

## E. 結論

薬剤耐性HIVの動向把握のための調査体制確立のために神奈川県域のHIV/AIDS診療実態の把握を行った。又、当院における検査体制確立の試みに一環として、施設内のBEDアッセイの確立を試みた。さらにデータの蓄積を行い、解析を進める予定である。

## 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

1. 須田昭子、浜 真麻、上田敦久、岡 秀昭、中仙道亜弥、岳野光洋、白井 輝、安達理恵、小田みどり、竹林早苗、松山奈央、沓名明子、石ヶ坪良明、Cutaneous Pneumocystosisの一例、第21回日本エイズ学会学術集会、2007.12 広島
2. 桐野洋平、上田敦久、吉見竜介、大野美香子、小林 弘、井畑 淳、岳野光洋、白井 輝、石ヶ坪良明、当院で経験されたAIDS関連Kaposi肉腫の9例、第57回神奈川感染症医学会、2007.3 横浜
3. 浜 真麻、上田敦久、井畑 淳、加藤英明、桐野洋平、須田昭子、岡 秀昭、岳野光洋、白井輝、石ヶ坪良明、肺カポジ肉腫による免疫再構築症候群の1例、第58回神奈川感染症医学会、2007.9 横浜

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



### 研究要旨

## 東北ブロックにおける薬剤耐性HIVの調査研究

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 佐々木 悟 仙台医療センター

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19年度（4月～11月までの期間）「薬剤耐性HIV動向把握のための調査体制確立およびその対策に関する研究」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症例中4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。また、個々の薬剤について耐性変異が同定されないにもかかわらず、臨床的にはウイルス抑制が観察されず、耐性ウイルスと考えざるを得ない症例が存在し注意が必要である。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

慢性疾患へと変換を遂げつつあるHIV感染症の対し今後も継続的に問題とすべきものの一つに薬剤耐性ウイルスの出現がある。HIVそれ自体が持つ易変異性と治療を受ける患者側の薬剤服用アドヒアランスがその出現に大きな影響力を持つが、感染拡大と疾患コントロールの観点から、未治療患者における耐性ウイルスの発生動向の把握は重要であり、現状把握が必要である。耐性ウイルスをサーベイすることにより適切な初期治療の選択や新薬の開発、また同系の耐性ウイルスの拡がりを把握することにより感染集団の同定などに役立つ可能性がある。

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。今回は平成19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19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℃、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 downPCR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19年11月末日までの間でHIV/AIDS感染者の累計は161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19年4月～11月の期間に当院を受診したHIV感染者は15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例であった。5例すべて日本国籍（日本人）の男性（MSM）で、年齢は27歳から52歳まで分布した。AIDS発症3例、キャリアー2名。耐性検査時のHIVウイルス量は $7.2 \times 10^3 \sim > 10^5$ コピー/ml、CD4は5～705/μl。ウイルスのsubtypeではすべてタイプBであった。

耐性変異は5例中4例に認められた。すなわち、PI領域においてL10I/L/V：2例、K20T：1例、I62V：1例、L63P：1例、A71T：2例、V77I：1例、I97L：1例。RT領域においてL74LQ：1例、V179D：1例であった。個々の薬剤感受性検査では調べられたすべての薬剤に対し「感受性あり」であったが、1例において明らかな耐性変異を検出できないにもかかわらず、臨床的にウイルス抑制効果がなく、臨床、耐性ウイルスと考えざるを得ない症例が存在した。

## 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平成19年度5例の新規未治療感染者において、4例に診断時・治療前すでに単～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。また1例ではあるが、検査上明らかな耐性変異がみられなかったにもかかわらず、臨床的には耐性ウイルスと考えざるを得ない（HAART：LPV/r/AZT/3TCでウイルスの抑制が得られない）症例が存在することにも注意を払う必要がある。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

1. 佐藤 功、小浜耕治、太田 貴、山田大介、伊藤俊広、佐藤愛子、鈴木智子、疋田美鈴：東北地方における同性間のHIV/STI感染予防啓発の普及促進に関する研究、男性同性間のHIV感染対策とその評価に関する研究（平成18年度総括・分担研究報告書）、厚生労働省科学研究費補助金エイズ対策研究事業、31-40、2007
2. Seiichiro Fujisaki, Saeko Fujisaki, Shiro Ibe, Tsukasa Asagi, Toshihiro Itoh, Shigeru Yoshida, Takao Koike, Masayasu Oie, Makiko Kondo, Kenji Sadamasu, Mami Nagashima, Hiroyuki Gatanaga, Masakazu Matsuda, Mikio Ueda, Aki Masakane, Mami Hata, Yasushi Mizogammi, Haruyo Mori, Rumi Minami, Kiyomi Okada, Kanako Watanabe, Takuma Shirasaka, Shinichi Oka, Wataru Sugiura and Tsuguhiro Kaneda: Performance and quality assurance of genotypic drug resistance testing for human immunodeficiency virus type 1 in japan, *Jpn.J.Infect.Dis*, 60, 113-117, 2007
3. 藤崎誠一郎、藤崎彩恵子、伊部史郎、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、湯永博之、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 瓦、金田次弘：日本におけるHIV-1遺伝子型薬剤耐性検査のコントロールサーベイ：日本エイズ学会誌 9, 136-146, 2007

### 2. 学会発表

1. 平野泰三、小池 彩、田島由美、井根省二、石川 泉、菅原知広、太田耕造、阿部正理、伊藤俊広：ITP経過中にクリプトコッカス髄膜炎を合併した1例：第183回日本内科学会東北地方会2007年9月1日青森
2. 杉浦 瓦、湯永博之、吉田 繁、千葉仁志、小池隆夫、伊藤俊広、原 孝、佐藤武幸、石ヶ坪良明、上田敦久、近藤真規子、今井光信、貞升健志、長島真美、福武勝幸、山元泰之、田中理恵、加藤信吾、宮崎菜穂子、岩本愛吉、藤野真之、仲宗根正、巽 正志、椎野禎一郎、岡慎一、林田庸総、服部純子、伊部史朗、藤崎誠一郎、金田次弘、浜口元洋、上田幹夫、正兼亜季、大家正義、下条文武、田邊嘉也、渡辺香奈子、白阪琢磨、榎原 健、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、松下修三、健山正男、藤田次郎：2003-2006年の新規HIV-1感染者における薬剤耐性頻度の動向：第21回日本AIDS学会総会 2007. 11. 30 広島
3. 鈴木博義、清水 愛、伊藤俊広、佐藤 功、武井英博、鈴木靖士、成川孝一、栗原紀子：AIDSに合併した原因不明の髄膜脳炎の1剖検

例：第14回東北神経病理研究会 弘前大学医学部コミュニケーションセンター 2007. 10. 6 弘前

4. 小住好子、佐藤ともみ、佐藤麻希、後藤達也、加藤儀昭、疋田美鈴、佐藤愛子、伊藤俊広、佐藤功：当院における抗HIV療法（HAART）の変遷・実態・服薬援助：第46回日本薬学会東北支部大会 平成19年10月28日仙台
5. 佐藤麻希、小住好子、佐藤ともみ、後藤達也、加藤儀昭、伊藤俊広、佐藤 功：保険薬局における抗HIV療法/抗HIV薬についての意識調査：第61回国立病院総合医学会 平成19年11月17日名古屋

## 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





### 研究要旨

## ACCにおける薬剤耐性HIVの調査研究

分担研究者 湯永博之

国立国際医療センター エイズ治療・研究開発センター 専門外来医長

国立国際医療センター エイズ治療・研究開発センターにおいて、平成19年1月から6月の間に、81人のHIV-1感染者が新規に診断された。この81人に対してHIV-1の遺伝子検査による薬剤耐性検査を施行したところ、8人の患者に主要な薬剤耐性変異が認められた。逆転写酵素のT215Sが1人、V90Iが1人、V179Dが4人、プロテアーゼ領域のM46Iが1人、D30NとL33Fを持つ者が1人であった。サブタイプは、Bが71人、AEが3人、Cが4人、AGが2人、Gが1人であった。BEDアッセイを行ったところ、22人が約半年以内の感染と判定された。今後も調査を継続する必要があると考えられた。

### A. 研究目的

全国的な薬剤耐性HIV-1の動態把握のため、国立国際医療センターで新規に診断されたHIV-1感染者のサブタイプおよび薬剤耐性変異を調べる。また、BEDアッセイを行い、感染時期を推定する。

### B. 研究方法

新規に診断されたHIV-1感染者の血漿からRNAを抽出し、HIV-1の逆転写酵素遺伝子領域とプロテアーゼ遺伝子領域をRT-PCRとnested-PCRにて増幅し、シーケンスを解析する。また、血漿中の、全IgGのうち、HIV-1 gp41に特異的なIgGの割合をBEDアッセイにより測定する。

#### (倫理面への配慮)

研究に参加していただいた患者様からは、すべて文書による同意を得ている。拒否は自由であり、拒否することで、診療面での不利益は生じない。説明文書・同意文書は国立国際医療センターにおける倫理委員会で承認されている(IMCJ-H13-80)。

### C. 研究結果

81人のHIV-1感染者が新規に診断された。この81人に対してHIV-1の遺伝子検査による薬剤耐性検査

を施行したところ、8人(9.9%)の患者に主要な薬剤耐性変異が認められた。逆転写酵素のT215Sが1人、V90Iが1人、V179Dが4人、プロテアーゼ領域のM46Iが1人、D30NとL33Fを持つ者が1人であった。サブタイプは、Bが71人、AEが3人、Cが4人、AGが2人、Gが1人であった。BEDアッセイを行ったところ、22人が約半年以内の感染と判定された。

### D. 考察

主要な耐性変異を持つ患者の割合は、例年と比較してやや高い。BEDアッセイによる新規感染者の割合は、初診時にCD4数が100以下の症例を7人含んでおり、false positiveを含んでいる可能性がある。

### E. 結論

耐性HIV-1の動態を把握するため、今後も新規診断症例の薬剤耐性検査を継続する必要があると考えられる。BEDアッセイによる感染時期の推定についても、経時変化を調べるため、継続が必要である。

### F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

## 1. 論文発表

1. Vasilescu A, Terashima Y, Enomoto M, Heath S, Poonpiriya V, Gatanaga H, Do H, Diop G, Hirtzig T, Auewarakul P, Lauhakirti D, Charneau P, Marullo S, Therwath A, Oka S, Kanegasaki S, Lathrop M, Matsushima K, Zagury JF, Matsuda F. A haplotype of the human CXCR1 gene protective against rapid diseases progression in HIV-1+ patients. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104;3354-3359, 2007
2. Honda M, Yogi A, Ishizuka N, Genka I, Gatanaga H, Teruya K, Tachikawa N, Kikuchi Y, Oka S. Effectiveness of subcutaneous growth hormone in HIV-1 patients with moderate to severe facial lipoatrophy. Internal Medicine 46;359-362, 2007
3. Yamanaka H, Gatanaga H, Kosalaraksa P, Matsuoka-Aizawa S, Takahashi T, Kimura S, Oka S. Novel mutation of human DNA polymerase gamma associated with mitochondrial toxicity induced by anti-HIV treatment. Journal of Infectious Diseases 195;1419-1425, 2007
4. Fujisaki S, Fujisaki S, Ibe S, Asagi T, Itoh T, Yoshida S, Koike T, Oie M, Konda M, Sadamasu K, Nagashima M, Gatanaga H, Matsuda M, Ueda M, Masakane A, Hata M, Mizogami Y, Mori H, Minami R, Okada K, Watanabe K, Shirasaka T, Oka S, Sugiura W, Kaneda T. Performance and quality assurance of genotypic drug-resistance testing for human immunodeficiency virus type 1 in Japan. Japanese Journal of Infectious Diseases 60;113-117, 2007
5. Gatanaga H, Hayashida T, Tsuchiya K, Yoshino M, Kuwahara T, Tsukada H, Fujimoto K, Sato I, Ueda M, Horiba M, Hamaguchi M, Yamamoto M, Takata N, Kimura A, Koike T, Gejyo F, Matsushita S, Shirasaka T, Kimura S, Oka S. Successful efavirenz dose reduction in HIV type 1-infected individuals with cytochrome P450 2B6 \*6 and \*26. Clinical Infectious Diseases 45;1230-1237, 2007

## 2. 学会発表

1. 湯永博之, 矢崎博久, 田沼順子, 本田美和子, 源河いくみ, 立川夏夫, 菊池 嘉, 岡 慎一, 木村 哲 過去5年間に新規に診断された未治療HIV-1感染者のHIV-1サブタイプと薬剤耐性変異 日本内科学会雑誌 96巻;p171, 2007
2. 渡辺珠代, 安岡 彰, 阿部泰尚, 神村麻穂子, 渡辺恒二, 矢崎博久, 田沼順子, 塚田訓久, 本田美和子, 源河いくみ, 湯永博之, 照屋勝治, 立川夏夫, 菊池 嘉, 岡 慎一 HIV合併ニューモシスチス肺炎における $\beta$ -D-glucan値の臨床的意義に関する検討 感染症学雑誌 81巻;p266, 2007
3. 阿部泰尚, 本田元人, 渡辺珠代, 神村麻穂子, 渡辺恒二, 矢崎博久, 塚田訓久, 本田美和子, 源河いくみ, 湯永博之, 立川夏夫, 照屋勝治, 菊池 嘉, 片野晴隆, 岡 慎一 HIVに合併したMulticentric Castleman Disease (MCD) 3例 感染症学雑誌 81巻;p266, 2007
4. 湯永博之, 田沼順子, 矢崎博久, 本田美和子, 源河いくみ, 照屋勝治, 立川夏夫, 菊池嘉, 白阪琢磨, 木村 哲, 岡 慎一 日本人とザンビア人におけるcytochrome P450 2B6の遺伝子型と抗HIV-1薬efavirenzの血中濃度の比較、およびその減量投与 感染症学雑誌 81巻;p146, 2007
5. Honda H, Tsukada K, Yazaki H, Tanuma J, Honda M, Gatanaga H, Teruya K, Tachikawa N, Kikuchi Y, Oka S. Low incidence of abacavir-associated hypersensitivity reactions in Japanese HIV-1-infected patients. The 4th International AIDS Society Conference, Sydney, Australia. July, 2007.
6. 立川夏夫, 柳沢邦雄, 後藤耕司, 神村麻穂子, 渡辺珠代, 渡辺恒二, 本田元人, 矢崎博久, 田沼順子, 本田美和子, 湯永博之, 照屋勝治, 菊池 嘉, 仲村秀太, 塚田訓久, 岡 慎一 AIDSリンパ腫 (diffuse large B-cell lymphoma) 18例の臨床的特徴の検討 日本エイズ学会誌 9巻;p387, 2007
7. 渡辺珠代, 安岡彰, 後藤耕司, 柳沢邦雄, 仲村秀太, 神村麻穂子, 渡辺恒二, 本田元人, 塚田訓久, 矢崎博久, 田沼順子, 本田美和子, 湯永博之, 照屋勝治, 立川夏夫, 菊池 嘉, 岡 慎一 当院におけるHAART時代のHIV日和見合併症の動向 日本エイズ学会誌 9巻;p391, 2007
8. 神村麻穂子, 後藤耕司, 柳沢邦雄, 仲村秀太, 渡辺珠代, 本田元人, 塚田訓久, 田沼順子, 矢崎博久, 本田美和子, 湯永博之, 照屋勝治, 立川夏夫, 菊池 嘉, 岡 慎一 抗HIV療法naïve患者124例におけるAtazanavirの治療成績 日本エイズ学会誌 9巻;p399, 2007
9. 矢崎博久, 後藤耕司, 仲村秀太, 柳沢邦雄, 神村麻穂子, 渡辺恒二, 渡辺珠代, 本田元人, 田沼順子, 塚田訓久, 本田美和子, 湯永博之, 照屋勝治, 立川夏夫, 菊池 嘉, 岡 慎一 当院での初回療法で使用された抗HIV薬の変遷とFPV投与者の経過について 日本エイズ学会誌 9巻;p400, 2007
10. 林田庸総, 湯永博之, 菊池 嘉, 岡 慎一. Efavirenzの血中濃度に関わるcytochrome P450 2B6の遺伝子多型についての解析 日本エイズ学会誌 9巻;p439, 2007
11. 仲村秀太, 後藤耕司, 柳沢邦雄, 渡辺珠代, 神村麻穂子, 渡辺恒二, 本田元人, 矢崎博久, 田沼順子, 塚田訓久, 本田美和子, 湯永博之, 照屋勝治, 立川夏夫, 菊池 嘉, 岡 慎一 当センターにおける急性HIV感染症96例の臨床検討 日本エイズ学会誌 9巻;p453, 2007
12. 本田美和子, 仲村秀太, 後藤耕司, 柳沢邦雄, 渡辺恒二, 神村麻穂子, 渡辺珠代, 本田元人,

- 塚田訓久、田沼順子、矢崎博久、湯永博之、照屋勝治、立川夏夫、菊池 嘉、岡 慎一 高齢 HIV 感染者に高率に起こった lopinavir/ritonavir との関連を疑う不整脈の検討 日本エイズ学会誌 9巻;p494, 2007
13. 本田元人、後藤耕司、仲村秀太、柳沢邦雄、神村麻穂子、渡辺珠代、塚田訓久、矢崎博久、田沼順子、本田美和子、湯永博之、照屋勝治、立川夏夫、菊池 嘉、岡 慎一、日本人 HIV 患者における abacavir 関連 Hypersensitivity Reactions の発現頻度 日本エイズ学会誌 9巻;p495, 2007
14. 蜂谷敦子、児玉栄一、湯永博之、松岡雅雄、滝口雅文、岡 慎一、核酸系 (NRTI) および非核酸系逆転写酵素阻害剤 (NNRTI) に対する多剤耐性変異 N348I について ~その1/基礎的検討 日本エイズ学会誌 9巻;p508, 2007
15. 蜂谷敦子、児玉栄一、湯永博之、松岡雅雄、滝口雅文、岡 慎一、核酸系 (NRTI) および非核酸系逆転写酵素阻害剤 (NNRTI) に対する多剤耐性変異 N348I について ~その2/臨床解析 日本エイズ学会誌 9巻;p508, 2007
16. 田沼順子、斉藤可奈、後藤耕司、柳沢邦雄、仲村秀太、渡辺恒二、神村麻穂子、渡辺珠代、本田元人、矢崎博久、塚田訓久、本田美和子、湯永博之、照屋勝治、立川夏夫、菊池 嘉、岡 慎一、初回治療として TDF/3TC を含む抗レトロウイルス療法を実施した HBe 抗原陽性 HIV 患者の臨床経過 日本エイズ学会誌 9巻;p538, 2007
17. 塚田訓久、立川夏夫、渡辺珠代、神村麻穂子、渡辺恒二、後藤耕司、斉藤可奈、仲村秀太、柳沢邦雄、本田元人、田沼順子、矢崎博久、本田美和子、湯永博之、照屋勝治、菊池 嘉、岡 慎一、新規抗 HIV 薬の使用経験 日本エイズ学会誌 9巻;p550, 2007
18. 杉浦 互、湯永博之、吉田繁、千葉仁志、小池隆夫、伊藤俊広、原孝、佐藤武幸、石ヶ坪良明、上田敦久、近藤真規子、今井光信、貞升健志、長島真美、福武勝幸、山元泰之、田中理恵、加藤信吾、宮崎菜穂子、岩本愛吉、藤野真之、仲宗根正、巽 正志、椎野禎一郎、岡 慎一、林田庸総、服部純子、浅黄司、伊部史朗、藤崎誠一郎、金田次弘、浜口元洋、上田幹夫、正兼亜季、大家正義、下条文武、田邊嘉也、渡邊香奈子、白阪琢磨、栗原 健、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、松下修三、健山正男、藤田次郎、2003-2006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 9巻;p553, 2007
19. 照屋勝治、田沼順子、仲村秀太、後藤耕司、柳沢邦雄、神村麻穂子、渡辺恒二、渡辺珠代、本田元人、塚田訓久、矢崎博久、本田美和子、湯永博之、立川夏夫、菊池 嘉、岡 慎一、HAART 時代の日和見感染症—残された課題—非定型抗酸菌症 日本エイズ学会誌 9巻;p335, 2007

## 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。





### 研究要旨

## 北海道ブロックにおける薬剤耐性HIVの調査研究

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2内科 教授  
 研究協力者 **千葉仁志、吉田 繁** 北海道大学医学部保健学科検査技術科学専攻

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新規感染者における薬剤耐性HIVの検出率の調査を目的に、新規感染者血液中のHIVの遺伝子解析をおこなった。2007年（1-12月）の北海道大学病院を新規受診したHIV感染者は16名であり、そのうち新規発生者は12名であった。2007年は初診時にAIDSを発症している患者は4名（33%）と、前年（22%）に比べ増加傾向にあった。薬剤耐性変異については1名（8%）にプロテアーゼ領域と逆転写酵素領域に高度耐性変異（proL90M、rtM41L、T69ins、T215NSTY）を有するHIVを検出した。本院では新規感染者から、はじめて高度耐性HIVが検出された。感染拡大の防止のために、新規感染者における薬剤耐性HIVの検出動向を継続的に調査する必要があると思われる。

### A. 研究目的

本邦における薬剤耐性HIV-1の発生動向把握のため、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新規感染者における薬剤耐性HIV-1の遺伝子解析を目的とする。

### B. 研究方法

北海道ブロックにおける2007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

2007年1月～12月に北大病院を新規受診したHIV感染者は16名であり、そのうち新規発生者は12名であった。エイズ動向委員会からの報告では、北海道ブロックでの2007年1月～9月の新規HIV感染者は11名であり、同期間での本院での新規HIV感染者は9名であることから、北海道ブロックで発生する新規感染者の捕捉率は約82%であった。新規感染者12名は男性11名、女性1名であり、年齢は30～39歳が最も多く6名（約55%）、次いで20～29歳3名（約27%）であった。感染経路は同性間9名（75%）、異性間1名（8%）不明2名（17%）であり、受診時の病期はHIV感染8名（67%）、AIDS期4名（33%）であった。紹介先施設は保健所5名（45%）が最も多かった。

これら新規感染者について受診時サンプルを用い薬剤耐性検査により変異の解析をおこなったところ12名中10名（83%）にIAS-USAのdrug resistant panelで報告されている薬剤耐性変異が認められた（図1）。そのうちプロテアーゼ阻害剤のメジャー変異または逆転写酵素阻害剤の感受性低下に関わる変異を有するHIVは1名（8%）に検出された。変異はプロテアーゼ領域L90M、逆転写酵素領域M41L、T69ins、



T215NSTYであり高度耐性変異であった。SubtypeはBが11名(92%)、AEが1名(8%)であった。

#### D. 考察

2006年に北大病院を受診した新規感染者数は前年比で約2倍と急増したが、2007年はやや低下または平行状態であった。北海道ブロックは感染者数、新規感染者数は少ないものの、毎年10-20名の新規感染者があり、年々、確実に増加している。北海道のHIV検査受診率は全国的に低く、近年の傾向として保健所や血液センターからの紹介が増加している。また、初診時にAIDS発症している患者が増加している傾向にある(2006年22%、2007年33%)ことから、潜在的には多くの感染者が存在することが予想される。2007年12月よりHIV検査・相談所が札幌市の中心街に開設された。本施設により、HIV抗体検査受診率と新たな感染者の検出率増加の可能性があり、より実情を反映することが期待される。

今まで、本院において検出されてきた薬剤耐性HIVは、マイナー変異や低度耐性変異を有するHIVであった。しかしながら、2007年はプロテアーゼ阻害剤、逆転写酵素阻害剤の双方に対する高度耐性変異を有するHIVが検出された。明らかな高度耐性HIVの検出は初めてである。また、同患者からは逆転写酵素215番のrevertantと思われる変異を検出した。複数ウイルスの存在が示唆されるため、これが本当にrevertantか否かを判断するためには、さらに詳細な解析が必要である。Revertantは過去にAZTやd4Tを使用していた感染者からの耐性HIVの感染を意味するものと考えられており、首都圏では以前より新規感染者からのrevertant検出が報告されていたが、本院では、検出されていない。もし、本ウイル

スが本当にrevertantであれば、はじめて検出されたことになる。

1) 2006年から新規感染者が増加したこと、2) 初診時のAIDS患者が増加していること、3) はじめて高度耐性HIVが検出されたことを考慮すると、北海道にも潜在的に多くの感染者や、感染に気付かない感染者が多く存在していると思われる。従って、HIV抗体検査の受診率を向上させるとともに、新規感染者におけるHIV薬剤耐性検査の普及と継続的な調査が、感染拡大防止に大いに貢献するものと考えられる。

#### E. 結論

- 1) 2007年度に北大病院を受診した新規感染者数は若干減少した。
- 2) プロテアーゼ、逆転写酵素領域に高度耐性変異を有するHIVが初めて検出された。
- 3) 逆転写酵素領域215番revertantを疑わせるHIVが初めて検出された。

#### 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

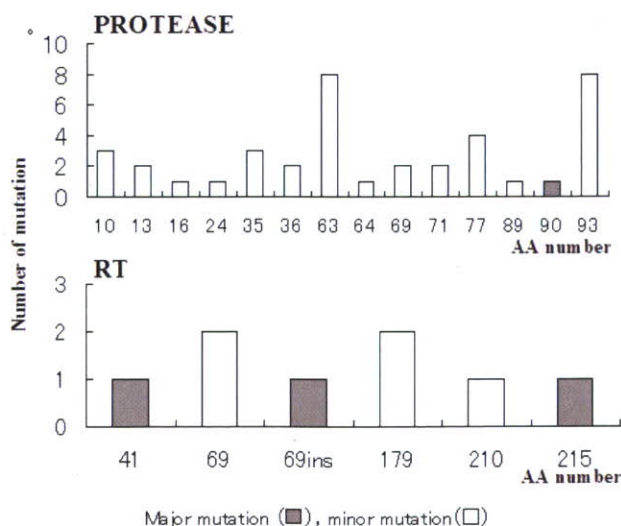


図1 2007年新規HIV感染者から検出された薬剤耐性変異





## 研究要旨

# 本邦感染者由来薬剤耐性ウイルス感染性分子クローン パネル整備

薬剤耐性ウイルス由来感染性クローンによるHIV薬剤耐性検査の標準化

分担研究者 巽 正志 国立感染症研究所 エイズ研究センター

HIV薬剤耐性試験 (Genotyping) の標準化に資するため、MAGIC-5A細胞とLong PCRを用いた「HIV Trapping System」による感染性分子クローン樹立法を国内外感染者由来の様々なsubtype/CRF薬剤耐性ウイルスおよびNaïveウイルスに適用し、現在まで総計39名の患者由来の46個のウイルス検体から1986個のFull-genome cloneを樹立した。50%以上の高効率で1087個が感染性を示し、そのうち選別した164クローンの全ゲノム配列を決定した。subtype Bは6名の患者から計14クローン、CRF01\_AE組換体は2名の患者より継時的に分離したウイルスから計93クローン及びsubtype Fは2名の患者から計4クローン、総計10名の患者由来ウイルスから総計111クローンを樹立した。これらのクローンの薬剤耐性プロファイルは多様であり、感染性分子クローンを用いた薬剤耐性試験法の標準化へ向けての基盤が整備された。

## A. 研究目的

HIV薬剤耐性試験 (Genotyping) が保険対象になり、今後各検査機関での測定が行なわれる。Genotypingによる薬剤耐性試験法が感染者の治療において有用となるためには、試験法そのものの標準化の確立が必須である。分担研究者はこれまでHIV-1ウイルス感染性分子クローン樹立法としてHIV感染価測定細胞株MAGIC-5AとLong PCRを用いた「HIV-1 Trapping System」を開発し、世界に先駆けてClade C, A, GおよびAG組換体などの感染性分子クローンの樹立を報告し、また樹立の効率を高めるべく改良に努めてきた。本研究では実際に臨床応用の段階に入ったGenotyping薬剤耐性試験法を標準化すべく、先に述べた「HIV-1 Trapping System」を用いて国内外患者由来の多様なプロファイルを有した薬剤耐性ウイルス及び未治療ウイルスの感染性分子クローンを樹立し、もって全国的な薬剤耐性試験法の効率的な標準化に資する分子基盤を整備することを目的とした。

## B. 研究方法

HIV-1ウイルスのクローニングおよびLong PCRと

全長ゲノムPlasmid構築は先に報告したHIV感染価測定系Indicator細胞MAGIC-5/HeLa4.5 nEGFP細胞株を用いたHIVウイルスクローニングと感染性クローンの構築系 (HIV Trapping System ; HIV捕捉実験系) により行った。対象としたウイルスは、国立感染症研究所エイズ研究センター第2グループにより分離されたsubtype B (7株)、CRF01\_AE組換体ウイルス (8株) 及びsubtype F (2株) の計17株の薬剤耐性ウイルスと、1名の未治療感染者から分離したCRF01\_AE組換体ウイルスである。またCRF01\_AE組換体ウイルスのプロトタイプとして米国NIH AIDS Reagents Programmeから1993年にタイ国で分離された6株のウイルスも含めた。さらに本邦で流行するsubtype Bのプロトタイプクローンを樹立する目的で、7名の未治療感染者から分離したウイルスも含めた。

まず末梢血リンパ球の共培養で分離したウイルスを直接感染させたMAGIC-5A細胞からゲノムDNAを抽出し、それを鋳型としてLong PCRを行い5'-および3'-側のプロウイルスゲノムを増幅、それらを連結することによって完全長のDNAクローンを得た。完全長DNAクローン作製戦略は患者ウイルスのRT-



PCR法によって得られていたPol からVpuまでの領域におけるRare cutterの制限酵素を選定し、その塩基配列を含むPrimerでHIV-1 genome pol下流領域を増幅しpMT1に組み込み、しかる後に上流領域を増幅した断片を酵素処理後組み込むHalf & Half戦略を用いて全長クローンを得た。得られたクローンはHeLa4.5nEGFP細胞と293FT細胞の混合培養にTransfectionし、その2日後の培養上澄をMAGIC-5A細胞にかけ感染性を確認した。感染性が確認されたクローンはTransposonを用いたGPS-1Genome Priming System (NEB) で全長ゲノムの配列を決定した。

本研究では、血液などヒト臨床材料が使用される場合には、材料提供者の個人情報が出漏らないよう厳格なプライバシー保護に努めた。このためヒト材料を用いた研究は連結不可能匿名化 (unlinked anonymous) の手法を行って個人情報の漏洩を防ぎ、患者の非特定性を保った。また、研究方法および研究により生じうる研究対象者に対する不利益、危険性の排除について十分な説明を加え、守秘義務を守った。以上を遵守することで倫理面の問題は無いと判断した。

### C. 研究結果

これまで当研究室で4年間に樹立した感染性分子クローンの成績の一覧を表1に示す。クローン樹立戦略は次の如く行った。分離ウイルス感染MAGIC-5A細胞ゲノムを鋳型にHIV genome下流半分を6塩基認識制限酵素認識配列を含むPolからVpuまでの領域に設定したForward Primerと3' LTR poly A signal下流領域にNot I siteを附加したReverse Primerで約5.0KbpのAmpliconを増幅し電気泳動後精製し制限酵素処理後該当酵素で切断されないことを確認後HIV-1 Cloning Vector pMT1へ組み込み、LacZ発現選択により組み込み陽性クローンを5クローン選別した。同じPrimer領域のComplementaryなReverse Primerと各subtype consensus 5' LTR領域上流にSal IもしくはMlu I siteを附加したForward PrimerでHIV genome左半分を増幅後精製し該当酵素にて処理後精製し、酵素処理した先の右半分を組み込んだクローンに組み込み全長クローンを得た。得られたクローンはHeLa4.5nEGFP細胞と293FT細胞の混合培養にTransfectionしそのTat活性とSyncytium形成を確認後、その2日後の培養上澄をMAGIC-5A細胞にかけ感染性を確認した。感染性を示す割合はウイルス毎に異なるが 平均して全長クローン総数1986個のう

表1 治療及び未治療患者由来ウイルスからの感染性分子クローン一覧表

Subtype/CRF	Patient code	Virus code	Number of full-length clones	MAGIC-5A positive clones		Number of sequenced clones	
				Number	(%)		
Subtype B	NH0801-076	DR1348	36	14	38.9	2	
		DR2510	47	25	53.2	2	
	NH0006-247	DR2508	47	45	95.7	2	
	NH0006-236	DR3884	59	57	96.6	2	
	NH0010-0002	DR5913	48	40	83.3	2	
	NH2013-0001	DR6174	63	29	46.0	2	
	NH0005-0673	DR6175	52	20	38.5	2	
	DR6073	DR6073	18	8	44.4	2	
	DR6075	DR6075	50	23	46.0	2	
	DR6089	DR6089	48	4	8.3	2	
	NH2047-1519600	DR6538	41	9	22.0	1	
	NH2047-1707600	DR6737	92	54	58.7	2	
	NH0020-520	DR7060	62	31	50.0	2	
	NH0305-038	DR7065	47	7	14.9	2	
Subtype A	UG037	92UG037	10	5	50.0	2	
	RW008	92RW008	16	2	12.5	2	
	RW025	92RW025	47	32	68.1	2	
	RW037	93RW037	46	13	28.3	2	
Subtype C	NH305-004	DR5782	39	30	76.9	2	
Subtype G	NJ-03-175	03GH175	31	30	96.8	3	
CRF01_AE	NH2000-0001	DR1741	26	17	65.4	12	
		DR2594	87	32	36.8	10	
		DR1873	62	57	91.9	12	
		DR3730	68	52	76.5	12	
	NH19-203	DR0492	70	36	51.4	12	
		DR1236	145	42	29.0	11	
		DR2192	83	29	34.9	14	
		DR5032	18	10	55.6	10	
		NH2047-1708444	DR6824	10	5	50.0	2
		TH051	93TH051	24	3	12.5	1
	TH054	93TH054	24	1	4.2	1	
	TH057	93TH057	24	5	20.8	2	
	TH060	93TH060	24	7	29.2	1	
	TH062	93TH062	61	37	60.7	1	
TH065	93TH065	37	13	35.1	1		
CRF02_AG	NJ-03-182	03GH182	36	36	100.0	2	
	NJ-03-184	03GH184	24	24	100.0	2	
	NJ-03-197	03GH197	23	23	100.0	2	
	NJ-03-181	03GH181	51	41	80.4	2	
	NJ-03-189	03GH189	27	22	81.5	2	
	NJ-03-195	03GH195	24	24	100.0	2	
CRF02_AG/CRF06_cpx	NJ-03-173	03GH173	33	27	81.8	2	
CRF02_AG/G	NJ-03-179	03GH179	40	19	47.5	2	
Subtype F	NH801-0127	DR6082	6	4	66.7	2	
	NH801-0128	DR6190	28	25	89.3	2	
CRF12_BF	NH0801-0077	DR0769	32	18	56.3	2	
Total	39	46	1986	1087	54.7	164	

薬剤耐性ウイルス  
未治療タイプウイルス



ち1087個54.7%のクローンがMAGIC-5A細胞で感染性を示した。この感染性分子クローンの取得率は実用的な高さであった。得られた感染性分子クローンのうち2名の長期治療患者から分離した薬剤耐性ウイルスについては各分離ウイルスについて計46個、他の治療患者由来耐性ウイルスからは各2クローン、及び未治療naiveウイルスについては各1から2クローン総計151個を選定し、全ウイルスゲノムの塩基配列を決定した。全てのウイルスゲノム塩基配列は全長に互って該当subtypeもしくはCRF組換体の特性を示していた。部分塩基配列からsubtype Bとsubtype Fの組換体であることが予測されたDR0769ウイルスはBootstrap解析からCFR12\_BF組換体であることが判明した。また今後国内へ様々なsubtype/CRF組換体ウイルスが侵入することが予想されるためsubtype Fの国内感染2例とガーナ国感染例も含めて感染性分子クローンを作成した。

これら樹立した感染性分子クローン由来ウイルスの血清由来ウイルスRNAゲノムのRT及びPT領域の薬剤耐性プロファイル及びデータベース登録済みのクローンはAccession番号を表2に示した。

患者NH2000-0001由来CRF01\_AE組換体ウイルス(DR1741, DR2594, DR1873, DR3730)の直接塩基配列によればPR領域にはL10F, K20T, N88Sの耐性変

異が検出されたが、部分塩基配列を決定した殆どの感染性分子クローンで同様な耐性変異が認められた。このことからPCR Amplificationによる塩基変異は低いものと考えられた。次にRT領域には直接塩基配列ではM41L, 挿入変異67STST68, T69T/A, L74V, V106L, Y188L, L210L/W, T215Yなどの多様な耐性変異が検出されていた。各感染時期に分離したウイルスから樹立した感染性分子クローンのRT領域には各時期のウイルスからRT-PCRにより直接塩基配列と同様な耐性変異が認められたが、感染時期を経るに従って耐性変異が蓄積される傾向が認められた。gag, pol領域とenv領域についてウイルスの個体内進化を辿る目的で、分離した44感染性分子クローンの系統樹を作成したところ、各感染時期のウイルスはクラスター群を形成しつつ進化していることが示された。

Subtype B及びsubtype F由来多剤耐性ウイルスの各クローンも血清由来ウイルスゲノムプロファイルを反映していたが各個の薬剤耐性変異の組合せはクローン毎に大きく異なるウイルスもあれば、殆どのクローンが同じプロファイルを示すウイルスもあり、ウイルス試料毎に大きく異なっていた。

表2 治療及び未治療患者由来ウイルスからの感染性分子クローン一覧表

HIV Database Accession No.	DR No.	Risk factor	Subtype	耐性変異(PR)	耐性変異(RT)	多剤耐性
AB253635 - AB253646	1741	Heterosexual	AE	L10F, L33L, E35D, N36L, E39A, P71AT, N88S, L90V	M41L, D67S, T69ns, L74V, V118L, L210W, T215Y	有U
AB253647 - AB253658	1873	Heterosexual	AE	L10F, K20T, E35D, N36L, E39A, P71T, N88S, L90V	M41L, D67S, T69ns, L74V, V118L, L210W, T215Y	有U
AB253659 - AB253669	2594	Heterosexual	AE	L10F, K20T, E35D, N36L, E39A, P71T, N88S, L90V	M41L, D67S, T69ns, L74V, V118L, L210W, T215Y	有U
AB253670 - AB253681	492	Heterosexual	AE	L10I, K20I, E35D, N36L, E4V, L63P, V82F, L90M	D67R, T69D, K70R	有U
AB253682 - AB253702	1236	Heterosexual	AE	L10I, K20I, E35D, N36L, E4V, L63P, V82F, L90M	D67R, T69D, K70R	有U
AB253703 - AB253716	2192	Heterosexual	AE	L10I, K20I, E35D, N36L, E4V, L63P, V82F, L90M	D67R, T69D, K70R, V108Y, I181C, L210W, T215F, K219W	有U
AB253669 - AB253680	3730	Heterosexual	AE	L10I, K20I, E35D, N36L, E4V, L63P, V82F, L90M	D67R, T69D, K70R, V108Y, I181C, L210W, T215F, K219W	有U
AB253717 - AB253725	5032	Heterosexual	AE	L10I, K20I, E35D, N36L, E4V, L63P, V82F, L90M	D67R, T69D, K70R, K88R, A88G, K101N, V108I, Y181C, M184V, C100A	有U
AB253426, AB253427	6824	Heterosexual	AE	なし	なし	未治療
AB297369, AB297370	1348	Homosexual	B	L10I, S0N/D, S4I/V, S2V, S3P, 71T/A, 77I, S2A/V, R89V/D, R90A/L, 44D, 67N, 101E/V, 108/V, 184V, 210W, 215Y	なし	有U
AB296987, AB296988	2508	Homosexual	B	L10I, S0R, 28I, 41K, 46I, S3L, S3P, 71V, 74S, S2T, R85, S0M	41L, 67N, 70R, 79N, 101Q, 215F, 219Q	有U
AB297371, AB297372	2510	Homosexual	B	L10I, S3/V, S0R/D, S5E/D, 46R/A, 48W/C, S4V, S2V, S3P, 71T/A, 44D, 67N, 101E, 210W, 215*/5/Y	なし	有U
AB296989, AB296990	3684	Homosexual	B	L10V/L, S0N, 41E/R, 46I, S4L, S3P, 71V, S4V, R8D, S0M	67N, 70R, 215F, 219Q	有U
pJPD8174857	6174	Heterosexual	B	D30N, I54V, N88D, L90M, L10V, A71V	M41L, E44A, D67N, V118L, L210W, T215Y	有U
pJPD8175830	6175	Homosexual	B	V32I, M46L, S4I/V, V82R, L90M, L10V, K43K, F53F, A71V	M41L, E44D, D67N, V118L, M184V, L210W, T215Y	有U
pJPD8175854	6175	Homosexual	B	V32I, M46L, S4I/V, V82R, L90M, L10V, K43K, F53F, A71V	M41L, E44D, D67N, V118L, M184V, L210W, T215Y	有U
pJPD8175859	5913	Homosexual	B	A71T	なし	未治療
AB221005	6073	Homosexual	B	なし	なし	未治療
AB221125, AB221126	6075	Homosexual	B	A71T	なし	未治療
AB286955, AB286956	6089	Homosexual	B	なし	なし	未治療
AB287363	6538	Heterosexual	B	なし	なし	未治療
AB287364, AB287365	6737	Homosexual	B	なし	なし	未治療
AB287366, AB287367	7060	Homosexual	B	A71T	なし	未治療
AB287368, AB287369	7065	Homosexual	B	なし	なし	未治療
pD4_JPD8190218	6082	Heterosexual	F	K20T, D30R, N36L, M88Q, L63P, A71V, N88D	M41L, E44E/D, D67N, T69A/D, K101E, V118L, L210W, T215Y	有U
pD4_JPD8190219	6190	Heterosexual	F	L10I, K20T, M3G, M46L, F53L, E3L, TPA71V, S4V, L90M	M41L, E44D, D67N, V118L, L210W, T215Y	有U
AB253430, AB253431	769	?	BF	L10V	K238S	?
AB286849, AB286850	5782	Heterosexual	Mosaic C	なし	なし	未治療



## D. 考察

当研究室で開発した Half & Half Strategy による「HIV trapping System」のさらなる効率化が実現し、国内外感染者から分離した薬剤耐性あるいは naïve な CRF01\_AE 組換え体、subtype B ウイルス及び様々なウイルス検体から 1087 クローンに及ぶ感染性分子クローンが樹立された。これらのクローンのうち選定した 164 クローンの全長塩基配列の解析から、今までの患者ウイルスのバルクでの直接解析では見えなかった塩基配列の異なるパターンの組合せの薬剤耐性ウイルスが存在することが判明した。この成績は、これら全ゲノムの感染性分子クローンの高効率樹立法が、患者ウイルスの多様性の解明に実用的で有力な解析手段を提供し、今まで成しえなかった側面から薬剤耐性獲得機序の解明に有用であることが十分に期待できることを示している。邦人未治療感染者から分離した Naïve ウイルスと 1993 年度にタイにて分離されたウイルスより、我が国で感染者が多い subtype B と CRF01\_AE 組換え体の感染性分子クローンを多数個樹立し、その内 *in vitro* での増殖効率に優れているクローンを選別し、全ゲノム塩基配列を決定した。これらのクローンは今後、邦人治療感染者の耐性ウイルスの効率的な Recombinant Virus Assay 系の構築のために有用であることが期待される。

本研究班において薬剤耐性試験法の標準化に向けて、最も重要な薬剤耐性ウイルス標準品として感染性分子クローンが患者血漿中の生ウイルスと比較して優位な点は幾つか想定できる。まず患者検体の血漿中には多様なウイルスゲノムが混在し、RT, PR の狭い領域の塩基配列解析に限っても増幅に用いる Primer Set によって限られた薬剤耐性ウイルスゲノムからのみ Amplicon が生成する可能性があること。また解析条件によっては混合塩基の解釈に用いる Algorithm により解釈に乖離が生じる可能性があること。また患者検体である事から原理的に容量に限りがあるため国内各解析機関への安定的な供給に限度がある事など、多くの問題点が挙げられる。これらの問題は Pol 領域を含めた全ゲノム塩基配列が判明している感染性分子クローンを用いる事により解決する。ただ樹立してきた感染性分子クローンのうちでも、あるクローンは、実際の患者から分離した Fitness の低いウイルスと同様 *in vitro* での増殖能が低い性状を示していることから、標準化に用いるクローン選定には実際の薬剤耐性試験を反映した耐性プロファイルのみならず、クローンの増殖性などを考慮に入れなければならないものと考えられる。また 2007 年に設定された感染症新法に基づき、感染性生物材料の運搬に関する規制から、各検査機関への配

布に此迄以上の制約がかかる事から、増幅した標準ウイルス液の不活化とウイルスゲノム RNA の安定性に関する解析も必要となるものと考えられる。

当研究室が過去 4 年間にわたり樹立してきた国内感染者由来ウイルスの多数の感染性分子クローンは薬剤耐性試験法の標準化に貴重な分子基盤を提供し得るものと期待される。

## E. 結論

感染性分子クローン樹立法をより効率的に進化させ、国内外感染者由来ウイルスから様々な薬剤耐性プロファイルをもつ多数の感染性分子クローンを樹立した。これらの感染性分子クローンの樹立により薬剤耐性試験の標準化の基盤が整備された。

## F. 健康危険情報

該当する事項はない。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

該当する事項はない。

### 2. 学会発表

該当する事項はない。

## H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

該当なし。



### 研究要旨

## 多剤耐性HIVの調査研究

分担研究者 **藤井 毅** 東京大学医科学研究所 先端医療センター・感染症分野 講師  
 研究協力者 **宮崎 菜穂子** 国立感染症研究所 エイズ研究センター リサーチレジデント

日本国内における多剤耐性HIV感染症の現状を明らかにするため、計25の医療機関に対して、既存の抗HIV薬による治療ではウイルスコントロールが不良なHIV感染者を対象としたアンケート調査を実施した。本研究によって国内の研究者間のネットワークを作り、質の高い検査の実施や新薬の臨床治験導入などを含む治療支援体制を実現させることが期待される。

### A. 研究目的

治療中のHIV感染者における薬剤耐性変異と背景因子を調査し、わが国における多剤耐性HIV感染症の現状を明らかにすることによって、今後の治療選択に役立つ。さらに、研究者間のネットワークを作り相互交流を活性化することによって、質の高い検査の実施や新薬の臨床治験導入などを含む治療支援体制を実現させることを目的とする。

### B. 研究方法

日本国内において承認されている抗HIV薬（2007年9月時点）による治療ではウイルスコントロールが不良であるHIV感染者を対象としたアンケート調査を、計25の医療機関に対して実施した。調査時点の情報（基礎情報）として、①性別、②生年月日（年月まで可）、③施設患者ID（匿名コード）、④陽転確認年月、⑤推定感染年月、⑥推定感染経路、⑦推定感染場所、⑧国籍、⑨初回治療（ART）開始年月、⑩ART開始前のCD4陽性細胞数、⑪ART開始前のHIVウイルス量、⑫ART開始前のHIV関連疾患（合併症）の有無、⑬調査時点の治療状況、⑭調査時点（直近）におけるHBV感染の有無（HBs抗原）、⑮調査時点（直近）におけるHCV感染の有無（RNA、抗体検査）、⑯治療中断経験の有無、⑰梅毒

既往の有無、の17項目を、経時情報として、1)治療開始時期、2)耐性検査実施時期、3)ART変更・中止・再開時期の各ポイントの、①調査年月日、②耐性検査実施機関、③薬剤耐性変異、④CD4陽性細胞数、⑤HIV RNA量、⑥ARTメニュー、⑦HIV関連疾患処方薬、⑧他疾患における継続的処方薬、⑨アドヒアランス状況、⑩自覚的副作用の有無・程度、の10項目の記載を依頼した。さらに、核酸配列を全て記載したデータ（FASTA file）の電子媒体での提出も合わせて依頼した。

本研究を施行するにあたっては、匿名コードによる施設患者IDを用い、生年月日は年月まで可とするなど特定の個人が同定されないよう十分に配慮した。個人情報保護法、臨床研究に関する倫理指針の原則ならびに疫学研究に関する倫理指針を遵守しており、倫理面における問題はないと判断した。研究成果の公表等にあたっては、個人と研究結果との関連性に結びつかないよう、プライバシーの保護には十分に配慮する。なお、効率的・効果的に調査を進めるために、各研究機関長の判断により本体研究の実施施設である国立感染症研究所の倫理委員会の審査を持って代えることが出来るものとする。

### C. 研究結果

本アンケート調査を実施する前段階として、調査対象の25施設に対する一次（予備）調査を実施した。調査内容は、日本で認可されている薬剤ではコントロール不良である HIV 感染者数および薬剤耐性検査の実施状況に関する問い合わせである。現在までに22施設から回答があり、計45名の患者が既承認薬ではコントロール不良であり、国内未承認薬（T-20, MK0518, TMC125 など）を投与中あるいは投与検討中という結果が得られた。薬剤耐性検査に関しては、ほとんどの施設で保険制度を利用した検査をおこなっていたが、一部の施設では国立感染研究所への検査依頼や自施設内での検査を実施していることが判明した。

### D. 考察

これまでに実施した予備調査の結果から、既承認薬ではコントロール不良な HIV 感染者が国内全体では少なくとも45症例は存在していることが明らかとなった。今後多剤耐性症例のリアルタイムでの把握が国レベルで必要と考えられる。また、治療薬研究班からの海外承認薬入手や今後増加するであろう未承認薬の拡大アクセス、思いやり使用等により、多剤耐性患者がどのような治療を受けているかを把握することも重要な課題である。さらに、現時点でのわが国の HIV 治療の問題点のひとつは、開発中の薬の新規治験がないことであると考えられるが、医療機関毎では1例～6例と少数であるため、米国等と異なって一施設が新薬の治験を受託し、実施することは事実上困難である。本研究によって、日本国内で HIV 診療に携わっている医療機関の相互交流によって既存治療薬での治療困難例を把握するとともに、多施設共同によって後期臨床開発薬の使用・治療状況や製薬メーカーとの新薬開発試験を視野に入れる可能性があると考えられる。

### E. 結論

本研究によって、薬剤耐性 HIV 感染者の生命予後を改善することが期待される。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

1. Wichukchinda N, Kitamura Y, Rojanawiwat A, Nakayama EE, Song H, Pathipvanich P, Auwanit W, Sawanpanyalert P, Iwamoto A, Shioda T, Ariyoshi K. The polymorphisms in DC-SIGNR affect susceptibility to HIV type 1 infection. *AIDS Res Hum*

*Retroviruses*. 23: 686-92, 2007

2. Maeda T, Fujii T, Oyaizu N, Endo T, Odawara T, Iwamoto A, Nakamura T. *Pneumocystis jiroveci* pneumonia in an AIDS patient: Unusual manifestation as multiple nodules with expansive multiloculated cavities. *Eur J Radiol extra*, 61, 49-52, 2007.
3. Liu H, Nakayama EE, Theodorou I, Nagai Y, Likanonsakul S, Wasi C, Debre P, Iwamoto A, Shioda T. Polymorphisms in CCR5 chemokine receptor gene in Japan. *Int J Immunogenet*. 34: 325-35, 2007.
4. Fujii T, Nakamura T, Iwamoto A. *Pneumocystis pneumonia* in patients with HIV infection: clinical manifestations, laboratory findings, and radiological features. *J Infect Chemother*. 13: 1-7, 2007.

### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし





## 近畿ブロックにおける薬剤耐性HIVの調査研究

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 渡邊 大<sup>1</sup>、上平 朝子<sup>1</sup>、山本 信夫<sup>2</sup>、新田 幸一<sup>2</sup>、管尾 龍彦<sup>2</sup>、  
佐子 肇<sup>2</sup>、常松 裕子<sup>2</sup>、溝上 泰司<sup>2</sup>、松永 加奈江<sup>2</sup>、真能 正幸<sup>2</sup>、  
古金 秀樹<sup>3</sup>、吉野 宗宏<sup>4</sup>

<sup>1</sup>大阪医療センター・免疫感染症科、<sup>2</sup>大阪医療センター・臨床検査科、

<sup>3</sup>大阪医療センター・HIV/AIDS 先端医療開発センター、

<sup>4</sup>大阪医療センター・薬剤科

薬剤耐性HIV変異株の出現はHIV感染症の臨床上重要な課題となっており、近畿ブロックでの薬剤耐性検査の実施とその結果を臨床に反映するシステム構築が必要とされる。今年度は新規HIV感染者における薬剤耐性変異の有無の頻度について調査した。平成19年に当院を受診した初診患者のうち62名が対象となった。サンプリングポイントは保険適応となる治療開始時の36名(58%)が最も多かった。逆転写領域の薬剤耐性変異は3つのアミノ酸にのべ8カ所導入されているのみであった。プロテアーゼ領域は18のアミノ酸に変異がみられ、最も多かった193は28人(45%)に変異を認めた。逆転写酵素領域のmajor mutationであるM184VはB型肝炎に対して3TCが投与されている症例に認めた。抗HIV薬の使用の増加による変異株の出現に加え、B型肝炎治療薬の使用による変異株の出現にも注意が必要であると考えられた。

### 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変異株の出現は臨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ような薬剤耐性検査システムを構築することである。今年度は当院での新規HIV感染者における薬剤耐性変異の頻度を調査し、その傾向について考察した。

### B. 研究方法

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を抽出した。その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プロテアーゼ領域を増幅

し、増幅されたDNAをDirect sequencing法にて決定した。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た。平成19年度に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)で薬剤耐性検査を実施した症例のうち、平成19年度に始めて感染が確認されたものを対象とし、カルテから情報を収集し検討を行った。いずれも個人情報の取り扱いについては厳重に行った。

### C. 研究結果

平成19年国立大阪医療センター初診患者のうち、平成19年度に初めて感染が確認され、未治療のまま薬剤耐性検査が実施された62名が対象となった。全例とも男性で、年齢分布は最低20歳、最高63歳で、中央値は38歳であった。国籍は大多数が日本(57人・92%)で、ザンビア・インド・トルコ・ナイジェリア・不明がそれぞれ1名ずつであった。感染経路は同性間が43名(69%)、異性間が8名(13%)で残りは不明であった。推定感染場所は国内30人(48%)、不明27人(44%)のほか、ザンビア・インド・トルコ・ナイジェリア・マレーシアが1名ずつ



で、日本人がマレーシアで感染したと推定された1名を除けば、全例が自国籍の国での感染と推定された。サンプリングポイントは保険適応となる治療開始時が36名(58%)と最も多かった。プロテアーゼおよび逆転写酵素の領域で行ったサブタイプ解析では大多数がB(58人・94%)で、AEが1名、Cが3名であった。AEの1名はマレーシアでの感染と推定された日本人の症例であり、Cの3名はザンビア・インド・ナイジェリア人の症例であった。逆転写酵素領域の薬剤耐性変異は比較的少数で、V179の変異が6名(10%)で、V108が1名、M184が1名であった。M184Vの変異は、HIV感染症の診断前にB型慢性肝炎に対して3TCが投与されていた症例に認められた。プロテアーゼ領域のminorな変異は18カ所(L10・I13・G16・L33・E34・E35・M36・K43・D60・I62・L63・I64・H69・A71・T74・V77・V82I・I93)に認め、I93(28人・45%)やL63(20人・32%)、V77(20人・32%)、I62(19人・31%)などの変異を高率に認めた。一方、majorな変異はM46LとM46Iを2症例に認めるのみであった。

#### D. 考察

平成19年にHIV感染症が明らかになった62名について薬剤耐性遺伝子の検索を行った。半数以上の症例が治療開始時にサンプリングされていた。薬剤耐性検査が平成18年4月1日から保険適応となり、その影響をうけて治療開始前のサンプリング数が多かったと思われる。逆転写酵素領域からは2名、major mutationを検出した。一例はV108V/Iであり、NNRTIに対する耐性を示していた。もう一例はM184Vで、この症例はHIV感染症の診断以前にB型慢性肝炎に対して3TC(ゼフィックス)が投与されていたため、3TC単剤投与が薬剤耐性の原因と考えられた。最近B型慢性肝疾患薬であるentecavir(バラクルード)もM184Vの耐性変異を引き起こすことが明らかとなった。B型肝炎のガイドラインでHIVの重複感染の有無の確認が必要であることを記載しているものは少ないのが現状である。HIVの薬剤耐性を引き起こさないためには、ガイドラインの記載もふくめ、消化器内科医にも肝炎の治療でHIVに変異が導入されることを広めていく必要がある。一方、プロテアーゼ領域にも2症例にIndinavir/ritonavirに関するmajor mutationが同定された。今回の薬剤耐性は6%(62名中4名)であったが、抗HIV薬やB型肝炎薬の使用の増加に伴い、新規感染者における薬剤耐性の頻度は上昇する可能性が危惧され、引き続き調査を行うことが必要と考えられた。

#### E. 結論

新規患者におけるHIVの薬剤耐性遺伝子の検索を62名に対して行った。4名にmajor mutationを認め、1名はB型慢性肝炎の治療に関係するものと考えられた。

#### 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。



## 北陸ブロックにおける薬剤耐性HIVの調査研究

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 エイズ予防財団

### 研究要旨

北陸地区における新規感染者の薬剤耐性HIV-1伝播の現状を把握するために、平成19年に新規に診断された6名のHIV感染者に対して薬剤耐性検査を行った。その結果、プロテアーゼ領域ではmajor mutationは認めず、逆転写酵素領域でもIAS-USAで定義されている変異は認めなかった。しかし、プロテアーゼ領域のminor mutationは6名全員で検出され、逆転写酵素領域ではV179EやT215Dなどの変異が検出された。HIV感染者の増加に伴い、耐性HIVの伝播が危惧される。

### 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、北陸地区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し、薬剤耐性HIVの発生動向を把握する。同時にサブタイプ解析を行い、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。これらの結果を全国や他の地区の成績と合わせて検討することで、その伝播状況を推察することを目的とする。

### B. 研究方法

「薬剤耐性HIV-1サーベイランスプロトコル」に従い、新規にHIV感染が診断された患者に対し、初診時または服薬開始前の検体について耐性検査を行った。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・増幅し、PCR産物を用いてダイレクトシーケンス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した。耐性変異箇所はIAS-USAとShafer's criteriaに従った。

またenv領域についても同様に遺伝子配列を決定し、プロテアーゼ・逆転写酵素領域とenv領域についてサブタイプ解析を行った。

### (倫理面への配慮)

患者には担当医から文書で研究の説明を行い、同意書に署名を得た後、検査を行った。また、サンプルの患者情報は記号化し、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

北陸地区の平成19年1月から9月末までのHIV感染者・AIDS患者の新規報告数は12名で（エイズ動向委員会報告）、全国と同様に増加傾向にある。平成19年に耐性検査を行った症例は6例で、データからは感染初期とは認められなかった。全て男性で、感染経路は同性間性的接触が4名（両性間を含む）、異性間性的接触が2名であった。

初診時のCD4陽性細胞実数の中央値は206/ $\mu$ l（424～24/ $\mu$ l）、ウイルス量は $7.8 \times 10^4$  copies/ml（ $>1.0 \times 10^5 \sim 4.0 \times 10^4$  copies/ml）で、初診時にAIDSを発症していた症例はいなかった。耐性検査の結果、プロテアーゼ領域では6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。逆転写酵素領域ではV179Eが1名に、T215L、Dがそれぞれ1名に確認された。これらの変異はIAS-USAでは耐性変異とはなっていないが、ス

タンフォード大学のデータベースではV179Eは非核酸系逆転写酵素阻害剤にpotential low-level resistanceとなり、T215DはT215YFの移行変異とされ、T215DがあるときT215YFも同時に感染している可能性があるとして、AZT、d4Tにlow level、ABC、ddI、TDFにpotential low levelの耐性となっている。

サブタイプ解析では、6名全員がサブタイプBであった。

#### D. 考察

北陸ブロックのHIV/AIDS新規感染者数は全国と同様に増加傾向にある。平成19年新規にエントリーしたのは6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、北陸地区での薬剤耐性HIVの検出頻度は0%であった。ただし、V179E、T215Dやプロテアーゼ領域のminor mutationは検出されているため、今後耐性HIVの出現が危惧される。

#### E. 結論

- 1)平成19年度新規にHIV感染が診断された12名のうち6名に対して耐性検査を行い、プロテアーゼ領域ではmajor mutationは0名、minor mutationは6名に変異を認めた。逆転写酵素領域では高度耐性変異ではないがV179E、T215L、Sをそれぞれ1名ずつに認めた。
- 2)新規診断者6名全員のHIVはサブタイプBであった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

正兼亜季、小川 哲、森下英理子、谷内江昭宏、上田幹夫：東海・北陸地域におけるフローサイトメーターを用いたCD4陽性Tリンパ球測定に関するアンケート調査。日本検査血液学会雑誌8：192-197, 2007

##### 2. 学会発表誌名・巻号・頁・発行年等も記入

1. 正兼亜季、山副有子、重山郁子、米山さゆき、小川 哲、村田秀治、上田幹夫：第4世代HIVスクリーニング試薬の検討。日本エイズ学会誌9：442, 2007
2. 正兼亜季、山田三枝子、北志保里、辻 典子、小谷岳春、上田幹夫：性感染症またはその疑いがあるハイリスク患者に対するHIV感染状況の調査。日本エイズ学会誌9：534, 2007

3. 上西理恵、正兼亜季、近藤真規子、長谷彩希、廖華南、小野木成美、今井光信、上田幹夫、相良裕子、花房秀次、加藤真吾、草川 茂、武部豊：CRF01とサブタイプBからなる新規組替えウイルス株（URF）の同定とその公衆衛生上の意義。日本エイズ学会誌9：545, 2007
4. 上田幹夫、小谷岳春、村田了一、山口正木、宮田 勝、河村洋一、山田三枝子、辻 典子、正兼亜季、北志保里、成川朝子、山下郁江、山下美津江、下川千賀子、青木 眞：北陸ブロックにおけるHIV感染症医療体制の整備10年を経て。日本エイズ学会誌9：548, 2007
5. 上田幹夫：ブロック拠点病院における相談事業。『講演・シンポジウム』エイズ治療の中核拠点病院における相談事業の実施報告書：37-42, 2007.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし





## 九州沖縄ブロックにおける薬剤耐性HIVの調査研究

分担研究者 **南 留美** 国立病院機構九州医療センター 免疫感染症科 医師  
**山本 政弘** 国立病院機構九州医療センター

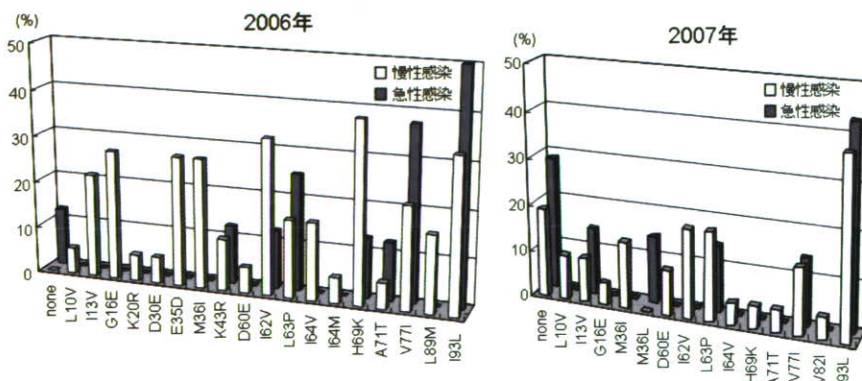
抗HIV剤の開発によりHIV-1の抑制が可能になり、HIV陽性者の予後は改善したが、一方で不十分な服薬により薬剤耐性ウイルスを持つ患者が存在する。近年、未治療の新規感染者のなかにも耐性ウイルスを持つ症例が認められるようになった。九州地区の新規感染患者における薬剤耐性変異の頻度を評価するため当院での新規感染患者の薬剤耐性変異の評価を2003年以降行っている。2003年以降、RT領域、PR領域とも耐性変異ウイルス感染の頻度は年度によって変動はあるが、全体として変化はない。2006年以降、急性感染者が多く認められたため、耐性変異について、慢性感染者との比較を行ったところ急性感染者の方が慢性感染者よりも耐性ウイルスをもつ割合が低かった。また、慢性感染者ではプロテアーゼ領域の変異（副次変異）は多岐に及んだが、急性感染者では比較的、限られた部位に変異が認められた。なお、今年度は、多剤耐性ウイルスを持つ既治療患者についても検討を行った。

### A. 研究目的

九州地区における急性HIV-1感染者および未治療慢性HIV-1感染者における薬剤耐性変異の頻度を調査し、双方を比較するとともに、薬剤耐性HIV-1伝播の疫学的動向を明らかにする。同時にウイルスサブタイプの解析を行い九州におけるサブタイプの頻度について考察する。また、多剤耐性ウイルスを持つ既治療患者についての検討も行う。

### B. 研究方法

2007年にHIV感染が判明し当院免疫感染症科、もしくは九州ブロック内の他施設を受診した未治療慢性HIV-1感染患者および急性HIV-1感染患者を対象に、informed consentのもとに採血を行い、血清中HIV-1のプロテアーゼ（PR）領域、逆転写（RT）領域の薬剤耐性遺伝子解析を行った。薬剤耐性変異の評価はIAS-USA（Aug/Sep:2007）およびShafer's criteriaを参考にした。同時にEnvC2V3領域、Gag p17



プロテアーゼ領域における薬剤耐性変異の割合