

200830009B

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18～20年度 総合研究報告書

主任研究者 金田 次弘

平成21(2009)年3月

目 次

I. 総合研究報告	
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 -----	1
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 -----	9
濱口元洋	
3. 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 -----	13
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 -----	16
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 -----	21
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 -----	25
伊藤俊広	
7. 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 -----	28
和山行正, 岡田清美, 廣部雅美, 魚住利樹, 伊部史朗, 近藤恭子, 加堂真由	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	33
III. 研究成果の刊行物・別刷 -----	41

I . 総合研究報告

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

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

三年間の研究において、HAART 著効患者 180 症例、282 検体に関して、CD4 陽性 T リンパ球中のプロウイルス量と全長 HIV-1 mRNA を定量することができた。このうち転写活性が低く、かつ、残存プロウイルス量が 100 コピー/10⁶ 以下の活動指数の低い症例が 64 例あり、それらを治療中断候補症例として抽出することができた。先行研究として、名古屋医療センターで治療中断臨床試験を 3 例に対して実施したが、いずれの症例においても、投薬中断後に HIV-1 ウイルス量のリバウンドが観察された。抗 HIV 薬の再投与を余儀なくされた。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) 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、複数のブロック拠点病院の、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 (図 1)。

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/ 10^6 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。研究の必要性と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 年度には 57 例の登録ができ、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 2)。このうち転写活性が低値 (mRNA 量が検出感度以下) を示す症例は 83 例存在し、かつ残存プロウイルス量

が 100 コピー/10⁶ 細胞以下の症例は 64 例存在した (図 3, 4, 5)。

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 (C_v 値 5% 以下の精度で 5 コピーを検出)。この方法で全血を用い、末梢白血球中のプロウイルスの定量は委託測定できるようになった。HIV-1 mRNA 定量の簡便化については見通しが立っていない。

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小 (<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 (図 6, 7)。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 (図 8)。症例 2. 37 歳、女性。10 年間の抗 HIV 療法 (AZT/3TC/RTV、AZT/3TC/ATV_r)。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/ATV_r) (図 9)。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 10)。

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. 知的所有権の出願・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 研究の流れ・年度計画・最終目標

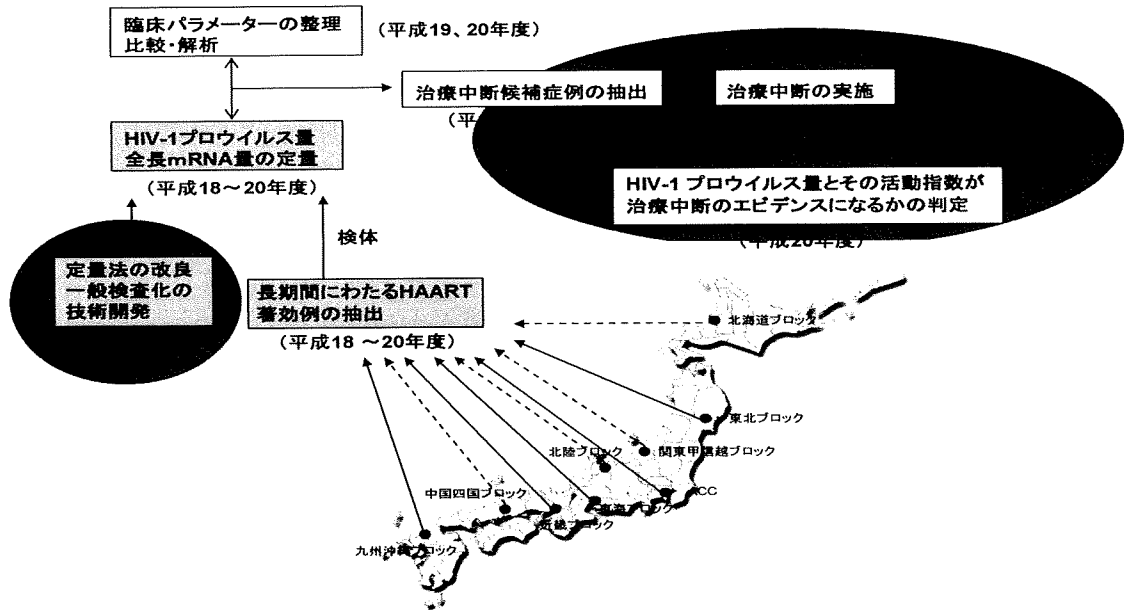


図2 HIV-1 DNAとHIV-1 mRNAを測定した 症例のまとめ

282検体(180症例)

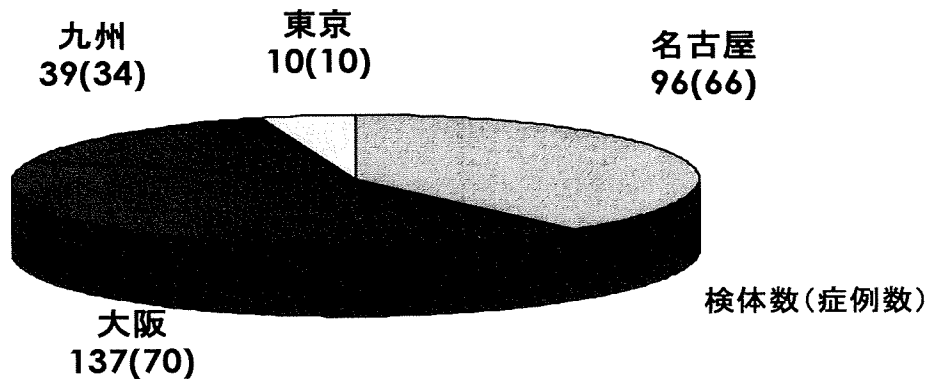


図3 HAART著効例のHIV-1 DNA、全長HIV-1 mRNA及び活動度指数(AI)の分布 (全症例、n=180)

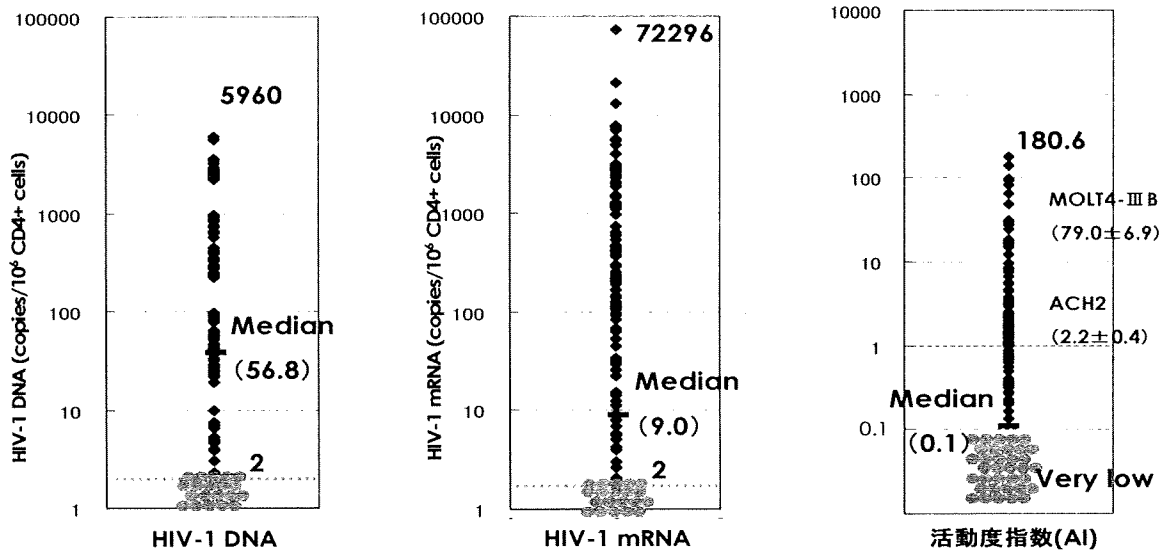


図4 HIV-1 DNAと活動指数(n=180)

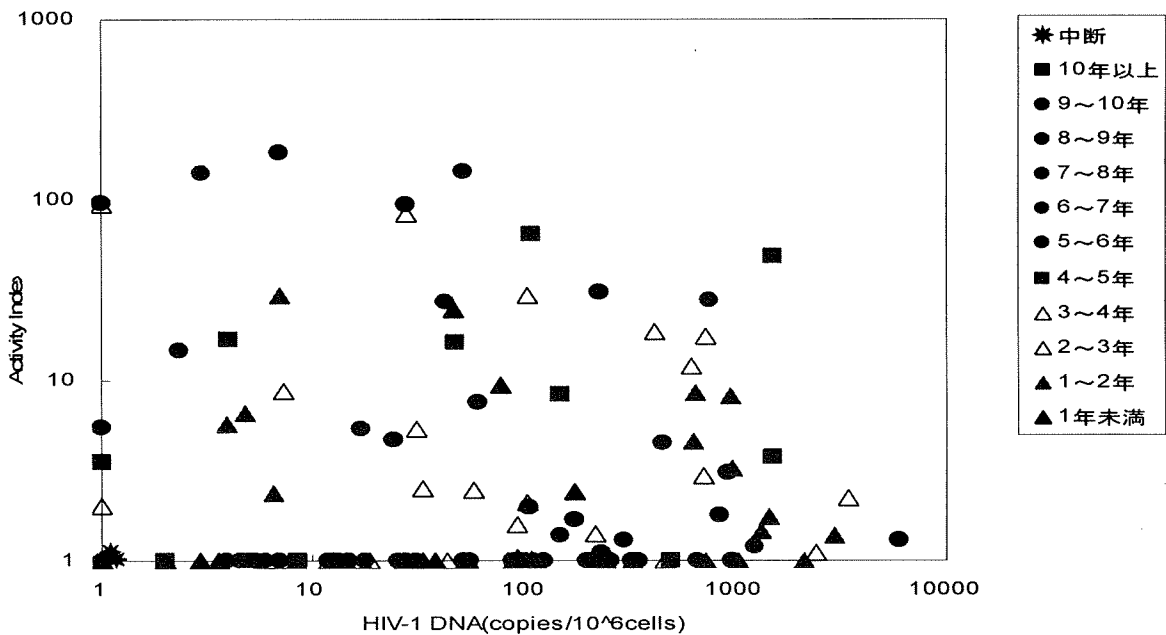


図5 プロウイルス、活動度指数からみた治療中断候補症例

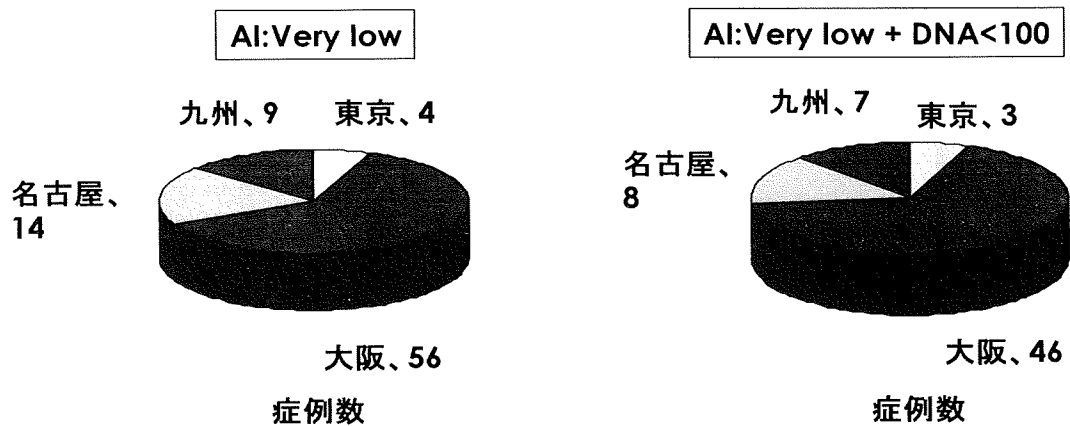


図6 治療中断臨床試験の概要(1)

「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によりHAART治療を中断する臨床試験」

目的： 残存プロウイルス量、全長HIV-1 mRNA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。

試験実施機関： 国立病院機構名古屋医療センター

対象： 次の条件を全て満たすHAART著効HIV-1感染患者

- ・Viral load: 3年以上、検出限度以下。
- ・プロウイルス量: 100 copies/10⁶ 細胞以下。
- ・プロウイルス活動指数: 2.0以下。
- ・CD4陽性Tリンパ球数: 500 cells/μL 以上。

図7 治療中断臨床試験の概要(2)

研究方法:

- ・登録症例は、HAARTを中断後、48週までは1ヶ月毎、48週から96週までは少なくとも3ヶ月毎に外来受診する。
- ・但し、経過中に viral load の上昇(1000 copies/mL 以上が2度継続)、または、CD4陽性Tリンパ球数の減少(200 cells/ μ L以下)が認められたときは、直ちにHAARTを再開とする。

予定登録数: 4例

登録期間: 2年間

効果判定: 登録終了後48週

追加追跡: 登録終了後48週から96週

研究期間: 登録開始から試験終了まで最長4年間

図8 AI study 登録症例(1)

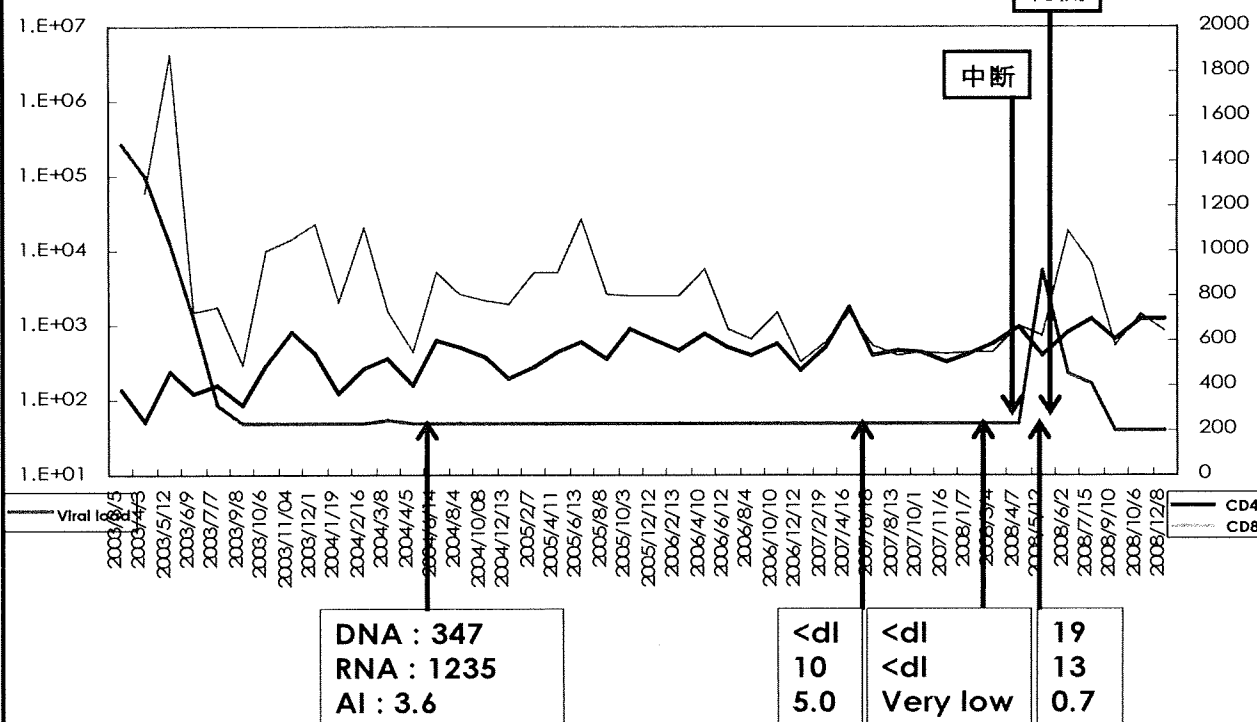


図9

AI study 登録症例(2)

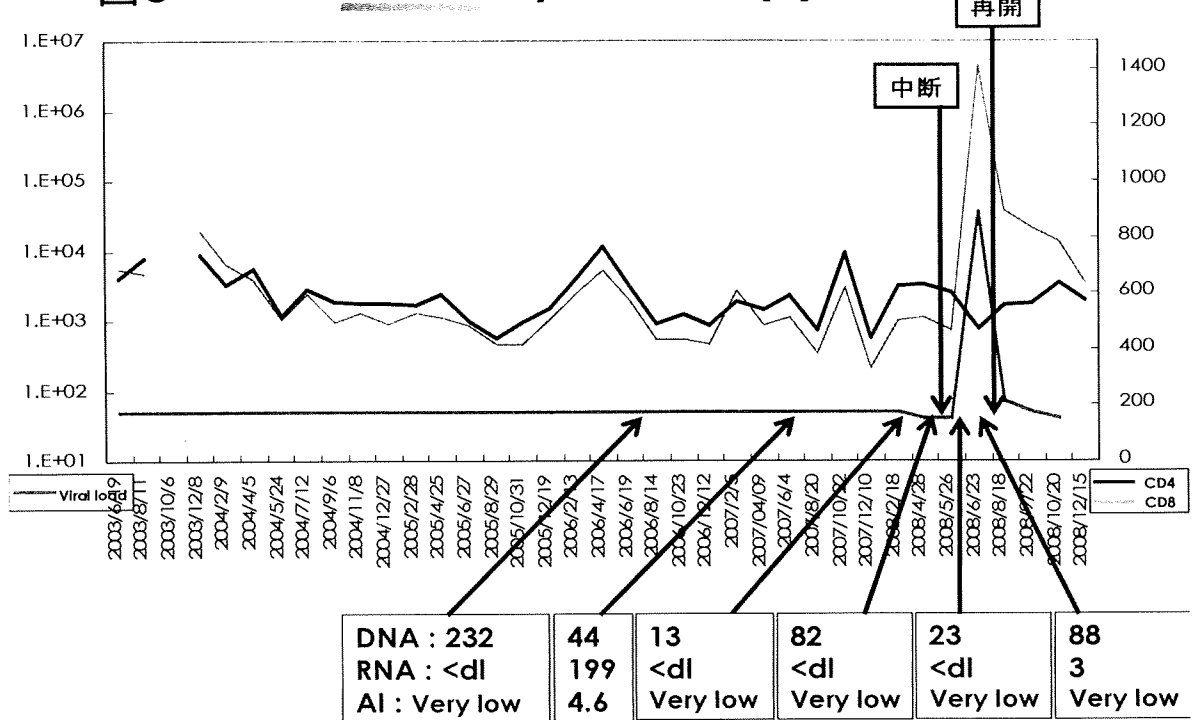
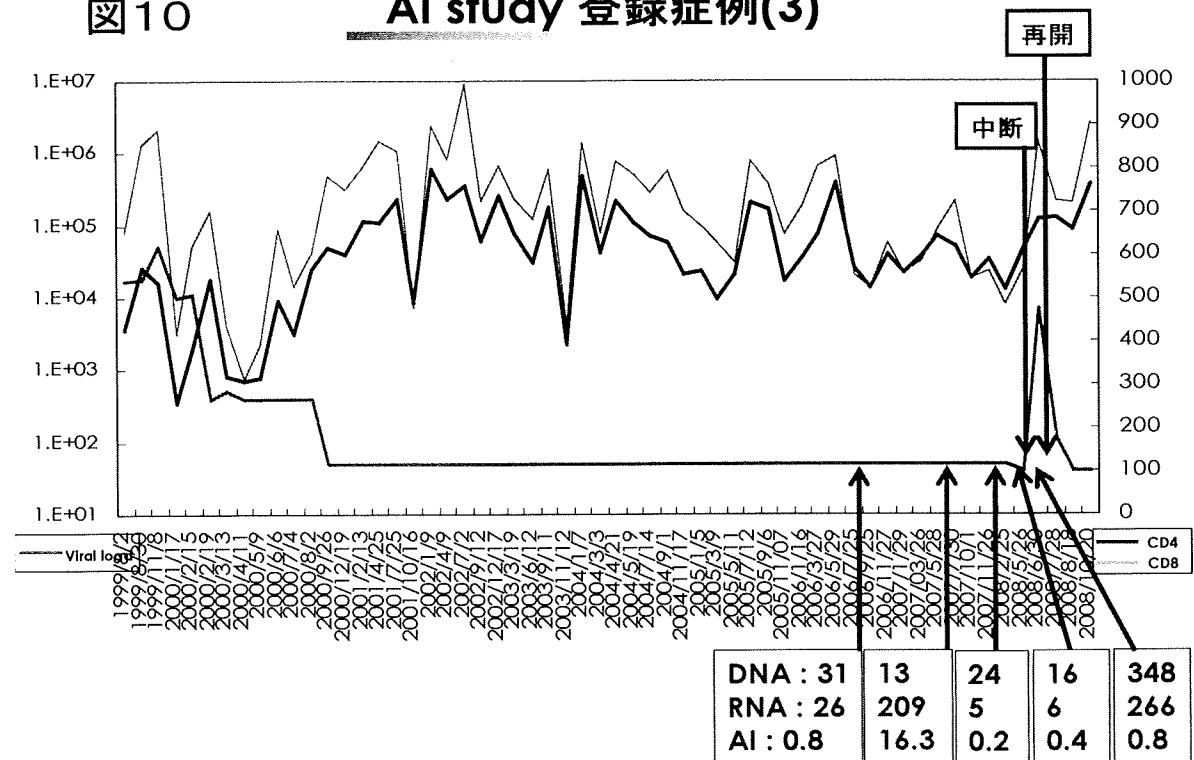


図10

AI study 登録症例(3)



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」

分担研究者 氏名 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 濱口元洋

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。

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-1 RNA 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。

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。

B. 研究対象と方法

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-1 RNA 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 copies/10⁶ 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/μL 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、何の不利益も発生しない。

C. 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 CD4=560/uL、HIV-RNA=50 >、HIV-DNA=感度以下、HIV-1mRNA=感度以下、AI=Very Low。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。21 日目の DNA=19, mRNA=13, AI=0.7 であった。治療再開後 4 カ月後に 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 CD4=576/uL、HIV-RNA=50 >、HIV-DNA=82、HIV-1mRNA=感度以下、

AI=Very Low。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 日目から治療再開 (AZT/3TC/ATVr)。54 日目の DNA=88, mRNA=3, AI=Very Low。治療再開 4 カ月後に 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 CD4=580/uL、HIV-RNA=50 >、HIV-DNA=16、HIV-1mRNA=6、AI=0.4。治療中断 30 日目に HIV-RNA=6.9x10³ (CD4=681) となり、32 日目から治療再開 (AZT/3TC/NVP)。30 日目の DNA=348, mRNA=266, AI=0.8 であった。治療再開 2 カ月後に 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 CD4=602/uL、HIV-RNA=50 >、HIV-DNA=25、HIV-1mRNA=感度以下、AI=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 HIV-RNA=43、CD4=449, DNA=13, mRNA=感度以下、AI=Very Low)。治療再開後 (TDF/FTC/ATVr に変更) 速やかに 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。

D. 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。

E. 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。

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) 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, 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.
- 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, 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.

- 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.
- 7) 濱口元洋. HIV 感染症治療の現況. *現代医学*.54: 115-122, 2006.

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) 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.
- 3) 濱口元洋 : 免疫再構築症候群とその対応. *J. AIDS Res.* 9: 98-101, 2007.
- 4) 平野淳、奥村直哉、久高祐一、寺畑奈美、高橋昌明、坂野和英、横幕能行、安岡彰、間宮均人、濱口元洋、金田次弘 : サイトメガロウイルス感染症を発症した日本人エイズ患者に対するバンガンシクロピルの効果および安全性についての評価. *日病薬誌* 43: 1397-1399, 2007.
- 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

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た。我々は国立国際医療センターの患者より、プロウイルスコピーが低く、活動指数が低くHAART中断のクライテリアに属する症例が存在するかどうかを抽出していたが、名古屋医療センターで先行して行われたHAART中断症例では、末梢血でウイルスの産生が一月以内に検出され、名古屋医療センターで先行して行われたHAART中断症例では、末梢血でウイルスの産生が一月以内に検出され、今回のマーカーをHAARTの中止のエビデンスとすることは出来なかった。

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)。

今回我々が、調査した患者サンプルのなかに、最初に名古屋医療センターで設定された症例は存在しなかった。

名古屋医療センターで先行して行われた HAART 中断症例では、末梢血でウイルスの産生が一月以内に検出され、今回のマーカーを HAART の中止のエビ

デンスとすることは出来なかった。以上の結果は、長期にわたるHAART治療成功例ですら急速なウイルスの立ち上がりが観察され、HAART治療は“一生継続”が必要であることを改めて確認した形になり、HIV-1感染症治療の厳しい現実を確認した形になった。

最後に一般的に、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 μM~1mM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。

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. 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. 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.
3. 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.
4. *Peltophorum africanum*, a traditional South African medicinal plant, contains an anti HIV-1 constituent, betulinic acid. Andros Theo, Tracy Masebe, Yasuhiro Suzuki, Haruhisa Kikuchi, Shoko Wada, Chikwelu Larry Obi, Pascal Obong Bessong, Motoki Usuzawa, Yoshiteru Oshima, Toshio Hattori. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*,217:93-99 (2009)

学会発表

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 Scienece Program 19thJoint Meeting of the AIDS Panels Kagoshima Dec. 6, 2006
2. Bi, X., Suzuki, Y., Oka, S. High Frequency of Effector Memory Regulatory T Cells in Advanced HIV-1 Patients Is Probably Due to Their High Proliferation. CROI 2007 abstract #412
3. 鈴木康弘. 南アフリカ植物からの抗 HIV 活性成分の単離. BioExpo2007, Tokyo, June 20-22.

4. T Hattori, X Peng, O Usami, H Ling, M Zhuang, Y Suzuki. Isolation of CD4-independent HIV-1 from a patient with Pneumocystis pneumonia that can efficiently enter and replicate in primary cultured human hepatocytes through CXCR4. 4th IAS Conference, Australia
5. Andros Theo, 鈴木康弘、菊地 晴久、今村 淳治、大島 吉輝、服部俊夫. 南アフリカの薬用植物からの抗 HIV 成分の単離. 日本エイズ学会、広島、11月28日
6. 今村淳治、鈴木康弘、肖、宇佐美、Promjyanyakul Warunya、服部俊. HIV-1 臨床分離株 SDA-1 は CD4 非依存性に初代培養肝細胞および B 細胞に感染増殖する. 日本エイズ学会、広島、11月28日
7. 鈴木康弘、横山 勝、佐藤裕徳、Promjyanyakul Warunya、今村淳治、服部俊. CD4 非依存性 HIV-1 臨床分離株 SDA-1 の責任領域のコンピューター及び分子生物学的な解析. 日本エイズ学会、広島、11月28日
8. 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
9. 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

研究分担者 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 HIV感染制御研究室員
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、末梢CD4陽性リンパ球中のプロウイルス（HIV-DNA）量を測定した。HIV-DNA量は検体採取時のCD4陽性リンパ球数と相関がみられたため、CD4陽性リンパ球100万個中のコピー数として算出した相対量と、1ml中のコピー数として算出した絶対量で解析を行った。ART導入前のCD4陽性リンパ球数はHIV-DNA量の相対量、絶対量の両者に対して逆相関を示した。一方、血中ウイルス量の感度未満の持続期間は相対量のみで逆相関を示し、絶対量に対しては統計学的に有意な関連を認めなかった。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絶対数・相対数ともにHIV-DNA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。しかし、ARTの継続期間が長い症例においては新規に産生されたT細胞により潜伏感染細胞が希釈されている可能性も示唆され、相対数と絶対数のいずれか有用であるかは今後の解析が必要である。

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薬服薬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（Nat Med. 9:727, 2003）とされ、生涯の抗HIV薬の服用の根拠とされている。前述の報告では、潜伏感染細胞を末梢血中のCD4陽性リンパ球数100万個中のinfectious units（IUPM）として算出されてお

り、潜伏感染細胞の半減期は44ヶ月で、100万個の潜伏感染細胞が体内から駆逐されるのに73.4年と推定された。しかし、IUPMとして算出する方法の感度は低く、その方法を用いた推定値には一定の限界があり、十分に吟味されているとは言い難い。そこで、金田らによって開発された高感度PCR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）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（40-50 copies/ml）未満で持続されている患者を対象

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量はCD4陽性Tリンパ球100万個に含まれるコピー数（相対量）、もしくは以下の計算式を用いて1ml中のコピー数（絶対量）として算出した。

$$\text{絶対量} = \text{相対量} \times \text{CD4数} (\text{/u1}) \div 1000$$

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、採血時のCD4陽性リンパ球数）との関連についてSpearman's rank testを用いて、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、末梢CD4陽性Tリンパ球中のHIV-DNA量を測定した。患者背景は男性62名と女性5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（図1）は相対量で平均 176 ± 433 copies/ 10^6 CD4+ lymphocytes（以下単位はコピー数のみ記載）、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。一方絶対量は平均 83 ± 179 copies/ml（以下単位はコピー数のみ記載）、中央値18コピー、最大1267コピー、最少は2コピー未満（感度未満）であった。

次に臨床情報との相関について検討した。まずHIV-DNA量と検体採取時のCD4陽性リンパ球数との相関を解析（図2）したところ、HIV-DNA量（相対量）とCD4陽性リンパ球数に有意な逆相関を認めた（ $\rho = -0.31$, $p = 0.010$ ）。これはART導入後の新生Tリンパ球によって潜伏感染細胞が希釈されている可能性を示唆している。この有意な逆相関は絶対量と比較することで消失した（ $\rho = -0.12$, $p = 0.34$ ）。

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、ART導入前のCD4数の意義が異なるため解析から除外し、52症例で検討を行った。図3に示されるように相対量（ $\rho = -0.48$, $p = 0.0003$ ）、絶対量（ $\rho = -0.44$, $p = 0.001$ ）。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。相対量に関しては弱いながらも有意な逆相関を認めた（図4、 $\rho = -0.288$, $p = 0.033$ ）。しかし、絶対量に関しては有意な逆相関は認めなかった。

最後に、急性期に治療した4例（測定値は感