

領域、Pol (protease, RT) 領域の遺伝子解析を行い、サブタイピングも施行した。また、多剤耐性ウイルスをもつ既治療患者に関しては、今までの投薬歴および耐性変異の推移について検討を行った。なお、この研究は、主研究施設の倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

2007年において検討した新規未治療患者数は32名であり、そのうち3名は2005年および2006年に陽性が判明しているため、2007年の新規登録者は29名であった。この数は同時期の九州ブロック内（沖縄は除く）での新規感染者数（エイズ発生動向委員会報告による）の約40%に相当した。解析症例数は年々増加している。（2003年:10人、2004年:12人、2005年:25人、2006年:26人）。2006年以降、急性感染者の割合が増加しており、今年度は29名中8名（27.6%）が急性感染であった。急性感染のうち1例は、HIV-RNA量が50コピー/ml以下であり遺伝子解析ができなかったため、解析は急性感染者7名、慢性感染者21名、計28名で行った。耐性変異の頻度は、RT領域では7.1%と頻度は比較的 low、経時的にも一定の傾向はなかった（2003年:11%、2004年:0%、2005年:8%、2006年:15.4%）。PR領域では副次変異も含めると82.1%に陽性であり、2003年:44%、2004年:91.7%、2005年:80%、2006年:88.5%と2004年以降は高頻度で経過している。RT領域、PR領域ともに変異を認めない症例は5例（17.8%）であった。耐性変異の内訳はRT領域ではL74Vが1例、revertant mutationといわれているT215Eが1例であった。PR領域に関しては、急性感染ではL63, V77, L93の部位に変異が集中していた。慢性感染では、多岐にわたる変異が認められたが、急性感染と同様L63, V77, L93の部位に変異が多くみられた。今年度はPR領域のmajor変異は認められなかったが、ATVのみに関連した耐性変異（G16E, M36L, D60E, I64V, V82I, I93L）をもつ患者が急性感染者4名（57.1%）、慢性感染者10名（47.6%）、計14名（50%）と多く認められた。これらの変異は2005年には12%（全例慢性感染者）、2006年には50%（急性感染者50%、慢性感染者50%）に認められ、増加傾向にあった。サブタイプに関しては、東南アジアで感染したと推定される1例がAEで残りは全例Bであった。治療患者における薬剤耐性サーベイランスに関しては、当院通院中の患者で1例対象となる症例があったため調査を行った。

D. 考察

2006年以降、新規感染者の中に急性感染者の占める割合が増加している。症例数が少ないため、正確な評価は出来ないが、急性感染者と慢性感染者において比較を行った。2006年の急性感染者において耐性変異はL63P, V77I, I93Lに多く認められ、その変異ウイルスの保持率は、慢性感染者よりも高かった。今年度も急性感染者においてはL63P, V77I, I93Lが主な耐性変異であったが、慢性感染者においてもこれらが主な変異となっており、その保持率も急性感染とほぼ同等になっている。このことは、急性感染者の耐性変異がより早期に慢性感染者の耐性変異を反映しうることを示唆する。短期間の少数例の解析であるが、今後も、急性患者における耐性変異がその後の慢性患者における耐性変異を予測する指標になりうるか検討を続けていく予定である。なお、2006年以降、ATV関連耐性変異をもつウイルスが増加しているが、これは治療薬としてATVの使用頻度が増加したこと、およびATVが耐性ウイルスを誘導しやすいことを反映していると考えられる。今後、新しい治療薬の普及とともに耐性変異がどのように変遷していくのか検討していきたい。

E. 結論

明らかな耐性変異ウイルス（T215Eも含む）をもつ症例は2例、7.1%であった。2006年以降、ATVに関連した耐性変異が増加している。今年度は、慢性感染で高頻度に認められる耐性変異と急性感染で見られる耐性変異が、一致する傾向があった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Fujisaki S., Fujisaki S., Ibe S., Asagi T., Ito T., Yoshida S., Koike T., Oie M., Kondo 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. and 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
2. Gatanaga H, Ibe S, Matsuda M, Yoshida S, Asagi T, Kondo M, Sadamasu K, Tsukada H, Masakane A, Mori H, Takata N, Minami R., Tateyama M, Koike T, Itoh T, Imai M, Nagashima M, Gejyo F, Ueda M, Hamaguchi M, Kojima Y, Shirasaka T, Kimura A,

Yamamoto M, Fujita J, Oka S, Sugiura W., Drug-resistant HIV-1 prevalence in patients newly diagnosed with HIV/AIDS in Japan., *Antiviral Res.*, 75(1), 75-82, 2007

3. 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、渦永博之、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(2)136-146, 2007

2. 学会

1. Human herpesvirus 8 DNA load in leukocytes of HIV-1 infected patients: Correlations with thrombocytopenia. Rumi Minami, Soichiro Takahama, Hisashi Ando, Masahiro Yamamoto, 8th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific, Aug 19-23, 2007, Colombo
2. Westren blot法にて長期間陰性が持続している HIV-1陽性者の1例、南留美、高濱宗一郎、安藤 仁、山本政弘、第19回日本エイズ学会、11月28-30日、広島
3. HAARTによる脂質代謝異常と高分子アディポネクチンの関連、南留美、安藤 仁、高濱宗一郎、山本政弘、第19回日本エイズ学会、2007年11月28-30日、広島
4. 当院における HAART導入患者での骨粗鬆症の評価、高濱宗一郎、山本政弘、南留美、安藤 仁、城崎真弓、長与由紀子、第19回日本エイズ学会、2007年11月28-30日、広島
5. 腹部超音波による脂肪肝の有無と抗HIV療法に関する検討、安藤 仁、山本政弘、南留美、高濱宗一郎、城崎真弓、長与由紀子、第19回日本エイズ学会、2007年11月28-30日、広島
6. 当院での HIV感染症患者におけるメンタルヘルスについて、辻麻理子、城崎真弓、長与由紀子、南留美、高濱宗一郎、安藤 仁、井上 緑、山本政弘、第19回日本エイズ学会、2007年11月28-30日、広島
7. 2003-2006年の新規 HIV-1感染者における薬剤耐性頻度の動向、杉浦 互、渦永博之、吉田 繁、南留美、山本政弘ら、第19回日本エイズ学会、2007年11月28-30日、広島
8. 当院における HIV-1急性感染患者8例の検討、高濱宗一郎、南留美、山本政弘、渡邊秀之、宮村知也、末松栄一、第276回九州地方会、1月13日、福岡

H. 知的財産の出願、登録状況

特になし。



関東甲信越ブロックにおける薬剤耐性HIVの調査研究

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

平成19年中に新規感染者7名のウイルスRNAの解析をおこなった。感染者の内訳は、男性6名（同性間感染4名、異性間感染2名）、女性1名（性感染）で、受診医療機関の所在地は新潟県5、東京都2である。また感染ウイルスは4例がサブタイプB、2例がCRF01_AEであった。プロテアーゼ領域のminor変異を除き、これらのウイルスに耐性変異はみいだされなかったが、薬剤感受性に関わる部位に定型的な耐性変異とは異なるアミノ酸置換をもつものが3例存在した。また、当初薬剤耐性をもたないウイルスに感染していると判定された患者に治療開始後急速に多剤に対する耐性が現れた症例が本年1例観察された。この耐性出現はもともと潜伏していた変異ウイルスの増殖によってもたらされた可能性が高く、われわれがカバーする新潟県を中心とする地域における薬剤耐性ウイルスの浸淫度はいまだ低い水準にあるとはいえ、非定型的変異の増加とあわせ、警戒すべき事象が増えつつあるといえる。従前のデータも含め、新潟県におけるHIVの感染動向についても考察した。

A. 研究目的

抗HIV薬3剤の併用によるHAAT法の普及はめざましいエイズ死亡の減少をもたらしたが、現行薬剤はいずれも体内に潜伏するウイルスを排除する効果はなく、長期使用による耐性ウイルスの増加を一方で招いている。新たな薬剤開発の努力は続けられているものの、多剤に対するウイルスの耐性の獲得によって治療が著しく困難となった症例は増加しつつあり、その治療集団外への漏出がエイズ治療の今後に大きな障害となってくることが懸念されている。われわれは厚生労働省「薬剤耐性HIVの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」班の調査・研究活動の一環として、2004年から新潟県内の医療機関であらたにHIV感染が確認された全例について、血液の提供を受けてウイルスRNAのシーケンシングをおこなっており、また関東甲信越地域の他県病院からの依頼分についても解析している。RNA配列は薬剤耐性に関わる逆転写酵素 (*rt*)、プロテアーゼ (*pro*) 領域のほか、変異頻度の高い *gag* p17、および *env* (C2V3) 領域についても決定し

ており、その結果から感染事例中の耐性ウイルスの割合に関するデータの取得に加えて、ウイルス間相互の類縁関係についての推定もおこなっている。これらのデータは現在構築中の国内HIVのシーケンスデータベースに統合され、その整備によって薬剤耐性ウイルスの浸淫状況や感染拡大の時系列的なトレースなど、HIVの感染動態のより詳細な解明に生かすことが期待される。

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℃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5～10μl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、シーケンシングに供した。PCR反応に用いたプライマーは、RT領域：5'-ATGATAGGGGAATTGGAGGTTT-3'/5'-TACTTCTGTTAGTGCTTTGGTTC-3' (1st, nt2388-3425)、および5'-GACCTACACCTGTC AACATAAT-3'/5'-TAATCCCTGCATAAATCTGACT-3' (2nd, nt2485-3372)、protease領域：5'-AGACAGGYT AATTTTTT AGGGA-3'/5'-TATGGATTTTCAGGCC AATTTT-3' (1st, nt2074-2716)、および5'-AGAGCCAA CAGCCC CACCAG-3'/5'-ACTTTTGGGCCATCCATT CC-3' (2nd, nt2148-2611)、C2/V3領域：5'-CATACATT ATTGTGCCCCGGCTGG-3'/5'-AGAAAAATTTCCCCT CTACAATTA-3' (1st, nt6866-7374)、および5'-AATG TCAGCTCAGTACAATGCACAC-3'/5'-ATTTCTGGGT CCCCTCCTGAGG-3' (2nd, nt6945-7336)、p17領域：5'-ATCTCTAGCAGTGGCGCCCGAACAG-3'/5'-CTGA TAATGCTGAAAACATGGGTAT-3' (1st, nt625-1318)、CT-3'/5'-CCCATGCATTCAAAGTTCTAGGTGA-3' (2nd, nt 683-1255)である。シーケンシング反応は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。

(倫理面への配慮)

血液サンプルの解析結果は提供先に通知され、治療薬剤の選択の目安として患者本人の利益に還元されるため、単なる調査研究の目的のみの利用とは性格をことにする。サンプル受け入れの際、患者の生年月日、性別、感染時期、感染ルートなど疫学研究に必要な情報の提供を求めているが、氏名、住所などただちに個人の特定に結びつく項目は含まれない。また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、情報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 (5件)、杏林大学付属病院 (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 (表1)。感染者の性別は男性6名、女性1名。年齢は20歳代2名、30歳代4名、40歳代1名となっている。国籍はすべて日本人で、感染地は全例国内と推定されている。男性感染者のうち4名は同性間感染で、男性2名と女性1名は異性間の性的感染によるものであった。採血は初診時 (1件)、または薬剤治療開始時 (6件) におこなわれているが、感染時期は全例不明である。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ではサブタイプBが4例、男性2例と女性1例はCRF01_AE (AE) であった。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データと一致している。

また、平成18年に新規感染者として登録した1名 (31歳女性) に治療開始後短期間に多剤薬剤耐性が発生したことが本年度2回にわたる検査で明らかになった。その詳細については後述する。

薬剤耐性変異

新規サンプルに検出された薬剤耐性にかかわる突然変異の解析結果を表2に示した。表中カッコつきで示したのは、IAS-USA 2007に記載された薬剤耐性変異 (T69_ins, K103N, V179DF, V106AM) と同一部位に生じた定義種以外のアミノ酸置換で、Stanford大学提供の判定プログラムによれば、T69Nはすべてのヌクレオチド系逆転写酵素阻害薬に、またK103RはEFVなど一部の非ヌクレオチド系阻害薬に弱い耐性を与えると判定される。こうした非定型の変異は治療中の患者サンプルを含め、これまで検出されることがまれであったが、本年度の新規サンプル7例中3例に見られた点は注目に値する。プ

表1 平成19年新規登録感染者

Case No	性別	年齢	感染ルート	国籍	推定感染地	推定感染時期	ウイルスサブタイプ	医療機関	サンプリング
1	男	30	同性間	日本	国内	不明	B	新潟大病院	治療開始前
2	女	23	異性間	日本	国内	不明	CRF01_AE	新潟大病院	初診時
3	男	32	同性間	日本	国内	不明	B	新潟大病院	治療開始前
4	男	40	同性間	日本	国内	不明	B	新潟大病院	治療開始前
5	男	26	異性間	日本	国内	不明	B	杏林大病院	治療開始前
6	男	36	異性間	日本	国内	不明	B	杏林大病院	治療開始前
7	男	36	同性間	日本	国内	不明	CRF01_AE	新潟大病院	治療開始前

ロテアーゼ阻害薬の耐性に関する変異はすべてのウイルスに複数の minor 変異が見られたが、単独で明確な耐性を誘導する major 変異は認められなかった。平成14年以降われわれが取り扱った未治療症例26例のうちIAS-USAの定義に合致する耐性変異をもったウイルスが検出されたのは1件に過ぎず(表3)、上記の結果はこの低い水準の浸淫度がなお維持されていることを示しているといえる。

しかしながら、昨年フォローアップ中の患者についておこなった解析で、これまでに経験のない気付きが結果が得られている。患者は現在31歳の女性、性行為による感染で、推定感染時期は平成14年、平成18年に未治療の段階で最初のシーケンシングをおこなっている。ウイルスのサブタイプはCRF_01AEであった。表4に示したように、初回の解析では protease 阻害薬に対する minor 変異を除き薬剤耐性は検出されなかったが、治療開始後の血中ウイルス量の低下は鈍く、症状の改善が見られないため、昨年2度にわたって解析をおこなった。ヌクレオチド系逆転写酵素阻害薬とプロテアーゼ阻害薬を

用いた治療を開始して10ヶ月後の時点で、*rt*、*pro*いずれの領域にも強い薬剤耐性を与える変異M184VおよびI54LMが検出された。さらにプロテアーゼ阻害薬を非ヌクレオチド系阻害薬に変更したプロトコルによる治療後、4ヶ月足らずの期間にL74V(NRTI耐性)、K103N(NNRTI耐性)という2つの耐性変異があらたに出現している。臨床経過からみてもこれらの変異をもったウイルスは感染成立時から存在し、患者体内に潜伏していた可能性が高い。未治療段階ではfitnessの低い変異ウイルスは十分に増殖しておらず、初回の解析では耐性無しと判定されたと思われる。今後real-time PCRによる解析でこの推定の当否を確認したい。この事例は新規感染時1回限りの解析では見落としが出ることを意味しており、1特殊例にとどまらないならば、薬剤耐性ウイルスの調査方法にも見直しを迫るものといえる。

ウイルス間の遺伝的距離

シーケンシングをおこなったウイルスの*rt*、*pro*、*gag*、*env*各領域のヌクレオチド配列について、分子

表2 新規登録感染者の薬剤耐性変異保有状況

Case No	薬剤耐性変異			
	NRTI	NNRTI	PI major	PI minor
1	(T69N)	(K103R)	—	L63P, A71T, I93L
2	—	—	—	I13V, M36I, L63P, H69K, I93L
3	—	(V179A)	—	L63P, A71V, I93I
4	—	(V106I)	—	L63T, A71V, I93L
5	—	—	—	L63P, A74S, V77I, I93L
6	—	—	—	E35D, L63P, I93L
7	—	—	—	I13V, M36I, H69K

注 薬剤耐性変異の定義はInternational AIDS Society-USA 2007による () 内の変異は定義部位に検出された非定型のなミノ酸置換を示す。

表3 薬剤耐性変異の検出頻度

	未治療群 (N=26)		治療群 (N=25)			未治療群		治療群	
	未治療群 (N=26)	治療群 (N=25)	未治療群	治療群		未治療群	治療群	未治療群	治療群
NRTI			V108I	1	1	PI minor			
M41L	0	4	V179DF	(1) _g	0	L10FIRV	2	7	
D67L	0	3	Y188CLH	0	1	I13V	8	11	
T69 _{ins}	(2) _{ab}	(1) _b	P236L	0	1	G16E	0	4	
K70R	0	2				K20MRITV	1	7	
L74V	0	2	PI major			L33IV	1	0	
M184VI	0	10	D30N	0	1	M36ILV	10	15	
L210W	(1) _c	2	M46IL	0	4	F53L	0	1	
T215YF	(1) _d	3	I54ML	0	1	I62V	0	2	
K219QE	0	2	V82AFLS	0	1	L63P	9	9	
			I84V	0	1	H69K	11	17	
NNRTI			N88S	0	2	A71VITL	3	1	
K103N	(1) _e	5	L90M	0	2	V77I	7	2	
V106AM	(1) _f	0				I93LM	11	7	

注 カッコ内の数字は非定型のミノ酸置換が認められたケースの数を示す。a: T69A, b: T69N, c: L210F, d: T215E, e: K103R, f: N106I, g: V179A。

表4 多剤薬剤耐性出現の一例

検査	検査日	治療薬剤	薬剤耐性変異		
			NRTI	NNRTI	PI (major)
1回目	2006/9/12	未治療	—	—	—
2回目	2007/7/3	TDF-FTC/LPV	M184V, (T69TN, L210F)	—	I54ILM
3回目	2007/11/26	TDF-FTC/EFV	L74V, M184V, (L210F)	K103N	I54M

系統樹を作製し相互間の類縁関係を推定している。これまでに新潟県内医療機関に受診した患者のおおよそ半数について、その感染ウイルスのシーケンスを把握しているが、対象4領域のすべてにわたって強い相同性が認められたケースは観察されていない。本年新たにリストに加わった5名の患者についても、既知のシーケンスと特に近縁とみなしうるものは見つからなかった(図1; 図にはgag (p17)の分子系統樹のみを示す)。新潟県内にいわゆるsuperspreaderが存在し、それを中心に域内感染集団が形成されている可能性は現時点では低いと考えられる。

D. 考察

国内のHIV感染の拡大は一向に歯止めがかからない状況が続いている。感染者増加の最大の要因はMSMによる感染数の急増であり、地域的には東京

を中心とする首都圏で目立っていた増加が、最近大阪、名古屋、福岡などの大都市圏でも顕著になってきている。一方、新幹線、高速道路で東京と直結しその日帰り圏に位置するにもかかわらず、新潟県でのHIV/AIDS発生率はいまだに低い水準にとどまっている(対10万人あたり、全国平均9.70、新潟県3.66; エイズ発生動向委員会平成18年報告)。低水準が保たれている要因として第一に挙げられるのはMSMによる感染発生数が少ないことであり、第二には、ほとんどが県外、おそらく東京などの首都圏での感染によって持ち込まれているウイルスが、2次・3次感染によって県内にさらに広がっていく徴候が認められないことにある。

新潟県でも1990年代後半に一時感染・発症報告数が急増した時期があったが(図2)、2000年以降減少し、年によって多少の増減はあるものの、かつてのような増勢が現れる兆しは今のところ見えていない。これまで新潟県では保健所の血液検査で感染が告知されたケースは極めてまれで、感染者のほとんどはエイズ症状、あるいはそれに近い免疫機能の低下が明らかになって医療機関を受診した後に初めて診断が下されている。このため、感染時期が推定されているケースでは診断までに5年以上経過しているのが大半で、1990年代後半に観察された感染報告数のピークは実際にはさらに5年以上遡った時点での感染による可能性が高い。この時期はいわゆるバブル経済期の終盤からその崩壊の前後に相当し、新潟でも週末を東京・横浜などで過ごすライフスタイルが広がった時期であり、また、首都圏各都県において、おそらく性産業で働く東南アジア系女性が大部分であると思われる外国籍女性の感染・発症報告数がピークに達した時期でもある。こうした女性との買春行為、あるいは風俗店に客として出入りする男性との性行為が主たる感染ルートであると推定すると、全国的には少数である東南アジア型HIV(CRF01_AE)が、新潟で感染ウイルスの半数以上を

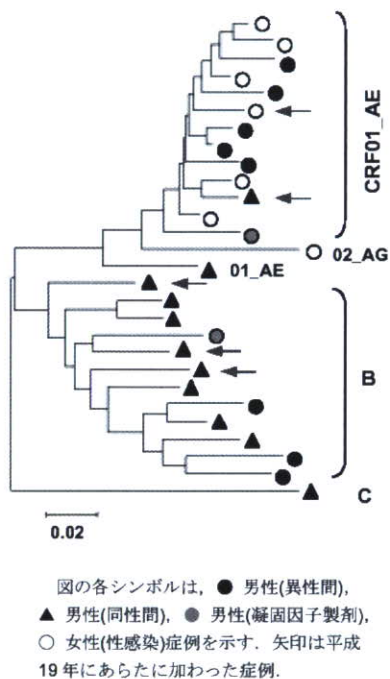


図1 gag (p17) の分子系統樹に基づくウイルス間の類縁関係

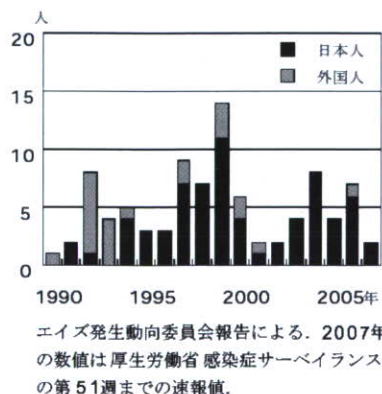


図2 新潟県の年次別HIV/AIDS発生報告数

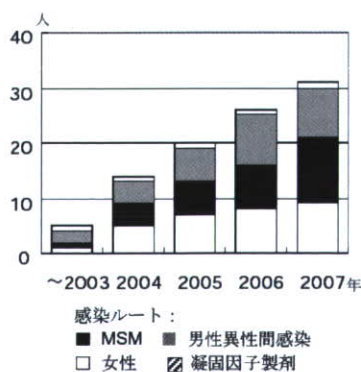


図3 本研究で把握された症例の性別・感染ルート別県内累積患者数の推移

占める理由も容易に説明できる。

経済・社会的要因の影響が大きい異性間感染の増加のおそれは、現在の状況で見ると比較的少ないと思われるが、全国的HIV感染増加の主体である男性同性愛者については、新潟県においてもすでに感染拡大の兆しが観察されている。平成19年中に取り扱った県内分サンプル5件のうち4件がMSMであったように、われわれが捕捉している症例中に占めるMSMの割合は年を追って増加しており、シーケンシングの結果感染源を共有する感染集団に属すると判定されるケースが、近い将来県内に現れてくる恐れは少なくない。

われわれが取り扱った未治療症例26例のうちIAS-USAの定義に合致する耐性変異はV108I1件にとどまっている。この変異は薬剤耐性の程度自体比較的弱いものであり、また治療と無関係に生じる polymorphismの可能性も否定できないとされる。これに比べ、昨年フォローアップ中の患者に多剤に対する耐性変異が急速に生じた事例はより深刻なケースといえる。本例は潜伏状態にあった耐性ウイルスが薬剤治療の開始とともに選択的に増殖した結果顕在化した可能性が高く、感染後診断までの期間が長い症例で今後このようなケースが増加してくることが予想される。それに対処するためには、新規感染サンプルについての1回限りの変異解析では明らかに不十分で、フォローアップの解析を行うことが不可欠となってこよう。感染ウイルスのタイプが東南アジア型のCRF01_AEであった点もまた重要なポイントであると思われる。発展途上で安価に抗HIV薬が入手できるようになったことはこれらの国々では大いなる福音となっているが、一方で医師の十分な管理下でない安易な薬剤の流通が耐性ウイルス蔓延の温床となる危険が指摘されている。とくに東南アジア諸国におけるこのような事態はわが国に深刻な脅威となりうるため特に重要である。本例がこれに相当するケースか否かは不明であるが、国内データベースの整備がなされた際には、類似のシーケンスの探索など、その広がり度を再度調べる必要がある。

IAS-USAの定義とはアミノ酸種の異なる変異の検出頻度が増加傾向にある（～2004年0件、2005年1件、2006年1件、2007年3件）点も、耐性ウイルスの蔓延を考える際気がかりな点である。これらが単なる polymorphismか、耐性変異からの復帰を意味するかについては容易に結論できないが、全国のデータの比較とあわせ、なお今後の推移を見ていきたい。

E. 結論

新潟県の医療機関から提供されるサンプルを中心とするわれわれの解析では、薬剤耐性をもったHIVの蔓延の程度は依然低いといえる。しかしながら、新規感染登録時に耐性無しと判定ながら、その後の臨床経過から多剤に耐性をもったウイルスに当初から感染していた疑いが強い事例が1例観察されるなど、懸念されるデータも一方で増えつつある。

F. 健康危険情報

特段の事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 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. Clin Infect Dis. 2007 Nov 1;45(9):1230-7.
- Gatanaga H, Ibe S, Matsuda M, Yoshida S, Asagi T, Kondo M, Sadamasu K, Tsukada H, Masakane A, Mori H, Takata N, Minami R, Tateyama M, Koike T, Itoh T, Imai M, Nagashima M, Gejyo F, Ueda M, Hamaguchi M, Kojima Y, Shirasaka T, Kimura A, Yamamoto M, Fujita J, Oka S, Sugiura W. Drug-resistant HIV-1 prevalence in patients newly diagnosed with HIV/AIDS in Japan. Antiviral Res. 2007 Jul;75(1):75-82.

2. 学会発表

- 佐藤みさ子、牧野麻由子、小林美佐江、石川朋子、川口 玲、内山正子、手塚貴文、太田求磨、田邊嘉也、津畑千佳子、佐藤 牧、下条文武：新潟大学医歯学総合病院におけるチーム医療の実例（第21回日本エイズ学会学術集会・総会 2007.11.28～11.30）
- 張 仁美、津畑千佳子、手塚貴文、田邊嘉也、下条文武：NASHを合併したHIV感染症の1例（第21回日本エイズ学会学術集会・総会 2007.11.28～11.30）
- 杉浦 互、下条文武他：2003年-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回日本エイズ学会学術集会・総会 2007.11.28～11.30）
- 牧野麻由子、村松芳幸、田邊嘉也、下条文武：関東甲信越ブロックにおける相談体制の現状と課題—抑うつ感・不安感との関係を中心に—（第21回日本エイズ学会学術集会・総会 2006.11.30～12.2）
- 須貝 恵、田邊嘉也、内山正子、塚田弘樹、下条文武：「関東甲信越エイズ治療拠点病院リス

ト<医療者用>」についての検討（第21回日本
エイズ学会学術集会・総会2006.11.30～12.2）

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



東京および近郊における薬剤耐性HIVの調査研究

2007年に東京都内保健所等検査で検出されたHIV-1のProteaseおよびReverse Transcriptase遺伝子の解析

分担研究者 貞升 健志 東京都健康安全研究センター

研究協力者 長島 真美¹、新開 敬行¹、尾形 和恵¹、吉田 靖子¹、矢野 一好¹
上野 泰弘²

¹東京都健康安全研究センター、²東京都健康安全室感染症対策課

HAARTに代表されるHIVの薬物治療が効果を上げている反面、薬剤治療患者数の増加に伴い、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。

東京都における新規HIV感染者数は年々増加傾向にあり、保健所等における検査陽性例についても同様の傾向がある。都内で流行しているHIVを遺伝子学的に調査する目的で、保健所等の検査陽性例より検出されたHIVのサブタイプ並びにReverse transcriptase (RT) およびProtease (Pro) 領域における薬剤耐性変異の有無を検索した。2007年の陽性例のうち161例について調査した結果、検出されたHIVの95.0%がサブタイプBであった。薬剤耐性変異を調査した結果、Pro領域でM46I/Lの変異が6例、RT領域においてはM41L (2例)、K103N (1例)、T215X (5例) の変異が認められ、ProおよびRT領域の両方で薬剤耐性変異を認める例が2例存在した。さらに、BED assayを用いて感染時期の推定を行ったところ、67例 (41.6%) が155日以内の感染と判定され、67例中9例 (13.4%) で薬剤耐性変異が認められた。

A. 研究目的

薬剤治療を受けているHIV患者数の増加に伴い、薬剤耐性変異を有するHIVの出現および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。

B. 研究方法

1. 塩基配列の決定

2007年に都内保健所等のHIV検査で陽性となった検体 (血清) 161例を供試した。各検体400μLよりウイルス核酸RNAを抽出後、図1に示すプライマーペアを用いたnested PCR法によりProtease (Pro) およびReverse transcriptase (RT) 領域を増幅し、特異バンドの精製を行い、精製DNAを得た。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. ProおよびRT領域の解析

サブタイプの型別は、得られた塩基配列を基に、遺伝子解析ソフトMEGA4を用いて系統樹を作成し決定した。薬剤耐性変異の有無についてはIAS-USAおよびShafferの報告に基づき、RT領域41~236番目のアミノ酸変異を、Pro領域については1~90番目のアミノ酸変異の有無により判定した。

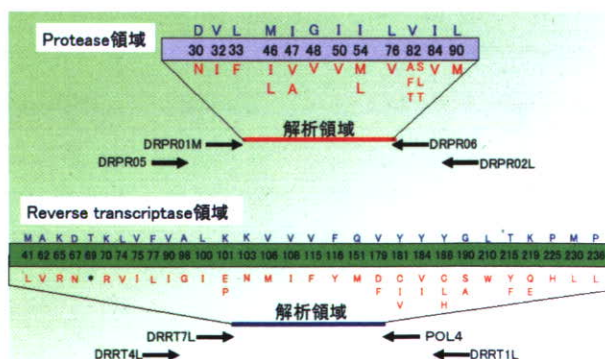


図1 薬剤耐性遺伝子解析領域

3. BED assayによる感染時期の推定

血清を101倍に希釈し、Calypte HIV-1 BED Incidence EIAを用いて検査を実施し、ODn値 ≤ 0.8 となったものを、感染初期（155日以内）と判定した。尚、検査の実施手順はキットの取り扱い説明書に準じた。

(倫理面の配慮)

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ている。

C. 研究結果

1. サブタイプ別

都内保健所等のHIV検査でHIV-1陽性となった161例のRT領域の分子系統樹解析を実施した結果、153例がサブタイプBで(95.0%)、5例がサブタイプAE(3.1%)に分類され、サブタイプC、CRF20_BG、CRF08_BCが各1例に検出された(図2)。

2. 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(図3)、161例中M46L(4例)、M46I(1例)、M46I/L(1例)の薬剤耐性変異が単独で認められる例が6例(3.7%)認められた。

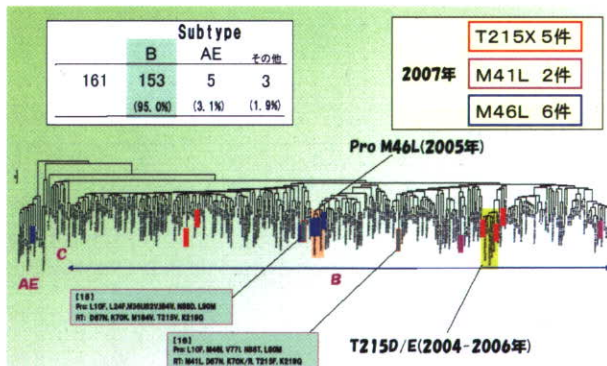


図2 分子系統樹解析(RT領域)と薬剤耐性変異

3. 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3)、161例中M41L(2例)、K103N(1例)、T215S(2例)、T215D(2例)、T215C(1例)の薬剤耐性変異が単独で認められる例が8例(5.0%)存在した。さらに、Pro領域およびRT領域で複数の薬剤耐性変異を有する例が2例認められた(図3 No.15: Pro領域L10F, M46I, V77I, L90M、RT領域M41L, D67N, K70K/R、T215F, K219Q、図3 No.16: Pro領域L10F, M36I, I62V, I84V, N88D, L90M、RT領域D67N, K70K, M184V, T215V, K219Q)。

161例中ProまたはRT領域で単独のアミノ酸変異を認めた例は14例(8.7%)であり、複数の変異を有する例を加えると9.9%であった。

4. 薬剤耐性変異を有する例の分子系統樹解析

RT領域の分子系統樹解析を実施し、薬剤耐性変異を認める例の系統樹における位置を検討した結果(図2)、Pro領域でM46I/Lの変異が認められた6例中4例は2005年に東京都内で検出されていたM46I/L群とほぼ同位置に存在した。また、RT領域でT215Xの変異を認めた5例中3例は、2004年から2006年に検出されたT215D/E群とほぼ同位置に存在した。

それ以外の薬剤耐性変異が認められた例はすべて系統樹上で別々の所に位置した。

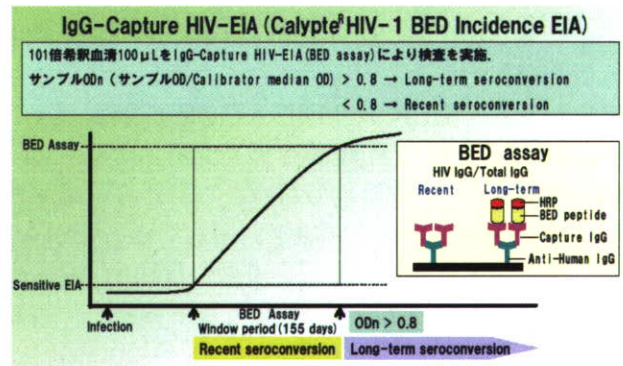


図4 BED assayによる感染初期検体の検出

	RT領域	Pro領域
1	(-)	I13V, M46L, M36I, H69K
2	(-)	M46I/L, D60E, L63P
3	(-)	M46L, L63P
4	(-)	M46L, L63P
5	(-)	M46L, I13V, I62V, L63P, V77I, I93L
6	(-)	M46I, L63P, I64V, V77I, I93L
7	M41L	V77I, I93L
8	M41L	L63P, V77I, I93L
9	K103N	(-)
10	T215S	V77I
11	T215S	M36I, V77I
12	T215D	I13V, I93L
13	T215D	I62V, I93L
14	T215C	I13V, M36I, I62V
15	M41L, D67N, K70K/R T215F, K219Q	L10F, M46I, V77I, L90M
16	D67N, K70K, M184V T215V, K219Q	L10F, M36I, I62V, I84V, N88D, L90M

図3 検出された薬剤耐性遺伝子変異

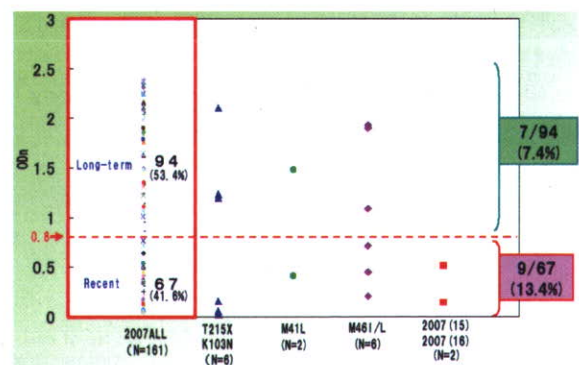


図5 BED assayと薬剤耐性変異

5. BED assayによる感染時期の推定

BED assay (図4) により血清学的に感染初期 (ODn値 ≤ 0.8) と判定された例は、67例 (41.6%) であった (図5)。67例中薬剤耐性変異が認められたものは9例 (13.4%) であった。一方、BED assay (ODn値 >0.8) と判定された94例 (感染後長期間経過) 中7例 (7.4%) に薬剤耐性変異が認められたことから、新規HIV感染者の中でも感染初期例の方が薬剤耐性の出現頻度がやや高いことが判明した。

耐性変異別にみると、RT領域で薬剤耐性変異 (T215X、K103NおよびM41L) が認められた8例中4例、Pro領域でM46I/Lの変異が認められた6例中3例および複数の薬剤耐性変異を有する2例 (図3 No.15,16) が感染初期 (155日以内) と判定された。

D. 考察

薬剤治療を受けているHIV患者数の増加に伴い、新規HIV感染者における薬剤耐性変異を有するHIVの出現が懸念されている。

2007年に都内保健所等のHIV検査で陽性となった161症例より検出されたHIV-1のPro領域およびRT領域の遺伝子解析を実施した結果、16例 (9.9%) に薬剤耐性変異を認めた。うち、14例については単独のアミノ酸変異のみを示した。RT領域の薬剤耐性変異であるM41LおよびK103Nは今まで検出されなかった例である。また、T215XおよびPro領域の変異であるM46I/Lは数年前より東京都においても検出されてきたが、系統樹上では以前のタイプと異なる例も存在することが確認されたため、これらの動向を今後も継続して調査していく必要がある。

複数の薬剤耐性変異を認めた2例については、BED-assayにおいて陽性であったことから、感染初期における薬剤耐性が示唆される。しかしながら、感染時にウイルス量の少ない事例ではBED assayの信頼性が低いとの情報もあり、今後も継続して調査していく必要性が示唆された。

E. 結論

2007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、アミノ酸の単独変異の認められる例では8.7%、複数のアミノ酸で変異が認められた例を加えると9.9%であった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 長島真美、貞升健志、新開敬行、秋場哲哉、吉田 勲、吉田靖子、矢野一好、甲斐明美、諸角 聖：東京都におけるHIV検査成績 (1999年-

2004年)、東京都健康安全研究センター年報、56, 41-44, 2005

2. 貞升健志、長島真美、新開敬行、尾形和恵、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 感染症：東京都における検査と解析、吉田靖子、矢野一好：東京都健康安全研究センター年報、58 (印刷中) 2007

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、尾形和恵、吉田靖子、矢野一好：イムノクロマト法における陽性例と偽陽性例の判定ライン出現時間の比較、第21回日本エイズ学会学術集会・総会、広島、2007
4. 貞升健志、長島真美、新開敬行、尾形和恵、吉田靖子、矢野一好：東京都内保健所等のHIV検査陽性例の血清学的、遺伝子学的解析、第21回日本エイズ学会学術集会・総会、広島、2007



研究要旨

多剤耐性HIV治療の最適化研究

分担研究者 松下修三 熊本大学エイズ学研究センター 教授

1997年よりHAARTを開始し、多剤耐性ウイルスが出現したが、治療変更により良好な経過を示している症例のpDNAおよび、分離ウイルスの耐性変異とウイルスフェノタイプの詳細な検討を行った。その結果2003年には多くの耐性変異がPR領域に認められたが、2004年からは若干減少しはじめ、2005年のサンプルではワイルドタイプが増殖、2006年には再び8つの耐性変異(L10I, V11I, K20R, F53L, I54V, L63P, A71V, V82A)を含むウイルスとなるが、2003年に認められたL90M, I93L, M36Iの耐性変異は認められなかった。また、2007年3月に同患者の末梢血単核球より分離したウイルスのPR領域には、L10I, I54V, L63P, A71V, V82A, L90Mという耐性が認められた。これはフェノタイプ試験において、3TC, IDV, NFV, SQVに耐性になっていたが、DRV, UIC-94003 (TMC-126)には感受性であった。同様に分離ウイルスのenv領域の系統樹解析を行うと、1998年のプロウイルスDNAに非常に近かった。これらのことは、薬剤耐性ウイルスの長期残存を示すと同時に、ある特定の時期の耐性プロフィールばかりでなく、これまでの薬剤投与歴(あるいは服薬歴)や、経時的な耐性変異出現のデータがサルベージ治療を考える上で、重要であることを示す。

A. 研究目的

HAARTの長期化に伴いいくつかの問題点が浮き彫りになってきた。中でも耐性ウイルスの出現は、治療の成否を大きく左右するため、多剤耐性ウイルスの出現を阻止する事は最重要課題であり、薬剤耐性のモニタリングは必要不可欠である。そこで、今年度は、実際の症例において、多剤耐性ウイルスを保持しているにもかかわらず、現在の治療でコントロール良好と考えられる症例について詳細な検討を行った。このような症例で、臨床経過と比較しながら耐性変異を詳細に検討していくことは、将来のサルベージ療法のガイドライン作成に不可欠である。

B. 研究方法

10年以上にわたりHAARTを継続しその過程において多剤耐性ウイルスが出現した症例のPBMCを経時的に採取しpDNAを抽出した。それらのpDNAをtemplateにしてRTとPR領域をPCRにて増幅した後、

クローニングし、シーケンスを行い、時系列で薬剤耐性変異を比較した。同時にEnv領域のシーケンスも行い、経時的变化を系統樹解析により調べた。また、2007年に分離したウイルス株の薬剤感受性をMTT assayで測定した。また、この臨床分離株のPRとEnv領域のシーケンスを行い、系統樹解析などを用いて、これまでのpDNAのシーケンスと比較検討した。

(倫理面への配慮)

本研究を行うに当たり該当症例には研究の概要を説明し同意を得た上で採血し、解析した。なお本研究の倫理的・科学的妥当性は熊本大学病院の先進医療審査委員会で審査され、了承されている。

C. 研究結果

HIV-1感染症の長期治療において、抗ウイルス薬耐性発現を阻止する事は重要であり、薬剤耐性のモ

ニタリングは必要不可欠である。一方、これまでの抗ウイルス療法によって、すでに薬剤耐性となった症例についての詳細な研究も、今後の治療を考える上で重要である。耐性をもつ症例に関する研究には、表1に示すような段階の調査が考えられる。すなわち、1.多剤耐性症例の現状調査、2.サルベージ療法の現状調査（今後のガイドライン作成の基礎となる）、3.耐性検査の問題点の調査、（特に、検査が臨床経過と一致しない場合）などである。今年度は1の現状調査を開始した。対象となる症例としては、コントロール不良の症例ということにしたが、多剤耐性の症例の中には、現在の治療でなんとかコントロールされている症例も存在する。このような症例の詳細な研究は、将来のサルベージ療法のガイドライン作成に結びつくものである。特に、薬剤耐性変異とサルベージ療法の有効性の関連を明らかにする必要がある。

我々は1997年2月よりHAART療法を開始し、治療経過の中で、多剤耐性となった症例を治療している。図1に臨床経過を示す。T215YのAZT耐性は当院に紹介される以前より存在していた(AZT単剤治療による)と考えられるが、その後、初期のPIであるリトナビルをキードラッグとして用いた状態で、PI耐性が出現、その後、PIの耐性が次々と蓄積し、現在に至っている症例である。現在はLPV/r 5T+EFV(600mg)+ABCにてHIV-RNA<50を保った良好な状態である。本症例について、プロウイルスの耐性変異頻度を経時的に調べた。図2に示す様に2003年には多くの耐性変異が認められたが、長期に亘り、HIV-RNAが測定感度以下で経過しているためか、2004年からは若干減少しはじめ、2005年のサンプルではワイルドタイプが増殖、2006年には再び耐性変異を多く含むウイルスとなるが、そのパターンはL10I, V11I, K20R, F53L, I54V, L63P, A71V,

表1 既治療症例での薬剤耐性の問題に関する研究

1. 多剤耐性症例の現状調査（新薬導入が必要か否かの判定の基礎データ）
2. サルベージ療法の現状調査（サルベージ療法に関するガイドライン作成の基礎データ）
3. 耐性検査の問題点のfollow up（耐性検査と臨床経過が一致しない場合など）

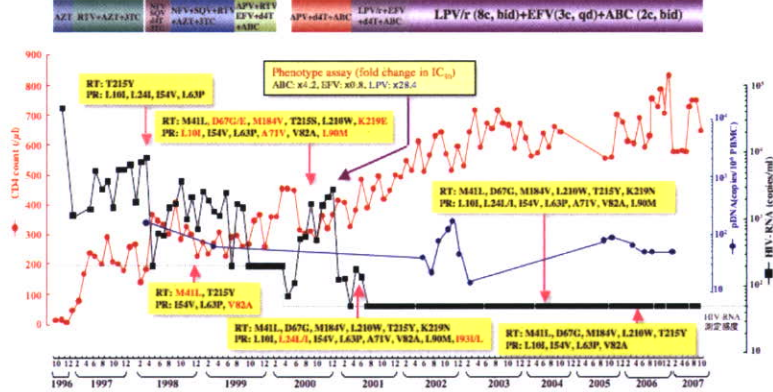


図1 多剤耐性症例の臨床経過とRT,PRシークエンスの推移

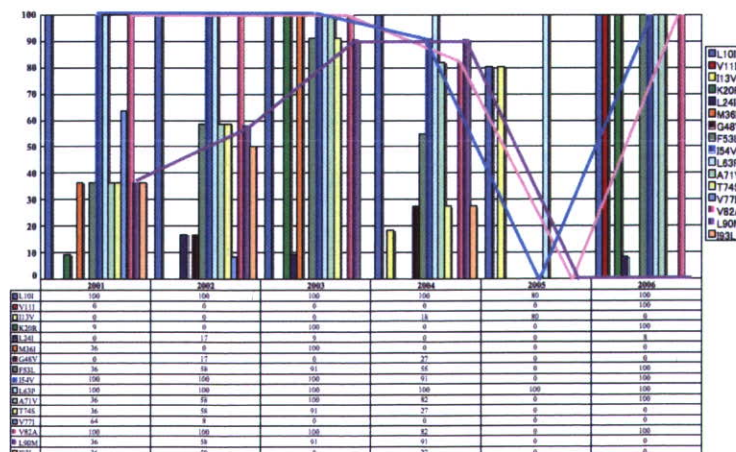


図2 多剤耐性症例のPRシークエンスの薬剤耐性関連変異の推移

V82Aとなり、2003年までに認められたL90M, I93L, M36Iなどの耐性変異は依然認められない状況が続いていた。

我々は2007年3月に同患者の末梢血単核球より、ウイルスを分離し、そのウイルスのPR領域をシーケンスし、さらに、薬剤耐性変異を調べた。図3に示す様にL10I, I54V, L63P, A71V, V82A, L90Mという耐性が認められた。これはフェノタイプ試験においても3TC, IDV, NFV, SQVに耐性になっていたが、DRV, UIC-94003(TMC-126)には感受性であった。同様に1998年、2003年、2007年のpDNAからenv領域を増殖し、シーケンスして系統樹解析を行うと(図4)、V3-tipのアミノ酸配列に“INIAPGR”という特徴的なシーケンスをもつ分離ウイルスのクワシスピーシス(赤ワク)は、1998年のプロウイルスDNAに最も近いものであった。

D. 考察

長期間の抗ウイルス薬サルベージ療法の過程で、異なった薬剤耐性のプロフィールをもつ残存ウイルスが出現しうると考えられる。TW Chunらによると、プロウイルスリザーブは耐性変異の入ったものを含んだウイルスによって、常に新しく構築されている、あるいはそういう、潜伏感染細胞が常にリザーブールに供給されていると報告している。しかし、我々の分離ウイルスについての研究から、9年前の耐性プロフィールと非常に近いenvelope配列をもつウイルスが分離されてくることから、リザーブの中には以前の耐性プロフィールをもったウイルスも存在していることが証明された。これらのことは、ある特定の時期の耐性プロフィールばかりでなく、これまでの薬剤投与歴(あるいは服薬歴)と同時に、経時的な耐性変異出現のデータがサルベージ治療を考える上で、重要であることを示す。

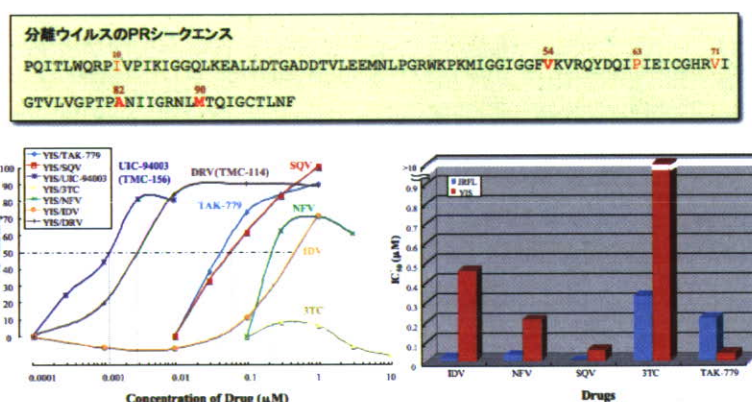


図3 分離ウイルスのPR領域のシーケンスと薬剤感受性

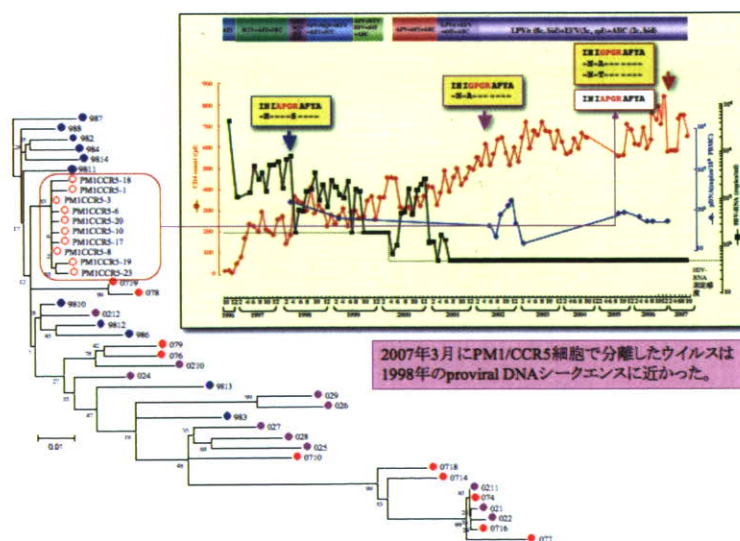


図4 多剤耐性症例の臨床経過とEnvシーケンスの推移

E. 結論

10年以上にわたり HAART を継続し多剤耐性ウイルスが出現した症例の pDNA および、分離ウイルスの耐性変異とウイルスフェノタイプの詳細な検討を行った。その結果、治療の過程で出現した耐性ウイルスが長期にわたり維持されていることがわかった。また、最近分離したウイルスが9年前の env シークエンスと変わらなかったことから、各時期のウイルスが異なるコンパートメントに保持されており、それぞれが持つ耐制度に応じてウイルスの再活性化を起している可能性が示唆された。このように、耐性ウイルスの出現した個々の症例を詳細に検討することで、薬剤耐性ウイルスの潜伏機構を解明し、今後のサルベージ療法のガイドライン作成に非常に役立つと考える。

F. 健康危惧情報

なし

G. 知的所有権の出願・取得状況

(予定含む) 特になし

H. 研究発表

1. 論文発表

1. 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. *J Virol*.81:3757-3768,2007
2. Nakayama E.E., Carpentier W, Costagliola D., Shioda T., Iwamoto A., Debre P, Yoshimura K, Autran B, Matsushita S, Theodorou I. Wild type and H43Y variant of human TRIM5 α show similar anti-human immunodeficiency virus type 1 activity both *in vivo* and *in vitro*. *Immunogenetics*. 59:511-515, 2007.
3. 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 M, Shirasaka T, Kimura S, Oka S.: Successful efavirenz dose reduction in HIV-1-infected individuals with cytochrome P450 2B6*6 and *26. *Clin Infect Dis*.45: 1230-1237, 2007.
4. Ryo A, Tsurutani N, Ohba K, Kimura R, Komano J, Nishi M, Soeda H, Hattori S, Perrem K, Yamamoto M, Chiba J, Mimaya J, Yoshimura K, Matsushita S, Honda M, Yoshimura A, Sawasaki, T, Aoki, I, Morikawa Y, Yamamoto N. SOCS1 is an inducible host factor during HIV-1 infection and regulates the intracellular trafficking and stability of HIV-1 Gag. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:294-299, 2008.



大阪府および近郊における薬剤耐性HIVの調査研究

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** 大阪府立公衆衛生研究所ウイルス課

研究要旨

2007年にHIV-1感染が判明し医療機関を受診した新規感染者4例、およびHIV抗体検査で陽性が確認された69例について、薬剤耐性遺伝子検査を実施した。その結果、医療機関受診症例には薬剤耐性HIV-1の感染を示唆するmajor mutationは認められなかったが、抗体確認検査の陽性検体において逆転写酵素阻害剤とプロテアーゼ阻害剤に対するmajor mutationがそれぞれ2例ずつ検出され、さらに2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認められた。

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

2007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4例について、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。

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、ダイレクトシークエンスにより塩基配列を決定した後、IAS-USAパネル2007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抗体確認検査の陽性検体69例についても同様に薬剤耐性遺伝子検査を実施した。

さらに一部の検体については、感染時期（初期／慢性期）を推定する目的で、Calypse HIV-1 BED Incidence EIA アッセイ（CALYPTE BIOMEDICAL Co., OR USA）を添付のマニュアルに従って実施した。

（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

1. 新規HIV-1感染者における薬剤耐性変異

2007年にHIV-1感染が判明した計73例について、薬剤耐性遺伝子検査を実施した。その結果、医療機関受診症例4例には薬剤耐性に関連するmajor mutationは検出されなかったが、抗体確認検査陽性検体69例中、日本人男性2例（#971、#1026）においてプロテアーゼ阻害剤に対するmajor mutation（M46LまたはI）が、また外国人男性1例（#928）においてRT阻害剤に対するmajor mutation（M41L、L210W、T215D）が検出された。さらに、日本人男性2例（#920、#964）において核酸系RT阻害剤に対する耐性変異であるT215Y/Fのrevertantと考えられるT215CまたはDが単独で検出された。また、HIV抗体検査を目的としてSTIクリニックを受診した日本人女性1例（#953）は、血漿中のHIV RNAには耐性変異が認められなかったが、末梢血単核球中のプロ

ウイルスにおいて、核酸系および非核酸系 RT 阻害剤に対する major mutation (K65R, K103N, Y181C, M184V, G190A) が検出された (図1)。

2. T215X変異株の分子疫学的解析

近年、核酸系 RT 阻害剤耐性変異の revertant と考えられる T215X (X:C/D/E/L/S) が当所確認検査の陽性検体において高頻度に見つかっており (2004年 3/40例: 7.5%、2005年 5/56例: 8.9%、2006年 7/84例: 8.3%)、系統樹を作成するとその大部分は2つのクラスターに集積することが明らかになっている。2007年には3例の T215X が認められ(3/69例: 4.3%)、そのうちの T215C または D が単独で見つかった #920 と #964 は、そのいずれかのクラスターに収束された。一方、TAMs (核酸系 RT 阻害剤に対する多剤耐性変異) として知られている M41L および L210W を伴った T215D が検出された #928 は、どちらのクラスターにも属さず、他の T215D 例とは遺伝的距離が離れた (図2)。

●医療機関受診症例(4例) 薬剤耐性変異なし

●確認検査陽性検体(69例)

#920	日本人男性	RT: T215C
#928	外国人男性	RT: M41L, L210W, T215D
#964	日本人男性	RT: T215D
#971	日本人男性	PR: M46L
#1026	日本人男性	PR: M46I
#953	日本人女性	(provirus RT: K65R, K103N, Y181C, M184V, G190A)

T215X 変異株は全国各地の新規感染例において報告されているが、今回東京都内で2005-2007年に見つかった7例の T215X 変異株 (東京都健康安全科学センター 貞升健志先生より供与) について、大阪の T215X 変異株との相同性を系統樹解析により調べた。その結果、東京の7例中4例 (05-TK-3749、05-TK-176120、07-TK-6941、07-TK-7498) は大阪の T215X から離れた独自のクラスターを形成しており、東京で採血され大阪で確認検査を行った1例 (06-852) もそのクラスターに含まれた。ところが興味深いことに、残りの3例中2例 (07-TK-8192、07-TK-7095) は大阪の T215X クラスターに収束あるいはその近傍に位置し、もう1例 (06-TK-13506) は大阪の T215X 変異を持たないグループのクラスターに収束された (図2)。

3. BEDアッセイによる感染時期の推定

Calypte HIV-1 BED Incidence EIA kit (BEDアッセイ) を用いて、2007年の確認検査陽性検体のおおよその感染時期を推定したところ、検討した67例中25例 (37.3%) が感染初期 (感染後155日以内) と推定された。感染初期例の中には、PR領域に M46I が検出された #1026 およびプロウイルスの RT 領域に多数の変異が検出された #953 も含まれていた。また、2005年以降の T215X 株11例についても BEDアッセイを実施した結果、6例 (54.5%) が感染初期と判定された (図2)。

図1 2007年新規HIV-1感染者における薬剤耐性変異

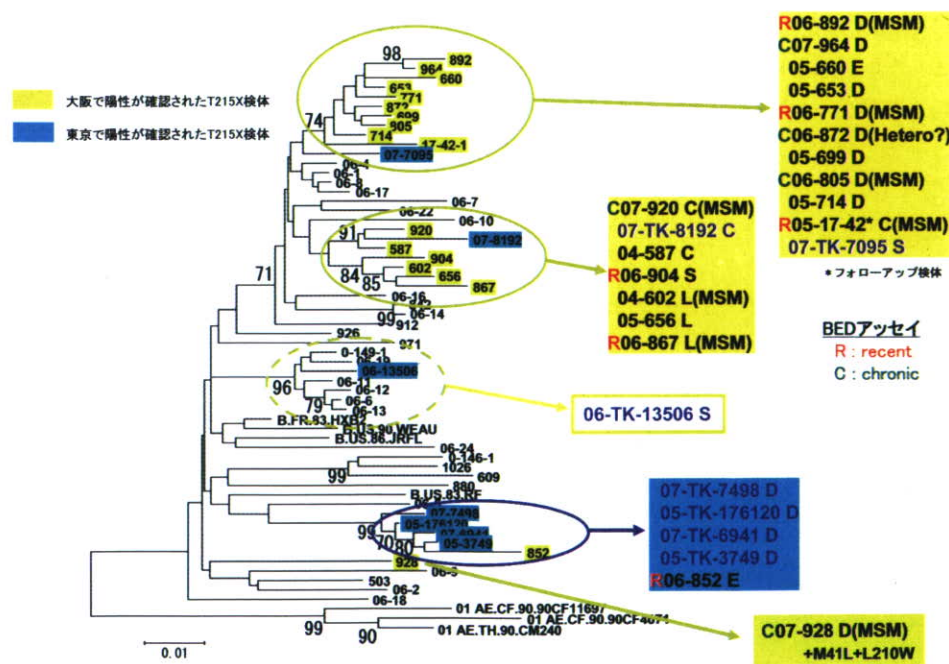


図2 RT領域の系統樹

D. 考察

2007年にHIV-1感染が確認された計73例のうち、医療機関受診症例は4例のみと例数が少ないため薬剤耐性変異は検出されなかったが、抗体確認検査陽性検体69例中6例(8.7%)のPR領域またはRT領域に薬剤耐性major変異が検出された。そのうちの2例はBEDアッセイにより感染初期と推定され、また近年高い頻度で検出されているT215X変異保有例についても約半数が感染初期と推測されることから、これら耐性変異を有するHIV-1株が新規感染者に広がりがつあることが示唆された。

プロウイルスのみにRT阻害剤に対する耐性変異が検出された日本人女性(#953)は、血漿中のウイルスのRT領域はサブタイプCであり、耐性変異は検出されなかった。ところが、プロウイルスのRT領域からはサブタイプCとCRF01_AEが検出され、耐性変異はCRF01_AE株にのみ認められた。本症例は海外渡航歴が多数あり、渡航先でのハイリスク行動により薬剤耐性株を含む複数のHIV-1株に重感染したものと推測された。CRF01_AE株には多数の薬剤耐性変異が存在するためfitnessが低下していることが推測され、そのため血漿中ではサブタイプC株の方が優勢となりCRF01_AE株は検出されなかったものと考えられた。

近年増加傾向にあるRT領域のT215X変異が2007年にも3例認められたが、うち2例は昨年までのT215Xと同じクラスターに含まれることから、これまでと同じタイプのT215X変異であると考えられた。一方、外国人MSMから検出された1例はTAMsとして知られている変異も同時に検出されており、薬剤耐性HIV-1に感染した可能性が強く示唆された。

今回初めて、東京都内で感染が確認されたT215X変異株の中に、大阪で感染拡大しているウイルスと遺伝的に近縁な株が3例見出された。これら3例は、大阪の2つのT215XクラスターとT215Xを持たない確認検査陽性検体のクラスターにそれぞれ含まれるが、これらのクラスターを形成するメンバーの多くはMSMであることから、東京と大阪のゲイコミュニティ間での交流により地域を越えた感染拡大が生じていることが示唆された。

E. 結論

大阪地域における新規HIV-1感染者は日本人MSMがその多くを占めており、系統樹を作成するとMSMを中心としたいくつかのクラスターが形成さ

れる。今回、これらゲイコミュニティの間で感染が広がっていると考えられるT215X変異ウイルスの解析から、東京-大阪間でのHIV-1の伝播が示唆された。その一方で、外国人男性や日本人女性の新規感染者から薬剤耐性HIV-1が検出されるなど、日本人MSM以外にも目を向ける必要性が示された。

このような疫学調査により、我が国におけるHIVの感染拡大機序を解明する上で有用な情報が得られるものと期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. YOKO KOJIMA, TAKUYA KAWAHATA, HARUYO MORI, ISAO OISHI, TORU OTAKE, Recent Diversity of HIV-1 in Individuals who visited STI-related clinics in Osaka, Japan, Journal of Infection and Chemotherapy (in press)

2. 学会発表

1. 森 治代、小島洋子、川畑拓也、大國 剛、プライマーにより異なるサブタイプおよび薬剤耐性変異が検出されたHIV-1重感染例、第21回日本エイズ学会、広島、2007(抄録：日本エイズ学会誌9:552、2007)
2. 小島洋子、川畑拓也、森 治代、大國 剛、大阪近隣の未治療新規感染者における薬剤耐性HIV-1の伝播状況、第21回日本エイズ学会学術集会、広島、2007(抄録：日本エイズ学会誌9:554、2007)
3. 小島洋子、川畑拓也、森 治代、大竹 徹、大國 剛、大阪府内のSTI関連クリニックにおけるHIV感染初期例、第21回近畿エイズ研究会学術集会、大阪、2007

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



神奈川県における薬剤耐性HIVの調査研究

分担研究者 近藤 真規子 神奈川県衛生研究所

研究協力者 相楽 裕子¹、岩室 紳也²、今井 光信³

¹横浜市立市民病院、²厚木市立病院、³神奈川県衛生研究所

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年から2007年の2年間に主として神奈川県内の医療機関に来院した新規HIV感染者97名について薬剤耐性変異の解析を行った。IAS-USA(2007)リスト、Shafer's criteria、スタンフォードデータベースに基づき薬剤耐性変異の有無を調べた結果、薬剤耐性関連変異を有する症例が5例(RT領域4例、PR領域1例)検出され、薬剤耐性変異の出現頻度は5.2%であった。変異の種類は核酸系逆転写酵素阻害剤(NRTI)のAZT耐性変異215YFのリバートANT215Xが3例、非核酸系逆転写酵素阻害剤(NNRTI)の耐性変異V179Eが1例、プロテアーゼ(PR)領域にプロテアーゼ阻害剤(PRI)ATVの耐性関連変異(M46I、L33V、I62V、I93L)が1例であった。これら5名は全て男性で、サブタイプはB、感染経路は同性間4名、異性間1名で、5名の内4名は日本人、同性間の1名は外国人であった。

今回の調査では2005年までの調査に比較して、薬剤耐性関連変異の出現頻度が増加傾向にあること、耐性変異の種類が多様化している傾向が見られること等が確認され、今後は薬剤耐性株の実態を把握するとともに耐性株蔓延の防御対策も重要となると考えられた。

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。欧米では薬剤耐性ウイルスによる感染が広がりつつあり、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いる。日本においては2004年から調査が開始され、2003年から2005年の調査で新規HIV感染者の約5%に薬剤耐性変異が認められることが明らかとなった。日本でのこの数字は欧米に比べまだ低いものの、薬剤耐性ウイルスの蔓延を制御するためにも継続した調査は重要である。

我々は、薬剤耐性HIVの発生動向把握とその増加

を抑制するため全国規模での調査に参加し、主として神奈川県内の医療機関を受診した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年から2007年の2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97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)によりプロテアーゼ(PR)および逆転写酵素(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(2007)リスト、Shafer's criteria、スタンフォードデータベースを基にプロテアーゼ阻害剤 (PRI: IDV、LPV、RTV、SQV、NFV、FPV、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について解析した。

また、同時にスタンフォードデータベース (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 領域のサブタイプ型別を行った。スタンフォード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。

env C2V3 領域については塩基配列決定後、neighbor-joining 法による系統樹を作成しサブタイプを決定した。

(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(2007)リスト、Shafer's criteria、スタンフォードデータベースに基づき 97 名の HIV-1 pol 領域のアミノ酸について解析した結果、PR 領域に 1 例、RT 領域に 4 例、計 5 例に薬剤耐性関連変異が認められ、耐性検出頻度は 5.2% であった (表 1、表 2)。

PR 領域に Major 耐性変異である M46I の見られた 1 例は、同時に複数の Minor 変異を有しており、スタンフォードデータベースにより PRI に対する耐性度は ATV、NFV に low-level resistance (5 段階評価の 3 番目)、FPV、IDV、LPV、TPV に Potential low-level resistance (5 段階評価の 4 番目) と判定された。

RT 領域に耐性関連変異の認められた 4 例の内 3 例には AZT 耐性に関する 215YF のリバータント変異である 215C/D/S が検出され、1 例に NNRTI に対する耐性変異 V179E が検出された。

97 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 73 名と最も多く、次いでサブタイプ AE が 16 名、A が 5 名、C が 2 名、D が 1 名であった。

感染経路別では、男性同性間性行為感染が 47 名 (日本人 43 名、外国籍 4 名)、異性間が 39 名 (日本人 30 名、外国籍 9 名)、その他 3 名、不明 8 名 (日本人) であった。

耐性関連変異の認められた 5 名は全て男性で、サブタイプは B、感染経路は同性間 4 名、異性間 1 名で、5 名の内 4 名は日本人、同性間の 1 名は外国人であり、4 名の日本人には RT 領域に耐性変異が、1 名の外国

表 1 薬剤耐性変異の認められた 6 例の詳細 (2006-2007 年)

陽性判明年	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
2006	日本	男性	同性間	B	E35D, L63P, A71T, I93L	M41L, T215C
	USA	男性	同性間	B	L33V, E35G, M36I, M46I, I62V, L63T, I64V, T74A, I93L	-
	日本	男性	異性間	B	L63A, V82I, I93L	T215S
2007	日本	男性	同性間	B	I13V, L63P, V77I, I93L	T215D, V179I
	日本	男性	同性間	B	L63P, H69K, V77I	V179E

表 2 新規 HIV 感染者 97 名から検出された薬剤耐性関連変異検出頻度 (2006-2007 年)

陽性判明年	解析数 (人)	耐性変異出現人数*	薬剤耐性関連変異	
			Pro	RT
2006年		1:同性間	-	M41L, T215C
		1:同性間	M46I	-
		1:異性間	-	T215S
2007年		1:同性間	-	T215D
		1:同性間	-	V179E
合計(人)	97	5(5.2%)		