

13. HIV (2)

—HIV 診断技術と薬物治療の発展—

杉 浦 互

はじめに

1981年に AIDS という疾患の存在が公式に確認されてから今年は20年目に当たる。この20年間は AIDS の診断という観点から、おおまかに3つの時代に区分することができる。第一の時代は1981年に原因不明の仮に肺炎症例が報告されてから^{8,17)}1983年にその後 Human immunodeficiency virus と名づけられる病原体が発見され^{1,20)}、その感染が AIDS の原因と判明するまでの期間である。この時代は原因不明の後天性進行性免疫不全症状とそれに伴う日和見感染が診断の唯一の根拠であった。

第2の時代は、HIV-1が発見されてから診断技術の基礎が確立されるまでの期間である。HIV-1に関連する種々の基礎研究が行われ、実験室レベルでは様々な検査技術開発が行われた時代である。基本的にこの時代も臨床症状が診断の中心であったが、HIV-1の存在を検査により確認することが可能となった時代でもある。

第3の時代は診断技術の基礎が確立した後から現在までである。診断技術は、より早く、より正確に行えるように改善され、免疫不全症状が出現するよりも遙か以前に HIV-1の感染を診断することが可能となった。そして今日、遺伝子診断技術の進歩により、HIV-1の確認のみならず、感染者体内におけるウイルス増殖レベルを定量することも可能となった。

HIV-1の感染を診断する検査

今日までに実用化された HIV-1 感染診断技術には大きく HIV-1 の侵入に対する宿主の防御反応、つまり特異的

免疫応答の有無を判定する方法と、感染したウイルス自体を検出する方法の二つがある。以下各々についてに説明する。

(1) HIV-1 特異的免疫反応の有無から感染を判定する検査

病原体に対する特異的抗体の有無から感染を診断する方法は HIV-1 に限らず感染症診断に広く用いられている技術である。HIV-1 感染症の場合は数週間から数ヶ月で HIV-1 の構成タンパク (p24あるいは外皮タンパクである gp120, gp41など) に対する抗体が体内に出現することが知られている⁷⁾。このような抗 HIV-1 抗体の検出は *in vitro* で HIV-1 の培養、増殖が可能となり、抗体検査を行うのに十分な抗原物質が安定して入手できるようになった時点で速やかに実現された。1985年頃から図 1-a, b に示すような PA, EIA による抗 HIV-1 抗体の検出がスクリーニング検査として行われるようになり、1987年に米国 FDA によって最初の HIV-1 感染診断検査薬として認可された。

当初ラテックス粒子あるいはプレート上には、LAI 株や HXB 2 株などの実験室株を感染させた H 9 や CEM 細胞の溶解産物が固層化されていた。その結果、目的とするウイルス抗原以外の細胞由来のタンパクも同時に吸着されてしまい高い擬陽性の原因となった。Houn 等は ELISA 検査で繰り返し HIV-1 抗体陽性を示した献血血液検体のうち真の HIV-1 感染症例は13%に過ぎなかったと報告している¹¹⁾。一方、擬陰性の比率は低く、僅か40000検体に一個程度 (0.0025%) であった²³⁾。擬陽性率の高いことは問題ではあるが、一次スクリーニングの目的が感染症例を取り落とさないことである点からこの数値は妥当なところであろう。

その後、タンパク合成技術の進展により、リコンビナントタンパクが感染細胞の溶解産物にとってかわり、固層化されるようになった。固層化された抗原の純度が高まった結果、検査の擬陽性率は低下し、また抗原を高濃度で吸着させることが出来るようになったため抗体力価の検出限界

国立感染症研究所エイズ研究センター(〒208-0011 東京都武蔵村山市学園 4-7-1)

History of HIV diagnostic technology and treatment
Wataru Sugiura MD, Ph. D

National Institute of Infectious Diseases AIDS Research Center

4-7-1 Gakuen, Musashimurayama, Tokyo 208-0011, Japan

TEL: 042-561-0771

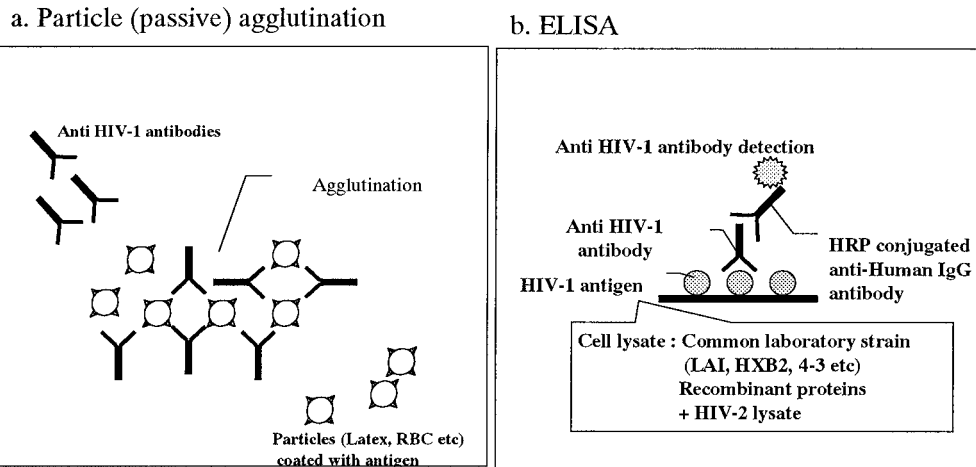


図1 HIV-1 特異的免疫応答の有無から感染を判定する方（血清学的診断方法）

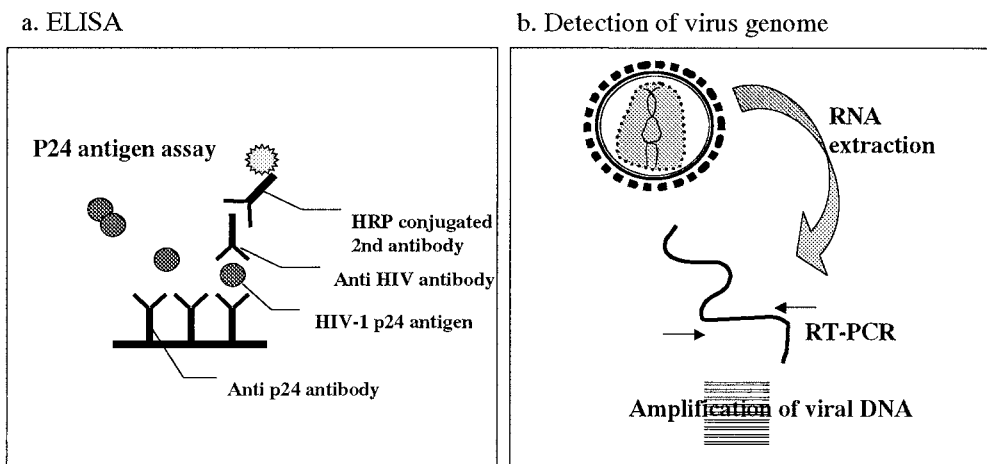


図2 感染により宿主体内に侵入した HIV-1 自体を検出する技術

を低下させることにも成功した。

しかしながら、純度の高い抗原の採用は検出できる抗体のスペクトラムを狭める結果となった。さらに、リコンビナントタンパクでは糖鎖の修飾に違いがあったため、抗原性が変化してしまい、見落とすケースが出てきた。このことが特に問題となったのは1994年にカメルーンなどの西アフリカで報告された Group O すなわち outlier の存在である¹⁵⁾。当時ヨーロッパや西アフリカ諸国で用いられていたリコンビナントタンパクを固層化した抗体検出キットは Group O を見落とすことが明らかになったため、O が疑われるような場合は再び感染細胞溶解産物を固層化した物を使用するように変更された。

(2) 感染により宿主体内に侵入した HIV-1 自体を検出する技術

宿主体内からウイルスを検出することは最も直接的な感染の診断である。基本的な方法としては感染患者の血清あ

るいは抹梢血単核細胞からのウイルス分離培養技術^{3,5)}、そして、血液中の p24 抗原の検出があげられる。その後 PCR 技術の進歩と普及に伴い感染細胞からの HIV-1 ゲノムの検出法が、さらには血中のウイルス RNA 量の定量法が確立した (図 2-a, b)。

p24 抗原は感染の比較的早期に、だいたいにおいて血清学的な診断より 2-3 週間早く、検出されることから抗体が検出されるまでのウィンドウ期における感染診断に有効とされた⁹⁾。しかしながら急性感染期以後の無症候時期では感染者の 20-30% にしか検出されないために結局のところ感染診断のルーチン検査としては成り立たなかった。しかし最近では抗 p24 抗体と p24 抗原を一緒に固層化し急性期の場合は抗原の検出で、無症候時期の場合は抗体検出で把握できるキットが用いられるようになっている。

ウイルスを直接検出する方法としてはウイルス抗原検出の他に、HIV-1 の遺伝子を検出する方法がある。1980 年中頃に登場してきた polymerase chain reaction (PCR) 技

表1 HIV-1 RNA の定量技術

	Branched DNA	NASBA	Amplicore
会社	Bayer Diagnostics	Organon Teknika	Roche Molecular system
標的遺伝子	Pol	Gag	Gag
遺伝子増幅の有無	(-)	(+)	(+)
再現性 (Log difference)	0.5	0.3-0.6	0.8-2.2
スペクトラム	Non-B (+/-) Group O (-) HIV-2 (-)	Non-B (+/-) Group O (-) HIV-2 (-)	Non-B (+) Group O (-) HIV-2 (-)
検出可能範囲 (copies/ml)	Ver 2.0 : 500-1,600,000 Ver 3.0 : 50-500,000	400-15,000,000 40-10,000,000	S : 400-750,000 U : 50-75,000

術は HIV-1 診断の分野でも威力を発揮し、宿主細胞に組み込まれた HIV-1 遺伝子、あるいは血液中のウイルス粒子から RNA を抽出し増幅検出することが可能となった。ウイルス遺伝子を検出するという手法は、「診断」という目的において確実な手法と思われるが、コンタミネーションによる擬陽性の危険も伴うため単独で確定診断に用いることには議論が残されている。今日「診断」という目的でこの PCR が採用されているのは日赤における献血の NAT 検査だけである。

HIV-1 感染治療のモニタリングのための検査技術

感染を診断する検査の次に必要となったのは、病状を把握する検査技術である。特に抗 HIV-1 薬剤が開発されて薬物治療が始まると、治療効果を評価するために患者体内でのウイルスの増殖レベルをモニタリングする必要があるがでてきた。前述の宿主細胞に組み込まれた HIV-1 遺伝子、ならびに血液中のウイルス粒子から RNA 量の検出方法は定量性も兼ね備えていたことから HIV-1 薬物治療の際のモニタリング検査として用いられるようになった。また治療薬剤に対して耐性を獲得した薬剤耐性 HIV-1 の出現の有無、耐性変異パターンの解析も適切な治療を進めて行く上で求められるようになった。

(1) ウイルス RNA 量の定量技術

今日までに Branched DNA¹⁾、NASBA²⁾、Amplicor Monitor¹⁸⁾ という 3 種類の異なる方法が開発されてきた。Branched DNA はウイルス遺伝子の増幅は行わず、検出プローブの標識化合物の増幅を行うことにより微量の遺伝子を検出する方法である。NASBA と Amplicor はウイルス遺伝子の増幅を行うが、その方法は全く異なり、NASBA では T7 RNA polymerase と RNaseH を用いて RNA 鎖の増幅を行うのに対し、Amplicor Monitor では RT-PCR により DNA 鎖として増幅する。表 1 にそれぞれの手法の違いをまとめたが²²⁾、検出感度、再現性という点では今日どれもほぼ同じ水準を達成している。ただし、NASBA と

Branched DNA はサブタイプ B にしか対応していません、non-B が存在する地域ではその利用が限定されてしまう。現在わが国では Amplicor Monitor のみが臨床検査試薬として認められている。

(2) 薬剤耐性検査

薬剤耐性検査に関しては現時点でもまだ研究段階にあり、臨床検査として確立されるにはいたっていない。しかしながらその臨床における有用性については既に論文が出されている⁶⁾。さて、薬剤耐性ウイルスを検出する方法には薬剤耐性遺伝子検査 (Genotyping) と薬剤感受性検査 (Phenotype) という二つの手法がある。遺伝子検査はその名が示すように治療薬剤の標的である逆転写酵素あるいはプロテアーゼの遺伝子配列を解析することにより耐性の有無を調べる手法である。この検査が成立する前提には各薬剤が特異的な点変異を標的酵素内に誘導するという事実がある。従って誘導された変異を見ることによって、耐性を示す薬剤の判定が可能となる。薬剤により誘導される変異は単独であることもあれば、複数が組み合わさることもある¹⁰⁾。もう一方の手法である感受性検査は遺伝子検査とは異なり、実際にウイルスの薬剤感受性を試験管内で測定する直接的な評価方法である。この検査を成立させるには何らかの形で患者由来のウイルスを回収することが必要である。今日ウイルスの回収には患者末梢血中 PBMC を *in vitro* で健常人 PBMC と混合培養し上清中に分泌されたウイルスを回収してくる方法¹²⁾、分子生物学的手法を用いてウイルス遺伝子より再構築させる方法など各種ある¹⁹⁾。感受性検査の実施には遺伝子検査と比較して高い技術力と費用が必要である。しかしながら、遺伝子検査において判定困難であったような多数の変異が集積した症例では感受性検査は威力を発揮すると期待される。両検査の長所短所は表 2 にまとめた。

治療の進歩

この20年間は各種診断技術の開発の歴史であるとともに

表2 薬剤耐性遺伝子検査と感受性検査の比較

	利 点	限 界
遺伝子検査	<ul style="list-style-type: none"> ・ P3 などの特殊設備は不要 ・ 検査費用がさほど高くない ・ 技術的に簡単である ・ 検査結果はおおむね実際の感受性を反映している。 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 間接的な評価である ・ 感受性結果と乖離する場合がある
感受性検査	<ul style="list-style-type: none"> ・ 直接的な評価である ・ 結果が理解しやすい 	<ul style="list-style-type: none"> ・ P3 実験室が必要である ・ 高度の培養, 分子生物学的技術が必要である ・ 結果を出すのに時間がかかる ・ 検査値の臨床的なカットオフがまだ明確ではない

表3 現在認可されている薬剤一覧

薬剤クラス	一般名	商標名	認可年
ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤 (nucleoside analogue RT inhibitor : NRTI)	Zidovudine (AZT)	レトロビル	1987
	Didanosine (ddI)	ヴァイデックス	1992
	Zalcitavine (ddC)	ハイビット	1996
	Stavudine (d4T)	ゼリット	1997
	Lamivudine (3TC)	エビビル	1997
	Abacavir (ABC)	ザイアジェン	1999
非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤 (non-nucleoside RT inhibitor : NNRTI)	Nevirapine	ヴィラミューン	1998
	Efavirenz	ストックリン	1999
	Delavirdine	レスクリプター	2000
プロテアーゼ阻害剤 (protease inhibitor)	Saquinavir	インビラーゼ	1997
	Ritonavir	ノービア	1997
	Indinavir	クリキシバン	1997
	Nelfinavir	ピラセプト	1998
	Amprenavir	ブローゼ	1999
	Lopinavir/Ritonavir	カレトラ	2000

に、治療薬剤開発の歴史でもあった。HIV-1 感染症の薬物治療の歴史は満屋裕明博士による zidovudine の発見に幕を開け¹⁶⁾、その後の HIV-1 感染者の世界規模での急速な増大に伴い、多くの製薬企業が新薬開発にしのぎを削ることとなった。そして薬物治療の歴史の第2幕は1995年のプロテアーゼ阻害剤の登場である^{13,14)}。プロテアーゼ阻害剤の出現により多剤併用療法が行われるようになり、患者の予後は飛躍的に改善された²⁾。しかしながら積極的な薬剤治療の推進は薬剤耐性ウイルスを新たな脅威として登場させることにもなった。薬剤耐性ウイルスの問題は更に新たな薬剤開発の動機となった。表3に実用化されている薬剤をまとめたが、今日実に15種類もの薬剤が使用されている。新薬の開発が現在も活発に行われているが、その中から現状を打破するような新薬が登場することを期待する。

文 献

1) Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dautet, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, and L. Montagnier.(1983). Isolation of a T-lym-

photropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. **220**, 868-871.

- 2) Cameron, D. W., and et al.(1998). Randomised placebo-controlled trial of ritonavir in advanced HIV-1 disease. The Advanced HIV Disease Ritonavir Study Group. *Lancet*. **351**, 543-549.
- 3) Davey, R. T., Jr., and H. C. Lane.(1990). Laboratory methods in the diagnosis and prognostic staging of infection with human immunodeficiency virus type 1. *Rev Infect Dis*. **12**, 912-930.
- 4) Dewar, R. L., H. C. Highbarger, M. D. Sarmiento, J. A. Todd, M. B. Vasudevachari, R. T. Davey, Jr., J. A. Kovacs, N. P. Salzman, H. C. Lane, and M. S. Urdea. (1994). Application of branched DNA signal amplification to monitor human immunodeficiency virus type 1 burden in human plasma. *J Infect Dis*. **170**, 1172-1179.
- 5) Dewar, R. L., M. D. Sarmiento, E. S. Lawton, H. M. Clark, P. E. Kennedy, A. Shah, M. Baseler, J. A. Metcalf, H. C. Lane, and N. P. Salzman.(1992). Isolation of HIV-1 from plasma of infected individuals : an analysis of experimental conditions affecting successful virus propagation. *J Acquir Immune Defic Syndr*. **5**, 822

- 828.
- 6) Durant, J., P. Clevenbergh, P. Halfon, P. Delgiudice, S. Porsin, P. Simonet, N. Montagne, C. A. Boucher, J. M. Schapiro, and P. Dellamonica. (1999). Drug-resistance genotyping in HIV-1 therapy : the VIRADAPT randomised controlled trial. *Lancet*. **353**, 2195–2199.
 - 7) Gaines, H., M. von Sydow, A. Sonnerborg, J. Albert, J. Czajkowski, P. O. Pehrson, F. Chiodi, L. Moberg, E. M. Fenyo, B. Asjo, and et al. (1987). Antibody response in primary human immunodeficiency virus infection. *Lancet*. **1**, 1249–1253.
 - 8) Gottlieb, M. S., R. Schroff, H. M. Schanker, J. D. Weisman, P. T. Fan, R. A. Wolf, and A. Saxon. (1981). Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men : evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med*. **305**, 1425–1431.
 - 9) Goudsmit, J., J. M. Lange, W. J. Krone, M. B. Teunissen, L. G. Epstein, S. A. Danner, H. van den Berg, C. Breederveld, L. Smit, M. Bakker, and et al. (1987). Pathogenesis of HIV and its implications for serodiagnosis and monitoring of antiviral therapy. *J Virol Methods*. **17**, 19–34.
 - 10) Hirsch, M. S., F. Brun-Vezinet, R. T. D' Aquila, S. M. Hammer, V. A. Johnson, D. R. Kuritzkes, C. Loveday, J. W. Mellors, B. Clotet, B. Conway, L. M. Demeter, S. Vella, D. M. Jacobsen, and D. D. Richman. (2000). Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection : recommendations of an International AIDS Society–USA Panel. *Jama*. **283**, 2417–2426.
 - 11) Houn, H. Y., A. A. Pappas, and E. M. Walker, Jr. (1987). Status of current clinical tests for human immunodeficiency virus (HIV) : applications and limitations. *Ann Clin Lab Sci*. **17**, 279–285.
 - 12) Japour, A. J., D. L. Mayers, V. A. Johnson, D. R. Kuritzkes, L. A. Beckett, J. M. Arduino, J. Lane, R. J. Black, P. S. Reichelderfer, R. T. D' Aquila, and et al. (1993). Standardized peripheral blood mononuclear cell culture assay for determination of drug susceptibilities of clinical human immunodeficiency virus type 1 isolates. The RV-43 Study Group, the AIDS Clinical Trials Group Virology Committee Resistance Working Group. *Antimicrob Agents Chemother*. **37**, 1095–1101.
 - 13) Kempf, D. J., K. C. Marsh, J. F. Denissen, E. McDonald, S. Vasavanonda, C. A. Flentge, B. E. Green, L. Fino, C. H. Park, X. P. Kong, and et al. (1995). ABT-538 is a potent inhibitor of human immunodeficiency virus protease and has high oral bioavailability in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **92**, 2484–2488.
 - 14) Kitchen, V. S., C. Skinner, K. Ariyoshi, E. A. Lane, I. B. Duncan, J. Burckhardt, H. U. Burger, K. Bragman, A. J. Pinching, and J. N. Weber. (1995). Safety and activity of saquinavir in HIV infection. *Lancet*. **345**, 952–955.
 - 15) Loussert-Ajaka, I., T. D. Ly, M. L. Chaix, D. Ingrand, S. Saragosti, A. M. Courouce, F. Brun-Vezinet, and F. Simon. (1994). HIV-1 /HIV-2 seronegativity in HIV-1 subtype O infected patients. *Lancet*. **343**, 1393–1394.
 - 16) Mitsuya, H., K. J. Weinhold, P. A. Furman, M. H. St. Clair, S. N. Lehrman, R. C. Gallo, D. Bolognesi, D. W. Barry, and S. Broder. (1985). 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U) : an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III /lymphadenopathy-associated virus *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **82**, 7096–7100.
 - 17) MMWR. (1982). Epidemiological Notes and Reports Persistent, Generalized Lymphadenopathy among Homosexual Males. *Morb. Mortal. Wkly. Rep*. **31**, 249–251.
 - 18) Mulder, J., N. McKinney, C. Christopherson, J. Sninsky, L. Greenfield, and S. Kwok. (1994). Rapid and simple PCR assay for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma : application to acute retroviral infection. *J Clin Microbiol*. **32**, 292–300.
 - 19) Petropoulos, C. J., N. T. Parkin, K. L. Limoli, Y. S. Lie, T. Wrin, W. Huang, H. Tian, D. Smith, G. A. Winslow, D. J. Capon, and J. M. Whitcomb. (2000). A novel phenotypic drug susceptibility assay for human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob Agents Chemother*. **44**, 920–928.
 - 20) Popovic, M., M. G. Sarngadharan, E. Read, and R. C. Gallo. (1984). Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science*. **224**, 497–500.
 - 21) Romano, J. W., R. N. Shurtleff, E. Dobratz, A. Gibson, K. Hickman, P. D. Markham, and R. Pal. (2000). Quantitative evaluation of simian immunodeficiency virus infection using NASBA technology. *J Virol Methods*. **86**, 61–70.
 - 22) Schuurman, R., D. Descamps, G. J. Weverling, S. Kaye, J. Tijnagel, I. Williams, R. van Leeuwen, R. Tedder, C. A. Boucher, F. Brun-Vezinet, and C. Loveday. (1996). Multicenter comparison of three commercial methods for quantification of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *J Clin Microbiol*. **34**, 3016–3022.
 - 23) Ward, J. W., S. D. Holmberg, J. R. Allen, D. L. Cohn, S. E. Critchley, S. H. Kleinman, B. A. Lenes, O. Ravenholt, J. R. Davis, M. G. Quinn, and et al. (1988). Transmission of human immunodeficiency virus (HIV) by blood transfusions screened as negative for HIV antibody. *N Engl J Med*. **318**, 473–478.