

動物の使用は行わなかった。

C. 研究結果

HIV-1 エンベロープタンパク質の膜融合能に影響を与えうる部位の評価として、今までその機能がよく解析されていない gp41 膜貫通部分を対象とした。gp41 膜貫通部分には膜貫通ヘリックス間相互作用に寄与すると考えられる保存されたアミノ酸配列 GXXXG(G:グリシン、X:いずれかのアミノ酸)が存在する。この配列中のグリシン残基をアラニン、あるいはロイシンに置換した点変異体、及び膜貫通部分を同じく GXXXG 配列を有する異種タンパク質 (GlycophorinA= GpA, あるいは VSV Gタンパク質= VSV-G)で全置換した変異体を作成した (図 1)。作成した変異プロウイルス DNA を MAGI 細胞にトランスフェクションしてその融合能を評価したところ点変異体では顕著な変化を認めなかったが、膜貫通部分全体の置換変異体では膜融合能の著明な低下が見受けられた (図 2)。それぞれのウイルスの複製能を CD4 陽性細胞株を用いて評価したところ、膜融合能に相応して置換変異体では複製能の著しい低下が認められた (data not shown)。膜融合能の低下がみられた置換変異体についてさらに解析を加えた。発現タンパク質のプロフィールをトランスフェクションされた COS 細胞由来の細胞及びウイルス溶解液で比較検討した結果、置換変異体では、gp160 から gp120/gp41 へのプロセッシングが増強していたが (data not shown)、置換変異体の細胞表面発現 (図 3) や CD4 結合能には著変を認めなかった (data not shown)。膜融合を定量的に評価できるアッセイ系として、融合に携わる細胞間での融合孔形成を T7RNA ポリメラーゼの移行によるレポーター遺伝子の活性化を指標にして評価する系を用いた。置換変異体では野生型に比べて膜融合孔形成能が

60%ほど低下していた (図 4)。膜融合の各ステップについて細胞膜、細胞質をそれぞれ蛍光色素で標識して評価したところ、脂質交流の低下に見合った細胞質交流の低下を認め (図 5)、CD 4 結合後のどこかのステップに障害があることが示唆されたが、hemifusion 段階での停止の異常は見られなかった。

D. 考察

現在臨床使用が試みられている膜融合阻害剤に対する耐性ウイルスの解析では、耐性責任領域は gp41 細胞外部分の比較的限局した部分であり、その部分の変異で説明できるとされている。しかし膜融合の全容は未だ明らかでないことや、すべての耐性変異体について詳細かつ網羅的解析が行われたとは言い切れないのでその解釈には注意を要する。今回の研究では gp41 膜貫通部分の変異の膜融合能に対する影響を解析したが、グリシンの他のアミノ酸への変異では機能的に著変を認めなかった。これは HIV-1 gp41 の変異に対する寛容性の大きさを示すもので、VSV で同様の変異がその機能に大きな影響を与えるのとは対照的である。この寛容性の一方で、同じ GXXXG モチーフをもった膜貫通部分との置換変異体ではその機能保持ができないことから、gp41 膜貫通部分もその配列が規定する構造が機能に多大な影響を与えることを示している。ただ以前の報告では gp41 膜貫通部分を CD22 や CD 4 のそれと置換しても機能が保たれた例があるなど、同部分の構造・機能関連については今後の解析が必要であると考えられる。いずれにしても膜融合に影響を与えうる部分はエンベロープ中に多数存在すると考えられ、将来的なことも考えれば、エンベロープの遺伝子型解析のためには比較的広範な部分を対象として設定することが望ましいと考えられる。

今回の研究にも使用した T7RNA ポリメラーゼの細胞間移行に基づく細胞膜融合孔の形成度合いの評価は膜融合を定量的に評価できる点で有用であるが、レポーター遺伝子の転写、翻訳までにかかる時間が必要なため膜融合過程の初期の現象を捕捉するには適当でない問題点がある。臨床検体からのエンベロープ部分の回収方法を含めて今後の課題であると考えられる。

E. 結論

細胞膜融合阻害剤耐性ウイルスの評価にあたっては、エンベロープの種々の領域が膜融合能などの機能に影響を与えうることから現在同定されている薬剤の耐性領域とされている部分のみでは無く、エンベロープ全体を把握できるようなシステムの構築が望ましい。また膜融合を定量的に評価できる系についてはまだ改善の余地があると考えられる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Komano J, Miyauchi K, Matsuda Z, Yamamoto N. Inhibiting the Arp2/3 Complex Limits Infection of Both Intracellular Mature Vaccinia Virus and Primate Lentiviruses. *Mol Biol Cell*. 2004 Sep 22 [Epub ahead of print]

2. Miyauchi K, Komano J, Yokomaku Y, Sugiura W, Yamamoto N and Matsuda Z
Role of the specific amino acid sequence of the membrane-spanning domain of human immunodeficiency virus type 1 in membrane fusion. *J.Virol.* in press

2. 学会発表

1 Jun Komano, Kosuke Miyauchi, Zene Matsuda,

and Naoki Yamamoto: Inhibiting the Arp2/3 complex limits infection of primate lentiviruses. *Retroviruses Cold Spring Harbor Laboratory*, Cold Spring Harbor NY, USA. May 25-30, 2004

2. Kosuke Miyauchi, Jun Komano, Yoshiyuki Yokomaku and Zene Matsuda: The membrane-spanning domain of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) gp41 is involved in the late steps of the membrane fusion. *Retroviruses Cold Spring Harbor Laboratory*, Cold Spring Harbor NY, USA. May 25-30, 2004

3. 感染初期過程におけるウイルス種特異的なアクチン利用の相違 駒野淳、宮内浩典、松田善衛、山本直樹 第52回日本ウイルス学会学術集会、2004年11月21日—23日、横浜

4. ウサギ由来の RK13 細胞においてヒト免疫不全ウイルス(HIV-1)感染は逆転写後に抑制される 駒野淳、浦野恵美子、二橋悠子、宮内浩典、松田善衛、山本直樹 第52回日本ウイルス学会学術集会、2004年11月21日—23日、横浜

5. HIV env の迅速なクローニング、発現および組み換えウイルス作成システム構築 藤秀義、田中真理、宮内浩典、松田善衛、有吉紅也、星野忠次、佐藤裕徳、横幕能行 第52回日本ウイルス学会学術集会、2004年11月21日—23日、横浜

6. Scanning alanine-insertion mutagenesis of the membrane-spanning domain of HIV-1 gp41

宮内浩典、駒野淳、松田善衛 第52回日本ウイルス学会学術集会、2004年11月21日—23日、横浜

7. ヒト免疫不全ウイルス(HIV-1)複製を特異的に増強する小分子化合物 sparsomycin 駒野淳、宮内浩典、二橋悠子、浦野恵美子、松田善衛、千葉智子、三浦秀佳、Lay Mynt、杉浦亙、山本直樹 第52回日本ウイルス学会学術集会、2004年11月21日—23日、横浜

8. ヒトT細胞由来の新たなレポーター細胞によるHIV-1薬剤感受性検査法の確立 三浦秀佳、千葉智子、滝澤万理、松田善衛、松田昌和、本多三男、杉浦亙 第52回日本ウイルス学会学術集会、2004年11月21日—23日、横浜

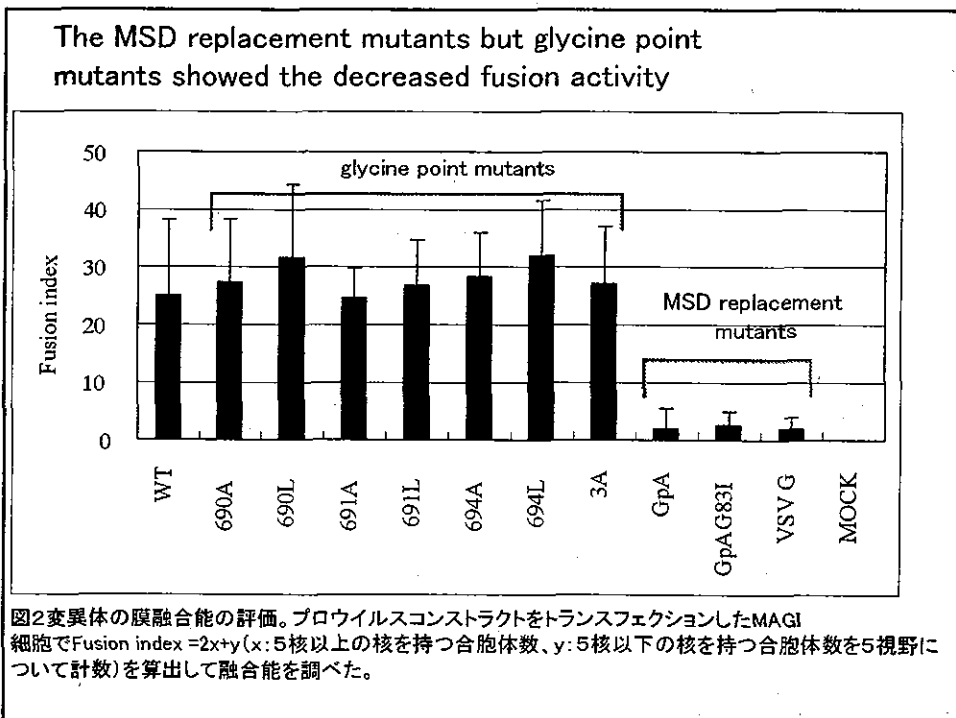
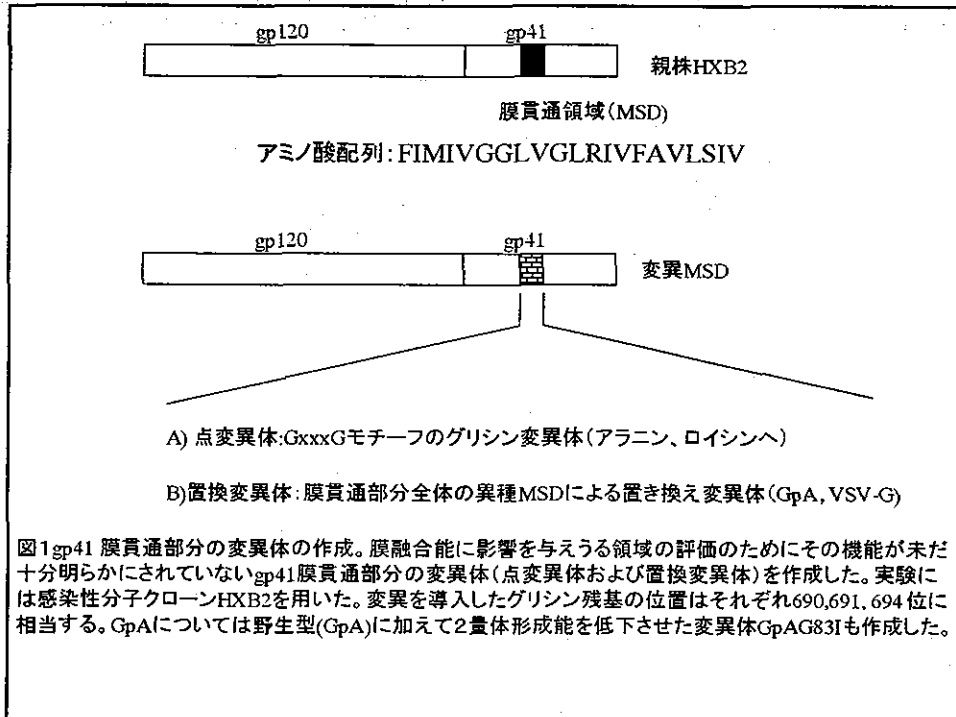
9. Ala 残基挿入変異による HIV-1gp41 膜貫通領域の構造機能連関の解析 宮内浩典、駒野淳、松田善衛 第27回日本分子生物学会年会 2004. 12. 8 11神戸

10. Restriction of HIV-1 infection at the post-nuclear translocation process in rabbit cell line RK13 駒野淳、浦野恵美子、二橋悠子、宮内浩典、松田善衛、山本直樹 第27回日本分子生物学会年会 2004. 12. 8 11神戸

11. HIV env クローンライブラリー作成の試み—HIV env の迅速なクローニング、発現および組み換えウイルス作成システム構築—藤秀義、田中真理、宮内浩典、松田善衛、星野忠次、有吉紅也、星野洪郎、佐藤裕徳、横幕能行 第18回日本エイズ学会、静岡2004, 12月9 11日

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし



Surface expression level is maintained in MSD replacement mutants

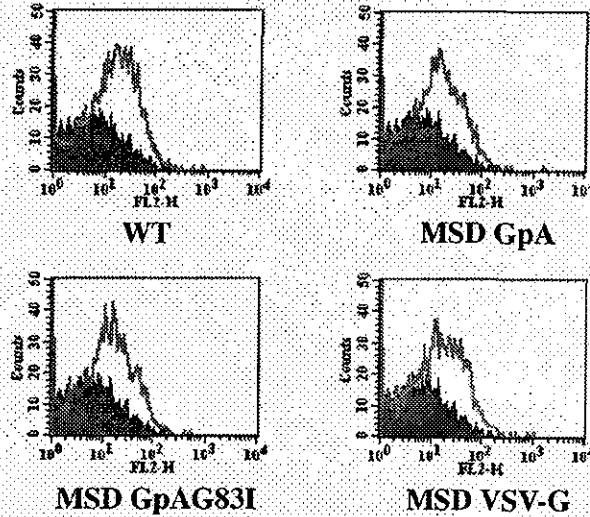


図3 gp41膜貫通部分置換変異体の細胞膜上の発現レベル。各変異体の細胞表面上の発現をEnv発現ベクターをトランスフェクションされたCOS細胞を対象にanti-gp120 Mab902を用いてFACSにて解析した。暗色部:コントロール、白色部:Mabによるシグナル。

T7RNAポリメラーゼを用いた膜融合活性の定量測定系

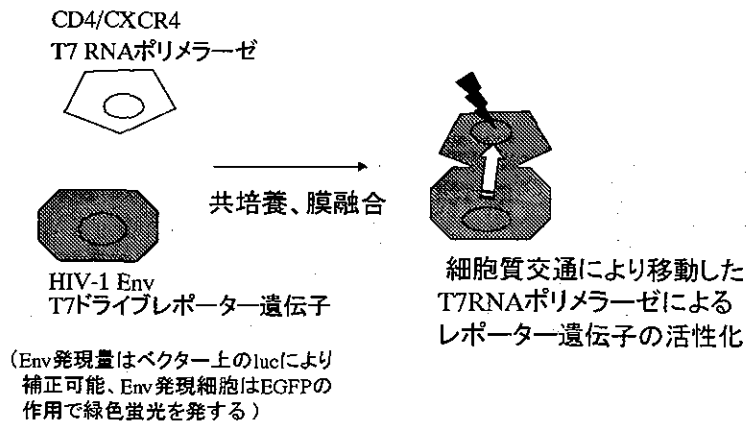
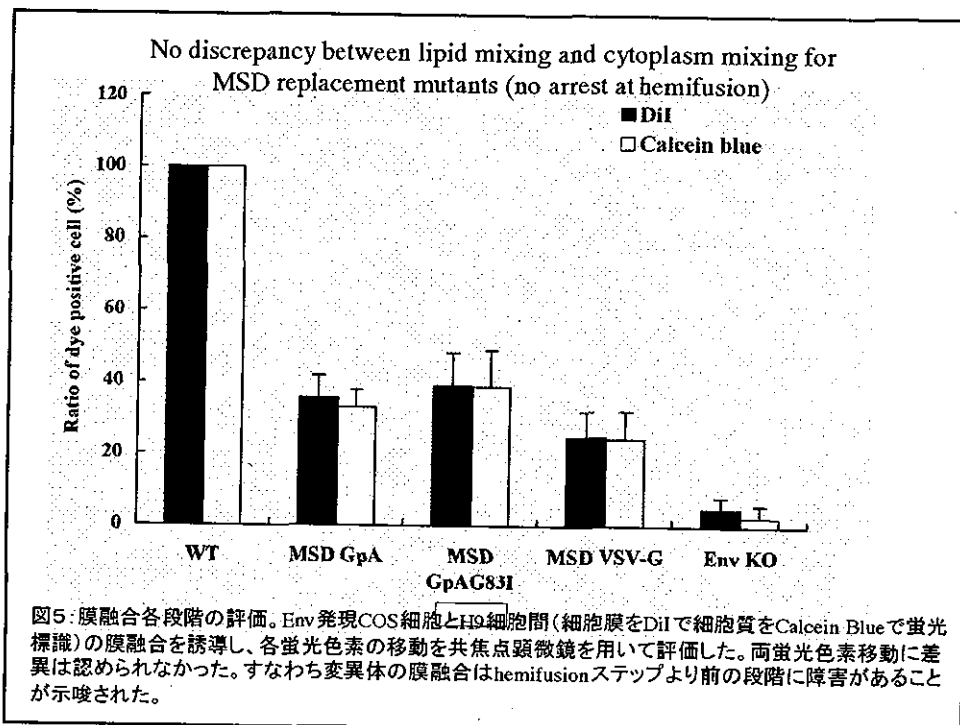
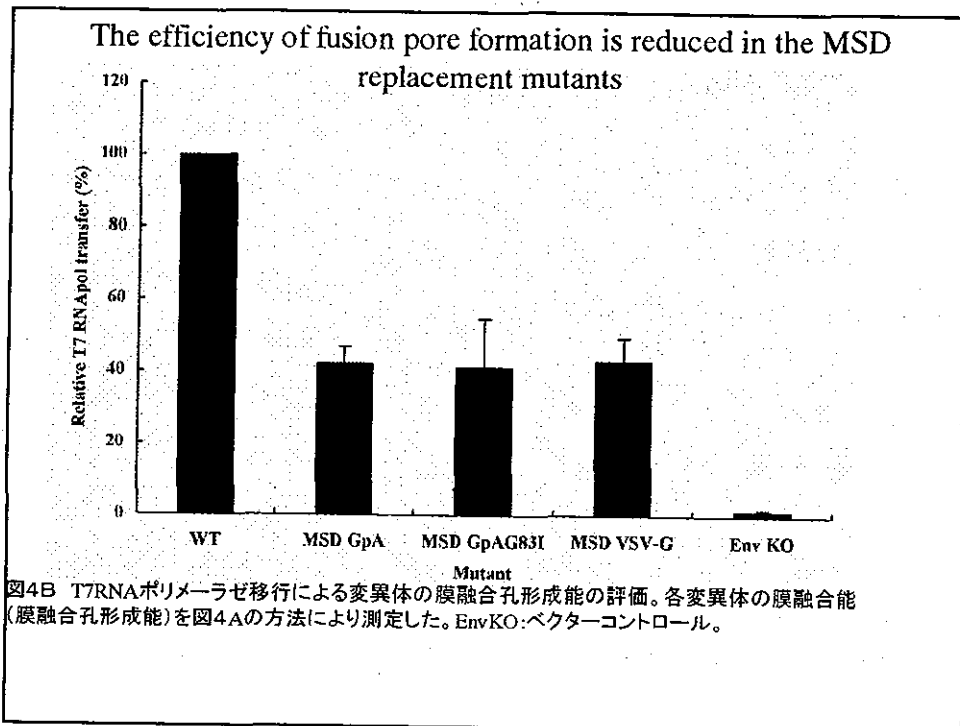


図4A: T7RNAポリメラーゼを用いた膜融合活性の定量測定系。細胞間膜融合の際に形成される膜融合孔を通じてのT7RNAポリメラーゼの移動に基づくレポーター遺伝子の発現程度で測定する。Env発現ベクターにはEGFP, LucがありEnv発現細胞の同定、トランスフェクション効率の補正に用いられる



厚生労働省科学研究費補助金 (エイズ研究事業)
分担研究報告書

HIV 薬剤耐性の変異の解析とデータベース構築に関する研究

分担研究者 山口由美 産業技術総合研究所 生物情報解析研究センター

研究要旨

HIV 薬剤耐性の調査、研究において、薬剤耐性変異の情報や、感染者の臨床、投薬情報などが膨大に蓄積している。薬剤耐性変異研究を情報解析の立場からサポートし、変異の出現頻度予測に繋げる為、HIV の配列の変異情報の整備、重要な薬剤耐性変異の立体構造への効果を調べる研究に着手した。

A. 研究目的

抗 HIV の薬として、逆転写阻害剤やプロテアーゼ阻害剤が主に使用されているが、薬剤耐性変異が出現する。効率の良い治療法の確立のためには、薬剤耐性変異の実態を把握し、薬剤投与後に起こりうる変異の範囲を予測することが重要である。そもそも HIV は突然変異率が高いので、薬剤耐性変異として知られているもの以外の変異が膨大にある。そこで、逆転写酵素とプロテアーゼの変異の実態を整備することが重要である。

国立感染症研究所では、国内の HIV 感染者の大規模のサーベイランスが行われており、感染者の臨床、投薬情報や HIV の遺伝子の塩基配列データなどを含んだデータベースが構築されつつある。

そこで、本年度は以下のような研究を行った。

(1) 薬剤耐性変異として知られているものだけでなく、全てのアミノ酸サイトにおいて、変異の実態を掴む。

(2) 国立感染症研究所にある HIV 薬剤耐性変異のデータベースの統計解析により得られた HIV の変異の蓄積に関する情報に対して、タンパク質の立体構造から裏付けを行い、さらに、分子レベルにおける HIV 薬剤耐性の構造特性

に関する知見を得ることを目的とし、そのための構造解析手法を確立する。

B. 研究方法

(1) HIV プロテアーゼの各アミノ酸サイトの変異の量を、出現するアミノ酸の種類数で評価した。HIV-1 プロテアーゼの各アミノ酸サイトの変異の量を評価した。そして、変異の量をタンパク質の 2 次構造、3 次構造との対応を調べた。

(2) HIV-1 プロテアーゼの 30 番目、90 番目のアミノ酸変異 D30N, L90M はそれぞれ、阻害剤の結合能を低下させる重要な薬剤耐性変異であることが知られているが、この二つの変異は共存しにくいということも知られている

(Sugiura et al. Antimicrob. Agents

Chemother. 46(2002) 708-715)。この現象が蛋白質立体構造から裏付けられるかどうかを

確認するため、(a) Wild type、(b) D30N、(c) D30N-L90M の三つの変異体の三次元立体構造をモデリングし、その構造を用いて分子動力学計算を行った。その結果をもとに生体内条件下における酵素の揺らぎ、各種相互作用の様式変化とそれに伴う相互作用エネルギー変化

を測定した。

C. 研究成果

(1) 多様性に富むアミノ酸サイトは、特に立体構造の外側に主に見られた。30、90番目のアミノ酸サイトなど、薬剤耐性変異が報告されているサイトの変異の量は、極めて抑えられていた。例えば、HIV-1全体(342本の配列)で見ても、2種類のアミノ酸しか出現せず、機能的制約が強いことが分かる。1種類のアミノ酸しか出現しないサイトは、13サイト検出された。

(2) 生体内条件での酵素の揺らぎの値をB-factorとしてアミノ酸残基ごとに算出したところ、主にフラップの部分(45~54)において3つの変異体間に差がみられ(図2)、Wild type、D30N、D30N-L90Mの順に平均値が大きくなっており、揺らぎが増大していることが判明した。このことから、このフラップ部分の不安定性が基質の結合、また阻害剤の結合に影響を与えているということが示唆された。さらに、二量体としての安定性を計測するために、 α 鎖と β 鎖の間の相互作用エネルギーをAMBER7.0のモジュールであるMM-PBSA法で計測したところ、Wild type、D30N、D30N-L90Mの相互作用エネルギーは各々 $\cdot 231.18\text{kcal/mol}$ 、 $\cdot 221.64\text{kcal/mol}$ 、 $\cdot 216.67\text{kcal/mol}$ となり、二つの変異が入ったD30N-L90M変異体が最も二量体としての安定性が低いということが判明した。

D. 考察

(1) 薬剤耐性変異の報告のあるサイトは、プロテアーゼの機能に関わっているため、変異の程度は抑えられている。他のアミノ酸サイトで変異の見られないサイトが13箇所あったが、機能的な重要性のために、そのアミノ酸が1種類しか受け入れられなくなっていると考えられる。

(2) フラップ部位の揺らぎの増大、そして二量体の不安定性が、基質-酵素複合体におけるエ

ンタルピーを低下させることで、D30N-L90M変異体の触媒機能が低下すると推測された。今回扱った30、90番目のアミノ酸の位置はお互いに直接的な相互作用は見られず、またフラップの部位はこれら二つのアミノ酸から離れた位置にあることから、変異の蓄積がどのように立体構造特性に影響するのかを解明するために、分子動力学を用いたアプローチが重要であることがわかる。しかし、酵素の触媒能、阻害剤の結合能をより詳細に解析するために、酵素-基質(阻害剤)複合体の構造解析、各変異がフォールディングに与える影響、転写、翻訳レベルでの変化等、様々な原因を考慮にいたした解析を行うことが必要であると考えられ、今後の課題である。

E. 結論

(1) 出現するアミノ酸の種類数を解析することにより、機能的制約の範囲を推定することが可能である。今後解析に利用する配列の本数が増えても、出現するアミノ酸の種類数は、それぞれサイトの機能的制約の範囲で、やがて飽和に達する。今後、サブタイプごとの解析との比較、異なるサイト間の多型の関係の分析により、プロテアーゼ、逆転写酵素のアミノ酸の多型の実態を明らかにしていく。

(2) D30N-L90Mの二つの変異が共存しにくい原因は、この二つの変異が組合わさるとフラップ部位の揺らぎが増大し、さらに二量体の安定性が低下することに起因することが分子動力学計算より示された。

F. 健康危険情報

該当しない

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Yamaguchi, Yamashita, Ohkura, Hayami, Miura (2004) "Linkage of amino acid variation and evolution of human immunodeficiency

virus type 1 gp120 envelope glycoprotein (subtype B) with usage of the second receptor? J Mol Evol. 2004 Mar;58(3):333-40.

- (2) 山口由美「HIVの遺伝的多様性とバイオイン
フォマティクス」ウイルス 2004年6月号 54(1)
33-38

2. 学会発表

- (1) 山口由美、松本竜三、早川陽介、細田誠吾、今
西規、五條堀孝、H-Invitational コンソーシアム

「ヒト完全長 cDNA と遺伝子多型」第27回日本分
子生物学会年会 ポスター発表 2004年12月
神戸

H. 知的財産権の出願・登録状況
現在のところ無し

Amino acid variation in HIV-1 Protease

All subtypes of HIV-1 including subtype O and SIVcpz
342 sequences

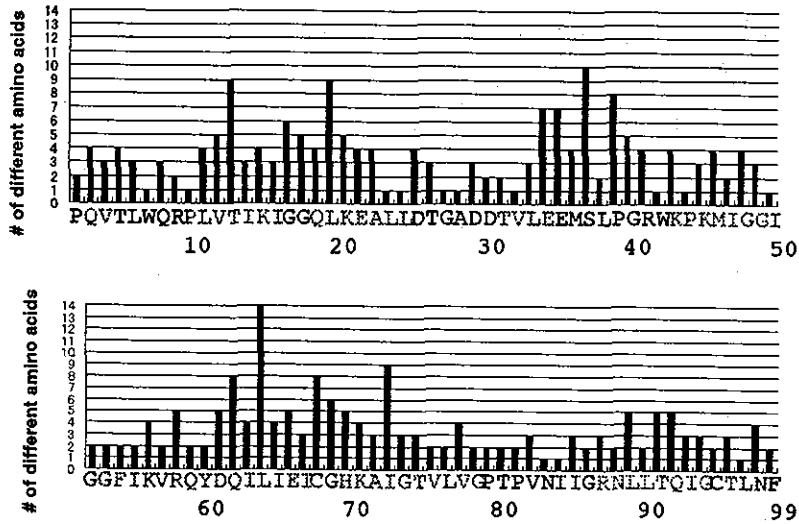


図1. HIV-1 プロテアーゼのアミノ酸の多様性の評価。ここでは、各アミノ酸サイトに出現するアミノ酸の種類数が示されている。

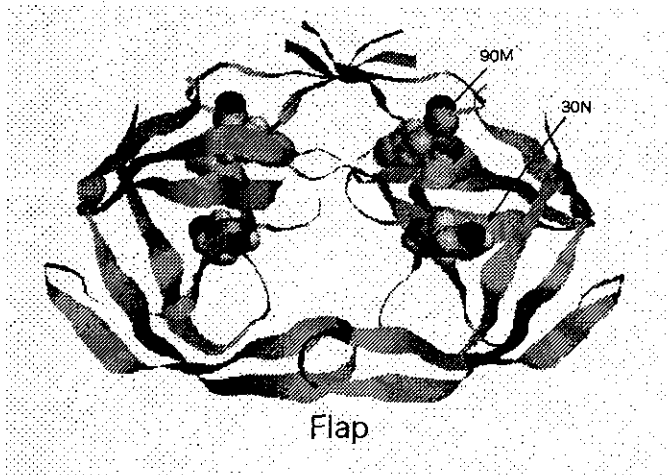


図2. D30N-L90M 変異体の分子動力学計算から得られた HIV-1 プロテアーゼの三次元立体構造。D30N 変異体の場合に比べて B-factor が 5 以上大きくなった箇所を濃く示してある。

厚生労働科学研究費補助金（エイズ研究事業）

分担研究報告書

北陸地区における薬剤耐性 HIV-1 調査体制確立のための研究

分担研究者 上田 幹夫 石川県立中央病院 血液免疫内科診療部長
研究協力者 正兼 亜季 財団法人エイズ予防財団 リサーチレジデント
山田三枝子 財団法人エイズ予防財団 リサーチレジデント
辻 典子 財団法人エイズ予防財団 リサーチレジデント
前川 実生 石川県立中央病院 血液免疫内科医員

研究要旨

北陸地方における新規感染者の薬剤耐性 HIV-1 伝播の現状を調査するために、北陸ブロック内の拠点病院に通知案内し、耐性検査を実施できる体制を整えた。

サブタイプ解析の結果、8名中6名がサブタイプB、2名がCRF01_AEであった。

A. 研究目的

厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業「薬剤耐性 HIV 発生動向把握のための検査方法・調査体制確立に関する研究（主任研究者 杉浦 互）」のもと、北陸ブロックにおける新規あるいは未治療慢性 HIV-1 感染者における薬剤耐性変異の頻度を調査し、耐性 HIV-1 伝播の疫学的動向を明らかにするとともに、北陸ブロックでの拠点病院間の連携を構築する。

また、同時にサブタイプ解析を行い、北陸ブロックにおいて新規に診断された感染者の HIV-1 サブタイプの頻度について調査する。

B. 研究方法

配布された「新規感染者耐性 HIV-1 サーヴェイランス プロトコル ver1.2」に従い研究を行なった。

ブロック内の各拠点病院へは平成16年11月にプロトコルから必要事項を抜粋しプロトコル概要として配布説明した。また、当院へ検査を依頼する際の耐性検査依頼書、患者様への説明書、薬剤耐性検査・研究参加同意書も作成し配布した。

（別添資料1、2、3）

倫理的問題については、現在石川県立中央病院倫理委員会に申請中である。

C. 研究結果

2004年9月25日に富山医科薬科大学附属病院にて行なわれた北陸 HIV 臨床談話会において、杉浦 互 主任研究者に「薬剤耐性 HIV-1 の現状と今後の課題」という題目のもと、講演をしていただいた。この会には北陸3県から約60名の参加があった。

2004年10月1日には独立行政法人国立病院機構 名古屋医療センターで行なわれた研究打ち合わせに検査担当者が出席した。また、12月16日に国立感染症研究所で行なわれた班会議には、分担研究者と検査担当者が出席し、現状を報告した。

2003年から2004年12月までに新規に HIV 感染を診断されたのは9名であった。新規急性感染者の定義にあてはまる患者はおらず、全ての患者が慢性未治療患者であった。診断後、2名は服薬を開始しており、そのうち1名は治療開始後1ヶ月で検出限界以下となったが、1名は治療開始後3ヶ月の時点での viral load が 2.2×10^2 であった。この症例は4ヵ月後に検出限界以下となった。

耐性変異の有無については倫理委員会で承認されしだい報告する。

サブタイプ解析は8名で終了しており、その結果、6名がサブタイプB、2名がCRF01_AEであった。

D. 考察

北陸ブロック内の 2003～2004 年の HIV 感染者・AIDS 患者の新規報告数はエイズ動向委員会の報告によると、合計 16 名であり、現在の補足率は 56%である。今後も研修会等での案内を継続し、補足率 100%を目指したい。

薬剤耐性 HIV-1 についての考察は倫理委員会が承認されしだい報告する。

E. 結論

北陸ブロックにおける薬剤耐性 HIV-1 発生動向把握のための調査体制を整備した。2003 年より、9 名の新規感染者が登録された。

サブタイプ解析の結果、8 名中 2 名 (25%) と高率に CRF01_AE が確認された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 正兼亜季、戸来依子、山田三枝子、下川千賀子、辻典子、上田幹夫：当院における薬剤耐性 HIV の状況. 第 28 回北陸臨床病理集談会、2003. 9.7 (第 28 回北陸臨床病理集談会抄録集；2003：15)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

資料 1

新規感染者薬剤耐性 HIV-1 サーベイランス用

HIV 薬剤耐性検査 (研究用) 申込書

患者の同意のもとに、薬剤耐性検査を依頼します。

この用紙は検体と一緒に送付してください。

依頼年月日 年 月 日

依頼者 氏名		施設名・〒住所	
所属			
電話番号		FAX 番号	

患者IDまたは匿名コード		依頼 回数	回目
生年月日	西暦 年 月 日 不明	性別*1	M ・ F ・ 不明
採血日	西暦 年 月 日 初診時 ・ 治療開始時 ・ 治療開始後 その他 ()	服用 薬剤名*2	
陰性確認最終 年月日*3	西暦 年 月 日 不明	陽転確認 年月日*3	西暦 年 月 日 不明
推定感染時期*3	西暦 年 月 日 不明	感染分類*4	新規登録・急性感染 その他 ()
推定感染経路	性感染 (異性間・同性間・同性異性のいずれか) ・ 母子感染 ・ IVDU*5 ・ 輸血 その他 () ・ 不明		
推定感染場所	国内 ・ 国外 () 不明	国籍	日本 ・ 外国 () 不明

・検体 EDTA 採血管 (5-7ml) 採血後すぐに配送

*1 性転換者の場合は生物学的性を記載

*2 治療開始後の場合は今までに服用した薬剤名を全て記入

*3 日にちが不明の場合は 15 日と記入

*4 ・急性感染者とは

①感染確認 1 年以内にウェスタンブロットでバンドが増加もしくは増強した症例で未治療の症例

②感染確認 1 年以内に検査陰性もしくは判定保留が陽性になった未治療の症例

・新規登録感染者とは、急性感染者以外ではじめて感染が確認された症例

*5 IVDU・・・Intravenous Drug User 麻薬静脈注射常習者

薬剤耐性 HIV-1 の調査研究 ご協力のお願い

HIV 感染症治療は、多剤併用療法の登場により大きく変わりました。しかしその一方で、耐性を獲得し、薬剤が効かなくなったウイルスが問題になってきています。

そこで今回、わが国における薬剤耐性 HIV-1 の広がりを明らかにすることを目的に、薬剤耐性 HIV の頻度を調査することになりました。

この研究は、厚生労働省エイズ対策研究事業の一つとして、国立感染症研究所の杉浦互主任研究者を中心に行なわれます。得られたデータは石川県立中央病院で解析し、国立感染症研究所に送付します。

データは匿名で送りますので、個人が特定されることはありません。

ご不明な点がございましたら遠慮なくお聞きください。

なお、この研究のための検査を断わられても今後の治療に対して不利益になることはありません。

ご協力よろしくお願いいたします。

薬剤耐性検査について

ウイルスの遺伝子配列を調べることにより、どの薬剤が効果があるかわかります。

HIV 治療の効果が無くなった場合などに検査することが推奨されており、また、治療開始前に検査することも考慮されています。この検査を行うことで、より効果的な治療方法を決定することができます。

薬剤耐性検査同意書

1. 薬剤耐性検査を受けることに

同意します

同意しません

(どちらかを○で囲んでください)

2. 薬剤耐性検査の研究事業にデータを提供することに

同意します

同意しません

(どちらかを○で囲んでください)

	年	月	日
フリガナ 患者氏名			
フリガナ 代諾者氏名	続柄		

担当医師名

年 月 日

第28回北陸臨床病理集談会
第11回 同 セミナー

プログラム・抄録集

当番幹事

石川県立中央病院中央検査部

車谷 宏

日時：平成15年9月7日（日）12:30～17:30

場所：石川県立中央病院 健康教育館大研修室

第二会議室

17. 当院における薬剤耐性 HIV の状況

- 正兼亜季、戸来依子、山田三枝子、下川千賀子、辻典子、上田幹夫
石川県立中央病院 HIV 診療チーム

HIV/エイズの治療は HAART（多剤併用療法）の登場により大きな進歩をとげた。しかし、激しい副作用や薬剤耐性ウイルスの出現など新たな問題も出てきている。当院でも薬剤耐性ウイルスの出現により治療効果が喪失し薬剤を変更した例を経験したので CD4 とウイルス量の推移を報告する。また以前から報告があるように、未治療にもかかわらず、PI 領域に変異を起こしている例を経験したのであわせて報告する。

厚生労働省科学研究費補助金(エイズ研究事業)
分担研究報告書

関東甲信越地区における薬剤耐性HIV-1 調査体制確立のための研究

分担研究者 下條 文武 新潟大学医歯学総合病院長

研究要旨

関東甲信越ブロック内の北関東・甲信越地区の新規あるいは未治療慢性 HIV-1 感染者における薬剤耐性変異ウイルスの頻度を調査するために、まず、新潟大学医歯学総合病院の患者でパイロット的に検査を施行し、陰性を確認した。対象地区のニーズに応える検査体制を整えて、耐性ウイルス蔓延の実態を明らかにしていきたい。

A. 研究目的

現在 HIV-1 感染症治療は、多剤併用療法が標準的治療法となっている。この治療法により AIDS による死亡率が激減したが、一方で薬剤耐性に陥る症例数の頻度も増加してきており、治療感染者からの薬剤耐性 HIV-1 の感染拡大が危惧されている。今回本研究では、新規あるいは未治療慢性 HIV-1 感染者における薬剤耐性変異の頻度を調査し、わが国における薬剤耐性 HIV-1 伝播の疫学的動向を明らかにする。

B. 研究方法

北関東・甲信越ブロックにおいて H15 年度から H16 年度に初めて HIV 感染が確認され、当院倫理委員会にもとづき同意書を作成し、同意を得た HIV 感染者を対象に、血液を採取。国立感染症センターの作成したプロトコールに基づき、逆転写酵素、及びプロテアーゼ遺伝子を RT-PCR 法により増幅し、その PCR 産物の遺伝子配列を決定する。既知の薬剤耐性変異と比較することにより、薬剤耐性変異の有無を判定する。

C. 研究結果

耐性検査施行した新規 HIV 感染者
H15 年度：新規 HIV 感染者 0 名
H16 年度：新規 HIV 感染者 3 名(途中経過)
うち 3 名とも新潟県内ブロック拠点病院からの依頼で、いずれも薬剤耐性変異は認められなかった。

D. 考察

当院の IRB 手続きに時間がかかり、本研究は端緒についたばかりである。北関東甲信越 HIV 症例検討会において、ブロック内拠点病院の関係医療従事者に協力をお願いし、検体収集の促進を試みたので、今後は対象症例の増加が見込まれる。新潟県保健環境科学センターのバックアップも期待でき、当ブロック新規感染者における耐性ウイルス蔓延の実態が明らかにされると考える。

E. 結論

新潟県において、15 16 年度に依頼があった新規感染 3 症例に関して、薬剤耐性は認められなかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金(エイズ研究事業)
分担研究報告書

北海道地区における薬剤耐性 HIV-1 調査耐性確立のための研究

分担研究者 小池 隆夫 北海道大学大学院医学研究科病態内科学講座・第二内科 教授
研究協力者 千葉 仁志 北海道大学病院検査部 (副部長)
吉田 繁 北海道大学病院検査部 (主任臨床検査技師)

研究要旨

本邦における薬剤耐性 HIV-1 の発生動向を把握のため、北海道ブロックにおける HIV 感染者数ならびに新規感染者数を調査したところ、平成 16 年 8 月末における北海道ブロックの HIV 感染者数は 124 名であり、平成 15 年度の増加率は前年比で 2.6 倍で、年々増加していることが確認された。また、北大病院に受診した新規感染者の HIV 薬剤耐性検査をおこなったところ 5.3% に耐性 HIV が確認されたことが明らかになった。

A. 研究目的

本邦における薬剤耐性 HIV-1 の発生動向を把握のため、北海道ブロックにおける新規 HIV 感染者数の動向ならびにそれら患者の HIV-1 薬剤耐性の解析を目的とする。

27 人、平成 14 年度 27 人、平成 15 年度 70 人(増加率前年比 2.6 倍)であった。2003 年 1 月～2004 年 10 月に北大病院を受診した新規 HIV 感染者は 19 名であり、うち 1 名に逆転写酵素領域の V108I を有する耐性 HIV (subtype B) が確認された。

B. 研究方法

北海道ブロックにおける 2003 年～2006 年度までの新規 HIV 感染者数を調査する。調査期間中に認められた新規 HIV 感染患者の血清および血球を凍結保存し、血清中に存在する遊離 HIV-1 の pol, gag, env 領域の遺伝子配列を解析し、薬剤耐性ならびに subtype の決定をおこなう。

(倫理面への配慮)

本研究は北海道大学医学研究科・医学部医の倫理委員会により承認されたものであり、担当医から患者へ研究の説明を行い、同意書に署名をしていただいた患者について検査をおこなっている。情報保護に関してはアクセスユーザー制限、パスワード設定、匿名コード化をおこなっている。

D. 考察

北海道ブロックは他ブロックと比較し、HIV 感染者数は少ないが、ここ数年で新規感染者が増加しており、その患者は道央、特に北大病院に集中している。新規患者の耐性 HIV 検出率は日本では 17% との報告があるが、今回の調査では低率であった。この原因としては耐性の定義が考えられる。V108I 以外にマイナーな変異も多数認められ、それらを耐性とするなら更に高率になることが考えられる。

C. 研究結果

平成 16 年 8 月末における北海道ブロックの HIV 感染者数は 124 名であり、分布は道央 78%、道北 7%、道東 10%、道南 5% であり、59% は北大病院の受診患者であった。新規 HIV 感染者は平成 13 年度

E. 結論

- 1) 北海道ブロックにおいても確実に感染者が増加している。
- 2) 感染者は道央に集中している。
- 3) 新規 HIV 感染者における耐性 HIV 検出率は 5.3% (1/19) であった。

F. 健康危険情報

なし

G.研究発表

1.論文発表

なし

2.学会発表

なし

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H.知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし