

「薬剤耐性検査法に関する研究」 治療歴のない HIV 感染者における薬剤耐性変異の検出例について

分担研究者 大石 功 (大阪府立公衆衛生研究所病理課長)
協力研究者 森 治代、小島洋子、川畑拓也、大竹 徹 (同 病理課)
今井光信 (神奈川県衛生研究所ウイルス部長)

研究概要 HAART の普及により HIV 感染症の治療は著しい効果を挙げているが、その一方で治療の長期化に伴い薬剤耐性ウイルスを保有する感染者が増加し、新規感染者への耐性ウイルスの伝播が懸念されている。今回、感染初期と思われる抗 HIV 剤服用歴のない感染者において、末梢血単核球 (PBMC) 中のプロウイルス DNA を分析した結果、逆転写酵素領域に 3TC の薬剤耐性に関連する変異 (M184V) がみとめられた。その後の治療経過も含めて報告する。

A. 研究目的

HAART の普及により HIV 感染症の治療は著しい効果を挙げているが、その一方で治療の長期化に伴い薬剤耐性ウイルスを保有する感染者が増加し、新規感染者への耐性ウイルスの伝播が懸念されている。今回、感染初期と思われる抗 HIV 剤服用歴のない感染者において、薬剤耐性に関連する変異が検出されたので、その後の治療経過も含めて報告する。

B. 研究方法

抗 HIV 薬未治療かつ感染ルートが血液製剤以外によるものである感染者 25 名について、薬剤耐性の genotype 検査を実施した。末梢血単核球 (PBMC) 中のプロウイルス DNA および一部の検体については血漿中の HIV RNA について、逆転写酵素 (RT) およびプロテアーゼ領域を PCR で増幅した後、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定し、薬剤耐性に関わるアミノ酸変異を解析した。

(倫理面への配慮)

薬剤治療を担当している臨床医師から当該感染者の了解を得たのち、当研究がフォローアップ検査の依頼を受けて実施した。

C. 研究結果

検討した 25 名の感染者のうち、一年前には抗 HIV-1 抗体が陰性であったことが確認されている 1 名の感染者において、抗 HIV 剤による治療歴がないにも関わらず、プロウイルス DNA の RT 領域に 3TC 耐性に関連する M184V の変異が検出された。その他の耐性関連変異は認められず、また血漿中の HIVRNA にも変異は検出されなかった。d4T+ddI+nelfinavir (NFV) の三剤併用療法を開始後の 4 ヶ月でウイルス量は 50 コピー以下にまで減少したが、7 ヶ月目には再び検出可能となり 14 ヶ月後には 8,500 コピーにまで上昇した。この時点で、プロウイルス DNA には M184V 以外の変異は検出されなかったが、血漿中の HIVRNA において RT 領域に AZT 耐性関

連変異である T215Y が、またプロテアーゼ領域には NFV 耐性獲得を示唆する D30N、V77I、N88D の変異が検出された《図 1 を参照》。薬剤未治療時のプロウイルスおよびコピー数上昇期のウイルス RNA について、プロテアーゼ領域から RT 領域までを同時に増幅した PCR 産物を pCR2.1 ベクターに TA クローニングし、耐性変異の存在を確認した。その結果、未治療時には 5 クローン中 3 クローンに 184V が検出され、1 クローンは 184I、残りの 1 クローンは野生株の配列である 184M であった。また、コピー数上昇期には 5 クローンすべての RT およびプロテアーゼ領域にダイレクトシーケンスで検出されたものと同様の耐性変異が検出され、そのうちの 1 クローンのプロテアーゼ領域においては、D30N、V77I、N88D に M46L および A71T が加わった計 5 カ所の変異が認められた。

D. 考察

検出された RT 阻害剤に対する耐性変異はいずれも服用歴のない薬剤に対するものであり、耐性ウイルスが感染した可能性が強く示唆された。今回の結果から、治療開始前の薬剤耐性検査にはプロウイルス DNA について、また治療中にウイルス量が上昇し耐性ウイルスの出現が疑われた場合には血漿中の RNA について実施するのが望ましいと考えられた。

E. 結論

HIV の薬剤耐性について、感染初期症例の PBMC 中のプロウイルス DNA を分析した結果、治療歴がないにもかかわらず、逆

転写酵素領域に 3TC の薬剤耐性に関連する変異 (M184V) がみとめられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1、森治代、小島洋子、川畑拓也、大竹徹、大石功、薬剤耐性 HIV-1 の検出および検出法の評価、感染症学雑誌 74 (5) : 450-457 (2000 年)。

2、小島洋子、大竹徹、森治代、川畑拓也、大石功、永尾暢夫、柴田弘俊、ウイルス分離を指標とした HIV 感染者の薬剤治療効果の判定、感染症学雑誌 74 (8) :

638-645. (2000 年)

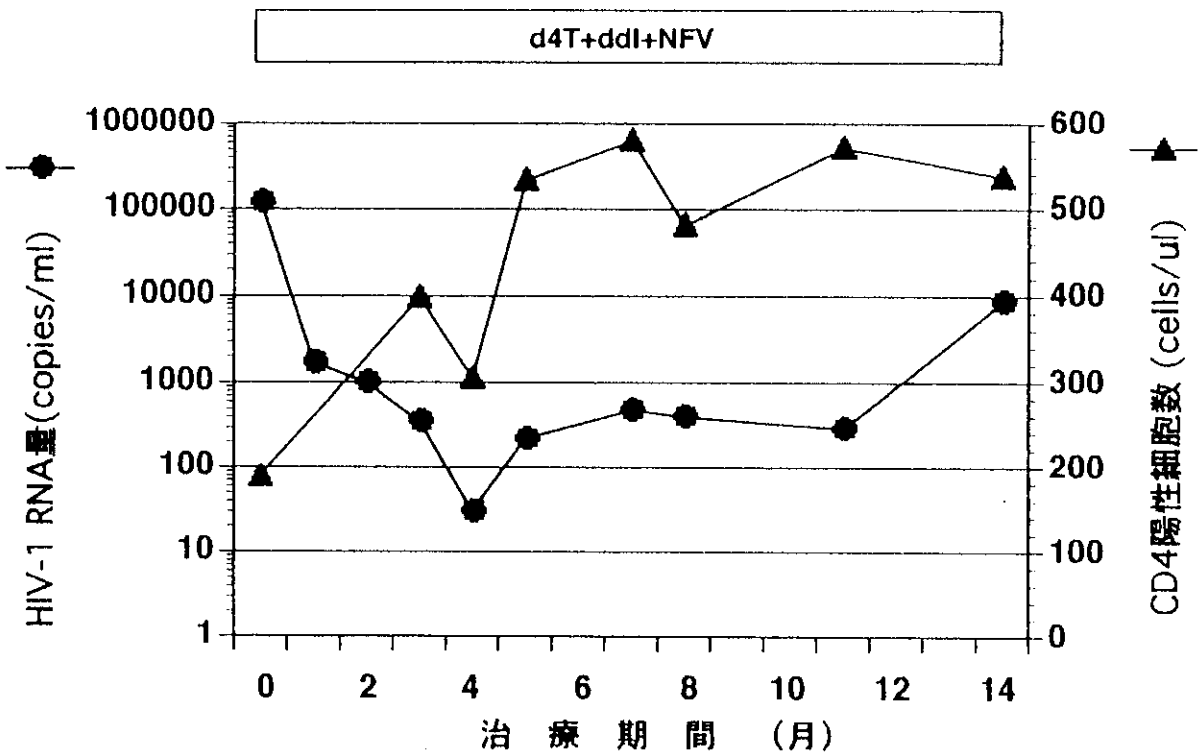
2. 学会発表

1、小島洋子、大竹徹、森治代、川畑拓也、大石功、HIV 感染者における薬剤治療の効果判定、第 14 回近畿エイズ研究会学術集会、(大阪) (2000 年)。

2、森治代、小島洋子、川畑拓也、大竹徹、大石功、HAART 療法に伴う感染者体内のウイルス phenotype の変化、第 14 回日本エイズ学会 (京都) (2000 年)。

3、森治代、小島洋子、川畑拓也、大竹徹、大石功、吉田英樹、治療歴のない HIV 感染者における薬剤耐性変異の検出例、第 75 回日本感染症学会総会 (奈良) (2001 年)。

H. 知的財産の出願、登録状況 なし



薬剤耐性変異

	↑	↑	↑	↑
Plasma : RT	-	NT	NT	T215Y
P	-	NT	NT	D30N, V77I, N88D
PBMC : RT	M184V	M184V/M	M184V/M	M184V/M
P	-	-	-	-

RT: 逆転写酵素領域 P: プロテアーゼ領域

-: 耐性変異は検出されなかった NT: 検討せず T: スレオニン Y: チロシン D: アスパラギン酸

N: アスパラギン V: バリン I: イソロイシン M: メチオニン V/M: バリンとメチオニンが混在している

図1 治療マーカーの推移と薬剤耐性変異の出現

薬剤耐性検査の検査体制の構築と評価：薬物耐性検査のガイドラインの作成

分担研究者 岩本愛吉 (東京大学医科学研究所 教授)

研究要旨

薬剤耐性検査に関する先進諸外国の事情を参考に、わが国のガイドラインを作成する。また、HIV 診療経験の少ない医療関係者にもわかりやすく耐性検査を紹介するマテリアルの作成を行う。

A. 研究目的

抗 HIV 薬の種類が増え、併用療法による治療効果が著しい成果を上げている一方で、薬剤耐性による治療効果の減弱、喪失がよりおおきな問題となっている。本研究では、薬剤耐性検査のより進んだ外国の事情を調査し、わが国の事情を考慮に入れ、耐性検査のガイドラインを作成することを目的とする。

B. 研究方法

平成 12 年度は、米国の国際エイズ会議・USA(IAS-USA)の専門家が発表した耐性検査に関する意見書を翻訳し、今後の参考とするとともに、耐性検査に関わる可能性のある医療関係者に、この意見書自体を配付する。

C. 研究結果

岩本の責任において IAS-USA の意見書「成人の HIV-1 感染症における抗レトロウイルス薬の耐性試験」(JAMA 283:2417-2426, 2000)を翻訳した。以下は、そのテキスト部分である。

「成人の HIV-1 感染症における抗レトロウイルス薬の耐性試験」

Hirsch, M.S., Brun-Vezinet, F., D'Aquila, R.T. et al., Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection. JAMA 283:2417-2426, 2000.

【目的】 ヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1) 感染症において、薬剤耐性検査が使えるようになった。臨床試験の成績から、薬剤耐性ウイルスの存在は、新しい治療に対するウイルス学的な反応の悪さと関連があることが示唆されている。国際エイズ協会・アメリカ支部 (IAS-USA) は、HIV 耐性検査の適応についての臨床家に対するガイダンスを供給するための以前の推薦書を最新のものにすることを企画した。

【参加者】 抗レトロウイルス薬に対する HIV の耐性に関する基礎科学、臨床研究、患者診療の専門的知識を有する 13 人のメンバーからなる IAS-USA の医師パネルを再召集して、薬剤耐性検査を臨床の場で用いるためのガイドライン (recommendation) を供給することを目論んだ。

【証拠と合意形成】1999 年の 1 月から 10 月まで定期的に全員が一堂に会した。2000 年 4 月までの 10 年間に明らかとなった耐性と耐性検査のデータと国内及び国際学会での発表について検討した。最終的な推奨を行うための決定的なデータはまだ集積されていないことを認めなが

ら、推奨と考察はグループ 100%の合意によって形成された。

【結論】 まだまだ限界はあるが、耐性検査は場合によっては患者の治療に組み入れられるべきである、とのデータが集積しつつある。耐性検査は、治療効果が喪失した後に新たな処方計画を選択する際や妊婦の治療方針決定する際の指針として活用することが推奨される。また、治療経験の無い HIV 感染者について耐性試験を行うことは考慮すべきであるが、この場合推奨できはしない。急性 HIV 感染症の患者に治療を開始する前に耐性検査を考慮すべきであるが、結果が出るまで治療を待つべきではない。検査結果の複雑さや検査の限界故に専門家の意見を聞くことが推奨される。

最近まで、HIV-1 の薬剤耐性検査は複雑で、臨床上の有益性に関して情報が十分でなかったために、日常の臨床で使用することは実用的ではなかった。血漿を用いて HIV のジェノタイプとフェノタイプを迅速に測定するための自動化された検査技術が開発され、抗レトロウイルス療法を行う上で、これらの検査を用いることが可能となった。

限られた状況においては、耐性検査は役に立つことがある、という仮勧告が出されている(1)。フェノタイプ検査とジェノタイプ検査を提供する営利検査会社も増えている。さらに、HIV-1 の *pol* 遺伝子内にあるプロテアーゼおよび逆転写酵素領域の遺伝子型判定を行うためのキットも考案されており、研究を目的とする

場合であれば使用可能である。

薬物耐性検査が臨床的に有用であるとの証拠が、回顧的臨床試験(2-9)や前向き臨床試験(10-13)から集まりつつある。表 1 に示した研究では、それまでの治療の効果がなくなり新しい治療薬の組み合わせに変えた際のウイルス学的効果と薬剤耐性の間には、有意な関連があった。さらに、血漿中の HIV RNA 量、CD4 陽性細胞数、治療歴を勘案した上で、薬剤耐性変異の存在は、ウイルス学的効果が不良であることの独立したリスク因子である。ウイルス学的効果が喪失した場合でも、併用療法で用いられている全ての薬剤に対して耐性が出現したことを必ずしも意味しない(14-17)。これらのデータは、患者の治療をしていく上で、耐性検査を用いることに対して理論的根拠を与えるものである。

この論文は、抗レトロウイルス薬に対する耐性の研究と HIV 感染症の治療を行っている臨床専門家 13 人からなる国際的委員会によって策定された「抗レトロウイルス療法における抗 HIV-1 薬耐性検査の使用法と解釈についての勧告(改訂版)」である。1999 年 1 月から 1999 年 10 月まで定期的な会合を重ね、2000 年 4 月までの 10 年間の出版された臨床的、基礎科学的データの全てや学会発表、専門家の意見を考慮に入れ、委員会の合意に基づく勧告を策定した(勧告は委員会構成員の 100%合意によって作られた)。個々のガイドラインは、「推奨」または「考慮」という表記によって限定される。「推奨」とは、関連した科学的データの評価や専門家としての意見に立脚し、一定の臨床

状況で耐性検査の日常使用を認めるに値する十分な証拠があると、委員会が結論したものである。「考慮」とは、耐性検査が有用であるとの初期データは存在するが、日常使用を認めるまでの確証的データはないものである。究極的な指針を作るためには、決定的なデータが必要ではあるが、今でも一定の状況下においては耐性検査は治療に役立つであろう。

抗レトロウイルス薬の耐性検査 フェノタイプ検査

薬剤感受性試験は分離した HIV-1 が、薬剤存在下で増殖する能力を測定するものである。異なる薬剤濃度の中でどの程度ウイルスの複製が阻害されるか、を測定する。その結果から、分離した HIV-1 の複製を 50% または 90% (IC₅₀ または IC₉₀) 抑制する薬剤濃度が計算される。また、薬剤感受性の HIV-1 株あるいは同じ患者から以前に分離されたウイルスと比較し、IC₅₀ または IC₉₀ が「何倍あがったか」によっても結果を表示できる。

HIV 感染症の治療方針を立てるためにフェノタイプ法による HIV の薬剤感受性試験を用いることも、組換え DNA 技術を用いた迅速かつ多検体処理可能な自動測定により現実的となっている。血漿中の HIV RNA を増幅することによりウイルス分離を不必要にしたこと、かつての測定法より多くの薬剤（少なくとも 12 薬剤）を検査することが可能になった、などがその理由である。組換え技術を用いたウイルスのフェノタイプ検査は、現在 2 つの会社が商業ベースで行っている。どちらの方法も、血漿中のウイルスから

HIV のプロテアーゼおよび逆転写酵素遺伝子をいっしょに増幅し、他の HIV 遺伝子を持つ実験室株との間で組換えウイルスを作るものである。検査の自動化と機能迅速判定遺伝子を用いて、通常検査室が検体を受け取ってから 2～数週のうちに結果が得られる。

これら 2 つの組換えウイルス測定法は、組換えウイルスの作り方とウイルスの複製の検出の仕方において技術的に異なっている。ひとつの方法は (Virologic 社、カリフォルニア州南サンフランシスコ)、ウイルスのエンベロープ遺伝子を機能迅速判定遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子に置き換えた組換え HIV ベクターに、患者のウイルスに由来するプロテアーゼと逆転写酵素の遺伝子領域を組み込む。プロテアーゼ阻害薬や逆転写酵素阻害薬の存在下でどの位 HIV が増えられるかは、ルシフェラーゼ遺伝子の発現を定量することで測定され、それにより患者のウイルスがどの程度薬剤に耐性かが示される。それぞれの薬剤に対する組換えウイルスの IC₅₀ は、対照ウイルス (NL4-3) との比較で表される。Virologic 社においてなされる複数の検査で対照ウイルス株より 2.5 倍以上の IC₅₀ を示すと、感受性が低い (less susceptible) と報告される(18)。

もう一つの商業ベースで利用可能な検査法は (Virco 社、ベルギー、メチェレン)、患者由来の HIV と HIV ベクターを試験管内組換え法でつないで、検査用のウイルスを作製する。機能迅速判定遺伝子の活性により、特定の薬剤濃度における組換えウイルスの複製の程度を測る。各薬剤に対する組換えウイルスの IC₅₀ は、対

照 HIV 株 (HXB-2) との相対比で表される。Virco 社によって複数回の測定が行われ、その結果対照株に対して 4 倍以上の IC₅₀ を示した検体は、感受性低下と報告される(19)。

薬剤感受性試験において IC₅₀ あるいは IC₉₀ の算定に反映されるのは、血漿中に循環しているウイルスの中でも大勢を閉めるもののみである。少数の薬剤耐性ウイルス (全ウイルスの 10-50%) は、抗 HIV 療法の失敗や耐性ウイルスの伝播に関与する可能性があるにもかかわらず、検出されない可能性がある (20,21)。フェノタイプ検査が軽度耐性という結果を示した場合、全ウイルスの IC₅₀ の軽度変化によるかもしれないし、耐性ウイルスと感受性ウイルスの混在によるかもしれない。薬剤耐性測定にかかわる煩雑さと莫大な費用のため、検査大きな商業検査会社に集中して行われつづけるものと考えられる。

ジェノタイプ検査

抗レトロウイルス薬の使用と関連して見られる HIV-1 の遺伝子の突然変異には、薬剤耐性をもたらすものがある (図)。フェノタイプ検査はウイルスの薬剤感受性を測定するものであるが、ジェノタイプ検査は、薬剤耐性という表現型をもたらす突然変異を検出するものである。ポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction : PCR) を利用し、関連遺伝子から突然変異を検出する検査法は文献 (1) に要約されている。この検査の最初ステップは、組換えウイルスを用いたフェノタイプ検査の場合と似ている、つ

まり、少なくとも 500 から 1000//ml の HIV RNA コピー数を有する血漿から HIV-1 の遺伝子を増幅することである。検査目的とする突然変異や検査会社の技術にもよるが、ジェノタイプ検査は混在したウイルス集団の中に存在する 10%~50%の突然変異を検出できる (20,33)。

HIV 耐性変異の検出に用いるキットはいくつかの会社で開発されている。その方法には、関連した全てのコドンでジェノタイプするもの (オンタリオ州・トロントの Visible Genetics 社、カリフォルニア州・フォスターシティーの ABI/Perkin Elmer 社、カリフォルニア州・サンタクララの Affymetrix 社)、限定されたコドンからハイブリダイゼーション法で変異を検出するもの (ジョージア州・アルファレッタの Innogenetics 社、カリフォルニア州・エメリービルの Chiron 社) などがある。これらのキットを用いれば、結果は数時間から 2~3 日の間に得られる。塩基配列決定 (シーケンシング) により得られる結果は複雑であることから、科学的な証拠に基づいた解釈をするための指針がいくつか策定されている。しかしながら、特別な変異パターンから推測される実際の耐性度には、異なった解釈が可能な場合もありうる。新しい知見が集まるにつれ、不適切あるいは誤った解釈をしてしまう可能性も存在する。

商業的な検査会社や学術的な研究室で、臨床上の治療方針を決定するための参考資料としてジェノタイプ検査を行っている。世界中からジェノタイプ検査を行っている 35 の学術的研究室を選び、試験検

体を用いた技術評価が 1999 年に行われ、1998 年中に進歩があったものの、HIV の変異が存在していても十分に検出されていない、と報告された (21)。しかし、経験豊かな 2 つの検査所の間で高い一致率が認められ、検査者の経験と検査精度が相関することを示す論文が、最近 2 報あった (7,21,34)。

未解決の技術的問題

ジェノタイプ検査にしる、フェノタイプ検査にしる、薬剤耐性試験に関しては、未解決の技術的問題点がある。例えば、適切な標準化や臨床上的有用性に関する評価が必要とされている。総論的に言えば、患者の血液検体は、血漿中 HIV RNA 検査に関する検査指針に従って、採血、保存、輸送されるべきである。検体受取時に検査に値する検体であるかどうかをどうやって確認するか、耐性検査用の組換えウイルスを作るための反応がうまく進行しているかどうかを判断するための評価法をどうやって組み込むか、検査を受ける一連の検体ごとに特徴の判明した薬剤感受性ウイルスと薬剤耐性ウイルスを取り入れること、など、検査の質を担保するための指針が検査現場において必要とされている。

北米以外の地域で流行する種々のサブタイプからなる遺伝的に多様な HIV 株は、ヨーロッパや北米でよく見られるサブタイプ B の HIV に比べて、フェノタイプングやジェノタイプングに用いるための遺伝子増幅の効率がよくないかもしれない。北アメリカより B 以外のサブタイプの頻度が高いヨーロッパからは、PCR による

増幅効率が様々であることが報告されている (35)。しかし、全ての M 群 (A-H) のサブタイプ遺伝子増幅が可能であり、耐性検査がうまくいくという報告がある (18,36)。

耐性検査に関する臨床試験の成績 前向き臨床試験

臨床での治療方針決定にジェノタイプ検査が有用であるか否かを調べた前向き無作為試験が 2 つ報告されている。ヨーロッパで行われた VIRADAPT 研究では (10,11)、血漿中のウイルス量が 10,000 コピー/ml 以上でプロテアーゼ阻害薬 (PI) を含む治療を 3 ヶ月以上受けた 108 人についての前向き試験を行った。患者は、通常の標準的な治療手順に従って治療薬を変更するか、ジェノタイプ検査の結果に従って治療薬を変更するか、の 2 群に無作為に振り分けられた。6 ヶ月の試験期間中、血漿中の HIV RNA 量の変化においても ($-1.15 \log_{10}$ コピー/ml 対 $-0.67 \log_{10}$ コピー/ml)、HIV RNA 量が 200 コピー/ml 以下となった患者の割合においても (32% 対 14%) においても、ジェノタイプ法の結果を参考に治療変更を行った患者群において成績がよかった。6 ヶ月後、検出可能なレベルを示す患者の全てに耐性検査の結果が示されるように配慮された。さらにその 6 ヶ月後、臨床試験に参加した 108 人中 92 人が依然として経過観察できており、2 群の患者はほぼ同じウイルス学的反応 (血漿中のウイルス量が治療開始直前の基準値より $-1.15 \log_{10}$ コピー/ml 対 $-0.98 \log_{10}$ コピー/ml 減少しており、両群とも 30% の患者で

<200 コピー/ml であった) (11)。このように、耐性検査の利点は1年間持続し、たとえ6ヶ月間遅れて検査しても有効であることが示された。

アメリカで行われた GART 研究 (Genotypic Antiviral Resistance Testing) では (12)、ジェノタイプ検査に振り分けられた群では、専門医の勧告に基づいて治療の変更が行われた；対照群では、そのような勧告は行われなかった。臨床試験の企画や大きさは VIRADAPT と同様であった：血漿中のウイルス量が 26,000 から 29,000 (どちらの群かによって) の 153 人の患者が対象であり、その半数は初回治療の効果がなくなった症例であった。耐性検査の結果はその後の治療薬の選択に影響を与え、通常の標準的な治療手順に従った場合よりも良好なウイルス学的反応が得られた (4~8 週で $-1.17 \log_{10}$ コピー/ml 対 $-0.62 \log_{10}$ コピー/ml)。この差は、耐性検査の結果と専門医の勧告を受けた群ではウイルスに対して有効性が期待される薬剤をより幅広く選択できた、ためだと思われる。しかしながら、ウイルス学的反応が持続的に得られたわけではなく、8 週目には耐性群の半数のみが、12 週目には 3 分の 1 の患者でのみ、血漿中のウイルス量が検出限界以下に維持できたに過ぎない。注目すべきことに、ジェノタイプ検査を受けた患者の半数は専門医による勧告通りの治療を受けていなかった。

抗レトロウイルス療法を受けた経験のある患者を対象に、フェノタイプ検査の結果に従って治療薬が選択された場合と、治療薬変更の際に耐性の情報がない群を

比較した前向きは無作為臨床試験では、前者のほうが良い成績であった (13)。

回顧的臨床試験

薬剤耐性試験の臨床的有用性についてのデータは、回顧的な臨床研究によってもなされている (表 1)。ヌクレオシド系逆転写酵素阻害薬 (nucleoside reverse transcriptase inhibitor : nRTI) による治療を受けたことがあり、ジドブジン (AZT) 感受性の低下した症例では有意に予後が悪かった (3・5)。他の臨床試験でも、治療を受けたことのある患者ではジェノタイプ検査あるいはフェノタイプ検査による耐性の存在と血漿中ウイルス量の間には強い相関関係を認めた (6・8,24,37・42)。

総合すると、薬剤感受性試験の結果は良い治療効果を得るために重要であり、薬剤服用歴、血漿中のウイルス量のデータだけに頼るよりも有効な判断をするチャンスが増える (7,42)。しかし、治療開始 (変更) 前のウイルスが“感受性”という結果を示した場合、良好なウイルス学的反応が得られるとは限らない。このことは、薬剤耐性ウイルスが少数であったために検出できなかった可能性、薬剤の血中濃度が有効なレベルに達していない可能性、アドヒアランスが悪い可能性などを示唆している (1)。

臨床での使い方

様々な状況で有効な薬剤を選ぶ際に、HIV の薬剤耐性試験が役に立つとのデータが集積しているが、治療を開始したり抗レトロウイルス療法を変更したりする

際、薬剤耐性試験が必須であると考えてはならない。そのような決定は原則として血漿中のウイルス量によってなされるべきである。

ある処方内容が効果を失ってしまい新しい組合せに使う薬剤を選ぶ際には、耐性検査以外にも考慮すべき事柄がいくつかある。それまでどのような薬剤が使われてきたか、ウイルス量はどうか、治療に対する認容度はどうか、今後のアドヒアランスは期待できるか、どのような合併症があるか、他の合併症のための治療を受けているか、などについて考慮することが重要である。血中あるいは細胞中の薬剤濃度も極めて重要であり、薬物相互作用、アドヒアランス、薬剤吸収や代謝に関わる遺伝的要因などにより個人差がある。VIRADAPT 研究では、ジェノタイプ法による検査を受けた上で、何点かの測定点で常にPIの血中のトラフ値が有効レベルに達していた患者群で最もウイルス学的な治療成績が良かった(43)。しかし、薬剤の血中濃度の測定を日常診療で用いることの有用性はいまだ大規模な臨床試験で評価されておらず、また、広く使えるようにはなっていない。

薬剤耐性試験を行う時、薬剤を服用しているか否かによって結果が異なる可能性がある。治療の変更あるいは中止後に耐性検査用の採血を行った場合、感受性のウイルスが耐性ウイルスを凌駕して増殖したため偽陰性の結果が出ることもある。例えば、ラミブジン(3TC)を中止した場合、逆転写酵素のM184V変異体(逆転写酵素の184番目のアミノ酸は通常メチオニンであるが、それがバリンに

置き換わった変異ウイルスをさす)は急速に検出できなくなる(44,45)。従って、有効でなくなった薬剤を中止する前に、耐性検査のための採血をすることが肝要である。薬剤中止後感受性のウイルスが再出現した場合、治療効果があがるかどうかについては更なる研究が必要であるが、静止期のメモリーCD4陽性細胞には歴代のプロウイルス遺伝子が再び増殖しうる形で潜伏感染していることが示されている(46,47)。

耐性変異の間で見られる相互作用も検査結果の解釈を難しくさせる要因である。例えば、コドン番号41,67,70,210,215,219などの変異によって起こるジドブジン(AZT)の耐性フェノタイプは、M184V変異が加わると若干緩和されうる(48)。しかし、この効果も他の変異がさらに加わることにより減弱し、結果としてジドブジン・ラミブジン(AZT/3TC)両者に耐性となってしまう。

PIの耐性については、多数の変異や多型性が複雑に組み合わさった場合の耐性の程度について全てが明らかになっていないため、PIの耐性や交叉耐性については異なった解釈がなされる場合がある。しかし、重要な変異(例えば、D30N; G48V; I50V; V82A/F/T/S; I84V; L90M)が2つ以上存在すると現在承認されているほとんどのPIに対して幅広い交叉耐性を示すものと考えられる(9,52)。

ある種の変異の組合せから生じる耐性の程度を推測する法則が限られた範囲で臨床評価を受けている(12)。しかし、複数の変異から生じる組合せが多岐に及ぶため、ジェノタイプ法の結果を法則に従

って解釈しようとするには限界があるだろう。耐性変異に関して間断なく研究成果が生まれていること、新規の薬剤が登場することなどから、その様な法則はしばしば改定される必要がある。もう一つのやり方は、同定されたジェノタイプから予測されるフェノタイプのみを報告するやり方である（仮想フェノタイプ法）。この方法は、ジェノタイプとそのフェノタイプに関する商業的なデータベースに基づいているが（53）、これまでに同定されていないジェノタイプについては有効ではないであろう（例えば、新しい薬剤や薬剤の組合せによって選択される変異）。変異のパターンやフェノタイプと臨床効果を直接関連付けたデータベースも開発されつつある。

フェノタイプ法のデータの方が解釈はやさしいと感じられるかもしれないが、ウイルス学的な効果を IC_{50} の値と関連付けるためのきちんと定義され、臨床的に評価された判断基準 (cutoff points) は今のところ存在しない。生体内でウイルスの増殖を抑制するために必要な血中トラフ濃度が判明している薬剤はないし、その値は薬剤ごとに違うはずである。PI を含むいくつかの薬剤に関してはトラフ値とウイルス学的効果に相関がある（43,54）。nRTI の場合、血清中あるいは血漿中の値より細胞内濃度が重要であるため、薬剤レベルのあいしやくはもっと複雑である。野生型と比較して IC_{50} が何倍増加したか、で表される耐性の程度は、薬剤によって選択される変異体ごとに異なる。一般的に言って、試験管内で測定された耐性度が高いほど、その薬剤

の生体内での抗ウイルス効果も期待しにくい。しかし、たとえ試験管内耐性が低いレベルであっても薬剤の効果を期待しにくい場合もある。ジェノタイプ法もフェノタイプ法も、薬剤耐性の原因が細胞由来である場合には無力であるし（55-58）、どちらの方法によっても耐性ウイルスの増殖能を測るものではない。

以上のような複雑な事情があるため、ジェノタイプ法やフェノタイプ法による薬剤耐性検査の結果用紙に効果の期待できる薬剤のリストが上げられていたとしても、専門医の解釈を聞いてみるのが推奨される。変異パターンの解釈を標準化することは非専門医にとって有用であろうと思われる。しかし、結果の解釈に影響する多数の臨床的、生物学的因子を評価するためには、抗レトロウイルス療法の経験を有し、薬剤耐性パターンの知識を持った臨床医あるいはウイルス学者の助力が役に立つであろう。

推奨 初感染

1998年には、カリフォルニア州サンフランシスコとスイスのジュネーブから、PI 耐性あるいは2~3クラスの薬剤に耐性を示すのHIV-1変異体が性感染によって伝播したことを示す研究成果が発表された（59,60）。その後、北アメリカやヨーロッパの他の市からも報告があり、多剤耐性のウイルスは地域に局限しているわけではないことが示された（61-65）。薬剤耐性ウイルスに感染した症例の既往歴からは、治療が効果を喪失している患者から血液や性的接触を通じて感染した

という話はしばしば聞かれなかった。強力な併用療法を開始した後、アドヒアランスのよい患者において血漿中 HIV RNA 量が期待よりゆっくりとしか減衰しない場合、もともと薬剤耐性ウイルスに感染した可能性が示唆され、耐性検査の適応と考えられる。

最近感染した患者では、非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害薬 (nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor : NNRTI)、リトナビル、ネルフィナビルに対して軽度の感受性低下 (< 10 倍) を示すウイルスを持つ患者が驚くほど高率である (61,62,66)。これらの薬剤に暴露されたことのないウイルスが、薬剤感受性を落とすことをこれまで知られていない多型性を持っているためと考えられる。NNRTI が効果を喪失した際選択されてくるウイルスは、通常著しく感受性が低下している (> 50 倍)。従って、耐性程度の低いウイルスは治療効果が喪失した患者から感染したものではないという考えも成り立つ。ある予備的な研究成果によれば、多型の 20%はいずれかの NNRTI に低い耐性と関連しているが、約 2%のみがエファビレンツを含む併用療法に対して悪い初期反応と関連してだけで、多型のない群と比較して治療効果の点で有意な差はなかった (67)。同様に、治療開始直前の感受性の低さは、ネビラピンを含む強力な併用療法に対する反応においてもほとんど無視しうるものであった (30)。NNRTI 耐性のジェノタイプを徹底的に特徴付けるための研究や、感受性のやや低下した薬剤を含む併用療法で治療した場合のウイルス学的効果に関する

詳細な臨床的評価を行うための研究が必要である。

ジドブジンとラミブジン (AZT/3TC) に耐性のウイルスは性的接触によって伝播しやすいという研究結果がある (68)。北アメリカ、英国、イタリア、スペイン、ルクセンブルグ、ブラジルなどで行われた研究では、20%にも及ぶジドブジン (AZT) 耐性が報告されている；ラミブジン (3TC) 耐性も報告されている。ジドブジン (AZT) 耐性があっても、ジドブジン (AZT)、ラミブジン (3TC)、PI からなる初回の 3 者併用療法により長期にわたってウイルスを抑制できている場合もある (77,78)。

以上のような理由から、症状のある急性感染者や過去数ヶ月以内に感染したという確証の得られる患者全てにおいて薬剤耐性検査は考慮されるべきであり、とりわけ感染源となった患者が抗レトロウイルス治療を受けている場合はそうである。この状況下での治療目的は、HIV 特異的な CD4 陽性ヘルパー細胞を保持し、長期の見通しを変えるためにウイルスの増殖をすばやく抑えることにある。その様な目的を治療によって達成できるかどうかは研究中であり、予備的なデータでは期待できそうである (79,80)。感染後間もない時期に治療を開始する場合には、耐性検査の結果を待たずに開始すべきである。その上で、万一いずれかの薬剤に対する耐性が発見された場合には 2~3 週以内に処方内容を変更する。初回治療に対してウイルス量が思うように低下しない場合も (例えば、治療開始後 16~24 週以内に検出限界以下にならない場合)、

耐性検査を直ちに考慮すべきである。その様な患者では、アドヒアランスに注意する必要がある。急性感染者や感染早期の患者についてPI耐性や多剤耐性ウイルスの疫学的調査を続けることが肝要である。

確立した感染

HIV感染の確立した症例について薬剤耐性ウイルスがどの程度蔓延しているか、調査がなされている(66,81-83)。これらの研究では検体数の少ないものが多く、フェノタイプ法で耐性か否かの判断基準やジェノタイプ法での重要な変異に関する定義の異なったものが多い。ある研究では、同じ地域の中で最近の感染者に比べて確立した感染者では耐性ウイルスの頻度が低いことが示されたが、(82)他の研究ではその結果は確認されなかった(81)。たとえ当初耐性ウイルスに感染したとしても、薬剤による選択圧がかかっていないと、増殖能に優れた野生型ウイルスが感染個体内に出現し、優勢なウイルスとなることも考えられる(84)。薬剤耐性ウイルスは、少数勢力として存続していても現在の検査法では検出されず、抗レトロウイルス療法が開始されるとすぐに出現してくる可能性もある。

感染の確立した患者においても治療開始前に耐性検査を行うことを考慮すべきである。とりわけ、耐性ウイルスによる初感染の頻度が高い地域においてはそうである。

治療変更における耐性検査の使用

治療効果の喪失がウイルス学的に確実

な場合、抗レトロウイルス療法の変更に際して耐性検査が役に立つとの研究成果がある。回顧的臨床試験において、治療変更前のジェノタイプやフェノタイプがウイルス学的な治療効果に反映されることが示されている(3-9)。ジェノタイプ検査に関する前向き臨床試験では(そのうちの一つの研究では専門医による検査結果の解釈が付帯されている)、少なくとも短期間の良好なウイルス学的効果が確認された(10-13)。ジェノタイプ法と適切なPIの血中濃度を組合せると、血漿中のHIV RNA量をよりいっそう減少させるという結果は、抗レトロウイルス療法を成功させるために薬物動態を考慮することの重要性を示している。

耐性検査を行うことによって、薬剤・宿主相互作用についてさらに知見が得られることがある。例えば、現在の治療で効果が得られていない患者から野生型のウイルスが検出された場合には、薬剤治療へのアドヒアランスや薬剤の吸収、薬物相互作用などにより、ウイルスに対して選択圧が働いていないことを示している可能性がある。注目すべきことは、2つのnRTIとPIを組合せた初回治療の効果が失われた際にも、耐性変異はしばしばnRTIだけに留まっている事が一般的である、という知見である。インジナビル・ジドブジン・ラミブジン(IDV/AZT/3TC)あるいはアンプレナビル・ジドブジン・ラミブジン(APV/AZT/3TC)の併用療法が効果を喪失する際、ほとんどの患者でラミブジン耐性のM184V変異のみが検出される(14-16)。この結果は、個々の薬剤には固有の“遺伝学的な防壁の高さ”

があり、それにより一時的な HIV-1 の薬剤耐性パターンが決定されうること、効果がなくなったからといって全ての薬剤を変更する必要が必ずしもないこと、を示唆している。状況によっては、1 剤以上の薬剤を継続とし、新規の薬剤を加えることによって治療が奏効する場合もあり得る。しかし、このやり方は臨床試験によって評価されていないため、現状では単剤の変更はさけ、現行のガイドラインに準拠すべきである (85,86)。検出できないレベルの少数の耐性ウイルスが存在し、増殖抑制が十分ではない治療薬の組合せによっては速やかに耐性ウイルスが出現しうることを、臨床医は銘記すべきである。たとえ全ての組合せを変更するにしても、耐性検査の結果は、その後治療効果が失われ、使用可能な薬剤が少なくなり、同じ薬剤を再び使わなければならない場合などに役に立つことがある。

初回治療の効果がなくなった時：治療へのアドヒアランスが良く、薬物動態から考えて特に治療効果が悪い原因が考えられない状況で、初回治療のウイルス学的効果が失われた場合には、耐性検査を推奨できる。耐性検査のための採血は、効果が無くなった治療を中止する前、ウイルスに対して選択圧をかけた状態で行うべきである。初回治療がうまくいかなかったとしても常に耐性検査が必要だというわけではない。特に、臨床医が患者の薬歴を周知しており、治療効果が失われてから早期にしかもウイルス量がまだ低い時期に治療の変更を行うなどがそれにあたる。アドヒアランスと薬剤の吸

収が良い状況で、薬剤耐性検査が役に立つのは以下のような場合である；(1) 治療開始後の間もない時期で最初の 4~12 週にかけてウイルス量の減少が悪く、治療効果が十分でないと判断される時、(2) 早期のウイルスの異常増殖 (検出限界以下を達成した後、血漿中の HIV RNA 量の上昇が確認できた場合)、(3) ウイルスの持続的な増殖が確認でき、広範囲な耐性が予測できる時、(4) 患者の耐性ウイルスを経時的にモニターするための基本データとして治療開始直前の検査をする時など。(1) の場合には、耐性ウイルスそのものに感染し、治療が始まったために顕在化したことが、耐性検査によって判明するかもしれない。(2) では、耐性ウイルスは、血漿中のウイルス量がたとえ 20~50 コピー/ml でも出てくる可能性があることを銘記すべきである (87)。

複数回治療効果がなくなった時：繰り返し治療を変更しても、治療の効果がなくなった場合には薬剤耐性試験をやるのが推奨される (85-86)。“耐性あり”という検査結果は、治療効果があがらないことを強く予測させる。医療計画が何回か変更され、治療に使える薬剤が少なくなった場合に、耐性検査を行うことによって、承認薬や試験中の薬剤の中から最も効果の期待できる薬剤を主治医や患者が選択できる根拠を与え、治療の恩恵を期待できない薬剤による不便さや医療費、毒性を避ける根拠を与えることができる。

妊娠

薬剤耐性ウイルスは、妊娠前あるいは妊娠中にも異性間性的接触によって伝播する可能性がある(88)。現行のガイドラインでは、母子感染を防止するための処方には必ずジドブジン(AZT)を加えることが推奨されている(89,90)。この勧告は、治療経験のない女性に対してジドブジン(AZT)を用いた臨床試験に基づいてなされている；現行のHIV治療ガイドラインでは、他に理由のない限り、妊婦といえども治療を延期してはならないとしている(85,89,91)。ネビラピン単独によっても母子感染抑制効果があることが示されている一方で、ウガンダの女性におけるネビラピンの単回使用により、K103M変異が選択されることが示唆された(92)。母親の血漿中のウイルス血症が抑制不十分で、母親が過去に抗レトロウイルス療法に暴露されている例において、多剤耐性HIV-1が母子間で垂直感染した事例が知られている(93)。この事例では、分娩前の母からはジドブジン(AZT)耐性ウイルスが検出されており、ジドブジン(AZT)によって母子感染が防止できるとは考えにくかった。母親にウイルス血症が認められる場合には、母親のウイルスについて耐性検査を施行する事が望ましく、とりわけ母親が以前に抗レトロウイルス治療を受けている場合や、その社会で耐性ウイルスの頻度が高い場合には望ましい。このようにして、妊婦に適切な薬剤が選び出され、垂直感染を阻止する可能性を最大限に高めるための処方内容の調整が可能となる。

要約および将来的な目標

不明確な部分があるとはいえ、今既にある研究成果から判断して、耐性検査は少なくとも短期的なウイルス学的効果を高め、効果で毒性のある薬剤を効果も期待できないのに使用することを避ける意味で有用である。それぞれの場合に応じた使い方の指針を表2に示した。今後明らかにされるべき事柄として以下のようなことが挙げられる。ウイルス学的効果に関して長期的な有用性を証明すること、ジェノタイプ法あるいはフェノタイプ法による検査が推奨される状況を明確にすること、少数派に属するウイルスを検出するため新しい方法を開発し感度を上げること、多剤併用療法の一部として使用する薬剤の有用性を評価するためにどのようにして耐性検査の結果を評価するか、治療効果の喪失した状況で治療中止を考慮する場合に耐性検査はどのような役割を果たせるか、患者の経過観察に用いる日常検査として耐性検査の費用対効果判定などである。耐性検査は高価である(米国ではプロテアーゼと逆転写酵素の塩基配列決定に\$400~\$500、フェノタイプ検査に\$700~\$900かかる)。しかし、うまく活用することにより、より適切な治療の選択が可能となり、医療費を少なくすることも可能である。このような課題に答えるための研究が成し遂げられるまでは、治療現場における耐性検査の役割については、今回示したようなガイドラインに盛り込まれたような判断と合意によって決めていくことになる。

D. 考察

HIV感染者の診療経験豊富な医師と、診療経験の少ない医師では、必要とする情報

が異なるであろう。HIV感染者が増加するであろうことを考えると、診療経験の少ない医師が、今後さらにHIV診療に関わることになる。そのような医師向けのわかりやすい資料作りも必要になるものと思われる。

E. 結語

IAS-USAが2000年に発表した耐性検査に関する専門家の意見書を翻訳した。これを一つの資料として、わが国のガイドライン作成を目指す。

F. 健康危険情報

該当しない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Katano, H., Suda, T., Morishita, Y., Yamamoto, K., Hoshino, Y., Nakamura, K., Tachikawa, N., Sata, T., Hamaguchi, H., Iwamoto, A., and Mori, S. Human herpesvirus 8-associated solid lymphomas that occur in AIDS patients take anaplastic large cell morphology. *Modern Pathology* 13:77-85, 2000.
2. Aoki, Y., Tosato, G., Nambu, Y., Iwamoto, A., and Yarchoan R. Detection of vascular endothelial growth factor in AIDS-related primary effusion lymphomas. *Blood* 95:1109-1110, 2000.
3. He, L., Terunuma, H., Hanabusa, H., Iwamoto, A., Oka, S., Tanabe, F., Chiba, N., Kurimoto, M., Ikeda, M., Okamura, H., Dai, J., Iwatani, Y., Ishida, T., and Ito, M. Interleukin 18 and interleukin 1 β production is decreased in HIV type 1-seropositive hemophiliacs but not in HIV type 1-seropositive nonhemophiliacs. *AIDS Research and Human Retroviruses* 16:345-353, 2000.
4. Katano, H., Iwasaki, T., Baba, N., Terai, M., Mori, S., Iwamoto, A., Kurata, T., and Sata, T. Identification of antigenic proteins encoded by human herpes virus 8 and the seroprevalence in the general population and among patients with and without Kaposi's sarcoma. *J. Virol.* 74:3478-3485, 2000.
5. Yamada, T., and Iwamoto, A. Comparison of proviral accessory genes between long-term non-progressors and progressors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Arch. Virol.* 145:1021-1027, 2000.
6. Taguchi, H., Yamada, T., Takahashi, T., Gotoh, M., Nakamura, T., and Iwamoto, A. Seroprevalence of parvovirus B19 among HIV-1-positives in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 53:21, 2000.
7. Wu, X., Okada, N., Goto, M., Iwamoto, A., and Okada, H. The IgM antibody level against ganglioside GM2 correlates to the disease status of HIV-1-infected patients. *Microbiol. Immunol.* 44:405-410, 2000.
8. Nakayama, E.E., Wasi, C., Ajisawa, A., Iwamoto, A., and Shioda, T. A new polymorphism in the promoter region of the human interleukin-16 (IL-16) gene. *Genes and Immunity* 1: 293-294, 2000.
9. Nakayama, E.E., Hoshino, Y., Xin, X., Liu, H., Goto, M., Watanabe, N., Taguchi, H., Hitani, A., Kawana-Tachikawa, A., Fukushima, M., Yamada, K., Sugiura, W., Oka, S., Sato, H., Takebe, Ajisawa, A., Y., Nakamura, T., Nagai, Y., Iwamoto, A., and Shioda, T. Polymorphism in

- the IL-4 promoter affects acquisition of HIV-1 syncytium inducing (SI) phenotype. *J. Virol.* 74:5452-5459, 2000.
10. Hosoya, N., Takahashi, T., Wada, M., Endo, T., Nakamura, T., Sakashita, H., Kimura, K., Ohnishi, K., Nakamura, Y., Mizuochi, T., and Iwamoto, A. Genotyping of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* isolates in Japan based on nucleotide sequence variations in internal transcribed spacer regions of rRNA genes. *Microbiol. Immunol.* 44:591-596, 2000.
 11. Yoshida, S., Yusa, N., Sato, N., Goto, M., and Iwamoto, A. Some problems found in HIV-1 RNA quantification. *J. Clin. Pathol.* 53:645-646, 2000.
 12. Aoki, Y., Yarchoan R., Braun, J., Iwamoto, A., and Tosato, G. Viral and cellular cytokines in AIDS-related malignant lymphomatous effusion. *Blood* 96:1599-1601, 2000.
 13. Miyashita, N., Niki, Y., Iwamoto, A., Yasuoka, A., Oka, S., Kawata, K., Ito, A., Tomono, K., Kohno, S., and Matsushima, T. Seroprevalence of antibodies to Chlamydia spp. In human immunodeficiency virus-infected subjects in Japan. *Microbiol. Immunol.* 44:781-785, 2000.
 14. Watanabe, T., Nakamura, K., Wakugawa, M., Kato, A., Nagai, Y., Shioda, T., Iwamoto, A., and Tamaki, K. Antibodies to Molluscum contagiosum virus in the general population and susceptible patients. *Arch. Dermatol.* 136:1518-1522, 2000.
 15. Takahashi, T., Hosoya, N., Endo, T., Nakamura, T., Sakashita, H., Kimura, K., Ohnishi, K., Nakamura, Y., and Iwamoto, A. Relationship between mutations in dihydropteroate synthase of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* isolates in Japan and resistance to sulfonamide therapy. *J. Clin. Microbiol.* 38:3161-3164, 2000.
 16. Takahashi, T., Nakamura, Y., and Iwamoto, A. Desensitization to fluconazole in an AIDS patient. *Annals Pharmacotherapy.* In press.
 17. Koibuchi, T., Hitani, A., Nakamura, T., Nojiri, N., Nakajima, K., Jyuji, T., and Iwamoto, A. Predominance fo genotype A HBV in HBV-HIV-1 dually positive population as compared to HIV-1-negative counterpart in Japan. *J. Med. Virol.* In press.
 18. Shioda, T., Nakayama, E.E., Tanaka, Y., Xin, X., Liu, H., Kawana-Tachikawa, A., Kato, A., Sakai, Y., Nagai, Y., and Iwamoto, A. A naturally occurring deletional mutation in the C-terminal cytoplasmic tail of CCR5 affects surface trafficking of CC5. *J. Virol.* In press.
 19. Ikegawa, M., Yuan, J., Matsumoto, K., Herrmann, S., Iwamoto, A., Nakamura, A., Matsushita, S., Kimura, T., Honjo, T., and Tashiro, K. Elevated SDF-1 protein levels in HIV-1 infected individuals. *AIDS Research and Human Retroviruses.* In press.
 20. Watanabe, N., Tomizawa, M., Tachikawa-Kawana, A., Goto, M., Ajisawa, A., Nakamura, T., and Iwamoto, A. Quantitative and

qualitative abnormalities in HIV-1-specific T cells. AIDS. In Press.

2. 学会発表

1. Liu, H., Chao, D., Nakayama, E.E., Taguchi, H., Goto, M., Xin, X, Takebe, Y., Wasi, C., Ma, J., Liang, W., Theodorou, I., Magierowska, M., Krishnamoorthy, R., Chaventre, A., French ALT and Immunoco study groups, Debre, P., Nakamura, T., Nagai, Y., Iwamoto, A., and Shioda, T., Polymorphism in RANTES chemokine promoter affects HIV-1 disease progression in Japanese and distributes differently in Asians, Africans and Caucasians. 7th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. San Francisco, California, U.S.A. January 30 – February 2, 2000.
2. Watanabe, N., Tomizawa, M., Tachikawa-Kawana, A., Goto, M., Ajisawa, A., Nakamura, T., and Iwamoto, A. Qualitative and quantitative abnormalities in HIV-1-specific T cells. Keystone Symposia on New biological approaches to HIV-1 infection based on new insights into HIV biology. Keystone, Colorado, U.S.A. April 4-10, 2000.
3. Shioda, T., Nakayama, E.E., Tanaka, Y., Xin, X., Liu, H., Kawana-Tachikawa, A., Kato, A., Sakai, Y., Nagai, Y., and Iwamoto, A. A Naturally occurring deletional mutation in the C-terminal cytoplasmic tail of CCR5 affects intracellular transport of CCR5. 2000 International Meeting of the Institute of Human Virology. Baltimore, Maryland, U.S.A. September 10-15, 2000.
4. Koibuchi, T., Nakamura, T., Nojiri, N., Nakajima, K., Juji, T., and Iwamoto, A. Shifting in genotype trends of hepatitis B virus in Japan. IDSA2000. New Orleans, LA, U.S.A. September 7-10, 2000.
5. Liu, H., Nakayama, E.E., Xin, X, Kawana-Tachikawa, A., Goto, M., Taguchi, H., Yamada, T., Takebe, Y., Nakamura, T., Nagai, Y., Iwamoto, A., and Shioda, T. Pseuquence variation in an 8.1-kb region of the human CCR5 gene. 8th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Chicago, Illinois, U.S.A. February 4-8, 2001.

H. 知的所有権の出願、登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

HIV-1プロウイルス検出の為のpeptide nucleic acidプローブを用いた *in situ* hybridization (PNA-ISH)法の確立

分担研究者 金田次弘 (国立名古屋病院・臨床研究部)

研究要旨

HIV-1感染症/エイズ患者のウイルス感染標的細胞の感染実態を把握する為に、HIV-1プロウイルスを簡便に検出する免疫組織化学的検出法を開発することを目的とした。DNAプローブの代わりに、FITC・HN-CTGGCTTTAATTTTA-CONH₂の構造を有するPNAプローブを選択し、シグナル増感法としてはチラミンを用いたcatalyzed signal amplification法を採用した。最終的にはストレプトアビジンを標識したAlexa488の蛍光か、ジアミノベンチジン発色によりHIV-1プロウイルスの存在を確認した。HIV-1関連シグナルはドット状に検出され、鋭敏で特異性の高いISH法を開発することができた。この方法により、末梢血の血液細胞だけでなく、骨髓組織、リンパ節など、HIV-1感染の重要な場を提供している組織を対象にしたHIV-1の検出が可能となった。

A. 研究目的

HIV-1感染症/エイズ患者における HIV-1の感染実態の把握やHAARTに対する治療効果の判定は、末梢血中のHIV-1 (RNA) 量の測定により実施している。しかし、HAARTに用いられている逆転写酵素阻害剤とプロテアーゼ阻害剤は、その薬剤の作用の性質上、HIV-1感染細胞からのウイルス産生は抑制しても、プロウイルスを保持している細胞を根絶する作用を持っているわけではない。即ち、HIV-1が感染したCD4陽性Tリンパ球やマクロファージのうち、セルサイクルに入っている細胞群は抗HIV-1薬剤存在下でウイルス産生を阻害された状態で短期間に代謝され死滅するが、休止期に入っている細胞群のターンオーバーには数年を要すると言われており、ひとたび薬剤がなくなればHIV-1産生を再開する。したがって、今後の治療の方向として、この休止期CD4陽性Tリンパ球を標的とした治療法の開発が推進されるものと思われる。本研究は、HIV-1感染症/エイズ患者のウイルス感染標的細胞の感染実態を把握する為に、HIV-1プロウイルスを簡便に検出する免疫組織化学的検出法を開発することを目的とした。

B. 研究方法

研究対象: ①HIV-1持続感染細胞株ACH 2と MOLT4-III。②2人のエイズ患者より精製した CD4細胞 ③エイズ患者剖検組織(胸腺、リンパ節、睾丸)

PNAプローブ: FITC・HN-CTGGCTTTAATTTTA-CONH₂。塩基配列はHIV-1のpol領域の2557~2571に対応している。

患者末梢血からのCD4陽性細胞の精製とその固定: CD4陽性T細胞分離用のStemSep STS-14032 (Stem Cell Technologies, Inc.)を用いてネガティブセレクションにより精製した。細胞の固定は4%パラホルムアルデヒド溶液 (pH7.4) を用い、10分間室温で固定した。

エイズ患者剖検検体の固定: 20%ホルマリンで16時間固定した。

固定サンプルの前処理とFITC標識PNAプローブの検出: 固定したスミア標本は、標的核酸を賦活化した後、FITC標識PNAプローブと反応させた。93°Cで5分熱変性を行い、45°Cで90分ハイブリダイズさせ、57°Cで洗浄した。ハイブリッド形成後、HRP標識抗FITC抗体を

反応させ、チラミンを用いた catalyzed signal amplification 法によりシグナルを増感した。最終的にstreptavidinを標識したAlexa488の蛍光検出により、HIV-1プロウイルスの存在を確認した。なお、ジアミノベンチジン発色による検出も可能であった。図1に方法の概要を示した。

(倫理面への配慮) HIV-1感染標的細胞中のプロウイルスコピー数は治療の効果判定や将来の治療方針に重要な情報を提供するパラメータの1つである旨を十分に患者に説明し、同意を得た上で検体を採取する。また、検査結果は患者のプライバシーが侵されないよう厳重に管理することを義務とする。

C. 研究結果

HIV-1持続感染細胞中のプロウイルスの検出: ACH2細胞, MOLT4-III_b 細胞共に全ての細胞がHIV-1陽性であった。シグナルは核内にドット状に検出され、その数は1〜

た(図2、AとC)。
エイズ患者CD4陽性細胞中のプロウイルスの検出: 持続感染細胞同様にシグナルは核内にドット状に検出された。患者1では、シグナル数は一つで、陽性率は約20%であった(図2、E)。患者2では、核と細胞質にHIV-1関連シグナルが検出され、陽性率は約7%であった(図2、F)。

パラフィン包埋組織切片中のプロウイルスの検出: 胸腺組織では、上皮細胞は全てHIV-1陰性で、約70%のリンパ球がHIV-1陽性であった(図3、B)。リンパ節では、HIV-1陽性リンパ球は散在性に認められたに過ぎなかったが、HIV-1陽性リンパ球を貪食したマクロファージは高頻度に認められた(図3、E)。辜丸では精母細胞はHIV-1陽性であったが、精子は陰性であった。陽性シグナルは全て核に検出された

(図3、H)。

D. 考察

HIV-1プロウイルスを検出するための、鋭敏で特異性の高いISH法を開発することができた。DNAプローブの代わりにPNAプローブを利用し、シグナル検出にcatalysed signal amplification法を採用したことにより、RI標識プローブを用いるISH法に匹敵する感度と、それを凌ぐ特異性を持たせることができた。検査対象として、末梢血の血液細胞だけでなく、骨髓組織、リンパ節などHIV-1感染の重要な場を提供している組織を対象にしたHIV-1の検出が可能である。

E. 研究発表

1. 論文発表

①A novel method for detecting HIV-1 by non-radioactive *in situ* hybridisation: Application of peptide nucleic acid probe and catalyzed signal amplification.

T. Murakami, T. Hagiwara, K. Yamamoto, J. Hattori, M. Kasami, M. Utsumi, and T. Kaneda. J. Pathol 2001, 194(1) in press.

②Defective HIV-1 provirus found in peripheral T lymphocytes and granulocytes in an AIDS patient imply viral infection of progenitor cells.

T. Kaneda, T. Murakami, T. Hagiwara, J. Hattori, K. Yamamoto, K. Sato, T. Morishita,

in press.