

第4回 ECC 山口メモリアルエイズ研究奨励賞受賞研究

薬剤耐性ウイルスにおける臨床研究

Clinical Study of Drug Resistant HIV-1

松岡 佐織

Saori MATSUOKA-AIZAWA

国立国際医療センター エイズ治療研究開発センター
エイズ予防財団・リサーチレジデント

AIDS Clinical Center, International Medical Center of Japan
Research Resident, Japan Foundation of AIDS Prevention

日本エイズ学会誌 6 : 152-158, 2004

はじめに

今回、第4回日本エイズ学会 ECC 山口メモリアルエイズ研究奨励賞受賞の背景となった研究業績を、薬剤耐性検査の有用性、耐性ウイルスの出現と治療効果、高度耐性へのメカニズム、の3点に分けて報告する。

薬剤耐性検査の有用性

抗 HIV 療法を科学的に行うために治療中に患者生体内で出現する薬剤耐性ウイルス出現をモニタリングすることは必須である^{1,2)}。その一方で過度な耐性検査の試行は、保険適応などの制度化を目指す際に医療費の高騰を招くなど、諸問題が残されている。そこで我々は「Cost effective」という観点から、血漿中ウイルス RNA コピー数が 10,000 コピー/ μ l 以上から PI 治療を開始した 119 症例を対象に retrospective な解析を行い、いつ、誰に耐性検査を行うべきかを検討した³⁾。

対象とした 119 例を治療開始 3 カ月後のウイルス量に基づき、4 乗以下に抑制し得なかった High titer 群 25 例、3 乗オーダーにとどまった Middle titer 群 27 例、2 乗オーダーまたは検出限界以下まで抑制し得た Low titer 群 67 例と 3 群別し、各群における Primary mutations⁴⁾ の出現時期と、ウイルス量の推移を解析した (表 1)。

4 乗オーダー以上の High titer 群 25 例では時間の経過と共に耐性獲得例数は増加し、治療開始 6 カ月では 15 例 (60%)、9 カ月までには 25 例全例において一次変異が検出された。3 乗オーダーの Middle titer 群 27 例は治療開始 3 カ月のみでなく、6 カ月以降のウイルス量を基に更に分類し解析した。その結果 Middle titer 群の中でも 3 カ月以降

更にウイルス量が減少し治療開始 6 カ月後までに検出限界以下までウイルスを抑制し得た 13 例では 3 カ月目に耐性変異は検出されなかった。一方、ウイルス量が不変または再上昇した 14 例中 6 例には治療開始 3 カ月後に耐性変異が認められた。2 乗オーダーの Low titer 群 67 例全例において、9 カ月以内に耐性は検出されなかった。PCR 陰性であった 48 例中 9 例で PBMC を用いた耐性検査も行ったが耐性変異は検出されなかった。

以上の結果から、各 3 群について以下のことが考えられる。High titer 群では治療開始 3 カ月後に耐性がなくとも以後確実に耐性を獲得し、治療効果は得られないことが示唆された。更にこの群においてはウイルス量のみで治療効果の推測が可能であり、必ずしも耐性検査の必要性はないと考えられる。同様に、Low titer 群においてもウイルス量が抑制されている期間は耐性の獲得はなかったことから、この群に対して必ずしも耐性検査の必要性はないと考えられる。その一方で、Middle titer 群の結果は、ウイルス量が 3 乗オーダーでも耐性変異は 27 例中 6 例 (22%) に出現するため、ウイルス量だけで耐性ウイルスの出現を予測することは難しいことが示された。しかしながら、この群においては治療開始 3 カ月後に耐性検査を行い耐性変異が同定されなければ、9 カ月までは治療効果が期待できることが示唆される。

以上 3 群の解析結果から、治療開始 3 カ月後耐性検査を行うことは有用であり、この結果は臨床的にその治療の成否を予測する上で重要であると結論づけた。

初回治療成績と薬剤耐性ウイルスの出現

Highly active anti-retroviral therapy (HAART) の導入は、HIV 感染者の予後を著しく改善した⁵⁾。しかし、初回治療に失敗すると交差耐性など様々な理由により、2 回目以降の治療効果を低下させることが少なくない^{1,2,4)}。そこで我々は、1997 年以降に無治療から AZT/3TC/IDV 治療を

著者連絡先：〒162-8655 東京都新宿区戸山 1-21-1 国立国際医療センターエイズ治療研究・開発センター臨床開発室
Fax : 03-5273-5277

2004 年 7 月 15 日受付

表 1 PI-naïve 患者^{a)}(n=119)における PI 治療開始後のウイルス量の推移と耐性獲得時期の関連

| 患者群 | 治療開始 3 カ月後のウイルス量 (コピー/ml) | 例数 | 耐性獲得累積患者数 | | |
|----------------|------------------------------|--------------------|-----------|----------|-----------|
| | | | 3 カ月後 | 6 カ月後 | 9 カ月後 |
| High titer 群 | $\geq 10^4$ | 25 | 4 (16%) | 15 (60%) | 25 (100%) |
| Middle titer 群 | $10^3 \leq VL < 10^4$ | 27 | 6 (42%) | 6 (42%) | 6 (42%) |
| | | (14) ^{b)} | 0 | 0 | 0 |
| | | (13) ^{c)} | 0 | 0 | 0 |
| Low titer 群 | $< 10^3$ | 67 | 0 | 0 | 0 |

a) 本研究の対象とした 119 例の PI 治療開始時のウイルス量は 10^4 コピー/ml 以上

b) Middle titer 群のうち 3 カ月以降にウイルス量が 3 乗オーダーにとどまった, または再上昇した症例

c) Middle titer 群のうち 3 カ月以降にウイルス量が 2 乗オーダーまで, または検出限界以下まで低下した症例

表 2 AZT/3TC/IDV 治療中断例の臨床経過

| 症例 | 理由 | 治療中断時 | | | 治療開始 24 カ月後 | |
|----|-------------|---------|-----------------|----------------------|-------------------|--------------------------|
| | | 中断時期(月) | 変更後 | 耐性変異 | ウイルス量 (コピー/ml) | CD4 (counts/ μ l) |
| 1 | IDV : 尿路結石 | 4 | AZT/3TC/NFV | 無 | UD ^{a)} | 759 |
| 2 | IDV : 尿路結石 | 7 | AZT/3TC/NFV | 無 | UD | 161 |
| 3 | IDV : 発熱 | 12 | AZT/3TC/NFV | 無 | UD | 772 |
| 4 | IDV : 尿路結石 | 14 | AZT/3TC/NFV | 無 | UD | 909 |
| 5 | AZT : 貧血 | 16 | d4T/3TC/NFV | 無 | UD | 657 |
| 6 | コンプライアンスの低下 | 6 | d4T/3TC/RTV/SQV | RTI/PI ^{b)} | 6,800 | 271 |

a) UD : 400 コピー/ml 以下

b) RTI : 逆転写酵素阻害剤, PI : プロテアーゼ阻害剤

開始した 17 例を対象とし, 耐性獲得状況と臨床経過を 2 年間調査した⁶⁾。本研究において耐性検査の PCR が陰性であった例については, 十分に治療効果が得られている結果であると考え, 耐性ウイルスは出現していないものと判断した。

ウイルス量に基づき判断した治療効果を図 1 に示した。本調査対象 17 例中 11 例 (65%) が治療開始 24 カ月間 AZT/3TC/IDV による初回治療を継続しており, このうち 8 例は 24 カ月後も VL は検出限界以下であった (Intent-to-treat 47%, on treatment 72%)。耐性ウイルスは継続例中 1 例に 3TC 耐性が認められたが, AZT, IDV に対してはこの RTI 耐性例を含めても耐性を獲得しておらず, 治療を継続例において 24 カ月までは耐性ウイルスは同定されなかった。治療中断例 6 例の主な理由は副作用であった (表 2)。そのうち耐性獲得がなく及び VL が検出限界以下の期間に治療を変更した 5 例は 24 カ月後も VL は検出限界以下に保たれていたが, 治療変更時に既に RTI, PI に対し共に耐性を獲得していた症例 6 では 24 カ月後のウイルス量は

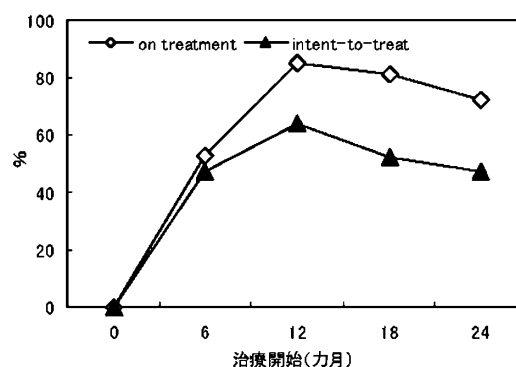


図 1 治療開始 24 カ月間の治療効果
血漿中ウイルス量をもとに Intent-to-treat, on treatment で評価した。AZT/3TC/IDV 治療を継続し, かつウイルス量が 400 コピー/ml 以下の時, 有効と判断した。治療開始 24 カ月後の治療効果は Intent-to-treat 47%, on treatment 72% だった。Intent-to-treat : (有効症例数/全17症例) × 100 (%), On treatment : (有効症例数/AZT/3TC/IDV 継続症例数)

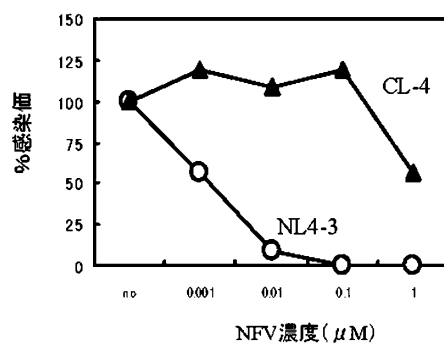
表 3 本研究に選んだ NFV 服薬患者 1 例の臨床経過と分離株

| 分離株 | 抗 HIV 療法 | NFV 服薬期間 [§] (月) | CD4 陽性細胞数 (/μl) | 血漿中 HIV-RNA 量 (コピー/ml) | 薬剤感受性 (倍) [†] | |
|------|-------------|------------------------------|--------------------|---------------------------|------------------------|-----|
| | | | | | NFV | SQV |
| — | AZT | —8 | 68 | 2.1×10^5 | — | — |
| CL-1 | ddC+SQV | —2 | 84 | 8.5×10^4 | — | — |
| CL-2 | d4T+3TC+NFV | 11 | 246 | 1.6×10^4 | — | — |
| CL-3 | d4T+3TC+NFV | 23 | 192 | 1.9×10^4 | 107 | 156 |
| CL-4 | d4T+3TC+NFV | 32 | 166 | 3.6×10^4 | 600 | 128 |

§ : NFV 服薬開始日を起点として算出した。

† : Magic-5 細胞を用いて各薬剤に対する 50% 感染阻止濃度 (IC₅₀) を決定した。標準株 NL4-3 の IC₅₀ を 1 とし、耐性を算出した。

A. 感染効率



B. 複製能

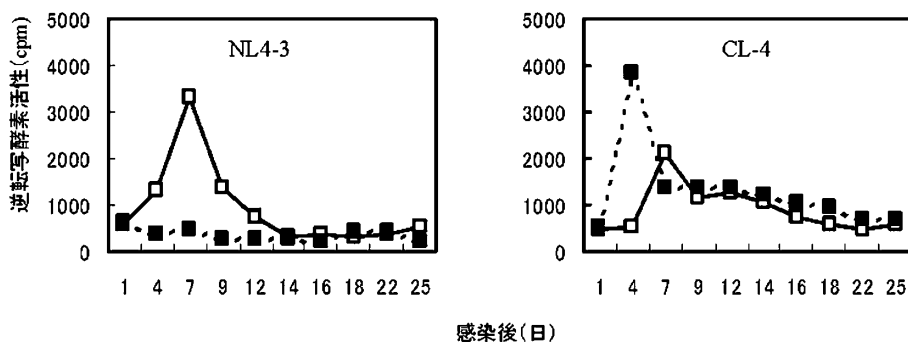


図 2 NFV 存在下での臨床分離株 CL-4 の動態

A. Magic-5 細胞を用いた HIV 感染効率の評価

横軸に NFV 濃度、縦軸に NFV 非存在下での感染価を 100 とし各薬剤濃度における % 感染値を示した。標準株 NL4-3 (○) は NFV0.1μM で完全に感染が阻止されたのに対し、CL-4 株 (▲) は 0.001-0.1μM の低濃度の NFV 添加により感染価が 20-27% 上昇した。

B. HIV 非感染者の PBMC を用いた HIV 複製能の評価

NFV0.1μM 存在下 (■), 非存在下 (□) にてウイルスを感染させた PBMC を、その後同条件で 25 日間培養した。ウイルスの複製動態は培養上清に含まれる逆転写酵素活性により評価した。CL-4 株は NFV0.1μM 添加 (■) により逆転写酵素活性のピークが早期に認められた。

表 4 NFV 服薬期間中に認められた Gag-PR 領域のアミノ酸変異

A. PR 領域

| 分離株 | 耐性関連変異部位 | | | | | その他の部位 | | | | | |
|------|----------|-----|-----|-----|-----|--------|-----|-----|-----|-----|-----|
| | L10 | M36 | G48 | 154 | V82 | E35 | N37 | K43 | I62 | I72 | T74 |
| CL-1 | I | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| CL-2 | I | — | V | V | A | — | — | — | — | V | S |
| CL-3 | I | I | V | V | A | — | — | — | V | V | S |
| CL-4 | I | I | V | V | A | D | S | T | V | V | S |

B. Ga, MA 領域

| 分離株 | MA 領域 | | | | | | | | | |
|------|-------|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|
| | N47 | K55 | M61 | G62 | F66 | V82 | S109 | Q117 | N129 | N130 |
| CL-1 | N47 | K55 | M61 | G62 | F66 | V82 | S109 | Q117 | N129 | N130 |
| CL-2 | — | E | I | — | S | — | — | — | — | D |
| CL-3 | D | E | I | — | S | — | — | — | — | D |
| CL-4 | D | Q | I | R | S | I | N | E | D | — |

C. Gag 前駆体タンパク質開裂部位近傍

| 分離株 | 開裂部位 | | | | |
|------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | MA/CA | CA/p2 | p2/NC | NC/p1 | p1/p6 |
| CL-1 | SQRF/PIVQ | ARVL/AEAM | GAIM/MQRG | RQAN/FLGK | PGNF/LQSR |
| CL-2 | ----/----- | ----/----- | ----/----- | ----/----- | ----/----- |
| CL-3 | ----/----- | ----/----- | ----/----- | ----/----- | ----/----- |
| CL-4 | ----/----- | --I-/----- | ----/----- | ----/----- | ----/----- |

NFV 期間中に同定されたアミノ酸変異を一文字略号にて列挙した。表 2. A の L10I はプロテアーゼ領域 10 番目のアミノ酸が L (ロイシン) から M (メチオニン) に変異したことを意味する。A. PR 領域, B. Gag, MA 領域, C. Gag, 開裂部位近傍

6,800 コピー/ml であった。以上の結果から、副作用等の理由であっても治療変更時にウイルス量が検出感度以下、かつ耐性変異が検出されていなければ、交差耐性による治療効果低下の可能性が少ないことが示唆された。

高度耐性ウイルスへの進化

近年では治療の長期化に伴い高度耐性ウイルスの出現する頻度が増加している。PI の耐性獲得及び耐性度の上昇については、現在次の 3 つの機序が考えられている。

第 1 に PR の活性中心近傍に一次変異が出現する。これらは PI との結合力を低下させウイルスにとって耐性という利点を付与する一方で、活性中心の構造変化を引き起こすため結果としてウイルスの複製能が低下することが報告されている^{7,8)}。第 2 に、この低下した PR の機能を代償する変異が付随される。この変異は二次変異と呼ばれ PR の立体構造の活性中心から遠い辺縁に形成される。これは一

次変異とは異なり直接的かつ単独で高度耐性へと導くものではなく、一次変異によって生じた歪を調整する役割を果たすことが報告されている⁹⁻¹¹⁾。これによりウイルスは適応度 (fitness) を回復し複製能を部分的に回復する。つまりウイルスにとって耐性度の上昇と複製能の維持は逆相関の関係にあると考えられる。

しかしながら PI の選択圧がある環境下では、生体内で適応度 (fitness) を増加させるため耐性度と複製能の両者を上げる方向に進化すると推測されるが、これはあくまで仮説であった。しかしながら我々は薬剤感受性試験を行うなかで、耐性と複製能の両者を獲得したウイルス、つまり薬剤存在下においてむしろ増殖能が亢進を示す株にもしばしば遭遇した。そこでこの現象の機序の解明に向けて、NFV 治療に失敗した患者 1 例から得られた臨床分離株をもとに遺伝子学的解析と組換えウイルスの作製、及びこのウイルスを用いて複製動態を解析し、この現象の責任領域

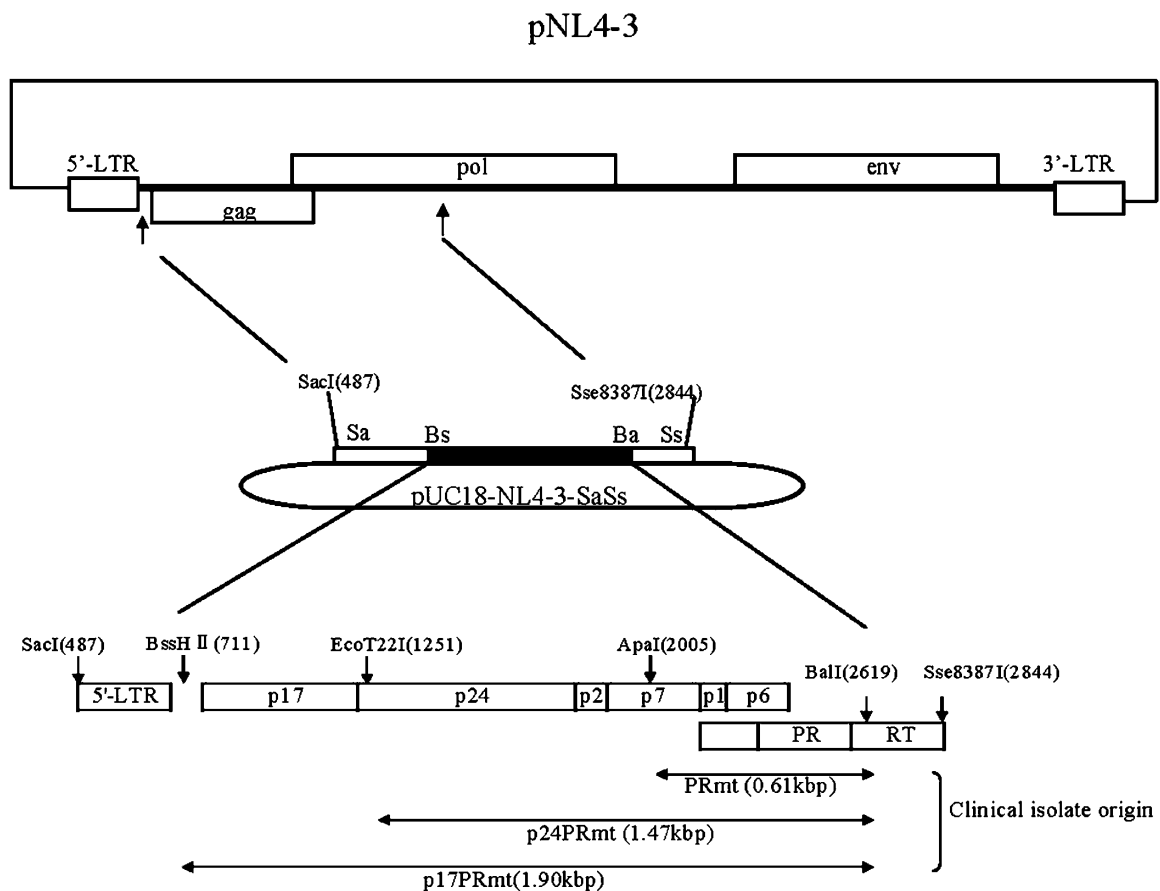


図 3 Gag-PR 組換えウイルスの作製図

臨床分離株 CL-4 の Gag-PR 領域を PCR 法にて増幅し、サブクローニングベクター pUC18-NL43-SaSs の BssH II-BalI 領域 (1.9kbp), EcoT22I-BalI 領域 (1.47kbp), ApaI-BalI 領域 (0.6kbp) に導入した。その後この SacI-Sse 8387I 断片 (2357 塩基) を pNL4-3 に置換し、CL-4 由来 gag-PR 領域を含む組換えウイルス DNA を得た。

を同定した¹²⁾。

本研究に選んだ患者の臨床経過、及び分離されたウイルスの薬剤感受性を表 3 に示した。当院来院時には既に ddC/SQV 治療を既に 8 カ月受けており、その後当院にて NFV を含む 3 剤に変更した。血漿中 HIV-RNA 量は 16,000 コピー/ml と高く推移しウイルス学的失敗が考えられたが、CD4 陽性細胞数が NFV 開始後 150 個/ μ l 以上を維持していたため治療を継続した。しかしながらこの期間に分離された臨床分離株 CL-4 の Magic-5 細胞¹³⁾ を用いた薬剤感受性は、NFV 開始後 23 から 32 カ月の 9 カ月間に SQV に対しては 150 倍前後と不変であったのに対し、NFV については 107 倍から 600 倍へと耐性度の上昇が認められた。この耐性度の上昇に着目し、NFV 治療開始 32 カ月後に分離された CL-4 株の感染価を Magic-5 細胞で、複製能を HIV-1 非感染者 PBMC にて評価した。結果を図 2 に示した。Magic-5 細胞を用いた実験では NFV 非存在下の感

染効率を 100% としたとき、0.001 から 0.1 μ M の NFV 添加により 20-27% の感染効率が上昇することが確認された。同様に PBMC を用いた実験においても、0.1 μ M の NFV 添加により増殖能の亢進が確認された。

そこでこの現象の責任領域を推測するため、NFV 治療期間に得られた 4 株の Gag-PR 領域の遺伝子解析を行った。結果は表 4 に示した。NFV 治療開始 11 カ月までに 5 カ所 (第 10, 36, 48, 54, 82 位) の耐性関連変異が揃ったのに対し、耐性関連変異位置以外のアミノ酸位では NFV による複製の亢進がみられる CL-4 において更に 3 アミノ酸変異 (第 35, 37, 43 位) が加算された。Gag 配列について、PR 変異との関連が報告されている開裂部位周辺では CA/p2, ARVL の V から I の変異が確認されたものの概ね保存されていたが、構造タンパク質ごとにとみると MA 領域内に特異的に 10 カ所の変異が同定された。この結果は MA の遺伝子変化が NFV 依存性な複製能の亢進に関与してい

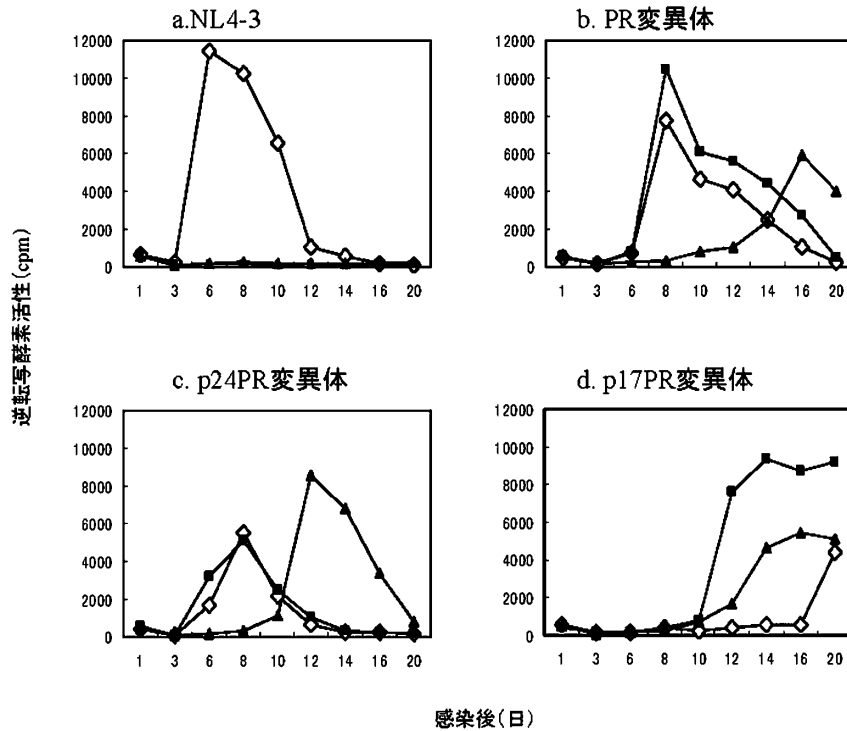


図 4 組換えウイルスの複製に及ぼす NFV の影響

MT-2 細胞を用いて NFV が変異体の複製能に及ぼす影響を評価した。A. NL4-3, b. PR 変異体, c. p24PR 変異体, d. p17PR 変異体。p17PR 変異体では NFV0.1 μ M 添加 (■) より複製能の亢進が認められた。◇: NFV (-), ■: NFV (0.1 μ M), ▲: NFV (1 μ M)

る可能性がある。

上記の遺伝子変化の意義を検討するため、組換えウイルスを作製した。作製方法の詳細は図3に示した。CL-4株由来の PR, gag 遺伝子を、標準的分子クローンである pNL4-3 に組み込んだ。p7中流から PR までを組み換えた PR 変異体、p24上流から PR までを組み換えた p24PR 変異体、gag 全域及び PR 領域を含む p17PR 変異体の3種の変異体を作製した。作製した組換えウイルスを NFV0.1, 及び 1 μ M 存在下, 非存在下でヒト T 細胞系の MT-2 細胞に感染させ、複製能を検討した。結果を図4に示した。

NFV 感受性株である NL4-3 は 0.1 μ M の NFV を加えると複製が完全に抑制されていたのに対し、PR 変異体は複製可能であった。しかしながら NFV 依存性の複製能の亢進は認められなかった。p24PR 変異体も同様の傾向を示した。一方、p17PR 変異体はこれまでの2つの変異体とは異なり、0.1 μ M の NFV 添加により複製能の亢進が確認された。以上の結果は PI 耐性の観点からみれば PR 変異体単独でも十分にその役割を有しているが、NFV 依存的増殖能亢進の観点からみた場合は PR 変異のみでは不十分であり、この現象には NFV 服薬期間の Gag-PR の共進化、特

に MA 変異が必須であることが示唆された。

今回我々は NFV 依存性に複製能の亢進が認められる高度 NFV 耐性臨床分離株をもとに解析し、その機序の解明を目指した。第1に遺伝子解析から、NFV 治療の長期化、及び耐性度の上昇に伴い PR 領域のみならず gag 領域、特に MA 領域特異的に変異が出現するが、他の Gag 領域は非常に保存されていることが明らかになった。つまり一次配列上は特定の領域に変異が集約されていた。しかし gag 前駆体蛋白質の2次構造の研究から、MA 領域下流は CA 領域上流のアミノ酸と α ヘリックスを形成することが確認されている。そのためこれら NFV 治療期間中に同定された MA 変異は、NFV 選択圧下で CL-4 株の CA アミノ酸配列との相互作用により選択された可能性が考えられる。この CA 配列との相互作用、また個々の変異がウイルスの複製、及び NFV 耐性にどのように寄与しているのかについては、今後更に詳しい解析が必要である。

第2に、組換えウイルスによる複製能解析により PR 変異単独でも十分に NFV 耐性能を有していることが明らかになった。その一方で、NFV 依存性に感染効率が亢進する臨床分離株 CL-4 の表現系を忠実に再現したのは p17PR 変

異体のみであった。以上の結果は MA 遺伝子変異が NFV 依存性の複製能の亢進に必須であることを示唆している。その一方で MA 蛋白質は NFV 作用点であるウイルスの複製後期過程のみならず、前期過程における核輸送、侵入においても機能を有する。この変異が複製前期ではどのように機能しているのか明確にすることが必要であると考えられる。

おわりに、今回我々は NFV 依存性に複製能を亢進する現象は、gag-PR の共進化が要因の一つであることを示した。このように患者生体内において特定の選択圧下では、その環境により高い適応度を上げる方向にウイルスは絶えず進化し続けている。今回我々が分離したウイルスはその一つの証拠となりうると考えている。

謝辞：この度は平成 15 年度 ECC 山口メモリアル賞をいただき、誠に光栄に存じます。これまで御指導下さった緒先生方、並びに本賞の審査委員長・熊本大学・松下修三先生をはじめとした選考委員の諸先生方に深謝申し上げます。

文 献

- 1) Molla A, Korneyeva M, Gao Q, Vasavanonda S, Schipper PJ, Mo HM, Markowitz M, Chernyavskiy T, Niu P, Lyons N, Hsu A, Granneman GR, Ho DD, Boucher CA, Leonard JM, Norbeck DW, Kempf DJ : Ordered accumulation of mutations in HIV protease confers resistance to ritonavir. *Nat Med* : 760-766, 1996.
- 2) Craig C, Race E, Sheldon J, Whittaker L, Gilbert S, Moffatt A, Rose J, Dissanayeke S, Chirn GW, Duncan IB, Cammack N : HIV protease genotype and viral sensitivity to HIV protease inhibitors following saquinavir therapy. *AIDS* : 1611-1618, 1998.
- 3) Aizawa S, Gatanaga H, Ida S, Sakai A, Tanaka M, Takahashi Y, Hirabayashi Y, Oka S : Clinical benefits of resistance assay for HIV-specific protease inhibitors : when to check and in whom?. *AIDS* : 1278-1279, 1999.
- 4) Hirsch MS, Conway B, D'Aquila RT, Johnson VA, Brun-Vezinet F, Clotet B, Demeter LM, Hammer SM, Jacobsen DM, Kuritzkes DR, Loveday C, Mellors JW, Vella S, Richman DD : Antiretroviral drug resistance testing in adults with HIV infection : implications for clinical management. *International AIDS Society-USA Panel. JAMA* : 1984-1991, 1998.
- 5) Palella FJ Jr, Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, Aschman DJ, Holmberg SD : Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med* : 853-860, 1998.
- 6) Aizawa S, Ida S, Sakai-Hachiya A, Tanaka M, Takahashi Y, Hirabayashi Y, Sugiura W, Kimura S, Oka S : Intention-to-treat analysis of anti-HIV therapies and incidence of drug resistance after a year of treatment. *Jpn J Infect Dis* : 129-131, 1999.
- 7) Zennou V, Mammano F, Paulous S, Mathez D, Clavel F : Loss of viral fitness associated with multiple Gag and Gag-Pol processing defects in human immunodeficiency virus type 1 variants selected for resistance to protease inhibitors in vivo. *J Virol* : 3300-3306, 1998.
- 8) Croteau G, Doyon L, Thibeault D, McKercher G, Pilote L, Lamarre D : Impaired fitness of human immunodeficiency virus type 1 variants with high-level resistance to protease inhibitors. *J Virol* : 1089-1096, 1997.
- 9) Zhang YM, Imamichi H, Imamichi T, Lane HC, Falloon J, Vasudevachari MB, Salzman NP : Drug resistance during indinavir therapy is caused by mutations in the protease gene and in its Gag substrate cleavage sites. *J Virol* : 6662-6670, 1997.
- 10) Dauber DS, Ziermann R, Parkin N, Maly DJ, Mahrus S, Harris JL, Ellman JA, Petropoulos C, Craik CS : Altered substrate specificity of drug-resistant human immunodeficiency virus type 1 protease. *J Virol* : 1359-1368, 2002.
- 11) Cote HC, Brumme ZL, Harrigan PR : Human immunodeficiency virus type 1 protease cleavage site mutations associated with protease inhibitor cross-resistance selected by indinavir, ritonavir, and/or saquinavir. *J Virol* : 589-594, 2001.
- 12) Matsuoka-Aizawa S, Sato H, Hachiya A, Tsuchiya K, Takebe Y, Gatanaga H, Kimura S, Oka S : Isolation and molecular characterization of a nelfinavir (NFV)-resistant human immunodeficiency virus type 1 that exhibits NFV-dependent enhancement of replication. *J Virol* : 318-327, 2003.
- 13) Hachiya A, Aizawa-Matsuoka S, Tanaka M, Takahashi Y, Ida S, Gatanaga H, Hirabayashi Y, Kojima A, Tatsumi M, Oka S : Rapid and simple phenotypic assay for drug susceptibility of human immunodeficiency virus type 1 using CCR5-expressing HeLa/CD4 (+) cell clone 1-10 (MAGIC-5). *Antimicrob Agents Chemother* : 495-501, 2001.