

原 著

ナノポアシーケンサーによる
HIV-1 近全長遺伝子配列の決定と薬剤耐性検査重見 麗¹⁾, 松田 昌和¹⁾, 大出 裕高¹⁾, 山村 喜美¹⁾,
今橋 真弓¹⁾, 横幕 能行¹⁾, 岩谷 靖雅^{1,2)}¹⁾ 独立行政法人国立病院機構名古屋医療センター 臨床研究センター 感染・免疫研究部,
²⁾ 名古屋大学大学院 医学系研究科 免疫不全統御学講座

目的: これまで、HIV-1 薬剤耐性 (drug resistance; DR) 遺伝子検査 (DR 検査) では *pol* を対象として主にサンガー法による遺伝子配列解析により実施されてきた。しかし、2023 年の HIV-1 カプシド阻害剤承認に伴い *gag* のカプシド領域が追加され、作業負担が増大した。この問題を解決するため、われわれは HIV-1 近全長ゲノム (near-full-length genome; NFLG) 配列をナノポアシーケンサーで解析し DR 検査に使用するプロトコール (ナノポア法) を確立した。本研究では、両手法による違いを精査するため、比較解析を行った。

方法・結果: 2009 ~ 2023 年に当院で DR 検査を行った 516 症例を対象とした。509 症例 (98.6%) で NFLG 増幅産物が得られ、配列を決定した。抗 HIV-1 薬 18 剤に対する DR 判定を行い、既検査 (サンガー法) の結果と相違を分析した。まず、増幅成功症例のうち、472 症例 (92.7%) では両手法による DR 判定が完全一致していた。一方、37 症例 (7.2%) では微少変異の検出不一致に起因する不一致が認められた。また、両手法間の DR 関連座位のアミノ酸一致率は 99.6%、DR 検査対象 *pol* 中各 3 遺伝子領域の塩基配列一致率は 98.3% 以上であった。

考察: ナノポア法で決定した塩基配列の信頼性はサンガー法と同等であり、DR 検査に実装可能であると考えられた。

キーワード: HIV-1, 薬剤 DR 検査, ナノポアシーケンサー, ウイルスゲノム, サンガーシーケンサー

日本エイズ学会誌 27: 166-174, 2025

序 文

HIV-1 感染症の治療には、標的タンパク質の異なる、複数の抗 HIV-1 薬を用いた抗 HIV 療法 (antiretroviral therapy; ART) が基本となっている。HIV-1 薬剤耐性 (drug resistance; DR) 遺伝子検査 (DR 検査) は、HIV-1 感染者おののに対する適切な治療薬剤の選択や、薬剤耐性変異 (drug resistance-associated mutation; DRM) の出現・伝播を防ぐために役立てられており¹⁾、米国保健福祉省の DHHS ガイドライン (<https://hivinfo.nih.gov/>) において ART 開始前に実施することが推奨されている。これまで DR 検査は、感染者が保有するウイルスの一部のゲノム情報をサンガーシーケンサーにより解読し、その情報をもとに薬剤感受性を予測・評価する手法 (サンガー法) が用いられてきた^{1~3)}。名古屋医療センターでは、プロテアーゼ領域および逆転写酵素の部分領域 (*PRRT*) とインテグラーゼ領域 (*IN*) をそれぞれ RT-PCR により増幅したのちサンガー法で配列

解析し、その配列情報をもとに DR 判定を行ってきた。また、2023 年に新しい作用機序をもつ HIV-1 カプシド (capsid; CA) 阻害剤^{4,5)} の多剤耐性症例への使用が承認されたことに伴い、CA 領域も DR 検査の対象として加わった。

しかしながら、従来のサンガー法を用いた DR 検査では解析領域が増えると、遺伝子増幅のための新たなプライマーの設計、波形解析の時間の増加等、作業コストが増えることが懸念される。この問題を克服するため、われわれは HIV-1 近全長ゲノム領域 (Near-Full-Length Genome; NFLG) の配列解析を簡便に実施できるシステム (以下、ナノポア法) を構築した⁶⁾。このシステムでは、RT-PCR で増幅した HIV-1 NFLG 増幅産物をナノポアシーケンサーで配列解析し、ウイルス近全長配列から必要な領域の情報を抽出することで、いずれの領域を標的とする薬剤に対する DR 検査にも応用することが期待できる。これまでに、名古屋医療センターで収集した 106 症例を対象にサンガー法とナノポア法に基づく DR 検査結果の比較を行った⁶⁾。二検査法の結果は高い一致率を示し、ナノポア法が DR 検査に利用可能であることが示唆された⁶⁾。本研究では、さらにナノポア法の精査・検証を実施するため、名古屋医療センターで収集した 500 を超える症例を対象にナノポア法による DR

著者連絡先: 岩谷靖雅 (〒460-0001 名古屋市中区三の丸 4-1-1 独立行政法人国立病院機構名古屋医療センター 臨床研究センター 感染・免疫研究部)

2025 年 4 月 10 日受付; 2025 年 7 月 8 日受理

検査を実施し、サンガー法との比較評価を行った。

対象と方法

1. 対象検体

2009年から2023年に名古屋医療センターにおいてHIV-1DR検査を行った516症例を対象とした。本研究はヘルシンキ宣言を遵守し、名古屋医療センターの倫理委員会から承認を得ている（承認番号2010-310）。

2. HIV-1近全長ゲノム領域（Near-Full-Length Genome: NFLG）の増幅

QIAamp Viral RNA Mini Kit（Qiagen）を用いて血漿140 μ LからウイルスRNA（vRNA）をBuffer AVE 60 μ Lに抽出した。血中ウイルス量（Viral Load; VL）が100,000 copies/mLより高い場合は、100,000 copies/mL以下となるよう、vRNAをpoly-A溶液（20 μ g/mL）（Merck）を用いて希釈した。

RT-PCRにはPrimeScript II High Fidelity One Step RT-PCR Kit（Takara Bio）を用いた。Primerは、Forward primer（5'-CTCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTG [HXB2参照配列 nt 681-705]）、Reverse primer（5'-CACTCAAGGCAAGCTTTATTGAGGC [nt 9,631-9,607]）を使用した。25 μ Lの反応液組成は、蒸留水（Distilled Water; DW）6 μ L、2 \times One Step High Fidelity Buffer 12.5 μ L、2.5 μ M RT-PCR primers Mix 1 μ L（最終濃度は0.1 μ M）、PrimeScript II RT Enzyme Mix 0.5 μ L、PrimeSTAR GXL for 1 step RT-PCR 2 μ L、鋳型vRNA 3 μ Lとした。45 $^{\circ}$ C（15 min） \rightarrow 94 $^{\circ}$ C（2 min） \rightarrow [98 $^{\circ}$ C（10 s） \rightarrow 68 $^{\circ}$ C（1 min 40 s）] \times 40 サイクルを基本増幅条件とした。

Nested PCRにはPrimeSTAR GXL DNA Polymerase（Takara Bio）を用いた。Primerは、Forward primer（5'-TTTGACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGA [nt 761-786]）、Reverse primer（5'-GGTCTAACCAGAGAGACCCAGTACAG [nt 9,557-9,532]）を使用した。25 μ Lの反応液組成は、DW 14 μ L、5 \times PrimeSTAR GXL Buffer 5 μ L、2.5 mM dNTPs 2 μ L、2.5 μ M Nested PCR primer Mix 1 μ L（最終濃度0.1 μ M）、PrimeSTAR GXL 1 μ L、およびRT-PCR産物2 μ Lとした。[98 $^{\circ}$ C（10 s） \rightarrow 68 $^{\circ}$ C（1 min 30 s）] \times 35 サイクルを基本増幅条件とした。なお、PCRバイアスの影響を低く抑えるために1検体につき4回のPCRを行った。

エチジウムブロマイド入りの0.7%アガロースゲル電気泳動によって増幅産物の確認を行った。状況によっては基本増幅条件から変更して（プライマー濃度、PCRサイクル数や鋳型量の増減）再増幅を試みた。増幅目的位置（約8,800 bp）にシングルバンドを確認した増幅産物溶液は1検体分をまとめ、MultiScreen HTS PCR 96 filter（Merck）で精製後、DW 25 μ Lで回収し、Qubit dsDNA BR assay kit（Thermo Fisher, TF）で濃度測定を行った。

3. ライブラリーの作製

PCR産物の5'末端へのリン酸基付加ならびに3'末端へのdA付加のため、NEBNext Ultra II End repair/dA-tailing Module（New England Biolabs; NEB）を用いた。精製したNFLG増幅産物を80~100 fmol/20 μ Lに調製し、NEBNext Ultra II End Prep Reaction Buffer 2.8 μ LおよびNEBNext Ultra II End Prep enzyme Mix 1.2 μ Lを添加し、25 $^{\circ}$ C（5 min） \rightarrow 65 $^{\circ}$ C（5 min）で反応後、MultiScreen HTS PCR 96 filter（Merck）で精製、DW 22.5 μ Lで回収した。

各産物22.5 μ LにNative Barcode 1.5 μ L（SQK-NBD114.96, Oxford Nanopore Technologies [ONT]）、Native Adaptor 1.0 μ L（ONT）およびBlunt/TA Ligase Master Mix 25.0 μ L（NEB）を添加し、25 $^{\circ}$ C（20 min）でライゲーション反応を行い、バーコードならびにシーケンスアダプターを付加した。

精製にはAMPure XP Beads（Beckman Coulter）を使用した。ライゲーション溶液にビーズ20.0 μ L（反応系に対して40%）を添加し25 $^{\circ}$ C（10 min）で吸着後、上清を除去しLong Fragment Buffer（LFB）50 μ L（ONT）による洗浄を2回行った。Elution Buffer（EB）12 μ L（ONT）でビーズを再懸濁した後、37 $^{\circ}$ C（10 min）でライブラリーを溶出した。Qubit dsDNA HS assay kit（TF）で濃度測定を行った後、ライブラリーをプールし25~30 fmol/12 μ Lのライブラリー調整液を作製した。

4. ナノポアシーケンスと配列解析

Ligation Sequencing Amplicons-Native Barcoding Kit 96（ONT）のプロトコールに従い、Flow Cell Flush（FCF）1,170 μ L（ONT）、Flow Cell Tether（FCT）30 μ L（ONT）およびBovine Serum Albumin（BSA）5 μ L（TF）を混合した調整溶液をR10.4.1 MinION flow cell（FLO-MIN114, ONT）に添加し室温で静置（5 min）後、ライブラリー調整液12 μ LとSequencing Buffer（SB）37.5 μ L（ONT）およびLibrary Beads（LIB）25.5 μ L（ONT）の混合液をflow cellに添加し、MinION Mk1C（ONT）でシーケンスランの実行、データ取得を行った。終了後Wash Kit（ONT）で洗浄した。

MinION Mk1Cにて出力されたデータをもとに、当院で構築したデータ解析パイプライン⁶⁾を使用して、検体あたり100本以上のHIV-1 NFLG塩基配列を決定した。微少変異検出閾値は15%とした。各遺伝子領域のコンセンサス配列を、複数の塩基が検出された座位には縮重塩基（mixed base）を利用し決定した。

5. 薬剤耐性（DR）判定

Stanford University HIV DRUG RESISTANCE DATABASE（SFDB）のHIVdb Program : Mutation Analysis（<http://hivdb.stanford.edu>、HIVdb version 9.8 [last updated on 2025-01-05]）を使用し、決定したプロテアーゼ（Protease; PR）、

逆転写酵素 (Reverse transcriptase; RT), インテグラーゼ (Integrase; IN) 領域のコンセンサス塩基配列を用いて HIV-1DR 判定を行った。対象薬剤は, PR 阻害剤 (PI) として Atazanavir/r (ATV/r), Darunavir/r (DRV/r) および Lopinavir/r (LPV/r), 核酸系 RT 阻害剤 (NRTI) では Abacavir (ABC), Zidovudine (AZT), Emtricitabine (FTC), Lamivudine (3TC) および Tenofovir (TDF), 非核酸系 RT 阻害剤 (NNRTI) では Doravirine (DOR), Efavirenz (EFV), Etravirine (ETR), Nevirapine (NVP) および Rilpivirine (RPV), IN 阻害剤 (INSTI) では Bictegravir (BIC), Cabotegravir (CAB), Dolutegravir (DTG), Elvitegravir (EVG) および Raltegravir (RAL) とした。Wild type (基準株) として HXB2 (accession #K03455) を採用した。

結 果

1. HIV-1 NFLG の増幅

対象 516 症例の VL は 2,120~19,700,000 copies/mL (平均値 480,387 copies/mL) であった。既 DR 検査 (サンガー法) で決定したウイルスサブタイプ (PRRT 領域 [1,017 bp]) の割合は, B, CRF01_AE, C, CRF02_AG, A, および F がそれぞれ 85.7% ($n=442$), 6.8% ($n=35$), 1.6% ($n=8$), 1.2% ($n=6$), 0.4% ($n=2$), および 0.2% ($n=1$) であり, 残りはリコンビナントであった。リコンビナントで最も多かったのは B/CRF01_AE の 2.1% ($n=11$) であった。

NFLG の増幅を行ったところ, 509 症例 (98.6%) で増幅

産物が得られた。VL $\geq 10,000$ copies/mL の症例では 99.2% 以上, VL $<10,000$ copies/mL の症例においても 92.1% の増幅成功率であった (Table)。また, ウイルスサブタイプ B の症例では 98.4%, 非サブタイプ B の症例においても 100% の増幅成功率が得られた (Table)。また, 509 症例の治療歴については, 未治療が 92.7% ($n=472$) と大部分を占めており, 治療中断中が 4.1% ($n=21$), 治療中が 2.8% ($n=14$), 不明が 0.4% ($n=2$) であった。

2. DR 判定

得られた NFLG 増幅産物の塩基配列をナノポア法によって決定したところ, 509 症例すべての NFLG 塩基配列を決定できた。これら配列をサンガー法の配列との比較に用い, 精査解析を行った。

サンガー法で決定した配列 (PRRT [1,017 bp] および IN [864 bp] 領域) ならびにナノポア法で決定した *pol* 領域のコンセンサス配列を対象に, SFDB の HIVdb Program: Mutations Analysis を用いて抗 HIV-1 薬 4 クラス 18 剤 (PI: 3 剤, NRTI: 5 剤, NNRTI: 5 剤, INSTI: 5 剤) に対する DR 判定を行った。18 剤に対する判定結果が二検査法で完全に一致したのは 472 症例 (92.7%) で, 37 症例 (7.3%) は判定に相違があった (Fig. 1A)。判定結果の相違は, 検出率 0.39% ($n=2$: DRV/r, BIC および DTG) ~ 1.96% ($n=10$: EFV, NVP および CAB) で 18 剤すべてにおいてみられた (Fig. 1B)。

Table Amplification of HIV-1 near-full-length genome via RT-PCR

	Amplified ($n=509$)	Not amplified ($n=7$)	Total ($n=516$)
	n	n	n
Viral load (copies/mL)			
>100,000	226	1	227
10,000–100,000	248	3	251
<10,000	35	3	38
Subtype*			
B	435	7	442
CRF01_AE	35	0	35
C	8	0	8
CRF02_AG	6	0	6
A	2	0	2
F	1	0	1
B / CRF01_AE	11	0	11
Other	11	0	11

*The subtypes were determined based on PRRT sequences from Sanger sequencing-based drug resistance tests.

次に、判定相違のあった37症例のDR判定と判定に関する変異を精査した (Fig. 2, 太字で表した変異)。PIでの判定相違は5症例が該当し、Major DRMではV32VI, M46MI ($n=2$) およびI50IV, Accessory DRM (Fig. 2, 括弧内に表した変異) ではM46MVとN83NDが相違に関与していた。NRTIとNNRTIではそれぞれ10症例と12症例が該当し、うち1症例 (No.6) は両方に判定相違がみられた。NRTIではK65KR, D67DN, K70KT, L74LV, M184MI, M184MV, T215TI, T215TS, K219KQ および K219KR, NNRTIではV106VI ($n=2$), V108VI ($n=4$), E138EA, E138EG ($n=2$), V179VD, G190GE, H221HY, P225PH および M230MIが判定の相違であった。INSTIでは12症例が該当し、判定相違にはMajor DRMのT66TI, G140GS および P145PS, Accessory DRMのL74LM, L74LIM ($n=5$), L74IMV, T97TS, S230SHNRが関与していた。判定相違に関与したDRMはすべて微少変異であった。さらに、1検体 (No. 36) を除き、これら座位において最も高頻度で観察されたアミノ酸は野生型と同一であり、サンガー法とナノポア法で一致した。

判定相違に関与する微少変異がサンガー法のみで検出されたものは25症例 (PI: $n=2$, NRTIとNNRTI: $n=12$, INSTI: $n=10$, PIとINSTI: $n=1$)、ナノポア法のみで検出されたものは11症例 (PI: $n=2$, NRTIとNNRTI: $n=8$, INSTI: $n=1$)、サンガー法、ナノポア法それぞれで別々の微少変異が検出されたものは1症例であった。

3. DRM関連座位におけるアミノ酸の比較

判定相違に微少変異が関与していたことから、微少変異

の出現が判定相違症例に偏っている可能性が考えられたため、次の解析を行った。SFDB記載のDRM関連座位68カ所のアミノ酸 (PR: 16カ所 [D30, V32, L33, M46, I47, G48, I50, I54, Q58, T74, L76, V82, N83, I84, N88, およびL90], RT: 30カ所 [M41, A62, K65, D67, T69, K70, L74, V75, F77, L100, K101, K103, V106, V108, Y115, F116, E138, Q151, V179, Y181, M184, Y188, G190, L210, T215, K219, H221, P225, F227, およびM230], IN: 22カ所 [H51, T66, L74, E92, T97, G118, F121, E138, G140, Y143, P145, Q146, S147, Q148, G149, V151, S153, N155, E157, G163, S230, およびR263]) について、判定一致症例群 ($n=472$) および判定相違症例群 ($n=37$) における微少変異を検出した症例数を調べた。各座位において、サンガー法とナノポア法の両方またはいずれかで微少変異を検出した症例数の総数とした。その結果、各座位で微少変異を検出した症例数は、判定一致群では0~30症例、判定相違群では0~7症例で、68カ所での中央値は一致群および相違群でそれぞれ、1 (Interquartile range [IQR] 0~3) と1 (IQR 0~1) であった (Fig. 3A)。微少変異は68座位のうち50カ所で検出されたが、一致群のみ、相違群のみで検出したのは、それぞれ15カ所と4カ所であった。31カ所は両群ともに微少変異を検出した。判定相違に関与した微少変異が出現した25カ所 (PR: 4カ所 [V32, M46, I50, およびN83], RT: 15カ所 [K65, D67, K70, L74, V106, V108, E138, V179, M184, G190, T215, K219, H221, P225, およびM230], IN: 6カ所 [T66, L74, T97, G140, P145, およ

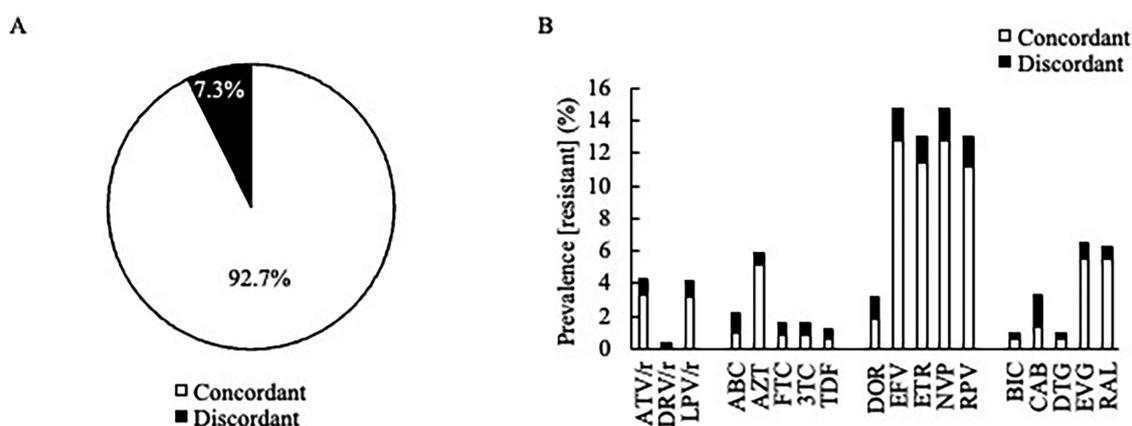


Fig. 1 Comparison of drug resistance (DR) results between Sanger and Nanopore sequencing-based DR tests for 509 cases

(A) Concordance rate (%) of DR test results between the two sequencing methods. (B) Prevalence (%) of DR case against each of 18 anti-HIV-1 drugs: Ritnavir-boosted Atazanavir (ATV/r), Ritnavir-boosted Darunavir (DRV/r), Ritnavir-boosted Lopinavir (LPV/r), Abacavir (ABC), Zidovudine (AZT), Emtricitabine (FTC), Lamivudine (3TC), Tenofovir (TDF), Doravirine (DOR), Efavirenz (EFV), Etravirine (ETR), Nevirapine (NVP), Rilpivirine (RPV), Bictegravir (BIC), Cabotegravir (CAB), Dolutegravir (DTG), Elvitegravir (EVG) and Raltegravir (RAL).

No.	PI				
	Mutations	Drug			
		ATV/r	DRV/r	LPV/r	
1	(L33F M46MV) (L33F)	PL		PL	
<u>2</u>	I501V (N83ND)	PL	L	I	
3	M46MI	PL		PL	
4	M46MI	PL		PL	
5	V32VI	L	L	L	

No.	Sanger sequencing	Nanopore sequencing	
			PL : Potential Low-Level Resistance

No.	NRTI					
	Mutations	Drug				
		ABC	AZT	FTC	3TC	
<u>6</u>	K70KT	L		PL	PL	L
7	K219KQ		PL			
8	K65KR	I		L	L	I
9	L74LV	I				
10	T215TS		PL			
11	M184MI	L		H	H	
12	D67DN		L			
13	K70N T215TI	L	L	PL	PL	PL
	K70N	L		PL	PL	L
14	M184MV	L		H	H	
15	D67DN		L			
	D67DN K219KR	PL	L			PL

No.	NNRTI					
	Mutations	Drug				
		DOR	EFV	ETR	NVP	
16	E138EG		PL	PL	PL	L
17	P225PH	L	I		I	
18	G190GE	H	H	I	H	H
<u>6</u>	V106VI E138EA			L		L
19	M230MI	PL	PL	PL	I	I
20	H221HY		PL	PL	L	L
21	V179VD		PL	PL	PL	PL
22	V108VI	PL	PL		L	
23	V108VI	PL	PL		L	
24	E138EG V179E		L	L	L	I
	V108VI V179E	PL	L	PL	L	L
25	V108VI V179VD	PL	L	PL	L	L
	V179VD	PL	PL	PL	PL	PL
26	V106VI V179AD		L	L	L	L
	V179D	PL	PL	PL	PL	PL

No.	INSTI					
	Mutations	Drug				
		BIC	CAB	DTG	EVG	
27	(L74LIM)		PL			
28	(L74LIM)		PL			
<u>2</u>	(L74LIM)		PL			
29	(L74LIM)		PL			
30	(S230SHNR)	PL	L	PL	L	L
31	T66TI		PL		H	L
32	(T97TAS)				PL	PL
33	(L74LM)		PL			
34	G140GS (E157EQ)	PL	L	PL	I	I
	(E157EQ)				PL	PL
35	(L74LIM E157Q)		PL		PL	PL
	(E157Q)				PL	PL
36	(L74IMV)		PL			
37	P145PS				H	

Fig. 2 Drug resistance-associated mutations (DRMs) identified in 37 cases of which results were discordant between Sanger and Nanopore sequencing-based tests

Resistance levels were classified into five categories: susceptible (blank), potential low-level (PL), low level (L), intermediate (I) and high level (H). Non-major accessory mutations in identified DRMs are indicated in parentheses, while DRMs that were discordant between the two methods are shown in bold. The cases #2 and #6 are underlined, which carried DRMs in two different classes of drugs.

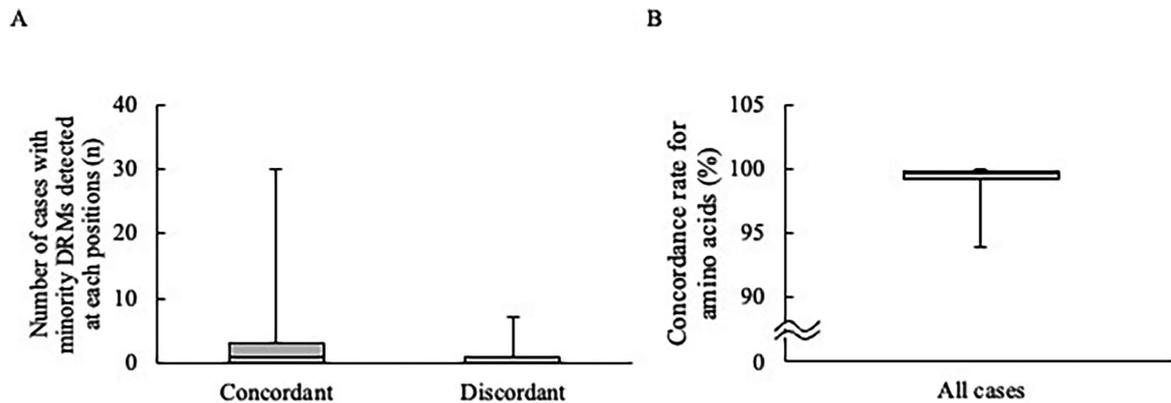


Fig. 3 Comparison of amino acid residues at 68 positions related to DRMs

(A) The graph shows the number of cases with minority DRMs detected at each of 68 DR-associated amino acid positions among 472 concordant cases and the other 37 cases (discordant). For each case, we counted the minority mutations identified by one of the two methods. (B) Concordance rate (%) of amino acid residues at the 68 positions for each case. In the box plots, medians and interquartile ranges are shown with horizontal lines within gray squares and upper and bottom lines of the squares. Error bars represent maximum and minimum quartile ranges.

び S230]) のうち、22 カ所 (T66, G140 および P145 を除く) において一致群においても微少変異を検出していた。一方、DRM 関連座位 68 カ所おのおのにおける全症例 ($n = 509$) のサンガー法とナノポア法で決定したアミノ酸の一致率を調べたところ、RT 領域 179 残基目が 93.9% で最も低く、11 座位 (PR 領域: 48, 54, 76, 88, および 90 残基目, RT 領域: 62, 75, 100, 151, 181, および 188 残基目) では 100% であった。一致率の 68 カ所の中央値は 99.6% (IQR 99.2 ~ 99.8) であった (Fig. 3B)。

4. 塩基配列の比較

DR 検査対象の 3 遺伝子領域 (PR 領域 [297 bp], RT 領域 [720 bp], および IN 領域 [864 bp]) について、サンガー法で決定した塩基配列およびナノポア法で決定したコンセンサス配列を比較した。各配列において、サンガー法では複数の塩基シグナルを検出した座位、ナノポア法では 15% 以上を占める塩基を複数検出した座位では縮重塩基として表記した。その結果、塩基配列の一致率の中央値は、PR, RT, および IN 領域でそれぞれ、98.3% (IQR 97.3~99.3), 98.3% (IQR 97.4~99.3), および 98.8% (IQR 98.0~99.4) であった (Fig. 4)。

考 察

われわれは以前にナノポアシーケンスによって決定した HIV-1 NFLG 配列を用いて薬剤 DR 検査を実施するシステム (ナノポア法) を構築し、DR 検査に使用し得るかについて検討を行った⁶⁾。本研究では、対象症例を増やし、ナノポア法の精度についてさらなる比較解析を行った。

2009 年から 2023 年に当院で DR 検査を行った 516 症例

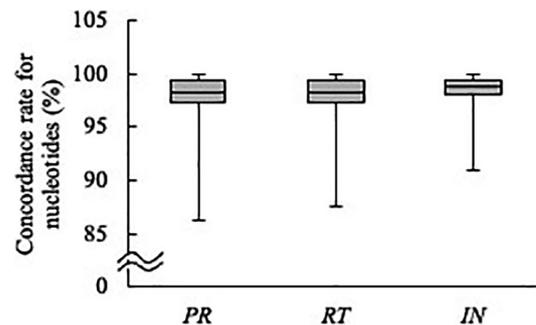


Fig. 4 Concordance rate (%) of nucleotide bases in the three gene regions: protease (PR, 297 bp), reverse transcriptase (RT, 720 bp) and integrase (IN, 864 bp)

The box plots show data between the 25th and 75th percentiles with central horizontal lines representing the median. Error bars represent maximum and minimum quartile ranges.

を対象に NFLG 増幅を試みたところ、509 症例 (98.6%) において増幅産物が得られ、サブタイプ B の 7 症例でのみ増幅できなかった (Table)。特に、VL が低い症例 (VL < 10,000 copies/mL) で増幅できない傾向が認められた。一方、増幅不能であった 7 症例のうち 4 症例は VL \geq 10,000 copies/mL であったものの、検体の凍結保存期間が 2~14 年であり、保存状態が NFLG 増幅不良に影響したのかもしれない。一般的に、血中 VL は HIV-1 感染急性期 (Fiebig Stage: FS I~IV) に 1,000,000 copies/mL 前後まで上昇し、感染後 30 日頃 (FS V) には急速に低下しはじめ 100 日以降 (FS VI) は 10,000 copies/mL 前後を維持することが知

られている^{7,8)}。また、対象症例の85.7%がサブタイプB、6.8%がCRF01_AEであり、全国におけるウイルスサブタイプのパターンと似ていた^{9,10)}。以上のことから、われわれが採用したNFLG増幅方法は、本邦においてDR検査の多くを占める治療開始前の症例に十分対応可能であると考えられた。

ナノポア法で決定したNFLG配列について4クラス(PI, NRTI, NNRTI, ならびにINSTI)18種類の抗HIV-1薬に対するDR判定をSFDBにて行い既検査結果(サンガー法)と比較したところ、対象509症例のうち472症例(92.7%)で判定の完全一致を認めた(Fig. 1A)。われわれはこれまでに、106症例を対象とし、ANRS (<https://hivfrenchresistance.org/>)を基準とした検査結果の一致率を92.5%と報告している⁶⁾。また、同一106症例に対してSFDBにて別途行った検査においても92.5%の一致率が得られた。このことから、症例数を増やした本研究においても、検査結果の一致率について、以前の報告⁶⁾と同様の結果が得られた。さらに、509症例におけるDRM関連座位68カ所のアミノ酸一致率の中央値は99.6%(IQR 99.2~99.8)であった(Fig. 3B)。DR検査対象3遺伝子領域(PR, RTおよびIN)の塩基配列の一致率についても、中央値はそれぞれ98.3%(IQR 97.3~99.3), 98.3%(IQR 97.4~99.3), 98.8%(IQR 98.0~99.4)であった(Fig. 4)。これらは微少アミノ酸、微少塩基を考慮しての一致率である。以上のことから、ナノポア法で決定した配列はサンガー法の配列と互換性があり、DR検査に利用可能であることを示唆するものである。

一方で、二検査法間でのDR判定の相違は37症例(7.3%)で観察され、微少変異の検出不一致が起因していた(Fig. 2)。判定相違症例は薬剤クラスによる偏りはなく、すべての薬剤で0.39~1.96%の割合の症例に認められた(Fig. 1B)。このことから、二検査法での微少変異の検出不一致は特定の領域に偏って出現するなどの遺伝子的要因にある可能性は低いと考えられる。また、判定一致症例においてDR関連の微少変異が二検査法で共通して検出できたことから(Fig. 3A)、ナノポア法でもサンガー法同様微少変異を検出できると考えられる。最も可能性が高い要因として、サンガー法とナノポア法で異なる増幅産物を用いたことに起因する、いわゆるPCRバイアスがあったと考えられる。あるいは、別の要因として、二検査法での微少変異の検出基準の違いもあげられるだろう。サンガー法では波形解析ソフト(SeqScape_4 [TF])で変異を自動検出したのち、目視で確認してさらに変異をピックアップしていたため検出基準が一定ではなかった可能性がある。一方、ナノポア法では各症例で得られた配列の15%未満の頻度を占めた変異は解析対象から除外してい

る。判定で相違が認められた37症例のうち25症例では、微少変異をサンガー法のみで検出していた(Fig. 2)。これら変異のうち波形解析ソフト(SeqScape_4)の既定値(Call IUB if 2nd highest peak is >10%)で縮重塩基を自動検出したのは2症例だけであり、他は目視修正したものであった。以上のことから、サンガー法とナノポア法で生じた耐性判定の相違は、サンガー法で波形を確認する際の人的な目視バイアスにも起因していることが考えられる。

2023年8月にHIV-1カプシド(CA)を標的としたHIV-1阻害剤、レナカパビル(LEN)^{4,5)}が国内で承認された。今後も新しい作用機序をもつ薬剤が出現することが予想される。また、DRに関与する部位は、RT領域の一般的な解析範囲(1~240位アミノ酸)外の318位と348位にもあり、さらにINSTIでは薬剤標的部位以外に存在することも報告されている^{11~14)}。そのため、HIV-1NFLG配列を解析することは、新たな薬剤に迅速に対応できるようになることや、新たな知見に対してウイルス配列をすぐに照らし合わせ精査することが可能になることが期待できる。このように、NFLG配列を把握できることは従来のサンガー法をはるかに凌ぐ利点である。

本研究のLimitationは、VL < 1,000 copies/mLの症例が対象になく、低VLの症例に対する検証が不足している点である。近年国内において曝露前予防内服(Pre-exposure prophylaxis; PrEP)を選択する人が増えており、非使用者と比較し偶発的な感染が有意に減少したとの報告がある¹⁵⁾。一方、国外においては不適切なPrEPによりHIV-1に感染した症例では高い割合で低VLを維持することも報告されている¹⁶⁾。今後初診時に低VLである症例が少なからずでてくることも考えられる。また、抗HIV-1療法中にVLの変化がみられた場合に低VLであってもDR検査を行う場合もある。そのため、低VL症例についてもNFLGによるDR検査を検討する必要があると思われる。

謝辞

本研究は日本医療研究開発機構(AMED)(エイズ対策実用化研究事業)(JP23fk0410050h0402 [今橋, 研究開発代表者: 菊地正 国立健康危機管理研究機構], JP23fk0410058h0001 [岩谷])および日本学術振興会(JSPS) 科研費(JP23K07938 [大出], JP22H02882 [岩谷])により実施致しました。また臨床から支援を賜りました独立行政法人国立病院機構名古屋医療センター CARESのスタッフのみなさまに合わせて御礼申し上げます。

利益相反: 本研究において利益相反に相当する事項はない。

文 献

- 1) Clutter DS, Jordan MR, Bertagnolio S, Shafer RW : HIV-1 drug resistance and resistance testing. *Infect Genet Evol* 46 : 292–307, 2016.
- 2) Ávila-Ríos S, Parkin N, Swanstrom R, Paredes R, Shafer R, Ji H, Kantor R : Next-generation sequencing for HIV drug resistance testing: laboratory, clinical, and implementation considerations. *Viruses* 12 : 617, 2020.
- 3) Metzner KJ : Technologies for HIV-1 drug resistance testing: inventory and needs. *Curr Opin HIV AIDS* 17 : 222–228, 2022.
- 4) Link JO, Rhee MS, Tse WC, Zheng J, Somoza JR, Rowe W, Begley R, Chiu A, Mulato A, Hansen D, Singer E, Tsai LK, Bam RA, Chou CH, Canales E, Brizgys G, Zhang JR, Li J, Graupe M, Morganelli P, Liu Q, Wu Q, Halcomb RL, Saito RD, Schroeder SD, Lazerwith SE, Bondy S, Jin D, Hung M, Novikov N, Liu X, Villaseñor AG, Cannizzaro CE, Hu EY, Anderson RL, Appleby TC, Lu B, Mwangi J, Liclican A, Niedziela-Majka A, Papalia GA, Wong MH, Leavitt SA, Xu Y, Koditek D, Stepan GJ, Yu H, Pagratis N, Clancy S, Ahmadyar S, Cai TZ, Sellers S, Wolckenhauer SA, Ling J, Callebaut C, Margot N, Ram RR, Liu YP, Hyland R, Sinclair GI, Ruane PJ, Crofoot GE, McDonald CK, Brainard DM, Lad L, Swaminathan S, Sundquist WI, Sakowicz R, Chester AE, Lee WE, Daar ES, Yant S R, Cihlar T : Clinical targeting of HIV capsid protein with a long-acting small molecule. *Nature* 584 : 614–618, 2020.
- 5) Segal-Maurer S, DeJesus E, Stellbrink HJ, Castagna A, Richmond GJ, Sinclair GI, Siripassorn K, Ruane PJ, Berhe M, Wang H, Margot NA, Dvory-Sobol H, Hyland RH, Brainard DM, Rhee MS, Baeten JM, Molina JM : Capsid inhibition with lenacapavir in multidrug-resistant HIV-1 infection. *N Engl J Med* 386 : 1793–1803, 2022.
- 6) Ode H, Matsuda M, Shigemi U, Mori M, Yamamura Y, Nakata Y, Okazaki R, Kubota M, Setoyama Y, Imahashi M, Yokomaku Y, Iwatani Y : Population-based Nanopore sequencing of the HIV-1 pangenome to identify drug resistance mutations. *Sci Rep* 14 : 12099, 2024.
- 7) Fiebig EW, Wright DJ, Rawal BD, Garrett PE, Schumacher RT, Peddada L, Heldebrant C, Smith R, Conrad A, Kleinman SH, Busch MP : Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. *AIDS* 17 : 1871–1879, 2003.
- 8) McMichael AJ, Borrow P, Tomaras GD, Goonetilleke N, Haynes BF : The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nat Rev Immunol* 10 : 11–23, 2010.
- 9) Hattori J, Shiino T, Gatanaga H, Mori H, Minami R, Uchida K, Sadamasu K, Kondo M, Sugiura W : Characteristics of transmitted drug-resistant HIV-1 in recently infected treatment-naïve patients in Japan. *J Acquir Immune Defic Syndr* 71 : 367–373, 2016.
- 10) Shiino T, Hachiya A, Hattori J, Sugiura W, Yoshimura K : Nation-wide viral sequence analysis of HIV-1 subtype B epidemic in 2003–2012 revealed a contribution of men who have sex with men to the transmission cluster formation and growth in Japan. *Front Reprod Health* 2 : 531212, 2020.
- 11) Malet I, Subra F, Charpentier C, Collin G, Descamps D, Calvez V, Marcelin AG, Delelis O : Mutations located outside the integrase gene can confer resistance to HIV-1 integrase strand transfer inhibitors. *mBio* 8 : e00922–17, 2017.
- 12) Hikichi Y, Van Duyne R, Pham P, Groebner JL, Wiegand A, Mellors JW, Kearney MF, Freed EO : Mechanistic analysis of the broad antiretroviral resistance conferred by HIV-1 envelope glycoprotein mutations. *mBio* 12 : e03134–20, 2021.
- 13) Hachiya A, Kubota M, Shigemi U, Ode H, Yokomaku Y, Kirby KA, Sarafianos SG, Iwatani Y : Specific mutations in the HIV-1 G-tract of the 3′-polypurine tract cause resistance to integrase strand transfer inhibitors. *J Antimicrob Chemother* 77 : 574–577, 2022.
- 14) Hikichi Y, Grover JR, Schäfer A, Mothes W, Freed EO : Epistatic pathways can drive HIV-1 escape from integrase strand transfer inhibitors. *Sci Adv* 10 : eadn0042, 2024.
- 15) Mizushima D, Takano M, Ando N, Uemura H, Yanagawa Y, Aoki T, Watanabe K, Ishizuka N, Oka S : A four-year observation of HIV and sexually transmitted infections among men who have sex with men before and during pre-exposure prophylaxis in Tokyo. *J Infect Chemother* 28 : 762–766, 2022.
- 16) To K, Lee S : A review of reported cases of HIV pre-exposure prophylaxis failure with resultant breakthrough HIV infections. *HIV Med* 22 : 75–82, 2021.

Nanopore Sequencing of HIV-1 Near-Full-Length Genome for Drug Resistance Testing

Urara SHIGEMI¹⁾, Masakazu MATSUDA¹⁾, Hirotaka ODE¹⁾, Yoshimi YAMAMURA¹⁾,
Mayumi IMAHASHI¹⁾, Yoshiyuki YOKOMAKU¹⁾ and Yasumasa IWATANI^{1,2)}

¹⁾ Department of Infectious Diseases and Immunology, Clinical Research Center, NHO Nagoya Medical Center,

²⁾ Laboratory of AIDS Research, Nagoya University Graduate School of Medicine

Objective : HIV-1 drug resistance (DR) testing has been performed based on short-fragment sequences via sanger sequencing. However, because of addition of a new class drug, determination of the additional HIV-1 target sequences is needed. Hence, we have recently developed a DR test protocol using HIV-1 near-full-length genome (NFLG) sequences determined by long-read nanopore sequencing technology. Here, to further validate our new protocol, we compared DR test results between the two methods.

Methods and Results : We analyzed DR tests for 516 cases in Nagoya Medical Center between 2009 and 2023. Success rate of NFLG amplification was approximately 98.6% ($n = 509$). For 92.7% of the successful amplification cases ($n = 472$), the DR test outcomes displayed high concordance between the two methods against 18 anti-HIV-1 drugs. In contrast, discordant results were observed in 37 cases largely due to different detection of low-abundance variants. Moreover, concordance rate of amino acids at 68 DR-associated positions were 99.6% between the two methods, whereas concordance rates of nucleotide bases were 98.3% or above for each 3 gene in *pol*.

Discussion : These results suggest that our new protocol would be useful for HIV-1 DR test in the clinical settings as well as efficient for understanding in HIV-1 molecular epidemiology.

Key words : HIV-1, drug resistance test, Nanopore sequencing, viral genome, Sanger sequencing