

(3) HIV-1 薬剤耐性検査の感度改善

浅黄 司¹⁾²⁾ 伊部 史朗⁴⁾ 金田 次弘⁴⁾
 鈴木 博義¹⁾ 手塚 文明²⁾ 西村 秀一²⁾
 佐藤 功³⁾ 山崎 孝文¹⁾

IMPROVEMENT OF SENSITIVITY IN HIV-1 GENOTYPE DRUG-RESISTANCE ASSAY

Tsukasa ASAGI¹⁾²⁾, Shiro IBE⁴⁾, Tsuguhiro KANEDA⁴⁾,
 Hiroyoshi SUZUKI¹⁾, Fumiaki TEZUKA²⁾, Syuichi NISHIMURA²⁾,
 Isao SATO³⁾ and Takafumi YAMAZAKI¹⁾

われわれは、「平成9年度厚生省科学研究事業 HIV 薬剤耐性検査に関する講習会資料」¹⁾に準じた HIV-1 薬剤耐性遺伝子検査（以後、従来法と記載）を実施してきた。その過程で、解析対象である HIV-1 のプロテアーゼ遺伝子や逆転写酵素遺伝子が増幅されない症例が毎年増加し、検査成功率が著しく低下する経験をした²⁾。そこで、より安定した HIV-1 遺伝子の増幅法の確立を目指し、HIV-1 薬剤耐性遺伝子検査にタッチダウン PCR 法の導入を検討した。その結果、従来法では遺伝子増幅ができなかった検体においても、高い遺伝子増幅能を示す RT-nested double touchdown PCR 法（以後 NWT D 法）を見出すことに成功した³⁾。2001年の55検体に対し、この NWT D 法を用いた HIV-1 薬剤耐性遺伝子検査を実施したところ、検査成功率は92.7% (51/55) と飛躍的に改善したが、3症例4検体 (7.3%) においてはプロテアーゼ遺伝子の増幅が不可能であった。そこで、HIV-1 薬剤耐性遺伝子検査成功率のさらなる向上を目的とし、これらの検体について遺伝子増幅が不可能であった原因を探り、その原因を克服するための検討を行った。

材料および方法

当院 HIV/AIDS 診療部門に受診した患者から、薬剤耐性遺伝子検査を目的とし、インフォームドコンセン

トを得た上で採取された EDTA 加静脈血液より、血漿中 HIV-1 RNA を抽出・精製した。精製 RNA 10 μ l を用いて、RT-nested PCR を実施した。プロテアーゼ遺伝子の増幅には従来法のプライマーに加え、gag 遺伝子領域 3' 末端側（コドン425-500）からプロテアーゼ遺伝子（コドン1-99）を含む領域を増幅する為の NNH プライマーを用い、NWT D 法で増幅反応を行った。得られた遺伝子増幅産物はアガロースゲル電気泳動で分離し、ゲルから精製した後、ダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定した。

結果および考察

プロテアーゼ遺伝子増幅不能原因の検討：従来法のプライマーを用いた NWT D 法でプロテアーゼ遺伝子の増幅が不可能であった3症例 PN99, PN107, PN109の検体を用い、NNH プライマーを用いた NWT D 法で同遺伝子の増幅を試みた。その結果、3検体ともその増幅に成功した。次に、従来法のプライマーを用いた NWT D 法でプロテアーゼ遺伝子増幅が不可能であった原因として、プライマー結合部位の変異の存在が考えられた。そこで、この増幅産物の塩基配列を決定し、従来法のプライマーの結合部位を解析した。その結果、PN99では、DRPR03プライマー結合部位の3'末端側から9, 10, 11, 13番目の塩基の変異に加え、6番目の塩基に21塩基の挿

国立仙台病院 Sendai National Hospital ¹⁾臨床検査科 ²⁾臨床研究部 ³⁾内科
 国立名古屋病院 Nagoya National Hospital ⁴⁾臨床研究センター

Address for reprints: Tsukasa Asagi, Department of Clinical Laboratory, Sendai National Hospital, 2-8-8, Miyagino, Miyagino-ku, Sendai, Miyagi 983-8520 JAPAN

Received March 25, 2003

Accepted September 19, 2003

入変異が認められ (図 1A), この挿入変異が PCR の障害となったと判断した. PN107では, DRPR01プライマー結合部位に変異は認められなかったが, DRPR03プライマー結合部位の 3' 末端側から 4, 9, 12, 13 番目の塩基に変異を認めた (図 1B). これらの変異が PCR の障害となった可能性はある. そして, PN109では, DRPR01プライマー結合部位の 3' 末端の塩基に変異が認められ, この変異が PCR の障害となったと判断した (図 1C). また, 3 検体とも DRPR02プライマーと DRP04プライマーの結合部位には変異は認められなかった.

増幅産物の塩基配列の相同性の検討: この検討には, 従来法のプライマーを用いた NWTD 法により塩基配列が決定されている 5 検体を用いた. そのうち, PN117では, プロテアーゼ遺伝子内に 5 個所と逆転写酵素遺伝子内に 9 個所の薬剤耐性変異を認め, PN122, PN123では, プロテアーゼ遺伝子内に 1 個所の薬剤耐性遺伝子変異を認めた. PN119, PN125では, 薬剤耐性変異は認められなかった. これらの 5 検体について, NNH プライマーを用いた NWTD 法, および, Virtual Phenotype™ 法 (Virco) を用いて遺伝子増幅を行ない, 3 つの方法により得られた増幅産物の塩基配列の相同性を比較した. その結果, 従来法のプライマーを用いた NWTD 法によって得られた塩基配列と NNH プライマーを用いた NWTD 法によって得られた塩基配列との一致率は 98.2%, 従来法のプライマーを用いた NWTD 法によって得られた塩基配列と Virtual Phenotype™ 法によって得られた塩基配列との一致率は 97.7%, NNH プライマーを用いた NWTD 法によって得られた塩基配列と Virtual Phenotype™ 法によって得られた塩基配列との一致率は 97.2% であり, 互いになぞかな塩基配列の違いが認められ, その一部はコードするアミノ酸も異なっていた. しかしながら, 従来法のプライマーを用いた NWTD 法により, 検体 PN117, PN122, PN123 に認められたすべての薬剤耐性変異は, NNH プライマーを用いた NWTD 法, および, Virtual

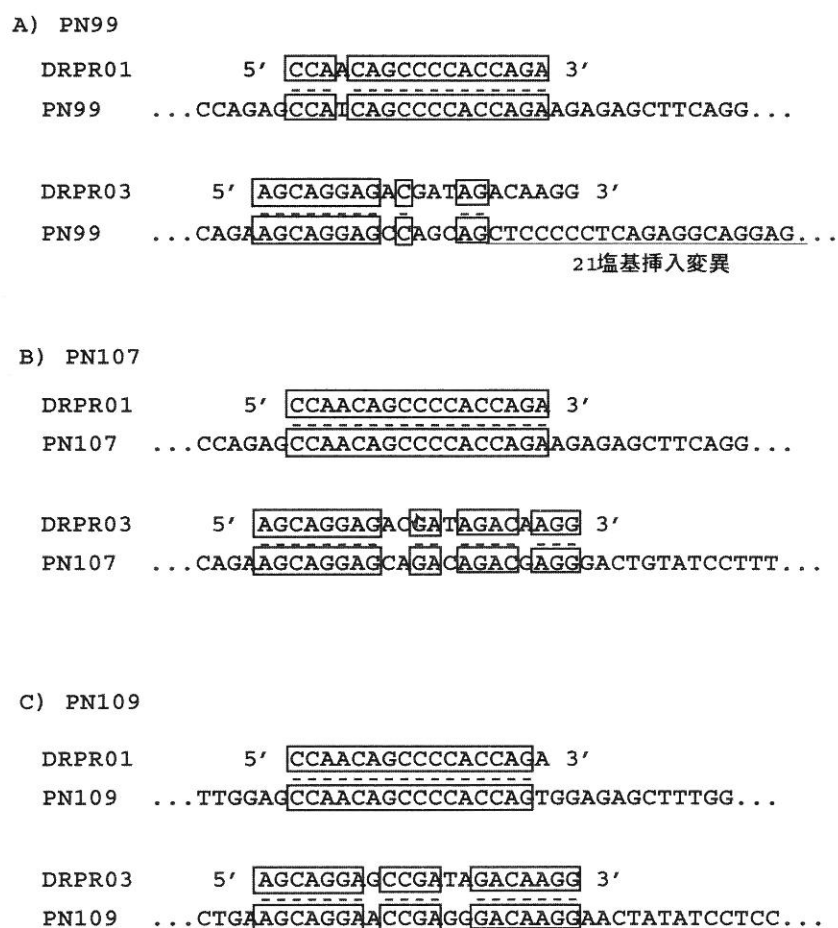


図 1 従来法のプライマー結合部位に検出された変異

Phenotype™ 法によっても認められた. また, 従来法のプライマーを用いた NWTD 法により, 薬剤耐性変異が認められなかった検体 PN119, PN125においては, NNH プライマーを用いた NWTD 法, および, Virtual Phenotype™ 法によっても薬剤耐性変異は認められなかった. これらの結果から, 検討した 3 つの異なる遺伝子増幅法から得られる HIV-1 薬剤耐性検査結果は同等であると推察した.

これらの結果から, 従来法のプライマーを用いた NWTD 法によって遺伝子増幅が困難な場合は, NNH プライマーを用いて遺伝子増幅を実施することによりさらに HIV-1 薬剤耐性遺伝子検査の成功率が向上することが期待される. また, この方法で得られる検査結果は, 従来法のプライマーを用いた NWTD 法や Virtual Phenotype™ 法で得られる結果と同等であると考えられた.

文 献

- 1) 平成 9 年度厚生科学研究エイズ対策研究事業, 抗ウ

ウイルス薬剤耐性検査実習資料. 1997

- 2) 浅黄 司：当院における HIV-1 薬剤耐性検査の現状と症例. 東北ブロック, エイズ/HIV感染症, 臨床カンファランス, 平成12年度報告書, 37-45, 2001
- 3) 浅黄 司, 伊部史朗, 金田次弘ほか：HIV-1 薬剤耐性検査の問題点とその克服. 医療 56 : 734-735,

2002

- 4) Don RH, Cox PT, Wainright BJ et al : Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. Nucleic Acids Res 19 : 4008, 1991
(平成15年 3 月25日受付)
(平成15年 9 月19日受理)