

14. 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－2

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、治療の長期化や薬剤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、それら耐性ウイルスの未感染者への伝播が問題となってきている。そこで、2002 年度中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確認検査により HIV 感染が確認された 9 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検討した。その結果、調査した 9 名からは薬剤耐性の 1 次変異は検出されなかったことから、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 が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。我々は前年度の本研究において、1995 年から 2001 年までに愛知県衛生研究所での確認検査により HIV 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った。その結果、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

と報告した。今回はその継続調査として、2002 年度中に HIV 感染の確認された 9 名について耐性ウイルスの浸淫状況について調査すると共に、薬剤耐性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）

2002 年度中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 9 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

番までのアミノ酸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 9 名のサブタイプは、エンベロープ遺伝子の系統樹解析の結果 B 型 8 名、D 型 1 名であった。サブタイプ D 型は中央アフリカに多くみられ日本においては稀なサブタイプであることから、感染者の国籍、性別については不詳であったが、アフリカ出身の外国人の可能性が高いと考えられた。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、プロテアーゼ遺伝子に 9 検体中 5 検体に認められた。プロテアーゼ遺伝子から検出された 2 次変異は、L10V、K20R、M36I、A71V/T、V77I の 6 種で、2 種以上の変異遺伝子を持つものが 5 検体中 3 検体に認められた。サブタイプと薬剤耐性関連遺伝子との相関を見ると、M36I と A71V/T の変異はサブタイプ B 型で 2 検体に、V77I は 3 検体に認められ、これらの変異はサブタイプの polymorphism であると考えられた。(表 1)

今回および前年度の調査結果から、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も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危惧され、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. Gag p6 遺伝子に検出された挿入変異の意義
伊部史朗、森下高行、佐藤克彦、内海 眞、
金田次弘
第 16 回日本エイズ学会(名古屋)
2. 2001 年次に新規受診した未治療 HIV-1 感染症患者の薬剤耐性検査結果
伊部史朗、森下高行、竹尾 歌、
堀田直恵、佐藤克彦、内海 眞、
金田次弘
第 16 回日本エイズ学会(名古屋)
3. 新規低分子化合物；ペンダント型亜鉛サイクレン錯体の抗 HIV 活性とその作用機序
山本直彦、森下高行、佐藤克彦、大竹 徹、
森 治代、川畑拓也、金田次弘、内海 眞
第 16 回日本エイズ学会(名古屋)
4. 高感度リアルタイム PCR による HIV-1 DNA 定量法の検討
永井裕美、和田かおる、森下高行、佐藤克彦、内海 眞、西山幸廣、金田次弘
第 16 回日本エイズ学会(名古屋)

表1)検査検体の詳細

検体名/採血年度	性別	国籍	Proアミノ酸2次変異	サブタイプ	感染経路
AI/1/02	不明			B	不明
AI/2/02	不明		L10V K20R M36I	B	不明
AI/3/02	不明			D	不明
AI/4/02	男	日本	A71V V77I	B	MSM
AI/5/02	男	日本	M36I	B	MSM
AI/6/02	男	日本		B	MSM
AI/7/02	男	日本		B	MSM
AI/8/02	男	日本	V77I	B	MSM
AI/9/02	男	日本	A71T V77I	B	MSM

15. 兵庫県において検出された HIV 薬剤耐性変異について

班員研究者 川村 隆 (兵庫県立健康環境科学研究センター)

研究協力者 近平雅嗣、藤本嗣人、増田邦義 (兵庫県立健康環境科学研究センター)

研究概要

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を行い、薬剤耐性を有した HIV の県内での流行を調べた。

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

を導入し、兵庫県下で検出された HIV の耐性変異について調べた。

B. 研究方法

1) サンプル

医療機関および保健所から当所に依頼のあった検体で HIV 抗体検査が陽性となった血清 28 検体を用いた。

ウイルス RNA の抽出には Quiagen 製 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 法ではプロテアーゼと逆転写酵素の両遺伝子を含む C2V3 領域を増幅し、nested PCR 法では、プロテアーゼおよび逆転写酵素領域を個々に増幅した。RT-PCR 法には Takara One Step PCR Kit (AMV) を、nested PCR 法には Takara Pyrobest DNA polymerase を用いた。

3) PCR 産物の塩基配列決定と耐性変異の解析
nested PCR 産物の電気泳動ゲルでシングルバンドを確認した後、PCR 産物を精製、ダイレクトシーケンシング反応を行った。G50 ゲルで精製し後に、DNA シークエンサー (ABI Prism 310 Genetic Analyzer) で塩基配列を

決定した。塩基配列はフォワード / リバース両プライマーでの整合性をとり、得られた塩基配列を米スタンフォード大学のホームページにある「Stanford HIV RT and Protease Sequence Database」の「Sequence Analysis Programs」に送信し、耐性変異におよびサブタイプに関する情報を得た。プロテアーゼの全遺伝子(コドン 1-99)と、逆転写酵素遺伝子のコドン 20~255 について解析した。

C. 研究結果

1) HIV 抗体検査時の陽性血清からの HIV-RNA 増幅

保存血清 28 検体中 20 検体から RT-PCR 法で HIV 遺伝子が増幅された。増幅されたのはいづれも比較的最近に採血された血清で、検査開始当初の長期保存した血清からは増幅されなかった。PCR 増幅された 20 検体中男性は 19、女性は 1 検体であった。また、20 検体の中には外国籍の男性が 1 名含まれていた。

2) HIV サブタイプ

PCR 増幅された 20 検体中サブタイプ B は 16 株で全体の 80% を占めており、サブタイプ AE は 4 株であった。サブタイプ AE が認められたのは、各々 1993 年、1997 年、2000 年および 2001 年に採取された検体で、そのうちの 2 検体は感染経路が異性間性的接触であった。また、PCR 増幅された 20 検体中唯一の女性からの検体がサブタイプ AE であった。3 検体の 10 代の検体は検査開始初期に医療機関から検査依頼のあった、血液製剤による感染者で、いずれもサブタイプ B であった。

3) 逆転写酵素遺伝子の変異

20 検体中 3 検体で逆転写酵素遺伝子に耐性変異が認められた。すべて血液製剤による感染検体で検出され、既に薬剤投与が行われていたと考えられる。確認された変異は、M41L、D67N、T69D、K70R、V118I、T215F、K219Q の 7 種類で、1 検体当たり 3~6 種類の変異が混在していた。今回の検体では、薬剤投与後早期に

出現し対象薬剤に特異的に強い耐性を示すことが知られている一次変異では、K70R、T215Y および T215F が認められた。これら 3 検体全てにおいて、何れかの一次変異が単在あるいは混在していた。

4) プロテアーゼ遺伝子の変異

20 検体中 11 検体でプロテアーゼ遺伝子に耐性変異が認められ、全体の 55% を占めていた。検出された変異は、L10I、K20R、M36I、M46I、L63P、A71T、V77I、I93L、M96L の 9 種類であった。この内で、一次変異は M46I で血液製剤による感染例で見いだされた。プロテアーゼ阻害剤が導入されたのは 1995 年からであり、この事例では薬剤の導入以前から耐性株が存在したことになる。ただ、一次変異後に集積して薬剤感受性に大きな影響を与えないとされる二次変異は、1995 年以前に採取された 4 検体中 3 検体においても確認されていることから、これらの変異はいづれも当該薬剤に関係しない spontaneous mutation、あるいは他の薬剤からの induced mutation と考えられる。

1995 年以降の検体についても、16 検体中 8 検体で二次変異が認められ、そのうちの 5 検体では 2~4 種類の変異が混在していた。

変異が認められた 11 検体で、最も多くの検体で認められた変異は L63P で、8 検体において検出された。次いで、M36I および I93L でそれぞれ 4 および 3 検体で認められた。これらの変異はいずれも、他の変異と混在することで PIs に対する薬剤耐性が増強されると考えられている変異で、薬剤耐性に強く影響する変異ではなかった。

D. 研究発表

論文発表

1. 近平雅嗣、藤本嗣人、増田邦義、楠田 均、木村英二、小林 稔、川村 隆：兵庫県立衛生研究所(現兵庫県立健康環境科学研究所センター)における過去 16 年間の HIV

抗体検査の推移(1986 - 2001 年)、兵庫
 県立健康環境科学研究センター年報、1 :
 110 - 119、2002

表 兵庫県において検出されたHIVの抗HIV薬に対する耐性変異

\No	採取年	性別	年代	サブタイプ	耐性変異		国籍	感染経路
					プロテアーゼ	逆転写酵素		
1	1991	♂	10	B	L63P	M41L, L210W, T215Y	日本	血液製剤
2	1993	♂	10	B	M36I, M46I, L63P	D67N, K70R, V118I, K219Q	日本	血液製剤
3	1993	♂	50	AE	M36I		日本	不明
4	1994	♂	10	B		D67N, T69D, K70R, V118I, T215F, K219Q	日本	血液製剤
5	1995	♂	40	B	L63P		外国	不明
6	1996	♂	20	B	M36I, L63P		日本	不明
7	1997	♂	30	B			日本	不明
8	1997	♂	40	B			日本	不明
9	1997	♂	50	AE			日本	異性間
10	1998	♂	20	B			日本	不明
11	1999	♂	50	B			日本	不明
12	1999	♂	30	B			日本	不明
13	2000	♂	40	B	L63P, A71T, V77I, I93L		日本	MSM
14	2000	♂	20	B	L10I, L63P, I93L		日本	不明
15	2000	♂	50	AE	M36I		日本	異性間
16	2000	♂	20	B			日本	不明
17	2000	♂	40	B	L63P, A71T, V77I, I93L		日本	MSM
18	2000	♂	20	B	L63A		日本	不明
19	2001	♂	40	B			日本	不明
20	2001	♀	20	AE	K20R, I93L, M96I		日本	不明

16. HIV-1 薬剤耐性変異の解析について

班員研究者 千々和 勝己 (福岡県保健環境研究所)
研究協力者 江藤 良樹 (福岡県保健環境研究所)
鍋島 茂樹、古庄 憲浩、鄭 湧、林 純 (九州大学医学部)

研究概要

HIV-1 薬剤耐性株が実際に感染を引き起こしている可能性を検討するため、未治療の HIV-1 感染者 24 名についてウイルスの遺伝子解析を行った。その結果、逆転写酵素阻害剤に対して耐性変異を持つものは、今のところ 1 名も確認できなかった。また、治療中の感染者 5 名についてウイルスの遺伝子解析を行ったところ、2 名について一次変異を含む複数の耐性変異が、また、2 名については複数の 2 次変異が見られた。

A. 研究目的

エイズの治療には、逆転写酵素阻害剤や、プロテアーゼ阻害剤などの多種類の薬剤が使用されるようになり、発症を遅らせる点ではかなりの効果を上げている。しかしながら、薬剤の使用に伴い耐性株が出現することが明らかになっており、治療効果の低下を防ぐためには、変異をモニターする必要がある。また、ヒトからヒトに感染を起こしている株に耐性株が含まれることも懸念されている。そこで、我々は福岡県において、薬剤耐性株が感染を引き起こしている可能性を検討し、また、治療中の感染者が保有しているウイルスの薬剤耐性について解析を行った。

B. 研究方法

対象は、九州大学医学部附属病院を受診した HIV-1 感染者で、血液から末梢血リンパ球と血漿を分離し、血漿を検体とした。未治療と考えられる感染者の検体は、1991 年から 2002 年までに 47 名から、また、治療中の感染者の検体は 2002 年 7-12 月に 16 名から採取した。
血清からの HIV RNA の抽出は、QIAamp Viral

RNA Mini Kit (QIAGEN 社) を用いて行った。抽出した RNA について AMV one step RNA PCR kit (宝酒造) で RT-PCR を行い、さらに PyroBest DNA Polymerase (宝酒造) を用いて nested PCR を行った。逆転写酵素領域の PCR に用いたプライマーは、平成 11 年度の国立感染症研究所における HIV 検査法技術講習会で示された DRRT16・DRRT17(1st)、及び DRRT7・DRRT10(2nd)、または森らの方法 1) に示されたプライマーであった。また、プロテアーゼ領域の PCR には同じく研修会で紹介された、DRPRO1・DRPRO2(1st)、及び DRPRO3・DRPRO4(2nd)、または森らの方法 1) に示されたものを用いた。得られた PCR 産物を精製し、dye terminator 法で塩基配列を決定し、それを基に各領域のアミノ酸配列を明らかにし、薬剤耐性に関与する変異を検討した。
血中 HIV-1 RNA の定量は、アンプリコア HIV-1 モニター v1.5 (ロシュ社) を用いて行った。

C. 研究結果

県内で実際に薬剤耐性株が感染を起こしている可能性を検討するため、未治療であると考えられる感染者の血中ウイルスについて解

析を試みた。PCRの結果、47名中24名について逆転写酵素領域を増幅することができ、塩基配列を決定することができた。それを基に明らかにしたアミノ酸配列のうち、逆転写酵素阻害剤に対する耐性に関与する27カ所のアミノ酸について、変異の有無を検討した。その結果、24名の感染ウイルスには全く耐性変異を認めなかった。

次に、治療中の感染者16名について血中ウイルスの解析を試みたところ、PCR法で逆転写酵素・プロテアーゼ領域を増幅できたのは、僅かに5名だけであった。その理由を探るため、16名の血中HIV-1 RNA量の定量を行った。その結果を表1に示す。PCR法で増幅できなかった感染者の血中RNA量は、いずれも検出感度以下であった。

PCR法で増幅できた5名のウイルスについて塩基配列からアミノ酸配列を決定し、プロテアーゼ領域については20カ所、逆転写酵素領域では27カ所の耐性に関わるアミノ酸変異を検討した。その結果を表2に示す。5名のうちNo.48だけが、耐性変異を全く持たなかった。一方、No.31ではヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤に対しては1次変異(V75T)を含む6カ所、プロテアーゼ阻害剤に対しても1次変異(M46I, L90M)を含む7カ所に耐性変異が見られた。また、No.51では、ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤に対しては1次変異(M184V)が1カ所、プロテアーゼ阻害剤に対しては2次変異が3カ所見られた。その他のNo.32とNo.47では、プロテアーゼ阻害剤に対して2次変異がそれぞれ2カ所見られた。プロテアーゼ阻害剤における耐性変異では、V77Iが4名に、L63Pが3名にと高頻度に見られた。

最後に、各感染者における薬剤ごとの変異数を表3に示した。解析を行った薬剤は、ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤では、ジドブジン(AZT)、ラミブジン(3TC)、ザルシタピン(ddC)、ジダノシン(ddI)、スタブジン(d4T)、

アバカビル(Aba)、非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤では、ネビラピン(Nev)、エファビレンツ(Efa)、デラビルジン(Del)、プロテアーゼ阻害剤では、インディナビル(Ind)、リトナビル(Rit)、サキナビル(Saq)、ネルフィナビル(Nel)、アンブレナビル(Anp)である。傾向としては、プロテアーゼ阻害剤ではどの薬剤についても耐性変異を持つものが多く、非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤では、耐性変異を持つものは見られなかった。

D. 考察

今回解析が可能であった、未治療と考えられる感染者24名には逆転写酵素阻害剤に対する変異は見られなかった。国内で逆転写酵素阻害剤が使用され始めたのは1987年からであるが、薬剤耐性株の流行は確認できなかった。一方、プロテアーゼ阻害剤については、使用が開始されたのは1997年と比較的最近のことであるが、治療中の感染者においても耐性変異が逆転写酵素阻害剤より多く見出されているため、今後耐性株の流行を監視していく必要がある。

今回解析を行った治療中の感染者については、PCR法で増幅が可能であった数が少なかった

(5/16, 31%)。その原因としては、血中にHIV-1 RNAが少ないことや、プライマーを設定している部分のミスマッチが考えられた。そこで、血中RNAの定量を行ったところ、検出感度(200-400コピー/ml程度)以下のものは、PCR法で遺伝子を増幅できなかったことが明らかになった。すなわち、今回の対象者には比較的治療が成功している例が多かったために、解析可能数が少なかったと考えられる。また、解析可能であった5名の中では、No.31が非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤を除くほとんどの薬剤に対する耐性変異を持っていた。また、全く薬剤耐性変異が見られなかったのは1名だけで、治療により高頻度に薬剤耐性株が出現していることが確認された。薬剤別

に見ると、プロテアーゼ阻害剤に対する耐性変異が多く見られ、非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤に対する耐性変異は見られなかった。

E. 研究発表

学会発表

1. 千々和勝己、江藤良樹：HIV感染者における薬剤耐性変異の解析、第28回九州衛生環境技術協議会、宮崎、2002年10月10日-11日。

参考文献

1) 森治代、小島洋子、川畑拓也、大竹徹、大石功、感染症学雑誌、74：450-457（2000）

表1. 血漿中のHIV-1 RNAコピー数と遺伝子解析の可否

検体番号	RNA copies /ml	遺伝子解 析	検体番号	RNA copies /ml	遺伝子解 析
13	検出感度以下	不可	46	検出感度以下	不可
15	検出感度以下	不可	47	11,000	可能
31	250	可能	48	2,100	可能
32	30,000	可能	49	検出感度以下	不可
41	検出感度以下	不可	50	検出感度以下	不可
42	検出感度以下	不可	51	640	可能
44	検出感度以下	不可	52	検出感度以下	不可
45	検出感度以下	不可	53	検出感度以下	不可

表2. HIV感染者における薬剤耐性変異

検体 番号	ヌクレオシド系逆 転写酵素阻害剤	非ヌクレオシド系逆 転写酵素阻害剤	プロテアーゼ阻害剤
31	M41L,A62V, <u>V75T</u> , V118I,L210W,T215F	—	L10I,M36I, <u>M46I</u> ,L63P, A71V,V77I, <u>L90M</u>
32	—	—	L63P,V77I
47	—	—	M36I,V77I
48	—	—	—
51	<u>M184V</u>	—	L63P,A71T,V77I

* 下線は1次変異。

表3. 薬剤別耐性変異の出現頻度

No.	AZT	3TC	ddC	ddI	d4T	Aba	multi	Nev	Efa	Del	Ind	Rit	Saq	Nel	Anp
31	3(1)	1	1		1(1)	3	2				5(1)	5	4(1)	6	3
32											1	1	1	2	1
47												1		2	
48															
51		1(1)	1	1		1					2	2	2	3	1

()内は、1次変異。

multi: ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤における多剤耐性変異

17. アジア途上国における初感染、未治療者の

薬剤耐性 HIV の浸淫状況

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

研究概要

インド、パキスタン、ベトナムを中心にアジア途上国における非サブタイプ B 型の HIV 初感染、未治療患者の薬剤耐性関連遺伝子を解析した。今年度は計 45 例の感染者について RT, Protease 領域の遺伝子を調べた結果、強い耐性を示す 1 次変異は逆転写酵素領域およびプロテアーゼ領域共にみられなかったが、非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤およびプロテアーゼ阻害剤に対する 2 次変異がそれぞれ平均 23%、70% と、特にプロテアーゼ領域に高頻度にみられた。

目的

欧米では AZT をはじめとする強力な薬物療法の中絶等より、HIV 初感染、未治療者における薬剤耐性ウイルスの存在が問題となっている。本研究は、アジアの中でも特に、推定 HIV 感染者数が世界最大とされているインドと、その隣国にあって未だ HIV の浸淫状況の情報に乏しいイスラム国パキスタン、および日本と経済的、文化的交流の盛んなベトナムにおいて、HIV 初感染、未治療者における HIV 薬剤耐性ウイルスの浸淫状況を調査し、特に非サブタイプ B の HIV を中心に、これらウイルスの遺伝学的特徴 (genotype) と感染性 (phenotype) および種々の薬剤に対する感受性を解析し、発展途上国における将来の薬物治療などの AIDS 対策に重要な基礎的および臨床的データを提供することを目的とする。

方法

感染者血清から HIV-RNA を精製し、RT-PCR 法により cDNA を作成し、Env, Pol 領域の PCR

産物を direct あるいは cloning により塩基配列を解析し、Neighbor Joint 法により、系統樹を作成し、subtype を決定した。薬剤耐性関連遺伝子については、RT、Protease 領域のアミノ酸配列を解析し、薬剤耐性を持たない HIV 野性株と比較した。

結果

平成 14 年度新たに、インドにおいて 22 例、パキスタンにおいて 10 例、ベトナムにおいて 13 例の異性間性的接触により感染した初感染、未治療患者について解析し得た。その結果、強い耐性を示す 1 次変異は逆転写酵素領域およびプロテアーゼ領域共にみられなかったが、非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤およびプロテアーゼ阻害剤に対する 2 次変異がそれぞれ平均 23%、70% と、特にプロテアーゼ領域に高頻度にみられた。

考察

現在、広く利用されている薬剤耐性に関する

るデーターはサブタイプ B におけるものが殆どであり、世界に広く流行するサブタイプ C や日本の性的接触による感染に多いサブタイプ E などいわゆる non-B 型の HIV におけるデーターに乏しいのが現状である。われわれが対象としている地域に流行するサブタイプは多くが non-B 型であるので、これらのタイプの HIV における薬剤耐性関連変異の臨床的有用性を検討することはきわめて重要なことである。

発表論文

Primary Mutations Associated with Protease Inhibitor Resistance in HIV-1 infected Patients without Antiviral Therapy in India (in preparation)

学会発表

「PRESENCE OF PRIMARY MUTATIONS ASSOCIATED WITH PROTEASE INHIBITOR RESISTANCE IN ANTIVIRAL-NAIVE HIV-1-INFECTED PATIENTS IN INDIA」

(第 16 回エイズ学会シンポジウム)

18. 日本における HIV-1 サブタイプの解析

分担研究者 近藤真規子（神奈川県衛生研究所）
研究協力者 嶋貴子、今井光信（神奈川衛研）、
伊藤章、川田かおる（横浜市大医学部）、相楽裕子（横浜市民病院）、
岩本愛吉（東大医科研）、野口有三、宇宿秀三（横浜市衛研）

研究概要

日本で流行している HIV-1 の特徴を明らかにするため、2002 年 12 月末までに神奈川県衛生研究所に依頼のあった HIV 感染者 400 例について HIV-1 のサブタイプを決定し、感染経路別にサブタイプの解析を行った。男性同性間の性行為による感染ではほとんどがサブタイプ B であった。一方、異性間性行為による日本人感染ではサブタイプ E が最も多く、ついでサブタイプ B、少数ではあるがサブタイプ A、C、D、G が検出された。外国籍では東南アジアが最も多く、そのほとんどはサブタイプ E であった。その他、アフリカや南米出身者からはサブタイプ A、C、F や A/C リコンビナントウイルスが検出されており、これらはそれぞれの国の流行状況を反映しているものと考えられた。

A. 研究目的

HIV-1 は遺伝子の差異によって M、N、O の 3 つのグループに分類され、この内、世界中で大きな流行となっているのは M グループで、M グループは 10 のサブタイプに分類されている。

日本で見られるサブタイプは従来は B が主流であったが、近年、異性間性的接触による感染では、サブタイプ E が増加している。また、最近では少数ながらサブタイプ B、E 以外の A や C 等も報告されるようになった。私たちは日本で流行している HIV の特徴を明らかにするためサブタイプの解析を行った。

B. 研究方法

1. HIV-1 感染者のサブタイプ解析

2002 年 12 月末までに神奈川県衛生研究所に依頼のあった HIV 感染者 400 例（リンパ球および血漿）について HIV-1 のサブタイプを決定し、感染経路別にサブタイプを解析した。サブタイプの解析は HIV-1 の env C2V3 領域を

nested PCR 法で増幅し塩基配列を決定後、neighbor-joining 法による系統樹解析により行った。男性同性間性的接触による感染者の一部と東南アジア出身の感染者の一部については、PCR 法によるサブタイプ B と E の簡易鑑別法および env V3 領域のペプチドを用いた ELISA 法を行った。

2. HIV-1 陽性献血血液のサブタイプ解析

1992 年から 2002 年までの HIV-1 陽性献血血液 268 例から HIV-1 遺伝子を抽出し、上記方法でサブタイプを決定した。

（倫理面への配慮）

HIV 感染者に対しては主治医より遺伝子検査の説明が行われている。また、血液サンプルの取り扱いは個人が特定できないように記号で行う等プライバシーの保護に努めている。

C. 研究結果

1. 感染経路別 HIV サブタイプの解析

(表1、図1~3)

日本人の男性同性間性行為による感染では109例中106例がサブタイプB(97%)であり、サブタイプEが2例、サブタイプAが1例検出された(表1、図1)。

一方、異性間の性的接触による感染では、249例中サブタイプEが170例と最も多く、ついでサブタイプBが50例、A12例、C9例、D3例、F3例、G2例であった(表1、図2)。また、これら249例の国籍は日本国籍120例、外国国籍129例で、その内訳は東南アジア出身が106例、アフリカ11例、南米7例、その他5例であった(表1、図2)。東南アジア出身の感染者ではサブタイプEが101例(95%)、サブタイプBが5例(5%)であったが、アフリカや南米出身の感染者からはサブタイプB、Eの他にサブタイプA、C、FやA/Cリコンビナントが検出された(図2)。

また、異性間性的接触による日本人感染者ではサブタイプEが66例(55%)と最も多く、ついでサブタイプBが38例(32%)、その他少数ではあるがサブタイプA7例、C4例、D3例、G2例が検出された(表1、図2)。

異性間性的接触による日本人感染者について、HIV感染が判明した年とサブタイプの関連について解析した結果、男女とも1993年まではサブタイプBが主流であったが、1994年以降サブタイプE増加していることがわかった。特に、女性感染者では1994年以降、サブタイプEの他にA、C、D等も増加傾向が認められた(図3)。

2. 献血者におけるHIVサブタイプの解析 (表2、図4)

2000年から2002年の3年間にHIV陽性が確認された献血血液228例中130例についてHIV-1サブタイプの解析を行った。その結果、サブタイプBが112例(86%)、次いでサブタイプE13例(10%)、サブタイプA2例(2%)であった。1999年までのHIV-1陽性献血血液

138例の解析においてもサブタイプBが82%を占めており、この3年間の結果は従来とほぼ同様の傾向であった。

D. 考察および結語

以上の結果から、日本で流行しているHIV-1のサブタイプは男性同性間性行為による感染ではほとんどがサブタイプBであるが、異性間性行為による感染では従来のサブタイプBから最近ではサブタイプEが増加しており、またこの他にも、少数ながらサブタイプA、C、D、F、G、A/Cリコンビナント等も存在していることが明らかとなった。特に異性間性行為による女性感染者においてサブタイプが多様化しており、これら多様なサブタイプの分子疫学調査は、感染実態の解明等に重要であり、HIV対策に役立つものと考えられる。

E. 研究発表

論文発表

1. 今井光信：HIVスクリーニング検査の陽性数の動向とその解析、微生物検出情報、23、111(2002)
2. 近藤真規子、今井光信：日本におけるHIV-1サブタイプ、微生物検出情報、23、111-112(2002)
3. 近藤真規子、今井光信：未治療のHIV感染者における薬剤耐性変異、微生物検出情報、23、112(2002)

学会発表

1. Kondo M, Shima T, Sudo K, Nishizawa M, Iwamuro S, Okabe T, Imai M: Characterization of HIV-1 genome from a patient who is western blot weak positive and HIV genome undetectable by PCR for 18 months. 第14回国際エイズ会議、Barcelona、2002年7月7~12日。
2. Imai M, Kondo M, Shima T, Yamanaka R: NAT

screening and subtype of HIV-1 among blood donors in Japan. 第14回国際エイズ会議、Barcelona、2002年7月7～12日。

3. 近藤真規子、西澤雅子、嶋貴子、須藤弘二、斎藤隆行、今井光信：HIV-1 感染者から分離された nef/LTR 領域欠損 HIV-1 株の遺伝子解析、第50回日本ウイルス学会、北海道、2002年10月16～18日。
4. 須藤弘二、西澤雅子、嶋貴子、近藤真規子、向出雅一、蜂谷敦子、岡慎一、加藤真吾、伊藤章、宇宿秀三、野口有三、相楽裕子、杉浦亙、今井光信：同一患者検体を用いた薬剤耐性検査結果の比較、第16回日本エイズ学会、名古屋、2002年11月28日～11月30日。
5. 西澤雅子、近藤真規子、須藤弘二、嶋貴子、斎藤隆行、加藤真吾、田中理恵、岩室紳也、岡部武史、今井光信：nef/LTR 領域欠損 HIV-1 の分離及び分離株の増殖についての解析、第16回日本エイズ学会、名古屋、2002年11月28日～11月30日。
6. 近藤真規子、西澤雅子、須藤弘二、嶋貴子、斎藤隆行、岩室紳也、岡部武史、今井光信：長期にわたり HIV-1 抗体価が低レベルで推移した感染者における HIV-1nef/LTR 遺伝子の経時的解析、第16回日本エイズ学会、名古屋、2002年11月28日～11月30日。
7. 宇宿秀三、野口有三、坂本光男、相楽裕子、須藤弘二、西澤雅子、近藤真規子、今井光信：HIV 薬剤耐性遺伝子変異の不一致例について（その2）：HIV-RNA（血漿中）と HIV プロウイルス DNA（PBMC 中）との長期不一致例について、第16回日本エイズ学会、名古屋、2002年11月28日～11月30日。

表1 HIV-1サブタイプの解析(神奈川県衛生研究所 1987-2002)

感染要因	合計	HIV-1サブタイプ(G2V3)						
		B	E	A	C	D	G	F
凝固因子製剤	30	30						
同性間性的接触								
日本国籍	109	106	2	1				
外国国籍	6	5	1					
小計	115	111	3	1				
異性間性的接触								
日本国籍男性	71	23	44	1	0	2	1	0
女性	49	15	22	6	4	1	1	0
外国国籍男性	36	5	24	3	4	0	0	0
女性	93	7	80	2*	1	0	0	3
小計	249	50	170	12	9	3	2	3
IDU(日本)	1	1						
(外国)	1							1
母児間	4	1	2					1
	6	2	2					2
合計	400	193	175	13	9	3	2	5

*内1例はサブタイプAとCのリコンビナントウイルス

2002 12月末

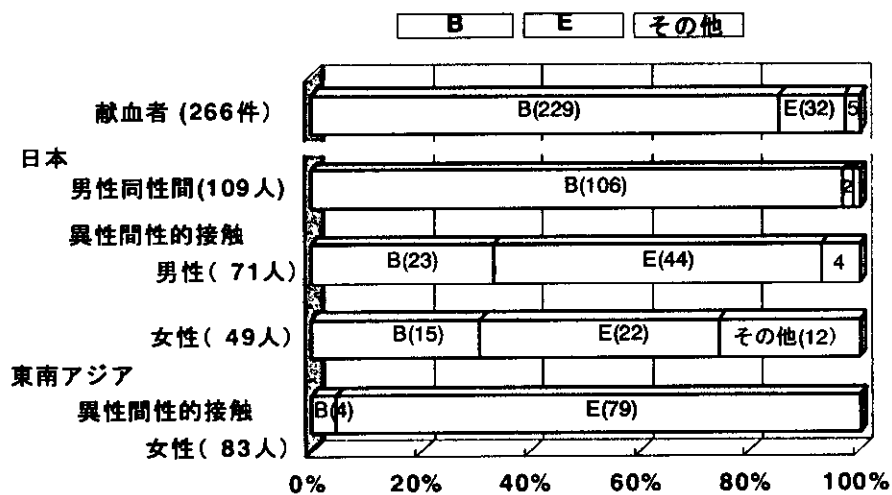


図1 献血者および感染要因別グループにおける HIV-1サブタイプ (神奈川県衛生研究所: 1987-2002年)

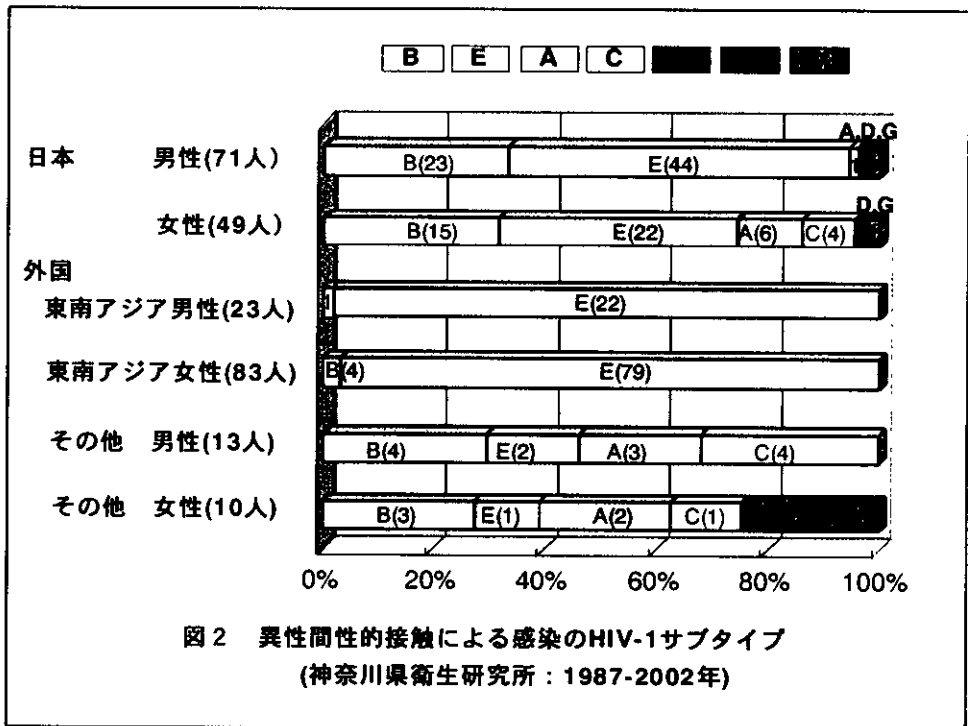


図2 異性間性的接触による感染のHIV-1サブタイプ
(神奈川県衛生研究所：1987-2002年)

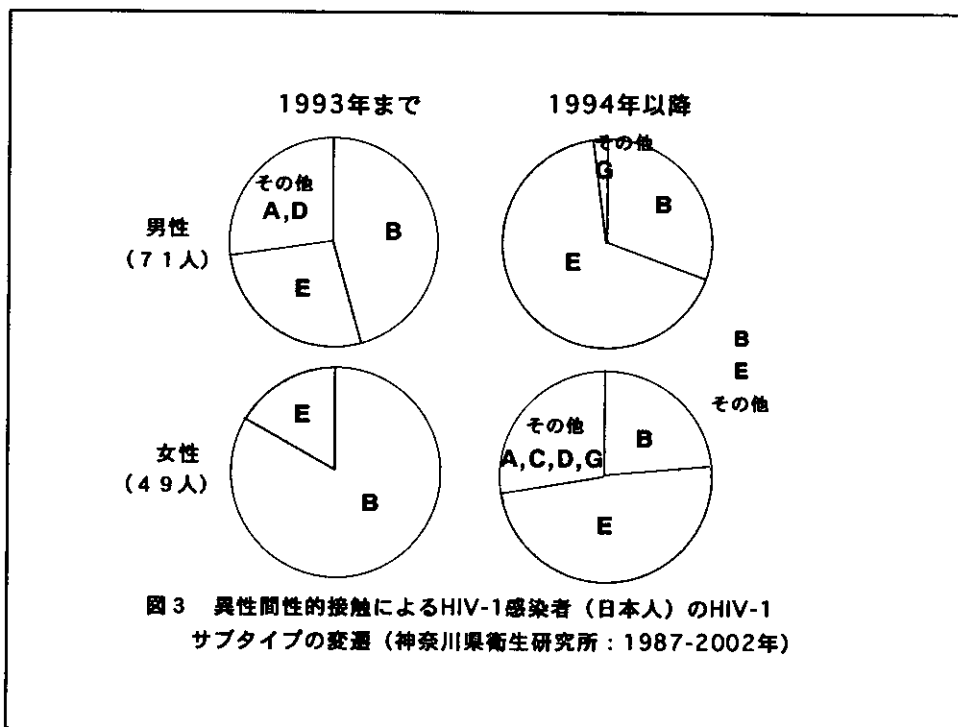


図3 異性間性的接触によるHIV-1感染者（日本人）のHIV-1サブタイプの変遷（神奈川県衛生研究所：1987-2002年）

表2 HIV-1サブタイプ(HIV-1陽性献血血液)
—1992~2002年—

採血年	件数	HIV-1サブタイプ(C2V3)			
		B	E	A	PCR陰性
1992~1996	28	24	4		
1997	36	28	6	1	1
1998	37	31	4	2	
1999	37	31	5		1
2000	37	30	4	1	2
2001	48	42	5	1	
2002	45	40	4		1
合計	268	226	32	5	5
		(84%)	(12%)	(2%)	(2%)

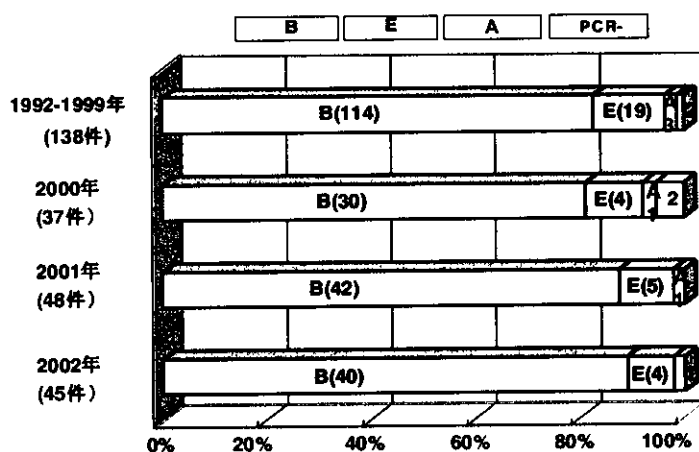


図4 HIV-1サブタイプ(HIV-1陽性献血血液)
—1992~2002年—

19. PCR 法を用いた新型 HIV 検出システム構築の試み

分担研究者 市村 宏 (金沢大学大学院医学系研究科ウイルス感染症制御学)
研究協力者 武久 盾 (金沢大学大学院医学系研究科ウイルス感染症制御学)

研究概要

新しいタイプの HIV の存在を明らかにするために、PCR を用いて遺伝子レベルで検体をスクリーニングする系を導入した。HIV-1 グループ M の env 遺伝子 V3 領域に特異的な PCR の系と、HIV/SIV 全般の pol 遺伝子インテグラーゼ領域を増幅できる PCR の系を用いた。pol のみが増幅できた検体はグループ M 以外である可能性が高いと考えられ、今回用いたカメルーン・コンゴの 1083 検体中、5 検体がグループ 0 であった。PCR を用いたスクリーニングの系は新型ウイルスの検索に応用できるものと考えられた。

目的

HIV-1 の起源地と考えられている中央アフリカにおいて、新しいタイプの HIV の存在を明らかにするために、PCR を用いて遺伝子レベルで検体をスクリーニングする系を導入した。霊長類レンチウイルス HIV/SIV (サル免疫不全ウイルス) 全般を増幅する PCR の系と、HIV-1 グループ M を特異的に増幅する PCR の系を用いて、既存の HIV-1 と判定される検体を除くことで新しいタイプの HIV のスクリーニングを行った。

方法

カメルーン・コンゴの臨床的に AIDS 症状を呈する患者を中心に 1995-2001 年にかけて採取された 1083 検体の PBMC を用いた。グループ M、グループ 0 それぞれの env 遺伝子 V3 領域に特異的な PCR の系と、HIV/SIV 全般の pol 遺伝子インテグラーゼ領域を増幅できる PCR の系 (unipol) を用いた。また、gag 遺伝子の p24 領域と env 遺伝子 gp41 領域にもそれぞれプライマーを設定した。グループ M に特異的な env が増幅されずに、unipol のみが増幅できた検体はグループ M 以外である可能性が高

いことから、HIV-2、HIV-1 グループ 0/N または新型 HIV と考えられ、塩基配列を決定した。

結果

グループ M 特異的 env/unipol による PCR の結果、1083 検体のうち 596 検体は HIV-1 抗体陽性で env/unipol 共に PCR 陽性であった。423 検体は抗体陰性で、かつ、env/unipol 共に PCR 陰性であった。抗体検査で保留となった 11 検体のうち、7 検体は env/unipol 共に PCR 陽性であったが、残り 4 検体は env/unipol 共に PCR 陰性であった。HIV-1 抗体陽性であり、env と pol の結果が一致しなかった 28 検体のうち 12 検体は env-/unipol+、16 検体は env+/unipol- であった。一方、25 検体は HIV-1 抗体陽性であるにもかかわらず、env/unipol 共に PCR で増幅できなかった。

env-/unipol+ の 12 検体の遺伝子配列を決定したところ、カメルーンの 5 検体はグループ 0 であったが、残り 7 検体はグループ M の様々なサブタイプに属した (サブタイプ A1 が 2 検体、サブタイプ D が 1、CRF02 が 2、CRF13 が 1、サブタイプ J が 1)。