better in the presence of subinhibitory concentrations of NFV than in the absence of the drug in CCR5-expressing HeLa/CD4<sup>+</sup> cells.

To assess the effects of NFV on CL-4 replication in a more physiologically relevant system, PHA-stimulated PBMCs were infected with CL-4 and replication kinetics were monitored in the absence or presence of NFV (0.1 and 1.0  $\mu$ M) by measuring RT activity released into the culture supernatant (Fig. 1B). In the absence of NFV, the kinetics of CL-4 replication were similar to those of the drug-sensitive control virus NL4-3, although the level of RT activity of CL-4 at the peak of infection (day 7) was about half that of NL4-3. In the presence of 0.1  $\mu$ M NFV, replication of NL4-3 was completely suppressed, whereas variant CL-4 showed very efficient replication. In three repeated experiments, the replication kinetics of CL-4 was constantly fast, and the level of RT activity at the peak of infection was consistently higher in the presence of 0.1  $\mu$ M NFV than without the drug (Fig. 1B, CL-4), suggesting that the subinhibitory concentration of NFV could potentiate replication of variant CL-4 in PBMCs, as well as in CCR5-expressing HeLa/CD4<sup>+</sup> cells. Such enhancement of replication was not seen with other PIs, such as SQV and amprenavir, under the same experimental conditions. It was also not seen with variant CL-3, the predecessor virus isolate of CL-4 (data not shown), suggesting that the phenomenon is specific to CL-4 and NFV.

**Genetic changes of *gag-pro* genes during HAART.** The above clinical data and phenotypic profiles of the clinical isolates suggested that PI-resistant HIV-1 variants emerged first, from which the CL-4 variant with the NFV-dependent replication enhancement phenotype had evolved. To assess the genetic changes in HIV-1 during antiretroviral therapy in our patient, we determined the nucleotide sequences of the *gag-pro* genes of CL-1, CL-2, CL-3, and CL-4 by direct sequencing of amplified DNA.

Comparison of the PR sequences showed a stepwise accumulation of amino acid substitutions during 32 months of

treatment with an NFV-containing regimen (Table 2). With regard to PI resistance-associated mutations in the PR region, the CL-1 variant, which was isolated 2 months before the use of the NFV-containing regimen, already possessed a single mutation (Leu10→Ile), which might have developed during the preceding SQV-containing regimen. After 11 months of treatment with NFV, the patient harbored variant CL-2, which possessed four amino acid substitutions: L10I (Leu10→Ile), G48V, I54V, and V82A. CL-3 and CL-4 gained another substitution, M36I.

Interestingly, other substitutions (E35D, N37S, K43T, I62V, I72V, and T74S), whose contributions to PI resistance have not been described previously, also accumulated gradually in a manner dependent on the duration of NFV therapy. In particular, while CL-4 showed no further substitutions compared with CL-3 at the known drug resistance-associated mutation sites, three novel substitutions (E35D, N37S, and K43T) had accumulated in the N terminal of the PR.

Similarly, comparison of Gag sequences revealed several stepwise changes that occurred most remarkably in the Gag p17 peptide (Table 3). A total of nine amino acid substitutions (N47D, K55Q, M61R, G62R, F66S, V82I, S109N, Q117E, and N129D) accumulated gradually and sporadically through the p17 region of variant CL-4 during 32 months of NFV-containing antiretroviral therapy. In contrast, other regions of Gag were highly conserved during this period. This conservation was also noticed around the cleavage site of the Gag p55 precursor, and only a single substitution was found in CL-4 (Table 4).

**Roles of genetic changes in conferring the biological phenotype of CL-4.** To assess the roles of the mutations described above in shaping the biological phenotype of CL-4, several recombinant molecular clones were constructed based on the pNL4-3 genetic background (Fig. 2). NL4-3PRmt, NL4-3p24PRmt, and NL4-3p17PRmt carried the cloned p1-p6-PR, p24-p2-p7-p1-p6-PR, and p17-p24-p2-p7-p1-p6-PR segments, respectively, from CL-4 or CL-3 virus isolates in the backbone of pNL4-3. They were used to assess the role of sporadic mutations in the corresponding regions of clinical isolates with respect to the genetic backbone of a drug-sensitive HIV-1.

PHA-stimulated PBMCs, MT-2, and PM-1 cells were infected with an amount of virus corresponding to  $2 \times 10^5$  cpm of RT activity (26), and virus replication was monitored in the absence or presence of 0.1 and 1  $\mu$ M NFV (Fig. 3). In the absence of NFV, all recombinant viruses tested retained replication competence in all tissue culture infection systems