

分担研究者 貞升健志（東京都健康安全研究センター 微生物部 主任研究員）
研究協力者 長島真美，新開敬行，吉田靖子，山田澄夫
（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の薬剤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．東京都においても感染者数が増加する傾向が続いており，薬剤耐性HIVの蔓延が懸念されている．

東京都の保健所等におけるHIV検査陽性例を材料とし，都内における新規HIV感染者で流行しているHIVの遺伝子学的な調査を実施した．2006年の保健所等のHIV検査陽性49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結果，検出された HIVの98.0%がサブタイプBで，RT領域においてはV108I，T215Dの変異がそれぞれ1例で認められたが，Pro領域では薬剤耐性に起因する変異は認められなかった．

A. 研究目的

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，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ことを本研究の目的とする．

（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．

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）49例を供試した．

各検体 400 μ 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)領域を増幅後，特異バンドを精製した．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

RT 領域の増幅には国立感染症研究所で開発された DRRT プライマー（ DRRT1L ; ATGATAGGGGGAATTGGAGGTTT , DRRT4L ; TACTTCTGTTAGTGCTTTGGGTTCC , DRRT7L ;

GACCTACACCTGTCAACATAATTGG)
お よ び POL4 ;
CCACTAACTTCTGTATGTCATT) を 使
用した。

逆転写反应用プライマーとして、
DRRT4L を使用し cDNA 作成後、
DRRT1L を加え 1st-PCR を実施した。さ
らに DRRT7L 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、IAS-USA および Shaffer の
報告に基づき、RT 領域 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 1~93 番目のアミノ酸を解析し
た。得られた塩基配列については、
IAS-USA および Shaffer の報告に基づ
き、Pro 領域 1~90 番目のアミノ酸の薬
剤耐性変異の有無を調べた。

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 49 例の RT 領域の分子系統樹解
析を実施した結果、48 例がサブタイプ B
で、1 例がサブタイプ AE に分類された。

2. RT 領域の薬剤耐性変異

RT 領域の薬剤耐性変異を検索した結

果 (図 2), V108I および T215D がそれ
ぞれ 1 例認められ、耐性変異ではないが
wild type と異なる例である L210F/M が
5 例, M230V, K101R, Q151P がそれぞ
れ 1 例で認められた。Q151P の変異が認
められた。

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、Major mutation では、変異が
認められなかった。

Minor mutation では、L10I が 5 例、
I13V が 5 例、G16E が 5 例、L24I が 1
例、E35D が 9 例、M36I が 6 例、I62V
が 14 例、L63X が 41 例、I64V が 4 例、
H69K/Q/Y が 7 例、A71V/T が 3 例、V77I
が 9 例、I93L が 16 例で認められた。さ
らに、薬剤に起因する変異ではないが、
N37_LT が 1 例で認められた (図 1)。

4. 分子系統樹解析

過去に東京都内で検出された HIV の
RT 領域の分子系統樹解析データを用い、
変異が認められた事例をプロットした。
その結果、T215D/E は同じ部位にクラ
スタリングされた (図 2)。V118I につ
いては 2006 年の IAS-USA パネルでは薬
剤耐性変異として記載されていないが、
すべて同じ部位にクラスタリングされ
た。

また、V106I および L210M 等の薬剤耐
性変異ではないが、wild type と異なる例
は分散する傾向が認められた (図 3)。

Pro 領域の薬剤耐性変異については、
多くは M36I や I62V のように、分散して
いるものが多かったが (図 4)、I85V の
ようにクラスタリングされた事例もあっ
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。

2006 年に都内保健所等の HIV 検査で陽性となった症例より検出された HIV-1 49 例の RT 領域の遺伝子解析を実施した結果、48 例(98.0%)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、V108I および T215D がそれぞれ 1 例認められた。Pro 領域では Major mutation では、変異が認められなかった。

過去に東京都内で検出された HIV の RT 領域の分子系統樹解析データを用い、変異が認められた事例をプロットした結果、V118I や T215D/E の薬剤耐性変異はクラスタリングされたが、他の変異では明確な因果関係は認められなかった。しかしながら、Pro 領域の minor mutation である I85V のようにクラスタリングされたものもあったため、分子系統樹と薬剤耐性変異の関係については、他の領域の系統樹解析も含めてさらに継続して検討していく必要があるものと考えられた。

E. 結論

2006 年に都内保健所等の検診で検査陽性例から検出された HIV の薬剤耐性変異の出現頻度は、Pro 領域では 0%、RT 領域では 4.1%であった。

F. 研究発表

1. 論文発表

2. 学会発表

(1)貞升健志, 長島真美, 新開敬行, 甲斐明美, 諸角聖, 山口 剛, イムノクロマ

ト法で陰性を示した HIV 検査陽性の 2 症例について, 第 80 回日本感染症学会総会, 東京, 2006,

(2)貞升健志, 長島真美, 新開敬行, 吉田靖子, 山田澄夫, 東京都内で検出された HIV-1 の Protease 遺伝子の解析, 第 20 回日本エイズ学会学術集会・総会, 東京, 2006

(3)長島真美, 貞升健志, 新開敬行, 吉田靖子, 山田澄夫, イムノクロマト法のロット間差に関する検討, 第 20 回日本エイズ学会学術集会・総会, 東京, 2006

(4)新開敬行, 貞升健志, 長島真美, 吉田靖子, 山田澄夫, 東京都の HIV 検査におけるイムノクロマト法偽陰性例について, 第 20 回日本エイズ学会学術集会・総会, 東京, 2006

図1. Pro遺伝子(A)で検出された挿入変異

37 38
 ↓ ↓

A PQITLWQRPLVTVKIGGQLKEALLDTGADDTVLEEMNLTLPGRWKPKMIGGIGGF IKVRQ
 B PQITLWQRPLVTIKIGGQLKEALLDTGADDTVLEDMT—LPGRWKPKMIGGIGGF IKVRQ
 C PQITLWQRPLVAIRIGGQLKEALLDTGADDTVLEEMN—LPGKWKPKMIGGIGGF IKVRQ
 D PQITLWQRPLVAIRIGGQLKEALLDTGADDTVLEEMN—LPGKWKPKMIGGIGGF IKVRQ

180 190 200
 GAAGAAATGAAATTGGACTTTGCCAGGAAAGAT

insert

A

190 200
 GAAGAAATGAGTTTAC CAGGCCAAAAT

B



図2. RT薬剤耐性変異事例の分子系統樹解析(RT領域)

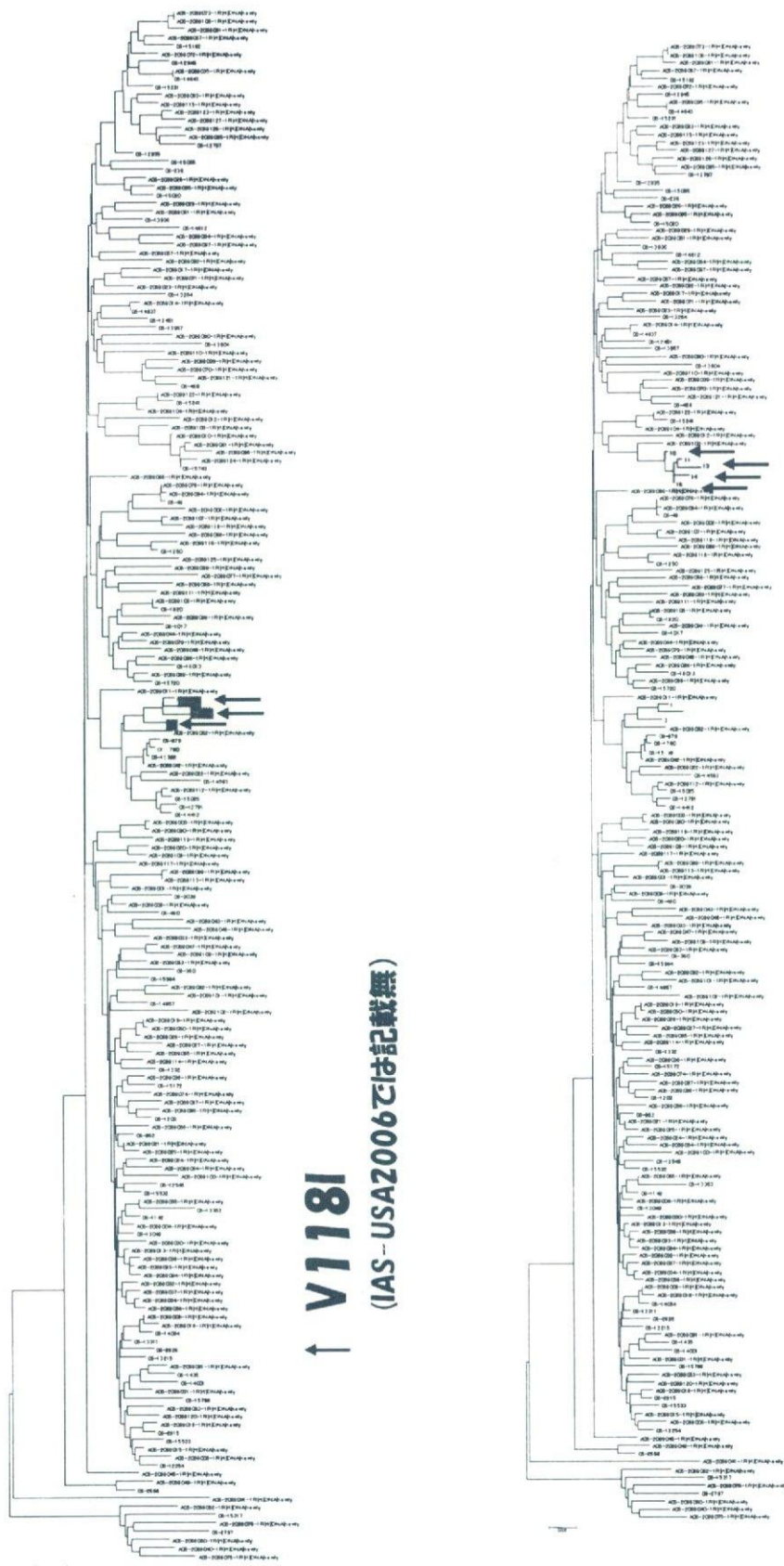


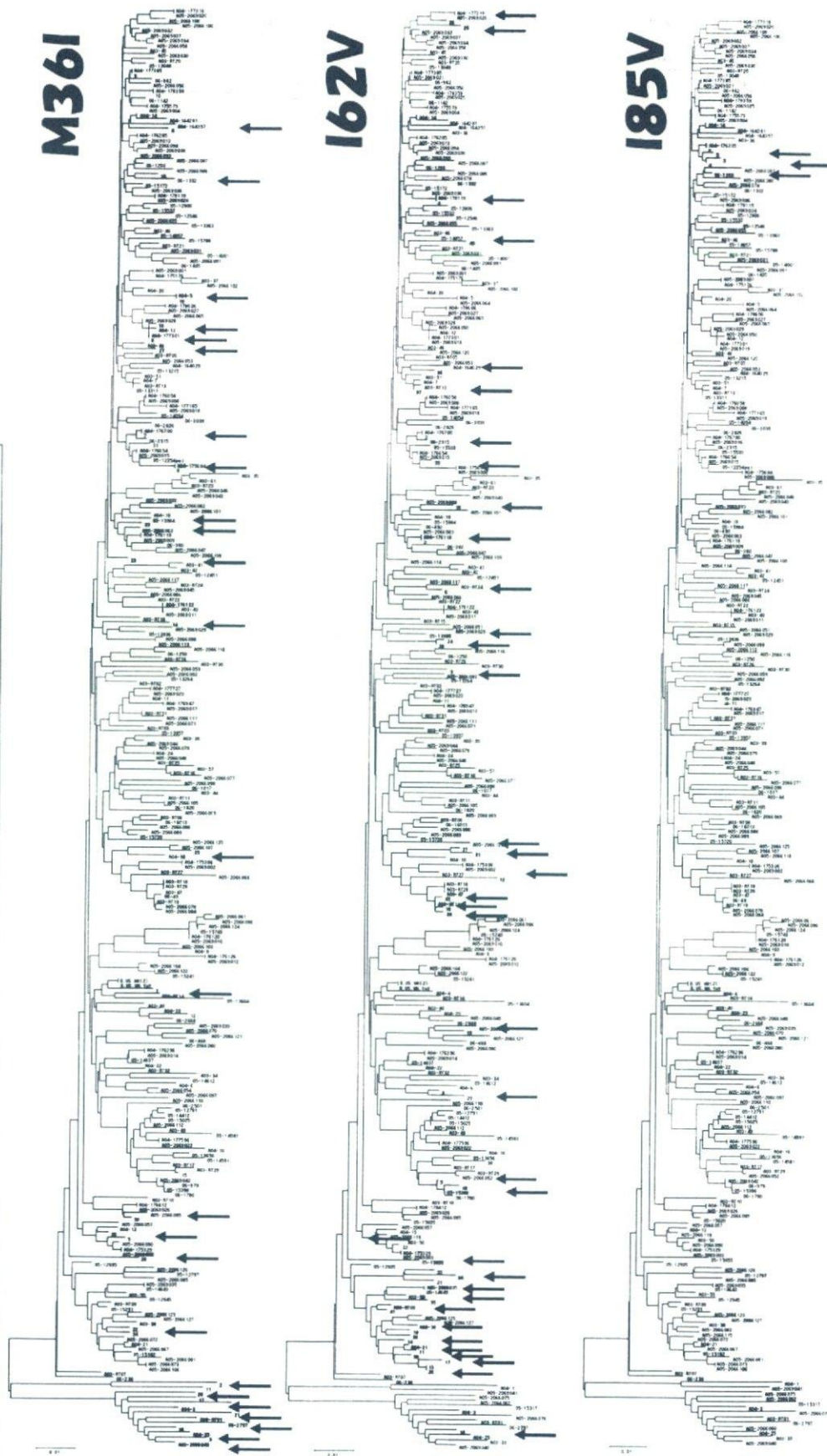
図3. RT polymorphism例の分子系統樹解析(RT領域)



↑ **V106I**
(NNRTIS:V106M)

↑ **L210M**
(RTIS:L210W)

図4. Protease minor mutation例の分子系統樹解析(RT領域)



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
研究協力者 椎木創一（大阪医療センター 免疫感染症科）、山本信夫、管尾龍彦、佐子肇、常松裕子、溝上泰司、松永加奈江、真能正幸（大阪医療センター 臨床検査科）、古金秀樹（大阪医療センター HIV/AIDS 先端医療開発センター）、吉野宗弘（大阪医療センター 薬剤科）

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。一方で、未治療患者から薬剤耐性変異株が分離されたとの報告があり薬剤耐性変異株の伝搬が問題となっている。本研究では国立大阪医療センターで平成 17 年度および 18 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 4 月に薬剤耐性検査が診療報酬の対象となったが保険適応の有無を巡って臨床現場では混乱もあった。今後とも症例を蓄積し、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も、しばしばであり、薬剤耐性 HIV 変異株の出現は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で、薬剤耐性検査が必要な HIV 感染症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を行った。今年度も、近年、未治療患者で問題となっている薬剤耐性変異 HIV 感染の検討も含めて、薬剤耐性検査につき検討を行う。

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-1（以下 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、プロテアーゼ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累積患者数の推移を示した（図-1）。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 年度は 181 名、平成 18 年度は 135 名（12 月末日まで）であった。平成 18 年 12 月末日の累積患者数は 1010 名であった。

内訳では、男性 946 名（93.7%）。女性 64 名（6.3%）。年齢別では 30 代が最多の 461 名（45.6%）、40 代が 233 名（23.1%）、20 代が 156 名（15.4%）であり、これらの年齢層が全体の 84.1%を占めた。初診時年齢別では 30 歳台が 401 名（39.7%）、20 歳台が 308 名（30.5%）で 7 割を占めていた。問診からの感染経路では性的接触が 876 名（86.7%）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 69.2%、異性間が 17.5%であった（図-2 は平成 18 年 11 月末日現在）。

②患者の初診時居住地域、紹介元施設等の内訳

初診時の居住地域は大阪府が 708 名（70.1%）（この内で大阪市内が 431 名）、近畿ブロックの他府県からが 257 名（25.7%）、他のブロック等からが 45 名（4.5%）であった。紹介元別では保健所等からが

149名、拠点病院からが240名、診療所および病院からが434名、他ブロックやACCからが46名などであった(図-3、-4は平成18年11月末日現在)。

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-5、図-6)。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288人であった。年次組み合わせ数は、それぞれ、21通り、35通り、38通り、45通り、52通り、48通り、46通りであった。平成17年、平成18年の処方数は379人、479人であり。初回療法はそれぞれ73人、95人で実施された。平成17年に引き続き平成18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-7)。

④薬剤耐性検査の実施状況

平成17年4月1日から平成18年11月30日までの期間内に144件のHIV耐性検査を行った。診療録によると耐性検査の実施は未治療が142件であった。その中で、初診時が133件、未治療での経過観察中が1件、治療前が5件、治療開始時が3件であった。治療開始後の実施が2件であった。

⑤薬剤耐性検査結果

1) PCRの増幅結果 耐性検査を行った144件の中で逆転写酵素、プロテアーゼ、両領域の少なくとも一部が増幅不良であったのが、それぞれ、2件、5件、1件であった。薬剤耐性検査実施時のHIV-1-RNA量が1000コピー/mL未満であったのが、7件あり、その内の6件で逆転写酵素あるいはプロテアーゼの領域のいずれかで増幅できなかった。また、HIV-1-RNA量が1000コピー/mL以上では全例で増幅ができていた。

2) 変異 初診時に薬剤耐性検査を実施した133件において次の変異を認めた。逆転写酵素領域で22アミノ酸(コドン36、62、65、67、69、70、74、75、98、100、101、103、106、108、115、179、181、184、190、210、215、219)、プロテアーゼ酵素領域では18アミノ酸(コドン10、13、16、33、35、36、43、60、62、63、64、69、71、74、77、82、93)で認められた。結果を図-8に示した。逆転写酵素領域ではコドン74、181、184、215などの変異が散見された。コドン215ではAZT耐性変異ではないrevertantと思われる変異が多かった。プロテアーゼ領域では前年度に較べコドンも変異数も多くなっていた。

D. 考察

今年度は国立大阪医療センターでの平成17年4月から平成18年11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た。原因として、ウイルス効果の優れた抗HIV薬が開発された事、薬剤開発によって服用が以前に比べ容易になった事、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などによってウイルス学的治療失敗率が減少したためと推定された。これまでの研究から、ウイルス学的失敗例における薬剤耐性検査結果は薬剤変更の参考となる事、ウイルス量が低値(<500)で一過性の上昇例(blip)で検討できた例では、明らかな薬剤耐性変異を見いだせ無かった事を示した。昨年度より検討を開始した初診症例(診療録上の未治療)の検討では、今年度も昨年度と同様に薬剤耐性変異を認め、頻度が増加傾向にあり、さらに薬剤耐性変異箇所も増加傾向が伺われた。今回、初診未治療133件で逆転写酵素あるいはプロテアーゼ領域に多くの変異が観察された。その中には、既に薬剤耐性と報告されている変異も含まれており、治療前に薬剤耐性検査を実施する重要性が示唆された。今回の検討は133例と少数であるので、今後も症例を増やしさらなる検討が必要と考える。なお、今年度の4月に診療報酬改定で薬剤耐性検査(遺伝子型)が保険収載された。適応についての現場の混乱から薬剤耐性検査実施に影響があった可能性がある。

E. 結論

国立大阪医療センターで平成17年4月から平成18年11月末日までに実施した144件で薬剤耐性検査を実施した。ウイルス量が1000コピー/mL未満症例では高率に増幅不良領域を認めたが、それ以外は良好であった。初診時に(診療録から)未治療症例でも薬剤耐性関連変異が少なからず観察され、薬剤耐性変異を有する変異株の伝搬が想定された。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。

薬剤耐性検査が保険適応となったが、適応につき混乱があった。初診時の薬剤耐性検査は保険適応が無い場合が多いが、薬剤耐性変異株の伝搬の様子を知るのに重要なデータであり、研究の意義が高いと考えられる。今後も、初診患者の薬剤耐性変異の推移についての研究を実施していく必要があると考える。

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

図-1 累積患者数の推移

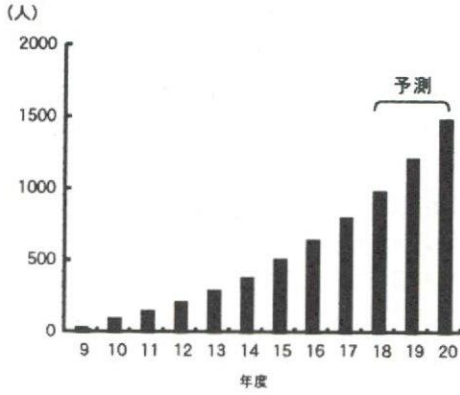


図-2 外来受診患者の内訳

(平成18年11月末日現在、1000名)

性別	人数 (%)	・年令別	
男性	936(93.6)	10代	4 (0.4)
女性	64 (6.4)	20代	153 (15.3)
		30代	457 (45.7)
・感染経路別		40代	231 (23.1)
血液製剤	77 (7.7)	50代	104 (10.4)
その他	923 (92.3)	60代~	51 (5.1)
・初診時病期		・初診時年齢別	人数 (%)
HIV	758(75.8)	0-19	19 (1.9)
AIDS	242 (24.2)	20-29	305 (30.5)
		30-39	397 (39.7)
		40-49	173 (17.3)
		50-59	77 (7.7)
		60~	29 (2.9)

図-3 外来患者の紹介元

保健所	147名
拠点病院	236名
一般医療機関	431名
献血	26名
NGO・その他	114名
ブロック拠点病院・ACC	46名

図-4 初診時居住地域

大阪府	699	北海道	0
(大阪市内426)		東北	1
滋賀県	10	関東甲信越	16
京都府	76	北陸	4
兵庫県	129	東海	9
奈良県	26	中四国	12
和歌山県	15	九州	2
		海外	1

図-5 初回療法における NRTI 使用状況

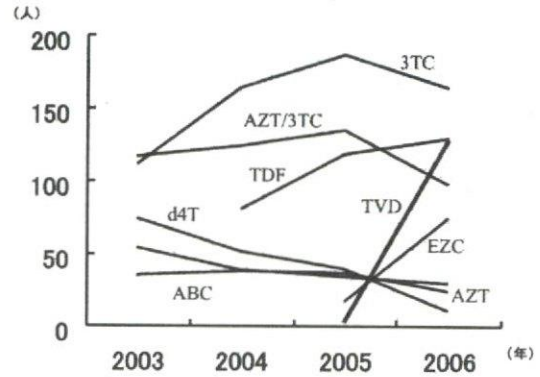


図-6 初回療法における PI および NRTI 使用状況

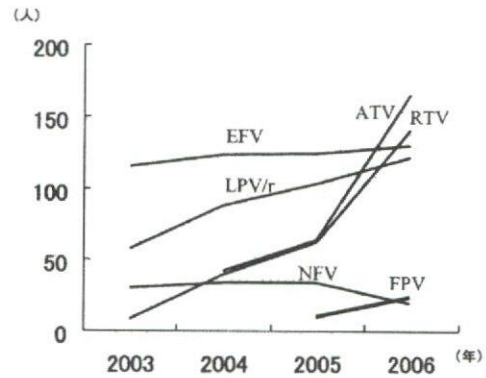


図-7 年度別処方組み合わせ上位の推移

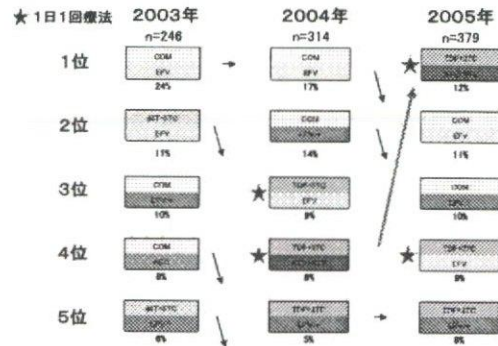


図-8 初診患者における薬剤耐性変異

プロテアーゼ

コドン	10	13	16	20	33	35	36	43	60
変異数	29	13	6	1	8	21	35	2	4
%	21.8	9.8	4.5	0.8	6.0	15.8	26.3	1.5	3.0
コドン	62	63	64	69	71	74	77	82	93
変異数	28	121	7	14	20	2	48	3	72
%	21.1	91.0	5.3	10.5	15.0	1.5	36.1	2.3	54.1

逆転写酵素

コドン	36	62	65	67	69	70	74	75	98	100	101
変異数	1	1	1	1	10	1	2	1	7	1	2
%	0.8	0.8	0.8	0.8	7.5	0.8	1.5	0.8	5.3	0.8	1.5
コドン	103	106	108	115	179	181	184	190	210	215	219
変異数	1	14	3	1	21	1	2	2	3	7	1
%	0.8	10.5	2.3	0.8	15.8	0.8	1.5	1.5	2.3	5.3	0.8

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（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、原永修作、宮城一也、那覇 唯、仲宗根 力、上江洲香織、前城達次、藤田次郎

研究要旨

今回、我々は前回に引き続き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2006年2月1日～2007年1月31日までで、同期間に11人が当院に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6人であった。5人に薬剤耐性HIV-1検査を施行した。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70%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（2006年2月1日以降2007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。

6. 倫理面での配慮

1) 個人情報の取得について

利用目的を明確にしたうえで、必要とする範

囲内に限り、適法かつ公正な手段によって、個人情報を取得した。

2) 個人情報の利用について

個人情報を取得する際に示した本研究の範囲内で、研究の遂行上、必要な限りにおいて利用した。

3) 個人情報の第三者提供について

取得した個人情報は、適切に管理し、個人情報保護法に定める例外事項を除き、本人の同意を得ることなく、第三者に提供、開示しなかった。

4) 個人情報の開示・訂正・削除・利用停止について

本人から自己の個人情報について、開示・訂正・削除・利用停止などの申し出を受けた場合は、すみやかに必要な措置をとる旨説明したが、研究の全期間を通して申し出はなかった。

5) 個人情報の管理について

個人情報の紛失、流出、改ざんおよび漏洩などを防ぐため、個人情報を保有するのは研究代表者のみとし、情報管理上問題は発生しなかった。

6) 法令等の順守について

個人情報保護に関して適用される法令、国のガイドラインを熟読し順守した。

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 11 人であった。その内、新規登録患者の定義を満たした 6 人中、5 人を今回の調査に登録し検査を施行した。

残り 1 人は外国人で保険支払手続き中で期間内に検査が施行できなかった。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 5 人の背景と結果を表に示した。性別では全員が男性で平均年齢は 37.8 歳であった。感染経路は 4 人が同性間、1 人が異性間感染であった。病期は HIV キャリアーが 2 人、AIDS が 3 人であった。CD4 数の平均値は $275.0/\mu\text{l}$ 、一方 HIV-RNA 定量の平均値は 9.6×10^4 コピー/ml であった。また薬剤耐性 HIV-1 検査では全員に薬剤耐性は認めなかった。HBV との重複感染は 1 人に認めた。

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、2006 年までの人口 10 万人あたりの患者数は HIV は 3.53 人、AIDS は 2.72 人と前者で全国 16 番目、後者で 10 番目と高い。特に AIDS 患者では西日本で最も高い発生率となっている（平成 17 年エイズ発生動向年報：厚生労働省エイズ動向委員会）。

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 70%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。今回の調査でも薬剤耐性と判定された HIV-1 は検出されなかったが耐性関連変異は 5 人中 4 人に認められた。当院の初診患者の届出地は 21%が県外であり、沖縄県全体では 30%を占めている。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 が持ち込まれる可能性が危惧されている。引き続き新規登録患者の薬剤耐性調査を行うことが必要と思われた。

E. 結論

新規患者における薬剤耐性 HIV-1 検査を施行した 5 人では HIV 耐性関連変異は認めしたが、薬剤耐性 HIV は検出されなかった。沖縄県は現時点（2007 年 1 月 31 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. 健康危険情報

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れる肺 MAC 症の 1 例。日本エイズ会誌、7:316、2005.
- e) 仲村秀太、那覇、宮城一也、原永修作、比嘉太、健山正男、藤田次郎。Tenofovir (TDF) 過量

- 内服にて急性腎不全を呈し血液透析にて改善した1. 日本エイズ会誌. 8:350, 2006.
- f) 那覇唯、原永修作、仲村秀太、宮城一也、比嘉太、健山正男、藤田次郎. 免疫再構築症候群を呈した AIDS 合併 Kaposi 肉腫の1例. 日本エイズ会誌. 8:367, 2006.
- g) 藤野真之他、: 2003-2005 年の新規 HIV-1 感染者における薬剤耐性頻度の動向. 日本エイズ会誌. 8:409, 2006.
- h) 宮城京子、健山正男、当真美奈子他、: 当院における HIV/AIDS 看護の意識調査. 日本エイズ会誌. 8:387, 2006.
- i) 宮城一也、原永修作、仲村秀太、比嘉太、健山正男、藤田次郎. CHOP 療法が奏功した AIDS 合併 anaplastic T cell Lymphoma の1例. 日

本エイズ会誌. 8:379, 2006.

- j) 辻真理子、山本政弘、城崎真弓、井上緑、健山正男. ブロック拠点病院、拠点病院、行政間の連携における出張研修の効果. 日本エイズ会誌. 8:334, 2006.

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. 新規登録患者の背景と HIV 薬剤耐性結果

No	性別	年齢	感染経路	stage	CD4数/ μ l	HIV-RNA 定量 (コピー/ml)	耐性関連変異	薬剤感受性判定
1	男	36	同性間	AIDS	6.6	3.1×10^5	R41K	無し
2	男	34	同性間	AIDS	39.3	1.2×10^4	L63P, V77I	無し
3	男	34	同性間	carrier	279	1.2×10^3	無し	無し
4	男	29	同性間	carrier	359	9.5×10^3	L63P, V77I	無し
5	男	56	異性間	AIDS	84	1.5×10^5	L10I, M36I	無し

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

「茨城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 原 孝 （茨城県衛生研究所遺伝子科学部 主任研究員）
研究協力者 増子京子 （茨城県衛生研究所微生物部 主任研究員）
大石 毅 （東京医科大学霞ヶ浦病院感染症科 診療科長）
千野根純子 （栃木県保健環境センター微生物部 主任研究員）
片岡俊輔 （宇都宮市衛生環境試験所微生物担当 獣医師）
山上隆也 （山梨県衛生公害研究所微生物部 研究員）
畦上由佳 （長野県環境保全研究所保健衛生部 研究員）

研究要旨

茨城県、栃木県、宇都宮市、山梨県及び長野県にわたる薬剤耐性 HIV-1 の調査体制を構築した。これら首都圏近県地域における HIV/AIDS の累計報告数は全国の 11.6%（1,397 人）を占め、東京都に次いで多い。

今回、5 県市の地方衛生研究所及びエイズ拠点病院から得られた 2003 年から 2006 年までの未治療検体 37 例について耐性変異の検出を試みたところ、薬剤耐性に関する変異は認められなかった。しかし、保健所における HIV 感染者等の捕捉率は 11.7%（36/308 人）にすぎないため、今回の調査結果からだけでは、当地域に薬剤耐性 HIV-1 が浸淫している可能性を否定することはできないと思われる。そのため、茨城県では、捕捉率を高め、実態をより正しく把握することを目指して、2006 年にエイズ拠点病院との連携をスタートさせた。

また、HIV と HBV の重複感染の状況を併せて調査したところ、その頻度は 14.8%（4/27 例）であった。感染 HBV のジェノタイプには、当地域に土着していない Ae（欧米型）や Aa（アジア・アフリカ型）が検出され、HIV の疫学情報としても有用な情報が得られた。

A 研究目的

関東甲信越ブロックには、首都圏以外にも、茨城県をはじめとして、我が国における HIV/AIDS の報告数の多い県が集積している。そのため、茨城県、栃木県、宇都宮市、山梨県及び長野県（以下、首都圏近県地域という）にわたる薬剤耐性 HIV-1 の調査体制を確立し、薬剤耐性変異株の発生動向を把握するとともに、B 型肝炎ウイルス（HBV）の重複感染の状況について併せて調査する。

B 研究方法

(1) 対象

2003 年から 2006 年に各県市の保健所で採取され、衛生研究所で HIV 陽性と判定された保存血清及び 2006 年にエイズ拠点病院で採取された血清、合計 37 検体について解析した。

(2) 解析方法

ア 薬剤耐性変異

ViroSeq HIV-1 Genotyping System Version2.0（アボット社）を用いて 500 μ l の血清から RNA を抽出し、逆転写反応後に PCR 反応を行ってプロテアーゼ領域（PR 領域）と逆転写酵素領域（RT 領域）の約 1.8kb を増幅し、増幅産物を agilent2100 と専用のゲルチップを用いて確認した。その後、キット付属の 7 セットのプライマーと BigDye3.1（ABI）によりシーケンス反応を行い、得られたそれぞれの反応物を精製後、ABI PRISM 3100 で泳動した。解析には、ViroSeq HIV-1 Genotyping System Software v2.5（アボット社）を用いた。7 つのシーケンスから 1 本のコンセンサス・シーケンスにアッセンブル、そしてアミノ酸への変換までが自動的に行われるが、そのようにして得ら

れたプロテアーゼ全領域と逆転写酵素領域の
コドン 1 から 335 までを、リファレンス株
(HXB2)と比較して耐性変異の検出を試みた。
なお、変異の検出にあたっては、使用したソフ
トウェアのアルゴリズムにより解析されたが、
併せて IAS-USA の 2006 年版チャートと
Shafer の criteria に基づき判定した。

イ HIV サブタイプ

アで得られたコンセンサス・シーケンスにつ
いて、参照株とともに DDBJ の Clustal W を
用いて多重アライメントと系統樹解析を行い、
サブタイプを判別した。

ウ HBV 関連検査

はじめに HBs 抗原検査を行い、陽性例につ
いてはジェノタイプを調べた。

(倫理面への配慮)

本研究は、所定の研究計画書を作成し、事前に茨
城県疫学研究合同倫理審査委員会の承認を受けて実
施した。臨床資料の提供を受けるにあたっては、研
究対象者からインフォームド・コンセントを得、ま
た、対象者に不利益が生じないように十分に配慮した。

C 研究結果

(1) 薬剤耐性変異

37 例のうち 35 例については解析が可能であ
ったが、2 例についてはウイルス量が少なかっ
たためか、解析出来なかった。

35 例のいずれからも、RT 領域及び PR 領域
の双方において、薬剤耐性に関する変異は検
出されなかった。

PR 領域においては、91.4% (32/35 例) のサ
ンプルに、14 の minor mutation のうちのい
ずれか 1 つ以上が認められた (表 1)。とくに
M36I/L, I13V, H69K, L63P, I93L 及び V77I
が、それぞれ 54.3% (19 例), 48.6% (17 例),
42.9% (15 例), 40.0% (14 例), 25.7% (9 例),
20.0% (7 例) と高い頻度でみられた。

(2) サブタイプ

35 例のうち 17 例が CRF01_AE, 18 例がサ
ブタイプ B であった。国籍については 21 例が

判明していたが、そのうち 15 例は日本人、6
例が外国人であった。日本人のうち 6 例 (40%)
はサブタイプ CRF01_AE, 9 例 (60%) がサブ
タイプ B であった。一方、外国人は、すべて
CRF01_AE であった。

サブタイプ別に minor mutation の出現頻度
をみたところ、M36I, H69K 及び I13V は
CRF01_AE に多くみられ、それぞれ 94.4%
(17/18, $p < 10^{-5}$), 100% (15/15, $p < 10^{-5}$),
及び 82.4% (14/17, $p = 0.0001$) 検出された。
一方、I93L 及び V77I は、サブタイプ B にそれ
ぞれ 88.9% (8/9), 100% (7/7) 認められた。

(3) HBV 関連検査

検査が可能であった 27 例について HBs 抗原
検査を行ったところ、4 例 (14.8%) が陽性で
あった。4 例のジェノタイプは、C 型 (アジア
型, 日本人の大部分) が 2 例, Ae 型 (欧米型)
と Aa 型 (アジア・アフリカ型) がそれぞれ 1
例であった。

D 考察

首都圏近県地域は、茨城県をはじめとして
HIV/AIDS の報告数が多い地域である。その数は、
合わせて 1,397 人 (平成 18 年 10 月 1 日現在) に
のぼり、我が国の 11.6% を占めるため、当地域に
おける薬剤耐性 HIV の発生動向を調査すること
は極めて重要である。

今回、当地域の 37 例を対象とした調査では、
薬剤耐性に関する変異は 1 例も検出されなかつ
た。茨城県衛生研究所が 2002 年度に行った独自
調査 19 例からも major mutation は検出されなかつ
た。したがって、これまでのところ累計で 54
例について解析を行っているが、未だ薬剤耐性変
異は検出されていない。真に耐性株が浸淫してい
ないのであれば幸いであるが、検査を受けに来た
者の多くが、感染から検査までの期間が長かつた
ために、耐性変異が検出されなかったことも考え
られる。また、2003 年から 2006 年までの各県市
保健所における HIV/AIDS の捕捉率は 11.7%
(36/308 人) に過ぎないため、これまでの調査で
は偶然検出できなかったことも考えられる。捕捉

率を高めるためにはエイズ拠点病院との連携が不可欠であると考え、茨城県衛生研究所は、2006年にエイズ拠点病院の一部と連携を試みた。来年度以降、順次連携の輪を拡大させていく予定である。

minor mutation については、M36I, H69K, L63P などが多くの検体に認められた。しかし、M36I は、プロテアーゼ阻害剤が導入される以前の検体を用いた報告で、すでに多く存在していることが明らかにされているため、natural polymorphism であるとみられる。M36I を含め H69K と I13V をサブタイプ別にみたところ、CRF01_AE に有意に多くみられることから、これらは CRF01_AE に特異的な minor mutation 又は polymorphism である可能性が考えられた。症例を増やして検討を続ける必要がある。

HBV 感染症に用いられる抗ウイルス薬は HIV 感染症の治療にも使用されているため、HBV の重複感染は HIV 感染症の治療に大きな影響を及ぼすことがある。そのため、本研究では HBV の重複感染の状況についても調査した。その結果、対象者の 14.8% (4 名) に HBs 抗原が検出され、比較的高い割合で重複感染のあることが判明した。

感染 HBV のうち 2 例は、我が国ではあまり報告のみられないジェノタイプ Aa 型 (アジア・アフリカ型) と茨城県の MSM から検出されたジェノタイプ Ae (欧米型) であった。ジェノタイプ Ae は、最近、首都圏や大都市圏で報告が増えており、注目されている。また、HIV との重複感染者には Ae 型が多く、しかも、そのほとんどが MSM であるという報告もあることから、今回の Ae 型の検出は、薬剤耐性 HIV が首都圏から首都圏近県地域に拡散している可能性を類推させるものである。HBV のジェノタイプピングによって、外来型 HBV の当地域における浸淫状況の一端を垣間見るとともに、HIV に関する有用な疫学情報も得ることができた。

E 結論

- (1) 5 つの県市から成る首都圏近県地域に薬剤耐

性 HIV-1 の調査体制を構築した。

- (2) 37 例の HIV の検査結果からは、薬剤耐性に関する変異は認められなかったが、薬剤耐性 HIV が首都圏近県地域に浸淫している可能性は否定できない。
- (3) M36I, H69K 及び I13V は、サブタイプ CRF01_AE に特異的な minor mutation 又は polymorphism であることが示唆された。
- (4) HIV のサブタイプの内訳は、CRF01_AE と B が約半数ずつであった。
- (5) HBV のジェノタイプは、HIV の疫学情報としても有用であると考えられた。

F 健康危険情報

該当なし

G 研究発表

なし

H 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

(表 1) プロテアーゼ領域のサブタイプ別薬剤耐性変異
(未治療者 35 例)

	L 10 IV	I 13 V	G 16 E	M 36 I/L	D 60 E	I 62 V	L 63 P	I 64 M/V	H 69 K	A 71 V	V 77 I	V 82 I	N 83 D	I 93 L
CRF01_AE ^a	2	14	2	17	0	0	7	2	15	0	0	1	0	1
B ^b	2	3	0	2	1	4	7	0	0	4	7	0	1	8
<i>P</i> (a VS b)		>10 ⁻⁴		>10 ⁻⁵					>10 ⁻⁵		<0.004			<0.009

分担研究者 森 治代（大阪府立公衆衛生研究所ウイルス課 主任研究員）

研究協力者 小島洋子、川畑拓也、大竹 徹（同上）

研究概要

2006年に感染が判明し医療機関を受診した新規 HIV-1 感染者 18 例、および HIV 抗体検査で陽性が確認された 81 例について薬剤耐性遺伝子検査を実施したところ、major な耐性関連アミノ酸変異は検出されなかったが、7 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

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、大阪府内の新規 HIV-1 感染者における薬剤耐性変異保有状況を調査することを目的とする。

B. 研究方法

2006 年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 18 例（治療開始後 1 ヶ月の 1 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、薬剤耐性遺伝子検査を実施した。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 2006 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。また、HIV 抗体確認検査で陽性となった検体 81 例についても同様に薬剤耐性遺伝子検査を実施した。

（倫理面への配慮）

医療機関において主治医より研究内容について説明し、本人の同意を得た上で採血を行っている。また、確認検査検体については、連結不可能な匿名検査である。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

2006 年に HIV-1 感染が判明した計 99 例について、薬剤耐性遺伝子検査を実施した結果、major mutation が検出される例はなかった。医療機関受診者 18 例中 16 例（88.9%）、抗体確認検査陽性例 81 例中 76 例（93.8%）の PR 領域において 1-7 カ所の minor mutation が検出されたが、その大部分は polymorphism であると思われる。一方、RT 領域においてもいわゆる major mutation は検出されなかったが、抗体検査陽性例中の 7 例（8.6%）に T215X（D 4 例、E 1 例、L 1 例、S 1 例）が検出された。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

2006 年の新規 HIV-1 感染者において、major な薬剤耐性変異は検出されなかった。約 90% の PR 領域において何らかの minor mutation が検出されたが、これは薬剤耐性ウイルスの蔓延を示唆するものではなく、新規プロテアーゼ阻害剤の導入により耐性関連アミノ酸部位が大幅に増加したことに起因すると思われる。その一方で、RT 阻害剤の耐性変異である T215Y/F の revertant と考えられる T215X 変異が 7 例に認められた。2002 年以降、同様の変異（T215C/D/E/L/S）が毎年継続して見つかり、近年増加傾向にある。その多くは日本人男

性同性愛者であり、*env* 領域の塩基配列より系統を作製するとほぼすべての株が2つのクラスターに集積することから、T215X 変異を有する遺伝的に近縁なウイルスが日本人ゲイグループの間で感染拡大していることが示唆された。

E. 結論

大阪地域の新規 HIV-1 感染者において、major mutation を有する薬剤耐性ウイルスの検出頻度に増加傾向は認められなかった。しかし、T215X 変異ウイルスがゲイコミュニティを中心に広がりつつある可能性が示され、今後も継続したモニタリングが必要であると考えられた。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 川畑拓也、小島洋子、森 治代、大竹 徹、大國 剛、当所にてHIV感染を確認した、2例のイムノクロマトグラフィ法陰性の感染初期例、感染症学雑誌、81：71-77、2007

2. 学会発表

- 1) 森 治代、小島洋子、川畑拓也、大竹 徹、V108I polymorphism が EFV 耐性の誘導に及ぼす影響、第 20 回日本エイズ学会、東京、2006
- 2) 川畑拓也、小島洋子、森 治代、大竹 徹、大國 剛、HIV 疫学調査における母集団の性感染症罹患リスクの解析、第 20 回日本エイズ学会、東京、2006
- 3) 川畑拓也、小島洋子、森 治代、大竹 徹、大國 剛、IC 法において陰性を示した3例の HIV 感染初期例、第 20 回日本エイズ学会、東京、2006
- 4) 川畑拓也、小島洋子、森 治代、大竹 徹、大國 剛、HIV 感染に対して感染リスクの高い行動を取る人々を対象にした疫学調査において見つかった、HIV-1 遺伝子陽性である3例の感染初期例、第 20 回近畿エイズ研究会学術集会、大阪、2006
- 5) 小島洋子、川畑拓也、森 治代、大竹 徹、

大阪府内において HIV 感染に対してリスクの高い行動をとるグループ内で広がる HIV-1 の疫学調査、第 20 回近畿エイズ研究会学術集会、大阪、2006

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし