

(5) HIV-1 DNA量のマーカーとしての意義 —PNA-ISH法との比較—

和田かおる¹⁾ 永井裕美¹⁾²⁾ 萩原智子¹⁾
内海 眞¹⁾ 金田次弘¹⁾

CLINICAL SIGNIFICANCE OF HIV-1 DNA QUANTIFICATION
: COMPARISON WITH PNA-ISH METHOD

Kaoru WADA¹⁾, Hiromi NAGAI¹⁾²⁾, Tomoko HAGIWARA¹⁾,
Makoto UTSUMI¹⁾ and Tsuguhiro KANEDA¹⁾

逆転写酵素阻害剤とプロテアーゼ阻害剤を用いた多剤併用療法, highly active antiretroviral therapy (HAART) により強力にウイルス複製を抑制することができるようになり, 現在ではHAARTがHIV-1感染症/エイズ治療法の軸となっている。

HIVは標的細胞に感染後, 自己の有する逆転写酵素を用いてHIV DNAを合成し, インテグレースによって標的細胞の染色体DNA内に組み込まれる。これをHIVプロウイルスと呼ぶ。HIVプロウイルスは免疫学的刺激等により活性化され, 宿主細胞の転写機構を利用しウイルスを複製する。したがって, 薬剤の性質上, HAARTでは標的細胞内に組み込まれたHIVプロウイルスを除去することはできない。それゆえ, リザーバーと呼ばれるHIVプロウイルスを有する細胞が存在し続け¹⁾, 血中ウイルス量が検出限界以下に抑えられている患者においても, 治療を中断した場合HIVの転写が再活性化し, 再びウイルスの増殖が起きる²⁾。

そこで, 血中ウイルス量が検出限界以下に抑えられた状況下のリザーバー量を把握することが重要となる。しかし, 血中ウイルス量を検出する現行の治療モニタリングでは, HIVプロウイルスを検出することはできない。今回われわれは, HIV DNA量に着目し, それが治療奏効の指針, マーカーになりえるかの検討を行った。

対象および方法

HAART施行患者28例, 未治療患者10例の末梢血CD4陽性T細胞を測定対象にした。定量PCRとも呼ばれるリアルタイムPCRの原理をFig. 1に示した。PCRに用いるプライマー, プロブセットをHIV-1ゲノムのgag領域に設定した。最低検出感度は1,000コピー/10⁶細胞であった。また, HIV-1陽性率をFig. 2に原理を示すpeptide nucleic acid-probed in situ hybridization (PNA-ISH)法³⁾にて決定し, リアルタイムPCRの結果と比較した。

結 果

リアルタイムPCR法によるHIV-1 DNAの定量:
HAART施行群で血中ウイルス量(VL)が50コピー/ml以下の患者においては, 16例中11例が検出限界以下であり, 5例のみHIV-1 DNAが検出された(31.3%)。検出可能であった5例のDNA量は1.0-4.8コピー/10²細胞(平均3.3コピー/10²細胞)であった(Table 1)。VL>50コピー/mlの患者においては, 12例中10例(83.3%)にHIV-1 DNAが検出され, そのDNA量は1.6-5.6コピー/10²細胞(平均3.5コピー/10²細胞)であった(Table 1)。未治療群においては, 10例すべてHIV-1 DNAが検出され, そのDNA量は0.8-39.6コピー/10²細胞(平均9.3コピー/10²細胞)

¹⁾ 国立名古屋病院 National Nagoya Hospital 臨床研究センター

²⁾ 名古屋大学医学部 Nagoya University School of Medicine ウイルス感染研究部門

Address for reprints: Kaoru Wada, Clinical Research Center, Nagoya National Hospital, 4-1-1 Sannomaru, Naka-ku, Nagoya 460-0001 JAPAN

Received March 25, 2003

Accepted September 19, 2003

であった (Table 2).

PNA-ISH 法による HIV-1 陽性細胞率の決定: HAART 施行群で VL<50コピー/ml の患者では, その陽性率は1.0-3.3% (平均2.1%) であり (Table 1), VL>50コピー/ml の患者においては, 0.5-3.3% (平均1.9%) であった (Table 1). 未治療群においては, 0.6-3.4% (平均1.6%) であった (Table 2). HIV-1 陽性細胞率は, 3 群においてほぼ同じ陽性率を示した.

リアルタイム PCR 法と PNA-ISH 法による比較: HAART 施行群で VL<50コピー/ml の患者では, PNA-ISH 法で HIV-1 陽性細胞が検出されているにも関わらず, リアルタイム PCR 法において検出限界以下の症例が多く存在した. VL>50コピー/ml の患者の結果は, PNA-ISH 法の結果とほぼ同様であり, 相関する結果が得られた. 一方, 未治療群においては, PNA-ISH 法と比較すると同様の値を示す症例と 2-20倍高い値を示す症例が存在した. また, 未治療群において, CD4 陽性細胞数が低いほど, リアルタイム PCR で高い HIV-1 DNA 量を示す傾向が見られた.

考 察

HIV-1 DNA 量は PNA-ISH 法においては, HAART 施行群と未治療群間で有意の陽性率の違いはなかったが, リアルタイム PCR 法においては, HAART 群と比較して未治療群の HIV-1 DNA 量は高い値を示す結果となった.

2 種類の 方法による 結果の 違いは, リアルタイム PCR 法においては unintegrated および integrated HIV-1 DNA を含むトータル DNA を検出しているためであると推測される.

Table 1 Copy numbers of HIV-1 DNA in the HAART-receiving patients

Patient No.	Plasma HIV-1 RNA (copies/ml)	CD4 cell counts (cells/ μ l)	Real-time PCR (copies/ 10^2 CD4 ⁺ cells)	PNA-ISH (%)
1	<50	383	<0.1	1.6
2	<50	256	<0.1	2.0
3	<50	300	<0.1	2.5
4	<50	333	2.8	3.2
5	<50	356	4.8	1.8
6	<50	369	3.6	2.3
7	<50	178	4.4	1.6
8	<50	476	1.0	2.4
9	<50	566	<0.1	3.3
10	<50	999	<0.1	2.3
11	<50	857	<0.1	1.3
12	<50	866	<0.1	3.0
13	<50	956	<0.1	1.9
14	<50	677	<0.1	2.3
15	<50	1,142	<0.1	1.0
16	<50	1,273	<0.1	1.7
17	530	132	1.6	2.5
18	570	630	4.8	1.9
19	580	773	<0.1	1.3
20	920	208	<0.1	1.1
21	1,300	328	4.4	2.5
22	1,900	275	2.6	3.3
23	2,300	367	2.8	0.5
24	7,700	315	5.6	1.9
25	8,100	488	2.3	2.7
26	83,000	618	5.6	1.4
27	61,000	170	2.4	2.7
28	84,000	391	2.5	0.7

Table 2 Copy numbers of HIV-1 DNA in the therapy-naïve patients

Patient No.	Plasma HIV-1 RNA (copies/ml)	CD4 cell counts (cells/ μ l)	Real-time PCR (copies/ 10^2 CD4 ⁺ cells)	PNA-ISH (%)
29	33,000	542	11.6	0.9
30	77,000	84	20.2	2.2
31	78,000	27	39.6	1.8
32	120,000	98	9.8	3.4
33	ND	47	3.3	0.8
34	8,800	388	1.9	0.8
35	9,800	329	1.0	0.6
36	93,000	ND	0.8	0.6
37	110,000	ND	1.5	2.3
38	210,000	49	2.8	3.0

ND : not done

したがって, HIV-1 DNA をリアルタイム PCR 法と PNA-ISH 法で検出し, その値を比較することにより, HIV-1 感染細胞の逆転写の活動度を評価することが可

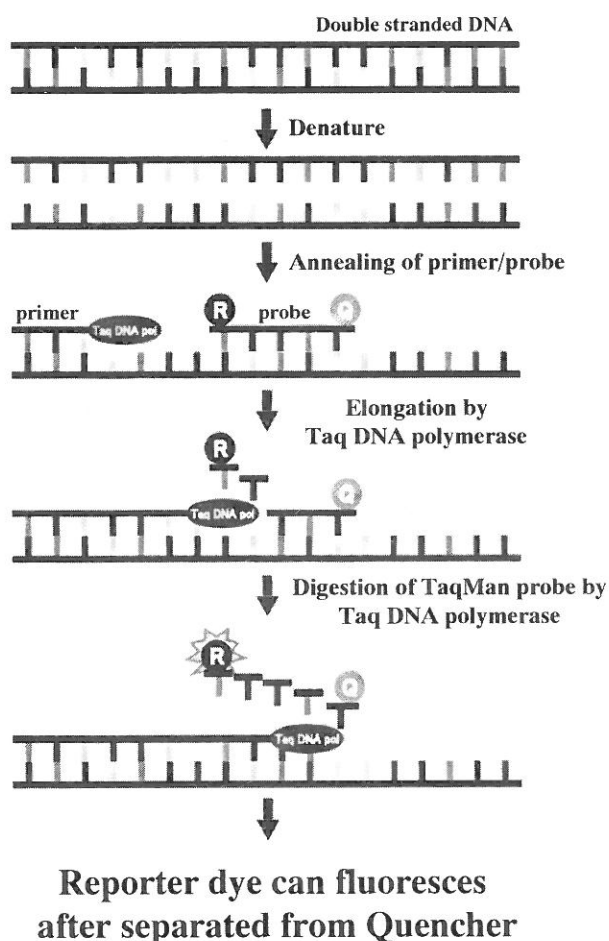


Fig. 1 Principle of Real-time PCR using Taq Man probe

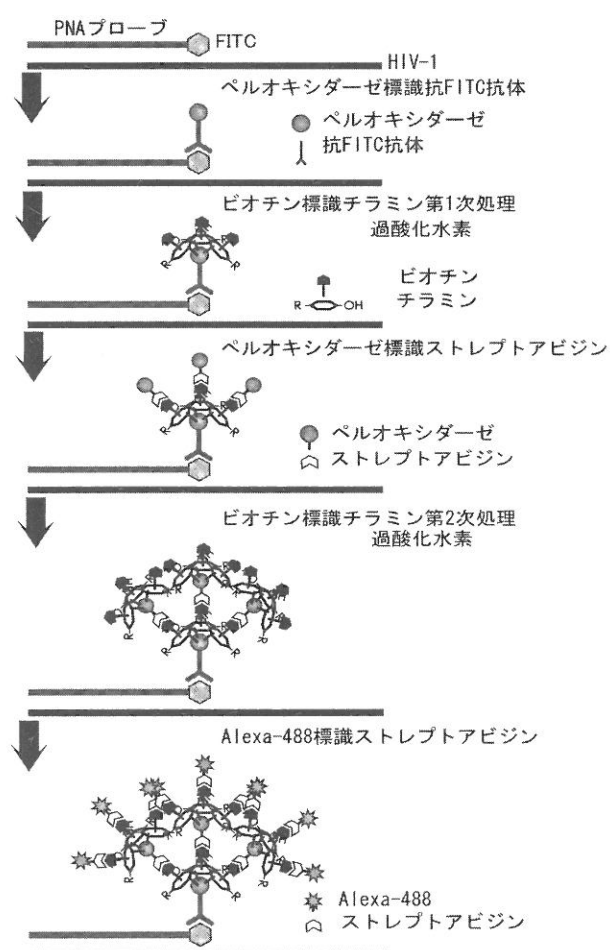


Fig. 2 Principle of PNA-ISH using Catalyzed Signal Amplification

能であると思われ、現在検討中である。

文 献

1) Chun TW, Stuyver L, Mizell SB et al : Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. Proc Natl Acad Sci USA **94** : 13193-13197, 1997
 2) Harrigan PR, Whaley M, Montaner JSG : Rate of HIV-1 RNA rebound upon stopping antiretroviral

therapy. AIDS **13** : F59-F62, 1999

3) Murakami T, Hagiwara T, Yamamoto K et al : A novel method for detecting HIV-1 by non-radioactive in situ hybridization : Application of a peptide nucleic acid probe and catalysed signal amplification. J Pathol **194** : 130-135, 2001
 (平成15年 3月25日受付)
 (平成15年 9月19日受理)