

## F. 研究危険情報

該当事項なし

## 3. その他

なし

## G. 研究発表

### 1) 論文

なし

### 2) 学会発表

1. 巽 正志、松田昌和、橋本 修、西澤雅子、石子博昭、杉浦 互、山本直樹. 薬剤耐性ウイルスの感染性分子クローンを軸にしたGenotypeとPhenotypeをつなぐ実験解析系について. 第22回日本エイズ学会、2008年11月.
2. 西澤雅子、Jeffery A. Johnson、Walid Heneine、山本直樹、杉浦互. 高感度薬剤耐性HIV検出法を用いた微少集族薬剤耐性HIVの検出と存在比率に関する研究. 第23回日本エイズ学会、2009、名古屋.
3. 服部純子、瀧永博之、吉田 繁、千葉仁志、小池隆夫、佐々木悟、伊藤俊広、内田和江、原 孝、佐藤武幸、上田敦久、石ヶ坪良明、近藤真規子、今井光信、長島真美、貞升健志、古賀一郎、太田康男、山元泰之、福武勝幸、田中理恵、加藤真吾、宮崎菜穂子、藤井 毅、岩本愛吉、西澤雅子、仲宗根正、巽 正志、椎野禎一郎、林田庸総、岡 慎一、伊部史朗、藤崎誠一郎、金田次弘、横幕能行、濱口元洋、上田幹夫、大家正義、田邊嘉也、渡辺香奈子、渡邊 大、矢倉裕輝、白阪琢磨、栗原 健、小島洋子、森 治代、中桐逸博、高田 昇、木村昭郎、南 留美、山本政弘、松下修三、藤田次郎、健山正男、堀 成美、杉浦 互. 2003-2008年の新規HIV/AIDS診断症例における薬剤耐性頻度の動向. 第23回日本エイズ学会、2009、名古屋.
4. 鈴木寿子、服部純子、村田大悟、三浦秀佳、伊部史朗、藤野真之、西澤雅子、山本直樹、杉浦互. インテグラーゼ阻害剤耐性化機序の分子生物学的解析. 第23回日本エイズ学会、2009、名古屋.

## H. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし



## 神奈川県における薬剤耐性HIVの調査研究

～神奈川県における薬剤耐性HIV-1 発生動向把握調査研究2007-2009年  
(3年間のまとめ)～

研究分担者 近藤 真規子 神奈川県衛生研究所

研究協力者 倉井 華子<sup>1</sup>、立川 夏夫<sup>1</sup>、相楽 裕子<sup>1</sup>、岩室 紳也<sup>2</sup>、井戸田 一朗<sup>3</sup>、  
山中 晃<sup>4</sup>、佐野 貴子<sup>5</sup>、今井 光信<sup>5</sup>

<sup>1</sup>横浜市立市民病院、<sup>2</sup>厚木市立病院、<sup>3</sup>しらかば診療所、

<sup>4</sup>新宿東口クリニック、<sup>5</sup>神奈川県衛生研究所

新規HIV-1感染者における薬剤耐性HIV-1の出現状況を調査するため、2007年から2009年の3年間に主として神奈川県および東京都内の医療機関に来院した新規HIV感染者178名について薬剤耐性変異の解析を行った。IAS-USA(2008)リスト、Shafer's criteria、スタンフォードデータベースに基づき薬剤耐性変異の有無を調べた結果、薬剤耐性関連変異を有する症例が11例(RT領域6例、PR領域5例)検出され、薬剤耐性変異の出現頻度は6.2%であった。

RT領域に核酸系逆転写酵素阻害剤(NRTI)であるAZT耐性変異215Y/Fのリバータント変異T215D/Eが3例、TAMの一つD67Nが1例、非核酸系逆転写酵素阻害剤(NNRTI)の高度耐性変異K103Nが2例検出された。PR領域にはM46I/Lが3例、D30Nが2例認められた。耐性関連変異の認められた11例のほとんどは男性同性間性行為感染で、サブタイプB、日本人であり、2004年から2006年までの調査と同様の傾向にあったが、今回の調査では異性間性行為感染の女性が1名含まれていた。また、耐性変異出現頻度が増加しており、2008年以降、D30N(NFV耐性変異)やK103N(NNRTI耐性変異)等の高度耐性変異株も検出され、変異の種類も増えている。今後は、薬剤耐性株の実態把握とともに耐性株の蔓延防御対策も重要である。

### A. 研究目的

HIV-1感染者の治療は多剤併用療法(HAART)の普及により飛躍的に進歩し、HIV-1感染者の病態の進行をコントロールすることが可能となった。その一方で、薬剤の長期投与に伴い薬剤耐性HIV-1株を保有する感染者が増加し、新規感染者が薬剤耐性株に感染している症例も見つかってきている。欧米では薬剤耐性ウイルスによる感染が広がりつつあり、新規感染者の数%から十数%が何らかの抗HIV薬に対する耐性変異が認められると報告されている。日本においては2004年から調査が開始され、2006年までの3年間の調査で新規HIV感染者の約5%に薬剤耐性変異が認められた。日本でのこの数字は欧米に比べまだ低いものの、薬剤耐性ウイルスの蔓延を制御するためにも継続した調査は重要である。

我々は、引き続き薬剤耐性HIVの発生動向把握とその増加を抑制するため全国規模での調査に参加

し、2007年から2009年の3年間に主として神奈川県および東京都内の医療機関を受診したHIV感染者について薬剤耐性変異の解析を行った。

### B. 研究方法

#### 1) 調査対象

2007年から2009年の3年間に主として神奈川県および東京都内の医療機関に来院した未治療のHIV感染者178名(表1)。

#### 2) HIV-1 薬剤耐性変異の解析

患者血漿よりHIV-1遺伝子を抽出(ハイピュア Viral RNA抽出キット:ロシュ・ダイアグノスティックス)し、RT nested PCR法(One step RNA PCRキット:タカラバイオ)によりプロテアーゼ(PR)および逆転写酵素(RT)領域を増幅後、ダイレクトシーケンス法(BigDye Terminator Cycle

Sequencing Kit：アプライドバイオシステムズ）により塩基配列を決定した。PCRプライマーおよびPCR条件は国立感染症研究所の方法に従った。

IAS-USA (2006、2008)リスト、Shafer's criteria、スタンフォードデータベースを基にプロテアーゼ阻害剤（PRI：IDV、LPV、RTV、SQV、NFV、FPV、ATV、DRV、TPV）、核酸系逆転写酵素阻害剤（NRTI：AZT、d4T、ddI、3TC、ABC、TDF、FTC）、非核酸系逆転写酵素阻害剤（NNRTI：DLF、EFV、ETR、NVP）に関する薬剤耐性変異について解析した。

また、同時にスタンフォードデータベース（インターネット上で公開）を用い各種抗HIV薬に対する耐性度の判定とPR、RT領域のサブタイプ型別を行った。スタンフォードデータベースの耐性度はsusceptible、potential low-level resistance、low-level resistance、intermediate resistance、resistanceの5段階評価で示される。

env C2V3領域については塩基配列決定後、neighbor-joining法による系統樹を作成しサブタイプを決定した。

### （倫理面への配慮）

主治医から患者に研究内容について説明を行い、研究への同意の得られた症例について研究を実施した。患者名はすべて記号化して扱っており、プライバシーの流出防止など患者の人権保護に十分配慮した。尚、本研究は当研究所の倫理委員会で承認されている。

### C. 研究結果

IAS-USA (2006、2008)リスト、Shafer's criteria、スタンフォードデータベースに基づき178名のHIV-1pol領域のアミノ酸変異について解析した結果、PR領域に5例、RT領域に6例、計11例に薬剤耐性関連変異が認められ、耐性検出頻度は6.2%であった（表2、表3）。

PR領域ではD30Nが2例、M46L/Iが3例に検出された。D30Nが検出された2例はスタンフォードデータベースにより、NFVにHigh-level resistance(5段階評価の1番目)、ATV、SQVにPotential low-level resistance(5段階評価の4番目)と判定された。これら2株についてneighbor-joining法による系統樹解析を

表1 新規HIV感染者の感染経路別解析数（2007-2009年）

感染経路	未治療感染者解析数			合計
	2007	2008	2009	
男性同性間	24(1)	47(2)	43(3)	114(6)
異性間 男性	7(2)	7(1)	4(1)	18(4)
異性間 女性	6(3)	7(4)	2(2)	15(9)
不明 男性	4	10	17	31
合計	41(6)	71(7)	66(6)	178(19)

( )は外国籍

表2 新規HIV感染者178名から検出された薬剤耐性関連変異検出頻度（2007-2009年）

陽性判明年	解析数 (人)	耐性変異 出現人数	感染経路 サブタイプ*	薬剤耐性関連変異	
				Pro	RT
2007年	41	3(7.3%)	同性間 B	—	T215D
			異性間 A#	M46I	—
			同性間 B	—	D67DN
2008年	71	4(5.6%)	同性間 B	D30N	—
			同性間 B	—	T215D
			同性間 B*	—	K103N
			異性間 B	D30N, L33F	—
2009年	66	4(6.1%)	同性間 B	—	K103N
			同性間 B	—	T215E
			同性間 B	M46L	—
			不明 B	M46ML	—
合計	178	11(6.2%)			

\*USA、男性、#日本女性、他すべて日本男性

行ったが、関連性は認められなかった。

M46I変異が検出された1例はATV、NFV、FPV、IDV、LPV、TPVに低レベル耐性と判定されたが、M46Lが検出された2例は、NFVにIntermediate resistance(5段階評価の2番目)、ATV、FPV、IDV、LPVに低レベル耐性と判定された。

RT領域においてはAZT耐性変異215Y/Fのリバタントである215D/Eが3例、TAMの一つであるD67Nが1例から検出され、これら4例はスタンフォードデータベースでNRTIのAZT、D4T、ABC、DDI、TDFに低レベル耐性と判定された。また、NNRTIに対する耐性変異K103Nが2例に検出され、DLV、EFV、NVPにHigh-level resistanceと判定された。

178例の感染経路およびサブタイプを表4に示した。サブタイプの内訳は、サブタイプBが158例(88.8%)と最も多く、CRF01\_AEは13例(8.2%)、その他(サブタイプA、D、CRF02\_AG等)7例であった。感染経路別にサブタイプを見てみると、男性同性間性行為感染114例(日本人108例、外国籍6例)のほとんどはサブタイプB、感染経路不明の31例は全てサブタイプBであった。異性間性行為感染33例

中日本男性が14例で、サブタイプBが10例、CRF01\_AEとCRF02\_AGが2例ずつであったが、日本女性6例のうちサブタイプBは1例のみでB以外が5例であった。耐性関連変異が認められた11例中10例はサブタイプBで、感染経路は男性同性間性行為感染が8例で最も多く、異性間2例、不明1例であった(表2、表3)。

この3年間の耐性変異検出頻度(6.2%)は2004年から2006年の調査(4.3%)に比べ増加していた。また、2006年までの調査では検出されなかったPRI耐性変異D30N、M41L/IやNNRTI耐性K103Nの高度耐性変異が検出された(表2、表5)。

#### D. 考察

我々は、薬剤耐性HIVの発生動向を把握するため、2004年より全国規模での調査に参加し、主として神奈川県内の医療機関に来院した新規HIV-1感染者について薬剤耐性変異の解析を行っている。2007年から2009年の3年間に医療機関に来院したHIV-1感染者の調査では、178例中11例に薬剤耐性変異が確認された。11例中3例はAZT耐性変異である215Y/Fの

表3 薬剤耐性変異の認められた11例の詳細(2007-2009年)

陽性判明年	国籍	性別	感染経路	サブタイプ	薬剤耐性変異	
					Pro領域	RT領域
2007	日本	男性	同性間	B	I13V, L63P, V77I, I93L	T215D, V179I,
	日本	女性	異性間	A	L10I, I13V, G16E, E35G M36I, M46I, M69K, L89M	-
	日本	男性	同性間	B	G16E, I62V, L63T, I64M, V77IV, I93L	M41MR, D67DN, V75EL, T215AT, A98S
2008	日本	男性	同性間	B	D30N, N88D, A71T, I62V, L63P, V77I,	-
	日本	男性	同性間	B	L63A, V82I, I93L	T215D
	USA	男性	同性間	B	L10V, L63P, I64V, A71AT, V77I, I93L	K103N, A98S
	日本	男性	異性間	B	D30N, N88D, L33F, I13V, E35D, M36I, I62V, L63P, I64V, A71T	V106I
2009	日本	男性	同性間	B	I13V, L63P, C67Y	A98S, K103N, V118I,
	日本	男性	同性間	B	I13V, L63P, V77I	V106IV, V179I, T215E
	日本	男性	同性間	B	E35D, M46L, L63AT, A71V, I93L	V179D
	日本	男性	不明	B	M46LM, L63A, I93L	-

表4 新規HIV感染者178名の感染経路とサブタイプ(2007-2009年)

感染経路	合計	サブタイプ( <i>env</i> C2V3, <i>pol</i> )					
		B	E	A	AG	D	?
男性同性間	日本	108					
	外国	6	5	1			
異性間 男性	日本	14	10	2		2	
	外国	4	1	3			
異性間 女性	日本	6	1	2	1	1	1
	外国	9	2	5		1	1
不明 男性	日本	31	31				
合計	178	158	13	1	4	1	1



リバータント215D/Eを有していた。リバータント215Xは、2004年から2009年までの6年間の神奈川の調査において17例中8例と高率に検出され、この変異は東京、大阪、名古屋等でも検出されており、日本において頻度の高い耐性関連変異であると考えられた。

RT領域にK103N変異を持つ症例が2例認められた。この変異はIAS-USA(2008)リスト、Shafer's criteria、スタンフォードの3つのデータベースでNNRTIに高レベル耐性変異として登録されており、薬剤投与歴のある症例からの感染の可能性が高いと思われた。この変異は2008年以降検出されており、今後の動向が注目される。

PR領域にM46L変異が検出された2例は、スタンフォードデータベースではNFVに中程度耐性、IDVに低レベル耐性と判定された。この変異はIAS-USA(2008)リストではIDVのmajor変異として登録されており、Shafer's criteriaでも耐性変異から除外されている。2つのデータベースでの結果に基づき耐性変異と判定したが、データベースにより判定が異なる場合があり、薬剤を選択する際には患者の病態や血中ウイルス量等のパラメーターを考慮する必要があると考えられた。

PR領域に認められた3種類の耐性変異D30N、M46I/LはいずれもスタンフォードデータベースにおいてNFV耐性と判定された。PRI耐性変異はこの3年間で増加傾向にあり、PRI耐性株、特にNFV耐性株の蔓延が危惧される。

2007年から2009年の調査において薬剤耐性関連変異の認められた11例のほとんどはサブタイプBで、男性同性間性行為感染が8例、日本人男性が9例で、2006年までの調査と同様の傾向にあった。しかし、薬剤耐性変異の出現頻度は2004年から2006年の調査に比べ増加しており、女性からも耐性関連変異が検出されている。また、変異の種類も増加し、D30N (NFV耐性変異) やK103N (NNRTI耐性変異)

等の高レベル耐性変異も認められており、今後、薬剤耐性株の動向把握と蔓延防止の対策がますます重要になると考えられる。

## E. 結論

2007年から2009年の3年間に主として神奈川県および東京都内の医療機関に来院した新規HIV感染者178名について薬剤耐性変異を解析した結果、薬剤耐性関連変異を有する症例が11例 (RT領域6例、PR領域11例) 検出され、耐性変異の出現率は6.2%であった。2004年から2006年までの調査に比べ耐性変異出現頻度は増加しており、また2008年以降、D30N (NFV耐性変異) やK103N (NNRTI耐性変異) 等の高度耐性変異株も検出され、変異の種類も増えている。今後は、薬剤耐性株の実態把握とともに耐性株の蔓延防御対策も重要である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kondo M, Sudo K, Tanaka R, Sano T, Sagara H, Iwamuro S, Takebe Y, Imai M, Kato S: Quantitation of HIV-1 group M proviral DNA using TaqMan MGB real-time PCR, *J. V. Meth*,157, 141-146 (2009).

### 2. 学会発表

- 1) 近藤真規子、嶋貴子、杉浦互、武部豊、今井光信：日本、特に首都圏において流行しているHIV-1の遺伝子学的特徴、第55回日本ウイルス学会学術集会 (2007年10月21～23日、札幌)。
- 2) 近藤真規子、宮崎裕美、須藤弘二、佐野貴子、倉井華子、相楽裕子、岩室紳也、杉浦互、武部豊、今井光信：日本で流行しているHIV-1サブタイプBのdiversity、第21回日本エイズ学会学術集会・総会 (2007年11月28～11月30日、広島)。

表5 新規HIV感染者215名から検出された薬剤耐性関連変異検出頻度 (2004-2006年)

陽性判明年	解析数 (人)	耐性変異出現人数	感染経路サブタイプ*	薬剤耐性関連変異	
				Pro	RT
2004年	46	2(4.3%)	同性間 B	—	K219Q
			同性間 B	—	T215D
2005年	32	1(3.1%)	同性間 B	—	T215D
2006年	63	3(4.8%)	同性間 B	—	M41L, T215C
			同性間 B*	M46I	—
			異性間 B	—	T215S
合計	141	6(4.3%)			

\*USA、男性、他すべて日本男性

- 3) 佐野貴子、近藤真規子、須藤弘二、宮崎裕美、倉井華子、相楽裕子、岩室紳也、今井光信：抗HIV抗体とHIV-1p24抗原が同時検出可能なHIV迅速検査試薬の検討、第21回日本エイズ学会学術集会・総会（2007年11月28～11月30日、広島）。
- 4) 宮崎裕美、佐野貴子、近藤真規子、須藤弘二、今井光信：ろ紙を用いたドライスポット法によるHIV検査法の検討、第21回日本エイズ学会学術集会・総会（2007年11月28～11月30日、広島）。
- 5) 須藤弘二、宮崎裕美、佐野貴子、近藤真規子、加藤真吾、今井光信：HIV郵送検査に関する実態調査と検査精度の調査、第21回日本エイズ学会学術集会・総会（2007年11月28～11月30日、広島）。
- 6) 木内英、岩室紳也、近藤真規子、今井光信、花房秀次、加藤真吾：母児感染予防における出生児へのHAARTの安全性の検討、第21回日本エイズ学会学術集会・総会（2007年11月28～11月30日、広島）。
- 7) 上西理恵、正兼亜季、近藤真規子、長谷彩希、小野木成美、今井光信、上田幹夫、相楽裕子、花房秀次、加藤真吾、草川茂、武部豊：CRF01とサブタイプBからなる新規組換えウイルス株（URF）の同定とその公衆衛生上の意義、第21回日本エイズ学会学術集会・総会（2007年11月28～11月30日、広島）。
- 8) Kondo M, Sudo K, Sano T, Sagara H, Iwamuro S, Imai: The genetic diversity of HIV-1 subtype B in Tokyo and Yokohama area, Japan, XVII International AIDS Conference Mexico City, 3-8 August 2008, CDC0076.
- 9) 近藤真規子、田中理恵、須藤弘二、佐野貴子、岩室紳也、倉井華子、立川夏夫、相楽裕子、加藤真吾、今井光信：汎用リアルタイムPCR装置を用いたHIV-1 RNA定量法の検討、第22回日本エイズ学会学術集会・総会（2008年11月26～11月28日、大阪）。
- 10) 木内英、岩室紳也、相楽裕子、大木茂、元重京子、近藤真規子、今井光信、花房秀次、加藤真吾：母児感染予防における出生児のAZT薬物動態と副作用、第22回日本エイズ学会学術集会・総会（2008年11月26～11月28日、大阪）。
- 11) 佐野貴子、山中晃、金子恵、井戸田一朗、平井由児、岩室紳也、須藤弘二、近藤真規子、今井光信：唾液で検査可能なHIV迅速検査試薬の検討、第22回日本エイズ学会学術集会・総会（2008年11月26～11月28日、大阪）。
- 12) 須藤弘二、佐野貴子、近藤真規子、加藤真吾、今井光信：HIV郵送検査に関する実態調査および検査制度の調査、第22回日本エイズ学会学術集会・総会（2008年11月26～11月28日、大阪）。
- 13) 近藤真規子、田中理恵、佐野貴子、加藤真吾、今井光信：汎用リアルタイムPCR装置を用いたHIV-1 RNA定量法の検討、第24回関東甲信静支部ウイルス研究会部会（2009年11月5日、東京）。
- 14) 近藤真規子、須藤弘二、佐野貴子、倉井華子、立川夏夫、相楽裕子、岩室紳也、加藤真吾、今井光信：コバスタqManHIV-1でのRNA定量値がアンプリコアHIV-1モニターに比べ100倍以上低値であった症例の解析、第23回日本エイズ学会学術集会・総会（2009年11月26～11月28日、名古屋）。
- 15) 佐野貴子、西大條文一、井戸田一朗、須藤弘二、加藤真吾、近藤真規子、今井光信：抗HIV抗体量により感染時期を推測するための検査法の検討、第23回日本エイズ学会学術集会・総会（2009年11月26～11月28日、名古屋）。
- 16) 川畑拓也、森治代、小泉洋子、秋吉京子、近藤真規子、中澤よう子、宇宿秀三、貞升健志、長島真美、矢永由里子、今井光信、加藤真吾：HIV検査体制相談における新型インフルエンザ流行の影響、第23回日本エイズ学会学術集会・総会（2009年11月26～11月28日、名古屋）。
- 17) 井戸田一朗、加藤朋子、畑寿太郎、島川真知子、佐野貴子、近藤真規子、須藤弘二、加藤真吾、今井光信：急速な進行と多彩な合併症を伴い、初期治療に早期に失敗した急性HIV感染症の一例、第23回日本エイズ学会学術集会・総会（2009年11月26～11月28日、名古屋）。
- 18) 服部純子、近藤真規子、杉浦互 他：2003-2008年の新規HIV/AIDS診断症例における薬剤耐性頻度の動向、第23回日本エイズ学会学術集会・総会（2009年11月26～11月28日、名古屋）。

## G. 知的財産権の出願・登録

### 1. 特許出願

- 1) 発明の名称：「HIV-1プロウイルス定量法」、発明者：近藤真規子、加藤真吾、出願年月日：平成19年11月15日、公開番号：特願2007-295896



## 研究要旨

# 本邦感染者由来薬剤耐性ウイルス感染性分子クローン パネル整備

～薬剤耐性ウイルス由来感染性クローンによるHIV薬剤耐性検査の標準化～

研究分担者 異 正志 国立感染症研究所エイズ研究センター

HIV薬剤耐性試験標準化に資するため、MAGIC-5A細胞とLong PCRを用いた「HIV Trapping System」による感染性分子クローン樹立法を国内外感染者由来の様々なsubtype/CRF薬剤耐性ウイルスおよびNaïveウイルスに適用して感染性分子クローンを樹立し、薬剤耐性試験における標準クローンを整備している。本研究期間においては国内16名の未治療感染者由来のsubtype B 14株及びCRF01\_AE組換え体2株のウイルスから樹立した29クローンについて薬剤に対する反応性を比較し、今後のPol遺伝子領域の組換え体ウイルス作製の基本骨格となる親クローンを選定した。又国内11名の治療感染者由来subtype B 7株、CRF01\_AE組換え体8株、subtype F 2株及びBF組換え体1株、計18株のウイルスから樹立した合計113クローンについて患者血漿のDirect RT-PCRから得られた薬剤耐性Genotypingとクローンゲノムから得られた薬剤耐性プロファイルと比較した。薬剤耐性ウイルス由来感染性分子クローンは親株ウイルスのGenotypingにおける主要な耐性変異以外にもDirect RT-PCR法では増幅し得なかった耐性変異を有することが判明した。国内感染症例由来ウイルスから様々な薬剤耐性プロファイルを有する感染性分子クローンが得られ薬剤耐性試験法標準化へ向けての基盤が整備された。

## A. 研究目的

HIV薬剤耐性試験(Genotyping)が保険対象になり、診断会社を含めた各検査機関での測定が行なわれている。Genotypingによる薬剤耐性試験法が感染者の治療において有用となるためには、試験法そのものの標準化の確立が必須である。研究分担者はこれまでHIV-1ウイルス感染性分子クローン樹立法としてHIV感染価測定細胞株MAGIC-5AとLong PCRを用いた「HIV-1 Trapping System」を開発し、世界に先駆けてClade C, A, GおよびAG組換え体などの感染性分子クローンの樹立を報告し、樹立の効率を更に高めるべく改良に努めてきた。本研究では実際に臨床応用の段階に入ったGenotyping薬剤耐性試験法を標準化すべく、先に述べた「HIV-1 Trapping System」を用いて国内外患者由来の多様なプロファイルを有した薬剤耐性ウイルス及び未治療ウイルスの感染性

分子クローンを樹立し薬剤耐性試験法における標準ウイルス株としての応用可能性を検討し、もって全国的な薬剤耐性試験法の効率的な標準化に資する分子基盤を整備することを目的とした。

## B. 研究方法

HIV-1ウイルスのクローニングおよびLong PCRと全長ゲノムPlasmid構築は先に報告したHIV感染価測定系Indicator細胞MAGIC-5/HeLa4.5 nEGFP細胞株を用いたHIVウイルスクローニングと感染性クローンの構築系(HIV Trapping System ; HIV捕捉実験系)により行った。対象としたウイルスは、国立感染症研究所エイズ研究センター第2グループが分離した国内未治療感染者検体及び当研究室で日赤献血由来検体から分離したsubtype B(14株)及びCRF01\_AE組換え体ウイルス(2株)の計16株のNaïveウイルスと、



国内治療感染者検体から分離した subtype B 7株、CRF01\_AE組換体 8株、subtype F 2株及びBF組換体 1株、計 18株のウイルスで総計 34株のウイルスである。

まず末梢血リンパ球の共培養で分離したウイルス、もしくはMAGIC-5A磁気ビーズ法により分離したウイルスを感染させたMAGIC-5A細胞からゲノムDNAを抽出し、それを鋳型としてLong PCRを行い5'-および3'-側のプロウイルスゲノムを増幅、それらを連結することによって完全長のDNAクローンを得た。完全長DNAクローン作製戦略は患者ウイルスのDirect RT-PCR法によって読み込んだ塩基配列からPol からVprまでの領域におけるRare cutterの制限酵素を選定し、その塩基配列を含むPrimerでHIV-1 genome pol下流領域を増幅しHIV-1 Cloningのために構築したpMT1もしくはpMT4に組み込み、しかる後に上流領域を増幅した断片を酵素処理後組込むHalf & Half戦略を用いて全長クローンを得た。得られたクローンはHeLa4.5nEGFP細胞と293FT細胞の混合培養にTransfectionし、その2日後の培養上澄をMAGIC-5A細胞にかけ感染性を確認した。感染性が確認されたクローンはTransposonを用いたGPS-1 Genome Priming System (NEB) とPrimer Walking法で全長ゲノムの配列を決定した。

本研究では、血液などヒト臨床材料が使用される場合には、材料提供者の個人情報が漏出しないよう

厳格なプライバシー保護に努めた。このためヒト材料を用いた研究は連結不可能匿名化 (unlinked anonymous) の手法を行って個人情報の漏洩を防ぎ、患者の非特定性を保つた。また、研究方法および研究により生じうる研究対象者に対する不利益、危険性の排除について十分な説明を加え、守秘義務を守った。以上を遵守することで倫理面の問題は無いものと判断した。

### C. 研究結果

国内未治療感染者と国内治療患者由来ウイルス及び日赤献血由来ウイルスから樹立した感染性分子クローンのAccession番号と分離ウイルスのDirect RT-PCRによるGenotypingでの薬剤耐性変異の一覧を表1、表2及び表3に示す。クローン樹立戦略は次の如く行った。分離ウイルス感染MAGIC-5A細胞ゲノムを鋳型にHIV genome下流半分は表に示す6塩基認識制限酵素認識配列を含むPol からVprまでの領域に設定したForward Primerと3' LTR poly A signal下流領域にNot I siteを附加したReverse Primerで約5.0KbpのAmpliconを増幅し電気泳動後精製し制限酵素処理後該当酵素で切断されないことを確認後HIV-1 Cloning Vector pMT1あるいはpMT4へ組み込み、LacZ発現選択により組み込み陽性クローンを5クローン選別した。同じPrimer領域のComplementaryなReverse Primerと各subtype consensus 5' LTR領域上流

表1 17 Infectious Molecular Clones Derived from Primary Isolates of Treatment-Naïve Patients as Candidates of Standard Clones for Construction of Recombinant DR Clones

HIV Database Accession No	Patient Code	DR No.	Risk factor	Sex	Bleed Date	Treatment	CD4	Viral Load	Subtype	Cloning Vector	Cloning Primer/ Enzyme X	Resistant Mutation	
												PR	RT
AB253426, AB253427	NH2047-170844	6824	Heterosexual	Male	2005.6.20	None	?	314,900	AE	pMT1	AEpol4758(±)/EcoRI	None	None
AB221005	NH0015-521	6073	Homosexual	Male	2004.7.29	None	209	60,900	B	pMT1	BFvpr5667(±)/NcoI	None	None
AB221125, AB221126	NH0305-018	6075	Homosexual	Male	2004.7.30	None	434	3,400	B	pMT1	BFvpr5667(±)/NcoI	A71T	None
AB286955, AB286956	NH2000-028	6089	Homosexual	Male	2004.8.10	None	66	342,100	B	pMT1	BFvpr5667(±)/NcoI	None	None
AB287363	NH2047-151960	6538	Heterosexual	Male	2005.3.1	None	123	8,800	B	pMT1	BFvpr5667(±)/NcoI	None	None
AB287364, AB287365	NH2047-1707600	6737	Homosexual	Male	2005.5.23	None	17	31,000	B	pMT1	B6737_vpr5657(±)/NcoI	None	None
AB287366, AB287367	NH0020-520	7060	Homosexual	Male	2005.10.11	None	?	1,011,800	B	pMT1	VifB(±)/Cla I/CG	A71T	None
AB287368	NH0305-038	7065	Homosexual	Male	2005.10.14	None	55	85,300	B	pMT1	BFvpr5667(±)/NcoI	None	None
AB286849, AB286850	NH305-004	5782	Heterosexual	Female	2004.3.26	None	182	500	B	pMT1	ZM112pol(±)/EcoRI	None	None
pJPR5913B56H, pJPR5913B59	NH0010-0002	5913	Hemophilic	Male	2004.5.24	None	?	65,300	B	pMT4	DR3884B5774(±)/Sal I, HXB2B5775(±)/Sal I	A71T	None

表2 12 Infectious Molecular Clones Derived from Primary Isolates of JRC Plasma as Candidates of Standard Clones for Construction of Recombinant DR Clones

JRC No.	Subtype/CRF			Clone No.	Clonong Vector	Cloning Primer /Enzyme X			
	p17_gag	pol_RT	env C2/V3			Primer L/For	Primer L/Rev	Primer R/For	Primer R/Rev
JRC 3	B (B1)	B (B1)	B (B1)	pJRC3B14	pMT4	Univ-LTR1(+)/Mlu I	HBX2 5803(-)/Sal I	HXB2 5775(+)/Sal I	LTR-R5(-)/Not I
				pJRC3B38					
JRC 5	B	B	B	pJRC5B15	pMT4	Univ-LTR1(+)/Mlu I	HBX2 5803(-)/Sal I	HXB2 5775(+)/Sal I	LTR-R5(-)/Not I
				pJRC5B34					
JRC 39	B (B1)	B (B1)	B	pJRC39B49	pMT4	Univ-LTR1(+)/Mlu I	HBX2 5803(-)/Sal I	HXB2 5775(+)/Sal I	LTR-R5(-)/Not I
				pJRC39B68					
JRC 53	B (B1)	B (B1)	B (B1)	pJRC53B33	pMT4	Univ-LTR1(+)/Mlu I	HBX2 5803(-)/Sal I	HXB2 5775(+)/Sal I	LTR-R5(-)/Not I
				pJRC53B67					
JRC 65	B	B	B	pJRC65B09	pMT4	Univ-LTR1(+)/Mlu I	HBX2 5803(-)/Sal I	HXB2 5775(+)/Sal I	LTR-R5(-)/Not I
				pJRC65B30					
JRC 77	CRF01_AE	CRF01_AE	CRF01_AE	pJRC77AE08	pMT1	Univ-LTR1(+)/Mlu I	AEpol4758(-)/EcoRI	AEpol4758(+)/EcoRI	LTR-R5(-)/Not I
				pJRC77AE31					



に Sal I (pMT1 Vector) もしくは Mlu I site (pMT4 Vector) を附加した Forward Primer で HIV genome 左半分を増幅後精製し該当酵素にて処理後精製し、酵素処理した先の右半分を組込んだクローンに組み込み全長クローンを得た。得られたクローンは HeLa4.5nEGFP 細胞と 293FT 細胞の混合培養に Transfection しその Tat 活性と Syncytium 形成を確認後、その2日後の培養上澄を MAGIC-5A 細胞にかけ感染性を確認した。感染性を示す割合はウイルス毎に異なるが平均して半分程のクローンが MAGIC-5A 細胞で感染性を示し、ウイルス株によっては95%以上の効率で感染性分子クローンが取得できた。従ってこの実験系の感染性分子クローンの取得率は実用的な高さであった。得られた感染性分子クローンのうち、各ウイルスについては各1から14クローン計142クローンを選定し、全ウイルスゲノムの塩基配列を決定した。全てのウイルスゲノム塩基配列は全長に互って subtype B、CRF01\_AE 組換体、subtype F 及び BF 組換体であり、それぞれ元のウイルス株の特性を示していた。

Naïve ウイルス株から樹立した感染性分子クローン由来ウイルスの薬剤耐性プロファイルを、実験室株プロトタイプである NL4-3 株と比較した (表4)。この薬剤耐性プロファイルは我々が開発した

MAGIC-5A 細胞株と MAGIC-5/SEAP 細胞株を用いた薬剤耐性 Phenotype Assay 系で既に実用化している。NL4-3 株を標準として、それぞれの薬剤に対する耐性を算定するとクローン毎に若干の違いはあるが、多くの薬剤で NL4-3 株より感受性を示す事が判明した。

Los Alamos HIV Database に登録されている配列情報に拠ると、HIV-1 subtype B ウイルスゲノムには Sal I site が認められる検体が少なからず存在するが、CRF01\_AE 組換体ウイルスゲノムでは稀である。また6塩基配列認識酵素 Mlu I site と8塩基配列認識酵素 NotI site は HIV-1 ゲノムには殆ど認められない。これらのことから、HIV-1 subtype B ウイルスクローン構築のために新たに Mlu I と NotI に幾つかの6塩基認識配列酵素部位を Multicloning Site にもつ pBR322 を基本骨格にもつ pMT4 Cloning Vector を構築した (図1)。この新たな Vector を用いることにより HIV-1 subtype B ウイルスクローン樹立効率は格段に上がった。

国内治療感染者由来ウイルスから樹立した感染性分子クローンと患者血漿の Direct RT-PCR から得られた配列の Stanford 法による薬剤耐性プロファイルと比較した (図2)。通常 Genotyping による薬剤耐性試験は患者血漿 HIV-1 の Direct PCR から得られた pol

表3 Current Panel of Infectious Molecular Clones Derived from Patients with Anti-HIV Drug Treatments

HIV Database Accession No	Patient Code	DR.No.	Risk factor	Sex	Blood Date	Treatment	CD4	Viral Load	Subtype	Resistance Mutation (PR)	Resistance Mutation (RT)	Resistance Mutation (IN)
AB253635-AB253646	NH2000-001	1741	Heterosexual	Male	1999.8.3	AZT, ddI, IDV	54	995,600	AE	L10F, L37M, E33D, M14L, A71T, N38S, L89V	M41L, D47S, T696, L74V, V110L, L210W, T215Y	None
AB253647-AB253658		1873			1999.9.28	ddI, d4T, EFV	50	335,000	AE	L10F, K20T, E33D, M34L, L89P, A71T, N38S, L89V	M41L, D47S, T696, L74V, V110L, L210W, T215Y	None
AB253659-AB253668		2594			2000.7.5	ddI, d4T, EFV, IDV	26	660,900	AE	L10F, K20T, E33D, M34L, L89P, A71T, N38S, L89V	M41L, D47S, T696, L74V, V110L, L210W, T215Y	None
AB253669-AB253680		3730			2001.10.3	ddI, d4T, EFV	15	230,800	AE	L10L, K20L, E33D, M34L, L89V, L89P, V32E, L90M	D67N, T64D, K70R, V108L, Y110C, L210W, T215F, K219R	None
AB253681-AB253691		492			1997.4.7	AZT, 3TC, SQV	22	61,000	AE	L10L, K20L, E33D, M34L, L89V, L89P, V32E, L90M	D67N, T64D, K70R	None
AB253692-AB253702	NH19-203	1236	Heterosexual	Male	1998.12.10	AZT, 3TC, NFV	8	423,900	AE	L10L, K20L, E33D, M34L, L89V, L89P, V32E, L90M	D67N, T64D, K70R	None
AB253703-AB253716		2192			2000.2.7	AZT, NVP	9	256,600	AE	L10L, K20L, E33D, M34L, L89V, L89P, V32E, L90M	D67N, T64D, K70R, V108L, Y110C, L210W, T215F, K219R	None
AB253717-AB253725		5032			2003.3.27	ABC, EFV, LPV/RTV	3	170,200	AE	L10L, K20L, E33D, M34L, L89V, L89P, V32E, L90M	D67N, T64D, K70R, V108L, Y110C, L210W, T215F, K219R, G160R, L210W, T215F, K219R	None
AB287369, AB287370, AB287371, AB287372	NH0801-076	1348	Homophilic	Male	1999.2.4	ddI, d4T, SQV, NFV	145	91,300	B	L10L, S38N, D, I54V, I57V, L89P, T717L, V77L, V82A, Y, S38N, D, L90M	M41L, E44D, D67N, K110E, V110V, M14V, L210W, T215Y	S23N
AB289587, AB289588	NH0006-247	2508	Homosexual	Male	2000.6.8	d4T, SQV, NFV	255	38,900	B	L10L, H3V, D38N, D, E35D, M45M, V44V, G, I54V, I57V, L89P, T717L, V77L, N38D, L90M	M41L, E44D, D67N, K110E, L210W, T215F, S23N	S23N
AB289589, AB289590	NH0006-236	3884	Homosexual	Male	2001.12.5	AZT, d4T, SQV, RTV	547	10,400	B	L10L, D39V, K16R, M45L, I56L, I57V, A71V, I84V, I85D, L90M	D67N, K70R, T215F, K219Q	None
AB480692, AB480693	NH2013-0001	6174	Heterosexual	Male	2004.9.14	ddI, d4T, SQV, RTV	502	18,300	B	D39V, I54V, N38D, L90M, L10V, A71V	M41L, E44D, D67N, V110L, L210W, T215Y	None
AB480694, AB480695	NH0005-0673	6175	Homophilic	Male	2004.9.14	AZT, d4T, SQV, RTV	516	6,500	B	V32L, M46L, I54V, V32A, L90M, L10V, K40CT, F353L, A71V	M41L, E44D, D67N, V110L, M14V, L210W, T215Y	None
AB480298, AB480299	NH0801-0127	6082	Heterosexual	Male	2004.8.5	ddI, d4T, NFV	124	6,600	F	K20T, D39V, M34L, M36M, L89P, A71V, N38D	M41L, E44D, D67N, T64D, K70R, V110L, L210W, T215Y	G163R
AB480300, AB480301	NH0801-0128	6190	Heterosexual	Female	2004.9.21	ddI, RTV, TDF, ATV	35	721,300	F	L10L, K20T, M34L, M46L, F35L, L89LTP, A71V, I84V, L90M	M41L, E44D, D67N, V110L, L210W, T215Y	I203M
AB253430, AB253431	NH0801-077	769	Heterosexual	Male	1998.5.21	None	70	918,100	BF	L10L, V, T74S	K235S	V110L, S23N
AB480698	NH0801-086	1120	Homophilic	Male	1998.10.27	d4T, 3TC, NFV	131	43,700	B	L10F, I54V, V32S, L90M, L10L, A71V, G75S	M41L, A24V, D67N, V110L, M14V, L210W, T215Y	None

表4 Phenotypic Profile of Naïve Infectious Clones Compared with pNL4-3

Subtype/CRF	Virus Code	Clone	NRTI												PI	
			AZT		d4T		ddI		3TC		ABC		ddC		µM	Fold Resistance
			µM	Fold Resistance	µM	Fold Resistance	µM	Fold Resistance	µM	Fold Resistance	µM	Fold Resistance	µM	Fold Resistance		
B	DR6073	pJDR6073B20	0.007	0.3	0.653	0.5	1.275	0.2	0.093	0.8	0.053	0.0	0.157	0.4	0.415	0.2
		pJDR6073B68	0.007	0.3	0.379	0.3	2.987	0.5	0.133	1.1	0.496	0.1	0.206	0.5	0.702	0.3
	DR6075	pJDR6075B50	0.049	2.0	1.717	1.2	0.579	0.1	0.519	4.2	0.048	0.0	0.072	0.2	1.766	0.8
BF	DR0769	pJDR0769BF03	0.014	0.6	0.465	0.3	4.656	0.7	0.050	0.4	2.109	0.4	0.161	0.4	5.249	2.3
		pJDR0769BF06	0.006	0.2	0.867	0.6	0.569	0.1	0.046	0.4	4.693	1.0	0.117	0.3	0.322	0.1
		pJDR0769BF05	0.021	0.9	0.314	0.2	4.694	0.7	0.277	2.2	1.111	0.2	0.166	0.4	0.138	0.1
CRF01_AE	DR6824	pJDR6824AE75	0.012	0.5	0.483	0.3	1.255	0.2	0.165	1.3	1.801	0.4	0.280	0.7	0.269	0.1
		pJDR6824AE96	0.015	0.6	1.369	1.0	1.752	0.3	0.140	1.1	2.248	0.5	0.302	0.7	0.385	0.2
		p93TH051AE13	0.038	1.6	0.423	0.3	4.220	0.6	0.032	0.3	3.855	0.8	0.111	0.3	0.433	0.2

Fold resistance: 50% reduction ratio compared with pNL4-3



領域の塩基配列から推定されるため、Direct PCRで用いるPrimerはConsensus配列に沿った設計がなされている。これにより設定したPrimer Setに選別されたBulk Virusの遺伝情報のみから薬剤体制度が推定される。一方、感染性分子クローン構築の戦略はHIV-1 Genomeで高度に保存されている領域にPrimerを選定して、成る可く多くのHIV-1 Genomeを増幅するように設計している。それぞれの戦略で増幅されたAmpliconの塩基配列の違いは図2から明瞭であった。すなわちDirect RT-PCRによる増幅領域は図2のp51RTの点線で区切った上流領域に限定されてお

り、これから下流のp31 INT領域（グレーゾーン）の配列情報は得られない。一方、感染性分子クローンの塩基配列情報は当然ながら全ゲノムに亘る。個々の感染性分子クローンの薬剤耐性プロファイルをDirect RT-PCRで検出された耐性変異を赤棒のみでプロットした図2に示したように、Direct RT-PCRで認められなかった耐性変異（青棒）、Direct RT-PCRの配列情報から消失した耐性変異（星印）及びDirect RT-PCRの配列情報でMixであった配列を確定した耐性変異（緑棒）が明らかになった。またp31 INTの領域にMinorではあるがIntegrase阻害剤の耐

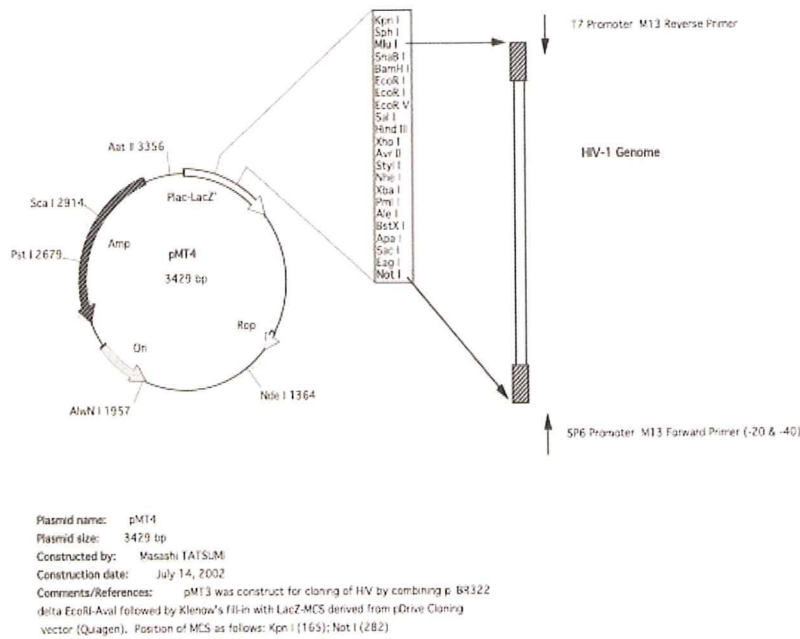


図1 Construction of pMT4 Vector for Stable HIV-1 subtype B Cloning

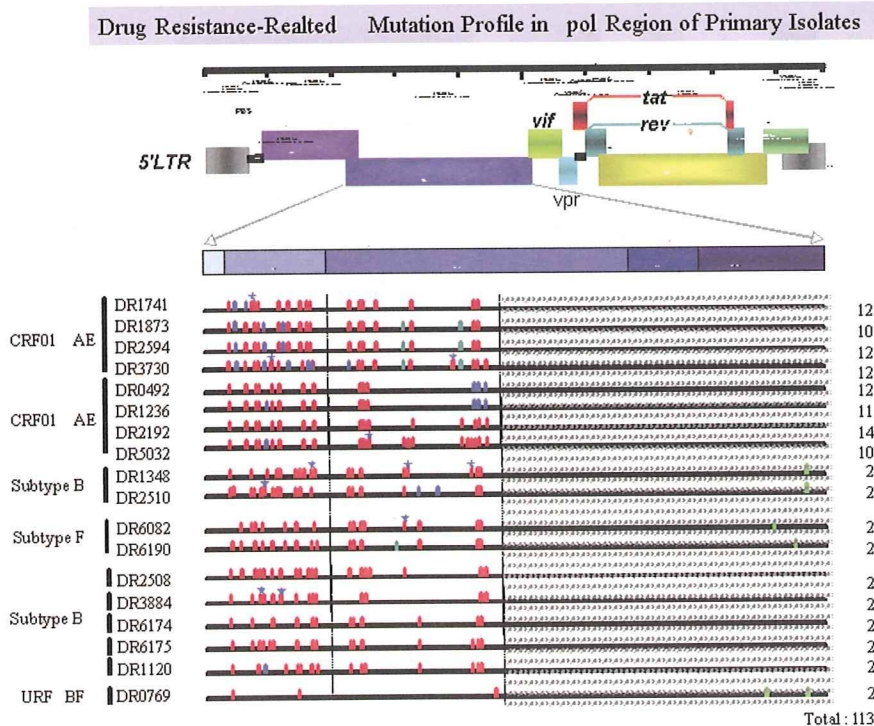


図2 感染性分子クローンにおける薬剤耐性変異

性関連変異も幾つかのクローンでは検出された。

これらの感染性分子クローンのStanford法による各種薬剤に対する耐性プロファイルを図3に示した。同一患者の異なる経過4時点で分離したウイルス由来の感染性分子クローンはそれぞれ1クローンのみ抽出して示している。患者コードNH2000-001ではPI及びNRTIのプロファイルは4時点で変わらないが、NNRTIに対する耐性は第2分離時点から全てのNNRTIに対して耐性に転換していた。また患者コードNH19-203では経過3時点まではPIとNRTIに対して同様な耐性プロファイルを示し、NNRTIには感受性であったが、第4経過時点で一転して一部NRTI薬剤に対する耐性が高まり、併せて全てのNNRTIに対して高度耐性プロファイルに転換した。

このように同一患者の異なる経過4時点での分離ウイルス株由来の感染性分子クローンは経過とともに耐性変異が蓄積する傾向が認められるが、一部のNRTIに対しては耐性レベルが低下した。NH0801-0127とNH0801-0128は夫婦間の感染例と推測されるsubtype Fの感染症例であるが、ほぼ同様な治療歴であるにもかかわらずPIに対する耐性プロファイルが異なっていることが注目される。これら18クローンの感染性分子クローンの薬剤耐性度はpDR0769BF03のNFVに対する軽度耐性からpDR6175B30の全てのPI及びNRTIに対する高度耐性まで、様々な耐性プロファイルを示していた。

### D. 考察

当研究室で開発したHalf & Half Strategyによる「HIV trapping System」の更なる効率化が実現し、国内感染者から分離したNaïveなCRF01\_AE組換え体及びsubtype Bウイルス検体から29クローンの感染性分子クローンが、及び国内治療感染者検体から分離したsubtype B 7株、CRF01\_AE組換え体 8株、subtype F 2株及びBF組換え体1株、計18株のウイルスから合計113クローンの感染性分子クローンを樹立し、総計142クローンの感染性分子クローンが樹立された。これらのNaïveウイルス由来クローンの薬剤耐性プロファイルは、その扱い易さから組換え体作製によるPhenotypic Assayに汎用されている実験室株NL4-3と比較すると、多くの薬剤で耐性度がより低かった。このことは臨床株ウイルスから樹立した我々のNaïve Cloneの方が、薬剤耐性度をより鋭敏に捉える事が出来る可能性を示していると考えられる。

また国内感染例が多いHIV-1 subtype Bの感染性クローン構築に当たって、ウイルスゲノム内に当初Half & Half Strategyで5’LTR側のRare CutterとしていたSalI siteがsubtype Bで多い事から、より効率的なクローン樹立の為に新たにpMT4 Cloning Vectorを構築した。

これらのNaïve Cloneの薬剤耐性プロファイルと各subtype/CRF HIV-1ウイルスでより保存されている領域を勘案してnon-B subtypeのうち国内感染例が多い

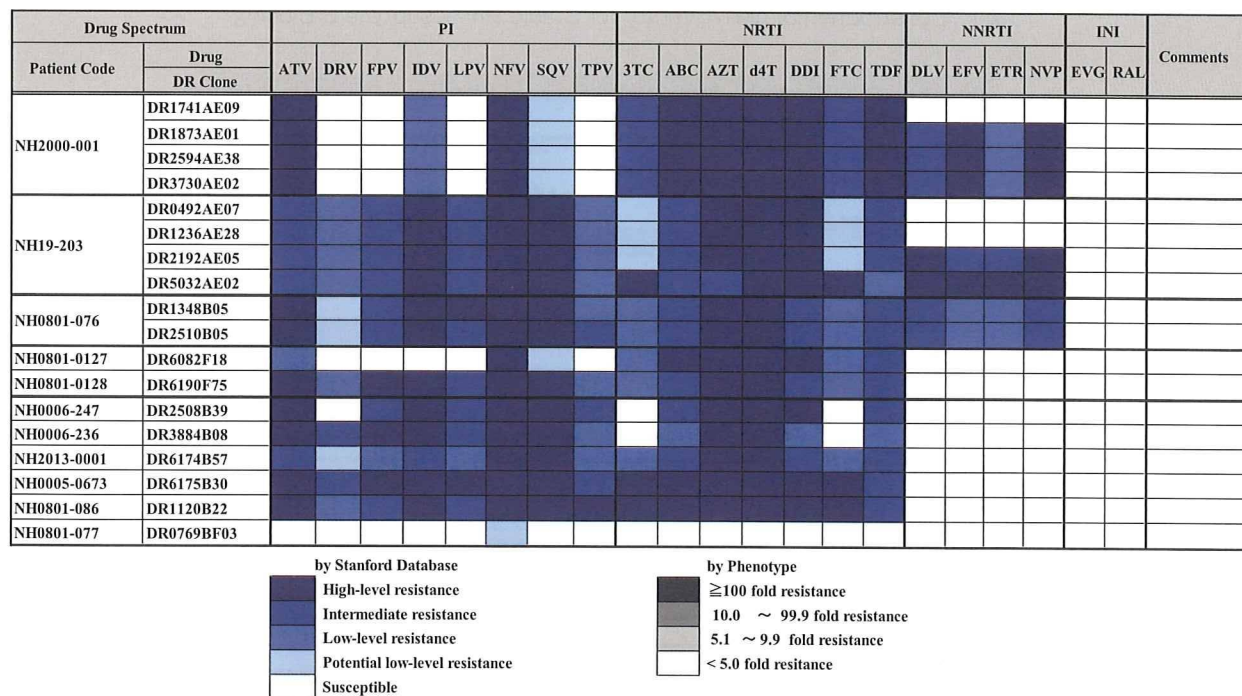


図3 感染性分子クローンの薬剤耐性プロファイル

CRF01\_AE組換え体ウイルスに適した組換え用親株としてpJPDR6824AE75及びpJRC77AE06クローンを選定した。また現在国内感染例が最も多いsubtype Bに適した組換え用親株としてpJPDR5913B59及びpJRC3B14クローンを選定した。これらのクローンを構築過程で利用したvifからvpr領域に設定したPrimerと5'LTRに設定したPrimerの組合せで各々のsubtype/CRFの5'上流のウイルスゲノムの増幅効率は多くの検体で良好であり、またproteaseの標的であるgag領域も併せて組換える事が可能であることから、共変異などの詳細な解析にも資することが可能であることから薬剤耐性ウイルス解析にとって、より有効な組換え戦略と考えられる。

国内治療感染者検体から分離した薬剤耐性ウイルスクローンの薬剤耐性プロファイルを、元の患者血漿のDirect RT-PCRで得られた塩基配列による薬剤耐性プロファイルと比較した。感染性分子クローンではDirect RT-PCRによる塩基配列では検出されない耐性変異や、消失した耐性変異が認められた。これはDirect RT-PCRがあくまでBulkとしての患者血漿中HIV-1集族のなかから選定したPrimer Setで増幅できる亜集団のみを増幅解析していることに由来しているものと考えられる。感染性分子クローンによる薬剤耐性プロファイルはDirect RT-PCRの範囲外であるIntegrase阻害剤の耐性関連変異も幾つかのクローンでは検出された。このことは今後Integrase阻害剤の導入による遺伝子検査にも対応し得ること示している。しかしながら感染性分子クローン構築においてはDirect RT-PCR法よりも長いAmpliconを増幅する必要があるため、その増幅感度については検討を要するものと考えられる。2例の同一患者の異なる経過4時点で分離したウイルスから分離したクローンでは、治療経過時間に沿って薬剤耐性変異が蓄積することが判明し、なおかつNNRTIに対する耐性変異は多くの薬剤に一転して耐性を示す事から、臨床応用に関しては治療経過に沿った綿密な薬剤耐性検査の継続が必要とされるものと考えられた。

本研究期間においては薬剤耐性試験法の標準化に向けて、未治療Naïve臨床分離ウイルス株から感染性分子クローンを樹立した。これら国内感染例から分離した感染性分子クローンは、国内標準株として有用であるばかりではなく、その特性から5'上流Halfゲノムの組換え体の親株として有用である事から今後の国内感染例における薬剤耐性機序解析に有用な基盤を提供する事が期待できるものと期待される。また薬剤耐性国内分離ウイルス由来の18クローンの感染性分子クローンに関する薬剤耐性度は

pDR0769BF03のNFVに対する軽度耐性からpDR6175B30の全てのPI及びNRTIに対する多剤高度耐性まで、様々な薬剤耐性プロファイルを示していた事から、典型的な薬剤耐性感染性分子クローンの整備がなされたものと考えられる。

これらの薬剤耐性クローンから数クローンを選定して、HIV薬剤耐性試験の標準化への応用に関するパイロット実験を行った。即ち選定した数クローンを293T細胞にTransfectionして培養上澄を分離し、MAGIC-5A細胞に感染させ、感染細胞を継代培養し、クローンウイルスを増殖させると共にTransfectionに用いた感染性分子クローンPlasmidを継代希釈した。現在、国立感染症研究所では感染性試料の輸送規制の遵守が求められている。感染性ウイルス液の輸送は厳重な規制下に置かれるため、固定濃縮後に試験検体配分機関に分与した。これらの固定後の感染性分子クローン由来の検体は、不安定なため薬剤耐性試験に不適であることが判明した。また感染性ウイルス取り扱い可能なBSL3施設が整った機関にしか、感染性分子クローンの分与は許可されないことから、一度継代培養で増殖させたウイルス原液を固定後、送付することを試したが安定した増幅成績が得られなかった。これは感染性HIV-1ウイルス液が固定操作により、より不安定になったためか、輸送段階での温度制御が不安定なためか原因の特定は現時点では難しい。よって今後BSL3施設を必要とせず、バイオセキュリティ上も分与の制約を受けない「非」感染性分子クローンが薬剤耐性試験の標準として適用可能か解析検討することが必要と考えられる。ここでいう「非」感染性分子クローンとは感染性分子クローン構築の過程で生じてくる、Indicator細胞 HeLa4.5 nEGFP細胞でSyncytium形成陽性で、培養上澄のTransferでHIV感染Indicator細胞MAGIC-5Aで感染陰性でなおかつ培養上澄中にコア蛋白であるp24 gagが陽性であり、ウイルスゲノムがパッケージされたHIV-1粒子を形成するクローンを示す。このような「非」感染性分子クローンを選別し解析検討することにより、より安定なHIV薬剤耐性試験の標準化に適確なクローンを取得する必要があると考えられた。

## E. 結論

感染性分子クローン樹立法をsubtype/CRFに特化させることにより、より効率的に進化させ国内未治療感染者由来ウイルスからNaïveな感染性分子クローンを樹立し、これらを用いた国内感染例に特化した組換え戦略を示した。また国内感染症例由来ウイルスから様々な薬剤耐性プロファイルを有する感染



性分子クローンが得られ薬剤耐性試験法標準化へ向けての基盤が整備された。これらの感染性分子クローンの一部を非感染性にするため固定後に薬剤耐性試験の標準化に応用したところ、標的領域の増幅が不安定であることが判明した。このことからバイオセキュリティの観点からウイルスゲノムを保持する「非」感染性分子クローンの選定が薬剤耐性試験法標準化に向けて必要であると考えられた。

## F. 健康危険情報

該当する事項はない。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

該当する事項はない。

### 2. 学会発表

1. 巽 正志、梅木優子、竹川奈穂、松田昌和、橋本 修、西澤雅子、石古博昭、杉浦 互、山本直樹 薬剤耐性ウイルスの感染性分子クローンを軸にしたGenotypeとPhenotypeをつなぐ実験解析系について 第22回日本エイズ学会、大阪、2008年11月27日
2. 巽 正志、柚木久雄、百瀬俊也、日野 学、田所憲治、山口一成、水落利男、山本直樹 日赤献血由来陽性血漿による感染研HIVパネル整備 第22回日本エイズ学会、大阪、2008年11月27日
3. 巽 正志、梅木優子、竹川奈穂、水落利男、山本直樹 感染性分子クローンによる第4世代抗体・抗原同時測定HIV診断キットの抗原検出感度の比較 第22回日本エイズ学会、大阪、2008年11月27日

## H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

該当なし



### 研究要旨

## 横浜および近郊における薬剤耐性HIVの調査研究

研究分担者 石ヶ坪良明 横浜市立大学大学院医学研究科 病態制御免疫内科 教授  
協力研究者 上田敦久 横浜市立大学附属病院 リウマチ・血液・感染症内科

横浜および近郊における薬剤耐性HIVの調査研究として平成19年度より21年度の3年間にわたり、基礎データ収集のための神奈川県におけるHIV診療実態調査（アンケート調査）、当院初診の新規感染患者の薬剤耐性検査、BEDアッセイを継続して行った。神奈川県下の医療機関で診療を受けているHIV感染患者数は平成19年10月の段階で約570名であったのに対し、21年8月には760名と増加していた。この3年間に横浜市立大学附属病院を初診した感染患者は72名、そのうち新規感染患者に対して同意を得た後52名に薬剤耐性検査、53名にBEDアッセイを行ったところ9例に耐性変異が確認され、年々の増加傾向も認められた。BEDアッセイを行った53名中17名が最近の感染を示唆するODn <0.8であり、うち3名は初期HIV感染であったものの、7例はAIDSを発症していた。最近の感染を疑う17名のうち経過中複数回BEDアッセイを施行しえた12名では非AIDS症例で経時的にODn値の上昇傾向が認められ、非AIDS症例ではこれを認めなかった。

### A. 研究目的

神奈川県下、特に横浜市立大学附属病院の診療圏である南横浜、横須賀、湘南地区における薬剤耐性HIVの調査研究が目的である。具体的には神奈川県におけるHIV診療の実態を把握するために平成19年度10月と平成21年度8月に医療機関を対象としたアンケート方式のHIV診療実態調査を行った。また、当院を初診したHIV感染患者のうち新たに感染が判明した新規感染患者を対象にBEDアッセイを施行し、全体に占める最近の感染例の割合を知ることで今後の感染の動向を予測、さらに実際に薬剤耐性検査を行うことで耐性ウイルスの増加や、耐性変異の部位から現在の抗HIV薬の使用動向を反映しているかを考察した。結果として判明した横浜近郊における薬剤耐性HIVの動向と全国のそれを比較した。

### B. 研究方法

#### アンケート調査

平成19年10月に神奈川県下の有床医療機関を対

象に、平成21年8月には神奈川県エイズ治療拠点17病院を対象にHIV診療状況に関するアンケート調査を行った。

#### 薬剤耐性検査およびBEDアッセイ

平成19年度1月より平成21年度12月の間に当院を新規感染患者として受診した73名のうち、研究の内容に同意を得られた53名にBEDアッセイを、52名に薬剤耐性検査を施行した。薬剤耐性検査は国立感染症研究所もしくは国立名古屋医療センターで検査を施行、BEDアッセイはcalypte® HIV-1 BED incidence EIAキット（Calypte Biochemical Co., Rockville, MD）を用いて調べた。

#### 開発および研究の対象となる個人への不利益および危険性への配慮

サンプリングは採血のみであり、多くは他の検査項目と一緒に行われた。薬剤耐性検査の解析結果は、治療開始時の薬剤選択において多に有用であり、



不利益な点はない。BEDアッセイは患者の要請に基づき通知するが、偽陽性や偽陰性の頻度が高いこと同時に知らせ、また診療方針の決定には影響しない。情報の扱いには細心の注意が払われる。施設から出る情報は匿名化されたものを用い、個人を特定する情報の流出はない。本解析は当院の倫理委員会で承認されており、これに基づき研究の目的、研究に協力いただいたときの利益と不利益、参加の方法と内容、研究調査の適切な運営と情報の保護、研究成果の公表、協力して頂くことを説明し、同意のもとに行われた。

C. 研究結果

アンケート調査

平成19年10月に神奈川県下の有床医療機関337施設を対象に、HIV診療の実態調査をアンケート方式で行った。107施設より回答を得た。計570名のHIV感染患者の診療実態が明らかとなった。うち567名は17の拠点病院で診療を受けていた。県内のHIV診療がほぼ拠点病院で行われていることが判明し、平成21年8月に県内の病院エイズ治療拠点17病院を対象に再びアンケート調査を行い全施設から回答を得た。17施設のHIV診療数は計760名であり、2年前の調査で判明した570名から190名増えていた。200名以上の診療数を有する2病院の患者増加の他に、中規模診療病院（39名から69名の診療を行っている病院）5病院での診療数増加が目立ち、特定病院

への患者の集中はあるものの、裾野の広がりを伺えるものであった。

薬剤耐性検査

平成19年1月より平成21年12月の3年間に当院を新規感染患者として初診した患者のうち、検査に同意が得られた52名に対して薬剤耐性検査を施行した。対象者は平成19年度16名、平成20年度17名、平成21年度19名であった。

表1に臨床上問題となる耐性変異を認めた9症例での変異を示す。rtT215D/E/Sのrevertantがそれぞれ1名ずつ、rtA98Sを4名に、その内1名にはrtK103Nも認めた。pol46IとintE157Qを1名ずつ認めた。耐性変異は平成19年度1名(6.25%)、平成20年度3名(17.6%)、平成21年度5名(26.3%)であり増加傾向が確認された。

BEDアッセイ

平成19年1月より平成21年12月の3年間に当院を新規感染患者として初診した患者のうち、検査に同意が得られた53名に対してBEDアッセイを施行した。表2に示すとおり、うち17名が最近の感染が示唆されるODn < 0.8に該当した。症例5、症例16、症例17は前医でのWB法の結果がそれぞれ陰性、判定保留、判定保留であり臨床歴からも初期HIV感染と診断されたものの、その他の症例では感染時期は推定できなかった。7名はAIDSを発症しており、臨床歴や検査結果からも進行したHIV患者であり疑陽性

表1

症例	AIDS	感染時期	CD4	VL (c/mL)	ODn
375M	PCP	不明	124	600 000	0.78
381M	(-)	不明	643	6 400	0.72
388M	(-)	不明	431	<400	0.43
389M	PCP	不明	81	300 000	0.25
390M	(-)	PHI	568	750 000	0.43
396M	PCP	不明	8	52 000	0.56
398M	TB	不明	10	150 000	0.65
403M	(-)	不明	456	1 600	0.12
405M	MAC	不明	0.2	450 000	0.24
416M	HHV2	不明	284	590 000	0.36
428M	(-)	不明	294	17 000	0.05
434M	(-)	不明	466	11 000	0.27
435M	(-)	不明	540	70 000	0.11
437M	(-)	不明	473	170 000	0.12
438M	PCP	不明	24	250 000	0.13
444M	(-)	PHI	494	9 700	0.14
445M	(-)	PHI	170	960 000	0.06

表2

症例	RTI	PI	INT
388M	T215S	R41K	
415M	T215D	I15V	
417M	(-)	M46I, I62V, L63P, V77I	
422M	A98S, V179D	I15V, M36I, I62V	
428M	A98S, K103N	L63P	
434M	(-)	L10I, M36I, I62V	E157Q
436M	A98S, V179D	V77I	(-)
439M	T215E	V77I	(-)
445M	A98S	I15V, I62V, A71T	(-)

を疑うものであった。17名中12名で経時的なODn値が測定し得た(図1)。は非AIDS症例で経時的にODnの上昇傾向が認められ、非AIDS症例ではこれを認めなかった。

#### D. 考察

2年前のHIV診療実態調査と現在のそれを比較し、神奈川県のエイズ治療拠点病院に於ける診療数の急増と拠点病院における診療体制の裾野の広がりが明らかとなった。一方で、BEDアッセイで最近の感染と推測された17名のうちわけは19年度16人7名(43.8%)、平成20年度17人中3名(17.6%)、平成21年度20人中7名(35%)と横ばいであるが、AIDS症例を除いた10名とすると平成19年度3名(18.8%)、平成20年度1名(5.9%)、平成21年度6名(30%)と昨年度の急増が示された。一方、東京都の医療機関での報告ではBEDアッセイで最近の感染を疑うHIV感染患者の割合は年々増加しており、首都圏での最近の感染増加を示唆するものとなっているが、これに比較して横浜近郊では異なる動向なのか、さらに継続して検査を行う必要があると考えられる。薬剤耐性検査ではこの3年間52症例の新規感染患者に施行し9名に耐性変異を確認した(16%)。平成20年度の全国での耐性変異の割合と比較しても高い出現率となっている。さらに年度をおうごとに増加しており当施設では初診時の耐性検査は必須な検査となっている。

#### E. 結論

平成19年から平成21年の間に神奈川県エイズ治療拠点病院でのHIV診療件数はおおきく増加している。BEDアッセイは最近の感染を示唆しうる有効な手段であるが、さらに経時的に測定することで、問

題となる疑陽性を疑うことができる。横浜近郊の最近の感染を疑う感染患者の割合は増えてはいない。一方、新規未治療感染患者から分離される耐性ウイルスの頻度は横浜近郊では高い割合で推移しており、年々の増加傾向も確認された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 石ヶ坪良明、上田敦久、【ウイルス感染とアレルギー】 HIV感染症とアレルギー、アレルギーの臨床(0285-6379)28巻3号 Page205-209(2008.03)
- 2) Naganawa S. Yokoyama M. Shiino T. Suzuki T. Ishigatsubo Y. Ueda A. Shirai A. Takeno M. Hayakawa S. Sato S. Tochikubo O. Kiyoura S. Sawada K. Ikegami T. Kanda T. Kitamura K. Sato H. Net positive charge of HIV-1 CRF01\_AE V3 sequence regulates viral sensitivity to humoral immunity. Plos ONE. 2008 Sep 12;3(9):e3206

##### 2. 学会発表

- 1) 桐野洋平、上田敦久、吉見竜介、大野美香子、小林弘、井畑淳、岳野光洋、白井輝、石ヶ坪良明、当院で経験されたAIDS関連Kaposi肉腫の9例、第61回神奈川感染症医学会、2007.3 横浜
- 2) 浜 真麻、上田敦久、井畑 淳、加藤英明、桐野洋平、須田昭子、岡 秀昭、岳野光洋、白井 輝、石ヶ坪良明、肺カポジ肉腫による免疫再構築症候群の1例、第62回神奈川感染症医学会、2007.9 横浜

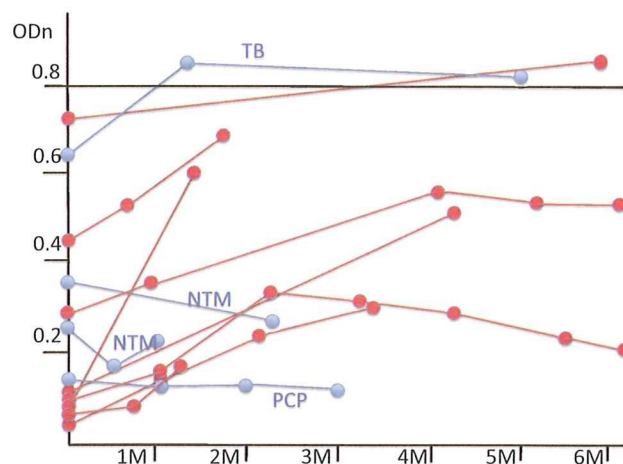


図1 ODn値0.8未満であった新規未治療患者の初診後から6ヶ月後までのODn値の変動  
AIDS発症例を青線で、未発症例を赤線で示す。TB: 結核症、NTM: 非結核性抗酸菌症、PCP: ニューモシスチス肺炎

- 3) 須田昭子、浜 真麻、上田敦久、岡 秀昭、中仙道亜弥、岳野光洋、白井 輝、安達理恵、小田みどり、竹林早苗、松山奈央、沓名明子、石ヶ坪良明、Cutaneous Pneumocystosisの一例、第21回日本エイズ学会学術集会、2007.12 広島
- 4) 上田敦久、桐野洋平、加藤英明、井畑淳、浜真麻、須田昭子、岡秀昭、岳野光洋、石ヶ坪良明、腸結核、回腸穿孔、汎発性腹膜炎より発症した後天性免疫不全症候群の一例、第63回神奈川感染症医学会、2008.3 横浜
- 5) 上田敦久、須田昭子、岡秀昭、内田大介、中仙道亜弥、安達理恵、竹林早苗、小田みどり、松山奈央、沓名明、白井輝、石ヶ坪良明、当院で経験されたHIV/結核重複感染症25症例の臨床像、第64回神奈川感染症医学会、2008.9 横浜
- 6) 須田昭子、上田敦久、中仙道亜弥、安達理恵、竹林早苗、小田みどり、松山奈央、沓名明子、筑丸寛、白井輝、石ヶ坪良明、Backbone drugとしてStavudine(d4T)より他のNRTIに変更した場合の脂質マーカーの変動について、第22回日本エイズ学会学術集会、2008.11 大阪
- 7) 中仙道亜弥、上田敦久、須田昭子、安達理恵、竹林早苗、小田みどり、松山奈央、沓名明子、筑丸寛、白井輝、石ヶ坪良明、HAART初回療法導入84症例における導入後の脂質マーカーの変動について、第22回日本エイズ学会学術集会、2008.11 大阪
- 8) 筑丸寛、上田敦久、松井義郎、小森康雄、泉福英信、金子明寛、池田正一、藤内祝、神奈川県HIV歯科診療ネットワーク運用開始後2年間の検討、第22回日本エイズ学会学術集会、2008.11 大阪
- 11) 上田敦久、築地淳、岡秀明、中向知子、石ヶ坪良明、白井輝、安達理恵、竹林早苗、小田みどり、松山奈央当院で経験されたAIDS関連悪性リンパ腫、第65回神奈川感染症医学会、2009.3 横浜
- 12) 上田敦久、安達理恵、竹林早苗、小田みどり、松山奈央、筑丸寛、白井輝、石ヶ坪良明、多種NRTI,PI剤に対して副作用を呈したHIV感染症患者に対する新規HIV薬の有用性について、第66回神奈川感染症医学会、2009.9 横浜
- 13) 須田昭子、上田敦久、安達理恵、竹林早苗、小田みどり、松山奈央、筑丸寛、白井輝、石ヶ坪良明、当院における新規未治療感染患者におけるBED assay解析結果の検討、第23回日本エイズ学会学術集会、2008.11 名古屋
- 14) 筑丸寛、上田敦久、松井義郎、小森康雄、泉福

英信、金子明寛、池田正一、白井輝、石ヶ坪良明、藤内祝、HIV感染者の歯科診療に関する研修で求められる情報、必要とされる情報についての検討、第23回日本エイズ学会学術集会、2008.11 名古屋

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし





## 研究要旨

# 血中、唾液、毛髪中の抗HIV薬定量

～PCR-MS法を用いたHIV感染者血漿中の薬剤耐性微小集団の定量～

研究分担者 加藤 真吾 慶應義塾大学医学部微生物学・免疫学教室 専任講師

微小集団の薬剤耐性ウイルスを検出・定量することは、薬剤耐性HIV-1の伝播状況の把握や、サルベージ療法における治療薬の選択などにおいて重要な情報を提供する。そのために近年開発されたallele-specific real-time PCRは検出感度において優れているが、3通りの点変異やT215Yのような2塩基の変異を測定できない問題点があった。それらを解決するための新しい方法として、ウイルスRNAの薬剤耐性変異部位を含むPCR増幅産物をI型制限酵素AclIで切断し、そのオリゴヌクレオチド断片をLC-MSによって解析することにより微小集団を検出・定量するPCR-MS法を開発した。PCR-MS法の検出感度を測定した結果、逆転写酵素のM184V、K103N、T215Yの変異、プロテアーゼのL90M変異の4種類の薬剤耐性変異について存在比率0.2%から0.5%までの微小変異を検出することが可能であった。

臨床検体として、薬剤変更時に継続採血した多剤耐性患者の血漿を2ヶ所の耐性変異について検出と定量を行った結果、7ヶ月あるいは9ヶ月で耐性株が感受性株に置き換わることが測定された。また未治療新規感染者137例の微小耐性変異の検出と定量を行った結果、L90Mで2例、K103Nで3例、M184Vで3例、T215で12例、計20例の薬剤耐性関連変異が検出された(15%)。そのうち6例は存在比20%以下の薬剤耐性微小集団であった。PCR-MS法は微小耐性ウイルスを持つ患者の治療及び疫学における意味を明らかにするために有用であると考えられる。

## A. 研究目的

抗HIV療法において薬剤耐性は重大な問題となっている。一般に耐性ウイルスの検査は耐性関連遺伝子の塩基配列を決定することによって行われているが、この方法では耐性ウイルスの比率が20%以上でなければ検出することができない。このような微小集団の耐性ウイルスを検出・定量することは、薬剤耐性HIV-1の伝播状況の把握や、サルベージ療法における治療薬の選択などにおいて重要な情報を提供すると期待される。Hanceらは2001年にallele-specific real-time PCRを用いて耐性変異を0.1%まで測定することに成功した。その後この技術は、未治療期、母子感染、STIなどの様々な時期における耐性ウイルスの量的変化を研究するために使用されてきた。しかし、この方法には、(i)3通りの点変異を同時に

測定できない、(ii)連続した2塩基変異（例えばT215Y）を測定できないという問題があった。これらの問題を解決する新しい方法として、PCRと液体クロマトグラフィー・マススペクトロメトリー(LC-MS)を組み合わせることによってHIV-1の微小集団を定量するPCR-MS法を開発した。PCR-MS法で測定する耐性変異箇所としてプロテアーゼのL90、逆転写酵素のK103、M184、T215の4種類を選択し、直線性および検出感度と検査精度についての検討を行った。また薬剤変更時に継続採血した多剤耐性患者の血漿と慶應義塾大学病院と名古屋医療センターに来院した新規感染者137人の血漿を測定することにより、臨床検体における耐性ウイルス微小集団の検出と定量を行った。

**B. 研究方法**

PCR-MS法の検査精度の検討に用いる検体として、野生株IIBと慶應義塾大学病院通院患者一人から分離したK2901株のウイルス培養上清を用いた。IIB株は耐性変異をもたず、K2901株は逆転写酵素(RT) 遺伝子にM41L、K103N、M184V、T215Yの変異を、プロテアーゼ(PR) 遺伝子にI54V、G73S、V82A、L90Mの変異をもっている。それぞれの株は塩基配列決定とPCR-MS法によって微小集団が検出されないことを確認した。それぞれの株の培養上清あるいはそれらの混合液をそれぞれp24抗原量で50 pg (約250,000コピーのウイルスを含む) ずつからQIAamp UltraSens® Virus Kit (QIAGEN)を用いて60 µLの溶出液でRNAを抽出した。また臨床検体を測定するための標準検体として、それぞれの株の培養上清あるいはそれらの混合液をそれぞれp24抗原量で14 pg (約70,000コピーのウイルスを含む) からQIAamp® Viral RNA mini Kit (QIAGEN)を用いて60 µLの溶出液でRNAを抽出した。

多剤耐性患者の臨床検体として、慶應義塾大学病院に通院し、薬剤変更時の2000年8月から2002年5月の2年10ヶ月間で12回採血した患者の血漿検体を用いた。また新規感染者の臨床検体として、2005年から2007年の慶應義塾大学病院における新規感染症例27例の血漿検体を用いた。各検体とも血漿200 µLからQIAamp UltraSens® Virus Kitを用いて60 µLの溶出液でRNAを抽出した。

新規感染者の臨床検体として、2005年から2008年の慶應義塾大学病院における未治療新規感染症例32例と2008年の名古屋医療センターにおける未治療新規感染症例105例の血漿検体を用いた。各検体とも血漿100 µLからQIAamp® Viral RNA mini Kit (QIAGEN)を用いて60 µLの溶出液でRNAを抽出した。

PCR-MS法による測定は以下のように行った。

RNA抽出液6 µLに50 µMランダムヘキサマーを2 µL、10 mM dNTPsを1 µL、蒸留水を4 µL加え、65°Cで5分変性させた後、氷上で1分以上静置した。この液にSuperScript IIIに添付されている5 x first strand bufferを4 µL、0.1 M DTTを1 µL、200 U/µL SuperScript IIIを1 µL、40 U/µL RNasinを1 µL加え、室温で5分、50°Cで10分、70°Cで15分静置してcDNAを作成した。1回目のPCRのプレミックスとしてPlatinum Taqに添付されている10 x PCR Bufferを5 µL、50 mM MgCl<sub>2</sub>を3 µL、25 mM dNTPsを0.4 µL、20 µM pre\_Fプライマーを0.5 µL、20 µM pre\_Rプライマーを0.5 µL、蒸留水を36.1 µL、Platinum Taqを0.5 µL加えて調製した。プライマーはプロテアーゼ領域のL90、逆転写酵素領域のK103、M184、T215の4種類の耐性変異についてpreプライマーセットとAcuIプライマーセットをそれぞれ作成した(表1)。cDNA液4 µLにプレミックスを46 µL加え、94°Cで2分変性させ、続けて94°Cで5秒、48°Cで10秒、72°Cで15秒のサイクルを5回繰り返し、さらに94°Cで5秒、60°Cで10秒、72°Cで15秒のサイクルを25回繰り返し、最後に72°Cで1分反応させた。2回目のPCRのプレミックスとして10 x PCR Bufferを5 µL、50 mM MgCl<sub>2</sub>を3 µL、25 mM dNTPsを0.4 µL、20 µM AcuI\_Fプライマーを5 µL、20 µM AcuI\_Rプライマーを5 µL、蒸留水を30.1 µL、Platinum Taqを0.5 µL加えて調製した。このプレミックス49 µLに1回目のPCR産物を1 µL加え、94°Cで2分変性させた。続けて94°Cで5秒、60°Cで10秒、72°Cで15秒のサイクルを30回繰り返し、最後に72°Cで1分反応させた。2回目のPCR反応後、反応液5 µLを用いてアガロースゲル電気泳動でPCR産物を確認した。制限酵素反応のプレミックスとして制限酵素AcuIに添付されている10 x NE Buffer 4を10 µL、1.6 mM S-adenosyl methionineを2.5 µL、蒸留水を40.5 µL、AcuIを2 µL加えて調製した。プレミックス55 µLに

表1 プライマーの塩基配列

	プライマー名	配列
PR L90	pre_p90a_F	CCT GTC AAC ATA ATT GGA AGA AAT MTG
	pre_p90a_R	TTT AAA GTG CAA CCA ATC TGA GTC A
	AcuI_p90a_F	CCG CTG AAG AAT TGG AAG AAA TMT G
	AcuI_p90a_7mR	CCG CTG AAG AGT GCA ACC AAT CTG AGT CA
RT K103	pre_r103c_F	TCC CGC AGG GTT AAA AAA GAA
	pre_r103c_R	CCC ACA TCC AGT ACT GTT ACT GAT TT
	AcuI_r103c_F	CCG CTG AAG CAG GGT TAA AAA AGA A
	AcuI_r103c_6mR	CCG CTG AAG CCA GTA CTG TTA CTG ATT T
RT M184	pre_r184a_F	ACA AAA TCC AGA CAT AGT TAT CTA TCA ATA C
	pre_r184a_R	AGT CAG ATC CTA CAT ACA AAT CAT CCA
	AcuI_r184a_F	CCG CTG AAG AGT TAT CTA TCA ATA C
	AcuI_r184a_5mR	CCG CTG AAG CTA CAT ACA AAT CAT CCA
RT T215	pre_r215ab_F2	ACA TCT ATT GAG GTG GGG RTT T
	pre_r215ab_R	TTT CTG ATG TTT TTT GTC TGG TGT R
	AcuI_r215ab_F	CCG CTG AAG GTT GAG GTG GGG ATT T
	AcuI_r215ab_F2	CCG CTG AAG ATT GAG GTG GGG RTT T



2回目のPCR産物を45  $\mu$ L加え、37°Cで1時間、65°Cで20分静置した。制限酵素処理した試料を5  $\mu$ L用いてアガロースゲル電気泳動で酵素反応を確認した後、90  $\mu$ Lに99.5%エタノールを360  $\mu$ L加え、14000 rpmで10分遠心した。上清を除き、14000 rpmで2分遠心した後、再度残余の上清を除き、真空乾燥機で5分乾燥させた。乾燥したDNAに5 mM 酢酸アンモニウムを10  $\mu$ L加えて溶解し、ZipTip<sub>C18</sub> (MILLIPORE)を用いてDNAを精製した。Equilibration/Wash solutionには5 mM 酢酸アンモニウム、Elution solutionには5 mM 酢酸アンモニウム/50%アセトニトリルを用い、4  $\mu$ Lで抽出し、真空乾燥機で10分乾燥させた。精製したDNAに5 mM 酢酸アンモニウムを11  $\mu$ L加えて溶解し、14000 rpmで2分遠心し、上清を10  $\mu$ Lとってそのうちの4  $\mu$ LをLC-MSで分析した。

### (倫理面への配慮)

本研究を実施するに当たりHIV-1感染者に研究の概要と意義を説明し同意を得た上で血液を採取した。

## C. 研究成果

直線性の検討のため、耐性株の割合が0.2、0.5、2、5、20、50%になるように調製した6検体について、PR変異L90M、RT変異K103N、M184V、T215Yの4変異の割合を5回ずつ測定した。耐性ウイルス0.2%に調整した培養上清では、L90M、M184V、T215Yの変異で5回中1回が検出限界以下であった。実際に測定した耐性株の割合と調整した割合をプロットし、直線性のデータを図1に示した。回帰直線を求

めた結果、4変異全てで良好な直線性が得られた( $r^2=0.9517\sim 0.9770$ )。

検査精度の検討のため、耐性株の割合が0.5、5、50%になるように調製した3検体について、4変異それぞれにつき実験内誤差の評価のため各濃度5点を1回測定し、実験間誤差のため各濃度1点を5回測定した。測定ごとに検量線による補正を行い、得られた結果の精度(Precision)と正確さ(Accuracy)を求めた。実験内誤差の変動係数は耐性株の割合が50%で4~9%、5%で5~20%、0.5%で31~53%であった。また、実験間誤差の変動係数は耐性株の割合が50%で7~16%、5%で7~21%、0.5%で20~36%であった。正確さは-31%~32%の範囲であり、半数以上が $\pm 15\%$ 以内であった(表2)。

多剤耐性患者における薬剤耐性変異の割合の推移を測定するため、薬剤変更時に継続して採取された多剤耐性患者の血漿12検体について、M184VとT215Yの耐性変異の割合を測定した。M184Vの耐性ウイルスは薬剤変更後9ヶ月間で次第に感受性ウイルスに置き換わっており、T215Yの耐性ウイルスは薬剤中止後7ヶ月間で次第に感受性ウイルスに置き換わっていることが測定できた(図2)。

慶応義塾大学病院の未治療新規感染者32例について4種類の耐性変異を測定した。その結果、L90M、K103N、M184Vの変異例がそれぞれ1例ずつ検出され、T215YではなくT215Iの変異例が1例検出された。それぞれの耐性変異の割合は、L90Mの耐性変異を持つ例が0.26%、K103Nが7.0%、M184Vが32%、T215Iが28%であった。T215Y(ACC $\rightarrow$ TAC)とT215I(ACC $\rightarrow$ ATC)の変異で得られるDNA断片は同じ質量であるが(antisenseの場合TAAAとATAA)、

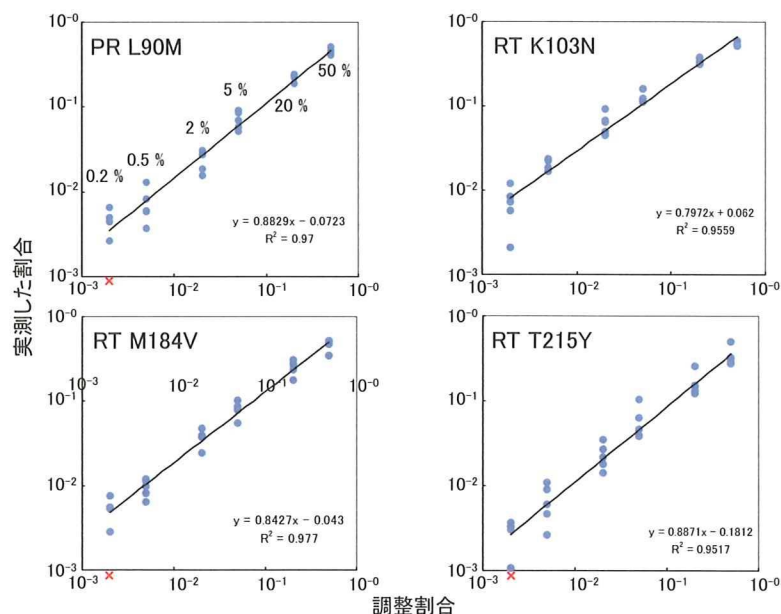


図1 PCR-MS法の直線性