

料となる。また同一のサブタイプ間の系統分析は、感染経路を推定するための貴重な手がかりになると思われる。一例を挙げると、図3で示した系統分析の結果によって、サブタイプできる。つまり、(1) Bの標準株に類似のタイプ、(2) 1994-1999 および 2000年のタイプ、(3) Q、R、Sを含むウイルスのタイプである。HIVの感染時期と検出年代とは必ずしも一致しないと思われるが、このような系統的な分類は、取りもなおさず府下で伝播されている HIV-1 に共通な感染源が存在することを示唆している。特にアミノ酸配列のホモロジーが高かった R01 と Q01 は、後の調査で同一の感染源であったことがわかっている。これとは対照的に、同じ 2001 年に検出された P01、T01 は、R と Q とは遺伝的に隔たっているため、感染ルートが異なっていたのではないかと推定される。AE 株についても系統分析を行ったが(図3)、大きなクラスターの形成はみられなかった。今回分析に供した AE 株は、いずれも外国人女性(この内2名はタイ出身者)から検出されたものであった。

前述してきたように従来当研究所で用いてきた WB によるエイズ確認検査は、判定保留となることが多く、検査判定の遅延が問題となってきた(図4)。すでに述べたように、この弊害を解消するために第4世代の抗原抗体同時検出 EIA 法を併用することが有用であったことが判明した。本確認法は単に判定が明瞭であるだけでなく、機器による自動判定であるため省力化も果たせるなど利点が多く、今後の確認検査にこの検査法の導入は有用である。

健康危険情報

性的に活動的な 20 歳代から 40 歳代の日本人男性の感染者が目立って多い。このことから、今後この年齢層へのエイズ啓発が特に大

切である。

E、研究発表

1、論文発表

- 1) 大竹 徹、川畑拓也、森 治代、小島洋子、大石 功： HIV 感染の確認診断(2000 年度)。大阪府立公衆衛生研究所研究報告 39 : 173-176、(2001)
- 2) 大石 功、小島洋子、川畑拓也、森治代、大竹 徹：フォローアップ観察中の HIV-1 感染者におけるアクセサリ蛋白質 Vpr のアミノ酸変異について。大阪府立公衆衛生研究所研究報告 39 : 11-14、(2001)

2、学会発表

- 1) 森 治代、小島洋子、川畑拓也、大竹 徹、大石 功：治療継続中に出現したリバウンドウイルスにおける薬剤耐性変異の解析。第 15 回日本エイズ学会学術集会(2001)、東京。
- 2) 小島洋子、川畑拓也、森 治代、大竹 徹、大石 功：大阪府における HIV 感染にハイリスクな行動をとるグループの分子疫学、第 38 回近畿地区ウイルス疾患競技会(2002)、京都。

F、その他

知的財産の出願と登録 なし

表1 2001年度のSTDクリニック別HIV抗体検査数

医療機関	性 別			合計
	男性	女性	不明	
A	0	0	0	0
B	84	6	0	90
C	1	37	1	39
D	240 <u>9</u>	1,638	1	1,879 <u>9</u>
E	0	32	0	32
F	5	257	0	262
合計	330 <u>9</u>	1,970	2	2,302 <u>9</u>

下線は抗体陽性者数

表2 STDクリニックの年別検査数

年	S T D ク リ ニ ッ ク						計
	A	B	C	D	E	F	
1992	35	459	217 <u>4</u>	354	34	61	1,160 <u>4</u>
1993	2	1,044	314 <u>2</u>	1,203 <u>1</u>	178	214	2,955 <u>3</u>
1994	7	397 <u>2</u>	221 <u>2</u>	1,203 <u>1</u>	134	99	2,061 <u>5</u>
1995	0	303 <u>1</u>	41 <u>1</u>	992 <u>2</u>	83	99	1,518 <u>4</u>
1996	0	351 <u>2</u>	51	1,206 <u>3</u>	71	144	1,823 <u>5</u>
1997	0	295 <u>3</u>	27 <u>1</u>	1,331 <u>4</u>	60	147	1,860 <u>8</u>
1998	0	265	31 <u>1</u>	1,542 <u>2</u>	56	171 <u>1</u>	2,065 <u>4</u>
1999	0	256	23 <u>1</u>	1,627 <u>2</u>	52	184	2,142
2000	0	225	12	1,686 <u>3</u>	38	205	2,166 <u>3</u>
2001	0	90	39	1,879 <u>9</u>	32	262	2,302 <u>9</u>
計	44	3,685 <u>8</u>	976 <u>12</u>	13,023 <u>27</u>	738	1,586 <u>1</u>	20,052 <u>48</u>

下線は抗体陽性者数

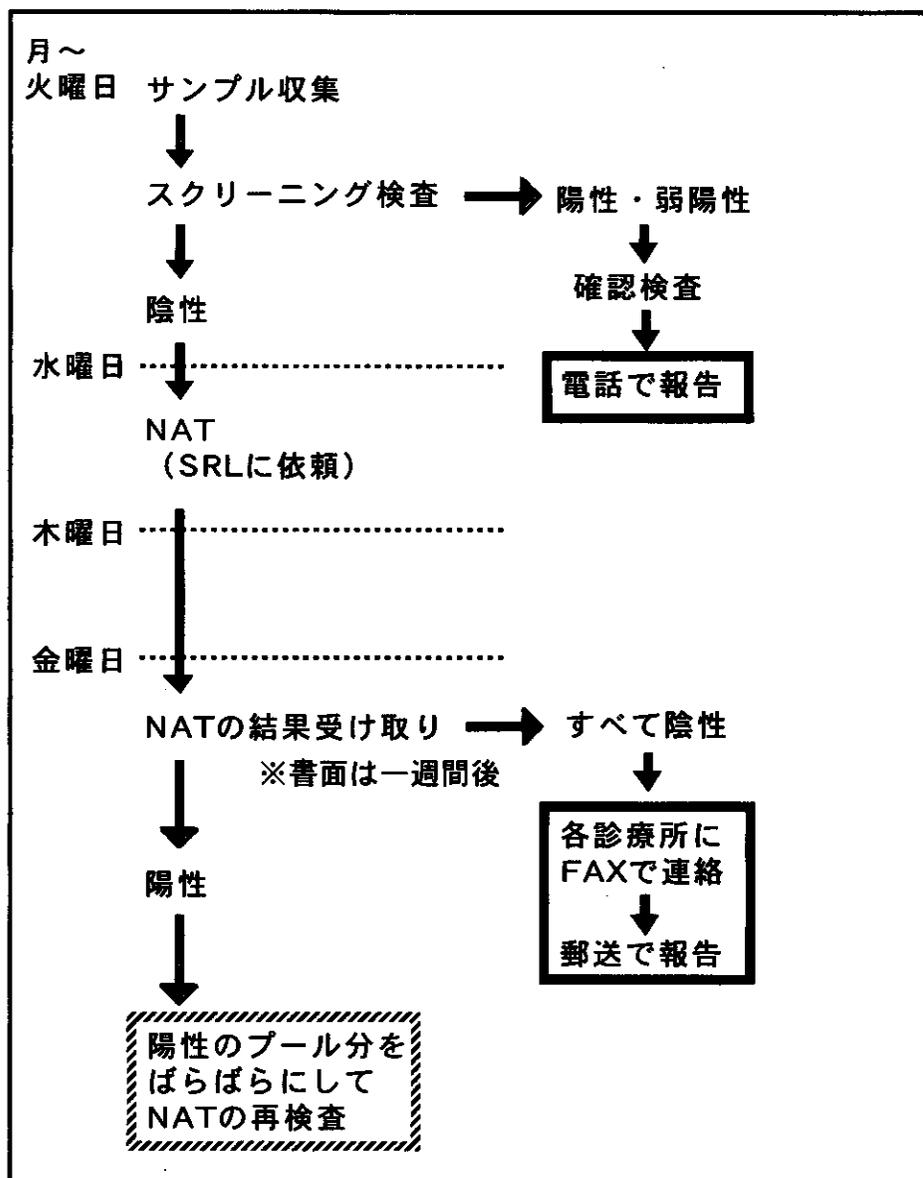


図1 NATの流れ (STD関連クリニック)

表3 NAT導入後の検体数

年	STDクリニック						計
	A	B	C	D	E	F	
2000	—	13	—	123	4	—	140
2001	—	85	33	1,649	30	—	1,797

※NATの結果は、すべて陰性

表4 年別検査数と陽性率の比較

年	府下保健所		STDクリニック	
	検査数	陽性率	検査数	陽性率
1992	18,121 <u>7</u>	0.039	1,160 <u>4</u>	0.345
1993	12,689 <u>4</u>	0.032	2,955 <u>3</u>	0.102
1994	9,124 <u>6</u>	0.066	2,061 <u>5</u>	0.243
1995	9,064 <u>4</u>	0.044	1,518 <u>4</u>	0.264
1996	9,296 <u>1</u>	0.011	1,823 <u>5</u>	0.274
1997	5,607 <u>4</u>	0.071	1,860 <u>8</u>	0.430
1998	6,495 <u>14</u>	0.216	2,065 <u>4</u>	0.194
1999	5,813 <u>5</u>	0.086	2,142 <u>3</u>	0.140
2000	5,167 <u>9</u>	0.174	2,166 <u>3</u>	0.139
2001	8,482 <u>25</u>	0.295	2,040 <u>9</u>	0.441
計	89,858 <u>79</u>	0.088	19,790 <u>48</u>	0.243

下線は抗体陽性者数

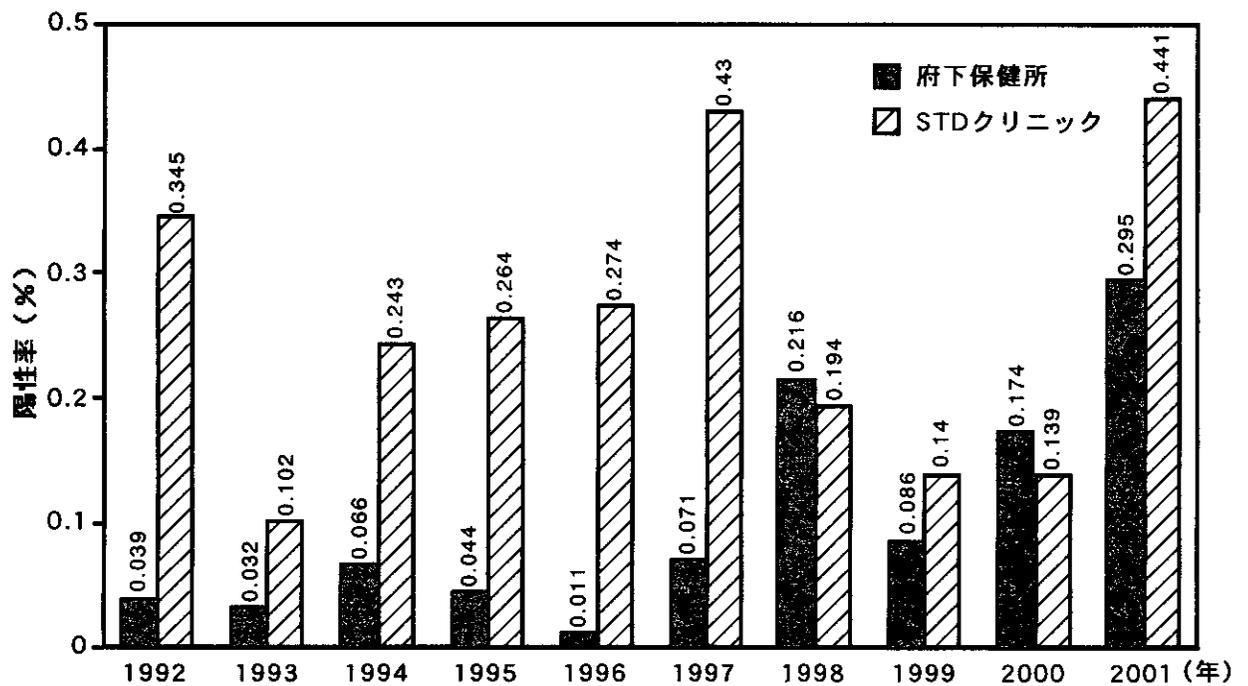


図2 府下保健所とSTDクリニックにおける、抗体陽性率の比較

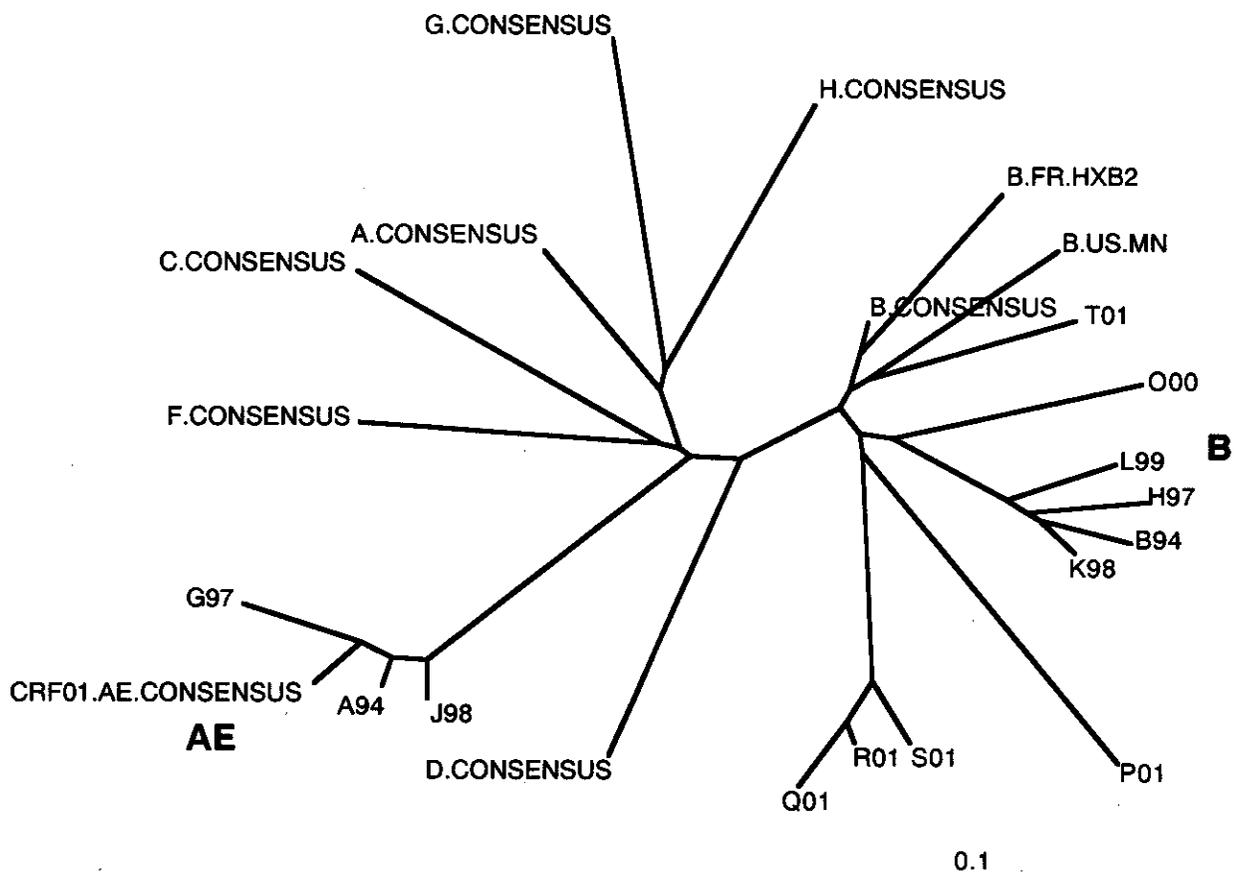


図3 STDクリニックで検出したHIV-1のサブタイプと系統分析

PA法とWB法による検査成績 (77検体)	
判定結果	検体数
HIV感染陽性	26/77
HIV感染陰性	13/77
判定保留	38/77
抗原抗体同時検出EIA法検査成績 (38検体)	
HIV感染陰性	37/38
判定保留	1*/38

*後に陽性となる

図4 HIV確認検査における抗原抗体同時検出EIA法の併用効果

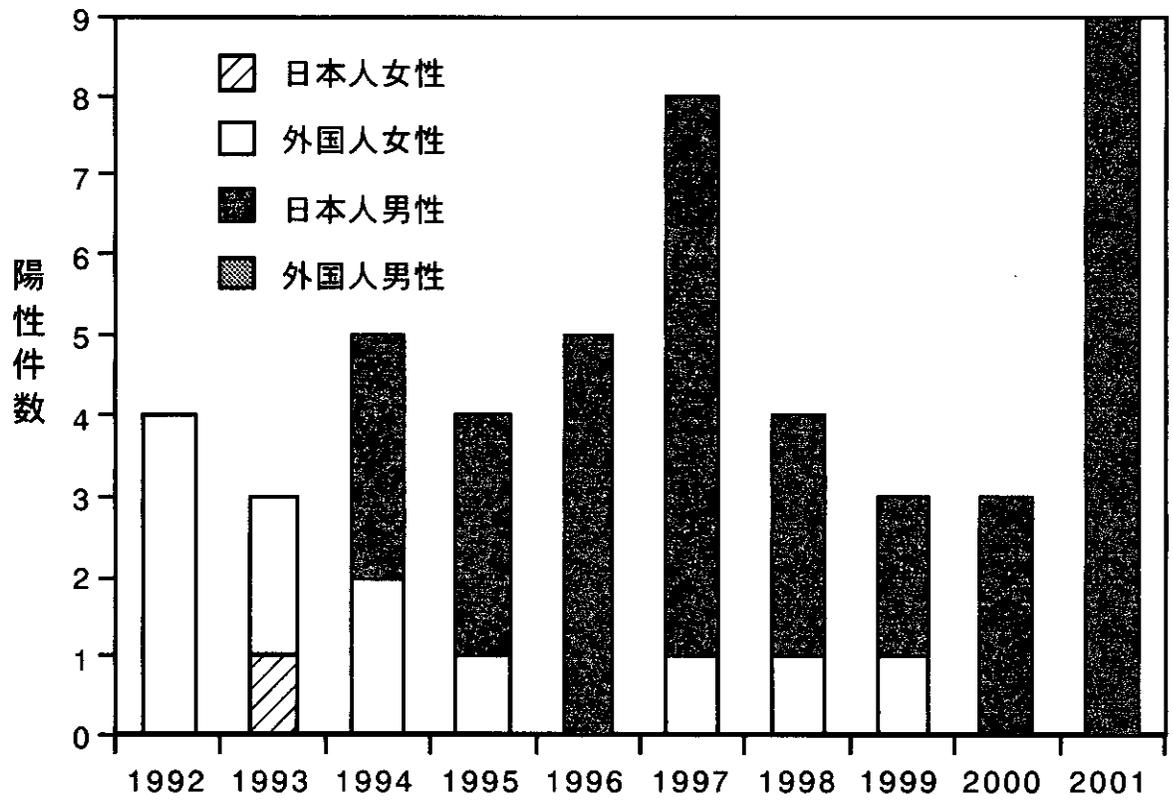


図5 STDクリニックにおける年別HIV抗体陽性件数

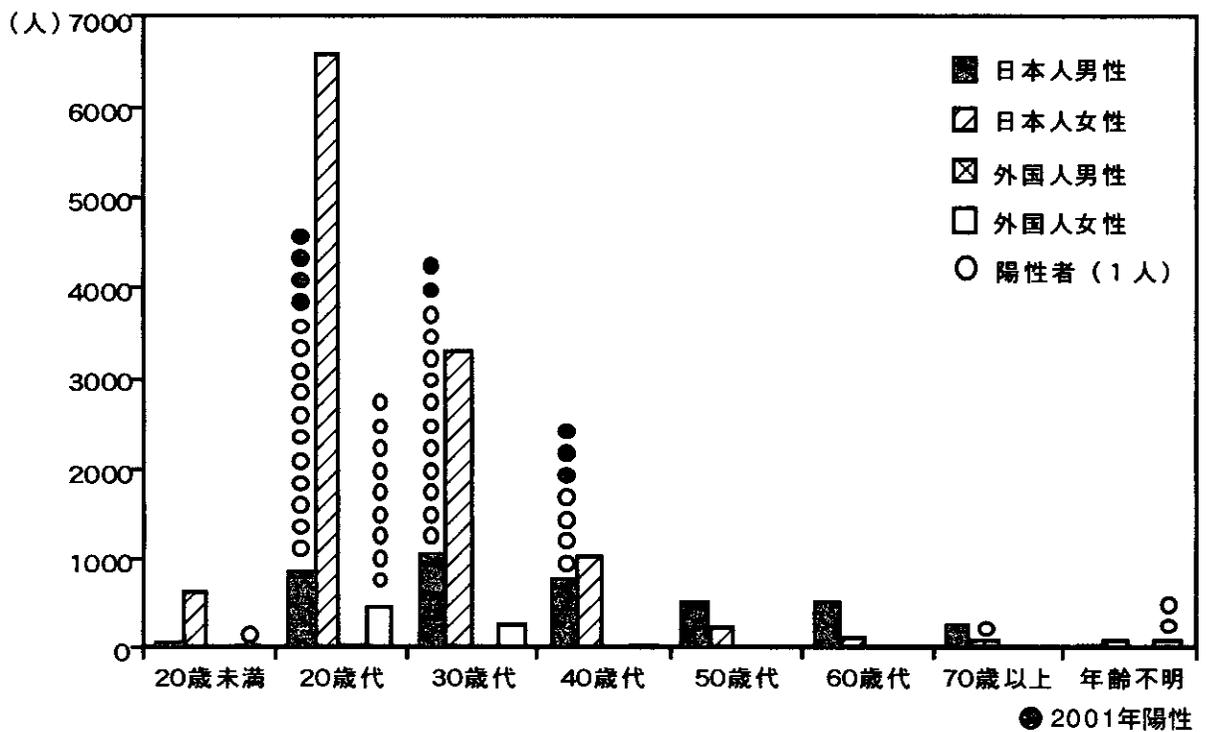


図6 STDクリニックにおける年齢別検査数と抗体陽性件数

3-2. ②治療継続中に出現したリバウンドウイルスにおける 薬剤耐性変異の解析

分担研究者 大石 功 (大阪府立公衆衛生研究所病理課長)

研究協力者 森 治代、小島洋子、川畑拓也、大竹 徹 (同病理課)

研究概要

HAART 継続中に出現したリバウンドウイルスについて薬剤耐性検査を実施したところ、過去に使用した薬剤に対する耐性変異が、新たに服用した薬剤への耐性獲得に影響を及ぼす可能性が考えられた。そこで、AZT 耐性株を用いて *in vitro* において indinavir (IDV) 耐性ウイルスを作製し、変異の出現状況を解析した結果、AZT 耐性変異を持つ株よりも変異を持たない野生株の方が新たな変異を獲得しやすいことが示唆された。

A. 目的

抗 HIV 剤に対する薬剤耐性変異ウイルスは、一度出現すると服薬中止後も長期間にわたって感染者体内に存続する。そこで、過去に使用した薬剤に対する耐性変異が新たに服用した薬剤への耐性獲得に及ぼす影響について検討した。

B. 方法

薬剤治療継続中にウイルス量の再上昇が見られた感染者について、血漿中のウイルスより RNA を抽出し、RT-PCR・シーケンスによる genotype 耐性検査を実施した。

また、当所において未治療患者から分離された HIV-1 KK-1 株と KK-1 株由来の AZT 耐性株であり T215F の変異を持つ KAR2.0 株をそれぞれ感染させた MT-4 細胞を indinavir (IDV) 存在下で混紡培養することにより IDV 耐性株を作製し、得られた耐性ウイルスについてプロテアーゼ/RT 領域のシーケンスを解析した。

C. 結果

過去に短期間の AZT 投与歴 (約 2 ヶ月半)

があり、その後 AZT を含まない HAART に変更した感染者において、PBMC 中のプロウイルスからは AZT 耐性変異が検出されないにも関わらず、リバウンドしてきたウイルスにプロテアーゼ阻害剤関連の耐性変異と共に AZT 耐性変異 (D67N および K70R) が検出された (図 1)。そこで、AZT 耐性ウイルスはプロテアーゼ阻害剤に対する耐性変異を獲得しやすいのではないかと考え、*in vitro* における IDV 耐性ウイルス作製実験を行った。KK-1/KAR2.0 混合感染細胞を IDV 存在下で培養し、培養上清中のウイルスについて経時的に genotype 検査を実施したところ、培養 12 週間目のウイルスに IDV 耐性に関連するアミノ酸変異 (M46L/I および L90M) が検出された。そこで、得られた IDV 耐性ウイルスをクローニングし、シーケンス解析を行ったところ、19 クローン中 6 クローンのプロテアーゼ領域に耐性変異が検出されたが、それらの RT 領域はすべて野生株の配列であった (表 1)。更に 25 週まで培養を続けたところ、ようやくプロテアーゼおよび RT 両領域に耐性変異を持つクローンの出現が認められるようになった。

以上の結果から、予想に反して AZT 耐性変

異を持つウイルスよりも変異を持たない野生株の方がプロテアーゼ阻害剤に対する耐性変異を獲得しやすいことが示唆された。今回リバウンドウイルスにおいて観察された AZT 耐性関連変異は、服用中の d4T によって誘導された可能性が高いものと思われる。

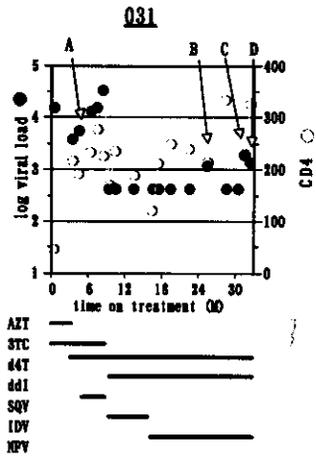
D. 発表論文

1. 小島 洋子、大竹 徹、森 治代、川畑 拓也、大石 功、HIV 感染者における薬剤治療の判定効果、MINOPHAGEN MEDICAL REVIEW 47(2):38-41、2001

E. 学会発表

1. 森 治代、小島洋子、川畑拓也、大竹 徹、大石 功、治療継続中に出現したリバウンドウイルスにおける薬剤耐性変異の解析、第 15 回日本エイズ学会、東京、2001

図1 プロテアーゼ / 逆転写酵素領域における耐性変異の推移



	protease	RT	clone#
031-A	wt	184V	4 / 6
	101	184V	2 / 6
031-B	wt	184V	4 / 12
	101, 30N	wt	2 / 12
	101, 30N	184V	2 / 12
	101, 30N, 461	184V	3 / 12
	101, 30N, 461	wt	1 / 12
031-C	101	wt	1 / 6
	101, 30N	wt	2 / 6
	101, 30N	67N	3 / 6
031-D	101, 30N	70R	1 / 7
	101, 30N	67N, 70R	1 / 7
	101, 30N, 771	70R	2 / 7
	101, 30N, 461, 771	70R	1 / 7
	101, 30N, 461, 771	67N, 70R	1 / 7
	101, 30N, 461, 88D	wt	1 / 7

表1 IDV耐性ウイルスのシーケンス解析

	culture period	protease	RT	clone#
KK-1/AR IDV150	90	wt	wt	7 / 12
		wt	215F	3 / 12
		461	wt	1 / 12
		46L, 90M	wt	1 / 12
KK-1/AR IDV200-2	115	wt	wt	3 / 7
		461	wt	3 / 7
		46L, 90M	wt	1 / 7
KK-1/AR IDV200-7	180	46L, 90M	wt	5 / 7
		46L, 90M	215F	2 / 7
KK-1/AR cont-30	120	wt	wt	4 / 5
		wt	215F	1 / 5

3-3. 地方衛生研究所におけるHIV検査体制について(福岡県)

千々和 勝己、梶原 淳睦、濱崎 光宏、江藤 良樹

(福岡県保健環境研究所)

研究要旨

当研究所は、保健所を窓口とする HIV 検査体制においては、保健所で実施したスクリーニング検査の結果が陽性の検体について、確認検査のみを行っている 2000 年 7 月からは、それまで使用していた抗体検出キットに変えて、抗原・抗体同時検出キットを保健所におけるスクリーニング検査に導入した。スクリーニング試験に用いるキットの変更に伴い、当所における確認試験法も変更した。このような新しい検査体制で、1 年半が経過したが、その間に生じた問題点について検討した。

A. 研究目的

現在行っている保健所を窓口とする HIV 抗体検査について再検討を行い、今後の検査体制のあるべき姿を検討する。

B. 研究方法

(1) HIV 血清検査

福岡県下（北九州市、福岡市、大牟田市は除く）の保健所で採血された検体について、県内 4 箇所の検査保健所でスクリーニング試験を行っている。検査には、2000 年 7 月からはビオメリュー社のバイダスアッセイキット HIV デュオを用いて、抗原・抗体の同時スクリーニング試験を行っている。

確認試験は、バイオラド社製ラブプロット 1、2 を用いたウェスタンブロット法による抗体確認検査を行い、その結果が陰性であった場合は、ロッッシュ社製のアンプリコア HIV-1 モニターを用いて PCR 法による血清中の HIV-1 RNA の検出を行っている。

また、確認試験で陰性であった、いわゆる偽陽性検体については、バイオラド社製のジェネディア HIV1/2 ミックス PA を用いた PA

法による抗体検出、また、アボット社製の HIV 抗原 EIAII 「アボット」を用いた p24 抗原の検出を行った。

C. 結果

(1) スクリーニング検査

2000 年 7 月以降に、福岡県下（北九州市、福岡市、大牟田市は除く）の保健所で採血され、スクリーニング試験を行った件数の推移を、図 1 に示す。2001 年末までに合計 936 件の検査を行った。2001 年の 6 月から 10 月まで検査件数が多かったのは、C 型肝炎の検査も同時に行ったためと考えられる。また、12 月に件数が多かったのは一部保健所で、世界エイズデーにちなんだイベントとして夜間相談窓口を開設したためと思われる。

スクリーニング試験を行った 936 件中、陽性となったのは 12 件であった。

(2) 確認検査

スクリーニング検査で陽性となった 12 件について、当所で確認検査を行った。最初に行ったウェスタンブロット法による抗体確認検査では、いずれの検体も全くバンドの出現

を認めなかった。次に、PCR法によるHIV-1 RNA検出を試みたが、これも全て陰性であった。従って、12件とも偽陽性であったと判定された。各月の検査件数と、偽陽性数を表1に示す。全体での偽陽性率は、1.28%であった。

(3) 偽陽性検体の検討

偽陽性と判定された12件中、十分な血清の量があった9件について、PA法による抗体検査、EIA法による抗原単独検査を行った。それらの結果を表2に示す。いずれも陰性で、陽性のものはなかった。

D. 考察

2000年7月にビオメリュー社の抗原・抗体同時検出キットを、スクリーニング試験に導入して以来、936件中12件が偽陽性反応を示した。偽陽性率は1.28%で、以前使用していたアボット社製のEIA法による抗体検出キットの偽陽性率が0.13%(11/8568)であったのと比較すると、著しく高いと言える。ビオメリュー社のキットは、抗原・抗体を同時に検出するため、抗体だけを検出するキットに比べると、ある程度の偽陽性率の上昇は予想されたが、予想以上に高い偽陽性率であった。また、Lyらのフランスでの約3万件についての試験結果1)では、偽陽性率は0.48%であり、

当所の偽陽性率よりもかなり低かった。一方、表1に示した偽陽性の出現時期を見ると、2000年の7-8月、2001年の5-6月、8-10月など、偽陽性の出現が2-3月単位で集中しているような傾向が見られる。このことは、スクリーニング試験件数などから考えると、同一ロットのキットにおいて、偽陽性が出ている可能性が考えられる。また、偽陽性検体についてPA法による抗体検出、EIA法による抗原単独検出を行ったが、いずれも陰性であり、偽陽性を示したのは検体ではなく、キットに起因する可能性が強い。

抗原・抗体同時検出キットを導入したのは、抗体が検出されない非常に初期の感染例を見逃さないことが大きな目的であった。当所では、今までにそのような例は経験していないがLyらのフランスでの約3万件についての試験結果1)では、陽性者全体の3.6%にあたる17例の、抗体検査だけでは見逃していた感染者を見つけている。そういった意味では、優れた検査法であるため、本県では同法を今後も使用していく予定である。ただ、確認検査にかかる費用等を考えると、偽陽性の発生をより押さえるようメーカーが改良されることを希望する。

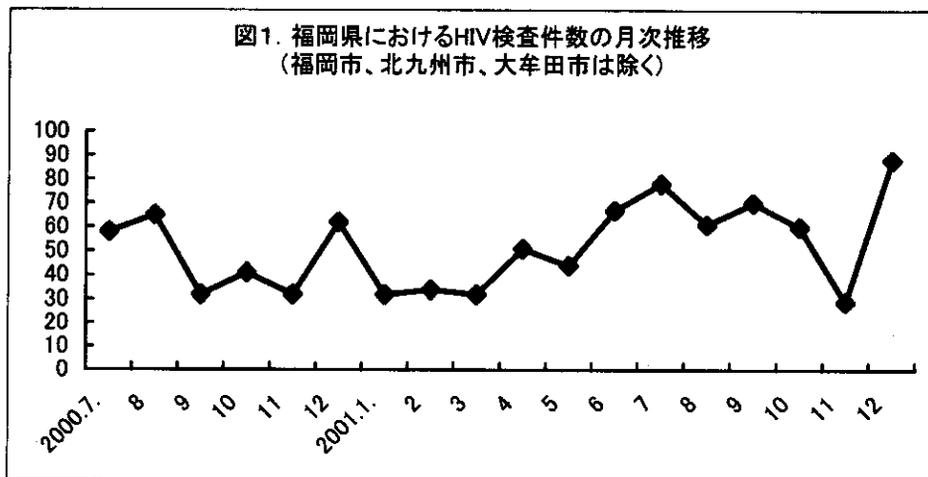


表1. 月別偽陽性件数

月	検査件数	偽陽性件数	偽陽性率(%)
2000.7	58	1	1.72
8	65	1	1.54
9	32	0	0
10	41	0	0
11	32	0	0
12	62	1	1.61
2001.1	32	0	0
2	34	0	0
3	32	0	0
4	51	0	0
5	44	2	4.55
6	67	1	1.49
7	78	0	0
8	61	2	3.28
9	70	2	2.86
10	60	2	3.33
11	29	0	0
12	88	0	0
合計	936	12	1.28

表2. 偽陽性検体の検討結果

検体番号	抗体検査		抗原(遺伝子)検査	
	WB法	PA法	RT-PCR法	抗原EIA法
1	—	<16	—	—
2	—	NT	—	NT
3	—	NT	—	NT
4	—	<16	—	—
5	—	<16	—	—
6	—	<16	—	—
7	—	<16	—	—
8	—	<16	—	—
9	—	<16	—	—
10	—	<16	—	—
11	—	NT	—	NT
12	—	<16	—	—

NT: 検体量が少なく試験できなかった

3-4. 保健所における即日告知のための HIV 抗体迅速検査法導入についての検討

班員研究者 田村 正秀 (北海道立衛生研究所)
研究協力者 三好 正浩、工藤 伸一、吉澄 志磨、
伊木 繁雄、沢田 春美 (北海道立衛生研究所)

研究要旨

北海道では、道内の各保健所を窓口とする HIV 抗体検査について北海道立衛生研究所がまとめてスクリーニング検査を実施している。検査結果の告知は、確認検査および検体の輸送に要する日数を考慮して採血の 2 週間後に行っている。告知までの待機日数が長い現在の検査体制は、検査依頼者に過度の負担を強いることから少しでも負担を軽減するための措置が望まれている。本研究では、簡便かつ短時間で結果が得られるイムノクロマトグラフィー法を応用した HIV 抗体迅速診断キットが、即日告知をふまえた検査法として保健所へ導入することが可能であるかを検討した。保健所および衛生研究所の双方における同一検体を用いた検討では、全ての判定結果が一致し再現性について問題は認められなかった。また、検体数の 1.29%は偽陽性になることがわかった。

A. 研究目的

HIV 感染症の蔓延を防止するためには、新たな感染者の早期発見と予防対策が重要である。しかし、感染者の増加に反し保健所を訪れる HIV 抗体検査依頼者の数は、平成 4 年以降減少傾向にある。このような状況にある理由として社会一般的に HIV 感染症に対する危機感が希薄になりつつあることがあげられる。また、北海道では、各保健所で受付た検体は札幌市に設置されている北海道立衛生研究所に送付され、週一回まとめて検査を行っている。検査結果の告知は、検体の輸送および確認検査の実施に要する日数を考慮して採血の 2 週間後に行っている。そのため、依頼者は再度保健所を訪れなければならない。これらの事実が依頼者にとって精神的または時間的

な負担となり、現在の HIV 抗体検査は、受けづらい状況にあると考えられる。さらに、北海道では、献血によって初めて自らの感染を知る割合が高いことから、HIV 感染者の潜在化が懸念される。HIV 抗体検査が保健所で実施されることによって、検査依頼者が即日結果を得られるようになれば、依頼者の精神的・時間的負担は少なからず軽減されることが考えられることから、将来的に検査数の増加および感染の早期発見につながるものと期待できる。本研究では、検査結果の即日告知をふまえた検査法として簡便かつ短時間で結果が得られるイムノクロマトグラフィー法を応用した HIV 抗体迅速診断キットが、保健所へ導入可能であるかを検討した。

B. 研究方法

1) HIV 抗体迅速診断キット「ダイナスクリーン・HIV-1/2(ダイナボット社)」の検討材料には、平成 11 年 10 月 14 日から 14 年 1 月 7 日の間に当所における HIV 抗体スクリーニング検査および確認検査によって抗体が陰性であった 1322 検体および陽性であった 10 検体を用いた。なお、HIV 抗体スクリーニング検査にはジェネディア HIV-1/2 ミックス PA (Bio-Rad) を、確認検査にはオーソ HIV ウェスタンブロットキット (オーソ・クリニカル・ダイアグノスティック)、ペプチラブ 1,2 (Bio-Rad)、IFA および HIV 抗原・EIA II「アボット」(ダイナボット社)を使用した。

2) 平成 13 年 2 月から帯広、釧路および渡島保健所において、血清分離後に迅速診断キットによる抗体検査を行い、得られた結果を当所における検査結果と比較した。なお、検討に先立ち各保健所において、迅速診断キットの製造元であるダイナボット社に陽性コントロール血清を用いたデモンストレーションを依頼した。また、保健所において実施された検討結果については、随時検体の送付とともに当所へ報告された。

C. 研究結果

スクリーニング検査において HIV 抗体陰性であった 1322 検体を迅速診断キットにおける検査に供した結果、1.29% (17 検体) が陽性の判定であった (表 1)。これらの検体について、ウェスタンブロットおよび HIV 型別診断法による抗体検査ならびに EIA 法による抗原検査に基づいた確認検査を行ったところ全て陰性であった。したがって、迅速診断キットにおける結果は偽陽性であると判断した。一方、確認検査において HIV 抗体陽性であった検体は 10 検体あり、これらの検体は迅速診断キットでも全て陽性であった (表 1)。

平成 13 年 2 月から平成 14 年 1 月 10 日の間

に保健所において実施された迅速診断キットによる抗体検査数は、帯広保健所 71 検体、釧路保健所 37 検体および渡島保健所 15 検体の計 123 検体であった。このうち、帯広保健所からは 69 検体が陰性、2 検体が陽性、釧路保健所および渡島保健所からはそれぞれ 37 検体および 15 検体が全て陰性であるとの報告を受けた。これらの検体について、当所で行った迅速診断キットの判定結果は全て保健所における判定と一致した。

D. 考察

スクリーニング検査において避けなければならないことは、陽性である検体を誤って陰性と判定することである。今回、確認検査によって陽性と判定された 10 検体は、迅速診断キットにおいても全て陽性の判定であり、陰性になった検体は無かった。一方、HIV 抗体が陰性の検体を用いた迅速診断キットの検討では、検体数の 1.29% が陽性の判定になった。したがって、現在までのところ、迅速診断キットでは若干の偽陽性が検出されるが陽性検体の見落としはないものと判断される。また、保健所および衛生研究所の双方における迅速診断キットの判定結果は全て一致していることから、再現性についても良好な結果が得られた。保健所における検査を実施するにあたっては、予め 1% 程度の偽陽性が検出される旨を依頼者に説明し、正確な理解と承諾をいただくためのカウンセリングが重要になる。その場合、各保健所の担当者においては、専門的なカウンセリング技術を習得するための研修が必要になるものと考えられる。また、迅速検査によって陽性と判定された検体については確認検査を実施する必要があることから、依頼者に即日に結果を告知することは困難である。したがって、今後そのような依頼者に対応するカウンセリング技術および検査体制を合わせて検討する必要があるものと考えられた。

表 1

血清を用いたダイナスクリーン・HIV-1/2の検討			
		スクリーニング検査	確認検査
		陰性1322検体	陽性10検体
ダイナスクリーン・HIV-1/2	陽性	17(1.29%)	10
	陰性	1305	0

3-5. 兵庫県における HIV 薬剤耐性スクリーニング法の導入について

班員研究者 川村 隆 (兵庫県立衛生研究所)

研究協力者 近平雅嗣、藤本嗣人、増田邦義 (兵庫県立衛生研究所)

研究要旨

国内の HIV 感染者や AIDS 発症者が増加する事により、多剤併用療法などにより様々な抗 HIV 薬剤が長期に渡って服用されるようになってきた。これらの薬剤の単独服用では比較的短期間で、薬剤耐性株が出現することが知られており、HIV 療法を的確に行うには感染者のモニタリングにより耐性を獲得した薬剤を適宜変更する必要性が指摘されている。今回我々はこのような耐性獲得した HIV を遺伝子レベルでの検出法の導入について検討を行った。

A. 研究目的

新しい HIV 抗ウイルス薬の開発に伴い、現在国内では逆転写阻害剤とプロテアーゼ阻害剤の複数の薬剤を組み合わせる多剤併用療法が実施されるようになり、AIDS の発症誘因となっている血液中の HIV 数を RT-PCR 法でも検出不可能なレベルに維持できるようになって来た。この効果と共に多剤併用療法は耐性変異株の出現を抑制することも知られており、その結果同一薬剤の長期使用が可能となった。しかし、多剤併用療法には患者や医療スタッフの努力を要し、服薬アドヒアランスの維持が困難なことも報告されている。これらの治療を効率的に行うには、投薬によって出現する可能性がある耐性株の出現や、感染ウイルスの薬剤耐性を考慮することが必要になって来た。

都心部に比較して兵庫県下の HIV 感染者数は少ないが、着実に増加しており、このため今後は複数の施設で薬物療法が開始され、またそれが長期に及ぶことが考えられ、その結果として生ずる耐性株についてのモニタリングが必要になると思われる。このための耐性スクリーニング法の一つである遺伝子解析法について検討した。

B. 研究方法

1) サンプル

当所への依頼検体で HIV 抗体検査が陽性となった血清を、冷凍保存してあった 19 検体と、PBMC 採取後に冷凍保存した HIV 抗体陽性血漿 20 検体を用いた。

ウイルス RNA の抽出には Quiagen の QIAamp Viral RNA mini Kit を用いた。

2) RT-PCR によるポリメラーゼ、逆転写遺伝子の増幅

RT-PCR には 2 組のプライマーを用い、いづれも nested PCR 法で行った。プライマーはポリメラーゼ領域を増幅する①感染症研究所の DRPRO1 / DRPRO2 → DRPR3 / DRPRO4 および大阪府立公衆衛生研究所の PROT-1 / RT-P2 → Prots10/Prots20 を、逆転写酵素領域には感染研の DRRT16 / DRRT17 → DRRT7/DRRT10 および大阪公衛研の PROT-1 / RT-P2 → RTs10 / RTs20 を用いた。RT-, nested PCR は感染研の方法に準じて行った。すなわち、RT-PCR には Takara One Step PCR Kit (AMV)、nested PCR には Takara Pyrobest DNA polymerase を用いた。

3) PCR 産物の塩基配列決定

電気泳動後のゲルにシングルバンドを確認した PCR 産物を精製後、ダイレクトシーケンシング反応を行い、カラム精製後に DNA シーケンサーで配列を調べた。

C. 研究結果

1) HIV 抗体検査時の陽性血清

兵庫衛研では 1986 年から HIV 抗体検査を行っており、陽性となった 19 名の血清を保存しており、ここから HIV-RNA 検出を試みた。感染経路は血液製剤が 7 名、異性間性的接触が 3 名、同性間が 2 名、その他の 7 名は不明だがこの中には外国人が 3 名含まれていた。このうち血液製剤による 6 名、異性間の 4、同性間の 2 名の合計 11 名は採血時点では投薬を受けていなかった。また感染ルート不明の 7 名についても治療経過は不明だが、日本国籍の 3 名と外国籍の 1 名については告知経過などから今回の検査で HIV 感染を知ったと思われる、投薬は行われていないものと思われた。このうち、男性は 18 名、女性は 1 名で 1987 年に判明した、国内初の女性 AIDS 患者である。

2) HIV 抗体検査時の陽性血清からの HIV-RNA 増幅

19 名中 8 名から PCR 法で HIV-RNA が増幅された。増幅されたのはいずれも 8 年以内に採血された血清で、この間に採取された血清は 12 検体である。それ以前の血清からは増幅されなかった

3) PBMC 分離後の保存血漿

血液製剤により HIV 感染した 5 名、および異性間性的接触により感染した 1 名から、不定期に採取し冷凍保存した PBS 希釈血漿の一部 20 検体を用いた。1995 年までに採取した血漿のほとんどはヘパリンで凝固防止した全血からフィコールパックで PBMC を採取後に

回収した PBS で希釈した血漿を凍結保存した。また、1996 年以降はヘパリンあるいはクエン酸で凝固防止した血漿を低速遠心し、バフィーコートを回収、これを PBS 浮遊後にフィコールパックで PBMC を採取したため、1996 年以降の検体からは血漿は希釈せずに保存した。その結果、PBS 希釈した保存血漿は 15 検体、希釈しない血漿は 5 検体であった。

4) PBMC 分離後の保存血漿からの HIV-RNA の増幅

20 検体中 5 検体から HIV 遺伝子が増幅された。陽性となったのは希釈血漿が 1 検体、非希釈血漿では 4 検体であった。

5) プライマー

今回保存血清、血漿をあわせて 13 検体から HIV 逆転写酵素、ポリメラーゼ領域が増幅された。13 検体からは両方の領域が増幅され、一方の領域だけが増幅された例は無かった。

今回我々が用いた 2 種類のプライマーのうち、ポリメラーゼ領域は DRPRO1 / DRPRO2 → DRPRO3 / DRPRO4 では 12 検体が陽性となり、PROT-1 / RT-P2 → Prots10/Prots20 では 13 検体全てが陽性となった。一方、逆転写酵素領域では DRRT16 / DRRT17 → DRRT7/DRRT10 では全く増幅が認められなかったが PROT-1 / RT-P2 → RTs10 / RTs20 では 13 検体全てが陽性となった。

6) PCR 増幅した HIV-DNA の塩基配列

13 検体全てについてダイレクトシーケンシング反応を行い、現在解析中である。

D. まとめ

今回の結果ではサンプルの 10 年近い長期保存や、希釈血漿からは HIV-RNA はほとんど検出されなかった。ただ、検査開始初期の検体は抗体検査のために何度も凍結融解を繰

り返していることや、震災による停電などで保存状態が良好とはいえず、ウイルス遺伝子の検出に適した検体ではなかった。又、ヘパリンは PCR 反応に阻害作用があるといわれており、初期の希釈血漿が陰性となる要因とも考えられる。

一方、PCR 反応ではプライマーにより検出率に差が認められた。PCR では逆転写領域が増幅された検体ではポリメラーゼ領域も増幅されており、この一方のみが陽性となった例は無かった。このことから、今回 PCR 陰性となった検体は、プライマーの適否ではなくウイルス RNA が抽出されていなかったか、あるいは酵素反応が阻害されていたのが原因と思われた。

今回の検討で様々な形態や保存状態からの HIV 遺伝子の増幅について検討を行ったが、その条件により増幅が大きく左右されることが明らかになった。今後、今回増幅した DNA の解析や、他の保存検体からの HIV 遺伝子の増幅についても検討を行いたい。

3-6. 東海地区における HIV 初感染者の薬剤耐性変異(ジェノタイプ)について

班員研究者 鈴木康元、(愛知県衛生研究所)
研究協力者 森下高行、佐藤克彦 (愛知県衛生研究所)
伊部史朗、金田次弘 (国立名古屋病院)
山本直彦 (名古屋大学大学院医学研究科)

研究概要

HIV 感染症に対する治療は、プロテアーゼ阻害剤と逆転写酵素阻害剤による強力な多剤併用療法 (HAART) により著しく改善された。しかし、治療の長期化や薬の副作用による治療の失敗や中断により薬剤耐性ウイルスが出現し、それらウイルスの未感染者への伝播が問題となってきている。今回我々は、1995 年から 2001 年までに愛知県内の保健所及び医療機関で HIV の感染が疑われ、愛知県衛生研究所での確認検査により HIV の感染が確認された 31 名の血清あるいは血漿を用いて、プロテアーゼ、逆転写酵素遺伝子の解析を行ない耐性ウイルスの浸淫状況について調査した。その結果、今回調査した 31 名からは薬剤耐性の 1 次変異は検出されず、東海地区においては薬剤耐性ウイルスの伝播は低いものと考えられた。

(研究目的)

HIV 感染症に対する治療はプロテアーゼ阻害剤の登場により飛躍的に改善された。プロテアーゼ阻害剤と逆転写酵素阻害剤による強力な HAART は臨床の場で盛んに用いられるようになって以降、欧米においては HIV による死亡者が激減した。しかし、薬の副作用による治療の失敗や中断により、多剤耐性ウイルスの出現が問題となってきている。事実、欧米等における報告によると、薬剤耐性遺伝子が初感染者の 10%前後に認められている。そこで我々は、東海地区における HIV の初感染者における耐性ウイルスの浸淫状況について調査すると共に、耐性関連遺伝子とサブタイプとの関連について調査した。

(研究方法)

1995 年から 2001 年までの間に愛知県内の

保健所及び医療機関で HIV 感染が疑われ、当衛生研究所での確認検査により HIV 感染が確認された血清あるいは血漿 31 検体 (95 年 3 検体、96 年 5 検体、97 年 5 検体、98 年 2 検体、99 年 6 検体、2000 年 2 検体、01 年 8 検体) を使用した。血清または血漿より RNA を抽出し、RT-PCR により逆転写酵素及びプロテアーゼ領域の遺伝子を含む約 1300bps とエンベロープ遺伝子の C2V3 領域を増幅した。PCR 産物に対して ABI PRISM 310 を用い Dye Terminator 法により遺伝子解析を行なった。プロテアーゼ遺伝子については全領域を、逆転写酵素遺伝子については 1~270 番までの遺伝子について解析を行なった。サブタイプの決定は NJ 法による系統樹解析により決定した。

(研究結果および考察)

HIV 初感染者 31 名のサブタイプは、エンベ

ローブ遺伝子の系統樹解析の結果サブタイプ B 型 25 名、サブタイプ A/E 型 6 名であった。その感染年別の内訳を見ると、97 年以前の感染者 13 名はすべてサブタイプ B であったが、98 年度以後の感染者では A/E 型も見られるようになった。98 年以降の感染者のうち、サブタイプ A/E 型は 98 年 1 名 (1/2)、99 年 0 名 (0/6)、00 年 2 名 (2/2)、01 年 3 名 (3/8) の計 6 名で、残り 12 名はすべて B 型であった。

また、プロテアーゼ、逆転写酵素遺伝子の解析の結果からは、強い薬剤耐性を示す 1 次変異はいずれの検体からも検出されなかった。しかし、2 次変異と呼ばれる薬剤耐性関連変異は 31 検体中 22 検体に認められたが、薬剤耐性関連変異の出現頻度に、検体採取年による差は認められなかった(表 1)。

プロテアーゼ遺伝子から検出された 2 次変異は、L10I、K20M、M36I、L63P、A71T、V77I の 6 つであった。そのうち L10I は 01 年の 1 検体から、K20M は 96 年の 1 検体から、A71T は 99 年と 01 年に各 1 検体検出された。M36I の変異はプロテアーゼ阻害剤の使用が日本において認可された 96 年以降 01 年までに 8 検体から、これに対し L63P、V77I の変異はプロテアーゼ阻害剤の認可される以前の 95 年の検体を含め 01 年までに、それぞれ 11 検体、9 検体から検出された。また、重複してプロテアーゼ領域に変異の見られた検体も 9 検体存在した。逆転写酵素領域からは核酸系逆転写酵素阻害剤に対する多剤耐性変異に関連する A62V のみが、97 年に 1 検体のみから検出された(表 2)。

サブタイプと薬剤耐性関連遺伝子との相関を見ると、M36I の変異はサブタイプ B 型で 3/25、A/E 型で 5/6 と、サブタイプ A/E 型に多く認められた。また L63P はサブタイプ B 型で 10/25、A/E 型で 1/6、それに、V77I はサブタイプ B 型で 8/25、A/E 型で 1/6 に認められ、サブタイプ B 型に多く認められる傾

向にあり、これらの変異は各サブタイプの polymorphism であると考えられた。

今回の調査から、東海地区において HIV 初感染者間における耐性ウイルスの伝播は低いものと考えられた。しかし近年、HIV 初感染者間における耐性ウイルスの伝播が国内において報告されるようになり、今後、初感染者における耐性ウイルスの伝播が増加するものと考えられ、耐性ウイルスに対する監視が重要になると考えられた。

(学会発表)

- 1、 Successful Isolation of HIV-1 by Co-culturing Peripheral Blood Mononuclear Cells with MAGIC5A cells
Katsuhiko Sato, Takayuki Morishita, Shiro Ibe, Junko Hattori, Masashi Tatsumi, Kenji Sakae, Makoto Utumi, and Tsuguhiro Kaneda
6th ICAAP (Melbourne, Australia)
- 2、 HIV-1 の薬剤耐性変異が検出された治療歴のない HIV-1 感染症患者
伊部史朗、森下高行、佐藤克彦、柴田直美、内海 眞、金田次弘
第 15 回日本エイズ学会 (東京)
- 3、 東海地区における HIV 初感染者のプロテアーゼ、逆転写酵素遺伝子の解析
森下高行、佐藤克彦、伊部史朗、金田次弘、山本直彦
第 15 回日本エイズ学会 (東京)