

HIV 薬剤耐性検査

HIV-1 Drug resistance genotyping

まつ だ まさ かず すぎ うら わたる
 松 田 昌 和¹⁾: 杉 浦 互²⁾
 Masakazu MATSUDA Wataru SUGIURA

はじめに

ヒト免疫不全ウイルス (HIV: Human Immunodeficiency Virus) は後天性免疫不全症候群 (AIDS: Acquired Immunodeficiency Sndrome) の病原ウイルスである。主な感染経路は性交渉の他に血液感染、母子感染が挙げられる。HIV または HIV 感染細胞を含む体液や血液が傷口や粘膜を介して侵入する。宿主細胞へ侵入後自身の逆転写酵素 (RT) とインテグラーゼ (IN) を用いて一本鎖 RNA ゲノムを二本鎖 DNA とし宿主ゲノムへの組み込みを行う。その後宿主細胞の生体活動を利用して自らのタンパクの前駆体を発現し、自身のプロテアーゼ (PR) の作用で成熟する。現在臨床使用されている抗 HIV 薬はこれら HIV に特異的な酵素である RT と PR を阻害するものである。IN 阻害薬は現在のところ開発段階である。

HIV に感染するということは我々の遺伝子の中に HIV の遺伝子が組み込まれるということであり、現在の治療法では残念ながら体内から完全に HIV を排除することは難しい。抗 HIV 治療の目的は体内でのウイルス増殖を抑えること、そして病態の進行を食い止めることである。抗 HIV 治療は 1997 年の多剤併用療法 (HAART: Highly Active Antiretroviral Therapy) の導入によって大きく変わった。それまでのヌクレオシド型逆転写酵素阻害剤 (NRTI: Nucleoside Analogue Reversetranscriptase Inhibitor) だけでなく、非ヌクレオシド型逆転写酵素阻害剤 (NNRTI: Non-nucleoside Reversetranscriptase Inhibitor) や

プロテアーゼ阻害剤 (PI: Protease Inhibitor) が相次いで実用化され、現在までに 18 種の化合物、剤形にすると 24 種類が臨床使用されている。また現在も活発に新薬開発が進められており、次々に新薬が登場することが期待されている。3 ないし 4 剤を選択して服用する HAART では阻害剤の絶対量が多いことに加え、ウイルス増殖を阻害する作用点が増えるため、それまでの単剤や二剤治療と比べて強力に血中ウイルス量を検出感度未満へ抑制することが可能となり、HIV 感染者の予後を著しく改善させることに成功した。

しかしながら、それでも薬剤耐性の出現による治療の失敗が起こりうるため、HAART 導入とほぼ同時期に国内のいくつかの公的研究機関や医療機関、大学等で薬剤耐性検査が臨床研究として実施されるようになった。薬剤耐性検査が治療の指標として有効であることは多くのコホート研究で実証され、今や HIV 感染者/AIDS 患者が適切な治療薬を選択し効果的な治療を進めるうえで、薬剤耐性検査は欠かせない検査とされている¹⁻³⁾。わが国では研究検査としての 9 年間を経て 2006 年 4 月に「HIV-ジェノタイプ薬剤耐性検査は、抗 HIV 治療の選択及び再選択の目的で行った場合に、3 月に 1 回を限度として算定できる。」として保険点数 6000 点で収載された。本稿では新規に保険収載された新しい測定法として、HIV 薬剤耐性検査について解説する。

I. 薬剤耐性検査の種類と検査方法

HIV 薬剤耐性検査には大きく分けて 2 つの手法が

1) 三菱化学メディエンス株式会社 感染症検査部
 感染症遺伝子グループ

〒174-8555 東京都板橋区志村 3 丁目 30 番 1 号

2) 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

〒208-0011 東京都武蔵村山市学園 4-7-1

1) *Infectious Disease Molecular Genetic Group, Infectious Disease Testing Department, Mitsubishi Chemical Medicine Corporation*

(30-1, Shimura 3-chome, Itabashi-ku, Tokyo)

2) *AIDS Research Center*

National Institute of Infectious Diseases

(4-7-1 Gakuen Musashimurayama Tokyo)

ある。1つはここで解説する遺伝子検査（ジェノタイプ）で、体内で増殖している HIV の遺伝子解析を行い、得られたアミノ酸配列をデータベースや一定のアルゴリズムと照合して薬剤耐性を間接的に評価する方法である。もう1つは感受性検査（フェノタイプ）と言われ、HIV 感染者のリンパ球を培養してウイルスを分離・回収、または遺伝子組み換え技術によって感染者ウイルス由来のプロテアーゼと逆転写酵素を持つ感染性ウイルスを再構築し、抗 HIV 薬存在下での増殖能から薬剤耐性を直接的に評価する方法である^{4,5)}。ジェノタイプは保険収載されたが、フェノタイプは未だ研究段階である（表）。

ジェノタイプは約 10 年前にその技術はほぼ確立していた。その検査法は抗 HIV 療法の発展とともに国立研究機関や大学等で in-house 法として開発・運用されていた研究検査がベースとなって発展してきた経緯があり、そのため検査手技にはさまざまな手法がとられている。現在厚生労働省研究班によって検査標準化への取り組みが進められており、別項を設けて解説する。薬剤耐性遺伝子検査は

大きく①検体からのウイルス核酸の抽出、② PCR 法による標的遺伝子の増幅と塩基配列の決定、そして③アミノ酸変異の解析と耐性評価法の3ステップに分けられる（図）。

①検体からのウイルス核酸の抽出法：

検体からのウイルス核酸の抽出は、100～200μL 程度の血清または血漿を材料として RNA を精製するのが一般的である。RNA の精製にはマグネットビーズ法、スピнкаラム法その他従来の AGPC 法も利用できる。また、全血検体であればリンパ球から DNA を抽出し、宿主ゲノムに組み込まれた HIV のプロウイルス DNA から検査することも可能であるが、これは薬剤耐性検査としては一般的でない。その時点で活発に増殖しているウイルスの遺伝子を調べることで最も有効な治療薬の指標とするのがこの検査の目的であるが、プロウイルス DNA では必ずしもこの目的を達成し得ないからである。

② PCR 法による標的遺伝子の増幅と塩基配列の決定法：

RNA を鋳型にして RT-PCR および必要に応じて

表 薬剤耐性検査：ジェノタイプとフェノタイプの比較

	ジェノタイプ検査	フェノタイプ検査
利点	<ul style="list-style-type: none"> 一般の検査室で実施可能 比較的短期間で結果が得られる 保険適用ができる 結果は感受性検査とほぼ（90～95%）一致する 	<ul style="list-style-type: none"> 薬剤感受性/耐性を直接評価するため、結果を理解しやすい 未知の変異による耐性も評価できる
欠点	<ul style="list-style-type: none"> 得られる結果は間接的な評価である 優位なウイルス株だけを検出しやすい 一部感受性と一致しない場合がある（5%前後） 	<ul style="list-style-type: none"> BSL3以上の高度安全施設が必要 検査日数、費用がかかる 臨床的なカットオフが明確でない場合がある

HIV 薬剤耐性検査の工程図

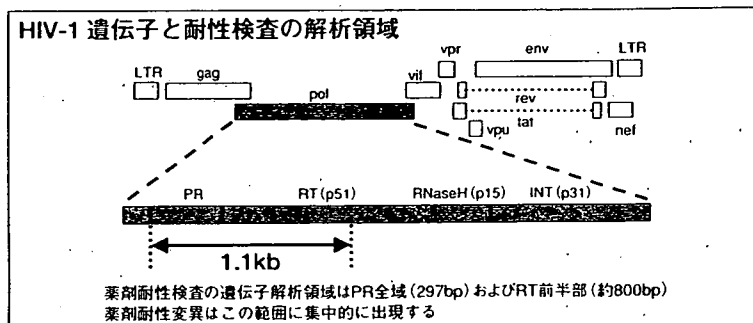
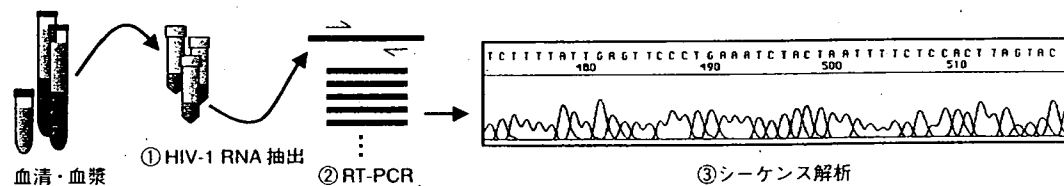


図 検査の概要

nested-PCRを実施して増幅産物を得た後、ダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定する方法が一般的である。解析対象となるのはPR領域は297bp (99 アミノ酸) のほぼ全域であり、RT領域は1680bp (560 アミノ酸) の前半部である。この約1kb余りの塩基配列を解析することが必須となる。

③アミノ酸変異の解析と耐性評価法：

アミノ酸変異の解析と耐性評価は、この検査の最も重要な工程と位置づけられる。ここでの第一段階はダイレクトシーケンスで塩基配列を決定することである。次に塩基配列をアミノ酸配列に変換し、標準HIV株もしくは同一患者の過去の配列と比較して変異リストを作成する。そして変異リストをデータベース照合や各種アルゴリズムにしたがって解析することで、どの薬剤にどれくらいの耐性があるかを評価することとなる。

すでにHIV薬剤耐性検査を実施している検査室等では保険収載前から研究検査として独自のプロトコルを確立しているが、新規にこの検査の実施を検討している場合は、市販されている検査試薬キット(アボット社 ViroSeq™、バイエル社 TRUGENE®)を利用するのも一案である。市販キットではRNA抽出から増幅・塩基配列解析とデータベース照合による耐性評価までがセットになっており便利である。

国立感染症研究所や厚生労働省研究班の調査研究によれば、各種in-house法・市販キットとも開発当初からは改良が加えられており、いずれも幅広いサブタイプに対応しており、検出感度も1000～3000コピー/mLを達成している⁶⁾。基本原理は上述のとおり、RT-PCR/ダイレクトシーケンスであり、得られる結果の違いは最終的に耐性評価を行うときに利用するデータベースやアルゴリズムの違いによるものである。

II. 薬剤耐性検査の問題点とこれからの課題

薬剤耐性遺伝子検査の解釈方法

HIV薬剤耐性検査では一次データとして得られた塩基配列をもとに二次的な解析を行い、どの薬剤にどれほど感受性や耐性があるかを評価し、最終的な検査結果として報告することになる。ここでは耐性評価の方法や、問題点を述べる。

IAS-USA (International AIDS Society USA, <http://www.iasusa.org/>) では各薬剤の耐性変異のリストを随時更新し公開している。学術論文や学会等で発表された情報を集約し薬剤耐性と関連のあるアミノ酸変異をリストしてまとめたものであるが、そもそも異なるプラットフォーム上で解析・評価された結果の集積であり、各変異と耐性度合いの関連性は低く、そのまま薬剤耐性の評価に用いることはできない。

よりわかりやすく耐性レベルを評価する方法としては、The French ANRS (National Agency for AIDS Research, <http://www.hivfrenchresistance.org/index.html>) やスタンフォード大学 HIV Drug Resistance Database (<http://hivdb.stanford.edu/index.html>) を利用することができる。耐性評価の結果は、各薬剤ごとの耐性度合いとしてANRSでは3段階 (Resistance, Possible Resistance, Susceptible) で、スタンフォードではさらに詳細に5段階 (High-level resistance, Intermediate resistance, Low-level resistance, Potential low-level resistance, Susceptible) で示される。各アルゴリズムの特徴は、ANRSでは検出された変異の組み合わせパターンから総合的に判断し、耐性評価を行うのに対し、スタンフォードではひとつひとつの変異に点数を付け、その合計点で判定を行う。スタンフォードのデータベースを利用する際は、検査で得られた塩基配列をインターネットのホームページ上に入力するか、または検出されたアミノ酸変異を打ち込むことで、自動的に評価結果が表示されるという簡便性があり、国内ではよく利用されているようである。

薬剤耐性を評価する方法は上記のように一般公開されているものの他にも商業的なものも複数あり、それぞれに特徴的なアルゴリズムが開発されている。耐性評価アルゴリズムは一定期間ごとに改良され、より精度が向上しているが、異なるアルゴリズムで同じ塩基配列やアミノ酸変異を照合すると、異なる結果が得られる場合がある^{7,8)}。いずれの場合も実際の薬剤感受性を測定した結果ではなく、過去に蓄積されたデータに基づいて計算された結果であり、どのアルゴリズムが正しいとか間違っているという判定は付け難い。現状では複数の評価アルゴリズムから総合的に判断することが望ましいだろう。

現在のHIV薬剤耐性検査は前項でも述べたとお

り、RT-PCR/ダイレクトシーケンス法が一般的であり、最も普及している。しかし今後新たな治療薬の開発・実用化が進み、解析対象となる遺伝子領域が拡大すると技術的に検査は困難となろう。技術的側面だけでなく、検査コストや所要日数を考慮しても、将来的にはより新しい技術を用いて効率的な検査方法へシフトし、より精度の高い耐性評価アルゴリズムが構築されていくことが望まれる。

Ⅲ. 薬剤耐性検査の質の管理

薬剤耐性遺伝子検査を研究検査として始めた当初は主要な国内の HIV-1 感染者は汚染血液製剤の曝露による感染症例であったことから、欧米に多いサブタイプ B を標的としてプライマー設計を行っていた。その後、性的接触による感染症例の増加に伴い B 以外のサブタイプや CRF (組み換え体) など検出される HIV の多様化が進んだ。その結果、従来の B を元に設計されたプライマーでは十分に増幅できない症例に直面することとなり、これらに対応するためにさまざまなプライマーが設計されてきた。ここで問題となるのが、薬剤耐性検査の質の管理である。プライマーや増幅プロトコルが多様化するにしたがい、検査を実施した施設により結果のばらつきが出るようになってきた。このような検査実施機関による検査の質が異なることのないように、全国どこでも同質の検査が受けられるような検査体制を作り上げることが重要である。このためには薬剤耐性検査の標準化作業が欠かせない。従来施設ごとに行われてきた検査にトレーサビリティを持たせるために、現在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およびその対策に関する研究」において基準測定操作法と外部コントロールとしての実用抗生物質の策定作業を進めている⁹⁾。また定期的な外部精度管理も実施しており成果を上げている。

おわりに

薬剤耐性遺伝子検査の保険収載は従来研究として行われてきた検査の門戸を広げるという点で大きな

前進である。しかし高額な検査であることから、検査ガイドラインに基づく適切な実施が望ましい¹⁰⁾。今後の課題として、新たな薬剤に対する迅速な対応と検査のコストダウンが挙げられる。

文 献

- 1) Durant J., Clevenbergh P., Halfon P., *et al.*: Drug-resistance genotyping in HIV-1 therapy : the VIRADAPT randomised controlled trial. *Lancet*, **353** : 2195-2199, 1999.
- 2) Baxter J.D., Mayers D.L., Wentworth D.N., *et al.*: A randomized study of antiretroviral management based on plasma genotypic antiretroviral resistance testing in patients failing therapy. CPCRA 046 Study Team for the Terry Bein Community Programs for Clinical Research on AIDS. *Aids*, **14** : F83-93, 2000.
- 3) Cingolani A., Antinori A., Rizzo M.G., *et al.*: Usefulness of monitoring HIV drug resistance and adherence in individuals failing highly active antiretroviral therapy : a randomized study (ARGENTA). *Aids*, **16** : 369-379, 2002.
- 4) Hertogs K., de Bethune M.P., Miller V., *et al.*: A rapid method for simultaneous detection of phenotypic resistance to inhibitors of protease and reverse transcriptase in recombinant human immunodeficiency virus type 1 isolates from patients treated with antiretroviral drugs. *Antimicrob Agents Chemother*, **42** : 269-276, 1998.
- 5) Petropoulos C.J., Parkin N.T., Limoli K.L., *et al.*: A novel phenotypic drug susceptibility assay for human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob Agents Chemother*, **44** : 920-928, 2000.
- 6) Mukaide M., Sugiura W., Matuda M., *et al.*: Evaluation of Viroseq-HIV version 2 for HIV drug resistance. *Jpn J Infect Dis*, **53** : 203-205, 2000.
- 7) Ravela J., Betts B.J., Brun-Vezinet F., *et al.*: HIV-1 protease and reverse transcriptase mutation patterns responsible for discordances between genotypic drug resistance interpretation algorithms. *J Acquir Immune Defic Syndr*, **33** : 8-14, 2003.
- 8) Snoeck J., Kantor R., Shafer R.W., *et al.*: Discordances between interpretation algorithms for genotypic resistance to protease and reverse transcriptase inhibitors of human immunodeficiency virus are subtype dependent. *Antimicrob Agents Chemother*, **50** : 694-701, 2006.
- 9) Fujisaki S., Fujisaki S., Ibe S., *et al.*: 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.
- 10) 杉浦互, 岡慎一: HIV 薬剤耐性検査ガイドライン. 平成 18 年度厚生労働化学研究費補助金エイズ対策研究事業「HIV 感染症の医療体制の整備に関する研究」2007.

特集：エイズ患者の抱える諸問題

薬剤耐性 HIV の抱える諸問題

Considerable Issues of HIV Drug Resistance

西澤 雅子, 杉浦 亙

Masako NISHIZAWA and Wataru SUGIURA

国立感染症研究所エイズ研究センター

AIDS Research Center, National Institute of Infectious Diseases

1. はじめに

本邦における HIV 感染症の治療は、1997年に導入された多剤併用療法 (Highly active antiretroviral treatment, HAART) によって大きく進展した。HAART によって HIV 感染患者の AIDS 発症率は低下し予後も改善された。しかし HAART をもってしても根治は不可能であり、患者は HAART を開始すると生涯にわたり 95% 以上のアドヒアランスで治療を継続しなければならない。

患者の負担を軽減するために、これまでにアドヒアランスの向上や薬剤耐性 HIV 克服のために様々な新薬が研究・開発されてきた。薬剤の剤形にも改良が加えられ、服薬が容易な 1 日 1 回服用の薬剤も登場し臨床で広く使用されるようになってきている。また既存の抗 HIV 薬剤に対して耐性を獲得した薬剤耐性 HIV に対して抗 HIV 効果が期待される新たな薬剤が登場し、薬剤耐性症例の救済に大きな期待が寄せられている。本稿では薬剤耐性 HIV の克服を目的として開発されたプロテアーゼ阻害剤であるカレトラ、レイアタツツ、プレジスタに焦点を当て、その薬剤耐性プロファイルと特徴について紹介する。また最近問題となっている B 型肝炎ウイルスと HIV の重感染や、未治療新規感染患者における薬剤耐性 HIV の伝播について薬剤耐性の観点からその問題点について論じる。

2. 薬剤耐性を獲得した症例を克服するための取り組み

薬剤耐性を獲得した HIV に対して最も有効な手段は、当然のことながら交叉耐性の無い薬剤を選択することであるが、これは言うほどには簡単ではない。ヌクレオシド型逆転写酵素阻害剤や非ヌクレオシド型逆転写酵素阻害剤では殆ど選択肢がないのが現実である。そのような中で、プロテアーゼ阻害剤に関しては *in silico* での化合物の設計によりサキナビル (SQV)、インジナビル (IDV) そしてネルフィナビル (NFV) 等に対して耐性を獲得した HIV に有

効な新たなプロテアーゼ阻害剤 (PI) の開発に成功している。

a. カレトラ

カレトラはロピナビル (LPV) とリトナビル (RTV) の合剤 (LPV/r) である。2000 年からソフトカプセルとして、2006 年からは剤形を変更し錠剤として本邦で臨床使用されている。LPV は開発当初 CYP3A による代謝のため、抗 HIV 活性を発揮するために必要な血中濃度を維持できない点が問題であったが、その後 CYP3A を競争阻害する RTV と併用する事により有効血中濃度を維持する事が可能となった^{1,2)}。LPV は RTV の化学構造を元に RTV の一次変異 V82A を回避するように開発され²⁾、報告によって変異の数は異なるが概ね 6 個以上の耐性変異が集積する事で初めて LPV への耐性を獲得するとされている³⁾。PI 投与経験の無い患者が LPV 投与を受けた場合には HIV が LPV に対する耐性を獲得することは稀だが、LPV 投与を受ける前にすでにプロテアーゼ遺伝子領域に I54V、あるいはこれに加えて V82A, M46I といった変異が存在した場合には LPV に対する耐性 HIV が出現する可能性が高くなる^{4,5)}。これらの変異の他にも頻度は低いが I47A/V や V32I といった変異が出現すると LPV に対する耐性が上昇する⁶⁻⁸⁾。しかし LPV は既存の PI 服用によって薬剤耐性を獲得した薬剤耐性 HIV に対しても総じて高い抗 HIV 効果が期待できる事から、現在では第一選択の PI として広く臨床応用されている薬剤である。

b. レイアタツツ

レイアタツツは主成分を硫酸アタザナビル (ATV)^{9,10)} とする PI で、本邦では 2003 年に承認された。ATV も LPV/r と同様、効果的な血中濃度を保つために RTV を併用する。ATV は 1 日 1 回の投与で有効血中濃度の維持が可能であり、また LPV に比べて脂質代謝異常等の副作用が少ない事が大きな利点である。複数の HAART で治療失敗を経験した HIV 感染患者を対象として、LPV との 96 週間投与の比較試験を行った報告では、PI に対して耐性を獲

得した耐性 HIV にも LPV と同等かそれ以上の抗 HIV 効果が得られる事が示され¹¹⁾, PI 耐性症例に対する有効性が確認された。過去に PI 投与を受けた患者に対して ATV を投与し, ATV の抗 HIV 効果と耐性変異を解析した報告によると, ATV 耐性変異は L10F/I/V, G16E, L33F/I/V, M46I/L, D60E, I84V, I85V 及び L90M の 8 変異とされている。これらの変異のうち, 3 つ以上獲得すると耐性の数に比例して ATV の抗 HIV 効果は低下した¹²⁾。この他に ATV に耐性を与える薬剤耐性変異には一次変異として I50L が知られているが¹³⁾, この I50L を持った HIV については興味深い報告がある。I50L を人工的に導入したリファレンス株や臨床分離株について *in vitro* の培養細胞を用いた感受性検査を行った結果, ATV 以外の他の PI に対して高度感受性を獲得している事が示された¹⁴⁾。また I50L を持つ HIV は増殖能が低下していた。In vitro で確認された I50L によって誘導される PI への高度感受性が, 実際に臨床においてどのような意味を持つかについてはまだ明らかではないが, I50L を持つ ATV 耐性 HIV が出現しても, この HIV は他の PI に対して感受性を保っている事から第一選択候補の PI として HAART に用いる事は適当であると思われる。ホスアンプレナビル (FPV) を主成分とするレクシヴァは, ATV と同様に 50 番目のイソロイシンに変異を誘導するが, FPV によって誘導されるのは I50L ではなく I50V である。I50V はプロテアーゼの酵素活性や HIV の増殖能を低下させ, また I50L 変異とは異なり他の PI に対しても耐性を獲得する¹⁴⁾。ATV と FPV によって各々誘導される I50L と I50V の構造学的な違いはまだ明らかになっていないが, それぞれの変異が PI のプロテアーゼ結合に与える影響に違いがあると考えられる。

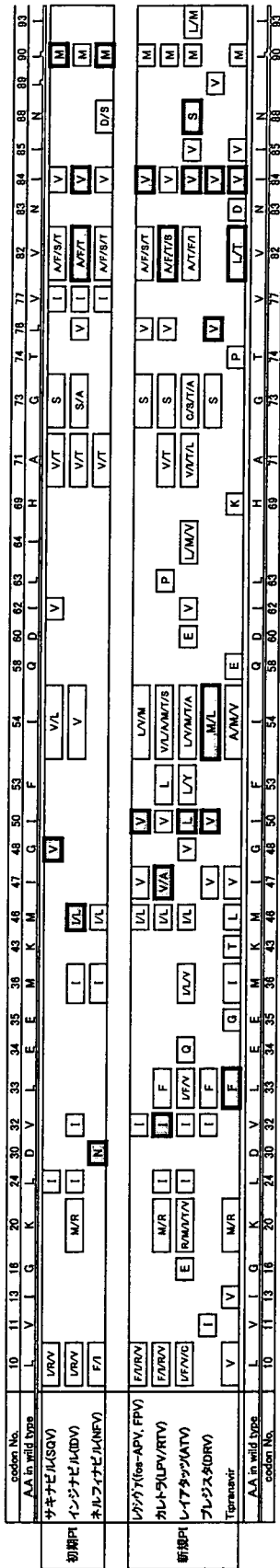
c. プレジスタ

プレジスタは 2006 年米国 FDA で承認されたが本邦では現在承認申請中の新しい PI である。主成分はダルナビア (DRV) で, プロテアーゼの活性中心である 29 番目, 30 番目のアスパラギン酸を標的として設計された新しいコンセプトの抗 HIV 薬剤である¹⁵⁾。前述の LPV や ATV と同様に RTV ブーストを行う薬剤で, HAART 治療の経験のある患者を対象とし, LPV を対照薬剤として 48 週間の比較試験を行った結果からは, DRV 投与群では LPV を上回る抗 HIV 効果を得る事が出来た。また耐性 HIV の出現の比率も LPV に比べて低かった¹⁶⁾。DRV は SQV, IDV, NFV といった初期から用いられている PI に対して高度耐性を示す臨床分離株に対しても高い抗 HIV 活性を持ち, また既存の PI と比較して低い IC50 を示す。既存の PI を含む HAART 治療で治療失敗を経験した患者の HIV の耐性検査を行い DRV に対する耐性変異の頻度を調査した結果, DRV における一次変異の I50V, I54M, L76V, I84V, あるい

は二次変異の V11I, V32I, L33F, I47V, I54L, G73S, L89V を併せて 3 個以上持つ HIV の頻度は 6.7% と低く, PI を含む HAART 治療に失敗した患者に DRV を含む HAART が有効である事が示唆された¹⁷⁾。DRV は臨床で使用されるようになってから日が浅いため薬剤耐性に関する情報が十分ではないが, 研究開発段階における耐性変異誘導実験では R41T と K70E が誘導されたと報告されている。これらの耐性変異は DRV に対して 10 倍程度の耐性を与えたが, 他の PI に対する耐性度は 10 倍以下で感受性を保っていた¹⁸⁾。今後は LPV や ATV と同様に, HAART における Key drug として広く使用されると思われる。紹介した新規の PI 以外にも, やはり PI 耐性の HIV に対して抗 HIV 効果を持つ Tipranavir が米国ではすでに使用されている¹⁹⁾。2007 年 8/9 月版 IAS-USA 薬剤耐性リストを基にした各 PI に対する耐性変異リストを図 1 に示す。

3. HIV と B 型肝炎の重感染に関連する問題

このように HIV 感染症治療において薬剤耐性 HIV の出現は大きな問題であるが, それに加えて B 型肝炎 (HBV) の重感染も HIV 感染症治療において大きな問題となっている。米国では HIV 感染患者の約 10% が HBV にも感染していると報告されており²⁰⁾, 日本でも HIV 感染症治療の上で HBV の重感染は考慮すべき問題である。HIV/HBV 重感染患者に薬剤治療を行う場合には, HIV のみあるいは HBV のみの感染の場合とは異なり投薬に注意を要する。これは HBV 治療に用いられる薬剤は抗 HIV 活性を併せもつ薬剤が多いからである。HBV に対してラミブジン (3TC) のみの単剤治療を行った場合, HIV が 3TC の耐性変異である M184V を獲得し将来の HAART に影響を与える可能性がある。またテノホビル (TDF) の誘導体であるアデホビル (ADF) も抗 HIV 活性を持ち, かつ HBV 治療に用いられる薬剤だが, HBV に対する投与量では HIV の増殖を完全に抑制できないため, やはり耐性 HIV が出現する可能性がある。このため HIV/HBV 重感染患者の場合には, HIV/HBV 双方に対して抗ウイルス効果のある 3TC や TDF を併用して使用する事がガイドラインで推奨されている。2005 年米国 FDA で承認されたバラクルード (エンテカビル, ETV) は, 抗 HIV 活性を持たず HBV に対してのみ抗ウイルス活性を発揮すると発表された事から注目を集めた²¹⁾。現在では HIV/HBV 重感染患者で HBV に対してのみ治療が必要な患者には ETV の使用が米国 Public Health Service のガイドラインでも推奨されている。これは ETV が, HIV の薬剤耐性を誘導しないため, 将来の HAART に影響しない事が期待されるからである。しかし最近の報告によると ETV も弱い抗 HIV 効果を患者体内で発揮している可能性が示唆された。また ETV によ



2007年8/9月版 IAS-USA薬耐性リストによる。
 ■ 一次変異、黒剤投与後最初に出現することが多い変異であり、且つ薬剤耐性に大きく影響を及ぼすもの
 □ 二次変異、一次変異に続いて出現してくる変異であり、一次変異と組み合わさることにより耐性レベルを上げる

て誘導されたと思われる M184V を持つ HIV も患者血漿中から検出された²²⁾。ETV を用いた抗 HBV 治療は、HIV/HBV 重感染患者については今後検討の余地があると思われる。

4. 未治療新規感染者における薬剤耐性 HIV-1 の拡大

近年になって、先進諸国では HAART の経験が無い HIV 新規感染患者から薬剤耐性 HIV が検出される事が問題となっている。2003 年から 2004 年にかけて、国立感染症研究所エイズ研究センターが中心となって取りまとめた、日本の未治療新規感染者における薬剤耐性 HIV 検出頻度は約 4% で、ヨーロッパや北米国で報告されている比率よりも低い²³⁾、地域によっては 10% 以上と報告された例もあり、今後薬剤耐性 HIV の伝播が懸念される。薬剤耐性 HIV に感染することは初回治療から使用可能な薬剤が制限される事を意味するとともに、HAART によって期待通りの効果を得られない可能性がある事を意味している。現在未治療新規感染者に対する薬剤耐性検査は保険適用外であるが、HIV 感染症治療研究会から発行されている 2006 年 12 月発行の第 10 版 HIV 感染症「治療の手引き」では、治療開始時の薬剤耐性検査が推奨されている。効果的な HAART を行う上で、薬剤耐性検査は重要であると思われる。

5. おわりに

かつて薬剤耐性 HIV の出現は抗 HIV 治療の上で回避できない問題であり、また一度薬剤耐性 HIV が出現すると治療が困難であった。しかし現在では薬剤耐性に関する理解も進み、薬剤耐性 HIV に対して効果のある抗 HIV 薬剤を選択する事も可能になった。しかし HIV は新規薬剤に対してもいずれは耐性を獲得するのは明らかであり、今後も薬剤耐性は十分な関心を持って取り組む必要のある課題である。

文 献

- 1) Kempf DJ, Marsh KC, Kumar G, Rodrigues AD, Denissen JF, McDonald E, Kukulka MJ, Hsu A, Graneman GR, Baroldi PA, Sun E, Pizzuti D, Plattner JJ, Norbeck DW, Leonard JM : Pharmacokinetic enhancement of inhibitors of the human immunodeficiency virus protease by coadministration with ritonavir. *Antimicrob Agents Chemother* 41 (3) : 654-660, 1997.
- 2) Sham HL, Kempf DJ, Molla A, Marsh KC, Kumar GN, Chen CM, Kati W, Stewart K, Lal R, Hsu A, Betebenner D, Korneyeva M, Vasavanonda S, McDonald E, Saldivar

- A, Wideburg N, Chen X, Niu P, Park C, Jayanti V, Grabowski B, Granneman GR, Sun E, Japour AJ, Leonard JM, Plattner JJ, Norbeck DW : ABT-378, a highly potent inhibitor of the human immunodeficiency virus protease. *Antimicrob Agents Chemother* 42 (12) : 3218-3224, 1998.
- 3) Johnson VA, Brun-Vézinet F, Clotet B, Günthard HF, Kuritzkes DR, Pillay D, Schapiro, JM, Richman DD : Update of the drug resistance mutations in HIV-1 : 2007. *Top HIV Med* 15 (4) : 119-125, 2007.
 - 4) Kempf DJ, Isaacson JD, King MS, Brun SC, Xu Y, Real K, Bernstein BM, Japour AJ, Sun E, Rode RA : 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 (16) : 7462-7469, 2001.
 - 5) Masquelier B, Breilh D, Neau D, Lawson-Ayayi S, Lavignolle V, Ragnaud JM, Dupon M, Morlat P, Dabis F, Fleury H ; Groupe d'Epidemiologie Clinique du SIDA en Aquitaine : Human immunodeficiency virus type 1 genotypic and pharmacokinetic determinants of the virological response to lopinavir-ritonavir-containing therapy in protease inhibitor-experienced patients. *Antimicrob Agents Chemother* 46 (9) : 2926-2932, 2002.
 - 6) Friend J, Parkin N, Liegler T, Martin JN, Deeks SG : Isolated lopinavir resistance after virological rebound of a ritonavir/lopinavir-based regimen. *AIDS* 18 (14) : 1965-1966, 2004.
 - 7) Mo H, King MS, King K, Molla A, Brun S, Kempf DJ : Selection of resistance in protease inhibitor-experienced, human immunodeficiency virus type 1-infected subjects failing lopinavir- and ritonavir-based therapy : mutation patterns and baseline correlates. *J Virol* 79 (6) : 3329-3338, 2005.
 - 8) Kagan RM, Shenderovich MD, Heseltine PN, Ramnarayan K : Structural analysis of an HIV-1 protease I47A mutant resistant to the protease inhibitor lopinavir. *Protein Sci* 14 (7) : 1870-1878, 2005.
 - 9) Robinson BS, Riccardi KA, Gong YF, Guo Q, Stock DA, Blair WS, Terry BJ, Deminie CA, Djang F, Colonno RJ, Lin PF : 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 (8) : 2093-2099, 2000.
 - 10) Gong YF, Robinson BS, Rose RE, Deminie C, Spicer TP, Stock D, Colonno RJ, Lin PF : In vitro resistance profile of the human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor BMS-232632. *Antimicrob Agents Chemother* 44 (9) : 2319-2326, 2000.
 - 11) Johnson M, Grinsztejn B, Rodriguez C, Coco J, DeJesus E, Lazzarin A, Lichtenstein K, Wirtz V, Rightmire A, Odeshoo L, McLaren C : 96-week comparison of once-daily atazanavir/ritonavir and twice-daily lopinavir/ritonavir in patients with multiple virologic failures. *AIDS* 20 (5) : 711-718, 2006.
 - 12) Vora S, Marcelin AG, Günthard HF, Flandre P, Hirsch HH, Masquelier B, Zinkernagel A, Peytavin G, Calvez V, Perrin L, Yerly S ; Swiss HIV Cohort Study : Clinical validation of atazanavir/ritonavir genotypic resistance score in protease inhibitor-experienced patients. *AIDS* 20 (1) : 35-40, 2006.
 - 13) Colonno R, Rose R, McLaren C, Thiry A, Parkin N, Friborg J : Identification of I50L as the signature atazanavir (ATV)-resistance mutation in treatment-naïve HIV-1-infected patients receiving ATV-containing regimens. *J Infect Dis* 189 (10) : 1802-1810, 2004.
 - 14) Weinheimer S, Discotto L, Friborg J, Yang H, Colonno R : Atazanavir signature I50L resistance substitution accounts for unique phenotype of increased susceptibility to other protease inhibitors in a variety of human immunodeficiency virus type 1 genetic backbones. *Antimicrob Agents Chemother* 49 (9) : 3816-3824, 2005.
 - 15) Koh Y, Nakata H, Maeda K, Ogata H, Bilcer G, Devasamudram T, Kincaid JF, Boross P, Wang YF, Tie Y, Volarath P, Gaddis L, Harrison RW, Weber IT, Ghosh AK, Mitsuya H : Novel bis-tetrahydrofuranylurethane-containing nonpeptidic protease inhibitor (PI) UIC-94017 (TMC114) with potent activity against multi-PI-resistant human immunodeficiency virus in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 47 (10) : 3123-3129, 2003.
 - 16) Madruga JV, Berger D, McMurchie M, Suter F, Banhegyi D, Ruxrungtham K, Norris D, Lefebvre E, de Bethune MP, Tomaka F, De Pauw M, Vangeneugden T, Spinosa-Guzman S ; TITAN study group : Efficacy and safety of darunavir-ritonavir compared with that of lopinavir-ritonavir at 48 weeks in treatment-experienced, HIV-infected patients in TITAN : a randomised controlled phase III trial. *Lancet* 370 (9581) : 49-58, 2007.
 - 17) Poveda E, de Mendoza C, Martin-Carbonero L, Corral

- A, Briz V, Gonzalez-Lahoz J, Soriano V : Prevalence of darunavir resistance mutations in HIV-1-infected patients failing other protease inhibitors. *J Antimicrob Chemother* 60 (4) : 885-888, 2007.
- 18) De Meyer S, Azijn H, Surleraux D, Jochmans D, Tahri A, Pauwels R, Wigerinck P, de Bethune MP : TMC114, a novel human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor active against protease inhibitor-resistant viruses, including a broad range of clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 49 (6) : 2314-2321, 2005.
- 19) Temesgen Z, Feinberg J : Tipranavir : a new option for the treatment of drug-resistant HIV infection. *Clin Infect Dis* 45 (6) : 761-769, 2007.
- 20) Thio CL : Hepatitis B Virus Treatment in HIV-infected Patients. *Top HIV Med* 14 (5) : 170-175, 2007.
- 21) Innaimo SF, Seifer M, Bisacchi GS, Standring DN, Zahler R, Colonna RJ : Identification of BMS-200475 as a potent and selective inhibitor of hepatitis B virus. *Antimicrob Agents Chemother* 41 (7) : 1444-1448, 1997.
- 22) McMahon MA, Jilek BL, Brennan TP, Shen L, Zhou Y, Wind-Rotolo M, Xing S, Bhat S, Hale B, Hegarty R, Chong CR, Liu JO, Siliciano RF, Thio CL : The HBV drug entecavir—effects on HIV-1 replication and resistance. *N Engl J Med* 356 (25) : 2614-2621, 2007.
- 23) Gatanaga H, Ibe S, Matsuda M, Yoshida S, Asagi T, Kondo M, Sadamasu K, Tsukada H, Masakane A, Mori H, Takata N, Minami R, Tateyama M, Koike T, Itoh T, Imai M, Nagashima M, Gejyo F, Ueda M, Hamaguchi M, Kojima Y, Shirasaka T, Kimura A, Yamamoto M, Fujita J, Oka S, Sugiura W : Drug-resistant HIV-1 prevalence in patients newly diagnosed with HIV/AIDS in Japan. *Antiviral Res* 75 (1) : 75-82, 2007.

抗ウイルス薬剤耐性獲得のメカニズム

——HIV

杉浦 亙
SUGIURA Wataru

国立感染症研究所エイズ研究センターグループ長

はじめに

今日世界にはおよそ4,000万人のHIV-1感染者がいるとされているが、この世界規模で拡大している感染症の歴史は短く、約25年前に米国において報告された同性愛者に出現した奇妙な免疫不全を呈する「奇病」が、記録されている最初の症例である^{1), 2)}。その後、1983年に仏米の研究者によりこの疾患がレトロウイルスによる感染症であることが突き止められた^{3), 4)}。以来、HIV-1は多くの研究者の手により解析され、感染経路、病態そして宿主免疫に及ぼす影響などさまざまな特性が明らかにされてきた。HIV-1の感染機構の解析が進むにつれ治療薬剤の標的は絞られ、1986年にジドブジンの発見により薬剤治療が実現された。1990年代に入るとHIV-1感染者数の爆発的な増大をうけて、HIV-1治療薬剤は熾烈な開発競争に突入した。その結果、今日ではヌクレオシド型アナログ逆転写酵素阻害剤 (nucleotide analogue reverse transcriptase inhibitor; NRTI) 8種類、非ヌクレオシド型逆転写酵素阻害剤 (non-nucleotide analogue reverse transcriptase inhibitor; NNRTI) 3種類、そしてプロテアーゼ阻害剤 (protease inhibitor; PI) 8種類——という3クラス19種類の薬剤が実用化され治療に用いられている (表1)。これらの薬剤を組み合わせ

表1 現在使用されている抗HIV薬剤一覧

クラス	一般名 (略表記)	認可年
ヌクレオシド型逆転写酵素阻害剤	ジドブジン (AZT)	1987
	ジダノシン (ddI)	1992
	ザルシタピン (ddC)	1996
	スタブジン (d4T)	1997
	ラミブジン (3TC)	1997
	エムトリシタピン (FTC)	2005
	アバカビル (ABC)	1999
	テノホビル (TDF)	2003
非ヌクレオシド型逆転写酵素阻害剤	ネビラピン	1998
	エファビレンツ	1999
	デラビルジン	2000
プロテアーゼ阻害剤	スキナビル	1997
	リトナビル	1997
	インジナビル	1997
	ネルフィナビル	1998
	アンブレナビル	1999
	ホスアンブレナビル	2005
	ロピナビル/リトナビル	2000
アタザナビル	2003	

た多剤併用療法は優れた治療効果を示す反面、その成功にはさまざまな障害が立ちふさがっている。低い服薬率 (アドヒアランス)、治療薬剤による副作用、そして薬剤耐性ウイルスの出現など、いずれも治療の失敗の引き金になる事項である。特に薬剤耐性ウイルスの出現はその後の治療選択に大きな制約を課すことから重要な問題である。

HIV-1 薬剤耐性獲得の機序

HIV-1 が治療薬剤耐性を獲得しやすい理由は3つあげられる。1つ目は極めて活発なウイルスの新生である。HIV-1 感染症は感染成立からAIDS発病まで5～10年という長い潜伏期があるため、一見緩慢な疾患のようにみえるが、感染者生体内において1日に 10^{10} 個にも及ぶ新たなHIV-1粒子が産生される活動的かつ消耗性のウイルス疾患である。2つ目は逆転写酵素の逆転写精度の低さにある。HIV-1の逆転写酵素はDNAポリメラーゼと異なりproof reading活性をもたないために逆転写の精度が低いことが知られている。RNAがDNAへの逆転写過程で変異を起こす頻度は、30万塩基対に対して1回起こりうると推定されている。前述の活発なウイルス増殖とあわせて考えると、少なくとも1カ所の変異をもったウイルスが1日に 3×10^6 個生み出される計算になる⁵⁾。3つ目は高い組み替え効率である。例えばAという変異をもつウイルスとBという変異をもつウイルスの組み換えにより、個別に順次獲得するより早い時間で変異AとBをもつウイルスが出現する。

このような易変異獲得性のために、HIV-1は感染者体内において多様性と可塑性に富む集団(quasispecies)を形成している。このためHIV-1は治療薬剤の有効血中濃度が達成されずHIV-1の増殖が抑えきれない状況に置かれると、当該薬剤に対して耐性変異をもつウイルスの増殖と選択を容易に許すこととなる。そして、このような薬剤が存在しつつも増殖が抑え切れていない環境でウイルスの複製が繰り返されることにより、時間とともに薬剤耐性に関与する変異がウイルスに集積し、薬剤耐性レベルが上昇していく。今日ほとんどの薬剤耐性変異は、薬剤を投与されていない状況下におけるquasispecies範疇で存在している

と考えられている。しかし、一般的に薬剤耐性変異はウイルスの増殖能(replication capacity)、適合性(fitness)が薬剤耐性をもたないウイルスに比べて低いために、薬剤非存在下では感染者体内で優位の集族として生存することは困難であると考えられる(図1)。

各薬剤クラスにおける耐性変異とその機序

一般に、薬剤耐性変異は治療薬剤の標的であるそれぞれの酵素に出現してくる。NRTIとNNRTIは逆転写酵素に、PIではプロテアーゼに、CCR5阻害剤と融合阻害外被蛋白(envelope)に、そしてインテグラーゼ阻害剤はインテグラーゼに薬剤特有の変異が誘導される。以下、現在使用されているNRTI、NNRTIそしてPI各薬剤の耐性機序について解説する(表2)。

1. NRTI耐性変異の部位と機序(図2)

NRTIの耐性化機序には3つの異なる機序が知られている。1つは、耐性変異の獲得によりNRTIの取り込みが物理的に阻害されるものである(steric hindrance)。この種の耐性変異には、逆転写酵素184番目のアミノ酸メチオニンがバリンに変わる(M184V変異)3TC耐性変異がこれに該当する。3TC耐性変異M184Vは逆転写酵素活性中心部のYMDDモチーフに誘導されるが、メチオニンからバリンへの置き換えは本来3TCが取り込まれるべきRTの活性中心の空間を占有してしまい、3TCを入り込めなくするとされている。この機序による耐性の特徴として、単独の変異で極めて高い耐性レベルを呈することがあげられる。M184V変異を獲得するとウイルスは3TCに対して数百倍以上の耐性になる⁶⁾。

2つ目の機序は、耐性変異の獲得によりddNTP

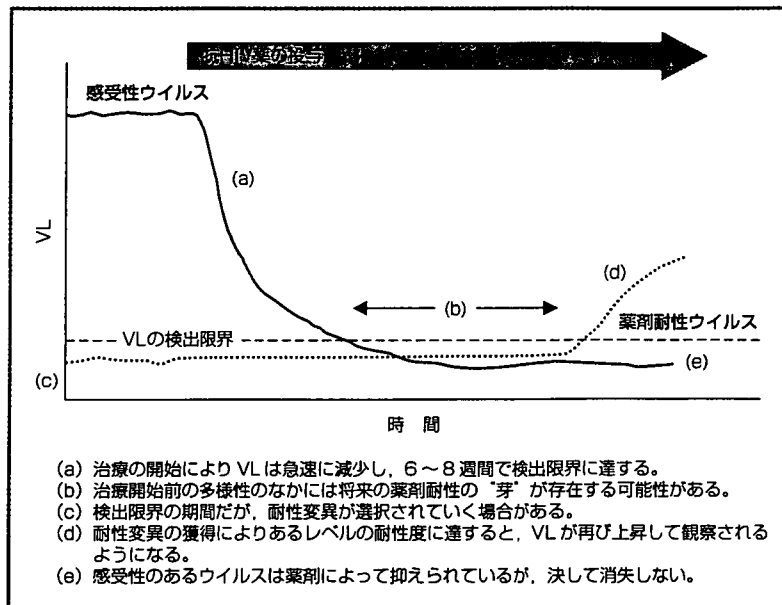


図 1 薬剤耐性の獲得と血中ウイルス量の変化

表 2 抗HIV薬剤耐性機序

ヌクレオシド類似体阻害剤	
• excision	M41L, D67N, K70R, T215YF, Q219M
• steric hindrance	M184V
• 取り込み低下	K65R
非ヌクレオシド類似体阻害剤	
• 親和性の低下	K103N, V106A, Y181C, Y188C
プロテアーゼ阻害剤	
• 親和性の低下	D30N, M46I, G48V, I50V, V82A, I84V, L90M

の取り込みが低下するものである (decreased uptake)。この機序に耐性変異としてはテノホビルに対する耐性を呈するK65RとK70E変異があげられる。K65RはRTのfinger domainの先端に位置しており、例えていえば指の爪のように側差が出ておりdNTPを捕らえると考えられている。この部分がRに変わることにより爪が短くなり、テノホビルの取り込みが選択的に阻害される⁷⁾。

3番目の耐性化機序は逆転写反応の際に取り込まれてDNAの伸張を阻害していたNRTIが取り外

されてしまい、DNAの伸長が再開されてしまう機序である (excision, pyrophosphorolysis)⁸⁾。これに該当する代表的なものはAZTに対する耐性変異 (thymidine analogue resistant mutation; TAM) のM41L, D67N, K70R, L210W, T215Y/F, K219Q/Eである。AZT耐性変異獲得ウイルスでは、このような取り外し反応が野生株に比して起きやすいと考えられている。ExcisionはATP依存性の反応であるが、前述の変異はいずれもRTのATP結合領域に誘導されており、AZT-

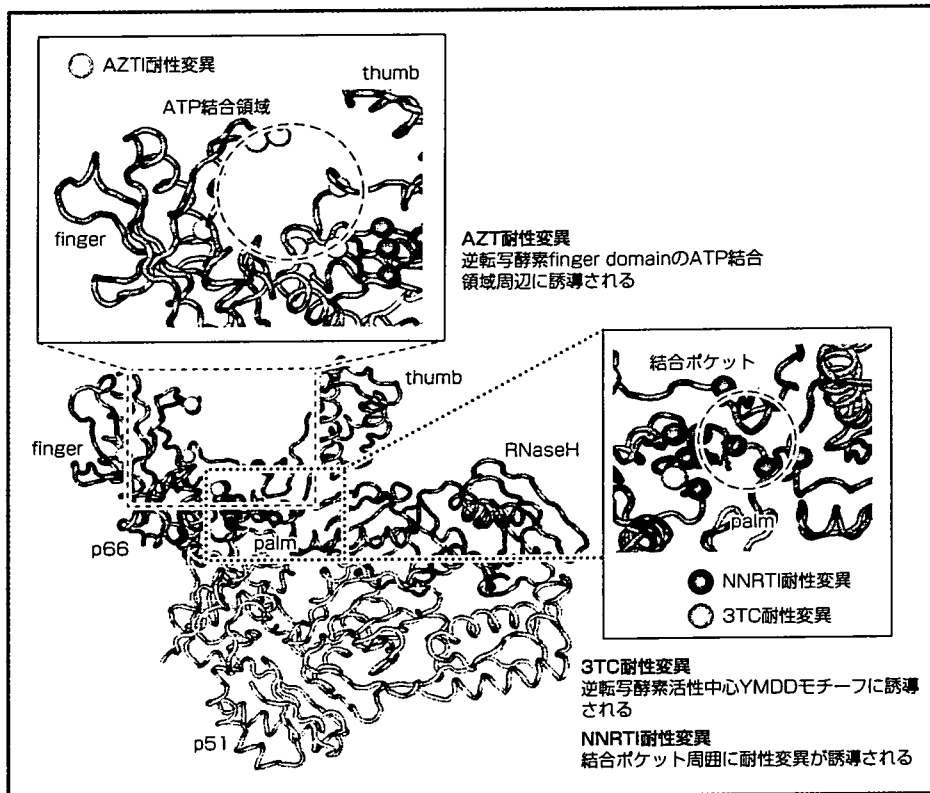


図2 逆転写酵素阻害剤耐性変異

MPを特異的excisionを加速させるとされる⁹⁾。興味深いことに、AZT耐性変異群を獲得すると3TC/FTC以外のすべてのNRTIに対してもある程度の耐性を呈するようになることが知られており、ddNTPを取り外す反応はNRTIに共通して起こりうる主要な耐性化機序であると考えられる。なお、この機序による耐性変異の特徴として、変異は単独では強い耐性を呈さないが、複数の変異の集積により相加的、相乗的に耐性度が上昇することが知られている。

2. NNRTI耐性化機序

NNRTIはNRTI剤とはまったく異なった機序で耐性化する。NNRTIは逆転写酵素の活性中心近傍の窪みに直接結合する薬剤のため、薬剤耐性変

異であるL100I, K103N, V106A/M, V108I, Y181CY, Y188CLH, G190A, P225H, P236Lはいずれも薬剤と逆転写酵素の結合部位に位置している。両者の結合親和性を低下させることにより耐性を呈する。したがって、耐性変異の獲得によって引き起こされる薬剤感受性の変化も大きく、単独変異で数百倍もの耐性を示すことが知られている。NNRTIの結合する窪みは小さいことから、3種類にNNRTIの耐性変異は重なっており、交叉耐性が著しいことが知られている。

3. PI耐性の部位と機序 (図3)

プロテアーゼ阻害剤はNNRTIと同様に、標的酵素に直接結合する薬剤であることから、薬剤耐性化機序は薬剤と酵素の結合親和性の低下であ

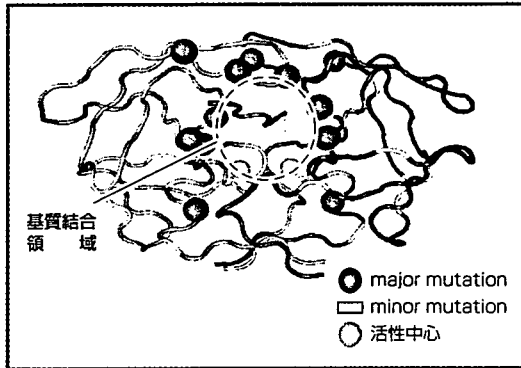


図3 プロテアーゼ阻害剤耐性変異

る。したがって、主要な変異の多くは阻害剤とプロテアーゼの結合面である活性中心近傍に集中している。これらの変異は特に耐性レベルに大きく影響を及ぼすことから、major mutationとよばれている。Major mutationにはD30N, M46L/L, G48V, I50V, V82A/F/T/S, I84V, L90Mがあり、L90Mを除きいずれも活性中心周辺に位置している。PIではこのほか薬剤結合部位から離れた部位にも薬剤投与に伴い変異が現れることが知られており、これらの変異は耐性レベルの増強だけでなく、major mutation獲得によるウイルスの増殖能の低下を補うことに関与していると考えられている。これらの変異はmajor mutationに対比してminor mutationとよばれている。構造学的にみると、これらの耐性変異の獲得により活性中心の空間が拡大するとされている¹⁰⁾。

PI耐性獲得に際しては、プロテアーゼの基質であるGagの基質領域 (cleavage site) や、それ以外の部分にも変異が誘導されることが報告されており、耐性ウイルスの増殖能の補完に重要であると考えられている^{11), 12)}。

薬剤耐性HIV-1の選択・淘汰機序

薬剤耐性変異の間には互いに干渉しあうものがあり、薬剤耐性ウイルスの選択・淘汰に大きく影響を及ぼしていることが知られている。例をあげるとPI阻害剤の一つであるネルフィナビル耐性変異D30NとL90Mが排他的な関係にあることが知られている。しかし、興味深いことに2次変異の集積によりこの2つの耐性変異の相互干渉が弱まり、最終的には2つの変異は共存できるようになる¹³⁾。RTIの場合でも、同様な干渉がテノホビル耐性変異K65Rとジドブジン耐性変異T215Yの間に存在することが知られている¹⁴⁾。このような耐性変異間の干渉は、薬剤耐性変異の選択・淘汰の過程に大きな影響を及ぼしていると考えられる。さらにこのような干渉は同一分子内だけでなく異なる分子間にも観察される。一番明確なのは前述したプロテアーゼとGagの間に観察される。

おわりに

薬剤投与に起因する薬剤耐性変異株の出現はHIV感染症に特有なものではなく、他の感染症(例えば結核、マラリア、細菌感染)、がんなどのさまざまな薬物治療においても治療の障害となっている問題であり、いわば薬物療法の孕む宿命ともいえよう。HIV-1感染症治療の場合は薬物治療が根治的なものではなく、長期間にわたり継続して服用しなければならないことから、薬剤耐性は疾患の予後を左右する深刻な問題となっている。この問題を解決するには薬剤耐性獲得機序、そしてその生体内における選択・淘汰の過程についてさらなる研究が必要である。

引用文献

- 1) CDC : Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men in New York and California. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 30 : 305-308, 1981
- 2) CDC : Pneumocystis pneumonia-Los Angeles. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 30 : 250-252, 1981
- 3) Popovic M, Sarngadharan MG, Read E, et al : Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. Science, 224 : 497-500, 1984
- 4) Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, et al : Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science, 220 : 868-871, 1983
- 5) Coffin JM : HIV population dynamics *in vivo*: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. Science, 267 : 483-489, 1995
- 6) Boucher CA, Cammack N, Schipper P, et al : High-level resistance to (-) enantiomeric 2'-deoxy-3'-thiacytidine *in vitro* is due to one amino acid substitution in the catalytic site of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. Antimicrob Agents Chemother, 37 : 2231-2234, 1993
- 7) Parikh UM, Zelina S, Sluis-Cremer N, et al : Molecular mechanisms of bidirectional antagonism between K65R and thymidine analog mutations in HIV-1 reverse transcriptase. Aids, 21 : 1405-1414, 2007
- 8) Arion D, Kaushik N, McCormick S, et al : Phenotypic mechanism of HIV-1 resistance to 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT); increased polymerization processivity and enhanced sensitivity to pyrophosphate of the mutant viral reverse transcriptase. Biochemistry, 37 : 15908-15917, 1998
- 9) Naeger LK, Margot NA, Miller MD : ATP-dependent removal of nucleoside reverse transcriptase inhibitors by human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. Antimicrob Agents Chemother, 46 : 2179-2184, 2002
- 10) Logsdon BC, Vickrey JF, Martin P, et al : Crystal structures of a multidrug-resistant human immunodeficiency virus type 1 protease reveal an expanded active-site cavity. J Virol, 78 : 3123-3132, 2004
- 11) Doyon L, Croteau G, Thibeault D, et al : Second locus involved in human immunodeficiency virus type 1 resistance to protease inhibitors. J Virol, 70 : 3763-3769, 1996
- 12) Myint L, Matsuda M, Matsuda Z, et al : Gag non-cleavage site mutations contribute to full recovery of viral fitness in protease inhibitor-resistant human immunodeficiency virus type 1. Antimicrob Agents Chemother, 48 : 444-452, 2004
- 13) Sugiura W, Matsuda Z, Yokomaku Y, et al : Interference between D30N and L90M in selection and development of protease inhibitor-resistant human immunodeficiency virus type 1. Antimicrob Agents Chemother, 46 : 708-715, 2002
- 14) Parikh UM, Bachelier L, Koontz D, et al : The K65R mutation in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase exhibits bidirectional phenotypic antagonism with thymidine analog mutations. J Virol, 80 : 4971-4977, 2006

①迅速化のための最近の基礎技術

DNA マイクロアレイ法

IWATANI YASUMASA/SUGIURA WATARU

岩谷靖雅/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

はじめに

ヒトゲノムプロジェクトはヒトの全遺伝子情報解明ということだけでなく、他のさまざまな生物の遺伝情報の解読にも多大な影響を与えた。感染症にかかわる病原体も、その例外ではない。近年、これらの遺伝情報を利用した生命科学技術の一つとして DNA マイクロアレイが注目を浴びている。感染症診断では、現在、おのおのの病原体について迅速に遺伝子診断する優れた方法があるが、多種類の病原体を網羅的に同時スクリーニングする方法がなく、時間がかかる培養/分離方法に頼らざるを得ない状況にある。一方、ベッドサイドや空港の検疫などの検査の現場では、疑われる病原体を網羅的かつ迅速にスクリーニングできる技術が要求される。その有力候補として、DNA マイクロアレイがある。感染症診断の分野で、この技術の威力が発揮されたのが SARS (severe acute respiratory syndrome: 重症急性呼吸器症候群) ウイルスのブレイクの時であった。当時、SARS ウイルスがコロナウイルスの仲間であることを同定する作業の中で、12 時間で出された DNA マイクロアレイの結果が一つの決め手であった¹⁾。DNA マイクロアレイを用いた感染症診断は、既知の病原体だけでなく未知の新興ウイルス/細菌の検出/同定にも大きな可能性を秘めていること物語っている²⁾。

▶ DNA マイクロアレイの基本原理解

多くの遺伝子解析技術は、核酸の相補性が一致した場合にアニーリングする特性を利用している。例えば、PCR 法、シーケンス解析法、サザン/ノーザンブロット法などは、いずれもプライマー・プローブと標的遺伝子の配列特異的なアニーリングを利用したものである。DNA マイクロアレイ法もハイブリダイゼーション (一本鎖の DNA, RNA を組み合わせることで、二本鎖分子の DNA-DNA, DNA-RNA, RNA-RNA を形成させること) を利用した、いわばマイクロサイズのサザンブロット法である。しかも、既知の DNA 断片 (プローブ) を数万から数十万種をチップ上に固着化することが可能であるため、網羅的に検体中の多種の核酸の有無を解析することができる。DNA マイクロアレイ法の流れを、細胞内の RNA 発現量の計測を例に挙げ、簡単に図 1 に示した。

検体細胞および対照細胞から mRNA (細菌の場合には rRNA) を抽出し、逆転写反応を利用して相補的な DNA (cDNA) を調製する。その逆転写の際に蛍光色素、Cy5 (緑) や Cy3 (赤) などを用いて直接あるいは間接的に cDNA を標識する。スライドガラス、またはシリコン基盤の上に、高密度に配置した既知のプローブとハイブリダイゼーションさせ、検出機で Cy3 と Cy5 の蛍

臨床と微生物 Vol.34 (増刊号) 2007.10. — 479 ● 023

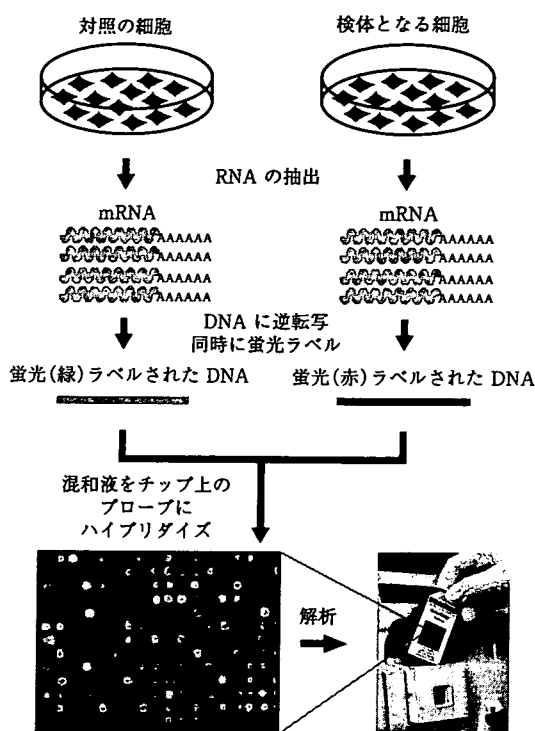


図1 DNA マイクロアレイの流れ

光強度をそれぞれ計測する。蛍光色素 Cy3, Cy5 は蛍光強度に応じてそれぞれ緑色, 赤色がコンピュータモニター上で着色される。したがって, ある遺伝子が検体細胞ではほとんど発現せず, 対照細胞では過剰に発現しているような場合, その遺伝子に対応するスポットは赤色に見えることになる。緑に見えるスポットは対照細胞でのみ発現している遺伝子であり, 黄色に見えるスポットは2つの細胞でもともに発現しているものである。両方の細胞でもともに発現がない遺伝子に関しては色が見えない, つまり黒色に見えることになる。これらの結果から, 使われたプローブの情報を基に, 検体中の RNA 量の発現量を一網打尽に検出 (比較) することができる。

ここで得られる結果は, 固定されるプローブに大きく依存する。現在, 世界中でさまざまなチップ技術が開発されているが, それらは大きく2つのタイプに分けられる。一つは, Affymetrix 社が開発した GeneChip (Affymetrix 型) であり, 024 ● 480 — 臨床と微生物 Vol.34 (増刊号) 2007.10.

もう一つは Stanford 大学の Brown 研究室で開発された cDNA マイクロアレイ (スタンフォード型) である。Affymetrix 社方式のオリゴヌクレオチドアレイ (GeneChip) は, フォトリソグラフィック技術と光照射化学合成を組み合わせ, 基盤上で 20~25mer 程度のオリゴヌクレオチドを合成することにより作成される。このオリゴヌクレオチドは, あらかじめ遺伝子の特異的な塩基配列を特定するためにコンピュータを用いて位置や長さなどがデザインされている。特に, ある遺伝子と完全に相補的になるようデザインされたプローブパーフェクトマッチだけでなく, ミスマッチと呼ばれる非特異的な塩基配列もプローブとして配置することによって, 非特異的なハイブリダイゼーションの定量値をシグナル値から減算できるのも大きな特徴である。これに対し, スタンフォード方式は, あらかじめ調製されたプローブをスライドガラス上に高密度に決まった位置に定量的に, スポッターを用いて打ちつけることによって作成される。スポット方法にはピン先端の固相への機械的な接触によるピン方式, インクジェットプリンタの原理を利用したインクジェット方式, スポッター内に加熱によって泡を生じさせ, その圧力を利用してサンプルを噴出させるバブルジェット方式, 毛細管によるキャピラリー方式などがある。

最近では, cDNA 断片を固定するスタンフォード型よりも, Affymetrix 型と同様に遺伝子情報からコンピュータ上で特異的な配列をデザインした 25~70mer のオリゴヌクレオチドを高密度に配置したタイプが主流となってきている。代表的なものとして, Agilent technologies 社の DNA マイクロアレイ, DNA チップ研究所の AceGene, タカラバイオ社の IntelliGene などがある。

2 DNA マイクロアレイの感染症診断への活用

DNA マイクロアレイは, 上述の RNA の発現

だけでなく、DNAにおける多型解析や遺伝子型の決定などにも応用可能である。すべてのアレイが適用可能ではないが、Affimetrix型のようにオリゴヌクレオチドを基盤上で合成する形式のGeneChipは、この目的に有効に利用できる。変異が入っていると思われる遺伝子についての変異検出用チップを作成することが可能となる。オリゴヌクレオチドプローブの中央にA, T, C, Gの置換を入れたものを合成し、増幅した目的遺伝子をハイブリダイズさせ、最も強いシグナルを出すプローブが目的遺伝子の配列となり、変異がある遺伝子は変異がない遺伝子と違ったパターンを示し、その配列の違いを検出することができる。いわゆるSNPs (single nucleotide polymorphisms: 一塩基遺伝子多型) 解析技術である。この方法によって、薬剤耐性病原体と宿主の薬剤感受性(あるいは耐性)を網羅的に検出可能である。例えば、HIV-1の逆転写酵素阻害剤やプロテアーゼ阻害剤に対する耐性変異の検出にも可能となる。

また、DNAマイクロアレイは未知の病原体(あるいはその亜種)の検出/同定にも利用できる。すでに多くの塩基配列が決定されている細菌のrRNAやウイルス種内で高度に保存されている遺伝子などが、オリゴヌクレオチドプローブに用いられる^{3,4)}。さらに、病原体に対する薬剤の反応性についても同様な原理で検索することができる。例えば、細菌の抗生物質に対する抵抗性であれば、

メチシリン耐性 (*mecA*) やバンコマイシン耐性 (*vanA*)、テトラサイクリン耐性 (*tetA*)、ペニシリン耐性 (*bla*) などの情報を得ることが可能である。

おわりに

以上のように感染症診断の分野でもDNAマイクロアレイは高い可能性と応用性を秘めている。しかし現状では、研究用には広く使われるようになってきたが、臨床診断用に日本国内で認可された例はまだまだない。さらに特許上の制約もあり、米国企業の先行的な臨床開発が進んでいるのが現状である。今後、日本国内でのDNAマイクロアレイ法を利用した感染症診断への実用化に向け、検出感度の増大、精度を高めることとともに、現行の感染症診断法よりもコストの面でも有利になることが期待される。

文献

- 1) Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS *et al.*: A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 348: 1953-1966, 2003.
- 2) Wang D, Urisman A, Liu Y-T *et al.*: Viral discovery and sequence recovery using DNA microarrays. *PLoS BIOLOGY* 1: 257-260, 2003.
- 3) 江崎孝行: Realtime PCRと系統アレイを用いた微生物相の網羅的解析方法, バイオインフォマティクがわかる. 105-111. 菅原秀明, 羊土社, 東京, 2003.
- 4) Wang D, Coscoy L, Zylberberg M *et al.*: Microarray-based detection and genotyping of viral pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 15687-15692, 2002.

* * *

薬剤耐性化と対策

薬剤耐性化

HIVの耐性化機序

Mechanisms of HIV drug resistance

杉浦 亙

Key words : HIV, 治療, 薬剤耐性

はじめに

HIV/AIDSの治療薬は1986年のzidovudineの登場以降、活発に開発が行われ、我が国では現在17種類の化合物が認可されている。1995年に開始された多剤併用療法 (highly active antiretroviral therapy: HAART) は優れた治療効果を示し、HIV-1感染者の予後は大きく改善された。しかし、現在の治療は疾病の進行を遅延させるだけで根治療法ではない。生涯にわたる服薬は薬剤耐性ウイルスのリスクと常に背中合わせである。

本稿では今、治療の前に立ちふさがるHIV薬剤耐性の機序について解説する。

1. 抗HIV-1療法の限界と薬剤耐性ウイルスの問題

HIV-1は活発なウイルスの新生(10^9 - 10^{10} 個/日)と精度の低い逆転写反応(3×10^{-5} /cycle)のため感染者体内で多様性に富む集団を形成している。その広がり範囲には薬剤耐性変異をもつものも含まれており、治療薬剤の服用によりそのような耐性変異獲得ウイルスは‘選択’され、‘選択’の繰り返しにより高度に耐性化していく。したがってわずかでも増殖が続いているかぎり、

薬剤耐性の出現は時間の問題であり、避けることができない。無論、耐性ウイルスが‘選択’されて確認できるようになる期間は薬剤などにより異なる。数週間で‘選択’されることもあれば10年以上過ぎてから出てくるものもあるであろう。はっきりとしていることは、現在使用されている抗HIV薬剤は例外なく薬剤耐性を誘導するという事実である。

2. 各薬剤クラスにおける耐性変異とその機序

抗HIV薬剤は標的・作用機序により①ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤 (nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitor: NRTI), ②非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤 (non-nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitor: NNRTI), ③プロテアーゼ阻害剤 (protease inhibitor: PI) の3クラスに分けられる。一般に薬剤耐性変異は治療薬剤の標的である各々の酵素に出現してくる。NRTIとNNRTIは逆転写酵素に、PIではプロテアーゼにおいて耐性に関与する特有の変異が誘導される¹⁾。以下各クラスの耐性化機序について記す。

a. NRTI耐性化機序

NRTIはHIV-1複製サイクルの初期に起こる

Wataru Sugiura: AIDS Research Center, National Institute of Infectious Diseases 国立感染症研究所 エイズ研究センター

逆転写反応の際に DNA 鎖に正常のヌクレオシドの代わりに取り込まれ、DNA 伸長反応を阻害する chain terminator である。今日 zidovudine (AZT), didanosine (ddI), zalcitabine (ddC), stavudine (d4T), lamivudine (3TC) と abacavir (ABC) そして nucleotide analogue の tenofovir (TDF) の 7 種類が使用されている。獲得する耐性変異のパターンと耐性化機序は薬剤ごとに異なりおおよそ以下のように分けられる。

1) AZT 耐性化機序

AZT 耐性変異は M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y/F, K219Q/E²⁾ が知られており、逆転写酵素の finger と呼ばれる部位に出現する (図 1-a)。この一群の変異をまとめて thymidine analogue resistance mutation (TAM) と呼ぶ。TAM による耐性化機序は pyrophosphorolysis あるいは excision と呼ばれる反応である。これは逆転写反応の際に取り込まれた ddNTP が PPi もしくは dNTP が反応基質となり取り外されてしまう現象で、一度停止した DNA の伸長の再開を許す機序である²⁾。この反応は ddNTP が活性部に取り込まれてから、最終的に化学反応により連結するまでに時間差があるため、耐性変異が獲得されると、この取り外される反応が亢進し、耐性として発現されると考えられる。この ddNTP を取り外す反応は NRTI に共通して起こり得る耐性の主要な機序であり、いずれの NRTI に対しても何がしかの耐性を呈する。この機序による耐性変異は単独ではあまり耐性を呈さないが、複数の変異が集積することにより耐性度が上昇することが知られている。

2) 3TC 耐性化機序

3TC の耐性化機序は逆転写酵素の活性中心配列 YMDD のメチオニンがバリンに置換されることによる。これはアミノ酸の置換により側鎖の方向が変わり、その結果取り込まれる 3TC 分子が側鎖と物理的に衝突するようになり取り込まれにくくなるためと考えられている (図 1-b)。耐性化機序からも容易に推測できるように、

M184V 変異が 3TC 耐性に及ぼす影響は極めて大きく、単独で 500 倍以上の耐性を呈することが知られている。興味深いことに、M184V 変異は逆転写酵素の活性にも影響を及ぼし、逆転写の精度を高めるとされている。ただし、逆転写の精度が高まることで、疾病の予後へどのように影響するかは定かではない。

3) TDF 耐性化機序

TDF 耐性変異の K65R は逆転写酵素の finger 領域にあり、65 位のリジンの側鎖は dNTP の捕捉に重要である (図 1-a)。特に TDF ではこのリジン残基は重要であり、アルギニンへの置換により捕捉効率が低下し、耐性を呈することが明らかになった。

4) RNaseH 活性と NRTI 耐性

HIV の逆転写酵素は polymerase 活性のほかに RNaseH 活性をもつが、近年 RNaseH 領域に誘導される変異が NRTI の耐性に関与していることが報告されつつある³⁾。

5) 多剤耐性変異

NRTI には 2 つの異なる多剤耐性変異がある。1 つは Q151M 変異であり、A62V, V75I, F77L, F116Y と組み合わせることによる高い耐性レベルを呈する。もう 1 つは finger 先端アミノ酸 68-69 領域への 2-3 アミノ酸の挿入変異であり、TAM との組み合わせで高い多剤耐性レベルを呈する。

6) NRTI 耐性変異間の相互作用

HAART では複数の NRTI を使用することから同時に複数の耐性が同じ酵素分子の中で観察されることがある。このような場合、耐性変異間に相互作用が生じ耐性レベルに影響を及ぼすことがある。まず AZT 耐性変異である M41L + T215Y は 3TC 耐性変異 M184V を獲得すると AZT に対する感受性が回復する。また変異の種類によっては排他的な組み合わせもあり、例えば K65R は構造的に AZT 耐性変異の T215Y と排他的な関係を示す⁴⁾。相互作用ではないが、M41L, T215Y などの変異が獲得されると次項

²⁾ 変異の記載は、野生型・アミノ酸番号・耐性型、の順である。例として M41L は 41 番目のアミノ酸が野生型のメチオニン (M) から耐性型のロイシン (L) に置換したことを示す。