

B-8. 埼玉県で検出された HIV 薬剤耐性変異 (ジェノタイプ) について

班員研究者 後藤敦 (埼玉県衛生研究所)
研究協力者 篠原美千代、内田和江、島田慎一、
瀬川由加里、土井りえ (埼玉県衛生研究所)

研究概要

近年、HIV 初感染者において薬剤耐性遺伝子をもつ HIV が検出されることから、薬剤耐性ウイルスの流行が懸念されている。今回我々は、埼玉県で受検し、陽性が確認された HIV 感染者の受検時点における薬剤耐性ウイルスの保有状況を把握するため、当所で 1999 年から 2003 年の間に確認された HIV 陽性例 (薬剤未治療例と考えられる) について HIV のジェノタイプによる薬剤耐性変異を調査した。その結果、1 次変異は検出されなかった。埼玉県における薬剤耐性 HIV の浸淫は小さいと考えられた。

A 目的

近年、検査によって初めて感染の事実がわかった感染者 (薬剤未治療と考えられる) に薬剤耐性 HIV が見つかる例が、国内でも報告されている。この場合、感染者の体内で薬剤耐性変異がおこったのではなく、すでに薬剤耐性を持つ HIV に感染した可能性が考えられることから、薬剤耐性 HIV の広がり懸念されている。薬剤耐性 HIV の動向に関する情報は、今後の HIV 対策を考える上で不可欠であると考えられる。本研究では、県内の保健所で受付けた HIV 検査で抗体陽性と認められた検体 (薬剤未治療と考えられる) の HIV の薬剤耐性について遺伝子解析により調査した。

B 研究方法

1999 年～2003 年に県内保健所で HIV 検査のために採血された血漿のうち、HIV 抗体陽性が確認されたものを検体として用いた。ウイルス RNA は各検体 300 μ l から QIAamp UltraSens Virus kit を用い抽出した。抽出されたウイルス RNA を鋳型に random 6mer primer により cDNA を作製し、Nested PCR

により、プロテアーゼ領域、及び逆転写酵素 (RT) 領域の増幅産物を得た。各々の PCR 産物は、ABI310 シーケンスアナライザーを用いたダイレクトシーケンス法により解析した。得られたプロテアーゼ遺伝子全領域 (1-99 番目のアミノ酸) と RT 遺伝子 1-250 番目のアミノ酸配列について、スタンフォード大学のホームページ「Stanford HIV RT and Protease Sequence Database」の「Sequence Analysis Programs」により、サブタイプ及び薬剤耐性変異を解析した。

(倫理面への配慮)

この調査にあたり、検体の使用、個人情報の保護、成果の公表手段等に関しては、所内倫理委員会の規定による審査により承認を受けた。

C 結果及び考察

1999 年～2003 年の 5 年間に県内保健所で受け付けた HIV の全検査数は、10,474 検体であり、このうち HIV 抗体陽性が確認されたのは 10 検体 (陽性率 0.1%) であった。これら 10

検体について HIV 遺伝子の増幅を試みたところ、プロテアーゼ領域、RT 領域とも 8 検体で増幅産物が得られた（両領域とも産物が得られたのは 7 検体）。これら増幅産物の遺伝子解析の結果、得られたウイルスのサブタイプ及び薬剤耐性変異について表 1 に示した。サブタイプは、5 検体が AE、4 検体が B であり、2002 年以降では AE のみが検出された。薬剤耐性変異は、プロテアーゼ領域では 1 次変異はいずれの検体にも検出されず、2 次変異のみが解析できた 8 検体中 7 検体に認められた。サブタイプ AE では、M36I の変異が 5 検体すべてに認められた。

RT 領域では、解析できた 8 検体中 1 検体に

非ヌクレオチド系逆転写酵素阻害剤に対する耐性変異が認められた。また common polymorphism と考えられる変異が、プロテアーゼ領域 (L63P, V77I, I93L)、RT 領域 (V179D) ともに認められた。

今回の調査結果から、埼玉県内の保健所で受検した HIV 初感染者においては、耐性ウイルスの浸透は、現在までのところ小さいと考えられた。

しかし近年、国内でも未治療例から耐性 HIV の検出報告があることから、耐性 HIV に対するサーベイランスは今後ますます重要になると考えられる。

表 1. HIV 陽性検体の詳細

年	No.	性別	国籍	サブタイプ	薬剤耐性変異			
					プロテアーゼ領域		RT 領域	
					1 次変異	2 次変異	NRTI	NNRTI
1999	1	M	?	B	NT	NT	無	有 : V179D
	2	M	日本	B	無	無	無	無
	3	F	日本	-	NT	NT	NT	NT
2001	4	M	?	B	無	有 : I93L	NT	NT
	5	M	日本	B	無	有 : L63P, V77I, I93L	無	無
	6	M	日本外	AE	無	有 : M36I, I93L	無	無
	7	M	?	AE	無	有 : K20R, M36I	無	無
2002	8	F	?	AE	無	有 : L10I, M36I	無	無
	9	M	?	AE	無	有 : K20I, M36I	無	無
2003	10	?	?	AE	無	有 : L10V, M36I	無	無

NRTI : ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤

NNRTI : 非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤

B-9. 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)

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の併用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、2003 年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 11 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、解析のできた 9 名のうち 1 名からはプロテアーゼ阻害剤のインジナビルに対して強い薬剤耐性を示す 1 次変異 (M46I) が検出された。今回の調査より東海地区においても耐性ウイルスの伝播が着実に広がっていることが示唆された。

(研究目的)

HIV 感染症に対する治療はプロテアーゼ (Protease: Pro) 阻害剤の登場により飛躍的に改善された。Pro 阻害剤と逆転写酵素 (Reverse Transcriptase: RT) 阻害剤の併用による強力な多剤併用療法 (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、薬剤耐性遺伝子の存在が初感染者の 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 2002 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 40 名の血清あるいは血漿を用いて、Pro、RT 遺伝子の解析を行なった。その結果、強い薬剤耐性を示す 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、2003 年に HIV 感染の確認された 11 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)

2003 年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 11 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 RT 及び Pro 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。Pro 遺伝子については全領域を、RT 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 11 名は全て男性で、2 名が外国籍を持つものであった。感染経路は 6 名が男性同性愛 (MSM) による感染と推定されたが残りの 5 名については感染経路が不明であった。それら検体のサブタイプは、エンベロープ遺伝子の系統樹解析の結果 B 型 10 検体、AE 型 1 検体であった (表 1)。次に、表 2 に示すように Pro 及び RT 遺伝子の解析の実施できた検体は 9 検体で、その内 1 検体から Pro 阻害剤のインジナビルに対する強い薬剤耐性を示す Pro 領域遺伝子の 1 次変異 (M46I) が検出された。その他の検体からは 1 次変異は検出されなかった。しかし、2 次変異と呼ばれる薬剤耐性関連変異は、Pro 遺伝子では 9 検体中 4 検体に、RT 遺伝子では 1 検体認められた。Pro 遺伝子から検出された 2 次変異は、L10I、K20M、V77I の 3 種で、2 種以上の変異遺伝子を持つものは認められなかった。一方、RT 遺伝子からは、核酸系 RT 阻害剤に対する変異遺伝子 M41L が検出された。サブタイプと薬剤耐性関連遺伝子との相関を見ると、L10I、K20M、V77I は昨年までの調査から B 型に多く認められており、これらの変異は薬剤耐性変異とは関係なくサブタイプ B 型の polymorphism (多形性) と考えられた。

前年まで行なっていた調査結果から、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。しかし今回調査した 9 名中 1 名から Pro 阻害剤のインジナビルに対する強い薬剤耐性を示す 1 次変異 (M46I) が検出され、東海地区においても耐性ウイルスの伝播が着実に広がっていることが示唆された。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. ケニア、ナイロビにおける HIV と梅毒の抗体保有状況. 森下高行、佐藤克彦、宮城島拓人、内海 眞、山本直彦. 第 17 回日本エイズ学会 (神戸)
2. 男性同性愛者における HIV-1 と GBV-C 感染率及び GBV-C ジェノタイプの解析. 服部純子、伊部史朗、永井裕美、和田かおる、森下高行、佐藤克彦、内海 眞、金田次弘. 第 17 回日本エイズ学会 (神戸)
3. ペンダント型亜鉛サイクレン錯体の抗 HIV 増殖抑制作用機序に関する研究. 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 17 回日本エイズ学会 (神戸)
4. 高感度リアルタイム PCR 法のバリデーション. 永井裕美、和田かおる、森下高行、内海 眞、西山幸廣、金田次弘. 第 17 回日本エイズ学会 (神戸)

表1 HIV感染者の詳細(サブタイプ、感染経路等)

検体名	性別	国籍	サブタイプ	感染経路
AI/1/03	男	ペルー	B	不明
AI/2/03	男	日本	B	不明
AI/3/03	男	外人	B	MSM
AI/4/03	男	日本	B	MSM
AI/5/03	男	日本	B	MSM
AI/6/03	男	日本	AE	MSM
AI/7/03	男	日本	B	MSM
AI/8/03	男	日本	B	MSM
AI/9/03	男	日本	B	不明
AI/10/03	男	日本	B	不明
AI/11/03	男	日本	B	不明

MSM: 男性同性愛者

表2 HIV感染者の血清・血漿検体のPro領域およびRT領域での遺伝子変異

検体名	Pro 1次変異	Pro 2次変異	RT 2次変異	サブタイプ
AI/1/03				B
AI/2/03				B
AI/3/03		L10I	M41L	B
AI/5/03		K20M		B
AI/6/03		V77I		AE
AI/7/03		V77I		B
AI/9/03	M46I			B
AI/10/03				B
AI/11/03				B

Pro: Protease

RT: Reverse Transcriptase

B-10. 地方衛生研究所における HIV 検査について(福岡県)

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

当研究所における HIV に関する検査としては、保健所を窓口とするエイズ検査の確認試験と、医療機関を受診している HIV 感染者について、感染ウイルスのジェノタイプから薬剤耐性の解析を行っている。2003 年には保健所におけるエイズ検査では、スクリーニング試験を 807 件実施し、そのうち 10 件について確認試験を行ったが、全て陰性であった。また、薬剤耐性の解析では、3 人の感染者について長期間での耐性変異の変化を観察できた。

A. 研究目的

保健所を窓口とするエイズ検査について現状を解析し、今後の検査体制のあるべき姿を検討する。また、エイズの治療には、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しており、治療効果を維持するためには、変異を経時的にモニターする必要がある。また、薬剤耐性株が、ヒトからヒトに感染を起こしてい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変異の経時的変化について解析を行った。

B. 研究方法

(1) 保健所におけるエイズ検査

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 カ所の検査保健所で抗体スクリーニング試験を行っている。検査には、バイオメリュエー社のバイダスアッセイキット HIV デュオを

用いて、抗原・抗体の同時検出を行っている。その試験で、陽性または判定保留の場合は、確認試験を行う。確認試験は、まず富士レビオ社製ラブレット 1,2 を用いたウェスタンブロット法による検査を行い、陰性であった場合は、ロ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。保健所の窓口は火曜日または月曜日に開かれ、検査保健所で水曜までにスクリーニング試験を行い、確認検査が必要な場合は、水曜日中に当研究所に搬入される。

(2) 薬剤耐性検査

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。

血清からの HIV RNA の抽出法、RT-PCR 法、逆転写酵素、プロテアーゼ各領域の塩基配列・アミノ酸配列の決定方法は、平成 14 年度の本研究の報告書に記載した。

C. 研究結果

(1) 保健所におけるエイズ検査

1988年以降の、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。2000年から検査件数は微増傾向にあり、2003年は807件の検査を行った。2003年の月別の検査件数と、確認検査で陰性であった偽陽性数を表1に示す。確認検査で陽性であったものはなく、偽陽性であったものは10件で、偽陽性率は1.2%で、2000年にバイダス HIV デュオを導入して以来大きな変化は見られなかった。12月に検査件数が多かったのは一部保健所で、エイズデーにちなんだイベントとして夜間受付を行ったためと思われる。

(2) 薬剤耐性検査

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初診時の感染者の血中ウイルスについて解析を試みた。逆転写酵素阻害剤に対する薬剤耐性については、平成14年度の本研究報告書に記したとおり、薬剤耐性は認められなかった。そこで今回は、プロテアーゼ阻害剤について解析を試みた。その結果、1996年から2002年までに採取した20名についてRT-PCRを試みたところ9名についてプロテアーゼ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からプロテアーゼ阻害剤に対する耐性変異の有無を検討した。その結果、9名中6名に耐性変異が見られ、そのうち2名に一次耐性変異を認めた。（表2）

当研究所では、12年間にわたり九州大学医学部で受診した患者・感染者の検体を採取し、保存してきた。その中には、同一人から繰り返し、検体を採取したものもある。そこで、6-8年にわたって解析が可能であった、3例（FA-15、31、32）の薬剤耐性変異の経時的変化を表3-5に示す。FA-15とFA-31では、薬

剤耐性変異の増加が観察された。また、FA-32ではスクレオシド系逆転写酵素阻害剤に対する主要な耐性変異に、変化が見られた。

D. 考察

保健所におけるエイズ検査については、バイダス HIV デュオの偽陽性率は1.2%で前年と大きな差はなかった。また、以前見られたように、偽陽性が見られる時期が集中するような傾向は、本年は見られなかった。

初診時のプロテアーゼ阻害剤に対する薬剤耐性変異を調べたところ、M46LとG48Vの一次変異を持つものがそれぞれ1例見られた。しかし、この2例はプロテアーゼ阻害剤が認可された直後の1996年と1997年に採取された検体であり、これらの変異は薬剤の投与を受けたために生じたものではなく、遺伝子多型である可能性が高い。また、長期間にわたって薬剤耐性変異の経時変化を解析した例では、2例については耐性変異の増加が見られた。また、1例については主要な薬剤耐性変異の変化が認められた。今後は、投薬歴を含めて解析を行うとともに、今回のようなレトロスペクティブな解析ではなく、リアルタイムな解析を行う予定である。

図1. 福岡県におけるHIV検査受診件数の年次推移
(福岡市、北九州市、大牟田市は除く)

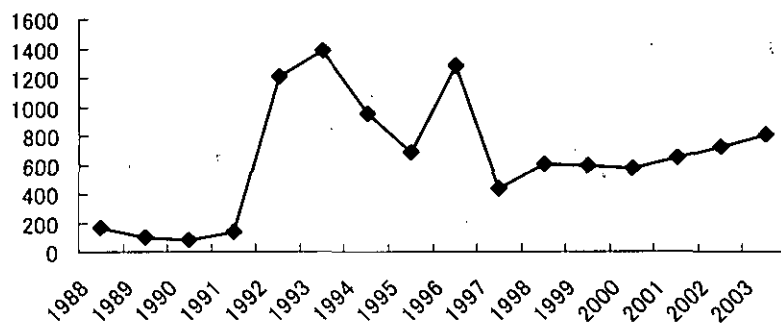


表1. 月別検査件数、偽陽性件数(2003)

月	検査件数	偽陽性件数	偽陽性率(%)
2003.1	56	0	0.0
2	54	1	1.9
3	100	0	0.0
4	47	1	2.1
5	84	1	1.2
6	59	2	3.4
7	54	0	0.0
8	65	0	0.0
9	64	1	1.6
10	41	1	2.4
11	45	0	0.0
12	138	3	2.2
合計	807	10	1.2

表2.初診者におけるPro領域の変異

被験者番号	耐性変異部位
FA32	L63P, V77I
FA35	<u>M46L</u>
FA36	L10I, V77I
FA37	L10I, M36I, <u>G48V</u>
FA42	K20R, L63P
FA43	L10I

下線は、一次変異であることを示す。

表3.薬剤耐性変異の経時的変化

FA15 (73才、男性同性愛)

採血月日	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
94年1月	—	—	解析不能
97年1月	—	—	L63P, V77I
00年8月	D67N, <u>K70R</u>	—	L10V, <u>M46I</u> , L63P, V77I, N88S
02年11月	D67N, <u>K70R</u>	—	解析不能

表4.薬剤耐性変異の経時的変化

FA31 (23才、異性間性的接触)

採血月日	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
97年3月	—	—	L10I, M36I, G48V, L63P, L90M
02年7月	M41L, A62V, V75T, V118I, L210W, T215F	—	L10I, M36I, M46I, L63P, A71T, V77I, L90M
03年1月	M41L, A62V, V75T, V118I, L210W, T215F	—	L10I, M36I, M46I, L63P, A71V, V77I, L90M

表5.薬剤耐性変異の経時的変化

FA32 (28才、血液製剤)

採血月日	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
96年11月	—	—	L63P, V77I
97年2月	—	—	L63P, V77I
97年6月	V75I	—	L63P
97年12月	M184V	—	L63P, V77I
98年3月	D67N, L210W	—	L63P, V77I
02年12月	—	—	L63P, V77I

B-11. コンゴ民主共和国における HIV-1 流行株の分子系統解析

班員研究者 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 喜多佳世子 (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

アフリカにおけるヒト免疫不全ウイルス 1 型 (human immunodeficiency virus type 1; HIV-1) のサブタイプ分布は、コンゴ民主共和国 (Democratic Republic of Congo; DRC) を含めその東部、西部ともサブタイプ A が主に流行しており、DRC 南部のザンビア以南ではサブタイプ C が極めて優勢である。今回、サブタイプ A と C の流行の境界線、及びこれらの組換え体の有無を明らかにするためザンビアとの国境に近い Likasi (DRC) において分子系統解析を行った。2001 年 9 月に Likasi 在住の HIV-1 抗体陽性者 15 例から採血をし、これらの buffy coat から抽出した DNA を対象とした。nested-PCR 法によって pol 領域と env 領域を増幅し、クローニング後シークエンスを行い、近隣結合法による分子系統解析を行った。その結果、サブタイプ A/A (pol/env) 3 例、C/C 2 例、G/A 2 例、A/G 1 例、A/U (帰属不明) 1 例、U/A 3 例、G/J 1 例、J/U (pol/gag) 1 例であった。このように 10 例 (67%) で組換え体と考えられた。以上の結果より、Likasi で流行している HIV-1 はサブタイプ A とその組換え体が主流であり、サブタイプ C は比較的稀 (13%) であることが明らかとなった。

目的

ヒト免疫不全ウイルス 1 型 (human immunodeficiency virus type 1, HIV-1) は遺伝子の差異によって、M、O、N の 3 つのグループに分類される。中でも HIV-1 グループ M は世界的に大流行しており、A-D, F-H, J, K の 9 種のサブタイプと 15 の組み換え型流行株 (circulating recombinant forms, CRF) に細分類されている。アフリカでは、これら全てのグループ全てのサブタイプ、そして 15 の CRF のうち 7 種が現在までに報告されている。

アフリカにおける HIV-1 サブタイプの分布は、コンゴ民主共和国 (Democratic Republic of Congo, DRC) を境に、南側のザンビア以南ではサブタイプ C が極めて優勢であり、東側のブルンジとタンザニアではそれぞれサブタイプ C とサブタイプ A が、そして西側のコンゴ共和国とガボンではサブタイプ A や D、そして H が流行している。DRC に

おいては、西北部の首都キンシャサと中央部の都市ブイマイでサブタイプ A が主に流行しているとの報告があるが、サブタイプ C が極めて優勢であるザンビアに隣接する南部地域の調査はなされていない。今回ザンビアとの国境に近い Likasi (DRC) においてサブタイプ A とサブタイプ C の流行の境界線、ならびにこれらの組換え体の有無を明らかにするために分子系統解析を行った。

対象と方法

・対象

2001 年 9 月にコンゴ民主共和国 (DRC) の南部に位置する Likasi 在住の一般献血者のうち、HIV-1 抗体陽性者 15 例から同意を得た後に採血をし、これらの buffy coat から抽出した HIV-1 DNA を対象とした。

・DNA 抽出

DNA 抽出キット (QIAamp DNA Mini Kit) を

用いて HIV-1 抗体陽性者の buffy coat からゲノム DNA を抽出した。

・ nested-PCR

プロウイルス DNA の *pol*-integrase (IN) 領域 (約 288 塩基) と *env*-C2V3 領域 (約 550 塩基) もしくは *env*-gp41 領域 (約 401 塩基)、

gag 領域 (約 421 塩基) を nested-PCR によって、それぞれ増幅した。使用したプライマーの配列を Table1. に示した。増幅した DNA はそれぞれ 1.5% アガロースゲルにて電気泳動した後、エチジウムブロマイドで染色、紫外線照射下で可視化した。

Table 1. Primers used for nested-PCR

Primer	Sequence (5'-3')	Usage
<i>pol</i> integrase region (corresponding to 4493-4780 of HIV-1 _{HXB2})		
unipol5	TGGGTACCAGCACACAAAGGAATAGGAGGAAA	Outer
unipol6	CCACAGCTGATCTCTGCCTTCTCTGTAATAGACC	Outer
unipol1	AGTGGATTCATAGAAGCAGAAGT	Inner
unipol2	CCCCTATTCCTTCCCCTTCTTTTAAAA	Inner
<i>env</i> gp120 region (corresponding to 6975-7520 of HIV-1 _{HXB2})		
M5	TGGGTACCAGCACACAAAGGAATAGGAGGAAA	Outer
M10	CCACAGCTGATCTCTGCCTTCTCTGTAATAGACC	Outer
M3	GTCAGCACAGTACAATGACACATGG	Inner
M8	TCCTTGGATGGGAGGGGCATACATTGC	Inner
<i>env</i> gp41 region (corresponding to 7880-8280 of HIV-1 _{HXB2})		
GP40F1	TCTTAGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGG	Outer
GP41R1	AACGACAAAGGTGAGTATCCCTGCCTAA	Outer
GP46F2	ACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAACAGCA	Inner
GP47R2	TTAAACCTATCAAGCCTCCTACTATCATTAA	Inner
<i>gag</i> region (corresponding to 1596-2016 of HIV-1 _{HXB2})		
H1G777	TCACCTAGAACTTTGAATGCATGGG	Outer
H1P202	CTAATACTGTATCATCTGCTCCTGT	Outer
H1gag/1584	AAAGATGGATAATCCTGGG	Inner
G17	TCCACATTTCCAACAGCCCTTTT	Inner

・ PCR による *pol*-IN 領域の増幅

first-round PCR は、95°C 10 分を 1 サイクル、95°C 30 秒、45°C 30 秒、72°C 1 分を 35 サイクル、72°C 10 分間を 1 サイクル行っ

た。プライマーは unipol5 と unipol6 を使用した。second-round PCR は Unipol1 と unipol2 のプライマーを用いて、first-round と同条件で行った。プライマーは unipol5 と

unipol6 を使用した。

・PCR による env-C2V3 領域の増幅

env-C2V3 領域の first-round PCR は pol 領域と同条件で行った。プライマーは M5 と M10 を使用した。second-round PCR は M3 と M8 プライマーを用いた。95°C 10 分を 1 サイクル、95°C 30 秒、55°C 30 秒、72°C 1 分を 35 サイクル、最後に 72°C 10 分間を 1 サイクル行った。

・PCR による env-gp41 領域の増幅

Env-C2V3 領域の増幅が出来なかった試料は、env-gp41 領域を nested-PCR によって増幅した。PCR は first-、second-round ともに env-C2V3 増幅用 PCR と同条件で行った。first-round PCR は GP40F1 と GP41R1 を、second-round PCR では GP46F2 と GP47R2 をプライマーとして用いた。

・PCR による gag 領域の増幅

Env-C2V3, -gp41 の両領域で増幅が出来なかった試料については gag 領域を増幅した。first-round PCR は 94°C 2 分を 1 サイクル、94°C 30 秒、56°C 30 秒、68°C 90 秒を 40 サイクル、最後に 68°C 10 分間を 1 サイクル行った。プライマーは H1G777 と H1P202 を使用した。second-round PCR は H1gag/1584 と G17 をプライマーに用いた。条件は 94°C 2 分 1 サイクル、94°C 30 秒、50°C 30 秒、72°C 60 秒を 35 サイクル、68°C 10 分間を 1 サイクル行った。

・クローニング

nested-PCR 法によって増幅した PCR 産物を TOPO Cloning kits (Invitrogen) を用いてクローニングした。

・プラスミド DNA 抽出

重複感染の可能性を確かめるため、1 試料につき 10~15 のクローンを、Plasmid Prep Kit (BioRad) を使いプラスミド DNA を抽出した。

・DNA のシーケンス

塩基配列の決定はオートシーケンサー

(Applied Biosystems 310) を用いてジデオキシ法 (Big Dye vr. 3.0, ABI 社) により行った。

・分子系統解析

各種サブタイプのレファレンスシーケンスは Los Alamos database を参照し、CLUSTAL W (vr. 1.7) を用いて近隣接合法による分子系統解析を行った。その信頼性を確立させるために 1000 回のブートストラップ検定を行った。分子系統樹は Tree View (vr. 1.65) を用いて描いた。

結果

・HIV-1 pol 領域の分子系統解析

サブタイプ C が極めて優勢であるザンビアとの国境に近い、DRC 南部に位置する Likasi において、サブタイプ A とサブタイプ C の流行の境界線、並びにこれらの組換え体の有無を明らかにするため、pol-IN (約 288 塩基) 領域を基にした分子系統解析を行った (Fig. 1)。

Likasi (DRC) 在住の HIV-1 抗体陽性者 15 例の内訳は、サブタイプ A 5 例 (33.3%)、G 4 例 (26.7%)、C 2 例 (13.3%)、J 2 例 (13.3%)、帰属不明 2 例 (13.3%) であった。

・HIV-1 env 領域の分子系統解析

V3 loop を含む env-C2V3 領域 (約 550 塩基) の分子系統解析の結果、サブタイプ A 8 例 (53.3%)、C 2 例 (13.3%)、G、CRFs_01AEGHJKU そして帰属不明はそれぞれ 1 例 (6.7%) であった (Fig2.)。

2 例については env-C2V3 領域を nested-PCR で増幅できず、この領域の解析が不可能であった。1 例は env-gp41 領域 (約 401 塩基) を増幅し、サブタイプを決定した。もう 1 例は env-C2V3 と env-gp41 領域の両部分ともに今回用いたプライマーでは PCR で増幅することが出来なかった。そのため、gag 領域 (約 418 塩基) を増幅し、分子系統解析を行った。前者はサブタイプ J、後者のサブタイプは U (帰属不明) であった

(Table2. 両領域とも系統樹不掲載)。env 領域においてサブタイプ C であった HIV-1 株はわずか 2 例 (13.3%) であり、pol 領域同様サブタイプ C は稀であった (Table2.)。

pol / env 両領域においてサブタイプが一致していたのは、A/A (pol/env) 3 例と C/C 2 例の計 5 例 (33.3%) であった。また、両領域のサブタイプが不一致であった例は A/A (pol/env) 3 例、C/C 2 例、G/A 2 例、A/G 1 例、A/U (帰属不明) 1 例、U/A 3 例、G/J 1 例、J/U (pol/gag) 1 例であった。

Table2. Summary of genetic subtype/CRFs circulating in Likasi, DRC

Sample No.	pol	Env
01CD101	A	A
01CD106	A	A
01CD114	A	A
01CD122	C	C
01CD129	C	C
01CD111	A	G
01CD123	A	U
01CD208	G	A
01CD210	G	A
01CD107	G	CRF01_GHJKU
01CD112	G	N. A (J ^a)
01CD103	J	N. A (U ^b)
01CD209	U	A
01CD102	U	A
01CD113	U	A
Total	15	15

N. A: not amplified

^a A HIV-1 subtype based on env gp41 sequence analysis.

^b A HIV-1 subtype based on gag sequence analysis.

考察

アフリカにおける HIV-1 サブタイプの分布は、コンゴ民主共和国 (DRC) を境に東部、西部ともにサブタイプ A が流行しており、ザンビア以南ではサブタイプ C が極めて優勢である。サブタイプ C の感染の拡大は年々北上

しているとの報告があるため、サブタイプ A と C の境界線を明らかにする必要があった。今回の調査では、コンゴ民主共和国南部に位置する Likasi において、サブタイプ C の存在 (15 例中 2 例、13.3%) は確認できたが、大流行は認められなかった。

DRC 南部に位置する Likasi において、HIV-1 抗体陽性者 15 例中 10 例 (66.7%) が Pol と env 領域のサブタイプが不一致であった。これらの pol/env 不一致例は組換え体と考えられ、この地域において HIV-1 の組換え体の流行が確認された。組換え体 10 例中サブタイプ A との組換え体は 7 例であり、サブタイプ A を中心とした組換え体が非常に高い割合で見られた。

発表論文

- 1) Songok EM, Ichimura H, et al.: Active generation and selection for HIV intersubtype A/D recombinant forms in a co-infected patient in Kenya. AIDS Res Hum Retroviruses 20(2):255-8, 2004.
- 2) Songok EM, Ichimura H, et al.: Experiences on the use of short course zidovudine to prevent perinatal transmission of HIV in rural Kenya. Am. J. Trop. Med. Hyg. 69(1):8-13, 2003.
- 3) Ndembu N, Ichimura H, et al.: HIV-1 infection in Pygmy hunter gatherers is from contact with Bantu rather than with nonhuman primates. AIDS Res. Hum. Retroviruses 19 (5):435-439, 2003.
- 4) Songok EM, Ichimura H, et al.: Identification of Env CRF 10 among HIV Variants Circulating in Rural Western Kenya. AIDS Res. Hum. Retroviruses 19 (2): 161-165, 2003.
- 5) 横山忠文、市村 宏、他：サハラ砂漠以

南アフリカ諸国における献血・輸血システム. 自己血輸血 16(2):151-6, 2003.

学会発表

- 1) Ichimura H. et al.: Evolution and dominance of a new HIV recombinant from a patient infected with two subtypes in western Kenya. 2nd IAC in Paris (July, 2003).
- 2) Ndembi N, Ichimura H. et al.: Emergence of new forms of human immunodeficiency virus type 1 in Cameroon. 第51回日本ウイルス学会学術集会 (2003年10月).
- 3) 竹村太地郎、市村宏、他: 中央アフリカ (コンゴ民主共和国) に生息するブラックマンガベイにおける新規 SIV (SIVbkm) の解析. 第51回日本ウイルス学会学術集会 (2003年10月).
- 4) 吾郷昌信、市村 宏、他: 新規抗ライノウイルス剤 MRL-2471 の作用部位に関する解析. 第51回日本ウイルス学会学術集会 (2003年10月).
- 5) Lwembe RM, Ichimura H. et al.: Genetic diversity of HIV in western Kenya. 第17回日本エイズ学会学術集会 (神戸、2003年11月).
- 6) 井戸栄治、市村 宏、他. コンゴ共和国におけるピグミー族の HIV 保有状況. 第17回日本エイズ学会学術集会 (神戸、2003年11月).
- 7) 景山誠二、市村 宏: フィリピンの HIV 感染拡大要因、HCV 感染集団の発見. 第17回日本エイズ学会学術集会 (神戸、2003年11月).
- 8) 小林かな、市村 宏、他. HIV 母子感染および病態進行に影響を及ぼす宿主因子の検討. 第17回日本エイズ学会学術集会 (神戸、2003年11月).

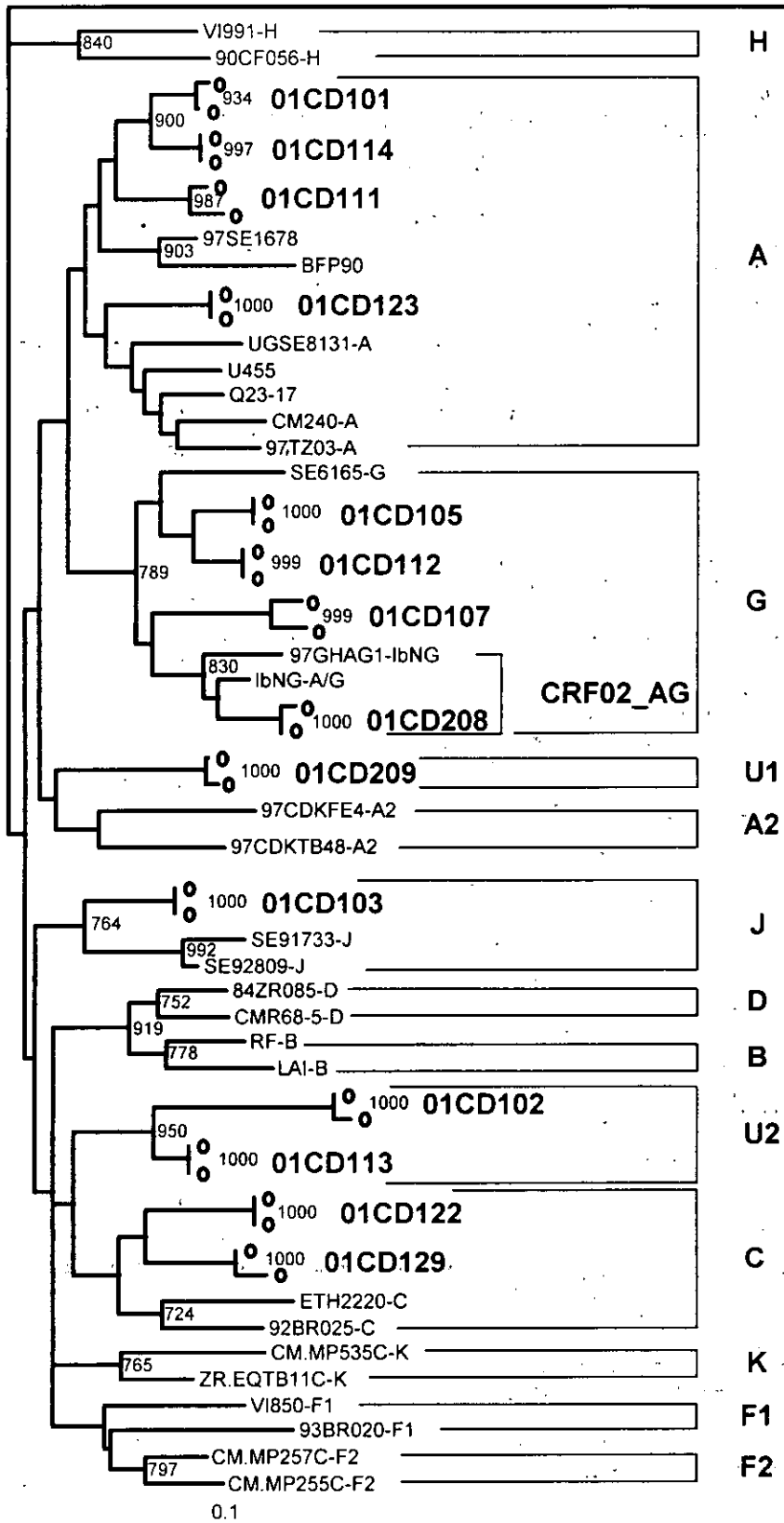


Fig 1. Phylogenetic tree of HIV-1 circulating in southern DRC based on *pol* integrase sequences

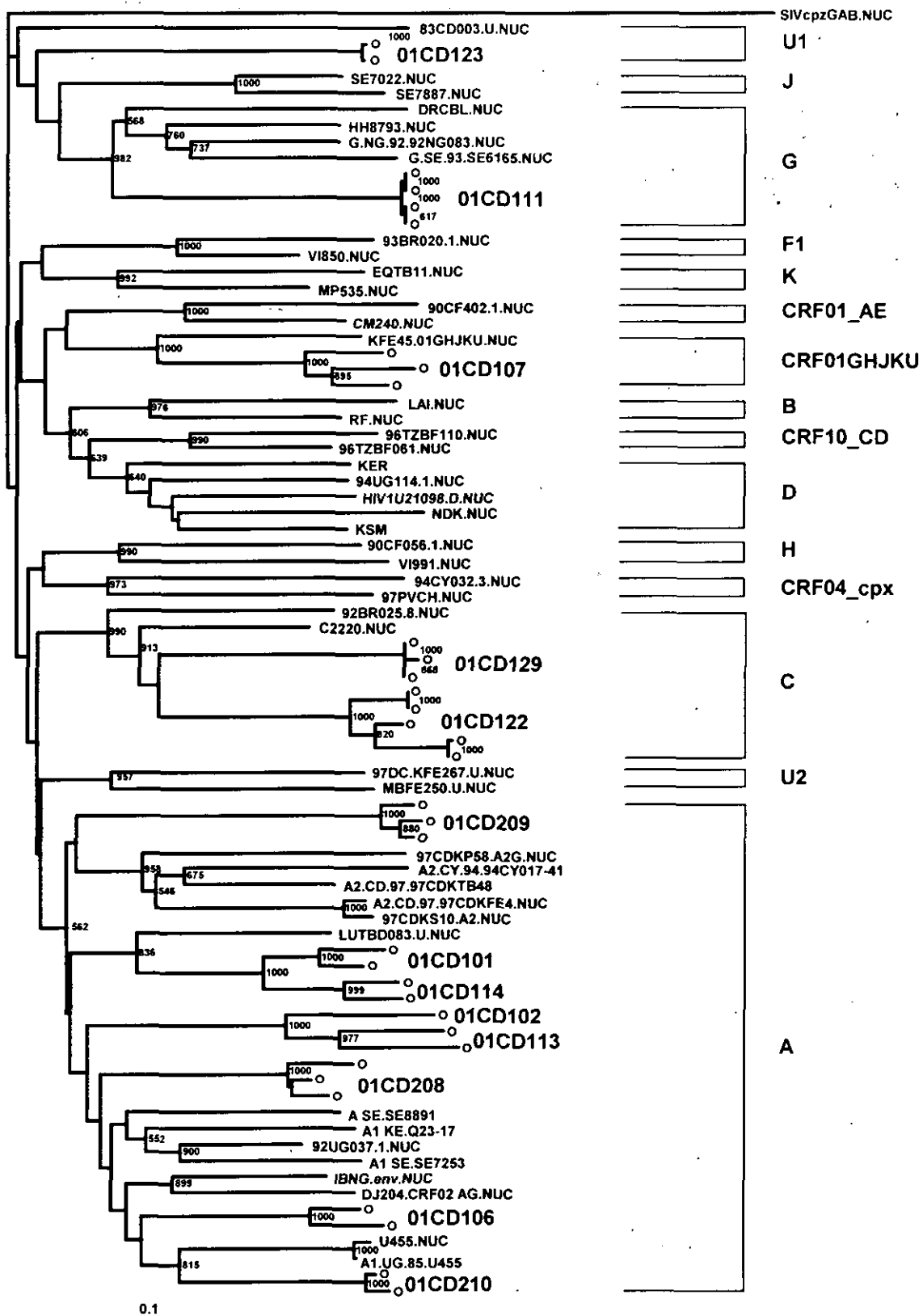


Fig 2. Phylogenetic tree of HIV-1 circulating in southern DRC based on env sequences

B-12. 薬剤耐性変異の解析法の開発改良実用化と

技術研修に関する研究

分担研究者 杉浦 互（国立感染症研究所エイズ研究センター）

研究概要

HIV-1 感染症の治療を適切に進める上で薬剤耐性検査は重要な指標として認識されつつある。この研究ではより多くの感染者が薬剤耐性検査の恩恵にあずかることができるように感染症研究所エイズ研究センターで開発した遺伝子検査手技を地方衛生研究所およびブロック拠点病院に技術移転することを目的としている。平成 15 年度は遺伝子検査技術の移植を目的に 22 の施設を対象に技術講習会を開催した。

A. 研究目的

遺伝子検査による薬剤耐性 HIV-1 検査法をわが国における標準法として講習会を通じて地方衛生研究所およびブロック拠点病院に公開し、より多くの患者が検査の恩恵にあずかることができる検査体制を構築することを目的とする。

B. 研究方法

薬剤耐性遺伝子検査手技をテーマに研究班では技術講習会を主催しており、この講習会を通じて薬剤耐性検査法の公開および移植を実施した。昨年同様本年度も薬剤耐性検査に加えてサブタイピングもテーマとして取り上げた。

（倫理面への配慮）

患者の血液検体を取り扱う際には検査の目的、必要性を十分に説明をし、同意書を作成する。

C. 研究成果

1) 遺伝子検査

感染症研究所エイズ研究センターでは平成 15 年度は 32 施設の医療機関を対象に総計 717

検体の遺伝子検査を実施した（4 月から 3 月上旬まで）。検査は 2-3 週間で結果を主治医に返送した。

2) 薬剤耐性遺伝子検査技術の公開

薬剤耐性遺伝子検査技術を地方衛生研究所に移植するために平成 15 年 10 月 15 から 17 日の 3 日間にわたり HIV-1 技術研修会を開催した。研修会には表 1 に示す 22 施設からの参加があった（表参照）。技術実習は感染者血漿からのウイルス RNA の抽出から始まり、プロテアーゼ、エンベロープ遺伝子の RT-PCR で増幅し、塩基配列を解析した。加えて、感染研と国立国際医療センターの講師による HIV-1 に関する基本的な知識についての講義も行った。

D. 考察および結論

地方衛生研究所への薬剤耐性検査の技術公開は本年度から 2 クール目に入ったこともあり、サブタイピングも加えたより実践的な実習を行った。また今回からブロック拠点病院の技術者も加わったことから実習を通しての相互親睦、今後の検査連携についても検討を

行った。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Lay Myint, Masakazu Matsuda, Zene Matsuda, Yoshiyuki Yokomaku, Tomoko Chiba, Aiko Okano, Kaneo Yamada, Wataru Sugiura. Contribution of Gag Non-Cleavage Site Mutations for full Recovery of Viral Fitness in Protease Inhibitor Resistant HIV-1. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*. 2004, Vol. 48, 444-452.
- 2) Koya Ariyoshi, Masakazu Matsuda, Hideka Miura, Sachiko Tateishi, Kaneo Yamada, Wataru Sugiura. Patterns of Point Mutations Associated With Antiretroviral Drug Treatment Failure CRF01_AE (Subtype E) Infection Differ From Subtype B Infection. *JAIDS*. 2003, Vol. 33, 336-342
- 3) J Snoeck, R Kantor, RW Shafer, I Derdelinckx, AP Carvalho, B Wynhoven, MA Soares, P Cane, J Clarke, C Pillay, S Sirivichayakul, K Ariyoshi, A Holguin, Z Grossman, R Rodrigues, MB Bouzas, P Cahn, LF Brigido, V Soriano, W Sugiura, P Phanuphak, L Morris, J Weber, D Pillay, A Tanuri, PR Harrigan, R Camacho, JM Schapiro, D Katzenstein, AM Vandamme. Comparison of Five Interpretation Algorithms for the Prediction of Protease Inhibitor Susceptibility in HIV-1 Non-B Subtypes. *Antiviral Therapy* 2003, Vol. 8, s 111
- 4) R Kantor, RW Shafer, AP Carvalho, B Wynhoven, MA Soares, P Cane, J Clarke, J Snoeck, C Pillay, S Sirivichayakul, K Ariyoshi, A Holguin, Z Grossman, R Rodrigues, MB Bouzas, P Cahn, LF

- Brigido, V Soriano, W Sugiura, P Phanuphak, L Morris, A-M Vandamme, J Weber, D Pillay, A Tanuri, D Katzenstein. Nucleic acid differences between HIV-1 non-B and reverse transcriptase and protease sequences at drug resistance positions. *Antiviral Therapy* 2003, Vol. 8, s 58
 - 5) L Myint, M Matsuda, T Chiba, H Yan, J Kakizawa, A Okano, M Hamatake, M Nishizawa, W Sugiura. Analysis of Virion Morphology and Assembly Process in Protease Inhibitor Resistant HIV-1. *Antiviral Therapy* 2003, Vol. 8, s 91
 - 6) Wataru Sugiura, Kazunori Shimada, Masakazu Matsuda, Tomoko Chiba, Lay Myint, Aiko Okano and Kaneo Yamada. Novel Genotyping Assay for Human Immunodeficiency Virus Type-1 Drug Resistance Using Enzyme Linked Mini-Sequence Assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003; Vol. 41, 4971-4979
 - 7) 杉浦 互. HIVの薬剤耐性研究の現状と今後の課題. *現代医療* No. 35 Vol. 6:113-118
 - 8) 杉浦 互. 日本における薬剤耐性 HIV-1の現状. *臨床とウイルス* Vol. 31, No. 4, 272-282
 - 9) 金田次弘、加藤真吾、山元泰之、千葉智子、杉浦 互. 抗HIV療法のモニタリング. *日本エイズ学会誌* Vol. 5:109-112
- ### 2. 学会発表
- 1) R Kantor, RW Shafer, B Efron, AP Carvalho, B Wynhoven, MA Soares, P Cane, J Clarke, J Snoeck, S Sirivichayakul, K Ariyoshi, A Holguin, C Pillay, H Rudich, R Rodrigues, MB Bouzas, P Cahn, LF Brigido, Z Grossman, L Morris, V Soriano, W Sugiura, P Phanuphak, AM Vandamme, J Weber, D Pillay, A Tanuri,

- PR Harrigan, R Camacho, JM Schapiro, and D Katzenstein. Contrasting Subtype-treatment interaction in HIV-1 subtypes: differences in subtypes B and C reverse transcriptase (RT) and protease(PR) genotypic evolution. 11th Conference on retrovirus and opportunistic infections. Sanfrancisco, USA, Feb.8-11, 2004
- 2) H. Yan, T Chiba, N Nomura, Y Kitamura, M Nishizawa, M Matsuda, N Yamamoto, and W Sugiura. Discovery of Novel Small-Molecule HIV-1 Integrase Inhibitory Compounds. Fourth HIV DRP Symposium ANTIVIRAL DRUG RESISTANCE. Virginia, USA, Dec.7-10, 2003
 - 3) L Myint, M Matsuda, T Chiba, H Yan, J Kakizawa, A Okano, M Hamatake, M Nishizawa, W Sugiura. Analysis of Virion Morphology and Assembly Processes in Protease Inhibitor Resistant HIV-1. XII International HIV Drug Resistance Workshop. Cabo SanLucas, Mexico. Jun.10-14, 2003
 - 4) R Kantor, RW Shafer, AP Carvalho, B Wynhoven, MA Soares, P Cane, J Clarke, J Snoeck, C Pillay, S Sirivichayakul, K Ariyoshi, A Holguin, Z Grossman, R Rodrigues, MB Bouzas, P Cahn, LF Brigido, V Soriano, W Sugiura, P Phanuphak, L Morris, A-M Vandamme, J Weber, D Pillay, A Tan, D Katzenstein. Nucleic acid differences between HIV-1 non-B and reverse transcriptase and protease sequences at drug resistance positions. XII International HIV Drug Resistance Workshop. Cabo SanLucas, Mexico. Jun.10-14, 2003
 - 5) J Snoeck, R Kantor, RW Shafer, I Derdelinckx, AP Carvalho, B Wynhoven, MA Soares, P Cane, J Clarke, C Pillay, S Sirivichayakul, K Ariyoshi, A Holguin, Z Grossman, R Rodrigues, MB Bouzas, P Cahn, LF Brigido, V Soriano, W Sugiura, P Phanuphak, L Morris, J Weber, D Pillay, A Tanuri, PR Harrigan, R Camacho, JM Schapiro, D Katzenstein, AM Vandamme. Comparison of Five Interpretation Algorithms for the Prediction of Protease Inhibitor Susceptibility in HIV-1 Non-B Subtypes. XII International HIV Drug Resistance workshop. Cabo SanLucas, Mexico. Jun.10-14, 2003
 - 6) 松井良輔、菅井隆弘、千葉晴美、塩見和朗、山口裕一、増間 郎、供田 洋、千葉智子、杉浦 互、大村 智、田中晴雄.:糸菌状の生産する HIV-1 インテグラーゼ阻害物質の単離と生物活性. 第124回日本薬学会 2004年3月
 - 7) 杉浦 互、駒野 淳、Lay Myint: HIV-1複製サイクル初期あるいは後期過程における宿主細胞因子の機能的、形態学的解析. 第6回 白馬シンポジウム 2003年8月1日. 長野県北安曇郡白馬村
 - 8) 杉浦 互、Lay Myint、駒野 淳、松田昌和、松田善衛、西澤雅子. 薬剤耐性 HIV-1における粒子形成過程の形態学的解析. 第51回日本ウイルス学会学術集会 2003年10月27日~29日 京都
 - 9) 横幕能行、松田善衛、千葉智子、巖 馬華、松田昌和、杉浦 互. 抗 HIV-1 新規候補薬剤検索のための多検体処理可能なスクリーニングシステム構築. 第17回 日本エイズ学会学術集会 2003年11月27日~11月29日 神戸
 - 10) 古賀一郎、小田原 隆、細谷紀章、後藤美江子、中村哲也、松田昌和、杉浦 互、岩本愛吉. HAART 下で良好な経過中、梅毒発症とともに抗 HIV 血症を呈した症例.