

20030573

厚生労働科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

計算機を活用したH I Vの薬剤耐性評価

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 星野 忠次

平成16（2004）年 3月

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
「計算機を活用したH I Vの薬剤耐性評価」
平成15年度 総括・分担研究報告書

目 次

I. 総括研究報告	
計算機を活用したH I Vの薬剤耐性評価	----- 1
星野忠次	
II. 分担研究報告	
1. 薬剤耐性評価のための計算遂行	----- 5
畑 晶之	
2. 薬剤耐性解析技術の臨床評価	----- 8
佐藤 武幸	
3. 耐性モニタリング技術としての計算解析法の評価	----- 10
杉浦 互	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 14
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 16

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
総括研究報告書

計算機を活用したHIVの薬剤耐性評価

主任研究者 星野忠次（千葉大学大学院薬学研究部 助教授）

研究要旨 HIV 感染患者の抗エイズ薬に対する薬剤耐性を、計算機を利用して評価するための技術開発を行った。耐性評価プログラムの開発を星野(千葉大学薬学研究部)が行い、実際の計算解析を畑(千葉大学薬学研究部)が遂行した。計算結果と既存の実験的検査結果との照合を杉浦(国立感染症研究所エイズ研究センター)が担当し、臨床データとの比較を佐藤(千葉大学医学部附属病院)が行った。研究初年度であり、薬剤耐性評価の計算解析システムの構築が中心であったが、薬剤-酵素間の親和性に関して従来の計算方法では評価が困難であった微少な違いを、再現性良く求める手法を開拓した。この方法により、既存の実験データとの整合性も見られるようになった。実験データとの比較を進め、検証例を増やすことが今後の課題である。

分担研究者

畑 晶之（千葉大学大学院薬学研究部 助手）
佐藤武幸（千葉大学医学部附属病院 感染症管理
治療部長、助教授）
杉浦 互（国立感染症研究所、エイズ研究センター
第2研究グループ長）

協力研究者

横幕能行（千葉大学医学部附属病院 助手）
布施 晃（国立感染症研究所 血液・安全性研究
部長）

A. 研究目的

抗 HIV 薬は長期にわたる投与を余儀なくされるため、ウイルスが薬剤抵抗性を獲得し、耐性ウイルスが発生してしまうことが、深刻な問題となっている。そこで HIV 感染患者に薬を投与する前に、予め薬剤耐性検査を行うことが、抗 HIV 療法をより充実させるために重要となってきている。これに対応して、HIV のジェノタイプとフェノタイプを迅速に決める検査技術が開発され、抗 HIV 療法の一環として、耐性検査を行うことが現実のものとなっている。

本研究では、ジェノタイプ検査やフェノタイプ検査に並ぶ新しい薬剤耐性検査法として、「コンピュータショナル検査」を提案している。本研究班は、この技術の実現に向け、計算手法の開拓を中心に研究開発を推進している。本研究の目標は、

計算機を駆使した理論化学的方法により、国内で認可されている全ての抗 HIV 薬のうち、個々の患者にとって最も適した薬剤を選択できる技術を確立することである。

B. 研究方法

患者ごとに異なるウイルスの構造変異を計算機内で再現し、抗エイズ薬への抵抗性を算出する。方法論の開拓ならびに実験的知見との整合性確認という2つの観点から、以下に示す項目について研究が進められた。特に本研究では、計算機で評価された検査結果に、高い信頼性があるか、十分に新規の医療技術として臨床に応用できるものかを確認することが、最大のポイントである。そこで、従来のジェノタイプ検査やフェノタイプ検査と照らし合わせて、計算機で算出した値が、それら従来の方法と整合性があるかを詳細に調べている。

ソフトウェア開発（方法論の開拓）

- ・ 計算評価法改良と計算機プログラムの作成
- ・ 計算の迅速化に向けた取り組み

既存データとの比較（整合性確認）

- ・ ジェノタイプあるいはフェノタイプ検査が既知のデータを照合例として選出
- ・ 選出されたデータの変異情報から、この検体例に固有の酵素を計算機内で仮想的に作成し、薬剤-変異酵素結合構造を構築

- ・薬剤と酵素の結合力算出と薬剤抵抗性の評価
- ・計算機算出値と実験データとの比較
臨床データとの比較（整合性確認）
- ・患者からのサンプル採取とウィルス量の測定
- ・国立感染症研究所エイズ研究センターでのサンプルのジェノタイプとフェノタイプ検査
- ・変異情報から患者固有の酵素を構築し、薬剤-変異酵素結合体構造を作成して、薬剤と酵素との結合親和性から薬剤抵抗性を評価
- ・HIV 感染者への治療の中での、ジェノタイプおよびフェノタイプ検査ならびに計算評価結果の情報を比較検討
(倫理面への配慮)

患者からの試料採取は、千葉大学大学院医学研究院倫理審査委員会での審議を経て行い、提供者に菌株が実験に利用される旨の説明をして同意を得る。分担研究者(佐藤)以外は、個人識別情報は全く参照できない。コンピュータシオナル検査の実施においては、主任研究者らは全く患者とは接点を持たない。

C. 研究結果

ソフトウェア開発

薬剤と酵素の間のクーロン力(電氣的力)とファンデルワールスカ(分子間力)を抽出し、これを計算中、常にモニターして薬剤と酵素が馴染んだ状態にあるか否かの判断に利用できるようにした。また、この値を結合親和性評価において親水性相互作用エネルギーとして採用した。

薬剤側の電荷を持たない官能基と酵素側の中性残基から構成される疎水部との接触面積を算出し、これに経験値(定数)を掛けて、疎水相互作用の効果をエネルギー的に評価するプログラムを作成した。

シミュレーション中の薬剤と酵素の相互作用エネルギーの変動を測り、その変動周期を利用して親和性評価を行う方法を開拓した。

当初、一つの薬剤のシミュレーションには3週間程必要であったが、一つの薬剤の計算結果を他の薬剤での計算に再利用する方法を開発し、計算精度を落とさずに計算時間を従来の3分の1程度に抑えることができた。

既存データとの比較

分担研究者(杉浦)は、プロテアーゼ阻害剤 Nelfinavir に耐性を持つ変異体を系統的に解析している。これに対応して、臨床で頻繁に見られ実験的解析の進んでいる変異体(D30N,L90M,N88D,N88S,D30N/N88D,D30N/N88D/L90M,D30N/L90M)7種と Wild タイプ(cladeB NL4-3)について、阻害剤として Nelfinavir が結合した構造を作成し、計算的解析を行った。Wild タイプでは薬剤が酵素の活性残基とバランス良く水素結合をとる。一方、D30Nでは、30番目のアミノ酸残基と薬剤間の水素結合が消失するため、薬剤の方位がずれる。L90Mでは、D30Nと薬剤の結合は保たれるものの、フラップ領域が活性残基側に近づき反応ポケットが扁平になるなどの知見が得られた。幾つかの方法でエネルギー評価を試みたが、独自の開発プログラムの一つでは、変異体は Wild タイプに比べ全て結合エネルギーが低下した。各種変異体間のエネルギー低下度の比は、実験的に測定された(EC₅₀)薬剤感受性の比と一致した。数値の絶対値に意味があるかどうかは検討の余地があるが、序列の上では、実験結果との整合性が確認できた。

分担研究者(杉浦)の蓄積している解析データの中より、検査会社(Virco)によりフェノタイプ検査の行われた36検体について、主任研究者(星野)は分担研究者(畑)と共に計算機解析を始めた。最初の4検体について、実験データとの整合性調査を行ったが、当初、従来からの計算方法を適用した時には、十分に満足な結果は得られなかった。例えば、実験データでは、全ての薬剤に感受性の低下があり、特に Ritonavir には強い抵抗性を示す変異体が存在するが、この変異体に関する計算では、Ritonavir に加えて Indinavir も強い抵抗性を持つと算出された。整合性が得られなかった原因は、多量の薬剤計算機評価を遂行するために機械的に一律の計算を実行したのみで、薬剤と酵素の馴染み具合を十分にモニターしていないこと、エネルギー評価の方法論の信頼性が十分でないことにあった。これらの点に改良を加え、さらに生体分子間相互作用の強さの時間変化をモニターし、変動の大きさより親和性を評価する方法を付加することによって、整合性が見出せるようになってきた。

臨床データとの比較

計算機による薬剤耐性評価が確立していないので、この項については研究が開始できず、目立った進展がなかった。但し、患者の薬剤投与履歴とウィルス量変化やウィルス変異の経過を追跡する必要があるので、分担研究者(佐藤)は、幾つかのサンプルについて、国立感染症研究所に検査を依頼して、後の評価検討のための準備を進めている。

D. 考察

これまで創薬の分野において、計算機シミュレーションは標的タンパク質(酵素)に対する薬物候補のスクリーニング等に利用されてきた。薬物と酵素の親和性を評価する指標として、自由エネルギー計算が行われ、MMGBSA (Molecular Mechanical Generalized Born Surface Area)法やMMPBSA (MM Poisson Boltzmann SA)法が良く利用されている。ところが HIV プロテアーゼの薬剤に対する感受性変化が 2~3 倍変化するのに対し、1kcal/mol 程度のエネルギー変化しかないとされており、従来の方法では対処しきれないことが判明した。そこでエネルギー計算精度の向上を目的としたプログラム開発を継続的に行い、またシミュレーション結果より有意な情報を抽出するための手段探索を行った。その一つとして、シミュレーション中のエネルギーの変動を測り、その変動周期を利用して親和性評価を行う方法を試みた。これは親和性の高い薬剤は揺らぎが少なくなるためにエネルギー変動が緩やかになるとの考えに基づくものである。評価結果は、リゾチームの抗原抗体反応のように実験的に良く調査されている系でも整合性の確認ができた。

計算機による耐性評価の実現に向けて、欧米でも研究が進められている。ところが現状では、実験データとの検証例が少なかったり、評価結果に十分な信頼性が得られないなど課題も多い。本研究では一部実験結果との整合性が確認され始めており、今後、学術的貢献も期待できる。また特定の変異が入ると耐性の獲得が起こる理由については、各アミノ酸残基を構成する原子の動きより、ある程度は説明することが出来るようになり、プロテアーゼ作用の理解を深めることに役立つ

ている。

Nelfinavir 耐性を持つ変異体に関する計算解析では、シミュレーション中の各アミノ酸残基の揺らぎ具合を数値化して調べることも行った。計算で構造揺らぎの小さい場所に位置する残基は、臨床上では変異の入り難いと認識される場所であることが判明してきた。このように定性的にはシミュレーションが確かに現実の系の一端を捉えていることが確認できている。従って、薬剤抵抗性に関わる有用な値を、計算結果より如何に引き出すことができるかが、研究の成否を握っている。

E. 結論

薬剤抵抗性評価に用いるソフトウェアの開発には、一定の成果があった。ところが計算機による全種の薬剤とプロテアーゼとの結合エネルギー算出値は、当初は、実験による測定値を十分に再現できない状況にあった。計算評価の方法論の改良を続けた結果、1つの薬剤(Nelfinavir)については、その薬剤耐性獲得した変異株に関する計算予測と実験値との整合性が取れるようになってきた。今後、評価法をさらに改良し、各種プロテアーゼ阻害剤について、変異株についての十分な予測ができるようにする必要がある。

F. 健康危険情報

特に無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

・Ode, H., Katagiri, D., Ishikawa, H., Neya, S., Hata, M., and Hoshino, T., "Fast Parameterization of Harmonic Force Field Based on the First-Principles Calculations", Submitted to Journal of Computational Chemistry.

2. 学会発表

・佐藤慶治, 太田雅美, 藤 秀義, 畑 晶之, 星野忠次, 佐藤武幸, 「病原ウィルスの薬剤耐性検査法の開発 薬剤-蛋白質間の結合エネルギー評価」、電子情報通信学会-バイオインフォマティクスとパターン認識-、2003年、千葉。
・大出裕高, 片桐大輔, 石川英典, 根矢三郎, 畑 晶之, 星野忠次, 「Hessian 行列を用いた Harmonic Force Field Parameterization」、情報計算化学生

物 (CBI) 学会, 2003 年、東京.

- ・ Ode, H., Katagiri, D., Ishikawa, H., Neya, S., Hata, M., and Hoshino, T., "Fast Parameterization of Harmonic Force Field Based on the First-Principles Calculations", International Symposium on Molecular Nano-Engineering and Its Development into Microsystems. Dec. 18-19, 2003, Tokyo, Japan.
- ・ Hattori, T., Yokomaku, Y., Hata, M., Hoshino, T. and Neya, S., "Theoretical Study of Binding Affinity between HIV Gap Epitope and Human Leukocyte Antigen HLA-A*2402", International Symposium on Molecular Nano-Engineering and Its Development into Microsystems. Dec. 18-19, 2003, Tokyo, Japan.
- ・ 大出裕高, 太田雅美, 星野忠次, 杉浦 互, 「HIV-1 protease 阻害剤耐性の分子動力的解析」、日本エイズ学会, 2003 年、神戸.

H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得

実績無し。

2. 実用新案登録

実績無し。

3. その他

一部の独自開発ソフトウェアに対し、商品化あるいは公開化に関する問合せが 2 件あった (企業 1 件、大学 1 件)。

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
分担研究報告書

薬剤耐性評価のための計算遂行

分担研究者 畑 晶之（千葉大学大学院薬学研究部 助手）

研究要旨 ウイルスの抗エイズ薬に対する薬剤耐性を評価するために、理論計算を実行した。初めに、6種類のプロテアーゼ阻害剤の間で、wildタイプの HIV プロテアーゼとの結合親和性について、どの程度の違いがあるかを求めた。通常のエネルギー計算では、十分に実験値と整合性が得られなかったが、エネルギー変動からの評価を組み合わせることにより、薬剤効果の傾向が示せるようになった。次に、HIV 感染患者の持つウイルス変異を HIV プロテアーゼに施して、6種類の阻害剤との親和性を求めた。一部で実験的な薬剤耐性評価と整合性のあるものの、さらに改良が必要であることが判明した。

A. 研究目的

現在のエイズ治療における深刻な問題の一つとして、ウイルスの薬剤耐性の獲得がある。耐性ウイルスの発生により、治療上、薬剤変更が余儀なくされる。従って、最少量の薬剤投与により十分な薬物効果をあげてウイルス量を抑えることが必要になる。仮に、患者ごとに最も適した薬剤を事前に選択することができるになれば、一般的な経験則による不用意な薬剤投与と薬剤耐性発生を回避することができ、患者の負担を軽減することができる。さらに、不必要なウイルス耐性発生を抑えられるので、使用可能な薬剤の選択を広げられ、よりよい治療効果を期待できる。本研究は、多様な変異 HIV 株に特異的に有効な治療薬を、コンピュータシミュレーションを用いて予測することで、HIV 感染患者の薬物治療を効率的なものとすることを目指す。

B. 研究方法

HIV 遺伝子の変異が起こるとアミノ酸配列が変化し、その結果ウイルスのタンパク構造が変化する。プロテアーゼの活性ポケットに入り込んで作用する阻害剤は、この構造変化によりタンパクとの結合力が変化し、作用強度に影響を受ける。現在日本でエイズ治療に用いられている薬剤と、そ

の標的である HIV 酵素（プロテアーゼ）の複合体構造分子モデルを構築し、生体内条件を再現したコンピュータシミュレーションを行う。このシミュレーションから得られた構造について、本研究班で開発したエネルギー評価プログラムを用い、安定性の評価を行う。これにより得られた安定化エネルギーを各薬剤の作用強度とし、各変異株に対し最も有効であると考えられる薬剤を決定する。各薬剤において wild タイプ HIV 酵素との複合体モデルのエネルギー値を基準値とし、変異型酵素の場合のエネルギー値を比較して、それぞれの薬剤が様々な変異株に対しどのような作用強度を示すかを、エネルギーの安定性により評価する。この結果、各変異型に対する最も有効な薬剤をそれぞれ決定する。

研究に用いた薬剤は、現在日本で承認されている6種類のプロテアーゼ阻害剤（ロピナビル、ネルフィナビル、アンブレナビル、サキナビル、リトナビル、インジナビル）である。

初めに wild タイプのプロテアーゼに、上記の6種類の阻害剤が結合した状況を計算した。wild タイプは、NL4.3 株のアミノ酸配列に統一した。また変異型プロテアーゼには、例として患者由来のアミノ酸変異：L10I、I13V、R41K、K43R、M46I、K55R、L63P、A71V、I72T、G73S、V77I、I84V、L90M、

I93L、を施した。

(シミュレーション方法)

コンピュータシミュレーションを行うにあたり、分子動力学計算の手法を採用する。HIV-1プロテアーゼとプロテアーゼ阻害剤複合体のX線解析による結晶構造 (Protein Data Bank より得られた結晶構造) をシミュレーションのモデルとして使用する。分子動力学計算のプログラムには AMBER7 を用いる。モデル周辺へ水分子を発生させ、温度を 310 K に設定して、生体内条件の再現を行う。シミュレーション時間は 1.5 から 2.0 ナノ秒であり、これはすべてのモデルの構造が安定になったとみなすことができる計算時間である。この構造安定化の確認には、RMSD 値 (構造の平均二乗変位値、Å)、モデル全体のポテンシャルエネルギー (kcal/mol) の推移を観察する。

各々の薬剤-酵素モデルのシミュレーション結果より、エネルギー安定性の評価を行う。評価には、クーロン力、van der Waals 力、疎水相互作用、 π - π 相互作用のエネルギー値を使用する。

(倫理面への配慮)

各々の薬剤-酵素複合体の基準値としては wild type 遺伝子型の HIV 酵素を用い、変異 HIV の遺伝子データは、実際の患者体内から採取した HIV を分析したデータを許可を得て使用する。データは遺伝子塩基配列と患者識別番号のみであり、患者個人の特定は患者の担当医以外できないようになっている。

C. 研究結果

wild タイプのプロテアーゼと阻害剤のシミュレーションを行った。シミュレーションによって得られた安定構造のクーロン相互作用、van der Waals 相互作用、疎水相互作用、 π - π 相互作用エネルギー値を算出し、その和をとって複合体構造全体の相互作用エネルギー (結合エネルギー) とした。その結果、得られたエネルギー値の大小から見た薬剤の順位を決定した。結合エネルギー値 (kcal/mol) は：ロピナビル-106.16、リトナビル-112.73、サキナビル-87.03、アンブレナビル-84.41、インジナビル-100.43、ネルフィナビル-107.93 となっており、作用強度の順位は強い方からリトナビル、ネルフィナビル、ロピナビル、

インジナビル、サキナビル、アンブレナビルの順となった。

また、ある変異型酵素とプロテアーゼの阻害剤のシミュレーション結果において、結合エネルギー値 (kcal/mol) は：ロピナビル-130.30、リトナビル-80.97、サキナビル-92.43、アンブレナビル-84.32、インジナビル-65.10、ネルフィナビル-106.07 となった。この結果から決定したこの変異型酵素に対する薬剤の作用強度順位は強い方からロピナビル、ネルフィナビル、サキナビル、アンブレナビル、リトナビル、インジナビルの順である。

D. 考察

本研究の計算結果の比較対象とした、*in vitro* 実験によって得られた薬剤の作用強度順位は強い順にロピナビル、リトナビル、サキナビル、アンブレナビル、インジナビル、ネルフィナビルである。計算値による作用強度と *in vitro* 実験値による作用強度を比較すると、ほとんど順位は一致しなかった。但し、シミュレーション中の薬剤と酵素の相互作用エネルギーの変動を測り、その変動周期を利用して親和性評価を行う方法で評価すると、作用強度順位はリトナビル、ロピナビル、サキナビル、アンブレナビル、インジナビルとなり、実験からの知見とかなり一致した結果となることが確認できた。

また、変異型酵素の結果について wild タイプ酵素の結果とエネルギーを比較すると、リトナビルとインジナビルは大きく不安定化し、ネルフィナビルとアンブレナビルは少し不安定化し、サキナビルとロピナビルは逆に安定化したことになった。*In vitro* で行われた変異型酵素の薬剤耐性実験では、リトナビルが最も大きく耐性となり、残りのロピナビル (*in vitro* 実験に含まれていなかった) 以外 4 種については少し耐性となる、という結果が出ている。これと比較すると、本研究の結果ではインジナビルとサキナビルについては予測される作用強度変化が正しく再現されなかった。

各相互作用のエネルギー評価プログラムについて、現在疎水相互作用エネルギーと π - π 相互作用エネルギーの計算についてはプログラムが

完成しており、数値にも大きなばらつきはない。しかしクーロン力、van der Waals 力のエネルギー評価については数値のばらつきが実際よりも大きすぎるためプログラムを改良中である。また、相互作用エネルギーを計算する以外に、活性ポケット周辺残基など特定の残基のゆらぎを測定して薬剤の安定性を判定する方法の併用も検討している。

エネルギー評価プログラムの改良と並行して、今回解析した変異株以外の変異型酵素のデータを用いたモデルのシミュレーションも多数行っている。今後はまず、プロテアーゼ阻害剤と多数の変異株 HIV-1 プロテアーゼとの相互作用・構造安定性をデータ化し、実際の患者の治療結果に本研究結果が合致することを確認する。その後は、逆転写酵素阻害剤で同じ方法の研究を行う予定である。

E. 結論

本研究で実行したシミュレーションの方法は確立しており、おおまかな数値結果は得られる。但し、結合エネルギーの評価、ひいては薬剤の作用強度の評価法が完全ではなく *in vitro* データとシミュレーションから得たデータは十分に一致しなかった。今後、薬剤作用強度の評価法を改良し、まず *in vitro* のデータとの一致を確認して本研究の手法を変異型酵素に対する薬剤選択ツールとするための信頼性を確立することが課題である。

F. 健康危険情報

特に無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Okimoto, N., Yamanaka, K., Suenaga, A., Hirano, Y., Futatsugi, N., Narumi, T., Yasuoka, K., Susukita, R., Koishi, T., Furusawa, H., Kawai, A., Hata, M., Hoshino, T., and Ebisuzaki, T. Molecular Dynamics Simulations of Prion Proteins - Effect of Ala¹¹⁷ → Val mutation- Chem-Bio Inform. J. 3 (2003) pp.1-11.
- Katagiri, D., Hata, M., Itoh, T., Neya, S., and Hoshino, T., Atomic-Scale Mechanism of the GTP → GDP Hydrolysis Reaction by the

Gi[alpha]1 Protein.

J. Phys. Chem. B 107 (2003) pp.3278-3283.

- Fujii, Y., Okimoto, N., Hata, M., Narumi, T., Yasuoka, K., Susukita, R., Suenaga, A., Futatsugi, N., Koishi, T., Furusawa, H., Kawai, A., Ebisuzaki, T., Neya S., and Hoshino, T., Molecular Dynamics Study on Class A β -Lactamase.

J. Phys. Chem. B 107 (2003) pp.10274-10283.

- Murata, K., Hoshino, T., Sato, Y., Hata, M., and Tsuda, M. Unidirectional Proton Transfer Mechanism in the L → M → N Sequence of Bacteriorhodopsin.

J. Mol. Struct. 664-665 (2003) pp.125-133.

- Torimoto, N., Ishii, I., Hata, M., Nakamura, H., Imada, H., Ariyoshi, N., Ohmori, S., Igarashi, T., and Kitada, M. Direct Interaction between Substrates and Endogenous Steroids in the Active Site May Change the Activity of Cytochrome P450 3A4.

Biochemistry, 42 (2003) pp.15068-15077.

2. 学会発表

- 佐藤慶治, 太田雅美, 藤 秀義, 畑 晶之, 星野忠次, 佐藤武幸, 「病原ウイルスの薬剤耐性検査法の開発 薬剤-蛋白質間の結合力評価」、電子情報通信学会-バイオインフォマティクスとパターン認識-、2003年、千葉。
- 大出裕高, 片桐大輔, 石川英典, 根矢三郎, 畑 晶之, 星野忠次, 「Hessian 行列を用いた Harmonic Force Field Parameterization」、情報計算法学生物 (CBI) 学会, 2003年、東京。
- Ode, H., Katagiri, D., Ishikawa, H., Neya, S., Hata, M., and Hoshino, T., "Fast Parameterization of Harmonic Force Field Based on the First-Principles Calculations", International Symposium on Molecular Nano-Engineering and Its Development into Microsystems. Dec. 18-19, 2003, Tokyo, Japan.
- Hattori, T., Yokomaku, Y., Hata, M., Hoshino, T. and Neya, S., "Theoretical Study of Binding Affinity between HIV Gap Epitope and Human Leukocyte Antigen HLA-A*2402", International Symposium on Molecular Nano-Engineering and Its Development into Microsystems. Dec. 18-19, 2003, Tokyo, Japan.

- H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)
実績無し。

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
分担研究報告書

薬剤耐性解析技術の臨床評価

分担研究者 佐藤武幸（千葉大学医学部附属病院感染症管理治療部長、助教授）

研究要旨 抗 HIV 療法をより充実させるために、予め HIV 感染患者の薬剤耐性検査を行うことが重要となってきた。薬剤耐性検査法の一つとして、計算機を用いて、患者ごとに薬剤の効果を評価する方法が提案されている。その際、計算機で評価された検査結果に、高い信頼性があるか、十分に新規の医療技術として臨床に応用できるものかを確認することが必須である。そこで従来のジェノタイプ検査やフェノタイプ検査も併せて実施して、計算機の算出値に既存の方法と整合性があるかを詳細に調べる。

A. 研究目的

現在、抗 HIV-1 感染症治療薬剤として、逆転写酵素を標的としたものが 9 種類、プロテアーゼを標的としたものが 6 種類、併せて 15 種類が実用化されている。一見、種類が豊富に見える抗 HIV-1 薬剤も、同種類の薬剤間で交差耐性が存在するために、ある薬剤に対して一旦耐性を獲得すると、次に効果の期待できる薬剤の選択肢は大きく制限されてしまう。このことから薬剤耐性変異の有無の判定は適切な治療薬剤選択に必須の検査として位置づけられている。その結果、1995 年の多剤併用療法 (HAART) の導入以降、多くの薬剤耐性遺伝子検査が実施されてきた。

幾度も治療内容を変更し、多数の耐性変異を獲得した症例では、遺伝子検査の結果だけでは薬剤耐性のレベルを判定するのが困難な場合がある。基本的に耐性変異が集積すると耐性レベルは上昇するが、耐性変異間の相互作用により薬剤感受性がむしろ回復するような組み合わせも知られている。薬剤耐性変異間の相互作用に関する知識は、薬剤耐性症例に対する適切な治療薬剤を選択する上で重要である。このような情報を得るために遺伝子検査と感受性検査を対比させたデータベースの構築の試みが行われてきた。最近ではさらに薬剤耐性遺伝子検査の結果を感受性検査と対比させるのではなく、薬剤耐性症例にどのような薬剤が投与され、治療の結果がどうであったか、という情報の集積が重要となっている。

本研究班では、HIV 感染患者の抗エイズ薬に対

する薬剤耐性を、計算機を利用して評価するための技術開発を行っている。計算機による方法では、原理的にデータベース等の過去の治療情報を必要とせず、複数の耐性変異があっても問題がない。ところがこれは計算による予測精度が十分に高いことが前提にあり、これを保証するために幾つかの症例で現実の系との比較が必要である。本研究では、臨床面から計算機を活用した HIV の薬剤耐性評価の有効性を検討する。

B. 研究方法

次の手順により、HIV の薬剤耐性評価に関する計算結果と現実系の比較を行う。

- (1) 分担研究者 (佐藤) の担当している患者から、倫理審査委員会で審議を経た上で、血液をサンプルとして採取する。同時に CD4 細胞数や HIV-RNA 量などの臨床上の諸量を測定する。
- (2) 採取されたサンプルは、国立感染症研究所エイズ研究センターに送付する。分担研究者 (杉浦) は、通常業務の中でこのサンプルのジェノタイプとフェノタイプ検査を行う。
- (3) ジェノタイプ検査の際に、DNA シークエンサーにより読み取られた酵素の変異情報を、主任研究者 (星野) に送る。
- (4) 変異情報から、患者固有の酵素に関して、薬剤-変異酵素結合構造をコンピューター内で構築し、薬剤と酵素との結合親和性から、薬剤抵抗性を評価する。
- (5) 主任研究者からは計算機による薬剤評価が示される。また、変異によって、著しく薬効が

減少したものについて、薬剤抵抗性の注意が示される。

(6) ジェノタイプおよびフェノタイプ検査ならびに計算結果のフィードバックを受け、HIV感染者への治療の中で、この情報を比較検討し、技術の有意性を判断する。

C. 研究結果

現在、40名程の HIV-1 感染患者を診断している。また1ヶ月に1,2名程の新規に患者が増加している。そのうち抗 HIV 薬の投与が必要と判断される患者は、30%程度である。HIV-1 感染症では、CD4 陽性 T 細胞の著しい低下が見られ、これにより免疫不全が引起される。従って、CD4 細胞の量により患者群を分類すると、(1). CD4 が 100 未満または急速に低下中のため、薬剤の変更を検討している患者、(2). CD4 が 300-400 位で不満足ながらも積極的に薬剤変更は考えていない患者、(3). ほぼ治療に反応している患者となる。

今年度は、薬剤の変更を要する患者あるいは新規に治療を開始しウイルス変異を経時的に追跡できる患者のうち、大学の倫理審査委員会での審議を経て行い、提供者に菌株が実験に利用される旨の説明をして同意を得られた患者について、サンプルの採取を行った。このように定期的にウイルスを保存し後日の検討を可能するための準備を行った。

また、幾つかのサンプルについて、分担研究者（杉浦：国立感染症研究所）に遺伝子変異の解析を依頼して、ジェノタイプあるいはフェノタイプ検査の実施を進めている。

D. 考察

ジェノタイプ検査の結果からは、ウイルス遺伝子内に誘導された変異を見ることにより、耐性を示す薬剤と感受性を保持した薬剤を判定することが可能となる。薬剤耐性変異は単独で出現することもあれば、複数が組み合わさることもある。変異が複数誘導されれば変異間の相互作用も生じる。フェノタイプ検査からの結果は、野生株の薬剤感受性と比較対照して、何倍耐性という数値で表現される。

計算による評価では、明確な数値として、薬剤

と酵素の結合エネルギーが算出される。算出された値は、自由エネルギー (ΔG) に対応するので、実験で測定される結合平衡定数や 50%阻害濃度 (IC50) と比較できる。主任研究者（星野）がプロテアーゼ阻害剤 (Nelfinair) について、野生株と幾つかの変異体モデルの結合エネルギー差 ($\Delta\Delta G$) を評価したところ、これらの数値は、IC50 との相関のある結果を得ている。従って、計算機による薬剤耐性評価は、フェノタイプ検査に近い指標を与えると期待される。今後、臨床で見られる変異株についても、相関があるか否かを慎重に評価する必要がある。

E. 結論

主任研究者による計算機による薬剤耐性評価が実施された場合に備えて、患者の薬剤投与履歴とウイルス量変化やウイルス変異の経過追跡を開始した。また、幾つかのサンプルについて、国立感染症研究所に検査を依頼して、後の評価検討のための準備を進めた。

F. 健康危険情報

特に無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

・ Sakao, E., Ishihara, A., Horikawa, K., Akiyama, M., Arai, M., Kato, M., Seki, N., Fukunaga, K., Shimizu-Yabe, A., Iwase, K., Ohtsuka, S., Sato, T., Kohno, Y., Shibata, S., Takiguchi, M. Two-peaked synchronization in day/night expression rhythms of the fibrinogen gene cluster in the mouse liver. *J Biol Chem.* 278 (2003) pp. 30450-304507.

2. 学会発表

・ 佐藤慶治, 太田雅美, 藤 秀義, 畑 晶之, 星野忠次, 佐藤武幸, 「病原ウイルスの薬剤耐性検査法の開発 薬剤-蛋白質間の結合力評価」、電子情報通信学会-バイオインフォマティクスとパターン認識-、2003年、千葉。

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

無し。

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
分担研究報告書

耐性モニタリング技術としての計算解析法の評価

分担研究者 杉浦 亙（国立感染症研究所、エイズ研究センター 第2研究グループ長）

研究要旨 薬剤耐性検査法の一つとして、計算機を用いて患者固有のウィルスへの薬剤の効果を評価する方法が提案されている。プロテアーゼ阻害剤の一つである Nelfinavir については、幾つかの変異体について、既の実験室株を作成し、薬剤耐性を系統的かつ詳細に解析している。そこで計算機による方法と、実験的な薬剤耐性評価とを比較して、両者の整合性を検討した。併せて、NFV と関係の深い D30N、N88D、L90M 変異体の構造学的解析から耐性機序を考察した。

A. 研究目的

今日行われている薬剤耐性ウィルスを検出する方法には、薬剤耐性遺伝子検査 (Genotyping) と薬剤感受性検査 (Phenotyping) という2つの手法がある。遺伝子検査は、治療薬の標的である逆転写酵素あるいはプロテアーゼの遺伝子配列を解析し、耐性を引き起こす遺伝子変異の有無を調べる手法である。一方、HIV の薬剤感受性を試験管内で測定する直接的な方法である。一般に、治療薬の使用歴が長ければ長いほど耐性変異は集積してゆく。そして変異が複数誘導されれば変異間の相互作用が生じ、遺伝子検査評価の前提である変異と薬剤の対応関係が乱れる場合がある。このような症例には感受性検査が有効である。但し、感受性検査を遂行するには、高い実験技術と多額の費用が必要であり、通常の検査として実施されにくい面もある。

HIV 感染が激増しているアジア、アフリカ地域では、経済的な理由より今まであまり抗エイズ薬が普及してこなかった。これらの地域では、サブタイプ B 以外の感染症例が圧倒的に多い。これまで治療薬開発や薬剤耐性の研究は、欧米先進諸国で感染の主流であったサブタイプ B を対象に行われてきた。従って、薬剤耐性ウィルスの知識はサブタイプ B に基づくものであり、これがそのまま非サブタイプ B のウィルスの薬剤耐性に適用できるか否かは明確でない。

計算機による薬剤耐性評価は、検査の費用の問題や非サブタイプ B の薬剤耐性を解析するための支援技術として期待される。但し、これを

実用化するためには、計算評価結果の信頼性を確認しておかなければならない。我々のグループでは、これまでプロテアーゼ阻害剤 Nelfinavir に関する変異体の薬剤耐性を系統的に解析している。そこでこのデータを用いて計算機による耐性評価の信頼性の確認を行う。

Nelfinavir (NFV) による治療により、D30N、N88D、L90M 変異体の出現が数多く報告されている。D30N は NFV に対して特異的に発現する primary mutation であり、secondary mutation として高頻度に N88D が起こる。一方、L90M は NFV ばかりでなく、他のプロテアーゼ阻害剤にも耐性を起こす多剤耐性変異である。しかしながら、これらの変異間の相互作用は明確ではない。NFV に対するこれらの変異の相互作用と、これによる耐性機序を解明することも、本研究の重要な目的である。

B. 研究方法

wild type および各変異体 (D30N, N88D, D30N/N88D, L90M) の HIV-1 PR/NFV 複合体モデルを構築し、分子動力学 (MD) 計算を行った。HIV-1 PR/NFV 複合体 (wild-type, D30N, N88D, D30N/N88D, L90M) モデルを構築する際には、Asp25/Asp25' のプロトン化状態を考慮する必要があるが、エネルギーの最も低い荷電 Asp25/中性 Asp25' のモデルを採用した。

計算プログラムは AMBER7 を用い、力場パラメーターには parm99 を使用した。また、Lee-Richard 法による溶媒露出面積の計算や

Poisson-Boltzmann 法による溶媒効果の算出、MMPB/SA 法による全結合エネルギー計算を実行した。

C. 研究結果

(水素結合系)

水素結合は HIV-1 PR/NFV 相互作用のひとつであり、複合体の安定化に大きく影響する。Wild type モデルでは、Asp25' の側鎖カルボン酸、Asp30 の主鎖、Ile50 の主鎖と NFV 間の水素結合が見られた。この傾向は N88D 変異体モデルに関しても見られた。しかしながら、Asn30 をもつ D30N、D30N/N88D 変異体モデルにおいては、NFV との水素結合系は見られず、L90M 変異体モデルにおいては Ile50 との水素結合系が見られなかった。エネルギー的にも D30N、D30N/N88D、L90M 変異体モデルではクーロン相互作用の低下が見られた。

(ファンデルワールス相互作用)

NFV が結合することにより溶媒に露出しなくなる面積 (SA) は、HIV-1PR/NFV 間接触表面の大きさの指標となる。Wild type モデルと比較して、D30N モデルは同程度の大きさを示した。一方、N88D、D30N/N88D モデルでは Wild type モデルよりも大きな値を示した。一方、L90M モデルでの SA は低下し、エネルギー的にもファンデルワールス相互作用の低下が見られた。

(疎水相互作用)

NFV をはじめとするプロテアーゼ阻害剤は、疎水的な相互作用によって、安定に結合する。しかしながら、変異によらず、疎水相互作用のエネルギーはほぼ一定であった。

(構造変化)

Wild type モデルと各変異体モデルの平均構造から両者の構造の違いを観察した。D30N、D30N/N88D 変異体モデルでは、Asn30 付近が NFV から離れるようにわずかに外側に移動、L90M モデルでは Ile50/Ile50' の大きな構造変化が見られた。また N88D、D30N/N88D モデルでは、Asp25 と Ile50/Ile50' の接近が見られた。

(B-factor 解析)

B-factor は分子の揺らぎを表す指標として用いられ、結晶構造の温度因子を再現する。Wild type モデルに比べ、D30N、D30N/N88D モデルはわ

ずかに大きな値をとった。一方、N88D、L90M モデルでは逆に小さな値を示した。

(結合エネルギー評価)

HIV-1PR/NFV 間の結合強度を評価するために、MMPB/SA 法を用いた。MMPB/SA 法で算出された値 (ΔG) は、しばしば実験での解離速度定数や 50% 阻害濃度 (IC50) と比較される。Wild type モデルと各変異体モデルの結合エネルギー差 ($\Delta\Delta G$) を評価したところ、これらの数値は、IC50 との相関のある結果を得た。

D. 考察

(D30N) NFV の芳香性水酸基 (-OH) は、Asp30 の主鎖と水素結合を形成することで安定化する。D30N 変異体は NFV に対して特異的に多く見られるが、アミノ酸側鎖の違いから、クーロン相互作用を低下させるであろうと予想される。本研究におけるシミュレーションにおいてもクーロン相互作用の低下が見られた。しかしながら、その主たる機序は Asn30 に変異したことによる微小な構造変化に依存すると考えられる。また HIV-1PR の揺らぎが増大や、クーロン相互作用の低下から、Asp30 は NFV の安定化に大きく影響しているといえる。

(N88D) N88D 変異体は、しばしば D30N につづく NFV の secondary mutation として発現する。N88/D88 は non-active site に存在するため、その役割は D30N のような active site mutation よりもはっきりしていない。しかしながら、N88D により何らかの構造変化が生じ、それが影響しているものと考えられる。本研究によるシミュレーションにより、D25 と I50/I50' 間が狭まることが見られた。SA の増大や HIV-1 PR の揺らぎの低下が生じていることから HIV-1 PR や NFV の安定化に関与していると思われる。

(L90M) L90M は NFV だけでなく他のプロテアーゼ阻害剤でも耐性を引き起こし、さらには Leu90/Met90 が非活性部位にあるため、N88D と同様にその耐性機序が明らかでなかった。本研究において、I50/I50' での大きな構造変化を引き起こし、クーロン相互作用、vdW 相互作用とともに低下させることを見いだした。I50/I50' の構造変化は、他の PIs への影響も大きいことが

予想され、多剤耐性の要因とも考えられる。

E. 結論

本研究において、NFV と関係の深い D30N、N88D、L90M 変異体の構造学的解析から耐性機序を考察した。NFV に特異的な D30N 変異では、Asp30 がわずかに外側へと動くことで、水素結合の解離が起こり、クーロン相互作用を低下させた。Secondary mutation である N88D は NFV 結合時に接触する面積の増大が、HIV-1 PR の揺らぎの低下をおこした。これは HIV-1 PR の安定化に寄与しているものと考えられる。一方、L90M では、flap 領域での構造を大きく変化させ、NFV と I50/I50' とのクーロンおよび vdW 相互作用に大きな影響を示した。

F. 健康危険情報

特に無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Lay Myint, Masakazu Matsuda, Zene Matsuda, Yoshiyuki Yokomaku, Tomoko Chiba, Aiko Okano, Kaneo Yamada, Wataru Sugiura
Gag Non-Cleavage Site Mutations Contribute to Full Recovery of Viral Fitness in Protease Inhibitor-Resistant Human Immunodeficiency Virus Type-1.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2004, Vol.48, pp.444-452.
- Koya Ariyoshi, Masakazu Matsuda, Hideka Miura, Sachiko Tateishi, Kaneo Yamada, Wataru Sugiura.
Patterns of Point Mutations Associated With Antiretroviral Drug Treatment Failure in CRF01_AE (Subtype E) Infection Differ From Subtype B Infection
Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes. 2003, Vol.33, pp.336-342.
- J Snoeck, R Kantor, RW Shafer, I Derdelinckx, AP Carvalho, B Wynhoven, MA Soares, P Cane, J Clarke, C Pillay, S Sirivichayakul, K Ariyoshi, A Holguin, H. Rudich, R Rodrigues, MB Bouzas, K Van Laethem, F Brun-Vezinet, C Reid, P Cahn, LF Brigido, Z Grossman, V Soriano, W Sugiura, P Phanuphak, L Morris, J Weber, D Pillay, A Tanuri, PR Harrigan, R Camacho, JM

Schapiro, D Katzenstein, AM Vandamme
Evaluation of Five Interpretation Algorithms for the Prediction of Drug Susceptibility in Non-B Subtype.

Antiviral Therapy 2003, Vol.8, s111

- R Kantor, AP Carvalho, B Wynhoven, MA Soares, P Cane, J Clarke, J Snoeck, C Pillay, S Sirivichayakul, K Ariyoshi, A Holguin, H. Rudich, R Rodrigues, MB Bouzas, P Cahn, LF Brigido, Z Grossman, V Soriano, W Sugiura, P Phanuphak, L Morris, AM Vandamme, J Weber, D Pillay, A Tanuri, PR Harrigan, R Camacho, JM Schapiro, D Katzenstein
Nucleic acid differences between HIV-1 non-B and B reverse transcriptase and protease sequences at drug resistance positions.
Antiviral Therapy 2003, Vol.8, s58
 - L Myint, M Matsuda, T Chiba, H Yan, J Kakizawa, A Okano, M Hamatake, M Nishizawa, Wataru Sugiura
Analysis of virion morphology and assembly process in protease inhibitor-resistant HIV-1.
Antiviral Therapy 2003, Vol.8, s91
 - Wataru Sugiura, Kazunori Shimada, Masakazu Matsuda, Tomoko Chiba, Lay Myint, Aiko Okano and Kaneo Yamada
Novel Enzyme Linked Minisequence Assay for Genotypic Analysis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Drug Resistance.
Journal of Clinical Microbiology. 2003, Vol.41, pp.4971-4979
 - 杉浦 互
HIV の薬剤耐性研究の現状と今後の課題
現代医療 No.35 Vol.6:113-118
 - 杉浦 互
日本における薬剤耐性 HIV-1 の現状
臨床とウイルス Vol.31, No.4, 272-282
- ##### 2. 学会発表
- R Kantor, RW Shafer, B Efron, AP Carvalho, B Wynhoven, MA Soares, P Cane, J Clarke, J Snoeck, S Sirivichayakul, K Ariyoshi, A Holguin, C Pillay, H Rudich, R Rodrigues, MB Bouzas, P Cahn, LF Brigido, Z Grossman, L Morris, V Soriano, W Sugiura, P Phanuphak, AM Vandamme J Weber, D Pillay, A Tanuri, PR Harrigan, R Camacho, JM Schapiro, and D Katzenstein
Contrasting Subtype-treatment interaction in

HIV-1 subtypes: differences in subtypes B and C reverse transcriptase(RT)and protease(PR) genotypic evolution.

11th Conference on retrovirus and opportunistic infections. Sanfrancisco, USA, Feb.8-11, 2004,

• H. Yan, T Chiba, N Nomura, Y Kitamura, M Nishizawa, M Matsuda, N Yamamoto, and W Sugiura

Discovery of Novel Small- Molecule HIV-1 Integrase Inhibitory Compounds.

Fourth HIV DRP Symposium ANTIVIRAL DRUG RESISTANCE. Virginia, USA, Dec.7-10, 2003

• L Myint, M Matsuda, T Chiba, H Yan, J Kakizawa, A Okano, M Hamatake, M Nishizawa, W Sugiura

Analysis of Virion Morphology and Assembly Princes in Protease Inhibitor Resistant HIV-1.

XII International HIV Drug Resistance Workshop. Cabo SanLucas, Mexico. Jun.10-14, 2003

• R Kantor, RW Shafer, AP Carvalho, B Wynhoven, MA Soares, P Cane, J Clarke, J Snoeck, C Pillay, S Sirivichayakul, K Ariyoshi, A Holguin, Z Grossman, R Rodrigues, MB Bouzas, P Cahn, LF Brigido, V Soriano, W Sugiura, P Phanuphak, L Morris, A-M Vandamme, J Weber, D Pillay, A Tan, D Katzenstein

Nucleic acid differences between HIV-1 non-B and reverse transcriptase and protease sequences at drug resistance positions.

XII International HIV Drug Resistance Workshop. Cabo SanLucas, Mexico. Jun.10-14, 2003

• J Snoeck, R Kantor, RW Shafer, I Derdelinckx, AP Carvalho, B Wynhoven, MA Soares, P Cane, J Clarke, C Pillay, S Sirivichayakul, K Ariyoshi, A Holguin, Z Grossman, R Rodrigues, MB Bouzas, P Cahn, LF Brigido, V Soriano, W Sugiura, P Phanuphak, L Morris, J Weber, D Pillay, A Tanuri, PR Harrigan, R Camacho, JM Schapiro, D Katzenstein, AM Vandamme.

Evaluation of FIVE Interpretation Algorithms for the Prediction of Drug Susceptibility in Non-B Subtype.

XII International HIV Drug Resistance workshop. Cabo SanLucas, Mexico. Jun.10-14, 2003

• 松井良輔、菅井隆弘、千葉晴美、塩見和朗、山口裕一、増間 郎、供田 洋、千葉智子、杉浦 互、大村 智、田中晴雄

糸菌状の生産する HIV-1 インテグラーゼ阻害物質

の単離と生物活性

第 124 回 日本薬学会 2004 年 3 月

• 杉浦 互、駒野 淳、Lay Myint

HIV-1 複製サイクル初期あるいは後期過程における宿主細胞因子の機能的、形態学的解析

第 6 回 白馬シンポジウム 2003 年 8 月 1 日

長野県北安曇郡白馬村

• 杉浦 互、Lay Myint、駒野 淳、松田昌和、松田善衛、西澤雅子

薬剤耐性 HIV-1 における粒子形成過程の形態学的解析

第 51 回日本ウイルス学会学術集会 2003 年 10 月 27 日～29 日 京都

• 横幕能行、松田善衛、千葉智子、巖 馬華、松田昌和、杉浦 互

抗 HIV-1 新規候補薬剤検索のための多検体処理可能なスクリーニングシステム構築

第 17 回 日本エイズ学会学術集会 2003 年 11 月 27 日～11 月 29 日 神戸

• 古賀一郎、小田原 隆、細谷紀章、後藤美江子、中村哲也、松田昌和、杉浦 互、岩本愛吉

HAART 下で良好な経過中、梅毒発症とともに抗 HIV 血症を呈した症例

第 17 回 日本エイズ学会学術集会 2003 年 11 月 27 日～11 月 29 日 神戸

• 松田昌和、千葉智子、佐藤裕徳、巖 馬華、Lay Myint、柿澤淳子、浜武牧子、植田知幸、西澤雅子、杉浦 互
相同組み換えを用いた CRF01_AE 薬剤感受性の解析

第 17 回 日本エイズ学会学術集会 2003 年 11 月 27 日～11 月 29 日 神戸

• 植田知幸、有吉紅也、三浦秀佳、松田昌和、千葉智子、巖 馬華、Lay Myint、柿澤淳子、浜武牧子、西澤雅子、杉浦 互

CRF01_AE 感染症例に見出された新たな薬剤耐性獲得機序

第 17 回 日本エイズ学会学術集会 2003 年 11 月 27 日～11 月 29 日 神戸

• 大出裕高、星野忠次、杉浦 互

HIV-1 protease 阻害剤耐性の分子力学的解析

第 17 回 日本エイズ学会学術集会・シンポジウム 2003 年 11 月 27 日～11 月 29 日 神戸

• 杉浦 互

HIV-1 治療における薬剤耐性の影響とその対策

第 17 回 日本エイズ学会学術集会・シンポジウム 2003 年 11 月 27 日～11 月 29 日 神戸

H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)
無し。

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻号	ページ	出版年
Lay Myint, Masakazu Matsuda, Zene Matsuda, Yoshiyuki Yokomaku, Tomoko Chiba, Aiko Okano, Kaneo Yamada, Wataru Sugiura	Gag Non-Cleavage Site Mutations Contribute to Full Recovery of Viral Fitness in Protease Inhibitor-Resistant Human Immunodeficiency Virus Type-1.	Antimicrobial Agents and Chemotherapy	Vol.48, No.2	444- 452	2004
Koya Ariyoshi, Masakazu Matsuda, Hideka Miura, Sachiko Tateishi, Kaneo Yamada, Wataru Sugiura.	Patterns of Point Mutations Associated With Antiretroviral Drug Treatment Failure in CRF01_AE (Subtype E) Infection Differ From Subtype B Infection	Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes	Vol.33,	336- 342	2003
J Snoeck, R Kantor, RW Shafer, I Derdelinckx, AP Carvalho, B Wynhoven, MA Soares, P Cane, J Clarke, C Pillay, S Sirvichayakul, K Ariyoshi, A Holguin, H. Rudich, R Rodrigues, MB Bouzas, K Van Laethem, F Brun-Vezinet, C Reid, P Cahn, LF Brigido, Z Grossman, V Soriano, W Sugiura, P Phanuphak, L Morris, J Weber, D Pillay, A Tanuri, PR Harrigan, R Camacho, JM Schapiro, D Katzenstein, AM Vandamme	Evaluation of Five Interpretation Algorithms for the Prediction of Drug Susceptibility in Non-B Subtype	Antiviral Therapy	Vol.8	s111	2003

R Kantor, AP Carvalho, B Wynhoven, MA Soares, P Cane, J Clarke, J Snoeck, C Pillay, S Sirivichayakul, K Ariyoshi, A Holguin, H. Rudich, R Rodrigues, MB Bouzas, P Cahn, LF Brigido, Z Grossman, V Soriano, W Sugiura, P Phanuphak, L Morris, AM Vandamme, J Weber, D Pillay, A Tanuri, PR Harrigan, R Camacho, JM Schapiro, D Katzenstein	Nucleic acid differences between HIV-1 non-B and B reverse transcriptase and protease sequences at drug resistance positions.	Antiviral Therapy	Vol.8	s58	2003
L Myint, M Matsuda, T Chiba, H Yan, J Kakizawa, A Okano, M Hamatake, M Nishizawa, Wataru Sugiura	Analysis of virion morphology and assembly process in protease inhibitor-resistant HIV-1	Antiviral Therapy	Vol.8	s91	2003
Wataru Sugiura, Kazunori Shimada, Masakazu Matsuda, Tomoko Chiba, Lay Myint, Aiko Okano, Kaneo Yamada	Novel Enzyme Linked Minisequence Assay for Genotypic Analysis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Drug Resistance.	Journal of Clinical Microbiology	Vol.41, No.11	4971- 4979	2003
杉浦 互	HIV の薬剤耐性研究の現状と今後の課題	現代医療	Vol.35, No.6	113- 118	2003
杉浦 互	日本における薬剤耐性 HIV-1 の現状	臨床とウイルス	Vol.31, No.4	272- 282	2003

20030573

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。