

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) **公開特許公報** ( A )

(11)特許出願公開番号

**特開2002 - 191399**

( P 2 0 0 2 - 1 9 1 3 9 9 A )

(43)公開日 平成14年7月9日(2002.7.9)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード <sup>*</sup> (参考)
C12Q 1/70		C12Q 1/70	4B024
1/02		1/02	4B063
// C12N 5/10		C12N 15/00	A 4B065
15/09		5/00	B

審査請求 未請求 請求項の数13 O L (全16頁)

(21)出願番号 特願2001 - 311793( P 2001 - 311793)  
(22)出願日 平成13年10月9日(2001.10.9)  
(31)優先権主張番号 特願2000 - 319189(P2000 - 319189)  
(32)優先日 平成12年10月19日(2000.10.19)  
(33)優先権主張国 日本 ( J P )

(71)出願人 591222245  
国立感染症研究所長  
東京都新宿区戸山一丁目23番1号  
(71)出願人 396020800  
科学技術振興事業団  
埼玉県川口市本町4丁目1番8号  
(72)発明者 巽 正志  
東京都小平市鈴木町1 - 369 - 16  
(72)発明者 蜂谷 敦子  
東京都板橋区赤塚新町3 - 29 - 2 - 301  
(74)代理人 100107984  
弁理士 廣田 雅紀

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 H I V 薬剤耐性試験方法

(57) 【要約】

【課題】 H I V - 1 感染価測定細胞株を用いた迅速簡便な薬剤耐性試験方法、特に多検体を迅速に処理することができる薬剤耐性試験方法を提供すること。

【解決手段】 H I V - 1 感染により分泌型レポータータンパク質を発現することができる動物細胞を被験薬剤の存在下において H I V - 1 を含む試料と接触させ、H I V - 1 感染により培養上清に分泌されるレポータータンパク質を検出することを特徴とする、H I V の薬剤耐性の試験方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 HIV-1 感染により分泌型レポータータンパク質を発現することができる動物細胞を被験薬剤の存在下において HIV-1 を含む試料と接触させ、HIV-1 感染により培養上清に分泌されるレポータータンパク質を検出することを特徴とする、HIV の薬剤耐性の試験方法。

【請求項 2】 動物細胞が、HIV-1 ウイルスレセプター CD4 と HIV-1 ウイルスコレセプターとを有する、請求項 1 に記載の試験方法。

【請求項 3】 動物細胞が HIV-1 ウイルスコレセプターとして CXCR4 及び / 又は CCR5 を有する、請求項 1 又は 2 に記載の試験方法。

【請求項 4】 動物細胞が HIV-1 ウイルスコレセプターとして CXCR4 及び CCR5 の両方を有する、請求項 1 から 3 の何れかに記載の試験方法。

【請求項 5】 分泌型レポータータンパク質が比色反応、蛍光発光または化学発光の何れか 1 種以上の測定系で検出できるタンパク質である、請求項 1 から 4 の何れか 1 項に記載の試験方法。

【請求項 6】 分泌レポータータンパク質がアルカリホスファターゼ、ルシフェラーゼ又はペルオキシダーゼである、請求項 1 から 5 の何れかに記載の試験方法。

【請求項 7】 動物細胞が、HIV-1 LTR 配列の下流に分泌レポータータンパク質をコードする遺伝子を有する発現ベクターを形質転換することにより得られる細胞である、請求項 1 から 6 の何れか 1 項に記載の試験方法。

【請求項 8】 動物細胞が、哺乳類動物細胞に由来する細胞である、請求項 1 から 7 の何れか 1 項に記載の試験方法。

【請求項 9】 動物細胞が、ヒト HeLa 細胞又はヒト HOS 細胞に由来する細胞である、請求項 1 から 8 の何れか 1 項に記載の試験方法。

【請求項 10】 動物細胞が、受託番号 FERMP-18078 を有する動物細胞である、請求項 1 から 9 の何れか 1 項に記載の試験方法。

【請求項 11】 被験薬剤が、逆転写酵素阻害剤又はプロテアーゼ阻害剤を含む抗 HIV 薬剤である、請求項 1 から 10 の何れか 1 項に記載の試験方法。

【請求項 12】 被験薬剤として 2 種類以上の薬剤の組み合わせを使用する、請求項 1 から 11 の何れか 1 項に記載の試験方法。

【請求項 13】 培養上清に分泌されるレポータータンパク質を比色反応、蛍光発光または化学発光の何れか 1 種以上の測定系で検出する、請求項 1 から 12 の何れか 1 項に記載の試験方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、HIV の薬剤耐性

の試験方法に関する。より詳細には、本発明は、被験薬剤の存在下において HIV-1 を感染させた標的細胞が培養上清に分泌するレポータータンパク質を検出することによる HIV の薬剤耐性の試験方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1) は Lentivirus に属する Retrovirus で、後天性免疫不全症候群 AIDS の病原体である。その発見から既に数十年を経て、当初は不可抗力的に感染宿主の免疫系を破壊し、感染者の殆どは免疫不全に陥り死に至る感染症として認識されていた。しかしながら近年に至り、HIV-1 の Life Cycle に必須な逆転写酵素とウイルス粒子形成に必要な成熟蛋白の開裂に関わるプロテアーゼに対する阻害剤が種々開発され、それらの組み合わせによる強力な抗 HIV-1 薬剤の投与（いわゆる、HAART 療法 (Highly Active AntiRetrovirus Therapy) ) により、感染者体内のウイルス量を高感度な PCR 法による検出限界以下に抑えることが可能になり、一部の患者にとって、もはや HIV-1 感染症は慢性感染症とみなされる程度までに至っている。

【0003】しかしながら、多剤投与を中止すると HIV-1 の速やかな増殖を来し、さらにこのウイルスの特性である逆転写酵素の変異導入率の高さから、投与薬剤に対する耐性ウイルスが容易に出現し、不用意な薬剤の選択により、同一作用機序に基づく複数の薬剤に耐性のウイルスを惹起し、以後の治療に困難をきたすことも多く報告されている。

【0004】根治治療法に近い将来に得られる見込みが得られない現況では、抗 HIV-1 療法戦略は如何に迅速に耐性ウイルスの出現を捉え、個々の患者のウイルスに最も効果的な薬剤を組み合わせ、患者のウイルス量を低い定常状態に保つかに、重心が移ってくるものと考えられる。新たに開発される抗 HIV-1 薬剤を含め、多種多様な薬剤を用いて多様化する HIV 治療法において、有効な薬剤選択の判定基準として Genotyping と Phenotyping の薬剤耐性試験が挙げられる。

【0005】Genotyping は Primer Design と PCR 法による HIV-1 pol 遺伝子領域の増幅とその塩基配列解析が既にキット化され、技術的に確立し普及している。しかしながら検体中のウイルスゲノムの逆転写酵素あるいはプロテアーゼをコードする遺伝子のアミノ酸変異による薬剤耐性変異と、患者ウイルスの生物学的な薬剤耐性に関する成績との乖離がしばしば指摘されている。

【0006】一方、Phenotyping は実際のウイルス耐性を反映するものの、現在標準法として用いられている末梢血単核球 (PBMC) を用いた方法は、その標準化においてまだ解決すべき問題点が多々あることが指摘されている。例えば、ヒト PBMC を用いた耐性試験では結果が得られるのにしばしば数ヶ月を要し、PBMC の

DonorのロットによるHIV感受性にばらつきが認められることから得られた結果の相互比較が困難であること、労力を要することから多検体を処理するには不向きであること、またHIV-1 gag蛋白p24 ELISAによるウイルス増殖の測定のため耐性試験に要する費用が高むことなどから限られた研究室でしかなされていないのが現況である。しかしながら、Phenotyping法はウイルスの生物学的耐性を反映していることから、薬剤選択の判断基準として欠かすべからざる情報を提供するものである。

【0007】これらの問題点を克服するため、本発明者らは迅速簡便なHIV-1感染価測定細胞株MAGIC-5Aを用いた薬剤耐性試験について報告してきた(蜂谷敦子、相沢佐織、田中真理、高橋由紀子、平林義弘、井田節子、巽 正志、岡 慎一、CCR5発現HeLa/CD4-LTR-Gal細胞(MAGIC5 clone 1-10)を用いた抗HIV薬耐性検査に関する検討 第13回日本エイズ学会 1999年12月 東京、Hachiya, A., Aizawa-Matsuoka, S., Tanaka, M., Takahashi, Y., Iida, S., Gatanaga, H., Hirabayashi, Y., Kojima, A., Tatsumi, M. and Oka, S.: Rapid and simple phenotypic assay for drug susceptibility of human immunodeficiency virus type 1 by using CCR5-expressing HeLa/CD4 cell clone 1-10 (MAGIC-5) Antimicrob. Agents Chemother. 45: 495 - 501, 2001.)。この細胞株MAGIC-5AはHIV-1のレセプターであるCD4とコレセプターCXCR4およびCCR5をヒト子宮頸癌細胞株HeLaに安定に発現させるように形質転換し、感染したHIV-1の産生するTat蛋白により、組み込まれたLTR下流のSV40核移行シグナルを付け加えた -Galactosidaseを駆動し、X-Gal染色により迅速簡便に試料検体中のHIV-1の感染価を測定するように工夫したIndicator Cellである。この細胞株を用いることにより、患者血清からの迅速なウイルス分離と、それに引き続く、抗逆転写薬剤および抗プロテアーゼ薬剤に対する耐性株を2週間以内に検出することが報告されている。

【0008】またこの細胞株はHIV-1の感染価測定という基本的技術をなすことから多くのHIV-1研究領域に応用されうる可能性がある。現在までの所、薬剤耐性Phenotype Assayおよび抗HIV薬剤スクリーニングなどにも応用されてきている。一般に用いられているHIV-1 gag蛋白p24のELISAによる測定もしくは逆転写酵素の活性測定に基づくものに比較して迅速、簡便、かつ経済的であるものの、この細胞株によるHIV感染価測定は顕微鏡下におけるX-galにより青染した細胞核の計数に基づくので、多検体迅速処理には向いていなかった。今後、抗HIV-1薬剤の開発が進展し、多くの薬剤が臨床応用されることが予測されることから、より迅速簡便な測定系が求められていた。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明は上記した従来技術の問題点を解消することを解決すべき課題とした。即ち、本発明は、HIV-1感染価測定細胞株を用いた迅速簡便な薬剤耐性試験方法を提供することを解決すべき課題とした。特に、本発明は、多検体を迅速に処理することができる薬剤耐性試験方法を提供することを解決すべき課題とした。

【0010】

10 【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討した結果、MAGIC-5Aを用いたPhenotyping薬剤耐性試験をさらに迅速簡便および高感度に進化させることを目的として、インジケータ細胞MAGIC-5AにLTR下流にSEAP(分泌型アルカリホスファターゼ)を組み込んだ発現ユニットをさらに組み込み、HIV感染により培養上清に分泌されるアルカリホスファターゼを化学発光で検出することによりHigh throughputな測定系を確立することに成功した。さらにこの細胞を用いた薬剤耐性試験により、  
20 各種抗HIV薬に対するHIVの薬剤耐性を評価することも判明した。本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。

【0011】即ち、本発明によれば、HIV-1感染により分泌型レポータータンパク質を発現することができる動物細胞を被験薬剤の存在下においてHIV-1を含む試料と接触させ、HIV-1感染により培養上清に分泌されるレポータータンパク質を検出することを特徴とする、HIVの薬剤耐性の試験方法が提供される。好ましくは、本発明で用いる動物細胞は、HIV-1ウイルスレセプターCD4とHIV-1ウイルスコレセプターとを有し、さらに好ましくは、HIV-1ウイルスコレセプターとしてCXCR4及び/又はCCR5を有し、特に好ましくは、HIV-1ウイルスコレセプターとしてCXCR4及びCCR5の両方を有する。

【0012】好ましくは、分泌型レポータータンパク質は比色反応、蛍光発光または化学発光の何れか1種以上の測定系で検出できるタンパク質である。特に好ましくは、分泌レポータータンパク質はアルカリホスファターゼ、ルシフェラーゼ又はペルオキシダーゼである。

40 【0013】好ましくは、本発明で用いる動物細胞は、HIV-1LTR配列の下流に分泌レポータータンパク質をコードする遺伝子を有する発現ベクターを形質転換することにより得られる細胞である。好ましくは、本発明で用いる動物細胞は、哺乳類動物細胞に由来する細胞であり、さらに好ましくはヒトHeLa細胞又はヒトHOS細胞に由来する細胞である。本発明で用いるのに特に好ましい動物細胞は、受託番号FERM P-18078を有する動物細胞である。

50 【0014】好ましくは、被験薬剤は、逆転写酵素阻害剤又はプロテアーゼ阻害剤を含む抗HIV薬剤であり、

被験薬剤としては2種類以上の薬剤の組み合わせを使用することもできる。好ましくは、培養上清に分泌されるレポータータンパク質を比色反応、蛍光発光または化学発光の何れか1種以上の測定系で検出する。

【0015】

【発明の実施の形態】以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。本発明の薬剤耐性の試験方法は、HIV-1感染により分泌型レポータータンパク質を発現することができる動物細胞を被験薬剤の存在下においてHIV-1を含む試料と接触させ、HIV-1感染により培養上清に分泌されるレポータータンパク質を検出することを特徴とする。まず、本発明で用いる、HIV-1感染により分泌型レポータータンパク質を発現することができる動物細胞について説明する。

【0016】本発明で用いる動物細胞は、HIV-1が感染することができる細胞であれば、その種類は特に限定されない。通常、HIV-1の感染には、HIV-1ウイルスレセプターCD4が必要とされることから、本発明で用いる動物細胞は、HIV-1ウイルスレセプターCD4を有していることが好ましい。また、本明細書中で上記した通り、HIV-1の標的細胞への侵入過程には細胞側の主要ウイルスレセプターであるCD4分子以外に、T細胞指向性HIV-1はCXCR4を、マクロファージ指向性HIV-1はCCR5をレセプターとして用いていることから、本発明で用いる動物細胞もこれらのレセプターを有していることが好ましい。広範なHIV-1の感染価を分析することを目的とする場合には、CXCR4及びCCR5の両方を発現している動物細胞を使用することが好ましい。

【0017】これらのHIV-1ウイルスレセプターCD4とHIV-1ウイルスレセプターは出発となる動物細胞がもともと保持し、かつ発現している場合にはそれらをそのまま利用すればよい。また、出発となる細胞がこれらを発現していない場合には、好適な発現ベクターに上記レセプターまたはレセプターをコードする遺伝子を組み込んだ組み換え発現ベクターを出発動物細胞に導入することにより、当該レセプターまたはレセプターを当該動物細胞中に発現させることができる。

【0018】本発明で用いる動物細胞を樹立するために用いることができる出発細胞の種類は特に限定はされないが、好ましくは哺乳類（例えば、ヒトまたはサルなどの霊長類や、マウス、ラット又はハムスターなどのげっ歯類など）の動物細胞であり、より具体的には、ヒト由来HeLa細胞又はヒト由来HOS細胞などが挙げられる。

【0019】目的のレセプター又はレセプターを発現している細胞を選択するための手法としては、当該レセプター又はレセプターを含む組み換え発現ベクター中に抗生物質耐性遺伝子を当該レセプター又はレセプターと一緒に発現され得るように組み込んでおき、当該抗

生物質を含む培地中で培養することにより、目的のレセプター又はレセプターを発現する細胞を選択することができる。また、目的の細胞を一つの細胞に由来する単一の細胞としてクローニングするための手法としては限界希釈法を挙げることができる。

【0020】例えば、構成的にCXCR4を発現しているHeLa細胞は出発細胞として使用する場合には、このHeLa細胞に抗生物質耐性遺伝子（例えば、ネオマイシン（Neo）耐性遺伝子）を乗せたマウスレトロウイルスベクターを形質転換してCD4を発現させ、所望によりLTR-Gal発現ユニットをハイグロマイシン（Hygromycin）耐性遺伝子とともに形質転換し、生育細胞を選択する。さらに、CD4発現増強のためのCD4発現とPuromycin耐性を形質転換体に付与する発現ベクター、並びにCCR5発現とBlasticidin耐性を形質転換体に付与する発現ベクターを上記細胞に形質転換し、限界希釈法により目的とする細胞をクローニングする。この操作でクローニングされる目的細胞は、G418、Hygromycin、PuromycinおよびBlasticidinの合計4種の選択薬剤に対して耐性を有している。

【0021】本発明で用いる動物細胞は、HIV-1感染により分泌型レポータータンパク質を発現することができることを特徴とする。本発明で用いる動物細胞はHIV-1感染により分泌型レポータータンパク質を発現し、発現した分泌型レポータータンパク質は細胞外に分泌され、培養液中に放出される。本発明で用いる動物細胞を含む培養系にHIV-1を含む試料を添加し、その培養液を採取し、該培養液中に分泌されたレポータータンパク質を適当な方法で検出又は分析することにより、試料中のHIV-1の感染価を測定することができる。

【0022】培養液中に分泌されたレポータータンパク質の検出方法は特に限定されないが、例えば、比色反応、蛍光発光または化学発光などにより検出する方法が挙げられる。分泌レポータータンパク質の種類は特に限定されないが、種々の酵素活性基質が入手しやすく、測定感度が高く、測定手技の簡略化が可能なものが好ましく、例えば、アルカリホスファターゼ、ルシフェラーゼ又はペルオキシダーゼなどが挙げられ、この中でもアルカリホスファターゼが特に好ましい。

【0023】本発明によるHIV-1感染により分泌型レポータータンパク質を発現する動物細胞を作成するための好ましい方法の一つとしては、HIV-1LTR配列の下流に分泌レポータータンパク質をコードする遺伝子を有する発現ベクターを動物細胞に形質転換する方法が挙げられる。上記方法で用いる発現ベクターには、所望の細胞の選択のための薬剤耐性遺伝子が含まれていることが好ましい。

【0024】例えば、本明細書中で上記したようなG418、Hygromycin、PuromycinおよびBlasticidinの合計4種の選択薬剤に対して耐性を有し、CXCR4、CD

4 およびCCR5を発現する細胞に対して、分泌レポータータンパク質をコードする遺伝子を有する発現ベクターを形質転換することにより、本発明で用いる動物細胞を作成することができる。この場合、分泌レポータータンパク質をコードする遺伝子を有する発現ベクター中に組み込むことができる薬剤耐性遺伝子としては、上記4種の薬剤耐性遺伝子以外であればよく、例えば、Zeoцин耐性遺伝子などが挙げられる。

【0025】より具体的には、分泌レポータータンパク質をコードする遺伝子を有する発現ベクターを、HIV-1ウイルスレセプターCD4とHIV-1ウイルスコレセプターとを有する細胞にトランスフェクションし、薬剤で選択し、生存コロニーを得ることができる。これらを増殖させたクローン細胞をマイクロプレートに2重に播き、一方はHIV-1を感染させ、他方は非感染対照とする。感染2日後、培養上清を採取し、65で15分間処理して内在性アルカリホスファターゼとHIVの不活化する。培養上清に分泌されたSEAPは例えば、p-Nitrophenol phosphateを基質とした比色反応で測定し選別することができる。HIV非感染ではSEAP活性が低く、HIV感染により高いSEAP活性を示すクローンを選別することにより、目的の細胞を樹立することができる。上記した方法で樹立することができる細胞の一例としては、受託番号FERMP-18078を有する細胞が挙げられる。

【0026】本発明で用いる動物細胞の培養方法、培養条件は細胞の種類、性質などに応じて適宜選択することができる。例えば、HeLa細胞に由来する細胞株の場合には、抗生物質(例えばKanamyacin等)を含み、5%FCSを添加したDulbecco's Modified Minimum Essential Medium (High glucose ; Gibco) 中で37で5%CO<sub>2</sub>で培養することができる。

【0027】本発明の薬剤耐性の試験方法は、上記したような動物細胞を被験薬剤の存在下においてHIV-1を含む試料と接触させ、HIV-1感染により培養上清に分泌されるレポータータンパク質を検出することを特徴とする。被験薬剤としては、抗HIV薬が好ましく、より具体的には、逆転写酵素阻害剤又はプロテアーゼ阻害剤を含む抗HIV薬剤が好ましい。逆転写酵素阻害剤としては、AZT / ZDV (zidovudine : 3'-Azido-3'-deoxythymidine)、d4T (santivudine : 2',3'-dideoxy-3'-deoxy-thymidine)、3TC (lamivudine : 2'-deoxy-3'-thiacytidine)、COM (ZDV / 3TC合剤)、ddI (didanosine : 2',3'-dideoxyinosine)、ddIEC (didanosine : 2',3'-dideoxyinosine)、ddC (zalcitabine : 2',3'-dideoxycytidine)、ABC (abacavir)、NVP (nevirapine)、EFV (efavirenz)、DLV (delavirdine)などが挙げられ、またプロテアーゼ阻害剤としてはRTV (ritonavir)、SQV (saquinavir)、NFV (nelfinavir)、IDV (in

dinavir)、APV (amprenavir)、LPV (ritonavir)などが挙げられる。また、被験薬剤としては2種類以上の薬剤の組み合わせを使用することもできる。

【0028】本発明の方法を実施するには、まず、HIV-1感染により分泌型レポータータンパク質を発現することができる動物細胞をマイクロプレートに接種し、HIV-1を含む試料を培地で段階的に希釈し、各穴に添加する。さらに適当な希釈系列の抗HIV薬を添加し、適当な培養条件(例えば、温度37で5%CO<sub>2</sub>)で一定時間インキュベートした後、各穴の上清を回収する。次いで、内在性レポータータンパク質とHIVの不活化のために65で15分間加熱する。この上清を用いて常法に従って、レポータータンパク質のアクセシを行うことができる。レポータータンパク質がアルカリホスファターゼの場合には、例えば、p-ニトロフェノールホスフェートを基質とした比色反応、MUPを基質とした蛍光発光、及びCSPDを基質とした化学発光測定系などを利用することができる。以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されることはない。

【0029】

【実施例】実施例1 : HIV-1感染により分泌型レポータータンパク質を発現することができる動物細胞の樹立  
全てのHeLa細胞由来細胞株は、抗生物質として50µg/mlのKanamyacinを含み、5%FCSを添加したDulbecco's Modified Minimum Essential Medium (High glucose ; Gibco)で37で5%CO<sub>2</sub>で培養した。既に本発明者が樹立したCCR5発現MAGI細胞株MAGIC-5Aは、元来の親株HeLa細胞にNeo耐性遺伝子を乗せたマウスレトロウイルスベクターによりCD4を発現し、LTR Gal発現ユニットはHygromycin耐性遺伝子とともに乗せて選択されFACS (Fluorescent Activated Cell Sorter) で選別された細胞株であるMAGI細胞株にさらにCD4発現増強のための発現ベクターpEFBOSpCD4 (CD4発現とPuromycin耐性をTransformantに与える)、CCR5発現のため発現ベクターpEFBOSbsr (CCR5発現とBlasticidin耐性をTransformantに与える)により形質転換され限界希釈法によりクローニングされ樹立した細胞株で、G418、Hygromycin、PuromycinおよびBlasticidinの合計4種の選択薬剤に耐性になっていた。

【0030】HIV-1 subtype B由来のLTRの下流にpSEAP2-Basic (Clontech) からTranscriptional Blockerとともにレポーター遺伝子として分泌型アルカリホスファターゼ(SEAP)を組み込み、さらに新たな選択遺伝子としてZeoцин耐性遺伝子を載せた発現ベクターを構築した。この発現ベクターをMAGIC-5A細胞株にトランスフェクション後、Zeoцинで選択培養

し生残したコロニー 165 個を得た。これらの増殖させたクローン細胞を 96 穴マイクロプレートに 2 重に播き、一方は HIV - 1 を感染させ一方は非感染対照とした。感染 2 日後培養上澄 100  $\mu$  l 採取し、内在性アルカリホスファターゼと HIV の不活化のため 65 で 15 分間処理し測定まで - 20 で保存した。検体中の分泌された SEAP は L-Homoarginine を内在性アルカリホスファターゼ阻害剤として添加した p - ニトロフェノールホスフェートを基質とした比色反応で測定し選別した (Berger J. et al., Secreted placental alkaline phosphatase : a powerful new quantitative indicator of gene expression in eukaryotic cells. Gene 66: 1-10, 1988)。

【0031】 HIV 非感染では SEAP 活性が低く、HIV 感染により高い SEAP 活性を示すクローンを選別し、選択薬剤非存在下で連続 2 回の限界希釈法を行った。即ち、200  $\mu$  g / ml の Zeocin 存在下の選択培養で総計 162 個の生残コロニーが得られた。しかしながら生残した殆どのコロニーは HIV 感染の有無にかかわらず高い SEAP を分泌していた。2 個の数少ないコロニーから、HIV 非感染では Background 程度の SEAP しか検出せず、HIV 感染により多量の SEAP を分泌する細胞群から 2 度にわたる限界希釈法で安定した HIV - 1 感受性を示したクローン MAGIC - 5 / SEAP 3 - 1 - 1 を樹立した。MAGIC - 5 / SEAP 3 - 1 - 1 は、FERMP - 18078 として、平成 12 年 10 月 16 日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所、日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号 (郵便番号 305 - 8566) に寄託されている。

【0032】 実施例 2 : 薬剤耐性試験 (方法)

#### 1 . 対象者及びウイルス分離

1997 年 12 月から 1999 年 1 月までに国立医療センターエイズ治療研究開発センターに通院した患者 137 名 245 検体について検査を行った。同意を得た患者から採血し、plasma を分離した。分離前日に 5% FCS を添加した Dulbecco's MEM 培地に懸濁した MAGIC 5 A ( 巽 正志、小島朝人 : HIV - 1 感染価測定に適した CCR5 発現 HeLa / CD4 - LTR - beta Gal 細胞の樹立と応用について 第 10 回日本エイズ学会総会、1997 年 12 月、熊本。Tsumi, M. and Kojima, A.: Establishment of HeLa/CD4-LTR=betaGal expressing CCR5 suitable for infectivity assay of T- and M-tropic HIV-1 and its application to clinical isolation and cloning of virus. The XIIth International Congress of AIDS, Geneva, Switzerland, June, 1998) を 48 穴マイクロプレートに 20,000 個 / well 播き、終夜培養で細胞を付着させた。感染当日患者由来の plasma 1 ml を微量遠心機で 15,000 rpm 40 分間遠心してウイルスを沈殿させ、上澄 900

$\mu$  l を取り除き、400  $\mu$  l の Infection Medium ( 20  $\mu$  g / ml DEAE - Dextran 5% FCS - D' MEM ) を加え、懸濁後 MAGIC - 5 A 細胞に接種した。37  $^{\circ}$ C CO<sub>2</sub> インキュベーターで 2 時間培養し、5% FCS - D' MEM 培地に交換後、ウイルス分離陽性まで観察培養を継続した。分離したウイルスは使用するまで - 80 に保存した。

#### 【0033】 1 . 薬剤耐性試験

感染価測定 : 感染前日に 96 穴マイクロプレートに MAGIC 5 A 細胞を 10,000 個 / well 播き培養し、感染当日、ウイルスを融解し Infection Medium にて 1 倍から 1000 倍まで段階希釈し、各ウェルに 100  $\mu$  l ずつ接種し、2 時間培養し、洗浄後新鮮な培養液を加えさらに培養した。48 時間後培養液を除去し、PBS で洗浄後、固定液 ( 1%ホルムアルデヒド、0.2% グルタルアルデヒド、PBS 中 ) を 100  $\mu$  l / ウェル加え、室温で 5 分間固定し、再度 PBS で洗浄後染色液 ( 4 mM フェロシアン酸カリウム、4 mM フェリシアン酸カリウム、16 mM MgCl<sub>2</sub>、400  $\mu$  g / ml X - gal、PBS 中 ) を 100  $\mu$  l / well 加え 37  $^{\circ}$ C で 2 時間インキュベートし、顕微鏡下で細胞核が青く染まった細胞数を計測し、試料検体中の HIV - 1 感染価とした。以後の薬剤耐性試験では 96 穴マイクロプレートの各穴に 100 ~ 300 bcc ( Blue cell count ) になるように検体を希釈し用いた。

【0034】 逆転写酵素阻害剤 : 感染前日に 96 穴マイクロプレートに MAGIC - 5 A もしくは MAGIC - 5 / SEAP 細胞を 10,000 個 / well 播き、培養してあらかじめ細胞を付着させた。感染当日、100 ~ 300 bcc のウイルスを Infection Medium にて希釈し、100  $\mu$  l ずつ加えた。さらに 10 倍希釈系列を作製した抗ウイルス薬を 100  $\mu$  l ずつ加え、37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターにて培養した。48 時間後、MAGIC - 5 A 細胞の方は上記のように染色を行い、Blue cell 数をかぞえ、一方 MAGIC - 5 / SEAP 細胞 ( 受託番号 FERMP - 18078 ) の方は培養上澄を採取し、そのアルカリホスファターゼ活性を Reporter Assay Kit - SEAP - ( SAK - 101 ; Toyobo Co. Japan ) を用いて化学発光を Luminometer により計測し、また p - ニトロフェノールホスフェートを基質とした比色反応では波長 405 nm で測定した。薬剤を加えていないウェルの値を 100% とし、50% 増殖阻止が得られた濃度を IC50 とした。

【0035】 プロテアーゼ阻害剤 : 100 ~ 300 bcc となる濃度のウイルスを Infection Medium にて希釈し、96 穴マイクロプレートに予め播いておいた MAGIC - 5 A 細胞に 100  $\mu$  l ずつ加えた。さらに 10 倍希釈系列を作製した抗ウイルス薬を 100  $\mu$  l ずつ加え、37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターにて培養した。72 時間後、前日用意しておいた MAGIC - 5 A

およびMAGIC-5/SEAP細胞の96穴のプレートに上清100μlとInfection Medium 100μlを加え培養した。48時間後、逆転写酵素阻害剤薬剤の項と同様にして、阻害剤を加えていないウエルの値を100%とし、50%増殖阻止が得られた濃度をIC50とした。なお、全ての耐性試験には阻害剤感受性ウイルスの対照として感染性分子クローンHIV-1NL432株を平行してアッセイし、この株のIC50値に対して何倍の耐性として、臨床分離株の耐性を表現した。

【0036】Genotype(遺伝子型)での耐性検査:患者血漿100mlからハイピュアRNAアイソレーションキット(Roche)を用いてRNAの抽出を行い、One Step RNA PCR Kit(Perkin Elmer)を用い、HIV-1のp01領域を増幅した。Wizad TM PCR Prep DNA Purification System(Promega)を用いてPCR反応産物を濃縮し、電気泳動した後、目的のフラグメントを含むゲル部位を切り出し、SUPREC-01(Takara Co.)を用いて精製を行った。こうして得られた各サンプルの塩基配列をAuto sequencer(ABI model 310)を用いて決定した。アミノ酸配列は、塩基配列より推定し、耐性の

有無を調べた。

【0037】(結果)

1. MAGIC-5Aとウイルス量の相関

MAGIC-5Aを用いて、210検体中129検体からウイルスを分離した。また患者plasma中のウイルス量とウイルス分離率を調べたところ、ウイルス量が4乗以上で分離率77%、4乗未満で8%であった。このことからウイルス量が4乗以上であれば、この方法を用いてウイルス分離が可能であると認められた。

【0038】2. NL432における再現性

逆転写酵素阻害剤としてAZT(3'-Azido-3'-deoxythymidine)、d4T(2',3'-didehydro-3'-deoxy-thymidine)、および3TC(2'-deoxy-3'-thiacytidine)で、またプロテアーゼ阻害剤としてRTV(ritonavir)、SQV(saquinavir)、およびNFV(nelfinavir)についてHIV-1 Wild株感受性ウイルスとしてNL432での薬剤耐性試験の再現性(triplicate x 5回)を調べたところ、表1に示す通り良好な再現性が示された。

【0039】

【表1】

drug <sup>a</sup>	experiment #	IC <sub>50</sub> (μM)					mean ± SD	CV <sup>b</sup> (%)
		1	2	3	4	5		
AZT		0.010	0.012	0.030	0.056	0.030		
		0.036	0.010	0.044	0.030	0.042		
		0.028	0.011	0.045	0.054	0.074		
	mean	0.025	0.011	0.040	0.047	0.049	0.034 ± 0.02	46
3TC		1.20	1.20	0.52	0.26	1.20		
		0.40	0.42	1.00	0.58	0.42		
		1.80	1.20	0.86	0.70	0.85		
	mean	1.13	0.94	0.79	0.51	0.82	0.84 ± 0.23	27
d4T		2.0	0.51	1.7	2.0	4.0		
		3.0	0.61	2.3	1.8	4.2		
		4.0	1.00	2.0	2.3	4.2		
	mean	3.00	0.71	2.00	2.03	4.13	2.37 ± 1.27	53
RTV		0.028	0.027	0.010	0.090	0.010		
		0.021	0.013	0.100	0.060	0.013		
		0.030	0.024	0.022	0.042	0.046		
	mean	0.026	0.021	0.044	0.064	0.023	0.03 ± 0.02	51
SQV		0.0068	0.0440	0.0250	0.0120	0.0006		
		0.0010	0.0200	0.0170	0.0062	0.0010		
		0.0089	0.0230	0.0560	0.0052	0.0013		
	mean	0.0056	0.0290	0.0327	0.0078	0.0010	0.01 ± 0.01	95
NFV		0.0040	0.0019	0.0011	0.0090	0.0010		
		0.0046	0.0025	0.0024	0.0040	0.0013		
		0.0060	0.0014	0.0048	0.0036	0.0013		
	mean	0.0053	0.0019	0.0028	0.0055	0.0012	0.003 ± 0.001	58

アッセイの再現性を調べるために、実験は3重に5回繰り返した。

a: AZT; zidovudine, d4T; stavudine, 3TC; lamivudine, RTV; ritonavir, SQV; saquinavir

NFV; nelfinavir

b: coefficient of variation

【0040】3. 表現型(phenotype)と遺伝子型(genotype)の比較

このMAGIC-5Aを用いて、得られた臨床分離株129検体と実験室株2検体を用いて、各薬剤の耐性検査を行った。さらに臨床分離株は、AZT46検体、d4

T47検体、3TC48検体、RTV41検体、SQV41検体、およびNFV43検体について、遺伝型と解析結果と比較した。また無治療での各薬剤に対するIC50の値をTable. 2に示した。無治療であるにもかかわらず、AZT、RTV、SQV、NFVについて

は、NL432 と比べ 4 倍以上耐性に傾いていることが認められた。

【 0 0 4 1 】

【 表 2 】

drug <sup>a</sup>	n	IC <sub>50</sub> (μM)		fold increase <sup>b</sup>
		mean ± SD	range	
AZT	22	0.04 ± 0.03	0.003 - 0.15	0.1-5
3TC	20	1.17 ± 0.90	0.1 - 3.2	0.12-3.86
d4T	21	2.36 ± 2.00	0.33 - 7.5	0.14-3.23
RTV	15	0.03 ± 0.02	0.01 - 0.08	0.33-2.67
SQV	16	0.02 ± 0.02	0.001 - 0.1	0.1-10
NFV	14	0.007 ± 0.009	0.001 - 0.03	0.3-10

全アッセイは 3 重で実施した。

a: AZT; zidovudine, d4T; stavudine, 3TC; lamivudine, RTV; ritonavir, SQV; saquinavir, NFV; nelfinavir

b: Fold increase was calculated by dividing IC<sub>50</sub>s of each drug by the mean IC<sub>50</sub> for NL432 in each assay.

【 0 0 4 2 】以下、それぞれの薬剤に対する耐性検査結果を記載する。

AZT (図 1 を参照) : NL432 を用いて得られた値を 1 倍とし、無治療群での AZT に対する phenotype での耐性の度合いは、0.1 ~ 5 倍 (平均 1.2 倍) であった。それに比べ genotype での耐性変異がアミノ酸配列番号 41, 215 位の単独もしくは、両者の組合わさった変異が認められた場合、2.6 倍 ~ 10.6 倍 (平均 7.0 倍) と耐性に傾くことがわかった。また以前から報告があるように、41, 215, 184 位が変異すると耐性ではなく、0.53 ~ 1.4 倍 (平均 0.7 倍) と感受性を取り戻していることが確認された。そしてこの 3 つの組み合わせに、67, 219 位の耐性変異が加算された場合には、2.6 ~ 10.6 倍 (1.12 倍) となり、再び高度耐性を獲得していることがわかった。

【 0 0 4 3 】3TC (図 2 を参照) : 無治療群での 3TC に対する phenotype での耐性の度合いは、0.12 ~ 3.86 (平均 1.4 倍) であった。それに比べ genotype で 184 位の耐性変異が認められた場合、すべての検体において 120 倍以上の高度耐性を獲得していた。また 184 位が wild type であっても他の逆転写酵素阻害剤や 3TC の治療歴がある場合は 0.12 ~ 3.1 倍 (平均 0.95 倍) と低い耐性が認められた。

【 0 0 4 4 】d4T (図 3 を参照) : 無治療群での d4T に対する phenotype での耐性の度合いは、0.4 ~ 3.2 倍 (平均 1 倍) であった。d4T では耐性に関連するアミノ酸置換は不明な部分が多く、現在知られている 75 位の変異との相関を調べてみたが、当センターにおいて 75 位に対する変異を獲得したウイルスは見つかっていないものの、耐性変異と報告されているアミノ酸置換ではなかった。しかし 3TC と同様、75 位が wild type であっても他の逆転写酵素阻害剤や 3TC の治療歴

がある場合は 0.04 ~ 8.18 倍 (平均 2.3 倍) と低い耐性が認められた。

【 0 0 4 5 】RTV (図 4 を参照) : 無治療群 15 名、また RTV の治療歴があるが genotype での耐性変異が全く認められない 6 名に対する phenotype での耐性変異の度合いは、0.33 ~ 2.53 倍 (平均 0.8 倍) であった。primary mutation である 82 位が wild type であり、secondary mutation が 1 つ (36 か 71 位) の変異があれば 0.33 ~ 1.33 倍であるが、2 つ以上の変異が伴うと 1.2 ~ 10.6 倍 (平均 7.2 倍) と中等度耐性から高度耐性を獲得していた。そして primary mutation である 82 位の耐性変異が伴うと、secondary mutation の数にかかわらず、すべて 100 倍前後 (平均 105 倍) の高度耐性を獲得していた。

【 0 0 4 6 】SQV (図 5 を参照) : 無治療群 16 名、また SQV の治療歴があるが genotype での耐性変異が全く認められない 12 名に対する phenotype での耐性変異の度合いは、0.1 ~ 10 倍 (平均 1.9 倍) であった。また secondary mutation が 1 つ (10 か 82 位) の変異であれば、0.34 ~ 3.2 倍であるが、primary mutation である 90 位に耐性変異が認められると 6.6 ~ 100 倍 (平均 60.7 倍) と中等度耐性から高度耐性を獲得していた。

【 0 0 4 7 】NFV (図 6 を参照) : 無治療群 4 名、また NFV の治療歴があるが genotype での耐性変異が全く認められない 2 名に対する phenotype での耐性変異の度合いは、0.33 ~ 10 倍であった。そして無治療であるにもかかわらず、secondary mutation である 36, 63, 77 位の単独変異もしくは 63, 77 位の組合わさった変異については、ウイルスの polymorphism であると考えられた。そのため無治療群では secondary mutation が 1 つであれば、0.3 ~ 4.6 倍 (平均 1.2 倍)、



2つ同時に認められれば0.3~1.5倍(平均1.3倍)とどちらも感受性を示しているのに対して、治療群については1つであれば、0.6~10.3倍(平均2.1.3倍)、2つ同時に認められれば10.6~33.3倍(平均11.5倍)と中等度耐性から高度耐性を獲得していた。またprimary mutationである30位に耐性変異が認められると5.3~33.3(平均16.5倍)と高度耐性を獲得していた。

【0048】MAGIC-5AとMAGIC-5/SEAP細胞を用いた薬剤耐性試験の相関:上記で基本的にMAGIC-5Aを用いたBlue Cell Countで計測した検体を同時に、MAGIC-5AとMAGIC-5/SEAP細胞を用いた感染価測定系で平行してその薬剤耐性を検討した。AZT, NVPおよびNFVについてそれぞれ26検体を、横軸にSEAP、縦軸にBlue Cell Countで得られた各薬剤のIC50を示す濃度をプロットすると、高濃度域から低濃度域にわたる広い濃度域で高い相関を示した。またこの相関は、実験室株HIV-1 NL432に対する相対的な耐性度としてプロットしても同様に、高い相関を示した(図7及び図8を参照)。MAGIC-5A細胞を用いたBlue Cell CountとMAGIC-5/SEAP細胞を用いたChemiluminescence測定は、途中の培養過程に係わる労力はほとんど変わらないが、最終段階の測定の際、Blue Cell CountはComputer Softによる画像処理によりその労力は軽減するもの、マイクロプレート1枚を読み切るには1時間

10  
20

弱の時間がかかるのに対して、マイクロプレート対応のLuminometerを用いれば数十秒で測定が終了するのは、多検体処理が必要な際は、かかる労力は大きくことなる。検出感度の点では、例えば96穴マイクロプレートの穴に接種された検体中に感染性HIV-1が十数個の時でも、MAGIC-5A細胞では固定して直接顕微鏡下で判定できる利点があるが、MAGIC-5/SEAPでもHIV-1非感染のバックグラウンドの数倍の有意な化学発光値が得られ、なおかつ培養を継続して翌日にはより明確な計測値が得られる利点もある。しかしながら、薬剤耐性試験に関しては、培養の初めに十分な感染価(100~300 bcc/well)のウイルスを接種するので実際には問題にはならない。またデータには示さないが、p-ニトロフェノールホスフェートを基質とした比色反応でも化学発光での測定系と比べて感度の点では劣るものの、充分実用に耐える成績が得られた。

【0049】次に、新たに許可された抗HIV薬であるアバカビア(ABC)、ネビラピン(NVP)およびアンブレナビア(APV)について、標準ウイルス株としてHIV-1 NL432を用いて薬剤耐性試験の再現性を検討した。その結果、表3に示すように良好な再現性が得られた。以下、それぞれの薬剤に対する耐性試験結果を記載する。

【0050】  
【表3】

**Reproducibility of MAGIC-5/SEAP Assay with NL432**

Drug	Number of Test	Mean IC <sub>50</sub> (μM)	Range (μM)	SD	CV
ABC	5	1.820	1.5 ~ 2.4	0.356	19
NVP	5	0.052	0.044 ~ 0.066	0.008	15
APV	5	0.002	0.001 ~ 0.003	0.008	43

SD; Standard deviation CV; Coefficient of variation

【0051】アバカビア(ABC)(図9を参照):逆転写酵素阻害剤であるアバカビア(ABC)は、65, 74, 115, 184の耐性変異が知られている。無治療者では平均して16.2倍と耐性に傾いた。さらに184に74の耐性変異が加わると26.1倍と耐性度が上昇した。

【0052】ネビラピン(NVP)(図10を参照):非拡散系逆転写酵素阻害剤であるネビラピン(NVP)は103, 106, 108, 181, 190の耐性変異が知られている。これらはすべてNVPに対するprimary mutationである。無治療者が1.05倍であり、逆転

40  
50

写酵素阻害剤を使用したことがある患者においても1.51倍と感受性の範囲であった。つまり逆転写酵素阻害剤とネビラピンでは交差耐性は認められなかった。また181の変異の27.6倍を除いて、そのほか全ての(106, 103, 190)耐性度が100倍以上と値が振り切れており、高度耐性を獲得していた。また、非拡散系逆転写酵素阻害剤のほとんどの耐性変異は交差耐性として認められているが、唯一NVPの106の耐性変異はEFV(エファビレンツ)に対して交差耐性が認められていない。今回測定した106の耐性変異が認められた検体は、NVPに対して131倍以上と高度耐性

であるが、E F Vに対して5.7倍と耐性を獲得していないことがわかった。

【0053】アンブレナピア(A P V)(図11を参照):無治療者では1.47倍であり、また無治療でありながらポリモフィズムとして10に変異を獲得している検体でも1.04倍と感受性の範囲であった。しかし同じ10に変異が認められ、治療を行っているものについては19.6倍と耐性度が上昇していることがわかった。さらにアンブレナピアのsecondary mutationである10,46,84がそろると、平均して232倍と耐性度が上昇していた。プロテアーゼ阻害剤であるアンブレナピアは、primary mutationである50が他のプロテアーゼ阻害剤に対する耐性変異ではないため交差耐性の少ない薬剤として知られていたが、しかし、secondary mutationだけでも複数存在すれば他のプロテアーゼ阻害剤に傾くことがわかった。また以前にParkinらによると過去にIDL、NFVを使用した患者の20%で見られるN88Sの変異は、APVに対しても感受性が戻ると報告(Journal of Virology, 2000, 4414-4419)していた。今回のアッセイにおいても46の耐性変異が認められる群では24.2倍耐性であるのに対し、46にN88Sが認められていると5.5倍と感受性が戻り、これらの患者は過去にNFVによる治療を受けていたことがわかった。

【0054】(考察)現在、薬剤耐性変異ウイルスを検出するためには、(1)薬剤作用領域の塩基配列の変異を調べる遺伝子型(genotype法)と(2)直接HIVを薬剤存在下で培養し、増殖を抑えることのできる濃度(IC50、IC90)を求めて評価する表現型(phenotype法)、そして(3)組換え(recombinant)DNA技術を利用し、患者由来の感染性recombinant HIVを作り、phenotype法を行うrecombinant virus assayの3つが挙げられる。このうち短時間で、操作性にも優れ、比較的容易に結果が得ることができgenotype法が主流となっているが、その反面、報告されていない耐性変異の出現や複数の変異蓄積した場合の総合的な判断は難しいとされている。それに比べ、耐性度を総合的に判断することができるphenotype法での検出方法は、現在急速に改善されつつあるとはいえ、いまだに時間や費用、労力が必要であると考えられ、一般的には行われていない。またrecombinant virus assayについても、患者由来のウイルスの薬剤作用領域をHIVベクタープラスミドに組み込む技術が非常に熟練を要し、得られた組換えウイルスが増殖しないことも多く、さらにp01遺伝子などの薬剤作用領域以外の領域がHIV-1粒子形成に関与していることが知られており、得られた組換えウイルスが実際の患者体内のウイルスの性状を反映しているか判明していないことからphenotype法と同様、一般的にはおこなわれていない。

【0055】そこで今回本発明者らは、MAGIC-5

AとMAGIC-5/SEAP細胞株によるphenotype法を用いて、これらの問題を解決し、臨床分離株から直接、感受性試験を迅速に行うことを目的とし、検査を行った。従来でのPBM Cを用いたphenotype法では、結果が得られるまでに数ヶ月を要し、また判定するのにp24を測定するという点でコストがかかるが、この細胞を用いることによりウイルス分離から薬剤感受性試験までわずか2週間ほどで結果が得ることができ、細胞の染色もしくは培養上澄の酵素活性測定により感染の有無を迅速に判定することができた。

【0056】本実施例の結果から、無治療の患者ではコントロールであるNL432に比べ、耐性の度合いが平均して1倍前後であったが、中には10倍という検体が認められた。これらのウイルスは、genotype法でも耐性変異が認められていないにもかかわらず、phenotype法では低度耐性を獲得していることが判明し、今後臨床において治療開始時の薬剤選択の判断に参考となるデータであることがわかった。さらにgenotype法とphenotype法を比較したところ、アミノ酸配列番号75位の耐性変異を検出出来なかったd4Tを除く薬剤については、良好な相関が得られた。しかし3TC、d4Tについては、wild typeであっても、逆転写酵素阻害剤の治療歴があるものでは、低度耐性が認められた。

【0057】またAZTについても41,184,215位のアミノ酸変異が同時に認められた場合は、感受性が復帰していることも、この細胞を用いて確認された。しかしこのようなアミノ酸変異によって起こる感受性の変化が、酵素と基質との反応、相互作用という点からどのように起こっているかについては、現段階の技術と知識では明らかにされていない。さらにプロテアーゼ阻害剤では、primary mutationが認められると100倍前後の高度耐性を示し、genotype法とphenotype法で得られた結果が一致したことが認められた。HIV-1ウイルスは薬剤投与下に適応するためsecondary mutationを獲得することが知られている。他のプロテアーゼ阻害剤で治療歴のある患者では、NFVに対する反応が50%程度しかないということが報告されたが、今回のこのようなケースにおいてNFVに対するprimary mutationが認められなくてもsecondary mutationが見つかった。このsecondary mutationは、無治療の患者では感受性に示しているものの、プロテアーゼ阻害剤に治療歴がある患者については、耐性を示しているということが、phenotype法により示唆された。これらの成績からMAGIC-5Aを用いたphenotype法は、genotype法で判断できなかった耐性の度合いを明確にし、今後の多剤併用療法で使用する薬剤選択の判断の一つとして有用であると考えられた。

【0058】薬剤耐性試験におけるMAGIC-5AとMAGIC-5/SEAP細胞を用いた成績の比較から、両者間では高い相関が得られた。このことはMAG

IC - 5 / SEAP細胞がMAGIC - 5 A細胞を親株としてさらにHIV - 1感染によりSEAPを細胞外に分泌するように改変したことから予測された。しかも ReporterとしてはSEAPを用いた系の方が - ガラクトダーゼに比べ、化学発光試薬を加えたあとの安定性及び操作の迅速簡便性においても格段に優れていた。検出感度の点についてもSEAPの方が優れていたため、接種するウイルス量が少なくても測定が可能であった。またMAGIC - 5 / SEAPを用いたAssay系は、細胞を播き、薬剤と同時にウイルスを接種し、培養上澄を採取して酵素基質液を添加して測定機にかけるのみで実測値が得られ、現在用いられているp24 ELISAあるいはRT Assayとくらべ操作手順は格段に簡略化されており、Work Stationによるロボット化への変換も可能であると考えられる。MAGIC - 5 A細胞株による患者検体からのウイルス分離とMAGIC - 5 / SEAPによる薬剤耐性Phenotyping Assayにより概略2週間程の短期間で薬剤耐性が判明することは、早期の耐性ウイルスの検出と、感受性薬剤の選定に有用であり、今後新たに承認される薬剤についても測定を行い、Combination Therapyとして様々な薬剤の組み合わせに対応しえるHigh Throughputな薬剤耐性試験系の構築になくてはならない測定系となることが期待される。

【0059】また、新たに許可された抗HIV薬であるABC、NVPおよびAPVについても本試験法により、効率的なおかつ鋭敏に耐性ウイルスを検出しえることが判明した。このことは今後、さらに開発され臨床応用が期待されている様々な抗HIV薬についても本試験法が対応しえる柔軟性をもつことを意味する。

【0060】

【発明の効果】本発明により、HIV - 1感染価測定細

胞株を用いた迅速簡便な薬剤耐性試験方法、特に多検体を迅速に処理することができる薬剤耐性試験方法を提供することが可能になった。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、表現型でのAZT耐性と遺伝型との相関関係を示す図である。

【図2】図2は、表現型での3TC耐性と遺伝型との相関関係を示す図である。

【図3】図3は、表現型でのd4T耐性と遺伝型との相関関係を示す図である。

【図4】図4は、表現型でのRTV耐性と遺伝型との相関関係を示す図である。

【図5】図5は、表現型でのSQV耐性と遺伝型との相関関係を示す図である。

【図6】図6は、表現型でのNFV耐性と遺伝型との相関関係を示す図である。

【図7】図7は、MAGIC - 5 / SEAP細胞を用いた化学発光アッセイとMAGIC - 5 A細胞を用いたBlue Cell Countとにおける、抗HIV - 1剤濃度に対する相関関係を示す図である。

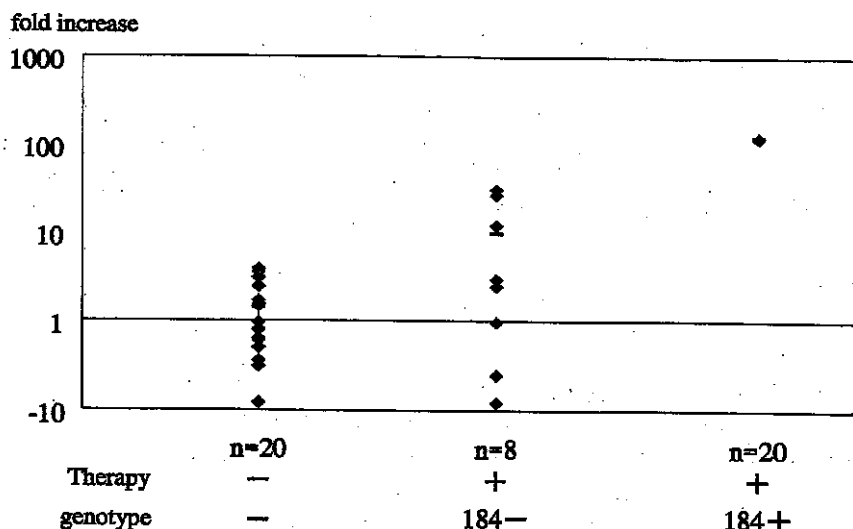
【図8】図8は、MAGIC - 5 / SEAP細胞を用いた化学発光アッセイとMAGIC - 5 A細胞を用いたBlue Cell Countとにおける、抗HIV - 1剤濃度に対する相関関係を示す図である。

【図9】図9は、表現型でのABC耐性と遺伝子型との相関関係を示す図である。

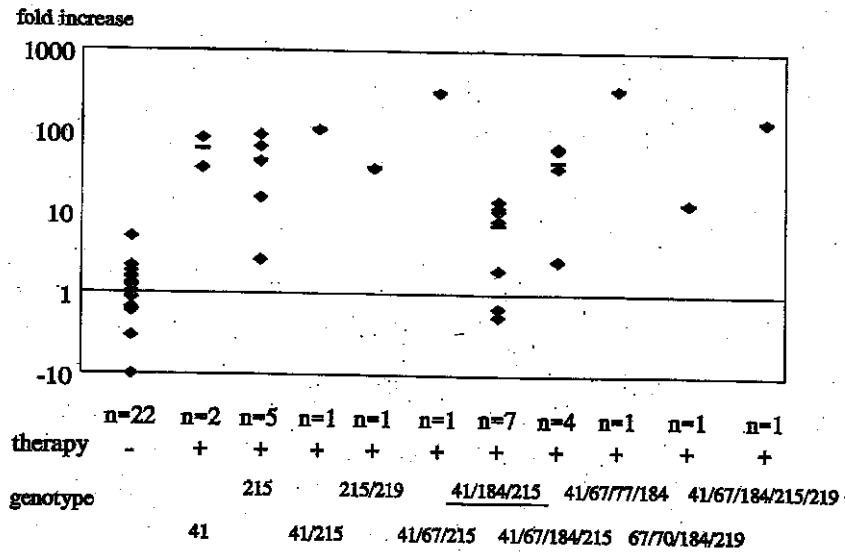
【図10】図10は、表現型でのNVP耐性と遺伝子型との相関関係を示す図である。

【図11】図11は、表現型でのAPV耐性と遺伝子型との相関関係を示す図である。

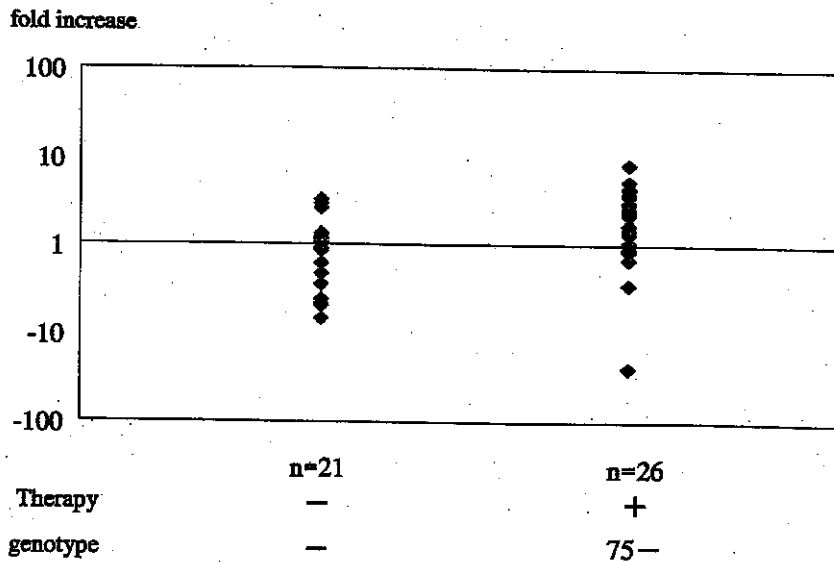
【図2】



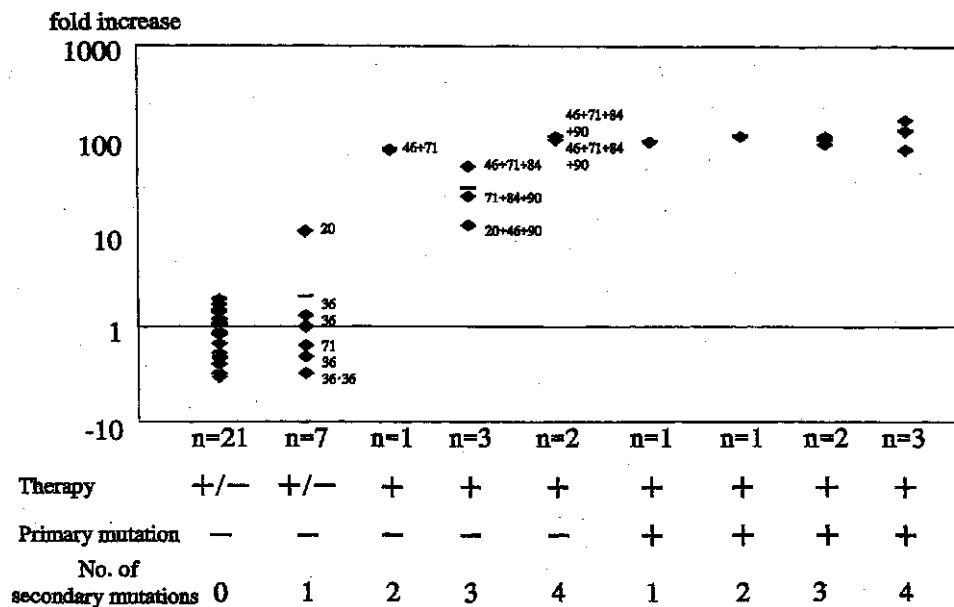
【 図 1 】



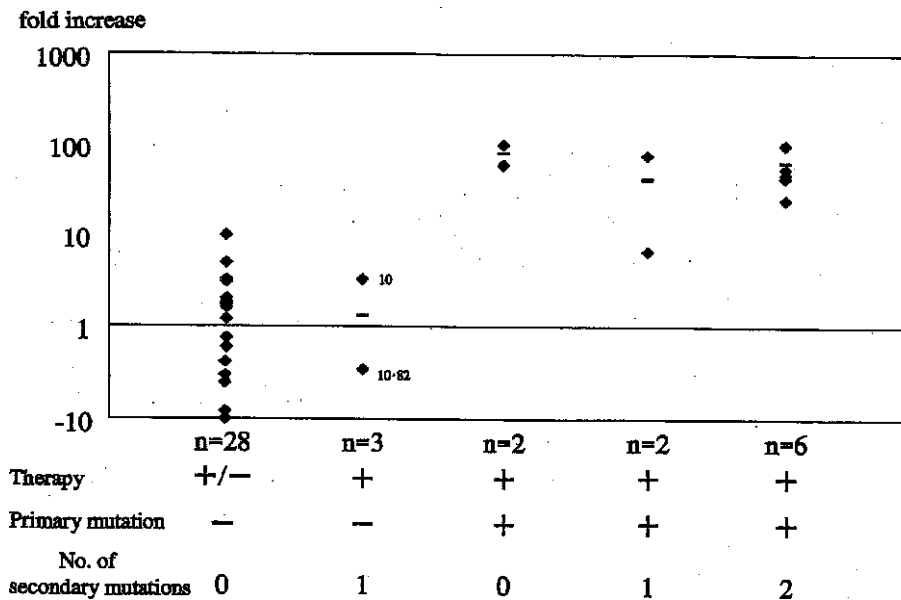
【 図 3 】



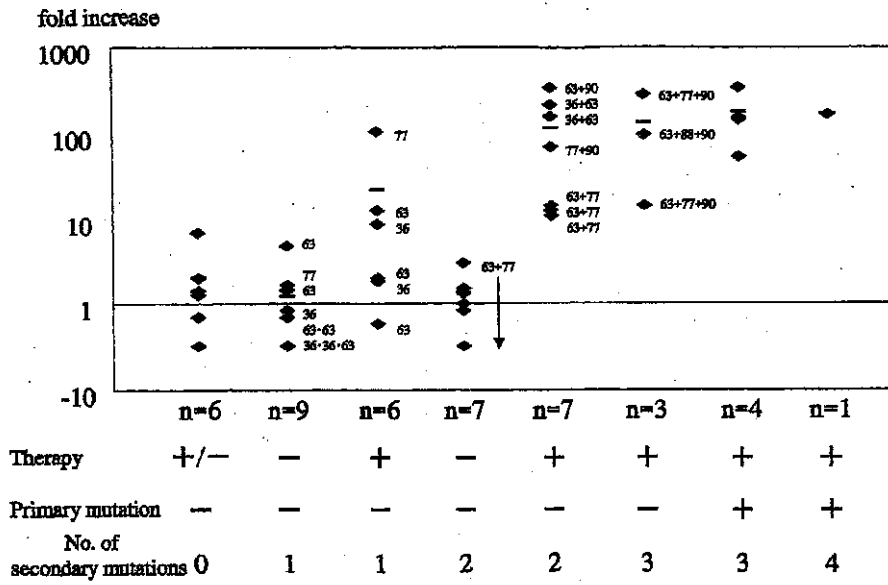
【 図 4 】



【 図 5 】



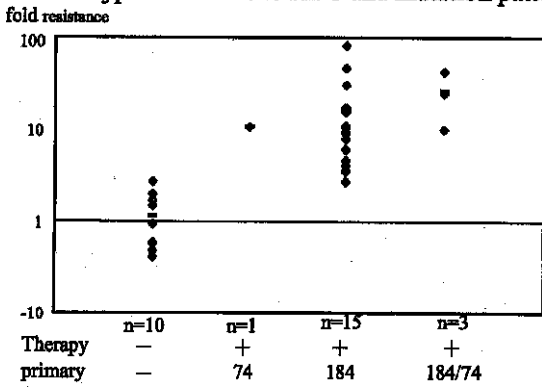
【 図 6 】



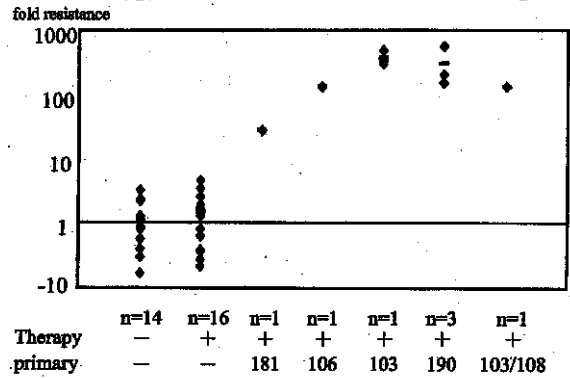
【 図 9 】

【 図 10 】

Phenotypic resistance to ABC and mutation pattern

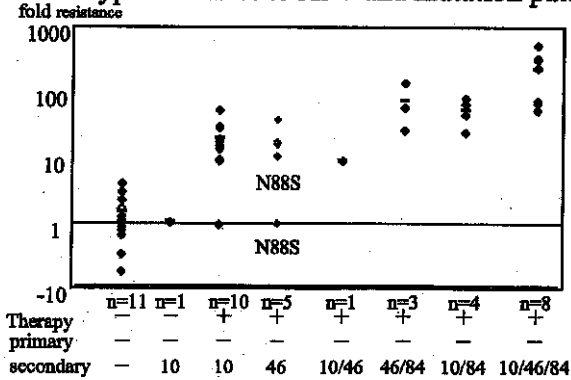


Phenotypic resistance to NVP and mutation pattern

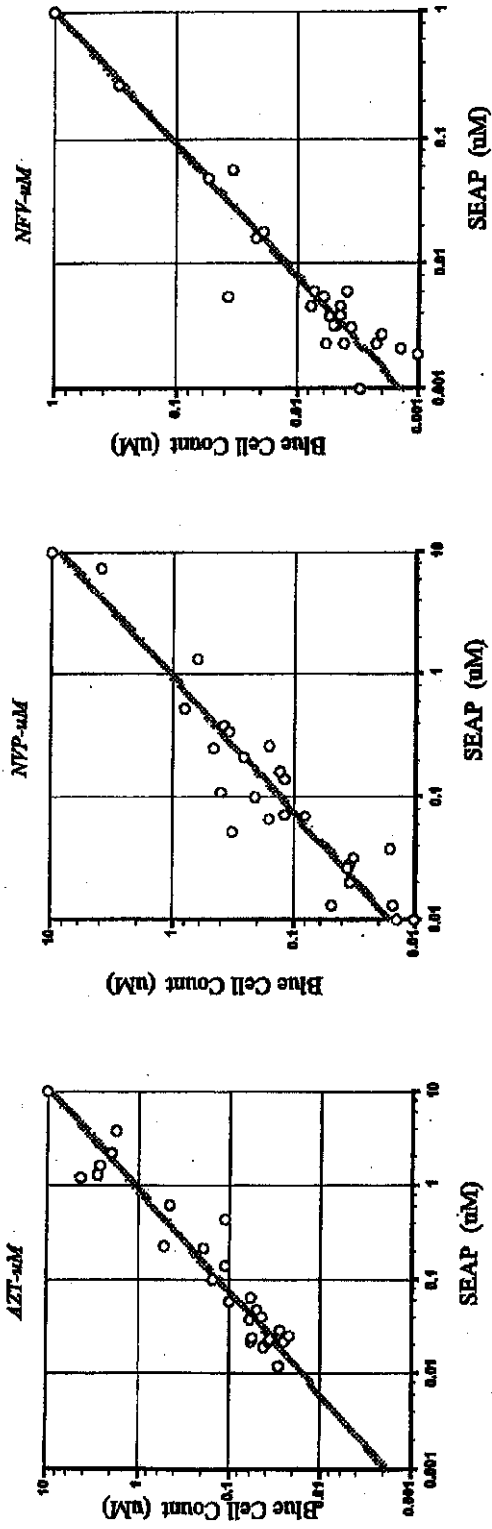


【 図 11 】

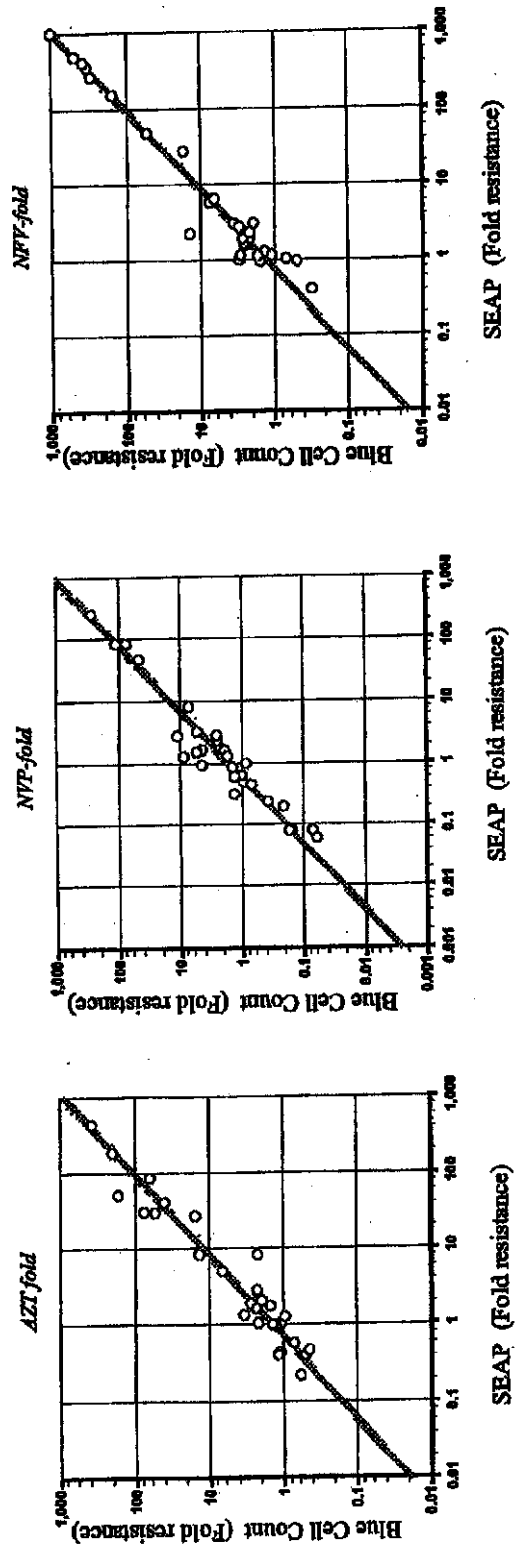
Phenotypic resistance to APV and mutation pattern



【 図 7 】



【 図 8 】



フロントページの続き

(72)発明者 岡 慎一  
東京都文京区弥生 2 - 13 - 7 - 502

Fターム(参考) 4B024 AA11 AA20 DA03 EA04 GA11  
4B063 QA01 QA18 QR02 QR13 QR77  
QR80 QX02  
4B065 AA93X AA93Y AA97X AC15  
BA02 CA46