

E. 結論

CDCが開発されたサブタイプBを検出する高感度法を日本へ導入した。昨年度開発したCRF01_AEを検出する高感度法と併せてサブタイプBとCRF01_AEの新規感染未治療患者検体を解析した結果、国立感染症研究所エイズ研究センターの患者検体28例中2例、名古屋医療センターの患者検体93例から4例のminority population薬剤耐性HIVが検出された。Minority populationの薬剤耐性HIVの検出率は国立感染症研究所のサンプルで約7%（28例中2例）、名古屋医療センターのサンプルで約4.5%（93例中4例）であった。

F. 研究危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 西澤雅子、Jeffery A. Johnson、Walid Heneine、山本直樹、杉浦互。高感度薬剤耐性HIV検出法を用いた微少集族薬剤耐性HIVの検出と存在比率に関する研究。第23回日本エイズ学会、2009、名古屋。
2. 服部純子、瀧永博之、吉田 繁、千葉仁志、小池隆夫、佐々木悟、伊藤俊広、内田和江、原 孝、佐藤武幸、上田敦久、石ヶ坪良明、近藤真規子、今井光信、長島真美、貞升健志、古賀一郎、太田康男、山元泰之、福武勝幸、田中理恵、加藤真吾、宮崎菜穂子、藤井 毅、岩本愛吉、西澤雅子、仲宗根正、巽 正志、椎野禎一郎、林田庸総、岡 慎一、伊部史朗、藤崎誠一郎、金田次弘、横幕能行、濱口元洋、上田幹夫、大家正義、田邊嘉也、渡辺香奈子、渡邊 大、矢倉裕輝、白阪琢磨、柴原 健、小島洋子、森 治代、中桐逸博、高田 昇、木村昭郎、南 留美、山本政弘、松下修三、藤田次郎、健山正男、堀成美、杉浦 互。2003-2008年の新規HIV/AIDS診断症例における薬剤耐性頻度の動向。第23回日本エイズ学会、2009、名古屋。
3. 鈴木寿子、服部純子、村田大悟、三浦秀佳、伊部史朗、藤野真之、西澤雅子、山本直樹、杉浦互。インテグラーゼ阻害剤耐性化機序の分子生物学的解析。第23回日本エイズ学会、2009、名古屋。

H. 知的所有権の取得状況

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

神奈川県における薬剤耐性HIVの調査研究

～神奈川県における薬剤耐性HIV-1 発生動向把握調査研究(2009年)～

研究分担者 近藤 真規子 神奈川県衛生研究所 主任研究員

研究協力者 倉井 華子¹、立川 夏夫¹、相楽 裕子¹、岩室 紳也²、井戸田 一朗³、
山中 晃⁴、佐野 貴子⁵、今井 光信⁵

¹横浜市立市民病院 ²厚木市立病院 ³しらかば診療所

⁴新宿東口クリニック ⁵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、2009年の1年間に主として神奈川県および東京都内の医療機関に来院した新規HIV感染者66名について薬剤耐性変異の解析を行った。IAS-USA(2008)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4例(RT領域2例、PR領域2例)検出され、薬剤耐性変異の出現頻度は6.1%であった。

RT領域にAZT耐性変異215Y/FのリバータントT215Eと非核酸系逆転写酵素阻害剤(NNRTI)に対する高度耐性変異K103Nが1例ずつ検出された。また、PR領域にM46L変異が2例から検出された。耐性関連変異の認められた4例は全て日本男性、サブタイプBで、感染経路は同性間性行為3例、不明1例であった。

耐性変異出現頻度は2004年から2006年の調査に比べ増加しており、また2008年以降、D30N(NFV耐性変異)やK103N(NNRTI耐性変異)等の高度耐性変異株も検出され、変異の種類が増えている。今後は、薬剤耐性株の実態把握とともに耐性株の蔓延防御対策も重要である。

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、その後も漸増傾向にあ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

て神奈川県および東京都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

2009年の1年間に主として神奈川県および東京都内の医療機関に来院した未治療のHIV感染者66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 (2008)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, ETR, NVP) に関与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 (2008) リスト、Shafer's criteria、スタンフォードデータベースに基づき66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2例、RT領域に2例、計4例に薬剤耐性関連変異が認められ、耐性検出頻度は6.1%であった(表1)。耐性関連変異の認められた4例は全て日本男性、サブタイプBで、感染経路は同性間3例、不明1例であった(表2)。

PR領域にMajor耐性変異であるM46Lの見られた2例は、スタンフォードデータベースによりPRIに対する耐性度がNFVにIntermediate resistance (5段階評価の2番目)、ATV、FPV、IDV、LPVにPotential low-level resistance (5段階評価の4番目)と判定された。

RT領域にAZT耐性変異215Y/Fのリバータント変異215Eが検出された1例は、スタンフォードデータベースによりAZT、D4Tにlow-level resistance、ABC、DDI、TDFにPotential low-level resistanceと判定された。また、NNRTIに対する耐性変異K103Nを持つ1症例は、DLV、EFV、NVPにHigh-level resistance、ETRにPotential low-level resistanceと判定された。

表1 新規HIV感染者66名から検出された薬剤耐性関連変異検出頻度 (2009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
2009年		1:同性間	—	K103N
		1:同性間	—	T215E
		1:同性間	M46L	—
		1:不明	M46LM	—
合計(人)	66	4(6.1%)		

表2 薬剤耐性変異の認められた4例の詳細 (2009)

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
2009	日本	男性	同性間	B	I13V, L63P, C67Y	A98S, K103N, V118I,
	日本	男性	同性間	B	I13V, L63P, V77I	V106IV, V179I, T215E
	日本	男性	同性間	B	E35D, M46L, L63AT, A71V, I93L	V179D
	日本	男性	不明	B	M46LM, L63A, I93L	—

66例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62例(93.9%)と最も多く、CRF01_AEが4例で、4例のうち3例は外国籍であった。感染経路別サブタイプを見てみると、男性同性間性行為感染43例(日本人40例、外国籍3例)および感染経路不明の17例は全てサブタイプB、異性間性行為感染6例(日本人男性3例、外国籍3例)はサブタイプBが2例、CRF01_AEが4例であった。

2007年から2009年の3年間の耐性関連変異出現頻度を表4に示した。178例中11例に薬剤耐性関連変異が検出され、検出率は6.2%であり、2006年までの出現頻度に比べ増加していた。

D. 考察

我々は、薬剤耐性HIVの発生動向を把握するため、2004年より全国規模での調査に参加し、主として神奈川県および東京都内の医療機関に来院した新規HIV-1感染者について薬剤耐性変異の解析を行っている。2009年に医療機関に来院したHIV-1感染者の調査では、66例中4例に薬剤耐性変異が確認され、この内1例はAZT耐性変異215Y/Fのリバータント215Eを有していた。リバータント215Xは、2004年

から2009年までの神奈川の調査において17例中8例と高率に検出され、また東京、大阪、名古屋等でも検出されており、日本において頻度の高い耐性関連変異であると考えられた。

2009年の調査でRT領域にK103N変異を持つ症例が1例認められ、スタンフォードデータベース解析により、NNRTIに対し高度耐性であると判定された。この変異はIAS-USA(2008)リスト、Shafer's criteria、スタンフォードの3つのデータベースでNNRTIに高レベル耐性変異として登録されており、薬剤投与歴のある症例からの感染の可能性が高い。K103N変異は2008年にも検出されており、今後の動向が注目される。

PR領域にM46L変異が検出された2例は、スタンフォードデータベースではNFVに中程度耐性、IDVに低レベル耐性と判定された。この変異はIAS-USA(2008)リストでもIDVのmajor変異として登録されており、Shafer's criteriaでは耐性変異から除外されている。2つのデータベースでの結果に基づき耐性変異と判定したが、データベースにより判定が異なる場合があり、薬剤を選択する際には患者の病態や血中ウイルス量等のパラメーターを考慮する必要もあると考えられた。

表3 新規HIV感染者66名(2009年)の感染経路とサブタイプ

感染経路		合計	HIV-1サブタイプ (<i>env</i> :C2V3, <i>pol</i>)	
			B	E
男性同性間	日本	40	40	
	外国	3	3	
異性間 男性	日本	3	2	1
	外国	1		1
異性間 女性	外国	2		2
不明 男性	日本	17	17	
合計		66	62	4

表4 新規HIV感染者178名から検出された薬剤耐性関連変異検出頻度(2007-2009年)

陽性判明年	解析数 (人)	耐性変異 出現人数	感染経路 サブタイプ*	薬剤耐性関連変異	
				Pro	RT
2007年	41	3(7.3%)	同性間 B	-	T215D
			異性間 A#	M46I	-
			同性間 B	-	D67DN
2008年	71	4(5.6%)	同性間 B	D30N	-
			同性間 B	-	T215D
			同性間 B*	-	K103N
			異性間 B	D30N, L33F	-
2009年	66	4(6.1%)	同性間 B	-	K103N
			同性間 B	-	T215E
			同性間 B	M46L	-
			不明 B	M46ML	-
合計	178	11(6.2%)			

*USA、男性、#日本女性、他すべて日本男性

今回、薬剤耐性関連変異の認められた4例中3例は男性同性間性行為感染で、4例すべてサブタイプ B であり、昨年までと同様の傾向にあった。しかし、2007年から2009年の3年間の薬剤耐性変異の出現頻度は前回の2004年から2006年の調査に比べ増加し、女性からも耐性関連変異が検出されている。また、変異の種類も増加し、D30N (NFV 耐性変異) や K103N (NNRTI 耐性変異) 等の高レベル耐性変異も認められており、今後、薬剤耐性株の動向把握と蔓延防止の対策がますます重要になると考えられる。

E. 結論

2009年1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66名について薬剤耐性変異を解析した結果、薬剤耐性関連変異を有する症例が4例 (RT領域2例、PR領域2例) 検出され、耐性変異の出現率は6.1%であった。2006年までの調査に比べ耐性変異出現頻度は増加しており、また2008年以降、D30N (NFV 耐性変異) や K103N (NNRTI 耐性変異) 等の高度耐性変異も検出された。今後は、薬剤耐性株の実態把握とともに耐性株の蔓延防御対策も重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kondo M, Sudo K, Tanaka R, Sano T, Sagara H, Iwamuro S, Takebe Y, Imai M, Kato S: Quantitation of HIV-1 group M proviral DNA using TaqMan MGB real-time PCR, J. V. Meth, 157, 141-146 (2009).

2. 学会発表

1. 近藤真規子、須藤弘二、佐野貴子、倉井華子、立川夏夫、相楽裕子、岩室紳也、加藤真吾、今井光信：コバスTaqManHIV-1でのRNA定量値がアンプリコアHIV-1モニターに比べ100倍以上低値であった症例の解析、第23回日本エイズ学会学術集会・総会 (2009年11月26～11月28日、名古屋)。
2. 佐野貴子、西大條文一、井戸田一朗、須藤弘二、加藤真吾、近藤真規子、今井光信：抗HIV抗体量により感染時期を推測するための検査法の検討、第23回日本エイズ学会学術集会・総会 (2009年11月26～11月28日、名古屋)。
3. 川畑拓也、森治代、小泉洋子、秋吉京子、近藤真規子、中澤よう子、宇宿秀三、貞升健志、長島真美、矢永由里子、今井光信、加藤真吾：HIV検査体制相談における新型インフルエンザ

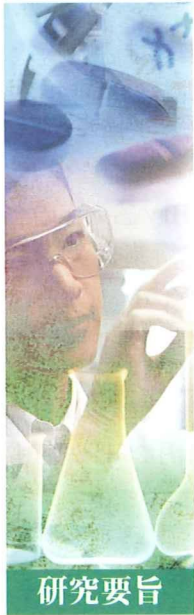
流行の影響、第23回日本エイズ学会学術集会・総会 (2009年11月26～11月28日、名古屋)。

4. 井戸田一朗、加藤朋子、畑寿太郎、島川真知子、佐野貴子、近藤真規子、須藤弘二、加藤真吾、今井光信：急速な進行と多彩な合併症を伴い、初期治療に早期に失敗した急性HIV感染症の一例、第23回日本エイズ学会学術集会・総会 (2009年11月26～11月28日、名古屋)。
5. 服部純子、近藤真規子、杉浦互 他：2003-2008年の新規HIV/AIDS診断症例における薬剤耐性頻度の動向、第23回日本エイズ学会学術集会・総会 (2009年11月26～11月28日、名古屋)。

G. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名：Kondo M, Sudo K, Tanaka R, Sano T, Sagara H, Iwamuro S, Takebe Y, Imai M, Kato S
論文タイトル：Quantitation of HIV-1 group M proviral DNA using TaqMan MGB real-time PCR,
発表紙：Journal of Virological Methods, 157, 141-146 (2009)



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 異 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Naïve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11名の治療感染者由来 subtype B 7株、CRF01_AE組換体 8株、subtype F 2株及びBF組換体 1株、計18株のウイルスから樹立した合計113クローンについて患者血漿のDirect RT-PCRから得られた薬剤耐性Genotypingとクローンゲノムから得られた薬剤耐性プロファイルと比較した。薬剤耐性ウイルス由来感染性分子クローンは親株ウイルスのGenotypingにおける主要な耐性変異以外にもDirect RT-PCR法では増幅し得なかった耐性変異を有することが判明した。国内感染症例由来ウイルスから様々な薬剤耐性プロファイルを有する感染性分子クローンが得られ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、診断会社を含めた各検査機関での測定が行なわれている。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。研究分担者はこれまで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、樹立の効率を更に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薬剤耐性試験法における標準ウイルス株としての応用可能性を検討し、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。本年度はこ

れまで樹立した国内治療患者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患者血漿のDirect RT-PCRから得られた薬剤耐性Genotypingと比較解析し検討した。

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治療感染者検体から分離した subtype B 7株、CRF01_AE組換体 8株、subtype F 2株及びBF組換体 1株、計18株のウイルスである。

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からDirect RT-PCR法によって読み込んだ塩基配列から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。得られた全長クローンは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細胞に接種し感染性を確認した。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)と Primer Walking法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し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ものと判断した。

C. 研究結果

対象とした国内治療感染者由来ウイルスから樹立した感染性分子クローンのAccession番号と分離ウイルスのDirect RT-PCRによるGenotypingでの薬剤耐性変異の一覧を表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の場合)もしくはMlu I site (pMT4 Vectorの場合)を附加したForward PrimerでHIV-1 genome上流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細胞の混合培養系にTransfectionし、そのTat活性とSyncytium形成を確認し、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。全Transfectionクローンのうち感染性を示すクローンの割合はウイルス株毎に異なるが、平均して半分程のクローンがMAGIC-5A細胞で感染性を示した。ウイルス株によっては95%以上の効率で感染性分子クローンが取得できた。従ってこの実験系の感染性分子クローン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、それぞれのウイルス株について各々2から14クローン計113クローンを選定し、全ウイルスゲノムの塩基配列をGPS-1 Genome Priming System (NEB)とPrimer Walking法で決定した。これらウイルスゲノム塩基配列は全長に互ってsubtype B、CRF01_AE組換体、subtype F及びBF組換体であり、それぞれ元のウイルス株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と患者血漿の

表1 Current Panel of Infectious Molecular Clones Derived from Patients with Anti-HIV Drug Treatments

HIV Database Accession No	Patient Code	DR No.	Risk factor	Sex	Bleed Date	Treatment	CD4	Viral Load	Subtype	Resistance Mutation (PR)	Resistance Mutation(RI)	Resistance Mutation (IH)			
AB253635 - AB253646 AB253647 - AB253658 AB253659 - AB253668 AB253669 - AB253680	NH2000-001	1741	Heterosexual	Male	1999.8.3	AZT, ddI, IDV	54	995,600	AE	L10F, L31E, E35D, M144L, A71T, N38S, E48V	M41L, D67S, T696A, L74V, V110L, L210W, T215Y	None			
1873		1999.9.28			ddI, d4T, EFV	50	335,000	AE	L10F, K20F, E35D, M50L, E48P, A71T, N38S, E48V	M41L, D67S, T696A, L74V, V110L, L210W, T215Y	None				
2594		2000.7.5			ddI, d4T, EFV, IDV	26	660,900	AE	L10F, K20F, E35D, M50L, E48P, A71T, N38S, E48V	M41L, D67S, T696A, L74V, V110L, L210W, T215Y	None				
3730		2001.10.3			ddI, d4T, EFV	15	230,800	AE	L10L, K20L, E35D, M50L, E48P, A71T, N38S, E48V	D67N, T610D, K70R, V101L, Y110C, L210W, T215F, K219W	None				
AB253681 - AB253691		NH19-203			492	Heterosexual	Male	1997.4.7	AZT,3TC,SQV	22	61,000	AE	L10L, K20L, E35D, M50L, E48P, A71T, N38S, E48V	D67N, T610D, K70R	None
AB253702					1236			1998.12.10	AZT,3TC,NFV	8	423,900	AE	L10L, K20L, E35D, M50L, E48P, A71T, N38S, E48V	D67N, T610D, K70R	None
AB253703 - AB253716					2192			2000.2.7	AZT,NVP	9	256,600	AE	L10L, K20L, E35D, M50L, E48P, A71T, N38S, E48V	D67N, T610D, K70R, V101L, Y110C, L210W, T215F, K219W	None
AB253717 - AB253725	5032		2003.3.27	ABC, EFV, LPV/RTV	3			170,200	AE	L10L, K20L, E35D, M50L, E48P, A71T, N38S, E48V	D67N, T610D, K70R, A74G, K103N, V101L, Y110C, M144V, G109M, L210F, T215F, K219W	NONE			
AB253730	1348		1999.2.4	ddI, d4T, SQV, NFV	145			91,300	B	L10L, N303D, I54V, I62V, E48P, Y117L, V77L, V324V, A148D, L50M	M41L, E44D, D67N, K103E, I109V, M144V, L210W, T215Y	S235N			
AB253731, AB253732	NH0801-076	2510	Hemophilic	Male	2000.6.8	d4T, SQV, NFV	255	38,900	B	L10L, H11V, D30N, E35D, M46M, V44V, G, I54V, H2V, E48P, T117L, V77L, N30D, L50M	M41L, E44D, D67N, K103E, L210F, T215F, S235Y	S235N			
AB253733		2508			2000.6.7	AZT, ddI, SQV, RTV	62	79,700	B	L10L, K20L, M50L, E48P, E35L, E48P, A71V, T74S, V32T, N38S, E48V	M41L, D67N, K70R, V75M, K103Q, T215F, K219Q	None			
AB253734 - AB253735 AB253736 AB253737	NH0006-247	3884	Homosexual	Male	2001.12.5	AZT, d4T, SQV, RTV	547	10,400	B	L10L, D30N, A10R, M50L, I54L, G10F, A71V, I14V, N38D, L50M	D67N, K70R, T215F, K219Q	None			
AB400692 AB400693 AB400694 AB400695	NH2013-0001	6174	Heterosexual	Male	2004.9.14	ddI, d4T, SQV, RTV	502	18,300	B	D30N, I54V, N38D, L50M, L10V, A71V	M41L, E44D, D67N, V110L, L210W, T215Y	None			
AB400696 AB400697	NH0005-0673	6175	Hemophilic	Male	2004.9.14	AZT, d4T, SQV, RTV	516	6,500	B	V32L, M44L, I54V, V32A, L50M, L10V, K103E, F35L, A71V	M41L, E44D, D67N, V110L, M144V, L210W, T215Y	None			
AB400698 AB400699	NH0801-0127	6082	Heterosexual	Male	2004.8.5	ddI, d4T, NFV	124	6,600	F	K20V, D30N, M50L, M46M, L48P, A71V, N38D	M41L, E44D, D67N, T610D, K103E, V110L, L210W, T215Y	G149R			
AB400700 AB400701 AB253430 AB253431	NH0801-0128	6190	Heterosexual	Female	2004.9.21	ddI, RTV, TDF, ATV	35	721,300	F	L10L, K20L, M50L, M46M, F35L, L48P, A71V, I54V, L50M	M41L, E44D, D67N, V110L, L210W, T215Y	I203M			
AB400702 AB400703	NH0801-077	769	Heterosexual	Male	1998.5.21	None	70	918,100	BF	L10L, T74S	K214S	V110L, S235N			
AB400704 AB400705	NH0801-086	1120	Hemophilic	Male	1998.10.27	d4T, 3TC, NFV	131	43,700	B	L10F, I54V, V32S, L50M, L10V, A71V, G73S	M41L, A24V, D67S, V110V, M144V, L210W, T215Y	None			

Direct RT-PCR から得られた配列の Stanford 法による薬剤耐性プロファイルと比較した (図1及び2)。通常 Genotyping による薬剤耐性試験は患者血漿 HIV-1 の Direct PCR から得られた pol 領域の塩基配列から推定されるため、Direct PCR で用いる Primer は Consensus 配列に沿った設計がなされている。これにより設定した Primer Set に選別された Bulk Virus の遺伝情報のみから薬剤耐性が推定される。一方、感染性分子クローン構築の戦略は HIV-1 Genome で

高度に保存されている領域に Primer を選定して、成る可く多くの HIV-1 Genome を増幅するように設計している。それぞれの戦略で増幅された Amplicon の塩基配列の違いは図1と図2の比較から明瞭であった。すなわち Direct RT-PCR による増幅領域は図1の p51RT の点線で区切った上流領域に限定されており、これから下流の p31 INT 領域の配列情報は得られない。一方、感染性分子クローンの塩基配列情報は当然ながら全ゲノムに亘る。個々の感染性分子ク

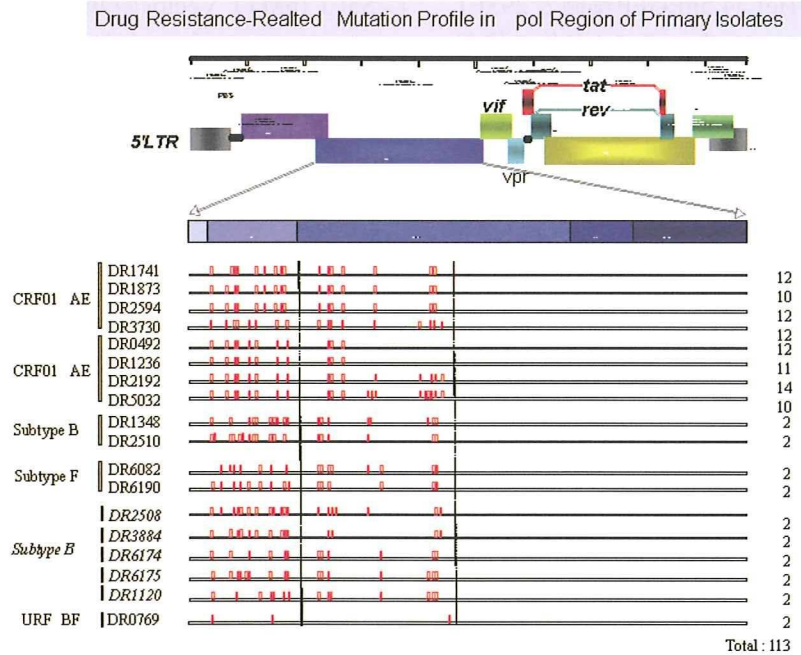


図1 Direct PCRによる薬剤耐性変異

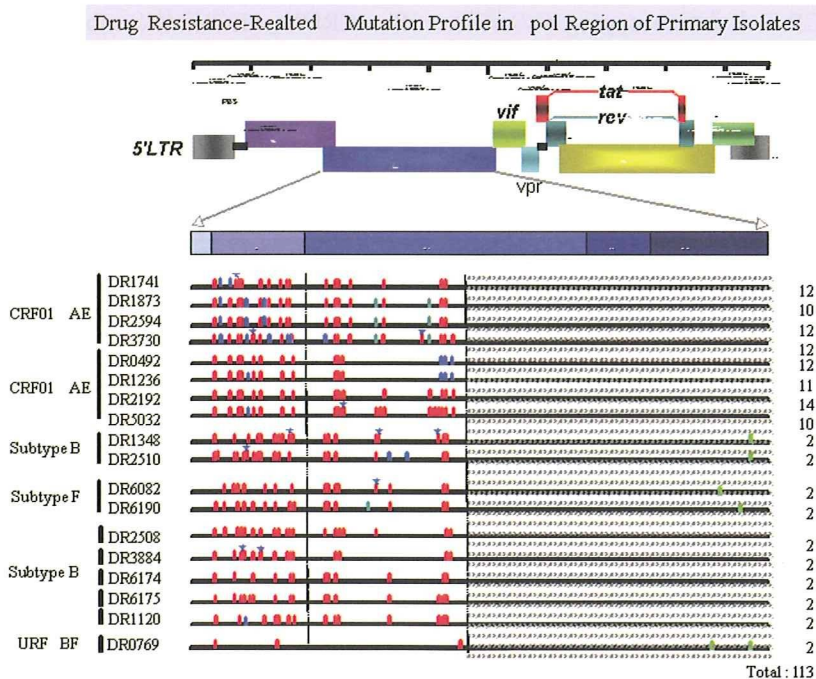


図2 感染性分子クローンにおける薬剤耐性変異

ローンの薬剤耐性プロファイルをDirect RT-PCRで検出された耐性変異を赤棒のみでプロットした図1と比較すると、Direct RT-PCRで認められなかった耐性変異（青棒）、Direct RT-PCRの配列情報から消失した耐性変異（星印）及びDirect RT-PCRの配列情報でMixであった配列を確定した耐性変異（緑棒）が明らかになった。またp31 INTの領域にMinorではあるがIntegrase阻害剤の耐性関連変異も幾つかのクローンでは検出された。

これらの感染性分子クローンのStanford法による各種薬剤に対する耐性プロファイルを図3に示した。同一患者の異なる経過4時点で分離したウイルス由来の感染性分子クローンはそれぞれ1クローンのみ抽出して示している。患者コードNH2000-001ではPI及びNRTIのプロファイルは4時点で変わらないが、NNRTIに対する耐性は第2分離時点から全てのNNRTIに対して耐性に転換していた。また患者コードNH19-203では経過3時点まではPIとNRTIに対して同様な耐性プロファイルを示し、NNRTIには感受性であったが、第4経過時点で一転して一部NRTI薬剤に対する耐性が高まり、併せて全てのNNRTIに対して高度耐性プロファイルに転換した。

このように同一患者の異なる経過4時点での分離ウイルス株由来の感染性分子クローンは経過とともに耐性変異が蓄積する傾向が認められるが、一部のNRTIに対しては耐性レベルが低下した。NH0801-0127とNH0801-0128は夫婦間の感染例と推測されるsubtype Fの感染症例であるが、ほぼ同様な治療歴であるにもかかわらずPIに対する耐性プロファイル

が異なっていることが注目される。これら18クローンの感染性分子クローンの薬剤耐性度はpDR0769BF03のNFVに対する軽度耐性からpDR6175B30の全てのPI及びNRTIに対する高度耐性まで、様々な耐性プロファイルを示していた。

D. 考察

当研究室で開発したHalf & Half Strategyによる「HIV trapping System」の更なる効率化が実現し、国内治療感染者検体から分離したsubtype B 7株、CRF01_AE組換え体 8株、subtype F 2株及びBF組換え体 1株、計 18 株のウイルスに応用し、合計 113 クローンの感染性分子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を、元の患者血漿のDirect RT-PCRで得られた塩基配列による薬剤耐性プロファイルと比較した。感染性分子クローンではDirect RT-PCRによる塩基配列では検出されない耐性変異や、消失した耐性変異が認められた。これはDirect RT-PCRがあくまでBulkとしての患者血漿中HIV-1 集簇のなかからを選定したPrimer Setで増幅できる亜集団のみを増幅解析していることに由来しているものと考えられる。感染性分子クローンによる薬剤耐性プロファイルはDirect RT-PCRの範囲外であるIntegrase阻害剤の耐性関連変異も幾つかのクローンでは検出された。このことは今後Integrase阻害剤の導入による遺伝子検査にも対応し得ること示している。しかしながら感染性分子クローン構築においてはDirect RT-PCR法よりも長いAmpliconを増幅する必要があるため、その増幅感度については検討

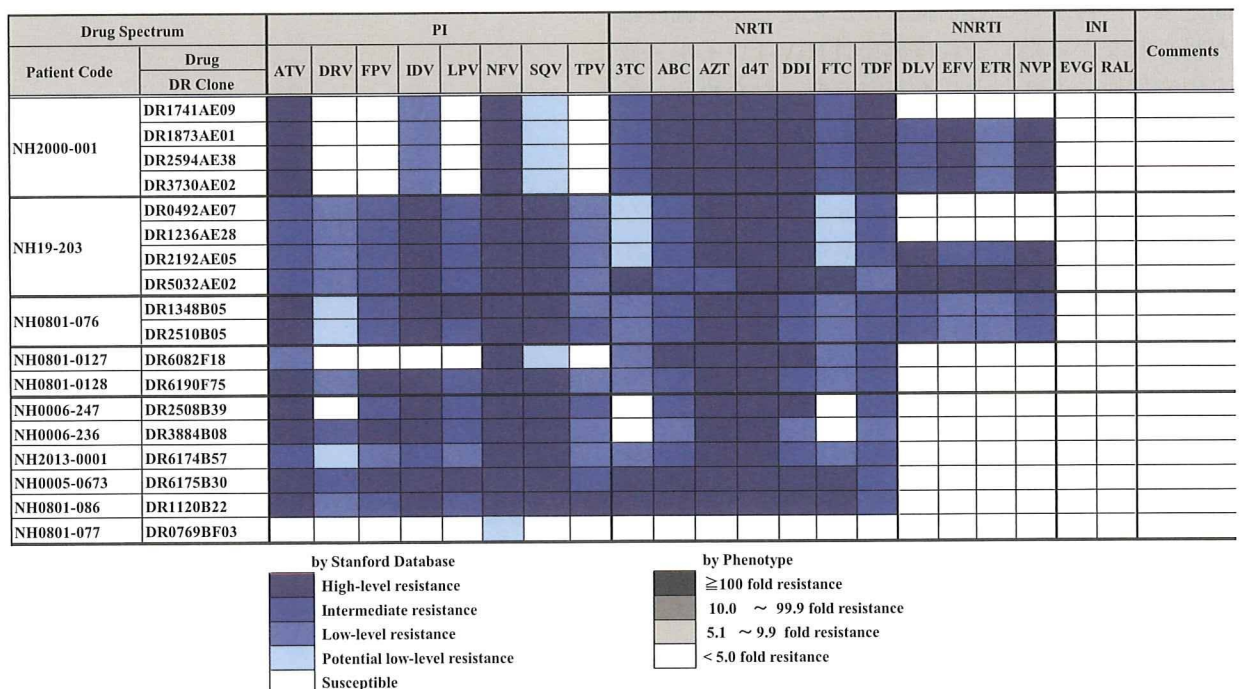


図3 感染性分子クローンの薬剤耐性プロファイル

を要するものと考えられる。2例の同一患者の異なる経過4時点で分離したウイルスから分離したクローンでは、治療経過時間に沿って薬剤耐性変異が蓄積することが判明し、なおかつNNRTIに対する耐性変異は多くの薬剤に一転して耐性を示す事から、臨床応用に関しては治療経過に沿った綿密な薬剤耐性検査の継続が必要とされるものと考えられた。

これら本年度まで整備した18クローンの感染性分子クローンの薬剤耐性はpDR0769BF03のNFVに対する軽度耐性からpDR6175B30の全てのPI及びNRTIに対する多剤高度耐性まで、様々な薬剤耐性プロファイルを示していた事から、典型的な薬剤耐性感染性分子クローンの整備がなされたものと考えられる。

これらの薬剤耐性クローンから数クローンを選定して、HIV薬剤耐性試験の標準化への応用に関するパイロット実験を行った。即ち選定した数クローンを293T細胞にTransfectionして培養上澄を分離し、MAGIC-5A細胞に感染させ、感染細胞を継代培養し、クローンウイルスを増殖させると共にTransfectionに用いた感染性分子クローンPlasmidを継代希釈した。現在、国立感染症研究所では感染性試料の輸送規制の遵守が求められている。感染性ウイルス液の輸送は厳重な規制下に置かれるため、固定濃縮後に試験検体配分機関に分与した。これらの固定後の感染性分子クローン由来の検体は、不安定なため薬剤耐性試験に不適であることが判明した。また感染性ウイルス取り扱い可能なBSL3施設が整った機関にしか、感染性分子クローンの分与は許可されないことから、一度継代培養で増殖させたウイルス原液を固定後、送付することを試したが安定した増幅成績が得られなかった。これは感染性HIV-1ウイルス液が固定操作により、より不安定になったためか、輸送段階での温度制御が不安定なためか原因の特定は現時点では難しい。よって今後BSL3施設を必要とせず、バイオセキュリティ上も分与の制約を受けない「非」感染性分子クローンが薬剤耐性試験の標準として適用可能か解析検討することが必要と考えられる。ここでいう「非」感染性分子クローンとは感染性分子クローン構築の過程で生じてくる、Indicator細胞 HeLa4.5 nEGFP細胞でSyncytium形成陽性で、培養上澄のTransferでHIV感染Indicator細胞MAGIC-5Aで感染陰性でなおかつ培養上澄中にコア蛋白であるp24 gagが陽性であり、ウイルスゲノムがパッケージされたHIV-1粒子を形成するクローンを示す。このような「非」感染性分子クローンを選別し解析検討することにより、より安定なHIV薬剤耐性試験の標準化に適確なクローンを取得する

必要があると考えられた。

E. 結論

国内感染症由来ウイルスから様々な薬剤耐性プロファイルを有する感染性分子クローンが得られ薬剤耐性試験法標準化へ向けての基盤が整備された。これらの感染性分子クローンの一部を非感染性にするため固定後に薬剤耐性試験の標準化に応用したところ、標的領域の増幅が不安定であることが判明した。このことからバイオセキュリティの観点からウイルスゲノムを保持する「非」感染性分子クローンの選定が薬剤耐性試験法標準化に向けて必要であると考えられた。

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

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 病態制御免疫内科 教授
 協力研究者 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

神奈川県におけるHIV/AIDS診療の実態を把握するため平成21年度8～9月に医療機関を対象にアンケート調査を行った。神奈川県エイズ治療拠点病院での診療症例数は約760名であり、2年前の調査で判明した570名から190名増加していた。また平成21年度、当院初診の新規未治療感染患者20名を対象に薬剤耐性検査とBEDアッセイを継続して行った。最近の感染を示唆するODn値0.8未満の者は7人(35%)であった。また、耐性変異を18人中5人(27.7%)に認めた。

A. 研究目的

神奈川県におけるHIV/AIDS患者数は、厚生労働省エイズ動向委員会の報告を累積すると2008年末まででHIV感染症例765名、AIDS症例399名の計1164名となり大阪府の1463名に次いで全国で3番目に報告が多い都道府県となる。一方で、死亡例や転院転居に伴う県外への転院、さらに補足率の問題で実際の神奈川県でのHIV感染診療の実態は明らかでない。これを明らかにするため神奈川県エイズ拠点病院17病院を対象に平成21年度8月から9月の期間にアンケート調査を行った。2年前の同時期に神奈川県下の有床医療機関を対象に行ったアンケートでは、県内のHIV感染診療の99.5%がエイズ治療拠点病院に集中していることが判明しており、今回は拠点病院のみを対象とした。また、当院診療圏におけるHIV感染の動向把握のために一昨年より施行している新規未治療感染患者の薬剤耐性検査とBEDアッセイを継続して行った。

B. 研究方法

アンケート調査；平成21年8月に神奈川県エイズ治療拠点17病院を対象にHIV診療状況に関するアンケート調査を行った。

薬剤耐性検査およびBEDアッセイ；2009年度に

当院を新規感染患者として受診した20名のうち、研究の内容に同意を得た後に薬剤耐性検査およびBEDアッセイを施行した。薬剤耐性検査は国立感染症研究所および国立名古屋医療センターに検査を依頼、BEDアッセイはcalypte® HIV-1 BED incidence EIAキット(Calypte Biochemical Co., Rockville, MD)を用いて調べた。

開発および研究の対象となる個人への不利益および危険性への配慮；

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行われた。薬剤耐性検査の解析結果は、治療開始時の薬剤選択において多いに有用であり、不利益な点はない。BEDアッセイは患者の要請に基づき通知するが、偽陽性や偽陰性の頻度が高いことを同時に知らせ、また診療方針の決定には影響しない。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。本解析は当院の倫理委員会で承認されており、これに基づき研究の目的、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、研究調査の適切な運営と情報の保護、研究成果の公表、協力して頂くことを説明し、同意のもとに行われた。

C. 研究結果

アンケート調査

神奈川県エイズ治療拠点病院17を対象にアンケート調査を行い全施設から回答を得た。17施設のHIV診療症例数は計760名であり、2年前の調査で判明した570名を190名上回っていた。200名以上の診療数を有する2病院の患者増加の他に、中規模診療病院（39名から69名の診療を行っている病院）5病院での診療数増加が目立ち、特定病院への患者の集中はあるものの、裾野の広がりを伺えるものであった。

薬剤耐性検査およびBEDアッセイ

表1に20名の対象者の初診時CD4陽性細胞数、VL、AIDS発症の有無、BEDアッセイの結果を示す。症例18と症例19は前医でWB法による確認検査が判定保留であったことから初期HIV感染と判明しているものの、その他の症例では感染時期は明らかでなかった。最近の感染の可能性を示唆するODn値0.8未満は症例18と症例19を含めた7症例(35%)であつた。

た。耐性検査の結果は5症例に診療上問題となる耐性を認めた（表2）。rt98S + rt103N, int157Q, rt98S, rt215E, rt98Sであった。このうち3症例（rt103N, int157Q, rt98S）がBEDアッセイで最近の感染を示唆するODn <0.8であったことは興味深いものの、int157Qの変異機序に関しては不明である。

D. 考察

横浜および近郊における薬剤耐性HIVの調査研究の一環として、この診療圏におけるHIV診療の動向を掌握することは重要と考える。今回のアンケート調査は2年前のそれと比較することにより、実際の神奈川に於けるHIV感染診療の増加傾向と拠点病院における診療体制の裾野の広がりを明らかにした。今後も同様の調査を継続したい。BEDアッセイでODn <0.8の患者は20名中7名(35%)であり昨年(27.3%)よりも比率は高く、一昨年(43.8%)よりは低く、経時的な傾向は明らかではない。体制ウイルスは18症例中5症例に認め、近年増加傾向である。

表1

症例	感染時期	CD4	VL (c/ml)	ODn
1	不明	40	64 000	3.73
2	不明	17	69 000	1.46
3 ¶	不明	423	380 000	2.22
4	不明	294	17 000	0.05
5 ¶	不明	20	82 000	3.06
6	不明	403	28 000	3.35
7 ¶	不明	10	210 000	1.41
8	不明	361	21 000	3.43
9	不明	466	11 000	0.27
10	不明	540	70 000	0.11
11 ¶	不明	26	160 000	2.74
12	不明	473	170 000	0.12
13 ¶	不明	24	250 000	0.13
14	不明	268	21 000	1.54
15 ¶	不明	73	370 000	1.29
16	不明	327	3 200	1.00
17	不明	46	110 000	2.98
18	初期 HIV 感染	494	9 700	0.14
19	初期 HIV 感染	170	960 000	0.06
20	不明		18 000	2.64

¶ AIDS 発症例

表2

症例	NRTI/NNRTI	PI	INT	ODn
1	106I, 179D	36I, 62V, 71T/V, 77I	NP ¶	3.73
2	(-)	63P	NP ¶	1.46
3	(-)	62V, 71V	NP ¶	2.22
4	98S, 103N	63P	NP ¶	0.05
5	(-)	16E, 36I	NP ¶	3.06
6	179D	15V	NP ¶	3.35
7	106I	15V, 16E, 36I, 69K, 89M	NP ¶	1.41
8	(-)	15V, 20T/R, 62V, 63P, 71T, 77I	(-)	3.43
9	(-)	10I, 36I, 62V	157Q	0.27
10	(-)	10I, 36I, 62V	(-)	0.11
11	98S, 179D	77I	(-)	2.74
12	(-)	62V, 71T, 77I	(-)	0.12
13	(-)	15V, 36I	(-)	0.13
14	T215E	77I	(-)	1.54
15	69N	10I, 36I, 63P, 69K, 89M/I	(-)	1.29
16	(-)	15V, 63P	(-)	1.00
17	(-)	10I, 36I, 69K, 77I, 89M	(-)	2.98
19	98S	15V, 62V, 71T,	(-)	0.06

¶ NP: not performed

E. 結論

神奈川県エイズ治療拠点17病院を対象にアンケート調査を行い、神奈川県におけるHIV診療の現状把握を試みた。また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を対象に薬剤耐性変異検査および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もデータの蓄積を継続するべきと考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 上田敦久、築地淳、岡秀明、中向知子、石ヶ坪良明、白井輝、安達理恵、竹林早苗、小田みどり、松山奈央当院で経験されたAIDS関連悪性リンパ腫、第65回神奈川感染症医学会、2009.3 横浜
2. 上田敦久、安達理恵、竹林早苗、小田みどり、松山奈央、筑丸寛、白井輝、石ヶ坪良明、多種NRTI,PI剤に対して副作用を呈したHIV感染症患者に対する新規HIV薬の有用性について、第66回神奈川感染症医学会、2009.9 横浜
3. 須田昭子、上田敦久、安達理恵、竹林早苗、小田みどり、松山奈央、筑丸寛、白井輝、石ヶ坪良明、当院における新規未治療感染患者におけるBED assay解析結果の検討、第23回日本エイズ学会学術集会、2008.11 名古屋
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、白井輝、石ヶ坪良明、藤内祝、HIV感染者の歯科診療に関する研修で求められる情報、必要とされる情報についての検討、第23回日本エイズ学会学術集会、2008.11 名古屋

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



研究要旨

血中、唾液、毛髪中の抗HIV薬定量

～PCR-MS法を用いたHIV感染者血漿中の薬剤耐性微小集団の定量～

研究分担者 加藤 真吾 慶應義塾大学医学部微生物学免疫学教室 専任講師

微小集団の薬剤耐性ウイルスを検出・定量することは、薬剤耐性HIV-1の伝播状況の把握や、サルベージ療法における治療薬の選択などにおいて重要な情報を提供する。そのために近年開発されたallele-specific real-time PCRは検出感度において優れているが、3通りの点変異やT215Yのような2塩基の変異を測定できない問題点があった。それらを解決するための新しい方法として、ウイルスRNAの薬剤耐性変異部位を含むPCR増幅産物をI型制限酵素AclIで切断し、そのオリゴヌクレオチド断片をLC-MSによって解析することにより微小集団を検出・定量するPCR-MS法を開発した。

本年度はPCR-MS法を用いて未治療新規感染者137例の微小耐性変異の検出と定量を行った。その結果、L90Mで2例、K103Nで3例、M184Vで3例、T215で12例、計20例の薬剤耐性関連変異が検出された(15%)。そのうち6例は存在比20%以下の薬剤耐性微小集団であった。PCR-MS法は微小耐性ウイルスを持つ患者の治療及び疫学における意味を明らかにするために有用であると考えられる。

A. 研究目的

抗HIV療法において薬剤耐性は重大な問題となっている。一般に耐性ウイルスの検査は耐性関連遺伝子の塩基配列を決定することによって行われているが、この方法では耐性ウイルスの比率が20%以上でなければ検出することができない。このような微小集団の耐性ウイルスを検出・定量することは、薬剤耐性HIV-1の伝播状況の把握や、サルベージ療法における治療薬の選択などにおいて重要な情報を提供すると期待される。Hanceらは2001年にallele-specific real-time PCRを用いて耐性変異を0.1%まで測定することに成功した。その後この技術は、未治療期、母子感染、STIなどの様々な時期における耐性ウイルスの量的変化を研究するために使用されてきた。しかし、この方法には、(i)3通りの点変異を同時に測定できない、(ii)連続した2塩基変異（例えばT215Y）を測定できないという問題があった。これらの問題を解決する新しい方法として、PCRと液体クロマトグラフィー・マススペクトロメトリー(LC-MS)を組み合わせることによってHIV-1の微

少集団を定量するPCR-MS法を開発した。PCR-MS法は逆転写酵素のM184V、K103N、T215Yの変異、プロテアーゼのL90M変異の4種類の耐性変異について存在比率0.2%から0.5%までの微小変異を検出することが可能であり、allele-specific real-time PCRと同程度の検出感度であった。今年度は慶應義塾大学病院と名古屋医療センターに来院した新規感染者137人の血漿を測定することにより、臨床検体における耐性ウイルス微小集団の検出と定量を行った。

B. 研究方法

新規感染者の臨床検体として、2005年から2008年の慶應義塾大学病院における未治療新規感染症例32例と2008年の名古屋医療センターにおける未治療新規感染症例105例の血漿検体を用いた。各検体とも血漿100 μLからQIAamp® Viral RNA mini Kit (QIAGEN)を用いて60 μLの溶出液でRNAを抽出した。PCR-MS法による測定時の標準検体として、野生株IIBと慶應義塾大学病院通院患者一人から分離したK2901株のウイルス培養上清を用いた。IIB株

は耐性変異をもたず、K2901株は逆転写酵素 (RT) 遺伝子にM41L、K103N、M184V、T215Yの変異を、プロテアーゼ (PR) 遺伝子にI54V、G73S、V82A、L90Mの変異をもっている。それぞれの株は塩基配列決定とPCR-MS法によって微小集団が検出されないことを確認した。それぞれの株の培養上清あるいはそれらの混合液をそれぞれp24抗原量で14 pg (約70,000コピーのウイルスを含む) からQIAamp® Viral RNA mini Kit (QIAGEN)を用いて60 µLの溶出液でRNAを抽出した。

PCR-MS法による測定は以下のように行った。RNA抽出液6 µLに50 µMランダムヘキサマーを2 µL、10 mM dNTPsを1 µL、蒸留水を4 µL加え、65°Cで5分変性させた後、氷上で1分以上静置した。この液にSuperScript IIIに添付されている5 x first strand bufferを4 µL、0.1 M DTTを1 µL、200 U/µL SuperScript IIIを1 µL、40 U/µL RNasinを1 µL加え、室温で5分、50°Cで10分、70°Cで15分静置してcDNAを作成した。1回目のPCRのプレミックスとしてPlatinum Taqに添付されている10 x PCR Bufferを5 µL、50 mM MgCl₂を3 µL、25 mM dNTPsを0.4 µL、20 µM pre_Fプライマーを0.5 µL、20 µM pre_Rプライマーを0.5 µL、蒸留水を36.1 µL、Platinum Taqを0.5 µL加えて調製した。プライマーはプロテアーゼ領域のL90、逆転写酵素領域のK103、M184、T215の4種類の耐性変異についてpreプライマーセットとAcuIプライマーセットをそれぞれ作成した(表1)。cDNA液4 µLにプレミックスを46 µL加え、94°Cで2分変性させ、続けて94°Cで5秒、48°Cで10秒、72°Cで15秒のサイクルを5回繰り返す、さらに94°Cで5秒、60°Cで10秒、72°Cで15秒のサイクル

を25回繰り返す、最後に72°Cで1分反応させた。2回目のPCRのプレミックスとして10 x PCR Bufferを5 µL、50 mM MgCl₂を3 µL、25 mM dNTPsを0.4 µL、20 µM AcuI_Fプライマーを5 µL、20 µM AcuI_Rプライマーを5 µL、蒸留水を30.1 µL、Platinum Taqを0.5 µL加えて調製した。このプレミックス49 µLに1回目のPCR産物を1 µL加え、94°Cで2分変性させた。続けて94°Cで5秒、60°Cで10秒、72°Cで15秒のサイクルを30回繰り返す、最後に72°Cで1分反応させた。2回目のPCR反応後、反応液5 µLを用いてアガロースゲル電気泳動でPCR産物を確認した。制限酵素反応のプレミックスとして制限酵素AcuIに添付されている10 x NE Buffer 4を10 µL、1.6 mM S-adenosyl methionineを2.5 µL、蒸留水を40.5 µL、AcuIを2 µL加えて調製した。プレミックス55 µLに2回目のPCR産物を45 µL加え、37°Cで1時間、65°Cで20分静置した。制限酵素処理した試料を5 µL用いてアガロースゲル電気泳動で酵素反応を確認した後、90 µLに99.5%エタノールを360 µL加え、14000 rpmで10分遠心した。上清を除き、14000 rpmで2分遠心した後、再度残余の上清を除き、真空乾燥機で5分乾燥させた。乾燥したDNAに5 mM 酢酸アンモニウムを10 µL加えて溶解し、ZipTip₁₈ (MILLIPORE)を用いてDNAを精製した。Equilibration/Wash solutionには5 mM 酢酸アンモニウム、Elution solutionには5 mM 酢酸アンモニウム/50%アセトニトリルを用い、4 µLで抽出し、真空乾燥機で10分乾燥させた。精製したDNAに5 mM 酢酸アンモニウムを11 µL加えて溶解し、14000 rpmで2分遠心し、上清を10 µLとってそのうちの4 µLをLC-MSで分析した。

表1 プライマーの塩基配列

	プライマー名	配列
PR L90	pre_p90a_F	CCT GTC AAC ATA ATT GGA AGA AAT MTG
	pre_p90a_R	TTT AAA GTG CAA CCA ATC TGA GTC A
	AcuI_p90a_F	CCG CTG AAG AAT TGG AAG AAA TMT G
	AcuI_p90a_7mR	CCG CTG AAG AGT GCA ACC AAT CTG AGT CA
RT K103	pre_r103c_F	TCC CGC AGG GTT AAA AAA GAA
	pre_r103c_R	CCC ACA TCC AGT ACT GTT ACT GAT TT
	AcuI_r103c_F	CCG CTG AAG CAG GGT TAA AAA AGA A
	AcuI_r103c_6mR	CCG CTG AAG CCA GTA CTG TTA CTG ATT T
RT M184	pre_r184a_F	ACA AAA TCC AGA CAT AGT TAT CTA TCA ATA C
	pre_r184a_R	AGT CAG ATC CTA CAT ACA AAT CAT CCA
	AcuI_r184a_F	CCG CTG AAG AGT TAT CTA TCA ATA C
	AcuI_r184a_5mR	CCG CTG AAG CTA CAT ACA AAT CAT CCA
RT T215	pre_r215ab_F2	ACA TCT ATT GAG GTG GGG RTT T
	pre_r215ab_R	TTT CTG ATG TTT TTT GTC TGG TGT R
	AcuI_r215ab_F	CCG CTG AAG GTT GAG GTG GGG ATT T
	AcuI_r215ab_F2	CCG CTG AAG ATT GAG GTG GGG RTT T

(倫理面への配慮)

本研究を実施するに当たり HIV-1 感染者に研究の概要と意義を説明し同意を得た上で血液を採取した。

C. 研究成果

慶応義塾大学病院の未治療新規感染者32例について4種類の耐性変異を測定した。その結果、L90M、K103N、M184Vの変異例がそれぞれ1例ずつ検出され、T215YではなくT215Iの変異例が1例検出された。それぞれの耐性変異の割合は、L90Mの耐性変異を持つ例が0.26%、K103Nが7.0%、M184Vが32%、T215Iが28%であった。T215Y(ACC→TAC)とT215I(ACC→ATC)の変異で得られるDNA断片は同じ質量であるが(antisenseの場合TAAAとATAA)、LCにおけるカラム保持時間が異なるため両変異を区別することが可能であった。PCR-MS法で耐性変異が検出された4例についてシーケンスの波形データを調べた結果、M184V(32%)の例とT215I(28%)の例では耐性変異を示す小さなピークが確認できたが、L90M(0.26%)の例とK103N(7.0%)の例については耐性変異のピークはまったく検出することができなかった(表2)。

名古屋医療センターの未治療新規感染者105例について4種類の耐性変異を測定した。その結果、

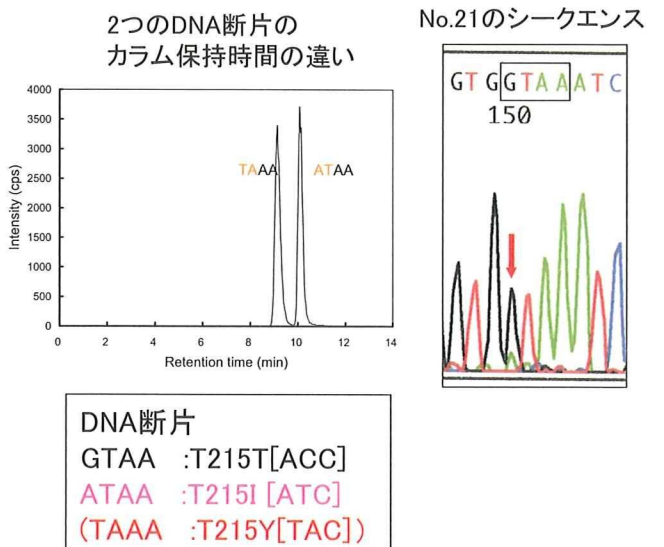
L90Mの耐性変異が1例、K103Nが2例、M184Vが2例、T215の耐性関連変異が11例、計16例の薬剤耐性変異が検出された。ダイレクトシーケンシングで耐性関連変異が確認された例はK103Nが1例、T215の耐性関連変異が4例の5例のみであり、11例はPCR-MS法でのみ耐性関連変異が検出された。ダイレクトシーケンシングとPCR-MS法の両方で検出された5例におけるそれぞれの耐性変異の割合は、K103Nが97%、T215Lが97%と81%、T215Sが95%と98%であった。それに加え、T215Lが97%検出された例でT215Yが3%、T215Sが95%の例でT215Lが2%、T215Sが98%の例でT215Lが2%の耐性微少変異がPCR-MS法でのみ検出された(表3)。ダイレクトシーケンシングで検出できず、PCR-MS法でのみ検出された11例におけるそれぞれの耐性変異の割合は、L90Mが1%、K103Nが58%、M184Vが3%、M184Vが4%、T215Yが2%、T215IとT215Lが98%と2%、T215Lが21%、T215LとT215Yが77%と5%、T215LとT215Yが93%と6%、T215Yが28%、T215Yが50%であった(表4)。

D. 考察

PCR-MS法を用いて未治療新規感染者137例の微少耐性変異の検出と定量を行った結果、L90Mで2例、K103Nで3例、M184Vで3例、T215で12例、計

表2 未治療新規感染者のPCR-MS測定結果 (慶應義塾大学病院)

新規患者 No.	HIV-1 RNA (copies/mL)	耐性変異部位			
		PR L90	RT		
			K103	M184	T215
1	44000	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
2	8500	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
3	81000	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
4	93000	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
5	270000	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
6	14000	<0.2	<0.2	ND	ND
7	4900	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
8	60000	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
9	7400	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
10	160000	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
11	32000	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
12	NT	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
13	64000	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
14	100000	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
15	3100	<0.2	<0.2	V: 32%	<0.2
16	120000	M: 0.26%	<0.2	<0.2	<0.2
17	310000	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
18	NT	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
19	74000	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
20	25	ND	<0.2	<0.2	ND
21	NT	<0.2	<0.2	<0.2	I: 28%
22	78000	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
23	120000	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
24	2100	<0.2	N: 7.0%	<0.2	<0.2
25	17000	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
26	11000	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
27	5200	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
28	28000	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
29	24000	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
30	NT	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
31	21000	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
32	31000	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5



20例の薬剤耐性関連変異が検出された。これは全体の15%であり、未治療の新規感染者において薬剤耐性変異をもつ微少集団が多く存在することが明らかになった。

今回用いた未治療新規感染者137例の内、ダイレクトシーケンシングで耐性変異が確認された例は7例であったが、7例すべてPCR-MS法でも同様の薬剤耐性変異が検出された。また、ダイレクトシーケンシングで検出されず、PCR-MS法でのみ微少変異が検出された例が13例あった。このうち6例は存在比20%以下の薬剤耐性微少集団であった。このことから、PCR-MS法を用いることによりダイレクトシーケンシングよりも高頻度で薬剤耐性変異例が確認される可能性が示された。

微少耐性変異を検出するためによく使われている allele-specific real-time PCR法がもつ問題点の一つとして、3通りの点変異を同時に測定できないことが挙げられる。今回PCR-MS法で薬剤耐性関連変異が検出された20例の内、T215T/S/Lが3%/95%/2%、T215T/L/Yが18%/77%/5%、T215T/L/Yが1%/93%/6%と3例で3通りの変異が同時に測定された。この点

においてPCR-MS法は allele-specific real-time PCR法よりも優れていると考えられる。

今後の研究課題としてY181C、K70R、それ以外の新規薬剤に対する耐性変異についても検討し、様々な種類の耐性変異を検出する系を確立することが重要である。また、より多くの新規感染症例の検査を行うと共に治療開始後早期に薬剤耐性を獲得した臨床検体の検査を行い、薬剤耐性微少ウイルス集団の存在と治療の推移等の関連性を調べる必要があると考えられる。

E. 結論

PCR-MS法を用いて未治療新規感染者137例の微少耐性変異の検出と定量を行った結果、L90Mで2例、K103Nで3例、M184Vで3例、T215で12例、計20例の薬剤耐性関連変異が検出された(15%)。そのうち6例は存在比20%以下の薬剤耐性微少集団であった。PCR-MS法は微少耐性ウイルスを持つ患者の治療及び疫学における意味を明らかにするために有用であると考えられる。

表3 未治療新規感染者のPCR-MS測定結果(名古屋医療センター)ダイレクトシーケンスで検出された5例

Sub type	VL (copies /mL)	PCR-MS				sequence	
		PI		RTI		PI	RTI
		L90	K103	M184	T215		
B	310000				L: 97%, Y: 3%	I13V I62V L63[T.A] I64V	T215L
B	410000				S: 95%, T: 3%, L: 2%	I62V L63A A71[T.J.A.V] I93L	T215S
B	120000				S: 98%, L: 2%	M36[I.M] I62V L63A A71V I93L	T215S
B	690				L: 81%, T: 19%	I62I/V	T215L
B	1600		N: 94%, K: 6%			I62V I93L	K103N

表4 未治療新規感染者のPCR-MS測定結果(名古屋医療センター)ダイレクトシーケンスで検出されなかった11例

Sub type	VL (copies /mL)	PCR-MS				sequence	
		PI		RTI		PI	RTI
		L90	K103	M184	T215		
AE	460000				T: 98% Y: 2%	I13V E35D M36I H69K	V179I
B	680				I: 98% L: 2%	I13[I.V] L63[P.L] H69[H.Y] V77[I.V]	-
B	71000				T: 79% L: 21%	E35D L63P V77I I93L	-
AE	16000			M: 97% V: 3%		G16[E.G] K20R M36I	-
B	1800000		N: 58% K: 42%			I62V V77I	-
B	46000				L: 77% T: 18%, Y: 5%	D60[E.D] I62V	-
B	10000				L: 93% Y: 6%, T: 1%	L63P V77I	-
B	1200				T: 72% Y: 28%	G16[E.G] M36[I.M] I62V	-
AE	37000			M: 96% V: 4%		M36I I93L	-
B	22000				T: 50% Y: 50%	M36I L63P V77I/V	-
B	190000	L: 99% M: 1%				G16E I62V I64I/V	-

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kondo, M., Sudo, K., Tanaka, R., Sano, T., Sagara, H., Iwamuro, S., Takebe Y., Imai, M., and Kato, S. (2009) Quantification of HIV-1 group M proviral DNA using TaqMan MGB real-time PCR. *J. Virol. Methods* 157(2):141-146.
2. Suzuki, T., Yamamoto N., Nonaka, M., Hashimoto, Y., Matsuda, G., Takashima, S., Matsuyama, M., Igarashi, T., Miura, T., Tanaka, R., Kato, S., and Aida, Y. (2009) Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) nuclear import via Vpr-Importin α interaction as a novel HIV-1 therapy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 380(4):838-843.

2. 学会発表

1. Shingo Kato. Quantification of HIV-1 RNA in clinical serum samples by the Poisson distribution-based method. The 4th Japan-Germany HIV/AIDS Symposium. 2009, March 23-24, Bochum, Germany.
2. 加藤真吾「シンポジウム：わが国におけるHIV検査戦略、我が国におけるHIV検査の現状と課題」第23回日本エイズ学会学術集会（2009年11月26-28日、名古屋）
5. 植田知幸、加藤真吾「休止期PBMCにおけるHIV-1感染防御機構の解析」第23回日本エイズ学会学術集会（2009年11月26-28日、名古屋）
6. 服部純子、瀧永博之、吉田繁、千葉仁志、小池隆夫、佐々木悟、伊藤俊広、内田和江、原孝、佐藤武幸、上田敦久、石ヶ坪良明、近藤真規子、今井光信、長島真美、貞升健志、古賀一朗、太田康男、山元泰之、福武勝幸、田中理恵、加藤真吾、宮崎菜穂子、藤井毅、岩本愛吉、西澤雅子、仲宗根正、巽正志、椎野禎一郎、林田傭総、岡慎一、伊部史朗、藤崎誠一郎、金田次弘、横幕能行、濱口元洋、上田幹夫、大家正義、田邊嘉也、渡辺香奈子、渡邊大、矢倉裕輝、白阪琢磨、栗原健、小島洋子、森治代、中桐逸博、高田昇、木村昭郎、南留美、山本政弘、松下修三、藤田次郎、健山正男、堀成美、杉浦互「2003－2008年の新規HIV/AIDS診断症例における薬剤耐性頻度の動向」第23回日本エイズ学会学術集会（2009年11月26-28日、名古屋）
7. 須藤弘二、杉浦互、加藤真吾「PCR-MS法を用いた新規感染者血漿中の薬剤耐性微少集団の定量」第23回日本エイズ学会学術集会（2009年11月26-28日、名古屋）

8. 伊部史朗、横幕能行、椎野禎一郎、田中理恵、服部純子、藤崎誠一郎、岩谷靖男、間宮均人、内海真、加藤真吾、濱口元洋、杉浦互「日本におけるHIV-2感染症の分子疫学的解析」第23回日本エイズ学会学術集会（2009年11月26-28日、名古屋）
9. 井戸田一朗、加藤朋子、畑寿太郎、島川真知子、佐野貴子、近藤真規子、須藤弘二、加藤真吾、今井光信「急速な進行と多彩な合併症を伴い、初期治療に早期に失敗した急性HIV感染症の一例」第23回日本エイズ学会学術集会（2009年11月26-28日、名古屋）
10. 川畑拓也、森治代、小島洋子、秋吉京子、近藤真規子、中澤よう子、宇宿秀三、貞升健志、長島真美、矢永由里子、今井光信、加藤真吾「HIV検査相談体制における新型インフルエンザウイルス流行の影響」第23回日本エイズ学会学術集会（2009年11月26-28日、名古屋）
11. 村山正晃、池野良、児玉泰光、川口玲、田邊嘉也、加藤真吾、高木律男「唾液中HIV-1濃度が血液中よりも高かった3症例」第23回日本エイズ学会学術集会（2009年11月26-28日、名古屋）
12. 近藤真規子、須藤弘二、佐野貴子、倉井華子、立川夏夫、相良裕子、岩室紳也、加藤真吾今井光信「コバスTaqMan HIV-1でのRNA定量値がアンプリコアHIV-1モニターに比べ100倍以上低値であった症例の解析」第23回日本エイズ学会学術集会（2009年11月26-28日、名古屋）
13. 田中理恵、加藤真吾「ポアソン分布を用いた血中のHIV-1 RNA量の定量」第23回日本エイズ学会学術集会（2009年11月26-28日、名古屋）
14. 佐野貴子、西大條文一、井戸田一朗、須藤弘二、加藤真吾、近藤真規子、今井光信「抗HIV抗体量により感染時期を推測するための検査法の検討」第23回日本エイズ学会学術集会（2009年11月26-28日、名古屋）

G. 知的所有権の取得状況

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

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

新規抗HIV薬(ARV)の使用状況を把握することによって治療困難症例が直面する問題を明らかにすることを目的として、全国のHIV診療機関377施設を対象に、新規ARV(ダルナビル、ラルテグラビル、エトラビリン、マラビロク、T-20、Tipranavir)使用状況について詳細なアンケート調査を行った。総服薬患者5,474例中、新規ARV服用症例は260例(4.7%)であった。新規ARVへの主な変更理由は効果不良33.1%(85名)、副作用43.1%(112名)であった。新規抗HIV薬剤使用前の耐性検査実施率は全体では40.8%、効果不良群では81.2%であった。使用経験薬剤数の平均は全体では5.8剤、効果不良理由群では7.8剤、効果不良理由群における新規抗HIV薬の平均使用期間11.1ヶ月で、HIV-RNA量平均低下量は1.5logコピー/mL、CD4数平均上昇量は83.4個/ μ Lであった。新規抗HIV薬導入症例では副作用軽減目的が多く、長期治療・かつ多数の薬剤使用経験があったが、新規抗HIV薬への変更によって良好な治療成績が得られていることが明らかになった。

A. 研究目的

近年、日本において承認された抗HIV薬は、サルベージとしての用途を目的に承認されているものの、副作用の軽減など他の理由にした薬剤変更も多数行われており、その使用実態はつかめていない。また、サルベージ症例は、各施設における症例数が非常に少ないため、直面した際の処方選択は難しい。今回、新規抗HIV薬の使用調査を行い、使用状況の把握と、治療困難症例が直面する問題を明らかにし、今後の治療選択に役立つものを目的として行った。

B. 研究方法

【研究デザイン】

各施設の既存資料(診療録等)を活用した後ろ向きの観察的研究を行った。背景因子を使用した解析も行うが、主たる目的は日本における新規抗HIV薬の使用状況と、その背景にある耐性実態を把握する記述的臨床疫学研究である。

【対象施設】

全国のHIV診療拠点病院、及びクリニックの全377施設に対して実施した。

【調査対象例】

現在、新規抗HIV薬である以下の薬を投与中の全ての患者。

ダルナビル(商品名プリジスタ)、ラルテグラビル(商品名アイセントレス)、

エトラビリン(商品名インテレンス)、マラビロク(商品名シーエルセントリ)、

T-20(商品名fuzeon)、Tipranavir(商品名Aptivus)

【調査内容】

今回の調査では、新規抗HIV薬の選択に至る背景、及び予後を中心に以下の調査を行った。(※は選択形式)

- ①現在のメニュー：現在の新規抗HIV薬メニュー、及びその開始年月
- ②患者背景：生年月、性別(※)、感染経路
- ③検査データ：現メニューに切替え直前におけるCD4数(個/ μ L)、及びHIV-RNA量(コピー/mL)、

最も直近のCD4数(個/μL)、及びHIV-RNA量(コピー/mL)

- ④切り替える直前の抗HIV薬メニュー
- ⑤新規抗HIV薬処方理由(※)
- ⑥新規抗HIV薬処方前の耐性検査実施の有無(※)
- ⑦現在までの使用薬剤(※)

【データの匿名性】

本研究では、多剤耐性HIVの背景因子との関連性より、患者背景として生年月、性別、感染経路の情報を収集するが、当研究班では各患者を特定する情報(イニシャル、名前、住所、診療録番号等)は有しておらず、非連結匿名化された情報として維持する。また、本研究実施にあたって、対象症例データは各施設において匿名コード化されるが、この際、イニシャル、診療録番号は用いないようにし、匿名を保つ。

(倫理的配慮)

本研究は、HIV診療拠点病院、及びクリニックの既存資料(診療録)からの情報を受け、疫学研究に関わる倫理指針を遵守して行った。

- 1) 全ての情報は、既存情報であり、生体資料を用いない観察研究である
 - 2) 主たる研究機関である国立感染症研究所倫理委員会の承認をうけて実施する
 - 3) 当該研究の目的を含む研究の実施についての情報を研究班ホームページ上で同指針第3-1(2)細則に準じて公開する
 - 4) 情報は匿名化されていると判断される
 - 5) 公表する情報は集計であり個人を特定できない
- 以上より、同指針第3-1細則①~⑤、同第4-3-(2)を適用し、インフォームドコンセント行わず実施することに倫理的問題はないと判断した。

C. 研究結果

回答があった203施設における通院患者は7692名、うち総服薬者5474名(71.2%)であった。新規抗HIV薬使用症例は260症例で、全服薬者の4.7%にあたる(図1)。主な変更理由は効果不良33.1%(85名)、副作用43.1%(112名)であった。新規抗HIV薬剤使用前の耐性検査実施率は全体では40.8%、効果不良群では81.2%であった(図2)。使用経験薬剤数の平均

【回答施設】 203/377 施設 回答率;53.8%
 【通院症例数】 7692名
 【服薬症例数】 5474名
 服薬症例/通院症例 = 71.2%
 【新薬導入症例】 260名 (50施設)
 男性:女性 228:28
 新薬症例/服薬症例 = 4.7%
 【効果不良による変更症例数】 85名
 効果不良による変更症例数/服薬症例 = 1.6%
 ≡わが国の既治療患者における多剤耐性割合
 // /通院症例 = 1.1%

図1 調査結果(全体)

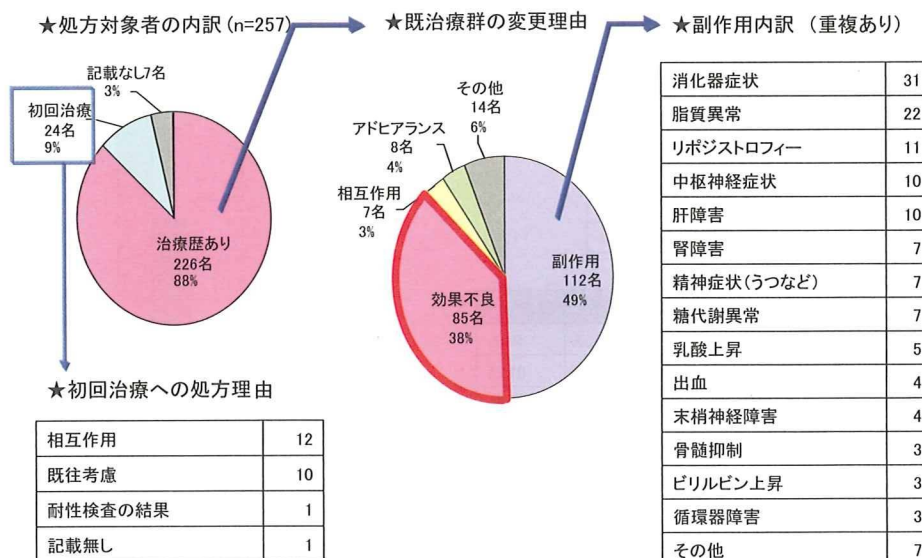


図2 新薬使用者の変更理由