

# HIV 薬剤耐性検査

## HIV-1 Drug resistance genotyping

まつ だ まさ かず すぎ うら わたる  
 松 田 昌 和<sup>1)</sup>: 杉 浦 亙<sup>2)</sup>  
 Masakazu MATSUDA Wataru SUGIURA

### はじめに

ヒト免疫不全ウイルス (HIV: Human Immunod-efficiency Virus) は後天性免疫不全症候群 (AIDS: Acquired Immunodeficiency Sndrome) の病原ウイルスである。主な感染経路は性交渉の他に血液感染、母子感染が挙げられる。HIV または HIV 感染細胞を含む体液や血液が傷口や粘膜を介して侵入する。宿主細胞へ侵入後自身の逆転写酵素 (RT) とインテグラーゼ (IN) を用いて一本鎖 RNA ゲノムを二本鎖 DNA とし宿主ゲノムへの組み込みを行う。その後宿主細胞の生体活動を利用して自らのタンパクの前駆体を発現し、自身のプロテアーゼ (PR) の作用で成熟する。現在臨床使用されている抗 HIV 薬はこれら HIV に特異的な酵素である RT と PR を阻害するものである。IN 阻害薬は現在のところ開発段階である。

HIV に感染するということは我々の遺伝子の中に HIV の遺伝子が組み込まれるということであり、現在の治療法では残念ながら体内から完全に HIV を排除することは難しい。抗 HIV 治療の目的は体内でのウイルス増殖を抑えること、そして病態の進行を食い止めることである。抗 HIV 治療は 1997 年の多剤併用療法 (HAART: Highly Active Antiretroviral Therapy) の導入によって大きく変わった。それまでのヌクレオシド型逆転写酵素阻害剤 (NRTI: Nucleoside Analogue Reversetranscriptase Inhibitor) だけでなく、非ヌクレオシド型逆転写酵素阻害剤 (NNRTI: Non-nucleoside Reversetranscriptase Inhibitor) や

プロテアーゼ阻害剤 (PI: Protease Inhibitor) が相次いで実用化され、現在までに 18 種の化合物、剤形にすると 24 種類が臨床使用されている。また現在も活発に新薬開発が進められており、次々に新薬が登場することが期待されている。3 ないし 4 剤を選択して服用する HAART では阻害剤の絶対量が多いことに加え、ウイルス増殖を阻害する作用点が増えるため、それまでの単剤や二剤治療と比べて強力に血中ウイルス量を検出感度未満へ抑制することが可能となり、HIV 感染者の予後を著しく改善させることに成功した。

しかしながら、それでも薬剤耐性の出現による治療の失敗が起こりうるため、HAART 導入とほぼ同時期に国内のいくつかの公的研究機関や医療機関、大学等で薬剤耐性検査が臨床研究として実施されるようになった。薬剤耐性検査が治療の指標として有効であることは多くのコホート研究で実証され、今や HIV 感染者/AIDS 患者が適切な治療薬を選択し効果的な治療を進めるうえで、薬剤耐性検査は欠かせない検査とされている<sup>1-3)</sup>。わが国では研究検査としての 9 年間を経て 2006 年 4 月に「HIV-ジェノタイプ薬剤耐性検査は、抗 HIV 治療の選択及び再選択の目的で行った場合に、3 月に 1 回を限度として算定できる。」として保険点数 6000 点で収載された。本稿では新規に保険収載された新しい測定法として、HIV 薬剤耐性検査について解説する。

### I. 薬剤耐性検査の種類と検査方法

HIV 薬剤耐性検査には大きく分けて 2 つの手法が

1) 三菱化学メディエンス株式会社 感染症検査部  
 感染症遺伝子グループ  
 ☎174-8555 東京都板橋区志村 3 丁目 30 番 1 号  
 2) 国立感染症研究所エイズ研究センター  
 第二研究グループ  
 ☎208-0011 東京都武蔵村山市学園 4-7-1

1) *Infectious Disease Molecular Genetic Group, Infectious Disease Testing Department, Mitsubishi Chemical Medicine Corporation (30-1, Shimura 3-chome, Itabashi-ku, Tokyo)*  
 2) *AIDS Research Center National Institute of Infectious Diseases (4-7-1 Gakuen Musashimurayama Tokyo)*

ある。1つはここで解説する遺伝子検査（ジェノタイプ）で、体内で増殖している HIV の遺伝子解析を行い、得られたアミノ酸配列をデータベースや一定のアルゴリズムと照合して薬剤耐性を間接的に評価する方法である。もう1つは感受性検査（フェノタイプ）と言われ、HIV 感染者のリンパ球を培養してウイルスを分離・回収、または遺伝子組み換え技術によって感染者ウイルス由来のプロテアーゼと逆転写酵素を持つ感染性ウイルスを再構築し、抗 HIV 薬存在下での増殖能から薬剤耐性を直接的に評価する方法である<sup>4,5)</sup>。ジェノタイプは保険収載されたが、フェノタイプは未だ研究段階である（表）。

ジェノタイプは約 10 年前にその技術はほぼ確立していた。その検査法は抗 HIV 療法の発展とともに国公立研究機関や大学等で in-house 法として開発・運用されていた研究検査がベースとなって発展してきた経緯があり、そのため検査手法にはさまざまな手法がとられている。現在厚生労働省研究班によって検査標準化への取り組みが進められており、別項を設けて解説する。薬剤耐性遺伝子検査は

大きく①検体からのウイルス核酸の抽出、② PCR 法による標的遺伝子の増幅と塩基配列の決定、そして③アミノ酸変異の解析と耐性評価法の 3ステップに分けられる（図）。

①検体からのウイルス核酸の抽出法：

検体からのウイルス核酸の抽出は、100～200 $\mu$ L 程度の血清または血漿を材料として RNA を精製するのが一般的である。RNA の精製にはマグネットビーズ法、スピнкаラム法その他従来の AGPC 法も利用できる。また、全血検体であればリンパ球から DNA を抽出し、宿主ゲノムに組み込まれた HIV のプロウイルス DNA から検査することも可能であるが、これは薬剤耐性検査としては一般的でない。その時点で活発に増殖しているウイルスの遺伝子を調べること以最も有効な治療薬の指標とするのがこの検査の目的であるが、プロウイルス DNA では必ずしもこの目的を達成し得ないからである。

② PCR 法による標的遺伝子の増幅と塩基配列の決定法：

RNA を鋳型にして RT-PCR および必要に応じて

表 薬剤耐性検査：ジェノタイプとフェノタイプの比較

	ジェノタイプ検査	フェノタイプ検査
利点	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 一般の検査室で実施可能</li> <li>・ 比較的短期間で結果が得られる</li> <li>・ 保険適用ができる</li> <li>・ 結果は感受性検査とほぼ（90～95%）一致する</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 薬剤感受性/耐性を直接評価するため、結果を理解しやすい</li> <li>・ 未知の変異による耐性も評価できる</li> </ul>
欠点	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 得られる結果は間接的な評価である</li> <li>・ 優れたウイルス株だけを検出しやすい</li> <li>・ 一部感受性と一致しない場合がある（5%前後）</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ BSL3 以上の高度安全施設が必要</li> <li>・ 検査日数、費用がかかる</li> <li>・ 臨床的なカットオフが明確でない場合がある</li> </ul>

HIV 薬剤耐性検査の工程図

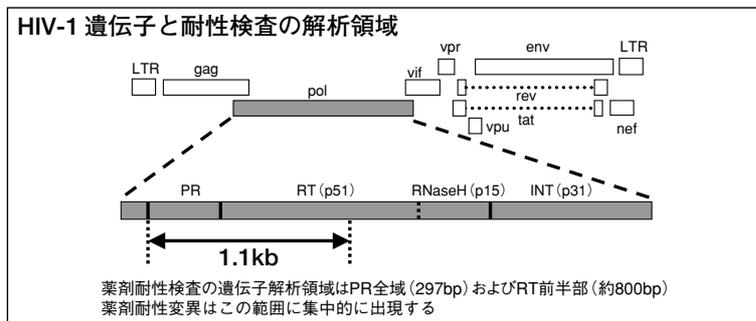
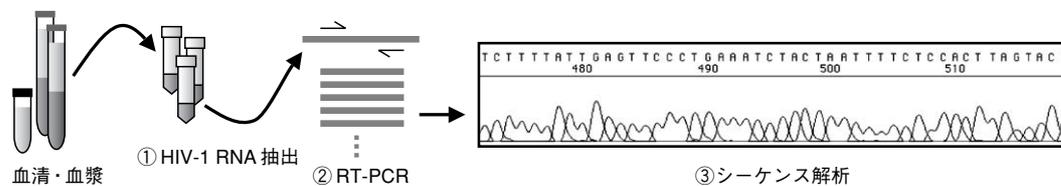


図 検査の概要

nested-PCRを実施して増幅産物を得た後、ダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定する方法が一般的である。解析対象となるのはPR領域は297bp(99アミノ酸)のほぼ全域であり、RT領域は1680bp(560アミノ酸)の前半部である。この約1kb余りの塩基配列を解析することが必須となる。

### ③アミノ酸変異の解析と耐性評価法：

アミノ酸変異の解析と耐性評価は、この検査の最も重要な工程と位置づけられる。ここでの第一段階はダイレクトシーケンスで塩基配列を決定することである。次に塩基配列をアミノ酸配列に変換し、標準HIV株もしくは同一患者の過去の配列と比較して変異リストを作成する。そして変異リストをデータベース照合や各種アルゴリズムにしたがって解析することで、どの薬剤にどれくらいの耐性があるかを評価することとなる。

すでにHIV薬剤耐性検査を実施している検査室等では保険収載前から研究検査として独自のプロトコルを確立しているが、新規にこの検査の実施を検討している場合は、市販されている検査試薬キット(アボット社 ViroSeq™、バイエル社 TRUGENE®)を利用するのも一案である。市販キットではRNA抽出から増幅・塩基配列解析とデータベース照合による耐性評価までがセットになっており便利である。

国立感染症研究所や厚生労働省研究班の調査研究によれば、各種in-house法・市販キットとも開発当初からは改良が加えられており、いずれも幅広いサブタイプに対応しており、検出感度も1000~3000コピー/mLを達成している<sup>6)</sup>。基本原理は上述のとおり、RT-PCR/ダイレクトシーケンスであり、得られる結果の違いは最終的に耐性評価を行うときに利用するデータベースやアルゴリズムの違いによるものである。

## II. 薬剤耐性検査の問題点とこれからの課題

### 薬剤耐性遺伝子検査の解釈方法

HIV薬剤耐性検査では一次データとして得られた塩基配列をもとに二次的な解析を行い、どの薬剤にどれほど感受性や耐性があるかを評価し、最終的な検査結果として報告することになる。ここでは耐性評価の方法や、問題点を述べる。

IAS-USA (International AIDS Society USA, <http://www.iasusa.org/>) では各薬剤の耐性変異のリストを随時更新し公開している。学術論文や学会等で発表された情報を集約し薬剤耐性と関連のあるアミノ酸変異をリストしてまとめたものであるが、そもそも異なるプラットフォーム上で解析・評価された結果の集積であり、各変異と耐性度合いの関連性は低く、そのまま薬剤耐性の評価に用いることはできない。

よりわかりやすく耐性レベルを評価する方法としては、The French ANRS (National Agency for AIDS Research, <http://www.hivfrenchresistance.org/index.html>) やスタンフォード大学 HIV Drug Resistance Database (<http://hivdb.stanford.edu/index.html>) を利用することができる。耐性評価の結果は、各薬剤ごとの耐性度合いとしてANRSでは3段階 (Resistance, Possible Resistance, Susceptible) で、スタンフォードではさらに詳細に5段階 (High-level resistance, Intermediate resistance, Low-level resistance, Potential low-level resistance, Susceptible) で示される。各アルゴリズムの特徴は、ANRSでは検出された変異の組み合わせパターンから総合的に判断し、耐性評価を行うのに対し、スタンフォードではひとつひとつの変異に点数を付け、その合計点で判定を行う。スタンフォードのデータベースを利用する際は、検査で得られた塩基配列をインターネットのホームページ上に入力するか、または検出されたアミノ酸変異を打ち込むことで、自動的に評価結果が表示されるという簡便性があり、国内ではよく利用されているようである。

薬剤耐性を評価する方法は上記のように一般公開されているものの他にも商業的なものも複数あり、それぞれに特徴的なアルゴリズムが開発されている。耐性評価アルゴリズムは一定期間ごとに改良され、より精度が向上しているが、異なるアルゴリズムで同じ塩基配列やアミノ酸変異を照合すると、異なる結果が得られる場合がある<sup>7,8)</sup>。いずれの場合も実際の薬剤感受性を測定した結果ではなく、過去に蓄積されたデータに基づいて計算された結果であり、どのアルゴリズムが正しいとか間違っているという判定は付け難い。現状では複数の評価アルゴリズムから総合的に判断することが望ましいだろう。

現在のHIV薬剤耐性検査は前項でも述べたとお

り、RT-PCR/ダイレクトシーケンス法が一般的であり、最も普及している。しかし今後新たな治療薬の開発・実用化が進み、解析対象となる遺伝子領域が拡大すると技術的に検査は困難となろう。技術的側面だけでなく、検査コストや所要日数を考慮しても、将来的にはより新しい技術を用いて効率的な検査方法へシフトし、より精度の高い耐性評価アルゴリズムが構築されていくことが望まれる。

### Ⅲ. 薬剤耐性検査の質の管理

薬剤耐性遺伝子検査を研究検査として始めた当初は主要な国内の HIV-1 感染者は汚染血液製剤の曝露による感染症例であったことから、欧米に多いサブタイプ B を標的としてプライマー設計を行っていた。その後、性的接触による感染症例の増加に伴い B 以外のサブタイプや CRF (組み換え体) など検出される HIV の多様化が進んだ。その結果、従来の B を元に設計されたプライマーでは十分に増幅できない症例に直面することとなり、これらに対応するためにさまざまなプライマーが設計されてきた。ここで問題となるのが、薬剤耐性検査の質の管理である。プライマーや増幅プロトコルが多様化するにしたがい、検査を実施した施設により結果のばらつきが出るようになってきた。このような検査実施機関による検査の質が異なることのないように、全国どこでも同質の検査が受けられるような検査体制を築き上げるのが重要である。このためには薬剤耐性検査の標準化作業が欠かせない。従来施設ごとに行われてきた検査にトレーサビリティを持たせるために、現在エイズ対策研究事業「薬剤耐性 HIV の動向把握のための調査体制確立およびその対策に関する研究」において基準測定操作法と外部コントロールとしての実用抗生物質の策定作業を進めている<sup>9)</sup>。また定期的な外部精度管理も実施しており成果を上げている。

#### おわりに

薬剤耐性遺伝子検査の保険収載は従来研究として行われてきた検査の門戸を広げるという点で大きな

前進である。しかし高額な検査であることから、検査ガイドラインに基づく適切な実施が望ましい<sup>10)</sup>。今後の課題として、新たな薬剤に対する迅速な対応と検査のコストダウンが挙げられる。

### 文 献

- 1) Durant J., Clevenbergh P., Halfon P., *et al.*: Drug-resistance genotyping in HIV-1 therapy : the VIRADAPT randomised controlled trial. *Lancet*, **353** : 2195-2199, 1999.
- 2) Baxter J.D., Mayers D.L., Wentworth D.N., *et al.*: A randomized study of antiretroviral management based on plasma genotypic antiretroviral resistance testing in patients failing therapy. CPCRA 046 Study Team for the Terry Beinr Community Programs for Clinical Research on AIDS. *Aids*, **14** : F83-93, 2000.
- 3) Cingolani A., Antinori A., Rizzo M.G., *et al.*: Usefulness of monitoring HIV drug resistance and adherence in individuals failing highly active antiretroviral therapy : a randomized study (ARGENTA). *Aids*, **16** : 369-379, 2002.
- 4) Hertogs K., de Bethune M.P., Miller V., *et al.*: A rapid method for simultaneous detection of phenotypic resistance to inhibitors of protease and reverse transcriptase in recombinant human immunodeficiency virus type 1 isolates from patients treated with antiretroviral drugs. *Antimicrob Agents Chemother*, **42** : 269-276, 1998.
- 5) Petropoulos C.J., Parkin N.T., Limoli K.L., *et al.*: A novel phenotypic drug susceptibility assay for human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob Agents Chemother*, **44** : 920-928, 2000.
- 6) Mukaide M., Sugiura W., Matuda M., *et al.*: Evaluation of Viroseq-HIV version 2 for HIV drug resistance. *Jpn J Infect Dis*, **53** : 203-205, 2000.
- 7) Ravela J., Betts B.J., Brun-Vezinet F., *et al.*: HIV-1 protease and reverse transcriptase mutation patterns responsible for discordances between genotypic drug resistance interpretation algorithms. *J Acquir Immune Defic Syndr*, **33** : 8-14, 2003.
- 8) Snoeck J., Kantor R., Shafer R.W., *et al.*: Discordances between interpretation algorithms for genotypic resistance to protease and reverse transcriptase inhibitors of human immunodeficiency virus are subtype dependent. *Antimicrob Agents Chemother*, **50** : 694-701, 2006.
- 9) Fujisaki S., Fujisaki S., Ibe S., *et al.*: Performance and quality assurance of genotypic drug-resistance testing for human immunodeficiency virus type 1 in Japan. *Jpn J Infect Dis*, **60** : 113-117, 2007.
- 10) 杉浦互, 岡慎一: HIV 薬剤耐性検査ガイドライン. 平成 18 年度厚生労働化学研究費補助金エイズ対策研究事業「HIV 感染症の医療体制の整備に関する研究」2007.