

D. 考察

1. 研究班のホームページ (HP) について

研究班が提供する血中濃度測定を利用した施設は55施設、2,046件の利用があったことから、抗HIV薬の安全で適正な使用に貢献することができたと思われた。また、HPへのアクセス数は年々増加していたことから、抗HIV薬の血中濃度測定に関する関心の高さが伺えた。新薬の治療効果を確実にするために、本研究班が提供する血中濃度測定システムは、

有用な臨床データの提供を行ったものと思われた。臨床医が容易に血中濃度測定にアクセスできたことで、抗HIV療法の治療効果を高め、副作用の軽減に寄与したものと思われた。

2. 相互作用血中濃度検索システムについて

抗HIV薬相互作用データベースは、複雑化する抗HIV療法における適正な薬物療法への支援と、副作用を未然に防止する観点から貴重な情報を容易に提

表12 LPV trough plasma concentration (mg/mL)

patient	Baseline	week 4	week 8	week 12	week 16	week 20	week 24
#1	9.23	2.10	1.73	0.80	1.34	1.68	1.43
#2	14.94	2.43	3.94	1.65	2.78	2.62	2.49
#3	14.86	0.80	1.09	1.09	1.67	1.07	1.18
#4	9.63	1.10	0.41	0.40	0.40	0.41	0.40
#5	11.19	5.85	4.63	3.17	4.24	3.04	5.47
#6	7.46	2.32	2.89	2.71	3.46	3.41	3.36
#7	11.75	0.41	0.70	0.49	0.33	1.37	1.14
#8	8.89	3.24	6.58	6.22	7.08	6.02	6.28
Mean (S.D.)	10.99 (2.75)	2.28 (1.72)	2.75 (2.17)	2.07 (1.96)	2.66 (2.27)	2.45 (1.77)	2.72 (2.16)

表13 Laboratory parameters

Parameter	n	Baseline	week 4	week 8	week 12	week 16	week 20	week 24
T-Cho (mg/dL)	8	197.3 (33.5)	185.6 (26.6)	191.1 (15.6)	186.5 (15.3)	189.0 (21.8)	190.6 (20.9)	193.6 (24.7)
HDL-Cho (mg/dL)	8	56.2 (9.9)	50.0 (6.7)	54.8 (7.7)	53.8 (7.8)	55.3 (8.1)	59.3 (11.5)	60.4 (9.8)
TG (mg/dL)	8	207.5 (115.0)	174.6 (50.6)	206.4 (110.8)	201.1 (105.6)	230.8 (139.6)	201.1 (114.9)	170.1 (63.6)
CD4 (cells/mm ³)	8	360 (156.4)	340 (140.9)	340 (132.3)	382 (157.1)	375 (163.5)	348 (164.5)	358 (165.7)
HIV-RNA (copies/mL)	8	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50

Data expressed as Mean (S.D.)

表14 下痢回数の変化/日

患者	変更前 (BID)	変更後 (QD)
#1	5回	3回
#2	2-3回	3-4回
#3	無	2-3回
#4	4-5回	4-5回
#5	無	無
#6	3回	1-2回
#7	無	無
#8	2-3回	2-3回

供できるシステムである。スタンドアローン版のダウンロード件数も多かったことから、より一層、抗HIV療法の安全性を高めることができたと考える。

3. ロピナビル/リトナビル配合剤の剤型変更に伴う血中濃度の変化に関する検討

錠剤群のトラフ値が有意に低値を示した要因として、第1相比較試験の単回投与の血中濃度推移からクリアランスに差異が生じている可能性があると考えられた。食事によるバイオアベイラビリティへの影響が少なくなったため、錠剤は食事の摂取は必須ではなくなったが、第1相比較試験において服薬時の食事に含まれる脂肪等、食事の内容によるAUCの差異が認められていることから、今後、食事の内容によるトラフ値の変化についても検討を加える必要があると思われた。ソフトカプセル製剤の下痢の原因の1つと思われる、ポリオキシル35ヒマシ油及びオレイン酸が添加剤として用いられなくなったことにより、投与開始初期に発現する消化器症状の軽減を認めたことは、服薬の阻害因子の1つである副作用の軽減に寄与するものであると思われた。服用方法及び保存条件の変更による服薬の負担軽減は、長期服薬におけるアドヒアランスの維持に寄与するものと考えられた。

4. 腎関連の通常検査データを使ったフマル酸テノホビルジソプロキシル (TDF)の血中濃度予測

TDFはこれまで実施された臨床治験の中で、明らかな腎機能障害を示す報告はない。しかし、TDFの腎毒性を示唆する散在する症例報告が行われ、近位尿管でのTDFによる障害について報告されていることから、腎毒性に対する意見には相違が見られる。この状況において、TDFが途中で排泄環境に変化を起こすこととBUN値との関係が強いことは新しい知見である。通常検査で測定されるBUNは、蛋白摂取、生活活動、GFRに影響され、微妙なBUN値の変化を評価することは難しいが、個人変動は治療前後のBUNの差を用いることによって最小限に抑えることが出来た。TDF血中濃度の変動は、薬剤の消化管からの吸収に影響される可能性を考慮しなければならない。TDFとPIとの血中濃度に影響する相互作用は、腎排泄のみでは説明がつかず、腸管での吸収の影響があると考えられている。加えて過去に、脂肪はTDF血中濃度を上昇させるとする報告もされている。このような知見の中で、我々が新しく見出したBUNとの関係はTDF濃度のばらつきを説明するための有力な情報を提供するものと考えられた。TDF血中濃度高値での対数正規曲線の逸脱は、たと

え短時間であったとしてもTDFのpeak時の濃度が腎の排泄能力を超えている可能性を示唆した。表6に示されたTDFトラフ値が高値であったことを考慮すると、これらの症例で報告されたTDF peak値は、さらに高値であったと推測される。図13、表6を基に考えると、TDFの腎での排泄能力には限界があり、排泄環境には変化が生じていると考えることに合理性がある。臨床で実際に使用される状況では、TDF濃度はその限界を超えることは少ないものと思われるが、治療後だけでなく治療前のCrとBUNを含めて定期的に評価することは、臨床現場における副作用防止の観点において、薬剤の安全使用のための指標となった。このように通常の検査から得られる情報をTDF濃度に直接結びつける情報を臨床にフィードバックすることで、TDFを安全に使用し、副作用を未然に防ぐ一つの指標を臨床の場に提供することが出来た。

5. HPLCによるダルナビル血中濃度測定法の開発

LC-MS/MS法はHPLC法に比し、その測定範囲は約30倍低濃度側に広がった。HPLC法、LC-MS/MS法の選択性および再現性はほぼ同程度と考えられた。LC-MS/MS法はHPLC法の評価や、HPLCで測定不可能な低濃度のDRVを定量研究に利用可能である。DRV血中濃度のトラフ値は 3.6 ± 1.2 mg/mL(外国人健康人)と報告されている。今回開発したHPLC法によって臨床検体の血中濃度測定は十分可能である。今回開発したHPLC法を用いることで、国内においてHPLCを用いたDRV血中濃度測定が可能となり、HIV診療の医療の質の向上に寄与できるものと思われた。

6. 硫酸アタザナビルの血中濃度が高値の患者を対象とした、ATV/r からATV₄₀₀へのスイッチ臨床試験

PIのウイルス学的効果は血中濃度と相関することから、ウイルス学的有効性を考えれば、より高く血中濃度を維持することが出来るATV/rの有効性はATV₄₀₀より勝っていると考えられる。しかし、ATVのトラフ濃度が高値となるとT-Bilの上昇を惹起することが複数報告されている。また、ATVによるT-Bilの上昇は、一般に肝機能障害とは関係なく、安全性に問題はないとされているが、黄疸という副作用症状は患者の外観の変化を来すことから、その発現する症状を嫌い、服薬変更を希望する場合や、患者によっては服薬の自己中断を行った症例も経験している。ATVの血中濃度は、有効かつ黄疸等の副作用が発現しない濃度でコントロールすることが最

も望ましい。ブースタとして使用するRTVは冷蔵庫での保存が必要であり、患者にとっては利便性を阻害する要因の一つとなり、さらにRTVは相互作用のある薬剤も多いため、併用を避けざるを得ない場合もある。従って、治療の有効性を高めるためには高い血中濃度を維持することは効果的であるが、高い血中濃度を示す患者に対し、ブースタであるRTVの使用を中止し、ATV400mg投与に変更し、その有用性を検討することは臨床的意義があると考えられる。

今回、ATV/r服用患者においてATVのトラフ濃度が1.50mg/mL以上を示す患者に焦点を絞り、ATV₄₀₀へ変更することで、有効性の維持、副作用の軽減について検討した。対象患者のトラフ濃度を1.50mg/mL以上にした設定根拠は、ATV/rを服用した健常成人が、ブーストしないATV₄₀₀へ変更した場合、トラフ濃度の幾何平均値が1.23mg/mLから0.16mg/mLへ87%、AUCが57.0mg・h/mLから28.1mg・h/mLへ51%低下する報告に基づき、DHHSのガイドラインが推奨するATV目標トラフ濃度0.15mg/mLを維持するためには、トラフ濃度が1.50mg/mL以上必要であると推定した。

ATV/rからATV₄₀₀へ変更後、トラフ濃度の平均値は1.95 ± 0.39 mg/mLから4週後には0.26 ± 0.18mg/mLまで約86%低下した。変更後の低下率は先行研究と類似しており、トラフ濃度の平均値は24週間において0.15mg/mL以上を維持したことから、今回対象患者のトラフ濃度を1.50mg/mL以上にした設定根拠は、妥当であると考えられた。しかし、表10に示すように、測定した患者の血中濃度には目標トラフ濃度を下回ったデータもあり、臨床試験を実施した24週間における患者のHIV-RNA量は、全例検出限界未満を維持していたものの、長期の安全性を検討するためのATV/r服用患者におけるATVトラフ濃度の設定に関しては検討が必要と考える。

ATV₄₀₀へ変更後、T-Bilが有意に低下したことは、黄疸の軽減と患者のQOLの向上につながった。HAARTによる高脂血症は、主にPIが関与しており、服用期間が長いほど虚血性心疾患の頻度が増加し、1年のHAARTへの暴露で年間発生率が26%増加することが報告されていることから、T-Cho、TGが変更後に低下したことは、長期服用による副作用発現を未然に防止できたものと考えられた。ATVのトラフ濃度が高値を示す患者に対し、ATV₄₀₀へ変更した24週間における安全性と有効性が示唆された。今後、ATV/rからATV₄₀₀への変更について長期間の安全性と有効性を検討するためには、より多くの症例について長期間観察を行う臨床試験が必要である。

7. ロピナビル・リトナビル配合剤 (LPV/r) の1日2回から1日1回投与へのスイッチ臨床試験結果

LPV/rは、大きなIQ(C_{min}/IC₅₀:Inhibitory Quotient)値を示すことで強力な抗ウイルス作用を示し、高い認容性、持続的なウイルス抑制作用を併せ持つPIである。PIのウイルス学的効果は血中濃度と相関することから、ウイルス学的有効性を考えれば、より高く血中濃度を維持することは有用であると考えられる。しかし、血中濃度が高いと副作用の発現率が増加することから、すべてのPIの血中濃度を高く保つことは不可能である。また、有効な抗HIV薬も服薬アドヒアランスが低下すれば、服薬の中断あるいは耐性獲得による治療失敗となる。近年、抗HIV薬の改良が重ねられ、QDが可能な抗HIV薬が複数承認されたことにより、QDはHAARTの主流となりつつある。患者は、服薬方法をQDにすることで、BIDに比べ服薬回数や服薬時間等の制約が軽減され、服薬アドヒアランスやQOLの向上が期待できる。従って、LPV/rのQDとBIDが同等の安全性と有効性を持つことを示すことができれば、臨床的な意義は大きいものとする。

今回我々は、国内で承認されていない用法用量であるQDによる臨床試験を行うにあたり、臨床試験の安全性を担保するために、初回治療からLPV/rをBIDで服用患者において、HIV-RNA量が12週以上感度未満を維持し、さらにLPVのトラフ濃度が6.00 mg/mL以上を示す患者をQD変更の対象とした。対象患者のトラフ濃度を6.00 mg/mL以上にした設定根拠は、海外臨床試験において、BIDのトラフ濃度が6.56 ± 3.71 mg/mLであり、QDでは3.22 ± 2.07 mg/mLとした報告に基づき、DHHSのガイドラインが推奨するLPV目標トラフ濃度1.00 mg/mLを維持するためには、トラフ濃度が6.00 mg/mL以上が必要であると仮定した。また、当院でLPV/rをBIDで服用した患者36例の平均トラフ濃度が6.85 ± 4.13 mg/mLであったことから、日本人におけるトラフ濃度は先の海外報告と同様であると考え、今回の臨床試験の設定根拠とした(図20)。

LPV/rをBIDからQDへ変更4週後の平均トラフ濃度は2.28 ± 1.72 mg/mLであった。トラフ濃度の平均値は今回の試験期間24週間を通じて1.00 mg/mL以上を維持したことから、対象患者のトラフ濃度を6.00 mg/mL以上に設定したことは適切であったと考えられた。しかし、本臨床試験におけるQDの平均トラフ濃度は、海外報告よりも低値であり、表11に示したように、測定した患者の血中濃度には目標トラフ濃度を下回ったデータもあった。臨床試験を実

施した24週間における患者のHIV-RNA量は、全例検出限界未満を維持していたものの、QDへ変更するためのLPVトラフ濃度の設定に関しては、今後さらに検討が必要と考える。また目標トラフ濃度を複数回、下回った症例 #4、#7に関しては、試験終了後も観察を継続しており、HIV-RNA量の変動により、BIDへの変更も検討している。

試験期間に発現した有害事象はいずれも軽微であり、嘔気、胃部不快感などの消化器症状は服薬後数時間で発現し、時間経過とともに消失する例が多かった。これは、QDへの変更で服用後の血中濃度がBIDに比べ上昇したことによって発現した症状であると考えられた。また、これらの症状が時間経過と共に消失したことから、血中濃度の上昇による副作用は、時間経過とともに軽減できる症状であったと考えられた。予想された下痢の頻度が海外報告に比べ少なかったことから、今回の試験におけるQDの忍容性を確認することができた。本試験の対象となった患者は、すでにLPV/rをBIDで服用した経験を持っていたことが、下痢の頻度の少なかった要因の一つであると推測された。

本試験を実施した結果、QDはBIDと同等のウイルス抑制効果を持ち、CD4細胞数の維持が可能であることが確認され、試験期間中に脂質代謝パラメータの変動、重篤な有害事象が認められなかったことから、24週間における安全性と有効性を確認することができた。日本では現在QDの適応はないものの、今回の結果が日本におけるQD投与の有用性確認の第一歩となったものと考えられる。

E. 結論

抗HIV薬の血中濃度を測定するシステムと、相互作用情報を含む薬剤情報の提供で、より適切で安全なHIV診療に貢献できたものと考えられる。また、新薬の血中濃度測定方法の開発と、血中濃度に関連する臨床試験を実施したことで、国内で臨床試験の行わ

れていない抗HIV薬の安全な使用に貢献することができた。今後さらに臨床データを蓄積し、日本人における薬物動態を検討し、臨床へのフィードバックを行うことが重要と考える。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. T. Makie, S. Nagai, A. Sasakawa, K. Kawamura, T. Kuwahara, Predicting Tenofovir Concentration on the Basis of Renal Factors Determined by Routine Tests, *American Journal of Therapeutics*, 14,514-518 (2007).
2. 矢倉裕輝、吉野宗宏、龍香織、治川知子、織田幸子、矢嶋敬史郎、谷口智宏、笹川淳、富成伸次郎、渡邊大、牧江俊雄、山本善彦、上平朝子、白阪琢磨、栗原健、ロピナビル/リトナビル合剤の剤型変更に伴う血中濃度及び副作用に関する比較検討、広島：第21回日本エイズ学会学術集会・総会；11月、2007。抄録番号OS14-105
3. 田中理恵、加藤真吾、栗原健、杉浦互、HPLCによるダルナビルの血中濃度測定法の開発、広島：第21回日本エイズ学会学術集会・総会；11月、2007。抄録番号OS14-103
4. T. Kuwahara, S. Oda, T. Nakakura, M. Mori, T. Uehira, G. Okamoto, M. Yoshino, A. Sasakawa, K. Yajima, A. Umemoto, K. Takada, T. Makie, Y. Yamamoto, Problems in three Japanese drug users with human immunodeficiency virus infection, *J. Med. Invest.*, 55, 156-160 (2008).
5. 吉野宗宏、矢倉裕輝、栗原健、坂東裕基、小川吉彦、矢嶋敬史郎、谷口智宏、大谷成人、富成伸次郎、渡邊大、上平朝子、白阪琢磨、硫酸アタザナビルの血中濃度が高値の患者を対象とした、ATV/r からATV400 へのスイッチ臨床試験結果、日本エイズ学会誌11(1)：50-53、2009
6. 栗原健、矢倉裕輝、吉野宗宏、小森勝也、白阪琢磨、杉浦互、抗HIV薬血中濃度測定支援システムの構築と血中濃度トラフ値の海外データとの比較、札幌：第18回日本医療薬学会年会；9月、2008。抄録番号20-P3-488
7. 吉野宗宏、矢倉裕輝、栗原健、坂東裕基、小川吉彦、矢嶋敬史郎、谷口智宏、笹川淳、大谷成人、富成伸次郎、渡邊大、上平朝子、白阪琢磨、ロピナビル・リトナビル(LPVR)の1日2回から1日1回投与へのスイッチ試験、大阪：第22回日本エイズ学会学術集会・総会；11月、2008。抄録

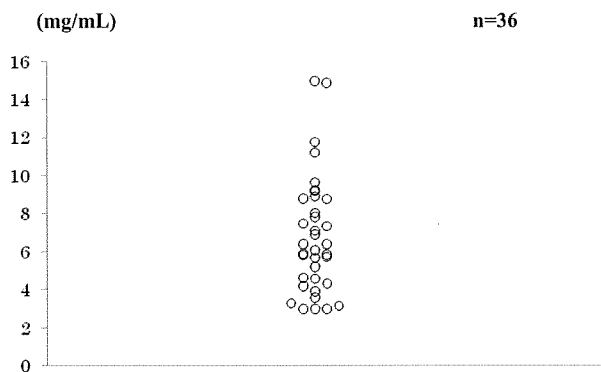


図20 LPV BID trough plasma concentration (mg/mL)

番号O-33-136

8. 矢倉裕輝、吉野宗宏、坂東裕基、小川吉彦、矢嶋敬史郎、谷口智宏、大谷成人、富成伸次郎、渡邊大、上平朝子、白阪琢磨、栗原 健、ロピナビル・リトナビル配合剤のトラフ値と脂質系への影響及びテノホビル血中濃度との相関に関する検討、大阪：第22回日本エイズ学会学術集会・総会；11月、2008。抄録番号P-024
9. 矢倉裕輝、吉野宗宏、栗原 健、坂東裕基、小川吉彦、矢嶋敬史郎、谷口智宏、大谷成人、富成伸次郎、渡邊大、上平朝子、白阪琢磨、ロピナビル・リトナビル配合剤の初回治療における有効性及び安全性に関する剤型間の比較検討、大阪：第22回日本エイズ学会学術集会・総会；11月、2008。抄録番号P-053
10. 吉野宗宏、矢倉裕輝、栗原 健、坂東裕基、小川吉彦、矢嶋敬史郎、谷口智宏、大谷成人、富成伸次郎、渡邊大、西田恭治、上平朝子、白阪琢磨：ロピナビル・リトナビル配合剤（LPV/r）の1日2回から1日1回投与へのスイッチ臨床試験結果、日本エイズ学会誌11(3)：250-254、2009
11. 吉野宗宏、矢倉裕輝、栗原 健、坂東裕基、小川吉彦、矢嶋敬史郎、谷口智宏、大谷成人、富成伸次郎、渡邊大、上平朝子、白阪琢磨：硫酸アタザナビルの血中濃度が高値の患者を対象とした、ATV/r からATV400 へのスイッチ臨床試験結果、日本エイズ学会誌11(1)：50-53、2009
12. 小田原隆、中村哲也、今村顕史、瀧永博之、栗原 健、古西満、立川夏夫、藤井毅、白阪琢磨、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「抗HIV治療ガイドライン」、2009
13. 吉野宗宏、矢倉裕輝、栗原 健、小川吉彦、坂東裕基、矢嶋敬史郎、笠井大介、谷口智宏、富成伸次郎、渡邊大、西田恭治、上平朝子、白阪琢磨：Tenofovir 長期投与における腎機能の評価（第3報）。第23回日本エイズ学会学術集会・総会、愛知、2009年11月
14. 吉野宗宏、矢倉裕輝、栗原 健、小川吉彦、坂東裕基、矢嶋敬史郎、笠井大介、谷口智宏、富成伸次郎、渡邊大、西田恭治、上平朝子、白阪琢磨：エファビレンツ投与患者における治療継続と中断に関する検討。第23回日本エイズ学会学術集会・総会、愛知、2009年11月
15. 矢倉裕輝、吉野宗宏、小川吉彦、坂東裕基、矢嶋敬史郎、笠井大介、谷口智宏、富成伸次郎、渡邊大、西田恭治、上平朝子、白阪琢磨、栗原 健：投与量別に見たFosamprenavirの血中濃度に関する検討。第23回日本エイズ学会学術集会・総会、愛知、2009年11月
16. 矢倉裕輝、吉野宗宏、小川吉彦、坂東裕基、矢嶋敬史郎、笠井大介、谷口智宏、富成伸次郎、渡邊大、西田恭治、上平朝子、白阪琢磨、栗原 健：Efavirenzの剤型変更に伴う血中濃度の変化及び副作用に関する検討。第23回日本エイズ学会学術集会・総会、愛知、2009年11月

II. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし



研究要旨

北海道ブロックにおける薬剤耐性HIVの調査研究

研究分担者 小池 隆夫 北海道大学大学院医学研究科内科学講座・第二内科 教授

研究協力者 千葉 仁志¹、吉田 繁²

¹北海道大学大学院保健科学研究院病態解析学分野 教授、²同 助教

2007-2009年度の北海道ブロックにおける新規HIV感染者の動向と薬剤耐性HIV検出状況を調べることを目的とし、北海道大学病院を受診したHIV感染者を対象に調査をおこなった。2007-2009年に北海道大学病院を受診したHIV感染者は67名であり、そのうち新規HIV感染者は42名であった。新規感染者から検出したHIVのほとんどはIAS-USAもしくはstanford drug resistance databaseで示されるマイナー変異を有していたが、そのうち3名（約7.1%）から高度耐性変異を有するHIV（proL90M/rtM41L/rtT69ins/rtT215X, rtL210W, proM46I）が検出された。北海道ブロックでも毎年15-20名の新規感染者があり、確実に増加している。従って、本調査の継続は北海道におけるHIV動向の把握に重要であり、それは感染拡大の防止を考えるうえでの一助となる。

A. 研究目的

本邦における薬剤耐性HIVの発生動向把握のため、北海道ブロックにおける新規HIV感染者数の動向ならびに新規感染者における薬剤耐性HIVの遺伝子解析を目的とする。

B. 研究方法

北海道ブロックにおける2007-2009年度の新規HIV感染者数を調査する。調査期間中に認められた新規HIV感染患者の血清および血球を凍結保存し、血清中に存在する遊離HIVのpol, gag, env領域の遺伝子配列を解析し、薬剤耐性ならびにsubtypeの決定をおこなう。

(倫理面への配慮)

本研究は北海道大学医学研究科・医学部医の倫理委員会により承認されたものであり、担当医から患者へ研究の説明を行い、同意書に署名をしていただいた患者について検査をおこなっている。情報保護

に関してはアクセスユーザー制限、パスワード設定、匿名コード化をおこなっている。

C. 研究結果

2007-2009年に北大病院を受診したHIV感染者は67名であり、そのうち42名（62.7%）は新規HIV感染者であった。新規感染者の性別は男性41名、女性1名であり、推定感染経路は同性間28名（約66.7%）、異性間7名（約16.7%）、不明7名（16.7%）であった。国籍は3名が外国人（いずれも男性）であった。初診時にAIDSを発症していた患者は10名（23.8%）であった。新規感染者についてHIV薬剤耐性検査をおこなったところプロテアーゼもしくは逆転写酵素領域にIAS-USAもしくはstanford drug resistance databaseで報告されている耐性変異を有するHIVが95.2%の患者において認められた（図1）。そのうち3名（7.1%）に高度耐性変異を有するHIVが確認された。それぞれの耐性変異はプロテアーゼL90Mと逆転写酵素M41L、T69ins、T215X（リバータント）

を有するHIV、逆転写酵素L210Wを有するHIV、プロテアーゼM46Iを有するHIVであった(表1)。また、2008年よりインテグラーゼ領域の解析を開始したが、現在までに本領域での高度耐性変異は確認されていない。SubtypeはBが37名(88.1%)、CRF01_AEが2名(4.8%)、CRF02_AGが3名(7.1%)であった(表2,3)。

D. 考察

北海道ブロックのHIV感染者総数は首都圏と比較し少ないが、2009年度には北大病院を受診したHIV感染者は累計で200名を超えた。新規感染者の増加は毎年約15-20名前後であり、確実に感染者は増加している。北海道ブロックにおける北大病院の新規HIV感染者捕捉率は約80%であったが、2009年9月

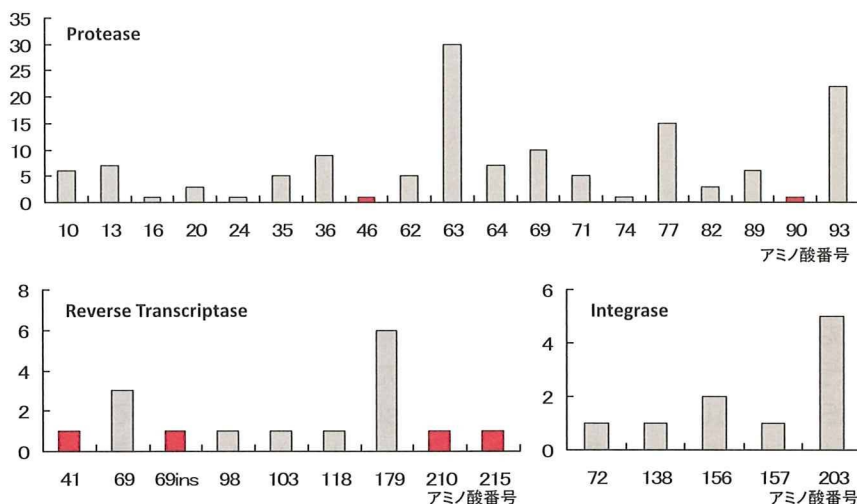


図1 2007-2009年に新規感染者から検出された薬剤耐性変異の数

表1 2007-2009年に薬剤耐性HIVが検出された新規感染者

症例	性別	年齢	国籍	感染経路	耐性変異	
					プロテアーゼ	逆転写酵素
1	男性	31	日本	同性間	L10LI, L63P, V77VI, L90LM , I93IV	M41LM, T69ins, T215NSTY
3	男性	24	日本人	同性間	L10I, L24M, E35D, M36MI, L63P, I93L	V179E, L210LW
2	男性	39	日本	不明	M36I, M46I , I62V, L63T, I64V, T74A, I93L	なし

表2 2007-2009年に検出された non-subtype B 感染者のプロファイル

症例	Subtype	性別	年齢	国籍	感染経路
1	CRF01_AE	男性	58	日本	異性間
2	CRF01_AE	男性	49	日本	異性間
3	CRF02_AG	男性	42	外国	不明
4	CRF02_AG	男性	31	日本	同性間
5	CRF02_AG	男性	37	外国	異性間

表3 2007-2009年に検出された subtype B 感染者のプロファイル

患者数(人)	
性別	男性 36
	女性 1
国籍	日本 36
	外国 1
感染経路	同性間 27
	異性間 4
	その他 6

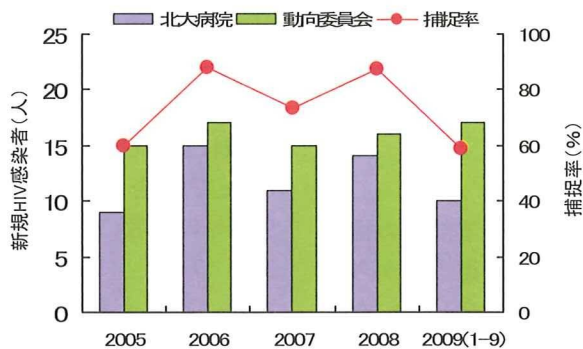


図2 新規HIV感染者数と捕捉率の年次推移

時点では約60%と低下している(図2)。これは北大病院以外の札幌市内の医療機関もしくは札幌以外の医療機関での感染者増加を示唆している可能性がある。北大病院での新規感染者は30歳代、日本人男性、同性間感染と日本国内での傾向と同様であった。新規感染者からの薬剤耐性HIV検出率は2004-2006年で約3%であったが、2007-2009年では平均7.1%と増加傾向にあった。これは日本国内と同様の傾向であった。検出された耐性変異の種類はPIとNRTIに対する変異であった。症例1はNRTIに対する高度耐性(M41L、T69ins、T215X)を有しており、特にT215のリバータント変異があることから、AZTを長期間服用していた感染者からの感染であることが推測される。症例2も同様にAZTやd4T服用感染者からの感染が推測される。症例3はPIに対する変異M46Iを中心とするいくつかのマイナー変異を有しており、それら変異からAtazanavirを服用していた感染者からの感染が考えられるが、PIは交差耐性が多いため可能性は高いものではない。また、今回の調査ではラルテグラビルの耐性は認められなかったが、本薬剤はDHHSガイドラインでも初回治療薬として推奨されたこと、他薬剤との交差耐性がないことから、今まで薬剤耐性で効果的な治療薬が選択できなかった患者が本薬剤を使用することが予測される。しかしながら、本薬剤はジェネティックバリアが低いことが報告されていることから、今後、新規感染者においてインテグラーゼ領域の解析が必要であると考えられる。いずれにしても近年、薬剤耐性HIVの感染は増加傾向にあるため、初診時もしくは治療開始前の薬剤耐性検査の重要性は更に増すことが考えられる。Subtypeでは新規感染者の約90%がBであり10%がAEとAGであった。特徴としてBは日本男性MSM、AEは異性間感染、AGは外国人が挙げられるが、これも日本国内と同様の特徴である。

北海道ブロックでは近年、札幌中心街にHIV検査・相談所を開設し、それにより手軽に検査・相談を受けることができる体制を構築している。本施設で検出されたHIV感染者は2008年4名、2009年3名と北海道ブロック新規感染者の約20%にあたる。このことは検査体制の充実が潜在的な感染者の検出につながると同時に、北海道で多くの潜在的HIV感染者が存在することを推測させるものであり、今後も感染者は更に増加し続けることが考えられる。従って、本研究の継続は今後の感染拡大防止に大きく貢献すると考えられる。

E. 結論

1) 2007-2009年度の北大病院での新規感染者は42

名であった。

- 2) 新規感染者42名中3名から薬剤耐性HIVが検出された
- 3) 検出された耐性変異はPIとNRTIに対する変異であり、1症例はrtT215X(リバータント)変異を有するものであった。
- 4) 北海道ブロックでは毎年15-20名の新規感染者が発生しており、今後、更に増加することが推測された。従って、今後も本調査を継続することが感染動向把握と拡大防止に重要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

Endo T, Fujimoto K, Nishio M, Yamamoto S, Obara M, Sato N, Koike T. Clearance of hepatitis C virus after changing the HAART regimen in a patient infected with hepatitis C virus and the human immunodeficiency virus. *J Med Virol* 81: 979-982, 2009.

学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得

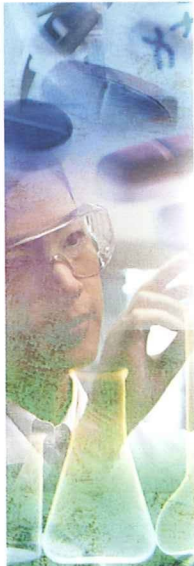
なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



研究要旨

東京および近郊における薬剤耐性HIVの調査研究

～南新宿検査・相談室等のHIV検査陽性例のHIV-1薬剤耐性遺伝子の解析(2005-2009)～

研究分担者 貞升 健志 東京都健康安全研究センター 微生物部
 研究協力者 長島 真美、高野 智香、新開 敬行、保坂 三継、甲斐 明美
 東京都健康安全研究センター

HAARTに代表されるHIV感染症治療の効果があがっている反面、東京都における新規HIV感染者数は増加傾向が続いており、薬剤耐性HIVの出現が懸念されている。都内で流行しているHIV株を遺伝子学的に調査する目的で、南新宿検査・相談室等の検査陽性例より検出されたHIVのサブタイプ型別並びにProtease(PR)、Reverse transcriptase(RT)およびIntegrase(INT)領域における薬剤耐性変異の有無を検索した。2005～2009年のHIV検査陽性例593例について調査した結果、多剤耐性変異は2例(0.3%)、PRに対する単独の変異が20例(3.4%)、NRTIに対する変異が4例(0.7%)、NNRTI変異が5例(0.8%)、revertant変異は22例(3.7%)で認められた。

A. 研究目的

薬剤治療を受けているHIV患者数の増加に伴い、薬剤耐性変異を有するHIVの出現および新規HIV感染者における伝播が大きな問題となりつつある。南新宿検査・相談室(南新宿)のHIV検査陽性例を対象とし、都内における新規感染者における薬剤耐性ウイルスの出現状況を調査することを本研究の目的とした。

B. 研究方法

1. 塩基配列の決定

2005年～2009年に南新宿等のHIV検査で陽性となった検体(血清)593例を供試した。各検体200 μ Lよりウイルス核酸RNAを抽出後、RT-nested PCR法によりProtease(PR)、Reverse transcriptase(RT)およびIntegrase(INT)領域を増幅し、特異バンドの精製を行い、精製DNAを得た。Dye-terminator-cycle-sequencing法を用いたDirect-Sequencing法により精製DNAの塩基配列を決定し、IAS-USA panelまたはShaferの報告等に基づいて、得られたアミノ酸配列の薬剤耐性変異の有無を検索した。

2. PRおよびRT領域の解析

得られたRT領域またはPR領域の塩基配列を基

に、遺伝子解析ソフトMEGA4を用いて系統樹を作成しサブタイプ型別を決定した。

PR領域の薬剤耐性変異については1～90番目のアミノ酸変異を、RT領域では41～236番目のアミノ酸変異の有無により判定した。また、RT領域のT215についてはrevertant変異の調査も行った。

3. INT領域の解析

2007年から2009年における129例を対象に、INT領域の薬剤耐性変異の有無を調査した。

4. BED assayによる感染時期の推定

血清を101倍に希釈し、AWARETM BEDTM EIA TEST(Calypte社)を用いて検査を実施し、OD_n値 \leq 0.8となったものを、感染初期例(抗体陽転後155日以内)と判定した。尚、検査の実施手順はキットの取り扱い説明書に準じた。

(倫理面の配慮)

本研究はヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針等の倫理規定に準拠して実施した。本研究は個人が特定できるようなデータを含まない、連結不可能匿名化されている検体から抽出したHIV遺伝子の解析を目的とした調査研究であり、東京都健康安

全研究センター倫理審査委員会において審査され、承認されている（21健研管第1955号）。

C. 研究結果

1. サブタイプ型別

都内保健所等のHIV検査でHIV-1陽性となった593例のサブタイプ解析を実施した結果（図1）、2009年を除いて90%以上がサブタイプBを占めていた。その他、CRF01_AEが5%前後で検出され、2005、2007、2008年にはサブタイプCやその他のCRFが検出された。2009年については、89.2%がサブタイプBであり、10.8%がCRF01_AEであった。

2. 薬剤耐性変異

2005年～2009年に検出されたPR領域およびRT領域の薬剤耐性変異ならびにrevertant変異を図2に示した。

1) 多剤耐性薬剤耐性変異

2007年にPR領域およびRT領域で複数の耐性変異を有する例が2例(0.3%)検出され、それぞれの耐性変異は、A(I84V,L90M/D67N,K70R,M184V,T215V,K219Q)、およびB(M46I,L90M/M41L,D67N,

K70K/R,T215F,K219Q)であった。

2) PR領域の薬剤耐性変異

PR領域について遺伝子解析を実施した結果、593例中、プロテアーゼ阻害薬(PI)に対する薬剤耐性変異が認められたのは20例であった(3.4%)。その内訳はM46Iが4例、M46I/Lが1例、M46Lが14例、V32V/Iが1例認められた。これらの変異は2006年以外毎年検出されており、いずれの症例でも単独のアミノ酸変異のみで、他のコドンや他の遺伝子領域での薬剤耐性変異は認められなかった。

3) RT領域の薬剤耐性変異

593例中RT領域で薬剤耐性に起因するアミノ酸変異を認めた例は9例(0.8%)であった。核酸系逆転写阻害薬(NRTI)に対する変異では、2007年にM41Lが3例、2009年にはL74L/Vが1例、非核酸系逆転写阻害薬(NNRTI)については、2006年～2008年にV108Iが2例、K103Nが3例認められた。

5) T215X revertant変異

593例中RT T215領域におけるrevertant変異が22例(3.7%)で認められた。その内訳はT215D、

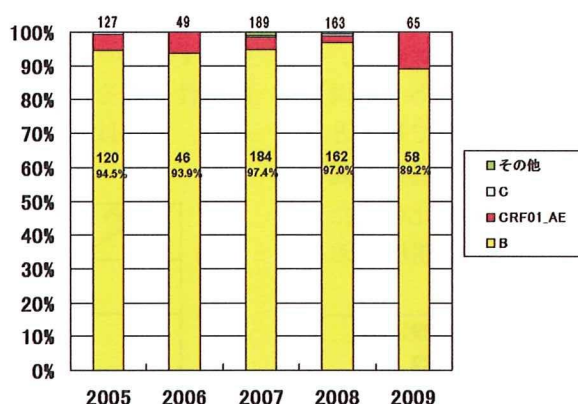


図1 HIVサブタイプ型別（保健所、南新宿検査・相談室）（2005～2009年）

Year	2005 (N=127)	2006 (N=49)	2007 (N=189)	2008 (N=163)	2009 (N=65)	Total N (%)
multi			I84V,L90M/D67N,K70R,M184V,T215V,K219Q M46I,L90M/M41L,D67N,K70K/R,T215F,K219Q			0.3
nRTIs			M41L M41L M41L		L74L/V	0.7
NNRTIs		V108I	K103N K103N	V108I K103N		0.8
PI	M46L M46L		M46I M46I M46I/L M46L M46L M46L M46L	M46I M46L M46L M46L	M46I M46L	3.4
Revertant	T215D T215D T215D T215E	T215D	T215C T215D T215D T215S T215S	T215C T215D T215E T215E T215E T215E	T215C T215C T215E T215E T215S	3.7

図2 HIV薬剤耐性変異の検出（2005～2009年）

T215Eが各7例、T215Cが4例、T215Sが3例、T215Lが1例であった。

6) INT領域の薬剤耐性変異

Y143R/H/C、Q148H/K/RおよびN155Hの耐性変異は認められなかったが(図3)、Minor変異であるL74Mが1例(1.6%)、T97Aが1例(0.8%)、V151Iが2例(1.6%)、E157Qが6例(4.7%)で認められた。

3. 分子系統樹解析による薬剤耐性変異株の解析

RT領域の分子系統樹解析を実施し、薬剤耐性変異を認めた例の系統樹における位置関係を検討した結果(図4)、M46L、T215D・T215E、T215Cについては各々明確にクラスタを形成した。また、T215LおよびM46Iについては、Ibeらにより報告されている名古屋関連株とクラスタを形成した。

4. BED assayによる感染時期の推定

BED assayによる年ごとの感染初期の比率を図5に示した。血清学的に感染初期(ODn値 \leq 0.8)と判定された例は、過去5年間では2005年が55.9%と最も高く、その後低下傾向を示したが、2007年(41.2%)以降、再び上昇の傾向が認められた。

5. 薬剤耐性変異率の推移

薬剤耐性変異およびrevertant変異の検出率は、年により差はあるものの、年々増加傾向にあり、両変異の合計は2009年に13.9%と過去5年間で最大となった(図6)。BED assayで陽性となった感染初期例における検出率と全体における検出率を比較したところ(図7、8)、過去4年間では感染初期例におけ

Y143R/H/C Q148H/K/R N155H	0/129
L74M	1/129 (1.6%)
E92Q	0/129
T97A	1/129 (0.8%)
G163K/R	0/129
V151I	2/129 (1.6%)
E157Q	6/129 (4.7%)
G163K/R	0/129
D232N	0/129

図3 Integraseの薬剤耐性変異(2007~2009年)

る薬剤耐性変異検出率が1.4~3.1%高い傾向が見られてきたが、2009年についてはほとんど差が認められなかった。一方、revertant変異についてはほぼ1.4%の範囲内にあり、どちらも感染初期例において薬剤耐性変異出現率が高いとはいえない。

D. 考察

2005年~2009年に南新宿等のHIV検査で陽性となった593例を材料とし、HIV-1のPR、RTおよびINT領域の遺伝子解析を実施した結果、多剤耐性変異を示す遺伝子型が検出されたのは2例のみで、それ以外の変異は単独の薬剤耐性変異のみを示していた。年ごとの検出率は増加傾向にあり、このような変異を有したウイルスが都内で増加していることが示唆された。また、多くの変異株は系統樹解析により独自のクラスタを形成していること、感染初期例で多く検出されるとはいえないことから、個々の株がすべて薬剤に曝露された結果出現したものではなく、変異株が次々と伝播していることが示唆された。今後も、都内におけるこれらの株の動向について継続して調査していく必要があると思われる。

E. 結論

2005年~2009年に南新宿等のHIV検査で陽性となった593例より検出されたHIV-1のPR、RTおよびINT領域の遺伝子解析を実施した。その結果、多剤耐性変異を示す遺伝子型が検出されたのは2例のみで、それ以外の変異は単独の薬剤耐性変異のみを

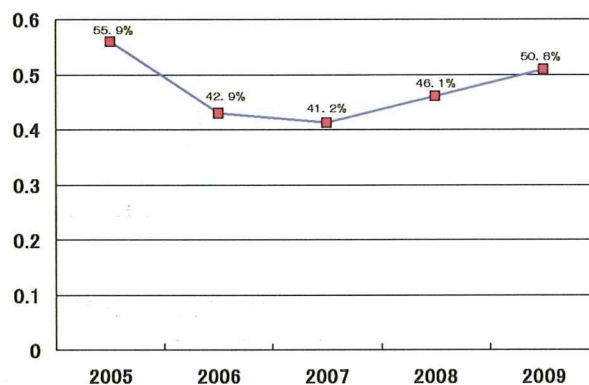


図5 BED assay陽性率(保健所および南新宿検査・相談室)

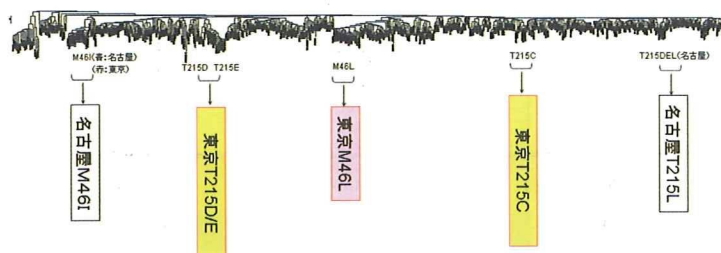


図4 分子系統樹(RT領域)におけるM46I/L、T215-revertantの分布

示していた。これらの変異のうち、M46L,T215C, D,Eについては、系統樹解析により独自のクラスタを形成することが判明した。さらに、M46IおよびT215Lについては名古屋株とクラスタを形成することが示されたため、都内におけるこれらの株の動向も今後も継続して調査していく必要があると思われる。

F. 健康危険情報

なし

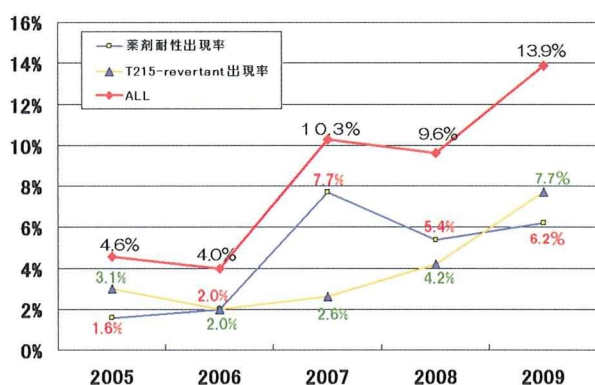


図6 薬剤耐性変異、revertant出現率 (2005~2009年)

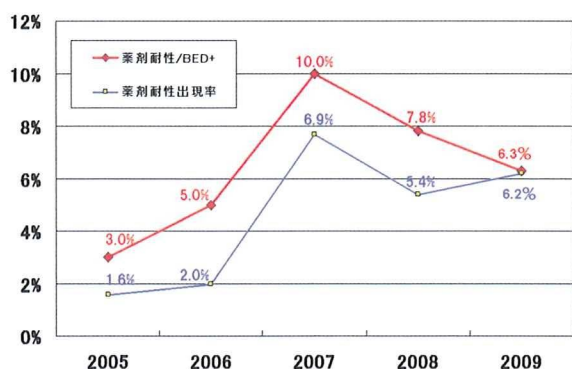


図7 薬剤耐性変異出現率 (BED assay +/-)

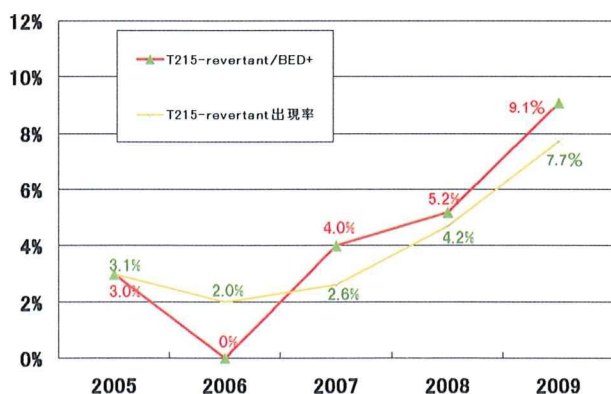


図8 Revertant変異出現率 (BED assay +/-)

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) 貞升健志、長島真美、新開敬行、尾形和恵、仲真晶子、矢野一好：東京都における2007年HIV検査陽性例の遺伝子学的、血清学的解析、日本エイズ学会誌、11、27-33、2009
- (2) 貞升健志、HIVジェノタイプ薬剤耐性検査、医学書院、臨床検査データブック2009-2010、551-553、2009
- (3) 貞升健志、長島真美、新開敬行、尾形和恵、吉田靖子、矢野一好：ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染症：東京都における検査と解析、東京都健康安全研究センター年報、58、27-36、2007

2. 学会発表

- (1) 長島真美、新開敬行、吉田 勲、尾形和恵、原田幸子、保坂三継、貞升健志、甲斐明美：東京都におけるHIV検査陽性例の解析 (2004-2008年)、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、名古屋(2009.11)
- (2) 椎野禎一郎、貞升健志、長島真美、服部純子、杉浦 互：国内感染者集団の大規模塩基配列データから推測されるHIV集団サイズの経時的変化、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、名古屋(2009.11)
- (3) 貞升健志、長島真美、新開敬行、尾形和恵、原田幸子、仲真晶子、矢野一好：2005-2008年の東京都内保健所等HIV検査陽性例の薬剤耐性変異の解析、第22回日本エイズ学会学術集会・総会、大阪(2008.11)
- (4) 長島真美、新開敬行、尾形和恵、原田幸子、貞升健志、仲真晶子、矢野一好：BED assayを使用した東京都内保健所等におけるHIV検査陽性例の血清学的解析、第22回日本エイズ学会学術集会・総会、大阪(2008.11)
- (5) 貞升健志、長島真美、新開敬行、尾形和恵、吉田靖子、矢野一好：東京都内保健所等のHIV検査陽性例の血清学的、遺伝子学的解析、第21回日本エイズ学会学術集会・総会、広島(2007.11)
- (6) 長島真美、貞升健志、新開敬行、尾形和恵、吉田靖子、矢野一好：イムノクロマト法における陽性例と偽陽性例の判定ライン出現時間の比較、第21回日本エイズ学会学術集会・総会、広島(2007.11)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



研究要旨

九州沖縄ブロックにおける薬剤耐性HIVの調査研究

研究分担者 南留美 国立病院機構九州医療センター 免疫感染症科 医師
山本 政弘 国立病院機構九州医療センター 感染対策室長

抗HIV薬の開発によりHIV-1の抑制が可能になり、HIV陽性者の予後は改善してきたが、一方、治療の経過中にウイルスの抑制が不十分であったため薬剤耐性ウイルスが選択され治療に難渋する患者も存在する。近年、多剤耐性ウイルスにも奏効する抗HIV薬が開発されているが、さらに新しい耐性獲得の問題など、薬剤耐性はHIV感染症の治療を続けていく上で大きな課題となっている。さらに、未治療の新規感染者のなかにも耐性ウイルスを持つ症例が認められ、全国的にはその頻度は増加している。2003年以降、九州地区の新規感染患者における薬剤耐性変異の頻度を評価するため当院での新規感染患者の薬剤耐性変異の解析 (RT領域, PR領域に加え、インテグラーゼ領域) およびサブタイプ^oの解析を行っている。2007年～2009年までの解析症例数は100例。サブタイプ^oはAEが1例、Gが1例、残りは全てBであった。耐性変位は3領域とも minor mutationが多かったがmajor mutationはRT領域に5例 (5%), PR領域に1例 (1%), インテグラーゼ領域は0例であった。minor mutationではI93LおよびL63Aの頻度が年々増加しており、新規感染ウイルスの変化が示唆された。2006年以降、急性感染者が多く認められるようになり、2008年度より急性感染/慢性感染の鑑別のためにBED assayを行っている。急性感染者の割合は2006年以降20-30%で推移している。

A. 研究目的

九州地区における急性HIV-1感染者および未治療慢性HIV-1感染者における薬剤耐性変異の頻度を調査し、薬剤耐性HIV-1伝播の疫学的動向を明らかにする。同時にウイルスサブタイプの解析を行い九州におけるサブタイプの頻度について考察する。

B. 研究方法

(倫理面への配慮)

2007年～2009年にHIV感染が判明し当院免疫感染症科、もしくは九州ブロック内の他施設を受診した未治療慢性HIV-1感染患者および急性HIV-1感染患者を対象に、informed consentのもとに採血を行い、血清中HIV-1のプロテアーゼ(PR)領域、逆転写(RT)領域、インテグラーゼ領域の薬剤耐性遺伝子解析を行った。薬剤耐性変異の評価はIAS-USA および

Shafer's criteriaを参考にした。同時にEnvC2V3領域、Gag p17領域、Pol (protease, RT)領域の遺伝子解析を行い、サブタイピングも施行した。BED assayに関してはCalypse® HIV-1 BED Incidence EIA (IgG-Capture HIV-EIA)を用いた。さらに2009年度はHIV感染に合併したHBV感染患者においてHBVのgenotypeの解析も行った。解析結果は、九州医療センターにて連結可能匿名化したデータとして、そのデータを研究代表施設(名古屋医療センター)に集約し、解析を行うので、個人の人権を侵害することは無く、個人の人権は確実に守られる。

C. 研究結果

2007年から2009年において当院にて登録された新規未治療患者数は100名であった。2007年 29名、2008年33名、2009年38名、と年々徐々に増加して

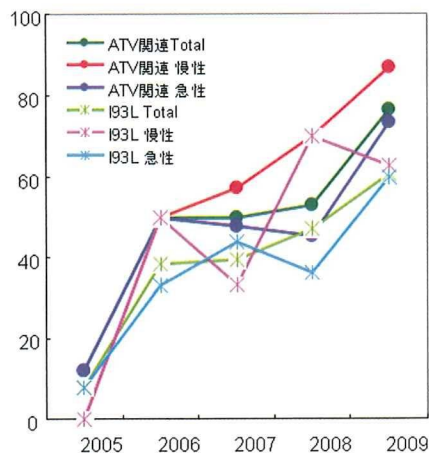
いる。この数は同時期の九州ブロック内（沖縄は除く）での新規感染者数(エイズ発生动向委員会報告による)の約40%に相当する。2006年以降、急性感染者の割合が増加しており、2007年～2009年で26名(26%)であった。年度別にみると2007年24.1%、2008年33.3%、2009年21.1%であり、今回の調査期間内ではほぼ横ばいであった。耐性変異の頻度は、RT領域ではL74Vを1例、T215Eを2例、V179Dを1例、K103Nを1例認めた(5.0%)プロテアーゼ(PR)領域のmajor変異に関してはM46Lを1例に認めた(1%)。PR領域では副次変異も含めると高頻度に何らかの変異を認め、2003年:44%、2004年:91.7%、2005年:80%、2006年:88.5%、2007年:82.1%、2008年:93.7%、2009年:100%と2004年以降は高頻度で経過している。副次変異に関しては、I93Lが年々増加してきており、今年度は23名(60.5%)に認められた(2005年:8%、2006年:38.5%、2007年:39.3%、2008年:46.9%)。非特異的変異であるが、同様に頻度が増加している変異としてL63Aがある(2005年:16%、2006年:19.2%、2007年:30%、2008年:33.3%、2009年:39.4%)。一方、L63Tに関しては年々頻度が低下している(2005年:24%、2006年:23%、2007年:16.7%、2008年:8.3%、2009年:5.3%)。また、ATVのみに関連した耐性変異(G16E、K20I、L33I、M36L、D60E、I64V、V82I、I93L)をもつ患者も増加している。これらの変異は2005年12%(全例慢性感染者)、2006年50%(急性感染者50%、慢性感染者50%)、2007年50%(急性感染者57.1%、慢性感染者47.6%)、2008年53.1%(急性感染者70%、慢性感染者45.4%)、2009年76.3%(急性感染者87.1%、慢性感染者73.3%)と増加している。2008年度は急性感染者で急な増加を認めたが、2009年度は慢性感染者でも同様の増加を認めた。またATV関連変異は、慢性感染者では多岐にわたっていたが、2009年は慢性感染者では多

岐にわたっていた。一方、急性感染者では2006年からG16E、I64V、I93Lに限局していた。これらから、急性感染者、慢性感染者間の耐性変異の差が小さくなってきていることが示唆される。インテグラーゼ領域に関してはmajor mutationを認めず、1例にE138Kを認めた。サブタイプに関しては、サブタイプはAEが1例、AGが一例、残りは全てBであった。全例Bであった。BED assayによる感染時期の推定では、19名がrecent infectionであったが、WBによる結果から判定した場合、recent infectionは11名であった。(CD4<10/μlと免疫不全が進行している症例では、BED assayのtiterが低くても、chronic infectionと判定した)。WB法による判定と不一致の症例は病歴上、比較的早期(1年以内)の感染が考えられる症例が2名、その他の症例ではBED assay値が、高い傾向があった。HIV感染に合併したHBV感染は2005年以降、10%前後で経過している。今年度は3例でHBV-DNAが陽性であり、解析した2例はともにgenotypeがAe型であった。2005年以降の解析では、19例の解析中15例(78.9%)がAe型、4例(21%)がC型であった。経過中にseroconversionを起こした率はAe型で20%、C型で0%であった。

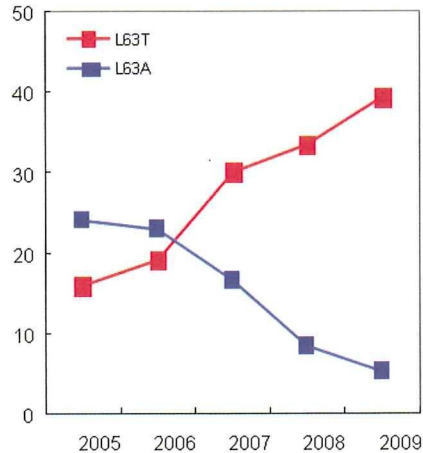
D. 考察

耐性変異について：2006年以降、新規感染者の中に急性感染者の占める割合が増加し、九州地区では20-30%前後である。急性感染者が増加している背景として、HIV抗原/抗体スクリーニング検査の感度が良くなっていることに加え、感染早期から免疫不全が進行して症状を呈し、病院を受診して感染が判明する症例が増加していることも関係すると考えられる。症例数が少なく観察期間も短いため、正確な評価は出来ないが、急性感染者と慢性感染者において比較を行った。特にATVのみに関連した耐性変異(G16E、K20I、L33I、M36L、D60E、I64V、V82I、

ATV関連変異、I93Lの頻度(%)



L63T, L63Aの頻度(%)



193L)の検討において変異の種類に限局化および変異の頻度の増加が、まず急性感染者のウイルスで認められ、その後、慢性感染者でのウイルスでも認められるようになってきている。このことは、急性感染者でのウイルスの変異によって、その後の慢性感染者でのウイルス変異の予測ができる可能性を示唆している。ATV関連変異のみではなく、L63Aや193Lでは年々増加、L63Tは、年々低下が認められている。急性感染者において近年、早期に病状が進行するようになったことなどを考慮すると、新たに感染するウイルスが徐々に変化してきていることが示唆される。

HBVについて：当院での検討でも、都市圏での報告と同様、従来のC型に代わり欧米型のAe型が増加している。seroconversion率はAe型の方が高かったが、症例数が少なく、また、登録時にseroconversionしている症例は検討対象ではないため正確な比較は出来ない。

E. 結論

2007年～2009年で解析した100例では、RT領域に耐性変異を持つ症例は5%、PR領域に耐性変異をもつ症例は1%であり、インテグラーゼ領域には耐性変異を認めなかった。2006年以降、ATVに関連した耐性変異(特に193L)が増加している。また、慢性感染者と急性感染者に感染したウイルスの差が小さくなってきている傾向がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

(1) 論文発表

1. High molecular weight form of adiponectin in anti-retroviral drug-induced dyslipidemia in HIV-infected Japanese individuals based on in vivo and in vitro analyses. Minami R, Yamamoto M, Takahama S, Ando H, Miyamura T, Suematsu E. Intern Med. 2009;48(20):1799-875, 2009
2. Human herpesvirus 8 DNA load in the leukocytes correlates with the platelet counts in HIV type 1-infected individuals. Minami R, Yamamoto M, Takahama S, Ando H, Miyamura T, Suematsu E. AIDS Res Hum Retroviruses.;25(1):1-8, 2009.
3. 治療後ウエスタンプロット法にて抗HIV抗体が陰性化し持続しているHIV-1感染症の一例。南留美、高濱宗一郎、安藤仁、山本政弘、日本感染症学誌 83巻3号、p251-5, 2009

4. 南留美、HAARTによる脂質代謝異常と高分子アディポネクチンの関連, Focus on HIV/AIDS, 2008
5. Fujisaki S., Fujisaki S., Ibe S., Asagi T., Ito T., Yoshida S., Koike, T., Oie M., Kondo M., Sadamasu K., Nagashima M., Gatanaga H., Matsuda, M., Ueda M., Masakane A., Hata M., Mizogami Y., Mori H., Minami R., Okada K., Watanabe K., Shirasaka T., Oka S., Sugiura W. and Kaneda T., Performance and Quality Assurance of Genotypic Drug-Resistance Testing for Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Japan., Japanese Journal of Infectious Diseases, 60,113-117, 2007
6. Gatanaga H, Ibe S, Matsuda M, Yoshida S, Asagi T, Kondo M, Sadamasu K, Tsukada H, Masakane A, Mori H, Takata N, Minami R, Tateyama M, Koike T, Itoh T, Imai M, Nagashima M, Gejyo F, Ueda M, Hamaguchi M, Kojima Y, Shirasaka T, Kimura A, Yamamoto M, Fujita J, Oka S, Sugiura W., Drug-resistant HIV-1 prevalence in patients newly diagnosed with HIV/AIDS in Japan., Antiviral Res., 75(1), 75-82, 2007
7. 藤崎誠一郎、藤崎彩恵子、伊部史朗、浅黄司、伊藤俊広、吉田繁、小池隆夫、大家正泰、渡邊香奈子、正兼亜季、上田幹夫、湯永博之、松田昌和、貞升健志、長島真美、岡田清美、近藤真規子、秦真美、溝上泰司、森治代、南留美、白阪琢磨、岡慎一、杉浦互、金田次弘 日本におけるHIV-1遺伝子型薬剤耐性検査のコントロールサーベイ、日本エイズ学会誌,9(2)136-146, 2007

(2) 学会

1. The effect of antiretroviral drug on the lipid metabolism in hepatocytes with and without HCV infection. Minami R, Takahama S, Ando H, Yamamoto M. 9th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific (ICAAP), in Bali, Indonesia from 9-13 August 2009.
2. Increasing Prevalence of Drug-resistance Mutations among Treatment-naïve HIV-infected Patients in Japan, 2003 to 2007. Junko Hattori^{*1}, S Yoshida², H Gatanaga³, M Kondo⁴, K Sadamasu⁵, T Shirasaka⁶, H Mori⁴, R Minami⁷, W Sugiura^{1,8}, and the Japanese Drug Resistance HIV-1 Surveillance Network. The 16th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. February 8 - 11, 2009, Montreal, Canada
3. 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. 服部順子、渦永博之、吉田繁、(略)、南留美、山本政弘、(略)、杉浦互、第23回日本エイズ学会学術集会 2009年11月26-28日、名古屋
4. 多施設共同疫学調査におけるHAARTの有効率 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、建山正男、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. 抗HIV剤はHBV感染肝細胞における肝脂質代謝を促進する. 南留美、高濱宗一郎、安藤仁、山本政弘、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. RAL/ATV/RTVによるダブルブースト療法が奏効した吸収不良HIV感染症の1例, 高濱宗一郎、安藤仁、南留美、山本政弘、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. 福岡地域におけるHIV感染者およびAIDS患者から分離されたHIVの遺伝子解析 川本大輔、桶脇弘、高橋真梨子、南留美、山本政弘、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. スポンサーシップ「当院におけるRaltegravirの使用経験 臨床的およびin vitroでの解析」南留美
 9. 第23回日本エイズ学会学術集会 2009年11月26-28日、名古屋、「HIV感染に関する3つの話」南留美、第7回福岡HIV感染症治療研究会 2009年11月6日
 10. High molecular weight form of adiponectin in anti-retroviral drug-induced dyslipidemia based on in vivo and in vitro analyses. Minami R, Takahama S, Ando H, Yamamoto M, XVII International AIDS Conference, 3-8 August, 2008, Mexico City
 11. HIV剤の肝細胞、HCV感染肝細胞における脂質代謝への影響, 南留美、高濱宗一郎、安藤仁、山本政弘、第20回日本エイズ学会 11月26-28日、大阪
 12. プロテアーゼ阻害剤が骨代謝に及ぼす影響, 高濱宗一郎、南留美、安藤仁、山本政弘、第20回日本エイズ学会 11月26-28日、大阪
 13. 社会的背景の複雑な患者の退院調整を振り返って—発達遅滞の患者の一事例を通じて—, 長与由紀子、城崎真弓、辻麻理子、本松由紀、首藤美奈子、安藤仁、南留美、山本政弘、第20回日本エイズ学会 11月26-28日、大阪
 14. 2003-2007年の新規HIV-1感染者における薬剤耐性頻度の動向、杉浦互、渦永博之、吉田繁、南留美、山本政弘ら、第20回日本エイズ学会 11月26-28日、大阪
 15. サルモネラ菌血症による感染性腹部大動脈瘤を合併したHIV感染症の一例、安藤仁、南留美、高濱宗一郎、山本政弘、第82回日本感染症学会総会 2008年4月18-19日、松江
 16. Human herpesvirus 8 DNA load in leukocytes of HIV-1 infected patients: Correlations with thrombocytopenia. Rumi Minami, Soichiro Takahama, Hisashi Ando, Masahiro Yamamoto, 8th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific, Aug 19-23, 2007, Colombo
 17. Western blot法にて長期間陰性が持続しているHIV-1陽性者の1例、南留美、高濱宗一郎、安藤仁、山本政弘、第19回日本エイズ学会 11月28-30日、広島
 18. HAARTによる脂質代謝異常と高分子アディポネクチンの関連、南留美、安藤仁、高濱宗一郎、山本政弘、第19回日本エイズ学会 2007年11月28-30日、広島
 19. 当院におけるHAART導入患者での骨粗鬆症の評価、高濱宗一郎、山本政弘、南留美、安藤仁、城崎真弓、長与由紀子、第19回日本エイズ学会 2007年11月28-30日、広島
 20. 腹部超音波による脂肪肝の有無と抗HIV療法に関する検討、安藤仁、山本政弘、南留美、高濱宗一郎、城崎真弓、長与由紀子、第19回日本エイズ学会 2007年11月28-30日、広島
 21. 当院でのHIV感染症患者におけるメンタルヘルスについて、辻麻理子、城崎真弓、長与由紀子、南留美、高濱宗一郎、安藤仁、井上緑、山本政弘、第19回日本エイズ学会 2007年11月28-30日、広島
 22. 2003-2006年の新規HIV-1感染者における薬剤耐性頻度の動向、杉浦互、渦永博之、吉田繁、南留美、山本政弘ら、第19回日本エイズ学会 2007年11月28-30日、広島
 23. 当院におけるHIV-1急性感染患者8例の検討、高濱宗一郎、南留美、山本政弘、渡邊秀之、宮村知也、末松栄一、第276回九州地方会 1月13日、福岡
- ## H. 知的財産権の出願・登録状況
- なし



研究要旨

高感度薬剤耐性HIV検査法を用いた 微量集族薬剤耐性HIVの検出と存在比率に関する研究 ～定量PCRを応用した高感度薬剤耐性検査法の開発～

研究分担者 西澤 雅子 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 研究官

通常のHIV薬剤耐性遺伝子検査で利用されるダイレクトシーケンス法では検出が難しい、ごく微量で血中に存在する微量集族(minority population)の薬剤耐性HIVが抗HIV療法に影響を及ぼす可能性が近年報告されている。本研究では、米国CDCでサブタイプBを検査対象に開発された、血中の微量な薬剤耐性HIVを検出できる高感度薬剤耐性HIV検査法(高感度法)を応用し、日本でHIV流行の約20%を占めるCRF01_AEを検出できる高感度法を開発した。CRF01_AEを検査対象とした高感度法の検出限界を耐性変異をクローニングしたベクターで解析した結果、M41L、K70R、K103N、Y181C、M184V、T215F/Yの7変異で、0.004%~0.4%の比率で存在する薬剤耐性変異を検出可能だった。高感度法を用いて日本の新規未治療感染患者の検体を解析し、サブタイプBとCRF01_AEについてminority population薬剤耐性HIVの検出を試みた。その結果、国立感染症研究所で薬剤耐性検査を行った患者検体28例から2例(7%)、名古屋医療センターで薬剤耐性検査を行った患者検体93例中4例(4.5%)のminority populationの薬剤耐性HIVを検出した。

A. 研究目的

近年になって、血中に微量集族(minority population)として存在する薬剤耐性HIVが、抗HIV療法の成否に影響を及ぼす可能性が報告され、高感度で薬剤耐性HIVを検出する事の重要性が認識されるようになった。本研究では米国CDCでサブタイプBに対してすでに開発された定量PCRの技法を用いた高感度薬剤耐性検査法(高感度法)を応用し、CDCとの共同研究として日本で2番目に感染者の多いCRF01_AEを対象とした高感度法の開発を試みた。また国立感染症研究所及び名古屋医療センターで薬剤耐性検査を行った新規感染未治療患者検体を高感度法で検査し、ダイレクトシーケンス法では検出できなかったminority populationの薬剤耐性HIVの検出を試みた。

B. 研究方法

患者血漿からHigh Pure RNA Isolation Kit(Roche)を用いてHIV RNAを抽出し、RT-PCRでPCR産物を得

た。これを鋳型にウイルス量を測定する為のcommon reaction用の特異的プライマーとプローブ(Taqman probe)及び薬剤耐性変異を検出するための薬剤耐性特異的プライマーとプローブ(Taqman probe)を用いて定量PCRを行い、それぞれの反応のCt値の差を Δ Ct値として値を求めた。M41L、Y181C、M184V、T215YについてはCRF01_AE特異的プライマーを設計した。K70R、K103N、T215Fはすでに報告されている(参考文献)サブタイプBプライマーで検出可能だった(図1)。サブタイプBの検出に関しては参考文献を元にプライマーとプローブを合成し、逆転写酵素阻害剤(NRTI, NNRTI)に対する薬剤耐性変異M41L、K65R、K70R、K103N、Y181C、M184V、T215F/Yの8変異について解析した。新規感染未治療患者検体からのminority populationの薬剤耐性HIVの検出は、2005年11月から2008年2月の間に国立感染症研究所エイズ研究センターにて薬剤耐性検査を行った28症例(サブタイプB 17症例、CRF01_AE 11症例)と、2008年1月から12月までの

間に名古屋医療センターで薬剤耐性検査を行った93症例（サブタイプB 88症例、CRF01_AE 5症例）を対象として行った。

参考文献：Simple PCR assays improve the sensitivity of HIV-1 subtype B drug resistance testing and allow linking of resistance mutations. Johnson JA et al. PLoS ONE. 2007 Jul 25;2(7):e638

（倫理面への配慮）

本研究では薬剤耐性変異を組み込んだベクターの作製で組換えDNA実験を行うので、組換えDNA実験安全委員会に実験申請を行いその許可を得た。またヒト由来検体を使用するため、国立感染症研究所の医学研究倫理審査委員会へ倫理審査を申請中である。

C. 研究結果

CRF01_AEを特異的に増幅できるM41L、Y181C、M184V、T215Yに対するプライマーを設計した（図1）。検出対象としたM41L、K70R、K103N、Y181C、M184V、T215F/Yの7種のそれぞれの薬剤耐性変異をもつ逆転写酵素(RT)領域をTAクローニングでベクター上にクローニングし、陽性コントロールとした。この陽性コントロールに薬剤耐性を持たない野生型のRT領域をクローニングしたプラスミドも構築し陰性コントロールとした。それぞれの陽性コントロールと陰性コントロールを比率を変えて混合し、これらの薬剤耐性変異に対するプライマーの検出限界を測定した。その結果M41Lの検出限界は0.04%、K70Rは0.004%、K103Nは0.05%、Y181Cは0.03%、M184Vは0.05%、T215Fは0.4%、T215Yは0.3%だった（図2）。CRF01_AEの未治療患者でダイレクトシーケンス法でRT領域に薬剤耐性変異が検出されな

Mutation	FWD primer	Name of each primer	%	REV primer	Name of each primer	%	Probe
M41L	AE-RT-M41L.Ver3F(FWD)	M41L.1.1F	30	Com4BR	-	-	41-70.2p
		M41L.2.1F	16				
		M41L.3.1F	25				
		M41L.4.1F	27				
K65R	-	-	-	-	-	-	
K70R	WD.5F(Subtype B primer)	-	-	min1F	-	70	41-70.2p
			min2F	-	30		
K103N	6.2 mix(Subtype B primer)	HIV-B-103N.1.1F	40	Com4BR	-	-	3.1p(80%)+3.2p(20%)
		HIV-B-103N.4.12F	12				
		HIV-B-103N.D.4F	10				
		HIV-B-103N.T.9F	27				
Y181C	AE-RT-181C.Ver1F	HIV-B-103N.T.10F	11	181-190.1.4R	-	-	1.1p(20%)+5.2p(80%)
		Y181C.1F	55				
		Y181C.2F	15				
		Y181C.3F	30				
M184V	AE-RT-184V.Ver12F	184V.1.1.1F	15	181-190.1.4R	-	-	1.1p(20%)+5.2p(80%)
		184V.1.2.2F	21				
		184V.1.2.3F	10				
		184V.4F	35				
T215Y	Com2F	-	-	AE-215Y.Ver7R	AE-215Y.1R	60	3.1p(80%)+3.2p(20%)
		-	-		AE-215Y.2.23R	40	
T215F	Com2F	-	-	T215Fmix(Subtype B primer)	-	-	3.1p(80%)+3.2p(20%)

図1 Primers for CRF01_AE

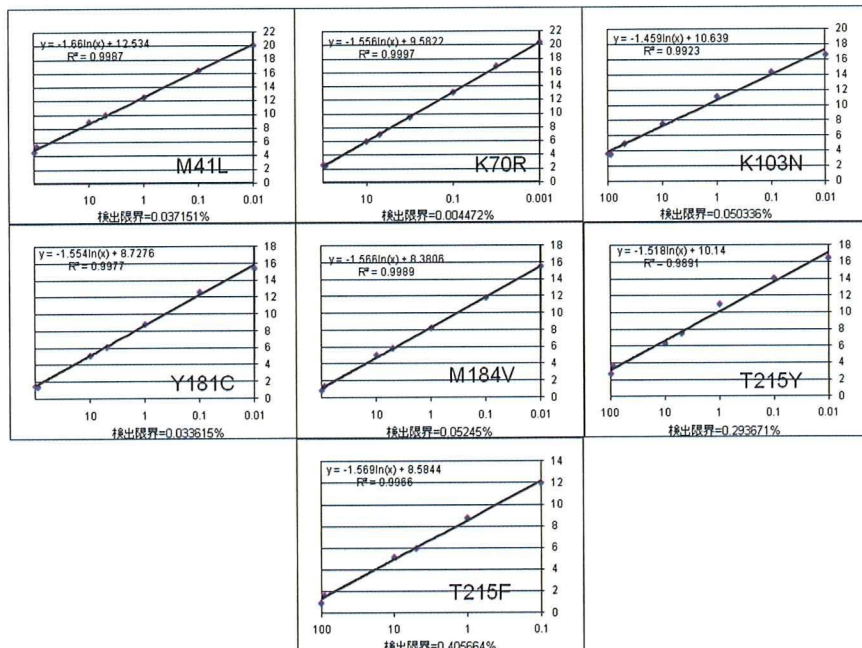


図2

かった患者検体と、ダイレクトシーケンスでRT領域に薬剤耐性が検出された治療患者検体を用い、臨床上的カットオフ値の決定を試みた。その結果からM184Vでは Δ Ct値8.5、その他の6薬剤耐性変異では Δ CT値10をカットオフ値とした。耐性変異有の検体と無の検体では、 Δ Ct値に大きな差が見られた(図3)。未治療患者検体60例を上記のカットオフ値を用いて高感度法で解析した結果、ダイレクトシー

ケンスでは検出されなかったY181Cが検出された検体が1例あった。この検体について高感度法で増幅した増幅産物をシーケンス解析した結果、高感度法による増幅産物にY181Cが認められた(図4)。

上述で開発したCRF01_AE検出用高感度法と、CDCで開発されたサブタイプB検出用高感度法を用いて新規感染未治療患者検体からminority populationの薬剤耐性変異の検出を試みた。その結果、国立感

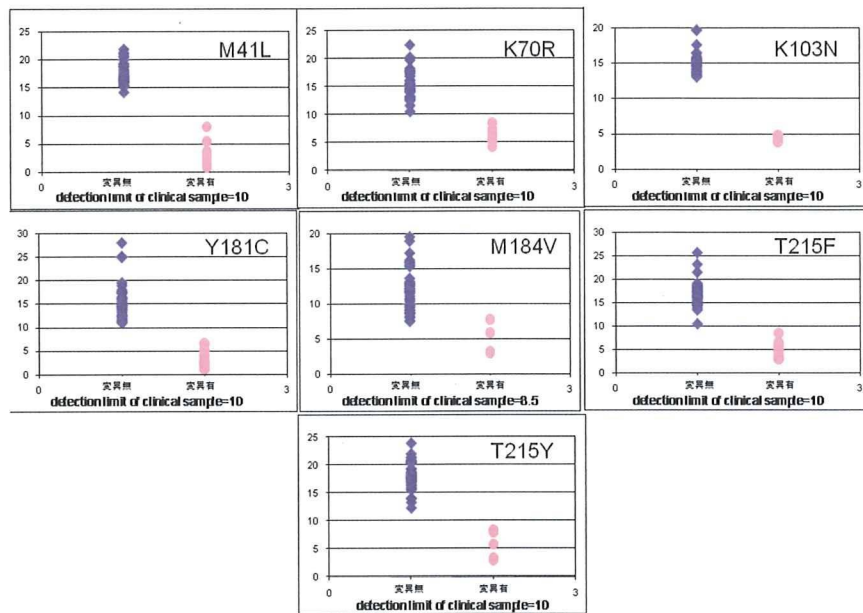


図3

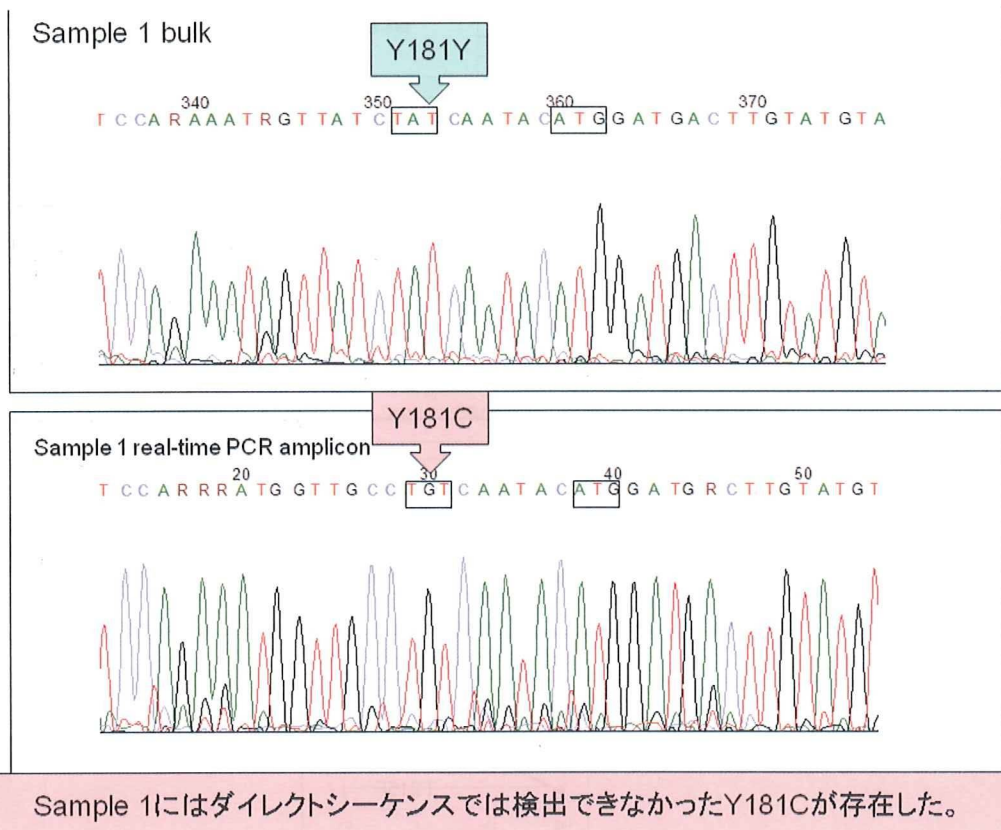


図4

感染症研究所の28例から2例（サブタイプBからK103N、CRF01_AEからT215F）のminority populationの薬剤耐性変異を検出した。それぞれの薬剤耐性の検出率は5.8%と9%で、全体では7.8%だった（図5）。名古屋医療センターの93例について高感度法による解析を行った結果、ダイレクトシーケンス法では見つからなかったminority populationの薬剤耐性変異をサブタイプBからK65R 1例、K70R 1例、K103N 1例、T215F 1例検出した。それぞれの耐性変異の検出率は1%で、全体としてのminority populationの薬剤耐性HIVの検出率は約4.5%だった。CRF01_AEの5症例からはminority populationの薬剤耐性HIVは検出されなかった（図6）

D. 考察

CRF01_AEを対象として開発した高感度法は、M41L、K70R、K103N、Y181C、M184V、T215F/Yの7変異を、サンプル中に1%以下の含有量でも検出可能であった。従来のダイレクトシーケンス法では血中に20%以下で存在する耐性HIVは検出困難とされていることから、高感度法は、より正確に薬剤耐性検査を行う上で有効であると考えられた。新規感染未治療患者検体を高感度法で解析した結果、ダイレクトシーケンス法では検出できなかった薬剤耐性が、国立感染症研究所の28例から2例(7.8%)、名古屋医療センターの93例から4例(4.5%)検出された。名古屋医療センターの93例中5例(5.4%)はダイレクトシーケンス法でも薬剤耐性変異が検出されており、二つの検査法で検出された薬剤耐性変異は9例(9.7%)となった。この結果は、ダイレクトシーケン

ス法のみで薬剤耐性検査を行った場合、薬剤耐性を持つ患者の約半数は検出できない可能性を示している。Minority populationで存在する薬剤耐性変異HIVも、将来の抗HIV療法に悪影響を与える可能性についてすでに報告があり、高感度法によってより正確な薬剤耐性検査を行う事は、効果的な抗HIV療法を行う上で重要であると考えられる。

E. 結論

CRF01_AEを検査対象とした高感度薬剤耐性検査法を確立した。検査対象の薬剤耐性変異は現在M41L、K70R、K103N、Y181C、Y184V、T215F/Yの7変異である。陽性コントロールを用いた実験から、高感度検査法は1%以下の割合でサンプル中に存在する耐性変異を検出可能であった。臨床検体のカットオフ値を決定する為、未治療患者でRT領域に変異の無い検体と変異のある検体とをそれぞれ高感度法で解析してΔCt値を比較した結果、Y184Vのカットオフ値は8.5、それ以外の6変異のカットオフ値は10であった。未治療患者検体60例を解析した結果、1例についてダイレクトシーケンス法では検出できなかった耐性変異(Y181C)を高感度法で検出する事ができた。国立感染症研究所と名古屋医療センターで薬剤耐性検査を行った新規感染未治療患者検体を高感度法で解析した結果、国立感染症研究所の28例から2例（7.8%）、名古屋医療センターの93例から4例(4.5%)の、ダイレクトシーケンス法では検出できなかったminority populationの薬剤耐性変異を検出した。

	M41L	K65R	K70R	K103N	Y181C	M184V	T215Y	T215F	Total
Subtype B(17)	0	0	0	1	0	0	0	0	1(5.8%)
CRF01_AE(11)	0	-	0	0	0	0	0	1	1(9.0%)

Subtype B 17例中1例、CRF01_AE11例中1例で、遺伝子検査では検出できなかったK103NとT215Fをそれぞれ検出した。

図5 解析結果（感染研、新規未治療）

	M41L	K65R	K70R	K103N	Y181C	M184V	T215Y	T215F	Total
Subtype B	0	1(1%)	1(1%)	1(1%)	0	0	0	1(1%)	4(4.5%)
CRF01_AE	0	-	0	0	0	0	0	0	0

Subtype B 88例の中から、遺伝子検査では検出されなかったK65R 1例、K70R 1例、K103N 1例、T215F 1例の、計4変異を異なる4例から検出した。それぞれの耐性変異の出現比率は約1%だった。

図6 解析結果（名古屋医療センター、新規未治療）