

200500703B

厚生労働科学研究研究費補助金

エイズ対策研究事業

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

平成15～17年度 総合研究報告書

主任研究者 山本 直彦

平成18(2006)年

## 目次

I. 総合研究報告書	
非サブタイプ B 型 HIV における薬剤耐性ジェノタイプ解析アルゴリズムに 関する研究    山本直彦	1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	10
III. 研究成果の刊行物・別冊	14

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

総合研究報告書

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

主任研究者 山本 直彦 名古屋大学大学院医学研究科助教授

研究要旨

これまでの3年間にわたる、ケニアのナイロビ孤児院での抗エイズ療法を受けている HIV 感染小児およびスラム地区における未治療 HIV 感染者、インド、パキスタンや日本国内における非サブタイプB型HIV-1の解析から、現在臨床的に利用されているサブタイプBに基づく薬剤耐性データと耐性部位が同じであっても、アミノ酸変異が異なっていたものとして、M41I, D67G, K74I, V75M, K103S, V106I/M, Y115G, V118C, Y181D, C181Y, L210S/L, K219D が逆転写酵素領域に、V82I, K20T がプロテアーゼ領域に見られた。また、これまでのサブタイプBに基づく薬剤耐性データには報告されていない新たな薬剤耐性変異の可能性のあるものとして、サブタイプAにおいてQ11N, K20R, L101E, E138Qが、サブタイプCにおいてH208Y, D218Eが、サブタイプDにおいてI135T, T139K, I178Mが、サブタイプAEにおいてL23I, M89Iが、サブタイプGにおいてI135L/Mがみられた。

また、ケニアのスラム街の未治療感染者における薬剤耐性変異の見られる陽性率は、サブタイプB型のgenotypeを基にした解析では、2002年：0%（63例中0例）、2003年：3%（65例中2例）、2004年：8%（74例中6例）と増加しているが、non-B型HIVに特徴的と思われる薬剤耐性変異も含めた解析では、2002年：3%（63例中2例）、2003年：14%（65例中9例）、2004年：19%（74例中14例）と陽性率の増加が見られている。これまでの解析から非サブタイプB型では、B型とは異なる耐性関連アミノ酸変異の出現パターンをとる場合があることが示唆され、サブタイプB型として報告されている耐性変異のデータのみでは、耐性変異が見逃される可能性があり、非サブタイプB型に特徴的な耐性変異のデータの蓄積が必要である事が半明した。

分担研究者

市村 宏（金沢大学大学院医学系研究科 教授）

大竹 徹（大阪府立公衆衛生研究所 ウイルス課  
課長）

金田 次弘（名古屋医療センター 臨床研究センター  
部長）

森下 高行（愛知県食品衛生検査所 微生物課  
主任研究員）

磯村 思无（名古屋女子大学家政学部 教授）

A. 研究目的

近年、HAART療法が導入されて以来、薬剤耐性HIVに対する対策が大きな課題となっている。アジアやアフリカの開発途上国においては十分な服用指導が行なわれないまま、抗AIDS薬を安価に提供したり、また、ある地域では中身が不確かな製剤が広まっており、その事がいっそう薬剤耐性HIVの出現を助長しているのが現状である。一方で、現在広く利用されている薬剤耐性に関するデータはサブタイプB

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

## B. 研究方法

アフリカ・ケニアにおいてはナイロビ市にあるエイズ孤児院 (Nyumbani) において抗エイズ療法を受けている HIV 感染小児から、ナイロビ郊外のスラム地区においては Punwani village の Alifaman 氏、Columbia 大学の稲田頼太郎博士、インドにおいては Sanjay Gandhi Postgraduate Institute Medical Sciences の Dhole 博士、パキスタンにおいてはカラチ AWAN Hospital の Rafiq 博士の協力を得て、また、国内においては非サブタイプ B として流行しているサブタイプ AE を中心に、患者血清を採取し、逆転写酵素およびプロテアーゼ領域の変異部位を解析した。その結果と、関連する臨床的データおよびサブタイプ B を基にした薬剤耐性のデータと比較検討し、新たに得られた逆転写酵素あるいはプロテアーゼ領域の変異部位における genotype を検討した。

(倫理面への配慮)

調査研究実施国の実情にあわせ、その国の方針を尊重しつつ、原則としてわが国の基準すなわち「ヒ

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

## C. 研究結果

3 年間の研究期間において、ケニアのナイロビ孤児院で抗エイズ療法を受けている HIV 感染小児およびスラム地区における未治療 HIV 感染者、インド、パキスタンおよび日本国内における非サブタイプ B 型 HIV-1 の解析を行った。

ケニアの Nyumbani 孤児院 (ナイロビ市) において抗エイズ療法を受けている HIV 感染小児 12 例のサブタイプは、A1 (8 例)、C (1 例)、D (2 例) と CRF02\_AG (1 例) であった。NRTI 耐性関連アミノ酸変異で最もよく見られたものは、M184V であり、7 例の児にみられ、ほとんどがチミジン類似体に関連した変異 (TAM) を伴っていた。5 例では、TAM だけが誘導され、その中の 3 例は異なる系列の TAM (M41L, L210W, T215Y と D67N, K70R, K219Q) の共存が認められた。3 例の児では、NNRTI 耐性関連アミノ酸変異で最もよく見られる K103N が治療前から存在しており、治療後も持続して存在した。1 人の児では、Y181C が治療前に認められたが、治療開始後に消失した。T215F/Y、M41L、D67N、K70R、と K103N の変異を持つウイルス株がマイナー集団として出現し、その後、メジャー

集団になるのが観察された。(表1)

ケニアのナイロビにあるスラム地区に住む未治療感染者における薬剤耐性変異の見られる陽性率は、サブタイプ B 型の genotype を基にした解析では、2002年：0% (63 例中 0 例)、2003年：3% (65 例中 2 例)、2004年：8% (74 例中 6 例) と増加しているが、non-B型 HIV に特徴的と思われる薬剤耐性変異も含めた解析では、2002年：3% (63 例中 2 例)、2003年：14% (65 例中 9 例)、2004年：19% (74 例中 14 例) と陽性率の増加が見られていたが、2005年に採血した検体では、薬剤耐性関連遺伝子は 48 例中 3 例見られたのみであった。(表2)

インドのサンジャイ・ガンジー医科学研究所における治療中のサブタイプ C 型 HIV 感染者 27 検体を解析した結果、11 検体 (41%) に薬剤耐性関連遺伝子が見られ、うち 1 例は PR 領域に V82I (サブタイプ B では V82A/F/L/T/S) が見られた。RT 領域にみられた薬剤耐性遺伝子のうち、従来のサブタイプ B 型には報告されていない V118C, L210S (サブタイプ B 型ではそれぞれ V118I, L210W) が 1 例にみられた。また、治療に対し抵抗性を示した 2 症例について解析したところ、サブタイプ B にはみられない T69N, L74I, V106M が逆転写酵素領域にみられた。さらに興味深いことに、逆転写酵素領域 D67N と H208Y の変異が、治療に反応した症例にはみられず、治療に抵抗した 2 例のみに共通してみられた。

パキスタンの AWAN Hospital において収集された未治療 HIV 感染者 58 例中、6 例 (10%) に薬剤耐性関連遺伝子が見られ、うち 4 例は PR 領域に見られ、従来のサブタイプ B 型には報告されていない V82I であった (サブタイプ B 型では V82A/F/L/T/S)。

国内において、治療に抵抗を示したサブタイプ AE の症例について解析したところ、逆転写酵素領域において、サブタイプ B には報告されていない変異として

V106I (サブタイプ B では V106A) と I135T が見られた。

また、プロテアーゼ領域において、K20T (サブタイプ B では K20M/R/I), V82I (サブタイプ B では V82A/F/L/T/S)、さらにサブタイプ B には報告されていない新しい変異として L23I と M89I が見られた。

#### D. 考察

ケニアの Nyumbani 孤児院で抗エイズ療法を受けている HIV 感染小児における解析から、非サブタイプ B 型 HIV-1 では、B 型 HIV-1 とは異なる RTI 耐性関連アミノ酸変異の出現パターンをとる場合があること、母子感染したと考えられる RTI 耐性関連変異 (K103N と Y181C) を持ったウイルス株が RTI 未使用下でも長期間存在すること、そして RTI による治療の予後を知るうえで、血中ウイルスのマイナー集団の検討が必要であることが示唆された。

スラム地区における未治療 HIV 感染者における今年度の解析では、薬剤耐性変異の陽性率が過去 3 年間に比べて減少したが、近年の政府による積極的な予防キャンペーンや NGO による VCT (Voluntary Counseling and Testing) プロジェクトの活動が効を奏した可能性もあるが、今後慎重に経緯を見ていく必要がある。

インドにおいては治療中の HIV 感染者の 41% と高率に薬剤耐性関連遺伝子が見られており、服薬指導を含めたアドヘレンスの悪さが推察される。なお、逆転写酵素領域にみられた V106M は、Brennerらによって、NNRTI に対して交叉耐性を示すという報告がみられており (AIDS, 17(1):F1-5, 2003 Jan 3)、今回みられた他の変異についても、それぞれのサブタイプに特徴的な耐性関連変異である可能性がある。一方、パキスタンの未治療 HIV 感染者においては、薬剤耐性関連遺伝子の陽性率は約 10%

で、当研究グループのケニアのスラム地区の陽性率（約20%）と比較して低率であった。

国内において、今年度、抗AIDS薬治療中のサブタイプAEの症例において、サブタイプBには報告されていない新しい薬剤耐性変異がいくつか見られたが、このうち、M89Iについては、phenotypeの解析によってサブタイプC、F、GにおいてNFV耐性に関与しているということが報告がAIDS 19:1799-1806, 2005に見られた。

なお、シークエンスの自動解析では薬剤耐性変異がないとされる場合でも、そのシークエンスのパターンによっては耐性変異がマイナー集団として存在していることがクローニング検査によって明らかになった（表3）。

このように、サブタイプによって異なるアミノ酸変異が生じる機序として、野生株において、アミノ酸のnucleotideの構成がサブタイプにより異なっている場合、1つのnucleotideが置換することによって、異なるアミノ酸に置き換わるためと考えられる（表4）。

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

#### E. 結論

これまでの3年間の研究において、ケニア、イン

ド、パキスタンおよび日本国内における非サブタイプB型HIV-1の解析を行った結果、現在臨床的に利用されているサブタイプBに基づく薬剤耐性データと耐性部位が同じであっても、アミノ酸変異が異なっていたものとして、M41L, D67G, K74L, V75M, K103S, V106I/M, Y115G, V118C, Y181D, C181Y, L210S/L, K219Dが逆転写酵素領域に、V82I, K20Tがプロテアーゼ領域に見られた。また、これまでのサブタイプBに基づく薬剤耐性データには報告されていない新たな薬剤耐性変異の可能性のあるものとして、サブタイプAにおいてQ11N, K20R, L101E, E138Qが、サブタイプCにおいてH208Y, D218Eが、サブタイプDにおいてI135T, T139K, I178Mが、サブタイプAEにおいてL23I, M89Iが、サブタイプGにおいてI135L/Mがみられた（表5）。以上、サブタイプB型として報告されている耐性変異のデータのみでは、サブタイプによっては見逃される可能性があり、非サブタイプB型に特徴的な耐性変異のデータの蓄積が必要であることが明らかとなった。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

研究成果に関する一覧表参照

#### H. 知的所有権の出願・登録状況

特になし。

表 1 general characteristics of non-B HIV-1 infected study children

Sample ID (subtype)	Age (years)	Sex	Study point Month, year	ARV (Therapy-start)	CD4 (Cells/ml)	Plasma VL (copies/ml)	NRTI resistance mutations	NNRTI resistance Mutations
030 (A1)	11	Female	Jul 02	AZT, ddl, EFV	456	<400	D67N+K70R+K219Q	L100I
044 (A1)	9	Male	Mar 03 Jan 04 Feb 02	AZT, ddl, EFV Jun 01	475 267 208	24,857 89,063 1,017,931	D67N+K70R+K219Q	K103N K103N+G190A K103N+G190A
062 (A1)	8	Male	Dec 01 Sep 02 Mar 03 May 04 Mar 03 May 04	AZT, ddl, NVP Mar 02	589 828 568 192 400	239,644 2,838 6,901 227,176 113,868	D67N+K70R D67N+K70R+T215F+K219E D67N+K70R+T215F+K219E	G190A G190A Y181C+G190A K103N K103N
069 (A1)	6	Male	Mar 03 May 04	AZT, 3TC, NVP Jul 03	718 169	700,563 1,323,431	M184V	K103N
070 (D)	7	Male	Sep 02 Jun 03 Dec 03	AZT, 3TC, NVP Jul 03	502	188,059	K70R+M184V	K103N K103N
083 (A1)	5	Male	May 01 Jul 02 Apr 03 Aug 04	AZT, 3TC, NVP Jun 01	876 946 1138 1125	634,644 50,570 74,437	M184V+T215Y	K103N K103N K103N
085 (CRF02_AG)	5	Female	Feb 03 Dec 03 Apr 04 Apr 03	AZT, 3TC, NVP Apr 03	178 1214 1148 6	30,690 3,264 79,080 523,950	D67N+M184V D67N+M184V	K103N K103N K103N Y181C
090 (D)	2	Female	Jan 04 Mar 04	AZT, 3TC, NVP Apr 03	399 379	55,679 155,191	M184V	K103N
033 (A1)	11	Female	Jul 02 Mar 03 Feb 04	AZT, ddl, EFV Apr 01	549 556 690	3,449 122,419 6,457	K219Q D218E+K219Q	K101Q K101Q
036 (D)	11	Male	Oct 01 May 02 Aug 02 Apr 03 Feb 04	ddl,q4T,EFV Apr 01	309 321 279 458	114,754 880,405 81,870 607,224 393,420	M184V+T215F M184V+T215F M184V+T215F T215F T215F	I178M G190A G190A G190A
079 (A1)	6	Male	Feb 03 Feb 04 Jun 04 Mar 03 Dec 03 Feb 04 Aug 04	ddl,3TC,EFV Apr 03	70 551 347 388 188 157 149	159,826 244,506 472,203 38,459 60,695 38,211	V75M+M184V V75M+ M184V D67N D67N+K70R+L210W+K219E D67N+K70R+L210W+K219E D67N+K70R+L210W+D218E+K219E	K101E+G190A K101E+G190A+Y181C
038 (C)	10	Male	Mar 03 Dec 03 Feb 04 Aug 04	ddl,3TC,EFV Sep 02	388 188 157 149	38,459 60,695 38,211		

表 2

## ケニアの未治療感染者の薬剤耐性関連遺伝子出現頻度

	Sample	性別	サブタイプ	RT 変異	PR 変異	耐性頻度
2002 (63 cases)	KN 52	F	A	Y115G (F) T69P/L (D)	V82I (A)	2/63(3%)
	KN 63	F	D			
2003 (65 cases)	KN110	F	D	Q151C (M) T69S (D)	V82I (A)	
	KN112	F	A		V82I (A)	
	KN118	F	A		V82I (A)	
	KN122	F	A		V82I (A)	
	KN133	F	A			
	KN134	F	A	E44D T69S (D)		
	KN148	F	A		V82I (A)	
	KN149	F	A			
	KN171	F	A	K103N		9/65(14%)
2004 (74 cases)	KN203	F	B		M46I	
	KN218	M	A	V118I K103N		
	KN224	F	B		V82I (A)	
	KN247	F	C			
	KN248	F	A	V118I T69S (D)		
	KN345	F	A			
	KN305	F	B		L90M V82I (A)	
	KN308	M	A			
	KN310	F	A	Y181I		
	KN316	M	A2		V82I (A) V82I (A)	
	KN317	F	A			
	KN323	M	D	V106I (A)		
	KN324	M	A		G48E(V)	
	KN343	F	D	L210M(W)		14/74(19%)
2005 (48 cases)	KN401	M	A	G190A		
	KN437	M	C	V118I		
	KN444	F	C		V82I (A)	3/48(6.3%)

( ) はサブタイプ B におけるアミノ酸変異



表3 薬剤耐性部位 (RT領域) において塩基の重複した部位におけるCloning





検体番号	シークエンスパターン	塩基	アミノ酸	コロニー数	耐性
KN343	 <p>CCCCCTTCCTGGTGGTGGCTCT 210</p>	CAT	→ M	4/5	→ wild
		CAA	→ L	1/5	→ resistance
KN431	 <p>CAGATAGCACTGGTGGGAG 70</p>	AGA	→ R	0/11	→ resistance
		AAA	→ K	7/11	→ wild
		AAG	→ K	4/11	→ wild
KN428	 <p>CGTTGGTGGTGGGGCT 236</p>	AGG	→ P	15/15	→ wild
		AAG	→ L	0/15	→ resistance
KN45	 <p>GGTGGTGGCTGGT 69</p>	ACT	→ T	8/8	→ wild
		GCT	→ A	0/8	→ resistance

表4

Nucleotide substitution and mutation on different subtypes

Mutation	Subtype	Wild	Mutant
V106A	B	GTA(V) ⇨	GCA(A)
V106M	C	GTG(V) ⇨	ATG(M)
V106I	AE	GTT(V) ⇨	ATT(I)
L74V	B	TTG(L) ⇨	GTG(V)
L74I	C	TTA(L) ⇨	ATA(I)
T69D	B	ACC(T) ⇨	GAC(D)
T69N	C	ACT(T) ⇨	AAT(N)

**表5 Summary of genotypic mutations of non-B subtype HIV-1-infected patients failing antiretroviral therapy**

	Same site as Subtype B		New site	
	Mutation	Subtype	Mutation	Subtype
RT	M41I(L)	A	Q11N	A
	D67G(N)	A	K20R	A
	Y69N/S/P/L(D)	A,C,D	L101E/Q	A
	K74I(V)	C	I135T	D, AE
	V75M(I)	A	I135L/M	G
	K103S(N)	C	E138Q	A
	V106I/M*(A)	AE,C	T139K	D
	Y115G(F)	A	I178M	D
	V118C(I)	C	H208Y	C
	Y181D(C/I)	A	D218E	C
	C181Y	D		
	L210S/L(W)	C		
	K219D(E)	C		
	V82I(A/F/T/S)	C,D	L23I	AE
	K20T(M/R/I)	AE	*M89I	AE
	PIs			

研究成果の刊行に関する一覧表(平成15年度)

1. Shirou Ibe, Naomi Shibata, Makoto Utsumi and Tsuguhiro Kaneda:  
Selection of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Variants with an Insertion Mutation in the P6<sup>gag</sup> and P6<sup>pol</sup> Genes under Highly Active Antiretroviral Therapy.  
*Microbiol. Immunol.*, 47, 71-79 (2003).
2. Yoshiko Usami, Tsuyoshi Oki, Masahiko Nakai, Masafumi Sagisaka and Tsuguhiro Kaneda.  
A Simple HPLC Method for Simultaneous Determination of Lopinavir, Ritonavir and Efavirenz.  
*Chem. Pharm. Bull.* 51, 715-718 (2003).
3. Shirou Ibe, Naoe Hotta, Uta Takeo, Yukio Tawada, Naoto Mamiya, Katsuo Yamanaka, Makoto Utsumi and Tsuguhiro Kaneda  
Prevalence of Drug-resistant Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Therapy-naive Patient and Usefulness of Genotype Testing.  
*Microbiol. Immunol.* 47,499-505 (2003).
4. Junko Hattori, Shiro Ibe, Hiromi Nagai, Kaoru Wada, Takayuki Morishita, Katsuhiko Sato, Makoto Utsumi and Tsuguhiro Kaneda  
Prevalence of infection and genotypes of GBV-C/HGV among homosexual men.  
*Microbiol. Immunol.*,47, 759-763 (2003)
5. Tewtrakul S, Miyashiro H, Nakamura N, Hattori M, Kawahata T, Otake T, Yoshinaga T, Fujiwara T, Supavita T, Yuenyongsawad S, Rattanasuwon P, Dej-Adisai S,  
HIV-1 integrase inhibitory substances from *Coleus parvifolius*,  
*Phytotherapy Research*, 17, 232-239, 2003
6. Hidehito Urata, Tetsuya Kumashiro, Takuya Kawahata, Toru Otake, and Masao Akagi  
Anti-HIV-1 activity and mode of action of mirror image oligodeoxynucleotide analogue of zintevir  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313, 55-61 (2004)

研究成果の刊行に関する一覧表(平成16年度)

1. Kayoko Kita, Nicaise Ndembi, Michel Ekawalanga, Eiji Ido, Rigobert Kazadi, Blaise Bikandou, Jun Takehisa, Taichiro Takemura, Seiji Kageyama, Junji Tanaka, Henri Joseph Parra, Masanori Hyamai, and Hiroshi Ichimura: Genetic Diversity of HIV Type 1 in Likasi, Southeast of the Democratic Republic of Congo. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2004 20(12):1352-7.
2. Nicaise Ndembi, Jun Takehisa, Leopold Zekeng, Eiji Kobayashi, Charlotte Ngansop, Elijah M. Songok, Seiji Kageyama, Taichiro Takemura, Eiji Ido, Masanori Hayami, Lazare Kaptue and Hiroshi Ichimura.: Genetic Diversity of HIV Type 1 in Rural Eastern Cameroon. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2004;37(5):1641-1650.
3. Elijah M. Songok, Raphael M. Lwembe, Rukia Kibaya, Kana Kobayashi, Nicaise Ndembi, Kayoko Kita, John Vulule, Isao Oishi, Fredrick Okoth, Seiji Kageyama and Hiroshi Ichimura.: Active generation and selection for HIV intersubtype A/D recombinant forms in a co-infected patient in Kenya. *AIDS Res Hum Retroviruses* 20(2):255-8, 2004.
4. T. Oki, Y. Usami, M. Nakai, M. Sagisaka, H. Ito, K. Nagaoka, K. Yamanaka, N. Mamiya, M. Utsumi and T. Kaneda. Pharmacokinetics of Lopinavir after Administration of Kaletra in Healthy Japanese Volunteers. *Biol. Pharm. Bull.* 27, 261-265 (2004)
5. K. Wada, H. Nagai, T. Hagiwara, S. Ibe, M. Utsumi and T. Kaneda. Delayed HIV-1 Infection of CD4<sup>+</sup> T Lymphocytes from Therapy-naïve Patients Demonstrated by Quantification of HIV-1 DNA Copy Numbers. *Microbiology & Immunology* 48, 767-772 (2004).
6. H. Nagai, K. Wada, T. Morishita, M. Utsumi, Y. Nishiyama and T. Kaneda. New estimation method for highly sensitive quantitation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 DNA and its application. *J. Virol. Methods*, 124, 157-165 (2005).
7. H. Urata, T. Kumashiro, T. Kawahata, T. Otake, M. Akagi. Anti-HIV-1 activity and mode of action of mirror image oligodeoxynucleotide analogue of zintevir. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 313,55-61,2004

研究成果の刊行に関する一覧表(平成17年度)

1. Khamadi SA, Ichimura H, et al.: HIV-1 subtypes in circulation in Northern Kenya. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* (2005), 21(9):810-4.
2. Agdamag DM, Ichimura H, et al.: Rapidly spreading HCV infections from limited sources simulating an AIDS outbreak in the Philippines. *J Med Virol* (2005), 77:221-226.
3. Kurbanov F, Ichimura H, et al.: A New Subtype (Subgenotype) Ac (A3) of Hepatitis B Virus and Recombination between Genotypes A and E in Cameroon. *J Gen Virol* (2005), 86:2047-2056.
4. Takemura T, Ichimura H, et al.: A novel SIV from black mangabey (*Lophocebus aterrimus*) in Democratic Republic of Congo. *J Gen Virol* (2005), 86:1967-1971.
5. Otake T, Kawahata T, Mori H, Kojima Y, Hayakawa K, Novel method of inactivation of human immunodeficiency virus type 1 by the freeze pressure generation method, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67, 746-751, 2005
6. 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).
7. Conventional HPLC Method Used for Simultaneous Determination of the Seven HIV Protease Inhibitors and Nonnucleoside 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).
8. 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* 3<sup>rd</sup> edition (edited by I. A. Darby), Humana Press, NJ, pp139-149 (2005).
9. 山本 直彦 アジアのエイズ：インドーエイズ流行におけるレオリエント  
日本エイズ学会誌 第8巻 第1号 p 7-11、 (2006年)
10. 大竹 徹, ウイルスの高圧不活化と血液製剤への利用,  
*Foods Food Ingredients J Jpn*, 210, 44-48, 2005
11. HPLCによるプロテアーゼ阻害剤アタザナビルの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).

12. 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).

## Editor-Communicated Paper

# Selection of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Variants with an Insertion Mutation in the p6<sup>gag</sup> and p6<sup>pol</sup> Genes under Highly Active Antiretroviral Therapy

Shiro Ibe, Naomi Shibata, Makoto Utsumi, and Tsuguhiro Kaneda\*

*Clinical Research Center, Nagoya National Hospital (Tokai Area Central Hospital for AIDS Treatment and Research), Nagoya, Aichi 460-0001, Japan*

Communicated by Yukihiro Nishiyama: Received October 31, 2002. Accepted November 9, 2002

**Abstract:** We detected several types of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) variants with an insertion mutation in the p6<sup>gag</sup> and p6<sup>pol</sup> genes in eight of twenty-two (36.4%) patients who possessed drug-resistant viruses under highly active antiretroviral therapy (HAART). It was characteristic that a conserved proline-rich motif "PTAPP" in the N-terminus of p6<sup>gag</sup> protein was completely or partially duplicated in all cases. Five among the eight cases were retrospectively investigated in terms of the occurrence of dynamic change in the gag gene between the inserted and wild-type HIV-1 in the course of HAART. The longitudinal analysis revealed the following: 1) The inserted-type viruses were selected over the wild-type during HAART in three cases in which the both types coexisted in the beginning of the therapy. 2) In two cases in which the inserted-type HIV-1 alone was detected before the beginning of HAART, the inserted-type HIV-1 alone was continuously detected during the therapy. The inserted-type HIV-1 was also detected in four of thirty-nine (10.3%) therapy-naive patients. However, the frequency of inserted-type HIV-1 detection in the HAART-receiving patients is significantly higher than that in the therapy-naive patients ( $P=0.02$ ). These results suggest that this type of insertion mutation is a polymorphism of the p6<sup>gag</sup> and p6<sup>pol</sup> genes, however, it consequently gave an advantage on proliferation and/or survival of the HIV-1 variant under the presence of antiretroviral drugs.

**Key words:** HIV-1, HAART, Insertion mutation, p6<sup>gag</sup>

Highly active antiretroviral therapy (HAART) for human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected individuals has made it possible to suppress the plasma viral load below the detectable level in many cases (19). However, HAART is still invalid in a minor population; the viremia and CD4 cell counts are not improved from a first trial in some cases, and in other cases, the viral load elevates again after HAART once suppressed it (4). In such cases, the emergence of variants with low susceptibilities to anti-HIV-1 drugs is considered (13, 14). As a number of mutations in the protease (PR) and reverse transcriptase (RT) genes of HIV-1 have been reported to give the drug resistance to the variants (10), we routinely assess these drug-resistance-associated

mutations before the start and change of regimens of HAART (12).

Recently, it was reported that amino acid substitutions, A431V and L449F, in the nucleocapsid (NC)/p1 and p1/p6<sup>gag</sup> cleavage sites of gag polyprotein precursor are induced by some PR inhibitors including indinavir and lopinavir (3, 5, 7, 23). This type of mutation in substrate regions for the PR as well as some amino acid

---

*Abbreviations:* ABC, abacavir; APV, amprenavir; AZT, zidovudine; bp, base pairs; DDBJ, DNA databank of Japan; ddi, didanosine; d4T, stavudine; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; EFV, efavirenz; HAART, highly active antiretroviral therapy; HIV-1, human immunodeficiency virus type 1; IDV, indinavir; NC, nucleocapsid; NFV, nelfinavir; NP, a therapy-naive patient; NVP, nevirapine; PR, protease; PTH, a patient treated with HAART; RT, reverse transcriptase; RT-PCR, reverse transcription and polymerase chain reaction; 3TC, lamivudine; TFP, transframe protein.

---

\*Address correspondence to Dr. Tsuguhiro Kaneda, Clinical Research Center, Nagoya National Hospital, 4-1-1 Sannomaru, Naka-ku, Nagoya, Aichi 460-0001, Japan. Fax: +81-52-955-1878. E-mail: kanedat@nagoya.hosp.go.jp



mutations in PR is involved in the development of resistance to the PR inhibitors since the mutations made the substrates easily hydrolyzed by drug-resistance-mutated PR (7). To examine the existence of the gag cleavage site mutations in addition to a routine genotypic analysis, we newly designed primer sets for the amplification of a region containing the gag, PR and RT genes. After the start of genotypic analysis using the primer sets, we frequently detected several types of insertion mutations in the p6<sup>gag</sup> and p6<sup>pol</sup> genes of drug-resistant HIV-1 derived from HAART-receiving patients. The existence of similar insertion mutations was recently reported by Peters et al. (18), while it is still unclear how the acquisition of this type of insertion mutation contributed the survival of the HIV-1 variant in the course of HAART. In the present study, we longitudinally investigated in terms of the occurrence of dynamic change in the gag gene between the inserted and wild-type HIV-1 during HAART.

## Materials and Methods

**Primers.** We designed two primer sets for an amplification of regions (1,539 bp) containing codon 425–500 of gag polyprotein and codon 425–936 of gag-pol polyprotein. The last codon of the amplified regions is codon 349 of the RT gene. Sense and antisense primers for reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) were K1 (5'-AAGGGCTGTTGGAAATGTGG-3') and U13 (5'-CCCACTCAGGAATCCAGGT-3'), respectively. Sense and antisense primers for nested PCR were K4 (5'-GAAAGGAAGGACACCAAATGA-3') and U12 (5'-CTCATTCTTGCATATTTTCCTGTT-3'), respectively (Fig. 1). Four other primers were used for sequencing reactions. KHC, 5'-CCTGTCAA-CATAATTGGAAG-3'; X9, 5'-CAATATCCAAAGTAGCATGAC-3'; N6, 5'-ATTTCCCACTAACTTCTGTAT-3'; DRPR04, 5'-CTGGCTTTAATTTTACTGGTA-3'. Primers for the determination of HIV-1 subtypes were MK650 (5'-AATGTCAGCACAGTACAATGTACAC-3'), MK616 (5'-AATGGTGAATATCCCT-

GCCTAACTCTATT-3'), 461M (5'-TGGCAGTC-TAGCAGAAGAAG-3'), and YT001 (5'-ACAATTTCTGGGTCCCCTCCTGAGGA-3') (16). Sense and antisense primers for RT-PCR were MK650 and MK616, respectively, and those for nested PCR were 461M and YT001, respectively.

**Measurements of plasma viral load and CD4 cell counts.** Viral load was measured using an ampricore HIV-1 monitor v1.5 system (Roche, Tokyo). CD4 cell counts were measured by flow cytometry (FACSCalibur, Becton Dickinson) using anti-CD4 antibody (DAKO, Kyoto, Japan).

**Informed consent.** All of the genotypic analyses of HIV-1 were performed with patients' informed consents in this study.

**Patients.** We performed the genotypic analysis on thirty-nine antiretroviral therapy-naive patients (NPs) and twenty-two HAART-receiving patients in whom the emergence of drug-resistant variants was clinically suspected. Table 1 shows the profiles of the patients treated with HAART (PTHs) and drug-resistance-associated amino acid mutations detected in the viruses.

**Stocked plasma samples.** Plasma samples stored at -80 C were used for the retrospective analysis of HIV-1.

**Genotypic analysis.** HIV-1 RNA was purified from plasma of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)-added peripheral blood using a QIAamp viral RNA mini kit (QIAGEN, Tokyo). The target region was amplified by RT-PCR with the superscript one-step RT-PCR for long templates kit (Invitrogen, Tokyo) and successive nested PCR with LA Taq polymerase (TaKaRa, Osaka, Japan). The products of RT-nested PCR were separated in 1.0% agarose gel, and purified with SUPREC-01 (TaKaRa). The DNA sequences of the PCR products were determined by a direct sequencing method using the BigDye terminator cycle sequencing kit and ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, Tokyo). Both DNA and amino acid sequences were compared with the consensus sequence of HIV-1 subtype B (database of Los Alamos

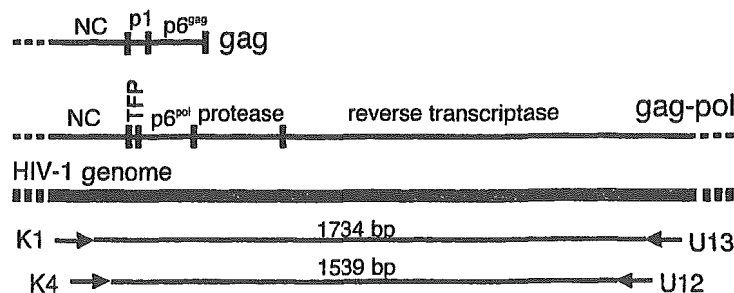


Fig. 1. Schematic drawing of HIV-1 DNA amplified by RT-nested PCR using four primers, K1, U13, K4, and U12. Amplified region containing both codon 425–500 of the gag polyprotein (NC, p1, and p6<sup>gag</sup>) and codon 425–936 of the gag-pol polyprotein (NC, TFP, p6<sup>pol</sup>, PR, and RT). NC, nucleocapsid; TFP, transframe protein; PR, protease; RT, reverse transcriptase.

Table 1. Profiles of patients treated with HAART and drug-resistance-associated amino acid mutations found in the viruses

Patient No.	Current treatments		HIV-1 subtypes	Viral load (copies/ml)	CD4 cells (cells/ $\mu$ l)	Amino acid mutations associated with drug resistance <sup>b)</sup>		
	Drugs <sup>a)</sup>	Terms (Mo)				Gag CSs	Protease	Reverse transcriptase
PTH#1	AZT, 3TC, NFV	27	B	$1.9 \times 10^3$	366	—	<u>D30N</u> , A71V, V77I, N88D	D67N, <u>V118L</u> , <u>M184V</u>
PTH#2	d4T, EFV, APV	15	B	$2.5 \times 10^4$	223	A431V	L10I, V82F	L100I, <u>K103N</u> , T215F
PTH#3	d4T, 3TC, NFV	37	B	$8.0 \times 10^3$	138	—	M36I	<u>M184V</u>
PTH#4	d4T, 3TC, NFV	39	B	$2.3 \times 10^4$	62	—	<u>D30N</u> , V77I, N88D	<u>M184V</u> , L210W
PTH#5	AZT, 3TC, NFV	16	B	$4.3 \times 10^3$	380	L449F	<u>D30N</u> , N88D	<u>M184V</u>
PTH#6	AZT, 3TC, NFV	35	B	$3.2 \times 10^4$	288	—	<u>L90M</u>	<u>M184V</u>
PTH#7	AZT, 3TC, NFV	23	AE	$6.5 \times 10^4$	114	A431V	L10F, M36I	D67N, <u>M184V</u>
PTH#8	AZT, 3TC, NFV	32	F	$1.1 \times 10^4$	692	A431V	K20R, M46L, <u>L90M</u>	<u>M184V</u>
PTH#9	d4T, 3TC, NFV	31	AE	$1.3 \times 10^4$	427	—	K20M, M36I	<u>M184V</u> , T215F
PTH#10	d4T, 3TC, NFV	15	B	$4.8 \times 10^4$	315	—	M36I, A71T, <u>L90M</u>	M41L, <u>M184V</u> , T215F
PTH#11	d4T, ddI, EFV	11	B	$1.4 \times 10^4$	85	—	L10I, V77I, L90M	K65R, L100I, <u>K103N</u>
PTH#12	ABC, ddI, EFV	3	AE	$5.7 \times 10^5$	29	—	M36I	V75I, <u>K103N</u> , <u>G190A</u>
PTH#13	d4T, 3TC, NVP	27	B	$2.8 \times 10^3$	259	—	L10I, A71T	<u>K103N</u> , <u>M184V</u>
PTH#14	d4T, 3TC, NFV	8	B	$1.2 \times 10^5$	192	L449F	L10V, M36I, <u>L90M</u>	D67N, K70R, <u>M184V</u> , K219Q
PTH#15	d4T, 3TC, NFV	44	B	$1.4 \times 10^3$	476	—	<u>D30N</u> , A71T, V77I, N88D	M41L, <u>M184V</u> , T215F
PTH#16	AZT, 3TC	45	B	$4.3 \times 10^3$	270	—	—	D67N, K70R, <u>M184V</u> , K219Q
PTH#17	AZT, EFV, NFV	11	B	$3.9 \times 10^3$	158	—	M36I	<u>K103N</u> , V108I
PTH#18	AZT, 3TC, NFV	34	B	$1.1 \times 10^3$	1183	—	L10V, <u>D30N</u> , A71V, V77I, N88D, <u>L90M</u>	<u>M184V</u>
PTH#19	d4T, 3TC, NFV	48	B	$4.0 \times 10^3$	324	L449F	<u>D30N</u> , M36I, N88D, <u>L90M</u>	M41L, <u>M184V</u> , T215Y
PTH#20	AZT, 3TC, NFV	34	B	$8.1 \times 10^4$	211	—	<u>D30N</u> , V77I, N88D, <u>L90M</u>	D67N, <u>K70R</u> , <u>M184V</u> , T215F, K219Q
PTH#21	d4T, 3TC, NFV	42	B	$4.0 \times 10^4$	130	A431V	L10V, M36I, M46I, A71T, G73S, <u>L90M</u>	M41L, <u>V118L</u> , <u>M184V</u> , T215Y
PTH#22	AZT, 3TC, NFV	39	B	$8.8 \times 10^3$	904	A431V	<u>D30N</u> , A71V, V77I, N88D	<u>K70R</u> , <u>V118L</u> , <u>M184V</u>

<sup>a)</sup> AZT, zidovudine; 3TC, lamivudine; d4T, stavudine; ddI, didanosine; ABC, abacavir; EFV, efavirenz; NVP, nevirapine; NFV, nelfinavir; APV, amprenavir.

<sup>b)</sup> Italicized, drug resistance-mutations against prescribed drugs; underlined, primary mutations against prescribed drugs; —, not detected; gag CSs, gag cleavage sites.

**A**

		▼	▽	
B consensus PTH#1	1	CCACAAGGGAAGGCCAGGGAATTTCTTCAGAGCAGACCAG-----AGCCAACAGCCCCACCAGAAGAGAGC...		
	1	CCACAAGGGAAGGCCAGGGAATTTCTTCAGAGCAGACCAG <b>AA</b> CCAA <b>ACAG</b> CCCC <b>ACCAGCACAG</b> CCCAACAGCCCCACCGGAGAGAGC...		
B consensus PTH#4	1	CCACAAGGGAAGGCCAGGGAATTTCTTCAGAGCAGACCAGAGCCA-----ACAGCCCCACCAGAAGAGAGCTTCAGGTTTGGG...		
	1	CCACAAGGGAAGGCCAGGGAATTTCTTCAGAGCAGACCAGCCAACAGCCCC <b>AGCAG</b> CCCCCGCCAGAGAGAGCTTCAGGTTTGGG...		
B consensus PTH#5	1	CCACAAGGGAAGGCCAGGGAATTTCTTCAGAGCAGACCAGAGCCAACAG-----CCCCACCAGAAGAGAGCTTCAGGTTTGGGGAA...		
	1	CAACAAGGGGAGGCCAGGGAATTTCTTCAGAGCAGACCAGAGCCAACAGCCCC <b>CCCTCC</b> GGGAAGAGAGCTTCAGGTTTGGGGAA...		
B consensus PTH#6	1	CCACAAGGGAAGGCCAGGGAATTTCTTCAGAGCAGACCAGAGCCAA-----CAGCCCCACCAGAAGAGAGCTTCAGGTTTGGG...		
	1	CCACAAGGGAAGGCCAGGGAATTTCTTCAGAGCAGGCCAGCCATCAGCTCC <b>ACCAG</b> CCCCACCAGAAGAGAGCTTCAGGTTTGGG...		
B consensus PTH#16	1	CCACAAGGGAAGGCCAGGGAATTTCTTCAGAGCAG-----ACCAGAGCCAACAGCCCCACCAGAAGAGAGCTTC...		
	1	CCACAAGGGGAGGCCAGGGAATTTCTTCAGAGCAGACCAGAGCC <b>AA</b> AGCCCC <b>ACCAGAG</b> CCAACAGCCCCACCAGAGAGAGCTTC...		
B consensus PTH#18	1	CCACAAGGGAAGGCCAGGGAATTTCTTCAGAGCAGACCAGA-----GCCAACAGCCCCACCAGAAGAGAGCTTC...		
	1	CCACAAGGGGAGGCCAGGAACTTCTTCAAAGCAGCCAGAGCC <b>AA</b> AGCCCC <b>ACCAGC</b> CCCAACAGCCCCACCGGAGAGAGTTTC...		
B consensus PTH#21	1	CCACAAGGGAAGGCCAGGGAATTTCTTCAGAGCAGACCAGAGCCAA-----CAGCCCCACCAGAAGAGAGCTTCAGGTTTGGG...		
	1	CCACAAGGGGAGGCCAGGGAATTTCTTCAGAGCAGACCAGAGCC <b>AA</b> AGCCCC <b>ACCAG</b> CCCCACCAGAGAGAGCTTCAGCTTTGGG...		
B consensus PTH#22	1	CCACAAGGGAAGGCCAGGGAATTTCTTCAGAGCAGACCAGAGCCAACAG-----CCCCACCAGAAGAGAGCTTCAGGTTTGGGGAA...		
	1	CCACAAGGGGAGGCCAGGGAATTTCTTCAGAGCAGACCAGAGCCAACAGCCCC <b>ACC</b> CCCAAGAGAGAGCTTCAGGTTTGGGGAG...		

**B**

B consensus PTH#1	1	LQSRPE-----PTAPPEESFRFG EETTPSQKQEPIDKELYPLASLRSLFGNDPSSQ	52
	1	LQSRPE <b>PTAPPAQ</b> PTAPPEESFRFG EETTPSQKQEMI DKEMYPLTSLRSLFGNDPSSQ	59
B consensus PTH#4	1	LQSRPE---PTAPPEESFRFG EETTPSQKQEPIDKELYPLASLRSLFGNDPSSQ	52
	1	LQCRPE <b>PTA</b> PTAPPEESFRFG EETATPSQKQEQIDKDLPSASLRSLFGNDPSSQ	55
B consensus PTH#5	1	LQSRPEPTA---PPEESFRFG EETTPSQKQEPIDKELYPLASLRSLFGNDPSSQ	52
	1	FQSRPEPTA <b>PP</b> PEESFRFG EETTPPQKQEQIDKELYPLASLRSLFGNDPSS	53
B consensus PTH#6	1	LQSRPEPT---APPEESFRFG EETTPSQKQEPIDKELYPLASLRSLFGNDPSSQ	52
	1	LQSRPE <b>PSAPPA</b> PEESFRFG EETTPSQKQEPMDKELYPSASLKSFLGNDPLSQ	55
B consensus PTH#16	1	LQSR-----PEPTAPPEESFRFG EETTPSQKQEPIDKELYPLASLRSLFGNDPSSQ	52
	1	LQSRPE <b>PTAPEPTA</b> PEESFRFG EETTAPSQKQEPIDQELYPLVSLKSLFGNDHSSQ	58
B consensus PTH#18	1	LQSRPE-----PTAPPEESFRFG EETTPSQKQEPIDKELYPLASLRSLFGNDPSSQ	52
	1	LQSSPE <b>PTAPPA</b> PTAPPAESFRFG EETATPSQKQEPIDKELYPLASLKSFLGNDP	55
B consensus PTH#21	1	LQSRPEPT---APPEESFRFG EETTPSQKQEPIDKELYPLASLRSLFGNDPSSQ	52
	1	LQSRPE <b>PTAPP</b> PEESFSFG ETTTPSQKQEQDKELYPLASLRSLFGNDPSSQ	55
B consensus PTH#22	1	LQSRPEPTA---PPEESFRFG EETTPSQKQEPIDKELYPLASLRSLFGNDPSSQ	52
	1	LQCRPEPTA <b>PP</b> PEESFRFG EETTPPQKQEPIDKELYPLASLRSLFGNDPSSQ	54

**C**

B consensus PTH#1	1	PQGKAREFSSEQTR-----ANSPTRELVWGRDNNLSLSEAGADRQGTVSFSF	48
	1	PQGKARELPSEQTR <b>NSPTSTANS</b> PTGRELVWGRDNNLSLSEAGDRQGNVSSNF	55
B consensus PTH#4	1	PQGKAREFSSEQTRAN---SPTRELVWGRDNNLSLSEAGADRQGTVSFSF	48
	1	PQGKAREFFSSVQTRAN <b>SPD</b> SPARGELQVWGRDNNLSLSEAGTDRQGSVFSF	51
B consensus PTH#5	1	PQGKAREFSSEQTRANS--PTRRELVWGRDNNLSLSEAGADRQGTVSFSF	48
	1	QQGEAREFFSEQTRANS <b>PAP</b> SGRELVWGRDNNLSLSEAGADRQGTVSFSF	50
B consensus PTH#6	1	PQGKAREFSSEQTRAN---SPTRELVWGRDNNLSLSEAGADRQGTVSFSF	48
	1	PQGKAREFSPEQARA <b>ISST</b> SPTRRELVWGRDNNLSLSEAGADGQGTVSFSF	51
B consensus PTH#16	1	PQGKAREFSSEQ-----TRANSPTRELVWGRDNNLSLSEAGADRQGTVSFSF	48
	1	PQGEAREFSSEQTRANS <b>PT</b> TRGELQVWGRDNNLSLSEAGADRPGTISFSF	54
B consensus PTH#18	1	PQGKAREFSSEQ-----TRANSPTRELVWGRDNNLSLSEAGADRQGTVSFSF	48
	1	PQGEARKLFSKQ <b>PRANSPTS</b> ANSPTGRELVWGRDSDLSLSEAGADRQGTVSFSF	54
B consensus PTH#21	1	PQGKAREFSSEQTRAN---SPTRELVWGRDNNLSLSEAGADRQGTVSFSF	48
	1	PQGEARELSSEQTRANS <b>PTS</b> PTRGELQVWGRDNNLSLSEAGAEQGTVLSL	51
B consensus PTH#22	1	PQGKAREFSSEQTRANS--PTRRELVWGRDNNLSLSEAGADRQGTVSFSF	48
	1	PQGEAREFFSSVQTR <b>NSPT</b> TRRELVWGRDNNLSLSEAGADRQGTISFSF	50

Fig. 2. Inserted-type HIV-1 detected in patients under HAART. A) Insertion mutations in a region containing both p6<sup>88</sup> and p6<sup>90</sup> genes. The 5' side of a region containing both the p6<sup>88</sup> and p6<sup>90</sup> genes of HIV-1 is compared with that of the consensus sequence of HIV-1 subtype B (B consensus) in each case. Solid and opened arrowheads indicate the start of the p6<sup>90</sup> and p6<sup>88</sup> genes, respectively. B) Comparison of an amino acid sequence of the p6<sup>88</sup> protein with that of the B consensus in each case. C) Comparison of the amino acid sequence of p6<sup>90</sup> proteins. Both inserted nucleotides and amino acids are shown in bold type, and identical or similar sequences to the inserted sequences are shown with underlines.

**A**

B consensus	1	CCACAAGGGGAGGCCAGGGGAATTTCTTCAGAG-----CAGACCAGAGCCAACAGCCCCACCAGAAGAGAGC...
NP#9	1	CCACAAGGGGAGGCCAGGGGAATTTCTTCAGAGCAGACCAGAGCCAACAGCCCC <u>CAGAACAGAGCCAACAGCCCC</u> ACCAGAAGAGAGT...
B consensus	1	CCACAAGGGGAGGCCAGGGGAATTTCTTCAGAGCAGACCAGAGCCAA-----CAGCCCCACCAGAAGAGAGCTTCAGGTTTGGG...
NP#11	1	CAACAAGGGGAGGCCAGGAAACTTCTTCAGAGCAGACCAGAGCCAACAGCCCC <u>CAGCCCC</u> ACCAGAAGAGAGCTTCAGGTTTGGG...
B consensus	1	CCACAAGGGGAGGCCAGGGGAATTTCTTCAGAGCAGACCAGAGCCAA-----CAGCCCCACCAGAAGAGAGCTTCAGGTTTGGG...
NP#28	1	CCACAAGGGGAGGCCAGGAAACTTCTTCAGAGCAGACCAGAGCCAACAGCCCC <u>CAGCCCC</u> ACCAGAAGAGAGTTCAGGTTTGGG...
B consensus	1	CCACAAGGGGAGGCCAGGGGAATTTCTTCAGAGCAGACCAGAGCCAA-----CAGCCCCACCAGAAGAGAGCTTCAGGTTTGGG...
NP#38	1	CCACAAGGGGAGGCCAGGAAACTTCTTCAGAGCAGACCAGAGCCAACAGCCCC <u>CAGCCCC</u> ACCAGAAGAGAGTTCAGGTTTGGG...

**B**

B consensus	1	LQSRP-----EPTAPPEESFRFGEETTPSQKQEPIDKELYPLASLRSFLGNDPSSQ	52
NP#9	1	LQSRP <b>EPTAPRTE</b> <u>EPTAP</u> PEESFRFGEETATPSQKQEPIDKELYPLASLRSFLGNDP	56
B consensus	1	LQSRPEPT---APPEESFRFGEETTPSQKQEPIDKELYPLASLRSFLGNDPSSQ	52
NP#11	1	LQSRPEPT <b>APP</b> <u>APP</u> PEESFRFGEETATPSQKQEPIDKELYPLASLRSFLGNDP	52
B consensus	1	LQSRPEPT---APPEESFRFGEETTPSQKQEPIDKELYPLASLRSFLGNDPSSQ	52
NP#28	1	LQSRPEPT <b>APP</b> <u>APP</u> PEESFRFGEETAAPSQKQEPIDKELYPLASLRSFLGNDP	52
B consensus	1	LQSRPEPT---APPEESFRFGEETTPSQKQEPIDKELYPLASLRSFLGNDPSSQ	52
NP#38	1	LQSRPEPT <b>APP</b> <u>APP</u> PEESFRFGEETATPSQKQEPIDKELYPLASLRSFLGNDP	52

**C**

B consensus	1	PQGKAREFSSE-----QTRNSPTRELVWGRDNNLSLSEAGADRQGTVSFSF	48
NP#9	1	PQGEARKLP <b>SEQ</b> <u>TRANSPQNRANS</u> PTRELVWGRDSDSLSETGADRQGTVSLSF	55
B consensus	1	PQGKAREFSSEQTRAN---SPTRRELQVWGRDNNLSLSEAGADRQGTVSFSF	48
NP#11	1	QGGKARKLP <b>SEQ</b> <u>TRANSP</u> <u>TSPT</u> RRELQVWGRDSDSLPETGADRQGTVSFSF	51
B consensus	1	PQGKAREFSSEQTRAN---SPTRRELQVWGRDNNLSLSEAGADRQGTVSFSF	48
NP#28	1	PQGGKARKLP <b>SEQ</b> <u>TRANSP</u> <u>TSPT</u> RREFQVWGRDSDSLSETGADRQGTVSFSF	51
B consensus	1	PQGKAREFSSEQTRAN---SPTRRELQVWGRDNNLSLSEAGADRQGTVSFSF	48
NP#38	1	PQGGKARKLP <b>SEQ</b> <u>TRANSP</u> <u>TSPT</u> RREFQVWGRDSDSLSETGADKQGTVSFSF	51

Fig. 3. Inserted-type HIV-1 detected in therapy-naive patients. A) Insertion mutations in a region containing both p6<sup>gag</sup> and p6<sup>pol</sup> genes. The 5' side of a region containing both the p6<sup>gag</sup> and p6<sup>pol</sup> genes of HIV-1 is compared with that of the consensus sequence of HIV-1 subtype B (B consensus) in each case. Solid and opened arrowheads indicate the start of the p6<sup>pol</sup> and p6<sup>gag</sup> genes, respectively. B) Comparison of an amino acid sequence of the p6<sup>gag</sup> protein with that of the B consensus in each case. C) Comparison of the amino acid sequence of p6<sup>pol</sup> proteins. Both inserted nucleotides and amino acids are shown in bold type, and identical or similar sequences to the inserted sequences are shown with underlines.

National Laboratory). Drug-resistance-associated mutations were defined according to consensus guidelines for drug-resistance testing (10). RT-PCR program consisted of 1 cycle of RT reaction (30 min at 50 C), 1 cycle of pre-PCR (2 min at 94 C), and 40 cycles of PCR (15 sec at 94 C, 30 sec at 50 C, and 2 min at 68 C). PCR program consisted of 1 cycle of pre-PCR (3 min at 94 C) and 40 cycles of PCR (15 sec at 94 C, 30 sec at 50 C, and 2 min at 70 C).

**Determination of HIV-1 subtypes.** The nucleotide sequence of the V3 region of the env gene was classified together with the reference sequences to determine HIV-1 subtypes (15).

**Accession numbers.** Nucleotide sequences encoding the p6<sup>gag</sup> and p6<sup>pol</sup> proteins of HIV-1 derived from PTH#1, PTH#4, PTH#5, PTH#6, PTH#16, PTH#18, PTH#21, PTH#22, NP#9, NP#11, NP#28, and NP#38 were submitted to the DNA databank of Japan (DBJ) (accession No. AB074263 through AB074267, and AB085203

through AB085209).

## Results

### Insertion Mutations Detected in the p6<sup>gag</sup> and p6<sup>pol</sup> Genes of HIV-1

We detected several types of insertion mutations at the 5' side of a region containing both the p6<sup>gag</sup> and p6<sup>pol</sup> genes of HIV-1 in eight of twenty-two (36.4%) patients who possessed drug-resistant viruses under HAART. The numbers of inserted nucleotides were six (PTH#5 and PTH#22), nine (PTH#4, PTH#6, and PTH#21), eighteen (PTH#16 and PTH#18), and twenty-one (PTH#1). The same or similar nucleotide sequences originally existed near the inserted sequence in each case (Fig. 2A). Since all the numbers of the inserted nucleotides were multiples of three, the insertions did not yield the frameshift of codons. Figure 2B shows the amino acid sequence of p6<sup>gag</sup> protein in each case. Insert-