

Hanae Abumi, Noboru Takata, Satoshi Shirahata, Kaneo Yamada, Hiroshi Yoshikura, and Yoshiyuki Nagai

Interference Between D30N and L90M in Selection and Development of Protease Inhibitor Resistant Human Immunodeficiency Virus Type-1.

Antimicrobial Agents & Chemotherapy (in press) 2002

#### 学会発表

1. Yoshiyuki Yokomaku, Koya Ariyoshi, Hideka Miura, Sachiko Tateishi, Ai Tachikawa, Aikichi Iwamoto, Wataru Sugiura, Yoshiyuki Nagai, Zene Matsuda

GENERATION OF TAILORED CTL TARGETS WITH VSV-PSEUDOTYPED HIV-1

An update of HIV-1 CTL assay. Bangkok. 2001

2. L Myint, Z Matsuda, Y Yokomaku, K Matsuo, T Iwasaki, K Yamada and W Sugiura

Contribution of accumulated Gag and protease mutations towards recovery of the fitness and the virus particle formation in the protease inhibitor -resistant HIV-1 with D30N and L90M.

5th International Workshop on HIV Drug Resistance & treatment Strategies.

Arizona. 2001

3. Y Yokomaku, Z Matsuda, W Sugiura, M Matsuda, K Sakai, and Y Nagai

Phenotypic analysis of HIV-1 protease by virus - like particle ELAIZA.

5th International Workshop on HIV Drug Resistance & treatment Strategies.

Arizona. 2001

4. 杉浦 互

プロテアーゼ阻害剤耐性 HIV-1 におけるフィットネスの回復と gag 領域の変異の役割解析  
第4回白馬シンポジウム 長野 2001

5. L Myint, Z Matsuda, Y Yokomaku, K Matsuo, T Iwasaki, K Yamada, W Sugiura

Importance of gag and protease mutations in fitness recovery of the HIV-1 with D30N and L90M protease mutations.

第49回日本ウイルス学会 大阪 2001

6. 杉浦 互

overview 「HIV (診断・治療)」

第49回日本ウイルス学会 大阪 2001

7. 杉浦 互

HIV-1 薬剤耐性検査の現状

衛生微生物技術協議会第22回研究会  
徳島 2001

8. 松田昌和、千葉智子、岡野愛子、鑑英恵、松田善衛、横幕能行、杉浦 互

相同組み換えによる患者由来 HIV-1 の再構築と薬剤感受性検査

第15回日本エイズ学会 東京 2001

9. 千葉智子、松田善衛、横幕能行、滝沢万理、本多三男、松田昌和、岡野愛子、鑑英恵、杉浦 互

ヒト T 細胞由来の新たな HIV-1 感染宿主細胞株の樹立と薬剤感受性検査への応用

第15回日本エイズ学会 東京 2001

10. Lay Myint, Koya Ariyoshi, Wattana Auwanit, Panita Pathipvanith, Hua Yan, Masakazu Matsuda, Kaneo Yamada, Wataru Sugiura

A novel MS-PCR assay for the detection of M41L and K70R AZT resistant mutations in subtype E HIV-1

第 15 回日本エイズ学会 東京 2001

11. 岡野愛子、松田昌和、鏡英恵、千葉智子、  
山田兼雄、杉浦 互

AMPLICORE MONITOR TM Test を用いた HIV-1、  
C 型肝炎ウイルス (HCV) RNA の同時定量法の可  
可能性について検討

第 15 回日本エイズ学会 東京 2001

12. 高田 昇、藤井輝久、西村 裕、杉浦 互  
抗 HIV 薬剤耐性検査の遺伝子型と表現型検査  
の比較

第 15 回日本エイズ学会 東京 2001

13. W. Sugiura, M. Matsuda, H. Miura,  
K. Yamada, K. Ariyoshi

Variation and Prevalence of non-subtype B  
infection in Japan and their genotypic  
patterns related to anti-retrovirus  
therapy failure.

第 2 回熊本エイズセミナー 熊本 2001

14. Yoshiyuki Yokomaku, Koya Ariyoshi,  
Hideka Miura, Sachiko Tateishi,  
Ai (Kawana) Tachikawa, Aikichi Iwamoto,  
Wataru Sugiura, Zene Matsuda

Rapid generation of tailored target cells  
for CTL assay.

第 2 回熊本エイズセミナー 熊本 2001

15. L. Myint, K. Ariyoshi, A. J. Frater, M.  
Matsuda, A. Okano, T. Chiba, H. Abumi, K.  
Yamada,

W. Sugiura.

Detection of M41L and K70R AZT resistant  
mutations in subtype E HIV-1 by  
Mutagenically Separated PCR.

6th International Congress in AIDS in ASIA  
and the Pacific. Australia. 2001

16. W. Sugiura, M. Matsuda, H. Miura, K. Yamada

and K. Ariyoshi

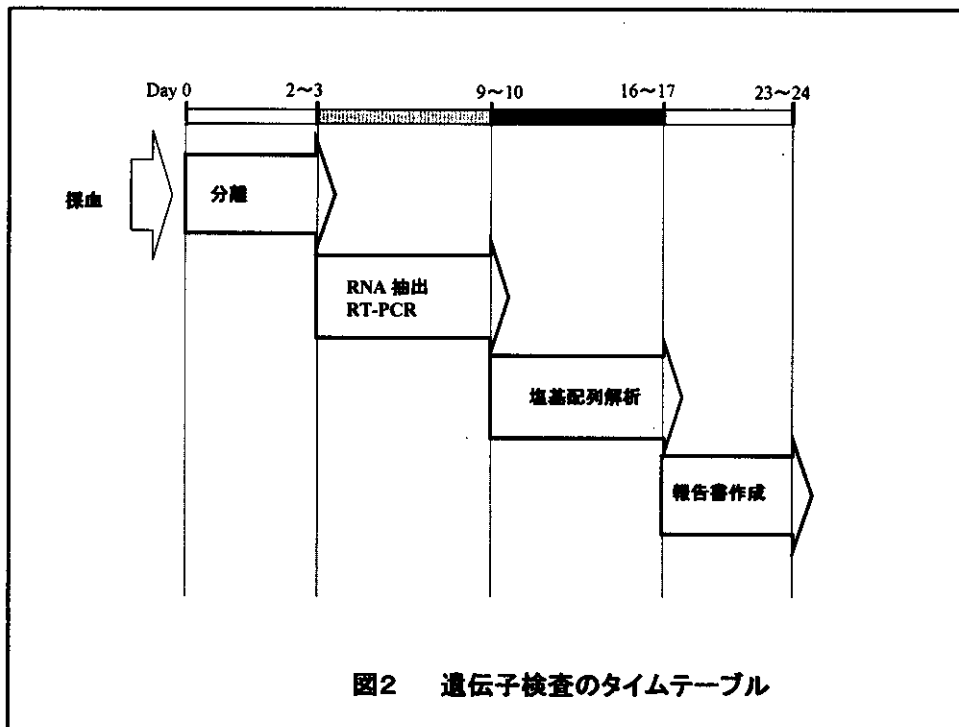
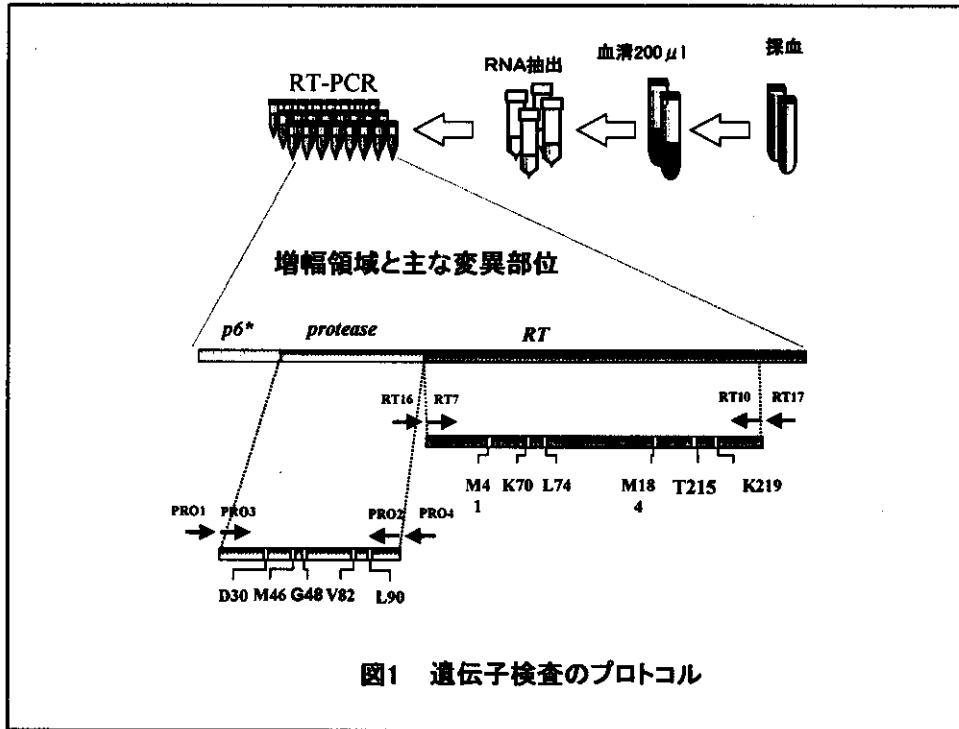
Genotypes related to nelfinavir resistance  
in subtype E infection differ from subtype  
B in Japan.

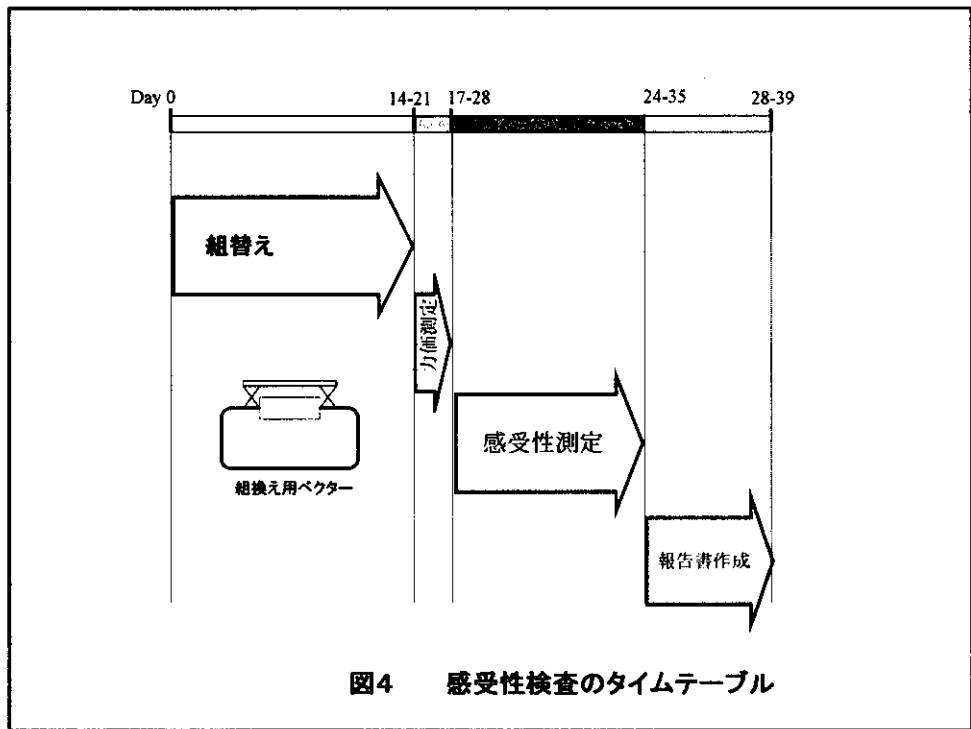
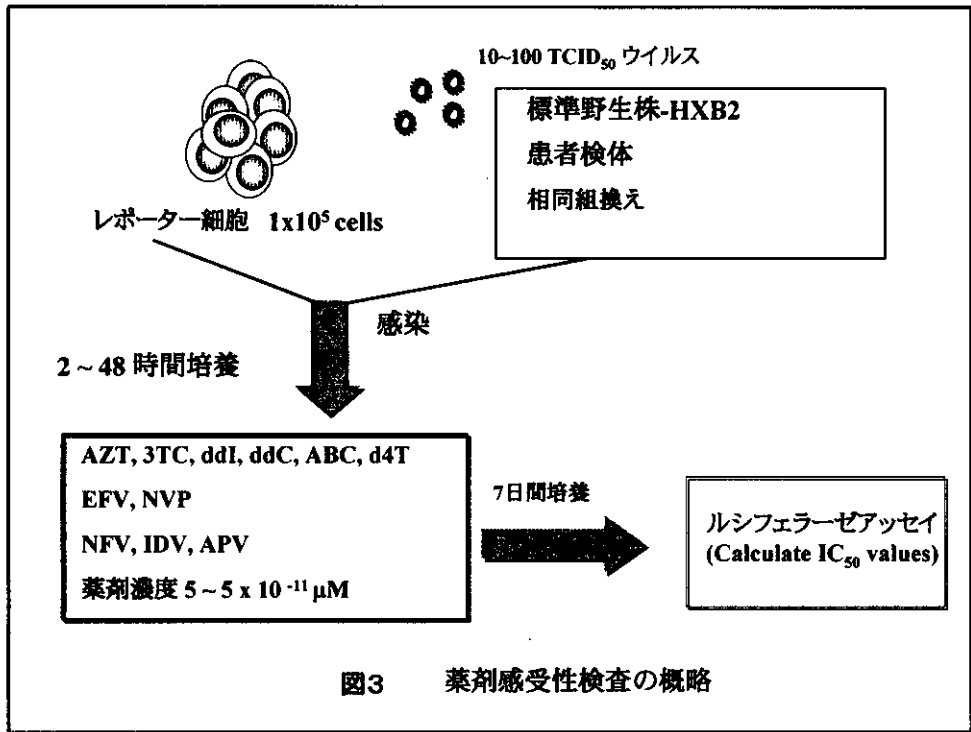
6th International Congress in AIDS in ASIA  
and the Pacific. Australia. 2001

17. W. Sugiura, M. Matsuda, H. Miura, K.  
Ariyoshi, K. Yamada

Unique Drug Resistant Mutation Pattern  
Found in Subtype-E HIV-1 Infected  
Patients.

13th Joint Scientific Meeting of the AIDS  
Panels. Kumamoto. 2001





参加施設:12施設

札幌市衛生研究所  
 山形県衛生研究所  
 新潟県保健環境科学研究所  
 静岡県環境衛生科学研究所  
 静岡市衛生試験所  
 石川県保健環境センター  
 三重県科学技術振興センター保健環境研究部  
 大阪市立環境科学研究所  
 徳島県保健環境センター  
 大分県衛生環境研究センター  
 熊本市環境総合研究所  
 沖縄県衛生環境研究所

実習内容:薬剤耐性遺伝子検査法

講義内容:薬剤耐性HIV-1概論(感染症 杉浦互)

疫学(感染症 武部 豊)

HIV-1学(感染症 松田善衛)

検査学(神奈川衛研 今井光信)

臨床における薬剤耐性(国立国際医療センター 岡慎一)

表1 平成13年度HIV-1技術研修会の実施

		IC <sub>50</sub> (uM)	IC <sub>90</sub> (uM)
NRTI	AZT	0.001	0.007
	3TC	0.014	0.1
	ddI	0.75	4.3
	ddC	0.004	0.03
	ABC	0.5	2.94
	d4T	0.008	0.1
NNRTI	EFV	0.004	0.03
	NVP	0.12	0.73
PI	IDV	0.001	0.03
	APV	0.008	0.17
	NFV	0.0006	0.04

表2 標準野生株(HXB2)感受性結果

	IDV	APV	NFV	AZT	3TC	ABC	d4T
wt	1	1	1	1	1	1	1
case 1	0.1	0.3	-	0.4	1.8	1.1	0.9
case 2	0.05	0.3	<0.01	0.4	0.2	1.5	0.8
case 3	-	0.2	<0.01	0.4	1.5	1.4	0.9
case 4	5	6.5	136.4	1.4	1.1	1.1	0.9
case 5	5	4.8	500	0.6	1.8	1.2	0.9
case 6	3	0.7	68.2	0.4	0.4	0.8	0.4
case 7	15	5	681.8	64.3	15.4	>14.8	ND
case 8	250	25	>1000	14.3	19.2	>14.8	3.7
case 9	300	3.3	>1000	6.6	>384.6	12.8	1.5
case 10	1.6	0.7	<1.4	2.3	1.3	1.3	0.9

表3 10症例の感受性検査の結果

## 8. MAGIC5-SEAP を用いた High Throughput な

### Phenotypic Resistance Assay の確立と応用

分担研究者 蜂谷敦子 (国立国際医療センター・エイズ治療研究開発センター)  
研究協力者 巽 正志 (国立感染症研究所・獣医科学部)  
松岡佐織 (国立国際医療センター・エイズ治療研究開発センター)  
土屋亮人 (国立国際医療センター・エイズ治療研究開発センター)  
岡 慎一 (国立国際医療センター・エイズ治療研究開発センター)

#### 研究概要

昨年までに我々が報告した「MAGIC5 細胞による薬剤感受性試験」をさらに改良するため、化学発光で測定が可能である MAGIC5-SEAP を作成した。そのためこれまでの方法と比べ、迅速、簡便、安定であり、多検体処理が出来るようになった。ルーチンの臨床検査への応用が可能となる際には、治療前、治療変更時での薬剤を決定する上での手段の1つとして本法は有用であると期待される。

#### 1. 目的

昨年までに我々は、HIV-1 のレセプターである CD4 とコレセプターの CXCR4 および CCR5 を発現させ、X4、R5 指向性ウイルスの両者の感染が可能である MAGIC5 を用いた phenotype 法を開発した。この系は X-gal 染色により HIV-1 の感染価が測定できる。しかしこの方法は顕微鏡下における青染した細胞核の計数であるため、安価、簡便ではあったが多検体迅速処理には向いていない。そこでこれらの問題を解決するために MAGIC5 の LTR の下流に分泌型アルカリフォスファターゼ (SEAP) を組み込んだ MAGIC5-SEAP 細胞を作成し、薬剤感受性試験の検出系で用いた。HIV 感染時の Tat 蛋白によって、組み込まれた LTR 下流の SEAP が発現し、培養上清中に分泌される SEAP を化学発光で検出することで、High Throughput な測定系の確立を目的として検討した。

#### 2. 方法

臨床検体：当センターを受診中の HIV 感染者からインフォームドコンセントを得て採血し、直ちに血漿を分離して使用した。

ウイルス分離：昨年に報告した方法と同様、患者由来の plasma からウイルスを分離した。

感染価の測定：感染当日、ウイルスを×1 から×1000 に Infection medium で希釈し、MAGIC5-SEAP に加え、37°C、5%CO<sub>2</sub> インキュベーターにて 48 時間培養した。

逆転写酵素阻害剤：一定濃度のウイルスを Infection Medium にて希釈し、100ul ずつ加えた。さらに 10 倍希釈系列を作成した抗ウイルス薬を 100ul ずつ加え、37°C、5%CO<sub>2</sub> インキュベーターにて培養した。48h 後、X-gal 染色または SEAP、β-ガラクトシダーゼのレポーター遺伝子アッセイを行い、薬剤を加えていないウエルを 100%とし、50%発育阻止が

出来たところを IC50 とした。

プロテアーゼ阻害剤：一定濃度のウイルスを Infection Medium にて希釈し、100ul ずつ加えた。さらに 10 倍希釈系列を作成した抗ウイルス薬を 100ul ずつ加え、37°C、5 %CO2 インキュベーターにて培養した。72h 後、前日用意しておいた 96well プレートに上清 100ul と Infection Medium 100ul を加え、培養した。48h 後、X-gal 染色または SEAP、 $\beta$ -ガラクトシダーゼのレポータージーンアッセイを行い、薬剤を加えていないウエルを 100%とし、50% 発育阻止が出来たところを IC50 とした。

genotype (遺伝子型) での耐性検査：昨年までの方法と同様、患者血漿中から RNA の抽出を行い、塩基配列を Auto sequencer を用いて決定した。アミノ酸配列は、塩基配列より推定し、耐性の有無を調べた。

### 3. 結果

検出感度の比較：MAGIC5-SEAP は、HIV 感染により培養上清中に分泌型アルカリフォスファターゼ (SEAP) が分泌され、その量は HIV が細胞に感染した数に比例している。またウイルスの検出感度は、MAGIC5A を用い  $\beta$ -ガラクトシダーゼを測定したものに比べ感度は 2 倍から 4 倍ほど高く、従来から使用されている Blue cell count による方法とほぼ同等の結果が得られた。(Table 1.)

Blue cell count 法と SEAP 法の相関：それぞれ作用機序の異なる 3 剤、AZT、NVP、NFV を用いて Blue cell count 法と SEAP 法で得られた fold resistance を比較した (Fig 1.)。ウイルスは、MAGIC5A を用いて臨床検体から分離した 30 例、(無治療 12 例、治療 18 例) を使用した。また Fold resistance についてはそれぞれのアッセイでの NL432 の IC50 を 1 倍とし算出した。

#### ①AZT (Fig 1)

Blue cell count 法で高度耐性株の 384 倍から感受性株の 0.5 倍までウイルスを SEAP 法で

測定したところ 434 倍から 0.4 倍となった。また決定係数 (R<sup>2</sup>) は 0.934 であった。(また相関係数は、0.957 であった。)

#### ②NVP (Fig 1)

Blue cell count 法で高度耐性株の 277 倍から感受性株の 0.06 倍までウイルスを SEAP 法で測定したところ 250 倍から 0.06 倍となった。また決定係数は 0.935 であった。(また相関係数は、0.994 であった。)

#### ③NFV (Fig 1)

Blue cell count 法で高度耐性株の 1000 倍から感受性株の 0.42 倍までウイルスを SEAP 法で測定したところ 1000 倍から 0.31 倍となった。また決定係数は 0.963 であった。(また相関係数は、0.999 であった。)

作用機序の異なる 3 剤において高度耐性株、中等度耐性株、感受性株において SEAP 法は検出が可能であり、Blue cell count 法との相関についても良好な結果が得られた。

今回のアッセイで使用した NL432 の IC50 の再現性 5 回を AZT、NVP、NFV の薬剤において Blue cell count による法と SEAP による方法と比較したところ、平均値、レンジ、CV において両者の方法でほぼ同様の結果が得られた。(データ示さず)

genotype との比較：実際に抗 HIV 療法を受けている患者を対象に phenotypic と genotypic assay の結果を比較した。(Table 2.) phenotypic assay では、AZT、3TC、d4T、ABC、NVP、RTV、SQV、NFV、IDV、APV の 10 薬剤について行った。逆転写酵素阻害剤、非核酸系逆転写酵素阻害剤、プロテアーゼ阻害剤において phenotypic と genotypic assay の結果は一致していた。プロテアーゼ阻害剤では、primary mutation が入ることにより RTV 309 倍、SQV 28.9~128 倍、IDV の 14.6~29 倍への高度耐性を獲得していた。また primary mutation に変異がなかった APV、NFV は、secondary mutation の蓄積で 10.7~66.6 倍、80 倍~666 倍とそれぞれ高度耐性に傾いてい



た。今回のアッセイから genotypic assay で検出された変異については、MAGIC-5/SEAP においても検出が可能であった。

#### 4. 考察

薬剤耐性検査における phenotypic assay の必要性が高まっているが、現在のところ手間がかかり、多検体処理には不向きであった。今までの報告されている phenotypic assay と比べ MAGIC5-SEAP は、非常に優れている点はいくつか上げられる。①従来までの方法では4～8週間ほど日数を要するが、本法は、約2週間でアッセイが終了する。②検出段階で化学発光を用いているため、多検体処理でも短時間で処理が可能であった。③この SEAP は通常のレポーターアッセイに必要な細胞溶解処理が不要であり、安定した結果が得られた。④培養上清を採取するだけで測定が可能であるため、HIV 感染時の経時的な変化を観察することができた。⑤発光安定性は30～90分まで安定した結果が得られた。(データ示さず)⑥検出感度は $\beta$ -ガラクトシダーゼを測定する系と比べ SEAP は優れており、従来までのウイルス量で薬剤感受性試験が可能であった。つまり今回の SEAP を用いた化学発光による phenotypic assay は、迅速、簡便、安定であり、多検体を処理するに向いており、ルーチンでの臨床検査が可能であると考えられた。またこの細胞を用いた感受性試験の結果は、作用機序の異なる3剤において MAGIC5A で得られた結果とほぼ同様であり、Fold resistance で示した相関係数についても0.9以上と非常に優れた相関性を示していた。この結果は MAGIC5A を親株として MAGIC5-SEAP が、HIV 感染により SEAP を細胞外に分泌するように作成しているためと示唆された。genotype との相関では、primary mutation があるものは本法でも検出でき、また secondary mutation の蓄積により耐性度が高まるという結果が得られ、今まで報告されて

いるような profile とほぼ同様の結果が得られた。また本法を用いることにより交差耐性の度合いも検出することが可能となった。近年薬剤耐性ウイルスの新規感染者への拡散が報告され、初回治療前の薬剤感受性試験は必要となり、さらに薬剤感受性試験の結果が治療のその後を予測できたという報告もなされている。このように薬剤感受性試験の需要が高まっており、薬剤感受性試験を今後ルーチンでの臨床検査への移行を考えなければならない。本法は、多検体処理が可能となるためルーチン検査が可能となり、今後最適サルベージ療法を決定する為の1つの手段として利用できることが期待される。

#### 発表論文

1. Hachiya A., S. Aizawa, M. Tanaka, Y. Takahashi, S. Ida, H. Gatanaga, Y. Hirabayashi, A. Kojima, M. Tatsumi, S. Oka. Rapid and simple phenotypic assay for drug susceptibility of human immunodeficiency virus type 1 using CCR5-expressing Hela/CD4+ cell clone 1-10 (MAGIC5). *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001;45:495-501
2. Tsuchiya K., S. Matsuoka, A. Hachiya, A. Yasuoka, N. Tachikawa, Y. Kikuchi, I. Genka, K. Teruya, S. Kimura, S. Oka. Accumulation of lopinavir resistance-associated mutations over 3 years follow-up of patients on highly active antiretroviral therapy: implication in salvage therapy. *AIDS.* 2001;15:9:1183-1184.
3. Sato H., Y. Tomita, K. Ebisawa, A. Hachiya, K. Shibamura, T. Shino, R. Yang, M. Tatsumi, K. Gushi, H. Umehara, S. Oka, Y. Takebe. Augmentation of human immunodeficiency virus type 1 subtype E(CRF01 AE) multiple-drug resistance by

insertion of a foreign 11-amino-acid fragment into the reverse transcriptase. Journal of Virology. 2001;75:12:5604-5613.

4. 蜂谷敦子、岡 慎一. Counting immuno assay 法による HIV-1/2 抗体検出キットに関する基礎検討. 感染症学雑誌 75(2):103-109, 2001

5. 蜂谷敦子、岡 慎一. penotype ウイルスー抗 HIV 薬に関する薬剤耐性検査一. 臨床と微生物 28(1):9-14, 2001

学会発表

1. 蜂谷敦子、松岡佐織、平林義弘、岡慎一から「APV を含んだサルベージ療法に関する基礎的検討」第 75 回日本感染症学会総会、平成 13 年 3 月 29 日、奈良

2. 蜂谷敦子、高橋由紀子、巽 正志、岡慎一から、「3 剤併用療法をそのまま評価する新しい薬剤耐性検査法の開発」第 15 回日本エイズ学会総会、平成 13 年 12 月 1 日、東京

Fig.1 SEAP法とBlue cell count法のFold resistanceでの比較

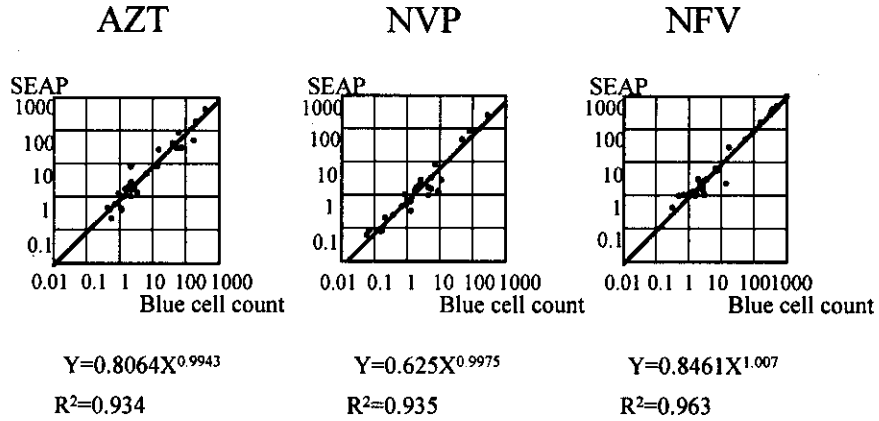


Table.1 検出感度の比較

Virus and dilution	Blue cell count (BFU)	SEAP (ΔRLU)	β-gal (ΔRLU)	Virus and dilution	Blue cell count (BFU)	SEAP (ΔRLU)	β-gal (ΔRLU)
<b>NL432</b>				<b>Case1</b>			
1/100	204	6282	1351	1/100	144	2055	11
1/200	104	3163	618	1/200	91	1046	<0
1/400	47	782	314	1/400	55	518	<0
1/800	16	438	<0	1/800	26	230	<0
1/1600	9	325	<0	1/1600	9	90	<0
1/3200	0	<0	<0	1/3200	0	<0	<0
1/6400	0	<0	<0	1/6400	0	<0	<0
1/12800	0	<0	<0	1/12800	0	<0	<0
1/25600	0	<0	<0	1/25600	0	<0	<0
<b>Case2</b>				<b>Case3</b>			
1/100	48	1739	104	1/100	846	65610	1446
1/200	24	524	<0	1/200	624	32143	636
1/400	21	366	<0	1/400	420	18109	170
1/800	4	253	<0	1/800	210	6109	<0
1/1600	2	33	<0	1/1600	132	3761	<0
1/3200	0	<0	<0	1/3200	73	1475	<0
1/6400	0	<0	<0	1/6400	44	1464	<0
1/12800	0	<0	<0	1/12800	11	620	<0
1/25600	0	<0	<0	1/25600	7	327	<0

Table.2 genotypeとの比較

Sample	AZT	3TC	d4T	ABC	NVP	RTV	SQV	NFV	IDV	APV	RT	PI
V-172	1.52	1.96	1.6	1.38	1.62	1	0.17	0.23	0.03	0.84	T215S	M36I, L63P
V-175	83	>172	4.16	4	0.28	309	111	633	29	24.1	M41L, D67N, M184V, L210W, T215Y, K219R	L10I, I54V, L63P, A71V, V77I, V82A, I84V, L90M
V-176	9.11	>322	0.92	6.84	0.47	38	6.6	300	14.6	10.7	M41L, M184V, L210W, T215Y	K20T, M36I, M46I, L63P, A71T, V77I, N88S
V-180	75	>256	6.09	8.75	0.39	160	128	666	47.2	53.3	M41L, D67E, V75M, F77L, M184V, T215Y,	L10I, K20R, M36I, G48V, I54V, L63T, V82A
V-181	0.41	1.43	1.12	2.62	0.62	1.6	0.42	0.7	2	3.2	nothing	M36I
V-182	2.7	2.82	3.53	10	151	34	28.9	80	11.8	66.6	M41L, L74V, M184V, G190S, T215Y	L10I, K20I, A71V, G73S, I84V, L90M

## 9. 薬剤耐性変異の解析法の開発に関する研究

分担研究者 加藤真吾 (慶応義塾大学医学部微生物学・免疫学教室)

研究協力者 田中理恵 (慶応義塾大学医学部微生物学・免疫学教室)

### 研究概要

感染者の末梢血単核球 (PBMC) からウイルスを効率的に分離できる方法を確立した。また、PBMC を標的細胞とするフェノタイプによる HIV-1 の薬剤耐性試験法を確立した。これらの方法を用いて過去 1 年間に 41 件の HIV-1 分離株の薬剤感受性を 12 種類の抗 HIV-1 薬に対して測定した。その結果、未治療の感染者のウイルス株では薬剤耐性が認められなかった。感受性が有意に高い過感受性ウイルスも見つかった。治療中の感染由来のウイルス株からはそれぞれの株に特有な様々な耐性パターンが認められた。薬剤耐性に関するこのような情報は抗 HIV-1 治療における治療薬の選択や変更時期を決定するための判断材料となることが期待される。

### 目的

抗 HIV-1 治療において、感染者から分離される HIV-1 の薬剤耐性に関する情報は、治療薬の選択や変更時期を決定する上で一つの重要な判断材料となる。HIV-1 の薬剤耐性を調べる方法としては、ジェノタイプによるものとフェノタイプによるものに大別される。本研究は、末梢血単核球 (PBMC) を HIV-1 の標的細胞として用いたフェノタイプによる薬剤耐性試験法の開発を目的とした。

### 方法

ウイルス分離：感染者と健常者のクエン酸ナトリウム採血液から Ficoll-Paque (Pharmacia) を用いて PBMC を調製し、Dynabeads M-450 CD8 を用いて CD8 陽性細胞を除去した。この感染者 PBMC と健常者 PBMC を  $5 \times 10^6$  細胞ずつ 10 ml の RPMI1640 培地 [3035%FCS と 70 U/ml rIL-2 (イムネース注 35、シオノギ) 含有) の中で混合し、50 倍希

釈した抗 CD3 抗体 (CLB-CD3、PeliCluster) を 40  $\mu$ l 加え、CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養した。3 日後に培養上清を遠心 (1,000 rpm、10 分間) して除き、細胞濃度が  $0.5 \times 10^6$ /ml になるように RPMI1640 培地を加えて培養を続けた。その後 2 日ごとに同様にして細胞を播き直し、上清中の HIV-1 p24 濃度をミニバイダス (ビオメリュー社) を用いて測定した。

IC<sub>50</sub> と IC<sub>90</sub> の測定：健常人 PBMC を先の方法で 4 日間培養し、その  $1 \times 10^7$  細胞に約 100 ng の p24 量のウイルス液を 1 ml の RPMI 1640 培地中で 1 時間感染させ、培地で一度洗浄した。この感染細胞を  $1 \times 10^5$  個ずつ、96 穴プレートにおいて AZT、ddI、3TC、d4T、ABC、NVP、EFV については 100  $\mu$ M から 0.1 nM まで、IDV、SQV、NFV、APV、LPV については 10  $\mu$ M から 0.01 nM まで RPMI1640 培地で 10 倍段階希釈した 200  $\mu$ l の液に加え 3 日間培養し、培養上清中の p24 濃度を測定した。こうして得られた阻害曲線から IC<sub>50</sub> と IC<sub>90</sub> を決定した。

## 結果

平成 13 年度にフェノタイプによる薬剤耐性試験を依頼された検体は 92 件で、そのうちウイルス分離が成功したのは 61 件 (66%)、実際に耐性試験を実施したのは 41 件であった。ウイルス分離が成功しても耐性試験を実施しなかった主な理由は、高力価のウイルス液が得られなかったか、同一患者由来の検体の耐性試験数を制限したためであった。

ウイルス分離の成否と血漿 HIV-1 RNA レベルとウイルス分離との関係を図 1 に示す。血漿 HIV-1 RNA レベルが 1000 コピー/ml 以上の症例の 80%以上でウイルス分離が成功した。ウイルス分離がこのように良好な成績をおさめた原因は、ウイルス分離プロトコールにおいて、PBMC から CD8 陽性細胞を除いたこと、患者と健常人の PBMC を混合してから増殖刺激を行ったこと、T 細胞の増殖刺激のために PHA ではなく抗 CD3 抗体を用いたことなどがあげられる。

同一ドナーの PBMC を用いたときの HIV-1 LAI 株の IC<sub>90</sub> と IC<sub>50</sub> の測定間誤差を表 1 と表 2 にそれぞれ示す。12 種類の薬剤に対する IC<sub>90</sub> と IC<sub>50</sub> の変動係数の平均はそれぞれ 29% と 19% であった。

二人のドナーの PBMC を用いたときの HIV-1 LAI 株の IC<sub>50</sub> (n=7) と IC<sub>90</sub> (n=3) の平均値を表 3 に示す。ドナー間で最も大きな差があったのは 3TC で、IC<sub>50</sub> では 2.6 倍、IC<sub>90</sub> では 1.9 倍であった。

代表的な 17 の患者検体の IC<sub>50</sub> と IC<sub>90</sub> を標準株である LAI 株の値に対する比として表 4 と表 5 にそれぞれ示す。LAI 株の値の 4 倍以上を薬剤耐性とみなし四角で囲んだ。また LAI 株の値の 1/4 以下を過感受性とみなし下線をつけた。抗 HIV-1 薬が投与されていない 10 症例では薬剤耐性が認められなかった。抗 HIV-1 薬が投与されている 7 症例では、少なくとも一種類の薬剤に対する耐性が認められ

た。同一クラスに属する薬剤に対して交差耐性が現われやすい傾向が認められた。特記すべきは症例 211 で、分離されたウイルスは検査した 12 種類すべての薬剤に対して耐性を示しており、難治性であることが予想される。

以上の結果から、本研究において HIV-1 の効率的な分離法と PBMC を用いたフェノタイプによる薬剤耐性試験のプロトコールを確立できたと考えられる。今後、この方法によって得られるデータを臨床においてどのように活用していくかを検討することが最も重要な課題である。

## 発表論文

なし

## 学会発表

1. Yoshii T, Kuji N, Kato S, Saito Y, Hanabusa H, Sueoka K, and Yoshimura Y. Buoyant density measurement of human immunodeficiency virus type 1 in silane-coated density gradient media. 11th World congress of Human Reproduction. 2001, July, Lausanne, Switzerland.
2. 田中宏明、久慈直昭、吉井毅、寺西貴英、佐藤健二、谷垣礼子、末岡浩、齊籐有紀、加藤真吾、吉村泰典、野澤志朗「迅速 nested RT-PCR 法を用いた非凍結・洗浄 HIV 感染者精子による人工授精・体外受精実用化の試み」第 53 回日本産科婦人科学会学術講演会 (2001 年 5 月、札幌)
3. 花房秀次、大田みお、田上尚道、加藤真吾「HIV 感染者の肝炎対策」第 15 回日本エイズ学会学術集会 (2001 年 11 月、東京)
4. 田上尚道、齊籐有紀、田中理恵、花房秀次、加藤真吾「感染個体内における HIV-1 RNA-DNA hybrid の生物学的役割」第 15 回日本エイズ学会学術集会 (2001 年 11 月、東京)
5. 花房秀次、加藤真吾、兼子智、鈴木美奈、高桑好一、田上尚道、田中憲一「改良 Swim up

法による HIV 陽性男性の精液からの HIV 除去と体外授精の臨床実施成績」第 15 回日本エイズ学会学術集会（2001 年 11 月、東京）

6. 齊藤有紀、花房秀次、加藤真吾「単一ビリオンの迅速検出法」第 15 回日本エイズ学会学術集会（2001 年 11 月、東京）

7. 加藤真吾、田中理恵、齊藤有紀、松本智

子、高野八百子、田上尚道、根岸昌功、花房秀次「PBMC を被感染細胞とする HIV-1 薬剤感受性試験」第 15 回日本エイズ学会学術集会（2001 年 11 月、東京）

その他

なし

図 1.

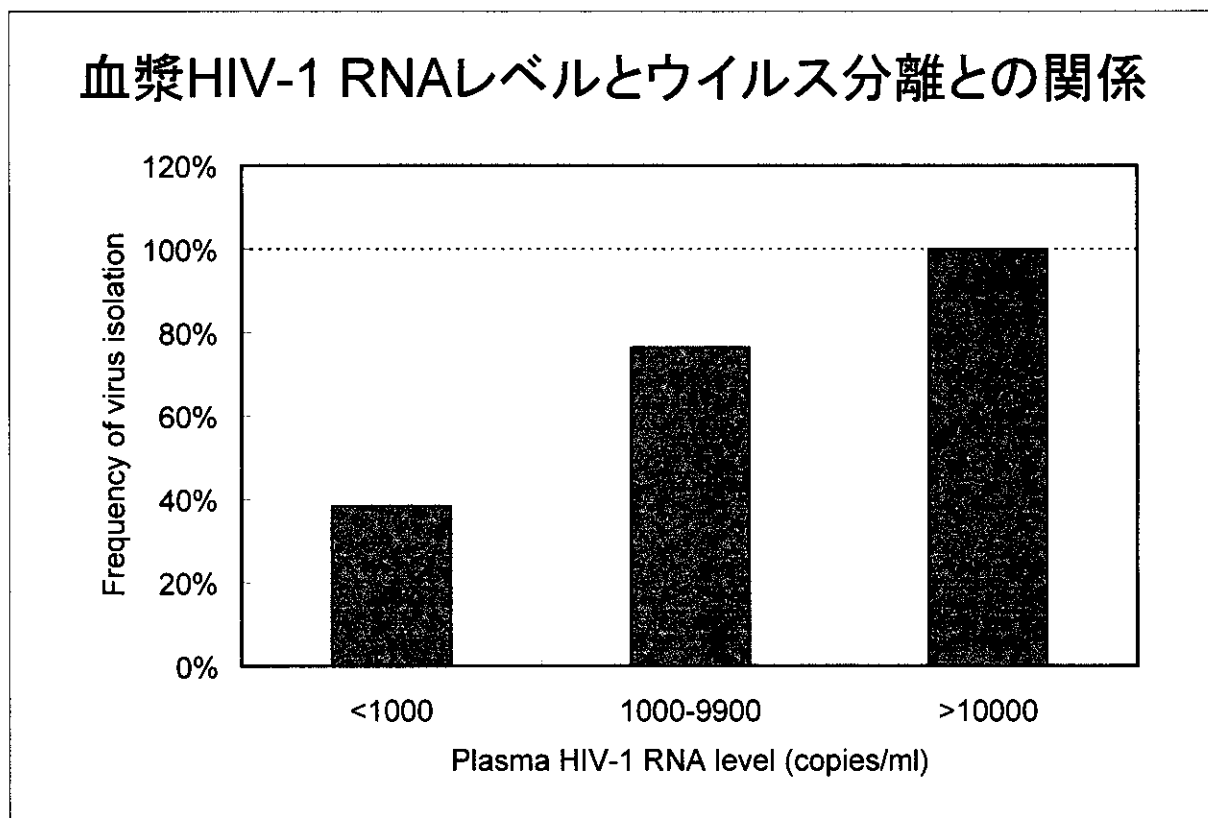


表 1.

### HIV-1 LAI株の各薬剤に対するIC<sub>50</sub>値の測定間誤差

同一ドナーのPBMCを使用

(単位: nM)

実験	AZT	ddl	3TC	d4T	ABC	NVP	EFV	IDV	SQV	NFV	APV	LPV
1	1.10	5500	370	73	100	20	1.2	12.0	14.0	9.9	17.0	19
2	1.30	7500	390	75	190	25	1.0	9.7	15.0	11.0	14.0	22
3	0.67	7600	460	70	220	22	1.1	7.1	12.0	8.6	9.8	20
4	0.71	8200	390	92	320	18	1.3	6.3	13.0	16.0	13.0	31
5	0.59	7200	230	62	130	24	1.2	7.3	5.3	7.2	18.0	15
6	0.99	12000	210	66	230	20	1.0	6.7	9.6	4.7	5.9	14
7	0.89	17100	300	45	180	24	1.0	5.1	6.1	8.4	6.8	16
平均	0.89	9304	335	69	195	22	1.1	7.7	10.7	9.4	12.1	20
CV	29%	43%	27%	21%	37%	12%	11%	30%	36%	38%	39%	30%

平均CV = 29%



表 2.

## HIV-1 LAI株の各薬剤に対するIC<sub>90</sub>値の測定間誤差

同一ドナーのPBMCを使用

(単位: nM)

実験	AZT	ddl	3TC	d4T	ABC	NVP	EFV	IDV	SQV	NFV	APV	LPV
1	6.1	31000	3000	490	1400	160	3.6	60	57	61	75	69
2	6.4	37000	2800	590	1500	160	3.5	73	68	79	110	100
3	6.6	51000	3700	550	1300	190	3.7	70	61	70	85	89
4	6.9	39000	3100	550	2000	140	3.9	94	65	94	88	100
5	4.4	39000	2300	460	2100	150	3.6	62	43	76	100	80
6	5.3	54999	2100	430	1200	120	3.4	58	48	58	56	69
7	7.8	83000	3400	520	2200	140	4.0	50	49	60	69	72
平均	6.2	48000	2900	510	1700	150	3.7	67	56	71	83	83
CV	18%	37%	19%	11%	25%	14%	6%	21%	17%	18%	22%	17%

平均CV = 19%

表 3.

## HIV-1 LAI株の各薬剤に対するIC<sub>50</sub>とIC<sub>90</sub>の平均値の ドナー間差異

(単位: nM)

	ドナー	n	AZT	ddl	3TC	d4T	ABC	NVP	EFV	IDV	SQV	NFV	APV	LPV
IC <sub>50</sub>	A	7	0.9	9300	340	69	200	22	1.1	7.7	11.0	9.4	12	20
	B	3	1.1	6300	130	49	130	17	1.2	3.9	8.6	7.5	14	22
IC <sub>90</sub>	A	7	6.0	42000	2800	510	1600	150	3.6	70.0	57.0	73.0	86	85
	B	3	7.0	35000	1500	510	2100	160	3.8	51.0	63.0	70.0	97	94

表 4.

## 感染者PBMC分離ウイルスのIC<sub>50</sub>

Case	Sample	Therapy	AZT	ddl	3TC	d4T	ABC	NVP	EFV	IDV	SQV	NFV	APV	LPV
C003	SP234	-	1.2	1.0	0.6	0.6	0.4	0.9	1.3	0.7	0.2	2.2	2.1	1.3
C039	SP232	-	0.8	2.9	0.1	0.3	0.8	0.9	0.9	0.6	0.2	0.7	1.0	0.4
H002	OK1088	-	1.6	1.8	0.8	0.8	0.9	2.7	1.2	2.2	0.6	2.7	1.4	0.8
H021	OK1073	-	3.0	3.0	0.8	0.8	0.7	2.2	1.2	1.8	2.2	0.8	3.0	1.5
H125	OK1077	-	1.9	0.5	0.1	2.0	0.3	0.3	0.4	1.1	0.7	0.8	1.3	0.9
H130	OK1086	-	0.9	1.5	1.0	0.1	0.1	1.2	1.3	2.2	1.5	1.9	1.1	1.1
H146	OK1071	-	2.1	0.4	0.7	0.9	0.7	0.2	0.9	0.4	0.3	0.3	0.9	0.7
H200	OK1078	-	0.9	0.5	0.1	0.7	0.5	0.9	0.5	1.0	0.5	0.7	1.4	0.7
H200	OK1090	-	0.7	1.3	0.6	1.3	0.2	1.3	0.6	0.2	0.4	1.5	1.7	1.0
H2004	OK1083	-	1.6	1.5	1.1	2.6	1.4	1.0	1.6	1.6	1.0	2.0	1.7	0.8
C008	SP228	+	41.6	0.8	>600	3.6	9.7	5.9	1.7	37.5	14.0	18.1	72.7	9.7
H033	OK1084	+	7.0	0.5	2.7	3.6	1.8	>9000	25225.2	0.8	0.7	1.1	1.4	1.7
H102	OK1076	+	0.7	1.6	1.1	0.4	1.5	0.3	1.1	1.8	0.6	2.4	0.9	1.3
H211	OK1100	+	191.0	21.5	7.5	11.6	7.2	>9000	8198.2	49.1	26.2	202.1	26.4	21.9
H225	OK1082	+	1.1	0.9	0.8	1.0	1.5	0.3	1.4	2.7	1.1	3.5	1.9	1.4
H390	OK1092	+	5.8	4.0	211.9	1.0	3.6	146.1	31.5	155.0	32.7	297.9	6.1	61.2
H390	OK1101	+	4.6	5.6	>600	1.4	5.0	1.1	5.6	129.2	25.2	138.3	6.4	40.3

表 5.

## 感染者PBMC分離ウイルスのIC<sub>90</sub>

Case	Sample	Therapy	AZT	ddl	3TC	d4T	ABC	NVP	EFV	IDV	SQV	NFV	APV	LPV
C003	SP234	-	1.8	1.1	0.4	0.8	0.4	0.9	1.4	0.6	0.2	1.4	0.8	0.8
C039	SP232	-	0.4	1.5	0.4	0.4	0.5	0.7	0.7	0.5	0.3	0.7	0.7	0.4
H002	OK1088	-	1.1	1.2	0.8	1.1	0.6	1.6	1.0	1.0	0.6	3.9	1.1	1.3
H021	OK1073	-	1.2	1.6	0.4	1.2	0.5	1.3	1.4	0.9	1.1	1.4	1.9	1.1
H125	OK1077	-	1.1	0.8	0.3	1.2	0.4	0.6	0.6	0.9	0.7	0.9	0.9	0.9
H130	OK1086	-	0.9	1.2	0.4	0.1	0.1	0.9	1.1	0.9	1.0	1.1	0.9	0.8
H146	OK1071	-	0.9	0.6	0.4	0.6	0.4	0.5	0.9	0.6	0.3	0.5	0.6	0.7
H200	OK1078	-	0.6	0.7	0.2	0.5	0.2	0.6	0.5	0.4	0.4	0.5	0.7	0.6
H200	OK1090	-	0.9	1.8	0.5	1.2	0.3	0.5	0.8	0.6	0.4	0.8	0.9	0.8
H2004	OK1083	-	0.7	0.9	0.5	1.0	0.5	0.6	1.2	0.5	0.6	0.8	0.7	0.5
C008	SP228	+	209.7	1.6	68.7	4.3	5.9	2.4	1.4	12.8	13.9	73.2	7.8	9.6
H033	OK1084	+	35.5	0.7	2.0	1.9	0.7	1315.8	20540.5	2.1	1.5	1.1	1.4	1.3
H102	OK1076	+	0.5	1.0	0.6	0.6	1.1	0.3	0.8	1.3	0.8	4.4	1.3	1.1
H211	OK1100	+	258.1	4.2	6.9	10.5	4.2	1315.8	7027.0	35.8	21.4	114.1	19.3	22.9
H225	OK1082	+	6.9	1.0	1.0	1.3	1.0	0.8	1.2	1.1	1.0	4.4	1.1	1.7
H390	OK1092	+	9.2	2.9	68.7	1.9	2.3	85.5	32.4	77.6	21.4	109.9	5.2	56.6
H390	OK1101	+	8.9	4.2	68.7	1.5	2.2	1.6	8.9	62.7	30.4	78.9	5.3	44.6

## 10. Tibotec-Virco 社への検査依頼状況および結果解析

向出雅一（神奈川県衛生研究所、SRL, Inc.）

近藤真規子（神奈川県衛生研究所）

西澤雅子（神奈川県衛生研究所）

須藤弘二（神奈川県衛生研究所）

今井光信（神奈川県衛生研究所）

### 研究要旨

HIV 薬剤耐性検査を専門とする Tibotec- Virco 社（ベルギー）との連帯により可能となった HIV 薬剤耐性検査（VirtualPhenotype™、Antivirogram®Phenotype）の検査依頼状況と結果解析を行った。検査対象となる薬剤数は、今年、2 薬剤（A component of Kaletra®（Lopinavir）Tenofovir DF（Viread™））追加され、16 薬剤となった。対象施設は、26 施設で、VirtualPhenotype™の報告数は、125 例（前年比 +130%）陽性率 76%であった。報告日数は、3～4 週間（通常 3 週間）、Antivirogram®Phenotype は、報告数 179 例（前年比 +71%）で、陽性率 72%、報告日数 5～7 週間（通常 5 週間）であった。VirtualPhenotype™と Antivirogram®Phenotype の比較では、全体としてほぼ相関が見られたが、症例によっては、乖離例も見られた。公的研究期間の充実・整備と共に民間検査センターの活用も含めた検査体制の確立に今後つとめたい。

### 1. 研究目的

現在、HIV 薬剤耐性検査は、抗 HIV 薬による治療方針決定において重要な検査となっている。今後、確実に実施できる検査体制の構築のためには、公的な研究機関での検査体制の充実とおもに、民間の検査センター等との連帯による検査体制の整備・拡大がきわめて重要である。このため、HIV 薬剤耐性検査を専門とし、きわめて多数の薬剤耐性検査の経験を有する Tibotec-Virco 社（ベルギー、英国）と日本の検査センター（SRL）との連帯による HIV 薬剤耐性検査態勢の整備と現状を把握し、検査結果の検証を目的とした。

### 2. 薬剤耐性検査のながれ

VirtualPhenotype™では、患者から血漿を医療機関で採取し、直接、または、研究機関を通じて臨床検査センターへ送り、HIV 薬剤耐性検査を依頼する。センターでは、核酸抽出、遺伝子増幅、塩基配列決定を行い、塩基配列データを Tibotec-Virco 社（英国）へおくり、データベースを用いてバーチャルフェノタイプ（仮想フェノタイプ）解析を行う。解析結果は、検査センターに報告され、直接、または、研究機関を通じて医療機関に返され、患者に診断結果を説明する。Antivirogram®Phenotype は、遺伝子増幅産物を Tibotec- Virco 社（ベルギー）に空輸し、Recombinant Virus Assay（RVA）を実施する。

### 3. VirtualPhenotype™

血漿より HIV-1 の RNA を抽出し、RT-PCR 法にて HIV-1 治療薬のターゲット領域である HIV-1 のプロテアーゼ (Protease codon 1-99) 領域と逆転写酵素 (Reverse Transcriptase codon 1-400) 領域を増幅する。次に、この PCR 産物を用いて遺伝子配列を決定し、Tibotec-Virco 社に送る。Tibotec-Virco 社では、その遺伝子配列をもとに、約 120,000 症例のゲノタイプとフェノタイプを含むリレーショナルデータベースによる HIV-1 治療薬、各々に対する感受性の解析する。解析結果はセンターに返送され、親展にて報告される。

-VirtualPhenotype™の報告例の形式の説明-

- Subtype analysis : 患者由来の HIV-1 の Polymerase 領域より判定された HIV-1 サブタイプを表示する。

- Resistance-associated mutations identified: HIV-1 ゲノムのプロテアーゼおよび逆転写酵素領域の変異を示します。「Pro」の上部には、患者由来 HIV-1 のプロテアーゼ領域の変異を示す。「Reverse Transcriptase」の下部には、患者由来 HIV-1 の逆転写酵素領域の変異を示す。

- Drug : 16 種類の薬剤の商品名 (Trade name) と、一般名 (Generic name) を示す。

- Matches in database : 患者由来 HIV-1 における突然変異のパターンに合致するデータベースの検体数を各薬剤に対し示す。

- Cut-off 値の設定 : 1000 例の HIV-1 陽性未治療症例と数 1000 例の wild type のフェノタイプ測定結果から設定した (cut-off = 2SD+Mean、測定データの信頼区間 97.5%)。

- Proportion of matched sample : 患者由来 HIV-1 における突然変異パターンに合致するデータベース中の症例が持つ IC50 が cut-off 値以下の症例 (within normal susceptible range : 緑の斜線のグラフ) と、より高い値 (above normal susceptible

range : 赤のグラフ) をもつ症例の割合 (%) を示した。

- Lopinavir: 最近開発された、A component of Kaletra® (Lopinavir) に対する検査結果においては、検査結果の cut-off 値 (2.5) より大きく、臨床的な cut-off 値 (10.0) 未満であるときにはオレンジのグラフで示した。FDA は、Kaletra®・Efavirenz®および核酸系逆転写酵素阻害剤の 24 週併用投与後、ウイルス量 400 コピー以下となった症例の治療前における Antivirogram® Phenotype の測定値は、10 倍未満では 93% (27/29)、10 倍以上では 65% (15/23) と報告している。

- Tenofovir: Tenofovir DF (Viread™) は、世界で最初の NtRTI (Nucleotide Reverse Transcriptase Inhibitor) です。その検査結果では、cut-off 値 (5. 参照) が 3.0 より大きく、臨床的な cut-off 値 4.0 未満である場合は、オレンジ色のグラフで示す。FDA は、他の抗レトロウイルス薬剤と Viread™ を 24 週併用投与した後のウイルス量は、Antivirogram® Phenotype の測定値が 4 倍以下では平均で 0.61 log<sub>10</sub> copies/ml (N=91)、4 倍以上では 0.12 log<sub>10</sub> copies/ml (N=9) 減少したと報告している。

- Fold change in IC50 : 各薬剤に対する患者由来 HIV-1 における突然変異パターンに合致するデータベース中の症例が持つ IC50 の平均値が示される。この値が cut-off 値よりも低い場合は緑の数値で、高い場合は赤の数値で示す

- 報告例より

患者由来の HIV-1 には PI 領域に 7 ヶ所、RT 領域に 7 ヶ所の薬剤耐性に関わる突然変異が認められました。商品名 Retrovir®, Epivir®, Hivid®, Ziagen®, Crixivan®, Norvir®, Viracept®, Agenerase®, A component of Kaletra®で、データベース上にその薬剤の感受性に影響を与える HIV-1 の突然変異が確認されている。この患者由来の HIV-1 のゲノタ