

D. 考察

この4年間で73名の当院初診の新規感染判明患者にBEDアッセイが施行され、21名で最近の感染を疑うODn<0.8となった。しかしながら8名はAIDSを発症するなど偽陽性も示唆された。今回初期HIV感染が明らかな4名の経過を追ったところ、初診時のODn値はいずれも<0.8であり高い感度が示唆されたものの、180日以内に>0.8となった患者は2名であり特異度に疑問が残るものであった。1名はAIDS発症に至っておりAIDS発症を偽陽性の根拠とする考えにも疑問を呈する結果となった。さらなる症例の蓄積が望ましい。

E. 結論

神奈川県東南部に診療圏を持つ横浜市立大学附属病院の新規感染患者を対象に薬剤耐性変異検査およびBEDアッセイを施行した。耐性変異の動向を明らかにするために今後もデータの蓄積を継続するべきと考えられる。最近の新規感染患者におけるBED陽性結果の特異性に関してもさらなる症例解析の蓄積が望ましい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 原著論文

なし

2. 口頭発表

国内

- 1) 上田敦久、筑丸 寛、友田安政、松井周一、安達理恵、竹林早苗、小田みどり、松山奈央、白井 輝、石ヶ坪良明：横浜市立大学附属病院を最近初診されたHIV感染患者の臨床像に関する解析（第24回日本エイズ学会学術集会・総会2010.11.24～26）
- 2) 筑丸 寛、上田敦久、光藤健司、小森康雄、泉福英信、金子明寛、池田正一、白井 輝、石ヶ坪良明、藤内 祝：HIV感染者の歯科診療の推移－HAART導入の前後における検討－（第24回日本エイズ学会学術集会・総会2010.11.24～26）
- 3) 松井周一、上田敦久、安達理恵、竹林早苗、小田みどり、松山奈央、筑丸 寛、白井 輝、石ヶ坪良明、西川能治：当院におけるラルテグラビルの使用経験（第24回日本エイズ学会学術集会・総会2010.11.24～26）
- 4) 上田敦久、白井 輝、筑丸寛、安達理恵、竹下早苗、小田みどり、松山奈央、中向知子、築地淳、石ヶ坪良明：新規未治療HIV感染患者を対

象とした薬剤耐性検査およびBEDアッセイの解析（第67回神奈川感染症医会2010.3.6）

- 5) 渡邊玲光、上田敦久、渡邊俊幸、加藤英明、築地 淳、小林 弘、岳野光洋、石ヶ坪良明：HIV急性感染期にPCPを発症した一例（第68回神奈川感染症医会2010.9.18）

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし



ACCにおける薬剤耐性HIVの動向調査研究

研究分担者 **潟永 博之** (独)国立国際医療研究センターエイズ治療・研究開発センター
治療開発室医長

研究協力者 **林田 庸総** (独)国立国際医療研究センターエイズ治療・研究開発センター

研究要旨

国立国際医療研究センター エイズ治療・研究開発センター (ACC) において、平成22年1月から12月の間に、159人のHIV-1感染者が新規に診断された。この159人に対してHIV-1の遺伝子検査による薬剤耐性検査を施行したところ、11人の患者に主要な薬剤耐性変異が認められた。逆転写酵素のM41Lが1人、K103Nが2人、V108Iが2人、T215Xが3人、K219Qが1人、P225Hが1人、プロテアーゼ領域のM46Lが1人、であった。サブタイプは、Bが142人、AEが12人、Cが3人、AGが1人、Aが1人であった。159人のうち155人にBEDアッセイを行ったところ、50人が約半年以内の感染と判定された。今後も調査を継続する必要があると考えられた。

A. 研究目的

全国的な薬剤耐性HIV-1の動態把握のため、国立国際医療研究センターACCで新規に診断されたHIV-1感染者のサブタイプおよび薬剤耐性変異を調べる。また、BEDアッセイを行い、感染時期を推定する。

(倫理面への配慮)

研究に参加していただいた患者様からは、すべて文書による同意を得ている。拒否は自由であり、拒否することで、診療面での不利益は生じない。説明文書・同意文書は国立国際医療センターにおける倫理委員会で承認されている (IMCJ-H13-80)。

B. 研究方法

新規に診断されたHIV-1感染者の血漿からRNAを抽出し、HIV-1の逆転写酵素遺伝子領域とプロテアーゼ遺伝子領域をRT-PCRとnested-PCRにて増幅し、シーケンスを解析する。また、血漿中の、全IgGのうち、HIV-1 gp41に特異的なIgGの割合をBEDアッセイにより測定する。

C. 研究結果

159人のHIV-1感染者が新規に診断された。この

159人に対してHIV-1の遺伝子検査による薬剤耐性検査を施行したところ、11人 (6.9%) の患者に主要な薬剤耐性変異が認められた。逆転写酵素のM41Lが1人、K103Nが2人、V108Iが2人、T215Xが3人、K219Qが1人、P225Hが1人、プロテアーゼ領域のM46Lが1人、であった。サブタイプは、Bが142人、AEが12人、Cが3人、AGが1人、Aが1人であった。159人のうち155人にBEDアッセイを行ったところ、50人 (32.3%) が約半年以内の感染と判定された。今後も調査を継続する必要があると考えられた。

D. 考察

主要な耐性変異を持つ患者の割合は、例年と比較してほぼ横ばいである。BEDアッセイによる新規感染者の割合は、年々増加傾向にあり、感染早期に診断される例が増えてきているといえる。

E. 結論

耐性HIV-1の動態を把握するため、今後も新規診断症例の薬剤耐性検査を継続する必要があると考えられる。BEDアッセイによる感染時期の推定についても、経時変化を調べるため、継続が必要である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 原著論文

欧文

- 1) Kawashima Y, Kuse N, Gatanaga H, Naruto T, Fujiwara M, Dohki S, Akahoshi T, Maenaka K, Goulder P, Oka S, Takiguchi M. Long-term control of HIV-1 hemophiliacs carrying slow-progressing allele HLA-B*5101. *J Virol.* 2010;84(14):7151-60. Epub 2010 Apr 21.
- 2) Hattori J, Shiino T, Gatanaga H, Yoshida S, Watanabe D, Minami R, Sadamasu K, Kondo M, Mori H, Ueda M, Tateyama M, Ueda A, Kato S, Ito T, Oie M, Takata N, Hayashida T, Nagashima M, Matsuda M, Ibe S, Ota Y, Sasaki S, Ishigatsubo Y, Tanabe Y, Koga I, Kojima Y, Yamamoto M, Fujita J, Yokomaku Y, Koike T, Shirasaka T, Oka S, Sugiura W. Trends in transmitted drug-resistant HIV-1 and demographic characteristics of newly diagnosed patients: nationwide surveillance from 2003 to 2008 in Japan. *Antiviral Res.* 2010;88(1):72-9. Epub 2010 Aug 6.
- 3) Tanuma J, Hachiya A, Ishigaki K, Gatanaga H, Lien TT, Hien ND, Kinh NV, Kaku M, Oka S. Impact of CRF01_AE-specific polymorphic mutations G335D and A731V in the connection subdomain of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase (RT) on susceptibility to nucleoside RT inhibitors. *Microbes Infect.* 2010;12(14-15):1170-7. Epub 2010 Aug 14.

2. 口頭発表

国内

- 1) 渡邊珠代、安岡彰、本田元人、矢崎博久、田沼順子、塚田訓久、本田美和子、湯永博之、照屋勝治、菊池嘉、岡慎一 HIV感染者におけるニューモシスチス肺炎の診断に対する血清(1→3)β-D-グルカン値の有用性 第84回日本感染症学会総会・学術講演会 2010年 京都
- 2) 青木孝弘、矢崎博久、田沼順子、塚田訓久、本田元人、渡邊珠代、渡辺恒二、柳沢邦雄、西島健、水島大輔、本田美和子、照屋勝治、湯永博之、菊池嘉、岡慎一 当センターにおけるAIDS関連クリプトコッカス髄膜炎17例の検討 第84回日本感染症学会総会・学術講演会 2010年 京都
- 3) 西島健、照屋勝治、本田美和子、湯永博之、菊池嘉、岡慎一 遷延性食思不振と低酸素血症を呈し、脳症と肺臓炎の合併が疑われた急性HIV感染の一例 第84回日本感染症学会総会・学術講演会 2010年 京都
- 4) 湯永博之 日本の医療体制のこれまでとこれから

ら 治療開発に携わる立場から～抗HIV薬の長期毒性について 第24回日本エイズ学会総会・学術講演会 2010年 東京

- 5) 湯永博之 最新の情報を明日の臨床に活かす -Year in Review 2010-Toxicities 第24回日本エイズ学会総会・学術講演会 2010年 東京
- 6) 湯永博之 HIV感染症「治療のてびき」第14版 近年使用可能になった新薬 第24回日本エイズ学会総会・学術講演会 2010年 東京
- 7) 湯永博之 HIV感染症・AIDSの初回治療：何を選択するか？ 第24回日本エイズ学会総会・学術講演会 2010年 東京
- 8) 矢崎博久、濱田洋平、橋本亜希、水島大輔、青木孝弘、西島健、渡辺恒二、本田元人、塚田訓久、田沼順子、本田美和子、湯永博之、照屋勝治、菊池嘉、岡慎一 HIV感染者における*Helicobacter pylori*罹患状況の解析 第24回日本エイズ学会総会・学術講演会 2010年 東京
- 9) 服部純子、椎野禎一郎、湯永博之、林田庸総、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、加藤真吾、藤井毅、岩本愛吉、西澤雅子、仲宗根正、岡慎一、伊部史朗、横幕能行、上田幹夫、大家正義、田邊嘉也、渡辺香奈子、渡辺大、白阪琢磨、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、杉浦互 2003～2009年の新規HIV/AIDS診断症例における薬剤耐性頻度の動向 第24回日本エイズ学会総会・学術講演会 2010年 東京
- 10) 田沼順子、蜂谷敦子、湯永博之、菊池嘉、岡慎一 CRF01_AE HIV-1の逆転写酵素polymorphisms G335D・A371VのNRTI感受性への影響 第24回日本エイズ学会総会・学術講演会 2010年 東京
- 11) 照屋勝治、濱田洋平、橋本亜希、千葉明生、水島大輔、青木孝弘、西島健、渡辺恒二、本田元人、矢崎博久、田沼順子、塚田訓久、本田美和子、湯永博之、菊池嘉、岡慎一 初回治療例におけるDarunavir (DRV)を含んだHAARTの成績 第24回日本エイズ学会総会・学術講演会 2010年 東京
- 12) 塚田訓久、西島健、湯永博之、叶谷文秀、橋本亜希、千葉明生、濱田洋平、水島大輔、青木孝弘、渡辺恒二、本田元人、田沼順子、矢崎博久、本田美和子、照屋勝治、菊池嘉、岡慎一 Raltegravir/boosted Darunavir併用によるNRTI sparing regimenの臨床成績 第24回日本エイズ学会総会・学術講演会 2010年 東京
- 13) 橋本亜希、濱田洋平、千葉明生、水島大輔、西島健、青木孝弘、渡辺恒二、本田元人、矢崎博久、田沼順子、塚田訓久、本田美和子、照屋勝治、湯永博之、菊池嘉、岡慎一 当センターにおける初回治療で選択された抗HIV薬の変遷と

- RAL選択例の治療成績 第24回日本エイズ学会総会・学術講演会 2010年 東京
- 14) 青木孝弘、橋本亜希、濱田洋平、千葉明生、水島大輔、西島健、渡辺恒二、本田元人、塚田訓久、矢崎博久、田沼順子、本田美和子、照屋勝治、渦永博之、菊池嘉、岡慎一 RT-PCR法を用いたAIDS関連ニューモシスチス肺炎の早期診断に関する研究 第24回日本エイズ学会総会・学術講演会 2010年 東京
- 15) 千葉明生、田沼順子、橋本亜希、濱田洋平、水島大輔、西島健、青木孝弘、渡辺恒二、本田元人、矢崎博久、塚田訓久、本田美和子、渦永博之、照屋勝治、菊池嘉、岡慎一 当センターのHIV感染者における結核症例の検討 第24回日本エイズ学会総会・学術講演会 2010年 東京
- 16) 水島大輔、橋本亜希、濱田洋平、千葉明生、西島健、青木孝弘、渡辺恒二、本田元人、塚田訓久、矢崎博久、田沼順子、本田美和子、照屋勝治、渦永博之、菊池嘉、岡慎一 サイトメガロウイルス網膜炎に関する臨床的検討 第24回日本エイズ学会総会・学術講演会 2010年 東京
- 17) 土屋亮人、濱田哲也、林田庸総、渦永博之、本田美和子、照屋勝治、菊池嘉、岡慎一 日本人HIV患者におけるラルテグラビル血中濃度の検討 第24回日本エイズ学会総会・学術講演会 2010年 東京
- 18) 渡辺恒二、濱田洋平、橋本亜希、千葉明生、水島大輔、西島健、青木孝弘、本田元人、塚田訓久、田沼順子、矢崎博久、本田美和子、渦永博之、照屋勝治、菊池嘉、岡慎一 HIV感染者に合併した急性肝炎13症例の検討 第24回日本エイズ学会総会・学術講演会 2010年 東京
- 19) Davaalkham Jagdagsuren、土屋亮人、林田庸総、渦永博之、椎野禎一郎、岡慎一 Origin and Evolutionary History of HIV-1 Subtype B in Mongolia 第24回日本エイズ学会総会・学術講演会 2010年 東京
- 20) 西島健、濱田洋平、橋本亜希、千葉明生、水島大輔、青木孝弘、渡辺恒二、本田元人、塚田訓久、田沼順子、矢崎博久、本田美和子、渦永博之、照屋勝治、菊池嘉、岡慎一 低体重はテノホビルによる腎障害のリスク因子となるか—日本人HIV感染患者の後ろ向きコホートにおける検討— 第24回日本エイズ学会総会・学術講演会 2010年 東京
- 21) 林田庸総、渦永博之、菊池嘉、岡慎一 2002年～2009年におけるHIV感染の早期診断の動向解析 第24回日本エイズ学会総会・学術講演会 2010年 東京
- 22) 本田元人、橋本亜希、濱田洋平、千葉明生、水島大輔、西島健、青木孝弘、渡辺恒二、塚田訓久、矢崎博久、田沼順子、本田美和子、渦永博之、照屋勝治、菊池嘉、岡慎一 HIV感染者における動脈硬化症 第24回日本エイズ学会総会・学術講演会 2010年 東京
- 23) 高橋佳子、池田和子、島田恵、渦永博之、飯田敏晴、今井公文、金沢吉展、岡慎一 HIV感染症患者における自覚症状と就労行動の関連に関する研究—テキストマイニングを使用した事例提示に基づく質的データの分析— 第24回日本エイズ学会総会・学術講演会 2010年 東京
- 24) 池田和子、島田恵、大金美和、渦永博之、菊池嘉、岡慎一 国立国際医療研究センター病院/エイズ治療・研究開発センターにおける薬害エイズ患者の療養経過と今後の課題 第24回日本エイズ学会総会・学術講演会 2010年 東京
- 25) 濱田洋平、橋本亜希、千葉明生、水島大輔、青木孝弘、西島健、渡辺恒二、本田元人、塚田訓久、田沼順子、矢崎博久、本田美和子、渦永博之、照屋勝治、菊池嘉、岡慎一 急性HIV感染後、横断性脊髄炎を呈した1例 第24回日本エイズ学会総会・学術講演会 2010年 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



研究要旨

次世代シーケンサーによる薬剤耐性HIVの遺伝的多様性解析に関する研究

研究分担者 加藤 真吾 慶應義塾大学医学部微生物学・免疫学教室 専任講師

抗HIV治療において、薬剤耐性ウイルスが治療前に存在することや、治療中に出現することは、治療のウイルス学的失敗の重大な原因となっている。一般に、薬剤耐性ウイルスの検査は、血中ウイルスRNAのPCR産物を直接シーケンシングすることに行われているが、この方法では存在割合が20%以下の微少ウイルス集団の遺伝情報を調べることができない。本研究では、次世代シーケンシングを用いてPCRアンプリコンのディープシーケンシングを行うことにより、微少集団におけるHIV薬剤耐性変異を定量的に解析する方法の実用性を検討した。特に、変異率（点置換、ホモポリマー部分での欠失と挿入）の測定、得られたウイルス塩基配列の変異補正アルゴリズムの開発、バーコードを用いた多領域・多検体の同時シーケンス解析を重点的に研究した。その結果、置換率は、トランジション型が0.214%、トランスバージョン型が0.049%で、前者の方が4.4倍高かった。欠失は、孤立した塩基の0.015%、2塩基以上連続した塩基（ホモポリマー）の2.626%で認められ、後者の方が175倍も高かった。また挿入の割合も、孤立した塩基では0.064%、ホモポリマーでは0.623%と、後者の方9.7倍高かった。これらの結果を踏まえ、塩基配列の原データを補正するアルゴリズムを開発し、トランジション型アミノ酸変異の場合は存在率2%まで、トランスバージョン型変異の場合は存在率0.5%まで定量できるシステムを開発した。この方法を2件の臨床検体に応用した結果、ダイレクト・シーケンシングやPCR-MS法の結果と一致するだけでなく、新たな微少変異が存在することを示された。次世代シーケンサーによる薬剤耐性検査のコストは1検体あたり3万円程度に落とすことが可能であり、経済的にも問題のない方法であると思われる。

A. 研究目的

抗HIV治療において、薬剤耐性ウイルスが治療前に存在することや、治療中に出現することは、治療のウイルス学的失敗の重大な原因となっている。一般に、薬剤耐性ウイルスの検査は、血中ウイルスRNAのPCR産物を直接シーケンシングすることに行われているが、この方法では存在割合が20%以下の微少ウイルス集団の遺伝情報を調べることができない。このような微少集団を検出・定量するため、リアルタイムPCRが主に使われてきた。しかし、この方法には次のような問題がある。(1) 交差反応が起きやすい、(2) 微少集団の存在率

がウイルス遺伝子とPCRプライマーの間のミスマッチに大きく影響される。(3) すべての耐性変異を同時に調べることができない。(4) それぞれの耐性変異の間の連関を調べることができない。最近、次世代シーケンシングを用いてPCRアンプリコンのディープシーケンシングを行うことにより、微少集団におけるHIV薬剤耐性変異を定量的に解析する方法が注目されている。本研究では、この方法を実用化するため、変異率（点置換、ホモポリマー部分での欠失と挿入）の測定、得られたウイルス塩基配列の変異補正アルゴリズムの開発、バーコードを用いた多領域・多検体の同時シーケンス解析について

検討した。

B. 研究方法

HIV-1 RNAのプロテアーゼと逆転写酵素のコーディング領域を図1に示すプライマーを用いてRT-nested PCRにより増幅した。プライマーの塩基配列は名古屋医療センター・臨床研究センターが推奨しているものを用いた。2回目のPCRのプライマーには、検体、増幅領域、下流/上流を区別するバーコード配列を5'端に付加した。得られたPCR産物をQIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN社)を用いて精製し、北海道システム・サイエンス株式会社にRoche Genome Sequencer FLXを用いたシーケンシングを依頼した。

次世代シーケンサーは塩基配列の読み誤り率が高い。特に、同じ塩基が並んだ配列の塩基数を正確に読み取ることを苦手とする。そのため、次世代シーケンサーで得られた塩基配列には微少な欠失や挿入が多数存在し、そのままでは正確なアミノ酸配列を得ることが難しい。そこで、次のような補正アルゴリズムを用いることにした。まず、対象の塩基配列をHIV-1サブタイプBのコンセンサス配列(HIV Sequence Database、Los Alamos National Laboratory)と5'端から3'方向に比較し行き、異なる塩基があった場合、1塩基のギャップあるいは欠

失を導入し、その塩基から3'方向に6塩基配列の相同性が増加したらそのギャップあるいは欠失を採用し、相同性が同じか低下したら元の塩基を採用する。最終的に、連続した6塩基のうち4塩基以上異なった部分をもつリードは除外する。例えば、コンセンサス配列がATTTC Aの場合、得られた配列がATTTC Aならば、Tが欠失されていたとみなしてATTTC Aと補正する。得られた配列がATTTTC Aならば、Tが挿入されていたとみなしてATTTC Aと補正する。ACTTC Aならば、T→Cへの置換とみなしてACTTC Aのままとする。AACTGTの場合、補正を行っても6塩基中4塩基が異なるので、この配列を含むリードは分析対象から除外する。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究成果

シーケンシングの典型的な動作データとリード長の分布を表1と図2にそれぞれ示す。動作データ、リード長分布ともに期待される性能の範囲内であった。

まず、限界希釈によってクローニングしたHIV-1 LAI株のRNAを使用し、次世代シーケンサーで得

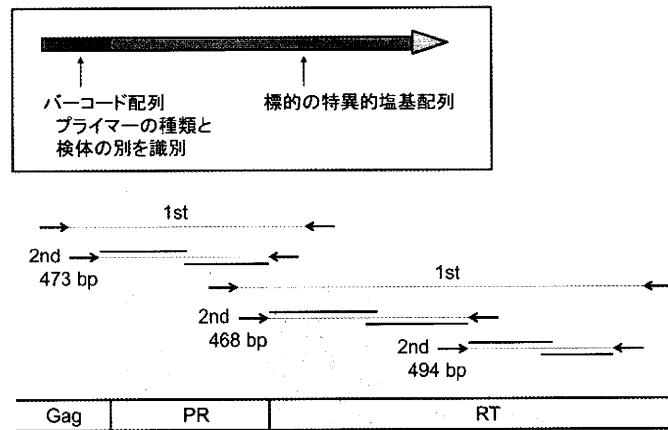


図1 PCRプライマーとシーケンシング

表1 シーケンシングの動作データ

Run Statistics : Summary of run metrics

Sample ID	PF Reads	PF Bases	Avg Read Quality	Avg Read Length
LAI _{mx}	61,595	20,814,606	29.92	337.93

PF Reads : GS RunProcessor の Quality Filter を通過し出力されたリード数。

PF Bases : GS RunProcessor の Quality Filter を通過し出力された塩基数。

Avg Read Quality : 各塩基の Quality 値 (Phred-equivalent Quality Score ; 後述) の平均。

Avg Read Length : 1 リードあたりの平均読み取り長。

られたリードの利用可能性を調べた。プロテアーゼ前半・後半、逆転写酵素上流と下流のそれぞれ前半・後半、合わせて6領域についてデータを表2に示す。計48,274のリードのうち、最も多かったのはプロテアーゼ前半の10,422リード(21.6%)であり、最も少なかったのはプロテアーゼ後半の4,440リード(9.2%)であった。PRとRTの全領域の塩基配列を決定するためには、各領域のリード長が約260塩基必要であるが、260塩基以上のリードは平均51%であった。そのうち、補正アルゴリズムで整列可能なリードの割合は平均85%であった。この整列可能なリード数が最も多かった領域はプロテアーゼ前半の5,141リードであり、最も少なかった領域は逆転写酵素下流前半の2,382リードであった。リード長の分布や整列の難易度は領域により大きく異なっていた。

次に、整列可能であったクローン化LAI RNAの塩基配列を用いて、置換、欠失、挿入のそれぞれについてエラー率を求めた(表3)。置換率は、トランジション型が0.214%、トランスバージョン型が0.049%で、前者の方が4.4倍高かった。欠失は、孤立した塩基の0.015%、2塩基以上連続した塩基(ホモポリマー)の2.626%で認められ、後者の方が175倍も高かった。また挿入の割合も、孤立した塩基では0.064%、ホモポリマーでは0.623%と、後者の方

9.7倍高かった。

このように次世代シーケンサーのエラー率はトランスバージョン型よりもトランジション型で起こりやすいことが分かった。このような傾向はアミノ酸レベルにおけるエラー率にも反映されるはずである。そこで、アミノ酸変異をトランジション型とトランスバージョン型に分けてエラー率を評価することにした。ここでトランジション型をトランジション変異(例、A→G)によるアミノ酸変異と定義する。例えば、Phe→LeuあるいはSer、Met→Val、ThrあるいはIleがこれにあたる。また、トランスバージョン型とは、トランスバージョン変異(例、A→CあるいはT)、あるいは、2つ以上の置換変異によるアミノ酸変異で、トランジション型以外のすべてのアミノ酸変異がこれにあたる。

クローン化LAI RNAで求めたアミノ酸配列のエラー率を表4に示した。トランジション型のエラー率がトランスバージョン型のエラー率よりも高い傾向があることが分かる。トランジション型の最大のエラー率はPhe→Leuの0.45%、トランスバージョン型の最大のエラー率はTrp→Cysの0.10%であった。これらの結果から、約5倍の安全係数を採用することにより、トランジション型アミノ酸変異の場合は2%、トランスバージョン型変異の場合は0.5%を微小変異の検出感度と考えることにした。

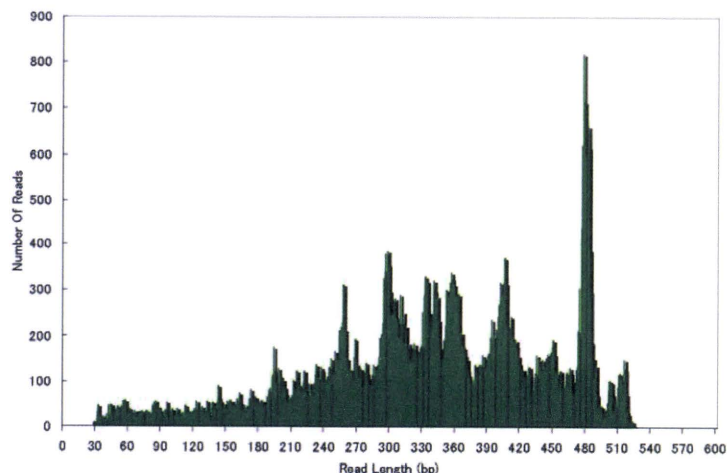


図2 リード長の分布

表2 耐性変異分析のために利用可能なリード数

	プロテアーゼ		逆転写上流		逆転写下流		その他	計
	前半	後半	前半	後半	前半	後半		
得られたリード数	10,422	4,440	8,797	8,206	5,833	7,469	3,107	48,274
260塩基以上のリード数	5,347 (51%)	3,280 (74%)	2,818 (32%)	3,227 (39%)	3,022 (52%)	5,155 (69%)	1,536 (49%)	24,385 (51%)
整列可能なリード数	5,141 (96%)	3,013 (92%)	2,797 (99%)	3,150 (98%)	2,382 (79%)	4,273 (83%)		20,756 (85%)

細胞培養から得られたLAI株のRNAを用いて次世代シーケンサーで求めた、薬剤耐性変異関連アミノ酸部位における各アミノ酸の存在率を図3（プロテアーゼ領域）、図4（逆転写酵素領域、NRTI関連）、図5（逆転写酵素、NNRTI関連）に示す。逆転写酵素領域にL74I（1.6%）の有意な微少変異が認めら

れた。この変異は耐性とは関連のない多型と考えられる。

通常のジェノタイプングで薬剤耐性変異が見つかった臨床分離株AのRNAを用いて得られた、薬剤耐性変異関連アミノ酸部位における各アミノ酸の存在率を図6（プロテアーゼ領域）、図7（逆転写酵素領

表3 次世代シーケンサーによる塩基配列の誤り率

変異の型	変異率
置換	0.263%
トランジション	0.214%
トランスバージョン	0.049%
欠失	2.641%
孤立ヌクレオチド	0.015%
ホモヌクレオチド	2.626%
挿入	0.687%
孤立ヌクレオチド	0.064%
ホモヌクレオチド	0.623%

表4 クローン化LAI RNAで求めたアミノ酸配列のエラー率

白枠:トランジション型変異
黄枠:トランスバージョン型変異
緑枠:変異なし

	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	Ter
A	99.71%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.10%	0.07%	0.10%	0.00%	0.00%	0.00%
C	0.00%	99.44%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.02%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.39%	0.03%	0.01%	0.00%	0.02%	0.05%	0.02%
D	0.01%	0.00%	99.52%	0.02%	0.00%	0.31%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.06%	0.00%	0.00%	0.00%	0.07%	0.00%	0.01%	0.00%	0.01%
E	0.01%	0.00%	0.03%	99.47%	0.00%	0.36%	0.00%	0.00%	0.05%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	0.00%	0.05%	0.00%	0.00%	0.02%
F	0.00%	0.02%	0.00%	0.00%	99.13%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	0.45%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.34%	0.00%	0.02%	0.00%	0.02%	0.00%
G	0.00%	0.00%	0.01%	0.05%	0.00%	99.80%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.11%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
H	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	99.48%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	0.01%	0.00%	0.01%	0.07%	0.29%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.12%	0.00%
I	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	0.00%	99.22%	0.01%	0.10%	0.11%	0.02%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.21%	0.30%	0.00%	0.00%	0.00%
K	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	99.20%	0.00%	0.02%	0.05%	0.00%	0.01%	0.37%	0.00%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.04%	0.00%
L	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.03%	0.00%	0.01%	0.01%	99.61%	0.01%	0.16%	0.01%	0.01%	0.13%	0.01%	0.13%	0.00%	0.00%	0.00%	0.02%	0.00%
M	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.08%	0.07%	0.04%	99.13%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.36%	0.30%	0.00%	0.00%	0.00%
N	0.00%	0.00%	0.29%	0.00%	0.00%	0.00%	0.02%	0.04%	0.02%	0.00%	99.35%	0.00%	0.00%	0.00%	0.23%	0.01%	0.00%	0.00%	0.03%	0.00%	0.00%
P	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.07%	0.00%	0.00%	99.87%	0.00%	0.00%	0.05%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
Q	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.03%	0.00%	0.00%	0.05%	0.00%	0.00%	0.02%	99.45%	0.39%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.05%	0.00%
R	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.27%	0.00%	0.01%	0.15%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	99.47%	0.06%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	0.05%
S	0.01%	0.05%	0.00%	0.00%	0.00%	0.20%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	0.03%	0.11%	0.00%	0.02%	99.55%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%
T	0.23%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	0.01%	0.00%	0.04%	99.64%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
V	0.27%	0.00%	0.01%	0.02%	0.00%	0.01%	0.00%	0.05%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	99.83%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
W	0.00%	0.10%	0.00%	0.00%	0.05%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.29%	0.00%	0.00%	0.02%	99.02%	0.00%	0.18%
Y	0.00%	0.18%	0.01%	0.00%	0.02%	0.00%	0.18%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.03%	0.00%	0.00%	0.00%	0.02%	0.00%	0.00%	99.80%	0.00%	0.05%

青枠:野生型
赤枠:耐性変異

アミノ酸	アミノ酸番号														
	30	32	46	47	48	50	54	58	74	76	82	84	88	90	
A	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	
C	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
D	99.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
E	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
F	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
G	0.8%	0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
H	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
I	0.0%	0.0%	0.0%	98.4%	0.0%	98.8%	99.4%	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%	99.0%	0.0%	0.0%	
K	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
L	0.0%	0.0%	0.0%	0.4%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	99.4%	0.2%	0.0%	0.0%	100.0%	
M	0.0%	0.0%	99.4%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.4%	0.0%	0.0%	
N	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	99.8%	0.0%	
P	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
Q	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	99.4%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
R	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.6%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
S	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.6%	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%	
T	0.0%	0.0%	0.4%	0.4%	0.0%	0.2%	0.4%	0.0%	99.8%	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%	
V	0.0%	99.8%	0.2%	0.8%	0.0%	1.0%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	99.6%	0.4%	0.0%	0.0%	
W	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
Y	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	

図3 LAI株 プロテアーゼ領域のアミノ酸頻度

域、NRTI関連)、図8(逆転写酵素、NNRTI関連)に示す。逆転写酵素領域にM41M(24.6%)、T214K(25.0%)、K103K(1.0%)の微小変異が見つかった。プロテアーゼ領域に見られる1.8%から2.5%の微小

変異はシーケンシングのアーティファクトの可能性がある。

通常のジェノタイピングでは薬剤耐性変異が見つからなかった臨床分離株BのRNAを用いて得られ

青枠:野生型
赤枠:耐性変異

アミノ酸	アミノ酸番号														
	41	62	65	67	70	74	75	77	115	116	151	184	210	215	219
A	0.0%	99.8%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.4%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%
C	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D	0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
E	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%
F	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	98.6%	0.0%	99.6%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
G	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
H	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
I	0.4%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	1.6%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%
K	0.2%	0.0%	99.8%	0.0%	99.8%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	99.8%
L	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	98.4%	0.0%	0.6%	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%	98.4%	0.0%	0.0%
M	98.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	99.2%	0.0%	0.0%	0.0%
N	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
P	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%
Q	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	99.8%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
R	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
S	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.6%	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%
T	1.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%	99.6%	0.0%
V	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	99.6%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
W	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%
Y	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	99.8%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%

図4 LAI株 逆転写酵素領域(NRTI関連)のアミノ酸頻度

青枠:野生型
赤枠:耐性変異

アミノ酸	アミノ酸番号								
	100	101	103	106	108	181	188	190	225
A	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
C	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
E	0.0%	0.2%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
F	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
G	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%
H	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
I	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
K	0.0%	99.8%	99.6%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%
L	98.8%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
M	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
N	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
P	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	100.0%
Q	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
R	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
S	1.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
T	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
V	0.0%	0.0%	0.0%	99.8%	99.8%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
W	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Y	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	99.8%	0.0%	0.0%

図5 LAI株 逆転写酵素領域(NNRTI関連)のアミノ酸頻度

青枠:野生型
赤枠:耐性変異
赤字:野生型以外の有意な存在率

アミノ酸	アミノ酸番号													
	30	32	46	47	48	50	54	58	74	76	82	84	88	90
A	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.4%	0.0%	0.2%	0.0%	97.6%	0.0%	0.0%	0.0%
C	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D	99.6%	0.0%	0.0%	2.6%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	1.8%
E	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%
F	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
G	0.4%	0.0%	0.0%	0.0%	97.4%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
H	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	1.8%	0.0%	0.0%
I	0.0%	0.0%	0.0%	97.0%	0.0%	96.4%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	98.0%	0.0%	0.2%
K	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%	2.0%	0.0%	0.0%	0.2%	1.8%	0.0%	1.8%	0.0%	0.0%
L	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%	98.0%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
M	0.0%	0.0%	96.6%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	97.4%
N	0.0%	0.0%	2.6%	0.0%	0.0%	2.4%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	97.2%	0.0%
P	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Q	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	97.8%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
R	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	2.6%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
S	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.6%	0.0%
T	0.0%	0.0%	0.2%	0.2%	0.0%	0.0%	2.0%	97.8%	0.0%	0.2%	0.2%	0.2%	0.0%	0.2%
V	0.0%	100.0%	0.4%	0.0%	0.0%	1.0%	97.2%	0.0%	0.2%	1.8%	0.0%	0.0%	0.0%	0.4%
W	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Y	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	1.8%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%

図6 臨床株A(ジェノタイピングによる薬剤耐性株)プロテアーゼ領域のアミノ酸頻度

た、薬剤耐性変異関連アミノ酸部位における各アミノ酸の存在率を図9（プロテアーゼ領域）、図10（逆転写酵素領域、NRTI関連）、図11（逆転写酵素、NNRTI関連）に示す。逆転写酵素領域にL210M

(6.2%)、T215I (22.4%)、K219Q (4.4%)、K219T (0.8%)の微少変異が見つかった。このうちK219Qが薬剤耐性変異である。

青枠:野生型
赤枠:耐性変異
赤字:野生型以外の有意な存在率

アミノ酸	アミノ酸番号														
	41	62	65	67	70	74	75	77	115	116	151	184	210	215	219
A	0.0%	100.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%
C	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D	0.0%	0.0%	0.0%	99.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
E	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%
F	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%	99.2%	0.0%	99.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
G	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
H	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
I	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
K	0.0%	0.0%	99.2%	0.0%	99.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	25.0%	99.2%
L	75.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	99.6%	0.0%	0.6%	0.0%	0.6%	0.2%	0.2%	100.0%	0.0%	0.0%
M	24.6%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
N	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
P	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Q	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	98.8%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%
R	0.0%	0.0%	0.8%	0.0%	0.6%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.4%
S	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%	0.4%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
T	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	75.0%	0.0%
V	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	99.6%	0.0%	0.0%	0.0%
W	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Y	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	99.6%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%

図7 臨床株A（ジェノタイプングによる薬剤耐性株）逆転写酵素領域（NRTI関連）のアミノ酸頻度

青枠:野生型
赤枠:耐性変異
赤字:野生型以外の有意な存在率

アミノ酸	アミノ酸番号								
	100	101	103	106	108	181	188	190	225
A	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
C	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D	0.0%	0.0%	0.6%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
E	0.0%	0.2%	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
F	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
G	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%
H	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.4%	0.0%	0.0%	0.0%
I	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
K	0.0%	99.6%	1.0%	0.0%	0.0%	0.4%	0.0%	0.0%	0.0%
L	99.8%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
M	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
N	0.0%	0.0%	98.4%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
P	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	99.8%
Q	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
R	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
S	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
T	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%
V	0.0%	0.0%	0.0%	99.8%	99.8%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
W	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Y	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	99.2%	99.6%	0.0%	0.0%

図8 臨床株A（ジェノタイプングによる薬剤耐性株）逆転写酵素領域（NNRTI関連）のアミノ酸頻度

青枠:野生型
赤枠:耐性変異

アミノ酸	アミノ酸番号													
	30	32	46	47	48	50	54	58	74	76	82	84	88	90
A	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%
C	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D	99.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%	0.4%	0.0%
E	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
F	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
G	0.4%	0.0%	0.0%	0.0%	99.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
H	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
I	0.0%	0.0%	0.0%	99.6%	0.0%	98.8%	99.8%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	99.8%	0.0%	0.0%
K	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
L	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.0%	0.0%	100.0%
M	0.0%	0.0%	99.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.6%	0.0%	0.0%
N	0.4%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	99.2%	0.0%	0.0%
P	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Q	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	99.6%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
R	0.0%	0.0%	0.4%	0.0%	0.6%	0.0%	0.0%	0.4%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
S	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.4%	0.0%
T	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%	99.8%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%
V	0.2%	99.6%	0.2%	0.2%	0.0%	0.6%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	99.4%	0.4%	0.0%	0.0%
W	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Y	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%

図9 臨床株B（ジェノタイプングでは薬剤耐性なし）プロテアーゼ領域のアミノ酸頻度

D. 考察

次世代シーケンサー（Roche Genome Sequencer FLX）を用いて、HIV-1のプロテアーゼと逆転写酵素における微少薬剤耐性関連変異を検出・定量する方法を開発した。

微少変異の検出感度は、クローン化されたLAI株を用いて行ったディープシーケンシングのエラー率の結果から求めた。このとき、アミノ酸変異をトランジション型とトランスバージョン型に分けて分析し、それぞれ2.0%と0.5%の検出感度を暫定的に設定した。しかし、ここで得られたエラー率が異なる株でも同様であるかどうかは現在のところ不明である。今後、いくつかのHIV-1株のクローン化RNAを用いてエラー率を求めることが必要であると考えられる。また、今回の研究では、PCRにPlatinum Taq polymerase（Invitrogen社）を用いたが、よりfidelityの高いpolymeraseを用いることによりエラー率を下げられる可能性がある。この点についても検討を行う必要がある。

今回の実験では、シーケンサーFLXの1/8分画を用いて、4検体を一度のランで解析した。しかし、検出感度を0.5%にした場合、得られるリード数はまだ十分余裕がある。おそらく、感度を落とすことなく、12検体まで同時にシーケンシングすることが可能である。1ランの委託費が32万円なので、シーケンシング費用は1検体あたり3万円程度と見積もられる。ジェノタイプによるHIV薬剤耐性検査の保険点数が6,000点であることと比較すると、次世代シーケンサーによる高感度薬剤耐性検査は決して高価な手法ではないと思われる。

今回の研究では2件の臨床検体を分析した。今後、無治療感染者における薬剤耐性変異の蔓延状況や、抗HIV治療における薬剤耐性ウイルスの出現の影響などにおける次世代シーケンシングの有用性を検討するためには、より多くの臨床検体をこの方法によって分析し、治療成績と照らし合わせる必要がある。

青枠: 野生型
赤枠: 耐性変異
赤字: 野生型以外の有意な存在率

アミノ酸	アミノ酸番号														
	41	62	65	67	70	74	75	77	115	116	151	184	210	215	219
A	0.0%	100.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.7%	0.0%
C	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D	0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
E	0.0%	0.0%	0.4%	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%
F	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%	99.6%	0.0%	99.2%	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%
G	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
H	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
I	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%	22.4%	0.0%
K	0.0%	0.0%	99.2%	0.0%	99.8%	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	94.4%
L	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	99.2%	0.2%	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%	92.2%	0.0%	0.0%
M	99.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	98.4%	6.2%	0.0%	0.0%
N	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%
P	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Q	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.0%	0.0%	2.4%
R	0.0%	0.0%	0.4%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%
S	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.6%	0.0%	0.2%	0.0%	0.6%	0.0%	0.0%	1.4%	0.5%	0.0%
T	0.4%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%	76.2%	0.6%
V	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	99.4%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	1.2%	0.0%	0.0%	0.0%
W	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Y	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	98.8%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%

図10 臨床株B（ジェノタイプングでは薬剤耐性なし）逆転写酵素領域（NRTI関連）のアミノ酸頻度

青枠: 野生型
赤枠: 耐性変異

アミノ酸	アミノ酸番号								
	100	101	103	106	108	181	188	190	225
A	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
C	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
D	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
E	0.0%	0.2%	0.4%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%
F	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
G	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	99.6%	0.0%
H	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.4%	0.2%	0.0%	0.0%
I	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
K	0.0%	99.0%	99.6%	0.0%	0.0%	0.4%	0.0%	0.0%	0.0%
L	100.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
M	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
N	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
P	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	100.0%
Q	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
R	0.0%	0.8%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%
S	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
T	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
V	0.0%	0.0%	0.0%	99.8%	99.6%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
W	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Y	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	99.2%	99.8%	0.0%	0.0%

図11 臨床株B（ジェノタイプングでは薬剤耐性なし）逆転写酵素領域（NNRTI関連）のアミノ酸頻度

E. 結論

次世代シーケンサー (Roche Genome Sequencer FLX) を用いて、HIV-1のプロテアーゼと逆転写酵素における薬剤耐性関連変異を、トランジション型アミノ酸変異の場合は存在率2%まで、トランスバージョン型変異の場合は存在率0.5%まで定量できる方法を開発した。この方法を2件の臨床検体に応用した結果、ダイレクト・シーケンシングやPCR-MS法の結果と一致するだけでなく、新たな微小変異が存在することを示された。今回の実験では、シーケンサーFLXの1/8分画を用いて、4検体を一度のランで解析したが、リード数にまだ余裕があるため、感度を落とすことなく、12検体まで同時にシーケンシングすることが可能である。その場合のシーケンシング費用は1検体あたり3万円程度である。微小集団も含めて薬剤耐性を決定できることを考慮すると、次世代シーケンシングによる薬剤耐性検査法は非常に経済性の高い手法であると思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shima-Sano, T., Yamada, R., Sekita, K., Hankins, R.W., Horr, H., Seto, H., Sudo, K., Kondo, M., Kawahara, K., Tsukahara, Y., Inaba, N., Kato, S., Imai, M. (2010) A human immunodeficiency virus screening algorithm to address the high rate of false-positive results in pregnant women in Japan. *PLoS One* 5(2):e9382.
- 2) Mizusawa, Y., Kuji, N., Tanaka, Y., Tanaka, M., Ikeda, E., Komatsu, S., Kato, S., and Yoshimura, Y. (2010) Expression of human oocyte-specific linker histone protein and its incorporation into sperm chromatin during fertilization. *Fertil. Steril.* 93(4):134-141.
- 3) Ibe, S., Yokomaku, Y., Shiino, T., Tanaka, R., Hattori, J., Fujisaki, S., Iwatani, Y., Mamiya, N., Utsumi, M., Kato, S., Hamaguchi, M., Sugiura, W. (2010) HIV-1 CRF01_AB: First circulating recombinant from of HIV-2. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 54(3):241-247.
- 4) 今井光信、加藤真吾。(2010) HIV検査—最近のスクリーニング検査と遺伝子検査の進歩—。日本臨床 68 (3) : 433-438.
- 5) 加藤真吾、今井光信。(2010) HIV検査と検査相談体制。最新医学・別冊 新しい診断と治療のABC 65、180-187.
- 6) 加藤真吾。(2011) HIV検査およびHIV関連検査。化学療法の領域 27 (3) : 71-77.

2. 学会発表

- 1) 加藤真吾：日本の流行状況から求められるHIV検査戦略の課題～根拠にもとづいた計画とその

評価のために何を解決すべきか～「HIV検査体制 現在の課題」、第24回日本エイズ学会学術集会・総会 (2010年11月24-26、東京)

- 2) 加藤真吾、須藤弘二：次世代シーケンサーを用いた薬剤耐性HIVの遺伝的多様性解析法の開発、第24回日本エイズ学会学術集会・総会、2010年11月、東京。
- 3) 服部純子、椎野禎一郎、瀧永博之、林田庸総、吉田繁、千葉仁志、小池隆夫、佐々木悟、伊藤俊広、内田和江、原孝、佐藤武幸、上田敦久、石ヶ坪良明、近藤真規子、今井光信、長島真美、貞升健志、古賀一朗、太田康男、山元泰之、福武勝幸、加藤真吾、藤井毅、岩本愛吉、西澤雅子、仲宗根正、岡慎一、伊部史朗、横幕能行、上田幹夫、大家正義、田邊嘉也、渡辺香奈子、渡辺大、白阪琢磨、小島洋子、森治代、中桐逸博、高田昇、木村昭郎、南留美、山元政弘、松下修三、藤田次郎、健山正男、杉浦互：2003～2009年の新規HIV/AIDS診断症例における薬剤耐性頻度の動向、第24回日本エイズ学会学術集会・総会 (2010年11月24-26、東京)
- 4) 須藤弘二、加藤真吾：LC-MS/MSを用いた毛髪中および血液中の抗HIV剤の定量、第24回日本エイズ学会学術集会・総会 (2010年11月24-26、東京)
- 5) 伊部史朗、横幕能行、服部純子、岩谷靖雅、加藤真吾、杉浦互：抗レトロウイルス療法のモニタリングのためのplasma HIV-2 viral load測定系の確立、第24回日本エイズ学会学術集会・総会 (2010年11月24-26、東京)
- 6) 山崎さやか、加藤真吾：リアルタイムPCRを用いたHIV-1とHIV-2の同時検査法の開発、第24回日本エイズ学会学術集会・総会 (2010年11月24-26、東京)
- 7) 村山正晃、池野良、児玉泰光、田邊嘉也、川口玲、山崎さやか、加藤真吾、高木律夫：唾液中ウイルスと血中ウイルスの定量値とウイルスRNA鎖の比較、第24回日本エイズ学会学術集会・総会 (2010年11月24-26、東京)
- 8) 南宮湖、長谷川直樹、小林芳夫、加藤真吾、小谷宙、戸蒔祐子、岩田敏、根岸昌功：当院において糖代謝異常を来したHIV患者の臨床的検討、第24回日本エイズ学会学術集会・総会 (2010年11月24-26、東京)
- 9) 柳瀬未季、吉田直子、赤沢学、木村和子、加藤真吾：未承認HIV自己検査キットの使用実態調査、第24回日本エイズ学会学術集会・総会 (2010年11月24-26、東京)
- 10) Tomoyuki Ueda and Shingo Kato. Purine deoxynucleosides inhibit the replication of human immunodeficiency virus type 1 in non-stimulated peripheral blood mononuclear cells. The 5th Japan-Germany HIV/AIDS Symposium. 2010, May 10-11, Tokyo, Japan.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

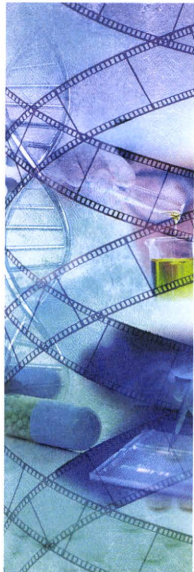
なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



研究要旨

高感度薬剤耐性HIV検査法を用いた微小集族薬剤耐性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

患者血中に微小集族としてごく微量に存在する薬剤耐性HIVが、抗HIV療法に影響を及ぼす可能性が示唆されている。しかし通常薬剤耐性検査で用いられるダイレクトシーケンス法では血中に約20%以下の割合で存在する微少な薬剤耐性変異の検出は難しい。そこで患者血中に1%以下の割合で存在する薬剤耐性変異を検出可能な高感度薬剤耐性HIV検査法を開発し、この方法を用いて微少な薬剤耐性変異の検出を試みた。2008年1月から2009年12月にかけて名古屋医療センターで薬剤耐性検査を行った新規未治療患者184検体について高感度薬剤耐性HIV検査で解析した結果、2008年サブタイプB患者検体から新たに5個、2009年サブタイプB患者検体から新たに2個、2008年CRF01_AE患者検体から新たに3個の微小集族として存在する薬剤耐性変異を検出した。微小集族薬剤耐性変異を加えた新規未治療患者からの薬剤耐性検出頻度はサブタイプBで4.9%から11%に(2008年)、6.5%から8.7%に(2009年)それぞれ増加した。

A. 研究目的

近年新規HIV感染患者における薬剤耐性HIVの感染拡大が懸念されている。患者血中に存在する薬剤耐性HIVはその後の治療に影響を及ぼす可能性があるため、至適治療を行うために治療開始前の薬剤耐性検査が望ましい。通常薬剤耐性検査に用いられるダイレクトシーケンス法(通常法)は患者血中に約20%以上存在する薬剤耐性変異HIVを検出可能だが、それ以下の比率で存在する微少な薬剤耐性HIVを検出する事は難しい。近年患者血中に微小集族として存在する薬剤耐性HIVも、その後の抗HIV療法に悪影響を及ぼす可能性が報告された。しかしこのような微小集族薬剤耐性HIVの感染拡大について詳細な解析は行われていない。そこで高感度薬剤耐性HIV検査法(高感度法)を用いて新規未治療感染者検体の微小集族薬剤耐性HIV検出を試みた。

(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し許可を得た。

B. 研究方法

微小集族薬剤耐性HIVの解析には、米国疾病対策局(CDC)との共同研究で開発された、定量PCRの原理を応用した高感度薬剤耐性HIV検査法(高感度法)を用いた。解析した薬剤耐性変異は逆転写酵素阻害剤(NRTI、NNRTI)に対する8耐性変異(M41L、K65R、K70R、K103N、Y181C、M184V、T215Y/F、K65RはサブタイプBのみ)とした。解析対象は2008年1月～2009年12月までに名古屋医療センターで薬剤耐性検査を行った184症例(サブタイプB:174例、CRF01_AE:10例)(表1)とした。これらの検体を高感度法により解析し、通常法による薬剤耐性検査の結果と比較した。

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

C. 研究結果

2008年に薬剤耐性検査を行った新規未治療サブタイプB患者検体82例から、通常法ではT215Y 2個、K219R 1個、K219Q 1個が検出された。薬剤耐性変異の検出率は4.9%だった。同じ検体を高感度法で

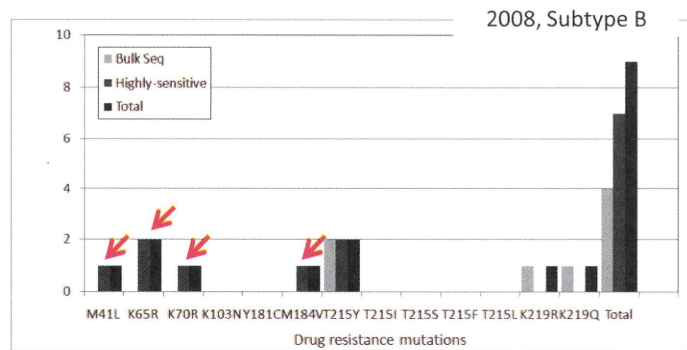
検査した結果、M41Lが1個、K65Rが2個、K70Rが1個、M184Vが1個の計5つの薬剤耐性変異が微小集簇薬剤耐性変異として検出された(図1)。また2009年新規未治療サブタイプB患者検体92例からは通常法でK103Nが1個、T215Sが2個、T215Lが3個検出され、薬剤耐性変異の検出率は6.5%だった。この検体を高感度法で解析した結果K65Rが1個、K70Rが1個新たに検出された(図2)。また2008年新規未

表1

解析対象とした症例

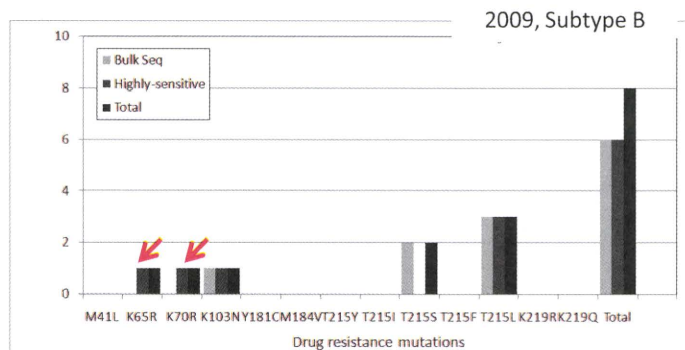
- 名古屋医療センターにて2008年1月から2009年12月にかけて回収された新規未治療患者症検体184症例

	検体数	ウイルス量(copies/mL)		
		Median	Min	Max
2008				
Subtype B	82	7.0E+04	1.3E+02	1.2E+07
CRF01_AE	5	1.6E+05	8.8E+02	2.2E+05
2009				
Subtype B	92	7.8E+04	6.8E+02	1.7E+07
CRF01_AE	5	3.7E+04	5.5E+02	5.4E+05



ダイレクトシーケンス： 4変異/82検体=4.9%
 高感度法： 7変異/82検体=8.5%
 Total : 9変異/82検体=11.0%

図1



ダイレクトシーケンス： 6変異/92検体=6.5%
 高感度法： 6変異/92検体=6.5%
 Total : 8変異/92検体=8.7%

図2

治療CRF01_AE患者検体5例から3個のM41Lが微小集族薬剤耐性変異として検出された(図3)。2009年の新規未治療CRF01_AE患者検体からは通常法でも高感度法でも薬剤耐性変異は検出されなかった(図4)。薬剤耐性変異の検出頻度は通常法の結果に高感度法を合わせると、2008年サブタイプBでは4.9%から11.0%に(図1)、2009年サブタイプBでは6.5%から8.7%に(図2)上昇した。

D. 考察

高感度法を用いることで、通常法では検出できない微小集族薬剤耐性HIVを新規未治療患者検体から検出することができた。薬剤耐性変異の検出率は高感度法を併用することで、2008年サブタイプBでは通常法での4.9%から11.0%に、2009年サブタイプBでは6.5%から8.7%へと上昇した。これは通常法

では薬剤耐性変異を見逃す恐れのある患者が全体の2~6%程度存在することを意味しており、将来の抗HIV治療に影響を及ぼす可能性がある。また2008年サブタイプB検体の解析からは、M41L/K70R/M184Vの3つの耐性変異を持つ症例が見つかった。この3つの変異はどれも微小集族として検出されており、通常法では検出されなかった。この症例をStanford大学のデータベースで解析するとNRTIに対して中程度~高度の薬剤耐性を示しており、3TCやFTCを含む治療では十分な抗HIV効果が得られない可能性があると考えられる。微小集族の薬剤耐性HIVがその後の抗HIV療法に悪影響を与えるという結果がすでに報告されており、抗HIV治療開始前に微小集族薬剤耐性HIVを解析する事は重要と思われる。

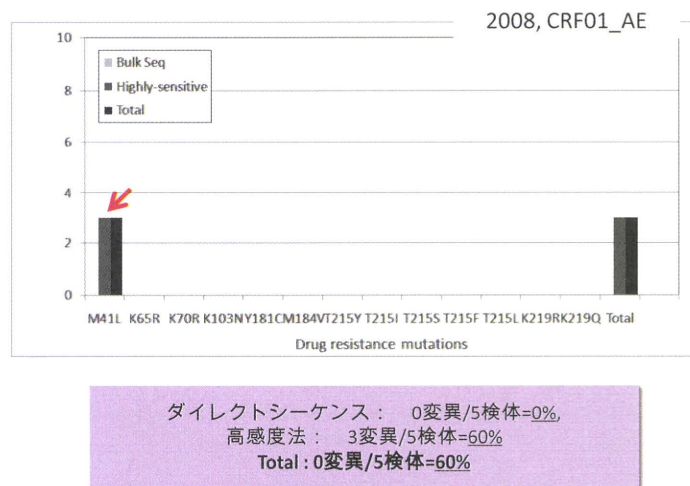


図3

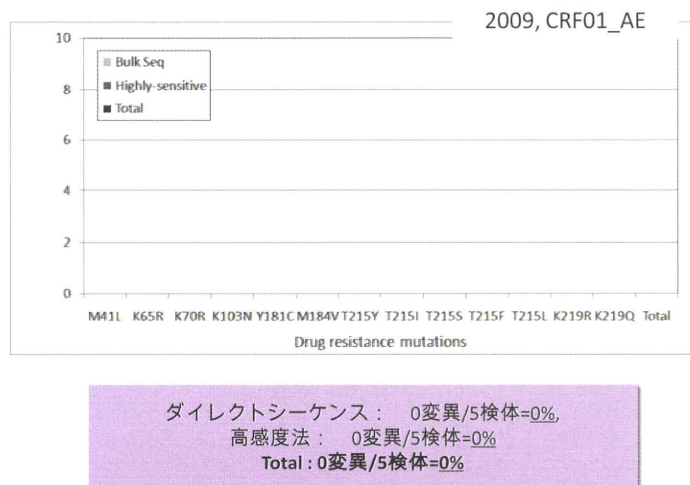


図4

E. 結論

定量PCRを応用した高感度法を用いることで、通常法では検出できない微少集族薬剤耐性HIVを検出可能になった。新規未治療患者からの薬剤耐性変異検出率は、高感度法を併用すると、2008年サブタイプBでは通常法の4.9%から11.0%に、2009年サブタイプBでは6.5%から8.7%へと上昇した。また2008年CRF01_AEの新規未治療患者検体5例のうち3例から通常法では検出できないM41Lを検出した。高感度法を用いる事によって、より正確に新規未治療患者の薬剤耐性を解析できる事が示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 原著論文

欧文

なし

和文

なし

2. 口頭発表

海外

- 1) Masako Nishizawa, Junko Hattori, Walid Heneine, Jeffrey A. Johnson and Wataru Sugiura. Sensitive testing identifies a greater prevalence of transmitted HIV drug resistance in Japan. 5th International Workshop on HIV Transmission, 2010年7月、ウイーン.

国内

- 1) 西澤雅子、服部純子、横幕能行、Jeffrey A. Johnson、Walid Heneine、杉浦互. 高感度薬剤耐性検査法を用いた新規未治療HIV/AIDS症例における微少集族薬剤耐性HIV調査研究. 第24回日本エイズ学会、2010年11月、東京.
- 2) 服部純子、椎野禎一郎、潟永博之、林田庸総、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、加藤真吾、藤井 毅、岩本愛吉、西澤雅子、仲宗根正、岡 慎一、伊部史朗、横幕能行、上田幹夫、大家正義、田邊嘉也、渡辺香奈子、渡邊 大、白阪琢磨、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、杉浦互. 2003～2009年の新規HIV/AIDS診断症例における薬剤耐性頻度の動向. 第24回日本エイズ学会、2010年11月、東京.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし



既治療患者における薬剤耐性HIV調査・サブタイプの調査

研究分担者 松下 修三 熊本大学エイズ学研究センター病態制御分野 教授
研究協力者 吉村 和久 同 准教授

研究要旨

熊本大学を受診したHIV-1感染の新規診断症例の *env* 領域のシーケンスによる subtype 分類の結果、subtype Bとnon-Bのキメラのシーケンスを持つ症例の増加が認められた。これらのV3 tipのシーケンスはGPGRもしくはGPGKであったが、GPGRの4番目のRのコドンはCAGもしくはCGGであり、従来のsubtype Bで見られるAGAとは異なっていた。これらは、非subtype BのV3 tipに見られる315Q (CAA or CAG) から315R (CGA or CGG) と変異したものと考えられた。一方、GPGKの4番目のKのコドンはAAAであり、こちらは従来のR (AGA) から進化したものと推測された。これまで、同一患者のV3 tipでGPGRとGPGK、あるいはGPGRとGPGQは混在するが、GPGQとGPGKの混在が認められない理由は不明であったが、今回の観察から、Q→Rの変異とR→Kの変異が全く異なるルートの進化をたどるためと考えられた。HIV-1の進化を知る上で、また日本や中国を含む東アジアでの分子疫学的解析に重要な知見であると考えられる。

A. 研究目的

HIV-1は感染を拡大させながら、進化し続けていることが大きな特徴である。我々は、新規診断症例に関して、ウイルス分離を行い、治療用に開発中の抗V3抗体を用いて中和抗体への感受性の検討を行ってきたが、その過程で興味深い観察をした。すなわち、subtype Bに分類されるウイルスのなかで、V3抗体に中和抵抗性のウイルスのV3-tipのアミノ酸配列がGPGRとGPGQが混在する症例とGPGKのみまたはGPGRとGPGKが混在する症例があることを観察した。特に、後者は、最近の数年間に急激に増加しているという印象を受けており、これらの解析は中和抗体に関わるワクチン開発に示唆を与えるだけでなく、感染拡大を調査する疫学的解析にも貢献するものと考えられる。本研究の目的は、このような進化に関わる分子マーカーが、新たな疫学的指標として提唱可能かどうか調べるところにある。

(倫理面への配慮)

HIV感染症例由来の血液検体を用いたウイルス分

離及び塩基配列同定、中和抗体感受性試験などに関しては、臨床研究に関する倫理指針に従い、学内倫理委員会の承認を得た説明と同意書を用いて同意を得たのちに採血した(臨床研究登録UMIN000004720)。

B. 研究方法

HIV-1感染症例末梢血単核球より、CD8-immunobeadsを用いてCD8+細胞を除去し、抗CD3抗体及びIL2を用いてCD4+細胞を増殖させ、その培養上清中のウイルスを *env* primerを用いてRT-PCRで増幅し、*env* 全長をシーケンスした。また、EDTA加血漿に対して直接RT-PCRにてC2-V3の塩基配列を同定し、HIVの集団内での進化を考察し、これによる分類を試みた。*env* シーケンスによる subtype 分類はNCBIのホームページのviral genotyping toolの subtype 分類機能を用いて同定した。

C. 研究結果

我々は、新規診断症例に関して、ウイルス分離を行い、治療用に開発中の抗V3抗体を用いて中和抗

体への感受性の検討を行ってきた。その過程で subtype B に分類されるウイルスのなかで、V3抗体に中和抵抗性を示すウイルスのV3-tipのアミノ酸配列が GPGR と GPGQ が混在する症例と GPGK のみまたは GPGR と GPGK が混在する症例があることを観察した。一方、2006年以降新規患者として熊本大学を受診した HIV-1 感染者由来の HIV-1 分離株の *env* 全長の塩基配列を決定し subtype 分類を行った結果、subtype B と non-B のキメラのシーケンスを持つ症例の増加が認められた。代表的解析例を図1に示す。NCBI のホームページの viral genotyping tool の subtype 分類機能を用いて解析すると、subtype B の配列を基本にしなが、CRF03_AB (green) や CRF14_BG や CRF15_01B などを含むキメラ化されたエンベロープ配列であることが分かった。これらの組み換え型エンベロープを持つウイルスを組み換え型 B として区別する。これらの多くは V3 tip のシーケンスが GPGR もしくは GPGK であり、その GPGR の4番目の R のコドンは CAG もしくは CGG であった。

一方、過去に熊本大学でシーケンスを行った患者サンプルの V3 tip シーケンスをあらためて調べ直した結果、1996年以前のサンプルにおける V3 tip のシーケンスの GPGR の4番目の R のコドンは2例を除き、全て北米タイプの 315R (AGA) もしくはこれから派生したと考えられる K (AAA)、S (AGT) または G (GGA) であった (30/32、データ示さず)。例外の2例は、Q (CAA) からの派生と考えられる R (CGA) であった。subtype B の HIV-1 株として、実験室で用いられている IIIB、JRFL、89.6、BaL、YU2、SF162 は全て従来タイプの B 株 (AGA) で、V3 tip の GPGR の全てが同一のコドンであった (図2)。

1997年以降 Non-B 株で 315R と Q の混在が確認され (AE2例)、その R のコドンは CAA → CGA のパターンであった。また、組換え型の B 株と考えられる中で CAA → CGA パターンの R コドンを持つものが6例認められた。一方、Q (CAG) から変異したと思われる R (CGG) を持つものが7症例確認された。7例中5例は2006年以降に外来を受診した症例であった。図2にこれらの複数の V3 tip シーケンスが検

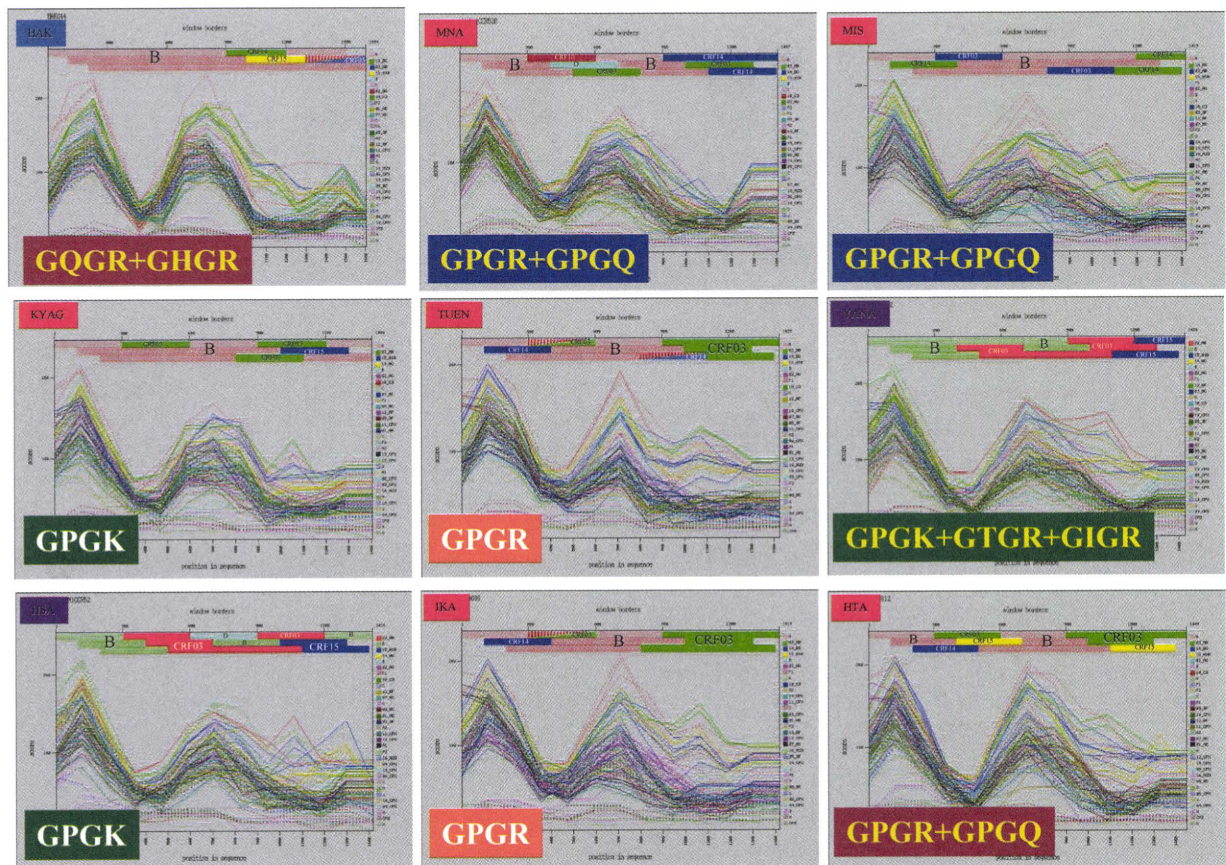


図1 新規症例から分離した HIV-1 のエンベロープシーケンスの subtype 解析: HIV-1 エンベロープシーケンスを NCBI の subtype 解析ソフトで解析した。subtype B の配列を基本にしなが、CRF03_AB や CRF14_BG や CRF15_01B などを含むキメラ化されたエンベロープ配列であることが分かった。

出された症例を含む最新の症例におけるV3 tipシーケンスとコドンの使用を示す。Aに赤枠及び青枠で表示したのは組み換え型B及び非subtype Bと判断される症例のV3 tipについて示した。新規診断症例に見られる組み換え型BウイルスのV3 tipのコドンは、従来のsubtype Bで見られるAGAとは異なっていた。このことは、同じV3 tipのGPGRシーケンスでも組み換え型Bの315Rは315Q (CAA or CAG) から315R (CGA or CGG) に変わってできたものであり、従来のsubtype B由来ではないことを示唆する。

もう一つの傾向として、最近数年以内に受診された症例の中にGPGKのみをもつ症例が見られるようになったことが上げられる。315Kのみのものが4例、RとKの混合が1例確認されている。315KのコドンはAGAから変わったと考えられるAAAであり、従来のB株がそのまま進化したものと考えられた(図2A.ピンク色枠にて例示した。)。2006年以降シーケンスした新患に限ると、25症例のうちNon-Bが6例(AE、C、BC、G、CRF13)、残り19例がEnvのシーケンスでB株に分類されたが、従来のBの

V3 tipを持つものはその内7名で、しかも1名はAGGタイプのRで、残りの中の2名はKとRの混在で、後の4名はKのみ持つものであった。そして、残った12名で、R (CGG) のみのものが4例、Q (CAG) との混在が1名、またR (CGA) のみが2例、Q (CAA) との混在が3例、Q (CAA) のみのものが2例であった。つまり、新規診断症例中63%は従来型ではないB株のV3 tipを持つ、組み換え型Bの症例であったことがわかった。

D. 考察

2006年以降新規患者として熊本大学の血液内科外来を受診したHIV-1感染者のenvシーケンスによるsubtype分類の結果、Bとnon-Bのキメラのシーケンスを持つ症例が顕著に増加していた。これらの多くはV3 tipのシーケンスがGPGRもしくはGPGKであり、GPGRの4番目のRのコドンはCAGもしくはCGGであった。つまり、従来のsubtype Bで見られるAGAとは全く異なっていた。このことは、同じV3 tipのGPGRシーケンスでも315Q

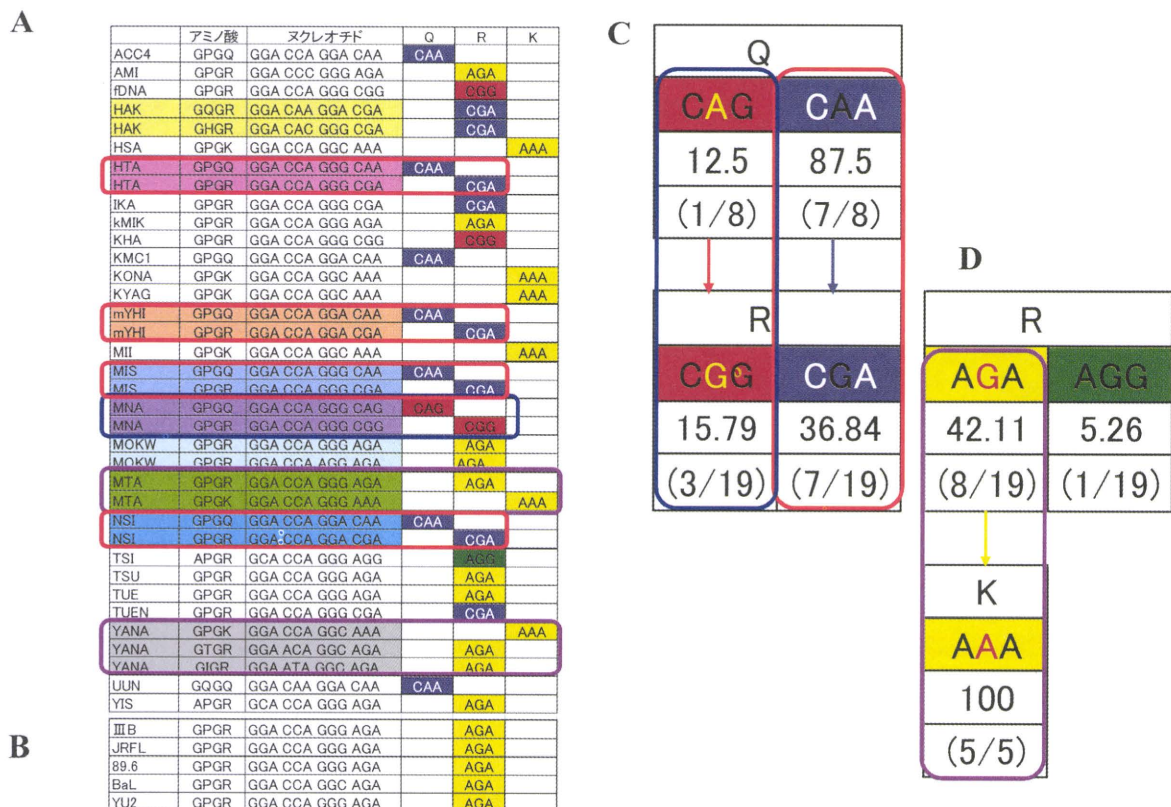


図2 Gp120 V3 tipのシーケンスのコドン使用とウイルスの進化。A：複数のV3 tipシーケンスが検出された症例を含む最新の症例におけるV3 tipシーケンスとコドンの使用。B：実験室で用いられているウイルスのV3 tipのコドン使用。C：組み換え型B及び非subtype Bと判断される症例のV3 tipの進化。Aに赤枠及び青枠で表示した。C：subtype BウイルスにおけるV3 tipの進化。Aにピンク色枠にて例示した。