

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、相対量(図4)、絶対量(図は省略)ともに急性感染例にて有意にプロウイルス量が低下していた($p=0.0098$)。

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量の測定をHAART著効例に対して行った。HIV-RNA量やactivity indexの解析、HIV-DNA量の再現性、HIV-DNA量が低値を示した症例の解析は平成20年度の年次報告書を参照していただき、本報告では省略とした。

当初は海外の報告と同様に相対量、すなわちCD4陽性リンパ球100万個あたりのコピー数として解析を行った。しかし、HIV-DNA量と検体採取時のCD4陽性リンパ球数に有意な逆相関を認めため、本報告では相対量に加え、血液1ml中のコピー数(絶対量)として解析を追加した。これは治療期間の延長によりCD4陽性リンパ球数が増加する影響を除外するためである。解析結果は省略するが、今回解析したデータにおいても、検体採取時のCD4陽性リンパ球数はVLの感度未満の持続期間、ART開始前のCD4陽性リンパ球数と相関を示しており、HIV-DNA量(相対量)と逆相関を示していた。従い、絶対量として検討を加えることは妥当な処理だと考えられる。

HIV-DNA量の相対量と治療期間は逆相関を示した。回帰分析では血中VLの感度未満が約1400日(約47ヶ月)持続すれば残存プロウイルス量が半減することを意味しており、前述の44ヶ月とほぼ同等の値となった。しかし、この有意差は絶対量をとることによって消失した。ART施行下においては新たな潜伏感染細胞の出現は

たとえあったとしても少数であると考えられる。治療期間の延長により残存プロウイルス量の相対量が減少したのは、単にCD4陽性リンパ球数全体が増えたため潜伏感染細胞が希釈された可能性が最も考えやすい。この可能性が正しいとなると、ARTによって体内からHIVがすべて駆逐されるには前述の報告よりさらに長い年月を要することになる。

一方、治療前のCD4陽性リンパ球数と残存プロウイルス量は逆相関を示しており、特に急性期に治療を導入した症例においては低レベルに維持されていた。この統計学的有意差は相対量のみならず、絶対量でも認めた。このことは早期に治療を行うことによって残存プロウイルス量を低く抑える可能性があることを意味している。特に急性期で治療を開始した症例は、半数において残存プロウイルス量が感度未満となったため、どの程度のレベルに抑えられているかは推定が不可能であった。もし1000分1に抑えられているとなれば、ARTが著効している症例においては20年程度で治癒する可能性も残されている。

今回我々は67名の検体を解析し、残存プロウイルス量の意義について検討した。有意な結果が得られた一方、個々の症例における経時変化、投与薬剤による効果の違い、相対量と絶対量のいずれが真の結果か等検討すべき項目は多数存在する。今後は測定する症例数を増やすとともに、残存プロウイルス量測定の意義を明らかにしたい。

E. 結論

ARTが著効した67症例に対して末梢CD4陽性Tリンパ球数の残存プロウイルス量を測定した。その相対量はART導入前のCD4陽性リンパ球数や治療期間と関連した。CD4陽性リンパ球やVL

にとつ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た。さらに急性期での治療導入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。しかし、残存プロウイルス量の相対量と絶対量の比較から、相対量は新しく産生されたCD4陽性リンパ球によって希釈され過小評価されている可能性も示唆された。

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。

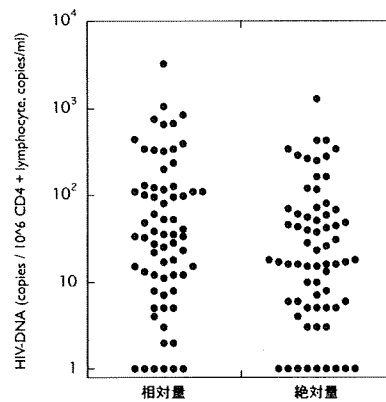


図1 残存プロウイルス量

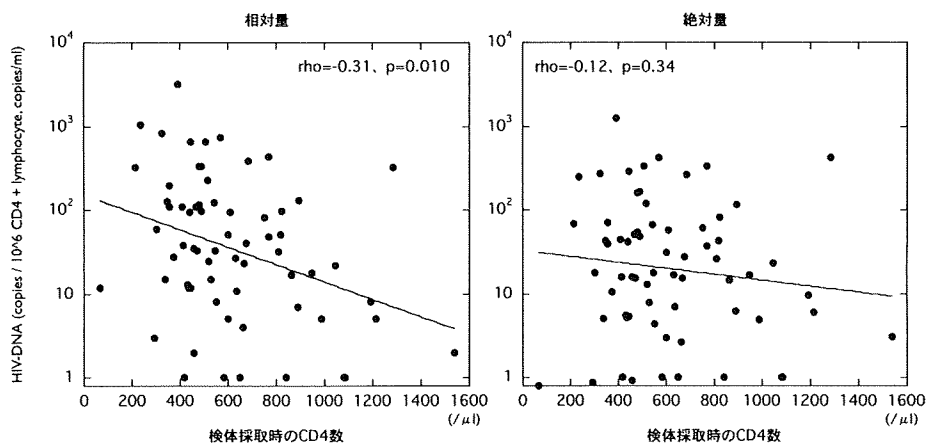


図2 残存プロウイルス量と検体採取時のCD4陽性リンパ球数

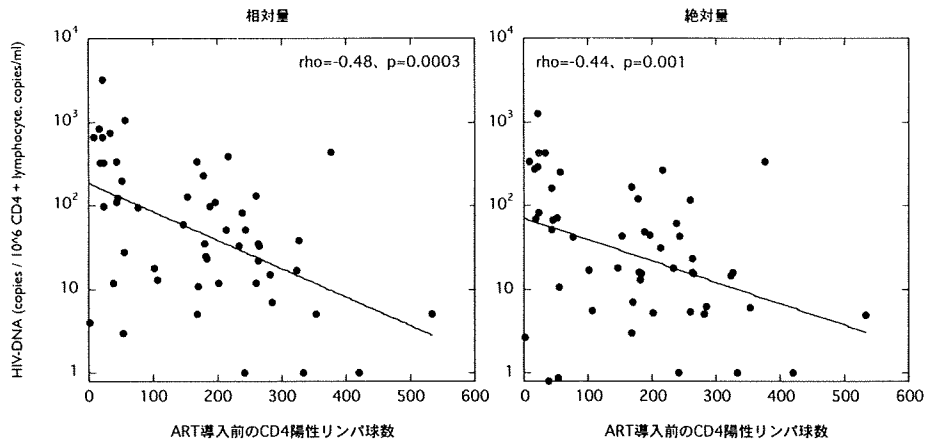


図3 残存プロウイルス量とART導入前のCD4陽性リンパ球数

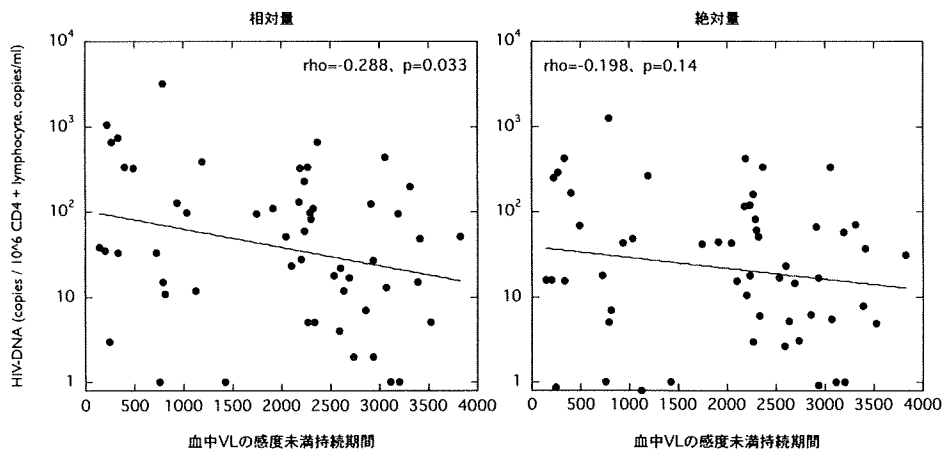


図4 残存プロウイルス量と血中VLの感度未満持続期間

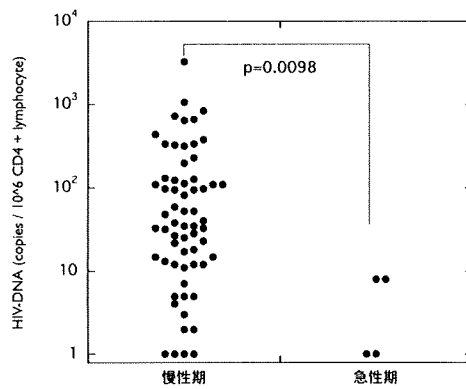


図5 急性期治療例と慢性期治療例の比較

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 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)とその転写活性能(HIV-mRNA)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。当施設では 2006 年から 2008 年までの間に HAART 反応良好群 28 症例について解析を行った。HIV-DNA 低値(<2 コピー/ 10^6 cells)、activity index 低値(very low)の症例は 8 例であった。8 例中 5 例は感染早期に HAART を開始した症例であった。感染早期治療導入例で経時的変化を検討したところ、HIV-DNA、HIV-mRNA、activity Index は経時的に減少する傾向があり 2 年以内に HIV-RNA、activity index とともに感度以下になっていた。これらの患者で治療中断が可能かどうかについては、今後の検討が必要である。

A. 研究目的

多剤併用療法(HAART)により HIV-1 の制御が可能になり、HIV-1 感染者の予後は大きく改善した。現在「HAART は一生継続」がコンセンサスになっているが、長期内服に伴う副作用や、薬剤耐性 HIV が問題になってきており、抗 HIV 薬を一生にわたり服用することは、患者および社会へ大きな負担をかけることになる。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(HIV-DNA)とその転写活性能(HIV-mRNA)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最終的な目的とする。当施設で、治療経過良好な症例で HIV-DNA および HIV-mRNA を測定し、解析、検討を行った。

B. 研究方法

対象は当院免疫感染症科を受診中で、抗 HIV 療

法施行中の HIV-1 感染者のうち血中 HIV-1 RNA 量が検出限度(50copies/ml)以下を維持している患者。Informed Consent のもとに採血を行い、末梢血 CD4 陽性 T 細胞中の HIV-1 プロウイルス(HIV-DNA)と HIV-1 mRNA の定量を行う。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(平成 18 年 7 月)。

C. 研究結果

1. HAART 中断症例での末梢単核球中 HIV-DNA の検討

当院における 3 例の HAART 中断症例について検討を行った。3 例中 2 例は、HAART 中断後、CD4 陽性細胞の低下により治療再開されたが、1 例は CD4 陽性細胞数が $400-500/\mu l$ に保たれており、治療中断を継続している。中断中の末梢血球中の HIV-DNA は、HAART 再開した症例では 1103 コピー/ 10^6 cells、治療中断持続している症例では 26 コ

コピー/10⁶cellsであった。HIV-DNAの差が治療中断後の予後に関連している可能性もある

2. 末梢 CD4 陽性 T リンパ球中の HIV-DNA (残存ブロウイルス量) とその活動指数の検討

(a) 測定対象症例

治療経過良好な症例として、計 28 名 (うち 5 名は感染早期に治療開始、3 名は複数回測定) にて、HIV-DNA、HIV-mRNA の測定を行った。症例の内訳は、男性 23 名、女性 5 名、血友病 4 名、性感染 24 名、感染早期の HAART 導入例 5 名、平均年齢 39.5 歳 (20-68 歳)、測定時の平均 CD4 陽性 T 細胞数 662/μl (382-1215/μl)、HIV-RNA 感度以下を継続している期間 3.5 年 (0.1-9.5 年) であった。HIV-DNA 量は、平均 205 コピー/10⁶cells (0-1720/μl)、HIV-mRNA は、平均 454 コピー/10⁶cells (0-7381/10⁶cells)、activity index (HIV-DNA/HIV-mRNA) は 7.3 (very low-142) と症例により様々な値を示した。治療中断対象症例になり得る HIV-DNA 低値 (<2 コピー/10⁶cells)、activity index 低値 (very low) の症例は、今回の検討では 8 例、認められた。

(b) 感染早期に HAART 導入した症例での検討

感染早期に HAART を開始した 5 例中 2 例は、初回測定時 (HAART 導入後 3、6 カ月、血清中の HIV-RNA <50 コピー/ml 到達後 1、2 カ月) に HIV-DNA、HIV-mRNA はいずれも検出感度以下であり activity Index は very low であった。残りの 3 例は、初回測定後 (各々 HAART 導入後 8、6、12 カ月、血清中の HIV-RNA <50 コピー/ml 到達後 6、3、6 カ月)、約 6 ヶ月ごとに 2-3 回、測定した。初回測定時は 3 例とも HIV-DNA は陽性 (19、36、218 コピー/ml)、HIV-mRNA は 2 例で陽性 (318、1707、検出感度以下)、activity Index は 2 例は 16.8、および 46.9 と比較的高値を示し、1 例は very low であった。しかし 2 回目以後の測定にていずれの症例とも多少の測定値の誤差はあるが血清中の HIV-RNA <50 コピー/ml 到達後 2 年以内に HIV-DNA、HIV-mRNA はいずれも検出感度以下とな

り activity Index も very low となった。

D. 考察

治療の中断により予後が悪化し、予後の悪化は治療再開にても元のレベルに戻らないことが大規模試験で明らかとなった (SMART study)。しかし良好な経過をたどる症例もあり、症例を選定すれば、治療中断が可能であると考えられる。今回、HIV-DNA、HIV-mRNA、activity index が治療中断の指標となり得るかを検討した。

今回の検討では、治療反応良好群にて測定を行ったが、HIV-DNA、HIV-mRNA、activity Index は、症例により様々な値をとり、一定の傾向は認められなかった。しかし、感染早期に HAART 導入した症例では、同一症例内で経時的に測定すると治療の経過とともに HIV-DNA、HIV-mRNA、activity Index は低下した。また、治療中断例での検討においては、成功例では末梢単核球中の HIV-DNA は低値であった。HIV-1 リザーブには CD4 陽性 T リンパ球だけではなく monocyte 系を始め他の細胞もとなり得ることを考慮すると、末梢 CD4 陽性 T リンパ球中の HIV-DNA、HIV-mRNA、activity Index だけを治療中断の指標とするのは危険であり、むしろ末梢血単核球での検討の方が望ましい可能性もある。しかし感染早期に HAART 導入した症例や、一部の症例では CD4 陽性 T リンパ球以外の HIV-1 リザーブが少ない可能性があり、そのような症例では末梢 CD4 陽性 T リンパ球中の HIV-DNA は治療中断の指標となり得る。

E. 結論

- 当院通院中の HIV 感染者 28 名において検討を行った結果、8 名が HIV-DNA 低値、activity Index 低値であり、治療中断対象症例になり得る。
- 急性期に HAART を開始した症例も治療中断対象症例になり得る。
- 感染早期に HAART を導入した症例を含め、一部の症例では末梢 CD4 陽性 T リンパ球中の

HIV-DNA、Activity Index は治療中断の指標となる可能性がある。

- 治療中断に関しては末梢 CD4 陽性 T リンパ球中の HIV-DN、Activity Index 以外のパラメーターも検討する必要がある。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Minami R, Takahama S, Ando H, Miyamura T, Suematsu E, and Yamamoto M. Human herpesvirus 8 DNA load in the leukocytes correlates with thrombocytopenia in HIV-1 infected individuals." which you submitted to AIDS Res Hum Retroviruses. AIDS Res Hum Retroviruses. 25:1-8, 2009.
2. 南 留美, HAART による脂質代謝異常と高分子アディポネクチンの関連, Focus on HIV/AIDS, 2008
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, 60,113-117, 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(1), 75-82, 2007
5. 藤崎誠一郎, 藤崎彩恵子, 伊部史朗, 浅黄司, 伊藤俊広, 吉田繁, 小池隆夫, 大家正泰, 渡邊香奈子, 正兼亜季, 上田幹夫, 瀧永博之, 松田昌和, 貞升健志, 長島真美, 岡田清美,

近藤真規子, 秦眞美, 溝上泰司, 森治代, 南留美, 白阪琢磨, 岡慎一, 杉浦互, 金田次弘
日本における HIV-1 遺伝子型薬剤耐性検査のコントロールサーベイ、日本エイズ学会誌,9(2)136-146,2007

6. 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 243:41-47,2006
7. 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
8. 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. High molecular weight form of adiponectin in antiretroviral drug-induced dyslipidemia based on in vivo and in vitro analyses. Minami R, Takahama S, Ando H, Yamamoto M, XVII International AIDS Conference, 3-8 August, 2008, Mexico City
2. 抗 HIV 剤の肝細胞, HCV 感染肝細胞における脂質代謝への影響, 南 留美, 高濱 宗一郎, 安藤 仁, 山本 政弘, 第 20 回日本エイズ学会, 11 月 26-28 日, 大阪
3. プロテアーゼ阻害剤が骨代謝に及ぼす影響, 高濱宗一郎, 南 留美, 安藤 仁, 山本 政弘, 第 20 回日本エイズ学会, 11 月 26-28 日, 大阪
4. 社会的背景の複雑な患者の退院調整を振り返って一発達遅滞の患者の一事例を通じて一, 長与由紀子, 城崎真弓, 辻 麻理子, 本松由紀, 首藤美奈子, 安藤 仁, 南 留美, 山本政弘, 第 20 回日本エイズ学会, 11 月 26-28 日, 大阪
5. 2003-2007 年の新規 HIV-1 感染者における薬剤耐性頻度の動向, 杉浦 互, 瀧永博之, 吉田繁, 南 留美, 山本 政弘ら, 第 20 回日本エイズ学会, 11 月 26-28 日, 大阪
6. Human herpesvirus 8 DNA load in leukocytes of HIV-1 infected patients: Correlations with thrombocytopenia. Rumi Minami, Soichiro

Takahama, Hisashi Ando, Masahiro Yamamoto,
8th International Congress on AIDS in Asia
and the Pacific, Aug 19-23, 2007, Colombo

7. Westren blot 法にて長期間陰性が持続している HIV-1 陽性者の 1 例, 南 留美、高濱宗一郎、安藤 仁、山本政弘、第 19 回日本エイズ学会、11 月 28-30 日、広島
8. HAART による脂質代謝異常と高分子アディポネクチンの関連、南 留美、安藤 仁、高濱宗一郎、山本政弘、第 19 回日本エイズ学会、2007 年 11 月 28-30 日、広島
9. 当院における HAART 導入患者での骨粗鬆症の評価、高濱宗一郎、山本政弘、南 留美、安藤 仁、城崎真弓、長与由紀子、第 19 回日本エイズ学会、2007 年 11 月 28-30 日、広島
10. 腹部超音波による脂肪肝の有無と抗 HIV 療法に関する検討、安藤 仁、山本政弘、南 留美、高濱宗一郎、城崎真弓、長与由紀子、第 19 回日本エイズ学会、2007 年 11 月 28-30 日、広島
11. 当院での HIV 感染症患者におけるメンタルヘルスについて、辻 麻理子、城崎真弓、長与由紀子、南 留美、高濱宗一郎、安藤 仁、井上 緑、山本政弘、第 19 回日本エイズ学会、2007 年 11 月 28-30 日、広島
12. 2003-2006 年の新規 HIV-1 感染者における薬剤耐性頻度の動向、杉浦 互、瀧永博之、吉田繁、南 留美、山本政弘ら、第 19 回日本エイズ学会、2007 年 11 月 28-30 日、広島
13. 当院における HIV-1 急性感染患者 8 例の検討、高濱宗一郎、南 留美、山本政弘、渡邊秀之、宮村知也、末松栄一、第 276 回九州地方会、1 月 13 日、福岡
14. HIV-1 感染症における HHV-8 DNA 測定の臨床的意義の検討 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

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 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(初年度)
佐々木 悟 仙台医療センター検査科技師(平成19, 20年度)

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、初年度(平成18年度)は「治療上の理由から HAART 中断をおこなった症例」について検討をおこなった。経験された臨床例すべてで、中断後短期間で HIV ウイルス量(VL)増加と CD4 陽性リンパ球(CD4)の減少が観察された。臨床例に対して積極的な HAART 中断を行うためには厳密な対象患者の選定を行うとともにインフォームドコンセントの重要性が強調された。平成19年度は HAART 成功例では速やかな VL の低下が得られ、時間経過とともに CD4 が増加し対象適格症例が増加していく可能性が示唆された。平成20年度(最終年度)では HAART 中断後も VL が測定限界以下に抑制され続ける例が経験されたが、CD4 の漸減が示唆されることから免疫能の維持が達成されているかどうかの問題点が示された。また、最終年度に名古屋医療センターで試みられた臨床トライアルの結果は failure であり末梢 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が治療中断の指標となることを明らかにすることができなかった。

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 感染症は予後が確実に改善し、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。他方 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、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-1mRNA 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 VL が測定限界以下に抑制され、かつ CD4 の回復が目覚ましい 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/ 10^6 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-1mRNA 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-1mRNA 転写活性を活動指数（全長 HIV-1mRNA 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

平成 18 年(初年)度:当施設における HAART 中断例の背景と中断前後における CD4、VL の動きについて調査、検討した。

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 $476/\mu\text{l}$ 、VL は 2.5×10^4 コピー/ml で 7 年間治療後医療費の問題で中断。中断時 VL < 50 コピー/ml、CD4 は $906/\mu\text{l}$ 。中断約 3 ヶ月で CD4 は減少 ($436/\mu\text{l}$)、VL: 2.2×10^4 。症例 2 : 64 歳男性、homosexual。HAART 開

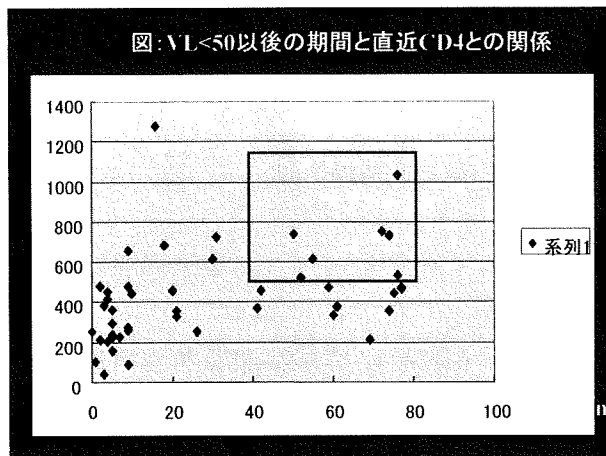
始時の CD4 は $9/\mu\text{l}$ 、VL は $> 10^6$ コピー/ml で 14 ヶ月治療後副作用で 7 週間中断。中断時 VL < 50 コピー/ml、CD4 は $212/\mu\text{l}$ 。HAART 再開時 CD4 は $63/\mu\text{l}$ 、VL $> 10^4$ コピー/ml。症例 3 : 60 歳男性、heterosexual。HAART 開始時の CD4 は $159/\mu\text{l}$ 、VL は 8.9×10^4 コピー/ml で 3 年 8 ヶ月治療後副作用で中断。中断時 VL < 50 コピー/ml、CD4 は $294/\mu\text{l}$ 。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 $1.4/\mu\text{l}$ 、VL は $> 10^6$ 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 $> 10^6$ 。医療上の理由で HAART を中断した症例はすべて中断後すみやかに VL の上昇と CD4 の減少がみられた。

平成 19 年度:対象例の条件として、血漿 HIV ウイルス量が測定限界以下 (VL < 50 copies/ml) である期間が 3 年以上で、CD4 陽性リンパ球数 $> 500/\mu\text{l}$ を 1 年以上維持している症例とした場合、7 症例が選択された。すべて男性であった。感染経路、初診時病期、初診時年齢 (y)、治療開始時 CD4 ($/\mu\text{l}$)、治療開始時 VL (コピー/ml)、平成 19 年 6 月時点(本調査時点)における直近の CD4 陽性細胞数 ($/\mu\text{l}$)、HIV-1 ウイルス量 < 50 コピー/ml 到達後から調査時までの期間 (Mo) の順に記載する。症例 1 : 血液製剤、無症候性キャリアー、37、411、1000、730、74。症例 2 : 血液製剤、無症候性キャリアー、43、不明、30000、748、72。症例 3 : 血液製剤、無症候性キャリアー、28、354、27000、1030、76。症例 4 : 血液製剤、無症候性キャリアー、33、206、76000、533、76。症例 5 : 男性同性間性交渉、無症候性キャリアー、30、390、不明、521、52。症例 6 : 男性同性間性交渉、無症候性キャリアー、25、181、40000、618、55。症例 7 : 男性同性間性交渉、AIDS、42、11、470000、739、50。

図に示すごとく、ウイルス量が測定限界以下 (< 50 コピー以下) に抑制されてからの期間が

長いほど CD4 は高値を呈した。

平成 20 年度：HAART 中断後も VL が測定



限界以下を維持している症例を経験した。中断前 VD4 は $591/\mu\text{l}$ 、VL は <50 コピー。中断後 5 ヶ月時点で VL の増加はみられていない。

D. 考察

HAART 中断を目的とし、その指標として HIV プロウイルス量とその活動指数を用い、基礎的検討から臨床への応用（適応）を試みる多施設共同研究を名古屋医療センターを中心施設として行なった。臨床的には我々の施設で経験されたごとく HAART 中断後も VL の上昇が観察されない症例が存在している。また、稀ではあるが、感染初期から無治療にもかかわらず VL が抑制され続け CD4 の低下も観察されない症例も経験される。残念ながらそのメカニズムは不明のままである。初年度の結果から CD4 の値や長期の VL の抑制のみでは中断の指標にならず、研究テーマである HIV プロウイルス量とその活動指数にそれを期待したが名古屋医療センターで最終年度に行なわれた臨床トライアルでは failure であり臨床検討は中止を余儀なくされた。結果として HIV プロウイルス量・活動指数が HAART 中断の指標となることは証明できなかった。HAART 施行中の宿主の状態を把握しようとする時ウイルス側、宿主側双方からのアプローチが必要となるが、感染後の HIV リザーバーの点を考えた場合、今回用いられた指標は必要条件ではあっても十分

条件にはなり得なかったと考えられる。また HAART 開始後の CD4 の増加の程度は個人差が大きく宿主側の要因も大きいことが示唆された。今後は上記の点を考慮しアプローチしていく必要がある。

E. 結論

現時点で HAART 中断を積極的に行なえるエビデンスは存在しない。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

なし

2. 実用新案特許

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）

総合研究報告書

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

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	廣部雅美	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 検査員
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	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

研究要旨

プロウイルス活動指数測定法の一般検査化に向けて、HIV-1 DNA 量、及び、HIV-1 mRNA 量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 DNA 定量系に関しては、高い感度を維持したまま、実験系を簡略化することに成功した。また、HIV-1 mRNA 定量系に関しては、標準 RNA 物質の作成法と長期保存法を確立し、逆転写効率を加味した測定のための準備が整った。ワンステップ RT・Real-Time PCR による定量系の簡素化を試みた結果、十分な感度を得ることができなかったが、代替法であるツーステップ RT・Real-Time PCR を検討した結果、広い測定範囲と高い感度を持ち合わせていることが分かった。実検体の測定に向けては、今後、更なる検討が必要と思われるが、本検討により、プロウイルス活動指数測定法の一般検査化に向けて克服すべき重要な問題を概ね解決できたと考えられる。

A. 研究目的

研究班の目的は、血中 HIV-1 RNA 量(viral load)が検出限度以下となった HAART 著効例を対象に、CD4 陽性 T 細胞内の HIV-1 DNA 量と HIV-1 mRNA 量を定量し、プロウイルスの活動指数(HIV-1 mRNA 量/HIV-1 DNA 量)が治療中断の指標として利用できるか否か

を明らかにすることである。我々は、プロウイルス活動指数測定法の一般検査化に向けて、HIV-1 DNA 量、及び、HIV-1 mRNA 量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。

B. 研究方法

①HIV-1 DNA 定量系の簡素化の検討：原法の HIV-1 DNA 定量系では、定量前に 20 サイクルの PCR(定量前 PCR)を行うことにより、高い感度を確保している。そこで、Real-Time PCR 自体の感度を高めることにより、定量前 PCR を省略できるかどうかを検討した。この検討には、ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems)を使用した。

②標準 RNA 物質の作成と保存方法の検討：原法の 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、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。そこで、標準 RNA 物質の作成とその保存法について検討を行った。標準 RNA は、肺炎球菌遺伝子、HIV-1 gag 遺伝子、又は、human β 2M 遺伝子を含むプラスミドを制限酵素により直線化した後、T7 RNA ポリメラーゼを用いたインビトロ転写反応により RNA を産生した。インビトロ転写反応液から RNA を精製後、各種の検討保存溶液に溶解し、安定性を検討した。

③細胞からの mRNA 抽出方法の検討：原法、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 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^5$ cells/ml に pH7.2 PBS にて調整して用いた。

④ワンステップ RT・Real-Time PCR による HIV-1 mRNA 定量系の簡素化の検討：原法の HIV-1 mRNA 定量系は、RT 反応後に定量前

PCR を行い、その後 Real-Time PCR を行う 3 段階のステップから成る。そこで、測定系の簡素化のために、ワンステップ RT・Real-Time PCR の導入を検討した。標準 RNA 物質と 4 社から販売されているワンステップ RT Real-Time PCR 試薬を用いて、良好な検量線が作成できるかどうかを検討した。

⑤ツーステップ RT・Real-Time PCR による HIV-1 mRNA 定量系の簡素化の検討：ワンステップ RT・Real-Time PCR による HIV-1 mRNA 定量系の簡素化の検討の代替として、ツーステップ RT・Real-Time PCR による HIV-1 mRNA 定量系の簡素化の検討も行った。Transcriptor Reverse Transcriptase (Roche)を用いて逆転写反応を行い、標準 RNA を cDNA へ変換した。Real-Time PCR 試薬には、QuantiTect Probe PCR Kit (QIAGEN)を用い、装置として ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems)を使用した。

C. 研究結果

①HIV-1 DNA 定量系の簡素化の検討：Real-Time PCR の最適化を行った結果、HIV-1 DNA 及び human B2M コピー数を 5 コピー/tube まで高精度(CV<5%)に測定することが可能となった(図 1)。

②標準 RNA 物質の作成と保存方法の検討：肺炎球菌の標準 RNA 物質を用いた保存条件の検討にて、保存液として *E. coli* total RNA、又は、*E. coli* total RNA に RNase inhibitor を $1 \mu\text{l}/30 \mu\text{l}$ 濃度で加える方法が最も良いことがわかった。この方法で標準 RNA 物質は、13 週間 4°C で安定であった。同様な方法で HIV-1 gag RNA 標準物質の保存安定性も確認した。また、標準 RNA 物質を一回使用分ずつ分注して -80°C で冷凍保存した

場合にも、検討した5ヶ月間にわたって安定した検量線が得られ、標準RNA物質を安定に保存できることが分かった。

③細胞からの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進めることがわかった。

④ワンステップRT・Real-Time PCRによるHIV-1 mRNA定量系の簡素化の検討：4種のワンステップRT Real-Time PCR試薬を用い、標準RNA物質を用いて検量線を作成したが、いずれの試薬も1000コピー/tube以下では安定したシグナルが得られず、我々が求めるような高い感度を得ることができなかった。

⑤ツーステップRT・Real-Time PCRによるHIV-1 mRNA定量系の簡素化の検討：標準HIV-1 gag RNAを用いて、検量線を作成した結果、10の1乗のオーダーから10の8乗のオーダーにわたって、概ね良好な検量線が得られた(図2)。10回の測定により再現性を調べた結果、チューブあたりで設定した最小値である12.5コピーにおいても、Cv値が1.998%と良好な再現性が得られた(図3)。

D. 考察

①HIV-1 DNA定量系の簡素化の検討：Real-Time PCRの最適化を行うことにより、HIV-1 DNA及びhuman B2Mコピー数を5コピー/tubeまで高精度(CV<5%)に測定することが可能となった。これは、原法の最小検出感度(2コピー)とほぼ同等の感度であり、原法の定量前PCRの省略が可能になっ

たと考えられる。HIV-1 DNA測定系に関しては、一般検査化に向けて大きく前進したと言える。

②標準RNA物質の作成と保存方法の検討：測定に必要な標準RNA物質の作成法と長期保存法を確立した。今後、これらの標準RNA物質を用いて測定を行うことにより、逆転写効率を加味した測定が可能になったことも有用であると考ええる。

③細胞からのmRNA抽出方法の検討：本検討により、細胞からの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できたことで、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える。

④ワンステップRT・Real-Time PCRによるHIV-1 mRNA定量系の簡素化の検討：検討したいずれの試薬でも我々が求めるような高い感度を得ることができなかった。ワンステップRT・Real-Time PCRの感度を向上させるための更なる検討が必要と考えられる。また同時に、代替法としてツーステップRT・Real-Time PCRによるHIV-1 mRNA定量系の検討が必要と考えられた。

⑤ツーステップRT・Real-Time PCRによるHIV-1 mRNA定量系の簡素化の検討：ワンステップRT・Real-Time PCRによるHIV-1 mRNA定量系の簡素化の検討の代替として、本測定法を検討した結果、チューブあたり10の1乗のオーダーから10の8乗のオーダーまで概ね良好な検量線が得られ、チューブあたりで設定した最小値である12.5コピーにおいても、Cv値が1.998%と良好な再現性が得られた。このツーステップRT・Real-Time PCRによるHIV-1 mRNA定量系の

広い測定範囲と高い感度は、ワンステップ RT・Real-Time PCR では得られなかったものであり、一般検査化に向けて大きく前進したと言える。ただし、追加で実施した血漿検体を用いた測定結果では、比較に用いた Cobas TaqMan HIV-1(Automatic)の測定値と乖離した結果が得られており、実検体の測定に向けては、更なる検討が必要と思われる。

E. 結論

プロウイルス活動指数測定法の一般検査化に向けて、HIV-1 DNA 量、及び、HIV-1 mRNA 量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 DNA 定量系に関しては、高い感度を維持したまま、実験系を簡略化することに成功した。また、HIV-1 mRNA 定量系に関しては、標準 RNA 物質の作成法と長期保存法を確立し、逆転写効率を加味した測定のための準備が整った。ワンステップ RT・Real-Time PCR による定量系の簡素化を試みた結果、十分な感度を得ることができなかったが、代替法であるツーステップ RT・Real-Time PCR を検討した結果、広い測定範囲と高い感度を持ち合わせていることが分かった。実検体の測定に向けては、今後、更なる検討が必要と思われるが、本検討により、プロウイルス活動指数測定法の一般検査化に向けて克服すべき重要な問題を概ね解決できたと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 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.

- 2) 伊部史朗、岡田清美、近藤恭子、廣部雅美、魚住利樹、加堂真由、和山行正、金田次弘.

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

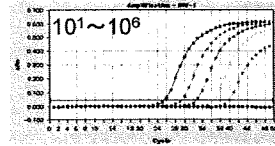
第 21 回 日本エイズ学会学術集会, 2007 年 11 月, 広島.

G. 知的財産権の出願・登録状況

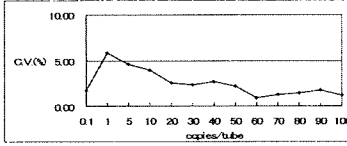
なし

図1 HIV-1 DNA定量法の最適化

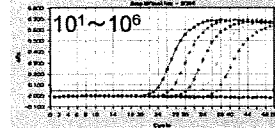
HIV-1 DNA定量系



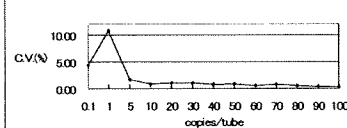
各 n=12



β2M DNA定量系



各 n=12



検討法は、HIV-1 DNA 及び β2M DNA を共に
5コピーまで高精度(CV<5%)で測定できた。

図2 ツーステップRT・Real-Time PCRにて
作成した検量線

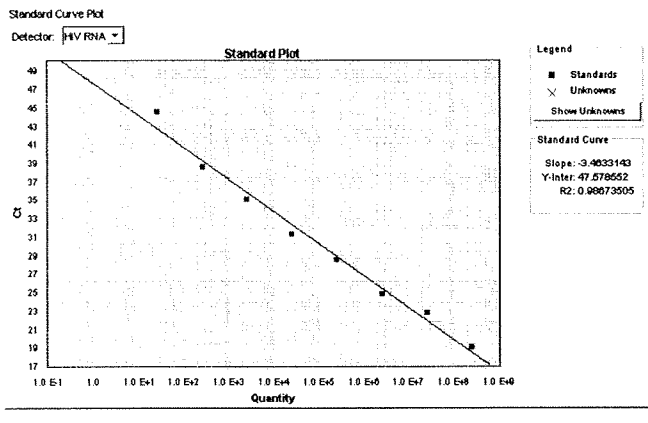


図3 ツーステップRT・Real-Time PCRの再現性

Real-time PCR											
Ct値 (copies/tube)											
回数	12.5	25	37.5	50	62.5	75	87.5	100	112.5	125	137.5
1	42.24	42.07	41.86	41.16	40.34	39.92	40.26	38.76	39.58	39.14	38.64
2	43.01	43.06	42.07	41.58	40.17	39.65	39.04	40.03	39.47	38.46	36.94
3	43.60	42.49	41.70	41.92	41.31	40.19	40.19	39.45	40.08	38.10	37.63
4	42.61	43.71	41.77	40.37	41.58	39.87	40.37	39.42	37.77	37.81	38.24
5	43.08	42.48	41.73	41.53	40.93	39.99	40.47	38.66	38.09	38.50	36.63
6	42.91	42.86	42.48	40.22	40.13	39.91	40.64	39.53	39.02	39.06	37.50
7	41.57	42.82	41.66	41.89	41.09	40.20	38.99	39.54	38.57	38.82	38.70
8	41.22	41.19	41.67	41.09	40.30	40.64	39.21	38.89	38.58	38.82	38.61
9	44.44	43.95	42.48	41.36	40.27	40.08	39.21	39.35	38.46	37.71	38.07
10	43.30	42.44	42.93	41.25	41.03	40.09	39.38	38.62	38.62	38.38	38.55
平均値	43.098	42.708	42.029	41.237	40.714	40.053	39.776	39.224	38.824	38.483	37.950
SD	0.861	0.790	0.449	0.570	0.532	0.263	0.561	0.167	0.711	0.494	0.746
2SD	1.722	1.579	0.897	1.141	1.063	0.526	1.123	0.933	1.422	0.988	1.491
CV	1.998	1.819	1.067	1.383	1.305	0.656	1.563	1.189	1.831	1.283	1.965
2SD	41.376	41.128	41.131	40.096	39.651	39.528	38.453	38.291	37.402	37.495	36.459
2SD	44.820	44.287	42.926	42.378	41.777	40.579	41.099	40.157	40.246	39.470	39.441

Ⅱ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Hagiwara T, Hattori J, <u>Kaneda T.</u>	PNA-In Situ Hybridization Method for Detection of HIV-1 DNA in Virus-Infected Cells and Subsequent Detection of Cellular and Viral Proteins.	Darby IA	In Situ Hybridization Protocols 3 rd edition	Humana Press	NJ	139-149	2006

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	頁	出版年
Bi X, <u>Suzuki Y</u> , Gatanaga H, Oka S.	High frequency and proliferation of CD4+FOXP3+ regulatory T cells in HIV-1 infected patients with low CD4 count.	Eur. J. Immunol.	39	301-309	2009
Fujisaki S, Ibe S, Hattori J, Shigemitsu U, Fujisaki S, Shimizu K, Nakamura K, Yokomaku Y, Mamiya N, Utsumi M, <u>Hamaguchi M</u> , <u>Kaneda T.</u>	An 11-Year Surveillance of HIV Type 1 Subtypes in Nagoya, Japan.	AIDS Res. Hum. Retroviruses	25	15-21	2009

Minami R, Yamamoto M, Takahama S, Ando H, Miyamura T, Suematsu E.	Human herpesvirus 8 DNA load in the leukocytes correlates with the platelet counts in HIV type 1-infected individuals.	AIDS Res. Hum. Retroviruses	25	1-8	2009
Theo A, Masebe T, Suzuki Y, Kikuchi H, Wada S, Obi CL, Bessong PO, Usuzawa M, Oshima Y, Hattori T.	Peltophorum africanum, a traditional South African medicinal plant, contains an anti HIV-1 constituent, betulinic acid.	Tohoku J. Exp. Med.	217	93-99	2009
Xiao P, Usami O, Suzuki Y, Ling H, Shimizu N, Hoshino H, Zhuang M, Ashino Y, Gu H, Hattori T.	Characterization of a CD4-independent clinical HIV-1 that can efficiently infect human hepatocytes through chemokine (C-X-C motif) receptor 4.	AIDS	22	1749-1757	2008
南 留美	HAARTによる脂質代謝 異常と高分子アディポ ネクチンの関連	Focus on HIV/AIDS			2008
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	臨床神経学	48	173-178	2008

Ibe S, Hattori J, Fujisaki S, Shigemi U, Fujisaki S, Shimizu K, Nakamura K, Kazumi T, Yokomaku Y, Mamiya N, <u>Hamaguchi M</u> , <u>Kaneda T</u> .	Trend of drug-resistant HIV type 1 emergence among therapy-naive patients in Nagoya, Japan: an 8-year surveillance from 1999 to 2006.	AIDS Res. Hum. Retroviruses	24	7-14	2008
Takahashi M, Kudaka Y, Okumura N, Hirano A, Banno K, <u>Kaneda T</u> .	Pharmacokinetic parameters of lopinavir determined by moment analysis in Japanese HIV type 1-infected patients.	AIDS Res. Hum. Retroviruses	24	114-115	2008
Ibe S, Shigemi U, Sawaki K, Fujisaki S, Hattori J, Yokomaku Y, Mamiya N, <u>Hamaguchi M</u> , <u>Kaneda T</u> .	Analysis of near full-length genomic sequences of drug-resistant HIV-1 spreading among therapy-naïve individuals in Nagoya, Japan: amino acid mutations associated with viral replication activity.	AIDS Res. Hum. Retroviruses	24	1121-1125	2008
Takahashi M, Konishi M, Kudaka Y, Okumura N, Hirano A, Terahata N, Banno K, <u>Kaneda T</u> .	A conventional LC-MS method developed for the determination of plasma raltegravir concentrations.	Biol. Pharm. Bull.	31	1601-1604	2008

Hattori J, Okumura N, Yamazaki Y, Uchiyama M, <u>Hamaguchi M</u> , Nishiyama Y, <u>Kaneda T</u>	Beneficial effect of GB virus C co-infection in human immunodeficiency virus type-1-infected individuals.	Microbiol. Immunol.	51	193-200	2007
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、 <u>濱口元洋</u> 、 <u>金田次弘</u>	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
Fujisaki S, Fujisaki S, Ibe S, Asagi T, <u>Itoh T</u> , 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, <u>Minami R</u> , Okada K, Watanabe K, <u>Shirasaka T</u> , Oka S, Sugiura W, <u>Kaneda T</u>	Performance and quality assurance of genotypic drug-resistance testing for human immunodeficiency virus type 1 in Japan.	Jpn. J. Infect. Dis.	60	113-117	2007