

200830009A

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20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 金田 次弘

平成21(2009)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. 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 -----	7
濱口元洋	
2. HAART著効患者における末梢CD4陽性Tリンパ球中に残存する プロウイルスコピー数と全長HIV-1 mRNAの検討 -----	11
鈴木康弘	
3. プロウイルス量測定の臨床的意義についての検討 -----	14
白阪琢磨	
4. 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 -----	18
南 留美	
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 -----	21
伊藤俊広	
6. プロウイルス活動指数測定法の一般検査化のための基礎検討 -----	23
和山行正, 岡田清美, 廣部雅美, 魚住利樹	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	26
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	28

I . 總括研究報告

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
客員研究員

研究要旨

第三年度は HAART 著効患者 57 症例、136 検体を対象に CD4 陽性 T リンパ球中の HIV-1 プロウイルスと全長 HIV-1 mRNA の定量を行うことができた。その結果、トータル 180 症例、282 検体に関するデータの収集ができた。その内、64 例はプロウイルス DNA が 100 コピー/ 10^6 細胞以下、活動指数（mRNA コピー数/プロウイルス DNA コピー数）が低値を示し、治療中断候補症例としてリストアップすることができた。名古屋医療センターの 3 症例を対象に治療中断試験を行ったが残念ながら薬剤投与中断後にウイルス量のリバウンドが観察され、投与再開を余儀なくされた。治療中の CD4 陽性細胞中の mRNA 数とプロウイルス DNA 数の測定のみでは治療中断のエビデンスにならないという残念な結果となった。

分担研究者

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

鈴木 康弘 東北大学大学院医学系研究科・講師

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

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

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

立川 夏夫 横浜市立市民病院・感染症部・感染内科部長

協力研究者

和山 行正 北里大塚バイオメディカルアッセイ研究所

伊部 史朗（独）国立病院機構名古屋医療センター

近藤 恭子（独）国立病院機構名古屋医療センター

藤崎彩恵子（独）国立病院機構名古屋医療センター

間宮 均人（独）国立病院機構名古屋医療センター

横幕 能行（独）国立病院機構名古屋医療センター

A. 研究目的

多剤併用療法 (HAART) の導入により HIV 感染症治療は飛躍的に進歩し、エイズによる死亡症例は激減した。しかし、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 薬を服用しつづけなければならぬという報告がなされて以来、“HAART は一生継続”がコンセンサスになっている。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り、且つ社会的負担も膨大なものになる。その意味で、有る一定の条件を満たしたとき、HAART を中断できると言うエビデンスを創出出来ればこの問題解決の一つの回答に近づくことが出来る。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/10⁶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。また、名古屋医療センター、九州医療センター、大阪医療センター、国立国際医療センターで、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能の把握」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。治療中断臨床試験に関しては臨床試験課題、「HIV-1 プロウイルス量とその活動指数により HAART 治療を中断する臨床試験 (AI study)」の承認を名古屋医療センター臨床研究審査委員会より得た。

C. 研究結果

① プロウイルス量と全長 HIV-1 mRNA の定量：3 年度に入り、57 症例、136 検体の追加ができ、現在までに 180 症例 282 検体について、プロウイルス量と全長 HIV-1 mRNA の定量を行なうことができた(図 1)。その結果、転写活性が低値 (mRNA 量が検出感度以下) を示す症例は 83 例、かつ残存プロウイルス量が 100 コピー/10⁶細胞以下の症例を 64 例抽出することができた(図 2)。なお、低値を示した症例を対象にプライマーやプローブのミスマッチによる誤判定かのチェックを塩基配列の決定により行なったが、全ての症例でミスマッチは検出されなかった。

② 一般検査化への技術改良：プロウイルスの定量法：nested リアルタイム PCR 法から通常リアルタイム PCR 法に切り替えることができた (Cv 値 5%以下の精度で 5 コピーを検出)。全長 HIV-1 mRNA の定量については RNA 標準物質の長期保存法の確立により可能になったが、3 ステップ法から 1 ステップ法への改善の目処は立っていない。2 ステップ法への改善は可能である。

③ 治療中断臨床試験：治療中断臨床試験のコンセプトの基本は以下の通りである：長期にわたり (3 年以上) HAART が奏功し残存プロウイルス量が微少 (<100 コピー/10⁶細胞) で、かつプロウイルスの活動指数が低値 (<2.0)を示し、CD4 リンパ球数が 500/μl 以上を確保できている症例に対して患者の同意の下に治療を中断する。このコンセプトに基づき、まず名古屋医療センターで先行実施した。完全実施できた 3 例の結果であるが、3 例ともに治療中断後 21 日目から 54 日目の期間内に血中 HIV-1 ウイルスのリバウンドが観察され、治療再開の経緯をたどった。症例 1.

33 歳、男性。5 年間の抗 HIV 療法 (COM/EFV、TDF/FTC/EFV)。治療中断後 21 日目の HIV-RNA=5.5x10³ と上昇したため (CD4=531)、治療中断 28 日目より TDF/FTC/EFV で治療再開とした。症例 2. 37 歳、女性。10 年間の抗 HIV 療法 (AZT/3TC/RTV、AZT/3TC/ATVr)。治療中断後 22 日目は HIV-RNA=40>、しかし、54 日目 HIV-RNA=3.5x10⁴ と上昇 (CD4=471) したため、57 日目から治療を再開した (AZT/3TC/ATVr)。症例 3. 58 歳、男性。8 年間の抗 HIV 療法 (AZT/3TC/NVP)。治療中断 30 日目に HIV-RNA が 6.9x10³ (CD4=681) となり、32 日目から治療を再開した (AZT/3TC/NVP) (図 3, 4, 5)。

D. 考察

3 例の治療中断候補症例に対する中断試験の結果は、治療中断後速やかな血中ウイルス量の増加が観察され、治療再開の経緯をたどった。10 年以上 HAART により効果的に治療を継続していた、プロウイルス量が 100 コピー/10⁶細胞以下、細胞内 mRNA が検出感度以下という症例であってもリバウンドを見たことから末梢血 CD4 陽性 T リンパ球中のプロウイルス量とその活動度だけでは治療中断の指標たりえないという結果であった。この結果は SMART 研究の結果からある程度の予測はできたとはいえ残念な結果であった。今回の研究は HIV-1 感染マクロファージリザーバーを考慮していなかったがこの点を考慮に入れた再検討は重要と思われる。

E. 結論

10 年以上 HAART により効果的に治療を継続していた、プロウイルス量が 100 コピー/10⁶

細胞以下、細胞内 mRNA が検出感度以下という症例であってもリバウンドを見たことから末梢血 CD4 陽性 T リンパ球中のプロウイルス量とその活動度だけでは治療中断の指標たりえないとの結論を得た。

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)

特許出願： 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 HIV-1 DNA と HIV-1 mRNA を測定した症例のまとめ

282検体(180症例)

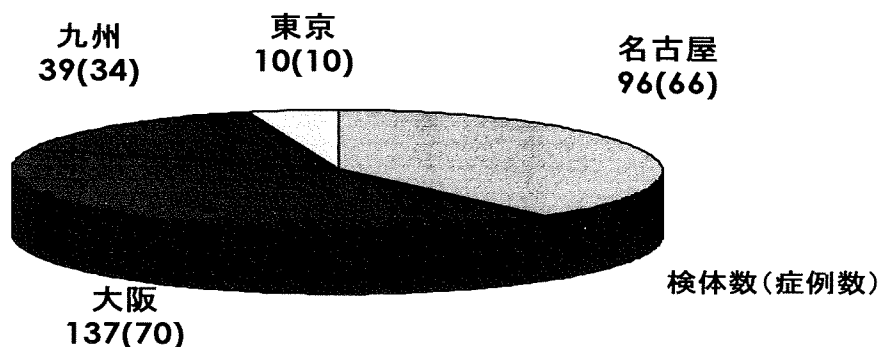


図2 プロウイルス、活動度指数からみた治療中断候補症例

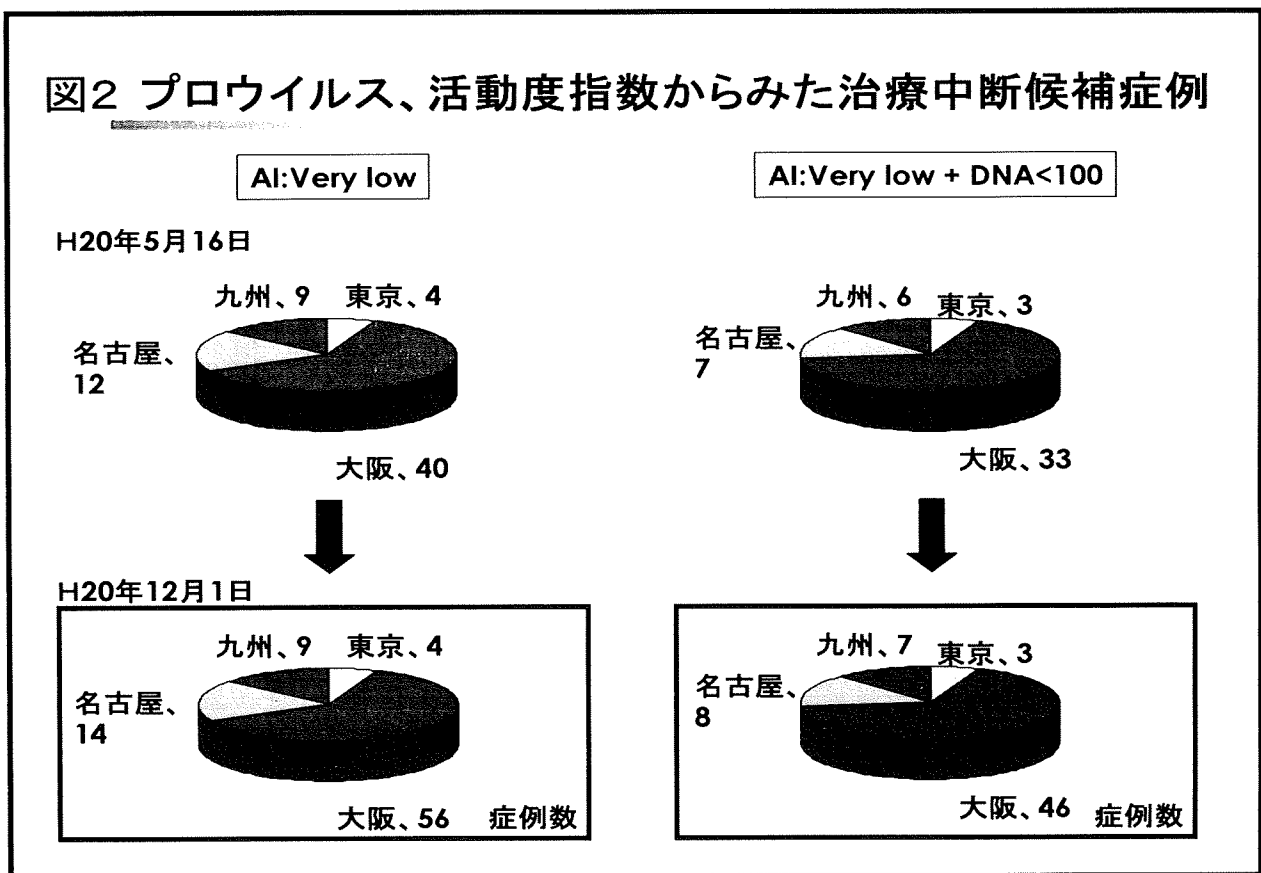


図3 AI study 登録症例(1)

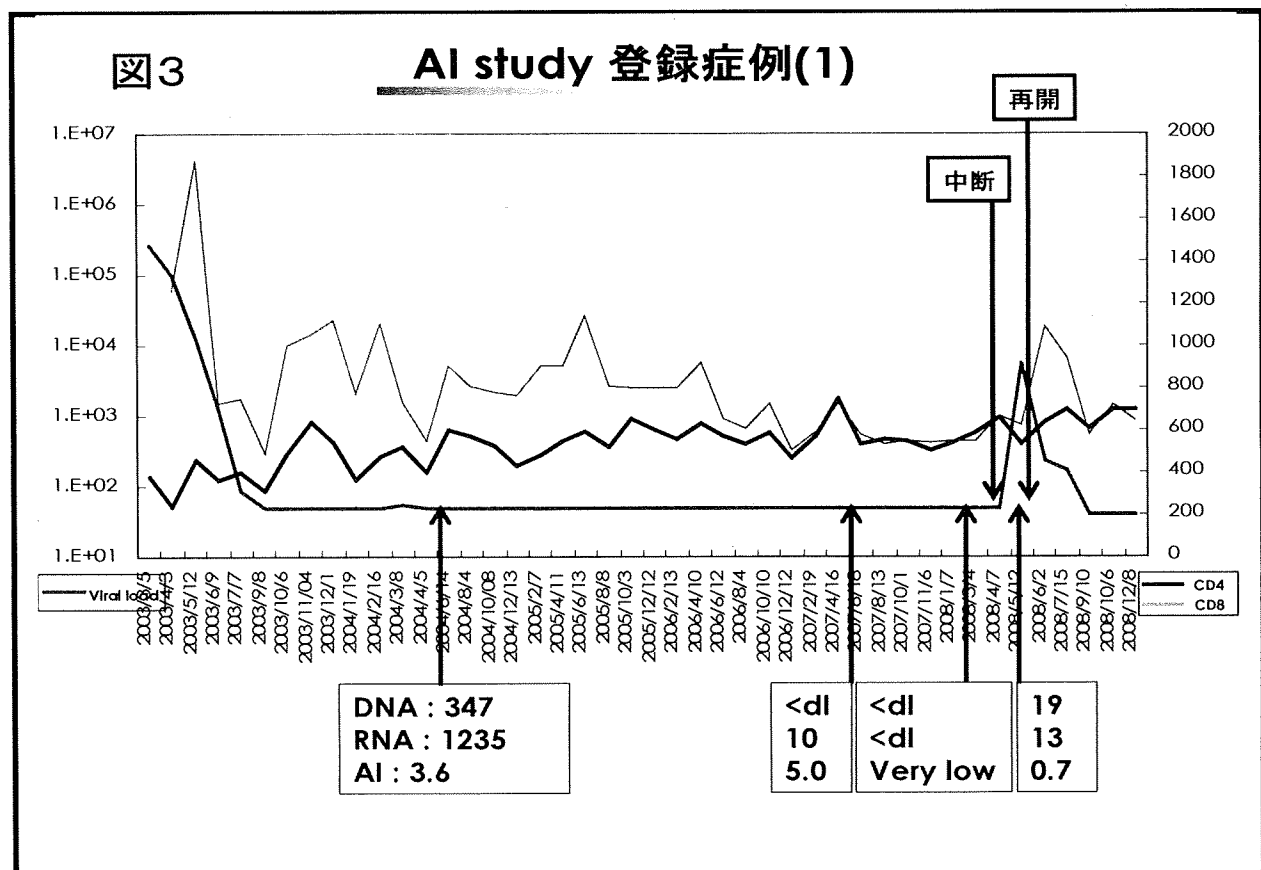


図4

AI study 登録症例(2)

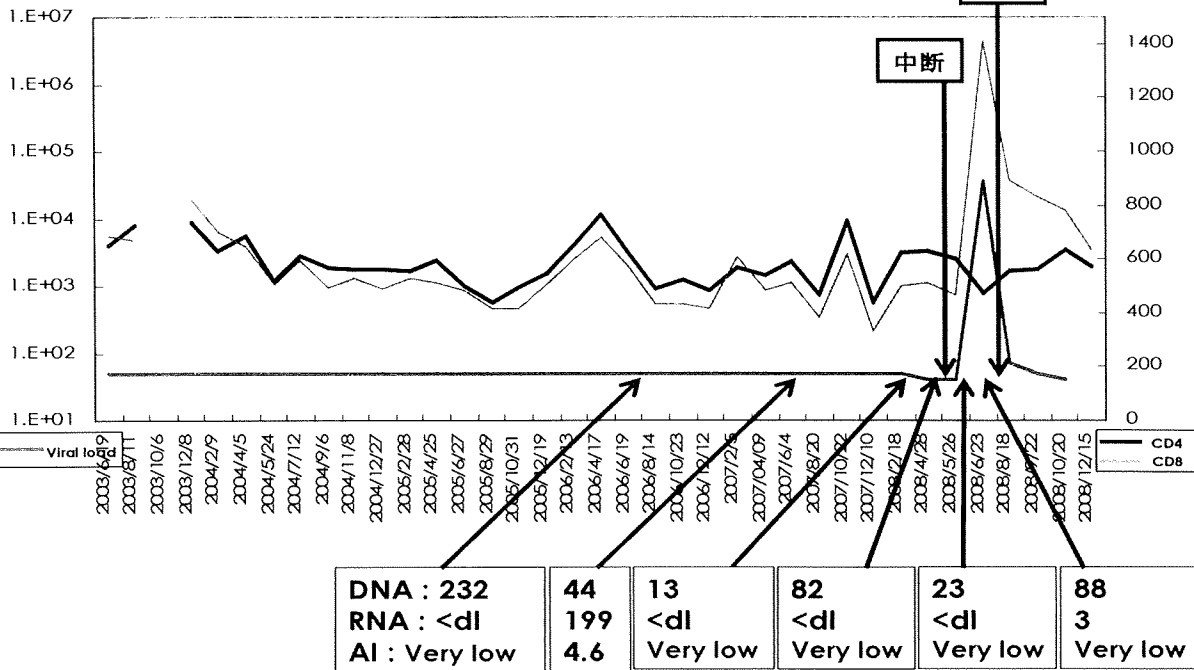
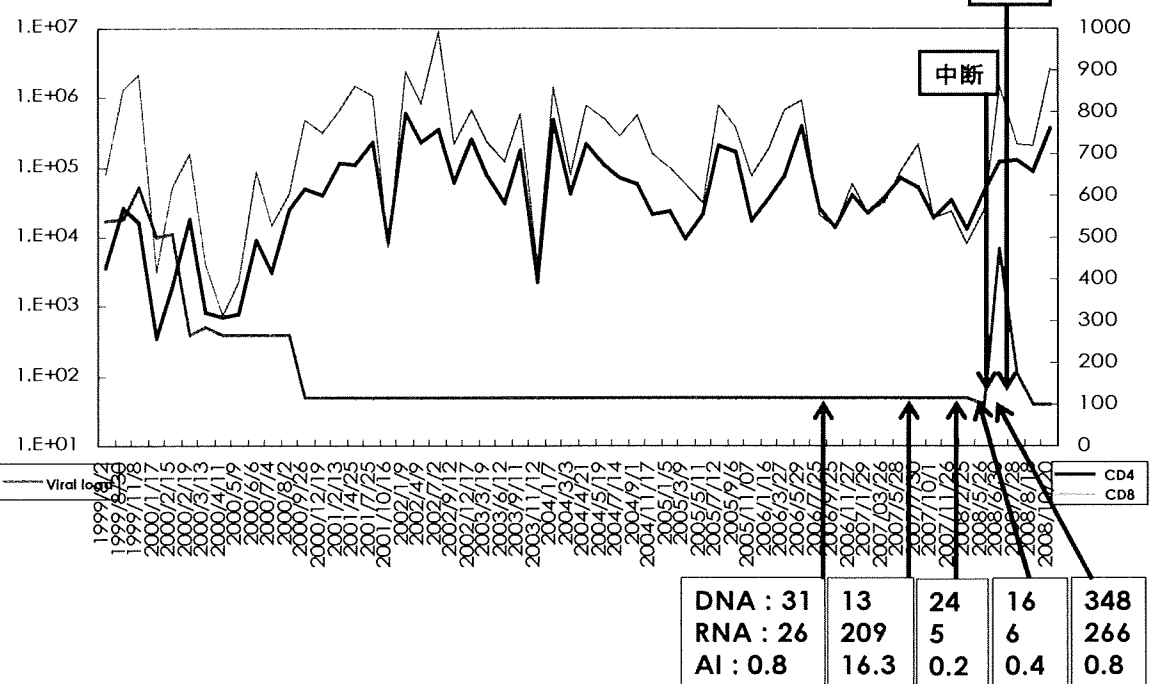


図5

AI study 登録症例(3)



II. 分担研究報告

研究課題：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

課題番号：H18-エイズ-010

主任研究者：金田 次弘（国立病院機構名古屋医療センター感染・免疫研究部）

分担研究者：濱口 元洋（国立病院機構名古屋医療センターエイズ・感染症診療部長）

1. 研究目的

多剤併用療法（HAART）著効の HIV-1 感染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（HIV-DNA）と全長 HIV-1mRNA を定量し、1 コピー当りのプロウイルスの HIV-1mRNA 転写能（活動指数：Activity Index, AI）を算出する。本研究の目的は、残存プロウイルス量、全長 HIV-1mRNA 量、活動指数などが HAART 中断の指標となるかを検討することである。

2. 研究方法

国立病院機構名古屋医療センターにおいて「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により HAART 治療を中断する臨床試験」(AI study)のパイロット試験を実施する。

その臨床試験の内容は、以下のすべての基準を満たす患者に同意のもと治療を中断する。目標症例数は2年間で4例とする。

- ① 血中 HIV-1RNA 量 (viral load, VL) が長期にわたり (3 年以上) 検出限度 (50 copies/mL) 以下の HAART 著効 HIV-1 感染患者。且つ、プロウイルス量が $100\text{copies}/10^6\text{cells}$ 以下ならびに活動指数が 2.0 以下、CD4 陽性 T リンパ球数が $500/\mu\text{L}$ 以上を登録1年前より維持されている患者。
- ② HAART 中断後 96 週まで経過観察が可能な患者
- ③ 20 歳以上の成人であること
- ④ 本人から文書で同意が得られていること

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。

(倫理面への配慮)

個人情報 は匿名化される。また、この臨床試験に参加しない場合は、通常通り抗 HIV 療法を続けるので、何の不利も発生しない。

3. 研究結果

国立病院機構名古屋医療センターでの単独施設によるパイロットスタディという位置づけで臨床研究計画書を

作成し、臨床試験を実施した。予定登録患者数は4例。ただし、明らかに多数（4例中3例以上または最初から連続して2例）の HIV-1RNA 量の早期上昇が認められた場合には、この臨床試験を中断することがあり得る。その判定は、効果・安全性評価委員会にて決定する。

症例1. 33歳、男性。5年間の抗 HIV 療法 (COM/EFV、TDF/FTC/EFV) にて $\text{CD4}=560/\mu\text{L}$ 、 $\text{HIV-RNA}=50>$ 、 $\text{HIV-DNA}=\text{感度以下}$ 、 $\text{HIV-1mRNA}=\text{感度以下}$ 、 $\text{AI}=\text{Very Low}$ 。治療中断後 21 日目の $\text{HIV-RNA}=5.5\times 10^3$ と上昇したため ($\text{CD4}=531$)、治療中断 28 日目より TDF/FTC/EFV で治療再開とした。21 日目の $\text{DNA}=19$ 、 $\text{mRNA}=13$ 、 $\text{AI}=0.7$ であった。治療再開後 4 カ月後に $\text{HIV-RNA}=40>$ となった。

症例2. 37歳、女性。10年間の抗 HIV 療法 (AZT/3TC/RTV、AZT/3TC/ATVr) にて $\text{CD4}=576/\mu\text{L}$ 、 $\text{HIV-RNA}=50>$ 、 $\text{HIV-DNA}=82$ 、 $\text{HIV-1mRNA}=\text{感度以下}$ 、 $\text{AI}=\text{Very Low}$ 。治療中断後 22 日目は $\text{HIV-RNA}=40>$ 、しかし、54 日目 $\text{HIV-RNA}=3.5\times 10^4$ と上昇 ($\text{CD4}=471$) したため、57 日目から治療再開 (AZT/3TC/ATVr)。54 日目の $\text{DNA}=88$ 、 $\text{mRNA}=3$ 、 $\text{AI}=\text{Very Low}$ 。治療再開 4 カ月後に $\text{HIV-RNA}=40>$ となった。

症例3. 58歳、男性。8年間の抗 HIV 療法 (AZT/3TC/NVP) にて $\text{CD4}=580/\mu\text{L}$ 、 $\text{HIV-RNA}=50>$ 、 $\text{HIV-DNA}=16$ 、 $\text{HIV-1mRNA}=6$ 、 $\text{AI}=0.4$ 。治療中断 30 日目に $\text{HIV-RNA}=6.9\times 10^3$ ($\text{CD4}=681$) となり、32 日目から治療再開 (AZT/3TC/NVP)。30 日目の $\text{DNA}=348$ 、 $\text{mRNA}=266$ 、 $\text{AI}=0.8$ であった。治療再開 2 カ月後に $\text{HIV-RNA}=40>$ となった。

症例4. 35歳、男性。7年6ヶ月の抗 HIV 療法 (COM/NVP) にて $\text{CD4}=602/\mu\text{L}$ 、 $\text{HIV-RNA}=50>$ 、 $\text{HIV-DNA}=25$ 、 $\text{HIV-1mRNA}=\text{感度以下}$ 、 $\text{AI}=\text{Very Low}$ 。治療中断してより、この臨床試験の中止基準に該当することが判明し、治療中断 35 日目に治療再開とした (当日の $\text{HIV-RNA}=43$ 、 $\text{CD4}=449$ 、 $\text{DNA}=13$ 、 $\text{mRNA}=\text{感度以下}$ 、 $\text{AI}=\text{Very Low}$)。治療再開後 (TDF/FTC/ATVr に変更) 速やかに $\text{HIV-RNA}=40>$ となった。

4例とも治療再開後に有害事象を認めなかった。

4. 考察

パイロットスタディとして国立病院機構名古屋医療センターにて HAART 中断臨床試験を実施したが、当初の中止基準（4 例中 3 例以上または最初から連続して 2 例に HIV-1RNA の上昇が認められた場合）に該当したため、4 例目はただちに臨床研究を中止し、治療再開とした。長期にわたり HAART が奏効し、ウイルスのリザーバーが小さく、また活動指数が極めて低い症例 4 例であったが、HAART 中断後速やかなウイルスの増加が認められ、HAART 中断できる症例の臨床指標を今回の臨床研究では見出せなかった。今後新たな臨床指標、計算方法などを考えなくてはならない。

5. 自己評価

1) 達成度について

この班研究の目的である臨床試験をパイロットスタディという形で名古屋医療センターにおいて実施できたことは十分な達成と考えられる。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

従来から一度抗 HIV 療法を行えば、治療中断は極めてむづかしいとされており、我々はそれらを覆す臨床指標を探索している。名古屋医療センターにて行った臨床試験では HIV-1DNA, HIV-1mRNA, Activity Index (AI) を測定し、その結果から治療中断できる症例候補を選別し、うち同意の得られた 4 例に臨床試験を実施した。今回の結果は抗 HIV 療法を中断する指標とはならなかった。従来の結果を支持することとなり、意義は大きい。

3) 今後の展望について

新たな臨床指標、計算方法などを考えなくてはならないが、我々の測定系である DNA, mRNA, AI は有意義なものであり、今後症例における測定結果の集積を行う予定である。

6. 結論

今回の「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により HAART 治療を中断する臨床試験」(AI study) は治療中断後のウイルス量の増加により試験中止となった。

7. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

なし。

研究発表

分担研究者

濱口元洋

原著論文による発表

欧文

- 1) Ibe S, Hattori J, Fujisaki S, Shigemi U, Fujisaki S, Shimizu K, Nakamura K, Kazumi T, Yokomaku Y, Mamiya N, Hamaguchi M, Kaneda T: Trend of drug-resistant HIV type-1 emergence among therapy-naïve patients in Nagoya, Japan: An 8-year surveillance from 1999 to 2006. *AIDS Res Human Retroviruses* 24: 7-14, 2008.
- 2) Gatanaga H, Hayashida T, Tsuchiya K, Yoshino M, Kuwahara T, Tsukada H, Fujimoto K, Sato I, Ueda M, Horibe M, Hamaguchi M, Yamamoto M, Takata N, Kimura A, Koike T, Gejyo F, Matsushita S, Shirasaka T, Kimura S, Oka S: Successful efavirenz dose reduction in HIV type-1-infected individuals with cytochrome P450 2B6*6 and *26. *Clin Infect Disease* 45: 1230-1237, 2007.
- 3) Takahashi M, Ibe S, Kudaka Y, Okumura N, Hirano A, Suzuki T, Mamiya N, Hamaguchi M, Kaneda T: No observable correlation between central nervous system side effects and EFV plasma concentrations in Japanese HIV type 1-infected patients treated with EFV containing HAART. *AIDS Res Human Retroviruses* 23: 983-987, 2007.
- 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* 75: 75-82, 2007.
- 5) Hattori J, Okumura N, Yamazaki Y, Uchiyama M, Hamaguchi M, Nishiyama Y, Kaneda K: 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) 橋本里奈、向井栄一郎、横幕能行、間宮均人、濱口元洋: HIV 脳症 5 例の臨床的特徴と経過. *臨床神経* 48: 173-178, 2008.
- 2) 濱口元洋: 免疫再構築症候群とその対応. *J. AIDS Res.* 9: 98-101, 2007.
- 3) 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: 332-335, 2007.
- 4) 濱口元洋: HIV 感染症治療の現況. *現代医学* 54: 115-122, 2006.
- 5) 間宮均人、濱口元洋: プライマリケア医が対処できる合併症と専門医に送るべき合併症. *治療* 88: 2955-2960, 2006.
- 6) 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.

口頭発表

国内

- 1) 神谷昌枝、石川雅子、一色ミユキ、菊池恵美子、佐藤愛子、高橋義博、高田知恵子、辻麻理子、濱口元洋、牧野麻由子、山中京子. 派遣カウンセリング制度の効果的運用に関する研究. 第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会 (大阪) (平成 20 年 11 月)
- 2) 菊池恵美子、内海眞、濱口元洋. 名古屋医療センターにおける MSM 外国籍患者動向. 第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会 (大阪) (平成 20 年 11 月)
- 3) 奥村直哉、平野淳、久高祐一、寺畑奈美、高橋昌明、横幕能行、間宮均人、安岡彰、濱口元洋. HAART 施行中における脂質代謝異常の検討. 第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会 (大阪) (平成 20 年 11 月)
- 4) 大出裕高、横山勝、佐藤裕徳、伊部史朗、藤崎誠一郎、間宮均人、濱口元洋、杉浦互、横幕能行. HIV-1 プロテアーゼにおける耐性変異 L89V の立体的影響. 第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会 (大阪) (平成 20 年 11 月)

- 5) Enfuvirtide (T-20) + raltegravir (RAL) + darunavir (DRV) + etravirine (TMC125) + lamivudine (3TC) の多剤高度耐性 HIV-1 感染症に対する治療効果. 横幕能行、大出裕高、間宮均人、濱口元洋、伊部史朗、藤崎誠一郎、藤崎彩恵子、金田次弘、杉浦互. 第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会 (大阪) (平成 20 年 11 月)
- 6) 杉浦互、鴻永博之、吉田繁、千葉仁志、小池隆夫、伊藤俊広、原孝、佐藤武幸、石ヶ坪良明、上田敦久、近藤真規子、今井光信、貞升健志、長島真美、福武勝幸、山元泰之、田中理恵、加藤信吾、宮崎菜穂子、藤井毅、岩本愛吉、藤野真之、仲宗根正、巽正志、椎野禎一郎、岡慎一、林田庸総、服部純子、伊部史朗、藤崎誠一郎、金田次弘、濱口元洋、上田幹夫、大家正義、田邊嘉也、渡辺香奈子、渡邊大、白阪琢磨、栗原健、森治代、小島洋子、高田昇、木村昭郎、南留美、山本政弘、松下修三、健山正男、藤田次郎. 2003-2007 年の新規 HIV-1 感染者における薬剤耐性頻度の動向. 第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会 (大阪) (平成 20 年 11 月)
- 7) 奥村かおる、山田由美子、濱口元洋. 名古屋医療センターにおける 5 年間の患者動向と今後の課題. 第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会 (大阪) (平成 20 年 11 月)
- 8) 平野淳、奥村直哉、久高祐一、寺畑奈美、高橋昌明、坂野和英、脇坂達郎、横幕能行、間宮均人、濱口元洋、金田次弘. アバカビル投与による副作用とその発現時期についての検討. 第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会 (大阪) (平成 20 年 11 月)

HAART 著効患者における末梢 CD4 陽性 T リンパ球中に残存するプロウイルスコピー数と全長 HIV-1 mRNA の検討

研究分担者： 鈴木康弘 東北大学大学院医学系研究科 感染病態学分野 講師

研究協力者： 立川 夏夫 横浜市立市民病院 感染症内科部長

研究要旨

HAART治療へのコンセンサスは現在“一生継続”であり、これは潜伏感染細胞HIV-1プロウイルスの減衰シミュレーションの結果に基づいている。本研究班ではHAART著効患者を対象にして末梢CD4陽性Tリンパ球中に残存す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している。本年度は、本班の研究遂行のための倫理委員会書類を準備、提出し受理された。その後、本研究班の患者抽出クライテリアに基づき患者の抽出を終えた後に、10名ほどの患者にサンプルについては実際に測定を終えたので、その結果を考察するとともに、結果的には、今回の研究では、HAARTを停止すると、プロウイルスコピーが低く、activity indexが低いものでもすぐに、ウイルスの産生が認められHAARTを中止することに今回のマーカーが直接使えることは明らかにならず、現時点では、HAART治療は“一生継続”が必要であることが確認されたが、検査法について、将来への改良点について考えてみた。

A. 研究目的

HAART 治療へのコンセンサスは現在“一生継続”であり、これは潜伏感染細胞 HIV-1 プロウイルスの減衰シミュレーションの結果に基づいている。本研究班では HAART 著効患者を対象にして末梢 CD4 陽性 T リンパ球中に残存す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した。

B. 材料・方法

HAART 著効患者は国立国際医療センター、治療研究センターのデータベースをもとに選択、抽出し、そのうちインフォームドコンセントの上で同意が得られた患者 9 名の末梢血サンプルを解析した。

患者サンプル末梢血から buffy coat を採取し、CD4 陽性 T リンパ球を単離し、半数の細胞から DNA を抽出し、HIV-1 プロウイルスをリアルタイム PCR 法にて定量した。残りの半数の細胞からは RNA を抽出し、逆転写反応させ cDNA を合成した後、HIV-1 DNA をリアルタイム PCR 法にて定量した。

C. 研究結果・考察

HAART 著効患者は ACC のデータベースをもとに選択、抽出し、そのうちインフォームドコンセントの上で同意が得られた、患者 9 名の末梢血サンプルを解析した(うち一名は急性感染症後の STI 症例)。

患者 8 名の症例の HAART 後のウイルス検出感度以下の日数は 4.4 ± 1.55 年であった。現時点ではサンプル数が少なく明らかなことは言えないがいくつかの傾向が示された。HAART 開始直前の VL 数と末梢

CD4陽性Tリンパ球中に残存するプロウイルスコピー数との間に明らかな相関関係は認められないように思われた。また、HAART開始し血清中のVLが検出感度以下になるまでにかかった日数と末梢CD4陽性Tリンパ球中に残存するプロウイルスコピー数との間にも明らかな相関関係は認められないように思われた。これに対して、HAART開始し血清中のVLが検出感度以下に抑えられている期間が長いほど末梢CD4陽性Tリンパ球中に残存するプロウイルスコピー数が少ない傾向が認められる様に思われた。この点については以前に報告されたレポートでは、潜伏感染細胞HIV-1プロウイルスの減衰は極めてゆっくりとしているという事が示されており、現在まで多くの追試がなされている。今回、我々が検出したプロウイルスコピーでは実際には、細胞内にあるウイルスDNAコピー数を全て測定しているので、この検査ではプロウイルス以外にも細胞に侵入し宿主遺伝子に組みこまれる以前のウイルスDNA数も含まれているという点には注意しなければならない。しかし、細胞あたりの転写活性を示すactivity indexとプロウイルスコピーには明らかな相関が認められないように思われたが、この結果より、少なくともCD4陽性Tリンパ球でHIV-1ウイルスが大量に産生されてそれが再感染し、細胞質にとどまっている可能性は低いと考えられる。今回の結果についていえば、CD4陽性Tリンパ球以外の細胞でHIV-1が作られて、それが、CD4陽性Tリンパ球に感染してウイルスDNAコピー数を増加させている可能性は完全には否定できない。

最後にactivation indexと末梢CD4陽性Tリンパ球中に残存するプロウイルスコピー数の関係を調べると、2例ではあるがプロウイルスコピー数が高いのにactivation indexが低い症例があるのは注目に値する。しかしこの件については、一般的に、RNAポリメ

ラーゼ、逆転写酵素やDNAリガーゼなどのcDNAライブラリー作製に使われる酵素の至適基質濃度(K_m 値)が $1\mu\text{M}\sim 1\text{mM}$ と高く極微量のmRNAを出発物質とした場合には、反応が全く進まないという問題があり、このことを考慮すると、ウイルスRNAコピー数については実際の値よりかなり低い値が出ており、検出できない閾値が存在すると考えるのが妥当である。Chum-RNA増幅法のような技術を導入することで、RT-PCR増幅法の弱点を克服したうえでの研究が望まれる。その上で更なる検討が必要ではないかと考えられた。

結果的には、今回の研究では、HAARTを停止すると、プロウイルスコピーが低く、activity indexが低いものでもすぐに、ウイルスの産生が認められHAARTを中止することに今回のマーカーが直接使えることは明らかにならず、現時点では、HAART治療は“一生継続”が必要であることが確認された。

ただし、病態解析への意味は十分にあり、今後、全長HIV-1 mRNAを定量法について改良が加えられることが要求される。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

論文発表 (欧文)

1. Characterization of a CD4-independent clinical HIV-1 that can efficiently infect human hepatocytes through chemokine (C-X-C motif) receptor 4. Xiao, P., Usami, O., Suzuki, Y., Ling, H., Shimizu, N., Hoshino, H., Zhuang,

- M., Ashino, Y., Gu, H., Hattori T AIDS. 22:1749-1757. 2008.
2. High Frequency and Proliferation of CD4⁺FOXP3⁺ Regulatory T Cells in HIV-1 Infected Patients with Low CD4 Count. Bi, X., Suzuki, Y., Gatanaga, H., Oka, S. Eur. J. immunol. 39:301-309. 2009.

学会発表

1. HIV-1 感染過程におけるダイナミンの役割の解析。Promjyanyakul Warunya、鈴木康弘、今村淳治、Chandra Nath Roy、服部俊夫。第2回リトリート研究発表会 萩ホール 宮城、2008, Dec, 6
2. HIV-1-tat-PTD が multivalent であることが表面結合とマクロピノサイトーシス活性に不可欠である。今村淳治、鈴木康弘、Chandra Nath Roy、Promjyanyakul Warunya、権田幸祐、樋口秀男、服部俊夫。第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会 ワールド記念ホール、神戸 2008, Dec, 12

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

1. HIV-1 脱核過程にかかわる宿主遺伝子の単離および、その抑制 small compound の同定（予定）
2. バキュロウイルスによる迅速ビオチン化・分泌 gp120 作成法（予定）

プロウイルス量測定 of 臨床的意義についての検討

分担研究者 白阪琢磨 国立病院機構大阪医療センター エイズ先端医療研究部長
研究協力者 渡邊 大 国立病院機構大阪医療センター エイズ先端医療研究部 室員
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

抗HIV療法（ART）を継続し血漿中HIV-RNA量（VL）が検出感度未満であるHIV-1感染症患者67名から研究参加の同意を得て、134検体に関して末梢CD4陽性Tリンパ球中のプロウイルス（HIV-DNA）量と同細胞内HIV-RNA量を測定した。HIV-DNA量は複数の測定においても再現性は良好であったが、HIV-RNA量は変動がみられた。HIV-DNA量はART導入前のCD4陽性リンパ球数や治療期間と逆相関を示した。急性期にARTを導入した4症例中2症例はHIV-DNA量が感度未満であり、慢性期で導入した63症例と比較し統計学的有意にプロウイルス量が低下していた。以上のことからHIV-DNA量の測定はHIV感染症の経過のモニタリングに有用である可能性が示唆された。

A. 研究目的

抗HIV療法（ART）の開発によってHIV感染者の血漿中ウイルス量（VL）は検出感度を下回るまで抑制されるようになった。長期の抗HIV薬服用による毒性の蓄積や、薬剤耐性変異株の出現などの課題が残されているものの、HIV感染症はコントロール可能な慢性疾患になったと言える。HIV感染細胞の半減期に関する研究からは感染細胞をすべて駆逐するには平均73.4年の内服期間が必要とされ、生涯の抗HIV薬服用の根拠とされている。しかし、それらの研究でも半減期には幅があり、個々の患者の感染細胞数の違いもあるため、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。すなわち潜伏感染として感染している細胞数が少ない症例などは73.4年を待たずに治癒されるはずである。今回、金田

らによって開発された高感度定量法を用いて感染細胞の染色体に組み込まれたプロウイルスDNA（HIV-DNA量）と細胞質内のフリーのRNA（HIV-RNA量）の測定し、個々の病状と比較検討した。

B. 研究方法

当院免疫感染症科を受診中のHIV-1感染者のうち血漿中HIV-RNA量（VL）が検出感度（50copies/ml）未満で持続している患者を対象に、informed consentのもとに採血を行い、末梢CD4陽性Tリンパ球中のHIV-DNA量とHIV-RNA量を測定した。検体は感染性物質としてシーリングなどの防御を行ったうえで名古屋医療センターまで空輸した。名古屋医療センターで血液検体からCD4陽性Tリンパ球を分離し、細胞内のDNAおよびRNAを精製した。精製し

た核酸から、HIV-DNA量とHIV-RNA量を金田らによって開発された高感度のrealtime PCR法にて決定した。HIV-DNA量およびHIV-RNA量はCD4陽性Tリンパ球10の6乗個に含まれるコピー数として算出した。活動性指数 (A. I.) はHIV-RNA量/HIV-DNA量で算出した。これらと臨床情報 (VL感度未満の持続期間、ART導入前のCD4陽性リンパ球数、ART導入前のVL) との関連について統計学的な解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は疫学研究に相当し、院内の倫理委員会に相当する受託研究審査委員会に研究課題「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能の把握」を提出し承認を取得した。この審査委員会で審査・受理された方法で研究を遂行し、具体的には文書での同意の取得や、検体処理やデータ管理の際の匿名化などを行った。

C. 研究結果

ARTを継続し、長期間血中VLが検出感度未満であるHIV-1感染症患者67名から研究参加の同意を得て、134検体に関して末梢CD4陽性Tリンパ球中のHIV-DNA量、HIV-RNA量と活動性指数を測定した。患者背景は男性62名と女性7名で、感染経路は同性間が49名、異性間が13名、血液製剤が5名であった。年齢は平成42.6歳 (中央値43歳、最少24歳、最大67歳) で、血中ウイルス量感度未満の持続期間は平均1897年 (中央値2205年、最少49日、最大3828日) と多くの症例で長期間治療が継続されていた。

これらの症例におけるHIV-DNA量は平均 $177\text{copies}/10^6\text{CD4}^+\text{lymphocytes}$ (以下単位はコピー数のみ記載) で中央値35コピー、最大3224コピー、最少は2コピー未満 (感度未満) であった。一方HIV-RNA量は平均347コピー (中央値感

度未満、最少感度未満、最大7597コピー) であり、感度未満の検体が大多数を占めた。

1年間の経過を複数回測定で観察可能であった4症例について、再現性と変動について検討した (表1)。HIV-DNA量は数倍までの変動であり、realtime PCR法を用いるという測定方法を考慮すると妥当な範囲と考えられた。一方HIV-RNA量は6例中4例で10倍以上の変動を認めた。再現性の良好であったHIV-DNA量に関しては1年程度の経過にても有意な変動は認めなかった。

次にデータの相関関係について検討した。HIV-DNA量とHIV-RNA量には正の相関を認め (図1; Spearman's rank test、 $\rho=0.5347$ 、 $p<0.0001$)、A. I. は大多数の症例で潜伏感染を示唆する2.2を下回った (図2)。HIV-RNA量は変動が大きく、A. I. は低値を呈することが多いため、臨床情報との相関についてはHIV-DNA量のみ検討した。HIV-DNA量とART導入前のCD4陽性リンパ球数に関して解析を行った。急性期でARTを導入した症例は解析から除外した。図3に示されるようにこれらは統計学的有意な逆相関を示した (Spearman's rank test、 $\rho=-0.48$ 、 $p=0.0008$)。一方、ART導入前のVLとの相関は認めなかった (図は略)。次にVL感度未満の持続期間との相関関係について検討した。急性感染例に加え、ウイルス学的治療失敗歴のある症例に関しては治療期間を決定することが困難なため解析から除外した。図4 (Spearman's rank test、 $\rho=-0.33$ 、 $p=0.0016$) に示されるように弱いながらも有意な逆相関を認めた。

HIV-DNA量が感度未満であった検体について検討した。137検体のうち感度未満であったのは16検体 (12%) であった。そのうち急性感染例を除外すると10検体に減少し、再検を行った3症例に関してはいずれも再検値は測定可能で

あった。一方急性感染例において感度未満の検体は再検を施行しても感度未満であった。以上のことより急性感染例ではプロウイルス量が低いことが予想された。急性期に治療した4例（測定値は感度未満、感度未満、8コピー、8コピー）と慢性期で治療を開始した63例についてWilcoxonの順位和検定を行ったところ、急性感染例にて有意にプロウイルス量が低下していた（ $p=0.0095$ ）。

D. 考察

金田らによって開発された方法を用いて末梢CD4陽性Tリンパ球中のHIV-DNA量とHIV-RNA量の測定をHAART著効例に対して行った。HIV-RNA量は変動が大きく、データ解析が困難であったが、HIV-DNAは再現性が良好であった。両者とも最終的にはrealtime PCR法にて定量化を行うが、HIV-DNA量の再現性が問題ないため、HIV-RNA量の測定のみで変動を有する理由としては、体内での変動・輸送時のRNAの安定性・cDNA合成の効率の変化などが考えられる。HIV-RNA量の解釈には採血条件などの設定も含め、変動の要因を明らかにする必要があると思われる。

再現性が良好であったHIV-DNA量は統計学的有意差をもってART導入前のCD4陽性リンパ球数とVL感度未満の持続期間に逆相関していた。回帰分析では図3および図4で示される数式となる。すわなち、CD4陽性リンパ球数が約91個減少すればプロウイルス量は2倍に増加し、HAARTを約3.3年内服すればプロウイルス量は半分に減少することを意味している。急性感染期でARTを導入した症例でHIV-DNA量が特に低かったという観察もこの結果と合致している。単一の症例を長期間測定したデータがないため最終的な結論を出すことは不可能であるが、

今回得られた結果からはプロウイルス量の測定はHIV感染症の病期の進行や治療効果の判定にも有効である可能性を示していることになる。VLが感度未満に到達した症例においては抗ウイルス効果をモニタリングする方法がなく、この方法は治療中断の指標のみならずそれ以前の治療効果にも有用であると思われる。

E. 結論

末梢CD4陽性Tリンパ球数の残存プロウイルス量はART導入前のCD4陽性リンパ球数や治療期間と関連し、CD4陽性リンパ球やVLにとってかわるものではないが、HIV感染症のモニタリングに有用な第3の検査となりうる可能性が示唆され、さらに症例を増やしてその有効性や意義を明らかにしたい。さらに急性期での治療導入例においては慢性期で導入した症例と比較して残存プロウイルス量が低いことが明らかとなった。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

該当なし。

H. 知的財産権の出現・登録状況

該当なし。