

700500683 A

厚生労働科学研究費補助金 エイズ対策研究事業

「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」

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 杉浦 互

平成18年3月

目 次

I. 総括研究報告書

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

国立感染症研究所 エイズ研究センター／杉浦 互 1

II. 分担研究報告書

【基礎研究グループ】

1. 細胞内における抗 HIV 薬（プロテアーゼインヒビター）の薬剤濃度のモニタリング
国立感染症研究所 エイズ研究センター／杉浦 互 5
2. 新規感染者に認めた薬剤耐性 HIV-1 のウィルス学的解析研究
（独）国立病院機構 名古屋医療センター 臨床研究センター／金田次弘 13
3. HAART 療法を受けている患者の PBMC における細胞内薬剤濃度と
治療効果及び副作用との関連
慶應義塾大学医学部 微生物免疫学教室／加藤真吾 19
4. 薬剤耐性検査の臨床応用に関する研究
国立国際医療センター エイズ治療・研究開発センター／瀧永博之 23
5. 抗 HIV 薬の血中濃度に関する臨床研究
（独）国立病院機構 大阪医療センター 薬剤科／栗原 健 26
6. 逆転写酵素 d4T の薬剤耐性機序の解明
京都大学ウィルス研究所 附属エイズ研究施設感染免疫研究領域／児玉栄一 40
7. 薬剤耐性ウィルスの Genophenotyping 実験系の確立
国立感染症研究所 エイズ研究センター／巽 正志 43
8. 薬剤耐性ウィルスの Genotype と薬剤耐性 RT Phenotype
および RT Structural Type との相関解析
国立感染症研究所 エイズ研究センター／仲宗根 正 48
9. HAART の最適化のための研究（治療のモニタリングと適正処方の研究）
熊本大学 エイズ学研究センター／松下修三 52

10. 細胞膜融合を標的にした薬剤の耐性機序
国立感染症研究所 エイズ研究センター／松田善衛 ……………5 6

11. HIV 薬剤耐性変異の解析とデータベースの構築
産業技術総合研究所 生物情報解析センター／山口由美 ……………6 2

【調査研究グループ】

12. 薬剤耐性遺伝子検査のバリデーションに関する研究
(独) 国立病院機構 名古屋医療センター 臨床研究センター／金田次弘 ……………6 6

13. 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
国立感染症研究所 エイズ研究センター／杉浦 互 ……………7 5

14. 薬剤耐性遺伝子検査のヴァリデーションに関する研究
(独) 国立病院機構 仙台医療センター 臨床検査科／浅黄 司 ……………8 3
(独) 国立病院機構 仙台医療センター 血液内科／伊藤俊広

15. 北陸地区における薬剤耐性 HIV-1 調査体制確立のための研究
石川県立中央病院 血液病治療部／上田幹夫 ……………8 5

16. 中国・四国地区における薬剤耐性 HIV-1 調査体制確立のための研究
広島大学原爆放射線医科学研究所 ゲノム疾患治療研究部門／木村昭郎 ……………8 7
広島大学病院 輸血部／高田 昇

17. 関東甲信越地区における薬剤耐性 HIV-1 調査体制確立のための研究
新潟大学医歯学総合病院 第2内科／下条文武 ……………9 2

18. 北海道地区における薬剤耐性 HIV-1 調査体制確立のための研究
北海道大学大学院医学研究科病態制御学講座／小池隆夫 ……………9 5

19. 神奈川県における薬剤耐性 HIV-1 調査体制確立のための研究
神奈川県衛生研究所 微生物部／近藤真規子 ……………9 7

20. 東京都における薬剤耐性 HIV-1 調査体制確立のための研究
東京都健康安全研究センター 微生物部／貞升健志 ……………9 9

21.	近畿地区における薬剤耐性検査体制確立のための研究 （独）国立病院機構 大阪医療センター HIV/AIDS 先端医療開発センター／白阪琢磨	104
22.	沖縄における薬剤耐性検査確立のための研究 琉球大学大学院医学研究科感染症態制御学講座／健山正男	112
23.	大阪府における薬剤耐性検査体制確立のための研究 大阪府立公衆衛生研究所 ウィルス課／森 治代	116
24.	九州地区における薬剤耐性 HIV-1 調査体制確立のための研究 （独）国立病院機構 九州医療センター 感染症対策室／山本政弘	118
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	120

I. 総括研究報告書

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

研究課題：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

主任研究者：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）

研究要旨

本研究班では新規 HIV-1 感染者における薬剤耐性 HIV-1 の発生・伝播動向を把握する全国規模の調査体制の確立と、薬剤耐性 HIV-1 症例の増加を抑制する有効な技術および協力体制を構築するという目標を達成するために疫学調査研究、治療最適化研究、薬剤耐性基礎研究 3 つのサブグループにわかれて研究を進めている。疫学調査研究では 2003 年と 2004 年の 2 年間について、エイズ動向委員会に報告された新規症例のおよそ 3 割を捉えて解析し、我が国における薬剤耐性 HIV-1 による感染例が 5.0%であることを明らかにした。また我が国における HIV/AIDS 感染症例と HBV あるいは HCV の合併率についてもはじめて明らかにした。さらに薬剤耐性検査のヴァリデーションを実施し検査技術の向上に努めた。治療最適化研究では血中濃度モニタリング情報がホームページを介して発信されており臨床現場で活用されている。血中濃度を測定・評価する新たな技術に関しては臨床現場で評価を検討する段階にまで到達している。薬剤耐性基礎研究では各分担研究者は着実に目標に向かって研究に取り組んでいる。

分担研究者

浅黄 司（独）国立病院機構仙台医療センター
金田次弘（独）国立病院機構名古屋医療センター
加藤真吾 慶応義塾大学
潟永博之 国立国際医療センター
栗原 健（独）国立病院機構大阪医療センター
児玉栄一 京都大学ウイルス研究所
巽 正志 国立感染症研究所
仲宗根 正 国立感染症研究所
松下修三 熊本大学
松田善衛 国立感染症研究所
山口由美 産業技術総合研究所
小池隆夫 北海道大学大学院医学研究科
上田幹夫 石川県立中央病院
下条文武 新潟大学医歯学総合病院
白阪琢磨（独）国立病院機構大阪医療センター
木村昭郎 広島大学原爆放射線医科学研究所
山本政弘（独）国立病院機構九州医療センター
健山正男 琉球大学大学院
貞升健志 東京都健康安全センター
近藤真規子 神奈川県衛生研究所
森 治代 大阪府立公衆衛生研究所

A.研究目的

新規 HIV-1 感染者における薬剤耐性 HIV-1 の発生・伝播動向を把握する全国規模の調査体制の確立と、薬剤耐性 HIV-1 症例の増加を抑制する有効な技術および協力体制の構築を目指す。

B.研究方法

目的を達成するために下記 3 つのサブグループに分かれて研究を進めていく。

疫学調査研究：本邦の新規 HIV/AIDS 感染・診断症例における薬剤耐性 HIV-1 の流行状況を把握するために、新規 HIV/AIDS 感染・診断症例を捕捉し薬剤耐性遺伝子検査を実施する。調査と併行して我が国における薬剤耐性検査体制の整備と確立も進めていく。調査により集積した HIV-1 遺伝子情報を元に新規 HIV-1 感染者における薬剤耐性 HIV-1 の頻度と動向を把握し、薬剤耐性 HIV-1 が拡散する背景と因子を推測する。その上で薬剤耐性 HIV-1 の拡散を抑制するための対策を検討する。

治療最適化研究：既治療 HIV/AIDS 症例における薬剤耐性の頻度を低下させることは新規

HIV/AIDS 症例への薬剤耐性の感染伝播を直接的に抑制すると考えられる。既治療症例における薬剤耐性の誘導を抑えるためには適切な処方と服用による薬剤の血中濃度の維持が肝心である。このことから、研究班では抗 HIV-1 治療薬剤の血中濃度測定・モニタリングを臨床現場に提供し、適切な治療のサポートに取り組んでいる。ホームページを介しての治療薬剤の情報発信と血中濃度測定検査の受付を実施している。また、薬剤耐性検査、薬剤血中濃度モニタリング、細胞内薬剤濃度の測定などの検査を統合した高度医療を実施し、今後の至適治療のあり方についての検討を行っていく。

薬剤耐性基礎研究: 薬剤耐性 HIV-1 症例の増加を抑制し、治療脱落症例の数を減らすためには薬剤耐性 HIV-1 のウイルス学的基礎研究を進め、その耐性化機序と病態を理解することが重要である。このグループでは薬剤耐性変異を獲得した HIV-1 の感染性クローンの樹立、核酸系逆転写酵素阻害剤 d4T の耐性機序の解析とそこから見えるあらたな治療薬開発の可能性、非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤の耐性化機序の解析、すでに米国では実用化された接着・進入阻害剤の耐性化機序の解析などに取り組み臨床現場に成果を還元していく。さらに、薬剤耐性 HIV-1 を同定する新たな検査法についても開発をしていく。

倫理面への配慮

この研究を進めるには患者の協力が必要であり、研究の必要性和意義について十分に説明し、理解と協力を得ることが欠かせない。この研究は国立感染症研究所医学研究倫理審査の結果承認されている（平成 16 年 10 月 21 日付け、第 48 号）。参加医療機関についても各機関の倫理規定に従い同意を得る。その際には自筆のサインを記入してもらおう。サインをした同意書原本は主治医あるいは各施設の担当者のもとで厳重に保管することを義務づける。

C. 研究成果

疫学調査研究：

(1) 薬剤耐性 HIV-1 検査ヴァリデーションの実施と評価

新規 HIV-1 感染者の調査は多施設で実施されるため、施設間の検査精度が同等のレベルであることが必要である。このことから研究班では薬剤耐性検査の施設間差を評価するヴァリデーションを計画し、これを実施した。平成 16 年度は準備として、各施設で実施している薬剤耐性検査法と調査への参加意思をアンケートにより調査した。本年度はこれに基づき患者由来のプロテアーゼと逆転写酵素領域を組み込んだ HIV-1 クローンを参加希望 15 施設に配布し、遺伝子検査を実施してもらい、その結果の収集を行った。最終的に参加 15 施設全てより結果を回答してもらった。解析の結果、8 施設の結果に若干の問題が認められ、技術的な改善が必要であることが判明したため個別に指導を実施した。

(2) 新規 HIV/AIDS 症例における薬剤耐性 HIV-1 の動向調査

平成 16 年度に設立したワーキンググループで作成したプロトコルに従い、2003 年および 2004 年の新規 HIV/AIDS 症例の調査を実施した。参加施設全てよりデータ登録があり、2003 年 1 月から 2004 年 12 月までの 2 年間に感染が確認された 575 症例（2003 年：267 例、2004 年：308 例）の捕捉に成功した。これらの症例全てに対して薬剤耐性遺伝子検査を実施した。調査期間にエイズ動向委員会に登録された症例数が 1375 名であることから、およそ 3 割の新規症例を捕捉したことになる。性別、年齢分布、感染経路等による検定の結果、研究班で捉えた集団は動向委員会に登録された集団を代表することが確認された。薬剤耐性検査の結果 31 症例（5.4%）に何らかの薬剤耐性変異が認められた。薬剤クラス別に見ると NRTI：20 例（3.5%）、NNRTI：7 例（1.2%）、PI：5 例（0.9%）であった。今回の調査では薬剤

耐性HIV-1の頻度だけでなく、合わせて肝炎合併の有無についても調査を行った。その結果HBs抗原陽性率8.8%、HCV抗体陽性率4.3%であることが明らかになった。

(3)平成17年6月24日：第1回班会議および系統樹解析法の講習会を実施。

治療最適化研究：

(1)血中濃度測定研究に関してはホームページを立ち上げて検査の紹介、検査の受付そして抗HIV-1薬の薬物動態に関する情報を提供しており、アクセス件数3220件、パスワード取得者116名となった(平成17年11月時点)。また平成17年4月～11月に測定した件数は779件、利用施設は26施設となった。(栗原)。

(2)LC-MS/MSを用いて細胞内efavirenzの定量を試みた。その結果efavirenzは細胞外に比して40倍以上に濃縮されていることが明らかになった。また細胞への流入は早くいずれも5分以内に完了することを明らかにした。(加藤)

(3)プロテアーゼ阻害剤の細胞内濃度と動態について細胞種間の相違について解析を行った。その結果HeLa細胞ではSQVとLPVの細胞内濃度がT細胞系のHPB-M(a)とCEMに比べて約3倍程度高い事が示された。NFVとRTVでは大きな差は認められなかった。またHeLa細胞とT細胞系細胞株ではNFVの細胞内への取り込みのパターンに差が認められ細胞によりメカニズムが異なる可能性が示唆された(杉浦)。

(4)服薬アドヒアランスを客観的に評価する方法として毛髪からの検出技術を開発した。非侵襲で血中濃度をモニタリングする方法として唾液からの薬剤検出を試み、核酸系逆転写酵素阻害剤の検出に成功した。(加藤)。

(5)長期間にわたり良好な治療効果が得られている7症例についてHIV-1インテグレーション部位の同定を試み、168の部位を同定した。その結果97%がイントロンに蓄積していることが明らかになった。さらにrestingCD4 T細胞についてインテグレーションしている遺伝子

が発現できるか解析を行った結果、全てにおいて発現が可能であることが明らかになった。

(松下)。

薬剤耐性基礎研究：

薬剤耐性機序の理解を深め検査結果を正しく評価するために、分担研究者が基礎研究に取り組み以下の研究成果を得た。

(1)核糖酸4位にエチニル基を有する新規核酸系阻害剤を見だし、既知の核酸阻害剤耐性HIVに対して有効であることを見いだした。NP-2細胞を元に感受性検査のための新たな細胞株NCK45を樹立した(児玉)。

(2)プロテアーゼ阻害剤耐性HIV-1による感染症例について薬剤耐性変異の推移について追跡を行った結果、薬剤非存在下においても耐性変異が長期間にわたり維持されることが明らかになった。同1例について増殖能の解析を行ったところ、野性株と同等の増殖能を呈することが明らかになった(金田)。

(3)Tenofovirの腎障害について解析を行い、血清creatinineと尿中 β 2-microglobulinについて解析した結果尿中 β 2-microglobulinが早期腎障害マーカーとして有用である可能性を見いだした(潟永)。

(4)T7RNAポリメラーゼトランスファーを介した膜融合の定量評価系を作成した。またenvelopeの膜貫通部分の変異が膜融合に影響を与えることが明らかになった(松田)。

(5)薬剤耐性症例より合計391個の感染性クローンを樹立し、100個以上のクローンの全長遺伝子配列解析を終了した(巽、杉浦)。

(6)超高感度RT活性測定法Real-time Amp-RT Assay: RTA2による3TC耐性、AZT耐性検出系を確立した。d4T耐性は現在の測定系での判定は困難であり、さらに条件の検討が必要であると考えられた。臨床検体についてRTA2による3TC耐性の有無を判定した結果、高い精度での検出に成功した。(仲宗根)。

(7)Nelfinavir耐性変異D30NとL90Mは排他的変異として知られているが、その原因につい

て構造学的に解析をした。その結果二つの変異が入った D30N・L90M 変異体が二量体としての安定性が低いということが明らかになった(山口)。

D. 考察

多剤併用療法の導入から10年が経過した今日、HIV/AIDS感染症の治療環境は大きく様変わりをした。HIV/AIDS感染者の予後が改善され死亡例が減少するその一方で薬剤耐性 HIV-1 による難治症例の出現と増加が大きな問題となっている。また薬剤耐性 HIV/AIDS 症例の増加にともない、薬剤耐性 HIV-1 による新規感染例が見いだされるようになり、その対策が新たな課題となっている。欧米諸国における薬剤耐性 HIV-1 による新規感染例の頻度は調査により幅があるが、低いもので数%、高いものでは26%に達している。我が国では、2003年にクロスセクショナルな2つの調査報告がなされ、各々数%、17%の耐性症例が新規感染者に認められたとしている。このように2つの報告でも欧米同様に耐性出現頻度が大きく隔たっているが、これは我が国においても薬剤耐性 HIV の広がりや調査集団に大きく左右されることを示唆しており、定点観測による調査では実態を捉えることが難しいことを示している。

このことから本研究班では全国に調査の網を広げ、できるだけ多くの新規感染・診断症例を解析することにより集団の偏りの無い正確な動向を捉えることを目指した。現時点で2003年と2004年の2年間で我が国における新規感染症例の3割に相当する575症例の捕捉と解析を完了した。その結果、新規感染・診断症例における薬剤耐性症例の頻度は5.0%であることが明らかにされた。この頻度は日本とほぼ同じ治療環境の欧米諸国の報告と比較するとかなり低い水準である。その理由は現時点では明確では無く、今後有効な対策を立てていくため

にも、薬剤耐性 HIV-1 の伝播に影響を及ぼしている因子(ウイルス学的、疫学的、社会学的)についての検討が必要である。

今回明らかにされた5.0%は欧米水準と比較すると低いというものの、20人に1人は最初から薬剤耐性ウイルスを保有しているということであり、米国DHHSが新規感染・診断症例に対してルーチンで薬剤耐性を実施すべきであるとしている値には到達している。

治療最適化研究ではHPでの情報提供により薬剤血中濃度のモニタリングが治療を進める際の指標の一つとして活用されるようになってきている。薬剤耐性基礎研究は薬剤耐性症例の増加を抑制する上で重要な研究課題であり、これらの研究成果が新規感染者への薬剤耐性拡散の抑制に繋がっていくことが期待される。

E. 結論

疫学調査研究では2003年・2004年の新規感染・診断症例における薬剤耐性の頻度が5.4%であることを明らかにした。治療最適化研究では血中濃度モニタリングの情報発信と検査を提供しその普及に大きく貢献した。基礎研究では薬剤耐性化機序の解析と新たな検査技術開発に取り組んだ。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

各分担研究者の項参照

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許：4・C・置換・2・ハロアデノシン誘導体 特願2004-263409

特許：細胞内薬剤検出法に関する特許出願準備中

II. 分担研究報告書

【基礎研究グループ】

研究要旨

本研究では、HIV の薬剤感受性検査でレポーター細胞として用いられている細胞株の HPB-M(a) と HeLa 細胞について細胞内のプロテアーゼインヒビター(PI)の細胞内濃度を測定し比較検討を行った。4 種類の PI(NFV、SQV、LPV、RTV)を細胞に取り込ませた後に細胞内から PI を抽出し、これを高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で解析した。比較として別の T 細胞系細胞株である CEM についても同様に解析した。その結果すべての PI が細胞内で濃縮されることが示された。NFV は約 100~200 倍、SQV は約 70~200 倍、LPV は約 10 倍~45 倍、RTV は約 10 倍に細胞内で濃縮された。LPV は HeLa で HPB-M(a)や CEM に比べて細胞内濃度が約 4 倍高いことが明らかになった。NFV、SQV、RTV でも HeLa の方が HPB-M(a)や CEM に比べて PI が高い濃度で細胞内に蓄積する傾向が見られた。

A. 研究目的

現在行われている HIV-1 薬剤耐性検査には、(i) プロテアーゼ遺伝子および逆転写酵素阻害剤の遺伝子配列解析を行って薬剤耐性変異を同定し、遺伝子型から薬剤耐性を推定する遺伝子検査 (genotype 検査) と、(ii)抗 HIV-1 薬剤存在下で細胞株を用いてウイルスを培養し、ウイルス増殖の抑制の程度から直接薬剤耐性を調べる感受性検査 (phenotype 検査) がある。現在我々は薬剤感受性検査に T 細胞系細胞株の HPB-M(a)を基に構築したレポーター細胞を使用しているが、他の研究室では本来 HIV-1 の宿主ではない上皮系接着細胞 (ex. HeLa) を基に作成されたレポーター細胞を用いる場合もある。しかしこの様な細胞での薬剤の細胞内取り込み・代謝が HIV-1 本来の宿主であるリンパ球系細胞と同等であるか明確ではない。そこで本研究では細胞内への抗 HIV-1 薬の取り込みや蓄積に着目し、T 細胞系細胞株の HPB-M(a)と上皮細胞系細胞株の HeLa 細胞における PI の細胞内濃度を HPLC を用いた測定法によって解析し比較検討した。

B. 研究方法

HPLC 条件

検出カラムは XTerra™ MSC18 4.6mm x 250mm, 5um (Waters)を用い、HPLC システムは LC-2000 シリーズ (日本分光) で PI の検出を行った。検出波長は 220nm、分析時間は NFV および SQV で 30 分、LPV および RTV で 20 分とした。カラム温度は 40°C、流速は 1ml/分とした。移動相は NFV と SQV では 25mM リン酸緩衝液 (pH3.4) : アセトニトリル = 65 : 35(v/v)、LPV と RTV では 25mM リン酸緩衝液 (pH3.4) : アセトニトリル = 60 : 40(v/v)を用いた。

細胞からの PI 抽出法

i)HPB-M(a)、CEM からの PI 抽出法

HPB-M(a)あるいは CEM を回収し、Serum Free Medium(SFM)で 2×10^6 /ml の細胞懸濁液を調製し 1ml/tube で分注した。これに DMSO に溶解した 0.1mM、0.25mM、0.5mM、1mM の PI 溶液を 10ul ずつ加え終濃度を 1、2.5、5、10uM として PI を細胞内に取り込ませた。37°C で取り込み開始後 1 分、3 分、5 分、10 分間反応させ、反応後遠心で細胞を回収し氷冷 PBS(-)で 2 回洗った。この細胞を 100ul の氷冷

PBS(-)で懸濁し 150ul の MeOH を加えて細胞から PI を抽出した。この上清を別なチューブに移し Speed Vac で溶媒を完全に除去した。残った沈査に HPLC 移動層 100ul 加え HPLC サンプルを調製した。

ii)HeLa 細胞からの PI 抽出法

実験前日に 2×10^5 /1ml の HeLa 細胞懸濁液を調製し、12 well プレートに 1ml/well で培養を開始した。実験当日培養液を除き PI を終濃度で 1、2.5、5、10uM 含む SFM を 1ml 加え、37°C で 1、3、5、10 分培養し PI を細胞内に取り込ませた。PI を取り込ませた後 SFM を除き、細胞を氷冷 PBS で 2 回洗った。PBS 除去後、細胞に 500ul メタノールを 2 回加えて PI を抽出した。回収した抽出液は遠心後に新しいチューブに移し、Speed Vac で溶媒を完全に除去し残った沈査に HPLC 移動層を 100ul 加えて HPLC サンプルとした。1 回の実験ごとに 1well あたりの細胞数を計測し細胞内濃度を計算する際に補正した。

細胞内濃度の計算法

HPB-M(a)と CEM を顕微鏡下で観察し、細胞の直径を測定した。約 150~300 個の細胞の直径の平均値を算出し、これに基づいて HPB-M(a)の平均細胞体積を算出した。HeLa 細胞に関してはトリプシン処理した後 HPB-M(a)や CEM と同様の手法にて平均細胞体積を算出した。この平均細胞体積を基にして細胞内の PI 濃度を算出した。

C. 研究結果

HPB-M(a)と、CEM 及び HeLa 細胞を顕微鏡下で約 150 個~300 個観察して細胞の直径を測定し細胞体積を計算した結果、HPB-M(a)では約 1.3547pl、CEM では約 0.502243pl、HeLa では約 2.177pl だった。NFV、SQV、LPV、RTV を各々取り込ませた HPB-M(a)の抽出液を HPLC で解析した結果それぞれ 10 分~20 分の時点で各 PI の特異的なピークが観察された(図 1)。HPB-M(a)、CEM、HeLa のいずれの細胞

抽出液でも、細胞由来の夾雑ピークは PI の溶出時間付近には認められなかった。HPB-M(a)と CEM への NFV、SQV、LPV、RTV、IDV の 4 種類の PI について細胞内濃度を解析した結果、これらの PI は培養液中の濃度に伴い細胞内濃度も高くなる傾向が見られた(図 2)。どの薬剤濃度においても、HPB-M(a)と CEM では NFV で約 100 倍、SQV で約 60 倍、LPV と RTV では約 10 倍に細胞内で濃縮されていた。HPB-M(a)と CEM の PI 細胞内濃度はほぼ同程度であった。HeLa では PI の全濃度において HPB-M(a)や CEM と比べて細胞内濃度が高い傾向が見られた。また 10uM における PI の細胞内濃度の経時的変化を HPB-M(a)、CEM および HeLa で比較した(図 3)。その結果 HeLa ではどの PI でも HPB-M(a)と CEM よりも細胞内濃度が高く、特に SQV で約 3 倍、LPV で約 4 倍高い濃度で HeLa の細胞内に蓄積していた。また PI の取り込みは HPB-M(a)と CEM では約 1 分で PI の細胞内への取り込み反応が完了するのに対し、HeLa では 10 分間にわたって経時的に細胞内への PI の取り込みが起きている事が示された。

D. 考察

今回用いた HPLC による解析法(S. Kato et. al, unpublished data) は、放射性同位元素を用いた解析法とほぼ同程度の感度で細胞内の PI 濃度を測定できることが明らかになった。このような放射性同位元素を用いない測定法は簡便で安価であることから、検査機関等への導入も可能であると考えられる。また、同じ T 細胞系の CEM と HPB-M(a)がほぼ同程度の PI の取り込みを示したことから、HPB-M(a)における結果は一般的な T 細胞系における細胞内への PI の蓄積をよく反映しているものと考えられる。また、HeLa 細胞内に蓄積される PI 濃度は HPB-M(a)や CEM よりも全体的に高い事が明らかになった。また PI は HPB-M(a)や CEM では PI は細胞内に速やかに取り込まれ 1 分以内

で最大値に達した一方で、HeLa では比較的緩やかに 10 分間にわたって経時的に細胞内へ取り込まれたが、このような取り込まれるパターンの違いは PI の細胞内への取り込みの機構が細胞によって異なる事を示唆している。今後は HeLa における PI の細胞内取り込みの機構についてもさらに解析し、HPB-M(a)との比較検討を行う予定である。

E. 結論

HPLC を用いて細胞から抽出された PI の濃度を測定できる事が示された。細胞の大きさを計測する事により細胞内濃度を正確に算出する事も可能であった。T 細胞系細胞株の HPB-M(a)と CEM の PI の細胞内への蓄積量は同程度であり、最大量まで取り込まれる早さも 1 分以内と同じだった。HeLa は HPB-M(a)と CEM に比べて高い濃度で PI が細胞内に蓄積された。また取り込まれる速さは HPB-M(a)と CEM と比べて遅く、今回検討した 10 分間の取り込みの間に経時的に細胞内へ蓄積していく事が示された。

F. 研究危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

(1)論文発表

1) Joke Snoeck, Rami Kantor, Robert W. Shafer, Kristel Van Laethem, Koen Deforche, Ana Patricia Carvalho, Brian Wynhoven, Marcel A. Soares, Patricia Cane, John Clarke, Candice Pillay, Sunee Sirivichayakul, Koya Ariyoshi, Africa Holguin, Hagit Rudich, Rosangela Rodrigues, Maria Belen Bouzas, Françoise Brun-Vezinet, Caroline Reid, Pedro Cahn, Luis Fernando Brigido, Zehava Grossman, Vincent Soriano, Wataru Sugiura, Praphan Phanuphak,

Lynn Morris, Jonathan Weber, Deenan Pillay, Amilcar Tanuri, Richard P.Harrigan, Ricardo Camacho, Jonathan M.Schapiro, David Katzenstein, and Anne-Mieke Vandamme: Discordances between Interpretation Algorithms for Genotypic of Human Immunodeficiency Virus Are Subtype Dependent. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 50(2): 694-701,2006

2) Hua Yan, Tomoko Chiba Mizutani, Nobuhiko Nomura, Tadakazu Takakura, Yoshihiro Kitamura, Hideka Miura, Masako Nishizawa, Masashi Tatsumi, Naoki Yamamoto, Wataru Sugiura: A novel small molecular weight compound with a carbazole structure that demonstrates potent human immunodeficiency virus type-1 integrase inhibitory activity. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*. Vol.16: 363-373, 2005

3) T Ueda, L Myint, M Nishizawa, M Matsuda, W Sugiura: Analysis of interference and co-evolution between protease inhibitor resistant mutations and gag mutations. *Antiviral Therapy*. Vol.10:s116, 2005

4) N Hasegawa, W Sugiura, M Matsuda, K Mogushi, H Tanaka, F Ren: Inference of evolutionary forces driving HIV-1 drug-resistance acquisition under HAART using longitudinal HIV-1 protease gene samples. *Antiviral Therapy*. Vol.10:s114, 2005

5) K. Shiomi, R. Matsui, M. Isozaki, H. Chiba, T. Sugai, Y. Yamaguchi, R. Masuma, H. Tomoda, T. Chiba, H. Yan, Y. Kitamura, W. Sugiura, S. Omura, H. Tanaka: Fungal phenalenones inhibit HIV-1 integrase. *J. Antibiot*. Vol.58: 65-68,

2005

- 6) Hirotaka Ode, Masami Ota, Saburo Neya, Msayuki Hata, Wataru Sugiura, and Tyuji Hoshino: Resistant Mechanism against Nelfinavir of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Proteases. *J Phys Chem B*. Vol.109: 564-574, 2005
 - 7) Miyauchi K, Komano J, Yokomaku Y, Sugiura W, Yamamoto N, Matsuda Z: Role of the specific amino acid sequence of the membrane-spanning domain of human immunodeficiency virus type 1 in membrane fusion. *J Virol*. Vol 79,4720-4729, 2005
 - 8) Rami Kantor, David A. Katzenstein, Brad Efron, Ana Patricia Carvalho, Brian Wynhoven, Patricia Cane, John Clarke, Sunee Sirivichayakul, Marcelo A. Soares, Joke Snoeck, Candice Pillay, Hagit Rudich, Rosangela Rodrigues, Africa Holguin, Koya Ariyoshi, Maria Belen Bouzas, Pedro Cahn, Wataru Sugiura, Vincent Soriano, Luis F. Brigido, Zehava Grossman, Lynn Morris, Anne-Mieke Vandamme, Amilcar Tanuri, Praphan Phanuphak, Jonathan N. Weber, Deenan Pillay, P. Richard Harrigan, Ricardo Camacho, Jonathan M. Schapiro, Robert W. Shafer. Impact of HIV-1 Subtype and Antiretroviral Therapy on Protease and Reverse Transcriptase Genotype : Results of a Global Collaboration. *PLoS Medicine*. Vol. 2: 325-337, 2005
 - 9) 杉浦 互 : 抗 HIV-1 薬剤の現状と薬剤開発の新たな展開. *ウイルス第 55*: 85-94,2005
 - 10) 西澤雅子, 杉浦 互 : HIV-1 の薬剤耐性についての知見. *BIO Clinica*. Vol.20:51-57,2005
 - 11) 杉浦 互: 新規感染者における薬剤耐性 HIV 拡散の危機~Alert for Outbreak of Drug Resisitance HIV-1 Newly Infected Population~ *日本エイズ学会誌 Vol. 7*: 117-120, 2005
 - 12) 杉浦 互、潟永博之、田宮貞宏、松田昌和、松見信太郎、蜂谷敦子、John Coffin、満屋裕明: シンポジウム 7. 「薬剤耐性の知見、基礎から臨床へ」を終えて. *日本エイズ学会誌*.7(3),2005
- (2)学会発表
- 1) Kato Shingo, Tsuji Kenji, Tanaka Rie, Kinai Ei, Hanabusa Hideji, Negishi Masayoshi, Sugiura Wataru: Quantitation of Antiretroviral Drugs in Hair with LC/MS/MS for Assessment of Medication Adherence. 7th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific. July 1-5. 2005, Kobe.
 - 2) Saeng-aroon Siriphan, Myint Lay, Pathipvanich Panita, BARIyoshi Koya, Wichukchinda Nuanjun, Rojanawiwat Archawin, Matsuda Masakazu, Sawanpanyalert Pathom, Sugiura Wataru, Auwanit Wattana: Mutagenically-Separated PCR as a Tool for Monitoring Lamivudine (GPOvir) Resistant CRF01_AE in Thailand(GPOvir). 7th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific. July 1-5. 2005, Kobe.
 - 3) N Hasegawa, W Sugiura, M Matsuda, K Mogushi, H Tanaka, F Ren: Inference of evolutionary forces driving HIV-1 drug-resistance acquisition under HAART using longitudinal HIV-1 protease gene samples. 14th International HIV Drug Resistance Workshop. June 7-11. 2005, Quebec, Canada.
 - 4) T Ueda, L Myint, M Nishizawa, M Matsuda, W Sugiura: Analysis of

- interference and co-evolution between protease inhibitor resistant mutations and gag mutations. 14th International HIV Drug Resistance Workshop. June 7-11. 2005, Quebec, Canada.
- 5) Wataru Sugiura, Masakazu Matsuda, Junko Kakizawa, Hideka Miura, Satoshi Takeda, Masayuki Fujino, Masako Nishizawa, Naoki Yamamoto: Changes in Prevalence and Patterns of Drug Resistant Mutations in JAPAN-Summary of Nine Years Nationwide HIV-1 Drug Resistance Monitoring Study (1996-2004). 6th Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance. Nov.13-16, 2005, Virginia
 - 6) Wataru Sugiura: Virological and Statistical Analyses of Interference between Protease Inhibitor Resistant Mutations and Gag Mutations. 13th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Feb. 5-9. 2006, Denver, USA
 - 7) Wataru Sugiura: Multi-Center Nationwide Survey of Drug Resistant HIV-1 in Newly Diagnosed HIV/AIDS Patients in Japan from 2003 to 2004. 13th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Feb 5-9. 2006, Denver, USA
 - 8) 杉浦 互: 日本における薬剤耐性HIV-1の動向と対策. 第62回岡山HIV診療ネットワーク 2005年5月31日 岡山
 - 9) Wataru Sugiura, Masakazu Matsuda, Junko Kakizawa, Hideka Miura, Satoshi Takeda, Masayuki Fujino, Masako Nishizawa and Naoki Yamamoto: Changes in Prevalence and Patterns of Drug Resistant Mutations in Japan - Summary of Nine Years Nationwide HIV-1 Drug Resistance Monitoring Study from 1996 to 2004. 第1回日独エイズ公開シンポジウム. 2005年11月9日 名古屋
 - 10) 杉浦 互: HIV-1 CRF01_AE における Nelfinavir 耐性変異 N88S の耐性化機序の解析. 第53回日本ウイルス学会学術集会. 2005年11月20日~22日, 横浜
 - 11) Myint Lay, 植田知幸, 西澤雅子, 松田昌和, 三浦秀佳, 杉浦 互: プロテアーゼ阻害剤耐性変異と Gag 変異間に見る相互干渉と共進化の解析. 第53回日本ウイルス学会学術集会. 2005年11月20日~22日, 横浜
 - 12) 杉浦 互: 薬剤耐性の獲得に見る Gag と Protease の共進化. 第7回白馬シンポジウム. 2005年11月3日~4日, 鹿児島
 - 13) 小池 満, 三好 洋, 井上靖之, 高橋正知, 山口洋子, 奥瀬千晃, 杉浦 互, 中島秀喜: HIV/HIB Coinfection における HBV 耐性の検討. 第19回日本エイズ学会学術集会. 2005年12月1日~3日, 熊本
 - 14) 浅黄 司, 金田次弘, 伊部史朗, 松田昌和, 吉田 繁, 津畑千佳子, 大家正泰, 近藤真規子, 貞升健志, 瀧永博之, 正兼亜季, 佐藤克彦, 奏 眞美, 溝上康司, 森 治代, 南 留美, 渡邊香奈子, 岡田清美, 杉浦 互: HIV-1 薬剤耐性遺伝子検査法に関するアンケート調査. 第19回日本エイズ学会学術集会. 2005年12月1日~3日, 熊本
 - 15) 西澤雅子, Urvi Parikh, 藤野真之, 松田昌和, 三浦秀佳, 加藤真吾, 山本直樹, 杉浦 互: ヒト末梢血単核球を用いた K65R 獲得 HIV-1 の逆転写酵素阻害剤に対する感受性の解析. 第19回日本エイズ学会学術集会. 2005年12月1日~3日, 熊本
 - 16) 石川暢恒, 高田 昇, 河部康子, 喜花伸子, 大江昌恵, 大下由美, 畝井浩子, 藤井輝久, 木村昭郎, 杉浦 互: 半年以内に感染したと推定される HIV 感染症の9例. 第19回日本エイズ学会学術集会. 2005年12月1日~3日, 熊本
 - 17) 杉浦 互, 瀧永博之, 吉田 繁, 千葉仁志,

浅黄 司、松田昌和、岡 慎一、近藤真規子、今井光信、貞升健志、長島真美、伊部史朗、金田次弘、浜口元洋、上田幹夫、正兼亜季、大家正義、渡邊香奈子、白阪琢磨、山本善彦、森 治代、小島洋子、中桐逸博、高田 昇、木村昭郎、南 留美、山本政弘、健山正男、藤田次郎: 新規 HIV-1 感染者における薬剤耐性の頻度に関する全国疫学調査 -2003 年から 2004 年にかけての報告-. 第 19 回日本エイズ学会学術集会. 2005 年 12 月 1 日~3 日, 熊本

18) 大出裕高、杉浦 互、星野忠次: コンピューター・シミュレーションによる CRF01_AE NH1 N88S HIV-1 PR の NFV 耐性機構の解明. 第 19 回日本エイズ学会学術集会. 2005 年 12 月 1 日~3 日, 熊本

19) 仲宗根 正、高松純樹、杉浦 互、佐藤裕徳、山本伸二、Heneine Walid、山本直樹: HIV-RT 薬剤感受性迅速試験法 (半日) の開発. 第 19 回日本エイズ学会学術集会. 2005 年 12 月 1 日~3 日, 熊本

20) 駒野 淳、宮内浩典、Lay Myint、二橋悠子、浦野恵美子、松田善衛、千葉智子、三浦秀佳、杉浦 互、山本直樹: Rapid propagation of low-fitness drug resistant mutants of HIV-1 by a-1 frameshift enhancer sparsomycin. 第 19 回日本エイズ学会学術集会. 2005 年 12 月 1 日~3 日, 熊本

21) 加藤真吾、田中理恵、根岸昌功、杉浦 互: AZT は血漿中及び細胞内において確かに d4T に変換される. 第 19 回日本エイズ学会学術集会. 2005 年 12 月 1 日~3 日, 熊本

22) 小池 満、鈴木貴雄、井上靖之、山口洋子、小池淳樹、杉浦 互、高橋正知: HIV 関連リンパ腫における自己造血幹細胞採取の経験. 第 19 回日本エイズ学会学術集会. 2005 年 12 月 1 日~3 日, 熊本

23) 小池 満、高橋正知、井上靖之、山口洋子、杉浦 互、中島秀喜: 当院における新規受診者の検討. 第 19 回日本エイズ学会学術集会.

2005 年 12 月 1 日~3 日, 熊本

24) 山元泰之、山中 晃、内田泰斗、尾形享一、福武勝幸、杉浦 互: 判定保留 HIV-1 抗体確認検査で確定し得ないとき. 第 19 回日本エイズ学会学術集会. 2005 年 12 月 1 日~3 日, 熊本

25) Wataru Sugiura: Changes in prevalence and patterns of drug resistant mutations in Japan-Summary of nationwide HIV-1 drug resistance monitoring study (1996-2004) in Japan. 第 19 回日本エイズ学会学術集会. 2005 年 12 月 1 日~3 日, 熊本

26) 杉浦 互、湯永博之、田宮貞宏、松田昌和、松見信太郎、蜂谷敦子、John Coffin、満屋裕明: シンポジウム 7. 「薬剤耐性の新知見、基礎から臨床へ」を終えて. 第 19 回日本エイズ学会学術集会. 2005 年 12 月 1 日~3 日, 熊本

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

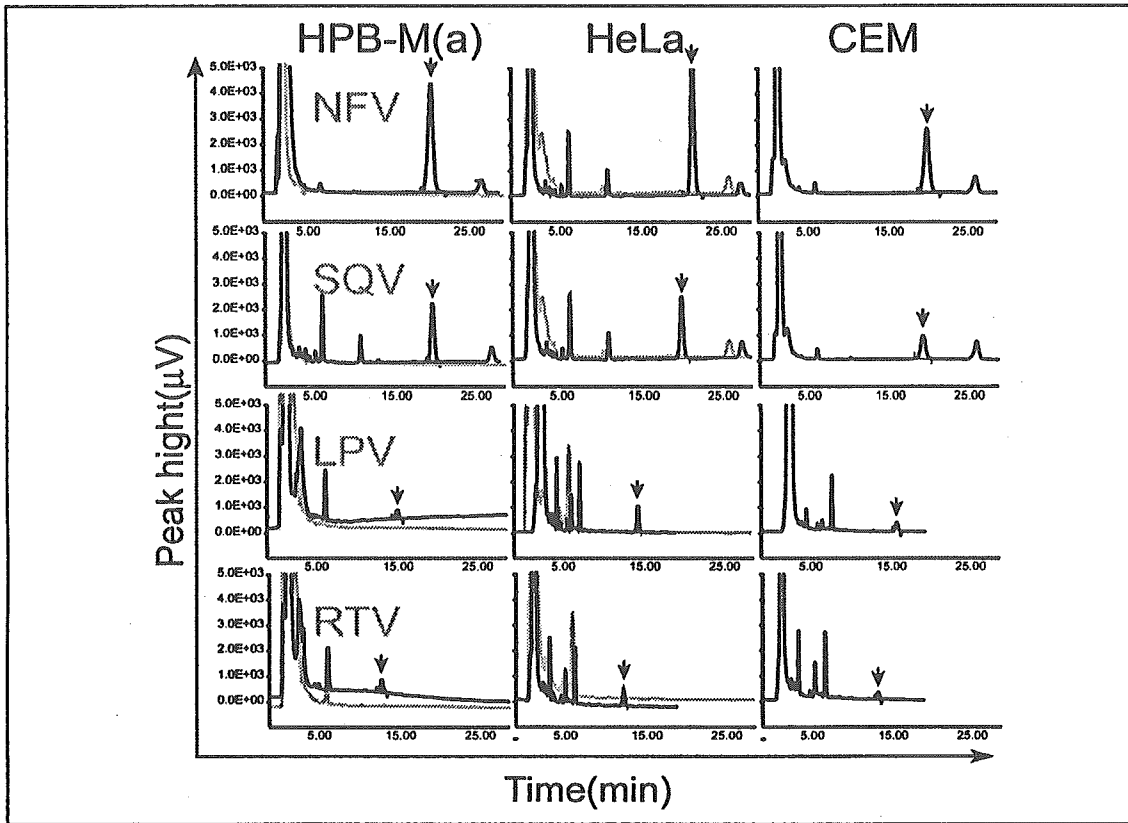


图 1

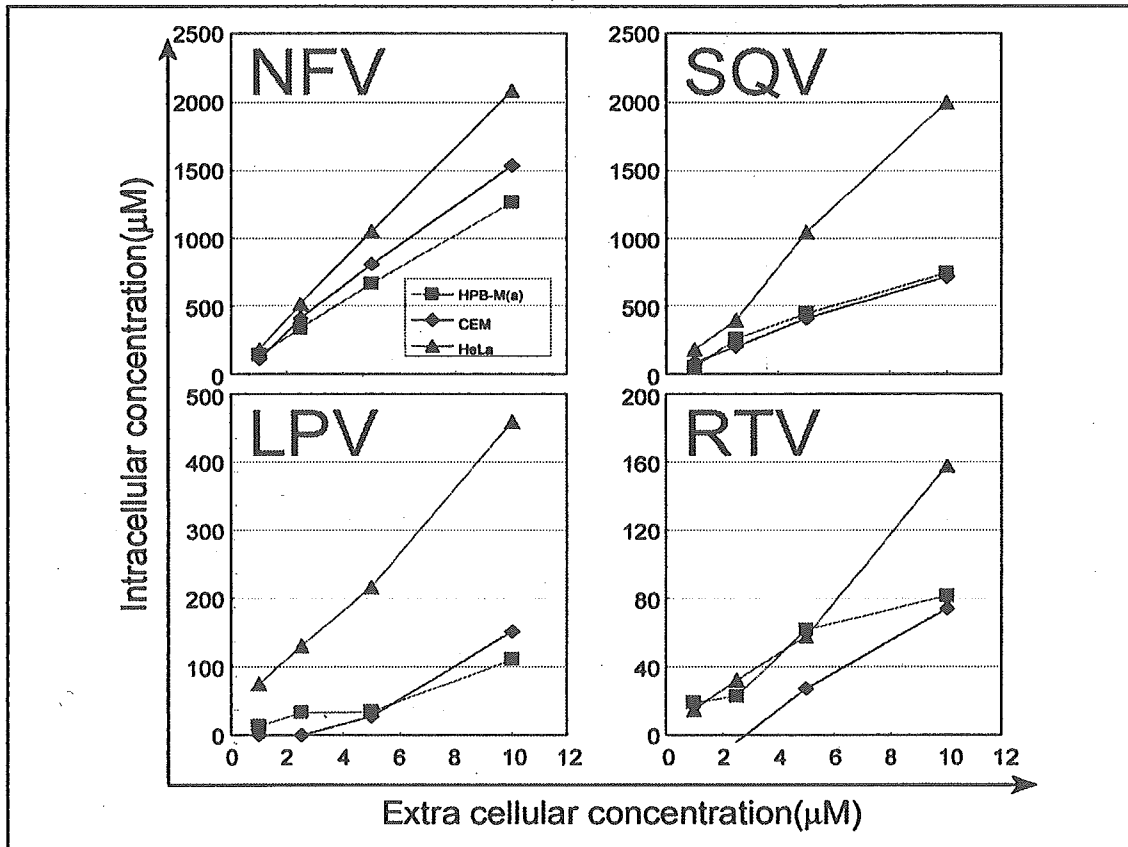


图 2

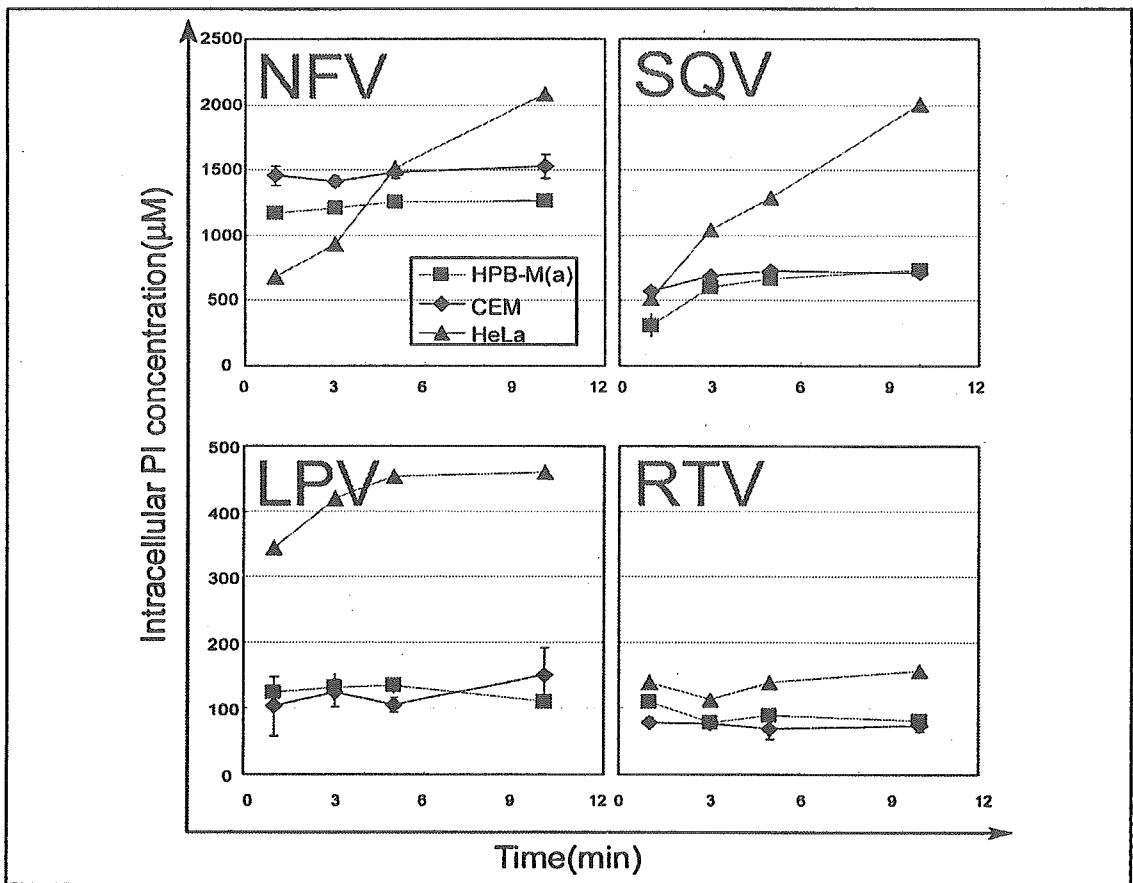


图 3

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

新規感染者に認めた薬剤耐性HIV-1のウイルス学的解析研究

分担研究者：金田 次弘^{*1}

研究協力者：伊部 史朗^{*2}、藤崎 彩恵子^{*2}、藤崎 誠一郎^{*3}

*1 国立病院機構名古屋医療センター 臨床研究センター 血液免疫研究部 部長、*2 同 研究員

*3 エイズ予防財団 リサーチレジデント

研究要旨

未治療患者由来プロテアーゼ(PR)阻害剤耐性HIV-1のgag•PR遺伝子に組換えたキメラウイルスは、薬剤の無い条件下で親株の野生型HIV-1であるHXB2より優れた複製能を示した。耐性ウイルスのgag•PR遺伝子をgag遺伝子とPR遺伝子に分割して組込んだキメラウイルスの複製能を調べた結果、HXB2を上回る複製能は、PR遺伝子に組換えたウイルスには観察されず、gag遺伝子に組換えたウイルスに観察された。このことから、組換え耐性ウイルスの野生型を凌ぐ複製能はgag遺伝子によってもたらされていると結論づけた。増殖キネティクス解析では他の組換えウイルスの複製能との違いは僅差ではあったが、未治療患者由来PR阻害剤耐性HIV-1のgag遺伝子を有する組換えウイルスが最も高い複製能を示した。これらの結果から、未治療患者由来PR阻害剤耐性HIV-1の複製能向上にgag遺伝子内の変異が関与している可能性が示唆される。

A. 研究目的

多剤併用療法(HAART)施行中に薬剤耐性ウイルスが出現した症例において治療を中断した場合、2～13週間のうちに耐性ウイルスは検出されなくなり、野生型ウイルスが主要な準種として置き換わることが知られている。これは、薬剤の無い条件下では、耐性ウイルスは野生型ウイルスよりも複製能が劣ることに起因すると考えられている。ところが、M46I変異型PR阻害剤耐性HIV-1が検出された当院の未治療患者3例では、2～3年にわたる経過観察期間に検出されたウイルスは耐性ウイルスのみであり、野生型ウイルスへの置換は観察されていない。我々は、未治療患者に伝播している薬剤耐性HIV-1は従来の常識とは異なり、何らかの遺伝子変異によって薬剤の無い条件下でも野生型と同等に増殖できる特性を有したウイルスで

ある可能性を考えた。そこで、未治療患者由来薬剤耐性HIV-1のウイルス学的特性を解明することを研究目的とした。昨年度は、①未治療患者に検出されたPR阻害剤耐性HIV-1が保有する主要薬剤耐性変異であるM46I変異やL90M変異は、薬剤存在下でのウイルス増殖には有利にはたらくが、薬剤の無い条件下ではウイルス複製能を減弱させること、②PR内部の副次変異(minor mutations)などによって減弱したウイルス複製能が野生型ウイルスであるHXB2の複製能と同等程度まで回復する例(L90M変異型耐性ウイルス)があること、③未治療患者由来PR阻害剤耐性HIV-1のgag•pol遺伝子に組換えたウイルスはHXB2よりも優れた複製能を示すこと、④未治療患者由来PR阻害剤耐性HIV-1のgag蛋白質には、共通に検出される7つの特異的なアミノ酸変異があることを明らかにした。しか

し、③の実験に関して、組込んだ耐性ウイルスのpol遺伝子にはPR領域だけでなく逆転写酵素領域も含んでいたため、逆転写酵素の性能の違いが実験結果に影響を与えている可能性を否定できなかった。そこで、本年度は、未治療患者由来PR阻害剤耐性HIV-1のgag●PRに組換えたウイルスを作成して実験を行った。さらに、耐性ウイルスのgag遺伝子のみを組み換えでもHXB2よりも優れた複製能が観察されるのか否かを調べた。また、ウイルス複製能の評価法として増殖キネティクス解析を加えた。

B. 研究方法

1. 組換えHIV-1の作成

図1に示す様にHIV-1 HXB2株の感染性クローンを基礎とし、未治療患者由来M46I変異型PR阻害剤耐性HIV-1のPR遺伝子に組換えたTN46 (PR)、gag●PR遺伝子に組換えたTN46 (gag●PR)、gag遺伝子に組換えたTN46 (gag) を作製した。未治療患者由来L90M変異型PR阻害剤耐性HIV-1についても同様に一連の組換えウイルス (TN90 (PR)、TN90 (gag●PR)、TN90 (gag)) を作製した。また、M46I変異やL90M変異自体がウイルス複製能に与える影響を調べるために、HXB2のPRにそれぞれのアミノ酸変異を導入したHXB2 (PR_{M46I})、HXB2 (PR_{L90M}) を作製した。

2. ウイルス複製能の比較

組換えウイルスの複製能は、親株であるHXB2との競争培養実験、及び、単独培養時の増殖キネティクス解析によって評価した。競争培養実験では、組換えウイルスと親株であるHXB2をそれぞれ50 CCID₅₀の感染価にてMT4細胞に接種し、薬剤の無い条件下で4日間隔で継代培養した。各継代のウイルス存在率は以下の手順で決定した。まず、培養液上清からRNAを抽出し、RT-nested PCRにてウイルスのgag●pol遺伝子を

増幅した。次に組換えウイルスとHXB2との塩基配列の違いを利用し、PCR産物を鋳型としてプライマーを一塩基蛍光標識し、その蛍光シグナルをGenetic Analyzer (Applied Biosystems)にて検出した。最後に、検量線を用いて蛍光シグナルのピーク面積比からウイルス存在率を算出した。増殖キネティクスの解析では、それぞれのウイルスを100 CCID₅₀の感染価にて単独でMT-4細胞に接種し、2日毎に培養液上清中のp24濃度をELISA法にて測定した。

C. 研究結果

1. ウイルス競争培養実験

TN46 (gag●PR) とHXB2との競争培養実験結果を図2Aに示した。継代数が進むに連れて、TN46 (gag●PR) の存在率は増加し、7継代目にはその存在率は100%に達した。TN90 (gag●PR) とHXB2との競争培養実験結果もほぼ同様であり (図2B)、未治療患者由来PR阻害剤耐性HIV-1のgag●PR遺伝子に組換えたキメラウイルスはいずれも親株の野生型HIV-1であるHXB2よりも優れた複製能を示した。次に、HXB2よりも優れた複製能が、耐性HIV-1のgag遺伝子に組換えたTN46 (gag) やTN90 (gag) に観察されるか否かを調べた。その結果、TN46 (gag) やTN90 (gag) の存在率は共に継代数が進むに連れて増加し、対するHXB2の存在率は低下した (図3A, B)。7継代目にTN46 (gag) やTN90 (gag) の存在率は80%に達し、未治療患者由来PR阻害剤耐性HIV-1のgag遺伝子に組換えたキメラウイルスにもHXB2よりも優れた複製能が観察された。

2. 増殖キネティクスの比較

HXB2, HXB2 (PR_{M46I}), TN46 (PR), TN46 (gag●PR), TN46 (gag) の単独培養時の増殖キネティクスを図4Aに示した。ウイルス間の増殖キネティッ