201124018A

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検出法を用いた微少集族薬剤耐性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２３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２４（２０１２）年　5月

目　　次

Ⅰ．総括研究報告

高感度薬剤耐性HIV検出法を用いた微少集族薬剤耐性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--- 10

研究分担者：杉浦　亙

III. 研究成果の刊行に関する一覧表-- 22

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２３年度　総括研究報告書

高感度薬剤耐性 HIV 検出法を用いた微少集族薬剤耐性 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　抗 HIV 治療(ART)を受けている HIV/AIDS 患者血中には様々な薬剤耐性変異を獲得した HIV が存在するが、その一部は minority population（微少集族）として潜在していると報告されている。近年、ダイレクトシーケンス法（従来法）では検出されない微少集族として存在する薬剤耐性 HIV が抗 HIV 療法(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。今年度はプロテアーゼ阻害剤(PI)耐性変異である M46I/L を高感度で検出可能な高感度薬剤耐性 HIV 検出法（高感度法）を開発した。CDC ですでに開発されている L90M 検出系と合わせてこの 3 変異の治療中患者血中に存在する微少集族薬剤耐性変異の検出を試みた。5 年以上に渡り ART を受けた 3 症例(Case A, Case B, Case C)を高感度法で解析した結果、3 症例全てから PI 耐性変異を微少集族として検出した。また、高感度法で得られた M46I/L amplicon を解析した結果、Case B では微少集族として存在していた M46L に I54V, A71V がリンクしていた。これらの薬剤耐性変異はどれも従来法では検出されず、複数の薬剤耐性変異が微少集族として存在していた事が示された。また Case C では微少集族として存在していた M46I に G48V がリンクしており、この G48V も微少集族として患者血中に存在していた。

A. 研究目的

抗 HIV 薬剤の投与を受けている HIV/AIDS 患者血中には投与されている薬剤に対して耐性を持つ HIV が存在するが、その中の一部は minority population（微少集族）として潜在していると報告されている。近年になり微少集族として存在する薬剤耐性 HIV が抗 HIV 療法(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。本研究では 20%以下の比率で存在する薬剤耐性 HIV 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 HIV 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。またプロテアーゼ阻害剤(PI)の耐性変異である M46I/L を検出可能な高感度法の開発を試みる。

B. 研究方法

プロテアーゼ阻害剤（PI）に対する耐性変異であるM46I/Lを検出可能な高感度薬剤耐性HIV検査法（高感度法）の開発を試みた。M46IとM46Lを特異的に検出する薬剤耐性特異的プライマーを各々設計した。またプライマー結合部位の遺伝子多系を考慮して、M46Lは3種類のM46L検出用プライマーを作製し混合してM46L特異的検出プライマーとした。検出用プローブは既にCDCで開発されたL90M検出用プローブを用いた。

設計したM46I/L検出系の理論的検出限界を測定するために、HXB2のPR~RT領域をクローニングしたベクターを作製しWTクローンとした。またM46IあるいはM46Lをsite-direct mutagenesisの手法でWTクローンのPR~RT領域に導入し、これをM46Iクローン、M46Lクローンとした。構築したWTクローンとM46IあるいはM46Lクローンを100:1から0.0001:99.9999の範囲で段階的に10倍希釈した希釈系列を作製し、M46IあるいはM46Lクローンの混合比率をどこまで低くしてもM46IあるいはM46Lが検出可能か解析し、理論的検出限界を求めた。

臨床検体での特異性を確認するために、薬剤耐性変異を持たない新規未治療患者12例の検体からPR～RT領域をクローニングし、43個の臨床検体由来で薬剤耐性変異の無いPR～RT配列を持つ臨床検体由来WTクローンを作製した。また、M46I変異をPR領域に持つ臨床検体を55例、M46Lを持つ臨床検体を22例選択し、M46IあるいはM46L特異的プライマーで解析しΔCt値を比較した。

平成21年度に逆転写酵素阻害剤の耐性変異について解析した3症例（Case A, Case B, Case C）（図1）について、今回開発したM46I/L検出プライマーとCDCで開発されたL90M検出プライマーを用いて微少集族のM46I/LとL90Mの検出を試みた。また高感度法によって微少集族として検出されたM46I/L ampliconのダイレクトシーケンス解析を行い、M46I/Lにリンクして存在する薬剤耐性変異の有無を解析した。

（倫理面への配慮）

本研究では感染者血漿を使用するため、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

M46I検出用・M46L検出用の高感度法に用いるプライマーを新たに開発した。WTクローンとM46I、あるいはM46Lクローンを段階的に100:0から0.0001:99.9999まで10倍ずつ混合比率を変えて調製したサンプルを調製し、このサンプルをM46IあるいはM46L高感度検出法により解析した。解析により得られたΔCt値と希釈倍率とをグラフにプロットし、どの希釈倍率まで直線的な関係が得られるか解析した結果、クローンを用いて計算される理論的検出限界はM46Iで0.04%、M46Lで0.03%だった（図2）。

未治療患者由来の薬剤耐性変異の無い臨床検体由来WTクローン42個のM46IのΔCt平均値は18.67、M46Lで18.98、M46Iを持つ臨床検体55例のΔCt平均値は4.34、M46Lを持つ臨床検体22例のΔCt平均値は5.26で、M46I、M46Lとも変異無・変異有のサンプル間で大きな差があり、変異の有無をΔCt値から判別するのは容易だった。変異無・変異有の臨床検体のΔCt値の差から、M46IのCut off値は11、M46LのCut off値は9と決定した。臨床検体のCut off値と理論的定量限界の結果から、臨床検体の定量限界はM46Iでは0.54%、M46Lでは4.01%と計算された（図2）。開発したM46I/L検出用高感度法と既に開発されているL90M検出用高感度法を用いて、長期間ARTを受けている患者3症例についてPI耐性変異について解析を行った。その結果、Case Aでは

M46I（図 3）、Case B では M46I/L と L90M（図 4-1、4-2）、Case C では M46I と L90M が微少集族として検出された（図 5）。Case B の微少集族薬剤耐性変異は、ダイレクトシーケンス法の解析では消失した後も 1 年以上に渡って M46I が患者血中に存在していた。Case A,では M46I が、Case B では M46I、L90M が、ダイレクトシーケンス法で検出される以前から既に微少集族として存在していた。高感度法によって得られる M46I-あるいは M46L-amplicon は、プロテアーゼ領域の 46 番目のアミノ酸から 88 番目のアミノ酸までの領域を増幅しているため、この領域をダイレクトシーケンス法で解析して、M46I あるいは M46L リンクして存在する別の耐性変異を解析する事が可能である。この Case B から微少集族として検出された M46L amplicon を解析した結果、この amplicon から I54V と A71V も検出され、これらの変異も M46L と同じゲノム上でリンクし、微少集族として患者血中に存在していた事が示された（図 4-2)。また Case C で微少集族として検出された M46I amplicon をダイレクトシーケンス法で解析した結果、G48V が M46I と同じゲノム上でリンクし、微少集族として患者血中に存在していた（図 5)。

D. 考察

今年度の研究で新たに開発した M46I/L の高感度法は、理論的検出限界が 0.04%と 0.03%、臨床検体での検出限界が M46I で 0.54%、M46L で 4.01%で、微少集族を検出するには十分な感度を有していた。この高感度法で臨床検体を解析した結果、解析した 3 症例全てから PI に対する耐性変異が微少集族として検出された。平成 21 年から 22 年にかけて解析した逆転写酵素阻害剤に対する耐性変異も高頻度で検出されていることから、PI に対する耐性変異も微少集族として存在する場合が少なくないと考えられた。Case A と Case C では M46I や L90M がダイレクトシーケンス法で検出される前の時点から検出されており、高感度法はダイレクトシーケンス法よりも正確に薬剤耐性の動態を解析できると思われる。また Case B では M46I がダイレクトシーケンス法では 1 年以上検出されない期間中も高感度法では検出されており、一度獲得された耐性変異は患者血中に長期間ある程度の比率で存在し続けることが示された。また高感度法で得られる定量 PCR amplicon は平成 22 年度に行った逆転写酵素阻害剤耐性変異の T215F/Y と同様にプロテアーゼ領域の広い範囲を増幅しており、今後 amplicon のシーケンス解析を行い M46I/L、L90M にリンクして存在する薬剤耐性変異の解析や系統樹解析も可能である。解析した Case B で M46I-amplicon にリンクして、M46L と同様に微少集族として存在する I54V、A71V を検出した。また Case C でも、M46I-amplicon とリンクして同じく微少集族として存在する G48V を検出した。M46L や M46I にリンクして存在していたこれらの薬剤耐性変異は従来法では検出されておらず、高感度法の amplicon を解析することで、簡便に微少集族として存在する薬剤耐性変異を正確に把握する事が可能である。L90M-amplicon でも M46I/L-amplicon と同様にリンクしている薬剤耐性変異の解析が可能であり、今後 amplicon の解析からさらに詳細な薬剤耐性変異の情報が得られる事が期待される。

E. 結論

PI 耐性変異の M46I/L の高感度検査法を確立した。理論的定量限界は M46I で 0.04%、M46L で 0.03%だった。臨床検体の定量限界は理論的定量限界とそれぞれの変異の Cut off 値から M46I で 0.54%、M46L で 4.01%と計算された。薬剤耐性変異を持たない臨床検体と M46I、M46L を持つ臨床検体の ΔCt 値の解析から特異性は十分に認められた。長期間に渡って ART を行っている 3 症例について M46I/L に加えて L90M についても高感度法による解析を行った結果、3 症例とも PI 耐性

変異が微少集族として検出された。Case A と Case C ではダイレクトシーケンス法で検出される以前から M46I と L90M がすでに患者血中に微少集族として存在していた。Case B では、ダイレクトシーケンス法では M46I と M46L が検出されない期間もこれらの変異が微少集族として 1 年以上に渡って患者血中に存在していたことが示された。Case B の M46L-amplicon のダイレクトシーケンス法による解析から、I54V と A71V が M46L とリンクして微少集族として存在していた。また Case C では G48V が M46I とリンクして微少集族として患者血中に存在していた。

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, Walid Heneine, Jeffrey A. Johnson, and Wataru Sugiura. Highly-sensitive allele-specific PCR demonstrated that minority-population of drug resistance mutations may affect ART in ART-treated patients. 2011 年 7 月、ローマ.

国内

1) 西澤雅子、Jeffrey A. Johnson、Walid Heneine、杉浦亙. 定量 PCR を応用した高感度薬剤耐性検査法による抗 HIV 治療患者からの微少集族薬剤耐性変異検出の試み. 第 25 回日本エイズ学会、2011 年 12 月、東京.
2) 服部純子、椎野禎一郎、潟永博之、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、渡邉 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 亙. 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 25 回日本エイズ学会、2011 年 12 月、東京.
3) 田中勇悦、児玉晃、西澤雅子、杉浦亙、田中礼子. CXCR4 架橋による CXCR4 および CCR5 親和性 HIV-1 の感染制御. 2011 年 12 月、東京.

研究分担者

杉浦　亙

論文発表

欧文

1) Hirano A, Ikemura K, Takahashi M, Shibata M, Amioka K, Nomura T, Yokomaku Y, Sugiura W. Lack of Correlation Between UGT1A1*6, *28 Genotypes, and Plasma Raltegravir Concentrations in Japanese HIV Type 1-Infected Patients. AIDS Res Hum Retroviruses. 2011 Nov 9. [Epub ahead of print]
2) Revell AD, Wang D, Boyd MA, Emery S, Pozniak AL, De Wolf F, Harrigan R, Montaner JS, Lane C, Larder BA; RDI Study Group*. The development of an expert system to predict virological response to HIV therapy as part of an

online treatment support tool. AIDS. 2011 Sep 24;25(15):1855-63. (* RDI Study Group のメンバとして参加)

3) Yotsumoto M, Shinozawa K, Yamamoto Y, Sugiura W, Miura T, Fukutake K. Mutations to the probe of Cobas TaqMan HIV-1 ver. 1.0 assay causing undetectable viral load in a patient with acute HIV-1 infection. J Infect Chemother. [Epub ahead of print]

4) 4) Yoshida I, Sugiura W, Shibata J, Ren F, Yang Z, Tanaka H. Change of positive selection pressure on HIV-1 envelope gene inferred by early and recent samples. PLoS One. 6(4):e18630, 2011.

5) Ibe S, Sugiura W. Clinical significance of HIV reverse transcriptase inhibitor-resistant mutations. Future Microbiology. 6(3):295-315, 2011.

6) Junko Shibata, Wataru Sugiura, Hirotaka Odee, Yasumasa Iwatani, Hironori Sato, Hsinyi Tsang, Masakazu Matsuda Naoki Hasegawa, Fengrong Ren and Hiroshi Tanaka. Within-host co-evolution of Gag P453L and protease D30 N/N88D demonstrates virological advantage in a highly protease inhibitor-exposed HIV-1 case: Antiviral Research. 90(1):33-41, 2011.

7) 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 coinfected with HIV-1 in Japan. J Clin Microbiol. 49(3):1017-24, 2011.

8) 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 Antivir. Res. 90(1):33-41, 2011.1)

和文

1) 杉浦　亙. HIV の指向性検査（トロピズムアッセイ）. Confronting HIV.40:1-3.2011.

2) 杉浦　亙、服部純子. HIV 薬剤耐性変異の動向 2003～2010 年. 病原微生物検出情報.32(10):8-9.2011.

2) 口頭発表

（国際学会）

1) Miyazaki N, Fujii T, Iwamoto A, Matsushita S, Sugiura W. Potential of recent antiretroviral treatments in controlling treatment-naive and drug -resistant HIV cases in Japan. International Work shop on HIV & Hepatitis Virus Drug Resistance an Curative Strategies. (Mexico) 2011.6

2) Sugiura W. Effects of HIV integrase polymorphisms on raltegravir–resistance susceptibility. 6th IASConference on HIV Pathogenesis Treatment and Prevention. (ROME,ITALY) 2011.7

3) Hattori J, Shao W, Shigemi U, Hosaka M, Okazaki R, Yokomaku Y, Iwatani Y, Maldarelli F, Sugiura W. Molecular epidemiology of transmitted drugresistant HIV among newly diagnosed individuals in Japan. 6th International Workshop on HIV Transmission Principles of Intervention (ROME,ITALY) 2011.7

4) Hattori J, Shigemi U, Hosaka M, Okazaki R, Sugiura W. Characteristics of Drug-Resistant HIV-1 Transmission: Analysis of Drug Resistance in Recently and Not-Recently Infected Treatment-Naive Patients in Japan. XV International Congress of Virology（札幌）2011.9

5) 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. XV International Congress of Virology（札幌）2011.9

6) Matsuoka K, Masaoka T, Tanabe F,Morishita R, Sawasaki T, Iwatani Y, Sugiura W. Development of in vitroenzy matic method for assessing susceptibility to HIV-1 reverse transcriptase inhibitors using a wheat-germ cell-free translation system. Protein Island Matsuyama International Symposium 2011（愛媛・松山）2011.9

7) Ibe S, Yokomaku Y, Maejima M, Iwatani Y, Sugiura W. Drug-resistance profiles of HIV-2 CRF01_AB-infected case during abacavir +lamivudine+lopinavir/r therapy. 6th German- Japanese HIV Symposium (Bochum, Germany) 2011, 10

8) Suzuki K, Ode H, Fujino M, Kimura Y, Masaoka T, Hattori J, Yokomaku Y, Iwatani Y, Suzuki A, Watanabe N, Sugiura W. Enzymatic and Structural

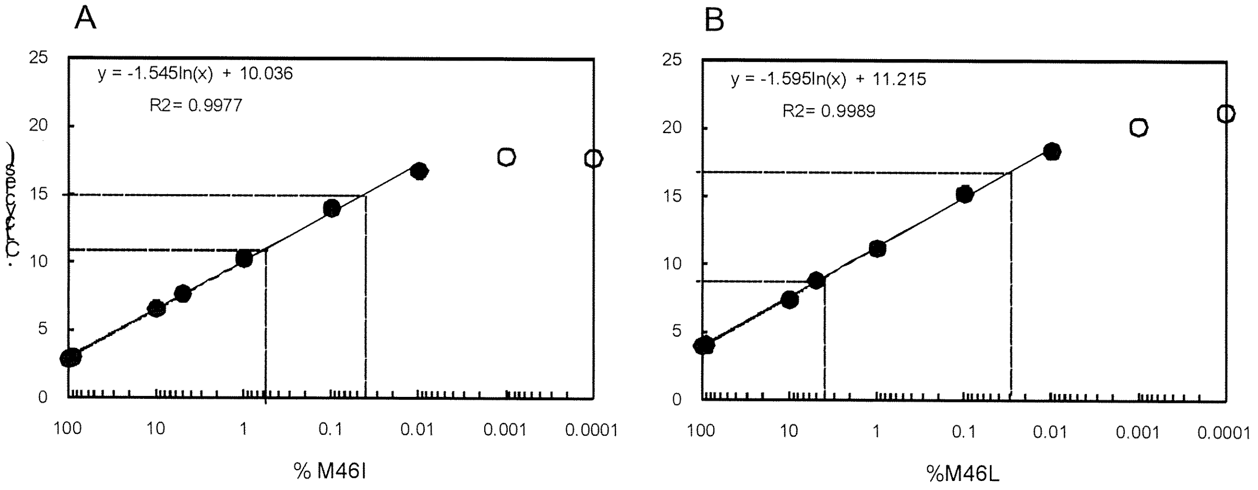
9) Analyses of DRV-resistant HIV-1 Protease.The 12th SADR (Hershey, Pennsylvania, USA) 2011.11

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

なし

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	微少集族HIV(RT)
Case A	B	5年5カ月	35	5回	K103N
Case B	B	8年8カ月	32	4回	Y181C, K103N
Case C	B	7年11カ月	15	4回	なし

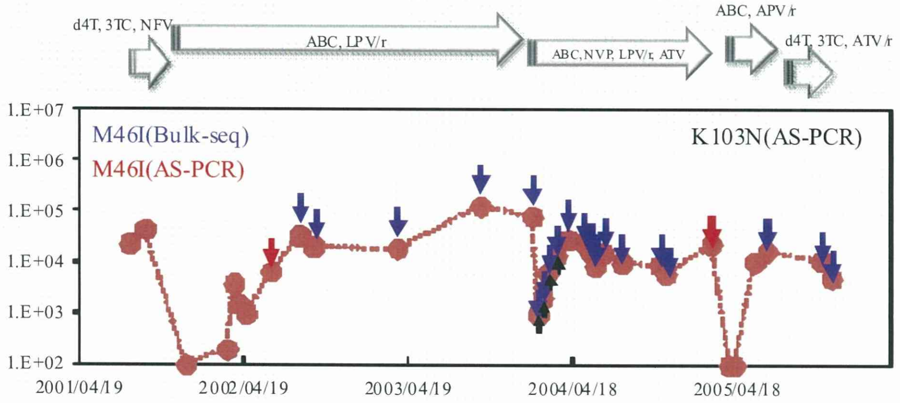
図 1



	ΔCt cutoff (# cycles)	Cutoff mean % mutant tested(%)	Sensitivity, #pos/mutants tested (%)	Mean ΔCt (range) of wildtype sequences wildtype n = 42	Mean ΔCt (range) of mutant samples	False-negatives ΔCts
M46I	11.0	0.54	55/55(100)	18.67(16.39-26.65)	4.34(1.39-10.1)	-
M46L	9.0	4.01	22/22(100)	18.98(15.43-23.43)	5.26(0.88-8.95)	-

図 2

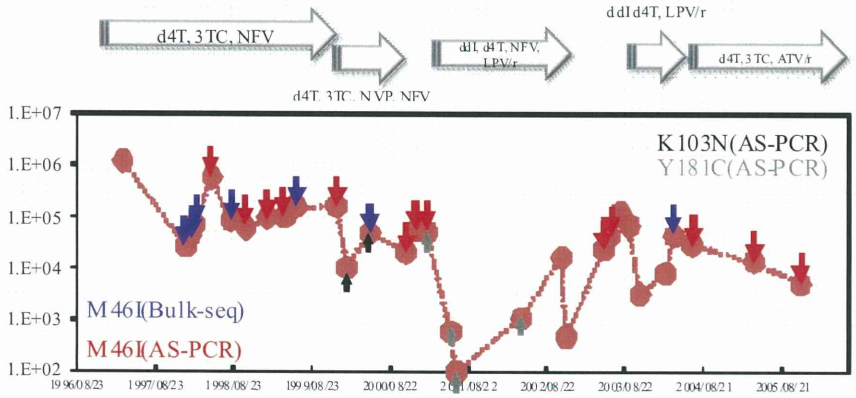
患者検体からの微少な薬剤耐性HIV検出(Case A)



ダイレクトシーケンス法で検出されるより約2か月前からM46Iが微少集族として検出された。またダイレクトシーケンス法でM46Iが検出されなくなった3カ月後もM46Iは微少集族として存在していた。M46Lは解析期間を通じて検出されず、L90Mは解析期間中のサンプル全てで検出された。

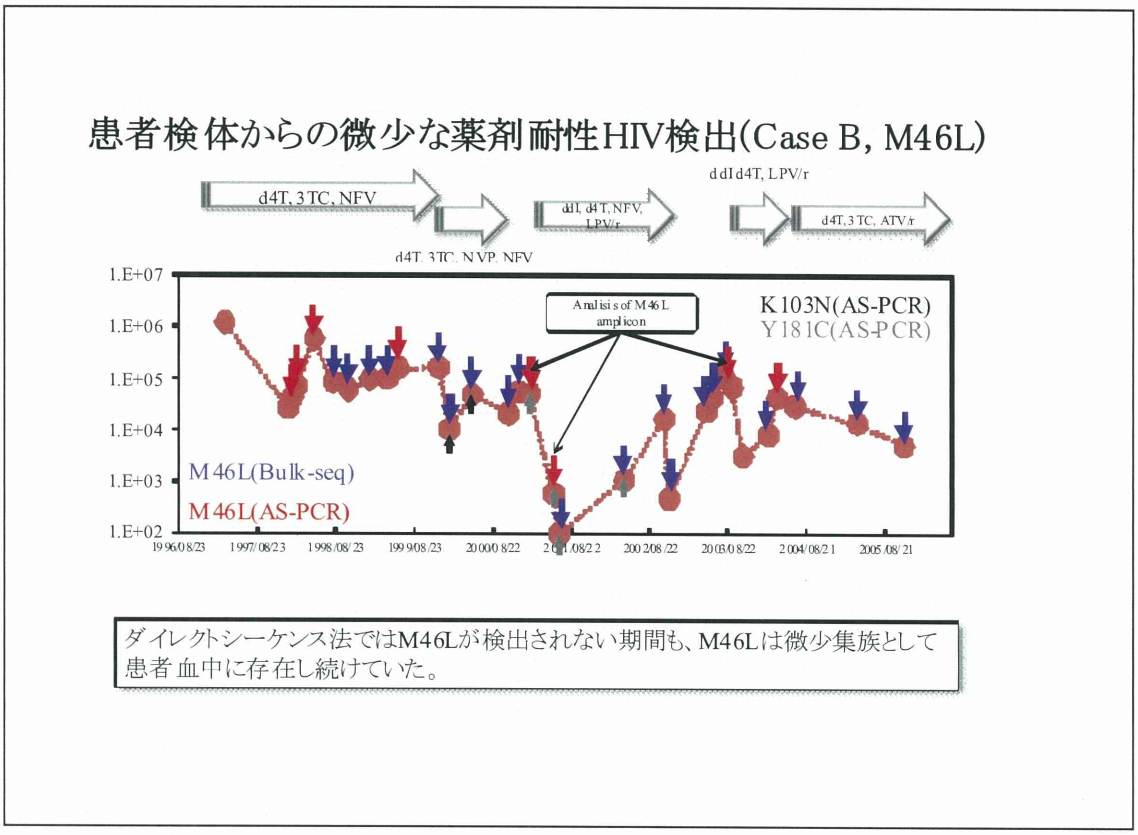
図 3

患者検体からの微少な薬剤耐性HIV検出(Case B, M46I)



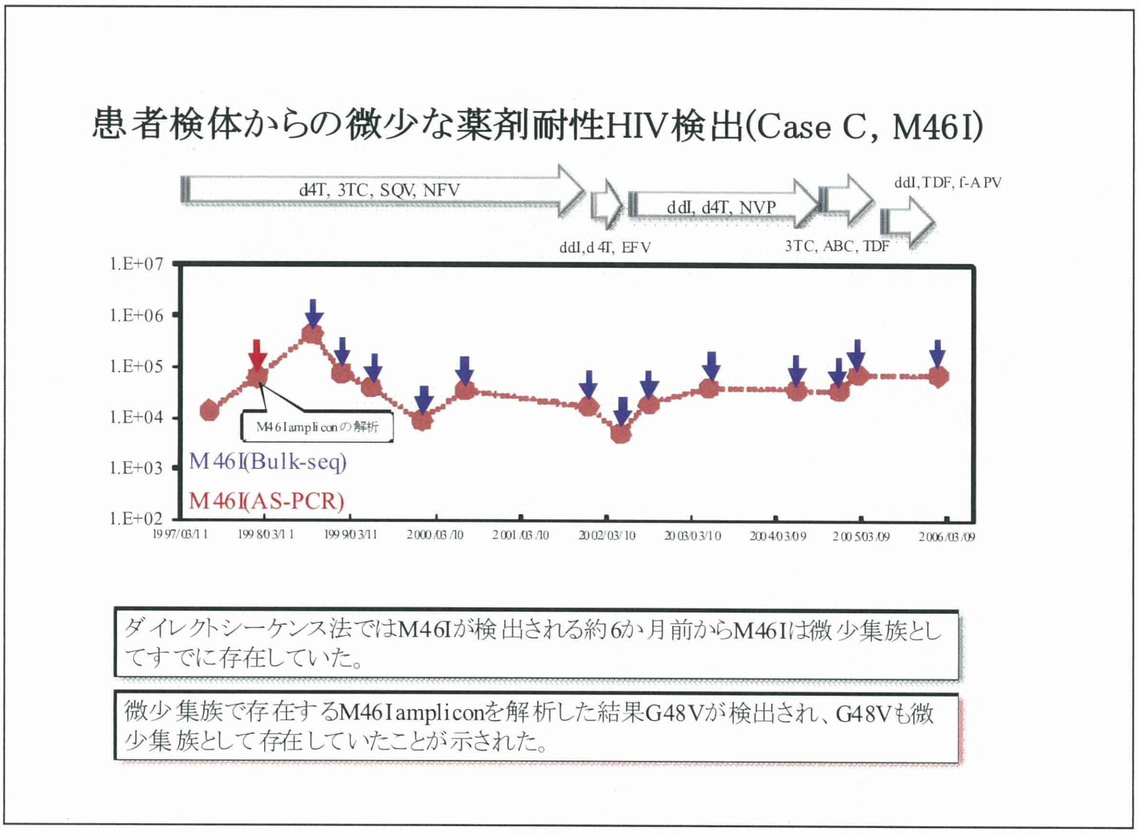
ダイレクトシーケンス法ではM46Iが検出されない期間も、4カ月から6カ月に渡ってM46Iが微少集族として存在していた。

図 4-1



患者検体からの微少な薬剤耐性HIV検出(Case B, M46L)
d4T, 3TC, NFV
d4T, 3TC, NVP, NFV
ddI, d4T, NFV, LPV/r
ddI d4T, LPV/r
d4T, 3TC, ATV/r
1.E+07
1.E+06
1.E+05
1.E+04
1.E+03
1.E+02
Analisis of M46L amplicon
K103N(AS-PCR)
Y181C(AS-PCR)
M46L(Bulk-seq)
M46L(AS-PCR)
ダイレクトシーケンス法ではM46Lが検出されない期間も、M46Lは微少集族として
患者血中に存在し続けていた。

図 4-2



患者検体からの微少な薬剤耐性HIV検出(Case C, M46I)
d4T, 3TC, SQV, NFV
ddI, d4T, EFV
ddI, d4T, NVP
3TC, ABC, TDF
ddI, TDF, f-APV
1.E+07
1.E+06
1.E+05
1.E+04
1.E+03
1.E+02
M46I ampliconの解析
M46I(Bulk-seq)
M46I(AS-PCR)
ダイレクトシーケンス法ではM46Iが検出される約6か月前からM46Iは微少集族とし
てすでに存在していた。
微少集族で存在するM46I ampliconを解析した結果G48Vが検出され、G48Vも微
少集族として存在していたことが示された。

図 5

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

平成２３年度　分担研究報告書

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　治療前の薬剤耐性検査は効果的な抗 HIV 治療(ART)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）が広く用いられ、一定の成果を上げてきた。しかし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最近になって報告された。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高感度薬剤耐性検査法（高感度法）で解析するために、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で、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 6 症例について、治療期間中における薬剤耐性変異の変化や臨床経過に関するデータ提供を行った。

A. 研究目的

ダイレクトシーケンス法（従来法）による薬剤耐性検査は、抗 HIV 治療(ART)の最適化に重要な役割を果たしている。しかし従来法では検出できない微少な集族で患者血中に存在する薬剤耐性 HIV が ART に影響する可能性が示唆される。本研究では、定量 PCR の原理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 HIV を検出し、ART に及ぼす影響や投与薬剤と微少集族薬剤耐性 HIV の経時的な動態について解析する。そのためには、ART を受けた期間中に投与された薬剤や、その薬剤の効果を判断するための患者血中のウイルス量(VL)の情報が経時的に正確に収集されている患者検体が必要となる。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。これらの患者検体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

今年度は PI 耐性変異の M46I/L 及び L90M の 3 変異について高感度法で解析するため、平成 22 年度に解析対象とした 3 症例についてこれら 3 変異を含む PI 耐性変異に関する情報と VL の経時的変化・投与薬剤履歴に関する情報提供を行った。また、平成 21 年度に解析を行った 3 症例について

も逆転写酵素阻害剤・PI耐性変異に関する情報収集・提供を行った。

（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年度から22年度にかけて、逆転写酵素阻害剤耐性変異について解析したCase A～Case Fの6症例は全てPIを含むART治療歴があった。高感度法解析対象としたM46I, M46L,L90Mの3変異は全て、あるいは一部が6症例に存在していた（表1～6)。今回調査した治療期間中の解析ポイントで3変異全てが従来法で検出された症例は無かった。治療薬剤の変更履歴とM46I, M46L, L90Mの動態の関連性は、従来法ではCase A,B,C,E及びFの5症例では明確には観察されなかった。関連Case Dでのみ、SQV/r投与開始後にL90Mが速やかに従来法で検出された（表4)。しかし他の5症例に関してもPI投与開始後や、PI変更後に数カ月～1年の間にこれらの変異が出現あるいは消失する現象が観察された。

M46I, M46L及びL90M以外のPI耐性変異の情報は、高感度法で得られるM46I, M46L-ampliconのダイレクトシーケンス解析を行ったCase B, Case Cで調査した。この2症例はPIの耐性パターンにかなり変化があり、またCase BではVLが低下した時点でPI耐性変異が従来法では消失していた（表2,3)。

D. 考察

平成21年度から22年度にかけて解析を続けてきた6症例には、いずれも高感度法で解析対象としたM46I/L, L90MのPI耐性変異が従来法で検出されており、高感度法での検証に有効と思われた。また、薬剤変更によってVLが下がった時点でほぼすべてのPI耐性変異が消失、また再出現していたCase Bでは、PI耐性変異が消失した期間に微少集族としてPI耐性変異が潜在しているかどうか検討するのに有効な症例と思われる。HIV感染患者にARTを行った場合、VLの低下とともに従来法で検出される薬剤耐性変異も減少する傾向はよく見られることから、このような場合の微少集族薬剤耐性変異の動態を解析するために、薬剤変更とVLの変化、及び従来法で検出される薬剤耐性変異のパターンの変化がみられる症例を重点的に解析する事は、高感度法による薬剤耐性検査を検証するために重要である。

E. 結論

平成21年度から22年度にかけて、高感度法で逆転写阻害剤耐性変異の耐性変異を検査した6症例について、PI耐性変異についての情報収集・提供を行った。これら6症例はすべてPI投与歴があり、またPIに対する耐性変異が従来法で検出されていた。高感度法で解析対象としたPI耐性変異M46I/L, L90Mの3変異も全て、またはいずれかがこの6症例から検出されていた。また、これらの6症例のうちCase B, Case Cでは薬剤変更によるVLの低下、及び従来法でのPI耐性変異の消失といった現象が確認され、従来法で検出限界以下となっている微少集族薬剤耐性変異の動態解析に有効だった。

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) Hirano A, Ikemura K, Takahashi M, Shibata M, Amioka K, Nomura T, Yokomaku Y, Sugiura W. Lack of Correlation Between UGT1A1*6, *28 Genotypes, and Plasma Raltegravir

Concentrations in Japanese HIV Type 1-Infected Patients. AIDS Res Hum Retroviruses. 2011 Nov 9. [Epub ahead of print]

2) Revell AD, Wang D, Boyd MA, Emery S, Pozniak AL, De Wolf F, Harrigan R, Montaner JS, Lane C, Larder BA; RDI Study Group*. The development of an expert system to predict virological response to HIV therapy as part of an online treatment support tool. AIDS. 24;25(15):1855-63, 2011.(* RDI Study Group のメンバとして参加)

3) Yotsumoto M, Shinozawa K, Yamamoto Y, Sugiura W, Miura T, Fukutake K. Mutations to the probe of Cobas TaqMan HIV-1 ver. 1.0 assay causing undetectable viral load in a patient with acute HIV-1 infection. J Infect Chemother. 17(6):863-5,2011.

4) Yoshida I, Sugiura W, Shibata J, Ren F, Yang Z, Tanaka H. Change of positive selection pressure on HIV-1 envelope gene inferred by early and recent samples. PLoS One. 6(4):e18630, 2011.

5) Ibe S, Sugiura W. Clinical significance of HIV reverse transcriptase inhibitor-resistant mutations. Future Microbiol. 6(3):295-315, 2011.

6) Shibata J, Sugiura W, Ode H, Iwatani Y, Sato H, Tsang H, Matsuda M, Hasegawa N, Ren F and Tanaka H. Within-host co-evolution of Gag P453L and protease D30 N/N88D demonstrates virological advantage in a highly protease inhibitorexposed HIV-1 case: Antivir. Res. 90(1):33-41, 2011.

7) 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 Bvirus genotype A and transmission of genetic drug resistance in cases coinfected with HIV-1 in Japan. J Clin Microbiol. 49(3):1017-24, 2011.

和文

1) 杉浦　亙. HIV の指向性検査（トロピズムアッセイ）. Confronting HIV.40:1-3.2011.

2) 杉浦　亙、服部純子. HIV 薬剤耐性変異の動向 2003～2010 年. 病原微生物検出情報.32(10):8-9.2011.

2. 学会発表

海外

1) Miyazaki N, Fujii T, Iwamoto A, Matsushita S, Sugiura W. Potential of recent antiretroviral treatments in controlling treatment-naive and drug -resistant HIV cases in Japan. International Work shop on HIV & Hepatitis Virus Drug Resistance an Curative Strategies. (Mexico) 2011.6

2) Sugiura W. Effects of HIV integrase polymorphisms on raltegravir–resistance susceptibility. 6th IASConference on HIV Pathogenesis Treatment and Prevention. (ROME,ITALY) 2011.7

3) Hattori J, Shao W, Shigemi U, Hosaka M, Okazaki R, Yokomaku Y, Iwatani Y, Maldarelli F, Sugiura W. Molecular epidemiology of transmitted drugresistant HIV among newly diagnosed individuals in Japan. 6th International Workshop on HIV Transmission Principles of Intervention (ROME,ITALY) 2011.7

4) Hattori J, Shigemi U, Hosaka M, Okazaki R, Sugiura W. Characteristics of Drug-Resistant HIV-1 Transmission: Analysis of Drug Resistance in Recently and Not-Recently Infected Treatment-Naive Patients in Japan. XV International Congress of Virology（札幌） 2011.9

5) 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. XV International Congress of Virology（札幌） 2011.9

6) Matsuoka K, Masaoka T, Tanabe F,Morishita R, Sawasaki T, Iwatani Y, Sugiura W. Development of in vitroenzy matic method for assessing susceptibility to HIV-1 reverse transcriptase inhibitors using a wheat-germ cell-free translation system. Protein Island Matsuyama International Symposium 2011（愛媛・松山） 2011.9

7) Ibe S, Yokomaku Y, Maejima M, Iwatani Y, Sugiura W. Drug-resistance profiles of HIV-2 CRF01_AB-infected case during abacavir +lamivudine+lopinavir/r therapy. 6th German- Japanese HIV Symposium (Bochum, Germany) 2011, 10

8) Suzuki K, Ode H, Fujino M, Kimura Y, Masaoka T, Hattori J, Yokomaku Y, Iwatani Y, Suzuki A, Watanabe N, Sugiura W. Enzymatic and Structural

9) Analyses of DRV-resistant HIV-1 Protease.The 12th SADR (Hershey, Pennsylvania, USA) 2011.11

国内

1) 伊部史朗、横幕能行、服部純子、杉浦 亙：抗レトロウイルス治療中の HIV-2CRF01_AB 感染症例に認めた薬剤耐性変異　第 85 回日本感染症学会総会（東京）2011 年 4 月

2) 今村淳治、横幕能行、服部純子、岩谷靖雅、杉浦 亙：新規 HIV/AIDS 診断症例におけるトロピズムに関する検討　第 85 回日本感染症学会総会（東京）2011 年 4 月

3) 平野 淳、池村健治、横幕能行、杉浦 亙：ラルテグラビル投与に伴う副作用発現並びに遺伝子多型と血中濃度に関する検討　第 85 回日本感染症学会総会（東京）2011 年 4 月

4) 伊部史朗、正岡崇志、横幕能行、岩谷靖雅、杉浦 亙：抗レトロウイルス療法中の HIV-2CRF01_AB 感染例に認めた薬剤耐性変異　第 13 回白馬シンポジウム in 札幌－最先端のエイズ研究を徹底討論する－（札幌） 2011 年 5 月

5) 岩谷靖雅：HIV の逆転写・複製機構と APOBEC3 による抑制機序　第 13 回白馬シ

ンポジウム in 札幌－最先端のエイズ研究を徹底討論する－（札幌）2011 年 5 月

6) 杉浦 亙：～難治性疾患の治療にむけて～「HIV/AIDS 治療の現状とこれからの課題」第 3 回富山ライフサイエンスシンポジウム（富山）2011 年 7 月

7) 松永智子、澤崎達也、小島良績、森下 了、佐藤裕徳、大出裕高、古川亜矢子、片平正人、杉浦 亙、梁 明秀：コムギ無細胞タンパク質合成系を用いた Xenotropic murine leukemia virus-related virus（XMRV）プロテアーゼの解析 日本ヒトプロテオーム機構第 9 回大会（新潟）2011 年 7 月

8) 横幕能行、鈴木奈緒子、杉浦 亙：医療現場における HIV 暴露事故への対策と課題 第 65 回国立病院総合医学会（岡山）2011 年 10 月

9) 杉浦 亙：インテグラーゼ阻害剤の臨床における耐性発現の実際 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会（東京）2011 年 11 月 30 日～12 月 2 日

10) 杉浦 亙：HIV 薬剤耐性検査と耐性 HIV の現状第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会（東京）2011 年 11 月 30 日～12 月 2 日

11) 北村紳悟、中島雅晶、大出裕高、前島雅美、伊部史朗、横幕能行、渡邉信久、鈴木淳巨、杉浦 亙、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

12) 11 月 30 日～12 月 2 日

13) 伊部史朗、近藤真規子、今村淳治、岩谷靖雅、横幕能行、杉浦 亙:ウエスタンブロット法により HIV-1/HIV-2 重複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 30 日～12 月 2 日

14) 岩谷靖雅、北村慎吾、前島雅美、伊部史朗、横幕能行、杉浦 亙: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 30 日～12 月 2 日

15) 田中勇悦、児 玉晃、西澤雅子、杉浦 亙、田中礼子：CXCR4 架橋による CXCR4 および CCR5 親和性 HIV-1 の感染制御 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会（東京） 2011 年 11 月 30 日～12 月 2 日

16) 服部純子、椎野禎一郎、潟永博之、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、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、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、渡邉 大、白坂琢磨、小島洋子、森 治代、中桐逸博、藤井輝久、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 亙：新規 HIV/AIDS 診断症例における薬剤耐性 HIV の動向 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会（東京） 2011 年 11 月 30 日～12 月 2 日

17) 椎野禎一郎、服部純子、潟永博之、吉田 繁、伊藤俊広、上田敦久、近藤真規子、貞升健志、藤井毅、横幕能行、上田幹夫、田邊嘉也、渡邉 大、森治代、藤井輝久、南 留美、健山正

男、杉浦 亙、日本薬剤耐性 HIV 調査研究グループ：国内感染集団の大規模塩基配列解析 2: Subtype B の動向と微少系統群の同定 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会（東京）2011 年 11 月 30 日～12 月 2 日

18) 片野晴隆、横幕能行、菅野隆行、福本 瞳、中山智之、新ヶ江章友、杉浦 亙、市川誠一、安岡 彰：日本人 MSM におけるカポジ肉腫関連ヘルペスウイルス（KSHV/HHV-8）抗体保有率について第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会（東京）2011 年 11 月 30 日～12 月 2 日

19) 渡邉綱正、横幕能行、今村淳治、杉浦 亙、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 30 日～12 月 2 日

20) 吉田 繁、伊部史朗、服部純子、松田昌和、橋本修、岡田清美、和山行正、巽 正志、杉浦 亙： HIV 薬剤耐性検査の外部精度管理 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会（東京）2011 年 11 月 30 日～12 月 2 日

21) 西澤雅子、Johnson Jeffrey、Heneine Walid、杉浦 亙：定量 PCR を応用した高感度薬剤耐性検査法による抗 HIV 治療患者からの微少集族薬剤耐性変異検出の試み 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会（東京）2011 年 11 月 30 日～12 月 2 日

22) 今村淳治、横幕能行、服部純子、岩谷靖雅、杉浦 亙：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 30 日～12 月 2 日

23) 柴田雅章、福島直子、高橋昌明、野村敏治、今村淳治、横幕能行、杉浦 亙：リトナビルソフトカプセルから錠剤への切り替えに伴うダルナビル血中農度の変化に関する検討 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会（東京）2011 年 11

24) 月 30 日～12 月 2 日

25) 大久保奈美、高橋昌明、木下枝里、柴田雅章、福島直子、野村敏治、泉田真生、今村淳治、横幕能行、杉浦 亙：抗結核薬リファンピシンが中止となった患者のラルグラビル（RAL）の血中濃度推移をみた一症例 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会（東京）2011 年 11 月 30 日～12 月 2 日

26) 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 亙：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 30 日～12 月 2 日

27) 福島直子、柴田雅章、木下枝里、大久保奈美、高橋昌明、野村敏治、横幕能行、杉浦 亙：薬剤師のための HIV 研修会開催に関するアンケート調査について 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会（東京）2011 年 11 月 30 日～12 月 2 日

28) 桑原 健、矢倉裕輝、吉野宗宏、上平朝子、白坂琢磨、杉浦 亙：エトラビリン、ダルナビル、ラルテグラビルの血中トラフ値と海外データーとの比較 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会（東京）2011 年 11 月 30 日～12 月 2 日

29) 丸山笑里佳、横幕能行、松岡亜由子、服部純子、杉浦 亙：服薬アドヒアランスの低さに関連する要因の検討 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会（東京）2011 年 11 月 30 日～12 月 2 日

30) 松下修三、杉浦 亙：「マラビロク、どう使う？」第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会（東京）2011 年 11 月 30 日～12 月 2 日

31) Matsuoka K, Masaoka T, Tanabe F, Morishita R, Sawasaki T, Iwatani Y, Sugiura W. Development of invitro enzymatic method for assessing susceptibility to HIV-1 reverse transcriptase inhibitors using a wheat-germ cell-free translation system. 第 34 回日本分子生物学会年会（横浜）2011 年 12 月 13 日～16 日

32) 北村紳悟、中島雅晶、大出裕高、前島雅美、伊部史朗、横幕能行、渡邉信久、鈴木淳巨、杉浦 亙、岩谷靖雅：Structure-Guided Mutagenesis を用いた

33) APOBEC3C/F の HIV-1 Vif 感受性に関するアミノ酸残基の同定 第 34 回日本分子生物学会年会（横浜）2011 年 12 月 13 日～16 日