

[別紙 1]

## 論文の内容の要旨

論文題目 抗 HIV 療法中の薬剤耐性変異に関する研究

指導教員 岩本 愛吉教授

東京大学大学院医学系研究科

平成14年4月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 古賀 一郎

1型ヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus type 1 :HIV-1) はヒトに後天性免疫不全症候群 (acquired immunodeficiency syndrome:AIDS) を引き起こす。主な感染経路は性的接触による感染、血液を介した感染、母子感染であるが、現在の我が国における新規感染者のほとんどが性的接触による感染である。

HIV 感染症の治療には 3 剤以上の抗 HIV 薬を併用する強力な抗レトロウイルス療法 (highly active antiretroviral therapy; HAART) が行われるようになり、体内の HIV の増殖を確実に抑制し、CD4 陽性 T 細胞数の回復も可能となった。しかし HAART を妨げる最も大きな要因として抗ウイルス薬に対して耐性を示すウイルスの出現が問題となっている。

また、HIV 感染者における他の感染症の合併は高頻度にみられ、特に男性同性愛者 (MSM) の HIV 感染者における梅毒に代表される性感染症の合併は現在も増加傾向にある。今後 HIV 感染者の増加、HAART 導入による HIV 感染者の予後の改善により性感染症はさらに増加することが懸念される。MSM を中心とした HIV 感染者における梅毒の流行は、新たな HIV 感染者を生み出すばかりでなく、HIV 感染者が新たに別の HIV 株に感染する HIV 重感染 (superinfection) の可能性をも孕む。さらに HIV 感染者が梅毒など他の感染症を罹患後に血中ウイルス量が増加したとの報告がされているがその影響については完全には明らかになっていない。

そこで有効な HAART 中に梅毒の初感染を認めた東京大学医科学研究所附属病院の 4 名の MSM 症例について、保存されていた末梢血単核球 (PBMC) を用いて梅毒感染前後の HIV プロウイルス DNA の塩基配列を決定し、他の HIV 株の重感染の有無、薬剤耐性関連変異の獲得の有無、HIV プロウイルス DNA の変異の頻度を解析し、これらに対して梅毒感染が影響を及ぼす可能性について検討を行った。

4 例はいずれも MSM の HIV 感染者で、HAART 導入以後梅毒感染まで良好に血中ウイルス量 (VL) を抑制していた症例であった。症例 1 は、肝悪性リンパ腫で AIDS を発症後、他院にて化学療法と並行して HAART が導入された症例であった。当院初診時から 15 ヶ月間 VL が検出感度以下に抑制されていたが梅毒感染を契機として VL の急増を認めた。症例 2 も梅毒感染前の時点と比較して梅毒感染後に十倍以上の VL の上昇を示した。症例 3、4 は、梅毒感染の前後での大きな変化を認めない症例であった。

まず、症例 1 では、梅毒感染後に確認された突然の VL の急増と多数の薬剤耐性関連変異が薬剤耐性 HIV 株の重感染の可能性について検証を要するものと考えられた。enW3 領域のダイレクトシーケンス、サブクローンのシーケンスで得られた塩基配列と HIV-1 M group の各サブタイプの参照配列、当研究室で解析した日本人患者の参照配列を用いて系統樹解析を行い、他の HIV 株の重感染の可能性を検討した。この結果、過去の HIV superinfection 報告例で示された大きな変化は梅毒感染の前後では認められなかった。

図 1 症例1における薬剤耐性関連変異の経時的変化 (経過中を通じて ZDV+3TC+NFV を服薬)

アミノ酸部位 野生型	RT領域						PR領域					
	41	67	184	210	215	30	46	63	88			
	M	D	M	L	T	D	M	L	N			
1-1	-	-	11/16*	-	W	D	11/16*	-	-	P	-	16/16
	L	-	5/16*	-	W	D	5/16*	-	-	-	-	-
1-2	L	-	20/20	-	W	D	19/20	-	I	P	-	13/13
	-	-	-	T	W	D	1/20	-	-	-	-	-
1-3	L	N	20/20*	V	W	Y	20/20*	N	I	P	D	20/20
1-4	L	N	19/20	V	W	Y	15/20	N	I	P	D	12/20
	L	-	1/20	-	W	D	4/20	N	I	P	-	2/20
	-	-	-	-	W	Y	1/20	-	I	P	D	1/20
	-	-	-	-	-	-	-	N	-	P	-	1/20
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	D	1/20
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	-	3/20

症例1の1-1から1-4までの各時点での薬剤耐性関連変異の獲得状況を示す。  
 図中 □ は薬剤耐性変異アミノ酸を、- は野生株と同一のアミノ酸であることを示す。  
 分数はサブクローンのシーケンスから得られたウイルス株の存在比率を示す。  
 なお、1-2、1-4のRT領域は前半、後半を別々に増幅し、サブクローンの解析を行った。  
 \*は同じ列のRT領域前半とRT領域後半が同一の株であることを示す。

薬剤耐性関連変異がどのようにして蓄積したかを明らかにするため梅毒感染前に二点 (1-1、1-2)、梅毒感染後に二点 (1-3、1-4) を選び、PR 領域、RT 領域について塩基配列の経時的変化を決定した (図 1)。その結果、梅毒感染後に確認された薬剤耐性関連変異のうち、ZDV 耐性に関連する M41L、L210W が 1-1 時点ですでに存在し、ZDV 耐性変異からの復帰変異であると考えられる T215D も確認された。また VL が検出感度以下で経過していた 1-2 時点でも PR 領域に M46I が新たに加わり、さらに梅毒感染時 (1-3)

に RT 領域の D67N、M184V、T215Y、PR 領域の D30N、N88D も加わって合計 9 カ所まで増えたことが分かった。また梅毒感染 2 ヶ月後では RT 領域の D67N、M184V、T215Y、PR 領域の D30N、M46I、D88N の 6 カ所（いずれも 1-1 時点以後に獲得された変異）の薬剤耐性変異部位で野生型アミノ酸の再出現が確認された。

以上から症例 1 では梅毒感染前に 4 カ所の薬剤耐性変異を保持し、梅毒感染後に血中ウイルス量の増加とともにさらに 5 カ所の薬剤耐性変異を獲得したことが明らかになった。1-4 の時点で 9 カ所の薬剤耐性変異のうち 6 カ所で、野生株や薬剤感受性株の塩基配列への復帰が一部のサブクローンに認められた原因として、服薬の不履行による血中薬剤濃度の低下や梅毒感染による HIV 感染細胞の活性化により潜在していた野生型株が増加した可能性が考えられた。また、梅毒による影響ではないが、HAART 導入後一貫して血中ウイルス量が検出感度以下に抑えられ良好な治療経過を辿っていたとしても元々薬剤耐性関連変異を持つウイルス株に感染している可能性、また VL が検出感度以下で経過していても新たな変異を蓄積する可能性についても明らかになった。

次に症例 2 について、梅毒感染後に梅毒感染前と比較して 10 倍以上の VL の上昇を示したことから症例 1 と同様に梅毒感染前（2-1）、梅毒感染後（2-2）の 2 時点を設定し、薬剤耐性関連変異の変化、*env3* 領域の塩基配列の変化を調べた。*env3* 領域の塩基配列は梅毒感染前後とも同一であり、症例 2 でも HIV の重感染の可能性は示唆されなかった。

図 2 症例 2 における RT 領域の薬剤耐性関連変異の変化  
(経過中を通じて d4T+ddI+EFV を服薬)

アミノ酸部位	106	179	184	
野生型アミノ酸	V	V	M	
2-1	-	□	-	20/20
2-2	-	□	-	6/20
	□	□	-	2/20
	□	-	□	1/20
	-	-	□	4/20
	-	-	-	7/20

症例 2 の 2-1、2-2 の各時点での薬剤耐性関連変異の獲得状況を示す。図中 □ は薬剤耐性変異であることを示す。- は野生株のアミノ酸と同一であることを示す。分数はサブクローンのシークエンスから得られたウイルス株の存在比率を示す。

梅毒感染前のサブクローンの RT 領域のシークエンスでは塩基配列を決定した 20 株全てに薬剤耐性関連変異 (V179D) が一カ所確認された。また梅毒感染後には新たに V106M (20 株中 3 株)、M184V (20 株中 5 株) の 2 カ所の薬剤耐性変異が確認された (図 2)。その一方で V179D は全体の 40% のサブクローンからしか確認されなかった。

梅毒感染後に新たに確認された薬剤耐性関連変異の一つである M184V はこの例が過去に内服していた薬剤 3TC に対して強力に耐性を示す変異であり、また M184V を含む株はいず

れも梅毒感染前の 2-1 で全株から確認された V179D を持っていなかった。そのため M184V を持つ株は 2-1 よりさらに過去の時点で耐性変異を獲得したものと考えられた。このような HIV が出現した原因として梅毒感染後にサイトカインが増加し潜伏感染 HIV の活性化を促進した可能性が考えられた。

これら 2 例の結果から、梅毒感染後に血中ウイルス量が増加した原因として、梅毒感染による潜伏感染 HIV を含めた体内の HIV の活性化、抗 HIV 薬内服の不十分な履行の可能性が考えられた。また可能性は限定されるものの類似した塩基配列を持つ HIV の重感染の可能性を完全に否定することは出来なかった。

梅毒感染の前後で VL の変化がほとんど見られなかった症例 3、4 では、いずれも梅毒感染前に RT 領域、PR 領域に薬剤耐性に寄与する変異はなく、梅毒感染後にも新たな薬剤耐性関連変異の獲得はなかった。しかし症例 4 では、梅毒感染後の時点で一時的に *env3* 領域の塩基配列に他の時点とは異なる配列が多く見られた。また塩基配列の変化は *env3* 領域に限定されていて、またその変化は一時的であった。*env3* 領域の塩基配列の変化の原因として症例 1、症例 2 で挙げた梅毒感染後に潜伏感染 HIV が活性化され、再出現した可能性が考えられた。

最後に、全症例の梅毒感染前後の HIV プロウイルス DNA の塩基配列を用いて、2 時点間の変異蓄積を定量化する Evolutionary Distance (ED) を計算し、梅毒感染が塩基配列の変化に及ぼす影響を検討した。*env3* 領域の変化について、V3 領域の ED が比較的大きかった 2 例（症例 1、4）でも、過去の HIV の superinfection 報告例に見られる大きな変化を認めることは出来なかった。また、RT 領域についての解析から梅毒感染後に血中ウイルス量が増加した 2 例だけでなく、血中ウイルス量に変化を認めなかった 2 例でも梅毒感染前後で一定の変化が認められた。しかし梅毒感染後に塩基配列の変異が促進された可能性は示唆されなかった。

今回解析した有効な HAART 下で梅毒を合併した 4 例のうち 2 例では、梅毒感染後に血中ウイルス量が増加し、その一例は治療失敗から薬剤の変更を余儀なくされた。また血中ウイルス量が増加したもう一例では、梅毒感染後に増加した血中ウイルス量はその後元の水準まで収束し、治療失敗には至らなかったが、新たに薬剤耐性変異の獲得により将来の薬剤の選択肢を減らしうる結果となった。また血中ウイルス量に変化しなかった 2 例のうちの 1 例を含め、4 例中 3 例で梅毒感染後に体内の HIV が増殖した可能性や潜伏感染 HIV が活性化された可能性が考えられた。

MSM を中心とした HIV 感染者における梅毒の高頻度の合併はやはり看過されるべきではなく、HAART 中の HIV 感染者における梅毒に代表される性感染症の合併の影響について今回の研究から得られた知見を HIV の臨床の場に還元し、HIV 感染者における性感染症の蔓延を抑止していくことが求められた。また今回の研究では対象症例が 4 例に留まったが、今後該当する症例があればさらに検討を続けていきたいと考えた。