

論文の内容の要旨

論文題目 Determination of HIV-1 subtypes (A-D, F, G, CRF01_AE) by PCR with novel designed primers, and analysis of subtype B from Brazil.

和訳 PCR による HIV-1 のサブタイプの鑑別とブラジルのサブタイプ B の解析

指導教官 牛島廣治教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 11 年 4 月進学

博士後期課程

国際保健学専攻

氏名 柳生 文宏

Introduction

後天性免疫不全症候群(AIDS)の原因となるヒト免疫不全ウイルス(HIV-1)は1983年に発見され、世界中に伝播した。この20年間に2000万人がエイズで死亡し、年間500万人が新たに感染し310万人が死亡している。また現在世界中で4200万人が感染している。

HIV-1の遺伝子に変異が多く、いくつかの分類カテゴリーがある。ほとんどのHIV-1はMグループに属しており、まれに見られるものをOグループ、M,Oどちらのグループにも属さないものをNグループに分類する。さらにMグループは9つのサブタイプに分類され、AとFはそれぞれA1とA2、F1とF2のサブサブタイプに分かれる。サブタイプBとDもサブサブタイプに分類されるが、慣例によりサブタイプとしての名前を与えられている。またリコンビナントも見つかっており、CRF01_AEはenv領域がサブタイプE、その他の遺伝子がサブタイプAで構成されているが、オリジナルのサブタイプEは見つかっていない。

世界中でのサブタイプの割合はサブタイプC(47.0%)、サブタイプA(27.2%)、サブタイプB(12.3%)、サブタイプD(5.3%)、CRF01_AE(3.2%)となっている。サブタイプには地域特異性があり、アフリカ、インドではサブタイプC、西欧諸国ではサブタイプB、東南アジアではサブタイプEが優位である。

サブタイプAはAIDSを発症しにくい、サブタイプCは他のサブタイプに比べ血中ウイルス量が高い、サブタイプA、CはサブタイプDに比べ母子感染を起こしやすいなどのサブタイプ間の違いが報告されているが、それらの違いは様々なファクターによって明確でなく、存在しないかもしれない。しかしながら、タイではサブタイプBはneedle sharingに

よって、サブタイプ E は性的接触によって感染するという事実により感染源を特定し、予防政策を成功に導いた。よってサブタイピングは疫学調査・研究は予防プログラムの立案や保健行政に役立つと考えられる。

本研究では、サブタイプ特異的プライマーを設計し、PCR によってサブタイプ A、B、C、D、F、G、CRF01_AE の鑑別することを目的とした。

Material and Methods

サンプル

インフォームドコンセントを得た後、血液サンプルを採取した。ブラジルから 6 サンプル、日本から 6 サンプル、ケニアとタイからそれぞれ 2 サンプル、タンザニアから 1 サンプル、感染地不明が 13 サンプルであった。(表)

DNA 抽出

プロテナーズ K を用いて血中細胞成分を処理し、DNA をエタノール沈殿で精製した。

beta-actin の PCR

ヒトの遺伝子に共通に含まれる beta-actin の PCR を行い、DNA の抽出の確認を行った。

v3 領域の sequence によるサブタイプの決定

v3 領域の sequence を行い、系統樹を描いてサブタイプを決定した。

PCR によるサブタイプ B と E の鑑別

先行研究(Yagyu F., et 2002. Differentiation of subtypes B and E of human immunodeficiency virus type 1 by polymerase chain reaction using novel env gene primers. J. Virol. Methods 101:11-20.)でデザインされたプライマーを用いて PCR を行い、サブタイプ B と CRF01_AE の鑑別を行った。

BRON06 の遺伝子解析

Env 領域全長を PCR で増幅しクローニングし、sequence を行った。得られた sequence を系統樹解析、Similarity Plot、BootScan および intrasubtype、intersubtype、intersubsubtype、BRON06 とサブタイプ B について distance を計算し比較した。

Results

beta-actin の PCR

すべてのサンプルが positive であった。

v3 領域の sequence によるサブタイプの決定

サブタイプ A、B、C、D、F、G、CRF01_AE がそれぞれ 7、6、3、6、1、1、6 サンプルであった。(表)

PCR によるサブタイプ B と CRF01_AE の鑑別

サブタイプ B と判定されたものは 10 サンプル、CRF01_AE と判定されたものは 15 サンプル、5 サンプルは PCR プロダクトが得られなかった。(表)

サブタイプ A、B、C、D、F、G、CRF01_AE 特異的プライマーの設計と PCR の結果代表的リファレンス株のアライメントをつくり、それぞれのサブタイプ特異的プライマー

を設計したが、一度の PCR での鑑別は困難なため図のような手順で鑑別を行った。結果はサブタイプ A、B、C、D、F、G、CRF01_AE がそれぞれ 6、5、2、5、1、1、6 サンプルで v3 領域の sequence と比較して 87% (26/30) が一致した。

BRON06 の遺伝子解析

NJ 法、UPGMA 法を用いてヌクレオチドとアミノ酸の系統樹を書いたところ、アミノ酸を UPGMA 法で描いたもので BRON06 はどのサブタイプにも属さない clade を形成した。他の系統樹ではサブタイプ B に属しているもののリファレンス株に対して枝が長かった。Similarity Plot、BootScan ではサブタイプ B という結果になった。リファレンス株の intrasubtype、intersubtype、intersubsubtype および BRON06 とサブタイプ B について distance を計算し比較したところ、BRON06 とサブタイプ B について distance は intersubsubtype の distance に位置していた。

Discussion

PCR によるサブタイプ B と CRF01_AE の鑑別においてサブタイプ B、と判定されたものは v3 領域の sequence によればサブタイプ B と D であり、サブタイプ CRF01_AE と判定されたものは v3 領域の sequence によればサブタイプ A、C、G、CRF01_AE であった。

この結果を参考にサブタイプ A、B、C、D、F、G、CRF01_AE 特異的プライマーの設計を行い、結果は感度 87% であった。残りの PCR プロダクトが得られなかったサンプルについては、beta-actin の PCR がすべてのサンプルで positive であったので、DNA 抽出に問題はなく、1 st PCR, 2 nd PCR のプライマーのミスマッチによるものと考えられる。また特異度は 100% であった。

遺伝子解析の結果より、BRON06 はサブタイプ B に属していることは明らかになったが、通常の変異と比べて G→A の変異が非常に多くハイパーミューテーションを起こしていることがわかった。しかしながら、PCR によるサブタイピングでも正しくサブタイプの鑑別を行うことができた。

Conclusion

新しく設計したサブタイプ特異的プライマーを用いた PCR によりサブタイプ A、B、C、D、F、G、CRF01_AE を鑑別することができ、87% (26/30) が検出可能で、検出できたものは v3 領域の sequence とすべて一致した。またブラジルからのサブタイプ B のサンプルはハイパーミューテーションを起こしていたが、PCR でも検出できた。新しくデザインしたプライマーを用いた PCR によるサブタイプの鑑別は正確かつ低コストであり、HIV 感染者を多く抱える発展途上国における HIV サブタイプスクリーニングに有効である。

表 サンプルと結果

sample	sex	age	sample taken in	v3 sequence	PCR differentiated to subtype B and E ^b Primers ^c	PCR with newly designed Primers ^d	PCR with newly designed Primers ^e
BRON01	M	34	Brazil	B	B	B	B
BRON02	M	24	Brazil	B	B	B	B
BRON03	M	54	Brazil	B	B	B	B
BRON04	F	31	Brazil	F	F	F	F
BRON05	M	33	Brazil	B	B	B	B
BRON06	M	36	Brazil	B	B	B	B
YoD	- ^a	- ^a	Japan	D	B	B	D
OS01	F	- ^a	Tanzania	D	B	B	D
OS02	F	- ^a	Japan	D	B	B	D
OS03	F	- ^a	Thailand	CRF01_AE	CRF01_AE	CRF01_AE	CRF01_AE
OS04	F	- ^a	Thailand	CRF01_AE	CRF01_AE	CRF01_AE	CRF01_AE
OS05	M	- ^a	Japan	CRF01_AE	CRF01_AE	CRF01_AE	CRF01_AE
OS06	- ^a	- ^a	- ^a	CRF01_AE	CRF01_AE	CRF01_AE	CRF01_AE
OS07	F	- ^a	Japan	CRF01_AE	CRF01_AE	CRF01_AE	CRF01_AE
OS08	F	- ^a	Kenya	A	CRF01_AE	A	A
OS09	M	- ^a	Japan	CRF01_AE	CRF01_AE	CRF01_AE	CRF01_AE
OS10	F	- ^a	Kenya	G	CRF01_AE	G	G
NG01	F	41	Africa	A	CRF01_AE	A	A
NG02	F	38	Africa	A	- ^f	- ^f	- ^f
NG03	F	21	Africa	D	B	B	D
NG04	M	14	Africa	C	CRF01_AE	C	C
NG05	F	36	Africa	A	CRF01_AE	CRF01_AE	A
NG06	F	26	Africa	A	CRF01_AE	CRF01_AE	A
NG07	F	20	Africa	C	CRF01_AE	C	C
NG08	F	61	Africa	A	- ^f	- ^f	- ^f
NG09	F	34	Africa	A	CRF01_AE	CRF01_AE	A
NG10	F	35	Africa	C	CRF01_AE	C	C
NG11	M	33	Africa	D	B	B	D
NG12	M	40	Africa	D	- ^f	- ^f	- ^f
JP02	M	31	Japan	B	- ^f	- ^f	- ^f

^a no data
^b using primer BECO5 and BECO3 for the first round PCR and BE-ANCH, B-SPEC and E-SPEC for the second PCR
^c using primer BECO5 and BECO3 for the first round PCR and, BE-ANCH, B-SPEC E-SPEC and newly designed subtype specific Primers C-SPEC and F-SPEC for the second round PCR
^d using primer BECO5 and BECO3 for the first round PCR and, BE-ANCH, B-SPEC E-SPEC and newly designed subtype specific Primers 5'A, 3'A, 5'E, 3'E, 5'G and 3'G for the second round PCR
^e using primer BECO5 and BECO3 for the first round PCR and, BE-ANCH, B-SPEC E-SPEC and newly designed subtype specific Primers 5'D and 3'D for the second round PCR
^f No product generated
^g Not done

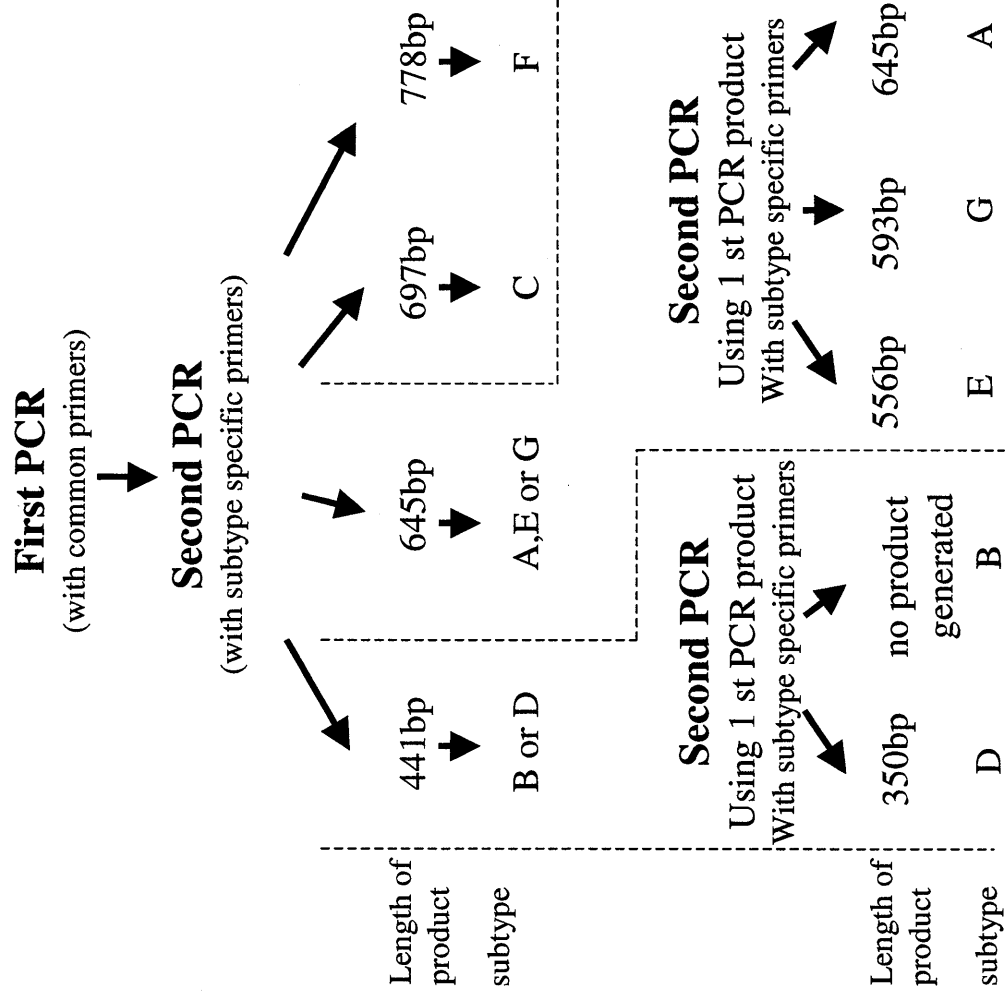


図 PCRの手順