

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19790401
 研究課題名 (和文) バイオセーフティレベル (BSL) -2 施設における HIV 薬剤感受性検査法の開発
 研究課題名 (英文) Development of phenotypic drug susceptibility assay for HIV-1 in biosafety level (BSL)-2 facility
 研究代表者
 藤野真之 (Fujino Masayuki)
 国立感染症研究所・エイズ研究センター・研究員
 研究者番号：50392329

研究成果の概要：

HIV 薬剤感受性検査は遺伝子検査とは異なり耐性の程度を定量化できることや、既知の耐性変異以外による耐性の検出ができることから、迅速かつ簡便な検査法の確立が望まれている。しかし、日本では、HIV-1 の取扱が BSL-3 に限定される事から、BSL-2 施設しか持ち合わせていない機関においては、HIV-1 の薬剤感受性検査を行う事は非常に難しい。この研究では、薬剤耐性 HIV-1 の薬剤感受性検査を BSL-2 施設にて簡便に効率良く行う事が出来る系の構築を目的とした。現在主に遺伝子導入実験に用いられている HIV-1 vector は BSL-2 での使用が可能である。本研究では HIV-1 vector の pol 領域に HIV-1 感染者由来の pol を In-Fusion クローニングシステムにより簡便に組み換える事が出来る様に改変した。また HIV-1 vector 感染の指標として Luciferase 遺伝子を組み込んだ。作製した HIV-1 vector を感染させた MT-2 細胞は、感染量依存的な Luciferase 活性を示し、既存の抗 HIV 薬剤に対して薬剤濃度依存的な Luciferase 活性低下を示した。プロテアーゼ阻害剤に耐性である 84V/90M の変異ウイルスにおいては、SQV では 2.0 倍、NFV に対しては 4.3 倍の耐性を示した。核酸系逆転写酵素阻害剤耐性の 41L/67L/70R/215Y 変異ウイルスにおいては AZT に対して 265 倍、184V 変異ウイルスにおいては 3TC に対して 100 倍以上の耐性を示した。非核酸系逆転写酵素阻害剤耐性の 103N 変異ウイルスにおいては NVP に対して 10 倍以上、190S 変異ウイルスにおいては EFV に対して 92 倍の耐性を示す事が確認された。これらの結果から、HIV-1 vector を用いた本薬剤感受性検査方法は、BSL-2 における HIV-1 薬剤感受性検査に利用可能であると考えられた。HIV-1 感染者血漿由来の薬剤耐性 HIV-1 から pol 領域を RT-PCR にて増幅したのち、In-Fusion クローニングシステムにて HIV-1 vector へのクローニングを行い、野生型の HIV-1 vector との薬剤感受性の比較を行った。同時に感染者血漿由来の HIV-1 pol 領域の遺伝子配列に対して、HIV-1 の遺伝子検査を行う際に最もよく用いられている Stanford 大学の HIV-1 genotyping システムを用い、薬剤耐性の推定を行った。その結果、本 HIV 薬剤感受性検査法によって得られた感染者由来の HIV-1 の薬剤耐性度は、Stanford 大学の genotyping システムから推定された結果との相関が見られた。これらの結果から本検査法は BSL-2 における簡便な HIV 薬剤感受性検査として有用であると考えられた。効率よく運用できる様に今後システムに更なる改良を加えていきたい。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,600,000	0	1,600,000
総計	3,300,000	0	3,300,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：臨床検査医学

1. 研究開始当初の背景

1981年に human immunodeficiency virus (HIV) 感染症が報告されてから、これまでに全世界で約 6500 万人が感染し、うち 2500 万人が既に死亡している。2005 年の 1 年間の推定感染者は 410 万人であり、280 万人が 1 年間で死亡している。日本においても 2005 年の新規感染者は 1000 人を越えて過去最高となり、累積感染者も 1 万人を突破した。その増加率は加速的であり、まだ診断されていない潜伏感染者がこの数倍は存在するであろうことから、感染爆発といっても良い状況である。HIV 感染症は宿主の CD4 細胞数を減少させ、進行性の免疫不全を引き起こす。日本では現在 18 種類の抗 HIV 薬が承認されており、多剤併用による強力な抗ウイルス療法：highly active anti-retroviral therapy (HAART) は、HIV の増殖を抑制し、免疫不全の進行をくい止め、予後を劇的に改善させた。しかし、抗 HIV 薬は最低 1 日 1 回忘れずに服薬する事が必須であり、不適切な薬剤投与による血中薬剤濃度の低下は、薬剤耐性 HIV の出現を招く。また、抗 HIV 薬の広範囲な使用に伴い、新規感染者における薬剤耐性 HIV の伝播が危惧されている。過去欧米各国で行われた調査では、その頻度は数～26%と報告されている。我が国では 2004 年より全国規模の調査が開始されており、2003-2004 年の頻度は 5.0%と報告されている

2. 研究の目的

HIV-1 感染症の治療薬剤を選択する上で、薬剤感受性検査は必須の検査である。薬剤感受性検査は遺伝子検査とは異なり、耐性の程度を定量化できることや、既知の耐性変異以外による耐性の検出ができる等の多くの利点を持つことから、迅速かつ簡便な検査法の確立が望まれている。しかし、時間、費用、労力などの問題から、薬剤感受性検査は現在のところ、臨床研究に位置づけられ、臨床検査としては行われていない。特にこの検査は、BSL-3 の施設が必要であり、BSL-3 を持たない多くの施設での実施を困難なものにしている。従って、この研究では、BSL-2 施設においても、in vitro の細胞培養系を用いた HIV-1 の薬剤感受性検査を簡便に行える系を確立する事を目的とする。本目的を達成するために、下記の 2 つの点に重点をおいて検査法の確立を行う。

(1) HIV-1 感染者由来の HIV-1 遺伝子の HIV-1 vector への簡便な遺伝子組み換え技術の構築

(2) 必要最低限の HIV-1 遺伝子を用いた安全な HIV-1 vector による薬剤感受性検査システムの構築

3. 研究の方法

(1). BSL-2 施設で利用可能な HIV-1 vector の薬剤感受性検査用途への改良

現在遺伝子導入に用いられている BSL-2 にて使用可能な HIV-1 vector の作製に必要な 3 つの plasmid、I: packaging plasmid、II: envelope & rev expression plasmid、III: self-inactivating (SIN) vector plasmid、を薬剤感受性検査へ適した遺伝子配列に改変する。

本研究では、packaging plasmid の pol 領域に HIV-1 感染者由来の薬剤耐性 HIV-1 の pol を In-Fusion クローニングシステムにより簡便に組み換える事が出来るようするため、組み換えた後のフレームの一致を考慮しながら、pol 領域にユニークな制限酵素配列を両端に持たせた致死遺伝子 ccdB を組み込む。また、近年 gag 領域がプロテアーゼ阻害剤に対する薬剤耐性に関与している事が指摘させている事から、gag および pol 領域の全てを In-Fusion により簡便に組み換えることができる packaging plasmid も構築する。次いで、SIN vector plasmid に最も発現効率の高い改良型 Luciferase 遺伝子 (Luc2) と改良型 YFP である venus を組み込み、検出感度の向上を試みる。

(2). 野生型の HIV-1 から増幅した pol および gag/pol 領域を組み込んだ packaging plasmid とその他 2 種類の作製した plasmid を用いて HIV-1 vector を作製し、既存の抗 HIV-1 薬剤に対する感受性について検討を行う。

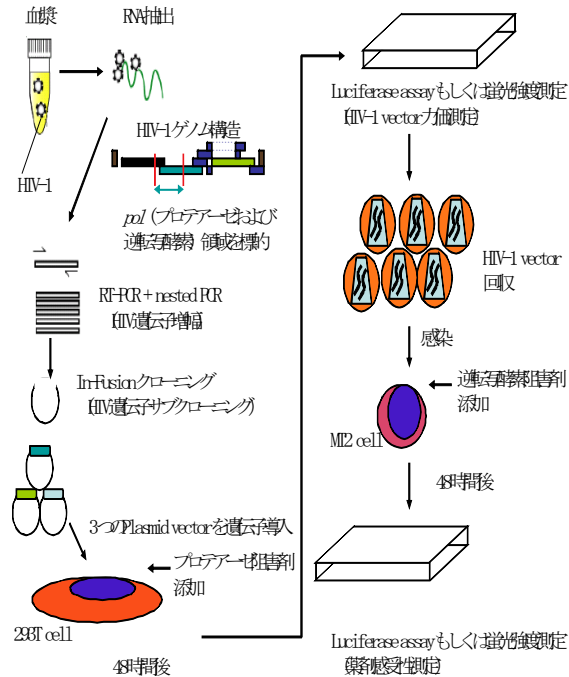
(3). 既存の薬剤に耐性を示す事が知られている遺伝子変異を持つ vector を作製し、既存の抗 HIV-1 薬剤に対する感受性について野生型の HIV-1 との比較を行う。

(4). HIV-1 感染者の血漿由来の薬剤耐性 HIV-1 から pol および gag/pol 領域を RT-PCR にて増幅したのち、In-Fusion クローニング

システムにて HIV-1 vector への効率的なクローニング条件を検討する。

(5). HIV-1 感染者血漿由来の HIV-1 遺伝子をクローニングした HIV-1 vector を用いて感受性検査を行い、遺伝子検査によって得られた耐性度との相関を比較検討する。

(6). 一般的な微生物学検査を行う研究室においても、効率よく検査を行うことができるように、plasmid の遺伝子導入、ウイルスの感染、ウイルスを感染させる細胞数、細胞の種類等の詳細な条件を検討する。



4. 研究成果

(1)-[I]: packaging plasmid 改変
packaging plasmid の pol 領域に HIV-1 感染者由来の薬剤耐性 HIV-1 の pol を In-Fusion クローニングシステムにより組み換えを可能にし、かつ HIV-1 感染者由来の遺伝子を持たないクローンの増殖を阻止するため、pol 領域に組み換え後にフレームが一致する様設計されたユニークな制限酵素配列を両端に持つ致死遺伝子 ccdB を組み込んだ。

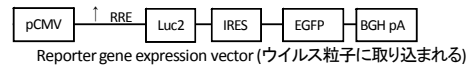
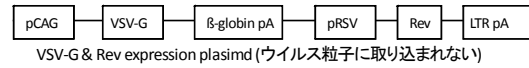
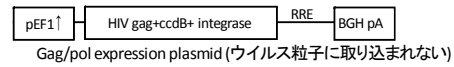
(1)-[II]: envelope & rev expression plasmid

発現効率の良い CAG promoter の下流に envelope および beta-globin polyA signal を配置した。同じ plasmid 上に rev を組み込む事により、envelope および rev 発現 plasmid を作製した。

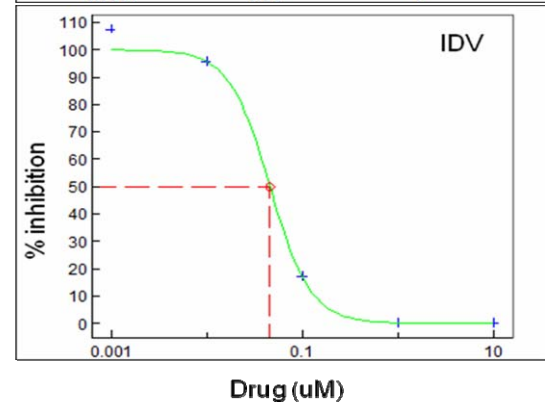
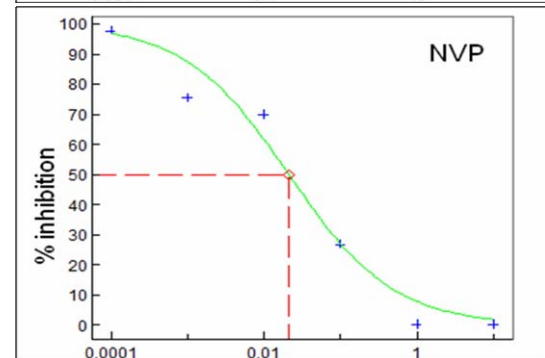
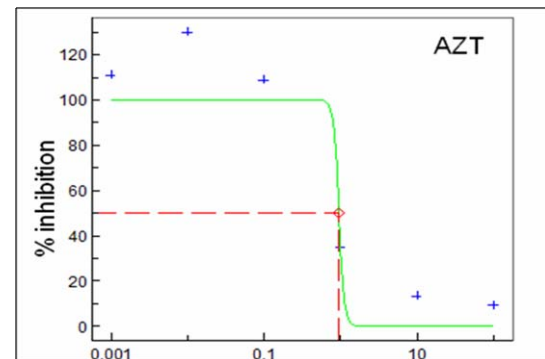
(1)-[III]: self-inactivating (SIN) vector plasmid 改変

Luciferase による高感度な薬剤感受性検出系だけでなく、検出コスト削減を目的とし、

蛍光蛋白 venus による検出も可能にするため、SIN vector plasmid に最も発現効率の高い改良型 Luciferase 遺伝子 (Luc2) と改良型 YFP である venus を組み込みこんだ。



(3). 野生型の HIV-1 から増幅した pol および gag/pol 領域を組み込んだ packaging plasmid とその他 2 種類の作製した plasmid を用いて HIV-1 vector を作製し、既存の抗 HIV-1 薬剤に対する感受性について検討を行った。HIV-1 vector は既存の抗 HIV 薬に対して濃度依存的な Luciferase 活性 (感染効率) の低下を示した。



IC50(uM)		
Drug	AVE	SD
AZT	0.818	1.269
ddC	5.925	2.075
ddl	5.255	4.263
d4T	12.547	14.168
3TC	5.704	9.828
ABC	1.739	2.237
TDF	6.941	5.648
NVP	0.121	0.278
EFV	0.058	0.135
IDV	0.033	0.033
SQV	0.031	0.022
NFV	0.031	0.026
APV	0.006	0.005
LPV	0.093	0.023

(4). 既存の薬剤に耐性を示す事が知られている遺伝子変異を持つ vector を作製し、既存の抗 HIV-1 薬剤に対する感受性について野生型の HIV-1 との比較を行った。これからの結果は、既存の薬剤感受性検査から得られた結果報告とよく一致しており、本検査方法は薬剤耐性ウイルスを用いた薬剤感受性検査に用いることが可能だと考えられた。

Mutations	IC50(uM)		
	Drug	AVE	SD
41L/67L/70R/215Y	AZT	59.311	35.087
184V	3TC	>100	-
103N	NVP	>10	-
190S	EFV	0.970	0.747
84V/90M	SQV	0.039	0.030
84V/90M	NFV	0.089	0.033

Mutations	Fold Resistance		
	Drug	AVE	SD
41L/67L/70R/215Y	AZT	264.9	99.4
184V	3TC	>100	-
103N	NVP	>10	-
190S	EFV	91.5	73.0
84V/90M	SQV	2.0	1.4
84V/90M	NFV	4.3	3.3

(5). 遺伝子検査で薬剤耐性を示す臨床検体から遺伝子を増幅し、In-Fusionにて gag-pol 発現 vector との組み換えを行った後、抗 HIV-1 薬剤に対する感受性について野生型の HIV-1 との比較を行った。感染者由来の HIV-1 の薬剤耐性度は、Stanford 大学の genotyping システムから推定された結果との相関が見

られた。これらの結果から本検査法は臨床検体を用いた BSL-2 における簡便な HIV 薬剤感受性検査として有用であると考えられた。

NRTI Resistance Mutations: M41L, T69I, T215Y

NNRTI Resistance Mutations: K238S

Interpretation of genotypic assay

NRTI resistance: AZT, ddC, ddl, d4T, ABC, TDF, High-level; 3TC, Intermediate.

NNRTI resistance: NVP, Intermediate; EFV Low-level.

Results of phenotypic assay (Fold resistance)

AZT >50, ddC 2.7, ddl 3.1, d4T 3.5, 3TC 7.4, ABC 7.6, TDF 5.8, NVP 2.4, EFV 1.0

上述の結果から本検査法は BSL-2 における簡便な HIV 薬剤感受性検査として有用であると考えられた。本システムを用いることにより、日本国内においても BSL-3 施設を利用することなく、安価かつ簡便な薬剤感受性検査を行うことが可能になる。現在薬剤感受性検査は主として国外の検査会社に外注して行われているが、本システムを使用することにより海外企業に依存することなく、検査を行うことが可能である。今後、更に効率よく運用できる様にシステムを改良する事により、地方衛生研究所または臨床検査会社での運用が可能であると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

Suzuki H, Fujino M, Matsuda M, Yan H, Iwatani Y, Sugiura W.

Effects of Protease and reverse transcriptase inhibitor-resistance mutations on integrase polymorphism in multidrug resistance cases.

Antivir Ther. 12(1): S4, 2007.

Shibata J, Ren F, Nishizawa M, Fujino M, Iwatani Y, Matsuda M, Miura H, Tanaka, Sugiura W. Interference between Gag non-cleavage site mutation P453L and HIV-1 protease non-drug resistance mutation E35D.

Antivir Ther 12(1): S143, 2007

Kassu A, Fujino M, Matsuda M, Nishizawa M,

Ota F, Sugiura W
Molecular Epidemiology of HIV-1 in
Treatment-Naive Patients in North
Ethiopia
AIDS Res Hum Retroviruses. 2007
Apr;23(4):564-8.

Kassu A, Fujino M, Nishizawa M, Mengistu
G, Diro E, Ayele B, Ketema D, Moges F, Mulu
F, Yismaw G, Huruy K, Abate E, Getachew A,
Tiruneh M, Wondmikum Y, Sugiura W, Ota F
Levels of serum HIV-1 RNA viral load in
tuberculosis patients with or without
intestinal parasites during treatment of
tuberculosis in Gondar, Ethiopia
Ethiop. J. Health Biomed Sci. 2008
Sep;1(1):3-10.

Hara Y, Kusumi Y, Mitsumata M, Li XK,
Fujino M.
Lysophosphatidylcholine upregulates
LOX-1, chemokine receptors, and
activation-related transcription factors
in human T-cell line Jurkat.
J Thromb Thrombolysis. 2008
Oct;26(2):113-8.

〔学会発表〕(計 9 件)

柴田潤子、任鳳蓉、西澤雅子、藤野真之、松
田昌和、岩谷靖雅、杉浦互、田中博
抗 HIV 薬剤投与下における Protease と Gag
の相互干渉と共進化に関する解析
第 55 回日本ウイルス学会学術集会 2007 年
10 月 21-23 日(札幌)

吉田いづみ、西澤雅子、藤野真之、仲宗根正、
岩谷靖雅、長谷川直紀、柴田潤子、杉浦互、
任鳳蓉、田中博
HIV-1 の env 遺伝子における多様性進化
第 55 回日本ウイルス学会学術集会 2007 年
10 月 21-23 日(札幌)

藤野真之、三浦秀佳、西澤雅子、松田昌和、
鈴木寿子、杉浦互
プロテアーゼ阻害剤耐性 HIV-1 株に対するダ
ルナピルの有効性についての解析
第 21 回 日本エイズ学会学術集会・総会 2007
年 11 月 28-30 日(広島)

鈴木寿子、巖馬華、松田昌和、藤野真之、西
澤雅子、岩谷靖雅、杉浦互
多剤併用療法がインテグラーゼの多様性に及
ぼす影響について
第 21 回 日本エイズ学会学術集会・総会 2007
年 11 月 28-30 日(広島)

柴田潤子、任鳳蓉、西澤雅子、藤野真之、松

田昌和、岩谷靖雅、杉浦互、田中博
抗 HIV 薬剤投与下における Protease と Gag
の共進化に関する解析
第 21 回 日本エイズ学会学術集会・総会 2007
年 11 月 28-30 日(広島)

吉田いづみ、西澤雅子、藤野真之、仲宗根正、
岩谷靖雅、長谷川直紀、柴田潤子、杉浦互、
任鳳蓉、田中博
HIV-1 env 遺伝子の多様性進化
第 21 回 日本エイズ学会学術集会・総会 2007
年 11 月 28-30 日(広島)

杉浦互、瀧永博之、吉田繁、千葉仁志、小池
隆夫、伊藤俊広、原孝、佐藤武幸、石ヶ坪良
明、上田敦久、近藤真規子、今井光信、貞升
健志、長島真美、福武勝幸、山元泰之、田中
理恵、加藤信吾、宮崎菜穂子、岩本愛吉、藤
野真之、仲宗根正、巽正志、椎野禎一郎、岡
慎一、林田庸総、服部純子、伊部史朗、藤崎
誠一郎、金田次弘、浜口元洋、上田幹夫、正
兼亜季、大家正義、下条文武、田邊嘉也、渡
辺香奈子、白阪琢磨、桑原健、森治代、小島
洋子、中桐逸博、高田昇、木村昭郎、南留美、
山本政弘、松下修三、健山正男、藤田次郎
2003-2006 年の新規 HIV-1 感染者における薬
剤耐性頻度の動向
第 21 回 日本エイズ学会学術集会・総会 2007
年 11 月 28-30 日(広島)

吉田繁、藤崎誠一郎、服部純子、伊部史朗、
藤野真之、松田昌和、和山行正、岡田清美、
藤崎彩恵子、巽正志、金田次弘、杉浦互
HIV 薬剤耐性検査標準化のための検討
第 55 回 日本臨床検査医学会学術集会 2008
年 11 月 27-30 日(名古屋)

杉浦互、瀧永博之、吉田繁、千葉仁志、小池
隆夫、伊藤俊広、原孝、佐藤武幸、石ヶ坪良
明、上田敦久、近藤真規子、今井光信、貞升
健志、長島真美、福武勝幸、山元泰之、田中
理恵、加藤信吾、宮崎菜穂子、藤井毅、岩本
愛吉、藤野真之、仲宗根正、巽正志、椎野禎
一郎、岡慎一、林田庸総、服部純子、伊部史
朗、藤崎誠一郎、金田次弘、浜口元洋、上田
幹夫、大家正義、田邊嘉也、渡辺香奈子、渡
邊大、白阪琢磨、桑原健、森治代、小島洋子、
高田昇、木村昭郎、南留美、山本政弘、松下
修三、健山正男、藤田次郎
2003-2007 年の新規 HIV-1 感染者における薬
剤耐性頻度の動向
第 22 回 日本エイズ学会学術集会・総会 2008
年 11 月 26-28 日(大阪)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤野真之

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者