

201421027A

厚生労働科学研究費補助金  
エイズ対策政策研究事業

急速な病期進行あるいはセロネガティブ感染を伴う

新型 HIV の国内感染拡大を検知可能な

サーベイランスシステム開発研究

-平成 26 年度 総括・分担研究報告書-

研究代表者

川 畑 拓 也

大阪府立公衆衛生研究所

平成 27 (2015) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金  
エイズ対策政策研究事業

急速な病期進行あるいはセロネガティブ感染を伴う  
新型 HIV の国内感染拡大を検知可能な  
サーベイランスシステム開発研究

-平成 26 年度 総括・分担研究報告書-

研究代表者

川 畑 拓 也

大阪府立公衆衛生研究所

平成 27 (2015) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金 エイズ対策政策研究事業  
「急速な病期進行あるいはセロネガティブ感染を伴う  
新型 HIV の国内感染拡大を検知可能なサーベイランスシステム開発研究」  
研究班班員名簿

研究代表者	川畑拓也	大阪府立公衆衛生研究所
研究分担者	白阪琢磨 塩田達雄 森 治代 駒野 淳 小島洋子	国立病院機構大阪医療センター 大阪大学微生物病研究所 大阪府立公衆衛生研究所 国立病院機構名古屋医療センター 大阪府立公衆衛生研究所
研究協力者 (50 音順)	青木理恵子 岩佐 厚 宇野健司 大北全俊 鬼塚哲郎 亀岡 博 菅野展史 木村 礼 近藤雅彦 桜井健司 白野倫徳 杉本賢治 高田昌彦 岳中美江 田端運久 辻 宏幸 中村幸生 中山英美 永井仁美 古林敬一 松浦基夫 松本珠実 村上 努 毛受矩子 渡邊 大	特定非営利活動法人 CHARM 岩佐クリニック 奈良県立医科大学 東北大学 MASH 大阪 亀岡クリニック 菅野クリニック 堺市保健所感染症対策課 近藤クリニック HIV と人権・情報センター 大阪市立総合医療センター 京橋杉本クリニック 高田泌尿器科 BULBY 田端医院 公益財団法人エイズ予防財団 中村クリニック 大阪大学微生物病研究所 大阪府健康医療部医療対策課 そねざき古林診療所 市立堺病院 大阪市保健所 国立感染症研究所 NPO 法人スマートらいふネット 国立病院機構大阪医療センター

# 平成 26 年度 研究 報告 書

## 目 次

### I. 総括研究報告

急速な病期進行あるいはセロネガティブ感染を伴う新型 HIV の国内感染拡大を 検知可能なサーベイランスシステム開発研究 -総括研究報告-	1
川畑拓也	(大阪府立公衆衛生研究所)

### II. 分担研究報告

1. 新型 HIV の遺伝子解析および分子疫学解析	7
森 治代、小島洋子 他	(大阪府立公衆衛生研究所)
2. 新型変異 HIV のウイルス学的解析	13
駒野 淳 他	(国立病院機構名古屋医療センター)
3. 新型変異 HIV 感染者の宿主側因子の解析	17
塩田達雄 他	(大阪大学微生物病研究所)
4. HIV 検査における偽陰性例の文献的考察	21
白阪琢磨 他	(国立病院機構大阪医療センター)
5. 地域における個別施策層向け HIV 検査体制の強化	25
川畑拓也 他	(大阪府立公衆衛生研究所)

6. 個別施策層向け新規 HIV 検査相談プログラムの検討……………	31
川畑拓也 他	(大阪府立公衆衛生研究所)
7. HIVサーベイランスの強化を目的とした地域ネットワークの構築 ……	37
川畑拓也 他	(大阪府立公衆衛生研究所)

# I . 総括研究報告

# 急速な病期進行あるいはセロネガティブ感染を伴う 新型 HIV の国内感染拡大を検知可能なサーベイランスシステム開発研究

## 総括研究報告

研究代表者	川畑拓也	大阪府立公衆衛生研究所
研究分担者	白阪琢磨	独立行政法人国立病院機構大阪医療センター
	塩田達雄	大阪大学微生物病研究所
	森 治代	大阪府立公衆衛生研究所
	駒野 淳	独立行政法人国立病院機構名古屋医療センター
	小島洋子	大阪府立公衆衛生研究所

### 研究要旨

セロコンバージョンまでの期間が通常よりも長い、世界でも報告の少ないセロネガティブ HIV 感染の事例を端緒として、大阪府南部で病期進行が著しく早い傾向があるエイズ患者の局地的な集団から、世界に例を見ない挿入変異を共通して持ち、遺伝学的にも非常に近縁な HIV-1 を検出した。この感染者集団に見られる急速な病期進行やセロネガティブ感染が新型 HIV-1 の感染によるものであるかを明らかにするため、またこの HIV-1 の流行状況を把握し感染拡大を阻止するため、以下の 4 項目について研究を行った。

1. 新型変異 HIV 感染の病態解析
  2. 新型変異 HIV の遺伝子疫学解析
  3. 個別施策層向け HIV 検査体制の強化
  4. 地域における HIV サーベイランス体制の強化
- その結果、今年度は以下のような結論を得た。

当所が保有する検体の解析結果より、2011 年から 2014 年に検出された 17 例の HIV-1 が p6 <sup>Gag</sup> 領域とインテグラーゼ領域の両方に特徴的な変異をもつ新型 HIV-1 であり、これらは近年になって大阪南部に出現したと推測された。新型変異を持った分子クローンの作出は、今後ウイルス性状を解析する上で有用である。HIV の病態進行に影響するヒト遺伝子多型を過去の報告から割り出した。MSM 向け通常検査の陽性率が非常に高く、来年度は協力診療所を増やすなど規模を拡大して実施する。MSM 向け迅速抗体検査において、陽性者のすり抜けが起こったことを明らかにした。WB 法が陰性もしくは判定保留である成人 HIV-1 感染者の診断においては、確認検査時に核酸増幅検査を実施する必要がある。新型変異 HIV-1 に関する情報共有を行い、通常とは異なる病期進行を示す HIV 検出に向けた地域のネットワークを構築した。

### A. 研究目的

セロコンバージョンまでの期間が通常よりも長い、世界でも報告の少ないセロネガティブ HIV 感染の事例を端緒として、大阪府南部で局地的な増加をみた病期進行が著しく早い傾向があるエイズ患者の集団から、世界に例を見ない挿入変異を共通して持ち、遺伝学的にも非常に近縁な HIV を検出した。HIV の変異が病期進行に関与する事を疑い、当該新型変異 HIV-1 の疫学的・ウイルス学的解析と、啓発・検査相談・支援・臨床が連携した HIV サーベイランス

の強化・再編を目的とし、本研究では次の 4 つの研究、すなわち(1)新型変異 HIV 感染の病態解析(2)新型変異 HIV の遺伝子疫学解析(3)個別施策層向け HIV 検査体制の強化(4)地域における HIV サーベイランス体制の強化、を実施する。(次の「2. 研究方法」以降において上記 4 項目に分けて記す。)

### B. 研究方法

(1) 新型変異 HIV 感染の病態解析

(1)-1: 新型変異 HIV の解析: 新型変異 HIV

は、p6 <sup>Gag</sup>領域に特徴的な5アミノ酸の重複挿入変異（以下p6変異）をgenetic signatureとして共通に持っていることを明らかにしたが、さらに詳細に遺伝子を解析する。また、新型変異HIVの性質をウイルス学的な側面から解析するために、新型変異HIVに共通する特徴的な変異を持つ分子クローンを作成する。

(1)-2：宿主側因子の解析：新型変異HIVに感染している者であっても類似した臨床像（高いViral Load（VL）とCD4数の急激な低下）を示さない者も存在するため、HIV感染に関わる宿主因子の解析を行う。

#### (2) 新型変異HIVの遺伝子疫学解析

新型変異HIVの遡及調査：新型変異HIV-1の流行実態を明らかにする目的で、当所にて保存しているHIV-1陽性検体について、HIV-1 gag-pol領域の塩基配列をRT-nested PCR・ダイレクトシークエンス法により決定し、新型HIV-1に特徴的な遺伝子変異の保有状況を調査する。

#### (3) 個別施策層向けHIV検査体制の強化

(3)-1：ハイリスク集団向け検査体制の強化：本年度大阪府が実施する診療所におけるMSM向けHIV/STI即日検査事業に併せ、通常検査でも診療所で受検できるよう検査体制を強化する。また、セロネガティブ感染を見逃さない目的で、即日検査陰性者から同意を得て核酸増幅検査（以下NAT）を行う。

(3)-2：公的検査施設等における確認検査体制の強化：大阪府立公衆衛生研究所（以下公衛研）で保健所や医療機関から依頼され実施するHIV確認検査において、WB法による抗体検出と平行してNAT・遺伝子解析を実施し、新型変異HIVの検出を行うとともに、急性感染期における抗体-VL乖離の有無を評価する。

#### (4) 地域におけるHIVサーベイランス体制の強化

(4)-1：ネットワークの構築と疫学情報・研究成果の共有・還元：当研究班（大学研究施設、ブロック拠点病院、地方衛生研究所）に加え中核拠点病院医師、診療所医師、CBO・NPO、陽性者支援組織、行政担当者が参加する、本研究の情報共有を行うための連絡会議を開催する。

(4)-2：検査相談・陽性者支援・治療の各現場での通常とは異なる病期進行事例の把握強化：通常とは異なる病期進行の事例を把握し、受療中の拠点病院を通じて本研究で詳細を解析できるようにするため、上述のネットワークで事例の把握・協力を呼びかける。

#### （倫理面への配慮）

各種ガイドラインを遵守し、大阪府立公衆衛生研究所の倫理審査を経て、受検者、HIV陽性者、検体提供者の人権に最大限配慮する。

### C. 研究結果と考察

#### (1) 新型HIV感染の病態解析

(1)-1：新型変異HIVの解析：当該HIVの遺伝子解析を詳細に行った結果、p6変異の他にインテグラーゼ領域のストップコドンに共通した点突然変異を持ち、このことでインテグラーゼC末端に4アミノ酸が付加されている可能性が示唆された（IN変異）。一方、新型変異HIVのコレセプター指向性を鑑みてpNL4-3株のenv領域をR5-tropicとして知られるAD8に置換したpNL/AD8株を鋳型とし、新型変異HIVのp6変異とIN変異を持つ分子クローンを遺伝子工学的実験手法により作出し、dideoxy法により変異の導入を確認した。

(1)-2：宿主因子の解析：HIV感染に係る宿主因子を研究する上で必須となるヒトゲノム遺伝子解析研究における個人情報保護管理を、遺漏の無い様入念に準備した。さらに、日本人においてHIV感染症の病態進行に影響する遺伝子多型を過去の報告から割り出した。

#### (2) 新型変異HIVの遺伝子疫学解析

新型変異HIVの遡及調査：2009年から2013年までの間に当所に搬入された559例について新型HIV-1に特徴的な遺伝子変異の有無を解析したところ、17例がp6変異とインテグラーゼ領域に変異を持つ新型変異HIV-1であった。そして、その大部分が2011～12年に集中しており、それ以前の検体には両方の変異を併せ持つHIV-1は検出されなかった。

#### (3) 個別施策層向けHIV検査体制の強化

(3)-1：ハイリスク集団向け検査体制の強化：大阪府が実施したMSM向け検査を強化し、通常検査実施診療所において80名の受検者（内陽性者3名（陽性率5.7%））を得た。また、HIV抗体迅速検査陰性者282名から同意を得て行ったNATでは1名がHIV陽性である事が明らかとなり、感染リスクの高い集団に対する抗体即日検査において、実際に偽陰性（すり抜け）が起きている事を明らかにした。これら感染者のHIVについて遺伝子解析を行ったが、4例とも新型変異HIVでは無かった。

(3)-2：公的検査施設等における確認検査体制の強化：本年度公衛研に搬入された確認検査検体のうち遺伝子解析実施が可能だった90検体に関して解析を行ったが、新型変異HIV-1



は検出されなかった。また急性感染期の検体 8 例に NAT を実施し、VL を測定した ( $1.3 \times 10^4$  ~  $7.2 \times 10^6$  コピー/mL)。

#### (4) 地域における HIV サーベイランス体制の強化

(4)-1: ネットワークの構築と疫学情報・研究成果の共有・還元: 本年度、研究分担・協力各機関の担当者を集めた連絡会議を 1 回実施し、新型変異 HIV-1 に関する情報共有を行い、通常とは異なる病期進行を示す HIV 検出に向けた地域のネットワークを構築した。

(4)-2: 検査相談・陽性者支援・治療の各現場での通常とは異なる病期進行事例の把握強化: 上述のネットワーク構成各個人・団体に依頼した。また拠点病院においては、特に急性感染期の新規患者に注視し、WB 法が陰性もしくは判定保留である成人 HIV-1 感染者について過去の報告を調査した。

#### D. 結論

当所が保有する過去の検体の解析結果より、p6<sup>Gag</sup> とインテグラーゼの特徴的な変異をもつ新型 HIV-1 は、近年になって大阪南部に出現したと推測された。新型変異を持った分子クローンの作出は、今後ウイルス性状を解析する上で有用である。HIV の病態進行に影響するヒト遺伝子多型を過去の報告から割り出した。2011 年から 2012 年に検出された 17 例が p6<sup>Gag</sup> 領域とインテグラーゼ領域の両方に変異を持つ新型変異 HIV-1 であった。MSM 向け通常検査の陽性率が非常に高かったことから、来年度は協力診療所を増やすなど、規模を拡大して実施し、地域における HIV 感染者の把握を進める。迅速抗体検査では陽性者のすり抜けが起こっていることが明らかとなり、今後簡便な HIV 核酸増幅検査法開発の重要性が高まった。WB 法が陰性もしくは判定保留である成人 HIV-1 感染者の診断においては、確認検査時に核酸増幅検査を実施する必要がある。新型変異 HIV-1 に関する情報共有を行い、通常とは異なる病期進行を示す HIV 検出に向けた地域のネットワークを構築した。

#### E. 発表論文等

(論文) - 英文

1. Morita-Ishihara T, Unemo M, Furubayashi K, Kawahata T, Shimuta K, Nakayama S, Ohnishi M: Treatment failure with 2 g of azithromycin (extended-release formulation) in *gonorrhoea* in Japan caused by the international

multidrug-resistant ST1407 strain of *Neisseria gonorrhoeae*. J Antimicrob Chemother. Aug. 69(8):2086-90, 2014

2. Katano H, Hishima T, Mochizuki M, Kodama Y, Oyaizu N, Ota Y, Mine S, Igari T, Ajisawa A, Teruya K, Tanuma J, Kikuchi Y, Uehira T, Shirasaka T, Koibuchi T, Iwamoto A, Oka S, Hasegawa H, Okada S, Yasuoka A: The prevalence of opportunistic infections and malignancies in autopsied patients with human immunodeficiency virus infection in Japan. BMC Infect Dis. 14:229. Published online Apr, 2014
3. Imahashi M, Izumi T, Watanabe D, Imamura J, Matsuoka K, Ode H, Masaoka T, Sato K, Kaneko N, Ichikawa S, Koyanagi Y, Takaori-Kondo A, Utsumi M, Yokomaku Y, Shirasaka T, Sugiura W, Iwatani Y, Naoe T. Lack of Association between Intact/Deletion Polymorphisms of the APOBEC3B Gene and HIV-1 Risk. PLoS One. 9(3):e92861. Published online Mar, 2014
4. Ota Y, Hishima T, Mochizuki M, Kodama Y, Moritani S, Oyaizu N, Mine S, Ajisawa A, Tanuma J, Uehira T, Hagiwara S, Yajima K, Koizumi Y, Shirasaka T, Kojima Y, Nagai H, Yokomaku Y, Shiozawa Y, Koibuchi T, Iwamoto A, Oka S, Hasegawa H, Okada S, Katano H. Classification of AIDS-related lymphoma cases between 1987 and 2012 in Japan based on the WHO classification of lymphomas, fourth edition. Cancer Med. 3(1): 143-153, Feb, 2014
5. Hayasaka H, Kobayashi D, Yoshimura H, Nakayama EE, Shioda T, Miyasaka M: The HIV-1 gp120/CXCR4 axis promotes CCR7 ligand-dependent CD4 T cell migration: CCR7 homo- and CCR7/CXCR4 hetero-oligomer formation as a possible mechanism for up-regulation of functional CCR7. PLoS One, 2014 Accepted.
6. Nomaguchi M, Nakayama EE, Yokoyama M, Doi N, Igarashi T, Shioda T, Sato H,

Adachi A: Distinct combinations of amino acid substitutions in N-terminal domain of Gag-capsid afford HIV-1 resistance to rhesus TRIM5 $\alpha$ . *Microbes infect.* 16(11), 936-44, 2014.

7. Taya K, Nakayama EE, Shioda T: Moderate restriction of macrophage-tropic human immunodeficiency virus type 1 by SAMHD1 in monocyte-derived macrophages. *PLoS One* 9(3), e90969, 2014.
8. Matsui M, Shindo K, Izumi T, Io K, Shinohara M, Komano J, Kobayashi M, Kadowaki N, Harris RS, Takaori-Kondo A, Small molecules that inhibit Vif-induced degradation of APOBEC3G. *Virol J.* 2014 Jul 1;11:122. doi: 10.1186/1743-422X-11-122.

(論文) -和文

1. 古林敬一、廣井 聡、川畑拓也. 異性間性的接触によるアデノウイルス 53 型の伝播. *日本性感染症学会誌*、Vol. 25, No. 1 113-114, 2014
2. 森 治代、川畑拓也、小島洋子、永井仁美、田邊雅章、原田一浩、松本治子、溝端孝史、田中佐代子. 大阪府における HIV/AIDS の現状と対策について. *病原微生物検出情報*. Vol. 35. 205-206, 2014.

(発表) -海外

1. Tatsuo Shioda: Host Factors in the Pathogenesis of HIV Infection. 17th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID) AIDS Panel Meeting 2015年1月26日-29日 Taipei, Taiwan.
2. Tatsuo Shioda: Host factors in the pathogenesis of HIV infection. International Congress on Medical Virology 2014 2014年11月5日-7日 Bangkok, Thailand.
3. Mori, H., Kojima, Y., and Kawahata, T. Drug resistance mutations persist in HIV-1 proviral DNA despite 12 years of successful viral suppression. 20th International AIDS Conference. July 20-25, 2014, Melbourne, Australia.

(発表) -国内

1. 川畑拓也. 地域における HIV・性感染症の検査について. 日本性感染症学会、2014年、神戸.
2. 森 治代、小島洋子、川畑拓也、駒野 淳. 急速な病期進行をみた感染初期例群に共通して検出された新規変異 HIV-1 の流行実態. 日本エイズ学会、2014年、大阪.
3. 川畑拓也. 診療所における HIV 検査の算定要件緩和前後における比較検討. 日本エイズ学会 (日本エイズ学会日本性感染症学会合同シンポジウム)、2014年、大阪.
4. 川畑拓也、古林敬一. 大阪府内の性感染症関連医療機関における HIV 検査に関するアンケート調査. 日本エイズ学会、2014年、大阪.
5. 川畑拓也、森 治代、小島洋子、他 14 名. 診療所を窓口とした MSM 向け検査キャンペーン (2013 年). 日本エイズ学会、2014年、大阪.
6. 中瀬克己、川畑拓也、他 15 名. WB 法 HIV 抗体確認検査数陽性数による全国の HIV 診断動向. 日本エイズ学会、2014年、大阪.
7. 小島洋子、川畑拓也、森 治代、古林敬一、谷口 恭、井戸田一朗、駒野 淳. HIV 感染者における新規 Ae/G リコンビナント HBV の解析. 近畿エイズ研究会、2014年、大阪.
8. 川畑拓也、森 治代、小島洋子、他 14 名. 診療所を窓口とした MSM 向け検査キャンペーン (2013 年). 日本性感染症学会関西支部総会、2014年、大阪.
9. 川畑拓也、古林敬一. 大阪府内の性感染症関連医療機関における HIV 検査に関するアンケート調査. 日本性感染症学会関西支部総会、2014年、大阪.
10. 川畑拓也、古林敬一、亀岡 博、安本亮二、中山周一、大西 真. 大阪府内における淋菌の薬剤感受性調査結果 (H23-25). 日本性感染症学会関西支部総会、2014年、大阪.
11. 櫻木小百合、塩田達雄、櫻木淳一: HIV パッケージングシグナル内最重要領域 SL1 の機能的構造に関する多角的解析. 第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会 2014年12月3日-5日、大阪
12. 中山英美, Uttayamakul Sumonmal, Tiphaine Oudot-Mellakh, Pimrapat Tengtrakulcharoen, Julien Guernon, Jean-Francois Delfraissy, Srisin

- Khusmith, Chariya Sangsajja, Sirirat Likanonsakul, Ioannis Theodorou, 塩田達雄: Genome-wide association study of HIV-related lipodystrophy in Thai patients: Association of a DLGAP1 polymorphism with fat loss. 第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会 2014 年 12 月 3 日-5 日 大阪
13. 武田英里, 河野 健, Amy E. Hulme, Thomas J. Hope, 中山英美, 塩田達雄: TRIM5 $\alpha$  存在下における HIV-1 および HIV-2 のカプシドコアの脱殻第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会 2014 年 12 月 3 日 -5 日大阪
  14. 田谷かほる, 武田英里, 中山英美, 塩田達雄, 明里宏文, 金子 新. 再生医療技術のエイズ研究応用のためのアカゲザル iPS 細胞樹立と CD34 陽性細胞への分化. 第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会 2014 年 12 月 3 日-5 日 大阪
  15. Tahmina Sultana, 中山英美, 飛田哲志, 齊藤 暁, 明里宏文, 塩田達雄: Novel mutant HIV-1 strains with high degree of resistance to cynomolgus macaque TRIMCyp generated by random mutagenesis. 第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会 2014 年 12 月 3 日-5 日 大阪
  16. 櫻木淳一, 櫻木小百合, 塩田達雄: HIV-1 パッケージングシグナル内最重要領域 SL1 の機能的構造に関する多角的解析. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 2014 年 11 月 10 日-12 日 横浜
  17. 武田英里, 河野 健, Amy E. Hulme, Thomas J. Hope, 中山英美, 塩田達雄: TRIM5 $\alpha$  による HIV-1 および HIV-2 のカプシドコアの脱殻促進: 可視化ウイルスによる解析. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 2014 年 11 月 10 日-12 日 横浜
  18. Emi E Nakayama, Tetsushi Tobita, Tahmina Sultana, Akatsuki Saito, Hirofumi Akari, Tatsuo Shioda: Novel mutant HIV-1 strains with high degree of resistance to cynomolgus macaque TRIMCyp generated by random mutagenesis. The 13th Awaji International Forum on Infection and Immunity in Nara 2014 年 9 月 23 日-26 日 奈良
  19. 椎野禎一郎, 服部純子, 湯永博之、他 9 名、森 治代, 南 留美、健山正男、杉浦 互. 国内感染者集団の大規模塩基配列解析 5: MSM コミュニティへのサブタイプ B 感染の動態. 日本エイズ学会、2014 年、大阪.
  20. 岡崎玲子、蜂谷敦子、服部純子、湯永博之、渡邊 大、長島真美、貞升健志、近藤真規子、南 留美、吉田 繁、森 治代、他 35 名. 新規 HIV/AIDS 診断症例における薬剤耐性 HIV の動向. 日本エイズ学会、2014 年、大阪.
  21. 野村 渉, 水口貴章, 大橋南美, Mathieu Metifiot, 藤野真之, Yves Pommier, 駒野 淳, 村上 努, 玉村啓和. HIV-1 遺伝子産物由来のインテグラーゼ阻害活性を持ったステーブルペプチド. 日本エイズ学会、2014 年、大阪.

## II. 分担研究報告

## 1. 新型 HIV の遺伝子解析および分子疫学解析

研究分担者：森 治代（大阪府立公衆衛生研究所 感染症部 ウイルス課）

小島洋子（大阪府立公衆衛生研究所 感染症部 ウイルス課）

研究協力者：松浦基夫（市立堺病院）、宇野健司（奈良県立医科大学附属病院）

研究代表者：川畑拓也（大阪府立公衆衛生研究所）

### 研究要旨

#### 1. 新型 HIV の遺伝子解析

急速な病期進行を呈する感染初期例群に検出された HIV-1 の *gag-pol* 遺伝子を詳細に解析した結果、 $p6^{Gag}$  領域における特徴的な 5 アミノ酸の重複挿入変異に加えて、インテグラーゼのストップコドンに変異を有していることがわかり、そのためインテグラーゼ C 末端に 4 アミノ酸が付加されている可能性が示唆された。

#### 2. 新型 HIV の分子疫学解析

新型変異 HIV-1 の流行実態を明らかにするため、当所に保存されている 2009-2014 年の HIV-1 陽性検体 649 例についてインテグラーゼ C 末端および  $p6^{Gag}$  の変異の有無を調べた。その結果、17 例から新型変異 HIV-1 が検出され、その大部分は 2011-12 年に集中していた。

#### A. 研究目的

我々は、2011-2012 年に地域的集積が見られた急速な病期進行を呈する感染初期例群において、 $p6^{Gag}$  領域に特徴的な 5 アミノ酸 (QSRPE) の重複挿入変異を持つ新型変異 HIV-1 を検出した。本研究では、新型変異 HIV-1 の遺伝学的・ウイルス学的特徴について、より詳細に解析する。また、過去の保存検体および新規の HIV 陽性検体について遺伝子解析を行い、新型変異 HIV-1 の流行実態を明らかにする。

#### B. 研究方法

##### (1) 新型変異 HIV-1 の遺伝子解析

急速な病期進行を呈した 4 例を含む 7 例の HIV-1 感染初期症例の血清（血漿）検体よりウイルス RNA を抽出し、HIV-1 *gag*(p17-p6)、*pol*（プロテアーゼ (PR)-逆転写酵素 (RT) 前半、インテグラーゼ (IN)）、*env*(C2V3) の各領域を RT-nested-PCR 法により増幅した後、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。得られた配列と実験室 HIV-1 株である HXB2 の配列とを比較することにより、感染初期症例群に検出される HIV-1 に特徴的な遺伝子変異部位を探索した。

IAS-USA パネル (2014 年度版) に基づき、PR・RT・IN 各領域における薬剤耐性関連アミノ酸変異の有無を判定した。*gag*、*pol* および *env*

領域の塩基配列よりサブタイプを決定し、また geno2pheno coreceptor 解析プログラム (<http://coreceptor.bioinf.mpi-inf.mpg.de/>) を利用して *env*-V3 領域の塩基配列よりコリセプター指向性を推定した。

##### (2) 新型変異 HIV-1 の流行実態調査

新型変異 HIV-1 の流行実態を明らかにするため、2009 年から 2013 年の間に当所に搬入された HIV-1 陽性保存検体 559 例および 2014 年の HIV-1 確認検査陽性検体 90 例について、新型 HIV-1 に特徴的な遺伝子変異の保有状況を調査した。

##### (3) $p6^{Gag}$ 領域における挿入変異の解析

新型 HIV-1 以外に、 $p6^{Gag}$  の QSRPE 重複挿入変異を持つ HIV 株があるかどうかを検討するため、インテグラーゼのストップコドンに変異を持たない 233 例の  $p6^{Gag}$  遺伝子を解析した

##### (倫理面への配慮)

本研究に用いる HIV-1 感染者血液試料は、医療機関において主治医が感染者本人の同意を得た上で採血し、匿名化された ID 番号を付けて当所に搬入される。また、HIV 確認検査検体は依頼元で採血の際に連結不可能に匿名化されるため、同意を得ることが出来ないため、当所の Web サイト上に研究内容を広報し、社会に周知する。

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得ている（申請番号：0210-09、0703-06、0810-5-1、0810-5-2、1409-05）。

## C. 研究結果

### (1) 感染初期例群における HIV-1 遺伝子解析

7例の感染初期症例から検出された HIV-1 について *gag-pol* 領域を詳細に解析した結果、これらのウイルスは共通してインテグラーゼのストップコドン (TAG) が T→C 置換によりグルタミン (Q, CAG) をコードするコドンに変異しており、さらにその 12 塩基下流に A→T 置換によるストップコドンが生じたため、インテグラーゼの C 末端に 4 アミノ酸 (QNME) が付加されている可能性が示唆された (図 1-2)。*gag* 領域には図 1-1 に示す p6<sup>Gag</sup> の 5 アミノ酸重複挿入以外に特徴的な変異は認められなかった。

また、この 7 例に検出された HIV-1 はすべて *gag, pol, env* の 3 領域ともにサブタイプ B で、CCR5 指向性の R5 ウイルスであった。薬剤耐性に関連する主要アミノ酸変異は検出されなかった。

### (2) 新型変異 HIV-1 の流行実態調査

新型変異 HIV-1 の流行実態を明らかにする目的で、当所にて保存されている HIV-1 陽性検体について当該変異の保有状況を調査した。

2009 年から 2013 年の間に当所に搬入された 559 例についてインテグラーゼ領域を解析した結果、C 末端のストップコドンに変異が認められたものは先の感染初期 7 例を含む 23 例

(4.1%) であった。そのうち 20 例は遺伝的の一つのクラスターを形成する近縁なウイルスであり (図 2)、残りの 3 例はすべて non-B サブタイプの HIV-1 であった。さらに、20 例中 17 例は p6<sup>Gag</sup> に特徴的な 5 アミノ酸 (QSRPE) の重複変異を合わせ持つ新型変異 HIV-1 であった (図 2)。その大部分は 2011-12 年に集中しており (2011 年 7 例、2012 年 9 例、2013 年 1 例)、それ以前の検体にはインテグラーゼ C 末端と p6<sup>Gag</sup> の両方に変異を持つ HIV-1 は検出されなかった。

また、2014 年の当所確認検査陽性検体のうち遺伝子解析が可能であった 90 検体についてインテグラーゼ領域の解析を行なった結果、2 例において C 末端のストップコドンに変異が認められ、いずれも系統樹解析により新型 HIV-1 の遺伝的クラスターに含まれることがわかった。しかしながら、2 例とも p6<sup>Gag</sup> に QSRPE の重複挿入変異は検出されず、近縁ではあるが新型変異 HIV-1 ではないと考えられた。そのうちの 1 例は p6 領域の塩基が混在しており、TA

クローニングを実施したところ、QSRPE のすぐ下流に位置する PTAPP モチーフの重複変異を持つクローンと持たないクローンが混在していることが判明した。

### (3) p6<sup>Gag</sup> 領域における挿入変異の解析

*gag* の p6 遺伝子は多様性に富んだ領域であることが知られている<sup>1)</sup>。そこで、新型 HIV-1 以外の HIV 株における p6<sup>Gag</sup> の QSRPE 重複挿入変異の有無について検討した。

インテグラーゼ C 末端に変異を認めない 233 例の p6<sup>Gag</sup> を解析したところ、53 例 (22.7%) において 3~10 アミノ酸の多様な重複変異が検出された。その大部分は、ウイルスの出芽に関与するとの報告<sup>2,3)</sup>がある PTAPP モチーフ関連の重複挿入変異であり、新型 HIV-1 の変異とまったく同じ 5 アミノ酸の重複は認められなかったが、医療機関由来の検体 6 例において類似の挿入変異が検出された。そのうち 5 例は抗 HIV 薬による治療中あるいは治療中断中で、中でも当該挿入変異に最も近い変異を有する 1 例は多剤耐性変異を獲得しており、耐性獲得に伴う挿入変異の出現が観察されたことより、この変異が薬剤耐性に関わる可能性が懸念された。

## D. 考察

当所が保有する 2009-2014 年の検体 649 例中 17 例 (2.6%) において、インテグラーゼ C 末端と p6<sup>Gag</sup> に特徴的な変異を有する新型 HIV-1 が検出された。その大部分は 2011-2012 年に HIV 感染が判明しているが、抗体検査と核酸増幅検査の結果より感染初期と診断された 7 例以外は、実際の感染時期は不明である。今後、前向きに新型変異 HIV の検索を行うにあたっては、感染初期からの継続したフォローを可能とするシステムの構築が必須と思われる。

今回の解析結果より、p6<sup>Gag</sup> とインテグラーゼにおける 2 ヶ所の特徴的な変異はそれぞれ独立に生じ、近年になって組み換えにより両者を併せ持つ新型変異 HIV-1 が大阪南部に出現したと推測された。

## E. 結語

病期進行に関わる新型 HIV-1 の遺伝子を探るためには、全長ゲノムの解析や病期の経過が異なる新型 HIV-1 感染者間でのウイルス遺伝子の比較など、今後さらなる詳細な解析が必要と考えている。

## F. 発表論文等

(論文) -和文

1. 森 治代、川畑拓也、小島洋子、永井仁美、

田邊雅章、原田一浩、松本治子、溝端孝史、  
田中佐代子. 大阪府における HIV/AIDS の  
現状と対策について. 病原微生物検出情  
報. Vol. 35. 205-206, 2014.

(発表) -国内

1. 森 治代、小島洋子、川畑拓也、駒野 淳：  
急速な病期進行を伴う感染初期症例に検  
出された新規変異 HIV-1 の流行実態調査.  
日本エイズ学会、2014 年、大阪.
2. 川畑拓也、森 治代、小島洋子、他 14 名.  
診療所を窓口とした MSM 向け検査キャンペ  
ーン (2013 年). 日本エイズ学会、2014 年、  
大阪.
3. 小島洋子、川畑拓也、森 治代、古林敬一、  
谷口 恭、井戸田一朗、駒野 淳. HIV 感  
染者における新規 Ae/G リコンビナント  
HBV の解析. 近畿エイズ研究会、2014 年、  
大阪.
4. 川畑拓也、森 治代、小島洋子、他 14 名.  
診療所を窓口とした MSM 向け検査キャンペ  
ーン (2013 年). 日本性感染症学会関西支  
部総会、2014 年、大阪.
5. 椎野禎一郎、服部純子、瀧永博之、他 9 名、  
森 治代、南 留美、健山正男、杉浦 互.  
国内感染者集団の大規模塩基配列解析 5：  
MSM コミュニティへのサブタイプ B 感染の  
動態. 日本エイズ学会、2014 年、大阪.
6. 岡崎玲子、蜂谷敦子、服部純子、瀧永博之、  
渡邊 大、長島真美、貞升健志、近藤真規  
子、南 留美、吉田 繁、森 治代、他 35  
名. 新規 HIV/AIDS 診断症例における薬剤  
耐性 HIV の動向. 日本エイズ学会、2014  
年、大阪.

(発表) -海外

1. Mori, H., Kojima, Y., and Kawahata, T.  
Drug resistance mutations persist in  
HIV-1 proviral DNA despite 12 years of  
successful viral suppression. 20th  
International AIDS Conference. July  
20-25, 2014, Melbourne, Australia.

G. 引用文献

1. Brumme ZL, Chan KJ, Dong WW, Wynhoven B,  
Mo T, Hogg RS, Montaner JS,  
O'Shaughnessy MV, Harrigan PR.:  
Prevalence and clinical implications of  
insertions in the HIV-1 p6Gag N-terminal  
region in drug-naive individuals  
initiating antiretroviral therapy,  
*Antivir Ther.*, 8(2), 91-6, 2013
2. Holguín À, Alvarez A, Soriano V:  
Variability in the P6gag domains of  
HIV-1 involved in viral budding, *AIDS*,  
20(4), 624-625, 2006
3. Martin-Serrano J, Zang T, Bieniasz PD:  
HIV-1 and Ebola virus encode small  
peptide motifs that recruit Tsg101 to  
sites of particle assembly to facilitate  
egress, *Nature Medicine*, 7, 1313-1319,  
2001





## 2. 新型変異 HIV のウイルス学的解析

研究分担者：駒野 淳（名古屋医療センター 統括診療部 臨床検査科）

研究協力者：村上 努（国立感染症研究所 エイズ研究センター）

研究代表者：川畑拓也（大阪府立公衆衛生研究所）

### 研究要旨

大阪府南部で発見された新型変異 HIV が急速な病態進行に関連する可能性が示唆されている。このメカニズムを明らかにするためには、ウイルス学的な性質が遺伝的変異によってどのように影響を受けるかを明らかにする必要がある。これを明らかにするため、ウイルス学的な性質が極めてよく解析されている分子クローン NL4-3 に対し、新型変異 HIV の持つ特徴的な変異を導入し、作出された分子クローンの性質を培養細胞レベルで解析を試みる。今年度は分子クローンの作出を行い、ウイルス複製に関する解析基盤の構築を行った。新型変異 HIV のコレセプター指向性を勘案し、NL4-3 の envelope を R5-tropic に変換した pNL(AD8) を背景にした。導入した変異は新型変異 HIV に共通してみられる *p6<sup>gag/pol</sup>* と *pol/vif* の特徴的な変異で、これらを単独あるいは両方持つ分子クローンを作成した。今後、野生型ウイルスと比較して新型変異がもつウイルス複製の素過程への影響を解明することで、ウイルスの病原性に関する示唆が得られると期待される。

### A. 研究目的

大阪府の南部で局地的に病期進行が著しく早い傾向を認める新型変異を有する HIV 感染者の増加がみられた。中には、ウイルスに対する抗体価が上昇するまでの期間が長いセロネガティブ感染例も含まれていた。臨床的な見地から、新型変異が感染者の病態を進行させる可能性が示唆される。HIV 感染症の病期進行はウイルスと宿主因子が密接に絡み合うが、疫学的に同時多発的に症例群が認められたことからウイルス因子が強く疑われる。しかし、直接的に変異が持つ病態への関与を感染者で解析する事は困難である。

そこで本研究では、新型変異 HIV の特徴的な遺伝的変化を分子クローンに導入して、ウイルス学的な性質がどのように変化するかを検討する。今年度は生物活性を解析するための基盤となる分子クローンのデザインと作出を行った。

### B. 研究方法

ウイルス学的な性質がよく研究されているプロウイルス分子クローンをもとに、新型変異 HIV の持つ特徴的な変異を、プライマーエクステンション法を始めとする遺伝子工学的手法によって導入した。コレセプター指向性を臨床分

離株にあわせるため、R5-tropic の envelope に変化させた NL4-3 を鋳型にした。変異は dideoxy 法による核酸配列解析により確認し、プロウイルスは常法により大腸菌で増幅し精製した。

### C. 研究結果

分子クローン NL4-3 をもとに変異体作成を試みた。まず、コレセプター指向性を臨床分離株にあわせるため、NL4-3 の envelope を R5-tropic の AD8 に変化させた NL(AD8) を作出し、これを鋳型にした(1, 2)。新型変異 HIV のもつ2つの signature 変異を順次遺伝子工学的な操作で導入した。一つ目の変異は Gag の p6 ドメインをコードする領域で、出芽に機能する PTAP モチーフのすぐ上流に位置する 15 ヌクレオチド挿入変異である (p6 変異)。具体的には 5' - CAG AGC AGA CCA GAG -3' の挿入変異で、この結果 Gag の p6 ドメインに 5 アミノ酸 N-QSRPE-C が挿入される。この変異により、Pol の p6 部分にも 5 アミノ酸 N-EQTRA-C が挿入される。2つめの変異は Pol/Vif 領域での T→C と A→T 点変異で、前者の変異により Pol のストップコドン TAG が CAG になるため、本来はないはずの 4 アミノ酸 N-QNME-C が Integrase の C 末端に付加される (IN 変異)。後者の変異

により4アミノ酸の後にストップコドン TAG ができる。後者の変異は Vif の ORF で AAA(K) を AAT(N)に変化させる。以上の2つの変異を単独で持つ NL(AD8) p6 変異株、IN 変異株と、同時に2つ持つ NL(AD8)p6/IN 変異株を作出した。

#### D. 考察

当初の目標である変異体作成は達成できた。本来、遺伝子変異がもたらすウイルス学的性質への影響を調べるためには、*p6<sup>sig</sup>* のみに変異があるが、*p6<sup>pol</sup>*には変化のないもの、その逆などの変異体を作成するのが望ましい。しかし、insertion mutation であるため、これを達成する事は困難であった。一方、*pol/vif*における変異体に関して言えば、片方の変異だけを導入した分子クローンの作出は可能であった。しかし、今回の戦略においては、作出された変異体で何らかの生物学的活性が認められるかを最初に検討して、活性があった場合にさらに細かい変異体を作成する戦略をとった。これにより、効率よく目標を達成することができると考えたためである。

今後は、本研究で作出された3つの変異体を NL(AD8)野生株と比較しながらウイルス各遺伝子の発現効率、ウイルス粒子の産生効率、ウイルスの逆転写～インテグレーション効率、ウイルスの複製効率、A3G turnover rate 等への影響について検討を加えたい。

#### E. 結論

本研究は、新型変異 HIV の病原性を理解するためのウイルス学的基盤を供与するうえで極めて重要な研究として位置づけられる。今後の生物学的な解析が待たれる。

#### F. 発表論文等

(論文) -英文

1. Sakon N, Yamazaki K, Nakata K, Kanbayashi D, Yoda T, Mantani M, Kase T, Takahashi K, Komano J. Impact of Herd Immunity on the Circulatory Dynamism of Norovirus: A 10-year Longitudinal Study of Viral Acute Gastroenteritis. *J Infect Dis*. 2014 Sep 9. pii: jiu496.
2. Kurata T, Kanbayashi D, Kinoshita H, Arai S, Matsui Y, Fukumura K, Matsumoto H, Odaira F, Murata A, Konishi M, Yamamoto K, Nakano R, Ohara T, Otsuru E, Komano J, Kase T, Takahashi K. Late onset of vaccine-associated measles in an adult with severe clinical symptoms: a case report. *Am J Med*. 2014 Apr;127(4):e3-4.
3. Matsui M, Shindo K, Izumi T, Io K, Shinohara M, Komano J, Kobayashi M, Kadowaki N, Harris RS, Takaori-Kondo A. Small molecules that inhibit Vif-induced degradation of APOBEC3G. *Virology*. 2014 Jul 1;11(1):122.
4. Kawabuchi-Kurata T, Misaki T, Suehiro Y, Komano J, Kase T, Takahashi K. Longitudinal study on respiratory viral co-infections in 0- to 2-year-old infants with or without clinical manifestations. *Jpn J Infect Dis*. In press.
5. Kurata T, Kanbayashi D, Nishimura H, Komano J, Kase T, Takahashi K. Increased reports of measles in a low endemic region of Japan during a rubella outbreak in 2013. *Am J Infect Control*. In press.
6. Kurata T, Kanbayashi D, Komano J, Kase T, Takahashi K. Pitfalls of National Surveillance Systems for Vaccine-associated Measles. *Am J Med*. In press.
7. Takeda S, Hisano M, Komano J, Yamamoto H, Sago H, Yamaguchi K. Influenza vaccination during pregnancy and its usefulness to mothers and their young infants (Review). *J Infect Chemother*. In press.

(発表) -国内

1. 武田 哲, 上林大起, 倉田貴子, 吉山裕樹, 駒野 淳. Measles virus as a potential oncolytic virotherapy against B cell lymphomas. 第73回日本癌学会学術総会. 2014年9月25-26日. 横浜.
2. 中田恵子, 山崎謙治, 駒野 淳, 加瀬哲男: 新生児無菌性髄膜炎の原因としてのコクサッキーBウイルスの重要性. 第46回日本小児感染症学会. 2014年10月18-19日. 東京.
3. 倉田貴子, 上林大起, 西村公志, 加瀬哲男, 駒野 淳. 水面下における麻疹の流行レベルの推定. 第73回日本公衆衛生学会総会. 2014年11月5-6日. 宇都宮.
4. 上林大起, 倉田貴子, 駒野 淳. 生物発光を利用した風疹ウイルス検出系の実験室診断への応用~流行要因解明に向けて~. 第73回日本公衆衛生学会総会. 2014年11月5-6日. 宇都宮.

5. 中田恵子, 駒野 淳.  $\beta$  グルコセレブロシダーゼが持つエンテロウイルス 71 感染症の分子標的治療薬としての潜在性. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 2014 年 11 月 10-12 日. 横浜.
6. 上林大起, 倉田貴子, 駒野 淳, 加瀬哲男, 高橋和郎. HI 抗体価で評価されてきた風疹に対する感染防御力は流行ウイルスに対して正しい判断をあたえるのか?. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 2014 年 11 月 10-12 日. 横浜.
7. 左近直美, 駒野 淳, 加瀬哲男. 小児集団胃腸炎におけるノロウイルス感染症の有症期間～ウイルス遺伝子型と年齢に関する解析～. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 2014 年 11 月 10-12 日. 横浜.
8. 倉田貴子, 上林大起, 加瀬哲男, 高橋和郎, 駒野 淳. ヒト胎盤由来細胞における麻疹ウイルスの増殖 kinetics. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 2014 年 11 月 10-12 日. 横浜.
9. 湯浅恵理, 伊藤千紗, 中川 光, 棚橋真規夫, 駒野 淳, 杉浦 互, 永井宏和, 飯田浩充, 宮田泰彦. フローサイトメトリー検査における 5-color 解析法の導入による影響. 第 68 回国立病院総合医学会. 2014 年 11 月 14-15 日. 横浜.
10. 森 治代, 小島洋子, 川畑拓也, 駒野 淳. 急速な病期進行をみた感染初期例群に共通して検出された新規変異 HIV-1 の流行実態. 第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2014 年 12 月 3-5 日. 大阪.
11. 野村 渉, 水口貴章, 大橋南美, Mathieu Metifiot, 藤野真之, Yves Pommier, 駒野 淳, 村上 努, 玉村啓和. HIV-1 遺伝子産物由来のインテグラーゼ阻害活性を持ったステーブルペプチド. 第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2014 年 12 月 3-5 日. 大阪.
12. 中田恵子, 駒野 淳, 加瀬哲男. 環境水サーベイランスによるポリオウイルス探知法の評価 (続報). 第 18 回日本ワクチン学会学術集会. 2014 年 12 月 6-7 日. 福岡.
13. 上林大起, 倉田貴子, 福村和美, 畑中己穂, 田邊雅章, 松本治子, 駒野 淳, 加瀬哲男, 高橋和郎. 麻疹と修飾麻疹について～MR ワクチン 2 回接種の重要性～. 第 18 回日本ワクチン学会学術集会. 2014 年 12 月 6-7 日. 福岡.
14. 加瀬哲男, 倉田貴子, 上林大起, 高橋和郎, 駒野 淳. 麻疹における家族内 2 次発生について. 第 18 回日本ワクチン学会学術集会. 2014 年 12 月 6-7 日. 福岡.
15. 倉田貴子, 上林大起, 加瀬哲男, 高橋和郎, 福村和美, 畑中己穂, 田邊雅章, 松本治子, 五十嵐愛子, 北島博之, 駒野 淳. 大阪府における風疹の流行と先天性風疹症候群の検査診断. 第 18 回日本ワクチン学会学術集会. 2014 年 12 月 6-7 日. 福岡.
16. 上林大起, 倉田貴子, 福村和美, 畑中己穂, 田邊雅章, 松本治子, 駒野 淳, 加瀬哲男, 高橋和郎, 五十嵐愛, 北島博之. 先天性風疹症候群の追跡調査の現状と出生時診断の留意点について. 第 26 回日本臨床微生物学会総会・学術集会. 2015 年 1 月 31 日-2 月 1 日. 東京.
17. 左近直美, 駒野 淳. ノロウイルス感染症の流行と遺伝子型. 第 45 回日本小児消化管機能研究会. 2015 年 2 月 14 日. 埼玉.

#### G. 引用文献

1. Freed EO, Englund G, Martin MA. Role of the basic domain of human immunodeficiency virus type 1 matrix in macrophage infection. *J Virol.* 1995 Jun;69(6):3949-54.
2. Takizawa M, Miyauchi K, Urano E, Kusagawa S, Kitamura K, Naganawa S, Murakami T, Honda M, Yamamoto N, Komano J\*. Regulation of the susceptibility of HIV-1 to a neutralizing antibody KD-247 by nonpeptide mutations distant from its epitope. *AIDS.* 2011 Nov 28;25(18):2209-16.

# プライマー一覧

プライマー デザイン	名前	プライマー配列	塩基数	用途
p6 insertion	p6-insert-F	agagcagaccagagcagagcagaccagagccaacagccc cacc	43	変異導入 (p6-insertion)
	p6-insert-R	gggtgggctgttggtctggtctgctctgctctggtctgctct'	43	変異導入 (p6-insertion)
	TM-GagF	gcagccatgcaaagttaaagag	24	Overlap extension
	NL4-3-1698F	tctaagagccgagcaagctt	20	Sequence
	p6-over2.2kb-R	gtgggcacccttcattcttg	20	overlap extension
	p6-3137seqR	atgctgccctatttctaagtca	22	sequence
IN- mutagenesis	IN-4-subF	gacaggatgaggatcagaacatggaatagattagtaaaca'	41	変異導入 (4力所置換)
	IN-4-subR	tgttttactaatctattccatgttctgatcctcctcctgctc	41	変異導入 (4力所置換)
	pNL4-3-6250rev	tccaaggagcatggtgccccatttcc	22	overlap extension
	NL4-3-1698F	tctaagagccgagcaagctt	20	overlap extension
	IN-3629seqF	AAGAATGAAGGGTGCCCAACA	20	sequence
	IN-4661seqF	TGGCATTCCCTACAATCCCC	20	sequence
Sequence	NL4-3-2096F	AGATCTGGCCTTCCCACAAG	20	sequence
	NL4-3-4730R	AGCCTGATCTCTTACCTGTCCT	22	sequence
	NL4-3-5278F	GGAGAAAGAGACTGGCATTGGG	23	sequence
	NL-2114-F	AGGGAAGGCCAGGGAATTTT	20	sequence
	NL-3297-F	GTGCTGCCAGAAAAGCACAG	20	sequence
	NL-4942-F	CAGTTTGGAAAGGACCAGCA	20	sequence
	NL-3738-F	CACCTGGATTCTGAGTGGG	20	sequence