

この感染細胞 8×10^4 個を RPMI1640 培地 160 μ l に懸濁し、96 穴プレートの各穴に加えた。各穴の RPMI1640 培地には、AZT、ddI、3TC、d4T、ABC、NVP、EFV については 100 μ M から 0.1 nM まで、IDV、SQV、NFV、APV、LPV については 10 μ M から 0.01 nM まで 10 倍段階希釈した薬剤を添加した。そして 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_{50} を決定した。

ジェノタイプ検査：患者の血漿と分離ウイルス株から RNA を精製し、RT-PCR によって逆転写酵素遺伝子とプロテアーゼ遺伝子を増幅し、dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems 社) を用いて自動 DNA シークエンサー (ABI PRISM 377 DNA Sequencer, Applied Biosystems 社) で塩基配列を決定しアミノ酸配列に変換した。薬剤耐性関連変異の解釈はスタンフォード大学で開発されたアルゴリズム HIVDB (<http://hivdb.stanford.edu/>) を利用した。

結果

対象とした HIV-1 感染者の血液検体採取時の CD4 細胞数、血漿 HIV-1 RNA レベル、投与薬剤を表 1 に示す。未治療患者群の CD4 細胞数の中央値は 303 cells/ μ l (範囲は 6 から 581)、既治療患者群の CD4 細胞数の中央値は 247.5 cells/ μ l (範囲は 2 から 1071) であった。未治療患者群の血漿 HIV-1 RNA レベルの中央値は 21000 copies/ml (範囲は 1200 から 260000)、既治療患者群の血漿 HIV-1 RNA レベルの中央値は 1150 copies/ml (範囲は 200 から 70000) であった。既治療患者群は 2 から 6 種類の核酸系逆転写酵素阻害薬、0 から 1 種類の非核酸系逆転写酵素阻害薬、0 から 5 種類のプロテアーゼ阻害薬の投与を受けていた。

未治療患者群と既治療患者群における血漿 HIV-1 及び分離 HIV-1 の逆転写酵素のアミノ酸配列を系統樹分析した結果を図 1 に示す。

プロテアーゼに関する同様の結果を図 2 に示す。逆転写酵素において血漿 HIV-1 と分離 HIV-1 のアミノ酸配列が同一であったのは未治療患者で 11 人中 9 人、既治療患者群で 14 人中 2 人であった。プロテアーゼにおいて血漿 HIV-1 と分離 HIV-1 のアミノ酸配列が同一であったのは未治療患者群で 11 人中 7 人、既治療患者で 14 人中 7 人であった。逆転写酵素のアミノ酸配列における血漿 HIV-1 と分離 HIV-1 の遺伝距離の平均値は、未治療患者群が 0.0007、既治療患者群が 0.0093 であった。プロテアーゼにおけるそれは、未治療患者群が 0.0064、既治療患者群が 0.0159 であった。なお系統樹分析から、患者 E1 の HIV-1 は CRF01_AE に属し、その他の患者のウイルスはすべてサブタイプ B に属することがわかった。

血漿ウイルスと分離ウイルスの逆転写酵素とプロテアーゼで見つかった薬剤耐性関連変異を表 2 に示す。プロテアーゼ阻害薬に対する主要耐性関連変異は太字のイタリックで示した。また、血漿ウイルスと分離ウイルスで異なる耐性関連変異に下線を引いた。未治療患者群のウイルスでは逆転写酵素に耐性関連変異は検出されなかった。プロテアーゼには L10I、K20R、M36I、L63P、L63T、L63S、V77I、I93L の耐性関連変異があったが、これらはすべて二次変異と呼ばれるものであった。既治療患者群のウイルスでは多くの薬剤関連変異が見られた。血漿ウイルスと分離ウイルスの耐性関連変異を比較すると、既治療患者 E11 以外はほとんど一致していた。

既治療患者群における、各種抗レトロウイルス薬に対する分離ウイルスの IC_{50} (未治療患者由来ウイルスの平均 IC_{50} に対する相対値) とジェノタイプ解釈アルゴリズム HIVDB による結果を表 3 で比較した。 IC_{50} の技術的カットオフはすべての薬剤に対して 4 倍である。HIVDB の結果は S (Sensitive)、P (Potential low-level)、L (Low-level)、I (Intermediate)、H (High-level) の五つの

レベルで示されている。両者の結果は ddI の 3 例と d4T の 1 例以外はよく一致していた(順位相関係数 0.76 以上)。なお、未治療患者群では、すべての薬剤に対して、 IC_{50} が 4 倍以下で HIVDB の結果も Sensitive であった(データ省略)。

フェノタイプとジェノタイプをさらに比較するために、HIVDB で予測された各耐性レベルに対する IC_{50} のプロットを逆転写酵素阻害薬(図 3)とプロテアーゼ阻害薬(図 4)に分けて示した。ジェノタイプから S、P、L と予測された場合の IC_{50} は技術的カットオフである 4 倍より低かったが、I あるいは H と予測されたほとんどの場合で IC_{50} は 4 倍以上であった。プロテアーゼ阻害薬の場合、耐性レベルが同じ I あるいは H と予測されても IC_{50} は大きく異なっていた。また、 IC_{50} の上限が、d4T と ABC では約 10 倍であったのとは対照的に、その他の薬剤では 100 倍から 1000 倍以上もあった。

考察

血漿ウイルスと分離ウイルスの遺伝学的差異は、逆転写酵素とプロテアーゼの両方とも、未治療患者より既治療患者の方が大きかった。これは薬剤の選択圧のもとでウイルスの遺伝的多様性が増大したことを反映していると考えられる。

血漿ウイルスと分離ウイルスの薬剤耐性関連変異は治療中患者 1 例を除いてほぼ一致していた。この患者の場合、両者のウイルスの遺伝距離は逆転写酵素で 0.034、プロテアーゼで 0.111 と著しく異なっていた。この症例が例外的なものであるかどうかを判断するためには今後の研究が必要である。

フェノタイプとジェノタイプの関係を調べるために、分離ウイルスの IC_{50} とスタンフォード大学で開発されたジェノタイプ解釈アルゴリズムを比較した結果、両者は ddI を除いてよく一致していた。しかし、プロテアーゼ

阻害薬の場合、アルゴリズムによって同じ耐性レベルと判定されても IC_{50} は大きく異なっていた。したがって、血中薬剤濃度との比較から薬剤耐性を評価する場合には、フェノタイプ検査の方が優れていると考えられる。

d4T と ABC はそれ以外の薬剤と比較して IC_{50} の上限が 10 倍程度とかなり低いことがわかった。このような低レベルの耐性によって治療効果が実際になくなるのであろうか。d4T と ABC に対する耐性獲得の臨床的意義について検討する必要がある。

サブタイプ B の薬剤耐性に関してはデータベースが整っており、比較的正確な解釈アルゴリズムも確立しているが、非サブタイプ B については世界的にデータが乏しい。国内の異性間性的接触による感染例の約半数が CRF01_AE によるものと報告されている。したがって、非サブタイプ B の薬剤耐性の研究は我が国のエイズ研究の重要な課題である。

発表論文

1. Kato, S., Saito, Y., Tanaka, R., Hiraishi, Y., Kitamura, N., Matsumoto, T., Hanabusa, H., Kamakura, M., Ikeda, Y., Negishi, M. (submitted) Differential prevalence of HIV-1 subtype B and CRF01_AE among different sexual transmission groups in Tokyo, Japan, as revealed by subtype-specific PCR. AIDS.

学会発表

1. Shingo Kato, Hisamichi Tagami, Yuki Saito, Rie Tanaka, Hideji Hanabusa. HIV-1 RNA-DNA hybrid in peripheral blood mononuclear cells of infected individuals. XIV International AIDS Conference, Abstract ThPeB7039. 2002, July 7-12, Barcelona, Spain.
2. Rie Tanaka, Yuki Saito, Hideji Hanabusa,

- Shingo Kato. Drug susceptibility assay using peripheral blood mononuclear cells as target cells. XIV International AIDS Conference, Abstract B10191. 2002, July 7-12, Barcelona, Spain.
3. Yuki Saito, Rie Tanaka, Hideji Hanabusa, Shingo Kato. A rapid procedure to detect a single copy of HIV-1 virion RNA. XIV International AIDS Conference, Abstract B10226. 2002, July 7-12, Barcelona, Spain.
 4. Naoyuki Kuji, Tuyoshi Yoshii, Shingo Kato, Hironori Asada, Kou Sueoka, Yasunori Yoshimura. Sedimentation Kinetics of HIV-1 in two gradient media. 50th Annual Meeting of the American Society. 2002, October 12-17, Seattle, USA.
 5. 田中雄大、久慈直昭、吉井毅、佐藤健二、谷垣礼子、浅田弘法、末岡浩、加藤真吾、吉村泰典、野澤志朗「Silane-coated colloide media 密度勾配における HIV-1 ウイルスの沈降動態」第 54 回日本産科婦人科学会 (2002 年 4 月 6-9 日、東京)
 6. 谷垣礼子、末岡浩、佐藤健二、中林章、田島博人、橋場剛士、浅田弘法、久慈直昭、吉村泰典、加藤真吾「マウス造精機能障害モデルにおける c-kit の役割」第 47 回日本不妊学会学術講演 (2002 年 10 月 2-4 日、岐阜)
 7. 中林章、末岡浩、佐藤健二、田島博人、松田紀子、橋場剛士、浅田弘法、久慈直昭、吉村泰典、加藤真吾「重複型遺伝子型を有する Duchenne 型筋ジストロフィーに対する出生前・着床前診断へのアプローチ」第 20 回日本受精着床学会 (2002 年 10 月 4-5 日、岐阜)
 8. 田島博人、末岡浩、中林章、佐藤健二、橋場剛士、浅田弘法、久慈直昭、吉村泰典、加藤真吾「1 塩基挿入および点変異型筋ジストロフィーの着床前診断における精度上の問題点」(2002 年 10 月 4-5 日、岐阜)
 9. 加藤真吾、齊藤有紀、杉田香代子、小林芳夫「PFGE と inverse PCR による MRSA の分子型別判定の比較」第 76 回日本感染症学会総会学術講演会 (2002 年 4 月 11-12 日、東京)
 10. 加藤真吾、谷合佐緒里、田中理恵、根岸昌功、花房秀次、杉浦亙「HPLC による抗 HIV 薬細胞濃度測定」第 16 回日本エイズ学会学術集会 (2002 年 11 月 28-30 日、名古屋)
 11. 田中理恵、松田昌和、杉浦亙、花房秀次、根岸昌功、加藤真吾「ジェノタイプ法とフェノタイプ法による抗レトロウイルス薬に対する HIV-1 の薬剤感受性検査結果の比較」第 16 回日本エイズ学会学術集会 (2002 年 11 月 28-30 日、名古屋)
 12. 須藤弘二、西澤雅子、嶋貴子、近藤真規子、向出雅一、蜂谷敦子、岡慎一、加藤真吾、伊藤章、宇宿修三、野口有三、相良裕子、杉浦亙、今井光信「同一患者検体を用いた薬剤耐性検査結果の比較」第 16 回日本エイズ学会学術集会 (2002 年 11 月 28-30 日、名古屋)
 13. 花房秀次、大田美緒、和田郁子、加藤真吾「HIV/HCV 感染者における Hit early and hard の有効性」第 16 回日本エイズ学会学術集会 (2002 年 11 月 28-30 日、名古屋)
 14. 花房秀次、加藤真吾、兼子智、高桑好一、鈴木美奈、久慈直昭、吉村泰典、田中憲一「改良 Swim up 法による HIV 除去精子を用いた体外授精の臨床成績」第 16 回日本エイズ学会学術集会 (2002 年 11 月 28-30 日、名古屋)
 15. 神野正雄、酒井謙、近藤憲一、井上保、山井礼子、小池麻耶、岩下光利、中村幸

雄、花房秀次、兼子智、加藤真吾「夫 HIV 陽性、妻 HIV 陰性の夫婦に対する洗浄精子 ICSI による本邦最初の妊娠例」第 324 回日本産科婦人科学会東京地方部会例会（2002 年 12 月 21 日、東京）

その他

特許取得

1. 発明の名称：H I V-1 プロウイルス D N A の定量法および診断キット。特許権者：東京都港区三田 2 丁目 1 5 番 4 5 号 学校法人慶応義塾。発明者：加藤真吾、平石佳之、杉田哲佳。出願番号：平成 1 0 年特許願第 3 4 0 3 0 3 号。出願年月日：平成 1 0 年 1 1 月 3 0 日。特許番号：特願第 3 3 3 4 0 8 6 号。登録年月日：平成 1 4 年 8 月 2 日
2. 発明の名称：H I V-1 のサブタイプ決定法。特許権者：東京都港区三田 2 丁目 1 5 番 4 5 号 学校法人慶応義塾。発明者：加藤真吾、小林芳夫、平石佳之、清水香代子、杉田哲佳。出願番号：特願 2 0 0 0-0 2 3 5 8 1。出願年月日：平成 1 2 年 2 月 1 日。特許番号：特願第 3 3 5 1 7 7 3 号。登録年月日：平成 1 4 年 9 月 2 0 日

Table 1. Characteristics of the drug-naïve and drug-experienced patients examined

Subject ^a	CD4 cells (cells/ μ l)	Plasma HIV-1 RNA (copies/ml)	Ongoing regimens ^b (months)	Previously administered drugs ^b (months of administration)
N1	199	6,800	-	-
N2	6	150,000	-	-
N3	343	260,000	-	-
N4	364	43,000	-	-
N5	237	2,800	-	-
N6	183	39,000	-	-
N7	429	1,200	-	-
N8	576	5,900	-	-
N9	303	28,000	-	-
N10	19	21,000	-	-
N11	581	2,000	-	-
E1	2	1,200	-	d4T, 3TC, ddI, EFV, NFV
E2	274	25,000	AZT+3TC+NFV	-
E3	20	70,000	AZT+ddI+RTV+SQV	-
E4	11	200	-	AZT(2), 3TC(2), EFV(2)
E5	13	510	d4T+3TC+NFV	-
E6	221	1100	d4T+ddI+EFV(14)	ddC(2), 3TC(37), IDV(1), RTV(2)
E7	382	850	d4T+3TC+NFV(38)	AZI(12), 3TC(12)
E8	650	860	AZT+3TC(45)	-
E9	800	940	d4T+3TC+EFV(8)	-
E10	375	560	AZT+3TC+EFV	-
E11	313	3300	d4T+ddI+LPV/r	AZT, d4T, ddC, 3TC, ABC, ddI, NVP, SQV, IDV, NFV, APV, LPV/r
E12	147	6100	d4T+ddI+APV+LPV/r	-
E13	138	11000	ABC+TDF+LPV/r	d4T, 3TC, ABC, NFV
E14	1071	5000	-	AZT, 3TC, ABC

^a Patients Ns and Es are drug-naïve and drug-experienced, respectively

^b No drug use is shown by minus.

Figure 1. Genetic relationship of plasma viruses and PBMC-isolated viruses in HIV-1 reverse transcriptase.

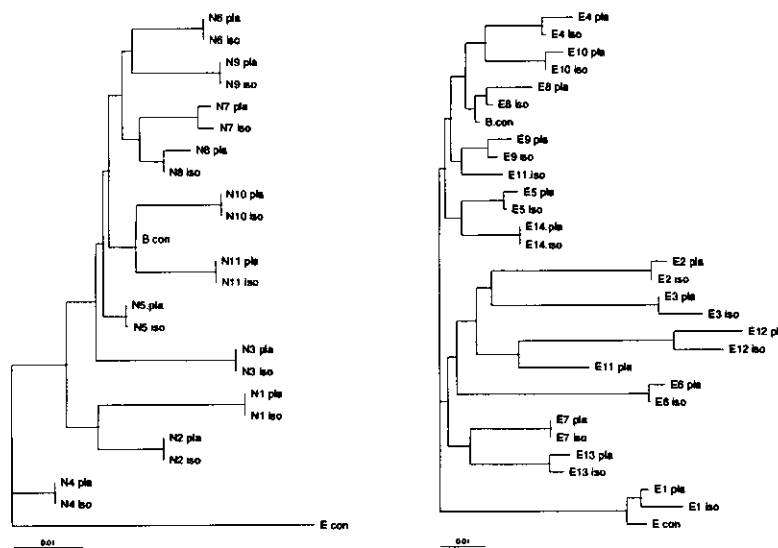


Figure 2. Genetic relationship of plasma viruses and PBMC-isolated viruses in HIV-1 protease.

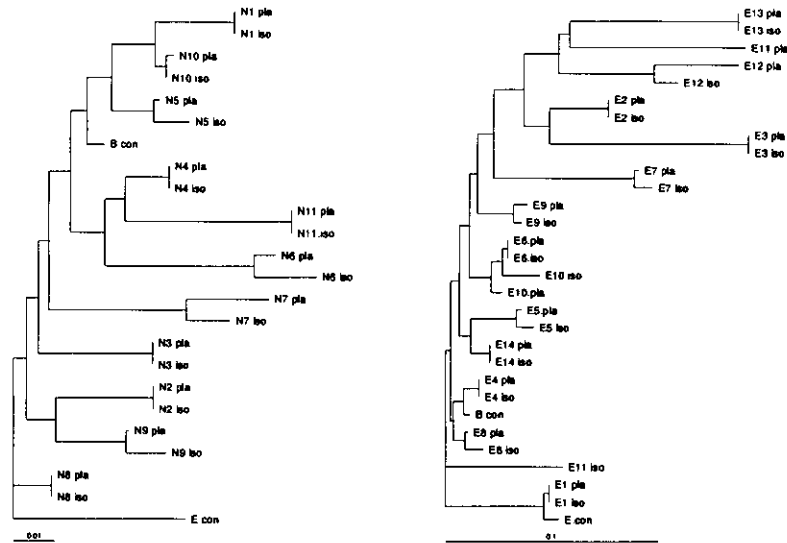


Table 2. Distribution of drug resistance-associated mutations in HIV-1 reverse transcriptase and protease from plasma viruses and PBMC-isolated viruses.

Patient*	In plasma virus ^a			In isolated virus ^a		
	NRTI	NNRTI	PI	NRTI	NNRTI	PI
N1	-	-	L101	-	-	L101
N2	-	-	L63P, V77I	-	-	L63P, V77I
N3	-	-	L63T	-	-	L63T
N4	-	-	L63P, V77I, I93L	-	-	L63P, V77I, I93L
N5	-	-	-	-	-	-
N6	-	-	I93L	-	-	I63P , I93L
N7	-	-	K20R, M36I, L63I	-	-	K20R, M36I, L63S
N8	-	-	L63P	-	-	L63P
N9	-	-	L63P	-	-	L63P
N10	-	-	-	-	-	-
N11	-	-	L63P, V77I, I93L	-	-	V77I, I93L
E1 ^b	-	-	M36I	K20R	-	M36I
E2	M41L, D67N, L74V, V118I, M184V, L210W, T215Y	-	L10I, M46I, L63P, A71V, G73S, V77I, L90M, I93L	M41L, D67N, L74V, V118I, M184V, L210W, T215Y	-	L10I, M46I, L63P, A71V, G73S, V77I, L90M, I93L
E3	M41L, D67N, K70R, V75M, T215F, K219Q	-	L10I, K20R, M36I, M46I, F53L, L63P, A71V, V82T, N88S, L90M, I93L	M41L, D67N, K70R, V75M, T215F, K219Q	-	L10I, K20R, M36I, M46I, F53L, L63P, A71V, V82T, N88S, L90M, I93L
E4	-	V179D	L63T	-	-	L63T
E5	-	-	L63P, V77I	-	-	L63P, V77I, I93L
E6	D67N, N70R, V118I, K219Q	K103N, Y188L	L63P	D67N, K70R, V118I, K219Q	K103N, Y188L	L63P
E7	M41L, M184V, T215Y	-	D30N, M46I, L63P, V77I, I93L	M41L, M184V, T215Y	-	L10I , D30N, M46I, L63P, V77I, I93L
E8	M184V	-	V77I	-	-	V77I
E9	M184V	-	I93L	-	-	L63E, I93L
E10	-	-	L63P	M184V	-	L63P
E11	M41L, E44D, T69D, V118I, T215Y, K219R	-	L10V, M46I, I54V, L63S, A71V, V77I, V82A, L90M	-	-	K20M, L63S, V77I
E12	M41L, D67N, T69D, L74V, L100I, L210W, T215Y	K103N	L24I, L33E, M46I, I54V, L63P, A71V, G73S, V77I, V82A	M41L, D67N, T69D, L74V, L100I, M184V, L210W, T215Y	K103N	K20I, L24I, M46I, I54V, L63P, A71V, G73S, V77I, V82A
E13	M41L, M184V, T215Y	-	L10V, M36I, I54V, L63P, A71V, G73T, V82A, L90M	M41L, M184V, T215Y	-	L10V, M36I, I54V, L63P, A71V, G73T, V82A, L90M
E14	-	-	L63P, V77I	-	-	L63P, V77I

* Patients Ns and Es are drug-naïve and drug-experienced, respectively

^a Absence of drug resistance-associated mutations is shown by minus. Discrepant amino acids between plasma virus and isolated virus are underlined. Major resistance-associated mutations are listed in boldface, italic type.

^b Virus from this patient belongs to CRF01_AE. Viruses from the other patients are subtype B.

Table 3. Results of the phenotypic assay and the genotypic assay to 12 antiretroviral drugs in 14 HAART-experienced patients.

Patient	Fold increase* Resistance level ^b		3TC	d4T	ABC	NVP	EFV	SQV	IDV	NFV	APV	LPV
	AZT	ddl										
E1	3.1	1.6	0.63	1.0	1.1	0.44	0.62	0.52	0.33	1.2	0.58	0.27
E2	L	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
E3	31	0.36	>520	3.8	14	5.9	1.8	30	16	12	5.5	14
E4	I	H	H	I	H	S	S	I	I	H	I	I
E5	280	>4.8	18	9.4	11	2.0	1.9	270	220	>680	14	100
E6	H	I	S	H	H	S	S	H	H	H	I	I
E7	0.55	1.4	1.3	1.2	0.98	0.45	0.63	1.3	0.79	0.57	0.56	1.8
E8	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
E9	0.68	0.72	0.73	1.1	1.7	0.64	1.9	1.6	1.1	1.50	2.0	1.5
E10	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
E11	5.2	0.20	4.7	3.8	2.6	>4500	26000	0.67	0.78	0.68	1.1	2.4
E12	I	P	S	L	L	H	H	S	S	S	S	S
E13	3.1	0.92	200	5.3	3.2	2.9	0.76	5.1	3.1	120	1.9	1.5
E14	I	I	H	L	I	S	S	P	L	H	L	L
E15	1.4	0.36	0.22	2.1	0.50	0.30	0.37	0.92	0.75	0.52	1.0	1.2
E16	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
E17	0.78	0.68	340	0.76	1.2	0.28	0.46	2.3	1.1	0.53	0.58	1.2
E18	S	L	H	S	L	S	S	S	S	S	S	S
E19	0.40	1.0	1.7	1.3	1.7	0.45	0.28	0.98	0.84	1.2	1.4	1.4
E20	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
E21	1.2	>4.8	2.0	1.3	1.1	0.91	0.44	2.0	2.4	2.7	2.5	2.4
E22	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
E23	5.9	>4.8	270	1.7	9.1	820	100	55	120	16	140	140
E24	I	H	H	I	H	H	I	H	H	H	I	I
E25	28	4.5	330	1.7	3.9	0.77	0.23	99	17	140	10	150
E26	I	I	H	L	I	S	S	H	H	H	I	I
E27	0.38	0.92	0.38	1.1	0.57	0.31	1.2	1.0	0.78	1.0	0.68	0.59
E28	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
r ²	0.91	0.10	0.83	0.78	0.89	0.68	0.68	0.85	0.85	0.83	0.79	0.76
P	0.0011	0.71	0.0027	0.0047	0.0014	0.028	0.028	0.0023	0.0021	0.0027	0.0042	0.0064

a Fold increase in IC50 relative to the mean IC50 for treatment-naïve patients.
 b Drug resistance interpretation by the Stanford method is listed in bold type.
 a,b Clearly different results from the phenotypic and genotypic assays are indicated in box.
 c Spearman's correlation coefficient.

Figure 3. Comparison of the phenotypic assay and genotypic drug resistance interpretation by the Stanford method among RT inhibitors.

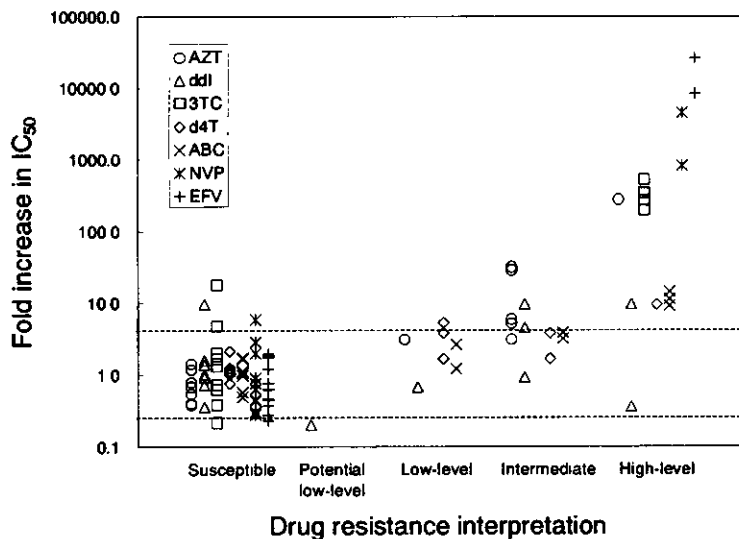
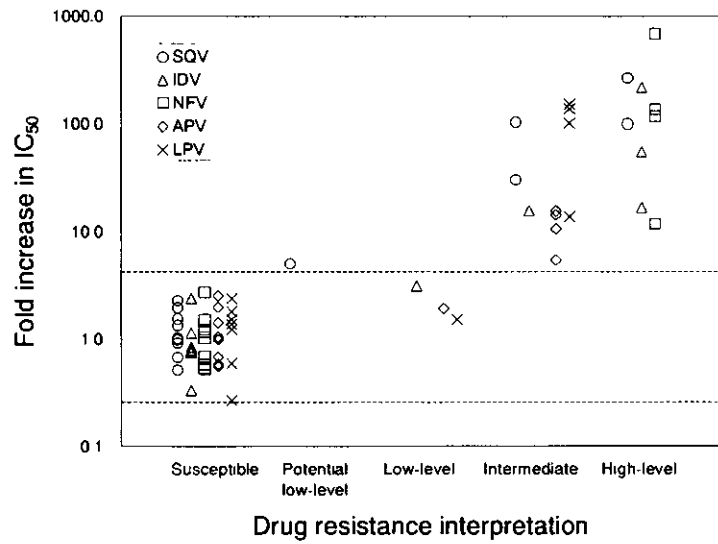


Figure 4. Comparison of the phenotypic assay and genotypic drug resistance interpretation by the Stanford method among protease inhibitors.



10. 3 剤併用療法をそのまま評価する

新しい薬剤感受性試験「All in One Assay」の開発

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）
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

昨年までに我々は「MAGIC5 細胞、MAGIC5-SEAP による薬剤感受性試験」を報告した。従来法に比べ、迅速、簡便、安定であり、多検体処理が可能となった。しかしこれまでの薬剤感受性試験の結果は、すべて単剤に対する結果であり、現在行われている多剤併用療法を反映しているとはいえない。そのため多剤併用療法をそのまま評価する全く新しい薬剤感受性試験「All-in-One Assay」を開発した。治療変更時、特にサルベージでの最適薬剤の組み合わせを選択する手段の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、多検体処理を可能とするため、MAGIC5 および MAGIC5-SEAP を用いた薬剤感受性試験を開発し、臨床検査としての実用化が期待されている。しかしこれらの薬剤感受性試験には、まだいくつかの問題点が残されている。①臨床では多剤併用療法が主流で行われているが、薬剤感受性試験は単剤に対する評価を行っている。②薬剤感受性試験の結果は耐性度で表されており、血漿中薬剤最低濃度とウイルス抑制の濃度の関係が不明である。③サルベージ療法では、交差耐性の問題から残された薬剤は少なく、単剤に対する結果から3剤併用による抗ウイルス効果を予測するのは難しいといった点があげられる。これらの問題を解決するため、3剤併用し、血中薬剤濃度を考慮した薬剤感受性試験、「All-in-One Assay」を開発し、その臨床応用を目的とした。

2. 方法

今回の研究を実施する際、国立国際医療センター倫理委員会において承認を得た。（IMCJ-H13-80）
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、PBMC を分離して使用した。
ウイルス分離：昨年までに報告した方法と同様、患者由来の plasma、CD8(-)PBMC 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%CO₂ インキュベーターにて48時間培養した。
薬剤濃度の設定、および組み合わせ：NNRTI、PI は、血漿中の C_{min} の値を、また RTI は、C_{max} の値をそれぞれ論文から引用した。（Table.1）これらの値で3剤混ぜたところを1BCCとし、10倍連続希釈系列を作成し、それぞれ0.1BCC、0.01BCC、0.001BCCと

した。

今回測定した薬剤の組み合わせは、①3TC+d4T+NVP、②3TC+d4T+EFV③AZT+3TC+NFV、④3TC+d4T+NFV⑤3TC+d4T+IDVとした。なおアメリカのHIV感染症治療ガイドラインにおいて②～⑤の組み合わせをFirst lineとして推奨し、①はsecond lineとされている。

RTI+NNRTIの薬剤感受性試験：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3剤混合した抗ウイルス薬を10倍希釈系列を作成し、100μlずつ加え、37°C、5%CO₂インキュベーターにて培養した。48h後、X-gal染色を行い、薬剤を加えていないウエルを100%とし、95%発育阻止が出来たところをID₉₅(Inhibitory Dilution)とした。

RTI+PIの薬剤感受性試験：一定濃度のウイルスをInfection Mediumにて希釈し、100μlずつ加えた。さらに3剤混合した抗ウイルス薬を10倍希釈系列を作成し、100μl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100μlとInfection Medium 100μlを加え、培養した。48h後、X-gal染色を行い、薬剤を加えていないウエルを100%とし、95%発育阻止が出来たところをID₉₅とした。

3. 結果

3剤存在下における抗ウイルス効果の比較：NL432を用いて、①～⑤の薬剤の組み合わせに対するAll-in-One Assayを行った。(Fig.1) Second line①は95%のウイルスが抑制される濃度が約1/10BCC(0.1BCC)であるのに対し、First line②～⑤では約1/100BCC(0.01BCC)であった。First lineは、血中濃度より1/100濃度で効果があることから、抗ウイルス効果がより強力であることがわかった。

NL432を用いたAll-in-One Assayの再現

性：それぞれ薬剤の組み合わせ4種に対し、NL432を用いて5回測定し、ID₉₅の再現性を調べた。どの組み合わせにおいてもCVは5%未満と良好の結果が得られた。またFirst lineの組み合わせでは0.0062～0.0069、second lineによる組み合わせでは0.072～0.074であった。(Table.2)

単剤と3剤併用による薬剤感受性試験の結果の比較：臨床検体を対象に無治療者3例(72,160,201)、治療失敗(中断)1例(183)を対象に、NNRTIを用いた薬剤の組み合わせ3TC/d4T/NVP、3TC/d4T/EFV、および単剤による薬剤感受性試験を行った。単剤による結果はIC₅₀を求め、NL432に対する耐性を示した。3剤に対する結果はID₉₅を求め、NL432に対する耐性を示した。無治療者を対象に比較すると、耐性度については単剤では0.35～1.09倍、3剤では0.02～1.0倍と感受性の結果が得られた。しかしID₉₅を比較することにより、3TC/d4T/NVPは0.016～0.076BCC、3TC/d4T/EFVは0.0017～0.008BCCと違いが生じた。耐性度からは同じように感受性の結果が得られても、薬剤の組み合わせによって血中濃度とウイルス抑制の濃度に差があることがわかった。またこれまでの単剤による薬剤感受性試験の結果では、この差はわからなかった。(Table.3)

臨床経過との比較：以下の解析は、レトロスペクティブに行った。

<治療成功例>AZT/3TC/NFVを投与中にA型肝炎、アメーバ大腸炎、梅毒を発症し、抗HIV療法を中断した。それまで抑えられていたウイルス量は5乗代へと上昇し、この時のウイルスで以前使用していたAZT/3TC/NFVに対する薬剤感受性試験を行った。ID₉₅は0.0097と非常に低い値が得られ、その後再びAZT/3TC/NFVを開始したところウイルス量は検出限界以下まで減少した。(Fig.2A)

<治療失敗例>SQV、ddC投与中に抗ウイルス効果が得られないため、次に使用予定であ

った 3TC/d4T/NFV に対する薬剤感受性試験を行った。ID₉₅ は 0.07 と、先の成功例に比べより血中濃度に近い値が得られ、その結果からは抗ウイルス効果は期待できなかった。その後、3TC/d4T/NFV による治療を開始したがウイルス量は低下することなく、別の薬剤による治療を余儀なくされた。治療変更直前において再び 3TC/d4T/NFV に対する薬剤感受性試験を行ったところ ID₉₅ は 0.31 とさらに上昇していた。(Fig.2B)

4. 考察

これまでの薬剤耐性検査の問題点を解決するため、臨床に即した全く新しい「All-in-One Assay」という薬剤感受性試験の方法を開発した。この方法は、①臨床で主流となっている多剤併用療法を反映するため、単剤ではなく 3 剤に対する薬剤感受性試験の結果を得た。②血中濃度と抗ウイルス効果を反映するため、薬剤濃度設定の際に血中薬剤濃度を考慮した。そのため結果は耐性度だけでなく、95%のウイルスを抑制する濃度 ID₉₅ を求め、血中濃度とウイルス抑制の濃度の差を評価できた。③ ID₉₅ を比較することによって、薬剤変更時において最も有用な薬剤の組み合わせの選択が可能となった。④ 3 剤同時測定が可能となったため、薬剤感受性試験のコストは 1/3 となった。

これまでの薬剤感受性試験と大きく異なり、より臨床を反映した「All-in-one assay」であるが、今後改良すべき点がいくつか挙げられる。① RTI の抗ウイルス効果は、細胞内の 3 リン酸濃度に依存しているが、今回の薬剤設定に C_{max} を使用した点である。細胞内の 3 リン酸濃度は、低濃度であり、報告されている値は測定系の違いによりかなり異なっていた。しかし in vivo を反映した測定系の確立を考慮すると、今後細胞内の 3 リン酸濃度に設定する必要があると考えられた。② 薬剤は血漿中蛋白結合率に大きく影響することが知

られている。そのため in vitro に比べ in vivo では、抗ウイルス効果は低下しており、今後この血漿中蛋白を考慮した測定系にする必要があると考えられた。③ 特にサルベージ療法として挙げられている組み合わせの効果を予測するため、カットオフ値を設定する必要があると考えられた。④ 今回の薬剤設定値はすべて欧米の文献から引用した。今後日本人での薬剤血中濃度に合わせた薬剤濃度の再設定、また各患者での薬剤血中濃度測定が可能となれば、本法の薬剤濃度を各患者の値に設定し、さらに詳しい抗ウイルス効果の評価が可能である。これらの方法が改良、実現されれば、オーダーメイド治療に向け「All-in-one assay」は、より有用な情報を臨床サイドに提供出来ると考えられた。

発表論文

1. Matsuoka-Aizawa S, H.Sato, A. Hachiya, K. Tsuchiya, Y. Takebe, H. Gatanaga, S. Kimura, S. Oka Isolation and molecular characterization of a nelfinavir(NFV)-resistant human immunodeficiency virus type1 that exhibits NFV-dependent enhancement of replication. Journal of virology. 2003;77:318-327

学会発表

1. Hachiya A., S. Matsuoka., K. Tsuchiya., S. Kimura., M. Tatsumi, S. Oka. "All-in-one Assay", a novel phenotypic drug resistance assay for anti-HIV-1 combination therapies. 42nd Inter science Conference on Antimicrobial agents and chemotherapy. September 27-30, 2002, San Diego, California, USA
2. Matsuoka-Aizawa S, H.Sato, A.

Hachiya, K. Tsuchiya, Y. Takebe, H. Gatanaga, S. Kimura, S. Oka
Nelfinavir(NFV) can potentiate the infectivity and replication of HIV-1 whose fitness is otherwise compromised upon the acquisition of Gag p17 in association with protease mutations conferring NFV resistance. 42nd Interscience Conference on Antimicrobial agents and chemotherapy. September 27-30, 2002, San Diego, California, USA

3. Oka S, Hachiya A, Matsuoka S, Tsuchiya K, Bi X, and Kimura S. Importance of Drug Resistance Assay in the Treatment of HIV-1 Infection with 3-Drug Combination Regimens. China-Japan Medical Conference 2002, November 3-6, 2002, Beijing, China
4. 蜂谷敦子、松岡佐織、木村 哲、岡 慎一ら、「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76回感染症学会総会、4月、東京、2002.
5. 蜂谷敦子、児玉栄一、木村 哲、岡 慎一ら、「新規感染者から検出された新たなネビラピン耐性変異について」 第16回日本エイズ学会総会、12月、名古屋、2002.
6. 蜂谷敦子、児玉栄一、木村 哲、岡 慎一ら、「新規感染者から検出された新たなネビラピン耐性変異について」 第13回抗ウイルス化学療法研究会、1月、千葉、2003.

Table.1 血中薬剤濃度を考慮したBCCの設定

Drug	Dose	Cmax (μM)	Cmin (μM)	1x BCC (μM)
NRTI	AZT 100mg tid	0.56 ~ 0.84		1
	3TC 150mg bid	4.9 ~ 7.8		5
	d4T 35mg bid	4.2 ~ 8.6		10
NNRTI	NVP 200mg bid	8.7 ~ 15.3		10
	EFV 600mg qd	5.6		5
PI	NFV 750mg tid	1.5 ~ 4.5		5
	IDV 800mg tid	0.07 ~ 0.43		0.2
	LPV 400mg bid	2.33 ~ 12.99		8

Fig.1 3剤存在下での抗ウイルス効果の比較

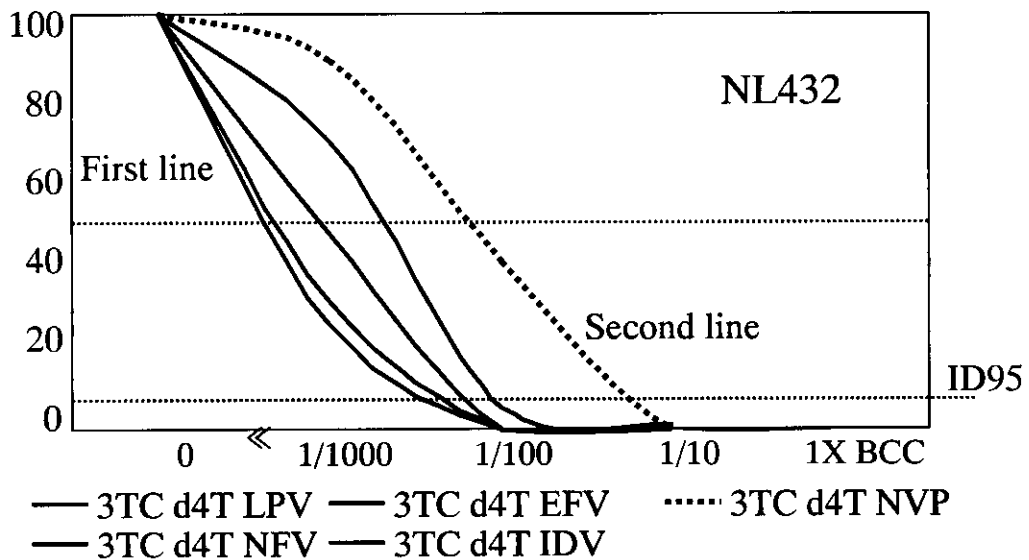
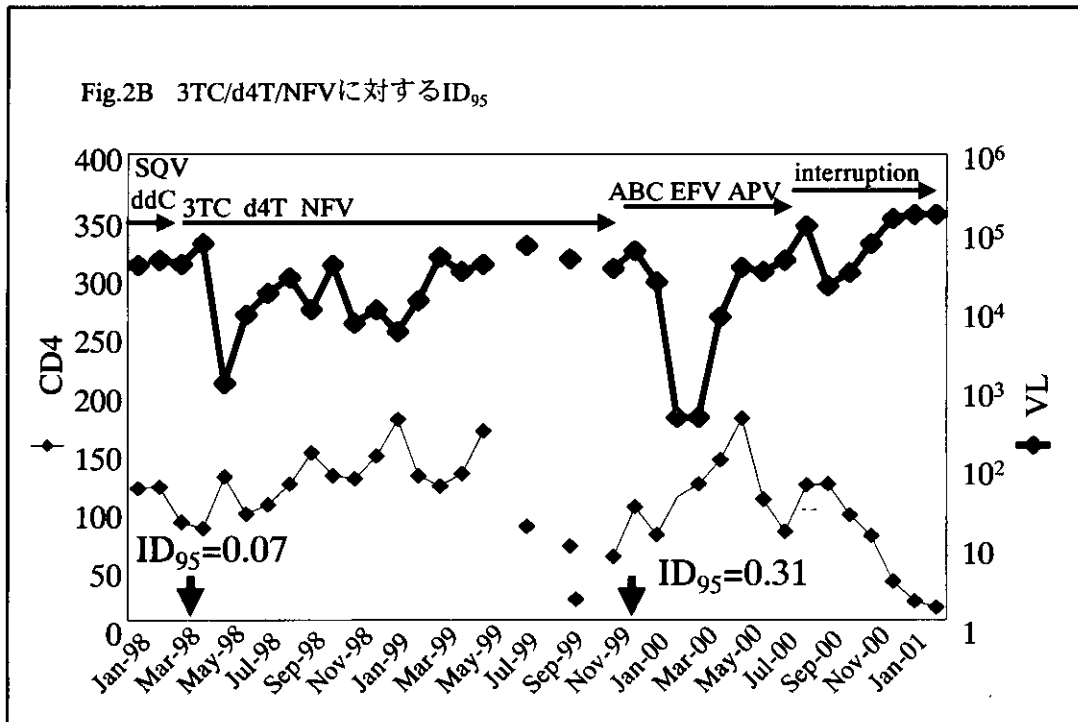
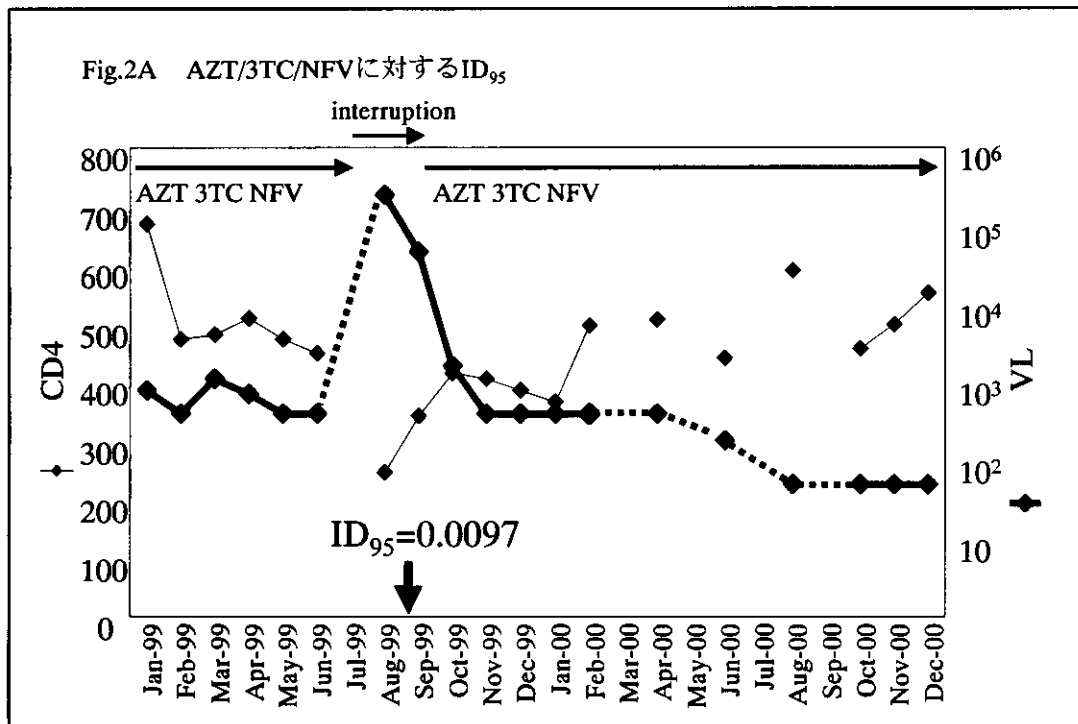


Table.2 NL432を用いた“All-in-One assay”の再現性

drug combination	n	ID95 (BCC)		CV(%)
		mean±SD	Range	
d4T 3TC NVP	5	0.072±0.002	0.07±0.074	2
d4T 3TC EFV	5	0.0065±0.0002	0.0062±0.0067	3
AZT 3TC NFV	5	0.0063±0.0002	0.0062±0.0066	2
d4T 3TC NFV	5	0.0065±0.0003	0.0063±0.0069	4

Table3. 単剤と多剤併用による薬剤感受性試験の結果の比較

Case No.	Current therapy	All-in-One Assay				Each drug				
		d4T/3TC/NVP		d4T/3TC/EFV		Fold resistance				
		ID95	FR	ID95	FR	3TC	d4T	NVP	EFV	
72	naive	0.016	0.2	0.0017	0.02	0.54	0.53	0.36	0.61	
160	naive	0.076	1.0	0.0022	0.30	0.76	0.36	0.57	0.35	
201	naive	0.073	1.0	0.0080	1.00	1.2	0.74	1.09	0.78	
.....										
183	interruption	>1	>13.5	0.8	109	>322	4.61	>131	400	



11. フェノタイプ検査とバーチャルフェノタイプ検査の比較検討と評価

研究協力者 向出雅一（神奈川県衛生研究所、SRL, Inc.）
須藤弘二（神奈川県衛生研究所、横浜市立大学）
分担研究者 近藤真規子、今井光信（神奈川県衛生研究所）

研究概要

HIV 薬剤耐性検査を専門とする Virco 社（ベルギー、アイルランド、アメリカ）との連帯により可能となった HIV 薬剤耐性検査（VirtualPhenotype™、Antivirogram(R) Phenotype）の検査の比較検討を行った。2002 年の検査数は、VirtualPhenotype™ が、前年の +53% で増加（Subtype B 83.3%、AE 14.4%、他 2.3%）、Antivirogram(R) Phenotype が、-13% と減少し、全体として増加した。報告日数は、それぞれ最短で 12 日、30 日で前年より短縮した。両者の相関は、全体として良かった（N=170、NRTI; $y=0.7031x+0.5098$, $R=0.76$ 、NNRTI; $y=1.6765x+0.4611$, $R=0.72$ 、PI; $y=1.181x+0.3733$, $R=0.64$ ）。症例によっては乖離例も見られた（数%）。今後、これらデータ蓄積と乖離例の検証を進めると共に、公的研究機関の充実・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つとめたい。

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（表 1、The US Department of Health and Human Services (DHHS), 2003）。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共に、民間検査センター等との連帯による検査体制の整備・拡大が極めて重要である（図 1）。このため、きわめて多数の HIV 薬剤耐性検査の経験を有する Virco 社（ベルギー、アイルランド、アメリカ、<http://www.vircolab.com/web/home.asp>）と日本の検査センターとの連帯による HIV 薬剤耐性検査体制の整備と現状を把握し、検査結果の検証を目的とした。

方法

バーチャルフェノタイプ（Virtual/Phenotype ; TM）

Virco 社は、genotype と phenotype 情報の世界最大のデータベースを発展させてきた。

患者の検体から HIV のプロテアーゼ (PR) 遺伝子と逆転写酵素 (RT) 遺伝子配列を決定（図 2）。PT-RT 領域に対する遺伝暗号を専用のソフトウェアシステム “VircoNET” に入力。システムは各薬剤と関係するすべての突然変異を識別し、データベース（アイルランド、図 3）に送信。合致するすべての遺伝子型を識別すると、ソフトウェアは検体ならびに各薬剤に対する表現型にアクセスし、合致するすべての表現型に関するデータを平均。これによってバーチャルに各薬剤について IC50 の fold change を定量的に表示。同時に、合致した症例数と、耐性、感受性の % を棒グラフで表示、PI-RT 領域の遺伝子配列から判定したサブタイプと共に report を作成（図 4）。

フェノタイプ（Antivirogram(R) Phenotype）

VirtualPhenotype™ と同様に、PR-RT 遺伝子を増幅（図 2）。Virco 社（ベルギー）に空輸。Virco 社では PR 領域と RT 領域を含まない HIV

クローンを作製し、この PR-RT DNA と共に CD4 陽性細胞に導入。検体とされたウイルスの PR-RT 配列が入った組換え増殖性ウイルスを生成。16 薬剤について濃度を変えて 384 マイクロウェルプレートに設置。組換えウイルスの稀釈液を添加。レポーター遺伝子系を有する CD4 陽性細胞の稀釈液を添加。インキュベーション。薬剤の濃度ごとに複製 HIV 量を測定。ウイルスの増殖を 50% 阻害するのに必要な薬剤濃度 (IC50) におけるウイルスの感受性を各薬剤について計算。次に、その IC50 を完全な感受性を有する非突然変異の野生型ウイルスの IC50 と比較 (図 5)。ウイルス耐性を野生型ウイルスと比較して IC50 の倍数で表現し Report を作成 (図 4)。

結果

2002 年度の検査数は、フェノタイプ 155 件 (前年比 -13%)、バーチャルフェノタイプ 185 件 (前年比 +53%) で、バーチャルフェノタイプがフェノタイプを上回った (図 6)。そのうち、サブタイプ分布は、B が 83.3%、AE が 14.4%、その他が 2.3% と B が主要であった (図 7)。

フェノタイプとバーチャルフェノタイプを同時に測定した症例 170 例について、相関性を検証した。両者の相関は、全体として良かった (図 10、 $N=170$ 、NRTI; 相関 $y=0.7031x+0.5098$ 、 $R=0.76$ 、NNRTI; $y=1.6765x+0.4611$ 、 $R=0.72$ 、PI; $y=1.181x+0.3733$ 、 $R=0.64$)。症例によっては乖離例も見られた (図 8)。AZT での乖離例には、RT、184V、215F を含む複数の変異を持ち (図 8、9)、データベース解析結果は、データベース中の症例との変異パターン一致症例数は、372 例、耐性 50%、感受性 50% で、その平均値 4.4fold (耐性)。実際のフェノタイプ検査結果は、24fold (耐性) と約 5.5 倍の数値となった。これは、この変異パターンをダイレクトシーケンスで示した 372 例のうち 50% は耐性 (4fold 以上)、

50% は感受性 (4fold 未満) と同じ変異パターンでありながら乖離したフェノタイプ結果が得られたということの意味する。結果解釈する上で、貴重な情報でありさらにデータ蓄積と解析が必要と思われた。また、サブタイプ別に相関を調べたところ、NRTI ではサブタイプ B; $y=1.1677x+0.0859$ 、 $R=0.81$ 、サブタイプ AE; $y=0.6135x+0.6039$ 、 $R=0.71$ と AE で偏りが認められたが PI では認められなかった。AE の症例数が少ないためさらに増やして調査が必要と考えられた (図 11)。

Virco 社では、現在、以下の耐性検査と治療薬剤モニターの統合検査を開発中であり、今後、期待される (<http://www.vircolab.com/web/home.asp>)。

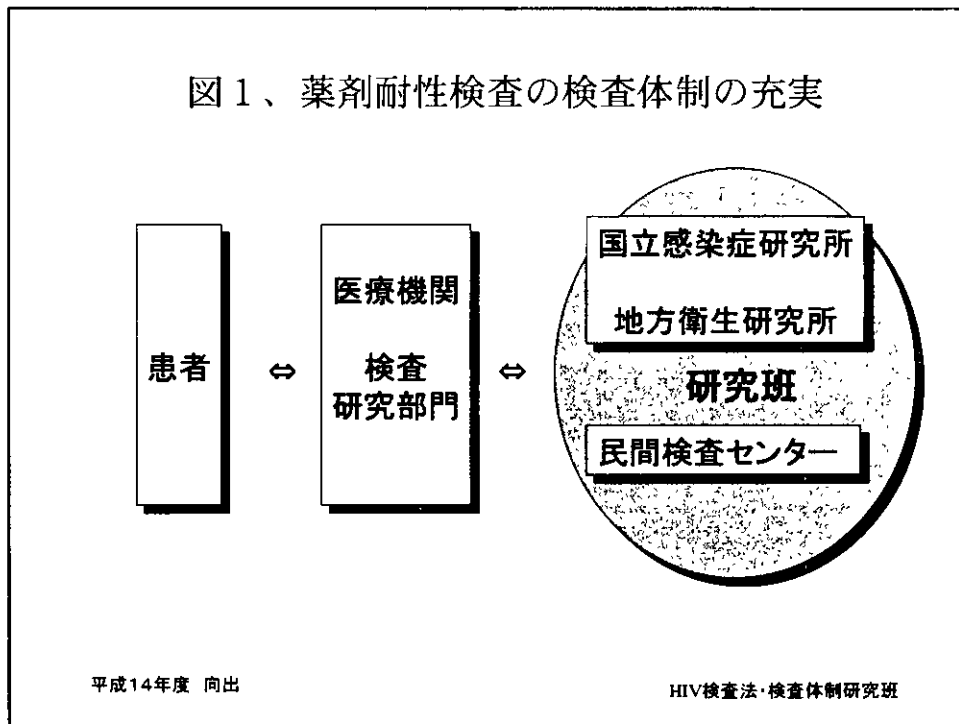
o *VircoPK*: Will calculate trough levels from a blood sample drawn at any time point after drug intake and can be used to determine optimum dosage levels in cases where resistance is not known.

o *Virco IQ*: The only integrated measure of drug resistance and drug concentration level, which can be used to determine optimum dosage levels to overcome resistance for a particular drug.

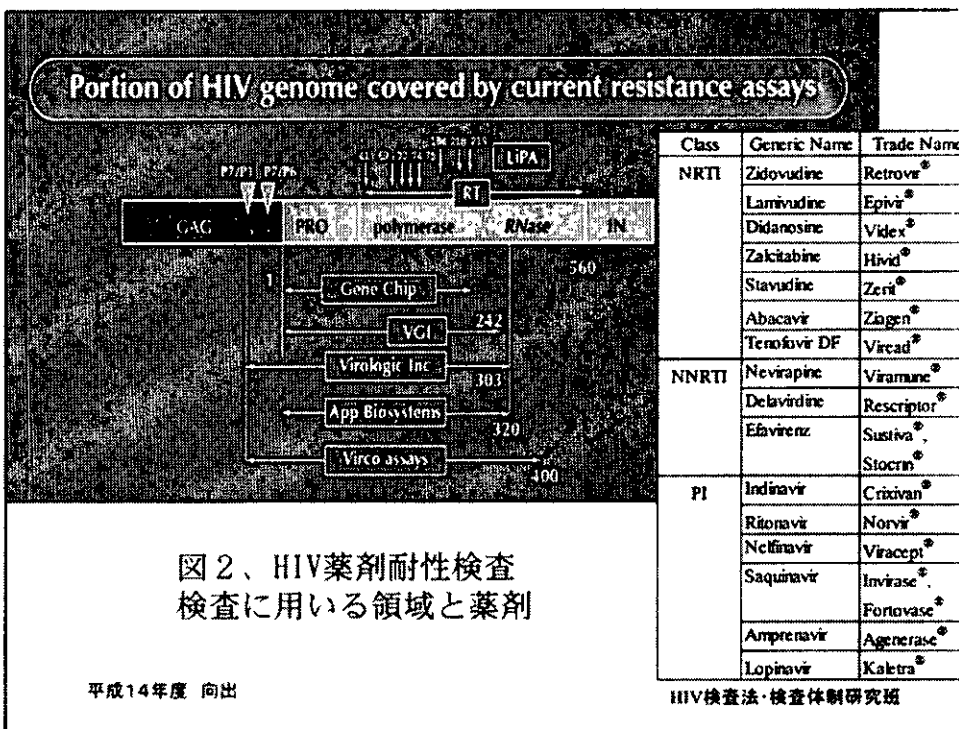
発表

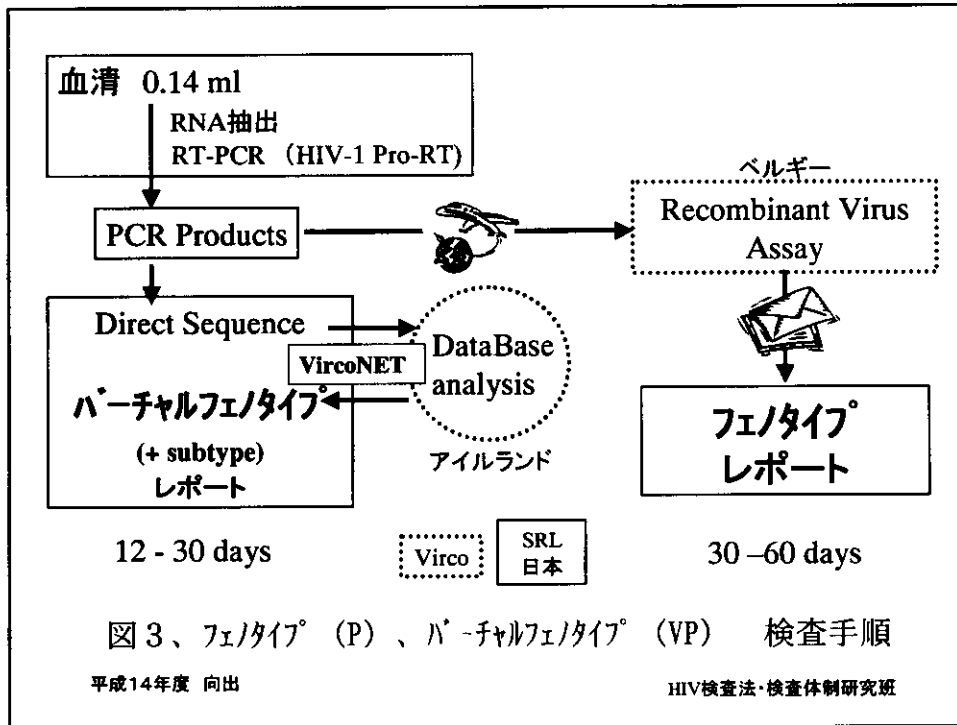
1. 向出雅一、フェノタイプ検査とバーチャルフェノタイプ検査の比較検討と評価、HIV 検査法・検査体制研究班、平成 14 年度班総会、京都、3 月

図1、薬剤耐性検査の検査体制の充実



Portion of HIV genome covered by current resistance assays



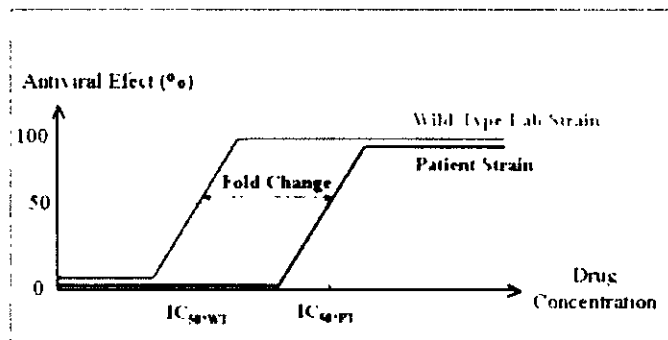


virco

Antivirogram® phenotype

VirtualPhenotype™

平成14年度 向出 HIV検査法・検査体制研究班

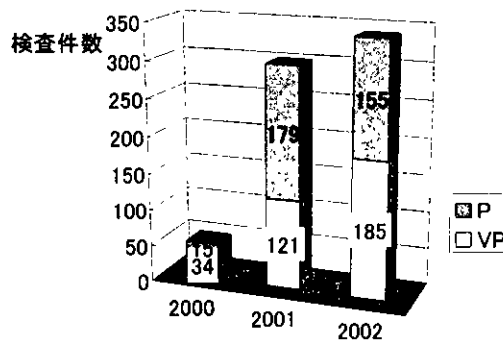


- IC₅₀ = 50% Inhibitory Concentration
- IC_{50-PT} / IC_{50-WT} = Fold change
- Example: IC_{50-PT} 5μM, IC_{50-WT} 0.5μM
=> Fold change = 10

図5、フェノタイプ (Antivirogram®Phenotype)

平成14年度 向出

HIV検査法・検査体制研究班



年度	2000	2001	2002
■ P	15	179	155
□ VP	34	121	185

図6、フェノタイプ(P)、パーシャルフェノタイプ(VP) 検査比率・数の推移

平成14年度 向出

HIV検査法・検査体制研究班