

200629019A

厚生労働科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

末梢CD4陽性Tリンパ球中の残存プロウイルス量とその活動指数は  
治療中断の指標となりうるかを明らかにする研究

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 金田 次弘

平成19(2007)年3月

# 目 次

I. 総括研究報告	
末梢CD4陽性Tリンパ球中の残存プロウイルス量とその活動指数は 治療中断の指標となりうるかを明らかにする研究	1
金田次弘	
II. 分担研究報告	
1. HAART著効患者末梢血CD4陽性Tリンパ球中のプロウイルス量と全長HIV-1 mRNA量の定量	5
金田次弘	
2. 末梢CD4陽性Tリンパ球中の残存プロウイルス量とその活動指数は 治療中断の指標となりうるかを明らかにする研究：治療中断症例の解析	13
濱口元洋	
3. HIV-1病気進行と細胞表面免疫複合体付着CD4 <sup>+</sup> T細胞の割合の変化の基礎検討	17
鈴木康弘	
4. プロウイルス量測定 of 臨床的意義についての検討：測定対象症例の抽出	20
白阪琢磨	
5. 末梢CD4陽性Tリンパ球中の残存プロウイルス量とその活動指数は 治療中断の指標となりうるかを明らかにする研究：測定対象症例の抽出	23
南 留美	
6. 末梢CD4 陽性Tリンパ球中の残存プロウイルス量とその活動指数は 治療中断の指標となりうるかを明らかにする研究：測定対象症例の抽出	26
伊藤俊広	
7. HIV-1 mRNA及びプロウイルスDNAアッセイ系のルーチン化の基礎検討	30
和山行正	
8. プロウイルス活動指数の測定法に関する検討	33
伊部史朗	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	37
IV. 研究成果の刊行物・別刷	41

# I. 総括研究報告



厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

総括研究報告書

末梢 CD4 陽性 T リンパ球中の残存プロウイルス量とその活動指数は治療中断の指標となりうるかを明らかにする研究

主任研究者 金田 次弘 (独)国立病院機構名古屋医療センター臨床研究センター  
血液免疫研究部長

研究要旨

HIV-1 プロウイルスと全長 mRNA 定量の研究対象症例の抽出を行った。HAART 著効期間 5 年以上を目安にして全体で約 100 例を見込むことが出来た。研究の全体像を明らかにする目的でウイルス量抑制持続期間を限定せずに、HAART 著効患者を抽出し、64 症例を対象にプロウイルス量と全長 HIV-1 mRNA を定量した。活動指数が低値を示す症例は 24 症例で、そのうちの 6 例がプロウイルス量も低値を示した。5 年以上にわたり血中ウイルス量が検出感度以下に抑制されている HAART 著効例に特定してみると、活動指数低値症例は 7 例でそのうちプロウイルス低値症例が 2 例存在した。これらの症例が第一段階の治療中断の候補症例と考えてよい。また、既に治療中断が施行されていて、その後有意の血中ウイルス量のリバウンドが観察されなかった治療中断成功例が 2 例存在したが、それらは共に残存プロウイルス低値、活性指数低値症例であった。

分担研究者	立川 夏夫 国立国際医療センター・エイズ治療・研究開発センター
濱口 元洋 (独) 国立病院機構名古屋医療センター・止血血栓研究部長	和山 行正 北里大塚バイオメディカルアッセイ研究所
鈴木 康弘 東北大学大学院医学系研究科・講師	伊部 史朗 (独) 国立病院機構名古屋医療センター
白阪 琢磨 (独) 国立病院機構大阪医療センター・HIV/AIDS 先端医療開発センター長	藤崎彩恵子 (独) 国立病院機構名古屋医療センター
南 留美 (独) 国立病院機構九州医療センター・免疫感染症・膠原病・医師	間宮 均人 (独) 国立病院機構名古屋医療センター
伊藤 俊広 (独) 国立病院機構仙台医療センター・血液内科/HIV 感染症・内科医長	横幕 能行 (独) 国立病院機構名古屋医療センター
協力研究者	A. 研究目的 多剤併用療法 (HAART) が開始されてから

HIV-1 感染者の予後は大きく改善され、その結果エイズによる死亡症例は減少した。しかし、末梢 CD4 陽性 T リンパ球中の HIV-1 プロウイルスの経時的測定研究によると感染細胞の駆逐には数十年の歳月を要し、感染患者は一生抗 HIV 薬を服用し続けなければならないという結果が報告され、それ以後“HAART は一生継続”がコンセンサスになっている。本当に HAART を一生継続しなければならないとすると、患者の精神的、肉体的、経済的負担は多大であることは論を待たないが、社会的負担も大きい。その意味で、ある一定の条件を満たしたとき HAART を中断できるという根拠を提供できるエビデンスの開発、実用化が待たれている。本研究の目的は、HAART 著効患者を対象にして末梢 CD4 陽性 T リンパ球中に残存しているプロウイルスコピー数と全長 HIV-1 mRNA を定量し、1 コピー当りのプロウイルスの HIV-1 mRNA 転写能（活動指数）を算出し、活動指数と残存プロウイルス量が HAART 中断のエビデンスになるかを検討することである。

## B. 研究方法

研究対象：HAART により血漿ウイルス量（VL）が検出感度以下に抑制され、かつ末梢 CD4 陽性 T リンパ球数の回復が目覚しい HAART 著効例である。これに加えて様々な経緯で治療中断を行った成功例と失敗例も対象とする。CD4 陽性細胞の精製：EDTA 加末梢血より StemSep14052 を用い精製した。DNA と RNA の抽出および精製：DNA はキアゲン Blood mini kit を用いて抽出・精製した。RNA はトリゾールにて抽出した。リアルタイム PCR 法による定量：主任研究者らにより開発された高感度リアルタイム PCR 法の検出限界は 2 コピー/10<sup>6</sup> 細胞である。この

方法により、末梢 CD4 陽性 T リンパ球中に残存している HIV-1 プロウイルスコピー数と全長 HIV-1 mRNA のコピー数を高感度で定量する。プロウイルスの活動度：残存プロウイルス 1 コピー当りの HIV-1 mRNA 転写活性を活動指数（全長 HIV-1 mRNA コピー数/プロウイルスコピー数）で表現した。塩基配列の決定：プライマーやプローブとのミスマッチにより定量値が過小評価される可能性があるのでプライマー、プローブ領域の塩基配列を決定した上で定量値の妥当性を評価する。必要に応じてプロウイルスの全長塩基配列を決定する。

（倫理面への配慮）

本研究を進める上で患者の協力は不可欠である。研究の必要性和意義を十分説明し理解と協力を得ることを前提とする。分担研究者は当該医療機関倫理委員会に研究計画書を提出し、審査・承認を経た上で研究を開始するものとする。研究参加同意書には患者の自筆でサインをお願いし、同意書原本は主治医もしくは各施設の担当責任者の下で保管することを義務とする。検査結果は個人情報保護の観点から漏出しないよう厳重に管理する。主任研究者の在籍している名古屋医療センターで、研究課題名「HAART 著効例における末梢 CD4 陽性 T リンパ球中の残存プロウイルス量とその転写活性の把握」の倫理審査申請を行い承認を受けるなど倫理面配慮の点でも進展を見ている。九州医療センターにおいても倫理審査に合格した。

## C. 研究結果

① 長期間にわたる HAART 著効例の抽出：名古屋医療センターでは HIV 感染患者の増加が過去 3 年間に急増したことを反映し、3 年未満



の症例が75%を占めるが、最長が9年で5年以上のHAART著効例は22例存在した（平成18年6月集計）。同様のデータ整理を分担研究者在籍施設で行っている。最終的な集計を待っているところであるが全体で100例の登録の目処がたった。

②プロウイルス量と全長HIV-1 mRNAの量: 64症例について、プロウイルスと全長HIV-1 mRNAを定量し活動指数を算出した。その結果、治療期間が短い症例が高い活動指数を示し、治療期間が長い症例程低い活動指数を示すというような相関は認められなかった。活動指数が低値（2.2以下）を示す症例は24症例で、そのうちの6例がプロウイルス量も低値を示した。5年以上にわたり血中ウイルス量が検出感度以下に抑制されているHAART著効例に特定してみると、活動指数低値症例は7例でそのうちプロウイルス低値症例が2例存在した。また、既に治療中断が施行されていて、その後有意の血中ウイルス量のリバウンドが観察されなかった治療中断成功例が2例存在したが、それらは共に残存プロウイルス低値、活性指数低値症例であった。

③プライマーとプローブ領域のマッチング解析: プライマーやプローブとのミスマッチにより定量値が過小評価される可能性があるので結合領域の塩基配列を決定した上で定量値の妥当性を評価した。25症例で実施したが、全ての症例で致命的なミスマッチは存在しなかった。

④一般検査化への技術改良: 現在行っている全長HIV-1 mRNAの“定量”は相補的HIV-1 DNAの定量で代替している。抽出するRNA分子種を全RNAからmRNAに変え、かつ定量に用いる標準物質にRNAを使用すれば文字どおりのHIV-1 mRNAの定量を行うことが

できる。RNA標準物質の保存は困難な問題であるがRNaseインヒビターとE.coli RNAの添加により解決できる見通しが立った。

#### D. 考察

プロウイルスの活動指数を評価した本研究の結果によると、HAART 著効患者のプロウイルスにも潜伏感染レベルの低活性のものから持続感染細胞を凌ぐ高活性を有するものまで広範囲に分布することがわかった。我々は、残存プロウイルス量が低値を示しかつ活動指数の低い集団の中に HAART 中断可能な候補が含まれていると推定している。今後の慎重な検討を待たねばならないが、残存プロウイルス量とその活動指数が治療中断のエビデンスになりうる可能性は高いと期待される。

#### E. 結論

初年度の研究結果のみでは結論は出せる段階ではない。しかし HIV-1 プロウイルス量とその活動度が HAART 中断の有効な指標となるとの感触は得られた。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

各分担研究者の項参照

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

##### 1. 特許取得

特願 2005-327417 発明の名称: 人免疫不全ウイルス-1 遺伝子検出又は定量用材料、検出又は定量方法、治療用遺伝子断片、および治療方法 発明者: 金田次弘、永井裕美、水野善文、 出願人: 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

## II. 分担研究報告

HAART 著効患者末梢血 CD4 陽性 T リンパ球中のプロウイルス量と全長 HIV-1 mRNA 量の定量

分担研究者：金田 次弘 名古屋医療センター 臨床研究センター 血液免疫研究部 部長

研究協力者：伊部 史朗 名古屋医療センター 臨床研究センター 血液免疫研究部 研究員

藤崎彩恵子 名古屋医療センター 臨床研究センター 血液免疫研究部 研究員

加堂 真由 名古屋医療センター 臨床研究センター 血液免疫研究部 研究員

近藤 恭子 名古屋医療センター 臨床研究センター 血液免疫研究部 研究員

研究要旨

HIV-1 プロウイルスと全長 mRNA 定量の研究対象症例の抽出を行った。HAART 著効期間 5 年以上を目安にして 22 例を抽出できた。研究の全体像を明らかにする目的でウイルス量抑制持続期間を限定せずに、HAART 著効患者を抽出し、64 症例を対象にプロウイルス量と全長 HIV-1 mRNA を定量した。その結果、治療期間が短い症例が高い活動指数を示し、治療期間が長い症例程低い活動指数を示すというような相関は認められなかった。活動指数が低値を示す症例は 24 症例で、そのうちの 6 例がプロウイルス量も低値を示した。5 年以上にわたり血中ウイルス量が検出感度以下に抑制されている HAART 著効例に特定してみると、活動指数低値症例は 7 例でそのうちプロウイルス低値症例が 2 例存在した。これらの症例が第一段階の治療中断の候補症例と考えてよい。また、既に治療中断が施行されていて、その後有意の血中ウイルス量のリバウンドが観察されなかった治療中断成功例が 2 例存在したが、それらは共に残存プロウイルス低値、活性指数低値症例であった。次いで、プライマーやプローブとのミスマッチにより定量値が過小評価される可能性があるのでプロウイルスのプライマー、プローブ結合領域の塩基配列を決定した上で定量値の妥当性を評価した。25 症例で実施したが、全ての症例で致命的なミスマッチは存在しなかった。

A. 研究目的

多剤併用療法 (HAART) が開始されてから HIV-1 感染者の予後は大きく改善され、その結果エイズによる死亡症例は減少した。しかし、末梢 CD4 陽性 T リンパ球中の HIV-1 プロウイルスの経時的測定研究によると感染細胞の駆逐には数十年の歳月を要し、感染患者は一生抗 HIV 薬を服用し続け

なければならないという結果が報告され、それ以後“HAART は一生継続”がコンセンサスになっている。本当に HAART を一生継続しなければならないとすると、患者の精神的、肉体的、経済的負担は多大であることは論を待たないが、社会的負担も大きい。その意味で、ある一定の条件を満たしたとき HAART を中断できるという根



拠を提供できるエビデンスの開発、実用化が待たれている。初年度は① 研究対象とする HAART 著効患者の抽出 ② HAART 著効患者を対象にして末梢 CD4 陽性 T リンパ球中に残存しているプロウイルスコピー数と全長 HIV-1 mRNA を定量し、1 コピー当りのプロウイルスの HIV-1 mRNA 転写能（活動指数）を算出し、活動指数と残存プロウイルス量どのような分布を示すかを明らかにすることを目的にして研究を行った。

## B. 研究方法

### CD4 陽性 T リンパ球の精製

患者末梢血より白血球を分離した後、StepSep human CD4+ T cell enrichment cocktail (ベリタス社)を用いて CD4 陽性 T リンパ球を精製した。

### DNA、RNA の精製

CD4 陽性 T リンパ球の DNA 精製は、DNA blood mini kit (QIAGEN 社)を用いて行った。CD4 陽性 T リンパ球の total RNA 精製は、TRIzol LS reagent (Invitrogen 社)を用いて行った。

### HIV-1 DNA、全長 HIV-1 mRNA の定量

HIV-1 DNA 量は、RightCycler (Roche Diagnosis 社)を用いたリアルタイム PCR 法により定量した。リアルタイム PCR に用いるプライマー、プローブは、HIV-1 の gag p17 遺伝子に設定した。定量に先立ち、Taq DNA polymerase (Roche Diagnosis 社)を用いた定量前 PCR を 20 サイクル行うことによって、測定限度を  $10^6$  の CD4 陽性 T リンパ球あたり 2 コピーまで高めた（高感度リアルタイム PCR 法）。

全長 HIV-1 mRNA の定量の際には、まず、oligo(dT)<sub>20</sub> を用いて逆転写反応

(SuperScript III reverse transcriptase, Invitrogen 社)を行い、total RNA 溶液中の mRNA を cDNA に変換した。次いで、高感度リアルタイム PCR 法により、変換した HIV-1 cDNA を定量した。HIV-1 mRNA 分子のうち、gag 遺伝子を含んでいるのは全長 HIV-1 mRNA のみであり、この定量法により、全長 HIV-1 mRNA 由来の cDNA を特異的に定量することができる。

（倫理面への配慮）

本研究を進める上で患者の協力は不可欠である。研究の必要性和意義を十分説明し理解と協力を得ることを前提とする。研究参加同意書には患者の自筆でサインをお願いし、同意書原本は主治医もしくは各施設の担当責任者の下で保管することを義務とする。検査結果は個人情報保護の観点から漏出しないよう厳重に管理する。名古屋医療センターでは倫理委員会に研究課題「HAART 著効例における末梢 CD4 陽性 T リンパ球中の残存プロウイルス量とその転写活性の把握」を提出し承認を取得した。

## C. 研究結果

①長期間にわたる HAART 著効例の抽出:名古屋医療センターでは HIV 感染患者の増加が過去 3 年間に急増したことを反映し、3 年未満の症例が 75% を占めるが、最長が 9 年で 5 年以上の HAART 著効例は 2 例存在した（図 1、平成 18 年 6 月集計）。

②プロウイルス量と全長 HIV-1 mRNA の量:現在までに測定した 64 症例について、プロウイルス量に対して活動指数をプロットした結果を図 2 に示す。その結果、治療期間が短い症例が高い活動指数を示し、治療期間が長い症例程低い活動指数を示すと

いような相関は認められなかった。活動指数が低値(2.2以下)を示す症例は24症例で、そのうちの6例がプロウイルス量も低値を示した。5年以上にわたり血中ウイルス量が検出感度以下に抑制されているHAART著効例に特定してみると、活動指数低値症例は7例でそのうちプロウイルス低値症例が2例存在した。症例#1と#2は既に治療中断を施行し、その後有意の血中ウイルス量のリバウンドが観察されなかった治療中断成功例であった。

③ 次いで、プライマーやプローブとのミスマッチにより定量値が過小評価される可能性があるのでプロウイルスのプライマー、プローブ結合領域の塩基配列を決定した上で定量値の妥当性を評価した。25症例で実施したが、全ての症例で致命的なミスマッチは存在しなかった(図3)。

#### D. 考察

プロウイルスの活動指数を評価した本研究の結果によると、HAART 著効患者のプロウイルスにも潜伏感染レベルの低活性のものから持続感染細胞を凌ぐ高活性を有するものまで広範囲に分布することがわかった。今後の慎重な検討を待たねばならないが、残存プロウイルス量とその活動指数が治療中断のエビデンスになりうる可能性は高いと期待される。

#### E. 結論

初年度の研究結果のみでは結論は出せる段階ではない。しかし HIV-1 プロウイルス量とその活動度が HAART 中断の有力な指標となるとの感触は得られた。我々は、残存プロウイルス量が低値、かつ活動指数の

低い集団の中に HAART 中断可能な候補が含まれていると推定できた。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. T. Hagiwara, J. Hattori and T. Kaneda. PNA-In Situ Hybridization Method For Detection of HIV-1 DNA in Virus-Infected Cells and Subsequent Detection of Cellular and Viral Proteins. In Situ Hybridization Protocols 3<sup>rd</sup> edition (edited by I. A. Darby), Humana Press, NJ, pp139-149, 2006.
2. 金田次弘 第2回 HIV 国際会議に参加(政策医療振興財団の助成による国際会議出席報告). 医療の広場 46, 18-20, 2006.
3. 高橋昌明、奥村直也、伊部史朗、久高祐一、溝口和代、鈴木達男、金田次弘 名古屋医療センターにおける抗 HIV 療法の変遷と TDM の有効例. 日本病院薬剤師会雑誌、42, 919-923, 2006.
4. S. Ibe, S. Fujisaki, S. Fujisaki, T. Morishita and T. Kaneda Quantitative SNP-Detection Method for Estimating HIV-1 Replicative Fitness: Application to Protease Inhibitor-Resistant Viruses. Microbiology & Immunology 50(10), 765-772, 2006.
5. J. Hattori, N. Okumura, Y. Yamazaki, M. Uchiyama, M. Hamaguchi, Y. Nishiyama and T. Kaneda Beneficial



- Effect of GB Virus C Co-Infection in Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Individuals. *Microbiology & Immunology* 51(2), 193-200, 2007.
6. 高橋昌明、藤崎誠一郎、伊部史朗、久高祐一、奥村直哉、平野 淳、鈴木達男、横幕能行、間宮均人、濱口元洋、金田次弘 HIV・HCV 重複感染に対するリバビリン併用ペグ・インターフェロン療法により CD4, CD8 陽性リンパ球数が減少した 1 症例. *新薬と臨床*, 56, 112-115, 2007.
  7. M. Takahashi, S. Ibe, Y. Kudaka, N. Okumura, A. Hirano, T. Suzuki, N. Mamiya, M. Hamaguchi and T. Kaneda No observable correlation between central nervous system side effects and EFV plasma concentration in Japanese HIV-1 infected patients treated with EFV containing HAART. *AIDS Research and Human Retroviruses* in press
  8. H. Nagai, K. Wada, Y. Mizuno, M. Kadou, J. Hattori, S. Ibe, N. Mamiya, M. Hamaguchi, Y. Nishiyama and T. Kaneda Clinical significance of simultaneous quantification of HIV-1 provirus and cell-associated full-length HIV-1 mRNA in patients responding well to HAART. 投稿準備中
2. 学会発表
    1. 金田次弘 HIV 診療を支えるモニタリングシステムの進歩. 第 3 回東海ブロック HIV 歯科医療研究会 (2006 年 7 月、名古屋)
    2. 藤崎誠一郎、藤崎彩恵子、伊部史朗、金田次弘 HIV-1 遺伝子型薬剤耐性検査の標準化. 第 25 回臨床化学会夏期セミナー (2006 年 8 月、札幌)
    3. Ibe S., Shigemi U., Fujisaki S., Fujisaki S., Hattori J., Mamiya N., Hamaguchi M., Kaneda T. Characterization of protease inhibitor-resistant HIV-1 in therapy-naïve Individuals. 16<sup>th</sup> International AIDS Conference Toronto Canada Aug. 13-18, 2006
    4. Takahashi M., Ibe S., Kudaka Y., Okumura N., Suzuki T., Mamiya N., Hamaguchi M., Kaneda T. Development and Application of a Simple HPLC Method to Therapeutic Drug Monitoring. 16<sup>th</sup> International AIDS Conference Toronto Canada Aug. 13-18, 2006
    5. Kaneda T., Nagai H., Mizuno Y., Kadou M., Hattori J., Ibe S., Mamiya N., Hamaguchi M. Clinical significance of quantifying HIV-1 provirus and cell-associated full-length HIV-1 mRNA in patients responding well to HAART. 16<sup>th</sup> International AIDS Conference Toronto Canada Aug. 13-18, 2006
    6. 金田次弘 CD4 陽性 T リンパ球中の HIV-1 プロウイルス定量の臨床的意義について. 第 2 回稲葉班小児科グループ班会議 (2006 年 8 月、名古屋)
    7. 金田次弘 HIV-1 プロウイルスと活動度指数定量の臨床的意義. 第 26 回九州



- ブロックエイズ拠点病院研修会 (2006年9月、福岡)
8. 金田次弘 抗 HIV 療法のモニタリング. 第 1 回血液ネット臨床セミナー (2006年10月、名古屋)
  9. I. Kamo, H. Tomoyasu, M. Kobayashi, N. Sakuragawa, S. Inoue, T. Hagiwara, T. Kaneda and A. Kikuchi Studies on myoid cells in the hyperplastic myasthenia thymus. 第 8 回国際神経免疫学会 (2006年10月、名古屋)
  10. 伊部史朗、村瀬泰之、山根 隆、金田次弘 薬剤耐性 HIV-1・キャプシドとヒト・サイクロフィリン A の相互作用. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会 (2006年11月、名古屋)
  11. 伊部史朗、藤崎彩恵子、藤崎誠一郎、金田次弘 定量的一塩基多型検出法を用いた HIV-1 競争培養実験法の確立とその応用. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会 (2006年11月、名古屋)
  12. 服部純子、間宮均人、濱口元洋、西山幸廣、金田次弘 HIV-1 感染患者における GBV-C 重複感染の影響. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会 (2006年11月、名古屋)
  13. J. Hattori, N. Mamiya, M. Hamaguchi, Y. Nishiyama and T. Kaneda Effect of GBV-C Co-Infection on HIV-1-Infected Individuals. 2<sup>nd</sup> German Japanese HIV Symposium (2006年11月、ドイツ)
  14. T. Kaneda, S. Ibe, H. Nagai, J. Hattori, S. Fujisaki, S. Fujisaki, M. Kado, K. Kondo, N. Mamiya, and M. Hamaguchi Clinical and molecular studies of HIV-infected patients in Nagoya, Japan: Prevalence and characteristics of drug-resistant HIV-1 among 307 therapy-naïve patient in Nagoya, Japan for the last 6 years. Clinical application of quantification of HIV-1 proviral DNA and HIV-1 mRNA 2<sup>nd</sup> German Japanese HIV Symposium (2006年11月、ドイツ)
  15. 金田次弘、永井裕美、伊部史朗、加堂真由、近藤恭子、水野善文、濱口元洋、間宮均人、横幕能行、星野 伸、村松友佳子、瀧本哲也、堀部敬三、井上孝実 HIV-1 のプロウイルスと mRNA 定量の臨床応用. 第 20 回日本エイズ学会総会 (2006年11月、東京)
  16. 星野 伸、村松友佳子、永井裕美、井上孝実、瀧本哲也、金田次弘、堀部敬三 母子感染予防対策施行後に児末梢血白血球中に微量の HIV-1 DNA が検出されたが、感染には至らなかった 1 例. 第 20 回日本エイズ学会総会 (2006年11月、東京)
  17. 藤野真之、瀧永博之、吉田 繁、千葉仁志、伊藤俊広、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、渡辺香奈子、白阪琢磨、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、杉浦 互 2003-2005 年の新規 HIV-1 感染者における薬剤耐性頻度の動向. 第 20 回日本エイズ学会総会

(2006年11月、東京)

18. 伊部史朗、藤崎誠一郎、重見 麗、服部純子、横幕能行、間宮均人、濱口元洋、金田次弘

過去6年間の未治療 HIV-1 感染患者に見出された薬剤耐性ウイルスの検出率とウイルスの特徴. 第20回日本エイズ学会総会 (2006年11月、東京)

19. 藤崎誠一郎、藤崎彩恵子、伊部史朗、浅黄 司、吉田 繁、正兼亜季、大家正義、渡辺香奈子、瀧永博之、松田昌和、貞升健志、岡田清美、近藤真規子、秦 眞美、溝上泰司、森 治代、南 留美、杉浦 互、金田次弘 HIV-1 遺伝子型薬剤耐性検査のバリデーション. 第20回日本エイズ学会総会(2006年11月、東京)

20. 高橋昌明、久高祐一、奥村直哉、平野 淳、鈴木達男、金田次弘 LC/MS を用いた簡便なテノホビル血中濃度測定法の開発. 第20回日本エイズ学会総会 (2006年11月、東京)

21. 久高祐一、奥村直哉、平野 淳、林 誠、野口明子、山田由美子、高橋昌明、鈴木達男、横幕能行、間宮均人、濱口元洋、金田次弘 テノホビル服用患者の血中濃度と腎障害との関係. 第20回日本エイズ学会総会 (2006年11月、東京)

22. 金田次弘 HIV-1 プロウイルスと活動度指数定量の臨床的意義. 東海ブロック都道府県・エイズ拠点病院等連絡会議 (2006年12月、名古屋)

- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む.)

1. 特許取得

特願 2005-327417 発明の名称: 人免疫不全ウイルス-1 遺伝子検出又は定量用材料、検出又は定量方法、治療用遺伝子断片、および治療方法 発明者: 金田次弘、永井裕美、水野善文、 出願人: 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

図1. Viral load  $\leq 50$ コピ- $^{\circ}$ /ml の継続期間による分類 (HAART施行下)

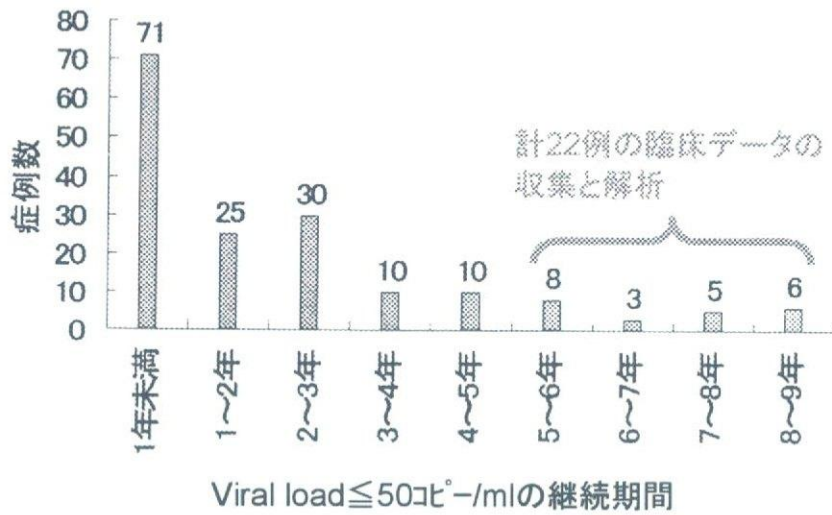


図2. HIV-1 DNAと活動指数

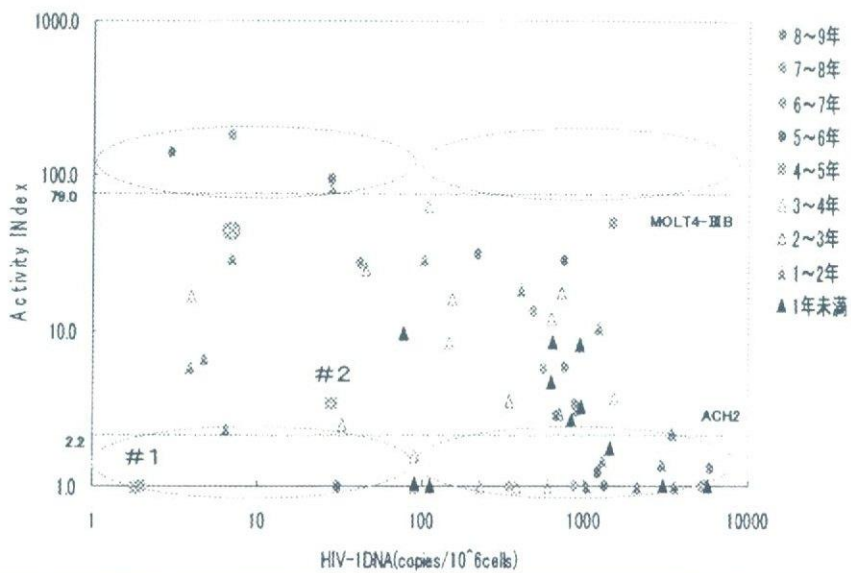
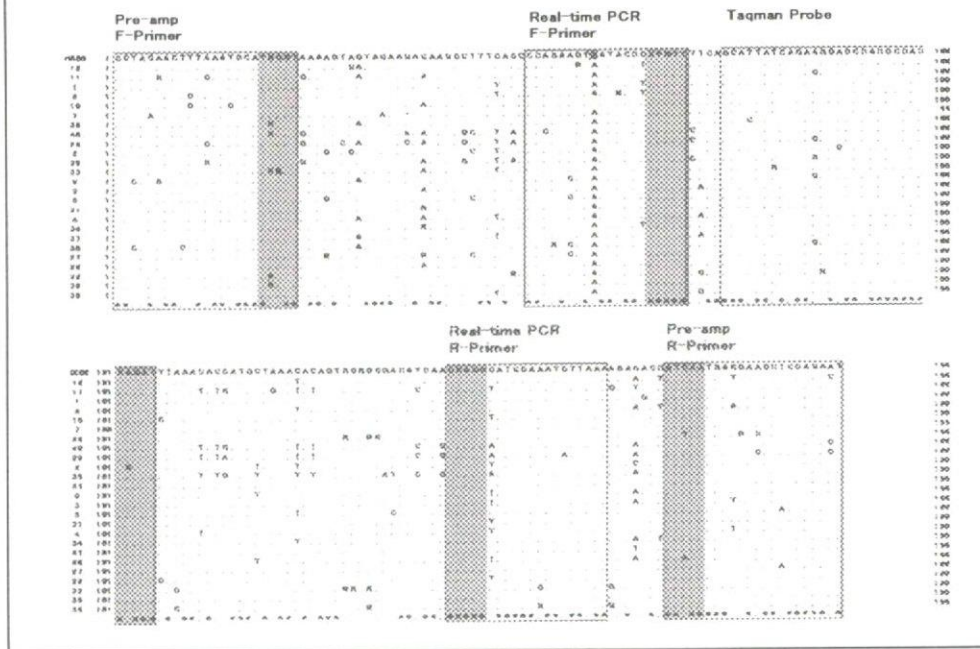




図3. プライマー・プローブ領域のマッチング解析



末梢 CD4 陽性 T リンパ球中の残存プロウイルス量とその活動指数は治療中断の指標となりうるかを明らかにする研究：治療中断症例の解析

分担研究者 濱口元洋 国立病院機構名古屋医療センター臨床研究センター 止血・血栓研究部長

研究要旨

抗 HIV 療法（多剤併用療法：HAART）著効の HIV-1 感染症患者において末梢 CD4 陽性 T リンパ球中に残存するプロウイルスと mRNA を定量し、1 コピーあたりのプロウイルスの HIV-1 mRNA 転写能（活動指数）を算出する。その活動指数が極めて低値の患者において、HIV-1 ウイルスが治療中断後も増殖していないかどうか、さらに治療中断の妥当性について検討した。

症例 1. 31 歳、男性。AZT+ddc の治療を開始されていたが、内服頻度が 30%であることが判明したため、治療中断とした。その時点の HIV-RNA=感度以下、CD4=562/ $\mu$ L。その後も HIV-RNA の増加を認めていない。活動指数は 3.5 であった。

症例 2. 38 歳、女性。抗 HIV 療法開始(d4T+3TC+NFV)。その後 CD4=500 以上、HIV-RNA=感度以下が 3 年間持続したため、HAART を中断とした。しかし、1 ヶ月後に頭痛など症状出現、HIV-RNA=4.6 x 10<sup>5</sup>copy/mL と急上昇、CD4=295/ $\mu$ L と低下した。（活動指数 29.6 と高値であった）。

長期にわたり HAART が著効し、HIV-RNA が感度以下と低値であり、且つ CD4 リンパ球数が 500 以上/ $\mu$ L を確保できている患者で、活動指数（DNA/mRNA）が低値であれば治療中断できる可能性があること示唆された。

A. 研究目的

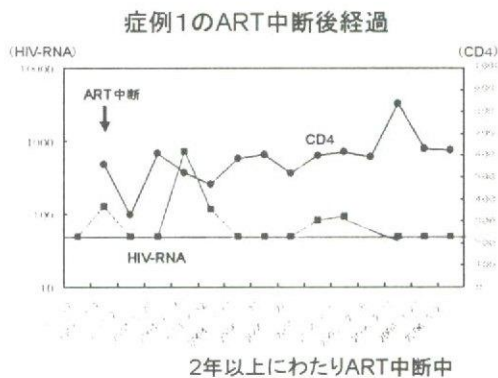
抗 HIV 療法（多剤併用療法：HAART）著効の HIV-1 感染症患者において末梢 CD4 陽性 T リンパ球中に残存するプロウイルスと mRNA を定量し、1 コピーあたりのプロウイルスの HIV-1 mRNA 転写能（活動指数）を算出する。その活動指数が極めて低値の患者において、HIV-1 ウイルスが治療中断後も増殖していないかどうか、さらに治療中断の妥当性について検討する。

長期にわたり HAART が著効し、HIV-RNA が感度以下と低値であり、且つ CD4 リンパ球数が 500 以上/ $\mu$ L を確保できている患者に対し、活動指数を測定する。活動指数（DNA/mRNA）が低値（例えば 2.0）の症例において HAART を患者同意のもと中断する。以後注意深く患者の HIV-1-RNA、CD4 リンパ球数を計測する。HIV-1 ウイルスの増加が認められれば速やかに HAART を再開する。また、薬剤耐性遺伝子についての検査も行う。

B. 研究対象と方法

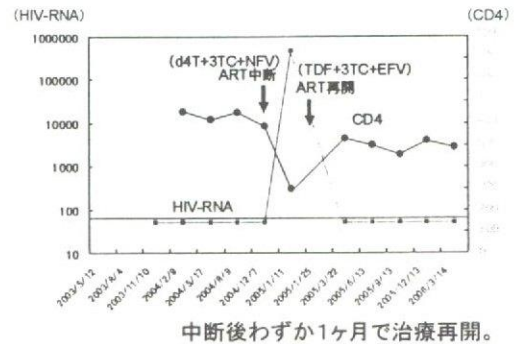
C. 研究結果

症例1. 31歳、男性。血友病Aと診断され、15歳時にHIV抗体陽性と判明。1990年よりAZT+ddcの治療を開始されていたが、2003年12月内服頻度が30%であることが判明したため、治療中断とした（薬剤耐性遺伝子変異は認めなかった）。その時点のHIV-RNA=感度以下、CD4=562/μL。しかし、その後も特にHIV-RNAの増加を認めていない。活動指数は3.5であった。



症例2. 38歳、女性。2000年6月子宮筋腫の術前検査にてHIV抗体陽性と判明。CD4=140/μLとなった時点で抗HIV療法開始(d4T+3TC+NFV)。その後CD4=500以上、HIV-RNA=感度以下が3年間持続したため、1日1回法への治療変更も考慮し、一旦2004年12月にHAARTを中断とした。しかし、1ヵ月後に頭痛など症状出現、HIV-RNA=4.6 x 10<sup>5</sup>copy/mLと急上昇、CD4=295/μLと低下した。直ちにTDF+3TC+EFVにて再導入し、現在再びCD4=500以上を継続している（活動指数29.6と高値であった）。

**症例2のART中断後経過**



#### D. 考察

2例治療中断を行った患者について検討した。1例は治療中断が成功し現在も抗HIV療法を行っておらず、経過は良好であるが、1例は治療中断後1ヶ月でウイルス量が上昇し、HAART再導入を行った。今後はこの活動指数を基準とし、前向き臨床研究のプロトコールを作成、臨床研究に入る予定である。

#### E. 結論

長期にわたりHAARTが著効し、HIV-RNAが感度以下と低値であり、且つCD4リンパ球数が500以上/μLを確保できている患者で、活動指数(DNA/mRNA)が低値であれば治療中断できる可能性があるとする唆された。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし。

##### 2. 実用新案登録

なし。

##### 3. その他



なし。

## G. 研究発表

### 原著論文による発表

#### 欧文

- 1) Gatanaga H, Ibe S, Matsuda M, Yoshida S, Asagi T, Kondo M, Sadamasu K, Tsukada H, Masakane A, Mori H, Takata N, Minami R, Tateyama M, Koike T, Itoh T, Imai M, Nagashima M, Gejyo F, Ueda M, Hamaguchi M, Kojima Y, Shirasaka T, Kimura A, Yamamoto M, Fujita J, Oka S, Sugiura W. Drug-resistant HIV-1 prevalence in patients newly diagnosed with HIV/AIDS in Japan. *Antiviral Res.*, in press.
- 2) Hattori J, Okumura N, Yamazaki Y, Uchiyama M, Hamaguchi M, Nishiyama Y, Kaneda T. Beneficial effect of GB virus C co-infection in human immunodeficiency virus type-1-infected individuals. *Microbiol. Immunol.* 51: 193-200, 2007.

#### 和文

- 1) 濱口元洋. エイズ・HIV 感染症患者の診療と今後の課題. *明日の臨床*.18: 1-7, 2006.
- 2) 濱口元洋. HIV 感染症治療の現況. *現代医学*.54: 115-122, 2006.

#### 学会発表

#### 国内

- 1) 濱口元洋. 免疫再構築症候群とその対応. 日本エイズ学会シンポジウム, 2006年、東京.
- 2) 横幕能行、奥村直哉、平野淳、高橋昌明、間宮均人、濱口元洋. ATV,FPV 併用療法が奏効した全クラス高度耐性 HIV-1 感染者の一例. 日本エイズ学会、2006年、東京.
- 3) 橋口桂子、山田由美子、野口明子、濱口元洋. 女性感染者の支援—産婦人科受診と看護支援について考える—. 日本エイズ学会、2006年、東京.
- 4) 野口明子、山田由美子、平野淳、横幕能行、間宮均人、濱口元洋. 高齢者独居患者への抗 HIV 療法導入後の支援と課題. 日本エイズ学会、2006年、東京.
- 5) 多和田行男、佐藤克彦、森下高行、藤崎誠一郎、伊部史朗、横幕能行、濱口元洋、内海眞、市川誠一. NLGR における無料 HIV 検査会 6 年間のまとめ. 日本エイズ学会、2006年、東京.
- 6) 野口志展、玉村好美、山田由美子、野口明子、林誠、奥村直哉、平野淳、菊池恵美子、濱口元洋、間宮均人、横幕能行. AIDS 発症者を対象とした抗 HIV 療法導入入院クリニカルパス導入の試み. 日本エイズ学会、2006年、東京.
- 7) 平野淳、奥村直哉、林誠、久高祐一、鈴木達男、横幕能行、安岡彰、間宮均人、濱口元洋. CMV 感染症におけるパンガンシクロピルの有用性についての検討. 日本エイズ学会、2006年、東京.

- 8) 藤野真之、瀧永博之、吉田繁、千葉仁志、伊藤俊広、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、大塚正義、渡辺香奈子、白坂琢磨、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、杉浦互。2003-2005年の新規 HIV-1 感染者における薬剤耐性頻度の動向。日本エイズ学会、2006年、東京。
- 9) 伊部史朗、藤崎誠一郎、重見麗、服部純子、横幕能行、間宮均人、濱口元洋、金田次弘。過去6年間の未治療 HIV-1 感染患者に見出された薬剤耐性ウイルスの検出率とウイルスの特徴。日本エイズ学会、2006年、東京。
- 10) 久高祐一、奥村直哉、平野淳、林誠、野口明子、山田由美子、高橋昌明、鈴木達男、横幕能行、間宮均人、濱口元洋、金田次弘。日本エイズ学会、2006年、東京。
- 11) 金田次弘、永井裕美、伊部史朗、加堂真由、近藤恭子、水野善文、濱口元洋、間宮均人、横幕能行、星野伸、村松友佳子、瀧本哲也、堀部敬三、井上孝実。日本エイズ学会、2006年、東京。



HIV-1 病気進行と細胞表面免疫複合体付着 CD4<sup>+</sup>T 細胞の割合の変化の基礎検討

分担研究者 鈴木康弘 東北大学大学院医学系研究科感染症・呼吸器病態学分野 講師

研究協力者 立川夏夫 国立国際医療センター・治療研究センター 医療情報室室長

研究要旨

近年、我々は HIV 感染者末梢血中 CD4<sup>+</sup>T 細胞の 70%近くが HIV 外表蛋白 gp120 及び抗 gp120 抗体からなる細胞表面免疫複合体(sIC)で覆われていることを明らかにし、この sIC<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞はマクロファージにより速やかに貪食され破壊されることを報告している。今回、その知見をふまえ、sIC<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞の割合が病気の進行とともにどのように変化するか、5 人の患者を選び、HAART 開始に至るまでの経過中に sIC<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞の割合がどのように変化するか検討した。その結果、sIC<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞の割合は病気の進行と共に増加傾向にあった。今後、病気の進行や、HAART 後の sIC<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞の割合が患者生体内の「プロウイルス量や activity index とどのような関係にあるか明らかにしていく予定である。

A. 研究目的

HIV の外殻上の突起は gp120 と gp41 により形成されている。HIV の標的細胞への侵入は、この突起 gp120 が標的細胞上の 2 種類の受容体、CD4 とケモカイン受容体に結合することで開始する。近年、我々は、ヒト末梢血静止 CD4<sup>+</sup>T 細胞上の CD4/ケモカイン受容体の動態がゆるやかで、このために HIV-細胞侵入過程で形成された gp120/ウイルス受容体複合体が細胞上に長時間 ( $t_{1/2}$  = 3-4days) 遺残することを報告した(特願 2005-333006)。gp120 に曝露された静止 CD4<sup>+</sup>T 細胞上には、HIV-1 感染者血清存在下で、血清中の抗 gp120 抗体が gp120/ウイルス受容体複合体に結合し、細胞表面免疫複合体(sIC)が形成された。実際に末梢血静止 CD4<sup>+</sup>T 細胞を調べると、我々が調べた全ての未治療 HIV-1 感染者で、CD4<sup>+</sup>T 細胞の 70%近くがこの gp120 及び抗 gp120 抗体からなる sIC に覆われていた。この sIC<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞の存在は、HIV 感染症に特徴的で、我々が検討した限りでは HIV 以外のいかなる感染症でも認められていない。さらに細胞培養系の実験では、これらの sIC<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞はマクロファージにより速やかに貪食破壊された。以上のことより sIC は HIV 感染者に認められる CD4<sup>+</sup>T 細胞減少の一因になっている可能性があると考えられた(以上全て特願

2005-333006 より)。

今回、その知見をふまえ、sIC<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞の割合が病気の進行とともにどのように変化するか、5 人の患者を選び、HAART 開始に至るまでの経過中に sIC<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞の割合がどのように変化するか検討した。

B. 材料・方法

国立国際医療センター、治療研究センターにインフォームドコンセントの上で同意を得た患者より分離され凍結保存されている PBMC を、抗体で染色後、CD4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>細胞にゲートをかけて静止 CD4<sup>+</sup>T 細胞でその表面に IgG 及び IgM が付着している細胞の割合を調べた。

C. 研究結果

病気の進行とともに、CD4<sup>+</sup>T細胞の減少が認められた 5 人の患者を選び、HAART 開始に至るまでの経過中に sIC<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞の割合がどのように変化するか検討した。症例は ACC のデータベースをもとに選択したが、CD4<sup>+</sup>T 細胞の減少が徐々に進行する症例は極めて限られており、300-400 例の症例中に 16 名ほどしか存在しなかった。このことは、一般的に教科書に記載されている“徐々に進行する CD4<sup>+</sup>T細胞の減少”という経過が少なくとも日本人においてはごくまれにしかおきず、ほとんどの症例では、極めて短期間(約半年で)突然 CD4<sup>+</sup>T細胞の減少が起きる