

## 第16回日本エイズ学会シンポジウム記録

## 抗 HIV 療法のモニタリング

金田 次弘<sup>1)</sup>, 加藤 真吾<sup>2)</sup>, 山元 泰之<sup>3)</sup>, 千葉 智子<sup>4)</sup>, 杉浦 亙<sup>4)</sup><sup>1)</sup> 国立名古屋病院臨床研究センター, <sup>2)</sup> 慶應義塾大学医学部微生物学・免疫学教室,<sup>3)</sup> 東京医科大学臨床検査医学科, <sup>4)</sup> 国立感染症研究所エイズ研究センター

キーワード: HAART, HIV-1, 薬剤耐性検査, HIV-1 プロウイルス

日本エイズ学会誌 5: 109-112, 2003

## はじめに

HIV-1 感染症/AIDS の治療は、逆転写酵素阻害薬とプロテアーゼ阻害薬による多剤併用療法、いわゆる HAART (highly active antiretroviral therapy) が開始されて以来、長足の進歩を遂げた。すなわち、HAART により HIV 感染患者体内でのウイルスの増殖を押さえることが可能になり、患者の生存率や病状が著しく改善された。この治療法の成功には、多彩な抗 HIV 薬の開発のみならず血漿ウイルス量の測定法の開発・普及が大きく寄与している。さて、現在では、前述したウイルスの“量”の測定に加えて、ウイルスの“質”を評価するための薬剤耐性検査が広汎に臨床で活用されている。それは、HIV-1 は変異を獲得して、薬剤存在下でも生き延びを図るという厄介なウイルス学的特性が治療上の大きな問題点となっているためである。薬剤耐性検査には遺伝子検査 (genotype test) と薬剤感受性テスト (phenotype test) がある。遺伝子検査では逆転写酵素とプロテアーゼの遺伝子を標的にして HIV-1 の塩基配列を決定し、薬剤耐性関連アミノ酸変異の有無を鑑別する。感受性テストでは分離したウイルスや組み換え体ウイルスを種々の濃度の抗 HIV-1 薬存在下で *in vitro* で培養して増殖抑制に必要な薬剤濃度 (IC<sub>50</sub> や IC<sub>90</sub>) を決定する。遺伝子検査が間接法であるのに対して感受性テストは直接法ともいえる。もちろん、それぞれの方法に精度、煩雑さ、費用、検査日数などに関して利点、欠点がある。さらに、膨大な検体母集団を対象にした遺伝子検査と感受性検査結果の対応分析から、遺伝子検査結果から薬剤に対する感受性を推定する方法論 (バーチャルフェノタイプ) も提起されてきた。これらの点を考慮したうえでそれぞれの検査法に対する評価を行うことを本シンポジウムの第一の目的とした。

さて、HIV-1 感染症治療の最終目標は HIV-1 を体内から

著者連絡先: 金田次弘 (〒460-0001 名古屋市中区三の丸4-1-1 国立名古屋病院臨床研究センター)

Fax: 052-951-0664 E-mail: kanedat@nagoya.hosp.go.jp

2003年4月23日受付

駆逐することといえる。このことは、休止期感染標的細胞プールに存在する、いわば潜在的 HIV-1 のリザーバーともいふべきプロウイルス陽性細胞を根絶させることと同義である。この根絶には 60 年を越える歳月を要するとの最近の報告もあるが、HIV-1 DNA 定量法の紹介を行い、マーカーとしての意義を明らかにすることを第二の目的とした。

以下、「薬剤耐性検査の有用性と問題点 (分担: 山元泰之)」、「薬剤耐性検査の現状と将来 (分担: 千葉智子, 杉浦亙)」、「HIV-1 プロウイルス測定の意義 (分担: 金田次弘)」の三つのテーマの概説を通じ、シンポジウムを総括する。

## 薬剤耐性検査の有用性と問題点

抗 HIV 薬に対する薬剤耐性の分野で近年理解が進んだ事柄の中で、最も重要な点は、従来、ジドブジン (ZDV) 関連変異とされてきたコドン 41 (M41L), 44 (E44D), 67 (D67N), 70 (K70R), 118 (V118I), 210 (L210W), 215 (T215V/F), 219 (K219Q/E) の変異を “Nucleoside Analogue Mutations” (NAMs) と称するようになり、これらの部位の変異の蓄積は、ラミブジン (3TC) を除く核酸系逆転写酵素阻害剤全ての耐性に関わるということが明らかになってきたことである (Richard T. D'Aquila *et al.* Drug Resistance Mutations in HIV-1, *Topics in HIV Medicine*<sup>TM</sup> (A publication of the International AIDS Society—USA), Volume 10 Issue 5 November/December 2002: 21-25)。

これらの NAMs の出現には、緩やかな順列・規則性があるが、sequential な薬剤使用のされかたや投薬期間、耐性検査のタイミングなどにより、NAMs の数やパターンに多様性が見られる。

NAMs, すなわち核酸系逆転写酵素阻害剤 (NRTI) に対する多剤耐性変異の蓄積は、多剤併用療法失敗時における NRTI の薬剤選択肢が非常に限られていることを示している。現在頻用される多剤併用療法下では、ウイルス学的治療失敗後に NAMs が多数蓄積する以前に、併用されている非核酸系逆転写酵素阻害剤、プロテアーゼ阻害剤あるいは 3TC などの変異が出現することが多い。先に顕在化する

るNAMs以外、あるいはNAMsの出現が1-2箇所にとどまっているうちに患者の服薬状況確認を含めた治療の再検討が必要である。

また、近年、d4Tを筆頭とする核酸系逆転写酵素阻害剤によるミトコンドリア障害、脂肪萎縮などが服薬継続に対する大きな阻害要因となっている。特にd4T/ddIのようなd-drugsの併用投与はそのリスクが大きく、選択肢が残されていれば変更すべきであろう。このような中、アバカビル(ABC)への変更(将来的にはテノフォビル(TDF)への薬剤変更となろう)が多くなっているが、Viral Loadが検出感度未満でない場合にはNAMsの有無と数の確認が必須と思われる。

非核酸系逆転写酵素阻害剤では、K103N, Y181Cなどの変異がエファビレンツ、ネビラピンに共通しており、現在使用可能な薬剤ではほぼ完全な交叉耐性を示す。1箇所の変異で高度耐性となること、血中濃度の半減期が長いことなどから不用意な服薬中断による耐性獲得が起きやすい。

一方、プロテアーゼ阻害剤(PI)関連では、PIを含むHAART下におけるVirological Failure例に対するロピナビビル(LPV/r)への変更が増加している。LPV/rの有効性は、Minor Mutationを含む11の部位での変異の数に依存しているとされる。

このように、抗HIV療法を何らかの理由で治療失敗に至り、HIVの増殖を招いた場合には遺伝子検査(ジェノタイプ)の結果を確認することが、これまでよりも一層重要となりつつある。服薬継続状態で、ウイルス量が1,000 copies/ml前後まで上昇した際には可能な限り薬剤耐性検査を行うべきであると思われる。

現在本邦で可能な耐性検査として、研究室レベルでの遺伝子検査、コマーシャルにはバーチャルフェノタイプ、フェノタイプが利用可能である。耐性変異部位数の多いこと、同じ部位に変異が起きたとしても変異後のアミノ酸によって耐性度に違いがある場合もあり、判断に迷いのある場合には、専門医にコンサルトを求めることが望ましい。

## 薬剤耐性検査の現状と将来

HIV-1感染症に用いられる治療薬剤は、いずれも薬剤耐性ウイルスを誘導することが知られている。薬剤耐性ウイルスの出現は、治療を進めていくうえで大きな障害となっている。患者の病状を把握し、治療効果を測るために行われる薬剤耐性検査は、多くの施設で研究そして実施されており、治療効果への有効性も多数報告されている(J Durant *et al.* Lancet 1999 ; 353 : 2195-2199, C Cohen *et al.* 4<sup>th</sup> IWDRTS, Sitges, 2000)。

すでに知られているように、薬剤耐性検査には以下の二つの方法がある。

1) 薬剤耐性遺伝子検査 (genotyping) : HIV-1感染患者由来のウイルス遺伝子配列解析により、薬剤耐性変異の有無を検出する方法は、PCRとシーケンス配列解析の設備があれば実施が可能である。検査の再現性は高く手技も比較的簡単である。検査実施の選択肢としては国立感染研エイズ研究センターへの委託、臨床検査会社への委託、あるいは検査用キットも販売されているので自施設でも可能である。

2) 薬剤感受性検査 : この方法は感染患者血中より分離したHIV-1に対する、治療薬剤の効果をin vitroで判断する方法である。この検査法では、HIV-1の直接的な薬剤感受性の評価が可能である。残念ながら遺伝子検査に比べて高価であり、特殊な実験環境と高い培養技術を必要とするため、全ての施設で実施できるというわけではない。しかし、phenotypingはgenotypingの前提である「変異と薬剤感受性の関係」を知るために不可欠な技術である。実施の選択肢としては臨床検査会社への委託あるいは研究している施設への委託がある。それぞれの検査法の利点と欠点を表1に示す。

さて、より薬剤耐性HIV-1について理解を深めるためにはどのような研究が望まれるのであろうか? 欧米における研究を見てみると以下の三つの課題について関心が高

表 1 遺伝子検査 (genotyping) と薬剤感受性検査 (phenotyping) の長所と短所

	遺伝子検査 (genotyping)	薬剤感受性検査 (phenotyping)
長所	比較的安価である 多検体処理に適している 迅速に結果を得られる 技術的に薬剤感受性検査より簡単である	直接的な評価であり、結果が理解しやすい
短所	間接的な評価であり、結果の解釈に経験が必要である 感受性の結果と乖離することがある	P3 実験室など特殊な実験設備が必要である 高度な技術が必要である コスト、時間、人手がかかる 臨床的なカットオフ値が必ずしも明確でない

まっている。

まず、感染者の多くを占める non-B サブタイプに関する研究をさらに進めることである。これまでは、先進諸国で主流感染源であるサブタイプ B が研究の中心であった。しかしながら、世界的に見ると、実はサブタイプ B 感染者数は少数であり、現在感染者が激増しているアフリカ、タイ、中国では non-B が感染者の大半を占めている。近年 generic medicine の登場で、これらの国での抗 HIV 薬治療が実施されるようになるにつれ、今まで以上に non-B の薬剤耐性に関心が集まっている。これまでの研究で non-B サブタイプではベースライン遺伝子配列の相違や、一部の薬剤で薬剤耐性変異パターンの違いが報告されている (P Gomes *et al.* 9<sup>th</sup> CROI, 2002, Z Grossan, JM Schapiro *et al.* AIDS 2001, vol 15, 1453-1460, K Ariyoshi, W Sugiura 11<sup>th</sup> IWHDRS, Seville, 2002)。このように異なるサブタイプでは、抗 HIV 薬によって誘導される耐性変異、またそれに対する薬剤効果も異なる可能性があり、より詳細なデータの集積が望まれる。

第二には、Genotyping の結果から治療効果を予測するデータベースとアルゴリズムの開発研究である。既に genotyping と phenotyping の結果を対比させて作られたデータベースが複数作成されている。そして genotyping の結果から感受性を予測するアルゴリズムが考案され実際に使用されている。しかしながら、genotyping と phenotyping 対比による方法では、治療によって抑制されていたウイルス集属に関しては評価に含まれないため、耐性検査結果からの予測と実際の治療効果が相関しない場合がある。このような欠点を補うために、新たな試みとして genotyping と phenotyping 対比させるのではなく、薬剤耐性検査の結果と変更前後の治療薬剤そして変更後の治療効果などのデータを集積し、そのデータを基にして治療の効果を予測する試みが行われている。

第三には、データベースの構築における国際協力である。一国のデータだけでなく複数の国、施設で協力し合うことにより、精度の高いデータベースが実現される。現在、non-B の薬剤耐性に関するデータの集積、および発展途上国における薬剤耐性遺伝子検査の技術移転に目標を置いた国際的な計画が進行している。今後、その進行が大きく望まれている。

### HIV-1 プロウイルス測定の意味

逆転写酵素阻害薬とプロテアーゼ阻害薬を組み合わせた多剤併用療法である HAART の導入により HIV-1 感染症の進行の抑制に成功し、AIDS による死亡率は劇的に減少した。当初は HAART により HIV-1 は患者体内より排除されるとの楽観的予測も存在したが、長期にわたり血漿ウ

イルス量を検出感度以下にまで抑制できた HAART 成功例でも抗 HIV-1 薬の投与を中止すると短期間でウイルス血漿が再燃するという事実の前にその予測は潰れ去った。HAART によっては潜伏感染した標的細胞、言いかえると HIV-1 プロウイルスを保持した感染標的細胞を根絶できなかったのである。このことにより、感染標的細胞中の特に寿命の長い休止期 CD4 陽性細胞にプロウイルスがどれだけ残存しているかを把握すること、さらにこのプロウイルスを保持した感染細胞を効果的に減少させる方途を見出すことが HIV-1 感染症治療の一つの重要課題となった。

HIV-1 プロウイルスの検出方法としては分子病理学的手法 (FISH, PNA-ISH) と分子生物学的手法の二つの方法がある。前者にはプロウイルスと表現型決定分子を同時染色することにより、末梢血単核球のみならず、組織内のプロウイルス陽性細胞を顕微鏡下で可視化することができるというメリットがある (T Murakami, *et al.*, J Pathol 194, 130-135, 2001)。しかし、非特異的シグナルの抑制レベルを考慮すると、最低検出感度は 1.0~0.5% である。これに対して分子生物学的検出法を用いれば、はるかに高感度 (最低検出感度, 0.005%) でプロウイルスを定量できる。限界希釈 PCR 法や競合 PCR 法による半定量的方法論は 1997 年に Chun *et al.* や Comar *et al.* により確立され、CD4 陽性 T リンパ球中に存在する HIV-1 プロウイルスやトータル HIV-1 DNA のコピー数に関する基本的データは集積されてきている。最近になり、Desiré *et al.* はリアルタイム PCR 法を利用して HIV-1 DNA の定量法を報告した (J Clin Microbiol, 39, 1303-1310, 2001)。実験操作は比較的容易で多量の検体を一度に処理できるメリットを生かすことで今後有力な方法となると思われる。検出感度は分子病理学的検出法に比べ約 50 倍高感度であるが、それでもなお、HAART 成功例を対象にしたときなどは一層の高感度化が要求される。筆者らはリアルタイム PCR 前に増幅 PCR を加味した、高感度リアルタイム PCR 法を開発した。検出感度は 5 コピー/10<sup>6</sup> 細胞であり、その他の特徴として、前増幅 PCR における増幅度をモニターするために利用する  $\beta$ 2-ミクログロブリン遺伝子コピー数から有核細胞数を同時算定できるため少量の全血検体を対象にした検査が可能である。本法をもちいて、レトロスペクティブに 3 年間の治療経過を追跡できた HAART 著効症例の HIV-1 DNA 量の推移を追跡した結果を提示した (図 1)。治療前のプラズマ HIV-1 RNA は約 23 万コピー/ml、抗 HIV 治療 (3TC, d4T, NFV) 開始 6 か月後に 100 コピー、1 年後には検出感度 50 コピー以下に減少、その後 2 年間は検出感度以下で安定に推移。これに対して、治療前の HIV-1 DNA は約 1300 コピー/10<sup>6</sup> 白血球、6 か月後は約 600 コピー、1 年後には約 450 コピーまで減少した。しかし、その後は変動な



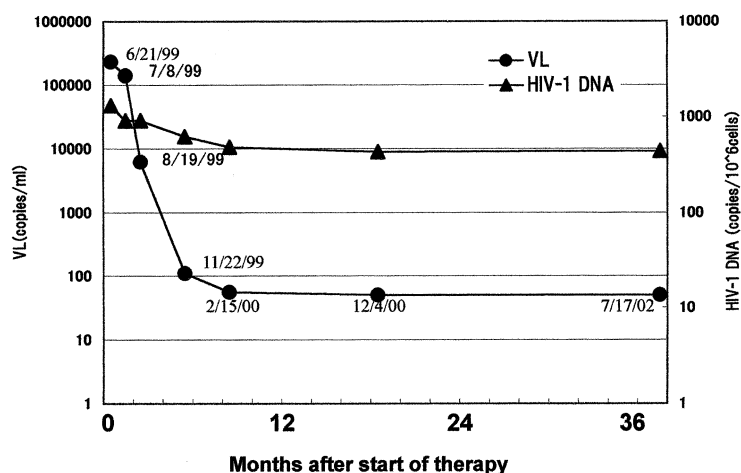


Fig. 1 Longitudinal measurements of viral load and HIV-1 DNA.

く推移している。文献的考察によると、HIV-1 DNAの変動に関するコンセンサスは“治療開始後約1年間に1 logから0.7 log減少し、その後の減少は極めて緩慢である”と整理することができるが、これを裏付ける結果であった。また、この結果からも明らかなように、HAART治療奏効のマーカーとしてはプラズマHIV-1 RNAの方がHIV-1 DNA量よりも敏感なマーカーであると評価できる。以上の点からHIV-1プロウイルスのマーカーとしての意義を考えると、HAARTに対する反応性を評価するマーカーに留まらず、HIV-1感染症の治癒を展望する全治療経過における治癒マーカーと位置づけられると思われる。

最後に、HIV-1 DNA分子種との関連で考察を加えた。細胞内には宿主のDNAに組み込まれたプロウイルス以外にもインテグレートされていないHIV-1 DNA、環状HIV-1 DNAなども存在している。したがって、適切なプライマー・プローブセットを用いないと厳密な意味でのプロウイルスの定量はできない。現時点では、トータルHIV-1 DNAを測定している研究が主流だが、例えば、未治療患者由来のCD4陽性細胞中の主たるHIV-1 DNAの分子種はunintegrated HIV-1 DNAであるとの示唆も得られているが、このような点を踏まえたうえで慎重にデータを評価すべきと思われる。

## おわりに

最後にモニタリングに関する今後の展望について若干の考察を述べる。まず、遺伝子型耐性検査についてであるが、現在はプロテアーゼ遺伝子、逆転写酵素遺伝子領域が解析の対象になっているが、Gag蛋白質の非切断部位における

変異が薬剤耐性獲得に関与しているとの新たな研究結果も報告されている(シンポジウム6, 杉浦互, 湯永博之の報告参照)。また、プロテアーゼ阻害薬や逆転写酵素阻害薬に加えて、フュージョンインヒビターと総称される抗HIV薬の臨床応用が間近に迫っている。この状況下で、遺伝子解析の対象をgag遺伝子やenv遺伝子領域へと拡張する必要性は考慮されてしかるべきと思われる。

また、フェノタイプ解析の方法論としては、リコンビナント法(杉浦互)、PBMC法(加藤真吾)、MAGIC5法(蜂谷敦子)などのバリエーションが報告されているが、現在では、それぞれの特質を生かした方法論的選択が可能となっていることを付記したい。次にHIV-1 DNA定量の課題についてであるが、ごく最近ヒト由来のAlu配列を利用した染色体DNAに組み込まれたプロウイルスを対象にした測定法も報告されたが今後の大切な方法論の進展として評価できると思われる。さらに、本シンポジウムでは割愛したがシンポジウム4で取り扱われた、血中薬剤濃度や細胞内薬剤濃度測定による、いわゆるtherapeutic drug monitoringの臨床的重要性についても論を待たないところである。なぜなら、感染個体内の抗ウイルス作用はウイルスの薬剤感受性と血中あるいは細胞内の薬剤濃度のバランスによって決定されると考えられるからである。一方、ホストの遺伝的背景、素因を考慮したモニタリングも展望されてはいるが、現時点では未だ研究の域を出ていないと思われる。抗HIV療法のモニタリングシステムの多面的かつ総合的な構築を通じHIV感染症の治療戦略が発展することを期待してやまない。