

(CAA or CAG) → 315R (CGA or CCG) によってできたものであり、従来の subtype B 由来ではないことを示している。一方、GPGKの4番目のKのコドンはAAAであり、こちらは従来のR (AGA → AAA) から進化したものと推測される。これまで、同一患者のV3 tipのシークエンスでGPGRとGPGK、あるいはGPGRとGPGQは混在していたが、GPGQとGPGKの混在は確認されていない。これは、Q → Rの変異とR → Kの変異は全く異なるルートの進化であるためではないかということが、今回の観察からわかった。従来の subtype B からの進化と、新たな組み替えによる進化の2つの進化のルートの存在がV3 tipの4つ目のアミノ酸のコドンを調べることで判断できると考えられた。HIV-1の進化の方向性を知る上で、また日本や中国を含む東アジアの今後のウイルスのトレンドを推測する上で重要な知見であると考えられる。

HIV-1の中では subtype B は本来マイナーな株であった可能性が考えられる。なぜなら、X4に変わりやすく、細胞傷害性も強く、宿主に対する病原性が他の株に比べると高い上に、抗原性も強く、免疫監視機構にも認識されやすいと考えられるからである。しかし、subtype B はIDUやMSMの間で急速に伝搬していったため、性行為での感染と比べ免疫バリアーのハードルが低い状態で広がっていったと考えられる。一方で、主に性交渉で広がっていったAEやC株などは人から人へ感染していく過程で、その都度粘膜での免疫関門をくぐり抜けねばならず、R5ウイルスでかつ、比較的粘膜面からの感染に有利に働く方向に向いていったとしても不思議ではない。一方で、fitnessの面から見た時のB株のアドバンテージは無視できないものがある。以上のことから、免疫監視からの逃避に優れ、異性間性交渉での感染成立に有利なC株やAE株の良い所を残しつつ、B株の増殖能の面での優位性をうまく組み込んで新しいレコンビナントウイルスが生まれて来ている可能性は十分考えられる。その時、初めはtipを含むV3領域はNon B型 (GPGQ) であったが、よりfitnessを良くする過程でGPGRへと進化していったのではないかと考えられる。これは、元々北米型のB株がほとんどを占めていた日本に、急速に感染を拡大している可能性があるが、多くの組み替え株が発生している中国などの東アジア地域から、ウイルス株が流入してきたことにより生じた特殊な組み替え株であるのかもしれない。今後全国規模での詳細な検討を行う必要がある。

E. 結論

今回我々は、V3 tipの315Rのコドンを調べることで、B株に分類されていたものの中に明らかに2つの全く異なった由来のウイルスが存在することを証明した。Non BタイプのV3 tip (GPGQ) であったものが、リコンビネーションの結果GPGRという、いわゆるB株のV3tipへと進化の舵を切ったのである。このことは、今後のウイルスの方向性を知る上において非常に重要な情報となるのではないかと考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 原著論文

欧文

- 1) Narumi, T., Ochiai, C., Yoshimura, K., Harada, S., Tanaka, T., Nomura, W., Arai, H., Ozaki, T., Ohashi, N., Matsushita, S., Tamamura, H. CD4mimics targeting the HIV entry mechanism and their hybrid molecules with a CXCR4 antagonist. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20:5853-5858, 2010.
- 2) Yoshimura, K., Harada, S., Shibata, J., Hatada, M., Yamada, Y., Ochiai, C., Tamamura, H., Matsushita, S. Enhanced exposure of human immunodeficiency virus type 1 primary isolate neutralization epitopes through binding of CD4 mimetic compounds. *J Virol*, 84:7558-7568, 2010.
- 3) Hatada, M., Yoshimura, K., Harada, S., Kawanami, Y., Shibata, J., Matsushita, S. HIV-1 evasion of a neutralizing anti-V3 antibody involves acquisition of a potential glycosylation site in V2. *J Gen Virol*, 91: 1335-1345, 2010.
- 4) Yamada, Y., Ochiai, C., Yoshimura, K., Tanaka, T., Ohashi, N., Narumi, T., Nomura, W., Harada, S., Matsushita, S., Tamamura, H. :CD4 mimics targeting the mechanism of HIV entry. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20: 354-358, 2010.

和文

- 1) 松下修三、横山勝、宮内浩典、松田善衛、俣野哲朗、岩谷靖雅：HIV細胞侵入とその防御機序。 *The Journal of AIDS Research*. 12(2)：67-73、2010.
- 2) 松下修三：抗HIV薬。治療薬 up-to date 2010. 711-712、2010.
- 3) 松下修三：IV生化学的検査[2]H. 薬物分析検査抗ウイルス薬、抗HIV薬。 *日本臨床*、68(増刊号1)：486-490、2010.
- 4) 松下修三：HIV感染症。Year note別冊 Selected Articles 1345-1364、2010.
- 5) 松下修三：HIV-1感染症の病態生理。最新医学(別冊) 新しい診断と治療のABC65 1345-1364、

2010.

2. 口頭発表

海外

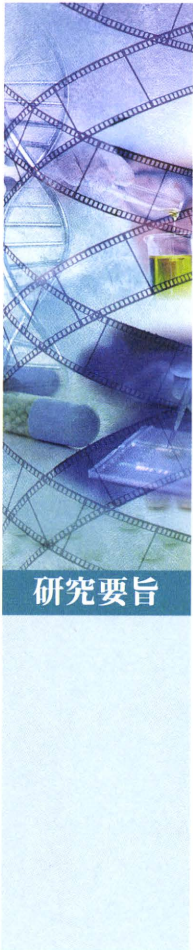
- 1) Matsushita, S., Mouri, S., Harada, S., Yamada, Y., Tamamura, H., Yoshimura, K.: CD4 mimetic compound-mediated enhancement of the neutralization activities of anti-V3 and CD4i monoclonal antibodies against the standard panel of primary isolates. XVIII International AIDS Conference. July.18-23, 2010. Vienna, Austria.
- 2) Liu, M., Shibata, J., Harada, S., Takehisa, J., Yoshimura, K., Matsushita, S.: Impact of a point mutation V2 (L175P) in neutralization resistance mediated by functional trimer formation of *Env*. AIDS Vaccine 2010, Sep.28-Oct.1, 2010. Atlanta, USA.

国内

- 1) Matsushita, S., Mouri, S., Harada, S., Yamada, Y., Tamamura, H., Yoshimura, K.: Strategy to overcome neutralization of HIV-1 primary isolates. 11th GCOE joint international Symposium Kumamoto AIDS Seminar, Oct.6-8, 2010. Kumamoto.
- 2) Harada, S., Hamaji A., Matsushita, S., Yoshimura, K.: Evaluation and selection of the *env* gene of HIV-1 primary isolates during *in vitro* selection of raltegravir. 11th GCOE joint international Symposium Kumamoto AIDS Seminar, Oct.6-8, 2010. Kumamoto.
- 3) 吉村和久、原田恵嘉、濱治有希、松下修三：CCR5阻害剤maraviroc (MVC) 耐性誘導による *Env*の変異が中和抗体感受性に及ぼす影響。第24回日本エイズ学会学術集会・総会。2010.11.24-26. 東京。
- 4) 原田恵嘉、濱治有希、松下修三、吉村和久：ラルテグラビルはHIV-1の *in vitro* 馴化における *Env* 選択に影響する。第24回日本エイズ学会学術集会・総会。2010.11.24-26. 東京。
- 5) 松下修三：共催シンポジウム2 最新の情報を明日の臨床に生かす-Year in review 2010-「病態の研究と治療薬開発の未来」。第24回日本エイズ学会学術集会・総会。2010.11.24-26. 東京。
- 6) 松下修三：共催セミナー8 HIV陽性者のメンタルヘルスへのアプローチ その2メンタルヘルス問題の「今」を考える：どのように捉え、どうアプローチすることが可能だろうか？～うつと依存症（薬物）を中心に。第24回日本エイズ学会学術集会・総会。2010.11.24-26. 東京。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし



薬剤耐性ウイルス感染性分子クローンの整備

～Pseudovirusによる薬剤耐性試験標準ウイルス作成～

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第2室 室長

研究要旨

安全で効率的なHIV薬剤耐性試験標準化に資するため、これまで整備された感染性分子クローンの *env* 遺伝子を欠損させ非感染性にしてVSV-G蛋白で被包されたPseudovirus粒子作成を試みた。その結果 *Env* を欠損させた薬剤耐性ウイルスクローンとVSV-Gを用いたPseudovirus粒子産生により、安定した薬剤耐性変異プロファイルをもつPseudovirusが作成できた。組換え用の親株はHigh Copy Vectorに移し替えることにより効率的にTransfectionに用いる様々な臨床ウイルス由来薬剤耐性プロファイルを持つ非感染性Pseudovirusが作成可能で、冷却微量遠心機により濃縮精製できるが、plasmid由来のノイズがあるため、Viral RNA精製過程に加えて、DNase処理が必要であることが示された。

A. 研究目的

HIV薬剤耐性試験 (Genotyping) が保険対象になり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。国立感染症研究所エイズ研究センター第2室では現在まで第2グループに登録された治療患者由来及び未治療患者由来ウイルスから多数の感染性分子クローンを整備してきた。治療患者由来ウイルスからは様々な薬剤耐性プロファイルを示すクローンが整備されつつある。しかしながら薬剤耐性試験用の標準ウイルス作成には「感染性」であることから分与とウイルス増幅に、様々な制約がある。非感染性分子クローンによるHIV-1 Genomeを保持するウイルス粒子の産生系は「非感染性」であることからウイルス増殖ができず、Transfectionに用いるplasmid由来のノイズが高く、実用的ではなかった。

そこでBSL3施設での操作に限定されない、分与配送過程においてより安定した「非感染性」ウイルス標準株を作成することを目的として、*Pol*領域を含むHIV-1 RNA genome前半を組み込み、HIV-1由来 *env* 遺伝子を欠損させたPseudovirus作成を試み、

薬剤耐性試験標準ウイルスとして有用か否か検討した。

(倫理面への配慮)

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出漏ら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。

B. 研究方法

Pseudovirusによる薬剤耐性試験標準ウイルス作成のため、これまで整備してきた薬剤耐性ウイルス由来感染性分子クローンから subtype B と CRF01_AE 由来で *env* 遺伝子領域にユニークな制限酵素サイトがあるクローンを選定した。初めの試みとして CRF01_AE 親株として pJPDR6824AE を選び Hpa I と

Stu Iで切断後ゲル電気泳動にて精製し、Self-Ligationをしてenv欠損クローンを得た。また subtype B親株としてpJPDR5929Bを選びBamHIで切断しKlenow Fill-Inをした後ゲル電気泳動して精製し、Self-Ligationをしてenv欠損クローンを得た。それぞれのクローンはenv欠損全長HIV-1ゲノムをLow Copy VectorのpMT1からHigh Copy Vectorである

pBluescript II SK (+)へ組み換え、HIV感染 Indicator細胞であるMAGIC-5及びHeLa4、5 nEGFPへの感染実験で非感染性を確認しPseudovirus作成用の親株とした(図1)。

得られたenv欠損クローンをVSV-G蛋白発現plasmid pVSV-Gと共に293T細胞へCo-transfectionし、培養3日後に培養上澄を回収した(図2)。回収した培

非感染性 HIV-1 clone の作製

- pJPDR6824AE Δenv ... env 内の HpaI, StuI siteで cut, 1998bp deletionしてLigation
- pJPDR5929B Δenv ... env 内の BamHI siteで cut, Klenow fill-inしてLigation
pBluescript II SK(+)に subcloningする (Copy数を上げ、取扱い易くする)
MAGIC-5A, HeLa 4,5 nEGFP への感染試験で非感染性を確認する (安全性を高め、取扱い易くする)

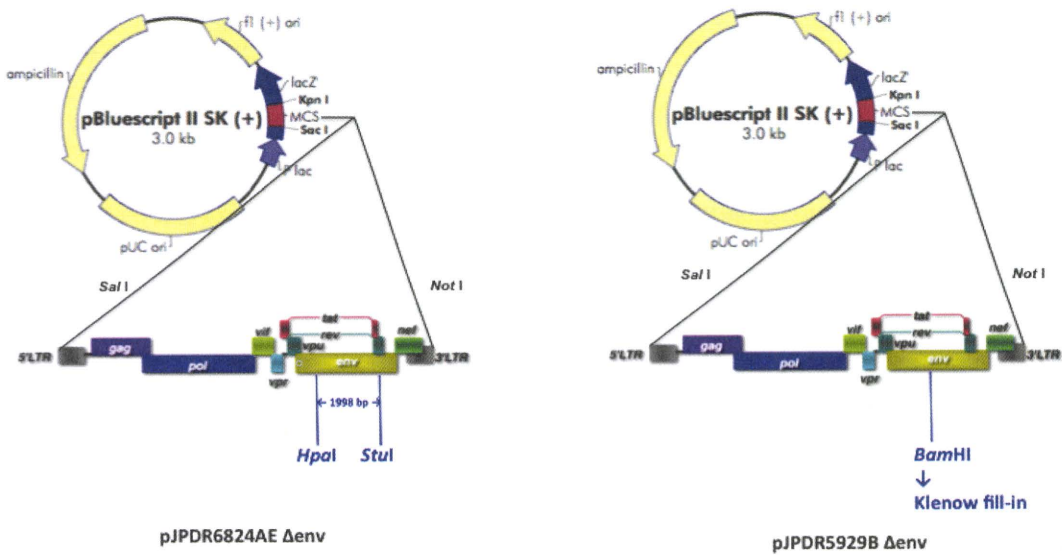


図1 非感染性HIV-1 cloneの作製

Co-Transfection

- Δenv Clone 5μg (約3.6x10⁷ copies/μl) / pVSV-G (Clontech) 3μg/10 mm dish を co-transfection,
- 培養3 日後にVSV-G Envを被ったpHIVΔenvゲノムのPseudovirus Particle を含んだ supernatant を回収 (培地交換無し)

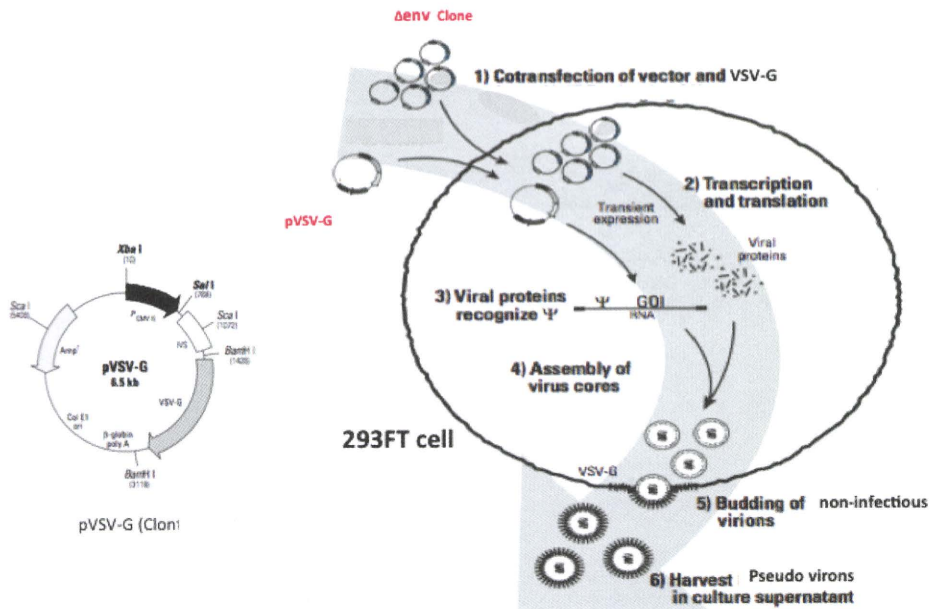


図2 Pseudovirus作成過程

養上澄はPEG沈殿原理によるLenti-X concentratorにより、または微量高速遠心（15000 rpm、90min at 4℃）で偽ウイルス粒子を濃縮し、それぞれの試料からHigh Pure Viral RNA Kit（Roche）でウイルスRNAを精製した（図3）。精製したRNA試料はDNase I処理あるいはRNase A処理の後、多くの

HIV-1ゲノム配列で保存されているNCR～gag領域を標的配列としたSyber Greenによる簡易定量Realtime RT-PCR/ PCRで偽ウイルス粒子内にPackagingされたHIV-1由来RNA copyあるいは残存プラスミド由来DNA copy数を測定した（図4）。実際の外部精度管理での標準品試料配布手段から想定

薬剤耐性遺伝子検査品質管理用標準液作製の概要

- 1) Δenvによる非感染性 HIV-1 クローンの構築
 - ・ pJPDR6824Δenv
 - ・ pJPDR5929 Δenv
- 2) 作製した Δenv HIV-1 のクローンそれぞれを VSV-G とともに 293FT ヘトランスフェクションし、pol 遺伝子に薬剤耐性を持つ偽ウイルス粒子を作成する
 - ↓
 - 上清を回収し、Lenti-X concentrator (Clonotech) または遠心 (15000rpm, 90min at 4 °C) で偽ウイルス粒子を濃縮
 - ↓
 - High Pure Viral RNA Kit (Roche) でウイルス RNA を抽出 (大量のplasmid DNAの残存あり)
 - ↓
 - Δ (Realtime RT-PCR - Realtime-PCR) によるウイルスRNA Copy 測定

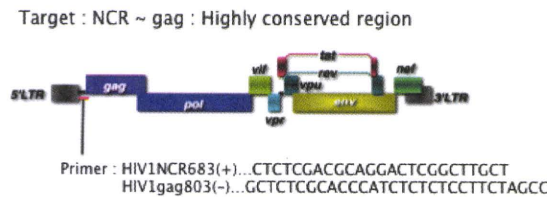
pJPDR6824 Δenv	RT-PCR - PCR Qty (copies/μl)	RT-PCR - PCR conc/sup	RT-PCR - PCR / 1 st sup
1 st sup	5.75E+06	—	1
LentiX sup	7.25E+05	1	0.13
LentiX conc	4.50E+06	6.21	0.78
Centrifug. sup	1.38E+04	1	0.00024
Centrifug. conc	9.20E+06	667	1.6

pDR5929 Δenv	RT-PCR - PCR Qty (copies/μl)	RT-PCR - PCR conc/sup	RT-PCR - PCR / 1 st sup
1 st sup	1.21E+07	—	1
LentiX sup	6.63E+05	1	0.05
LentiX conc	7.60E+06	11.5	0.63
Centrifug. sup	7.85E+04	1	0.006
Centrifug. conc	8.90E+06	113	0.74

遠心 (15000rpm,90min at 4 °C)は偽ウイルス粒子を濃縮することができたが、Lenti-X concentrator では濃縮することができなかった。

図3 薬剤耐性遺伝子検査品質管理用標準液作製の概要

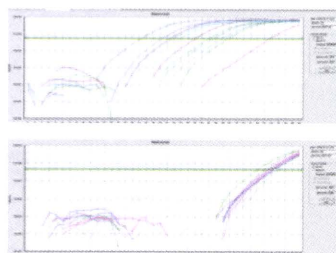
簡易定量Realtime RT-PCR / PCR



- 使用試薬
- One Step SYBR PrimeScript PLUS RT-PCR Kit (Takara / RT-PCR)
 - Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems / PCR)
 - Standard : Parent clones

Virus 粒子濃縮の確認

- 調製したRNA sample を DNaseI 処理したもの、さらに RNase A 処理したものをそれぞれRealtime PCR / Realtime RT-PCR を行ったところ、DNaseI /- もしくはDNaseI /RNaseA処理をした sampleではQty が出発材料より大きく減少した。
- Co-transfection した 293T よりPseudovirus 粒子の産生を確認できた。



Realtime PCR(RT-PCR)
 上 : DNaseI 処理 sample
 下 : DNaseI + RNaseA 処理 sample

図4 簡易定量Realtime RT-PCR/PCRと粒子濃縮の確認

して、上記の方法で得られた偽ウイルス粒子の4℃での安定性を検討した。

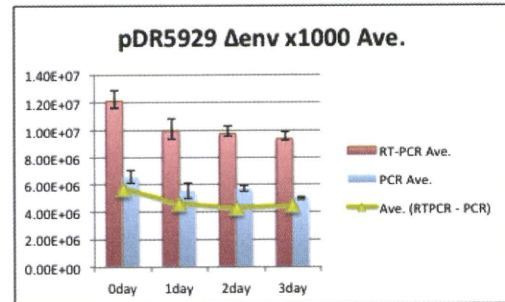
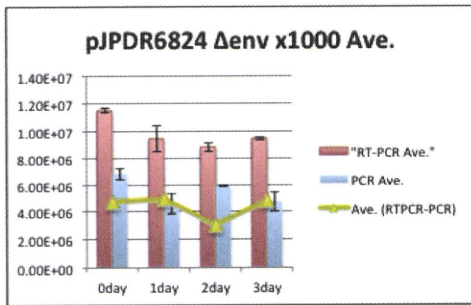
このようにして試みた非感染性分子クローン親株から、異なる薬剤耐性プロファイルをもつ臨床ウイルス由来の gag-pol 領域の組換えを、pJPDR6824 env

欠損クローンをモデルに、異なる薬剤耐性プロファイルをもつ感染性分子クローン pJPDR1741 から同じユニークな制限酵素サイト Sal I と Nco I を用いて組み換えたクローンをを用いて同様に偽ウイルス粒子作成を検討し、得られた粒子から RNA を精製し、

偽 HIV-1 ウィルス粒子の 4℃ 安定性試験

偽ウイルス粒子溶液(遠心で濃縮した sample)を
200μl Basematrix に x1000 希釈
↓
4℃で保存
↓
0 日から 3 日後まで 24 時間おきに回収、-80℃で保存
↓
RNA 抽出
↓
Realtime RT-PCR, PCR

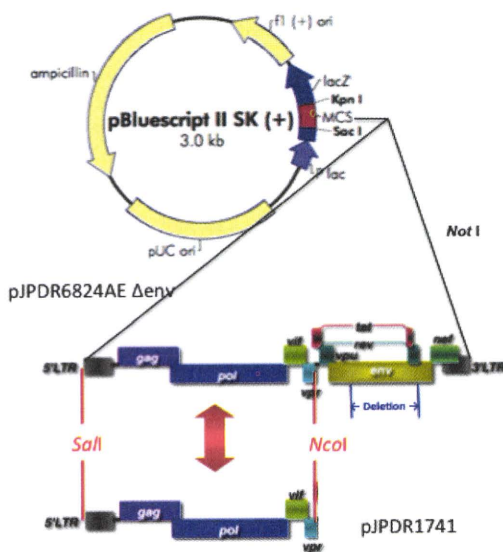
↓
精製した DNase 処理 RNA から感染法により RT-PCR で Pol 領域配列を確認した。



グラフは同一 sample で 3 回 Realtime PCR/RT-PCR を行った結果の平均を示す

図5 Pseudovirus 粒子の 4℃ 安定性

異なる薬剤耐性プロファイルの標準シュードウィルスの作製



pJPDR6824 LTR の Sal I、vpr 内の Nco I site で cut し、
pJPDR1741 の相同部位と入れ換え
↓
作製したクローンを VSV-G とともに
293FT ヘトランスフェクション
↓
上清を回収
↓
ウィルス RNA の抽出
↓
Realtime-PCR / Realtime RT-PCR
↓
RT-PCR による配列決定

Sal I / Nco I が標的ゲノムでユニークではない場合
→ In-Fusion Cloning で Cutting なしで入れ換える

P6824/1741 Δenv	RT-PCR — PCR Qty (copies/μl)
1 st sup	4.29E+07
Centrifug. sup	6.43E+04
Centrifuge conc	6.79E+06

LTR ~ vpr 領域を入れ替えた clone をトランスフェクションした 293T から偽ウイルス粒子の産生を確認できた

図6 臨床ウイルス由来薬剤耐性プロファイルをもつ Pseudovirus の作成

RT-PCRとDirect sequencingにより組換えを確認した(図6)。

C. 研究結果

Pseudovirusによる薬剤耐性試験標準ウイルス作成のため選定し作成した*env*遺伝子欠損HIV-1クロンの感染性をHIV感染Indicator細胞であるMAGIC-5とHeLa4、5nEGPF細胞で検討したところ、pJPDR6824AE Δenv およびpJPDR5929B Δenv とも感染性は認められなかった。これら*env*欠損クロンとpVSV-Gを293T細胞へCo-transfectionして培養し、得られたPseudovirusはMAGIC-5細胞及びHeLa4、5nEGFP細胞でTat蛋白発現に伴う β -GalあるいはnEGFPの核内発現が認められたが、細胞融合は認められず、*env*蛋白が発現されず、子孫ウイルスも産生されないことを確認した。

Co-transfection3日後の培養上澄から遠心濃縮したペレットからRNAを精製し、DNase I処理したものの、さらにRNase A処理したものを、それぞれRealtime PCR(DNA copy測定)及びRealtime RT-PCR(DNA+RNA copy測定)で標的配列をもつウイルス粒子数と残存プラスミド数を計測したところ、DNase I/もしくはDNase I/RNase A処理をしたRNA試料では計測コピー数(Qty)が出発試料より減少した。DNase I処理のみでは10倍希釈系列に添って減少したが、DNase I/RNase A処理では、殆どのコピー数は測定範囲外のサイクル数まで減少した(図4)。

このようにして得られたPseudovirus粒子をLenti-X concentrator (Clontech)または遠心(15,000rpm、90min at 4°C)で濃縮を試み、Pseudovirus粒子中のHIV-1 RNA Copy数をRealtime RT-PCRで得られたCopy数とRealtime PCRで得られたCopy数の差として、濃縮されているか検討したところ、pJPDR6824AE Δenv およびpJPDR5929 Δenv ともLenti-X concentratorによる濃縮効果は認められず、一方遠心による濃縮効果は認められた(図3)。

次に濃縮したPseudovirus粒子をBaseMatrixに $\times 1000$ 希釈し4°Cにおける安定性を検討した。Pseudovirus作成当日から3日間冷蔵し毎日一部試料をとりRNAを精製し、それぞれRealtime RT-PCRで(RNA+DNA)のCopy数を、Realtime PCRでDNAのCopy数を測定し、その差をPseudovirus粒子中のRNA Copy数としてプロットしたところ、どちらの*env*欠損クロンとも 10^6 copy/mLで有意な変動はなく安定していた。

次に臨床ウイルス株から異なった薬剤耐性プロファイルを示すPseudovirus粒子作成を試みた。CRF01_AE由来*env*欠損クロンpJPDR6824AE Δenv

を親株にして、別の感染性分子クローンpJPDR1741AEのユニークな制限酵素サイトSalIとNcoI siteを利用して、LTRからvprまでの領域を入れ換えたクローンを作成して、同様にPseudovirusを作成して検討したところ、得られたPseudovirus粒子のRNA由来配列は組み換えたクローン由来であることが確認された(図6)。

D. 考察

薬剤耐性感染性分子クローン由来感染性ウイルスの大量培養はBSL3における規制がある。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プラスミド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薬剤耐性標的領域の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困難であった。そこで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検討した。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、感染指示細胞HeLa4.5 nEGFP細胞でSyncytium形成陽性で、培養上澄のTransferでHIV感染指示細胞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。しかしながら、このような「非」感染性分子クローンのTransfection上澄から混在するプラスミド由来のノイズを排除することは、「非」感染性分子クローンゆえに培養によってウイルス粒子のみを増幅することは不可能であることから、著しく困難であった。

そこで薬剤耐性ウイルス由来感染性分子クローンの*env*遺伝子を欠損させ、代わりにウイルス*env*蛋白として安定であり、粒子の濃縮手段が複数あるVSV-G *env*蛋白を被包させ、HIV-1 Δenv 全RNAゲノムがPackagingされたPseudovirus粒子の作成し、

Pseudovirus 粒子を濃縮することによりプラスミド由来のノイズを除去することを試みた。今回選定した感染性分子クローンは、その *env* 遺伝子領域を欠損させることにより全ゲノムを保持したままで High Copy Vector でも比較的安定であった。pVSV-G との Co-transfection により非感染性であり、なおかつ *env* 欠損の HIV-1 RNA ゲノムがパッケージされた粒子が産生されていることが、NCR から *gag* 領域を標的配列とした Realtime RT-PCR と Realtime PCR の Copy 数の差として追跡することができた。この濃縮操作過程の検討で、組み換えレンチウイルスの濃縮に用いられている Lenti-X concentrator では濃縮効果は殆ど認められず、ウイルス実験室において常用される微量冷却高速遠心機による遠心により濃縮されることが判明した。しかしながら濃縮したウイルス液においても Realtime PCR で検出される残存プラスミドに由来すると考えられる 10^6 copy/mL に及ぶノイズが認められた。このノイズは Transfection に用いたプラスミドが 293T 細胞膜内、あるいは細胞膜内に残存し、遠心によりウイルス粒子と共に沈殿してくることを示しているかも知れない。より厳密にこの可能性を検討するには密度勾配超遠心によるウイルス粒子の分画実験が必要となる。しかしながら標準ウイルスを作成するに当たって望ましいのは、操作過程は成る可く簡素にするに越したことはないことから、Pseudovirus を標準ウイルスとして用いる場合には、臨床ウイルスにおける薬剤耐性試験にプラスミド由来のノイズを除去するため精製 RNA 試料を DNase I による前処理が必要となる。

この Pseudovirus 粒子は 4℃ で比較的安定であること、様々な薬剤耐性プロファイルをもつ臨床ウイルス由来標的領域を比較的容易に組み換えることが可能であること、そしてなにより非感染性であることから薬剤耐性試験の外部精度管理の標準ウイルス候補として考慮しうるものと考えられた。

E. 結論

薬剤耐性感染性分子クローンの *env* 遺伝子を欠損させ、VSV-G *env* 蛋白に被包させた Pseudovirus 粒子は、RNA 精製過程にノイズであるプラスミド由来 DNA を DNase I 処理を加えることにより、より安定な非感染性の標準ウイルスとなり得る可能性があることが判明した。

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

欧文

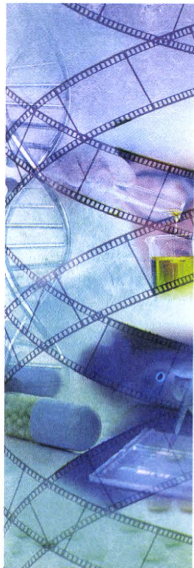
Iwabu Y, Kinomoto M, Tatsumi M, Fujita H, Shimamura M, Tanaka Y, Ishizaka Y, Nolan D, Mallal S, Sata T and Tokunaga T : Differential anti-Apobec 3G activity of HIV-1 vif proteins derived from different subtypes. J.Biol.Chem.285: 35350 – 35358, 2011.

2. 学会発表

該当する事項はない。

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

HIVの分子進化学的解析

研究分担者 **杉浦 亙** (独)国立病院機構名古屋医療センター
臨床研究センター感染・免疫研究部 部長

研究協力者 **椎野 禎一郎** 国立感染症研究所感染症情報センター 主任研究官

わが国のHIV-1感染者における薬剤耐性変異の状況を調べるために、我々は患者・検体・塩基配列情報のデータベースの作成事業を行っている。このデータベースに集められた配列情報を分子進化学的手法で解析し、わが国におけるHIV-1感染の動態を明らかにすることを目的として、解析が進められている。データベースに蓄積されたProtease-RT領域の塩基配列データから、初回来院かつCRF01_AEに分類される検体(228名)を抽出し、これに東京都の確認検査検体からの16配列を加えた244検体を解析に供した。分子系統樹解析の結果、29個の国内採取検体のみからなる系統群が見出された。これらは、国内感染クラスターを示していると考えられる。感染クラスターは、3患者以上で構成される4つの大きなクラスターと、2患者のペアからなる25の小さなクラスターに分けられた。これらのクラスターのネットワーク構造は、スケールフリーネットワークとみなされた。これは、我が国のCRF01_AEにおいては主要な感染クラスターに注目した対策が求められることを示唆している。各感染クラスターの祖先配列の存在時期(tMRAC)を、Bayesian Markov Chain Monte-Carlo法で解析したところ、大きなクラスターはすべて90年代初頭に感染が広がり始めた一方、小さなクラスターは2000年代に入ってからわが国に輸入されてきたことが明らかになった。大きなクラスターでは、外国人と薬物使用者が多いことが特徴であった。我が国において、CRF01_AEは薬物使用者を中心に大きなクラスターを形成して感染を広げている危険がある。

A. 研究目的

- 研究班で収集された患者・検体・塩基配列情報をデータベース化し、わが国におけるHIV-1感染の動態を経時的・地理的・サブタイプ依存的に描き出す
- わが国におけるHIV-1感染の実態の把握に必要なである
- 通常の疫学情報の解析とともに、分子進化学的手法を用いた塩基配列の大量解析を行う

(倫理面への配慮)

B. 研究方法

- WebサーバとDBサーバの連携によって、研究班が集める患者/検体情報を情報ネットワークを活

用して効率的に収集・集積・検索するシステムを構築する。

- 上記の情報システムに蓄積されたProtease-RT領域の塩基配列データを用いて、距離行列/近隣接合法を用いたサブタイピングとクラスター候補の高速・逐次抽出を行う。
- 各サブタイプの塩基配列データを、Bayesian Markov Chain Monte-Carlo法で解析し、最適塩基置換モデル・進化パラメーター・時間系統樹トポロジー・クラスター候補のtMRCA推定を行う。
- Bayesian Markov Chain Monte-Carlo法でスカイラインプロット解析を行い、ウイルス集団サイズの経時的変化を推定する。

C. 研究結果

本年度は、日本国内のCRF01_AEについて上に記した方法で解析を行った。2010年までの8年間に、*pol*領域の塩基配列解析によりCRF01_AEに感染したと判断された患者は228名いた。これに、東京都で行われているHIV-1確認検査の検体から得られたCRF01_AEの16塩基配列を加えた244検体を解析にentryした。これらの患者では、男性167名(68%)、heterosexual 163名(67%)、日本人165名(68%)が優勢だった(表1)。Protease-RT領域の塩基配列から推定された各検体間の塩基置換数は、患者の来院した地域間および申告した感染経路のいずれにおいても、HIV-1の遺伝的分化を生じていないことを示

唆した(表2)。これら244検体に国外採集のCRF01_AE 90配列を加え、距離行列法(図S2)とBayesian coalescence MCMC法(図2)の二つの異なる推定法で分子系統樹を推定した。二つの系統樹の共通系統群を抽出し、29個の国内採取検体のみからなる系統群(micro-clade: MC)を検出した。MCに属さず、自分以外の日本由来の患者と直接の遺伝的關係を持たない患者は174人いた。MC構成員を互いにcommunicationを持つネットワークとみなすと、ネットワーク頻度はべき乗則にしたがい、そのスケールリング指数は英国における異性間のそれと類似することがわかった(図3)。MCのうち25個は2患者のみが含まれるもの(小さなMC)だったものの、3

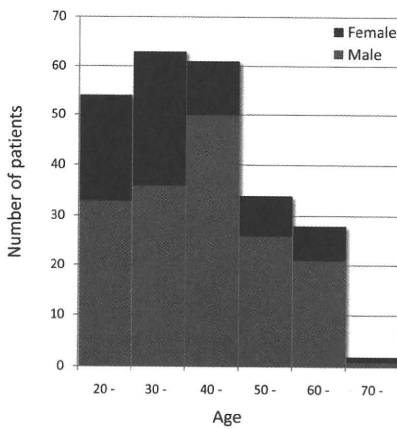
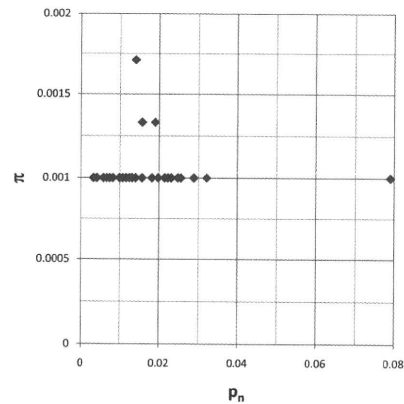


図1



図S1

表1 Demographic characteristics of CRF01_AE-infected patients in Japan

	Number	% proportion
Nationality		
Japanese	165	67.6%
Non-Japanese	58	23.8%
Thai	24	9.8%
Indonesian	8	3.3%
Myanmarese	6	2.5%
Chinese	4	1.6%
Vietnamese	3	1.2%
Laotian	2	0.8%
Malaysian	2	0.8%
Peruvian	1	0.4%
Brazilian	1	0.4%
Philippino	1	0.4%
Unspecified	6	2.5%
Unknown	21	8.6%
Transmission category		
Male	167	68.4%
High-risk heterosexual contact	102	41.8%
Male-to-male sexual contact	36	14.8%
IVDU	7	2.9%
Unidentified	22	9.0%
Female	75	30.7%
High-risk heterosexual contact	61	25.0%
IVDU	2	0.8%
Unidentified	12	4.9%
Unknown	2	0.8%
Area of the clinics and facilities		
Hokkaido	6	2.5%
Kanto	146	59.8%
Confirmed in metropolitan health centers	16	6.6%
Koushinetu	8	3.3%
Tokai	6	2.5%
Chukyo	36	14.8%
Hokuriku	2	0.8%
Kinki	16	6.6%
Kyushu	4	1.6%
Okinawa	3	1.2%
Unknown	1	0.4%
Total	244	

表2 Estimates of the Mean Evolutionary Diversity for categories of CRF01_AE sequences.

	Mean inter-population diversity (net)		Coefficient of Differentiation	
	d	S.E.	d	S.E.
Inter-patients in Japan	0.03284	0.00247	-	-
CRF01_AE Asian variant	0.03406	0.00251	-	-
Within reconstructed clones	0.00122	0.0002	-	-
Between reconstructed clones	0.03927	0.00269	0.96416	0.00557
Within risk behaviors	0.03707	0.00627	-	-
Between risk behaviors	0.00174	0.00195	0.03569	0.03802
Within collection areas	0.03194	0.00231	-	-
Between collection areas	0.00582	0.00091	0.15414	0.02133
Within MCs	0.00969	0.00072	-	-
Between MCs	0.02957	0.00208	0.605359	0.01372

患者以上が含まれる“大きな”MCが4つ見つかった。小さなMCは、日本人同士が多く（21個）、heterosexual couple（8個）とMSM関連（10個）がほぼ

同数であった（表4）。また、Bayesian MCMC法で推定したMCのtMRCAは比較的新しかった（図3・表3）。一方、大きなMCの構成員は、ほぼ半数

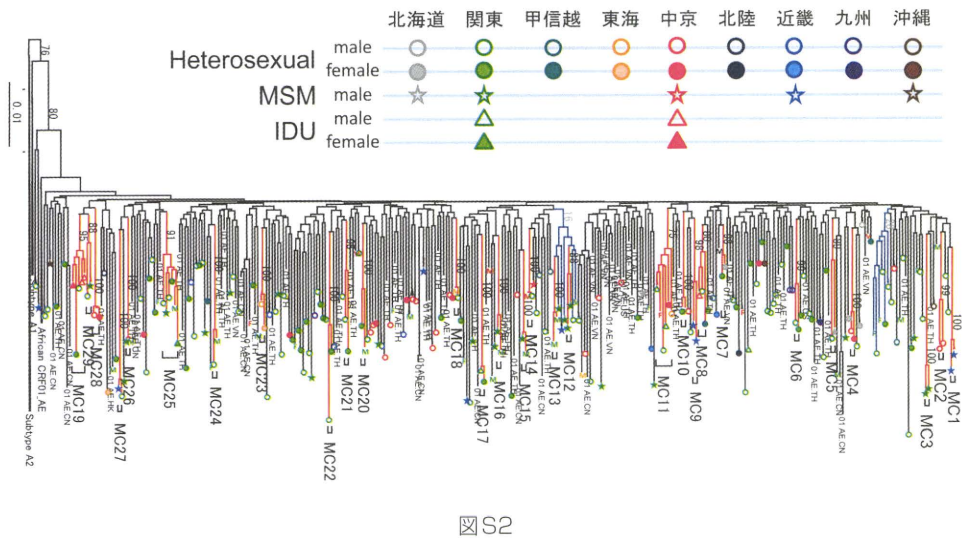


図 S2

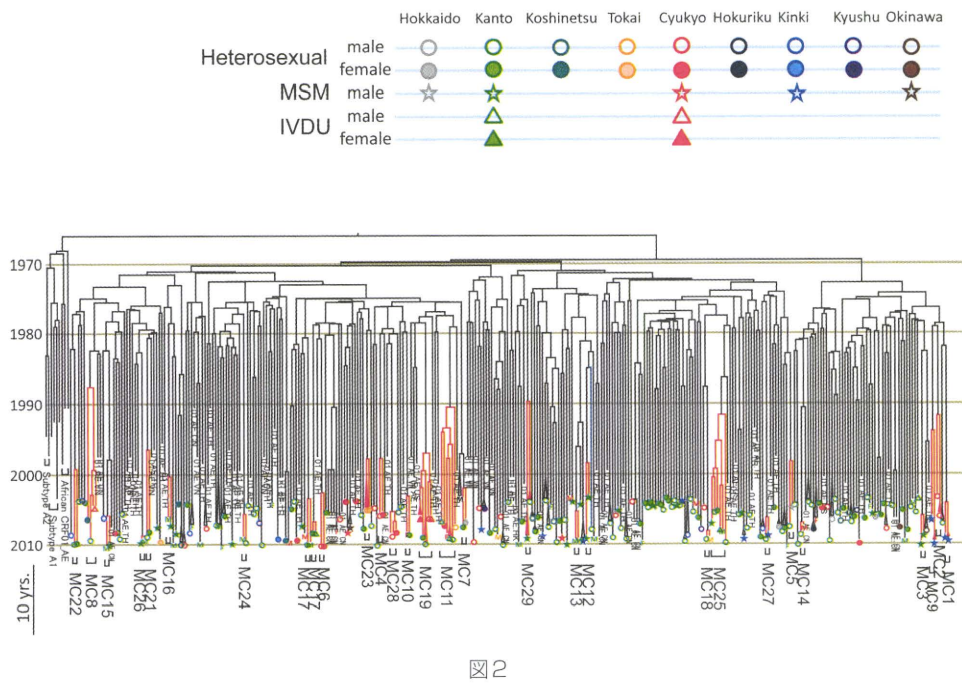


図 S3

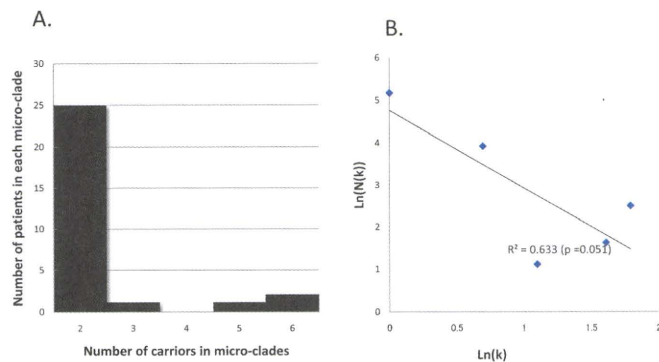


図 3

(9/20) が外国人で、女性比が比較的多く (7/20)、MSMはほとんど含まれていなかった (図4・図5)。また、MCのtMRCAは80年代終わりから90年代初

めを示していた (図4・表3)。特筆すべきことに、9患者いるIVDUのうち7患者が、4つの大きなMCに集中していた ($p < 0.001$)。

表3 MCMC法による各微小系統群のtMRCA推定値

	number of patients	Mean time	tMRCA		Transmission category	Natonarity
			95% lower HPD	95% higher HPD		
Root	334	23-Jan-64	15-Oct-74	1-Mar-56	-	-
Subtype A1 and CRF01_AE	332	4-Aug-67	15-Oct-74	1-Mar-56	-	-
Asian variant of CRF01_AE	328	30-Nov-68	18-Apr-75	12-Sep-56	-	-
CRF01_AE in Japan	244	30-Nov-68	18-Apr-75	12-Sep-56	-	-
MC1	2	20-Jun-04	12-Sep-07	28-May-99	cat.3	Japanese
MC2	2	16-Jul-94	2-Jan-00	25-Feb-87	cat.5	Japanese
MC3	2	11-Apr-04	6-Sep-07	15-Dec-98	cat.3	Japanese
MC4	2	5-Dec-00	28-May-04	16-Jan-95	cat.2	Japanese
MC5	2	1-Aug-92	15-Nov-99	15-Jan-84	cat.4	Japanese
MC6	2	12-Nov-03	14-Dec-04	15-Jul-02	cat.2	Japanese
MC7	2	25-Sep-02	4-Dec-05	31-Oct-96	cat.6	Japanese
MC8	3	10-May-92	27-Aug-99	20-Oct-82	cat.1	see Figure 4
MC9	2	8-Jun-97	12-Aug-03	2-Jan-89	cat.3	Japanese
MC10	2	8-Aug-05	2-Jan-08	5-Feb-01	cat.6	Thai
MC11	6	4-Jan-89	22-Jun-96	14-Aug-79	cat.1	see Figure 4
MC12	2	15-Jun-97	14-Apr-02	3-Nov-89	cat.3	Japanese
MC13	2	10-Nov-04	5-Jan-08	22-Dec-99	N.D.	N.D.
MC14	2	26-Nov-06	11-Jun-07	7-Jul-04	N.D.	Japanese
MC15	2	29-Aug-07	11-Oct-09	21-Sep-03	cat.3	Japanese
MC16	2	16-May-01	20-Dec-04	17-Jun-95	same person	Japanese
MC17	2	23-Aug-05	19-Nov-07	10-Nov-01	cat.2 (IVDU) non-Japanese	Japanese
MC18	2	21-Oct-07	22-Jan-09	13-Sep-04	N.D.	Japanese
MC19	5	23-Apr-94	2-Apr-00	29-Sep-85	cat.1	see Figure 4
MC20	2	19-Feb-99	30-Sep-05	17-Apr-90	cat.2	Myanmarese
MC21	2	4-Jul-93	6-Dec-01	10-Feb-83	cat.2	Japanese
MC22	2	15-Oct-99	1-Dec-05	8-Mar-92	cat.2	Myanmarese
MC23	2	31-Jul-00	25-Aug-03	28-Sep-95	cat.2	Japanese
MC24	2	18-May-04	30-Mar-08	25-May-98	cat.5	Japanese
MC25	6	5-Feb-93	11-Mar-00	20-Feb-84	cat.1	see Figure 4
MC26	2	1-Jul-08	7-Jan-09	13-Jun-06	same person	Japanese
MC27	2	22-Apr-06	18-May-08	30-May-02	cat.4	Japanese
MC28	2	14-Jan-06	27-Oct-07	28-Sep-02	cat.2	Japanese
MC29	2	2-Jan-91	15-Feb-99	16-Jul-80	cat.4	Japanese

表4 構成員が2名の微小系統群の感染経路と国籍分布

Couple categories	Japan	Japan x Foreign	Thailand x Unknown	Myanmar	Unknown	Total
Heterosexual couple	5	1*1		2		8
MSM couple	5 (1)					5
MSM and heterosexual male	3 (2)					3
Male pair of heterosexual behavior	2					2
Female pair	1 (1)		1			2
Unknown	4*2 (2)				1	5
Total	21	1	1	2	1	25

*1: The mate was a male IVDU from foreign country
 *2: Two cases were suspected to be from a same parson.
 Parenthesis shows a number of the widely distributed clusters.

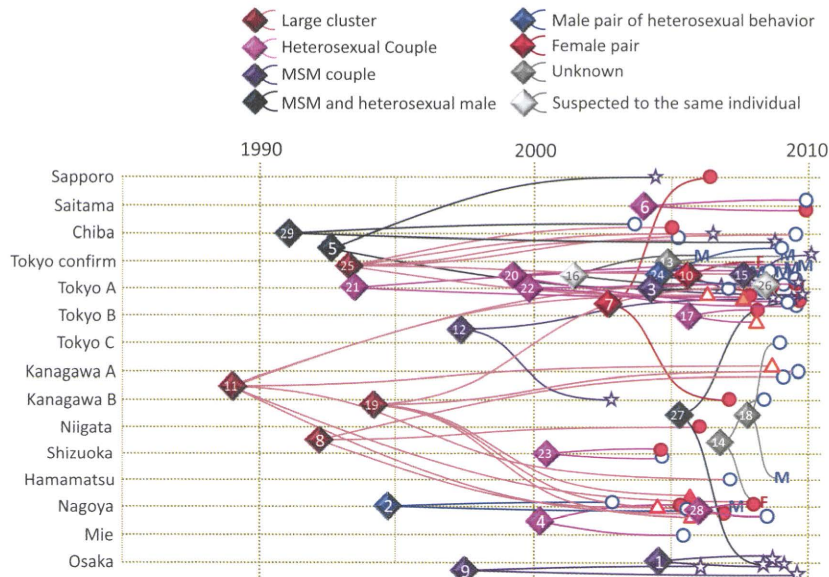


図4

D. 考察

CRF01_AEの単系統群の構成員のネットワーク頻度がべき乗則に従うことは、我が国のCRF01_AE感染者の感染に係るネットワークがスケールフリー性を持っていることを示唆している。このことは、CRF01_AEへの感染者の大半は他者に感染を広げることはないかあるいは特定のパートナーにしか広げないが、一部のハイリスクなコミュニティにおいて感染が広がる傾向があることを示している。大きなMC（感染ネットワーク）は、外国人とIVDUが独立に関わっていることが明らかのため、ハイリスク・コミュニティのリスク因子はこれら2つであると考えられる。これらの知見は、我が国の

CRF01_AE感染対策の標的集団の想定に、有用であると思われる。

E. 結論

日本国内のCRF01_AE感染集団は、90年代初頭から国内で感染を広げている少数のネットワークと、最近になって感染した小さなネットワークに分類される。大きなネットワークには、外国人とIVDUの関与が疑われる。

F. 健康危険情報

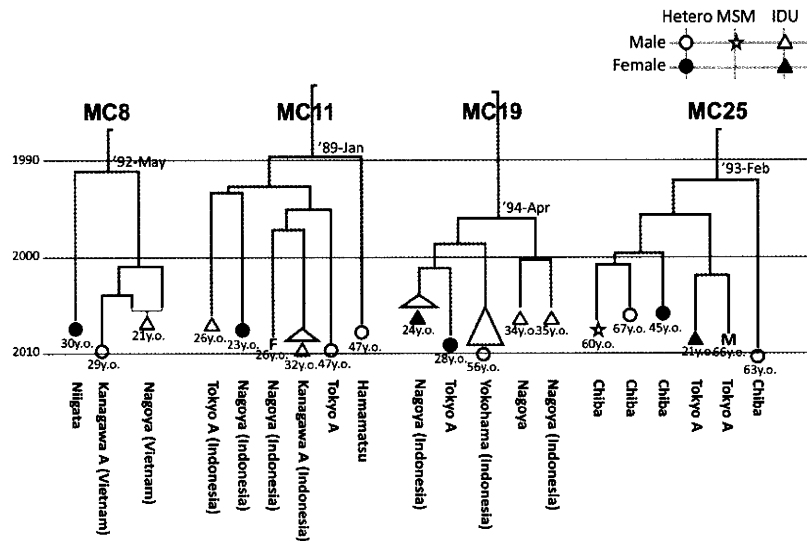


図5

Supplemental Table 1
Distribution of transmission route of CRF01_AE-infected patients in each nationality

	Japanese	Other Asian	S. American	Others	Unspecified	Total
Male						
High-risk heterosexual contact	84	11	1	3	3	102
Male-to-male sexual contact	35	1	0	0	0	36
IVDU	1	5	0	1	0	7
Unidentified	9	2	0	0	11	22
Female						
High-risk heterosexual contact	33	25	1	2	0	61
IVDU	1	1	0	0	0	2
Unidentified	2	5	0	0	5	12
Unknown	0	0	0	0	2	2
Total	165	50	2	6	21	244

Supplemental Table 2
MCMC法で推定した進化パラメーター

Parameters	Mean	95% HPD Lower	95% HPD Higher
Mean Rate (/yr.)	1.59×10^{-3}	1.13×10^{-3}	2.04×10^{-3}
Coeff. Of Var.	5.24×10^{-1}	4.45×10^{-1}	6.04×10^{-1}
likelihood	-2.83×10^4	-2.84×10^4	-2.82×10^4
site1.mu	8.09×10^{-1}	6.93×10^{-1}	9.32×10^{-1}
site2.mu	1.20×10^0	1.07×10^0	1.32×10^0
site3.mu	9.95×10^{-1}	8.65×10^{-1}	1.13×10^0
Logi. Pop. size	2.19×10^6	1.43×10^6	3.10×10^6
doubling time	4.38×10^2	2.98×10^2	5.75×10^2
t50	9.98×10^3	8.15×10^3	1.26×10^4

G. 研究発表

1. 原著論文

欧文

和文

2. 口頭発表

海外

国内

- 1) 椎野禎一郎、貞升健志、長島真美、服部純子、杉浦互 国内感染者集団の大規模塩基配列解析 1：CRF01_AEの動向と微小系統群の同定. 第24回日本エイズ学会学術集会総会（東京）、2010年11月24～26日.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他



研究要旨

新規手法・数珠多クローン遺伝子解析法を用いた潜在的薬剤耐性HIVの発掘調査

研究分担者 仲宗根 正 国立感染症研究所エイズ研究センター第1研究グループ 主任研究官
研究協力者 Walid Heneine 米国疾病予防制御センター 室長

未治療HIV感染者の中にも存在が予想されている薬剤耐性HIV、すなわち潜在的薬剤耐性HIV発掘調査を目的として、これまでに耐性遺伝子超高感度定量法を開発した。しかしながら次世代シークエンサーを用いた絶対的定量法の低コスト化が進み、実用的なレベルに達したため、解析データ量で劣る本法の開発は中止した。今年度は、もうひとつの重要課題であるHIV-RT薬剤感受性迅速試験法の開発について酵素学的な試験法の確立に取り組み、以下の知見を得た。

- 1) HIV治療薬3TCとNevirapine (NVP) に対する酵素学的HIV-RT薬剤感受性迅速試験法を開発するため、Real-Time-Amp-RT法を用いた。
- 2) 本法では、3TCに対するM184I/V、NVPに対するK103N、Y181C/I、G190A/Qといった変異HIV-RTの抵抗性をそれぞれ迅速に測定可能であった。
- 3) 本法の感度と特異度はM184I/Vでそれぞれ97.0%と96.0%であった。
- 4) K103Nらでは、それぞれ97.4%と96.2%であった。
- 5) 以上のように精度の高い酵素学的HIV-RT薬剤感受性迅速試験法が確立された。

A. 研究目的

薬剤耐性HIVの克服は、HIV感染者の長期生存のためには大きな課題のひとつである。これまで未治療HIV感染者体内には薬剤耐性HIVは存在しない、あるいは極めて少ないと考えられていた。しかし、近年の研究結果から予想より多い可能性が示唆されている。この、未治療HIV感染者体内のいわゆる潜在的薬剤耐性HIVを検出することができれば、効果的な薬剤選択を事前に予測することが可能となり、HIV感染者にとって福音となる。本研究では、未治療HIV感染者の中にも存在が予想されている薬剤耐性HIVの発掘、すなわち潜在的薬剤耐性HIV発掘調査を目的とする。さらに、発掘された潜在的薬剤耐性が顕在化していく課程を明らかにすることを次の目的とする。これらの目的を達成するには、耐性遺伝子超高感度定量法と薬剤耐性感受性高感度試験法が必要である。前者については次世代シークエンサー法絶対的定量法の低コスト化が進み、実用的なレベルに達している。本年度は後者の確立を目指した。

B. 研究方法

我々がこれまでに開発してきたReal-Time-Amp-RT法を薬剤耐性感受性高感度試験法に応用した。本法は酵素学的HIV-RT薬剤感受性を迅速に判定できる。系の至適化のため、140のHIV感染者血漿 (Subtype B=114, Non-B=26)、160のHIV非感染者血漿、そして14のHIV感染者血漿 (ウイルスRNA量40copies/ml未満) を本法で測定した。次にValidationのため、253のHIV感染者血漿 (Subtype B=229, C=14, A=6, D=1, CRF-AG=2 CRF-01=1) をブラインドで測定した。また実験室HIV株のHXB2、SUM9をRT野生株として、M184V変異株を3TC耐性株として、Y181C変異株とK103N/Y181C変異株をNVP耐性株として、それぞれの実験に対照として用いた。薬剤存在下と非存在下でのCt値の違い ΔC_t 値で薬剤「感受性」と「耐性」を判定した。薬剤濃度は50mMで統一した。耐性変異と相関しないサンプルについては、5-500mMの薬剤濃度範囲で再測定し、IC50とIC90を算出した。

C. 研究結果

測定された逆転写酵素活性レベルとウイルスRNA量の相関

114のSubtype Bサンプルのウイルス量とCt値（逆転写酵素活性値の指標）には有意な正の相関関係が認められた（ $r=0.68$ 、95% CI：0.77-0.57、 $P<0.0001$ ）。同様の相関関係は26のSubtype non-Bサンプルにおいても確認された（ $r=0.69$ 、95% CI：0.85-0.41、 $P<0.0001$ ）。一方で、160の非感染者血漿のCt値は 44.6 ± 1.1 （40.2～>45）で、14のHIV感染者血漿（ウイルスRNA量40copies/ml未満）のCt値は 43.8 ± 1.9 （39.6～>45）であった。

3CTCとNVP耐性の検出

56の野生株の ΔCt 値（ $mean=6.2 \pm 2.5$ ）は55の3TC耐性M184V変異株の ΔCt 値（ $mean=0.2 \pm 0.8$ ）より有意に高かった（ $P<0.0001$ ）。NVPについても同様であった。すなわち、83の野生株の ΔCt 値（ $mean=7.4 \pm 3.2$ ）は28のNVP耐性K103N、Y181C/I、Y11L、G190A/Q変異株の ΔCt 値（ $mean=0.48 \pm 0.96$ ）より有意に高かった（ $P<0.0001$ ）。3TCとNVPに対する ΔCt 値のcut-off（ $mean\Delta Ct + 3SD$ ）は、それぞれ2.66と3.28と算出された。このcut-offで評価すると、55のM184V変異株は全て3TC耐性、28のNVP関連変異株も全てNVP耐性と判定された。逆に、184Mの56サンプル中52が、そしてNVP関連変異を持たない83サンプル中79がそれぞれ3TC及びNVP感受性と判定された。不一致のこれら8サンプルの内5サンプルの ΔCt 値はcut-off値に近かった。

Assay variability

14回の実験によりinter-assay variabilityを評価した。HXB2野生株の3TCに対する ΔCt 値は平均9.5（7.9～10.8）で、NVPに対する ΔCt 値は平均9.7（7.9～11.9）であった。M184V変異株の3TCに対する ΔCt 値は平均0.9（0.3～1.6）で、NVPに対する ΔCt 値は平均8.8（6.9～11.0）であった。一方で、Y188C変異株の3TCに対する ΔCt 値は平均8.4（6.9～9.7）で、NVPに対する ΔCt 値は平均1.9（1.3～2.7）であった。

臨床サンプルでの評価

173の臨床サンプルについてブラインドで測定した。99サンプルが3TC感受性で残り74サンプルは耐性と判定された。前者の内94サンプルが遺伝子学的に野生型で、3サンプルはM184M/V混合型、2サンプルはM184Vであった。M184Vであった2サンプルの ΔCt 値は2.7と2.8でcut-off値（2.66）に近かった。3TC耐性と判定された後者74サンプル中70サンプルは遺伝子学的にM184VまたはM184I型（184V=65、184I=1、184M/I=5）であった。

M184VまたはM184I型ではない4サンプル中3つにV118I変異が確認された。この変異は、本法で用いられる3TC-TPに対する低いレベルの酵素学的抵抗性に関連していることが最近報告されている。NVPについては、82サンプルが感受性で残り91サンプルは耐性と判定された。前者の内73サンプルが遺伝子学的に野生型で、3サンプルはK103N型、7サンプルは野生型と変異型の混合であった。NVP耐性と判定された後者91サンプル中88サンプルは遺伝子学的に変異型（K103N、Y181C/I、Y188L、G190A/Q、or K238N）であった。残りの3サンプルにはいずれの変異も確認できなかった。

D. 考察

未治療HIV感染者の中にも存在が予想されている薬剤耐性HIV、すなわち潜在的薬剤耐性HIV発掘調査を目的として、これまでに耐性遺伝子超高感度定量法を開発した。しかしながら次世代シーケンサーを用いた絶対的定量法の低コスト化が進み、実用的なレベルに達したため、解析データ量で劣る本法の開発は中止した。今年度は、もうひとつの重要課題であるHIV-RT薬剤感受性迅速試験法を開発を再開した。

これまでに我々は、我々が開発した逆転写酵素活性高感度測定法（Amp-RT法）を用いて薬剤耐性HIV-RT定量法を開発し、HIV-RT薬剤感受性迅速試験法としての可能性を検討してきた。当初は薬剤濃度を4～8濃度に振ってIC50を算出する方針をとっていた。しかしながらこの方針だと作業工程が多く、系としての品質管理にやや難点があった。そこで定量法から定性法に方針を転換した。すなわち薬剤濃度を固定し、薬剤感受性か耐性かを判定する方針である。

この方針の元に、今回示したように感度と特異性の高い酵素学的HIV-RT薬剤感受性迅速試験法が確立された。本法はまた少なくとも今回調べた範囲内では、HIVのサブタイプに依存しない。理論的にもHIV-1の全てのサブタイプばかりかHIV-2の薬剤耐性検査にも応用可能である。既存の遺伝子学的薬剤耐性検査がサブタイプに依存していることを考慮すると、この点の長所は特筆すべきと考える。また、本法では薬剤非存在下での逆転写酵素活性を測定しているが、今回の研究でもこれまでの研究でも示してきたようにこの数値はウイルスRNA量と相関する。すなわちウイルスRNA量の指標として代用できる可能性を示唆している。ウイルス量測定と薬剤耐性検査が1度で済むのである。特に途上国など診断的資源の少ない地域での検査法として有用と考える。

今後の課題としては、研究目的にもあるが、次世代シーケンサーを用いた耐性遺伝子超高感度定量法により発掘されるであろう潜在的薬剤耐性が顕在化していく課程を明らかにすることが挙げられる。そのために時系列でのサンプリング及び解析が必要であり、その検討を始めたい。

なお、中止した耐性遺伝子超高感度定量法については平成22年2月18日に国立感染症研究所職務発明の認定を受けており、その設計理論については特許出願を準備している。

E. 結論

- 1) HIV治療薬3TCとNevirapine (NVP) に対する酵素学的HIV-RT薬剤感受性迅速試験法を開発するため、Real-Time-Amp-RT法を用いた。
- 2) 本法では、3TCに対するM184I/V、NVPに対するK103N、Y181C/I、G190A/Qといった変異HIV-RTの抵抗性をそれぞれ迅速に測定可能であった。
- 3) 本法の感度と特異度はM184I/Vでそれぞれ97.0%と96.0%であった。
- 4) K103Nらでは、それぞれ97.4%と96.2%であった。
- 5) 以上のように精度の高い酵素学的HIV-RT薬剤感受性迅速試験法が確立された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hoffmann D, Garcia A, Harrigan PR, Johnston ICD, Nakasone T, Garcia Lerma JG, Heneine W. Measuring enzymatic HIV-1 susceptibility to two reverse transcriptase inhibitors as a rapid and simple approach to HIV-drug resistance testing. PLoS One 2011 (submitted).

2. 学会発表

- 1) 服部純子、椎野禎一郎、渦永博之、林田庸総、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、加藤真吾、藤井毅、岩本愛吉、西澤雅子、仲宗根正、岡慎一、伊部史朗、横幕能行、上田幹夫、大家正義、田邊嘉也、渡辺香奈子、渡邊大、白阪琢磨、栗原健、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、杉浦 互：2003-2009年の新規HIV/AIDS診断症例における薬剤耐性頻度の動向。第24回日本エイズ学

会 (11/24-26、2010、東京)

- 2) 仲宗根正、熊倉成、村上努、山本直樹：KRH-3955単回内服によるSHIV/サルモデルでの長期感染予防効果。第24回日本エイズ学会 (11/24-26、2010、東京)

H. 知的財産権の出願・登録状況

国立感染症研究所職務発明承認：数珠多クローン遺伝子解析法

特許出願準備中：数珠多クローン遺伝子解析法 (仮称)



研究要旨

大阪市及び近郊における薬剤耐性HIVの動向調査研究

研究分担者 森 治代 大阪府立公衆衛生研究所ウイルス課 主任研究員

研究協力者 小島 洋子、川畑 拓也 大阪府立公衆衛生研究所ウイルス課 主任研究員

2010年にHIV-1感染が判明し医療機関を受診した新規診断症例13例中12例、および当所のHIV検査で陽性が確認された115例中103例について、HIV-*pol*および*env*領域の遺伝子解析を実施した。その結果、確認検査の1例(外国人男性、CRF_02_AG)を除きすべてがサブタイプBによる感染であり、医療機関受診症例2例および確認検査の陽性検体9例においてmajorな薬剤耐性変異が検出された。医療機関受診症例では逆転写酵素領域にT215E/Sが、また確認検査陽性検体ではプロテアーゼ領域にD30N+L33F+N88D、逆転写酵素領域にK103N、V108I、T215E/D/L/S、V108I+T215Dが認められた。

A. 研究目的

国内で流行するHIV遺伝子型および新規診断症例における薬剤耐性HIVの出現頻度の動向について全国規模での疫学調査を実施するにあたり、近畿ブロックとして調査に参加し、大阪府およびその近郊における新規HIV診断症例についてウイルスの遺伝子解析を行ない、今後のエイズ対策に有用な情報を集積することを目的とする。

(倫理面への配慮)

医療機関において主治医より研究内容について説明し、本人の同意を得た上で採血を行っている。また、確認検査検体については連結不可能な匿名検査であり、HIV陽性検体を研究に用いることを当所ホームページ上で広報している。本研究は、大阪府立公衆衛生研究所の倫理審査委員会の承認を受けている。

B. 研究方法

2010年にHIV-1感染が判明し医療機関を受診した新規診断症例13例、および当所におけるHIV確認検査の陽性検体115例について、血漿中のウイルスRNAを鋳型にして治療薬が標的とするプロテアーゼ

(PR)領域(297bp)、逆転写酵素(RT)領域(720bp)およびインテグラーゼ(IN)領域(864bp)をRT-PCRにより増幅した。増幅が可能であった医療機関受診症例12例と確認検査陽性例103例のPCR産物について、ダイレクトシークエンスにより塩基配列を決定した後、IAS-USAパネル2009年版に基づいて薬剤耐性アミノ酸変異の有無を判定した。ただし、確認検査陽性検体のIN領域については、55例のみ検討を行った。また、*env*-C2V3領域についてもシークエンスを行ない、得られた塩基配列をもとに系統樹を作成しウイルスのサブタイプを決定した。一部の検体については、Geno2pheno coreceptorサイト(<http://coreceptor.bioinf.mpi-inf.mpg.de/>)を利用して、*env*-V3領域の配列よりウイルスのコレセプター嗜好性の推測を試みた。

さらに、感染時期(感染後155日以内recent/155日以上not recent)を推定する目的で、Calypte HIV-1 BED Incidence EIA アッセイ(CALYPTE BIOMEDICAL Co., OR USA)を添付のマニュアルに従って実施した。

C. 研究結果

医療機関受診症例13例はすべて日本人男性であ

り、感染リスクは同性間性的接触が11例、異性間性的接触が1例、不明が1例で、HIVの遺伝子解析が可能であった12例のサブタイプはすべてBであった。薬剤耐性遺伝子検査の結果、major mutationとしては2例のRT領域にT215YFのリバートと考えられるT215E/Sが検出された(表1)。その他の症例も、PR領域にはpolymorphismと思われるminor mutationが多数見られ、2例においてはRT領域に非核酸系RT阻害剤(NNRTIs)の耐性に関連するminor mutationであるV106IとV179Dが検出された。IN領域には薬剤耐性に関連するとされるmajorなアミノ酸変異は認められなかった。

遺伝子解析が可能であった確認検査陽性検体103例におけるHIVのサブタイプは、外国人男性1例に見られたCRF02_AGを除いてすべてサブタイプBであった(表2)。薬剤耐性に関連するmajor mutationは103例中9例(8.7%)に認められ、その内訳はPR

領域のD30N+L33F+N88D、RT領域のK103N、V108I、V108I+T215Dがそれぞれ1例ずつとT215リバートが5例(D1、E1、L2、S1)であった。IN阻害剤に対するmajorな耐性変異は検出されなかった(表1)。

Geno2pheno coreceptorサイトにより、2009-2010年の確認検査陽性検体に検出されたHIVについてコレセプター嗜好性を調べた結果、119例中7例(5.9%)がコレセプターにCXCR4を利用するためCCR5阻害剤の効果は期待できないと診断された。

2010年の新規HIV-1診断症例について、Calypste HIV-1 BED Incidence EIA kit (BEDアッセイ)を用いておおよその感染時期を推定したところ、医療機関受診症例13例中2例(15.4%)、確認検査陽性検体115例中29例(25.2%)が感染初期(ODn<0.8、感染後155日以内)と推定された。

表1 薬剤耐性関連アミノ酸変異が認められた新規HIV-1診断症例(2010年)

性別	国籍	感染リスク	薬剤耐性アミノ酸変異			サブタイプ (env-C2V3)	BEDアッセイ	
			PR	RT	IN			
● 医療機関受診症例								
1	男性	日本	同性間	-	T215L	L74I,G163E	B	not-recent
2	男性	日本	同性間	I13V, L63P, I64V, V77I	V106I, T215E	-	B	not-recent
● 確認検査陽性検体								
1	男性	日本	不明	-	T215S	-	B	not-recent
2	男性	日本	不明	I62V, V82I, I93L	V108VI, T215D	-	B	not-recent
3	男性	日本	同性間	-	T215L	-	B	not-recent
4	男性	日本	同性間	I13V, L63P, I64V, V77I	V106I, T215E	L74I,G163E	B	not-recent
5	男性	日本	不明	I13V, I62V	T215L	増幅せず	B	not-recent
6	男性	日本	不明	I13V, L63P, A71T	K103N	-	B	not-recent
7	男性	日本	同性間	V77I, I93L	V108I	G163E	B	recent
8	男性	日本	同性間	I62V, V82I, I93L	T215D	-	B	not-recent
9	男性	日本	同性間	L10I, D30N, L33F, M36I, I62V, L63P, N88D	-	-	B	recent

表2 確認検査陽性検体におけるHIV遺伝子型

	陽性件数	解析数	性別	感染リスク	サブタイプ					
					B	01_AE	02_AG	A	C	未分類?
2007年	88	85	男性	同性間	56	56 (2)				
				異性間	4	4				
				不明	21	19	2			
			女性	2	異性間	2	1			1
			不明	2	2					
2008年	120	108	男性	同性間	60	56	4			
				異性間	6	5	1 (1)			
				IDU	1	1				
			女性	3	異性間	33	33			
			不明	3	1	1 (1)		1 (1)		
			不明	5	5					
2009年	93	91	男性	同性間	64	61	3*			
				異性間	7	6 (1)	1			
				不明	16	13	1	1 (1)		1 (1)
			女性	1	異性間	1	1			
			不明	3	3					
2010年	115	103	男性	同性間	36	36				
				異性間	2	2				
				不明	59	58	1 (1)			
			女性	0						
			不明	6	6					

():外国人、再掲

*:1例はAE/Bの重複感染

D. 考察

我々が行なっている大阪地域における調査では、全国的な傾向と同様に流行HIVの大部分をサブタイプBが占めているが、例年日本人男性においてCRF01_AEが数例検出されており、MSM (men who have sex with men) コミュニティへのCRF01_AEの広がりが懸念されている。しかしながら、2010年は1例の外国人男性を除き全例がサブタイプBによる感染であり、CRF01_AEが感染拡大する傾向は認められなかった。

2010年にHIV-1感染が判明した新規診断症例（医療機関受診症例12例、確認検査陽性検体103例）について薬剤耐性遺伝子検査を実施したところ、医療機関受診症例の2例（16.7%）、確認検査陽性検体の9例（8.7%）においてmajor mutationが検出された。RT領域のT215リバータントは例年と同じく検出された薬剤耐性変異の中では最も多く、系統樹解析ではこれまでに見つかっているT215リバータント例と同じクラスターに収束されることより、それらと近縁であることが示唆された。昨年に引き続き、今年も確認検査陽性検体1例（日本人MSM）においてプロテアーゼ阻害剤であるネルフィナビルに高度耐性を示すアミノ酸変異（D30N+N88D）が検出され、また今回始めてNNRTIs耐性変異であるK103Nが1例（日本人男性、感染リスクは不明）に検出されるなど、新規診断症例に見られる薬剤耐性変異がここ数年で多様化・高度耐性化しており、今後の動向が注目される。

BEDアッセイにより推定される確認検査陽性検体中の感染初期率は25.2%で、2007年35.2%、2008年30.8%、2009年29.0%と徐々に減少する傾向にある。これはすなわち、感染発見が遅れる傾向にあることを意味していると思われ、大阪における「いきなりエイズ率」がここ数年上昇していることとも一致する。さらに、新規診断症例の約6%において感染後期に出現するとされるX4タイプのHIVが検出されたことから、感染の発見が遅れることによりせっかく開発された新薬であるCCR5阻害剤が使用できなくなるなど、治療薬の選択余地が狭まることが危惧される。

E. 結論

2010年のHIV新規診断症例について薬剤耐性遺伝子検査を実施した結果、医療機関受診症例12例のうち2例、確認検査陽性検体103例のうち9例においてmajor mutationが検出された。近年、新規診断症例において高度耐性変異がしばしば検出されるようになっており、薬剤耐性検査の重要性は今後ますます高

まるものと思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 原著論文

なし

2. 口頭発表

海外

なし

国内

- 1) 森 治代、小島洋子、川畑拓也 HIV重複感染例の検出 第24回日本エイズ学会（東京）平成22年11月24-26日（ポスター）

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし