

杉浦 互

渡邊綱正、横幕能行、今村淳治、杉浦互、田中靖人、HBV 新規感染における HIV 重感染の影響についての検討。第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2011 年 11 月

横幕能行

横幕能行、鬼頭優美子、今村淳治、大出裕高、服部純子、伊部史郎、岩谷靖雅、杉浦互、HIV プロテアーゼ表現型検査法である VLP ELISA 法の実臨床への応用。第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2011 年 11 月

分担研究報告

2

HIV 感染症治療の開始時期と治療終焉の指標に関する研究

研究分担者：渡邊 大 (国立病院機構大阪医療センター エイズ先端医療研究部 HIV 感染制御研究室)

研究協力者：上平 朝子 (国立病院機構大阪医療センター 感染症内科)

岡本瑛里子 (国立病院機構大阪医療センター エイズ先端医療研究部)

蘆田 美紗 (国立病院機構大阪医療センター エイズ先端医療研究部)

鈴木佐知子 (国立病院機構大阪医療センター エイズ先端医療研究部)

土肥 浩美 (国立病院機構大阪医療センター エイズ先端医療研究部)

研究要旨

【目的】抗 HIV 薬を複数用いる多剤併用療法 (highly active antiretroviral therapy; HAART) の登場によって、HIV 感染者の予後は改善した。一方で、薬剤副作用や、治療開始時期や治療終焉の目安など、未解決の問題も残されている。本研究の3年間の課題として (1) 薬剤の毒性としての血清 CK 異常とその原因解析 (2) 治療開始時期および終焉時期の指標として残存プロウイルス量の測定系の改良を行った。【方法】(1) 診療録より血清 CK、CK-MB、処方された抗 HIV 薬を収集し統計解析を行った。HIV 感染者の血清ミトコンドリア CK (MtCK) 活性の定量を行い、投与薬剤の関連、薬剤投与後の変化、腎機能等との関連等について解析した。(2) 血中 HIV-RNA 量が測定感度未満で維持されている症例を対象に、TaqMan PCR 法とポワソン分布法による残存プロウイルス量の測定を行った。また、プロウイルスのシークエンスを行った。【結果】(1) tenofovir (TDF) の投与と血清 CK-MB の上昇に関連を認めた。MtCK の活性を阻害するモノクローナル抗体を用い、その上昇は MtCK 由来であることを明らかとした。MtCK の上昇は TDF 特異的であった。(2) 残存プロウイルス量の測定系の改良を行い、先行研究で測定感度未満の症例も測定可能となった。TaqMan PCR 法とポワソン分布法の結果の一致性は良好であった。APOBEC-type G-to-A mutation によると考えられるナンセンス変異を 13 例中 4 例に認めた。【考察】(1) TDF 投与により血清 MtCK 活性が上昇することを明らかとした。(2) 残存プロウイルス量については、量的な評価に加え、質的評価も必要であることが示された。

研究目的

1990年代の後半から登場した複数の抗 HIV 薬を用いる多剤併用療法 (highly active antiretroviral therapy ; HAART) によって、HIV 感染症は致死の病から、コントロール可能な慢性疾患となった。しかし、多くの課題は解決されずに残されている。HAART によって血中のウイルス量は測定感度未満となるが、寿命の長い潜伏感染細胞を除去することができず、一生、抗 HIV 薬を内服する必要がある。このことから、抗 HIV 薬の毒性の蓄積が危惧される。また、抗 HIV 薬の血中濃度を保つために厳密な内服が必要とされ、飲み忘れ・飲み遅れ等により薬剤耐性ウイルスの誘導が引き起こされる。この事実は HAART を内服する患者に多大な精神的負担をかけることになる。最後に、抗 HIV 薬の薬価が高いことがあげられる。

一人の年間の医療費は 300 万円、一生の医療費は 1 億円と推定されている。このように、HIV 感染症の予後を劇的に改善した HAART であるが、今後、解決すべき”陰”の側面も残されており、治療を強いられる患者にとっては、身体的・精神的・経済的負担は多大である。

HAART による解決すべき問題点の一つとして薬剤の副作用があげられる。体内の HIV の増殖を抑制し、免疫能の回復があつたとしても、抗 HIV 薬の毒性による QOL の低下や平均寿命の短縮は避けるべきである。従って、毒性の蓄積を早期発見するための指標開発が必要である。我々はこのような観点から、血清 creatine kinase (CK) 活性に注目した。平成 21 年度は診療録から後ろ向きに血清 CK および CK-MB と投与薬剤との関連について解析した。平成 22-23

年度は新規に開発されたミトコンドリア CK (MtCK) の活性を阻害するモノクローナル抗体を用いて、血清 MtCK の活性の測定を行い、CK-MB との関連や種々の特徴についての解析を行った。

抗 HIV 療法をいつ開始するかについては多くの議論がなされている。CD4 陽性 T リンパ球数が $350/\mu\text{l}$ を上回った場合に計画的に治療を中断するという臨床試験 (SMART Study; N. Engl. J. Med. 355, p2283, 2006) に加え、大規模なコホート研究の結果 (N. Engl. J. Med. 360, p360, 2009 および Lancet 373, p1314, 2009) も報告された。臨床試験とコホート研究の後者からは CD4 数が $350/\mu\text{l}$ 以下で HAART を開始すべきであり、治療を遅らせた場合、心血管系イベント・腎疾患・肝疾患・非 AIDS 関連悪性腫瘍が問題になるとされた。一方、Kitahata らのコホート研究 (前者) は CD4 数が $500/\mu\text{l}$ 以下で治療すべきと結論づけている。現在無作為割付国際臨床試験 (Strategic Timing of AntiRetroviral Treatment, NCT00867048) が行われ、開始すべき CD4 数は $350/\mu\text{l}$ なのか、それとも $500/\mu\text{l}$ であるべきかが検討されようとしている。一方、治療の終焉に関する研究はあまり進歩が見られていない。2003 年の報告 (Nat. Medicine 9, p727, 2003) では、潜伏感染細胞の半減期は平均 44 ヶ月と推定され、100 万個の潜伏感染細胞をすべて駆逐するのに平均 73.4 年かかるという結果であった。この仮説が正しければ、多くの症例で治癒は困難であるが、抗ウイルス効果が際立って良好な症例等では治癒する可能性も示唆している。我々は先行研究で、残存プロウイルス量が臨床指数として有効か否かを検討し、その結果の報告をした (D. Watanabe et al., BMC Infect Dis, 2011)。その報告において、残存プロウイルス量は、HAART 導入前の CD4 陽性 T リンパ球数と逆相関を示すこと、急性期での治療導入例では低レベルに維持されること、治療期間との関連性は低いことを示した。これらの観察からは、残存プロウイルス量が開始時期の検討および治療終焉の指標となりうることが示された。しかし、先行研究で用いた方法では感度や再現性といった点に問題があった。それらの問題点を解決するために、TaqMan PCR 法の条件の見直しや、ポワソン分布法の開発、そしてプロウイルスのシーケンスを行った。

研究方法

HAART が導入されている症例もしくは導入予定の 100 症例から検体を採取した。通常法である CK-MB 測定キットとミトコンドリア CK に対する阻害抗体を含んだ CK-MB 測定キットの 2 種類の測定を行い、その測定値の差を 2 で割ることによって MtCK 活性を算出した。抗 HIV 療法が導入され血中 HIV-RNA 量が感度未満で維持されている症例を対象とし、末梢血から CD4 陽性 T リンパ球を分離し、DNA を抽出した。精製した DNA を鋳型として、Lightcycler DX400 を用いて TaqMan PCR 法を用いてコピー数を決定した。また、ポワソン分布法を用いてコピー数を決定し、TaqMan PCR 法との比較を行った。ダイレクトシーケンス法にて、HIV-DNA の配列の決定を行った。

(倫理面への配慮)

各研究について、院内の倫理委員会に相当する受託研究審査委員会で倫理審査を行い、承認を取得した (承認番号 0819, 0973)。この審査委員会で審査・受理された方法で研究を遂行し、具体的には文書での同意の取得や、検体処理やデータ管理の際の匿名化などを行った。

研究結果

副作用としての CK の上昇に関しては、平成 21 年度は診療録からデータを回収し、後ろ向きに解析を行った。2005 年 1 月 1 日から 2008 年 10 月 31 日までに HAART が開始され血清 CK および CK-MB が同時に測定された検体は 43 症例・113 検体であった。そのうち各症例の直近の 43 検体を対象とした。基準値外 (CK 62~287 IU/L・CK-MB 0~16 IU/L) となった検体は、血清 CK で 25 例 (58%)、血清 CK-MB で 28 例 (65%) と、半数以上の症例で基準を外れていた。次に投与された抗 HIV 薬との関連について検討した。10 例以上投与が行われていた抗 HIV 薬 (TDF, ABC, FTC, ATV, LPV, RTV) を選択し、それらの投与の有無と血清 CK および血清 CK-MB の関連性について MANOVA にて解析した。血清 CK との相関はいずれの薬剤に関連性を認めなかったが、血清 CK-MB では TDF ($p=0.054$) と関連性があった。TDF が投与された 21 例では血清 CK-MB の平均は 40 IU/L であり、TDF の投与のない 22 例では平均 18 IU/L と、統計学的有意に TDF 投与にて血

清 CK-MB の上昇を認めた (Wilcoxon の検定、 $p < 0.0001$)。以上のことから TDF の投与と血清 CK-MB の関連性が明らかとなった。

平成 22 年度は MtCK の活性を阻害するモノクローナル抗体を用いて解析を行った。TDF を含むレジメンで抗 HIV 療法が施行されている 18 例に対して血清の CK-MB の酵素活性を測定した。16 例 (89%) で正常範囲の上限の 25 IU/L を超えて上昇していた。MtCK の阻害抗体を含んだ測定系で CK の活性値の測定を行った場合、全例で従来法より低い値を示し、16 例 (89%) で正常上限である 6 IU/L 以下となった。従来法と MtCK 阻害抗体を含んだ新規法の差が、血中 MtCK 活性として算出された。次に対象症例を拡大して MtCK 活性を測定した。治療未経験者 15 例 (naive 群)、TDF を含んだ治療患者 44 例 (TDF 群)、TDF を含まないレジメンによる治療患者 51 例 (非 TDF 群) を対象とした。TDF 群では MtCK 活性の平均は 16.0 IU/L となり、非 TDF 群 (平均 3.4 IU/L) および naive 群 (平均 4.8 IU/L) と比較して統計学的有意に上昇していた (Student's t test, $p < 0.0001$)。以上のことから、TDF で治療されている HIV 感染者の血中では MtCK が出現しており、MtCK 活性の上昇は TDF に特異的であることが示された。

平成 23 年度は、TDF による MtCK 活性の上昇についてさらに詳細に検討した。初回治療導入となった 5 症例に関して、治療開始前、2 週間後、1 ヶ月後、3 ヶ月後、6 ヶ月後に検体を採取し、MtCK 活性を測定した。TDF を投与 2 週間後には、わずかな MtCK 活性の上昇を認めた。1 ヶ月後には投与前と比較して著明な上昇を認め (paired t test, $p < 0.05$)、以後定常状態となった。次に、TDF が 60 日以上投与されている症例を対象に、他の臨床データとの関連性について検討した。腎機能障害は、TDF の副作用として最も解決すべき課題の一つである。MtCK 活性と推定 GFR との相関について検討したが、有意な相関は認めなかった (回帰分析、 $p = 0.375$)。また、年齢や TDF の投与期間、TDF の血中濃度のトラフ値、AST や ALT、BUN、白血球数や血小板数といった臨床検査との関連についても検討したが、検索した限りでは MtCK 活性との間に相関を認める項目を認めなかった。

残存プロウイルス量の測定に関しては、平成 21

年度に 5 組のリアルタイム PCR 用のプライマー・プローベセットについて検討した。先行研究で使用していた 1 組において PCR の効率が低下していたことが明らかとなった。そこで、プライマー近傍のシーケンス配列を保有している 2 組のプライマー・プローベセットに注目し、最終的には反応容量を増加させることによって、先行研究で測定感度未満であった検体の測定も可能となった。

平成 22 年度は 2 組の TaqMan PCR 法の測定系 (gag および SK と命名) と、ポワソン分布法について比較検討した。希釈再現性・ポワソン分布法との一致率は SK と比較して、gag で良好であった。特に、低コピー数のサンプルにおいて SK では希釈再現性が乏しく、ポワソン分布との一致率も不良であった。従って、低コピー数の臨床検体を扱う上では、プライマー・プローベセットとして gag を選択することが好ましいと考えられた。

平成 23 年度は、TaqMan PCR 法とポワソン分布法による測定の継続を、抗 HIV 療法によって血中 HIV-RNA 量が測定感度未満で維持されている 33 症例を対象に測定を行ったが、昨年度同様に、TaqMan PCR 法による測定系とポワソン分布法は良好な一致性を示し (図 3)、測定が問題なく行われていることが確認された。次に 13 症例において、プロテアーゼ (PR) 領域および逆転写酵素 (RT) 領域 (1-240 番目のアミノ酸) のプロウイルスのシーケンスを行った。13 症例中 4 例にナンセンス変異の出現を認めた。ストップコドンと tryptophan の混在が計 7 カ所、ストップコドンが計 6 カ所、存在していた。そのうちの 1 症例は、PR 領域の W6*、RT 領域の W71*、W88*、W153*、W212*/W、W229*/W と、多数のナンセンス変異を有しており、APOBEC-type G-to-A hypermutation を示した 1 症例と考えられた。

考察

本研究は、TDF を内服している症例で CK-MB の測定値が異常に増加していることを契機に、MtCK による CK-MB の測定系への干渉と、TDF と MtCK の関連性を見いだしたものである。また、MtCK に対する特異的な阻害抗体を用いた測定系を採用することにより、TDF の投与によって上昇する血中 MtCK 活性値を定量化した最初の試みである。MtCK は TDF を内服してい

る症例の 80%で上昇を認め、その上昇は TDF に特異的であった。このことは、いまだ明らかにされていない TDF の副作用の発現機序解明の糸口になる可能性が考えられる。腎に豊富に存在している ubiquitous MtCK が上昇していることや、TDF による腎尿細管細胞のミトコンドリア障害の報告が存在すること、TDF の腎機能障害が臨床で大きな問題となっていることから、将来的に詳細な解析が必要とされる。本研究においては、MtCK 活性と腎機能、TDF の血中濃度との関連性が見いだされなかったため、MtCK 活性の上昇がミトコンドリア障害を意味しているかどうかを明らかにすることができなかった。しかし、TDF 内服症例においては心筋梗塞といった心筋障害が存在しなくても、従来の測定法による CK-MB 値が 100 IU/L 弱を示すこともあり、HIV 感染症を診療する医師は TDF による MtCK の上昇、すなわち MtCK の阻害抗体を含んでいない CK-MB 検査における偽陽性に注意すべきである。

残存プロウイルス量の測定が臨床指標として有効である可能性は、先行研究が示した通りである。本研究は、まず測定系の改良に取り組んだ。その結果、5-10 年のスパンで継続的に測定するのに十分な感度および再現性が得られた。抗 HIV 療法によって、残存プロウイルス量が本当に減少するかは、いまだ結論がでていない。ある一定のレベルでプラトーとなり、それ以下に低下しない可能性も、十分考えられる。そのような課題に取り組むためには、長期間の残存プロウイルス量の測定の継続が必要である。さらに平成 23 年度においては、プロウイルスのシーケンスにおいて成果が見られた。13 症例中 4 症例でナンセンス変異を認めた。特に 3 症例においては、いずれかの tryptophan 残基がストップコドンに完全に置き換わっている（つまり、W-to-*であり W-to-*/W ではないということ）ことが確認された。これらの観察は、実際体内において、APOBEC が機能していることを示唆している。本研究では、時間的制約もあり、APOBEC-type G-to-A mutation がみられた症例を特徴づけるのに十分な症例数を解析できなかった。今後は解析症例数を増やし、APOBEC-type G-to-A mutation を示す症例の特徴を明らかとするとともに、量的および質的な解析から、臨床指標としての残存プロウイルスに注目していきたい。

結論

TDF の投与によって血清 MtCK 活性が上昇することを明らかとした。TDF による血清 MtCK 活性と関連性を示す因子は同定できず、今後の課題と考えられた。残存プロウイルス量の改良に取り組むとともに、13 症例中 4 症例のプロウイルスのメジャーシーケンスに APOBEC-type G-to-A mutation によると考えられるナンセンス変異を認めた。臨床指標としての残存プロウイルスについては、量的な評価に加え、質的評価も必要であると考えられた。

健康危険情報

該当なし

知的財産権の出願・取得状況

該当なし

研究発表

1) 原著論文による発表

Taniguchi T, Ogawa Y, Kasai D, Watanabe D, Yoshikawa K, Bando H, Yajima K, Tominari S, Shiiki S, Nishida Y, Uehira T and Shirasaka T. Three cases of fungemia in HIV-infected patients diagnosed through the use of mycobacterial blood culture bottles. Intern Med. 2010;49(19):2179-83

Watanabe D, Uehira T, Yonemoto H, Bando H, Ogawa Y, Yajima K, Taniguchi T, Kasai D, Nishida Y and Shirasaka T. Sustained high levels of interferon-gamma during HIV-1 infection: Specific trend different from other cytokines. Viral immunology. 2010;23(6):619-25

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

Watanabe D, Taniguchi T, Otani N, Tominari S, Nishida N, Uehira T, Shirasaka T. Immune reconstitution to parvovirus B19 and resolution of anemia in a patient treated with highly active antiretroviral therapy: A case report. *J Infect Chemother.* 2011;17(2):283-7

Watanabe D, Ibe S, Uehira T, Minami R, Sasakawa A, Yajima K, Yonemoto H, Bando H, Ogawa Y, Taniguchi T, Kasai D, Nishida Y, Yamamoto M, Kaneda T, Shirasaka T. Cellular HIV-1 DNA levels in patients receiving antiretroviral therapy strongly correlate with therapy initiation timing but not with therapy duration. *BMC Infect Dis.* 2011;11:146

Yoshino M, Yagura H, Kushida H, Yonemoto H, Bando H, Ogawa Y, Yajima K, Kasai D, Taniguchi T, Watanabe D, Nishida Y, Kuwahara T, Uehira T, Shirasaka T. Assessing recovery of renal function after tenofovir disoproxil fumarate discontinuation. *J Infect Chemother.* in press

Watanabe D, Koizumi Y, Yajima K, Uehira T, Shirasaka T. Diagnosis and Treatment of AIDS-Related Primary Central Nervous Lymphoma. *J Blood Disord Transfus.* in press

Watanabe D, Yoshino M, Yagura H, Hirota K, Yonemoto H, Bando H, Yajima K, Koizumi Y, Otera H, Tominari S, Nishida Y, Kuwahara T, Uehira T, and Shirasaka T. Increase in Serum Mitochondrial Creatine Kinase Levels Induced by Tenofovir Administration, *J Infect Chemother.* in press

小川吉彦、渡邊大、佐子肇、坂東裕基、矢嶋敬

史郎、谷口智宏、富成伸次郎、笠井大介、西田恭治、上平朝子、白阪琢磨、旅行者感染症として播種性ペニシリウム症を発症し治療が奏功した邦人 HIV 感染者の 1 症例。感染症学雑誌 84(6):740-743, 2010

矢倉裕輝、吉野宗宏、桑原健、矢嶋敬史郎、谷口智宏、富成伸次郎、渡邊大、上平朝子、白阪琢磨、HIV 感染症患者におけるニューモシスチス肺炎に対する ST 合剤の投与量別副作用発現頻度と脱感作療法の検討。日本エイズ学会誌 13(1):20-25, 2011

2) 口頭発表

大北全俊、白阪琢磨、渡邊大、急性感染者の早期発見の促進に関する倫理的な課題について。第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会、愛知、2009 年 11 月

渡邊大、米本仁史、坂東裕基、小川吉彦、矢嶋敬史郎、谷口智宏、笠井大介、西田恭治、上平朝子、白阪琢磨、血漿 HIV-RNA 量が測定感度未満に到達するまで長期の日数を必要とした初回抗 HIV 療法導入例の解析。第 24 回近畿エイズ研究会学術集会、大阪、2010 年 6 月

渡邊大、伊部史朗、近藤恭子、上平朝子、南留美、笹川淳、矢嶋敬史郎、米本仁史、坂東裕基、小川吉彦、谷口智宏、笠井大介、西田恭治、山本政弘、金田次弘、白阪琢磨、残存プロウイルス量測定の臨床的意義について。第 24 回日本エイズ学会総会・学術集会、東京、2010 年 11 月

渡邊大、上平朝子、白阪琢磨、横幕能行、濱口元洋、南留美、急性 HIV 感染症の入院 37 症例の検討。第 24 回日本エイズ学会総会・学術集会、東京、2010 年 11 月

大北全俊、渡邊大、白阪琢磨、急性感染者の早期発見の促進に関する倫理的な課題について。第 24 回日本エイズ学会総会・学術集会、東京、2010 年 11 月

渡邊大、蘆田美紗、岡本瑛里子、鈴木佐知子、
廣田和之、米本仁史、坂東裕基、矢嶋敬史郎、小
泉祐介、大寺博、富成伸次郎、西田恭治、上平朝
子、白阪琢磨、Population-based genotypic
tropism test による HIV 感染血友病患者の HIV の
指向性の検討。第 25 回近畿エイズ研究会学術集会、
京都、2011 年 6 月

蘆田美紗、渡邊大、岡本瑛里子、鈴木佐知子、
廣田和之、米本仁史、坂東裕基、矢嶋敬史郎、小
泉祐介、大寺博、富成伸次郎、西田恭治、上平朝
子、白阪琢磨、大阪医療センターにおける
HLA-B*51 逃避変異ウイルスを保有する HIV 感染者
の動向。第 25 回近畿エイズ研究会学術集会、京都、
2011 年 6 月

渡邊大、吉野宗宏、矢倉裕輝、廣田和之、米本
仁史、坂東裕基、矢嶋敬史郎、小泉祐介、大寺博、
富成伸次郎、西田恭治、栗原健、上平朝子、白阪
琢磨、Tenofovir の投与による血中ミトコンドリ
ア CK 活性の上昇に関する研究。第 25 回日本エイ
ズ学会学術集会・総会、東京、2011 年 11 月

渡邊大、上平朝子、白阪琢磨、味澤篤、今村顕
史、菅沼明彦、濱口元洋、横幕能行、南留美、高
濱宗一郎、白野倫徳、後藤哲志、急性 HIV 感染症
における他のウイルス感染症との関連性の検討。
第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2011
年 12 月

3

治療終焉のためのプロウイルスDNA等臨床指標の開発に関する研究

研究分担者：岩谷 靖雅（国立病院機構名古屋医療センター 臨床研究センター）

研究要旨

HIV/AIDS 治療薬の開発によって HIV 感染者の予後は著しく改善され、既に満足できるレベルに達している様に見える。しかし、終生にわたって服薬の継続が求められ、治療の長期化がより高まり将来的には様々な問題に直面する可能性を考慮しなければならない。今後、HIV 感染症における根治（eradication）療法が確立するまで、既存薬による適切な治療が求められている。そこで、長期化する HIV 感染症に対する多剤併用療法の投薬効果と病態変化の的確なモニタリングするためのプロウイルス DNA 等の臨床指標を開発する基盤を構築することを目的とし、ウイルス *env* の遺伝子情報配列と、そのケモカインレセプター（CR）指向性との関連性について解析する表現系判定のアッセイ系の確立と、プロウイルス DNA を利用した Geno2pheno[coreceptor]による遺伝子検査法の有用性について検証した。

HIV のケモカインレセプター（CR）トロピズムは、感染者の病態進行と深く関連している。さらに、CR 拮抗薬 マラビロック（MVC）の治療導入時には、その有効性を予測するために感染者がもつウイルスの CR 指向性検査は必要不可欠な状態になっている。その判定には臨床検体として、血漿中ウイルス RNA あるいは血球中プロウイルス DNA が用いることが可能であると考えられている。本研究の結果、臨床検体としてリンパ球プロウイルス DNA は有用であり、血漿ウイルス（RNA）に置き換えることが可能であることが考えられた。一方、サブタイプ AE における Geno2Pheno を用いた指向性検査では解決しなければならない課題が浮き彫りとなった。さらに、サブタイプ B の臨床検体について、R5 指向性 Env は R3 に対しても指向性をもつタイプがあるという前年度の知見基に、MVC の R3 指向性ウイルスに対する抑制効果を検討した結果、MVC は CCR3 依存的な HIV-1 の感染に対して有意な効果がないことが明らかになった。MVC 投与により R3 指向性 Env がどのように変動するのかは今後の研究課題である。

研究目的

HIV/AIDS 治療薬の開発によって HIV 感染者の予後は著しく改善され、既に満足できるレベルに達している様に見える。しかし、終生にわたって服薬の継続が求められ、治療の長期化がより高まり将来的には様々な問題に直面する可能性を考慮しなければならない。一方、インテグラーゼ阻害剤や CCR5 阻害剤等の新規な阻害機序による抗 HIV 薬剤の登場は、「治療の終焉」という期待を高めた。しかし、その可能性は、現状では厳しいと考えられる。このような状況をふまえると、長期的な視野に立った感染者の病態変化の的確なモニタリングが増々重要になると考えられる。今後、HIV 感染症における根治（eradication）療法が確立するまで、既存薬による適切な治療が求められている。そこで、長期化する HIV 感染症に対する多剤併用療法の投薬効果と病態変化の的確なモニタリングするためのプロウイルス

DNA 等の臨床指標を開発する基盤を構築することを目的とし、ウイルス *env* の遺伝子情報配列と、そのケモカインレセプター（CR）指向性との関連性について解析する表現系判定の方法の確立と、プロウイルス DNA を利用した Geno2pheno[coreceptor]による遺伝子検査法の有用性について検証した。

HIV のケモカインレセプター（CR）トロピズムは、感染者の病態進行と深く関連している。さらに、CR 拮抗薬 マラビロック（MVC）の治療導入時には、その有効性を予測するために感染者がもつウイルスの CR トロピズムの判定は必要不可欠な状態になっている。しかし、その判定方法は、phenotype Assay を利用した特殊であるため、時間とコストが大きいという問題が生じている。さらに、この判定は、海外の検査会社に頼らざるを得ないのが現状である。もし、検体中のウイルスの遺伝型から CR トロピズムを判定（Genotype Assay）できれば、本邦だけでな

く、世界各国で、現場レベルでの迅速判定（検査）が可能になると考えられている。これを実現するためには、ウイルスの *env* 遺伝子配列の情報から、CR トロピズムを判定するデータベース作りが必要である。現在、*env* 遺伝子の V3 近傍領域の配列情報からトロピズムを判定するデータベースを利用した、Geno2pheno[coreceptor] が用い始められている。CR トロピズムでは、V3 領域のアミノ酸配列が最も重要な決定因子であるが、その他の *env* 遺伝子領域にも影響されることが知られている。

CR 指向性検査では、臨床検体として、血漿中ウイルス RNA あるいはプロウイルス DNA から *env* の遺伝子情報を解析することが可能であるが、両者における遺伝子情報の差異についてその詳細が明らかになっていない。感染から時間が経過することにより、感染者における末梢リンパ球中のプロウイルス DNA 由来の遺伝子配列は多様性を増すと考えられている (Nature Med 1. 1284- (1995), Nature 387. 183-(1997))。そのため、経年化により蓄積したプロウイルス DNA (archived viral DNA として) の情報から、X4 指向性 *env* をもつ HIV の存在の可能性を判定する主旨では、プロウイルス DNA を用いた CR トロピズム判定は有用であることが想定できる。一方、血中ウイルスが検出限界以下の治療患者由来の検体における血漿中ウイルス RNA の抽出・分離には技術的な限界があり、このようなケースではプロウイルス DNA 由来のトロピズム判定は有用であると予想される。しかし、血漿中 HIV の集団とプロウイルス DNA の集団では、各々の場におけるウイルスの動態や遺伝情報は異なっていることが報告されている。

そこで、我々は、*env* (gp120) 遺伝子配列の情報とそれに呼応する CR トロピズムデータの情報蓄積を行い、将来的な CR トロピズム Genotype Assay に向けたデータベースの基盤構築を行うことを目的として臨床検体の Env の表現系判定のアッセイ系の確立を行った。さらに、血漿中ウイルス RNA あるいはプロウイルス DNA 間における *env* の遺伝子情報およびトロピズムの比較を行い、Geno2pheno [coreceptor] による遺伝子検査法におけるプロウイルス DNA の有用性を検証した。

研究方法

(1) 血漿ウイルスからの HIV-1 *env* 遺伝子のクローニング

表現系判定には、HIV-1 陽性（サブタイプ B、血中ウイルス量 10^4 コピー/ml 以上）検体を、遺伝子検査には 2010 年から 2011 年までに当院および協力機関から HIV-1 薬剤耐性検査または指向性検査を依頼された 602 検体（治療患者も含む）を対象とした。血漿 (200 μ l) あるいはリンパ球から、MagNA Pure Compact (Roche) により Total RNA あるいは proviral DNA を抽出した。表現系判定には全長 *env* 遺伝子のクローニングが必要のため、プライマーの検索から独自に行った。あらかじめ Los Alamos の HIV Databases を参照し、サブタイプ B の *env* 遺伝子領域を効率よく増幅できるプライマーセットを見出した。結果的に、RT-PCR には、vpr primer (5830-5848) と U3 primer (9170-9146) を、Nested PCR には rev primer (5965-5982) と ppt primer (9058-9079) をそれぞれ用いた。遺伝子検査では、プライマーセットおよび判定基準は、Dr. Richard Harrigan らによって推奨されている手法を用いた (J. Vis. Exp 46. 1-(2010)、Lancet Infectious Diseases 11. 394-(2011))。gag および *env* 遺伝子配列より HIV-1 のサブタイプの判定も行い、gag (523 bps) あるいは *env* (753 bps) cDNA を増幅した。

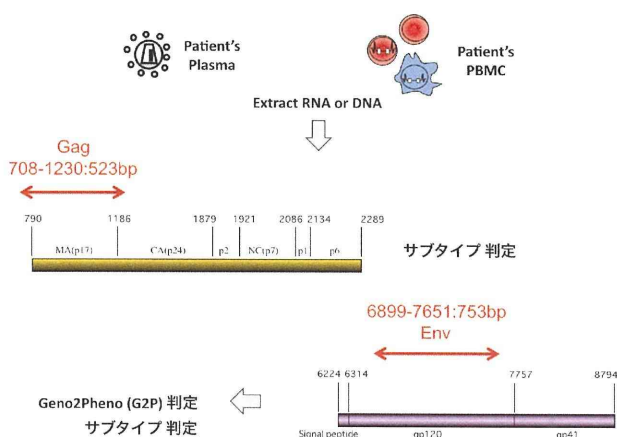


図1 血漿中／プロウイルスからの *gag* および *env* cDNA の増幅と塩基配列の決定

(2) 各クローンの HIV のケモカインレセプター (CR) トロピズムの判定

得られた各クローン (1 症例あたり 6 クローンずつ) の遺伝子配列を決定した。さらに、各ク

ローンは培養細胞(HEK 293T 細胞)に導入するように精製・調製した。

各 Env 発現プラスミドを HEK 293T 細胞に、pNLuc Env(-) プラスミドと共導入し、培養上清(Pseudo-Typed ウィルス)を作製した。内在性 CR を発現していない NP-2 細胞に様々な CR を安定発現する細胞(群馬大学、星野先生と清水先生より供与)に、Pseudo-typed ウィルスを感染させ、感染後 48 時間後に、感染細胞内の Luciferase 活性を測定した。得られた Luciferase 活性の値を相対的に比較することにより、各 Env クローンがどの CR 指向性を示すか判定した。

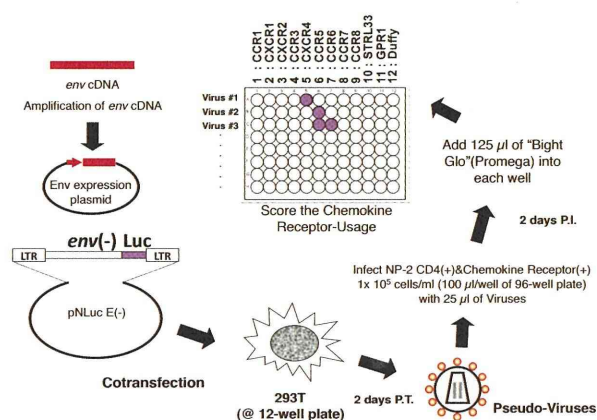


図2 NP-2 細胞を利用したケモカインレセプター指向性の判定

(3) Geno2pheno[coreceptor] による CR 指向性判定

増幅した cDNA の遺伝子配列を解析し、False Positive Rate (FPR) は 5% に設定して Geno2pheno [coreceptor] (URL: <http://coreceptor.bioinf.mpi-inf.mpg.de/index.php>) にて指向性判定

をおよびサブタイプ判定を行った。

(4) MVC の CCR3 指向性 HIV-1 に対する抑制効果に関する研究方法

CCR5 & CCR3 指向性 HIV-1 JRFL あるいは CXCR4 指向性 HIV-1 HXB2 Env 発現プラスミドを HEK 293T 細胞に、pNLuc Env(-) プラスミドと共導入し、培養上清(Pseudo-Typed ウィルス)を作製した。内在性 CR を発現していない NP-2 細胞に様々な CR を安定発現する細胞(群馬大学、星野先生と清水先生より供与)に、Pseudo-typed ウィルスを感染させ、感

染後 48 時間後に、感染細胞内の Luciferase 活性を測定した。予め、感染 1 時間前から NP-2 細胞に様々な濃度の MVC を添加し、前処理した。得られた Luciferase 活性の値を相対的に比較することにより、MVC による感染阻害効果を評価した。

(倫理面への配慮)

ウィルス遺伝子配列解析に関して

HIV-1 のウィルス疫学調査では全て検体が匿名化されるため、万が一の情報漏洩の事態においても個人情報流出は起こりえない。また、調査にあたっては疫学研究に関する倫理指針(平成 19 年文部科学省・厚生労働省告示第 1 号)で定めた倫理規定等を、臨床研究に関する倫理指針(平成 20 年厚生労働省告示第 415 号)で定めた倫理規定等を遵守する。疫学的研究を実施する研究施設、国立病院機構名古屋医療センターにおける倫理委員会の承認は既に得た。

研究結果

(1) ケモカインレセプター(CR)トロピズムの判定

NP-2 ベースの CR 指向性を、図 2 に示す方法で判定した。CR として、CXCR1、CXCR2、CCR1、CCR3 (R3)、CXCR4 (X4)、CCR5 (R5)、CCR6、CCR8、GPR1、STRL33、Duffy Blood Group Ag の 11 種について調べた。43 検体(各 1 クローンずつ)について指向性を判定した結果を図 3 に示す。まず、R3、X4、R5 以外の CR 指向性 Env は見出せなかった。X4 指向性 Env は 2 検体、X4 と R5 の両指向性(Dual Tropic)は 2 検体見出された。R5 指向性は、27 検体であった。興味深いことに 27 検体の R5 指向性 Env の内、24 検体が R3 にも指向性を示す結果が得られた。R5 指向性を示す Env のアミノ酸配列を、Geno2Pheno を用いた指向性予測(V3 loop 領域のアミノ酸配列のみから予測)を行った結果、27 検体、すべてが R5 指向性として判定された。以上のことから、R5 指向性ウィルスの多くが R3 にも指向性があることが明らかになった。ちなみに、12 検体については、いずれの細胞株においても Luciferase の活性が検出できなかった。HIV-1 サブタイプ B においては、R5 指向性の Env は R3 に対しても指向性を示すケースが多いという結果は、本研究途中にて、Dr. Mosier らによっても同様な傾向があることが報告された(J. Virol 83.

8353-)

R5+R3	24/43
R5 only	3/43
X4 only	2/43
X4+R5	2/43
ND	12/43

表1 NP-2細胞を利用したEnv (43検体)のCR指向性判定の結果を示す

(2) MVCのCCR3指向性HIV-1に対する抑制効果
 サブタイプBの臨床検体のうち、CCR5指向性Envの多く(29クローン中24)がCCR3にも指向性を示すことは明らかになった。そこで、MVCのCCR3依存的なウイルス感染の抑制効果について解析した。図3に示すように、X4指向性であるIIIB(HXB2)では、MVCの濃度に関係なくCXCR4を発現した細胞に対して同等の感染価を示した(黒)。一方、CCR5を発現した細胞に、R5指向性Env(HIV-1 JRFL由来)をもつウイルスを感染した場合、MVCの容量依存的に感染価が低下し、強力な抑制効果を示した(IC50 = 9.6 nM)(赤)。しかし、興味深いことに、CCR3にも指向性をもつJRFL EnvをもつウイルスをCCR3を発現する細胞に感染させた場合、MVCの濃度に関係なく感染価は保たれていた(青)。以上のことから、MVCはCCR3依存的なHIV-1の感染に対して有意な効果がないことが明らかになった。

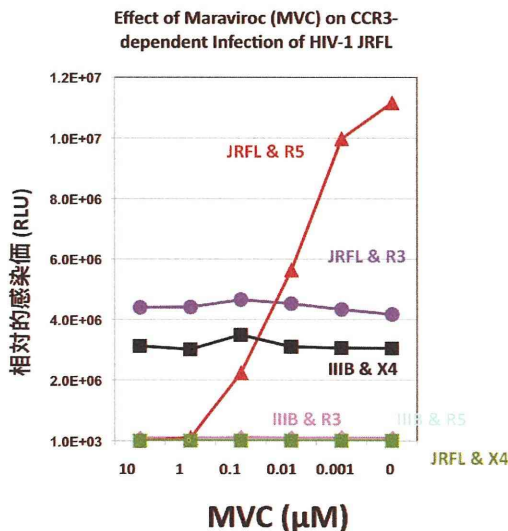


図3 MVCはHIV-1 JRFLのCCR3依存的な感染を抑制しない

(3) 血漿あるいは末梢血リンパ球からの遺伝子抽出とHIV-1 env遺伝子のCRトロピズム判定

580検体の血漿あるいは血球より核酸を抽出し、遺伝子の増幅と配列の決定ができたサンプルはRNA由来が約89%、DNA由来が約74%の成功率であった(RNA由来gagおよびenv領域は共に514検体、DNA由来およびgagおよびenv領域はそれぞれ、430および435検体であった)。(表2)。

	RNA		DNA	
	GAG	ENV	GAG	ENV
PCR TRY	580	580	580	580
N.T.	22	22	21	21
	602	602	601	601
PCR(+)	524	516	435	435
PCR(-)	56	64	145	145
PCR(+)%	90.3	89.0	75.0	75.0
SEQ OK	514	514	430	435
SEQ NG	10	2	5	0
SEQ OK%	98.1	99.6	98.9	100.0

表2 解析した検体数とCRトロピズム判定の成功率

今回用いたプライマーセットを用いた場合、プロウイルスDNAからの塩基配列決定までの成功率が若干低く、技術的に検出(判定)がより困難である傾向にある。得られた配列からHIV-1のサブタイプを調べた結果を表3に示す。サブタイプBとAEがそれぞれ約83%と12%で、全体の約95%を占める。

	RNA		DNA	
	GAG	ENV	GAG	ENV
B	83.3	83.7	83.3	82.3
AE	11.7	11.3	12.1	12.6
A	2.7	1.8	2.6	1.8
C	1.2	1.2	0.7	0.9
D	0.6	0.2	0.2	0.2
F	0.4	0.4	0.7	0.7
G	0.2	1.6	0.5	1.4
	100.0	100.0	100.0	100.0

表3 解析したHIV-1検体のサブタイプ

CRトロピズム判定の結果について、False Positive Rate (FPR)を5%として解析した結果のうち(サブタイプBのみ)を表4に示す。血漿RNA由来のサンプルから判定した場合には514検体中70(13.6%)がX4指向性を示した。一方、プロウイルスDNA由来からでは434検体中7(1.7%)がX4指向性を示した。RNAとDNAともに判定可能で

あった検体は384検体であった。このうち、両者とも X4 指向性として判定されたものが、10.9% (42検体)であった。DNA のみ、あるいは RNA のみで X4 であったもの (DNA と RNA 由来において判定が不一致であったもの) は、各々、22 と 10 検体であった。以上のことから、プロウイルス DNA 由来の遺伝子情報の方が、微量ながらも、より高頻度で X4 指向性の *env* を検出する傾向がある。

G2P 判定による Tropism 判定結果 (サブタイプBのみ)

	tropism				
	RNA から判定	DNA から判定	RNA を優先	DNA を優先	両者から判定
R5	444	357	481	469	310
X4	70	77	83	95	42
R5 (R) / X4(D)	-	-	-	-	22
X4 (R) / R5(D)	-	-	-	-	10
合計	514	434	564	564	384

FALSE POSITIVE RATE 5%

表 4 血漿ウイルス RNA あるいはリンパ球プロウイルス DNA を用いた CR トロピズム判定の結果 (サブタイプ B のみ)

次に、HIV-1 サブタイプ B の検体に関して、CR トロピズム判定結果と、血中ウイルス量あるいは CD4 陽性細胞数 (情報が入手できたもののみ解析) との相関性について調べてみた。まず、血中ウイルス量との相関性 (図 4 左) について、RNA あるいは DNA 由来、また R5 あるいは X4 指向性に関わらず、血中ウイルス量の間接値には大きな優位差が認められなかった。しかし、RNA 由来の検体において、血中ウイルス量が低い傾向がある。当然の結果と考察されるが、血中ウイルス量が低い場合には血漿中ウイルス RNA から CR トロピズムの判定は困難にある傾向があると考察できる。さらに、CD4 細胞との相関性についての結果を (図 4 右) の分散図に示す。プロウイルス DNA より判定ができなかった検体に関しては、CD4 細胞数が低い傾向があり、CD4 細胞由来の Total DNA の収率とも関与し、技術的な問題である可能性が考えられる。一方、X4 指向性と判定された検体 (RNA と DNA とともに) は、CD4 細胞数の中間値が低い傾向にある。これらのことは、病態進行とともに CD4 細胞数の減少を伴い (あるいは経年化による)、X4 指向性ウイルスの出現頻度が増すとい考え方を支持している。

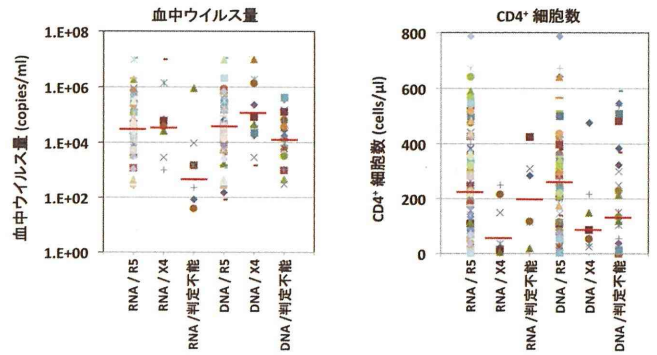


図 4 血漿ウイルス RNA あるいはリンパ球プロウイルス DNA を用いた CR トロピズム判定と、血中ウイルス量/CD4 陽性細胞数の相関性を比較した

上述の CR トロピズムの結果は、サブタイプ B についての検体である。サブタイプ AE の検体に注目すると、57 の検体中 36 検体が X4 指向性 (FPR 5%) であると判定された。AE では、63% の検体が X4 指向性であるという驚くべき結果である。サブタイプ B の 13.6-17.7% に比較すると高い傾向にある。

考察

本研究において、独自の Env CR 指向性 (表現系) を判定する実験系を構築することに成功した。その研究の中で、我々は、HIV-1 サブタイプ B において、R5 指向性の Env は R3 に対しても指向性を示すケースが多く、MVC は R3 依存的なウイルス感染には効果を示さないことが明らかにした。今後、MVC 投与により R3 指向性 Env がどのように変動するのかについても詳細な解析が必要であると考えている。さらに、解析検体数を増やし、R3 と R5 の両指向性を決定する Env のアミノ酸配列 (領域) を特定する必要がある。一方で、HIV-1 サブタイプ B が、R3 指向性をもつ臨床的意義が全く分かっていないため、病歴とも照らし合わせて Env の CR トロピズムを解析することが重要であると考えられる。

Geno2pheno[coreceptor] のデータベースを用いた CR 指向性 (遺伝子学的) 検査において、X4 指向性ウイルスの検出 (安全性を考慮し X4 指向性ウイルスの存在を論ずる) という観点からは、臨床検体としてリンパ球プロウイルス DNA は有用であり、血漿ウイルス (RNA) に置き換えることが可能であると考えられた。特に、血中ウイルス量が低い患者における

(例えば、治療などによる) ケースにおいては、プロウイルス DNA を用いた指向性検査は有効であることが考えられる。しかし、プロウイルス DNA を用いて指向性検査が判定困難なケースでは CD4 細胞数が低い検体が多い傾向である結果から、CD4 細胞数が低い患者検体の場合には血漿中ウイルス RNA からの判定も並行して行った方が良いかもしれない。

本研究の検体においてサブタイプ AE における X4 指向性の検体の割合が 63%と高かった。これは、Geno2Pheno の判定ソフトがサブタイプ B を中心とした Env の情報を基に構築されたものであるため、Geno2Pheno によるサブタイプ AE に対する判定の信頼性が欠如している可能性が考えられる。あるいは、サブタイプ AE には、真に、X4 指向性のものが多い傾向がある可能性も否定できない。これらの可能性を明らかにするために、今後、これらの検体の *env* 遺伝子を用いて実際の表現系を解析する必要がある。

結論

Env 配列の情報を利用した基盤データベースは、CR の指向性を判定する目的だけでなく、患者の病態把握や病態予測にも応用できる可能性がある。例えば、患者の血球中のプロウイルス DNA の *env* 情報と血中ウイルスの Env 情報を比較することにより、ウイルスの免疫からの逃避状況や体内でのウイルスの複製活動状況が的確に判断することに応用できると考えられる。膨大な *env* 遺伝子の情報データベース構築に向けて、今後も継続して *env* 遺伝子配列情報と CR 指向性情報を蓄積して行きたいと考えている。

一連の Env CR トロピズム研究において、サブタイプ B の臨床検体について、R5 指向性 *env* は R3 に対しても指向性をもつタイプがあるという独自の知見を見出し、MVC は CCR3 依存的な HIV-1 の感染に対して有意な効果がないことが明らかにした。R3 指向性ウイルスの動態把握と臨床的意義を解析することは重要であると考えられる。また、今後、MVC 投与により R3 指向性 Env がどのように変動するのかについても詳細な解析をしなければならない。

一方、Geno2pheno[coreceptor] のデータベースを用いた CR 指向性 (遺伝子学的) 検査では、臨床検体として、我々は、プロウイルス DNA の有用性を検

討した。その結果、臨床検体としてリンパ球プロウイルス DNA は有用であり、血漿ウイルス (RNA) に置き換えることが可能であることが明らかになった。ただし、CD4 陽性細胞が低下している患者由来の検体の場合には、血漿中ウイルス由来の RNA を用いた指向性検査も補完的に行った方が確実である可能性を示した。また、サブタイプ AE における Geno2Pheno を用いた指向性検査では解決しなければならない課題が浮き彫りとなった。

健康危険情報

該当なし

知的財産権の出願・取得状況

該当なし

研究発表

1) 原著論文による発表

Iwatani Y, Chan D. S. B, Liu L, Yoshii H, Shibata J, Yamamoto N, Levin J. G, Gronenborn A. M, and Sugiura W, HIV-1 Vif-mediated ubiquitination/degradation of APOBEC3G involves four critical lysine residues in its C-terminal domain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2009) 106:19539-19544

Iwatani Y, Study on molecular mechanism of host defense factor, APOBEC3G, against HIV. J. AIDS (2009) 11:218-222

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. (2010) 90:33-41

Fujisaki S, Yokomaku Y, Shiino T, Koibuchi T, Hattori J, Ibe S, Iwatani Y, Iwamoto A, Shirasaka T, Hamaguchi M, Sugiura W, Outbreak of hepatitis B virus genotype A and transmission of genetic drug resistance in

cases coinfecting with HIV-1 in Japan. *J. Clin. Microbiol.* (2011). 49:1017-1024

Li, J, Hakata, Y, Takeda, E, Liu, Q, Iwatani, Y, Kozak, CA, and Miyazawa M, Two genetic determinants acquired late in Mus evolution regulate the inclusion of exon5, which alters mouse APOBEC3 translation efficiency. *PLoS Pathogens*, in production, 2011

Kitamura, S, Ode, H, and Iwatani Y, Structural features of antiviral APOBEC3 proteins are linked to their functional activities. *Frontiers in Microbiology* 2:258, 2011

松下修三、横山勝、宮内浩典、松田善衛、俣野哲朗、岩谷靖雅、HIV 細胞進入とその防御機序、*日本エイズ学会誌* (12)67-73、2010 年

徳永 研三、足立 昭夫、高折 晃史、中山 英美、岩部 幸枝、岩谷 靖雅、HIV-1 感染阻害因子、*日本エイズ学会誌* (13)56-62、2011 年

岩谷 靖雅、宿主防御因子 APOBEC3 ファミリーと抗レトロウイルス機序、*ウイルス*(61) 61-72、2011 年

2) 口頭発表

国内発表

岩谷靖雅、吉居廣朗、柴田潤子、杉浦互、APOBEC3G のユビキチン化部位と抗レトロウイルス作用。第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月

岩谷靖雅、吉居廣朗、柴田潤子、杉浦互、Vif 依存的な APOBEC3G のユビキチン化部位と抗ウイルス作用。第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会、愛知、2009 年 11 月 2 日

柴田潤子、杉浦互、岩谷靖雅、HsinyTsang、松田昌和、長谷川直樹、任鳳蓉、田中博、宿主内 HIV-1 の共進化変異の解析:Protease 阻害剤耐性変異 D30N/N88D と p1/p6 切断領域の P453L 変異の相互干渉の意義。第 23 回日本エイズ学会学術集会・総

会、愛知、2009 年 11 月

重見麗、服部純子、保坂真澄、伊部史朗、藤崎誠一郎、横幕能行、濱口元洋、内海眞、岩谷靖雅、杉浦互、BED アッセイを用いた名古屋医療センターにおける新規 HIV 感染者の動向調査。第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会、愛知、2009 年 11 月

藤崎誠一郎、横幕能行、服部純子、伊部史朗、内海眞、濱口元洋、岩谷靖雅、杉浦互、HIV/HBV 重複感染者における HBV genotype 解析および薬剤耐性アミノ酸変異の検出。第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会、愛知、2009 年 11 月

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、岩谷靖雅、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・総会、愛知、2009 年 11 月

吉居廣朗、岩谷靖雅、杉浦互、抗 HIV-1 宿主因子 APOBEC3 ファミリーの発現調節に関する研究。第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会、愛知、2009 年 11 月

岩谷靖雅、宿主防御因子 APOBEC3 ファミリーと抗レトロウイルス機序。第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010 年 11 月

松永智子、小島良績、澤崎達也、森下了、佐久間龍太、岩谷靖雅、杉浦互、山本直樹、梁明秀、コムギ無細胞タンパク質合成系を用いた新規ガンマレトロウイルス XMRV プロテアーゼの解析。第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010 年 11 月

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 活性化状態に相関する。第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010 年 11 月

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-1 Vif 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、徳島、2010 年 11 月

岩谷靖雅、北村紳悟、吉居廣朗、前島雅美、横幕能行、杉浦互、HIV-1 Vif 感受性及びウイルス粒子への取り込みに関する APOBEC3C の機能ドメインの探索。第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2010 年 11 月

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・総会、東京、2010 年 11 月

伊部史朗、横幕能行、服部純子、岩谷靖雅、加藤真吾、杉浦 互、抗レトロウイルス療法のモニタリングのための plasma HIV-2 viral load 測定系の確立。第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2010 年 11 月

横幕能行、今村淳治、平野淳、木下枝理、柴田雅章、服部純子、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・総会、東京、2010 年 11 月

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、木下枝理、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・総会、東京、2010 年 11 月

今村淳治、横幕能行、服部純子、岩谷靖雅、杉浦互、新規 HIV/AIDS 診断症例におけるトロピズムに関する検討。第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2010 年 11 月

岩谷靖雅、北村紳悟、前島雅美、伊部史朗、横幕能行、杉浦互、HIV-1 NC は逆転写開始反応を促進する。第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2011 年 11 月

北村紳悟、中島雅晶、大出裕高、前島雅美、伊部史朗、横幕能行、渡邊信久、鈴木淳巨、杉浦互、岩谷靖雅、HIV-1 Vif 感受性に関する APOBEC3C/F のアミノ酸残基の同定。第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2011 年 11 月

伊部史朗、近藤真規子、今村淳治、岩谷靖雅、横幕能行、杉浦互、ウェスタンブロット法により HIV-1/HIV-2 重感染が疑われた症例の精査解析。第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2011 年 11 月

今村淳治、横幕能行、服部純子、岩谷靖雅、杉浦互、薬剤耐性変異を認めた新規未治療 HIV/AIDS 症例の治療と予後の検討。第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2011 年 11 月

横幕能行、鬼頭優美子、今村淳治、大出裕高、服部純子、伊部史朗、岩谷靖雅、杉浦互、HIV プロテアーゼ表現型検査法である VLP ELISA 法の実臨床への応用。第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2011 年 11 月

北村紳悟、中島雅晶、大出裕高、前島雅美、伊部史朗、横幕能行、渡邊信久、鈴木淳巨、杉浦互、岩谷靖雅、Structure-Guided Mutagenesis を用いた APOBEC3C/F の HIV-1 Vif 感受性に関するアミノ酸残基の同定。第 34 回日本エイズ学会・年会、横浜、2011 年 12 月

松岡 和弘、正岡 崇志、田邊 史子、森下 了、澤崎 達也、岩谷 靖雅、杉浦 互、Development of in vitro enzymatic method for assessing susceptibility to HIV-1 reverse transcriptase inhibitors using a wheat-germ cell-free translation system。第 34 回日本エイズ学会・年会、横浜、2011 年 12 月

国際発表

Iwatani Y, Chan DSB, Liu L, Yoshii H, Shibata J, Levin JG, Gronenborn AM, Sugiura W, Four Lysine Residues in the APOBEC3G C-terminal Domain Are Critical for HIV-1 Vif-Mediated Ubiquitination/Degradation. 10th Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance. Richmond, VA. USA, Nov 2009

Iwatani Y, Chan DSB, Liu L, Yoshii H, Shibata J, Levin JG, Gronenborn AM, Sugiura W, Structure-Guided Mutagenesis of APOBEC3G Reveals Critical Lysine Residues for HIV-1 Vif-Mediated Ubiquitination/Degradation. 17th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. San Francisco, CA. USA, Feb 2010

Rouzina I, Qualley DF, Wu T, Iwatani Y, Geertsema H, Chan DSB, Hertz A, Williams MC, Levin JG, Musier-Forsyth K, Nucleic acid interaction kinetics of APOBEC3G investigated using ensemble and single molecule methods. Biophysical Society 54th Annual Meeting, San Francisco, CA, USA, Feb 2010

Ibe S, Yokomaku Y, Shiino T, Tanaka R, Hattori J, Fujisaki S, Iwatani Y, Kato S, Hamaguchi M, Sugiura W, HIV-2 CRF01_AB: First Circulating Recombinant Form of HIV-2. 17th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, San Francisco, CA, USA, Feb 2010

Iwatani Y, Liu L, Chan DS, Yoshii H, Levin JG, Gronenborn AM, Sugiura W, Structure-guided mutagenesis of APOBEC3G reveals four lysine residues critical for HIV-1 Vif-mediated ubiquitination/degradation. Cold Spring Harbor Laboratory 2010 Annual Meeting on Retroviruses, New York, NY. USA, May 2010

Yoshii H, Kitamura S, Sugiura W, Iwatani Y, Constitutive activation of Stat1 causes

spontaneous APOBEC3G expression, which determines permissive phenotype against vif-deficient HIV-1 replication in T-cell lines. Cold Spring Harbor Laboratory 2010 Annual Meeting on Retroviruses, New York, NY. USA, May 2010

Iwatani Y, Chan DS, Liu L, Yoshii H, Shibata J, Levin JG, Gronenborn AM, Sugiura W, Structure-guided mutagenesis of APOBEC3G reveals four lysine residues critical for HIV-1 Vif-mediated ubiquitination/degradation near the C-terminal end. The 5th JAPAN-GERMANY HIV/AIDS Symposium, Tokyo, Japan, May 2010

Iwatani Y, Kitamura S, Nakashima M, Ode H, Saito A, Ibe S, Yokomaku Y, Sugiura W, HIV-1 NC Facilitates Formation of Efficient Initiation Complex for Reverse Transcription, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Sep 2011

Kitamura S, Nakashima M, Ode H, Saito A, Yoshii H, Yokomaku Y, Sugiura W, Iwatani Y, Identification of Critical Residues in APOBEC3C/F for HIV-1 Vif-mediated degradation, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Sep 2011

Hattori J, Shigemi U, Hosaka M, Okazaki R, Iwatani Y, Yokomaku Y, Sugiura W, Characteristics of drug-resistant HIV-1 transmission, Analysis of drug resistance in recently and not-recently infected treatment naïve patients in Japan, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Sep 2011

Ibe S, Masaoka T, Yokomaku Y, Iwatani Y, Sugiura W, Identification of novel drug-resistance mutations selected during abacavir+ Lamivudine+ Lopinavir/R therapy in

HIV-2 CRF01_AB infection, International Union
of Microbiological Societies 2011 Congress,
Sapporo, Sep 2011

4

抗HIV療法の実施状況と副作用調査に関する研究

研究分担者：栗原 健（国立病院機構南京都病院 薬剤科）

研究協力者：畝井 浩子（広島大学病院 薬剤部）

久保 鈴子（財団法人薬剤師研修センター）

小島 賢一（荻窪病院 血液科）

佐藤 麻希（国立病院機構仙台医療センター 薬剤科）

高橋 昌明（国立病院機構名古屋医療センター 薬剤科）

日笠 聡（兵庫医科大学病院 血液内科）

松田 勉（山形大学大学院医学系研究科 医薬品医療機器評価学講座）

吉野 宗宏（国立病院機構大阪医療センター 薬剤科）

脇屋 義文（愛知学院大学薬学部 医療薬学科）

研究要旨

① 患者が自覚する副作用と抗 HIV 薬の服薬がもたらす生活への影響、服薬率並びに服薬を継続するための条件等について調査した。調査期間は 2010 年 2 月～7 月。ブロック拠点病院 4 施設に通院する患者を対象にアンケート用紙を配布し、年齢、性別、HIV-RNA 量、CD4 陽性細胞数、薬の組み合わせ、副作用、過去 1 ヶ月間の服薬状況、服薬困難な理由、服薬を続けるための条件等について調査を行った。アンケート配布枚数は 319 枚、回収は 294 枚で回収率は 92.2%であった。CD4 陽性細胞数が 500 個以上の患者の割合は 2006 年調査の 21%から 27%に増加していた。主な組み合わせは TVD, EFV が 53 例、TVD, ATV, RTV が 39 例、TVD, LPV/r が 25 例であった。自覚若しくは医師から伝えられている副作用があると答えた患者は 49%で 2006 年調査の 67%より減少していた。過去 1 ヶ月以内に飲み忘れがなかった患者は 77%。服薬率が 95%以上であった患者は 89%。服薬率 95%未満の患者は前回調査に比べ 9%と増加しており、1 日 1 回処方増加による服薬率の低下と考えられた。服薬を困難にする理由を聞いたところ、「薬を飲み続けねばならない」をあげる患者が最も多く、次いで「大きくて飲みにくい」、「他人の目が気になる」が上位を占めていた。薬剤の改善によって患者の負担は軽減してきているものの、長期継続を求められる服薬の困難さに変わりはないことから、服薬支援の重要性を再確認することができた。

② 全国のエイズ拠点病院に対し 3 年にわたってアンケート調査用紙を配布し、各拠点病院における採用、在庫、廃棄等について調査した。2009～2011 年の毎年 5 月 1 日～ 5 月 31 日までの期間に受診した患者の、抗 HIV 薬の組み合わせについて調査を行った。2009 年のアンケート用紙の配布は 374 施設、回収は 235 施設で回収率は 62.8%。2010 年のアンケート用紙の配布は 378 施設、回収は 239 施設で回収率は 63.2%。2011 年のアンケート用紙の配布は 380 施設で回収は 240 施設、回収率は 63.2%であった。各施設における抗 HIV 薬の薬剤部での採用率を薬剤別に検討・比較した。各施設の在庫調査結果から、在庫金額等を算出した。調査全施設の総在庫金額は 2009 年が 490,440,943 円、2010 年が 427,220,909 円、2011 年が 448,868,206 円とほぼ横ばいであったものの、病院経営に及ぼす影響は大きいものと考えられた。1 施設あたりの在庫リスクも、2009 年が 2,123,121 円、2010 年が 1,787,535 円、2011 年が 1,870,284 円とほぼ横ばいであった。抗 HIV 薬の組み合わせについて集計した。2009 年の第一位は TVD, LPV/r、第二位は AZT, 3TC, LPV/r、第三位は AZT, 3TC, NFV であった。2010 年の第一位は TVD, EFV、第二位は TDV, ATV, RTV、第三位は TVD, LPV/r であった。2011 年の一位は TVD, EFV、二位は TDV, RAL、三位は TVD, ATV, RTV であった。2009～2011 年の新規処方のバックボーンは合剤の使用が標準的であり、年々 TDF の処方数は増加傾向にあった。キードラッグはガイドライ

ンの第一推奨薬が分散して処方されていたが、2011年のキードラッグはRALとDRV+RTVが増加した。今後、RALとDRV+RTVの処方頻度はさらに増加するものと思われる。

研究目的

本研究は、国内で実施されている抗HIV療法の組み合わせと薬剤供給等の現状調査を実施し、患者に必要な的確な薬剤情報提供のあり方と、より効果的な服薬支援について検討することを目的とする。

① 抗HIV薬の服薬と副作用に関する調査

近年、抗HIV療法の進展はめざましく、Highly active anti-retroviral therapy (HAART) が主流となった1996年以降、HIV感染症患者の死亡率は急激に減少し、治療は飛躍的に改善したものの、現在治療に使われている抗HIV薬の作用は、ウイルスの増殖を強力に抑制するものであり根治療法ではない。現在の治療法では患者は一生、服薬継続する必要がある。抗HIV療法が成功するための服薬は、時間を守った100%に近い服薬率が求められる。さらに、中途半端な服薬は薬剤耐性を誘導し、薬剤によっては交差耐性の問題があるため、治療に失敗した後の薬剤選択等に影響する可能性は否定出来ない。確実性を求められる抗HIV療法の服薬の問題は、患者に大きなストレスを与えている。

海外では患者と医師の視点の相違について、治療薬の服薬行動を維持する上での障害や、服薬アドヒアランスを維持するための方策について研究された先行研究が示されているが、国内において服薬と副作用に関する調査研究は少ない。本調査では患者が自覚する副作用と服薬率、抗HIV薬の服薬がもたらす生活への影響、服薬率、服薬を継続するための条件等について調査を行うことで、変化する患者ニーズを把握し、より効果的な服薬援助の方法について検討した。

② 拠点病院における抗HIV療法と薬剤関連調査

拠点病院における抗HIV薬の組み合わせと、薬剤採用並びに院外処方箋発行状況を調査し、より充実した抗HIV療法への支援を目的にアンケート調査を実施した。過去に実施した調査との比較を踏まえ検討することを目的とする。

研究方法

① 抗HIV薬の服薬と副作用に関する調査

アンケートの内容について検討し調査用紙と患者向け説明文書を作成。研究分担者の施設に設置された倫理委員会の審議を受け、研究協力者の4施設で再度倫理委員会等の審議を経て、平成22年2～7月にアンケート調査用紙の配布を実施した。抗HIV薬を服薬する患者を対象に、説明文書を用い研究方法等について説明し、アンケート調査用紙を患者に手渡す方法をとった。調査用紙には個人情報を含まないことから、同意書の取得は行わず、アンケート調査用紙の返送をもって患者の同意を得たこととした。年齢、性別、HIV-RNA量、CD4陽性細胞数、薬の組み合わせ、副作用、過去1ヶ月間の服薬状況、服薬困難な理由、服薬を続けるための条件等について調査を行った。また、今回の研究では2002年、2006年に実施した調査と比較対照し検討を行った。

② 拠点病院における抗HIV療法と薬剤関連調査

全国のエイズ拠点病院に対し3年にわたってアンケート調査用紙を配布し、各拠点病院における採用、在庫、廃棄等について調査した。2009～2011年の毎年5月1日～5月31日までの期間に受診した患者の、抗HIV薬の組み合わせについて調査を行った。

研究結果

① 抗HIV薬の服薬と副作用に関する調査

調査対象を年齢別、男女別、基礎疾患別に分類した結果は(図1)のとおり。

