

事が明らかになった (data not shown)。

16名の症例から5人の患者を選び、sIC<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T細胞の割合がどのように変化するか調べ、その割合の変化をCD4、CD8、Viral Loadsとともに図1には示してある。一見して明らかなように、CD4が徐々に低下するのに対し、CD8細胞は様々な経過をたどる。このことは、HIV-1感染後の免疫反応、病気進行のメカニズム等は、一般に教科書に指し示されているほど単純でなく、複合系のoutputとしてCD4<sup>+</sup>T細胞の減少が起きている事が示唆された。

IgGクラスsIC<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T細胞の割合は常にIgMクラスsIC<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T細胞の割合よりも高かった。このことは血中における抗gp120抗体のIgG、IgMクラスの比率をあらわしていると考えられた。

特にIgGクラスsIC<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T細胞の割合は病気の進行と伴に増加傾向にあったが、症例の中には逆に低下傾向を示すものもあった(症例5)。今回示さなかったが、今回調べた全ての症例でCD4が200/μlを切った場合、IgG、IgMクラスsIC<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T細胞の割合は著しく低下した、このことは、sIC<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T細胞が抗gp120抗体を反映している別の意味での証明だと考えられ、血中の抗gp120抗体の低下がCD4が200/μl前後で起きる事を示唆していると考えられた。このことは、sIC<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T細胞の割合を測定していく事で、B細胞の抗HIV-1抗体産生能を明らかに出来ると考えられたが、血中抗体との関係については更なる検討が必要であると考えられる。

現時点で、IgGクラスsIC<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T細胞の割合がなぜ急激に低下していく症例があるのかは明らかでないが、このような症例では、急激な液性免疫低下が起きている可能性が考えられる。抗gp120抗体の産生量の簡便追跡にもsIC<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T細胞の割合の測定は役に立つと考えられる。この点についても血中抗体との関係について更なる検討が必要であると考えられる。

#### D. 考察

本年度の成果  
自己評価

今回の研究は、sICという視点からHIV病態(CD4<sup>+</sup>T細胞、減少および機能不全)、診断マーカーを捉えようとする研究である。sICの生成メカニズム、その診断マーカー等については、世界で初めて我々が明らかにしたもので

ある。この20年にわたる膨大な研究でもHIV-1感染者の生体内ではCD4<sup>+</sup>T細胞がsICに覆われているという驚くべき事実が見逃されてきた。そこで、この新しい事実に基づいた研究は、HIV-1の病態解明への新たな知見をもたらし、さらに新たな治療方法およびワクチン開発に有用な情報をもたらすことが期待される。

今後、班の一員として、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り、金田らが明らかにしてきた生体内のプロウイルス量とsIC<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T細胞との関係を明らかにしていく予定である。

#### F. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

特になし。

#### G. 研究発表

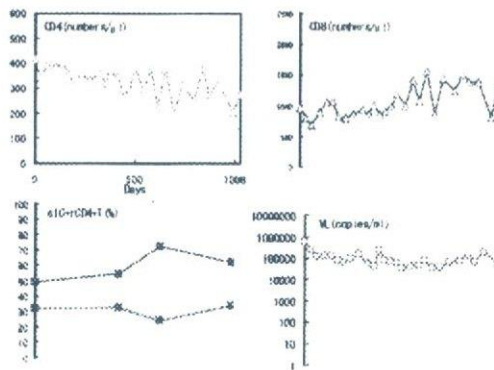
##### 論文発表

1. Gatanaga H, Das D, Suzuki Y, Yeh DD, Hussain KA, Ghosh AK, Mitsuya H. Altered HIV-1 Gag protein interactions with cyclophilin A(CypA) on the acquisition of H219Q and H219P substitutions in the CypA binding loop. *J. Biol. Chem.* 2006 281:1241-50.
2. Suzuki Y, Gatanaga, H., Tachikawa, N., Kimura, S., Oka, S. Retention of Ig-gp120 complex on resting T-cells due to slow turnover of viral receptor results in phagocytosis of patients' T-cells. *J. Exp. Med.*, in press
3. Bi, X., Suzuki Y, Kimura, S., Oka, S. High Percentage and Proliferation Rate of Effector Memory FOXP3-Positive Regulatory T Cells in Patients with Advanced HIV-1 Infection. *J. immunol.*, in press

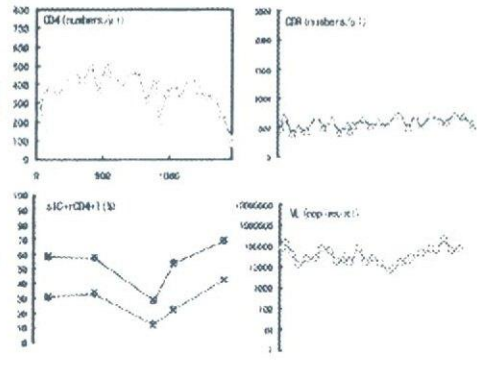
##### 学会報告等

1. Suzuki Y. Retention of Ig-gp120 complex on resting T-cells due to slow turnover of viral receptor results in phagocytosis of patients' T-cells. US-Japan Cooperative Medical Science Program 19<sup>th</sup> Joint Meeting of the AIDS Panels Kagoshima Dec. 6, 2006

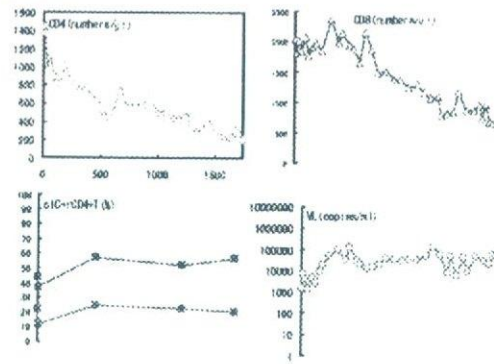
病例1



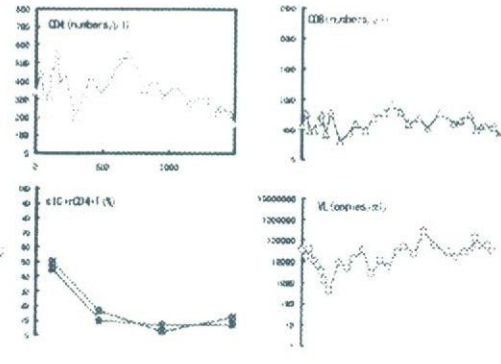
病例4



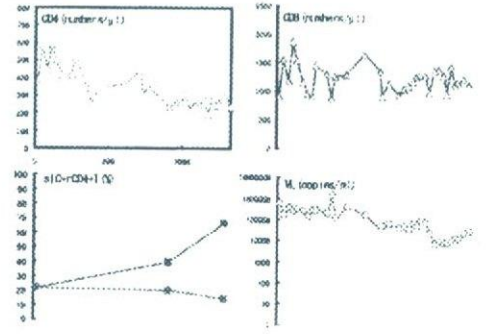
病例2



病例5



病例3



厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）  
分担研究報告書

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

分担研究者 白阪琢磨 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  
研究協力者 上平朝子 国立病院機構大阪医療センター 免疫感染症科医長

研究要旨

HIV 感染症の治療の進歩によって HIV 感染症は慢性疾患ととらえられる様になったが、副作用や薬剤耐性変異株の出現などといった抗 HIV 療法の課題が未だにある。HIV 感染細胞の半減期に関する研究から感染細胞は最長で約 60 年間は存続するとされ、生涯の服用が必要と考えられている。ただ、HIV 感染細胞の半減期に関する研究でも個体差があり、感染細胞の存続期間も一律でよいのかは十分な議論がされていないのが実状である。今回、我々は、金田班で開発された感染細胞の染色体に組み込まれたウイルス DNA と細胞質内のフリーの RNA の定量法を用いて測定する対象患者に付き検討を行った。次年度は、選定した対象患者を対象に測定を行う。なお、本研究に付き当院の倫理委員会に申請を行った。

A. 研究目的

HIV 感染症の治療の進歩によって HIV 感染症は慢性疾患ととらえられる様になったが、抗 HIV 薬の副作用や、薬剤耐性変異株の出現などの課題がある。先の HIV 感染細胞の半減期に関する研究から感染細胞は約 60 年間は存続するとされ、生涯の服用が必要と考えられている。HAART によって CD4 値が回復した患者群に HAART を継続あるいは休止で 2 群にわけ、それぞれの end point を比較した国際治験 (SMART study) の中間報告では、継続群が end point で有意に優れた結果が観察され、服薬は長期継続が必要と結論つけられた。ただ、前述の HIV 感染細胞の半減期に関する研究でも半減期には幅があり、感染細胞の存続期間も一律でよいのかは十分な議論がされていないのが実状である。今回、開発された感染細胞の染色体に組み込まれたウイルス DNA と細胞質内のフリーの RNA の定量法を用い、個々の病状と比較検討する事で治療期間の適正化についての新たな知見に繋がると期待される。本研究では対象患者に付き検討を行った。

B. 研究方法

独立行政法人国立病院機構大阪医療センター（以下、国立大阪医療センター）を受診した全患者の治療状況と現在の治療効果につき、カルテから情報を収集し検討した。いずれも個人情報取り扱いについては厳重に行った。

C. 研究結果

①患者数の推移

国立大阪医療センターを受診した累積患者数の推移を示した (図-1)。新規受診患者数は平成 15 年度に 130 名、平成 16 年度に 144 名、平成 17 年度は 181

名、平成 18 年度は 135 名 (12 月末日まで) であった。平成 18 年 12 月末日の累積患者数は 1010 名であった。

内訳では、男性 946 名 (93.7%)、女性 64 名 (6.3%)。年齢別では 30 代が最多の 461 名 (45.6%)、40 代が 233 名 (23.1%)、20 代が 156 名 (15.4%) であり、これらの年齢層が全体の 84.1% を占めた。初診時年齢別では 30 歳台が 401 名 (39.7%)、20 歳台が 308 名 (30.5%) で 7 割を占めていた。問診からの感染経路では性的接触が 876 名 (86.7%) であった。中には薬物使用例があった。感染経路が性的接触の場合は、同性間が 69.2%、異性間が 17.5% であった。

②患者の初診時居住地域、紹介元施設等の内訳

初診時の居住地域は大阪府が 708 名 (70.1%) (この内で大阪市内が 431 名)、近畿ブロックの他府県からが 257 名 (25.7%)、他のブロック等からが 45 名 (4.5%) であった。紹介元別では保健所等からが 149 名、拠点病院からが 240 名、診療所および病院からが 434 名、他ブロックや ACC からが 46 名などであった。

③抗 HIV 薬剤の使用状況

平成 9 年に HAART が登場して以来、新薬が毎年の様に登場し、国立大阪医療センターでも使用薬剤と組み合わせは年々変化してきた。抗 HIV 薬を同センターで処方された人数は平成 10 年は 69 人、平成 11 年 109 人、平成 12 年 130 人、平成 13 年 171 人、平成 14 年 208 人、平成 15 年 248 人、平成 16 年 288 人であった。年次組み合わせ数は、それぞれ、21 通り、35 通り、38 通り、45 通り、52 通り、48 通り、46 通りであった。平成 17 年、平成 18 年の処方数は 379 人、479 人であり。初回療法はそれぞれ 73 人、95 人で実施された。平成 17 年に引き続き平成 18 年の組み合わせの上位には 1 日 1 回処方

の組み合わせが増加した (図-3)。

#### ④長期治療効果

平成 9 年度からの受診患者の中で平成 17 年度末までに当院で初回療法を開始し平成 18 年末に当院で治療継続している 325 名につき現時点でのウイルス量を検討した (図-4)。平成 9 年度、平成 10 年度、平成 11 年度、平成 12 年度、平成 13 年度、平成 14 年度、平成 15 年度、平成 16 年度、平成 17 年度に初回療法開始患者数は 22 名、19 名、23 名、22 名、31 名、34 名、44 名、61 名、69 名であり、平成 18 年の直近の血中ウイルス量が検出限界域である者が、20 名、17 名、22 名、20 名、29 名、34 名、42 名、59 名、69 名であった。5 年以上の継続者が 108 名であった。次年度は対象患者に付き測定を実施する。

#### D. 考察

今年度は治療状況の調査を実施した。次年度に測定の予定である。

#### E. 結論

平成 9 年度からの受診患者の中で平成 17 年度末までに当院で初回療法を開始し平成 18 年末に当院で治療継続している 325 名につき現時点でのウイルス量を検討した。平成 18 年の直近の血中ウイルス量が検出限界域である者が 312 名 (96%) であった。5 年以上の継続者が 108 名であった。次年度は対象患者に付き測定を実施する予定である。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Fujisaki S, Fujisaki S, Ibe S, Asagi T, Ito T,

Yoshida S, Koike T, Oie M, Kondo M, Sadamasu K, Nagashima M, Gatanaga H, Matsuda M, Ueda M, Masakane A, Hata M, Mizogami Y, Mori H, Minami R, Okada K, Watanabe K, Shirasaka T, Oka S, Sugiura W, Kaneda T.

Performance and Quality Assurance of Genotypic Drug-Resistance Testing for Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Japan. Japanese Journal of Infectious Diseases, in press.

2) 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.

##### 3) 白阪琢磨

増え続ける HIV 感染症とその対策  
公衆衛生, 70, 101-105, 2006.

##### 4) 川崎美由紀、橋本修二、古金秀樹、下司有加、織田幸子、白阪琢磨

近畿ブロック拠点病院における HIV/AIDS 受療者の居住地、紹介元と転院先、  
日本エイズ学会誌, 8 (1), 34-40, 2006.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

図-1 累積患者数の推移

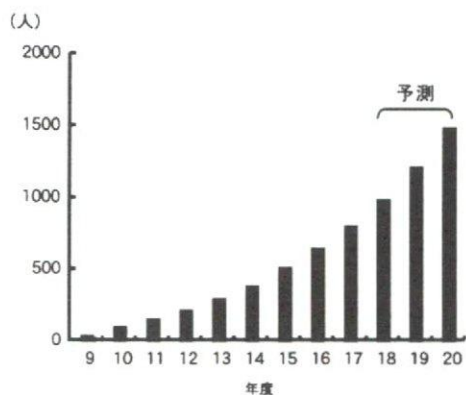


図-2 外来患者の内訳

(平成18年11月末日現在、1000名)

性別	人数 (%)	年齢別	人数 (%)
男性	936(93.6)	10代	4 (0.4)
女性	64 (6.4)	20代	153 (15.3)
		30代	457 (45.7)
		40代	231 (23.1)
		50代	104 (10.4)
		60代~	51 (5.1)

感染経路別	人数 (%)	初診時年齢別	人数 (%)
血液製剤	77 (7.7)	0-19	19 (1.9)
その他	923 (92.3)	20-29	305 (30.5)
		30-39	397 (39.7)
		40-49	173 (17.3)
		50-59	77 (7.7)
		60~	29 (2.9)

図-3 年度別処方組み合わせ上位の推移

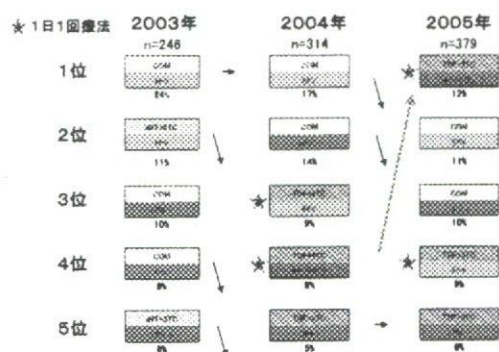
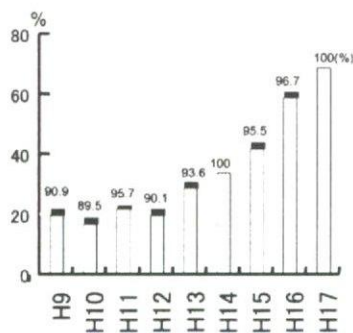


図-4 年次別初回療法導入患者数と治療状況



厚生労働科学研究費補助金(エイズ対策研究事業)  
分担研究報告書

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：測定対象症例の抽出

分担研究者 南 留美、国立病院機構九州医療センター 医師

研究要旨

本研究は、HAART 著効患者の HIV-1 残存プロウイルス量(HIV-DNA)とその転写活性から患者の HIV 感染病態を把握し、これらのパラメーターが治療中断のエビデンスとして利用できるかを検討することを目的とする。当院にて検討の結果、HIV-DNA はウイルス学的予後(血清中 HIV-RNA、HAART 開始後 HIV-RNA<50 コピー/ml になるまでの期間、HAART 施行中に再度 HIV-RNA>50 コピー/ml になるかどうか)、および免疫学的予後(CD4 陽性 T 細胞数 <250/ $\mu$ l)と関連があった。今後、転写活性とともに検討し、末梢 CD4 陽性 T リンパ球中の HIV-DNA および活動指数が治療中断の指標となるかどうかを検討する予定である。なお、当院での測定対象は、「HIV-RNA<50 コピー/ml 持続期間が 6 年以上」の症例を対象とすると 18 名であった。

A. 研究目的

多剤併用療法(HAART)により HIV-1 感染者の予後は大きく改善されたが、現在のところ「HAART は一生継続」がコンセンサスになっている。抗 HIV 薬を一生にわたり服用することは、患者および、社会の負担が大きい。この視点からも、治療経過が良好な患者で HAART 中断を判定できるエビデンスの開発と実用化が待たれている。本研究は、HAART 著効患者の HIV-1 残存リザーサイズとその転写活性から患者の HIV 感染病態を把握し、これらのパラメーターが治療中断のエビデンスとして利用できるかを検討することを目的とする。

B. 研究方法

免疫感染症科を受診中の HIV-1 感染者のうち血中 HIV-1 RNA 量が検出限度(50copies/ml)以下が持続している患者を対象に、informed consent のもとに採血を行い、HIV-1 プロウイルス(HIV-DNA)と HIV-1 mRNA の定量および塩基配列の決定を行う。測定は名古屋医療センターにて行うため検体をクール便にて名古屋医療センターに送付する。なお、この研究は、当院倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

1. 「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」測定対象症例の抽出

本研究班の今年度の目標は、「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」測定症例の抽出であったため、当院にて HAART 施行中の患者 78 名(血友病 15 名、性感染 63 名)について検討を行った。HIV-RNA<50 コピー/ml が持続している期間が 9-10 年 4 名、8-9 年 3 名、7-8 年 6 名、6-7 年 5 名、5-6 年 7 名、5 年以下 50 名、不明 3 名であった。当院での末梢血球中の HIV-DNA 測定において HIV-RNA<50 コピー/ml 持続期間が 6 年以上の群は 6 年未満の群に比較して HIV-DNA 量が有意に低値であった。

2. 治療中断症例の解析

当院での HAART 中断例 3 例にて治療中断中の HIV-DNA を測定した。HAART 中断後、CD4 陽性 T 細胞数の低下、HIV 腎症のため早期に HAART 再開となった症例では HIV-DNA が高値(94727 コピー/ $10^6$  cells)であったが、現在も中断のまま安定した CD4 陽性 T 細胞数を保っている症例では HIV-DNA は低値(458 コピー/ $10^6$  cells)であった。

3. HIV-DNA 測定の臨床的意義の検討

当院通院中のサブタイプ B の HIV-1 感染患者にて末梢血球中の HIV-DNA を測定した。未治療患者において HIV-DNA(log) は血清中の HIV-RNA(log) と正の相関を示した。CD4 陽性 T 細胞数低値

(<250/ $\mu$ l) 群はそれ以外の群に比較して有意に HIV-DNA(log) が高値を示した。また HAART 開始後、末梢血中の HIV-RNA が<50 コピー/ml になるまでの期間と HAART 開始前の HIV-DNA(log) は逆相関を示した。HAART 施行中の患者においても治療前の HIV-RNA(log) は、現在の HIV-DNA(log) に弱い正の相関を示した。また HAART 開始後、一旦末梢血中の HIV-RNA が<50 コピー/ml になったのち、再度>50 コピー/ml になったことがある群 (blip を含む) は無い群に比較して有意に HIV-DNA(log) が高値であった。

#### D. 考察

当院での検討の結果、HIV-DNA はウイルス学的予後(血清中 HIV-RNA、HAART 開始後 HIV-RNA<50 コピー/ml になるまでの期間、HAART 試行中に再度 HIV-RNA>50 コピー/ml になるかどうか)、および免疫学的予後(CD4 陽性 T 細胞数 <250/ $\mu$ l) と関連があった。また治療中断例での検討においては、成功例では HIV-DNA は低値であった。これらのことより末梢 CD4 陽性 T リンパ球中の HIV-DNA は治療中断の指標となる可能性がある。なお今回の測定はサブタイプ B の HIV-1 感染者のみでの検討である。来年度はサブタイプ B 以外の HIV-DNA も測定可能なプライマーを用いて症例数を増やし検討していく予定である。

当院での末梢血球中の HIV-DNA 測定において HIV-RNA<50 コピー/ml 持続期間が 6 年以上の群は 6 年未満の群に比較して HIV-DNA 量が有意に低値であったため、来年度は HIV-RNA<50 コピー/ml 持続期間が 6 年以上の症例に対してインフォームド Consent を行い、名古屋医療センターにて「末梢 CD4 陽性 T リンパ球中の HIV-DNA 量とその活動指数」を測定していただく予定である。なお、活動性指数を以前、名古屋医療センターにて測定していただいたが、同一症例でも変動が大きかったため活動性指数に影響を与える因子(日内変動?、他の感染症?、性周期?)についての検討が必要である。

#### E. 結論

当院での「末梢 CD4 陽性 T リンパ球中の残存ブロウイルス量とその活動指数」測定対象は、「HIV-RNA<50 コピー/ml 持続期間が 6 年以上」の症例を対象とすると 18 名であった。

末梢 CD4 陽性 T リンパ球中の HIV-DNA は治療中断の指標となる可能性がある。

#### F. 健康危険情報

特記事項なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Rumi Minami, Masahiro Yamamoto. Elevated serum levels of RCAS 1 are associated with poor recovery of CD4+T cell count after ART in HIV-1-infected patients. *Journal of AIDS Research* 8:25-27, 2006
- 2) Rumi Minami, Masahiro Yamamoto, Soichiro Takahama, Tomoya Miyamura, Hideyuki Watanabe, Eiichi Suematsu. RCAS1 induced by HIV-Tat is involved in the apoptosis of HIV-1 infected and uninfected CD4+ T cells. *Cellular Immunology* (in press)
- 3) Fujisaki S, Fujisaki S, Ibe S, Asagi T, Ito T, Yoshida S, Koike T, Oie M, Kondo M, Sadamasu K, Nagashima M, Gatanaga H, Matsuda M, Ueda M, Masakane A, Hata M, Mizogami Y, Mori H, Minami R, Okada K, Watanabe K, Shirasaka T, Oka S, Sugiura W and Kaneda T. Performance and Quality Assurance of Genotypic Drug-Resistance Testing for Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases* (in press)
- 4) 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)

- 5) 南 留美、山本 政弘 高熱、リンパ節腫脹を繰り返したのち発症した HIV-1 陽性 HHV-8 関連 Castleman 病の 1 例 感染症学雑誌 80(4): 423-427, 2006

## 2. 学会発表

- 1) HIV-Tat protein increased the expression of apoptosis-associated protein RCAS1 in CD4 + cells and monocytes. Rumi Minami, Masahiro

Yamamoto. XVI International AIDS Conference in Toronto, Canada, 13-18 August 2006. (誌上発表)

- 2) HIV-1 感染症における HHV-8 DNA 測定 of 臨床的意義の検討 南 留美、高濱 宗一郎、山本 政弘 第 20 回日本エイズ学会総会 2006 年 11 月 30 日-12 月 2 日 東京

## 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



厚生労働科学研究費補助金(エイズ対策研究事業)  
分担研究報告書

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：測定対象症例の抽出

分担研究者 伊藤 俊広 仙台医療センター血液内科医長  
研究協力者 浅黄 司 宮城病院臨床検査科主任

### 研究要旨

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指標となりうるかを明らかにする研究を遂行するにあたり、対象患者の選定を目的に当施設の HIV 感染患者について臨床的背景について検討した。当院を受診した患者 146 名のうち、HAART 中断例は 4 例で中断理由として診療費によるものが 1 例、副作用によるものが 3 例であった。4 例すべてで、測定限界以下まで抑制されていた VL は中断後上昇、CD4 の減少が観察された。HAART により良好にコントロールされている (VL < 50 コピー/ml) 患者は 46 例おり、CD4 数を加味すると本研究の対象となりうる症例数は 20 数例程度になるものと考えられた。HAART 中断による患者のメリットは大きい、指標がないため、積極的な HAART 中断は難しい。本研究は最終的には対象例に対するインフォームドコンセントを得た上での臨床治験となるので、そこにいたるまでの基礎的検討を充分に行う必要がある。

#### A. 研究目的

1990年代後半から始まった核酸系逆転写酵素阻害剤 (NRTI) とプロテアーゼ阻害剤 (PI) もしくは非核酸系逆転写酵素阻害剤 (NNRTI) を組み合わせた HIV に対する多剤併用療法 (HAART) は非常に有用であり、HIV 感染症は確実に予後が改善し、慢性疾患としてとらえられるようになった。HAART により HIV の増殖をほぼ完全に抑え続けても、生体内から HIV を駆逐するためには数十年かかるといわれており治癒に導くには HAART を一生涯継続する必要性が強調されている。HAART の長期服用による弊害として代謝性副作用や服用疲れによるアドヒアランスの低下、それに由来する耐性ウイルスの出現などが問題になっており、もし薬剤中断についての安全性を示す証拠が得られれば、服用中止による感染者

の負担 (精神的、肉体的、社会的) の軽減に大いに寄与するに違いない。

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。平成 18 年度は本研究の対象となりうる患者の選定を目的に当施設 (仙台医療センター) の HIV 感染患者の現状を調査し、選定条件について検討した。

#### B. 研究方法

研究対象：HAART により血漿 HIV ウイルス量 (VL) が測定限界以下に抑制され、かつ CD4 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、様々な経緯で治療中断を行な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。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・精製する。RNA はトリゾールにて抽出する。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)で表現する。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。施設倫理委員会に研究計画書を提出し、審査・承認を得た上で研究を開始する。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施設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。

### C. 研究結果

立ち上げの年である平成 18 年度は研究開始にあたっての対象患者のしほりこみに関しておもに検討した。すなわち、1) HAART 中断例の背景と中断前後における CD4、VL その他検査結果の動き、2) 本研究対象患者になりうると思われる症例の背景についてである。

1) 平成 18 年 11 月末日までの間で HIV/AIDS 感染者の累計は 146 名であり、全国傾向と同様に新規の受診者は年々増加している。当然のことながら、現時点で積極的に HAART を中断した症例は存在しておらず、何らかの理由により中断せざるを得ない症例が 4 例認められた。症例 1 : 36 歳男性、homosexual。HAART 開始時の CD4 は 476/ $\mu$ l、VL は 2.5x10<sup>4</sup> コピー/ml で 7 年間治療後医療費の問題で中断、現在も服薬していない。中断時、VL < 50 コピー/ml、CD4 は 906/ $\mu$ l。CD4 は漸減しつつある。症例 2 : 64 歳男性、homosexual。HAART 開始時の CD4 は 9/ $\mu$ l、VL は >10<sup>6</sup> コピー/ml で 14 ヶ月治療後副作用で 7 週間中断。中断時 VL < 50 コピー/ml、CD4 は 212/ $\mu$ l。HAART 再開時 CD4 は 63/ $\mu$ l、VL > 10<sup>4</sup> コピー/ml。症例 3 : 60 歳男性、heterosexual。HAART 開始時の CD4 は 159/ $\mu$ l、VL は 8.9x10<sup>4</sup> コピー/ml で 3 年 8 ヶ月治療後副作用で中断。中断時 VL < 50 コピー/ml、CD4 は 294/ $\mu$ l。4 週以上中断し、VL 上昇、CD4 は漸減。症例 4 : 58 歳男性、homosexual。HAART 開始時の CD4 は 1.4/ $\mu$ l、VL は >10<sup>6</sup> コピー/ml で 15 ヶ月治療後副作用で 3 ヶ月中断。中断時 VL < 50 コピー/ml、

CD4 は  $210/\mu\text{l}$ 。HAART 再開時 CD4 は  $105/\mu\text{l}$ 、VL  $>10^6$  コピー/ml。

2) VL  $<50$  コピー/ml を HAART 療法の奏功条件とした場合、CD4 絶対数により対象患者がどの程度の人数になるか絞込みについて検討した。VL  $<50$  コピー/ml の患者は 46 例（男性 42 例、女性 4 例）で血液製剤による感染者は 9 例、同性間性的接触感染は 23 例、異性間 13 例、不明 1 例であった。診断時無症候性キャリアーは 33 例、AIDS 13 例。治療後 CD4  $>400/\mu\text{l}$  の症例は 23 例、 $300\sim 400/\mu\text{l}$  は 8 例、 $200\sim 300/\mu\text{l}$  は 11 例であった。血液製剤による感染者は HIV ウイルス量が測定限界以下になってからの治療期間が長く、CD4 陽性 T 細胞数は概して高いが、初診時すでに治療歴があり耐性ウイルスをもつものが多いことや、ウイルス量測定限界以下以後の期間が長いほど CD4 陽性細胞の回復が期待されるので研究対象例の選択には CD4 細胞数だけでなく、VL 抑制期間も考慮する必要があると思われた。

#### D. 考察

現在 HIV 感染症の治療コンセンサスは HAART 開始後はアドヒアランスを保持し、中断せず服用し続けることとなっている。しかし、数ある臨床例の中には、非常に良好にコントロールされ中断可能ではないかと思わせる症例や、何らかの理由で治療中止後も VL の著明な増加をきたさず CD4 の低下もきたさないものが存在しているのは確かであり、もし HAART 中断が可能であれば患者の受けるメリットは非常に大きい。しかしなが

ら、現在治療中断にあたっての指標はないため、積極的な HAART 中断は困難である。HIV プロウイルスの活動指数が中断の指標となりうるかどうかの検討は最終的には対象例に対するインフォームドコンセントを得た上での臨床治験となるので、そこにいたるまでの基礎的検討を充分に行う必要がある。

#### E. 結論

我々の施設における患者の検討でも HAART 中断の可能性を有する症例は 20 数例存在していると考えられ、今後 HIV プロウイルス活動指数を積極的に測定していく予定である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 6) Fujisaki S, Fujisaki S, Ibe S, Asagi T, Itoh T, Yoshida S, Koike T, Oie M, Kondo M, Sadamasu K, Nagashima M, Gatanaga H, Matsuda M, Ueda M, Masakane A, Hata M, Mizogami Y, Mori H, Minami R, Okada K, Watanabe K, Shirasaka T, Oka S, Sugiura W, Kaneda T., Performance and Quality Assurance of Genotypic Drug-Resistance Testing for Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Japan., Japanese Journal of Infectious Diseases, in press.
- 7) 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. 学会発表

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

厚生労働科学研究費補助金 (エイズ対策研究事業)  
分担研究報告書

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

研究協力者 和山行正 北里大塚バイオメディカルアッセイ研究所 ウイルス感染症解析  
センター 検査部長・センター長  
研究協力者 岡田清美 北里大塚バイオメディカルアッセイ研究所 検査部 感染特殊検査  
室 課長  
研究協力者 魚住利樹 北里大塚バイオメディカルアッセイ研究所 ウイルス感染症解析  
センター 研究員

研究要旨

HIV-1 mRNA及びプロウイルスDNAの測定系をより簡便で再現性の高い臨床検査方法とすることを目的として本検討を行った。mRNA抽出方法として原法である金田らの方法、polyAT-tract法、MagNA法の3法に関して比較検討した。各種方法を検討した結果、MagNA法で溶出時にDNase処理する方法がDNAの混入もなくmRNAの検出感度も最も良い結果であり、抽出から検出までの時間もより短時間で行えることがわかった。また、RNAスタンダードの作製及び保存方法の検討を行い、保存液として*E.coli* RNA及び*E.coli* RNAにRNase inhibitor 1  $\mu$ l/30  $\mu$ l濃度で加える方法が最も良いことがわかった。この方法でRNAスタンダードは、13週間4℃で安定であった。HIV-1プロウイルスDNA Real-time PCR法をone step で実施する方法を検討した。HIV-1プロウイルスDNAの最小検出感度は5 copies/tubeでC.V.も1.7%と非常に良好であった。本検討により、作業時間の短縮、アッセイ工程も省力、簡便化することが出来た。また、最小検出感度は良いもののプロウイルスDNAと $\beta$  2 M測定系において増幅効率の差が約7%あることからこの差をなくす検討をしたいと考える。

A. 研究目的

HIV-1 mRNA 及びプロウイルス DNA の測定系をより簡便で再現性の高い臨床検査方法とすることを目的として本検討を行った。HIV-1 mRNA の測定は、より簡便な抽出方法の検討と逆転写効率をみるためにRNA スタンダードを使用することを検討した。プロウイルス DNA の測定は、特異性、簡便性、再現性に関して検討した。

B. 研究方法

1. mRNA 抽出方法の検討

mRNA 抽出方法として原法である金田らの方法、polyAT-tract 法、MagNA 法の3法に関して比較検討した。更に、MagNA法に関しては、キット能書に準拠した方法、溶出後 DNase 処理する方法、溶出時にDNase 処理する方法の3法を比較検討し

た。感染細胞として MOLT4, ACH2, MOLT4-III B 細胞をビュルケルチュルク血球計算盤にて細胞数を  $1 \times 10^0 \sim 1 \times 10^5$  cells/ml に pH7.2 PBS にて調整して用いた。

## 2. RNA スタンダードの作製及び保存方法の検討

RNA スタンダードの作製は、HIV-1 gag gene を pCR-TOPO2.1 に挿入し、プラスミドを制限酵素により消化及びリニアー化を行った。そして、T7RNA ポリメラーゼにより転写を行い、RNA 精製キットにより精製した。肺炎球菌及び HIV-1 RNA スタンダードを作製し、各種保存液を用いて RNA スタンダードの保存方法を検討した。

## 3. プロウイルス DNA Real-time PCR 法の検討

プロウイルス DNA Real-time PCR 法として原法である金田らの方法と one step による Real-time PCR 法を検討した。

## C. 研究結果

### 1. mRNA 抽出方法の検討

各種方法を検討した結果、MagNA 法で溶出時に DNase 処理する方法が DNA の混入もなく mRNA の検出感度も最も良い結果であり、抽出から検出までの時間もより短時間で出来ることがわかった。

### 2. RNA スタンダードの作製及び保存方法の検討

肺炎球菌 RNA スタンダードの保存条件の検討で、保存液として *E.coli* RNA 及び *E.coli* RNA に RNase inhibitor  $1 \mu\text{l}/30 \mu\text{l}$  濃度で加える方法が最も良いことがわかった。この方法でスタンダードは、13 週間  $4^\circ\text{C}$  で安定であった。同様な方法で HIV-1 RNA スタンダードの保存安定性も確認し

た。

### 3. プロウイルス DNA Real-time PCR 法の検討

One step で実施する Real-time PCR 法を検討した。HIV-1 プロウイルス DNA の最小検出感度は 5 copies/tube で C.V. も 1.7% と非常に良好であった。同時に測定する  $\beta$  2 M の最小検出感度も 5 copies/tube で C.V. も 1.7% と非常に良好であった。また、ホモロジーサーチの結果も他のウイルス、細菌との交差反応性は認められなかった。

## D. 考察

本検討により、mRNA 検出のアッセイ時間を 4.5 時間から 3.25 時間に短縮することができた。また、アッセイ工程も省力化することが出来たことで、より簡便なアッセイ系を構築することができ、本検査法をルーチン化するうえで有用であると考えられる。また、RNA スタンダードを使用することで逆転写の効率を加味した測定が出来るようになったことも有用であると考えられる。しかしながら、プロウイルス DNA Real-time PCR 法において、最小検出感度は良いもののプロウイルス DNA と  $\beta$  2 M 測定系において増幅効率の差が約 7% あることからこの差をなくすことは重要なことと考える。今後、この点を解消する方法を検討する必要があると考える。

## E. 結論

本法により、今後の HIV-1 研究により有用なデータを提供できるものと考えられる。

## F. 健康危険情報

特記事項無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fujisaki S, Fujisaki S, Ibe S, Asagi T, Ito T, Yoshida S, Koike T, Oie M, Kondo M, Sadamasu K, Nagashima M, Gatanaga H, Matsuda M, Ueda M, Masakane A, Hata M, Mizogami Y, Mori H, Minami R, Okada K, Watanabe K, Shirasaka T, Oka S, Sugiura W, Kaneda

T.

Performance and Quality Assurance of Genotypic Drug-Resistance Testing for Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Japan.

Japanese Journal of Infectious Diseases, in press.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記事項無し

プロウイルス活動指数の測定法に関する検討

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  
研究協力者 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  
研究協力者 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**

現在、全長 HIV-1 mRNA 量の定量は、相補的 DNA (cDNA)の定量で代替しているが、文字通り、全長 HIV-1 mRNA 量の定量を行うためには、標準 RNA 物質を作成し、逆転写効率を加味した測定を行う必要がある。本年度は、標準 RNA 物質の作成とその保存法について検討を行った。検討の結果、全長 HIV-1 mRNA の標準物質を作成することはできなかったものの、約 1 kb の標準 HIV-1 gag RNA と標準 human  $\beta$ 2M RNA の作成に成功した。作成した標準 RNA 物質を一回使用分ずつ分注して $-80^{\circ}\text{C}$ で冷凍保存することにより、検討した5ヶ月間にわたって安定して使用できることが分かった。今後、CD4 陽性 T リンパ球から mRNA を精製し、今回作成した標準 RNA 物質を用いて測定を行うことにより、文字通り、全長 HIV-1 mRNA を定量することが可能となる。全長 HIV-1 mRNA 定量法の完成を目指し、引き続き検討を行う予定である。

**A. 研究目的**

プロウイルスの活動指数は、CD4 陽性 T リンパ球中の HIV-1 DNA 量と全長 HIV-1 mRNA 量をそれぞれ測定し、1 コピーの HIV-1 DNA あたりの全長 HIV-1 mRNA 量を算出することにより求めている。現在、全長 HIV-1 mRNA 量の定量は、相補的 DNA (cDNA)の定量で代替している。文字通り、全長 HIV-1 mRNA 量の定量を行うためには、標準 RNA 物質を作成し、逆転写効率を加味した測定を行う必要がある。本年度は、標準 RNA 物質の作成とその保存法について検討を行った。

**B. 研究方法**

1. 全長 HIV-1 mRNA 合成の検討

pT7blue2 ベクターの T7 プロモーター下流に HXB2 の全長 HIV-1 RNA をコードした DNA 断片 (9,181 塩基対) を組み込み、3' 末端に polyA が 0, 30, または 60 個付加される 3 種類のプラスミドを作成した。プラスミドを Xba I で処理して直線化した後、MEGAscript (Ambion)を用いて *in vitro* 転写を行った。反応産物を変性アガロース電気泳動で分離した後、エチジルプロマイド染色により検出した。

2. HIV-1 gag RNA、 $\beta$ 2M RNA 合成の検討

pT7blue2 ベクターの T7 プロモーター下流に、HIV-1 gag RNA をコードした DNA 断片 (990 塩基対) を組み込んだプラスミド



を作成した。また、pGEM ベクターの T7 プロモーター下流に、human  $\beta$ 2M RNA をコードした DNA 断片 (1,105 塩基対) を組込んだプラスミドを作成した。プラスミドを制限酵素(Apa I, Xho I, Sca I)を用いて直線化した後、MEGAscript (Ambion)を用いて *in vitro* 転写を行った。反応産物を変性アガロース電気泳動で分離した後、エチジウムブロマイド染色により検出した。

### 3. 標準 RNA 物質の作成と保存

*In vitro* 転写反応液に DNase を添加し、鋳型 DNA を分解した後、MEGAclean (Ambion) を用いて RNA を精製した。260nm の吸光度値からコピー数を決定し、一回使用分ずつ分注して $-80^{\circ}\text{C}$ で冷凍保存した。

## C. 研究結果

### 1. 全長 HIV-1 mRNA 合成の検討

全長 HIV-1 mRNA が合成されれば、9 kb 近傍にバンドが認められるはずであったが、そのようなバンドは認められず、2 kb 付近にスミアバンドが観察されたのみであった (図 1A)。

### 2. HIV-1 gag RNA、 $\beta$ 2M RNA 合成の検討

次に、約 1 kb の標準 HIV-1 gag RNA と標準 $\beta$ 2M RNA の作成を試みた。HIV-1 gag RNA の *in vitro* 転写反応の結果、反応時間と共に増強する約 1 kb の特異的バンドを認めた(図 1B)。また、 $\beta$ 2M RNA の *in vitro* 転写反応の結果でも、反応時間と共に増強する約 1 kb の特異的バンドを認めた(図 1C)。次に、これら *in vitro* 転写反応液からの標準 RNA 物質を作成した。

### 3. 標準 RNA 物質の作成と保存

精製した HIV-1 gag RNA 溶液、 $\beta$ 2M

RNA 溶液の 260nm の吸光度値からそれぞれコピー数を決定し、一回使用分ずつ分注して $-80^{\circ}\text{C}$ で冷凍保存した。この冷凍保存条件下での標準 RNA 物質の安定性を評価するために、経時的に検量線を作成した結果、検討した 5 ヶ月間にわたって安定した検量線が得られた。このことから、本条件にて少なくとも 5 ヶ月間、標準 RNA 物質を安定に保存できることが分かった (図 2)。

## D. 考察

まず、*in vitro* 転写による全長 HIV-1 mRNA の合成を試みたが、予想される約 9 kb の転写産物を得ることができなかった。文献的に、全長 HIV-1 mRNA の合成に成功している技術を検索したが、そのような文献は見つけられていない。そこで次に、約 1 kb の HIV-1 gag RNA と $\beta$ 2M RNA の合成を試みた。その結果、両 RNA の合成に成功した。*In vitro* 反応液から RNA を精製後、標準 RNA 物質として一回使用分ずつ $-80^{\circ}\text{C}$ で冷凍保存した。この保存条件下での標準 RNA 物質の安定性を検討した結果、5 ヶ月間にわたって安定に使用できることが分かった。

## E. 結論

本年度の検討により、全長 HIV-1 mRNA の標準物質を作成することはできなかったものの、約 1 kb の標準 HIV-1 gag RNA と標準 $\beta$ 2M RNA の作成に成功した。今後、CD4 陽性 T リンパ球から mRNA を精製し、今回作成した標準 RNA 物質を用いて測定を行うことにより、文字通り、全長 HIV-1 mRNA を定量することが可能となる。全長 HIV-1 mRNA 定量法の完成を目指し、引き

続き検討を行う予定である。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Fujisaki S, Fujisaki S, Ibe S, Asagi T, Ito T, Yoshida S, Koike T, Oie M, Kondo M, Sadamasu K, Nagashima M, Gatanaga H, Matsuda M, Ueda M, Masakane A, Hata M, Mizogami Y, Mori H, Minami R, Okada K, Watanabe K, Shirasaka T, Oka S, Sugiura W, Kaneda T.  
Performance and Quality Assurance of Genotypic Drug-Resistance Testing for Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Japan.  
Japanese Journal of Infectious Diseases, in press.
- 2) 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 Research, in press.
- 3) Ibe S, Fujisaki S, Fujisaki S, Morishita T, Kaneda T.

Quantitative SNP-Detection Method for Estimating HIV-1 Replicative Fitness: Application to Protease Inhibitor-Resistant Viruses.

Microbiology and Immunology, 50 (10), 765-772, 2006.

### 2. 学会発表

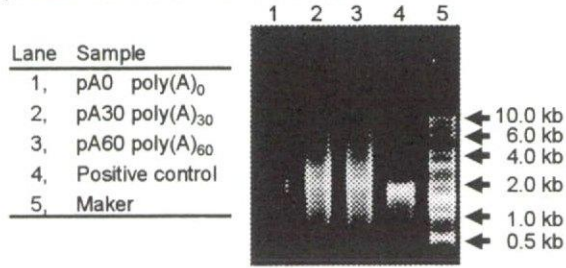
- 1) Clinical and molecular studies of HIV-infected patients in Nagoya, Japan.  
T. Kaneda, S. Ibe, H. Nagai, J. Hattori, S. Fujisaki, S. Fujisaki, M. Kado, K. Kondo, N. Mamiya, and M. Hamaguchi  
2nd German Japanese HIV Symposium, Bochum Germany, Nov., 2006.
- 2) Characterization of protease inhibitor-resistant HIV-1 in therapy-naïve individuals.  
S. Ibe, U. Shigemi, S. Fujisaki, S. Fujisaki, J. Hattori, N. Mamiya, M. Hamaguchi, T. Kaneda.  
XVI International AIDS Conference, Toronto Canada, Aug., 2006
- 3) HIV-1のプロウイルスと mRNA 定量の臨床応用  
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  
第20回日本エイズ学会総会（平成18年11月-2006）。

## H. 知的財産権の出願・登録状況

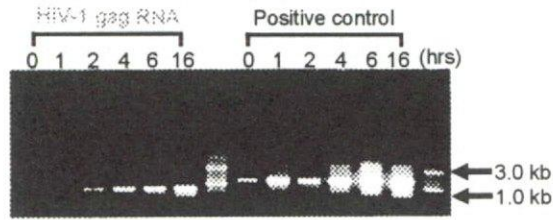
なし

図1 In vitro転写産物の解析

A) 全長HIV-1 mRNA合成の検討



B) HIV-1 gag RNA合成の検討



C)  $\beta$ 2M RNA合成の検討

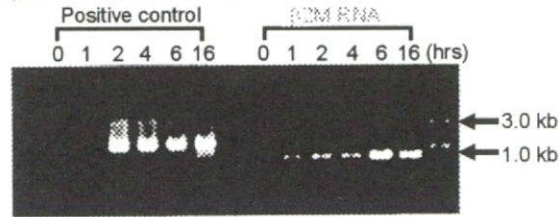
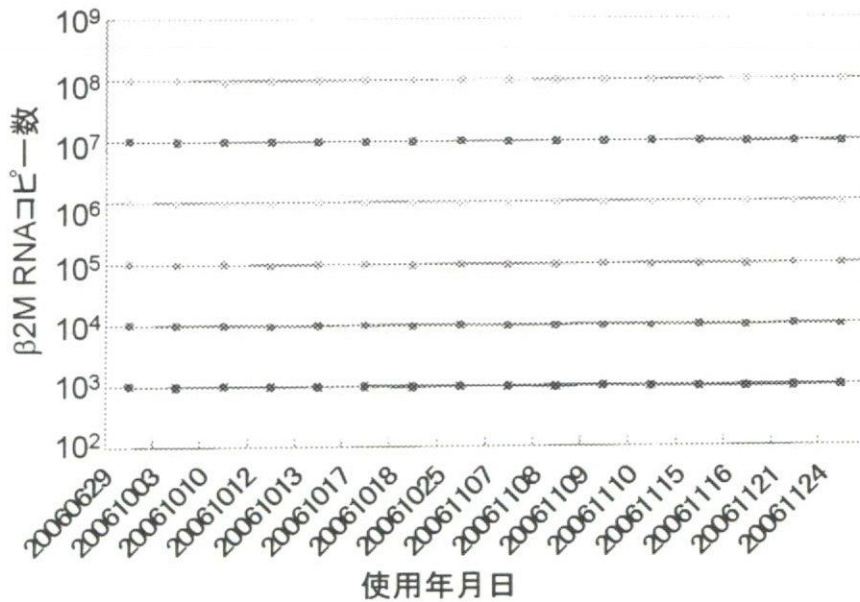


図2 標準 $\beta$ 2M RNAの-80°C凍結保存下での安定性



### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表