

|                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title            | 次世代シーケンシングを用いた準完全長HIV-1プロウイルスの定量法の確立                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| Sub Title        | Development quantitatively measuring method of quasi-full length HIV-1 provirus by using next generation sequencing.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| Author           | 西松, 直美(Nishimatsu, Naomi)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Publisher        | 慶應義塾大学                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| Publication year | 2019                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| Jtitle           | 学事振興資金研究成果実績報告書 (2018. )                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| JaLC DOI         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Abstract         | <p>申請時には、準完全長プロウイルス量の測定法の確立のために次世代シーケンシングを用いる方針であったが、組み換えPCRを用いてより簡易に行える方法を考案したため、それを成果実績として報告する。</p> <p>【方法】 HIV- 1 ゲノムにおけるU5、gag、vif、env、U3の5箇所の領域を同時にもつプロウイルスを準完全長プロウイルスと定義し、これら5か所の領域のプライマーを作成した。PCRの増幅過程でU5-gag-vif、およびenv-U3がそれぞれ繋がるように、作成するプライマーの端にアタッチメント配列を付加し、これを用いて2段階のmultiplex-PCRを行った。すなわち、最初のPCRにおいて、multiplex-PCRを用いてHIV-1のU5、gag、vifの3ヶ所およびenvとU3の2ヶ所が繋がるように増幅させた。この時点では断片的なDNAも増幅されてしまうため、複数のバンドが確認される。2回目のPCRでは目的の配列だけを増幅させるようにU5-forward、gag-reverseのプライマーおよびvif-forward、U3-reverseのプライマーを用いて再度multiplex-PCRを行った。これにより完全長ウイルスが存在する場合には特有の2本のバンドを確認することが出来た。</p> <p>【結果】 実験は前もってプロウイルス濃度をポアソン分布により求め、1反応あたり約0.4コピーのプロウイルスを含むようにサンプルを調製して行った。プラスミドを用いた試験において、1チューブ当たりのウイルス量が10コピーの条件および1コピーの条件において特有のバンドを検出できるプライマーを作成することが出来た。またヒトDNAが反応液に100ng存在する条件に置いても同様にバンドを検出出来ることを確認した。これにより、ヒトより採取した検体においても準完全長プロウイルスを検出することが出来ると考えられる。今後はこの方法を用いて患者検体の定量を行い、準完全長プロウイルス量と治療効果との関連を調べ、至適治療法の開発に繋げたい。</p> <p>At the time of our application, we had planned to develop a quantitatively measuring method of quasi-full length HIV-1 provirus by using next generation sequencing. However, we devised a simpler method using recombinant PCR, and thus we report our results and achievements here.</p> <p>[Methods]</p> <p>We defined quasi-full length proviruses as proviruses that have the 5 regions U5, gag, vif, env, and U3 within the HIV-1 genome, and created primers for each region. During PCR amplification, attachment sequences were added to the ends of the primers to join U5-gag-vif and env-U3 in order to perform two-step multiplex-PCR. In other words, amplification by multiplex-PCR was performed (the first PCR step) to join the 3 sites of HIV-1 U5, gag, and vif, and the 2 sites of env and U3. At this point, multiple bands become observable due to the amplification of fragmented DNA. The U5-forward and gag-reverse primers, and the vif-forward and U3-reverse primers were then used in the second round of multiplex-PCR to amplify only the target sequences. This allowed the appearance of 2 specific bands in the presence of quasi-full length proviruses.</p> <p>[Conclusion]</p> <p>Before the experiment, proviral concentration was calculated using a Poisson distribution, and samples were prepared so they contained approximately 0.4 copies of proviruses per reaction. In the test using plasmids, we were able to obtain primers that can be used to detect unique bands under the conditions of a proviral load of 10 copies per tube, and a proviral load of 1 copy per tube. We also confirmed that bands can similarly be detected from reagents that contained 100 ng of human DNA. Based on our results, it may be possible to detect quasi-full length proviruses from human specimens. In the future, we will apply this method to quantify proviral loads in patient samples, study the relationship between quasi-full length proviral load and treatment efficacy, and develop optimal treatment methods.</p> |
| Notes            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Genre            | Research Paper                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| URL              | <a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2018000006-20180426">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2018000006-20180426</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |



|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                         |                                                |                          |                  |     |        |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|------------------------------------------------|--------------------------|------------------|-----|--------|
| 研究代表者                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 所属                      | 大学病院薬剤部門                                       | 職名                       | 技術員              | 補助額 | 500 千円 |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 氏名                      | 西松 直美                                          | 氏名（英語）                   | Naomi Nishimatsu |     |        |
| 研究課題（日本語）                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                         |                                                |                          |                  |     |        |
| 次世代シーケンシングを用いた準完全長 HIV-1 プロウイルスの定量法の確立                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                         |                                                |                          |                  |     |        |
| 研究課題（英訳）                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                         |                                                |                          |                  |     |        |
| Development quantitatively measuring method of quasi-full length HIV-1 provirus by using next generation sequencing.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                         |                                                |                          |                  |     |        |
| 研究組織                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                         |                                                |                          |                  |     |        |
| 氏 名 Name                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                         | 所属・学科・職名 Affiliation, department, and position |                          |                  |     |        |
| 西松 直美（Naomi Nishimatsu）                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                         | 薬剤部 薬剤師                                        |                          |                  |     |        |
| 小谷 宙（Hiroshi Kotani）                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                         | 薬剤部 兼 医学部感染制御センター 薬剤師                          |                          |                  |     |        |
| 長谷川 直樹（Naoki Hasegawa）                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                         | 医学部感染制御センター 教授 医師                              |                          |                  |     |        |
| 加藤 真吾（Shingo Kato）                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                         | 医学部微生物・免疫学教室 専任講師                              |                          |                  |     |        |
| 須藤 弘二（Koji Sudo）                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                         | 医学部微生物・免疫学教室 特任助教                              |                          |                  |     |        |
| 1. 研究成果実績の概要                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                         |                                                |                          |                  |     |        |
| <p>申請時には、準完全長プロウイルス量の測定法の確立のために次世代シーケンシングを用いる方針であったが、組み換え PCR を用いてより簡易に行える方法を考案したため、それを成果実績として報告する。</p> <p>【方法】HIV-1 ゲノムにおける U5、gag、vif、env、U3 の 5 箇所の領域を同時にみつプロウイルスを準完全長プロウイルスと定義し、これら 5 か所の領域のプライマーを作成した。PCR の増幅過程で U5-gag-vif、および env-U3 がそれぞれ繋がるように、作成するプライマーの端にアタッチメント配列を付加し、これを用いて 2 段階の multiplex-PCR を行った。すなわち、最初の PCR において、multiplex-PCR を用いて HIV-1 の U5、gag、vif の 3 ヶ所および env と U3 の 2 ヶ所が繋がるように増幅させた。この時点では断片的な DNA も増幅されてしまうため、複数のバンドが確認される。2 回目の PCR では目的の配列だけを増幅させるように U5-forward、gag-reverse のプライマーおよび vif-forward、U3-reverse のプライマーを用いて再度 multiplex-PCR を行った。これにより完全長ウイルスが存在する場合には特有の 2 本のバンドを確認することが出来た。</p> <p>【結果】実験は前もってプロウイルス濃度をポアソン分布により求め、1 反応あたり約 0.4 コピーのプロウイルスを含むようにサンプルを調製して行った。プラスミドを用いた試験において、1 チューブ当たりのウイルス量が 10 コピーの条件および 1 コピーの条件において特有のバンドを検出できるプライマーを作成することが出来た。またヒト DNA が反応液に 100ng 存在する条件に置いても同様にバンドを検出出来ることを確認した。これにより、ヒトより採取した検体においても準完全長プロウイルスを検出することが出来ると考えられる。今後はこの方法を用いて患者検体の定量を行い、準完全長プロウイルス量と治療効果との関連を調べ、至適治療法の開発に繋げたい。</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                         |                                                |                          |                  |     |        |
| 2. 研究成果実績の概要（英訳）                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                         |                                                |                          |                  |     |        |
| <p>At the time of our application, we had planned to develop a quantitatively measuring method of quasi-full length HIV-1 provirus by using next generation sequencing. However, we devised a simpler method using recombinant PCR, and thus we report our results and achievements here.</p> <p>[Methods]</p> <p>We defined quasi-full length proviruses as proviruses that have the 5 regions U5, gag, vif, env, and U3 within the HIV-1 genome, and created primers for each region. During PCR amplification, attachment sequences were added to the ends of the primers to join U5-gag-vif and env-U3 in order to perform two-step multiplex-PCR. In other words, amplification by multiplex-PCR was performed (the first PCR step) to join the 3 sites of HIV-1 U5, gag, and vif, and the 2 sites of env and U3. At this point, multiple bands become observable due to the amplification of fragmented DNA. The U5-forward and gag-reverse primers, and the vif-forward and U3-reverse primers were then used in the second round of multiplex-PCR to amplify only the target sequences. This allowed the appearance of 2 specific bands in the presence of quasi-full length proviruses.</p> <p>[Conclusion]</p> <p>Before the experiment, proviral concentration was calculated using a Poisson distribution, and samples were prepared so they contained approximately 0.4 copies of proviruses per reaction. In the test using plasmids, we were able to obtain primers that can be used to detect unique bands under the conditions of a proviral load of 10 copies per tube, and a proviral load of 1 copy per tube. We also confirmed that bands can similarly be detected from reagents that contained 100 ng of human DNA. Based on our results, it may be possible to detect quasi-full length proviruses from human specimens. In the future, we will apply this method to quantify proviral loads in patient samples, study the relationship between quasi-full length proviral load and treatment efficacy, and develop optimal treatment methods.</p> |                         |                                                |                          |                  |     |        |
| 3. 本研究課題に関する発表                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                         |                                                |                          |                  |     |        |
| 発表者氏名<br>（著者・講演者）                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 発表課題名<br>（著書名・演題）       | 発表学術誌名<br>（著書発行所・講演学会）                         | 学術誌発行年月<br>（著書発行年月・講演年月） |                  |     |        |
| 小谷 宙                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 準完全長プロウイルスによる治療効果の新しい評価 | 第 32 回日本エイズ学会学術集会・総会                           | 2018 年 12 月 4 日          |                  |     |        |