

Quantitative SNP-Detection Method for Estimating HIV-1 Replicative Fitness: Application to Protease Inhibitor-Resistant Viruses

Shiro Ibe¹, Saeko Fujisaki¹, Seiichiro Fujisaki¹, Takayuki Morishita², and Tsuguhiro Kaneda^{*1}

¹Clinical Research Center, National Hospital Organization Nagoya Medical Center (Tokai Area Central Hospital for AIDS Treatment and Research), Nagoya, Aichi 460-0001, Japan, and ²Department of Microbiology, Aichi Prefectural Institute of Public Health, Nagoya, Aichi 462-8576, Japan

Received April 14, 2006; in revised form, July 10, 2006. Accepted July 26, 2006

Abstract: We have improved the methods for the standard competitive growth assay of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). The cloning step for the mixed viral population and subsequent genotype analysis for arbitrary numbers of clones were excluded from procedures. Instead, a single nucleotide polymorphism (SNP)-detection step was devised for the determination of viral populations. The quantitative SNP-detection method can rapidly estimate the proportion of wild-type and mutant populations with high reproducibility. Consequently, this method allows manipulation of many samples within a short period. Using this new competitive growth assay, replicative fitness of drug-resistant HIV-1 containing an M46I amino acid mutation in the protease was assessed in the presence or absence of indinavir. Without indinavir, replicative fitness of wild-type HIV-1 surpassed that of M46I-mutated HIV-1, and the fraction of mutated virus was reduced to about 10% at passage #9. In contrast, the fraction of M46I-mutated virus increased to >90% at passage #5 in the presence of 26.4 nM indinavir. Almost identical results were obtained for L90M-mutated HIV-1 with or without saquinavir. HIV-1 can survive under indinavir pressure by acquiring M46I mutation, as with acquisition of the L90M mutation under saquinavir pressure. However, these mutations damage viral replicative fitness under natural conditions without any drugs. Subtle differences between wild-type and mutant viruses are thus easily detected using the improved method.

Key words: Quantitative SNP-detection, Competitive growth assay, Viral replicative fitness, Protease inhibitor-resistant HIV-1

Competitive growth assay is a sensitive method for evaluating replicative fitness between 2 types of virus. In fact, this type of assay demonstrated the merit in determining minute differences in replicative fitness between viruses (1, 6). In this assay, viruses are dually inoculated into recipient cells and passed several times. Viral population at each passage is determined to judge which virus predominates. However, the procedure for standard competitive growth assay contains a cloning process for determining viral genotypes (19). This cloning process requires substantial time and labor, and arbitrary numbers of clones must be chosen from numerous clones for estimating viral populations. To bypass the cloning process, we established a quantitative

single nucleotide polymorphism (SNP)-detection method for estimating viral populations in the competitive growth assay. This method allows differential determination of viral genotypes and estimation of proportions with high reproducibility. We evaluated the usefulness of this method by assessing the replicative fitness of protease inhibitor-resistant human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) possessing an M46I or L90M amino acid mutation (2, 9, 20, 22).

*Address correspondence to Dr. Tsuguhiro Kaneda, Clinical Research Center, National Hospital Organization Nagoya Medical Center, Sannomaru 4-1-1, Naka-ku, Nagoya, Aichi 460-0001, Japan. Fax: +81-52-955-1878. E-mail: kanedat@nhh.hosp.go.jp

Abbreviations: CCID₅₀, 50% cell culture infective dose; CPE, cytopathic effect; FCS, fetal calf serum; HIV-1, human immunodeficiency virus type 1; IC₅₀, 50% inhibitory concentration; K_m, Michaelis constant; MTT, methylthiazolyl-diphenyl-tetrazolium bromide; PR, protease; RT-nested PCR, reverse transcription-nested polymerase chain reaction; SNP, single nucleotide polymorphism.

Materials and Methods

Cell culture. COS-7 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium with 10% fetal calf serum (FCS) and 20 µg/ml gentamycin. MT-4 cells were maintained in RPMI1640 with 10% FCS and 20 µg/ml gentamycin. Cells were cultured at 37 C with 5% CO₂ in a humidified chamber. All materials for cell culture were obtained from Invitrogen (Tokyo).

Construction and expression of HIV-1 infectious clones. The infectious clone of pHXB2-PR_{M46I} was generated from the pSUM9-based plasmid (kindly provided by Dr. H. Mitsuya, National Cancer Institute, Bethesda, U.S.A.) by site-directed mutagenesis in which ATG at codon 46 of the protease gene was changed to ATA, ATT or ATC (21). As ATA is a common codon in PR inhibitor-resistant viruses possessing the M46I mutation, we used this type of infectious clone for analysis of viral replicative fitness. Other ATT- and ATC-type clones were used only in preparing template DNAs for kinetics analysis of single nucleotide labeling, as described below. Another infectious clone, pHXB2-PR_{L90M}, was made using the same method, but with TTG at codon 90 of the protease gene changed to ATG. Next, 400 ng of each infectious clone was transfected into COS-7 cells (about 40% confluence in 1 ml of medium) with lipofectamine (Invitrogen). After 4 days, 500 µl of culture supernatants were transferred to a fresh culture of MT-4 cells in a logarithmic phase for a cell density of 1×10^5 cells/ml in a total volume of 5 ml. After another 4 days, culture supernatants were harvested as virus stocks by spinning at $400 \times g$ and stored at -80 C until use.

Inoculation of viruses into recipient cells. Recipient MT-4 cells were incubated with viruses at 37 C for 1.5 hr. After washing cells twice with phosphate-buffered saline, they were re-suspended in culture medium, and then cell culture was started. The detailed conditions of virus inoculation are described below.

Determination of viral titer. The 50% cell culture infective dose (CCID₅₀) of viral stocks was determined by the level of virus-induced cytopathic effect (CPE) (5, 17). The effect was triggered by infecting MT-4 cells (cell density, 1×10^5 cells/ml; total volume, 200 µl) with 5-fold serially diluted virus stocks in triplicate. The effect was assessed 5 days later using the methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) colorimetric method (16). Titers were estimated as 3.4×10^4 CCID₅₀/ml ($\pm 3.9 \times 10^3$ CCID₅₀/ml) for HXB2, 3.3×10^3 CCID₅₀/ml ($\pm 3.1 \times 10^2$ CCID₅₀/ml) for HXB2-PR_{M46I} and 3.2×10^3 CCID₅₀/ml ($\pm 5.3 \times 10^2$ CCID₅₀/ml) for HXB2-PR_{L90M}.

Drug susceptibility assay. Serially diluted drug solutions (100 µl) were added to 100 µl of 2×10^4 MT-4 cell suspensions inoculated with 10 CCID₅₀ of each virus. Tests used 7 concentrations of indinavir and saquinavir, from 1,000 ng/ml to 0.064 ng/ml. After 5 days of culture, living cells were assessed using the MTT colorimetric method, and 50% inhibitory concentration (IC₅₀) of virus-induced CPE was then determined (16, 17). Each experiment was performed in triplicate. Indinavir and saquinavir were generously donated by Merck & Co. (Linden, U.S.A.) and F. Hoffmann-La Roche (Basel, Switzerland), respectively.

Competitive growth of viruses. First, 50 CCID₅₀ each of wild-type HXB2 and either HXB2-PR_{M46I} or HXB2-PR_{L90M} were inoculated into 2×10^4 MT-4 cells, then co-cultured in 200 µl of medium. Every 4 days, viruses in 10 µl of culture supernatant were passed into fresh MT-4 cell culture to allow virus growth in optimal conditions. Viral RNA at each time point was purified from total harvested culture supernatant using a High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Tokyo). DNA fragments containing the protease gene of wild-type and mutated HIV-1 were amplified by reverse transcription-nested polymerase chain reaction (RT-nested PCR) and purified from the reaction mixture, as previously described (8). Finally, the population of each virus was differentially determined using a quantitative SNP-detection method developed for this study.

Single nucleotide labeling. Template DNAs (1,539 bp) used in generating standard curves and those used in a kinetics analysis were amplified by PCR with K4 and U12 primers (8), in which each plasmid of the infectious clone was individually added to a reaction mixture. Amplified DNAs were purified using a QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Tokyo), and DNA concentrations were determined from triplicate measurements by a BioSpec-1600 spectrometer (Shimadzu, Kyoto, Japan). Single nucleotide labeling was performed using a SNaPshot Multiplex kit (Applied Biosystems, Tokyo). The Ready Reaction Mix contained 4 kinds of dideoxynucleotide labeled with different fluorescence dyes: ddGTP, dR110; ddATP, dR6G; ddTTP, dROX; and ddCTP, dTAMRA. Reaction mixture (total volume, 10 µl) contained 5 µl of Ready Reaction Mix, 20 nM of template DNAs, and 200 nM of SNP PR46 or SNP PR90 primer. Template DNAs of 4 different concentrations (5, 10, 20 or 40 nM) were added into reaction mixtures for kinetics analysis. For determining the third nucleotide of protease codon 46, we adopted an antisense primer (SNP PR46, 5'-(A)₁₁TCT TAC TTT GAT AAA ACC TCC AAT TCC CCC TAT-3') because a sense primer showed possible stem structure formation through the 3'-terminal region. A sense

primer (SNP PR90, 5'-(A)₁₅GAC CTA CAC CTG TCA ACA TAA TTG GAA GAA ATC TG-3') was used for determining the first nucleotide of protease codon 90. After labeling, 1 unit of calf intestinal alkaline phosphatase (New England BioLabs, Beverly, U.S.A.) was added to dephosphorylate unincorporated dideoxynucleotide substrates. Thermal controls for labeling and dephosphorylation were performed in accordance with the protocols described by the manufacturers. For electrophoresis, 1/600-diluted labeling mixture was applied to a Genetic Analyzer 310 (Applied Biosystems). Each area was estimated using GeneScan software (Applied Biosystems).

Growth kinetics analysis. For growth kinetics analysis, 2×10^5 MT-4 cells were inoculated with 10 or 100 CCID₅₀ of each virus. Cells were cultured in 2 ml of medium for 8 days, and aliquots of culture medium were harvested and spun down to obtain supernatants every 2 days. Amounts of p24 in supernatants were quantified using a Retro-Tek enzyme-linked immunosorbent assay kit (ZeptoMetrix, New York, U.S.A.).

Results

Development of Quantitative SNP-Detection Method

Determining the ratio of mixed genotype populations is easy using the SNP-detection method. However, as the SNaPshot reagent was developed for qualitative detection of SNP, products labeled with each dideoxynucleotides did not yield equal intensities. Fluorescence intensity of a unit amount of primer labeled with ddGTP, ddATP, or ddTTP was therefore measured and normalized to that of ddCTP-labeled primer to obtain intensity ratios. Kinetics analysis of single nucleotide labeling showed that each kind of labeled products increased in a Michaelis-Menten manner and nearly reached a plateau of 20 nM template DNA (Fig. 1). Michaelis constant K_m values of dideoxynucleotides ranged from 7.2 to 7.9 nM, indicating that affinities of the 4 types of dideoxynucleotide to DNA polymerase were similar. Ratio of fluorescence intensity at 20 nM of template DNA concentration was as follows: G:A:T:C = 2.51 : 1.55 : 1.34 : 1.00. We subsequently generated a standard curve for determining the mix ratio of DNA fragments. Standard DNA mixtures with 6 different ratios of wild-type and mutant DNA (0:100, 20:80, 40:60, 60:40, 80:20 and 100:0) were subjected to single nucleotide labeling, and reaction mixtures were analyzed using the Genetic Analyzer. Two types of fluorescence-labeled primers were detected at similar time points, one labeled with ddCTP (wild-type) and the other with ddTTP (mutant) through the codon 46 poly-

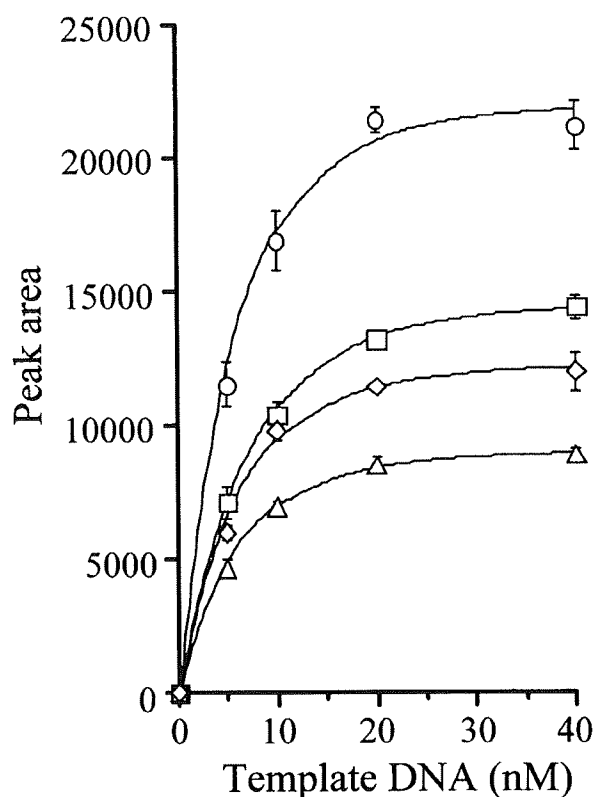


Fig. 1. Kinetics of single nucleotide labeling. SNP PR46 primers were individually labeled with different types of dideoxynucleotide, ddGTP (circles), ddATP (squares), ddTTP (diamonds), or ddCTP (triangles). Data represent means and standard deviations calculated from triplicate experiments.

morphism; or one labeled with ddTTP (wild-type) and the other with ddATP (mutant) through the codon 90 polymorphism. Y-axis values were calculated using the intensity ratio determined above. The standard curves thus generated are shown in Fig. 2. Standard deviations ranged from 0 to ± 1.0 in intra-assays ($n=5$) and from 0 to ± 1.9 in inter-assays ($n=15$), indicating high reproducibility for this method. The standard curves generated at four different concentrations of template DNA (5, 10, 20, and 40 nM) were similar in both cases of PR codons 46 and 90 (data not shown).

Competitive Growth Assay of Wild-Type and Protease Inhibitor-Resistant HIV-1

Before starting the competitive growth assay, IC_{50} values for indinavir and saquinavir were determined. The IC_{50} of indinavir was 26.4 ± 3.2 nM to HXB2 and 35.2 ± 1.4 nM to HXB2-PR_{M46I}. Resistance of HXB2-PR_{M46I} compared to HXB2 was 1.3-fold. The IC_{50} of saquinavir was 8.1 ± 1.2 nM to HXB2 and 17.4 ± 2.7 nM to HXB2-PR_{L90N}. Resistance of

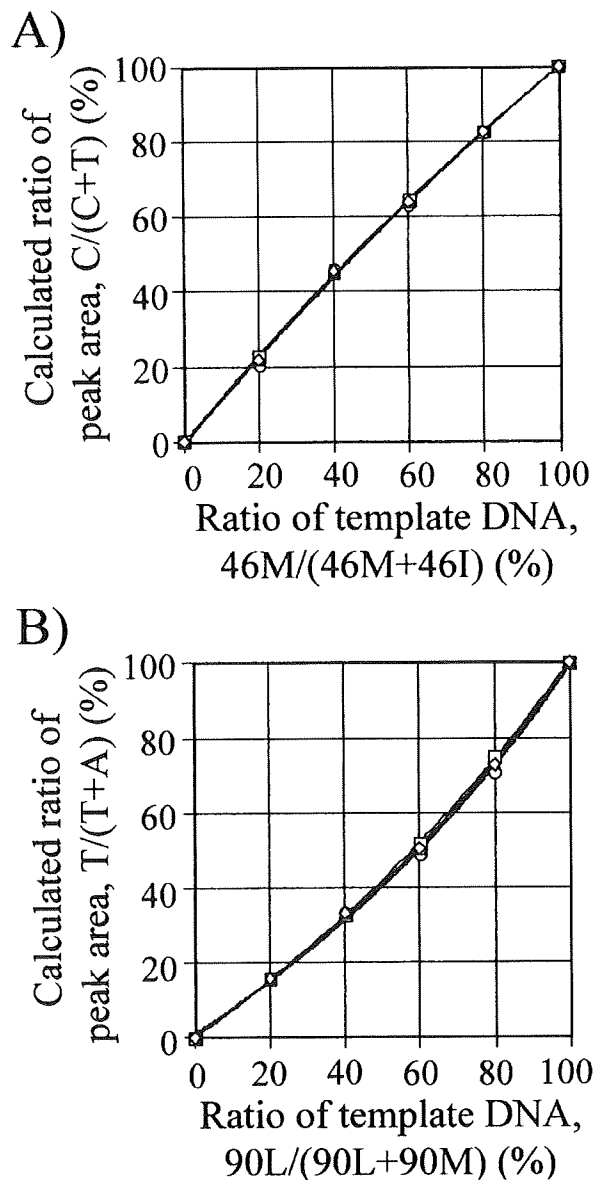


Fig. 2. Standard curves for estimating the ratio of viral populations in the co-culture of HIV-1. Standard curve for estimating the ratio of viral populations in the co-culture of HXB2 and HXB2-PR_{M46I} (A), or in the co-culture of HXB2 and HXB2-PR_{L90M} (B). Labeling reaction was performed with 20 nM template DNA. Three experiments were performed on different days, and 5 measurements were made. Day 1, squares; day 2, circles; day 3, triangles; and all data, diamonds. Standard deviations ranged from 0 to ± 1.0 in intra-assays and from 0 to ± 1.9 in inter-assays. Ratios of viral populations were estimated from calculated ratios of peak area using these standard curves.

HXB2-PR_{L90M} compared to HXB2 was 2.1-fold. Levels of drug resistance for HXB2-PR_{M46I} and HXB2-PR_{L90M} resembled previous descriptions (3, 10–12, 14, 15).

To evaluate the effects of M46I or L90M protease

mutations on the replicative fitness of HIV-1, we directly compared replicative fitness of wild-type HXB2 with that of HXB2-PR_{M46I} or HXB2-PR_{L90M} using competitive growth assays. In co-culture containing 26.4 nM indinavir, the proportion of HXB2-PR_{M46I} increased from 51% at passage #1 to 75% at passage #3, and 95% at passage #7 (Fig. 3A, left). Conversely, the proportion of HXB2-PR_{M46I} decreased in a linear manner from 57% at passage #3 to 10% at passage #9 in the absence of indinavir (Fig. 3A, right). These results indicate that HIV-1 with the M46I mutation exhibits higher replicative fitness than wild-type HIV-1 in the presence of indinavir, but lower replicative fitness in the absence of this drug. Next, replicative fitness was compared between HXB2-PR_{L90M} and wild-type HXB2 in the same assay system. HXB2-PR_{L90M} completely dominated in co-cultures containing 8.1 nM saquinavir at passage #3 (Fig. 3B, left). In contrast, the proportion of HXB2-PR_{L90M} gradually decreased from 56% at passage #1 to 21% at passage #11 in the absence of saquinavir (Fig. 3B, right). These results indicate that acquisition of the L90M mutation is advantageous to HIV-1 replication in the presence of saquinavir, but reduces replicative fitness in the absence of the drug. To quantitatively evaluate relative replication efficiency of HIV-1 mutants, logarithm ratios against passage numbers of co-culture were plotted. Decreases in the proportion of both HXB2-PR_{M46I} and HXB2-PR_{L90M} were clearly apparent in the absence of any drug (Fig. 4), indicating that both M46I and L90M mutations damage the replicative fitness of HIV-1, although the level of damage is not serious. The nucleotide sequence of RNA genome was determined to eliminate the possibility that HIV-1 had captured any other mutations affecting viral replication during culture, but no such mutations were detected.

Growth Kinetics Analysis

Growth kinetics analysis is another common method for evaluating replicative fitness of HIV-1, although the sensitivity is lower than that of competitive growth assay (1, 19). We examined whether the reduced replicative fitness of HXB2-PR_{M46I} or HXB2-PR_{L90M} was detectable by growth kinetics analysis. After inoculation with 100 CCID₅₀ of HXB2, HXB2-PR_{M46I} and HXB2-PR_{L90M}, all viruses exhibited similar growth kinetics (Fig. 5A). Vigorous growth occurred to nearly 500 ng/ml of p24 for 4 days before reaching a plateau. Similar growth kinetics were also observed in the assay inoculated with 10 CCID₅₀ of viruses, 1/10 of the dose in Fig. 5A (Fig. 5B). No reduced replicative fitness of HXB2-PR_{M46I} or HXB2-PR_{L90M} was demonstrated by growth kinetics analysis. This result also implies that damage caused by the M46I and L90M mutations does

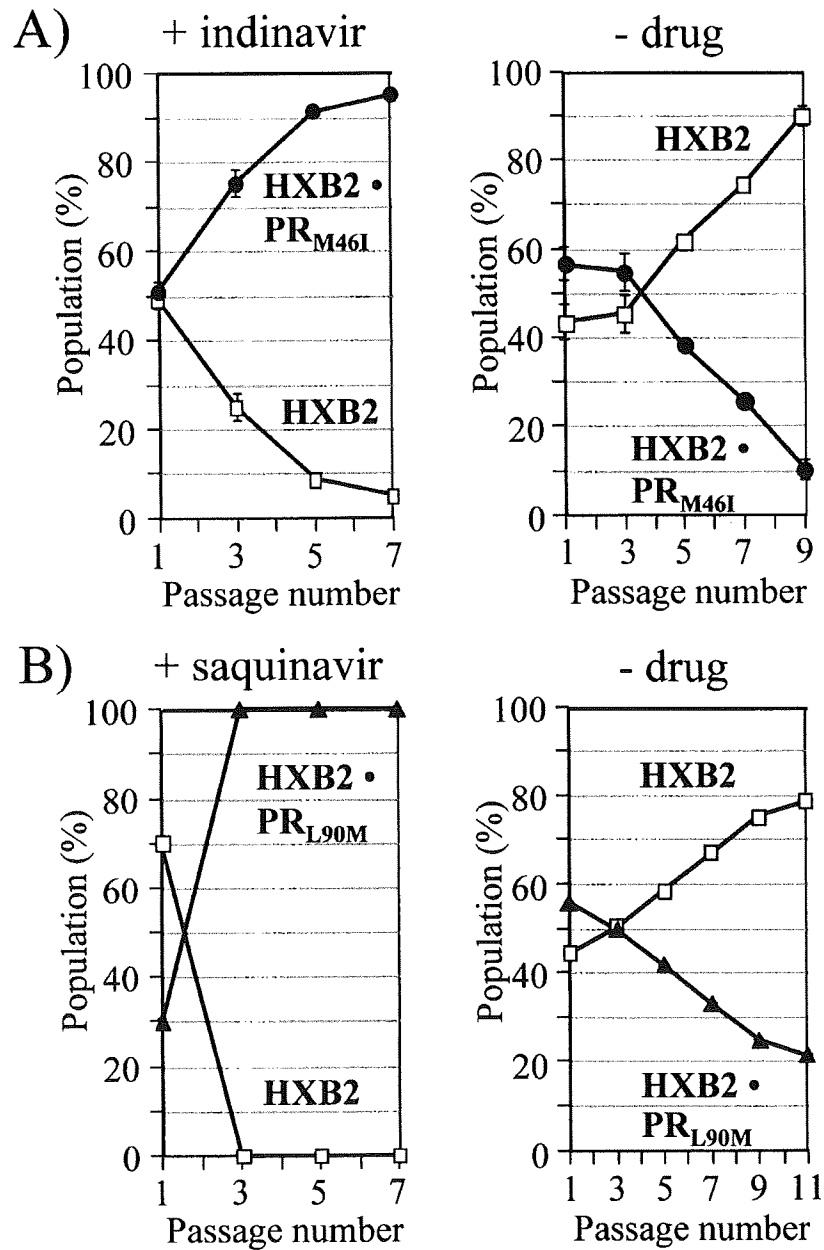


Fig. 3. Competitive growth assay. A) Competitive growth assay for HXB2-PR_{M46I} (closed circles) and wild-type HXB2 (open squares) in the presence (left) or absence (right) of 26.4 nM indinavir. B) Competitive growth assay for HXB2-PR_{L90M} (closed triangles) and wild-type HXB2 (open squares) in the presence (left) or absence (right) of 8.1 nM saquinavir. Data represent means and standard deviations calculated from triplicate measurements.

not severely impact the replicative fitness of HIV-1.

Discussion

HIV-1 can easily mutate through the error-prone reverse-transcription in the replication process. HIV-1 thus generates variants that can escape from the host immune system or can cause resistance against anti-

retroviral drugs. Such variants cannot form major populations in viral quasi-species when acquired mutations cause severe damage to replicative fitness. Drug-resistant HIV-1, however, has been found in 6% of therapy-naïve patients at our hospital (7). Assessment of replicative fitness has thus become important for understanding the survival activity of drug-resistant HIV-1 found in therapy-naïve patients.

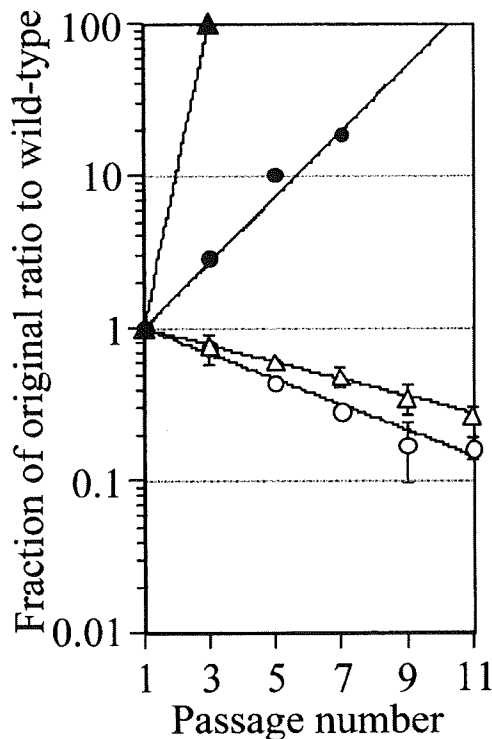


Fig. 4. Relative replicative efficiency of mutant viruses. Logarithm ratios of mutant virus to wild-type virus were plotted against passage numbers in co-culture. Ratios of HXB2-PR_{M46I} in the presence or absence of indinavir are represented as closed or open circles, respectively. Ratios of HXB2-PR_{L90M} in the presence or absence of saquinavir are represented as closed or open triangles, respectively. Data obtained from experiments in the absence of drugs represent means with standard deviations calculated from triplicate experiments.

The most sensitive method for evaluating the replicative fitness of drug-resistant HIV-1 is the competitive growth assay between wild-type and mutant viruses (1, 6). In the process of this assay, cloning methods have generally been used for determining the mix ratio of any 2 viral populations (19). However, the cloning process requires substantial time and labor for transformation, and arbitrary numbers of clones must be chosen from numerous clones for estimation of viral populations. We developed a quantitative SNP-detection method to bypass the ambiguity in the cloning process. Two types of viral genotype can be detected differentially as 2 kinds of peaks on electrophoregrams, and the fluorescence intensities that reflect viral populations are automatically estimated by the Genetic Analyzer. This method, however, possesses a weak point in that observed fluorescence intensity requires normalization, since the fluorescence intensities of the 4 of dye-labeled dideoxynucleotides are unequal. A standard curve

should thus be made for estimation. Once the standard curve is established, the quantitative SNP-detection method we developed offers an easy and conventional method. Labeling and dephosphorylation reactions during the assay require only 2 hr, and no purification of labeled products is necessary. In addition, as running time of capillary electrophoresis requires 20 min, population ratio at 1 time point can be determined within 3 hr. Our method allows manipulation of numerous samples for competitive growth assay.

Using this newly developed method of quantitative SNP-detection, we evaluated the effects of M46I or L90M protease mutations on the replicative fitness of HIV-1. Lower replicative capacities of HXB2-PR_{M46I} and HXB2-PR_{L90M} were identified compared with that of HXB2 in the absence of drugs. In contrast, replicative capacities of these mutants were higher than that of HXB2 in the presence of the relevant drugs. We therefore concluded that acquisition of M46I or L90M mutations enables HIV-1 to survive under pharmacotherapeutic pressure, but sacrifices the replicative fitness of HIV-1 in the absence of drug. Martinez-Picado et al. previously noted that HIV-1 with the L90M mutation exhibits lower replicative fitness than wild-type virus, but found that HIV-1 with the M46I mutation possesses similar replicative fitness to wild-type virus in the absence of drug (12, 13). The present results are consistent with their findings for the L90M mutation, but are at odds with their findings for the M46I mutation. Two possibilities can be considered to explain this discrepancy. First, the genetic background of infectious HIV-1 clones used in these studies may be different, as we used HXB2-based viruses while Martinez-Picado et al. used NL4-3-based viruses. Second, methods for estimating viral populations in co-culture also differed. The SNP-detection method we developed offers the advantage of quantification using PCR products expanded from whole co-existing viruses. In contrast, Martinez-Picado et al. adopted the cloning method, randomly picking 20 clones from numerous clones constructed using a mixture of wild-type and mutated viruses before determining genotypes. This method seems to rely on arbitrary selection of clones. As the database of Stanford University shows an ultra-low prevalence of 0.07% for M46I mutation among HIV-1 isolates from patients untreated with protease inhibitors, this type of HIV-1 mutant does not seem optimally adapted to conditions without drugs. The decreased level of replicative fitness may be associated with reduced levels of catalytic activity in the M46I-mutant protease (4, 18).

We have been studying the prevalence of drug-resistant HIV-1 in therapy-naïve patients (7). Mean preva-

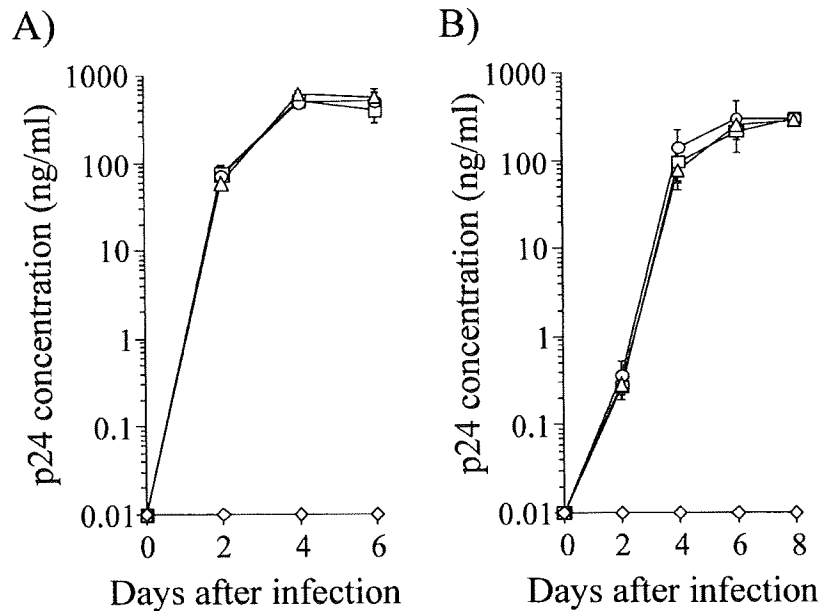


Fig. 5. Viral growth kinetics assay. Wild-type HXB2, HXB2-PR_{M46I} and HXB2-PR_{L90M} were individually inoculated into 2×10^5 MT-4 cells with 100 CCID₅₀ (A) or 10 CCID₅₀ (B). Cells were cultured in 2 ml of culture medium for 8 days. Amounts of p24 in culture supernatants were quantified by enzyme-linked immunosorbent assay at 0, 2, 4, 6 and 8 days. HXB2, HXB2-PR_{M46I}, HXB2-PR_{L90M} and no virus are shown as squares, circles, triangles and diamonds, respectively. Data represent means with standard deviations calculated from triplicate experiments.

lence over the past 6 years has been about 6%, but the epidemic has become a serious problem as antiretroviral drugs cannot be properly selected in such cases unless drug-resistant genotype testing identifies the drug-resistant amino acid mutations before initiation of therapy. About one-third of the pool of drug-resistant HIV-1 cases in our hospital possesses M46I or L90M mutation. Given the present results, we can speculate that these types of drug-resistant viruses restore any reduction in replicative fitness by acquiring other effective mutations in the genome and consequently allowing survival under drug-free conditions such as in therapy-naïve patients. We are now engaged in detecting amino acid mutations responsible for improvements in replicative fitness.

Seiichiro Fujisaki is a research resident of the Japanese Foundation for AIDS Prevention. This study was partly supported by a Health Science Research Grant for Research on HIV/AIDS from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan (No. H-16-AIDS-002 to TK).

References

- 1) Clavel, F., Race, E., and Mammano, F. 2000. HIV drug resistance and viral fitness. *Adv. Pharmacol.* **49**: 41–66.
- 2) Condra, J.H., Holder, D.J., Schleif, W.A., Blahy, O.M., Danovich, R.M., Gabryelski, L.J., Graham, D.J., Laird, D., Quintero, J.C., Rhodes, A., Robbins, H.L., Roth, E., Shivaprakash, M., Yang, T., Chodakewitz, J.A., Deutsch, P.J., Leavitt, R.Y., Massari, F.E., Mellors, J.W., Squires, K.E., Steigbigel, R.T., Tepler, H., and Emini, E.A. 1996. Genetic correlates of *in vivo* viral resistance to indinavir, a human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor. *J. Virol.* **70**: 8270–8276.
- 3) Condra, J.H., Schleif, W.A., Blahy, O.M., Gabryelski, L.J., Graham, D.J., Quintero, J.C., Rhodes, A., Robbins, H.L., Roth, E., Shivaprakash, M., Titus, D., Yang, T., Tepler, H., Squires, K.E., Deutsch, P.J., and Emini, E.A. 1995. *In vivo* emergence of HIV-1 variants resistant to multiple protease inhibitors. *Nature* **374**: 569–571.
- 4) Gulnik, S.V., Suvorov, L.I., Liu, B., Yu, B., Anderson, B., Mitsuya, H., and Erickson, J.W. 1995. Kinetic characterization and cross-resistance patterns of HIV-1 protease mutants selected under drug pressure. *Biochemistry* **34**: 9282–9287.
- 5) Harada, S., Koyanagi, Y., and Yamamoto, N. 1985. Infection of HTLV-III/LAV in HTLV-I-carrying cells MT-2 and MT-4 and application in a plaque assay. *Science* **229**: 563–566.
- 6) Holland, J.J., de la Torre, J.C., Clarke, D.K., and Duarte, E. 1991. Quantitation of relative fitness and great adaptability of clonal populations of RNA viruses. *J. Virol.* **65**: 2960–2967.
- 7) Ibe, S., Hotta, N., Takeo, U., Tawada, Y., Mamiya, N., Yamanaka, K., Utsumi, M., and Kaneda, T. 2003. Prevalence of drug-resistant human immunodeficiency virus type

- I in therapy-naïve patients and usefulness of genotype testing. *Microbiol. Immunol.* **47**: 499–505.
- 8) Ibe, S., Shibata, N., Utsumi, M., and Kaneda, T. 2003. Selection of human immunodeficiency virus type 1 variants with an insertion mutation in the p6^{int} and p6^{ext} genes under highly active antiretroviral therapy. *Microbiol. Immunol.* **47**: 71–79.
 - 9) Jacobsen, H., Hänggi, M., Ott, M., Duncan, I.B., Owen, S., Andreoni, M., Vella, S., and Mous, J. 1996. *In vivo* resistance to a human immunodeficiency virus type 1 proteinase inhibitor: mutations, kinetics, and frequencies. *J. Infect. Dis.* **173**: 1379–1387.
 - 10) Jacobsen, H., Yasargil, K., Winslow, D.L., Craig, J.C., Kröhn, A., Duncan, I.B., and Mous, J. 1995. Characterization of human immunodeficiency virus type 1 mutants with decreased sensitivity to proteinase inhibitor Ro 31-8959. *Virology* **206**: 527–534.
 - 11) Mammano, F., Trouplin, V., Zennou, V., and Clavel, F. 2000. Retracing the evolutionary pathways of human immunodeficiency virus type 1 resistance to protease inhibitors: virus fitness in the absence and in the presence of drug. *J. Virol.* **74**: 8524–8531.
 - 12) Martinez-Picado, J., Savara, A.V., Shi, L., Sutton, L., and D'Aquila, R.T. 2000. Fitness of human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor-selected single mutants. *Virology* **275**: 318–322.
 - 13) Martinez-Picado, J., Savara, A.V., Sutton, L., and D'Aquila, R.T. 1999. Replicative fitness of protease inhibitor-resistant mutants of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **73**: 3744–3752.
 - 14) Maschera, B., Furfine, E., and Blair, E.D. 1995. Analysis of resistance to human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitors by using matched bacterial expression and proviral infection vectors. *J. Virol.* **69**: 5431–5436.
 - 15) Molla, A., Korneyeva, M., Gao, Q., Vasavanonda, S., Schipper, P.J., Mo, H.M., Markowitz, M., Chernyavskiy, T., Niu, P., Lyons, N., Hsu, A., Granneman, G.R., Ho, D.D., Boucher, C.A., Leonard, J.M., Norbeck, D.W., and Kempf, D.J. 1996. Ordered accumulation of mutations in HIV protease confers resistance to ritonavir. *Nat. Med.* **2**: 760–766.
 - 16) Pauwels, R., Balzarini, J., Baba, M., Snoeck, R., Schols, D., Herdewijn, P., Desmyter, J., and De Clercq, E. 1988. Rapid and automated tetrazolium-based colorimetric assay for the detection of anti-HIV compounds. *J. Virol. Methods* **20**: 309–321.
 - 17) Pauwels, R., De Clercq, E., Desmyter, J., Balzarini, J., Goubau, P., Herdewijn, P., Vanderhaeghe, H., and Vandeputte, M. 1987. Sensitive and rapid assay on MT-4 cells for detection of antiviral compounds against the AIDS virus. *J. Virol. Methods* **16**: 171–185.
 - 18) Pazhanisamy, S., Stuver, C.M., Cullinan, A.B., Margolin, N., Rao, B.G., and Livingston, D.J. 1996. Kinetic characterization of human immunodeficiency virus type-1 protease-resistant variants. *J. Biol. Chem.* **271**: 17979–17985.
 - 19) Quiñones-Mateu, M.E., and Arts, E.J. 2002. Fitness of drug resistant HIV-1: methodology and clinical implications. *Drug Resist. Updat.* **5**: 224–233.
 - 20) Schapiro, J.M., Winters, M.A., Stewart, F., Efron, B., Norris, J., Kozal, M.J., and Merigan, T.C. 1996. The effect of high-dose saquinavir on viral load and CD4⁺ T-cell counts in HIV-infected patients. *Ann. Intern. Med.* **124**: 1039–1050.
 - 21) Shirasaka, T., Kavlick, M.F., Ueno, T., Gao, W.Y., Kojima, E., Alcaide, M.L., Choekijchai, S., Roy, B.M., Arnold, E., Yarchoan, R., and Mitsuya, H. 1995. Emergence of human immunodeficiency virus type 1 variants with resistance to multiple dideoxynucleosides in patients receiving therapy with dideoxynucleosides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**: 2398–2402.
 - 22) Zhang, Y.M., Imamichi, H., Imamichi, T., Lane, H.C., Falloon, J., Vasudevachari, M.B., and Salzman, N.P. 1997. Drug resistance during indinavir therapy is caused by mutations in the protease gene and in its Gag substrate cleavage sites. *J. Virol.* **71**: 6662–6670.

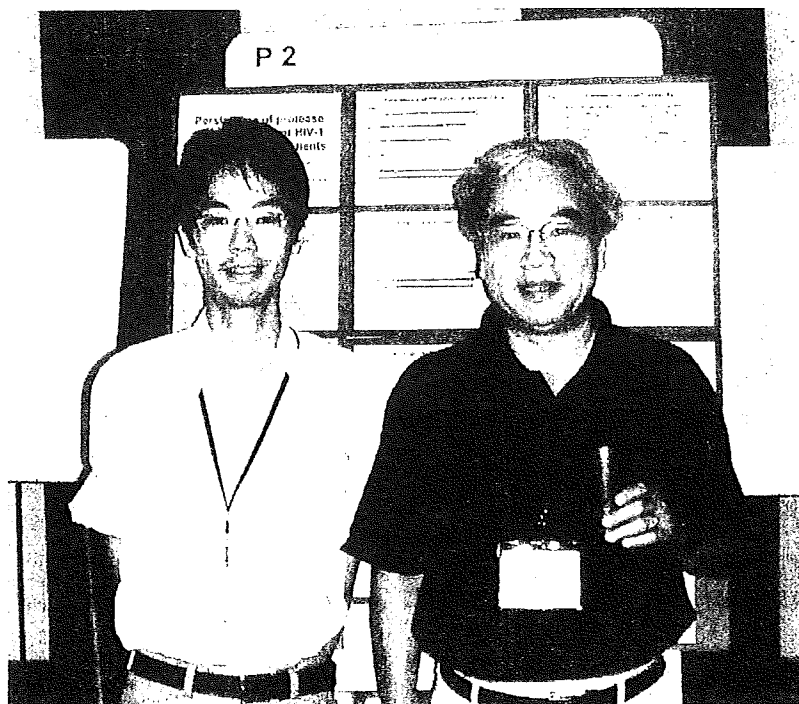
第2回HIV国際会議に参加

2nd International Workshop on HIV Persistence during Therapy

独立行政法人国立病院機構 名古屋医療センター
臨床研究センター
金田 次弘

標記ワークショップは昨年で2回目。昨年12月6日から9日まで、カリブ海のセントマーチン島で開催されました。HIV-1発見者の一人であるGallo博士を中心とするアメリカの研究者とLafeuillade博士らフランスの研究者が中心となって2003年に企画されたものです。日本からは私と名古屋医療センターの伊部史朗研究員、熊本大学の松下修三教授が参加しました。

さて、HIV感染症/エイズは人類が克服しなければならない感染症の一つですが、1996年から始まったHAARTと呼ばれる、プロテアーゼ阻害薬と逆転写酵素阻害薬を用いた多剤併用療法の進歩により、もはや死の病ではなくなったといっても過言ではありません。しかし、HAARTの恩恵を被る事ができるのはその費用の多大さから先進国の患者に限らざるを得ず、一部では抗HIV薬の使用が始まったとはいえ、アフリカ等の発展途上国のHIV感染症治療は未だ極めて限定的な状態にあります。この状態を一気に改善するにはワクチン開発しかないというのがコンセンサスですが、アミノ酸変異を獲得してすばやく姿を変えて生き残る戦略を持つHIVに翻弄されているのが実情といえます。しかも、HAARTがHIV感染細胞を死滅させる効果は有していませんので、HAARTの原則は“一生服用”です。今後もHAARTを軸にしたHIV感染症治療の展開になると思われますが、HAARTを効果的に実施していく上でも、潜伏感染したHIVの様々な性質を研究するこ



(左) 伊部史朗研究員 (右) 筆者

とが重要です。何故ならば、それらを知ることにより潜伏感染したHIVやHIV潜伏感染細胞を、より効果的に殲滅することを可能にする戦略を立てることが出来るからです。ワークショップの目論見はこんなところだと思います。

今回のシンポジウムの構成を整理してみると①HIV-1の持続感染に関わる“聖域”(抗HIV薬が十分に到達しない組織、HIV-1感染細胞が存在し続けている組織と読み替えても可能)はどこか。②HIV-1のリザーブ(貯水池、HIV-1プロウイルス保有細胞・組織)になり得る組織・細胞は何か。③感染標的細胞内のHIV-1 DNA量は治療遂行上のマーカーとして役立つか。④HIV-1感染に抵抗し、防御的に働くホスト因子と感染を増進させるホスト因子の特徴と解析。⑤潜伏HIV-1感染細胞の



ワークショップ参加者の皆様

除去を目指した新しい治療法の開拓、新規薬剤の試用。⑥HAART初期治療を困難にする未治療患者に伝播した薬剤耐性HIV-1の特徴、にまとめられます。第一回目のシンポジウムと比べると③、④、⑥の分野が重視されて充実してきました。以下、具体例を挙げながら詳しく説明します。

①と②は独自性を持ちながらも相互に関連しているので、ひとつのジャンルとして整理してみます。まず“聖域”についてですが、解剖学的視点から予想された中枢神経系、生殖器官やリンパ組織等です。このうち、脳脊髄液中のHIV-1 RNA量は前HAART時代とHAARTが一般化している現在とを比較すると、統計的優位差を持って現在のほうが低値を示しています。中枢神経系は聖域とは言うものの部分的にはHAARTの効果はある、との主張もありましたが、私の解釈では部分的にしか効果のない有効薬剤濃度に達しない器官は“薬剤耐性HIV-1の生育部位”になり兼ねない、HIV感染症治療にとって厄介な器官と評価したほうが良いと思われました。細胞リザーブとしては、休止期CD4陽性メモリーT細胞、ナイーブCD4陽性T細胞、単球（マクロファージ）などが既に証明されていますが、今回、

新たな細胞種に関する発表は有りませんでした。ただ、ナチュラルキラー細胞やメモリーT細胞を構成するCD4+CCR5+細胞に、一旦細胞内に取り込んだ抗HIV薬を細胞外に吐き出す機能を持ったP-糖蛋白質が高レベルに発現し、その結果これらの細胞が感染リザーブに成り続けるとしたPavlakisグループの発表は注目に値します。

③については、従来フランスのグループが精力的なコホート研究を継続していますが、今回、注目すべき結果を出してきました。末梢血単核球中のHIV-1 DNA量は治療遂行にとって極めて有意義なマーカーになる、そして100コピー/10⁶細胞以下の症例ではHAART中断後も血中ウイルス量が上昇しないケースが多いと報告しました。私達も、同様のデータを持っていますが、HIV-1 DNA量が治療中断のエビデンスになるかの判断を下す研究がよいよ世界中で活発に展開される時が来たとの感を強くしました。

さて、④のテーマですが、このテーマは非常に重要なテーマだと思います。ヒューマンゲノム計画でヒト遺伝子の全塩基配列は決定されたことは記憶に新しい出来事です。しかも、なんと約40%の塩基配

別はレトロウイルスの残骸とも言えるレトロエレメントに占められていました。この結果は、人類がいかにレトロウイルスの攻撃にさらされてきたか、また幾度となくその攻撃を乗り越えてきた歴史を物語っています。と同時にゲノムに進入してきたレトロウイルスを無害化する未知のメカニズムを人類は持っている可能性を夢想させる結果でした。Trono等のグループが精力的に研究しているAPOBECファミリーもその一つだと思われます。TRIM5という蛋白質もHIV-1複製を阻害することが知られていますが、レトロウイルスの無害化に関わる蛋白質の更なる発見、メカニズムの解析、その結果の臨床応用など期待は尽きない研究分野です。

⑤のテーマでも幾つかの興味ある報告がなされました。そのひとつがhistone deacetylase inhibitorです。この物質はがんの治療薬としても期待されていますが、潜伏感染細胞内のHIV-1プロウイルスを活性化させるそうです。したがって、HAARTと共にこの阻害薬を投与すると潜伏感染細胞の除去が出来るという戦略です。また、HIV-1複製に必須のTatを活性化する宿主因子positive transcription elongation factorの活性阻害を通じHIV-1複製を阻害するというindirubin-3'-monoximeは漢方薬に見出された抗白血病薬の誘導体ですがGallo博士のグループで研究されているのが印象的でした。

私達は⑥に関する分野で「Persistence of Protease Inhibitor-resistant HIV-1 in Therapy-naive Patients」を発表しました。言うまでもなく

未治療患者に検出される薬剤耐性HIV-1の感染源はHAART治療を受けている患者で、かつ、アドヒアランスの不良などにより患者体内に惹起された薬剤耐性HIV-1が伝播したものです。北米大陸やヨーロッパにおける検出率は数年前に既に10%を超えています。わが国では約3%です。名古屋地区では全国平均より高値で約6%です。私達が強調したい第一点は、複製のフィットネスを大きく失うような耐性度の高い薬剤耐性ウイルスは伝播しにくい点です。第二は、しかしM46IやL90Mなどの薬剤耐性アミノ酸変異を獲得したウイルスは野生型ウイルスに比べ極端にフィットネスは落ちず、新規個体に伝播し、かつバックミューテーションを起こさずに3年以上も主要ウイルス種として持続感染しうる点です。第三は、gag内の遺伝子変異に起因したアミノ酸変異により野生型HIV-1を凌ぐ増殖性を付与される可能性があるという点です。HAART時代の不可避的な出来事ですが、効率よいHAARTを開始するためには、事前に薬剤耐性遺伝子検査を実施しなければならない時代が到来しました。事の真偽の究明も含め、今後とも重視しなければならない分野であると思います。残念ながらハードスケジュールの為に、降り注ぐ太陽とカリブの海は全く楽しむことが出来ませんでした。

最後に、ワークショップ参加を援助して下さった政策医療振興財団と関係者諸氏に深甚なる感謝を表明し稿を終わらせていただきます。

医療訴訟「判例紹介」は、しばらくの間お休みします。

「医療の広場」編集室

プライマリ・ケア医が対処できる 合併症と専門医に送るべき合併症

間宮均人¹⁾ 濱口元洋²⁾

国立病院機構名古屋医療センター 1) 感染症科医長 2) 臨床研究センター副センター長

SUMMARY

- ・プライマリ・ケア医にとってもHIV感染症は身近なものとなってきている。
- ・免疫抑制の程度の著しい患者や、エイズ規定疾患に罹患している患者は専門医に送ることが望ましい。
- ・HIVの合併症の診療にあたっては、CD4数を参考にすると鑑別に役立つ。
- ・HIV感染症の合併症には特徴あるものが多いので、そのポイントをおさえておけば、円滑な対応が可能である。
- ・HIV感染者に成人病が合併することが増加している。プライマリ・ケア医のHIV感染所医療における重要度は今後増大する。

はじめに

本稿での前提は、対象症例のHIV感染症が既知であることである。HAARTを受けている症例では、薬物相互作用に留意して治療にあたる必要があるが、HIV患者が日常疾患に罹患した場合には、全くの一般診療を実施することになる。

とはいえ、HIV患者に特徴的な合併症は特別な考慮を要する場合があり、その知識をもって診療にあたることのメリットは大きいので、ここで専門医に送るべきものを中心として概観してみたい。

I

皮膚症状

皮膚疾患の合併は頻繁にみられる。脂漏性湿疹は、頭部や顔面、前胸部、腋窩などを中心に掻痒感の強い落屑と紅斑を示す。ステロイドによる局所療法が適応になる。症状が強い場合には皮膚科へのコンサルトも考える。毛嚢炎もよくみられる。ブドウ球菌などによる細菌性の毛嚢炎では、抗菌薬による局所治療を行う。

好酸球性膿疱性毛嚢炎は高度な掻痒を呈することがあり、ステロイド局所治療や光線療法が施行される。疥癬の合併も時折みられるので、その可能性も考慮する。掻痒の強い赤色丘疹を指間、手関節掌側、腋窩、大腿、臍周囲、性器、間擦部位に見つけたら、疥癬を疑って皮膚科依頼をすることが望ましい。乾癬の重症化もみう

けられる。白癬症に対しては通常の対応をする。間擦部位に皮膚カンジダ症をみれば、フルコナゾールなど抗真菌薬で治療する。口唇や性器の単純ヘルペスは抗ウイルス薬で治療する。帯状疱疹も頻度の高い合併症である。

限局した皮膚病変は通常の抗ウイルス薬で対応する。重症例や網膜壊死など眼科合併症、中枢神経症状を合併する場合には専門医へのコンサルトが必要になる。赤紫色の丘疹が拡大し、バルトネラ感染症である細菌性多発性血管腫が疑われると

き、生検を必要とするので専門医へのコンサルトが勧められる。播種性クリプトコッカス血症の部分症として皮膚クリプトコッカス症が発症することがある。輸入真菌感染症によっても同様な皮膚感染が起こりえるので、その場合は専門医に相談すべきであろう。HHV-8感染によるカポジ肉腫は、CD4が高値であっても発症するエイズ規定疾患である。それなりの頻度で遭遇する疾患である。下肢、顔面、口腔内、性器などに黒褐色ないし紫色調の皮疹をみたら、生検が必要である。

II

口腔症状

口腔内病変の合併症に、口腔内カンジダ症がある。フルコナゾールなどの抗真菌薬の投与で治療する。ただし、頻回に同症を繰り返すときには、HAARTの適応も考えられるので、専門医へのコンサルトが望ましい。これと鑑別すべき毛状白板症は、EBウイルス感染によるもので

あるが、とくに治療する必要はない。非特異的な口腔内アフタも頻度が高い。通常の治療を行う。口唇や舌にHPVによる疣贅をみることがある。ときに有痛性の高度な歯周炎をみる。この場合には、抗菌薬投与と歯科治療を要する。

III

消化器症状

消化器症状として多いのは下痢である。ノロウイルスやキャンピロバクターによる感染性下痢症に対しては、標準的治療法を施す。サルモネラ感染症は高率に菌血症を合併するので、ニューキノロンで治療する。再発する場合はエイズ規定疾患に該当する。難治性の場合には専門医に送るべきであろう。慢性の下痢の原因として赤痢アメーバが、かなりの高頻度で認められる。フラジール®を6錠から9錠分3投与が標準治療である。プライマリ・ケア医が治療を担当することに支障はないと考えられるが、薬剤の過少量投与がなされている例があるので注意する。肝膿瘍を合併すれば、専門医に依頼するのが無難であろう。典型的な粘血便を伴わない下痢症

として発症することがあるので、寄生虫感染を疑ってみることが必要である。ジアルジア症、イソスポラ症、サイクロスポラ症、クリプトスポリジウム症などによる感染症が散見されるので、治療に反応しない下痢症は専門医にコンサルトするのが適切と考えられる。ただし、HAART治療を受けている患者が当初から薬剤による下痢を生じている場合には、ロペミン®などの止瀉剤を適宜投与すればよい。食道の感染症として、カンジダ、サイトメガロウイルス、単純ヘルペスウイルスがあるが、重篤になる可能性を有しているから、専門医に委ねるべきである。食道カンジダ症に対してフルコナゾールなどの抗真菌薬で治療を開始するのは妥当であるが、患者

がエイズを発症していることを意味するため、速やかに専門医に送るので無難である。

肝炎の合併は高頻度であり、また、深刻な問題となっている。急性A型肝炎はSTDとしての発症が多く、ほかの肝障害を合併していなければ良好な経過をとるので通常の治療でよい。急速B型肝炎もSTDとしてみられることが多い。HIVとの重感染で慢性化率が高いことが知られるが、肝炎が重症であれば、当然専門医に送る必要がある。

HBs抗原陰性でHBs抗体陰性の患者に対して初期段階でHBVワクチンを推奨することは重要である。慢性B型肝炎の治療は、専門医に任せるべきであろう。ラミブジンの単独投与は回避しなければならない。HIVウイルスのラミブジン耐性を誘導することによって、HIV治療の幅を狭めてしまうからである。慢性C型肝炎の標準療法はリバビリンとペグインターフェロンの併用療法であるが、これもプライマリ・ケアの枠を超える問題である。

IV 耳血所見の異常

貧血もよくみる合併症である。HIVそのものによる正球性貧血に対してはエリスロポエチン製剤を使用することがあるが、保険診療の関係上困難な場合も多い。鉄欠乏性貧血の場合には消化管や女性の場合では婦人科疾患をスクリーニングすべきである。核酸系逆転写酵素阻害薬のレトロビル[®]や、日和見感染予防のために、バクタやダブソンが投与されている場合には、こ

れらの薬剤による溶血性貧血が生じている可能性があり、HIV治療の基本薬剤を変更することが必要であるかもしれないので、専門医にコンサルトすべきであろう。HIVそのものによるか、レトロビル[®]やガンシクロビルなどの薬剤による白血球減少症に対しては、G-CSFの投与が必要になることがある。この場合もやはり、専門医にコンサルトしたほうがよいと考える。

V 神経学的合併症

神経学的合併症では、プライマリ・ケアの範疇におさまる疾患は僅少である。HIV感染症自体による抹消神経炎であることが明白であれば、対症療法を行うことに問題はない。

しかし、HAART施行中の多発神経炎は核酸系逆転写酵素阻害剤によるミトコンドリア障害である可能性がある。HIV治療の薬剤を変更する必要があるかどうか、専門医へのコンサルトがよいと考えられる。運動神経障害は、初期感染のギランバレー症候群、慢性期のCIDPが知られるが、どちらも専門医による診断治療が必要であろう。下肢の筋力低下を認めた場合には、HIVによるミエロパシー、HSVやCMVによる

多発根神経炎、ビタミンB₁₂欠乏症など鑑別すべきものが多いので、専門医に送るべきと考えられる。中枢神経疾患は重篤なものばかりであり、プライマリ・ケアとして対応すべきものではないので、その早期発見が主たる目標になる。頭痛、発熱で発症するクリプトコッカス髄膜炎は症状から疑いやすい。血清のクリプトコッカス抗原の感度が95%を超えている。また、髄液中の同抗原はさらに高い感度を示すことから、診断は困難ではないと思われる。トキソプラズマ脳症は腫瘍を形成する中枢神経疾患の合併症としては頻度として最多である。原発性中枢神経性リンパ腫がこれにつく。両疾患とも麻痺な

どの明確な神経症状が出現すれば、画像所見からマス・エフェクトを伴う腫瘤として認識できるので、両疾患のうちのいずれかの存在を強く疑うまでの道程は明解である。しかし、その初期段階では漠然とした倦怠感や注意散漫、軽度の性格変化としてしか臨床症状を示さない場合があるので、一度は疑ってみることがポイントであると考えられる。できればMRIを、そうでなければCTを撮影して腫瘤の存在診断を行う。他方、意識障害が著名であり、専門医に送るまでに時間を要する場合には、トキソプラズマ脳症を否定できない状況で、ピリメサミンとスルファジアジンによるエンピリカルにトキソプラズマ脳症の治療を開始することは考えられる。トキソプラズマ脳症の可能性があるときには、最初から脳生検を実施しないで、2週間程度反応をみるのが標準的な診療手順になっているうえ、トキソプラズマ脳症は急速に進行して、治療

を急がなければならないことが多いからである。

また、構語障害や麻痺などの神経症状とともにマス・エフェクトと伴わない、多発病巣を皮質下に認める場合には、進行性多巣性白質脳症(PML)を考え、専門医に送るのが適当であろう。HIV脳症は見当識画障害として初発する。画像上腫瘤を示すことがない。画像に所見があるときには、びまん性の白質病変が皮質の萎縮とともに認められる。反射亢進、歩行障害などの運動機能障害は、高度になると対麻痺や四肢麻痺にいたる。初期段階で治療すれば、HAARTによって改善することが多い。HIV脳症の合併が疑われたら、専門医に送るべきと考えられる。HIV脳症と鑑別が問題になるものにCMV脳炎がある。髄液のPCRで診断されることが多い。当然、専門家に送るべきであろう。髄膜炎がみられるときには、クリプトコッカスや一般細菌のほかにも、結核性のものを念頭に置く。

VI

精神症状

躁うつ病、单相性うつ病、パニック障害などの精神科的合併症の頻度は高い。軽度のうつ状態に

対して抗うつ剤を処方するのは妥当だが、それ以外の場合には精神科受診が必要となることが多い。

VII

眼科症状

眼科的合併症として、飛蚊症や視力障害、視野障害、充血などの症状が出現した場合に、眼科コンサルトをすることが重要である。サイトメガロ網膜炎、急性ヘルペス性壊死性網膜炎、トキソプラズマ網膜脈絡膜炎など、急速な視力

障害を引き起こすことのある疾患に対する注意を怠らないことは、視力低下や失明のような事態を可及的に回避するうえで必要である。二期梅毒に合併するブドウ膜炎やライター症候群に合併する結膜炎なども散見される。

VIII

呼吸器合併症

呼吸器感染症の合併に遭遇することは多い。CD4が200以上ある状態での肺炎は、肺炎球

菌やインフルエンザ桿菌などによる細菌性肺炎のことが多いので、プライマリ・ケア医が対応

できる。その際、当然のことながら、結核を除外診断すべきである。CD4が200以下に低下すれば、ニューモシスチス肺炎の合併に注意する。エイズに合併する同疾患は3週間程度かけて徐々に呼吸障害が進行することが多いので、手遅れにならないように、このエイズ規定疾患を念頭に置きながら、治療にあたるのが大切である。呼吸苦を訴える免疫低下患者では、胸部CT検査を積極的に行い、ニューモシスチス肺炎が疑われるのであれば、専門医に送るのが無難であると考えられる。無治療で放置すれば致死的であるが、早期から治療すれば予後がよい疾患であるので、診断の遅れを防止することが重要である。肺結核は典型的な画像を示す場合は疑うのは困難ではないが、縦隔リンパ節の腫脹のみで、肺野病変が目立たないのに排菌がみられることもあるので、常に疑ってかかる姿勢で診療に臨むのが、結核に対する暴露を最小限にするうえでも適切であろう。肺の非定型好酸菌症、クリプトコッカス症やノカルジア症などを鑑別しなければいけない場合もある。通常肺炎と異なる画像所見や臨床所見がある場合

には専門医にコンサルトすることが必要である。CD4が50以下の場合、とくにステロイド使用後には、HIV感染症には比較的まれなサイトメガロ肺臓炎を認めることはあるので、その疑いがあるときは早急に専門医に送る。ニューモシスチス肺炎が疑われる場合に、 β -Dグルカンの測定が有力な補助診断となる。逆にこの測定値が高い場合の肺炎に対して、プライマリ・ケア医にて、カンジダ症などの真菌感染症としてニューモシスチスに有効ではない治療をうけているケースもみられるので、十分注意したい。ニューモシスチス肺炎の病原体の検出に際して、高濃度食塩水の吸入による誘導痰のギムザ染色やディフ・クイック染色あるいは、蛍光抗体による検出ができることが多いので活用したい。それで、診断がつかない場合はBALをするが、専門医に送ることが必要になる。

また、胸部に画像上腫瘤病変を認めた場合、当然専門医に送るべきであるが、カポジ肉腫やリンパ腫の頻度が高い。肺癌、クリプトコッカス感染症のほか、まれに腫瘤形成型ニューモシスチス感染症なども可能性がある。

IX

代謝性合併症

代謝性疾患でエイズ規定疾患であるのは、エイズ消耗性症候群である。もちろん、専門医に送るべき状態であるが、定義上、10%以上の体重減少があり、さらに30日以上続く下痢症状な

いし、衰弱と発熱を有する状態である。

成長ホルモンなどによる治療が行われることもあるが、HAARTをはじめとして、二次感染の検索、消化管疾患の検索を要する。

X

腎合併症

腎疾患の合併症として、よくみられるのは、薬剤による腎機能障害である。HAARTで現在でこそ投与される頻度は減ったが、かつての標準療法を構成していたインジナビルの結晶によ

る間質障害の後遺症は、経過観察で足りるが、腎機能障害のある薬剤を避けることが必要である。また、腎結石を合併していれば、その治療が必要になることもあるので、泌尿器科へのコ

ンサルトをする。クリプトコッカス髄膜炎の治療などに用いられるアンフォテリシンBや、ニューモシスチス肺炎の第二選択薬であるペンタミジン、サイトメガロウイルス感染症治療薬であるホスカーネットやシドフォビルなどの使用後の腎機能障害をみることはあると考えられるが、やはり、なるべく腎機能障害性の薬剤を併用することを避けたい。HIV腎症も、時にみ

られる。ネフローゼ領域の蛋白尿で発症することが多い。HAARTがある程度奏功することが知られる。専門医へ送ることが必要である。また、血尿とタンク尿がC型慢性肝炎に、艇補体血症や紫斑とともにみられれば、混合型クリオグロブリン血症の合併を考慮して専門医に送るべきである。

XI

心血管系合併症

心血管系合併症で、今後増加することが予想されるのは、虚血性心疾患である。とくに、プロテアーゼ阻害薬の副作用で高脂血症がみられることが多い。その長期副作用としての発症率の増加が知られるので、抗HIV療法が長期に及ぶ例では、注意すべきである。肺高血圧症や拡

張型心筋症の合併が知られ、HAARTの有効性も報告されているので、相当する症状があれば、積極的に心エコーによるスクリーニングを考える。さらに、結核性心外膜炎がみられることもあり、心嚢液が貯留している場合には専門医にコンサルトする。

XII

悪性腫瘍

悪性腫瘍の合併にも注目し、その可能性があれば、専門医のコンサルトすることも大切である。エイズ規定疾患であるカポジ肉腫、ノンホジキンリンパ腫、子宮頸癌のほかにも、肺癌や

ホジキン病、メラノーマなどの頻度の増加が報告されているので、プライマリ・ケアに際して注意しておく。

おわりに

HAARTの絶大な効果によってHIV感染症が真の慢性疾患として扱われるようになった現在、HIV特異的な疾患もさることながら、成人病や、

ごく一般の疾患の合併が増加している。プライマリ・ケア医のHIV診療における重要性は増すばかりである。

(参考文献)

- 1) Dolin R, Masur H, Saag M : AIDS Therapy. Churchill Livingstone, 2003.
- 2) Bartlett J, Gallant J : 2005-2006 Medical Management of HIV infection, Johns Hopkins Medicine Health Publishing Business Group, 2005.

名古屋医療センターにおける 抗HIV療法の変遷とTDMの有効例

高橋昌明*^{†1,2}, 奥村直哉^{1,2}, 伊部史朗², 久高祐一¹, 溝口和代¹, 鈴木達男¹, 金田次弘²

独立行政法人国立病院機構名古屋医療センター薬剤科¹, 臨床研究センター²

Effectiveness of Therapeutic Drug Monitoring and Changes in Antiretroviral Regimens in HIV-1 Infected Patients at Nagoya Medical Center

Masaaki Takahashi*^{†1,2}, Naoya Okumura^{1,2}, Shiro Ibe², Yuichi Kudaka¹,
Kazuyo Mizoguchi¹, Tatsuo Suzuki¹, Tsuguhiro Kaneda²

Department of Pharmacy¹, Clinical Research Center², National Hospital Organization Nagoya Medical Center

〔受付：2006年2月7日 受理：2006年3月31日〕

HIV感染症の治療は、抗HIV薬の開発と多剤併用療法（以下、HAART）によって大きな進歩を遂げた。しかしその一方で、HAARTの長期的実施における副作用や耐性ウイルスの出現などが問題となってきた。こうした変化を反映して、独立行政法人国立病院機構名古屋医療センター（以下、当センター）での抗HIV薬の使用量も核酸系逆転写酵素阻害薬は全体的に使用量が減少傾向となっている。一方、プロテアーゼ阻害薬や非核酸系逆転写酵素阻害薬は、より強力な、服薬しやすい薬剤の使用が増えている。また、HAARTにおける抗HIV薬のTDMは、至適治療域の確認、ウイルスの耐性化予防、副作用防止、アドヒアランスの確認などの点において有用と評価できるが、簡便な測定技術がないことや結果解釈の難しさなどからルーチン検査として確立されるには至っていない。当センターではHPLCを用いた簡便な測定法（M. Takahashi *et al.* : *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 1286-1290 (2005))を開発し、現在、臨床応用に供しているが、その実状について報告する。

キーワード—HIV, Therapeutic drug monitoring, 多剤併用療法, 血中濃度

緒言

HIV-1感染症の治療は、抗HIV薬の開発とそれらの薬剤を用いた多剤併用療法（以下、HAART : highly active antiretroviral therapy）によって大きな進歩を遂げ、AIDSの発症率やAIDSによる死亡率は著しく減少した¹⁾。しかしその一方で、長期にわたるHAARTにおいて、耐性ウイルスの出現によりHAARTが無効となる症例もみられるようになった。また、長期治療によるアドヒアランスの低下、ミトコンドリア障害による高乳酸血症やリポジストロフィーなどの慢性毒性の発現などといった問題点も明らかとなった²⁻⁵⁾。

近年、アドヒアランスの改善を目的とした1日1回療法や耐性ウイルスにも有効な新薬の開発など、HAART

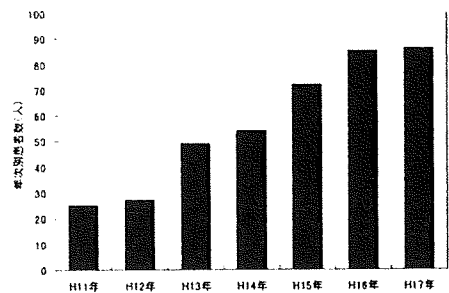
の問題点を改善すべくいくつもの試みが行われている。しかしながら、抗HIV薬のtherapeutic drug monitoring（以下、TDM）に関する研究は未だ始まったばかりであり、様々なデータが蓄積され始めたというのが現状である^{6,7)}。名古屋医療センター（以下、当センター）ではHPLCを用いた簡便な測定法⁸⁾を開発し、現在臨床に適用している。今回、抗HIV薬の使用量およびTDM測定件数の推移について検討を行うとともに、実際に経験した症例を用いてHIV-1感染患者に対するTDMの有用性について検討したので報告する。

対象および方法

平成11～17年における当センター外来を受診したHIV-1感染患者を対象に、抗HIV薬の使用量およびTDMの測

† 愛知県名古屋市中区三の丸4-1-1 ; 4-1-1, Sannomaru, Naka-ku, Nagoya-shi, Aichi, 460-0001 Japan

(A) 新規患者数



(B) 累積患者数

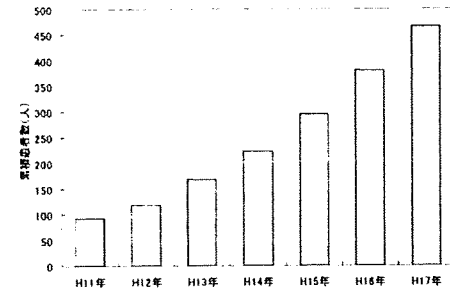


図1 HIV-1感染患者数の年次別推移

定件数の年次別推移を比較検討した。当センターではHPLCを用いた測定法⁸⁾を独自に開発し、すべてのプロテアーゼ阻害薬とエファビレンツ（以下、EFV）の血中濃度を測定している。また、同期間内においてウイルスの薬剤耐性化による治療無効例、薬物濃度に依存する副作用発現例に対してTDMが重要な役割を果たした2症例を選択した。本研究は当センター倫理審査委員会での承認を得ており、また、対象となる患者からは文書による同意を得た。

結果

1. HIV-1感染患者数の年次別推移

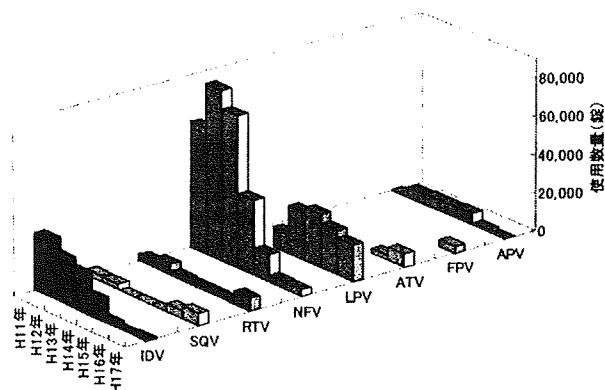
平成11～17年における当センター外来を受診した新規患者数の年次別推移を図1(A)に、また、累積患者数の推移を図1(B)に示した。新規患者数は平成11年の25人から

年々増加し、平成16年で85人、平成17年で86人となり、名古屋地区におけるHIV-1の感染拡大が懸念された。また、累積患者数も平成17年末時点で466人となった。

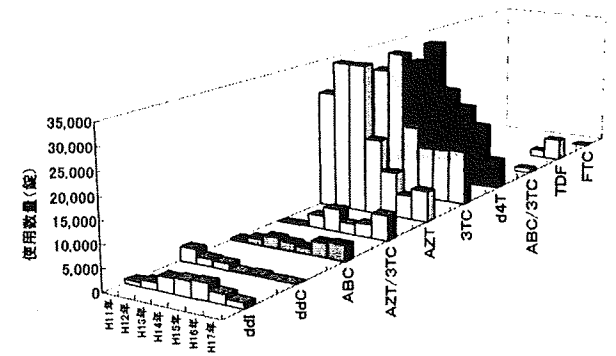
2. 抗HIV薬の使用量

各年における抗HIV薬の使用量の推移を図2に示した。プロテアーゼ阻害薬(A)の中で、インジナビルの使用量は29,880錠(平成11年)をピークに720錠(平成17年)まで減少した。同様にネルフィナビル(以下、NFV)も88,695錠(平成12年)をピークに3,600錠(平成17年)ま

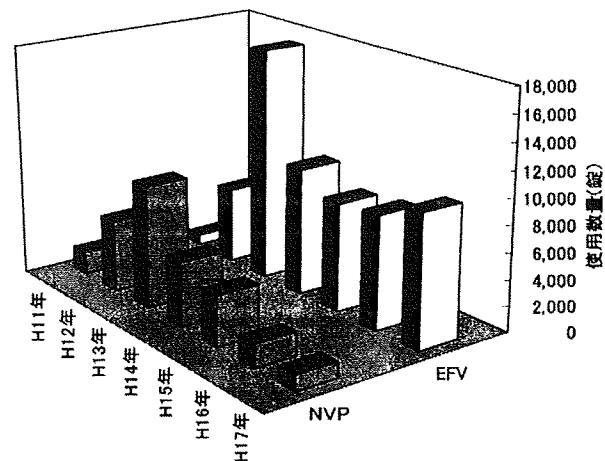
(A) プロテアーゼ阻害薬



(B) 核酸系逆転写阻害薬



(C) 非核酸系逆転写阻害薬



IDV：インジナビル、SQV：サキナビル、RTV：リトナビル、NFV：ネルフィナビル、LPV：ロビナビル、ATV：アタザナビル、FPV：ホスアンプレナビル、APV：アンプレナビル、AZT：ジドブジン、ddl：ジダノシン、ddC：ザルシタピン、3TC：ラミブジン、d4T：サニルブジン、ABC：アバカビル、TDF：テノホビル、FTC：エムトリシタピン、NVP：ネビラビン、EFV：エファビレンツ

図2 抗HIV薬の使用量の年次別推移

表1 HAARTレジメンの年次別組み合わせ

年	最多のHAARTレジメン	2番目のHAARTレジメン
平成11年	AZT+3TC+NfV	AZT+3TC+IDV
平成12年	d4T+3TC+NfV	AZT+3TC+NfV
平成13年	d4T+3TC+EFV	AZT+3TC+NfV
平成14年	AZT+3TC+LPV/r	AZT+3TC+EFV
平成15年	AZT+3TC+EFV	d4T+3TC+EFV
平成16年	AZT+3TC+EFV	AZT+3TC+LPV/r
平成17年	AZT+3TC+EFV	AZT+3TC+LPV/r

AZT：ジドブジン，3TC：ラミブジン，NfV：ネルフィナビル，
IDV：インジナビル，d4T：サニルブジン，EFV：エファビレンツ，
LPV/r：ロピナビル/リトナビル

で減少した。サキナビルは3,200錠(平成11年)から徐々に減少したが、最近、増加傾向にあり、平成17年では6,700錠であった。リトナビル(以下、r)は6,000錠(平成12年)をピークに1,000~2,000錠で推移した。なお、平成17年に6,840錠と増加したのは、ロピナビル(以下、LPV)やアタザナビルとの併用投与によるものである。一方、平成12年に発売されたLPVは抗HIV活性が強いのが特徴で、毎年20,000~30,000錠と最もよく使用されていた。また、1日1回投与が可能なアタザナビルが7,140錠(平成17年)、ホスアンプレナビルが3,660錠(平成17年)と増加傾向にあった。

核酸系逆転写酵素阻害薬(B)は、全体的に使用量が減少傾向にあった。なかでもジドブジンが38,800錠(平成13年)をピークに7,200錠(平成17年)に、ラミブジンが36,000錠(平成13年)をピークに12,780錠(平成17年)に、サニルブジンが40,080錠(平成13年)をピークに6,840錠(平成17年)へと減少した。

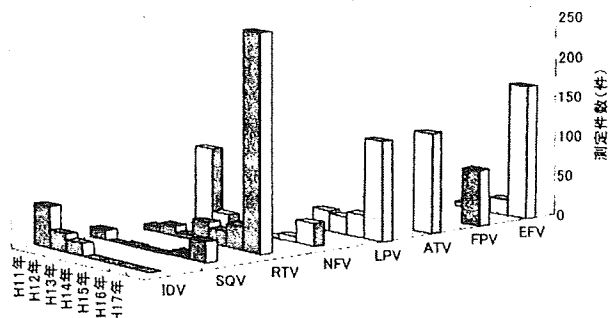
非核酸系逆転写酵素阻害薬(C)では、ネビラピンの使用量が9,300錠(平成13年)をピークに1,200錠(平成17年)まで減少した。代わりに、抗HIV活性が強く1日1回投与のEFVの使用量が17,820~10,080錠(平成13年~平成17年)と増加した。

3. HAARTレジメンの変遷

最も多用されたHAARTレジメンと2番目に多い組み合わせを年次別に表1に示した。ジドブジンやラミブジンを中心とした核酸系逆転写酵素阻害薬の組み合わせには大きな変化はみられなかった。一方、プロテアーゼ阻害薬に関しては、平成14年より抗HIV活性の強いLPVと組み合わせられることが多くなった。非核酸系逆転写酵素阻害薬は、1日1回投与可能なEFVが組み合わせられることが多くなった。

4. TDM測定件数の推移

各年におけるTDM測定件数の推移を図3に示した。測定件数は使用量に比例してLPVが121件(平成17年)、アタザナビルが123件(平成17年)、ホスアンプレナビル



IDV：インジナビル，SQV：サキナビル，RTV：リトナビル，
NFV：ネルフィナビル，LPV：ロピナビル，ATV：アタザナビル，
FPV：ホスアンプレナビル，EFV：エファビレンツ

図3 TDM測定件数の年次別推移

が69件(平成17年)、EFVが166件(平成17年)と増加した。なお、rが260件(平成17年)と急激に増加したのは、LPVやアタザナビルなどの効果を増強するブースト剤として併用投与されることが多いためである。

5. HIV-1感染患者に対するTDM

症例①：34歳，男性。

経過：

平成15年5月21日より、サニルブジン、ラミブジン、NFVの投与を開始した。最大51,000コピーあったウイルス量は、平成17年2月23日時点で350コピーまで減少した。しかしながら、ウイルス量は50コピー(検出限界)以下となることはなかった。また、ウイルスの耐性検査では、プロテアーゼ阻害薬に対する副次耐性アミノ酸変異(L63P, A71T, V77I)が検出されたのみであった。TDM：

NFV(単回投与時Cmin-Cmax：0.9~6.7μg/mL)は2,500mg分2で投与された。NFVの血中濃度(トラフ値)は、2月23日で3.4μg/mL、3月16日で5.2μg/mL、4月13日で4.4μg/mL、5月11日で4.1μg/mL、6月8日で4.4μg/mLとほぼ一定の値を示し、アドヒアランスは良好であった。現在のガイドライン³⁾によるとNFVの最低目標血中濃度は0.8μg/mLとなっており、本症例は十分な濃度を有していたが、ウイルス量は50コピー以下にならず、逆に6月8日には780コピー、8月17日には1,100コピーと増加した。4月13日の検体を用いてウイルスの耐性検査を再び行ったところ、NFVに対する主要耐性アミノ酸変異であるD30N変異とサニルブジン、ラミブジンに対する主要耐性アミノ酸変異であるM41L, M184V, T215Yが見つかった。そのため、8月17日にHAARTの組み合わせをジダノシン、アバカビル、アタザナビル、rに変更した(表2)。変更後、10月5日時点でウイルス量は50コピー以下まで減少した。