

3. 抗 HIV-1 薬剤の現状と薬剤開発の新たな展開

杉 浦 互

国立感染症研究所エイズ研究センター第二研究グループ

HIV-1 感染症は 1980 年代初頭に男性同性愛者の間で広がり、その後急速に感染が拡大し、今日世界には 4000 万人の感染者がいると推測されている。HIV/AIDS の薬剤治療の歴史は 1985 年の zidovudine の登場に始まる。以降今日まで抗 HIV-1 薬剤開発は積極的に行われており、平成 17 年現在 3 クラス 17 種類の抗 HIV-1 薬剤が認可され使用されている。ここでは抗 HIV-1 薬剤の開発史、治療薬の現状と問題点、そして今後の展望について簡単にまとめてみた。

はじめに

HIV/AIDS の薬剤治療の歴史は 1985 年の zidovudine の登場に始まる¹⁾。以降今日まで抗 HIV-1 薬剤開発は積極的に行われており、平成 17 年現在 3 クラス 17 種類の抗 HIV-1 薬剤が認可され使用されている (図 1)。開発された抗 HIV-1 薬剤の中でも治療戦略の転換ポイントとして重要なのは 1995 年末のプロテアーゼ阻害剤の登場である²⁾。プロテアーゼ阻害剤の登場により、異なる HIV-1 の酵素を標的とした薬剤を組み合わせた多剤併用療法が標準的な治療法として実施されるようになった。複数の抗 HIV 薬剤を組み合わせることにより、感染者体内の HIV-1 増殖を強力に押さえ込むことに成功しただけでなく、個々の薬剤の減量による副作用リスクの軽減と薬剤耐性出現リスクの低下も合わせて実現した。多剤併用療法の治療効果は先進諸国において導入以後 AIDS 死亡者数が著しく低下したことが物語っている³⁾。

多剤併用療法の成功により HIV/AIDS の薬剤治療は一応の完成の域に到達したと言えよう。しかしながら初回治療から脱落する頻度は高く、まだ改善すべき課題が残されている。まず重要なことは薬理動態の改善である。血中薬物半減期の長い薬剤の開発による服薬回数の減少は感染者の

負担を減らし、アドヒアランスと QOL の改善が期待される。そしてアドヒアランスの改善は当然のことながら薬剤耐性 HIV の出現抑制にも効果があると考えられる。次に重要なことは薬剤耐性 HIV-1 獲得症例の救済である。治療脱落の主要な原因に薬剤耐性の獲得があるが、既存の薬剤は同一クラスの薬剤間での交叉耐性が著しいため、薬剤耐性を獲得した後の薬剤の選択肢は大きく狭まってしまう。このような薬剤耐性症例の救済には既存の薬剤の耐性変異と交叉をしない新薬が必要であり、その開発が切望されている。抗 HIV-1 薬剤の現状と今後の展開について薬剤クラス毎にまとめてみた。

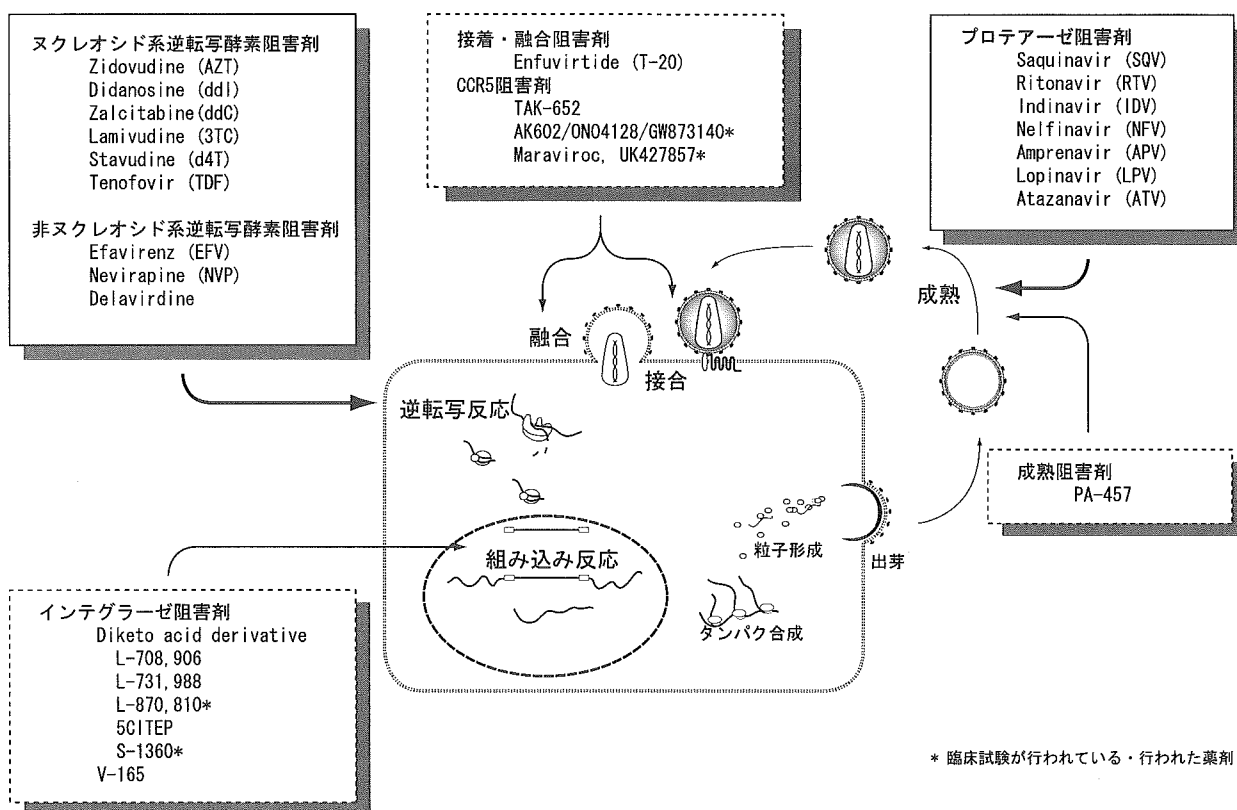
抗 HIV 薬剤の現状と新たな展開

(1) ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤 (Nucleoside Analogue Reverse transcriptase Inhibitor : NRTI)

最初に実用化された抗 HIV-1 薬剤クラスであり、(a) zidovudine (AZT), (b) didanosine (ddI), (c) zalcitabine (ddC), (d) lamivudine (3TC), (e) stavudine (d4T), (f) abacavir (ABC) そして (g) tenofovir (TDF) の合計で 7 種類の薬剤が認可されている^{1, 4-9)}。このクラスの薬剤は nucleoside を模倣したものであり、構造式をみるといづれの化合物も DNA 伸長の際の基質となる 2'-Deoxyribose 3'位の OH 基が欠損している (図 2)。阻害機序は細胞内で 3 リン酸を付与され逆転写の際に本来の 2'-deoxynucleotide-5'-triphosphate の代わりに DNA に取り込まれることによる伸長反応の停止 (chain termination) である。NRTI は多剤併用療法の柱となる重要な位置付けの薬剤であるが、多剤併用療法以前にも単剤もしくは 2 剤療法として用いられてきたために NRTI 耐性を獲得した症例が

連絡先

〒 208-0011 東京都武蔵村山市学園 4 - 7 - 1
TEL : 042-561-0771
FAX : 042-561-7746
E-mail : wsugiura@nih.go.jp



* 臨床試験が行われている・行われた薬剤

図1 HIV-1の複製サイクルと抗HIV-1薬剤の作用点

実線で囲まれたボックス内の薬剤は既に使用されているもの。破線で囲まれたボックス内の薬剤は現在開発中のものである。

多数認められている。特に AZT 耐性変異を獲得している症例の頻度は多く、このような症例を救済するために交叉耐性の無い新薬開発が求められてきた。その意味において 2004 年に認可された TDF は他の NRTI と一線を画す特徴を持っており、期待される新薬である。TDF は 2'-Deoxyribose が acyclic nucleoside phosphonate (ANP) に置換された構造を持つ (図 2-(g))。ANP 構造を持った抗ウイルス剤の歴史は意外と古く、1980 年代後半にはすでに EB に対する阻害効果が確認されている¹⁰⁾。その後この構造を持つ類縁化合物が多くの Herpes virus および retrovirus に対しても効果を示すことが明らかにされた¹¹⁾。特に [R]-9-[2-phosphonylmethoxypropyl]adenine (PMPA) は retrovirus と hepadnavirus に作用する化合物として見出された^{9, 12)}。PMPA は SIV を用いた in vitro 実験で優れた阻害効果を実証したが^{13, 14)}、これは薬剤を注射により投与した場合の結果であり、PMPA は低い経口吸収性のために実用化されるまでに時間が費やされた。その後、経口吸収性を大幅に改善したプロドラッグ bis(isopropylloxycarbonyloxymethyl)-PMPA (bis[POC]-PMPA) が完成し、7 番目の NRTI として登場してきた (図 2-(h))¹⁵⁻¹⁷⁾。TDF には他の NRTI と異なる次のような特徴を持っている。① nucleotidase あるいは esterase 等により分解されなくなり、生体内において長

時間安定した血中濃度を維持することが可能となった¹⁸⁾。②他の NRTI と異なる機序で細胞内に取り込まれる。Dipyridamole で細胞内取り込みが阻害されないことから、TDF は nucleoside carrier pathway とは異なる別のルートで細胞内に取り込まれると推測される^{19, 20)}。③すでにリン酸が 1 つ付与された構造をしており (TDF は正確には nucleotide analogue である)、他の NRTI では薬理効果発現の律速となっている最初のリン酸化反応をスキップして 2 リン酸の付与だけで阻害活性を呈することが出来る。④さらにいったん取り込まれた TDF は AZT 耐性変異の機序として知られている excision の標的となりにくいことが明らかにされている。これは TDF が AZT 耐性とは交叉しにくいことを意味している^{17, 21)}。⑤さらに好都合なことに TDF で誘導される耐性変異 K65R は AZT 耐性変異 T215Y と基本的に排他的な関係にあることが報告されている²²⁾。このことから TDF は first line の薬剤としてだけでなく、AZT 耐性獲得症例のサルヴェージ療法の切り札としても期待されている。

(2) 非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤 (Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor : NNRTI)

NNRTI もその名が示すとおり逆転写酵素を阻害する薬

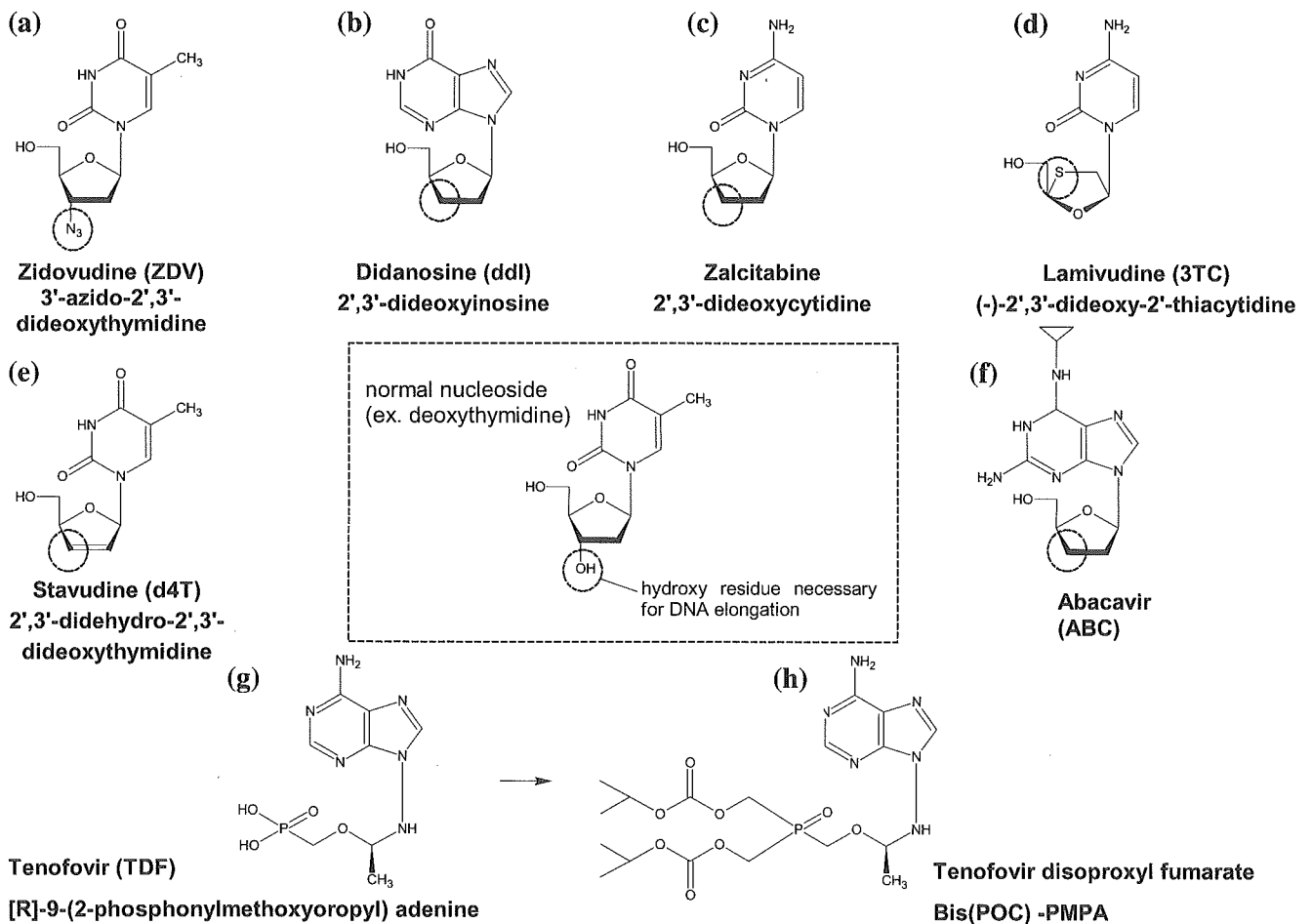


図2 ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤

剤である。現在 (a) nevirapine (NVP), (b) efavirenz (EFV), (c) delavirdine (DLV) の3薬剤が認可され使用されているが、わが国では efavirenz が群を抜いて多く使用されている²³⁻²⁵⁾。NNRTIの構造をみると先に記載したNRTIとは全く異なる構造をしており(図3)、逆転写酵素の阻害機序も大きく異なっている。NNRTIは逆転写酵素の活性中心部近傍に結合し、酵素活性中心である Asp110, Asp183と Asp185の位置をずらし、ひずみを作り出すことにより逆転写活性を失活させてしまう²⁶⁾。現在使用されている薬剤の化合物は構造式ではかなり異なっているが、結合した状態では類似しており、蝶がはねを広げたような形にたとえられている²⁷⁾。結合した形状が類似していることは、既存の3薬剤間の交叉耐性が著しいことを意味している。この3つのNNRTIはその結合形式から大きく次の二つのタイプに分けることが出来る²⁸⁾。① tight-binding inhibitor: 薬剤がRTに結合すると外れない薬剤であり、efavirenzがこの対応に該当する。Tight-binding inhibitorは、HIVの感染予防に用いる殺菌剤としての使用することが検討されている²⁹⁾。② rapid-equilibrium inhibitor: 薬剤

は可逆的にRTに結合しており、RTと薬剤が結合している側に極端に平衡が偏っているために抗HIV-1効果を呈するが、殺菌剤としては作用しない薬剤である。nevirapineとdelavirdineがこのタイプになる。

NNRTIも積極的な新薬開発が行われているが、既存薬との交叉耐性を回避することが大きな課題である。NNRTIは単剤で使用した場合、容易に高度耐性を獲得するために、使用され始めた当初は寿命の短い薬剤と予想されていたが、実際に使用されるようになると、長い血中半減期と大変優れた治療効果を発揮し、プロテアーゼ阻害剤に代わりうる多剤併用療法の要となっている。

(3) プロテアーゼ阻害剤 (Protease Inhibitor: PI)

プロテアーゼ阻害剤は1995年末に登場してから今日までに (a) saquinavir (SQV), (b) ritonavir (RTV), (c) indinavir (IDV), (d) nelfinavir (NFV), (e) amprenavir (APV), (f) lopinavir (LPV) そして (g) atazanavir (ATV) の7種類が認可され使用されている^{2, 30-34)}(図4)。最初に登場した3つのプロテアーゼ阻害剤 SQV, RTV,

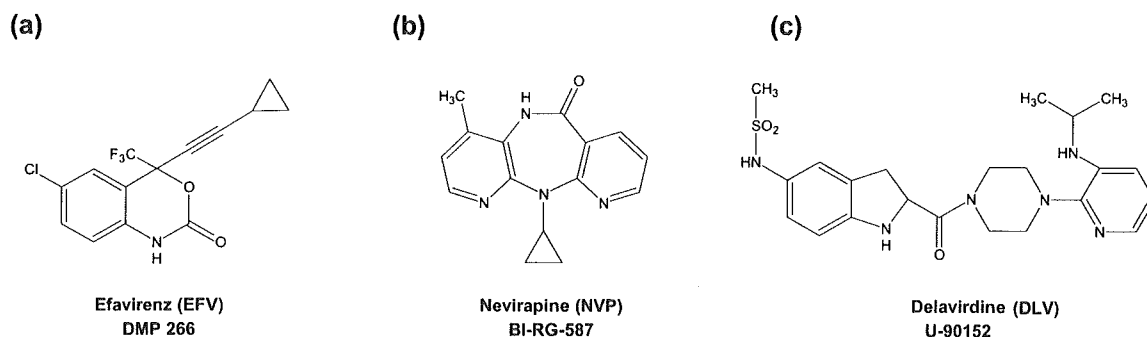


図3 非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤

Hydroxyethylamine isosteres 系

Symmetrical inhibitor 系

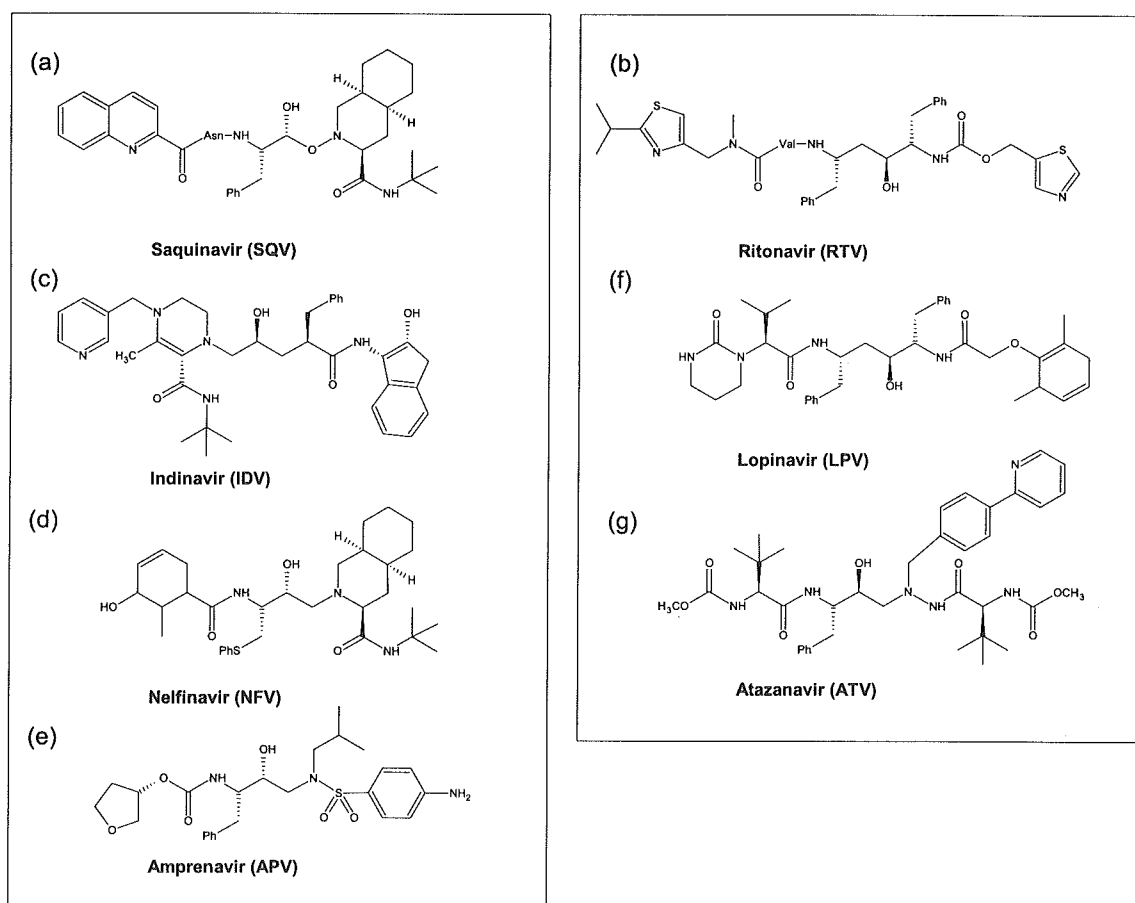


図4 プロテアーゼ阻害剤

IDV はそれぞれ異なる開発戦略から生み出された³⁵⁾. SQV は phenylalanine-proline を模倣した hydroxyethylamine isosteres 構造を持つ薬剤である。これは Gag p17-p24, Pol p6*-protease, proase-RT 間の切断部に見る Tyrtirosine/ Phenilalanine-Proline 配列が HIV-1 プロテアーゼに特異的で、哺乳類のアスパラティックプロテアーゼでは認識・切

断できないことを応用したものである²⁾. これに対して IDV 阻害剤開発の基盤となったのは、同じアスパラティックプロテアーゼであるレニンに対する薬剤開発戦略である。レニン阻害剤開発では本来の基質を模倣した化合物を阻害剤の候補としたが、HIV-1 プロテアーゼにおいても同様に本来の基質である Gag タンパクの切断配列を模倣した化合物が

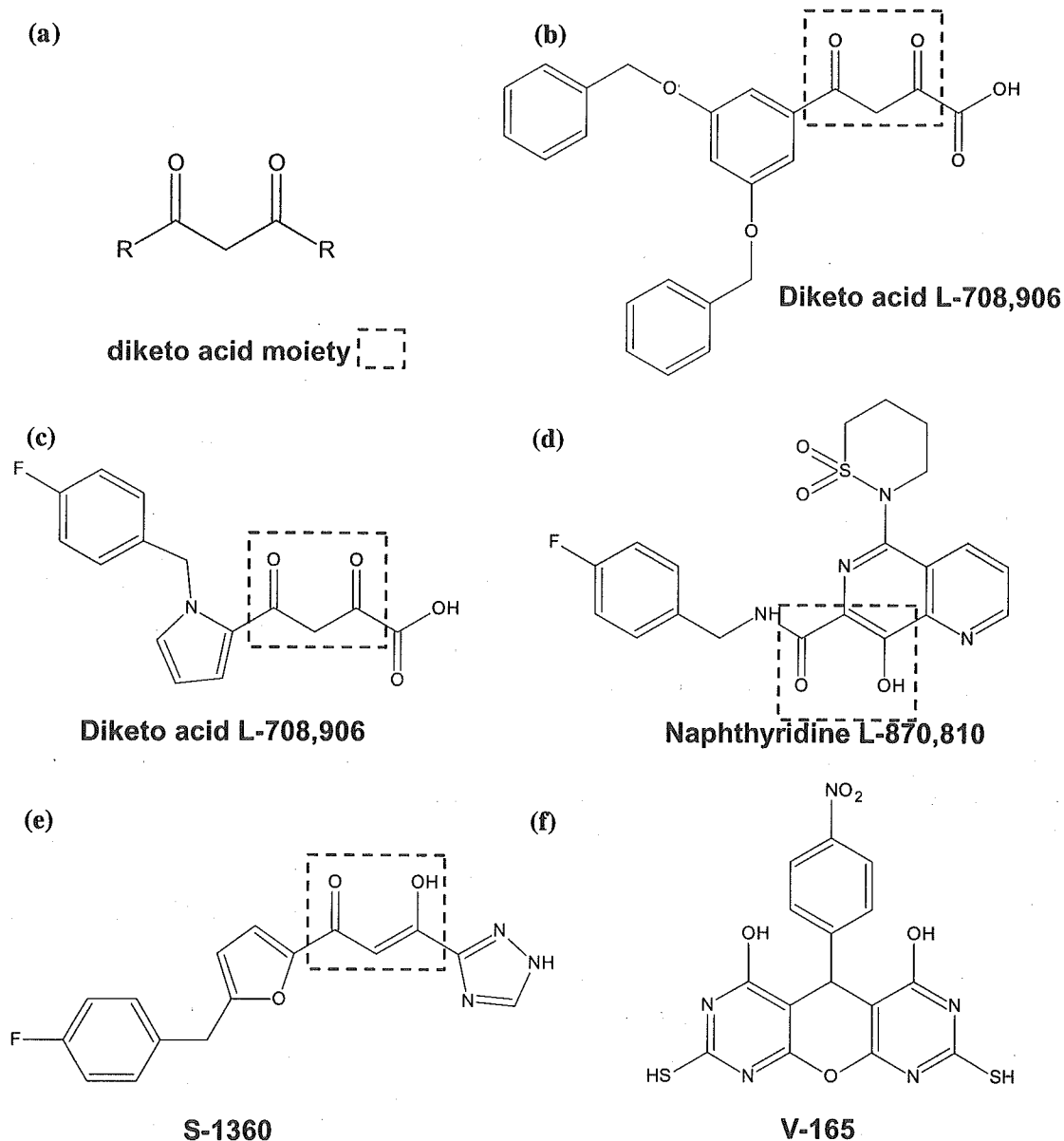


図5 現在までに報告されているインテグラーゼ阻害剤候補

取り上げられた。その結果 hydroxyethylamine isosteres 構造を持つ化合物 IDV が生み出された³⁶⁾。このように 1995 年末から 1996 年にかけて登場したプロテアーゼ阻害剤のうち SQV と IDV の 2 化合物は開発戦略が異なっていたにもかかわらず、いずれも hydroxyethylamine isosteres 構造をもつ化合物にたどり着いたことは興味深いことである。これに対して RTV は結晶構造解析から得られたプロテアーゼ活性中心部の構造を元に設計された薬剤である。プロテアーゼの基質を結合する S1-S1' が活性中心に対して対称構造をとっていることから、切断部を境に P1-P1' に相当する部位が対称になるように薬剤の設計が行われた³⁷⁾。これ以降のプロテアーゼ阻害剤は大まかに SQV・IDV の hydroxyethylamine isosteres 系と RTV の symmetrical

inhibitor 系の二つに分類することができる。初期の 3 剤の登場以降、新たなプロテアーゼ阻害剤の開発には①高い経口吸収性、②長い血中半減期、③低いタンパク結合率、そして④交叉耐性のない薬剤耐性プロファイルが求められるようになった。1997 年に登場した NFV は SQV と C 末側半分は全く同じ構造をもつ薬剤である。SQV との違いは N 末側の構造を小さくしたことであり、これにより経口吸収性の改善に成功した。また他のプロテアーゼ阻害剤とは異なる NFV に特有の耐性変異 D30N と N88D を誘導することとなった³⁸⁾。APV もまた hydroxyethylamine isostere を基本構造に持つ hydroxyethylamine isosteres 系列の薬剤である。1999 年に認可された時点では経口吸収性に問題があり、あまり使用されなかったが、2004 年になり経口吸収

性を改善させた pro-drug の fosamprenavir が認可された。Fosamprenavir は腸管上皮において alkaline phosphatase により APV に変換されて吸収される³⁹⁾。LPV は RTV が元になって作り出された薬剤である。開発に当たっては RTV の耐性変異である 82 番の変異誘導を回避する様に設計された。その結果 LPV は特異的な耐性変異を誘導せず、耐性変異の集積数が耐性度を左右するユニークな薬剤耐性プロファイルを持っている⁴⁰⁾。最近登場してきたのが ATV であり、この薬剤も RTV、LPV 同様に P1-P1' の対称性を念頭に開発された薬剤である。ATV は大変優れた経口吸収性を示し、血中の薬剤半減期も長いことから一日一回の服用が可能な薬剤である。また薬剤耐性 HIV-1 のプロファイルも既存の PI とは異なり、初回治療に失敗した症例では I50L が 100% の確立で認められた。I50L は ATV に特徴的な変異であり、他の PI に対しては殆ど影響しないことが知られている。また 1～2 剤の PI に対して耐性を獲得したウイルスであれば十分 ATV の効果が期待される^{41,42)}。

今後登場が見込まれる新しい薬剤

現在使用されている薬剤の標的である逆転写酵素とプロテアーゼ以外のウイルスタンパクあるいは宿主のレセプターを標的にした新薬開発も活発に行われている。図 1 に示したように HIV-1 複製過程の全てのステップが新薬開発の標的となりうる。その中でも実用化に近い下記薬剤について簡単に記す。

(1) 融合阻害剤

HIV-1 envelope の gp41 を標的にした T-20 (enfuvirtide) が米国では認可されている^{43,44)}。この薬剤は gp41 の leucine zipper like domain である heptad repeat 2 (HR2) の C 末 36 アミノ酸配列と相同のペプチドであり、HR2 の相方である HR1 に結合することによりウイルス粒子と宿主細胞の融合を阻害する。わが国ではまだ認可されていない薬剤である。T-20 はペプチドのため大量生産に適さないこと、高価であること、そして現段階では注射薬であることがその普及を妨げている。

(2) インテグラーゼ阻害剤 (図 5)

インテグラーゼは逆転写酵素、プロテアーゼと共に HIV-1 の増幅・複製に必須の酵素であり、新薬開発の有望な標的とされ活発な開発が行われてきた。数多くのスクリーニングが行われた中で最初に HIV-1 インテグラーゼに特異的な化合物として報告されたのが diketo acid 構造をもつ化合物である (図 5(a))。Diketo acid は組み換え酵素活性に必須の Mg^{2+} のキレートとして働くことにより酵素活性を失活させると考えられている⁴⁵⁾。2000 年に報告された L-708,906 と L-731,988 の二つは強い抗 HIV-1 効果を呈したが臨床試験にまでには至らなかった (図 5-(b)(c))⁴⁶⁾。その後、diketo 構造を持つ S-1360 が登場し、このクラスでは初めて臨床試験にまで駒を進めたが、その後実用化には至っ

ていない (図 5-(e))⁴⁷⁾。S-1360 の後、L-870,810 が臨床試験に入っている (図 5(d))⁴⁸⁾。Diketo acid とは異なるタイプのインテグラーゼ阻害剤としては pyrano dipyrimidine (V-165) が報告されている (図 5(f))⁴⁹⁾。ここ 1-2 年、臨床試験まで到達するインテグラーゼ阻害剤候補化合物が増えている。このことは薬剤開発とともにインテグラーゼの構造および機能への理解が深まり、化合物の開発が新たな段階に入りつつあることを反映しているのであろう。近い将来インテグラーゼ阻害剤が登場してくることが大いに期待される状況である。

(3) ケモカインレセプター阻害剤 (CXCR4 阻害剤, CCR5 阻害剤)

HIV-1 のタンパクあるいは酵素ではなく、宿主細胞のケモカインレセプターを標的にした薬剤である。CXCR4 あるいは CCR5 を標的にしたものが開発されている。現在開発中の CCR5 阻害剤には TAK-652, AK602/ONO4128/GW873140 などがある。CCR5 阻害剤は現在開発が行われている様々な新薬候補の中で、最も実用化に近い薬剤である^{50,51)}。

(4) 成熟阻害剤

2003 年に PA-457 という HIV-1 阻害活性を呈する薬剤が報告された。その阻害機序は今まで開発が行われてきたいずれのクラスにも当てはまらない新しいものである。電子顕微鏡による解析、薬剤耐性変異の出現箇所から Gag の CA-p1 の基質領域に結合し、プロテアーゼによる加水分解を阻害すると考えられている。現在 Phase I/II 臨床試験が行われている⁵²⁾。

結 語

先進諸国における多剤併用療法の成功は HIV 感染症に“慢性感染症”という地位を与えることとなった。しかし HIV/AIDS が増加を続けている発展途上国では治療薬剤へのアクセスがないために、いまま死に至る感染症である。世界保健機構が推し進めてきた 3 by 5 戦略の成果として発展途上国にも抗 HIV-1 薬剤が普及しつつあるが、まだまだ先進国並みには至っていない。ここで述べてきたように抗 HIV-1 薬剤は確実に進歩をしている。より強力な、より簡単な、より安全な、そしてより安価な治療を目指し薬剤開発は続けられているが、その恩恵を先進諸国だけではなく発展途上国の感染者とも分かち合いたいものである。

文 献

- 1) Mitsuya, H., K. J. Weinhold, P. A. Furman, M. H. St. Clair, S. N. Lehrman, R. C. Gallo, D. Bolognesi, D. W. Barry, and S. Broder. 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in

- in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 7096-100, 1985.
- 2) Roberts, N. A., J. A. Martin, D. Kinchington, A. V. Broadhurst, J. C. Craig, I. B. Duncan, S. A. Galpin, B. K. Handa, J. Kay, A. Krohn, R. W. Lambert, J. H. Merrett, J. S. Mills, K. E. B. Parkes, S. Redshaw, A. J. Ritchie, D. L. Taylor, G. J. Thomas, and P. J. Machin. Rational design of peptide-based HIV proteinase inhibitors. *Science* 248: 358-61, 1990.
 - 3) CDC. 1999. HIV/AIDS Surveillance Report.
 - 4) Mitsuya, H., and B. Samuel. Inhibition of the in vivo infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotrophic virus type III/lymphadenopathy-associated virus (HTLV-III/LAV) by 2', 3'-dideoxynucleosides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 1911-1915, 1986.
 - 5) Baba, M., R. Pauwels, P. Herdewijn, E. De Clercq, J. Desmyter, and M. Vandeputte. Both 2', 3'-dideoxythymidine and its 2', 3'-unsaturated derivative (2', 3'-dideoxythymidinene) are potent and selective inhibitors of human immunodeficiency virus replication in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 142: 128-34., 1987.
 - 6) Soudeyns, H., X. I. Yao, Q. Gao, B. Belleau, J. L. Kraus, N. Nguyen-Ba, B. Spira, and M. A. Wainberg. Anti-human immunodeficiency virus type 1 activity and in vitro toxicity of 2'-deoxy-3'-thiacytidine (BCH-189), a novel heterocyclic nucleoside analog. *Antimicrob Agents Chemother* 35: 1386-90, 1991.
 - 7) Daluge, S. M., S. S. Good, M. B. Faletto, W. H. Miller, M. H. St Clair, L. R. Boone, M. Tisdale, N. R. Parry, J. E. Reardon, R. E. Dornsife, D. R. Averett, and T. A. Krenitsky. 1592U89, a novel carbocyclic nucleoside analog with potent, selective anti-human immunodeficiency virus activity. *Antimicrob Agents Chemother* 41: 1082-93., 1997.
 - 8) Balzarini, J., L. Naesens, P. Herdewijn, I. Rosenberg, A. Holy, R. Pauwels, M. Baba, D. G. Johns, and E. De Clercq. Marked in vivo antiretrovirus activity of 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine, a selective anti-human immunodeficiency virus agent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 332-6, 1989.
 - 9) Balzarini, J., A. Holy, J. Jindrich, L. Naesens, R. Snoeck, D. Schols, and E. De Clercq. Differential anti-herpesvirus and antiretrovirus effects of the (S) and (R) enantiomers of acyclic nucleoside phosphonates: potent and selective in vitro and in vivo antiretrovirus activities of (R)-9-(2-phosphonomethoxypropyl)-2, 6-diaminopurine. *Antimicrob Agents Chemother* 37: 332-8, 1993.
 - 10) Lin, J. C., E. DeClercq, J. S. Pagano, Y. M. Mul, R. T. van Miltenburg, E. De Clercq, P. C. van der Vliet, M. S. Smith, and E. L. Brian. Novel acyclic adenosine analogs inhibit Epstein-Barr virus replication. *Antimicrob Agents Chemother* 31: 1431-3, 1987.
 - 11) Clercq, E. D. Potential of acyclic nucleoside phosphonates in the treatment of DNA virus and retrovirus infections. *Expert Rev. Anti-infect. Ther.* 1: 21-42, 2003.
 - 12) Smee, D. F., R. W. Sidwell, D. Kefauver, M. Bray, and J. W. Huggins. Characterization of wild-type and foscarnet-resistant strains of camelpox, cowpox, monkeypox, and vaccinia viruses. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 1329-35, 2002.
 - 13) Van Rompay, K. K., J. M. Cherrington, M. L. Marthas, P. D. Lamy, P. J. Dailey, D. R. Canfield, R. P. Tarara, N. Bischofberger, N. C. Pedersen, and N. L. Aguirre. 9-[2-(Phosphonomethoxy)propyl]adenine (PMPA) therapy prolongs survival of infant macaques inoculated with simian immunodeficiency virus with reduced susceptibility to PMPA. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 802-12, 1999.
 - 14) Van Rompay, K. K., J. M. Cherrington, M. L. Marthas, C. J. Berardi, A. S. Mulato, A. Spinner, R. P. Tarara, D. R. Canfield, S. Telm, N. Bischofberger, N. C. Pedersen, R. V. Srinivas, B. L. Robbins, M. C. Connelly, Y. F. Gong, A. Fridland, J. Balzarini, A. Holy, J. Jindrich, L. Naesens, R. Snoeck, D. Schols, and E. De Clercq. 9-[2-(Phosphonomethoxy)propyl]adenine therapy of established simian immunodeficiency virus infection in infant rhesus macaques. *Antimicrob Agents Chemother* 40: 2586-91., 1996.
 - 15) Robbins, B. L., R. V. Srinivas, C. Kim, N. Bischofberger, and A. Fridland. Anti-human immunodeficiency virus activity and cellular metabolism of a potential prodrug of the acyclic nucleoside phosphonate 9-R-(2-phosphonomethoxypropyl)adenine (PMPA), Bis(isopropylloxymethylcarbonyl)PMPA. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 612-7, 1998.
 - 16) Naesens, L., N. Bischofberger, P. Augustijns, P. Annaert, G. Van den Mooter, M. N. Arimilli, C. U. Kim, and E. De Clercq. Antiretroviral efficacy and pharmacokinetics of oral bis(isopropylloxymethyl)-9-(2-phosphonylmethoxypropyl)adenine in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 1568-73, 1998.
 - 17) Srinivas, R. V., and A. Fridland. Antiviral activities of 9-R-2-phosphonomethoxypropyl adenine (PMPA) and bis(isopropylloxymethylcarbonyl)PMPA against various drug-resistant human immunodeficiency virus strains. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 1484-7, 1998.
 - 18) Balzarini, J., and E. De Clercq. Nucleoside and Nucleotide Reverse Transcriptase Inhibitors. In E. De Clercq (ed.), *Antiretroviral therapy*. ASM press, Washington DC. 2001.
 - 19) Palu, G., S. Stefanelli, M. Rassa, C. Parolin, J. Balzarini, and E. De Clercq. Cellular uptake of phosphonylmethoxyalkylpurine derivatives. *Antiviral Res* 16: 115-9, 1991.
 - 20) Balzarini, J., Z. Hao, P. Herdewijn, D. G. Johns, and E. De Clercq. Intracellular metabolism and mechanism of anti-retrovirus action of 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine, a potent anti-human immunodeficiency virus compound. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 1499-503, 1991.
 - 21) Naeger, L. K., N. A. Margot, and M. D. Miller. ATP-dependent removal of nucleoside reverse transcriptase inhibitors by human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 2179-84, 2002.

- 22) Parikh, U., D. Barnas, C. Bixby, H. Faruki, and J. W. Mellors. Presented at the 12th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Boston MA. 2005.
- 23) Merluzzi, V. J., K. D. Hargrave, M. Labadia, K. Grozinger, M. Skoog, J. C. Wu, C. K. Shih, K. Eckner, S. Hattox, J. Adams, and et al. Inhibition of HIV-1 replication by a nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor. *Science* 250: 1411-3., 1990.
- 24) Dueweke, T. J., S. M. Poppe, D. L. Romero, S. M. Swaney, A. G. So, K. M. Downey, I. W. Althaus, F. Reusser, M. Busso, L. Resnick, and et al. U-90152, a potent inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 replication. *Antimicrob Agents Chemother* 37: 1127-31., 1993.
- 25) Young, S. D., S. F. Britcher, L. O. Tran, L. S. Payne, W. C. Lumma, T. A. Lyle, J. R. Huff, P. S. Anderson, D. B. Olsen, S. S. Carroll, and et al. L-743, 726 (DMP-266): a novel, highly potent nonnucleoside inhibitor of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 2602-5., 1995.
- 26) Esnouf, R., J. Ren, C. Ross, Y. Jones, D. Stammers, and D. Stuart. Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by non-nucleoside inhibitors. *Nat Struct Biol* 2: 303-8, 1995.
- 27) Ding, J., K. Das, H. Moereels, L. Koymans, K. Andries, P. A. Janssen, S. H. Hughes, and E. Arnold. Structure of HIV-1 RT/TIBO R 86183 complex reveals similarity in the binding of diverse nonnucleoside inhibitors. *Nat Struct Biol* 2: 407-15, 1995.
- 28) Motakis, D., and M. A. Parniak. A tight-binding mode of inhibition is essential for anti-human immunodeficiency virus type 1 virucidal activity of nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 1851-6, 2002.
- 29) Van Herrewege, Y., J. Michiels, J. Van Roey, K. Fransen, L. Kestens, J. Balzarini, P. Lewi, G. Vanham, and P. Janssen. In vitro evaluation of nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors UC-781 and TMC120-R147681 as human immunodeficiency virus microbicides. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 337-9, 2004.
- 30) Kempf, D. J., K. C. Marsh, J. F. Denissen, E. McDonald, S. Vasavanonda, C. A. Flentge, B. E. Green, L. Fino, C. H. Park, X. P. Kong, and et al. ABT-538 is a potent inhibitor of human immunodeficiency virus protease and has high oral bioavailability in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 2484-8, 1995.
- 31) Dorsey, B. D., R. B. Levin, S. L. McDaniel, J. P. Vacca, J. P. Guare, P. L. Darke, J. A. Zugay, E. A. Emini, W. A. Schleif, J. C. Quintero, and et al. L-735, 524 : the design of a potent and orally bioavailable HIV protease inhibitor. *J Med Chem* 37: 3443-51, 1994.
- 32) Kaldor, S. W., V. J. Kalish, J. F. n. Davies, B. V. Shetty, J. E. Fritz, K. Appelt, J. A. Burgess, K. M. Campanale, N. Y. Chirgadze, D. K. Clawson, B. A. Dressman, S. D. Hatch, D. A. Khalil, M. B. Kosa, P. P. Lubbehusen, M. A. Muesing, A. K. Patick, S. H. Reich, K. S. Su, and J. H. Tatlock. Viracept (nelfinavir mesylate, AG1343) : a potent, orally bioavailable inhibitor of HIV-1 protease. *J Med Chem* 40: 3979-85, 1997.
- 33) Sham, H. L., D. J. Kempf, A. Molla, K. C. Marsh, G. N. Kumar, C. M. Chen, W. Kati, K. Stewart, R. Lal, A. Hsu, D. Betebenner, M. Korneyeva, S. Vasavanonda, E. McDonald, A. Saldivar, N. Wideburg, X. Chen, P. Niu, C. Park, V. Jayanti, B. Grabowski, G. R. Granne-man, E. Sun, A. J. Japour, D. W. Norbeck, and et al. ABT-378, a highly potent inhibitor of the human immunodeficiency virus protease. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 3218-24., 1998.
- 34) Robinson, B. S., K. A. Riccardi, Y. F. Gong, Q. Guo, D. A. Stock, W. S. Blair, B. J. Terry, C. A. Deminie, F. Djang, R. J. Colonno, and P. F. Lin. BMS-232632, a highly potent human immunodeficiency virus protease inhibitor that can be used in combination with other available antiretroviral agents. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 2093-9, 2000.
- 35) Redshaw, S., and G. J. Thomas. Inhibitor of protease, p. 151-180. In R. Unger, J. Kreuter, and H. Rubsamens-Waigmann (ed.), *Antivirals Against AIDS*. Marcel Dekker, Inc., NY. 2000.
- 36) Tomasselli, A. G., J. O. Hui, T. K. Sawyer, D. J. Staples, C. Bannow, I. M. Reardon, W. J. Howe, D. L. DeCamp, C. S. Craik, and R. L. Heinrikson. Specificity and inhibition of proteases from human immunodeficiency viruses 1 and 2. *J Biol Chem* 265: 14675-83, 1990.
- 37) Kempf, D. J. Protease Inhibitor as anti-human immunodeficiency virus agents. In E. De Clercq (ed.), *Antiretroviral Therapy*. ASM press, Washington DC. 2001.
- 38) Patick, A. K., M. Duran, Y. Cao, D. Shugarts, M. R. Keller, E. Mazabel, M. Knowles, S. Chapman, D. R. Kuritzkes, and M. Markowitz. Genotypic and phenotypic characterization of human immunodeficiency virus type 1 variants isolated from patients treated with the protease inhibitor nelfinavir [In Process Citation]. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 2637-44, 1998.
- 39) Furfine, E. S., C. T. Baker, M. R. Hale, D. J. Reynolds, J. A. Salisbury, A. D. Searle, S. D. Studenberg, D. Todd, R. D. Tung, A. Spaltenstein, R. Wood, K. Arasteh, H. J. Stellbrink, E. Teofilo, F. Raffi, R. B. Pollard, J. Eron, J. Yeo, J. Millard, M. B. Wire, and O. J. Naderer. Preclinical pharmacology and pharmacokinetics of GW433908, a water-soluble prodrug of the human immunodeficiency virus protease inhibitor amprenavir. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 791-8, 2004.
- 40) Kempf, D. J., J. D. Isaacson, M. S. King, S. C. Brun, Y. Xu, K. Real, B. M. Bernstein, A. J. Japour, E. Sun, and R. A. Rode. Identification of genotypic changes in human immunodeficiency virus protease that correlate with reduced susceptibility to the protease inhibitor lopinavir among viral isolates from protease inhibitor-experienced patients. *J Virol* 75: 7462-9, 2001.
- 41) Colonno, R. J., A. Thiry, K. Limoli, and N. Parkin. Activities of atazanavir (BMS-232632) against a large panel of human immunodeficiency virus type 1 clinical isolates resistant to one or more approved protease

- inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 1324-33, 2003.
- 42) Colonna, R., R. Rose, C. McLaren, A. Thiry, N. Parkin, and J. Friborg. Identification of I50L as the signature atazanavir (ATV)-resistance mutation in treatment-naive HIV-1-infected patients receiving ATV-containing regimens. *J Infect Dis* 189: 1802-10, 2004.
 - 43) Lambert, D. M., S. Barney, A. L. Lambert, K. Guthrie, R. Medinas, D. E. Davis, T. Bucy, J. Erickson, G. Merutka, and S. R. Petteway, Jr. Peptides from conserved regions of paramyxovirus fusion (F) proteins are potent inhibitors of viral fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 2186-91, 1996.
 - 44) Cervia, J. S., and M. A. Smith. Enfuvirtide (T-20) : a novel human immunodeficiency virus type 1 fusion inhibitor. *Clin Infect Dis* 37: 1102-6, 2003.
 - 45) Grobler, J. A., K. Stillmock, B. Hu, M. Witmer, P. Felock, A. S. Espeseth, A. Wolfe, M. Egbertson, M. Bourgeois, J. Melamed, J. S. Wai, S. Young, J. Vacca, and D. J. Hazuda. Diketo acid inhibitor mechanism and HIV-1 integrase : implications for metal binding in the active site of phosphotransferase enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 6661-6, 2002.
 - 46) Hazuda, D. J., P. Felock, M. Witmer, A. Wolfe, K. Stillmock, J. A. Grobler, A. Espeseth, L. Gabryelski, W. Schleif, C. Blau, and M. D. Miller. Inhibitors of strand transfer that prevent integration and inhibit HIV-1 replication in cells. *Science* 287: 646-50, 2000.
 - 47) Yoshinaga, T., A. Sato, T. Fujishita, and T. Fujiwara. Presented at the 9th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Seattle WA. 2002.
 - 48) Hazuda, D. J., N. J. Anthony, R. P. Gomez, S. M. Jolly, J. S. Wai, L. Zhuang, T. E. Fisher, M. Embrey, J. P. Guare, Jr., M. S. Egbertson, J. P. Vacca, J. R. Huff, P. J. Felock, M. V. Witmer, K. A. Stillmock, R. Danovich, J. Grobler, M. D. Miller, A. S. Espeseth, L. Jin, I. W. Chen, J. H. Lin, K. Kassahun, J. D. Ellis, B. K. Wong, W. Xu, P. G. Pearson, W. A. Schleif, R. Cortese, E. Emini, V. Summa, M. K. Holloway, and S. D. Young. A naphthyridine carboxamide provides evidence for discordant resistance between mechanistically identical inhibitors of HIV-1 integrase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 11233-8, 2004.
 - 49) Pannecouque, C., W. Pluymers, B. Van Maele, V. Tetz, P. Cherepanov, E. De Clercq, M. Witvrouw, and Z. Debyser. New class of HIV integrase inhibitors that block viral replication in cell culture. *Curr Biol* 12: 1169-77, 2002.
 - 50) Baba, M., N. Kanzaki, H. Miyake, X. Wang, K. Takashima, K. Teshima, M. Shiraishi, and Y. Iizawa. Presented at the 12th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. 2005.
 - 51) Maeda, K., H. Nakata, Y. Koh, T. Miyakawa, H. Ogata, Y. Takaoka, S. Shibayama, K. Sagawa, D. Fukushima, J. Moravek, Y. Koyanagi, and H. Mitsuya. Spirodiketopiperazine-based CCR5 inhibitor which preserves CC-chemokine/CCR5 interactions and exerts potent activity against R5 human immunodeficiency virus type 1 in vitro. *J Virol* 78: 8654-62, 2004.
 - 52) Li, F., R. Goila-Gaur, K. Salzwedel, N. R. Kilgore, M. Reddick, C. Matallana, A. Castillo, D. Zoumplis, D. E. Martin, J. M. Orenstein, G. P. Allaway, E. O. Freed, and C. T. Wild. PA-457 : a potent HIV inhibitor that disrupts core condensation by targeting a late step in Gag processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 13555-60, 2003.

Progress in antiretroviral drugs

Wataru Sugiura

AIDS Research Center, National Institute of Infectious Diseases

E-mail: wsugiura@nih.go.jp

HIV-1, causative agent of acquired immunodeficiency syndrome, was identified in the early 1980s. The plague quickly spread throughout the world and today 40 million people are living with HIV/AIDS. The first anti-HIV drug "zidovudine", was discovered in 1985, and many other inhibitory compounds have been developed successfully in the last decade. Today, three classes 17 antiretroviral drugs are available in Japan. This article overviews the history of anti-HIV drug discovery, present HIV-1 treatment, and on-going drug discovery.

総 説

新規感染者における薬剤耐性 HIV 拡散の危機

Alert for Outbreak of Drug Resistance HIV-1 in Newly Infected Population

杉 浦 互

Wataru SUGIURA

国立感染症研究所エイズ研究センター

National Institute of Infectious Diseases

キーワード：新規感染者，薬剤耐性 HIV-1，疫学調査

日本エイズ学会誌 7 : 117-120, 2005

はじめに

1985年に満屋裕明博士の手により zidovudine が見いだされ¹⁾、HIV/AIDS の治療が実現してから今年で 20 年目にあたるが、この間の治療薬剤と治療法の開発に目覚ましい進歩があったことはこの雑誌の読者には周知の事実であろう。平成 17 年現在、ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤 7 種類、非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤 3 種類、そしてプロテアーゼ阻害剤 7 種類、合計 17 種類の薬剤が使用されている。改良された剤形や合剤などを含めると、その数はさらに増え 23 種類になる。現在もケモカインレセプター阻害剤、インテグラーゼ阻害剤などの新たなクラスの薬剤開発が活発に行われており、今後益々治療の選択肢が増えていくことが期待される。特定の病原体に対して、これほど多数の治療薬剤が作られてきた例は他には無く、一つ一つが研究者たちの HIV/AIDS を克服するために尽くしてきた努力の標石といえよう。

皮肉なことに治療薬剤の登場は HIV-1 に薬剤耐性という新たな進化の扉を開き、優れた治療法の実現による死亡者の減少は、私たちから HIV-1 感染症に対する恐れを忘れさせつつあるようである。今日、先進諸国では薬剤耐性 HIV-1 による新たな感染拡大が危惧されているが、これはこのようなウイルス学的そして意識の変化が根底にあると考えられる。あるいは、薬剤耐性株による感染の拡大は HIV に特有の問題ではなく、結核やマラリアなどの薬剤治療が行われている他の感染症においても解決すべき大きな課題となっていることを考えると、今の状況は抗 HIV 薬剤が登場した時から定められていた必然であるとも考える

ことができる。

先進諸国における薬剤耐性 HIV-1 による新規感染者の問題

では、薬剤耐性 HIV-1 による新規感染はどのような状況になっているのであろうか。表 1 に日本と同等の治療環境をもつ先進各国で行われた新規感染者における薬剤耐性 HIV-1 の調査結果をまとめた²⁻²¹⁾。この表を一瞥して判るのは、ほぼ同時期に調査が行われたにもかかわらず、薬剤耐性 HIV の検出頻度が報告により大きく異なっていることである。一つの説明としては調査毎に薬剤耐性検査法、そして薬剤耐性の定義が異なっていたことが挙げられる。もう一つの説明として調査対象集団（地域、人種、感染経路）が耐性 HIV-1 の拡散を考える際の重要な因子であり、薬剤耐性による感染の拡大が特定の集団に局限していたことも考えられる。

このように薬剤耐性 HIV-1 の検出頻度がばらつく一方で、調査間で共通して見られている事象もある。それは、どの調査においても耐性の検出頻度がヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤で最も高いことである。これは表に示す国々では、調査時点で既にヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤は 10 年近く治療に用いられてきた薬剤となっており、HIV-1 感染者集団内にヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤耐性ウイルスが蔓延しつつあることを反映しているであろう。これに対して非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤とプロテアーゼ阻害剤に対する耐性検出頻度については調査によって順位が入れ替わっているが、概ね非ヌクレオシド系の耐性検出頻度のほうが高いようである。これら 2 クラスの薬剤はヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤に比べるとまだ使用の歴史が浅い（調査時点で数年程度）ためであろう。

表に示した調査のほとんどが薬剤耐性遺伝子検査によって行われているが、薬剤耐性遺伝子検査と感受性検査を平

著者連絡先：杉浦 互（〒208-0011 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）
Fax : 042-561-7446

2005 年 6 月 20 日受付

行して行った調査が2つある。#2のLittle等と#3のSimon等の調査である。この2つの調査結果における薬剤耐性遺伝子検査と感受性検査の結果を比較して気がつくの

は、非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤耐性とプロテアーゼ阻害剤耐性では遺伝子検査と感受性検査で行った調査結果がほぼ一致しているのに対して、ヌクレオシド系逆転写

表 1 諸外国における薬剤耐性による新規感染症例の報告

	Author and Group	country	year	test	N	prevalence				ref
						Total	NRTI	NNRTI	PI	
1	Novak RM Terry Berin Community Programs for clinical Research on AIDS_058 study team	US	1999-2001	Genotyping	n=491	11.6%	7.8%	3.0%	0.7%	10
2	Little SJ Richmann DD	USA	1995-1998	Genotyping	n=213	8.0%	8.5%	1.7%	0.9%	4
				Phenotyping	n=264	3.4%	2.3%	1.9%	0.4%	
			1999-2000	Genotyping	n=88	22.7%	15.9%	7.3%	10.2%	
				Phenotyping	n=114	12.4%	8.5%	7.1%	8.0%	
3	Simon V & Markowitz M	USA	1995-2001	Genotyping	n=76	13.2%	11.8%	2.6%	1.3%	9
				Phenotyping	n=60	10.0%	8.3%	3.0%	1.7%	
			1999-2001	Genotyping	n=78	19.7%	14.5%	6.6%	5.1%	
				Phenotyping	n=74	10.8%	2.7%	8.1%	5.4%	
4	Wegner S US military	USA	1997-1998	Genotyping	n=95	22.1%	4.0%	15.0%	10.0%	6
				Phenotyping	n=91	29.7%	8.0%	26.0%	1.0%	
5	Weinstock HS	USA	1997-2001	Genotyping	n=1082	8.3%	6.4%	1.7%	1.9%	12
6	Hanna GJ D'Aquila RT	USA	1999	Genotyping	n=88	18.0%	14.0%	5.0%	2.0%	11
7	Boden D Markowiz M	USA	1999	Genotyping	n=80	16.3%	12.5%	7.5%	3.8%	14
8	Alexander CS	Canada	1997-1998	Genotyping	n=479	6.3%	3.4%	3.8%		2
9	Alexander CS	Canada Vancouver	1996-1998	Genotyping	n=57	19.2%	14.0%	7.0%	1.9%	3
10	Routy JP	Canada Montreal	1997-2000	Genotyping	n=127	13.0%	11.0%	2.4%	5.5%	15
				2001-2003	Genotyping	n=53	4.0%	0.0%	1.9%	
11	Salomon H Quebec Primary Infection Study	Canada	1997-1999	Genotyping	n=56	NR*	22.0%	12.0%		18
				Genotyping	n=21**	NR	24.0%	24.0%		
12	UK collaborative Group on Monitoring the transmission of HIV Drug Resistance	UK	1994-2000	Genotyping	n=69	14.5%	11.6%	4.3%	1.4%	5
13	Descamps D ANRS antiretroviral Resistance Study	France	1998	Genotyping	n=391	3.7% (51.1%)	3.3%	0.8%	1.9%	8 (49.2%)
14	Chaix ML	France	1999-2000	Genotyping	n=249	10.0%	8.0%	4.0%	6.0%	7
15	Duwe	Germany	1996-1999	Genotyping		NR	9.0%	5.0%		16
16	Romano L	Italy	1996-2000	Genotyping	n=116	12.9%	12.9%	0.0%	0.9%	13
17	Martinz-Picado	Spain	2004	Genotyping	n=182	3.8%	2.2%	1.1%	0.5%	20
18	Maljkovic I	Sweden	1998-2001	Genotyping	n=100	9.0%	7.0%	5.0%	1.0%	21
19	Jorgensen LB	Denmark	2000	Genotyping		NR	2.0%	0.0%		19
20	Ammoranond P	Australia	1992-2001	Genotyping		NR	9.0%	0.0%		17

* NR : Not reported

** : IVDU data

酵素阻害剤耐性では遺伝子検査での結果のほうがかなり高い頻度を示していることである。薬剤耐性 HIV-1 の調査は疫学的な視点から耐性ウイルスの拡散頻度と拡散様式を把握することが目的であるため、主要な耐性変異が1つでも見つければ“耐性ウイルスが感染した”と判定する必要があるが、ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤耐性は耐性変異が複数集積しないと薬剤感受性自体は大きく変化しないためにこのような調査結果の開きが生じたのであろう。この2つの調査結果は、新規感染者における薬剤耐性 HIV-1 のサーベイランスには遺伝子検査が適しており、感受性検査では結果を低く見積もる恐れがあることを示している。

結 語

HIV-1 の感染成立には体液の物理的な接触が必要である。このような感染症では、教育による危険行為の回避と感染予防が効果を上げるはずである。事実、積極的な啓発活動は優れた成果をあげてきた。その一方で薬剤耐性ウイルスが新規感染者に広がっているという現実には教育・啓発活動に限界があることを示している。今年の初頭に *New York Times* で報道された多剤耐性且つ急速進行性の新型ウイルス騒ぎはニューヨーク市保健局によって、薬剤耐性 HIV-1 が広がりつつあるという現状に人々の関心を向けさせる絶好の話題として演出された。このような報道は新たな差別を助長しかねない最悪のやり方だという批判も出ているようだが、感染者の10人に1人に耐性ウイルスが検出される米国の現実をみると、このような荒療治も必要なのかも知れないと考えさせられる。なお、この症例にはウイルス学的新事実は無く、多剤耐性を獲得した以外には特徴の無いウイルスであったことが明らかにされている。また症例自体も単発であり、急速進行性という特性は感染者の宿主因子に帰すると結論されている²²⁾。

わが国における新規感染者の薬剤耐性 HIV-1 については2003年に2つの研究グループの手により調査が行われた。国立国際医療センターエイズ治療・研究開発センターのグループによる調査では4%、国立名古屋医療センターのグループによる調査では17%という結果が示された²³⁾。このように2つの調査結果には大きな開きが認められているが、これは日本においても耐性 HIV-1 による感染が集団に限局していることを強く示唆している。この2つの調査結果を踏まえて平成16年度より厚生労働省エイズ対策事業の1つとして新規感染者における薬剤耐性 HIV-1 のサーベイランスが開始された。調査は HIV-1 診療に携わる全国のブロック拠点、拠点病院の医師、薬剤耐性検査を担当する検査技師、研究者など多くの人々の協力を得て進められている。この調査を行うことにより、日本の新規感染者における薬剤耐性 HIV-1 の広がりが正確に把握でき、

またどのような対策が薬剤耐性 HIV-1 による新たな感染を防ぐために有効か明らかにできると期待している。

文 献

- 1) Mitsuya H, Weinhold KJ, Furman PA, St. Clair MH, Lehrman SN, Gallo RC, Bolognesi D, Barry DW, Broder S : 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U) : an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82 : 7096-7100, 1985.
- 2) Alexander CS, Dong W, Chan K, Jahnke N, O'Shaughnessy MV, Mo T, Piaseczny MA, Montaner JS, Harrigan PR : HIV protease and reverse transcriptase variation and therapy outcome in antiretroviral-naive individuals from a large North American cohort. *Aids* 15 : 601-607, 2001.
- 3) Alexander CS, Dong W, Schechter MT, O'Shaughnessy MV, Strathdee SA, Mo T, Montaner JS, Harrigan PR : Prevalence of primary HIV drug resistance among seroconverters during an explosive outbreak of HIV infection among injecting drug users. *Aids* 13 : 981-985, 1999.
- 4) Little SJ, Holte S, Routy JP, Daar ES, Markowitz M, Collier AC, Koup RA, Mellors JW, Connick E, Conway B, Kilby M, Wang L, Whitcomb JM, Hellmann NS, Richman DD : Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV. *N Engl J Med* 347 : 385-394, 2002.
- 5) UK Collaborative Group on Monitoring the Transmission of HIV Drug Resistance : Analysis of prevalence of HIV-1 drug resistance in primary infections in the United Kingdom. *BMJ* 322 : 1087-1088, 2001.
- 6) Wegner SA, Brodine SK, Mascola JR, Tasker SA, Shaffer RA, Starkey MJ, Barile A, Martin GJ, Aronson N, Emmons WW, Stephan K, Bloor S, Vingerhoets J, Hertogs K, Larder B : Prevalence of genotypic and phenotypic resistance to anti-retroviral drugs in a cohort of therapy-naive HIV-1 infected US military personnel. *Aids* 14 : 1009-1015, 2000.
- 7) Chaix ML, Descamps D, Harzic M, Schneider V, Deveau C, Tamalet C, Pellegrin I, Izopet J, Ruffault A, Masquelier B, Meyer L, Rouzioux C, Brun-Vezinet F, Costagliola D : Stable prevalence of genotypic drug resistance mutations but increase in non-B virus among patients with primary HIV-1 infection in France. *Aids* 17 : 2635-2643, 2003.

- 8) Descamps D, Calvez V, Izopet J, Buffet-Janvresse C, Schmuck A, Colson P, Ruffault A, Maillard A, Masquelier B, Cottalorda J, Harzic M, Brun-Vezinet F, Costagliola D : Prevalence of resistance mutations in antiretroviral-naive chronically HIV-infected patients in 1998 : a French nationwide study. *Aids* 15 : 1777-1782, 2001.
- 9) Simon V, Vanderhoeven J, Hurley A, Ramratnam B, Louie M, Dawson K, Parkin N, Boden D, Markowitz M : Evolving patterns of HIV-1 resistance to antiretroviral agents in newly infected individuals. *Aids* 16 : 1511-1519, 2002.
- 10) Novak RM, Chen L, MacArthur RD, Baxter JD, Huppler Hullsiek K, Peng G, Xiang Y, Henely C, Schmetter B, Uy J, van den Berg-Wolf M, Kozal M : Prevalence of antiretroviral drug resistance mutations in chronically HIV-infected, treatment-naive patients : implications for routine resistance screening before initiation of antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis* 40 : 468-74. Epub 2005 Jan 10, 2005.
- 11) Hanna GJ, Balaguera HU, Freedberg KA, Werner BG, Steger Craven KA, Craven DE, D'Aquila RT : Drug-selected resistance mutations and non-B subtypes in antiretroviral-naive adults with established human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 188 : 986-991. Epub 2003 Sep 10, 2003.
- 12) Weinstock HS, Zaidi I, Heneine W, Bennett D, Garcia-Lerma JG, Douglas JM, Jr., LaLota M, Dickinson G, Schwarcz S, Torian L, Wendell D, Paul S, Goza GA, Ruiz J, Boyett B, Kaplan JE : The epidemiology of antiretroviral drug resistance among drug-naive HIV-1-infected persons in 10 US cities. *J Infect Dis* 189 : 2174-2180. Epub 2004 May 21, 2004.
- 13) Romano L, Venturi G, Ferruzzi R, Riccio ML, Corsi P, Leoncini F, Vinattieri A, Incandela L, Valensin PE, Zazzi M : Detection of genotypically drug-resistant HIV-1 variants and non-B subtypes in recently infected antiretroviral-naive adults in Italy. *Aids* 14 : 2204-2206, 2000.
- 14) Boden D, Hurley A, Zhang L, Cao Y, Guo Y, Jones E, Tsay J, Ip J, Farthing C, Limoli K, Parkin N, Markowitz M : HIV-1 drug resistance in newly infected individuals. *Jama* 282 : 1135-1141, 1999.
- 15) Routy JP, Machouf N, Edwardes MD, Brenner BG, Thomas R, Trottier B, Rouleau D, Tremblay CL, Cote P, Baril JG, Remis RS, Sekaly RP, Wainberg MA : Factors associated with a decrease in the prevalence of drug resistance in newly HIV-1 infected individuals in Montreal. *Aids* 18 : 2305-2312, 2004.
- 16) Duwe S, Brunn M, Altmann D, Hamouda O, Schmidt B, Walter H, Pauli G, Kucherer C : Frequency of genotypic and phenotypic drug-resistant HIV-1 among therapy-naive patients of the German Seroconverter Study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 26 : 266-273, 2001.
- 17) Ammaranond P, Cunningham P, Oelrichs R, Suzuki K, Harris C, Leas L, Grulich A, Cooper DA, Kelleher AD : No increase in protease resistance and a decrease in reverse transcriptase resistance mutations in primary HIV-1 infection : 1992-2001. *Aids* 17 : 264-267, 2003.
- 18) Salomon H, Wainberg MA, Brenner B, Quan Y, Rouleau D, Cote P, LeBlanc R, Lefebvre E, Spira B, Tsoukas C, Sekaly RP, Conway B, Mayers D, Routy JP : Prevalence of HIV-1 resistant to antiretroviral drugs in 81 individuals newly infected by sexual contact or injecting drug use. Investigators of the Quebec Primary Infection Study. *Aids* 14 : F17-23, 2000.
- 19) Jorgensen LB, Christensen MB, Gerstoft J, Mathiesen LR, Obel N, Pedersen C, Nielsen H, Nielsen C : Prevalence of drug resistance mutations and non-B subtypes in newly diagnosed HIV-1 patients in Denmark. *Scand J Infect Dis* 35 : 800-807, 2003.
- 20) Martine-Picado J, Guitierrez C, deMendoza C, Erkcicia I, Domingo P, Camino X, Galindo MJ, Blaonco JL, Leal M, Masabeu A, Guelar A, Baldovi JF, Pedereia JD, Gatell JM, Moreno S, Clotet B, Soriano V, Ruiz J : Presented at the 14th international HIV drug resistance workshop, Quebec City, Canada, June 7-11, 2005. 2005.
- 21) Maljkovic I, Wilbe K, Solver E, Alaeus A, Leitner T : Limited transmission of drug-resistant HIV type 1 in 100 Swedish newly detected and drug-naive patients infected with subtypes A, B, C, D, G, U, and CRF01_AE. *AIDS Res Hum Retroviruses* 19 : 989-997, 2003.
- 22) Volberding PA : The New York case : lessons being learned. *Ann Intern Med* 142 : 866-868. Epub 2005 Apr 21, 2005.
- 23) Ibe S, Hotta N, Takeo U, Tawada Y, Mamiya N, Yamanaka K, Utsumi M, Kaneda T : Prevalence of drug-resistant human immunodeficiency virus type 1 in therapy-naive patients and usefulness of genotype testing. *Microbiol Immunol* 47 : 499-505, 2003.

第18回日本エイズ学会シンポジウム記録

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

杉浦 互¹, 瀧永 博之², 田宮 貞宏³, 松田 昌和¹, 松見信太郎^{3,4},
蜂谷 敦子², John M. Coffin⁵, 満屋 裕明^{3,4}

¹ 国立感染症研究所, エイズ研究センター

² 国立国際医療センター, エイズ治療・研究開発センター

³ 熊本大学医学部血液内科学・感染免疫診療部

⁴ 米国国立癌研究所内科療法部門レトロウイルス感染症部

⁵ HIV Drug Resistance Program, NCI-Frederick

日本エイズ学会誌 7 : 180-188, 2005

多剤併用療法が標準的な HIV 感染症治療法として行われている今日, 治療を適切に進めていく上で薬剤耐性変異の出現を如何に回避するかは重要な研究課題である。また, 薬剤耐性 HIV について研究することは治療上の必要性だけでなく, 治療薬剤と変異の対応関係の解析によるプロテアーゼおよび逆転写酵素の機能と構造, 感染者体内における耐性変異の進化・選択のプロセス, そしてヒトにおけるレトロウイルス感染症の病態などの知見も得ることができる点でも意義の深いことである。第18回日本エイズ学会総会2日目に行われたシンポジウム「薬剤耐性の新知見, 基礎から臨床へ」では, 米国国立癌研究所 HIV Drug resistance Program の所長 John Coffin 博士を基調講演者として迎え, 3人の日本人研究者とともに薬剤耐性 HIV-1 研究の最近の研究成果についての発表と活発な討論が行われた。以下各発表の概要を紹介する。

S7-1 「非核酸系逆転写酵素阻害薬 nevirapine に対する新規耐性変異パターンの解析」

瀧永博之, 蜂谷敦子

国立国際医療センター エイズ治療・研究開発センター

臨床的に広く使われている薬剤耐性検査は genotype assay であるが, この assay は既知の耐性変異の有無で HIV-1 の薬剤耐性を推測する。未知の耐性変異が存在した場合には, まったく無力となるため, genotype assay をより有効にするためには, 新たな薬剤耐性変異の同定・解析が不可欠である。また, phenotype assay の結果が genotype assay から予想されるものと大きく異なる場合, 未知の耐性変異が存在している可能性があり注意を要する。

国立国際医療センターを受診した未治療の HIV-1 感染

著者連絡先: 杉浦 互 (〒208-0011 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)

2005年6月4日受付

患者44人から, HIV-1 を分離培養し, MAGIC-5 細胞による phenotype assay を行ったところ, 2株が非核酸系逆転写酵素阻害薬 nevirapine (NVP) に対して高度耐性 (69倍と310倍以上) であった。genotype assay では, 既知の NVP 耐性変異は認められなかったが, 2株とも, 逆転写酵素の238番目のアミノ酸が lysine (K) から serine (S) に変異していた (K238S)。組換え HIV-1 を作成して, 増殖能・薬剤感受性を調べたところ, K238S 単独で NVP に対し4.4倍耐性となり, 既知の NVP 耐性変異と K238S が共存すると, V106A/K238S では530倍, V108I/K238S では56倍耐性となり, 高度な NVP 耐性を獲得することが明らかとなった¹⁾。K238S が genotype assay で認められた場合には, NVP を key drug とする治療法は不適切であると考えられる。近年, 非核酸系逆転写酵素阻害薬耐性に関与する238番目付近のアミノ酸変異が相次いで報告されており, この領域の polymorphism が治療結果に影響を与える可能性がある。

S7-2 「プロテアーゼ阻害剤に対する薬剤耐性の発現」

松見信太郎^{1,2}, 田宮貞宏², 満屋裕明^{1,2}

¹ 熊本大学医学部血液内科学・感染免疫診療部

² 米国国立癌研究所内科療法部門レトロウイルス感染症部

プロテアーゼ阻害剤 (PIs) の標的である HIV のプロテアーゼは対称的な二量体構造を有し, 構造的に微生物のアスパラチルプロテアーゼに類似している。HIV プロテアーゼ阻害剤はこの複合蛋白の切断を阻害し, ウイルス粒子の成熟をブロックすることによって抗ウイルス活性を発揮する。PIs に対する耐性は, 主要には, HIV がプロテアーゼの基質結合部位 (あるいはその近傍) にアミノ酸置換を起こして, 本来の基質 (ウイルスの前駆体) との親和性を著しく低下させずに, 阻害剤との親和性だけを下げることによる。HIV のプロテアーゼはかなりの可撓性 (flexibility)

を有しており、99個の構成アミノ酸のうち60%以上のアミノ酸に、プロテアーゼとしての酵素活性を保ちながら(減弱は見られるものの)、置換を起こし得る²⁾(図1)。

耐性株で最初に出現する一群のアミノ酸置換は、投与された阻害剤に特異的なものが多い。そうしたアミノ酸置換は「一次変異」と呼ばれる。「一次変異」はウイルス酵素の構造を変えて阻害剤と酵素の結合が起こらないようにするなどしてウイルスに耐性を付与すると思われるが、その構造変化のために酵素本来の活性が低下して増殖能などが損なわれることが多い。この構造変化を修復、補正するために続いて起こってくる一連のアミノ酸置換が「二次変異」と呼ばれる。複数の「二次変異」が加わってくると、HIVは増殖能を取り戻し、また高度の交差耐性を獲得するようになる²⁾。PIsに対する薬剤耐性の発現には複数のメカニズムが関与している。プロテアーゼとPIの結合という観点から最も重要な機序と考えられるものは、酵素の活性部位にアミノ酸の置換が起こってPIとの結合性が失われて(あるいは減弱して)耐性が発現するというものである²⁾。プロテアーゼは構造的に活性中心部位付近にPIの側鎖が入り込んで強固な結合を形成する幾つもの「ポケット(又はサブサイト)」を有している。この酵素はウイルスの基質とも同様な水素結合パターンを形成すると考えられており、それぞれのPIで観察される基質特異性はPIとサブサイトのアミノ酸側鎖との間で形成される結合パターンに依存していると考えられる。このような特異性を規定するサブサイトのアミノ酸に置換が起これば当然そのPIに特異的な耐性が発現することになる²⁾。プロテアーゼの活性中心部位でない領域にもアミノ酸の置換が起こって、それが耐性発現に関与することがある。HIVはアミノ酸置換によってPIに対する耐性を獲得するが、その度に本来のプロテアーゼ酵素の活性がしばしば減弱する。これを補うためにHIVは、基質である複合蛋白(例えばGag蛋白の前駆体部分)の切断部位に突然変異を起こして切断されやすくする等して酵素活性の減弱を代償させ、結果的に酵素活性の損なわれたプロテアーゼによるウイルス蛋白の前駆体(基質)の切断・成熟を進める³⁾。切断部位とは異なったGag領域にもアミノ酸置換を起こしてviral fitnessを維持するメカニズムも確認されている⁴⁾。極く最近我々は複数のプロテアーゼ阻害剤に対する耐性変異株(PIR-HIV)でHIVのGag部分のp17/p24とp1/p6の切断部位の近傍に「繰返し配列」が集積することを発見した⁵⁾(図2)。このような一連の付加アミノ酸(例えば図2のHIV-1B変異株におけるTGNS)は何れも近傍のアミノ酸配列の繰返し配列で、この「繰返し配列」を野生HIV株(HIVWT)に導入すると増殖能が低下したが、full-sizeの感染性PIR-HIVクローンをそれぞれ作成してこのクローンから「繰返し配

列」を除くとPIR-HIVクローンの増殖能が低下したことから、この「繰返し配列」はPIに対する耐性を付与する複数のアミノ酸置換のために損なわれたプロテアーゼ活性を代償して酵素によるp17/p24とp1/p6の切断部位での切断が起こりやすいようにするものと考えられた。ウェスタンブロットで検討するとHIVWTに「繰返し配列」を導入すると成熟p24Gagの産生量が著減した。PIR-HIVの増殖速度はHIVWTに比べて遅く、またPIR-HIV内の成熟p24Gag量もHIVWTに比べると少ないが、PIR-HIVから「繰返し配列」を除くとPIR-HIV内の成熟p24Gag量は更に減少した(図3)。これらのデータはHIVWTの増殖にとっては「繰返し配列」は不要かつ有害であるが、多剤耐性を獲得したPIR-HIVにとっては損なわれた変異プロテアーゼの酵素活性を回復するのに必須であることを示すものと思われた⁵⁾。

S7-3 「本邦における薬剤耐性 HIV-1 の現状と今後の課題」

松田昌和, 杉浦 互

国立感染症研究所エイズ研究センター

多剤併用療法がHIV-1感染症の標準的な治療法として1997年に開始されてから今日までの約7年間、多数の新薬が登場してHIV-1感染症を取り巻く治療環境は大きく進歩した。我々は多剤併用療法の導入がHIV-1の進化・選択にどのような影響を及ぼしてきたのか理解するために(i)既治療感染症例および(ii)新規感染・慢性未治療感染症例という2つの異なる集団について解析を行った。解析に用いたHIV-1の遺伝子領域は治療薬剤の標的であるproteaseおよび逆転写酵素遺伝子あわせて1.3Kbである。HIV-1サブタイプはプロテアーゼ領域あるいはenv C2V3領域350bpsの系統樹解析により判定をした。既治療症例については国立感染症研究所エイズ研究センターで薬剤耐性遺伝子検査を実施した症例の集団における薬剤耐性出現頻度の年次推移について解析を行った。薬剤耐性変異の判定はIAS-USAの耐性変異リストに準じた。新規感染・慢性未治療症例については、図4に示すような遺伝子進化学的な視点から、1997年と2003年の新規・慢性未治療症例各集団内における遺伝子多様性の解析と、1997年と2003年の集団間の多様性のネット変化の算出を行い、抗HIV-1治療薬剤の導入がこの7年間にHIV-1に直接的、間接的にどのような影響を及ぼしてきたかについて考察をした。

まず既治療症例における薬剤耐性変異の頻度と推移であるが、ヌクレオシド系およびプロテアーゼ阻害剤耐性変異の頻度は多剤併用療法の導入とともに1999年から2000年ころまで増加をたどっており、興味深いことにこの2クラスの耐性検出頻度はその後横ばいからやや減少に転じてい

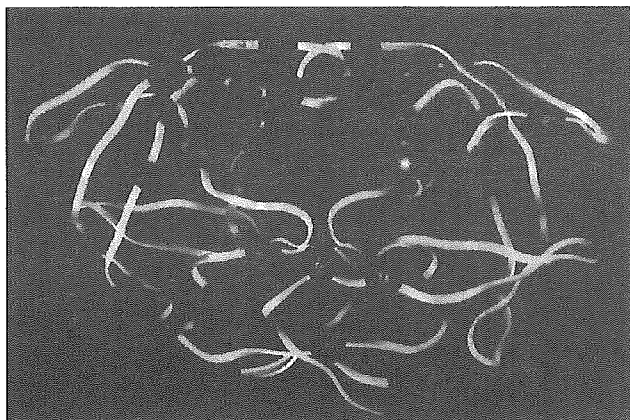


図 1 プロテアーゼ阻害剤に対する薬剤耐性を付与するアミノ酸置換 HIV のプロテアーゼは極めて柔軟性に富んでおり、99 個の構成アミノ酸のうち 60% 以上のアミノ酸に置換を起こして「偽の基質」であるプロテアーゼ阻害剤との結合を回避、正常の基質（ウイルスのポリ蛋白）を認識するようになるとウイルスの複製が再び始まる。これが HIV のプロテアーゼ阻害剤に対する耐性獲得の主要な機序である²⁾。

	p17 p24
HIV-1NL4-3:	SKKKAQQA----AADTGNN----SQVSNQNYPIVQ
HIV-1B:	SKKKAQQA----AAD TGNS TGNSSQVSNQNYPIVQ
HIV-1G:	S-KKAQQA----AADTGNS----SKVSNQNYPIVQ
HIV-1EV:	SKKKAQQA-- AAA AADTGNS SQVNSQV SQNYPIVQ
HIV-1ES:	SKKKA QAQAQA AAADTGSN----SQVSNQNYPIVQ
	p1 p6
HIV-1NL4-3:	HKGRPGNF LQ SRPE-----PTAPP---EESFR
HIV-1B:	HKGRPGNF LQ SRPE-----PT APP APPEESFR
HIV-1G:	HKGRPGNF LQ SRPE SR PE--PTAPP---EESFR
HIV-1EV:	Q KGRPGN FF QSRPE-----PTAPP---EESFR
HIV-1ES:	HKGRPGN L LQSR L EP TA PP PT APP--- A ESFR

図 2 複数のプロテアーゼ阻害剤に対する耐性変異株(PIR-HIV)で見られた HIV の Gag 部分での「繰返し配列」PIR-HIV の p17/p24 と p1/p6 の切断部位の近傍で集積して見られたアミノ酸置換（例えば HIV-1B 変異株における TGNS）は何れも近傍のアミノ酸配列の繰返し配列であった。この「繰返し配列」を野生 HIV 株に導入すると増殖能が低下したが、full-size の感染性 PIR-HIV クローンをそれぞれ作成してこのクローンから「繰返し配列」を除くと PIR-HIV クロンの増殖能が低下したことから、この「繰返し配列」は PI に対する耐性を付与する複数のアミノ酸置換のために損なわれたプロテアーゼ活性を代償して酵素による p17/p24 と p1/p6 の切断部位での切断が起こりやすいようにするものと考えられた。野生株 (HIVWT) のアミノ酸配列は紫、置換アミノ酸は青、「繰返し配列」は赤、鋳型となった元の配列は下線で示す³⁾。

HIV Diversity over Time in Chronic Infection

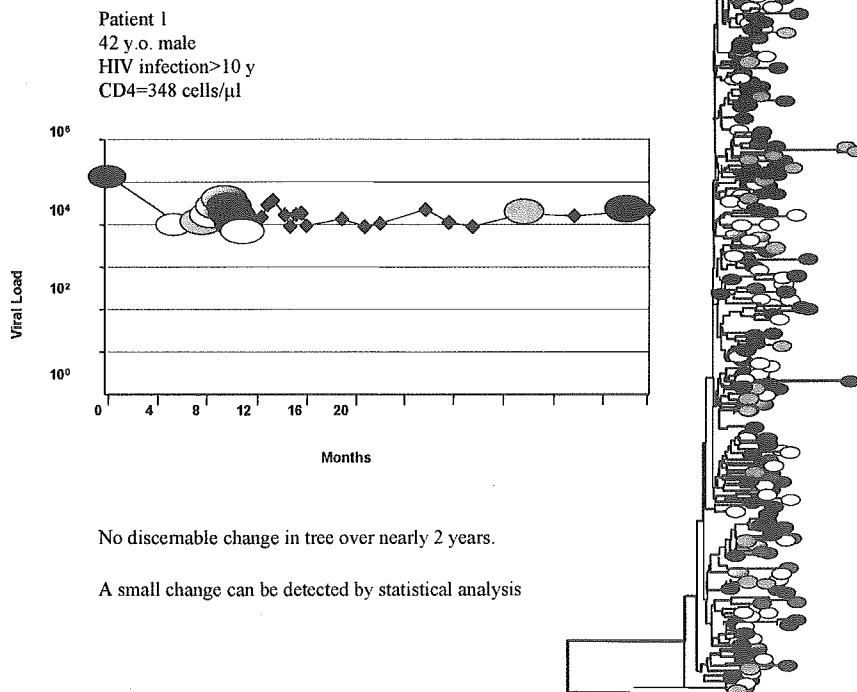


図 8

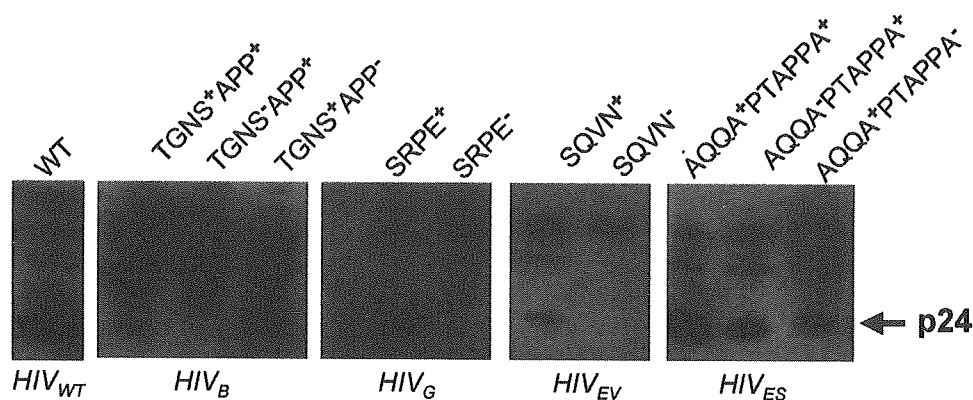


図 3 Gag 部分での「繰り返し配列」は PIR-HIV の増殖能維持に必須である。PIR-HIV の増殖速度は HIV_{WT} に比べて遅く、また PIR-HIV 内の成熟 p24Gag 量も HIV_{WT} に比べると少ないが、PIR-HIV から「繰り返し配列」を除くと PIR-HIV 内の成熟 p24Gag 量は更に減少した⁵⁾。

1997年と2003年の2つの集団間の遺伝的多様性の比較計算手法

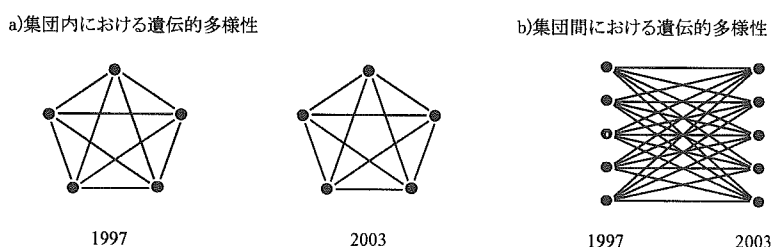


図 4

る。一方、非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤耐性変異の検出頻度は 2004 年まで緩やかに増加している。個々の耐性変異毎にその検出頻度を見ると、出現頻度により大まかに高度 (20% 以上)、中等度 (5-20%) そして低度 (5% 未満) の 3 群に分類された。このような耐性変異の出現頻度を左右する因子としては、その時々処方薬剤のトレンド、変異が耐性に及ぼす影響、変異間の相互作用、そして変異がウイルスの増殖能力に及ぼす酵素化学的および構造的な因子の関与が示唆された。

新規感染・慢性未治療症例における遺伝的多様性の変化は図 5 に示したように、逆転写酵素遺伝子では $D_{1997} = 0.032 \pm 0.003$ に対し $D_{2003} = 0.048 \pm 0.004$ と集団における多様性が有意に拡大している。プロテアーゼ遺伝子についても $D_{1997} = 0.042 \pm 0.005$ に対し $D_{2003} = 0.055 \pm 0.007$ と多様性の拡大が観察された。この集団内における多様性の拡大は図 5 の無根系統樹の広がりから視覚的にも捕らえることができる。しかしながら 1997 年の症例群と 2004 年症例群の集団間のネット変化については逆転写酵素では 0.002、

プロテアーゼでは 0.003 ± 0.001 にとどまっており、7 年という時間では遺伝子の大きな進化・淘汰は起きてはいないと考えられた。集団間の多様性の拡大については、これが治療薬剤の出現による選択。淘汰の変化なのか、それとも自然界における通常の変化の範疇に収まっているのか、更なる解析と検討が必要であろう。

S7-基 “The HIV-Host Interaction : New Insights from New Tools.”

John M. Coffin¹, Frank Maldarelli¹, Sarah Palmer¹, Valerie Boltz¹, Mary Kearney¹, Ann Weigand¹, and John W. Mellors²

¹ HIV Drug Resistance Program, NCI-Frederick,

² Division of Infectious Disease, University of Pittsburgh.

To obtain more detailed information about the dynamics and evolution of HIV in infected individuals, we have developed 3 assays to detect and quantitate virus and analyze its genetic makeup (図 6). The first of these, the single copy

1997年と2003年の2つの集団の系統樹と多様性

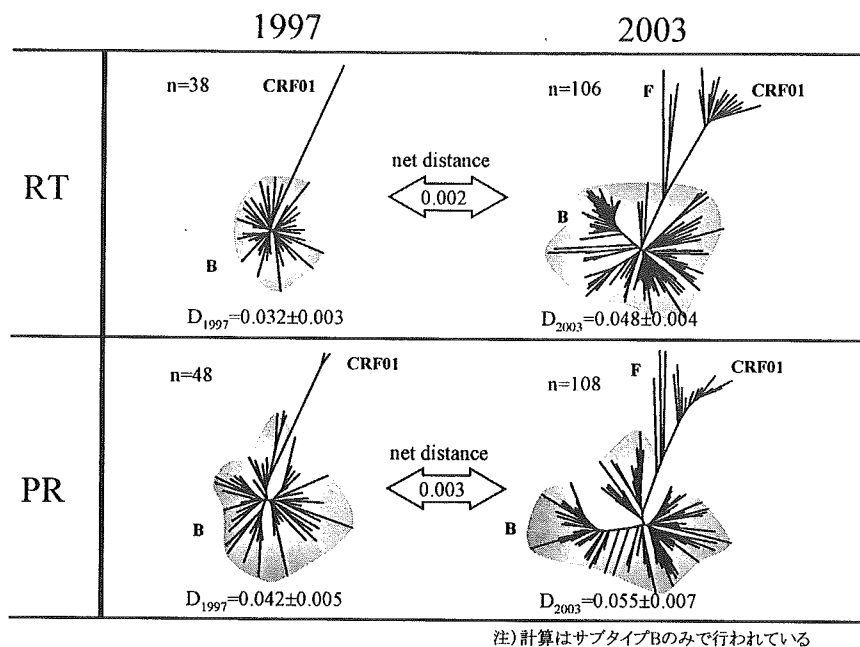


図 5

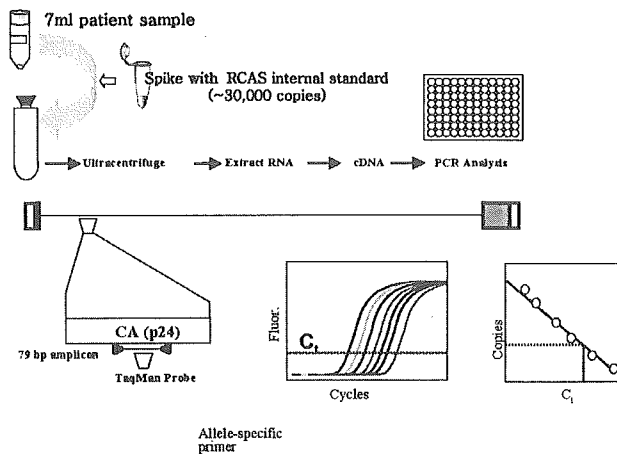
assay (SCA) allows us to detect and accurately quantitate 1 copy of HIV RNA. In routine use, we can measure as little as 0.3 copies of HIV RNA (or 0.15 virions) per ml of patient plasma. The second assay is use of allele-specific PCR (ASP) to detect specific point mutations such as K103N in HIV RT, which confers resistance to NNRTIs. Using ASP, we can detect and quantitate mutations at this codon (AAA to AAT or AAC) comprising less than 0.1% of the total virus population. The third assay is single-genome sequencing (SGS), in which multiple single cDNA molecules derived from reverse transcription of plasma virus are amplified over a region extending from the p6 region of *gag* through most of RT, and sequenced in bulk. This approach allows us to obtain a snapshot of the genetic diversity within the virus population in a single patient at any point in time, with minimal assay based error, and essentially no artifacts due to resampling or assay-based recombination. We have used these assays to study the virus in both naïve and drug-treated patients, with the following results.

1. In a large set of patients with levels of plasma virus that are “undetectable” by standard assays, we find that about 2/3 of them have viremia in the range of 1–20 copies of RNA per ml, with an average around 5 copies/ml. These levels are stable over periods of a year or more (図 7), and are likely to

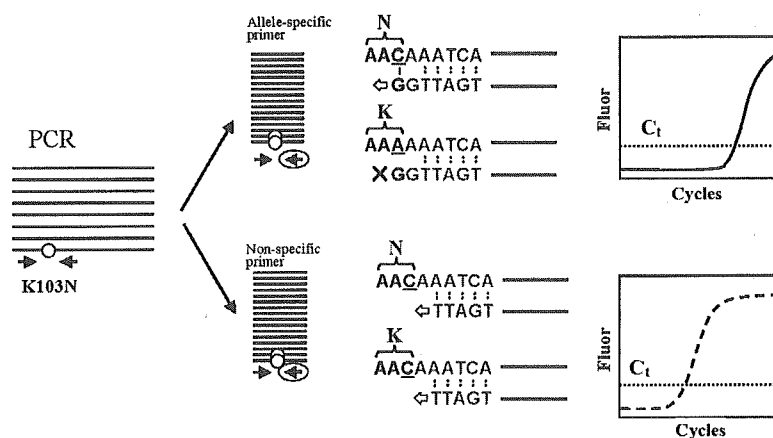
be the source of rebound viremia observed in all patients following interruption of therapy. We do not yet know whether this virus is the result of ongoing low-level replication or is derived from cells infected before initiation of therapy, although preliminary results are consistent with the latter possibility.

2. In individuals who have been infected for long periods of time and remained untreated, the virus has diversified to about 1–2% in the *gag-pol* region, as determined by SGS (図 8). This diversity is remarkably stable so that samples taken years apart can not be distinguished by phylogenetic analysis. Similarly, virus populations retain their diversity through a 100-fold decline in viremia following initiation of therapy. Samples taken soon after infection, by contrast, are usually almost perfectly monomorphic, exhibiting levels of diversity indistinguishable from background up to 70 days after infection. Thus, we can conclude that infection is usually effectively clonal, and the virus population is large and subject to strong purifying selection leading to gradual diversification up to a point where the population is both highly diverse and stably so, although later populations gradually become distinguishable from earlier ones (by subtle statistical tests), there are no significant bottlenecks or episodes of obvious selective sweeps over long periods of time.

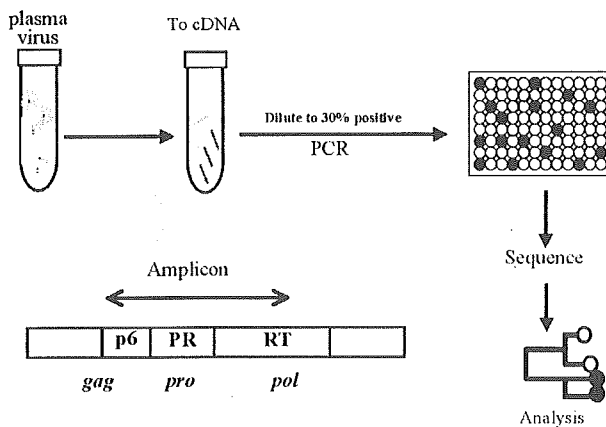
1) Single Copy Assay



2) 103N/K Allele-Specific PCR



3) Limiting Dilution PCR Sequencing AKA: single genome sequencing (SGS)



6