

CD4 でも発現している遺伝子のイントロンに入っていることがわかった。すなわち、ほとんどの HIV は転写に対して抑制的とはいえない場所に存在していた。しかし、一部の集団ではヘテロクロマチンのような転写に対して抑制的な場所が、HIV の潜伏感染に関与している可能性も考えられた。解析を行っている中から B 細胞の分化に関与する遺伝子として知られている BACH2 遺伝子に HIV のインテグレーションが集中している症例を発見したことは驚きであった。なぜなら、これほどの強いクラスターは、これまでに報告されていないからである。この症例では BACH2 遺伝子への HIV の integration が優先的に行われていると考えられる。一方でこの遺伝子は、resting CD4 でも発現していることから、HIV の転写も十分に行える場所と考えられる。臨床的な側面から見ると、この症例が HAART 開始以前からウイルスのセットポイントが低く CD4 の低下もあまり認められなかったことを考えると、全 integration event の 31%を占めるこの領域が実際には HIV の転写に関して抑制的な場所であり、潜伏感染に関与している可能性も否定できない。

また、臨床経過の異なる時期に同じインテグレーション部位をもった感染細胞がしばしば観察されており、HIV DNA を保持している感染細胞が増殖しながら残存していることを示唆している。本年度はインテグレーションに関与する宿主因子の検索のため、ウイルスが感染し染色体に組み込まれると GFP が発現するようにベクターを構築した。Pt1 由来の T 細胞株、B 細胞株を樹立し、これらの細胞株と末梢血 CD4+細胞に VSV シュウドタイプウイルスを用いて導入し、インテグレーション部位を同定した。しかし、インテグレーション部位は用いた細胞によって異なり、BACH2 遺伝子への集積も見られなかった。感染から組み込みの *in vitro* モデルの困難さを示すと考えられる。

## E. 結論：

本研究では、長期に亘る有効な HAART 療法後も残存している HIV-1 のほとんどが転写を十分に行える場所に組み込まれていることを示した。また、HIV 感染細胞が増殖しながら残存する新たなメカニズムを示した。また、*BACH2* 遺伝子における HIV インテグレーションの集中は、新たな潜伏感染あるいはインテグレーションメカニズムが存在していることを示唆する。

## F. 健康危惧情報

なし

## G. 知的所有権の出願・取得状況

(予定含む) 特になし

## H. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Eda, Y., Takizawa, M., Murakami, T., Maeda, H., Kimachi, K., Yonemura, H., Koyanagi, S., Shiosaki, K., Higuchi, H., Makizumi, K., Nakashima, T., Osatomi, K., Tokiyoshi, S., Matsushita, S., Yamamoto, N. and Honda, M. Sequential immunization with V3 peptides from primary HIV-1 produces cross-neutralizing antibodies against primary isolates with matching narrow neutralization sequence motif. *J. Virol.* 80 : 5552-5562, 2006.
2. Eda, Y., Murakami, T., Ami, Y., Nakasone, T., Takizawa, M., Someya, K., Kaizu, M., Izumi, Y., Yoshino, N., Matsushita, S., Higuchi, H., Matsui, H., Shinohara, K., Takeuchi, H., Koyanagi, S., Yamamoto, N. and Honda M. Anti-V3 humanized antibody KD-247 effectively suppresses *ex vivo* generation of human immunodeficiency

- virus type 1 and affords sterile protection of monkeys against a heterologous simian/human immunodeficiency virus infection. *J. Virol.* 80 : 5563-5570, 2006
3. Yoshimura, K., Shibata, J., Kimura, T., Honda, A., Maeda, Y., Koito, A., Murakami, T., Mitsuya, H., Matsushita S. Resistance profile of a novel broadly neutralizing anti-HIV monoclonal antibody, KD-247, that shows favorable synergism with anti-CCR5 inhibitors in vitro. *AIDS*, 20:2065-2073, 2006.
  4. Ikeda, T., Shibata, J., Yoshimura, K., Koito, K., Matsushita, S. Recurrent HIV-1 integration at the BACH2 locus in resting CD4+ T cell populations during effective HAART. *J. Infect. Dis.* 2007 (in press).
  5. Shibata, J., Yoshimura, K., Honda, A., Koito, A., Murakami, T. and Matsushita, S. Impact of V2 mutations for escape from a potent neutralizing anti-V3 monoclonal antibody during in vitro selection of a primary HIV-1 isolate. *J. Virol.* 2007 (in press).
  6. 松下修三. 抗ウイルス薬血中濃度測定的重要性. *治療*. 88(12) : 2916-2925, 2006.
  7. 清原万紀子, 吉村和久, 松下修三. 新しい抗 HIV 薬の開発動向と期待される臨床効果. *薬局*. 57(10) : 2959-2966, 2006
2. 学会発表
    1. Matsushita S., Shibata J., Honda A., Murakami T, Eda Y, Koito K, Yoshimura. Development of broadly reactive neutralizing monoclonal antibody KD247: implications for passive immunotherapy. *AIDS Vaccine 2006 Conference, Amsterdam, the Netherlands, Aug. 29-Sep. 1, 2006.*
    2. Shibata, J., Yoshimura, K., Honda A., Murakami, T., Koito, A., and 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. 13<sup>th</sup> Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Denver, USA, Feb. 4-9, 2006.
    3. Yoshimura, K., Shibata, J., Honda A., Murakami, T., Mitsuya, H., Koito, A., and 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*. 13<sup>th</sup> Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Denver, USA, Feb. 4-9, 2006.
    4. Ikeda T, Shibata J, Yoshimura K, Koito A, Matsushita S. Recurrent HIV-1 integration at BACH2 locus in resting CD4+ T cell populations during effective HAART. 7<sup>th</sup> AIDS Seminar in Kumamoto, Sep 21-22, 2006.
    5. Shibata J, Yoshimura K, Honda A, Koito A, Murakami T, Matsushita S. Impact of V2 mutations for escape from a potent neutralizing anti-V3 monoclonal antibody during in vitro selection of a primary HIV-1 isolate. 7<sup>th</sup> AIDS Seminar in Kumamoto, Sep 21-22, 2006.
    6. Yoshimura K, Shibata J, Honda A, Koito A, Matsushita S. A novel potent neutralizing anti-V3 monoclonal antibody, KD-247, that shows favorable synergism with anti-CCR5 inhibitors in vitro. 7<sup>th</sup> AIDS Seminar in Kumamoto, Sep 21-22, 2006.
    7. 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 と組込み部位の関連性. 第 54 回日本ウイルス学会総会. 2006. 11. 18-21. 名

古屋

8. 柴田潤二、吉村和久、小糸 厚、松下修三.  
抗 HIV-1 gp120-V3 抗体より逃避した V2 領域変異ウイルスの中和抵抗性メカニズムの解析. 第 54 回日本ウイルス学会総会.  
2006. 11. 18-21. 名古屋
9. 吉村和久、柴田潤二、小糸 厚、松下修三.  
In vitro における抗 HIV-1 中和単クローン抗体とその他の薬剤との相互作用の研究.  
第 20 回日本エイズ学会学術集会・総会.  
2006. 11. 30-12. 2. 東京.
10. 松下修三. シンポジウム 3 「より良い HAART に向けて」-耐性検査の意義とタイミング. 第 20 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2006. 11. 30-12. 2. 東京.



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 研究員

## 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の調査を行った。

### 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) HIV-1 のプロテアーゼについて、変異の実態を掴む。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、解析を行う。既知の薬剤耐性変異の情報収集を行って、変異の解析とあわせてサブデータベース化する。

(2) 各々のアミノ酸サイトにおける変異のパターンはサイトごとに完全に独立している訳ではなく、サイト間にて変異が相互に干渉しあうケースが報告されている。本研究では相互情報量を用いた解析により、全てのアミノ酸サイト間での干渉の度合いを求め、治療歴等の条件による変化を観測することにより、薬剤耐性との関連や変異の蓄積の傾向を明らかにする。また、立体構造や分子のダイナミクスとの関連を明らかにする。

### 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、各アミノ酸の出現頻度、アミノ酸の多様性、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 プロテアーゼの配列を用い 99 のアミノ酸サイト間の相互情報量を求めた。まず、入力配列を未治療の状態にて採取したサンプル (n=2049)、indinavir の投与を受けたサンプル (n=737)、同じく nelfinavir (n=598)、saquinavir (n=215) の 4 つの群に分け、それぞれの群において、アミノ酸サイト間の相互情報量を Hoffman らの手法 [Virology 314 (2003) 536-548] を用いて求め、STANFORD HIV DRUG RESISTANCE DATABASE [http://hivdb.stanford.edu] に登録されている阻害活性値の変化や、立体構造情報との対応を取った。さらに統計的な有意差を求めるために 100,000 回のランダムサンプリングによる permutation test を行い、より確からしいサイト間の関連を明らかにした。

### 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) 全てのアミノ酸サイト間において、0.05 以上の相互情報量を持ち、かつ統計的な有意差 ( $p < 0.01$ ) において関連があると判断されたペアは、未治療のサンプルにて 3 ペア、治療歴のあるサンプルにて合計 69 ペア存在した。indinavir, nelfinavir, saquinavir のそれぞれの群において、サイト間の干渉のパターンに違いが見られた。さらに、変異の組み合わせで分類したところ、極性のアミノ酸が関与しているケースに比べ、非極性のアミノ酸が関与しているケースが多かった。また、近距離で直接相互作用するケースだけでなく、離れた 2 つのサイトが干渉しているケースも数多く観測された。さらに、阻害活性の変化 (fold resistance) と相互情報量との関係を図 2 に示した。これら 2 つの値は弱い相関ではあるが ( $R=0.34$ )、fold resistance が大きいほど、相互情報量が高い傾向にあることが判明した。

#### 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) アミノ酸サイト間での干渉と阻害活性値との関係、さらに立体構造との対応をとることにより、変異の蓄積の傾向を把握することができる。例えば、nelfinavir 投与群でのみ観測された 30 番目と 88 番目のサイト間での正の干渉において、D30N/N88D の変異体の頻度が期待値よりも大きかったが (頻度と期待値の差 =  $\Delta P=0.11$ )、D30/N88D の変異体の出現頻度は非常に低かった ( $\Delta P=-0.13$ )。この現象は負電荷の 2 つのアスパラギン酸が近距離に相互作用し、酵素を不安定化させることに起因すると考えられ、

D30N/N88 変異体の頻度が比較的に高いことを考慮に入れると、D30N/N88D 変異体は 30→88 の順に変異が蓄積している可能性が高いことが導き出せる。また Stanford HIV DRUG RESISTANCE DATABASE に登録されている阻害活性値の変化から、nelfinavir 以外の薬剤にて 30-88 間での干渉が起こらないのは D30N 変異が薬剤耐性を起こさないことに起因することも推察された。この他、サイト間の干渉のパターンは薬剤によって大きく異なり、干渉の度合いと阻害活性との間の関連が示唆されたことから、サイト間の干渉に薬剤の阻害活性が大きく関与していることが判明した。

変異の蓄積は薬剤耐性の度合い (阻害活性の変化)、ウイルスの適応度 (酵素触媒能) のバランスによって傾向が異なり、変異体の出現頻度、阻害活性、立体構造情報などを統合することで、変異の蓄積の傾向、またそのメカニズムに構造的な観点から迫ることができると考えられる。

#### 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) 関連のある 2 つのサイト間の変異を解析し、薬剤の阻害活性値との対応をとることで、変異の蓄積の傾向に関する情報を収集することに成功し、配列の頻度解析・立体構造や fold resistance など各種実験結果との対応をとるために有用なツールを作成した。また、立体構造との対応から、静電的な相互作用よりも疎水相互作用や VDW 相互作用などのように、非静電的な相互作用をするケースが多いことが判明した。また、距離が離れているサイト間での干渉も数多く存在し、さらに

以前の分子動力学計算からも2つの近接したサイトの変異が離れた場所の揺らぎを変化させるという結果が得られたことから、変異の蓄積がタンパク質全体のダイナミクスにどのような変化をもたらすかを捉えていくことが重要であると考えられる。

今後本研究で用いた情報に加え、3つ以上のサイト間での関連、酵素触媒能、分子動力学シミュレーションを用いた酵素の安定性といった情報をさらに付加し、統合することで変異の蓄積の予測、最適な治療薬の選択、薬剤耐性のメカニズムの解明に迫ることができると考えられる。

#### F. 健康危険情報

該当しない

#### 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

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

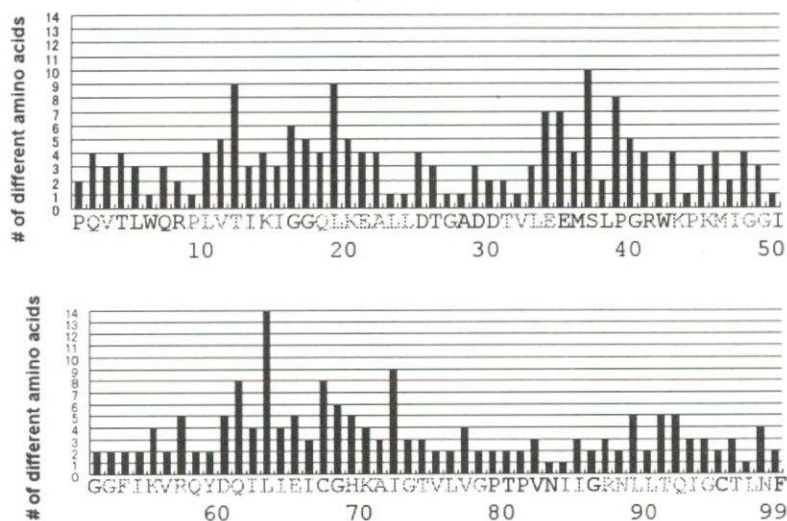


図1. HIV-1 プロテアーゼのアミノ酸の多様性の評価。ここでは、各アミノ酸サイトに出現するアミノ酸の種類数が示されている。

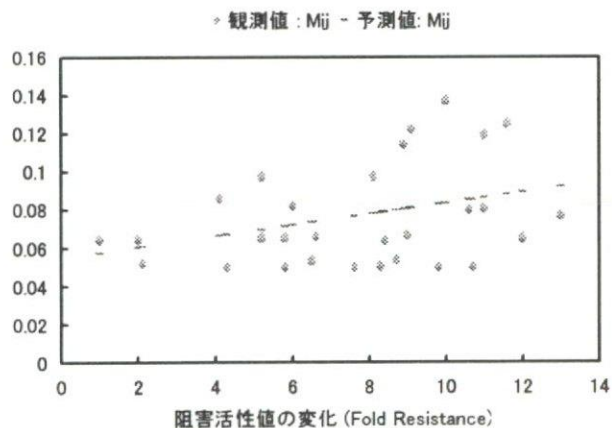


図2. Indinavir 群における相互情報量と阻害活性値の変化との関係

Fold resistance の値は  $i$  番目、 $j$  番目のサイトに置ける変異を含む全ての変異体の実験値から算出した第一四分位置の値。[STANFORD HIV DRUG RESISTANCE DATABASE [http://hivdb.stanford.edu/cgi-bin/PR\\_Phenotype.cgi](http://hivdb.stanford.edu/cgi-bin/PR_Phenotype.cgi)]



## II. 分担研究報告書 【調査研究グループ】



厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

分担研究報告書

「薬剤耐性遺伝子検査のヴァリデーションに関する研究」

分担研究者 金田次弘 国立病院機構名古屋医療センター臨床研究センター血液免疫研究部 部長  
研究協力者 藤崎誠一郎 国立病院機構名古屋医療センター臨床研究センター血液免疫研究部  
研究協力者 藤崎彩恵子 国立病院機構名古屋医療センター臨床研究センター血液免疫研究部  
研究協力者 伊部史朗 国立病院機構名古屋医療センター臨床研究センター血液免疫研究部  
研究協力者 服部純子 国立病院機構名古屋医療センター臨床研究センター血液免疫研究部  
研究協力者 清水香代子 国立病院機構名古屋医療センター臨床研究センター血液免疫研究部  
研究協力者 中村和代 国立病院機構名古屋医療センター臨床研究センター血液免疫研究部  
研究協力者 吉田繁 北海道大学病院検査部  
研究協力者 浅黄司 国立病院機構宮城病院臨床検査科  
研究協力者 正兼亜季 石川県立中央病院中央検査部  
研究協力者 大家正泰 新潟大学大学院医歯学総合研究科  
研究協力者 渡邊香奈子 新潟保健環境科学研究所  
研究協力者 松田昌和 株式会社三菱化学ビーシーエル検査企画管理部  
研究協力者 岡田清美 株式会社北里大塚バイオメディカルアッセイ研究所  
研究協力者 秦眞美 愛知県衛生研究所微生物部  
研究協力者 溝上泰司 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  
研究協力者 南留美 国立病院機構九州医療センター免疫感染症科臨床研究部

**研究要旨：**臨床検体を対象にした薬剤耐性遺伝子型検査の第二次バリデーションを行った。10 個の主要薬剤耐性アミノ酸変異（プロテアーゼ領域：L10I, L63P, V77I, L90M, I93L、逆転写酵素領域：M41L, T69insertion, G190A, L210W, T215Y）を有する検体であったが、バリデーションに参加した 16 施設全てからこれらの薬剤耐性アミノ酸変異は正しく報告された。また、プロテアーゼ領域に 3 個（V3I, I15V, S37D/N）、逆転写酵素領域に 10 個（V35I/T, T39A, E122K, I135T, Q207H, R211K, L214F, K238S）の計 11 個のその他のアミノ酸変異も存在していた。これらについては正しく検出されていたが、5 アミノ酸については報告書作成時に誤った記入があり、人手を介した報告書作成の限界を示した。これらの結果を踏まえ、薬剤耐性検査の標準化への準備は終了したと思われる。

#### A. 研究目的

昨年度は、遺伝子型が均一な HIV-1 クローンを用いたバリデーションを実施した。その結果、遺伝子型薬剤耐性検査でミスジャッジを引き起こす原因を、以下の 3 つに分類することが出来た。①マッチしないプライマーの使用、②ノイズを伴うエレクトロフォグラムに起因する解析エラー、③人為エラー、である。これらのエラーを克服するために、①HIV-1 の塩基配列と保存性の高

いプライマーを使用する、②シーケンス反応に精製度の高いプライマー（HPLC 精製）を使用し、さらに、シーケンサーには新鮮なキャピラリー、ゲル、バッファーを用いる。また、シーケンスはフォワード、リバースの両方向から行う、③解析の自動化により、人為ミスを防ぐ、の 3 つを提案し各施設に通達した。本年度は、上記改善点を踏まえ各施設が問題点を克服できているかを確認するため、臨床検体を用いたバリデーションを



実施した。

## B. 研究方法

患者血漿 1 サンプルを用いて HIV-1 遺伝子型薬剤耐性検査のバリデーションを実施した。健康人血漿を用いて希釈した患者血漿（血中ウイルス量  $9.43 \times 10^4$  copies/mL）を各施設に送付し、HIV-1 遺伝子型薬剤耐性検査を実施した。検査後、薬剤耐性アミノ酸変異、ならびに薬剤耐性以外のアミノ酸変異を報告して頂いた。報告書は、薬剤耐性アミノ酸変異の判定基準を統一して評価するため、IAS-USA パネルに基づいて判定した結果を提出して頂いた。報告書と共に、使用したプライマーの配列、エレクトロフォレグラム、解析した塩基およびアミノ酸配列のファイルも提出して頂いた。各施設が報告したアミノ酸変異は、名古屋医療センターの検査結果を基準として評価した。必要に応じて、提出されたファイルを詳細に解析した。

## C. 研究結果

バリデーションには全国の 16 施設が参加した。IAS-USA パネルに基づき各施設より報告された薬剤耐性アミノ酸変異を図 1 に、その他のアミノ酸変異を図 2 に示した。また、施設 F は報告書に、アミノ酸ではなくコドンに記載していたので、コドンがコードするアミノ酸に翻訳した後、評価した。その結果全施設より、共通の主要薬剤耐性アミノ酸変異が 10 個（プロテアーゼ領域：L10I, L63P, V77I, L90M, I93L、逆転写酵素領域：M41L, T69insertion, G190A, L210W, T215Y）報告されており、完璧な成績であった（図 1）。

その他の明確に検出可能なアミノ酸変異については、プロテアーゼ領域に 3 個（V3I, I15V, S37D/N）、逆転写酵素領域に 8 個（V35I/T, T39A, E122K, I135T, Q207H, R211K, L214F, K238S）の計 11 個のアミノ酸変異が存在している（図 2）。これら 11 個のアミノ酸変異については全施設で正しく検出されていた。しかし第一次バリデーションの結果より改善が求められていた人為的エ

ラーに関する誤記入は 4 施設で見受けられた。

## D. 考察

薬剤耐性アミノ酸変異に関しては、全 16 施設が共通のアミノ酸変異を検出しており、極めて優秀な成績を収めたといえる。

本年度のバリデーションでは、ミスジャッジを引き起こす第一の原因である、マッチしないプライマーの使用はなかったことから、このエラーは解決したといえる。ミスジャッジを引き起こす二番目の原因である、ノイズを伴うエレクトロフォレグラムによるエラーは全く存在しなかった。三番目の原因である人為エラーは、今回のバリデーションでも発生した。この種のエラー数は合計 5 個であり、エラー率は 1.5%であった。以上を総合すると、人為的なエラー撲滅の課題は引き続き残っているものの本検査精度は大きく改善できたと評価できる。人為エラーは検査を担当する者の不注意によって発生したものである。人為エラーは、現在ほとんどの施設が行っている「人手を介した報告書作成」では不可避的なエラーであり、エレクトロフォレグラムの解析から報告書作成の過程を自動化するソフトウェアの開発と普及が重要であることをあらためて示している。

## E. 結論

臨床検体を用いた第二次バリデーションの結果は、第一次バリデーションにより明らかになった HIV-1 遺伝子型薬剤耐性検査の問題点を全国の研究参加施設で改善できたことを明らかにした。また、本検査法の標準化の必要性が明らかになった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Performance and Quality Assurance of Genotypic Drug-Resistance Testing for Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Japan  
S. Fujisaki, S. Fujisaki, S. Ibe, T. Asagi,



T. Ito, S. Yoshida, T. Koike, M. Oie, M. Kondo, K. Sadamasu, M. Nagashima, H. Gatanaga, M. Matsuda, M. Ueda, A. Masakane, M. Hata, Y. Mizogami, H. Mori, R. Minami, K. Okada, K. Watanabe, T. Shirasaka, S. Oka, W. Sugiura and T. Kaneda

Japanese Journal of Infectious Diseases,  
in press

2) HIV-1 遺伝子型薬剤耐性検査のバリデーション

藤崎誠一郎、藤崎彩恵子、伊部史朗、浅黄司、伊藤俊広、吉田繁、小池隆夫、大家正泰、渡邊香奈子、正兼亜季、上田幹夫、潟永博之、松田昌和、貞升健志、長島真美、岡田清美、近藤真規子、秦真美、溝上泰司、森治代、南留美、白阪琢磨、岡慎一、杉浦互、金田次弘  
日本エイズ学会誌、投稿中

2. 学会発表

1) HIV-1 遺伝子型薬剤耐性検査のバリデーション

藤崎誠一郎、藤崎彩恵子、伊部史朗、浅黄司、吉田 繁、正兼亜季、大家正義、渡辺香奈子、潟永博之、松田昌和、貞升健志、岡田清美、近藤真規子、秦 真美、溝上泰司、森 治代、南 留美、杉浦 互、金田次弘

第 20 回日本エイズ学会総会（平成 18 年 11 月－2006）（東京）

2) HIV-1 遺伝子型薬剤耐性検査の標準化

藤崎誠一郎、藤崎彩恵子、伊部史朗、金田次弘

第 25 回臨床化学会夏期セミナー（平成 18 年 8 月－2006）（札幌）

G. 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

# 図1

各施設に共通して検出された

主要薬剤耐性アミノ酸変異

( IAS-USA 2005 Fall に基づいて判定 )

標準株 施設名	HXB2											IUJ-3		Stanford univ. consensus B sequence														
	A	B	C	D	F	G	I	J	K	L	N	O	P	L10	H	L10	L63	V77	L90	I93	M41	T69	G190	L210	T215	E	M	
PR	L10	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	L10	I	L10	L63	V77	L90	I93	M41	T69	G190	L210	T215	I	I
	L63	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	L63	P	L63	L63	V77	L90	I93	M41	T69	G190	L210	T215	P	P
	V77	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	V77	I	V77	V77	V77	L90	I93	M41	T69	G190	L210	T215	I	I
	L90	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	L90	M	L90	L90	V77	L90	I93	M41	T69	G190	L210	T215	M	M
	I93	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	I93	L	I93	I93	V77	L90	I93	M41	T69	G190	L210	T215	L	L
RT	M41	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	M41	L	M41	M41	V77	L90	I93	M41	T69	G190	L210	T215	L	L
	T69	S, S-G	S, S/R, G	ins	S, S-G	S, S-G	S, S-G	S, S-G	S, S-G	S, S-G	S, S-G	ins	S, S-G	S, S-G	T69	S, S-G	T69	T69	V77	L90	I93	M41	T69	G190	L210	T215	S, S-G	S, S-G
	G190	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	G190	A/G	G190	G190	V77	L90	I93	M41	T69	G190	L210	T215	A	A/G
	L210	L/W	W	L/W	W	W	L/W	L/W	W	W	W	W	W	L/W	L210	L/W	L210	L210	V77	L90	I93	M41	T69	G190	L210	T215	W	W
	T215	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	T215	Y	T215	T215	V77	L90	I93	M41	T69	G190	L210	T215	Y	Y

薬剤耐性アミノ酸変異

検出率: 100%



## 図 2

# 各施設に共通して検出された その他のアミノ酸変異 (IAS-USA 2005 Fallに基づいて判定)

標準株 施設名		IAS-USA 2005 Fall																Stanford univ. consensus B														
		HXB2						NL4-3						Stanford univ. consensus B																		
A	B	C	D	F	G	I	J	K	L	N	O	P	NL4-3						E	M												
V 3	I	I*	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I 3	I 3	I 3	I 3	I 3	I 3	I 3	I 3	I 3	I 3	I 3	I 3	I 3	I 3	I 3					
I 15	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	PR	PR	PR	PR	PR	PR	PR	PR	PR	PR	PR	PR	PR	PR	PR	PR				
S 37	D	D	D	D	D	D/N	D	D/N	D	D	D/N	D/N	N 37	N 37	N 37	N 37	N 37	N 37	N 37	N 37	N 37	N 37	N 37	N 37	N 37	N 37	N 37	N 37				
V 35	IT	T	T	T	T	T	T	T	T	T	IT	IT	V 35	V 35	V 35	V 35	V 35	V 35	V 35	V 35	V 35	V 35	V 35	V 35	V 35	V 35	V 35	V 35				
T 39	A	I	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	T 39	T 39	T 39	T 39	T 39	T 39	T 39	T 39	T 39	T 39	T 39	T 39	T 39	T 39	T 39	T 39				
E 122	K	K*	K	K	K	K	K	K	K	K	K/E	K	K 122	K 122	K 122	K 122	K 122	K 122	K 122	K 122	K 122	K 122	K 122	K 122	K 122	K 122	K 122	K 122				
I 135	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	I 135	I 135	I 135	I 135	I 135	I 135	I 135	I 135	I 135	I 135	I 135	I 135	I 135	I 135	I 135	I 135	I 135			
I 142	IT	IT	IT	IT	IT	T	IT	IT	T	IT	IT	IT	I 142	I 142	I 142	I 142	I 142	I 142	I 142	I 142	I 142	I 142	I 142	I 142	I 142	I 142	I 142	I 142	I 142			
I 178	VL	VL	VL	VL	VL	L	VL	VL	L	VL	VL	VL	I 178	I 178	I 178	I 178	I 178	I 178	I 178	I 178	I 178	I 178	I 178	I 178	I 178	I 178	I 178	I 178	I 178	I 178		
Q 207	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	Q 207	Q 207	Q 207	Q 207	Q 207	Q 207	Q 207	Q 207	Q 207	Q 207	Q 207	Q 207	Q 207	Q 207	Q 207	Q 207	Q 207	Q 207		
R 211	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	R 211	R 211	R 211	R 211	R 211	R 211	R 211	R 211	R 211	R 211	R 211	R 211	R 211	R 211	R 211	R 211	R 211	R 211	R 211	
L 214	F	F	F	F	F*	F	F	F	F	F	F	F	L 214	L 214	L 214	L 214	L 214	L 214	L 214	L 214	L 214	L 214	L 214	L 214	L 214	L 214	L 214	L 214	L 214	L 214	L 214	
K 238	S	S*	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	K 238	K 238	K 238	K 238	K 238	K 238	K 238	K 238	K 238	K 238	K 238	K 238	K 238	K 238	K 238	K 238	K 238	K 238	K 238	K 238

- ・ グレーで示した箇所は、NL4-3、Stanford inv. consensus Bにおいて HXB2と異なるアミノ酸を示している。
- ・ \* は人為エラーが存在していた箇所を示している。

#### 研究要旨

我が国における薬剤耐性 HIV-1 の拡散の状況を把握するために、2006 年 4-10 月にかけて国立感染症研究所エイズ研究センターに送られてきた新規 HIV/AIDS 診断症例 32 例について薬剤耐性 HIV-1 の頻度を調査した。解析の結果耐性ウイルス検出頻度は 9.4%であった。今回の結果を過去 3 年間の推移と比較すると急激に増加しているように見えるが、2006 年度は収集症例数が少なかったため耐性ウイルスが増加したとは結論できない。今後も引き続いて HIV 感染症例が増加しており、今後とも十分な監視が必要と考えられた。

#### A. 研究目的

我が国における薬剤耐性 HIV-1 の拡散の状況を把握するために、国立感染症研究所エイズ研究センターに送られてきた HIV/AIDS 感染者検体のうち新規診断症例に該当するものについて薬剤耐性 HIV-1 の頻度を調査した。

#### B. 研究方法

2006 年 1-10 月末までに陽転もしくは陽転日不明で当該期間内に新規登録した症例について以下に示す方法によってプロテアーゼ (PR) および逆転写酵素 (RT) 領域の遺伝子配列解析を行った。

1. スピнкаラムを用いて新規 HIV-1 感染者の血漿 250 $\mu$ l からウイルス RNA を精製し、遺伝子増幅の鋳型とした。
2. 配列特異的プライマーを用いた逆転写反応による cDNA 合成と PCR による一次増幅を one step RT-PCR で行った。遺伝子増幅の特異性と感度を高めるため、その産物の一部を用いてさらに nested-PCR をかけ、PR 全域を含む 0.5kb、RT 前半部 0.9kb そして Env C2V3 0.4Kb をそれぞれ増幅した。
3. ダイターミネータ法によるダイレクトシーケ

ンスで塩基配列を決定し、解析した配列をアミノ酸配列へ置換し、薬剤耐性関連変異の有無を IAS-USA の薬剤耐性チャートに基づき判定した。

#### C. 研究結果

2006 年は 32 例の新規診断症例が送付された。2006 年 4 月より薬剤耐性検査が保険収載されたことから、2005 年以前と比べると感染研に送られてきた検体数は大きく減少した。

PR は多様性が高いため、HXB2 レファレンスと比較した際に何らかの変異を持つ例が 26/32(81.3%)に達したが、認められた変異のほとんどが 2 次変異であり、薬剤耐性変異に限ってみると L90M が 1 例 (3.1%) 認められた。RT 阻害剤に対する耐性では T215D と T215E がそれぞれ 1 例ずつ検出された (6.3%)。

#### D. 考察

平成 18 年 4 月からの薬剤耐性検査の保険収載は国内における薬剤耐性遺伝子検査検体の動きを大きく変えてしまい、今まで感染症研究所に依頼のあった検体数は大きく減少した。さらに民間



検査会社で行われた薬剤耐性検査の結果を感染研で入手するのは難しくなり、本年度は感染研として薬剤耐性検査の結果を収集するのが極めて困難であった。今後このような調査を適切に行うためにも、調査体制の早急な再構築が必要であるが、現在直面している問題点は解決が容易ではなく、再構築には相当の時間がかかると予想される。

#### E. 結論

2006年1-12月の新規HIV-1診断症例32例における薬剤耐性変異の有無をスクリーニングした結果、薬剤耐性HIV-1の伝播が疑われる症例の頻度は9.4%であった。

#### G. 研究発表

基礎研究グループ 分担研究報告書参照

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

「薬剤耐性遺伝子検査のヴァリデーションに関する研究」

分担研究者 伊藤 俊広 ((独)国立病院機構 仙台医療センター血液内科 医長)

研究協力者 浅黄 司 (宮城病院臨床検査科 主任)

## 研究要旨

多剤併用療法 (HAART) を行うことにより HIV 感染症の予後は改善されているが、当初より予想されている耐性ウイルスの出現頻度増加が懸念されている。平成 18 年度 (4 月～11 月までの期間)「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」の分担研究として東北地方における新規 HIV 感染者における薬剤耐性 HIV の現状を調査した。その結果、経験された新規感染者 5 症例すべてに RT もしくは PI 領域に複数個の耐性と考えられる変異が検出された。現時点で初期治療の薬剤選択に混乱はないが、今後 HIV 感染者の増加に伴い、新規感染者における薬剤耐性ウイルスの検査の重要性が増すものと考えられる。

## A. 研究目的

1990 年代後半から始まった核酸系逆転写酵素阻害剤 (NRTI) とプロテアーゼ阻害剤 (PI) もしくは非核酸系逆転写酵素阻害剤 (NNRTI) を組み合わせた HIV に対する多剤併用療法 (HAART) は非常に有用であり、HIV 感染症の予後を確実に改善させたが、HIV それ自体が持つ易変異性による薬剤耐性ウイルスの出現が当初より大きな問題である。またウイルスのサブタイプも種々検出されており、感染地域の拡大が示唆されるとともに現在研究の主流となっているサブタイプ B に対する治療戦略がそのままでは通用しない可能性もある。薬剤耐性 HIV の発生動向を把握するため、検査方法と調査体制を確立するための分担研究として東北地方における新規 HIV 感染者における薬剤耐性 HIV の現状について調査した。

本研究の目的は、臨床サイドで分離されるこれらウイルスの耐性遺伝子部位の変化を調べることにより、ウイルスの持つ性格を知り、今後期待される新規薬剤に対する評価や基礎研究に役立てられるよう検査方法・調査体制を確立することである。本研究は平成 16 年度から継続されているものであり、今回は平成 18 年度 (4 月～11 月) の症例分について報告する。

## B. 研究方法

平成 18 年度 (4 月～11 月)、仙台医療センターにおける新規 HIV 感染者から分離された臨床株 (HIV) を用い、これらウイルスが持つ性質の一つである薬剤耐性遺伝子変異について検討した。方法: nested double touch down PCR 法を用いた。すなわち、cDNA 合成を 50°C、30 分間行い、95°C、5 分間 RNase の不活化と DNA 変性を行う。1st タッチダウン反応では、変性反応を 94°C で 50 秒間、アニーリング反応を 55°C、30 秒間、伸長反応を 72°C、30 秒間一行程として、2 サイクル行った後、アニーリング温度のみを 1°C 降下させ、変性と伸張反応は同一として、50°C まで 6 段階のタッチダウン反応をする。更に PCR 反応として 94°C、50°C 30 秒間の反応を 28 サイクル行った後、最終伸張反応として 72°C、7 分間行う。Nested 法でも touch down PCR 反応は 1st touch down PCR と同様に行った。

(倫理面への配慮)

耐性遺伝子変異データの集計においては個人名、個人情報の同定は不可能であり、HIV 関連遺伝子以外の遺伝学的研究には用いない。



### C. 研究結果

平成 18 年 11 月末日までの間で HIV/AIDS 感染者の累計は 146 名であり、全国傾向と同様に新規の受診者は年々増加している。平成 18 年 4 月～11 月の期間に当院を受診した HIV 感染者は 11 例（男性 10 例、女性 1 例）で、すべて性的接触による感染であり、この内治療歴のない HIV 感染者で本研究の対象となった症例は 5 例（男性 4 例、女性 1 例）であった。初診時すでに AIDS を発症していたものは 1 例である。5 例すべて日本国籍（日本人）で、年齢は 25 歳から 71 歳まで分布した。20 歳代：3 例、30 歳代：1 例、そして 70 歳代 1 例であった。感染経路別では同性間：4 例、異性間は女性の 1 例である。HIV のサブタイプでは女性が C（海外滞在中の感染）以外他の 4 例は B であった。

薬剤耐性変異：RT 領域では 1 例で 2 箇所、すなわち K219N と F227L が認められた。PI 領域では 5 例、11 箇所検出された。すなわち、L63P：1 例、L63T：2 例、L63A：1 例、L63V：1 例、M36I：2 例、L10V：1 例、A71V：1 例、I93L：2 例であった。

### D. 考察

東北においても全国と同様に HIV 感染者は同性間の性的接触（MSM）を中心に増加傾向にある。NRTI、NNRTI、PI を用いた多剤併用療法は HIV の診療の上で多大な貢献をしたが、一方で薬剤耐性ウイルスの出現は当初より懸念されていた。東北ブロック拠点病院という限られた領域で経験された今年（平成 18 年）度 5 例の新規未治療感染者において、すでに多くに症例に単～複数の薬剤耐性変異が認められたことは今後の HIV 診療上、重要な問題である。現時点において実際の診療上、抗 HIV 療法の薬剤選択に大きな混乱は生じていないので、検出された変異の解釈は慎重であるべきであるが、複数の変異の関連からも薬剤耐性が生じることを考えれば、今後初期治療における耐性変異の検査は薬剤選択上、重要なものになると考えられる。

### E. 健康危険情報

なし

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

なし

#### 2. 学会発表

なし

### G. 知的財産権の出願・登録状況

#### 1. 特許出願

なし

#### 2. 実用新案特許

なし

#### 3. その他

なし

分担研究者：稲吉 恵 静岡県環境衛生科学研究所 微生物部 ウイルススタッフ 副主任

**研究要旨** 2003 年から 2006 年の間に確認された新規未治療 HIV 感染者の、薬剤耐性遺伝子検査を行った。その結果、14 件中 1 件にヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤（NRTI）に耐性を示す M184V の薬剤耐性変異が認められた。対象者が未治療の新規 HIV 感染者であるにもかかわらず、薬剤耐性変異が検出されたことは、新たな HIV 感染者への耐性ウイルスの伝播が増加することも危惧され、今後とも耐性ウイルスの動向に注意が必要であると考えられた。

## A. 研究目的

HIV 感染症に対する治療は、プロテアーゼ阻害剤の認可と多剤併用療法の導入により、著しく改善された。しかし、抗ウイルス薬の使用に伴い、薬剤耐性変異をもつウイルスの出現が問題となっている。近年、薬剤耐性変異をもつ HIV-1 が新たに感染した未治療感染者からも報告されており、薬剤耐性 HIV-1 の未感染者への伝播が懸念されている。そこで、2003 年から 2006 年の間に確認された新規 HIV-1 感染者における薬剤耐性変異の頻度を調査し、初感染者における薬剤耐性 HIV-1 の浸淫状況を明らかにする。

## B. 研究方法

2003 年から 2006 年までの間に確認された新規 HIV-1 感染者の血清あるいは血漿 14 検体を使用した。

血清または血漿よりウイルス RNA を抽出し、RT-PCR および nested PCR を行い、逆転写酵素領域とプロテアーゼ領域を増幅した。RT-PCR および nested PCR に使用したプライマーは、DRRT1L / DRRT4L - DRRT7L / DRRT6L（逆転写酵素領域）、DRPRO5 / DRPRO2L - DRPRO1M / DRPRO6（プロテアーゼ領域）である。増幅産物を精製後、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。得られた塩基配列をアミノ酸配列に変換し、薬剤耐性変異の有無について調べた。逆転写酵素遺伝子のコ

ドン 1-266 と、プロテアーゼ遺伝子のコドン 1-99 について解析した。

（倫理面への配慮）

HIV 検査は匿名で行なっており、検体自体に個人識別情報が存在しないため、検査担当者が患者の氏名、生年月日など、個人情報にふれることはない。しかし、ヒト血液を検体とした研究を行なう以上、倫理的な配慮をかかすことはできない。そのため、個人情報保護とその家族の人権擁護のため、個人識別情報は含まないが、提供された情報および検査結果に関しては厳重に管理することを遵守する。

## C. 研究結果

今回検査をおこなった 14 検体は、いずれも男性であり、年齢層としては 20 代 3 件、30 代 6 件、40 代 3 件、不明 2 件であった。また、年度ごとの検査数は、2003 年 3 件、2004 年 4 件、2005 年 5 件、2006 年 2 件であった。14 検体のうち、逆転写酵素領域で 11 件、プロテアーゼ領域で 13 件からそれぞれ増幅産物が得られた。両領域とも増幅産物が得られなかった検体が 1 件あった。

増幅産物の得られた検体の中で、逆転写酵素遺伝子に耐性変異が認められたものが 1 件あり、ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤（NRTI）に耐性を示す M184V の変異であった。M184V の変異が認められたのは、2006 年の検体であった。その他に逆



転写酵素遺伝子では、T69I (1件) と T215D (1件) の変異が認められた。

プロテアーゼ遺伝子では、薬剤感受性に大きく影響を及ぼす変異は認められなかった。しかし、すべての検体でプロテアーゼ遺伝子には何らかの変異が認められた。それら変異について (表 1) に示した。

サブタイプ解析では、サブタイプ B が 11 件、サブタイプ CRF01\_AE が 2 件、増幅産物が得られず解析不能であったものが 1 件であった。サブタイプ CRF01\_AE が検出されたのは、2003 年 1 件、2004 年 1 件であった。M184V の薬剤耐性変異が認められた 1 件の HIV は、サブタイプ B であった。

#### D. 考察

今回検討した 14 件のうち 1 件より、ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤 (NRTI) に耐性を示す M184V の薬剤耐性変異が認められた。その他の検体およびプロテアーゼ遺伝子には、いずれも薬剤感受性に大きく影響を及ぼす変異は認められなかった。しかし、すべて治療歴のない新規 HIV 感染者であるにも関わらず、1 件の薬剤耐性変異が検出されたことは、新たな HIV 感染者への耐性ウイルスの伝播が増加することも危惧され、今後とも耐性ウイルスの動向に注意が必要であると考えられた。

#### E. 結論

2003 年から 2006 年の間に確認された新規未治療 HIV 感染者の薬剤耐性遺伝子検査を行ったところ、14 件中 1 件から薬剤耐性変異が検出された。すべて治療歴のない新規 HIV 感染者であるにも関わらず、ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤 (NRTI) に耐性を示す M184V の変異が検出されたことは、新たな HIV 感染者への耐性ウイルスの伝播が増加することも危惧され、今後とも耐性ウイルスの動向に注意が必要であると考えられた。

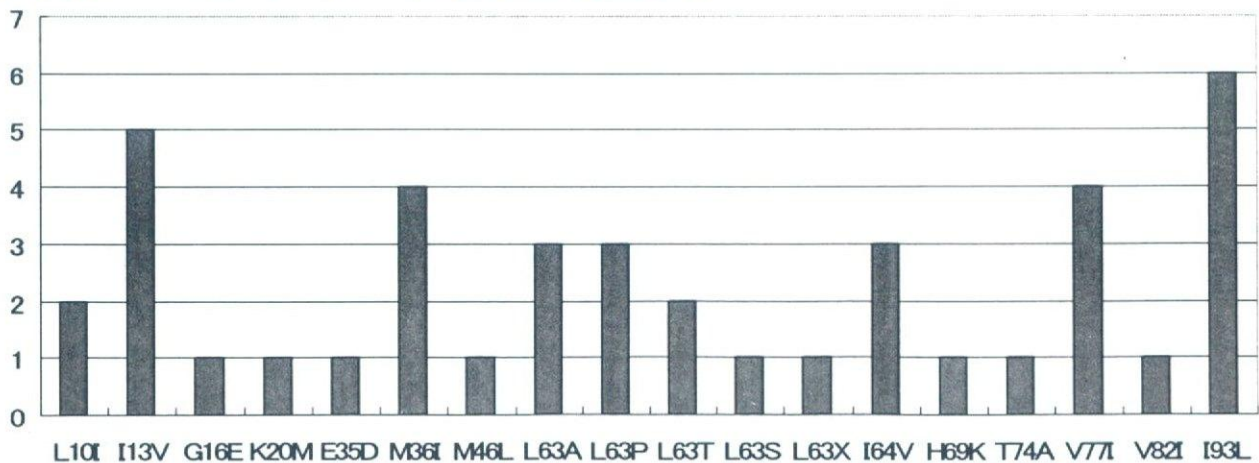
#### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### G. 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

(のべ件数) 表 1. プロテアーゼ遺伝子にみられた変異



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  
小谷 岳春 石川県立中央病院 血液免疫内科医長

#### 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。

2006 年には新規に診断された 7 名に対して耐性検査を行い、逆転写酵素領域では 2 名、プロテアーゼ領域では 7 名全員に野生株とは異なる変異を耐性関連部位に認めた。新規診断者 7 名のうち 5 名 (71.4%) がサブタイプ B、CRF02\_AG が 2 名 (28.6%) であった。pol 領域と env 領域でサブタイプの異なるリコンビナントウイルスが 1 名に確認された。

#### A. 研究目的

我が国における薬剤耐性 HIV-1 伝播の状況を把握するために、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する。また、北陸ブロック内の拠点病院間の連携を構築する。

同時にサブタイプ解析を行い、北陸ブロックにおける新規診断感染者の HIV-1 サブタイプの頻度について調査する。

#### B. 研究方法

「新規感染者耐性 HIV-1 サーベイランスプロトコール」に従い研究を行う。

新規に HIV 感染が診断された患者に対し、初診時、服薬開始前（必要に応じて服薬開始後 3 ヶ月）の検体について耐性検査を行う。同意取得後、保存血漿より HIV-1-RNA を抽出し、RT-PCR 法にて cDNA を合成した後増幅する。増幅させたサンプルを用いてダイレクトシーケンシング法で遺伝子配列を決定し、アミノ酸配列へ置換後、HXB2 株と比較し変異を判定する。

また env 領域についても同様に遺伝子配列を決定し、サブタイプ解析を行う。

患者には担当医から研究の説明を行い、同意書に署名を得た後、検査を行った。また、他施設からの検体は、依頼施設において記号化してもらいプライバシーの保護に配慮した。なお、本研究は石川県立中央病院倫理委員会にて承認されている。

#### C. 研究結果

北陸地方において 2006 年に新規に HIV 感染が確認されたのは、12 名（エイズ動向委員会平成 18 年 11 月 1 日報告）で、累積患者数は 105 名となった。当院では新規の感染者、患者数は 8 名で、累積患者数は 56 名である。当院の通院患者で 2006 年に本研究に新規にエントリーしたのは 6 名である。

初診時の耐性検査を、当院からの 6 名と他施設より依頼のあった 1 名、計 7 名に対して行った。このうち 2006 年に診断されたのは 5 名で、新規急性感染者の定義に当てはまる患者はおら