

図9

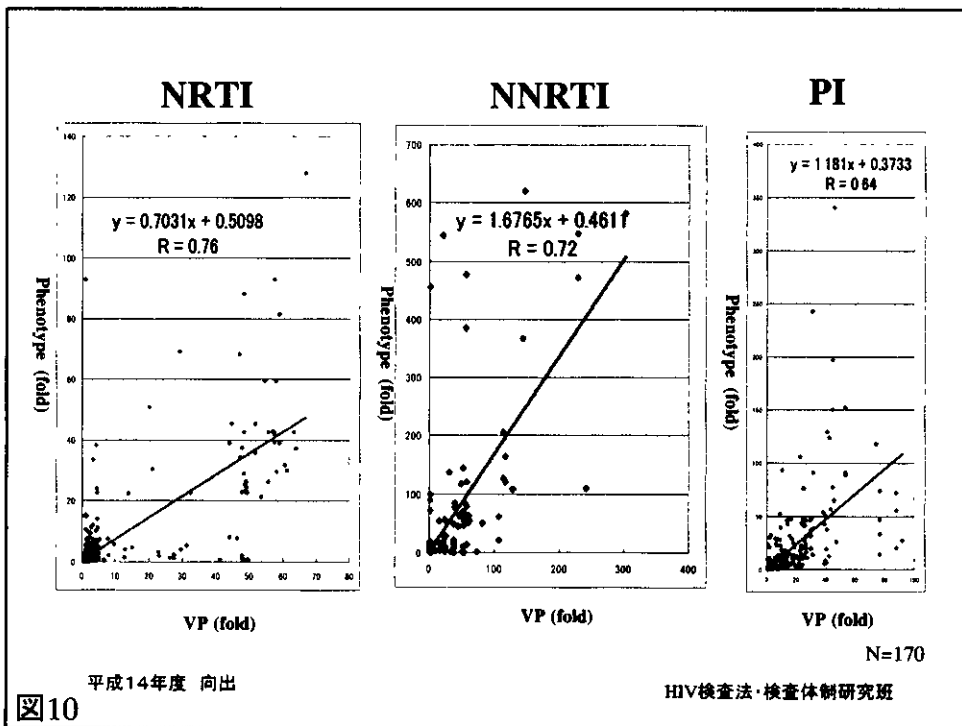


図10

### Subtype 別相關解析結果

B (N=140) AE (N=13)

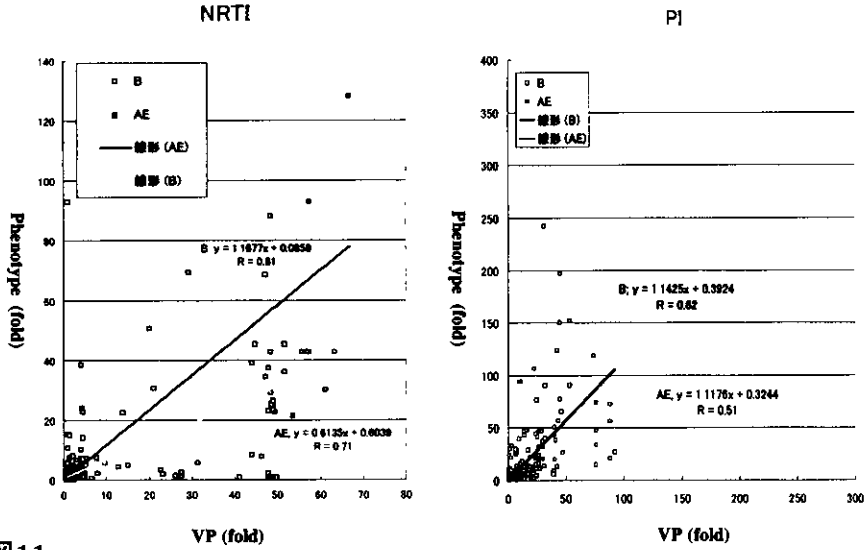


図11

平成14年度 向出

HIV検査法・検査体制研究班

表1、Summary of the key recommendations from the major international organizations.

Clinical Characteristics	IAS-USA recommendation	US Treatment Guidelines Recommendation	EuroGuidelines
Primary HIV infection	Consider testing	Consider testing	Consider testing
Chronic HIV infection	Consider testing	Testing not generally recommended	Consider testing
First Regimen Failure	Recommend testing	Recommended testing (particular regimen failure not specified)	Recommended testing
Multiple Regimen Failure	Recommend testing		Recommend testing
Pregnancy	Recommend testing	Not specified	Recommended testing if mother has detectable virus
Post-exposure Prophylaxis	Not specified	Not specified	Recommend testing
Paediatrics	Not specified	Not specified	Recommend testing in HIV-1 infected children born to mothers with detectable virus while on treatment Consider testing children with virological treatment failure

平成14年度 向出

HIV検査法・検査体制研究班

## 12. 各種薬剤耐性検査法（フェノタイプ）による検査結果と比較

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）、  
蜂谷敦子（国際医療センター）、  
加藤真吾、田中理恵（慶応大学医学部）、  
向出雅一（SRL）、  
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）、  
相楽裕子（横浜市立市民病院）

### 研究概要

HIV 分離株 9 株の培養上清を用いて 4 力所の研究機関（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、12 薬剤（AZT、3TC、d4T、ddI、ddC、ABC、EFV、NVP、IDV、NFV、SQV、RTV）の結果について比較検討した。

4 施設での各分離株の結果は ABC（逆転写酵素阻害剤）を除く 11 薬剤でよく一致しており、その一致率は 90%以上であった。

しかし、ABC では耐性 1 次変異を有する 7 株（NO. 3-9）すべての結果が施設間で異なっており、国際医療センターでは耐性、Virco 社では感受性と判定される傾向が見られた。これら 7 株の Virco 社バーチャルフェノタイプ（ジェノタイプ）の結果はすべて ABC 感受性で、Virco 社フェノタイプ結果を反映していた。しかし、スタンフォード大のデータベース（インターネット上で公開）を利用したジェノタイプ結果では 7 株の内 6 株が ABC 耐性と判定され、用いるデータベースにより結果が異なることがわかった。

AZT 耐性変異の認められた 6 株の内 RT 領域に AZT 耐性変異 T215Y と 3TC 耐性変異 M184V の両変異を有している 3 株（NO. 3、5、6）では AZT に対するフェノタイプ検査結果に違いが認められた。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り、これら変異がフェノタイプ検査結果の違いに影響したものと考えられた。

SQV に対する 4 施設でのフェノタイプ検査結果は 9 株全て一致していた。しかし、Pro 領域に SQV 1 次変異の L90M 変異を有しているにもかかわらず、フェノタイプ検査結果が感受性と判定される株があり、L90M の変異と SQV 耐性との関連については今後も検討が必要と考えられた。

分離株別に見ると、ほとんどの分離株のフェノタイプ検査結果は施設間でよく一致していたが、分離株 NO. 7 においては 12 薬剤中半分の 6 薬剤の結果に違いが見られた。NO. 7 株は AZT、RTV の 2 剤を長期間投与し、血中ウイルス量も低く押さえられている症例からの分離株で、AZT 耐性変異の T215Y、M41L のみを有していた。しかし、施設によっては d4T、ABC、NVP、IDV、NFV、RTV に対して耐性と判定される場合があった。長期間の薬剤投与により血中ウイルス量が低く押さえられている症例においては、従来知られている耐性変異が検出できなくても薬剤存在下では比較的増えやすいクローンがセレクションされている可能性がある。このような株を用いてフェノタイプ検査を行うと、方法によっては耐性と判定されたり感受性と判定されたりする可能性があると考えられた。

## 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。これらの検査結果評価のため、同一の HIV 分離株を用いて、4 力所の研究機関(国際医療センター、慶応大、神奈川衛研、Virco 社)で行わ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。

## B. 研究方法

9 名の HIV 感染者の末梢血単核球 (PBMC) から HIV を分離し、その培養上清を試料とした。これら 9 名の患者の薬剤投与歴を表 1 に、分離株の逆転写酵素 (RT) 領域およびプロテアーゼ (Pro) 領域の薬剤耐性に関するアミノ酸変異を表 2 に示した。これら 9 株 (耐性 1 次変異無し 2 株、1 次変異有り 7 株) の培養上清を用い、4 力所の研究機関 (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いその結果を比較検討した。

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 3 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 細胞を用いて薬剤感受性試験を行い、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。

慶応大と神奈川衛研では HIV-1 標準株としてそれぞれ LAI 株、IIIB 株を用いており、検査結果は標準株の  $IC_{50}$  に対する HIV 分離株の  $IC_{50}$  の比 (fold resistance) で表した。判定は、慶応大では fold resistance が 4 倍未満を感受性 (Sensitive:S)、4 倍以上を耐性、神奈川衛研では 10 倍未満を感受性、10 倍以上を耐性 (Resistance:R) と判定した。

国際医療センターでは未治療症例について各薬剤に対する  $IC_{50}$  を求め、 $IC_{50}$  の平均に 3SD を加えた値を cut-off とし、cut-off 以下を感受性、cut-off 以上を耐性と判定した。

Virco 社では、培養上清中の 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リコンビナントウイルスを作製し、MT4 細胞を使用した培養系でフェノタイプ検査を行っている。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 9 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。

これらの方法を用いて得られた AZT、3TC、d4T、ddI、ddC、ABC、EFV、NVP、IDV、NFV、SQV、RTV の 12 薬剤のフェノタイプ検査結果について比較した。

### (倫理面への配慮)

HIV のウイルス分離および薬剤耐性検査は患者の同意のうえ行った。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

9 つの分離株について 4 力所の施設で行った 12 薬剤 (AZT、3TC、d4T、ddI、ddC、ABC、EFV、NVP、IDV、NFV、SQV、RTV) のフェノタイプ検査結果および一致率を図 1A、1B に、各薬剤に対する検査結果の詳細を図 2-13 に示した。4 施設での各分離株の結果は ABC (逆転写酵素阻害剤) を除く 11 薬剤でよく一致しており、その一致率は 90% 以上であった。

しかし、ABC では耐性 1 次変異を有する 7

株 (NO. 3-9) すべての結果が施設間で異なっており、国際医療センターでは耐性、Virco 社では感受性と判定される傾向が見られた (図 2)。しかし、耐性と判定された場合でも fold resistance 値は低い傾向にあった。

また、Virco 社のバーチャルフェノタイプ (ジェノタイプ) の結果は 7 株すべて ABC 感受性で、Virco 社フェノタイプ結果を反映していた (図 2)。しかし、スタンフォード大のデータベース (インターネット上で公開) を利用したジェノタイプ結果では 7 株の内 6 株は ABC 耐性と判定され、用いるデータベースにより結果が異なることがわかった。

ABC に対する耐性は、AZT 関連変異 (Thymidine Analogue Mutations: M41L, K70R, L210W, T215Y, K219Q) の蓄積や 3TC の耐性変異 M184V に TAMs が重なった場合に見られることが報告されている。これら 7 株はすべて TAMs や M184V の変異を有しているが、ABC に対する検査結果が各施設間で一致せず、ABC の耐性についてはさらにデータの蓄積が必要と考えられる。

AZT では AZT 耐性変異の認められた 6 株の内 RT 領域に AZT 耐性変異 T215Y と 3TC 耐性変異 M184V の両変異を有している 3 株 (NO. 3, 5, 6) のフェノタイプ検査結果に違いが認められた (図 3)。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り、これら変異がフェノタイプ検査結果の違いに影響したものと考えられた。

SQV に対する 4 施設でのフェノタイプ検査結果は 9 株全て一致していた。しかし、SQV の耐性一次変異 L90M (Pro 領域) を持つ 4 株の内 2 株 (NO. 3, 4) はジェノタイプ検査とフェノタイプ検査結果が異なっていた (図 4)。すなわち、NO. 3 株と NO. 4 株のジェノタイプ検査結果は耐性と判定されたが、フェノタイプ検査結果は感受性と判定された。

SQV に対するフェノタイプ検査では 1 次変異 L90M を有していても他のアミノ酸変異と

の組み合わせによっては感受性と判定される場合があると考えられる。L90M 変異と SQV 耐性との関連については今後も検討が必要と考えられた。

分離株別に見ると、ほとんどの分離株のフェノタイプ検査結果は施設間でよく一致していた。しかし、分離株 NO. 7 は 12 薬剤中半分の 6 薬剤の結果に違いが見られた (図 14)。NO. 7 株は RT 領域に AZT 耐性に関与する T215Y、M41L の変異を有しており、4 施設とも AZT に耐性と判定されたが、施設によっては d4T、ABC、NVP の逆転写酵素阻害剤に対しても耐性と判定される場合があった。また、Pro 領域に耐性変異は認められなかったが、1 施設でプロテアーゼ阻害剤 IDV、NFV、RTV に対して耐性と判定された。

NO. 7 は AZT、RTV の 2 剤を約 4 年間投与した患者から得られた分離株で、分離時の血中ウイルス量は 170 コピー/ml であった。このように長期間の薬剤投与により血中ウイルス量が低く押さえられている症例においては、従来知られている耐性変異が検出できなくても薬剤存在下では比較的増えやすいクローンがセレクションされている可能性がある。このような株を用いてフェノタイプ検査を行うと、方法によっては耐性と判定されたり感受性と判定されたりする場合があると考えられた。

#### D. 結語

同一の分離株の培養上清を検査材料として 4 施設で行ったフェノタイプ検査結果を比較した結果、ABC を除く 11 薬剤でよく一致していた。

しかし、ABC では AZT 耐性変異や 3TC 耐性変異などが蓄積された株で各施設でのフェノタイプ検査結果が一致せず、ジェノタイプ検査結果も用いるデータベースによって結果が異なることがわかった。

RT 領域に AZT 耐性変異 T215Y と 3TC 耐性変

異 M184V の両変異を持つ株ではフェノタイプ検査結果が施設間で一致しなかった。

Pro 領域に SQV の 1 次変異の L90M 変異を有しているにもかかわらず、フェノタイプ検査が感受性と判定される株があり、L90M の変異と SQV 耐性との関連についてはさらに検討が必要と考えられた。

分離株 NO.7 の 1 株は 6 薬剤の結果に違いが見られた。NO.7 は AZT、RTV の 2 剤を長期間投与し、血中ウイルス量も低く押さえられている症例からの分離株で、薬剤耐性変異は AZT 耐性変異の T215Y、M41L のみを有していた。しかし、施設によっては d4T、ABC、NVP、IDV、NFV、RTV に対しても耐性と判定される場合があった。長期間の薬剤投与により血中ウイルス量が低く押さえられている症例においては、フェノタイプ検査方法によって耐性と判定されたり感受性と判定されたりする場合があると考えられた。

#### E. 研究発表

##### 学会発表

1. Kondo M, Shima T, Sudo K, Nishizawa M, Iwamuro S, Okabe T, Imai M: Characterization of HIV-1 genome from a patient who is western blot weak positive and HIV genome undetectable by PCR for 18 months. 第 14 回国際エイズ会議、Barcelona、2002 年 7 月 7-12 日。
2. Imai M, Kondo M, Shima T, Yamanaka R: NAT screening and subtype of HIV-1 among blood donors in Japan. 第 14 回国際エイズ会議、Barcelona、2002 年 7 月 7-12 日。
3. 近藤真規子、西澤雅子、嶋貴子、須藤弘二、斎藤隆行、今井光信：HIV-1 感染者から分離された nef/LTR 領域欠損 HIV-1 株の遺伝子解析、第 50 回日本ウイルス学会、北海道、2002 年 10 月 16-18 日。
4. 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、宇宿秀三、野口有三、相楽裕子、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、名古屋、2002 年 11 月 28 日-11 月 30 日。
5. 西澤雅子、近藤真規子、須藤弘二、嶋貴子、斎藤隆行、加藤真吾、田中理恵、岩室紳也、岡部武史、今井光信：nef/LTR 領域欠損 HIV-1 の分離及び分離株の増殖についての解析、第 16 回日本エイズ学会、名古屋、2002 年 11 月 28 日-11 月 30 日。
6. 近藤真規子、西澤雅子、須藤弘二、嶋貴子、斎藤隆行、岩室紳也、岡部武史、今井光信：長期にわたり HIV-1 抗体価が低レベルで推移した感染者における HIV-1nef/LTR 遺伝子の経時的解析、第 16 回日本エイズ学会、名古屋、2002 年 11 月 28 日-11 月 30 日。
7. 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：HIV 薬剤耐性遺伝子変異の不一致例について（その 2）：HIV-RNA（血漿中）と HIV プロウイルス DNA（PBMC 中）との長期不一致例について、第 16 回日本エイズ学会、名古屋、2002 年 11 月 28 日-11 月 30 日。

表1 薬剤投与歴

分離株	採血日	使用薬剤
NO.1	00.6.6	97.7~ AZT,ddC,NFV( 3TC)
NO.2	00.8.7	無し
NO.3	00.6.7	97.7~ AZT,3TC,IDV( ddl)
NO.4	00.7.11	98.4~ d4T,3TC,NFV( AZT,ddC,SQV,NVP,IDV)
NO.5	00.6.7	?
NO.6	01.6.27	98.9~ d4T,3TC,NVP( AZT)
NO.7	00.6.20	96.10~ AZT,RTV
NO.8	00.6.21	99.9~ ddl,d4T,APV,EFV( AZT,3TC,NFV,SQV,RTV)
NO.9	99.12.15	98.12~ d4T,3TC,NFV( ddl,IDV,AZT)

表2 各分離株の薬剤耐性変異

分離株	RT領域耐性変異	Pro領域耐性変異
NO.1	無し	K20I, M36I
NO.2	無し	M36I
NO.3	M41L, M184V, T215Y	V32I,M46I,I47V, L63P, A71V, V77I, V82A, L90M
NO.4	M41L,E44D,D67N,T69AD, A98G,M184V,T215F	L10V,K20T,M36I,M46IM,L63P,T74S, N88NS,L90M,I93L
NO.5	M41L, M184V, L210W, T215Y	D30N, L63P, A71V, V77I, N88D
NO.6	A98S, K103N, M184V, T215Y	L63P, V77I, I93L
NO.7	M41L, T215Y	無し
NO.8	D67N, K70R, Y188L, T215Y	L10I, L63P, G73S, I84V, L90M
NO.9	M184V	L10I, I54V, L63P, A71I, G73S, V82A, L90M



表3 フェノタイプ検査法の比較

検査機関	国際医療センター	慶応大	神奈川衛研	Virco社
方法	MAGIC5法	PBMC法	PBMC/MAGIC5法	リコンビナント法
判定	未治療症例のIC <sub>50</sub> からcut-off算出 cut-off IC <sub>50</sub> 平均+3SD  感受性:<cut-off 耐性:≥cut-off	LA1株のIC <sub>50</sub> に対する倍数(fold)  感受性:<4 fold 耐性:≥4 fold	III B株のIC <sub>50</sub> に対する倍数(fold)  感受性:<10 fold 耐性:≥10 fold	未治療症例、耐性変異のない株のIC <sub>50</sub> からcut-off算出  感受性:<cut-off 耐性:≥cut-off

図1A 薬剤耐性フェノタイプ検査結果の比較

(逆転写酵素阻害剤)

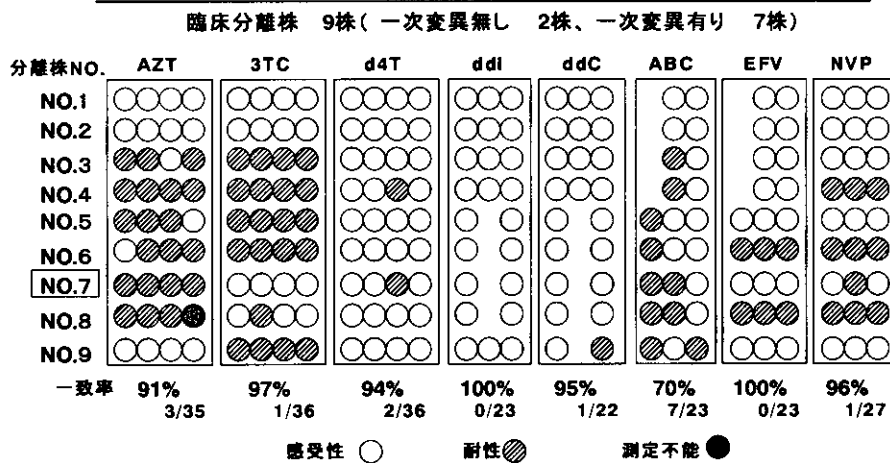


図1B 薬剤耐性フェノタイプ検査結果の比較  
(プロテアーゼ阻害剤)

臨床分離株 9株 (一次変異無し 2株、一次変異有り 7株)

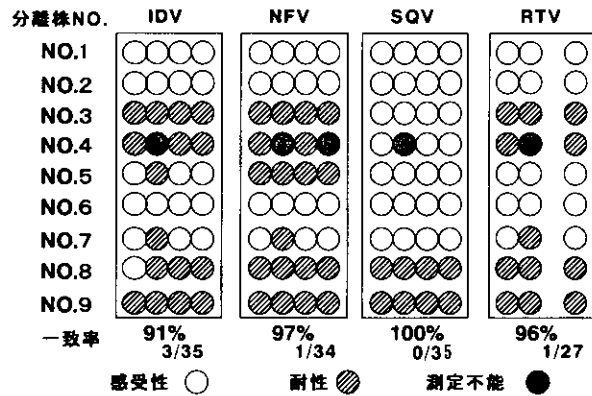


図2 アバカビル(ABC)に対する薬剤耐性検査結果と耐性変異

フェノタイプ検査				RT領域の薬剤耐性変異
国際医療 センター	慶応大	Virco	Virco VP*	(ABC耐性一次変異: ?)
	0.8	0.3	0.7	
	0.6	0.9	0.7	
☆	5.4	2.6	2.8	M41L, M184V, T215Y
☆	10	2.6	?	M41L, E44D, D67N, T69AD, A98G, M184V, T215F
☆	13	3.2	3.5	M41L, M184V, L210W, T215Y
☆	9.4	2.6	2.4	A98S, K103N, M184V, T215Y
☆	8.8	6.1	<0.2	M41L, T215Y
☆	7.6	4.5	1.3	D67N, K70R, Y188L, T215Y
☆	15	0.8	3.9	M184V

感受性 □      耐性 ■      判定不能 ■      ☆ 不一致例  
\*Virco社バーチャルフェノタイプ(ジェノタイプ)

図3 AZTに対する薬剤耐性検査結果と耐性変異

フェノタイプ検査					RT領域の薬剤耐性変異 (AZT耐性一次変異: T215Y)
神奈川 衛研	国際医療 センター	慶応大	Virco	Virco VP†	
1.5	0.3	1.9	1.3	1.1	
1.6	0.8	2.7	0.7	1.1	
☆ 11	4.8	3.6	21	4.8	M41L, M184V, T215Y
☆ 17	12	110	4.3	13	M41L, E44D, D67N, T69AD, A98G, M184V, T215F
☆ 38	15	6.4	2.2	12	M41L, M184V, L210W, T215Y
☆ 3.3	8.3	5.9	6.3	2.2	A98S, K103N, M184V, T215Y
71	35	38	4.4	9.7	M41L, T215Y
49	>200	45		24	D67N, K70R, Y188L, T215Y
0.9	0.4	1.0	1.0	0.9	M184V

感受性  耐性  測定不能  ☆ 不一致例

\*Virco社バーチャルフェノタイプ(ジェノタイプ)

図4 SQVに対する薬剤耐性検査結果と耐性変異

フェノタイプ検査					Pro領域の薬剤耐性変異 (SQV耐性一次変異: G48V, L90M)
神奈川 衛研	国際医療 センター	慶応大	Virco	Virco VP†	
1.2	0.9	0.5	0.6	0.6	K20I, M36I
1.0	0.9	0.3	0.3	0.6	M36I
3.2	3.4	3.0	0.9	5.4	V32I, M46I, I47V, L63P, A71V, V77I, V82A, L90M
5.9		2.6	1.6	4.0	L10V, K20T, M36I, M46I, L63P, T74S, N88NS, L90M, I93L
5.3	1.5	1.4	1.0	1.2	D30N, L63P, A71V, V77I, N88D
5.6	0.9	0.5	0.4	0.6	L63P, V77I, I93L
0.3	2.0	1.5	0.3	0.6	
29	7.9	30	9.7	18	L10I, L63P, G73S, I84V, L90M
>95	76	21	14	7.8	L10I, I54V, L63P, A71I, G73S, V82A, L90M

感受性  耐性  測定不能  ☆ 不一致例

\*Virco社バーチャルフェノタイプ(ジェノタイプ)

図5 3TCに対する薬剤耐性検査結果と耐性変異

フェノタイプ検査					RT領域の薬剤耐性変異 (3TC耐性一次変異: M184V)
神奈川 衛研	国際医療 センター	慶応大	Virco	Virco VP*	
2.4	0.2	0.7	0.3	0.9	
0.6	0.6	1.3	0.5	0.9	
>850	>100	260	30	58	M41L, M184V, T215Y
340	>100	>7.7	30	55	M41L, E44D, D67N, T69AD, A98G, M184V, T215F
>980	>151	>7.7	>19	51	M41L, M184V, L210W, T215Y
>987	>151	290	>37	48	A98S, K103N, M184V, T215Y
1.8	5.8	3.4	0.7	1.8	M41L, T215Y
☆ 6.2	24	3.3	2.0	2.9	D67N, K70R, Y188L, T215Y
>562	>151	52	>23	48	M184V

感受性  耐性  ☆ 不一致例  
\*Virco社バーチャルフェノタイプ(ジェノタイプ)

図6 d4Tに対する薬剤耐性検査結果と耐性変異

フェノタイプ検査					RT領域の薬剤耐性変異 (d4T耐性一次変異: V75T)
神奈川 衛研	国際医療 センター	慶応大	Virco	Virco VP*	
1.2	1.0	1.3	0.9	0.9	
3.2	2.5	0.1	0.7	0.9	
0.6	2.4	2.3	1.6	1.1	M41L, M184V, T215Y
☆ 7.3	4.3	4.8	0.8	0.8	M41L, E44D, D67N, T69AD, A98G, M184V, T215F
1.8	1.6	1.2	1.5	1.5	M41L, M184V, L210W, T215Y
4.7	1.4	2.5	0.4	0.9	A98S, K103N, M184V, T215Y
☆ <0.1	0.8	39	1.4	1.2	M41L, T215Y
2.6	1.1	2.5	0.8	1.5	D67N, K70R, Y188L, T215Y
1.0	0.3	0.8	1.1	0.7	M184V

感受性  耐性  ☆ 不一致例  
\*Virco社バーチャルフェノタイプ(ジェノタイプ)

図7 ddlに対する薬剤耐性検査結果と耐性変異

フェノタイプ検査				RT領域の薬剤耐性変異 (ddl耐性一次変異: L74V)
神奈川 衛研	国際医療 センター	Virco	Virco VP*	
0.6	0.8	0.8	0.8	
1.2	0.9	0.9	0.8	
2.3	1.8	2.3	1.5	M41L, M184V, T215Y
0.9	2.9	1.2	判定不能	M41L, E44D, D67N, T69AD, A98G, M184V, T215F
4.6		3.0	1.7	M41L, M184V, L210W, T215Y
2.8		0.9	1.5	A98S, K103N, M184V, T215Y
3.1		0.2	1.0	M41L, T215Y
0.8		0.4	1.1	D67N, K70R, Y188L, T215Y
☆ 0.1		4.6	1.3	M184V

感受性  耐性  判定不能  ☆ 不一致例  
\*Virco社バーチャルフェノタイプ(ジェノタイプ)

図8 ddCに対する薬剤耐性検査結果と耐性変異

フェノタイプ検査				RT領域の薬剤耐性変異 (ddC耐性一次変異: ?)
神奈川 衛研	国際医療 センター	Virco	Virco VP*	
0.5	1.2	1.6	0.9	
1.1	0.9	1.5	0.9	
2.6	1.6	1.6	1.8	M41L, M184V, T215Y
1.4	1.3	3.4	判定不能	M41L, E44D, D67N, T69AD, A98G, M184V, T215F
2.5		1.9	1.9	M41L, M184V, L210W, T215Y
1.9		2.1	1.8	A98S, K103N, M184V, T215Y
2.0		0.5	1.0	M41L, T215Y
2.6		0.4	1.0	D67N, K70R, Y188L, T215Y
0.2		1.5	1.6	M184V

感受性  耐性  判定不能   
\*Virco社バーチャルフェノタイプ(ジェノタイプ)

図9 EFVに対する薬剤耐性検査結果と耐性変異

フェノタイプ検査				RT領域の薬剤耐性変異 (EFV耐性一次変異: ?)
国際医療 センター	慶応大	Virco	Virco VP†	
	1.4	0.7	1.3	
	1.2	1.8	1.1	
	0.9	0.7	1.1	M41L, M184V, T215Y
	3.0	3.3	1.3	M41L, E44D, D67N, T69AD, A98G, M184V, T215F
1.5	1.6	0.3	1.1	M41L, M184V, L210W, T215Y
353	400	385	57	A98S, K103N, M184V, T215Y
1.0	1.3	1.0	1.1	M41L, T215Y
106	110	61	107	D67N, K70R, Y188L, T215Y
0.9	0.3	0.7	1.1	M184V

感受性  耐性

\*Virco社バーチャルフェノタイプ(ジェノタイプ)

図10 NVPに対する薬剤耐性検査結果と耐性変異

フェノタイプ検査				RT領域の薬剤耐性変異 (NVP耐性一次変異: ?)
国際医療 センター	慶応大	Virco	Virco VP†	
0.6	0.4	0.7	1.3	
0.7	0.7	1.3	1.1	
0.4	1.0	3.6	1.4	M41L, M184V, T215Y
7.9	18	39	3.6	M41L, E44D, D67N, T69AD, A98G, M184V, T215F
0.6	1.6	4.0	1.4	M41L, M184V, L210W, T215Y
>59	3100	>46	46	A98S, K103N, M184V, T215Y
☆ 0.9	4.6	1.0	1.4	M41L, T215Y
59	>5300	55	62	D67N, K70R, Y188L, T215Y
1.7	0.3	0.7	1.4	M184V

感受性  耐性  ☆ 不一致例

\*Virco社バーチャルフェノタイプ(ジェノタイプ)

図 1 1 IDVに対する薬剤耐性検査結果と耐性変異

フェノタイプ検査					Pro領域の薬剤耐性変異 ( ID V 耐性一次変異: M461L,V82AFT)
神奈川 衛研	国際医療 センター	慶応大	Virco	Virco VP+	
1.0	0.2	1.5	1.2	0.7	K20I, M36I
0.3	0.5	0.5	0.6	0.7	M36I
48	16	63	7.9	18	V32I,M46I,I47V, L63P, A71V, V77I, V82A, L90M
15	16	19	6.3	7.4	L10V,K20T,M36I,M46IM,L63P,T74S,N88NS,L90M,I93L
☆ 5.6	13	2.2	0.4	1.4	D30N, L63P, A71V, V77I, N88D
2.5	3.0	0.8	0.8	0.7	L63P, V77I, I93L
☆ 1.5	30	2.0	0.5	0.7	
☆ 6.0	144	13	4.2	10	L10I, L63P, G73S, I84V, L90M
>530	244	56	46	14	L10I, I54V, L63P, A71I, G73S, V82A, L90M

感受性  耐性  測定不能  ☆ 不一致例  
 \*Virco社バーチャルフェノタイプ(ジェノタイプ)

図 1 2 NFVに対する薬剤耐性検査結果と耐性変異

フェノタイプ検査					Pro領域の薬剤耐性変異 ( NFV耐性一次変異: D30N, L90M)
神奈川 衛研	国際医療 センター	慶応大	Virco	Virco VP+	
2.3	0.8	1.8	0.3	0.9	K20I, M36I
4.0	2.0	1.0	0.4	0.9	M36I
48	21	44	6.9	34	V32I,M46I,I47V, L63P, A71V, V77I, V82A, L90M
160	21	220	6.9	19	L10V,K20T,M36I,M46IM,L63P,T74S,N88NS,L90M,I93L
157	34	120	7.5	38	D30N, L63P, A71V, V77I, N88D
3.9	1.8	3.5	1.8	1.0	L63P, V77I, I93L
☆ 2.0	7.5	2.5	0.4	0.9	
23	31	58	10	18	L10I, L63P, G73S, I84V, L90M
19	34	99	>41	25	L10I, I54V, L63P, A71I, G73S, V82A, L90M

感受性  耐性  測定不能  ☆ 不一致例  
 \*Virco社バーチャルフェノタイプ(ジェノタイプ)

図 1 3 RTVに対する薬剤耐性検査結果と耐性変異

フェノタイプ検査				Pro領域の薬剤耐性変異 (RTV耐性一次変異: V82AFT)
神奈川 衛研	国際医療 センター	Virco	Virco VP*	
1.0	2.6	0.6	0.8	K20I, M36I
0.9	1.2	0.7	0.7	M36I
>200	170	107	65	V32I, M46I, I47V, L63P, A71V, V77I, V82A, L90M
12	14	14	9.3	L10V, K20T, M36I, M46I, L63P, T74S, N88NS, L90M, I93L
6.0	1.5	0.6	1.2	D30N, L63P, A71V, V77I, N88D
5.8	2.6	0.4	0.8	L63P, V77I, I93L
☆ 0.6	14	0.4	0.7	
16	5.0	12	17	L10I, L63P, G73S, I84V, L90M
>330	55	120	74	L10I, I54V, L63P, A71I, G73S, V82A, L90M

感受性     耐性     測定不能     ☆ 不一致  
 \*Virco社バーチャルフェノタイプ(ジェノタイプ)

図 1 4 NO.7株の耐性変異と薬剤耐性検査結果の比較

分離株 培養上清	耐性検査 検討機関	NRTI								PRI			
		AZT	3TC	d4T	ddI	ddC	ABC	EFV	NVP	IDV	NPV	SQV	RTV
NO.7 96.10 <sup>-</sup> AZT+RTV 1703 <sup>+</sup> / ml	神奈川衛研	71	1.8	<0.1	3.1	2.0	ND	ND	ND	1.5	2.0	0.3	0.6
	国際医療センター	35.4	5.8	0.83	ND	ND	8.8	1.0	0.9	30	7.5	2.0	14
	慶応大学	38	3.4	39	ND	ND	6.1	1.3	4.6	2.0	2.5	1.5	ND
	Virco(P)	4.4	0.7	1.4	0.2	0.5	<0.2	1.0	1.0	0.5	0.4	0.3	0.4
	Virco(VP)	9.7	1.8	1.2	1.0	1.0	1.2	1.1	1.4	0.7	0.9	0.6	0.7

感受性     耐性

NO.7 株	RT領域耐性変異	Pro領域耐性変異
	M41L, T215Y	無し



## 13. HAART 治療中の HIV-1 感染者に検出された

### リバウンドウイルスの遺伝子解析

分担研究者 大竹 徹（大阪府立公衆衛生研究所病理課）

研究協力者 森 治代、小島洋子、川畑拓也（同上）

#### 研究概要

薬剤耐性 HIV-1 の出現様式を明らかにするため、多剤併用療法（HAART）中に出現したリバウンドウイルスについて pol 遺伝子のプロテアーゼ-RT 領域および env 遺伝子の V1-V3 領域の塩基配列を解析した。その結果、V1-V3 領域におけるアミノ酸の特徴より、HAART 開始以前のプロウイルス集団にごく少数存在していた SI タイプのウイルスが薬剤耐性変異を獲得し、リバウンドウイルスとして増殖を始めた可能性が示唆された。

#### 目的

多剤併用療法（HAART）の普及により、多くの HIV-1 感染者において長期間にわたりウイルスの増殖をコントロールすることが可能となった。しかしその一方で、期待する効果が得られない例も少なからず認められ、その主たる原因は薬剤耐性ウイルスの出現である。

今回、薬剤耐性変異出現時のウイルスの性質との関連を明らかにするため、治療中の HIV-1 感染者において出現したリバウンドウイルスの遺伝子的特徴を解析した。

#### 方法

HAART により血漿中のウイルス量が一旦検出限界以下にまで減少したものの治療中にウイルス量の再上昇が認められた HIV-1 感染者について、HAART 開始以前およびウイルスリバウンド時における血漿および末梢血単核球（PBMC）からウイルス RNA およびプロウイルス DNA を抽出し、プロテアーゼ-RT 領域および env V1-V3 領域を nested-PCR 法により増幅した。増幅産物を TA クローニングし、各クローンについてシーケンスによる解析を行っ

た。

#### 結果

HAART 施行により血漿中のウイルス量は検出限界以下（<400 あるいは<50 copies/mL）に減少したが、治療 34 週目にウイルス量の再上昇が観察された（Figure 1）。

ウイルスリバウンド時における PBMC 中のプロウイルス DNA（34-cell）からは、この感染者がもともと持っていたと思われるプロテアーゼ領域の L10I 以外に耐性変異は検出されなかったが、血漿中のリバウンドウイルス（34-pl）から得られた 7 クローンすべてにおいて、服用中の治療薬（d4T+ddI+Nelfinavir）に対する 3?6 個の一次および二次耐性変異が検出された（Table 1）。そこで、耐性変異を獲得したウイルスの遺伝子的特徴を調べるため、HAART 開始以前のプロウイルス（1c）と治療 34 週目のリバウンドウイルス（34pl）について env V1-V3 領域のアミノ酸配列を比較した。Figure 2 に示すように、リバウンドウイルスは V3 ループ内の 25 番目が酸性アミノ酸（Asp または Glu）から塩基性アミノ酸（Lys）

へと置換しており、net charge も+6 と高値を示すことから、SI (Syncytium-inducing) 能を有することが示唆された。さらに、VI ループにおける4アミノ酸の欠失およびV2ループの6番目アミノ酸のThr→Aspへの置換が認められ、それらによりN型糖鎖結合部位が失われてウイルスのコレセプター使用に影響を及ぼしている可能性が示された。興味深いことに、HAART 開始以前のプロウイルス 10 クローン中1クローン (1c-5) においてV1V2 およびV3 部位にリバウンドウイルスと同様の遺伝子的特徴が見られ、このSI タイプのクローンからリバウンドウイルスが誘導されたのではないかと考えられた。以上の結果から、多様なプロウイルス集団にSIウイルスとNSIウイルスが混在する場合、耐性変異は増殖力の早いSIウイルスにより出現しやすいことが示唆された。

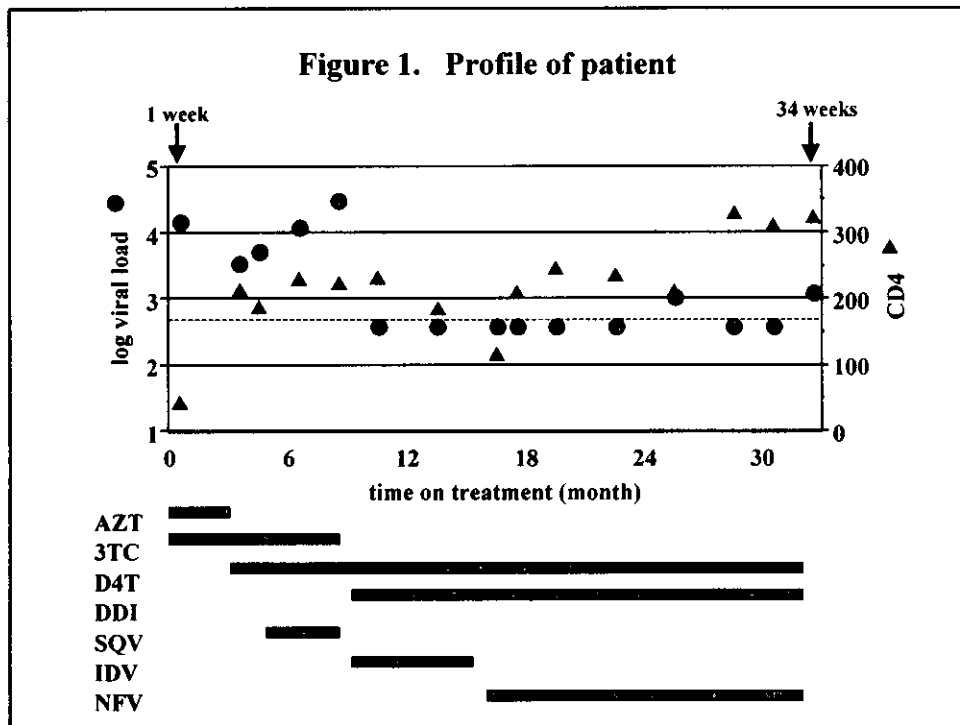
治療前のプロウイルスDNAにおけるV3領域のアミノ酸配列およびV1V2領域に見られるN型糖鎖結合部位のパターンはSIウイルスの存在を示す指標となり、治療開始後に耐性変異を獲得しやすいかどうかを予測するマーカーとなるかもしれない。

#### 発表論文

1. 森 治代、小島洋子、川畑拓也、大竹 徹、大石 功、未治療HIV-1感染者から検出された薬剤耐性関連変異、平成13年度感染症流行予測調査結果報告書(第37報)、3-5、2002

#### 学会発表

1. Mori H., Y. Kojima, T. Kawahara, T. Otake and I. Oishi, Characterization of rebound virus emerged in human immunodeficiency virus type 1 infected patient during highly active antiretroviral therapy, XIV International AIDS Conference, Barcelona, 2002
2. 森 治代、小島洋子、川畑拓也、大竹 徹、巽 正志、HIV感染者におけるウイルス phenotype の量的変動、第50回日本ウイルス学会、札幌、2002
3. 森 治代、小島洋子、川畑拓也、大竹 徹、巽 正志、コレセプター阻害剤を利用したHIV-1 phenotype の測定、第13回抗ウイルス化学療法研究会、千葉、2003



**Table 1. Resistant-mutations emerged in plasma rebound virus**

Sample	Protease	RT	No. of clone
1-cell	10L/I	-	ds
1-plasma	10L/I	-	ds
34-cell	10L/I	-	ds
34-plasma	10I, 30N	70R	1 / 7
	10I, 30N	67N, 70R	1 / 7
	10I, 30N, 77I	70R	2 / 7
	10I, 30N, 46I, 77I	70R	1 / 7
	10I, 30N, 46I, 77I	67N, 70R	1 / 7
	10I, 30N, 46I, 88D	wt	1 / 7

ds : direct sequence    wt : wild type

**Figure 2. Deduced amino acid sequences of V1,V2 and V3 loop from pre-HAART provirus and rebound virus**

Sample-clone#	V1 loop		V2 loop	
	1	20	1	20
1c-1	CTNLKNN	TSNNTSSNGEGEMKNC	SPNITTRIGK	KVQKEYAFFYKSDIVPIEKQNASYMLRYC
1c-2	T		R	
1c-3	K	H.N.I.V	K	L
1c-4	W	I	K	A
1c-5		N.K	D.S	H.VL.N.M.NE.L
1c-6	W	I	K	
1c-7	K	H.N.I.V	K	L
1c-8	K	H.N.K	D.S	H.VL.N.M.NE.L
1c-9				
1c-10	DW		R	
34pl-1		N.G	D.S	H.VL.N.M.NE.T.L
34pl-2		N	D.S	H.VL.N.M.NE.T.L
34pl-3		N	D.S	H.VL.N.M.NE.T.L
34pl-4		N	D.S	H.VL.N.M.NE.T.L
34pl-5		N.R	D.S	H.VL.N.M.NE.T.L
34pl-6		N	D.S	H.VL.N.M.NE.T.L
34pl-7		N	D.S	H.VL.N.M.NE.T.L

**Figure 2. - cont.**

Sample-clone#	V3 loop		Net charge		
	1	30	V1	V2	V3
1c-1	CTRPNNNTRKSIQLGMGR	AWYATGDIIGDIRQAYC	-2	5	3
1c-2		HI.V.L.E	-1	5	4
1c-3			-1	3	3
1c-4		T.E	-1	4	3
1c-5	Y.T	R.L.P.T.EK.N	2	-1	6
1c-6		E	-1	4	3
1c-7			-1	3	3
1c-8			1	-1	3
1c-9	I.S	HI.V.L.T.E.N	-1	5	6
1c-10		I	-1	5	3
34pl-1	Y.T	R.P.T.EK.N	0	-1	6
34pl-2	Y.T	R.P.T.EK.N	1	-1	6
34pl-3	Y.T	R.P.T.EE.N	0	-1	4
34pl-4	Y.T	R.P.T.EK.N	0	-1	6
34pl-5	Y.T	R.P.T.EK.N	1	-1	6
34pl-6	Y.T	R.P.T.EKL.N	0	-1	6
34pl-7	Y.T	R.P.T.EK.N	0	-1	6