

しているかどうかの検索が必要であろう。同様の検討は EFV と LPV/r を併用した症例に於いても必要であると考えられるため、今後これらの組み合わせの症例に於いても、薬剤の細胞内及び血中濃度と、遺伝子タイピングを行って行く必要がある。これまでは、幸いにも薬剤耐性変異株の出現は確認されていないが、今後も定期的な監視が必要と思われる。また、d4T に代表される、代謝異常を惹起する薬剤を含む HAART を施行している場合、定期的に乳酸値や血糖値また、HbA1c 等の測定を行うことで、比較的早期に副作用の出現を察知することができ、薬剤変更を速やかに行うことが可能となる。また、当該薬剤を変更することにより、副作用の発現や、異常値の遷延を最小限に留められることも確認できている。今後は、同じ薬剤を服用しても、代謝異常が出現する症例としない症例の間の違いを、細胞レベルで検討すべく現在各症例から細胞株を作製している。

本研究では、HAART により血中のウイルス量が長期間測定感度以下 (6 年以上 HIV-RNA<50copies/ml) の 7 人の HIV 感染例の HIV-1 組み込み部位を解析した。その結果、多くの残存している HIV-1 は resting CD4+T cell 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-1 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-1 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-1 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-1 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+T cell でも発現していることから、HIV-1 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-1 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。

また本研究では、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+T cell 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

SQV の血中濃度の長期にわたる観察を行い、高い血中濃度を長期間維持し、副作用がほとんど見られない症例を、症例数を増やして報告した。これらの症例では、臨床経過も良好で耐性変異も見られなかった。また、プロテアーゼ阻害剤の排出に関与する MDR1 遺伝子について SNPs タイピングを実施したところ、最も高値を示した症例と最も低値であった症例が WT の homo であり、hetero や Mut の homo のものは平均的な値であったことから、今後も明らかな耐性変異が Protease 領域に見られないにも関わらず、SQV 耐性を示す症例における検討を進めていく必要があると考える。また、EFV と LPV/r を併用している症例については、特にウイルスが感度以下にならない症例で LPV の血中濃度の測定を行う必要性がある。

本研究では、長期に亘る HAART 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存在していることを示した。また、HIV-1 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と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 松下修三: HAART 開始のタイミング. 化学療法の領域. 20(7): 37-42, 2004.
2. Matsushita, S., Yoshimura, K., Kimura T., Kamihira, A., Takano, M., Eto, K., Shirasaka, T., Mitsuya, H., Oka, S.: Spontaneous recovery of hemoglobin and neutrophil levels in Japanese patients on a long-term Combivir® containing regimen. J. Clin. Virol. 33: 188-193, 2005.
3. Sakaguchi, N., Kimura T., Matsushita, S., Fujimura S., Shibata J., Araki M., Sakamoto T., Minoda S., and Kuwahara K. Generation of high-affinity antibody

- against T cell-dependent antigen in ganp gene-transgenic mouse. *J. Immunol.* 174: 4485-4494, 2005.
4. Matsushita, S., Takahama S., Shibata J., Kimura T., Shiozaki K., Eda Y., Koito A., Murakami T., and Yoshimura K. Ex vivo neutralization of HIV-1 quasispecies by a broadly reactive humanized monoclonal antibody KD247. *Human Antibodies.* 14:80-88, 2005
 5. 柴田潤二、松下修三: Anti-HIV Neutralizing Antibodies. *The Journal of AIDS Research.* 7(3): 161-165, 2005.
 6. 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.
 7. 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
 8. 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.
 9. 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.
 10. 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.
 11. 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).
 12. 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).
2. 学会発表
1. 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.
 2. 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.
 3. Kenai, A., Kimura, T., Yoshimura K., Koito, A., Matsushita, S.: Efficient induction of both cellular and humoral immune response by immunization with Tat-Nef fusion protein (tNEF) without adjuvants. XV International AIDS Conference Bangkok, 2004. 7. 11-16, Bangkok, Thailand.
 4. 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. XV International AIDS Conference Bangkok, 2004. 7. 11-16, Bangkok, Thailand.
 5. Matsushita, S.: International symposium of AIDS Research Institute in Yonsei University College of Medicine "HIV/AIDS". 2004. 10. 15. Seoul, Korea.
 6. 小糸厚、柴田潤二、大杉剛生、松下修三、亀山祐一: 小動物由来 APOBEC3G の抗 HIV-1

- 活性の解析. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会. 2004. 11. 21-23. 横浜.
7. 祁内 梓、木村 哲也、吉村 和久、小糸厚、松下 修三: HIV Tat-Nef 融合タンパクを用いた細胞性・液性免疫の誘導. 第 34 回日本免疫学会総会・学術集会. 2004. 12. 1-3. 札幌.
 8. 濱本理恵子、祁内 梓、吉村和久、小糸 厚、松下修三: HIV 感染患者におけるヘルパーT 細胞活性に対する制御性 T 細胞の影響. 第 34 回日本免疫学会総会・学術集会. 2004. 12. 1-3. 札幌.
 9. 柴田潤二、木村哲也、岩田隆一、吉村和久、小糸厚、松下修三: gp 120 の C3 領域変異による抗 V3 中和抗体に対する中和抵抗性の獲得自己由来の HIV に対して中和活性をもつ血清中和抗体の交差中和性の研究. 第 18 回日本エイズ学会学術集会. 2004. 12. 9-11. 静岡.
 10. 岩田隆一、柴田潤二、木村哲也、吉村和久、小糸厚、松下修三: 自己由来の HIV に対して中和活性をもつ血清中和抗体の交差中和性の研究. 第 18 回日本エイズ学会学術集会. 2004. 12. 9-11. 静岡.
 11. 松下修三: Introductory comments on HIV residual diseases (イントロダクション: HAART で残存するウイルスとは?) 第 18 回日本エイズ学会学術集会. 2004. 12. 9-11. 静岡.
 12. 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. 12. 6-9, 2005, Saint Martin, FWI.
 13. Matsushita S., Shibata, J., Yoshimura, K., Maeda, Y., Murakami, T., Atsushi Koito, Honda, M., Mitsuya, H., Eda, Y.: Development of broadly reactive neutralizing monoclonal antibody KD247: implication for passive immunotherapy. The cooperative research project on clinical and epidemiological studies of emerging and re-emerging infectious diseases, Aso, Japan, Sep. 15-16, 2005.
 14. 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. 9. 15-16. Kumamoto.
 15. 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.
 16. 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.
 17. 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 reactive neutralizing monoclonal antibody KD247: implications for passive Patients under HAART. 7th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific. 2005. 7. 1-5. Kobe.
 18. 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.
 19. 松下修三: シンポジウム-HIV/AIDS の臨床における最近の問題点-イントロダクション-. 第 19 回日本エイズ学会学術集会. 2005. 12. 1-3. 熊本.
 20. 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.

21. 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.
22. 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.
23. 松下修三：A broadly reactive neutralizing antibody and evolution of escape mutants *in vitro*. 第 8 回白馬シンポジウム in 鹿児島-エイズ治療の最前線-. 2005. 11. 3-4. 鹿児島.
24. 柴田潤二、吉村和久、前田洋助、村上利夫、江田康幸、小糸厚、松下修三：広範囲 HIV-1 単クローン抗体の *in vitro* 逃避ウイルスの誘導と解析. 第 8 回白馬シンポジウム in 鹿児島-エイズ治療の最前線-. 2005. 11. 3-4. 鹿児島.
25. 柴田潤二、吉村和久、小糸厚、松下修三：ヒト免疫不全ウイルス 1 型 gp120 の C3 領域変異による抗 V3 中和抗体に対する中和抵抗性の獲得. 第 53 回日本ウイルス学会総会、横浜、2005. 11. 20-22.
26. 柴田潤二、吉村和久、前田洋助、村上利夫、江田康幸、小糸厚、松下修三：広範囲 HIV-1 単クローン抗体の *in vitro* 逃避ウイルスの誘導と解析. 第 6 回熊本エイズセミナー. 2005. 9. 15. 熊本.
27. 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. 13th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Denver, USA, Feb. 4-9, 2006
28. 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*. 13th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Denver, USA, Feb. 4-9, 2006. Matsushita S., Shibata J., Honda A., Murakami T, Eda Y, Koito K, Yoshimura. Development of broadly immunotherapy. AIDS Vaccine 2006 Conference, Amsterdam, the Netherlands, Aug. 29-Sep.1, 2006.
29. 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. 7th AIDS Seminar in Kumamoto, Sep 21-22, 2006.
30. 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. 7th AIDS Seminar in Kumamoto, Sep 21-22, 2006.
31. 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*. 7th AIDS Seminar in Kumamoto, Sep 21-22, 2006.
32. 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 と組み込み部位の関連性. 第 54 回日本ウイルス学会総会. 2006. 11. 18-21. 名古屋
33. 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
34. 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.
35. 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.

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、HIV の遺伝子変異することによって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。そこで本研究では、以下のような研究を目的とした。

- (1) HIV のプロテアーゼの変異の実態を整備する。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、サイト間にて変異に相関のあるケースが報告されている。アミノ酸サイト間での変異の関連の度合いを求め、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、そしてたんぱく質の構造と機能との関係を明らかにする。

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 プロテアーゼの配列を用いて、99 のアミ

ノ酸サイト間の変異の相互情報量を求めた。用いたデータは、未治療の HIV 感染者からのサンプル、インジナビルの投与を受けたサンプル、さらにネルフィナビル、サキナビルの投与を受けたサンプルの合計4つの群であった。アミノ酸サイト間の変異の相互情報量を計算し、阻害活性値の変化の情報や、たんぱく質の立体構造情報との対応を取った。

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) プロテアーゼの99のアミノ酸サイト間において、変異の相互情報量を計算したところ、変異に関連の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。インジナビル、ネルフィナビル、サキナビルのそれぞれの投与された群において、サイト間の変異の関連のパターンに違いが見られた。さらに、アミノ酸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つのサイトが関連しているケースも数多く観測された。

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) プロテアーゼの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により、変異の蓄積の傾向を把握することができた。ネルフィナビル投与群でのみ観測された30番目と88番目の変異の関係において、D30N/N88Dの変異体の出現頻度は非常に低かった。これは、負電荷の2つのアスパラギン酸の側鎖が近距離に作用し、酵素を不安定化させることによると考えられ、30、88の順に変異している可能性が高い。また阻害活性値の情報から、ネルフィナビル以外の薬剤にて30-88間での変異に有意な相関が見られないのは、D30N変異がそれらの薬剤には耐性を与えないためと考えられる。

E. 結論

HIV プロテアーゼのアミノ酸の多様性をサイトごとに評価することにより、変異が観察されるサイト、不変サイトの同定ができた。そして、たんぱく質の2つのサイト間の変異の関係の解析により、薬剤の阻害活性値との対応をとることで、変異の蓄積のしかたの特徴を見出すことができた。たんぱく質の立体構造との対応から、静電的な相互作用よりも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、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。

F. 健康危険情報

該当しない

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamaguchi, Yamashita, Ohkura, Hayami, Miura (2004) "Linkage of amino acid variation and evolution of human immunodeficiency virus type 1 gp120 envelope glycoprotein (subtype B) with usage of the second receptor" J Mol Evol. 2004 Mar;58(3):333-40.
- 2) Takemura T, Ekwilanga M, Bikandou B, Ido E, Yamaguchi-Kabata Y, Sadayuki Ohkura S, Harada H, Takehisa J, Ichimura H, Parra H-J, Nende M, Mubwo E, Sepole M, Hayami M and Miura T (2005) A novel SIV from black mangabey (*Lophocebus aterrimus*) in Democratic Republic of Congo. Journal of General Virology 86:1967-71
- 3) 山口由美 「HIV の遺伝的多様性とバイオインフォマティクス」 ウイルス 2004年6月号 54(1) 33-38
- 4) 山口由美 ウイルスの表面構造と遺伝的多様性 化学と工業 58(10):1181-1184. (2005)

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

II. 総合 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）

総合分担研究報告書

「薬剤耐性遺伝子検査のバ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：全国の施設で実施されている HIV-1 薬剤耐性遺伝子型検査の内容を把握し、問題点を明らかにする為、16 施設の参加で検査のバリデーションを行った。また、その結果を基に各施設の問題点を明らかにし、検査内容を改善することで、全国の HIV-1 薬剤耐性遺伝子型検査法の精度向上を図ることを目的とした。平成 17 年度に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#1 を実施し、平成 18 年度には臨床検体を対象にしたバリデーション#2 を実施した。

平成 17 年度のバリデーション#1 では、正答率が 97.3%の優秀な成績を収めた。バリデーションに用いた HIV-1 が有するアミノ酸変異と異なる検査結果については、その原因を解明するため、各施設で使用しているプライマー、シーケンスの波形データ、および塩基配列・アミノ酸配列のファイルを精査した。その結果、異なる結果を引き起こすと考えられる原因は、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、③人為エラー、の3つに分類できた。これらの原因と対処法を各施設に通達した。平成 18 年度のバリデーション#2 では、参加した 16 施設全てから薬剤耐性アミノ酸変異は正しく報告されており、完璧な結果であった。その他のアミノ酸変異については、5 アミノ酸について報告書作成時に誤った記入があったが、検出に関しては問題はなかった。薬剤耐性検査の標準化への準備は整ったと思われる。

A. 研究目的

HIV-1 薬剤耐性遺伝子型検査法は多岐にわたっており、そのため検査技術および精度が均一

かつ十分信頼に足るものであるかは不明である。そこで、本研究では全国の施設で実施されている HIV-1 薬剤耐性遺伝子型検査の内容を把

握することと、問題点を明らかにする為、各施設に対してバリデーションを実施した。また、その結果を基に各施設と問題点を討議し、検査方法を改善することで、全国の HIV-1 薬剤耐性遺伝子型検査法の精度向上を目的とした。平成 17 年度は、臨床検体を対象にしたバリデーションの前段階として、遺伝子型が均一な HIV-1 クローンを用いてバリデーションを実施した。平成 18 年度は、平成 17 年度のバリデーションより明らかとなった問題点を各施設が克服できているかを確認するため、臨床検体を用いてバリデーションを実施した。

B. 研究方法

平成 17 年度 (バリデーション#1)

臨床検体由来の薬剤耐性 HIV-1 と、HIV-1 HXB2 株の感染性クローンを用いて、2 種類の組み換え感染性クローンを作製した。①多剤薬剤耐性アミノ酸変異の一つである Q151M を含むクローン#1、②アミノ酸挿入による薬剤耐性変異を含むクローン#2 である。作製した感染性クローン#1、2 を培養細胞に遺伝子導入し、組み換えウイルスを得た。HIV-1 クローン#1、2 から RNA を抽出し、バリデーションに参加している各施設へ送付、薬剤耐性検査を実施して頂いた。検査後、検出された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も報告して頂いた。薬剤耐性アミノ酸変異は HIV-1 HXB2 を標準株とし、IAS-USA パネルに基づいて判定するように指示した。また、検査に用い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。各施設から報告された検査結果をクローンが有するアミノ酸変異と比較して、異なる結果についてはその原因を解明する為、提出されたファイルを詳細に調べた。

平成 18 年度 (バリデーション#2)

患者血漿サンプルを用いて 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 9.43×10^4 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て頂いた。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。平成 17 年度と同様に、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

平成 17 年度 (バリデーション#1)

バリデーションには全国の 15 施設が参加した。検査結果の報告書に対して正誤の判定を行い、一覧表を作製した (図 1 - 2)。

具体的には、クローン#1 のプロテアーゼ遺伝子領域 (図 1) に存在する薬剤耐性変異は L63P、A71T、V77I であり、その他のアミノ酸変異は V3I、E35D、S37N、R41K、K70R である。薬剤耐性アミノ酸変異について誤答を報告した施設は A、G の 2 施設であり、どちらも A71T についてのものであった。施設 A は A71V と報告しており、施設 G は A71T を検出していなかった。V3I については施設 H が、E35D については施設 G、H が、S37N については施設 H が、R41K については施設 G、H が、K70R については施設 H が検出していなかった。また、HIV-1 クローン#1 には存在していないはずのアミノ酸変異を施設 E、F が報告していた。

クローン#1 の逆転写酵素領域 (図 1) に存在する薬剤耐性アミノ酸変異は A62V、V75I、F77L、F116Y、Q151M、その他のアミノ酸変異は S68G、

T69V、E122K、Q197E、R211K である。薬剤耐性アミノ酸変異は全ての施設で正しく検出されていた。その他のアミノ酸変異、S68G については施設 C が、Q197E と R211K については施設 C が検出していなかった。

クローン#2 のプロテアーゼ遺伝子領域(図 2) に存在する薬剤耐性アミノ酸変異は L10I、L63P、V77I、L90M であり、その他のアミノ酸変異は V3I、I15V、S37D、I93L である。薬剤耐性アミノ酸変異について誤答を報告した施設は D、F の 2 施設であった。施設 D は L90M を検出しておらず、施設 F は L10I を L10L/S と報告していた。また、HIV-1 クローン#2 には存在していないはずのアミノ酸変異を施設 E、F が報告していた。

クローン#2 の逆転写酵素領域 (図 2) に存在する薬剤耐性変異は M41L、T69S-SG(insertion)、G190A、L210W、T215Y、その他のアミノ酸変異は V35T、T39A、K43E、E122K、I135T、R172K、D177E、Q207H、R211K、L214F、K238S である。薬剤耐性アミノ酸変異について異なる結果を報告した施設は K の 1 施設であり、T69S-SG(insertion)をその他のアミノ酸変異として報告していた。その他のアミノ酸変異、K238S については施設 L が検出していなかった。また、HIV-1 クローン#2 には存在していないはずのアミノ酸変異を施設 M、N が報告していた。

全体をまとめると、17 個の誤答があった(表 1)。全 15 施設から報告されるべきアミノ酸変異の総数は 626 個である。よって、エラー率は 2.7% ($17 \div 626 \times 100$) であった。

平成 18 年度 (バリデーション#2)

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 3 に、その他のアミノ酸変異を図 4 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 3)。

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 4)。これら 11 個のアミノ酸変異についても全施設から正しく検出されていた。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しては 4 施設で計 5 つ見受けられた。そのため、見かけ上のエラー率は 1.5% ($5 \div 336 \times 100$) であった。

D. 考察

平成 17 年度に実施したバリデーション#1 では、エラー率は 2.7% であった。これらのエラーについて調べた結果、その原因を以下の 3 つに分類することができた。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レグラム、③人為エラー、である。これらに対する解決策として、次の 3 つを我々は提案し、各施設に通達した。①最新のプライマー情報と、塩基配列決定領域内の新規検出変異や、挿入・欠失に関する HIV 塩基配列情報を、少なくとも年に一度は全関係施設に配布する等の、検査水準をバックアップする体制を充実する、②純度の高いプライマー、すなわち、HPLC 精製グレードのプライマーを使用する。更に、フォワードプライマーだけでなく、リバースプライマーを用いてシークエンスを行い、より正確性の高い解析を行う、③ソフトウェアの普及と充実による、解析の自動化を進める、である。これらの改善点を踏まえて、平成 18 年度のバリデーション#2 を実施した。その結果、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無かったことから、このエラ

一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、バリデーション#2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。バリデーション#1ではエラー率が2.7%であったことから、HIV-1 遺伝子型薬剤耐性検査の精度は大幅に向上できたと考えている。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

3年間にわたるバリデーションを通じ、全国の施設におけるHIV-1 遺伝子型薬剤耐性検査の問題点を改善し、精度を向上させることができた。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、瀧永博之、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、瀧永博之、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）

3) 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、瀧永博之、正兼亜季、佐藤克彦、秦真美、溝上康司、森 治代、南 留美、渡邊香奈子、岡田清美、杉浦 互

第19回日本エイズ学会総会（平成17年12月—2005）（熊本）

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

表 1. エラーの原因と、エラーを引き起こす問題点のまとめ

分類	ミスジャッジをひき起こした原因	平成 17 年度	平成 18 年度
		(バリデーション#1) 数(%)	(バリデーション#2) 数(%)
技術的なエラー	不適切なプライマーの使用	9(1.4%)	0(0%)
	エレクトロプログラムの乱れ		
人為的エラー	報告書への記入ミス	6(1.0%)	5(1.5%)
	アミノ酸変異を分類する際の判断ミス	1(0.2%)	0(0%)
	コードンの翻訳エラー	1(0.2%)	0(0%)
全問題点		17(2.7%)	5(1.5%)

図 1. HIV-1 クロローン#1 についての遺伝子型薬剤耐性検査結果の評価 (バリデーション#1)

アミノ酸変異	正解した施設数	正解率(%)	備考
V3I	13/15	86.7	施設 B は 13V と報告。施設 H は報告無し。
E35D	13/15	86.7	施設 G と H は報告無し。
S37N	14/15	93.3	施設 H は報告無し。
R41K	13/15	86.7	施設 G と H は報告無し。
L63P	15/15	100	
K70R	14/15	93.3	施設 H は報告無し。
A71T	13/15	86.7	施設 A は A71V と報告。施設 G は報告無し。
V77I	15/15	100	
Ghosts			施設 E と F は D29N および C95W をそれぞれ報告していた。これらはクロローン#1 には存在していないアミノ酸であった。
A62V	15/15	100	
S68G	14/15	93.3	施設 C は報告無し。
T69V	15/15	100	
V75I	15/15	100	
F77L	15/15	100	
F116Y	15/15	100	
E122K	15/15	100	
Q151M	15/15	100	
Q197E	14/15	93.3	施設 C は報告無し。
R211K	14/15	93.3	施設 C は報告無し。

15 施設は A から O のアルファベットで示した。薬剤耐性アミノ酸変異は太字のイタリック体で示した。

図 2. HIV-1 クローン#2 についての遺伝子型薬剤耐性検査結果の評価 (バリデーション#1)

アミノ酸変異	正解した施設数	正解率(%)	備考
V3I	15/15	100	
L10I	14/15	93.3	施設 F は L10L/S と報告。
I15V	15/15	100	
S37D	15/15	100	
L63P	15/15	100	
V77I	15/15	100	
L90M	14/15	93.3	施設 D は報告無し。
I93L	15/15	100	
Ghosts	-	-	施設 E は E34K を、施設 F は R41K および T96S をそれぞれ報告していた。これらはクローン#2 には存在していないアミノ酸変異であった。
V35T	14/14	100	施設 G は使用したプライマーの組み合わせにより V35T を含む領域が解析対象外であった。
T39A	14/14	100	施設 G は使用したプライマーの組み合わせにより V39A を含む領域が解析対象外であった。
M41L	15/15	100	
K43E	15/15	100	
T69S-SG insertion	14/15	93.3	施設 K は T69S-SG 挿入変異を、薬剤耐性変異ではないアミノ酸変異として報告していた。
E122K	14/14	100	施設 H は使用したプライマーの組み合わせにより E122K を含む領域が解析対象外であった。
I135T	14/14	100	施設 H は使用したプライマーの組み合わせにより I135T を含む領域が解析対象外であった。
R172K	15/15	100	
D177E	15/15	100	
G190A	15/15	100	
Q207H	15/15	100	
L210W	15/15	100	
R211K	15/15	100	
L214F	15/15	100	
T215Y	15/15	100	
K238S	14/15	93.3	施設 L は報告無し。
Ghosts	-	-	施設 N は、クローン#2 には存在していないアミノ酸変異である I31T を報告していた。

15 施設は A から O のアルファベットで示した。薬剤耐性アミノ酸変異は太字のイタリック体で示した。

図 3

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)
 (バリデーション#2)

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

薬剤耐性アミノ酸変異
 検出率: 100%

図 4
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)
(バリデーション#2)

標準株		IAS-USA 2005 Fall															
施設名		HXB2												NL4-3		Stanford univ. consensus B	
A	B	C	D	F	G	I	J	K	L	N	O	P	H	E	M		
PR	V 3	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I		
	I15	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V		
	S37	D/N	D	D	D	D/N	D	D/N	D	D	D/N	D/N	D	D	D		
RT	V35	I/T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	I/T	T	V35	I		
	T39	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	T39	A		
	E122	K	K	K	K	K	K	K	K	K	KE	K	K	K122	K		
	I135	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	I135	T		
	I142	I/T	I/T	I/T	I/T	I/T	I/T	I/T	I/T	I/T	I/T	I/T	I/T	I142	T		
	I178	I/L	I/L	I/L	I/L	I/L	I/L	I/L	I/L	I/L	I/L	I/L	I/L	I178	I/L		
	Q207	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	Q207	H		
	R211	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	R211	K		
	L214	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F214	F		
	K238	S	S*	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	K238	S		

- ・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。

「薬剤耐性 HIV の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」

主任研究者 杉浦 亙 (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、2003 年から 2006 年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 245 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 2003 年：1.6%、2004 年：5.4%、2005 年：2.5%そして 2006 年は 9.4%であった。サブタイプは B が最も頻度が高く全体の 81.3%を占めていた。今回の 4 年間の頻度の推移を見ると 2006 年に 9.4%と跳ね上がっているようにも見えるが、2006 年度は症例数が少ないためにこのデータのみで耐性ウイルスが増加しているという判断は困難と考えられる。今後とも新規 HIV/AIDS 症例における薬剤耐性の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

2003 年 1-12 月、2004 年 1-12 月、2005 年 1-12 月そして 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 μ 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

2003 年は 59 例、2004 年は 74 例、2005 年は 80 例、そして 2006 年は 32 例の新規診断症例が送付された。

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 2003 年で 54/59(91.5%)、2004 年で 71/74(95.9%)、2005 年で 78/79(98.7%)、そして 2006 年で 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、耐性変異および耐性関連変異の伝播とは考えられなかった。2006 年に初めて L90M を持つものが 1 例確認された。

RT 領域では 2003 年に 1 例 (1.6%) (M184V) あり、2004 年に 4 例 (5.4%) (M41L、V179VDE/M184MIV、M41L/D67N/V118I/M184V/L210W/T215D) あり、2005 年に 2 例 (2.5%) (M184V、K103N/V108I)、2006 年に 2 例 (6.2%) (T215D、T215E) が認められた。

サブタイプは 2003 年が CRF01_AE:8 例、B:49 例、C:1 例、G:1 例、2004 年が A:3 例、CRF01_AE:12 例、B:58 例、D:1 例、2005 年が A:1 例、CRF01_AE:10 例、CRF02_AG:2 例、B:66 例、2006 年は CRF01_AE:4 例、B:26 例、D:1 例、不明:1 例であった。

D. 考察

プロテアーゼ領域は元々多様性が高い領域であることもあり逆転写酵素領域に比べ変異出現率が高かったが、耐性に寄与するものはほとんど無く、その多くが自然多型の範疇にあると考えられた。あるいは耐性変異に付随をしていた変異が、薬剤中断あるいは変更などにより耐性変異が消失した後も残存したと考えられる。このような症例では耐性ウイルスが潜んでいる可能性は否定できず、将来 PI を含む治療を行った際に、速やかに耐性株が出現する危険性は否定できない。また RT については、明らかに耐性株の伝播が示唆される変異株が毎年散見されていることから、新規感染症例においても薬剤耐性検査を行うことが HIV-1 の疫学状況の把握だけでなく、治療薬を選択する際の情報として重要であると思われた。このような症例では治療開始時には再度薬剤耐性検査を実施して、その結果を踏まえて薬剤の選択を行うことが望ましいと考えられる。今回 RT に多く検出された M184 位の変異は 3TC によって誘導されるが、この薬剤は抗 HIV-1 薬としてだけでなく、ウイルス性肝炎の治療にも用いられる

ものである。これらの症例のウイルス性肝炎の罹患率や治療歴は不明だが、このように他疾患での治療内容にも十分な注意を払う必要がある。

E. 結論

2003 年から 2006 年にかけての新規 HIV-1 診断症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 2.5~9.4%であった。4 年間の頻度の推移では、増減の判断は困難であり、薬剤耐性の今後の動向を知るためにも引き続き監視を行うことが必要であると思われる。

E. 結論

今回の解析より PI 耐性変異と gag は密接な関連があることが改めて確認された。薬剤耐性の評価を正確に行うためには gag の変異についても考慮する必要が強く示唆された。

F. 研究発表

基礎研究グループ 分担研究報告書 参照

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

分担研究者 伊藤 俊広 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 16 年～平成 18 年の期間、「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 39 症例の内 37 例に 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 それ自身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。

B. 研究方法

平成 16 年 1 月～平成 18 年 11 月の期間で、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℃、30 分間行い、95℃、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℃で 50 秒間、アニーリング反応を 55℃、30 秒間、伸長反応を 72℃、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℃降下させ、変性と伸張反応は同一として、50℃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℃、50℃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℃、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7年に当院でHIV感染症の診療を開始して以来、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、全国傾向と同様で新規の受診者は年々増加している。

平成16年1月～平成18年11月の期間に当院を受診したHIV感染者は53例（男性45例、女性8例）で、このうち性的接触による感染者は50例であった。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39例（男性35例、女性4例）であった。初診時すでにAIDSを発症していたものは8例である。女性4例を含む38例は日本国籍（日本人）で、韓国国籍1例であった。感染地域は女性1例を除く38例が国内であり、年齢は22歳から71歳まで分布し、20歳代：11例（女性1例）、30歳代：14例、40歳代：5例（女性1例）、50歳代：3例（女性1例）、60歳代：4例（女性1例）、70歳代1例、不明1例であった。感染経路別では同性間：29例、異性間10例である。薬剤耐性変異はRT領域では6例（7箇所）で検出された。すなわち、L210Sが1例、T215Dが1例、V118Iが1例、L210L/Mが1例で、K219NとF227Lの2箇所の変異を1例で認めた。PI領域では37例で検出され1症例で複数個の変異がみられることから全体では65個の変異を検出した。すなわち、L63P：15例、L63N：1例、L63T：4例、L63A：9例、L63S：1例、L63V：1例、K20R：3例、K20M：1例、M38I：1例、M36I：8例、A71T：4例、A71V：2例、A71I：1例、A77I：1例、G48R：1例、V77I：6例、L10V：4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39例の新規感染者において、治療前

すでに多くに症例で耐性と思われる変異が観察されたことは今後の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。研究期間3年の間に薬剤耐性変異の検出法については他の施設と同様にほぼ確立されたものと考えられ、施設間での結果についても違いは見出せない。今後も継続的にデータの集積が必要と考えられた。

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