



研究要旨

横浜および近郊における薬剤耐性HIVの調査研究

研究分担者 石ヶ坪良明 横浜市立大学大学院医学研究科 病態免疫制御内科教授
 研究協力者 上田敦久 横浜市立大学附属病院 リウマチ血液感染症内科 准教授

平成20年に当院を初診したHIV感染患者は21人であった。このうち16人が当院初診の前後で新規に感染が判明した未治療患者であった。患者同意の基に11名の患者を対象に薬剤耐性検査とBEDアッセイを施行した。薬剤耐性変異に関しては10名中1名の患者からプロテアーゼ領域にM46Iの変異を有するウイルスが確認された。BEDアッセイに関しては11名中ODn値が0.8以下の者が3名であった。うち1名は病歴から最近の感染が疑われる者で、他2名はAIDS発症例であった。本年度は治療中の慢性感染患者の耐性変異に関しても解析を加えた。

A. 研究目的

新規感染患者の薬剤耐性ウイルスの出現動向に関する全国的な疫学調査に参加するにあたり、神奈川県南部の診療圏で中核的役割を果たす当院を受診する患者を対象に解析を行うものである。又、昨年より行っているBEDアッセイを本年度も継続して施行し、感染時期を推定するにあたり、その有用性を計るデータの蓄積を行うこととした。さらに本年度は当院での治療中に薬剤耐性を認めた患者に関してその耐性変異を経時的にまとめ、慢性患者の多剤耐性HIVウイルスに関するデータの収集も試みた。

B. 研究方法

新規感染患者の薬剤耐性検査

2008年度に当院を新規感染患者として受診したHIV感染患者16人のうち、研究の内容に同意が得られた10名を対象に薬剤耐性検査を行った。当院でサンプリングした後に、解析は国立感染症研究所エイズ研究センター第2研究グループで行われた。

新規感染患者のBEDアッセイ

2008年度に当院を新規感染患者として受診したHIV感染患者16人のうち、研究の内容に同意が得られた11名を対象に薬剤耐性検査及びBEDアッセイ

を行った。患者血清中のIgGのうちHIV特異的IgGの占める比をCalypte® HIV-1 BED incidence EIA キット (Calypte Biochemical Co., Rockville, MD) を用いて調べた。

治療中の慢性感染患者の薬剤耐性検査

2000年から2007年の間に当院受診中のHIV感染患者のうち、同意の基に行われた薬剤耐性検査において耐性変異が認められた15名について、匿名化の後に治療歴、耐性検査の結果を抽出し経時的に解析した。

開発及び研究の対象となる個人への不利益及び危険性への配慮

サンプリングは採血のみであり、多くは他の検査項目と一緒にされる。解析の結果はその患者診療において有用であり、不利益な点はない。情報の扱いには細心の注意が払われる。施設から出る情報は匿名化されたものを用い、個人を特定しうる情報の流出はない。登録に先立って、担当医は患者本人に当院の倫理委員会で承認された説明文書を患者本人に渡し、研究の目的、研究に協力いただいたときの利益と不利益、参加の方法と内容、研究調査研究の適切な運営と情報の保護、研究成果の公表、協力していただくことを説明し、同意のもとに行われた。

C. 研究結果

新規感染患者の薬剤耐性検査

2008年度に当院を初診したHIV感染患者は21人であった。2007年は29人であり、当院における初診患者数の増加傾向はない。これら最近2年間に初診した50名の居住地を調べると横浜南部、三浦半島から湘南地域にわたる神奈川県南東部が当院の主な診療圏と判る。2008年の21人のうち、16人が当院を初診する前後にHIV感染症が判明した新規感染患者であった。このうち6人がAIDSを発症していた。10名に対して薬剤耐性検査を施行した(表1)。治療に影響を持つ変異として1名からM46Iの変異が検出された。その他の9人には臨床問題となる耐性変異は認めなかった。

新規感染患者のBEDアッセイ

2008年度新規感染患者16名のうち11症例についてBEDアッセイを行った(表1)。最近の感染の可能性を示唆するODn値0.8以下は3人(27%)であり、昨年の44%と比較して少なかった。このうち諸検査及び臨床歴より感染時期が最近と推測しえた症例は1例のみであり、他2症例は感染時期の特定はなされていない。他2症例はAIDS発症例(単純ヘルペス、非結核性抗酸菌症)であり、むしろ進行例と推測された。

治療患者における薬剤耐性

2000年から2007年の間に、当院において薬剤耐性検査から耐性変異が確認された患者は15名であった。1例は2007年に当院を初診した未治療新規感染患者から確認されたrtT215Sの変異であり、他14名は治療中にウイルス学的失敗の原因としての確認された耐性変異であった。2名からはNRTI, NNRTI, PIの3系統に耐性を有する多剤耐性HIVが確認された。経時的に使用薬剤と耐性変異を図1、図2にまとめた。いずれの症例も2008年度にサルベージされ、CD4陽性細胞数は増加傾向であり症例1(図1)についてはVLも検出限界以下となっている。

D. 考察

当院では本調査研究に参加するにあたり、2007年度より新規感染患者と診断された患者のうち同意が得られた者全例を対象に初診時もしくは初診より月日の離れない2ないし3診目に薬剤耐性検査及びBEDアッセイを施行することとした。昨年末に当院を初診された1名よりrtT215Sの耐性が確認されたが、今年も1名よりproM46Iの薬剤耐性変異が確認された。解析は2007年度の16例、2008年度の10例の計26例であり、耐性の出現は7.7%となっている。感染時期の推測のためにBEDアッセイも昨年より引

表1 2008年度 新規感染患者における薬剤耐性変異とBEDアッセイ

症例	PI	RT	ODn	AIDS発症
1	I15V	(-)	0.12	なし
2	I15V, I62I/V, V77I	(-)	0.24	あり
3	L63P, V77I	(-)	2.97	あり
4	M36M/I	(-)	2.68	なし
5	V77I	(-)	1.52	なし
6	D60D/E, I62V, L63P, V77I	(-)	1.47	なし
7	G16E, K20R, M36I, I62V, L63P, V77I	V179V/D	2.73	あり
8	I15V	(-)	0.95	なし
9	I15V, M36M/I, D60D/E	V179V/D	0.36	あり
10	M46M/I, I62V	(-)	1.05	なし
11	ND	ND	2.44	あり

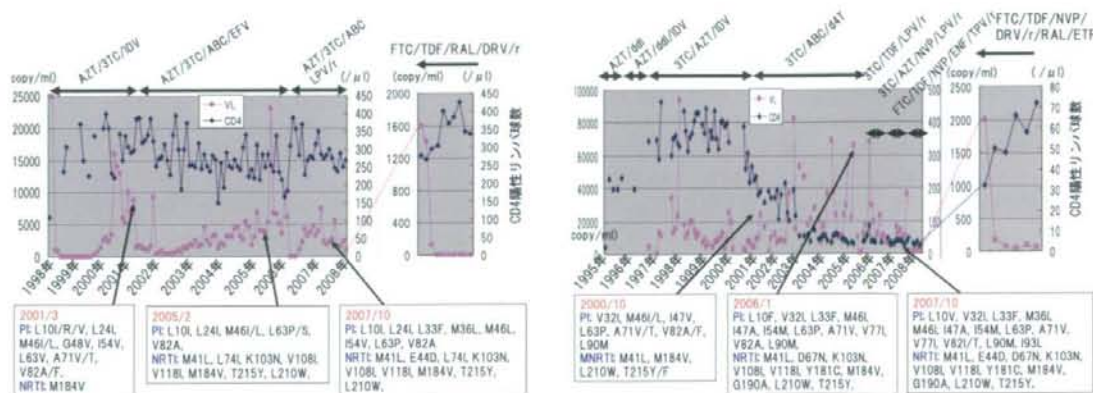


図1

図2

き続き行われた。11名中3名が最近の感染を示唆する結果(ODn値0.8以下)であったが、うち2名はAIDS発症進行例であり、臨床歴からも感染より日時が経っていることが推測されるものであった。本年度は治療中の慢性感染患者の耐性変異の解析も行った。14名においてウイルス学的失敗があり、2名においては3系統の多剤耐性変異が確認されたが、こういった症例に関しても、最近本邦でも使用が可能となっている Darnavir, Raltegravir, Etravirine, Maraviroc等の新規薬剤の出現により予後改善が期待しうると考えられた。

E. 結論

神奈川県東南部に診療圏を持つ横浜市立大学附属病院の新規感染患者、さらには治療中の慢性感染患者を対象に薬剤耐性変異及びBEDアッセイを施行した。耐性変異の動向を明らかにするために今後データの蓄積を継続すべきと考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 石ヶ坪良明、上田敦久、【ウイルス感染とアレルギー】 HIV感染症とアレルギー、アレルギーの臨床(0285-6379)28巻3号 Page205-209(2008.03)
2. Naganawa S, Yokoyama M, Shiino T, Suzuki T, Ishigatsubo Y, Ueda A, Shirai A, Takeno M, Hayakawa S, Sato S, Tochikubo O, Kiyoura S, Sawada K, Ikegami T, Kanda T, Kitamura K, Sato H. Net positive charge of HIV-1 CRF01_AE V3 sequence regulates viral sensitivity to humoral immunity. PLoS ONE, 2008 Sep 12;3(9):e3206

2. 学会発表

1. 上田敦久、須田昭子、岡秀昭、内田大介、中仙道重弥、安達理恵、竹林早苗、小田みどり、松山奈央、沓名明子、白井輝、石ヶ坪良明、当院で経験されたHIV/結核重複感染症25症例の臨床像、第22回日本エイズ学会学術集会、2008.11 大阪
2. 須田昭子、上田敦久、中仙道重弥、安達理恵、竹林早苗、小田みどり、松山奈央、沓名明子、筑丸寛、白井輝、石ヶ坪良明、Backbone drugとしてStavudine(d4T)より他のNRTIに変更した場合の脂質マーカーの変動について、第22回日本エイズ学会学術集会、2008.11 大阪
3. 中仙道重弥、上田敦久、須田昭子、安達理恵、竹林早苗、小田みどり、松山奈央、沓名明子、筑丸寛、白井輝、石ヶ坪良明、HAART初回療法導入84症例における導入後の脂質マーカーの

変動について、第22回日本エイズ学会学術集会、2008.11 大阪

4. 筑丸寛、上田敦久、松井義郎、小森康雄、泉福英信、金子明寛、池田正一、藤内祝、神奈川県HIV菌科診療ネットワーク運用開始後2年間の検討、第22回日本エイズ学会学術集会、2008.11 大阪
5. 上田敦久、桐野洋平、加藤英明、井畑淳、浜真麻、須田昭子、岡秀昭、岳野光洋、石ヶ坪良明、腸結核、回腸穿孔、汎発性腹膜炎より発症した後天性免疫不全症候群の一例、第59回神奈川感染症医学会、2008.3 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

研究分担者 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 仙台医療センター臨床検査技師

平成19年度(平成19年12月～平成20年3月)及び平成20年度(平成20年4月～11月まで)「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、検査可能であった新規感染者6症例中2例でNNRT領域に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治療薬を選択する上でHIVの薬剤耐性変異の検出は重要である。

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动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や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の発生动向を把握するため、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12月～平成20年11月の症例分について報告する。

B. 研究方法

平成19年12月～平成20年11月の期間に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

仙台医療センターにおける平成20年11月末日までのHIV/AIDS感染者の累計は176名(一年で15例の増加)である。東北全体での平成20年11月までの累計では336名で、全国と同様に増加している。平成19年4月～平成20年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6例であった。6例すべて日本国籍(日本人)の男性(MSM:3例、異性間3例)で、年齢は23歳から43歳まで分布した。AIDS発症4例、キャリアー2名。耐性検査時のHIVウイルス量は $2.9 \times 10^4 \sim > 1.0 \times 10^5$ コピー/ml、CD4は $10 \sim 510$ / μ l。ウイルスのsubtypeではすべて「B」であった。

耐性変異は6例中2例に認められた。すなわち、RT領域においてV179D:1例、V106LV:1例、V176DV:1例(V106LDとV179DVは同一症例)であった。また耐性と同定はされないもののminorな変異が多数検出された。RT領域の耐性変異が検出された症例ではHAART開始時のkey drugの選択にprotease inhibitorが選択された。

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(HAART)開始時に耐性ウイルスの存在の有無を確認することはその後のさらなる耐性出現を防ぐ上で重要である。実際の症例で耐性変異の情報が薬剤選択に利用された。近年耐性克服を考慮した新薬が開発され、臨床に供されるようになってきており、これら薬剤に対する耐性ウイルスの出現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、耐性変異の情報は薬剤選択上重要であり今後もサーベイが必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. NeuroAIDSの発症病態と治療法の開発を目指した長期フォローアップ体制の構築研究: AIDS合併クリプトコッカス髄膜炎の発症病態及び治療法の開発に関する研究、平成19年度厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業 平成19年度総括・分担研究報告書(主任研究者: 中川正法)16-18、2008、3月

2. 男性同性間のHIV感染対策とその評価に関する研究: 東北地域における同性間のHIV/STI感染予防啓発の普及促進に関する研究、平成19年度厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業 平成19年度総括・分担研究報告書(主任研究者: 市川誠一)33-41、2008、3月
3. 薬剤耐性HIVの動向把握のための調査体制確立及びその対策に関する研究: 東北ブロックにおける薬剤耐性HIVの調査研究、平成19年度厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業 平成19年度総括・分担研究報告書(主任研究者: 杉浦 互)40-42、2008、3月
4. HIV感染症の医療体制の整備に関する研究: 東北ブロックのHIV医療体制整備、平成19年度厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業 平成19年度総括・分担研究報告書(主任研究者: 岡 慎一)26-29、2008、3月

2. 学会発表

1. 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、藤井 毅、岩本愛吉、藤野真之、仲宗根正、巽 正志、椎野慎一郎、岡慎一、林田庸経、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、大家正義、田邊嘉也、渡辺香奈子、渡邊 大、白阪琢磨、柴原 健、森治代、小島洋子、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: 2003-2007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、2008年、大阪
2. 伊藤俊広、佐藤 功、突田健一、成川孝一、鈴木靖士: HIV感染症におけるクリプトコッカス髄膜炎再燃例に対するイトラコゾールの使用経験: 日本エイズ学会、2008年、大阪
3. 疋田美鈴、武藤 愛、佐藤 功、伊藤俊広、西巻雄司、鈴木智子、佐藤愛子、小倉美緒: 宮城県におけるHIV感染者の在宅医療等に向けての基本調査: 日本エイズ学会、2008年、大阪
4. 小住好子、佐藤ともみ、佐藤麻希、後藤達也、諏江 裕、伊藤俊広、佐藤 功: 当院における抗HIV療法(ART)の薬剤選択の変遷: 日本医療薬学会年会 2008年

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

なし

2. 実用新案特許

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

研究分担者 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
治療開発室長

研究協力者 林田 庸総 国立国際医療センター エイズ治療・研究開発センター
リサーチレジデント

国立国際医療センター エイズ治療・研究開発センター（ACC）において、平成20年1月から11月の間に、163人のHIV-1感染者が新規に診断された。この163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、10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K103Nが2人、V108Iが2人、T215Eが1人、プロテアーゼ領域のM46I/Lが5人、であった。サブタイプは、Bが151人、AEが9人、Cが1人、Gが2人であった。BEDアッセイを行ったところ、そのうちの53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ACC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承認されている(IMCJ-H13-80)。

C. 研究結果

163人のHIV-1感染者が新規に診断された。この163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、10人(6.1%)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K103Nが2人、V108Iが2人、T215Eが1人、プロテアーゼ領域のM46I/Lが5人、であった。サブタイプは、Bが151人、AEが9人、Cが1人、Gが2人であった。BEDアッセイを行ったところ、そのうちの53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、年々増加傾向にあり、感染早期に診断される例が増えてきているといえる。

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

- Hachiya A, Kodama E, Sarafianos SG, Schuckmann MM, Sakagami Y, Matsuoka M, Takiguchi M, Gatanaga H, Oka S. Amino acid mutation N348I in the connection subdomain of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase confers multiclass resistance to nucleoside and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *J. Virol.* 82: 3261-3270, 2008.
- Hayashida T, Gatanaga H, Tanuma J, Oka S. Effects of low HIV-1 load and antiretroviral treatment on IgG -captured BED-enzyme immunoassay. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 24: 495-498, 2008.
- Gatanaga H, Honda H, Oka S. Pharmacogenetic information derived from analysis of HLA alleles. *Pharmacogenetics* 9: 207-214, 2008.
- Tanuma J, Fujiwara M, Teruya K, Matusoka S, Yamanaka H, Gatanaga H, Tachikawa N, Kikuchi Y, Takiguchi M, Oka S. HLA-A*2404-restricted HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and escape mutation after AER with structured treatment interruptions. *Microbes Infect.* 10: 689-698, 2008.

2. 学会発表

- 湯永博之、シンポジウム「HIV 感染症治療の最前線」進化した抗 HIV 療法と残された問題 日本感染症学会総会 2008年4月
- 林田庸総、湯永博之、田沼順子、本田元人、後藤耕司、菊池嘉、岡慎一 HIV-1 感染者における BED アッセイに対するウイルス量と抗 HIV-1 治療の影響 日本感染症学会総会 2008年4月
- 田沼順子、大金美和、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、瓜生英子、山中純子、国方徹也、宮澤廣文、松下竹次、源河いくみ 当院における HIV 合併妊娠に対する抗レトロウイルス療法 日本感染症学会総会 2008年4月
- 柳沢邦雄、本田元人、湯永博之、仲村秀太、後藤耕司、渡辺恒二、神村麻穂子、渡辺珠代、塚田調久、田沼順子、矢崎博久、本田美和子、照屋勝治、立川夏夫、菊池嘉、岡慎一 Fluconazole (FLCZ) と Micafungin (MCFG) の併用療法が有効と考えられた HIV 感染者における *Candida albicans* 脊椎炎の一例 日本感染症学会総会 2008年4月
- 周東翔、原口日和、湯永博之、森川裕子 非スクレオシド系逆転写酵素阻害剤エファビレンツによる HIV 粒子形成阻害機構 日本ウイルス学会 2008年10月
- 中村春香、渡辺恒二、塚田調久、矢崎博久、田沼順子、本田美和子、湯永博之、照屋勝治、菊池嘉、岡慎一 糞線虫症をきたしイベルメクチン内服が奏功した HIV 感染タイ人女性の1例 日本感染症学会東日本地方学術集会 2008年10月

- 青木孝弘、塚田調久、渡辺珠代、本田美和子、照屋勝治、湯永博之、菊池嘉、岡慎一 HAART 開始時よりステロイド併用し PML の免疫再構築に備えた1例 日本感染症学会東日本地方学術集会 2008年10月
- 湯永博之、新規標的に対する抗ウイルス薬の臨床的意義—日常臨床への新薬導入—我が国における新薬導入の課題 日本エイズ学会総会 2008年11月
- 湯永博之、抗 HIV 薬治療の変遷と PI の位置づけ 日本エイズ学会総会 2008年11月
- 今村顕史、湯永博之、花房秀次、日笠聡 HIV 感染症「治療の手引き 第12版」エキスパートに聞く—処方に対する考え方 日本エイズ学会総会 2008年11月
- 今村顕史、小田原隆、湯永博之、小島賢一、村松崇、榎谷法生、中田たか志 現在の HIV 診療が抱える他科連携の問題点を総括する 日本エイズ学会総会 2008年11月
- 本田元人、湯永博之、西島健、青木孝弘、中村春香、田里大輔、柳沢邦雄、渡辺恒二、神村麻穂子、渡辺珠代、塚田調久、矢崎博久、田沼順子、本田美和子、照屋勝治、菊池嘉、岡慎一 Warfarin と抗 HIV 薬併用症例の検討 日本エイズ学会総会 2008年11月
- 田里大輔、中村春香、西島健、青木孝弘、柳沢邦雄、神村麻穂子、渡辺恒二、渡辺珠代、本田元人、塚田調久、矢崎博久、田沼順子、本田美和子、照屋勝治、湯永博之、菊池嘉、岡慎一 当センターで経験した HAART 時代の AIDS 関連カポジ肉腫 90 例の検討 日本エイズ学会総会 2008年11月
- 渡辺珠代、安岡彰、中村春香、青木孝弘、西島健、田里大輔、神村麻穂子、渡辺恒二、本田元人、矢崎博久、田沼順子、塚田調久、本田美和子、湯永博之、照屋勝治、菊池嘉、岡慎一 当院における HAART 時代の日和見感染症の動向 日本エイズ学会総会 2008年11月
- 蜂谷敦子、嶋根和毅、児玉栄一、小泉寛和、湯永博之、松岡雅雄、滝口雅文、岡慎一 逆転写酵素 connection と RNase H subdomain の多様性と薬剤感受性に及ぼす影響 日本エイズ学会総会 2008年11月
- 神村麻穂子、中村春香、西島健、青木孝弘、田里大輔、渡辺恒二、渡辺珠代、本田元人、矢崎博久、塚田調久、田沼順子、本田美和子、湯永博之、照屋勝治、菊池嘉、岡慎一 HBs 抗原陽性 HIV 患者に導入した TDF/3TC (FTC) を含む抗 HIV 療法の効果 日本エイズ学会総会 2008年11月
- 高橋佳子、池田和子、島田恵、今井公文、湯永博之、岡慎一 HIV 感染症患者における非就労の背景要因に関する研究 日本エイズ学会総会 2008年11月
- 八楯類子、杉野祐子、島田恵、荒井理那、伊藤紅、石垣今日子、山田由紀、武田謙治、大金美

- 和、池田和子、遠藤貴子、西垣昌和、数間恵子、湯永博之、岡慎一 HIV/AIDS患者の脂質代謝コントロールのための健康行動支援の検討 日本エイズ学会総会 2008年11月
19. 塚田訓久、青木孝弘、田里大輔、中村春香、西島健、神村麻穂子、柳沢邦雄、渡辺恒二、渡辺珠代、田沼順子、本田元人、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 新規抗HIV薬の使用経験と有害事象 日本エイズ学会総会 2008年11月
20. 渡辺恒二、中村春香、青木孝弘、西島健、田里大輔、柳沢邦雄、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、本田美和子、湯永博之、照屋勝治、菊池嘉、岡慎一 当院におけるアタザナビル使用473症例の検討 日本エイズ学会総会 2008年11月
21. 矢崎博久、中村春香、青木孝弘、西島健、田里大輔、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、菊池嘉、岡慎一 当院での新規抗HIV薬の変遷とFPV投与者の経過について(続報)日本エイズ学会総会 2008年11月
22. 照屋勝治、西島健、中村春香、田里大輔、青木孝弘、渡辺恒二、柳沢邦雄、神村麻穂子、渡辺珠代、塚田訓久、本田元人、矢崎博久、田沼順子、本田美和子、湯永博之、菊池嘉、岡慎一 HIV合併結核における抗結核薬の有害事象についての検討 日本エイズ学会総会 2008年11月
23. 林田庸総、湯永博之、菊池嘉、岡慎一 当センターにおけるBEDアッセイを用いた2003年と2007年以降の新規患者の解析 日本エイズ学会総会 2008年11月
24. 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、真升健志、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、藤井毅、岩本愛吉、藤野真之、仲宗根正、巽正志、椎野慎一郎、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、大家正義、田邊嘉也、渡邊香奈子、渡邊大、白阪琢磨、栗原健、森治代、小島洋子、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 2003-2007年の新規HIV-1感染者における薬剤耐性頻度の動向 日本エイズ学会総会 2008年11月

3. その他

なし。

II. 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。



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

研究分担者 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 北海道大学大学院保健科学研究院病態解析学分野 教授
 吉田 繁 北海道大学大学院保健科学研究院病態解析学分野 助教

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。2008年(1-12月)の北海道大学病院を新規受診したHIV感染者は28名であり、そのうち新規発症者は14名であった。2008年は初診時にAIDSを発症している患者は3名(21%)であった。薬剤耐性変異については新規感染者からの高度耐性変異を有するHIVは検出されなかった。新規感染者数は増加傾向にあることから感染拡大の防止のために、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の発生动向把握のため、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2008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

2008年1月～12月に北大病院を新規受診したHIV感染者は28名であり、そのうち新規発症者は14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2008年1月～10月の新規HIV感染者は16名であり、同期間での本院での新規HIV感染者は14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88%であった。新規感染者14名はすべて男性であり、年齢は30～39歳が最も多く7名(50%)であった。感染経路は同性間8名(57%)、異性間3名(21.5%)不明3名(21.5%)であり、受診時の病期はHIV感染11名(79%)、AIDS期3名(21%)であった。

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14名中13名(93%)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)。しかしながら高度耐性変異は確認されなかった。SubtypeはBが12名(86%)、Gが1名(7%)CRF06が1名(7%)であった。

D. 考察

2008年に北大病院を受診した新規感染者数は過去最高であった。北海道ブロックは毎年10-20名の新規感染者があり、年々、確実に増加している。2007年12月よりHIV検査・相談所サークルさっぽろが札幌市の中心街に開設された。本年は本施設により4

名の感染者が検出されていることから、北海道の新規感染者数は少ないものの、潜在的な感染者が多く存在することが予想される。

2008年は高度耐性変異を有するHIVは検出されなかった。確認されたマイナー変異も特徴的な変異や頻度は見られなかった。本年度は過去最高の新規感染者数であったことは、サークルさっぽろなどHIV抗体検査体制の充実にあると思われる。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

2008年度に北大病院を受診した新規感染者数は過去最高であった。

高度耐性変異を有するHIVは検出されなかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得

なし

実用新案登録

なし

その他

なし

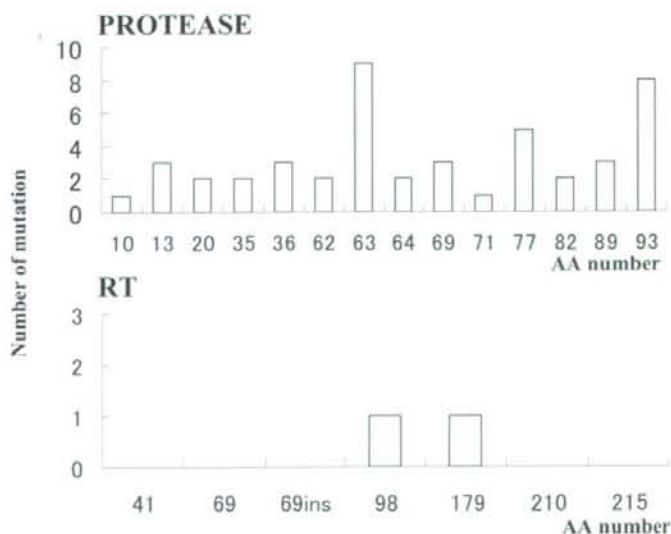


図1 2008年新規HIV感染者から検出された薬剤耐性変異
Major mutation (■), minor mutation (□)



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

研究分担者 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Naiveウイルスに適用して感染性分子クローンを樹立し、薬剤耐性試験における標準クローンを整備している。本年度は国内未治療感染者由来のsubtype B 14株及びCRF01_AE組換体 2株のウイルスから樹立した29クローンについて薬剤に対する反応性を比較し、今後のPol遺伝子領域の組換体ウィルス作製の基本骨格となる親クローンを選定した。これらのクローンの薬剤耐性プロファイルは実験室株クローンNL4-3と比較して相対的に多くの薬剤により感受性であった。主要な国内感染症例を構成するsubtype BとCRF01_AE組換体の親株になりうるクローンとその組換え戦略を提示する事により感染性分子クローンを用いた薬剤耐性試験法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。本年度は特にNaiveウイルス由来感染性分子クローンの薬剤耐性プロファイルを解析し、今後の組換体作製における親株の選定と組換え戦略の立案に焦点を絞って検討した。

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グループが分離した国内未治療感染者検体及び済研究室で日赤献血由来検体から分離したsubtype B (14株) 及びCRF01_AE組換体ウイルス (2株) である。

まず末梢血リンパ球の共培養で分離したウイルス、もしくはMAGIC-5A磁気ビーズ法により分離したウイルスを感染させた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HIV-1 Cloningのために構築したpMT1もしくはpMT4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-1 Genome 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つた。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ものと判断した。

C. 研究結果

国内未治療感染者由来ウイルスと日赤献血由来ウイルスから樹立した感染性分子クローンの成績の一覧を表1及び表2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下流半分は表に示す6塩基認識制限酵素認識配列を含むPol からVpr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あるいはpMT4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 (pMT1 Vector)もしくはMlu I site (pMT4 Vector)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半分程のクローンがMAGIC-5A細胞で感染性を示し、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、各ウイルスについては各1から2

クローン計29クローンを選定し、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亘ってsubtype BもしくはCRF01_AE組換体の特性を示していた。

これら樹立した感染性分子クローン由来ウイルスの薬剤耐性プロファイル、実験室株プロトタイプであるNL4-3株と比較した(表3)。この薬剤耐性プロファイルは我々が開発したMAGIC-5A細胞株とMAGIC-5/SEAP細胞株を用いた薬剤耐性Phenotype Assay系で既に実用化している。NL4-3株を標準として、それぞれの薬剤に対する耐性度を算定するとクローン毎に若干の違いはあるが、多くの薬剤でNL4-3株より感受性を示す事が判明した。

Los Alamos HIV Databaseに登録されている配列情報に拠ると、HIV-1 subtype B ウイルスゲノムにはSal I siteが認められる検体が少なからず存在するが、CRF01_AE組換体ウイルスゲノムでは稀である。また6塩基配列認識酵素Mlu I siteと8塩基配列認識酵素Not I siteはHIV-1ゲノムには殆ど認められない。これらのことから、HIV-1 subtype B ウイルスクローン構築のために新たにMlu IとNot Iに幾つかの6塩基認識配列酵素部位をMulticloning SiteにもつpBR322を基本骨格にもつpMT4 Cloning Vectorを構築した(図1)。この新たなVectorを用いることによりHIV-1 subtype B ウイルスクローン樹立効率は格段に上がった。

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、国内感染者から分離したNaiveなCRF01_AE組換体及びsubtype B ウイルス検体から29クローンの感染性分子クローンを樹立された。これらのクローンの薬剤耐性プロファイルは、その扱い易さから組換体作製によるPhenotypic Assayに汎用されている実験室株NL4-3と比較すると、多くの薬剤で耐性度がより低かった。このことは臨床株ウイルスから樹立した我々のNaive Cloneの方が、薬剤耐性度をより鋭敏に捉える事が出来る可能性を示していると考えられる。

また国内感染例が多いHIV-1 subtype Bの感染性クローン構築に当たって、ウイルスゲノム内に当初Half & Half Strategyで5'LTR側のRare CutterとしていたSal I siteがsubtype Bで多い事から、より効率的なクローン樹立の為に新たにpMT4 Cloning Vectorを構築した。

これらのNaive Cloneの薬剤耐性プロファイルと各subtype/CRF HIV-1ウイルスでより保存されている領域を勘案してnon-B subtypeのうち国内感染例が多いCRF01_AE組換体ウイルスに適した組換え用親株と

表1 17 Infectious Molecular Clones Derived from Primary Isolates of Treatment-Naïve Patients as Candidates of Standard Clones for Construction of Recombinant DR Clones

HFV Database Accession No.	DR No.	Patient Code	Sex	Blood Date	Treatment	CD4	Viral Load	Subtype	Cloning Vector	Cloning Primer/Enzyme X	Resistant Mutation
AB253426, AB253427	6824	NH2047-170844	Male	2005.5.20	None	?	314,900	AE	pMT1	AE-pst75(+)EcoRI	None
AB221005	6073	NH0015-521	Male	2004.7.29	None	209	60,900	B	pMT1	BF-pyr567(+)NeoI	None
AB221125, AB221126	6075	NH0305-018	Male	2004.7.30	None	434	3,400	B	pMT1	BF-pyr567(+)NeoI	None
AB286955, AB286956	6089	NH2000-028	Male	2004.8.10	None	66	342,100	B	pMT1	BF-pyr567(+)NeoI	A71T
AB287363	5538	NH2047-151960	Male	2005.3.1	None	123	8,800	B	pMT1	BF-pyr567(+)NeoI	None
AB287364, AB287365, AB287366, AB287367	6737	NH2947-1707600	Male	2005.5.23	None	17	31,000	B	pMT1	86273_pyr567(+)NeoI	None
AB287368	7065	NH0020-520	Male	2005.10.11	None	?	1,011,800	B	pMT1	V(B)3/Cla I/Cc	A71T
AB286849, AB286850	5792	NH305-004	Female	2005.10.14	None	55	85,300	B	pMT1	BF-pyr567(+)NeoI	None
pJPD95H13856H	5913	NH0010-0602	Male	2004.3.26	None	182	500	B	pMT1	ZM11200(+)EcoRI	None
pJPD95H13859				2004.5.24	None	?	65,300	B	pMT4	DC30048574(+)SalI hdb28575(+)SalI	A71T

表2 12 Infectious Molecular Clones Derived from Primary Isolates of JRC Plasma as Candidates of Standard Clones for Construction of Recombinant DR Clones

JRC No.	Subtype/CRF		Cloning Vector		Cloning Primer/Enzyme X		Primer R/Rov
	p17_gag	pol_RT	env_G2V3	Clone No.	Primer L/For	Primer R/For	
JRC 3	B (B1)	B (B1)	B (B1)	pJRC3B14 pJRC3B38	Univ-LTR1(+)/Mlu I	HBX2 5803(+)/Sal I	LTR-RS(-)/Not I
JRC 5	B	B	B	pJRC5B15 pJRC5B34	Univ-LTR1(+)/Mlu I	HBX2 5803(+)/Sal I	LTR-RS(-)/Not I
JRC 39	B (B1)	B (B1)	B	pJRC39B49 pJRC39B68	Univ-LTR1(+)/Mlu I	HBX2 5803(+)/Sal I	LTR-RS(-)/Not I
JRC 53	B (B1)	B (B1)	B (B1)	pJRC53B33 pJRC53B67	Univ-LTR1(+)/Mlu I	HBX2 5803(+)/Sal I	LTR-RS(-)/Not I
JRC 85	B	B	B	pJRC65B09 pJRC65B30	Univ-LTR1(+)/Mlu I	HBX2 5803(+)/Sal I	LTR-RS(-)/Not I
JRC 77	CRF01_AE	CRF01_AE	CRF01_AE	pJRC77AE08 pJRC77AE31	Univ-LTR1(+)/Mlu I	AE-pst75(+)EcoRI	LTR-RS(-)/Not I

表3 Phenotypic Profile of Naïve Infectious Clones Compared with pNL4-3

Subtype/CRF	Virus Code	Clone	AZT			MRT7			3TC			ABC			dRc			PJ
			μ M	Fold Resistance	μ M	Fold Resistance	μ M	Fold Resistance	μ M	Fold Resistance	μ M	Fold Resistance	μ M	Fold Resistance	μ M	Fold Resistance		
B	DR6073	pJPD6073B20	0.007	0.3	6.53	0.5	1.275	0.2	0.093	0.8	0.157	0.4	0.415	0.2	0.157	0.4	0.415	0.2
	DR6075	pJPD6073B58	0.007	0.3	0.379	0.3	2.987	0.5	0.133	1.1	0.498	0.1	0.206	0.5	0.723	0.5	0.723	0.5
BF	DR0769	pJPD0769BF03	0.049	2.0	1.717	1.2	0.579	0.1	0.519	4.2	0.948	0.0	0.072	0.2	1.766	0.8	1.766	0.8
	DR6624	pJPD0769BF06	0.006	0.2	0.867	0.6	4.656	0.7	0.550	0.4	2.109	0.4	0.161	0.4	5.249	2.3	5.249	2.3
CRF01_AE	93TH051	pJPD6624AE75	0.021	0.9	0.314	0.2	4.694	0.7	0.277	2.2	1.111	0.3	0.117	0.3	0.322	0.1	0.322	0.1
		pJPD6624AE96	0.012	0.5	0.463	0.3	1.255	0.2	0.165	1.3	1.001	0.4	0.260	0.7	0.369	0.1	0.369	0.1
		p93TH051AE13	0.015	0.6	1.369	1.0	1.752	0.3	0.140	1.1	2.248	0.5	0.302	0.7	0.385	0.2	0.385	0.2
		p93TH051AE27	0.038	1.6	0.423	0.3	4.220	0.6	0.032	0.3	3.555	0.8	0.111	0.3	0.433	0.2	0.433	0.2

Fold resistance, 50% reduction ratio compared with pNL4-3

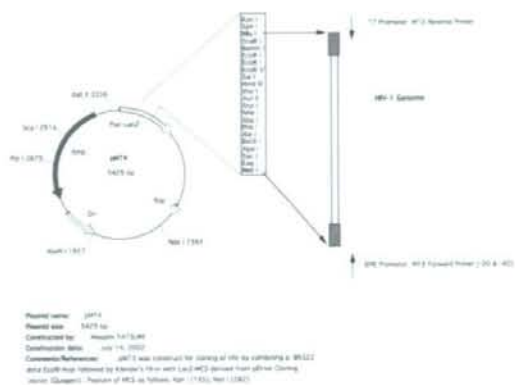


図1 Construction of pMT4 Vector for Stable HIV-1 subtype B Cloning

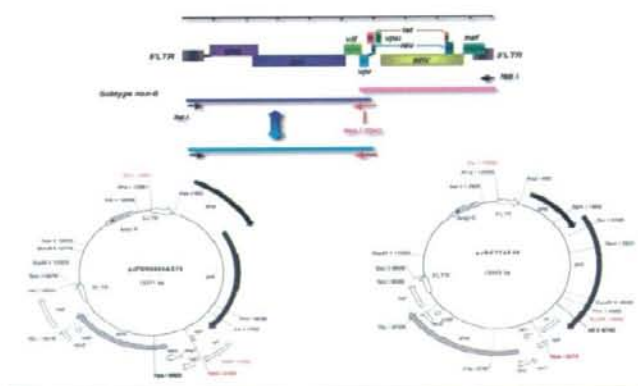


図2 Strategy for Stable Recombinant Drug-Resistant HIV-1 subtype non-B Cloning

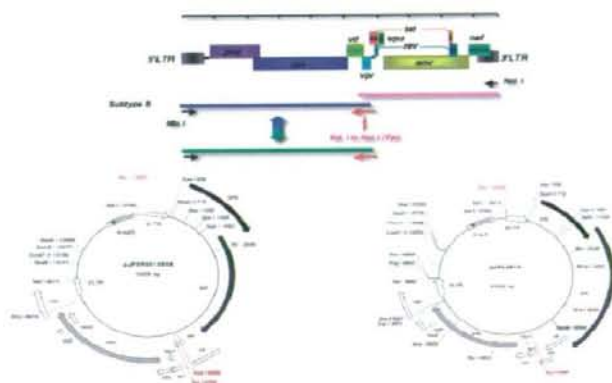


図3 Strategy for Stable recombinant Drug-Resistant HIV-1 subtype B Cloning

して図2に示すpJPDR6824AE75及びpJRC77AE06クローンを選定した。また現在国内感染例が最も多い subtype Bに適した組換え用親株として図3に示すpJPDR5913B59及びpJRC3B14クローンを選定した。これらのクローンを構築過程で利用した赤文字で示したvifからvpr領域に設定したPrimerと5'LTRに設定したPrimerの組合せで各々のsubtype/CRFの5'上流のウイルスゲノムの増幅効率は多くの検体で良好であり、またproteaseの標的であるgag領域も併せて組換える事が可能であることから、共変異などの詳細な解析にも資することが可能であることから薬剤耐性ウイルス解析にとって、より有効な組換え戦略と考えられる。

本研究においては薬剤耐性試験法の標準化に向けて、未治療Naïve臨床分離ウイルス株から感染性分子クローンを樹立した。これら国内感染例から分離した感染性分子クローンは、国内標準株として有用であるばかりではなく、その特性から5'上流Halfゲノムの組換え体の親株として有用である事から今後の国内感染例における薬剤耐性機序解析に有用な基盤を提供する事が期待でき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 subtype/CRF に特化させることにより、より効率的に進化させ国内未治療感染者由来ウイルスからNaïveな感染性分子クローンを樹立し、これらを用いた国内感染例に特化した組換え戦略を示した。

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

1. 巽 正志、梅木優子、竹川奈穂、松田昌和、橋本 修、西澤雅子、石古博昭、杉浦 互、山本直樹 **薬剤耐性ウイルスの感染性分子クローンを軸にしたGenotypeとPhenotypeをつなぐ実験解析系について** 第22回日本エイズ学会 大阪 平成20年11月26日～28日
2. 巽 正志、竹川奈穂、田角栄二、武田 哲、阪井弘治、柚木久雄、百瀬俊也、日野 学、田所憲治、山口一成、水落利明、山本直樹 **日赤献血由来陽性血漿による感染研HIVパネル整備** 第22回日本エイズ学会 大阪 平成20年11月26日～28日
3. 巽 正志、梅木優子、竹川奈穂、水落利明、山

本直樹 **感染性分子クローンによる第4世代抗体・抗原同時測定HIV診断キットの抗原検出感度の比較** 第22回日本エイズ学会 大阪 平成20年11月26日～28日

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし



研究要旨

多剤耐性HIVの調査研究

研究分担者 藤井 毅 東京大学医科学研究所感染免疫内科 講師
研究協力者 宮崎菜穂子 国立感染症研究所 リサーチレジデント

本邦における薬剤耐性HIVの出現状況とその臨床的背景因子を明らかにし、さらに、多剤耐性HIV感染による治療困難症例の実態を把握して、今後の治療選択に役立てることは極めて重要な課題である。本研究では、全国60施設を対象として、ARV服薬者数、耐性患者数、新規ARV使用状況などについて詳細なアンケート調査を行った。総服薬者2715例中、既承認薬ではコントロール不良な多剤耐性症例は51例(1.9%)で、その約半数は多剤併用療法導入以前からの長期治療中の患者であった。サルベージ療法として追加される新薬は、ダルナビルとラルテグラビルの組合せが多かった。一方で、3クラス耐性群の予後は未だに極めて不良であり、全国的な調査・治療支援体制を確立することの重要性が再認識された。

A. 研究目的

多剤併用療法(HAART)により先進諸国ではAIDSによる死亡率が劇的に低下したが、その影で生み出された薬剤耐性HIVの問題は年々深刻化してきている。

薬剤耐性に関連すると考えられる臨床的背景には、服薬率のほかに、処方メニュー、治療変更の回数、日和見疾患合併の有無、治療開始時のウイルス量など様々な因子が存在する。欧米においては、Glassらが血中HIV RNA量と背景因子の解析(JAIDS 41: 385: 2006)、Phillipsらが多剤耐性の患者背景と転機を調査した大規模コホート(The Lancet 370: 1923: 2007)などを発表しているが、本邦においては、このような薬剤耐性の出現と背景因子の関係や、多剤耐性の現状を明らかにした報告はなされてこなかった。しかし、多剤耐性症例、それによる治療困難症例は確実に増えており、本邦でもこれらの現状の調査は急務である。

我々は今後の至適治療選択に役立てることを目的に、治療中のHIV感染者における薬剤耐性変異とその背景因子の全国調査を行っている。

B. 研究方法 (倫理面の配慮) (図1)

(a) 予備調査

調査の前段階として、50施設を対象とした予備調査を行った。内容は、2007年9月時点において、日本国内で承認されている抗HIV薬を使用した治療では、ウイルスコントロールが不良であるHIV感染者数、及び耐性検査の実施状況であった。これを受け、全国60施設を対象とし2系統の調査を行った。

(b) 多剤耐性症例の現状・臨床背景調査

予備調査に基づき、全国25施設を対象として多剤耐性症例の詳細を調査した。即ち、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



図1 調査概要

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、⑩ ART開始前のCD4陽性細胞数、⑪ ART開始前のHIVウイルス量、⑫ ART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、④ CD4陽性細胞数、⑤ HIV RNA量、⑥ ARTメニュー、⑦ HIV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項目の記載を調査した。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。

(c)データベース(DB)追跡調査

2005年度まで薬剤耐性検査を担当してきた国立感染症研究所で、2005年度以前に多剤耐性と判定された症例について、その後の耐性検査実施状況および転帰、を全国50施設で調査した。調査内容は、① 2006年 (保険収載年)以降の耐性調査回数、② 転帰、③ 治療中の抗HIV薬、④ 直近のCD4陽性Tリンパ球数、⑤ 直近のHIVウイルス量とした。

尚、以上の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で可とするなど特定の個人が特定されないよう十

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に、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して行った。

C. 研究結果

- (a) 既存の抗HIV薬ではVLのコントロールが不良な症例は全国で51症例報告され、これは調査機関における総服薬者の1.9%に相当した (図2)。
- (b) 多剤耐性症例の背景としては、全員が国内感染、全員が男性であった。また半数は1990年代のHAART導入以前より治療が開始されていた。多剤耐性に対するサルベージ療法として追加される新薬は、ダルナビル+ラルテグラビルの2剤を併用した組み合わせが多かった (図2)。
- (c) 2005年以前に感染研で多剤耐性と判定された症例195症例の問い合わせに対し、160症例の回答が得られた。そのうち、2006年以降耐性検査を必要としたのは25%であった。この再検査実施率を耐性クラス別で分けると、1クラス耐性群27.4%、2クラス耐性群で18.0%、3クラス耐性群で28.6%であった。同じく、元のVL別で分けると、400コピー/ml未満では17.8%、400-1000コピー/mlでは16.7%、3logでは22.9%、4logで

【T-20などの未承認薬や新規承認薬剤が必要な症例数】

▼51症例 (43施設)

【現在の服薬者数 (概数)】

▼2715症例 (27施設)

未回答の施設があるが...

$$51 \div 2715 \times 100 \approx 1.9(\%) \text{ 以下}$$

【新規抗HIV薬導入症例の背景】

▼全員男性、国内感染

年代	感染経路	治療開始時期	開始時		最近		新規ARV	併用ARV
			CD4	VL	CD4	VL		
30	血液製剤	1993	185	50000	234	97	DRV/RAL	AZT TDF/FTC rtv
30	血液製剤	1994	192	-	138	<50	DRV/RAL	TDF/FTC rtv
30	血液製剤	1994	244	-	47	17000	DRV/RAL	EFV rtv
50	血液製剤	1995	60	-	375	50>	DRV/RAL	TDF/FTC rtv
30	同性間性交渉	1995	227	-	25	16000	TPV	F-20 TDF/FTC NVP rtv
40	同性間性交渉	1996	120	51000			DRV/RAL	F-20 rtv
40	異性間性交渉	1999	5	不明			DRV/RAL	F-20 TDF/FTC EFV rtv
60	異性間性交渉	2001	5	>750000	19	96800	DRV	rtv

HAART以前の治療開始

2剤以上の併用。特にDRV+RAL

図2 調査 (a) (b) 多剤耐性症例の状況