

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/μLであった(図3)。

D. 考察

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、今回の変更により新規抗HIV薬が奏功していることが明らかとなった。

E. 結論

日本における新規抗HIV薬の長期使用経験はまだなく、長期的忍容性や耐性機序については不明な部分も多い。施設ごとの多剤耐性症例は少ないため、全国規模でのサーベイランスを行うことが今後の治療を考えていく上で大変重要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. バイオテロ対応ホームページ (http://bt.sfc.wide.ad.jp/) の立ち上げと、同内容のCD-ROM作成
2. Mizutani T, Ishizaka A, Tomizawa M, Okazaki T, Yamamichi N, Kawana-Tachikawa A, Iwamoto A,

Iba H. Loss of the Brm-type SWI/SNF chromatin remodeling complex is a strong barrier to the Tat-independent transcriptional elongation of human immunodeficiency virus type 1 transcripts. J Virol. 2009 Nov;83(22):11569-80

3. Nunoya J, Nakashima T, Kawana-Tachikawa A, Kiyotani K, Ito Y, Sugimura K, Iwamoto A. Short communication: generation of recombinant monoclonal antibodies against an immunodominant HLA-A*2402-restricted HIV type 1 CTL epitope. AIDS Res Hum Retroviruses. 2009 Sep;25(9):897-904.
4. Miyazaki E, Kawana-Tachikawa A, Tomizawa M, Nunoya J, Odawara T, Fujii T, Shi Y, Gao GF, Iwamoto A. Highly restricted T-cell receptor repertoire in the CD8+ T-cell response against an HIV-1 epitope with a stereotypic amino acid substitution. AIDS. 2009 Mar 27;23(6):651-60.
5. 薬剤耐性HIVインフォメーションセンターホームページ(http://www.hiv-resistance.jp/)の立ち上げ
6. 宮崎菜穂子、松下修三、藤井毅、杉浦互. 抗HIV療法を受けている患者における薬剤耐性HIVの現状と問題点：日本エイズ学会誌 11(2);p146-51,2009.
7. 藤井毅. HIV/AIDSの診断・治療の最新知見：医学の歩み 231(1);p41-46, 2009.
8. 藤井毅. HIV感染症/AIDS：治療 91;1210-

★総治療期間(平均)

	年
全体	6.6
効果不良群	8.8
〃 以外	5.5

★これまで使用した抗HIV薬の剤数(平均)

	剤
全体	5.8
効果不良群	7.8
〃 以外	4.8

★新薬使用期間(平均)

	月
全体	9.1
効果不良群	11.1
〃 以外	8.1

★耐性検査実施率

	実施/全体(名)	実施率
全体	105/257	40.9%
効果不良群	69/85	81.2%
〃 以外	36/172	20.9%

★HIV-RNA量減少(平均・logコピー/mL)

	コピー/mL(log)
全体	1.1
効果不良群	1.5
〃 以外	0.9

★CD4(平均・個/μL)



図3 効果不良群の背景

14,2009.

9. 吉田文、宮崎菜穂子、黒川陽介、内服困難者な HIV/AIDS患者への経管投与は可能か? : 薬局 60(8);p2948-54, 2009.

(第2報): 日本医療薬学会年会.2009.10,長崎.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

学会発表

1. 宮崎菜穂子、松下修三、藤井毅、岩本愛吉、杉浦互、多剤耐性症例治療を目的とした新規抗 HIV薬使用症例に対する緊急全国調査:第23回日本エイズ学会学術集会.2009.11,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、加藤信吾、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、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、掘成美、杉浦互、2003-2008年の新規HIV-1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.2009.11,名古屋.
3. 今井健太郎、前田卓哉、菊池正、宮崎菜穂子、鯉淵智彦、古賀道子、中村仁美、三浦聡之、藤井毅、岩本愛吉、ペンタミジンによる低血糖が長期間遷延したAIDS症例:第23回日本エイズ学会学術集会.2009.11,名古屋.
4. 立川(川名)愛、中山香、古賀道子、鯉淵智彦、小田原隆、藤井毅、岩本愛吉、日本人集団におけるHIV特異的細胞性免疫応答の解析: 第23回日本エイズ学会学術集会.2009.11,名古屋.
5. 菊池正、古賀道子、鯉淵智彦、今井健太郎、中村仁美、三浦聡之、小田原隆、藤井毅、岩本愛吉、ART初回導入したABC、TDFの使用症例の血清脂質の経時的変化について: 第23回日本エイズ学会学術集会.2009.11,名古屋.
6. 鯉淵智彦、今井健太郎、菊池正、古賀道子、中村仁美、三浦聡之、藤井毅、岩本愛吉、HAART導入1年半後にCD4数の減少を来し、Diffuse Large B-cell Lymphoma(DLBCL)と診断された一例: 第23回日本エイズ学会学術集会.2009.11,名古屋.
7. 吉田文、宮崎菜穂子、菊池正、鯉淵智彦、藤井毅、岩本愛吉、高橋昌明、黒川陽介、内服困難患者に対する抗HIV薬の投与方法についての検討



研究要旨

近畿ブロックにおける薬剤耐性HIVの調査研究

研究分担者 白阪 琢磨 国立病院機構大阪医療センター

臨床研究センター エイズ先端医療研究部 部長

研究協力者 渡邊 大¹、上平 朝子²、山本 信夫³、新田 幸一³、管尾 龍彦³、
佐子 肇³、常松 裕子³、溝上 泰司³、松永 加奈江³、真能 正幸³、
吉野 宗宏⁴

¹大阪医療センター HIV感染制御研究室 ²同 感染症内科

³同 臨床検査科 ⁴同 薬剤科

薬剤耐性HIV変異株の出現はHIV感染症の臨床上重要な課題となっており、近畿ブロックでの薬剤耐性検査の実施とその結果を臨床に反映するシステム構築が必要とされる。昨年度に引き続き、新規HIV感染者における薬剤耐性変異の有無の頻度について調査した。平成21年に当院を受診した初診患者のうち44名が対象となった。RT領域にM41L、D67Nの変異を認めるのみで、PR領域も含め他の一次変異はなかった。平成20年・平成21年初診患者のうち、初回治療導入後、3ヶ月以内に治療失敗と判断された症例が3例あった。いずれの症例も治療開始後の検体にのみ一次変異を認めた。新規抗HIV薬に関して当院での使用調査を行った。副作用のため新規抗HIV薬を使用した症例が多く、いずれも良好な抗ウイルス効果が得られた。薬剤耐性検査は臨床上重要であり、新規抗HIV薬の登場とともにシステム構築の改変も必要とされる。

A. 研究目的

HIV感染症は抗HIV療法の進歩によって慢性疾患になったと捉えられているが、実際には種々の理由から適切な服薬を継続できずにウイルス学的治療失敗となり、その結果、投与薬剤に耐性なHIV変異株が出現する事が知られている。この薬剤耐性HIV変異株は他剤にも交叉耐性を示すことも、しばしばであり、薬剤耐性HIV変異株の出現は臨床上重要な課題となっている。本研究の最終目標は近畿ブロックで、薬剤耐性検査が必要なHIV感染症患者に薬剤耐性検査を実施でき、かつ、その検査結果を臨床に反映できるような薬剤耐性検査システムを構築することである。今年度は当院での新規HIV感染者における薬剤耐性変異の頻度を調査し、ウイルス学的治療失敗症例においては、経時的に薬剤耐性変異を解析した。

ここ数年で多剤耐性症例にも効果が認められる複数の抗HIV薬が保険収録された。プロテアーゼ阻害剤であるdarunavir (DRV、商品名プリジスタ)に加え、raltegravir (RAL、商品名アイセントレス)、etravirine (ETR、商品名インテレンス)そしてmaraviroc (MVC、商品名シーエルセントリ)である。

これらの新しく承認をうけた抗HIV薬（以下新規抗HIV薬）は多剤耐性症例におけるサルベージ療法として用いることが想定されているが、副作用などのための薬剤変更も行われている。そこで、使用状況を明らかにするために当院における処方の実態について診療録から後ろ向き調査を行った。

B. 研究方法

薬剤耐性検査方法は、患者から採血後直ちに血漿を分離し、ウイルスRNAを抽出した。その後特定のプライマーを用いてRT-PCR法でHIV-1（以下HIV）の逆転写酵素およびプロテアーゼ領域を増幅した。一部の症例ではインテグラーゼ領域についても増幅を行った。増幅されたDNAをdirect sequencing法にて決定した。決定された塩基配列を既報告の薬剤耐性に関連する変異と照合した。平成21年度に（独）国立病院機構大阪医療センターで薬剤耐性検査を実施した症例のうち、平成21年に初めて感染が確認されたものを対象とし、カルテから情報を収集し検討を行った。また、新規抗HIV薬調査については平成21年7月20日までにDRV・ETR・RAL・MVCを用いた35例を対象として、診療記録から経

過について情報を収集した。

(倫理面への配慮)

研究の遂行に関しては、当院の倫理委員会に相当する受託研究審査委員会で承認を得た方法を用いた(薬剤耐性HIVの動向把握のための調査耐性確立およびその対策に関する研究・承認番号0820、新規抗HIV薬使用症例調査・承認番号0918)。いずれも個人情報取り扱いについては厳重に行った。日本未承認薬(RALとETRで保険収録前の投与)に関しては、当院の倫理委員会にて審査・承認をうけたのち、患者に投与を行った。

C. 研究結果

国立大阪医療センター初診患者は年々増加傾向あり(図1)のうち、平成21年度は250名が来院した。累計の患者内訳は男性が94.5%と大多数で、初診時は20~30歳代が多く、約1/4がAIDSを発症していた(図2)。平成21年度に初めて感染が確認され、未治療のまま薬剤耐性検査が実施された44名から検体を採取し解析を行った。背景は図3に示した。サンプリングポイントが治療開始時の症例が多かったため、CD4陽性リンパ球数の中央値65/μL(最大677/μL, 最小1/μL)、血漿HIV-RNA量の中央値

193,500cp/ml(最大9,070,000cp/ml、最小3,370cp/ml)と免疫能低下症例が多数を占めていた。耐性検査の結果は図4に示した。PCRにてRT領域が増幅されなかった症例が1例、PR領域が増幅されなかった症例が1例あった。RT領域にM41L、D67Nの一次変異を認めるのみで、PR領域には一次変異を認めなかった。

平成20年~21年初診患者のうち、初回治療導入3ヶ月以内に治療失敗と判断された症例は3例存在した。1例はTVD+EFVで初回導入された症例(図5)

新規診断患者、44名から検体採取

・推定感染経路	・国籍	・CD4数
同性間 39例	日本 41例	中央値 65/μL
異性間 5例	外国 3例	(1-677)
・推定感染場所	・Subtype (pol)	・HIV-RNA量
国内 40例	B 42例	中央値 193,500cp/ml
国外 2例	01_AE 2例	(3,370-9,070,000)
不明 2例		

図3 2009年耐性検査の患者背景

PR領域 (43症例)	RT領域 (43症例)
L101V 6	M41L 1
I13V 2	D67N 1
G16E 5	V106I 4
K20R 1	V179D 3
M36I/L 9	T215A/D 2
D60E 3	
I62V 15	
L63P 15	
I64V 2	
H69K 2	
A71T/V 14	
V77I 17	
I93L 28	

図4 2009年耐性検査の結果のまとめ

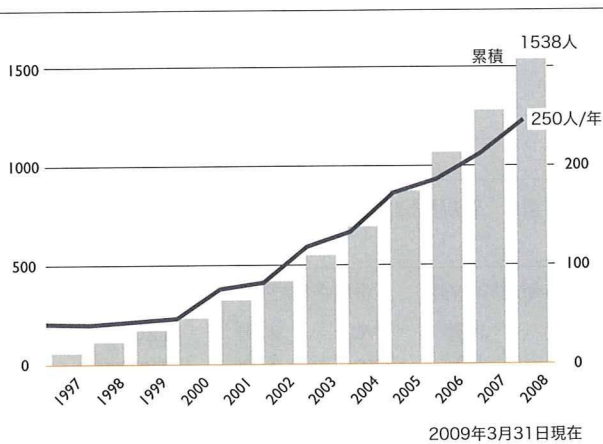


図1 累積患者数と年間新規患者数の推移

・性別	人数 (%)	・年齢別	人数 (%)
男性	1414 (94.6)	10代	32 (2.1)
女性	81 (5.4)	20代	419 (28.0)
・感染経路別		30代	597 (39.9)
血液製剤	81 (5.4)	40代	272 (18.2)
同性間	1066 (71.3)	50代	125 (8.4)
異性間	266 (17.8)	60代~	50 (3.3)
不明	163 (10.9)	・初診時病期	
・死亡者数	52 (3.5)	HIV	1124 (75.2)
		AIDS	263 (24.8)

平成21年3月9日1495名

図2 外来受診状況

症例I 初回治療導入例 サブタイプB
 薬剤耐性検査 ↓ 治療前 PR: L60P, I93L RT: (-)
 ↓ 治療後 PR: M36IM, L63P, I93L
 RT: K65R, G190E

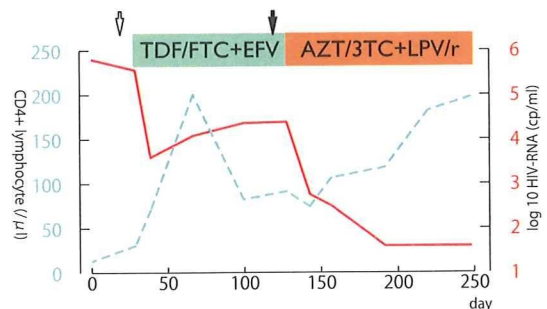


図5 初回導入後の早期治療失敗例1

であり、投与3ヶ月後においても血中ウイルス量が数万で経過し、K65RとG190Eの変異を認めた。EZC+ATVで初回導入された症例(図6)では、同様に投与3ヶ月後においても血中ウイルス量の低下がなく、PR領域にN88S、RT領域にD67GとM184Vの変異を認めた。最後の一例はEZC+RALで初回導入となった症例(図7)である。入院加療中のため服薬率は100%であるが、投与2ヶ月後においても血中ウイルス量の低下を認めず、RT領域にM184Vの変異を、IN領域にE92EQの変異を認めた。最後の症例の治療開始前のIN領域の検査は施行予定であるが、いずれの症例においても治療開始前の耐性検査ではPRおよびRT領域に一次変異は認めなかった。

平成21年7月20日までに当院で新規抗HIV薬を使用されていたのは35症例であった。年齢の中央値は40歳(最高72歳、最低30歳)で、50歳以上が8例(23%)と外来通院患者全体の分布と比較すると高齢の症例に投与がなされていた(図8)。大多数が男

性(33例、94%)であり、推定感染経路は同性間性的接触が22例(63%)と最も多かったが、血液製剤による感染例も7例(20%)認めた。初回治療開始時期は2000年以前の症例が多かった。新規抗HIV投与前のCD4数は大多数は200以上であり、血中HIV-RNA量も感度未満である症例が14例(40%)と、比較的コントロールされた症例が多かった。投与された新規抗HIV薬は、DRVが10例、RALが28例、ETRが8例(後から追加投与された3例は除く)であり、MVCの投与はなかった(図9)。新規抗HIV薬と併用した抗HIV薬としては、TVDが最も多く、約半数(17例、49%)で併用されていた。投与メニューは21種類と多岐にわたった。投与理由は副作用が24例(69%)と最も多く、効果不十分は1/3程度(12例、34%)であった(図10)。副作用としては、倦怠感・嘔気・下痢・腹満感・食欲低下・リポディストロフィー・高脂血症・肝障害・乳酸アシドーシス・しびれ等があげられた。

症例2 初回治療導入例 サブタイプB
 薬剤耐性検査 ▲治療前 PR: L10V, M36I, L63A RT: (-)
 ▼治療後 PR: L10V, M36I, L63A, **N88S**
 RT: **D67G, M184V**

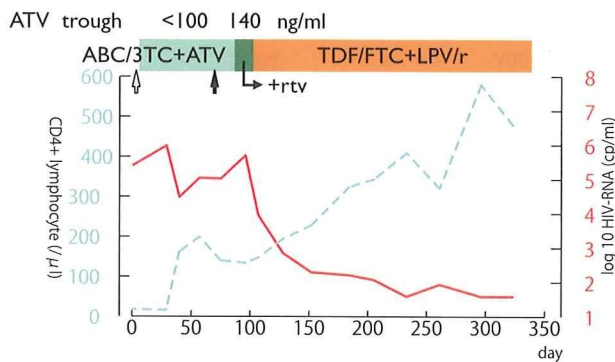


図6 初回導入後の早期治療失敗例2

症例3 初回治療導入例 サブタイプB
 薬剤耐性検査 ▼治療前 PR: I13V, G16E, I62V, V77I RT: (-)
 IN: 実施予定
 ▼治療後 PR: I13V, G16E, I62V, V77I RT: **M184V**
 IN: **E92E/Q**

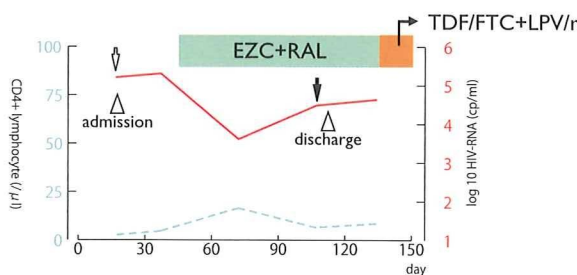


図7 初回導入後の早期治療失敗例3

・年齢		・推定感染経路		・CD4数	
30代	14例 (40%)	同性間	22例	中央値	249/μL
40代	13例 (37%)	異性間	3例		(6-932)
50代	4例 (11%)	血液製剤	7例		
60代~	4例 (11%)				
・性別		・初回治療開始時期		・HIV-RNA量	
男性	33例	~1999年	13例	中央値	150cp/ml
女性	2例	2000年~	6例		(<40-280,000)
		2004年~	6例		
		2008年~	6例		

図8 新規抗HIV薬投与症例の患者背景 (35症例)

・投与新規抗HIV薬		・併用された抗HIV薬		・投与メニュー	
DRV	10例	TVD	17例	EZC,RAL	4例
RAL	28例	EZC	11例	TVD,RAL	3例
ETR*	8例	ABC, 3TC	2例	TVD,ETR	3例
MVC	0例	COM	1例	TVD,ETR,RAL	3例
		EFV	2例	その他(17組)	22例
		NVP	1例		
		FPV	3例		
		LPV/r	3例		
		ATV/r	1例		

図9 新規抗HIV薬と投与メニュー (35症例)

副作用の軽減	24例
効果不十分	12例
アドヒアランス不良	3例
薬剤相互作用	1例
など	

図10 新規抗HIV薬投与理由 (35症例)

D. 考察

HIV耐性検査は治療導入前の施行がガイドライン上勧められており、検査結果によって使用薬剤が変更されることもある。今年度の解析結果では、RT領域にM41LとD67Nを認めるのみで、直接治療の選択に関わる変異は同定されなかった。この変異は国内からも多数報告されており、2003-2004年の日本における出現率はそれぞれ0.7%と0.2%とされている（HIV薬剤耐性検査ガイドライン2007年3月）。この変異は確かにいくつかの薬剤において低レベルの耐性を引き起こすが、他の耐性が併発しない限りは現在の推奨レジメンを用いるうえで問題はない。一方、初回治療後に早期にウイルス学的治療失敗となり、耐性変異を確認した症例を3例経験した。これらの症例はいずれも治療開始前にはPRおよびRT領域に耐性変異を認めなかった。100%の内服率にも関わらず耐性変異が出現した症例があるため、おそらく耐性株がminor populationとして存在し、治療導入後に選択的に増殖したと考えられる。AIDS発症例等では速やかな血中ウイルス量のコントロールと免疫の再構築が望まれるため、minor populationの検出の臨床応用も期待される。

新規抗HIV薬のなかで、最も頻用されているのがインテグラーゼ阻害剤であるRALである。平成20年7月から国内において使用可能となっている。当院では海外輸入により平成20年5月から2症例に投与を行い、以降も併せて平成21年7月20日の段階で28症例に投与を行った。すでに報告されているように、抗ウイルス効果は良好であり、RALを除く多剤耐性症例にも関わらず全例において良好な血中ウイルス量の減少を認めた。また、特記すべき副作用もなく、atazanavirと併用時のみ血中濃度が上昇する程度で薬剤相互作用の問題もほとんど知られていない。多剤耐性症例のみではなく、副作用が許容できない症例に広く処方されていた。初回治療として用いることが保険適応となったことや、DHHSのガイドラインにおいても初回治療の推奨レジメンに加えられたことから、広く使用されることは容易に推測される。一方で現時点では治療実績が十分にでないことから、初回治療例に対するEZC+RALの投与や、治療失敗歴のある症例に対するTVD+RALの投与により長期的にウイルスの増殖抑制が得られるかどうか不安の声もある。そのため、TVD・EZCに加えETRやFPV、ATV/r等も同時併用されている症例もある。また、初回治療早期にウイルス学的治療失敗となり耐性変異が出現したRAL使用症例も認められており、DRV/r、ETRを含め、使用に関する治療指針の作製についても期待される。

E. 結論

新規患者におけるHIVの薬剤耐性遺伝子の検索を44名に対して行った。RT領域にM41L、D67Nの変異を認めるのみであった。一方、昨年度および今年度で早期にウイルス学的治療失敗となった3症例を経験し、いずれも治療開始前ではPRおよびRT領域に耐性を認めなかった。新規抗HIV薬の使用調査を行い、当院では35症例に対してDRV、ETR、RALが投与されていた。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

学会発表

(国内学会)

1. 上平朝子、吉野宗宏、渡邊大、宮成伸次郎、谷口智宏、矢嶋敬史郎、小川吉彦、坂東祐基、矢倉裕輝、笠井大介、西田恭治、白阪琢磨：当院における新規抗HIV薬（Raltegravir, Etravirine）の使用経験。第23回日本エイズ学会学術集会・総会、愛知、2009年11月

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治療の最適化研究

研究分担者 松下 修三 熊本大学エイズ学研究センター 教授

我々は、昨年度に引き続き、複数の患者から分離した臨床分離株を用いて、新規HIV-1治療薬であるインテグラーゼ阻害薬ラルテグラビル (Raltegravir, RAL)に対するin vitro耐性誘導を行い、primary変異の出現をはじめとする耐性機序についてウイルス学的な検討を行った。本年度は、さらに新たな感染症例より分離した3つの臨床分離株を加えてRALに対するin vitro耐性誘導を行った。その結果、これまで臨床データのみで認められているものの、in vitroでの耐性誘導は報告されていないY143C/R変異や、これまでに報告がない新たな関連変異であるG163Rがin vitroで誘導された。これらのことは実験室株ではなく各種臨床分離株を用いる本システムにより、in vivoに近い耐性変異のデータを得ることが可能なことを示している。また、今回耐性誘導に用いた臨床分離株ではRALをはじめとするpol系阻害剤に対する耐性メカニズムの新たな知見として、直接pol領域に耐性変異が蓄積する前に、もともとあるレパートリーからpolのみならずenvにおいても選択が生じ、その後により高度な耐性を獲得する為の活性中心への耐性変異が蓄積していくことが示唆された。

A. 研究目的

HIV感染症に対する治療は、逆転写酵素阻害剤 (RTIs) とプロテアーゼ阻害剤 (PIs) による多剤併用療法 (HAART) が主体となり、臨床的に大きな効果を上げているが、一方でHIVがRTIsとPIsの両剤に対して耐性を獲得し、その多くが交叉耐性であって治療に抵抗するという問題は、臨床・基礎医学の分野で避けて通ることのできない最重要課題となっている。この課題を解決するためには、HIV-1が耐性を発現しにくい、または発現しても他薬剤との交差耐性を有しない新規のRTIsおよびPIs、更に全く新たな作用機序を有する抗HIV剤の開発など、新しい治療法についての研究が必要である。

我々は、昨年度までに、臨床分離株を用いたRALに対するin vitro耐性誘導実験法を確立し、RALの作用部位ではないエンベロープ (Env) 領域における誘導変異の存在を明らかにした。これらの結果から、直接pol領域に耐性に関与する変異が生じる前に、

何らかの選択圧がEnv領域に加わり、その後、徐々にpol領域に耐性変異を獲得していくメカニズムの可能性が考えられた。今年度はこれらの解析をより詳細に行なうために、新たに3人の感染症例よりウイルス分離し、RALに対するin vitro耐性誘導を行い、primary変異の出現をはじめとする耐性機序について詳細なウイルス学的な検討を行った。

B. 研究方法 (倫理面への配慮)

1. 耐性ウイルスの出現という課題を解決するために、現在までに各抗HIV-1剤に対するin vitro耐性誘導解析が進められて成果を上げてきたが、これらの研究には実験室株であるサブタイプBのX4ウイルスをT細胞株に感染させる方法が主に採用されており、in vitroの知見と臨床の知見で少なからず乖離が認められるという問題点が存在する。実際に患者体内で感染の主体となっているR5臨床分離ウイルス

を用いた耐性誘導の研究は殆どなく、ましてやサブタイプ B 以外の HIV-1 R5 臨床分離ウイルスが用いられることはほとんどなかった。

そこで本年度は、新たに本学付属病院の 3 名の新規感染症例より各種サブタイプの R5-臨床ウイルスを分離し、昨年度から継続している臨床ウイルス (X4, R5, および X4R5 混在) も含めた現在流行しているウイルスを用いて、PM1/CCR5 細胞を標的細胞とし、RAL 濃度を IC₅₀ 濃度から徐々に上昇させながら in vitro 耐性誘導実験を行った。PM1/CCR5 細胞に馴化する過程で現れる変異と耐性変異を区別するために、継代コントロールとして RAL 非存在下における各ウイルスの継代も併せて行った。

2. 研究の倫理的妥当性は熊本大学医学部先進医療審査会、倫理委員会にて承認されている。

C. 研究結果

RAL の臨床試験において、(i) N155H、(ii) Q148K/H/R、および (iii) Y143C/R を primary 変異とした 3 つの RAL 耐性変異経路が報告されている (Witmer M, et. al., ICAAC, 2008)。しかしながら、in vitro 耐性誘導については、研究室株を用いた 1 報のみであり、先に挙げた primary 変異の 1 つである Y143C/R 変異の誘導の報告はまだない (Kobayashi M, et. al., Abstriviral Res., 80, 213-22, 2008)。そこで本研究では、最近分離した 7 種の臨床分離株、YANA (B, Mix), IKA (B, Mix), MOKW (B, R5), ACC4 (C, R5), UUN (CRF01_AE, X4), KMC1 (CRF08_BC, R5), KMC1/MVC (CRF08_BC, R5)、および研究室株

89.6(B, dual) を用いて、RAL に対する in vitro 耐性誘導を行い、耐性機序の検討を行った。最初に、各 baseline ウイルスのインテグラーゼ領域のアミノ酸配列および RAL 感受性を解析したところ、MOKW, KMC1, および KMC1/MVC は RAL に対し、各々 16, 32, および 32 nM と他のウイルス ($1.2 < IC_{50} < 6.9$) に比べてわずかに感受性が低かったが、今回用いた全ての baseline ウイルスが RAL 感受性であることが示された (表-1)。これら baseline ウイルスのインテグラーゼ領域のアミノ酸配列を解析したところ、これまでに報告されている RAL 耐性変異および補償変異のいずれも検出されなかったが、KMC1 および KMC1/MVC においては、これまでに報告されていない 5 塩基の挿入変異 (NQDME) が 288 残基に認められた (表-1)。

次に、これら RAL 感受性の baseline ウイルスを用いて、我々が昨年度に確立した RAL に対する in vitro 耐性誘導システムを用いて、RAL 耐性ウイルスを誘導し、インテグラーゼのアミノ酸配列および RAL に対する薬剤感受性を比較検討した。最近、Hazuda らにより、治療失敗例の患者群で認められる RAL 耐性変異として、L74M, E92Q, T97A, E138A/K, G140S, Y143C/H/R, Q148H/K/R, V151I, N155H, および G163K/R が報告されている (Hazuda DJ, et. al., International Drug Resistance Workshop, 2007)。

今回の耐性誘導の結果、G163R および Y143C 変異が IKA (21 passage) および KMC1/MVC (8 passage) で各々検出された (表-2)。他方、これまでに報告がされていない新たな置換である G189R 変異が KMC1

表 1 今回用いた baseline ウイルス (臨床分離株) の各サブタイプコンセンサス配列と比較したインテグラーゼ領域のアミノ酸変異および RAL に対する薬剤感受性。

virus	genotype	IC ₅₀ (nM) RAL
89.6 (B, dual)	S17T, D41N, Q177Q/R, T206S, D256D/N, R263R/K	1.2
YANA (B, X4R5)	K7R/K, S17N, I84M, L101I, K111R/K, G163E, Q216Q/H, D278D/N	4
IKA (B, X4R5)	V32I, S39C, A91S, L101I, M154M/I, V201I, A205S, K240R	6.9
MOKW (B, R5)	S17N, D41D/N, I72V, L101I, T112A, T124A, T125A, K211T, I217V, T218S, S283G	32
ACC4 (C, R5)	I50T, I72V, D167E, I218T, I220L, D253E, S255S/N	5.5
UUN (CRF01_AE, X4)	T21A, I31V, V32I, N39S, R136Q, E167D, D279N/D	2.1
KMC1 (CRF08_BC, R5)	K14R, D41N, L45Q, M50I, I84M, A125T, L161I, V201I, R211K, D253H, K269R, D288NQDME	16
KMC1/MVC (CRF08_BC, R5)	K14R, D41N, L45Q, M50I, I84M, A125T, L161I, V201I, R211K, D253H, K269R, D288NQDME	32

(22 passage)で認められた(表-2)。また、V31I/R263S変異が研究室株89.6 (8 passage) で検出された(表-2)。これら以外のウイルス (YANA, MOKW, ACC4, および UUN) では、12-25 passageにおいてもこれまでに報告されているRAL耐性変異および補償変異のいずれも検出されていない(表-2)。しかしながら興味深いことに、インテグラーゼおよびEnv領域において、耐性誘導前のquasispeciesから、耐性誘導群と継代コントロール群で明らかに異なった配列を有するウイルスが選択されることが明らかになった。例えば、今回用いた臨床分離株のひとつYANAでは、インテグラーゼ領域において4残基でアミノ酸の明白な選択が確認され、さらに、Env領域においても、V2挿入をはじめC1からV5までにわたり顕著な配列の違いが2群間で認められた(図-1)。以上の結果から、RAL耐性獲得におけるEnv領域の関与が改めて示唆された。

D. 考察

今回、これまでの耐性誘導解析で用いられてきたX4実験室株と異なり、国内の患者から、サブタイプBだけでなく各種サブタイプのR5-、X4-、およびX4/R5混在-臨床ウイルスを分離し、これまで報告が殆どないnon-BサブタイプおよびR5臨床分離株を中心に広範囲なRALに対するin vitro耐性誘導解析を行った結果、CRF08_BCのR5ウイルスであるKMC1/MVCにおいて、これまで臨床データのみで認められて、in vitroでは報告されていないY143C/R変異が検出された。今回の結果から、実験室株ではなく各種臨床分離株を用いることで、in vivoに近い耐性変異のデータを得ることが可能であることが示唆された。また、今回のように臨床分離株を用いた

場合、RALをはじめとするpol系阻害剤に対する耐性メカニズムの新たな知見として、直接pol領域に耐性変異が蓄積する前に、もともとあるレパトリーからpolのみならずenvにおいても選択が生じ、その後により高度な耐性を獲得する為の活性中心への耐性変異が蓄積していくことが示唆された。現在、より高度なRAL耐性株の誘導を継続して行っており、更なるウイルス学的解析を進める予定である。

E. 結論

現在の抗HIV療法における問題点である耐性ウイルスの出現に対する解決法として、今回は、最近承認された初のインテグラーゼ阻害薬ラルテグラビルに対する複数の臨床分離株を用いたin vitro耐性誘導による耐性機序の検討を行った。その結果、これまで臨床においてのみ認められたY143C/R変異およびこれまでに報告がない新たな関連変異の可能性が高いG163Rをin vitroで誘導することができた。このことは我々のin vitroの耐性誘導の系がX4, X4R5のみならずR5ウイルスを用いたRAL等の薬剤耐性の研究に有用であることを示している。また、インテグラーゼ阻害薬であるRALがEnvの選択に関与している可能性について今後検討を進めていく予定である。

表2 RAL耐性誘導で現れたインテグラーゼ領域のアミノ酸変異および薬剤感受性。

virus	passage no.	concn (nM)	mutation	IC ₅₀ (nM) RAL
89.6 (B, dual)	8	15	V31I, R263S	4.4 (3.7)
YANA (B, X4R5)	17	20	no mutation	26 (6.5)
IKA (B, X4R5)	21	50	G163R, R269K	31 (4.5)
MOKW (B, R5)	11	25	no mutation	25 (0.78)
ACC4 (C, R5)	11	20	no mutation	27 (4.9)
UUN (CRF01_AE, X4)	8	30	no mutation	33 (16)
KMC1 (CRF08_BC, R5)	22	80	G189R	32 (2.0)
KMC1/MVC (CRF08_BC, R5)	8	25	C56Y/C, Q137R/Q, Y143C	29 (0.91)

青は耐性誘導で現れたポリモルフィズムを、赤は耐性誘導で現れた変異を各々示す。

A.

		IN sequence relative to the consensus subtype B sequence								
consensus B		K	S	I	L	K	G	Q	D	
amino acid positions		7	17	84	101	111	163	216	278	
group M polymorphisms		RQE	NTC	MLV	IV	RTON	ERKQ	HRN	ANG	
YANA	base-line virus	3/12	R	N	M	I	R	E	Q	N
		3/12	K	N	M	I	R	E	Q	D
		2/12	R	N	M	I	K	E	Q	D
		1/12	R	N	M	I	R	E	Q	D
		1/12	K	N	M	I	K	E	Q	D
		1/12	K	N	M	I	K	E	H	D
		1/12	K	N	M	I	R	E	H	D
	17p.passage control	11/11	R	N	M	I	R	E	Q	N
	17p.RAL+.20 nM	12/12	K	N	M	I	K	E	H	D

B.

		Env sequence relative to the HXB2 reference sequence																																		
HXB2	amino acid positions	SP	C1							V1							V2							C2		V3										
		G	T	K	E	V	N	D	S	K	L	D	N	T	S	G	K	I	I	G	Y	F	D	INS	T	T	S	INS	K	T	A	S	T	R		
		18	31	33	47	87	94	107	128	130	134	137	139	140	144	145	151	154	161	167	173	175	185	185	188	189	190	190	192	194	281	291	304	308		
YANA	base-line virus	2/12	G	A	N	E	E	N	D	T	N	F	I	N	T	N	G	R	I	I	D	S	L	D	MGNTNNNS	T	T	S	N	K	R	A	S	I	H	
		1/12	D	T	N	D	E	D	N	T	K	F	A	E	A	D	G	N	M	I	D	H	L	D	MGNTNNNS	T	T	S	N	R	R	A	S	I	H	
		1/12	G	T	N	D	G	N	D	A	N	F	I	K	A	N	G	S	M	I	D	Y	L	D	MGNTNNNS	T	T	S	NYRS	R	I	A	T	T	H	
		1/12	G	T	D	E	G	N	D	T	N	F	I	N	T	N	G	N	M	I	D	H	L	D	MGNTNNNS	T	T	S	NYRS	R	I	V	S	T	H	
		1/12	G	A	N	D	E	D	D	T	N	S	I	N	T	N	E	S	M	I	D	Y	L	D	MGNTNNNS	T	T	S	N	R	R	A	T	T	H	
		1/12	G	A	N	E	G	D	D	T	K	F	A	E	A	D	G	N	M	T	D	Y	L	D	MGNTNNNS	T	T	S	R	S	R	R	A	T	T	H
		1/12	G	A	N	E	G	D	D	T	K	F	A	E	A	D	G	N	M	T	D	Y	L	D	MGNTNNNS	T	T	S	R	S	R	R	V	S	T	H
		1/12	G	A	N	E	E	N	D	T	K	F	A	E	A	D	G	N	M	T	D	Y	L	D	MGNTNNNS	T	T	S	R	S	R	R	V	S	T	H
		1/12	G	A	N	E	E	N	D	I	N	F	I	N	T	N	E	S	M	I	D	Y	L	N	-	N	S	S	-	R	I	A	T	T	H	
		1/12	G	A	N	D	E	D	T	N	S	I	N	T	N	E	S	M	I	G	Y	L	N	-	N	S	S	-	R	I	V	S	T	H		
		1/12	G	A	N	E	E	D	N	T	K	F	A	E	A	D	G	N	M	I	D	Y	L	N	-	N	S	S	-	R	I	A	T	T	H	
		17p.passage contrl	7/7	G	A	N	E	E	D	N	T	K	F	A	E	A	D	G	N	M	I	D	Y	L	N	-	N	S	S	-	R	I	A	T	T	H
	17p.RAL+.20 nM	5/11	D	T	N	E	G	N	D	A	N	F	I	K	A	N	G	S	M	I	D	Y	L	D	MGNTNNNS	T	T	S	NYRS	R	I	A	S	T	H	
3/11		D	T	N	E	G	N	D	A	N	F	I	K	A	N	G	S	M	I	D	Y	L	D	MGNTNNNS	T	T	S	NYRS	R	I	A	S	T	H		
2/11		D	T	N	E	G	N	D	A	N	F	I	K	A	N	E	S	M	I	D	Y	L	D	MGNTNNNS	T	T	S	NYRS	R	I	A	S	T	H		
1/11		D	T	N	E	G	N	D	A	N	F	I	K	A	N	G	S	M	I	D	Y	L	D	MGNTNNNS	T	T	S	NYRS	R	I	A	S	T	H		

		Env sequence relative to the HXB2 reference sequence																																				
HXB2	amino acid positions	V3							C3							V4							C4		V5													
		P	R	T	G	K	INS	N	R	Q	I	A	N	K	R	N	INS	S	V	N	T	S	N	N	G	D	I	Q	L	N	N	INS	N	E	S	I		
		313	315	319	321	322	323	325	327	328	333	336	340	343	350	355	365	365	372	386	394	405	406	407	410	412	414	442	453	460	462	462	463	464	465	467		
YANA	base-line virus	2/12	T	R	T	K	T	I	N	K	K	I	T	N	K	K	N	V	K	Y	D	I	D	-	-	S	G	I	L	I	G	Q	-	T	G	N	T	
		1/12	T	R	T	K	T	I	N	K	K	I	T	N	K	K	N	V	K	I	N	T	N	R	T	P	D	V	L	I	G	Q	TGT	N	G	S	I	
		1/12	P	K	A	G	A	V	D	R	Q	V	T	D	R	K	N	A	P	Y	N	T	N	R	T	P	D	V	L	I	G	Q	TGT	N	G	S	I	
		1/12	P	K	A	G	A	I	D	R	Q	V	T	D	I	K	N	V	K	Y	N	T	N	I	P	P	D	V	L	I	G	Q	TGT	N	G	N	T	
		1/12	P	K	A	G	A	V	D	R	Q	V	T	N	R	K	N	V	K	I	N	T	N	R	T	S	D	V	L	I	G	Q	TGT	N	G	N	T	
		1/12	P	K	A	G	A	V	D	R	Q	V	T	N	R	Q	-	V	K	I	N	I	N	-	-	S	G	I	H	I	G	Q	-	T	G	N	T	
		1/12	P	K	A	G	A	I	D	R	Q	V	T	D	I	K	N	V	K	Y	D	I	N	-	-	S	G	I	L	I	G	Q	-	T	G	N	T	
		1/12	P	K	A	G	A	I	D	R	Q	V	T	N	R	Q	-	V	K	Y	N	T	D	I	P	P	D	V	L	I	G	Q	-	T	G	N	T	
		1/12	P	K	A	G	A	V	D	R	Q	V	T	N	R	Q	-	V	K	Y	N	T	K	-	-	S	G	V	L	I	D	Q	-	T	G	N	T	
		1/12	P	K	A	G	A	I	D	R	Q	V	T	D	I	K	N	V	K	Y	N	T	N	R	T	P	D	V	L	I	G	Q	TGT	N	G	S	I	
		1/12	P	K	A	G	A	V	D	R	Q	V	T	N	R	Q	-	V	K	Y	N	T	K	-	-	S	G	V	H	I	E	R	-	R	E	N	T	
		17p.passage control	7/7	P	K	A	G	A	V	D	R	Q	V	T	N	R	Q	-	I	K	I	N	T	K	-	-	S	G	V	H	I	E	R	-	R	E	N	T
	17p.RAL+.20 nM	5/11	P	K	A	R	A	I	D	R	Q	I	S	D	R	K	N	A	P	Y	N	T	S	R	T	P	D	V	L	I	G	Q	TGT	N	G	S	I	
3/11		P	K	A	G	A	I	D	R	Q	I	S	D	R	K	N	A	P	Y	N	T	S	R	T	P	D	V	L	I	G	Q	TGT	N	G	S	I		
2/11		P	K	A	G	A	I	D	R	Q	I	S	D	R	K	N	A	P	Y	N	T	S	R	T	P	D	V	L	I	G	Q	TGT	N	G	S	I		
1/11		P	K	A	R	A	I	D	R	Q	I	S	D	R	K	N	A	P	Y	N	T	S	R	T	P	D	V	L	I	G	Q	TGT	N	G	S	I		

図1 YANA (B, X4R5)のbaseline、継代コントロール、および耐性誘導ウイルスで現れたインテグラーゼ領域(A)およびエンベロープ領域(B)のアミノ酸配列の選択。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Makiko Hatada, Kazuhisa Yoshimura, Shigeyoshi Harada, Yoko Kawanami, Junji Shibata and Shuzo Matsushita : HIV-1 evasion of a neutralizing anti-V3 antibody involves acquisition of a potential glycosylation site in V2. J. Gen. Virol. 2010 (in press)

2. 学会発表

(国内学会)

1. 松下修三：HIV-1に対する中和単クローン抗体の治療応用に向けた基礎研究. 第9回日本蛋白質化学学会 2009.5.20-22. 熊本.
2. 畑田万紀子、吉村和久、原田恵嘉、松下修三：抗HIV-1V3抗体からの逃避過程で挿入されるV2領域の糖鎖が保存されるメカニズム-HIV-1の進化における耐性度と増殖能のバランスに関する考察- 第57回日本ウイルス学会学術集会. 2009.10.25-27 東京.
3. 松下修三：エンベロープの進化と中和抗体. シンポジウム HIV細胞侵入とその防御機構. 第23回に本エイズ学会学術集会・総会. 2009.11.26-28 名古屋.
4. 吉村和久: ケモカインレセプター阻害剤の臨床的研究～臨床分離株を用いたマラビロック耐性誘導～. 第23回に本エイズ学会学術集会・総会. 2009.11.26-28 名古屋.
5. 原田 恵嘉、吉村和久、松下修三：最近分離した7種の臨床HIV-1株を用いたin vitro ラルテグラビル耐性ウイルス誘導. 第23回に本エイズ学会学術集会・総会. 2009.11.26-28名古屋.
6. 石川哲也、畑田万紀子、原田 恵嘉、吉村和久、松下修三: 実験室 HIV-1 R5株を用いた in vitro CCR5阻害薬 (maraviroc) 耐性ウイルス誘導の試み第23回に本エイズ学会学術集会・総会. 2009.11.26-28 名古屋.

(国際学会)

1. Matsushita S, Narahara C, Morizono M, Nishida Y, Honda-Shibata A, Harada S., Yoshimura, K.,: Polyclonal antibody response against gp120 including antibodies to V3, CD4bs and CD4i epitopes account or broad neutralization. 5th Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention. 2009.7.19-22, Cape Town, South Africa.

2. Harada S, Yoshimura K., and Matsushita S.: Generation of an integrase inhibitor raltegravir resistant variants using recent primary isolates, X4, R5 and dual/mix HIV-1. 10th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium. 2009.9.28-29, Kumamoto
3. Yoshimura K., Harada S, Hatada M. and Matsushita S.: In vitro induction of HIV-1 resistant to a CCR5 antagonist maraviroc. 10th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium. 2009.9.28-29, Kumamoto
4. Ishikawa T., Yoshimura K., Hatada M. Harada S, and Matsushita S.: Mutations in gp120 of R5 HIV-1 laboratory isolate induced by the in vitro selection of maraviroc confer highly sensitive to anti-V3 monoclonal antibody. 10th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium. 2009.9.28-29, Kumamoto
5. Hatada M. Yoshimura K., Harada S, and Matsushita S.: Mechanism of maintaining a glycan-insertion in HIV-1 gp120 V2 region under pressure of a potent neutralizing antibody in vitro. 10th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium. 2009.9.28-29, Kumamoto.
6. Matsushita S. Narahara C, Nishida Y, Honda A., Harada S., Yoshimura K.: Mechanism of maintaining a glycan-insertion in HIV-1 gp120 V2 region under pressure of a potent neutralizing antibody in vitro. 10th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium. 2009.9.28-29, Kumamoto.
7. Yoshimura K, Matsushita S: In vitro induction of HIV-1 resistant to a CCR5. Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium-Satellite Symposium, 2009.9.30, Aso, Kumamoto
8. Matsushita S: Accumulation of multiple functional mutations in HIV-1 gp120 is involved in the development of neutralization escape under pressure of neutralizing antibody in vitro. Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium-Satellite Symposium, 2009.9.30, Aso, Kumamoto.
9. Narahara C, Hatada M, Harada S., Yoshimura, K., Matsushita S, : A primary R5 isolate undergoes different escape pathway during in vitro selection with low or high concentration of an anti-V3 monoclonal antibody. AIDS Vaccine 2009, 2009.10.19-22, Paris.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

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 瀧永 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21年1月から12月の間に、152人のHIV-1感染者が新規に診断された。この152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、9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V108Iが1人、T215Xが6人、プロテアーゼ領域のM46Lが2人、であった。サブタイプは、Bが130人、AEが14人、AGが3人、Cが2人、Gが2人、Aが1人であった。152人のうち106人にBEDアッセイを行ったところ、36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で承認されている(IMCJ-H13-80)。

C. 研究結果

152人のHIV-1感染者が新規に診断された。この

152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、9人(5.9%)の患者に主要な薬剤耐性変異が認められた。逆転写酵素のV108Iが1人、T215Xが6人、プロテアーゼ領域のM46Lが2人、であった。サブタイプは、Bが130人、AEが14人、AGが3人、Cが2人、Gが2人、Aが1人であった。152人のうち106人にBEDアッセイを行ったところ、36人(34.0%)

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。

D. 考察

主要な耐性変異を持つ患者の割合は、例年と比較してほぼ横ばいである。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. Kawashima Y, Pfafferott K, Frater J, Matthews P, Payne R, Addo M, Gatanaga H, Fujiwara M, Hachiya A, Koizumi H, Kuse N, Oka S, Duda A, Prendergast A, Crawford H, Leslie A, Brumme Z, Brumme C, Allen T, Brander C, Kaslow R, Tang J, Hunter E, Allen S, Mulenga J, Branch S, Roach T, John M, Mallal S, Ogwu A, Shapiro R, Prado JG, Fidler S, Weber J, Pybus OG, Klenerman P, Ndung'u T, Phillips R, Heckerman D, Harrigan PR, Walker BD, Takiguchi M, Goulder P. Adaptation of HIV-1 to human leukocyte antigen class I. *Nature* 458: 641-645, 2009.
 2. Hachiya A, Shimane K, Sarafianos SG, Kodama EN, Sakagami Y, Negishi F, Koizumi H, Gatanaga H, Matsuoka M, Takiguchi M, Oka S. Clinical relevance of substitutions in the connection subdomain and RNase H domain of HIV-1 reverse transcriptase from a cohort of antiretroviral treatment-naïve patients. *Antiviral Res.* 82: 115-121, 2009.
 3. Davaalkham J, Unenchimeg P, Baigalmaa Ch, Oyumbileg B, Tsuchiya K, Hachiya A, Gatanaga H, Nyamkhuu D, Oka S. High-risk status of HIV-1 infection in the very low epidemic country, Mongolia, 2007. *Int. J. STD AIDS* 20: 391-394, 2009.
 4. Honda H, Gatanaga H, Matsumura J, Kamimura M, Goto K, Tsukada K, Honda M, Teruya K, Kikuchi Y, Oka S. Favorable use of non-boosted fosamprenavir in patients treated with warfarin. *Int. J. STD AIDS* 20: 441, 2009.
 5. Watanabe T, Yasuoka A, Honda H, Tanuma J, Yazaki H, Tsukada K, Honda M, Teruya K, Gatanaga H, Kikuchi Y, Oka S. Serum (1→3) β-D-glucan as a non-invasive useful adjunctive diagnostic marker for *Pneumocystis pneumonia* in patients with human immunodeficiency virus. *Clin. Infect. Dis.* 49: 1128-1131, 2009.
 6. Tsukada K, Teruya K, Tasato D, Gatanaga H, Kikuchi Y, Oka S. Raltegravir-associated perihepatitis and peritonitis: a single case report. *AIDS* 24: 160-161, 2010.
 7. Watanabe K, Honda M, Watanabe T, Tsukada K, Teruya K, Kikuchi Y, Oka S, Gatanaga H. Emergence of raltegravir-resistant HIV-1 in the central nervous system. *Int. J. STD AIDS* (in press)
- ## 2. 学会発表
1. 湯永博之. HIV感染症における tailor-made 治療はどこまできたか? 日本感染症学会総会 2009年4月
 2. 井田節子、渡邊珠代、湯永博之、岡慎一. CTLからの逃避と病状の進行—感染から20年を経て急激に病状が進行した患者の解析— 日本感染症学会総会 2009年4月
 3. 渡辺恒二、照屋勝治、本田美和子、湯永博之、菊池嘉、岡慎一. BCGワクチン皮内誤接種により形成された皮膚潰瘍を抗結核薬とステロイド全身投与により治療した1例 日本感染症学会総会 2009年4月
 4. 田里大輔、矢崎博久、本田美和子、照屋勝治、湯永博之、菊池嘉、岡慎一. 多彩な皮膚症状が繰り返し出現した急性HIV感染症の1例 日本感染症学会総会 2009年4月
 5. 湯永博之. HIV/AIDS治療からみた、疾病のコントロール 日本エイズ学会 2009年11月
 6. 湯永博之. インテグラーゼ阻害薬(raltegravir)の臨床現場における実際と今後の問題 日本エイズ学会 2009年11月
 7. 湯永博之. Darunavirを中心とした新規薬剤の使用経験 日本エイズ学会 2009年11月
 8. 服部純子、湯永博之、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、渡辺大、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 日本エイズ学会 2009年11月
 9. Davaalkham Jagdagsuren、土屋亮人、湯永博之、岡慎一. Two clusters of HIV-1 subtype B infection in Mongolia 日本エイズ学会 2009年11月
 10. 塚田訓久、照屋勝治、水島大輔、中村春香、青木孝弘、西島健、柳沢邦雄、渡辺恒二、渡邊珠代、本田元人、田沼順子、矢崎博久、本田美和

- 子、湯永博之、菊池嘉、岡慎一. Raltegravirを含む多剤併用療法の効果と有害事象 日本エイズ学会 2009年11月
11. 渡邊珠代、安岡彰、水島大輔、中村春香、西島健、青木孝弘、柳沢邦雄、渡辺恒二、本田元人、矢崎博久、田沼順子、塚田訓久、本田美和子、湯永博之、照屋勝治、菊池嘉、岡慎一. 当院におけるHAART時代のHIV日和見合併症の動向 日本エイズ学会 2009年11月
 12. 青木孝弘、西島健、中村春香、柳沢邦雄、渡辺恒二、水島大輔、渡邊珠代、本田元人、塚田訓久、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. ニューモシスチス肺炎108例の治療の検討 日本エイズ学会 2009年11月
 13. 照屋勝治、水島大輔、西島健、中村春香、青木孝弘、渡辺恒二、柳沢邦雄、渡邊珠代、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. 当科におけるHIV合併ノカルジア症の臨床的検討 日本エイズ学会 2009年11月
 14. 本田美和子、水島大輔、中村春香、西島健、青木孝弘、柳沢邦雄、渡辺恒二、渡邊珠代、本田元人、塚田訓久、田沼順子、矢崎博久、湯永博之、照屋勝治、菊池嘉、岡慎一. 当院における女性HIV感染者の傾向とその背景についての報告 日本エイズ学会 2009年11月
 15. 田沼順子、水島大輔、中村春香、青木孝弘、西島健、柳沢邦雄、渡辺恒二、渡邊珠代、本田元人、塚田訓久、矢崎博久、本田美和子、湯永博之、照屋勝治、菊池嘉、岡慎一. HBe抗原陽性HIV感染者に対するHAARTの抗HBV効果について 日本エイズ学会 2009年11月
 16. 渡辺恒二、水島大輔、中村春香、青木孝弘、西島健、柳沢邦雄、渡邊珠代、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、平林義弘、菊池嘉、岡慎一. 当院で経験した赤痢アメーバ症の臨床症状と治療についての検討 日本エイズ学会 2009年11月
 17. 村越勇人、湯永博之、小柳円、岡慎一、滝口雅文. 慢性HIV-1感染者におけるHIV-1 pol特異的CD8T細胞によるHIV-1のコントロール 日本エイズ学会 2009年11月
 18. 久世望、川島夕佳、湯永博之、岡慎一、滝口雅文. HLA-B*5101拘束性CTLによるHIV-1逃避変異体の選択 日本エイズ学会 2009年11月
 19. 矢崎博久、水島大輔、中村春香、青木孝弘、西島健、柳沢邦雄、渡辺恒二、渡邊珠代、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. 当院での初回治療で使用された抗HIV薬の変遷とDRV投与者の経過について 日本エイズ学会 2009年11月
 20. 本田元人、水島大輔、中村春香、青木孝弘、西島健、柳沢邦雄、渡辺恒二、渡邊珠代、塚田訓久、矢崎博久、田沼順子、本田美和子、湯永博之、照屋勝治、菊池嘉、岡慎一. HIV感染者における高血圧症 日本エイズ学会 2009年11月
 21. 小澤あかね、池田和子、島田恵、大金美和、武田謙治、山田由紀、石垣今日子、八楯類子、伊藤紅、徐廷美、三枝政行、芳田玲子、湯永博之、菊池嘉、岡慎一. HIV/AIDS患者の治療を支える医療保障制度の活用及び自立支援に向けての実態調査 日本エイズ学会 2009年11月
 22. 柳沢邦雄、田沼順子、水島大輔、中村春香、青木孝弘、西島健、渡辺恒二、渡邊珠代、本田元人、矢崎博久、塚田訓久、本田美和子、照屋勝治、湯永博之、菊池嘉、岡慎一、萩原將太郎. 当科で経験したAIDS関連悪性リンパ腫56例における神経系病変の検討 日本エイズ学会 2009年11月
 23. 西島健、水島大輔、中村春香、青木孝弘、柳沢邦雄、渡辺恒二、渡邊珠代、本田元人、矢崎博久、田沼順子、塚田訓久、本田美和子、湯永博之、照屋勝治、菊池嘉、岡慎一. 日本人患者におけるTenofovir disoproxil fumarateによる腎機能障害 日本エイズ学会 2009年11月

H. 知的財産権の取得状況

なし



研究要旨

東京医大における薬剤耐性HIVの調査研究

～HIV-1 RNA測定法のリアルタイムPCR法への変更に伴う問題点とその改善～

研究分担者 福武 勝幸 東京医科大学 主任教授 臨床検査医学講座

研究協力者 四本美保子、山元 泰之、清田 育男、大瀧 学、藤田 進、
鈴木 隆史、天野 景裕、香川 和彦

東京医科大学 臨床検査医学講座

HIV-1感染症の治療のモニタリングと耐性ウイルスの検出においてHIV-1 RNAの測定は必須である。2007年末より、HIV-1 RNA測定法に新しいリアルタイムPCR法(TaqMan法)が導入され変更が進んでいる。新法変更後に検査値が従来法と比べ高値を示したり、変動する症例が経験されており、治療のモニタリング特に耐性ウイルスの早期発見に大きな障害となった。この原因として採血管の分離剤の上に沈殿した血球成分の再浮遊が原因と考えられたため、日常臨床検体として分離剤入り採血管で採取された血漿検体を院内で通常の遠心処理後、そのまま冷蔵で輸送し、測定前に再度1200gで20分間遠心分離を行い、専用チューブに分注して測定(以下、改良日常法)して測定値の変化を検討した。アンプリコア法で過去5回連続50コピー/mL未満を示していた150症例について、改良日常法を実施した結果は95%以上が50コピー/mL未満を示し、改良日常法で50コピー/mL以上を示した9例のうち、高値の3例は治療中断例または服薬不良例で、他は非常に低値であり、改良日常法は従来法と良好な一致性を示した。今回の検討で分離剤入り採血管で輸送された検体の処理法に問題があったことが判明した。この結果、一部の患者に無用の不安を与えたり、不適切な薬剤変更へ誘導するなどの重大な事態を招く危険性を生じた。分離剤入り採血管で輸送された検体は、検査前に再度遠心分離を行うなどの手順改善措置が必要であり、改良日常法は有用な方法の一つと考えられた。

A. 目的

HIV-1感染症の治療のモニタリングと耐性ウイルスの検出においてHIV-1 RNAの測定は必須である。2007年末より、HIV-1 RNA測定法に新しいリアルタイムPCR法(TaqMan法)が導入され変更が進んでいる。新法変更後に検査値が従来法と比べ高値を示したり、変動する症例が経験されており、治療のモニタリング特に耐性ウイルスの早期発見に大きな障害となった。この原因を究明するために検体調整方法の影響が検討され、改善方法が提唱されたので、実際の症例により検証した。

B. 方法

I. 血中HIV-1 RNA量測定法

血中HIV-1 RNA量の測定にはコバスTaqMan HIV-

1「オート」(ロシュ・ダイアグノスティックス株)を使用した。測定は添付文書記載の操作方法に従い行われた。

II. 検体の調整

通常、医療施設からの検体は分離剤入り採血管中に保存し凍結状態で搬送されるので、解凍して一旦室温状態に戻した後、解凍後の血清中の濃度勾配をなくすため数回転倒混和による攪拌し、その後キャップの裏側や容器の側面に付着した付着物を除くため1分間程度の遠心操作を行い、専用チューブに分注して測定している。後述する検討において分離剤の上に沈殿した血球成分の再浮遊が原因と考えられたため、日常臨床検体として分離剤入り採血管で採取された血漿検体を院内で1200gで20分間遠心し血

漿分離を行い、遠心後、そのまま冷蔵で輸送し、測定前に再度1200gで20分間遠心分離を行い、専用チューブに分注して測定（以下、改良日常法）した。分離剤入り採血管としては8mL EDTA-2K血漿採血管（積水メディカル社製）を使用した。

III. 日常改良法による実検体の検討

過去の外注データから、従来法であるコバスアンプリコアHIV-1モニターv1.5で過去5回連続50コピー/mL未満を示していた150症例について、TaqMan法に切替えて以後の測定結果を過去データから調査し比較検討した。SRLによって従来の通常の手順に従い測定された過去3回の血清検体測定結果および過去2回の血漿検体測定結果および日常改良法により測定した結果を調査した。

（倫理面の配慮）

本研究は、世界医師会によるヘルシンキ宣言に示された倫理規範を踏まえ、また、「疫学研究に関する倫理指針（平成14年6月17日）平成19年8月16日全部改定」を遵守し、東京医科大学倫理審査委員会の承認のもとに学長の許可を得たプロトコルに則り行った。

Amplificor法からTaqMan法へ変更 50copies/ml未満症例の割合

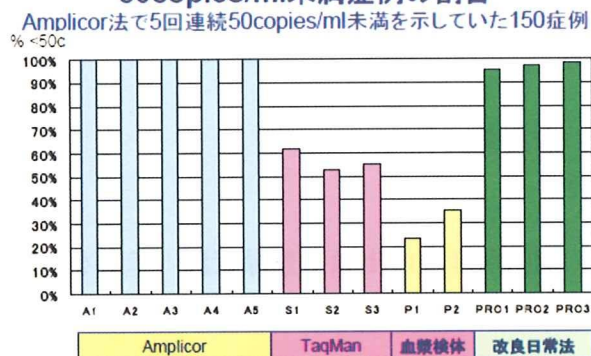


図1 Amplificor法からTaqMan法へ変更50copies/ml未満症例の割合

表1 日常検査を改良後50copies/ml以上を示した症例

症例	1	2	3	服薬状況
1	N.D.	130000	440000	中断
2	46	480	N.D.	問題なし
3	32000	21000	120	中断・再開
4	61	N.D.	-	問題なし
5	130	N.D.	N.D.	問題なし
6	64	40	40	問題なし
7	71	40	40	問題なし
8	8600	68	N.D.	服薬不良
9	61	N.D.	N.D.	問題なし

N.D.; Not Detected

C. 結果

アンプリコア法で過去5回連続50コピー/mL未満を示していた150症例について、TaqMan法への変更後、通常の手順で処理された過去3回の血清検体測定結果（S1、S2、S3）および過去2回の血漿検体測定結果（P1、P2）について調査した結果と測定前に20分間の再遠心（改良日常法）を実施してから測定した結果を図1に示す。血清検体の約40～60%が40コピー/mLから最大900コピー/mLまで分布し、血漿検体の約65～75%が40コピー/mLから最大1500コピー/mLまで分布していた。一方、改良日常法で測定した結果は95%以上が50コピー/mL未満を示した。また、改良日常法で50コピー/mL以上を示した9例のうち、高値の3例は治療中断例または服薬不良例で、他は非常に低値であった（表1）。

D. 考察

TaqMan法における測定値の乖離は、検体を分離剤入り採血管中に保存したまま輸送し測定した場合に高頻度で発生していることが確認された。また、血漿分離後二次チューブへ検体を移し輸送した場合には乖離は起こらないこと、分離剤入り採血管中に保存したまま輸送した場合でも、測定前に再遠心を行うとほぼ回避できるということが確認され、2009年の日本エイズ学会において著者らが報告した(表2)。

この検討に用いた検体は、平成21年2月から5月の間に東京医科大学病院へ通院したHAART治療患者の内、過去に低レベルHIV-1 RNA量（<400コピー/mL）が測定された患者50名からインフォームドコンセントを受けて血漿検体を採取した。一被験者から、分離剤なしEDTA-2K血漿採血管（以下、「分離剤なし採血管」と記す）2本、分離剤入りEDTA-2K血漿採血管（以下、「分離剤入り採血管」と記す）2本を採血し、それぞれ1200gで20分間遠心、血漿分離を行い次の1から7の試料を作成した。分離剤

表2 対照検体との3倍超乖離率
対照検体との3倍超乖離率

被検体群	分離剤	小分け ¹⁾	輸送・保存条件	測定前手順	3倍超乖離率
対照群 ²⁾	なし	あり	冷蔵	軽遠心	対照
被検体群 1	なし	あり	凍結	軽遠心	0% (0/50)
被検体群 2	あり	あり	冷蔵	軽遠心	2% (1/50)
被検体群 3	あり	なし	冷蔵	軽遠心	48% (24/50)
被検体群 4	あり	あり	凍結	軽遠心	0% (0/50)
被検体群 5	あり	なし	凍結	軽遠心	46% (23/50)
改良日常法	あり	なし	冷蔵	再遠心分離 ³⁾	4% (2/50)

測定値が対照群値より3倍を超えて高く測定された場合を乖離とした。ただし、測定値がN.D.と40未満は25コピー/mLとして計算した。

なし採血管としては6mL EDTA-2K血漿採血管（BD社製）、分離剤入り採血管としては8mL EDTA-2K血漿採血管（積水メディカル社製）を使用した。

- ①. 分離剤なし採血管で採取された血漿全量をプロピレン製滅菌管（以下、「PP管」）に分注し、冷蔵保存状態で輸送（コントロール群）
- ②. 分離剤なし採血管で採取された血漿全量をPP管に分注、凍結保存状態で輸送（検体群1）
- ③. 分離剤入り採血管で採取された血漿1.2mLをPP管に分注、冷蔵状態で輸送（検体群2） ④. ③の残検体を採血管ごと冷蔵状態で輸送（検体群3）
- ⑤. 分離剤入り採血管で採取、血漿1.2mLをPP管に分注し凍結状態で輸送（検体群4）
- ⑥. ⑤の残検体を採血管ごと凍結状態で輸送（検体群5）
- ⑦. 日常臨床検体として③と同一の試験管で採血し、院内で遠心後冷蔵で輸送（検体群6）

各検体群における乖離の頻度を表2に示すが、各検体群の乖離率は、小分け分注してから輸送した検体群1において0%（0/50）、分離剤入り採血管（P3採血管）のまま輸送した検体群3（冷蔵保存輸送）および5（凍結保存輸送）においてそれぞれ48%（24/50）、46%（23/50）と半数近くの検体で乖離していた。また、分離剤入り採血管のまま冷蔵保存輸送し、測定前に20分間の再遠心を実施した検体群6においては、乖離の頻度は4%（2/50）であった。

採血後血漿分離したならば二次チューブへ検体を移し輸送する方法は欧米では標準的な方法として行われており、本邦においても全ての医療機関がこの方法で運用できれば問題はないと考えられる。しかし、HIV-1RNA ウイルス検体を取扱うことを想定した上で、検体へのコンタミネーション防止および医療者の安全管理上、検体を二次チューブへ移す作業は熟練した技師によりクリーンベンチ内で行うことが望ましいことから、ただちに全ての施設で実施できるとは考えられない。特に、中小病院やクリニックなど検体測定を外注しなければならない施設においては、実運用上困難と考えられる。一方、分離剤入り採血管のまま検査センターへ輸送し、測定前再遠心を行う改良日常法では、採血してから測定されるまで、分離剤入り採血管中に検体が保存されたままで一度も開封されることがないことから、クリニックなどにとってコンタミネーション防止や医療者の安全管理上の問題を解決したシステムと考えられる。これらの状況を踏まえて我々は日常改良法を設定し実際の検体について検討した。この改良日常法の有用性は、従来のアンプリコア法で50コピー/mL未満に安定していた患者150例において50コピー

/mL未満を示す検体が95%以上であったこと、50コピー/mL以上を示した9例のうち、高値の3例は治療中断例または服薬不良例で、他は非常に低値であったことから、臨床的に有用な改善方法であることが明らかであると考えられる。

一方、海外においてもPPT(plasma preparation tubes)に関する検討がなされ、分離しきれずに残存しているリンパ球由来のHIV-1RNA量が測り込まれ乖離がおこっているとの報告がある。また、残存リンパ球の影響が測定前の再遠心により回避できたと報告されており、分離剤入り採血管中に保存されたまま検体を検査センターへ輸送し、測定が行われる外注検査の検体処理手順において、測定前再遠心が乖離問題回避の上で有効な方法であると考えられた。

E. 結論

今回の検討で分離剤入り採血管で輸送された検体の処理法に問題があったことが判明した。この結果、一部の患者に無用の不安を与えたり、不適切な薬剤変更へ誘導するなどの重大な事態を招く危険性を生じた。分離剤入り採血管で輸送された検体は、検査前に再度遠心分離を行うなどの手順改善措置が必要であり、改良日常法は有用な方法の一つと考えられた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし。



研究要旨

大阪府および近郊における薬剤耐性HIVの調査研究

研究分担者 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 主任研究員

2009年にHIV-1感染が判明し医療機関を受診した新規診断症例12例、および当所におけるHIV検査で陽性が確認された93例中90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1例および確認検査の陽性検体7例においてmajorな薬剤耐性変異が検出された。医療機関受診症例ではプロテアーゼ領域のM46Iが、また確認検査陽性検体ではプロテアーゼ領域のM46I、D30N+L33F+M46I+N88D、逆転写酵素領域のA62V、D67N、T215E、T215L、M41L+T215Dがそれぞれ1例ずつ認められた。

A. 研究目的

新規診断症例における薬剤耐性HIV-1の出現頻度の動向について全国規模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診断症例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

2009年にHIV-1感染が判明し医療機関を受診した新規未治療症例12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、逆転写酵素（RT）領域およびインテグラーゼ（IN）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2008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。HIV確認検査の陽性検体93例中90例についても同様に薬剤耐性遺伝子検査を実施した。ただし、確認検査陽性検体のIN領域については、46例のみ検討を行った。また、*env*-C2V3領域についてもシークエンスを実施し、得られた塩基配列をもとにウイルスのサブタイプを決定した。

さらに、感染時期（感染後半年以内 recent／慢性期 long-term）を推定する目的で、Calypte 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審査委員会の承認を受けている。

C. 研究結果

医療機関受診症例12例の感染リスクは、同性間性的接触が9例（日本人男性8例、外国人男性1例）、異性間性的接触が3例（日本人男性2例、外国人男性1例）で、すべてサブタイプBであった。薬剤耐性遺伝子検査の結果、major mutationとしては1例にPR領域のM46Iが検出された。その他の症例も、PR領域にはpolymorphismと考えられるminor mutationが多数見られ、2例においてはRT領域に非核酸系RT阻害剤（NNRTIs）の耐性に関連するminor mutationであるV179Dが検出された。IN領域には薬剤耐性

に関連するとされるアミノ酸変異は認められなかった。

次に、確認検査陽性検体93例のうち遺伝子検査が可能であった90例についてサブタイプを調べたところ、Bが82例、CRF01_AEが3例、A、C、Fがそれぞれ1例ずつであった。CRF01_AEの1例は、混合塩基が多くダイレクトシーケンスでは塩基配列が決定出来なかったため、TAクローニングを実施したところ、CRF01_AEとBの重感染であることが判明した。薬剤耐性に関連するmajor mutationは90例中7例(7.8%)に認められ、その内訳はPR領域のM46I、D30N+L33F+M46I+N88D、RT領域のA62V、D67N、T215E、T215L、M41L+T215Dがそれぞれ1例ずつであった。IN阻害剤に対するmajorな耐性変異は検出されなかったが、minor mutationとしてL74I/Vが3例、E138Dが1例、G163E/K/Tが4例において認められた。

2009年の新規HIV-1診断症例について、Calypse HIV-1 BED Incidence EIA kit (BEDアッセイ)を用いておおよその感染時期を推定したところ、医療機関受診症例12例中2例(16.7%)、確認検査陽性検体93例中27例(29.0%)が感染初期(ODn<0.8、感染後155日以内)と推定された。

D. 考察

2009年にHIV-1感染が判明した新規診断症例(医療機関受診症例12例、確認検査陽性検体90例)について薬剤耐性遺伝子検査を実施した。医療機関受診症例のうち薬剤耐性に関連するmajor mutationが検出されたものは1例(8.3%)のみであったが、確認検査陽性検体では7例(7.8%)においてmajor mutationが検出された。検出数・頻度共に2008年の11例(13.1%)から若干減少したが、これは主にT215リバータントの検出数の減少によるもので、T215リバータント単独で見つかった例を除くと、

2008年、2009年共にmajor mutation検出例数は5例、頻度も6.0%および5.6%とほぼ同程度であった。これら耐性変異保有例について系統樹解析を行なったところ、PR領域のM46IやRT領域のT215リバータント単独例はこれまでに見つかったものと同じクラスターに収束され、それらと近縁であることが示唆された。一方、M41Lを伴ったT215Dを有する例は従来のT215リバータントから離れたところに位置し、タイプが異なるリバータントであると考えられた(データ示さず)。また、これまで我々の調査の中で新規診断症例に見られた耐性変異はNRTIsあるいはNNRTIs関連のものがほとんどであったが、今回初めて確認検査陽性検体においてプロテアーゼ阻害剤(PIs)であるネルフィナビルに高度耐性を示すアミノ酸変異が検出された。しかしながら匿名検査の特性上、本症例は日本人MSM(men who have sex with men)であること以外の情報がないため、既治療患者である可能性も否定は出来ないと思われる。

大阪府内および近郊ではサブタイプBが流行の大部分(90%以上)を占めているが、確認検査陽性検体の1例において、*pol*領域、*env*領域共にCRF01_AEとBが混合して検出され、重感染であることが推察された。リコンビナントの可能性も考えられるが、その証明にはより詳細な検討が必要である。

BEDアッセイにより推定される確認検査陽性検体中の感染初期例は29.0%で、昨年とほぼ同程度であったが、抗体検査から推定される感染初期例(ウェスタンブロット法で陰性または判定保留、かつ核酸増幅検査で陽性のもの)は昨年の6.7%(8/120例)から8.6%(8/93例)と検出頻度では増加しており、大阪およびその近郊でHIV感染が引き続き広がっていることが示された。

表1 薬剤耐性関連アミノ酸変異が認められた新規HIV-1診断症例(2009年)

性別	国籍	感染リスク	薬剤耐性アミノ酸変異				サブタイプ (<i>env</i> -C2V3)	BEDアッセイ
			PR	RT	IN			
● 医療機関受診症例								
1	男性	インドネシア	異性間	M36I, M46I , I62V, I64V, I93L	-	-	B	Long-term
● 確認検査陽性検体								
1	不明	不明	不明	M36I, M46I , I62V, I64V, I93L	-	-	B	Recent
2	男性	日本	同性間	L10F, D30N , L33F , M46I , L63P, A71T, N88D	(V118I)	-	B	Long-term
3	男性	日本	同性間	-	D67N	-	B	Long-term
4	男性	日本	不明	G16E, V77I	M41L , T215D	-	B	Long-term
5	男性	不明	不明	I13V, M36L, H69K, V77I, I93L	A62V	-	A	Long-term
6	男性	日本	不明	M36I, I62V	T215L	-	B	Recent
7	不明	不明	不明	I13I/V, I62V, I93L	T215E	-	B	Long-term