

平成19年度
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の動向把握のための調査体制確立及び
その対策に関する研究

—平成19年度 総括・分担研究報告書—

主任研究者 杉浦 互

平成20(2008)年3月

薬剤耐性HIVの動向把握のための調査体制確立及びその対策に関する研究

研究者名	分担	所属	役職
杉浦 互	主任研究者	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
柴原 健	分担研究者	(独)国立病院機構大阪医療センター 薬剤科	副薬剤科長
金田 次弘	分担研究者	(独)国立病院機構名古屋医療センター 臨床研究センター	客員研究員
加藤 真吾	分担研究者	慶応義塾大学医学部 微生物学免疫学教室	助教
仲宗根 正	分担研究者	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
石ヶ坪良明	分担研究者	横浜市立大学大学院医学研究科 病態制御免疫内科	教授
伊藤 俊広	分担研究者	(独)国立病院機構仙台医療センター 血液内科	医長
潟永 博之	分担研究者	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
小池 隆夫	分担研究者	北海道大学大学院医学研究科 病態内科学講座第2内科	教授
巽 正志	分担研究者	国立感染症研究所 エイズ研究センター 第2室	室長
藤井 毅	分担研究者	東京大学医科学研究所 先端医療研究センター・感染症分野	講師
白阪 琢磨	分担研究者	(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
福武 勝幸	分担研究者	東京医科大学医学部 臨床検査医学科	主任教授
上田 幹夫	分担研究者	石川県立中央病院 血液免疫内科	診療部長
南 留美	分担研究者	(独)国立病院機構九州医療センター 免疫感染症内科	医師
下条 文武	分担研究者	新潟大学大学院医歯学総合研究科 臨床感染制御学分野	教授
貞升 健志	分担研究者	東京都健康安全研究センター 微生物部	主任研究員
松下 修三	分担研究者	熊本大学エイズ学研究センター 病態制御分野	教授
森 治代	分担研究者	大阪府立公衆衛生研究所 ウイルス課	主任研究員
近藤真規子	分担研究者	神奈川県衛生研究所 微生物部	主任研究員
佐藤 武幸	分担研究者	千葉大学医学部附属病院 感染症管理治療部	准教授
健山 正男	分担研究者	琉球大学大学院医学研究科 感染病態制御学講座分子病態感染症学分野	准教授
木村 昭郎	分担研究者	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
原 孝	分担研究者	茨城県衛生研究所 遺伝子科学部	部長

目次

総括研究報告書

薬剤耐性HIVの動向把握のための調査体制確立およびその対策に関する研究2

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

分担研究者：乗原 健¹、加藤真吾²、仲宗根 正³、石ヶ坪良明⁴、伊藤俊広⁵、
 渦永 博之⁶、金田 次弘⁷、小池 隆夫⁸、巽 正志⁹、藤井 毅¹⁰、
 白阪 琢磨¹¹、福武 勝幸¹²、上田 幹夫¹³、南 留美¹⁴、下条 文武¹⁵、
 貞升 健志¹⁶、森 治代¹⁷、松下 修三¹⁸、近藤 真規子¹⁹、佐藤 武幸²⁰、
 健山 正男²¹、木村 昭郎²²、原 孝²³

- 1 (独)国立病院機構大阪医療センター 薬剤科
- 2 慶応義塾大学医学部 微生物学免疫学教室
- 3 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
- 4 横浜市立大学大学院医学研究科 病態制御免疫内科
- 5 (独)国立病院機構仙台医療センター 血液内科
- 6 国立国際医療センター エイズ治療・研究開発センター
- 7 (独)国立病院機構名古屋医療センター 臨床研究センター
- 8 北海道大学大学院医学研究科 病態内科学講座第2内科
- 9 国立感染症研究所 エイズ研究センター 第2室
- 10 東京大学医科学研究所 先端医療研究センター・感染症分野
- 11 (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
- 12 東京医科大学医学部 臨床検査医学科
- 13 石川県立中央病院 血液免疫内科
- 14 (独)国立病院機構九州医療センター 免疫感染症内科
- 15 新潟大学大学院医歯学総合研究科 臨床感染制御学分野
- 16 東京都健康安全研究センター 微生物部
- 17 大阪府立公衆衛生研究所 ウイルス課
- 18 熊本大学エイズ学研究センター 病態制御分野
- 19 神奈川県衛生研究所 微生物部
- 20 千葉大学医学部附属病院 感染症管理治療部
- 21 琉球大学大学院医学研究科 感染病態制御学講座分子病態感染症学分野
- 22 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
- 23 茨城県衛生研究所 遺伝子科学部

分担研究報告書

薬剤耐性HIV発生機序に関する研究

感染研における薬剤耐性検査と新規診断症例の疫学調査および関連する基礎的研究 10

分担研究者：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：鈴木 寿子¹、柿澤 淳子¹、柴田 潤子¹、吉田 いづみ²、石川 喜也²

¹国立感染症研究所エイズ研究センター、²東京医科歯科大学

抗HIV薬剤血中濃度モニタリング 16

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
研究協力者： 高田 寛治¹、杉岡 信幸¹、芝田 信人²、加藤 真吾³、田中 理恵³、上平 朝子⁴、
白阪 琢磨⁴、吉野 宗宏⁵、矢倉 裕輝⁴、平林 義弘⁶、照屋 勝治⁶、林田 庸絵⁶、
小田原 隆⁷、味澤 篤⁸、今村 顕史⁸、牧江 俊雄⁹
¹京都薬科大学薬物動態学教室、²同志社女子大学薬学部生物薬剤学教室、
³慶應義塾大学医学部微生物学・免疫学教室、
⁴独立行政法人国立病院機構大阪医療センター免疫感染症科、
⁵独立行政法人国立病院機構大阪医療センター薬剤科、
⁶国立国際医療センターエイズ治療研究開発センター、
⁷東京大学医科学研究所感染免疫内科、⁸東京都立駒込病院感染症内

東海ブロックにおける薬剤耐性HIVの調査研究 26

分担研究者： 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 客員研究員
研究協力者： 服部 純子¹、藤崎 誠一郎²、伊部 史朗²、重見 麗²、
伊藤 和代²、清水 香代子²、藤崎 彩恵子¹
¹財団法人エイズ予防財団、²国立病院機構名古屋医療センター

血中、唾液、毛髪中の抗HIV薬定量

LC-MSによる微量薬剤耐性変異ウイルスの定量 30

分担研究者： 加藤 真吾 慶應義塾大学医学部 微生物学免疫学教室 助教

耐性遺伝子高感度定量法の開発及び潜在的薬剤耐性発掘調査 34

分担研究者： 仲宗根 正 国立感染症研究所 エイズ研究センター 第1研究グループ 主任研究官
協力研究者： 杉浦 互¹、西澤 雅子¹、Sarah Palmer²、Siriphan Saeng-aroon³
¹国立感染症研究所・エイズ研究センター、²米国NCI、³タイ国NIH

横浜および近郊における薬剤耐性HIVの調査研究

神奈川県域におけるHIV/AIDS診療の現状と、新規感染患者の受診状況

一県域有床医療機関を対象としたアンケート調査、及び平成19年当院受診の

新規感染患者のBEDアッセイ 36

分担研究者： 石ヶ坪 良明 横浜市立大学大学院医学研究科 病態制御免疫内科 教授
研究協力者： 上田 敦久 横浜市立大学附属病院 リウマチ血液感染症内科

東北ブロックにおける薬剤耐性HIVの調査研究 40

分担研究者： 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
研究協力者： 佐々木 悟 仙台医療センター

ACCにおける薬剤耐性HIVの調査研究 44

分担研究者： 湯永 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

北海道ブロックにおける薬剤耐性HIVの調査研究	48
分担研究者：小池 隆夫 北海道大学大学院医学研究科 病態内科学講座第2内科 教授 研究協力者：千葉 仁志、吉田 繁 北海道大学医学部保健学科検査技術科学専攻	
本邦感染者由来薬剤耐性ウイルス感染性分子クローンパネル整備 薬剤耐性ウイルス由来感染性クローンによるHIV薬剤耐性検査の標準化	50
分担研究者：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	
多剤耐性HIVの調査研究	54
分担研究者：藤井 毅 東京大学医科学研究所 先端医療研究センター・感染症分野 講師 研究協力者：宮崎 菜穂子 国立感染症研究所エイズ研究センターリサーチレジデント	
近畿ブロックにおける薬剤耐性HIVの調査研究	56
分担研究者：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 研究協力者：渡邊 大 ¹ 、上平 朝子 ¹ 、山本 信夫 ² 、新田 幸一 ² 、管尾 龍彦 ² 、佐子 肇 ² 、 常松 裕子 ² 、溝上 泰司 ² 、松永 加奈江 ² 、真能 正幸 ² 、古金 秀樹 ³ 、吉野 宗宏 ⁴ ¹ 大阪医療センター・免疫感染症科、 ² 大阪医療センター・臨床検査科、 ³ 大阪医療センター・HIV/AIDS先端医療開発センター、 ⁴ 大阪医療センター・薬剤科	
北陸ブロックにおける薬剤耐性HIVの調査研究	58
分担研究者：上田 幹夫 石川県立中央病院 血液免疫内科 診療部長 研究協力者：正兼 亜季 エイズ予防財団	
九州沖縄ブロックにおける薬剤耐性HIVの調査研究	60
分担研究者：南 留美 (独)国立病院機構九州医療センター 免疫感染症内科 医師 山本 政弘 国立病院機構九州医療センター	
関東甲信越ブロックにおける薬剤耐性HIVの調査研究	64
分担研究者：下条 文武 新潟大学大学院医歯学総合研究科 臨床感染制御学分野 教授	
東京および近郊における薬剤耐性HIVの調査研究 2007年に東京都内保健所等検査で検出されたHIV-1のProteaseおよび Reverse Transcriptase遺伝子の解析	70
分担研究者：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 研究協力者：長島 真美、新開 敬行、尾形 和恵、吉田 靖子、矢野 一好、上野 泰弘 東京都健康安全室感染症対策課	
多剤耐性HIV治療の最適化研究	74
分担研究者：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	

大阪府および近郊における薬剤耐性HIVの調査研究	78
分担研究者：森 治代 大阪府立公衆衛生研究所 ウイルス課 主任研究員	
研究協力者：小島 洋子、川畑 拓也 大阪府立公衆衛生研究所ウイルス課	
神奈川県における薬剤耐性HIVの調査研究	82
分担研究者：近藤 真規子 神奈川県衛生研究所 微生物部 主任研究員	
研究協力者：相楽 裕子 ¹ 、岩室 紳也 ² 、今井 光信 ³	
¹ 横浜市立市民病院、 ² 厚木市立病院、 ³ 神奈川県衛生研究所	
千葉県および近郊における薬剤耐性HIVの調査研究	86
分担研究者：佐藤 武幸 千葉大学医学部附属病院 感染症管理治療部 准教授	
沖縄における薬剤耐性HIVの調査研究	90
分担研究者：健山 正男 琉球大学大学院医学研究科 感染症制御学講座	
分子病態感染症学分野 准教授	
研究協力者：比嘉 太、原永 修作、田里 犬輔、仲村 秀太、前城 達次、	
山城 剛、宮城 京子、日比谷 健司、藤田 次郎	
中国四国ブロックにおける薬剤耐性HIVの調査研究	
—無治療状態でHIVの薬剤耐性遺伝子変異は変化するか—	94
分担研究者：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	
研究協力者：高田 昇 ¹ 、藤井 輝久 ¹ 、齊藤 誠司 ²	
¹ 広島大学病院輸血部、 ² 広島大学病院エイズ医療対策室	
首都圏および近郊における薬剤耐性HIVの調査研究	98
分担研究者：原 孝 茨城県衛生研究所 遺伝子科学部 部長	
研究協力者：増子 京子 ¹ 、大石 毅 ² 、千野根 純子 ³ 、片岡 俊輔 ⁴ 、山上 隆也 ⁵ 、	
畦上 由佳 ⁶	
¹ 茨城県衛生研究所微生物部、 ² 東京医科大学霞ヶ浦病院感染症科、	
³ 栃木県保健環境センター微生物部、 ⁴ 宇都宮市衛生環境試験所微生物担当	
⁵ 山梨県衛生公害研究所微生物部、 ⁶ 長野県環境保全研究所保健衛生部	
研究成果の刊行に関する一覧	101

1. 総括研究報告書



薬剤耐性HIVの動向把握のための調査体制確立およびその対策に関する研究

主任研究者 杉浦 亙 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

分担協力者 桑原 健¹、加藤 真吾²、仲宗根 正³、石ヶ坪 良明⁴、伊藤 俊広⁵、
瀧永 博之⁶、金田 次弘⁷、小池 隆夫⁸、巽 正志⁹、藤井 毅¹⁰、
白阪 琢磨¹¹、福武 勝幸¹²、上田 幹夫¹³、南 留美¹⁴、下条 文武¹⁵、
貞升 健志¹⁶、森 治代¹⁷、松下 修三¹⁸、近藤 真規子¹⁹、佐藤 武幸²⁰、
健山 正男²¹、木村 昭郎²²、原 孝²³

¹ (独) 国立病院機構大阪医療センター薬剤科

² 慶應義塾大学医学部微生物免疫学教室

³ 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

⁴ 横浜市立大学医学部医学部

⁵ (独) 国立病院機構仙台医療センター血液内科

⁶ 国立国際医療センター エイズ治療研究開発センター

⁷ (独) 国立病院機構名古屋医療センター臨床研究センター

⁸ 北海道大学大学院医学研究科病態制御学講座

⁹ 国立感染症研究所エイズ研究センター第2室

¹⁰ 東京大学医科学研究所 先端医療研究センター

¹¹ (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

¹² 東京医科大学医学部臨床検査医学科

¹³ 石川県立中央病院 血液病治療部

¹⁴ (独) 国立病院機構九州医療センター感染症対策室

¹⁵ 新潟大学医歯学総合病院第2内科

¹⁶ 東京都健康安全研究センター微生物部

¹⁷ 大阪府立公衆衛生研究所ウイルス科

¹⁸ 熊本大学エイズ学研究センター病態制御分野

¹⁹ 神奈川県衛生研究所微生物部

²⁰ 千葉大学医学部附属病院感染症管理治療部

²¹ 琉球大学大学院医学研究科感染病態制御学講座

²² 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

²³ 茨城県衛生研究所

研究要旨

多剤併用療法は標準的なHIV/AIDS治療法として定着しHIV感染者の予後を大きく改善した。しかしその一方では治療薬剤による薬剤耐性HIVの誘導が治療を進める上での大きな障害となっている。また先進諸国では薬剤耐性ウイルスによる新たな感染が広がりつつあり、その頻度は新規診断症例の10～15%に達するとされている。我が国でも2003年から2005年の調査で新規HIV/AIDS診断症例の約5%に薬剤耐性変異が確認されている。本研究班では我が国における薬剤耐性HIVの発生動向把握とその増加を抑制することを目的とし、以下4項目の研究に取り組んだ。

(1) 薬剤耐性調査研究：新規診断および既治療HIV/AIDS症例における薬剤耐性HIVの発生動向の把握を行った。新規感染症例508例を捕捉し、39例(7.7%)薬剤耐性変異を認めた。多剤耐性症例を把握するためにアンケート調査を行った。

(2) 薬剤耐性HIV発生機序に関する研究：感染時期を推測するためにBEDアッセイを実施した。また潜在的な薬剤耐性の検出のための技術開発に取り組んだ。

(3) 薬剤耐性検査の質的管理：本邦における薬剤耐性HIV検査の外部精度管理と検査標準化作業を進めている。

(4) 薬剤血中濃度測定研究：平成19年度までに6749件のHPへのアクセスがあり、また482件の血中濃度測定検査が行われた。平成19年11月に新たに承認された新しいプロテアーゼ阻害剤ダルナビルの血中濃度測定法を開発した。

A. 研究目的

本研究班は我が国における薬剤耐性HIVの発生動向の把握とその増加を抑制するために必要な対応を明確にすることを目的とし、その達成のために以下4項目の研究に取り組む。

(1) 薬剤耐性調査研究：

これは本邦における新規HIV/AIDS診断症例および既治療症例における薬剤耐性HIVの発生動向の把握と調査体制確立を目標とする研究で、薬剤耐性HIVの現状を正確に把握するために必要である。

(2) 薬剤耐性HIV発生機序の解析研究：

これは薬剤耐性HIVの伝播形式などの解明を目標とする研究で、調査情報の質を高め、疫学状況の理解を深めるために必要である。

(3) 薬剤耐性検査の質的管理：

これは薬剤耐性HIV検査の外部精度管理と検査標準化を目標とする研究で、全国同質の薬剤検査の実施を実現するために必要な研究である。

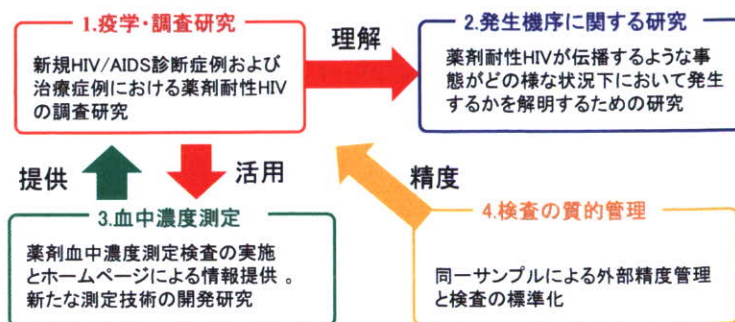
(4) 薬剤血中濃度測定研究：

薬剤血中濃度測定研究：これは薬剤耐性血中濃度測定検査の提供と情報発信を目標とする研究で、適切な抗HIV療法の実践のために必要な研究である。

B. 研究方法

研究全期間を通じて協力施設を増やし調査対象の拡大を目指し国内を網羅する調査ネットワークの完成を目指していく。研究協力は分担研究者の推薦・紹介を通じて募っていくほかに研究班のホームページを開設し、調査情報の発信と協力受付等を行う。また収集する疫学情報の質と量をあげてより詳細な実態の把握を目指していく。

目的を達成するために以下の4テーマについて取り組む



研究実施体制

(1) 薬剤耐性調査研究：

新規診断症例の捕捉とその薬剤耐性検査およびサブタイピングを実施する。薬剤耐性検査については従来のプロテアーゼと逆転写酵素領域に加えて、新薬の標的であるインテグラーゼ領域の解析についても一部の施設で実施する。遺伝子解析方法は参加施設毎に若干の相違があるが、いずれの施設も平成17・18年の2回のヴァリデーションに参加し、その精度が担保された方法を用いている。治療を受けている症例の薬剤耐性に関しては平成19年度に実施した予備調査に基づき、リストアップされた多剤耐性症例についてより詳細な情報を入手し、多剤耐性にいたる背景、臨床経過、遺伝子配列の変化について解析を進めていく。新規診断症例、耐性症例ともに収集した遺伝子情報を管理するデータベースを完成させる。

(2) 薬剤耐性HIV発生機序の解析研究：

HIV感染症は感染成立時に特徴的な自覚兆候がないため感染時期の特定が困難な疾患である。しかし現在発生している新たな感染の状況を理解するには感染時期の特定・推測とその情報が必須である。本研究班では米国CDCが開発した血清中のHIV特異的IgGの総量から感染時期を推測するBEDアッセイを調査のルーチン検査項目として実施し、捕捉した新規診断症例を最近感染した症例とそれ以前の慢性感染症例に分類して比較する。研究班では受診した医療機関で診断の確定した症例を主に調査対象として解析しているが、一部施設では医療機関に到達するより早い確認検査で陽性となった検体を対象に薬剤耐性の調査を実施している。これら二つのラインでの検体の相違を比較・考察し新たな感染の動向に迫りたい。また通常の薬剤耐性検査法では検出できない、潜在する薬剤耐性ウイルスの検出法を定量PCR等を基盤に開発を進めており、将来調査項目に加えていくことを検討している。

(3) 薬剤耐性検査の質的管理：

平成19年度に研究班実用校正サンプルとして作製した感染性クロンを薬剤耐性検査実施機関に送付し、其々の施設毎のプロトコルに則って薬剤耐性遺伝子検査を実施してもらう。その結果を元にプロテアーゼ、逆転写酵素、インテグラーゼ各領域の研究班推奨基準測定法の作成を進める。

(4) 薬剤血中濃度測定研究：

ホームページを介しての検査受付と情報発信を行う。さらに研究班で提案された非侵襲且つアドヒアランスを客観的に評価する毛髪検査、唾液による血

中濃度の推定などの新たな技術開発をさらに進める。

(倫理面への配慮)

薬剤耐性調査研究では全ての検体が匿名化されるため、万が一の情報漏えいの事態においても個人情報の流出は起こりえない。また実施に当たっては疫学研究に関する倫理指針（平成19年8月16日改定）で定めた倫理規定等を遵守すると共に必要に応じて施設ごとの倫理委員会の承認を得るものとする。薬剤耐性HIVの発生機序に関する研究では実施にあたり臨床研究に関する倫理指針（平成16年厚生労働省告示第459号）で定めた倫理規定等を遵守するとともに、必要に応じて施設ごとの倫理委員会の承認を得るものとする。

C. 研究結果

研究班一年目として以下の成果を挙げた。

(1) 薬剤耐性調査研究：

平成19年は本報告書の執筆時点で新規感染症例508例を捕捉し、その薬剤耐性検査を実施した。補足した症例のプロファイルは性別（男：488例、女：20例）、感染経路（同性間：386例、異性間：55例、同異性間：5例、IVDU：1例、不明：37例）、サブタイプ（B：452例、AE：29例、C：12例、AG：3例、A：83例、その他：4例）であった。薬剤耐性変異に関しては全体39例（7.7%）、NRTI：24例（4.7%）、NNRTI：4例（0.8%）、PI：13例（2.6%）であった。感染経路別に見てみると同性間で29例（7.5%）、異性間では8例（10.3%）と頻度としては異性間のほうは高い値を示した。治療症例の薬剤耐性に関しては平成20年度に予定をしている本調査の準備として、拠点病院における抗HIV療法と薬剤関連アンケート調査を実施した。その結果合計133例の薬剤耐性症例が報告された。またこれとは別にHIV/AIDS治療患者の多い医療機関25施設に対してアンケートによる予備調査を実施した。その結果16施設より回答があり、多剤耐性症例40例が報告された。

(2) 薬剤耐性HIV発生機序の解析研究：

BEDアッセイを実施した症例では30%前後の症例がBED陽性と判定された。確認検査陽性検体161例について薬剤耐性の調査では16例（9.9%）に耐性変異が認められた。潜在する薬剤耐性ウイルスを検出するために定量PCR等を応用した検出法の開発を代表的なNRTI耐性変異であるD67N, K70R, M184Vについて行った。新たな方法としてLC-MS

を用いた微小集団の検出法を開発した。RT : K103N, M184V, T215Y, PR:L90M 其々の変異について作成し、0.1~1%程度の微小集団の検出に成功した。

(3) 薬剤耐性検査の質的管理 :

薬剤耐性を獲得した患者分離 HIV 株を元にサブタイプ B と CRF_01AE それぞれの全長感染性クローンを作製し、薬剤耐性遺伝子検査の研究班実用校正サンプル候補とした。インテグラーゼ領域の遺伝子検

査法についての検討を開始しサブタイプ B:104 例、CRF01_AE:37 例の解析を行った。

(4) 薬剤血中濃度測定研究 :

平成 19 年度までに 6749 件の HP へのアクセスがあり、また 482 件の血中濃度測定検査が行われた。平成 19 年 11 月に新たに承認された新しいプロテアーゼ阻害剤ダルナビル/リトナビル合剤のソフトカプセルから錠剤への剤型変更に伴う血中濃度と副作用及ぼす影

新規診断症例のプロファイルの推移 (2003-2007)

	2003-2006 (n = 1,437)	2003 (n = 267)	2004 (n = 308)	2005 (n = 430)	2006 (n = 432)	2007 (n = 508)
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)	20(3.8)
Race:						
Japanese	1287(89.6%)	227(85.0)	281(91.2)	387(90.0)	392(90.7)	450(88.8)
Others	150(10.4%)	40(15.0)	27(8.8)	43(10.0)	40(9.3)	55(10.8)
Risk factor:						
MSM	1005(69.9%)	186(69.7)	206(66.9)	323(75.1)	290(67.1)	386(76.1)
Hetero	304(21.2%)	65(24.3)	75(24.4)	67(15.6)	97(22.4)	78(15.4)
IVDU	8(0.6%)	1(0.4)	1(0.3)	3(0.7)	3(0.7)	1(0.2)
MTCT	3(0.2%)	1(0.4)	1(0.3)	0(0.0)	1(0.2)	0(0.0)
Others	1(0.1%)	1(0.4)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	5(1.0)
Unknown	116(8.1%)	13(4.9)	25(8.1)	37(7.6)	41(9.5)	37(7.3)

2007 年の新規診断症例の感染経路別プロファイル

	全体 n=507	同性間 n=386	異性間 n=78
Sex			
M	487 (96.1%)	386 (100.0%)	61 (78.2%)
F	20 (3.9%)	0 (0.0%)	17 (21.8%)
Subtype			
B	452 (89.2%)	376 (97.4%)	38 (48.7%)
AE	29 (5.7%)	5 (1.3%)	22 (28.2%)
C	12 (2.4%)	1 (0.3%)	9 (11.5%)
AG	8 (1.6%)	3 (0.8%)	2 (2.6%)
F	1 (0.2%)	0 (0.0%)	1 (1.3%)
G	3 (0.6%)	0 (0.0%)	3 (3.8%)
G			1 1.3%
Nationality			
Japanese	450 (88.8%)	358 (92.7%)	54 (69.2%)
Others	55 (10.8%)	28 (7.3%)	24 (30.8%)
UN	2 (0.4%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)

調査対象症例における薬剤耐性症例の頻度 (2003-2007)

観察される耐性変異の頻度は高まりつつある

	2003-2006 (n = 1398)	2003 (n = 267)	2004 (n = 307)	2005 (n = 427)	2006 (n = 395)	2007 (n = 507)
Any	69 (4.9%)	12 (4.5%)	13 (4.2%)	19 (4.5%)	25 (6.3%)	39 (7.7%)
PI	17 (1.2%)	3 (1.1%)	1 (0.3%)	7 (1.6%)	6 (1.5%)	13 (2.6%)
NRTI	45 (3.2%)	8 (3.4%)	10 (3.6%)	11 (2.6%)	16 (4.1%)	24 (4.7%)
NNRTI	11 (0.8%)	1 (0.4%)	3 (1.0%)	4 (0.9%)	3 (0.8%)	4 (0.8%)

響について検討を行った結果、ソフトカプセル投与群に比して錠剤投与群では薬剤のトラフ値が有意に低値を示した。しかしこれは薬効に影響するレベルではなく、むしろ錠剤への変更により冷所保存が不要になり、食事に関係無く服薬できるようになった点について好ましい返答が多く寄せられた。

D. 考察

欧米各国では新規HIV/AIDS診断症例の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。わが国では平成15年から新規HIV/AIDS診断症例における薬剤耐性変異の全国調査を実施しており、平成15年から17年までは例年5%前後で推移してきた。その後、平成18年度の調査では6.3%と若干増加傾向がみられたことから、翌平成19年の頻度が上向きか下向きか気がかりであった。平成19年度より開始した本研究班では前述の調査を基盤に平成19年の新規HIV/AIDS診断症例について調査を行ったが、その結果、7.7%という平成18年度を上回る頻度で薬剤耐性変異を獲得した症例が確認された。感染経路別に頻度をみると同性間：7.5%に対し異性間：10.3%であった。本抄録執筆時は2007年中途のデータであり、まだ最終的な結論ではないが、薬剤耐性HIVの拡散の兆し、それも異性間の性交渉において増加が見受けられ、今後の薬剤耐性HIVの動向にさらに注意する必要があると考えられる。今後BEDアッセイや確認検査陽性検体の結果等の新たな情報を加味して、薬剤耐性HIVの拡散の実態を理解し、適切な対策を取ることが重要であると思われる。治療中のHIV/AIDS症例における薬剤耐性HIVの状況は平成17年度以降調査が途絶えており、本研究班で改めてその実態把握を目指している。治療症例における薬剤耐性の状況把握は新規診断症例における薬剤耐性の動向の理解に必要な情報であるだけでなく、新薬が承認された際に、その需要をはかり、また適切な使用を進めるために重要な情報と考えられる。本年度はアンケートによる予備調査を実施したが、40～120名の薬剤耐性症例が確認された。すべての施設からの回答ではないことから、この数値は実態より低く見積もられていると思われる。近年の治療の進歩により一時期より薬剤耐性による治療困難症例は減少したとはいうものの、2桁以上の症例が薬剤耐性HIVによる治療困難に直面しており、依然として深刻な問題であることが明らかになった。薬剤耐性HIV発生機序の解析研究で進めているBEDアッセイは擬陽性が多いことが知られており、そのデータの解釈に当たっては患者の情報などを合わせて行

うことが必要である。確認検査検体については、本研究班で収集している症例とは異なる集団であるが、両集団を比較することにより、HIV感染の状況についての考察が可能であると考えている。

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、2007年に新規にHIV/AIDS診断がなされた300例について解析を行った。その結果、7.7%に薬剤耐性HIVが確認された。平成15年～18年の同頻度と比較すると明らかに高くなっており、今後の動向監視が重要であると考えられる。治療中の症例における薬剤耐性の状況についてアンケートによる予備調査を実施した。BEDアッセイを正式に研究班の調査項目として取り上げ、データの収集を進めている。薬剤耐性検査の研究班実用校正サンプルを作成した。合計482例の薬剤血中濃度測定検査の実施と情報発信を行った。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

各分担研究者の頁参照

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

該当なし

II. 分担研究報告書



研究要旨

薬剤耐性HIV発生機序に関する研究

感染研における薬剤耐性検査と新規診断症例の疫学調査および関連する基礎的研究

分担研究者 杉浦 亙 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 鈴木 寿子¹、柿澤 淳子¹、柴田 潤子¹、
吉田 いづみ²、石川 喜也²

¹国立感染症研究所エイズ研究センター、²東京医科歯科大学

2007年に新たにHIV/AIDSと診断された30例を対象に薬剤耐性検査、サブタイプピン
グ、BEDアッセイを実施した。また関連する基礎的研究にも取り組み、Gag-protease
の相互作用、インテグラーゼ遺伝子の多様性解析、CRF01_AEプロテアーゼの結晶構造
解析に取り組んだ

A. 研究目的

(i) 薬剤耐性遺伝子検査の実施および新規診断症例 における薬剤耐性HIVの疫学調査研究

我々は平成8年度より適切な抗HIV-1治療実現のための支援事業として、薬剤耐性HIV-1検査を実施している。薬剤耐性遺伝子検査の結果は約3週間で主治医に報告され、治療薬剤選択の指標として活用されている。平成18年度からは薬剤耐性遺伝子検査が保険収載されたため、検査は民間の検査会社にゆだねられることになったが、その後も精査を目的とするもの、経済的な理由により検査が困難なものについては不足なく薬剤耐性検査を供給するために随時検査を受け付けている。

近年HIV/AIDSに新たに感染し、治療前にもかかわらず既に薬剤耐性を獲得している症例が世界各国で報告されており、その頻度は10-20%ともいわれている。日本では新規HIV感染者数およびエイズ患者数報告数が年々記録を更新する勢いで増加しており、また治療を受けている患者数も増加を続けている。このことから本邦においても新規HIV/AIDS診断確定未治療患者への薬剤耐性HIVの拡大が大きな関心をもたれている。我が国の新規感染者における薬剤耐性HIVの動向を理解し予防啓発活動などに活用するために、平成15年度から本研究班において分

担研究者とともに全国調査を行っている。

(ii) 関連する基礎的研究

さらに我々は調査で得られた情報を理解する基盤として、以下の薬剤耐性に関連する基礎的研究に取り組んだ。

a. 抗HIV薬剤投与下におけるProteaseとGagの共進化に関する解析：

この研究は治療薬剤の投与がどの様にGagおよびproteaseの相互作用に影響し変異を誘導するのか理解し、主要な薬剤耐性以外に観察される諸々の変異の意義について理解することを目的とする。

b. インテグラーゼの多様性の解析：

我が国においても近い将来インテグラーゼ阻害剤が認可されると予想されるが、既存の治療薬への暴露がインテグラーゼにどの様に影響を及ぼしているか、更には将来のインテグラーゼ阻害剤治療に及ぼす影響について考察を行った。

c. HIV-1ウイルスCRF01_AEプロテアーゼの構造的、生化学的解析：

疫学調査より我が国ではサブタイプBに次いでCRF01_AEによる感染症例が多いことが知られているが、CRF01_AEプロテアーゼの構造と耐性獲得機序を理解するために結晶構造解析を行った。

B. 研究方法

(i) 薬剤耐性遺伝子検査の実施および新規診断症例における薬剤耐性HIVの疫学調査研究

感染症研究所エイズ研究センターに依頼のあった検体について、protease-RT領域の塩基配列解析を行った（薬剤耐性検査）また新規依頼された症例についてはenvC2V3領域の配列解析を行い、サブタイプを決定した。また全症例を対象に感染時期を推測するためにBEDアッセイを実施した。

(ii) 関連する基礎的研究

a. 抗HIV薬剤投与下におけるProteaseとGagの共進化に関する解析（図1）

- ①抗HIV薬剤治療を受けた1症例（HIVサブタイプB）より経時的に血漿サンプルを採取し、HIV-1 RNAを抽出後、Single Genome Sequencing法（Palmer, 2005）を用いてGag-PR-Reverse transcriptase領域（約3Kb）のクローニングを行った。
- ②得られた配列データは共進化解析プログラムCoMap（Dutheil, 2005）により解析した。
- ③検出された共進化サイトについてはその獲得意義をリコンビナント・ウイルスを作成し、*in vitro*での実証を試みた。

b. インテグラーゼの多様性の解析

- ①対象検体は1998～2006年に当施設において薬剤耐性遺伝子検査を実施した症例より、RTおよびPR阻害剤、耐性、獲得症例あるいは未治療、新規、診断症例を無作為に選択した。
- ②未治療症例はサブタイプB40例、サブタイプAE8例について、薬剤耐性症例はサブタイプB64例、サブタイプAE29例について解析を行った。
- ③解析方法は患者血漿200 μ lよりHIV-RNAを抽出し、PR-RT領域（1.3Kbps）およびインテグラーゼ領域（0.9Kbps）をnested PCRにより増幅した。次にそれらの増幅産物はオートシーケンサー（ABI-3730）で解析を行った。

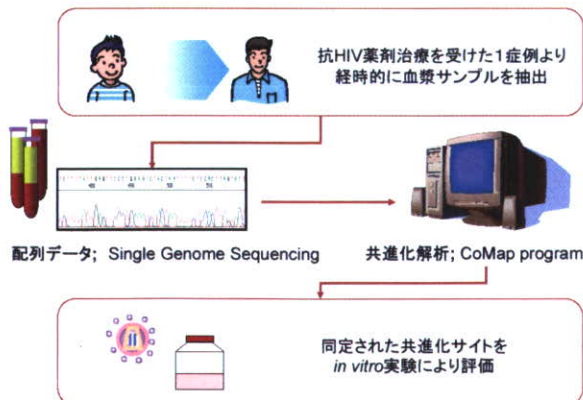


図1 抗HIV薬剤投与におけるProteaseとGagの共進化に関する解析研究の流れ

c. CRF01_AEプロテアーゼの構造学的、生化学的解析

- ①HXB2およびNH1プロテアーゼいずれもD25Nの変異を入れて酵素活性を失活させたもの、CRF01_AEの患者分離株のプロテアーゼについてWT+Q7K, WT+N88S+Q7K, WT+N88S+L10F+K20I+K41R+M46I+I64V+T74S+I93L+Q7Kの3種類をpET11a発現用ベクターに組み込み、大腸菌で産生させた。大腸菌を回収後インクルージョンボディを酢酸で可溶化、ゲル濾過により分離精製した。精製したプロテアーゼについてはp1-p6のペプチドをもしくはプロテアーゼ阻害剤を添加してリフォルディング～透析～FPLCによる精製をした後、結晶化しX線結晶解析した。さらに、プロテアーゼと基質との結合性をカロリメトリーで測定し、基質を用いて酵素活性を確認し、プロテアーゼインヒビターによる阻害をみた。

C. 研究結果

(i) 薬剤耐性遺伝子検査の実施および新規診断症例における薬剤耐性HIVの疫学調査研究

平成17年度は合計242検体に薬剤耐性検査を実施した。このうち新規診断として登録されたものは30症例であった。このうち28例についてBEDアッセイを実施したが、その結果をもとに「最近（150日以内）感染した症例」と、「そうでない（150日以降）症例」の2群に分け、比較を行った。表1に示すよう「150日以内」の14症例は全例男であり、13例（93%）が同性間性的接触で感染した症例であった。これに対し、「150日以降」ではほとんどが男性であるものの、感染経路は異性間性的接触のものが6例（43%）見られた。サブタイプにも両群では明確な違いがあり、「150日以内」では前例サブタイプBであったのに対し「150日以降」ではAEが3例、それ以外のものが1例認められた。薬剤耐性変異の頻度については母数が少ないために明確な結論は言えないが、「150日以内」3例（21%）「150日以降」2例（14.3%）で有意な差は認められなかった。

表1 感染研で実施した新規診断症例のプロファイル

	BED	
	recent n=14	not recent n=14
Sex		
M	14	13
F	0	1
Risk factor		
homo	13	7
hetero	1	6
unknown	0	1
Subtype		
B	14	10
AE	0	3
others	0	1
Drug resistance		
protease	3	2
	M46I 1	L90M 1
RT	T115F 1	T115F 1
	T215S 1	

(ii) 関連する基礎的研究

a. 抗HIV薬剤投与下におけるProtease(PR)とGagの共進化に関する解析

5年間の観察期間中8時点、合計132クローンの遺伝子配列解析を行った(図2)。その結果、GagとPR両者ともに複数の分子内・間共進化サイトが同定された。同定されたサイトの中でPRのE35Dはnelfinavir耐性変異サイトであるPRのD30N、N88Dと分子内共進化し、且つGagの切断点近傍に位置するP453Lと分子間共進化することが明らかになった(図3)。共進化サイトの有意性について*in vitro*の実験系にて確認するため、P453L、D30N、E35D、N88Dを様々な組み合わせでHXB2/sotorushiに導入したHIV-1クローンを構築し、増殖動態を比較した。その結果、P453L、D30N、E35D、N88Dをもつウイルスクローンは他のクローンに比べ、明らかに高い増殖能力を示した(図4)。

b. インテグラーゼの多様性の解析

サブタイプBにおけるインテグラーゼの変異分布では薬剤耐性症例のほうが未治療症例に比べ変異の集積が多く、特に変異数が16箇所以上の症例数をみると薬剤耐性症例の方が未治療症例よりも多く、且つ変異の集積が高い傾向が認められた。CRF_01AEにおいても同様の傾向が認められた(図5)。米国で認可された世界で最初のインテグラーゼ阻害剤ラル

テグラビル耐性変異の有無について見てみたが、薬剤耐性症例64例中2例にE157Qの変異が観察された。この変異はラルテグラビル耐性変異とされているが、スタンフォード大学の薬剤耐性データベースではスコアが2で、単独での耐性への寄与は弱いものであった。その他これまでに報告されているその他のジケト酸に対する変異のうち、V72I、M154I、V165I、V201Iが観察された(表2)。これらの変異が、実際にラルテグラビルが投与されたときにどの様に耐性獲得に影響を及ぼすかは未だ明確でない。

c. HIV-1 ウイルスCRF01_AEとサブタイプBのプロテアーゼの構造学的、生化学的解析

基質であるp1-p6ペプチドと結晶化した不活化AE(NH1株)プロテアーゼでは、35番目のアスパラギン酸と20番目のアルギニンの上に水素結合が見られたが、p1-p6ペプチドと結晶化した不活化B(HXB2

表2 サブタイプB薬剤耐性64症例に見るインテグラーゼ阻害剤ラテグラビル耐性変異の有無

	変異部位	薬剤耐性症例 (n=64)	未治療症例 (n=40)
ラルテグラビル	E157Q	2	0
	E92Q,E138A/K,G140A/S	0	0
	Q148H/R,K,N155H	0	0
論文で紹介されている他のdiketo acidに対する耐性変異	V72I	44	26
	M154I	3	0
	V165I	0	2
	V201I	27	16

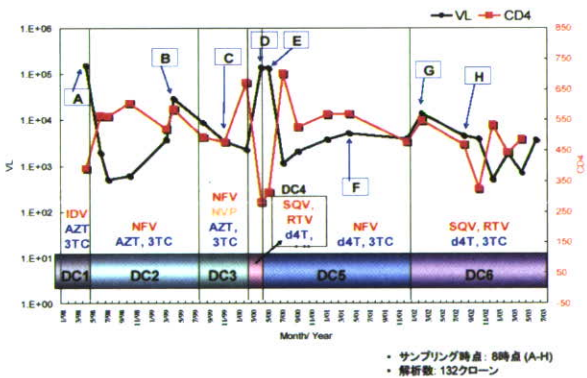


図2 解析対象サンプルの臨床経過

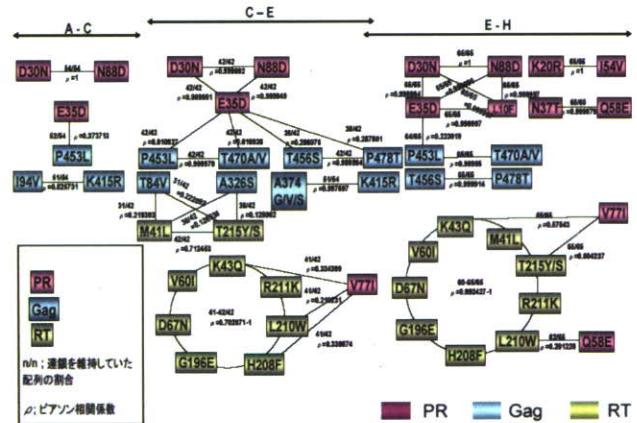


図3 CoMap解析により複数の分子内、分子間の共進化サイトが検出された

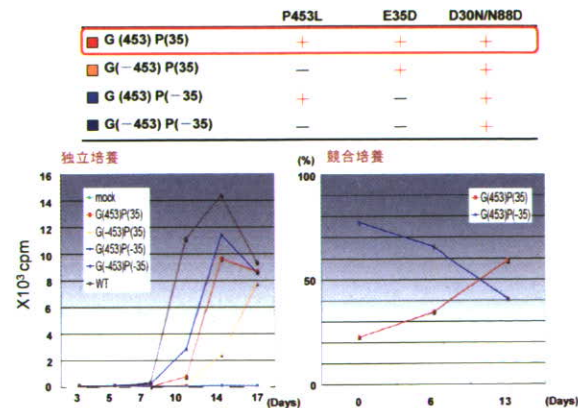


図4 P453L、E35D、D30N、N88Dを同時に持つことが増殖に有利である

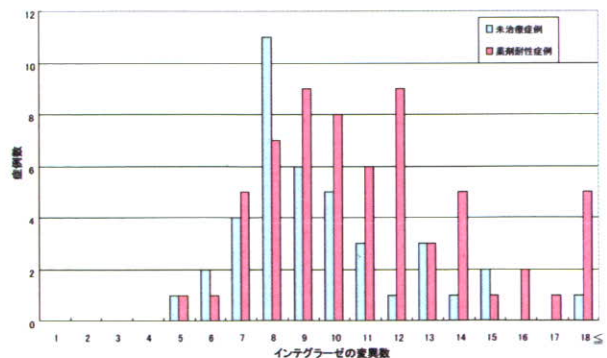


図5 サブタイプBの薬剤耐性症例は、未治療症例よりもインテグラーゼ変異の集積が高い

株)ではこの結合は観察されなかった(図6)。基質 p1-p6の結合状況を見ると、サブサイトP3-P3'では、AE (NH1株)のプロテアーゼと基質p1-p6との水素結合数はB (HXB2株)より多かった(図7)。

一方活性型プロテアーゼではnelfinavirとdalunavirそれぞれを結合させた状態での結晶化を試みたが、AE (NH1株)プロテアーゼはB (HXB2株)より、両者に対して結合しにくい傾向が観察された。AE (NH1株)プロテアーゼの酵素額の解析ではN88Sを含むAE臨床症例由来のプロテアーゼは、nelfinavirに明らかに耐性を示したがdalunavirには感受性を示した。

D. 考察・E. 結論

(i) 薬剤耐性遺伝子検査の実施および新規診断症例における薬剤耐性HIVの疫学調査研究

我々が解析した2007年10月までの新規診断症例数は30例と多くないため、研究班全体のデータを取りまとめるまでは明確なことは言えないが、我々のところでの解析結果を見る限り、最近我が国において感染が拡大しているのは男性の同性間性的接触であり、流行しているのは依然サブタイプBと思われる。

(ii) 関連する基礎的研究

基礎的研究では疫学調査で得られた情報解析につながる研究を中心に実施した。

取り組んだ抗HIV薬剤投与下におけるProtease

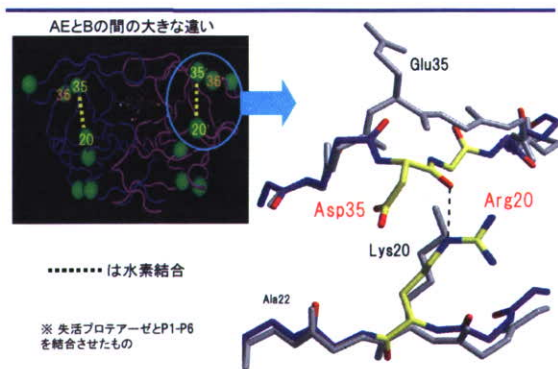


図6 AEではAsp35とArg20間に水素結合が見られた

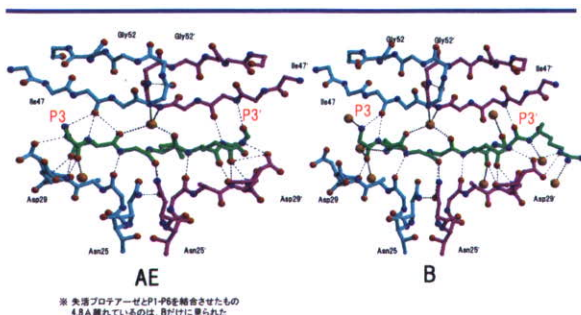


図7 サブサイトP3-P3'間ではAEの方がBよりも基質p1-p6との水素結合数が多い

(PR)とGagの共進化に関する解析研究ではgagとpolの相互干渉が明確に示されたが、この情報の臨牀的な意義については必ずしも明確ではなく、次年度以降に取り組む課題としたい。

間もなくインテグラーゼ阻害剤が認可されるが、その受け入れ準備として、インテグラーゼ領域を対象にした遺伝子配列解析を行った。興味深いことに逆転写酵素やプロテアーゼ阻害剤の投与を受けていた見地ではインテグラーゼ領域に多数の変異が観察された。こんごこれら集積する変異がインテグラーゼ阻害剤の効果にどの様に影響してくるのかの研究が必要だと考えられる。また、薬剤耐性を理解する上で構造学的な視点は必須であり、前述した抗HIV薬剤投与下におけるProtease (PR)とGagの共進化に関する解析研究においても構造学的なアプローチを加えていきたい。

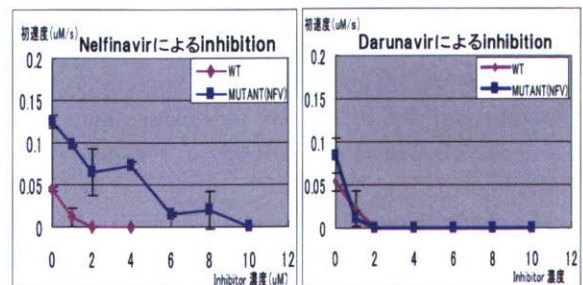
F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. H Suzuki, M Fujino, M Matsuda, H Yan, Y Iwatani, W Sugiura.: Effects of Protease and reverse transcriptase inhibitor-resistance mutations on integrase polymorphism in multidrug resistance cases. Antiviral Therapy. 12(1):S4, 2007
2. J Shibata, F Ren, M Nishizawa, M Fujino, Y Iwatani, M Matsuda, H Miura, H Tanaka and W Sugiura.: Interference between Gag non-cleavage site mutation P453L and HIV-1 protease non-drug resistance mutation E35D. Antiviral Therapy. 12(1):S143, 2007
3. Okuma K, Tanaka R, Ogura T, Ito M, Kumakura S, Yanaka M, Nishizawa M, Sugiura W, Yamamoto N, Tanaka Y.: Interleukin-4-Transgenic hu-PBL-SCID Mice: A Model for the Screening of Antiviral Drugs and Immunotherapeutic Agents against X4 HIV-1 Viruses. J Infect Dis. Jan 1;197(1):134-41, 2008
4. Saeng-Aroon S, Yoshida LM, Ariyoshi K, Taguchi



MUTANT= 88S+その他変異 mt

図8 N88Sを含む変異を持つAEプロテアーゼはNelfinavir耐性を示したが、Darunavirには感受性を示した

- M, Pathipvanich P, Rojanawiwat A, Matsuda M, Kannagi M, Sawanpanyalert P, Sugiura W, Auwanit W.: An Efficient Tool for Surveying CRF01_AE HIV Type 1 Resistance in Thailand to Combined Stavudine-Lamivudine-Nevirapine Treatment: Mutagenically Separated PCR Targeting M184I/V. *AIDS Res Hum Retroviruses*. Dec;23(12):1461-8, 2007
5. Satoh E, Li XK, Hara Y, Ogata K, Guo L, Kitazawa Y, Funeshima-Fuji N, Satoh T, Miyagi T, Sugiura W, Yamamoto N, Teramoto K, Arii S, Kimura H.: Sensitization to enhanced green fluorescence protein minor histocompatibility antigen by gene transduction into dendritic cells and peritoneal exudate macrophages. *Transpl Immunol*. Nov;18(2):73-84, 2007
 6. Iwatani Y, Chan DS, Wang F, Maynard KS, Sugiura W, Gronenborn AM, Rouzina I, Williams MC, Musier-Forsyth K, Levin JG.: Deaminase-independent inhibition of HIV-1 reverse transcription by APOBEC3G. *Nucleic Acids Res*. 35(21):7096-108, 2007
 7. Seiichiro Fujisaki, Saeko Fujisaki, Shiro Ibe, Tsukasa Asagi, Toshihiro Itoh, Shigeru Yoshida, Takao Koike, Masayasu Oie, Makiko Kondo, Kenji Sadamasu, Mami Nagashima, Hiroyuki Gatanaga, Masakazu Matsuda, Mikio Ueda, Aki Masakane, Mami Hata, Yasushi Mizogami, Haruyo Mori, Rumi Minami, Kiyomi Okada, Kanako Watanabe, Takuma Shirasaka, Shinichi Oka, Wataru Sugiura and Tsuguhiro Kaneda.: Performance and Quality Assurance of Genotypic Drug-Resistance Testing for Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.*,60:113-117, 2007
 8. Ode H, Matsuyama S, Hata M, Hoshino T, Kakizawa J, Sugiura W.: Mechanism of drug resistance due to N88S in CRF01_AE HIV-1 protease, analyzed by molecular dynamics simulations. *J Med Chem*. 19;50(8):1768-77, 2007
 9. Chiba-Mizutani T, Miura H, Matsuda M, Matsuda Z, Yokomaku Y, Miyauchi K, Nishizawa M, Yamamoto N, Sugiura W.: Use of new T-cell-based cell lines expressing two luciferase reporters for accurately evaluating susceptibility to anti-human immunodeficiency virus type 1 drugs. *J Clin Microbiol*. 45(2):477-87, 2007
 10. Makiko Hamatake, Masako Nishizawa, Naoki Yamamoto, Shingo Kato, Wataru Sugiura.: A simple competitive RT-PCR assay for quantitation of HIV-1 subtype B and non-BRNA in plasma. *J Virol Methods*. 142:113-7, 2007
 11. 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*, 75(1):75-82, 2007
 12. K.Furuya, M.Omura, S.Kudo, W. Sugiura, H. Azuma.: Recognition Profiles of microsporidian Encephalitozoon cuniculi polar tube protein 1 with human immunoglobulin M antibodies. *Parasite Immunology*. 30:13-21, 2008
 13. Mako Omura, Koji Furuya, Shinichi Kudo, Wataru Sugiura, Hiroshi Azuma.: Detecting Immunoglobulin M Antibodies against Microsporidian Encephalitozoon cuniculi Polar Tubes in Sera from Healthy and Human Immunodeficiency Virus-Infected Persons in Japan. *Clinical and Vaccine Immunology*. 14(2):168-172, 2007
 14. Afework Kassu, Masayuki Fujino, Masakazu Matsuda, Masako Nishizawa, Fusao Ota, Wataru Sugiura.: Molecular Epidemiology of HIV-1 in Treatment Naïve Patients in North Ethiopia, *AIDS Research and Human Retroviruses*, 23(4):564-568, 2007
 15. 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*. 7(3):382-90, 2007
 16. 今井光信、中瀬克己、小島弘敬、加藤真吾、杉浦 互、榊原 健、白阪琢磨：HIV検査および検査体制-技術の進歩と今後の課題-。第20回日本エイズ学会 シンポジウム記録。9(3):202-208,2007
 17. 松田昌和、杉浦 互：HIV薬剤耐性検査。モダンメディア別冊53(11):319-322, 2007
 18. 西澤雅子、杉浦 互：薬剤耐性HIVの抱える諸問題：Considerable Issues of Drug Resistance. *The Journal of AIDS Research*. 9(3):197-201,2007
 19. 杉浦 互：抗ウイルス薬耐性獲得のメカニズム-HIV。月刊薬事。49(11):31-36, 2007
 20. 岩谷靖雅、杉浦 互：DNAマイクロアレイ法。(増刊号)臨床と微生物。34:479-481, 2007
 21. 杉浦 互。薬剤耐性化と対策。薬剤耐性化。HIVの耐性化機序。日本臨床65増刊号2.487-492, 2007
 22. 杉浦 互：感染症の治療と薬剤耐性。生体防御

医学辞典. 朝倉書店. 66-71, 2007

23. 藤崎誠一郎、藤崎彩恵子、伊部史朗、浅黄 司、伊藤俊広、吉田 繁、小池隆夫、大家正泰、渡邊香奈子、正兼亜季、上田幹夫、湯永博之、松田昌和、貞升健志、長島真美、岡田清美、近藤真規子、奏 真美、溝上泰司、森 治代、南 留美、白阪琢磨、岡 慎一、杉浦 互、金田次弘：日本における HIV-1 遺伝子型薬剤耐性検査のコントロールサーベイ. 日本エイズ学会誌 (The Journal of AIDS Research). 9(2):136-146, 2007
- 2. 学会発表**
24. H Suzuki, M Fujino, M Matsuda, H Yan, Y Iwatani, W Sugiura: Effects of Protease and reverse transcriptase inhibitor-resistance mutations on integrase polymorphism in multidrug resistance cases. XVI International HIV Drug Resistance Workshop. Jun. 12-16, 2007, Barbados, West Indies.
 25. J Shibata, F Ren, M Nishizawa, M Fujino, Y Iwatani, M Matsuda, H Miura, H Tanaka and W Sugiura: Interference between Gag non-cleavage site mutation P453L and HIV-1 protease non-drug resistance mutation E35D. XVI International HIV Drug Resistance Workshop. Jun. 12-16, 2007, Barbados, West Indies.
 26. J Shibata, F Ren, M Nishizawa, H Tsang, Y Iwatani, M Matsuda, H Miura, H Tanaka, W Sugiura: Gag and Protease Interference Affect Acquisition and Selection of Resistance Viruses in Antiretroviral Treatment Failure Case. 8th Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance. Nov. 11-14, 2007, USA.
 27. Wataru Sugiura: Drug Resistance assays. International Conference on Molecular and Cellular Biology of Therapeutics of HIV and Associated Viral Infections. Jan. 12-14, 2007, Hyderabad, India.
 28. 乗原 健、吉野宗宏、佐野俊彦、小島賢一、日笠 聡、杉浦 互、白阪琢磨：拠点病院における抗 HIV 療法と薬剤関連アンケート調査結果 (第 4 報). 第 21 回日本エイズ学会学術集会. 2007.11.28-30, 広島
 29. 中里俊文、高村 斉、大出裕高、清水 愛、杉浦 互、星野忠次：L90M 変異体に阻害作用をもつ抗 HIV 薬の設計・合成. 第 21 回日本エイズ学会学術集会. 2007.11.28-30, 広島
 30. 羽生勇一郎、山本紀生、日吉真照、黒崎直子、石川晃一、松田昌和、岡田誠治、杉浦 互、山本直樹、高久 洋：shRNA, decoy RNA 共発現レンチウイルスベクターによる HIV-1 複製阻害効果の検討. 第 21 回日本エイズ学会学術集会. 2007.11.28-30, 広島
 31. 田中理恵、乗原 健、杉浦 互、加藤真吾：HPLC によるダルナビルの血中濃度測定法の開発. 第 21 回日本エイズ学会学術集会. 2007.11.28-30, 広島
 32. 岩谷靖雅、杉浦 互：HIV-1 NC と APOBEC3G の逆転写反応への作用. 第 21 回日本エイズ学会学術集会. 2007.11.28-30, 広島
 33. 松山 翔、大出裕高、柿澤淳子、杉浦 互、星野忠次：臨床検体由来 Subtype C HIV-1 protease の薬剤耐性機構に関する構造化学的研究. 第 21 回日本エイズ学会学術集会. 2007.11.28-30, 広島
 34. 柿澤淳子、松山 翔、大出裕高、星野忠次、大高泰靖、岩谷靖雅、西澤雅子、Rajintha Bandaranayake、Celia A Sciffer、杉浦 互：CRF01_AE とサブタイプ B のプロテアーゼの構造解析. 第 21 回日本エイズ学会学術集会. 2007.11.28-30, 広島
 35. 長谷川直紀、杉浦 互、任 鳳蓉、松田昌和、柴田潤子、田中 博：HARRT 下における連続サンプルを用いた経時的な HIV の宿主内進化解析. 第 21 回日本エイズ学会学術集会. 2007.11.28-30, 広島
 36. 柴田潤子、任 鳳蓉、西澤雅子、藤野真之、松田昌和、岩谷靖雅、杉浦 互、田中 博：抗 HIV 薬剤投与下における protease と Gag の共進化に関する研究. 第 21 回日本エイズ学会学術集会. 2007.11.28-30, 広島
 37. 吉田いづみ、西澤雅子、藤野真之、仲宗根 正、岩谷靖雅、長谷川直紀、柴田潤子、杉浦 互、任 鳳蓉、田中 博：HIV-1 env 遺伝子の多様性進化. 第 21 回日本エイズ学会学術集会. 2007.11.28-30, 広島
 38. 近藤真規子、宮崎裕美、須藤弘二、佐野貴子、倉井華子、相楽裕子、岩室紳也、杉浦 互、武部 豊、今井光信：日本で流行している HIV-1 サブタイプ B の diversity. 第 21 回日本エイズ学会学術集会. 2007.11.28-30, 広島
 39. 藤野真之、三浦秀佳、西澤雅子、松田昌和、鈴木寿子、杉浦 互：プロテアーゼ阻害剤耐性 HIV-1 株に対するダルナビルの有効性についての解析. 第 21 回日本エイズ学会学術集会. 2007.11.28-30, 広島
 40. 杉浦 互、湯永博之、吉田 繁、千葉仁志、小池隆夫、伊藤俊広、原 孝、佐藤武幸、石ヶ坪良明、上田敦久、近藤真紀子、今井光信、貞升健志、長島真美、福武勝幸、山元泰之、田中理恵、加藤真吾、宮崎菜穂子、岩本愛吉、藤野真之、仲宗根 正、巽 正志、椎野禎一郎、岡 慎一、林田庸聡、服部純子、伊部史朗、藤崎誠一郎、金田次弘、浜口基洋、上田幹夫、正兼亜季、大家正義、下条文武、田邊嘉也、渡邊香奈子、白阪琢磨、乗原 健、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、松下修三、健山正男、藤田次郎：2003-2006 年の新規 HIV-1 感染者における薬剤耐性頻度の動向. 第 21 回日本エイズ学会学術集会. 2007.11.28-30, 広島
- H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)**
該当なし



抗HIV薬剤血中濃度モニタリング

分担研究者 **薬原 健** 独立行政法人国立病院機構 大阪医療センター薬剤科
 研究協力者 **高田寛治¹、杉岡信幸¹、芝田信人²、加藤真吾³、田中理恵³、
 上平朝子⁴、白阪琢磨⁴、吉野宗宏⁵、矢倉裕輝⁴、平林義弘⁶、
 照屋勝治⁶、林田庸総⁶、小田原隆⁷、味澤篤⁸、今村顕史⁸、牧江俊雄⁹**
¹京都薬科大学薬物動態学教室、²同志社女子大学薬学部生物薬剤学教室、
³慶應義塾大学医学部微生物学・免疫学教室、⁴独立行政法人国立病院機構
 大阪医療センター免疫感染症科、⁵独立行政法人国立病院機構大阪医療セ
 ンター薬剤科、⁶国立国際医療センターエイズ治療研究開発センター、⁷東
 京大学医科学研究所感染免疫内科、⁸東京都立駒込病院感染症内科、⁹医薬
 品医療機器総合機構

- ①研究班が開設したホームページは平成19年10月末現在、通算アクセス数6746件、パスワード取得者156名。平成19年4月～平成19年10月末までに研究班が(株)BML、(株)第一化学に委託し測定した検体の測定件数は482件、26施設からの利用があった。件数の内訳はATV:127、RTV:126、LPV:79、EFV:77、TDF:72、NFV:1であった。平成18年10月より受託を開始したCYP2B6遺伝子検査の今年度依頼件数は39件(7施設)であった。
- ②相互作用情報提供システムのスタンドアロン版を開発し、ホームページ上で提供を開始した。
- ③ロピナビル/リトナビル配合剤の剤型変更に伴う血中濃度の変化に関して検討を行った。ロピナビルのトラフ値は錠剤群が有意に低値を示し、リトナビルのトラフ値は有意ではないものの低値を示した。
- ④テノホビル血中濃度と、GFRとBUNとの関係について検討を行った。GFRが125以上とBUNの変化が3以下であればTDF血中濃度は腎機能に影響しないと予測できた。
- ⑤新規プロテアーゼ阻害剤ダルナビルについて、HPLCによる血中濃度測定法の開発を行った。さらに、LC-MS/MSを利用したアッセイ法を確立し、HPLC法との比較検討を行った。

A. 研究目的

プロテアーゼ阻害剤 (PI)、非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤 (NNRTI) はHIV感染症治療薬として広く使われ、めざましい改善をもたらした薬剤である。しかし、PIやNNRTIの体内動態は、主に海外から報告されたもので、日本人でのデータが限られていることが問題とされている。また、近年発売されている抗HIV薬は、すべて希少疾病用医薬品として迅速承認の対象とされており、国内での治験を行わずに承認されている。本研究ではこれら抗HIV薬の薬物動態について調査・検討し、日本人HIV感染症患者における抗HIV薬の血中濃度の推移について確認し、より適切な治療が行えるよう血中濃度測定に必要なデータを収集することで、抗HIV療法の治療効果を高めることを目的とする。また、抗HIV薬の組み合わせは近年、多岐に渡っており、薬剤の組み

合わせによる相互作用情報や血中濃度に関する情報は少ないことから、抗HIV薬の相互作用情報を収集し、データベースを作成し最新の情報を提供する必要があります。

抗HIV薬の血中濃度測定は、HPLC等高度な専門機器や高度な専門知識を有する人材が必要であることから、一般診療を行う施設での測定が難しい。国内の臨床医が簡便に血中濃度測定を行えるよう、ホームページを利用した血中濃度測定システムを構築・供給し、抗HIV療法の治療効果を高めることを目的とする。また、EFV血中濃度に関連する遺伝子多型検査システムを提供した。

今年度はさらに、新規プロテアーゼ阻害薬ダルナビルの血中濃度測定系の確立と、ロピナビル/リトナビル配合剤の剤型変更に伴う血中濃度の変化に関する検討と、テノホビル血中濃度と、GFRとBUN