



## 研究要旨

# 沖縄における薬剤耐性HIVの動向調査研究

～平成22年度沖縄県における薬剤耐性HIV-1 調査体制確立のための研究～

研究分担者 **健山 正男** 琉球大学大学院医学研究科感染症制御学講座  
分子病態感染症学分野 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>、宮城 綾乃<sup>2</sup>、名護 珠美<sup>2</sup>、  
又吉 拓<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、我々は前年度に引き続き当院での薬剤耐性の現状を把握するため、新規感染者における薬剤耐性サーベイランスを実施した。対象期間は2010年1月1日～2010年12月31日で、同期間に21人が当院にHIV感染者として初診外来受診した。新規感染者の定義を満たすのは14人であり、12人に薬剤耐性HIV検査を施行した。RT領域では耐性に関連する変異は認めなかった。PI領域では耐性に関連する変異が全例に認められたが、major mutationは検出されなかった。当院はエイズ中核拠点病院として県内の患者の70%超を診療しており、当院における検査結果は県内の状況を反映していると考えられ、沖縄県はこれまで薬剤耐性HIV-1の低浸淫地域であったが、今回25%が薬剤耐性と判定された。今後の動向に注視する必要がある。

## A. 研究目的

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

## B. 研究方法

1. 当院を日本薬剤耐性HIV-1調査研究グループとして登録した。
2. 新規登録患者の定義：対象期間内（2010年1月1日～2010年12月31日）の期間に初めて感染が確認された者。
3. 検体のサンプリングポイント。下記のいずれかで行った。
  - a). 初診時
  - b). 治療開始時
4. 新規登録患者において、本調査の参加の同意を文書にて取得した。
5. 3. a) またはb) のポイントで採血し、院内および国立感染症研究所エイズ研究センター第2研究グループにて薬剤耐性HIV-1検査を行った。
6. 増幅対象
  - Protease領域：アミノ酸1から99番
  - 逆転写酵素領域：アミノ酸1から240番
  - Integrase領域：アミノ酸1から288番
7. 薬剤耐性遺伝子検査の判定法
  - 1) The Agence Nationale de Recherche sur le SIDA (ANRS) 薬剤耐性評価 (<http://www.hivfrenchresistance.org/table.html>)
8. 倫理面での配慮
  - 1) 個人情報の取得について
 

利用目的を明確にしたうえで、必要とする範囲内に限り、適法かつ公正な手段によって、個人情報を取得した。
  - 2) 個人情報の利用について
 

個人情報を取得する際に示した本研究の範囲内で、研究の遂行上、必要な限りにおいて利用した。
  - 3) 個人情報の第三者提供について
 

取得した個人情報は、適切に管理し、個人情報保護法に定める例外事項を除き、本人の同意を得ることなく、第三者に提供、開示しなかった。
  - 4) 個人情報の開示・訂正・削除・利用停止について

本人から自己の個人情報について、開示・訂正・削除・利用停止などの申し出を受けた場合は、すみやかに必要な措置をとる旨説明したが、研究の全期間を通して申請者はいなかった。

5) 個人情報の管理について

個人情報の紛失、流出、改ざんおよび漏洩などを防ぐため、個人情報を保有するのは研究代表者のみとし、情報管理上問題は発生しなかった。

6) 法令等の順守について

個人情報保護に関して適用される法令、国のガイドラインを熟読し順守した。

C. 研究結果

対象期間内に当院外来を受診したHIV/AIDS患者は21人であった。その内、新規登録患者の定義を満たした14人中12人に薬剤耐性検査を施行した。検体のサンプリングポイントは、全員、治療開始前に設定した。

薬剤耐性HIV-1検査を施行した12人の背景と結果を表1に示した。感染経路は12人が同性間であり、病期はHIVキャリアーが8人、AIDSが4人であった。性別は全員が男性で平均年齢はAIDSは39.1歳、HIVは35.0歳であった。CD4数の平均値はHIVキャリアーは316cells/ $\mu$ l、AIDSは37.0cells/ $\mu$ lであった。一方HIV-RNA定量の平均値は、HIVキャリアーは $1.9 \times 10^5$ コピー/ml ( $1 \times 10^2 \sim 6.6 \times 10^5$ )、AIDSは $8.6 \times 10^5$ コピー/ml ( $1.7 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^6$ )であった。

薬剤耐性HIV-1薬剤耐性検査ではRT領域では耐性に関与する変異はT69Nが2例、V179E、V179I、T215C、T215E、G190Eが各1例づつ認められた。ANRSによる薬剤耐性評価ではAZT/D4Tに対してPossible Resistanceが1例、EFV/NVPに対してResistanceが1例認められた。PI領域では耐性に関連

する変異が表1に示すように全例に認められたが、M36I、H69K、L89MによるTipranavirに1例Resistanceが認められた。

D. 考察

沖縄県におけるHIV感染者の増加は1999年より顕著となり、2008年以降、人口10万人あたりの新規感染者は全国で常に3位内を占めている。

琉球大学附属病院はエイズ拠点病院として2010年は県内の新規患者の80%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、以上の検査結果から沖縄県はこれまで薬剤耐性HIV-1の低浸淫地域であったが今回25%が薬剤耐性と判定された。今後の動向に注視する必要がある。

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

E. 結論

新規患者における薬剤耐性HIV-1検査を施行した12人では薬剤耐性HIV-1薬剤耐性検査ではRT領域では耐性に関与する変異は7例認められた。ANRSによる薬剤耐性評価ではPossible Resistance/Resistanceが2例認められた。PI領域では1例Resistanceと判定された。

沖縄県はこれまで薬剤耐性HIV-1の低浸淫地域であったが、今回25%が薬剤耐性と判定された。今後の動向に注視する必要がある。

表 2010年度新規登録患者の薬剤耐性遺伝子変異結果

HIV genotype	Stage	Age	HIV-1 copies/ml	CD4 cells/ $\mu$ l	RT mutations	PI mutations
AE	AIDS	41	756000	4	T69N	L33F,M36I,H69K,L89M
B	AIDS	29	177000	37	T69N	V77I,I15V
B	AIDS	47	1040000	95	ND	V77I,I15V, I62V
B	AIDS	40	1450000	13	ND	A71T,V77I,I15V,A71T
B	HIV	31	27200	215	T215C	A71T,V77I,L63P,H69K
B	HIV	36	115000	182	V179E	A71T,V77I,L63P,A71T,D60E
B	HIV	51	49400	482	ND	A71T,V77I,L63P,H69K
B	HIV	37	21200	310	ND	A71T,I62V,L63P
B	HIV	36	5420	620	T215E	V77I,L63P
B	HIV	31	667000	120	ND	H69Q
B	HIV	28	409	318	G190E	V77I, I62V, G16E
ND	HIV	31	614000	280	V179I,T215C	15V,D60E, I64V, G143N

ND: not done

**F. 健康危惧情報**

なし

**G. 研究発表****1. 論文発表****欧文**

- 1) Hibiya K, Tateyama M, Tasato D, Atsumi E, Higa F, Fujita J. Mechanisms involved in the extension mechanism of pulmonary Mycobacterium avium infection from primary focus to regional lymph nodes. *Kekkaku*.86 (1). 2011(in press)
- 2) Teruya H, Tateyama M, Hibiya K, Tamaki Y, Haranaga S, Nakamura H, Tasato D, Higa F, Hirayasu T, Furugen T, Kato S, Kazumi Y, Maeda S, Fujita J. Pulmonary Mycobacterium parascrofulaceum infection as an immune reconstitution inflammatory syndrome in an AIDS patient. *Intern Med*. 49:1817-21.2010.
- 3) 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*. 74:252-7. 2010.
- 3) 仲村秀太、健山正男、田里大輔、原永修作、比嘉 太、藤田次郎. 当院 HIV-1 感染者における骨代謝異常の有病率とその危険因子に関する検討. *日本エイズ会誌*. 12 : 319、2010
- 4) 田里大輔、健山正男、仲里 愛、宮城京子、仲村秀太、原永修作、比嘉 太、富永大介、藤田次郎. アドヒアランスが確保できない HIV 脳症患者へのアプローチ (1) ~ガイドライン通りにはいかない症例への HAART 導入~*日本エイズ会誌*. 12 : 419、2010
- 5) 仲里 愛、富永大介、田里大輔、宮城京子、仲村秀太、原永修作、比嘉 太、健山正男、藤田次郎. アドヒアランスが確保できない HIV 脳症患者へのアプローチ (2) ~スクリーニング検査の限界と神経心理学検査の有用性について~*日本エイズ会誌*. 12 : 420、2010
- 6) 大城市子、與那嶺敦、渡久山朝裕、平安良次、仲村秀太、田里大輔、宮城京子、健山正男. 地域における陽性者交流会の試み. *日本エイズ会誌*. 12 : 354、2010
- 7) 宮城京子、石川章子、健山正男、藤田次郎. 当院における HIV 看護に関する看護スタッフ教育プログラムの実践報告. *日本エイズ会誌*. 12 : 465、2010
- 8) 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. *エイズ予防財団*. 平成 21 年度「ケア応用編研修会」、2010

**和文**

- 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*. 41 : 15-21、2010

**2. 報告書**

- 1) ○健山正男、宮川桂子、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. 一沖縄県の男性同性愛者の HIV 検査受検率向上のための調査一. 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 21 年度 総括・分担研究報告書. 2010 年. p77-88.
- 2) ○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 21 年度総括・分担研究報告書. 2010 年. p120-123.

**3. 学会発表**

- 1) 仲村秀太、健山正男、田里大輔、原永修作、比嘉 太、藤田次郎. 抗ニューモシスチス肺炎治療薬の変更が転帰に与える影響に関する臨床検討. 第 58 回日本化学療法学会総会、2010 長崎.
- 2) 仲村秀太、健山正男、田里大輔、照屋宏充、上地華代子、仲村 究、古堅 誠、玉城佑一郎、

原永修作、屋良さとみ、比嘉 太、藤田次郎. 慢性壊死性肺アスペルギルス症に Rasmussen's aneurysm を併発するもポリコナゾールで軽快した AIDS の 1 例. 第 65 回日本呼吸器学会・日本結核病学会九州支部秋季学術講演会 2010 熊本

- 3) 仲村秀太、健山正男、田里大輔、原永修作、比嘉 太、藤田次郎. 当院 HIV-1 感染者における骨代謝異常の有病率とその危険因子に関する検討. *日本エイズ会誌*. 12 : 319、2010
- 4) 田里大輔、健山正男、仲里 愛、宮城京子、仲村秀太、原永修作、比嘉 太、富永大介、藤田次郎. アドヒアランスが確保できない HIV 脳症患者へのアプローチ (1) ~ガイドライン通りにはいかない症例への HAART 導入~*日本エイズ会誌*. 12 : 419、2010
- 5) 仲里 愛、富永大介、田里大輔、宮城京子、仲村秀太、原永修作、比嘉 太、健山正男、藤田次郎. アドヒアランスが確保できない HIV 脳症患者へのアプローチ (2) ~スクリーニング検査の限界と神経心理学検査の有用性について~*日本エイズ会誌*. 12 : 420、2010
- 6) 大城市子、與那嶺敦、渡久山朝裕、平安良次、仲村秀太、田里大輔、宮城京子、健山正男. 地域における陽性者交流会の試み. *日本エイズ会誌*. 12 : 354、2010
- 7) 宮城京子、石川章子、健山正男、藤田次郎. 当院における HIV 看護に関する看護スタッフ教育プログラムの実践報告. *日本エイズ会誌*. 12 : 465、2010
- 8) 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. *エイズ予防財団*. 平成 21 年度「ケア応用編研修会」、2010

**H. 知的財産権の出願・登録状況**

なし

**1. 特許取得**

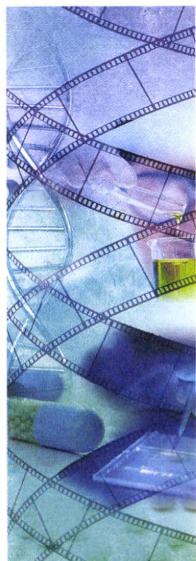
なし

**2. 実用新案登録**

なし

**3. その他**

なし



## 研究要旨

# 帝京大学における薬剤耐性HIVの動向調査研究

～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 同 助教

帝京大学医学部附属病院には、2010年12月現在で58名のHIV感染症患者在通院しているが、平成19年度以降の初診症例が過半数を占めている。初診時のAIDS発症の有無にかかわらず、大半が初診後数年以内に抗レトロウイルス療法に導入に至っている。我々は、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および治療開始後に血中HIVRNA量が増加した患者を対象に、血中HIVRNAの薬剤耐性変異の同定を行なった。同時に、HIVRNAのPol領域を解析し、HIVサブタイプの推定を試みた。

2010年に実施した6名の治療開始前患者のうち、3名に逆転写酵素（RT）領域に薬剤耐性変異を認めた。いずれも非核酸系逆転写酵素阻害薬（NNRTI）の耐性に寄与する変異であったが、1名はetravirineの耐性に寄与するV90Iであった。また6名すべてからプロテアーゼ阻害薬（PI）関連変異が確認されたが、いずれもminor mutationであった。また6名はいずれもサブタイプBであると推測された。一例について治療開始前、治療開始4週間後の血中HIVRNAを用いてクローニング解析を行ったところ、治療開始4週間後に、新たに5カ所のアミノ酸置換を伴う少数集族が確認された。うち1カ所は薬剤耐性変異部位であった。今後、少数集族を効率的に検出する手法としての有効性を検証し、複数の症例について同様の解析を行っていく予定である。

## A. 研究目的

帝京大学医学部附属病院には、2011年1月現在で58名のHIV感染症患者在通院している。半数以上が平成19年度以降に当院を新規に受診した症例である。来院時に抗レトロウイルス療法の導入が必要となるAIDS発症例は、平成19年度以降10名を数えるが、AIDS指標疾患やその他の日和見感染症による死亡者はこの4年でわずかに1名にすぎない。未治療経過観察中の患者はわずかに8名に留まる。ARTの導入開始基準となるCD4数が高く設定されるようになったことで、今後HIV感染症診療の主体は、初診後の速やかなARTの導入と導入後の長期間の外来通院加療が主体となることが予想される。HIV診療に携わる医療機関は、薬剤耐性変異の獲得に伴う治療失敗への対応、ARTの長期合併症への迅速かつ的確な対応をこれまで以上に要求されるものと考えら

れる。

抗レトロウイルス療法の導入にあたり、多くの臨床治験の結果に基づいて決定された抗HIV治療ガイドライン推奨の薬剤の組み合わせが、治療薬として選択されることが多いが、その一方で、個々の症例で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でも、また治療の失敗を未然に防止する意味でも重要である。そこで我々は、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感染症患者在血中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、REGA HIV subtyping toolを用いてHIVサブタイプの同定を行った。

さらに保険診療下での薬剤耐性検査は、主要な集

族の塩基配列のみを判定結果として表示するダイレクトシーケンスであることから、少数薬剤耐性変異の同定には限界があり、体内に耐性変異を有するHIVがごく少数存在しても同定できない。一般に、変異株は野生株に比しウイルスの増殖能が劣るため、微小集族として存在している事が多く、ダイレクトシーケンスの結果において、一定比率に満たない微小集族の塩基配列は反映されない。そこで我々は、新たに治療開始前と治療開始直後の血中HIVRNAを用いて、クローニングシーケンスを行い、微小集族として存在する薬剤耐性変異を同定する試みも合わせて行った。

## B. 研究方法（倫理面の配慮）

- 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った。一部症例については複数の日時についてのクローニングの解析を行った。
- 3) 上記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たHIVサブタイプの推定を行った。
- 4) 新たな試みとして、ART導入後一定量まで血中HIVRNA量が減少した時点でのクローニングの解析を行った。

### （倫理面への配慮）

平成19年以降HIV薬剤耐性検査は、診療の一環として、保険診療下で外部検査会社に委託して実施してきたが、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。遺伝子解析研究を実施するに

あたり、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」などの指針に基づき、院内の倫理委員会において研究内容の承認を得た。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、保管をおこなっている。

## 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27名、女性は3名の計30名であり、男性27名の感染経路は、70%が同性間性交であった。平成22年は治療開始前の患者6名についてHIV薬剤耐性検査を実施した。6名のうち、3名がRT領域に薬剤耐性変異を認めた。2名はNNRTI関連の変異、1名はetravirineの関連変異として新たに加えられたV90Iの変異であった。protease領域については6名すべての患者でpolymorphismを含め1カ所以上の変異が確認されたが、いずれの患者からもmajor mutationは認められなかった。6名のサブタイプは、Pol領域の配列をもとにREGA HIV-1 Subtyping Tool-Version2.0 (<http://dbpartners.stanford.edu/RegaSubtyping/>)を用いて解析した結果、いずれもサブタイプBであった。

また1例について、微小集族の解析のために、治療開始前、治療開始4週後の血中HIVRNAのクローニングシーケンスを行った (Fig. 1)。両者ともダイレクトシーケンスでは全く同一の塩基配列を示した一方で、クローニングシーケンスでは複数のCodonで少数集族が確認された。プロテアーゼ領域では極めて相同性が高く、少数集族が確認されたのは1カ所（1%）のみであった。RT領域では22カ所（18%）のCodonで少数集族の出現と消失が確認された。治療開始4週間後に8カ所のCodonで少数集

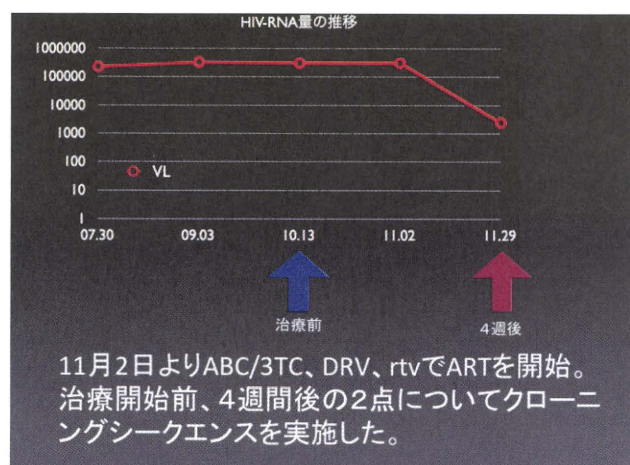


Fig1 クローニングシーケンスを行った症例の臨床経過

族が消失し、14カ所のCodonで新たに少数集族が確認された。また新たな少数集族が確認された14カ所のうち、アミノ酸置換を伴った変異は6カ所であり、うち1カ所は投与中のabacabirの薬剤耐性変異に関連したY115Hであった (Fig. 2)。

#### D. 考察

抗レトロウイルス療法開始前の薬剤耐性変異の解析は、当院を含め多くの医療機関で行われるようになり、抗レトロウイルス薬の選択に寄与している。その一方、ダイレクトシーケンスによる解析であるため、微小集族に存在する薬剤耐性変異の解析には限界がある。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、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。今回我々は、治療開始4週間後の血中HIVRNAから、治療開始前には確認出来なかった薬剤耐性変異を確認出来た。この変異が今後の治療失敗に関与するのかどうかの判断は、今後の治療経過を待たなければならない。また本例の経過観察とともに、今後複数の症例での同様の解析を行うことで、少数集族を効率的に発見する点において、我々が用いた方法の有効性を検証していきたい。

#### E. 結論

当院を受診した患者についての薬剤耐性変異の解析の結果、6例中3例にRT領域の、6例すべてにprotease領域の変異を認めた。また解析を行った6例は、いずれもサブタイプBであることが推定された。

1例の解析に留まるが、治療開始前、治療開始4週間後の血中HIVRNAを用いたクローニング解析により、治療開始前に確認出来なかった5カ所の変異

を確認することができ、そのうち一カ所は投与中の核酸逆転写酵素阻害薬に関連する耐性変異であった。

#### 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) Yoshino Y, Kitazawa T, Kamimura M, Tatsuno K, Ota Y, Yotsuyanagi H. Pseudomonas putida bacteremia in adult patients: five case reports and a review of the literature. J Infect Chemother. 2010 Sep 1. *in press*.
- 2) Yoshino Y, Kitazawa T, Tatsuno K, Ota Y, Koike K. Cryptococcal Pleuritis Containing a High Level of Adenosine Deaminase in a Patient with AIDS: A Case Report, Respiration, 79(2) 153-156, 2010
- 3) 太田康男, 古賀一郎. わが国および帝京大学医学部附属病院におけるHIV感染症例の現状. 帝京医学雑誌33巻4号 219-224、2010

##### 2. 学会発表誌名

- 1) 古賀一郎、松永直久、北沢貴利、太田康男. HAART導入後患者における骨塩量の低下と測定部位別の傾向 第24回日本エイズ学会 (2010年11月24~26日、東京) (日本エイズ学会誌12巻4号 457)
- 2) 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、

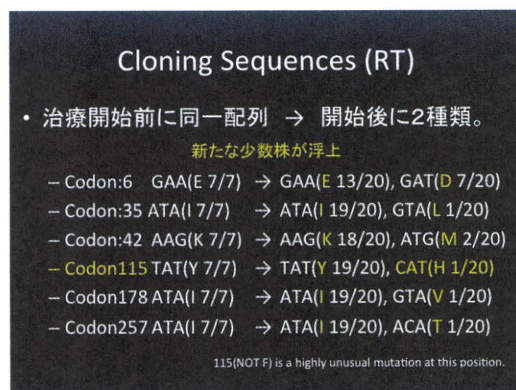


Fig2 クローニングシーケンスのまとめ

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. 最近の話題 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24～26日、東京）（日本エイズ学会誌12巻4号330）

## H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし



## 研究要旨

# 関東甲信越ブロックにおける薬剤耐性HIVの 動向調査研究

～新潟県における状況2010～

研究分担者 **田邊 嘉也** 新潟大学医歯学総合病院第2内科 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

平成22年新潟県内の病院でHIV感染と診断された新規患者4名の血中ウイルスについて、遺伝子塩基配列の解析をおこない、薬剤耐性変異の検出とウイルスの性状の分析をおこなった。患者の内訳は、男性3名（27～38歳）、女性1名（40歳）で、全員日本人である。男性はすべてMSM、女性は異性間の性感染で、感染場所はすべて国内と推定されている。感染時期は6年前と推定される1例を除いていずれも不明ながら、全員エイズ症状を呈しており、感染後相当期間が経過していると思われる。感染ウイルスは男性が3例ともサブタイプB、女性がCRF01\_AEで、男性1例にNNRTIの耐性変異V179Dが検出されている。

新潟県では1990年代にHIV感染／エイズ発症が増加し、1999年に報告数（計14件）がピークに達した後、急減して近年では年間4～5例で推移している。この減少は異性間感染に限って観察されるもので、MSMによる感染はほぼ横ばいとみられる。2010年分も含め、県内で解析されたウイルスのほとんどは相互に遺伝的距離が大きく離れており、地域内での感染の関与はきわめて少ない。近い将来患者の発生が急増に転ずる可能性は低いと思われるが、一方で、感染の発見がより症状が悪化した段階まで遅延するという傾向が、新たな問題として浮上している。

## A. 研究目的

抗HIV薬多剤併用治療の普及によるエイズ死亡の減少にはめざましいものがある一方、現行薬剤の多くに抵抗性をもつ多剤耐性ウイルスの増加が、絶えざる新薬開発を強いる圧力となる新たな問題を生み出している。こうした多剤耐性ウイルスの治療集団外への漏出はエイズ治療の大きな障害として今後さらに大きく立ちはだかってくるのが懸念される。われわれは2004年にはじまる厚生労働省「薬剤耐性HIVの動向把握のための調査体制確立およびその対策に関する研究」に参加して以来、新潟県内であらたに発生したHIV感染／エイズ発症の全例について、感染ウイルスの分析と耐性変異の保有状況の調査をおこなってきた。大都市圏に比較して地方部の感染の捕捉が手薄な中であって、われわれのデータはこの弱点を補い、国内で流行するウイルスのより正確な全体像を把握することに寄与してきた。また、

長期にわたる定点観測的な調査は、耐性変異の問題にとどまらず、さまざまな観点からHIV感染症の特徴や問題点を浮かび上がらせることにもつながっている。本研究班の年次報告でこれまでしばしば述べたように、新潟県内で採取されたウイルスのほとんどは遺伝学的に大きく懸け離れており、それぞれ感染源を異にしている。この事実は、県内住民間の感染はまれであって、これまでに解析したウイルスは県外、おそらく東京など大都市圏に由来するものであることを意味すると思われる。われわれのデータも現在構築が進んでいる国内HIVのシーケンスデータベースに加えられており、その整備によって県内で採取されたウイルスの由来について時系列的なトレースが可能になると期待している。現在進行しているHIV感染の拡大は、大都市を含む一部の地域にはほぼ限局しており、多くの地域では比較的少数にとどまったまま推移している。新潟県における調査



で明らかになってきた感染伝播様式の特徴は、こうした地域間の感染拡大速度の違いに対するひとつの説明となるかも知れない。本研究班の主要な課題である薬剤耐性ウイルスの現状分析に加えて、ウイルス遺伝子の解析で同時に明らかになる感染の疫学的側面をも視野に入れつつ、調査を続けていく予定である。

#### (倫理面への配慮)

本研究は新潟大学医学部遺伝子倫理審査委員会の承認のもとに行っている。用いた血液サンプルの解析結果のうち薬剤耐性に関する情報は提供先医療機関に通知しており、治療薬剤の選択の目安として患者本人の利益に還元されるため、単なる調査研究の目的のみの利用とは性格をこととする。サンプル受け入れの際、患者の生年月日、性別、感染時期、感染ルートなど疫学研究に必要な情報の提供を求めているが、氏名、住所などただちに個人の特定に結びつく項目は含まれない。また文書で通知された内容は直ちにデジタル化した後、原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。

## 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0.2mLからHigh Pure Viral RNA kit®（Roche, 1858-882）を用いてRNAを抽出し、50μLの溶出バッファーに回収して-90℃で保存した。ウイルスRNAの塩基配列の決定は逆転写酵素（RT）、プロテアーゼ、gp120（C2/V3）、マトリックス（p17）の各タンパク質をコードする領域についておこなった。RNAサンプル5～10μLを目的領域に特異的なプライマー対を用いてRT-PCR法で増幅した後（One-step RNA PCR Kit®、

TaKaRa RR024A）、反応液の一部（5μL）に第1段の反応で増幅される領域の内部に設定した第2のプライマー対を加えるnested PCRによって再増幅し、シーケンシングに供した。シーケンシング反応にはnested PCRと同じプライマーを使用した。増幅したウイルス遺伝子のcDNAサンプルとプライマーをBigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit（Applied Biosystems）の試薬と混合して反応させた後、反応産物をエタノール沈殿により回収、ホルムアミド溶液中で加熱変性し、ABI PRISM®310 Genetic Analyzerで解析した。

薬剤耐性変異の同定は基本的にInternational AIDS Society-USAの定義にしたがったが、適宜Stanford大学（<http://hivdb.stanford.edu/>）、Max Plank研究所（<http://coreceptor.bioinf.mpi-inf.mpg.de/>）が提供する薬剤耐性判定プログラムを参照した。決定した遺伝子配列相互の系統学的関係は、専用アプリケーションMega4を用いて推定をおこなった。

## C. 研究結果

**解析したサンプル** 平成22年中に4件の新規検体を解析した（表1）。いずれも新潟県内の病院からの依頼を受け解析を行ったもので、1例（Case #2）を除き初診時ですでに血中CD4細胞のレベルが100以下に低下しており、ニューモシスティス肺炎、サイトメガロ症、結核などの日和見感染をともなっていた。本検査の結果を待って直ちに抗HIV薬による治療が開始されたと思われる。患者はすべて日本国籍で男性が3（年齢27～38歳）、女性1（40歳）となっている。いずれも性行為により感染しており、男性はすべて同性間感染、女性は異性間の感染である。感染したウイルスは同性間感染の全例がSubtype B、異性間感染がCRF01\_AEとなっており、感染ルートによりウイルスの型に明瞭な差がみられる点は従来の傾向と一致している。感染地はすべて国内と推定され、推定感染時期は1例（Case #4）が6年前、その他は不明となっている。

表1 平成22年新規登録感染者

Case No	性別	年齢	国籍	感染ルート	推定感染地	推定感染時期	CD4/μl	Viral load (per ml)	感染ウイルス
1	男	37	日本	同性間	不明	不明	20	1.6×10 <sup>5</sup>	Subtype B
2	男	38	日本	同性間	国内	不明	256	1.0×10 <sup>4</sup>	Subtype B
3	女	40	日本	異性間	国内	不明	26	1.3×10 <sup>5</sup>	CRF01_AE
4	男	27	日本	同性間	国内	2004年	68	5.1×10 <sup>4</sup>	Subtype B

**薬剤耐性変異** 取り扱った検体のうちCase #1にNNRTIに軽度の耐性を付与するとされるV179Dが検出された。新潟県では、本例を含めて新規症例から薬剤耐性変異5例（V106I 2例、V108I 1例、V179D 2例）を検出しているが、これらはすべて非スクレオシド系の阻害薬に対するもので、耐性付与の程度はいずれも比較的軽微である。県外病院からの依頼分を含め、われわれがこれまでにおこなった検査で検出された薬剤耐性変異のリストを表2に示すが、治療中に発生した薬剤抵抗性のウイルスで普通に検出されるM184VI、K103N、M46ILなどの強い薬剤耐性と結びついた変異が新規症例ではみられておらず、体内に潜伏するウイルスを含めて、感染したウイルスの耐性度がこうした軽度のもののみであれば、治療への影響は当面少ないとみてよいであろう。

本研究班の調査で新規症例に薬剤耐性変異が検出される頻度は全国的に見て10%を超えるレベルに達することが明らかになっている。この数値に比べても、新潟県における検出頻度（5/27）は、少なくとも量的観点からはかなり高い。しかも、新規症例に

おける耐性変異の保有は、これまでのところすべてMSMの症例で観察されており（図1）、この集団に限ればその検出頻度は異常に高いとみなければならない。これに加えて、MSMの新規症例ではT69、K103など耐性変異を生じうる部位にアミノ酸置換を生じているケースがしばしば見られる。IAS-USAの定義では耐性変異とはされないものの、Stanfordの判定プログラムでは軽微な薬剤抵抗性を付与するとされるこれらの変異を、われわれは疑似耐性変異として扱っている。疑似耐性変異も含めると、MSMの新規症例で耐性変異が検出される割合は50%に達する。

**新潟県の感染動向** エイズ動向委員会の報告によると、新潟県では1990年代後半に新規感染／発症の報告数が急増し、1999年にピーク値（14例）をつけた後急減して、以後現在まで少数の報告のまま推移している（図2）。われわれは本調査を開始して以後、2005年から2010年まで毎年コンスタントに4、5例の新規症例の解析をおこなっている。医療機関受診から検査依頼までにある程度のタイムラグがあるケースもあって、年ごとの動向委員会の報告数とは若

表2 薬剤耐性変異の検出頻度

	未治療群		治療群			未治療群		治療群	
	(N=39)	(N=32)	(N=39)	(N=32)		(N=39)	(N=32)		
NRTI			NNRTI		PI major				
M41L	0	4	K101EHP	0	2	D30N	0	1	
D67L	0	4	K103N	(2) <sub>f</sub>	7	M46IL	0	4	
T69_ins	(2) <sub>ab</sub>	(2) <sub>bc</sub>	V106IAM	3	0	I54ML	0	1	
K70R	0	2	V108I	1	1	V82AFSL	0	1	
L74V	0	2	V179DF	4(1) <sub>g</sub>	0	I84V	0	1	
M184VI	0	12	Y188CLH	0	3	N88S	0	2	
L210W	(1) <sub>d</sub>	2	P236L	0	1	L90M	0	2	
T215YF	(1) <sub>e</sub>	3							
K219QE	0	2							

注 薬剤耐性変異の定義は International AIDS Society-USA 2010 による。( )内の数字は定義部位に検出された非定型的なアミノ酸置換が認められた症例数を示す。a: T69A, b: T69N, c: T69S, d:L210F, e: T215E, f: K103R, g: V179A.

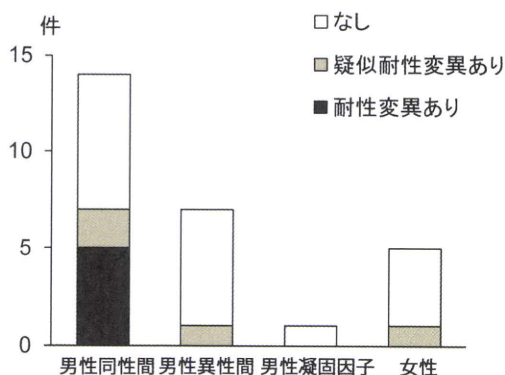


図1 新規症例における薬剤耐性変異検出頻度

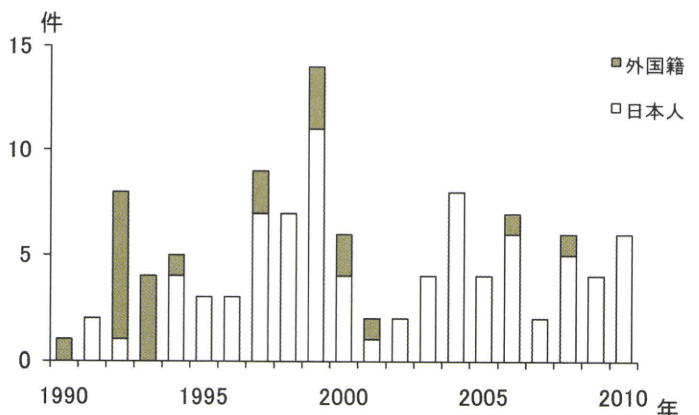


図2 新潟県におけるHIV感染／エイズ発症報告数 (エイズ動向委員会報告による)

干の差があるものの、この期間に発生した県内の感染についてはほぼ完全な把握がなされている。一方、現在県内病院を受診する患者の多くは、調査開始時にすでに薬剤治療を受けており、その感染ウイルスについては治療によるコントロールが不良となつて耐性検査が実施されるまでは性状を知ることができず、これまでに捕捉できていない割合はおおよそ1/3程度にとどまっている。図3にみるように、2004年以前に感染が診断され最初の検査が治療開始の後におこなわれた症例と、それ以降の未治療段階から把握できている症例の間には、患者の性別や感染ルート、また感染ウイルスの型に顕著な差がみられる。早期の感染は異性間の性行為による感染が中心で、女性感染者の比率が高く、検出されるウイルスにはCRF01\_AEが多いのに対して、後の感染の半数は男性主体、MSMが全体の半分を占め、感染ウイルスもサブタイプBが優勢となっている。早期の感染状況については捕捉が未だ十分とはいえない弱点はあるものの、こうした差がサンプリングの偏りだけが理由で生じたとは考えにくく、これまでに扱った21名の早期感染者からえたデータは、ほぼこの期間の感染の実態を表しているとみている。新潟県の感染にみられる特異な動向はおそらく異性間感染の増減

に起因するものであり、その感染に主として関わっていたCRF01\_AEタイプのウイルスの県内への流入が減少した結果、人口当たりで見れば全国的にも最低水準に近い現在の感染/発症の発生数が現出したのであろう。

**新潟県で検出されるウイルスの特徴** これまでの調査報告でもしばしば強調してきたとおり、県内患者から検出された50に近いウイルスは、2007年と2009年に検査した各1例のウイルスが解析した5領域の遺伝子配列のいずれにおいても高い相同性を示したのを唯一の例外として、遺伝的にきわめて雑多な遺伝子配列をもっている(図4)。2010年の4件についても、過去に解析したウイルスとの近縁性をうかがわせる結果は得られなかった。新潟県で検出されるウイルスが県外での感染、あるいは県外居住者によってもたらされており、域内での感染拡大が進んでいる可能性は低いとするこれまでの見解は、今回も変更の必要は無いと判断している。

**新潟県のHIV感染の問題点** 以上みてきたように、新潟県のHIV感染は比較的少数のまま推移しており、昨年1年間の調査でもこの状況に急激な変化が現れる徴候は読み取れない。感染拡大が続く大都市圏に比べ、問題の深刻度が低いことはおそらく間

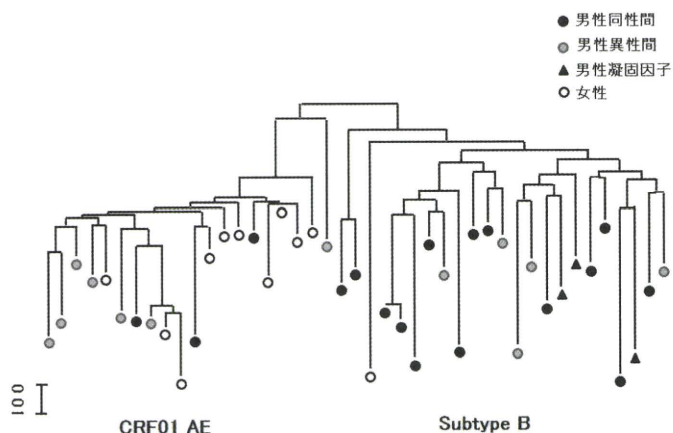
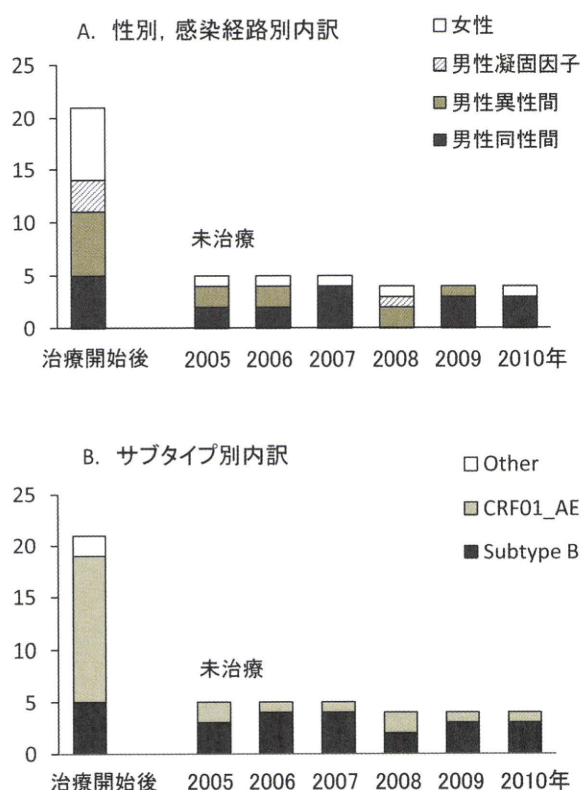


図4 新潟県で検出されたウイルスのenv C2/V3領域配列の分子系統樹

図3 本調査で扱った症例の内訳

違いないが、それでも継続的な調査で懸念すべき傾向も見えてきている。図5はこれまでに扱った新規症例について、検査前の血中CD4陽性細胞数を縦軸に、検査をおこなった時期を横軸に取り、プロットしたものである。本調査を開始した頃からすでに、エイズ発症、あるいは免疫機能低下が相当に進んだ症例は少なくなかった、最近ではこうした‘いきなりエイズ’的なものの割合が更に増える傾向にある。症状がより悪化した時点で医療機関を受診する傾向は、CD4陽性細胞数の検査値の推移からも見て取れる。感染の早期発見は良好な治療成績をえるための重要なファクターであり、HIV血液検査の受診率の向上を図るなど、早急な改善が求められる問題点であろう。

#### D. 考察

エイズ動向委員会報告によると、2005～2010年の6年間に新潟県で発生した新規のHIV感染、エイズ発症数は合わせて31件となっている。人口規模の似た岐阜、長野、宮城、京都などの府県の報告数は、同期間にそれぞれ92、100、73、137件となっており、新潟県の数値が際立って低いことが分かる。しかしながら、さらに10年程度遡れば、新潟県における人口当たりの感染／発症者数は千葉、埼玉、神奈川などの東京隣接県と比肩できるレベルにあった。エイズ発症までの潜伏期間を考慮すると、この報告数の増加に対応する感染が実際に起きた時期は、いわゆるバブル経済の期間に重なる。かつての新潟県における感染増加は、エイズ先進地たる東京という都市が地方に対してもつ吸引力と、当時の社会に満ちていた享樂的な雰囲気をもたらしたものと見えよう。この時期流入したウイルスが引き続いて県内で感染

を拡大していった形跡は、その後の調査では認められない。ウイルス流入の機会の増減がそのまま新潟県における特異なHIV感染症動向に反映したというのが、われわれの見方である。近年、HIV感染症の拡大は首都圏、近畿圏、中京圏などの大都市圏で顕著である一方、地方部ではかならずしも増加傾向が認められない地域が多い。こうした地域ではウイルス伝播の実態は新潟県と同様であるのかも知れない。

取り扱う検体から薬剤耐性変異が検出される頻度が最近2、3年で急増している点は、理由は不明ながら注目しておく必要がある。これらの変異はすべてMSMの症例で検出されているが、I106I、V179Dなど複数のウイルスで検出される変異についても、保有するウイルス相互間に遺伝学的な近縁性は観察されず、それぞれ別個の感染源に由来することが分かっている。これまでに検出された耐性変異は、いずれも薬効に対する影響は比較的強く、治療に当たって薬剤の選択に制約を加えるほどのものではないが、その由来が薬剤治療を受ける患者に生じた耐性ウイルスであるとすれば、かならずしも軽視はできない。弱い耐性変異が単独で発生する可能性は低く、より強い耐性変異に付加して現れるのが常態であって、後者の変異は薬剤の選択圧に曝されない限り体内に潜伏するウイルスに保有されたまま、表面に現れてこない可能性がある。耐性変異が検出された患者については、今後の治療成績を注意深くみていきたい。

感染の発見が免疫不全症状がより進行した状態まで遅延化している傾向は、治療への悪影響に加えて、別の懸念をもはらんでいると思われる。新潟県では保健所などでおこなわれているHIVの血液検査を年

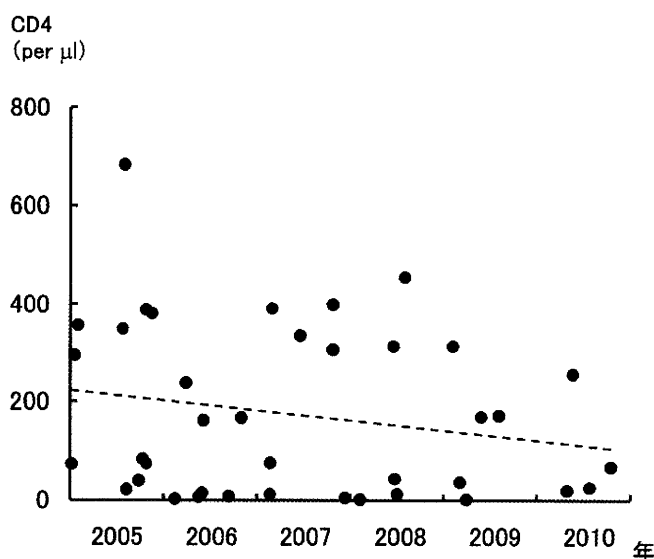


図5 新規症例の初診時血中CD4陽性細胞数

間2000名近くが受診しており、この数は他地域の状況と比較して格別少ないものではない。これが感染の早期発見に結びついていないのは、感染のリスクを自覚し検査を自発的に受けている層と実際の感染者との間に乖離があることを意味している。寝耳に水のごとく、HIV感染とエイズ発症を同時に告げられる患者本人にとって悲劇であることはもちろん、こうした状況は「エイズに関する警告はかなり国民に周知されているはず」という、われわれの期待を裏切るものでもある。かつておこなわれたエイズ撲滅キャンペーンの効果がすでに風化しているのではないか、改めて検証する時期に来ているのかも知れない。

## E. 結論

新潟県におけるHIV感染は全国的にみてきわめて低いレベルにあり、2010年に解析をおこなった新規検体数も4件（MSM3件、女性異性間感染1件）にとどまった。あらたに検出されたウイルスも、従来通り県内で分離された既知のウイルスとの遺伝的近縁度は低く、県域内での本格的な感染連鎖は未だ起きていないとみられる。

MSM 1例にNNRTIに対し軽度の耐性を与える変異V179Dが見いだされた。MSM症例にこうした弱い耐性変異が検出される例は最近増加しており、その頻度は35%にもなっている。

本調査開始時から現在まで、県内の病院から解析を依頼される新規症例を比較すると、免疫不全がより進んだ状態にいたって患者が来院する傾向がしだいに強まっている。治療面からも、また今後の感染動向を予測する上でも、懸念すべき現象と思われる。

## F. 健康危険情報

特記事項なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

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

### 2. 学会発表

#### 口頭発表

- 1) 池 睦美、HIV患者の血液透析療法における管理、(第37回東北腎不全研究会2010.8.28～29)、(第11回北関東・甲信越HIV感染症症例検討会2011.1.29において川口 令により一部改変して発表)
- 2) 田邊 嘉也、「Trends in Niigata area epidemic of

HIV-1 infection and transmitted Drug-resistant HIV-1 of newly diagnosed Patients」、(Japan-Russia International Workshop 2010.5.29)、透析室の感染症対策 ～その重要性と特殊性～、(第37回東北腎不全研究会2010.8.28～29)

- 3) 三船 大樹、免疫再構築症候群として発症したCMV脳室炎の1例、(新潟日和見感染症研究会2010.9.22)
- 4) 須貝恵、拠点病院診療案内の作成効果の検討(その2)、～拠点病院の回答から今後の課題へ～、(第24回日本エイズ学会学術集会・総会2010.1.26～28)

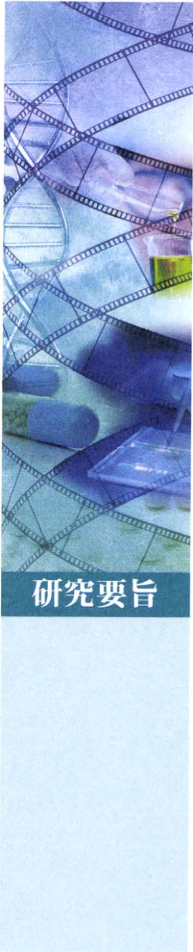
## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

### 1. 特許取得

### 2. 実用新案登録

### 3. その他

特になし



## 東北ブロックにおける薬剤耐性HIVの動向調査研究

研究分担者 **伊藤 俊広** (独)国立病院機構仙台医療センター血液内科 医長  
 研究協力者 **山本 善彦** (独)国立病院機構仙台医療センター 内科医師  
**佐々木 悟** (独)国立病院機構仙台医療センター 臨床検査技師  
**葛西 淳** (独)国立病院機構仙台医療センター 臨床検査技師

### 研究要旨

平成21年度(平成21年12月～平成22年3月)及び平成22年度(平成22年4月～11月まで)「国内で流行するHIV遺伝子型および薬剤耐性株の動向把握と治療方法の確立に関する研究」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、検査可能であった新規感染者4症例中3例で耐性変異が検出された。すべてサブタイプBで、NRT領域にD67D/N(2例)、L74I/L(1例)、NNRT領域にV90I(1例)、プロテアーゼ領域にA71V(2例)、L10I/L(1例)、I15L(1例)A71I/V(1例)、I62V(2例)変異が存在していた。現時点で初期治療の薬剤選択に混乱はないが、今後HIV感染者の増加に伴い、新規感染者における治療薬を選択する上でHIVの薬剤耐性変異の検出は重要である。

### A. 研究目的

慢性疾患へと変換を遂げつつあるHIV感染症の対し今後も継続的に問題とすべきものの一つに薬剤耐性ウイルスの出現がある。HIVそれ自体が持つ易変異性と治療を受ける患者側の薬剤服用アドヒアランスがその出現に大きな影響力を持つが、感染拡大と疾患コントロールの観点から耐性ウイルスの発生動向の把握は重要であり、現状把握が必要である。耐性ウイルスをサーベイすることにより適切な初期治療の選択や新薬の開発、また同系の耐性ウイルスの拡がりを把握することにより感染集団の同定などに役立つ可能性がある。

国内で流行するHIV遺伝子型および薬剤耐性株の動向を把握する上で新規感染者における薬剤耐性HIVの発生動向を把握し治療法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と動向を知り、今後期待される新規薬剤による治療法を確立することであり、さらに治療法の評価やHIV基礎研究に役立てれるよ

うな体制を確立することである。今回は平成21年12月～平成22年11月の症例分について報告する。

### B. 研究方法

平成21年12月～平成22年11月の期間に仙台医療センターにおける新規HIV感染者から分離された臨床株(HIV)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

仙台医療センターにおける平成22年11月末日までのHIV/AIDS感染者の累計は195名である。東北全体での平成22年9月までの累計では404名で、全国と同様に増加している。平成21年12月～平成22年11月の期間に当院を受診したHIV感染者は8例で、すべて性的接触による感染であり、この内治療歴のないHIV感染者で本研究の対象となった症例は4例(すべて日本人男性MSM)であった。年齢は32歳から43歳で平均37.6歳、中央値は38歳でAIDS発症2例、キャリアー2名。耐性検査時のHIVウイルス量は $1.1 \times 10^3 \sim > 1.0 \times 10^7$ コピー/ml、CD4は44～630/ $\mu$ l。ウイルスのsubtypeはすべてBであった。

耐性変異は4例中3例に認められた。すなわち、NRT領域にD67D/N(2例)、L74I/L(1例)、NNRT領域にV90I(1例)、プロテアーゼ領域にA71V(2例)、L10I/L(1例)、I15L(1例)、A71I/V(1例)、I62V(2例)の変異が存在していた。

## 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(HAART)開始時に耐性ウイルスの存在の有無を確認することはその後のさらなる耐性出現を防ぐ上で重要である。近年耐性克服を考慮した新薬が開発され、臨床に供されるようになってきており、これら薬剤に対する耐性ウイルスの出現にも注意を払う必要がある。現時点において実際の診療上、抗HIV療法の薬剤選択に大きな混乱は生じていないが、複数の変異の関連からも薬剤耐性が生じることを考えれば、耐性変異の情報は薬剤選択上重要であり今後もサーベイが必要である。

## E. 健康危険情報

なし

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Junko Hattori, Teiichiro Shiino, Hiroyuki Gatanaga, Shigeru Yoshida, Dai Watanabe, Rumi Minami, Kenji Sadamasu, Makiko Kondo, Haruyo Mori, Mikio Ueda, Masao Tateyama, Atsuhisa Ueda, Shingo Kato, Toshihiro Ito, Masayasu Oie, Noboru Takata, Tsunefusa Hayashida, Mami Nagashima, Masakazu Matsuda, Shiro Ibe, Yasuo Ota, Satoru

Sasaki, Yoshiaki Ishigatsubo, Yoshinari Tanabe, Ichiro Koga, Yoko Kojima, Masahiro Yamamoto, Jiro Fujita, Yoshiyuki Yokomaku, Takao Koike, Takuma Shirasaka, Shinichi Oka, Wataru Sugiura: Trends in transmitted drug-resistant HIV-1 and demographic characteristics of newly diagnosed patients: Nationwide surveillance from 2003 to 2008 in Japan. *Antiviral Research* 2010(88), 72-79.

- 2) Seiichi Ichikawa, Noriyo Kaneko, Jane Koerner, Satoshi Shiono, Akitomo Shingae, Toshihiro Ito: Survey investigating homo-sexual behaviour among adult males used to estimate the prevalence of HIV and AIDS among men who have sex with men in Japan: *Sexual Health*, in press

## 2. 学会発表

- 1) 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AIDS学会、2010、11月、東京
- 2) 菊池 嘉、遠藤知之、南 留美、伊藤俊広、田邊嘉也、上田幹夫、横幕能行、渡邊 大、藤井輝久、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2009。第24回日本AIDS学会、2010、11月、東京
- 3) 佐藤麻希、佐藤ともみ、山中博之、諏江 裕、武藤 愛、伊藤ひとみ、山本善彦、佐藤 功、伊藤俊広、抗HIV療法(ART)導入患者における他科受診時の処方薬と問題点について。第24回日本AIDS学会、2010、11月、東京
- 4) 山本善彦、塚本琢也、佐藤 功、伊藤俊広：東北ブロックにおけるエイズ拠点病院間のアクセス条件と、遠距離通院が必要となる地域でのエイズ診療に関する考察。第24回日本AIDS学会、2010、11月、東京

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許出願

なし

### 2. 実用新案特許

なし

### 3. その他

なし



## 北陸ブロックにおける薬剤耐性HIVの動向調査研究

研究分担者 上田 幹夫 石川県立中央病院血液病治療部 部長

研究協力者 古谷 智慧 (財)エイズ予防財団 リサーチ・レジデント

### 研究要旨

北陸ブロックにおける新規感染者の薬剤耐性HIV-1伝播の現状を把握するために、2010年新規に診断された6例のHIV感染者に対して薬剤耐性検査とサブタイプ解析を行った。その結果、プロテアーゼ領域では一次変異は認められず、逆転写酵素領域でも高度耐性変異は認められなかった。しかし、プロテアーゼ領域の二次変異は全例で検出され、逆転写酵素領域ではV75Iが1例に検出された。サブタイプ解析では、5例がB、1例がAEであった。抗HIV療法中の人々が年々増加している中、新規にHIV感染が診断される人も増えており、新たな耐性HIVの出現やその伝播が危惧される。

### A. 研究目的

本邦における薬剤耐性HIV-1伝播の状況を把握する研究の分担として、北陸ブロックにおける新規あるいは未治療慢性HIV-1患者における薬剤耐性変異の状況を調査し、薬剤耐性HIVの発生动向を把握する。同時にサブタイプ解析を行い、新規診断患者のHIV-1サブタイプの頻度についても調査する。

### B. 研究方法

薬剤耐性検査とサブタイプ解析は、初診時または服薬開始前の検体を用いて行った。検査の同意を得た後、検査は外部の研究機関と検査会社に委託した。

### (倫理面への配慮)

患者には担当医から説明を行い、同意を得た後、検査を行った。また、サンプルの患者情報は記号化し、プライバシーの保護に配慮した。なお、本研究は石川県立中央病院倫理委員会にて承認されている。

### C. 研究結果

当院における2010年1月から12月までのHIV感染者・AIDS患者での新規登録は10例である。その中で耐性検査を行った症例は6例で、問診と免疫学的検査データからは、感染初期と判断される例はなかった。

表1 薬剤耐性変異の解析結果 (2010年)

No.	Pro	RT	II	サブタイプ*
1	L10I, I62V, A71T, V77I, I93L	—	—	B
2	A71V, I93L	—	—	B
3	I15V, K20R, M36I, H69K, L89M	V75I	—	AE
4	K20R, L63P, A71T, V77I, I93L	—	—	B
5	I13V, I93L	—	NT	B
6	L63P, H69N, V77I	—	—	B



耐性検査の結果、プロテアーゼ領域では6例全例に耐性に関与する変異が確認されたが、全て二次変異であった(表1)。それらの変異の中で頻度の多いものとしてはI93L(4例)、V77IとA71V/T(それぞれ3例)であった(表1)。逆転写酵素領域では、V75Iが1例に観察された。インテグラーゼ領域は、検索した5例で耐性変異は検出できなかった。サブタイプ解析では、サブタイプBが5例(83.3%)、AEが1例(16.7%)であった。表2は北陸ブロックにおける抗HIV療法(ART)の状況を年次ごとに示す。ARTを受けている患者の実数も比率も年々増加している。またアンケートによる調査ではあるが、北陸ブロックの拠点病院においては、今までに6例のウイルス学的治療失敗例を経験した。

#### D. 考察

2010年、調査研究として新規にエントリーしたのは6例であった。逆転写酵素領域でmulti-NRT耐性を獲得するとされる151 complexを構成するV75Iが1例に検出された。ここ数年の間観察されていたT215Y or Fのリバートantは、2010年は1例も観察されなかった。プロテアーゼ領域では一次変異はなかったが、二次変異はI93L、V77I、A71V/Tをはじめとして多くの種類が検出された。ARTを受けている患者数が増加し、ウイルス学的治療失敗例も少なからず存在していることより、今後北陸においても耐性HIVの出現や伝播が危惧される。

#### E. 結論

2010年、新規にHIV感染が診断され登録された10例のうち6例に対して耐性検査を行い、プロテアーゼ領域では一次変異は0例、二次変異は全例に認められた。逆転写酵素領域では耐性に寄与するとされるV75Iを1例に認めた。インテグラーゼ領域では変異はみられなかった。5例がサブタイプBで1例がAEであった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 原著論文

###### 欧文

- 1) Junko Hattori, Teiichiro Shiino, Hiroyuki Gatanaga, Shigeru Yoshida, Dai Watanabe, Rumi Minami, Kenji Sadamasu, Mikiko Kondo, Haruyo Mori, Mikio Ueda, Masao Tateyama, Atsuhisa Ueda, Shingo Kato, Toshihiro Ito, Masayasu Oie, Noboru Takata, Tsunefusa Hayashida, Mami Nagashima, Masakazu Matsuda, Shiro Ibe, Yasuo Ota, Satoru Sasaki, Yoshiaki Ishigatsubo, Yoshinari Tanabe, Ichiro Koga, Yoko Kojima, Masahiro Yamamoto, Jiro Fujita, Yoshiyuki Yokomaku, Takao Koike, Takuma Shirasaka, Shinichi Oka, Wataru Sugiura: Trends in transmitted drug-resistant HIV-1 and demographic characteristics of newly diagnosed patients: Nationwide surveillance from 2003 to 2008 in Japan. *Antiviral Research* 88: 72-79, 2010.

###### 和文

- 1) 松井祥子、安村敏、喜多博文、北啓一朗、鳴河宗聡、上田幹夫：第10回日本内科学会専門医部会北陸支部オープンカンファレンスまとめ 1ヵ月間に呼吸困難が進行した中年男性. *日本内科学会誌* 99 (7) : 164-171, 2010.

##### 2. 口頭発表

###### 海外

特になし

###### 国内

- 1) 宮田勝、高木純一郎、名倉功、坂下英明、池田正一：エイズ北陸ブロック拠点病院における歯科のHIV診療体制整備の取り組みの現状と問題点. 第64回日本口腔外科学会学術集会、2010.6.24、札幌.
- 2) 上田幹夫、小谷岳春、山田三枝子、辻典子、北志保里、高山次代、山下美津江、下川千賀子、

表2 抗HIV治療(ART)中の患者数の推移(北陸)

	2006年	2007年	2008年	2009年	2010年
通院患者数	84	82	102	105	120
ART中(人)	49	58	75	90	99
ART(%)	58.3	70.7	73.5	85.7	82.5

ウイルス学的治療失敗は6例(今までの累積)

- 安田明子：北陸ブロックでのHIV/AIDS出前研修7年を振り返って。日本エイズ学会、2010年、東京。
- 3) 宮田勝、高木純一郎、能島初美、山本裕佳、山田三枝子、辻典子、下川千賀子、上田幹夫、池田正一、前田憲昭：ブロック拠点病院におけるHIV歯科医療体制整備のための研修会の現状と課題。日本エイズ学会、2010年、東京。
  - 4) 下川千賀子、安田明子、表志穂、亀井勝一郎、山田三枝子、上田幹夫：当院における抗HIV薬レジメンの変更状況について。日本エイズ学会、2010年、東京。
  - 5) 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。日本エイズ学会、2010年、東京。
  - 6) 菊池嘉、遠藤知之、南留美、伊藤俊広、田邊嘉也、上田幹夫、横幕能行、渡邊大、藤井輝久、宮城島拓人、健山正男、中村仁美：他施設共同疫学調査におけるHAARTの有効率2009。日本エイズ学会、2010年、東京。
  - 7) 能島初美、前田憲昭、溝部潤子、中川祐美子、中野恵美子、三村文子、藤本千夏、趙春麗、山本裕佳：HIV協力歯科診療所に勤務する歯科衛生士の意識調査。日本エイズ学会、2010年、東京。

## H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

該当なし



## 首都圏近郊における薬剤耐性HIVの動向調査研究

研究分担者 内田 和江 埼玉県衛生研究所ウイルス担当 専門研究員  
 研究協力者 鈴木 典子<sup>1</sup>、宇野 優香<sup>2</sup>、原 孝<sup>3</sup>、人見 重美<sup>4</sup>、今井 一穂<sup>5</sup>、  
 池ヶ谷 美穂<sup>6</sup>、大沼 正行<sup>7</sup>、畔上 由佳<sup>8</sup>

<sup>1</sup>埼玉県衛生研究所ウイルス担当

<sup>2</sup>さいたま市健康科学研究センター保健科学科

<sup>3</sup>茨城県衛生研究所ウイルス部 <sup>4</sup>筑波大学大学院人間総合科学研究科

<sup>5</sup>栃木県保健環境センター微生物部 <sup>6</sup>宇都宮市衛生環境試験所微生物担当

<sup>7</sup>山梨県衛生環境研究所微生物部 <sup>8</sup>長野県環境保全研究所感染症部

### 研究要旨

東京やその近郊の都市では、全国の他の地域と比較し、HIV感染者及びAIDS患者の10万人当たりの報告数が多い。本分担研究は、埼玉県、茨城県、栃木県、山梨県、長野県で2009年から2010年に新たに感染が確認された保健所検査受診例11検体及びエイズ拠点病院の未治療例4検体、合計15検体についてHIVの遺伝子型（サブタイプ）及び薬剤耐性変異を調査した。サブタイプ調査の結果、サブタイプBが13検体（86.6%）と最も多く検出され、残る2検体（13.4%）はCRF01\_AEであった。薬剤耐性変異の調査では、プロテアーゼ領域においては15検体中14検体（93.3%）に1ヶ所以上のMinor mutationが、また、逆転写酵素領域及びインテグラーゼ領域においてはそれぞれ1検体に薬剤耐性変異が検出された。

### A. 研究目的

HIV感染の広がり防止及び効果的な治療法の確立のためには、国内に流行するHIVの疫学及び薬剤耐性株の動向を把握することが欠かせない。首都圏とその近郊都市は、人口も多く、埼玉県、茨城県をはじめとし、HIV感染者及びAIDS患者の10万人当たり報告数が比較的多い地域が存在するため、この地域の動向を把握することは重要である。本研究では、国内におけるHIVの疫学及び薬剤耐性変異株の動向に関する調査研究の一環として、首都圏とその近郊を対象地域とし、新規または未治療の感染者から検出されたHIV株について遺伝子型と薬剤耐性変異の動向を把握することを目的とした。

### B. 研究方法

#### 1. 調査対象

2009年から2010年に埼玉県、茨城県、栃木県、山梨県、長野県の保健所及び拠点病院でのHIV検査でHIV抗体陽性と判定された新規または未治療HIV感染者15名からの血清または血漿検体（2009年：拠点病院2検体、2010年：保健所11検体、拠点病院2検体）を供試した。

#### 2. 方法

##### 1) HIVサブタイピング

各検体200 $\mu$ lからウイルスRNAを抽出し、RT-nested PCR法によりプロテアーゼ（PR）、逆転写酵素（RT）、エンベロープ（env）及びgag領域の塩基配列を増幅した。得られた増幅DNAを精製し、BigDye Terminators v1.1 Cycle sequencing Kit（Applied Biosystems）を用いてシークエンス反応を行い、ABI PRISM 310 Genetic Analyzerにより解析した。PCR及びシークエンス反応のためのプライマーは、国立感染症研究所病原体検出マニュアルに記載されたものを使用した。解析により得られたPR/RT、env、gag領域の塩基配列について、スタンフォード大学のHIV Drug Resistance Database（<http://hivdb.stanford.edu/>）及びロスアラモス国立研究所のHIV Databases（<http://www.hiv.lanl.gov/content/index>）のプログラムを使用し、サブタイピングを実施した。

##### 2) 薬剤耐性変異の解析

PR、RT領域の他、インテグラーゼ（IN）領域の塩基配列を上記1）と同様の方法で解析した。得られたPR、RT、IN領域の塩基配列を遺伝子解析ソフトGENETYX ver 10（株式会社ゼネティックス）を用いてアミノ酸配列へ翻訳し、PR領域の1～99番目、

RT領域の1～240番目及びIN領域の1～288番目のアミノ酸について、IAS-USA (2009 December)の報告及びShafer's criteriaに基づき薬剤耐性変異の有無を判定した。

### 3) BED assayによる感染時期の推定

調査対象者のHIV感染が感染初期のものであるかどうかを推定するため、Aware BED EIA HIV-1 Incidence Test (CALYPTE社 USA) を用いBED assayを実施した。検査はキットの添付説明書に従い実施し、ODn<0.8となったものを感染初期 (recent: 感染後155日以内) とした。

### 4) B型肝炎s抗原 (HBs抗原) 及びC型肝炎抗体 (HCV抗体) 検査

肝炎治療薬のHIV薬剤耐性変異の影響の有無についての検討のため、HBs抗原及びHCV抗体の有無を検査した。HBs抗原の検査はエスプラインHBs Ag (富士レビオ株式会社)、HCV抗体はHCV Ab PAテストII (オーソ社) を用い添付説明書に従い実施した。

### (倫理面への配慮)

本研究は、埼玉県衛生研究所倫理審査委員会の承認を受けて実施した。保健所で採取された検体は、匿名で検査受付された。保健所及び拠点病院から検体及び臨床情報の提供を受けるに当たっては、すべ

て匿名化し個人が特定できないようにする等、研究対象者に不利益が生じないように十分に配慮した。

## C. 研究結果

### 1. HIVサブタイプ

調査対象15検体のHIVサブタイピングの結果について、陽性確認年別、性別にBED assayの結果と併せて表1に示した。PR/RT領域の塩基配列に基づき解析した15検体のサブタイプは、サブタイプBが13検体 (86.6%) と最も多く、CRF01\_AEが2検体 (13.3%) であった。env領域及びgag領域の配列に基づくサブタイプは、PR/RT領域に基づくものと全ての検体で一致した。

これら15検体の感染者の国籍は1例を除き全て日本であった。

男性感染者14例の感染経路は、サブタイプBの12例 (2009年2例、2010年10例) では10例で判明し、その内訳は6例が同性間、2例が異性間、残る2例が同/異性間未確定の性的接触であった。CRF01\_AEの2例はいずれも異性間性的接触であった (表2)。

### 2. 薬剤耐性変異の解析

PR領域においては、本研究の15検体ではMajor mutationは検出されなかった。一方、Minor mutation

表1 HIVサブタイプと推定感染時期

陽性確認年	性別		Subtype		BED assay	
			B	CRF 01_AE	recent	not recent
2009	男性	2	2		1	1
	女性	0				
2010	男性	12 (1)	10 (1)	2	4 (1)	8
	女性	1	1			1

( )内の数字は国籍不明感染例 (再掲)

表2 男性感染者のサブタイプ別感染経路

感染経路	Subtype B	CRF 01_AE	TOTAL
同性間性的接触	6 (* recent: 3)		6
異性間性的接触	2	2	4
同/異性間未確定性的接触	2		2
不明	2 (* recent: 2)		2

\* BED assayでrecentの症例数