

氏 名 (本 籍)	小 泉 祐 介 (大阪府)
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 士 第 5 4 3 号
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
学 位 授 与 年 月 日	平 成 1 9 年 3 月 2 6 日
学 位 論 文 題 目	Emergence of Antiretroviral Therapy Resistance - Associated Primary Mutations Among Drug-Naive HIV-1 - Infected Individuals in Rural Western Cameroon (カメルーン西部の未治療 HIV-1 感染者における ART(抗レトロウイルス療法)耐性関連 1 次変異株の出現)
審 査 委 員	主 査 教 授 後 藤 敏 副 査 教 授 野 田 洋 一 副 査 教 授 岡 部 英 俊

論文内容要旨

*整理番号	548	(ふりがな) 氏 名	こ いずみ ゆう すけ 小 泉 祐 介
学位論文題目	<p>Emergence of Antiretroviral Therapy – Resistance Associated Primary Mutations Among Drug Naive HIV-1 – Infected Individuals in Rural Western Cameroon</p> <p>(カメルーン西部の未治療 HIV-1 患者における ART(抗レトロウイルス療法)耐性関連 1 次変異株の出現)</p> <p>Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes 2006, 43(1):15-22</p>		
<p>【背景】</p> <p>1990 年代後半の開発以来、逆転写酵素阻害剤（以下 RTI）、蛋白合成酵素阻害剤（以下 PI）は抗 HIV 療法（以下 ART）の主流であるが、薬剤耐性ウイルス株が大きな問題となっている。薬剤の十分普及している先進国においては未加療例のうち 10%から 20%は薬剤耐性株に感染していると報告されているが、途上国でもここ数年間の急激な ART 導入に伴い薬剤耐性ウイルスの出現が増加傾向にある。今回我々は ART 黎明期の代表的な地域である西部カメルーンの未治療 HIV-1 感染者における薬剤耐性株の保有率を評価した。解析に当たっては近年その意義が注目されている少数クローンを含めて検討した。</p> <p>【方法】</p> <p>2004 年 2 月の時点で未治療であるカメルーン北西部の HIV-1 感染者 54 名(男 24 名、女 30 名、年齢 32.9±10.1 歳) の静脈血より末梢血単核球を採取(Ficoll-Hypaque 法)、DNA 抽出を行った(Qiagen DNA 抽出キット)。抽出した DNA を用いてポリメラーゼ領域 (プロテアーゼ – 以下 Pol-PR、逆転写酵素 – 以下 Pol-RT、インテグラーゼ – Pol-IN)、エンベロープ領域 (Env) に関して Nested PCR を施行した。Nested PCR 産物をそれぞれクローニングし(TOPO TA cloning kit)、Dye Terminator 法にて塩基配列を解析した(ABI310 Genetic analyzer)。既存のデータベース (HIV database 2005) を用いて、以上 4 領域の遺伝子型から各検体の HIV-1 サブタイプを決定した。サブタイプ決定には CLUSTAL W と TreeView1.66 を用いた。また Pol-PR、Pol-RT に関してはアミノ酸配列から主要薬剤耐性関連変異の有無を評価した。少数クローンの検討のため 1 検体あたり 4 クローン以上を既存のデータベース(Stanford Univ. database)と対照した。</p> <p>【結果】</p> <p>1) サブタイプ解析</p> <p>54 検体中 45 例 (83.3%) は既存のサブタイプに矛盾なく、その内訳は CRF02_AG (40 例)、A1、G (各 2 例)、F2 (1 例) であった。残る 9 例は CRF02_AG と各々 A1 (6 例)、D (2 例)、G (1 例) の新たな組み替え体であった。</p>			

2) PI 耐性関連変異

PI 耐性関連一次変異の出現頻度は合計 7.4% (54 例中 4 例) であった。うち 1.9% (1 例) は全加-ンに M46L を認めた。他の 3 例は V82A、M46L、M46I を、それぞれ少数加-ンに認めた。二次変異の殆どは D10, 20, 36, 63, 77 等の非サブタイプ B 特異的な polymorphic site に認めた。

3) RTI 耐性関連変異

RTI 耐性関連一次変異の出現頻度は合計 9.8% (51 例中 5 例) であり、全て少数加-ンのみでの検出であった。うちヌクレオチド系 RTI 耐性関連変異は 2 例で、M184V と V75I をそれぞれ 1 例に認めた。非ヌクレオチド系 RTI 耐性関連変異は 3 例で、Y188C を 2 例、L100I を 1 例に認めた。二次変異は E44D を 1 例の全加-ンに認めた。

【考察】

本論文の特徴としては次の 2 点が挙げられる。

第一に、未治療 HIV-1 感染者における耐性関連一次変異に関するものとしてはカカ-ンにて最初の報告という点である。これまで RTI、PI いずれも二次変異のみ報告されてきたが、2004 年の時点で一次変異が出現したことになる。耐性関連変異が生じた理由は薬剤使用中の患者から感染した可能性がまず考えられるが、特に PI はカカ-ンで標準治療 regimen に含まれず HIV-1 の遺伝的多様性そのものが原因である可能性もありうる。

第二に、少数加-ン評価のために末梢血単核球中の proviral DNA を加-ンクしている点である。HIV-1 感染者の薬剤耐性モニタリングに関しては血漿ウイルス RNA を用いた直接シークエンスが標準法であるが、近年、この従来の方法では検出できない薬剤耐性少数加-ンが治療失敗例の早期から存在したり、生存上不利で淘汰されやすいという旧来の定説に反して overgrow した報告等から臨床的意義が強調されつつある。この為我々は、今後 ART の普及に伴い薬剤耐性が顕在化する国の現時点での潜在的リスクを評価するため、上記の手法を選択した。少数加-ンの定量化に関しては、あらかじめ対象 D10 を限定して解析する従来法と比べて、今回の手法は網羅的なスクリーニングが可能である。

今回の検討では、サブタイプ分布に関してはカカ-ンにおける既存の報告とほぼ矛盾のない結果が得られたが、非サブタイプ B に特異的な polymorphism が散見され、更には新しい組み替えウイルスもあり、今後は薬剤耐性株がさらに増加する可能性がある。今後も、特に少数加-ンの存在を念頭に薬剤耐性株の定点観測と治療 regimen の詳細な検討が必要と考えられる。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	548	氏名	小泉 祐介
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>先進諸国では、抗 HIV 薬剤である逆転写酵素阻害剤 (RTI) や蛋白分解酵素阻害剤 (PI) に対する耐性ウイルスの出現が問題となっている。</p> <p>本研究では、抗 HIV 剤が普及しつつあるカメルーンでの HIV-1 耐性株の出現を検討するため、未治療 HIV 患者のリンパ球中プロウイルスの遺伝子解析を行った。</p> <p>1) カメルーンで流行している HIV-1 サブタイプは、組換えウイルス CRF02A/G (ー 70%) であった。また、新たな組換えウイルスの出現 (約 17%) も認めた。</p> <p>2) PI 耐性株は、54 症例中 4 例に、また、RTI 耐性株は、51 症例中 5 例に認めた。PI 耐性株を持つ 1 症例では、耐性株が優位であったが、その他の症例では、いずれの耐性株も個体内で小集団を占めるに過ぎなかった。</p> <p>以上より、未治療患者にもすでに薬剤耐性株が出現していることが判明した。本研究は、カメルーンでの薬剤耐性株の出現を初めて明らかにした論文であり、博士 (医学) の学位を授与するに値すると判定された。</p> <p>なお、本学位授与申請者は平成 19 年 1 月 31 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められた。</p>			
(平成 19 年 2 月 2 日)			