

No.	主成分名	対象薬	対象薬の投与量	本剤の投与量	対象薬の薬物動態	本剤の薬物動態	予想される相互作用	相互作用のメカニズム	対処方法	重要な相互作用	参考文献
139	NFV(ビラセプト)	NFV(ビラセプト) / NVP(ビラセプト) / Zalcitabine(ビラセプト)	200mg 1日1回 × 14日間 (BR)その後 200mg 1日2回 × 14日間	750mg 1日3回 × 36日間	おそろしく血中濃度への影響なし	AUC, Cmaxは変化なし, Cmin 32%減少	-	-	投与量の調節は必要なし	-	①Viracept [package insert], La Jolla, CA; Agouron Pharmaceuticals, Inc.; 2003. ②Stavudine (d4T), nelfinavir (NFV) and nevirapine (NVP): preliminary safety, activity and pharmacokinetic (PK) interactions. Skowron G, Leung G, Dusek A, et al. 5th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, 1998, abstract 350. ③The pharmacokinetics of combination therapy with nelfinavir plus nevirapine in HIV positive patients. Vilro J, Mascaro J, Colomer J, et al. 41st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Chicago, December 1998. ④Pharmacokinetic interaction between efavirenz and nelfinavir mesylate in healthy volunteers. Fiske WD, Benedek JH, White SJ, et al. 5th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, 1998, abstract 348. ⑤Viracept [package insert], La Jolla, CA; Agouron Pharmaceuticals, Inc.; 2003.
140	NFV(ビラセプト)	EFV(エトリブタール)	600mg 1日1回 × 7日間	750mgを8時間ごとに1日3回 × 7日間	AUCが12%減少, Cmaxが19%減少, Cminが22%減少する	AUCが20%上昇, Cmaxが21%上昇する	-	-	投与量の調節は必要なし	-	①Viracept [package insert], La Jolla, CA; Agouron Pharmaceuticals, Inc.; 2003.
141	NFV(ビラセプト)	DLV(レスクリブタール)	400mg 1日3回 × 14日間	750mgを1日3回 × 7日間	AUCが31%減少, Cmaxが27%減少, Cminが33%減少する	AUCが107%上昇, Cmaxが88%上昇, Cminが138%上昇する	-	-	投与量の調節は必要なし	-	①Viracept [package insert], La Jolla, CA; Agouron Pharmaceuticals, Inc.; 2003.
142	NFV(ビラセプト)	DLV(レスクリブタール)	400mg 1日3回 × 14日間	750mgを1日3回 × 14日間	AUCが42%, Cminが52%減少する	AUCが72%上昇する	ネルフイナビルとの効果増強	テラビリンによるCYP450 3A4への阻害作用	投与量の調節は必要なし	-	①Viracept [package insert], La Jolla, CA; Agouron Pharmaceuticals, Inc.; 2003.
143	NFV(ビラセプト)	DLV(レスクリブタール)	400mg 1日3回	750mg 1日3回	AUCが51%上昇, Cmaxは10%減少する	AUCが83%上昇, Cmaxが31%上昇する	ネルフイナビルとの効果増強	インジナビルとネルフイナビルによるCYP450 3A4への阻害作用	投与量の調節は必要なし	-	①Viracept [package insert], La Jolla, CA; Agouron Pharmaceuticals, Inc.; 2003. ②Cox SR, Schneck DH, Herman BD, et al. Delavirdine (DLV) and nelfinavir (NFV): a pharmacokinetic (PK) drug-drug interaction study in healthy adult volunteers [abstract #345]. 5th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Feb. 1-5, 1998, Chicago, Illinois. ③DDG. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-infected adults and adolescents. Jan 28, 2000. [AIDS Treatment Information Service: Current Treatment] Available at http://www.hivatis.org/trguidelines.html . Accessed April 26, 2000. ④Viracept [package insert], La Jolla, CA; Agouron Pharmaceuticals, Inc.; 2001. ⑤Yuen G, Anderson R, Daniels R, et al. Investigations of nelfinavir mesylate pharmacokinetic interactions with indinavir and ritonavir [abstract #428]. 4th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections; 1997 Jan 28-Feb 1; Washington, D.C. ⑥Havir DV, Riddler S, Squires K, et al. Co-administration of indinavir and nelfinavir in a twice daily regimen: preliminary safety, pharmacokinetic and antiviral activity results [abstract #393]. 5th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections; 1998 Feb 1-5; Chicago, Illinois. ⑦Squires K, Riddler S, Havir D, et al. Co-administration of indinavir 1000 mg and with escalating Viracept [package insert], La Jolla, CA; Agouron Pharmaceuticals, Inc.; 2003. ⑧Yuen G, Anderson R, Daniels R, et al. Investigations of nelfinavir mesylate pharmacokinetic interactions with indinavir and ritonavir [abstract #428]. 4th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections; 1997 Jan 28-Feb 1; Washington, D.C. ⑨Havir DV, Riddler S, Squires K, et al. Co-administration of indinavir and nelfinavir in a twice daily regimen: preliminary safety, pharmacokinetic and antiviral activity results [abstract #393]. 5th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections; 1998 Feb 1-5; Chicago, Illinois. ⑩Squires K, Riddler S, Havir D, et al. Co-administration of indinavir 1200 mg and with escalating nelfinavir dose in a twice daily regimen: preliminary safety, pharmacokinetic and anti-viral activity. 36th Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America, 1998 Nov 11-14; Denver, Colorado. ⑪Squires K, Riddler S, Havir D, et al. Co-administration of indinavir 1200 mg with nelfinavir 1250 mg in a twice daily regimen: preliminary safety, PK activity. 6th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections; 1999 Jan 31-Feb 4; Chicago, Illinois.
144	NFV(ビラセプト)	IDV(クリキシン)	800mg 単回投与	750mgを8時間ごとに1日3回 × 7日間	AUCが61%上昇, Cmaxは10%減少する	AUCが83%上昇, Cmaxが31%上昇する	ネルフイナビルとの効果増強	インジナビルによるCYP450 3A4への阻害作用	投与量の調節は必要なし	-	①Viracept [package insert], La Jolla, CA; Agouron Pharmaceuticals, Inc.; 2003. ②Squires K, Riddler S, Havir D, et al. Co-administration of indinavir 1200 mg and with escalating nelfinavir dose in a twice daily regimen: preliminary safety, pharmacokinetic and anti-viral activity results [abstract #393]. 5th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections; 1998 Feb 1-5; Chicago, Illinois. ③Squires K, Riddler S, Havir D, et al. Co-administration of indinavir 1200 mg and with escalating nelfinavir dose in a twice daily regimen: preliminary safety, pharmacokinetic and anti-viral activity. 36th Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America, 1998 Nov 11-14; Denver, Colorado. ④Squires K, Riddler S, Havir D, et al. Co-administration of indinavir 1200 mg with nelfinavir 1250 mg in a twice daily regimen: preliminary safety, PK activity. 6th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections; 1999 Jan 31-Feb 4; Chicago, Illinois.
145	NFV(ビラセプト)	IDV(クリキシン)	800mg 2時間ごと1日3回 × 7日間	750mg 単回投与	AUCは重要な変化なし(800 mgを1日3回2時間ごと)に投与した場合と比較している。Cmaxは重要な変化なし	AUCが83%上昇, Cmaxが31%上昇する	ネルフイナビルとの効果増強	インジナビルによるCYP450 3A4への阻害作用	インジナビル1200 mg 1日1回12時間毎、ネルフイナビル1250 mg 1日1回12時間毎	-	①Viracept [package insert], La Jolla, CA; Agouron Pharmaceuticals, Inc.; 2003. ②Squires K, Riddler S, Havir D, et al. Co-administration of indinavir 1200 mg and with escalating nelfinavir dose in a twice daily regimen: preliminary safety, pharmacokinetic and anti-viral activity results [abstract #393]. 5th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections; 1998 Feb 1-5; Chicago, Illinois. ③Squires K, Riddler S, Havir D, et al. Co-administration of indinavir 1200 mg and with escalating nelfinavir dose in a twice daily regimen: preliminary safety, pharmacokinetic and anti-viral activity. 36th Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America, 1998 Nov 11-14; Denver, Colorado. ④Squires K, Riddler S, Havir D, et al. Co-administration of indinavir 1200 mg with nelfinavir 1250 mg in a twice daily regimen: preliminary safety, PK activity. 6th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections; 1999 Jan 31-Feb 4; Chicago, Illinois.
146	NFV(ビラセプト)	IDV(クリキシン)	1200mgを1日2回(12時間ごと)	1,250mgを1日2回(12時間ごと)	AUCは重要な変化なし(800 mgを1日3回2時間ごと)に投与した場合と比較している。Cmaxは重要な変化なし	重要な変化なし	-	-	インジナビル1200 mg 1日1回12時間毎、ネルフイナビル1250 mg 1日1回12時間毎	-	①Viracept [package insert], La Jolla, CA; Agouron Pharmaceuticals, Inc.; 2003. ②Squires K, Riddler S, Havir D, et al. Co-administration of indinavir 1200 mg and with escalating nelfinavir dose in a twice daily regimen: preliminary safety, pharmacokinetic and anti-viral activity results [abstract #393]. 5th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections; 1998 Feb 1-5; Chicago, Illinois. ③Squires K, Riddler S, Havir D, et al. Co-administration of indinavir 1200 mg and with escalating nelfinavir dose in a twice daily regimen: preliminary safety, pharmacokinetic and anti-viral activity. 36th Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America, 1998 Nov 11-14; Denver, Colorado. ④Squires K, Riddler S, Havir D, et al. Co-administration of indinavir 1200 mg with nelfinavir 1250 mg in a twice daily regimen: preliminary safety, PK activity. 6th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections; 1999 Jan 31-Feb 4; Chicago, Illinois.

No.	薬剤名	対象薬	対象薬の投与量	本剤の投与量	対象薬の薬物動態	本剤の薬物動態	予想される相互作用	相互作用のメカニズム	対処方法	参考文献
147	NFV(ビラセプト)	SOV(インビラゼ、フォートベイス)	1200mg/日3回投与	750mgを1日3回×4日間	AUCが392%上昇、Cmaxは179%上昇する	-	サキナビル効果増強	ネルフィナビルによるCYP450 3A4への阻害作用	サキナビルは800mg/日3回に、ネルフィナビルは750mgを1日3回、あるいはサキナビル1200mg/日2回に、ネルフィナビル1250mgを1日2回投与し	Viracept (package insert), La Jolla, CA: Agouron Pharmaceuticals, Inc., 2003. (BR) Inivase (package insert) Roche Laboratories Inc, Nutley, NJ, 2003.
148	NFV(ビラセプト)	SOV(インビラゼ、フォートベイス)	1200mg/日3回投与×4日間	750mgを1日3回×4日間	換算なし	AUCが18%上昇、Cmaxは変化なし	-	-	投与量の調節は必要なし	Viracept (package insert), La Jolla, CA: Agouron Pharmaceuticals, Inc., 2003. (BR) Inivase (package insert) Roche Laboratories Inc, Nutley, NJ, 2003.
149	NFV(ビラセプト)	SOV(インビラゼ、フォートベイス)	1200mg/日3回投与×4日間	750mgを1日3回×4日間	AUCが392%上昇する	AUCが18%上昇する	-	ネルフィナビルとサキナビルによるCYP450 3A4への阻害作用	サキナビルは800mg/日3回あるいは1200mg/日2回に減量する。ネルフィナビルは用量変更必要なし	Viracept (package insert), La Jolla, CA: Agouron Pharmaceuticals, Inc., 2003. (BR) Inivase (package insert) Roche Laboratories Inc, Nutley, NJ, 2003.
150	NFV(ビラセプト)	RTV(ノービア)	500mg/日3回投与	750mgを1日2回×5日間	換算なし	換算なし	-	-	投与量の調節は必要なし	Viracept (package insert), La Jolla, CA: Agouron Pharmaceuticals, Inc., 2003.
151	NFV(ビラセプト)	RTV(ノービア)	500mg/日3回投与	750mgを1日2回×5日間	換算なし	AUCが152%上昇、Cmaxは44%上昇する	ネルフィナビルの効果増強	リトナビルによるCYP450 3A4への阻害作用	投与量の調節は必要なし	Viracept (package insert), La Jolla, CA: Agouron Pharmaceuticals, Inc., 2003.
152	NFV(ビラセプト)	RTV(ノービア)	200mgあるいは400mgを1日1回×15日間(午後)	200mg/リトナビル、200mg/リトナビル、200mg/リトナビル、400mgあるいは200mg/リトナビル、200mg/リトナビル、200mg/リトナビル、200mg/リトナビル	換算なし	AUCが17-27%上昇(リトナビル100mg/日2回併用)、C _{BR} M ₈ AUCは上昇67-82%(リトナビル100mg/日2回併用)、C _{BR} AUCは20-53%上昇(リトナビル200mg/日2回併用)、C _{BR} M ₈ AUCは69-87%上昇(リトナビル)	ネルフィナビルの効果増強	リトナビルによるCYP450 3A4への阻害作用	1日1回投与であれば、ネルフィナビル2000mg/リトナビル200mgを食後投与する	Viracept (package insert), La Jolla, CA: Agouron Pharmaceuticals, Inc., 2003. (BR) Inivase (package insert) Roche Laboratories Inc, Nutley, NJ, 2003.
153	NFV(ビラセプト)	RTV(ノービア)	100mgあるいは200mgを1日2回×18-31日間	1250mgを1日2回×31日間	換算なし	AUCが17-27%上昇(リトナビル100mg/日2回併用)、C _{BR} M ₈ AUCは上昇67-82%(リトナビル100mg/日2回併用)、C _{BR} AUCは20-53%上昇(リトナビル200mg/日2回併用)、C _{BR} M ₈ AUCは69-87%上昇(リトナビル)	ネルフィナビルの効果増強	リトナビルによるCYP450 3A4への阻害作用	投与量の調節は確立されてはいない	Viracept (package insert), La Jolla, CA: Agouron Pharmaceuticals, Inc., 2003. (BR) Inivase (package insert) Roche Laboratories Inc, Nutley, NJ, 2003.
154	NFV(ビラセプト)	APV(プロセ)	800mgを1日3回×14日間	750mgを1日3回×14日間	AUC変化なし、Cmaxは14%減少する、C _{min} は189%上昇する	重要な変化なし	-	ネルフィナビルとアンブレナビルによるCYP450 3A4への阻害作用	投与量の調節は必要なし	Viracept (package insert), La Jolla, CA: Agouron Pharmaceuticals, Inc., 2003.
155	NFV(ビラセプト)	APV(プロセ)	800mg/日3回	750mg/日3回	Cmaxは21%減少、C _{min} は167%上昇する	重要な変化なし	-	ネルフィナビルとアンブレナビルによるCYP450 3A4への阻害作用	投与量の調節は必要なし	Viracept (package insert), La Jolla, CA: Agouron Pharmaceuticals, Inc., 2003.
156	NFV(ビラセプト)	APV(プロセ)	1200mg/日2回(エファビレンツ併用)	1250mg/日2回	クリアランスが41%減少する	換算なし	-	アンブレナビルとエファビレンツによるCYP450 3A4への阻害作用	投与量の調節は確立されてはいない	Viracept (package insert), La Jolla, CA: Agouron Pharmaceuticals, Inc., 2003.
157	NFV(ビラセプト)	APV(プロセ)	750mgあるいは800mgを1日3回×14日間(午後)	750mgを1日3回×14日間(午後)	重要な変化なし	ネルフィナビルのAUCが15%上昇、Cmaxは変化なし	-	ネルフィナビルとアンブレナビルによるCYP450 3A4への阻害作用	投与量の調節は必要なし	Viracept (package insert), La Jolla, CA: Agouron Pharmaceuticals, Inc., 2003.
158	NFV(ビラセプト)	LPV(リカト)	400mg/リトナビル100mgを1日2回	1,000mgを1日2回	ロピナビルのCmaxが21%減少、AUCが27%減少、C _{min} が33%減少、C _{BR} リトナビルのCmaxが25%減少、AUCが24%減少、C _{min} が99%減少	AUCは変化なし、Cmaxは6%減少、C _{min} は113%上昇する(ネルフィナビル1,250mg/日2回併用と比較して)	カレトラの効果減弱	ロピナビル/リトナビル、P450 3A4への阻害作用	投与量の調節は確立されてはいない	Viracept (package insert), La Jolla, CA: Agouron Pharmaceuticals, Inc., 2003.
159	NFV(ビラセプト)	ATV(レイアック)	-	-	-	-	-	-	-	Viracept (package insert), La Jolla, CA: Agouron Pharmaceuticals, Inc., 2003.
160	NFV(ビラセプト)	ST(各剤/バクタ、バクタラミン等)	-	-	-	-	おそろく、重要な薬物相互作用なし	-	-	Viracept (package insert), La Jolla, CA: Agouron Pharmaceuticals, Inc., 2003.

No.	主治疾患	対象薬	対象薬の投与量	本剤の投与量	対象薬の薬物動態	本剤の薬物動態	予想される相互作用	相互作用のメカニズム	対応方法	変更可能な同効薬	参考文献
161	NFV(ビラセプト)	アシスロマイシン(水和物)(ジスロマック)	1200mg単回投与	750mg8時間毎1日3回×11日	AUCが112%上昇、Cmaxが136%上昇する	AUCが19%減少、Cmaxが10%減少、Cminが29%減少する	-	ネルフイナズビルのP-経路の阻害が原因の可能性あり	(併用注意)	-	©Viracept [package insert], La Jolla, CA; Agouron Pharmaceuticals, Inc.; 2003. ③A study of the pharmacokinetics of azithromycin and nelfinavir when coadministered in healthy volunteers. Amsden GW, Nafziger AM, Foulds G, et al. J Clin Pharmacol. 2000; 40: 1522-1527.
162	NFV(ビラセプト)	リアファンペンシリン(リファジン)、リマクタム(リマクタム等)	600mgを1日1回×7日間	750mgを8時間毎1日3回×5-6日	-	AUCが93%減少、Cmaxが78%減少、Cminが92%減少する	ネルフイナズビルの効果減弱	リアファンペンシリンによるCYP450 3A4への阻害作用	(併用禁忌) (R)リアファンシリンの投与を遅けた患者に本剤を投与する場合は、少なくとも2週間の間隔を置くことが望まし	リアファンペンシリン	©Viracept [package insert], La Jolla, CA; Agouron Pharmaceuticals, Inc.; 2003. ③CDC. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-infected adults and adolescents. Jan 28, 2000. [AIDS Treatment Information Service. Current Treatment]. Available at: ④Pharmacokinetic evaluation of oral levofloxacin in human immunodeficiency virus-infected subjects receiving concomitant antiretroviral therapy. Viliani P, Viale P, Signorini L, et al. Antimicrob Agents Chemother. 2001; 45(7):2160-2.
163	NFV(ビラセプト)	レボフロキサシン(クラビッド)	500mgを1日1回	750mgを1日3回	重要な変化なし	重要な変化なし	重要な相互作用はなし	-	-	-	⑤Fichtenbaum CJ, Gerber JG, Rosenkranz SL, et al. Pharmacokinetic interaction between protease inhibitors and statins in HIV seronegative volunteers: ACTG study A5047. AIDS 2002; 16:569-77.
164	NFV(ビラセプト)	ゾラバスタチン(メハロゾン等)	40mgを1日1回×15-18日間	1250mgを1日2回×1-18日間	検出なし	AUCの大きさが変化なし、Cminは61%上昇する	-	不明	投与量の調節は必要なし	-	⑥Viracept [package insert], La Jolla, CA; Agouron Pharmaceuticals, Inc.; 2003. ③Hsyu PH, Schultz-Smith MD, et al. Pharmacokinetic interactions between nelfinavir and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A inhibitors atorvastatin and simvastatin. Hsyu PH, Schultz-Smith MD, Lillibridge JH, et al. Antimicrob Agents Chemother. 2001; 45: 3445-3450.
165	NFV(ビラセプト)	シンバスタチン(リボバスタチン等)	20mg1日1回投与×28日間	1, 250mg12時間ごと1日2回投与×14日間	AUCが505%上昇、Cmaxは517%上昇する	おそろしく血中濃度への影響なし	-	CYP450 3A4への阻害作用	シンバスタチンのAUCが約8倍に上昇するとの報告があり、横紋筋融解症、ミオパチー等の副作用が出現するおそれがあることから、本剤とシンバスタチンとの併用は避けることが望ましい	アトルバスタチン、プラバスタチン	⑦Viracept [package insert], La Jolla, CA; Agouron Pharmaceuticals, Inc.; 2003. ③Hsyu PH, Schultz-Smith MD, et al. Pharmacokinetic interactions between nelfinavir and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A inhibitors atorvastatin and simvastatin. Hsyu PH, Schultz-Smith MD, Lillibridge JH, et al. Antimicrob Agents Chemother. 2001; 45: 3445-3450.
166	NFV(ビラセプト)	アトルバスタチン(リビトール)	10mg1日1回投与×28日間	1, 250mg12時間ごと1日2回投与×14日間	AUCが74%上昇、Cmaxは122%上昇、Cminが39%上昇する	おそろしく血中濃度への影響なし	アトルバスタチンの副作用(ミオパチーなど)	CYP450 3A4への阻害作用	可能であれば併用は避ける。併用量のアトルバスタチンならはミオパチーに注意して投与すること	プラバスタチン	⑧Viracept [package insert], La Jolla, CA; Agouron Pharmaceuticals, Inc.; 2003. ③Hsyu PH, Schultz-Smith MD, et al. Pharmacokinetic interactions between nelfinavir and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A inhibitors atorvastatin and simvastatin. Hsyu PH, Schultz-Smith MD, Lillibridge JH, et al. Antimicrob Agents Chemother. 2001; 45: 3445-3450.

厚生労働科学研究費補助金（エイズ研究事業）
分担研究報告書

逆転写酵素 d4T の薬剤耐性機序の解明

分担研究者：京都大学ウイルス研究所附属エイズ研究施設感染免疫研究領域 助手 児玉 栄一

研究要旨

d4T 耐性臨床分離 HIV の解析から耐性責任部位は逆転写酵素 (RT) 活性中心近傍に存在しないことを見出し、その部位以外の検討が必要であることを明らかとした。そのため、簡便な phenotype assay 系を NP-2 細胞にて樹立しつつある。また、薬剤耐性 HIV に有効な RT 阻害剤、4'-ethynyl-2'-fluoro-2'-deoxyadenosine を開発した。

A. 研究目的

現在、本邦においてもヒト免疫不全症ウイルス (HIV) 感染症に対して多剤併用療法 (HAART) が導入され、その治療成績は著しく向上したが、依然、薬剤耐性や多剤併用によって引き起こされる副作用の問題は残されたままである。また genotype/phenotype assay によって薬剤耐性 HIV の出現を早期に検出できつつあるが HAART において高頻度で使用される RT 阻害剤、特に d4T に対する耐性機序は依然不明のままであり、比較的簡便な genotype assay では検出が困難である。また HAART によって RT 阻害剤に対する耐性ウイルス、いわゆる多剤耐性株、の出現パターンが年々変化してきている。そこで分担研究者は臨床分離 HIV における HAART 中に誘導される RT 阻害剤に対する耐性機序の詳細な解明という基礎的解析から新しい genotype assay 法の確立、併せて、新規 RT 阻害剤開発およびそれらに対する耐性機序の解析を行い、臨床応用を視野に入れた研究を推進する。

B. 研究方法

細胞とウイルス

ヒト T 細胞株である MT-2 細胞、ヒトグリオーマ由来細胞である NP-2 細胞、HeLa-CD4/ β -galactosidase (MAGI) 細胞を使用した。野生型と組換えウイルスはプラスミドクローンである pNL4-3 とその組換え体を 293T 細胞に遺伝子導入して作製した。健常ヒト末梢リンパ球 (PBM) は PHA で刺激したのちに臨床 HIV 株の分離に用いた。

d4T 耐性機序の解明

HAART 中で d4T に対して耐性化が認められた HIV 感染患者サンプルより DNA を抽出し、逆転写酵素領域 (RT 活性中心部を含むアミノ酸 14 から 267 番目まで) を PCR 法で増幅し塩基配列を決定した。また、この部位を感染性分子クローン、pNL4-3 に組換え、MAGI 法によって phenotype assay を行い、耐性度を検討した。

新しい phenotype assay の確立

NP-2 細胞に HIV receptor である CD4、

CXCR4、CCR5 を発現するプラスミドを遺伝子導入した (NCK45 細胞)。この NCK45 細胞を使用し、MTT を利用した色素法で HIV 感染を検出し、薬剤感受性試験法の確立を試みた。また reporter gene (本年度は β -galactosidase: β -Gal) を同様に導入し、 β -Gal による検出法の確立も試みた。

新規 RT 阻害剤のスクリーニング

研究代表者らは、4'-ethynyl-2'-deoxynucleoside が耐性 HIV に対しても強い抗 HIV 活性を有することを報告しているが、その誘導体の抗 HIV 作用を MAGI 法にて検討した。

(倫理面への配慮)

基礎研究であり、特に配慮は要らないと考えられた。臨床分離株の患者情報に関しては薬剤使用歴を除いて氏名、年齢、性別も含めて一切を研究に利用していない。

C. 研究結果

1) d4T 耐性機序

臨床的 d4T 耐性患者サンプル 20 例の RT 領域の塩基配列を決定したが、in vitro で報告されているような d4T 耐性責任変異を有するサンプルはなかった。また、一部のサンプルで組換えウイルスを作製し、その d4T に対する感受性を MAGI 細胞で検討したが、臨床分離株で見られたような 20 倍以上の耐性化は認められず、5 倍程度の耐性しか認められなかった。これらのことから、d4T の耐性責任変異は RT の 14 から 267 番目といった酵素活性部位以外に存在すると考えられた。

2) NCK45 細胞の樹立

臨床分離 HIV では、CXCR4 をコレセプターとして細胞に進入する X4-HIV よりも CCR5 をコレセプターとして進入する R5-HIV が、大多数であることが知られている。実験室内細胞株において HIV の感染を十分に維持できるだけの CXCR4 を発現している細胞はあるが CCR5 を発現しているものは現在まで同定されていない。そのため、新規に遺伝子導入して CCR5 を発現させる必要がある。しかし、外部から導入された遺伝子は早期に遺伝子サイレンシングを受け、その発現が低下することが

部から導入された遺伝子は早期に遺伝子サイレンシングを受け、その発現が低下することが知られている。そのため本研究ではサイレンシング効果が低いヒトグリオーマ細胞由来 NP-2 細胞を用いた。また、プラスミドセレクションマーカーである薬剤耐性遺伝子 (G418-phosphotransferase) と HIV レセプター遺伝子を IRES (internal ribosomal entry site) で融合させ、CCR5 発現量の低下を防いだ (Figure 1A)。このように新しい phenotype assay 用に CD4/CXCR4/CCR5 を導入した (NCK45) を樹立した。

NCK45 細胞における HIV レセプターを flow cytometer で解析したところ CD4/CXCR4/CCR5 の発現レベルはあまり高いものではなかったが、HIV の感染性は MAGI 細胞とほとんど差がなかった。さらに 6 ヶ月間培養を続けてもレセプターの発現低下はほとんど認められなかった。一方で MAGI 細胞は 6 ヶ月間目にはその HIV 感受性が 10 分の 1 にまで低下していた (Figure 1B)。

次に NCK45 細胞を用いて MTT 法で抗 HIV 活性を測定することができるかどうかを検討した。吸着阻害剤、RT 阻害剤、転写阻害剤等々を検討したが、MAGI 細胞で得られた結果とほぼ同様であった。また、同様に β -Gal を指標とした MAGI 変法においても MAGI 細胞と同様の結果を得た (Figure 1C)。

3) 新規 RT 阻害剤

新規 RT 阻害剤のスクリーニングから 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine (4'-EFdA) を同定した。この薬剤は MT-4 を用いた MTT 法で 60 pM という非常に強い活性を有していた。耐性 HIV に関して M184V 変異によって感受性がやや低下するが、他の主な耐性変異ウイルスには感受性を維持していた (Figure 2)。

D. 考察

臨床分離株の RT 領域に d4T に対する耐性変異が同定されなかったこと、そして RT 領域の組換えウイルスが d4T に低い耐性しか示さなかったことから、現在までに報告されていない変異、つまり従来の RT 活性中心近傍ではない変異が耐性を付与することが示唆された。今後、臨床分離 HIV 株の DNA 断片を組み換え範囲を広げてその責任耐性変異部位を同定する予定である。今回の低い耐性は、他の RT 阻害剤に対する耐性変異 (NAM: nucleoside associated mutation) によって付与されたものと考えられた。事実 RT 領域には AZT 関連変異である M41L、T215Y を含め、いろいろな耐性変異が導入されていた。これら NAM の蓄積が d4T 耐性を付与するという報告が多数あるが、今回の実験から否定的であることが明らかとなった。

これらの臨床分離株を効率的に培養そして薬剤感受性試験を簡便に測定しうる方法を早

期に確立する必要がある。本年度樹立した NCK45 細胞は今までに報告された細胞と比べ、長期培養によってもそのウイルス感受性に变化が少ない細胞として有用であると考えられた。MAGI 細胞は世界中でもっとも汎用されている細胞ではあるが、長期培養によってそのウイルス感受性が低下することが問題である。また、PBM を用いたアッセイはドナーによって細胞の性格が異なるため、サンプル間での比較が難しく、また、時間がかかることや p24 量を測るといった費用・煩雑さの問題がある。NCK45 細胞を用いた試験では、これらの問題点をすべて改善していると考えられ、今後、試験法の最適化を行う予定である。

今年度、分担研究者が以前報告した 4'-ethynyl 誘導体よりも抗 HIV 活性に関して優れた核酸誘導体を同定しており、臨床応用の可能性を検討する必要がある。以前報告した 4'-ethynyl 誘導体は糖鎖の 3' 位置に OH 基が付加されており、それを宿主 polymerase 認識、読み取るために細胞の DNA 合成が阻害され毒性が引き起こされると考えられたことから、本年度は塩基を修飾し毒性を低下させようと試みた。しかし活性は上昇したものの毒性を有意に低下させるにはいたらなかった。現在細胞毒性をさらに低減させるために誘導体の感受性を調べている。

来年度の到達目標を以下の 4 点として研究を遂行する予定である。1) 臨床分離 HIV を簡便にスクリーニングする phenotype assay の確立 (NCK45 細胞に HIV 感染を検出する適当なレポーター遺伝子を組み込む)、2) 症例の収集、3) 組換えウイルスの作成 (逆転写領域を含めた 5'-側)、4) 耐性 HIV にも効果を示す新しい RT 阻害剤の開発 (4'-EFdA の臨床分離株に対する効果判定)。

E. 結論

d4T の責任耐性部位は RT 活性中心以外にあると予想され、組換えウイルスの作製、症例の収集をさらに行う必要があると考えられた。そのために NCK45 細胞を用いて簡便で再現性のある試験法を樹立した。また、耐性 HIV を抑制しうる薬剤の基本骨格、4'-ethynyl-deoxyadenosine を同定した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kitano K, Kohgo S, Yamada K, Sakata S, Ashida N, Hayakawa H, Nameki D, Kodama E, et al. Attempt to reduce cytotoxicity by synthesizing the L-enantiomer of 4'-C-ethynyl-2'-deoxy-purine nucleosides as antiviral agents

- against HIV and HBV. *Antiviral Chem Chemother.* 14:161-167, 2004.
2. Kohgo S, Yamada K, Kitano K, Iwai Y, Sakata S, Ashida N, Hayakawa H, Nameki D, Kodama E, et al. Design, efficient synthesis, and anti-HIV activity of 4'-C-cyano- and 4'-C-ethynyl-2'-deoxy purine nucleosides. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 23:671-690, 2004.
 3. Hachiya A, Gatanaga H, Kodama E, et al. Novel patterns of nevirapine resistance-associated mutations of human immunodeficiency virus type 1 in treatment-naive patients. *Virology* 327:215-224, 2004.
 4. Masuda N, Yamamoto O, Fujii M, Ohgami T, Fujiyasu J, Kontani T, Moritomo A, Orita M, Kurihara H, Koga H, Nakahara H, Kageyama S, Ohta M, Inoue H, Hatta T, Suzuki H, Sudo K, Shimizu Y, Kodama E, et al. Studies of nonnucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. Part 1: Design and synthesis of thiazolidenebenzene sulfonamides. *Bioorg Med Chem.* 12:6171-6182, 2004.
 5. Hayakawa H, Kohgo S, Kitano K, Ashida N, Kodama E, et al. Potential of 4'-C-substituted nucleosides for the treatment of HIV-1. *Antiviral Chem Chemother.* 15: 169-187, 2004.
 6. Futaki S, Nakase I, Suzuki T, Nameki D, Kodama E, et al. RNase S complex bearing arginine-rich peptide and anti-HIV activity. *J Mol Recognit* in press.
 7. Nameki D, Kodama E, et al. Mutations Conferring Resistance to HIV-1 Fusion Inhibitors are Restricted by gp41 and Rev Responsive Element Functions. *J Virol.* 79:764-770, 2005

2. 学会発表

Kodama E. HIV-1 fusion inhibitor-resistance and development of the new inhibitors. The Japan-Korea Basic Scientific Cooperation Program. Recent Status and Future Prospect of Antiviral Chemotherapy. Nov 17-19, 2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特願 2004-007 発明の名称：4'-C-置換-2-ハロアデノシン誘導體
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

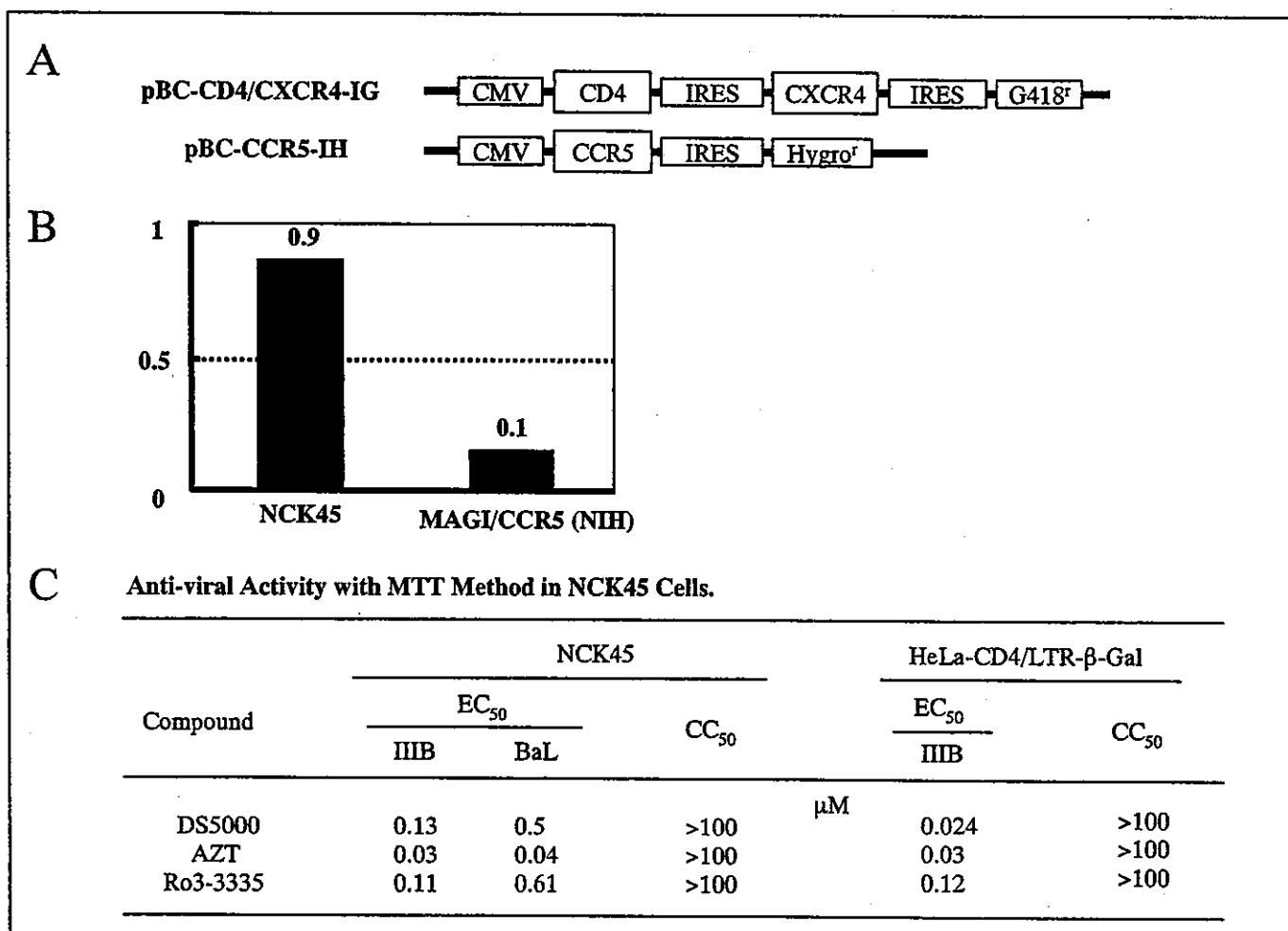


Figure 1. NCK45細胞を用いた抗HIV活性測定法の確立

A) NP-2細胞に導入したプラスミドの構成。CMVプロモーター下にCD4/CXCR4/G418耐性遺伝子、CCR5/Hygromycin耐性遺伝子をIRES配列を利用し、同時に発現できるようにした。B) 6ヶ月培養後のHIV-1感染性の推移。C) NCK45を用いたMTT法での抗HIV効果と従来のMAGI法の比較。DS5000: attachment inhibitor, AZT: RT inhibitor, Ro3-3335: Tat antagonist.

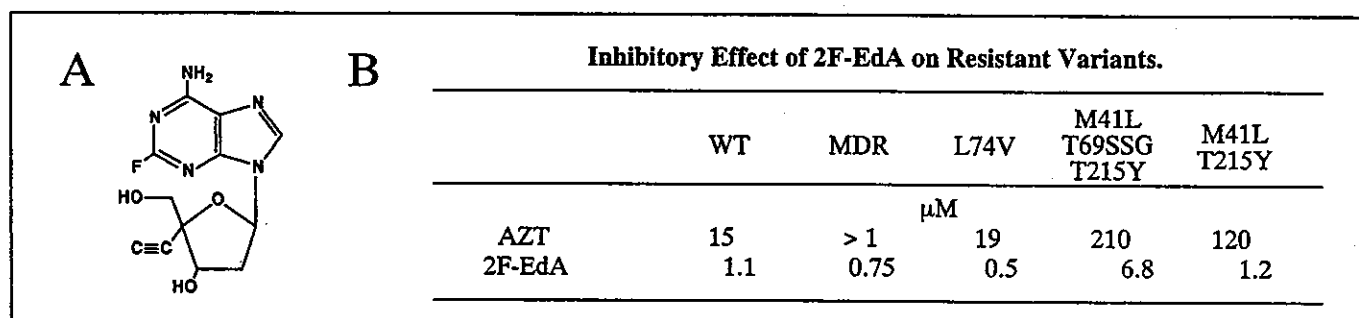


Figure 2. 4'-Ethinyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine (2F-EdA)の抗HIV活性

A) 2-F-EdAの構造式、B) 2-F-EdAの薬剤耐性HIVに対する効果。

厚生労働科学研究費補助金（エイズ研究事業）

分担研究報告書

薬剤耐性ウイルスの Genotyping 実験系の確立

分担研究者：異 正志（国立感染症研究所エイズ研究センター）

研究要旨 MAGIC-5A 細胞と Long PCR を用いた「HIV Trapping System」による効率的感染性 HIV-1 DNA クローン樹立法を邦人 CRF01_AE 組換え体薬剤耐性ウイルスに適用し、未だフィージビリティの高い感染性分子クローンが得られていない CRF01_AE 組換え体の薬剤耐性ウイルスのクローン樹立を試みたところ、Full-genome clone のうち 40% 以上の高効率で感染性分子クローンが得られた。この方法論で患者ウイルスの多様性を保持したクローン群を分離し、耐性変異の進展を予見しえる可能性が示唆された。

A. 研究目的

HIV 感染症の治療において今や耐性発現という問題は臨床・基礎医学の分野で避けて通る事の出来ない基本的な課題であり、耐性発現はこれからの HIV-1 に対する新規の治療薬開発で最重要課題と掲げられるようになった。現在多種多様な薬剤を用いて多様化する HIV 治療法における有効な薬剤選択の判定基準の一つとして Genotyping と Phenotyping の薬剤耐性試験があげられる。しかしながら両者を総合的に繋ぐ有効な方法論ははまだ確立されておらず、耐性ウイルスの出現に対応するレジメの変更は経験的な「勘」に依存する事例も多い。それは感染者体内での HIV-1 の存在様式が高度の多様性を示していることから、Genotyping あるいは Phenotyping といっても患者末梢血中のウイルスをバルクで解析するしか方法論がないためであった。分担研究者は現在まで HIV-1 ウイルス感染性分子クローン樹立法として HIV 感染価測定細胞株 MAGIC-5A と Long PCR を用いた「HIV-1

Trapping System」を開発し、世界に先駆けて Clade C, A, G および AG recombinant などの感染性分子クローンの樹立を報告し、その樹立の効率を高めるべく改良に努めてきた。一方、MAGIC-5A 細胞に新たに HIV-LTR 駆動分泌型アルカリフォスファターゼを組み込み、新規 HIV-1 感染価測定細胞株 MAGIC-5/SEAP を樹立し、迅速簡便な Phenotyping 薬剤耐性試験法を開発した。これらの細胞株を用いた多検体処理が可能な High Through-Put 薬剤耐性試験実験系の実用化を目指している。

本研究では Genotyping と Phenotyping 薬剤耐性試験法を有機的に統合し得る薬剤耐性試験法を開発すべく、先に述べた 2 方法を統合して邦人の薬剤耐性ウイルス解析に応用し、もって将来の薬剤耐性獲得機序と病原性解析の分子基盤を整備することを目的とした。

B. 研究方法

HIV-1 ウイルスのクローニングおよび Long PCR と全長ゲノム Plasmid 構築は先に報告し

た HIV 感染価測定系 Indicator 細胞 MAGIC-5/HeLa4.5 nEGFP 細胞株を用いた HIV ウイルスクローニングと感染性クローンの構築系(HIV Trapping System ; HIV捕捉実験系)により行った。対象としたウイルスは国立感染症研究所エイズ研究センター第2グループにより長期にわたり薬剤治療を受けている患者(コード番号 NH2000-0001)から分離された CRF01_AE 組換え体ウイルス(コード番号 DR2594)である。いまだ CRF01_AE 組換え体で薬剤耐性ウイルスの標準となるプロトタイプがないことからこのウイルスを選定した。

まず末梢血リンパ球の共培養で分離したウイルスを直接感染させた MAGIC-5A 細胞からゲノム DNA を抽出し、それを鋳型として、Long PCR を行い 5'-および 3'-側のプロウイルスゲノムを増幅、それらを連結することによって完全長の DNA クローンを得た。完全長 DNA クローン作製の戦略は当初先に報告した 5'-LTR から PBS までを予め pBR322 ベースの Cloning Vector pMT1 に組み込み、その Kas I 部位から 3'-LTR の PolyA signal 下流までを Not I 部位を付け加えた Primer で増幅した 9.0 Kbp に及ぶ Long Amplicon を制限酵素処理精製後組み込む方法と患者ウイルスの RT-PCR 法によって得られていた pol 領域における Rare cutter の制限酵素を選定し、その塩基配列を含む Primer で HIV-1 genome pol 下流領域を増幅し pMT1 に組み込み、しかる後に pol 上流領域を増幅した断片を酵素処理後組み込む Half & Half 戦略を用いて全長クローンを得た。得られたクローンは HeLa4.5nEGFP 細胞に Transfection しその培養上澄を

MAGIC-5A 細胞にかけ感染性を確認した。

本研究では、血液などヒト臨床材料が使用される場合には、材料提供者の個人情報が漏出しないよう厳格なプライバシー 保護に努める。このためヒト材料を用いた研究は連結不可能匿名化 (unlinked anonymous) の手法を行って個人情報の漏洩を防ぎ、患者の非特定性を保つ。また、研究方法および研究により生じうる研究対象者に対する不利益、危険性の排除について十分な説明を加え、守秘義務を守る。以上を遵守することで倫理面の問題は無いと判断した。

C. 研究結果

選別した CRF_01AE の薬剤耐性ウイルスについて感染性分子クローンの樹立を試みた。増幅用 Primer の設計は直接塩基配列決定により Pol 領域に見いだされた EcoR I 部位を含む患者ウイルス特異的な配列に基づいた。分離ウイルス感染 MAGIC-5A 細胞ゲノムを鋳型に HIV genome 右半分を EcoR I site を含む Pol Forward Primer と 3' LTR poly A signal 下流領域に Not I site を附加した Reverse Primer で約 5.5Kbp の Amplicon を増幅し電気泳動後精製し制限酵素処理後該当酵素で切断されないことを確認後 HIV-1 Cloning Vector pMT1 へ組み込み、LacZ 発現選択により組み込み陽性クローンを 5 クローン選別した。同じ Primer の Complementary な Reverse Primer と各 subtype consensus 5' LTR 領域上流に Sal I site を附加した Forward Primer で HIV genome 左半分を増幅後精製し該当酵素にて処理後精製し、酵素処理した先の右半分を組み込

んだクローンに組み込み全長クローン 87 クロ
ーンを得た。得られたクローンは
HeLa4.5nEGFP細胞にTransfectionしそのTat
活性と Syncytium 形成を確認後、その培養上
澄を MAGIC-5A 細胞にかけ感染性を確認した。
取得した全長クローン 87 個のうち 58 個 67%
のクローンがHeLa4.5 nEGFP細胞で Syncytium
陽性であり、さらにそのTransfection培養上
澄が MAGIC-5A 細胞で感染性を示すクローンは
38 個 44%になることが判明した。この感染
性分子クローンの取得率は今までになく高い
ものであった。得られた感染性分子クロー
ンの一部を選定し、pol 領域の塩基配列を決定
し、患者ウイルスの RT-PCR による直接塩基配
列と比較解析した。直接塩基配列によれば PR
領域には L10F, K20T, N88S の耐性変異が検出
されたが、部分塩基配列を決定した 32 感染性
クローン全てで同様な耐性変異が認められた。
このことから PCR 増幅に起因する
misincorporationによる塩基変異は想定より
低いものと考えられた。次に RT 領域には直接
塩基配列では M41L, 挿入変異
67STST68, T69T/A, L74V, V106L, Y188L, L210L/W
, T215Y などの多様な耐性変異が検出されてい
た。部分塩基配列を決定した 32 感染性クロー
ン全てで同様な耐性変異が認められたが、
E6D/E と G242K/Q の様々な組合せのクロー
ンが得られた。現在代表的な組合せの 8 クロ
ーン的全長塩基配列を決定の途上であるが、
得られた感染性分子クローンの薬剤耐性
Phenotype と全ゲノム情報がどのように関連
するか解明し得るものと期待される。

D. 考察

本年度は、Half & Half Strategyにより「HIV
trapping System」のさらなる効率化を実現し、
本邦感染者から分離した薬剤耐性 CRF01_AE
組換え体ウイルスから 38 クローンに及ぶ感染
性分子クローンが樹立された。これらのクロ
ーンの部分塩基配列の解析から、今までの患
者ウイルスのバルクでの直接解析では見えな
かった塩基配列の異なるパターンとの組合せの
薬剤耐性ウイルスが存在することが判明した。
この成績は、これら全ゲノムの感染性分子ク
ローンの高効率樹立法が、患者ウイルスの多
様性の解明に有力な解析手段を提供し、今ま
で成しえなかった Phenotyping と Genotyping
を統合した薬剤耐性試験法の開発が可能であ
り、薬剤耐性獲得機序の解明に有用であるこ
とを示している。

また今回樹立した CRF01_AE 組換え体の感染
性クローンは同組換え体のプロトタイプとして
現在異性間性交渉により本邦でも感染者が増
加している CRF01_AE 組換え体ウイルスの薬剤
耐性ウイルスの解析にとって Recombinant
Virus Assay などに応用できることからその
有用性は幅広いものと考えられる。

また今回比較対照とした NL4-3 株の検討か
ら現時点の Long PCR 法による HIV genome の
増幅における合成酵素の fidelity では感染
性クローンの取得率はほぼ極限まできている
ことが推測された。しかしながら今後も PCR
DNA Polymerase の Fidelity の向上は期待で
きることから、この戦略がさらに有効になる
ものと考えられる、

今後は得られた複数個の全長塩基配列解析

と、同一患者の時系列にそった分離ウイルスの感染性分子クローンの樹立と解析を行い、さらに CRF01_AE 組換体のみならず、本邦で感染者数が多い subtype B の薬剤耐性ウイルス感染性分子クローンの樹立を試みたい。

今年度に達成されたクローン樹立率の向上は更に改善され得ると考えられるが、現段階でも十分に実用化の段階に達したと考えられる。多様な遺伝子構造を持つ HIV-1 の研究はさらに多くの感染性クローンを必要とするが、その取り掛かる基盤が整備された。

E. 結論

感染性クローン樹立法をより効率的に進化させ様々な耐性パターンをもつ CRF01_AE 組換体の感染性クローンを樹立した。

F. 健康危険情報

該当する事項はない。

G. 研究発表

1. 発表論文

Harada T, Tatsumi M, Takahashi H, Sata T, Kurata T and Kojima A. Specific reactions between purified HIV-1 particles and CD4+ cell membrane fragments in a cell-free system of virus fusion or entry. *Microbes Infect.* 2004 Apr;6(5):421-8.

Kuroyama H, Ikeda T, Kasai M, Yamasaki S, Tatsumi M, Utsuyama M, Saito T, Hirokawa K Identification of a novel isoform of ZAP-70, truncated ZAP kinase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Mar 19;315(4):935-41.

Suzuki J, Ikeda T, Kuroyama H, Seki S, Kasai M, Utsuyama M, Tatsumi M, Uematsu H, Hirokawa K. Regulation of osteoclastogenesis by three human RANKL isoforms expressed in NIH3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Feb 20;314(4):1021-7.

2. 学会発表

原 敬志、坂本優子、照沼 裕、本多三男、山本直樹、巽 正志 Zambia由来サブタイプ C 感染性分子クローンの樹立と解析。第 52 回日本ウイルス学会、横浜、2004 年 11 月 21 日～23 日
木ノ本正信、徳永研三、坂本優子、生田和良、倉田 毅、佐多徹太郎、巽 正志 Ghana 由来 HIV-1 感染性分子クローンの樹立と解析。第 52 回日本ウイルス学会、横浜、2004 年 11 月 21 日～23 日

原 敬志、坂本優子、照沼 裕、本多三男、山本直樹、巽 正志 アフリカ由来 subtype C 感染性分子クローンの樹立と解析。第 18 回日本エイズ学会、静岡、2004 年 12 月 9 日～11 日
木ノ本正信、徳永研三、坂本優子、生田和良、倉田 毅、佐多徹太郎、巽 正志 HIV Trapping System による Ghana で流行する HIV-1 感染性分子クローンの樹立。第 18 回日本エイズ学会、静岡、2004 年 12 月 9 日～11 日

大槻貴博、清水宣明、大上厚志、巽 正志、星野洪郎 GPR1 をコレセプターとして使用する HIV-1 株の感染を検出する細胞株の作製。第 18 回日本エイズ学会、静岡、2004 年 12 月 9 日～11 日

富田康浩、Pumpradit W, Wichukchinda N, Pathipvanich P, Sawanpanyalert P, 草川 茂、武

部 豊、巽 正志、田中真理、横山 勝、有吉紅
也、佐藤裕徳 HIV-1 CRF01_AE R5 ウイルス株
NH2 に固有の抗体回避機構。第 18 回日本エイ
ズ学会、静岡、2004 年 12 月 9 日～11 日

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

該当なし

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
分担研究報告書

HIV Genotype と、薬剤耐性 RT Phenotype および RT Structural Type との相関解析

分担研究者 仲宗根正 国立感染症研究所・エイズ研究センター・主任研究官

研究要旨:日本の薬剤耐性 HIV-1 の動態を酵素学・遺伝子学・構造学の面から把握し、薬剤耐性克服に向けた研究に資することを目的とする。そのため、今年度は酵素学的な HIV-1 薬剤耐性動態把握のための検査体制確立を目指した。その結果、以下の知見を得た。

- ① 超高感度 RT 活性測定法: Real-Time Amp-RT Assay:RTA2 を開発した。
- ② 同検査法にて HIV 感染者および SHIV 感染サルの血漿 RT 活性が測定可能であった。
- ③ 血漿 RT 活性値と血漿ウイルス RNA 量はほぼ相関していたが、一部かい離が見られた。
- ④ AZT、d4T 耐性 RT (実験室由来) が測定可能であった。

協力研究者

佐藤裕徳 国立感染症研究所・遺伝子解析室

A. 研究目的

日本の薬剤耐性 HIV-1 の動態を酵素学・遺伝子学・構造学の面から把握し、薬剤耐性克服に向けた研究に資することを目的とする。そのため、今年度は酵素学的な HIV-1 薬剤耐性動態把握のための検査体制確立を目指した。

B. 研究方法

酵素学的な薬剤耐性動態把握のために、超高感度 RT 活性測定法による RT 薬剤感受性テストの開発を行った。まず超高感度 RT 活性測定法については RT-PCR 法を応用した Amp-RT 法を改良し、Real-Time PCR 法(TaqMan)を取り入れた Real-Time Amp-RT Assay:RTA2 を開発した。完成した RTA2 を用いて実際に臨床検体 (HIV 感染者血漿 120 検体、SHIV 感染サル血漿 22 検体、SHIV 感染サル髄液 2 検体、原因不明肺炎患者末梢血単核球 1 検体) を測定した。次に、RT 薬剤

感受性テスト開発のために、HIV-RT 標準 2 種と薬剤耐性 RT 1 種、薬剤耐性 HIV 株 5 株を譲り受けた。さらに薬剤 2 種 (6 形態) も入手して系の立ち上げ並びに至適化を行った。

C. 研究結果

1. SHIV 感染サルでは、血漿 RT 活性値と RNA コピー数は、セットポイント期では綺麗な相関が見られた。(図 1)
2. RT 活性値/RNA コピー数比で見ると、SHIV 感染サルでは、初感染後のピーク時はセットポイント期よりも低い傾向が見られた。
3. SHIV 感染サルでは、さらに剖検時の髄液中 RT 活性値/RNA コピー数比も、セットポイント期より低い傾向が見られた。
4. HIV 感染者では血漿 RT 活性値と RNA コピー数は、一部相関が見られなかった。
5. 細胞由来 RT 活性の測定が可能であった。
6. 細胞由来 RT 陽性症例を 1 例確認した。
7. AZT-TP 耐性 RT と d4T-TP 耐性 RT が測定可能であった。(図 2)

厚生科学研究費補助金 (エイズ対策研究事業)
分担研究報告書

D. 考察

今回、超高感度 RT 活性測定法 RTA2 が完成したことから次の意義が予想される。1) 安全・簡便・迅速 (半日) かつ広検出域のシステムの完成により、より多くの施設での使用が可能となる。2) HIV 感染者に対する多剤併用療法治療効果の指標として現時点で有用なのは CD4 数と血漿中ウイルス量であるが、血漿中 RT 活性値が新たな指標となりうる。3) 本システムでは 2 μ l の血漿中 RT 活性を測定可能であることから、HIV 感染新生児・乳児のモニターに有用である。4) 治療中の HIV 感染者において薬剤耐性 RT の出現を酵素学的に迅速に検出でき、さらに薬剤感受性テストにより感受性 RT 阻害剤の選別が可能となり、これらの情報を HIV 感染者に還元できる。しかしながら 4) については薬剤感受性テストが未完成である。今年度の検討では、AZT-TP と d4T による RT 阻害を定量的に捉えることに成功しているが、高度耐性 RT でなければ判定できないことから、現時点では感度の問題があると考えられるからである。

E. 結論

- ① 超高感度 RT 活性測定法: Real-Time Amp-RT Assay: RTA2 を開発した。
- ② 同検査法にて HIV 感染者および SHIV 感染サル の血漿 RT 活性が測定可能であった。
- ③ 血漿 RT 活性値と血漿ウイルス RNA 量はほぼ相関していたが、一部かい離が見られた。
- ④ AZT、d4T 耐性 RT (実験室由来) が測定可能であった。

F. 健康危険情報
特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Someya K, Cecilia D, Ami Y, Nakasone T, Matsuo K, Burda S, Yamamoto H, Yoshino N,

Kaizu M, Ando S, Okuda K, Zolla-Pazner S, Yamazaki S, Yamamoto N, Honda M. Vaccination of rhesus macaques with recombinant Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin Env V3 elicits neutralizing antibody-mediated protection against simian-human immunodeficiency virus with a homologous but not a heterologous V3 motif. J Virol. 2005 Feb;79(3):1452-62.

- 2) Usami O, Xiao P, Ling H, Liu Y, Nakasone T, Hattori T. Properties of anti-gp41 core structure antibodies, which compete with sera of HIV-1 infected patients. Microbes & Infection. 2005, accepted
- 3) Nakasone T, Hara T, Yoshino N, and Honda M. Update on HIV/AIDS in Japan, 2003. Eds. Lu, Y.; and Essex, M. HIV in Asia. Kluwer Academic Publishers. p72-78 2004.
- 4) Yamakami K, Honda M, Takei M, Ami Y, Nakasone T, Kitamura N, Nishinarita S, Sawada S, Horie T. Early bone marrow hematopoietic defect in simian/human immunodeficiency virus C2/t-infected macaques and relevance to advance of disease. J Virol. 2004;78:10906-10.
- 5) 仲宗根正、原敬志、染谷健二、池尾一穂、五條堀孝、山本直樹、本多三男。2004. HIV 感染症統合データベースの開発。日本エイズ学会誌、2004;6:42-9
- 6) 仲宗根正、山本直樹 ワクチンはまだか！ 感染・炎症・免疫 2005;35:in press

2. 学会発表

- 1) Motohara M, Suzuki H, Miyake A, Ibuki K, Masuda K, Minato N, Kawamoto H, Nakasone T, Honda M, Hayami M, and Miura T. Impaired T cell differentiation in thymus at early stage of SHIV-infected monkeys. The 3rd International Student Seminar. (Nov. 25, 2004, Kyoto)

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
分担研究報告書

- 2) Miyake A, Ibuki K, Enose Y, Suzuki H, Horiuchi R, Saito N, Nakasone T, Honda M, Miura T and Hayami M. Early Virological Events in Various Organs of Adult and Newborn Macaques after Intrarectal Infection with Pathogenic SHIV. 22nd Annual Symposium on Non human Primate Models for AIDS (Nov. 3-6, 2004, Seattle, USA)
 - 3) Ibuki K, Enose Y, Miyake A, Takahashi M, Suzuki H, Horiuchi R, Saitou N, Nakasone T, Honda M, Miura T, Takahashi H, and Hayami M. Analysis of gut-associated lymphoid tissues (GALT) at early phase of acute pathogenic SHIV intrarectal infection in macaques. The XV International AIDS Conference, (Jul. 11-16, 2004, Bangkok, Thailand)
 - 4) Miyake A, Ibuki K, Enose Y, Suzuki H, Horiuchi R, Saito N, Nakasone T, Honda M, Miura T and Hayami M. Early virological events in various tissues of adult and newborn macaques after intrarectal infection with pathogenic SHIV. The XV International AIDS Conference, (Jul. 11-16, 2004, Bangkok, Thailand)
 - 5) 仲宗根正 日本伝播HIV集団の遺伝子・分子生物学的解析及び分子力学的構造解析 第356回東北医学会例会シンポジウム 2004年11月26日 仙台
 - 6) 仲宗根正、Walid Heneine、山本直樹：逆転写酵素活性高感度測定法 (Real-Time Amp-RT Assay) の開発 第34回日本免疫学会 (12/1-3, 2004, 札幌)
 - 7) 仲宗根正、高松純樹、山本伸二、Walid Heneine、山本直樹：逆転写酵素活性高感度測定法 (Real-Time Amp-RT Assay) の開発 第18回日本エイズ学会 (12/9-11, 2004, 静岡)
 - 8) 田中慎一、大場孝、阪井弘治、仲宗根正、小島直也、佐多徹太郎、山本直樹、石川晃一：各種アジュバントを用いた抗 HIV 抗体産生能の検討 第18回日本エイズ学会 (12/9-11, 2004, 静岡)
 - 9) 横山勝、木ノ本正信、徳永研三、佐多徹太郎、長縄聰、北村勝彦、蜂谷敦子、岡慎一、服部知秀、田中真理、横幕能行、有吉紅也、星野忠次、仲宗根正、佐藤裕徳：計算科学の HIV-1 研究への適用に関する基礎研究 第18回日本エイズ学会 (12/9-11, 2004, 静岡)
 - 10) 山上賢治、武井正美、網康至、仲宗根正、北村登、三田村巧、本多三男、澤田滋正：病原性 SHIV C2/1 感染カニクイサルにおける早期骨髄幹細胞コロニー形成の障害と病態進行への関連性 第18回日本エイズ学会 (12/9-11, 2004, 静岡)
 - 11) Someya K, Matsuo K, Izumi Y, Ami Y, Nakasone T, Yamamoto N, Honda M. A novel recombinant vaccinia DIs is replication deficient and efficiently elicits virus-specific positive-immunity. 第18回日本エイズ学会 (12/9-11, 2004, 静岡)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

Plasma Viral RT Activity paralleled to Plasma Viral RNA Copy Number

SHIV/Cynomolgus Monkey AIDS Model

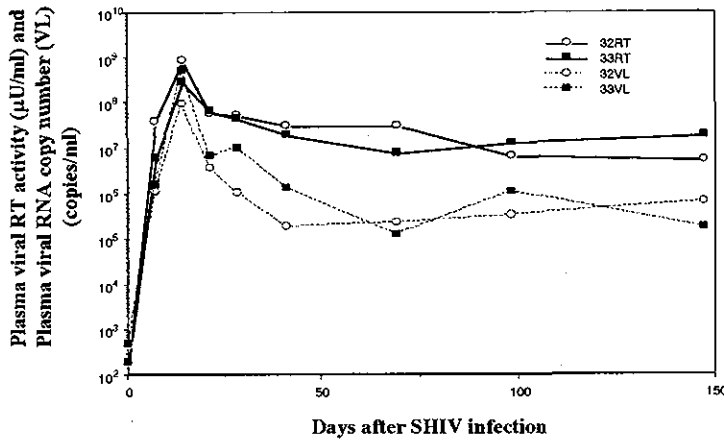


図1. SHIV感染サルでの血漿RT活性と血漿ウイルスRNA量の相関はほぼ相関していたが、一部かい離が見られた。

RTI Susceptibility Test by Use of RTA²

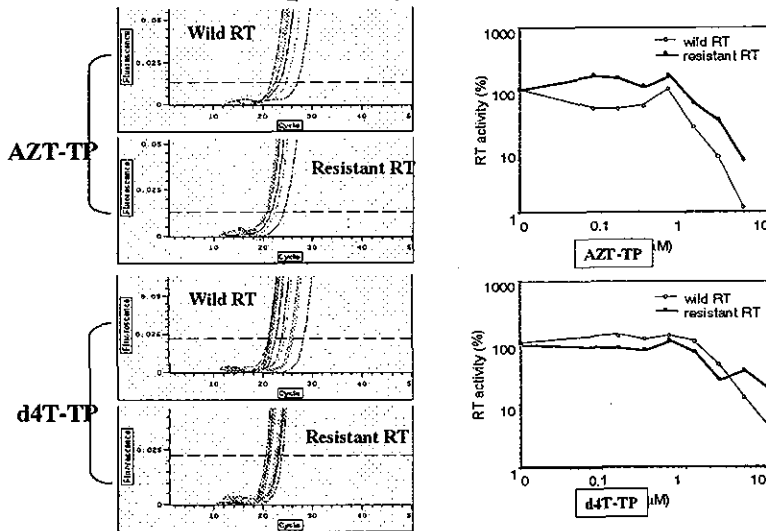


図2. 薬剤耐性HIV-RTの耐性検査
薬剤耐性HIV-RTはWild株RTに比べてAZT-TPとd4T-TPIに耐性を示した。

厚生労働省科学研究費補助金 (エイズ対策研究事業)
分担研究報告書

HAART の最適化に関する臨床研究

分担研究者：松下修三・熊本大学エイズ学研究センター・教授

研究要旨

抗ウイルス薬の多剤併用療法は、AIDS の発症率や死亡率を低下させたが、治癒をもたらすのは困難であると認識されるようになり、薬剤耐性の蓄積や、長期毒性などの問題点もあきらかとなってきた。よって、薬剤耐性変異や慢性毒性を克服し、長期にわたり HAART の有効性を得るためには、治療に用いられている薬剤の血中濃度と臨床効果や副作用・耐性変異を検討し、HAART の最適化を図ることが増々重要となってきている。本年度は、長期にわたり良好なコントロールを得ている症例のなかからリトナビル (RTV) +サキナビル (SQV) の double protease inhibitor を用いている症例の SQV の血中濃度に注目し、最適な薬剤の量と組み合わせについて考察すると同時に、薬剤代謝に関与する遺伝子の解析を行った。プロテアーゼ阻害剤の排出に関与する MDR1 遺伝子について SNPs タイピングを行った結果、最も高値を示した症例と最も低値であった症例が WT の homo であり、hetero や Mutant の homo のものは平均的な値であった。また、EFV と LPV/r を併用した 3 症例における LPV の PK を検討では、ウイルスが感度以下にならない症例では良好症例と比較すると LPV の血中濃度は有効濃度には達していたものの低値であった。今後、細胞内濃度との関係を検索する必要があると考える。

1. 研究目的

抗ウイルス剤の多剤併用療法は、AIDS の発症率や死亡率を低下させたが、治癒をもたらすのは困難であることと、様々な長期毒性があきらかとなったことから、いかにして副作用を抑えつつ長期間服薬継続ができるかという段階となっている。そのためには、抗ウイルス剤の組み合わせと最適な薬剤量の研究が、新規薬剤の開発と同様にきわめて重要である。本研究では、治療に用いられている薬剤の血中濃度と臨床効果や副作用・耐性変異の検索結果により、HAART に用いられる薬剤の組み合わせや量の最適化を図ることを目標にしている。そこで、本年度は、長期にわたり良好なコントロールを得ている症例のなかからリトナビル (RTV) +サキナビル (SQV) の double protease inhibitor を用いている症例の SQV の血中濃度に注目し、最適な薬剤の量と組み合わせについて考察すると同時に、薬剤代謝に関与する遺伝子の解析を行った。また、EFV と LPV/r を併用した 3 症例における LPV の PK を検討した。

2. 研究方法

症例； RTV(100 400mg, BID)+SQV(800 1000mg, BID)+RTIs で 2 年以上継続的に良好な治療効果 (HIV-RNA が測定感度以下) が得られている症例を対象とした。耐性変異検査；

患者末梢血単核球より DNA を分離し、nested-PCR にて逆転写酵素 (RT) とプロテアーゼ (PR) 部位耐性変異の有無を調べる。SQV の血中濃度測定； EDTA 加血より血漿を分離し (2 ポイント；服薬前及び薬剤服薬後 2 時間) (5 ポイント PK；服薬前及び薬剤服薬後 1, 2, 4, 8 時間)、HPLC にて SQV を定量した。また、それぞれの症例の genomic DNA を用い、薬剤耐性遺伝子 (ABCBI と ABCC4) の SNPs タイピングを行った。EFV と LPV/r の併用による治療でウイルス量が感度以下にならない症例の LPV の PK を、良好症例のそれと比較検討した。

(倫理面への配慮)

本研究を行うに当たり各症例には研究の概要を説明し同意を得た上で採血し、解析した。なお本研究の倫理的・科学的妥当性は熊本大学病院の先進医療審査委員会にて審査され、了承されている。また、遺伝子解析に関しても、倫理的・科学的妥当性は熊本大学医学部のヒトゲノム・遺伝子解析に係る倫理審査委員会にて審査され、了承されている。

3. 研究結果

1) RTV+SQV+RTIs で継続的に 2 年以上良好な治療効果を得ている症例が 11 例に増え、いずれの症例も副作用は観察されなかった。また PR に耐性変異は見られていない。

すなわち、RTV+SQVの組み合わせは上記の量でnRTIやNNRTIと併用した場合、SQVの有効濃度を保つことが可能で、長期にわたり良好な臨床効果が得られるだけでなく、副作用も少ないことが確認された。

- 2) 症例により、薬剤血中濃度に大きな差が見られていることから、これら11症例の多剤排出遺伝子の検索(ABCB1とABCC4のSNPsタイピング)を、東京大学医科学研究所の北村義浩先生との共同研究で開始した。詳細な検討にはさらなる情報の蓄積が必要と考えられるが、3年以上継続してSQVを服薬している症例の平均のトラフ値とMDR1遺伝子間で関係を見ると、最もSQVの平均トラフ値が高値を示した症例と最も低値であった症例がWTのhomo(C/C)であり、hetero(C/T)やMutantのhomo(T/T)のものはそれらの中間の値であった。
- 3) EFVとLPV/rを併用した3症例におけるLPVのPKを検討した結果、ウイルスが感度以下にならない症例では良好症例に比較すると全体的に低値であったが、有効濃度には達していた。今後、細胞内濃度との関係を検索する必要があると考える。

4. 考察

投与量や体重が、さほど変わらないにも関わらず、SQVの血中濃度に約10倍の差がある症例があり、これまで報告されてきたプロテアーゼ阻害剤の代謝に関与するといわれる、多剤排出トランスポーターであるMDR1遺伝子(ABCB1)のSNPsタイピングを東京大学医科学研究所の北村義浩先生と共同研究で行った。その結果、最も高値を示した症例と最も低値であった症例がWTのhomoであり、heteroやMutのhomoのものは平均的な値であった。今後、血中濃度と細胞内濃度との関係にMDR1遺伝子が関与しているかどうかの検索が必要であろう。同様の検討はEFVとLPV/rを併用した症例に於いても必要であると考えられるため、今後これらの組み合わせの症例に於いても、薬剤の細胞内及び血中濃度と、遺伝子タイピングを行って行く必要がある。これまででは、幸いにも薬剤耐性変異株の出現は確認されていないが、今後も定期的な監視が必要と思われる。また、d4Tに代表される、代謝異常を惹起する薬剤を含むHAARTを施行している場合、定期的に乳酸値や血糖値また、HbA1c等の測定を行うことで、比較的早期に副作用

の出現を察知することができ、薬剤変更を速やかに行うことが可能となる。また、当該薬剤を変更することにより、副作用の発現や、異常値の遷延を最小限に留められることも確認できている。今後は、同じ薬剤を服用しても、代謝異常が出現する症例としない症例の間の違いを、細胞レベルで検討すべく現在各症例から細胞株を作製している。

5. 結論

SQVの血中濃度の長期にわたる観察を行い、高い血中濃度を長期間維持し、副作用がほとんど見られない症例を、症例数を増やして報告した。これらの症例では、臨床経過も良好で耐性変異も見られなかった。また、プロテアーゼ阻害剤の排出に関与するMDR1遺伝子についてSNPsタイピングを実施したところ、最も高値を示した症例と最も低値であった症例がWTのhomoであり、heteroやMutのhomoのものは平均的な値であったことから、今後も明らかな耐性変異がProtease領域に見られないにも関わらず、SQV耐性を示す症例においての検討を進めていく必要があると考える。また、EFVとLPV/rを併用している症例については、特にウイルスが感度以下にならない症例でLPVの血中濃度の測定を行う必要性がある。

6. 研究発表

1) 論文発表

1. Matsushita, S., Yoshimura, K., Kimura T., Kamihiro, A., Takano, M., Eto, K., Shirasaka, T., Mitsuya, H., Oka, S.: Spontaneous recovery of hemoglobin and neutrophil levels in Japanese patients on a long-term Combivir[®] containing regimen. *J.Clin.Virol.* 2005 (in press).
2. Sakaguchi, N., Kimura T., Matsushita, S., Fujimura S., Shibata J., Araki M., Sakamoto T., Minoda S., and Kuwahara K. Generation of high-affinity antibody against T cell-dependent antigen in *ganp* gene-transgenic mouse. *J. Immunol.* 2005 (in press).

2) 学会発表

1. 小糸厚、柴田潤二、大杉剛生、松下修三、亀山祐一：小動物由来APOBEC3Gの抗HIV-1活性の解析。第52回日本ウイルス学会学術集会。2004.11.21-23。横浜。
2. 祁内 梓、木村 哲也、吉村 和久、小糸 厚、松下 修三：HIV Tat-Nef融合タンパクを用いた細胞性・液性免疫の誘導。第34回日本免疫学会総会・学術集会。2004.12.1-3。札幌。
3. 濱本理恵子、祁内 梓、吉村和久、小糸 厚、松下修三：HIV感染患者におけるヘルパーT細胞活性に対する制御性T細胞の影響。第34回日本免疫学会総会・学術集会。2004.12.1-3。札幌。
4. 柴田潤二、木村哲也、岩田隆一、吉村和久、小糸厚、松下修三：gp120のC3領域変異による抗V3中和抗体に対する中和抵抗性の獲得自己由来のHIVに対して中和活性をもつ血清中和抗体の交差中和性の研究。第18回日本エイズ学会学術集会。2004.12.9-11。静岡。
5. 岩田隆一、柴田潤二、木村哲也、吉村和久、小糸厚、松下修三：自己由来のHIVに対して中和活性をもつ血清中和抗体の交差中和性の研究。第18回日本エイズ学会学術集会。2004.12.9-11。静岡。
6. 松下修三：Introductory comments on HIV residual diseases (イントロダクション：HAARTで残存するウイルスとは?) 第18回日本エイズ学会学術集会。2004.12.9-11。静岡。
7. Shibata, J., Wang, F.X., Kimura, T., Iwata R., Yoshimura K., Koito, A., Matsushita, S.: Involvement of C3 mutation in neutralization sensitivity for anti-V3 antibodies. 5th AIDS seminar in Kumamoto 2004.9.9-10. Kumamoto.
8. Iwata, R., Shibata, J., Kimura, T., Yoshimura K., Koito, A., Matsushita, S.: Cross neutralizing activity of serum antibodies with neutralizing activity against autologous HIV. 5th AIDS seminar in Kumamoto 2004.9.9-10. Kumamoto.
9. Kenai, A., Kimura, T., Yoshimura K., Koito, A., Matsushita, S.: Efficient induction of both cellular and humoral immune response by immunization with Tat-Nef fusion protein (tNEF) without adjuvants. XV International AIDS Conference Bangkok, 2004.7.11-16, Bangkok, Thailand.
10. Matsushita, S., Kimura, T., Shirai, N., Koito, A., Yoshimura, K. New approach for optimization of HAART; Evaluation of residual viral replication by monitoring proviral DNA level and T cell turnover rate. XV International AIDS Conference Bangkok, 2004.7.11-16, Bangkok, Thailand.
11. Matsushita, S.: International symposium of AIDS Research Institute in Yonsei University College of Medicine "HIV/AIDS". 2004.10.15. Seoul, Korea.
7. 知的所有権の出願・取得状況
特になし

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 HIV 発生動向把握のための検査方法・調査体制確立に関する研究」

細胞膜融合を標的にした薬剤の耐性機序

分担研究者 松田善衛 国立感染症研究所エイズ研究センター第三室長

研究協力者 宮内浩典 国立感染症研究所エイズ研究センター第三室

研究要旨：現在、抗 HIV-1 化学療法の主体はウイルス酵素を標的としたものであるが、近年の膜融合分子機構の解析の進展に基づいて、膜融合を対象とした薬剤の開発、臨床使用が試みられている。これらの薬剤に対しても、耐性ウイルスの出現が予想される。有効な治療を達成するためには耐性機構の解析とともに、耐性度を定量的に評価できる系の構築も重要である。現状では膜融合過程の全容が明らかになっていないわけではないため、耐性機構の解明のためにも融合過程そのものの解析も継続していく必要がある。本年度は将来的な耐性ウイルス検出にむけて耐性評価の対象とすべき領域の検討および膜融合を定量的に評価できる系を検討した。その結果将来的に膜融合を評価する際にはエンベロープタンパク質の広範な部分を考慮に入れた評価が必要であることが示唆された。

A. 研究目的

現在の抗 HIV-1 化学療法の主体はウイルス酵素を標的とした治療剤によるものであるが、近年 HIV-1 エンベロープタンパク質を介した膜融合分子機構の解析の進展に基づいて、膜融合を対象とした薬剤の開発、臨床使用が試みられている。これらの薬剤に対しても、耐性ウイルスの出現が予想される。有効な治療を達成するためには耐性機構の解析が重要であるが、現状では膜融合のすべての過程が明らかになっていくわけではなく耐性機構の解明には融合過程そのものの解析の継続も不可欠である。一方、耐性の有無の評価には膜融合を定量的に評価できるアッセイ系の確立が必要である。本研究は膜融合過程の解明を目指した基礎的研究を行うとともに膜融合を解析するのに有用な手法の開発を目的とする。

B. 研究方法

1) 膜融合過程に影響を与えるエンベロープタンパク質領域の解析—今まで膜融合過程の

分子機構の解析は gp41 の細胞外部分の構造・機能解析がその中心となってきた。一方で膜融合にはそれ以外の gp41 の部分も必要と考えられる。膜融合能に影響を与える領域の同定は将来的に塩基配列解析による遺伝子型による耐性の評価の際の検査対象領域の選定上重要な意味を持つ。われわれは膜貫通部分の変異体を作成し、その膜融合に与える影響を検討した。この解析には点変異体及び膜貫通部分全体の置換変異体をもちいて解析を行なった。2) 定量的膜融合アッセイ系の検討—膜融合能を定量的に評価できるように融合細胞間での T7 RNA ポリメラーゼの移行を用いてアッセイを行なう系を評価した。今回の解析はクレード B の感染性分子クローン HXB2 を用いて培養細胞株を用いて行った。使用した培養細胞は MAGI 細胞（膜融合能の評価）、COS 細胞（タンパク発現の確認）、293T H9（細胞間蛍光色素移行の観察による膜融合各過程の評価）等である。本研究では倫理面で問題となるような試料や