

201029002B

厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業 平成20-22年度総合研究報告書

抗HIV薬の適正使用と効果・毒性に関する基礎的研究



研究代表者 湯永 博之

(独)国立国際医療研究センター エイズ治療・研究開発センター

平成23(2011)年3月

平成20～22年度
厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業

抗HIV薬の適正使用と効果・毒性に関する基礎的研究

－平成20～22年度 総合研究報告書－

抗HIV薬の適正使用と効果・毒性に関する基礎的研究

研究者名	分 担	所 属	職 名
研究代表者	湯永 博之	(独)国立国際医療研究センター エイズ治療・研究開発センター	治療開発室 医長
研究分担者	杉浦 互	(独)国立病院機構名古屋医療センター 臨床研究センター 感染・免疫研究部	部 長
研究分担者	太田 康男	帝京大学医学部 内科学講座	教 授
研究分担者	児玉 栄一	東北大学病院 内科・感染症科	助 教
研究分担者	吉村 和久	熊本大学エイズ学研究センター 吉村プロジェクト研究室	准教授
研究分担者	鈴木 康弘	東北大学大学院医学系研究科 内科病態学講座感染病態学分野	講 師
研究分担者	横幕 能行	(独)国立病院機構名古屋医療センター エイズ診療科	医 長
研究分担者	川村 龍吉	山梨大学医学部附属病院 皮膚科	講 師
研究分担者	塚田 訓久	(独)国立国際医療研究センター エイズ治療・研究開発センター	医療情報 室長
研究分担者	本田 元人	(独)国立国際医療研究センター エイズ治療・研究開発センター	医 師
研究分担者	関 康博 (平成20年度)	熊本大学大学院医学薬学研究部 血液内科学・感染免疫診療部	特定事業 研究員
研究分担者	蜂谷 敦子 (平成20年度)	(独)国立国際医療研究センター エイズ治療・研究開発センター	臨床 検査技師

目次

◆総括研究報告書

抗HIV薬の適正使用と効果・毒性に関する基礎的研究	2
渦永 博之 (独) 国立国際医療研究センター エイズ治療・研究開発センター	

◆分担研究報告書

抗HIV薬の効果と毒性の解析	8
渦永 博之 (独) 国立国際医療研究センター エイズ治療・研究開発センター	

抗HIV薬の効果に関わる因子の研究	14
杉浦 互 (独) 国立病院機構名古屋医療センター 臨床研究センター 感染・免疫研究部	

免疫再構築の分子機序の解析 (プロテアーゼ阻害薬による糖代謝異常の分子機序の解析)	26
太田 康男 帝京大学医学部 内科学講座	

融合阻害薬・インテグラーゼ阻害薬の <i>in vitro</i> 研究	32
児玉 栄一 東北大学病院 内科・感染症科	

侵入阻害薬に対する耐性メカニズムの解析	44
吉村 和久 熊本大学エイズ学研究センター 吉村プロジェクト研究室	

侵入阻害薬の及ぼす分子的影響の解析	50
鈴木 康弘 東北大学大学院医学系研究科 内科病態学講座感染病態学分野	

新規薬剤の臨床効果の解析	56
横幕 能行 (独) 国立病院機構名古屋医療センター エイズ診療科	

抗HIV薬の感染予防効果の解析	62
川村 龍吉 山梨大学医学部附属病院 皮膚科	

抗HIV療法の臨床効果に関する研究	66
塚田 訓久 (独) 国立国際医療研究センター エイズ治療・研究開発センター	

抗HIV薬の副作用・相互作用に関する研究	70
本田 元人 (独) 国立国際医療研究センター エイズ治療・研究開発センター	

研究成果の刊行物に関する一覧	77
----------------------	----

I. 総括研究報告書

抗HIV薬の適正使用と効果・毒性に関する基礎的研究

研究代表者

潟永 博之 (独)国立国際医療研究センター エイズ治療・研究開発センター
治療開発室医長

研究分担者

杉浦 亙 (独)国立病院機構名古屋医療センター 臨床研究センター 感染・免疫研究部 部長
太田 康男 帝京大学医学部 内科学講座 教授

児玉 栄一 東北大学病院 内科・感染症科 助教

吉村 和久 熊本大学エイズ学研究センター 吉村プロジェクト研究室 准教授

鈴木 康弘 東北大学大学院医学系研究科 内科病態学講座感染病態学分野 講師

横幕 能行 (独)国立病院機構名古屋医療センター エイズ診療科 医長

川村 龍吉 山梨大学医学部附属病院 皮膚科 講師

塚田 訓久 (独)国立国際医療研究センター エイズ治療・研究開発センター 医療情報室長

本田 元人 (独)国立国際医療研究センター エイズ治療・研究開発センター 医師

関 康弘 熊本大学大学院医学薬学研究部 血液内科学・感染免疫診療部 特定事業研究員

蜂谷 敦子 (独)国立国際医療研究センター エイズ治療・研究開発センター 臨床検査技師

研究要旨

新規薬剤の適正使用に関する基礎的研究として、etravirineの耐性HIV-1への効果、CTL逃避変異の薬剤耐性への影響、raltegravir耐性変異への影響、maravirocに対する耐性誘導、maravirocによるHIV感染予防効果について解析を行った。また、抗HIV薬の効果と毒性に関する研究として、tenofovir腎障害の解析、プロテアーゼ阻害薬による脂質異常、プロテアーゼ阻害薬による代謝異常のメカニズム、抗HIV療法時のワーファリン併用、raltegravirの有害事象について解析を行った。抗HIV薬の効果と毒性に関して、いくつかの重要な知見が得られた。特に、欧米人よりも日本人・アジア人特有と思われる問題も見いだされており、欧米のガイドラインを適用する際に留意すべき注意点を示すことができた。

A. 研究目的

新規抗HIV薬の適正な使用をガイドするために、臨床と基礎の両面から新薬による治療指針のもとになるデータを提供することを目指す(柱1：新規薬剤の適正使用に関する基礎的研究)。また、治療に伴う毒性や他剤との相互作用を解析し、有害事象を回避するための治療法を探索する(柱2：抗HIV薬の効果と毒性に関する研究)。

B. 研究方法

柱1では、多剤耐性患者から得られた臨床分離株や継代培養で選択された薬剤耐性HIVに対する新規薬剤の効果を解析した。また、表皮水疱蓋を用いたex vivo HIV感染モデルを用いて、新規薬剤の感染予

防効果を解析した。

柱2では、臨床症例より新規薬剤および既存薬による有害事象の程度・頻度を明らかにし、そのメカニズムを解析した。また、安全な他剤との併用を検討した。

(倫理面への配慮)

国立国際医療研究センターと国立病院機構名古屋医療センターの症例の臨床経過・HLAの解析およびHIV遺伝子を解析した。臨床経過・HLAの解析と患者HIV遺伝子の解析について、それぞれの施設の倫理委員会で承認を得た。患者の理解と協力を得るため、研究の必要性和意義について十分に説明し、それぞれの施設の倫理規定に従い同意書に自筆のサインを得た。サインが得られた同意文書はカルテに

綴じ込み保存した。個人情報を守るため、個人を特定できるような情報は外部には出さない。健常者からの表皮水疱蓋の採取については、山梨大学の倫理委員会で承認を得た後、同大学病院皮膚科で行った。

C. 研究結果

柱1：①「etravirine (ETR) の耐性HIV-1への効果」次世代型の非核酸系逆転写酵素阻害薬 (NNRTI) であるETRは、efavirenz (EFV) やnevirapine (NVP) に高度耐性となった臨床分離株に対しても十分な抗HIV-1効果を示した。逆転写酵素 (RT) の二つの多型的変異V106I、V179Dを持つHIV-1は、EFVとNVPに対し有意な耐性を示したが、ETRには感受性だった。*in silico*の構造解析から、ETRはEFVやNVPと異なりflexibleな構造をもつため、種々の変異を持つRTのbinding pocketに結合できると考えられた。②「CTL逃避変異の薬剤耐性への影響」RTにはHLA-B*51拘束性CTLのmajor epitope (RT 128-135) が存在し、HLA-B*51陽性の感染者ではほぼ100%、RT135番のアミノ酸が逃避変異 (I135X) を起こしていた。最も頻度が高いI135Tを持つHIV-1を継代培養しEFV耐性ウイルスを誘導したところ、新たな変異E138Kが出現した。I135TとE138Kは、それぞれ単独では有意な耐性はもたらさないが、組み合わせるとEFV・NVPのみならず、ETRに対しても耐性をもたらした。I135Tは、HLA-B*51陰性の感染者にも拡がっており、特に日本でその頻度が高い。I135T/E138Kは今後世界的に増えてくる可能性の高い新規のNNRTI耐性変異パターンであり、今までのNNRTI耐性変異と異なりETRやrilpivirine (RPV) でサルベージできない可能性があり注意を要する。③「raltegravir (RAL) 耐性変異の影響」インテグラーゼの遺伝的多様性のRAL感受性への影響を調べるため、実験株 (HXB2) と多剤耐性症例由来株にRAL耐性変異Q148K/H/R・N155Hを導入した。RAL耐性変異を単独で導入した場合、多剤耐性症例由来の株で実験株よりもRAL耐性度が高かった。いずれの株も148と155を同時に導入した場合、増殖がほとんど観察されなかった。また、Q148H変異は増殖能を著しく落とすが、G140Sが加わることによりほぼ回復した。インテグラーゼ遺伝子の多様性がRAL耐性変異獲得後の耐性度に影響を与えていた。実際にRAL投与症例では、G140SとQ148Hの組み合わせがよく見られ、Q148HとK155Hの組み合わせは見られないが、増殖能の点から説明できることが明らかとなった。④「maraviroc (MVC) に対する耐性誘導」三つのCCR5-tropicな臨床分離株

(CRF08_BC、subtype C、B) から、CCR5を導入した浮遊細胞 (PM1/CCR5細胞) でMVC耐性を誘導したところ、いずれも異なる変異が出現し、共通したものはなかった。株により異なる変異が生じており、耐性メカニズムも異なる可能性がある。遺伝子型によるMVCの耐性検査は極めて困難であると考えられた。⑤「MVCによるHIV感染予防効果の解析」MVC内服前後の健常者から表皮水疱蓋を採取し、その表面にHIVを接種し、ランゲルハンス細胞の感染を調べた。MVC内服前の表皮水疱蓋には感染が認められたが、内服後のものには認められなかった。また、MVC内服後の精液中のMVC濃度は、血液中と同等かそれ以上であった。MVC内服は、非感染者が自らの感染を防止するためにも、男性感染者がパートナーの感染を防止するためにも、いずれにも有望であることが示された。

柱2：⑥「tenofovir (TDF) 腎障害の解析」腎障害によるTDFの中止率はほぼ5%であり、欧米の報告よりも多く、低体重がリスク因子の一つであると考えられた。TDFは、欧米のガイドラインで、不可欠な第一選択と位置づけられているが、今後、体重のより軽いアジア人への投与が本格化した際に、腎障害が問題になる可能性がある。⑦「プロテアーゼ阻害薬 (PI) による脂質異常」lopinavir (LPV) 導入症例では、中性脂肪が平均して導入前の2倍になり、総コレステロールが36%増加した。LPVからdarunavir (DRV) に変更した7例で、中性脂肪とコレステロール値の改善が見られた。LPVは特に中性脂肪を上昇させ、DRVへ変更すると脂質異常が改善する可能性があることが示された。⑧「PIによる代謝異常のメカニズム解析」LPVとDRVはprotein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) の発現を増加させ、インスリン受容体基質1 (IRS-1) のリン酸化を抑制し、glucose transporter 4 (GLUT4) の細胞膜上への発現を抑制した。その程度はLPVのほうが強かった。PTP1B阻害薬は、まだ臨床投与されていないが、PIによるインスリン抵抗性を改善する可能性が示された。⑨「抗HIV療法時のワーファリン併用」ワーファリンは2つの光学異性体よりなり、それぞれが異なるチトクロームP450 (CYP) で代謝され、また、それぞれのCYPが薬剤による誘導や阻害を別々に受けるため、抗HIV薬と併用する際は投与量調節が重大な問題となる。LPV投与中にワーファリゼーションが困難だった例でritonavir (RTV) boostをしないfosamprenavir (fAPV) に変更したところ、PT-INRが安定した。RALに変更しても適切なPT-INRが得られた。他の2例で、RALと併用したが良好なコントロールが可能であった。ワーファリンが必要な症

例で抗HIV療法を行う際は、RTV boostをしないfAPVか、RALをkey drugとするとコントロールしやすいことが示された。⑩「RALの有害事象」RALが投与された感染者200例について検討したところ、16例で肝障害、4例で皮膚掻痒感、1例でCT画像上明らかな腹膜炎を起こした。RALの日本人における有害事象は、欧米の臨床試験よりも高頻度である可能性がある。また、腹部症状や腹膜炎など、日本人特有のものもあるかもしれない、今後の投与に際して注意が必要である。

D. 考察

抗HIV薬の効果と毒性に関して、いくつかの重要な知見が得られた。特に、欧米人よりも日本人・アジア人特有と思われる問題も見いだされており、欧米のガイドラインを適用する際に留意すべき注意点を示すことができた。

E. 結論

抗HIV薬の適正な使用をガイドするため、薬剤耐性のメカニズムと日本人における治療に伴う毒性の解析に取り組み、臨床現場で活用可能な成果が得られた。

F. 研究発表

各研究分担者の頁参照

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

該当なし

II. 分担研究報告書

抗HIV薬の効果と毒性の解析

研究代表者

湯永 博之 (独)国立国際医療研究センター エイズ治療・研究開発センター
治療開発室医長

研究要旨

①HIVの逆転写酵素(RT)にはHLA-B*51拘束性CTLのmajor epitope(RT 128-135)が存在し、HLA-B*51陽性の感染者ではほぼ100%、RT135番のアミノ酸が逃避変異(I135X)を起こしていた。最も頻度が高いI135Tを持つHIVを継代培養しefavirenz(EFV)耐性ウイルスを誘導したところ、新たな変異E138Kが出現した。I135TとE138Kは、それぞれ単独では有意な耐性をもたらさないが、組み合わせるとEFVのみならずnevirapineや新規のNNRTIであるetravirine(ETR)にも耐性となった。I135Xは、HLA-B*51陰性の感染者にも広がっており、特に日本でその頻度が高い。I135T/E138Kは今後世界的に増えてくる可能性の高い新規のNNRTI耐性変異パターンであり、今までのNNRTI耐性変異と異なりETRでサルベージできない可能性があり注意を要する。CTLと薬剤選択圧が新たな変異パターンを生み出している点で興味深い。②tenofovir(TDF)は治療ガイドライン等で第一選択薬とされている核酸系逆転写酵素阻害薬であるが、時折腎機能障害が見られることが問題である。日本人HIV感染者でTDFを含む抗HIV療法を開始した495人をレトロスペクティブに解析したところ、97人(19.6%)に腎機能障害が認められた(incidence: 10.5/100person-year)。多変量解析を行ったところ体重が最も有意に関連しており、低体重の患者ほど腎機能障害を起こしやすかった。低体重の患者にTDFを投与する際は要注意である。日本以外のアジア諸国でも、今後TDF投与が増えてくると思われるが、アジア人は欧米人よりも低体重であり注意が必要である。

A. 研究目的

①HIVのシーケンスは感染者一人一人において異なり、未治療の患者にも様々な多型的変異が認められる。逆転写酵素やプロテアーゼなどの抗HIV薬のターゲットとなっている酵素にも多型的変異は存在するが、通常、多型的変異そのものは、それだけでは薬剤耐性をもたらさない。しかし、いくつかの多型的変異は、薬剤耐性変異が起こる部位に異なるアミノ酸として存在し、薬剤耐性パターンの出現に影響をもたらすことがある。HLA-B*51は日本人に比較的多いHLAであるが、HLA-B*51拘束性CTLは、HIVの逆転写酵素の128番から135番のアミノ酸配列をmajor epitopeとして認識し、135番のアミノ酸にescape変異が生じると認識しなくなることが知られている。日本人においては、HLA-B*51陽性者のほとんどでescape変異が見られるのみならず、HLA-B*51陰性者においても高率にescape変異が拡

がっていると報告されている。このescape変異が薬剤耐性出現に与える影響を明らかにする。

②tenofovir(TDF)は抗HIV療法で、最も広く使用されている核酸系逆転写酵素阻害薬(NRTI)の一つであり、効果・安全性の両面で他のNRTIよりも優れている。しかし、近位尿細管障害を起こすことが知られており、Fanconi症候群、尿崩症、急性尿細管壊死などの多数の症例報告があり、急性腎不全に至ることもある。明らかな腎不全がなくても、長期TDF投与患者では糸球体濾過率(GFR)の低下がみられるが、現在までのところ、このGFR低下は軽微なものが多く、治療薬変更の必要はないと考えられていることが多い。しかしながら、TDF腎障害の評価については、多くの場合、欧米人が対象になっており、より体格の小さいアジア人での評価は十分でない可能性がある。WHOのガイドラインもTDFを第一推奨薬としたため、今後、途上国でも

TDFの使用が急速に増えてくると予想される。アジア人におけるTDFの安全性を評価するため、日本人のTDF投与例についてレトロスペクティブに解析した。

B. 研究方法

①国立国際医療センターエイズ治療・研究開発センターを受診したHIV感染者の血漿からRNAを抽出し、RT-PCRに続きnested PCRを行うことにより、HIV逆転写酵素領域を増幅しシーケンス解析を行い、135番アミノ酸を同定する。これにより、HLA-B*51拘束性CTLのHIV逆転写酵素135番アミノ酸におけるescape変異の頻度を調べる。Escape変異の薬剤耐性出現への影響を調べるため、逆転写酵素の135番のアミノ酸に変異を持つ組み換えHIVを作成し、抗HIV薬存在下で培養する。抗HIV薬の濃度を徐々に上げていき、高度耐性HIVを誘導し、その過程で出現した変異を解析する。新たに出現した変異の影響を調べるために、再び組み換えHIVを作成し、薬剤感受性を調べる。

②国立国際医療研究センターエイズ治療・研究開発センターを受診した18歳以上の日本人HIV感染者のうち、2002年1月から2009年3月までの間に常用量である300mg/dayのTDFの投与を開始された患者で、開始前のModification of Diet in Renal Diseases (MDRD)の評価式で計算した糸球体濾過率 (eGFR) が60ml/min/1.73m²を超える者を研究対象とした。フォローアップは2009年9月末までとした。TDFによる腎障害をTDF投与前を基準としたeGFRの25%以上の減少と定義した。

(倫理面への配慮)

国立国際医療センターの症例のHLAの解析およびHIV遺伝子、および腎機能の推移を解析した。これらの研究について倫理委員会で承認を得、患者の理解と協力を得るため、研究の必要性和意義について十分に説明し、それぞれの施設の倫理規定に従い同意書に自筆のサインを得た。サインが得られた同意文書はカルテに綴じ込み保存した。個人情報を守るため、個人を特定できるような情報は外部には出さないこととした。

C. 研究結果

①2003年と2004年に国立国際医療センターを受診しHIV感染が新規に診断された97人の患者について、HLA-B*51とHIV逆転写酵素135番のアミノ酸の相関について調べた。97人のうち17人がHLA-

B*51陽性であったが、そのうち16人(94.1%)は、135番目のアミノ酸がイソロイシン(I)からスレオニン(T)に置換する変異(I135T)、I135L、I135Vなどのescape変異が認められ、HLA-B*51陰性の患者よりもescape変異の割合が有意に高かった。しかしながら、HLA-B*51陰性の患者においても、escape変異は62.5%に認められ、escape変異がHLA-B*51陽性の患者から陰性の患者に感染し、しかもHLA-B*51拘束性CTLの選択圧がない状態でも存続し続けていた。結局、escape変異は日本の未治療の感染者に高頻度で見られ、最も多いescape変異はI135T(35.1%)で、野生型のI135(32.0%)よりも高頻度であった。

これらのescape変異の非核酸系逆転写酵素阻害薬に対する耐性変異出現パターンへの影響を調べるため、I135L、I135V、I135T、I135Rのそれぞれのescape変異を持つ組み換えHIVをefavirenz(EFV)存在下で培養し、徐々にEFVの濃度を上げることにより、EFV高度耐性HIVを誘導した。それぞれの組み換えHIVから、3回の誘導実験を行った。I135Lを持つHIVの耐性誘導実験では、K103RとV179D、L100IとV108I、V106AとG190Aの変異の組み合わせが出現した。I135Vを持つHIVの耐性誘導実験では、L100IとE138K、L100IとY188H、L100IとV108Iの組み合わせが出現した。I135Tを持つHIVの耐性誘導実験では、K101EとV108I、V106IとV179D、L100IとV108IとE138Kの組み合わせが出現した。I135Rを持つHIVの耐性誘導実験では、L100IとE138K、V108IとE138KとG190A、L100IとK101Eの組み合わせが出現した。認められた変異のうち、K103RとV179Dの組み合わせ、V106IとV179Dの組み合わせは、非核酸系逆転写酵素阻害薬耐性を賦与すると既に我々は報告している。これら以外の変異は、E138Kを除きすべて、International AIDS Society-USAのmutation tableに非核酸系逆転写酵素阻害薬耐性変異としてリストに挙げられている。138番のアミノ酸は多くの株でグルタミン酸(E)であり、高度に保存されているアミノ酸である。しかし、I135Vを持つHIVの3回の耐性誘導実験のうち1回、I135Tを持つHIVの3回の耐性誘導実験のうち1回、I135Rを持つHIVの3回の耐性誘導実験のうち2回、E138Kが出現している。

E138Kの影響を調べるため、E138Kを単独で持つ組み換えHIVと、上記4種のescape変異のいずれかとE138Kの両方を持つ組み換えHIVを作成し、EFV・nevirapine(NVP)・etravirine(ETR)の3つの非核酸系逆転写酵素阻害薬に対する感受性を調べた。予想される通り、escape変異のみでは、有意な

薬剤感受性の変化は認められなかった。E138K単独でも有意な薬剤感受性の変化は認められなかったが、I135TとE138Kを組み合わせたHIVは、EFVに対して7.0倍、NVPに対して3.8倍、ETRに対して4.2倍と有意な耐性を示した。I135LとE138Kの組み合わせもNVPに4.6倍、I135RとE135Kの組み合わせもETRに3.9倍と、有意な耐性をもたらした。

日本で最も拡がっているescape変異であるI135TとE138Kの組み合わせで、非核酸系逆転写酵素阻害薬、特にEFVに対して、有意な耐性をもたらされたため、そのメカニズムを探るため、コンピューターによる構造解析を行った。野生型の逆転写酵素では、138番のグルタミン酸は比較的EFVの近くに位置し、EFVと逆転写酵素との間のファンデルワールス力と電気的相互作用の形成に寄与していると考えられた。I135T単独では、138番のグルタミン酸側鎖の位地に有意な変化はもたらさなかった。E138K単独では、138番のアミノ酸側鎖の位地に有意な変化をもたらすが、ファンデルワールス力は野生型の場合とほぼ同じだった。I135TとE138Kの組み合わせも、138番のアミノ酸側鎖の位地に有意な変化をもたらすが、更に、135番のスレオニンとの相互作用により138番のアミノ酸側鎖の方向がE138K単独の場合と異なっていた。これにより、138番のアミノ酸とEFVの間にギャップが生じ、ファンデルワールス力が有意に減少し、結合に必要な電気的エネルギーが大きくなっていった。以上より、EFVの結合には、138番のアミノ酸の位地が極めて重要で、I135TとE138Kの組み合わせにより、EFVの結合ポケットが阻害されることが示された。

②2002年1月から2009年3月までに、495人の日本人HIV感染者に対してTDFの投与が開始されていた。TDF投与前の平均体重は63kg、平均年齢は38歳、95.2%が男性だった。平均eGFRは120.9ml/min/1.73m²と保たれており、平均CD4値は247/μlだった。208人は未治療、287人は抗HIV療法中あるいは治療経験があり、162人はTDF投与前にウイルス量が検出限界以下(<50copies/ml)だった。

TDF投与開始後、97人(19.6%)の患者でTDFによる腎障害が生じた(10.5/100person-year)。腎障害を発症するまでの治療期間は、平均39週だった。多変量解析の結果、TDF投与前の体重が腎障害の発症に有意に相関しており(p=0.002)、体重が5kg低下すると1.21倍の発症率になった。

D. 考察

①HIV感染の世界的な広がりが拡大するにつれ、ウイルスの遺伝的な多様性は増し、地域により独特

な配列も生まれてくる。最近、HIVはそのepitopeにescape変異を獲得することによりCTLに適応し、HLAに応じて集団レベルでescape変異が驚くべき早さで増えていることが報告された。escape変異が抗HIV薬のターゲット蛋白に起こった場合、その変異自身が薬剤耐性をもたらさなくても、薬剤耐性変異の獲得パターンに影響を与える可能性がある。日本人ではHLA-B*51が比較的多く、HLA-B*51拘束性CTLのescape変異が起こる逆転写酵素の135番のアミノ酸にフォーカスを絞った。135番のアミノ酸にescape変異を持つHIVを、EFVの存在下で徐々に濃度を上げながら培養したところ、いくつかの培養実験でまだ耐性変異としてリストアップされていないE138Kが出現した。組み換えHIVを作成して解析したところ、E138K単独では薬剤感受性に有意な変化をもたらさないが、E138Kといくつかの135番のescape変異、特に最も頻度が高いI135T、との組み合わせで、非核酸系逆転写酵素阻害薬に有意な耐性をもたらすことが明らかとなった。臨床データのデータベースを調べたところ、非核酸系逆転写酵素阻害薬を含む抗HIV療法の失敗例で、I135TとE138Kの組み合わせがあり、他の知られている非核酸系逆転写酵素阻害薬耐性変異が存在しない症例が数例見つかった。このことは、I135TとE138Kの組み合わせが、実際に臨床的に有意な薬剤耐性をもたらすことを示している。

HIVが感染者の体内でHLAに適応しつつ進化していることを考えると、薬剤耐性変異のパターンは影響を受けて変わっていく可能性がある。耐性変異の解析や新規薬剤の開発を行う際に、10年以上前の臨床分離株由来の実験株のみ使っていると、現在拡がっているウイルスには対応できなくなる可能性もある。

②この研究のTDF腎障害の発生率は、今までのより大柄な人種における報告よりも高い。欧米やヨーロッパ(平均体重69-74kg)の報告ではTDF腎障害の発生率は1%以下から4.3%と報告されている。他の報告されているTDF腎障害の危険因子のみから考えると、我々の研究対象は、より若く、より免疫能が保たれており、HIV量は低く、高血圧・糖尿病・高脂血症の割合も低いため、TDF腎障害の発生率はより少ないはずである。これらのことから、低体重のTDF危険因子としての影響は、極めて大きいと考えられる。タイからの報告では、平均体重56.5kgの観察対象で、TDF腎障害の発生率は、16.2/100 person-yearだったと報告されており、今後、体格の小さい人が多いアジアでTDFの使用が増えると、TDF腎障害の発生が多くなることが懸念される。

E. 結論

CTL逃避変異から新規の薬剤耐性変異パターンが誘導されることが明らかとなった。このCTL逃避変異が世界中に広がっていることを考えるとこの薬剤耐性変異パターンは重要である。低体重はTDF腎障害の危険因子であり、投与に際し注意が必要である。欧米よりも小柄な人が多いアジアでTDF投与が増えると、腎障害の発生が増える可能性が高い。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Gatanaga H, Honda H, Oka S. Pharmacogenetic information derived from analysis of HLA alleles. *Pharmacogenetics* 9: 207-214, 2008.
- 2) Hayashida T, Gatanaga H, Tanuma J, Oka S. Effects of low HIV-1 load and antiretroviral treatment on IgG-capture BED-enzyme immunoassay. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 24:495-498, 2008.
- 3) Gatanaga H, Oka S. Successful genotype-tailored treatment with small-dose efavirenz. *AIDS* 23: 433-434, 2009.
- 4) Gatanaga H, Honda H, Tsukada K, Tanuma J, Yazaki H, Honda M, Teruya K, Kikuchi Y, Oka S. Detection of HIV-1 load by the Roche COBAS TaqMan assay in patients with previously undetectable load by the Roche COBAS Amplicor Monitor. *Clin. Infect. Dis.* 48: 260-262, 2009.
- 5) Bi X, Suzuki Y, Gatanaga H, Oka S. High frequency and proliferation of CD4+FOXP3+ regulatory T cells in HIV-1 infected patients with low CD4 count. *Eur. J. Immunol.* 39: 301-309, 2009.
- 6) Kawashima Y, Pfafferott K, Frater J, Matthews P, Payne R, Addo M, Gatanaga H, Fujiwara M, Hachiya A, Koizumi H, Kuse N, Oka S, Duda A, Prendergast A, Crawford H, Leslie A, Brumme Z, Brumme C, Allen T, Brander C, Kaslow R, Tang J, Hunter E, Allen S, Mulenga J, Branch S, Roach T, John M, Mallal S, Ogwu A, Shapiro R, Prado JG, Fidler S, Weber J, Pybus OG, Klenerman P, Ndung'u T, Phillips R, Heckerman D, Harrigan PR, Walker BD, Takiguchi M, Goulder P. Adaptation of HIV-1 to human leukocyte antigen class I. *Nature* 458: 641-645, 2009.
- 7) Hachiya A, Shimane K, Sarafianos SG, Kodama EN, Sakagami Y, Negishi F, Koizumi H, Gatanaga H, Matsuoka M, Takiguchi M, Oka S. Clinical relevance of substitutions in the connection subdomain and RNase H domain of HIV-1 reverse transcriptase from a cohort of antiretroviral treatment-naïve patients. *Antiviral Res.* 82: 115-121, 2009.
- 8) Davaalkham J, Unenchimeg P, Baigalmaa Ch, Oyumbileg B, Tsuchiya K, Hachiya A, Gatanaga H, Nyamkhuu D, Oka S. High-risk status of HIV-1 infection in the very low epidemic country, Mongolia, 2007. *Int. J. STD AIDS* 20: 391-394, 2009.
- 9) Honda H, Gatanaga H, Matsumura J, Kamimura M, Goto K, Tsukada K, Honda M, Teruya K, Kikuchi Y, Oka S. Favorable use of non-boosted fosamprenavir in patients treated with warfarin. *Int. J. STD AIDS* 20: 441, 2009.
- 10) Watanabe T, Yasuoka A, Honda H, Tanuma J, Yazaki H, Tsukada K, Honda M, Teruya K, Gatanaga H, Kikuchi Y, Oka S. Serum (1→3) beta-D-glucan as a non-invasive useful adjunctive diagnostic marker for *Pneumocystis pneumonia* in patients with human immunodeficiency virus. *Clin. Infect. Dis.* 49: 1128-1131, 2009.
- 11) Tsukada K, Teruya K, Tasato D, Gatanaga H, Kikuchi Y, Oka S. Raltegravir-associated perihepatitis and peritonitis: a single case report. *AIDS* 24: 160-161, 2010.
- 12) Gatanaga H, Ode H, Hachiya A, Hayashida T, Sato H, Oka S. Combination of V106I and V179D polymorphic mutations in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase confers resistance to efavirenz and nevirapine but not to etravirine. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 54: 1596-1602, 2010.
- 13) Gatanaga H, Ode H, Hachiya A, Hayashida T, Sato H, Takiguchi M, Oka S. *AIDS* 24: F15-22, 2010.
- 14) Kawashima Y, Kuse N, Gatanaga H, Naruto T, Fujiwara M, Dohki S, Akahoshi T, Maenaka K, Goulder P, Oka S, Takiguchi M. Long-term control of HIV-1 hemophiliacs carrying slow-progressing allele HLA-B*5101. *J Virol.* 84: 7151-7160, 2010.
- 15) Hattori J, Shiino T, Gatanaga H, Yoshida S, Watanabe D, Minami R, Sadamasu K, Kondo M, Mori H, Ueda M, Tateyama M, Ueda A, Kato S, Ito T, Oie M, Takata N, Hayashida T, Nagashima M, Matsuda M, Ibe S, Ota Y, Sasaki S, Ishigatsubo Y, Tanabe Y, Koga I, Kojima Y, Yamamoto M, Fujita J, Yokomaku Y, Koike T, Shirasaka T, Oka S, Sugiura W. Trends in transmitted drug-resistant HIV-1 and demographic characteristics of newly diagnosed patients: nationwide surveillance from 2003 to 2008 in Japan. *Antiviral Res.* 88: 72-79, 2010.
- 16) Tanuma J, Hachiya A, Ishigaki K, Gatanaga H, Lien TT, Hien ND, Kinh NV, Kaku M, Oka S. Impact of CRF01_AE-specific polymorphic mutations G335D and A731V in the connection subdomain of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase (RT) on susceptibility to nucleoside RT inhibitors. *Microbes Infect.* 12: 1170-1177, 2010.

2. 学会発表

- 1) 瀧永博之. HIV感染症治療の最前線—進化した抗HIV療法と残された問題 感染症学会 2008年.
- 2) 瀧永博之. 新規標的に対する抗ウイルス薬の臨床的意義—日常臨床への新薬導入—我が国における新薬導入の課題 エイズ学会 2008年.
- 3) 瀧永博之. 抗HIV薬治療の変遷とPIの位置づけ エイズ学会. 2008年.
- 4) 瀧永博之. HIV感染症における tailor-made 治療はどこまでできたか? 感染症学会 2009年.
- 5) 瀧永博之. HIV/AIDS 治療からみた、疾病のコントロール エイズ学会 2009年.
- 6) 瀧永博之. インテグラーゼ阻害薬 (raltegravir) の臨床現場における実際と今後の問題 エイズ学会 2009年.
- 7) 瀧永博之. Darunavirを中心とした新規薬剤の使用経験 エイズ学会 2009年.
- 8) 瀧永博之. 日本の医療体制のこれまでとこれから—治療開発に携わる立場から—抗HIV薬の長期毒性について エイズ学会 2010年.
- 9) 瀧永博之. 最新の情報を明日の臨床に活かす—Year in Review 2010—Toxicities エイズ学会 2010年.
- 10) 瀧永博之. HIV感染症「治療のてびき」第14版 近年使用可能になった新薬 エイズ学会 2010年.
- 11) 瀧永博之. HIV感染症・AIDSの初回治療：何を選択するか? エイズ学会 2010年.

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

該当なし

抗HIV薬の効果に関わる因子の研究

研究分担者

杉浦 亙 (独)国立病院機構名古屋医療センター 臨床研究センター
感染・免疫研究部 部長

研究協力者

伊部 史朗 (独)国立病院機構名古屋医療センター 臨床研究センター
感染・免疫研究部 流動研究員

正岡 崇志 (独)国立病院機構名古屋医療センター 臨床研究部 感染・免疫研究部
客員研究員 (財)エイズ予防財団 リサーチレジデント

梁 明秀 横浜市立大学医学部微生物学教室

研究要旨

新規抗HIV薬の耐性獲得に関わるウイルス側および宿主側因子について明らかにするためにインテグラーゼ遺伝子の多様性の解析、インテグラーゼの基質であるウイルスDNAの変異の可能性に着目して、HIVのラルテグラビル耐性獲得機構解明、さらに無細胞反応系を応用したプロテアーゼ阻害剤感受性検査の確立と実用化に取り組んだ。その結果、インテグラーゼが多様性に富む遺伝子であり、また既存の薬剤投与により影響を受けている可能性が明らかになった。またコムギ無細胞系を用いて、安全、簡便かつハイスループットにプロテアーゼ活性を検出する事の出来る新規薬剤耐性検査法の基盤技術の構築に成功した。

A. 研究目的

新規抗HIV薬の耐性獲得に関わるウイルス側および宿主側因子について明らかにするために以下の研究に取り組んだ。

a. インテグラーゼ (IN) の多様性の解析とそのウイルス抑制効果に対する効果の評価

未治療症例および既存の薬剤に対して薬剤耐性を獲得した症例におけるIN領域の多様性について評価・解析し、それらの変異がIN阻害剤の感受性に及ぼす影響について検討を行う。

b. IN阻害剤の耐性機構の解析

本研究は、HIVインテグラーゼ内に誘導されるアミノ酸変異と共に、インテグラーゼの基質であるウイルスDNA内の変異に着目して、ラルテグラビル (RAL) 耐性獲得機構を明らかにすることを目的とする。

c. 無細胞反応系を応用したプロテアーゼ阻害剤感受性検査の確立と実用化

無細胞系タンパク質合成システムと化学増幅型ル

ミネッセンス近接ホモジニアスアッセイ (以下AlphaScreen) と組み合わせた、プロテアーゼ活性に基づくプロテアーゼ阻害剤耐性のレベルを評価できる、*in vitro*生化学的検査法の開発、更には臨床現場での応用を視野にハイスループット化を目指す。

B. 研究方法

a. IN遺伝子の多様性の解析とそのウイルス抑制効果に対する効果の評価

インテグラーゼ (IN) 阻害剤ラルテグラビル (RAL) 耐性獲得機序におけるウイルス側要因を明らかにするために、RAL未投与症例におけるIN遺伝子情報の収集を行う。抗HIV療法未投与症例群および既存の薬剤 (プロテアーゼ阻害剤、逆転写酵素) に対して耐性を獲得し、且つIN阻害剤が未投与な薬剤耐性症例群を解析の対象とした。次にINの有する遺伝的多様性がその後のラルテグラビルの治療効果に及ぼす影響について理解するために、IN内に複数の変異を (特に活性中心近傍に) 獲得している感染者を選び、IN領域を増幅し、HXB2に組み込んだりコンビナント・ウイルスを作成し、さらにRAL耐性変異Y143C、Q148K/H/R、N155H、G140S+

Q148K、Q148K + N155Hを site directed mutagenesis で導入したりコンビナント・RAL 耐性ウイルス群を作成した (図1)。作成した株の増殖性、RAL 感受性を評価した。

b. IN阻害剤の耐性機構の解析

名古屋医療センターにおいてRALの投与を受け、RAL 耐性変異を獲得した症例3例を対象に、RAL 服用前後の血漿検体を用いて、全長ウイルスゲノムRNAの塩基配列を決定した。具体的には、RT-nested PCR法にて、5’LTRからインテグラーゼ遺伝子を含む前半領域と、インテグラーゼ遺伝子から3’LTRを含む後半領域の2つの遺伝子断片を増幅し、増幅産物の塩基配列を決定した (図2)。

c. 無細胞反応系を応用したプロテアーゼ阻害剤感受性検査の確立と実用化

コムギ無細胞系を用いたHIV-1プロテアーゼ (PR) の発現系を構築した。効率のよいPR発現と高い活性のPRを回収するための条件検討として、PRの前後に付加する配列の検討、反応基質の配列等の検討

を行った。次に当該手法により得られたIC₅₀や耐性評価を、従来の解析法であるウエスタンブロット法と比較することで、その妥当性の確認を行った。さらに25種類の薬剤耐性PRについて、開発した測定法と遺伝子型検査法 (Stanford Database) および感受性検査法 (PhenoSense) による耐性評価を行い、それらの結果を比較することでCFBA法により得られた結果の正確さを検証した。実用化に向けた試みとして、患者血清中ウイルスRNAからサブクローニングすることなく直接的にプロテアーゼを無細胞合成できる手法を検討し、それらの耐性評価を試みた。

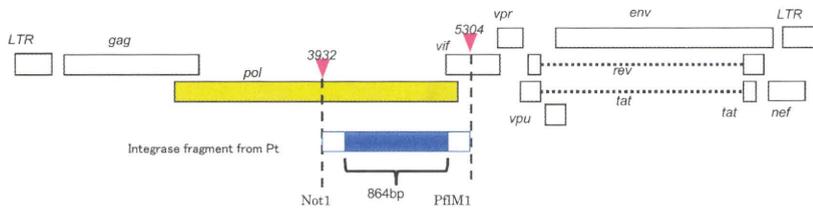
(倫理面への配慮)

薬剤耐性検査の実施に当たっては患者の同意を得ている。

C. 研究結果

a. IN遺伝子の多様性の解析とそのウイルス抑制効果に対する効果の評価

研究初年度はIN遺伝子情報の収集の為に未治療群40例と薬剤耐性群64例のIN領域の遺伝子配列解



以下7種類ラルテグラビル耐性変異を導入した

1. Q148K
2. Q148R
3. Q148H
4. N155H
5. Q148K+N155H
6. G140S+ Q148H
7. Y143C

図1 ラルテグラビル耐性リコンビナント・クローンの作成

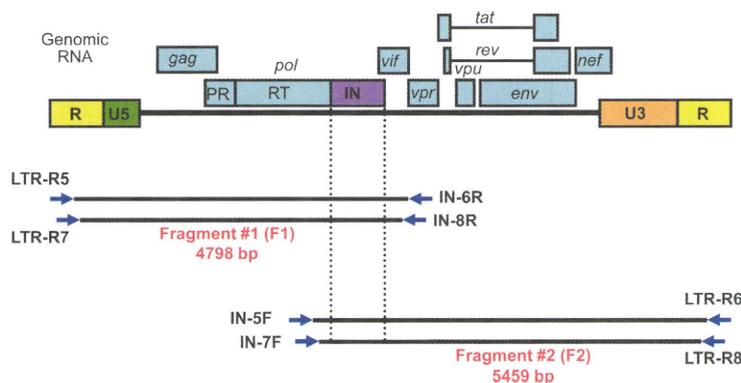


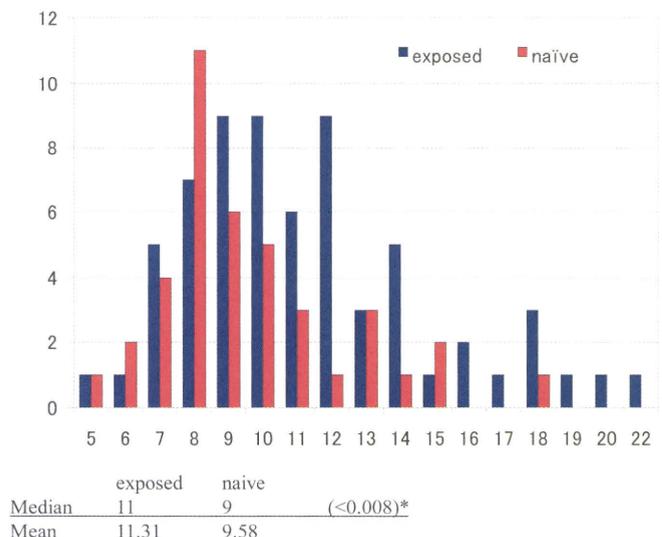
図2 全長ゲノムRNAの塩基配列決定

析を行った。その結果、RAL未治療にも関わらず薬剤耐性症例のほうにINの変異が有意に多く集積している (<0.005) 事が明らかになった (図3)。またRAL耐性変異に関してはQ148H、N155Hなどのラルテグラビルの感受性に強く影響する変異は認められなかったがE157Qが薬剤耐性群に2例観察された。一方、RAL登場以前の実験的なIN阻害剤であるdiketo acid耐性に関連する変異が多数観察された (表1)。研究2～3年目には初年度に解析した症例の中からIN変異が最も多く観察された4症例を選択し、そのIN領域を増幅しHXB2に組み込んだリコンビナント・ウイルスを作成した (SHIN-1、-2、-3、-4)。更にそのIN配列にRAL耐性変異Y143C、Q148K/H/R、155H、G140S + Q148K、Q148K + N155Hを導入したりリコンビナント・ウイルスを作成した。MT2細胞感染実験においてIN耐性クローンQ148K/H/Rを導入したHXB2およびSHIN1～3株は各々の野生株よりも相対的に増殖能力 (replication capacity : RC) の低下が認められた。之に対してN155HとG140S + Q148Hの2変異を導入したウイルスでは野生株と同等のRCが観察された (図4)。HXB2およびSHIN-2株について導入した変異の感受

性に及ぼす影響を評価した。その結果、SHIN-2株のほうがHXB2に変異を入れたものより高い薬剤耐性レベルが観察され (図5)。同様にSHIN-3、-4にG140S + Q148Hを導入したウイルスではHXB2に導入したウイルスに比較して高いIC₅₀が観察された。この事からIN領域に観察された遺伝的多様性はRALの耐性レベルを引き上げる方向に働くことが示唆された。

b. IN阻害剤の耐性機構の解析

1例目の症例#NMC127の臨床経過を図6に示した。本症例はTDF/FTC/RALによる多剤併用療法中にもかかわらずviral load (VL) が低下せず、他院より当院へ紹介された症例であった。薬剤耐性検査の結果、インテグラーゼ内にRAL耐性変異の典型的な組み合わせであるG140SとQ148Hが検出され、RAL耐性症例であることが確定した (図6、時点CとD)。RAL服用前の2時点 (図6、時点AとB) を加えた計4時点の検体を用いた解析の結果、インテグラーゼ内にはG140SとQ148H変異だけが、RAL服用中に惹起し保持されていることが明らかになった。さらに、



* Wilcoxon rank test
No difference were confirmed in histogram pattern by Two-sample Kolmogorov-Smirnov test

図3 未治療および既治療耐性症例にみるインテグラーゼ領域の多様性

表1 未治療および既治療耐性症例に観察された変異

	変異	既治療耐性症例 (n=64)	未治療症例 (n=40)
ラルテグラビル	E157Q	2	0
	E92Q,E138A/K,G140A/S	0	0
	Q148H/R/K,N155H	0	0
diketo acid に対する耐性変異	V72I	44	26
	M154I	3	0
	V165I	2	2
	V201I	27	16

インテグラーゼの基質であるウイルスDNAの5'LTRには一塩基置換と二塩基欠損が、そして、3'LTRにも一塩基置換が、RAL服用中に惹起し保持されていることが明らかになった(図6)。

2例目の症例#NMC843の臨床経過を図7に示した。本症例では初回治療としてTDF/FTC/RALによる多剤併用療法が導入され良好な治療経過を示していたが、後にviral load (VL) のリバウンドを呈した(図7、時点CとD)。薬剤耐性検査の実施により、インテグラーゼ内にRAL耐性主要変異であるN155Hが検出され、RAL耐性症例であることが確定した。未治療時(図6、時点AとB)も含め計4時点の検体を用いた検討により、インテグラーゼ内ではN155H変異だけが治療中に惹起し保持されていることが明らかになった(図7)。一方、インテグラーゼの基質であるウイルスDNAの5'LTRと3'LTRには治療中に惹起した塩基置換等は観察されなかった。

3例目の症例#NMC851の臨床経過を図8に示した。本症例では初回治療としてd4T/3TC/RALによる多剤併用療法が導入され、後にTDF/FTC/RALに変更となったものの良好な治療経過を維持していた。

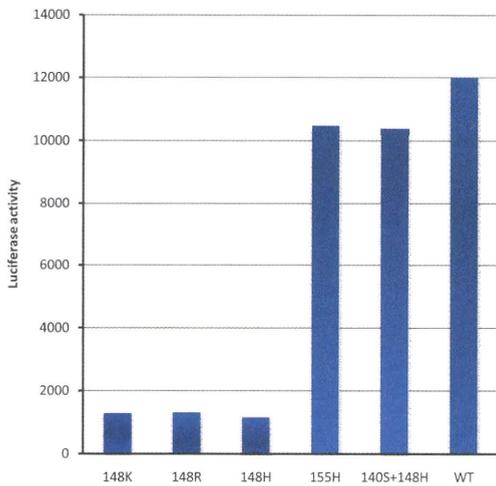
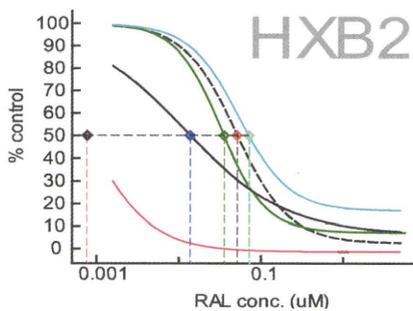


図4 ラルテグラビル耐性変異を導入したクローンSHIN-4の増殖能力



148H>148K>148R>155H> wt

しかし、治療開始後1年後にVLのリバウンドを呈し(図8、時点BからD)、薬剤耐性検査の実施によりインテグラーゼ内にRAL耐性主要変異Y143Cが検出されRAL耐性症例であることが確定した。未治療時(図8、時点A)も含め計4時点の検体を用いた検討により、インテグラーゼ内では主要変異であるY143Cに加え、T97A、S119R、D232N変異が治療中に惹起し保持されていることが明らかになった。さらに、インテグラーゼの基質であるウイルスDNAの5'LTRに2つの塩基置換が治療中に惹起し保持されていることが明らかになった(図8)。

c. 無細胞反応系を応用したプロテアーゼ阻害剤感受性検査の確立と実用化

本研究におけるプロテアーゼ活性の検出原理を図9に示す。まず基質としてHIV-1 Gagタンパク質の内部切断部位p2-p7領域のN末端とC末端に、それぞれAlphaScreenドナービーズとアクセプタービーズが結合するタグを融合させた人工基質を無細胞合成し、使用した。この基質が切断されずビーズ間距離

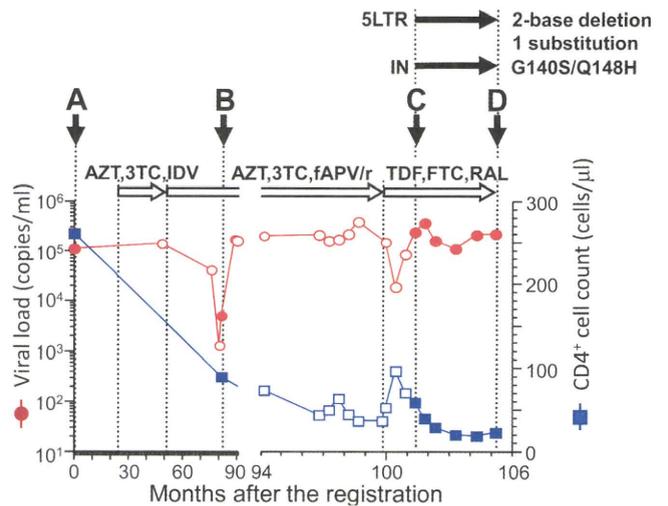
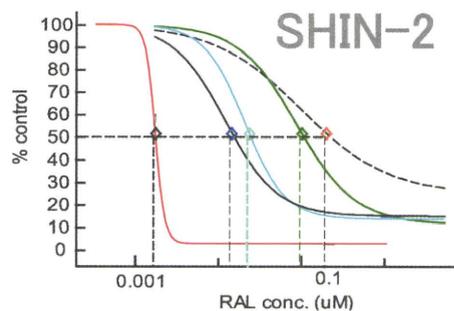


図6 症例#NMC127の臨床経過



148K>148R>148H>155H> wt

図5 インテグラーゼの多様性はRAL耐性に影響を及ぼす

離が近接している場合 (PI感受性の場合) はシグナルが得られるが (図9b)、プロテアーゼによって基質が切断されビーズ間の距離が離れた場合 (PI耐性の場合) (図9a)、シグナルが低下することでプロテアーゼ活性を定量的に測定でき (Cell Free Biochemical Assay: CFBA法)、これにより酵素活性を指標としてHIVの薬剤耐性を迅速、安全に評価できる基盤技術の開発に成功した。本CFBA法により得られたプロテアーゼ阻害剤耐性の評価結果は、従来のウエスタンブロット法や遺伝子検査法とよく一致することを確認した (表2)。また本CFBA法による耐性評価は現在米国において商業サービスが提供されている pseudo-type virus を用いた感受性検査 PhenoSense の評価結果と最もよく一致した (表3)。患者血清由来ウイルスRNAからサブクロニングすることなく活性を保持したプロテアーゼを調製することに成功し、それらの耐性評価は遺伝子型検査

法とよく一致した (表4)。

D. 考察

a. IN遺伝子の多様性の解析とそのウイルス抑制効果に対する効果の評価

INの遺伝子配列解析を行った結果、INが多様性に富む領域であることが明らかになった。今回の結果からは今後RALを使用する際にあたり、投与前のINの遺伝子配列を調べ、どのような多様性を有しているか確認し、その変異が将来のRA耐性獲得に及ぼす影響を仔細に検討していくことが必要であると考えられた。また今回臨床症例において観察された変異のうち活性中心近傍に位置するものについては、どの変異がRAL耐性に作用しているか構造的に解析する事が必要と思われる。今後臨床的および基礎的な視点両方からの詳細な解析が必要と思われる。

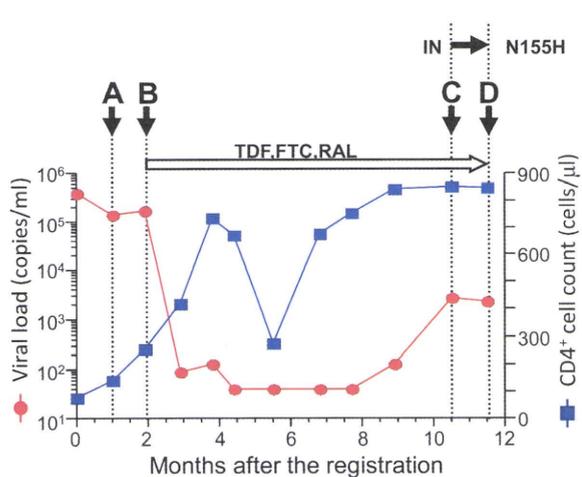


図7 症例#NMC843の臨床経過

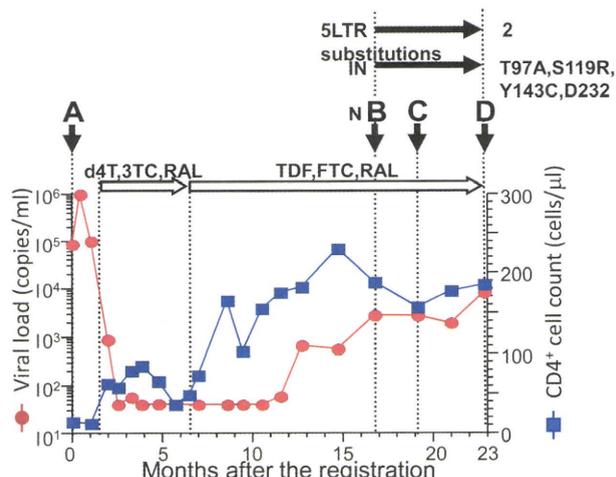


図8 症例#NMC851の臨床経過

a. 薬剤耐性PRの場合→基質が切断・・・Signal ↓



b. 野生型PRの場合→基質は切断されない・・・Signal ↑

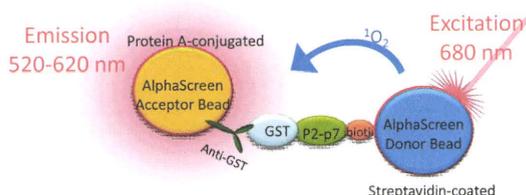


図9 AlphaScreenを用いたHIVプロテアーゼ活性検出法

b. IN阻害剤の耐性機構の解析

2症例で検出されたインテグラーゼ内のN155HとY143C変異は、RAL耐性主要変異の典型例であり、

従来の知見とよく合致したものであった。一方、症例#NMC851では、インテグラーゼの基質であるウイルスDNAの5’LTRにも治療中に遺伝子変異が惹

表2 CFBA法とwestern blotting、Stanford Score

Drug-resistant Protease: DR5032
Major Mutations: G48S, I54V, V82F, L90M

PI	Our System		Western Blot		Stanford Score
	IC ₅₀ DR/WT	Fold Resistance	IC ₅₀ DR/WT	Fold Resistance	
ATV	238 nM / 27 nM	8.8	219 nM / 46 nM	4.8	Intermediate
APV	113 nM / 22 nM	5.1	111 nM / 32 nM	3.5	Intermediate
DRV	30 nM / 22 nM	1.4	32 nM / 32 nM	1	Low
IDV	1194 nM / 30 nM	39.8	1534 nM / 47 nM	32.6	High

表3 CFBA法とPhenoSense、Stanford GSSとの比較

Clones	ATV			APV			DRV			IDV			Major Resistance Mutations
	PhenoSense*	CFBA*	GSS										
F719105-FY4	101	10.1	122	>Max	69.2	181	>Max	20.9	76	24	5.5	120	V32I, L33F, M46I, I47V, I54M, I84V, L90M
T48131_4	86	4.3	98	42	7.6	134	46	1.6	47	13	2.2	113	L24I, V32I, L33F, M46L, I54L, V82A, I84V
T450023_2	90	12.5	102	148	38.5	121	127	5.7	46	22	3.9	102	V32I, L33F, I54V, I84V, L90M
T48131_3	206	4.7	98	31	7.7	114	27	1.9	34	24	2.5	115	L24I, V32I, L33F, M46L, I54V, V82A, I84V
T328997_4	107	17.5	68	11	13.4	56	5.19	1.7	10	47	14.9	73	M46I, I54V, V82L, L90M
F190755-3	109	6.3	80	112	30.0	113	39	2.8	29	>Max	34.0	75	L33F, M46I, G48V, I50V, I54S, V82A
T448163_4	111	3.4	100	>Max	18.9	110	140	2.0	41	47	1.3	98	L33F, M46L, I54M, I84V, L90M
V42613_1	88	2.2	99	>Max	19.6	153	112	2.7	61	88	3.2	122	V32I, L33F, M46I, I47V, I54M, V82A, L90M
F390563_1	109	3.4	112	>Max	25.6	151	239	4.0	59	21	1.4	110	V32I, L33F, M46L, I54L, I84V, L90M
V41414-1	29	3.5	113	54	29.5	106	17	2.9	37	8.8	2.7	106	L33F, M46L, G48M, I54M, V82A, I84V
V20742-4	7.7	1.3	46	17	3.3	74	3.6	0.4	19	>Max	17.5	93	L24I, M46I, I54V, L76V, V82T
V69839-2	17	18.0	66	6.1	14.4	89	2.2	11.6	22	97	114.6	61	G48V, I50V, I54A, V82T
H49040_4	1.85	6.4	115	4.18	31.8	168	1.35	5.5	61	18	3.8	118	V32I, L33F, M46I, I47V, I54L, I84V, L90M
V48334_2	7.36	2.0	71	16	9.2	66	3.51	1.6	14	28	9.9	81	M46I, I84V, L90M
W37096_1	33	2.2	71	26	14.4	109	25	4.1	39	17	1.6	71	V32I, M46I, I47V, I84V
V1326_2	31	3.9	69	16	7.9	67	5.84	1.4	17	29	3.6	91	L24I, I54V, V82A, I84V
V25079-3	18	3.5	113	40	27.6	111	9	3.6	42	7.7	2.7	106	L33F, M46L, G48M, I54M, V82A, I84V
V59543-3	0.73	1.9	58	5.6	5.7	86	2.5	1.7	21	22	10.2	118	M46L, I54V, L76V, V82A, L90M
V53129_2	1.92	1.5	31	4.61	16.0	66	1.49	2.3	19	23	3.3	71	M46I, L76V, L90M
V63377-1	4.6	2.3	66	4.1	3.5	89	2.4	2.1	22	30	8.8	61	G48V, I50V, I54V, V82T
V59543-1	0.9	0.7	58	7.1	3.8	86	2.4	1.7	21	21	6.4	118	M46L, I54V, L76V, V82A, L90M
M37821-1	16	2.6	101	0.8	0.6	21	0.9	0.7	-1	16	2.4	56	M46I, N88S, L90M
V44765_1	6.7	2.3	34	1.09	4.2	21	0.72	3.4	2	11	2.8	39	L90M,
V642_5	1.84	1.1	44	1.32	1.1	37	0.48	0.7	4	4.92	2.0	66	L24I, M46I, I54V, V82A
V54263_1	3.39	1.2	24	1.23	1.5	19	0.57	1.1	2	4.78	1.7	34	L90M,

表4 CFBA法による臨床検体の評価

PR	ATV		DRV		FPV		IDV		Major Mutations	Minor Mutations	Other Mutations
	GSS	CFPA*	GSS	CFPA*	GSS	CFPA*	GSS	CFPA*			
NL4-3	0	1.0	Sus	1.0	Sus	1.0	Sus	1.0	None	None	None
#1	22	1.7	0	0.9	17	3.6	32	1.7	L90LM	L10I, I62IV, L63P, I93L	R57K
#2	22	1.9	0	1.0	17	2.6	32	3.7	L90M	L10I, M36IM, I62IV, L63P, I93L	R57K
#3	73	3.7	10	3.2	51	8.6	93	3.2	M46I, I54V, V82F, L90M	L10I, Q58E, L63P, H69K, A71AT, V77I, I93L	None
#4	22	1.2	0	0.9	17	1.0	32	1.3	L90M	L10I, M36IM, I62IV, L63P, V77IV, I93L	R57K, I62IV, L63P, V77IV, I93L