

HIVの薬剤耐性研究の現状と今後の課題

杉浦 互

国立感染症研究所 エイズ研究センター

はじめに

1987年の zidovudine (ZDV) の登場により始まった HIV-1 感染症の薬剤治療は、1995年のプロテアーゼ阻害薬の登場と多剤併用療法 (HAART) の実現により大きく前進し、以後、欧米諸国においては AIDS による死亡率は顕著に低下した。HAART という積極的な薬剤治療の推進は HIV-1 感染者の予後を改善したが、その一方で薬剤耐性ウイルスを新たな脅威として登場させることになった。初回治療では、感染者の 40% 近くが血中ウイルスコピー数を検出限界以下にまで押し込め込むことに失敗するとされており、薬剤耐性ウイルスの出現が原因の大きな部分を占めている。ここでは薬剤耐性 HIV-1 に関する最近の知見を述べたい。

抗 HIV-1 薬剤の種類と耐性変異

2003年現在、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、合わせて15種類が実用化されている(表1)。一見、種類が豊富に見える抗 HIV-1 薬剤も、同種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た。その結果、1995年の HAART 導入以降、非常に多くの薬剤耐性遺伝子検査が実施され、HIV-1 の配列情報が集積された。表2~4には、今までに明らかにされた既存の薬剤に対する薬剤耐性変異を示してある。出現する耐性変異の部位は薬剤の標的とその作用機序により明確に異なっている。

ヌクレオシド系逆転写酵素阻害薬 (NRTI) は逆転写酵素に直接作用するのではなく、伸長する DNA 鎖の 3' 端に取り込まれ、伸長を停止させる作用すなわち chain terminator として働く薬剤である。NRTI に対する耐性変異の中で高頻度に認められ、耐性評価の基本となるのが ZDV 耐性変異とされてきた M41L, D67N, K70R, L210W, T215YF, K219QE の6個の変異群と 3TC に対して高度の耐性を示す M184V 変異である。M41L, D67N, K70R, L210W, T215YF, K219QE の6個の変異は、当初 ZDV に特有のものと考えられていたが、研究が進むにつれ didanosine (ddI), zalcita-

表 1. 抗 HIV-1 薬剤一覧

クラス	一般名	商品名	認可年
ヌクレオシド系逆転写酵素阻害薬 (nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitor: NRTI)	zidovudine (ZDV)	レトロビル®	1987
	didanosine (ddI)	ブサイデックス®	1992
	zalcitabine (ddC)	ハイビット®	1996
	stavudine (d4T)	ゼリット®	1997
	lamivudine (3TC)	エビビル®	1997
	abacavir (ABC)	ガイアジェン®	1999
非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害薬 (non-nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitor: NNRTI)	nevirapine (NVP)	ピラミューン®	1998
	efavirenz (EFV)	ストックリン®	1999
	delavirdine (DLV)	レスクリプター®	2000
プロテアーゼ阻害薬 (protease inhibitor)	saquinavir (SQV)	インビラーゼ®	1997
	ritonavir (RTV)	ノービア®	1997
	indinavir (IDV)	グリキシバン®	1997
	nelfinavir (NFV)	ピラセプト®	1998
	amprenavir (APB)	ブローゼ®	1999
	lopinavir/ritonavir (LPV/RTV)	カレトラ®	2000

bine (ddC), stavudine (d4T) に対しても薬剤感受性を低下させることが明らかになった。そのため最近では nucleoside analogue mutation (NAM) と呼ばれている。NAM 位置を逆転写酵素の立体構造上でみても、DNA の伸張が行われ薬剤が取り込まれる反応が行われている部位よりも離れており、NAM の獲得がどうして NRTI 耐性を引き起こすのか、そのメカニズムは長い間謎であった。1998 年になり、Arionらにより、NAM の場合は一旦 chain terminator として DNA 鎖に取り込まれた ZDV monophosphate が取り外される機序が充進していることが報告された。これは DNA 鎖に取り込まれた ZDV monophosphate が細胞内の pyrophosphate あるいは ATP 依存性 pyrophosphorolysis により取り外される反応である²⁾(enhanced excision)。NAM は単独ではそれほど耐性レベルが高くない。しかし、集積するに従い、耐性レベルが高まって行くことが知ら

れている。

一方、3TC の耐性変異 M184V の耐性発現機序はこれとは異なり、184 のメチオンンがバリンに置き換わることにより、側鎖が 3TC 分子に干渉するようになり (steric hindrance)、逆転写酵素の反応部位に 3TC が取り込まれにくくなるためとされている²⁾(decrease of uptake)。このため M184V の変異は単独できわめて高い耐性を呈することが知られている。

非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害薬 (NNRTI) は直接逆転写酵素に結合し作用する薬剤である。NRTI とは薬剤の作用機序が異なり、そして誘導される耐性変異もまったく異なっており、NNRTI と NRTI 間には原則的に交差耐性はない。この薬剤に対する耐性変異は薬剤と酵素間の結合親和性を低下させることにより耐性を発現する。したがって NNRTI の耐性変異は、3TC 同様に単独でも高い耐性レベルを呈する。

表 2. ヌクレオシド系逆転写酵素阻害薬耐性変異のリスト

	① NAM	② 3TC	③ 薬剤特異的	④ 全 NRTI (1)	⑤ 全 NRTI (2)
コドン No.	41 67 70 210 215 219	44 118 184	65 69 74 75 115	62 75 77 116 151	67 69 70
野性型アミノ酸	M D K L T K	E V M	K T L V Y	A V F F Q	D T K
NRTIs					
zidovudine (ZDV)	L N R W Y F Q E			V I L Y M	N ins R
didanosine (ddI)	L N R W Y F Q	V	R V	V I L Y M	N ins R
zalcitabine (ddC)	L N R W Y F Q	V	R D V	V I L Y M	N ins R
stavudine (d4T)	L N R W Y F Q		T	V I L Y M	N ins R
lamivudine (3TC)		D I V		V I L Y M	N ins R
abacavire (ABC)	L N R W Y F Q	V	R V F	V I L Y M	N ins R

耐性変異を五つのグループに分類し示してある。

- ① nucleoside analogue mutation (NAM) はもともと ZDV 耐性変異として知られてきた 6 種類の変異群である。
- ② 3TC に対する耐性変異群である。
- ③ どちらかという個々の薬剤に対して特異的な変異群である。
- ④ NRTI に対して多剤耐性を呈する変異群である。中心となる変異は Q151M である。
- ⑤ NRTI に対して多剤耐性を呈する変異群である。中心となる変異は 65-70 間の挿入変異である。

表 3. 非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害薬耐性変異のリスト

コドン No.	100	103	106	108	181	188	190	225	230	236
野性型アミノ酸	L	K	V	V	Y	Y	G	P	M	P
NNRTIs										
nevirapine (NVP)	I	N	A	I	CI	C	A			
efavirenz (EFV)	I	N		I		L	SA	H		
delavirdine (DLV)		N			C					L
全 NNRTI		N				L				
全 NNRTI	I		A		CI		SA		L	

プロテアーゼ阻害薬の耐性変異は大まかに二つのグループに分けることができる。まず major mutation と呼ばれる七つの変異 (D30N, M46IL, G48V, V50I, V82AFTS, I84V, L90M) は薬剤とプロテアーゼの親和性に影響を及ぼし耐性に大きく寄与するとされている。これに対して minor mutation と呼ばれるものは、それ自体のみでは耐性レベルに及ぼす影響は大きく

ないが, major mutation の存在下で, ウイルスの増殖能力を回復させる, あるいは耐性レベルを押し上げる働きをしていると考えられている³⁾。

薬剤耐性変異の相互作用

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

表 4. プロテアーゼ阻害薬耐性変異のリスト

	major mutations	minor mutations
コドン No.	30 46 48 50 82 84 90	10 20 24 32 33 36 47 53 54 63 71 73 77 88
野性型アミノ酸	D M G I V I L	L K L V L M I F I L A G V N
PIs		
saquinavir (SQV)	V A M	VL VT VCS I
ritonavir (RTV)	IL A S V M	FIRV MR L F I VL VT S I
indinavir (IDV)	L A S V M	IRV MR L F I V VT SA I
nelfinavir (NFV)	N L A S V M	FI I VT A I DS
amprenavir (APB)	IL V A S V M	FIRV L V LVM S
lopinavir (LPV)	IL V A S V M	FIRV MR L F I V L VL P VT S
全 PI	L A S V M	VIRV VML

耐性変異を major (primary) mutation, minor (secondary) mutation に分けて示してある。

PI : protease inhibitor

□ : 一次変異薬剤投与後、最初に出現することが多い変異であり、かつ薬剤感受性に大きく影響を及ぼすもの

ほか : 二次変異。一次変異に続いて出現してくる変異であり、一次変異と組み合わせることにより耐性レベルを上げる

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。ZDV 耐性変異 M41L+T215Y の組み合わせに 3TC の M184V が加わると、ZDV の感受性が回復することはその代表的なものである。また、特定の変異がある薬剤に対しては耐性を、別の薬剤に対しては反対に高い感受性を示すことも知られている。プロテアーゼの N88S は nelfinavir (NFV) に対して耐性を示すが、amprenavir (APB) に対してはむしろ高い感受性 (hypersusceptibility) を示す⁹⁾。また、長期にわたり NRTI の投与を受け、NRTI 耐性を獲得した患者では NNRTI の感受性が高まる事実が報告されている。hypersusceptibility が何によって引き起こされているか明確にされていないが、この NNRTI の hypersusceptibility は NRTI の中止により速やかに消

失することから、NRTI 耐性変異が関与していると考えられている⁵⁾。興味深いのは hypersusceptibility が治療効果に良い影響を与えているという報告がされていることである⁶⁾。現在のところ hypersusceptibility はある特定の感受性検査法 (ViroLogic 社) でしか観察することができず、現象そのものの確認、そして治療における意義はさらに検証をする必要があると思われる。

このほか、耐性変異間の相互作用としては、共存することによりウイルスの増殖能力が著しく低下する組み合わせが知られており、耐性ウイルスの進化に影響を及ぼしていることが報告されている。NFV 耐性変異の D30N と L90M が排他的関係を持つことはその代表的な例といえよう⁷⁾。

以上、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複数なされてきた。最近はさらに一歩進んで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、という情報を集積し、治療成功の確率を計算するデータベース構築の国際共同研究が提唱されている⁸⁾(RDI-project)。

薬剤耐性ウイルスの病態

薬剤治療により一度は検出限界以下(<50 コピー/mL)に押し込まれていた HIV-1 の増殖は、薬剤耐性変異を獲得することにより薬剤に抗して再び増殖をするようになる。多くの場合このリバウンド後の血中ウイルス量は治療前よりも低いレベルに落ち着くことが多い。そしてこのような症例では HIV-1 の増殖が抑え切られていないにもかかわらず、CD4 陽性 T 細胞が低下せずに維持あるいは増加を示す場合がある。

UCSF (University of California, San Francisco) の Deeks らは高度薬剤耐性症例において治療を中断し、その後のウイルス量と CD4 陽性 T 細胞数の動態を観察した。その結果、治療前後でウイルス量は増加し、また CD4 の低下を認めた。また、当初観察された耐性変異の多くは治療の中断とともに消失したと報告している⁹⁾。彼らの報告からは大まかに二つのことが示唆される。一つは、多剤耐性に陥った症例において検出限界以下に抑え込むことに失敗した場合でも使用薬剤により抑えられているウイルス集簇が存在するということであり、もう一つは薬剤耐性ウイルスでは野生株に比べてウイルスの増殖能力が低下している、すなわち病原性が低下している可能性があるということである。したがって薬剤耐性症例でも抗 HIV-1 治療を継続する必要がある、また部分的な治療効果が期待できると考えられる。

発展途上国における問題

HIV-1 の出現から 20 年を経た今日、世界には 4,200 万例の感染者、そしてその 84% にあたる 3,540 万例がアフリカと東南アジアの発展途上国に生活している。先進諸国において HAART が標準的な治療として行われているのに対して、発展途上国においては抗 HIV-1 薬剤が高価なために感染者たちが薬剤治療を受けられる機会はほとんど存在しなかった。しかし、近年先進諸国からの援助、NGO による積極的な支援、そして generic medicine の使用が WTO で認められるに至り、発展途上国においても HAART の時代が本格的に訪れることになった。そして、これらの地域において HAART を適正に実施するために、薬剤耐性 HIV-1 のモニタリングが最重要課題として大きな関心を持たれている。

問題は、このような国で広がっている HIV-1 が欧米諸国において主流となっているサブタイプ B ではないことである。現在までの HIV-1 研究はサブタイプ B を標的に進められてきたが、サブタイプ B における研究成果がそのまま非 B サブタイプに当てはまるかは明確にされていない。これまでにサブタイプ C、E、G¹⁰⁻¹²⁾ の薬剤耐性変異の解析と報告がなされているが、いずれのサブタイプにおいても NFV における耐性変異がサブタイプ B と異なっていることが指摘されている。また逆転写酵素阻害薬では、V106M の変異がサブタイプ C で特有であることが報告されている¹³⁾。以上、B と非 B では明らかに異なる部分があり、非 B において正確な薬剤耐性の評価を行うためには、さらに多くのデータを集積していくことが重要である。より理解を深めることを目的に現在、米国 Stanford 大学のグループが中心になって、12ヶ国 14 施設による国際的な共同研究が進められており、その成果が期待される¹⁴⁾。

文 献

- 1) Arion D *et al* : Phenotypic mechanism of HIV-1 resistance to 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) : increased polymerization processivity and enhanced sensitivity to pyrophosphate of the mutant viral reverse transcriptase. *Biochemistry* **37** : 15908, 1998.
- 2) Sarafianos SG *et al* : Lamivudine (3TC) resistance in HIV-1 reverse transcriptase involves steric hindrance with beta-branched amino acids. *Proc Natl Acad Sci USA* **96** : 10027, 1999.
- 3) Hirsch MS *et al* : Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection : recommendations of an International AIDS Society-USA Panel. *JAMA* **283** : 2417, 2000.
- 4) Ziermann R *et al* : A mutation in human immunodeficiency virus type 1 protease, N88S, that causes *in vitro* hypersensitivity to amprenavir. *J Virol* **74** : 4414, 2000.
- 5) Whitcomb JM *et al* : Hypersusceptibility to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors in HIV-1 : clinical, phenotypic and genotypic correlates. *AIDS* **16** : F41, 2002.
- 6) Haubrich RH *et al* : The clinical relevance of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor hypersusceptibility : a prospective cohort analysis. *AIDS* **16** : F33, 2002.
- 7) Sugiura W *et al* : Interference between D30N and L90M in selection and development of protease inhibitor-resistant human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob Agents Chemother* **46** : 708, 2002.
- 8) Larder B *et al* : The international HIV resistance response database initiative : a new global collaborative approach to relating viral genotype and treatment to clinical outcome. 11th International HIV drug resistance workshop. 111, 2002.
- 9) Deeks SG *et al* : Virologic and immunologic consequences of discontinuing combination antiretroviral-drug therapy in HIV-infected patients with detectable viremia. *N Engl J Med* **344** : 472, 2001.
- 10) Grossman Z *et al* : Genotypic variation of HIV-1 reverse transcriptase and protease : comparative analysis of clade C and clade B. *AIDS* **15** : 1453, 2001.
- 11) Gomes P *et al* : Different pathway to nelfinvir genotypic resistance in HIV-1 subtype B and G. in 9th CROI (Seattle, 2002).
- 12) Ariyoshi K *et al* : Patterns of point mutations associated with anti-retroviral drug treatment failure in CRF01AE (subtype E) infection differ from subtype B infection. *J AIDS* 2003. (in press)
- 13) Turner D *et al* : Novel drug resistance profiles in non-B subtype HIV-1 Infections. in 10th CROI (Boston, 2003).
- 14) Kantor R *et al* : Genotypic analyses of RT and protease sequences from person infected with non-subtype B HIV-1. in 10th CROI (Boston, 2003).

日本における薬剤耐性 HIV-1の現状

杉浦 互 国立感染症研究所エイズ研究センター

1. はじめに

Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS)の原因ウイルス Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)の同定以来今日までの約20年間、この感染症を制圧するために多くの研究が行われてきた。中でも治療薬剤の開発には目覚ましい進展があり、現在までに逆転写酵素を標的にし

た逆転写酵素阻害剤がヌクレオシド系 (NRTI) 6 薬剤, 非ヌクレオシド系 (NNRTI) 3 薬剤プロテアーゼを標的にしたプロテアーゼ阻害剤 (PI) が6 薬剤の, 合わせて15薬剤が開発実用化されている (表1)。これらの薬剤を複数組み合わせた多剤併用療法 (Highly active antiretroviral therapy : HAART) は1995年の導入以来先進諸国において素晴らしい治療効果を

表1 抗 HIV-1薬剤一覧

ク ラ ス	一 般 名	商 標 名	認 可 年
ヌクレオシド型逆転写酵素阻害剤 (nucleoside analogue RT inhibitor : NRTI)	Zidovudine (AZT)	レトロビル	1987
	Didanosine (ddI)	ヴァイデックス	1992
	Zalcitavine (ddC)	ハイビット	1996
	Stavudine (d4T)	ゼリット	1997
	Lamivudine (3TC)	エビビル	1997
	Abacavir (ABC)	ザイアジェン	1999
非ヌクレオシド型逆転写酵素阻害剤 (non-nucleoside RT inhibitor : NNRTI)	Nevirapine	ヴィラミューン	1998
	Efavirenz	ストックリン	1999
	Delavirdine	レスクリプター	2000
プロテアーゼ阻害剤 (protease inhibitor)	Saquinavir	インビラーゼ	1997
	Ritonavir	ノービア	1997
	Indinavir	クリキシバン	1997
	Nelfinavir	ビラセプト	1998
	Amprenavir	プローゼ	1999
	Lopinavir/Ritonavir	カレトラ	2000

Current status of anti-retroviral drug resistant HIV-1 in Japan

Wataru SUGIURA, AIDS Research Center, National Institute of Infectious Diseases

別刷請求先: 杉浦 互 〒208-0011 東京都武蔵村山市学園4-7-1 国立感染症研究所エイズ研究センター

Tel : 042-561-0771 Fax : 042-561-7746

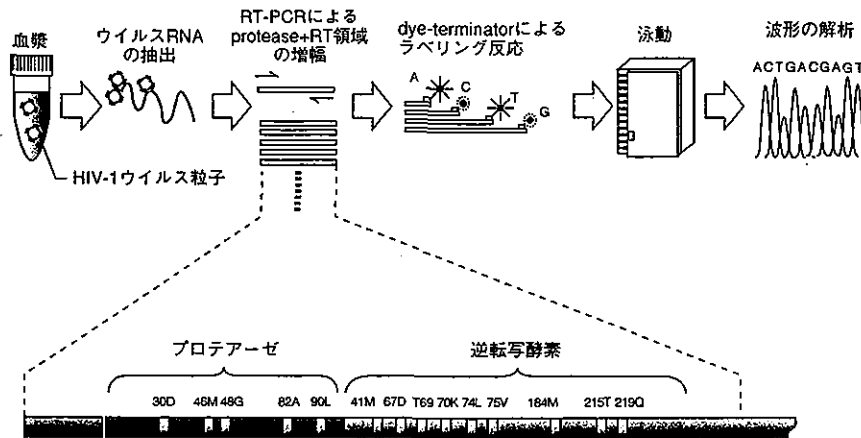
上げており、RT-PCRによる最も感度の良い検査手法を用いても血液中から HIV-1 RNA を検出出来ないレベル (50 copies/ml) にまで体内におけるウイルス増殖を長期間にわたり抑えることを可能にした。その結果 AIDS による死亡率は大きく低下し、米国 CDC の統計では HAART 導入前の30%程度までに減少した¹⁾。このように治療薬剤の開発とその普及は成功を収めてきたが、その一方で、治療薬剤に対して抵抗性を示す変異ウイルス、すなわち薬剤耐性ウイルスの出現という新たな難問を作り出すことになった。HIV-1感染症の薬剤治療は現時点では根治的なものではなく、治療薬剤を終生飲み続けなければならないことから、薬剤耐性ウイルスの出現は患者の予後に大きく影響を及ぼす深刻な問題となりつつある。以下、薬剤耐性

HIV-1とその検査方法、そして日本および世界の現状について簡単に記す。

2. HIV-1の薬剤耐性検査

今日行われている薬剤耐性ウイ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) という二つの手法がある。遺伝子検査はその名が示すように治療薬剤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。図 1 a に遺伝子検査の一般的な流れを示す。遺伝子検査が成立する前提には各薬剤が薬剤耐性を呈する特有な点変異を標的酵素内に誘導するという事実がある。図 2 に示すように、薬剤はそれぞれ幾つかの決まった点変異を誘導する²⁾。

a. 遺伝子型による薬剤耐性の検出 (genotyping)



b. 薬剤感受性検査 (phenotyping)

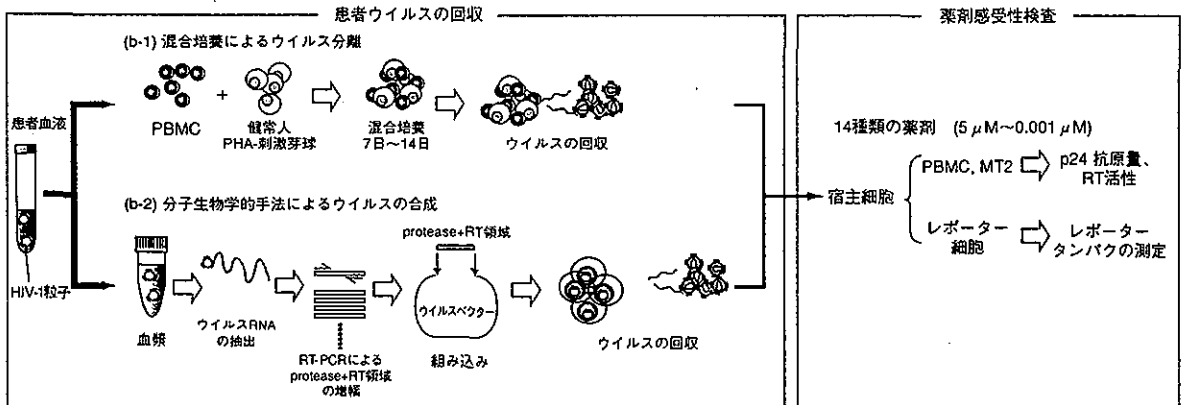


図 1

用いてウイルス遺伝子を再構築させる方法(図1b-2)など各種ある⁶⁾。ウイルスの分離技術に加え、感受性検査では薬剤によるウイルス増殖抑制を評価する為の *in vitro* でのウイルス感染実験が必要である。感染実験では手技を簡便、迅速に行うために HIV-1 の宿主として HIV-1 感染によりレポータータンパク (β -gal, luciferase, SEAP, etc.) を発現する遺伝子操作を行った特殊な細胞を使用することが多い。このように、感受性検査の実施には遺伝子検査と比較して更に高い技術力と費用が必要であるが、遺伝子検査では判定困難であったような多数の変異が集積した症例に対してもこの検査は威力を発揮する。感受性検査の結果は、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、感覚的に理解がしやすい。しかしながら、臨床的に薬剤変更の指標となるべき閾値がはっきりしないため薬剤変更の判断は必ずしも容易ではない⁷⁾。遺伝子検査、感受性検査いずれの検査も、結果を正しく評価するには個々の症例を丁寧に解析検討し、経験を積んでいくことが重要である。

3. 薬剤耐性検査の有効性

薬剤耐性検査は遺伝子検査、感受性検査とともに今日の分子生物学的技術および細胞培養技

術を結集させた総合的な検査技術である。この検査の実施には高い技術水準、高価な機器、多数の人材、高い品質の試薬類、そして何よりもこれらを維持するための多額の費用が必要である。従って、薬剤耐性検査を実施することがどれだけ HIV-1 感染者の予後に恩恵を与えるのか検証する必要がある。

HIV-1 感染患者数の多い欧米では1995年頃より薬剤耐性遺伝子検査の治療における有効性を測る試みが行われてきた。AZT の耐性変異が HIV-1 感染症の進行と AIDS による死と密接な関連があることが1995年に Japour 等により明らかにされた⁸⁾。プロテアーゼ阻害剤と併用療法についても薬剤耐性検査が治療の成否、病気の進行に影響を及ぼすことが報告されたが⁹⁾、これらの研究は“薬剤耐性変異の有無”と“病気の進行”の関連を明らかにした retrospective study で、“薬剤耐性検査”が“治療の成否”に及ぼす影響を見たものではなかった。近年、この“薬剤耐性検査”の治療効果への効果を見るために prospective randomized cohort study が幾つか行われた^{10-16, 22)}。表2に主だった研究をまとめてみた。薬剤耐性遺伝子検査ではフランスのグループによる VIRADAPT と米国のグループによる GART がよく知られた研究である。どちらの研究も薬剤耐性遺伝子検査を指標

表2 近年実施された薬剤耐性検査の臨床効果の Prospective 調査研究一覧

著者	調査名	調査内容	N	期間	結果	文献
Clevenbergh Durant	VIRADAPT	Genotyping	108	3ヶ月、 6ヶ月	治療薬剤変更の際、薬剤耐性遺伝子検査の結果を指標にすると、VLを有意に下げることが出来る。	10, 11
Baxter	GART	Genotyping	153	8週間	短い観察期間において薬剤耐性遺伝子検査はVLを有意に下げた。	12, 16
De Luca	ARGENTA	Genotyping	174	6ヶ月、 12ヶ月	多剤耐性症例においても薬剤耐性遺伝子検査は有効である。またきちんと薬剤を服薬をし、VLのベースラインが低い患者で最も効果があった。	15
Tural	HAVANA	Phenotyping	274	24週	24週の時点で薬剤耐性遺伝子検査と専門家の助言は有効であった。	14
Cohen	VIRA3001	Phenotyping	271	16週	薬剤感受性検査による治療方針の決定はVLを有意に下げた。	13
Meynard	Narval trial	Genotyping Phenotyping	541	36週	治療を進めていく上で感受性検査の有益性は認められなかった。	22

VL: 血漿中 HIV-1 RNA コピー数

にして治療薬剤を選択したグループと薬剤耐性遺伝子検査なしで治療を進めたグループに分けて治療の効果を比較している。この二つの研究の結果、薬剤耐性遺伝子検査の実施が短期的なウイルス量の抑制に有用であるということが明らかにされた。しかしながら、どちらの研究も追跡期間が短く、薬剤耐性遺伝子検査の長期的な効果についてはさらなる検証が必要であろう。薬剤感受性検査に関しても retrospective な調査が幾つか報告されており、いずれも薬剤感受性検査の結果と治療の成否の間に強い相関があったという結論を得ている¹⁷⁻²¹⁾。感受性検査の prospective study としては VIRA3001 study¹³⁾、Narval study²²⁾ が知られている。VIRA3001の結果は感受性検査結果を指標にした治療群は検査をしないで治療をした群に比して有意にウイルス量を下げたということであり、薬剤感受性検査に有効性があったと報告している¹²⁾。一方、Narval study では感受性検査は遺伝子検査と比較して必ずしも有益でなかったと報告している²²⁾。このように感受性検査に関しては、その適応と有益性について必ずしも明確ではなく、今後さらに検討する必要があると考えられる。

予測される将来の薬剤耐性検査のあり方であるが、薬剤耐性変異パターンと薬剤感受性の対応関係は研究の進展により、感受性検査を行わずとも正確な感受性評価が出来るようになると予想される。既に複数の検査会社、試薬メーカーは遺伝子検査の結果から感受性を推測するデータベースあるいはアルゴリズムを開発して運用している (ex. Virtual Phenotype, VIRCO inc)。薬剤耐性感受性検査は経済的にも負荷が

大きく、今後日常診療で使う臨床検査として普及するのは遺伝子検査と思われる。そして感受性検査は遺伝子検査では判定が困難な多剤耐性症例などの一部の症例が適応になると思われる。また、新薬開発にともなう薬剤感受性評価アルゴリズム等の更新、あるいは基礎研究分野において薬剤耐性 HIV-1 を解析するための手段として感受性検査は活用されて行くであろう。

4. 日本における薬剤耐性の状況

国立感染症研究所では1996年より HIV-1 感染者治療を支援することを目的に薬剤耐性遺伝子検査を実施してきた。ここでは1996年の検査開始から2002年12月までに解析した4,809検体の集計結果より日本における薬剤耐性 HIV-1 の現状を紹介する。

図3に NRTI, NNRTI, PI それぞれの代表的な耐性変異の出現頻度年次推移を示した。NRTI の代表的な薬剤である AZT は1987年に認可され mono therapy, dual therapy が行われていた当時より抗 HIV-1 療法の柱として使用されてきた薬剤である。このような背景から、我々が検査を開始した1996年、すでに AZT 耐性変異の頻度は高く、M41L は25%、T215YF は約30%を示していた。この2つの耐性変異の頻度は以後1999年まで増加傾向を示し、1999年には M41L, T215YF ともに耐性変異出現頻度が解析検体数の40%を超えるまでに達した。ここで観察された AZT 耐性変異の増加は HAART の導入とともに薬剤療法が積極的に行われるようになり、AZT に暴露された患者数が増えたことによると推測される。その後、

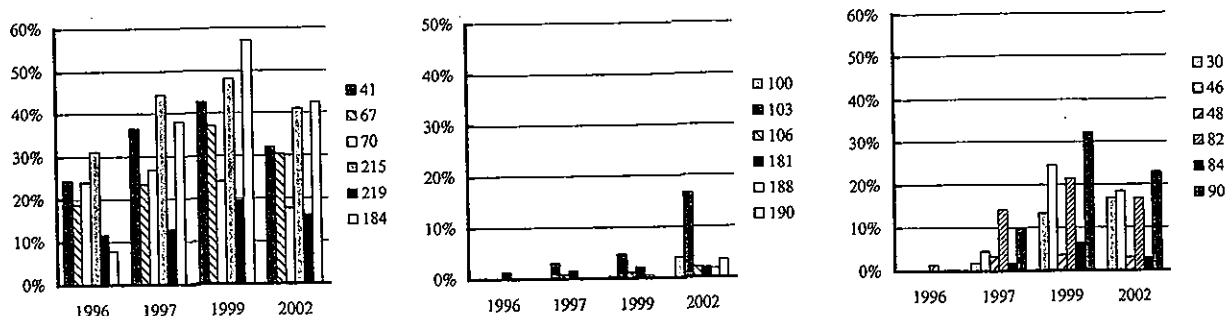


図3

AZT 耐性変異の頻度はやや減少に転じ、2002年には M41L で約30%、T215YF で約40%となっている。NRTI を代表するもう一つの薬剤、3TC の場合は AZT とは異なり1997年に承認された比較的新しい薬剤である。したがって1996年の時点では治験薬として少数例に投与されていたに過ぎず、また3TC 耐性変異である M184V の検出頻度も数%であった。しかし薬剤承認後は3TC 使用症例数の増加に伴い急速に耐性変異の出現頻度が高まった。承認後僅か2年の1999年には実に解析検体数の過半数に M184V が検出された。1999年以降は AZT と同様に減少に転じ、2002年度には約40%まで低下してきた。PI に対する耐性変異の推移も基本的に3TC と同様である。ritonavir, saquinavir, indinavir が承認された1997年以降1999年まで M46I, A82V そして L90M の頻度は一直線に増加している。やや遅れて認可された nelfinavir 耐性の D30N の場合は2002年まで増加傾向を示している。NNRTI では1998年に nevirapine が、1999年になって efavirenz が承認されており、その後1999年から2002年にかけて耐性症例頻度

が増加している。興味深いのは NRTI, NNRTI, PI いずれの薬剤においても検出頻度が高い変異と、低い変異があり、その序列は1996年から2002年までを観察しても大きく変わらないことである。出現頻度が低い変異は、ほかの耐性変異と相互干渉したり、ウイルス増殖能力を低下させたりする HIV-1にとって不都合な変異と思われる。

我々の今までの調査結果からは耐性変異に関する以下のような事実を読み取ることができる。1) 新薬が登場すると耐性変異を獲得した症例が速やかに出現してくる。2) 耐性変異の出現頻度はその時々治療薬剤のトレンドを反映している。3) 耐性変異は出現頻度より獲得されやすいものと獲得されにくいものが区別できる。これは薬剤耐性変異のウイルス増殖能力へ及ぼす影響を見ているものと考えられ、今後薬剤耐性 HIV-1の病態を理解するうえで重要である。

5. 新規感染者に見られる薬剤耐性 HIV-1

薬剤治療が進んでいる先進諸国では今薬剤耐

表3 新規感染者における薬剤耐性 HIV-1の検出頻度の報告一覧

著者	国	研究期間	n	NRTI	NNRTI	Protease	文献
1 Birk M	スウェーデン	1996~1998	57	1.8%	1.8%	0.0%	23
2 Tamlet C	仏国	1995~1998	48	14.6%	0.0%	2.1%	24
3 Quigg M	英国	1990~1996	35	5.7%	ND*	ND	25
4 Yearly S	スイス	1996~1998	82	8.5%	ND	3.7%	26
5 Simon V	USA	1995~1998	76	13.2%	2.6%	1.3%	27
		1999~2001	76	18.4%	6.6%	5.1%	
6 Ibe S	日本	1999~2001	75	2.7%	0.0%	2.7%	28
		2002	41	12.2%	0.0%	2.4%	
7 Ida S	日本	2001~2002	138	3.6%		2.9%	34
8 Wensing AMJ	CATCH	1996~2002	14279%.....		2.0%	29
9 Bennett DE	米国	1997~2001	1082	6.4%	1.7%	1.9%	30
10 Grant RM	米国	Jan 2000~June 2001	91	20.9%	13.2%	7.7%	31
		July 2001~Dec 2001	89	10.1%	12.4%	13.5%	
11 JP Routy	カナダ	1996~2001	159	4.0%	11.0%	8.7%	32
					2.0%	2.6%	
12 Chaix ML	仏国	2001~2002	269	6.0%	2.0%	2.0%	33

注 ND* not done

性変異の新規感染者への拡散が大きな問題となりつつある。代表的な論文報告例と2003年の第XII回国際薬剤耐性会議 (LosCabos, Mexico) で発表された最近の各国の状況を表にまとめた。表に示すように論文として発表されているデータ (表3 #1~#6)²³⁻²⁸⁾ は2000年以前のものが多く、論文での報告では耐性 HIV-1の検出頻度は PI ではいずれの報告でも 2~3% と類似しているのに対して、NRTI で1.8%~14.5%と報告によりかなりの幅が認められる。一方、第XII回国際薬剤耐性会議に発表された最近の統計では (表3 #7~#12)²⁹⁻³⁴⁾、極端に高い報告をしている Grant RM 等¹⁸⁾ を別とすれば、薬剤耐性症例全体としてみた場合は各々 2~6.4%, 2.0~2.6%, 1.9~2.6% となっている。報告者により耐性変異の検出頻度が異なるのは“新規感染者”の定義と“薬剤耐性”の定義が各調査で一致していないためと考えられる。このように異なる基準でなされた調査の結果を単純に対比して総括するのは難しいが、おそらく新規感染者における薬剤耐性ウイルスの検出率は数%から高くても10%程度と考えるべきであろう。実のところ、薬剤耐性ウイルスが新規感染者に増加しているという明確な証拠は現時点では無い。むしろ表に紹介した報告のうち2つ (#10, #11) は薬剤のクラスによっては減少していると報告している。これは先に述べたように、その時々治療薬剤使用のトレンドを単に反映している一時的な減少かもしれないし、あるいは実際に減少しつつあるのかもしれない。薬剤耐性変異の拡散の動向を把握するためには、やはり、調査の基準をある程度統一させることと、長期間にわたってモニタリングを続けていく必要があると考えられる。現在の HIV-1 感染症をとりまく種々の状況、そして結核など別の病原体における薬剤耐性の歴史を見ると、HIV-1 の場合も薬剤耐性は広がっていくと考え、今から対策を講じておくことが重要であろう。わが国の状況については、現在のところ国立名古屋病院の伊部²⁸⁾ と国立国際医療センター ACC の井田の報告³⁴⁾ がある。伊部らは1999年から2002年まで総計116名の新感染者の遺伝子解析を行い、薬剤耐性の検

出頻度が1999年の5.3% (4/75) から2002年には17.1% (7/41) に増加したことを報告している。一方井田らの報告では2001年から2002年までの間に ACC を受診した138名を検査した結果 PI 3% (4/138), RTI 4% (5/126) であったと報告している。このように2002年時点での二つの調査には隔たりがあるが、新規感染者に薬剤耐性 HIV-1 が検出されたという事実は共通している。新規感染者への更なる耐性 HIV-1 の拡散を抑えるためには、より広いポピュレーションを対象に、基準を統一して調査を行い耐性ウイルス伝播のリスクを評価することが求められる。

6. Non-B サブタイプの薬剤耐性変異

HIV-1 感染が激増しているアジア、アフリカ地域の発展途上国では経済的な理由より今まで抗 HIV 薬剤が普及してこなかった。しかしながら近年、国際的な治療支援活動、あるいは generic medicine により、これらの地域における HIV-1 感染症の薬剤治療が積極的に進められるようになってきている。そして、皮肉なことに、薬剤の導入はこれらの地域における薬剤耐性 HIV の出現の増加と拡散という先進諸国と同じ問題を与えることになった。HIV-1 には B 以外に 9 のサブタイプと 15 の circulating recombinant format (CRF) があり、近年薬剤が導入されつつあるアジア・アフリカに於いては、サブタイプは B 以外の感染症例が圧倒的に多い。また旧宗主国であるヨーロッパの国々でもアフリカ諸国からの移民を受け入れていることもあり、やはり non-B サブタイプによる HIV-1 感染症例が増加してきている。HIV-1 ウイルスの発見以来今日までの20年余り、治療薬剤開発や薬剤耐性の研究は、研究を担ってきた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。このため薬剤耐性ウイ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 non-B の薬剤耐性に適用できるのか否か明確ではない。そして、このような背景から近年 non-B の薬剤耐性に対する関心が高まり、調査研究が行われるようになった。代表的な発表を表4にまとめたが、表4に示すように G, C, E のいずれにおいても PI の一

表4 non-B サブタイプにおける薬剤耐性変異の報告

著者	国名	サブタイプ	内容	文献
Brenner B et al	カナダ, 米国	subtype C	V106M は subtype C では EFV 治療により V106M 変異が誘導される。V106M は NNRTI に対して高い交叉耐性を呈する。	28
Grossman Z et al	イスラエル	subtype C	未治療症例ではプロテアーゼ領域に 5 箇所 (K20R, M36I, M46I, A71V, V77I), 逆転写酵素領域には 1 箇所 (A98G/A) の有意な差が, 治療を受けている症例では新たにプロテアーゼ領域に 5 箇所 (L10I, L63P, G73I, I84V, L90M), 逆転写酵素領域には 5 箇所 (M41L, D67N, K70R, T215Y, K219Q) の有意な差が認められた。	32
Gomes I	ポルトガル	subtype G	subtype G では nelfinavir の耐性変異 D30N が出現しにくい。	14
Ariyoshi K et al	日本	CRF01_AE	CRF01_AE では nelfinavir の耐性変異 D30N が出現しにくいことが明らかになった。D30N の代わりに N88S が誘導され, nelfinavir 耐性を呈することが明らかになった。	34

つである nelfinavir の耐性変異 D30N が出現しにくい結果が報告されている³⁵⁻³⁷⁾。また NNRTI の efavirenz においても耐性変異パターンが B とは異なっていることが報告されている³⁸⁾。Non-B の薬剤耐性については現在多くの研究グループが関心をもって取り組んでおり、国際的な共同研究も進められている。いずれ詳細な情報が得られ、正確な薬剤耐性の評価が可能になると期待される。

7. 結 語

薬剤耐性 HIV-1 の検査の概論とわが国における状況について述べてきた。わが国の状況は他の先進諸国と基本的に変わらない。治療を受けている感染者における薬剤耐性 HIV-1 は増加しており、また新規感染者からの耐性ウイルスも検出されている。その一方で薬剤耐性検査の普及は検査費用や検査を行う機関、人材などの問題から十分なレベルにはいたっていない。今後我が国においても薬剤耐性検査体制が整い、より多くの HIV-1 感染者が検査の恩恵を受けられることを期待する。

文 献

1. CDC : HIV/AIDS Surveillance Report, 1999
2. D'Aquila RT, Schapiro JM, Brun-Vezinet F, Clotet B, Conway B, Demeter L, Grant RM, Johnson V, Kuritzkes DR, Loveday C, Shafer RW, Richman DD : Drug Resistance Mutations in HIV-1. *Topics in HIV Medicine* 11 : 92-96, 2003
3. Tisdale M, Kemp SD, Parry NR, Larder BA : Rapid in vitro selection of human immunodeficiency virus type 1 resistant to 3'-thiacytidine inhibitors due to a mutation in the YMDD region of reverse transcriptase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 : 5653-6, 1993
4. St Clair MH, Martin JL, Tudor-Williams G, Bach MC, Vavro CL, King DM, Kellam P, Kemp SD, Larder BA : Resistance to ddI and sensitivity to AZT induced by a mutation in HIV-1 reverse transcriptase. *Science* 253 : 1557-9, 1991
5. Tersmette M, Koot M, DeGoede REY, Kootstra N, Schuitemaker H : Isolation and biological characterization of primary HIV-1 isolates. *In* K. J. (ed.), HIV, vol. 1. Oxford University

- Press, New York, 1995, p.47
6. Kellam P, Larder BA : Recombinant virus assay : a rapid, phenotypic assay for assessment of drug susceptibility of human immunodeficiency virus type 1 isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 38 : 23-30, 1994
 7. Hirsch MS, Brun-Vezinet F, D'Aquila RT, Hammer SM, Johnson VA, Kuritzkes DR, Loveday C, Mellors JW, Clotet B, Conway B, Demeter LM, Vella S, Jacobsen DM, Richman DD : Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection : recommendations of an International AIDS Society-USA Panel. *Jama* 283 : 2417-26, 2000
 8. Japour AJ, Welles S, D'Aquila RT, Johnson VA, Richman DD, Coombs RW, Reichelderfer PS, Kahn JO, Crumpacker CS, Kuritzkes DR : Prevalence and clinical significance of zidovudine resistance mutations in human immunodeficiency virus isolated from patients after long-term zidovudine treatment. AIDS Clinical Trials Group 116B/117 Study Team and the Virology Committee Resistance Working Group. *J Infect Dis* 171 : 1172-9, 1995
 9. Zolopa AR, Shafer RW, Warford A, Montoya JG, Hsu P, Katzenstein D, Merigan TC, Efron B : HIV-1 genotypic resistance patterns predict response to saquinavir-ritonavir therapy in patients in whom previous protease inhibitor therapy had failed. *Ann Intern Med* 131 : 813-21, 1999
 10. Durant J, Clevenbergh P, Halfon P, Delgiudice P, Porsin S, Simonet P, Montagne N, Boucher CA, Schapiro JM, Dellamonica P : Drug-resistance genotyping in HIV-1 therapy : the VIRADAPT randomised controlled trial. *Lancet* 353 : 2195-9, 1999
 11. Clevenbergh P, Durant J, Halfon P, del Giudice P, Mondain V, Montagne N, Schapiro JM, Boucher CA, Dellamonica P : Persisting long-term benefit of genotype-guided treatment for HIV-infected patients failing HAART. The Viradapt Study : week 48 follow-up. *Antivir Ther* 5 : 65-70, 2000
 12. Baxter JD, Mayers DL, Wentworth DN, Neaton JD, Merigan TC : Presented at the 6th Conf Retroviruses Opportunistic Infect, 1999
 13. Cohen C, Hunt S, Sension M, Farthing C, Conant M, Jacobson S, Nadler J, Verbiest W, Hertogs K, Ames M, Rinehart A, Graham N : Phenotypic resistance testing significantly improves response to therapy : A randomized trial (VIRA3001). 7th Conference on Retrovirus and Opportunistic Infections, 2000
 14. Tural C, Ruiz L, Holtzer C, Viciano P, Gonzalez J, Ferrer E, Martinez-Picado J, Ryiz I, Dalmau D, Domingo P, Boucher CA, Schapiro JM, Romeu J, Sirera G, Clotet B : Utility of HIV genotyping and clinical expert advice- The HAVANA trial. 8th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infection, 2001
 15. De Luca A, Antinori A, Cingolani A, Rizzo MG, Murri RAA, Baldini F, Di Giambenedetto S, Marconi P, Ciancio B, Cauda R : A prospective, randomized study on the usefulness of genotypic resistance testing and the assessment of patients reported adherence in unselected patients failing potent HIV therapy (ARGENTA) : Final 6-month results. 8th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, 2001
 16. Baxter JD, Mayers DL, Wentworth DN, Neaton JD, Hoover ML, Winters MA, Mannheimer SB, Thompson MA, Abrams DI, Brizz BJ, Ioannidis JP, Merigan TC : A randomized study of antiretroviral management based on plasma genotypic antiretroviral resistance testing in patients failing therapy. CPCRA 046 Study Team for the Terry Bein Community Programs for Clinical Research on AIDS. *Aids* 14 : F83-93, 2000
 17. Miller V, Cozzi-Lepri A, Hertogs K, Gute P, Larder B, Bloor S, Klauke S, Rabenau H, Phillips A, Staszewski S : HIV drug susceptibility and treatment response to mega-HAART regimen in patients from the Frankfurt HIV cohort. *Antivir Ther* 5 : 49-55, 2000
 18. Call SA, Saag MS, Westfall AO, Raper JL, Pham SV, Tolson JM, Hellmann NS, Cloud GA, Johnson

- VA : Phenotypic drug susceptibility testing predicts long-term virologic suppression better than treatment history in patients with human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 183 : 401-408, 2001
19. Deeks SG, Hellmann NS, Grant RM, Parkin NT, Petropoulos CJ, Becker M, Symonds W, Chesney M, Volberding PA : Novel four-drug salvage treatment regimens after failure of a human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor-containing regimen : antiviral activity and correlation of baseline phenotypic drug susceptibility with virologic outcome. *J Infect Dis* 179 : 1375-81, 1999
 20. D'Aquila RT, Johnson VA, Welles SL, Japour AJ, Kuritzkes DR, DeGruttola V, Reichelderfer PS, Coombs RW, Crumacker CS, Kahn JO, et al : Zidovudine resistance and HIV-1 disease progression during antiretroviral therapy. AIDS Clinical Trials Group Protocol 116B/117 Team and the Virology Committee Resistance Working Group. *Ann Intern Med* 122 : 401-8, 1995
 21. Miller V, Phillips A, Rottmann C, Staszewski S, Pauwels R, Hertogs K, de Bethune MP, Kemp SD, Bloor S, Harrigan PR, Larder BA : Dual resistance to zidovudine and lamivudine in patients treated with zidovudine-lamivudine combination therapy : association with therapy failure. *J Infect Dis* 177 : 1521-32, 1998
 22. Meynard JL, Vray M, Morand-Joubert L, Race E, Descamps D, Peytavin G, Matheron S, Lamotte C, Guiramand S, Costagliola D, Brun-Vezinet F, Clavel F, Girard PM : Phenotypic or genotypic resistance testing for choosing antiretroviral therapy after treatment failure: a randomized trial. *Aids* 16 : 727-36, 2002
 23. Birk M, Sonnerborg A : Variations in HIV-1 pol gene associated with reduced sensitivity to antiretroviral drugs in treatment-naive patients. *Aids* 12 : 2369-75, 1998
 24. Tamalet C, Pasquier C, Yahy N, Colson P, Poizot-Martin I, Lepeu G, Gallais H, Massip P, Puel J, Izopet J : Prevalence of drug resistant mutants and virological response to combination therapy in patients with primary HIV-1 infection. *J Med Virol* 61 : 181-6, 2000
 25. Quigg M, Rebus S, France AJ, McMenamin J, Darby G, Leigh Brown AJ : Mutations associated with zidovudine resistance in HIV-1 among recent seroconvertors. *Aids* 11 : 835-6, 1997
 26. Yerly S, Kaiser L, Race E, Bru JP, Clavel F, Perrin L : Transmission of antiretroviral-drug-resistant HIV-1 variants. *Lancet* 354 : 729-33, 1999
 27. Simon V, Vanderhoeven J, Hurley A, Ramratnam B, Boden D, Louie M, Kost R, Dawson K, Parkin N, Routy JP, Sekaly RP, Markoviz M : Presented at the 8th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Chicago, 2001
 28. Ibe S, Shibata N, Utsumi M, Kaneda T : Selection of human immunodeficiency virus type 1 variants with an insertion mutation in the p6 (gag) and p6 (pol) genes under highly active antiretroviral therapy. *Microbiol Immunol* 47 : 71-9, 2003
 29. Wensing A, van de Vijver D, Asjo B, Balotta C, Camacho R, de Mendoza C, Deroo S, Derdelinckx I, Grossman Z, Hamouda O, Hatzakis A, Hoepelman A, Horban A, Korn K, Kuecherer C, Nielsen C, Ormaasen V, Perrin L, Paraskevis D, Puchhammer E, Roman F, Salminen M, Schmit J, Soriano V, Stanczak G, Stanojevic M, Vandamme A, Van Laethem K, Violin M, Yerly S, Zazzi M, Boucher C : Prevalence of transmitted drug resistance in Europe is largely influenced by the presence of non-B sequences : analysis of 1400 patients from 16 countries: the CATCH-Study. XII international HIV drug resistance workshop, 2003
 30. Bennett D, Zaidi I, Heneine W, Woods T, Garcia-Lerma J, Smith A, McCormick L, Weinstock H : Prevalence of mutations associated with antiretroviral drug resistance among men and women newly diagnosed with HIV in 10 US cities, 1997. 2001. XII International HIV drug resistance workshop, 2003

31. Grant RM, Liegler T, Spotts G, Hecht FM : Declining nucleoside reverse transcriptase inhibitor primary resistance in San Francisco, 2000. 2002. XII International HIV drug resistance workshop, 2003
32. Routy J, Brenner B, Rouleau D, Thomas R, Trottier B, Cote P, Baril J, Tremblay C, LeBlanc R, Edwardes M, Machouf N, Spira B, Sekaly R, Wainberg M : Drug resistance prevalence declines in recently infected subjects having sex with men but not in those using drug injections : results from the Montreal Primary HIV-Infection Cohort. XII International HIV drug resistance workshop, 2003
33. Chaix ML, Descamps D, Mouajjah S, Deveau C, Andre P, Cottalorda J, Ingrand D, Izopet J, Kohli E, Masquelier B, Parmentier K, Poggi C, Rogez S, Ruffault A, Schneider V, Schmuck A, Tamalet C, Wirden M, Rouzioux C, Meyer L, Brun-Vezinet F, Costagliola D : French National Sentinel Survey of antiretroviral resistance in patients with HIV-1 primary infection and in antiretroviral-naïve chronically infected patients in 2001. 2002. XII International HIV drug resistance workshop, 2003
34. Ida S, Tsuchiya R, Tachikawa N, Kimura S, Oka S : Annual conference of Infectious Diseases, 2003
35. Grossman Z, Vardinon N, Chemtob D, Alkan ML, Bentwich Z, Burke M, Gottesman G, Istomin V, Levi I, Maayan S, Shahar E, Schapiro JM : Genotypic variation of HIV-1 reverse transcriptase and protease : comparative analysis of clade C and clade B. *Aids* 15 : 1453-60, 2001
36. Ariyoshi K, Matuda M, Miura H, Tateishi S, Yamada K, Sugiura W : Patterns of point mutations associated with anti-retroviral drug treatment failure in CRF01_AE (subtype E) infection differ from subtype B infection. *JAIDS* 33 : 336-342, 2003
37. Gomes P, Diago I, Goncalves MF, Carvalho P, Cabanas J, Lobo MC, Camacho R : Different pathway to nelfinvir genotypic resistance in HIV-1 subtype B and G. 9th CROI, 2002
38. Brenner B, Turner D, Oliveira M, Moisi D, Detorio M, Carobene M, Marlink RG, Schapiro J, Roger M, Wainberg MA : A V106M mutation in HIV-1 clade C viruses exposed to efavirenz confers cross-resistance to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Aids* 17 : F1-5, 2003