

イブに合致する検体は、データベース中にそれぞれ、47、123、32、30、162、160、120、108、120 検体存在します。それらの検体の Retrovir[®]、Epivir[®]、Hivid[®]、Ziagen[®]、Crixivan[®]、Norvir[®]、Viracept[®]、Agenerase[®]、A component of Kaletra[®]に対する IC50 の平均値はそれぞれ、wild type の 11.3、57.2、2.1、3.7、10.6、40.6、4.2、2.5、11.6 倍と、cut-off 値よりも高値を示した。

4. Antivirogram[®]Phenotype

血漿より HIV-1 の RNA を抽出し、RT-PCR 法にて HIV 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 Tibotec-Virco 社に送付する。Tibotec-Virco 社では、この PCR 産物を元に組換え体 HIV-1 (リコンビナントウイルス) を作製する。そのリコンビナントウイルスをヒトリンパ球細胞株にて培養し、16 種類の薬剤を直接作用させ薬剤耐性の表現型を解析します (Recombinant Virus Assay : RVA)。その解析結果が弊社に返送され、親展にてご報告される。

-Antivirogram[®]Phenotype 報告書の形式説明-

- Drug : 16 種類の HIV-1 治療薬の商品名 (Trade name) と一般名 (generic name) を示した。Susceptibility : 患者由来リコンビナントウイルスの各薬剤に対する IC50 の wild type に対する倍数を log10 表示の棒グラフで示した。IC50 とは、ウイルスの増殖を 50% 阻害するために必要な薬剤濃度で、感受性データ域をうす緑色の棒グラフで示した。患者由来リコンビナントウイルスの IC50 (検査結果) が wild type に対して cut-off 値以下 (Sample within the normal susceptible range) のときは、緑色斜線の棒グラフで、患者由来リコンビナントウイルスの IC50 (検査

結果) が wild type に対して cut-off 値より大きい (Sample above the normal susceptible range) ときは、赤色の棒グラフで表示した。Fold change in IC50 : 患者由来リコンビナントウイルスの IC50 の wild type に対する倍数を示した。cut-off 値以下のときは、緑字、cut-off 値より大きいときは、赤字で示します。括弧内にそれらの各薬剤での cut-off 値を示した。

- Cut-off 値の設定 : 各薬剤の cut-off 値の設定は、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行った。(cut-off = 2SD+Mean、測定データの信頼区間 97.5%)。

- 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、検査結果の cut-off 値 (6. 参照) が 2.5 より大きく、臨床的な cut-off 値 10 未満である場合は、オレンジ色の棒グラフで示される。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) と報される。

- Tenofovir : 世界で最初の NtRTI (Nucleotide Reverse Transcriptase Inhibitor) である Tenofovir DF (Viread[™]) に対する検査結果において、検査結果の cut-off 値 (4. 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、オレンジ色の棒グラフで示される。FDA は、他の抗レトロウイルス薬剤と Viread[™] を 24 週併用投与後のウイルス量は、Antivirogram[®] Phenotype の測定値が 4 倍以下では平均で 0.61 log10 copies/ml (N=91)、4 倍以上では 0.12 log10 copies/ml (N=9) 減少したと報告される。

- 報告例で、患者由来の HIV-1 は、商品名 Viravept[®] (一般名 Nelfinavir)、Invirase[®]

(一般名 Saquinavir)に対し、それぞれ、wild type の IC50 に比べ、5.3 倍、5.4 倍を示し、cut-off 値より高値を示しました。よって患者の HIV-1 は、Viravept®と Invirase®に対して耐性を示し、この2薬剤以外の14薬剤については、感受性を示すことが予想する。

5. 結果解析

VirtualPhenotype™と Antivirogram® Phenotype の Fold Change in IC50 の比較を65例で行った。cut off 値以上のデータ比較では、全体としてほぼ相関が見られたが、症例によっては、大きく乖離する例も見られた。また、両検査の結果が cut off 値以下を示した症例の中で、wild 株に対する Fold change in IC50 が 0.1 付近の hypersensitivity の可能性が示唆される症例が観察された。また、依頼検体のサブタイプは、82%がB、17%がAE、1%がGと、サブタイプBが多かった。

6. 参考文献

- ①Kellam, P., Recombinant virus assay: a rapid phenotypic assay for assessment of drug susceptibility of human immunodeficiency virus type 1 isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1994. 38: p. 23-30.
- ②Japour, A. J., Mayers, T. L., Johnson, V. A., Kuritzkes, D. R., Beckett, L. A., Arduino, J.-M., Lane, J., Black, R. J., Reichelderfer, P. S., D'Aquila, R. T., Crumacker, C. S., The RV-43 Study Group & The ACTG Virology Committee Resistance Working Group. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1993. 37: p. 1095-1101.
- ③Sun E, Kempf D, Harrigan R, et al. Analysis of clinically relevant breakpoints for lopinavir/ritonavir in multiple PI-experienced, NNRTI-naive

patients using virtual phenotype. *Antiviral Therapy* 2001; 6 (Supplement 1): 93.

2001年度 Virco社への検査依頼状況

VirtualPhenotype™

報告数 125 (前年比 +130%)

陽性率 76%

報告日数 3 - 4 週間 (通常 3 週間)

Antivirogram®Phenotype

報告数 179 (前年比 +71%)

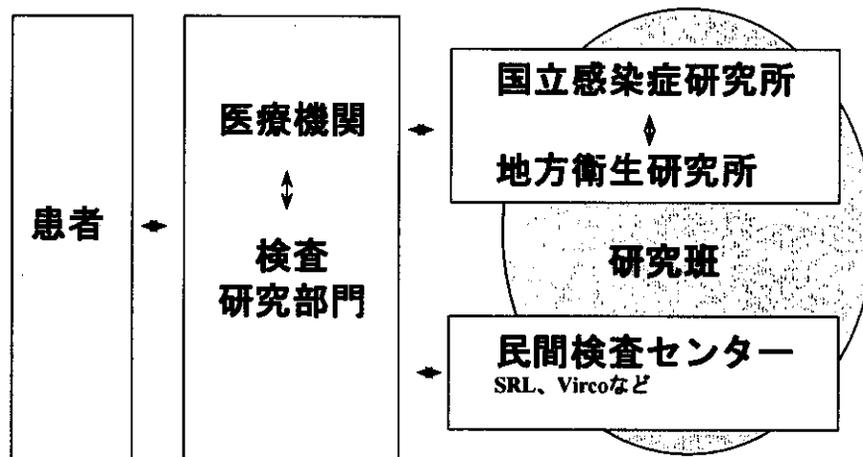
陽性率 72%

報告日数 5 - 7 週間 (通常 5 週間)

2002-3/7-8 Kyoto

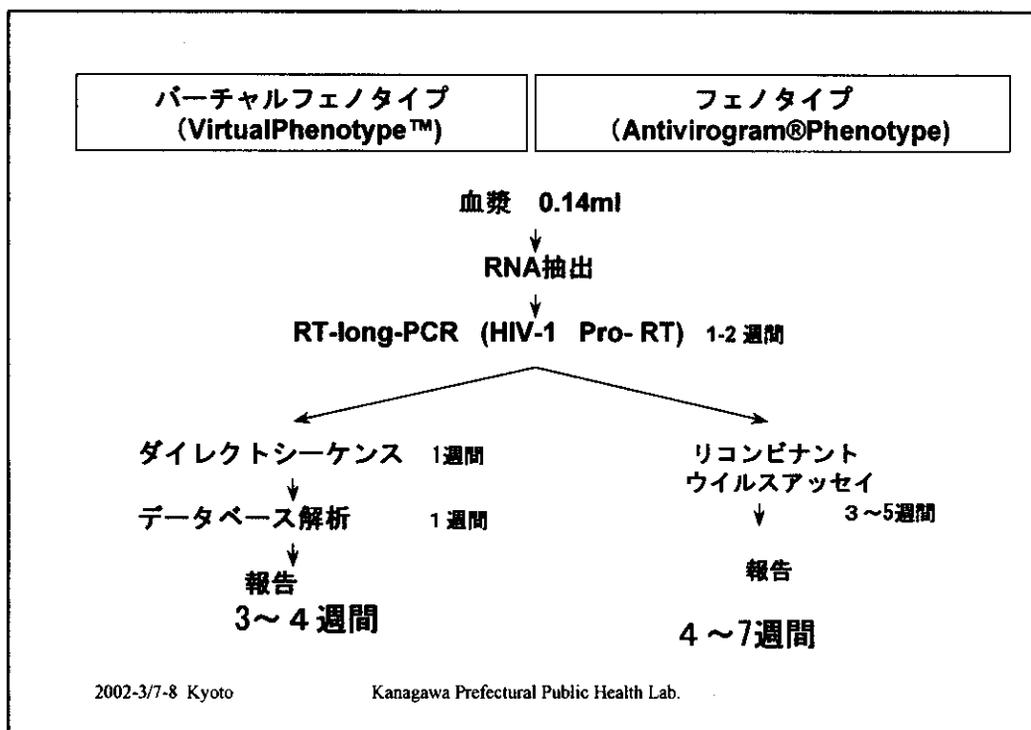
Kanagawa Prefectural Public Health Lab.

薬剤耐性検査の検査体制の充実



2002-3/7-8 Kyoto

Kanagawa Prefectural Public Health Lab.



Tibotec Virco社 薬剤耐性検査対象 16 薬剤

NRTI

Zidovudine
 Lamivudine
 Didanosine
 Zalcitabine
 Stavudine
 Abacavir

NtRTI

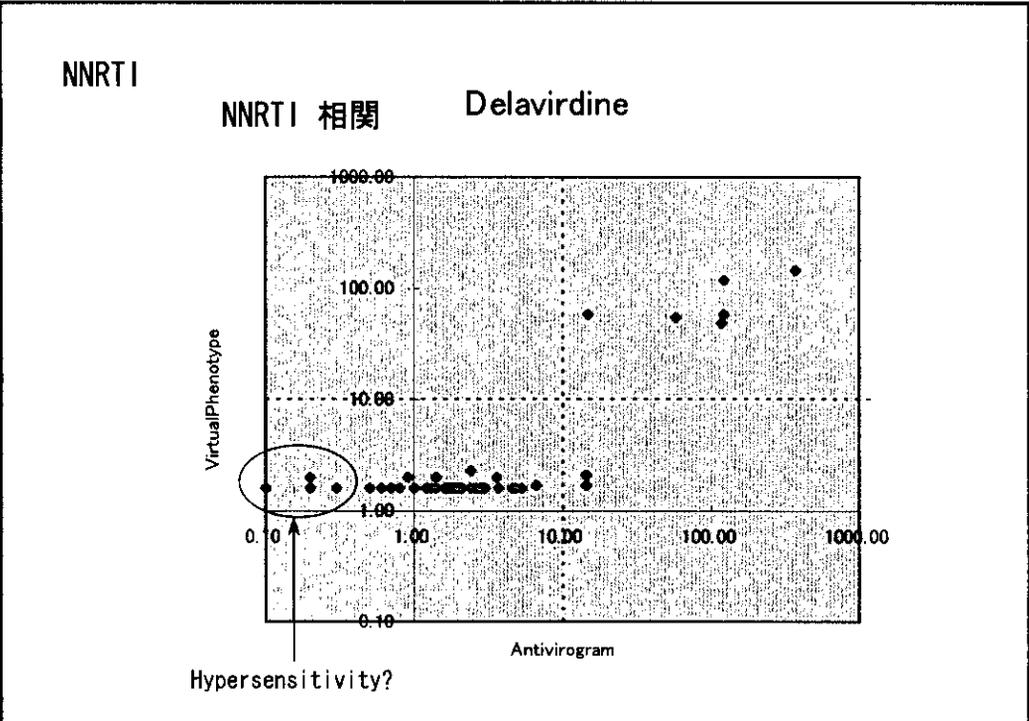
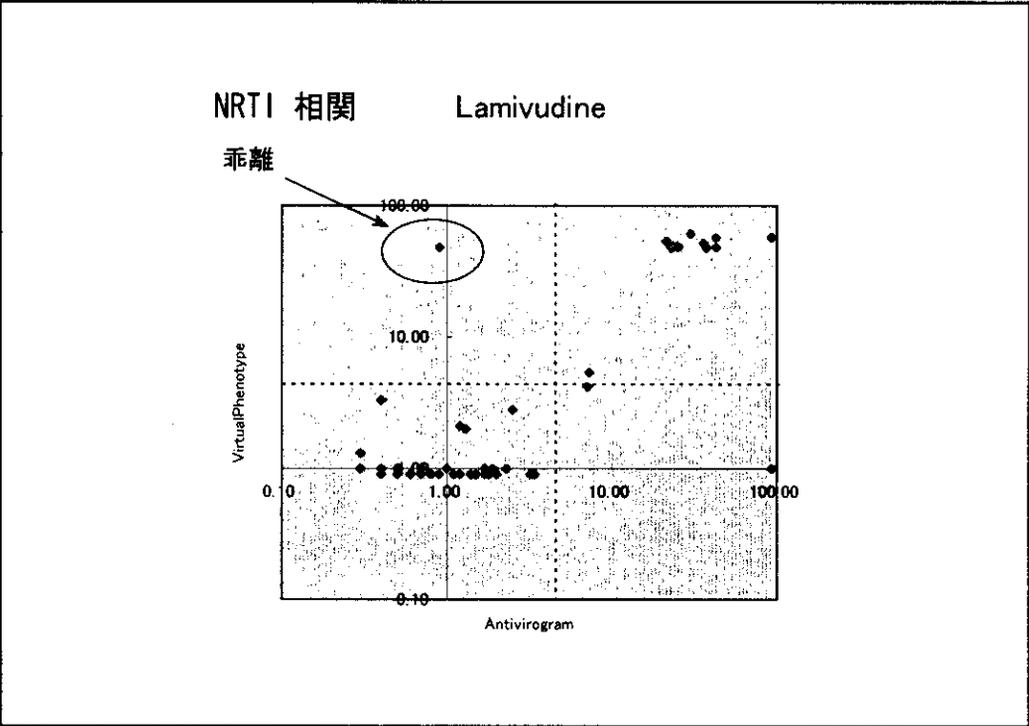
Tenofovir DF

NNRTI

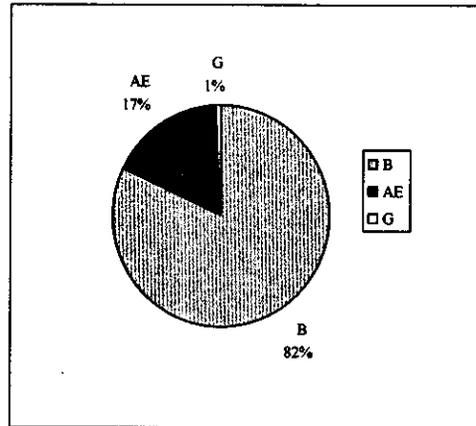
Nevirapine
 Delavirdine
 Efavirenz

PT

Indinavir
 Ritonavir
 Nelfinavir
 Saquinavir
 Amprenavir
Lopinavir



VirtualPhenotype™報告でのサブタイプ頻度



2002-3/7-8 Kyoto

Kanagawa Prefectural Public Health Lab.

11. 薬剤耐性検査法の比較と評価

11-1. 同一分離株を用いた薬剤耐性検査(フェノタイプ)結果の比較

分担研究者：近藤真規子（神奈川県衛生研究所）

協力研究者：須藤弘二、西澤雅子、嶋貴子、今井光信（神奈川県衛生研究所）、
向出雅一（SRL）、蜂谷敦子（国際医療センター）、加藤真吾
（慶応大学医学部）、伊藤章（横浜市大医学部）、宇宿秀三、野口有三
（横浜市衛生研究所）、坂本光男、相楽裕子（横浜市立市民病院）

研究要旨

HIV 分離株 5 株の培養上清を用いて 4 カ所の研究機関（国際医療センター、慶応大、神奈川県衛研、Virco 社）で開発、検討されているフェノタイプ検査を行い、その結果について比較検討した。

HIV-1 標準株 IIIB 株および薬剤耐性の 1 次変異が認められない HIV 分離株 2 株は、いずれのフェノタイプ検査法でも全ての薬剤に対して感受性であった。

薬剤耐性の 1 次変異を有する 2 株 H197-12、H129-54 のフェノタイプ検査の結果はどの施設でもほぼ一致していた。しかし、H197-12 で AZT に対する結果については各施設で違いが見られ、神奈川県衛研、Virco 社では耐性、国際医療センターでは中間域、慶応大では感受性となった。この株の RT 領域には M41L、M184V、T215Y の変異が認められ、Virco 社のジェノタイプ検査（バーチャルフェノタイプ）の結果では AZT 耐性と判定された。これら変異と M184V、T215Y の変異と AZT 耐性との関連については今後も検討が必要であると考えられた。

また、Pro 領域に L90M（SQV 耐性 1 次変異）を有している 2 株において、フェノタイプ検査では SQV 感受性であったこと、RT 領域に NVP 耐性の 1 次変異がないにもかかわらずフェノタイプ検査では NVP 耐性とであったこと等、ジェノタイプとフェノタイプの検査結果についてもさらに比較のデータが必要と考えられた。

A. 研究目的

HIV の薬剤感受性を直接的に測定するフェノタイプ検査が各研究機関で開発、検討されている。今回我々は、同一の HIV 分離株を用いて、4 カ所の研究機関（国際医療センター、慶応大、神奈川県衛研、Virco 社）で開発、検討されているフェノタイプ検査を行い、その結果について比較検討した。また、これらフ

フェノタイプとジェノタイプ検査の結果についても比較した。

B. 研究方法

HIV-1 の標準株である IIIB 株、薬剤耐性の 1 次変異の認められなかった Y105、GM68-42 の 2 株（感受性株）、1 次変異の認められた H197-12、H129-54 の 2 株（耐性株）の計 5 株

の培養上清を試料とし、4カ所の研究機関(国際医療センター、慶応大学、神奈川衛研、Virco社)でフェノタイプ検査を行った。

各研究機関のフェノタイプ検査に使用している細胞および判定基準について表1に示した。国際医療センターではMAGIC-5細胞、慶応大学では末梢血単核球(PBMC)、神奈川衛研ではPBMC/MAGIC-5細胞を用い、HIV-1標準株およびHIV分離株について各薬剤に対する IC_{50} (ウイルス増殖を50%抑制する薬剤濃度)を求めた。これら3施設ではHIV-1標準株として、NL432、LAI、IIIBを使用しており、結果はHIV-1標準株の IC_{50} に対するHIV分離株の IC_{50} の比で表した。判定は、比が4倍未満を感受性(Sensitive:S)、4倍以上10倍以下を中間域(Intermediate:I)、10倍以上を耐性(Resistance:R)とした。

薬剤は国際医療センターと慶応大ではAZT、ddI、ddC、d4T、3TC、NVP、IDV、NFV、SQV、RTVの10剤を、神奈川衛研でAZT、ddI、ddC、d4T、3TC、IDV、NFV、SQV、RTVの9剤を用いた。

Virco社では、試料中のHIV-RNAから増幅したHIVのプロテアーゼ(Pro)領域から逆転写酵素領域(RT)の400アミノ酸までをベクターに組み込んで作製したリコンビナントウイルスとMT4細胞を使用した培養系でフェノタイプ検査を行っており、14種類(AZT、ddI、ddC、d4T、3TC、ABC、NVP、EFV、DLV、IDV、NFV、SQV、RTV、APV)の薬剤について検討した。結果は未治療症例1000例と耐性変異の認められないHIV株数千例の IC_{50} から各薬剤に対するcut-offを算出し、cut-off以下を感受性(S)、cut-off以上を耐性(R)と判定する。

また、上記フェノタイプ検査を行った5株についてVirco社で行っているジェノタイプ検査(バーチャルフェノタイプ:Virco-VP)を行い、フェノタイプ検査の結果と比較した。Virco-VPではPro領域からRT領域の塩基配

列を決定し、約10万症例のジェノタイプとフェノタイプの結果から作成したデータベースを用いて各薬剤に対する感受性(耐性)について解析している。

(倫理面への配慮)

HIVウイルスの分離および薬剤耐性検査は患者の同意のうえで行った。また、本研究の全体を通してプライバシーの流出防止など患者の人権保護に十分配慮した。

C. 結果および考察

HIV-1標準株IIIB株および分離株2株(Y105、GM68-42)についてのフェノタイプ検査の結果は、3施設とも全ての薬剤に感受性であった。また、これら3株の内Y105のPro領域にM36I、GM68-42のPro領域にK20I、M36Iのアミノ酸変異が認められたが、Virco-VPでも全ての薬剤について感受性と判定された(表2)。

薬剤耐性の1次変異を有する株H197-12、H129-54のフェノタイプ検査の結果はどの施設でもほぼ一致していた。しかし、H197-12でAZT(ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤)に対する結果については各施設間で違いが見られ、神奈川衛研、Virco社では耐性、国際医療センターでは中間域、慶応大では感受性となった(表3)。この株のRT領域にはM41L、M184V、T215Yの変異が認められた、Virco-VPの結果はAZTに耐性と判定された(表4)。

T215Yの変異はAZT耐性の1次変異であり、この変異にM41Lが加わるとAZT耐性がさらに強くなるが、T215Yの変異にM184Vの変異が加わるとAZTに対する感受性が回復するという報告がある。これらの変異とAZT耐性との関連については今後も検討が必要である。

また、H197-12とH129-54のSQV(プロテアーゼ阻害剤)に対するフェノタイプの検査結果は、いずれの施設においても感受性、あるいは中間域であったが、これら2株のPro領域にはSQVの1次変異L90Mが認められ、

Virco-VPではSQV耐性と判定された(表4,5)。L90Mの変異とSQV耐性の関連についても検討が必要と考えられた。

H129-54ではNVP(非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤)に対してVirco社のフェノタイプ検査の結果は耐性であったが、RT領域にNVP耐性の1次変異は認められず、Virco-VPの結果はNVP感受性であった(表5)。

D. 結語

以上の結果から、1次変異の認められない株ではどのフェノタイプ検査法でもほぼ同様の結果が得られたが、RT領域にM184VとT215Yの変異のある株ではAZTに対する検査結果が方法によって異なる場合があることがわかった。

また、Pro領域にL90M(SQV耐性1次変異)を有している2株において、フェノタイプ検査ではSQV感受性であったこと、RT領域にNVP耐性の1次変異がないにもかかわらずフェノタイプ検査ではNVP耐性であったこと等から、ジェノタイプとフェノタイプの検査結果についてさらに比較のデータが必要と考えられる。今後も同じサンプルについて異なる方法で薬剤耐性検査を行い、結果の解析を行うことが重要である。

E. 研究発表

論文発表

1. Suzuki K., Mukaide M., Kondo M., Imai M., Cooper D.: Amino acid insertion in p6gag of the human immunodeficiency virus type 1 alter incorporation of VPR into virions. J. Virology (in press).
2. 嶋貴子、近藤真規子、斎藤隆行、川田かおる、伊藤章、坂本光男、相楽裕子、今井光信: マイクロプレート法によるHIV-1抗体、HIV-2抗体およびHIVp24抗原検出キット(HIV抗原抗体同時検出

キット)の検討、感染症学雑誌、75: 1014-1024、(2001)。

学会発表

1. 近藤真規子、嶋貴子、斎藤隆行、今井光信: HIV-1感染患者におけるnef/LTR遺伝子の欠損について、第49回日本ウイルス学会、大阪、2001年11月18-19日。
2. 宇宿秀三、野口有三、坂本光男、相楽裕子、須藤弘二、西澤雅子、近藤真規子、今井光信: 薬剤耐性変異株の不一致例について: HIV-RNA(血漿中)とプロウイルスDNA(PBMC中)との長期不一致例について、第49回日本ウイルス学会、大阪、2001年11月18-19日。
3. 須藤弘二、西澤雅子、向出雅一、宇宿秀三、嶋貴子、近藤真規子、斎藤隆行、伊藤章、相楽裕子、今井光信: データベースを用いた薬剤耐性ジェノタイプ検査と薬剤耐性フェノタイプ検査との比較検討、第15回日本エイズ学会、東京、2001年11月29日-12月1日。
4. 西澤雅子、須藤弘二、近藤真規子、斎藤隆行、森下高行、川田かおる、伊藤章、坂本光男、相楽裕子、蜂谷敦子、岡慎一、巽正志、今井光信: HIV-1感染患者からのウイルス分離-ウイルス分離法およびウイルス分離株の比較検討-、第15回日本エイズ学会、東京、2001年11月29日-12月1日。
5. 近藤真規子、嶋貴子、斎藤隆行、加藤雄二、岩室紳也、岡部武史、今井光信: HIV感染後長期間HIV抗体価が低レベルで推移した感染者におけるHIV遺伝子の解析、第15回日本エイズ学会、東京、2001年11月29日-12月1日。
6. 向出雅一、西澤雅子、近藤真規子、須

藤弘二、嶋貴子、斎藤隆行、斉藤由美子、植田昌宏、伊藤章、相楽裕子、鈴木一雄、今井光信：HIV-1DNA および 2-Long Terminal Repeat (2-LTR) DNA の同時定量法の開発、第 15 回日本エイズ学会、東京、2001 年 11 月 29 日～12 月 1 日。

7. 嶋貴子、近藤真規子、斎藤隆行、西大條文一、井戸田一朗、今井光信：抗原抗体同時検出キットの検討および HIV 抗体スクリーニング検査弱陽性例への応用、第 15 回日本エイズ学会、東京、2001 年 11 月 29 日～12 月 1 日。

表1 フェノタイプ検査法の比較

	国際医療センター	慶応大学	神奈川衛研	Virco-P
方法	MAGIC-5法	PBMC法	PBMC/MAGIC-5法	リコンビナント法
判定	NL432株のIC ₅₀ に対する倍数:fold	LAI株のIC ₅₀ に対する倍数:fold	IIIB株のIC ₅₀ に対する倍数:fold	未治療症例千例と数千例のIC ₅₀ からCut-off算出
	S:Sensitive Intermediate: 4≤fold≤10 R:Resistance >10 fold	<4 fold		S:<Cut-off R:>Cut-off

Virco社フェノタイプ (P) とバーチャルフェノタイプ (VP) の判定基準 (cut-off) 値

薬剤	AZT	ddI	ddC	d4T	3TC	ABC	NVP	EFV	DLV	IDV	NFV	SQV	RTV	APV
Virco (VP)	4.0	2.0	2.0	1.8	4.5	3.0	8.0	6.0	10.0	3.0	4.0	2.5	3.5	2.0
Virco (P)	4.0	3.5	3.5	3.0	4.5	3.0	8.0	6.0	10.0	3.0	4.0	2.5	3.5	2.5

表2 各種薬剤耐性検査(フェノタイプ検査)結果の比較 (感受性株)

分離株 培養上清	耐性検査 検計機関	薬剤感受性検査結果													
		AZT	ddI	ddC	d4T	3TC	ABC	NVP	EFV	DLV	IDV	NFV	SQV	RTV	APV
IIIB	神奈川衛研	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	-	-	-	ND	
	国際医療センター	0.7	1.3	0.8	0.9	0.6	ND	0.7	ND	ND	0.9	1.1	0.7	2.0	ND
	Virco (P)	0.7	0.3	0.3	0.5	0.3	0.2	2	0.6	3.3	0.7	0.7	1.0	1.2	0.4
Y105 治療前 11000 ₂₁₇ -/al	神奈川衛研	1.6	1.2	1.1	3.2	0.6	ND	ND	ND	ND	0.3	4.0	1.0	0.9	ND
	国際医療センター	0.8	0.9	0.9	2.5	0.6	ND	0.7	ND	ND	0.5	2.0	0.9	1.2	ND
	Virco (P)	0.7	0.9	1.5	0.7	0.5	0.9	1.3	1.8	5.7	0.6	0.4	0.3	0.7	0.3
GM68-42 AZT, ddC, NFV 2307 ₁₇ -/al	神奈川衛研	1.5	0.6	0.5	1.2	2.4	ND	ND	ND	ND	1.0	2.3	1.2	1.0	ND
	国際医療センター	0.3	0.8	1.2	1.0	0.2	ND	0.6	ND	ND	0.2	0.8	0.9	2.6	ND
	Virco (P)	1.3	0.8	1.6	0.9	0.3	0.3	0.7	0.7	2.9	1.2	0.3	0.6	0.6	0.2

検体名	RT領域の変異	Pro領域の変異
IIIB	無し	無し
Y105	無し	M36I
GM68-42	無し	K20I, M36I

表3 各種薬剤耐性検査 (フェノタイプ検査) 結果の比較 (薬剤耐性梯)

分離株 培養上清	耐性検査 検討機関	NRTI					NNRTI				PI				
		AZT	ddI	ddC	d4T	3TC	ABC	NVP	RPV	DLV	IDV	NFV	SQV	RTV	APV
H197-12 AZT, 3TC, IDV, ddI 3600コピ-/ml	神奈川衛研	11	2.8	2.6	0.6	>860	ND	ND	ND	ND	48	48	3.2	>300	ND
	国際医療センタ-	4.8	1.8	1.6	2.4	>100	ND	0.4	ND	ND	15.5	21.0	3.4	148	ND
	慶応大学	1.5	0.4	0.3	2.1	>400	ND	3.7	ND	ND	85	210	7.5	>700	ND
	Virco(P)	21	2.2	1.6	1.6	30	2.6	3.6	0.7	1.0	7.9	6.9	0.9	107	4.0
H129-54 d4T, 3TC, NFV, AZT, ddC, NVP, IDV, SQV 14000コピ-/ml	神奈川衛研	16.9	0.9	1.4	7.5	240	ND	ND	ND	ND	16	160	5.9	12	ND
	国際医療センタ-	17	2.9	1.3	4.5	>100	ND	7.9	ND	ND	*	*	*	*	ND
	Virco(P)	4.3	1.2	3.4	0.8	30	2.6	3.9	2.3	8.1	6.3	*	1.6	13.9	2.0

検体名	RT領域の変異	Pro領域の変異
H197-12	M41L, M184V, T215Y	V32I, M46I, I47V, L63P, A71V, V77I, V82A, L90M
H129-54	M41L, E44D, D67N, T69AD, A98G, M184V, T215F	L10V, K20T, M36IV, M46IM, L63P, T74S, N88NS, L90M, I93L

表4 H197-12における各種薬剤耐性試験のAZT, SQV結果の比較

分離株 (培養上清)	耐性検査 検討機関	方法 (特徴)	薬 剤	
			AZT	SQV
H197-12 AZT, 3TC, IDV, ddI 3600コピ-/ml	神奈川衛研	PBMC/ MAGIC-5	11	3.2
	国際医療センタ-	MAGIC-5	4.8	3.4
	慶応大学	PBMC	1.5	7.5
	Virco(P)	リコンビナント	21.3	0.9
	Virco(VP)	フェノタイプ	4.8	5.4

RT領域の変異	PR領域の変異
M41L, M184V, T215Y AZT: T215Y, M184V	V32I, M46I, I47V, L63P, A71V, V77I, V82A, L90M SQV: L90M

表5 H129-54における各種薬剤耐性試験のNVP、SQV結果の比較

分離株 (培養上清)	耐性検査 検討機関	方法 (特徴)	薬 剤	
			NVP	SQV
H129-54 d4T, 3TC, NPV, AZT ddC, NVP, IDV, SQV 14000コピ-/ml	神奈川衛研	PBMC/ MAGIC-5	ND	5.9
	国際医療センター	MAGIC-5	7.9	*
	Virco(P)	リコンビナント	38.8	1.6
	Virco(VP)	シエノタイプ	3.6	4.0

*倍数を決定できなかった

RT領域の変異	Pro領域の変異
M41L, E44D, D67N, T69AD, A98G, M184V, T215F NVP: 無し	L10V, K20T, M36IV, M46IM, L63P, T74S, N88NS, L90M, I93L SQV: L90M

11-2. ホームページで公開されているデータベース(スタンフォード大)を用いた薬剤耐性度の解析

須藤 弘二 (神奈川県衛生研究所)
西澤 雅子 (神奈川県衛生研究所、
(財)エイズ予防財団リサーチレジデント)
近藤 真規子 (神奈川県衛生研究所)
宇宿 秀三 (横浜市衛生研究所)
今井 光信 (神奈川県衛生研究所)

研究概要

変異と薬剤耐性との関連に関する膨大なデータを用い、コンピューターによるデータ処理を行うことにより、HIVの塩基配列からそのHIVの各薬剤に対する耐性の度合いを推定するシステムがスタンフォード大学メディカルセンターで開発され、インターネット上に公開されている。このシステムは、ホームページを通して誰でも無料で利用できるシステムであり、ジェノタイプの薬剤耐性検査への活用が期待される。今回その有用性を検討するため、Virco社で行っているバーチャルフェノタイプやフェノタイプとの比較検討を行った。フェノタイプを調べた12例の臨床分離株について、pol領域の塩基配列を決定し、スタンフォード大の耐性度解析を行う一方で、Virco社のバーチャルフェノタイプを行い、3者の結果について比較検討した。薬剤耐性関連の変異のほとんどない4例では3者の結果は全ての薬剤に対して感受性で一致し、耐性変異を有する8例では、高度の耐性に関しては概ね一致していたが、中程度以下の耐性に関しては、結果に違いがみられた。今後さらに多くの検体で、比較検討することにより各検査法の特長や利用上の注意点等を明らかにしてゆきたい。

A. 研究目的

HIVのジェノタイプから薬剤に対する耐性度を推定する方法として、スタンフォード大学メディカルセンターで開発されたシステムがある(以下スタンフォードシステム)。スタンフォードシステムとは、変異と薬剤耐性との関連性に関するデータベースをもとに、HIVの塩基配列から、薬剤に対する耐性の度合いを算出するシステムである。このシステムはインターネット上で利用しやすいホームページの形で公開され、誰でも無料で簡単に利用することが出来ることから、薬剤耐性を調

べる方法の一つとして活用が期待される。

本研究において我々は、Virco社のフェノタイプ検査での薬剤耐性度と、同じくVirco社のバーチャルフェノタイプ検査での薬剤耐性度、スタンフォードシステムでの薬剤耐性度との三者の結果を比較検討し、スタンフォードシステムの有用性について検討を行った。

B. 研究方法

スタンフォードシステムの比較検討には、神奈川県衛生研究所で分離された臨床分離株12例を用いた。これらの臨床分離株について、

フェノタイプの検査 (Virco社) を行い、その結果を、薬剤に対する耐性度の基準とした。なお、Virco社の検査で結果を得られなかった例については、神奈川県衛生研究所でフェノタイプ検査を実施し、この結果を比較検討の基準とした。

この臨床分離株12例についてバーチャルフェノタイプ検査を行った。バーチャルフェノタイプ検査では、約100,000症例の塩基配列データ (RT領域とプロテアーゼ領域) と、個々の症例の薬剤耐性フェノタイプを基に構築されたデータベースを用い、検体の塩基配列をデータベースと照合し、薬剤耐性の度合いについて推測を行う。

また、スタンフォードシステムを利用して解析を行うために、この臨床分離株12例のRT領域とプロテアーゼ領域について塩基配列を決定した。材料として、培養上清からRNAを抽出し、RT-PCRでpolの一部を増幅し、この増幅産物を用いた。こうして得られたシーケンスをもとに、これらの臨床分離株12例について、スタンフォードシステムを用いて薬剤耐性を調べた。

スタンフォードシステムの利用方法の概略を図1に示した。図に示すように、スタンフォードシステムのホームページにアクセスし、指示の通りに各臨床分離株のシーケンスデータを入力、薬剤耐性の解析を行った。

スタンフォードシステムでは、抗HIV薬に対する耐性度を検体の耐性変異から解析する。薬剤耐性変異に応じて、各薬剤に対し、耐性度を算出するための点数が加算されていくシステムになっている。つまり変異数が多くなればそれだけ点数が高くなり、その薬剤に対してHIVが高い耐性を持つことを意味する。最終的に表示される耐性度は、Susceptible (0-9点), Potential low-level resistance (10-14点), Low-level resistance (15-29点), Intermediate resistance (30-59点), High-level resistance (60点以上) の5段階で示さ

れる (図2, 3, 4)。

上記の方法で、Virco社のフェノタイプ (一部神奈川県衛生研究所のフェノタイプ) ・Virco社のバーチャルフェノタイプ及びスタンフォードシステムの結果を比較検討した。

C. 研究結果

①. フェノタイプと薬剤耐性変異

フェノタイプ検査の結果、12検体中4例 (GM48-42, Y34-000626, Y105, Y115-010402) は全ての薬剤に対して感受性であり、8例 (H093-53, H127-6, H129-54, H172-45, H197-12, H199-5, H220-56, Y48-16) はRT阻害剤に対して耐性を示した。RT阻害剤に対して耐性を示した8例の内、プロテアーゼ阻害剤に対する感受性例が3例 (H093-53, H172-45, H220-56)、耐性を示した例が5例 (H127-6, H129-54, H197-12, H199-5, Y48-16) あった。

全ての薬剤に対して感受性を示した4例の塩基配列を決定した結果、RT領域とプロテアーゼ領域に主要な薬剤耐性変異は見られなかった。RT阻害剤に耐性を示した8例の塩基配列を決定した結果、8例全てのRT領域に何らかの主要な薬剤耐性変異が見られた。8例の内、184番目のアミノ酸に変異を持つ検体が2例 (H093-53, H199-5)、215番目に変異を持つ検体が2例 (H172-45, Y48-16)、184と215番目の両方に変異を持つ例が4例 (H127-6, H129-54, H197-12, H220-56) あった。プロテアーゼ阻害剤に対して耐性を示した5例の塩基配列を決定した結果、5例全てプロテアーゼ領域に主要な耐性変異が見られ、90番目のアミノ酸を含む変異を持つ検体が4例 (H129-54, H197-12, H199-5, Y48-16)、30番のアミノ酸に変異を持つ検体が1例 (H127-6) あった。

②. バーチャルフェノタイプによる耐性度の推測

フェノタイプで感受性株となった4例につ

いてバーチャルフェノタイプを行った結果、4例とも全ての薬剤に対して感受性と推測され、フェノタイプの結果と一致した。

薬剤耐性を示した8例についてバーチャルフェノタイプを行った結果、RT領域の184番のアミノ酸に変異が見られる例は2例とも3TCに対して耐性と推測された。また215番のアミノ酸に変異が見られる例は2例ともAZTに対して耐性と推測された。184と215番目の両方に変異が見られる4例では3例がAZTと3TCに耐性、1例が3TCに耐性と推定された。プロテアーゼ領域の90番目のアミノ酸を含む変異を持つ4例ではその内3例(H197-12, H199-5, Y48-16)が全てのプロテアーゼ阻害剤に耐性、1例(H129-54)がAPVを除くプロテアーゼ阻害剤に耐性と推測された。

③. スタンフォードシステムによる耐性度の算出

フェノタイプで感受性株となった4例について、RT阻害剤とプロテアーゼ阻害剤に対する耐性度をスタンフォードシステムで解析した。その結果、3例(GM48-42, Y34-000626, Y105)は全ての薬剤に対してSusceptibleと算出され、フェノタイプの結果と一致した。1例(Y115-010402)のみAZTに対する耐性度がLow-level resistanceと算出されたが、他の薬剤は全てSusceptibleと算出され、フェノタイプの結果とほぼ一致した。

薬剤耐性を示した8例について、RT阻害剤に対する耐性度をスタンフォードシステムで解析した。

184番目のアミノ酸に変異が見られる2例では、2例とも3TCに対する耐性度がHigh-level resistance、ABCに対する耐性度がIntermediate resistance、ddIとddCに対する耐性度がLow-level resistanceと算出された。算出された耐性度とフェノタイプを比較した結果、3TCに対する耐性度は完全に一致しており、他のRT阻害剤でもほぼ一致して

いた。

215番のアミノ酸に変異が見られる2例では、AZTに対する耐性度が1例(Y48-16)でHigh-level resistance、もう1例(H172-45)ではIntermediate resistanceと算出された。d4Tに対する耐性度は2例ともIntermediate resistanceで、ddIとddCに対する耐性度は1例でLow-level resistance、もう1例ではPotential low-level resistanceと算出された。算出された耐性度とフェノタイプを比較した結果、AZTに対する耐性度は完全に一致しており、他のRT阻害剤でもほぼ一致していた。

184と215番目の両方に変異が見られる4例では、4例とも3TCに対する耐性度がHigh-level resistanceと算出された。AZTとddCに対する耐性度は1例(H129-54)でHigh-level resistance、3例(H127-6, H197-12, H220-56)でIntermediate resistanceと算出された。ddI、d4T、ABCに対する耐性度は全てIntermediate resistanceと算出された。算出された耐性度とフェノタイプを比較した結果、AZTと3TCに対する耐性度はほぼ一致していた。しかしddI、ddC、d4T、ABCに対する耐性度では、フェノタイプの結果が感受性であったのに対し、スタンフォードシステムでは中程度以上の耐性と算出された。

また、この8例について、プロテアーゼ阻害剤に対する耐性度をスタンフォードシステムで解析した。

フェノタイプでプロテアーゼ阻害剤に対し感受性だった3例(H093-53, H172-45, H220-56)は、全てのプロテアーゼ阻害剤でSusceptibleと算出され、フェノタイプの結果と一致した。

フェノタイプでプロテアーゼ阻害剤に対し耐性だった5例の内、90番目のアミノ酸を含む変異を持つ4例では、全てのプロテアーゼ阻害剤に対する耐性度がHigh-level resistance、あるいはIntermediate resistance

と算出され、30番目のアミノ酸に変異を持つ1例(H127-6)ではNFVに対する耐性度がHigh-level resistanceと算出された。このようにプロテアーゼ阻害剤に耐性のある例については、IDV, NFV, RTVはフェノタイプと完全に一致し、SQV, APVもほぼ一致していた。

D. 考察および結語

塩基配列に薬剤耐性関連の変異がほとんど無かった4例について、フェノタイプ・バーチャルフェノタイプ及びスタンフォードシステムの結果は、1例(Y115-010402)のAZTに対する耐性度の結果を除き、すべての薬剤に対して感受性となり一致した。

一方、何らかの耐性変異を有する8例では、高度の耐性については概ね一致していたが、中程度以下の耐性については、3者の結果に違いが見られた。特にRT領域の184と215番目のアミノ酸に変異を持つ検体(H127-6, H129-54, H197-12, H220-56)で、ddI, ddC, d4Tに対する薬剤耐性を調べた結果、フェノタイプでは感受性であったのに対し、スタンフォードシステムでは中程度の耐性と算出される例があった。

今回の結果から、スタンフォードシステムは、感受性株の解析や、1つの薬剤耐性変異を持つ株の解析では、フェノタイプ検査とほぼ同様の結果を得られることが分かった。しかし複数の薬剤耐性変異を持つ株では、フェノタイプに比べ薬剤に対する耐性が高めに算出される例があった。今回の結果をふまえ、今後さらに多くの検体で比較検討を行い、各検査法の特長や利用上の注意点を明らかにしていきたい。

E. 研究発表

学会発表

1. データベースを用いた薬剤耐性ジェノタイプ検査と薬剤耐性フェノタイプ検査との比較検討。

須藤 弘二、西澤 雅子、向出 雅一、
宇宿 秀三、嶋 貴子、近藤 真規子、
斎藤 隆行、伊藤 章、相楽 裕子、
今井 光信。

第15回日本エイズ学会(東京)

◇解析したい塩基配列の入力方法

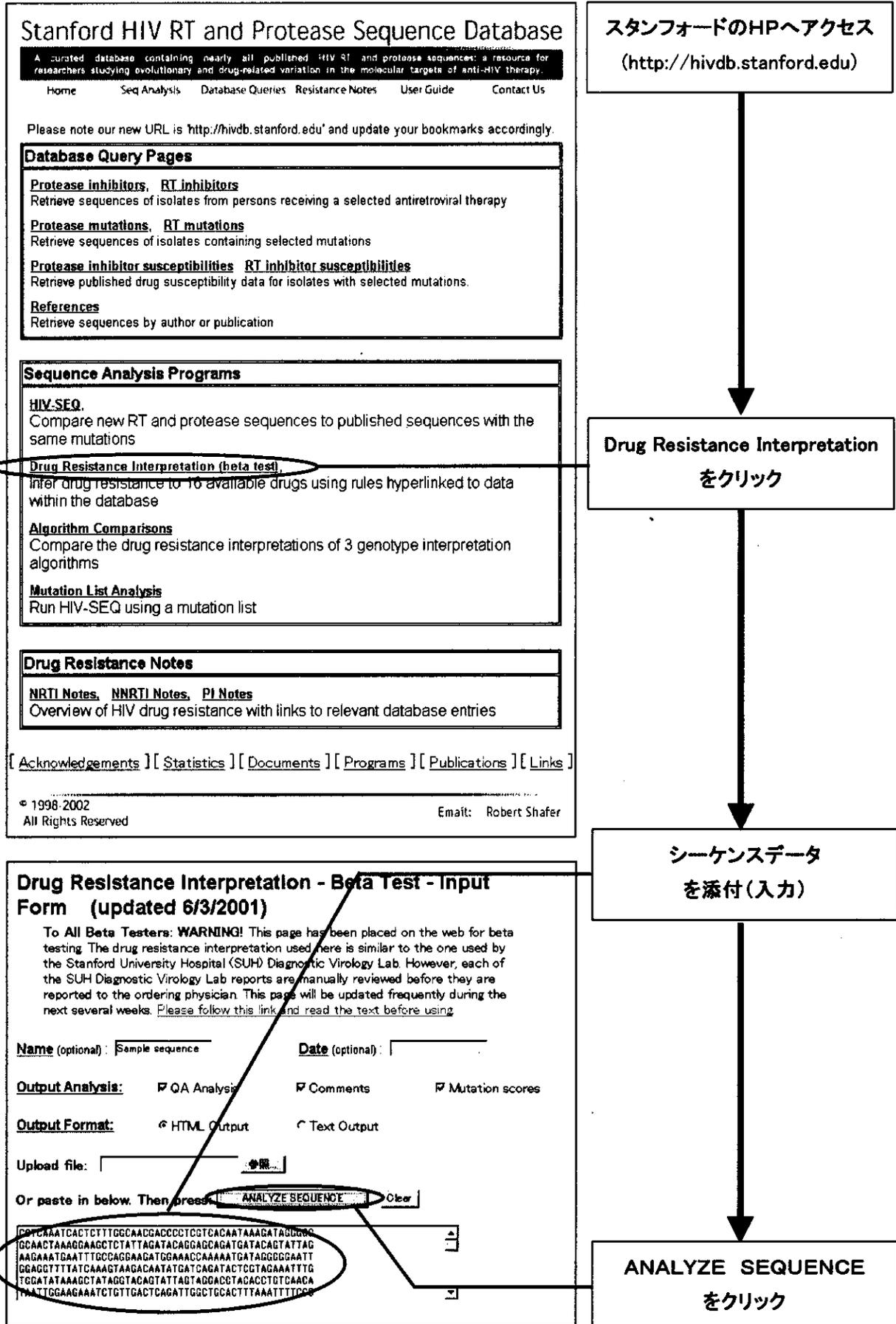


図1. スタンフォードシステムのホームページでの操作手順

◇塩基配列解析結果表示

Drug Resistance Interpretation - Beta Test - Output
 Go back to [main page](#)

SeqID: SampleSequence Date: 3-27-2002

Summary Data
 Sequence includes PR: codons: 1 - 99
 Sequence includes RT: codons: 1 - 400
 There are no insertions or deletions
 Subtype and % similarity to closest reference isolate: PR: B (99.66%) RT: B (99.41%)

Sequence Quality Assessment

Gene	QA Problem	Codons
PR	Stop Codons, Frame Shifts:	None
PR	B,D,H,V,N:	None
PR	Unusual Residues:	None

Drug Resistance Interpretation

PR Resistance Mutations: None
 PR Other Mutations: N37S

Protease Inhibitors

APV Susceptible
 IDV Susceptible
 NFV Susceptible
 RTV Susceptible
 SQV Susceptible
 LPV Susceptible

PR Comments: None

Drug Resistance Interpretation

RT Resistance Mutations: M41L, K70R, T215Y
 RT Other Mutations: R83K, K122E, F214L, A272P, K277R, A376T, A400T

Nucleoside RTI		Non-Nucleoside RTI	
AZT	High-level resistance	EFV	Susceptible
DDI	Low-level resistance	DLV	Susceptible
DDC	Low-level resistance	NVP	Susceptible
D4T	Intermediate resistance		
ABC	Intermediate resistance		
3TC	Susceptible		
TDF	Low-level resistance		

RT Comments

- M41L usually occurs with T215Y. Together these mutations confer intermediate-to-high level resistance to AZT and D4T and low-level resistance to DDI, ABC, and TDF.
- K70R causes low-level AZT resistance.
- T215Y/F cause AZT resistance and also limit the effectiveness of D4T, ABC, DDI, DDC, and possibly TDF. T215S/C/D represent transitions between the wildtype T and the mutations Y and F.
- The classical AZT-resistance mutations (aka Nucleotide Excision associated Mutations (NEMs)) at codons 41, 67, 70, 210, 215, and 219 are associated with resistance to each of the NRTIs with the exception of 3TC. For more detailed information please read the [NEMs section](#) in the drug resistance notes.

Mutation Scoring

	APV	IDV	NFV	RTV	SQV	LPV	AZT	DDI	DDC	D4T	ABC	3TC	TDF	EFV	DLV	NVP
Total							M41L	15	5	5	12	10	0	5		
							K70R	20	0	0	0	0	0	5		
							T215Y	35	10	10	25	20	0	10		
Total								70	15	15	37	30	0	20	0	0

Go back to [main page](#)

検体の名前と日付

添付したシーケンスが含む
RTとProtease領域

シーケンス解析に
問題がある要因のチェック
(ストップコドンの存在等)

プロテアーゼ領域の変異

プロテアーゼ阻害剤への
耐性度

RT領域の変異

RT阻害剤への耐性度

RT領域の変異と
RT阻害剤への耐性に
関するコメント

各薬剤に対する
耐性度の算出表

図2. 塩基配列解析結果の説明