

201124018B

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21～23年度 総合・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-----	23
----------------------------	----

研究分担者：杉浦 互

III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	40
--------------------------	----

I. 総合研究報告

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

平成21～23年度 総合研究報告書

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 ダイレクトシーケンス法（従来法）を用いた薬剤耐性検査の普及により、抗 HIV 治療(ART)を受けている HIV/AIDS 患者の薬剤耐性 HIV を解析して最適な抗 HIV 薬を選択することが可能となった。しかし従来法では検出不可能な 20%以下の比率で患者血中に潜在する minority population（微小集族）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す可能性が示唆されている。本研究では CDC と国立感染症研究所で開発された、0.5～5%の割合で患者血中に存在する薬剤耐性変異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）を利用して、5年以上に渡って ART を行った 6 症例(Case A, B, C, D, E, F)について、逆転写酵素阻害剤(RTI)8 耐性変異(M41L, K65R, K70R, K103N, Y181C, M184V, T215Y/F)、プロテアーゼ阻害剤(PI)3 耐性変異(M46I/L, L90M)を解析対象として微小集族薬剤耐性変異の検出を試みた。その結果 6 症例全てから RTI あるいは PI に対する耐性変異が微小集族として検出された。微小集族 RTI 耐性変異は Case A, B, E, F の 4 症例から検出され、Case A と Case B では治療変更後従来法では K103N や Y181C が検出されなくなった後も数カ月～1年以上渡ってこれらの耐性変異が微小集族として患者血中に潜在していた。Case E と Case F では治療変更後に出現した K70R, K103N や T215I が従来法で検出される数カ月～3年以上前から患者血中に潜在していた事が示された。微小集族 PI 耐性変異は Case A,B,C,D,F の 5 症例から検出された。5 症例とも、従来法で検出されるようになる数ヶ月前から M46I/L あるいは L90M が微小集族として潜在していた。また Case B, F では治療変更で PI 耐性変異が従来法で検出されなくなった後も数カ月に渡ってこれらの PI 耐性変異は微小集族として潜在していた。Case D では従来法では検出された事のない M46L が微小集族として検出された。

A. 研究目的

抗 HIV 治療(ART)導入時や治療変更時にダイレクトシーケンス法（従来法）による薬剤耐性検査を行う事で、より効果的な抗 HIV 薬剤の選択が可

能になり、より効果的な ART を行う事も可能になった。しかし従来法では検出不可能な、患者血中に 20%以下の割合で存在する minority population（微小集族）薬剤耐性 HIV が ART に

影響を及ぼす可能性が示唆されている。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経時的な微小集族薬剤耐性 HIV 検出を試み、その動態を解析する。至適治療を進める上での高感度法の臨床的有用性について検討する。

B. 研究方法

高感度薬剤耐性 HIV 検出法（高感度法）は米国 CDC で開発された定量 PCR を応用した定性的検出法を用いた。検出する耐性変異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 8 変異及びプロテアーゼ阻害剤(PI)耐性変異の M46I/L, L90M の 3 変異とした。高感度薬剤耐性 HIV 検出法の概略であるが、標的耐性変異毎に特異的なプライマーとプローブを構築して定量 PCR を行い、これを薬剤耐性特異的反応とする。また逆転写酵素遺伝子内の比較的保存された領域（HXB2 での nt 番号 258~420）を増幅するプライマーとプローブを用いて定量 PCR を行い、これを共通反応（内部コントロール）とした。薬剤耐性特異的反応と共通反応それぞれについて、増幅 cycle が閾値を越えた cycle 数(Ct 値)を算出した。共通反応の Ct 値と、薬剤耐性特異的反応の Ct 値の差を計算し、これを Δ Ct 値とした。この Δ Ct 値が予め計算・設定した Cut off 値よりも小さい場合には薬剤耐性陽性、Cut off 値よりも大きい場合には薬剤耐性陰性と判定した（図 1）。逆転写酵素阻害剤耐性変異の 8 変異と PI 耐性変異の L90M を検出する高感度法プロトコールは CDC で開発された方法を用いた (ref)。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）については、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。

解析対象の症例は、国立感染症研究所で薬剤耐性検査を行った約 1200 症例の中から、まず逆転写酵素及びプロテアーゼ領域に 2 か所以上の耐性変異を持ち、逆転写酵素阻害剤・PI に対して高度耐性を持つ症例を 13 症例(Subtype B 10 症例、CRF01_AE3 症例)選択した。また、この中から 5 年以上に渡って ART を行い、なおかつ 1 回以上の薬剤変更を行った 6 症例を選択した（図 2）。

（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。

（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

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 Δ Ct 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3)。

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3)。多剤耐性症例と判定された 13 サンプルを高感度法を用いて微少集族薬剤耐性変異の検出を行った結果、Subtype B 10 症例中 2 症例から従来法では検出できない微少集族として存在していた T215Y を、CRF01_AE 3 症例中 1 症例から K70R を検出した(図4)。Subtype B 10 症例のうちの 5 症例は 5 年以上にわたって ART を受け、1 回以上の投与薬剤を変更した症例であった(Case A~Case E、図2)。この 5 症例に、もう 1 症例 5 年以上の ART と 1 回以上の薬剤変更を行った治療歴のある症例 F を加えた Case F (図2) の計 6 症例について、各薬剤耐性検査ポイントについて高感度法を行い逆転写阻害剤・PI 耐性変異の微少集族薬剤耐性変異の経時的動向について解析を行った。

(Case A)

投与薬剤に NVP を含む ART に変更後、従来法では NNRTI に対する耐性変異は検出されなかったが、高感度法では NPV 投与開始後 2 ヶ月間に渡って NVP 耐性変異である K103N が微少集族として存在していた(図5-1)。また、LPV/r を含む ART の期間に M46I が従来法で検出されるようになったが、従来法で検出される約 2 ヶ月前から M46I が微少集族として患者血中に存在していた(図5-2)。

(Case B)

ART を NVP を含むレジメに変更した直後から NNRTI 耐性変異の Y181C が従来法で検出されたが、NVP 投与を中止した後 Y181C は従来法では速やかに検出されなくなった。しかし高感度法で解析した結果、Y181C は従来法で検出されなくなった後も 1 年以上に渡って微少集族として潜在していた(図6-1)。この患者は治療期間中 K103N は従来法では検出されていなかったが、NVP 投与開始直後から K103N が微少集族として NVP 投与期間中患者血中に存在していた(図6-2)。また PI 耐性変異の M46I は従来法では検出されなくなった後も 1 年以上に渡って微少集族として高感度法で検出された(図6-3)。また M46L も、従来法で検出されるようになる 6 か月前からすでに微少集族として患者血中に潜在していた(図6-4)。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。高感度法によって微少集族として検出された M46I-amplicon と M46L-amplicon のダイレクトシーケンスを解析した結果、これらの amplicon には I54V と A71V が M46I、M46L とリンクして存在していた。I54V と A71V も従来法では検出されておらず、これらの変異は M46I、M46L と同じゲノム上にリンクした状態で微少集族として潜在していた(図6-3,4)。

(Case C)

NNRTI, NNTI に対する薬剤耐性変異は微少集族としては検出されなかった。しかし PI 耐性変異の M46I と L90M が、従来法で検出されるようになる約 7 か月前から微少集族として潜在していた(図7-1,2)。また、高感度法で得られた M46I-amplicon のダイレクトシーケンス法の解析から、この M46I には G48V がリンクして存在していた。従来法で G48V がこの患者検体から検出

された事は無く、G48V も微量集族として患者血中に潜在していた事が示された (図 7-2)。

(Case D)

NRTI, NNRTI に対する微量集族薬剤耐性変異は検出されなかった。しかし PI 耐性変異の M46I は従来法で検出される 5 年以上前から微量集族として患者血中に潜在していた (図 8-1)。また M46L は、追跡した 8 年 2 カ月の治療期間中従来法では一度も検出されなかったが、高感度法では M46L が美長集族として存在していた事が明らかになった (図 8-2)。

(Case E)

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 を微量集族として検出した (図 9-1)。また 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 9-2)。微量集族として検出された K103N-amplicon のダイレクトシーケンスを行い、この塩基配列と Case 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、K103N-amplicon は 2005 年 2 月以降の従来法で K103N が検出されるようになった時期の配列の近傍に位置していた (図 9-3)。また微量集族として検出された 2 時点の T215I-amplicon の塩基配列と、Case 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、T215I-amplicon 配列は系統樹上では 2005 年 8 月以降の従来法で T215I が検出された時期の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量集族として患者血中に存在していた可能性が示唆された (図 9-4)。

(Case F)

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 を微量集族として検出した (図 10-1)。K70R は治療期間中従来法では 1 回も検出されなかったが、高感度法によって K103N と同じ時点で微量集族として検出された (図 10-2)。PI 耐性変異の M46I は従来法で検出されるようになる 8 か月前から微量集族として患者血中に存在していた (図 10-3)。M46L は従来法で検出されない時点でも微量集族として患者血中に潜在していた (図 10-4)。

D. 考察

定量 PCR を応用した高感度法で治療中患者検体を解析した結果、解析対象とした 6 症例全てから微量集族として存在する薬剤耐性変異を検出した。この事から、従来法で薬剤耐性変異が検出されなくなった後も場合によっては 1 年以上の間薬剤耐性変異は微量集族として患者血中に潜在し、薬剤変更等によって速やかに再出現してくるものと思われた。また、EFV を含む ART で K103N 出現による治療失敗に陥った 2 case のうち Case E では、K103N が従来法で検出されるよりも 3 年以上前から患者血中で微量集族として潜在していた事が明らかになっており、高感度法で薬剤性変異を解析して ART に使用する薬剤を決定することで、より効果的な治療法を選択できる可能性が示唆された。また、本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、微量集族を検出するには十分な感度を有していた。高感度法によって得られる M46I-amplicon と M46L-amplicon はプロテアーゼ領域の 46~88 番目のアミノ酸を増幅しており、微量集族として存在する M46I や M46L にリンクした薬剤耐性変異も解析可能である。この特徴を生かして Case B や Case C から従来法では検出で

きなかった I54V や A71V, G48V を新たに検出した。このように高感度法を応用して、詳細な薬剤耐性検査が可能になると思われる。

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。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 8 変異及びプロテアーゼ阻害剤(PI)耐性変異の M46I/L, L90M の 3 変異について、高感度法による解析を行った。5 年以上に渡り ART を行い、治療期間中に 1 回以上の薬剤変更を行った治療中患者 6 症例の薬剤耐性変異について経時的に高感度法で解析した結果 6 症例全てから微少集族薬剤耐性変異が検出された。一部の変異は従来法で検出されなくなった後も数カ月～数年に渡って微少集族として患者血中に潜在し、薬剤変更等に寄って速やかに再出現して治療に影響を及ぼす可能性が示唆された。また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の結果、M46I/L にリンクして存在する I54V, A71V, G48V といった変異を見出した。これらも従来法では検出されず、微少集族として存在していた。高感度法による解析によって、複数のリンクした薬剤耐性変異を同時に検出可能になった。T215I-amplicon や K103N-amplicon の解析により、これらの変異が従来法で検出されるよりも 1 年～3 年前から既に存在し、治療薬剤変更後に速やかに出現して治療に影響を与えた可能性を示した。

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, 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.

2) 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、Jeffery A. Johnson、Walid Heneine、山本直樹、杉浦互. 高感度薬剤耐性 HIV 検出法を用いた微少集族薬剤耐性 HIV の検出と存在比率に関する研究. 第 23 回日本エイズ学会、2009、名古屋.

2) 服部純子、瀧永博之、吉田 繁、千葉仁志、小池隆夫、佐々木悟、伊藤俊広、内田和江、原 孝、佐藤武幸、上田敦久、石ヶ坪良明、近藤真規子、今井光信、長島真美、貞升健志、古賀一郎、太田康男、山元泰之、福武勝幸、田中理恵、加藤真吾、宮崎菜穂子、藤井 毅、岩本愛吉、西澤雅子、仲宗根正、巽 正志、椎野

禎一郎、林田庸総、岡 慎一、伊部史朗、藤崎誠一郎、金田次弘、横幕能行、濱口元洋、上田幹夫、大家正義、田邊嘉也、渡辺香奈子、渡邊 大、矢倉裕輝、白阪琢磨、桑原 健、小島洋子、森 治代、中桐逸博、高田 昇、木村昭郎、南 留美、山本政弘、松下修三、藤田次郎、健山正男、堀 成美、杉浦 互。2003-2008年の新規 HIV/AIDS 診断症例における薬剤耐性頻度の動向。第 23 回日本エイズ学会、2009、名古屋。

- 3) 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。
- 4) 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。
- 5) 鈴木寿子、服部純子、村田大悟、三浦秀佳、伊部史朗、藤野真之、西澤雅子、山本直樹、杉浦互。インテグラーゼ阻害剤耐性化機序の分子生物学的解析。第 23 回日本エイズ学会、2009、名古屋。
- 6) 西澤雅子、Jeffrey A. Johnson、Walid Heneine、杉浦互。定量 PCR を応用した高感

度薬剤耐性検査法による抗 HIV 治療患者からの微小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。

- 7) 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 25 回日本エイズ学会、2011 年 12 月、東京。
- 8) 田中勇悦、児玉晃、西澤雅子、杉浦互、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 互

1. 論文発表

欧文

- 1) Matsuyama S, Aydan A, Ode H, Hata M, Sugiura W, Hoshino T. Structural and Energetic Analysis on the Complexes of Clinically-isolated Subtype C HIV-1 Proteases and Approved Inhibitors by Molecular Dynamics Simulation. The Journal of Physical Chemistry. B. 2010. 114(1):521-530
- 2) Land S, Cunningham P, Zhou J, Frost K, Katzenstein D, Kantor R, Chen YM, Oka S, DeLong A, Sayer D, Smith J, Dax EM, Law

- M; TAQAS Laboratory Network. TREAT Asia Quality Assessment Scheme (TAQAS) to standardize the outcome of HIV genotypic resistance testing in a group of Asian laboratories. *J Virol Methods*. 2009 Aug;159(2):185-93.
- 3) 3)Hasegawa N, Sugiura W, Shibata J, Matsuda M, Ren F, Tanaka H. Inferring within-patient HIV-1 evolutionary dynamics under anti-HIV therapy using serial virus samples with vSPA. *BMC Bioinformatics*. 2009 Oct 29;10(1):360.
 - 4) 4)Iwatani Y, Chan DS, Liu L, Yoshii H, Shibata J, Yamamoto N, Levin JG, Gronenborn AM, Sugiura W. HIV-1 Vif-mediated ubiquitination/degradation of APOBEC3G involves four critical lysine residues in its C-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Nov 17;106(46):19539-44.
 - 5) Ibe S., Sugiura W. Clinical significance of HIV reverse transcriptase inhibitor-resistant mutations. *Future Microbiology*. in press
 - 6) 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.
 - 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 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.
 - 8) 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.
 - 9) 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.
 - 10) 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.
 - 11) 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.
- 12) Peptide HIV-1 integrase inhibitors from HIV-1 gene products. *J Med Chem.* 2010 Jul 22;53(14):5356-60.
 - 13) 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.
 - 14) 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.
 - 15) 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]
 - 16) 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)
 - 17) 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]
 - 18) 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.
 - 19) Ibe S, Sugiura W. Clinical significance of HIV reverse transcriptase inhibitor-resistant mutations. *Future Microbiology.* 6(3):295-315, 2011.
 - 20) 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.
 - 21) 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.* 49(3):1017-24, 2011.
 - 22) 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 互. 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 互、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) Yasumasa Iwatani. LinLiu, Denis S Chan, Hiroaki Yoshii, Judith G Le vin, Angela M Gronenborn, Wataru Sugiura.
 - 2) 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.
 - 4) 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
 - 5) 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

- 6) 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
- 7) 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
- 8) 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 15-162010, Vienna, Austria
- 9) 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
- 10) 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
 - 11) 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
 - 12) 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
 - 13) 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
 - 14) 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
 - 15) 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 Workshop on HIV & Hepatitis Virus Drug Resistance and Curative Strategies. (Mexico) 2011.6
 - 16) Sugiura W. Effects of HIV integrase polymorphisms on raltegravir-resistance susceptibility. 6th IASConference on HIV Pathogenesis Treatment and Prevention. (ROME,ITALY) 2011.7
 - 17) Hattori J, Shao W, Shigemi U, Hosaka M, Okazaki R, Yokomaku Y, Iwatani Y, Maldarelli F, Sugiura W. Molecular epidemiology of transmitted drug-resistant HIV among newly diagnosed individuals in Japan. 6th International Workshop on HIV Transmission Principles of Intervention (ROME,ITALY) 2011.7
 - 18) 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
 - 19) 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
- 20) Matsuoka K, Masaoka T, Tanabe F, Morishita R, Sawasaki T, Iwatani Y, Sugiura W. Development of in vitro enzymatic 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
- 21) 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
- 22) 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
- 23) 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

定量PCRを応用した高感度薬剤耐性検査法の原理

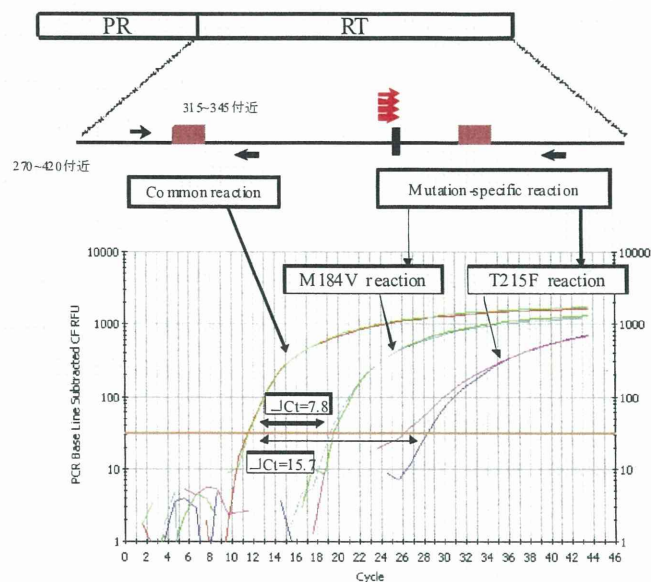
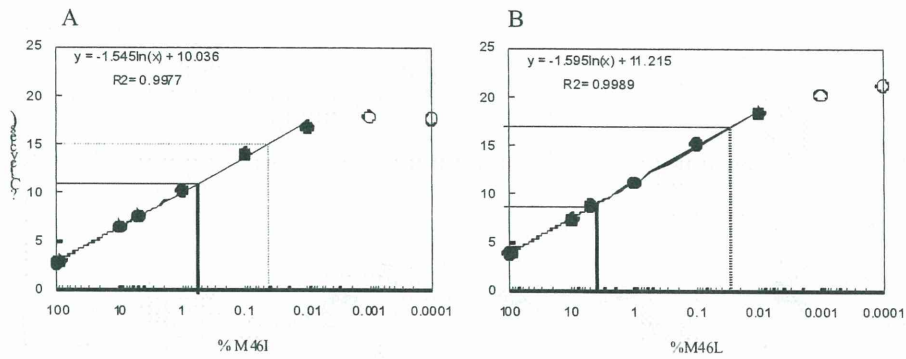


図1

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
Case A	B	5年5カ月	32	6回
Case B	B	8年8カ月	32	5回
Case C	B	7年11カ月	15	5回
Case D	B	8年2カ月	41	11回
Case E	B	7年1カ月	30	1回
Case F	B	8年6カ月	25	3回

図2

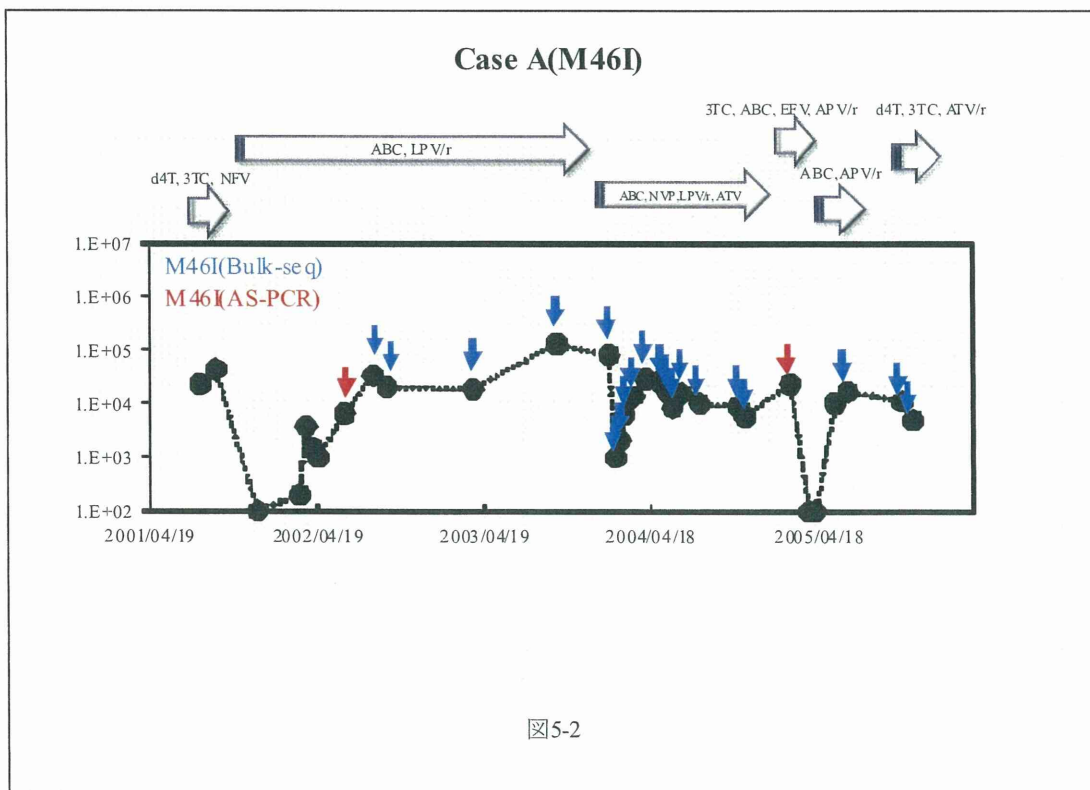
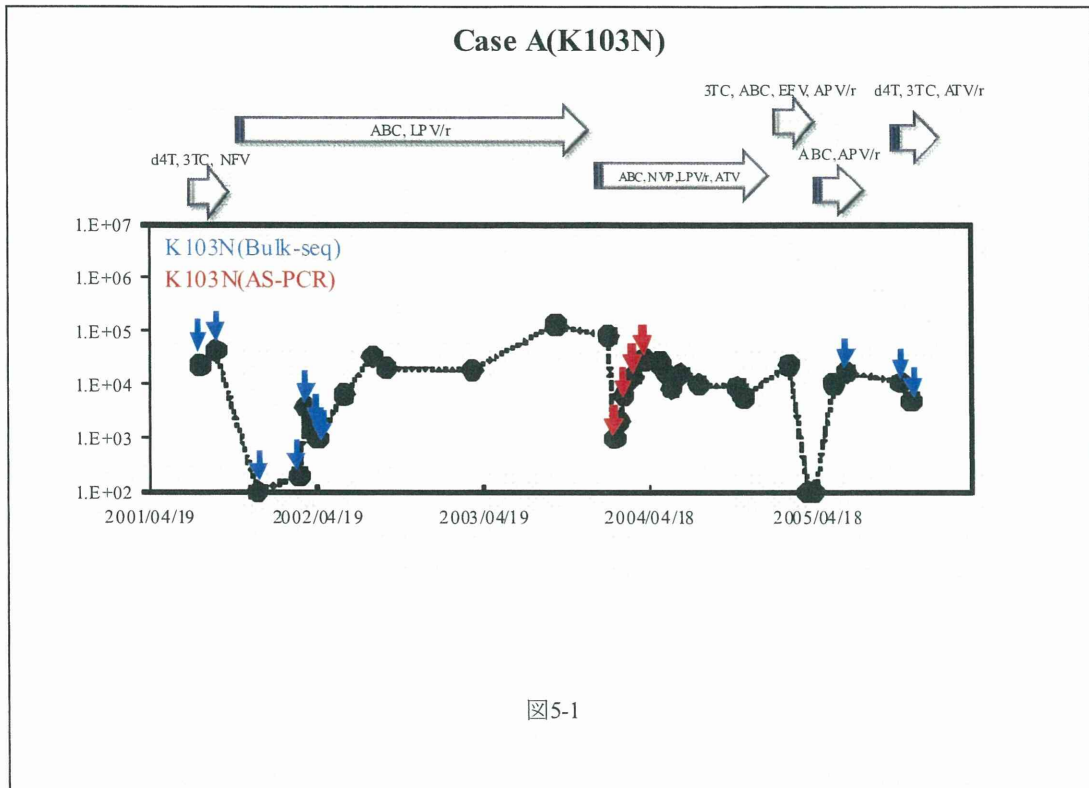


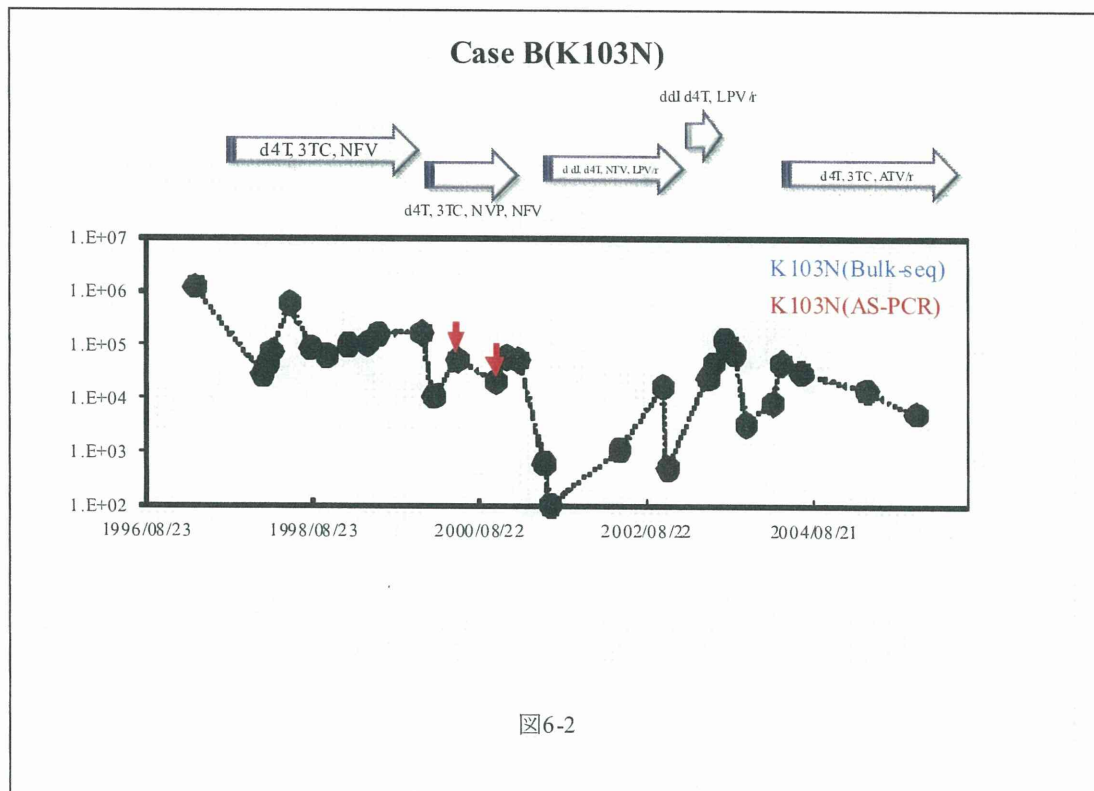
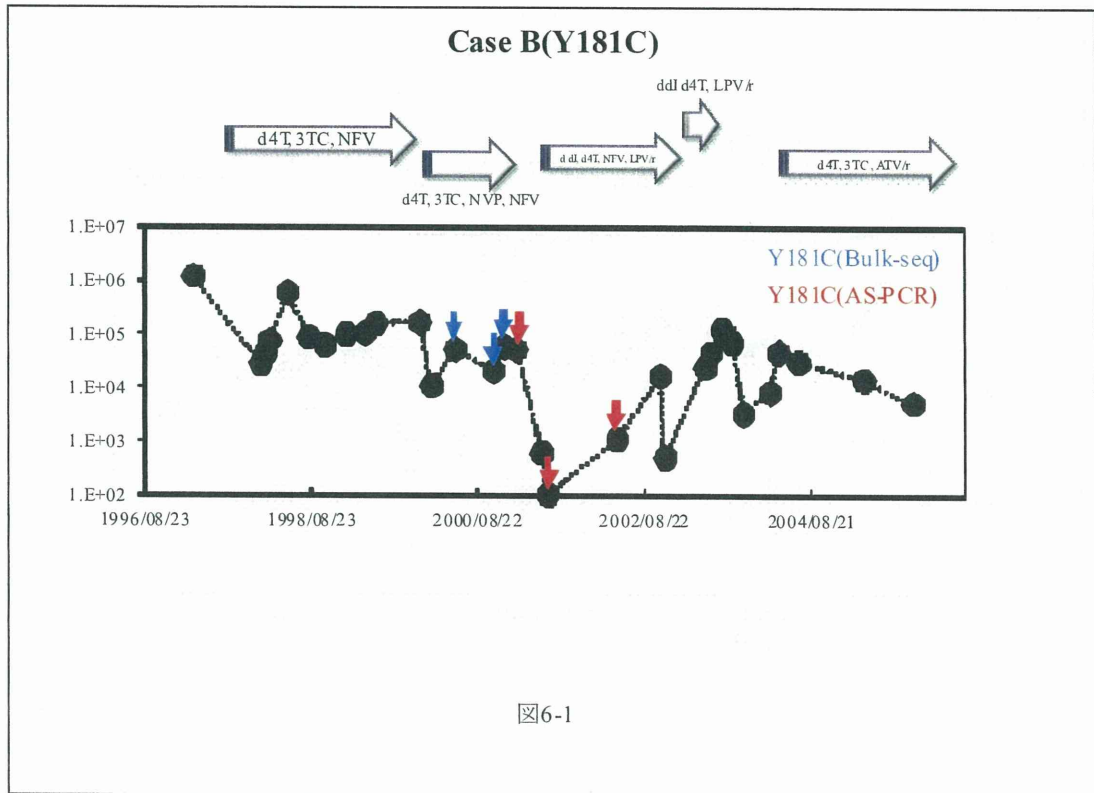
	ΔCt cutoff (# cycles)	Cutoff mean % mutant (test %)	Sensitivity #pos/mutants tested (%)	Mean ΔCt (range) of wildtype sequences wildtype n = 42	Mean ΔCt (range) of mutant samples	False-negative ΔCt s
M46I	11.0	0.54	5555(100)	18.67(16.39-26.65)	43.4(1.39-10.1)	-
M46L	9.0	40.1	2222(100)	18.98(15.43-23.43)	5.26(0.88-8.95)	-

図3

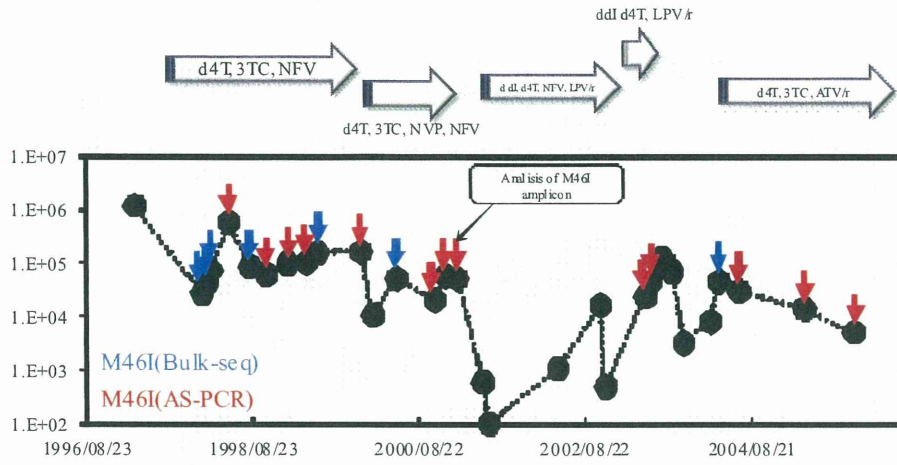
Sample ID	Subtype	採血日	M41L		K70R		K103N		Y181C		M184V		T215Y		T215F	
			従来法	高感度	従来法	高感度	従来法	高感度	従来法	高感度	従来法	高感度	従来法	高感度	従来法	高感度
1	B	2002/1/16	M41L	-	K70R	-	WT	-	WT	-	WT	-	WT	-	T215F	-
2	B	2002/3/20	M41L	-	WT	-	WT	-	WT	-	M184V	-	WT	-	T215F	-
3	B	2003/3/13	M41L	-	WT	-	WT	-	WT	-	WT	-	T215Y	-	WT	-
4(Case D)	B	2003/4/14	M41L	-	WT	-	K103N	-	Y181C	-	WT	-	T215Y	-	WT	-
5	B	2003/1/14	M41L	-	WT	-	WT	-	WT	-	M184V	-	T215Y	-	WT	-
6	B	2004/1/22	M41L	-	K70R	-	WT	-	WT	-	M184V	-	WT	-	T215F	-
7(Case B)	B	2004/4/2	M41L	-	WT	-	WT	-	WT	-	M184V	-	T215Y	-	WT	-
8(Case E)	B	2005/2/1	WT	-	K70R	-	K103N	-	WT	-	M184V	-	WT	-	WT	-
9(Case C)	B	2005/2/15	WT	-	WT	-	K103N	-	Y181C	-	M184V	-	T215Y	-	WT	-
10(Case A)	B	2005/5/25	M41L	-	WT	-	WT	-	Y181C	-	M184V	-	T215Y	-	WT	-
1-AE	AE	2008/8/29	M41L	+	WT	+	WT	-	WT	-	WT	-	T215Y	-	WT	-
2-AE	AE	2002/2/4	WT	-	K70R	-	WT	-	WT	-	M184V	-	WT	-	WT	-
3-AE	AE	2003/2/10	WT	-	WT	-	K103N	-	WT	-	WT	-	WT	-	WT	-

図4





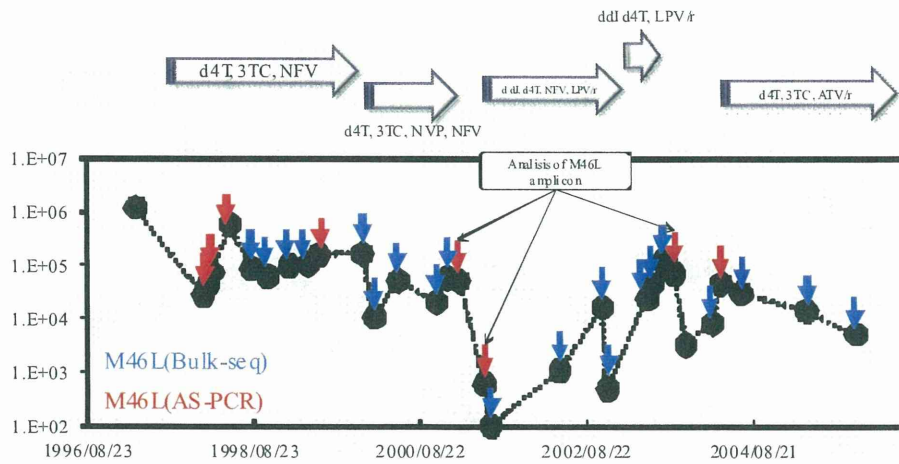
Case B(M46I)



M46I ampliconの解析から、M46LとI54V,A71Vがリンクして存在していた。これらの変異はすべて微量集族として存在していた。

図6-3

Case B(M46L)



M46L ampliconの解析から、M46LとI54V,A71Vがリンクして存在していた。これらの変異はすべて微量集族として存在していた。

図6-4

