

201029039A

厚生労働科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

高感度薬剤耐性HIV検出法を用いた微小集族薬剤耐性HIVの動態と
HAART治療効果との相関についての研究
課題番号：H21-エイズ-若手-019

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 西澤 雅子
(国立感染症研究所 エイズ研究センター)

平成 23 (2011) 年 5月

目 次

I. 総括研究報告

高感度薬剤耐性HIV検出法を用いた微小集族薬剤耐性HIVの動態とHAART治療効果との
相関についての研究----- 1

研究代表者：西澤 雅子

II. 分担研究報告

薬剤耐性HIV症例の臨床的解析に関する研究----- 11

研究分担者：杉浦 亙

III. 研究成果の刊行に関する一覧表----- 19

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

平成22年度 総括研究報告書

高感度薬剤耐性 HIV 検出法を用いた微小集族薬剤耐性 HIV の動態と
HAART 治療効果との相関についての研究

研究代表者 西澤 雅子（国立感染症研究所 エイズ研究センター）

研究分担者 杉浦 亙（（独）名古屋医療センター 臨床研究センター 感染・免疫部長）

研究協力者 服部 純子（（独）名古屋医療センター 臨床研究センター 感染・免疫部）

研究要旨 HIVは増殖の過程で多様性を獲得し、その一部は微小集族の薬剤耐性 HIVとして血中に存在することが知られている。この微小集族薬剤耐性 HIVがARTに影響を及ぼすことが報告されているが、通常薬剤耐性検査で使用するダイレクトシーケンス法（従来法）では20%以下の比率で存在する微小集族薬剤耐性変異を検出することは難しいため、定量PCRを応用した高感度薬剤耐性検査法（高感度法）を開発し、治療中患者血中の微小集族薬剤耐性変異について解析した。7年以上に渡りARTを受けた3症例を高感度法で解析した結果、2症例から従来法では検出できなかった微小集族薬剤耐性変異を検出した。ARTレジメ変更後にT215Iが従来法で検出されるようになった1症例について、高感度法で検出されたT215I ampliconの塩基配列と従来法によって経時的に得られた逆転写酵素(RT)領域の塩基配列とを系統樹解析によって比較した結果、このT215IがART変更前から微小集族薬剤耐性変異として既に患者血中に存在しており、ARTレジメ変更後に従来法でも検出できるMajorな耐性変異になったことが示された。また平成21年度に解析した症例のうち1症例について解析した結果、T215Yと連鎖しない耐性変異の存在を示唆するデータを得た。逆転写酵素阻害剤耐性変異に加え、プロテアーゼ阻害剤耐性変異L90MとM46Iの検出系の確立を行った。その結果CDCで開発されたL90M検出系は日本の患者検体の微小集族として存在するL90Mを検出可能だったが、L46I検出系はCDCの系では感度が不十分だったため、新たにプライマーを設計し系の確立を行った。

A. 研究目的

抗 HIV 薬剤の投与を受けている HIV/AIDS 患者血中では quasi-species の一部に微小集族として薬剤耐性 HIV が潜在することが報告されている。近年、微小集族として存在する薬剤耐性 HIV が ART による薬剤耐性の選択と治療の転機に影

響を及ぼしている可能性が示唆されるようになった。しかし薬剤耐性検査で通常用いられるダイレクトシーケンス法（従来法）では20%以下の比率で存在する微小集族の薬剤耐性 HIV 検出が難しいことから、本研究では微小集族薬剤耐性変異を検出可能な高感度薬剤耐性 HIV 検出法（高感度

法)を用いて ART を受けている患者検体からの微少な薬剤耐性変異検出を試み、至適治療を進める上での臨床的有用性について検討する。

B. 研究方法

平成 21 年度研究で確立した定量 PCR を応用した高感度薬剤耐性検査法(高感度法)によって、微少集族薬剤耐性変異の検出を試みた。検出する耐性変異としてサブタイプ B では核酸系逆転写酵素阻害剤(NRTI)に対する耐性変異 M41L, K65R, K70R, M184V, T215F/Y、非核酸系逆転写酵素阻害剤(NNRTI)に対する耐性変異 K103N, Y181C の計 8 変異を検査対象とした。またサブタイプ B を検査対象としてプロテアーゼ阻害剤(PI)耐性変異である L90M と M46I の検査系の確立を試みた。患者検体は、長期間(5 年以上)に渡って HAART を受け、治療途中で薬剤変更と薬剤耐性変異のパターンに変化が見られた症例を検査対象として 10 症例選択した。その中から

1. 採血ポイントが 20 点以上
2. 各採血ポイントの間隔が半年以内
3. 治療途中で薬剤の変更が 1 回以上ある

の条件を満たした 3 症例を選択し(図 1)、微少集族薬剤耐性変異の検出・経時的変化について解析した。また従来法で得られた薬剤耐性変異のデータと高感度法の結果を比較し、微少集族薬剤耐性変異の検出パターンとの比較を行った。

高感度法で T215F/Y を検出する際に得られる定量 PCR amplicon が、逆転写酵素(RT)のアミノ酸番号 105~215 までを増幅できる性質を利用して、微少集族薬剤耐性変異として検出される T215F/Y が臨床経過のどの時点で出現したのか、従来法で経時的に解析した RT 領域の塩基配列と T215F/Y amplicon の塩基配列とを一緒に系統樹解析で比較し、微少集族の T215Y/F が臨床経過のどの段階の RT 領域塩基配列と近縁であるのか解析を試みた。また T215F/Y の耐性変異と他の薬剤耐性変異の連鎖関係について T215F/Y amplicon の塩基配

列を解析し、amplicon 上に T215Y/F とリンクした変異として検出される耐性変異の同定を試みた(図 2)。

(倫理面への配慮)

本研究では感染者血清を使用するため、国立感染症研究所の医学研究倫理審査委員会へ倫理審査を申請しその承認を得た。また薬剤耐性変異を組み込んだベクターの作製で組換え DNA 実験を行うので、組換え DNA 実験安全委員会に実験申請を行いその許可を得た。

C. 研究結果

平成 21 年度に解析したサンプル A、B、C に加えサンプル D(採血ポイント 41 点、解析対象期間約 8 年 2 カ月)、サンプル E(採血ポイント 31 点、解析対象期間約 7 年 1 カ月)、サンプル F(採血ポイント 26 点、解析対象期間約 8 年 6 カ月)を解析した(図 1)。その結果その結果サンプル D では従来法と高感度法の薬剤耐性変異の結果に乖離は見られなかったが、サンプル E、F で従来法では検出できなかった微少集族薬剤耐性変異を検出した(図 3、4)。サンプル E では、ART を AZT/3TC/IDV→3TC/EFV/TDF に変更した 2005 年 2 月以降速やかに EFV の耐性変異である K103N が従来法で検出されたが、高感度法による検査では、約 3 年前の 2002 年 1 月の検体から K103N を微少集族として検出した(図 3)。サンプル F では ART を d4T/3TC/IDV→ddI/d4T/EFV/SQV に変更した 2004 年 4 月以降速やかに K103N が従来法で検出されたが、高感度法では約 1 年前の 1999 年 2 月の検体から K103N を微少集族として検出した(図 4)。サンプル E で 2005 年 7 月以降から T215I が従来法で検出されているが、高感度法ではその 1 年以上前の 2004 年 3 月(E-1)と 2004 年 10 月(E-2)の時点から T215I が検出された(図 3)。E-1、E-2 の 2 検体の T215I 高感度法 amplicon の塩基配列と、サンプル E の各採血ポイントで従来法により得られた RT 領域

塩基配列とを合わせて系統樹解析を行った結果、E-1とE-2で検出されたT215I amplicon配列は系統樹上では2005年8月以降に従来法で検出されたRT配列の近傍に位置し、T215Iが従来法で初めて検出された2005年7月よりも1年以上前から既に微小集族として患者血中に存在しており、ARTレジメ変更によって血中での比率が増加し従来法でも検出できるようになった可能性を示唆された(図5)。また平成21年度に解析したサンプルAについて、サンプルEで行ったのと同様に高感度法で検出されたT215Y ampliconの塩基配列解析を行い、従来法で検出したRT領域の薬剤耐性変異とT215Y ampliconから検出される、T215Yと連鎖して存在する薬剤耐性変異を比較した結果、従来法で検出されたV108IとL210WがT215Y ampliconからは検出されなかった。またY115FもT215Y ampliconから検出されない場合があった。これらの結果から、V108I、Y115F、V118IがT215Yとは連鎖せずに患者血中に存在している可能性が示された(図6)。

CDCで開発されたプロテアーゼ阻害剤(PI)耐性変異のL90M及びM46I検出系を検討した。日本で回収されたL90Mを持つ11サンプルを解析した結果、全てでL90Mを検出可能だった(図7)。L90M検出系はすでにCDCでValidationが行われ系が確立しており、日本の患者検体のL90M解析に応用可能と思われる。しかしM46I検出系は十分な感度が得られなかったため新たにプライマーを設計し系の確立を試みた。日本で回収されたM46Iを持つ8サンプルを解析した結果、CDCのM46I検出系では1サンプルしか検出できなかったが、本研究で開発したプライマーで解析した結果8サンプル全てでM46Iを検出可能だった(図7)。

D. 考察

平成21年度の解析で治療中患者3症例中2症例から微小集族薬剤耐性変異を検出したが、本年

度も3症例中2症例から微小集族薬剤耐性変異が検出され、治療中の患者では治療期間中に何らかの微小な薬剤耐性変異が普遍的に存在する可能性が高いと考えられる。ARTをEFVに変更した後速やかにK103Nが出現したサンプルE及びFで、ART変更前から既にK103Nが微小集族として存在していた事は、EFV投与によるK103Nの速やかな出現をART変更前に予測できた可能性を示唆している。またサンプルEで検出された微小集族T215Iの系統樹解析結果からも、高感度法による微小集族薬剤耐性変異解析を行う事で、より効果的なARTを選択できる可能性があると思われる。またT215F/Y ampliconの塩基配列を解析することによって、T215Y/Fと連鎖して存在する耐性変異を調べることが可能だった。今後、各薬剤耐性変異の動態を詳細に解析することで、耐性変異の関連性について新たな知見が得られる事が期待される。CDCで開発されたPI耐性変異検出系のうちM46I検出系は、プライマーの配列が日本人の患者検体の配列との一致率が一部低いことが原因だった。現在改良を加えて感度を上昇させることに成功したが、多検体に応用できるようプライマーの改良をさらに重ねる必要があると思われる。

E. 結論

平成21年度に引き続き、高感度法による微小集族薬剤耐性変異の検出を試みた。その結果3症例中2症例から微小集族で存在する薬剤耐性変異を検出した。高感度法で得られたT215I ampliconの塩基配列解析・系統樹解析から、微小集族薬剤耐性変異が従来法で検出されるよりも前から患者血中に既に存在している可能性を示した。またT215Yと連鎖しない耐性変異の存在を示唆するデータを得た。PI耐性変異検出系は、L90Mに関して日本の検体も解析可能であることを確認した。M46I検出系はCDCで開発されたプライマーが日本の検体の解析に適していなかったため新たにプ

ライマーを設計した。高感度法の臨床的有用性の評価は今後の課題である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

研究代表者

西澤 雅子

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

海外

1) Masako Nishizawa, Junko Hattori, Walid Heneine, Jeffrey A. Johnson and Wataru Sugiura. Sensitive testing identifies a greater prevalence of transmitted HIV drug resistance in Japan. 5th International Workshop on HIV Transmission, 2010年7月、ウイーン.

国内

1) 西澤雅子、服部純子、横幕能行、Jeffrey A. Johnson、Walid Heneine、杉浦互. 高感度薬剤耐性検査法を用いた新規未治療 HIV/AIDS 症例における微小集族薬剤耐性 HIV 調査研究. 第 24 回日本エイズ学会、2010年11月、東京.

2) 服部純子、椎野禎一郎、瀧永博之、林田庸総、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、加藤真吾、藤井毅、岩本愛吉、西澤雅子、仲宗根正、岡慎一、伊部史朗、横幕能行、上田幹夫、大家正義、田邊嘉也、渡辺香奈子、渡邊大、白阪琢磨、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、杉浦互. 2003~2009年の新規 HIV/AIDS 診断症例における薬剤耐性頻度の動向. 第 24 回日本エイズ学会、2010年11月、東京.

研究分担者

杉浦 互

1. 論文発表

欧文

1) Ibe S., Sugiura W. Clinical significance of HIV reverse transcriptase inhibitor-resistant mutations. *Future Microbiology*. in press

2) Shibata J, Sugiura W, Ode H, Iwatani Y, Sato H, Tsang H, Matsuda M, Hasegawa N, Ren F, Tanaka H. Within-host co-evolution of Gag P453L and protease D30N/N88D demonstrates virological advantage in a highly protease inhibitor-exposed HIV-1 case. *Antiviral Res.* 2011 Feb 19.

3) Fujisaki S, Yokomaku Y, Shiino T, Koibuchi T, Hattori J, Ibe S, Iwatani Y, Iwamoto A, Shirasaka T, Hamaguchi M, Sugiura W. Outbreak of Infections by Hepatitis B Virus Genotype A and Transmission of Genetic Drug Resistance in Patients Coinfected with HIV-1 in Japan. *J Clin Microbiol.* 2011 Mar;49(3):1017-24.

4) 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.* 2010 Oct;88(1):72-9.

5) Hirano A, Takahashi M, Kinoshita E, Shibata M, Nomura T, Yokomaku Y, Hamaguchi

M, Sugiura W. High performance liquid chromatography using UV detection for the simultaneous quantification of the new non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor etravirine (TMC-125), and 4 protease inhibitors in human plasma. *Biol Pharm Bull.* 2010;33(8):1426-9.

6) Bandaranayake RM, Kolli M, King NM, Nalivaika EA, Heroux A, Kakizawa J, Sugiura W, Schiffer CA. The effect of clade-specific sequence polymorphisms on HIV-1 protease activity and inhibitor resistance pathways. *J Virol.* 2010 Oct;84(19):9995-10003.

7) Suzuki S, Urano E, Hashimoto C, Tsutsumi H, Nakahara T, Tanaka T, Nakanishi Y, Maddali K, Han Y, Hamatake M, Miyauchi K, Pommier Y, Beutler JA, Sugiura W, Fuji H, Hoshino T, Itotani K, Nomura W, Narumi T, Yamamoto N, Komano JA, Tamamura H.

Peptide HIV-1 integrase inhibitors from HIV-1 gene products. *J Med Chem.* 2010 Jul 22;53(14):5356-60.

8) Ibe S, Yokomaku Y, Shiino T, Tanaka R, Hattori J, Fujisaki S, Iwatani Y, Mamiya N, Utsumi M, Kato S, Hamaguchi M, Sugiura W. HIV-2 CRF01_AB: first circulating recombinant form of HIV-2. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2010 Jul 1;54(3):241-7.

9) Saeng-aroon S, Tsuchiya N, Auwanit W, Ayuthaya PI, Pathipvanich P, Sawanpanyalert P, Rojanawiwat A, Kannagi M, Ariyoshi K, Sugiura W. Drug-resistant mutation patterns in CRF01_AE cases that failed d4T+3TC+nevirapine fixed-dosed, combination treatment: Follow-up study from the Lampang cohort. *Antiviral Res.* 2010 Jul;87(1): 22-9. 3.

2. 学会発表

海外

1) Hiroaki Yoshii, Shingo Kitamura, Wataru Sugiura, Yasumasa Iwatani. Constitutive activation of Stat1 causes spontaneous APOBEC3G expression, which determines permissive phenotype against vif-deficient HIV-1 replication in T-cell lines. *CSHL RETROVIRUSES.* May 24-29, 2010.5.24-29. Cold Spring Harbor Laboratory, USA

2) Yasumasa Iwatani, LinLiu, Denis S Chan, Hiroaki Yoshii, Judith G Le vin, Angela M Gronenborn, Wataru Sugiura. Structure-guided mutagenesis of APOBEC3G reveals four lysine residues critical for HIV-1 Vif-mediated ubiquitination. *CSHL RETROVIRUSES.* May 24-29, 2010.5.24-29. Cold Spring Harbor Laboratory, USA

3) H Suzuki, J Hattori, M Nishizawa, S Ibe, Y Iwatani, Y Yokomaku, W Sugiura. Previous antiretroviral exposure enhances accumulation of mutations in the integrase region and affects acquisition of raltegravir resistance. *The International HIV & Hepatitis Virus Drug Resistance Workshop & Curative Strategies.* June 8-12, 2010, Dubrovnik, Croatia

4) T Masaoka, W Sugiura, Y Iwatani, T Sawasaki, S Matsunaga, Y Endo, M Tatsumi, N Yamamoto, A Ryo. A high-throughput phenotypic assay for HIV-1 protease drug resistance using a wheat cell-free protein production system. *The International HIV & Hepatitis Virus Drug Resistance Workshop & Curative Strategies.* June 8-12, 2010, Dubrovnik, Croatia

5) J Hattori, H Gatanaga, M Kondo, K Sadamasu, S Kato, H Mori, R Minami, W Sugiura, the Japanese Drug Resistance HIV-1

Surveillance Network. Characteristics of drug-resistant HIV-1 transmission: analysis of drug resistance in recently and non-recently infected treatment-naive patients in Japan. The International HIV & Hepatitis Virus Drug Resistance Workshop & Curative Strategies. June 8-12, 2010, Dubrovnik, Croatia

6) S. Ibe, Y. Yokomaku, T. Shiino, R. Tanaka, J. Hattori, S. Fujisaki, Y. Iwatani, N. Mamiya, M. Utsumi, S. Kato, M. Hamaguchi, W. Sugiura. Molecular epidemiology of HIV-2 in Japan: identification of the first circulating recombinant form of HIV-2, CRF01_AB. 5th International Workshop on HIV Transmission. July 15-16 2010, Vienna, Austria

7) M. Nishizawa, J. Hattori, W. Heneine, J.A. Johnson, W. Sugiura. Sensitive testing identifies a greater prevalence of transmitted HIV drug resistance in Japan. 5th International Workshop on HIV Transmission. July 15-16 2010, Vienna, Austria

8) W. Sugiura, J. Hattori, S. Yoshida, H. Gatanaga, M. Kondo, K. Sadamasu, T. Shirasaka, H. Mori, R. Minami, M. Tateyama, M. Ueda, S. Kato, T. Ito, M. Oie, A. Ueda. A nationwide surveillance study on the prevalence of drug-resistance mutations among newly diagnosed individuals in Japan from 2003 to 2008. 5th International Workshop on HIV Transmission. 15-16 July 2010, Vienna, Austria

9) S. Ibe, Y. Yokomaku, R. Tanaka, J. Hattori, S. Fujisaki, Y. Iwatani, S. Kato, M. Hamaguchi, W. Sugiura. Development of a highly sensitive and reproducible plasma HIV-2 RNA copy quantification method for monitoring

antiretroviral treatment. XVIII International AIDS Conference. July 18-23 2010. Vienna, Austria

10) Naoko Miyazaki, Shuzo Matsushita, Takeshi Fujii, Aikichi Iwamoto, Wataru Sugiura, Japanese HIV-MDR Study Group. Drug-Resistant Genotyping to Guide Selection of Etravirine, Darunavir and Raltegravir in Salvage Therapy for Multi-Drug-Resistant Cases Improves Outcomes. XVIII International AIDS Conference. July 18-23 2010. Vienna, Austria

11) J Hattori, H Gatanaga, M Kondo, K Sadamasu, S Kato, H Mori, R Minami, W Sugiura, and the Japanese Drug Resistance HIV-1 Surveillance Network. Characteristics of Drug-Resistant Hiv-1 Transmission: Analysis of Drug Resistance in Recently and Not-Recently Infected Treatment-Naive Patients in Japan. 11th Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance. November 7-10 2010, Hershey PA

12) Shiro Ibe, Yoshiyuki Yokomaku, Junko Hattori, Yasumasa Iwatani and Wataru Sugiura. First Case of Hiv-2 Crf01_Ab Infection Treated with Combination Antiretroviral Therapy. 11th Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance. November 7-10 2010, Hershey PA

13) Wataru Sugiura. Characterization and phylodynamic analysis of Drug-Resistant HIV-1 Transmission in Japan. US-Japan Joint AIDS Panel: Resistance Meeting. December 8-9, 2010, Singapore

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）
なし

解析対象とした症例

サンプルID	サブタイプ	投薬期間	採血ポイント	薬剤変更回数	解析	微小集族HIV
A(T-10-B)	B	5年5カ月	35	5回	21年度	あり
B(T-7-B)	B	8年8カ月	32	4回	21年度	あり
C(T-9-B)	B	7年11カ月	15	4回	21年度	なし
D	B	8年2カ月	41	5回	22年度	
E	B	7年1カ月	31	1回	22年度	
F	B	8年6カ月	26	4回	22年度	

図 1

T215Y ampliconとT215F amplicon解析

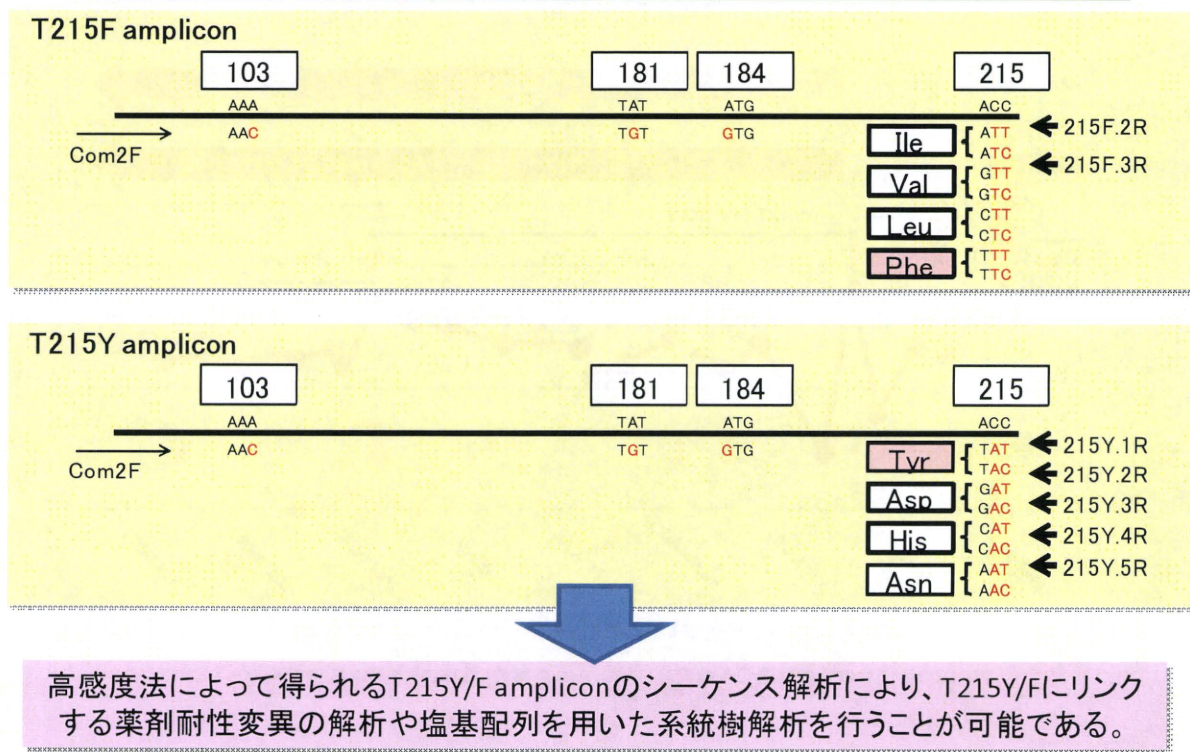


図 2

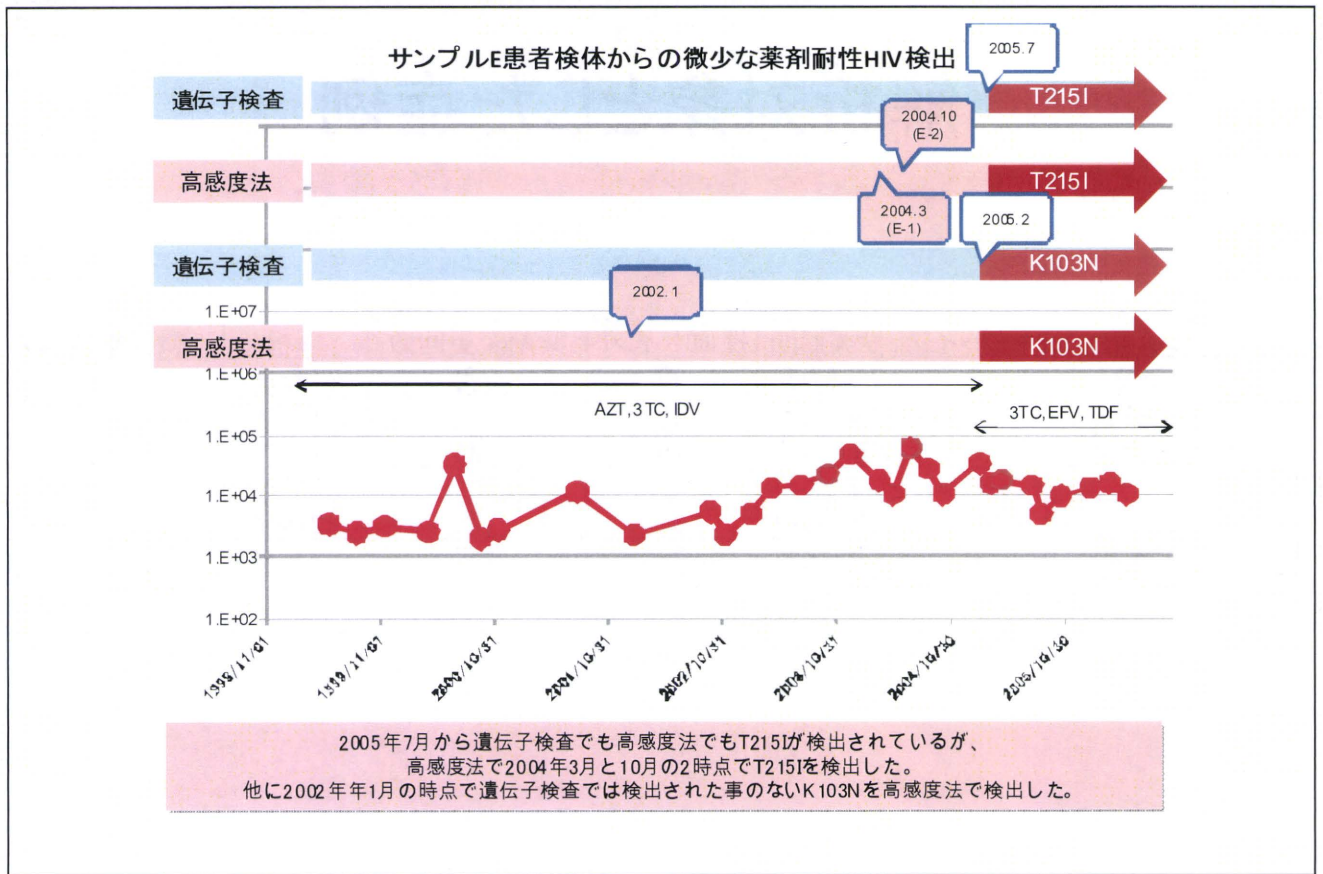


図 3

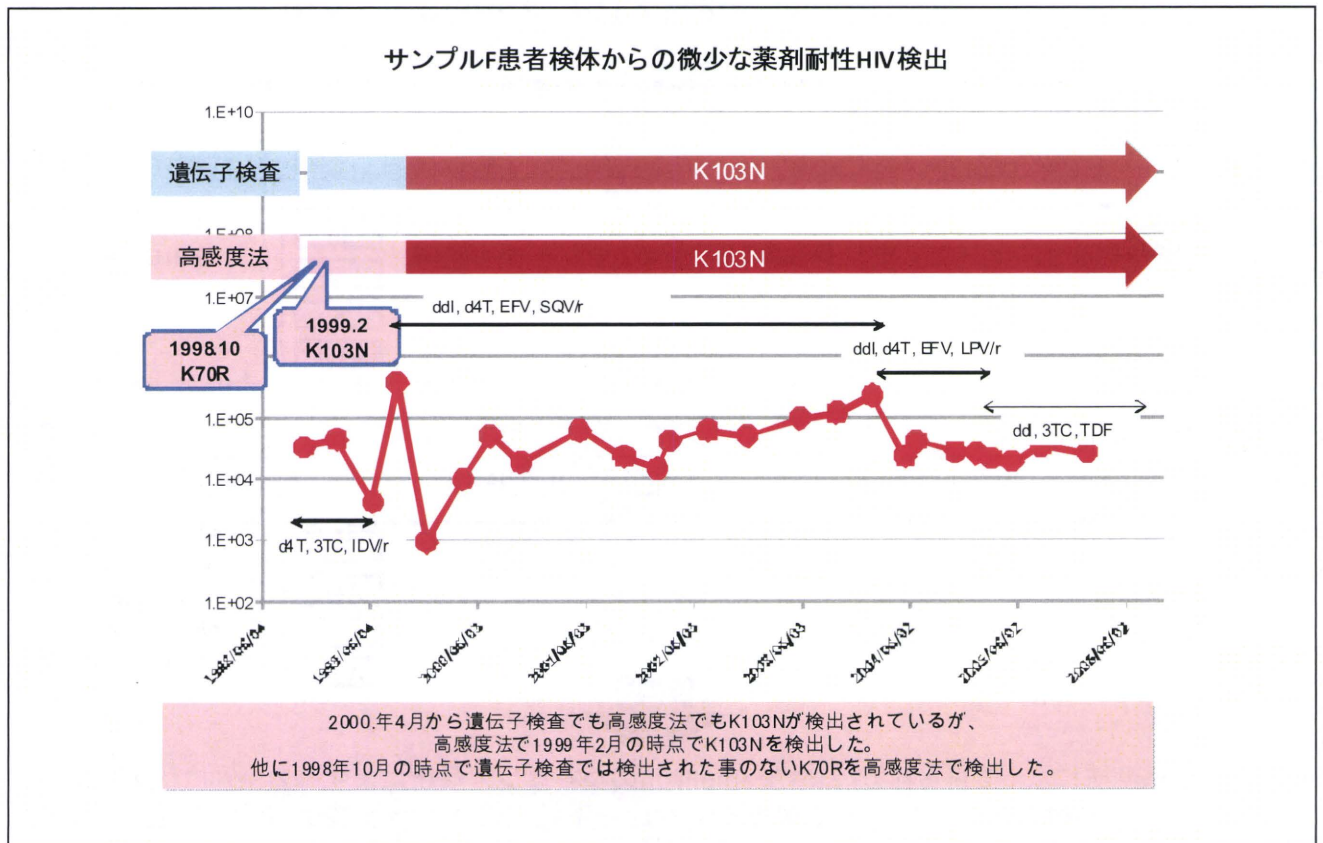
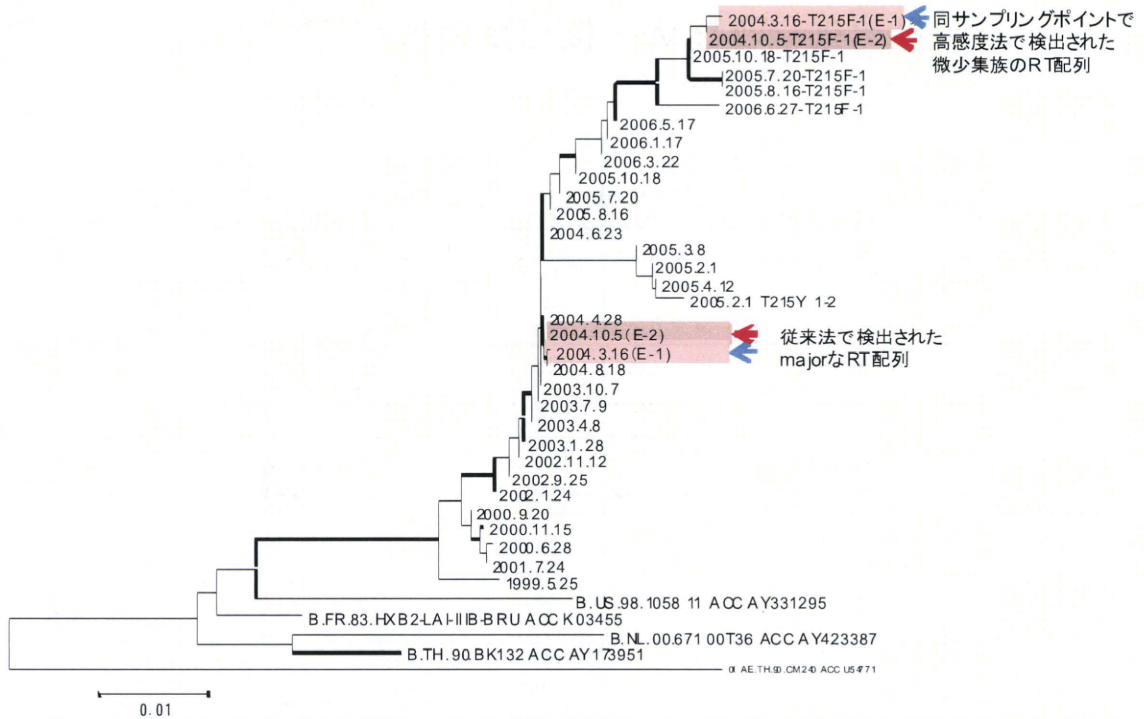


図 4

サンプルE患者検体から検出された微小集族T215Iの系統樹解析結果



2004年3月・10月に高感度法で検出された微小集族のT215IはART変更後の2005年6月以降Majorな耐性変異として従来法で検出されたT215Iと近縁であった。

図 5

T-10-B(A)患者検体から検出されたT215Yと他の薬剤耐性変異との関連性の解析

採血日	通常法	高感度法	投薬	VL
4/22/02	M184V, T215Y	M184V, T215Y	ABC, LPV/r	1000
6/17/02	M184V, T215Y	M184V, T215Y	ABC, LPV/r	6000
8/19/02	M184V, T215Y	M184V, T215Y	ABC, LPV/r	33800
9/18/02	M184V, T215Y	M184V, T215Y	ABC, LPV/r	20800
3/24/03	Y115F, M184V, T215Y	M184V, T215Y	ABC, LPV/r	18800
9/24/03	Y115F, V118I, M184V, T215Y	Y115F, V118I, M184V, T215Y		130700
1/17/04	Y115F, V118I, M184V, T215Y	Y115F, V118I, M184V, T215Y	ABC, NVP, TDF, LPV/r, ATV	81000
1/30/04	Y115F, V118I, Y181C, M184V, T215Y	Y115F, V118I, Y181C, M184V, T215Y		1000
2/9/04	Y115F, V118I, Y181C, M184V, T215Y	Y115F, V118I, Y181C, M184V, T215Y	ABC, NVP, LPV/r, ATV	2100
2/20/04	V108I, Y115F, V118I, Y181C, M184V, T215Y	Y115F, V118I, Y181C, M184V, T215Y	ABC, NVP, LPV/r, ATV	6400
3/10/04	Y115F, V118I, Y181C, M184V, L210W, T215Y	Y115F, V118I, Y181C, M184V, T215Y	ABC, NVP, LPV/r, ATV	13800
4/6/04	Y115F, V118I, Y181C, M184V, T215Y	Y115F, V118I, Y181C, M184V, T215Y	ABC, NVP, LPV/r, ATV	28700
5/10/04	Y115F, V118I, Y181C, M184V, T215Y	Y115F, V118I, Y181C, M184V, T215Y	ABC, NVP, LPV/r, ATV	25700
5/24/04	Y115F, V118I, Y181C, M184V, T215Y	Y115F, V118I, Y181C, M184V, T215Y	ABC, NVP, LPV/r, ATV	15700
6/4/04	Y115F, V118I, Y181C, M184V, T215Y	Y115F, V118I, Y181C, M184V, T215Y	ABC, NVP, LPV/r	8600
6/23/04	Y115F, V118I, Y181C, M184V, T215Y	Y115F, V118I, Y181C, M184V, T215Y	ABC, NVP, LPV/r, ATV	15800
8/2/04	V108I, Y115F, V118I, Y181C, M184V, T215Y	Y115F, V118I, Y181C, M184V, T215Y	ABC, NVP, LPV/r, ATV	10000
10/25/04	V108I, Y115F, V118I, Y181C, M184V, T215Y	Y115F, V118I, Y181C, M184V, T215Y	ABC, NVP, LPV/r, ATV	9000
11/8/04	V108I, Y115F, V118I, Y181C, M184V, T215Y	Y115F, V118I, Y181C, M184V, T215Y		5900

※ 太字下線の耐性変異が、従来法によってのみ検出された耐性変異

図 6

L90M及びM46I検出系の検討・確立

サンプル番号	L90M		M46I		
	Direct	real-time(CDC Ver.)	Direct	real-time(CDC Ver.)	real-time(NIID Ver.)
DR-1*	L90M	2.87	M46I	10.06	4.52
DR-2	L90M	2.67	M46I	9.8	2.62
DR-3	L90M	2.85	M46L	17.73	17.7
DR-4	L90M	9.19	WT	28.65	16.47
DR-5	L90M	6.18	M46I	13.14	3.94
DR-6	L90M	2.97	WT	25.92	-
DR-7*	WT	20.6	M46I	-	5.29
DR-8	L90M	5.19	M46I	20.96	3.83
DR-9	L90M	4.19	M46L	29.77	16.48
DR-10	L90M	3.86	M46I	11.99	2.53
DR-11	WT	>20	WT	20.37	-
DR-12	L90M	3.53	M46I	11.6	-
DR-13	L90M	3.58	M46L	>20	-
DR-14	-	-	M46L	10.94	16.41
DR-15-1	-	-	WT	11	9.6
DR-15-2	-	-	M46I	17.08	3

※: 黒字は>Cut off値(Cut off値=10.0)・・・陰性
 ※: 赤字は<Cut off値(Cut off値=10.0)・・・陽性

図 7

II. 分担研究報告

薬剤耐性 HIV 症例の臨床的解析に関する研究

研究分担者 杉浦 亙（独）名古屋医療センター 臨床研究センター 感染・免疫部長）

研究協力者 服部 純子（独）名古屋医療センター 臨床研究センター 感染・免疫部）

研究要旨 薬剤耐性 HIV は HIV 感染症治療失敗の原因の一つであり、治療前の薬剤耐性検査は効果的な治療を行う上で重要である。一般的な薬剤耐性検査として、抗 HIV 薬の標的酵素の遺伝子配列を解析して薬剤耐性変異を同定するダイレクトシーケンス法（従来法）が用いられている。近年になって、従来法では検出が難しい 20%以下の比率で患者血中に存在する微少集族薬剤耐性変異が抗 HIV 両方に悪影響を及ぼす可能性が報告された。本研究では、このような微少集族薬剤耐性変異の臨床経過中の詳細な動態を解析するために、これまでに国立感染症研究所エイズ研究センターで薬剤耐性検査を行った症例の中から、長期間（5年以上）に渡って ART を受け、治療途中で薬剤変更と薬剤耐性変異のパターンに変化が見られた症例を 10 症例選択した。その中から 1) 採血ポイントが 20 点以上、2) 各採血ポイントの間隔がほぼ半年以内 3) 治療途中で薬剤の変更がある 3 症例を選択し、臨床経過に関するデータ提供を行った。

A. 研究目的

患者血中に微少な割合で存在する微少集族薬剤耐性 HIV が ART に悪影響を及ぼす可能性が米国等の SD-NVP を受けた患者の解析等から既に報告されている。日本で ART を受けている患者血中にもダイレクトシーケンス法（従来法）では解析できない 20%以下の比率で存在する微少集族薬剤耐性変異が存在し、ART に影響を及ぼす可能性が示唆されている。国立感染症研究所で薬剤耐性を行ってきた患者検体は、血中ウイルス量や CD4 数、投与薬剤履歴などの情報も保管されており、従来法で解析した薬剤耐性変異の情報も合わせてデータベース化された貴重なサンプルである。これらの患者サンプルの中から長期間に渡って ART を継続しながら薬剤耐性検査を行っており、かつ治

療途中で ART の変更と薬剤耐性変異の経時的変化の起こっている患者検体を抽出し、高感度法による微少集族薬剤耐性変異の解析用に提供する。

B. 研究方法

平成 21 年度の研究で、国立感染症研究所エイズ研究センターで 5 回以上薬剤耐性検査を行っている症例で、なおかつ ART レジメの変更があった 126 症例の中から、臨床経過中に多剤耐性変異を獲得し、さらに

- 1)採血ポイントが 20 点以上
- 2)各採血ポイントの間隔がほぼ半年以内
- 3)治療途中で薬剤の変更がある

の条件を満たす症例を検索した。検索対象は 1996

年 11 月～2008 年 3 月までに採血し薬剤耐性検査を行った検体とした。

(倫理面への配慮)

本研究では感染者血清を使用するため、国立感染症研究所の医学研究倫理審査委員会へ倫理審査を申請しその承認を得た。

C. 研究結果

平成 21 年度には国立感染症研究所エイズ研究センターで管理されているデータベースに登録された約 1500 症例の中から、採血ポイントが 5 回以上あり、なおかつ治療途中で治療薬剤の変更があった 126 症例を選択した。平成 21 年度の研究から、微少集族薬剤耐性の動態を解析するには短い間隔で多数回の薬剤耐性検査を行っている症例が適当と考えられたため、今年度は

- 1)採血ポイントが 20 点以上
- 2)各採血ポイントの間隔がほぼ半年以内
- 3)治療途中で薬剤の変更がある

の 3 条件を満たす 10 症例を選択した。また薬剤変更後に薬剤耐性変異の割合や種類が短時間で変化する事が平成 21 年度の研究から予想されたため、特に薬剤変更後の採血の間隔が 2 カ月～半年以下となっているものを特に重点とした。また NRTI, NNRTI に対する複数の薬剤耐性変異を解析するために、臨床経過途中で多剤耐性を獲得していた 3 症例 D, E, F を最終的に選択し、高感度法を用いた微少集族薬剤耐性検査に提供した (表 1～3)。

D. 考察

今年度選択した症例は、3 症例とも薬剤変更後の採血ポイントが 2 カ月～半年と短いものを選択した。薬剤耐性変異は、従来法の解析結果からは薬剤変更と連動して速やかに変化していたが、高感度法の解析結果からは微少集族薬剤耐性変異の

変化は必ずしも薬剤の変更とは連動していない事が示され、耐性変異によっては長期間維持されていることが明らかになっている。国立感染症研究所エイズ研究センターのデータベースには 10 年以上に渡って薬剤耐性検査を行い、臨床経過や耐性変異のデータが蓄積されている症例が 2 症例登録されており、長期間の微少集族薬剤耐性変異の動態解析に有用であると思われる。

E. 結論

平成 21 年度に国立感染症研究所エイズ研究センターのデータベースから選択された 126 症例の中から、

- 1)採血ポイントが 20 点以上
- 2)各採血ポイントの間隔がほぼ半年以内
- 3)治療途中で薬剤の変更がある

の 3 条件を満たし、なおかつ薬剤変更後の採血間隔が 2 カ月～半年と短く、臨床経過の途中で多剤耐性を獲得した症例を 3 症例選択した。また 10 年以上に渡って臨床経過や耐性変異のデータが蓄積されている症例が 2 症例選択できた。

F. 健康危険情報

総括研究報告書に記載

G. 研究発表

1. 論文発表
欧文

- 1) Ibe S., Sugiura W. Clinical significance of HIV reverse transcriptase inhibitor-resistant mutations. *Future Microbiology*. in press
- 2) Shibata J, Sugiura W, Ode H, Iwatani Y, Sato H, Tsang H, Matsuda M, Hasegawa N, Ren F, Tanaka H. Within-host co-evolution of Gag P453L and protease D30N/N88D demonstrates virological advantage in a highly protease inhibitor-exposed HIV-1 case. *Antiviral Res.* 2011 Feb 19.

- 3) Fujisaki S, Yokomaku Y, Shiino T, Koibuchi T, Hattori J, Ibe S, Iwatani Y, Iwamoto A, Shirasaka T, Hamaguchi M, Sugiura W. Outbreak of Infections by Hepatitis B Virus Genotype A and Transmission of Genetic Drug Resistance in Patients Coinfected with HIV-1 in Japan. *J Clin Microbiol.* 2011 Mar;49(3):1017-24.
- 4) 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.* 2010 Oct;88(1):72-9.
- 5) Hirano A, Takahashi M, Kinoshita E, Shibata M, Nomura T, Yokomaku Y, Hamaguchi M, Sugiura W. High performance liquid chromatography using UV detection for the simultaneous quantification of the new non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor etravirine (TMC-125), and 4 protease inhibitors in human plasma. *Biol Pharm Bull.* 2010;33(8):1426-9.
- 6) Bandaranayake RM, Kolli M, King NM, Nalivaika EA, Heroux A, Kakizawa J, Sugiura W, Schiffer CA. The effect of clade-specific sequence polymorphisms on HIV-1 protease activity and inhibitor resistance pathways. *J Virol.* 2010 Oct;84(19):9995-10003.
- 7) Suzuki S, Urano E, Hashimoto C, Tsutsumi H, Nakahara T, Tanaka T, Nakanishi Y, Maddali K, Han Y, Hamatake M, Miyauchi K, Pommier Y, Beutler JA, Sugiura W, Fuji H, Hoshino T, Itotani K, Nomura W, Narumi T, Yamamoto N, Komano JA, Tamamura H. Peptide HIV-1 integrase inhibitors from HIV-1 gene products. *J Med Chem.* 2010 Jul 22;53(14):5356-60.
- 8) Ibe S, Yokomaku Y, Shiino T, Tanaka R, Hattori J, Fujisaki S, Iwatani Y, Mamiya N, Utsumi M, Kato S, Hamaguchi M, Sugiura W. HIV-2 CRF01_AB: first circulating recombinant form of HIV-2. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2010 Jul 1;54(3):241-7.
- 9) Saeng-aroon S, Tsuchiya N, Auwanit W, Ayuthaya PI, Pathipvanich P, Sawanpanyalert P, Rojanawiwat A, Kannagi M, Ariyoshi K, Sugiura W. Drug-resistant mutation patterns in CRF01_AE cases that failed d4T+3TC+nevirapine fixed-dosed, combination treatment: Follow-up study from the Lampang cohort. *Antiviral Res.* 2010 Jul;87(1): 22-9.
- 10) Y Iwatani, DS.B.Chan, L Liu, H Yoshii, J Shibata, JG. Levin, A M.Gronenborn, and W Sugiura. Fourlysine Residues In The Apobec3g C-Terminal Domain Are Critical For Hiv-1 Vif-Mediated Ubiquitination/Degradation. 10th Annual symposium on Antiviral Drug Resistance, Nov15-18 2009, Richmond, VA
- 11) Masaoka, T Sawasaki, W Sugiura, Y Endo, M Tatsumi, N Yamamoto, and A Ryo. Development Of Method For Testing Hiv-1 Rptease Drug-Resistance Based On Cell-Free Protein Production System. 10th Annual symposium on Antiviral Drug Resistance, Nov15-18 2009, Richmond, VA

和文

- 1) 服部純子、杉浦 亙、薬剤耐性検査の現状と課題、化学療法の領域. 2011 ; 27 (3) (in press)
- 2) 伊部史朗、杉浦 亙、薬剤耐性 HIV の現状と対策、日本臨牀. 2010 ; 68(3): 476-79.
- 3) 服部純子、杉浦 亙、我が国における薬剤耐性 HIV の現状、感染・炎症・免疫. 2010 ; 39(4) : 361-63
- 4) 吉居廣朗、杉浦 亙、ラルテグラビルの耐性、医薬ジャーナル. 2010;46(8) : 2054-58
- 5) 杉浦 亙、5th International Workshop on HIV Transmission/ 18th International AIDS Conference、HIV 感染症と AIDS の治療.2010 : 1(2) 71-73.
- 6) 杉浦 亙、HIV 感染—最新の疫学・臨床・治療、内科 2010 ; 106(5) : 781-87
- 7) 伊部史郎、横幕能行、杉浦亙、本邦における HIV-2 の疫学動向と新たな組換え流行株 CRF01_AB の同定. IASR 2010 ; 31(8):232-233.
- 8) 宮崎菜穂子、杉浦 亙、わが国における抗 HIV 治療と多剤耐性症例の現状 IASR 2010 ; 31(8):233-234.

2. 学会発表

海外

- 1) Hiroaki Yoshii、Shingo Kitamura、Wataru Sugiura、Yasumasa Iwatani. Constitutive activation of Stat1 causes spontaneous APOBEC3G expression, which determines permissive phenotype against vif-deficient HIV-1 replication in T-cell lines. CSHL RETROVIRUSES. May 24-29, 2010.5.24-29. Cold Spring Harbor Laboratory, USA
- 2) Yasumasa Iwatani. LinLiu, Denis S Chan, Hiroaki Yoshii、Judith G Le vin, Angela

- M Gronenborn, Wataru Sugiura. Structure-guided mutagenesis of APOBEC3G reveals four lysine residues critical for HIV-1 Vif-mediated ubiquitination. CSHL RETROVIRUSES. May 24-29, 2010.5.24-29. Cold Spring Harbor Laboratory, USA
- 3) H Suzuki, J Hattori, M Nishizawa, S Ibe, Y Iwantani, Y Yokomaku, W Sugiura. Previous antiretroviral exposure enhances accumulation of mutations in the integrase region and affects acquisition of raltegravir resistance. The International HIV & Hepatitis Virus Drug Resistance Workshop & Curative Strategies. June 8-12, 2010, Dubrovnik, Croatia
- 4) T Masaoka W Sugiura, Y Iwatani, T Sawasaki, S Matsunaga, Y Endo, M Tatsumi, N Yamamoto, A Ryo. A high-throughput phenotypic assay for HIV-1 protease drug resistance using a wheat cell-free protein production system. The International HIV & Hepatitis Virus Drug Resistance Workshop & Curative Strategies. June 8-12, 2010, Dubrovnik, Croatia
- 5) J Hattori, H Gatanaga, M Kondo, K Sadamasu, S Kato, H Mori, R Minami, W Sugiura, the Japanese Drug Resistance HIV-1 Surveillance Network. Characteristics of drug-resistant HIV-1 transmission: analysis of drug resistance in recently and non-recently infected treatment-naive patients in Japan. The International HIV & Hepatitis Virus Drug Resistance Workshop & Curative Strategies. June 8-12, 2010, Dubrovnik, Croatia
- 6) S. Ibe, Y. Yokomaku, T. Shiino, R. Tanaka, J. Hattori, S. Fujisaki, Y. Iwatani, N. Mamiya, M. Utsumi, S. Kato, M. Hamaguchi, W. Sugiura. Molecular epidemiology of HIV-2 in Japan: identification of the first circulating

recombinant form of HIV-2, CRF01_AB. 5th International Workshop on HIV Transmission. July 15-16 2010, Vienna, Austria

7) M. Nishizawa, J. Hattori, W. Heneine, J.A. Johnson, W. Sugiura. Sensitive testing identifies a greater prevalence of transmitted HIV drug resistance in Japan. 5th International Workshop on HIV Transmission. July 15-16 2010, Vienna, Austria

8) W. Sugiura, J. Hattori, S. Yoshida, H. Gatanaga, M. Kondo, K. Sadamasu, T. Shirasaka, H. Mori, R. Minami, M. Tateyama, M. Ueda, S. Kato, T. Ito, M. Oie, A. Ueda. A nationwide surveillance study on the prevalence of drug-resistance mutations among newly diagnosed individuals in Japan from 2003 to 2008. 5th International Workshop on HIV Transmission. 15-16 July 2010, Vienna, Austria

9) S. Ibe, Y. Yokomaku, R. Tanaka, J. Hattori, S. Fujisaki, Y. Iwatani, S. Kato, M. Hamaguchi, W. Sugiura. Development of a highly sensitive and reproducible plasma HIV-2 RNA copy quantification method for monitoring antiretroviral treatment. XVIII International AIDS Conference. July 18-23 2010. Vienna, Austria

10) Naoko Miyazaki, Shuzo Matsushita, Takeshi Fujii, Aikichi Iwamoto, Wataru Sugiura, Japanese HIV-MDR Study Group. Drug-Resistant Genotyping to Guide Selection of Etravirine, Darunavir and Raltegravir in Salvage Therapy for Multi-Drug-Resistant Cases Improves Outcomes. XVIII International AIDS Conference. July 18-23 2010. Vienna, Austria

11) J Hattori, H Gatanaga, M Kondo, K Sadamasu, S Kato, H Mori, R Minami, W Sugiura, and the Japanese Drug Resistance

HIV-1 Surveillance Network. Characteristics of Drug-Resistant Hiv-1 Transmission: Analysis of Drug Resistance in Recently and Not-Recently Infected Treatment-Naïve Patients in Japan. 11th Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance. November 7-10 2010, Hershey PA

12) Shiro Ibe, Yoshiyuki Yokomaku, Junko Hattori, Yasumasa Iwatani and Wataru Sugiura. First Case of Hiv-2 Crf01_Ab Infection Treated with Combination Antiretroviral Therapy. 11th Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance. November 7-10 2010, Hershey PA

13) Wataru Sugiura. Characterization and phylodynamic analysis of Drug-Resistant HIV-1 Transmission in Japan. US-Japan Joint AIDS Panel: Resistance Meeting. December 8-9, 2010, Singapore

国内

1) 伊部史朗、横幕能行、服部純子、杉浦 互. 定量PCR法を用いたHIV-2 viral load 測定系の確立とその臨床応用. 第84回日本感染症学会総会. 平成22年4月5-6日. 京都

2) 岩谷靖雅、杉浦互. Structure-guided mutagenesis of APOBEC3G reveals four lysine residues critical for HIV-1 Vif-mediated ubiquitination near the C-terminal end. 第5回日独エイズシンポジウム. 平成22年5月10-11日. 東京

3) 吉居廣朗、岩谷靖雅、杉浦互. Spontaneous APOBEC3G expression which determines permissive phenotype against Vif-deficient HIV-1 replication, is caused by constitutive activation of Stat1 in T-cell lines. 第5回日独エイズシンポジウム. 平成22年5月10-11日. 東京

- 4) 岩谷靖雅、杉浦 互. 抗 HIV 宿主因子 APOBEC3G の発現制御と分解、第 12 回白馬シンポジウム、徳島 5 月 14 日-5 月 15 日
- 5) 服部純子、重見 麗、杉浦 互. BED アッセイを用いた未治療 HIV 感染者の動向調査. 第 12 回 白馬シンポジウム in 徳島～最先端のエイズ研究を徹底討論する～.平成 22 年 5 月 14-15 日.徳島
- 6) Wataru Sugiura. A Nationwide Surveillance Study on the Prevalence of Drug-Resistance Mutations among Newly Diagnosed Individuals in Japan from 2003 to 2009, Joint Meeting of AIDS Panel for U.S. Japan Cooperative. 14Sept 2010. Awaji, Japan
- 7) 北村紳悟、吉居廣朗、前島雅美、横幕能行、杉浦 互、岩谷靖雅、APOBEC3C における HIV-1Vif に対する感受性を決定する領域の探索、第 58 回日本ウイルス学会学術集会.2010 年 11 月 7 日
- 7) 正岡崇志、杉浦 互、澤崎達也、松永智子、遠藤弥重太、巽 正志、Robert Shafer、山本直樹、梁 明秀.酵素活性を指標とした HIV プロテアーゼ薬剤耐性新規検査法の開発、第 58 回日本ウイルス学会学術集会.2010 年 11 月 7 日
- 8) 吉居廣朗、北村紳悟、前島雅美、杉浦 互、岩谷靖雅、リンパ球由来細胞株における vif 欠損 HIV に対する異なる感受性は Stat1 活性化状態に関する. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会.2010 年 11 月 9 日
- 9) 木下枝里、平野淳、柴田雅章、高橋昌明、野村敏治、脇坂達郎、横幕能行、杉浦 互、リファンピシン併用下におけるインテグラーゼ阻害剤ラルテグラビルの投与量に関する検討. 第 24 回日本エイズ学会学術集会. 東京. 2010 年 11 月 24 日
- 10) 横幕能行、今村淳治、平野淳、伊部史朗、岩谷靖雅、杉浦 互、名古屋医療センターにおける etravirine の使用状況と効果および適応に関する検討、第 24 回日本エイズ学会学術集会. 東京. 2010 年 11 月 24 日
- 11) 高橋昌明、平野淳、木下枝里、柴田雅章、野村敏治、横幕能行、杉浦 互、HPLC using UV detection for the simultaneous quantification of etravirine(TMC-125), And 4 protease inhibitors in human plasma. 第 24 回日本エイズ学会学術集会. 東京. 2010 年 11 月 24 日
- 12) 平野淳、木下枝里、柴田雅章、高橋昌明、野村敏治、横幕能行、杉浦 互、Tipranavirtide 併用患者に対する TDM の有効例、第 24 回日本エイズ学会学術集会. 東京. 2010 年 11 月 24 日
- 13) 吉居廣朗、前島雅美、北村紳悟、横幕能行、杉浦 互、岩谷靖雅
抗 HIV 宿主因子 APOBEC3 ファミリーの細胞依存的な発現調節機構の解明、第 24 回日本エイズ学会学術集会. 東京. 2010 年 11 月 24 日
- 14) 西澤雅子、服部純子、横幕能行、Jeffrey Johnson、Walid Heneine、杉浦 互、高感度薬剤耐性検査法を用いた新規未治療 HIV/AIDS 症例における微小集族薬剤耐性 HIV 調査研究. 第 24 回日本エイズ学会学術集会. 東京. 2010 年 11 月 25 日
- 15) 奥村かおる、横幕能行、三和治美、山田由美子、杉浦 互、岩谷靖雅、平野 淳、木下枝里.ベナンボックス吸入時の苦味の軽減に対するハッカ飴の使用とその効果 第 2 報-他の有効な手段を探すためのハッカの有効性の検証-.第 24 回日本エイズ学会学術集会. 東京. 2010 年 11 月 25 日
- 16) 柴田雅章、平野 淳、木下枝里、高橋昌明、野村敏治、横幕能行、杉浦 互、薬剤師のための HIV 研修会開催についての事前アンケート調査結果、第 24 回日本エイズ学会学術集会. 東京. 2010 年 11 月 25 日
- 17) 正岡崇志、杉浦 互、澤崎達也、松永智子、遠藤弥重太、巽 正志、Shafer Robert、山本直樹、梁 明秀.コムギ無細胞合成 HIV プロテア