

図3 Real time PCR 法によるHIVプロウイルスの定量
 ー試薬の調整およびPCR条件ー

1. 試薬の調整

★TaqMan PCR core reagents kit
 (アプライドバイオシステムズ)

10Xbuffer	5ul
10mM dATP	1ul
10mM dGTP	1ul
10mM dCTP	1ul
20mM dUTP	1ul
UNG	0.5ul
25mM MgCl ₂	8ul
AmpliQaQ GOID	0.25ul
20uM primer(F)	0.5ul
20uM primer(R)	0.5ul
20uM probe	0.5ul
DDW	20.75ul
sample DNA	10ul

total 50ul

(sampleDNA量:500ng/反応チューブ)

2. PCR条件

50℃ 2分

95℃ 10分

↓

95℃ 15秒

60℃ 1分

45cycle

3. 定量PCR装置

ABI PRISM^R 7900HT

(アプライドバイオシステムズ)

表1 試料A1の測定結果

A1: 10コピー/ul pNL432を含む50ng/ulヒトDNA
 (ポアソン分布での予測値: 200コピー/DNA1ug)

sample	copy/(DNA1ug)						Ave.	SD	CV(%)
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)			
Exp.1	164	154	156	211	164	154	167	22.1	13.2
Exp.2	164	195	113	183	212	114	164	41.7	25.5
Exp.3	248	206	194	179	195	319	224	52.5	23.5

全平均値	185
全標準偏差	48
実験内標準偏差	41
実験内変動係数	22%
実験間標準偏差	83
実験間変動係数	45%
P値	0.038

表2 試料Bシリーズの測定結果

B1-B6: pNL432 2,5,8,10,20,50コピー/ulの6種類
 ポアソン分布予測値: 40,100,160,200,400,1000コピー/DNA1ug

sample	Exp.1(3回測定)			Exp.3(3回測定)		
	Ave.	SD	CV(%)	Ave.	SD	CV(%)
B1	784	108.0	13.7	932	12.8	1.4
B2	132	18.5	14.0	198	35.0	17.7
B3	39	5.6	14.7	51	7.7	14.9
B4	318	36.7	11.6	432	25.5	5.9
B5	201	21.2	10.5	248	50.4	20.3
B6	93	10.2	11.0	124	33.5	27.2

単位: copies/1ugDNA

図4 プロウイルス定量値の直線性

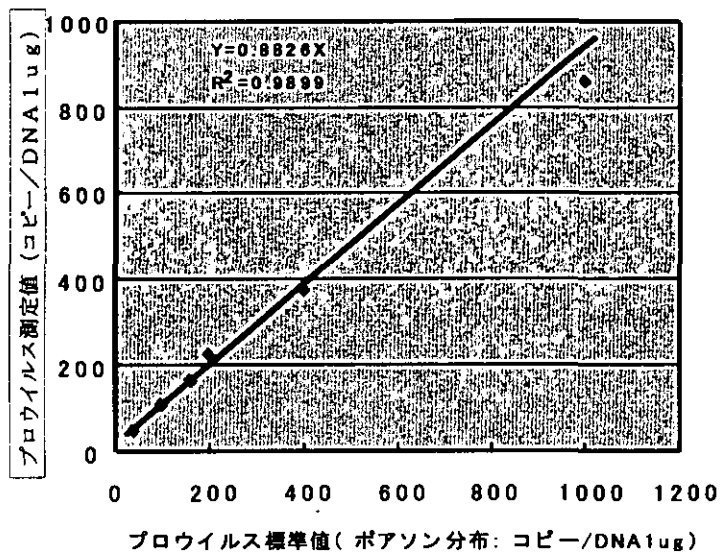


表3 試料Pシリーズの測定結果

P1~P5: HIV感染者のPBMC由来DNA

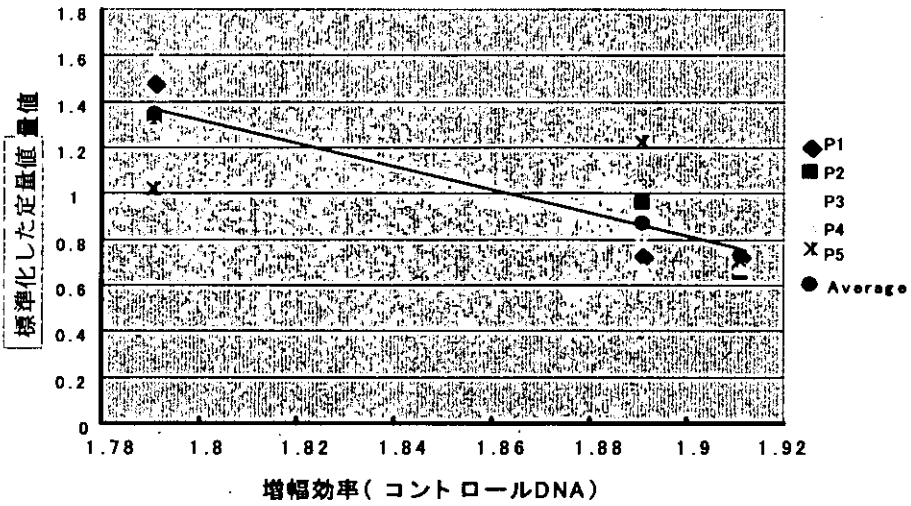
sample	Exp.1(3回測定)			Exp.2(3回測定)			Exp.3(3回測定)		
	Ave.	SD	CV(%)	Ave.	SD	CV(%)	Ave.	SD	CV(%)
P1	8	1.0	27.9	8	1.6	45.5	16	3.2	43.9
P2	16	3.0	29.0	11	1.4	20.7	22	4.9	35.4
P3	23	4.3	34.1	24	3.4	6.3	54	6.3	20.9
P4	35	3.1	24.2	38	4.6	33.1	59	3.3	15.1
P5	12	3.6	51.7	7	0.8	19.0	10	5.5	96.4

単位: copies/1 μ gDNA

表4 標準曲線の増幅効率

	Exp.1	Exp.2	Exp.3
Slope	-3.61	-3.54	-3.95
Y-Intercept	42.14	41.82	43.52
R ²	0.9966	0.9946	0.9882
増幅効率	1.89	1.91	1.79

図5 定量値と増幅効率の関係



B-5. HIV 薬剤耐性検査数および薬剤耐性変異について

(アンケートのまとめ)

分担研究者	近藤真規子	(神奈川県衛生研究所)
研究協力者	田中理恵、加藤真吾	(慶応義塾大医学部)
	蜂谷敦子	(国立国際医療センター)
	杉浦互	(国立感染症研究所)
	永井裕美、金田次弘	(国立名古屋病院)
	向出雅一	(SRL)
	今井光信	(神奈川県衛生研究所)
	地方衛生研究所グループ：	
	工藤伸一、長野秀樹	(北海道立衛生研究所)
	勝見正道、橋本渉	(仙台市衛生研究所)
	原 孝、 増子京子	(茨城県衛生研究所)
	三瓶憲一、岡田峰幸	(千葉県衛生研究所)
	後藤敦、篠原美千代	(埼玉県衛生研究所)
	村田以和夫、貞升健志	(東京都健康安全研究センター)
	嶋貴子、 須藤弘二	(神奈川県衛生研究所)
	野口有三、宇宿秀三	(横浜市衛生研究所)
	小澤茂、 嶋村博	(山梨県衛生公害研究所)
	中村雅子	(福井県衛生環境研究センター)
	森下高行、佐藤克彦	(愛知県衛生研究所)
	大竹徹、 森治代	(大阪府立公衆衛生研究所)
	近平正嗣	(兵庫県立健康環境科学研究センター)
	池田義文、野田衛	(広島市衛生研究所)
	大瀬戸光明、山下育孝	(愛媛県立衛生環境研究所)
	千々和勝巳、江藤良樹	(福岡県保健環境研究所)

研究概要

本研究班では共同研究の一環として、HIV 感染者の依頼検体について薬剤耐性変異の解析を行っている。今回、HIV 薬剤耐性検査状況（ジェノタイプ、フェノタイプ）や薬剤耐性変異株の浸淫状況を把握するために、24 カ所の医療機関や地方衛生研究所等の協力のもと、薬剤耐性検査数、未治療の HIV 感染者の耐性検査等のアンケート調査を実施した。

アンケート調査の結果、24 施設中ジェノタイプ検査は 18 施設で、フェノタイプ検査は 6 施設で行われており、2003 年 12 月までの集計で、それぞれ 9106 件、922 件であった。

未治療の HIV 感染者における薬剤耐性検査（ジェノタイプ）は 2003 年 12 月までに 14 施設で 776 名の検査が行われており、その内 40 名に何らかの薬剤に対する耐性変異（1 次変異）が認められた。

これら 40 名の耐性変異について年別に見ると、2000 年以前に検出された変異では逆転写酵素阻害剤の AZT や 3TC に関する変異が多かったが、2001 年以降は AZT と ddI の併用投与時に高頻度に出現する変異や非核酸系逆転写酵素阻害剤、プロテアーゼ阻害剤の耐性変異が多数検出されるようになり、薬剤の使用状況を反映していると考えられた。

プロテアーゼ領域に M46I の変異が 40 名中 10 名に認められた。M46I は IDV のメジャー変異（1 次変異）であるが、他のプロテアーゼ阻害剤 RTV や NFV 等のマイナー変異（2 次変異）としても報告されている。10 名の内 9 名には M46I 以外のメジャー変異は認められず、M46I は遺伝子の多型である可能性も考えられ、結果の解釈には注意が必要である。

2002 年以降、2 名の感染者から多剤耐性変異が検出された。抗 HIV 薬の治療の普及とともに多剤耐性変異株による感染例が増加する懸念もあり、今後ともその動向には注意が必要である。

A. 研究目的

本研究班では共同研究の一環として、HIV 感染者の依頼検体について薬剤耐性変異の解析を行っている。今回、HIV 薬剤耐性検査状況（ジェノタイプ、フェノタイプ）や薬剤耐性変異株の浸淫状況を把握するため、医療機関や地方衛生研究所等の協力のもと薬剤耐性検査数、未治療の HIV 感染者の耐性検査等のアンケート調査を実施した。

B. 研究方法

国際医療センター、慶応大医学部、国立感染症研究所、4 カ所の拠点病院（国立名古屋病院、国立仙台病院、国立大阪病院、国立九州医療センター）、検査センターエスアールエル（SRL）および 16 カ所の地方衛生研究所（北海道立衛研、仙台市衛研、茨城県衛研、千葉県衛研、埼玉県衛研、東京都健康安全研究センター、神奈川県衛研、横浜市衛研、山梨県衛生公害研、福井県衛生環境研究センター、

愛知県衛研、大阪府公衛研、兵庫県立健康環境科学研究センター、広島市衛研、愛媛県立健康環境研、福岡県保健環境研）、の計 24 施設の協力を得て、各々の施設で行った薬剤耐性検査数（ジェノタイプ検査数、フェノタイプ検査数）および未治療の HIV 感染者におけるジェノタイプ検査数と耐性変異出現数、変異の種類について調査した。

検査数は 1999 年以前と 2000 年～2003 年の 1 年ごと（1 月～12 月）で集計した。

また、未治療の HIV 感染者で薬剤耐性の 1 次変異の検出された症例については変異の種類、サブタイプ、感染経路、性別、国籍についても調査した。

薬剤耐性変異は The International AIDS Society- USA Drug Resistance Mutations Groups review 2003 に従った。

C. 研究結果

1. HIV 薬剤耐性検査数（ジェノタイプ、フェ

ノタイプ)

各施設で2003年12月までに行った薬剤耐性検査数(ジェノタイプ、フェノタイプ)を表1、表2に示した。

調査した4つの拠点病院、4つの医療研究機関は8施設ともジェノタイプ検査を行っていたが、地方衛生研究所グループでは16施設の内10施設がジェノタイプ検査を実施していた。

これら18施設で2003年12月までに計9106件のジェノタイプ検査を行っていた。2000年以降では2002年の検査数が最も多く、2003年には検査数が減少傾向にあった。国立名古屋病院を除く3つの病院と検査センターSRLで2003年の検査数が調査できなかったが、その他の施設でも前年に比べ検査数が20%～50%減少していた。

フェノタイプ検査は国際医療センター、慶応大医学部、北海道立衛研、神奈川県衛研、大阪府公衛研、SRLの6施設で実施しており、2003年末までに922件の検査を行っていた。2000年以降の検査数は2001年が361件で最も多く、2002年では279件とやや減少し、2003年には35件で2002年までと比べ著しく減少していた。

2. 未治療のHIV感染者における薬剤耐性検査(ジェノタイプ)と耐性変異

2003年12月までに行った未治療のHIV感染者のジェノタイプ検査数と耐性変異の頻度を表3-1に、年毎の検査症例数と耐性1次変異の出現数を表3-2に示した。

未治療のHIV感染者のジェノタイプ検査は国立名古屋病院、国立仙台病院、国立九州医療センター、慶応大学医学部と10カ所の地方衛生研究所の14施設で実施していた。

14施設で2003年12月までに計776名についてジェノタイプ検査を行い、40名(5.2%)に何らかの薬剤に対する耐性変異が認められた。

これら40名の感染経路は同性間性行為による感染が29名(73%)と最も多く、続いて異性間性行為による感染4名、不明7名であった。性別・国籍別では日本人男性が34名(85%)、外国籍4名(10%)、不明2名(5%)であった。サブタイプは40名中39名が判明しており、サブタイプBが35名、Eが3名、Dが1名であった(表4)。

薬剤耐性変異の詳細については表5に示した。逆転写酵素領域において2000年以前と2001年以降で特徴が認められた。2000年以前は核酸系逆転写酵素阻害剤のAZTや3TCの耐性関連変異が14名中9名に認められた。しかし、2001年以降ではAZTや3TCの耐性関連変異は減少し、AZTとddIの併用投与時に高頻度に出現することが報告されているV118Iの変異や非核酸系逆転写酵素阻害剤の耐性変異K103N、V106Aが26名中12名に認められた。

プロテアーゼ領域では2001年以降、プロテアーゼ阻害剤のSQVやNFVの耐性1次変異(メジャー変異)L90Mが26名中5名から検出された。また、M46Iの変異が40名中10名から検出された。M46Iの変異はプロテアーゼ阻害剤IDVの1次変異(メジャー変異)として報告されているが、他のプロテアーゼ阻害剤であるRTV、NFV等のマイナー変異としても報告されている。M46Iの変異が認められた10名の内9名にはM46Iの変異の他にメジャー変異は認められず、この変異は遺伝子の多型である可能性も考えられた。

2002年以降、多剤耐性変異を有する感染者が2名確認された。1名は逆転写酵素阻害剤AZTとLAVの耐性変異として報告されているE44D、V118I、T215Yの変異を有しており、もう1名はNFV耐性変異(D30N、N88D)と3TC耐性変異(M184V)を有していた。

D. 考察および結語

2003年12月までにジェノタイプ検査は9106件、フェノタイプ検査は922件行われた。

年毎の検査数を比べると、2003年のHIV薬剤耐性検査数は前年に比べジェノタイプ、フェノタイプ検査ともに減少していた。

未治療のHIV感染者についてのジェノタイプ検査では774名中40名に耐性1次変異が検出された。2000年以前では核酸系逆転写酵素阻害剤のAZTや3TCの耐性関連変異が多かったが、2001年以降はAZTとddIの併用投与時に高頻度に出現する変異(V118I)や非核酸系逆転写酵素阻害剤の耐性変異K103N、V106Aやプロテアーゼ阻害剤の耐性関連変異が多数検出されるようになり、薬剤の投与状況を反映していると考えられた。

プロテアーゼ領域にM46Iの変異が40名中10名に認められた。M46IはIDVのメジャー変異であるが、他のプロテアーゼ阻害剤のマイナー変異としても報告されている。10名中9名にはM46I以外のメジャー変異は認められず、これらは遺伝子の多型である可能性も考えられ、結果の解釈には注意が必要である。

2002年以降、多剤耐性変異を有する感染者が2名確認された。1名は逆転写酵素阻害剤AZTとLAVの耐性変異を、もう1名はNFVと3TCの耐性変異を有していた。抗HIV薬の治療の普及とともに多剤耐性変異株による感染例が増加する懸念もあり、今後ともその動向には注意が必要と考えられる。

E. 研究発表

論文発表

1. Kurbanov F., Kondo M., Mizogami M., Imai M. et al: Human Immunodeficiency Virus In Uzbekistan: Epidemiological and Genetic Analyses. AIDS Res Hum Retroviruses, 19, 731-738 (2003)

学会発表

1. 近藤真規子、嶋貴子、須藤弘二、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血漿中のHIV-1 nef/LTR領域の経時的解析、第17回日本エイズ学会（2003年11月27-29日）
2. 足立拓也、相楽裕子、宇宿秀三、野口有三、近藤真規子、今井光信：当院における急性HIV感染4症例の臨床的検討、第17回日本エイズ学会（2003年11月27-29日）
3. 嶋貴子、近藤真規子、一色ミユキ、塚田三夫、潮見重毅、今井光信：HIV検査の普及のための試みー保健所検査への即日検査の導入ー、第17回日本エイズ学会（2003年11月27-29日）
4. 近藤真規子、嶋貴子、須藤弘二、岩室紳也、岡部武史、今井光信：HIV感染後長期間抗体価が低レベルで推移した感染者におけるHIV-1遺伝子解析、第18回関東甲信静支部ウイルス研究部会（2003年9月25-26日）

表1 HIV-1薬剤耐性検査数(ジェノタイプ)

検査機関	ジェノタイプ検査数(件)				合計	
	1999年以前	2001年	2002年	2003年		
国立感染研	2106	939	903	727	2106	
国際医療センター	0	109	240	152	0	
慶応大医学部	0	0	42	20	62	
地方衛生研究所	北海道立衛研	50	6	10	3	50
	東京都健康安全研究センター	66	0	50	57	66
	茨城県衛研	1	4	4	0	1
	埼玉県衛研	2	4	2	1	2
	神奈川県衛研	200	16	6	19	200
	横浜市衛研	-	-	200*	38	238
	愛知県衛研	14	6	9	6	14
	大阪府公衛研	417	39	50	64	417
	兵庫県立健康環境科学研究所	12	2	0	1	12
	福岡県保健環境研	29	1	8	1	29
	小計	741	72	339	187	979
拠点病院	国立名古屋病院**	0	69	85	83	0
	国立仙台病院#	95	36	40	-	95
	国立大阪病院#	176	69	0	-	176
	国立病院九州医療センター#	24	15	27	-	24
	小計	295	189	152	83	295
エスアールエル(SRL)#	0	121	185	-	0	
合計	3192	1436	1861	1172	3192	

* 横浜市衛研2002年ジェノタイプ検査数は2002年以前のデータを含む。
 ** 国立名古屋2000年ジェノタイプの検査数は、1999年以前のデータも含む。
 # 2003年の検査数は調査できず。

表2 HIV-1薬剤耐性検査数(フェノタイプ)

検査機関	フェノタイプ検査数(件)					合計
	1999年以前	2000年	2001年	2002年	2003年	
国際医療センター	132	64	102	82	12	132
慶応大医学部	0	0	40	31	20	91
大阪府公衛研	6	2	1	0	0	6
神奈川県衛研	0	12	37	11	3	0
北海道立衛研	13	3	2	0	0	13
エスアールエル(SRL)*	0	15	179	155	-	0
合計	151	96	361	279	35	922

*2003年の検査数は調査できず。

表3-1 未治療のHIV感染者における薬剤耐性検査数(ジェノタイプ)

	検査機関	患者数 人	耐性変異出現 (1次変異)人	耐性変異頻度 %
地方衛生研究所	北海道立衛研	8	0	0
	東京都健康安全研究センター	211	5	2.4
	茨城県衛研	14	1	7.1
	埼玉県衛研	9	0	0
	神奈川県衛研	20	0	0
	横浜市衛研	83	4	4.8
	愛知県衛研	37	0	0
	大阪府公衛研	143	12	8.4
	兵庫県立健康環境科学研究所	21	0	0
	福岡県保健環境研	23	2	8.7
拠点病院	国立名古屋病院	148	14	9.5
	国立仙台病院	10	2	2
	国立病院九州医療センター	22	0	0
	慶応大医学部	27	0	0
	合計	776	40	5.2%

表3-2 未治療のHIV感染者における薬剤耐性検査数(ジェノタイプ)

	検査機関	ジェノタイプ検査数					合計
		1999年以前	2000年	2001年	2002年	2003年	
地方衛生研究所	北海道立衛研	2	1	1	3	1	2
	東京都健康安全研究センター	66(3)	38(2)	0	50	57	211(5)
	茨城県衛研	1	5(1)	4	4	0	14(1)
	埼玉県衛研	2	0	4	2	1	2
	神奈川県衛研	0	0	5	6	9	0
	横浜市衛研	12(1)	15(1)	13	13	30(2)	83(4)
	愛知県衛研	14	2	6	9	6	14
	大阪府公衛研	20(1)	13	20(2)	38(5)	52(4)	143(12)
	兵庫県立健康環境科学研究所	12	6	2	0	1	12
	福岡県保健環境研	21(2)	1	1	0	0	23(2)
	小計	150(7)	81(4)	56(2)	125(5)	157(6)	569(24)
拠点病院	国立名古屋病院	15(1)	17(1)	43(2)	41(7)	32(3)	148(14)
	国立仙台病院		(1)		(1)	—	10(2)*
	国立病院九州医療センター				22	—	22*
	慶応大医学部	0	0	0	12	15	27
	合計	165*(8)	98*(6)	99*(4)	200*(13)	204(9)	776(40)

()内は耐性1次変異を有する症例数

*国立仙台病院、九州医療センターは2003年の調査はできなかった。検査数は2002年までの合計。

表4 未治療HIV感染者の耐性変異

—耐性変異の認められた40例について—

感染要因	国籍	合計	HIV-1サブタイプ			
			B	E	D	NT
男性同性間性行為	日本	28	27			1
	外国	1	1			
異性間性行為	日本	1	1			
	外国	3		2	1	
不明	日本	5	4	1		
	不明	2	2			
合計		40	35	3	1	1

表5 未治療のHIV感染者における薬剤耐性変異(ジェノタイプ)

—耐性1次変異の見られた40例の変異の詳細—

採血年	耐性変異部位 (次変異)		サブタイプ
	Pro	RT	
1996年	M 46I	—	B (V3,gag)
1997年	G 48V	—	B (V3,gag)
1998年	-	K70R, T215D	B(envV3)
1999年	NT	M41L,D67N,T215D	B(envV3)
	NT	K70R, T215D	B(envV3)
	NT	M41L, M184V, T215Y	B(envV3)
	-	M 184V	B (φ0D)
	-	M 184V	D (envV3)
2000年	NT	V75L	B(envV3)
	NT	M41L,T215D	B(envV3)
	-	M41L, T215H	B(envV3)
	-	M 184V	B(envV3)
	-	T69D	NT
	M 46I	-	B (envV3)
2001年	M 46I	—	B (envV3)
	L90M	—	B (envV3)
	-	V106V/A	B (envV3)
	-	E44D	AE (env V3)
2002年	M 46I	—	B (envV3)
	-	V118I	B (envV3)
	-	V118I	B (envV3)
	-	Y181C	B (φ0D)
	M 46L, L90M	L74L/V	B (envV3)
	M 46I	—	B (envV3)
	M 46M/I	-	AE(envV3)
	-	V118I	B (envV3)
	M 46I	—	B (envV3)
	-	V118I	B (envV3)
	-	V118I	B (envV3)
	-	E44D, V118L, T215Y	AE(envV3)
	-	V108I	B (φ0D)
2003年	-	T215D	B (φ0D)
	D30N,N88D	M 184V	B (φ0D)
	M 46I	—	B (envV3)
	-	K103N	B (envV3)
	-	V106A	B (env)
	M 46I	—	B (φ0D)
	-	V106A	B (φ0D)
	L90M	—	B (envV3)
	-	V108I	B (φ0D)

B-6. 新規感染患者から検出された

新たなネビラピン (NVP) 耐性変異について

分担研究者 蜂谷敦子 (国立国際医療センター・エイズ治療研究開発センター)
研究協力者 岡 慎一 (国立国際医療センター・エイズ治療研究開発センター)
渦永博之 (国立国際医療センター・エイズ治療研究開発センター)
児玉栄一 (京都大学ウイルス研究所・感染免疫研究領域)
原田恵嘉 (熊本大学医学部・第2内科)

研究概要

日本における新規感染者 (治療前) を対象に、薬剤感受性試験を行い、薬剤耐性ウイルスの出現頻度について検討した。その中から NVP に対し 68 倍、128 倍以上と高度耐性を示すウイルスを 2 例、検出した。しかしこのウイルスの genotype と phenotype 検査の結果から乖離が生じたため、患者特有の変異をもつリコンビナントウイルスを作成し、NVP に対する新しい薬剤耐性変異を見つけた。この耐性ウイルスは、薬剤非存在下では存在しにくく、薬剤存在下では優位に存在することから、2 人の新規感染者体内で偶発的に発生したウイルスではなく、薬剤をすでに服用し耐性変異をもつ患者からの感染が強く疑われた。

NVP は WHO の推奨する "3BY5" 計画の中でも中心となる薬剤であり、その使用頻度が高くなると考えられる。そのため発展途上国での感染が疑われる例では、NVP に対する耐性変異に注意する必要があると考えられた。

1. 目的

HAART の導入により、HIV 感染症による死亡率は激減したものの、その後、薬剤耐性ウイルスの出現により、その抗ウイルス効果は妨げられている。欧米では薬剤耐性ウイルスの新規感染が多数報告され、その割合は 20% にまで達すると言われている。そのため日本における新規感染者 (治療前) を対象に、薬剤耐性ウイルスの出現頻度、伝播について検討した。特に非核酸系逆転写酵素阻害剤 (NNRTI) 耐性ウイルスの出現頻度率は高いものの、その耐性度は比較的低いことが知られている。しかし今回、我々は NVP に対し 68 倍、128 倍以上と高度耐性を示すウイルスを 2 例から検出したため、この耐性ウイルスの生物学的性

状について解析することを目的とした。

2. 方法

薬剤感受性試験: MAGIC5 細胞を用いた方法で行った。既知の濃度の薬剤と一定量のウイルスを培養し、48 時間後に β -ガラクトシダーゼで染色、感染細胞数を測定し、薬剤の効果調べた。

genotype 検査: 患者血漿、もしくは分離ウイルス液中の HIV RNA を抽出し、RT-PCR にて逆転写酵素遺伝子部位を増幅し、DNA シークエンサー (ABI3730) を用いて塩基配列を決定した。

リコンビナントウイルスの作成:

oligonucleotide-based mutagenesis 法を用

い、pNL101 をベースとした耐性遺伝子を含むクローンを作成し、Cos 細胞にトランスフェクト、ウイルスを回収した。

PBMC による増殖試験:PBMC に一定量のウイルスを感染させ、2 時間後に洗浄した。NVP 存在下、非存在下で培養し、0, 2, 4, 6, 8 日目に上清を回収し、p24 抗原の量を測定した。

CHRA:H9 細胞に一定量の 2 種のウイルスを同時に感染させ、次の日に細胞を洗浄した。このとき細胞から核酸を抽出し、塩基配列を調べ、2 種のウイルスが同量感染したことを確認した。7 日ごとに細胞上清中のウイルスを新しい H9 細胞に感染させた。パッセージ毎に感染細胞からウイルス DNA を抽出し、塩基配列を調べ、ウイルスの感染割合を比較した。系統樹解析:ダイレクトシーケンスで得られた RT と env の塩基配列を CLUSTAL X で多重アライメントを行い、MEGA を用いた系統樹解析を行った。Neighbor-joining 法は、kimura 2-parameter を使い、ブートストラップ分析は 1000 回抽出を行った。

立体構造解析:NVP の結合を含む RT の立体構造モデルは、SYBYL6.7 と結晶解析 (Protein Data Bank code 1FKP) を用いて解析を行った。

3. 結果

新規感染患者における耐性出現頻度:2001 年に当センターに来院した新規感染患者 44 名を対象に MAGIC5A を用いた薬剤感受性試験を行った。RTI に対し 3 名 (6%)、NNRTI に対し 4 名 (9%)、PI に対し 7 名 (15%) が耐性と判断された。中でも NNRTI 耐性と判断された 4 名のうち 2 名は、NVP に対して 128 倍以上、68 倍と高度耐性を示した。

genotype 解析による結果:この NVP 高度耐性患者の血漿を用いて、genotype 検査を行ったが、耐性変異は見つからなかった。そのため分離されたウイルスを薬剤存在下で培養し、そのウイルスの genotype 検査を行った。Case 2 からは V106A、V108I、Case 1 からは V108I

がそれぞれ検出された。また立体構造解析から、NVP の結合する疎水ポケット下部に患者特有変異 K238S が見つかった。

患者特有変異が NVP の感受性に及ぼす影響:患者から検出された変異が NVP に対する影響を検討するため、V106A、V108I、K238S、および V106A/K238S、V108I/K238S 変異をもつ組みかえウイルスを作成し、NVP に対する薬剤感受性試験を行った。

V106A、V108I、K238S と単独変異をもつウイルスでは、それぞれ NVP に対する耐性度は、28 倍、3.8 倍、4.1 倍であったが、V106A/K238S、V108I/K238S と両者の組み合わせをもつと 283 倍、47 倍と高度耐性となった。つまり今回検出された K238S は単独変異でも低度耐性を示すが、V106A や V108I と組み合わせることでその耐性度がさらに高くなることがわかった。また臨床分離株と比較すると Case 2 では、V106A/K238S、V108I/K238S が検出され、NVP に対する耐性度は 128 倍以上、この変異をもつリコンビナントウイルスは 283 倍と再現出来た。また Case 1 では V108I/K238S が検出、68 倍耐性、このリコンビナントウイルスでも 47 倍であった。つまり K238S が NVP 耐性に関与していることが示唆された。

ウイルスの増殖速度の比較:耐性変異ウイルスの増殖速度を調べるために、PBMC を用いて比較した。薬剤非存在下では、V106A/K238S、V108I/K238S の両者の変異をもつウイルスの増殖速度は非常に遅く、薬剤存在下では、これらの変異は優位に増殖していた。またこの現象をさらに確認するため H9 細胞を用いた CHRA を行い、患者から検出された組み合わせである K238S 対 V106A/K238S、K238S 対 V108I/K238S を比較した。薬剤非存在下では K238S が優位となり、薬剤存在下では 2 つの変異をもつものが優位となった。つまり今回の新規感染患者の体内では、高度耐性を示した V106A/K238S、V108I/K238S のウイルスは存在しにくく、マイナーな集団へと変化し、

K238S 単独変異をもつウイルスに置き換わることが予測された。

系統樹解析:RT と env の系統樹解析を行った。これら2人の患者の分枝は同じところに位置し、ブートストラップ値も99、100と高い値を示した。この系統樹解析とウイルスの増殖速度の結果から、耐性ウイルスは無治療患者体内で偶発的に発生したウイルスが2人の間で伝播したのではなく、治療中の患者体内で優位となった耐性ウイルスが2人の無治療患者に伝播した可能性が高いと考えられた。

4. 考察

近年欧米では、薬剤耐性ウイルスの出現、新規感染者への伝播が多数報告されている。そのため現在のガイドラインでは、新規感染者を対象に薬剤耐性試験の実施が推奨されている。今回の研究から日本国内でも新規感染者から高度耐性ウイルスが検出され、その頻度は決して低い値ではなかった。また今回のケースでは、耐性ウイルスが minor population へと変化していたため、plasma を用いた genotype 検査では耐性ウイルスを検出することが出来なかった。そのため新規感染者での薬剤耐性検査は、感染後早急に行う必要があると考えられた。また現在知られていない NVP に対する耐性変異が、今回の新規感染患者群から検出されたことから、すべての耐性検査を genotype 検査に依存するのではなく、phenotype 検査の必要性があげられた。これまでに NNRTI に対する低度耐性は、薬剤の服用と関係なく変異がおこるポルモルフィズムとされており、高度耐性の伝播は非常にまれであると報告されている。しかし今回のケースでは NNRTI に対して高度耐性を獲得し、増殖速度、系統樹解析の結果から、すでに薬剤を服用していた耐性患者から2人の新規感染患者へ伝播したことが強く示唆された。

最近、WHO から発展途上国での治療ガイドラインの First line として NVP の使用があげ

られた。このような国での感染が考えられる場合、治療を進めていく上で、NVP に対する耐性変異にも注意を払わなければならないと考えられた。

発表論文

1. Hachiya A., S. Oka, et al. (2003) "All-in-One Assay", a direct phenotypic anti-human immunodeficiency virus type 1 drug resistance assay for three-drug combination therapies that takes into consideration: in vivo drug concentrations. J. Virol. Methods 111:43-53.
2. Matsuoka-Aizawa S, H. Sato, A. Hachiya, K. Tsuchiya, Y. Takebe, H. Gatanaga, S. Kimura, S. Oka Isolation and molecular characterization of a nelfinavir (NFV)-resistant human immunodeficiency virus type 1 that exhibits NFV-dependent enhancement of replication. Journal of virology. 2003:77:318-327

学会発表

1. 蜂谷敦子、児玉栄一、木村 哲、岡 慎一ら、「新規感染者から検出された新たなネビラピン耐性変異について」 第13回抗ウイルス化学療法研究会、1月、千葉、2003.
2. 松岡佐織、蜂谷敦子、鴻永博之、岡 慎一、木村 哲 「NFV 存在下で感染効率亢進を示す高度薬剤耐性臨床分離株の解析」 第17回日本エイズ学会、11月、神戸、2003.

Fig.1 新規感染者における耐性出現頻度

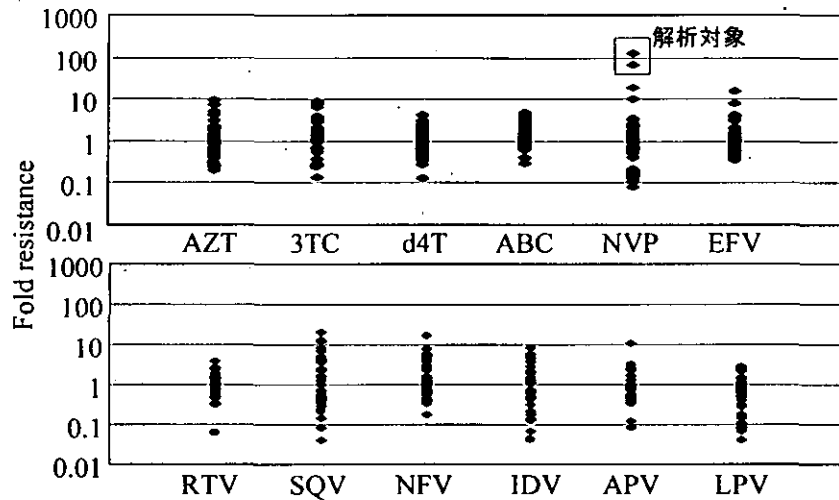


Fig.2 リコンビナントウイルスにおける増殖速度の比較

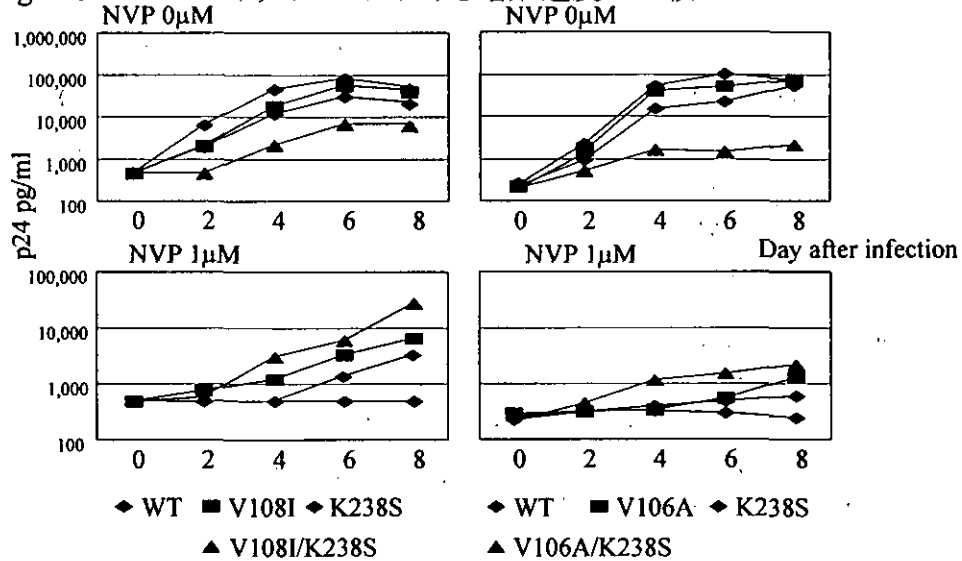


Fig.3 増殖速度の比較 (CHRA : Competitive HIV Replication Assay)

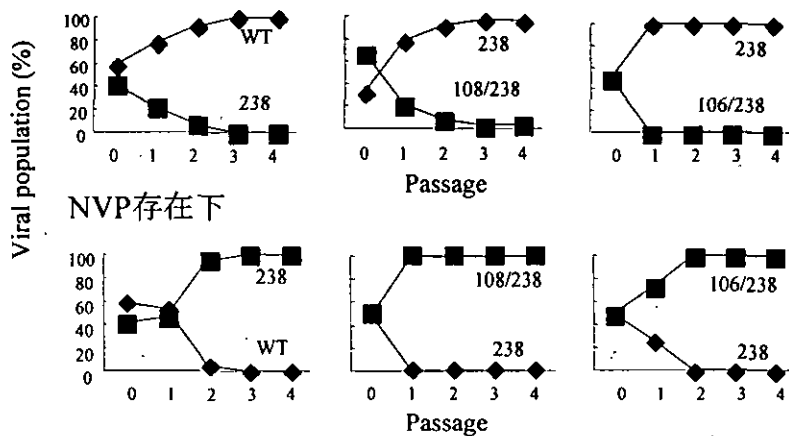


Fig.4 系統樹解析

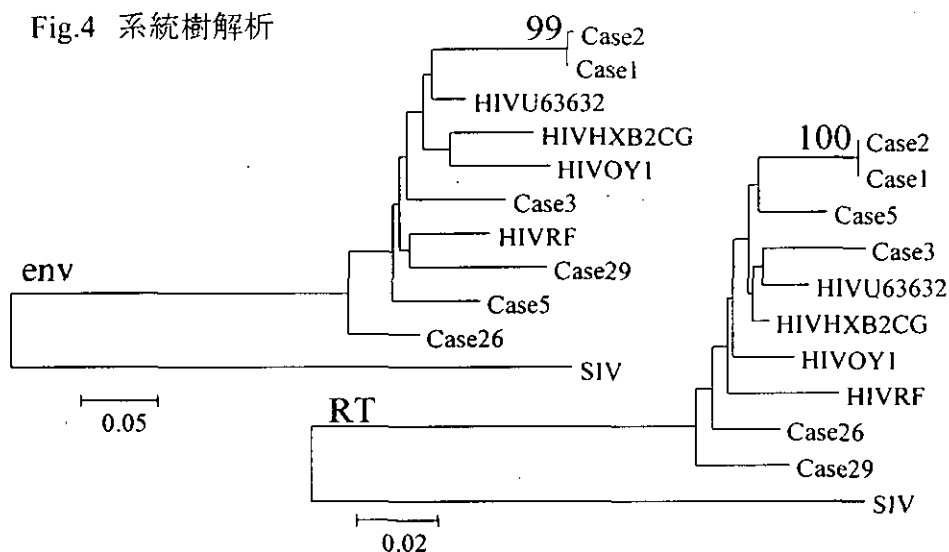


Table.1 薬剤非存在下、存在下培養でのNVP耐性変異の比較

Isolate	NVP concentration	Amino acid residue								
		98	100	103	106	108	181	188	190	238
Consensus amino acid		A	L	K	V	V	Y	Y	G	K
Case 1	plasma	—	—	—	—	—	—	—	—	S
	0uM	—	—	—	—	—	—	—	—	S
	1uM	—	—	—	—	V/I	—	—	—	S
Case 2	plasma	—	—	—	—	—	—	—	—	S
	0uM	—	—	—	A/V	V/I	—	—	—	S
	1uM	—	—	—	A/V	V/I	—	—	—	S
	10uM	—	—	—	A	V/I	—	—	—	S

Sequences of RT-coding region were determined by PCR-directed sequencing method.

Table.2 薬剤感受性の比較

Fold resistance	NRTI		NNRTI	
	AZT	3TC	NVP	EFV
Recombinant virus				
V106A	0.71	1.33	28.0	1.72
V108I	1.80	0.34	3.88	1.20
K238S	0.69	0.62	4.10	2.20
V106A / K238S	0.66	0.14	283	1.18
V108I / K238S	1.30	0.30	47.0	1.00
臨床分離ウイルス				
Case1 V108I / K238S	1.2	1.7	68.0	4.20
Case2 V106A / K238S	3.5	2.6	>128	16.0
V108I / K238S				

B-7. 茨城県における HIV-1 薬剤耐性変異株の動向 (Genotyping)

班員研究者 土井幹雄 (茨城県衛生研究所)
研究協力者 原 孝 (茨城県衛生研究所)
増子京子 (茨城県衛生研究所)

研究概要

HIV 感染症の標準的な治療法として HAART 療法が定着し、病状の進行を遅らせることが出来るようになった。これに伴い、欧米ではエイズによる死亡者数が激減した。しかし、HAART 療法が有効でない症例、即ち薬剤耐性変異株の出現が治療を進めていくうえで深刻な問題となってきた。本県は、わが国でも HIV の高度感染地域の 1 つであるため、HIV-1 薬剤耐性変異株の動向を把握することは、今後の HIV 対策を考えるうえで大変重要である。

そこで、我々は、保存されていた 1999 年から 2002 までの HIV-1 抗体陽性血清 14 検体について、薬剤耐性変異の検出を試みた。感染 HIV のプロテアーゼ領域と逆転写酵素領域の配列を解析した結果、逆転写酵素領域において 1 検体 (7.1%) から 1 つの Major Mutation が検出された。本県でも未治療とみられる例において薬剤耐性変異株の出現が確認されたことから、今後、注意深く監視していくことが必要であると考えられた。

[目的]

1996 年に始まった HAART 療法によって、欧米では、それまで右肩上がり上昇していたエイズによる死亡者数が激減した。しかし、HAART 療法が有効でない症例、即ち薬剤耐性変異株の出現が治療を進めていくうえで深刻な問題となってきた。

本県は、HIV 感染症の報告数が 569 名 (HIV 感染者数: 376 名, AIDS 患者数: 193 名 - 平成 15 年末現在-) と、わが国における HIV の高度感染地域の 1 つである。そのため、HIV 感染症対策を進めるうえにおいて、薬剤耐性変異株の動向を把握することは極めて重要である。よって、HIV-1 薬剤耐性変異株の感染状況を調べ、これからの課題について検討した。

[材料及び方法]

本県では、HIV の無料匿名検査が昭和 62 年からスタートした。全保健所を窓口として採

取された血清は、当研究所に搬入され抗体検査が実施される (現在、スクリーニング検査は特定の保健所で実施)。今回は、保存されている陽性血清のうち 1999 年から 2002 までの 14 検体 (日本人 9 名, タイ人 5 名) について、薬剤耐性変異の検出を試みた。

ViroSeq HIV-1 Genotyping System Version2 (アボット社) を用いて RNA 抽出、RT 反応及び PCR 反応を行い、プロテアーゼ領域 (PR 領域) と逆転写酵素領域 (RT 領域) の約 1.8kb を増幅した。その後、キット付属の 7 つのプライマーと BigDye3.0 (ABI) によりシーケンス反応を行い、得られたそれぞれの反応物を Centri-Sep (ABI) で精製後、ABI PRISM 3100 で塩基配列を解析した。

次に、その配列データを ViroSeq HIV-1 Genotyping System Software v2.5 (アボット社) を用いて解析した。7 つのシーケンスから 1 本のコンセンサス シーケンスにアッセ

ンプル、そしてアミノ酸への変換までが自動的に行われる。そのようにして得られたプロテアーゼ全領域と逆転写酵素領域のコドン1から335までをリファレンス株（HXB2）と比較して変異の検出を行った。

なお、パソコンのモニター上には7つのシーケンス波形データが描き出されるため、シーケンスデータの信頼性を高めるためにデータの読み直しを行った。

変異の種類やその有無については、使用したソフトウェアのアルゴリズムにより決定されたが、併せて The International AIDS Society-USA（IAS-USA）薬剤耐性研究グループの review により確認した。

また、一部の検体については、gag 遺伝子の p17 領域を One step RT-PCR 法により増幅し、反応物の塩基配列をダイレクトシーケンス法によって決定した。それらの配列は、参照株とともに Clustal W を用いて多重アライメントと系統樹解析を行い、サブタイプを判別した。

【結 果】

14 検体について耐性変異の検出を試みたところ、RT 領域では1例（7.1%）、PR 領域では11例（78.6%）に変異が認められた。RT 領域からは、2000年に採血された1人の日本人男性から、Major Mutation である T69D が検出された。

PR 領域では L10I、M36I、L63P 及び V77I の4種類の二次変異が検出されたが、そのほとんどは M36I と L63P であり、M36I は 72.7%（8/11）に、L63P は 36.4%（4/11）の検体に認められた。それらの変異のうち、9 検体では1種類のみの変異であったが、2種類の変異を有するものが1検体、3種類の変異を持つものが1検体あった。

サブタイプの検査は、日本人2名、タイ人3名の計5検体について行ったが、サブタイプ AE が2名、サブタイプ B が3名であった。

【考 察】

Major Mutation として T69D が1例から検出された。この変異は、ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤の1つであるザルシタピン耐性であることが明らかになっている。ザルシタピンは、HAART 療法では first choice として使用されることはほとんどないため、仮に、この株が広がってもあまり問題とはならないと考えられる。しかし、未治療とみられるケースに変異が検出されたということは、本県が耐性ウイルスの広がっていく可能性のある地域になったということを示唆しており、深刻な状況が生まれつつあると考えるべきであろう。今後、十分注意深く監視していくことが重要である。

M36I は、多くの検体に認められた。この変異については、プロテアーゼ阻害剤が承認される以前の検体を用いた研究報告から、すでに存在していたことが明らかにされている（鈴木ら、平成13年度研究報告書、川村ら、平成14年度研究報告書）。L63P も、プロテアーゼ阻害剤の投与を受けていないウイルス株においてもみられるとの報告（Kozal et al, NatMed, 1996）やプロテアーゼ阻害剤が承認される以前の検体にすでに存在していたとの報告（鈴木ら、平成13年度研究報告書、川村ら、平成14年度研究報告書）があることから、いずれも Natural polymorphism であるとみられる。

また、サブタイプの違いによりそれらの出現の頻度が異なることも報告されているが、今回は調べた例数が少ないため、次回の報告書で考察したい。

県内の未治療例における変異株の感染状況の把握をさらに進めるため、残っている陽性検体について早急に調べる必要がある。県内のエイズ拠点病院における医療支援体制の構築も視野に入れ、さらに研究を進めて行かなければならないと考えている。

検体情報と HIV-1 薬剤耐性変異の検査結果

No.	性	年齢	国籍	採血年	推定感染経路	サブ タイプ	耐性変異	
							プロテアーゼ領域	逆転写酵素 領域
1	M	27	日本	1999	性的接触(同性間)	NT		
2	M	33	タイ	2000	性的接触(異性間)	NT	M36I	
3	M	46	日本	2000	性的接触(同性間)	NT		T69D
4	F	47	日本	2000	性的接触(異性間)	NT	M36I	
5	M	62	日本	2000	不明	NT		L63P
6	M	40	日本	2000	性的接触(同性間)	NT		
7	M	35	タイ	2001	性的接触(異性間)	NT	M36I	
8	M	30	日本	2001	性的接触(異性間)	NT	M36I	
9	M	31	日本	2001	性的接触(同性間)	NT		L63P V77I
10	M	37	タイ	2001	不明	AE	M36I	
11	M	26	日本	2002	性的接触(同性間)	B		L63P
12	M	33	タイ	2002	性的接触(異性間)	B	L10I M36I	L63P
13	M	18	日本	2002	性的接触(異性間)	AE	M36I	
14	M	43	タイ	2002	不明	B	M36I	

茨城県衛生研究所