

C. 研究結果

1) 名古屋医療センターにおける新規 HIV/AIDS 診断症例

名古屋医療センターを新規に受診した 133 例中、他施設からの転院例を除く 115 例の HIV-1 感染症例が新規 HIV/AIDS 診断症例として登録された。この内 108 例の未治療症例について薬剤耐性検査、サブタイプ解析を施行した。108 症例の内訳は、全例男性、日本人が 91.7% (99 症例) とそのほとんどが日本人男性であった。推定される感染経路は男性同性間の性接触による感染が 50.0% (54 症例) と最も高く、不明の 3 症例を除いて全例において性接触による感染であった。しかし、この内 4 例については静注薬物使用を併用しており、はっきりとした感

染経路は断定できなかった。サブタイプ解析の結果、サブタイプ B が 100 症例 (92.6%) と最も多く、non-B においては AE と C がそれぞれ 2 症例、A、AG、D、F がそれぞれ 1 症例という分布を示した。

薬剤耐性変異は 9 症例 (8.3%) から検出された (図 1)。薬剤クラス別の内訳は、プロテアーゼ阻害剤耐性変異が 5 症例 (4.8%、全例 M46I)、核酸系逆転写酵素阻害剤耐性変異が 4 症例 (3.7%、全例 T215 リバタント) であり、非核酸系逆転写酵素阻害剤やインテグラーゼ阻害剤に対する耐性変異は検出されなかった (図 2 (a), 表 1)。

BED アッセイの結果、OD<0.8 を示した症例が 42 例 (38.9%) 認められた。しかしながらこの内、16 例は受診時既に AIDS 症状を発症しており、擬陽性

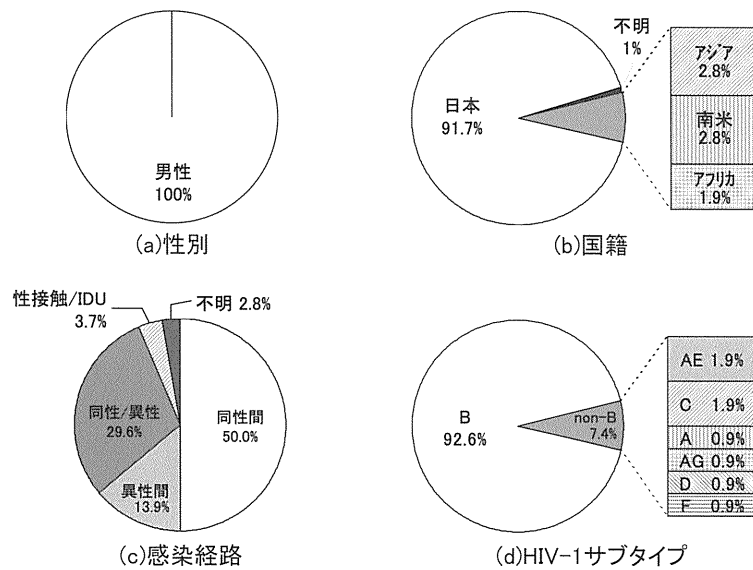


図 1 名古屋医療センターにおける新規 HIV/AIDS 診断症例の背景 (n=108)

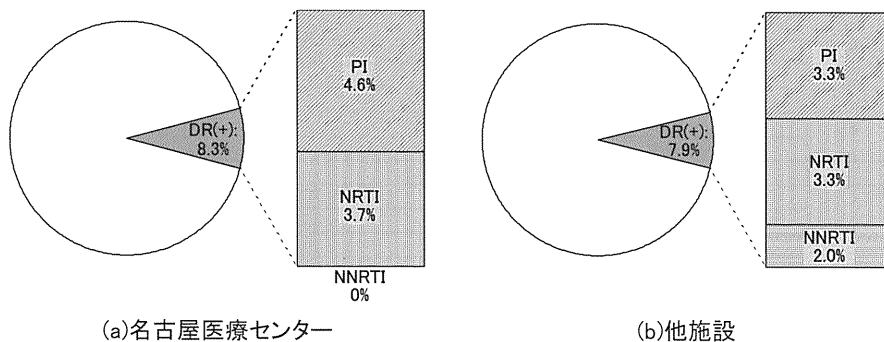


図 2 薬剤耐性 HIV の検出頻度と薬剤クラス別の内訳

の可能性があることから、26 例（24%）が真の陽性、155 日以内の感染症例と推測された。

2) 他施設における新規 HIV/AIDS 診断症例：

平成 23 年度は 31 施設、305 検体について検査依頼があり、その内 152 検体が診断後 1 年以内に受診した新規 HIV/AIDS 診断症例であった。これら症例の 88.8%が日本人、89.5%が男性と大多数を占めた。感染経路は、同性間の性接触による感染が 57.9%、異性間の性接触が 27.6%、同性/異性いずれかの性接触が 5.3%であり、合わせて 90.8%が性接触により感染していた。検査可能であった 151 症例のサブタイプ解析の結果、サブタイプ B が 87.4% (n=132) と大部分を占めた。Non-B サブタイプにつ

いては AE (n=11、7.3%) が高い頻度で検出された他、F が 3 症例、C と G がそれぞれ 2 症例、AG が 1 症例という分布を示し、その内 AE と G は日本人が国内で感染した症例が含まれた (図 3)。

薬剤耐性 HIV-1 は 7.9% (12/151) に認められた。東海ブロックと同様に、T215 リバータント変異 (n=5)、M46I/L 変異 (n=5) が高頻度に検出された。その他には 1 症例ではあるが、非核酸系逆転写酵素阻害剤に耐性を示す K103N が検出された (図 2 (b)、表 1)。

薬剤耐性遺伝子検査の残余検体あった 138 検体について BED アッセイを施行した結果、23.9% (n=33) が recent と判定された。また、臨床医が急性感染を疑った 10 症例については全例 OD<0.8 であり recent

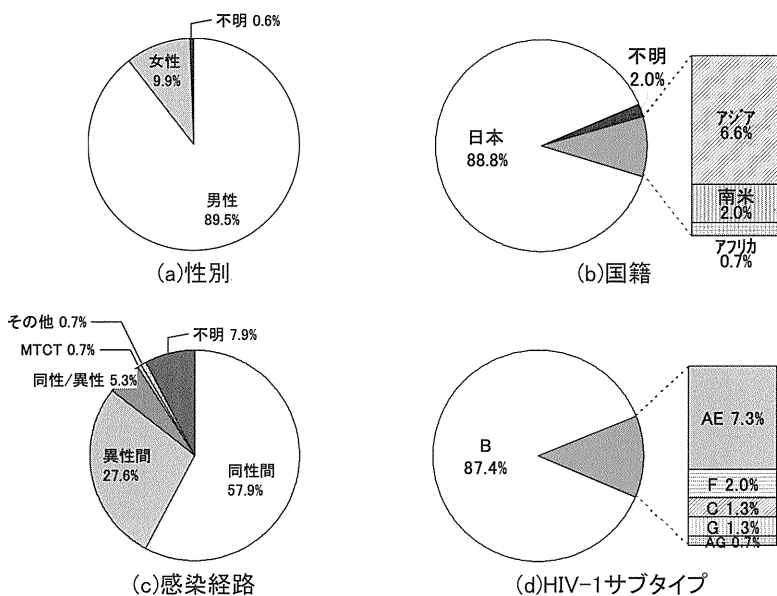


図 3 他施設における新規 HIV/AIDS 診断症例の背景 (n=152)

表 1 検出された薬剤耐性アミノ酸変異

	性別	国籍	感染場所	感染経路	サブタイプ	変異_PR	変異_RT	変異_IN
名古屋医療センター	M	日本	国内	同性間	B	M46I	-	-
	M	日本	国内	同性間	B	M46I	-	-
	M	日本	国内	同性間	B	M46I	-	-
	M	日本	国内	同性/異性	B	M46I	-	-
	M	日本	国内	同性/異性	B	M46I	-	-
	M	日本	国内	同性間	B	-	T215D	-
	M	日本	国内	異性間	B	-	T215E	-
	M	日本	国内	同性/異性	B	-	T215E	-
	M	日本	国内	異性/IDU	B	-	T215C	-
他施設	M	日本	国内	同性間	B	M46I	-	-
	M	日本	国内	同性間	B	M46I	-	-
	M	日本	国内	同性間	B	M46I	-	-
	M	日本	国内	同性間	B	M46I	-	-
	M	日本	国内	不明	AE	M46L	-	-
	M	日本	国内	同性間	B	-	T215C	-
	M	日本	国内	同性間	B	-	T215E	-
	M	日本	不明	同性間	B	-	T215E	-
	M	日本	不明	同性/異性	B	-	T215S	-
	M	日本	国内	同性間	B	-	T215D M230L	-
	M	日本	国内	同性間	B	-	K103N	-
	F	タイ	タイ	その他	AE	-	K101E	-

と判定された。

#### D. 考察および結論

名古屋医療センターにおける新規診断 HIV-1 感染症例の薬剤耐性 HIV-1 検出頻度は 8.3% で、前年 2010 年の 26.0% の約 3 分の 1 に大きく減少したことが明らかとなった。名古屋地域における 2009 年、2008 年のデータを振り返ってみるとそれぞれ 9.6%、13.3% を示しており、各年の増減が著しいことがわかる。この事は観察する集団によってバイアスがかかる事と、薬剤耐性変異 HIV の伝播が幅広く起きている出来事ではなく、特定の集団に限局していることを強く示唆している。また、この事実は薬剤耐性 HIV の動向を把握するためには継続した調査が必要であることを示している。比較的高い頻度で検出された M46I や T215 リバータント変異は現在主に使われている薬剤に対する耐性変異ではなく、従ってこれらの耐性の存在が直ちに個々の症例の治療に影響を及ぼすものではないが、毎年必ず検出されることから、既に流行株として感染が徐々に拡大していることが示唆された。院外検体においても M46I や T215 リバータント変異が比較的高い頻度で検出されていることも、この事実を裏付けていると思われる。また、BED では AIDS 症例を除くと感染後約半年以内に診断される症例が 24% 観察されたが、この頻度を上げていく事が重要であり、そのためにも更なる調査、解析を重ねて実態を明らかにするとともに感染拡大の低減に繋がるよう介入すべき対象を絞りこむのにデータを活用していく事が重要と思われる。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1) 原著論文

- 1) Hirano A, Ikemura K, Takahashi M, Shibata M, Amioka K, Nomura T, Yokomaku Y, Sugiura W. Lack of Correlation Between UGT1A1\*6, \*28 Genotypes, and Plasma Raltegravir Concentrations in Japanese HIV Type 1-Infected Patients. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2011 Nov 9. [Epub ahead of print]
- 2) Revell AD, Wang D, Boyd MA, Emery S, Pozniak AL, De Wolf F, Harrigan R, Montaner JS, Lane C, Larder BA; RDI Study Group\*. The development of an expert system to predict virological response to HIV therapy as part of an online treatment support tool. *AIDS*. 2011 Sep 24;25(15):1855-63. (\* RDI Study Group のメンバーとして参加)

- 3) Yotsumoto M, Shinozawa K, Yamamoto Y, Sugiura W, Miura T, Fukutake K. Mutations to the probe of Cobas TaqMan HIV-1 ver. 1.0 assay causing undetectable viral load in a patient with acute HIV-1 infection. *J Infect Chemother*. 17(6):863-5, 2011
- 4) Yoshida I, Sugiura W, Shibata J, Ren F, Yang Z, Tanaka H. Change of positive selection pressure on HIV-1 envelope gene inferred by early and recent samples. *PLoS One*. 6(4):e18630, 2011.
- 5) Ibe S, Sugiura W. Clinical significance of HIV reverse transcriptase inhibitor-resistant mutations. *Future Microbiol*. 6(3):295-315, 2011.
- 6) Junko Shibata, Wataru Sugiura, Hirotaka Ode, Yasumasa Iwatani, Hironori Sato, Hsinyi Tsang, Masakazu Matsuda Naoki Hasegawa, Fengrong Ren and Hiroshi Tanaka. Within-host co-evolution of Gag P453L and protease D30 N/N88D demonstrates virological advantage in a highly protease inhibitor-exposed HIV-1 case: *Antivir. Res*. 90(1):33-41, 2011.
- 7) Fujisaki S, Yokomaku Y, Shiino T, Koibuchi T, Hattori J, Ibe S, Iwatani Y, Iwamoto A, Shirasaka T, Hamaguchi M, Sugiura W. Outbreak of hepatitis B virus genotype A and transmission of genetic drug resistance in cases coinfecting with HIV-1 in Japan. *J Clin Microbiol*. 49(3):1017-24, 2011.
- 8) 杉浦互：HIV の指向性検査（トロピズムアッセイ）*Confronting HIV* 40:1-3, 2011
- 9) 杉浦互、服部純子：HIV 薬剤耐性変異の動向 2003 ～ 2010 年 病原微生物検出情報 32(10):8-9, 2011

##### 2) 口頭発表

(国際学会)

- 1) Miyazaki N, Fujii T, Iwamoto A, Matsushita S, Sugiura W. Potential of recent antiretroviral treatments in controlling treatment-naive and drug-resistant HIV cases in Japan. *International Workshop on HIV & Hepatitis Virus Drug Resistance and Curative Strategies*. (Mexico) 2011.6
- 2) Sugiura W. Effects of HIV integrase polymorphisms on raltegravir-resistance susceptibility. *6th IAS Conference on HIV Pathogenesis Treatment and Prevention*. (ROME, ITALY) 2011.7
- 3) Hattori J, Shao W, Shigemi U, Hosaka M, Okazaki R, Yokomaku Y, Iwatani Y, Maldarelli F, Sugiura W. Molecular epidemiology of transmitted drug-resistant HIV among newly diagnosed individuals in Japan. *6th International Workshop on HIV Transmission Principles of Intervention* (ROME, ITALY) 2011.7
- 4) Hattori J, Shigemi U, Hosaka M, Okazaki R, Sugiura W. Characteristics of Drug-Resistant HIV-1 Transmission: Analysis of Drug Resistance in Recently and Not-Recently Infected Treatment-

Naive Patients in Japan. XV International Congress of Virology (札幌) 2011.9

- 5) Ibe S, Masaoka T, Yokomaku Y, Iwatani Y, Sugiura W. Identification of novel drug-resistance mutations selected during abacavir+lamivudine+lopinavir/r therapy in HIV-2 CRF01\_AB infection. XV International Congress of Virology (札幌) 2011.9
- 6) Matsuoka K, Masaoka T, Tanabe F, Morishita R, Sawasaki T, Iwatani Y, Sugiura W. Development of in vitro enzymatic method for assessing susceptibility to HIV-1 reverse transcriptase inhibitors using a wheat-germ cell-free translation system. Protein Island Matsuyama International Symposium 2011 (愛媛・松山) 2011.9
- 7) Ibe S, Yokomaku Y, Maejima M, Iwatani Y, Sugiura W. Drug-resistance profiles of HIV-2 CRF01\_AB-infected case during abacavir + lamivudine+lopinavir/r therapy. 6th German-Japanese HIV Symposium (Bochum, Germany) 2011, 10
- 8) Suzuki K, Ode H, Fujino M, Kimura Y, Masaoka T, Hattori J, Yokomaku Y, Iwatani Y, Suzuki A, Watanabe N, Sugiura W. Enzymatic and Structural Analyses of DRV-resistant HIV-1 Protease. The 12th SADR (Hershey, Pennsylvania, USA) 2011.11

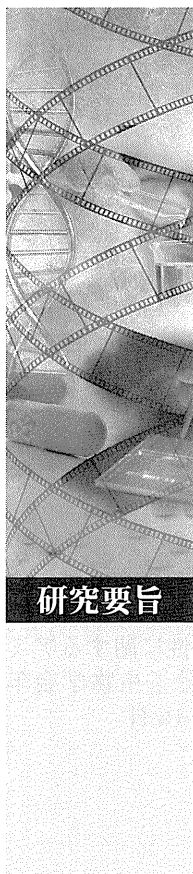
#### (国内学会)

- 1) 伊部史朗、横幕能行、服部純子、杉浦 互：抗レトロウイルス治療中の HIV-2CRF01\_AB 感染症例に認めた薬剤耐性変異 第 85 回日本感染症学会総会 (東京) 2011 年 4 月
- 2) 今村淳治、横幕能行、服部純子、岩谷靖雅、杉浦 互：新規 HIV/AIDS 診断症例におけるトロピズムに関する検討 第 85 回日本感染症学会総会 (東京) 2011 年 4 月
- 3) 平野 淳、池村健治、横幕能行、杉浦 互：ラルテグラビル投与に伴う副作用発現並びに遺伝子多型と血中濃度に関する検討 第 85 回日本感染症学会総会 (東京) 2011 年 4 月
- 4) 伊部史朗、正岡崇志、横幕能行、岩谷靖雅、杉浦 互：抗レトロウイルス療法中の HIV-2CRF01\_AB 感染例に認めた薬剤耐性変異 第 13 回白馬シンポジウム in 札幌—最先端のエイズ研究を徹底討論する— (札幌) 2011 年 5 月
- 5) 岩谷 靖雅：HIV の逆転写・複製機構と APOBEC3 による抑制機序 第 13 回白馬シンポジウム in 札幌—最先端のエイズ研究を徹底討論する— (札幌) 2011 年 5 月
- 6) 杉浦 互：～難治性疾患の治療にむけて～「HIV/AIDS 治療の現状とこれからの課題」第 3 回富山ライフサイエンスシンポジウム (富山) 2011 年 7 月
- 7) 松永智子、澤崎達也、小島良績、森下了、佐藤裕徳、大出裕高、古川亜矢子、片平正人、杉浦 互、梁 明秀：コムギ無細胞タンパク質合成系を用いた Xenotropic murine leukemia virus-related virus (XMRV) プロテアーゼの解析 日本ヒトプロテオーム機構第 9 回大会 (新潟) 2011 年 7 月
- 8) 横幕能行、鈴木奈緒子、杉浦 互：医療現場における HIV 暴露事故への対策と課題 第 65 回国立病院総合医学会 (岡山) 2011 年 10 月
- 9) 杉浦 互：インテグラーゼ阻害剤の臨床における耐性発現の実際 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会 (東京) 2011 年 11 月 30 日～12 月 2 日
- 10) 杉浦 互：HIV 薬剤耐性検査と耐性 HIV の現状 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会 (東京) 2011 年 11 月 30 日～12 月 2 日
- 11) 北村紳悟、中島雅晶、大出裕高、前島雅美、伊部史朗、横幕能行、渡邊信久、鈴木淳巨、杉浦 互、岩谷 靖雅：HIV-1 Vif 感受性に関する APOBEC3C/F のアミノ酸残基の同定 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会 (東京) 2011 年 11 月 30 日～12 月 2 日
- 12) 伊部史朗、近藤真規子、今村淳治、岩谷靖雅、横幕能行、杉浦 互：ウエスタンブロット法により HIV-1/HIV-2 重複感染が疑われた症例の精査解析 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会 (東京) 2011 年 11 月 30 日～12 月 2 日
- 13) 岩谷靖雅、北村慎吾、前島雅美、伊部史朗、横幕能行、杉浦 互：HIV-1 NC は逆転写開始反応を促進する 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会 (東京) 2011 年 11 月 30 日～12 月 2 日
- 14) 田中勇悦、児 玉晃、西澤雅子、杉浦 互、田中礼子：CXCR4 架橋による CXCR4 および CCR5 親和性 HIV-1 の感染制御 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会 (東京) 2011 年 11 月 30 日～12 月 2 日
- 15) 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、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、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、白坂琢磨、小島洋子、森 治代、中桐逸博、藤井輝久、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：新規 HIV/AIDS 診断症例における薬剤耐性 HIV の動向 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会 (東京) 2011 年 11 月 30 日～12 月 2 日
- 16) 椎野禎一郎、服部純子、湯永博之、吉田 繁、伊藤俊広、上田敦久、近藤真規子、貞升健志、藤井毅、横幕能行、上田幹夫、田邊嘉也、渡邊 大、森 治代、藤井輝久、南 留美、健山正男、杉浦 互、日本薬剤耐性 HIV 調査研究グループ：国内感染集団の大規模塩基配列解析 2: Subtype B の動向と微少系統群の同定 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会 (東京) 2011 年 11 月 30 日～12 月 2 日

- 17) 片野晴隆、横幕能行、菅野隆行、福本 瞳、中山智之、新ヶ江章友、杉浦 互、市川誠一、安岡 彰：日本人 MSM におけるカポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV/HHV-8) 抗体保有率について 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会 (東京) 2011 年 11 月 30 日～12 月 2 日
- 18) 渡邊綱正、横幕能行、今村淳治、杉浦 互、田中靖人：HBV 新規感染における HIV 重感染の影響についての検討 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会 (東京) 2011 年 11 月 30 日～12 月 2 日
- 19) 吉田 繁、伊部史朗、服部純子、松田昌和、橋本修、岡田清美、和山行正、巽 正志、杉浦 互：HIV 薬剤耐性検査の外部精度管理 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会 (東京) 2011 年 11 月 30 日～12 月 2 日
- 20) 西澤雅子、Johnson Jeffrey、Heneine Walid、杉浦 互：定量 PCR を応用した高感度薬剤耐性検査法による抗 HIV 治療患者からの微量集族薬剤耐性変異検出の試み 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会 (東京) 2011 年 11 月 30 日～12 月 2 日
- 21) 今村淳治、横幕能行、服部純子、岩谷靖雅、杉浦 互：薬剤耐性変異を認めた新規未治療 HIV/AIDS 症例の治療と予後の検討 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会 (東京) 2011 年 11 月 30 日～12 月 2 日
- 22) 柴田雅章、福島直子、高橋昌明、野村敏治、今村淳治、横幕能行、杉浦 互：リトナビルソフトカプセルから錠剤への切り替えに伴うダルナビル血中濃度の変化に関する検討 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会 (東京) 2011 年 11 月 30 日～12 月 2 日
- 23) 大久保奈美、高橋昌明、木下枝里、柴田雅章、福島直子、野村敏治、泉田真生、今村淳治、横幕能行、杉浦 互：抗結核薬リファンピシンが中止となった患者のラルグラビル (RAL) の血中濃度推移をみた一症例 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会 (東京) 2011 年 11 月 30 日～12 月 2 日
- 24) 横幕能行、鬼頭優美子、今村淳治、大出裕高、服部純子、伊部史朗、岩谷靖雅、杉浦 互：HIV プロテアーゼ表現型検査法である VLP ELISA 法の実臨床への応用 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会 (東京) 2011 年 11 月 30 日～12 月 2 日
- 25) 福島直子、柴田雅章、木下枝里、大久保奈美、高橋昌明、野村敏治、横幕能行、杉浦 互：薬剤師のための HIV 研修会開催に関するアンケート調査について 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会 (東京) 2011 年 11 月 30 日～12 月 2 日
- 26) 桑原 健、矢倉裕輝、吉野宗宏、上平朝子、白坂琢磨、杉浦 互：エトラビル、ダルナビル、ラルテグラビルの血中トラフ値と海外データとの比較 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会 (東京) 2011 年 11 月 30 日～12 月 2 日
- 27) 丸山笑里佳、横幕能行、松岡亜由子、服部純子、杉浦 互：服薬アドヒアランスの低さに関連する要因の検討 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会 (東京) 2011 年 11 月 30 日～12 月 2 日
- 28) 松下修三、杉浦 互：「マラビロク、どう使う？」第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会 (東京) 2011 年 11 月 30 日～12 月 2 日
- 29) Matsuoka K, Masaoka T, Tanabe F, Morishita R, Sawasaki T, Iwatani Y, Sugiura W. Development of in vitro enzymatic method for assessing susceptibility to HIV-1 reverse transcriptase inhibitors using a wheat-germ cell-free translation system. 第 34 回日本分子生物学会年会 (横浜) 2011 年 12 月 13 日～16 日
- 30) 北村紳悟、中島雅晶、大出裕高、前島雅美、伊部史朗、横幕能行、渡邊信久、鈴木淳巨、杉浦 互、岩谷靖雅：Structure-Guided Mutagenesis を用いた APOBEC3C/F の HIV-1 Vif 感受性に関するアミノ酸残基の同定 第 34 回日本分子生物学会年会 (横浜) 2011 年 12 月 13 日～16 日

## G. 知的所有権の出願・取得状況

該当なし



## 研究要旨

# 横浜及び近郊における薬剤耐性 HIV の動向調査研究

研究分担者 石ヶ坪 良明 横浜市立大学大学院医学研究科病態免疫制御内科 教授  
 研究協力者 上田 敦久 横浜市立大学附属病院リウマチ・血液・感染症内科

神奈川県における HIV/AIDS 診療の実態を把握するため平成 23 年度 1 ～ 12 月に当院初診の新規未治療感染患者 21 名を対象に薬剤耐性検査と BED アッセイを継続して行った。最近の感染を疑う ODn<0.8 に該当する患者は 7 名おられ、うち 4 名は初期 HIV 感染であった。耐性検査は 17 名になされ T215E, M46L の変異をそれぞれ 1 名認めた。耐性ウイルスの検出率と ODn<0.8 の比率は最近の 5 年間で大きな変化を示していない。

## A. 研究目的

当院診療圏（横浜市南部・三浦湘南地区）における HIV 感染の動向把握のために 5 年前より施行している新規未治療感染患者の薬剤耐性検査と BED アッセイを継続して行った。

### （倫理面への配慮）

サンプリングは採血のみであり、多くは他の検査項目と一緒にされた。薬剤耐性検査の解析結果は、治療開始時の薬剤選択において多に有用であり、不利益な点はない。BED アッセイは患者の要請に基づき通知するが、偽陽性や偽陰性の頻度が高いこと同時に知らせ、また診療方針の決定には影響しない。情報の扱いには細心の注意が払われる。施設から出る情報は匿名化されたものを用い、個人を特定する情報の流出はない。本解析は当院の倫理委員会で承認されており、これに基づき研究の目的、研究に協力いただいたときの利益と不利益、参加の方法と内容、研究調査の適切な運営と情報の保護、研究成果の公表、協力して頂くことを説明し、同意のもとに行われた。

## B. 研究方法

薬剤耐性検査および BED アッセイ； 2011 年度

に当院を新規感染患者として受診した 21 名に研究の内容に同意を得た後に薬剤耐性検査および BED アッセイを施行した。薬剤耐性検査は国立感染症研究所および国立名古屋医療センターに検査を依頼、BED アッセイは calypte® HIV-1 BED incidence EIA キット（Calypte Biochemical Co., Rockville, MD）を用いて調べた。

## C. 研究結果

### 薬剤耐性検査および BED アッセイ

当院を初診した HIV 感染患者数を年度別に図 1 に示す。最近の 5 年間は約 25 名前後と横ばいとなっている。新規に HIV 感染が判明した患者数は AIDS 発症例と非発症例を併せ、2007 年より昨年の 2011 年までの 5 年間 24 名、16 名、20 名、19 名、21 名と推移している。この新規感染判明患者を対象に研究の同意が得られたものに関し薬剤耐性検査と BED アッセイを継続して行った。耐性ウイルスの検出された割合、BED<0.8 で recent infection が疑われた症例数も図 1 に示した。

2011 年度に当院を新規感染患者として受診した 21 名中 17 名からの検体でプロテアーゼ領域、逆転写酵素領域、インテグラーゼ領域で薬剤耐性検査が行われた。結果を表 1 に示す。臨床上問題となる変

異は prM46L が 1 名に、rtT215E が別の 1 名に確認された以外は認めなかった。17 名中 3 名がサブタイプ AE、であり内訳は東南アジアの方が 2 名、邦人が 1 名であった。サブタイプ G が 1 名でアフリカの方、残り 15 名はサブタイプ B であった。耐性変異の検出率は 11.8% となり、昨年の 10.5% とほぼ同様の結果となっている。BED アッセイは 21 名全員に施行され recent infection を疑う ODn<0.8 の症例は 7 名 30.4% であった。全員エイズ未発症例であり、うち 4 名は診断時のウエスタンブロット法による抗体検査が陰性、もしくは判定保留であり、初期 HIV 感染に矛盾しない症状を伴っていた。

**D. 考察**

薬剤耐性検査はこの 5 年間で当院を初診した新規感染判明患者 100 名中 88 名に施行され、9 名 10.2%

に変異を認めたことになる。増加傾向はなく、例年 1~2 名が耐性変異を示し、2011 年度に検出された T215E, M46L も当診療圏では以前よりしばしば認められる変異である。初期 HIV 感染は一昨年と同様に昨年も 4 名と散見され、増えている印象をもっているが、ODn<0.8 は 33% であり、従来どおりの割合であった。

**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。耐性変異検出率および ODn<0.8 の頻度は当診療圏において大きな変動はみられない。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。

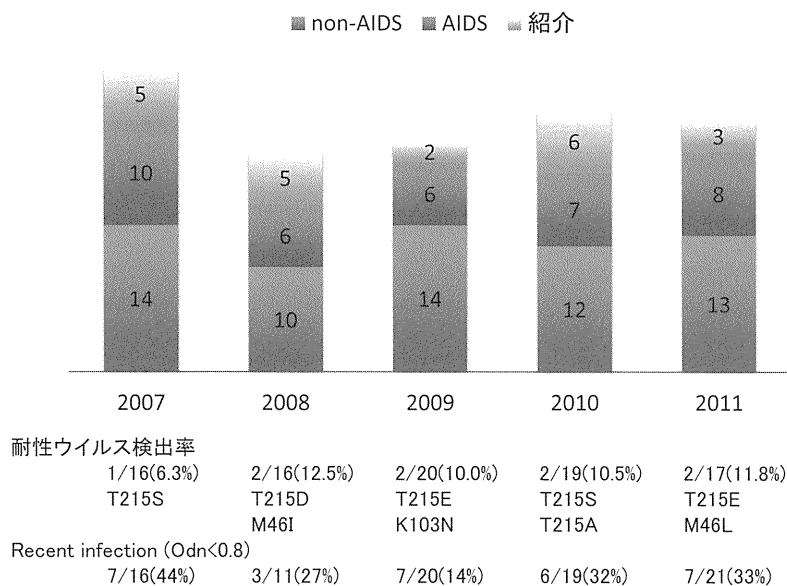


図 1

表 1

症例	感染時期	CD4	VL (c/ml)	ODn
1	不明	520	3 500	0.94
2	不明	750	24 000	1.01
3 ¶	不明	10	99 000	0.85
4	不明	22	730 000	4.74
5 ¶	不明	6	150 000	1.11
6	不明	11	140 000	1.08
7 ¶	不明	25	190 000	1.28
8	不明	248	170 000	0.25
9	不明	533	700	0.40
10 ¶	不明	87	70 000	3.44
11 ¶	不明	15	4 700 000	7.35
12 ¶	不明	13	900 000	1.41
13	不明	194	150 000	1.10
14	初期 HIV 感染	391	1 900 000	0.26
15	初期 HIV 感染	427	15 000	0.24
16	初期 HIV 感染	132	10 000 000	0.25
17	初期 HIV 感染	642	810	0.26
18 ¶	不明	38	110 000	3.60
19	不明	424	2 400	0.37
20	不明	467	8 700	1.98
21 ¶	不明	67	51 000	2.10

¶ AIDS 発症例

表 2

症例	NT	PR	INT	Subtype
1	(-)	15V, 36I	(-)	B
2	(-)	15V	(-)	B
3	(-)	15V, 77I	(-)	B
4	(-)	36I, 46L, 63P, 69K, 89M	(-)	AE
5	(-)	15V, 63P, 77I	(-)	B
6	69N	10I, 20I, 36I, 63P, 69K, 89M	72I	G
7	106I	62V, 63P, 71V, 77I	72I	B
8	(-)	15V, 60E	72I	B
9	(-)	62V, 63P, 71T/V, 77I	72I	B
10	(-)	15V	72I	B
11	(-)	20R, 36I, 69K, 89M	72I	AE
12	(-)	10V, 15V, 36I, 60E	72I	B
13				B
14				B
15	(-)	10F, 62V, 63P, 71V, 77I	72I	B
16	215E	15V	72I	AE
17	69N, 98G	63P	(-)	B
18				
19				
20	98G	L63P	(-)	AE
21	(-)	L10V, 115V, G16E, M36I	72I	B

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

原著論文

なし

口頭発表

国内

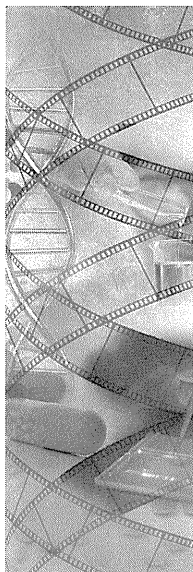
- 1) 上田敦久、竹林早苗、松山奈央、友田安政、松井周一、筑丸 寛、白井 輝、石ヶ坪良明：当院診療圏における医療サービスに関する患者評価、アンケート調査の結果解析（第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会 2011. 11.30 ~ 12.2）
- 2) BED assay にて HIV 初期感染と推定された症例（会議録 / 症例報告）  
渡邊玲光、上田敦久、渡邊俊幸、加藤英明、築地 淳、小林 弘、岳野光洋、石ヶ坪良明（第 69 回神奈川感染症医会 2011. 3. 29）
- 3) HIV 感染症に合併した梅毒性ぶどう膜炎の 1 例  
上田敦久、井畑 淳、高瀬 薫、浜 真麻、上原武晃、加藤英明、築地 淳、石ヶ坪良明  
（第 70 回神奈川感染症医会 2011. 9. 24）

## H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし







## 研究要旨

# 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 仙台医療センター血液内科 医長

研究協力者 葛西 淳 仙台医療センター 臨床検査技師

平成 22 年度（平成 22 年 12 月～平成 23 年 3 月）及び平成 23 年度（平成 23 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 11 症例中 9 例で耐性変異が検出された。すべてサブタイプ B で、NRT 領域では 1 例に V179DE と E138EG が、プロテアーゼ領域では A71V (3 例)、A71T (1 例)、L10I (1 例)、A71AV (1 例)、I62V (7 例)、I64V (1 例) の変異を検出した。現時点で初期治療の薬剤選択に混乱はないが、今後も 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 感染症に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 の状況について調査した。

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 基礎研究に役立てられるような体制を確立することである。今回は平成 22 年

12 月～平成 23 年 11 月の症例分について報告する。

## B. 研究方法

平成 22 年 12 月～平成 23 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 down PCR 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 23 年 11 月末日までの HIV/AIDS 感染者の累計は 215 名である。東北全体での平成 23 年 9 月までの累計では 433 名で、全国と同様に増加している。平成 22 年 12 月～平成 23 年 11 月の期間に当院を初診した HIV 感染者は 20 例で、19 例が性的接触による感染、1 例が血液製剤による感染者であった。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 11 例（すべて日本人男性 MSM）であった。年齢は 22 歳から 51 歳で平均 31.5 歳、中央値は 28 歳で AIDS 発症 2 例、キャリアー 9 例。耐性検査時の HIV ウイルス量は  $1.8 \times 10^4 \sim 1.3 \times 10^6$  コピー/mL、CD4 は 19 ～ 455/ $\mu$ L。ウイルス subtype はすべて B であった。

耐性変異は 11 例中 9 例に認められた。すなわち、NRT 領域に V179DE と E138EG（どちらも NNRT 領域）、プロテアーゼ領域に A71V（3 例）、A71T（1 例）、L10I（1 例）、A71AV（1 例）、I62V（7 例）、I64V（1 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始触（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（インテグラーゼ阻害剤：Raltegravir、NNRTI における Etravirine、PI における Darunavir など）が開発され、すでに臨床に供されており、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) 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 8(1): 123-124, 2011

## 2. 学会発表

- 1) 服部純子、椎野禎一郎、瀧永博之、林田庸紘、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、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、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、藤井輝久、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：新規 HIV/AIDS 診断症例における薬剤耐性 HIV の動向。第 25 回日本 AIDS 学会、2011、11 月、東京
- 2) 椎野禎一郎、服部純子、瀧永博之、吉田 繁、伊藤俊広、上田敦久、近藤真規子、貞升健志、藤井毅、横幕能行、上田幹夫、田邊嘉也、渡邊 大、森治代、藤井輝久、南 留美、健山正男、杉浦 互：国内感染者集団の大規模塩基配列解析 2：Subtype B の動向と微小系統群の同定。第 25 回日本 AIDS 学会、2011、11 月、東京
- 3) 菊池 嘉、遠藤知之、宮城島拓人、伊藤俊広、中村仁美、田邊嘉也、上田幹夫、横幕能行、渡邊 大、藤井輝久、南 留美、健山正男：多施設共同疫学調査における HAART の有効率 2010。第 25 回日本 AIDS 学会、2011、12 月、東京
- 4) 伊藤俊広、山本善彦、塚本琢也、佐藤 功：初診時エイズ発症 HIV 感染症例（いきなりエイズ）に関する検討。第 25 回日本 AIDS 学会、2011、11 月、東京
- 5) 山口 泰、仁木孝行、伊藤俊広、山本善彦、佐藤功：拠点病院における歯科治療の意義－多発カリエス患者とチームアプローチの検討－。第 25 回日本 AIDS 学会、2011、11 月、東京
- 6) 塚本琢也、佐藤麻希、阿部憲介、鈴木智子、武藤愛、伊藤ひとみ、佐藤 功、山本善彦、伊藤俊広：災害発生時における HIV 医療従事者と患者の対応と備えの在り方について：東日本大震災の経験から。第 25 回日本 AIDS 学会、2011、11 月、東京

## G. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

### 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 石川県立中央病院免疫感染症科 部長

研究協力者 古谷 智慧 公益財団法人エイズ予防財団 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、2011 年新規に診断された 12 例の HIV 感染者のうち 11 例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ほとんどの症例で検出され、逆転写酵素領域では V179D、V179I がそれぞれ 1 例に検出された。また、インテグラーゼ領域でも高度耐性変異は認められなかったが、9 例で V72I が検出された。サブタイプ解析では、B が 9 例、AG が 1 例、C が 1 例であった。

### 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 の発生動向を把握する。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で承認されている。

### C. 研究結果

当院における 2011 年 1 月から 12 月までの HIV 感染者・AIDS 患者の新規登録は 12 例である。その中で耐性検査を行った症例は 11 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。

耐性検査の結果、プロテアーゼ領域では 11 例中 10 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 V77I (6 例)、H69K/N と L63P (それぞれ 5 例) であった。逆転写酵素領域では、V179D と V179I がそれぞれ 1 例に観察された。インテグラーゼ領域は 11 例のうち 9 例に V72I が観察された。サブタイプ解析では、サブタイプ B が 9 例 (82%)、AG が 1 例 (9%)、C が 1 例 (9%) であった。

また抗 HIV 療法中の患者 2 例で耐性ウイルスの出現を疑い薬剤耐性検査を行った。その結果を表 2 に示す。症例 1 は、K103N、M184V、L210W、T215Y などの変異が確認され、多くの逆転写酵素阻害剤に耐性と判断された。また、症例 2 は Y181C、M184V の変異が見られ 3TC/FTC、Efavirenz、Nevirapine 耐性と判断され、H69K、L89M 変異から Tipranavir 耐性と判断された。これらの 2 症例は、薬剤の変更により十分なウイルス抑制効果を得た。

### D. 考察

2011 年、未治療者の薬剤耐性調査研究として新規にエントリーしたのは 11 例であった。プロテアー

表 1 新規登録患者における薬剤耐性変異の解析結果 (2011 年)

No.	Pro	RT	IN	サブタイプ
1	L63P, H69N, V77I	—	—	B
2	V11I, K20I, M36I, H69K, A71T, L89I	—	V72I	AG
3	—	—	V72I	B
4	L63P, H69N, A71T, V77I	—	V72I	B
5	I15V	V179D	V72I	B
6	I62V, L63P, H69K, V77I	—	V72I	B
7	L63P, V77I	—	—	B
8	M36I	V179I	V72I	B
9	I15V, I62V, V77I	—	V72I	B
10	M36I, D60E, H69K, L89M, I93L	—	V72I	C
11	I62V, L63P, V77I	—	V72I	B

表 2 ART 患者における薬剤耐性変異の解析結果 (2011 年)

No.	Pro	RT	IN
1	I62V, L63P, V77I, I93L	M41L, E44D, L74I, K103N, M184V, L210W, T215Y	—
2	L10I, G16E, K20I, M36I, L63P, H69K, L89M	Y181C, M184V	—

ゼ領域では一次変異はなかったが、二次変異は L63P、H69K/N、V77I をはじめとして多くの種類が検出された。逆転写酵素領域では、ここ数年の間観察されていた T215Y or F のリバータントは、2010 年に引き続き 2011 年も観察されなかった。昨年報告したように 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には多剤耐性ウイルスも検出されている。今後北陸においても耐性 HIV の出現や伝播が危惧されるので、臨床の現場では服薬アドヒアランスの向上や HIV 二次感染予防の啓発に努めなければならない。

## E. 結論

2011 年、新規に HIV 感染が診断され登録された 12 例のうち 11 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 10 例に認められた。逆転写酵素領域では非核酸系逆転写酵素阻害剤耐性に寄与するとされる V179D と V179I をそれぞれ 1 例に認めた。インテグラーゼ領域では高度耐性変異はみられなかったが、V72I 変異は多数の例でみられた。サブタイプ B が 9 例で、AG、C がそれぞれ 1 例であった。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

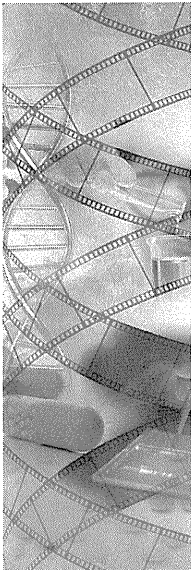
- 1) Miwako Honda, Michiyo Ishisaka, Naoki Ishizuka, Satoshi Kimura, Shinichi Oka, and behalf of Japanese Anti-HIV-1 QD Therapy Study Group : Koji Watanabe, Tamayo Watanabe, Yasuhisa Abe, Ikumi Genka, Haruhito Honda, Hirohisa Yazaki, Junko Tanuma, Kunihisa Tsukada, Hiroyuki Gatanaga, Katsuji Teruya, Yoshimi Kikuchi, Misao Takano, Mikiko Ogata, Mizue Saida, Toshio Naito, Yoshiyuki Yokomaku, Motohiro Hamaguchi, Keiko Ido, Kiyonori Takada, Toshikazu Miyagawa, Shuzo Matsushita, Takeyuki Sato, Masaki Yoshida, Takafumi Tezuka, Yoshiya Tanabe, Isao Sato, Toshihiro Ito, Masahide Horiba, Mieko Yamada, Mikio Ueda, Kazufumi Matsumoto, Takeshi Fujii, Mariko Sano, Shin Kawai, Munehiro Yoshino, Takuma Shirasaka, Satoshi Higasa, Tomoyuki Endo, Norihiro Sato, Katsuya Fujimoto, Rumi Minami, Masahiro Yamamoto, Yukiko Nakajima: Open-Label Randomized Multicenter Selection Study of Once Daily Antiretroviral Treatment Regimen Comparing Ritonavir-Boosted Atazanavir to Efavirenz with Fixed-Dose Abacavir and Lamivudine. Internal Medicine 50: 699-705, 2011.
- 2) 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、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、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、藤井輝久、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：新規 HIV/AIDS 診断症例における薬剤耐性 HIV の動向 日本エイズ学会誌 13：372 2011.
- 3) 椎野禎一郎、服部純子、渦永博之、吉田 繁、伊藤俊広、上田敦久、近藤真規子、貞升健志、藤井毅、横幕能行、上田幹夫、田邊嘉也、渡邊 大、森治代、藤井輝久、南 留美、健山正男、杉浦 互：日本薬剤耐性 HIV 調査研究グループ：国内感染者集団の大規模塩基配列解析 2：SubtypeB の動向と微小系統群の同定 日本エイズ学会誌 13：372 2011.
- 4) 千田昌之、植田孝介、國本雄介、井上正朝、佐藤麻希、山田 徹、斎藤美保、田川尚行、下川千賀子、柴田雅章、吉野宗宏、畝井浩子、松本俊治、松浦清隆、大石裕樹、増田純一、中村真依、西澤優子、三上二郎：HIV/AIDS 中核拠点病院薬剤部（科）における HIV に関するアンケート結果について 日本エイズ学会誌 13：390 2011.
- 5) 山田三枝子、高山次代、武田謙治、小山美紀、大金美和、池田和子、島田 恵、岡 慎一：エイズ拠点病院 HIV 担当看護師に対する支援の検討「HIV/AIDS 看護に関する調査」結果から（その 1）～診療報酬の算定状況から見た看護ケアの状況と課題～ 日本エイズ学会誌 13：393 2011.
- 6) 武田謙治、小山美紀、山田三枝子、高山次代、大金美和、池田和子、島田 恵、岡 慎一：エイズ拠点病院 HIV 担当看護師に対する支援の検討「HIV/AIDS 看護に関する調査」結果から（その 2）～自由回答から見た看護上の課題と支援ニーズ～ 日本エイズ学会誌 13：394 2011.
- 7) 牧野麻由子、古谷野淳子、加藤朋子、塚本琢也、北志保里、松岡亜由子、仲倉高広、森田眞子、安尾利彦、大谷ありさ、藤本恵里、倉谷昂志、宮本哲雄、喜花伸子、辻麻理子、高橋佳子、飯田敏晴、山中京子：HIV カウンセリングの実践内容の明確化の試み 日本エイズ学会誌 13：442 2011.
- 8) 上田幹夫、辻 典子、山田三枝子、北志保里、古谷智慧、高山次代：自発的 HIV 抗体検査数と“いきなりエイズ”について～全国データと北陸の解析から～ 日本エイズ学会誌 13：451 2011.
- 9) 下川千賀子、表 志穂、亀井勝一郎、山田三枝子、辻 典子、上田幹夫：TDF/FTC から ABC/3TC への変更による血清クレアチニンへの影響について 日本エイズ学会誌 13：460 2011.
- 10) 菊池 嘉、遠藤知之、宮城島拓人、伊藤俊広、中村仁美、田邊嘉也、上田幹夫、横幕能行、渡邊 大、藤井輝久、南 留美、健山正男：多施設共同疫学調査における HAART の有効率 2010 日本エイズ学会誌 13：463 2011.
- 11) 山本裕佳、能島初美、宮田 勝、高木純一郎、山田三枝子、辻 典子、上田幹夫、前田憲昭：HIV 診療における北陸地区歯科衛生士の意識調査 日本エイズ学会誌 13：504 2011.
- 12) 辻 典子、田村恵子、鈴木智子、須貝 恵、小塚雅子、井内亜紀子、濱本京子、吉用 緑、山本政弘：エイズ拠点病院から地域医療機関への患者紹介の現状 その 1～拠点病院から一般病院への紹介～ 日本エイズ学会誌 13：518 2011.
- 13) 吉用 緑、田村恵子、鈴木智子、須貝 恵、辻 典子、小塚雅子、井内亜紀子、濱本京子、山本政弘：エイズ拠点病院から地域医療機関への患者紹介の現状 その 2～拠点病院から診療所/クリニックへの紹介～ 日本エイズ学会誌 13：518 2011.
- 14) 表 志穂、下川千賀子、亀井勝一郎、山田三枝子、辻 典子、上田幹夫：院外処方せんの発行促進へ向けた取り組み 日本エイズ学会誌 13：519 2011.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

該当なし





## 研究要旨

# 免疫制御が HIV 流行株および耐性獲得に及ぼす影響

研究分担者 上野 貴将 熊本大学エイズ学研究センター 准教授

本邦で流行している HIV 株に、ヒト免疫系の選択圧がどのように影響しているか、長期的な視点で解析することを目的としている。本年度は、免疫学的な影響を解析する方法論の確立とともに、HIV 蛋白質の中で最も変異性の高い Vpu を例として、本邦での特徴と、MHC 免疫制御の影響を解析した。240 名の HIV 感染者の血漿ウイルスから vpu 遺伝子を増幅して、遺伝子配列を解析した。その結果、本邦の vpu 遺伝子は、他の地域と同様、変異性（多型性）が著しく高かった。しかしながら、そのほとんどの変異は感染者の HLA クラス I アリルとの関連が見られなかったことから、Vpu の多型性に細胞性免疫応答は大きく寄与しないと考えられた。HIV 変異と感染者の HLA クラス I アリルとの相関を解析する系を確立できたので、今後は検体数を増やして精度を高めるとともに、HIV 遺伝子の他の領域に解析を広げて行きたい。

## A. 研究目的

本研究は、本邦で流行している HIV 株に、ヒト免疫系の選択圧がどのように影響しているか、薬剤の選択圧とどのような関係にあるか、長期的な視点で解析することを目的としている。本年度は、免疫学的な影響を解析する方法論の確立とともに、HIV 蛋白質の中で最も変異性の高い Vpu を例として、本邦での特徴と、MHC 免疫制御の影響を解析した。

## B. 研究方法

薬剤治療経験のない慢性感染期の HIV 感染者 240 名から提供された血漿サンプルを用いて（国立国際医療センター・岡先生および瀧永先生の協力の下）、ウイルス RNA を調製した。RT-PCR 法により、vpu 遺伝子の特異的に増幅したのち、ダイレクトシーケンス法によって遺伝子配列を解析した。その後、HXB2 配列に対してアラインメントを行い、系統樹解析や、感染者の HLA クラス I アリルとの相関を統計学的手法により解析した。

### （倫理面への配慮）

HIV 感染者から供与いただいた検体を用いた研究

に関しては、関連する機関（熊本大学および国立国際医療研究センター）の倫理審査会の審議を受け、承認を得ている。提供者の文書による承諾と個人情報保護に万全を期すことを含め、承認を受けた研究計画に厳密にしたがって遂行した。

## C. 研究結果

### （1）本邦で流行している vpu 遺伝子の特徴

240 名から横断的に集めた検体を用いて、vpu 遺伝子の増幅と配列解析を試みたところ、214 検体についてデータを取ることができた。Vpu 蛋白質をコードしている領域について、HXB2 の配列をもとにアラインメントを行った。本対象者で得られたコンセンサス配列を Los Alamos database のサブタイプ B コンセンサス配列と比較したところ（図 1）、3 番および 24 番目のアミノ酸が異なっていた。さらにこの横断的にサンプリングした検体でのアミノ酸配列の変異率を調べた（図 2）。その変異率は Los Alamos database のものと同じく、非常に高い値を示した。他のウイルス蛋白質との比較では、Env や Nef に匹敵する変異率であった。さらに各アミノ酸コドンについて、本研究の対象者と、Los Alamos database で



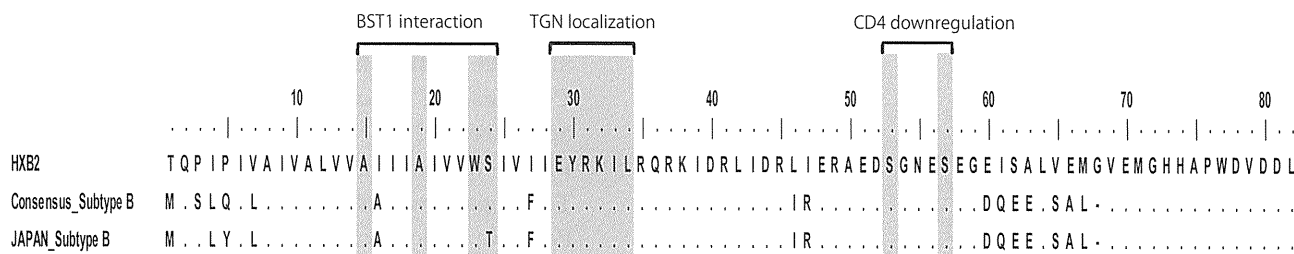


図1 vpu 遺伝子配列の比較

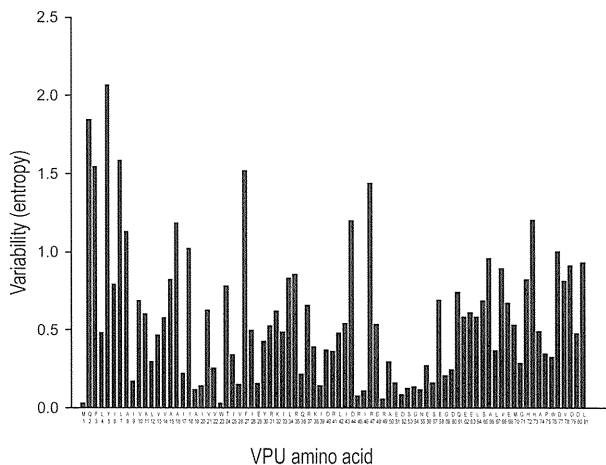


図2 Vpu 蛋白質の変異性

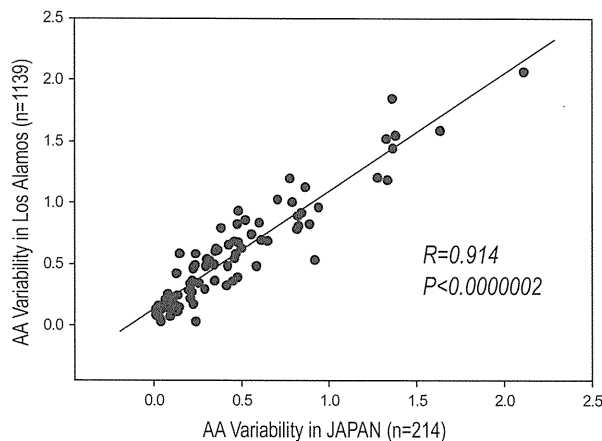


図3 Vpu 蛋白質変異性の比較



図4 HLA クラス I アリルに相関する変異と CTL エピトープ

変異率の比較を行ったところ、有意に強い相関を認めた。このことから、本研究の対象者の Vpu 変異(多型性)は、地域に特殊なものではなく、グローバルなレベルとほぼ変わらないものと考えられた。

(2) MHC 制御との関連

本対象者の HLA クラス I アリルを解析したところ、遺伝子頻度は HLA-A\*24:02 が約 26% と最も高いなど、これまでに報告されている日本人の HLA 遺伝子頻度との間に大きな乖離はなかった。次にマイクロソフト社の J. Carlson らが開発した phylogenetic dependency network model を用いて、Vpu の各コドンと、感染者の HLA クラス I アリルとの相関関係を解析した。その結果、図 4 に示した通り、統計学的に有意な相関が 3 つ認められた。一つ目は、5 番目のアミノ酸はコンセンサス配列では Gln であるが、HLA-C\*03 を持つ人では、有意に Glu であることが少ないというものである。残りの 2 つは同じ 37 番目のアミノ酸に関するものである。HLA-A\*33:03 を

持つ人では、Lys であるケースが有意に多く、Arg であることが有意に少ないというものである。

この 37 番目の変異は、既に報告されている HLA-A:33:03 拘束性エピトープである EYRKILRQR の C 末端部位に相当している(図 4)。免疫学的な解析はされていないが、おそらく、このエピトープに特異的な CTL によって選択された CTL 逃避変異ではないかと推測された。

D. 考察

vpu 遺伝子は、env や nef 遺伝子に相当するレベルで変異性の高い遺伝子であった。Env や nef は、それぞれ抗体や CTL 応答など、ヒト免疫系のターゲットとなっているために、高い変異性(多型性)が維持されていると考えられている。vpu の変異がなぜ高いのか明らかではないが、本研究の結果からは HLA クラス I 拘束性の CTL は、Vpu の変異性(多型性)にほとんど寄与していないと示唆された。

## E. 結論

本研究では、Vpu を例として、本邦で流行しているウイルスの動向を解析するとともに、Vpu の変異性（多型性）と日本人の HLA クラス I 多型性との関連を解析する実験系を確立した。今後は、検体数を増やして解析の精度を上げるとともに、他の遺伝子領域にも広げて行きたい。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Philip Mwimanzi, Zafrul Hasan, Ranya Hassan, Shinya Suzu, Masafumi Takiguchi and Takamasa Ueno (2011) Effects of naturally-arising HIV Nef mutations on cytotoxic T lymphocyte recognition and Nef's functionality in primary macrophages. *Retrovirology* 8:50
- 2) Nopporn Chutiwitoonchai, Masateru Hiyoshi, Philip Mwimanzi, Takamasa Ueno, Akio Adachi, Hirota Ode, Hironori Sato, Oliver T. Fackler, Seiji Okada, Shinya Suzu (2011) The identification of a small molecule compound that reduces HIV-1 Nef-mediated viral infectivity enhancement. *PLoS ONE* 6(11): e27696

### 2. 学会発表

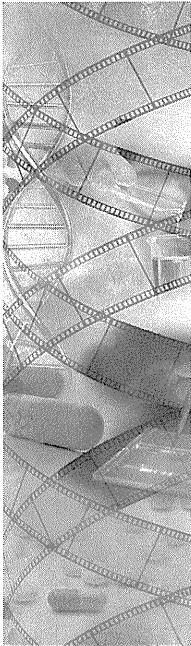
- 1) Philip Mwimanzi, Tristan Markle, Michiyo Tokunaga, Toshiyuki Miura, Eric Martin, Florencia Pereyra, Bruce Walker, Zabrina Brumme, Mark Brockman, Takamasa Ueno. Impaired viral infectivity and viral replication capacity by nef alleles from HIV elite controllers. 25th Annual Meeting of Japanese Society for AIDS Research, Tokyo Hyatt Regency, Tokyo, Japan. November 30th - 2nd December, 2011.
- 2) Philip Mwimanzi, Tristan Markle, Michiyo Tokunaga, Toshiyuki Miura, Eric Martin, Florencia Pereyra, Bruce Walker, Zabrina Brumme, Mark Brockman, Takamasa Ueno. Population analysis of viral replication capacity by nef alleles of HIV elite controllers. 12th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, 19-21 October 2011.
- 3) Philip Mwimanzi, Tristan Markle, Michiyo Tokunaga, Toshiyuki Miura, Eric Martin, Florencia Pereyra, Bruce Walker, Zabrina Brumme, Mark Brockman, Takamasa Ueno. Impairment of viral replication capacity by nef alleles from HIV elite controllers. *Frontiers of Retrovirology, Complex retroviruses, retroelements and their hosts*, Amsterdam, Netherlands, 3-5 October 2011.
- 4) Philip Mwimanzi, Tristan Markle, Michiyo Tokunaga, Toshiyuki Miura, Eric Martin, Florencia Pereyra, Bruce Walker, Zabrina Brumme, Mark Brockman, Takamasa Ueno. Impairment of virion infectivity by nef alleles from HIV elite controllers.

Nef activity in enhancement of virion infectivity is impaired in HIV elite controllers. XV, International Congress of Virology, Sapporo, Japan, 11-16 September 2011.

- 5) Philip Mwimanzi, Tristan Markle, Michiyo Tokunaga, Toshiyuki Miura, Eric Martin, Florencia Pereyra, Bruce Walker, Zabrina Brumme, Mark Brockman, Takamasa Ueno. Impairment of virion infectivity by nef alleles from HIV elite controllers. Keystone Symposia HIV Evolution, Genomics and Pathogenesis (X7), Whistler Conference center, Whistler, Canada, March 20-25, 2011.
- 6) Zafrul Hasan, J. Carlson, H. Gatanaga, A. Le, C. Brumme, S. Oka, Z. Brumme, T. Ueno. Impact of HLA class I-driven genetic variability in HIV-1 accessory genes in Japanese sequences. Keystone Symposia HIV Evolution. Genomics and Pathogenesis (X7): Whistler Conference Centre, Whistler, Canada; March 20 - 25, 2011.
- 7) Zafrul Hasan, J. Carlson, H. Gatanaga, A. Le, C. Brumme, S. Oka, Z. Brumme, T. Ueno. Subtle effect of HLA class I-driven selective forces on the variability of HIV-1 accessory genes. 12th Kumamoto AIDS Seminar and GCOE Joint International Symposium. Hotel Nikko Kumamoto and Aso Resort Grandvrio Hotel, Kumamoto, Japan; October 19-21, 2011.
- 8) Zafrul Hasan, J. Carlson, H. Gatanaga, A. Le, C. Brumme, S. Oka, Z. Brumme, T. Ueno. Effect of HLA class I-mediated selective pressure on HIV-1 accessory genes. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress: Virus and host response, Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan; September 11-16, 2011.
- 9) Zafrul Hasan, J. Carlson, H. Gatanaga, A. Le, C. Brumme, S. Oka, Z. Brumme, T. Ueno. Impact of HLA class I-driven genetic variability in HIV-1 accessory genes. 2011 The Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology. Chiba, Makuhari Messe, Japan; November 27-30, 2011.
- 10) Chihiro Motozono, John J. Miles, Linda Wooldridge, David A. Price, Takamasa Ueno, Andrew K. Sewell. The cross-reactivity footprints of HIV-specific CTLs. 12th Kumamoto AIDS Seminar and GCOE Joint International Symposium. Hotel Nikko Kumamoto and Aso Resort Grandvrio Hotel, Kumamoto, Japan; October 19-21, 2011.
- 11) 緒方陽子、大津家裕仁、Philip Mwimanzi、徳永美知代、Tristan Markle、三浦聡之、Bruce Walker、Zabrina Brumme、Mark Brockman、上野貴将：Nef のウイルスレセプター発現低下機能と病態 一般演題「アクセサリ遺伝子-2」第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会 ハイアットリージェンシー東京 2011 年 11 月 30 日 - 12 月 2 日

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし



## 研究要旨

# 首都圏近郊における薬剤耐性 HIV の動向調査研究

～流行株の遺伝子型及び薬剤耐性株の動向把握に関する研究～

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>、岡本その子<sup>5</sup>、池ヶ谷美穂<sup>6</sup>、大沼 正行<sup>7</sup>、小林 広記<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

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 2010 年から 2011 年に新たに感染が確認された保健所検査受診例 16 検体及びエイズ拠点病院の未治療例 3 検体、合計 19 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 18 検体（94.7%）と最も多く検出され、残る 1 検体（5.3%）はサブタイプ C であった。薬剤耐性変異の調査では、プロテアーゼ領域で 19 検体中 17 検体（89.5%）に 1 ヶ所以上の Minor mutation が検出され、逆転写酵素領域で 2 検体、インテグラーゼ領域で 3 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、国内で流行している HIV の動向に関する研究の一環として、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 株の遺伝子型と薬剤耐性変異を調査した。併せて HIV の推定感染時期及び感染経路や治療薬が共通する B 型肝炎、C 型肝炎との重複感染の有無を調査し、HIV 流行との関連と治療への影響の可能性を把握することを目的とした。

## B. 研究方法

### 1 調査対象

2010 年から 2011 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 19 名からの血清または血漿検体（2010 年：保健所 1 検体、拠点病院 3 検体、2011 年：保健所 15 検体）を供試した。

## 2 方法

### 1) HIV サブタイピング

各検体 200µl 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) を用いてシーケンス反応を行い、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer により解析した。PCR 及びシーケ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