



### 研究要旨

## 沖縄における薬剤耐性HIVの調査研究

～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～

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 准教授

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

<sup>1</sup>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、

<sup>2</sup>同 検査部、<sup>3</sup>同 看護部

今回、我々は沖縄県における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2007年1月1日～2009年12月31日までで、同期間に55人が当院にHIV/AIDS患者として初診外来受診した。その内、新規感染者の定義を満たすのは41人であった。36人に薬剤耐性HIV-1検査を施行した。検査結果としてRT領域に耐性を3人に認めた。PI領域はほとんどの検体に耐性関連変異は認められたが、理論的感受性評価では薬剤耐性HIV-1は検出されなかった。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%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

新規HIV感染者における薬剤耐性変異の頻度を調査し、当院のHIV感染者/AIDS患者におけるHIV伝搬の疫学的傾向を明らかにする。

### 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（2007年1月1日～2009年12月31日）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。
  - 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し出はなかった。

- 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55人であった。その内、新規登録患者の定義を満たした41人中、36人を今回の調査に登録し検査を施行した。

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35人の背景と結果を表に示した。性別では全員が男性で、感染経路は全員が同性間であった。病期はHIVキャリアーが20人、AIDSが16人であった。平均年齢はHIVは36.2歳、AIDSが37.6歳であった。CD4数の平均値はHIVが298.7/μl、AIDSが102.3/μlであった。一方HIV-RNA定量の平均値はHIVが $2.4 \times 10^5$ コピー/ml、AIDSが $1.6 \times 10^5$ コピー/mlであった。またHIV-1薬剤耐性検査では3人に耐性関連変異は認められた。耐性変異はT215T/I, A98A/S, T69T/A/D/Nに一例ずつ認めた。理論的感受性評価では薬剤耐性HIV-1は検出されなかった。HBVとの重複感染は1人に認めた。

### 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、2007年度の人口10万人あたりの新規届出数は全国2位、2008年度は3位と上位にランクされている。特にAIDS患者では西日本で最も高い発生率となっている。

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。

当院の初診患者の届出地は21%が県外であり、沖縄県全体では30%を占めている。本県は観光地でもあり国内、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。今後は県内における拠点病院、保健所をネットワーク化して本調査に組み込み、県

内における全ての新規登録患者の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HIV-1薬剤耐性検査を施行した36人では薬剤耐性HIVは検出されなかった。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の未浸淫地域と推定された。

### F. 健康危惧情報

無し

### 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  $\beta$ -D-glucan and KL-6 levels in *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *Internal Medicine*.2009.48
3. Satoshi Toma<sup>1</sup>, Tsuyoshi Yamashiro<sup>2\*</sup>, Shingo Arakaki<sup>1</sup>, Joji Shiroma<sup>1</sup>, Tatsuji Maeshiro<sup>1</sup>, Kenji Hibiya<sup>1</sup>, Naoya Sakamoto<sup>3</sup>, Fukunori Kinjo<sup>4</sup>, Masao Tateyama<sup>1</sup>, and Jiro Fujita<sup>1</sup>. Inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by nelfinavir and synergistic effect with interferon- $\alpha$ . *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<sup>1</sup> 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

無し

### 1. 特許取得

無し

### 2. 実用新案登録

無し

### 3. その他

無し



### 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 助教  
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

研究期間中に15件の新規HIV感染/エイズ発症者の血液に含まれるウイルスRNAのシーケンシングによる解析を行った。うち12件は新潟県内の病院、3件は東京都内の病院から耐性検査の目的で依頼されたものである。解析したのは、薬剤耐性変異を検出するためのプロテアーゼ(PR)、逆転写酵素(RT)、インテグラーゼ(IN)の3領域と、ウイルスサブタイプの決定、系統学的解析を行うための*gag p17*、*env C2/V3*の2領域である。同一課題でおこなった前3年間(平成16～18年度)の成績と比較し、検査件数に大きな違いはないが、症例および解析結果には顕著な違いが見られた。すなわち、男性異性間感染、および女性の症例が減少し、かわって男性同性間感染例が増加しており、これに対応して検出されるウイルスがCRF01\_AEの比率が低下し、サブタイプB主体に変化した。また、前研究期間に新規症例から検出された薬剤耐性変異が19件中1件であったのに比べ、今期の検出率は5/15と大幅に上昇しており、新潟地域でも耐性変異の蔓延の程度はもはや低いとはいえない状態に達していることがわかった。新潟県で検出されたウイルスを系統学的に比較し、それぞれが個別的な感染源から由来していると判定した前期の結論は、基本的には今期も踏襲できるが、平成19年および21年に解析した2例のウイルスについては遺伝学的近縁性が明らかで、共通の感染集団に由来するとみられることがわかった。従来 of 首都圏からの流入に加えて、地域内での感染も生じていることを示している可能性があり注目する必要がある。総じて、新潟県のHIV感染の様相は、かつての地域固有の特徴が次第に不分明となり、首都圏の感染像に近づきつつあるといえる。

### A. 研究目的

HAART療法の普及は、HIV/AIDS治療にめざましい成果を上げている一方で、感染者は長期間にわたって薬剤を服用する必要があることから、この間に体内で生じるウイルスの突然変異の中から薬剤に抵抗性をもったものを選択しつづけるという、負の側面を有している。このような薬剤耐性ウイルスは保有者本人のみならず、2次、3次感染を通じて感染集団を形成した場合には、将来のエイズ治療に深刻な影響を及ぼす可能性がある。新規感染者のウイルスから薬剤耐性変異が検出される割合は、欧米諸国では20～30%に達するとされており、わが国でもその動向に重大な関心を払う必要がある。薬剤耐性ウ

イルス蔓延の実態把握のために平成16年度から始まった「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」は本年で第2期を終えるが、報告者田邊が所属する新潟大学大学院医歯学総合研究科臨床感染制御学分野のスタッフは同研究科ウイルス学教室、新潟県保健環境研究所と連携しつつ、この研究開始当初より分担研究を行ってきた。新潟大学医歯学総合病院は新潟県のエイズ患者の大半が通院する施設であり、また県内他病院の通院についても患者耐性検査の実施とコンサルティング業務を通じて、治療開始前、開始後の経過を含め、薬剤耐性変異の発生状況を把握できる立場にある。この報告では、これまでのおこなった検査の結

果から見てきたHIV感染の地域的特徴を述べ、その意味を考察する。

**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し（3,000rpm×10min）、血漿を分離した。血漿0.2 mL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、シーケンシングに供した。シーケンシング反応は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。えられた各領域のヌクレオチド配列は、遺伝学的関係の解析ソフトウェアMEGA4をもちいて分子系統樹を作成し、既知の配列との類縁関係を求めた。

**(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**

今研究期間に検査をおこなった症例の特徴 平成19～21年の間にわれわれが取り扱った新規症例の性状、および検査の結果を、平成16～18年度のものと比較しながら、表1、表2に示した。今研究期間内の検査の総数は15件、内12件は新潟県内の病院の受診患者、県外分3件は東京都内の同一の病院

表1. 検体の提供を受けた医療機関の所在地

所在地	件数
平成 16～18 年度	
新潟県	10
茨城県	4
長野県	3
群馬県	2
平成 19～21 年度	
新潟県	12
東京都	3

表2. 検査症例および感染ウイルスの特徴      カッコ内：新潟県分の数

性別感染ルート	全数	年齢分布	ウイルスサブタイプ		国籍		推定感染地	
			B	01_AE	日本	外国	国内	海外
平成 16～18 年度								
男性同性間	4(4)	30.3±6.6	3(3)	1(1)	4(4)	0(0)	4(4)	0(0)
男性異性間	10(4)	32.4±4.4	6(4)	4(0)	10(4)	0(0)	10(4)	0(0)
女性異性間	5(2)	26.8±5.4	0(0)	5(2)	5(2)	0(0)	3(2)	2(0)
平成 19～21 年度								
男性同性間	7(6)	39.0±12.3	6(5)	1(1)	7(6)	0(0)	7(6)	0(0)
男性異性間	5(3)	52.2±7.3	3(1)	2(2)	5(3)	0(0)	4(2)	1(1)
男性凝固因子製剤	2(2)	32.4±7.0	2(2)	0(0)	2(2)	0(0)	2(2)	0(0)
女性異性間	1(1)	32.3	0(0)	1(1)	0(0)	1(1)	0(0)	1(1)

から依頼されたものである。前3年間に比べ検査数は若干減少しているが、これは他県でもシーケンシングによるHIV耐性検査の体制が整備されてきたことにより生じたもので、新潟県内患者の検査数に大きな変動はない。なお、われわれの検査は、平成16年以降に県内病院で新たに薬剤治療を開始されたHIV感染患者すべての、未治療段階、およびその後の状況を把握するものである。

本研究の開始以前からわれわれが把握していた県内病院で治療を受けているHIV感染患者には、他地域を対象としている班研究グループからの報告とは明らかに異なる特徴を有していた。すなわち、女性患者の比率が高く(約4割)、その年齢が20歳代に集中していること、また、男性では異性間感染の数が同性間感染の数を上回ること、さらにこのような患者の傾向に対応して、検出されるウイルスが全国では圧倒的に多いサブタイプBがむしろ少数派で、CRF01\_AEが非常に多い、などである。しかし、平成16年以降新規感染/発症を対象におこなった検査では、このような地域の特徴は急速に失われつつあるように見える。とくに今研究期間のデータを見る限り、新潟県におけるHIV感染も全国の傾向と同じ

く、男性同性間の感染が主体で、関与するウイルスはサブタイプB中心という形になったといえる。ただし、1999年(平成11年)頃から大都市圏で顕著になってきた男性同性間の感染の増加は、今のところわれわれのデータには顕われていないようである。

**薬剤耐性変異の検出状況** 検体に含まれるウイルスRNAをPR、RT、INの3領域についてシーケンシングし、International AIDS Society USA ([http://www.iasusa.org/resistance\\_mutations/mutations\\_figures.pdf](http://www.iasusa.org/resistance_mutations/mutations_figures.pdf)) の定義に従って、耐性変異存在の有無を決定している。表3に示したように、本研究の前期3年間に検出されたこの定義に合致する耐性変異は19件中わずか1件であったのに対して、後期には5/15と検出率が急上昇したのが目立つ。これらの変異はすべて男性同性間の感染例で検出されたもので、耐性変異が生じうる部位で野生型のアミノ酸が定義されたもの以外のアミノ酸種に置換されているケース(仮に非定型変異とよんでおく。Stanford大提供の薬剤耐性判定プログラムでは、多くが弱い耐性を生じる18年以降に取り扱ったMSM症例のほとんどに何らかの耐性~耐性関連変異が検出されるに至っている(図1)。表3に掲げた変異の多くは、治

表3. 検出された薬剤耐性変異  
斜字は定義外の非定型変異を示す

変異部位	阻害薬	件数
平成16~18年度		
V108I	NNRTI	1
<i>T69A</i>	NRTI	1
<i>T215E</i>	NRTI	1
平成19~21年度		
V106I	NNRTI	2
V108I	NNRTI	1
V179D	NNRTI	2
<i>T69N</i>	NRTI	1
<i>K103R</i>	NNRTI	1
<i>V179A</i>	NNRTI	1

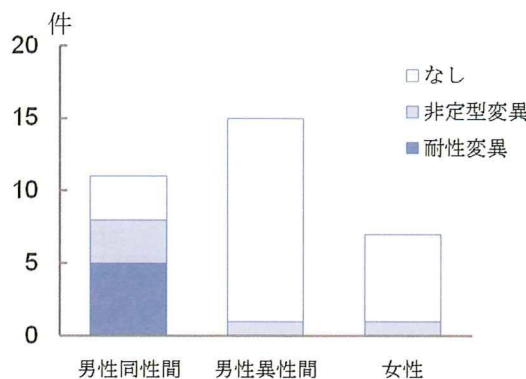


図1. 新規症例から検出される薬剤耐性(関連)変異

療の第一選択薬として使われることが比較的少ない非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤（NNRTI）に対して抵抗性を生じるものであり、またその耐性の程度も比較的小さいものばかりである。したがって、これらの変異が実際の治療に与える悪影響は現時点では大きくないが、今後MSM症例が増加していく中で、耐性が広がっていく可能性を注意深く、推移を見守っていく必要がある。

**検出されウイルスの系統学的関係** 薬剤治療の開始後に初めて解析を行ったものも含め、これまでに新潟県内の患者40名の感染ウイルスの性状を調べている。それぞれPR、RT、p17 (gag)、p120 (env)の遺伝子領域のヌクレオチド配列を決定し、分子系統樹を作成して各ウイルスの近縁関係の推定をおこなっている（図2）。HIVのように変異頻度が高く、またその頻度も常に免疫的選択を受けるため遺伝子の部位によって大きく異なるウイルスの場合、40程度の配列データで信頼できる系統関係を構築することは難しく、単一領域のデータだけに頼った解析では誤った結論を下す恐れが大きい。われわれはデータ数の不足による信頼性の低下を補うために、明らかに他から区別できるほどのヌクレオチド配列の相同性が4領域すべてに一致して認められることを基準にして、ウイルス間の近縁性を判定している。

新潟県内の患者から検出されたウイルスのほとんどは、互いに相当な遺伝学的距離をもっており、最近になって同一の感染源から派生したと見ることはできないものである。しかしながら、今研究期間の

平成19年と平成21年にいずれも男性同性間の感染症例とされる患者から検出された2つのウイルス（図2中、それぞれ細矢印、太矢印で示す）は、上記の基準を援用しても十分に近縁ウイルスと見なされるものであった。いずれのウイルスもV106Iという薬剤耐性変異を共通して含んでいた。明瞭な遺伝学的近縁性を示すウイルスが県内で検出された最初の例である。

**D. 考察**

いまやもっぱら性感染によって拡大を続けているHIV感染症は経済、文化、医療など、様々な社会的要因によってその様相が変化していく。日本においては欧米諸国と異なり、HIVの最初の広がり血液凝固因子製剤のウイルス汚染という医原的なものであった。

感染原因の中心はその後、海外あるいは国内での外国人女性のセックスワーカーからの異性間感染に移り、さらに遅れて男性同性間の感染がそのほとんどを占める現況に至っている。MSM症例が急激な増加を見せ始めるのは平成11年頃からで、本研究班が発足した平成16年には報告される新規症例の9割までがすでにMSMによって占められるに至っていた。その中で異性間感染が大多数で、検出されるウイルスにCRF01\_AEが多いとする新潟のデータは特異であり、われわれ自身ある種の違和感を抱いていた。このような地域的特徴がその後の6年間に急速に薄れていったことは興味深い。

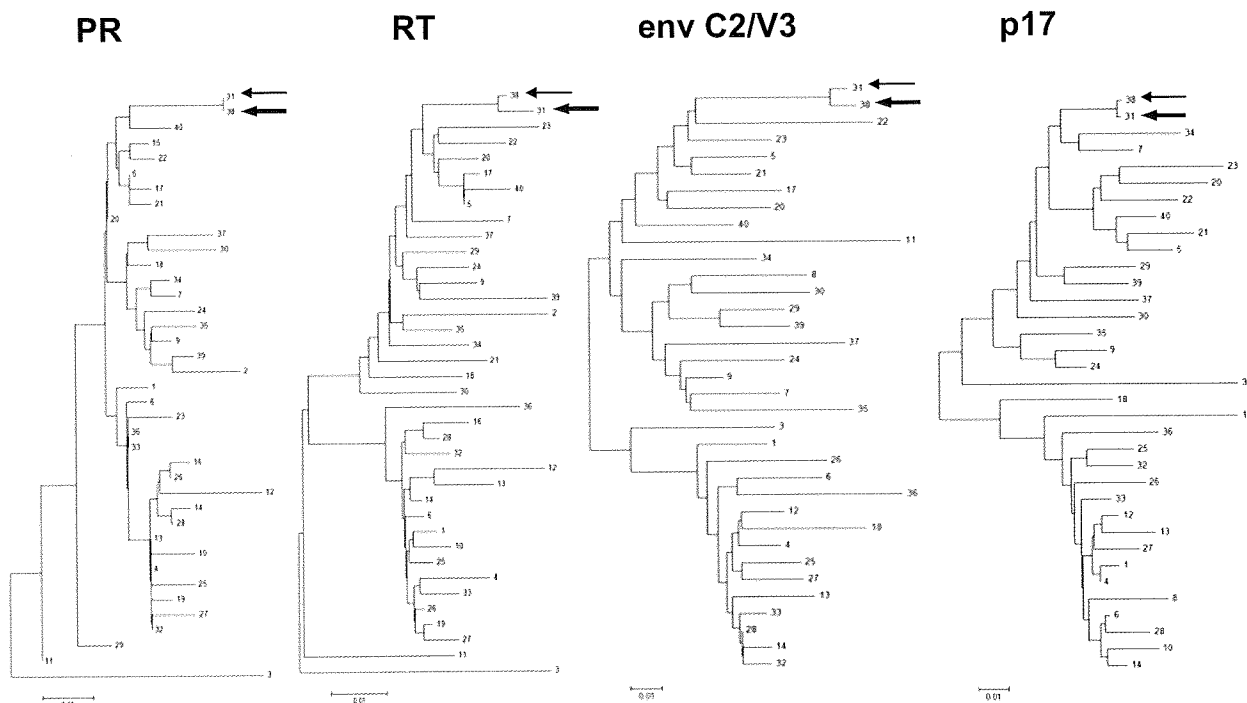


図2. 新潟県内の患者から検出されたHIVの系統学的関係



われわれは新潟県におけるHIV感染の動態を知る目的で、県内で検出されたウイルスすべてについて、PR、RT、p17 (gag)、p120 (env)の4遺伝子領域（平成19年からはIN領域も加える）を対象に系統学的分析をおこなっている。その結果からは検出されるウイルスが遺伝学的に相互に懸け離れたものであることを示しており、HIVが地域内の感染で拡がっていることを伺わせるものではなかった。検査時に医療機関から提供される患者に関するデータには、推定される感染地について具体的な地名までの記載を求めているが、それでも「国内」の記述に付して「東京」と書かれているケースもいくつかある。おそらく県内で検出されたウイルスのほとんどは、すでにHIVが広く浸透し、遺伝学的多様性が進行している首都圏に求めるのが至当であると思われる。これら県内に流入したウイルスは2次感染によってさらに域内で拡がっていくことはなく、そのため昨年まで遺伝的に近縁なウイルスが検出されなかったであろう。東京都のHIV感染を解析しているグループからは、男性同性間の感染において同一起源のウイルスから生じたと推定される感染集団が多数存在すると報告されているが、現在本研究班で整備を進めている国内HIVの配列データベースが利用可能となれば、われわれが解析したウイルスの中に首都圏の感染集団のいずれかと、関連が明らかになるケースも出てくるとと思われる。

このように新潟県の患者のウイルスが首都圏から直接由来したものとするならば、両地域間の感染の様相の違いはどのように考えればよいのだろうか。われわれはその理由として、これまで地域性に根ざした性行動上のバイアスを想定していたが、本研究を通じて短期間に新潟県の感染像が首都圏のそれに近づいたことは、このようなバイアスは、たとえ存在するにしても、さほど大きな要因ではないことを意味するのかもしれない。図3に県内で報告された

感染／発症者数と保健所でおこなわれたHIV血液検査数の年次推移を示したが、前者が1999年にピークを付けた後急減したのに対して、後者はそれに7年先行して急増の後減少に転じている。われわれがこれまで取り扱ったウイルス検体はすべて医療機関から提供されたものであり、患者のほとんどはエイズ発症後、またはそれに近い状態に至っている。エイズ発症までの潜伏期間を考えるならば、1999年前後に県内で発生した新規症例の多くが、じつはそれより7年程度以前、つまり売買春行為によるエイズの蔓延のおそれが強調されていた時期に感染したものであったとも考えられるのである。また、MSM主体の感染が最近になってようやく顕著になってきた事実も、実際の感染からそれが明らかになるまでに7年近くものタイムラグがあるとすれば、それほど不思議ではない。つまり、われわれは首都圏の場でおきていたHIV感染を、新潟県において回顧的に観察しているのであり、県内の感染状況はかなり直截的に首都圏の状況を反映していると考えた方が良いのかもしれない。このような可能性は、できる限り直近の感染状況を知りたいわれわれにとって好ましいものではないが、HIV感染を疫学的に分析する上では避けられない問題といえる。

新規症例から薬剤耐性変異が検出される割合も研究期間を通じて大きく増加した。MSM症例に限れば（5/11）、新潟県でえられた耐性変異検出率は、いまや全国水準（約10%）を大きく上回る。ただし、われわれがこれまでに見いだした変異はいずれも薬剤に対する効果が比較的低いものばかりで、治療中の患者にまず出現してくる強い耐性をともなうものは1例も観察されない。強い耐性変異はウイルス酵素の構造、機能に相当の変化を生じるもので、おおむね増殖力に劣る。そのため、新たに感染した個体内で野生型の形質をもつウイルスと共存した場合、薬剤治療がおこなわれない間にその割合が急速に減

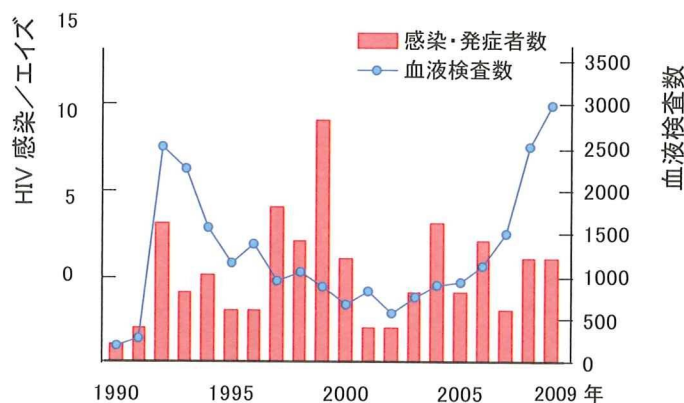


図3. 新潟県におけるHIV感染／エイズ発症者数と、県内保健所でおこなわれた血液検査数の年次推移  
エイズ動向委員会報告に基づき作成。2009年は第3四半期までの数値

少する。また、ウイルスが保有する耐性変異自体も復帰変異によって徐々に失われていこう。MSM症例において、われわれが非定型変異とよぶ耐性関連部位にみられる変異がときに真の耐性変異とともに同じウイルスから検出されるのも、こうした文脈で理解できる。野生型ウイルス優位の状態が続いても、耐性ウイルスは潜伏した状態で体内に残存するため薬剤治療の開始とともにふたたび血液中に現われてくる可能性が高いが、薬剤に曝されることなく次々に新たな個体に感染をくり拡げていけば、いつかは当初の強い耐性変異は消滅していくはずである。これまでにわれわれが未治療の時点で弱い耐性変異、または非定型変異を認めた症例で、薬剤治療の開始後耐性ウイルスが出現した例は未だ1例もない。MSM症例に高頻度でみいだされる耐性変異を保有するウイルスが、多くは何代もの感染連鎖を経た野生型に近い性状をもったウイルスであるとすれば、治療への影響は懸念に及ぶ段階までには至っていないのかもしれない。しかしながら、耐性変異をもったウイルスが野外でどのような動態を示すのか、実態はほとんど知られておらず、その評価については上に記した観点からの検討も含め、なお今後の研究が必要であろう。

## E. 結論

研究期間を通じて、新潟県のHIV感染の様相は異性間感染中心、CRF01\_AEのウイルス優位の以前の状況から、男性同性間の感染が主体でサブタイプBのウイルスが多い全国的傾向に近づいた。男性同性間感染症例で、薬剤耐性変異が検出される割合が大きく増加し、全国水準を超えるに至った。ただし、検出された変異は薬剤に比較的軽度の抵抗性を付与するものに限られ、現段階では治療への大きな影響はないものと考えられる。

## 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
2. 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
3. 新潟医学会雑誌, 123(5) :p214-222, 2009.

### 2. 口頭発表

1. 牧野 麻由子 古谷野 淳子 田邊 嘉也：拋

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)
3. 手塚貴文、張仁美、和田真一、田邊嘉也、亀田茂美、竹田徹朗、西慎一、下条文武：HIV関連腎症の一部検例 (第22回日本エイズ学会学術集会・総会2008.11.26～28)
4. 佐藤みさ子、牧野麻由子、小林美佐江、石川朋子、川口 玲、内山正子、手塚貴文、太田求磨、田邊嘉也、津畑千佳子、佐藤 牧、下条文武：新潟大学医歯学総合病院におけるチーム医療の実例 (第21回日本エイズ学会学術集会・総会2007.11.28～11.30)
5. 張 仁美、津畑千佳子、手塚貴文、田邊嘉也、下条文武：NASHを合併したHIV感染症の1例 (第21回日本エイズ学会学術集会・総会2007.11.28～11.30)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

### 2. 実用新案登録

### 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

研究協力者 杉浦 亙<sup>1</sup>、西澤 雅子<sup>1</sup>、阪井 弘治<sup>1</sup>、武田 哲<sup>1</sup>、Sarah Palmer<sup>2</sup>

<sup>1</sup>国立感染症研究所・エイズ研究センター、<sup>2</sup>米国NCI

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、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。また、発掘が予想される体内薬剤耐性HIVの感染性の新規指標確立を目的として、平成18年度までに開発した超高感度HIV逆転写酵素活性定量法を用いて感染者体内のHIVの1分子当たりの逆転写酵素活性を測定し検討した。以上の結果、次の成果を得た。

- ①血漿中全ウイルス中に0.15%以上存在する耐性遺伝子（K103NまたはM184V）を検出する耐性遺伝子超高感度定量法を確立した。
- ②血漿中全ウイルス中に数%以上存在するD67N耐性遺伝子を検出する耐性遺伝子超高感度定量法を確立した。
- ③高速多クローン遺伝子解析法（仮称）を開発した。
- ④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。
- ⑤HIVの1分子当たりの逆転写酵素活性（RT/RNA）が薬剤耐性HIVを含めて、HIV感染性の新たな指標となる可能性を確認した。

## 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。そのため、まず潜在的薬剤耐性HIVを高感度に検出できる測定法の確立を目指した。また、潜在的薬剤耐性HIVを遺伝子学的に検出するのみならず、その感染性の脅威を明らかにする

べく、HIV感染性の新規指標の確立を目指した。

## B. 研究方法

潜在的薬剤耐性HIVを高感度に検出できる測定法として、協力研究者のPalmerらが2006年に開発したAllele-Specific RT-PCRを用いた耐性遺伝子超高感度定量法(AS-PCR法)(AIDS 2006)を応用した。まずPalmerらの系の再現性をK103N耐性遺伝子で確認した。次に、Palmerらの手法を参考にM184VとD67R耐性遺伝子に対するAllele-Specific Primerペアをいくつかデザインし、最適なペアを選定した。それぞれの耐性遺伝子を持つ分子クローンを耐性コントロールとし、感受性遺伝子をもつWild株分子クローンを感受性コントロールとした。

次に、このAS-PCR法の正確性を検証するため多クローン遺伝子解析法を用いることにした。その効

率化を図るべく、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）。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。

また、HIV感染性の新規指標の確立のためには、平成16年度までに我々が開発した超高感度HIV逆転写酵素活性定量法を用いて感染者体内のHIVの1分子当たりの逆転写酵素活性を測定した。具体的には、薬剤耐性実験室株5株（41L/184V/215Y,41L/67N/70R/215Y,184V,41L/215Y,103N）、薬剤感受性実験室株3株（HIVMN、HIVBRU、HIVNDK）、薬剤感受性臨床HIV（感染者血漿中の生ウイルス）8検体についてウイルスRNAコピー数（アンプリコア）と逆転写酵素活性（一昨年度までに開発した超高感度HIV逆転写酵素活性定量法）を測定し、RNA1コピー当たりの逆転写酵素活性を算出した。実験室株についてはHIV-p24抗原量（富士レボ：ルミパルス）も測定し、RNA1コピー当たりのp24分子コピー数を算出した。

### C. 研究結果

- AS-PCR法において、耐性遺伝子用Primerペアが感受性遺伝子を増幅してしまう割合、これはこの測定系のBackground値であるが、Palmerらの報告とほぼ同じく0.01%以下であった。
- 血漿中全ウイルス中に0.15%以上存在する耐性遺伝子（K103NまたはM184V）を検出する耐性遺伝子超高感度定量法が確立された。
- 感受性遺伝子用Primerペアに対応する部分にいくつかの不適合塩基配列があると、増幅効率が低下し、100%感受性クローンであっても、見掛け上。感受性遺伝子コピー数が少なく測定された。すなわち、本系は耐性あるいは感受性コントロールの品質に依存する事を確認した。
- 血漿中全ウイルス中に数%以上存在するD67N耐性遺伝子を検出するAllele-Specific Primerペアを選定できた。
- 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。
- 超高感度HIV逆転写酵素活性定量法により、RNA1コピー当たりの逆転写酵素活性(mean±SE)はそれぞれ以下であった。

薬剤耐性実験室株(n=5)：6,018±1,855 nU/copy  
薬剤感受性実験室株(n=3)：13,679±5,845 nU/copy

薬剤耐感受性臨床株(n=8)：3,679±1,506 nU/copy

- RNA1コピー当たりのp24分子コピー数(mean±SE)はそれぞれ以下であった。

薬剤耐性実験室株(n=5)：357±75 x10<sup>3</sup> copies/copy

薬剤感受性実験室株(n=3)：1,219±755 x10<sup>3</sup> copies/copy

### D. 考察

平成19年度までに開発した耐性遺伝子超高感度定量法(AS-PCR法)の検出限界は、Palmerらの報告では0.1%、今回の我々の検討では0.15%である。すなわちHIV感染者血漿中600～1,000個のウイルスの中の1個の薬剤耐性ウイルスを検出することが可能である。既存の方法でも数%の検出限界を誇るものはあるが、本法に比較して手間とコストがかかりすぎる。いずれにせよ、本法は既存の方法に比べて高感度で簡便と言えよう。

一方で本法の欠点は次のように多数挙げられる。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、本法は無効である。5)特に感度増強目的でPrimerの3'endにあえてこしらえる mismatch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。

これらの欠点の中には致命的なものもあるが、その解決策もある。調査対象集団の遺伝子配列を事前にスクリーニングする方法である。一般的なダイレクトシーケンスでメジャーな遺伝子配列を明らかにし、目的の遺伝子近傍の配列が本法のPrimerとほぼ一致する症例を選択すれば、前記の問題はクリアできる。その分、症例数は少なくなるという新たなデメリットも生じるが、得られる結果の精度につい

ては充分評価に耐えるものとする。

しかし、解決策があるとは言え限定的である。前記の欠点に加えて、致命的なの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。これを克服するべく今回開発した高速多クローン遺伝子解析法（仮称）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。

これらの新規手法により、潜在的薬剤耐性HIVが発掘された場合、次の課題として挙がってくるのは、その感染力である。通常、HIVの感染力は、ウイルス生物学的手法であるCell-based assayが一般的である。この手法は煩雑で時間がかかることからより実用的な測定法の開発が望まれている。一方、HIVの逆転写酵素活性は感染性を直接表すものではない。しかしながら文献的にはその活性は感染性の間接的な指標とされている。従って、RNA 1コピー当たりの逆転写酵素活性（RT/RNA）は感染性の間接的な指標になる可能性を示唆している。今回示した手法はPCRを基本としており、Cell-based assayに比較して極めて簡便である。我々のは、SHIV感染サルにおいては感染早期（peak viremia期）の血中SHIVのRT/RNAは、感染中期以降（set-point viremia期）のRT/RNAよりも低く（約1/10）、感染末期の髄液中SHIVのRT/RNAはさらに低い（1/100以下）ことを確認している（未発表）。このことは、体内の場所や感染時期によって、ウイルスはその感染性が著しく異なっていることを示唆している。今回、我々は、薬剤耐性HIVのRT/RNAが薬剤感受性HIVのRT/RNAより低い可能性を確認した。Cell-based assayによる測定でも、薬剤耐性HIVのいわゆるfitnessは低いことが確認されており、RNA 1コピー当たりの逆転写酵素活性（RT/RNA）がHIV感染性の新たな指標となる可能性を示唆していると考えられる。今後はサンプル数を増やし、また薬剤耐性臨床

株を多数測定して、新たな指標としての可能性をさらに明らかにする必要がある。

このように3年間で他分野にも応用可能な新規手法・新規技術が開発された点は、成果として評価している。しかしながらこれらの成果は基礎研究に留まっており、臨床解析が進んでいない。すなわち臨床研究としてHIV感染者への還元のみならず、社会的利益といった公衆衛生学的成果には結びついていない。少なくとも臨床研究としての解析結果を出すという最低限の目標が達成できていない点は大きく反省している。

## E. 結論

- ①血漿中全ウイルス中に0.15%以上存在する耐性遺伝子（K103NまたはM184V）を検出する耐性遺伝子超高感度定量法を確立した。
- ②血漿中全ウイルス中に数%以上存在するD67N耐性遺伝子を検出する耐性遺伝子超高感度定量法を確立した。
- ③高速多クローン遺伝子解析法（仮称）を開発した。
- ④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。
- ⑤HIVの1分子当たりの逆転写酵素活性（RT/RNA）が薬剤耐性HIVを含めて、HIV感染性の新たな指標となる可能性を確認した。

## 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

1. 仲宗根正、兼清優、吉野直人、網康至、山本直樹：Cell-Associated Virusを用いたHIV/AIDSサル動物モデル。第21回日本エイズ学会（11/28-30, 2007, 広島）
2. 吉田いづみ、西澤雅子、藤野真之、仲宗根正、岩谷靖雄、長谷川直紀、柴田潤子、杉浦互、任鳳蓉、田中博：HIV-1 env 遺伝子の多様性変化。

- 第21回日本エイズ学会 (11/28-30, 2007, 広島)
3. 杉浦互、渦永博之、吉田 繁、千葉仁志、小池隆夫、伊藤俊広、原 孝、佐藤武幸、石ヶ坪良明、上田敦久、近藤真規子、今井光信、貞升健志、長島真美、福武勝幸、山元泰之、田中理恵、加藤信吾、宮崎菜穂子、岩本愛吉、藤野真之、仲宗根正、巽正志、椎野禎一郎、岡慎一、林田庸総、服部純子、伊部史朗、藤崎誠一郎、金田次弘、浜口元洋、上田幹夫、正兼亜季、大家正義、下条文武、田邊嘉也、渡辺香奈子、白阪琢磨、栗原 健、森治代、小島洋子、中桐逸博、高田昇、木村昭郎、南 留美、山本政弘、松下修三、健山正男、藤田次郎：2003-2006年の新規HIV-1感染者における薬剤耐性頻度の動向。第21回日本エイズ学会 (11/28-30, 2007, 広島)
  4. 村上努、大隈和、田中礼子、仲宗根正、濱武牧子、駒野淳、谷中幹郎、田中勇悦、山本直樹：KRH-3955: 新規CXCR4 アンタゴニストは経口投与可能な高活性抗HIV-1 剤である。第56回日本ウイルス学会 (10/26-28, 2008, 岡山)
  5. 仲宗根正、網康至、梁明秀、山本直樹：ウイルス曝露非感染サルモデル開発の試み。第22回日本エイズ学会 (11/26-28, 2008, 大阪)
  6. 村上努、大隈和、田中礼子、仲宗根正、濱武牧子、駒野淳、谷中幹郎、田中勇悦、山本直樹：KRH-3955は経口投与可能な高活性抗X4 HIV-1 阻害剤である。第22回日本エイズ学会 (11/26-28, 2008, 大阪)
  7. 杉浦互、渦永博之、吉田 繁、千葉仁志、小池隆夫、伊藤俊広、原 孝、佐藤武幸、石ヶ坪良明、上田敦久、近藤真規子、今井光信、貞升健志、長島真美、福武勝幸、山元泰之、田中理恵、加藤信吾、宮崎菜穂子、岩本愛吉、藤野真之、仲宗根正、巽正志、椎野禎一郎、岡慎一、林田庸総、服部純子、伊部史朗、藤崎誠一郎、金田次弘、浜口元洋、上田幹夫、正兼亜季、大家正義、下条文武、田邊嘉也、渡辺香奈子、白阪琢磨、栗原 健、森治代、小島洋子、中桐逸博、高田昇、木村昭郎、南 留美、山本政弘、松下修三、健山正男、藤田次郎：2003-2007年の新規HIV-1感染者における薬剤耐性頻度の動向。第22回日本エイズ学会 (11/26-28, 2008, 大阪)
  8. 服部純子、渦永博之、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。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

1. 国立感染症研究所発明委員会審査中  
高速多クロン遺伝子解析法 (仮称)
2. 特許出願準備中  
高速多クロン遺伝子解析法 (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

多剤併用療法（HAART）を行うことによりHIV感染症の予後は改善されているが、感染者の増加傾向に歯止めがかかっていない。当初より予想されている薬剤耐性ウイルスの出現頻度も増加傾向にある。平成19年～平成21年の期間、「薬剤耐性HIV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」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、この間に経験された新規感染者21症例の内8例に耐性変異が検出された。現時点で初期治療の薬剤選択に混乱はないが、HIV感染者の増加という現状を考えると、今後も新規感染者における薬剤耐性ウイルスの検査は重要である。

## A. 研究目的

1990年代後半から始まった核酸系逆転写酵素阻害剤（NRTI）とプロテアーゼ阻害剤（PI）もしくは非核酸系逆転写酵素阻害剤（NNRTI）を組み合わせたHIVに対する多剤併用療法（HAART）は非常に有用であり、HIV感染症の予後を確実に改善させた。その結果、現在HIV感染症は慢性疾患と捉えられている。しかしながらHIVそれ自体が持つ易変異性による薬剤耐性ウイルスの出現が当初より問題となっており、実際その出現頻度は増加傾向にある。またHIVのサブタイプも種々検出されており、感染地域の拡大が示唆されるとともに現在研究の主流となっているサブタイプBに対する治療戦略がそのままでは通用しない可能性もある。薬剤耐性HIVの発生動向を把握するため、検査方法と調査体制を確立するための分担研究として東北地方における新規HIV感染者における薬剤耐性HIVの現状について調査した。本研究の目的は、臨床サイドで分離されるこれらウイルスの耐性遺伝子部位の変化を調べることにより、ウイルスの持つ性格を知り、今後期待される新規薬剤に対する評価や基礎研究に役立てられるよう検査方法・調査体制を確立することである。

## B. 研究方法

平成19年4月～平成21年11月の期間（2年7カ月）で、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、個人情報の同定は不可能であり、HIV関連遺伝子以外の遺伝学的研究には用いない。

## C. 研究結果

平成7年に当院でHIV感染症の診療を開始して以来、平成21年11月末日までの期間でHIV/AIDS感染者の累計は187名であり、全国傾向と同様に新規の受診者は年々増加している。

平成19年4月～平成21年11月の期間に当院を受診したHIV感染者は37例（男性35例、女性2例）で、すべて性的接触による感染であった。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21例（男性20例、女性1例）で初診時すでにAIDSを発症していたものは7例（30%）であった。すべて日本人で感染地域も国内、年齢は25歳から58歳まで分布し、20歳代：7例、30歳代：8例、40歳代：4例、50歳代：2例（女性1例）であった。感染経路別では男性同性間：17例、異性間4例である。HIVサブタイプは「B」：17例、「AE」：2例、不明2例であった。HIVウイルス量は $< 10^3$ (コピー/ml)：1例、 $< 10^4$ ：3例、 $< 10^5$ ：6例、 $> 10^5$ ：11例であり、免疫力の指標となるCD4陽性リンパ球の数値では $< 100$  ( $\mu\text{l}$ )：6例、 $< 200$ ：1例、 $< 300$ ：7例、 $< 400$ ：2例、 $> 400$ ：5例であった。AIDS発症例7例中6例はCD4 $< 50$ であった。

薬剤耐性変異はNRT領域では2例（2箇所）で検出された。すなわち、L210Fが1例、L74L/Qが1例。PI領域では4例で検出され、1症例で複数個の変異がみられることから全体では13個の変異を検出した。すなわち、K20R、K20T、I62IV、I62V（2例）、L63P、A71V、A71T、I93L、L10I、L10L/V、V77I、E35D/E/G。NNRT領域では2例に3箇所（V179D、V106LV、V179DV）が検出された。

## D. 考察

東北においても全国と同様にHIV感染者は同性間の性的接触（MSM）を中心に増加傾向にある。NRTI、NNRTI、PIを用いた多剤併用療法はHIVの診療の上で多大な貢献をしたが、一方で薬剤耐性ウイルスの出現は当初より懸念されていた。東北ブロック拠点病院という限られた領域で経験された21例の新規感染者において、治療前すでに多くに症例で耐性と思われる変異が観察されたことは今後のHIV診療上、重要な問題である。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、今後、初期治療における耐性変異の検査は薬剤選択上重要である。今後とも継続的にデータの集積が必要と考えられた。

## E. 健康危険情報

なし

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 佐藤功、小浜耕治、太田貴、山田大介、伊藤俊広、佐藤愛子、鈴木智子、疋田美鈴：東北地方における同性間のHIV/STI感染予防啓発の普及促進に関する研究、男性同性間のHIV感染対策とその評価に関する研究（平成18年度総括・分担研究報告書）、厚生労働省科学研究費補助金エイズ対策研究事業、31-40、2007
2. Seiichiro Fujisaki, Saeko Fujisaki, Shiro Ibe, Tsukasa Asagi, Toshihiro Itoh, Shigeru Yoshida, Takao Koike, Masayasu Oie, Makiko Kondo, Kenji Sadamasu, Mami Nagashima, Hiroyuki Gatanaga, Masakazu Matsuda, Mikio Ueda, Aki Masakane, Mami Hata, Yasushi Mizogammi, Haruyo Mori, Rumi Minami, Kiyomi Okada, Kanako Watanabe, Takuma Shirasaka, Shinichi Oka, Wataru Sugiura and Tsuguhiro Kaneda：Performance and quality assurance of genotypic drug resistance testing for human immunodeficiency virus type 1 in japan、*Jpn.J.Infect.Dis.*、60、113-117、2007
3. 藤崎誠一郎、藤崎彩恵子、伊部史郎、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 眞美、溝上泰司、森 治代、南留美、白阪琢磨、岡 慎一、杉浦 瓦、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、136-146、2007
4. NeuroAIDSの発症病態と治療法の開発を目指した長期フォローアップ体制の構築研究：AIDS合併クリプトコッカス髄膜炎の発症病態及び治療法の開発に関する研究、平成19年度厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業 平成19年度総括・分担研究報告書（主任研究者：中川正法）16-18、2008、3月
5. 男性同性間のHIV感染対策とその評価に関する研究：東北地域における同性間のHIV/STI感染予防啓発の普及促進に関する研究、平成19年度厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業 平成19年度総括・分担研究報告書（主任研究者：市川誠一）33-41、2008、3月
6. 薬剤耐性HIVの動向把握のための調査体制確立及びその対策に関する研究：東北ブロックにお



- ける薬剤耐性HIVの調査研究. 平成19年度厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業 平成19年度総括・分担研究報告書(主任研究者: 杉浦 互) 40-42、2008、3月
7. HIV感染症の医療体制の整備に関する研究: 東北ブロックのHIV医療体制整備. 平成19年度厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業 平成19年度総括・分担研究報告書(主任研究者: 岡 慎一) 26-29、2008、3月
  8. 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
  9. 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
  10. 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
  11. 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

## G. 学会発表

1. 平野泰三、小池 彩、田島由美、井根省二、石川 泉、菅原知広、太田耕造、阿部正理、伊藤俊広: ITP経過中にクリプトコッカス髄膜炎を合併した1例: 第183回日本内科学会東北地方会2007年9月1日青森
2. 杉浦互、瀧永博之、吉田 繁、千葉仁志、小池隆夫、伊藤俊広、原 孝、佐藤武幸、石ヶ坪良明、上田敦久、近藤真規子、今井光信、貞升健志、長島真美、福武勝幸、山元泰之、田中理恵、加藤信吾、宮崎菜穂子、岩本愛吉、藤野真之、仲宗根正、巽正志、椎野禎一郎、岡慎一、林田庸総、服部純子、伊部史朗、藤崎誠一郎、金田次弘、濱口元洋、上田幹夫、正兼亜季、大家正義、下条文武、田邊嘉也、渡辺香奈子、白阪琢磨、栗原 健、森治代、小島洋子、中桐逸博、高田 昇、木村昭郎、南 留美、山本政弘、松下修三、健山正男、藤田次郎: 2003-2007年の新規HIV-1感染者における薬剤耐性頻度の動向. 日本エイズ学会、2008年、大阪
3. 鈴木博義、清水 愛、伊藤俊広、佐藤 功、武井英博、鈴木靖士、成川孝一、栗原紀子: AIDSに合併した原因不明の髄膜脳炎の1剖検例: 第14回東北神経病理研究会 弘前大学医学部コミュニケーションセンター 2007.10.6弘前
4. 小住好子、佐藤ともみ、佐藤麻希、後藤達也、加藤儀昭、疋田美鈴、佐藤愛子、伊藤俊広、佐藤功: 当院における抗HIV療法(HAART)の変遷・実態・服薬援助: 第46回日本薬学会東北支部大会 平成19年10月28日仙台
5. 佐藤麻希、小住好子、佐藤ともみ、後藤達也、加藤儀昭、伊藤俊広、佐藤功: 保険薬局における抗HIV療法/抗HIV薬についての意識調査: 第61回国立病院総合医学会 平成19年11月17日名古屋
6. 杉浦互、瀧永博之、吉田 繁、千葉仁志、小池隆夫、伊藤俊広、原 孝、佐藤武幸、石ヶ坪良明、上田敦久、近藤真規子、今井光信、貞升健志、長島真美、福武勝幸、山元泰之、田中理恵、加藤信吾、宮崎菜穂子、藤井 毅、岩本愛吉、藤野真之、仲宗根正、巽 正志、椎野禎一郎、岡慎一、林田庸総、服部純子、伊部史朗、藤崎誠一郎、金田次弘、濱口元洋、上田幹夫、大家正義、田邊嘉也、渡辺香奈子、渡邊 大、白阪琢磨、栗原 健、森 治代、小島洋子、高田 昇、木村昭郎、南 留美、山本政弘、松下修三、健山正男、藤田次郎. 2003-2007年の新規HIV-1感染者における薬剤耐性頻度の動向. 日本エイズ学会、2008年、大阪
7. 伊藤俊広、佐藤 功、突田健一、成川孝一、鈴木靖士. HIV感染症におけるクリプトコッカス髄膜炎再燃例に対するイトラコナゾールの使用経験. 日本エイズ学会、2008年、大阪
8. 疋田美鈴、武藤 愛、佐藤 功、伊藤俊広、西巻雄司、鈴木智子、佐藤愛子、小倉美緒. 宮城県におけるHIV感染者の在宅医療等に向けての基本調査. 日本エイズ学会、2008年、大阪
9. 小住好子、佐藤ともみ、佐藤麻希、後藤達也、諏江 裕、伊藤俊広、佐藤 功. 当院における抗HIV療法(ART)の薬剤選択の変遷. 日本医療薬学会年会2008年、札幌
10. 佐藤麻希、佐藤ともみ、武藤 愛、疋田美鈴、

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.

11. 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.
12. 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.
13. 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 一—. 第23回日本エイズ学会学術集会2009年、名古屋.
14. 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.
15. 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患者へのソーシャル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

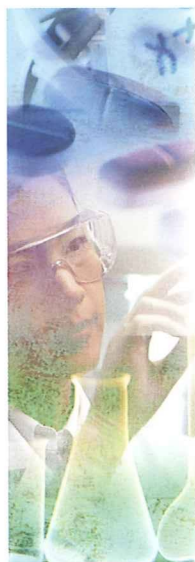
なし

### 2. 実用新案特許

なし

## H. 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、HIVRNA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-