

ず、全ての患者が慢性未治療患者であった。感染経路の内訳は、3名が同性間性的接触、2名が異性間性的接触、2名は不明であり、初診時のCD4の中央値は258/ μl (28-550/ μl)、ウイルス量は 8.8×10^4 copies/ml (2.1×10^4 - 3.1×10^5 copies/ml)で、初診時にAIDSを発症していたのは2名(28.6%)であった。耐性検査の結果、逆転写酵素領域には2名にT215Lが、プロテアーゼ領域では7名全員に耐性に関与する部位に変異が確認されたが全て minor mutation であった。その内容を図に示す。また、2003年に診断され、今年服薬を開始した1名(服薬開始前)に検査を行ったところ、初診時はL63L/P、H69N、V77Iに変異が確認されたが、服薬開始前にはA71A/Iの変異も確認された。

サブタイプ解析では、新規にエントリーされた7名のうち、サブタイプBが5名、CRF02_AGが2名(2名とも外国籍)であった。2003年に診断され、サブタイプ解析を行ない pol 領域と env 領域で異なるサブタイプを示した1例に関して、国立感染症研究所へ解析を依頼したところ、サブタイプBとCRF01_AEのリコンビナントウイルスであることが確認された。

D. 考察

北陸ブロックのHIV/AIDS新規患者も全国と同様に増加傾向にあり、2006年の累計報告数は100名を超えた。今回、新規にエントリーしたのは7名であった。逆転写酵素領域に耐性をもたらす変異は確認されず、プロテアーゼ領域でも major mutation は無かったことから、北陸では全国平均と比較して耐性 HIV-1 の伝播は少ない可能性がある。

サブタイプBとCRF01_AEのリコンビナントウイルスが確認され、今後はこのようなウイルスの伝播についても注意が必要である。

E. 結論

1) 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名にT215Lを、プロテアーゼ領域では major mutation ; 0名、minor mutation ; 7名に変異を認めた。

2) 新規診断者7名のうち5名(71.4%)がサブタイプB、2名(28.6%)がCRF02_AGであった。

3) pol 領域と env 領域でサブタイプの異なる1名はリコンビナントウイルスであることが確認された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- ・山川朋子, 木村和子, 小野俊介, 辻 典子, 上田幹夫: 石川県の病院・診療所におけるHIV抗体検査の実態と初期対応. 日本エイズ学会誌 8 : 163-168, 2006

2. 学会発表

- ・今井由三代, 中崎しげ子, 吉田眞知子, 西田和子, 山下美津江, 山田三枝子, 北志保里, 辻 典子, 正兼亜季, 上田幹夫: 北陸ブロックにおけるNGOの役割. 日本エイズ学会誌 8 : 318, 2006
- ・本間隆之, 田辺貴幸, 下川千賀子, 森 正昭, 上田幹夫, 木村和子: エイズ診療拠点病院に勤務する薬剤師の意識調査. 日本エイズ学会誌 8 : 342, 2006
- ・山田三枝子, 山下美津江, 今井由三代, 北志保里, 辻 典子, 正兼亜季, 上田幹夫: グループ活動への試み - 「女性(患者・家族)の会」の活動から考える -. 日本エイズ学会誌 8 : 363, 2006
- ・中野久美子, 小谷岳春, 山田三枝子, 上田幹夫: 劇症型赤痢アメーバ腸炎から人工肛門造設となったHIV感染者に対する支援. 日本エイズ学会誌 8 : 389, 2006
- ・藤野真之, 湯永博之, 吉田 繁, 千葉仁志, 伊藤俊広, 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, 浜口元洋, 上田幹夫, 正兼亜季, 大家正義, 渡辺香奈子,

- 白阪琢磨, 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, 杉浦互 : 2003-2005
年の新規 HIV-1 感染者における薬剤耐性頻
度の動向. 日本エイズ学会誌 8 : 409, 2006
- ・藤崎誠一郎, 藤崎彩恵子, 伊部史朗, 浅黄
司, 吉田 繁, 正兼亜季, 大家正泰, 渡邊
香奈子, 瀧永博之, 松田昌和, 貞升健志,
岡田清美, 近藤真規子, 秦 眞美, 溝上泰
司, 森 治代, 南 留美, 杉浦 互, 金田
次弘 : HIV-1 遺伝子型薬剤耐性検査のバリ
デーション. 日本エイズ学会誌 8 : 414, 2006
 - ・小谷岳春, 上田幹夫, 山田三枝子, 山崎雅
英, 青木 眞 : 劇症型赤痢腸炎にて大腸全
摘、小腸亜全摘後に HAART を導入した HIV
感染患者の経験. 日本エイズ学会誌 8 : 449,
2006
 - ・山田三枝子, 山田里佳, 辻 典子, 正兼亜
季, 北志保里, 木村和子, 小谷岳春, 上田
幹夫 : 石川県における病院・診療所での HIV
抗体検査実施状況の調査結果(H16~17年).
第 19 回日本性感染症学会誌 Vol.17, No.2 :
85, 2006

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

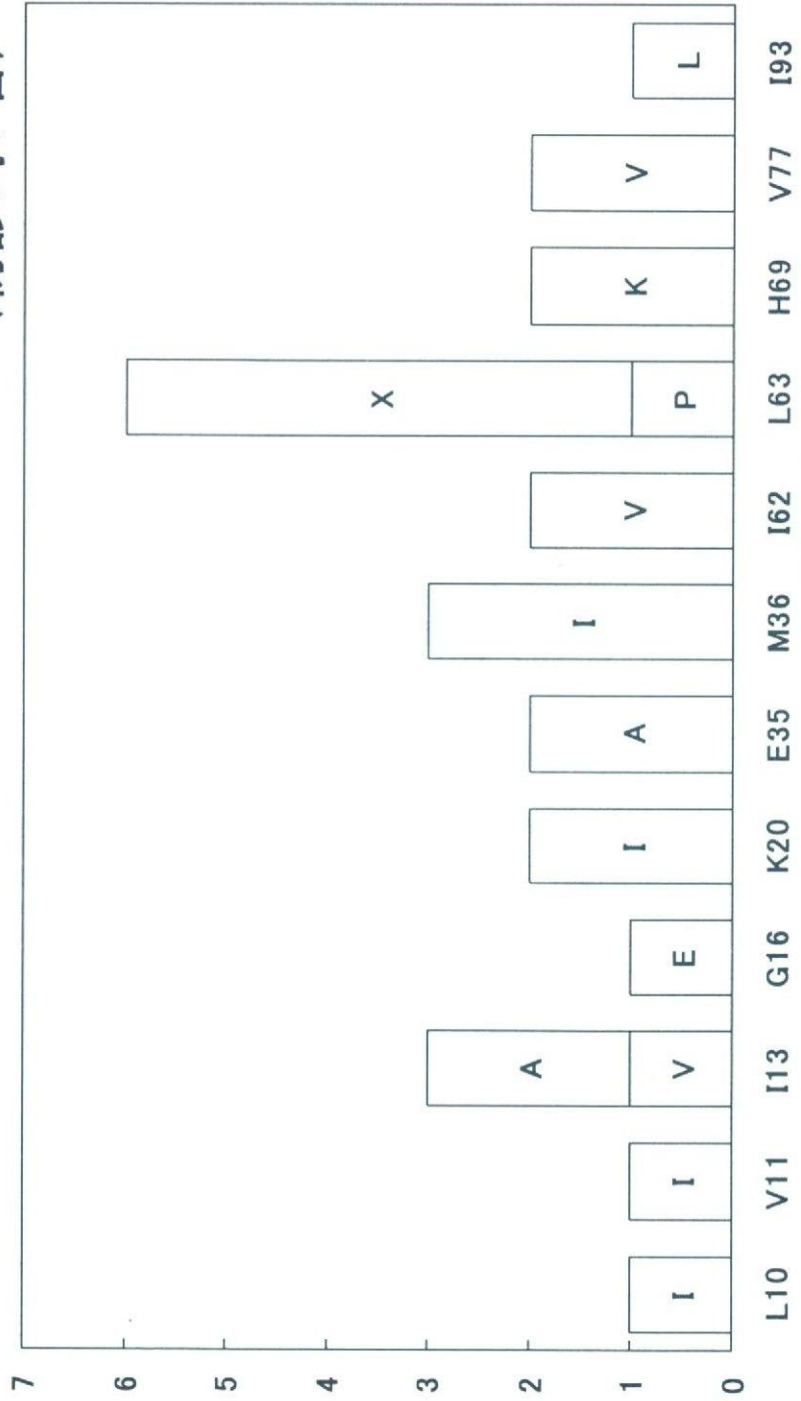
なし

【図】

プロテアーゼ領域の変異

(2006年)

(初診時7名)



* L63X; A, S, T, X

分担研究報告書

「中国・四国地区における薬剤耐性HIV-1調査体制確立のための研究」
- 抗HIV療法中断後にみられる薬剤耐性遺伝子変異の経時的变化 -

分担研究者：木村昭郎（広島大学原爆放射線医科学研究所 血液内科 教授）

研究協力者：高田 昇、藤井輝久（広島大学病院輸血部）、喜花伸子（同エイズ医療対策室）

【研究要旨】 薬剤の副作用、偶発的な合併症などにより抗HIV療法の中断に至った6例について、薬剤耐性遺伝子検査を経時的に行った。核酸系逆転写酵素阻害剤、非核酸系逆転写酵素阻害剤、およびプロテアーゼ阻害剤の使用中に誘導された変異には特徴があり、薬剤中断後に消失するもの、継続するものなどがある。薬剤再開のときには体内にこれらの変異HIVの存在を考えながら治療薬選択を行う必要があると考えられた。

A. 研究目的

色々な理由で抗HIV薬の服薬を中断したあと、中断後の経過を追って薬剤耐性遺伝子変異がどのように推移するかを観察すること。

B. 研究方法

広島大学病院血液内科で観察したHIV感染者のうち、抗HIV薬を中断したあと、薬剤耐性検査（以下ジェノタイプ）を実施したものの6例を対象とした。本人に文書による説明で同意を得たものについて採血を行い、国立感染症研究所エイズ研究センター杉浦研究室に送付した。血漿から別に述べた方法によってHIVの遺伝子配列から逆転写酵素領域と、プロテアーゼ領域のアミノ酸変異を同定した。以下、逆転写酵素領域をRT系とし、プロテアーゼ領域をPr系と略した。年齢は中断時のものとした。

倫理面への配慮

検体は研究協力者ですべて記号化を行い、患者のプライバシーに触れることがないように配慮した。

C. 研究結果

症例1 ST 55才、男性

本院初診は1993年。1997年よりAZT+3TCで治療開始。開始後6ヶ月目のジェノタイプ検査では変異が見られなかったが、14ヶ月目にM184Vを検出した【表1】。その後、Pr系には変異がみられず、RT系で徐々に新規の変異が追加されていった。治療開始後7年目に突然インシュリン治療が必要な糖尿病を発症したため、抗HIV療法を中断した。中断後のジェノタイプ観察では、HIV RNAの増加

とともに中断後半年以上経過して、野生型が優位を占めた。RT系の変異は薬剤を中断すると、fitnessに優れる野生型が盛り返してくることがわかった。

症例2 OT 28才、男性

本院初診は2004年4月。25才の時に前医のもとでAZT+3TC+ABCによる抗HIV療法を開始した【表2】。3年間継続したあと神経症状あり、本人の希望により服薬を中断した。その後神経症状は横ばい状態、HIV RNA値やCD4細胞数も横ばい状態で、当院に紹介された。治療開始前および抗HIV療法中断後108週の時点でのジェノタイプ検査は、野生型のままであった。本例では、中断後のリバウンド時期の検査が行われていない。しかし変異は発生しなかった可能性がある。

症例3 KW 35才、男性

本院初診は1998年【表2】。初回治療前のジェノタイプは野生型であった。1999年より開始したd4T+3TC+NFVへの反応は良好であったが、リポジストロフィーによる容貌変化があり、本人の希望でAZT+3TC+EFVを経て治療を中断するに至った。中断後16Wと72Wにジェノタイプ検査を実施したところ、Pr系でV77V/Iが継続していた。

症例4 FY 27才、男性

初診は1989年で1997年に小児科から転科した。AZT+3TCの治療歴が長く、抗HIV薬の変更を希望したため、2004年12月にTDF+3TC+EFVに変更した【表2】。変更前のジェノタイプでは、「RT: D67N, T69S, K70R, M184V, K219Q, Pr: M36I」が検出されていた。変更により抗HIV効果は優れていたが、

肝障害が発生したために変更4ヶ月目にレジメン全部を休薬した。中断後、4W、14Wにジェノタイプ検査を実施した。RT系でD67NとK219Qが消失した。この後、新しいレジメンに変更しHIV RNAは陰性化した。

症例5 MK 49才、男性

初診は1992年。抗HIV療法を開始して12年経過して、HIV感染症は良好なコントロールであった。しかし併発するHCV感染症の悪化のため、服薬継続が困難となり、治療と中断とを繰り返すに至った【表2】。本例の服薬歴では、AZT、ddI、IDV、d4T、RTV、NFV、3TC、TDF、ATV、ABC、FPVを組み合わせたレジメンであった。薬剤変更の前に実施したジェノタイプ検査の結果で薬剤選択を行ったため、変更後の抗HIV効果は良好であった。RT系の変異は消失する傾向があること、Pr系の変異は継続する傾向があることがわかった。最終的にはこの後に黄疸・腹水・食道静脈瘤破裂など肝不全により死亡した。

症例6 OA, 48才、女性

前医のもとで45才の時から、AZT+3TC、ついでd4T+ddI+NFVで治療されてきたがアドヒアランスは不良で、HIV RNA値が検出限界以下になったことはなかった。転居に伴い2001年に本院初診【表3】。この時点ですでに多数の耐性変異を有していた。病状進行のため、EFV+LPV/rに変更したところ、高熱、皮疹、顔面浮腫が生じて休薬した。軽快後にNVP+LPV/rを開始したが同様の症状があり、抗HIV薬の完全中断に追い込まれた。その後、患者の希望もあり可能な限り無治療のままで経過をみることになった。ジェノタイプについてみると、K103Nはわずか2週間のNNRTIによって発現した。他の変異も3ヶ月程度の休薬では消失することはなかった。病状は徐々に進行し、3年後にジフルカン耐性の深在性カンジダ症によって死亡した。

D. 考察

以上の薬剤中断と耐性変異の変化を観察した結果、次のような所見を得た。

1. 核酸系逆転写酵素阻害剤の2剤、AZT+3TCによる治療では病状の早い進行は抑えられるが、不完全なHIVの抑制によってRT系の耐性変異が蓄積していく。
2. RT系の耐性変異は、薬剤中断後に徐々に消失し、野生型優位に戻る傾向がある。

3. 非核酸系逆転写酵素阻害剤(NNRTI)開始後に中断に至った例から、わずか2週間の治療でK103N変異が出現し、薬剤中止後も消失することはない。
4. RT系、Pr系ともに多数の変異を生じた場合には、もはや選択すべき抗HIV薬がなくなり、薬剤中断後も病状が進行してしまう。患者の個人的な状況に合わせて服用できる薬剤を組み合わせ、新薬の登場を待つしかない。

E. 結論

抗HIV薬耐性検査の結果は、過去の治療薬によって耐性が生じたことを示すものであるが、必ずしも「次にはどの薬剤が有効である」ことを示すものではない。治療薬の変更や中断の理由は、治療失敗と副作用出現が主なものであるが、偶発症発生や患者の治療拒否(心理・社会的な理由)もありうる。

いったん発生した薬剤耐性が、薬剤の中断によってどのような経緯をたどるか、観察を行ったところ、薬剤毎に特徴があることがわかった。

体内からHIVを完全に排除できない現在、薬剤耐性発生の問題は感染者のQOLを損ない、HIV治療システムの最大の課題である。

F. 健康危険情報

特にない。

G. 研究発表

- 1) 藤井輝久：中四国地方のHIV/AIDSの現状 前編 広島県医師協だより 426:7-10, 2006.
- 2) 藤井輝久：中四国地方のHIV/AIDSの現状 後編 広島県医師協だより 427:8-10, 2006.
- 3) 藤井輝久、高田昇、畝井浩子、木平健治：抗HIV薬の留意すべき相互作用 薬局 57:29-33, 2006.
- 4) 藤井輝久：HIVの感染経路 診断と治療 94:2214-2217, 2006.
- 5) 藤井輝久、高田昇、齊藤誠司、石川暢恒、木村昭郎、藤田啓子、畝井浩子：HIV関連肺高血圧症に対するボセンタンとプロアテーゼ阻害剤との併用 日本エイズ学会誌 8:253, 2006.
- 6) 高田昇：エイズ検査を勧めるのが上手になるには学習と慣れが大切「平成18年度エイズ相談研修会」 広島県医師会だより 483:3-4, 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特にない。

【表1】

検査日	治療/中断	CD4	RNA	Genotype
1997年11月6日	治療中	449	436	RT:(-), Pr:(-)
1998年7月9日	治療中	435	808	RT:M184V Pr:(-)
1998年10月1日	治療中	ND	1100	RT:M184V Pr:(-)
1999年1月7日	治療中	562	100	RT:M184V Pr:(-)
1999年5月20日	治療中	521	459	RT:M184V Pr:(-)
2000年3月30日	治療中	598	428	RT:M184V Pr:(-)
2000年7月6日	治療中	363	100	RT:V179V/D, M184V, Pr:(-)
2001年1月4日	治療中	ND	221	RT:K70K/R, M184V, Pr:(-)
2001年6月14日	治療中	ND	ND	RT:M41M/L, M184V, Pr:(-)
2001年7月12日	治療中	618	343	RT:M41M/L, K70K/R, M184V, Pr:(-)
2002年1月17日	治療中	591	363	RT:M41M/L, K70K/R, M184V, Pr:(-)
2002年12月19日	治療中	672	516	RT:M184V, Pr:(-)
2003年10月23日	治療中	613	1300	RT:M41M/L, K70K/R, V179I/V, M184V Pr:(-)
2004年5月13日	治療中	663	1900	ND
2004年6月1日	3W 中断	623	27000	RT:K70K/R, V179I/V, M184V Pr:(-)
2004年7月1日	7W 中断	526	24000	RT:K70K/R, V179I/V, M184V Pr:(-)
2004年7月29日	11W 中断	488	28000	RT:K70K/R, V179I/V, M184V Pr:(-)
2004年8月26日	15W 中断	733	35000	RT:K70K/R, V179I/V, M184M/V Pr:(-)
2004年11月11日	25W 中断	468	48000	RT:V179I/V, Pr:(-)
2005年3月10日	37W 中断	568	230000	RT:(-), Pr:(-)

【表2】

ID	検査日	治療/中断	CD4	RNA	Genotype
OT	2002年3月25日	治療中	650	<50	ND
	2004年6月1日	108W 中断	429	3400	RT:(-), Pr:(-)
KW	1998年11月17日	治療前	342	58000	RT:(-), Pr:(-)
	2005年3月3日	16W 中断	405	66000	RT:(-), Pr:V77V/I
	2005年6月7日	28W 中断	368	110000	ND
	2006年1月12日	72W 中断	473	31000	RT:(-), Pr: V77V/I
	2004年12月14日	前	798	2300	RT:D67N, T69S, K70R, M184V, K219Q, Pr:M36I
FY	2005年5月10日	4W 中断	644	3700	RT:D67D/N, T69S, K70R, M184V, K219K/Q, Pr:M36I
	2005年7月19日	14W 中断	506	30000	ND
	2003 10 28	治療中	546		RT:V118I L210W, T215Y Pr:K20R, M36I, L63P
	2004年3月4日	5W 中断	247	86000	RT:M41L, V118I L210L/W, T215N/T Pr:M36I, L63P
	2004年9月30日	治療中	427	109	ND
MK	2005年3月30日	治療中		1300	ND
	2005年4月27日	4W 中断	269	18000	RT:(-), Pr:K20R, M36I, L63P
	2005年5月11日	治療中	251	390	ND
	2005年7月13日	8W 中断	135	160000	RT:(-), Pr:K20K/R, M36I

【表3】

検査日	治療/中断	CD4	RNA	Genotype
2001年10月23日	治療中 d4T+ddI+NFV	205	33000	RT: M41L, E44D, D67N, L74L/V, V118I, L210W, T215Y, Pr: L10L/I/V, K20K/T, M46M/I, L63P, L90L/M
2002年8月15日	治療中 NVP+LPV/r	287	5100	ND
2002年8月22日	中断			RT: M41L, E44E/D, D67D/N, L74L/V, V118V/I, L210L/W, T215Y, Pr:L10V, K20K/T/R, M36I, M46M/I, L63P, L90M
2002年9月12日	5W 中断	123	520000	RT: M41L, E44D, D67N, L74V, V118I, Y188Y/C, L210W, T215Y, Pr:L10V, K20T/R, M36I, L63P, L90M
2002年9月26日	治療中 EFV+LPV/r	422	9700	ND
2002年10月24日	4W 中断	216	640000	RT: M41L, E44D, D67D/N, L74L/V, L100L/I, K103K/N, Y188Y/C, G190G/A, L210R/LW, T215Y, Pr:L10V, K20T/R, M36I, L63P, L90M
2002年11月19日	8W 中断	185	140000	RT: M41L, E44D, D67N, L74V, L100L/I, K103K/N, V118V/I, Y188Y/C, G190G/A, L210R/W, T215Y, Pr:L10V, K20T, M36I, L63P, L90M
2002年12月3日	11W 中断	142	180000	RT: M41L, E44D, D67N, L74L/V, L100L/I, K103K/N, V118V/I, Y188Y/C, G190G/A, L210W, T215Y, Pr:L10V, K20T, M36I, L63P, L90M

「関東甲信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 下条文武 (新潟大学大学院医歯学総合研究科臨床感染制御学分野 教授)

研究要旨

2006年度、新潟県(5件)と群馬県(2件)の医療機関から送付された HIV 新規登録感染者の血液サンプル7件の解析をおこなった。感染者の内訳は男性5名、女性2名。すべて性的感染と見られ、男性感染者の2例は同性間感染である。感染ウイルスは男性が全例サブタイプB、女性が2例ともCRF01_AEと同定された。同性間感染のサンプル1例から一部の非ヌクレオシド系阻害薬への耐性に関わる変異V108Iが検出された。本研究班の継続期間中、新規感染者から検出された薬剤耐性変異の頻度は約5%(1/19)で、北関東・信越地区における耐性ウイルスの広がりには軽度の段階にあるといえる。

A. 研究目的

前年度より引き続き、北関東・信越地区の医療機関から送付された HIV 感染者の血液に含まれるウイルス RNA の塩基配列を解析し、新規登録患者分のデータを本研究班の作成する全国データベースに提供した。ウイルスゲノムの RT, protease, env(C2/V3), gag(p17)の4遺伝子領域のシークエンシングをおこない、決定された RT と protease 遺伝子の配列はおもに薬剤耐性変異の検出に、env と gag の配列はウイルス間の近縁関係の解析に用いた。2006年中に入手した7件のサンプルについて解析結果を述べる。

B. 研究方法

医療機関から送付された EDTA 添加患者血液(～7ml)を到着後直ちに遠心分離し(3,000rpm×10min)、血漿を分離した。血漿 0.2 ml から High Pure Viral RNA kit® (Roche, 1858-882)を用いて RNA を抽出し、50μl の溶出バッファーに回収して-90°Cで保存した。

ウイルス RNA の塩基配列の決定は RT, protease, env(C2/V3), gag(p17)の各領域についておこなった。RNA サンプル 5～10 μl を RT-PCR 法で増幅した後 (One-step RNA PCR Kit®, TaKaRa RR024A), 反応液の一部 (5μl) を nested PCR により再増幅して、シークエンシングに供した。PCR 反応に用いたプライマーは、RT 領域:

5'-ATGATAGGGGAATTGGAGGTTT-3'/5'-TACTTC
TGTTAGTGCTTTGGTTC-3' (1st, nt2388-3425), およ
び 5'-GACCTACACCTGTCAACATAAT-3'/5'-TAATCC
CTGCATAAATCTGACT-3' (2nd, nt2485-3372),
protease 領域: 5'-AGACAGGYTAATTTTTAGGGA-3'/
5'-TATGGATTTTCAGGCCCAATTTT-3' (1st, nt2074-
2716), および 5'-AGAGCCAACAGCCCCACCAG-3'/
5'-ACTTTTGGGCCATCCATTCC-3' (2nd, nt2148-
2611), C2/V3 領域: 5'-CATACATTATTGTGCCCCGG
CTGG-3'/ 5'-AGAAAAATCCCCTCTACAATTAA-3' (1st,
nt6866-7374), および 5'-AATGTCAGCTCAGTACAA
TGCACAC-3'/5'-ATTTCTGGGTCCCCTCTGAGG-3' (2nd,
nt6945-7336), p17 領域: 5'-ATCTCTAGCAGTGGCG
CCCGAACAG-3'/5'-CTGATAATGCTGAAAACATGGGTAT-3'
(1st, nt625-1318), および 5'-CTCTCGACGCAGG
ACTCGGCTTGCT-3'/5'-CCCATGCATTCAAAGTTCTAGGTGA
-3' (2nd, nt 683-1255)である。シークエンシ
ング反応は BigDye® Terminator v3.1 Cycle
Sequencing Kit (Applied Biosystems)を用いて
おこない、ABI PRISM®310 Genetic Analyzer によ
り解析した。

薬剤耐性変異は被検配列を参照配列 (HXB2) と比較した上、International AIDS Society (IAS)-USA 2005 の基準に基づいて同定した。ウイルスのサブタイプの同定はおもに C2V3 領域の BLAST によるホモロジー検索によりおこなった。

(倫理面への配慮)

血液サンプル受け入れの際、医療機関には疫学的研究に必要な患者に関する情報を、本人の同意の下に通知することを求めているが、これらには氏名、住所などただちに本人の特定に結びつく項目は含まれない。文書で通知された内容は直ちにデジタル化した後、元書類をシュレッダーで切断廃棄しており、転記したファイルは暗号化して保存するなど、個人情報の漏洩により患者が不利益を蒙る恐れを最小にとどめるよう配慮している。

C. 研究結果

解析したサンプル 解析したウイルス RNA は、新潟大学医歯学総合病院 (4 件)、新潟県長岡赤十字病院 (1 件)、および独立行政法人国立病院機構・西群馬病院 (2 件) でそれぞれ採取された HIV 新規登録患者 7 名の血液に含まれていたものである。感染者の性別は男性 5 名、女性 2 名。年齢は 20 歳代 2 名、30 歳代 3 名、50、60 歳代各 1 名となっている。国籍はすべて日本人で、感染地は不明の 1 名を除き、すべて国内である。男性感染者のうち 2 名は同性間感染で、男性 3 名と女性の全員は異性間の性的感染によるものであった。採血は初診時 (2 件)、または薬剤治療開始時 (5 件) におこなわれているが、感染時期が推定されているもの 4 例は少なくとも感染後 3 年以上 (最長 10 年) 経過した時点での解析となっている。シーケンシングの結果判明した感染ウイルスのサブタイプは男性の全例がサブタイプ B、女性はすべて CRF01_AE (AE) となっている。全国データに比して AE の頻度が高く、特に女性にこの傾向が著しい点はわれわれの従来の結果と同じである。

薬剤耐性変異 今回解析したウイルスの塩基配列に検出された薬剤体制にかかわる突然変異を、protease 阻害薬に対する minor 変異を含めて末尾の表に掲げた。前年度までの結果では、新規登録の感染例に著明な薬剤耐性変異を検出していなかったが、7 例中 1 例のウイルス (男性同性間感染、サブタイプ B) に非ヌクレオシド系阻害薬に耐性を付与する V108I が見出された。同じウイ

ルスの RT の配列中には、ヌクレオシド系阻害薬全般に軽微な耐性を有するとされる変異 T69A

(IAS-USA の定義には含まれない) も検出されている。また、別の 1 例にはヌクレオシド系阻害薬に同じく弱い抵抗性を付与する変異 L210F が検出された。T69 および L210 位の変異は置換されるアミノ酸の種類によっては強い抵抗性が誘導されるため、薬剤治療中の患者のウイルスには同部位の変異がしばしば認められる。したがって、今回解析したウイルスに見出された T69A および L210F という変異が、薬剤治療によって生じた耐性ウイルスから復帰変異によって生じた可能性は排除できないと思われる。

解析した配列間の類縁関係 今回のウイルスにわれわれがこれまでに解析したものを加え、全 39 のサンプルについて RT, protease, env, gag の各領域で配列の相同性を比較した。その結果は個別の領域で比較的高い相同性を示すウイルスの組み合わせはみられるものの、4 領域すべてにおいて強い近縁度を認めうる例は存在しないことを示した。したがって、それぞれの患者が過去の近い時点で感染系列がつながる可能性は低く、地域内での流行をとくに疑わせるケースは存在しないことが分かった。

D. 考察

われわれは 2001 年より新潟県を中心に北関東、信越地区の HIV 感染者の血液を収集し、ウイルス学的調査をおこなってきた。他地域の機関からの報告と比較すると、われわれが受け取ったサンプルには、①女性感染者由来の比率が有意に高い、②男性同性愛者からの比率が極めて低い、③検出されるウイルスがサブタイプ B に偏らず、AE の頻度が男女ともに高い、④とくに女性由来の検体では AE のウイルスが圧倒的に多い。など明らかに異なった特徴が見られている。今年度おこなった調査においても、これらの特徴は変わっていなかった。また、この地域で収集されたウイルスの系統的關係を調べても明確なクラスターの形成は認められず、地域内流行を思わせる優勢なウイル

スの存在は、これまでと同様に見つからなかった。これらの特徴の解釈については総合報告の考察で別に論ずるが、男性同性愛者が地域医療機関を忌避する傾向が強いこと、感染機会の多くが地域外であると思われること、などはわれわれのサンプリング対象地域が東京など首都圏の日帰り圏にあることと密接に関係していると考えている。ただし、検出されるウイルスのサブタイプ比については、なぜ首都圏におけるデータと比較してこのような大きな違いが生じるのか、現時点では説明は難しい。

今回解析したサンプル1例に見出された薬剤耐性変異 V108I は、付与される薬剤抵抗性としては比較的軽度な部類に属する。また、poly morphismの可能性も指摘される変異であり、薬剤治療を受けた患者に由来するものかどうかは必ずしも明らかではない。しかしながら、同一サンプルから別種の変異 T69A も検出されていることは、もとはさらに強い耐性を獲得していたウイルスが、薬剤の非存在下に fitness を回復させる過程で復帰変異を起こしたものの可能性も想起させる。いずれにしても、この地域における感染で薬剤耐性ウイルスが関与している割合は、比較的低いことをこれまでの結果は示しており、実際の治療に困難をきたすレベルには至っていないと言えよう。

E. 結論

新潟県とその周辺県で採集された HIV のサンプルには、感染者の性別、感染経路別内訳、および検出されるウイルスのサブタイプ比に、顕著な地域的特徴が見られる。ただし、感染の多くは地域内流行によるものとは考えられず、このような特徴を呈する理由は不明な点が多い。

新規登録のウイルスサンプルから検出される薬剤耐性変異の頻度は低く（2006 年度 1/7、本研究班継続期間全例 1/19）、当地域における耐性ウイルスの浸淫状況は比較的軽微であるといえる。

F. 健康危険情報

特記すべき事項無し。

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. 特許出願
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
特記事項なし

表. 解析した配列に含まれる薬剤変異

阻害剤	耐性変異 (例数)
PI major	none
minor	L10I (1), I13V (2), L33V (1), M36I (3), L63P (2), H69K (3), V77I (2), I93L (1)
NRTI	<i>T69A</i> (1), <i>L210F</i> (1)
NNRTI	V108I (1)

「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 北海道大学医学部保健学科検査技術科学専攻 教授
吉田 繁 北海道大学医学部保健学科検査技術科学専攻 助手

研究要旨

2006年度の北海道大学病院を受診した新規 HIV 感染者は 21 名であり、2005年度と比較し約 2 倍と確実に増加していることが確認された。薬剤耐性変異についてはプロテアーゼ領域にマイナー変異はあるが、逆転写酵素領域も含め明らかな耐性 HIV は検出されなかった。従って 2006 年度の薬剤耐性 HIV 検出頻度は 0%であった。

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 2006 年度の新規 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

2006 年度に北大病院を受診した新規 HIV 感染者は 21 名であり、エイズ動向委員会からの報告では、北海道ブロックでの 2006 年 1 月～9 月の新規 HIV 感染者は 15 名であることから、北海道ブロックの新規感染者のほとんどは北大病院を受診していると考えられる。したがって、本研究結果は北海道ブロックの新規 HIV 感染者の動向を反映していると考えられる。2006 年度の新規受診者は前年比で約 2 倍、過去最高の新規患者数であった。感染が発覚した機関としては保健所が 5 名と増加していること、21 名の新規感染者で 4 名は初診時で AIDS 発症者であったことが特徴として挙げられる。感染推定経路は MSM が 81%と最も多かった。薬剤耐性検査により変異の解析をおこなったところ

IAS-USA で報告されている薬剤耐性変異を有する HIV は約 95%の患者において認められたものの、ほとんどはプロテアーゼ領域のマイナー変異であり、耐性に重要とされているメジャー変異は確認されなかった。また RT 領域においても同様に高度耐性変異は認められなかったが、NNRTI に低度耐性を示す V118I（IAS-USA Fall2006 では除外）が 1 名に確認された。本院での 2006 年度における薬剤耐性 HIV 検出頻度は約 0%（V118I を耐性変異とすると 5%）であった。また、subtype は B が 15 名、CRF01_AE が 2 名（日本人女性と外国人男性）であった。

D. 考察

北海道ブロックの HIV 感染者数は他ブロックと比較し少ないが、2006 年度に北大病院を受診した新規感染者数は前年比で約 2 倍と急増したこと、保健所で感染が確認された症例が約 25%と増加していることは、北海道ブロックにおいても確実に感染者が増えており、新規感染者数は今後さらに増加することが考えられる。患者背景は日本全体の傾向と同様に MSM と若年化、初診時での AIDS 発症者の増加傾向が伺えた。2006 年度の薬剤耐性 HIV は 0%であった。日本の新規感染者における薬剤耐性 HIV 検出頻度は 4.0%であり、特に RT 領域の 215 番の revertant が多数報告されているが、北海道ブロックで revertant は検出されていない。したがって、地理的な環境等により本州とは違った感染形態をとっている可能性も考えられる。今後も引き続き調査をすることが、耐性変異と耐性 HIV 伝搬との関係解明、薬剤耐性 HIV 拡散防止に貢献すると考える。

E. 結論

- 1) 2006 年度に北大病院を受診した新規感染者数は急激に増加した。

- 2) 高度耐性となる薬剤耐性変異は確認されなかった。

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（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(エイズ対策研究事業)
分担研究報告書

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 微生物部 主任研究員)
研究協力者 宮崎裕美、今井光信 (神奈川県衛生研究所)

研究要旨

新規 HIV-1 感染者における薬剤耐性 HIV-1 の出現状況を調査するため、2006 年の 1 年間に神奈川県内の医療機関に来院した未治療 HIV 感染者 50 名について薬剤耐性変異の解析を行った。

IAS-USA (2006) リストに基づき薬剤耐性変異の有無を調べた結果、RT 領域において核酸系逆転写酵素阻害剤である AZT の耐性変異 T215Y のリバータント T215C に加え M41L 変異を持つ症例が 1 例認められた。この症例は、男性同性間性行為による感染で、日本人、サブタイプ B であった。プロテアーゼ領域にプロテアーゼ阻害剤である TPV の major 変異、L33F が 2 名に認められた。これらは 2 名ともタイ国籍、サブタイプ AE であった。しかし、日本やタイにおいて TPV の使用はほとんど無く、L33F はサブタイプ AE の多型の一つである可能性が高いと考えられた。

A. 研究目的

HIV-1 感染者の治療は多剤併用療法 (HAART) の普及により飛躍的に進歩し、HIV-1 感染者の病態の進行をコントロールすることが可能となった。その一方で、薬剤の長期投与に伴い薬剤耐性 HIV-1 株を保有する感染者が増加し、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%から十数%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-1 株の動向が注目されている。

我々は、新規感染者における薬剤耐性 HIV-1 の発生・伝播の動向について全国規模での調査に参加し、主として神奈川県内の HIV 感染者について薬剤耐性変異の解析を行った。

B. 研究方法

1) 調査対象

2006 年の 1 年間に神奈川県内の医療機関に来院した未治療の HIV 感染者 50 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シング法 (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 (2006) リストを基にプロテアーゼ阻害剤

(PRI: IDV, LPV, RTV, SQV, NFV, fAPV, ATV, DRV, TPV)、核酸系逆転写酵素阻害剤 (NRTI: AZT, d4T, ddI, 3TC, ABC, TDF, FTC)、非核酸系逆転写酵素阻害剤 (NNRTI: DLF, EFV, NVP) に関する薬剤耐性変異の解析およびサブタイプを決定した。

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 領域および env C2V3 領域のサブタイプ型別を行った。スタンフォード大学データベースの耐性度は susceptible、potential low-level resistance、low-level resistance、intermediate resistance、resistance の 5 段階評価で示される。

(倫理面への配慮)

主治医から患者に研究内容について説明を行い、研究への同意の得られた症例について研究を実施した。患者名はすべて記号化して扱っており、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. 研究結果

IAS-USA (2006) 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、50 名中 2 名に TPV の major 変異である L33F が検出された (表 1、表 2)。スタンフォード大学データベースでの解析の結果、これら 2 名の TPV に対する耐性度は low-level resistance (5 段階評価の中間) と判定された。

また、50 名のほとんどになんらかの Minor 変異が認められており、サブタイプ B では L63P、V77I、I93L の変異が、サブタイプ B 以外では I13V、M36IL、H69K

の変異が50%以上に検出され(表2)、これらの変異はサブタイプに依存する多型の可能性が考えられた。

major 変異の認められなかった48名はスタンフォード大学データベース解析において、8種類のPRI(ATV、DRV、FPV、IDV、LPV、NFV、SQV、TPV)に感受性と判定された。

RT領域については、50名中1名からNRTIであるAZTおよびd4Tの耐性変異M41LとT215Cを持つ症例が1例検出された(表1)。この症例のスタンフォード大学データベースでの耐性度は、AZT、d4Tに対してintermediate resistance、ddI、ABC、TDFに対してlow-level resistanceと判定された。

50名のサブタイプおよび感染経路を表3に示した。サブタイプの内訳は、サブタイプBが36名と最も多く、次いでサブタイプAEが10名、Cが2名、A、Dが各1名ずつであった。

感染経路および国籍別では、男性同性間性行為感染が22名(日本人20名、外国籍2名)、異性間性行為感染が22名(日本人16名、外国籍6名)、針治療および母児感染が1名ずつ、不明が4名(日本人)であった。

PRIであるTPVのmajor変異L33Fが検出された2名はいずれもタイ国籍の男性、異性間性行為による感染であった。系統樹解析の結果、これら2株ともにサブタイプAEであったが、HIV-1遺伝子に特別な関連性は認められなかった。RT領域にM41LとT215Cの変異の認められた1名は日本人男性、サブタイプB、同性間性行為感染であった。

D. 考察

2006年の1年間に神奈川県内の医療機関に来院した新規HIV-1感染者50名について薬剤耐性変異を解析した。その結果、PRIであるTPVのmajor変異L33Fが2名に認められたが、日本ではTPVは認可前であり、TPVを使用している医療機関はほとんど無いと思われる。また、これら2名はタイ国籍で、タイでの感染も疑われるが、タイにおいてもTPVの使用はほとんど無い。またShaferらは、L33F変異はサブタイプAEの未治療感染者において、1%以上認められることから、新規感染者における薬剤耐性株伝播の調査・研究において、L33F変異を除外することを提案している。以上のことから、これらの症例は薬剤耐性株の感染ではなく、L33Fの変異はサブタイプAEの多型の一つである可能性が考えられた。しかしながら、L33F変異が認められる症例において、TPV投与後早期に耐性を獲得する可能性は否定できず、薬剤の選択の際には考慮する必要があると考えられ

た。

RT領域にAZTおよびd4Tの耐性関連変異であるM41LとT215Cを持つ症例が1例検出された。T215CはAZTの耐性変異T215Yのリバートントと考えられ、この症例はAZT投与歴のある症例からの感染の可能性が考えられた。

RT領域にK238T変異を持つ症例が1例認められた。この変異はIAS-USA(2006)リストには登録されていないが、スタンフォード大学データベースではNNRTIの耐性変異として登録されている。この症例の耐性度はNNRTIのDLV、NVPに対してintermediate resistanceと判定された。解析に用いるデータベースにより判定が異なる場合があり、薬剤を選択する際には患者の病態や血中ウイルス量等のパラメーターを考慮する必要もあると考えられた。

E. 結論

2006年の1年間に神奈川県内の医療機関に来院した新規HIV感染者50名について薬剤耐性変異を解析した。IAS-USA(2006)リストに基づき薬剤耐性変異の解析を行った結果、RT領域においてNRTIであるAZTの耐性変異M41LとT215YのリバートントT215Cを持つ症例が1例検出され、薬剤耐性変異の出現頻度は2.0%であった。

プロテアーゼ領域にPRIであるTPVのmajor変異、L33Fが2名(タイ国籍、サブタイプAE)に認められたが、日本やタイでTPVの使用はほとんど無く、L33FはサブタイプAEの多型の一つである可能性が高い。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 宇宿秀三、野口有三、坂本光男、足立拓也、相楽裕子、須藤弘二、西澤雅子、近藤真規子、栃久保修、今井光信: Analysis of a long term discrepancy in drug-targeted genes in plasma HIV-1 RNA and PBMC HIV-1 DNA in the same patient. Jpn. J. Infect. Dis, 59, 122-125 (2006)
- 2) 須藤弘二、嶋貴子、近藤真規子、加藤真吾、今井光信: Real-time PCRを用いたHIV-1 RNA測定キットの基礎的研究、感染症学雑誌, 81, 1-5 (2007).

2. 学会発表

- 1) 近藤真規子、須藤弘二、田中理恵、嶋貴子、相楽裕子、岩室紳也、加藤真吾、今井光信: A quantification of HIV-1 group M proviral DNA using a TaqMan real-time PCR, XVI International AIDS Conference, 13-18 Aug. 2006, Toronto.
- 2) 嶋貴子、近藤真規子、今井光信ほか: Implementation and Effectiveness of Rapid HIV

Testing at Publicly Funded Voluntary HIV Counseling and Testing (VCT) Sites in Japan, XVI International AIDS Conference, 13-18 Aug. 2006, Toronto.

3) 近藤真規子、須藤弘二、嶋貴子、高橋華子、相楽裕子、武部豊、今井光信ほか：日本で検出された CRF01_AE/B リコンビナント HIV-1 の解析、第 20 回日本エイズ学会学術集会・総会（2006 年 11 月 30～12 月 2 日、東京）。

4) 嶋貴子、近藤真規子、須藤弘二、相楽裕子、今井光信：新しい HIV 迅速抗体検査キットの検討、第 20 回日本エイズ学会学術集会・総会（2006 年 11 月 30～12 月 2 日、東京）。

5) 須藤弘二、田中理恵、近藤真規子、今井光信、加藤真吾：HIV 感染者 PBMC 中プロウイルスの multiplex nested PCR による構造解析、第 20 回日本エイズ学会学術集会・総会（2006 年 11 月 30～12

月 2 日、東京）。

6) 木内英、岩室紳也、近藤真規子、今井光信、花房秀次、加藤真吾：母児感染予防における AZT 血中濃度、第 20 回日本エイズ学会学術集会・総会（2006 年 11 月 30～12 月 2 日、東京）。

G. 知的財産権の出願・登録

1. 特許出願

1) 発明の名称：「HIV-1 プロウイルス定量法」、発明者：近藤真規子、加藤真吾、出願年月日：平成 18 年 5 月 2 日、出願番号：特願 2006-128565

2) 発明の名称：「弱毒型 HIV-1 塩基配列」、発明者：近藤真規子、今井光信、武部豊、公開年月日：平成 18 年 7 月 27 日、公開番号：特開 2006-191891

表1 未治療HIV感染者50(2006)名の薬剤耐性変異

—MSM 22(B22)、異性間 22(B10、E9、A1、C2)、その他 6(B4、E1、D1)—

サンプル	国籍	性別	感染経路	サブタイプ		薬剤耐性変異
				Pro領域	RT領域	
Y290	タイ	男性	異性間	E	I13V, <u>L33F</u> , L63P, H69K	無し
Y297	タイ	男性	異性間	E	L10LV, I13V, <u>L33F</u> , M36I, L63P, H69K, I93V	無し
GM1974	日本	男性	同性間	B	L63P, A71T, I93L	<u>M41L, T215C</u>

M33F: Tipranavirのmajor変異

M41L: AZT、d4Tの耐性変異

T215C: AZT耐性変異215Yのリバータント

表2 未治療HIV感染者50(2006)名のプロテアーゼ領域の変異
 -MSM 22(B22)、異性間 22(B10、E9、A1、C2)、その他 6(B4、E1、D1)-

Pro領域の変異	変異出現頻度		サブタイプ別変異出現頻度		
	B	non B	B	non B	
L33F*	3.8 %	(2/50)	0 %	(0/36)	14.3% (2/14)
M36I L	32.0%	(16/50)	13.9%	(5/36)	78.6% (11/14)
L63P	42.0%	(21/50)	57.2%	(17/36)	28.6% (4/14)
V77I	44.0%	(22/50)	50.0%	(18/36)	28.6% (4/14)
K20I R	8.0%	(4/50)	2.8%	(1/36)	21.4% (3/14)
L10I V	10.0%	(5/50)	8.3%	(3/36)	14.3% (2/14)
A71V	24.0%	(12/50)	33.3%	(12/36)	0% (0/14)
I13V	28.0%	(14/50)	5.6%	(2/36)	78.6% (11/14)
G16E	14.0%	(7/50)	13.9%	(5/36)	14.3% (2/14)
D60E	2.0%	(1/50)	2.8%	(1/36)	0% (0/14)
I62V	22.0%	(11/50)	27.8%	(10/36)	7.1% (1/14)
I64V	8.0%	(4/50)	2.8%	(1/36)	21.4% (3/14)
H69K	38.0%	(19/50)	16.7%	(6/36)	92.9% (13/14)
I93L	48.0%	(24/50)	61.1%	(22/36)	14.3% (2/14)

IAS-USA(2006)リストに従って解析

*M33FはTipranavirのmajor変異

表3 未治療HIV感染者50名の感染経路とサブタイプ(2006)

感染経路	サブタイプ(C2V3)			
	合計	B	E	A C D
男性同性間	20	20		
日本				
外国	2	2		
異性間 男性	14	9	4	1
日本				
外国	3		2	1
異性間 女性	2		1	1
日本				
外国	3	1	2	
その他 女性	2	1		1
不明 男性	4	3	1	
合計	50	36	10	1 2 1