

LCにおけるカラム保持時間が異なるため両変異を区別することが可能であった。PCR-MS法で耐性変異が検出された4例についてシーケンスの波形データを調べた結果、M184V(32%)の例とT215I(28%)

の例では耐性変異を示す小さなピークが確認できたが、L90M(0.26%)の例とK103N(7.0%)の例については耐性変異のピークはまったく検出することができなかった(表3)。

表2 PCR-MS法の実験内誤差と実験間誤差
精度(Precision) 変動係数

調整割合	実験内誤差 (n=5)				実験間誤差 (n=5)			
	L90M	K103N	M184V	T215Y	L90M	K103N	M184V	T215Y
50.0%	6%	9%	7%	4%	16%	10%	7%	9%
5.0%	16%	5%	20%	8%	13%	12%	7%	21%
0.5%	31%	49%	40%	53%	20%	35%	36%	32%

正確さ(Accuracy)

調整割合	実験内誤差 (n=5)				実験間誤差 (n=5)			
	L90M	K103N	M184V	T215Y	L90M	K103N	M184V	T215Y
50.0%	12%	-12%	-18%	-16%	0%	-23%	-10%	-12%
5.0%	-5%	9%	32%	31%	5%	22%	7%	23%
0.5%	-31%	-12%	18%	12%	-3%	-10%	1%	-7%

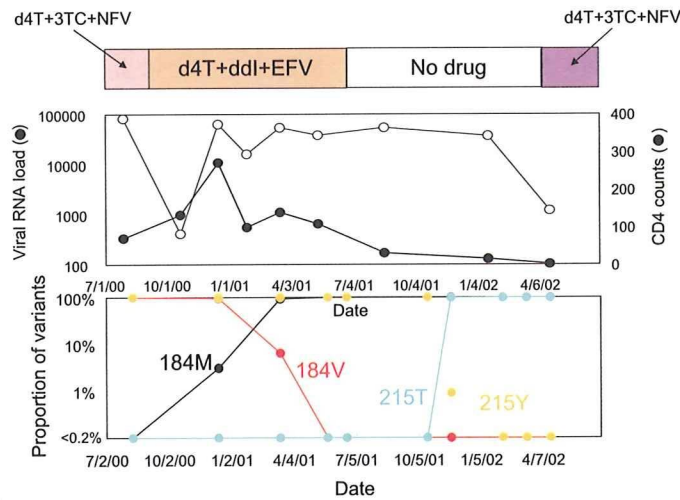
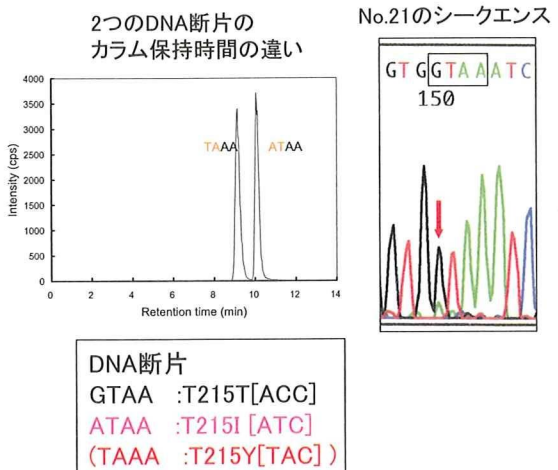


図2 多剤耐性変異症例における薬剤感受性・耐性微少集団の推移

表3 未治療新規感染者のPCR-MS測定結果 (慶應義塾大学病院)

新規患者 No.	HIV-1 RNA (copies/mL)	耐性変異部位			
		PR L90	RT K103	RT M184	RT T215
1	44000	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
2	8500	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
3	81000	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
4	93000	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
5	270000	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
6	14000	<0.2	<0.2	ND	ND
7	4900	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
8	60000	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
9	7400	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
10	160000	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
11	32000	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
12	NT	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
13	64000	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
14	100000	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
15	3100	<0.2	<0.2	V: 32%	<0.2
16	120000	M: 0.26%	<0.2	<0.2	<0.2
17	31000	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
18	NT	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
19	74000	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
20	25	ND	<0.2	<0.2	ND
21	NT	<0.2	<0.2	<0.2	I: 28%
22	78000	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
23	120000	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
24	2100	<0.2	N: 7.0%	<0.2	<0.2
25	17000	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
26	11000	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
27	5200	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
28	28000	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
29	24000	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
30	NT	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
31	21000	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
32	31000	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5



名古屋医療センターの未治療新規感染者105例について4種類の耐性変異を測定した。その結果、L90Mの耐性変異が1例、K103Nが2例、M184Vが2例、T215の耐性関連変異が11例、計16例の薬剤耐性変異が検出された。ダイレクトシーケンシングで耐性関連変異が確認された例はK103Nが1例、T215の耐性関連変異が4例の5例のみであり、11例はPCR-MS法でのみ耐性関連変異が検出された。ダイレクトシーケンシングとPCR-MS法の両方で検出された5例におけるそれぞれの耐性変異の割合は、K103Nが97%、T215Lが97%と81%、T215Sが95%と98%であった。それに加え、T215Lが97%検出された例でT215Yが3%、T215Sが95%の例でT215Lが2%、T215Sが98%の例でT215Lが2%の耐性微小変異がPCR-MS法でのみ検出された(表4)。ダイレクトシーケンシングで検出できず、PCR-MS法でのみ検出された11例におけるそれぞれの耐性変異の割合は、L90Mが1%、K103Nが58%、M184Vが3%、M184Vが4%、T215Yが2%、T215IとT215Lが98%と2%、T215Lが21%、T215LとT215Yが77%と5%、T215LとT215Yが93%と6%、T215Yが28%、T215Yが50%であった(表5)。

D. 考察

PCR-MS法で0.2%から0.5%までの微小変異を検出することが可能となったことにより、およそ0.1%の微小変異を検出することが出来るallele-specific real-time PCR法の感度に近づけることができた。PCR-MS法の感度はI型制限酵素AclIによって切断されるオリゴヌクレオチドの量に依存しており、AclIの使用量を増加することで感度を高めることが可能である。また現在のプロトコルでは再検査の可能性を考え精製DNAサンプル10 µL中4 µLをLC-MSで分析しているが、これを全量使用することによりさらに感度を高めることが可能である。これらの方法を併用することにより、allele-specific real-time PCRとほぼ同等の感度が得られることが予想される。PCR-MS法は、現在用いられているallele-specific real-time PCR法と原理的に全く異なる方法で微小変異を検出・定量するため、両方法の結果を比較検討することはより検査結果の検証に役立つものと考えられる。

検査精度の検討をした結果、耐性株の比率が5%の検体の実験間誤差は最大で21%であり、耐性株の比率が0.5%の検体でも最大で53%と良好であるこ

表4 未治療新規感染者のPCR-MS測定結果(名古屋医療センター)
ダイレクトシーケンスで検出された5例

Sub type	VL (copies /mL)	PCR-MS				sequence	
		PI	RTI			PI	RTI
			L90	K103	M184		
B	310000				L: 97%, Y: 3%	I13V I62V L63[T,A] I64V	T215L
B	410000				S: 95%, T: 3%, L: 2%	I62V L63A A71[T,I,A,V] I93L	T215S
B	120000				S: 98%, L: 2%	M36[I,M] I62V L63A A71V I93L	T215S
B	690				L: 81%, T: 19%	I62I/V	T215L
B	1600		N: 94%, K: 6%			I62V I93L	K103N

表5 未治療新規感染者のPCR-MS測定結果(名古屋医療センター)
ダイレクトシーケンスで検出されなかった11例

Sub type	VL (copies /mL)	PCR-MS				sequence	
		PI	RTI			PI	RTI
			L90	K103	M184		
AE	460000				T: 98% Y: 2%	I13V E35D M36I H69K	V179I
B	680				I: 98% L: 2%	I13[I,V] L63[P,L] H69[H,Y] V77[I,V]	-
B	71000				T: 79% L: 21%	E35D L63P V77I I93L	-
AE	16000			M: 97% V: 3%		G16[E,G] K20R M36I	-
B	1800000		N: 58% K: 42%			I62V V77I	-
B	46000				L: 77% T: 18%, Y: 5%	D60[E,D] I62V	-
B	10000				L: 93% Y: 6%, T: 1%	L63P V77I	-
B	1200				T: 72% Y: 28%	G16[E,G] M36[I,M] I62V	-
AE	37000			M: 96% V: 4%		M36I I93L	-
B	22000				T: 50% Y: 50%	M36I L63P V77I/V	-
B	190000	L: 99% M: 1%				G16E I62V I64I/V	-

とが確認された。また耐性株の調整比率と実測値を比較した正確さは-31%~32%の範囲であり、PCR-MS法が優れた検査精度を持つことが示された。

PCR-MS法を用いて多剤耐性患者の臨床検体を測定した結果から、薬剤変更後すぐに耐性ウイルス集団が感受性ウイルス集団に置き換わるのではなく、数ヶ月以上かけて感受性ウイルスと耐性ウイルスが置き換わることが示された。臨床検体における耐性株の推移についてはより多くの臨床例を検査し、薬剤変更時における耐性株の推移を明らかにしていきたい。

PCR-MS法を用いて未治療新規感染者137例の微小耐性変異の検出と定量を行った結果、L90Mで2例、K103Nで3例、M184Vで3例、T215で12例、計20例の薬剤耐性関連変異が検出された。これは全体の15%であり、未治療の新規感染者において薬剤耐性変異をもつ微小集団が多く存在することが明らかになった。

今回用いた未治療新規感染者137例の内、ダイレクトシーケンシングで耐性変異が確認された例は7例であったが、7例すべてPCR-MS法でも同様の薬剤耐性変異が検出された。また、ダイレクトシーケンシングで検出されず、PCR-MS法でのみ微小変異が検出された例が13例あった。このうち6例は存在比20%以下の薬剤耐性微小集団であった。このことから、PCR-MS法を用いることによりダイレクトシーケンシングよりも高頻度で薬剤耐性変異例が確認される可能性が示された。

微小耐性変異を検出するためによく使われている allele-specific real-time PCR法がもつ問題点の一つとして、連続した2塩基変異を測定できないことが挙げられるが、PCR-MS法ではT215Yの薬剤耐性変異のような2塩基の変異を測定できた。また実際の臨床検体においてT215Iの耐性変異が検出でき、測定するオリゴヌクレオチドの分子量が同じであるT215YとT215Iの耐性変異を区別することができた。このことから、他の2塩基の薬剤耐性変異でも同様に測定するオリゴヌクレオチドの分子量が同じとなる場合であっても、LCにおけるカラム保持時間を調べることで区別が可能と考えられた。

また allele-specific real-time PCR法のもう一つの問題点として、3通りの点変異を同時に測定できないことが挙げられるが、PCR-MS法では薬剤耐性関連変異が検出された20例の内、T215T/S/Lが3%/95%/2%、T215T/L/Yが18%/77%/5%、T215T/L/Yが1%/93%/6%と3例で3通りの変異が同時に測定できた。この点においてPCR-MS法は allele-specific real-time PCR法よりも優れていると考えられる。

今後の研究課題としてY181C、K70R、それ以外の新規薬剤に対する耐性変異についても検討し、様々な種類の耐性変異を検出する系を確立することが重要である。また、より多くの新規感染症例の検査を行うと共に治療開始後早期に薬剤耐性を獲得した臨床検体の検査を行い、薬剤耐性微小ウイルス集団の存在と治療の推移等の関連性を調べる必要があると考えられる。

E. 結論

薬剤耐性変異をもつ微小ウイルス集団を1/200~1/500の存在比まで検出・定量できる新しい分析方法、PCR-MS法を開発した。PCR-MS法は薬剤耐性変異をもつ微小ウイルス集団を1/200~1/500の存在比まで検出・定量することが可能であった。この方法を実際の臨床検体に適用することにより、多剤耐性患者の耐性ウイルスの推移を測定できた。また未治療新規感染者137例の微小耐性変異の検出と定量を行った結果、L90Mで2例、K103Nで3例、M184Vで3例、T215で12例、計20例の薬剤耐性関連変異が検出された(15%)。そのうち6例は存在比20%以下の薬剤耐性微小集団であった。PCR-MS法は微小耐性ウイルスを持つ患者の治療及び疫学における意味を明らかにするために有用であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kondo, M., Sudo, K., Tanaka, R., Sano, T., Sagara, H., Iwamuro, S., Takebe Y., Imai, M., and Kato, S. (2009) Quantification of HIV-1 group M proviral DNA using TaqMan MGB real-time PCR. *J. Virol. Methods* 157(2):141 - 146.
2. Suzuki, T., Yamamoto N., Nonaka, M., Hashimoto, Y., Matsuda, G., Takashima, S., Matsuyama, M., Igarashi, T., Miura, T., Tanaka, R., Kato, S., and Aida, Y. (2009) Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) nuclear import via Vpr-Importin α interaction as a novel HIV-1 therapy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 380(4):838 - 843.
3. Tanaka, R., Hanabusa, H., Kinai, E., Hasegawa, N., Negishi, M., and Kato, S. (2008) Intracellular efavirenz levels in peripheral blood mononuclear cells from HIV-infected individuals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52(2):782 - 785.
4. Kuji, N., Yoshii, T., Hamatani, T., Hanabusa, H., Yoshimura, Y., and Kato, S. Buoyant density and sedimentation dynamics of HIV-1 in two density-

- gradient media for semen processing. (2008) *Fertil. Steril.* 90(5):1983- 1987.
5. Hamatake, M., Nishizawa, M., Yamamoto, N., Kato, S., and Sugiura, W. (2007) A simple competitive RT-PCR assay for quantitation of HIV-1 subtype B and non-B RNA in plasma. *J. Virol. Methods* 142:113 – 117.
 6. Kinai, E., Hanabusa, H., and Kato, S. (2007) Prediction of the efficacy of antiviral therapy for hepatitis C virus infection by an ultrasensitive RT-PCR assay. *J. Med. Virol.* 79:1113 – 1119.
- ## 2. 学会発表
1. Shingo Kato. Quantification of HIV-1 RNA in clinical serum samples by the Poisson distribution-based method. The 4th Japan-Germany HIV/AIDS Symposium. 2009, March23 – 24, Bochum, Germany.
 2. S. Kato, K. Sudo, R. Tanaka. Novel assay using PCR and mass spectrometry for quantification of minor populations of HIV-1 carrying drug-resistant mutations. XVII International AIDS Conference. 3-8 August, 2008, Mexico city, Mexico.
 3. Shingo Kato, Mitsuhiro Kamakura. Quantification of minor populations of drug-resistant HIV-1 variants by PCR and mass spectrometry. United States-Japan Cooperative Medical Science Program, 21st Joint Meeting of the AIDS Panels. 2008, September 10 – 12, Awaji Island and Tokyo, Japan.
 4. 加藤真吾「シンポジウム：わが国におけるHIV検査戦略、我が国におけるHIV検査の現状と課題」第23回日本エイズ学会学術集会（2009年11月26-28日、名古屋）
 5. 植田知幸、加藤真吾「休止期PBMCにおけるHIV-1感染防御機構の解析」第23回日本エイズ学会学術集会（2009年11月26-28日、名古屋）
 6. 服部純子、渦永博之、吉田繁、千葉仁志、小池隆夫、佐々木悟、伊藤俊広、内田和江、原 孝、佐藤武幸、上田敦久、石ヶ坪良明、近藤真規子、今井光信、長島真美、貞升健志、古賀一朗、太田康男、山元泰之、福武勝幸、田中理恵、加藤真吾、宮崎菜穂子、藤井 毅、岩本愛吉、西澤雅子、仲宗根正、巽 正志、椎野禎一郎、林田傭総、岡 慎一、伊部史朗、藤崎誠一郎、金田次弘、横幕能行、濱口元洋、上田幹夫、大家正義、田邊嘉也、渡辺香奈子、渡邊 大、矢倉裕輝、白阪琢磨、栗原 健、小島洋子、森 治代、中桐逸博、高田 昇、木村昭郎、南 留美、山本政弘、松下修三、藤田次郎、健山正男、堀成美、杉浦 互「2003 – 2008年の新規HIV/AIDS診断症例における薬剤耐性頻度の動向」第23回日本エイズ学会学術集会（2009年11月26-28日、名古屋）
 7. 須藤弘二、杉浦 互、加藤真吾「PCR-MS法を用いた新規感染者血漿中の薬剤耐性微少集団の定量」第23回日本エイズ学会学術集会（2009年11月26-28日、名古屋）
 8. 伊部史朗、横幕能行、椎野禎一郎、田中理恵、服部純子、藤崎誠一郎、岩谷靖男、間宮均人、内海 眞、加藤真吾、濱口元洋、杉浦 互「日本におけるHIV-2感染症の分子疫学的解析」第23回日本エイズ学会学術集会（2009年11月26-28日、名古屋）
 9. 井戸田一朗、加藤朋子、畑 寿太郎、島川眞知子、佐野貴子、近藤真規子、須藤弘二、加藤真吾、今井光信「急速な進行と多彩な合併症を伴い、初期治療に早期に失敗した急性HIV感染症の一例」第23回日本エイズ学会学術集会（2009年11月26-28日、名古屋）
 10. 川畑拓也、森 治代、小島洋子、秋吉京子、近藤真規子、中澤よう子、宇宿秀三、貞升健志、長島真美、矢永由里子、今井光信、加藤真吾「HIV検査相談体制における新型インフルエンザウイルス流行の影響」第23回日本エイズ学会学術集会（2009年11月26-28日、名古屋）
 11. 村山正晃、池野 良、児玉泰光、川口 玲、田邊嘉也、加藤真吾、高木律男「唾液中HIV-1濃度が血液中よりも高かった3症例」第23回日本エイズ学会学術集会（2009年11月26-28日、名古屋）
 12. 近藤真規子、須藤弘二、佐野貴子、倉井華子、立川夏夫、相良裕子、岩室紳也、加藤真吾今井光信「コバス TaqMan HIV-1でのRNA定量値がアンプリコアHIV-1モニターに比べ100倍以上低値であった症例の解析」第23回日本エイズ学会学術集会（2009年11月26-28日、名古屋）
 13. 田中理恵、加藤真吾「ポアソン分布を用いた血中のHIV-1 RNA量の定量」第23回日本エイズ学会学術集会（2009年11月26-28日、名古屋）
 14. 佐野貴子、西大条文一、井戸田一朗、須藤弘二、加藤真吾、近藤真規子、今井光信「抗HIV抗体量により感染時期を推測するための検査法の検討」第23回日本エイズ学会学術集会（2009年11月26-28日、名古屋）
 15. 加藤真吾「サテライト公演：HIV感染症診断のガイドライン 保健所等におけるHIV検査のガイドライン—妊婦検診を含めて」第22回日本エイズ学会学術集会（2008年11月26-28日、名古屋）

- ズ学会学術集会・総会（2008年11月26日-28日、大阪）
16. 植田知幸、加藤真吾「休止期CD4+T細胞におけるHIV-1感染防御機構の解析」第22回日本エイズ学会学術集会・総会（2008年11月26日-28日、大阪）
 17. 花房秀次、小島賢一、加藤真吾、兼子 智、高桑好一、久慈直明、木内 英、加嶋克則、吉村泰典、田中憲一、和田裕一「HIV感染夫婦の生殖補助医療の実績と安全性：HIV陽性同士の生殖補助医療プロトコール」第22回日本エイズ学会学術集会・総会（2008年11月26日-28日、大阪）
 18. 木内 英、岩室紳也、相楽裕子、大木 茂、元重京子、近藤真規子、今井光信、花房秀次、加藤真吾「母子感染予防における出生児のAZT薬物動態と副作用」第22回日本エイズ学会学術集会・総会（2008年11月26日-28日、大阪）
 19. 田中理恵、古谷茂之、林 邦彦、今井光信、加藤真吾「HIV-1 RNA定量キットのコントロールサーベイ」第22回日本エイズ学会学術集会・総会（2008年11月26日-28日、大阪）
 20. 近藤真規子、田中理恵、須藤弘二、佐野貴子、岩室紳也、倉井華子、立川夏夫、相楽裕子、加藤真吾、今井光信「汎用リアルタイムPCR装置を用いたHIV-1 RNA定量法の検討」第22回日本エイズ学会学術集会・総会（2008年11月26日-28日、大阪）
 21. 須藤弘二、加藤真吾「PCRとLC-MSを組み合わせた薬剤耐性変異定量法の検討」第22回日本エイズ学会学術集会・総会（2008年11月26日-28日、大阪）
 22. 須藤弘二、佐野貴子、近藤真規子、加藤真吾、今井光信「HIV郵送検査に関する実態調査および検査精度の調査」第22回日本エイズ学会学術集会・総会（2008年11月26日-28日、大阪）
 23. 池野 良、高木律男、児玉泰光、田邊嘉也、手塚貴文、佐藤みさ子、加藤真吾「リアルタイムPCR法（TaqMan法）を用いた唾液中HIV-1 RNA/DNA量と血清中HIV-1 RNA量の比較検討」第22回日本エイズ学会学術集会・総会（2008年11月26日-28日、大阪）
 24. 加藤真吾、榎本 茜、田中理恵「正しい血中ウイルス量を求める方法の検討」第22回日本エイズ学会学術集会・総会（2008年11月26日-28日、大阪）
 25. 杉浦 互、渦永博之、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、近藤真規子、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、藤井 毅、岩本愛吉、藤野真之、仲宗根正、巽 正志、椎野禎一朗、岡 慎一、林田庸総、服部純子、伊部史朗、藤崎誠一郎、金田次弘、浜口元洋、上田幹夫、大家正義、田邊嘉也、渡辺香奈子、渡邊 大、白阪琢磨、栗原 健、森 治代、小島洋子、高田昇、木村昭郎、南 留美、山元政弘、松下修三、健山正男、藤田次郎「2003-2007年の新規HIV-1感染者における薬剤耐性頻度の動向」第22回日本エイズ学会学術集会・総会（2008年11月26日-28日、大阪）
 26. 加藤真吾「教育講演：HIV定量法の進歩とその臨床応用（生殖医療への応用）」第21回日本エイズ学術集会（2007年11月28-30日、広島）
 27. 花房秀次、小島賢一、加藤真吾、兼子智、高桑好一、久慈直昭、木内英、加藤克則、吉村泰典、田中憲一「HIV感染者夫婦の生殖補助医療」第21回日本エイズ学術集会（2007年11月28-30日、広島）
 28. 木内英、岩室紳也、近藤真規子、今井光信、花房秀次、加藤真吾「母子感染予防における出生児へのHAARTの安全性の検討」第21回日本エイズ学術集会（2007年11月28-30日、広島）
 29. 田中理恵、栗原 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回日本エイズ学術集会（2007年11月28-30日、広島）
 30. 須藤弘二、宮崎裕美、佐野貴子、近藤真規子、加藤真吾、今井光信「HIV郵送検査に関する実態調査と検査精度の調査」第21回日本エイズ学術集会（2007年11月28-30日、広島）
 31. 加藤真吾、田中理恵、井土美由紀、林邦彦、今井光信「HIV-1 RNA定量キットのコントロールサーベイ」第21回日本エイズ学術集会（2007年11月28-30日、広島）
 32. 加藤真吾、須藤弘二「LC-MSによる薬剤耐性変異の検出」第21回日本エイズ学術集会（2007年11月28-30日、広島）
 33. 上西理恵、正兼亜季、近藤真規子、長谷彩希、廖華南、小野木成美、今井光信、上田幹夫、相良裕子、花房秀次、加藤真吾、草川茂、武部豊「CRF01とサブタイプB からなる新規組換えウイルス株（URF）の同定とその公衆衛生学上の意義」第21回日本エイズ学術集会（2007年11月28-30日、広島）
 34. 杉浦互、渦永博之、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、近藤真規子、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、中曾根正、巽正志、椎野禎一郎、岡慎一、林田庸総、服部純子、伊部史朗、藤崎誠一郎、金田次弘、浜口元洋、上田幹夫、正兼亜季、大家正義、下条文武、田邊嘉也、渡辺香奈子、白坂琢磨、栗原健、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回日本エイズ学術集会（2007年11月28-30日、広島）

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

発明の名称：遺伝子変異検出システム及び遺伝子変異検出方法。発明者：加藤真吾、須藤弘二。発願年月日：2008年05月19日。出願番号：特願2008-131243号。

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



研究要旨

多剤耐性HIVの調査研究

～既治療患者に対するサーベイランス（多剤耐性）～

研究分担者 **藤井 毅** 東京大学医科学研究所附属病院・感染免疫内科 講師

研究協力者 **宮崎 菜穂子** 国立感染症研究所 リサーチレジデント

本邦における薬剤耐性HIVの出現状況とその臨床的背景因子を明らかにし、今後の治療選択に役立てることは極めて重要な課題である。本研究では、全国でHIVの診療をおこなっている多くの医療機関を対象とした詳細なアンケート調査を実施することによって、多剤耐性HIV感染者の実態および新規抗HIV薬(ARV)の使用状況を把握することができた。また、本研究を通じて研究者間のネットワークを作り、相互交流によってより質の高い検査の実施や新薬の臨床治験導入などを含む治療支援体制を実現させることの重要性が再認識された。

A. 研究目的

我々は「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」課題に関し、特に「薬剤耐性出現と患者背景・服薬状況との相関関係」を明らかにすべく、「治療患者における薬剤耐性サーベイランスプロトコルVer.1.0」(07/9/10)を作成した。これはわが国における多剤耐性HIV感染症の現状を明らかにすることによって、今後の治療選択に役立て、かつ研究者間のネットワークを作り相互交流を通して、質の高い検査の実施や新薬の臨床治験導入などを含む治療支援体制を実現させることを目的としている。本研究班では以下の4調査を行った。尚、研究を施行するにあたっては、匿名コードによる施設患者IDを用い、生年月日は年月までで可とするなど特定の個人が同定されないよう十分に配慮した。個人情報保護法、臨床研究に関する倫理指針の原則ならびに疫学研究に関する倫理指針を遵守しており、倫理面における問題はないと判断した。研究成果の公表等にあたっては、個人と研究結果との関連性に結びつかないよう、プライバシーの保護には十分に配慮し、本体研究の実施施設である国立感染症研究所の倫理委員会の承認を得た上で以下の調査を行った。

また、より多くの施設に調査内容を広く知っても

らい、協力しやすいシステム構築するために、ホームページを立ち上げ、インターネットからのエントリーも開始した。

B. 研究方法

【1】多剤耐性HIV事前調査、及び保険体制調査(2007年度分終了)

後述【2】の調査に先立ち、全国25の医療機関に対して各施設における多剤耐性HIVの人数を調査した。併せて耐性検査の保険適用化についての実態調査も行った。

【2】多剤耐性HIV調査(2007-8年度分終了)

日本国内において承認されている抗HIV薬(2007年9月時点)での治療では、ウイルスコントロールが不良であるHIV感染者を対象とし、臨床背景と耐性プロファイルの両面を調査するものである。具体的には、臨床背景の基礎情報として17項目(①性別、②生年月、③匿名患者コード、④陽転確認年月、⑤推定感染年月、⑥推定感染経路、⑦推定感染場所、⑧国籍、⑨初回治療(ART)開始年月、⑩ART開始前のCD4陽性細胞数、⑪ART開始前のHIVウイルス量、⑫ART開始前のHIV関連疾患の有無、⑬調査時点の治療状況、⑭調査時点における

HBV感染の有無、⑮ 調査時点におけるHCV感染の有無、⑯ 治療中断経験の有無、⑰ 梅毒既往の有無)を、経時情報として10項目(1)治療開始時期、2)耐性検査実施時期、3)ART変更・中止・再開時期の各ポイントでの、① 調査年月日、② 耐性検査実施機関、③ 薬剤耐性変異、④ CD4陽性細胞数、⑤ HIV RNA量、⑥ ARTメニュー、⑦ HIV関連疾患処方薬、⑧ 他疾患における継続的処方薬、⑨ アドヒアランス状況、⑩ 自覚的副作用の有無・程度)を、また耐性プロファイルとしてFASTA file形式での耐性データ核酸配列の提出も併せて依頼した。

【3】 感染研DB追跡調査 (2007-8年度分終了)

2005年度まで薬剤耐性検査を担当してきた国立感染症研究所で、2005年度以前に多剤耐性と判定された症例について、その後の耐性検査実施状況および転帰、を全国50施設で調査した。調査内容は、① 2006年(保険収載年)以降の耐性調査回数、② 転帰、③ 治療中の抗HIV薬、④ 直近のCD4陽性Tリンパ球数、⑤ 直近のHIVウイルス量とした。

【4】 新規抗HIV薬使用状況調査 (2009年度、集計解析中)

2007年度から2008年度にかけて行った【1】～【3】の調査では、実施機関を60施設に絞って行ったが、調査終了後の2008年以降、多剤耐性症例に対するサルベージ療法を主目的とした新規抗HIV薬が相次いで承認・発売され、耐性患者を取り巻く状況は刻々と変わってきている。我々は現在のこれらの新規薬剤の使用状況を把握することで、治療困難症例が直面する問題を明らかにすべく、全国377施設へ緊急調査を行った。対象は、現在、新規抗HIV薬(ダルナビル、ラルテグラビル、エトラビリン、マラビロク、T-20、Tiplranavirを投与中の患者とし、調査

内容は ①現在の新規抗HIV薬メニュー、及びその開始年月、②患者背景(生年月、性別、感染経路)、③新薬使用直前及び、直近の検査値(CD4数、HIV-RNA量)、④切り替える直前の抗HIV薬メニュー、⑤新規抗HIV薬処方理由、⑥新規抗HIV薬処方前の耐性検査実施の有無、⑦現在までの使用薬剤とした。

C. 結果

【1】 多剤耐性HIV事前調査、及び保険体制調査 (2007年度分終了)

【2】の事前調査と併せて行った耐性検査の保険適用化についての実態調査では、多くの施設が保険を利用に切り替えていた(図1)。また、保険制度への要望としては、結果の解り易さ、保険価格の引き下げを望む声が多かった。

【2】 多剤耐性HIV調査 (2007-8年度分終了)

服薬者の1.9%にあたる51例の多剤耐性症例の報告があり、それらは全員国内の感染・男性であり、多剤併用療法以前からの長期治療患者で深刻であった。多剤耐性に対するサルベージ療法として追加される新薬は、ダルナビル+ラルテグラビルを加えたものが多かった(図2)。

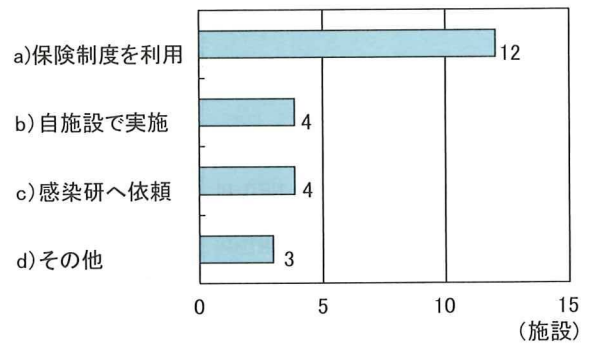


図1 【調査1】2006年以降の耐性検査実施機関

【T-20などの未承認薬や、DRV以降の新薬が必要な症例数】

▼51症例(43施設)

未回答の施設があるが...

【現在の服薬者数(概数)】

51 ÷ 2715 × 100 ≒ 1.9(%) 以下

▼2715症例(27施設)

【新規ARV使用者の背景】

▼全員男性、国内感染

年代	感染経路	治療開始時期	開始時		最近		新規ARV	併用ARV
			CD4	VL	CD4	VL		
30	血液製剤	1993	185	50000	234	97	DRV/RAL	AZT TDF/FTC rtv
30	血液製剤	1994	192	-	138	<50	DRV/RAL	TDF/FTC rtv
30	血液製剤	1994	244	-	47	17000	DRV/RAL	EFV rtv
50	血液製剤	1995	60	-	375	50>	DRV/RAL	TDF/FTC rtv
30	同性間性交渉	1995	227	-	25	16000	TPV	T-20 TDF/FTC NVP rtv
40	同性間性交渉	1996	120	51000			DRV/RAL	T-20 rtv
40	異性間性交渉	1999	5	不明			DRV/RAL	T-20 TDF/FTC EFV rtv
60	異性間性交渉	2001	5	>750000	19	96800	DRV	rtv

HAART以前の治療開始

2剤以上の併用。特にDRV+RAL

図2 【調査2】多剤耐性の状況

【3】感染研DB追跡調査（2007-8年度分終了）

2005年以前に感染研で多剤耐性と判定された症例195症例の問い合わせに対し、160症例の回答が得られた。そのうち、2006年以降耐性検査を必要としたのは25%であった。この再検実施率を耐性クラス別で分けると、1クラス耐性群31.3%、2クラス耐性群で23.9%、3クラス耐性群で42.9%であった。同じく、現在のVL別で分けると、400コピー/ml未満では20.5%、400-1000コピー/mlでは50%、3logでは77%、4logでは60%、5log以上では100%であった。また、3クラス耐性での治療成功率は26%、死亡率も26%であった（図3）。

更に現在の治療メニューを5群（標準治療^{注1}、旧標準治療^{注2}、サルベージ^{注3}、2剤治療、治療なし）に分類し解析した。耐性クラス別では、全群においてサルベージ、標準治療症例ともに多く存在した。「2剤治療」「治療なし」症例は13例（13.4%）で1クラス・2クラス群に多かった。HIV-RNA量（VL）別では、標準治療でVL<50コピー/mLが45例（37.8%）、サルベージでVL<50コピー/mLとなった症例が17例（14.3%）であった。VL>10,000コ

ピー/mLのうち10例（8.4%）が「2剤治療」や「治療なし」であった（図4）。

※注釈

注1) 2008年2月時点のDHHSガイドラインで、初回治療で第一推奨・第二推奨となっている組み合わせ。

注2) 以前は推奨されていたが、現在は推奨されていないメニュー。例としてd4T+3TC+NFVやIDVを含む組み合わせなど。

注3) 新規承認薬剤のほか、ダブルプロテアーゼや、3クラス投与などを含む組み合わせなど。

【4】新規抗HIV薬使用状況調査（2009年度、集計解析中）

2009年10月末日までに回答があった203施設における通院患者は7692名、うち総服薬者5474名（71.2%）であった。新規抗HIV薬使用症例は260症例で、全服薬者の4.7%にあたる。主な変更理由は効果不良33.1%（85名）、副作用43.1%（112名）であった。新規抗HIV薬剤使用前の耐性検査実施率は全体では40.8%、効果不良群では81.2%であった。使用経験薬剤数の平均は全体では5.8剤、効果不良理由群で

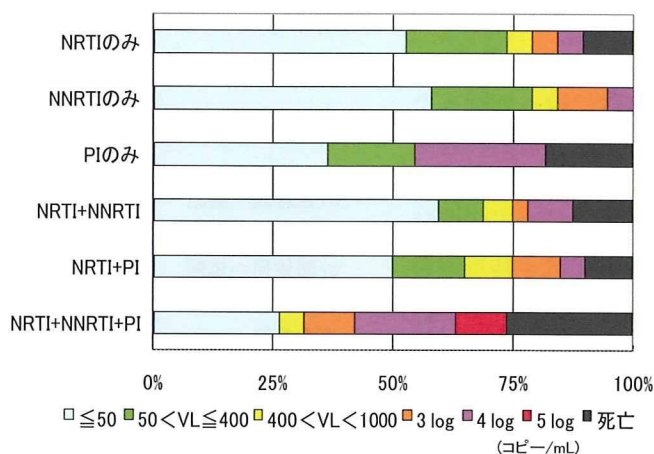


図3 【調査3】薬剤耐性診断症例の転帰

●耐性クラスから見た治療メニュー

	n	標準治療	旧標準	サルベージ	2剤治療	治療なし
NRTI	17	9	2	4	1	1
NNRTI	33	22	3	2	0	6
PI	9	4	1	1	0	3
NRTI+NNRTI	28	15	5	6	0	2
NRTI+PI	18	5	3	8	1	1
NRTI+NNRTI+PI	14	5	0	8	1	0

●現在のVL別に見た治療メニュー

	n	標準治療	旧標準	サルベージ	2剤治療	治療なし
VL≤ 50	68	45	6	17	0	0
50<math>< VL \le 400</math>	15	8	2	4	0	1
400<math>< VL < 1000</math>	10	2	2	2	2	2
3 log	9	4	3	1	0	1
4 log	15	1	1	3	1	9
VL$\ge 5 \log$	2	0	0	2	0	0

(コピー/mL)

図4 【調査3】現在の治療メニュー

は7.8剤、効果不良理由群における新規抗HIV薬の平均使用期間11.1ヶ月で、HIV-RNA量平均低下量は1.5logコピー/mL、CD4数平均上昇量は83.4個/ μ Lであった(図5)。

D. 考察

新規抗HIV薬導入症例では副作用軽減目的が多く、長期治療・かつ多数の薬剤使用経験があったが、近年相次いで発売された新規抗HIV薬が奏功していることが明らかとなった。

E. 結論

日本における新規抗HIV薬の長期使用経験はまだなく、長期的忍容性や耐性機序については不明な部分も多い。施設ごとの多剤耐性症例は少ないため、全国規模でのサーベイランスを行うことが今後の治療を考えていく上で大変重要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. バイオテロ対応ホームページ (<http://bt.sfc.wide.ad.jp/>) の立ち上げと、同内容のCD-ROM作成, 2009
2. 薬剤耐性HIVインフォメーションセンターホー

ムページ(<http://www.hiv-resistance.jp/>)の立ち上げ, 2009

3. Mizutani T, Ishizaka A, Tomizawa M, Okazaki T, Yamamichi N, Kawana-Tachikawa A, Iwamoto A, Iba H. Loss of the Brm-type SWI/SNF chromatin remodeling complex is a strong barrier to the Tat-independent transcriptional elongation of human immunodeficiency virus type 1 transcripts. J Virol. 2009 Nov;83(22):11569-80
4. Nunoya J, Nakashima T, Kawana-Tachikawa A, Kiyotani K, Ito Y, Sugimura K, Iwamoto A. Short communication: generation of recombinant monoclonal antibodies against an immunodominant HLA-A*2402-restricted HIV type 1 CTL epitope. AIDS Res Hum Retroviruses. 2009 Sep;25(9):897-904.
5. Miyazaki E, Kawana-Tachikawa A, Tomizawa M, Nunoya J, Odawara T, Fujii T, Shi Y, Gao GF, Iwamoto A. Highly restricted T-cell receptor repertoire in the CD8+ T-cell response against an HIV-1 epitope with a stereotypic amino acid substitution. AIDS. 2009 Mar 27;23(6):651-60.
6. 宮崎菜穂子、松下修三、藤井毅、杉浦互. 抗HIV療法を受けている患者における薬剤耐性HIVの現状と問題点：日本エイズ学会誌 11(2);p146-51,2009.
7. 藤井毅. HIV/AIDSの診断・治療の最新知見：医学の歩み 231(1);p41-46,2009.

★総治療期間(平均)

	年
全体	6.6
効果不良群	8.8
〃 以外	5.5

★これまで使用した抗HIV薬の剤数(平均)

	剤
全体	5.8
効果不良群	7.8
〃 以外	4.8

★新薬使用期間(平均)

	月
全体	9.1
効果不良群	11.1
〃 以外	8.1

★耐性検査実施率

	実施/全体(名)	実施率
全体	105/257	40.9%
効果不良群	69/85	81.2%
〃 以外	36/172	20.9%

★HIV-RNA量減少(平均・logコピー/mL)

	コピー/mL(log)
全体	1.1
効果不良群	1.5
〃 以外	0.9

★CD4(平均・個/ μ L)



図5 【調査4】効果不良群

8. 藤井毅. HIV感染症/AIDS:治療 91;1210-14,2009.
 9. 吉田文、宮崎菜穂子、黒川陽介. 内服困難者なHIV/AIDS患者への経管投与は可能か? :薬局 60(8);p2948-54,2009.
 10. Mizukoshi F, Yamamoto T, Mitsuki YY, Terahara K, Kawana-Tachikawa A, Kobayashi K, Iwamoto A, Morikawa Y, Tsunetsugu-Yokota Y. Activation of HIV-1 Gag-specific CD8(+) T cells by yeast-derived VLP-pulsed dendritic cells is influenced by the level of mannose on the VLP antigen. *Microbes Infect.* 2008 in press.
 11. Kondo N, Ebihara A, Ru H, Kuramitsu S, Iwamoto A, Rao Z, Matsuda Z. Thermus thermophilus-derived protein tags that aid in preparation of insoluble viral proteins. *Anal Biochem.* 2008 in press.
 12. Hou W, Aoki C, Yu L, Wen X, Xue Y, Gao B, Liu W, Gao GF, Iwamoto A, Kitamura Y. A recombinant replication-competent hepatitis C virus expressing Azami-Green, a bright green-emitting fluorescent protein, suitable for visualization of infected cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 Dec 5;377(1):7-11.
 13. Hosoya N, Miura T, Kawana-Tachikawa A, Koibuchi T, Shioda T, Odawara T, Nakamura T, Kitamura Y, Kano M, Kato A, Hasegawa M, Nagai Y, Iwamoto A. Comparison between Sendai virus and adenovirus vectors to transduce HIV-1 genes into human dendritic cells. *J Med Virol.* 2008 Mar;80(3):373-82.
 14. 宮崎菜穂子、岩本愛吉: HIV感染症/エイズ: *Pharmavision* 12(6);p2-12,2008.
 15. 宮崎菜穂子. 薬剤師の役割: *治療学* 42;512-518,2008.
 16. 藤井毅. ニューモシステイス肺炎の3例: *治療学* 42;603-606,2008.
 17. 吉田文、宮崎菜穂子、黒川陽介. 内服困難者に対する抗HIV薬の投与: *治療学* 42;616-619,2008.
 18. 藤井毅. HIV-1感染症:今日の治療指針(2008年度版), 152-153, 2008.
 19. 岩本愛吉、藤井毅. 臨床医学の展望-感染症および化学療法: *日本医事新報* 4379号, 53-58, 2008.
 20. Wichukchinda N, Kitamura Y, Rojanawiwat A, Nakayama EE, Song H, Pathipvanich P, Auwanit W, Sawanpanyalert P, Iwamoto A, Shioda T, Ariyoshi K. The polymorphisms in DC-SIGNR affect susceptibility to HIV type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 23: 686-92, 2007
 21. Maeda T, Fujii T, Oyaizu N, Endo T, Odawara T, Iwamoto A, Nakamura T. Pneumocystis jirovecii pneumonia in an AIDS patient: Unusual manifestation as multiple nodules with expansive multiloculated cavities. *Eur J Radiol extra,* 61, 49-52, 2007.
 22. Liu H, Nakayama EE, Theodorou I, Nagai Y, Likanonsakul S, Wasi C, Debre P, Iwamoto A, Shioda T. Polymorphisms in CCR5 chemokine receptor gene in Japan. *Int J Immunogenet.* 34: 325-35, 2007.
 23. Fujii T, Nakamura T, Iwamoto A. Pneumocystis pneumonia in patients with HIV infection: clinical manifestations, laboratory findings, and radiological features. *J Infect Chemother.* 13: 1-7, 2007.
- ## 2. 学会発表
1. 宮崎菜穂子、松下修三、藤井毅、岩本愛吉、杉浦互. 多剤耐性症例治療を目的とした新規抗HIV薬使用症例に対する緊急全国調査:第23回日本エイズ学会学術集会.2009.11,名古屋.
 2. 服部純子、潟永博之、吉田繁、千葉仁志、小池隆夫、佐々木悟、伊藤俊広、内田和江、原孝、佐藤武幸、上田敦久、石ヶ坪良明、近藤真規子、今井光信、長島真美、貞升健志、古賀一郎、太田康男、山元泰之、福武勝幸、田中理恵、加藤信吾、宮崎菜穂子、藤井毅、岩本愛吉、西澤雅子、仲宗根正、巽正志、椎野禎一郎、林田庸総、岡慎一、伊部史朗、藤崎誠一郎、金田次弘、横幕能行、濱口元洋、上田幹夫、大家正義、田邊嘉也、渡辺香奈子、白阪琢磨、栗原健、小島洋子、森治代、中桐逸博、高田昇、木村昭郎、南留美、山本政弘、松下修三、藤田次郎、健山正男、掘成美、杉浦互. 2003-2008年の新規HIV-1診断症例における薬剤耐性頻度の動向:第23回日本エイズ学会学術集会.2009.11,名古屋.
 3. 今井健太郎、前田卓哉、菊池正、宮崎菜穂子、鯉淵智彦、古賀道子、中村仁美、三浦聡之、藤井毅、岩本愛吉. ペンタミジンによる低血糖が長期間遷延したAIDS症例:第23回日本エイズ学会学術集会.2009.11,名古屋.
 4. 立川(川名)愛、中山香、古賀道子、鯉淵智彦、小田原隆、藤井毅、岩本愛吉.日本人集団におけるHIV特異的細胞性免疫応答の解析:第23回日本エイズ学会学術集会.2009.11,名古屋.
 5. 菊地正、古賀道子、鯉淵智彦、今井健太郎、中村仁美、三浦聡之、小田原隆、藤井毅、岩本愛

- 吉. ART初回導入したABC、TDFの使用症例の血清脂質の経時的変化について:第23回日本エイズ学会学術集会.2009.11,名古屋.
6. 鯉淵智彦、今井健太郎、菊地正、古賀道子、中村仁美、三浦聡之、藤井毅、岩本愛吉. HAART導入1年半後にCD4数の減少を来し、Diffuse Large B-cell Lymphoma(DLBCL)と診断された一例:第23回日本エイズ学会学術集会.2009.11,名古屋.
 7. 吉田文、宮崎菜穂子、菊池正、鯉淵智彦、藤井毅、岩本愛吉、高橋昌明、黒川陽介. 内服困難患者に対する抗HIV薬の投与方法についての検討(第2報):日本医療薬学会年会.2009.10,長崎.
 8. 宮崎菜穂子、松下修三、藤井毅、岩本愛吉、杉浦互. 既治療患者における耐性HIV(多剤耐性)調査報告:第22回日本エイズ学会学術集会.2008.11,大阪.
 9. 杉浦互、渦永博之、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、近藤真規子、今井光信、貞升健志、長島真美、福武勝幸、山元泰之、田中理恵、加藤信吾、宮崎菜穂子、藤井毅、岩本愛吉、藤野真之、仲宗根正、巽正志、椎野禎一郎、岡慎一、林田庸総、服部純子、伊部史朗、藤崎誠一郎、金田次弘、浜口元洋、上田幹夫、大家正義、田邊嘉也、渡辺香奈子、白阪琢磨、栗原健、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. 2003-2007年の新規HIV-1感染者における薬剤耐性頻度の動向:第22回日本エイズ学会学術集会.2008.11,大阪.
 10. 中村仁美、宮崎菜穂子、藤井毅、小田原隆、岩本愛吉. 超多剤耐性患者における新規抗HIV薬 Etravirin, Darunavir, Raltegravirの併用効果:第22回日本エイズ学会学術集会.2008.11,大阪.
 11. 古賀道子、宮崎菜穂子、前田卓哉、中村仁美、鯉淵智彦、遠藤宗臣、藤井毅、小田原隆、岩本愛吉. HAARTによるHIVウイルス量抑制力の時代の変遷について:第22回日本エイズ学会学術集会. 2008.11,大阪.
 12. 吉田文、宮崎菜穂子、黒川陽介. 内服困難患者に対する抗HIV薬の投与方法についての検討:日本医療薬学会年会.2008.9,札幌.
 13. 菊地正、鯉淵智彦、片寄智規、小柳津直樹、前田卓哉、遠藤宗臣、藤井毅、小田原隆、岩本愛吉. 特異な経過を辿った結核による免疫再構築症候群の一例:第22回日本エイズ学会学術集会.2008.11,大阪.
 14. 鯉淵智彦、中村仁美、菊地正、前田卓哉、遠藤宗臣、藤井毅、小田原隆、岩本愛吉. HAART導入後に急性肝障害を生じ、1ヶ月後にHBe抗体陽性となったHBVキャリアの1例:第22回日本エイズ学会学術集会.2008.11,大阪.
 15. 鯉淵智彦、中村仁美、菊地正、前田卓哉、遠藤宗臣、藤井毅、小田原隆、岩本愛吉. HAART施行したHIV/HBV重複感染者13例の解析:第22回日本エイズ学会学術集会.2008.11,大阪.
 16. 藤井毅. 真菌症の予防対策-HIV感染者におけるポイント:第23回日本環境感染学会総会.2008.2,長崎.
 17. 藤井毅. HIVと真菌感染:第52回日本医真菌学会総会.2008.9,長崎.
 18. 宮崎菜穂子、中村哲也、小田原隆、伊賀睦了、鯉淵智彦、遠藤宗臣、藤井毅、細野治、森本幾夫、吉田久博、岩本愛吉. 当院外来患者へのアンケート調査で見られた服薬の問題点と服薬指導の意義:第21回日本エイズ学会学術集会. 2007.11,広島.
 19. 前田卓哉、藤井毅、宮崎菜穂子、鯉淵智彦、遠藤宗臣、小田原隆、岩本愛吉. HIV/AIDS患者に対するST合剤の副作用発現に関する、臨床的および基礎的解析:第21回日本エイズ学会学術集会. 2007.11,広島.
 20. 遠藤宗臣、坂本勇一、前田卓哉、鯉淵智彦、宮崎菜穂子、藤井毅、小田原隆、岩本愛吉. HIVプロテアーゼ阻害剤アタザナビル長期投与における臨床効果に関する検討:第21回日本エイズ学会学術集会. 2007.11,広島.
 21. 杉浦互、渦永博之、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、近藤真規子、今井光信、貞升健志、長島真美、福武勝幸、山元泰之、田中理恵、加藤信吾、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、林田庸総、服部純子、伊部史朗、藤崎誠一郎、金田次弘、浜口元洋、上田幹夫、正兼亜季、大家正義、下条文武、田邊嘉也、渡辺香奈子、白阪琢磨、栗原健、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,広島.
- ## H. 知的財産権の出願・登録状況
- なし



近畿ブロックにおける薬剤耐性HIVの調査研究

研究分担者 白阪 琢磨 国立病院機構大阪医療センター 臨床研究センター
エイズ先端医療研究部 部長

研究協力者 渡邊 大¹、上平 朝子²、山本 信夫³、新田 幸一³、管尾 龍彦³、
佐子 肇³、常松 裕子³、溝上 泰司³、松永 加奈江³、真能 正幸³、
吉野 宗宏⁴

¹大阪医療センター・HIV感染制御研究室、²同 感染症内科、

³同 臨床検査科、⁴同 薬剤科

薬剤耐性HIV変異株の出現はHIV感染症の臨床上重要な課題となっており、近畿ブロックでの薬剤耐性検査の実施とその結果を臨床に反映するシステム構築が必要とされる。また、新規抗HIV薬は多剤耐性症例においても有効であり、これらの使用においても薬剤耐性検査は必須であると考えられる。そこで本研究は耐性検査と新規抗HIV薬に注目し、新規診断HIV感染者における薬剤耐性頻度の調査（耐性疫学調査）、初回治療導入後に早期（3ヶ月以内）に治療失敗となった症例における薬剤耐性の調査（早期失敗例調査）、多剤耐性症例における新規抗HIV薬の有効性に関する検討（多剤耐性例調査）および新規抗HIV薬の処方の実態調査（新規抗HIV薬調査）の4つの調査を行った。耐性疫学調査では184例が対象となり、RT領域にM184Vの単独の変異を2症例、K219EとY181Cを有する1症例を認めた。早期失敗例を調査において3症例を認めた。3症例とも治療開始後の薬剤耐性変異を認めたが、治療開始前には変異を認めなかった。1症例はIN領域の薬剤耐性を認めた。6例の多剤耐性例に対して新規抗HIV薬を用いて、全例良好な抗ウイルス効果が得られた。新規抗HIV薬調査においては、35症例に対して新規抗HIV薬を処方しており、副作用が原因となって薬剤変更がなされた症例が多数であった。薬剤耐性検査は臨床上必須の検査であり、新規抗HIV薬の登場とともにさらに必要性が増すと考えられた。

A. 研究目的

HIV感染症は抗HIV療法の進歩によって慢性疾患になったと捉えられているが、実際には種々の理由から適切な服薬を継続できずにウイルス学的治療失敗となり、その結果、投与薬剤に耐性なHIV変異株が出現する事が知られている。この薬剤耐性HIV変異株は他剤にも交叉耐性を示すこともしばしばあり、薬剤耐性HIV変異株の出現は臨床上重要な課題となっている。本研究の最終目標は近畿ブロックで、薬剤耐性検査が必要なHIV感染症患者に薬剤耐性検査を実施でき、かつ、その検査結果を臨床に反映できるような薬剤耐性検査システムを構築することである。また、過去の不十分な治療歴を持つ症例では、多剤耐性のHIVが出現することがある。ここ2-3年で多剤耐性HIVに適応をもった新規の抗HIV薬が

保険収録され、このような多剤耐性症例において有効な治療法をもたらすことが期待できるようになった。新規抗HIV薬にはプロテアーゼ阻害剤であるdarunavir (DRV、商品名プリジスタ)に加え、インテグラーゼ阻害剤であるraltegravir (RAL、商品名アイセントレス)、非核酸系逆転写酵素阻害剤であるetravirine (ETR、商品名インテレンス)そしてCCR5阻害剤であるmaraviroc (MVC、商品名シーエルセントリ)があげられる。これらの薬剤の使用にも、耐性検査は欠かすことのできない必須の検査であるといえる。従って、本研究では新規抗HIV薬についても焦点を当てた。

以上の観点から、本研究は以下の4つに注目して、調査、解析を行った。(1) 当院での新規診断HIV感染者における薬剤耐性頻度の調査（耐性疫学調査）。

(2) 初回治療導入後に早期に治療失敗となった症例における薬剤耐性の調査（早期失敗例調査）。(3) 多剤耐性症例における新規抗HIV薬の有効性に関する検討（多剤耐性例調査）。(4) 新規抗HIV薬の処方の実態調査（新規抗HIV薬調査）。

B. 研究方法

薬剤耐性検査方法は、患者から採血後直ちに血漿を分離し、ウイルスRNAを抽出した。その後特定のプライマーを用いてRT-PCR法でHIV-1（以下HIV）の逆転写酵素およびプロテアーゼ領域を増幅した。一部の症例ではインテグラーゼ領域についても増幅を行った。増幅されたDNAをDirect sequencing法にて決定した。決定された塩基配列を既報告の薬剤耐性に関連する変異（IAS-USAパネルおよびStanford薬剤耐性データベース）と照合した。耐性疫学調査は、平成19～21年度に独立行政法人国立病院機構大阪医療センター（以下、国立大阪医療センター）で薬剤耐性検査を実施した症例のうち、同年度に始めて感染が確認されたものを対象とし、カルテから情報を収集し検討を行った。早期失敗例調査は、初回治療導入後3ヶ月以内にウイルス学的治療失敗となった症例の、治療前後の薬剤耐性検査結果を比較した。多剤耐性症例調査は、複数のクラスの抗HIV薬に耐性を示した症例に対して、新規抗HIV薬（DRV・ETR・RAL・MVC）を投与した症例の経過について診療録から情報を回収した。新規抗HIV薬調査については平成21年7月20日までにDRV・ETR・RAL・MVCを用いた35例を対象として、診療記録から経過について情報を収集した。

（倫理面への配慮）

研究の遂行に関しては、当院の倫理委員会に相当する受託研究審査委員会で承認を得た方法を用いた

（薬剤耐性HIVの動向把握のための調査耐性確立およびその対策に関する研究・承認番号0820、新規抗HIV薬使用症例調査・承認番号0918）。いずれも個人情報取り扱いについては厳重に行った。日本未承認薬（RALとETRで保険収録前の投与）に関しては、当院の倫理委員会にて審査・承認をうけたのち、患者に投与を行った。

C. 研究結果

耐性疫学調査：本調査は平成19～21年度に行った。平成19年度は、同年に新規にHIV感染症と診断され当院に初診となった62名が対象となった。RT領域の一次変異としてV108V/Iを1名、M184Vを1名認めた。M184Vの症例はB型慢性肝炎を合併しており3TC（商品名ゼフィックス）が投与されていた。PR領域の一次変異はM46LとM46Iの2症例であった。平成20年度は78名が対象となった。RT領域にM184V、K219E、Y181Cの一次変異を認めた。M184Vは平成19年度の症例と同様にB型慢性肝炎に対して3TCが投与されていた。K219EとY181CはサブタイプBの同一症例に認めたが、TVD+ATV/rによる初回治療にて速やかに血中ウイルス量は感度未満となった。平成21年度は44名が対象となった。RT領域にM41LとD67Nを認めるのみで、他の一次変異は認めなかった。

早期失敗例調査：平成20年～21年初回治療例のうち、初回治療導入3ヶ月以内に治療失敗と判断された症例は3例存在した。1例はTVD+EFVで初回導入された症例（図1）であり、投与3ヶ月後においても血中ウイルス量が数万で経過し、K65RとG190Eの変異を認めた。EZC+ATVで初回導入された症例（図2）では、同様に投与3ヶ月後においても血中ウイルス量の低下がなく、PR領域にN88S、RT領域にD67GとM184Vの変異を認めた。最後の

症例1 初回治療導入例 サブタイプB
薬剤耐性検査 ↓ 治療前 PR: L60P, I93L RT: (-)
↓ 治療後 PR: M361M, L63P, I93L
RT: **K65R, G190E**

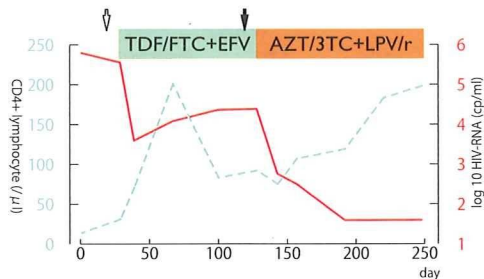


図1 初回導入後の早期治療失敗例1

症例2 初回治療導入例 サブタイプB
薬剤耐性検査 ↓ 治療前 PR: L10V, M361, L63A RT: (-)
↓ 治療後 PR: L10V, M361, L63A, **N88S**
RT: **D67G, M184V**

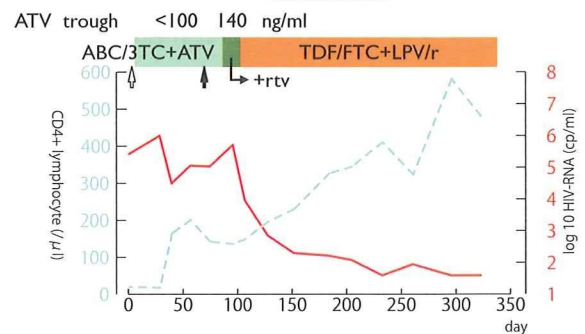


図2 初回導入後の早期治療失敗例2

一例はEZC+RALで初回導入となった症例（図3）である。入院加療中のため服薬率は100%であるが、投与2ヶ月後においても血中ウイルス量の低下を認

めず、RT領域にM184Vの変異を、IN領域にE92EQの変異を認めた。最後の症例の治療開始前のIN領域の検査は施行予定であるが、いずれの症例においても治療開始前の耐性検査ではPRおよびRT領域に一次変異は認めなかった。

症例3 初回治療導入例 サブタイプB

薬剤耐性検査 ↓治療前 PR: I13V, G16E, I62V, V77I RT: (-)
IN: 実施予定

↓治療後 PR: I13V, G16E, I62V, V77I RT: **M184V**
IN: **E92E/Q**

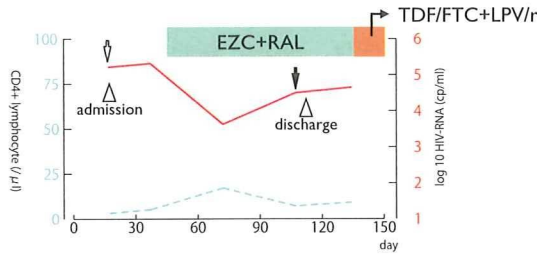


図3 初回導入後の早期治療失敗例3

多剤耐性例調査

本調査は平成20年度に行った。新規抗HIV薬は平成20年12月の段階で6例に対して投与されており、全症例で少なくとも2つのクラスで耐性を有していた。耐性検査の結果は図4に示す通りである。半数の3例（症例2・3・6）が血液製剤による感染であり、4例（症例1・2・3・5）で既存の抗HIV薬では十分な抗ウイルス効果が得られていなかった。症例4は血中ウイルス量は感度未満であったが、多剤耐性がベースにあり高脂血症のために新規抗HIV薬

年齢 (歳代)	NRTI NNRTI PI	HIV耐性変異	感染経路	変更前 CD4(/mm ³) VL(cp/ml)	薬剤変更理由
① 30	M184V, T69A, K103N, P225H L63A		同性間	7 250000	多剤耐性
② 30	T215Y, M184V, V75A, V118I V106L, V179I, Y188C, L10I, L63Q, V77I, L90M, I93L, I64V		血液製剤	162 280000	多剤耐性
③ 70	D67N, K70R, T215F, K219Q, M184V, T69TA, V75M L10I, K20M, M36VM, I47I, I54V, L63T, V82A, L90M, G16E, L76V, T74S		血液製剤	340 18500	多剤耐性
④ 40	M41L, D67G, L210W, T215Y, Q151M K20M, M36I, M46L, I47I, I54V, L63P, A71V, V82A, L90M		同性間	712 <40	高脂血症、多剤耐性
⑤ 30	D67N, K70R, M184V, K219KQ K101E, G190A L10V, I13V, K20R, L33F, M46L, Q58E, V82F, I84V		異性間	188 25900	多剤耐性
⑥ 50	M41L, D67N, K70R, T215F, K219Q, M184V, L74L, T69TA, V118I L10I, K20M, M36I, G48V, I47I, I54V, L63P, A71V, V82C, I93L, I13V, I62V, T74S		血液製剤	76 113	抗ウイルス効果不良 多剤耐性

図4 当院のインテグラーゼ阻害剤使用例

年齢 (歳代)	レジメン	CD4(/mm ³) VL(copies/ml)			
		治療開始前	4W	8W	
① 30	ABC/3TC +RTV+DRV+RAL	7 250000	85 49000	118 3400	124 64 (19W)
② 30	TDF/FTC +LPVr+RAL	162 280000	270 3500	290 <40	403 <40 (28W) 他院からの紹介
③ 70	RTV+DRV +RAL+ETR	340 18500	301 201	456 184	479 <40 (19W) 他院からの紹介
④ 40	EFV+LPVr+RAL	712 <40	433 <40	469 <40	-
⑤ 30	RTV+DRV +RAL+ETR	188 25900	256 304 (2W)	234 86	231 <40 (21W) 他院からの紹介
⑥ 50	ABC/3TC +RAL+EFR	76 113	80 <40 (2W)	106 <40	-

図5 当院のインテグラーゼ阻害剤の投与例のまとめ

が使用された。治療メニューは図5に示した。使用された新規抗HIV薬は、RAL単独が2例、ETR+RALが1例、DRV+RALが1例、ETR+DRV+RALが2例であった。いずれの症例もサルベージ療法開始後、速やかに血中ウイルス量の低下が得られた。アドヒアランス不良の一例を除き、現在も良好な抗ウイルス効果が得られている。

新規抗HIV薬調査

本調査は平成21年度に行った。平成21年7月20日までに当院で新規抗HIV薬を使用されていたのは35症例であった。年齢の中央値は40歳（最高72歳、最低30歳）で、50歳以上が8例（23%）と外来通院患者全体の分布と比較すると高齢の症例に投与されていた（図6）。大多数が男性（33例、94%）であり、推定感染経路は同性間性的接触が22例（63%）と最

も多かったが、血液製剤による感染例も7例（20%）認めた。初回治療開始時期は2000年以前の症例が多かった。新規抗HIV薬投与前のCD4数は大多数は200以上であり、血中HIV-RNA量も感度未満である症例が14例（40%）と、比較的コントロールされた症例が多かった。投与された新規抗HIV薬は、DRVが10例、RALが28例、ETRが8例（後からETRが追加投与された3例は除く）であり、MVCの投与はなかった（図7）。新規抗HIV薬と併用した抗HIV薬としては、TVDが最も多く、約半数（17例、49%）で併用されていた。投与メニューは21種類と多岐にわたり、以前に投与された薬剤の耐性や副作用が関連していると考えられた。投与理由は副作用が24例（69%）と最も多く、効果不十分は1/3程度（12例、34%）であった（図8）。副作用としては、倦怠感・嘔気・下痢・腹満感・食欲低下・リポディストロフ

・年齢		・推定感染経路		・CD4数	
30代	14例 (40%)	同性間	22例	中央値	249/μL
40代	13例 (37%)	異性間	3例		(6-932)
50代	4例 (11%)	血液製剤	7例		
60代～	4例 (11%)				
・性別		・初回治療開始時期		・HIV-RNA量	
男性	33例	～1999年	13例	中央値	150cp/ml
女性	2例	2000年～	6例		(<40-280,000)
		2004年～	6例		
		2008年～	6例		

図6 新規抗HIV薬投与症例の患者背景(35症例)

・投与新規抗HIV薬		・併用された抗HIV薬		・投与メニュー	
DRV	10例	TVD	17例	EZC,RAL	4例
RAL	28例	EZC	11例	TVD,RAL	3例
ETR*	8例	ABC,3TC	2例	TVD,ETR	3例
MVC	0例	COM	1例	TVD,ETR,RAL	3例
*ETRが後日追加投与された3例を除く		EFV	2例	その他(17組)	22例
		NVP	1例		
		FPV	3例		
		LPV/r	3例		
		ATV/r	1例		

図7 新規抗HIV薬と投与メニュー(35症例)

副作用の軽減	24例
効果不十分	12例
アドヒアランス不良	3例
薬剤相互作用	1例
	など

図8 新規抗HIV薬投与理由(35症例)

イー・高脂血症状・肝障害・乳酸アシドーシス・しびれ等があげられた。

D. 考察

HIV耐性検査は治療導入前の施行がガイドライン上勧められており、検査結果によって使用薬剤が変更されることもある。この3年間の解析結果で、注意すべき耐性は3症例認めた。そのうちの2症例はRT領域のM184V単独の変異であった。これらの2症例はHIV感染症の診断以前にB型慢性肝炎に対して3TCが投与されていたため、3TC単剤投与がHIVの薬剤耐性の原因と考えられた。最近B型慢性肝炎患者であるentecavir（バラクルード）もM184Vの耐性変異を引き起こすことが明らかとなった。B型肝炎のガイドラインでHIVの重複感染の有無の確認が必要であることを記載しているものは少ないのが現状である。HIVの薬剤耐性を引き起こさないためには、ガイドラインの記載もふくめ、消化器内科医にも肝炎の治療でHIVに変異が導入されることを広めていく必要がある。

初回治療後に早期にウイルス学的治療失敗となり、耐性変異を確認した症例を3例経験した。これらの症例はいずれも治療開始前にはPRおよびRT領域に耐性変異を認めなかった。100%の内服率にも関わらず耐性変異が出現した症例も存在していることから、おそらく耐性株がminor populationとして存在し、治療導入後に選択的に増殖したと考えられる。AIDS発症例等では速やかな血中ウイルス量のコントロールと免疫の再構築が望まれるため、minor populationの検出の臨床応用も期待される。

新規抗HIV薬のなかで、最も頻用されているのがインテグラーゼ阻害剤であるRALである。平成20年7月から国内においても使用可能となっている。当院では海外輸入により平成20年5月から2症例に投与を行い、以降も併せて平成21年7月20日の段階で28症例に投与を行った。すでに報告されているように、抗ウイルス効果は良好であり、多剤耐性症例にも関わらず全例において良好な血中ウイルス量の減少を認めた。また、特記すべき副作用もなく、atazanavirと併用時のみ血中濃度が上昇する程度で薬剤相互作用の問題もほとんど知られていない。新規抗HIV薬調査では、多剤耐性症例のみではなく、副作用が許容できない症例に広く処方されていた。現時点ではNRTI2剤との組み合わせによって長期間ウイルスを抑制できるかどうかについては明らかではないが、初回治療として用いることが保険適応となったことや、DHHSのガイドラインにおいても初回治療の推奨レジメンに加えられたことから、広く使

用されることは容易に推測される。一方で治療実績に欠けることから、初回治療例におけるEZC+RALや、治療失敗歴がある症例に対するTVD+RALの投与により長期的にウイルスの増殖抑制が得られるかどうか不安の声もでており、NNRTIに加えETRやFPV、ATV/r等も同時併用されている症例も多い。実際、初回治療早期にウイルス学的治療失敗となり耐性変異が出現したRAL使用症例（早期失敗例調査）も認めた。DRV/r、ETRを含め、今後の使用に関して、一定の治療指針の必要であり、その確立のためにもHIV薬剤耐性検査は重要であると考えられる。

E. 結論

新規患者におけるHIVの薬剤耐性遺伝子の検索を184例に対して行った。3症例で抗HIV薬の選択に直接関わる耐性変異を認めた。初回治療導入後に早期に治療失敗となった症例を3例同定し、耐性変異は治療後のみで、治療前には認めなかった。多剤耐性症例6例に対して新規抗HIV薬の投与を行い、良好な抗ウイルス効果を得た。35症例に対して新規抗HIV薬を処方しており、副作用が原因となって薬剤変更がなされた症例が多数であった。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

口頭発表

国内

- 1) 上平朝子、吉野宗宏、渡邊大、宮成伸次郎、谷口智宏、矢嶋敬史郎、小川吉彦、坂東祐基、矢倉裕輝、笠井大介、西田恭治、白阪琢磨：当院における新規抗HIV薬（Raltegravir,Etravirine）の使用経験。第23回日本エイズ学会学術集会・総会、愛知、2009年11月
- 2) 上平朝子、大谷成人、富成伸次郎、坂東裕基、谷口智宏、矢嶋敬史郎、小川吉彦、矢倉裕輝、吉野宗宏、渡邊大、白阪琢磨：新規抗HIV薬（Darunavir,Raltegravir,Etravirine）の使用経験。第22回日本エイズ学会学術集会・総会、大阪、2008年11月

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし。



研究要旨

多剤耐性HIV治療の最適化研究

研究分担者 松下 修三 熊本大学エイズ学研究センター 教授

薬剤耐性や不耐用の症例に有効な新規インテグラーゼ阻害剤 (Raltegravir;RAL) は、わが国でも2008年7月より使用可能となった。RALは、米国での臨床試験において、多くの治療失敗例が報告され、耐性変異に対するgenetic barrierが低いのではないかとされている。しかし、これまでの臨床試験例における、耐性関連変異は報告されたものの、in vitro耐性誘導による解析の報告は少ない。そこで、我々は、新たに樹立した臨床分離株および研究室株89.6を用いて、RALに対するin vitro耐性誘導を行い、耐性機序の検討を行った。その結果、臨床データで認められているものの、これまでin vitroでの耐性誘導は報告されていないY143C/R変異や、これまでに報告がない新たな関連変異であるG163Rが誘導された。これらのことは実験室株ではなく各種臨床分離株を用いる本システムにより、in vivoに近い耐性変異のデータを得ることが可能であることを示している。また、今回耐性誘導に用いた臨床分離株ではRALをはじめとするpol系阻害剤に対する耐性メカニズムの新たな知見として、直接pol領域に耐性変異が蓄積する前に、もともとあるレパートリーからpolのみならずenvにおいても選択が生じ、その後、より高度な耐性を獲得する為の活性中心への耐性変異が蓄積していくことが示唆された。

A. 研究目的

HIV感染症に対する治療は、逆転写酵素阻害剤 (RTIs) とプロテアーゼ阻害剤 (PIs) を用いた多剤併用療法 (HAART療法) にて大きな効果を上げ、AIDSの発症率と死亡率の改善をもたらした。しかし、これらの薬剤は、ウイルスの増殖は抑制するものの、潜伏感染細胞や残存ウイルスの増殖を許すため、治療に至ることはなく、いったん開始すると長期にわたる治療の継続が不可避である。このような状況で、抗ウイルス薬の長期毒性と薬剤耐性の問題は、臨床・基礎医学の分野でますます重要な課題となっている。この課題を解決するためには、HIV-1が耐性を発現しにくい、または発現しても他薬剤との交差耐性を有しない新規のRTIsおよびPIs、更に全く新たな作用機序を有する抗HIV剤の開発など、新しい治療法についての研究が必要である。

最近、新しい作用機序の抗ウイルス薬として、侵

入阻害剤 (CCR5阻害剤) とインテグラーゼ阻害剤が新たに認可されたが、これらの新規薬剤に関する耐性発現の機序は未だに不明な点も多い。我々は、このなかでインテグラーゼ阻害剤であるRaltegravir (RAL) に注目し、臨床分離株を用いたRALに対するin vitro耐性誘導実験法を確立し、primary変異の出現をはじめとする耐性機序について、詳細な検討を行った。

B. 研究方法 (倫理面の配慮)

(1) 耐性ウイルスの出現という課題の解決のために、現在までに各抗HIV-1剤に対するin vitro耐性誘導解析が進められて成果を上げてきたが、これらの研究には実験室株であるサブタイプBのX4ウイルスをT細胞株に感染させる方法が主に採用されており、in vitroの知見と臨床の知見

で少なからず乖離が認められるという問題点が存在する。実際に患者体内で感染の主体となっているR5臨床分離ウイルスを用いた耐性誘導の研究は殆どなく、サブタイプB以外のHIV-1 R5臨床分離ウイルスが用いられることはほとんどなかった。感染者体内では様々な polymorphism を持った亜種ウイルスが存在していることから、in vivoでのRAL耐性獲得メカニズムを知るためには、多様な変異を持った臨床分離株を使ってRAL耐性ウイルスを誘導して解析する必要がある。そこで本研究では、患者から分離した臨床分離株 (UUN, IKA, YANA, MOKW, ACC4, KMC1, KMC1/MVC) および研究室株 89.6を用いて、PM1/CCR5細胞を標的細胞とし、RAL濃度をIC₅₀濃度から徐々に上昇させながら in vitro耐性誘導実験を行った。PM1/CCR5細胞に馴化する過程で現れる変異と耐性変異を区別するために、継代コントロールとしてRAL非存在下における各ウイルスの継代も併せて行った。

- (2) 研究の倫理的妥当性は熊本大学医学部先進医療審査会、倫理委員会にて承認されている。

C. 研究結果

新規インテグラーゼ阻害剤 (RAL) の臨床試験において、(i) N155H、(ii) Q148K/H/R、および (iii) Y143C/Rを primary変異とした3つのRAL耐性変異経路が報告されている (Witmer M, et. al., ICAAC, 2008)。しかしながら、in vitro耐性誘導については、研究室株を用いた1報のみであり、先に挙げた primary変異

の1つであるY143C/R変異の誘導の報告はまだない (Kobayashi M, et. al., Abtivial Res., 80, 213-22, 2008)。他方、異なるインテグラーゼ阻害剤で、現在米国で臨床試験中のエルビテグラビル (Eltitegravir, EVG) に対しては in vitro耐性誘導について2つの報告がなされているが、いずれも研究室株を用いた実験であり、また、先に挙げた primary変異の誘導はできていない。

そこで本研究では、最近分離した7種の臨床分離株、YANA (B, Mix), IKA (B, Mix), MOKW (B, R5), ACC4 (C, R5), UUN (CRF01_AE, X4), KMC1 (CRF08_BC, R5), KMC1/MVC (CRF08_BC, R5)、および研究室株 89.6 (B, dual) を用いて、RALに対する in vitro耐性誘導を行い、耐性機序の検討を行った。最初に、各 baseline ウイルスのインテグラーゼ領域のアミノ酸配列およびRAL感受性を解析したところ、MOKW, KMC1, および KMC1/MVC はRALに対し、各々 16, 32, および 32 nM と他のウイルス ($1.2 < IC_{50} < 6.9$) に比べてわずかに感受性が低かったが、今回用いた全ての baseline ウイルスが RAL 感受性であることが示された (表-1)。これら baseline ウイルスのインテグラーゼ領域のアミノ酸配列を解析したところ、これまでに報告されている RAL 耐性変異および補償変異のいずれも検出されなかったが、KMC1 および KMC1/MVC においては、これまでに報告されてない5塩基の挿入変異 (NQDME) が288残基に認められた (表-1)。

次に、これら RAL 感受性の baseline ウイルスを用いて、我々が確立した RAL に対する in vitro耐性誘導システムを用いて、RAL耐性ウイルスを誘導し、インテグラーゼのアミノ酸配列およびRALに対する

表1 今回用いた baseline ウイルス (臨床分離株) の各サブタイプコンセンサス配列と比較したインテグラーゼ領域のアミノ酸変異およびRALに対する薬剤感受性。

virus	genotype	IC ₅₀ (nM) RAL
89.6 (B, dual)	S17T, D41N, Q177Q/R, T206S, D256D/N, R263R/K	1.2
YANA (B, X4R5)	K7R/K, S17N, I84M, L101I, K111R/K, G163E, Q216Q/H, D278D/N	4
IKA (B, X4R5)	V32I, S39C, A91S, L101I, M154M/I, V201I, A205S, K240R	6.9
MOKW (B, R5)	S17N, D41D/N, I72V, L101I, T112A, T124A, T125A, K211T, I217V, T218S, S283G	32
ACC4 (C, R5)	I50T, I72V, D167E, I218T, I220L, D253E, S255S/N	5.5
UUN (CRF01_AE, X4)	T21A, I31V, V32I, N39S, R136Q, E167D, D279N/D	2.1
KMC1 (CRF08_BC, R5)	K14R, D41N, L45Q, M50I, I84M, A125T, L161I, V201I, R211K, D253H, K269R, D288NQDME	16
KMC1/MVC (CRF08_BC, R5)	K14R, D41N, L45Q, M50I, I84M, A125T, L161I, V201I, R211K, D253H, K269R, D288NQDME	32

薬剤感受性を比較検討した。図1に示すように、各ウイルスいずれもIC₅₀濃度の10-20倍の濃度付近で感染力の鈍化が見られ、耐性誘導は容易ではなかったが、これらの中から、IKA (21 passage) および KMC1 (22 passage)の増殖がみられ、耐性変異の誘導が観察された。

最近、Hazudaらにより、治療失敗例の患者群で認められるRAL耐性変異として、L74M, E92Q, T97A, E138A/K, G140S, Y143C/H/R, Q148H/K/R, V151I, N155H, およびG163K/Rが報告されている (Hazuda DJ, et. al., International Drug Resistance Workshop, 2007)。今回の耐性誘導の結果、G163R および Y143C変異がIKA (21 passage) および KMC1/MVC (8 passage)で各々検出された(表-2)。他方、これまでに報告がされていない新たな置換であるG189R変異がKMC1 (22 passage)で認められた(表-2)。また、V311/R263S変異が研究室株89.6 (8 passage)で検出さ

れた(表-2)。

一方、これら以外のウイルス (YANA, MOKW, ACC4, および UUN) では、12-25 passageにおいてもこれまでに報告されているRAL耐性変異および補償変異のいずれも検出されていない(表-2)。しかしながら興味深いことに、インテグラーゼおよびEnv領域において、耐性誘導前のquasispeciesから、耐性誘導群と継代コントロール群で明らかに異なった配列を有するウイルスが選択されることが明らかになった。例えば、今回用いた臨床分離株のひとつYANAでは、インテグラーゼ領域において4残基でアミノ酸の明白な選択が確認され、さらに、Env領域においても、V2挿入をはじめC1からV5までにわたり顕著な配列の違いが2群間で認められた(図-2)。以上の結果から、RAL耐性獲得におけるEnv領域の関与が改めて示唆された。

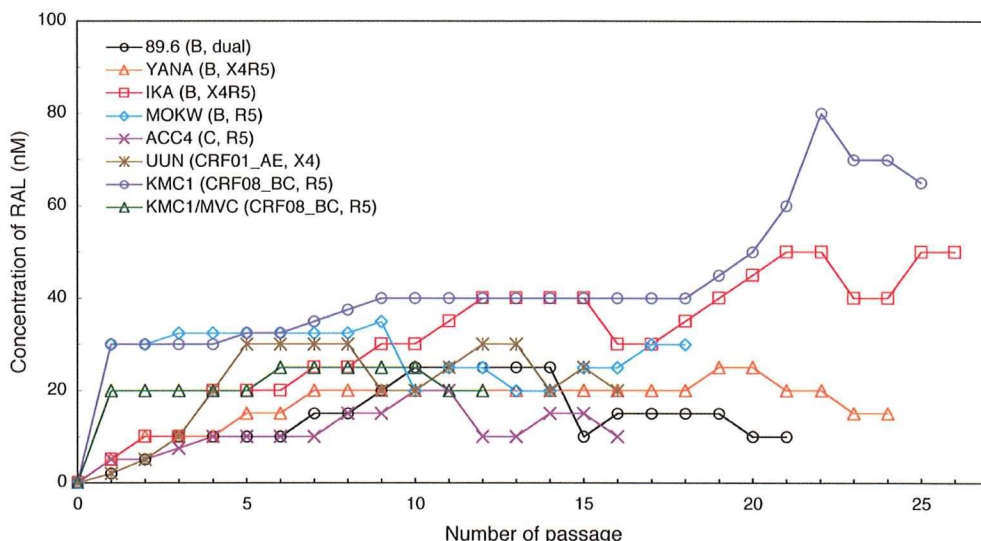


図1 臨床分離株を用いたRaltegravir(RAL)に対するin vitro耐性誘導

縦軸にあらわした濃度のRAL存在下に標的細胞 (PM1/CCR5) に各ウイルス株を感染させ、増殖させる。6~7日を1パッセージとして、HIV-1の感染をcytopathic effect (CPE)で確認しながら徐々に薬剤濃度を上げて耐性を誘導する。

表2 RAL耐性誘導で現れたインテグラーゼ領域のアミノ酸変異および薬剤感受性

virus	passage no.	concn (nM)	mutation	IC ₅₀ (nM) RAL
89.6 (B, dual)	8	15	V311, R263S	4.4 (3.7)
YANA (B, X4R5)	17	20	no mutation	26 (6.5)
IKA (B, X4R5)	21	50	G163R, R269K	31 (4.5)
MOKW (B, R5)	11	25	no mutation	25 (0.78)
ACC4 (C, R5)	11	20	no mutation	27 (4.9)
UUN (CRF01_AE, X4)	8	30	no mutation	33 (16)
KMC1 (CRF08_BC, R5)	22	80	G189R	32 (2.0)
KMC1/MVC (CRF08_BC, R5)	8	25	C56Y/C, Q137R/Q, Y143C	29 (0.91)

青は耐性誘導で現れたポリモルフィズムを、赤は耐性誘導で現れた変異を各々示す。