

論文題目 Changes of HIV-1 Resistance-Associated Mutations in Plasma and PBMC during on-Therapy and after Interruption

抗 HIV-1 治療中及び中断後血漿及び末梢血単核球中の
薬剤耐性ウイルスの動態に関する研究

氏名 毕秀琼 (Xiuqiong Bi)

【背景】 HIV-1 (Human immunodeficiency virus type-1) はエイズ (後天性免疫不全症候群, AIDS) の病原ウイルスである。HIV-1 は CD4 陽性細胞に感染、逆転写後プロウイルスとして宿主細胞の DNA に挿入、その後 RNA として複製するライフサイクルを持つ。強力な多剤併用療法 (HAART, highly active antiretroviral therapy) は体内のウイルスの複製と成熟を抑えることによりウイルス増殖を阻止する。現在一般臨床で使用されているのは、ウイルス逆転写を阻害する逆転写酵素阻害剤 (RTI) とウイルス粒子の成熟を阻害するプロテアーゼ阻害剤 (PI) である。HIV-1 はレトロウイルスであり、逆転写の精度が低く、ウイルスの増殖が速いため高変異性を持つ。これが薬剤耐性の原因である。耐性変異は一次変異 (major, primary mutation) と二次変異 (minor, secondary mutation) に分れ、一次変異がウイルスに耐性を付与すると同時にウイルスの増殖能を低下させ、二次変異は耐性レベルを押し上げて低下した増殖能を引き戻す。HAART 失敗時に、血漿を用いて薬剤耐性検査が薦められている。しかし、薬剤耐性ウイルスの動態は血漿と末梢血単核球でどの程度異なるかは示されていない。本研究では、HAART 失敗時と HAART 中断後の血漿中の HIV-1 RNA ウイルスと末梢血単核球中の DNA プロウイルスの耐性変異の動態を解析し、耐性検査はいつ、どの検体で行うのが一番有用な情報を寄与するのかを検討した。

【方法】 本研究では、薬剤耐性遺伝子解析法 (genotypic assay) を用いて、PI を含む

論文の内容の要旨

HAART を開始後治療が失敗し、血中 HIV ウイルス量 (viral load, VL) が 400 copies/ml 以上の患者 22 名の血漿 275 検体及び末梢血単核球 211 検体のプロテアーゼ遺伝子をシーケンスし、HAART 失敗後 PI 耐性変異の血漿と末梢血単核球での出現頻度、出現時期、耐性の入り方、またその出現と VL の関連について解析した。また、HAART 中断後、薬剤耐性変異を持つ 16 名の血漿中ウイルス RNA と末梢血単核球中プロウイルス DNA の逆転写酵素およびプロテアーゼ遺伝子をシーケンスし、RTI と PI の耐性変異が野生型に戻るまで両検体中での消失時期、パターンを解析した。薬剤耐性変異の判定は IAS-USA の耐性変異表に準じた。

【実験結果】 HAART が失敗した HIV-1 患者 22 名の血漿サンプル 275 件と末梢血単核球サンプル 211 件のうち、同時に採取されたのが 107 対であった。PI を含む HAART を開始し、血中ウイルスが検出された状態で服薬を続けた場合、107 対のサンプル中 70 対 (65.4%) での PI 耐性変異の数が異なり、末梢血単核球中より血漿中の方が耐性変異を多く認め、VL が低いほど末梢血単核球中の耐性変異数が少なかった ($P < 0.0004$) (表 1)。また、薬剤耐性変異の出現時期は血漿中と末梢血単核球中で異なり、耐性変異がまず血漿から検出され、続いて末梢血単核球で検出された。共に耐性変異の数は時間とともに徐々に増加した。血漿中の耐性変異出現から末梢血単核球での出現までの lag time は平均 289 日 (0-739 日) と予想より長かった。さらに、VL が 10,000 copies/ml 未満の場合、血漿中 PI 一次耐性変異は末梢血単核球中より平均 425 日 (30-680 日) 早く検出された。末梢血単核球中変異数と血漿中変異数の比は VL と相関を認めた。また、血漿と末梢血単核球中ではともに一次耐性変異と二次耐性変異の出現の時間差が VL と逆相関関係を認めた。

一方、HAART を中断した 16 名の患者を解析した結果、薬剤を中止する前に全例が RTI 耐性変異を獲得し、そのうち 12 名が PI 耐性変異も獲得していた。血漿と末梢血単核球ではそれぞれ 59 個の RTI 耐性変異、74 個の PI 耐性変異を含む 133 個の耐性変異を認めた。HAART が奏功し VL が低くなった 6 名の患者では、副作用などのために治療を中止したが、薬剤を中止した際、中止 1 ヶ月後に VL が著しく上昇し、その上昇したウイルスは 1 名を除く、5 名で耐性ウイルスであった。HAART 中断後の耐性ウイルス保有者を Kaplan-Meier で解析すると、50%の患者の薬剤耐性変異は血漿では 6.3 ヶ月に、末梢血単核球では 9.2 ヶ月に野生型に戻った。同様に 50%の RTI 耐性変異及び PI 耐性変異は 3 ヶ月後に血漿から消失し、末梢血単核球中では RTI 耐性変異が 6.7 ヶ月後、PI 耐性変異が 5.7 ヶ月後に検出されなく

なった。RTI 耐性変異と PI 耐性変異は、双方とも末梢血単核球からよりも血漿から早期に消失した。また、血漿中と末梢血単核球中でも RTI 耐性変異より PI 耐性変異の方が速く野生型に戻った(図 1)。直接シーケンス法で耐性変異が検出されなかったサンプルをクローニング検査法で解析した結果、601 クローン中 44 クローン (7.3%) は耐性株であった。

表 1. 血漿と末梢血単核球中のプロテアーゼ阻害剤耐性変異

血中ウイルス量 (Copies/ml)	患者数	耐性変異数		
		血漿中	末梢血単核球	P 値*
< 10 ⁴	10	4.19	1.78	0.0076
> 10 ⁴	12	5.24	4.02	0.0216
Total	22	4.76	3	0.0004

* Wilcoxon signed rank test

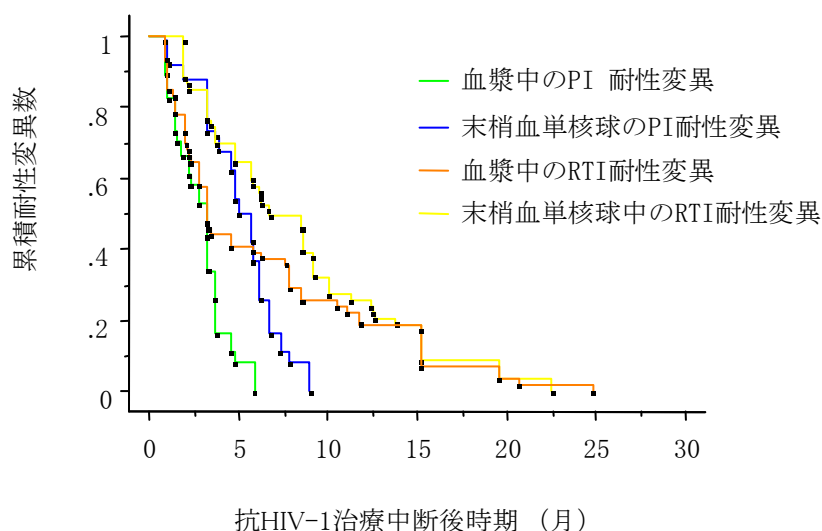


図 1 HAART中断後133ヶ所の耐性変異の変化を示すKaplan-Meier 曲線。耐性変異は血漿と末梢血単核球中それぞれRTIで59ヶ所、PIで74ヶ所が認められた。PI耐性変異：血漿対末梢血単核球(P<0.05)、RTI耐性変異：血漿対末梢血単核球(P<0.05)、PI 耐性変異対RTI耐性変異(P<0.05)。

論文の内容の要旨

【考察】 PI を含む HAART 失敗後、PI 耐性変異はまず血漿で検出され、そのあと末梢血単核球のプロウイルスで検出された。血漿での PI 耐性変異は末梢血単核球より平均 289 日早く検出された。耐性変異は徐々に出現し、特に VL が低い患者では、末梢血単核球での耐性変異の出現時期が血漿よりも大きな時間差を認めた。したがって、治療失敗時の耐性検査は血漿を用いることが推奨できた。一方、治療中断時に耐性変異を獲得していた患者は、治療中断後は野生型のウイルスの増殖能が耐性株より優れるため、検査上は耐性変異が検出されなくなることが示された。しかし、患者体内から耐性ウイルスが完全に消失しているわけではないので、このような患者に同じ様な治療を行うと治療は失敗する事になる。したがって、耐性検査の結果を判定する上で治療中断後の耐性ウイルスの動態を知る事は非常に重要である。本研究では、50%の患者の耐性変異は血漿から 6 ヶ月後に、末梢血単核球から 9 ヶ月後に直接シーケンス法では検出されなくなった。また、血漿中の耐性変異は末梢血単核球中より速く消失し、血漿中の 50%の耐性変異は約 3 か月後には検出されなくなったが、末梢血単核球の耐性変異の 50%は約 6 ヶ月残存した。したがって、治療をすでに中断してしまっている場合には、耐性検査はなるべく早期に行うことが重要であり、さらにその場合可能であれば、血漿ではなく末梢血単核球を検体として使用できれば、検査結果の信頼度は上昇すると考えられた。

【結語】 HAART失敗時は、治療中もしくはHAART中断後可能なかぎり早期に血漿を用い耐性検査を行うことが推奨できた。また、HAARTを中断してしまった場合には、末梢血単核球を用いての耐性検査が施行できれば、より有用な情報が得られると考えられた。