

れる肺MAC症の1例. 日本エイズ会誌.
7:316、2005

H. 知的財産権の出願・登録状況

無し

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

表 1. 新規登録患者の背景と薬剤耐性 HIV-1 結果

No	性別	年齢	感染経路	stage	CD4数/ μ l	HIV-RNA 定量 (コピー/ml)	薬剤耐性 HIV-1 結果
1	男	43	同性間	carrier	313	3.3×10^4	耐性無し
2	男	23	同性間	carrier	269	1.1×10^4	耐性無し
3	男	41	同性間	carrier	280	7.2×10^3	耐性無し
4	男	45	同性間	carrier	964	1.2×10^4	耐性無し
5	男	26	同性間	carrier	261	5.1×10^3	耐性無し
6	男	41	同性間	carrier	133	1.5×10^3	耐性無し
7	男	48	同性間	AIDS	66	4.1×10^4	耐性無し
8	男	38	同性間	AIDS	113	3.1×10^4	耐性無し
9	男	51	同性間	AIDS	76	7.0×10^4	耐性無し

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

大阪府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 森 治代（大阪府立公衆衛生研究所ウイルス課）
研究協力者 小島洋子、川畑拓也、大竹 徹（同上）

研究概要

2003年 2005年に感染が判明した新規 HIV-1 感染者 55 例について genotype 薬剤耐性検査を実施した結果、プロテアーゼ阻害剤および非核酸系逆転写酵素阻害剤に対する耐性関連アミノ酸変異がそれぞれ 1 例ずつ認められた。さらに、2 例において核酸系逆転写酵素阻害剤に対する耐性変異の revertant と考えられる変異が検出された。

A. 研究目的

多剤併用療法(HAART)の普及により HIV-1 感染症の治療は飛躍的に進歩し、多くの HIV-1 感染者において長期間にわたりウイルスの増殖をコントロールすることが可能となった。その一方で、治療の長期化に伴い薬剤耐性 HIV-1 を保有する感染者が増加し、新規感染者への耐性ウイルスの感染拡大が懸念されている。欧米諸国では数% 20 数%の新規 HIV-1 感染者に耐性ウイルスが検出されるとの報告があるが、我が国ではこれまで積極的な調査がなされてこなかった。

今回、新規感染者における薬剤耐性 HIV-1 の出現頻度の動向について全国レベルでの疫学調査を実施するにあたり、近畿ブロック(主に大阪地域)として調査に参加した。

B. 研究方法

2003年1月から2005年12月の間に感染が判明し医療機関を受診した未治療新規 HIV-1 感染者 55 例(治療開始後 5 日、21 日および 3 ヶ月の 3 例を含む)について、

本人から同意を得た上で血液を採取し、genotype 薬剤耐性検査を実施した。すなわち、血漿中のウイルス RNA を鋳型にして治療薬が標的とするプロテアーゼ (PR) 領域および逆転写酵素 (RT) 領域を RT-PCR により増幅し、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した後、IAS-USA パネル 2005 年版に基づいて薬剤耐性アミノ酸変異の有無を判定した。

(倫理面への配慮)

本研究は、大阪府立公衆衛生研究所の倫理委員会の承認を受けている。

C. 研究結果

2003 年、2004 年および 2005 年に HIV-1 感染が判明した 16 例、15 例、24 例の計 55 例について、genotype 薬剤耐性検査を実施した。その結果、55 例中 44 例(80.0%)の PR 領域および 9 例(16.4%)の RT 領域において薬剤耐性関連部位にアミノ酸変異が認められたが、その大部分は polymorphism と思われる変異であり、major mutation とされるものは 2003 年に

検出されたプロテアーゼ阻害剤耐性に関連する M46I 変異および非核酸系 RT 阻害剤耐性に関連する V108I 変異の 2 例 (3.6%) のみであった (表 1)。また 2004 年と 2005 年には、いわゆる major mutation ではないものの、RT 領域において T215L および C の変異が 1 例ずつ検出された (表 1)。これらの変異は、核酸系 RT 阻害剤に対する耐性変異である T215Y/F の revertant である可能性が考えられた。

D. 考察

新規 HIV-1 感染者における薬剤耐性ウイルス保有状況を調査する目的で、2003 年から 2005 年の 3 年間に HIV-1 感染が判明した 55 例について genotype 薬剤耐性検査を実施したところ、2 例において耐性ウイルスの感染を示唆するアミノ酸変異が検出された。さらに、RT 阻害剤の耐性変異である T215Y/F の revertant と考えられる T215C/L 変異が 2 例において認められた。2002 年以降、同様の変異 (T215C/D/E/L/S) が HIV 抗体確認検査の陽性検体中にも数例見つかっており、近年増加傾向にある。これらの中には感染初期と思われる症例も含まれていることから、新規感染者への revertant virus の伝播が示唆された。Revertant virus 自身は薬剤感受性であるとされているが、野生株に比べ逆転写酵素阻害剤に対する耐性を獲得しやすい可能性が考えられるため、治療を開始する際には注意が必要であると思われる。

今回薬剤耐性変異が検出された新規 HIV-1 感染者は全体の 3.6% (revertant 変異を含めると 7.3%) であり、欧米での報告に比べると低い数字であった。しかしながら、調査した症例の約 40% は感染が判明した時点ですでに CD4 数が 200 以下であり、感染後かなりの期間が経過していることが推測された。この場合、もし耐性ウイルス

が感染していたとしても血漿中のウイルスはすでに野生型が優勢となり、通常の genotype 検査では耐性変異が検出されない可能性が考えられる。

新規感染者における薬剤耐性 HIV-1 の出現頻度をより正確に把握するためには、感染者の補足率を上げるとともに、感染早期における検査が重要であると思われる。

E. 健康危険情報

なし

F. 学会発表

1. 森 治代、小島洋子、川畑拓也、大竹 徹、未治療感染者から検出された V108I 変異が非核酸系逆転写酵素阻害剤耐性獲得に及ぼす影響、第 19 回近畿エイズ研究会、京都、2005
2. Haruyo Mori, Yoko Kojima, Takuya Kawahata, Toru Otake, Influence of V108I mutation in a treatment-naive HIV-1-infected patient on the development of NNRTI-resistance, 7th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific, Kobe, 2005, Abstract No. SaPA0045

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

九州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 山本 政弘、国立病院機構九州医療センター

研究協力者 南 留美、堀田 飛香 国立病院機構九州医療センター

研究要旨 HAARTによりエイズへの進行阻止が可能となった。一方で薬剤耐性ウイルスを持つ患者が増加し新規感染者のなかにも耐性ウイルスを持つ症例が認められるようになった。九州地区の新規感染患者における薬剤耐性変異の頻度を評価するため当院での新規感染患者の薬剤耐性変異の評価を2003年以降、行っている。2003年以降、頻度の増加はないが、有意な耐性変異をもつ新規感染患者が認められるようになった。

A. 研究目的

九州地区における急性 HIV-1 感染者および未治療慢性 HIV-1 感染者における薬剤耐性変異の頻度を調査し、薬剤耐性 HIV-1 伝播の疫学的動向を明らかにする。同時にウイルスサブタイプの解析を行い九州におけるサブタイプの頻度について考察する。

B. 研究方法

2005年に当院免疫感染症科を受診した未治療慢性 HIV-1 感染患者および急性 HIV-1 感染患者を対象に、informed consentのもとに採血を行い、血清中 HIV-1 の protease 領域、逆転写 (RT) 領域の薬剤耐性遺伝子解析を行った。薬剤耐性変異の評価は IAS-USA2003 年度および 2005 年度版を参考にした。同時に EnvC2V3 領域、Gag p17 領域、Pol protease, RT 領域の遺伝子解析を行い、サブタイピングも施行した。なお、この研究は、当院倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

2005年における新規未治療患者数は25名であり九州ブロック内(沖縄は除く)での新規感染者数(エイズ発生動向委員会報告による)の約半数に相当する。耐性変異の内訳は、RT 領域においては T215L が 2 例、B 型肝炎治療のため生じた M184V が 1 例、変異なしが 22 例、

protease 領域においては、D30N が 1 例、副次変異のみが 14 例、非特異的変異および変異なしが 10 例であった。サブタイプは国内で異性間で感染したと考えられるサブタイプ CRF08-BC が 1 例で、それ以外はサブタイプ B であった。

D. 考察

当院における 2003 年、2004 年、2005 年の調査では未治療患者の耐性変異は副次変異も含めて各々 44%、83%、64% と一定の傾向はなかった。しかし、2003 年以降、当院でも明らかな耐性変異ウイルスをもつ新規感染者が見られるようになり、今年度は D30N をもつ nelfinavir 耐性ウイルスが検出された。D30N をもつウイルスは fitness が低くなると報告されており、当院例のように新規未治療患者で検出されたことは興味深い。D30N は N88D が同時に存在すると fitness がやや回復するといわれているが、本例でも D30N 以外に L33F、M36I、L63P、A71T、N88D を合わせ持っており fitness に関与している可能性がある。また今年度は revertant mutation といわれている T215L が 2 例検出された。D30N、T215L においては、今後も定期的に耐性検査を施行していく予定である。

今年度の解析は、九州ブロック(沖縄を除く)内での新規感染者数の約半数での解析であり正確な評価のためにも出来るだけ多くの施

設の多くの症例での解析が必要と思われる。今年度は九州内の他の拠点病院にも、本研究への参加協力をお願いする手紙を郵送した。連絡を頂いた施設もあるため、今後、検討症例の増加が期待できる。

E. 結論

副次変異まで含めると耐性変異をもつウイルスの検出例は 2003 年以降、一定の傾向はないが、本年度は NFV に対し有意な耐性変異をもつ新規感染患者が認められた。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) HIV-Tat protein increased the expression of apoptosis-associated protein RCAS1 in CD4+ cells and monocytes.

Rumi Minami, Masahiro Yamamoto, Asuka Horita, Tomoya Miyamura, Kensuke Izutsu, Eiichi Suematsu

Seventh International Congress on AIDS in Asia and the Pacific. July 2, 2005 Kobe

2) 高熱を繰り返したのち発症したHIV-1陽性HHV-8関連Castleman病の一例

南留美, 山本政弘

第19回日本エイズ学会学術集会・総会

平成 17 年 12 月 1 日 熊本

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

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hua Yan, Tomoko Chiba Mizutani, Nobuhiko Nomura, Tadakazu Takakura, Yoshihiro Kitamura, Hideka Miura, Masako Nishizawa, Masashi Tatsumi, Naoki Yamamoto, Wataru Sugiura.	A novel small molecular weight compound with a carbazole structure that demonstrates potent human immunodeficiency virus type-1 integrase inhibitory activity.	Antiviral Chemistry & Chemotherapy	16	363-373	2005
T Ueda, L Myint, M Nishizawa, M Matsuda, W Sugiura.	Analysis of interference and co-evolution between protease inhibitor resistant mutations and gag mutations.	Antiviral Therapy	10	s116	2005
N Hasegawa, W Sugiura, M Matsuda, K Mogushi, H Tanaka, F Ren.	Inference of evolutionary forces driving HIV-1 drug-resistance acquisition under HAART using longitudinal HIV-1 protease gene samples.	Antiviral Therapy	10	s114	2005

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Miyauchi K, Komano J, Yokomaku Y, Sugiura W, Yamamoto N, 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.	79	4720-4729	2005
K. Shiomi, R. Matsui, M. Isozaki, H. Chiba, T. Sugai, Y. Yamaguchi, R. Masuma, H. Tomoda, T. Chiba, H. Yan, Y. Kitamura, W. Sugiura, S. Omura, H. Tanaka.	Fungal phenalenones inhibit HIV-1 integrase.	J. Antibiot.	58	65-68	2005
Hiroataka Ode, Masami Ota, Saburo Neya, Msayuki Hata, Wataru Sugiura, and Tyuji Hoshino.	Resistant Mechanism against Nelfinavir of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Proteases.	J Phys Chem B	109	564-574	2005

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Joke Snoeck, Rami Kantor, Robert W. Shafer, Kristel Van Laethem, Koen Deforche, Ana Patricia Carvalho, Brian Wynhoven, Marcel A. Soares, Patricia Cane, John Clarke, Candice Pillay, Sunee Sirivichayakul, Koya Ariyoshi, Africa Holguin , Hagit Rudich, Rosangela Rodrigues, Maria Belen Bouzas, Francoise Brun -Vezinet, Caroline Reid, Pedro Cahn, Luis Fernando Brigido, Zehava Grossman, Vincent Soriano, <u>Wataru Sugiura</u> , Praphan Phanuphak, Lynn Morris, Jonathan Weber, Deenan Pillay, Amilcar Tanuri, Richard P.Harrigan, Ricardo Camacho, Jonathan M.Schapiro, David Katzenstein, and Anne-Mieke Vandamme	Discordances between Interpretation Algorithms for Genotypic of Human Immunodeficiency Virus Are Subtype Dependent	Antimicrobial Agents and Chemotherapy	50(2)	694-701	2006

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Rami Kantor, David A. Katzenstein, Brad Efron, Ana Patricia Carvalho, Brian Wynhoven, Patricia Cane, John Clarke, Sunee Sirivichayakul, Marcelo A. Soares, Joke Snoeck, Candice Pillay, Hagit Rudich, Rosangela Rodrigues, Africa Holguin, Koya Ariyoshi, Maria Belen Bouzas, Pedro Cahn, <u>Wataru Sugiura</u> , Vincent Soriano, Luis F. Brigido, Zehava Grossman, Lynn Morris, Anne-Mieke Vandamme, Amilcar Tanuri, Praphan Phanuphak, Jonathan N. Weber, Deenan Pillay, P. Richard Harrigan, Ricardo Camacho, Jonathan M. Schapiro, Robert W. Shafer.	Impact of HIV-1 Subtype and Antiretroviral Therapy on Protease and Reverse Transcriptase Genotype: Results of a Global Collaboration	Results of a Global Collaboration PLoS Medicine.	2	325-337	2005
杉浦 互	抗 HIV-1 薬剤の現状と薬 剤開発の新たな展開	ウイルス	55	85-94	2005
西澤雅子、杉浦 互	HIV-1 の薬剤耐性について の最近の知見	BIO Clinica	20	8	2005
杉浦 互	新規感染者における薬剤 耐性 HIV 拡散の危機 ~Alert for Outbreak of Drug Resisitance HIV-1 Newly Infected Population~	日本エイズ学会 誌	7	117-120	2005

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
杉浦 互、瀧永博之、田宮貞宏、松田昌和、松見信太郎、蜂谷敦子、John Coffin、満屋裕明	シンポジウム 7. 「薬剤耐性の知見、基礎から臨床へ」を終えて	日本エイズ学会誌	7	3	2005
Bi X, Gatanaga H, Tanaka M, Honda M, Ida S, Kimura S, Oka S.	Modified Dynabeads method for enumerating CD4+ T-lymphocyte count for widespread use in resource-limited situations.	Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome	38(1)	1-4	2005
Gatanaga H, Hachiya A, Kimura S, Oka S.	Mutations other than 103N in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase (RT) emerge from K103R polymorphism under non-nucleoside RT inhibitor pressure.	Virology	In press		2005
Gatanaga H, Das D, Suzuki Y, Yeh DD, Hussain KA, Ghosh AK, Mitsuya H.	Altered HIV-1 gag protein interactions with cyclophilin A (CypA) upon the acquisition of H219Q and H219P substitutions in the CypA binding loop.	Journal of Biological Chemistry	In press		2005
Shingo Kato, Hideji Hanabusa, Satoru Kaneko, Koichi Takakuwa, Mina Suzuki, Naoaki Kuji, Masao Jinno, Rie Tanaka, Kenichi Kojima, Mitsutoshi Iwashita, Yasunori Yoshimura, Kenichi Tanaka.	Complete removal of HIV-1 RNA and proviral DNA from semen by the swim-up method: Assisted reproduction technique using spermatozoa free from HIV-1.	AIDS	In press		2006
Nameki D, Kodama E, Ikeuchi M, Mabuchi N, Otaka A, Tamamura H, Ohno M, Fujii N, Matsuoka M.	Mutations Conferring Resistance to HIV-1 Fusion Inhibitors are Restricted by gp41 and Rev Responsive Element Functions.	J Virol.	79	764-770	2005

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Masuda N, Yamamoto O, Fuji M, Ohgami T, Fujiyasu J, Kontani T, Moritomo A, Orita M, Kurihara H, Koga H, Kageyama S, Ohta M, Inoue H, Hatta T, Shintani M, Suzuki H, Sudo K, Shimizu Y, <u>Kodama E</u> , Matsuoka M, Fujiwara M, Yokota T, Shigeta S, Baba M.	Studies of non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. Part 2: synthesis and structure-activity relationships of 2-cyano and 2-hydroxy thiazolidenebenzenesulfo namide derivatives.	Bioorg Med Chem.	13	949-961	2005
Fan J, <u>Kodama E</u> , Koh Y, Nakao M, Matsuoka M.	Halogenated thymidine analogues restore the expression of silenced genes without demethylation.	Cancer Res.	65	6927-6933	2005
Hua Yan, Tomoko Chiba Mizutani, Nobuhiko Nomura, Tadakazu Takakura, Yoshihiro Kitamura, Hideka Miura, Masako. Nishizawa, <u>Masashi Tatsumi</u> , Naoki Yamamoto, Wataru Sugiura.	A novel small molecular weight compound with a carbazole structure that demonstrates potent human immunodeficiency virus type-1 integrase inhibitory activity.	Antiviral Chemistry & Chemotherapy	16	363-373	2005
M A. Rodriguez, Y Chen, J K. Craig, R Chatterjee, D Ratner, <u>M Tatsumi</u> , P Roy, D Neogi and P Gupta	Construction and characterization of an infectious molecular clone of HIV-1 subtype A of Indian origin.	Virology	In press		2006

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Misumi S, Nakayama D, Kusaba M, Iiboshi T, Mukai R, Tachibana K, <u>Nakasone T</u> , Umeda M, Shibata H, Endo M, Takamune N, Shoji S.	Effects of immunization with CCR5-based cycloimmunogen on simian/HIVSF162P3 challenge.	J. Immunol.	176	463-471	2006
Someya K, Cecilia D, Ami Y, <u>Nakasone T</u> , Matsuo K, Burda S, Yamamoto H, Yoshino N, Kaizu M, Ando S, Okuda K, Zolla-Pazner S, Yamazaki S, Yamamoto N, Honda M.	Vaccination of rhesus macaques with recombinant Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin Env V3 elicits neutralizing antibody-mediated protection against simian-human immunodeficiency virus with a homologous but not a heterologous V3 motif.	J Virol.	79(3)	1452-1462	2005
Usami O, Xiao P, Ling H, Liu Y, <u>Nakasone T</u> , Hattori T.	Properties of anti-gp41 core structure antibodies, which compete with sera of HIV-1 infected patients.	Microbes & Infection.	7	650-657	2005
仲宗根正	日本伝播 HIV 集団の遺伝 子・分子生物学的解析及 び分子力学的構造解析	東北医学雑誌	117	27-31	2005
仲宗根 正、山本 直樹	ワクチンはまだか!	感染・炎症・免疫	35	2-11	2005
<u>Matsushita, S.</u> , Yoshimura, K., Kimura T., Kamihira, A., Takano, M., Eto, K., Shirasaka, T., Mitsuya, H., Oka, S.	Spontaneous recovery of hemoglobin and neutrophil levels in Japanese patients on a long-term Combivir® containing regimen.	J.Clin.Virol.	33	188-193	2005
Sakaguchi, N., Kimura T., <u>Matsushita, S.</u> , Fujimura S., Shibata J., Araki M., Sakamoto T., Minoda S., and	Generation of high-affinity antibody against T cell-dependent antigen in ganp gene- transgenic mouse.	J. Immunol.	174	4485-4494	2005

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Miyauchi K, Komano J, Yokomaku Y, Sugiura W, Yamamoto N, <u>Matsuda Z.</u>	Role of the specific amino acid sequence of the membrane-spanning domain of human immunodeficiency virus type 1 in membrane fusion.	J. Virol.	79	4720-4729	2005
Miyauchi K, Curran , Matthews E, Komano , Hoshino T, Engelman DM and <u>Matsuda Z</u>	Mutations of Conserved Glycine Residues within the Membrane-Spanning Domain of Human Immunodeficiency Virus type 1 gp41 Can Inhibit Membrane Fusion and Incorporation of Env onto Virions.	JJID	In press		2005
Takemura T, Ekwalanga M, Bikandou B, Ido E, <u>Yamaguchi-Kabata Y,</u> Sadayuki Ohkura S, Harada H, Takehisa J, Ichimura H, Parra H-J, Nende M, Mubwo E, Sepole M, Hayami M and Miura T (2005)	A novel SIV from black mangabey (<i>Lophocebus aterrimus</i>) in Democratic Republic of Congo.	Journal of General Virology	86	1967-71	2005
山口由美	ウイルスの表面構造と遺伝的多様性	化学と工業	58(10)	1181-1184	2005
<u>Kondo Makiko,</u> Shima Takako, Nishizawa Masako, Sudo Koji, Iwamuro Shinya, Okabe Takeshi, Takebe Yutaka, Mitsunobu Imai	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.	The Journal of Infectious Diseases	192	56-61	2005
高橋昌明、吉田昌生、大木 剛、奥村直哉、鈴木達男、 <u>金田次弘</u>	HPLCによるプロテアーゼ阻害剤アタザナビル の血中濃度測定法の開発	日本病院薬剤師会雑誌	41	731-734	2005

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
高橋昌明、吉田昌生、大木 剛、奥村直哉、鈴木達男、金田次弘	カレトラ™投与外来HIV感染患者における脂質異常とロピナビル血中濃度の評価	日本病院薬剤師会雑誌	41	873-876	2005
M. Takahashi, M. Yoshida, T. Oki, N. Okumura, T. Suzuki and T. Kaneda	Conventional HPLC Method Used for Simultaneous Determination of the Seven HIV Protease Inhibitors and Nonnucleoside Reverse Transcription Inhibitor Efavirenz in Human Plasma.	Biol. Pharm. Bull.	28	1286-1290	2005