

比較においても、強い類縁性を疑わせる例は見  
出せなかった。

#### D. 考察

新潟県の人口当たりの新規 HIV 感染・発症率  
は全国平均に比べきわめて低く、過去保健所  
でおこなわれた 16,000 件を超える HIV 検査  
での陽性者の発見はわずかに 4 件で、2000  
年以降陽性例は見つかっていない。今回  
解析した検体もすべて医療機関を経由して  
得られたものである。感染発生数が低い  
理由のひとつは、あきらかに男性同性愛  
者の HIV 感染が少ない点にあり、検出さ  
れるウイルスも全国傾向と異なって、  
CRF01\_AE が優勢でサブタイプ B の比率  
が低い。このサブタイプ比が大きく異な  
る点は、本県の解析結果を全国データと  
比較する際とくに留意する必要がある。

長野、茨城両県は大都市圏以外では HIV  
感染・発症の多発地域であるが、今回調  
べた検体については、表 1 に示したよう  
に感染経路やサブタイプ比などに本県の  
ものと大きな違いはみられなかった。両  
県での発生数に比べて検体の解析数が少  
なく、サンプリングの偏りの効果を除く  
ために更なるデータの集積が必要である  
が、甲信越、北関東圏に共通する何らか  
の特殊要因も考えられ、この点に注目し  
つつ解析を続けたい。

検体の大部分が感染後 5 年以上経過した  
後に採取されていると推定される点は、  
結果が必ずしも現在の感染動向を的確に  
捉えていない可能性を残すばかりでなく、  
薬剤耐性変異ウイルスの浸淫状況の研究  
にとっても重大なマイナス要因となる。  
耐性変異はしばしばウイルスの fitness  
を低下させるため、無治療下での長い  
incubation period の間に消失している  
可能性があり、今回の重要な変異が検出  
されなかった結果についても、一定の留  
保をおく必要がある。RT 領域に検出さ  
れた T215E 変異については T215Y/F  
からの復帰変異である可能性に配慮す  
べきとの指摘がなされており、また多  
くの配列に検出された protease inhibitor  
に対する

minor 変異 M36I, L63P は薬剤治療中の  
患者に特に高率に見られる変異であり、  
単なる polymorphism と解することが  
できるか、若干の疑問が残る。

今回報告の分を加え、われわれがこれ  
までに解析した配列の中にきわめて強い  
類縁性を疑わせる例をいまだ観察して  
おらず、活動的な感染源は県内にはま  
れと考えているが、こうした観点の検  
討にとっても感染直後のウイルスの  
入手が望ましい。血液検査の勧奨を強  
めるなどの施策を行政に期待すると  
ともに、医療機関に対して可能な限  
り初診時にシーケンシング用の検体  
採取をおこなうよう働きかける必要  
があると考えられる。

#### E. 結論

薬剤感受性に重大な影響を与える変  
異が見出されなかった今回の解析結  
果は好ましいものではあるが、新潟  
県とその周辺における耐性ウイルス  
の浸淫状況を的確に捉えるためには、  
調査環境のいっそうの整備を要す  
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

北海道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 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**

2003 年からの北海道ブロックにおける新規 HIV 感染者は毎年 25 名前後発生しており、確実に増加していることが確認された。新規感染者の 78%は道央で発生しており約半数は北大病院受診患者である。2005 年度に北大病院を受診した新規未治療 HIV 感染者 9 名には薬剤耐性 HIV は検出されなかった。北大病院における 2003～2005 年度での薬剤耐性 HIV 検出頻度は 10.0%となった。

**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。

**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 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。

**C. 研究結果**

北海道ブロックの拠点病院へ新規感染者数に関するアンケートを行ったところ北海道ブロックでの新規感染者は 2003 年 27 名、2004 年 25 名、2005 年 10 月時点 24 名であった。新規感染者の発生状況を地域別に見ると道央 78%、道北 4%、道東 8%、道南 10%であり全体の 55%は北大病院受診患者であった。2005 年度に北大病院を新規受診した HIV 感染者は 13 名であり、うち 3 名が献血、1 名が保健所で確認された。新規受診者 13 名中 10 名が未治療（男性 9 名、女性 1

名）であり、感染推定経路は MSM が 70%と最も多かった。新規未治療感染者 9 名の HIV 薬剤耐性をおこなったところ耐性に大きく関与する耐性を有する HIV は確認されなかった。従って本院での 2003 年 1 月から 2005 年 12 月までの薬剤耐性 HIV 検出頻度は 10.0%となった。また、subtype は全て B であった。

**D. 考察**

北海道ブロックでの新規感染者数の増加は横ばいであるが、毎年 25 名前後発生している為、感染者数は確実に増加している。新規感染者は道央、特に北大病院に集中している。患者背景は前年度と比較し MSM の増加、若年化、初診時 HIV RNA の増加傾向が伺えた。新規未治療 HIV 感染者における薬剤耐性 HIV は 2003 年、2004 年に 2 例、1 例が検出されていたが、2005 年度は検出されず 3 年間の薬剤耐性 HIV 検出頻度は 10.0%となり、日本での 5.4%より若干高い頻度を示した。しかしながら母数が少ない為、北海道ブロックでのより正確な頻度を算出する為に新規感染者の補足率を上げ、継続調査をすることが必要と考えられた。

2005 年度に北大病院を受診した新規患者 13 名中 3 名が HBV との重複感染であった。HBV genotype は A であり subgenotype は Ae であった。HBV は STD であり、2005 年以前にも数は少ないものの重複感染は確認されていた。しかしながら genotype は日本で多く見られる C もしくは A 以外であり、2005 年度から A が検出された。近年 HIV 非感染の急性 B 型肝炎患者も同様に genotype A の感染者が多いことが報告されている。Ae は欧米で見られる genotype A であるため

性間感染により欧米から日本に持ち込まれ広がっていると考えられた。今後、新規感染者ではHBVの重複感染者が増加することが考えられる。一方、急性B型肝炎患者ではHIVの感染の有無を検査することが必要であり、HIVとの重複感染ではラミブジン治療の開始を慎重に行うことが必要と考えられた。

#### E. 結論

- 1) 北海道ブロックの感染者数は年間25名前後の割合で増加している。
- 2) 新規感染者数は横ばいである。
- 3) 感染者は道央に集中している。
- 4) 2005年度は薬剤耐性HIVは確認されなかった。
- 5) 2003～2005年での薬剤耐性HIV出現頻度は10.0%であった。
- 6) HBV/HIV重複感染者が増加傾向にあった。

#### 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

第52回 日本臨床検査医学会総会

「北大病院での新規HIV感染者における薬剤耐性HIV感染状況」

吉田 繁

#### 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

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

神奈川県における薬剤耐性 HIV-1 調査体制確立のための研究

分担研究者 近藤真規子 神奈川県衛生研究所

研究要旨

未治療 HIV 感染者における薬剤耐性 HIV の出現状況を調査するため、2003-2005 年の間に神奈川県内の 2 カ所の医療機関に来院した未治療の HIV 感染者 73 例 (2003 年 11 例、2004 年 32 例、2005 年 33 例) について薬剤耐性変異の解析を行った。

IAS-USA(2005)リストに基づき薬剤耐性変異の有無を調べた結果、PR 領域においては 73 例のほとんどに何らかの minor 変異が認められたが、薬剤耐性に深く関与する major 変異は 1 例も認められなかった。

RT 領域の薬剤耐性関連変異は K103N が 1 例、V118I が 2 例、V118I,K219Q が 1 例、計 4 例 (5.4%) に認められた。この内 K103N の検出された 1 例はスタンフォード大のデータベース解析においても 3 種類の非核酸系逆転写酵素阻害剤 (DLF、EFV、NVP) に耐性と判定された。

また、RT 領域に AZT 耐性変異である T215Y のリバータントと考えられる T215D が 2 例検出された。これらは AZT 投与歴のある症例からの感染の可能性が考えられ、今後も新規感染者における薬剤耐性変異の解析を継続することが重要である。

A. 研究目的

HIV 感染者の治療は逆転写酵素阻害剤 (RTI) とプロテアーゼ阻害剤 (PRI) を組み合わせた多剤併用療法が主流となっている。しかし、最近では薬剤の長期投与による薬剤耐性株の出現が大きな問題となり、また、新規感染者が薬剤耐性株に感染している症例も見つかってきている。欧米では新規感染者の数〜十数%が何らかの抗 HIV 薬に対する耐性変異が認められると報告されており、日本においても薬剤耐性 HIV 株の動向が注目されている。そこで、未治療 HIV 感染者における薬剤耐性 HIV の出現状況を調査するために、本研究に依頼のあった HIV 患者について HIV-1 遺伝子のプロテアーゼ (PR) および逆転写酵素 (RT) 領域の遺伝子解析を行った。

B. 研究方法

1) 調査対象

2003-2005 年の間に神奈川県内の 2 カ所の医療機関に来院した未治療の HIV 感染者 73 名 (2003 年 11 名、2004 年 32 名、2005 年 33 名)。

2) HIV-1 薬剤耐性変異の解析

患者血漿より HIV-1 遺伝子を抽出 (ハイピュア Viral RNA 抽出キット: ロシュ・ダイアグノスティックス) し、RT nested PCR 法 (One step RNA PCR キット: タカラバイオ) により PR および RT 領域を増幅後、ダイレクトシーケンス法

(BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit : アプライドバイオシステムズ) により塩基配列を決定した。PCR プライマーおよび PCR 条件は国立感染症研究所の方法に従った。

IAS-USA (2005)リストを基に PRI (IDV、RTV、SQV、NFV、APV、ATV)、核酸系逆転写酵素阻害剤 (NRTI:AZT、d4T、ddI、ddC、3TC、ABC、TDF、FTC)、非核酸系逆転写酵素阻害剤 (NNRTI:DLF、EFV、NVP) に関与する薬剤耐性変異の有無を確認した。また、同時にスタンフォード大学のデータベース (インターネット上で公開) を用い各種抗 HIV 薬に対する耐性度の判定と PR、RT 領域のサブタイプ型別を行った。

(倫理面への配慮)

患者の同意のうえ、当研究所に依頼のあった症例について薬剤耐性変異の解析を行った。また、本研究の全体を通してプライバシーの流出防止など患者の人権保護に十分配慮した。尚、本研究は当研究所の倫理委員会で承認されている。

C. 結果および考察

IAS-USA(2005)リストに基づき薬剤耐性変異について解析した結果、PR 領域においては、薬剤耐性に深く関与する major 変異は認められなかったが、minor 変異は 73 例のほとんどに認められた。minor 変異の出現数は M36I が 34 例と最も多く、次いで L63P が 21 例、V77I が 17 例、

K20R が 15 例、L10I が 7 例、A71V が 5 例、L10V が 3 例、L10F が 1 例、K20I が 1 例であった。これら 73 例はスタンフォード大学データベース解析において、7 種類の PRI (IDV、RTV、SQV、NFV、APV、ATV) に感受性と判定された。

RT 領域については薬剤耐性変異が 73 例中 4 例に認められ、その内訳は V118I が 2 例、V118I、K219Q が 1 例、K103N が 1 例であった。スタンフォード大学データベースでの解析では、K103N の検出された 1 例は 3 種類の NNRTI (DLF、EFV、NVP) に耐性と判定されたが、他の 3 例は RTI に感受性であった。

また、RT 領域に AZT 耐性変異である T215Y のリバータントと考えられる T215D が 2 例検出され、これらは AZT 投与歴のある症例からの感染の可能性が考えられた。

73 例のサブタイプの内訳は、サブタイプ B が 47 例、サブタイプ AE が 20 例、その他 6 例 (サブタイプ 1A、2C、1F、1AG、1KC) であった。

感染経路別では異性間性行為 32 例 (日本人 17 例、外国籍 15 例)、同性間性行為 29 例 (日本人男性 28 例、外国籍男性 1 例)、不明 12 例 (日本人男性 11 例、外国籍男性 1 例) であった。

薬剤耐性関連変異の認められた 6 例の内 4 例 (T215D の 2 例、V118I の 1 例、V118I、K219Q の 1 例) は同性間性行為感染 (日本人男性) で、4 例ともサブタイプ B であり、K103N と V118I が検出された 2 例は異性間性行為による感染であった。

#### D. 結論

2003-2005 年の間に神奈川県内の 2 カ所の医療機関に来院した未治療の HIV 感染者 73 例 (2003 年 11 例、2004 年 32 例、2005 年 33 例) について薬剤耐性変異の解析を行った。

PR 領域においては 73 例のほとんどに何らかの minor 変異は認められたが、major 変異は 1 例も認められなかった。

RT 領域の薬剤耐性変異は K103N が 1 例、V118I が 2 例、V118I、K219Q が 1 例、計 4 例 (5.4%) に認められた。この内 K103N の検出された 1 例はスタンフォード大のデータベース解析においても NNRTI に耐性と判定された。

また、AZT 耐性変異である RT 領域の T215Y のリバータントと考えられる T215D が 2 例検出され、これらは AZT 投与歴のある症例からの感染の可能性が考えられ、今後も新規感染者における薬剤耐性変異の解析を継続することが重要と考

えられる。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Kondo M, Sudo K, Nishizawa M, Shima T, Iwamuro S, Okabe T, Takebe Y, Imai M : Identification of Attenuated Variants of HIV-1 Circulating Recombinant Form 01\_AE That Are Associated with Slow Disease Progression Due to Gross Genetic Alterations in the *nef*/Long Terminal Repeat Sequences. J. Infect. dis. 192, 56-61 (2005).

##### 2. 学会発表

1) 須藤弘二、近藤真規子、嶋貴子ほか : Evaluation of a Real-time PCR assay, HPS COBAS TaqMan HIV-1 RNA in plasma、第 7 回アジア・太平洋地域エイズ国際会議、神戸、2005 年 7 月 1-5 日。

2) 宇宿秀三、近藤真規子、今井光信ほか : Long term genotypic discrepancy associated with drug resistance persisted between plasma HIV-1 RNA and HIV-1 proviral DNA in peripheral Blood mononuclear cells. 第 7 回アジア・太平洋地域エイズ国際会議、神戸、2005 年 7 月 1-5 日。

3) 近藤真規子、嶋貴子、武部豊、加藤真吾、今井光信 : Real-time PCR 法を用いた HIV-1 プロウイルス定量法—6 種類の HIV-1 サブタイプとプライマー、プローブの反応性の検討、第 53 回日本ウイルス学術集会・総会、横浜、2005 年 11 月 20-22 日。

4) 近藤真規子、嶋貴子、今井光信ほか : 各種サブタイプに対応できる Real-time PCR 法による HIV-1 プロウイルス定量法の検討、第 19 回日本エイズ学術集会・総会、熊本、2005 年 12 月 1-3 日。

5) 嶋貴子、近藤真規子、今井光信ほか : 新しい抗原抗体同時検出キットの検討および HIV スクリーニング追加検査への応用、第 19 回日本エイズ学術集会・総会、熊本、2005 年 12 月 1-3 日。

厚生労働省科学研究費補助金（エイズ研究事業）  
「東京都における薬剤耐性 HIV-1 調査体制確立のための研究」  
分担研究報告書

東京都内で検出された HIV-1 の Protease および Reverse Transcriptase 遺伝子解析

分担研究者 貞升健志  
研究協力者 長島真美，新開敬行，甲斐明美，諸角 聖  
(東京都健康安全研究センター)

研究概要

HAARTに代表されるHIVの薬物治療が効果を上げている反面，薬剤治療患者数の増大に伴い，薬剤耐性変異を有するHIVの新たな出現が問題となりつつある。

東京都では1987年より保健所で，1993年より夜間受診機関である東京都南新宿検査・相談室の無料匿名HIV検診を開始している。東京都の保健所等における検査陽性例は年々増加傾向にあることから，都内で流行しているHIVを遺伝子学的に調査する目的で，保健所等の検査陽性例より検出されたHIVのサブタイプおよびReverse transcriptase(RT)およびProtease(Pro)領域における薬剤耐性変異を検索した。2003年～2005年の陽性例193例について調査した結果，検出されたHIVの94.8%がサブタイプBで，RT領域においては薬剤耐性に起因する変異は認められなかったが，3例にT215Dの変異が認められ，Pro領域では1例にMajor mutationであるI50Vの変異を認めた。

A. 研究目的

薬剤治療を受診している HIV 患者数の増大に伴い，薬剤耐性変異を有する HIV の新規感染が大きな問題となりつつある。

都内保健所等の HIV 検査陽性例を対象として，HIV の薬剤耐性変異を検索し，都内における新規感染者における薬剤耐性ウイルスの出現状況を調査する。

B. 研究方法

1. 塩基配列の決定

都内保健所等の HIV 検査で陽性となった検体（血清）193例（2003年55例，2004年51例，2005年87例）を供試し

た。

各検体 400 $\mu$ l よりウイルス核酸 RNA を抽出後，nested PCR 法により Protease(Pro) および Reverse transcriptase(RT)領域を増幅し，特異バンドの精製を行い，精製 DNA を得た。Dye-terminator-cycle-sequencing 法を用いた Direct-Sequencing 法により精製 DNA の塩基配列を決定し，IAS-USA panel を基に，得られたアミノ酸配列の薬剤耐性変異の有無を検索した。

2. RT 領域の解析

使用したプライマーは POL1(AAGCCAGGAATGGATGGCCC) ，

POL2(GGATAAATCTGACTTGCCCAATT) ,  
POL3(AACAATGGCCATTGACAGAAG)および  
POL4(CCACTAACTTCTGTATGTCATT)である。

逆転写反作用プライマーとして、POL2  
を使用し cDNA 作成後、POL1 を加え  
1st-PCR を実施した。さらに POL3 およ  
び POL4 を用いて、2nd-PCR を実施した。

得られた塩基配列を基に、遺伝子解析  
ソフト MEGA3 (フリーソフトウェア、  
<http://www.megasoftware.net/>) を用  
いて系統樹を作成し、サブタイプを決定  
するとともに、RT 領域の 41~236 番目  
のアミノ酸の薬剤耐性変異の有無を調  
べた。

### 3. Pro 領域の解析

Pro 領域の増幅には、国立感染症研究  
所で開発された DRPR プライマーを使用  
した。すなわち、1st-PCR には DRPR05  
および DRPR02L を、2nd-PCR には DRPR01M  
および DRPR06 を使用し、Pro 領域の 1  
~90 番目のアミノ酸を解析した。

#### (倫理面の配慮)

なお、本研究の実施前に、東京都健康  
安全研究センター倫理委員会で、本研究  
に倫理的な問題のないことが承認され  
た。

## C. 研究結果

### 1. サブタイプ型別

都内保健所等の HIV 検査で陽性とな  
った HIV-1 193 例の RT 領域の分子系統  
樹解析を実施した結果、183 例がサブタ  
イプ B で、8 例がサブタイプ AE、2 例  
がサブタイプ C に分類された (図 1)。

### 2. RT 領域の薬剤耐性変異

IAS-USA panel を基に、RT 領域の薬剤

耐性変異を検索した結果 (図 2)、薬剤  
に起因する耐性変異は認められなかつ  
たが、IAS-USA panel の耐性変異部位で、  
K103Q/R が 3 例、V106I が 3 例、V108E  
が 2 例、Q151R が 1 例、G190V が 1 例、  
L210F/M が 9 例、T215D が 3 例、P236H  
が 1 例に変異が認められた。

なお、同変異が認められた例は、すべ  
てサブタイプ B で、サブタイプ AE およ  
び C では IAS-USA の耐性変異部位に変異  
は認められなかった。

なお、T215D が認められた 3 例は、RT  
領域に他の変異はなく、Pro 領域では  
V77I を有していた。

### 3. Pro 領域の薬剤耐性変異

Pro 領域について、遺伝子解析を実施  
した結果 (図 3)、Major mutation で  
は、I50V が 1 例 (0.5%) に認められた。  
Minor mutation では、L10I が 10 例、K20R  
が 4 例、M36I が 41 例、L63P が 72 例、  
A71V/T が 23 例、V77I が 64 例で認めら  
れた。なお、サブタイプ AE および C で  
は、M36I および L63P の変異は認められ  
たが、L10、K20、V71 および V77 の変異  
を有する例は認められなかった。

Major mutation である I50V の変異を  
有する症例が 1 例認められたが、本事例  
ではその他の変異として Minor  
mutation である L63P を有していたが、  
RT 領域における薬剤耐性変異は認めら  
れなかった。

## D. 考察

薬剤治療を受けている HIV 患者数の  
増大に伴い、薬剤耐性変異を有する HIV  
の出現が懸念されている。

都内保健所等の HIV 検査で陽性とな

った症例より検出された HIV -1 193 例の RT 領域の遺伝子解析を実施した結果、183 例(94.8%)がサブタイプ B に分類された。さらに、RT 領域の薬剤耐性変異を検索した結果、T215D の変異が 3 例(1.6%)で認められた。T215D は、薬剤耐性変異である T215F または T215Y の “revertant” として知られており、薬剤耐性変異ではないが、薬剤耐性に起因する変異として知られている。

今回、認められた T215D の変異を有する 3 症例は、T215D 以外に Pro 領域の V77I を有し、3 例ともに同様の耐性変異を有する症例であったことから、今回、得られた 3 症例が “revertant” であるのか、あるいは、同様のウイルスを起源に持つ症例なのかについては、今後も引き続き調査を実施していく必要がある。

#### E. 結論

都内保健所等の検診で陽性となった例から検出された HIV の薬剤耐性変異の出現頻度は、PR 領域では 0.5%、RT 領域では 0% (1.6% : T215D 変異を含めた場合) であった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

長島真美，貞升健志，新開敬行，秋場哲哉，吉田 勲，吉田靖子，矢野一好，甲斐明美，諸角 聖：東京都における HIV 検査成績(1999 年－2004 年)，東京都健康安全研究センター年報（印刷中）

##### 2. 学会発表

貞升健志，長島真美，新開敬行，秋場哲哉，甲斐明美，諸角 聖：東京都内で検出された HIV-1 の Protease および Reverse Transcriptase 遺伝子の解析，第 19 回日本エイズ学会学術集会・総会，2005



図1 Reverse transcriptase領域の分子系統樹解析

	Subtype		
	B	AE	C
2003年:55件	52	2	1
2004年:51件	48	3	0
2005年:87件	83	3	1
計:193件	183	8	2

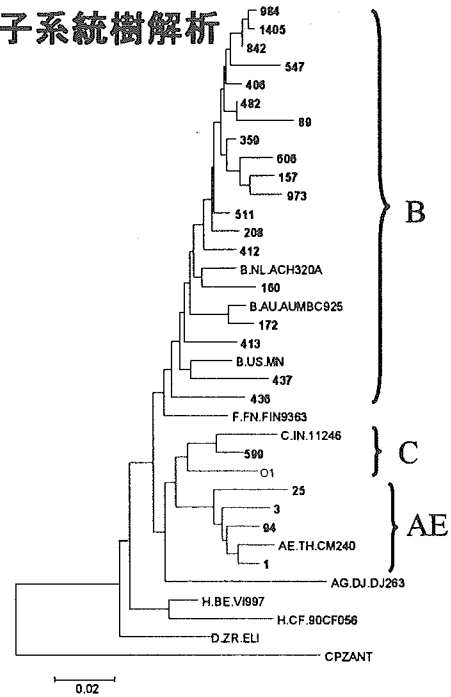


図2 Reverse transcriptase領域における遺伝子変異

Wild Type		M E A K D T K L V F L K V V V F V Q Y M Y G L T K P M P																											
		41	44	62	65	67	69	70	74	75	77	100	103	106	108	115	116	118	151	181	184	188	190	210	215	219	225	230	236
Amino Acid		L	D	V	R	N	D	R	V	I	L	I	N	A	I	F	Y	I	M	C	V	C	S	W	Y	Q	H	L	L
Substitution														Q	M					I		H		F	F	E			
														↓	↓	↓			↓					↓	↓	↓			↓
														R	I	E			R				V	M	D			H	
Total	193												3	3	2			1				1	9	3			1		
B	183												3	3	2			1				1	9	3			1		
AE	8																												
C	2																												

図3 Protease領域における遺伝子変異

Wild Type	Major mutation					Minor mutation													
	L 10	K 20	L 24	D 30	V 32	M 36	M 46	I 47	G 48	I 50	I 54	L 63	A 71	G 73	V 77	V 82	V 84	I 84	L 90
Amino Acid Substitution	F	M	I	N	I	I	I	V	V	V	V	P	V	S	I	A	V	M	
	I	R			L	L					L		T	A		F			
	R	I			V						V			C		T			
	V	L									A			S		S			
	T										M			T		S			
											T			A		V			
	I	R			I						P		V						
Total	193	10	4		41				1		72		23		64				
B	183	10	4		32				1		65		23		64				
AE	8				7						5								
C	2				2						2								

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

近畿地区における薬剤耐性検査体制確立のための研究

分担研究者 白阪琢磨 国立病院機構大阪医療センター HIV/AIDS 先端医療開発センター長

研究要旨

HIV 感染症の治療の進歩によって HIV 感染症は慢性疾患ととらえられる様になったが、副作用の出現や長期に適切な服薬の実施な種々の理由で困難となり、ウイルス学的失敗やウイルス量の再上昇を来し薬剤耐性変異が出現する場合がある。本研究では国立大阪医療センターで平成 16 年度および 17 年度に実施した薬剤耐性検査の実状を調査し、検査の臨床的意義につき検討を行った。治療歴のない患者でも抗 HIV 薬に高度に耐性となる変異が観察された例もあり、治療開始前に薬剤耐性検査の実施は有意義であると示唆された。平成 18 年度から薬剤耐性検査が診療報酬の対象となると伝えられている。来年度は症例を増やし、特に、初期感染例や未治療例での薬剤耐性変異株の検討を行い、近畿ブロックでの耐性検査の支援体制の構築を目指す。

A. 研究目的

HIV 感染症は抗 HIV 療法の進歩によって慢性疾患になったと捉えられているが、実際には種々の理由から適切な服薬を継続できずにウイルス学的治療失敗となり、その結果、投与薬剤に耐性な HIV 変異株が出現する事が知られている。この薬剤耐性 HIV 変異株は他剤にも交叉耐性を示すことが、しばしばある事が明らかとされ、临床上重要な課題となっている。本研究の最終目標は、近畿ブロックの HIV 感染者、AIDS 患者を対象に必要な患者に薬剤耐性検査を実施でき、かつ、その検査結果を臨床に反映できる様な薬剤耐性検査システムを構築することである。昨年度、薬剤耐性検査の適応につき検討した。近年、未治療患者での薬剤耐性変異 HIV 感染が問題となっている。本研究でも未治療者の耐性変異につき検討を行い、未治療患者での薬剤耐性検査の意義につき明らかにする。

B. 研究方法

独立行政法人国立病院機構大阪医療センター（以下、国立大阪医療センター）での薬剤耐性検査の実施状況を調査した。薬剤耐性検査方法は、患者から採血後直ちに血漿を分離し、ウイルス RNA を抽出後、特定のプライマーを用いて RT-PCR 法で HIV の逆転写酵素および HIV のプロテアーゼを支配する遺伝子を増幅し、増幅された DNA の塩基配列をサンガーの方法を用いて Direct sequencing 法によって決定した。決定された塩基配列を既報告の薬剤耐性に関連する変異と照合し、耐性変異の有無につき主治医に報告した。PCR に用いるプライマーの塩基配列は HIV のコンセンサス塩基配列に基づいた逆転写酵素、蛋白分解酵素の支配領域から決定されたものを用いた。平成 17 年度に国立大阪医療センターで薬剤耐性検査を実施した症例につきカルテから情報を収集し検討した。いずれも個人情報の取り扱いについ

ては厳重に行った。

C. 研究結果

①患者数の推移

国立大阪医療センターを受診した患者数の推移と今後の予測を示した（図-1、図-2）。新規受診患者数は平成 15 年度に 130 名、平成 16 年度に 144 名、平成 17 年度（4 月から 12 月末日まで）は 140 名であった。累積患者数は 834 名であった。内訳では、男性 774 名（92.8%）。女性 60 名（7.2%）。年齢別では 30 代が最多の 366 名（43.9%）、40 代が 202 名（24.2%）、20 代が 138 名（16.5%）であり、これらの年齢層が全体の 84.7%を占めた（図-3）。初診時年齢別では 30 歳台が 318 名（38.1%）、20 歳台が 260 名（31.2%）で 7 割を占めていた（図-3）。問診からの感染経路では性的接触が 713 名（85.5%）であった。中には薬物使用例があった。感染経路が性的接触の場合は、同性間が 78.5%、異性間が 21.5%であった。

②患者の初診時居住地、紹介元施設等の内訳

初診時の居住地は大阪府が 579 名（69.4%）（この内で大阪市内が 351 名）、近畿ブロックの他府県からが 214 名（25.7%）、他のブロック等からが 41 名（4.9%）であった（図-4）。紹介元別では保健所等からが 114 名、拠点病院からが 204 名、診療所および病院からが 356 名、他ブロックや ACC からが 42 名などであった（図-5）。

③抗 HIV 薬剤の使用状況

毎年のように新薬が登場し HIV 治療ガイドラインも改訂されてきた。国立大阪医療センターでも使用薬剤と組み合わせは、年々変化してきた（図-6、図-7）。抗 HIV 薬を同センターで処方された人数は平成 10 年は 69 人、平成 11 年 109 人、平成 12 年 130 人、平成 13 年 171 人、平成 14 年 208 人、平成 15 年 248 人、平成 16 年（12 月末まで）288 人であった。平成 17 年の組み合わせの上位には 1 日 1 回処方の組み合わせが増加した（図-9）。

#### ④薬剤耐性検査の実施状況

平成9年度から平成17年度(10月末現在)まで648件の薬剤耐性検査を実施した。平成16年4月1日から平成17年10月30日までで合計163件の検査を実施した。初診が84件、治療中あるいは治療後が79件であった。初診例84件の中で未治療例が82件、前医で既に治療開始例が2件あった。治療中あるいは治療後の79件では、58例で、耐性検査回数は1人平均1.36回(1~3回)であった。

#### ⑤薬剤耐性検査結果

1) PCRの増幅結果 耐性検査を行った163件の中で逆転写酵素あるいはプロテアーゼ酵素の領域のいずれかあるいは両者の増幅が出来なかったのが20件であった。両領域の増幅できなかったのは9件あり、いずれもウイルス量が低値(7件が50コピー/mL未満、2件が300あるいは1200コピー/mL)であった。残りの11件では逆転写酵素領域かプロテアーゼ領域の一部が増幅できなかった。これらのウイルス量は240コピー/mLから100,000コピー/mL(平均 $2.0 \times 10^3$ )であった。逆転写酵素領域が増幅できなかった3件の内で2件は部分的増幅不良であった。プロテアーゼ領域の増幅不良が8件であった。これらの11件では部分的増幅不良でありPCRに用いるプライマーとDNAの塩基配列のミスマッチが原因である可能性が示唆された。

2) 変異 初診未治療82例を対象に既知の薬剤耐性関連変異として、逆転写酵素領域で21アミノ酸(コドン41、62、65、67、69、70、74、75、77、103、106、108、116、151、181、184、188、190、210、215、219)、プロテアーゼ酵素領域で13アミノ酸(コドン10、20、24、30、36、46、48、54、63、71、82、84、90)につき検討した。結果を図10に示した。逆転写酵素領域ではコドン215の変異が8件(10%)、コドン69が6.5件(8.1%)、コドン106が5件(6.3%)、コドン103が4件(5%)などであった。プロテアーゼ領域では薬剤耐性と関連しない変異が多いとされるコドン36とコドン63を除けば、コドン10の変異が11件(14%)、コドン71が9件(11%)などであった。プロテアーゼ領域のコドン36とコドン63を除く32コドンのいずれかに変異を求めたものは37件であった。

#### D. 考察

今年度は国立大阪医療センターでの平成16年4月から平成17年10月末日までの薬剤耐性検査(遺伝子型)の実状を調査した。本センターは平成9年に近畿ブロックのブロック拠点病院に選定され、患者数の年々増加に伴い薬剤耐性検査件数も増加したが、近年むしろ減少傾向となっていた。原因として、外来での服薬指導や療養支援によってアドヒアランスが向上した事、薬剤開発によって服用が以前に比べ容易になった事、ウイルス効果の優れた抗HIV薬

が開発された事などが推定される。昨年度の研究から、ウイルス学的失敗例での薬剤耐性検査は薬剤変更の参考となる事が示され、一過性のウイルス量の低値再上昇例では明らかな薬剤耐性変異を見いだす事がない事が示された。今年度、初診未治療に付き検討を行い薬剤耐性変異を認めた。今回、初診未治療82件で薬剤耐性に関連があると報告されている主な耐性変異の中でプロテアーゼ領域のコドン36とコドン63を除く32コドンについて検討を行ったところ、いずれかに変異を求めたものは37件であった。薬剤耐性変異と報告されていない変異もあり薬剤耐性との関連は明らかではない。また既に薬剤耐性と報告されている変異でも、薬剤への耐性度が大きいものから、あまり変異を示さないものまでであるので、結果の解釈は慎重である必要があると考えられる。今回検討を行った初診未治療例では、プロテアーゼ酵素領域では高い耐性を獲得する変異(D30N、M46I/L、V82AFTS、I84V、L90Mなど)は観察されなかったが、逆転写酵素領域に3TCに高度耐性のM184V(3例)やEFVなどNNRTIに共通して高度耐性を示すK103N(2例)が認められた。今後、治療歴のない患者に抗HIV療法を開始する際には、前もって薬剤耐性検査を実施する必要性が強く示唆された。今回の検討は82例と少数であるので、症例を増やしさらなる検討が必要と考える。

#### E. 結論

国立大阪医療センターで平成16年4月から平成17年10月末日までに実施した163件の中でウイルス量低値であった9例を除く11件でPCRによる増幅が出来なかった。その理由としてプライマーの問題が示唆された。初診時に未治療(と考えられた)症例でも薬剤耐性関連変異が少なからず観察され、逆転写酵素阻害薬3TCやEFVなどに耐性の変異が観察され、今後は治療開始前に薬剤耐性検査の実施が必要であると考えられた。近畿圏内で患者数の更なる増加が予想されている。来年度から薬剤耐性検査が保険適応となり多くのHIV診療施設で薬剤耐性検査の実施が可能となるが、薬剤耐性検査実施のタイミングと結果の解釈が重要であり、これらの知識の周知と、特に結果の解釈についての支援体制が必要であると考えられる。

#### F. 健康危険情報

該当なし

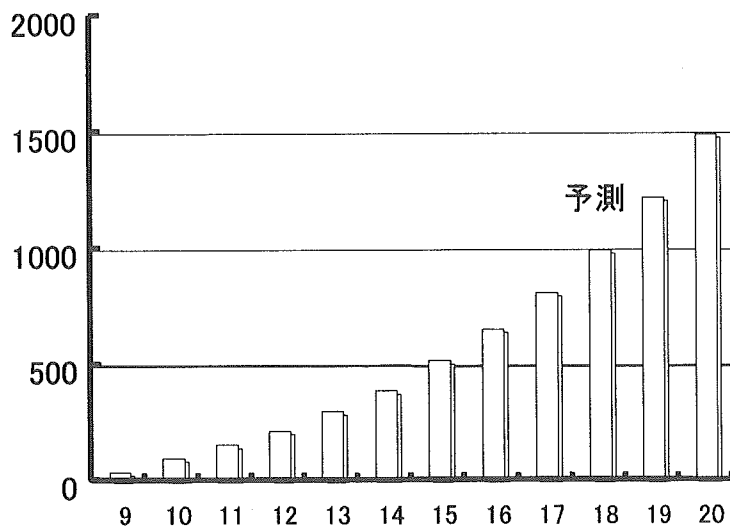
#### G. 研究発表

学会発表なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

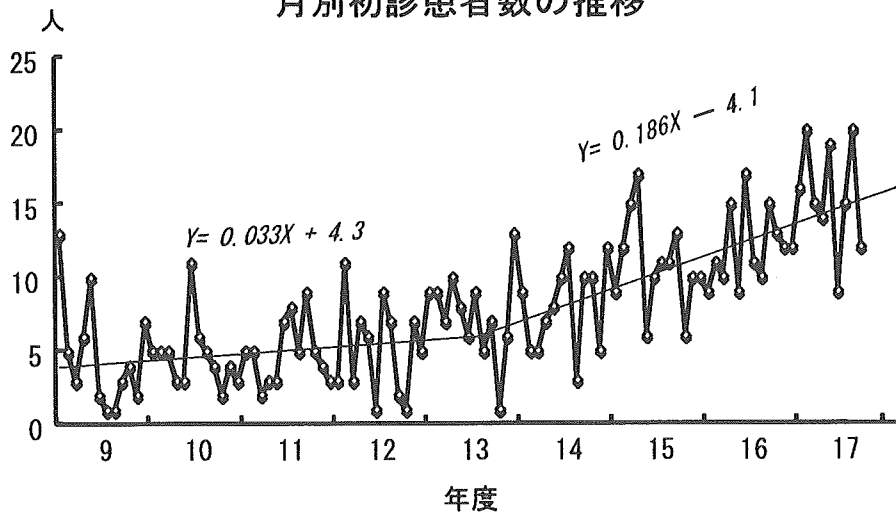
該当なし

### 累積患者数の推移



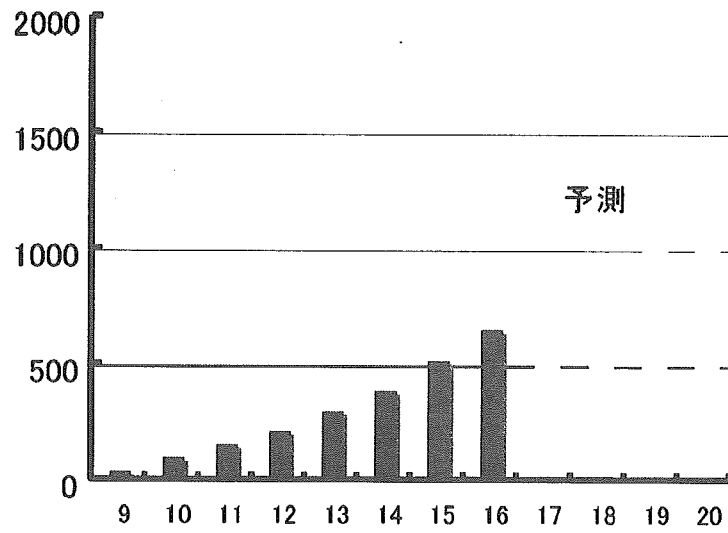
独立行政法人 国立病院機構 大阪医療センター

### 月別初診患者数の推移



独立行政法人 国立病院機構 大阪医療センター

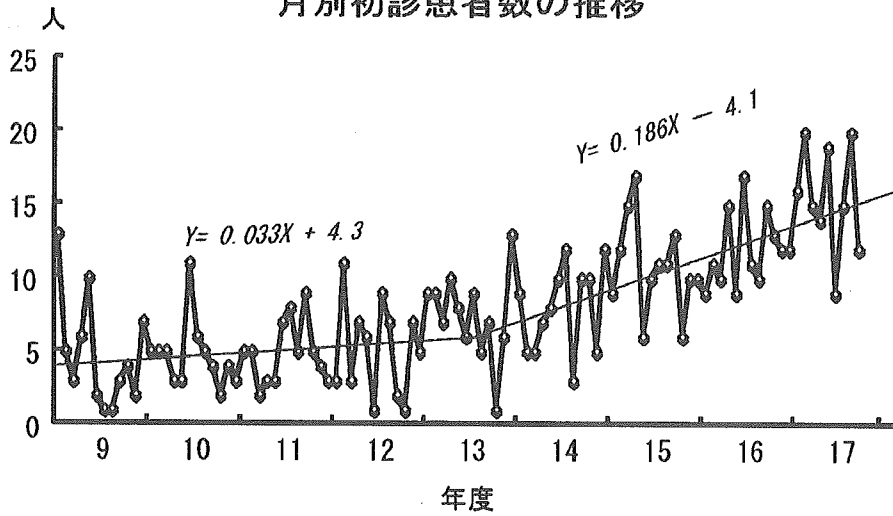
## 累積患者数の推移



独立行政法人 国立病院機構 大阪医療センター

図1 患者累積数の推移

## 月別初診患者数の推移



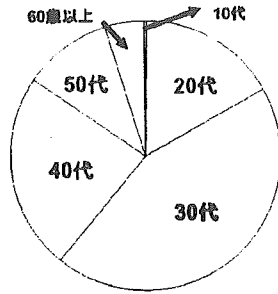
独立行政法人 国立病院機構 大阪医療センター

図2 月別初診患者数の推移

## 外来受診状況

H17.10.31 802名

・性別	人数 (%)	・年齢別	人数 (%)
男性	744 (92.8)	10代	2 (0.2)
女性	58 (7.2)	20代	132 (16.5)
・感染経路別	人数 (%)	30代	354 (44.1)
血液製剤	74 (9.2)	40代	191 (23.8)
(10.6)		50代	85
その他	728 (90.8)	60代～	38 (4.7)



・初診時年齢別	人数	(%)
0-19	17	(2.1)
20-29	251	(31.3)
30-39	300	(37.4)
40-49	148	(18.5)
50-59	66	(8.2)
60～	20	(2.5)

独立行政法人 国立病院機構 大阪医療センター

図3 外来受診状況

## 紹介元施設の内訳

(平成17年8月末日現在、778名)

### 内訳

保健所	102名
拠点病院	192名
一般医療機関	335名
献血	26名
NGO・その他	82名
ブロック拠点病院・ACC	41名

独立行政法人 国立病院機構 大阪医療センター

図4 初診時居住地

## 初診時居住地

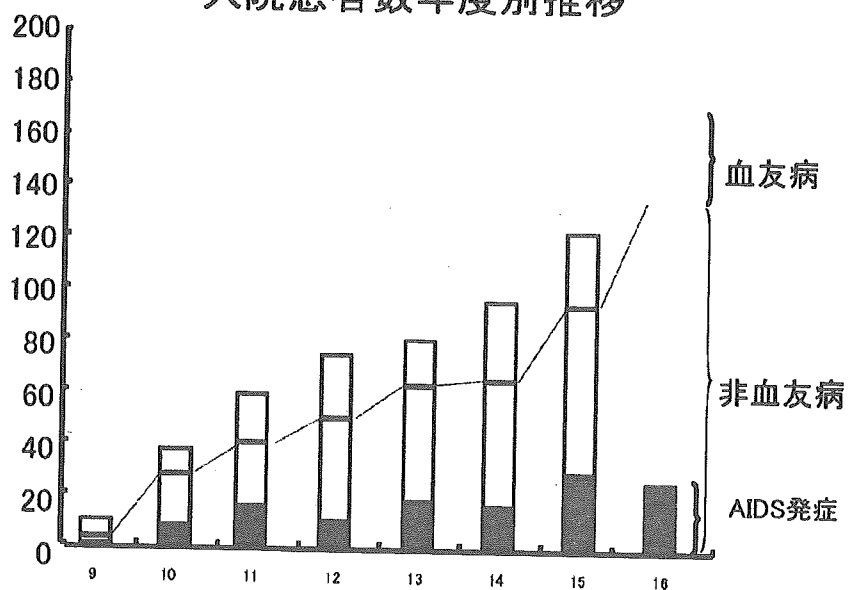
大阪府	534	北海道	0
(大阪市内)	326)	東北	1
滋賀県	6	関東甲信越	14
京都府	57	北陸	3
兵庫県	110	東海	7
奈良県	18	中四国	10
和歌山県	13	九州	2
		海外	1

(平成17年8月末日現在、778名)

独立行政法人 国立病院機構 大阪医療センター

図5 紹介元施設の内訳

## 入院患者数年度別推移



独立行政法人 国立病院機構 大阪医療センター

図6 入院患者数年度別推移



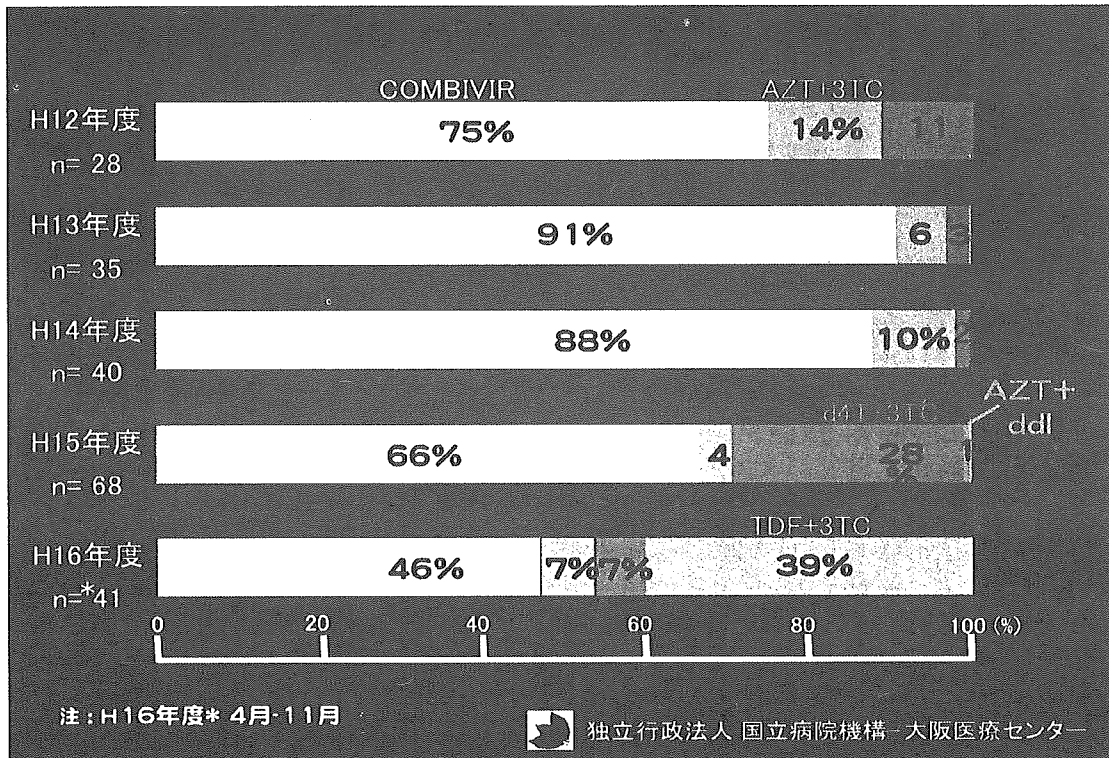


図7 初回治療における NRTI 使用頻度

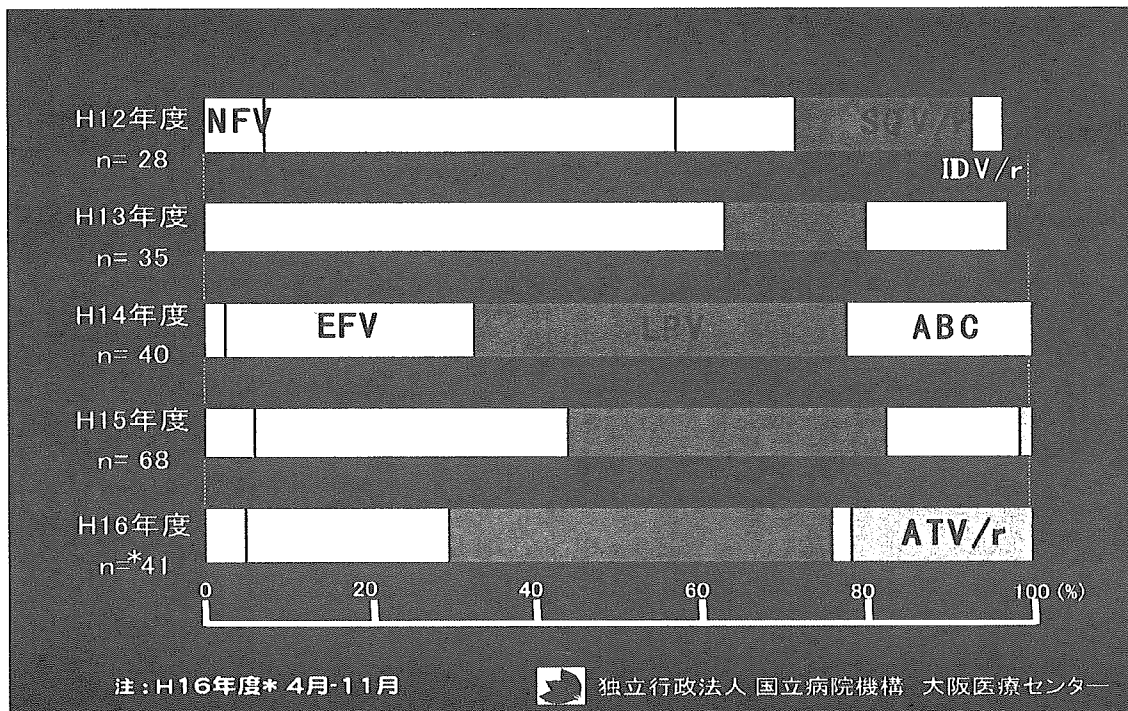


図8 初回治療における PI および NRTI 使用頻度

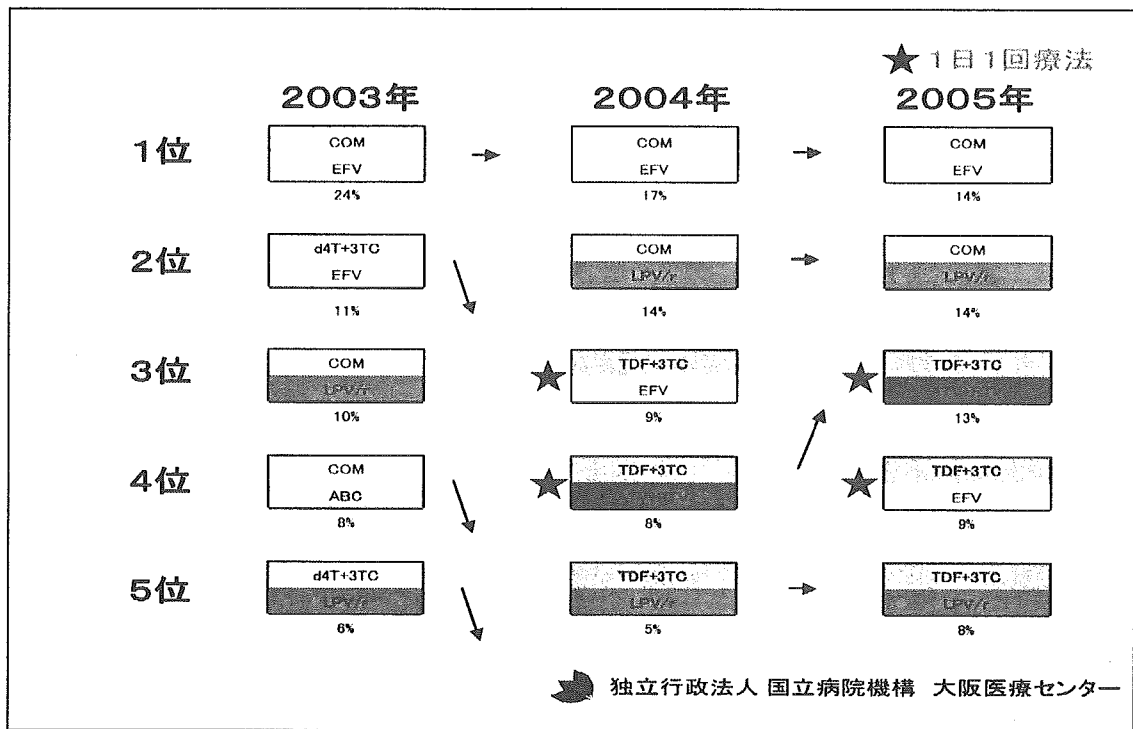


図9 年度別組み合わせ上位

## 薬剤耐性検査(初診未治療82名)

RT (n=80)

2例で増幅出来なかった

M41	A62	K65	D67	T69	K70	L74	V75	F77	K103	V106	V108
0	0	0.5	1	6.5	1	1	0	0	4	5	1.5
0	0	0.63	1.25	8.13	1.25	1.25	0	0	5	6.25	1.88 %

F116	Q151	Y181	M184	Y188	G190	L210	T215	K219
0	0	0	3	0	1	0	8	1
0	0	0	3.75	0	1.25	0	10	1.25 %

Protease (n=79)

3例で増幅出来なかった

L10	K20	L24	D30	M36	M46	G48	I54	L63	A71	V82	I84	L90
11	2	0	0	22	0	0	0	72	9	2	0	0
13.9	2.53	0	0	27.8	0	0	0	91.1	11.4	2.53	0	0 %

図10 薬剤耐性検査結果(初診未治療者)

厚生労働科学研究費補助金（エイズ研究関連事業）  
分担研究報告書

沖縄における薬剤耐性検査体制確立のための研究

分担研究者 健山 正男<sup>1)</sup> 琉球大学大学院医学研究科 感染症制御学講座  
分子病態感染症学分野 助教授

研究協力者 比嘉 太<sup>1)</sup>、原永修作<sup>1)</sup>、宮城一也<sup>1)</sup>、那覇 唯<sup>1)</sup>、仲宗根 力<sup>1)</sup>、  
上江洲 香織<sup>1)</sup>、前城達次<sup>1)</sup>、佐久川 廣<sup>2)</sup>、藤田次郎<sup>1)</sup>

<sup>2)</sup>琉球大学医学部附属病院輸血部

### 研究要旨

沖縄県のHIV感染者/AIDS患者は人口10万人あたりの患者数はともに2.60人で前者では全国16番目、一方、後者で10番目と高い。観光地であるという特性から、国内、または海外から、薬剤耐性HIV-1が持ち込まれる可能性が危惧されている。今回、我々は当地での薬剤耐性の現状を把握するため、新規感染者における薬剤耐性サーベイランスを実施した。対象期間は2004年10月1日～2006年1月31日までで、同期間に16名が当院にHIV/AIDS患者として初診外来受診した。その内、新規感染者の定義を満たすのは13名であった。薬剤耐性HIV-1検査を施行したのは9名であり、検査結果として薬剤耐性HIV-1は検出されなかった。琉球大学附属病院はエイズ拠点病院として県内の患者の80%を診療しており当院における検査結果は県内の状況を反映していると考えられ、沖縄県は今回の検査結果からは薬剤耐性HIV-1の未浸淫地域と推定された

#### A. 研究目的

新規HIV感染者における薬剤耐性変異の頻度を調査し、当院のHIV感染者/AIDS患者におけるHIV伝播の疫学的傾向を明らかにする。

#### B. 研究方法

1. 当院を日本薬剤耐性HIV-1調査研究グループとして登録した。
2. 新規登録患者の定義：対象期間内（2004年10月1日以降2006年1月31日）に初めて感染が確認された者。
3. 検体のサンプリングポイント。
  - a). 初診時
  - b). 治療開始時
4. 新規登録患者において、本調査の参加の同意を文書にて取得した。
5. 3. a)または b)のポイントで採血し国立感染症研究所エイズ研究センター第2研究グ

ループにて薬剤耐性HIV-1検査を行った。

#### C. 研究結果

対象期間内に当院外来を受診したHIV/AIDS患者は16名であった。その内、新規登録患者の定義を満たした13名中、9名を今回の調査に登録し検査を施行した。検体のサンプリングポイントは、全員、治療開始前に設定した。

薬剤耐性HIV-1検査を施行した9名の背景と結果を表1に示した。性別では全員が男性で平均年齢は39.6歳であった。感染経路は全員が同性間感染であった。病期はHIVキャリアーが6名、AIDSが3名であった。CD4数の平均値は275.0/ $\mu$ l、一方 HIV-RNA定量の平均値は $2.4 \times 10^4$  コピー/mlであった。また薬剤耐性HIV-1検査では耐性は認めなかった。さらにHBVとの重複感染は全員に認めなかった。

#### D. 考察

沖縄県におけるHIV感染者の増加は1999年より顕著となり、2005年までの人口10万人あたりのHIV感染者/AIDS患者は前者で2.60（全国16番目）、後者で2.60（全国10番目）と高い。特にAIDS患者では関東甲信越ブロック（10都道府県）を除くと最も高い発生率となっている（平成16年エイズ発生動向年報：エイズ動向委員会）

琉球大学附属病院はエイズ拠点病院として県内の患者の80%以上を診療しており当院における検査結果は県内の状況を反映していると思われるので、今回の検査結果から沖縄県は現時点において薬剤耐性HIV-1の未浸淫地域と推定された。本県は観光地でもあり国内、国外からの人の入域が活発であり、薬剤耐性HIV-1が持ち込まれる可能性が危惧されている。今回は琉球大学附属病院のみにおける調査であったが、本年の下半期には県内における拠点病院、保健所をネットワーク化して本調査に組み込み、県内における全ての新規登録患者の調査を行うべく準備を進めている。

また今回の調査ではHBVとHIVの重複感染は認めなかったものの、調査期間直前の2004年8月にHBV genotype AとHIVの重複感染例を1例経験している。本邦において全国的にはHBVの遺伝子型はほとんどがgenotype Cであるが、沖縄ではgenotype Bが6割以上である。近年アフリカ・ヨーロッパに多いgenotype Aが日本でも報告されるようになってきており、この感染経路としては東南アジア経由から日本の風俗産業などに流入し、商業的な性的接触感染経路での感染拡大が問題となっている。特に東京・大阪・福岡など大都市部での報告が多くなってきている。またgenotype Aは約10%の患者で初感染後に慢性・持続感染することが認められており、我々の症例も初感染後に慢性・持続感染した例であった。Sexually transmitted diseases (STD)として詳細な問診を取得することにより、本患者は同性愛者であり、かつ複数

の同性との性的接触があることが判明しHIV検査を追加して重複感染であることを明らかにした。

STDの指標としてHBVのgenotype Aのサーベイランスは薬剤耐性HIV-1の伝搬と連動する可能性が高い。現在、当院で経験したHBVの急性、慢性肝炎を解析した結果、3例にgenotype Aを認めた。今後もこの動向を注視しつつ、さらに解析を進めていく予定である。

#### E. 結論

1. 薬剤耐性HIV-1検査が判明した9人では薬剤耐性HIV-1は認めなかった。
2. 沖縄県は現時点（2006年2月5日現在）において薬剤耐性HIV-1の未浸淫地域と推定された。

#### F. 健康危惧情報

無し

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

無し

##### 2. 学会発表

- a) 原永修作、曾木美佐、當山真人、新里 敬、比嘉 太、健山正男、斎藤 厚。  
上腸間膜静脈および門脈血栓症をきたしたAIDS症例の1例。感染症誌、79:217-218、2005
- b) 原永修作、古堅 誠、城間留奈、當山真人、新里 敬、比嘉 太、健山正男、斎藤 厚。  
当院における肺限局の免疫再構築症候群の検討。日呼吸会誌、43:250、2005
- c) 比嘉 太、原永修作、屋良さとみ、古堅 誠、城間留奈、當山真人、東 正人、新里 敬、仲村浩明、健山正男、兼島 洋、斎藤 厚。  
ニューモシスチス肺炎における気管支内視鏡診断。気管支学、27:201、2005
- d) 原永修作、健山正男。HAART開始後に二度の免疫再構築症候群をきたしたと考えら