

E. 結論

2009年のHIV新規診断症例について薬剤耐性遺伝子検査を実施した結果、医療機関受診症例12例のうち1例、確認検査陽性検体90例のうち7例においてmajor mutationが検出された。今回、調査開始後初めて確認検査陽性検体にPIs高度耐性変異を認めた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yoko Kojima, Takuya Kawahata, Haruyo Mori. Cases of HIV type 1 acute infection at STI-related clinics in Osaka. AIDS Research and Human Retroviruses 25:717-719, 2009

2. 学会発表

1. 川畑拓也、小島洋子、森 治代、大國 剛、古林敬一、岩佐 厚、谷口 恭、大阪府内のSTI関連診療所でのHIV陽性者におけるB型肝炎・梅毒の罹患状況とHBV遺伝子型、第23回日本エイズ学会、名古屋、2009（抄録：日本エイズ学会誌 11:487、2009）
2. 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流行の影響、第23回日本エイズ学会、名古屋、2009（抄録：日本エイズ学会誌 11:536、2009）

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



研究要旨

沖縄における薬剤耐性HIVの調査研究

～平成21年度沖縄県における薬剤耐性HIV-1 調査体制確立のための研究～

研究分担者 **健山 正男** 琉球大学大学院医学研究科感染症制御学講座
分子病態感染症学分野 準教授

研究協力者 **仲村 秀太¹、田里 大輔¹、日比谷健司¹、前城 達次¹、原永 修作¹、
比嘉 太¹、藤田 次郎¹、木佐貫京子²、山根 誠久²、宮城 京子³**

¹琉球大学大学院医学研究科感染症制御学講座 分子病態感染症学分野

²同 検査部 ³同 看護部

今回、我々は前年度に引き続き当地での薬剤耐性の現状を把握するため、新規感染者における薬剤耐性サーベイランスを実施した。対象期間は2009年1月1日～2009年12月31日で、同期間に19人が当院にHIVキャリアー/AIDS患者として初診外来受診した。新規感染者の定義を満たすのは10人であり、同年12月31日までにHIV薬剤耐性検査を施行した10人全員に薬剤耐性HIV検査を施行した。RT領域では耐性に関連する変異は認めなかった。PI領域では耐性に関連する変異が全例に認められたが、major mutationは検出されなかった。当院はエイズ中核拠点病院として県内の患者の70%超を診療しており、当院における検査結果は県内の状況を反映していると考えられ、沖縄県は今回の検査結果からは薬剤耐性HIV-1の未浸淫地域と推定された。

A. 研究目的

沖縄県の新規患者の70%を診療する当院における新規HIV-1感染者における薬剤耐性変異の頻度を調査し、本県のHIV-1薬剤耐性の浸淫度を明らかにする。

B. 研究方法

1. 当院を日本薬剤耐性HIV-1調査研究グループとして登録した。
2. 新規登録患者の定義：対象期間内（2009年1月1日以降2009年12月31日）の期間に初めて感染が確認された者。
3. 検体のサンプリングポイント。下記のいずれかで行った。
 - a). 初診時
 - b). 治療開始時
4. 新規登録患者において、本調査の参加の同意を文書にて取得した。
5. 3. a)またはb)のポイントで採血し、院内および国立感染症研究所エイズ研究センター第2研究グループにて薬剤耐性HIV-1検査を行った。

倫理面での配慮

- 1) 個人情報の取得について
利用目的を明確にしたうえで、必要とする範囲内に限り、適法かつ公正な手段によって、個人情報を取得した。
- 2) 個人情報の利用について
個人情報を取得する際に示した本研究の範囲内で、研究の遂行上、必要な限りにおいて利用した。
- 3) 個人情報の第三者提供について
取得した個人情報は、適切に管理し、個人情報保護法に定める例外事項を除き、本人の同意を得ることなく、第三者に提供、開示しなかった。
- 4) 個人情報の開示・訂正・削除・利用停止について
本人から自己の個人情報について、開示・訂正・削除・利用停止などの申し出を受けた場合は、すみやかに必要な措置をとる旨説明したが、研究の全期間を通して申請者はいなかった。
- 5) 個人情報の管理について
個人情報の紛失、流出、改ざんおよび漏洩などを防ぐため、個人情報を保有するのは研究代表者のみとし、情報管理上問題は発生しなかった。

6) 法令等の順守について

個人情報保護に関して適用される法令、国のガイドラインを熟読し順守した。

C. 研究結果

対象期間内に当院外来を受診したHIV/AIDS患者は19人であった。その内、新規登録患者の定義を満たした10人全員に薬剤耐性検査を施行した。検体のサンプリングポイントは、全員、治療開始前に設定した。

薬剤耐性HIV-1検査を施行した10人の背景と結果を表に示した。感染経路は全員が同性間であり、病期はHIVキャリアーが5人、AIDSが5人であった。性別は全員が男性で平均年齢はAIDSは39.6歳、HIVは36.2歳であった。CD4数の平均値はHIVキャリアーは347/ μ l、AIDSは60.0/ μ lであった。一方HIV-RNA定量の平均値は、HIVキャリアーは 2.4×10^5 コピー/ml、AIDSは 1.4×10^5 コピー/mlであった。

薬剤耐性HIV-1薬剤耐性検査ではRT領域では耐性に関与する変異は認められなかった。PI領域では耐性に関連する変異が全例に認められたが、major mutationは検出されなかった。

D. 考察

沖縄県におけるHIV感染者の増加は1999年より顕著となり、2008年の人口10万人あたりの新規感染者は全国で3番目に高い陽性率となった。

琉球大学附属病院はエイズ拠点病院として県内の患者の70%以上を診療しており当院における検査結果は県内の状況を反映していると思われるので、今回の検査結果から沖縄県は現時点において薬剤耐性HIV-1の未浸淫地域と推定された。しかしながらプロテアーゼ阻害薬に対する耐性関連変異は施行した全員に認められたので、今後の動向に注視する必要がある。

当院の初診患者の届出地は血友病を除く30% (39人/130人) が県外である。本県は観光地でありため国内、国外からの人の入域が活発であり、薬剤耐性HIV-1が持ち込まれる可能性が危惧されている。引き続き新規登録患者の薬剤耐性調査を行うことが必要と思われた。

E. 結論

新規患者における薬剤耐性HIV-1検査を施行した10人ではPR領域に対するmutationは全例に認められたが全てminor mutationであった。

沖縄県は現時点 (2009年12月31日現在) におい

て薬剤耐性HIV-1の浸淫は低い、毎年PI領域のmajor mutationの出現頻度が高まっており今後もいっそうのサーベイランス強化が必要である。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 健山正男. 日本におけるHIV診療の現況. 日本臨床細胞学会九州連合会雑誌. 2010.40: *in press*
2. Hideta Nakamura, Masao Tateyama, Daisuke Tasato, Syusaku Haranaga, Satomi Yara, Futoshi Higa, Yuji Ohtsuki, Jiro Fujita. Clinical utility of serum β -D-glucan and KL-6 levels in *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *Internal Medicine*.2009.48
3. Satoshi Toma1, Tsuyoshi Yamashiro2*, Shingo Arakaki1, Joji Shiroma1, Tatsuji Maeshiro 1, Kenji Hibiya1, Naoya Sakamoto 3, Fukunori Kinjo4, Masao Tateyama1, and Jiro Fujita1. Inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by nelfinavir and synergistic effect with interferon- α . *J Viral Hepat*. 2009 Jul;16(7):506-12 .
4. Hibiya K, Kazumi Y, Nishiuchi Y, Sugawara I, Miyagi K, Oda Y, Oda E, Fujita J. Descriptive analysis of the prevalence and the molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* complex-infected pigs that were slaughtered on the main island of Okinawa. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* (in press)
5. Hibiya K, Utsunomiya K, Yoshida T, Toma S, Higa F, Tateyama M, Fujita J. Pathogenesis of systemic *Mycobacterium avium* infection in pigs through histological analysis of hepatic lesions. *Can J Vet Res* (in press)
6. Hibiya K, Higa F, Tateyama M, Fujita J. The pathogenesis and the development mechanism of *Mycobacterium avium* complex infection. *Kekkaku*. 2007;82(12):903-18.
7. Hibiya K, Nakamura H, Tasato D, Toma S, Furugen M, Yamashiro T, Higa F, Tateyama M, Mochizuki M, Teruya K, Endo H, Kikuchi Y, Oka S, Fujita J. The Importance of Lymphatic Dissemination after Enteral Infection of *Mycobacterium avium*. - Comparative analysis of porcine carcasses and autopsy cases of patients with AIDS-. *Comp Pathol*.
8. 日比谷健司、比嘉太、健山正男、藤田次郎. 人獣共通感染症としての抗酸菌症. *Kekkaku*.

- 2007,82:539-550.
9. 日比谷健司、比嘉太、健山正男、藤田次郎. *Mycobacterium avium complex* 感染症の病態と進展機序. *Kekkaku*. 2007.82:903-918.
 10. Gatanaga, Ibe S, Matsuda M, Yoshida S, Asagi T, Kondo M, Sadamasu K, Tsukada H, Masakane A, Mori H1, Takata N, Minami R, Tateyama M, Koike T, Itoh T, Imai M, Nagashima M, Gejyo F, Ueda M, Hamaguchi M, Kojima Y, Shirasaka T, Kimura A, Yamamoto M, Hujita J, Oka S1), Sugiura W. Drug-resistant HIV-1 prevalence in patients newly diagnosed with HIV/AIDS in Japan. *Antiviral Research*.75: 75-82.2007.
- ## 2. 報告書
1. 健山正男、比嘉太、原永修作、田里大輔、仲村秀太、前城達次、山城剛、宮城京子、日比谷健司、藤田次郎. 沖縄における薬剤耐性HIVの調査研究. 厚生労働科学研究費補助金 エイズ対策研究事業. 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. 平成20年度総括・分担研究報告書. 2009年. p90-93.
 2. 健山正男、仲村秀太、田里大輔、比谷健司、原永修作、比嘉太、藤田次郎、宮城京子. 沖縄地域における男性同性間のHIV感染予防介入研究. 厚生労働科学研究費補助金 エイズ対策研究事業. 男性同性間のHIV感染対策とその評価に関する研究. 平成20年度 総括・分担研究報告書. 2009年. p 75-82.
 3. 健山正男、比嘉太、原永修作、田里大輔、仲村秀太、前城達次、山城剛、宮城京子、日比谷健司、藤田次郎. 沖縄における薬剤耐性HIVの調査研究. 厚生労働科学研究費補助金 エイズ対策研究事業. 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. 平成19年度総括・分担研究報告書. 2008年. p90-93.
 4. 健山正男、仲村秀太、田里大輔、比谷健司、原永修作、比嘉太、藤田次郎、宮城京子、長谷川博史、宮川桂子、嘉数光一郎、仲程ひろみ、翁長悦子、椎木創一、遠藤和郎、向井三穂子、松田奈月. 沖縄の男性同性間感染によるHIV陽性者へのアンケート調査. -急増する地方MSM向け予防介入プログラム作成の視点から-. 厚生労働科学研究費補助金 エイズ対策研究事業. 男性同性間のHIV感染対策とその評価に関する研究. 平成19年度 総括・分担研究報告書. 2008年. p 83-88.
 5. 健山正男「沖縄における薬剤耐性検査確立のための研究」「琉球大学附属病院におけるHIV-1薬剤耐性検査に関する研究」厚生労働科学研究費補助金 エイズ対策研究事業「薬剤耐性HIVの発生動向把握のための検査方法・調査体制確立に関する研究」平成16～18年度 総括・分担研究報告書」2007年. p171-173
 6. 健山正男「沖縄における薬剤耐性検査確立のための研究」厚生労働科学研究費補助金 エイズ対策研究事業「薬剤耐性HIVの発生動向把握のための検査方法・調査体制確立に関する研究」平成18年度 総括・分担研究報告書」2007年. p 124-126
- ## 3. 学会発表
1. 田里大輔、仲村秀太、照屋宏允、原永修作、比嘉太、健山正男、藤田次郎：琉球大学医学部附属病院におけるRaltegravirの使用経験、日本エイズ会誌. 11:462, 2009.
 2. 日比谷健司、照屋勝治、仲村秀太、田里大輔、知念寛、比嘉太、健山正男、望月誠、遠藤久子、菊池嘉、岡慎一、藤田次郎：AIDS関連播種性Mycobacterium avium感染症の免疫病理分子機構、日本エイズ会誌. 11：495, 2009.
 3. 照屋宏允、健山正男、日比谷健司、仲村秀太、田里大輔、原永修作、前城達次、比嘉太、藤田次郎、宮城京子：診断に苦慮した非結核性抗酸菌症、日本エイズ会誌. 11：504. 2009.
 4. 仲村秀太、田里大輔、照屋宏允、原永修作、比嘉太、健山正男、藤田次郎：当院HIV感染男性患者におけるCOPDの有病率とその危険因子に関する臨床的検討、日本エイズ会誌. 11:513, 2009.
 5. 宮城京子、石川章子、石郷岡美穂、仲程ひろみ、嘉数光一郎、向井三穂子、椎木創一、佐久川あや子、健山正男、藤田次郎：沖縄県における自立困難患者の療養環境整備に関して、日本エイズ会誌. 11:541, 2009.1.
 6. 日比谷健司、仲村秀太、田里大輔、照屋勝治、稲垣考、小川賢二、西内由紀子、知念寛、比嘉太、健山正男、望月眞、遠藤久子、菊池嘉、岡慎一、藤田次郎「播種性Mycobacterium avium感染症の病態解明－AIDS剖検症例の解析から－」日本臨床免疫学会 Mid Winter Seminar, 2009.
 7. 日比谷健司、仲村秀太、田里大輔、照屋勝治、知念寛、比嘉太、健山正男、望月眞、遠藤久子、菊池嘉、岡慎一、藤田次郎「AIDS関連播種性

Mycobacterium avium 感染症の免疫病理分子機構の検討」第37回日本臨床免疫学会総会, ワークショップ2009年。

8. 日比谷健司、照屋勝治、仲村秀太、田里大輔、知念寛、比嘉太、健山正男、望月眞、遠藤久子、菊池嘉、岡慎一、藤田次郎「AIDS関連播種性Mycobacterium avium 感染症の免疫病理分子機構」第23回日本エイズ学会総会。2009年
9. 健山正男。地方中核拠点病院におけるHIV診療の取り組み－2007年HIV/AIDS比率全国2位の沖縄県からの報告－。ランチョンセミナー。日本エイズ会誌。10:260, 2008。
10. 前田憲昭、溝辺淳子、吉川博政、山本政弘、健山正男、砂川元、新垣敬一、中川由美子。沖縄県における歯科医療体制構築に関する活動報告。日本エイズ会誌。10:459, 2008。
11. 前城達次、宮城京子、仲村秀太、原永修作、比嘉太、健山正男、藤田次郎。硫酸アタザナビルによるビリルビン上昇に対するウルソデオキシコール酸投与の効果に関する検討。日本エイズ会誌。10:487, 2008。
12. 宮城京子、健山正男、大城市子、石郷岡美穂、松茂良揚子、諸見牧子、謝花万寿子、石川章子、田里大輔、仲村秀太、真栄城達次、原永修作、比嘉太、藤田次郎。県内離島病院の診療体制構築に向けての出張研修の成果。日本エイズ会誌。10:489, 2008。
13. 杉浦互ほか：2003-2007年の新規HIV-1感染者における薬剤耐性頻度の動向。日本エイズ会誌。10:545, 2008。
14. 仲村秀太、田里大輔、原永修作、比嘉太、健山正男、藤田次郎。HAART導入後に免疫再構築症候群として肺サルコイドーシスを発症した一例。日本エイズ会誌。10:557, 2008。
15. 健山正男。教育セミナー「HIV関連非感染性肺疾患」。第61回日本呼吸器学会九州支部学術講演会。
16. 當間智、山城剛、伊禮史朗、小橋川ちはる、渡辺貴子、井濱康、上間恵理子、富盛宏、仲村将泉、前田企能、前城達次、岸本一人、仲本学、平田哲生、金城渚、外間昭、佐久川廣、金城福則、健山正男、藤田次郎。C型肝炎ウイルス増殖に関するHIV Protease Inhibitorの作用。第49回日本消化器病学会総会。日本消化器病学会誌。104:A684, 2007。
17. 田里大輔、仲村秀太、那覇唯、原永修作、比嘉太、健山正男、藤田次郎。ST合剤による2次予防中に再燃をきたしたAIDS合併ニューモ

シスチス肺炎の一例－免疫再構築症候群と日和見感染症再燃の異同について－。日本エイズ会誌。9:518, 2007。

18. 宮城京子、健山正男、諸見牧子、松茂良揚子、石郷岡美穂、大城市子、石川章子、田里大輔、仲村秀太、比嘉太、藤田次郎。離島病院の医療体制構築に向けて。日本エイズ会誌。9。548, 2007。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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

関東甲信越ブロックにおける薬剤耐性HIVの調査研究 ～新潟県および隣接地域における薬剤耐性発生の状況～

研究分担者 田邊 嘉也 新潟大学大学院医歯学総合研究科 臨床感染制御学分野
研究協力者 大家 正泰 新潟大学大学院医歯学総合研究科 地域疾病制御医学専攻・
国際感染医学講座

平成21年1月から12月の間に新規感染／発症者5名のウイルスRNAの解析をおこなった。感染者はすべて日本国籍の男性で、性的感染(異性間1、同性間4)である。推定感染地は不明1例を除き、国内となっている。いずれも医療機関からの依頼を受けて解析をおこなったもので、病院の所在地は新潟県4、東京都1であった。感染ウイルスは異性間感染の1例がCRF01_AE、同性間感染の4例すべてがサブタイプBであった。シーケンシングの結果、3例(いずれも同性間感染)に一部のNNRTIに耐性を示すとされる変異(V106I 1例、V179D 2例)が見いだされた。薬剤未治療の段階で耐性変異が検出される頻度が全国的に増加する中、われわれのこれまでの解析ではその頻度は比較的低いレベルにあったが、同一年内に3例もの変異が検出された点は注目される。新潟県の患者に感染しているウイルスは、これまで解析結果で見限り遺伝学的にきわめて雑多で、共通の感染源に由来すると考えられるケースは確認されていなかったが、本年取り扱った検体の1例に既知のもの(平成19年解析)ときわめて類似するウイルスが見いだされた。いずれも男性同性間感染によるものであった。

A. 研究目的

抗HIV薬3剤の併用によるHAART療法の普及はエイズ死亡のめざましい減少をもたらしたが、現行薬剤はいずれも体内に潜伏するウイルスを排除する効果はなく、長期使用による耐性ウイルスの増加を一方で招いている。多剤耐性ウイルスに対し効果がある新たな薬剤の開発が進められ、逐次臨床現場に導入されてはいるものの、耐性を獲得したウイルスの出現により治療が著しく困難となる症例は増加しつつあり、耐性ウイルスの治療集団外への漏出がエイズ治療の今後に大きな障害となってくることが懸念されている。われわれは厚生労働省「薬剤耐性HIVの動向把握のための調査体制確立およびその対策に関する研究」班の調査・研究活動の一環として、2004年から新潟県内の医療機関であらたにHIV感染が確認された全例について、血液の提供を受けてウイルスRNAのシーケンシングをおこなっており、また関東甲信越地域の他県病院からの依頼分についても解析している。RNA配列は薬剤耐性に関わる逆

転写酵素(*rt*)、プロテアーゼ(*pro*)、インテグラーゼ領域のほか、変異頻度の高い*gag* p17、および*env* (C2V3)領域についても決定しており、その結果から感染事例中の耐性ウイルスの割合に関するデータの取得に加えて、ウイルス間相互の類縁関係についての推定もおこなっている。これらのデータは現在構築中の国内HIVのシーケンスデータベースに統合され、その整備によって薬剤耐性ウイルスの浸淫状況や感染拡大の時系列的なトレースなど、HIVの感染動態のより詳細な解明に生かすことが期待される。

B. 研究方法

医療機関から送付されたEDTA添加患者血液(～7mL)を到着後直ちに遠心分離(3,000rpm×10min)、血漿を分離した。血漿0.2mLからHigh Pure Viral RNA kit®(Roche, 1858-882)を用いてRNAを抽出し、50μLの溶出バッファーに回収して-90℃で保存した。ウイルスRNAの塩基配列の決定

はRT、protease、env(C2/V3)、gag(p17)の各領域についておこなった。RNAサンプル5～10 µLをRT-PCR法で増幅した後(One-step RNA PCR Kit[®]、TaKaRa RR024A)、反応液の一部(5µL)をnested PCRにより再増幅して、シークエンシングに供した。PCR反応に用いたプライマーは、RT領域：5'-ATGATAGGGGAATTGGAGGTTT-3'/5'-TACTTC

TGTTAGTGCTTTGGTTC-3' (1st, nt2388-3425)、および5'-GACCTACACCTGTCAACATAAT-3'/5'-TAATCCCTGCATAAATCTGACT-3' (2nd, nt2485-3372)、プロテアーゼ領域：5'-AGACAGGY-TAATTTTTAGGGA-3'/5'-TATGGATTTTCAGGCCCAATTTT-3' (1st, nt2074-2716)、および5'-AGAGC-CAACAGCCCCACCAG-3'/5'-ACTTTTGGGCCATC-CATTCC-3' (2nd, nt2148-2611)、インテグラーゼ領域：5'-CAGACTCACAATATGCATTAGG-3'/5'-CCTGTATGCAGACCCCAATATG-3' (1st, nt2074-2716)、および5'-CTGGCATGGGTACCAGCACACAA-3'/5'-CCTAGTGGGATGTGTACTTCTGAACTTA-3' (2nd, nt2148-2611)、env C2/V3領域：5'-CATACAT-TATTGTGCCCGGCTGG-3'/5'-AGAAAAATTTCC-CTCTACAATTA-3' (1st, nt6866-7374)、および5'-AATGTCAGCTCAGTACAATGCACAC-3'/5'-ATTTCTGGGTCCCCTCTGAGG-3' (2nd, nt6945-7336)、p17領域：5'-ATCTCTAGCAGTGGCGCCCGAACAG-3'/5'-CTGATAATGCTGAAAA-CATGGGTAT-3' (1st, nt625-1318)、および5'-CTCTC-GACGCAGGACTCGGCTTGCT-3'/5'-CCCATG-CATTCAAAGTTCTAGGTGA-3' (2nd, nt 683-1255)である。シークエンシング反応はBigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)を用いておこない、ABI PRISM[®]310 Genetic Analyzerにより解析した。増幅の良好でない検体については、RT-PCRの反応系に1/3量のPCRBoost[®] (Biomatrix)を加え、反応効率の改善を図っている。

(倫理面への配慮)

本研究は新潟大学医学部遺伝子倫理審査委員会の

承認のもとに行っている。用いた血液サンプルの解析結果のうち薬剤耐性に関する情報は提供先医療機関に通知しており、治療薬剤の選択の目安として患者本人の利益に還元されるため、単なる調査研究の目的のみの利用とは性格をことにする。サンプル受け入れの際、患者の生年月日、性別、感染時期、感染ルートなど疫学研究に必要な情報の提供を求めているが、氏名、住所などただちに個人の特定に結びつく項目は含まれない。また文書で通知された内容は直ちにデジタル化した後、元書類をシュレッダーで切断廃棄しており、転記したファイルはスクランブル化して保存するなど、情報漏洩により患者が不利益を蒙る恐れを最小にとどめるよう配慮している。

C. 研究結果

解析したサンプル 平成21年中に5件の新規検体を解析した(表1)。いずれも医療機関からの依頼を受け解析を行ったもので、提供先は新潟県内の病院4件、東京都内の病院1件となっている。患者は全例日本国籍男性、年齢は20～60歳台と幅広く分布している。いずれも性行為により感染しており、うち同性間感染が4例、異性間感染が1例であった。解析の結果、感染したウイルスは異性間感染の1例がCRF01_AE、同性間感染は全例がSubtype Bと判明した。感染ルートによりウイルスの型に明瞭な差がみられる点は従来傾向と一致している。感染地は不明1例を除き、すべて国内と推定されるが、感染時期が特定されているものはなかった。

検体採取の直近におこなわれた検査では、血中のCD4陽性細胞数は最も高いケースでも1 µL当たり300をわずかに超える程度であり、他の症例は200以下といずれもエイズ発症もしくはそれに近い状態にいたっており、1例はHIV脳症の状態で感染が判明している(表2)。

薬剤耐性変異 本年取り扱った検体から検出された薬剤耐性変異を表3に示した。新規感染/発症者

表1 平成21年新規登録感染者

Case No	性別	年齢	感染ルート	感染ウイルス	国籍	推定感染地	推定感染時期	医療機関所在地
1	男	42	同性間	Subtype B	日本	不明	不明	新潟県
2	男	42	同性間	Subtype B	日本	国内	不明	新潟県
3	男	61	同性間	Subtype B	日本	国内	不明	新潟県
4	男	24	同性間	Subtype B	日本	国内	不明	東京都
5	男	51	異性間	CRF01_AE	日本	国内	不明	新潟県

のウイルスが耐性変異を含む頻度は全国的にはほぼ一貫して増加傾向にあり、今や10%を超えることが本研究班の調査で明らかになっている。これに比べ、われわれが解析している新潟県中心の検体では、昨年までに扱った新規症例30件の内、IAS-USAの定義に該当する耐性変異が検出されたのは2件(PI耐性に関するminor変異を除く)で、大都市圏に比べ薬剤耐性ウイルスの蔓延はさほど問題となるレベルには達していないとみてきた。この見方は、今年解析した検体に3件もの耐性変異が見いだされたことで、耐性変異検出率は新潟県およびその周辺地域において

も、少なくとも量的観点からはほぼ全国的レベルに達していると修正しなければならなくなったのかもしれない。

本年のものを含め、新規検体の解析でこれまでに検出した薬剤耐性変異5件(V106I 2、V108I 1、V179D 2)はいずれもNNRTIに関わるものに偏っており(表4)、また薬効への影響は比較的小さなものである。このような弱い変異ばかりが検出される意味については、平成19~21年度本調査のまとめの報告の中で改めて触れる。なお、V106I変異について、昨年度までの報告では耐性変異V106AMに関連

表2 検体採取時の状況

Case No	サンプリング時点	血中ウイルス (copies/ml)	CD4 (per µl)	HBs Ag	HCV Ab	臨床症状
1	治療開始前	24,000	313	+	+	
2	治療開始前	30,000	37	-	-	HIV 脳症 ニューモシテリス肺炎
3	治療開始前	54,000	169	-	-	
4	治療開始前	150,000	172	-	-	
5	治療開始前	53,000	2	-	-	カンジダ症

表3 新規登録感染者の薬剤耐性変異保有状況

Case No	薬剤耐性変異				
	NRTI	NNRTI	PI major	PI minor	Raltegravir
1	-	V106I	-	A71T, I93L	-
2	-	V179D	-	I13V, L63P, A71T, V77I	-
3	-	-	-	L10V, I13V, M36I	-
4	-	V179D	-	I13V, L63P, I93L	-
5	-	-	-	I13V, M36I	-

表4 薬剤耐性変異の検出頻度

	未治療群 (N=35)		治療群 (N=27)			未治療群		治療群	
<u>NRTI</u>			V106I	2	0	<u>PI minor</u>			
M41L	0	4	V108I	1	1	L10FIRV	3	7	
D67L	0	3	V179DF	(3) f	0	I13V	12	11	
T69_ins	(2) ab	(1) b	Y188CLH	0	1	G16E	0	4	
K70R	0	2	P236L	0	1	K20MRITV	1	7	
L74V	0	2				L33IV	1	0	
M184VI	0	11	<u>PI major</u>			M36ILV	11	15	
L210W	(1) c	2	D30N	0	1	F53L	0	1	
T215YF	(1) d	3	M46IL	0	4	I62V	0	2	
K219QE	0	2	I54ML	0	1	L63P	11	9	
			V82AFLS	0	1	H69K	11	17	
<u>NNRTI</u>			I84V	0	1	A71VTIL	5	1	
K103N	(2) e	5	N88S	0	2	V77I	8	2	
V106AM	0	0	L90M	0	2	I93LM	13	7	

注 薬剤耐性変異の定義は International AIDS Society-USA 2007 による。() 内の数字は定義部位に検出された非定型的なアミノ酸置換が認められた症例数を示す。a: T69A, b: T69N, c: L210F, d: T215E, e: K103R, f: V179A.

した非定型的な変異として扱ってきたが、IAS-USAの新しい定義でNNRTIのひとつであるエトラピリンに対し耐性を与えるものとして記載されたため、正規の耐性変異とすることに改めている。

ウイルスの系統学的関係 新潟大学医歯学総合病院で新たに治療が開始された患者(付表中のCase No.1)の感染ウイルスが、p17 (matrix)、プロテアーゼ、逆転写酵素、インテグラーゼ、および *env* C2/V3の5遺伝子領域の比較で、一昨年同病院の別患者の感染ウイルスからえられたヌクレオチド配列ときわめて近いことが明らかになった。いずれの患者も男性同性間の性行為により感染したもので、推定感染地は国内となっているが、具体的地名は把握していない。感染時期はいずれも不明であった。われわれのデータでこれほどの近縁性が明確なウイルスが見いだされたのはこれが最初であるが、今後類似ウイルスが引き続き検出されてくるならば、県域内にアクティブな感染集団がすでにできあがっていることを意味しよう。この点に留意しつつ、今後の調査を進めたい。

D. 考察

平成16年度より始まった本調査研究の初期、おもに新潟県内の病院から寄せられた検体の解析を元に報告したわれわれのデータには、他の地域を分担する研究グループのものと大きく異なるいくつかの特徴がみられた。すなわち、1) 女性感染者の検体が男性のものに匹敵するほど多く、また若年層の比率が高い、2) 他地域ではすでに男性感染者の8~9割に達していた同性間感染が異性間の感染よりむしろ少数である、3) 検出されたウイルスの型別にみると、サブタイプBの比率が低くCRF01_AEが大きな割合を占める、などである。こうした新潟地域のHIV感染の特殊性は、その後急速に消えつつあるように見える。新規感染/発症者の中で男性同性間の感染によるものが、表1にみるとおり5例中4例を占めた。男性同性間の感染の圧倒的大部分はサブタイプBのウイルスによるものであり、このタイプのウイルスが検出される割合も、ほぼ年を追って増加してきている。これまでの調査結果から、われわれは新潟県在住の感染者の大部分は県外、おそらく首都圏で感染したとみている。新潟県におけるHIVの感染動向が首都圏のそれに追従することはある程度必然といえ、今後も全国的な感染像に近づいていくと考えられよう。

従来検出がまれであった薬剤耐性変異を有するウイルスが、本年の調査で5件中3件にも見つかったことも、おそらく同じ文脈で理解できよう。本研究

班のデータで新規検体から薬剤耐性変異が検出される頻度は最近では10%に達することがわかっている。解析数が少ないため年ごとの変動は大きいにせよ、今後ある程度の頻度で耐性変異が検出されることが予測される。これまでのところ、われわれの調査で見つかった耐性変異はすべてNNRTIに対するものであった。また耐性付与の程度も比較的弱い。薬剤治療のさいNNRTIが第一選択薬として選ばれることが少ない点を考慮すれば、こうした変異をもったウイルスが蔓延したとしても、当面治療に大きな障害となる可能性は低い。しかし、新規検体における耐性変異の検出頻度の増加は、治療をうけながら性行為を繰り返す感染者の存在を示す指標であり、治療への影響ばかりでなく、感染拡大防止の観点からも重要な問題である。継続的な監視が欠かせない状況にあるといえる。

東京、大阪、名古屋など大都市圏のデータには、ヌクレオチド配列のホモロジーから強い類縁性が明らかで、ウイルスのクラスターが多数認められている。本調査研究の捕捉率が既に相当のレベルに達していることを考慮すれば、個々のクラスターに含まれる症例数はそれにかかわる感染集団の活動性の強さをおおよそ反映していると見てよいと思われる。新潟県における調査では、昨年までに解析されたウイルス相互の遺伝的差異は十分に大きく、共通の感染集団に属するとみなしうる例は発見されてこなかった。現在整備が進んでいる国内HIVのシーケンズデータベースの利用が可能になれば、県内感染者のウイルスの中に大都市圏では既知の活動度の強いクラスターとの関連が明らかとなる例がいくつか出てくると想像している。平成17年と本年にそれぞれ解析を行った2検体から強い近縁性を示すウイルスが検出されたが、これらの患者もそうしたアクティブな感染集団に含まれる可能性が高い。感染地、感染時期が不明であるため、その意味づけについては現在のところ保留せざるをえないが、今後同系統のウイルスが引き続き検出されてくるならば、元の感染集団から派生したサブクラスターが新潟県内に成立したことを強く示唆することになる。

E. 結論

新潟県の医療機関から提供されるサンプル中心のわれわれの調査では、昨年まで薬剤耐性変異をもったHIVの蔓延の程度は全国水準に比して低い結果が出ていた。本年5件中3件の検体に耐性変異が検出されたこと、男性同性間感染患者数の増加とサブタイプBのウイルスの検出比率が上昇したことから、新潟県のHIVの感染像はしだいに全国のそれに

近づきつつあるといえる。

F. 健康危険情報

特段の事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 牧野麻由子、田邊嘉也、村松芳幸、塚田弘樹、
下条文武 関東甲信越ブロックにおけるHIV感
染症患者への相談体制の現状と課題 新潟医学
会雑誌, 123(5) :p214-222, 2009

2. 学会発表

1. 牧野 麻由子 古谷野 淳子 田邊 嘉也：拠
点病院のチーム医療にカウンセラーを導入する
取り組み (第23回日本エイズ学会学術集会・
総会2009.11.26～28)
2. 牧野麻由子 村松芳幸 田邊嘉也 古谷野淳
子：HIV感染者のQOLと精神心理的要因の関係
について (第23回日本エイズ学会学術集会・総
会2009.11.26～28)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし



研究要旨

耐性遺伝子超高感度定量法の開発及び潜在的薬剤耐性発掘調査

研究分担者 仲宗根 正 国立感染症研究所・エイズ研究センター・主任研究官
協力研究者 阪井 弘治、武田 哲 国立感染症研究所・エイズ研究センター

未治療HIV感染者の中にも存在が予想されている薬剤耐性HIV、すなわち潜在的薬剤耐性HIV発掘調査を目的として、昨年度までに耐性遺伝子超高感度定量法を開発した。同法の検証目的を兼ねて、多クローン遺伝子解析を行うべく、その効率化のための研究を行った。その結果、今年度は以下の成果を得た。

- ①高速多クローン遺伝子解析法（仮称）を開発した。
- ②耐性遺伝子超高感度定量法が、絶対的定量法ではなく演繹的定量法であるのに対して高速多クローン遺伝子解析法（仮称）は絶対的定量法である。

A. 研究目的

薬剤耐性HIVの克服は、HIV感染者の長期生存のためには大きな課題のひとつである。これまで未治療HIV感染者体内には薬剤耐性HIVは存在しない、あるいは極めて少ないと考えられていた。しかし、近年の研究結果から予想より多い可能性が示唆されている。この、未治療HIV感染者体内のいわゆる潜在的薬剤耐性HIVを検出することができれば、効果的な薬剤選択を事前に予測することが可能となり、HIV感染者にとって福音となる。本研究では、未治療HIV感染者の中にも存在が予想されている薬剤耐性HIVの発掘、すなわち潜在的薬剤耐性HIV発掘調査を目的とする。昨年度までに、耐性遺伝子超高感度定量法を開発した。この方法は絶対的定量法ではなく演繹的定量法であり、なおかつ、いくつかの課題があることを昨年度報告書において報告した。この課題を克服するには、演繹的定量結果を絶対的定量結果で検証する必要がある。既存の絶対的定量法である多クローン遺伝子解析法での検証は、膨大な時間と費用を要するため、その効率化のための研究を行った。

B. 研究方法

まず効率化のための高速多クローン遺伝子解析法

（仮称）の理論設計を行った。特許出願前のためその詳細は割愛する。設計された同法を実行するため、組換えDNA実験計画の承認を得たのち、同法に不可欠の人工遺伝子を合成した（受託）。今回の解析標的部位は、耐性点変異が5箇所集中しているRTの65番から75番までの11アミノ酸（33塩基配列）に設定した。

C. 研究結果

高速多クローン遺伝子解析法（仮称）の理論設計が完成した。現時点では既存の多クローン遺伝子解析法に比較して10倍の効率化が達成されている。

D. 考察

昨年度までに開発した耐性遺伝子超高感度定量法（AS-PCR法）の欠点は、昨年度報告書で次のように指摘している。1)目的の耐性遺伝子毎にPrimerを作成しなければならない。2)目的の耐性遺伝子近傍に頻度の高い別の耐性遺伝子が存在する場合、Primerの設定は極めて困難である。3)たとえ良いPrimerが設定されたとしても、それは近傍の別の耐性遺伝子をも含めて設計されている。すなわち2x2以上の組み合わせ数となり、その数字分の測定が必要となる。この事は、場合によっては、既存の方法を凌駕する

手間とコストがかかることを意味する。4)同様の理由で、目的の耐性遺伝子近傍に耐性には無関係の非特異的変異が存在する場合、本法は無力である。5)特に感度増強目的でPrimerの3'endにあえてこしらせるミスマッチ配列が、対象のHIV遺伝子にも高頻度で存在する場合は、間違った評価につながる。6)0.1～1%の検出を目指す場合、100～1,000個以上のウイルスを感染者から提供していただく必要がある。すなわち、血漿ウイルス量が数百コピー数/mlで推移している感染者は、そもそも対象にしづらい。

以上の欠点に加えて、決定的な点は本法が絶対的定量法ではなく演繹的定量法であることである。理論的演繹がなされているとは言え、塩基配列を直接読んでいないことから、その正確性について検証が必要である。加藤らが開発した別の耐性遺伝子超高感度定量法であるPCR-MS法も演繹的定量法であることから、本法に対する検証法として有用ではあるが、絶対的なものではない。検証には絶対的定量法が必要である。

ところが、既存の絶対的定量法である多クローン遺伝子解析法での検証は、膨大な時間と費用を要する。本法では現時点で既存の多クローン遺伝子解析法の10倍の効率化が図られており、理論上は100倍以上の効率化も達成可能である。今後の解析により、AS-PCR法の正確性の検証はもちろん、最終目標である潜在的薬剤耐性HIV発掘調査の主力となる可能性についても検討が必要である。

なお、本法は、HIVのみならず他の病原体にも応用可能である。例えばインフルエンザウイルスの潜在的薬剤耐性検査への応用である。

E. 結論

- ①高速多クローン遺伝子解析法（仮称）を開発した。
- ②耐性遺伝子超高感度定量法が、絶対的定量法ではなく演繹的定量法であるのに対して高速多クローン遺伝子解析法（仮称）は絶対的定量法である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Murakami T, Eda Y, Nakasone T, Ami Y, Someya K, Yoshino N, Kaizu M, Izumi Y, Matsui H, Shinohara K, Yamamoto N, Honda M. Postinfection passive transfer of KD-247 protects against simian/human immunodeficiency virus-induced CD4+ T-cell loss in macaque lymphoid tissue.

AIDS. 2009, 23:1485-94.

2. 学会発表

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、浜口元洋、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（11/26-28、2009、名古屋）

H. 知的財産権の出願・登録状況

国立感染症研究所発明委員会審査中：高速多クローン遺伝子解析法（仮称）

特許出願準備中：高速多クローン遺伝子解析法（仮称）



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、葛西 淳 仙台医療センター臨床検査技師

平成20年度（平成20年12月～平成21年3月）及び平成21年度（平成21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8症例中2例で耐性変異が検出された。NRT領域にL210F、プロテアーゼ領域にE35D/E/G、I62V、K62R、I62IV変異が存在し、NNRT領域では検出されなかった。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

慢性疾患となったHIV感染症について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を把握することにより感染集団の同定などに有用であると思われる。

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20年12月～平成21年11月の症例分について報告する。

B. 研究方法

平成20年12月～平成21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21年11月末日までの HIV/AIDS 感染者の累計は187名(一年で11例の増加)である。東北全体での平成21年9月までの累計では369名で、全国と同様に増加している。平成20年12月～平成21年11月の期間に当院を受診した HIV 感染者は12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8例(男性7例、女性1例)であった。すべて日本国籍(日本人)で男性はMSM6例、異性間1例、異性間女性1例であった。年齢は29歳から58歳まで分布した。AIDS発症1例(58歳女性)、キャリアー7名。耐性検査時の HIV ウイルス量は $1.3 \times 10^2 \sim > 1.0 \times 10^5$ コピー/ml、CD4陽性リンパ球数は $0.3 \sim 757/\mu\text{l}$ 。ウイルスのサブタイプでは「B」が6例、「AE」2例であった。

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L210F：1例、プロテアーゼ領域にE35D/E/G、I62V、K62R、I62IVを検出した。

D. 考察

東北においても全国と同様に HIV 感染者は男性同性間の性的接触(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。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。

E. 健康危険情報

なし

F. 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20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20年度総括・分担研究報告書(研究代表者：中川正法) 33-37、2009、3月
2. 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20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20年度総括・分担研究報告書(研究代表者：杉浦 互) 36-37、2009、3月

3. 男性同性間の HIV 感染対策とその介入効果に関する研究：東北地域における男性同性間の HIV 感染予防介入研究。平成20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20年度総括・分担研究報告書(研究代表者：市川誠一) 22-26、2009、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 医療体制の整備に関する研究。平成20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20年度総括・分担研究報告書(研究代表者：濱口元洋) 21-24、2009、3月

2. 学会発表

1. 佐藤麻希、佐藤ともみ、武藤 愛、正田美鈴、佐藤愛子、小倉美緒、諏江 裕、伊藤俊広、後藤達也、佐藤 功。当院における抗HIV薬の院外処方箋発行に向けての取り組み。第63回国立病院総合医学会 2009年、仙台。
2. 山口 泰、玉木裕介、仁木孝行、伊藤俊広、正田美鈴、武藤 愛、鈴木智子。仙台医療センター歯科・口腔外科における HIV 歯科治療の患者統計。第63回 国立病院総合医学会 2009年、仙台。
3. 塩野徳史、コーナ・ジェーン、新ヶ江章友、市川誠一、金子典代、伊藤俊広。日本人男性における MSM (Men who have sex with men) 人口の推定。第23回日本エイズ学会学術集会 2009年、名古屋。
4. 太田 貴、小浜耕治、伊藤俊広、金子典代。東北地域における男性同性間の HIV 感染対策—ゲイ・ボランティアグループ「やろっこ」の活動展開。—第23回日本エイズ学会学術集会 2009年、名古屋。
5. 菊池 嘉、岩本愛吉、佐藤典宏、伊藤俊広、田邊嘉也、横幕能行、上田幹夫、渡邊 大、藤井輝久、南 留美、宮城島拓人、健山正男、中村仁美。多施設共同疫学調査における HAART の有効率。第23回日本エイズ学会学術集会 2009年、名古屋。
6. 金澤悦子、正田美鈴、武藤 愛、佐藤愛子、伊藤俊広、佐藤 功、土屋香代子。エイズ拠点病院外来通院中の HIV 感染者および AIDS 患者へのソーシャサポートに関する研究。第23回日本

エイズ学会学術集会2009年、名古屋.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

なし

2. 実用新案特許

なし

3. その他

なし



研究要旨

首都圏における薬剤耐性HIVの調査研究

帝京大学医学部附属病院における新規HIV症例の薬剤耐性の解析

研究分担者 太田 康男 帝京大学医学部内科学講座 教授

研究協力者 古賀 一郎 帝京大学医学部内科学講座 助教

抗レトロウイルス療法の導入に際し、確実な効果の発現と治療失敗の未然防止を目的とし、抗レトロウイルス療法導入前の患者と治療開始後に血中HIV RNA量が増加した患者を対象に血中HIV RNAの薬剤耐性変異の同定を行い、同時にHIV RNAのPol領域の解析結果からHIVサブタイプの推定を試みた。2008年12月以降に実施した7名（治療開始前患者が6名、治療経過中の患者が1名）について、7名のうちの5名がRT領域に薬剤耐性変異を認めた。2名はチミジンアナログ変異、1名は非核酸系逆転写酵素阻害薬（NNRTI）関連の変異、1名はNNRTI関連変異およびM184Vが確認された。1名の未治療患者からはabacavir, tenofovirを含むzidovudine以外の全ての核酸系逆転写酵素阻害薬（NRTI）関連変異であるK65K/Nを認めた。protease領域については7名中6名でpolymorphismを含む複数の変異が確認された。また7名はいずれもサブタイプBであると推測された。今後抗レトロウイルス療法導入時にzidovudine以外のNRTIを選択すれば、選択的に主流株となりうるだけでなく、更なる耐性変異の蓄積にもつながることから、NRTIの選択は、慎重に対応する必要がある。耐性変異を保有する株は少数株であることも多く、今後少数株を効率的に検出する系の確立を検討する必要があると考えられ、今後引き続きその解析方法を検討したい。

A. 研究目的

帝京大学医学部附属病院には、2009年12月現在で45名のHIV感染症患者が通院している。そのうちの半数以上が平成19年度以降に新規に当院を受診している。抗レトロウイルス療法の導入が必要のAIDS発症例は平成19年度以降10名を数えた。また、AIDS発症例以外でも初診から数年以内に抗レトロウイルス療法を導入される例が多く、未治療で経過観察中の患者はわずかに5名に留まる。当院のHIV感染症診療の特徴として、未治療で経過観察している患者数に比べ、抗レトロウイルス療法を導入している患者数の方が圧倒的に多いことがあげられる。

抗レトロウイルス療法の導入にあたっては、個々の症例で有効な薬剤を選択するため、薬剤耐性変異の有無を確認することは、治療効果を予見する意味においても、治療の失敗を未然に防止する意味においても重要である。我々は、HIV感染症診療に際し、

より確実に抗レトロウイルス効果を発現させる治療薬を選択し、可能な限り治療の失敗を防ぐことを目的とし、HIV感染症患者の血中HIVRNAの薬剤耐性変異を同定することを試みた。同時に、薬剤耐性変異の同定のために解析したHIVRNAのPol領域の解析結果からHIVサブタイプの同定を行った。

B. 研究方法

- 1) 当院を受診するHIV感染症患者の抗レトロウイルス療法導入前の血中HIVの薬剤耐性変異の解析を行った。
- 2) 抗レトロウイルス療法導入後に血中HIVRNA量が増加した患者の血中HIVの薬剤耐性変異の解析を行い、その症例の一部については複数の日時においてクローンの解析を行った。
- 3) これらの薬剤耐性変異の解析で得られたHIV Pol領域の遺伝子配列を用いてHIVサブタイプ

の推定を行った。

(倫理面への配慮)

帝京大学医学部附属病院においては、従来は診療の一環として保険診療の下で、外部検査会社に委託して HIV 薬剤耐性検査を実施してきた。平成 21 年度より従来の外部委託による薬剤耐性検査に加えて、HIV RNA 遺伝子解析を院内で実施することとした。HIV 遺伝子解析研究を実施するにあたり、あらかじめ帝京大学医学部倫理委員会の承認を得た。研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究による対象者への不利益や危険性の排除に留意し、説明と理解（インフォームドコンセント）を書面にて確認した。

C. 研究結果

平成 19 年度以降当院に新規に通院を開始した HIV 感染症患者は、男性 18 名、女性 3 名であった。男性 18 名の感染経路は、同性間性交が全体の 70% を占めた。

平成 19 年度以降のべ 18 名について HIV 薬剤耐性検査を実施した。内訳は、治療開始前が 13 名、治療経過中の検査が 5 名であった。そのうち 2008 年 12 月以降に実施した 8 名（治療開始前患者が 6 名、治療経過中の患者が 2 名）のうち、解析不能であった治療経過中の一例を除く 7 名について、さらに詳細に解析を行った。

7 名のサブタイプは Pol 領域の配列のみを用いた結果から判断すると、いずれもサブタイプ B であった。7 名のうちの 5 名が RT 領域に薬剤耐性変異を認めた。2 名はチミジンアナログ変異（thymidine analogue-associated mutation）である L210M、L210F、1 名は NNRTI 関連の変異、1 名は NNRTI 関連変異および M184V が確認された。1 名からは abacavir, tenofovir を含む NRTI 関連変異である K65K/N を認めた。protease 領域については 7 名中 6 名で polymorphism を含め 1 つ以上の変異が確認された。なお未治療の患者から確認された K65N については、シークエンス解析時の波形から野生株（K65）の中に少数の変異株（K65N）が存在していることが示唆された。

D. 考察

我々は、未治療の一例で確認された K65N という変異に着目した。K65N は K65R と同様、現在の推奨される抗レトロウイルス薬の組み合わせにも選ばれている abacavir や tenofovir を含む zidovudine 以外の全ての核酸系逆転写酵素阻害薬の耐性に関与する非常に影響の大きい部位に生じた変異である。今回、K65N が確認された未治療患者の場合、変異を持つ

株はあくまでも少数株であったが、今後抗レトロウイルス療法を開始する際に zidovudine 以外の NRTI を選択すれば、選択的に主流株となる可能性が考えられ、さらなる薬剤耐性変異を蓄積する可能性がある。今後の抗レトロウイルス療法の導入に際して、どの NRTI の選択が適切かという点について、慎重に対応する必要があると考えられる。

また一般に、耐性変異を持つ株の増殖能は野生株に劣るとされ、また薬剤耐性変異は複数が共存することでより強固な耐性を獲得する。本例のように耐性変異を保有する株が少数株であることも多いため、耐性変異を持つ少数株を効率的に検出する系の確立を検討する必要があると考えられる。

E. 結論

当院を受診する患者についての薬剤耐性変異の解析の結果、7 例中 5 名に RT 領域の、6 名に protease 領域の変異を認めた。また、解析を行った 7 例はいずれもサブタイプ B であることが推定された。

また一部の症例で、少数株ではあるものの抗レトロウイルス薬の選択に大きな影響を及ぼしうる変異を RT 領域に認めた。今後引き続き薬剤耐性を持つ少数株の解析方法を検討したい。

F. 健康危険情報

特記すべき事なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Cryptococcal Pleuritis Containing a High Level of Adenosine Deaminase in a Patient with AIDS: A Case Report. Yoshino Y, Kitazawa T, Tatsuno K, Ota Y, Koike K. Respiration. 2010;79(2):153-156. (in press)
2. Polymerase chain reaction assay for specific identification of *Candida guilliermondii* (*Pichia guilliermondii*). Yamamura M, Makimura K, Fujisaki R, Satoh K, Kawakami S, Nishiya H, Ota Y. J Infect Chemother. 2009 Aug;15(4):214-8.
3. Yanagimoto S, Tatsuno K, Okugawa S, Kitazawa T, Tsukada K, Koike K, Kodama T, Kimura S, Shibasaki Y, Ota Y. An essential single amino acid of Toll-like receptor 4 that is pivotal for its signal transduction and subcellular localization. J. Biol Chem, 2009, 284; 3513-20.
4. Yamamura M, Makimura K, Ota Y. Jpn J Infect Dis. 2009 Jan;62(1):20-5.
5. Evaluation of a new rapid molecular diagnostic sys-

tem for Plasmodium falciparum combined with DNA filter paper, loop-mediated isothermal amplification, and melting curve analysis.

6. Successful unrelated done marrow transplantation for a human immunodeficiency virus type-1-seropositive acute myelogenous leukemia patient following HAART. Oka Y, Tashiro H, Mizutani-Noguchi M, Koga I, Sugao T, Shirasaki R, Miura T, Akiyama N, Kawasugi K, Fujimori S, Shirafuji N. Int J Hematol. 2010;91:140-145.

2. 学会発表

1. 古賀一郎、太田康男。未治療時の薬剤耐性検査でRT領域にK65Nを認めた1例のHIV RNA遺伝子解析。第23回日本エイズ学会学術集会（平成21年11月、名古屋）、日本エイズ学会誌 14(4): 446, 2009

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



研究要旨

中国四国ブロックにおける薬剤耐性HIVの調査研究

- 広島大学病院で検出された抗HIV薬耐性遺伝子変異の種類と特徴 -

研究分担者 **木村 昭郎** 広島大学原爆放射線医科学研究所 血液内科 教授

研究協力者 **高田 昇¹**、**藤井 輝久¹**、**齊藤 誠司²**

¹広島大学病院輸血部 ²同エイズ医療対策室

抗HIV薬耐性変異の出現は、その時代に使用された薬剤に影響される。本研究班の2008年度の検討では、どのような変異がどの年度に出やすかったかを検討した。変異の頻度はまさにその時期に使用頻度が多かった薬剤と連動していた。本年は検出された個別のアミノ酸変異に注目し、種類と特徴について後方視的な観察研究を行った。

A. 研究目的

HIV感染者における薬剤耐性検査の遺伝子型結果について、後方視的に変異部位別の発生状況を集計し考察を行った。

B. 研究方法

採血・検査法については既報の通りである。1997年2月から2010年1月までに、薬剤耐性検査が実施されたのは119人のHIV感染者に対し477回の薬剤耐性検査が実施された。RT-PCRによる増幅産物が得られた384検体の結果を、パーソナルコンピュータ用データベースに入力した。

データをIAS-USAの最新の論文、2009年12月版 (<http://www.iasusa.org/pub/topics/2009/issue5/138.pdf>) の記載に沿って分類した。すなわち逆転写酵素領域では核酸系と非核酸系に分け、プロテアーゼ領域については主要変異と副次変異に分けて集計した。

倫理面への配慮

本検査の目的や方法などを文書によって検査前に説明し、初回は本人から書面で、2回目以降は口頭で同意を得た。検体は研究協力者が記号化を行い、患者のプライバシーに触れることがないように配慮した。

C. 研究結果

1. TAMについて

TAM(Thymidine analogue-associated mutations)は逆転写酵素領域(RT)のM41L、D67N、K70R、L210W、T215Y/F、K219Q/Eなどの変異を示す一群であり、特にAZTやd4Tに強い耐性を示す。抗HIV薬に対する耐性変異の歴史を開いた。多くは2つ以上の変異を併存していることが多い。

M41L検出の第1例は1997年であった。これまで14人に94回検出された。全例に治療歴があった。この中でさらにT215Yを持つものは12人85回あり、L210Wを持つものは5人30回検出された。

E44D検出は1999年が初回で、6人に37回検出された。中でも5人に31回はM41Lと同時に検出された。そのうち28回はV118Iも同時に検出された。E44DとV118IはTAMの存在下で薬剤耐性を強めると報告されている。このような相互関連の発生機序は不明であるが、適者生存の選択を受けたものと考えられることができる。

D67N検出は1997年が初回で、14人に87回検出され、M41Lと共に検出されるのは8人68回であり、M41Lを伴わないのは7人19回であった。

K70R検出は1997年が初回で、7人に46回検出され、D67Nと共に検出されるのは5人20回であった。

この両者の併存も E44D 変異と独立しているようであり興味深い。

V118Iは11人に51回検出された。本変異はE44Dと同様TAM存在下に耐性を強めると報告されている。2004年に1人だけ治療前の検体で他のTAMを伴わずに検出された。

L210変異は2000年が初回で、6人に37回検出された。ほとんどはL210Wであったが、1人だけ治療前にL210Fが検出された例があった(2003年、急性例)。

T215Y/F変異は1997年以来15人に108回検出された。この変異は非核酸系逆転写酵素阻害剤(NNRTI)への感受性を高めることがあると報告されているが、そのうちNVP服用例が2人5回、EFV服用例が1例6回高ウイルス量とともに検出され、NNRTI服用に有利とは考えられなかった。T215にはこの他I、Nの変異も2人ずつ経験された。

K219Q/E変異は2000年以来6人に15回検出された。5人ではTAMと同時検出されたが、1人だけ治療前に他のTAMを伴わず検出された。2008年の発症例であった。

2. T69変異について

T69変異は1997年以来9人に37回検出された。

T69の変異と同時にTAMの存在があると全ての核酸系逆転写酵素阻害剤に耐性になると報告されている。T69Sは3例に検出され、1例目はAZT+3TCの治療歴が長かった例で2001年に検出され、2例目と3例目はそれぞれ2008年と2009年に無治療の初回検査で検出された。このほかT69A、T69D、T69delが7人から28回検出された。いずれも長い治療歴を持った例ばかりであった。2000年の急性感染例で無治療時にT69Dが検出された例があった。

3. M184V変異について

M184Vは3TCとFTC耐性で非常に有名な変異である。確かに2005年ごろまではAZT+3TCやd4T+3TCが汎用された。M184Vは1997年以来19人に115回検出された。うち11人44回ではM41Lを併存していたが、14人71回ではM41Lを併存していなかった。M184VとM41Lの出現の順序では、先にM184Vが出現してそのまま、あるいは遅れてM41Lが出現する例が8人、先にM41Lが出現して後でM184Vが出現する例が4人であった。最初から両者が出現したのは5人であった。M184VがあるとTAM発生の時期が遅れると報告されている。

表1 逆転写酵素領域のアミノ酸変異の出現数

Mutation on Nucleoside RT				Mutation on Non-nucleoside RT			
AA substitution	Patients	Yield	NoTx	AA substitution	Patients	Yield	NoTx
M41L	14	94	0	L100I	1	3	0
E44D	6	37	0	K101E/Q	4	21	0
A62V	2	10	0	K103N/R/T	9	37	3
K65R	1	1	0	V106A	2	3	0
D67N	14	87	1	Y181C	3	18	0
T69D/S/N/A/del	9	37	3	Y188C	1	3	0
K70R	7	46	0	G190A	3	10	0
L74V	4	22	0				
V75I/T	2	13	0				
Y115F	1	1	0				
V118I	11	51	0				
M184V	19	115	1				
L210W	6	37	1				
T215Y/F/I	15	108	0				
K219Q/E	6	15	1				

略号	アミノ酸	略号	アミノ酸
A	アラニン	M	メチオニン
C	システイン	N	アスパラギン
D	アスパラギン酸	P	プロリン
E	グルタミン酸	Q	グルタミン
F	フェニルアラニン	R	アルギニン
G	グリシン	S	セリン
H	ヒスチジン	T	スレオニン
I	イソロイシン	V	バリン
K	リジン	W	トリプトファン
L	ロイシン	Y	チロシン

参考1 アミノ酸の略号対照表

略号	一般名	略号	一般名
3TC	ラミブジン	ATV	アタザナビル
ABC	アバカビル	DRV	ダルナビル
AZT	アジドチキジン	FPV	フォスアンプレナビル
d4T	スタブジン	IDV	インジナビル
ddI	ジダノシン	LPV	ロピナビル
EFV	エファビレンツ	NFV	ネルフィナビル
NVP	ネビラピン	RTV	リトナビル
TDF	テノホビル	SQV	サキナビル
RAL	ラルテグラビル	TPV	チプラナビル

参考2 抗HIV薬の略号対照表