

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 の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16～18年度 総合・分担研究報告書

主任研究者 杉浦 亙

平成19年3月

# 目 次

## I. 総合 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. 総合 分担研究報告書

### 【基礎研究グループ】

1. 薬剤耐性 HIV 発生動向把握のための検査方法・調査体制確立に関する研究

～細胞内における抗 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～

～抗 HIV 剤治療下における Protease と Gag の共進化に関する解析～

国立感染症研究所 エイズ研究センター／杉浦 互 …………… 1 0

2. 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

（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 …………… 2 6

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 …………… 3 6

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／湯永博之 …………… 4 7

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 …………… 5 6

6. 逆転写酵素 d4T の薬剤耐性機序の解明

京都大学ウイルス研究所 附属エイズ研究施設感染免疫研究領域／児玉栄一 …………… 9 3

7. 薬剤耐性ウイルスの 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 …………… 1 0 1

8. 薬剤耐性ウイルスの 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 …………… 1 0 8

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 …………… 1 1 3
10. 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 …………… 1 1 9

【調査研究グループ】

11. 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 …………… 1 2 1
12. 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 3 0
13. 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 仙台医療センター血液内科／伊藤俊広 …………… 1 3 2
14. 静岡県における薬剤耐性 HIV-1 調査体制確立のための研究  
静岡県環境衛生科学研究所 微生物部／稲吉 恵 …………… 1 3 4
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 …………… 1 3 6
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 …………… 1 4 1  
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 …………… 1 4 6
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 …………… 1 5 1
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 …………… 1 5 3
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 …………… 1 6 1

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	168
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制御学講座／健山正男	171
23.	茨城県における薬剤耐性 HIV-1 調査体制確立のための研究 茨城県衛生研究所／原 孝	174
24.	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	178
25.	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	183
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	185

# I. 総合 総括研究報告書

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

我が国における薬剤耐性 HIV の発生・伝播動向を把握する調査体制の確立と、薬剤耐性 HIV 症例の増加を抑制する有効な対策を提案することを目的として疫学調査研究、治療最適化研究、薬剤耐性基礎研究に取り組んだ。疫学調査研究では、平成 15～18 年にかけてエイズ動向委員会に報告された症例数の 30%の捕捉に成功し、新規感染者集団における薬剤耐性 HIV の頻度が 4 年間平均で 4.9%、年別では H15:4.5%、H16:4.2%、H17:4.5%、H18:6.3%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測定検査の提供を行った。細胞内濃度測定、アドヒアランス評価のための毛髪からの薬剤濃度測定、非侵襲的な血中濃度評価としての唾液中薬剤濃度測定などの新たな技術開発に取り組んだ。薬剤耐性基礎研究では薬剤耐性獲得機序に関する研究、新たな NNRTI 耐性変異の発見、感染性クローンライブラリーの作成、新たな薬剤耐性検査技術開発などについての基礎研究に取り組み成果をあげた。

分担研究者：栗原 健((独)国立病院機構大阪医療センター 薬剤科 副薬剤科長)、瀧永博之(国立国際医療センター エイズ治療・研究開発センター 専門外来医長)、金田次弘((独)国立病院機構名古屋医療センター 臨床研究センター 部長)、加藤真吾(慶應義塾大学医学部微生物免疫学教室 助手)、児玉栄一(京都大学ウイルス研究所 附属エイズ研究施設感染免疫研究領域 助手)、巽 正志(国立感染症研究所 エイズ研究センター 第2室 室長)、白阪琢磨((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 センター長)、松下修三(熊本大学エイズ学研究センター 病態制御分野 教授)、仲宗根 正(国立感染症研究所 エイズ研究センター 第1研究グループ 主任研究官)、小池隆夫(北海道大学大学院医学研究科病態制御学講座 教授)、山本政弘((独)国立病院機構九州医療センター 感染症対策室 医長)、伊藤俊広((独)国立病院機構仙台医療センター 血液内科 医長)、稲吉 恵(静岡県環境衛生科学研究所 微生物部 副主任)、近藤真規子(神奈川県衛生研究所 微生物部 主任研究員)、貞升健志(東京都健康安全研究センター 微生物部 主任研究員)、健山正男(琉球大学大学院医学研究科感染病態制御学講座 助教授)、

原 孝(茨城県衛生研究所 主任研究員)、山口由美((独)産業技術総合研究所 生物情報解析研究センター 研究員)、森 治代(大阪府立公衆衛生研究所 ウイルス科 主任研究員)、上田幹夫(石川県立中央病院 血液病治療部 部長)、下条文武(新潟大学歯学総合病院 第2内科 教授)、木村昭郎(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 血液内科 教授)

### A. 研究目的

我が国における薬剤耐性 HIV の発生・伝播動向を把握する調査体制の確立と、薬剤耐性 HIV 症例の増加を抑制する有効な対策を提案することを目的とする。

### B. 研究方法

目的を達成するために下記3つの研究グループに分かれて研究を実施した(図1)。

**疫学調査研究:** 新規 HIV/AIDS 診断症例の捕捉と薬剤耐性検査・調査体制の確立を行う。HIV 診療に携わる医療機関および地方衛生研究所に参加してもらい、薬剤耐性検査の実施し、わが国における薬剤耐性 HIV の動向を把握する。これを元

に薬剤耐性 HIV が拡散する背景を推測し、その対策を提案する。調査は多施設で行われるため、施設間の検査制度の違いを測り、是正するための外部精度管理を実施する。

治療最適化研究：至適治療を支援するために治療薬剤血中濃度のモニタリング研究に取り組む。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を行っていく。また、細胞内薬剤濃度の測定、非侵襲な測定技術など新しい評価技術の開発・実用化について検討する。

薬剤耐性基礎研究：薬剤耐性 HIV の増加を抑制するためには、そ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不可欠である。この研究では薬剤耐性 HIV の感染性クローンの樹立、薬剤耐性発現機序の解明を進めていく。薬剤耐性 HIV の検査方法も技術革新に応じて改良、新規開発していく努力が必要である。この研究では薬剤耐性 HIV を同定する新たな検査法についても開発を試みていく。

#### 倫理面への配慮

本研究は国立感染症研究所医学研究倫理会に承認されている(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(表 1-8 参照)：

(1) 平成 15 年に遡り新規診断症例の薬剤耐性検査データを収集するとともに、平成 16～18 年は新規 HIV/AIDS 診断症例の薬剤耐性検査を実施した。総計 1437 例(H15:267, H16:308, H17:430, H18:432, H18 は 10 月までのデータ)の症例を収集したがこれは同時期にエイズ動向委員会に報告された 3340 名のおよそ 30%に相当する。主な感染者のプロファイルはいずれの年も 30～50 代、日本人男性、同性間性的接触であり、調査期間中に変化は認められなかった。動向委員

会のデータと統計学的に比較すると、我々の調査集団では異性間性的接触、女性、外国人の捕捉が有意に低いことが明らかになったが、概ね日本における新規 HIV/AIDS 感染者集団を反映していると考えている。調査の結果、新規診断症例における薬剤耐性検出の頻度は全体で 4.9%、年別では H15:4.5%、H16:4.2%、H17:4.5%、H18:6.3%であった。薬剤クラス別に見るとヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤(NRTI)耐性は 3.2%(H15:3.4%, H16:3.6%, H17:2.6%、H18:4.1%)、非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤(NNRTI)耐性変異 0.8%(H15:0.4%, H16:1.0%, H17:0.9%、H18:0.8%)、プロテアーゼ阻害剤(PI)耐性変異 1.2%(H15:1.1%、H16:0.3%、H17:1.6%、H18:1.5%)であった。使用歴の最も長い NRTI に対する耐性変異が多く認められた一方で、近年処方が増えている NNRTI および PI 耐性変異は低い頻度の留まっていることが明らかになった。

(2) 新規感染者の調査は多施設で行われた検査結果を取りまとめることから、耐性検査の施設間差を評価する外部精度管理を実施した。平成 16 年度は検査法のアンケートによる事前調査を実施した。平成 17 年度はクローン化した株の RNA を参加 15 施設に送付し、耐性変異検出の正解率を算出した。その結果、正答率は 97.5%であった。結果に問題を示した施設に対しては個別に改善案を提示した。平成 18 年度は同一 HIV 感染者血漿を送付したが、耐性変異検出の正答率は 100%となった。この結果から、平成 17 年度の外部精度管理での改善指導が有効であったことと、参加機関における薬剤耐性検査が信頼しうるものであることが確認された。

#### 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、受付そして抗 HIV 薬の薬物動態に関する情報を提供しており、平成 16～18 年の 3 年間でアクセス件数 3690 件、パスワード取得者 132 名、そして測定検体 2547 検体を達成した。平成 18 年度からは efavirenz の血中濃度に影響するとされる CYP2B6 遺伝子検査の受

付も開始した。

(2) HPLC および LC-MS/MS を用いて細胞内 AZT, AZT-MP, AZT-DP, AZT-TP の定量を試みた。その結果 AZT-MP は細胞外の AZT 濃度に依存して増加するのに対して、-DP と -TP は細胞外濃度が 100nM 以上の領域では plateau に達することが明らかになった。

(3) 服薬アドヒアランスを客観的にモニタリングする一つの方法として毛髪からの薬剤検出を試みた。lopinavir、nelfinavir を服用している患者からの毛髪を用いて測定した結果、2mm 程の長さの毛髪より極めて高い感度で lopinavir、nelfinavir を検出し定量することに成功した。

(4) 非侵襲的な手法による血中濃度の評価方法として毛髪あるいは唾液中の薬剤濃度測定法を考案した。LPV,NFV服用している患者からの毛髪を用いて測定した結果、2mm 程の長さの毛髪より極めて高い感度で LFV,NFV の検出し定量することに成功した。唾液中の薬剤濃度の測定を試みた。唾液 20  $\mu$ L より LC-MS/MS を用いて AZT、3TC、efavirenz、atazanavir、lopinavir の定量に成功した。

(5) 治療最適化における血中濃度測定の有効性を 10 名の saquinavir+ritonavir 併用療法を受けている患者の追跡から立証した。

(6) 新たに承認されたプロテアーゼ阻害剤 atazanavir の日本人 94 名における血中濃度測定を行った。その結果、日本人における atazanavir トラフ値は欧米人と差が無いことが初めて明らかにされた。

(7) 抗 HIV 薬剤血中濃度とそれをコントロールすると考えられている宿主遺伝子 ABCB1 と ABCC4 の解析を行い、宿主遺伝子解析の有用性について検討を加えた (松下)。

(8) 治療最適化における血中濃度測定の有効性を 10 名の SQV+RTV 併用療法を受けている患者の追跡から立証した。抗 HIV-1 薬剤血中濃度とそれをコントロールすると考えられている宿主遺伝子 ABCB1 と ABCC4 の解析を行い、宿主遺伝子解析の有用性について検討を加えた (松下)。

#### 薬剤耐性基礎研究：

分担研究者は平成 16-18 年度にかけて本研究班の中で以下の基礎研究に取り組み成果を挙げた。主だったものについて列挙したが、詳細は各分担研究者の研究報告書を参照のこと。

(1) d4T の耐性変異責任領域の探索を行った。逆転写酵素領域には有意の変異を認め無かった。3TC を除く既存の NRTI 新規 RT 阻害剤 4'-EfdA を同定した。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) 3TC を除く既存の NRTI 新規 RT 阻害剤 4'-EfdA を同定した。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。

(3) 塩基ラベリングによる SNP 検出法を用いた耐性変異 M46I,L90M の定量法を開発した。

(4) 新たな NNRTI 耐性変異 K238S を見出した。NNRTI 耐性変異の K103N の獲得機序について解析を行い K103R の重要性を明らかにした (湯永)。

(5) NNRTI 耐性変異の K103N の獲得機序について解析を行い K103R の重要性を明らかにした。

(6) T7-RNA 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構築した。本法を用いて 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。

(7) MAGIC5 細胞を用いた CRF01\_AE 薬剤耐性感染性クローンを樹立した。3 年間で計 950 の感染性クローンを確立した。

(8) 超高感度 RT 活性測定法 RT2 を確立した。

(9) 超高感度 RT 活性測定法 RT2 を感染した。この方法による測定値は SHIV では RNA コピー数と高い相関を示した。しかし HIV-1 では一部のサンプルで相関が認められなかった。またこの方法を用いることによりこの方法を用いることにより 3TC、nevirapine、AZT、d4T 耐性の評価が可能であった。(仲宗根)

(10) 国立感染症研究所のデータベースを基に nelfinavir 耐性変異 D30N と L90M の構造学的排他性について明らかにした。

(11) HIV の persistency の機序を明らかにするた



めに7症例より計168のインテグレーション部位を同定した。

その結果、その多くがヒトゲノムのイントロン領域に組み込まれていることが明らかになった。解析結果は特定の HIV 遺伝子を保有する細胞が長期間にわたって存在し続けていることを明らかにした。

(12) 薬剤耐性 HIV の選択進化機序を解明するために Gag とプロテアーゼ変異の干渉について連鎖不平衡解析を行った。その結果プロテアーゼ阻害剤耐性変異とリンクした新たな Gag 基質部変異 Y132F を見出した。

(13) 薬剤耐性 HIV の選択進化機序を解明するために Gag とプロテアーゼ変異の干渉について解析した。薬剤耐性を獲得した一症例について、Single Genome Sequencing を用いた限界希釈によるクローニングを行った結果、複数の変異間に有意の連携が確認された。

(14) 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）。

#### D. 考察

治療薬剤に対する耐性の出現と拡散を如何に抑え込むかという命題は HIV/AIDS に特有の問題ではなく、感染症に共通する克服への険しい道りである。統計学的に薬剤耐性症例の比率が感染者総数の5-10%に達すると、新規感染者への薬剤耐性ウイルスの感染リスクが高まると言われている。欧米各国では薬剤耐性 HIV の状況はこの閾値を遥かに超えており、1998年以降に行われた疫学調査では新規感染者の10%以上に何らかの耐性変異を持つものが認められ、初回治療の薬剤の選択に大きな障害となりつつある。一方、わが国の状況を見てみると、既治療感染者のモニタリング調査では薬剤耐性症例の頻度は20-30%に達しており、薬剤耐性 HIV 拡散の危険水準に達していると考えられる。このことから本研究班では平成15~18年にかけて新規 HIV/AIDS 診断症

例の調査を実施した。その結果いずれの年も4%強に留まっており、また高度耐性の症例は認められなかったことから、日本の現状は欧米に比べるとよほど良いと考えられる。しかし、なんら対策を行わずにいればいずれは欧米並みになることは想像に難く無く、今後どのようにして薬剤耐性 HIV の拡散を抑制するか実効性のある戦略を練ることが急務と思われる。

#### E. 結論

新規 HIV/AIDS 診断症例の薬剤耐性を調査する全国規模の調査体制を構築した。調査の結果、我が国においては新規 HIV/AIDS 診断症例の約4%に薬剤耐性 HIV が認められることが明らかになった。治療薬剤血中濃度測定を実用化した。薬剤耐性 HIV の基礎研究において多くの成果を挙げた。

#### F. 研究発表

各分担研究報告書 参照

#### G. 知的所有権の出願・登録状況

- 1) 発明の名称：「HIV-1 プロウイルス定量法」、  
発明者：近藤真規子、加藤真吾、出願年月日：平成18年5月2日、出願番号：特願2006-128565
- 2) 発明の名称：「弱毒型 HIV-1 塩基配列」、  
発明者：近藤真規子、今井光信、武部豊、公開年月日：平成18年7月27日、公開番号：特開2006-191891

図1. 研究班の構成

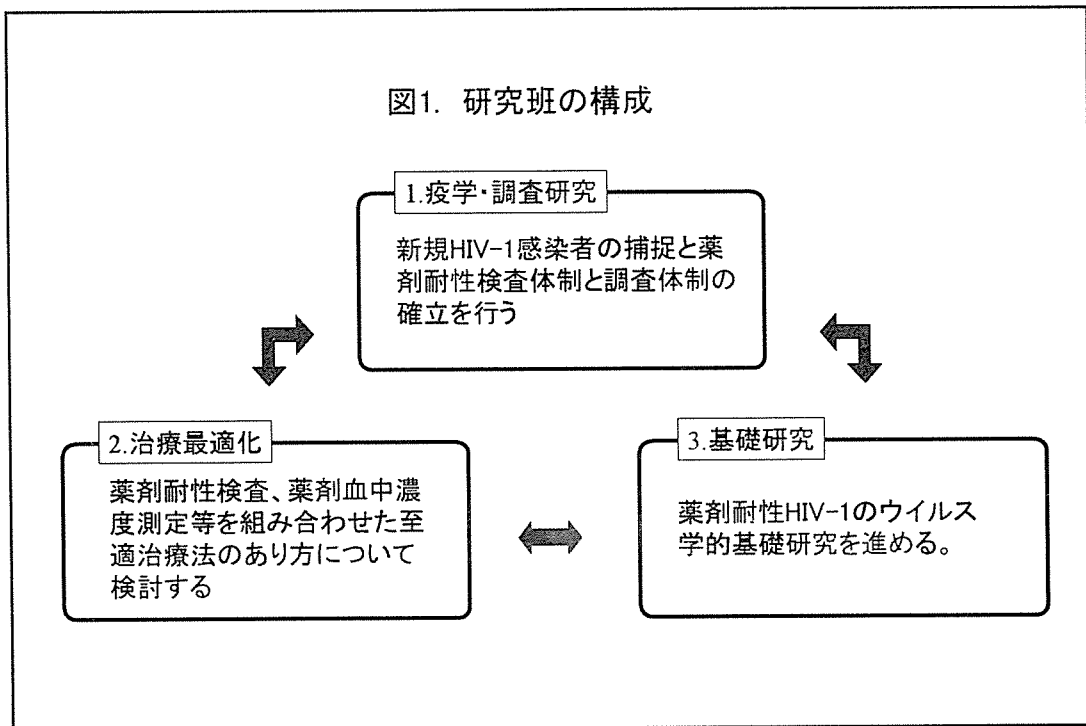


表1. 新規HIV/AIDS診断症例の調査

2003-2006年の新規感染者のプロファイル

調査の継続に伴い、調査集団の偏りが認められるようになりつつある

		Studied patients (n = 1,437)	Registered patients (n = 3,340)	$\rho$ (A vs B)
Age, mean years (range)		36.6 (4-79)	30-39	
Female sex		<u>105 (7.3%)</u>	<u>325 (9.7%)</u>	0.013
Race	Japanese	1287(89.6%)	2860 (85.6%)	0.005
	Others	<u>150(10.9%)</u>	<u>480 (14.4%)</u>	
Risk factor	MSM	<u>1005 (76.4%)</u>	<u>1,725 (61.4%)</u>	<0.001
	Heterosexual	<u>304 (21.9%)</u>	<u>981 (34.9%)</u>	<0.001
	Injection drug	8 (0.4%)	21 (0.7%)	
	MTCT	3 (0.2%)	4 (0.1%)	
	Others	<u>1 (8.1%)</u>	<u>80 (2.8%)</u>	<0.001

表2. 2003-2006年新規HIV/AIDS診断症例のプロファイル

	2003-2006 (n = 1,437)	2003 (n = 267)	2004 (n = 308)	2005 (n = 430)	2006 (n = 432)	P
Age (range)	36.6(4-79)	36.2(10-70)	33.5(8-78)	36.6(18-79)	37.8(4-74)	
Female sex:	105(7.3%)	21(7.9)	33(10.7)	18(4.2)	33(7.6)	0.009
Race:						
Japanese	1287(89.6%)	227(85.0)	281(91.2)	387(90.0)	392(90.7)	
Others	150(10.4%)	40(15.0)	27(8.8)	43(10.0)	40(9.3)	
Risk factor:	(n = 1437)	(n = 267)	(n = 308)	(n = 430)	(n = 432)	
MSM	1005(69.9%)	186(69.7)	206(66.9)	323(75.1)	290(67.1)	0.007
Hetero	304(21.2%)	65(24.3)	75(24.4)	67(15.6)	97(22.4)	0.008
IVDU	8(0.6%)	1(0.4)	1(0.3)	3(0.7)	3(0.7)	
MTCT	3(0.2%)	1(0.4)	1(0.3)	0(0.0)	1(0.2)	
Others	1(0.1%)	1(0.4)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	
Unknown	116(8.1%)	13(4.9)	25(8.1)	37(7.6)	41(9.5)	

表3. 2003-2006年新規HIV/AIDS診断症例のサブタイプ

	2003-2006 (n = 1367)	2003 (n = 267)	2004 (n = 307)	2005 (n = 427)	2006 (n = 366)
B	1180(86.3%)	221 (82.8%)	255 (83.1%)	383 (89.7%)	321 (87.7%)
AE	135 (9.9%)	37 (13.9%)	34 (11.1%)	34 (8.0%)	30 (8.2%)
A	14 (1.0%)	2 (0.7%)	6 (2.0%)	4 (0.9%)	2 (0.5%)
C	16 (1.2%)	4 (1.5%)	6 (2.0%)	2 (0.5%)	4 (1.1%)
D	3 (0.2%)	0 (0.0%)	1 (0.3%)	0 (0.0%)	2 (0.5%)
F	3 (0.2%)	1 (0.4%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	2 (0.5%)
G	5 (0.4%)	1 (0.4%)	3 (1.0%)	0 (0.0%)	1 (0.3%)
AG	6 (0.4%)	1 (0.4%)	0 (0.0%)	2 (0.5%)	3 (0.8%)
BC	1 (0.1%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (0.2%)	0 (0.0%)
others	4 (0.3%)	0 (0.0%)	2 (0.7%)	1 (0.2%)	1 (0.3%)

表4. 2003-2006年新規HIV/AIDS診断症例の薬剤クラス別耐性頻度

	2003-2006 (n = 1398)	2003 (n = 267)	2004 (n = 307)	2005 (n = 429)	2006 (n = 395)
Any	69 (4.9%)	12 (4.5%)	13 (4.2%)	19 (4.5%)	25 (6.3%)
PI	17 (1.2%)	3 (1.1%)	1 (0.3%)	7 (1.6%)	6 (1.5%)
NRTI & NNRTI	52 (3.7%)	9 (3.4%)	12 (3.9%)	12 (2.8%)	19 (4.8%)
<i>NRTI</i>	45 (3.2%)	8 (3.4%)	10 (3.6%)	11 (2.6%)	16 (4.1%)
<i>NNRTI</i>	11 (0.8%)	1 (0.4%)	3 (1.0%)	4 (0.9%)	3 (0.8%)

表5. 2003-2006年新規HIV/AIDS診断症例の  
プロテアーゼ阻害剤耐性変異パターン

	2003-2006 (n = 1394)	2003 (n = 267)	2004 (n = 303)	2005 (n = 429)	2006 (n = 395)
Any	18 (1.3)	3 (1.1)	1 (0.3)	7 (1.6)	7 (1.8)
D30N	3 (0.2)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (0.7)	0 (0.0)
V32I	1 (0.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)
M46I	12 (0.9)	3 (1.1)	1 (0.3)	3 (0.7)	5 (1.3)
I47V	1 (0.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)
V82A	1 (0.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.2)	0 (0.0)
L90M	2 (0.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.5)

表6. 2003-2006年新規HIV/AIDS診断症例のNRTI耐性変異パターン

	2003-2006 (n = 1392)	2003 (n = 267)	2004 (n = 305)	2005 (n = 425)	2006 (n = 393)
Any	46 (3.3)	8 (3.0)	10 (3.3)	11 (2.6)	17 (4.3)
M41L	7 (0.5)	2 (0.8)	2 (0.7)	0 (0.0)	3 (0.8)
K65R	1 (0.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)
D67N	3 (0.2)	0 (0.0)	1 (0.3)	1 (0.2)	1 (0.3)
K70R	1 (0.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.2)	0 (0.0)
L74V	1 (0.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.1)	1 (0.3)
Y115F	1 (0.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)
M184I	1 (0.1)	0 (0.0)	1 (0.3)	0 (0.0)	0 (0.0)
M184V	10 (0.7)	1 (0.4)	3 (1.0)	4 (0.9)	2 (0.5)
L210X	34 (2.4)	6 (2.2)	7 (2.3)	7 (1.6)	14 (3.6)
K219Q	1 (0.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.2)	0 (0.0)

表7. 2003-2006年新規HIV/AIDS診断症例のNNRTI耐性パターン

	2003-2006 (n = 1390)	2003 (n = 267)	2004 (n = 305)	2005 (n = 425)	2006 (n = 393)
Any	11 (0.8)	1 (0.4)	3 (1.0)	4 (0.9)	3 (0.8)
L100I	2 (0.1)	0 (0.0)	1 (0.3)	1 (0.2)	0 (0.0)
K103N	7 (0.5)	1 (0.4)	1 (0.3)	3 (0.7)	2 (0.5)
V106A	1 (0.1)	0 (0.0)	1 (0.3)	0 (0.0)	0 (0.0)
Y181C	1 (0.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)
G190A	1 (0.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.2)	0 (0.0)
P225H	1 (0.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)

表8. 2003-2006年新規HIV/AIDS診断症例のPI耐性2次変異

	2003-2006 (n = 1388)	2003 (n = 267)	2004 (n = 303)	2005 (n = 429)	2006 (n = 395)
Any	1133(81.6)	192(71.9)	238(78.5)	344(80.2)	364(92.2)
L10F	6 (0.4)	2 (0.7)	0 (0.0)	4 (0.9)	0 (0.0)
L10I	129 (9.3)	21 (7.9)	26 (8.6)	45(10.5)	37 (9.4)
L10V	38 (2.7)	6 (2.2)	6 (2.0)	15 (3.5)	11 (2.8)
K20I	22 (1.6)	5 (1.9)	7 (2.3)	4 (0.9)	6 (1.5)
K20M	5 (0.4)	0 (0.0)	1 (0.3)	1 (0.2)	3 (0.8)
K20R	51 (3.7)	6 (2.2)	13 (4.3)	19 (4.4)	13 (3.3)
K24I	1 (0.1)	0 (0.0)	1 (0.3)	0 (0.0)	0 (0.0)
L33F	7 (0.5)	0 (0.0)	2 (0.7)	2 (0.5)	3 (0.8)
L33I	13 (0.9)	1 (0.4)	2 (0.7)	9 (2.1)	1 (0.3)
L33V	6 (0.4)	0 (0.0)	2 (0.7)	2 (0.5)	2 (0.5)
M36I	354(25.5)	68(25.5)	90(29.7)	105(24.5)	93(23.5)
M36L	12 (0.9)	1 (0.4)	0 (0.0)	3 (0.7)	8 (2.1)
M36V	3 (0.2)	0 (0.0)	2 (0.7)	1 (0.2)	0 (0.0)
I62V	114 (8.2)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (0.9)	111(28.1)
L63P	546(39.3)	103(38.6)	141(46.5)	161(37.5)	142(35.9)
A71I	2 (0.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.2)	1 (0.3)
A71T	122 (8.8)	24 (9.0)	21 (6.9)	41 (9.6)	38 (9.6)
A71V	87 (6.3)	21 (7.9)	18 (5.9)	22 (5.1)	26 (6.7)
V77I	462(33.3)	82(30.7)	88(29.0)	140(32.6)	155(39.2)
V82I	36 (2.6)	6 (2.2)	11 (3.6)	8 (1.9)	11 (2.8)
I93L	235(16.9)	-	-	42(29.6)	175(44.3)

## II. 総合 分担研究報告書 【基礎研究グループ】

「薬剤耐性 HIV の発生動向把握のための検査方法・調査体制確立に関する研究」  
～細胞内における抗 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～  
～Gag と protease の相互干渉・共進化に関する研究～

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）

研究協力者 植田知幸（慶應義塾大学）、椎野禎一朗（エイズ研究センター）、柴田潤子、任 鳳蓉、  
田中 博（東京医科歯科大学）

### 研究要旨

薬剤耐性変異獲得ウイルスの選択と進化に Gag と PR の相互干渉が大きな影響を及ぼしている（共進化）ことが知られている。本研究では PI 耐性変異を獲得した HIV-1 感染者に観察される PR と Gag の相互干渉の解明を二つの異なるアプローチから試みた。一方は PI 治療を受けた異なる症例の gag-protease 塩基配列を多数集めて Gag と protease の変異の相互干渉を連鎖不平衡解析したもので、もう一方は特定の症例について経時的にサンプルを回収し、精度の高い Single Genome Sequencing (SGS) 法を用いて分子内、分子間相互干渉を解析したものである。いずれの結果においても Gag と protease 間に有意の相互干渉が薬剤耐性 HIV の選択進化につよく影響を及ぼしていることが明らかになった。また、連鎖不平衡解析では Gag の Y132F、CoMap 解析では PR の E35D という Gag-Protease の相互干渉を示した新たな変異を見出した。さらに今回の一連の研究では、RT においても共進化サイトが複数観察された。これらの結果より、Gag、PR、RT は独立して変異を獲得するのではなく、相互に干渉しながら共進化を辿っていることが示唆された。

### A.研究目的

HIV/AIDS 治療において、薬剤耐性変異獲得ウイルスの出現が大きな問題となっている。多剤併用療法の要であるプロテアーゼ阻害剤 (PI) はプロテアーゼ (PR) に耐性変異を誘導するが、PI 耐性を獲得した HIV-1 では、その基質である Gag にもしばしば、PR との結合を回復させる変異が二次的に獲得されることが知られている。この事実は Gag と PR が相互に干渉しながら進化をしている（共進化）ことを示唆しているが、その詳細は未だ明らかではない。Gag と PR の相互干渉と薬剤耐性の進化と獲得の関連を詳細に調査することはプロテアーゼ阻害剤耐性の獲得機構の理解を深め、薬剤耐性を回避する手段の解明に繋がることを期待される。このことから、我々は gag と protease 全領域にわたりその塩基

配列を解析し、バイオインフォマティクスの手法を用いて両者の相互干渉の解析を行った。

本研究では二つの異なるアプローチから解析を行った。一つは PI 治療を受けた異なる症例の gag-protease 塩基配列を多数集めて解析するというアプローチ「連鎖不平衡解析による Gag と protease の相互干渉解析」で、症例を超えて共通する相互作用を見出すことを目的とした。もう一つは特定の症例について経時的にサンプルを回収し詳細に解析をした「抗 HIV 剤治療下における Protease と Gag の共進化に関する解析」で、相互作用の経時的推移を観察しそのウイルス学的意義の解明を目的としたアプローチである。



## B. 研究方法

### (1)連鎖不平衡解析による Gag と protease の相互干渉解析

国立感染症研究所において薬剤耐性遺伝子検査を実施したものを対象とした。RT-PCR による gag-protease 領域 1.9Kb の一括増幅とそのクローニング、シーケンスによる塩基配列解析を行った。シーケンス結果から、検査対象のサブタイプ、薬剤耐性変異、gag 領域全長のアミノ酸配列を決定した。同定された protease 阻害剤耐性変異と pr55<sup>Gag</sup> タンパク質に観察されたアミノ酸変異を、連鎖不平衡解析を用いて解析した。この解析は、ある集団の遺伝子座が互いに全く連鎖しない場合は図 1 にある様に、単純に互いの頻度を掛け合わせて、理論値の様な分布になる所を、お互いの遺伝子座が強い関連性があった時、理論値と観察値でずれが生じ、それを数値化して確認することが出来る (D 値)。このずれの大きさを見ることで互いの連鎖の強さを確認することが出来るが、連鎖サイトの同定に当たっては算出された D 値が 0.01 以上であり、その時  $\chi$  二乗検定を行って有意水準が 1% 以下だったものを、有意な変異として取り上げた。

### (2)抗 HIV 剤治療下における Protease と Gag の共進化に関する解析

本研究では Gag と PR の共進化を理解するために、PI 耐性変異を獲得した HIV-1 感染者に観察される PR と Gag の遺伝子配列の経時的推移を最新のクローニング技術と共進化解析プログラムを用いて解析した。1998 年 4 月から 2002 年 8 月までの 52 ヶ月間、抗 HIV 剤治療を受け、且つ PI 耐性変異を獲得した 1 症例より経時的に血液サンプルを採取した。サンプルの総採取回数は 8 回であり (平均採取間隔 7.4 ヶ月)、各サンプリング時点を A~H とした。また、投与薬剤の組み合わせは、時系列順に DC1~DC6 (DC: Drug Combination) とした。各薬剤の組合せ、治療暦、臨床データは図 2 に示した。

血漿から HIV-1 RNA の抽出後 Single Genome Sequencing (SGS)法を用いて Gag-PR-RT (約 3Kbp) のクローニングを行った。SGS 法は Palmer ら (2004 JCM) により開発された限界希釈によるクローニング手法であり、インフォマティックス解析で誤差として問題となる PCR による人為的ゲノム組換えの出現確率をほぼ 0% にまで抑えこむことを可能とした手法である。

薬剤耐性変異の獲得と投与薬剤との関連を詳細に解析するために、SGS で得られたシーケンスデータをサンプリング時点によって 3 グループに分け (A~C, C~E, E~H)、各グループにおいて、Gag、PR、および RT の分子内、分子間の共進化解析を行った。グループごとにシーケンスをアライメント後、系統樹を作成し、CoMap により共進化解析を行った。CoMap はマルコフ置換モデルを用いることで、配列データを基に作成された系統樹上の各ノード間 (各枝) で生じた塩基置換数をマッピングするプログラムである。また、独立進化を仮定したシミュレーション結果と実際の観察結果とを比較することで擬陽性の検出を抑えている。さらに、多塩基置換が生じることや、各サイト間での塩基置換速度が異なることを考慮しており、既存のマルコフモデル基盤型のプログラムに比べ精度の高い手法である。

CoMap 解析により検出された共進化候補ペアについて、HIV-1 の蛋白質の機能や構造及び薬剤耐性に関する既知の情報を加えて分析し、薬剤耐性に寄与する可能性の高いサイトを絞り込んだ。

## C. 研究結果

### (1)連鎖不平衡解析による Gag と protease の相互干渉解析

合計 163 症例について解析を行った。その結果、Subtype B が 132 例、CRF01\_AE が 26 例、その他の subtype が 5 例認められた。このうち、統計的解析に耐えうる十分な症例数のあった subtype B について連鎖不平衡解析を行った。表

1 は統計解析の結果、プロテアーゼ領域の薬剤耐性に対して現れたと考えられる Gag の変異を示している。括弧内の値はそれぞれ観測された症例数を示している。表に示した以外にも薬剤耐性変異が観察されたが、症例数が5未満の場合は統計解析による判定が行えないため、表に示していない。表中下線で示されているものは、Gag の基質領域を表しており、アスタリスクはそれぞれの有意水準を示している。表に示すように基質領域の変異として、V82A、L90M、L10I、I54V、A71V に対して Y132F の変異を確認した。次に M46I、M46L、V82A、L90M、L10I、L10F、L24I、L33F、I54V に対する A431V を確認した。M46I、V82A 変異に対する A431V は、既知の関連である。M46I との L449F との関連についても既に報告されているが、今回我々が新たに L90M、L10I と L449V に関連があることを見出した。L10F に対しては L449P も関連図付けられた変異として確認された。更に D30N と N88D にたいして R452K が連鎖していることが明らかになった。また興味深いことに、D30N/N88D のようにウイルスのフィットネスが低下するような耐性変異を獲得した症例では、関連があると評価された Gag 変異が多数観察された。

結論として pr55<sup>Gag</sup> タンパク質の cleavage site に現れた変異は、従来知られていた A431V あるいは L449F 以外に、新たに 5 つの変異があることが明らかにされた。またプロテアーゼに薬剤耐性変異が入ることにより、gag の多数の領域で変異が生じることが確認された

## (2) 抗 HIV 剤治療下における Protease と Gag の共進化に関する解析

SGS により 8 時点、合計 132 クローンの遺伝子配列解析を行った。患者の薬剤情報、血中 HIV RNA 量 (Viral Load: VL)、CD4 陽性リンパ球数および SGS 法を用いたシーケンス解析により観察された Gag, PR, RT 領域における主要な変異の経時的变化を図 2 に示す。

CoMap 解析の結果、図 3 に赤線で示す分子内あるいは分子間に有意の相互干渉が認められた。我々はネルフィナビル耐性変異である PR の D30N, N88D と分子内共進化し、且つ Gag の切断領域近傍の P453L と分子間共進化する PR の E35D という未知の共進化サイトを見出した。E35D と D30N, N88D は C-E、および E-H サンプリング時点において互いに非常に強く連鎖しており、3 サイト全てで変異を獲得していない (以下、野生型) クローンは 46 クローン、逆に 3 サイト全てで変異を獲得している (以下、変異型) クローンは 84 クローンであったのに対し、サイト 35 のみ野生型で、サイト 30, 88 は変異型であったクローンは 2 クローンしか存在しなかった。さらに、E35D は全ての期間において Gag の p1/p6 切断点より 5 アミノ酸 C 末側に位置する P453L と分子間共進化することが示唆された ( $\rho = 0.223019 - 0.610927$ )。この E35D と P453L の連鎖も強く、サイト 35, 453 共に野生型であったクローンは 45 クローン、逆に共に変異型であったクローンは 83 クローンであったのに対し、ヘテロに存在するクローンは 4 クローンのみであった。また、今回の解析結果では、AZT, d4T 耐性変異が RT 分子内に複数の共進化サイトをもつことや、AZT, d4T の耐性変異である RT の M41L と T215Y/S が Gag の非切断領域である T84V, A326S と共進化することが、さらに AZT, d4T の耐性変異である RT の L210W, T215Y/S が PR の V77I と共進化することが示唆された。E35D は薬剤耐性変異ではないが、ネルフィナビル耐性獲得の進化・選択に影響を及ぼしていることが示唆されたことから、その構造学的、酵素学的意義を明らかにするための更なる解析が必要であると考えられた。さらに興味深いことに、二次変異を獲得しにくいと考えられている RT においても共進化サイトが存在するという新たな見解が示され、AZT, d4T 耐性変異が RT 分子内に複数の共進化サイトをもつことや、AZT, d4T の耐性変異である RT の M41L と T215Y/S が Gag の非切断領域である T84V, A326S と共進

化すること、さらに AZT, d4T の耐性変異である RT の L210W、T215Y/S が PR の V77I と共進化することが示唆された。これらの結果より、Gag、PR、RT は独立して変異を獲得するのではなく、相互に干渉しながら共進化を辿っていることを指示する重要な知見を得た。

#### D. 考察

アプローチは異なるが、二つの Gag-PR 相互干渉解析を行い、いずれの結果においても Gag と protease 間に有意の相互干渉があり、薬剤耐性 HIV の選択進化につよく影響を及ぼしていることが明らかになった。また、連鎖不平衡解析では Gag の Y132F、CoMap 解析では PR の E35D という Gag-Protease の相互干渉を示した新たな変異を見出すことに成功した。

今回の研究では、興味深いことに二次変異を獲得しにくいと考えられている RT においても共進化サイトが複数存在するという新たな見解が示された。これらの結果は、Gag、PR、RT は独立して変異を獲得するのではなく、相互に干渉しながら共進化を辿っていることを指示する重要な知見である。

これらの結果より、Gag、PR、RT は独立して変異を獲得するのではなく、相互に干渉しながら共進化を辿っていることを指示する重要な知見を得た。

#### E. 結論

今回の解析より PI 耐性変異と gag は密接な関連があることが改めて確認された。薬剤耐性の評価を正確に行うためには gag の変異についても考慮する必要が強く示唆された。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### (1) 論文発表

- 1) Tomoko Chiba-Mizutani, Hideka Miura, Masakazu Matsuda, Zene

Matsuda, Yoshiyuki Yokomaku, Kosuke Miyauchi, Masako Nishizawa, Naoki Yamamoto, Wataru Sugiura: New T-Cell-Based Lines with Two Luciferases for Accurately Evaluating Susceptibility to HIV-1 Drugs. *J Clinical Microbiology*, 45(2):477-487, 2007.

- 2) Hiroyuki Gatanaga, Shiro Ibe, Masakazu Matsuda, Shigeru Yoshida, Tsukasa Asagi, Makiko Kondo, Kenji Sadamasu, Hiroki Tsukada, Aki Masakane, Haruyo Mori, Noboru Takata, Itsuhiro Nakagiri, Rumi Minami, Masao Tateyama, Takao Koike, Toshihiro Itoh, Mitsunobu Imai, Fumitake Gejyo, Mikio Ueda, Motohiro Hamaguchi, Yoko Kojima, Takuma Shirasaka, Akio Kimura, Masahiro Yamamoto, Jiro Fujita, Shinichi Oka, and Wataru Sugiura: Nationwide Survey of Drug-Resistant HIV-1 Prevalence in Patients Newly Diagnosed with HIV/AIDS in Japan. *Antiviral Research*, in press.
- 3) Afework Kassu, Masayuki Fujino, Masakazu Matsuda, Masako Nishizawa, Fusao Ota, Wataru Sugiura: Molecular Epidemiology of HIV-1 in Treatment Naive Patients in North Ethiopia. *AIDS Research and Human Retroviruses*, in press.
- 4) Kousuke Miyauchi, Jun Komano, Lay Myint, Yuko Futahashi, Emiko Urano, Zene Matsuda, Tomoko Chiba, Hideka Miura, Wataru Sugiura and Naoki Yamamoto: Rapid propagation of low-fitness drug-resistant mutants of human immunodeficiency virus type 1 by a streptococcal metaboite sparsomycin. *Antiviral Chemistry &*

- Chemotherapy, 17(4):167-174, 2006.
- 5) T Ueda, M Itaya, K Tusge, K Fujita, M Matsuda, M Nishizawa, W Sugiura: Reconstruction of HIV-1 full genome clones with *Bacillus subtilis*. *Antiviral Therapy*, 11:S192, 2006.
  - 6) Hirotaka Ode, Saburo Neya, Masayuki Hata, Wataru Sugiura, Tyuji Hoshino: Computational Simulations of HIV-1 Proteases-Multi-drug Resistance Due to Nonactive Site Mutation L90M. *J. AM.Chem.Soc.*, 128:7887-7895, 2006.
  - 7) 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, Francoise 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.
  - 8) Deforche K, Camacho R, Grossman Z, Silander T, Soares MA, Moreau Y, Shafer RW, Van Laethem K, Carvalho AP, Wynhoven B, Cane P, Snoeck J, Clarke J, Sirivichayakul S, Ariyoshi K, Holguin A, Rudich H, Rodrigues R, Bouzas MB, Cahn P, Brigido LF, Soriano V, Sugiura W, Phanuphak P, Morris L, Weber J, Pillay D, Tanuri A, Harrigan PR, Shapiro JM, Katzenstein DA, Kantor R, Vandamme AM. : Bayesian network analysis of resistance pathways against protease inhibitors. *Infect Genet Evol.* 2006 Nov 24.
  - 9) Koga I, Odawara T, Matsuda M, Sugiura W, Goto M, Nakamura T, Iwamoto A.: Analysis of HIV-1 sequences before and after co-infecting syphilis. *Microbes Infect.* 2006 Oct 23.
  - 10) Omura M, Furuya K, Kudo S, Sugiura W, Azuma H.: Detecting IgM antibodies against microsporidian *Encephalitozoon cuniculi* polar tubes in sera from healthy and HIV-infected Japanese. *Clin Vaccine Immunol.* 2006 Nov 15.
  - 11) 西澤雅子, 柴田潤子, 杉浦 互: ウィルス感染制御における ncRNA の役割. *実験医学* 24(6):805-809, 2006.
  - 12) 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*. 16: 363-373, 2005.
  - 13) 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.* 58: 65-68.