

associated herpesvirus, KSHV, ヒトヘルペスウイルス 8, human herpesvirus 8, HHV-8ともいわれる)はエイズに合併したカポジ肉腫から発見された最も新しいヒトヘルペスウイルスである^{42, 43)}。KSHVの日本人健常者における抗体保有率は1%程度であり、他のヒトヘルペスウイルスと異なり感染率は低い^{44, 45)}。KSHVが感染したヒトは必ずカポジ肉腫を発症するわけではなく、エイズなどの免疫不全者にカポジ肉腫は発症する。KSHVはすべてのカポジ肉腫症例から検出されることから、カポジ肉腫との関連は疑いがない。これまで、KSHVはカポジ肉腫以外にも様々な疾患から検出されてきたが、疾患との関連が明らかになったのはカポジ肉腫、primary effusion lymphoma (PEL)や一部の multicentric Castleman's disease (MCD)などに限られる(表3)⁴³⁾。昨今、日本ではカポジ肉腫患者が増加している⁴⁶⁾。カポジ肉腫はエイズ患者では男性同性愛者にほぼ限定して発症することから、KSHVは男性同性愛者の間に広く感染していることが推察される⁴⁷⁻⁵⁰⁾。この数年、日本の新規 HIV 感染者の約7割が同性間の性交渉による感染である(厚生労働省エイズ動向委員会)。これらの事実を勘案すると、本邦でカポジ肉腫が増加しているのは、男性同性愛のエイズ患者が増加していることに起因しており、カポジ肉腫症例はさらに増加していくことが見込まれる。

2. KSHV 感染の分子メカニズム

この数年でKSHVの感染の分子メカニズムが急速に明らかにされつつある⁵¹⁾。KSHVの細胞への吸着はエンベロープの糖タンパク質であるK8.1AやgBが細胞表面のヘパラン硫酸と結合することで起こり、ヘパラン硫酸はattachment receptorの役割を果たす⁵²⁻⁵⁴⁾。吸着に成功したウイルスのgBがKSHVのentry receptorの一つであるintegrin $\alpha 3 \beta 1$ (CD 49c/29)に特異的に結合し、ウイルスのエンベロープと宿主細胞の細胞膜の膜融合が開始する⁵⁵⁾。接着細胞においては細胞内輸送タンパクであるCD98-xCTがintegrin $\beta 1$ の近傍に存在し、やはりKSHVのレセプターとして働く⁵⁶⁾。また、KSHVの樹状細胞におけるレセプターとしてDC-SIGN(CD209)が同定されているが⁵⁷⁾、in vivoで樹状細胞に対する感染はまれである。これらのレセプター分子はいずれも細胞膜表面のlipid raft上に存在し、KSHVとの結合により下流にあるSrc, PI3-K, Rho-GTPase, Dia-2などのシグナル伝達分子を活性化する⁵⁸⁾。レセプター分子と結合したKSHVは膜融合後に、ウイルスカプシドを含むエンドゾームが形成され、同時に、微小管形成が促進される。エンドゾームに取り込まれたKSHVカプシドは微小管まで運ばれ、ここでRho-GTPaseにより活性化されたPKC ζ とMEKにより、細胞質内へ放出される。放出されたカプシドはダイニンモータータンパクによって微小管に沿って核内へ輸送される⁵⁹⁾。さらにRho-

GTPaseにより活性化されたPKC ζ とMEKは核内のERK1/2をリン酸化し、結果、NF- κ Bの構成的活性化を誘導し、ウイルス遺伝子の発現を誘導する⁶⁰⁾。

3. ウイルスの増殖と遺伝子発現

核内に入ったKSHVには他のヘルペスウイルスと同様、lytic(溶解性感染、または増殖感染)とlatent(潜伏感染)の2つの感染状態がある。KSHVは潜伏感染が優位であり、KSHVを感染させた感染細胞はほとんど溶解感染を示すことなく潜伏感染に移行する⁶¹⁾。カポジ肉腫やPELなどの発症部位でも溶解感染細胞はまれで、ほとんどの細胞はKSHVの潜伏感染状態にある⁶²⁾。しかし、近年のPEL細胞を解析した研究からは、PEL細胞のある一定の割合の細胞が常に溶解性感染の状態にあり、そこからごく少量の溶解性感染タンパクが発現することで周囲の微小環境を整え、感染細胞が増殖しやすい環境を作っていることが推察されている⁶³⁾。

(1) 潜伏感染遺伝子

KSHVの潜伏感染遺伝子は、latency-associated nuclear antigen 1(ORF73, LANA-1)、v-cyclin(ORF72)、viral FLICE-inhibitory protein(K13, v-FLIP)、Kaposin(K12)、LANA-2などに限られる(表4)。これらの遺伝子はKSHVのK12からORF73がコードされる領域、及び、K10.5(LANA2)から転写される産物であり、さらにORF71からORF73は同じプロモーター(LANA promoter)から転写される⁶⁴⁾。KaposinはK12領域にコードされ、LANA promoterに加え、独自のプロモーターから転写される⁶⁵⁾。LANA-1は潜伏感染タンパクの中でも最も重要で、発現量の高いタンパクである。LANA-1はカポジ肉腫、PELを含むKSHV感染細胞には必ず検出される⁶²⁾。LANA-1は単独では完全な形質転換能は持っていないものの、表3に示すような多彩な機能を発揮することで、宿主細胞を最終的に癌化の方向に向かわせる多機能タンパクであると考えられている。KaposinはK12にコードされるタンパク群で、ひとつのmRNAから翻訳開始点の異なる少なくとも3つタンパク(Kaposin A, B, C)が翻訳される⁶⁶⁾。KSHVの他の潜伏感染タンパクであるviral cyclin(v-cyclin)、v-FLIP、LANA-2はLANA-1と異なり、カポジ肉腫でつねに高発現が証明されているタンパクではない点に注意が必要である。

(2) 溶解性感染遺伝子

KSHVがコードする約90の遺伝子のうち、前項で挙げた潜伏感染遺伝子以外はすべて溶解性感染で発現する遺伝子である(表4)。したがって、溶解性感染遺伝子は種類も多く、機能も様々であるが、いずれもカポジ肉腫やPELではまれな発現しか見られない⁶²⁾。KSHVではORF50(RTA; regulator of transcription activation)がimmediate early proteinとして、latentからlyticへのswitching proteinの役割を持っている⁶⁷⁾。ORF50はK8(K-bZIP)を

表4 KSHVの主要なタンパク

遺伝子名	発現時期	特徴, 機能
LANA-1	latent	KSHV 感染細胞で常に検出される。 KSHV エピゾームを核内染色体につなぎ止め, 有糸分裂の際のウイルスゲノムの保持と複製に必要。 p53 と結合し, p53 依存性のアポトーシスを阻害 Rb と結合し, Rb-E2F の経路を阻害 GSK-3 β と結合し, β -catenin の細胞質内過剰貯留を誘導
LANA-2	latent	PEL のみで発現, IRF のホモログ, p53 の細胞死を阻害.
Kaposin	latent	Kaposin A : 形質転換? Kaposin B, C : MAP kinase-associated protein kinase 2 (MK2) のアダプタータンパクとして, サイトカイン遺伝子の発現誘導に関与
v-cyclin	latent	cyclinD1 のホモログ, P27Kip1 を抑制, 細胞を S 期に誘導.
v-FLIP	latent	抗アポトーシス
ORF50 (RTA)	Lytic (IE)	Lytic switch protein, 転写活性化因子
K1	lytic	形質転換能
K8	Lytic (early)	転写活性化因子
K3, K5	Lytic (IE/early)	MHC クラス I の発現抑制
vIL-6	Lytic (early)	VEGF の発現を誘導 Stat3 の恒常的活性化を誘導 IFN- α の抗ウイルス作用を阻害
vIRF-1	Lytic (early)	IFN シグナルの抑制, 形質転換能あり?
vMIPs,	Lytic (early)	K4/4.1(vMIP-II, III), K6(vMIP-I) にコードされる, ケモカイン受容体に結合し血管新生
vBcl-2,	Lytic (early)	アポトーシスを阻害
vGPCR	Lytic (early)	形質転換能, IL-8 と結合, VEGF の誘導
K15	Lytic	TRAF と結合し NF- κ B の活性化

誘導し, K8 がさらに他のウイルス遺伝子の転写活性化因子として働く. early 転写産物はウイルス DNA 合成に先立って転写される⁶⁸⁾. 溶解性感染関連タンパクのうち, viral interleukin 6 (vIL-6), vBcl-2, viral Interferon regulatory factor 1 (vIRF-1), vMIP-I, II, vGPCR などはヒト遺伝子のホモログであり, その翻訳産物は, 宿主本来の分子の機能を阻害することにより免疫回避機構, 発癌機構に関与する. こうした働きはウイルス分子が宿主分子の本来の機能を乗っ取ってしまうことに喩え, 分子海賊行為 (molecular piracy) といわれる.

4. KSHV 関連疾患の病因メカニズム

KSHV 関連疾患であるカポジ肉腫, PEL, MCD の間で, KSHV 感染との関わり方は異なる. KSHV の生体内でのリザーバーは B 細胞であり, カポジ肉腫の発症には KSHV が B 細胞から血管内皮細胞に感染することが必要である. KSHV に感染した血管内皮細胞では細胞側の遺伝子発現の reprogramming が起こり, 血管内皮細胞のマーカーである Factor VIII-related antigen の発現が抑制され, それに代わり, リンパ管内皮のマーカーである Podoplanin が高発現する⁶⁹⁾. その後, 血管内皮細胞は KSHV により形質転換

を起こし, 増殖をはじめ, すべての細胞で LANA-1 を発現する. この状態が初期のカポジ肉腫である. 溶解性感染関連タンパクの発現はごくまれで, 1% 以下の細胞にみとめられるにすぎない⁶²⁾. PEL はリザーバーである B 細胞が KSHV により腫瘍化したものと考えられるが, KSHV の B 細胞への感染には B 細胞の分化が深く関係する. すなわち, PEL 細胞の由来は CD138 陽性の post germinal center B cell であり, その他の分化段階の B 細胞に KSHV が感染した報告はない⁷⁰⁾. PEL 細胞にも LANA-1 の発現が必ず認められ, 同時に, 溶解性感染タンパクである vIL-6 の発現がカポジ肉腫より高頻度に見られる. 一方で, MCD では潜伏感染タンパク以外にも多くの溶解性感染タンパクの発現が認められる^{62, 71)}. MCD は KSHV の急性感染症ともいえる疾患であり, vIL-6 が高発現することが疾患の成立に重要である.

5. マイクロ RNA

KSHV では K12 領域に変異体を含めると 17 種類の miRNA がコードされている⁶⁵⁾. PEL 細胞株を対象に high throughput のシークエンサーを用いた研究では miR-K4 が検出されたウイルス miRNA の約 8 割を占め, KSHV

miRNAには特に3'側に多くのvariationが見られたことが報告されている⁷²⁾。KSHV miRNAの標的分子に関して、これまでにすでに多くの報告がある。主なものではBCL2と関連するBCLAF1 (miR-K5)、抗腫瘍因子であるTHBS1、NF- κ Bの抑制因子であるIkB α (miR-K1)などがあり、腫瘍の抑制因子や抗アポトーシス因子、ウイルスの複製を抑えるような分子を標的としている報告が多い⁷³⁻⁷⁵⁾。

6. 動物モデルとワクチン

KSHVはヒト以外にはほとんど感染せず、マウスやラットなどの小動物では免疫反応は起こるものの、持続感染には至らない。サルですら持続感染に至った報告はなく、KSHVの動物モデルの作製は困難と考えられていた。しかし、最近になって、マーマセットを使った感染実験系が報告され、最初の感染動物モデルとして注目されている⁷⁶⁾。KSHVを感染させると抗体価が上がるばかりでなく、潜伏感染が成立し、一部の接種動物にはカボジ肉腫に近似した疾患ができたという。これまでのところKSHVに対するワクチンの開発はされていないが、マウスへの接種実験では血清中の抗体価が上がり、接種マウスの血清はin vitroでの感染をブロックできる⁷⁷⁾。今後、動物実験系を用いたワクチン開発へ進展することが期待される。

終わりに

EBVとKSHVはともに100kbpを超え、ヒト発癌ウイルスの中では、そのサイズの上で、最も大きなものに分類されるであろう。コードしているタンパクはそれぞれで数十を超え、疾患ごとに発現タンパクが異なることで、その発癌機構は複雑を極め、解明は容易ではない。ウイルス分離などの旧来のウイルス学的手法が通じないこれら2つのウイルスに対して、近年の強力な分子生物学的手法が次々と新しい事実を明らかにしていく様は、謎のベールが一枚ずつ剥がされていくような感がある。ワクチン開発などの予防法の開発にはほど遠いが、現在進行している分子生物学的解析が将来の有効な予防法や治療法の開発に結びついていくことを期待したい。

引用文献

- 1) Epstein MA, Achong BG, Barr YM: Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *Lancet* 1:702-703, 1964.
- 2) Kieff ED, Rickinson AB: Epstein-Barr virus and its replication, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007.
- 3) Rickinson AB, Kieff ED: Epstein-Barr virus, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007.
- 4) Takeuchi K, Tanaka-Taya K, Kazuyama Y, Ito YM, Hashimoto S, Fukayama M, Mori S: Prevalence of Epstein-Barr virus in Japan: trends and future prediction. *Pathol Int* 56:112-116, 2006.
- 5) Kimura H, Hoshino Y, Kanegane H, Tsuge I, Okamura T, Kawa K, Morishima T: Clinical and virologic characteristics of chronic active Epstein-Barr virus infection. *Blood* 98:280-286, 2001.
- 6) Yajima M, Imadome K, Nakagawa A, Watanabe S, Terashima K, Nakamura H, Ito M, Shimizu N, Honda M, Yamamoto N, Fujiwara S: A new humanized mouse model of Epstein-Barr virus infection that reproduces persistent infection, lymphoproliferative disorder, and cell-mediated and humoral immune responses. *J Infect Dis* 198:673-682, 2008.
- 7) Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW: WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC), 2008.
- 8) Katamine S, Otsu M, Tada K, Tsuchiya S, Sato T, Ishida N, Honjo T, Ono Y: Epstein-Barr virus transforms precursor B cells even before immunoglobulin gene rearrangements. *Nature* 309:369-372, 1984.
- 9) Rowe M, Lear AL, Croom-Carter D, Davies AH, Rickinson AB: Three pathways of Epstein-Barr virus gene activation from EBNA1-positive latency in B lymphocytes. *J Virol* 66:122-131, 1992.
- 10) Shimizu N, Tanabe-Tochikura A, Kuroiwa Y, Takada K: Isolation of Epstein-Barr virus (EBV)-negative cell clones from the EBV-positive Burkitt's lymphoma (BL) line Akata: malignant phenotypes of BL cells are dependent on EBV. *J Virol* 68:6069-6073, 1994.
- 11) Rawlins DR, Milman G, Hayward SD, Hayward GS: Sequence-specific DNA binding of the Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA-1) to clustered sites in the plasmid maintenance region. *Cell* 42:859-868, 1985.
- 12) Kennedy G, Komano J, Sugden B: Epstein-Barr virus provides a survival factor to Burkitt's lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:14269-14274, 2003.
- 13) Mosialos G, Birkenbach M, Yalamanchili R, VanArsdale T, Ware C, Kieff E: The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family. *Cell* 80:389-399, 1995.
- 14) Cohen JL, Wang F, Mannick J, Kieff E: Epstein-Barr virus nuclear protein 2 is a key determinant of lymphocyte transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:9558-9562, 1989.
- 15) Grossman SR, Johannsen E, Tong X, Yalamanchili R, Kieff E: The Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 transactivator is directed to response elements by the J kappa recombination signal binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:7568-7572, 1994.
- 16) Arrand JR, Rymo L: Characterization of the major Epstein-Barr virus-specific RNA in Burkitt lymphoma-derived cells. *J Virol* 41:376-389, 1982.
- 17) Howe JG, Shu MD: Epstein-Barr virus small RNA (EBER) genes: unique transcription units that combine RNA polymerase II and III promoter elements. *Cell* 57:825-834, 1989.
- 18) Lerner MR, Andrews NC, Miller G, Steitz JA: Two small RNAs encoded by Epstein-Barr virus and com-

- plexed with protein are precipitated by antibodies from patients with systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:805-809, 1981.
- 19) Randhawa PS, Jaffe R, Demetris AJ, Nalesnik M, Starzl TE, Chen YY, Weiss LM: Expression of Epstein-Barr virus-encoded small RNA (by the EBER-1 gene) in liver specimens from transplant recipients with post-transplantation lymphoproliferative disease. *N Engl J Med* 327:1710-1714, 1992.
 - 20) Yajima M, Kanda T, Takada K: Critical role of Epstein-Barr Virus (EBV)-encoded RNA in efficient EBV-induced B-lymphocyte growth transformation. *J Virol* 79:4298-4307, 2005.
 - 21) Komano J, Maruo S, Kurozumi K, Oda T, Takada K: Oncogenic role of Epstein-Barr virus-encoded RNAs in Burkitt's lymphoma cell line Akata. *J Virol* 73:9827-9831, 1999.
 - 22) Yamamoto N, Takizawa T, Iwanaga Y, Shimizu N: Malignant transformation of B lymphoma cell line BJAB by Epstein-Barr virus-encoded small RNAs. *FEBS Lett* 484:153-158, 2000.
 - 23) Kitagawa N, Goto M, Kurozumi K, Maruo S, Fukayama M, Naoe T, Yasukawa M, Hino K, Suzuki T, Todo S, Takada K: Epstein-Barr virus-encoded poly(A)(-) RNA supports Burkitt's lymphoma growth through interleukin-10 induction. *EMBO J* 19:6742-6750, 2000.
 - 24) Samanta M, Iwakiri D, Kanda T, Imaizumi T, Takada K: EB virus-encoded RNAs are recognized by RIG-I and activate signaling to induce type I IFN. *EMBO J* 25:4207-4214, 2006.
 - 25) Samanta M, Iwakiri D, Takada K: Epstein-Barr virus-encoded small RNA induces IL-10 through RIG-I-mediated IRF-3 signaling. *Oncogene* 27:4150-4160, 2008.
 - 26) Iwakiri D, Zhou L, Samanta M, Matsumoto M, Ebihara T, Seya T, Imai S, Fujieda M, Kawa K, Takada K: Epstein-Barr virus (EBV)-encoded small RNA is released from EBV-infected cells and activates signaling from Toll-like receptor 3. *J Exp Med* 206:2091-2099, 2009.
 - 27) Ambros V: The functions of animal microRNAs. *Nature* 431:350-355, 2004.
 - 28) Bartel DP: MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116:281-297, 2004.
 - 29) Rana TM: Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:23-36, 2007.
 - 30) Pfeffer S, Zavolan M, Grassler FA, Chien M, Russo JJ, Ju J, John B, Enright AJ, Marks D, Sander C, Tuschl T: Identification of virus-encoded microRNAs. *Science* 304:734-736, 2004.
 - 31) Cosmopoulos K, Pegtel M, Hawkins J, Moffett H, Novina C, Middeldorp J, Thorley-Lawson DA: Comprehensive profiling of Epstein-Barr virus microRNAs in nasopharyngeal carcinoma. *J Virol* 83:2357-2367, 2009.
 - 32) Pratt ZL, Kuzembayeva M, Sengupta S, Sugden B: The microRNAs of Epstein-Barr Virus are expressed at dramatically differing levels among cell lines. *Virology* 386:387-397, 2009.
 - 33) Barth S, Pfuhl T, Mamiani A, Ehses C, Roemer K, Kremmer E, Jaker C, Hock J, Meister G, Grassler FA: Epstein-Barr virus-encoded microRNA miR-BART2 down-regulates the viral DNA polymerase BALF5. *Nucleic Acids Res* 36:666-675, 2008.
 - 34) Lo AK, To KF, Lo KW, Lung RW, Hui JW, Liao G, Hayward SD: Modulation of LMP1 protein expression by EBV-encoded microRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:16164-16169, 2007.
 - 35) Chang MS, Uozaki H, Chong JM, Ushiku T, Sakuma K, Ishikawa S, Hino R, Barua RR, Iwasaki Y, Arai K, Fujii H, Nagai H, Fukayama M: CpG island methylation status in gastric carcinoma with and without infection of Epstein-Barr virus. *Clin Cancer Res* 12:2995-3002, 2006.
 - 36) Kwong J, Lo KW, To KF, Teo PM, Johnson PJ, Huang DP: Promoter hypermethylation of multiple genes in nasopharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res* 8:131-137, 2002.
 - 37) Garcia MJ, Martinez-Delgado B, Cebrian A, Martinez A, Benitez J, Rivas C: Different incidence and pattern of p15INK4b and p16INK4a promoter region hypermethylation in Hodgkin's and CD30-Positive non-Hodgkin's lymphomas. *Am J Pathol* 161:1007-1013, 2002.
 - 38) Chong JM, Sakuma K, Sudo M, Ushiku T, Uozaki H, Shibahara J, Nagai H, Funata N, Taniguchi H, Aburatani H, Fukayama M: Global and non-random CpG-island methylation in gastric carcinoma associated with Epstein-Barr virus. *Cancer Sci* 94:76-80, 2003.
 - 39) Fukayama M: Epstein-Barr virus and gastric carcinoma. *Pathol Int* 60:337-350, 2010.
 - 40) Tsai CL, Li HP, Lu YJ, Hsueh C, Liang Y, Chen CL, Tsao SW, Tse KP, Yu JS, Chang YS: Activation of DNA methyltransferase 1 by EBV LMP1 involves c-Jun NH(2)-terminal kinase signaling. *Cancer Res* 66:11668-11676, 2006.
 - 41) Hino R, Uozaki H, Murakami N, Ushiku T, Shinozaki A, Ishikawa S, Morikawa T, Nakaya T, Sakatani T, Takada K, Fukayama M: Activation of DNA methyltransferase 1 by EBV latent membrane protein 2A leads to promoter hypermethylation of PTEN gene in gastric carcinoma. *Cancer Res* 69:2766-2774, 2009.
 - 42) Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, Lee F, Culpepper J, Knowles DM, Moore PS: Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* 266:1865-1869, 1994.
 - 43) Ganem D: Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Fields Virology*, 5th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2007.
 - 44) Fujii T, Taguchi H, Katano H, Mori S, Nakamura T, Nojiri N, Nakajima K, Tadokoro K, Juji T, Iwamoto A: Seroprevalence of human herpesvirus 8 in human immunodeficiency virus 1-positive and human immunodeficiency virus 1-negative populations in Japan. *J Med Virol* 57:159-162, 1999.
 - 45) Katano H, Iwasaki T, Baba N, Terai M, Mori S, Iwamoto A, Kurata T, Sata T: Identification of antigenic proteins encoded by human herpesvirus 8 and

- seroprevalence in the general population and among patients with and without Kaposi's sarcoma. *J Virol* 74:3478-3485, 2000.
- 46) 安岡彰, 照屋勝治: 日本における AIDS 指標疾患の動向. 平成 21 年度 厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業 「日和見感染症の診断/治療およびそれを端緒とする HIV 感染者の早期発見に関する研究」報告書:16-31, 2010.
 - 47) Antman K, Chang Y: Kaposi's sarcoma. *N Engl J Med* 342:1027-1038, 2000.
 - 48) Engels EA, Atkinson JO, Graubard BI, McQuillan GM, Gamache C, Mbisa G, Cohn S, Whitby D, Goedert JJ: Risk factors for human herpesvirus 8 infection among adults in the United States and evidence for sexual transmission. *J Infect Dis* 196:199-207, 2007.
 - 49) Casper C, Wald A, Pauk J, Tabet SR, Corey L, Celum CL: Correlates of prevalent and incident Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection in men who have sex with men. *J Infect Dis* 185:990-993, 2002.
 - 50) Smith NA, Sabin CA, Gopal R, Bourboulia D, Labbet W, Boshoff C, Bariow D, Band B, Peters BS, de Ruiter A, Brown DW, Weiss RA, Best JM, Whitby D: Serologic evidence of human herpesvirus 8 transmission by homosexual but not heterosexual sex. *J Infect Dis* 180:600-606, 1999.
 - 51) Chandran B: Early events in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection of target cells. *J Virol* 84:2188-2199, 2010.
 - 52) Akula SM, Pramod NP, Wang FZ, Chandran B: Human herpesvirus 8 envelope-associated glycoprotein B interacts with heparan sulfate-like moieties. *Virology* 284:235-249, 2001.
 - 53) Birkmann A, Mahr K, Ensser A, Yaguboglu S, Titgemeyer F, Fleckenstein B, Neipel F: Cell surface heparan sulfate is a receptor for human herpesvirus 8 and interacts with envelope glycoprotein K8.1. *J Virol* 75:11583-11593, 2001.
 - 54) Wang FZ, Akula SM, Pramod NP, Zeng L, Chandran B: Human herpesvirus 8 envelope glycoprotein K8.1A interaction with the target cells involves heparan sulfate. *J Virol* 75:7517-7527, 2001.
 - 55) Akula SM, Pramod NP, Wang FZ, Chandran B: Integrin $\alpha 3\beta 1$ (CD 49c/29) is a cellular receptor for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8) entry into the target cells. *Cell* 108:407-419, 2002.
 - 56) Kaleeba JA, Berger EA: Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus fusion-entry receptor: cystine transporter xCT. *Science* 311:1921-1924, 2006.
 - 57) Rappocciolo G, Jenkins FJ, Hensler HR, Piazza P, Jais M, Borowski L, Watkins SC, Rinaldo CR, Jr.: DC-SIGN is a receptor for human herpesvirus 8 on dendritic cells and macrophages. *J Immunol* 176:1741-1749, 2006.
 - 58) Raghu H, Sharma-Walia N, Veettil MV, Sadagopan S, Caballero A, Sivakumar R, Varga L, Bottero V, Chandran B: Lipid rafts of primary endothelial cells are essential for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8-induced phosphatidylinositol 3-kinase and RhoA-GTPases critical for microtubule dynamics and nuclear delivery of viral DNA but dispensable for binding and entry. *J Virol* 81:7941-7959, 2007.
 - 59) Naranatt PP, Krishnan HH, Smith MS, Chandran B: Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus modulates microtubule dynamics via RhoA-GTP-dependent signaling and utilizes the dynein motors to deliver its DNA to the nucleus. *J Virol* 79:1191-1206, 2005.
 - 60) Sharma-Walia N, Krishnan HH, Naranatt PP, Zeng L, Smith MS, Chandran B: ERK1/2 and MEK1/2 induced by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) early during infection of target cells are essential for expression of viral genes and for establishment of infection. *J Virol* 79:10308-10329, 2005.
 - 61) Bechtel JT, Liang Y, Hvidding J, Ganem D: Host range of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in cultured cells. *J Virol* 77:6474-6481, 2003.
 - 62) Katano H, Sato Y, Kurata T, Mori S, Sata T: Expression and localization of human herpesvirus 8-encoded proteins in primary effusion lymphoma, Kaposi's sarcoma, and multicentric Castleman's disease. *Virology* 269:335-344, 2000.
 - 63) Grundhoff A, Ganem D: Inefficient establishment of KSHV latency suggests an additional role for continued lytic replication in Kaposi sarcoma pathogenesis. *J Clin Invest* 113:124-136, 2004.
 - 64) Dittmer D, Lagunoff M, Renne R, Staskus K, Haase A, Ganem D: A cluster of latently expressed genes in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol* 72:8309-8315, 1998.
 - 65) Cai X, Lu S, Zhang Z, Gonzalez CM, Damania B, Cullen BR: Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus expresses an array of viral microRNAs in latently infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:5570-5575, 2005.
 - 66) McCormick C, Ganem D: The kaposin B protein of KSHV activates the p38/MK2 pathway and stabilizes cytokine mRNAs. *Science* 307:739-741, 2005.
 - 67) Sun R, Lin SF, Gradoville L, Yuan Y, Zhu F, Miller G: A viral gene that activates lytic cycle expression of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:10866-10871, 1998.
 - 68) West JT, Wood C: The role of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus-8 regulator of transcription activation (RTA) in control of gene expression. *Oncogene* 22:5150-5163, 2003.
 - 69) Wang HW, Trotter MW, Lagos D, Bourboulia D, Henderson S, Mäkinen T, Elliman S, Flanagan AM, Alitalo K, Boshoff C: Kaposi sarcoma herpesvirus-induced cellular reprogramming contributes to the lymphatic endothelial gene expression in Kaposi sarcoma. *Nat Genet* 36:687-693, 2004.
 - 70) Jenner RG, Maillard K, Cattini N, Weiss RA, Boshoff C, Wooster R, Kellam P: Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-infected primary effusion lymphoma has a plasma cell gene expression profile. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:10399-10404, 2003.

- 71) Dupin N, Fisher C, Kellam P, Ariad S, Tulliez M, Franck N, van Marck E, Salmon D, Gorin I, Escande JP, Weiss RA, Alitalo K, Boshoff C: Distribution of human herpesvirus-8 latently infected cells in Kaposi's sarcoma, multicentric Castleman's disease, and primary effusion lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:4546-4551, 1999.
- 72) Umbach JL, Cullen BR: In-depth analysis of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus microRNA expression provides insights into the mammalian microRNA-processing machinery. *J Virol* 84:695-703, 2010.
- 73) Ziegelbauer JM, Sullivan CS, Ganem D: Tandem array-based expression screens identify host mRNA targets of virus-encoded microRNAs. *Nat Genet* 41:130-134, 2009.
- 74) Samols MA, Skalsky RL, Maldonado AM, Riva A, Lopez MC, Baker HV, Renne R: Identification of cellular genes targeted by KSHV-encoded microRNAs. *PLoS Pathog* 3:e65, 2007.
- 75) Lei X, Bai Z, Ye F, Xie J, Kim CG, Huang Y, Gao SJ: Regulation of NF-kappaB inhibitor Ikbapalpha and viral replication by a KSHV microRNA. *Nat Cell Biol* 12:193-199, 2010.
- 76) Chang H, Wachtman LM, Pearson CB, Lee JS, Lee HR, Lee SH, Vieira J, Mansfield KG, Jung JU: Non-human primate model of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection. *PLoS Pathog* 5:e1000606, 2009.
- 77) Sakamoto K, Asanuma H, Nakamura T, Kanno T, Sata T, Katano H: Immune response to intranasal and intraperitoneal immunization with Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in mice. *Vaccine* 28:3325-3332, 2010.

Epstein-Barr virus (EBV) and Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV, HHV-8)

Harutaka KATANO

Department of Pathology, National Institute of Infectious Diseases
1-23-1 Toyama, Shinjuku, Tokyo 162-8640, Japan.
katano@nih.go.jp

Epstein-Barr virus (EBV) and Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV or human herpesvirus 8, HHV-8) are members of gamma-herpes virus family. Both viruses infect to B cells and cause malignancies such as lymphoma. Since EBV and HHV-8 are so-called 'oncovirus', their oncogenicities have been focused in the researches on EBV and KSHV for a long time. EBV was discovered in 1964, whereas KSHV was identified in 1994. However, KSHV was analyzed rapidly in these fifteen years. One of the recent progresses in the research on EBV and KSHV is that virus-encoded small RNAs were identified in their genomes and characterized. EBV is the first human virus in whose genome microRNA was identified. The oncogenicity of EBV and KSHV remains unclear. Here, I discuss the pathogenesis by EBV and KSHV with special reference to recent progress in this field.

研究成果の刊行に関する一覧表

平成22年度 国立病院機構九州医療センター 感染症対策室 山本政弘

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Minami R, Yamamoto M, Takahama S, Ando H, Miyamura T, Suematsu E	Comparison of the influence of four classes of HIV antiretrovirals on adipogenic differentiation: the minimal effect of raltegravir and atazanavir	J Infect Chemother			2010
田中沙希恵,藤野達也, 堀田飛香,原田浩邦,中 村辰己,高橋真梨子,高 濱宗一郎,安藤仁,南留 美,山本政弘	TaqManPCR法によるHIV-1 RNA 定量の基礎的検討	国臨協九州	10	1-6	2010

Comparison of the influence of four classes of HIV antiretrovirals on adipogenic differentiation: the minimal effect of raltegravir and atazanavir

Rumi Minami · Masahiro Yamamoto ·
Soichiro Takahama · Hitoshi Ando ·
Tomoya Miyamura · Eiichi Suematsu

Received: 12 March 2010 / Accepted: 12 July 2010

© Japanese Society of Chemotherapy and The Japanese Association for Infectious Diseases 2010

Abstract Antiretroviral therapy for HIV infection is associated with lipodystrophy. However, raltegravir (RAL), a new integrase inhibitor, and atazanavir (ATV), a new generation of protease inhibitor (PI), have not been reported to significantly induce metabolic abnormalities in some clinical studies. The aim of this study was to investigate the influence and molecular mechanisms of RAL and compared it with the other three classes of ARVs (nucleoside reverse-transcriptase inhibitors; NRTI, nonnucleoside reverse-transcriptase inhibitor; NNRTI, and PI) on adipogenesis using 3T3-L1 cells. RAL and ATV had minimal effects on the lipid metabolism of 3T3-L1 cells. NRTI induced a moderate change, and NNRTI and some PIs induced a severe reduction in cell lipid content. These ARVs induced a decrease in the expression of genes associated with lipogenic transcription factors (sterol regulatory-element-binding protein-1c, CAAT box enhancer-binding protein- α , and peroxisome proliferator-activated receptor- γ). The differentiated 3T3-L1 cells were less sensitive to ARV-induced metabolic disturbance than were predifferentiated cells. RAL and ATV did not significantly affect the lipid metabolism in our in vitro study. The other ARVs had a direct influence on adipocytes. Degree and underlying mechanisms of metabolic disturbance differed among different ARVs. These data suggest that the distinct metabolic side-effect profiles of ARVs are a consequences of their differential effects on the adipocyte physiology. A better understanding of the mechanism of ARV-induced metabolic abnormalities

could lead to safer use of ARVs or selection of alternative agents for further clinical development.

Keywords HIV-1 · Antiretrovirals · Adipocyte · Lipodystrophy

Introduction

Highly active antiretroviral therapy (HAART) has helped to control HIV infections and the development of AIDS. However, this antiretroviral therapy (ART) is often associated with severe lipodystrophy, such as peripheral lipodystrophy, central fat accumulation, and hyperlipidemia, but the use of new-generation protease inhibitors (PIs) atazanavir (ATV), and the integrase inhibitor raltegravir (RAL), has been reported to be associated with a decrease in hyperlipidemia [1] and reversal of lipodystrophy [2]. The cellular and molecular mechanisms underlying the metabolic abnormalities induced by ART are unclear, but many studies have shown that the pathogenesis of adipose cell dysfunction includes adverse effects on adipocyte differentiation status [3], survival [4], ability to secrete a variety of adipokines [5], mitochondrial function [6], and recovery from oxidative stress [7] induced by antiretrovirals (ARVs). Different ARVs might induce lipid abnormalities to a different degree though distinct mechanisms, and these properties could underlie the metabolic side-effect profile observed from the use of ARVs.

Adipocyte differentiation involves sequential and coordinated action of several transcription factors that regulate expression of adipocyte-specific genes [8]. Following the initial and transient increase in CAAT box enhancer-binding protein (C/EBP)- β and - δ , peroxisome-proliferator-activated receptor (PPAR)- γ , and C/EBP- α promote expression

R. Minami (✉) · M. Yamamoto · S. Takahama · H. Ando ·
T. Miyamura · E. Suematsu
Internal Medicine, Clinical Research Institute,
National Hospital Organization, Kyushu Medical Center,
1-8-1 Jigyohama, Chuo-ku, Fukuoka 810-8563, Japan
e-mail: rrrh@kyumed.jp

of a number of adipose-specific markers, allowing acquisition of an enlarged, rounded shape and progressive accumulation of cytoplasmic triacylglycerol droplets. C/EBP- α is expressed early during adipogenesis and is involved in the induction of PPAR- γ . Coexpression of C/EBP- α and PPAR- γ has synergistic effects on adipogenic conversion, including lipid metabolism, adipokine secretion, and insulin sensitivity. Adipocyte differentiation is also enhanced by sterol regulatory-element-binding protein (SREBP)-1c. SREBP-1c activates PPAR- γ or related adipogenic transcription factors, thus leading to defective adipogenesis and insulin resistance. Therefore, PPAR- γ , C/EBP- α , and SREBP-1c act in concert to induce and maintain the adipocyte phenotype.

Many studies provide evidence that some PIs influence lipid metabolism by inhibiting degradation of adipogenic transcription factors, such as SREBPs [9, 10], C/EBP- α [11], and PPAR- γ [12, 13]. On the other hand, treatment with nucleoside reverse-transcriptase inhibitors (NRTIs) has been reported to affect mitochondrial functions [2, 14] by depleting mitochondrial DNA (mtDNA) and inhibiting transcription. Integrase inhibitor and the newer generation of PIs have been reported to exhibit antiviral efficacy without adverse effects on lipid metabolism [2, 15]. A re-examination of the molecular pharmacology and toxicology of ART, including these new drugs, may help explain the differences in the metabolic profiles observed among ART in clinical use and lead to the discovery of new drugs that will reduce the incidence of lipodystrophy and related metabolic complications in HIV-infected patients receiving HAART. This study first examined the influence of RAL and then compared it with the four classes of ARVs (NRTI, NNRTI, PI, and integrase inhibitor) with regard to lipid metabolism using well-characterized 3T3-L1 adipocytes [16].

Materials and methods

Cells

This study used the 3T3-L1 cell line, which is one of the most widely used and well-characterized models for studying adipocyte differentiation and function. After stimulation, 3T3-L1 preadipocytes show changes in gene expression and acquire adipocyte characteristics, such as a spherical shape and accumulation of triglyceride-rich lipid droplets, as signs of differentiation. The 3T3-L1 cells were purchased from the Japanese Collection of Research Bioresources (Tokyo, Japan) and maintained in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). Postconfluent cells were induced to differentiate by incubation with 0.5 mM 3-isobutylmethylxanthine and 1 μ M dexamethasone for 2 days. This

was followed by incubation with 10 μ g/ml insulin for 2 days. The cells were then maintained in DMEM with 10% FBS for another 2 days. Antiretroviral drugs were added to the medium before and after the differentiation of 3T3-L1 cells.

Antiretroviral drugs

Zidovudine (AZT) was purchased from Calbiochem-Novabiochem. (California, USA). Abacavir (ABC), stavudine (d4T), didanosine (ddI), lamivudine (3TC), efavirenz (EFV), ritonavir (RTV), and nelfinavir (NFV) were purchased from Toronto Research Chemicals Inc. (Ontario, Canada). Atazanavir (ATV) was provided by Bristol-Myers Squibb Company (New York, USA). Lopinavir (LPV) was provided, by Abbott Laboratories (Illinois, USA). Amprenavir (APV) was provided by Glaxo SmithKline (North Carolina, USA). Raltegravir (RAL) was provided by Merck (New Jersey, USA). Drug stocks in dimethyl sulfoxide (DMSO) were stored at -20°C and diluted into culture media. Vehicle controls received the same final DMSO concentration as all drug-treated incubations (0.1%). The peak serum concentration (C_{max}) of each drug are as follows: AZT 1.07–3.03 μM , ABC 3.4–8.19 μM , d4T 2.14 μM , ddI 6.95 μM , 3TC 7.89–15.6 μM , EFV 14.2–28.8 μM , RTV 0.84–21.9 μM , NFV 5.0–8.6 μM , ATV 4.96–8.38 μM , LPV 8.22–22.2 μM , APV 6.68–16.2 μM , and RAL 10.44–11.15 μM . Cells were treated with 10 μM of ABC, AZT, d4T, ddI, 3TC, and NFV; and with 20 μM of EFV, RTV, ATV, LPV, APV, and RAL.

Quantitative real-time RT-PCR

Total cellular RNA was isolated from 3T3-L1 cells using QIAamp RNA Blood Mini (QIAGEN, Tokyo, Japan), including treatment with DNase. Complementary DNA (cDNA) was generated from the RNA using TAKARA RNA Polymerase Chain Reaction (PCR) kit (TAKARA BIO, Shiga, Japan). Real-time PCR was conducted with LineGene33 (BioFlux, Tokyo, Japan) using SYBR Green Realtime PCR Master Mix (TOYOBO Co, Osaka, Japan). The copy numbers of β -actin were determined in every sample tested as internal control to normalize DNA input. The ratio of the normalized mean value for drug-treated samples was calculated and is indicated in the graphs.

Oil red O staining

The cellular lipid content was assessed by lipid staining with Oil red O. Staining was quantified at 490 nm after solubilization using an Adipogenesis Assay Kit (Chemicon International, California, USA).

Quantitation of 8-OHdG in culture medium

The levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) in the culture medium were determined using a competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (DNA Damage ELISA Kit; Assay Designs Stressgen, Michigan, USA).

Statistical analysis

Results were reproduced in at least three independent experiments and are presented as mean \pm standard error (SE). The Fisher least significant difference (LSD) post hoc test was used for multiple comparisons if analysis of variance (ANOVA) was significant. In all statistical comparisons, a P value of <0.05 was considered to be significant.

Results

Effect of ARVs on lipid content in 3T3-L1 cells

Effects of ARVs on dyslipidemia and lipodystrophy differ among ART regimens, but it is nearly impossible to fully assess the separate effects of each class of drug from the clinical data because patients almost always receive a combination of several classes of ARVs. As a result, in vitro models were used to examine the exact influence of the individual drugs on adipocyte development or metabolism using well-characterized preadipocyte 3T3-L1 cells. Lipid accumulation in predifferentiated 3T3-L1 cells was dramatically decreased by NFV and mildly decreased by ABC, AZT, d4T, EFV, LPV, and APV (Fig. 1).

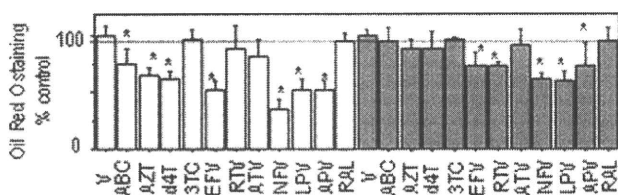


Fig. 1 Effect of antiretrovirals (ARVs) on triglyceride accumulation during 3T3-L1 adipose conversion. From confluence (day 0), 3T3-L1 cells were treated with differentiation medium in the absence (control) or presence of vehicle or various ARVs. To compare the effects of ARVs on preadipocytes with mature adipocytes, ARVs were added to the medium on day 0, when 3T3-L1 cells were still preadipocytes (white bar), or on day 6, when 3T3-L1 cells differentiate into mature adipocytes (gray bar). On day 7, the cells were stained with Oil red O. Staining was quantified at 490 nm after solubilization and expressed as percent \pm standard error (SE) of the control. P values were evaluated by the Fisher least significant difference (LSD) post hoc test. *V* vehicle, *ABC* abacavir, *AZT* zidovudine, *d4T* stavudine, *3TC* lamivudine, *EFV* efavirenz, *RTV* ritonavir, *ATV* atazanavir, *NFV* nelfinavir, *LPV* lopinavir, *APV* amprenavir, *RAL* raltegravir. * $P < 0.01$

It is possible that the effect of ARVs on adipocyte metabolism is different between preadipocytes and differentiated mature adipocytes because the differentiation of adipocytes involves the sequential and coordinated action of several transcription factors that regulate the expression of adipocyte-specific genes and proteins. Therefore, differentiated 3T3-L1 cells were also treated with ARVs and assessed for effects on lipid accumulation. The differentiated 3T3-L1 cells were less sensitive to the effects of ARVs on lipid accumulation level than on immature 3T3-L1 cells. Lipid accumulation in mature 3T3-L1 cells was reduced by EFV, RTV, NFV, LPV, and APV (Fig. 1). On the other hand, RAL had little effect on lipid accumulation in both the immature and mature 3T3-L1 cells.

Effect of ARVs on lipogenic gene expression in 3T3-L1 cells

As shown in Fig. 1, several ARVs reduced lipid accumulation to different degrees. This suggests that various mechanisms are involved in the regulation of lipid accumulation and that different drugs might induce lipid abnormalities through distinct mechanisms. The key lipogenic transcription factors, including SREBP-1c (Fig. 2a), C/EBP- α (Fig. 2b), C/EBP- β (Fig. 2c), and PPAR- γ (Fig. 2d) were investigated to determine the primary cellular mechanisms that underlie these ARV-mediated lipid abnormalities. Treatment with several of the ARVs resulted in marked decreases in the expression of messenger RNAs (mRNAs) for C/EBP- α and SREBP-1c in predifferentiated 3T3-L1 cells (ABC, AZT, d4T, EFV, NFV, LPV, and APV for C/EBP- α ; ABC, AZT, d4T, 3TC, EFV, NFV, LPV, and APV for SREBP-1c), and differentiated 3T3-L1 cells (AZT, d4T, EFV, RTV, NFV, LPV, and APV for C/EBP- α ; ABC, d4T, 3TC, EFV, NFV, LPV, and APV for SREBP-1c) (Fig. 2). Expression of C/EBP- α and SREBP-1c was not affected by RTV, ATV, or RAL in predifferentiated 3T3-L1 cells. Predifferentiated 3T3-L1 cells were more sensitive to these ARVs than differentiated 3T3-L1 cells, but only RTV had a little stronger effect in the differentiated 3T3-L1 cells than in the predifferentiated cells on C/EBP- α expression. Effects of ARVs on C/EBP- α were similar to those on SREBP-1c. PPAR- γ was also down-regulated by EFV and some PIs (NFV, LPV, APV) but not by NRTIs (ABC, AZT, d4T, 3TC). ATV- and RAL-treated cells remained relatively quiescent. C/EBP- β , which is expressed early during adipogenesis, was not affected by any of the ARVs.

Effect of ARVs on oxidative stress in 3T3-L1 cells

Increased oxidative stress is associated with obesity-related disorders [17], and some ARVs increase oxidative stress in adipocytes in vitro [18] and in vivo [19]. Our study

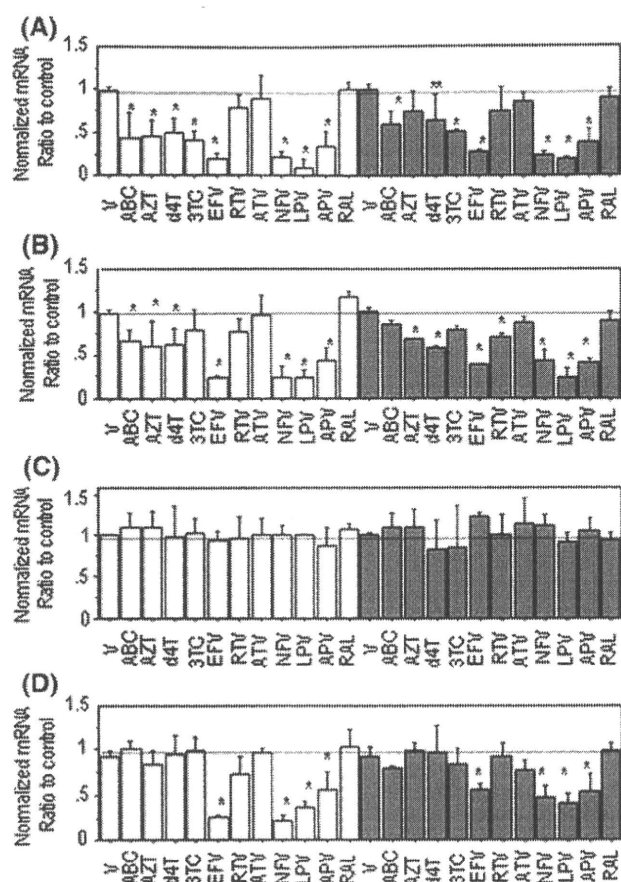


Fig. 2 Effect of antiretrovirals (ARVs) on lipogenic gene expression in 3T3-L1 cells. From confluence (day 0), 3T3-L1 cells were treated with differentiation medium in the absence (control) or presence of vehicle or various ARVs. To compare the effects of ARVs on preadipocytes with mature adipocytes, ARVs were added to the medium on day 0, when 3T3-L1 cells are still preadipocytes (white bar), or on day 6, when 3T3-L1 cells differentiate into mature adipocytes (gray bar). On day 7, total RNA was prepared, and messenger RNA (mRNA) levels were determined by real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). The results shown are after correction for the levels of β -actin mRNA and were normalized to the controls. *P* values were evaluated by Fisher's least significant difference (LSD) post hoc test. **a** sterol regulatory-element-binding protein, **b** CAAT box enhancer-binding protein- α , **c** C/EBP- β , **d** peroxisome-proliferator-activated receptor- γ . V vehicle, ABC abacavir, AZT zidovudine, d4T stavudine, 3TC lamivudine, EFV efavirenz, RTV ritonavir, ATV atazanavir, NFV nelfinavir, LPV lopinavir, APV amprenavir, RAL raltegravir. **P* < 0.01, ***P* < 0.05

investigated the influence of the four classes of ARVs on the production of oxidative stress by measuring 8-OHdG in the culture medium. This compound is a modified nucleoside base, which is associated with reactive oxygen species (ROS) and used as a biomarker of oxidative stress. The level of 8-OHdG was increased in the culture medium of predifferentiated 3T3-L1 cells by d4T, RTV, NFV, LPV, and APV and was increased in differentiated 3T3-L1 cells by RTV and NFV (Fig. 3a). Expression of antioxidant

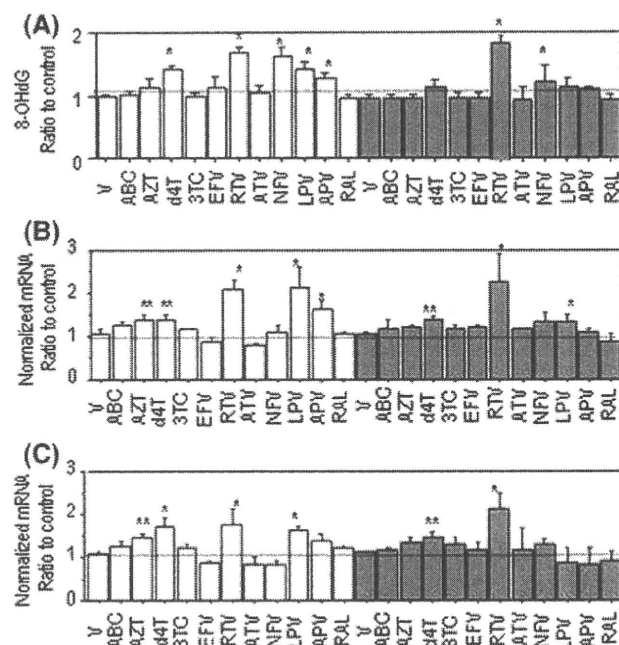


Fig. 3 Effect of antiretrovirals (ARVs) on oxidative stress in 3T3-L1 cells. From confluence (day 0), 3T3-L1 cells were treated with differentiation medium in the absence (control) or presence of vehicle or various ARVs. To compare the effects of ARVs on preadipocytes with mature adipocytes, ARVs were added to the medium on day 0, when 3T3-L1 cells are still preadipocytes (white bar), or on day 6, when 3T3-L1 cells differentiate to mature adipocytes (gray bar). **a** For the assay of 8-OHdG, each supernatant was collected at day 7. Then, concentrations of 8-OHdG were determined using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Results shown were normalized to the controls and represent the mean \pm standard error (SE). On day 7, total RNA was prepared, and messenger RNA (mRNA) levels were determined by real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). Effects of the drugs on **b** superoxide dismutase (SOD) and **c** catalase (CAT) were also examined. The results shown were obtained after correction for the levels of β -actin mRNA and were also normalized to the controls. Data are presented as the mean \pm standard error (SE). *P* values were evaluated by the post hoc test. V vehicle, ABC abacavir, AZT zidovudine, d4T stavudine, 3TC lamivudine, EFV efavirenz, RTV ritonavir, ATV atazanavir, NFV nelfinavir, LPV lopinavir, APV amprenavir, RAL raltegravir. **P* < 0.01

enzymes, including superoxide dismutase (SOD, Fig. 3b) and catalase (CAT, Fig. 3c) was also investigated. Generally, oxidative stress, such as that induced by the free-radical superoxide, stimulates the expression of SOD and CAT. Expression of SOD mRNA was increased by the addition of AZT, d4T, RTV, LPV, and APV in predifferentiated 3T3-L1 cells; and d4T, RTV, and LPV in differentiated 3T3-L1 cells. Expression of CAT mRNA was increased by the addition of AZT, d4T, RTV, and LPV in predifferentiated 3T3-L1 cells and of d4T and RTV in differentiated 3T3-L1 cells. Neither SOD mRNA nor CAT mRNA was increased by the addition of ABC, 3TC, EFV, ATV, NFV, or RAL in predifferentiated and differentiated cells. These results and previous studies indicate that the

influence of ARVs on oxidative stress or the antioxidant system differs based upon the class and particular structure of the ARV.

Discussion

ART has been involved in the emergence of a metabolic disorder with potentially severe consequences, but the use of new-generation PIs ATV and the integrase inhibitor RAL has been reported to be associated with a decrease in hyperlipidemia [1] and a reversal of lipodystrophy [2]. Most previous studies examined one or a few classes of ARVs, and each study used different cell systems. Therefore, it is difficult to compare the effects of each drug. Our study investigated the effect of four classes of ARVs (NRTIs, NNRTI, PIs, and integrase inhibitor) using pre- and post-differentiated 3T3-L1 cells. We were especially interested in determining the effects of RAL and ATV compared with other ARVs in order to obtain a better understanding of the molecular basis for the more favorable metabolic side-effect profile associated with RAL and ATV. This is the first study to investigate the effects of RAL on the cellular and molecular regulation of adipocytes.

Expression of C/EBP- α , PPAR- γ , and SREBP-1c were strongly inhibited by some PIs, mildly inhibited by NNRTI and NRTIs, and minimally affected by ATV, RAL, and RTV. These results and the fact that RTV decreased lipid accumulation and increased oxidative stress in mature 3T3-L1 cells more than in predifferentiated cells suggest that the effect of RTV occurs relatively late in adipocyte differentiation. C/EBP- β , which is expressed during early adipogenesis, was not affected by ARVs, suggesting that molecular targets affected by the antiadipogenic properties of ARVs are probably located downstream of this adipogenic transcription factor. This is consistent with previous reports that some ARVs block adipocyte differentiation by inhibiting the expression of C/EBP- α and PPAR- γ [3, 12, 13] or by impairing SREBP-1 intranuclear localization [9, 20]. These findings indicate that altered functions of PPAR γ , C/EBP- α , and SREBP-1c play a role in ARV-related dystrophy.

Increased oxidative stress is also considered to contribute to metabolic abnormalities caused by ARVs. Several reports indicate that ROS production in response to ARVs probably results from increased mitochondrial oxidative stress [7, 14]. The marker of oxidative stress, 8-OHdG, was increased by d4T, RTV, NFV, LPV, and APV, and the antioxidant pathway was impaired by NFV. These results indicate that increased oxidative stress by ARVs is due to activation of ROS production and an impaired antioxidant system. Oxidative stress also contributed to ARV-induced lipogenic abnormalities.

Mature 3T3-L1 cells were less sensitive to the lipid-reducing effect of ARVs than were predifferentiated 3T3-L1 cells, and similar results were obtained with regard to the inhibitory effect of ARVs on the expression of lipogenic transcription factors and some oxidative stress markers. One explanation for the differences between preadipocytes and mature adipocytes is that the more differentiated adipocytes have pathways that could enable cells to escape from ARV-induced blockade of the lipogenic pathway, or they may have a system that inactivates and/or decreases the intracellular level of ARVs.

It is notable that the intracellular events reflect lipodystrophy in the form of depleted adipocyte triglyceride stores, and the extent that each ARV influences the adipocytes was in proportion to that observed in clinical manifestations, although functional links between the molecular mechanism and the observed metabolic alterations are still not fully understood. It is certain that metabolic disorder is affected by numerous other modifiers, including genetic predisposition, diet and lifestyle, and HIV-1 infection. However, some features can be avoided by careful selection of ARVs and thus can be effectively treated.

In conclusion, different ARVs acted through distinct mechanisms to induce disruption of adipocyte differentiation and function to different degrees through distinct mechanisms. Whereas most of ARVs affected lipid accumulation, RAL and ATV had no influence on lipid metabolism in our in vitro study. A greater understanding of the mechanisms underlying the development of this metabolic effect could lead to safer ARVs while indicating the best treatment for these metabolic side effects of ARVs.

Acknowledgments We are grateful to Ms. Mariko Takahashi for her valuable technical support. This study was partly supported by Health Science Research Grants on HIV/AIDS from the Ministry of Health, Labor and Welfare of the Japanese Government. The sponsor had no role in study design, data collection, data analysis, data interpretation, or writing of the report.

References

1. Stanley TL, Joy T, Hadigan CM, Liebau JG, Makimura H, Chen CY, et al. Effects of switching from lopinavir/ritonavir to atazanavir/ritonavir on muscle glucose uptake and visceral fat in HIV-infected patients. *AIDS*. 2009;23:1349–57.
2. Haerter G, Manfras BJ, Mueller M, Kern P, Trein A. Regression of lipodystrophy in HIV-infected patients under therapy with the new protease inhibitor atazanavir. *AIDS*. 2004;18:952–5.
3. Stankov MV, Schmidt RE, Behrens GM. German Competence Network HIV/AIDS. Zidovudine impairs adipogenic differentiation through inhibition of clonal expansion. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52:2882–9.
4. Kim RJ, Wilson CG, Wabitsch M, Lazar MA, Stepan CM. HIV protease inhibitor-specific alterations in human adipocyte differentiation and metabolism. *Obesity (Silver Spring)*. 2006;14:994–1002.

5. Cianflone K, Zakarian R, Stanculescu C, Germinario R. Protease inhibitor effects on triglyceride synthesis and adipokine secretion in human omental and subcutaneous adipose tissue. *Antivir Ther.* 2006;11:681–91.
6. Flint OP, Noor MA, Hruz PW, Hylemon PB, Yarasheski K, Kotler DP, et al. The role of protease inhibitors in the pathogenesis of HIV-associated lipodystrophy: cellular mechanisms and clinical implications. *Toxicol Pathol.* 2009;37:65–77.
7. Lagathu C, Eustace B, Prot M, Frantz D, Gu Y, Bastard JP, et al. Some HIV antiretrovirals increase oxidative stress and alter chemokine, cytokine or adiponectin production in human adipocytes and macrophages. *Antivir Ther.* 2007;12:489–500.
8. Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev.* 2000;14:1293–307.
9. Bastard JP, Caron M, Vidal H, Jan V, Auclair M, Vigouroux C, et al. Association between altered expression of adipogenic factor SREBP1 in lipoatrophic adipose tissue from HIV-1-infected patients and abnormal adipocyte differentiation and insulin resistance. *Lancet.* 2002;359:1026–31.
10. Hirano Y, Yoshida M, Shimizu M, Sato R. Direct demonstration of rapid degradation of nuclear sterol regulatory element-binding proteins by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem.* 2001;276:36431–7.
11. Dowell P, Flexner C, Kwiterovich PO, Lane MD. Suppression of preadipocyte differentiation and promotion of adipocyte death by HIV protease inhibitors. *J Biol Chem.* 2000;275:41325–32.
12. Parker RA, Flint OP, Mulvey R, Elosua C, Wang F, Fenderson W, et al. Endoplasmic reticulum stress links dyslipidemia to inhibition of proteasome activity and glucose transport by HIV protease inhibitors. *Mol Pharmacol.* 2005;67:1909–19.
13. Caron M, Vigouroux C, Bastard JP, Capeau J. Antiretroviral-related adipocyte dysfunction and lipodystrophy in HIV-infected patients: alteration of the PPARgamma-dependent pathways. *PPAR Res.* 2009;2009:507141.
14. Stankov MV, Lücke T, Das AM, Schmidt RE, Behrens GM. Relationship of mitochondrial DNA depletion and respiratory chain activity in preadipocytes treated with nucleoside reverse transcriptase inhibitors; German Competence Network HIV/AIDS. *Antivir Ther.* 2007;12:205–16.
15. Eron JJ, Young B, Cooper DA, Youle M, Dejesus E, Andrade-Villanueva J, et al. Switch to a raltegravir-based regimen versus continuation of a lopinavir–ritonavir-based regimen in stable HIV-infected patients with suppressed viraemia (SWITCHMRK 1 and 2): two multicentre, double-blind, randomised controlled trials. *Lancet.* 2010;375:396–407.
16. Green H, Kehinde O. An established preadipose cell line and its differentiation in culture. *Cell.* 1975;5:19–27.
17. Kamigaki M, Sakaue S, Tsujino I, Ohira H, Ikeda D, Itoh N, et al. Oxidative stress provokes atherogenic changes in adipokine gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;339:624–32.
18. Ben-Romano R, Rudich A, Etzion S, Potashnik R, Kagan E, Greenbaum U, et al. Nelfinavir induces adipocyte insulin resistance through the induction of oxidative stress: differential protective effect of antioxidant agents. *Antivir Ther.* 2006;11:1051–60.
19. Masiá M, Padilla S, Bernal E, Almenar MV, Molina J, Hernández I, et al. Influence of antiretroviral therapy on oxidative stress and cardiovascular risk: a prospective cross-sectional study in HIV-infected patients. *Clin Ther.* 2007;29:1448–55.
20. El Hadri K, Glorian M, Monsempes C, Dieudonné MN, Pecquery R, Giudicelli Y, et al. In vitro suppression of the lipogenic pathway by the nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor efavirenz in 3T3 and human preadipocytes or adipocytes. *J Biol Chem.* 2004;279:15130–41.

TaqManPCR 法による HIV-1 RNA 定量の基礎的検討

独立行政法人国立病院機構 九州医療センター臨床検査科 臨床研究センター¹⁾独立行政法人国立病院機構 九州医療センター感染症対策室 臨床研究センター²⁾田中 沙希恵¹⁾ 藤野 達也¹⁾ 堀田 飛香¹⁾ 原田 浩邦¹⁾
中村 辰己¹⁾ 高橋 真梨子²⁾ 高濱 宗一郎²⁾ 安藤 仁²⁾
南 留美²⁾ 山本 政弘²⁾

はじめに

血中 HIV-1 RNA 測定は HIV 感染者および AIDS 患者の治療と病態把握のために重要な検査である。血中 HIV-1 RNA 量は初感染後に一時的に増加するが、その後、二相性に減少して一定のレベル (set point) に落ち着き、余年にわたり継続する¹⁾。この set point が HIV 感染症の予後にかかわる要因であり、HIV-1 RNA 測定が予後判定に有用であると報告されている²⁾。これまで、日本においてはアンプリコア HIV-1 モニター-v1.5 (ロシュ・ダイアグノスティックス(株): 従来法) が広く臨床で用いられていた。しかし、この方法では、HIV-1 RNA 測定で最も煩雑で熟練を要する核酸抽出工程において自動化されていないのが現状であった。そのため、従来法による核酸抽出では、ウイルスの濃度により標準法と高感度法の二つの方法を使い分ける必要があり、さらに、高感度法においては低濃度検体中のウイルスを遠心し、濃縮する操作が必要で長時間を要していた。測定限界は標準法で 400copies/ml、高感度法では 50copies/ml であり、ウイルス量の推移を観察する場合、測定下限を下回ると HIV ウイルスの存在自体確認することが出来なかった。また、高濃度領域では測定値のぶれも指摘されていた³⁾。そのため以前より核酸抽出の自動化と、検出感度が高く、測定範囲の広い HIV-RNA 定量検査法の開発が望まれていた。近年、新たな検査法としてリアルタイム PCR 法の原理を用い、核酸の抽出から増幅・検出までの全ての検査工程を全自動で行うコバス TaqMan HIV-1 「オート」(ロシュ・ダイアグノスティックス(株): TaqMan 法)が開発された。今回我々は、TaqMan 法と従来法との比較検討を行った。

A. 対象と方法

1. 対象

2006年8月から2009年4月までに当院を受診し、HIV-1 RNA 定量の依頼のあった検体のうち、TaqMan 法での測定に必要な1mlの血清を有す計212検体の血清を対象とした。血清は採血後、速やかに遠心分離し、 -80°C で凍結保存された血清を用いた。

2. 方法

1) 従来法

試薬はコバスアンプリコア HIV-1 モニターv1.5 キット (Roche)を用い、添付文書に従って RNA 抽出を行った後、PCR 測定装置「コバス アンプリコア」(Roche)にて測定を行った。測定範囲は $50 \sim 1.0 \times 10^5$ copies/ml (高感度法)とした。

2) TaqMan 法

試薬はコバス TaqMan HIV-1 「オート」キットを用い、検体前処理装置「コバス AmpliPrep」によって RNA 抽出した後、遺伝子解析装置「コバス TaqMan48」にセットする TaqMan 「オート」システム Bにて測定を行った。その概要は、血清 $1000 \mu\text{l}$ とプロテアーゼを含む TaqMan HIV-1 QS を混合させ、イソプロパノールを含む磁性粒子懸濁液およびカオトロピック塩を含む TaqMan 溶解液を添加してインキュベートし、ウイルスを溶解して、磁性粒子に目的の RNA を吸着させて磁石により固定させ、溶解したウイルスの蛋白など不要成分を洗浄 (B/F 分離) し、これに TaqMan 溶出試薬を加えて核酸抽出液とした。次に、この核酸抽出液 $50 \mu\text{l}$ に TaqMan HIV-1 マスターミックスと TaqMan HIV-1 マンガンの混合液 $50 \mu\text{l}$ を加えた試料は核酸増幅・検出工程に進む。増幅および検出はリアルタイム PCR の原理を用いたコバス TaqMan48 にて行い、まず、 Mn^{2+} の存在下、逆転写活性と DNA ポリメラーゼ活性を合わせ持つ耐熱性 Z05 DNA ポリメラーゼにより逆転写反応を行って相補的 DNA (cDNA) を合成する。熱変性で1本鎖にし、2組の蛍光色素 (蛍光物質と消光物質) で標識した HIV-1 用及び HIV-1 QS 用 DNA プローブを cDNA の標的配列にハイブリダイズする。温度を下げることで標的配列に相補的な DNA 鎖が伸長され、DNA プローブが遊離・切断し蛍光を発する。このサイクルを連続的に繰り返し、PCR 産物をリアルタイムモニターしながら、蛍光物質と消光物質を異なる波長で測定し、HIV-1 RNA と HIV-1 QS RNA の増幅曲線を作成する。発光強度が一定以上となるサイクル数を求め、HIV-1 用と HIV-1 QS 用の値を比較して HIV-1 RNA 濃度を算出した。なお、操作および判定方法は添付書に従い、測定範囲は $40 \sim 1.0 \times 10^7$ copies/ml で、定量値が得られなくてもウイルスを検知できれば < 40 copies/ml と報告し、ウイルスが検知できなければ Target not detected と報告した。

3. 統計学的処理

TaqMan 法と従来法の比較は、回帰分析によって行った。

B. 結果

1. 再現性

1) 同時再現性

HIV-1 RNA 高濃度, 低濃度検体を各々9重測定し, 同時再現性を検討した. (表 1-a) 測定値は低濃度検体 212~424 copies/ml (平均 288 copies/ml), 高濃度検体 104,000~163,000 copies/ml (平均 129,555 copies/ml) であった. 対数変換値での変動係数(CV 値)は低濃度検体では CV 値 3.88% (実数値では 22.80%), 高濃度検体では CV 値 1.15% (実数値では 13.57%) と良好な結果であった.

2) 日差再現性

HIV-1 RNA 高濃度, 低濃度検体を各々8日間測定し, 日差再現性を検討した. (表 1-b) 測定値は低濃度検体 184~382 copies/ml (平均値 277 copies/ml), 高濃度検体 148,000~202,000 copies/ml (平均 163,625 copies/ml) であった. 対数変換値での CV 値は低濃度検体では CV 値 4.06% (実数値では 21.76%), 高濃度検体では CV 値 0.73% (実数値では 9.44%) と良好な結果であった.

表 1-a 同時再現性

Time	Low (実数値)	Log LOW (対数変換値)	High (実数値)	Log High (対数変換値)
1	241	2.38	145000	5.16
2	338	2.53	118000	5.07
3	281	2.45	125000	5.10
4	255	2.41	163000	5.21
5	284	2.45	127000	5.10
6	212	2.33	139000	5.14
7	216	2.33	137000	5.14
8	424	2.63	104000	5.02
9	349	2.54	108000	5.03
平均値	288.89	2.45	129555.6	5.11
標準偏差	65.86	0.10	17575.94	0.06
変動係数	22.80	3.88	13.57	1.15

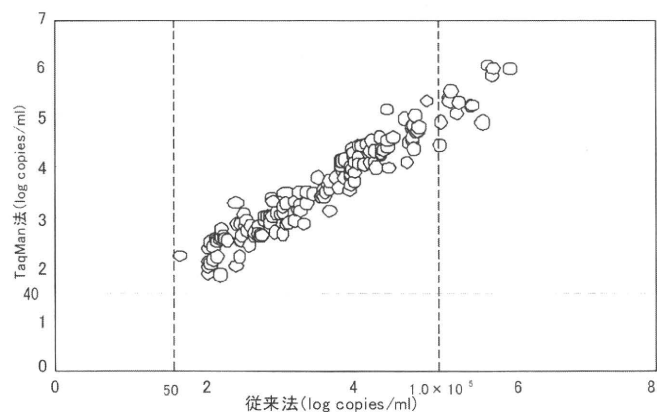
表 1-b 日差再現性

Time	Low (実数値)	Log LOW (対数変換値)	High (実数値)	Log High (対数変換値)
1	203	2.31	156000	5.19
2	244	2.39	202000	5.31
3	298	2.47	163000	5.21
4	382	2.58	155000	5.19
5	314	2.50	156000	5.19
6	310	2.49	164000	5.21
7	184	2.26	148000	5.17
8	288	2.46	165000	5.22
平均値	277.88	2.43	163625.0	5.21
標準偏差	60.47	0.10	15451.03	0.04
変動係数	21.76	4.06	9.44	0.73

2. 相関関係

患者血清 212 検体のうち, 両測定法で検出可能となった 153 例の相関性について検討した結果, 対数変換値 (log) での相関係数は, $r = 0.9669$, 回帰式は $y = 0.9602x + 0.1644$, $p < 0.0001$ と良好な相関性を認めた (図 1).

図 1 TaqMan 法と従来法の相関関係



3. TaqMan 法と従来法の検出率の比較

従来法と TaqMan 法において、対象血清全 212 検体を用いて検出率について検討した結果を示す(表 2)。従来法では対象中 153 例(72.2%)から HIV-1 RNA を検出したのに対し、TaqMan 法では 177 例(83.5%)、 >40 copies/ml が 165 例と <40 copies/ml が 12 例)が検知可能であり、両測定法の一致率は 88.7%であった。不一致となった

24 例(>40 copies/ml が 12 例と <40 copies/ml が 12 例)は全て従来法において検出下限(50 copies/ml)未満で、TaqMan 法により検知可能となった検体であった。

従来法で検出下限未満(50 copies/ml 未満)となった検体について TaqMan 法での測定結果を示す(表 3)。従来法で検出下限未満となった検体 59 例中、TaqMan 法にて検知したが 40copies/ml 未満となった検体が 12 例(20.3%)、

定量値が得られた検体が 12 例(20.3%)、両測定法で検出下限未満(target not detected)となった検体が 35 例(59.4%)であった。さらに、従来法と TaqMan 法の乖離例の分布を検討した結果(図 2)、従来法で検出下限未満(50 copies/ml 未満)となった検体 59 例中 TaqMan 法にて新たに検知できた 24 例(40.6%)であった。一方、測定上限以上(1.0×10^5 copies/ml 以上)となった検体 14 例中全例(100%)において、TaqMan 法にて定量値が得られた。

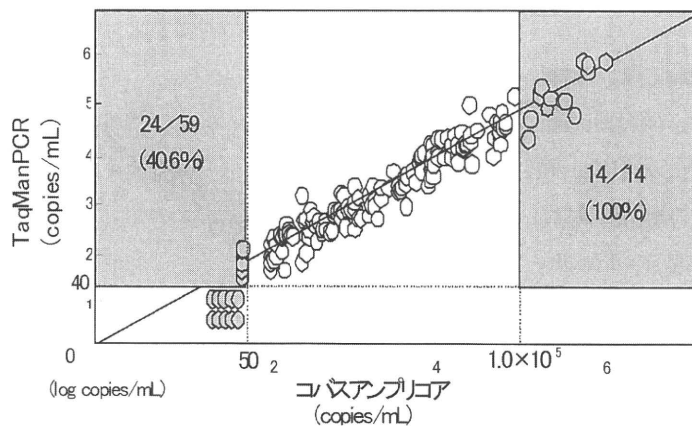
表 2 TaqMan 法と従来法の検出率の比較 (n = 212)

		従来法(コバス・アンプロア)	
		(+) >40 copies/ml	(-) <50 copies/ml
TaqMan法	>40 copies/ml	153	12
	<40 copies/ml (+)	0	12
	Target not detected (-)	0	35
total		1	59

表 3 従来法で <50 copies/ml となった検体について TaqMan 法での結果 (n=59)

	TaqMan「オート」法	ウイルス検知 24例
<4.0 × 10copies/ml となった検体	12	
定量値が得られた検体	12	
Target not detectedとなった検体	35	

図 2 従来法と TaqMan 法の乖離例の分布



C. 考察

HIV 感染症は早期診断と適切な治療が感染者の予後に密接に関係している。HIV 感染症における病態の程度や経過を把握するには CD4 陽性リンパ球数と並んで HIV RNA 量も重要な指標であり、血中 HIV RNA 量が少なければ体内全体の HIV RNA 量も少ないと考えられている⁴⁾。定期的に HIV RNA 量を測定することで治療効果の評価ができ、治療継続・変更の決定を行なうことが可能である。今回われわれは、コバス TaqMan HIV-1 「オート」と従来法との比較検討を行った。

これまで従来法では、核酸抽出に複雑な手法が用いられており、長い時間と手間がかかるという点から煩雑さや測定者間の差が指摘されていた^{5) 6)}。また、測定範囲や測定感度に問題があることなども挙げられていた。しかし、TaqMan 法に変わることによって核酸抽出は自動化され、また、増幅および検出を同時に行うために、検査時間の大幅な短縮と検査精度の向上が期待できる。測定範囲は $40 \sim 1.0 \times 10^7$ copies/ml と従来法の測定範囲 ($50 \sim 1.0 \times 10^5$ copies/ml) 以上の広さを持ち、範囲以下であっても、ウイルスを検知したかどうかで <40copies/ml もしくは Target not detected と表示方法を分けて報告することが可能となっている。

TaqMan 法の再現性の検討結果においては、同時再現性は対数変換値で高濃度検体の CV 値 1.15% (実数値では 13.57%)、低濃度検体の CV 値 3.88% (実数値では 22.80%) で、日差再現性は対数変換値で高濃度検体の CV 値 0.73% (実数値では 9.44%)、低濃度検体の CV 値 4.06% (実数値では 21.76%) と良好な結果であった。我々が使用してきた従来法の再現性は、対数変換値で高濃度検体の CV 値 3.68%、低濃度検体の CV 値 5.76% であったことから、TaqMan 法は従来法に比し、良好な結果が得られていると考えられた。また、両測定法の一致率は 88.7% だが、乖離例はすべて従来法において <50copies/ml となり、TaqMan 法にてウイルスを検知できた検体であり、また、従来法での測定範囲を超えた高濃度検体が TaqMan 法にて測定可能であったことから、従来法に比べて TaqMan 法は高感度であることが明らかとなった。

TaqMan 法と従来法の相関性を検討した結果、良好な相関関係が認められた。しかし、従来法にて低値 (40copies/ml 未満) を示した検体について、TaqMan 法での値と比較すると低い相関性となった。これは、どちらの方法でも低濃度領域での CV 値が高濃度領域に比べると高くなることから、値のぶれがおきていると考えられた。実際、従来法にて <50copies/ml を示した検体が、TaqMan 法では 50copies/ml 以上を示すといった例がしばしばみられた。これは臨床サイドにおいても報告されており、従来法に比べて TaqMan 法ではおおよそ 2 倍高く測定されることが確認されている⁷⁾。この原因としては一次標準品の違いが挙げられており、従来法では VQA スタandard を一次標準品として用いていたが、TaqMan 法では WHO Standard を一次標準品として採用している。この WHO Standard を用いた場合、従来法のデータに合わせて補正する行為は出来ないのが現状であり、今回のような乖離現象を防ぐことは困難と考えられる。ただし、これまで TaqMan 法を用いた低濃度域測定症例において、ウイルス学的失敗の報告や薬剤耐性ウイルス発現の報告、HIV 感染症の進行や AIDS

の発症例の報告は現時点ではないと報告されている⁷⁾。また、今回用いた試料は血清であったが、血漿を用いた測定の場合、分離剤入り EDTA-2K 採血管で採血した検体を遠心分離後保存し、使用時に転倒混和してそのまま測定すると、測定値が高値になることが確認されている。この場合は転倒混和後に再度遠心操作を行うことにより、防ぐことが可能と報告されている⁸⁾。

HIV RNA 量を定期的に測定することは、HIV 感染症において治療効果の評価ができ、治療継続・変更の決定を行なうことが出来る重要な手段である。また、HIV 抗体陽性となる前の急性期感染の状態での診断も迅速に行うことが可能となったため、早期診断と適切な時期の治療開始が出来るようになった。そのため今後、HIV-RNA 検査の依頼件数はさらに増加するものと考えられる。

今回、新たに開発されたコバス TaqMan HIV-1 「オート」は従来法に比べ、検体量が 1000 μ l と、これまでの約 2 倍量必要となるが、検出感度は従来法より高感度となることが明らかになった。また、RNA 抽出操作が自動化されることで、抽出効率や洗浄効率が一定水準を維持でき、検査精度の向上が期待できる。TaqMan 法の測定値は従来法とよく相関し、さらに高感度で広範囲な測定範囲を有していることから、日常ルーチン検査において有用な検査法として十分使用可能と考えられた。本論文内容は第 19 回福岡県医学検査学会、第 44 回九州医学検査学会にて発表した。

文献

- 1) Mellors JW, Kingsley LA, Rindo CRJ, et al: Quantitation of HIV-1 RNA in plasma predicts outcome after seroconversion. *Ann Intern Med* 122:573-579, 1995
- 2) 西田恭治, 山本泰之, 福武勝幸: HIV 感染症血友病患者の 10 年間の経緯-HIV RNA 定量による予後判定. *臨床とウイルス* 25: 56-60, 1997
- 3) 田原和子, 山口松夫, 中野卓, 鍵田正智, 吉岡範, 浅利誠志: C 型肝炎ウイルス (HIV)-RNA 量測定におけるコバス TaqMan HCV 「オート」の臨床的評価. *日本臨床検査自動化学会会誌* 第 32 巻 第 3 号
- 4) 西田恭治: 遺伝子診断の実際 感染症 HIV. *臨床検査* vol. 51 no. 12 2007 年増刊号 p1473-1476
- 5) 照屋勝治, 岡慎一, 福武勝幸, 天野景裕, 古谷茂之, 林邦彦, 真崎夕美子, 木村哲: リアルタイム PCR 法による HIV-1 RNA 定量キットコバス TaqMan HIV-1 「オート」の検討. *感染症学雑誌* 第 82 巻 第 1 号
- 6) 吉原なみ子: HIV-1RNA の定量に関する研究—アンプリコア HIV-1 モニター v1.5 のコントロールサーベイ—, HIV の検査法と検査体制を確立するための研究. 平成 12~14 年度厚生労働科学研究費補助金 エイズ対策研究事業
- 7) 新しい核酸増幅検査 TaqMan HIV-1 ~臨床上の課題とその解決に向けて~
第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会要旨集 2008 年
- 8) HIV-1 RNA 検査に関するお知らせ vol. 2 ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社 2008 年 7 月

研究成果の刊行に関する一覧表

平成22年度 奈良県立医科大学附属病院 感染症センター 古西 満, 宇野健司

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
古西満,宇野健司, 善本英一郎	免疫再構築症候群への対応	日本臨牀	68	508-511	2010
古西満,宇野健司	HIV感染者における骨代謝異常	HIV感染症とAIDSの治療	1	24-29	2010
治田匡平,古西満,乾比砂野,生駒貴代子,森田幸子,北啓二,宇野雅之	HIV感染者の薬疹に関する臨床的検討	日本病院薬剤師会雑誌	46	215-218	2010
Hoshino S, Konishi M, Mori M, Shimura M, Nishitani C, Kuroki Y, Koyanagi Y, Kano S, Itabe H, Ishizaka Y	HIV-1 Vpr induces TLR4/MyD88-mediated IL-6 production and reactivates viral production from latency	J Leukoc Biol	87	1133-1143	2010
Nagai H, Odawara T, Ajisawa A, Hagiwara S, Watanabe T, Uehira T, Uchiumi H, Yotsumoto M, Miyakawa T, Watanabe A, Kambe T, Konishi M, Saito S, Takahama S, Tateyama M, Okada S	whole brain radiation alone produces favourable outcomes for AIDS-related primary central nervous system lymphoma in the HAART era	Eur J Haematol	84	499-505	2010
古西満,米川真輔,宇野健司,膳本英一郎,三笠桂一	急性Epstein-Barrウイルス感染症を発症したHIV感染症の1例	内科	105	344-346	2010