

- lymphocytes from patients responding well to HAART. 金田次弘 第 18 回日本エイズ学会総会シンポジウム(平成 16 年 12 月-2004)
12. HIV-1 感染患者における G 型肝炎ウイルス (GBV-C) 重複感染の影響 服部純子、内山雅宇、加藤 稔、濱口元洋、西山幸廣、金田次弘 第 18 回日本エイズ学会総会 (平成 16 年 12 月-2004)
 13. 未治療患者由来プロテアーゼ阻害剤耐性 HIV-1 の増殖能解析 伊部史朗、澤木香、森下高行、佐藤克彦、金田次弘 第 18 回日本エイズ学会総会 (平成 16 年 12 月-2004)
 14. 未治療患者に検出された薬剤耐性 HIV-1 の gag 遺伝子領域内アミノ酸変異の解析 澤木 香、伊部史朗、金田次弘 第 18 回日本エイズ学会総会 (平成 16 年 12 月-2004)
 15. ケニアにおける未治療 HIV 感染者の薬剤耐性遺伝子とサブタイプの流行状況について 山本直彦、森下高行、佐藤克彦、金田次弘、伊部史朗、永井洋美、内海 眞、宮城島拓人 第 18 回日本エイズ学会総会 (平成 16 年 12 月-2004)
 16. プロテアーゼ阻害剤アタザナビルの HPLC による血中濃度測定法の開発 高橋昌明、吉田昌生、大木 剛、奥村直哉、鈴木達男、金田次弘 第 18 回日本エイズ学会総会 (平成 16 年 12 月-2004)
 17. 種々の感染病態における末梢 CD4 陽性 T リンパ球内の HIV-1 DNA レベル 永井裕美、和田かおる、照沼 裕、水野善文、多和田行男、間宮均人、内海 眞、濱口元洋、とう学文、伊藤正彦、西山幸廣、金田次弘 第 18 回日本エイズ学会総会 (平成 16 年 12 月-2004)
 18. MSG (major surface glycoprotein) を用いた Real-time PCR 法による *Pneumo-cystis jirovecii* 迅速定量法の確立 小柏 均、永井裕美、水野善文、堀 洋美、加藤 稔、多和田行男、玉村和栄、間宮均人、濱口元洋、金田次弘 第 18 回日本エイズ学会総会 (平成 16 年 12 月-2004)
 19. 未治療患者に検出された薬剤耐性 HIV-1 のウイルス学的特徴 伊部史朗、澤木香、金田次弘 第 15 回抗ウイルス化学療法研究会 (屋久島) (平成 17 年 5 月-2005)
 20. HIV-1 薬剤耐性遺伝子検査法に関するアンケート調査 浅黄 司、金田次弘、伊部史朗、松田昌和、吉田 繁、津畑千佳子、大家正泰、近藤真規子、貞升健志、潟永博之、正兼亜季、佐藤克彦、秦 眞美、溝上康司、森 治代、南 留美、渡邊香奈子、岡田清美、杉浦 亙 第 19 回日本エイズ学会総会 (平成 17 年 12 月-2005)
 21. 未治療患者由来プロテアーゼ阻害剤耐性 HIV-1 の増殖能解析 伊部史朗、藤崎誠一郎、藤崎彩恵子、金田次弘 第 19 回日本エイズ学会総会 (平成 17 年 12 月-2005)
 22. 新規 HIV-1 感染者における薬剤耐性の頻度に関する全国疫学調査 -2003 年から 2004 年にかけての報告 杉浦 亙、潟永博之、吉田 繁、千葉仁志、浅黄 司、松田昌和、岡 慎一、近藤真規子、今井光信、貞升健志、長島真美、伊部史朗、金田次弘、濱口元洋、上田幹夫、正兼亜季、大家正義、渡邊香奈子、白坂琢磨、山本善彦、森 治代、小島洋子、中桐逸博、高田 昇、木村昭郎、南 留美、山本政弘、健山正男、藤田次郎 第 19 回日本エイズ学会総会 (平成 17 年 12 月-2005)
 23. プロテアーゼ阻害薬 7 剤とエファビレンツの同時血中濃度測定法の開発及びその臨床応用 高橋昌明、伊部史朗、久高

- 祐一、奥村直哉、鈴木達男、金田次弘 第
19 回日本エイズ学会総会（平成 17 年 12
月－2005）
24. B、CRF01 AE を含む複数のサブタイプの
HIV-1 定量法の確立 水野善文、永井裕
美、加堂真由、渡辺朝子、森下高行、山
本直彦、伊部史朗、重見 麗、藤崎誠一
郎、稲田頼太郎、金田次弘 第 19 回日
本エイズ学会総会（平成 17 年 12 月－
2005）
25. HAART 著効例 HIV-1 感染患者における残
存 HIV-1 プロウイルス複製レベルの評価
永井裕美、水野善文、加堂真由、服部純
子、濱口元洋、間宮均人、西山幸廣、金
田次弘 第 19 回日本エイズ学会総会（平
成 17 年 12 月－2005）
26. Persistence of protease
inhibitor-resistant HIV-1 in
therapy-naive patients T. Kaneda, S.
Ibe, K. Sawaki, T. Morishita, U.
Shigemi, N. Mamiya and M. Hamaguchi
2nd International Workshop on HIV
Persistence during Therapy Saint
Martin, FWI, December 6-9, 2005

B-3. 長期 HAART 施行症例における pDNA の推移とその臨床的意義

分担研究者 吉村和久（熊本大学エイズ学研究センター・病態制御・助手）

研究概要

我々は本研究班で患者さんの末梢血単核球に含まれるウイルスの proviral DNA (pDNA) を高感度に測定する系を確立し、300 をこえる検体の pDNA を測定した。これにより、血中のウイルス量が測定感度以下の症例でも、pDNA の変動を追うことでウイルスの抑制をより詳細にモニタリングすることができることがわかった。しかし、近年 non-B のウイルス感染者の増加にともない、高感度ゆえ特異性が高く、測定できない症例が増加してきた。そのため、現在 p17 領域にプライマーとプローブを設定し、2 種類の方法で測定をおこなっている。これらの基礎データを基に HAART で長期間(4-9 年)ウイルスを抑制できている症例でプロウイルス DNA (pDNA) を測定し、臨床経過との相関を調べた。その結果これまで5年以上 HAART を継続しても pDNA の低下は認められないとされていたものが、治療によっては低下しうることがわかった。これらの長期抑制症例に残存しているウイルスはどのようなものであるかを検討するため、経時的にプロウイルスのシーケンスを比較検討したところ、治療期間が長くなるほどウイルスの diversity が低下していくことが分かった。

A. 研究目的

現在一般的に行われている HAART を施行すると、多くの症例でウイルス量は測定感度以下になり、CD4 の数も上昇してくる。しかし、ウイルス量が測定感度以下であっても、ウイルスの増殖はリンパ節等で続いているといわれている(residual replication)。ところが、現在この residual replication を推測する指標がない。そこで、血中ウイルス量が測定感度以下の症例の proviral DNA を我々の開発した高感度法で測定を行い、症例の臨床経過や各種マーカーと照らし合わせながら、residual replication の指標となりうるかの検討を行った。その結果から、長期間(4 年一)良好に治療を継続できた症例で、pDNA の推移を高感度法で測定し治療効果との関連を検討する(治療の有効性の判定に使用可能か否か)。長期治療で残存しているウイルスの系統樹解析を行い、残存ウイルスの特徴を考察する。

B. 研究方法

異なった二種類の方法によるプロウイルス DNA (proviral DNA; pDNA) の定量; 末梢血単核球を分離精製し DNA を抽出した後、LTR 領域に設定した primer を用いて 1st PCR を行う。得られた増幅産物を template にして 2nd PCR を Real time PCR 法を用いて行った。P17 領域にプライマーとプローブを設定し、Real time PCR 法で pDNA を測定する。これらを用いて測定した結果と臨床経過や HIV-RNA 量、CD4、CD8 陽性細胞数などとの相関を検討した。

エンベロープ (Gp120) 領域のシーケンス; HAART 中の症例で pDNA が変化したポイントのプロウイルスの env 領域のシーケンスをクローニング(7-10 クローン)したのち行う。その後、系統樹解析を行い、それぞれのウイルス間の関連を検討する。

(倫理面への配慮)

本研究を行うに当たり各症例には研究の概要を説明し同意を得た上で採血し、解析した。

なお本研究の倫理的・科学的妥当性は熊本大学病院の先進医療審査委員会で審査され、了承されている。

C. 研究結果及び考察

HAART の potency の問題は、これまで必ずしも評価が十分でなかったが、我々が確立したプロウイルス DNA (pDNA) の測定を行うことにより、HIV RNA の測定よりも鋭敏にウイルスプールの増減の評価が可能となった。その結果、血漿中のウイルス量が測定感度以下(50 コピー/ml 以下) の場合でも、pDNA の量が多いまま経過している症例があることがわかった。そして、従来慢性感染症例ではほとんど減少しないといわれてきた pDNA 量が、より強力な治療への変更によって明らかに減少する症例があることもわかってきた。しかも、強化療法を行った症例では pDNA の減少に伴いそれまで上昇しなかった CD4 陽性細胞の数が増加し始めた。このことは、現在の治療で充分ウイルスを抑制できてない (pDNA 量の多い) 症例でも、治療の変更 (強化) により、residual replication を減らすことができ、ウイルスの増殖をより完全に押さえ込む可能性があることを意味している。これまでは、pDNA の値はある程度まで低下すると後は一定の値で推移するという報告が多かった。確かに、我々の症例でも 4-5 年間の治療に限れば、初めの 1-2 年に比べると pDNA の減少は緩やかになっていった。しかし、5 年から 9 年に亘り HAART 継続可能であった症例には、その後明らかに pDNA の値が低下していくことが確認できた。つまり、HAART 開始 1-2 年で pDNA 量は約 1log 低下し、その後の 3-4 年間は緩徐な低下もしくはほとんど一定の値を示した後、測定感度前後 (10-20 copies/10⁶ PBMC) まで緩やかに低下をしていく。一旦測定感度以下になった後も、測定できたりできなったりを繰り返していく。実験手技によるものか、ウイルスが一時的に再活性化しているためか

は、まだ結論が出ていないが、それぞれの時点でのシーケンスどうしに関連性がありつつも、それぞれが独立したクラスターを形成していることから、再活性化の可能性が充分考えられると言える。現在、系統樹解析から言えることは、治療初期に見られたウイルスの多様性 (高 diversity) が pDNA の低下に伴い多様性は低下していく (低 diversity) が、先祖ウイルスからの遺伝的な距離は遠くなる (高 divergence) ことが示唆されている。

D. 結論

- 1) HAART 施行症例における病状の指標として、また residual replication の新たな指標として、プロウイルス DNA (pDNA) を、多くの現在経過観察中の症例で測定し、臨床経過との相関を検索した。
- 2) 測定値が、低かった症例や、ばらつきがあるものに関して、Gag probe を用いた Real time PCR を行ったところ、安定した測定を得られた症例があった。
- 3) HAART で長期間(4-9 年)ウイルスを抑制できている症例でプロウイルス DNA (pDNA) を測定し、臨床経過との相関を調べた。
- 4) pDNA が一旦感度以下になった症例でも、pDNA の再検出が認められることが多かった。
- 5) 長期に渡り治療を施行しウイルスを抑制できている症例に残存しているウイルスはどのようなものであるかを検討するため、経時的にプロウイルスのシーケンスを比較検討した。その結果、治療期間が長くなるほどウイルスの diversity が低下していくことが分かった。
- 6) 残存しているウイルスのシーケンスは病初期のウイルスとの関連はあるものの、クラスターを形成する。このことは、長期治療により残存するウイルスは、潜伏ウイルスが周期的に再活性化することによりメンテナンスされている可能性を示唆している。

E. 研究発表

(論文発表)

1. Matsushita, S., Yoshimura, K., Kimura T., Kamihira, A., Takano, M., Eto, K., Shirasaka, T., Mitsuya, H., and Oka, S. Spontaneous recovery of hemoglobin and neutrophil levels in Japanese patients on a long-term CombivirR containing regimen. *J. Clin. Virol.* 2005, 33: 188-193.
2. Tamiya, S., Mardy, S., Kavlick, M.F., Yoshimura, K., and Mitsuya, H. Amino acid insertions near Gag cleavage sites restore the otherwise compromised replication of human immunodeficiency virus type 1 variants resistant to protease inhibitors. *J. Virol.* 2004, 78:12030-40.
3. Yoshimura, K., Ido, E., Akiyama, H., Kimura, T., Aoki, M., Suzuki, H., Mitsuya, H., Hayami, M., Matsushita, S. The impact of highly active antiretroviral therapy by the oral route on the CD8 subset in monkeys infected chronically with SHIV89.6P. *J. Virol. Methods.* 2003, 112:121-128.

(国際学会発表)

1. Yoshimura, K., Shibata, J., Honda, A., Murakami, T., Mitsuya H., Koito, A., Matsushita, S.: Resistance profile of a novel broadly neutralizing anti-HIV monoclonal antibody, KD-247, that has favorable synergism with anti-CCR5 inhibitors in vitro. 13th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infection. Feb 5-8, 2006, Denver, CO, USA.
2. Shibata, J., Yoshimura, K., Honda, A., Murakami, T., Koito, A., Matsushita, S.: A role of mutations in non-V3 envelope regions for escape from a broad neutralizing anti-V3 monoclonal antibody, KD-247, during in vitro selection. 13th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infection. Feb 5-8, 2006, Denver, CO, USA.
3. Matsushita, S., Honda, A., Shibata, J., Kimura, T., Ikeda, T., Koito, A., Yoshimura, K.: HIV-1 proviral DNA dynamics in patients with long-term successful HAART. 2nd International Workshop on HIV Persistence during Therapy. December 6-9, 2005, Saint Martin, FWI.
4. Yoshimura, K., Shibata, J., Ikeda, T., Honda A., Koito, A., Matsushita, S.: HIV-1 proviral DNA dynamics in patients with long-term successful HAART. International Symposium, The Cooperative research Project on Clinical and Epidemiological Studies of Emerging and Re-emerging Infectious Diseases, 2005. Sep.15-16. Kumamoto.
5. Shibata, J., Yoshimura, K., Maeda, Y., Murakami, T., Eda. Y., Koito, A., Matsushita, S.: In vitro induction of human immunodeficiency virus type 1 variants resistant to a novel broad neutralizing anti-HIV monoclonal antibody, KD-247. International Symposium, The Cooperative Research Project on Clinical and Epidemiological Studies of Emerging and Re-emerging Infectious Diseases, 2005. 9.15-16. Kumamoto.
6. Ikeda, T., Shibata, J., Honda A.,

- Yoshimura, K., Koito, A., Matsushita, S.: Relationship of residual HIV-1 and the integration sites in patients on prolonged and effective HAART. International Symposium, The Cooperative research Project on Clinical and Epidemiological Studies of Emerging and Re-emerging Infectious Diseases, 2005. 9.15-16. Kumamoto.
7. Yoshimura, K., Honda A., Kenai, A., Shibata, J., Koito, A., Matsushita, S.: Proviral DNA and turnover levels in aviremic long-term non-progressors (LTNPs); A temporary goal for patients under HAART. 7th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific. 2005. 7. 1-5. Kobe.
 8. Matsushita, S., Honda A., Kenai, A., Shibata, J., Koito, A., Yoshimura, K.: Long-term follow-up study for the change of the reservoir for HIV-1 on highly active antiretroviral therapy. 7th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific. 2005. 7. 1-5. Kobe.
 9. Yoshimura, K. Evaluation of residual viral replication for optimization of highly active antiretroviral therapy (HAART). 5th AIDS seminar in Kumamoto 2004. 9.9-10. Kumamoto.
 10. Shibata, J., Wang, F.X., Kimura, T., Iwata R., Yoshimura K., Koito, A., Matsushita, S. Involvement of C3 mutation in neutralization sensitivity for anti-V3 antibodies. 5th AIDS seminar in Kumamoto 2004. 9.9-10. Kumamoto.
 11. Iwata, R., Shibata, J., Kimura, T., Yoshimura K., Koito, A., Matsushita, S. Cross neutralizing activity of serum antibodies with neutralizing activity against autologous HIV. 5th AIDS seminar in Kumamoto 2004. 9.9-10. Kumamoto.
 12. Kenai, A., Kimura, T., Yoshimura K., Koito, A., Matsushita, S. Efficient induction of both cellular and humoral immune responses by immunization with Tat-Nef fusion protein (tNEF) without adjuvants. [ThPeA6983], XV International AIDS Conference Bangkok, 2004. 7.11-16, Bangkok, Thailand.
 13. Matsushita, S., Kimura, T., Shirai, N., Koito, A., Yoshimura, K. New approach for optimization of HAART; Evaluation of residual viral replication by monitoring proviral DNA level and T cell turnover rate. [TuPeA4356], XV International AIDS Conference Bangkok, 2004. 7.11-16, Bangkok, Thailand.
 14. Matsushita, S., Kimura, T., Shirai, N., Koito, A., Yoshimura, K.: Evaluation of residual viral replication for optimization of HAART. 1st International Workshop on HIV Persistence during Therapy, 12.10-12, 2003, Saint Martin, French West Indies.
 15. Yoshimura, K., Kimura, T., Matsushita, S.: Proviral DNA (pDNA) and turn over levels in HIV-1-positive long-term non-progressors (LTNPs). 2003 International Meeting of the Institute of Human Virology, 9.29-10.3, 2003, Baltimore, U.S.A
 16. Yoshimura, K.: The impact of highly active antiretroviral therapy by the oral route on the CD8 subset and turnover in chronically

SHIV89.6P-infected monkeys. 第3回あ
わじしま感染症・免疫フォーラム、
8.26-28, 2003, 兵庫県津名郡.

(国内学会発表)

1. 吉村和久、柴田潤二、池田輝政、小糸厚、
松下修三：HAARTにより長期間ウイルス
が抑制された症例のpDNAの推移. 第19
回日本エイズ学会学術集会.
2005.12.1-3. 熊本.
2. 柴田潤二、吉村和久、前田洋助、村上俊
夫、小糸厚、松下修三：広範囲 HIV-1 中
和単クローン抗体の *in vitro* 逃避ウイ
ルスの誘導と解析. 第19回日本エイズ
学会学術集会. 2005.12.1-3. 熊本.
3. 池田輝政、柴田潤二、吉村和久、小糸厚、
松下修三：長期間 HAART 有効症例におけ
る残存 HIV と integration site の関連
性. 第19回日本エイズ学会学術集会.
2005.12.1-3. 熊本.
4. 吉村和久：HAART の最適化のための残存
ウイルスの評価[S1-2]. 第18回日本エ
イズ学会学術集会・総会, 2004.12.9-11,
静岡.
5. 吉村和久、木村哲也、松下修三：Proviral
DNA (pDNA) and turn over levels in
HIV-1-positive long-term
non-progressors (LTNPs). 第17回日
本エイズ学会学術集会・総会, 11.27-29,
2003, 神戸

B-4. 新規感染者および非サブタイプ B を対象にした

薬剤耐性試験と感受性試験のデータの構築について

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 根岸ふじ江、瀧永博之、木村 哲、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）
児玉栄一、松岡雅雄
（京都大学ウイルス研究所・感染免疫研究領域）

研究概要

日本国内で分離されたウイルスでの、薬剤耐性試験と感受性試験結果のデータの構築を目的とし、初年度は、新規感染者（治療前）から分離されたウイルスを対象に解析を行い、NVP に対する新しい耐性変異 K238S を見いだした。2 年目以降は国内で流行しているサブタイプの動向を調べるとともに、非サブタイプ B ウイルスを対象にしたデータ比較を行った。

サブタイプ B と CRF01_AE による未治療例の解析を行ったところ、NRTI、NNRTI に対する薬剤感受性試験、耐性試験にサブタイプ間での有意な差は認められなかった。しかし PR に対する耐性変異の出現頻度、薬剤感受性に違いが生じた。

また治療失敗例においては、NNRTI に対する薬剤感受性試験と耐性試験結果に乖離が生じた非サブタイプ B ウイルスが 1 例見つかった。このウイルスには、NVP に対する新たな耐性変異の存在が示唆された。

現在の薬剤耐性試験の結果から薬剤感受性が 90% 以上予測可能とされているが、本研究から、初年度はサブタイプ B、3 年目に非サブタイプ B から、それぞれ NVP に対する新たな耐性変異が存在した。また現在の薬剤耐性試験の解釈は、サブタイプ B を元に作成されており、非サブタイプ B でも対応可能かどうか疑問である。今後、両者のデータを比較し、薬剤耐性データの更新を図り、HIV 治療の薬剤選択の手段として役立てていく必要があると思われる。

A. 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、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での薬剤耐性ウイルスの出現頻度、伝播について検討することを目的とした。

また現在の薬剤耐性検査の解釈、解析は、

先進国で流行しているサブタイプ B を元に作成され、耐性変異から薬剤感受性が 90% 以上予測可能とされている。しかし世界的な規模からみるとサブタイプ B は少数であり、サブタイプ A や C、CRF01_AE、CRF02_AG に感染している数が、圧倒的に多い。その非サブタイプ B を対象にした大規模な研究がほとんどなされていないのが、実状である。そのため日本で分離されたウイルスのサブタイプ分布を調べるとともに、非サブタイプ B ウイルスの

薬剤感受性試験と耐性試験の結果を比較し、データ構築を試みることを目的とした。

B. 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もしくはSEAP（分泌型アルカリフォスファターゼ）を測定し、薬剤の効果を調べた。

薬剤耐性試験：分離ウイルス液中のHIV RNAを抽出し、RT-PCRにてpol領域を増幅し、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：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。

サブタイプ検査：分離ウイルス液中のHIV RNAを抽出し、RT-PCRにてenv領域（6935F-7329R）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。得られたシークエンスは、NCBIのgenotypingにデータを送り、サブタイプを決定した。

(<http://www.ncbi.gov/projects/genotyping/formpage.cgi>)

C. 結果

1) 新規感染患者における耐性出現頻度、および新たなNVPの耐性変異：

2001年、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（Fig. 1）。この患者ウイルスのgenotype解析、立体構造解析から、今回NVPに対する耐性に患者特有の変異K238Sがかかっていることが予測さ

れた。そのためK238Sを含む組み換えウイルスを作成、その薬剤感受性試験結果から、K238Sが新たなNVPに対する薬剤耐性変異であることを見いだした（Table 1）。

2) 日本国内でのサブタイプの動向

日本国内で流行しているウイルスのサブタイプの動向を知るために、env領域におけるサブタイプ検査を行った。

1998年から2003年にかけて分離されたウイルス、355例、212名を対象に行い、そのうちサブタイプB 84%、CRF01_AE 8%、A 0.9%、C 0.9%、CRF02_AG 0.5%、CRF12_BF 0.5%、CRF14_BG 1.9%、不明 3.3%であった。また2004年以降は、当センターに訪れた患者のplasmaから抽出を行い、同様の検査を行った。サブタイプB 93.8%、CRF01_AE 2%、CRF14_BG 1%、G 1%、CRF03_AB 1%、CRF15_AEB 1%であり、サブタイプBが主流であった（Table 2）。

3) 未治療例でのサブタイプBとCRF01_AE

の薬剤感受性試験と薬剤耐性試験の比較 subtypeの結果をもとに、未治療例のサブタイプB（109例）と非サブタイプB（CRF01_AEを対象）（13例）の各薬剤に対する感受性、もしくは耐性変異を比較した。

a) NRTI（未治療例）

CRF01_AEとBでは、K219Q/Eを除いて耐性変異の出現頻度に違いは認められなかった（Table. 3）。しかしK219Q/Eは、AEで1例しか認められておらず、比較をするには症例数が少ないと思われた。

また薬剤感受性を比較すると、AZT、3TC、d4T、ABCでp=0.29、0.39、0.50、0.80と、サブタイプ間で有意な差は得られなかった（Fig. 2）。

b) NNRTI（未治療例）

どちらのサブタイプも耐性変異は検出されなかった（Table. 3）。また薬剤感受性を調べたところ、NVP p=0.81、EFV p=0.87と、サブタイプ間における感受性の差は認められなかった（Fig. 2）。

c) PR (未治療例)

CRF01_AE では L10I/R/V、K20R、M36I の出現頻度が B に比べ高く、 $p=0.477$ 、 0.0003 、 <0.0001 であった。一方、サブタイプ B では、L63P、A71V/T、V77I の出現頻度が高く、 $p=0.0538$ 、 0.0736 、 0.0025 であった。(Table. 4) 薬剤感受性試験を比べると、RTV、SQV、NFV、IDV、APV、LPV で $p=0.048$ 、 0.005 、 0.403 、 0.070 、 0.588 、 0.007 であり、SQV と LPV で CRF01_AE の方が、薬剤感受性が高い傾向が認められた (Fig. 2)。

4) 非サブタイプ B で認められた薬剤感受性試験と薬剤耐性試験の乖離症例

すでに分離されている非サブタイプ B ウイルスのうち、耐性を獲得していた 4 例のうち、NVP の薬剤感受性試験と耐性試験結果の乖離検体が 1 例認められた。NVP に対し 57 倍と高度耐性を示していたにもかかわらず (Table5)、薬剤耐性試験では NVP に対する耐性変異は全く検出されなかった。薬剤耐性試験の解析は、International AIDS Society 2005 Oct/Nov で報告されたものに基づいたものを使用した (Table6)。その後、組み換えウイルスによる解析 (Fig. 3) から、RT 前半領域の非サブタイプ B 特有の変異と RT 後半領域の耐性変異が加わることによって、NVP に耐性を示すことがわかった。しかしこの耐性は、RT 後半領域に耐性変異が存在しても、RT 前半領域がサブタイプ B であれば NVP に感受性を示すことがわかっている。つまり非サブタイプ B 特有の NVP 耐性であることが示唆された。

D. 考察

3 年間にわたり、薬剤耐性試験、感受性試験を中心に、新規感染者での耐性伝播状況、非サブタイプ B に関する両者のデータ構築を目的とした。

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おり、また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。今回の研究で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。また現在知られていない NVP に対する耐性変異が、今回日本での新規感染患者群から検出されたことから、既存の耐性検査では、十分な対応ができないことが示唆された。

1998 年から 2003 年にかけて分離されたウイルスの 84% がサブタイプ B、2004 年以降においても、主流はサブタイプ B であった。非サブタイプ B のほとんどが CRF01_AE であり、東南アジアで流行している株が日本国内に入ってきていることが示唆された。

未治療例における CRF01_AE とサブタイプ B の比較は、NRTI や NNRTI の耐性変異の出現頻度、薬剤感受性において、有意な差は認められなかった。しかし PR については、サブタイプ間での耐性変異の出現頻度に違いが認められ、また薬剤感受性においても、SQV、LPV で有意な差があり、CRF01_AE で感受性が高いことが示唆された。この感受性の差が臨床の場において、影響を及ぼすのかどうか、今後検討する必要があると思われた。しかし比較となった CRF01_AE の症例数が少ないため、今後もう少し数を増やし、引き続き検討を行っていきたい。

また非サブタイプ B における耐性獲得症例から、両者の NVP の結果に乖離した症例が見つかった。組み換えウイルスによる解析から、RT 前半の非サブタイプ B 特有の変異と RT 後半の耐性変異が組合わさると、NVP に耐性を示すことが認められた。つまりこれまでのサブタイプ B の耐性変異データでは NVP 耐性を予測出来ない非サブタイプ B ウイルスが見つかった。

日本での非サブタイプ B ウイルスが占める割合は低いものの、今回のように非サブタイプ B 特有の耐性変異が存在することから、非サブタイプ B に対する薬剤耐性変異データの

再構築の必要性は非常に高く、早急に対応していかなければならないと思われた。

E. 研究発表

発表論文

1. Hachiya A., S. Matsuoka-Aizawa, K. Tsuchiya, H. Gatanaga, S. Kimura, M. Tatsumi, S. Oka. "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, 2003.
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, 2003.
3. A. Hachiya, H. Gatanaga, E. Kodama, M. Ikeuchi, M. Matsuoka, S. Harada, H. Mitsuya, S. Kimura, S. Oka. Novel patterns of nevirapine resistance-associated mutations of human immunodeficiency virus type 1 in treatment-naive patients. *Virology*. 327:215-24, 2004.
4. H. Gatanaga, A. Hachiya, S. Kimura, S. Oka. Mutations other than 103N in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase emerge from K103R polymorphism under non-nucleoside RT inhibitor pressure. *Virology*. 344:354-362, 2006.

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、潟永博之、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.
3. 横山 勝、木之元正信、徳永研三、佐多徹太郎、長縄 聡、北村勝彦、蜂谷敦子、岡 慎一、服部知秀、田中真理、横幕能行、有吉紅也、星野忠次、仲宗根正、佐藤裕徳 「計算科学の HIV 研究への適用に関する基礎研究」 第18回日本エイズ学会総会、静岡、12月、2004
4. 蜂谷敦子、潟永博之、根岸ふじ江、木村哲、岡 慎一. 新規臨床分離株の抗 HIV 薬に対する累積百分率. 第18回日本エイズ学会総会、静岡、12月、2004
5. 橋本 修、吉田隆史、林 明男、蜂谷敦子、巽 正志、岡 慎一、山崎修道、青木 学. 実用的な抗 HIV-1 薬剤耐性フェノタイプ測定法の確立. 第19回日本エイズ学会総会、熊本、12月、2005

Fig.1 新規感染者における耐性出現頻度

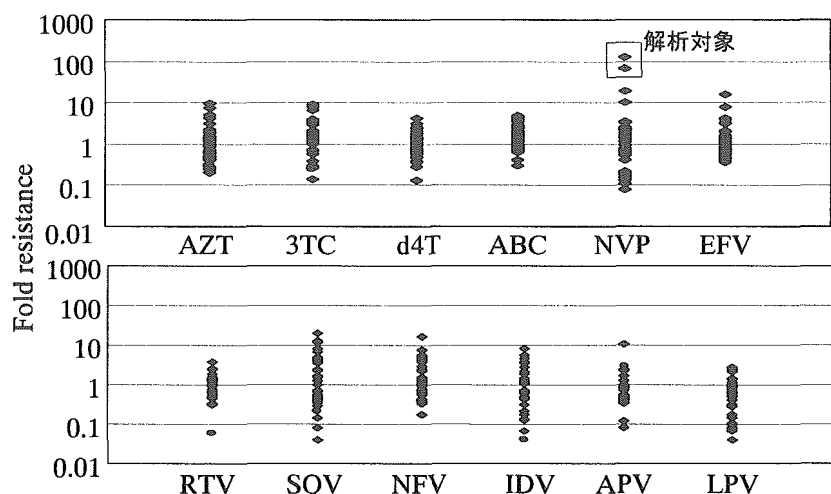


Table.1 薬剤感受性の比較

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				

Table.2 Env V3領域におけるサブタイプ分布

1998~2003 分離ウイルスを対象			2004.10~2005.12 患者血漿を対象		
subtype	n	%	subtype	n	%
B	178	84.0	B	92	93.8
CRF01 (AE)	17	8.0	CRF01 (AE)	2	2.0
CRF14 (BG)	4	1.9	G	1	1.0
A	2	0.9	CRF03 (AB)	1	1.0
C	2	0.9	CRF14 (BG)	1	1.0
CRF02 (AG)	1	0.5	CRF15 (AE B)	1	1.0
CRF12 (BF)	1	0.5			
不明	7	3.3		98	

Fig.2 サブタイプBとAEの薬剤感受性

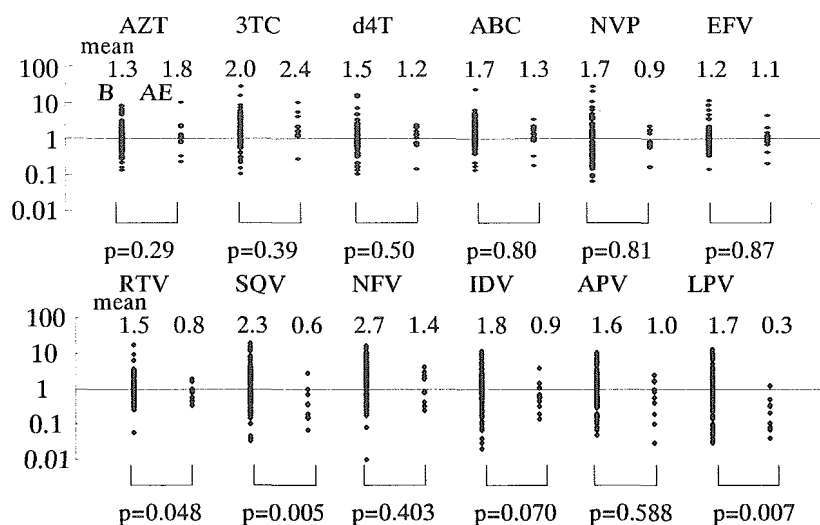


Table.3 RT領域における耐性変異の出現頻度の違い

	B	AE	P		B	AE	P
M41L	0	0	—	L100I	0	0	—
E44D	0	0	—	K103N	0	0	—
K65R	0	0	—	V106A	0	0	—
D67N	0	0	—	V108I	0	0	—
T69D	0	0	—	Y181C/I	0	0	—
K70R	0	0	—	Y188C/	0	0	—
L74V	0	0	—	L/H	0	0	—
V75I	0	0	—	G190A	0	0	—
F77L	0	0	—	P225H	0	0	—
Y115F	0	0	—	M230L	0	0	—
V118I	0	0	—	P236L	0	0	—
M184V	0	0	—	V118I	0	0	—
L210W	0	0	—				
T215Y/F	0	0	—				
K219Q/E	0 (0)	1 (7.7)	0.0036				

Table.4 PR領域における耐性変異の出現頻度の違い

	B	AE	P		B	AE	P
L10I/R/V	10(9.1)	2(15.4)	0.477	F53L	0	0	—
K20M/R	2 (1.8)	3(23.1)	0.0003	I54V/L	0	0	—
L24I	0	0	—	L63P	47(43.1)	2(15.4)	0.0538
D30N	0	0	—	A71V/T	22(20.2)	0 (0)	0.0736
V32I	0	0	—	G73S	0	0	—
L33F	0	0	—	V77I	47(43.1)	0 (0)	0.0025
M36I	5 (4.6)	12(92.3)	<0.0001	V82A/F/T	0	0	—
M46I/L	0	0	—	I84V	0	0	—
I47V	0	0	—	N88D/S	0	0	—
G48V	0	0	—	L90M	0	0	—
I50V	0	0	—				

Table.5 薬剤感受性試験

	AZT	3TC	d4T	ABC	NVP	EFV
A	24	2.0	0.6	0.9	57	5.0
B	314	6.9	4.2	4.8	38.8	1.0
C	1.2	0.4	1.0	1.4	0.8	<1
D	1.3	1.1	0.43	1.0	2.1	1.5

Table.6 主な耐性変異の導入状況

NRTI		International AIDS Society 2005												Oct/Nov				
ACC No.	M	E	A	K	D	T	K	L	V	F	Y	V	Q	M	L	T	K	
A	L	—	—	—	N	—	—	—	M	—	—	—	—	—	—	W	Y	—
B	L	—	—	—	N	—	—	—	M	—	—	I	—	—	—	W	Y	—
C	—	—	—	—	—	—	—	—	V/M	—	—	I/V	—	—	L/W	—	—	—
D	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

NNRTI		International AIDS Society 2005								Oct/Nov	
ACC No.	100	103	106	108	181	188	190	225	230	236	
	L	K	V	V	Y	Y	G	P	M	P	
A	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
B	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
D	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	

Fig. 3 組み換えウイルスによる薬剤感受性試験結果

WT(NL)		NVP		EFV		上段 μM 下段 耐性度	
RT		NVP		EFV		RT	
前半	後半	NVP	EFV	前半	後半	NVP	EFV
B	— ^{a)}	0.08 1.4	0.002 1	B	C	0.13 2.8	0.001 0.5
C	—	0.31 5.3	0.004 2	C	B	1.9 42	0.03 15
—	B	0.17 2.9	0.009 4.5	B	B	2.2 48	0.006 3
—	C	0.08 1.4	0.003 1.5	C	C	0.094 2	0.002 1

a) —は、NLとの組み換え

B-5. 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

榮 賢司 (愛知県衛生研究所)

秦 眞美、續木雅子 (愛知県衛生研究所)

佐藤克彦、森下高行、鈴木康元

研究概要

HIV感染症の治療は抗HIV薬のプロテアーゼ阻害剤と逆転写酵素阻害剤のコンビネーションによる多剤併用療法により劇的に改善された。しかし、治療からの離脱や中断により耐性ウイルスの出現が確認され、それら耐性ウイルスの未治療者への伝播が問題となってきた。そこで、2003-5年に愛知県内の保健所及び医療機関でHIV感染が疑われ、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44名の血清を用いてプロテアーゼおよび逆転写酵素遺伝子の解析を行い、耐性ウイルスの浸淫状況について検討した。その結果、2003年度では、解析のできた9名のうち1名からProtease阻害剤のMajor変異であるM46Iが検出され、2004年度では、16名中1名から多剤の非核酸系RT阻害剤に対する強い薬剤耐性を示すK103Nが検出された。2005年度では、15名中3名からProtease阻害剤のMajor変異であるM46Iおよび1名からD30Nが、さらに、2名から核酸系RT阻害剤に対する薬剤耐性を示すY115FとF77Lがそれぞれ検出された。3年間の調査より東海地区においても耐性ウイルスの伝播は着実に拡がっていると示唆された。

A. 研究目的

HIV感染症の治療は抗HIV薬の登場により大きく変化した。抗HIV薬のプロテアーゼ (Protease:Pro) 阻害剤と逆転写酵素 (Reverse Transcriptase:RT) 阻害剤のコンビネーションによる多剤併用療法 (Highly Active Anti Retroviral Therapy:HAART) が臨床応用され、HIV感染者の予後は劇的に改善されている。しかし、副作用による治療からの離脱や中断により、耐性ウイルスの出現が確認され問題となっている。我が国に先駆けてHAARTを導入した欧米等では、HIV初感染者の約10%前後に薬剤耐性関連遺伝子が検出されたとの報告がある。

我々は以前、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遺伝子について解析を行なった。その結果、強い薬剤耐性を示す一次変異は検出され、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考えられたが、今回その継続調査として、2003-5年にHIV感染の確認された44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。

B. 研究方法

2003-5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44検体を使用した。血清よりRNAを抽出し、

RT-PCR 法により RT 及び Pro 領域の遺伝子を含む約 1,300bps とエンベロープ遺伝子の C2V3 領域を増幅した。PCR 産物を鋳型として、ダイレクトシーケンシング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 番までのアミノ酸配列に対する遺伝子について解析を行なった。サブタイプ決定は NJ 法による系統樹解析により決定した。

C. 研究結果および考察

HIV 初感染者 44 名の概要を表 1 に示す。匿名検査のため性別、国籍、年齢等不明である場合が多い。感染経路は、26 名が男性同性愛者 (Men who Sex with Men:MSM) による感染と推定されたが、残りの 18 名については不明であった。こ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、2003 年度の 1 検体が AE 型であったが、その他は全て B 型であった。次に、薬剤耐性関連変異についての解析結果を表 2 に示した。2003 年度は 9 名中 1 名から Pro 阻害剤に対するメジャー変異である M46I が検出され、2004 年度は 16 名中 1 名から多剤の非核酸系 RT 阻害剤に対する強い薬剤耐性を示す K103N が検出された。2005 年度は 15 名中 3 名から Pro 阻害剤に対するメジャー変異である M46I、1 名から D30N が検出された。さらに 2 名から核酸系 RT 阻害剤に対する薬剤耐性を示す Y115F と F77L がそれぞれ検出された。また、Pro 阻害剤のマイナー変異は 21 検体 (52.5%) に検出された。検出されたのは、L10I、L10P、K20M、M36I、L63P、A71T、V77I の 7 種類で、10 検体 (24.3%) は 2 種類以上の変異を持っていた。サブタイプと薬剤耐性関連変異との相関を見ると、検出された Pro 遺伝子マイナー変異は昨年までの調査から B 型に多く検出されており、これらの変異は薬剤耐性関連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。

2002 年までの調査結果から、東海地区における HIV 初感染者間での耐性ウイルスの伝播は低い状態で推移していたが、2003 年に Pro 阻害剤に対するメジャー変異 (M46I) が検出され、さらに 2004 年に多剤の非核酸系 RT 阻害剤に対する強い薬剤耐性を示す K103N が検出された。2005 年度の調査では、Pro 阻害剤に対するメジャー変異である M46I または D30N、さらに核酸系 RT 阻害剤に対する薬剤耐性を示す変異である F77L および Y115F が検出された。東海地区における HIV 初感染者間の耐性ウイルスの伝播は着実に拡がっていると示唆された。今後、HIV 初感染者間での耐性ウイルスの伝播が定着し、さらに拡大する可能性も考えられるので、耐性ウイルスに関する監視を継続することが重要であると考えられた。

表1 HIV 感染者の詳細（性別、感染経路等）

検体名	性別	国籍	感染経路
A ich i/1/03	男	ペルー	不明
A ich i/2/03	男	日本	不明
A ich i/3/03	男	不明	MSM
A ich i/4/03	男	日本	MSM
A ich i/5/03	男	日本	MSM
A ich i/6/03	男	日本	MSM
A ich i/7/03	男	日本	MSM
A ich i/8/03	男	日本	MSM
A ich i/9/03	男	日本	不明
A ich i/10/03	男	日本	不明
A ich i/11/03	男	日本	不明
A ich i/1/04	男	ブラジル	不明
A ich i/2/04	女	ブラジル	不明
A ich i/6/04	男	日本	不明
A ich i/7/04	男	日本	MSM
A ich i/8/04	男	日本	MSM
A ich i/9/04	男	日本	MSM
A ich i/11/04	男	日本	MSM
A ich i/12/04	男	日本	MSM
A ich i/13/04	男	日本	MSM
A ich i/14/04	男	日本	MSM
A ich i/15/04	男	日本	MSM
A ich i/16/04	男	日本	MSM
A ich i/17/04	男	日本	MSM
A ich i/18/04	男	日本	MSM
A ich i/19/04	女	不明	不明
A ich i/21/04	男	日本	不明
A ich i/22/04	男	日本	不明
A ich i/24/04	男	日本	不明
A ich i/1/05	男	日本	不明
A ich i/2/05	男	不明	MSM
A ich i/3/05	男	不明	MSM
A ich i/4/05	男	不明	MSM
A ich i/5/05	男	不明	MSM
A ich i/6/05	男	不明	MSM
A ich i/7/05	男	不明	MSM
A ich i/8/05	男	不明	MSM
A ich i/9/05	男	不明	MSM
A ich i/10/05	男	不明	MSM
A ich i/11/05	男	日本	不明
A ich i/12/05	男	日本	不明
A ich i/13/05	不明	不明	不明
A ich i/14/05	男	不明	不明
A ich i/15/05	男	不明	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メジャー変異	Proマイナー変異	RT変異
A ich i/1/03	-	-	-
A ich i/2/03	-	-	-
A ich i/3/03	-	L10I	-
A ich i/5/03	-	K20M	-
A ich i/6/03	-	V77I	-
A ich i/7/03	-	V77I	-
A ich i/9/03	M46I	-	-
A ich i/10/03	-	-	-
A ich i/11/03	-	-	-
A ich i/1/04	-	-	-
A ich i/2/04	-	-	-
A ich i/6/04	-	V77I	-
A ich i/8/04	-	-	-
A ich i/9/04	-	A71V, V77I	-
A ich i/11/04	-	-	K103N
A ich i/13/04	-	M36I	-
A ich i/14/04	-	-	-
A ich i/15/04	-	-	-
A ich i/16/04	-	M36I, L63P	-
A ich i/17/04	-	L63P	-
A ich i/18/04	-	-	-
A ich i/19/04	-	M36I, L63P	-
A ich i/21/04	-	L10P, L63P, V77I	-
A ich i/22/04	-	M36I	-
A ich i/24/04	-	L10P, L63P, V77I	-
A ich i/1/05	-	L63P, A71I	-
A ich i/2/05	-	M36I	-
A ich i/3/05	M46I	M36I, L63P	-
A ich i/4/05	M46I	M36I, L63P	-
A ich i/5/05	-	M36M/I	Y115Y/F
A ich i/6/05	-	L10I, L63P	-
A ich i/7/05	-	-	F77F/L
A ich i/8/05	-	V77I	-
A ich i/9/05	-	-	-
A ich i/10/05	-	-	-
A ich i/11/05	-	-	-
A ich i/12/05	M46I	-	-
A ich i/13/05	-	-	-
A ich i/14/05	D30D/N	-	-
A ich i/15/05	-	L10I, M36I	-

Pro:Protease

RT:Reverse Transcriptase

B-6. 薬剤耐性変異の解析法の開発・改良・技術研修に関する研究：

薬剤耐性検査の実用化と衛生研究所等への技術移管

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第2研究グループ長)

研究概要

全国の衛生研究所等の施設において HIV-1 検査を担当する技術者を対象にした技術研修会を3日間の日程で開催した。この研修会では国立感染症研究所で行っている HIV 薬剤耐性検査の技術について技術移管を行うとともに、内外から講師を招待し HIV-1 の薬剤耐性に関する基礎的な知識から臨床における薬剤耐性検査の意義について講義を行った。

A. 研究目的

1995年の多剤併用療法(HAART)の導入により HIV 感染症に対する治療は大きく改善したが、一方で薬剤耐性を獲得した HIV の出現が治療に対する大きな問題として注目されるようになった。新規 HIV-1 感染者調査グループの報告によると、2003年から2004年の間に新たに HIV 感染を診断された症例の約5%に逆転写酵素阻害剤あるいはプロテアーゼ阻害剤に対する耐性変異が認められたとされている。この知見は薬剤耐性 HIV-1 が新規感染患者に伝播する危険性が拡大している現状を強く示唆して保健所等で把握される HIV 症例において薬剤耐性 HIV-1 感染症例が今後増加することを予想させる。新規診断における薬剤耐性 HIV の状況を正しく把握し迅速な対策を講じるためにも、各地の拠点病院・衛生研究所等で HIV 検査業務を担当する技官等が HIV の薬剤耐性検査法や薬剤耐性について正しい技術と知識を習得している事が望ましい。そこで本研究では HIV 検査担当者に対して HIV 検査技術研修会を開催し、技術移管と知識の習得を実施した。

B. 研究方法

平成15年度は10月15日～17日、平成16年度は10月27日～29日、平成17年度は10月5日～7日のどの年度も3日間の日程で国立感染症研究所村山分室において HIV 検査技術講習会を開催した。3年間の間に全国39施設からのべ48名の参加者があり(図1)、図2に示すプログラムに従い薬剤耐性検査の実習と講義を行った。実習では事前に調製・解析済みの HIV RNA をサンプルとした。この RNA サンプルを国立感染症研究所で開発したプライマー(図3)を用い、RT-PCR で逆転写酵素領域とプロテアーゼ領域を増幅し、塩基配列解析を行った。また env 領域についても同様に PCR による増幅・塩基配列解析を行いサブタイプ決定した。研修終了後実習と講義に対してアンケート調査を行い研修参加者の満足度と次年度以降の要望について調査した。

C. 研究結果

平成15年度には事後評価のアンケート調査は行わなかったが、平成16年度と平成17年度にはアンケート調査を行い参加者の満足度と要望について交差した。その結果、実習・

講義について約 85%の受講者が満足と回答し、参加者の要求にはほぼ応えることができたと思われる(図4)。平成17年度は平成16年度のアンケート調査の結果を踏まえて実験開始前に実習の全体像について説明する時間を設け、実習参加者の理解度の向上に努めた。しかしフリーコメントの中から、得られたシーケンス情報を元にして系統樹解析を行う方法の理解度が低い傾向が見られた。これまでにHIV検査の経験を持たない参加者にとっては作業が複雑であったため実験手技の意味を理解しにくい点があったと思われた。一方これまでにHIV検査の経験を持つ参加者からは、自分で準備したシーケンスデータを実際に解析する時間を取れたため非常に参考になったという意見も聞かれた。

D. 考察

実習開始前に研修の全体像の説明を行った事は、実習生の理解度を深めるために効果があったと思われた。しかし一方で、コンピューターを使用した解析方法の難しさを指摘する意見も聞かれた。実習生の経験レベルを一定に保つのは難しいため、経験を持たない実習生の理解度をさらに上げる事が今後の課題であろう。今回は以前同じ研修を受講した研修生の参加があり、研修後に研修生が得た知識をどのように生かしたのか、どのような技術や知識を新たに得たいと考えているのかを知る機会があり、今後の実習計画の参考にしたい。また今後も参加者が研修会によって得た検査技術を実地でどのように生かしたのか追跡調査することが今後の研修会改善や各地域でのHIV検査への取り組みの実態を知るために重要であるのでこれについても次年度以降の課題として検討したい。

E. 結論

3年間で全39施設のべ48名の参加者を対象にしてHIV検査技術研修会を3日間の日程

で開催しHIV検査技術の移管と薬剤耐性HIVの講義を行い知識の向上を図った。アンケート調査を行った結果参加者の85%以上が研修会が有意義であったと回答し、参加したHIV検査担当者に有効な検査技術移管と教育を行う事が出来た。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

(1)論文発表

1. 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, Wataru Sugiura, 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
2. Hua Yan, Tomoko Chiba Mizutani, Nobuhiko Nomura, Tadakazu Takakura, Yoshihiro Kitamura, Hideka Miura, Masako Nishizawa, Masashi Tatsumi, Naoki Yamamoto, Wataru Sugiura: A