

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 領域の塩基配列から得られたアミノ酸配列 (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) 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

B 型肝炎、C 型肝炎と HIV 感染の関連性及び薬剤耐性変異への影響を調べるため、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・クリニカル・ダイアグノスティクス株式会社) 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 19 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 19 のサブタイプは、サブタイプ B が 18 検体 (94.7%) と最も多く、C が 1 検体 (5.3%) 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 19 検体の感染者の性別は全て男性で、年齢構成は 20 歳代 5 名、30 歳代 8 名、40 歳代 5 名、60 歳代 1 名であった。国籍は日本籍が 18 名 (全てサブタイプ B を検出)、日本籍以外 1 名 (サブタイプ C) であった。サブタイプ B の 18 例の感染経路は、同性間性的接触 11 例 (57.9%)、異性間性的接触 4 例 (21.1%) であった。

2 薬剤耐性変異の解析

上記 19 検体の遺伝子解析の結果、PR 領域では Major mutation は検出されず、一方、いずれかの Minor mutation は 17 検体 (89.5%) に検出された。特に I93L、V77I がそれぞれ 57.9%、47.4% と、他の変異と比較し高い頻度で検出された (表 2)。RT 領

表 1 検査症例の HIV サブタイプと感染経路

陽性確認年	性別	症例数	Subtype		BED assay		感染経路
2010	男性	4	B	3	recent	1	*同:1
					not recent	2	同:1、不明:1
			C	1	not recent	1	*異:1
2011	男性	15	B	15	recent	2	異:1、*未:1
					not recent	13	同:9、異:3、未:1

\* 同:同性間性的接触、異:異性間性的接触、未:同異性間未確定性的接触

表 2 PR 領域の薬剤耐性変異 (Minor Mutation)

変異部位	L10V/F/I	I13V	G16E	M36I	I62V	L63P	I64V	H69K	A71V/I/T	V77I	I93L
変異株数 (n=19)	3	3	1	2	5	6	1	2	3	9	11
	(15.8%)	(15.8%)	(5.3%)	(10.5%)	(26.3%)	(31.6%)	(5.3%)	(10.5%)	(15.8%)	(47.4%)	(57.9%)

域は K101E、V179D の耐性変異がそれぞれ異なる 1 検体に検出された他、T215 リバータント変異である T215S が 1 検体に検出された。IN 領域では、PCR により増幅産物が得られなかった 1 検体を除く 18 検体について解析した結果、L74I の耐性変異が 2 検体、T97A/T の耐性変異が別の 1 検体に検出された。

### 3 BED assay による感染時期の推定

本研究の 19 検体中 3 検体 (15.8%) が recent、16 検体 (84.2%) が not recent と判定された (表 1)。

### 4 HBs 抗原及び HCV 抗体検査

本研究の 19 検体の HBs 抗原、HCV 抗体を検査した結果、HBs 抗原、HCV 抗体がそれぞれ 2 検体検出された。HBs 抗原、HCV 抗体共に検出された検体はなかった。

### D. 考察

本研究の対象地域である埼玉県、茨城県、栃木県、山梨県及び長野県を合わせた平成 22 年の新規 HIV 感染者及び AIDS 患者の報告数は、それぞれ 46 人、34 人 (厚生労働省エイズ動向委員会 平成 22 年報告) であり、これは全国の感染者及び患者報告数 (1075 人、469 人) のそれぞれ 4.3%、7.3% を占める。本地域は、人口 10 万人当たりの HIV 感染者/AIDS 患者の報告数も全国の府県の中で上位に位置しており、この地域に流行する HIV の動向を継続して調査することは、全国的な動向を把握する上で重要である。

今年度、得られた検体は、全て男性からのもので、年齢層は 20 歳から 40 歳代が大部分を占めており、エイズ動向委員会報告の国内における新規感染者の発生状況を如実に反映したものとなった。また、検出されたサブタイプは、外国籍者 1 例を除きすべて B であり、その他のサブタイプが拡大している傾向は認められなかった。薬剤耐性変異の調査では、PR 領域では、Minor mutation はほぼ 90% の検体に認められたが、Major mutation が認められた検体はなく、一方、RT 領域、IN 領域では、1 ヶ所のみ耐性変異が認められる検体がそれぞれ 10% 程度であった。昨年度の調査 (15 検体) 結果と同様、本地域からは、多くの深刻な耐性変異箇所を持つ株は、検出されなかったと言える。BED assay の結果、感染初期と推定される検体は、ほぼ 10% と昨年度 (30%) より低下した。感染者の健康管理や治療の点からも、また感染の広がりを防止するためにも、より早期に検査を受診できるような環境の改善が必要であると考えられる。HBs 抗原及び C 型肝炎抗体 (HCV 抗体)

検査の結果から、HBV、HCV 感染を伴う例が、それぞれ 10% 程度あると推察された。本研究の 19 検体という限られた調査から、この地域の HIV のサブタイプの分布、薬剤耐性変異株の動向、HIV 感染と B 型及び C 型肝炎感染との疫学的関連について全体像を推察するのは困難であるが、動向に注視し、今後も調査を継続する必要があると示唆された。

### E. 結論

2010 年から 2011 年に埼玉県、茨城県、栃木県、山梨県、長野県の 5 県で採取された新規または未治療 HIV 感染例の 19 検体について HIV のサブタイプ調査及び薬剤耐性変異の調査を実施した。サブタイプ調査では、19 検体中サブタイプ B が 18 検体、C が 1 検体であった。薬剤耐性変異の調査では、PR 領域の Minor mutation がほぼ 90% の検体で認められた他、2 検体に RT 領域、3 検体に IN 領域の変異が認められた。今後も首都圏及び近郊における HIV の疫学及び薬剤耐性株の動向を注視していく必要がある。

### F. 健康危険情報

該当なし

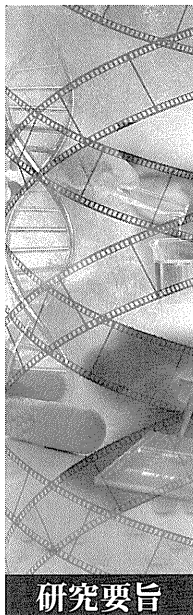
### G. 研究発表

なし

### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし





## 帝京大学における薬剤耐性 HIV の動向調査研究

～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～

研究分担者 太田 康男 帝京大学医学部内科学講座 教授

研究協力者 古賀 一郎 帝京大学医学部内科学講座 助教

帝京大学医学部附属病院には、2011 年 12 月現在で 69 名の HIV 感染症患者が通院しているが、平成 19 年度以降の初診症例がその大部分を占めている。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 HIV RNA 量が増加した患者を対象に、血中 HIV RNA の薬剤耐性変異の同定を行なった。2011 年に実施した 9 名の治療開始前の患者のうち、4 名に逆転写酵素 (RT) 領域に薬剤耐性変異を認めた。そのうちの 2 症例で、T215 の変異を認めた。また 9 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、うち 3 名に V82 変異が、1 名に Q58 変異を認めた。さらに 1 例にインテグラーゼ (INT) 領域の変異を認めたが、minor なものであった。また 9 名中 8 名はサブタイプ B であり、残りの 1 名はサブタイプ AE と推測された。

昨年度からの継続症例と合わせて、計 5 例について治療開始前、治療開始 3-4 週間後の血中 HIV RNA を用いてクローニング解析を行った。いずれもダイレクトシーケンスでは、相違を示さなかったが、アミノ酸置換を伴う少数集族が確認された症例も認めた。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さらに検証し、症例数を増やして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 12 月現在で 69 名の HIV 感染症患者が通院している。その多くが平成 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 14 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 5 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 10 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、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 感染症患者の血中 HIV RNA 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 HIV RNA 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

- 1) 当院を受診する HIV 感染症患者において、抗レトロウイルス療法導入前の血中 HIV の薬剤耐性変異（逆転写酵素領域、プロテアーゼ領域、インテグラーゼ領域）の解析を行った。
- 2) 抗レトロウイルス療法導入後に、血中 HIV RNA 量が増加した患者において、血中 HIV の薬剤耐性変異（逆転写酵素領域、プロテアーゼ領域、インテグラーゼ領域）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) cART 導入 3-4 週後の一定量まで血中 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」などの指針を遵守し、院内の倫理委員会において研究内容の承認を得た後に開始した。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、保管を行っている。

## 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 48 名、女性は 3 名の計 51 名である。平成 23 年度は治療開始前の患者 9 名について HIV 薬剤耐性検査を実施した（表 1）。9 名のうち、4 名が RT 領域に薬剤耐性変異を認めた。そのうちの 2 症例で、T215 の変異を認めた。プロテアーゼ領域については 9 名すべての患者で 1 カ所以上の変異が確認されたが、そのうち 3 名に V82 変異が、1 名に Q58 変異を認めた。さらに 1 例にインテグラーゼ（INT）領域の変異を認めたが、E157Q とマイナーなものであった。

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、サブタイプ B が 8 例、サブタイプ AE が 1 例と推定された。

表 1 平成 23 年度に施行した薬剤耐性検査結果のまとめ  
(治療開始前の症例 9 例、治療開始後の症例 (\*) 2 例)

年月	年齢	性別	CD4	VL	Sub type	RT	PR	INT
2011.04	27	M	450	110,000	B	T215S	60E, V82IV	
2011.05	36	M	428	3,700	AE		I3V, 20R, 35D, 36I, 69K, 89M	E157Q
2011.06	34	M	59	3,100*	B		63P, 71T, 77I, 93L	
2011.07	43	M	545	16,000	B	I01Q	M36M/I, L63P, I64L, V82I	
2011.07	42	M	327	720,000	B		62V, 63P, 69N, 77I, 93L	
2011.07	39	M	5	370,000	B		Q58E, 62V, 63S, 71T, 77I, 93L	
2011.08	38	M	247	5,300*	B	L100I, K103N, T215C, V179I	I0I, Q58Q/R, 62V, 63Q, 77I, 93L	I63D, 232N
2011.09	37	M	401	110,000	B	I79I, T215S	60E, V82IV	
2011.09	33	M	163	190,000	B		63A, 93L	
2011.10	23	M	294	36,000	B		35D, 63X, 93L	
2011.10	30	M	260	26,000	B	I79E	71V, 93L	

昨年度からの継続症例と合わせて、計 5 例について治療開始前、治療開始 4 週間後の血中 HIV RNA を用いてクローニング解析を行った。アミノ酸置換を伴う少数集族が確認された症例も認めしたが、いずれもダイレクトシーケンスでは、相違を示さなかった。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さらに検証し、症例数を増やして解析を行っていく予定である。

#### 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 HIV RNA 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ず、いまだ解決できていない課題である。

#### E. 結論

- 1) 当院を受診した患者についての cART 開始前の薬剤耐性変異の解析の結果、9 例中 4 例に RT 領域の、9 例すべてにプロテアーゼ領域の変異を認めた。
- 2) 解析を行った 9 例のうち 8 例はサブタイプ B であり、残りの 1 例はサブタイプ AE であることが推定された。
- 3) 治療開始前、治療開始 3-4 週間後の血中 HIV RNA 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変異を確認することができた症例も認められた。

#### 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) Kogure H, Tsujino T, Yamamoto K, Mizuno S, Yashima Y, Yagioka H, Kawakubo K, Sasaki T, Nakai Y, Hirano K, Sasahira N, Isayama H, Tada M, Kawabe T, Omata M, Harada S, Ota Y, Koike K. Fever-based antibiotic therapy for acute cholangitis following successful endoscopic biliary drainage. J

Gastroenterol. Dec; 46 (12) : 1411-7.2011

- 2) Yoshino Y, Kitazawa T, Ikeda M, Tatsuno K, Yanagimoto S, Okugawa S, Ota Y, Yotsuyanagi H. Clinical features of Bacteroides bacteremia and their association with colorectal carcinoma. Infection. 2011 (published on line on Jul 20) .
- 3) Atsukawa Y, Kawakami S, Asahara M, Ishigaki S, Tanaka T, Ono Y, Nishiya H, Fujisaki R, Koga I, Ota Y, Miyazawa Y. The usefulness of changing focus during examination using Gram staining as initial diagnostic clue for infective tuberculosis. Infect Chemother. Aug;17 (4) :571-4. 2011.
- 4) 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. Apr;17 (2) :278-82. 2011

#### 2 口頭発表

- 1) Kitazawa T, Yoshino Y, Yamamoto Y, Kuyama Y, Ota Y. Does Use of Proton Pump Inhibitors Increase Incidence of Clostridium difficile-Associated Diarrhea?: A Japanese Study. The 51st ICAAC. September 17-20, 2011, Chicago, USA.
- 2) 古賀一郎、吉野友祐、松永直久、北沢貴利、太田康男：当院通院中の HIV 感染症患者における骨密度低下のリスク因子と経時的な変化についての考察 日本エイズ学会 2011 年 東京
- 3) 古賀一郎、吉野友祐、松永直久、北沢貴利、太田康男：Rifabutin associated uveitis と診断した日本人 HIV 感染症患者の一例 日本エイズ学会 2011 年 東京
- 4) 服部純子、他 45 名：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 2011 年 東京

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

- |           |    |
|-----------|----|
| 1. 特許取得   | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他    | なし |



## 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** 国立国際医療研究センターエイズ治療・研究開発センター室長

研究協力者 **林田 庸総** 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 23 年 1 月から 12 月の間に、144 人の HIV-1 感染者が新規に診断された。この 144 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、23 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 3 人、K70R が 1 人、K103N が 3 人、V108I が 2 人、M184V が 1 人、L210W が 5 人、T215X が 10 人、P225H が 1 人、プロテアーゼ領域の Q58E が 1 人、I84V が 2 人、であった（重複あり）。サブタイプは、B が 115 人、AE が 18 人、C が 6 人、AG が 2 人、G が 2 人、A が 1 人であった。

### 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。

#### （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研究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、シーケンスを解析した。

### C. 研究結果

144 人の HIV-1 感染者が新規に診断された。この 144 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、23 人（16%）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 3 人、K70R が 1 人、K103N が 3 人、V108I が 2 人、M184V が 1 人、L210W が 5 人、T215X が 10 人、P225H が 1 人、プロテアーゼ領域の Q58E が 1 人、I84V が 2 人、であった（重複あり）。サブタイプは、B が 115 人、AE が 18 人、C が 6 人、AG が 2 人、G が 2 人、A が 1 人であった。

### D. 考察

主要な耐性変異を持つ患者の割合は、例年より増加している。今後も注意深く解析していく必要があると思われる。

### 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。

### F. 健康危険情報

なし。

### G. 研究発表

#### 1. 原著論文

- 1) Watanabe K, Gatanaga H, Escueta-de Cadiz A, Tanuma J, Nozaki T, Oka S. Amebiasis in HIV-1-

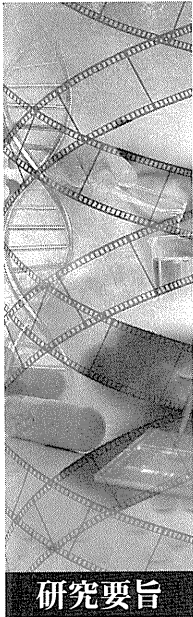


infected Japanese men: clinical features and response to therapy. PLoS Negl Trop Dis. 5(9):e1318, 2011.

- 2) Nishijima T, Komatsu H, Gatanaga H, Aoki T, Watanabe K, Kinai E, Honda H, Tanuma J, Yazaki H, Tsukada K, Honda M, Teruya K, Kikuchi Y, Oka S. Impact of small body weight on tenofovir-associated renal dysfunction in HIV-infected patients: a retrospective cohort study of Japanese patients. PLoS One 6(7):e22661, 2011.
- 3) Nakamura H, Teruya K, Takano M, Tsukada K, Tanuma J, Yazaki H, Honda H, Honda M, Gatanaga H, Kikuchi Y, Oka S. Clinical symptoms and courses of primary HIV-1 infection in recent years in Japan. Intern Med. 50(2):95-101, 2011.

## 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

～次世代シーケンサーを用いた HIV-1 細胞指向性解析法の開発～

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

HIV-1 は細胞への侵入において細胞表面に存在するケモカインレセプターである CCR5 と CXCR4 のどちらを利用するかによって R5 株と X4 株に大別される。CCR5 拮抗薬である抗 HIV-1 薬マラビロクが登場して以来、HIV-1 のこのような細胞指向性を検査することは臨床的にも有意義なものとなった。PCR シーケンシングで決定した env 遺伝子 V3 ループの塩基配列をもとに細胞指向性を推定するジェノタイプ法は低価格で標準化しやすいという利点があるが、HIV-1 微少集団の細胞指向性を評価できないという問題がある。本研究では、次世代シーケンサーによる微少集団の検出感度が 1%程度であることを実験的に求め、それをもとに 4 例の感染者の血液中 HIV-1 の RNA と DNA における微少集団と割合とそれぞれの細胞指向性を評価した。その結果、RNA あるいは DNA の中には、通常の指向性ジェノタイプ検査では検出できない、細胞指向性の異なる HIV-1 微少集団が共存することが明らかになった。また、RNA の方が DNA より X4 株が現れやすい傾向があることが分かった。微少 X4 株の存在は、マラビロクのような CCR5 拮抗薬の治療効果に影響を与える可能性が高い。HIV 治療の最適化のため、次世代シーケンサーを用いた HIV-1 指向性検査の実用化を図ることが今後重要になると考えられる。

## A. 研究目的

HIV-1 はエンベロープタンパク質である gp120 と細胞表面に存在する CD4 レセプター及びケモカインレセプターと結合することにより細胞に侵入する。HIV-1 が利用する主要なケモカインレセプターには CCR5 と CXCR4 があり、CCR5 を利用するウイルスを R5 株、CXCR4 を利用するウイルスを X4 株と呼ぶ。HIV 感染症が進行するにしたがい R5 株は X4 株に変化していくことが知られている。また、CCR5 拮抗薬である抗 HIV-1 薬（マラビロクなど）が使用されるようになったため、このような HIV-1 の細胞指向性を知ることは臨床的にも有用となってきた。HIV-1 の細胞指向性検査にはフェノタイプ法とジェノタイプ法がある。代表的なフェノタイプ法は Monogram Biosciences の Trofile 検査で、最も広く利用されているが、米国にある検査施設に検体を送る

必要があることや検査費用が高価であるという問題がある。一方、ジェノタイプ法として、env 遺伝子 V3 ループの塩基配列を PCR シーケンシングで決定し、バイオインフォマティクスを用いたアルゴリズムで細胞指向性を推定するという方法がある。この方法は低価格で標準化しやすいという利点があるが、CCR5 拮抗薬の治療効果に影響を与える可能性のある HIV-1 微少集団の細胞指向性を評価できないという問題がある。この問題に対処するため、膨大な数の塩基配列を一度に決定することができる次世代シーケンサーを用いたジェノタイプ検査の開発が進んでいる。本研究では、まず次世代シーケンサーによるシーケンシング（以下、ディープシーケンシングという。）による塩基配列決定の誤り率を求めて有意な微少集団の存在率を決定し、それをもとに 4 例の感染者の血液中 HIV-1 の RNA と

DNA における微小集団の割合とそれぞれの細胞指向性を評価することにより、ディープシーケンシングによる細胞指向性検査の有用性と実施可能性を検討した。

## B. 研究方法

HIV-1 感染者の血液から Ficoll-Paque PLUS (GEヘルスケアバイオサイエンス) を用いて血漿と末梢血単核球を分離し、血漿からは QIAamp MinElute Virus Spin Kit (QIAGEN) で RNA を、末梢血単核球からは QIAamp DNA Blood Kit (QIAGEN) で DNA を調製した。これらの核酸を用いて HIV-1 の env 遺伝子 V3 ループを図 1 に示すプライマーを用いて (RT-) nested PCR により増幅した。2 回目の PCR のプライマーには、5 つの異なる検体を区別するためのバーコード配列を 5' 端に付加した。シーケンシングの誤り率を求める実験には HIV-1 LAI 株の RNA を限界希釈して RT-nested PCR で増幅したものをを用いた。得られた PCR 産物を QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) 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委託した。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、ディープシーケンシングで得られた塩基配列には 1 塩基

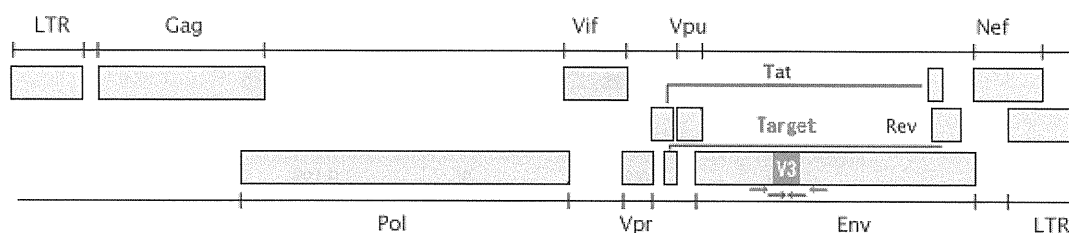
あるいは 2 塩基の欠失や挿入が起こりやすい。そこで、V3 ループの塩基配列数が 3 の倍数でないリードは除外した。また、異なる箇所でも欠失と挿入が起こったために塩基配列数が 3 の倍数になったことが明らかなリードも除外した。細胞指向性の推定はインターネット上の geno2pheno [coreceptor] 2.0 を用いて行った。Cut-off は 10% FPR を用いた。変異株名は遺伝的距離を参考にして命名した。すなわち遺伝的距離が 10% 以上の場合は A、B、C、等とし、10% 以下の場合はその後ろに 1、2、3、等を付けた。

### (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

ディープシーケンシングの誤り率を求めるために PCR でクローン化した HIV-1 LAI 株のシーケンシングを 2 回行った。得られた異なる塩基配列それぞれの出現頻度を高い順に 10 番まで表 1 に示す。元のクローンの塩基配列の次に頻度の高いリードの存在率は、実験 1 では 0.54%、実験 2 では 0.30% であった。すなわち、元の検体の中に存在しなかった塩基配列をもったリードが次世代シーケンサーの出力データとしてこのような頻度で出現することを



### Primers

#### 1st-round PCR (424 bp)

Forward, TR1F: 5'-CAG TAC AAT GYA CAC ATG GA-3'

Reverse, TR1R: 5'-CAR TAG AAA AAT TCC CCT C-3'

#### 2nd-round PCR (333 bp)

Forward, TR2F: 5'-TTA AAT GGC AGT CTA GCA GA-3'

Reverse, TRB2R: 5'-AAT TTC TGG GTC CCC TCC TG-3' (for subtype B)

TRE2R: 5'-AAT TTC TAG ATC TCC TCC TG-3' (for subtype CRF01\_AE)

Barcode: AGCTAG (sample 1), GATACT (sample 2), ATGAAC (sample 3),  
CATGCG (sample 4), CGCTAT (sample 5)

図 1 HIV-1 細胞指向性検査のための PCR

示している。この結果から、ディープシーケンシングで検出できる有意な微少集団の存在率を 1%とした ( $P=0.05$ )。HIV-1 感染者から血液検体を採取した時点での被験者の CD4 数とウイルス量を表 2 に示す。CD4 数の範囲は 7 ~ 650 copies/ $\mu$ L、ウイルス量の範囲は 40,000 ~ 860,000 copies/ $\mu$ L であった。これらの被験者はすべて未治療であった。感染時期については不明である。HIV-1 感染者の血漿中 HIV-1 RNA と単核球中 HIV-1 DNA を用いたディープシーケンシングの結果それぞれ表 3 と表 4 に示す。以下、各感染者について HIV-1 RNA と DNA の結果を比較しながら説明する。症例 C305 では、HIV-1 RNA から 4 種の変異株 A1 ~ A4 が同定され、最も優勢な株 A1 の存在率は 71.1% であった。HIV-1 DNA からは 6 種の変異株 A1 ~ A3 と A5 ~ A8 が同定された。すなわち、そのうちの 3 株は RNA から同定されたものと同一配列をもっていた。最も優勢な株は RNA と同じく A1 でその存在率は 41.7% であった。細胞指向性は、RNA と DNA のいずれから同定された変異株もすべて R5 株であった。

症例 C310 では、HIV-1 RNA から 9 種の変異株 A1 ~ A4 と B1 ~ B5 が同定され、最も優勢な株 A1 の存在率は 66.6% であった。変異株 A1 ~ A4 の細

胞指向性は X4 株であったが、変異株 B1 ~ B5 の細胞指向性は R5 株であった。HIV-1 DNA からは 3 種の変異株 C1、B1、A1 が同定された。最も優勢な株は C1 で、その存在率は 47.6% であった。すなわち、RNA で最も優勢な株 A1 は DNA では少数派で、DNA で最も優勢な株 C1 は RNA では同定されなかった。細胞 C1 株の細胞指向性は R5 であった。

症例 C324 では、HIV-1 RNA から 5 種の変異株 A1 ~ A5 が同定され、最も優勢な株 A1 の存在率は 43.6% であった。HIV-1 DNA からは 6 種の変異株 A1 ~ A6 が同定された。すなわち、DNA から新たに同定された変異株は A6 のみであった。最も優勢な株は RNA と同じく A1 でその存在率は 57.1% であった。細胞指向性は、RNA と DNA のいずれから同定された変異株もすべて R5 株であった。症例 C137 では、HIV-1 RNA から 3 種の変異株 A1、A2、B1 が同定された。最も優勢な株 A1 の存在率は 77.4% であった。HIV-1 DNA からは変異株 A1 のみが同定され、その存在率は 96.8% であった。細胞指向性は、変異株 A1、A2 は R5 株であったが、変異株 B1 は X4 株であった。すなわち RNA からは R5 株と X4 株の両方が検出されたが、DNA からは R5 株のみが検出された。次に、細胞指向性の違いに注

表 1 クローン化 HIV-1 のディープシーケンシングの結果

実験1		実験2	
同一リード数	割合 (%)	同一リード数	割合 (%)
5048	91.62%	4366	92.87%
30	0.54%	14	0.30%
26	0.47%	13	0.28%
23	0.42%	12	0.26%
18	0.33%	12	0.26%
13	0.24%	11	0.23%
13	0.24%	9	0.19%
12	0.22%	9	0.19%
12	0.22%	9	0.19%
11	0.20%	9	0.19%
<11	5.52%	<8	5.04%

表 2 検体採取時の被験者の CD4 数とウイルス量

被検者	検体番号	CD4 count (cells/ $\mu$ L)	ウイルス量 (copies/ $\mu$ L)
C305	SP923	650	40,000
C310	SP939	113	330,000
C324	SP974	263	270,000
C137	SP971	7	860,000

表 3-1 感染者血漿中 HIV-1 RNA のディープシークエンシングの結果 (1)

被検者	検体番号	変異株名	存在率	細胞指向性
C305	SP923	A1	71.1%	R5
		A2	11.5%	R5
		A3	2.0%	R5
		A4	1.5%	R5
C310	SP939	A1	66.6%	X4
		A2	3.9%	X4
		B1	2.1%	R5
		A3	1.8%	X4
		B2	1.7%	R5
		B3	1.6%	R5
		A4	1.4%	X4
		B4	1.4%	R5
		B5	1.0%	R5

表 3-2 感染者血漿中 HIV-1 RNA のディープシークエンシングの結果 (2)

被検者	検体番号	変異株名	存在率	細胞指向性
C324	SP974	A1	43.6%	R5
		A2	26.4%	R5
		A3	15.8%	R5
		A4	2.2%	R5
		A5	1.2%	R5
C137	SP971	A1	77.4%	R5
		B1	2.9%	X4
		A2	2.6%	R5

表 4-1 感染者末梢血単核球中 HIV-1 DNA のディープシークエンシングの結果 (1)

被検者	検体番号	変異株名	存在率	細胞指向性
C305	SP923	A1	41.7%	R5
		A2	24.8%	R5
		A5	8.9%	R5
		A3	4.5%	R5
		A6	4.3%	R5
		A7	1.2%	R5
C310	SP939	C1	47.6%	R5
		B1	36.7%	R5
		A1	6.8%	X4

表 4-2 感染者末梢血単核球中 HIV-1 DNA のディープシークエンシングの結果 (2)

被検者	検体番号	変異株名	存在率	細胞指向性
C324	SP974	A1	57.1%	R5
		A2	13.2%	R5
		A4	8.6%	R5
		A3	7.2%	R5
		A5	2.8%	R5
		A6	1.2%	R5
C137	SP971	A1	96.8%	R5

目して変異株の存在率を各症例ごとに比較してみた。CD4 数が比較的高い症例 C305 と C324 では RNA も DNA も R5 株のみが検出された。CD4 数 113 の症例 C310 においては、RNA では R5 株が 7.6% で X4 株が 73.7% であり、DNA では R5 株が 84.3% で X4 株が 6.8% であった。また、CD4 数 7 の症例 C137 においては、RNA では R5 株が 80.0% で X4 株が 6.8% であり、DNA では R5 株のみが検出された。

#### D. 考察

次世代シーケンサー (Roche Genome Sequencer FLX) を用いて、HIV-1 微少集団における細胞指向性を定量する方法の開発を行った。

まず微少集団の検出感度を求めるため、クローン化 HIV-1 LAI 株を用いてディープシーケンシングの誤り率を求め、その結果から  $P=0.05$  で検出可能な微少集団の存在率を 1.0% とした。この検出感度をさらに高めるためには、ディープシーケンシングで誤りが起こる原因が PCR にあるのか、それともディープシーケンシングそのものにあるのかをまず調べる必要がある。後者の可能性に関しては、プラスミドベクター等に挿入してクローン化した DNA 断片をディープシーケンシングをすることによって検討することができる。もしこの過程が誤りの主要な原因であるならば、各種ディープシーケンシングによる誤り率を同じ検体を用いて比較することが必要となる。PCR の過程が誤りの主因であるならば、フィデリティの高い DNA ポリメラーゼを使用するなどの PCR 条件の改善が必要であろう。細胞指向性が異なる HIV-1 微少集団が症例 C310 と C137 の検体で認められた。症例 C310 においては、RNA での多数変異株は X4 株であったが、DNA での多数派変異株は R5 株と結果が大きく異なっていた。もし通常の指向性ジェノタイプ検査を実施した場合、検査対象を RNA にするか DNA にするかによって結果が逆になったであろう。症例 C137 の RNA においては、多数派は R5 株であったが、2.9% の X4 株が検出された。この場合も、通常のジェノタイプ検査では微少 X4 株を見落とすことになる。CCR5 拮抗薬であるマラビロクの治療における有効性に対する微少 X4 株の影響に関してはまだ研究が十分ではないが、治療効果が低下する可能性は否定できない。血漿中 RNA と末梢血単核球 DNA における HIV-1 の R5 株と X4 株の存在率を比較すると、両者が共存した症例 C310 と C137 においてどちらも RNA の方が X4 株の存在率が高かった。また、CD4 数の比較的高い症例 C305 と C324 では同定さ

れたすべて変異株は R5 株であった。これらのことは、感染細胞は遊離ビリオンよりも半減期が相当長いために HIV-1 プロウイルスは過去に増殖した HIV-1 のアーカイブとなっており、HIV 感染症の進行にともない R5 株から X4 株に徐々に変化するというこれまでの知見とよく一致している。本研究において、微少 HIV-1 集団における細胞指向性を次世代シーケンサーを用いて検査することが可能であることが示された。今後、このシーケンシング技術を HIV-1 指向性検査の一般的方法として使用するためには、シーケンシングの正確性の向上、検体前処理の自動化、バーコード配列の多数利用によるコスト削減、操作性の高い解析ソフトウェアの開発などが必要であると考えられる。

#### E. 結論

次世代シーケンサーを用いて HIV-1 微少集団における細胞指向性を定量する方法を開発した。この方法により、抗 HIV 治療を受けている感染者の血漿 RNA あるいは末梢血単核球 DNA の中に R5 株と X4 株が共存することが示された。微少 X4 株の存在は、マラビロクのような CCR5 拮抗薬の治療効果に影響を与える可能性が高いと考えられる。抗 HIV 治療の最適化のため、次世代シーケンサーを用いた HIV-1 指向性検査の実用化を図ることが重要である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 加藤真吾：(2011) HIV 検査および HIV 関連検査 化学療法領域 27 (3) :71-77.
- 2) 加藤真吾、今井光信：(2011) HIV 検査の新たな展開 日本エイズ学会誌 13 (3) :132-136.
- 3) 近藤真規子、佐野貴子、今井光信、加藤真吾：(2011) 日本における HIV 検査体制 病原微生物検出情報 32 (10) :287-288.

##### 2. 学会発表

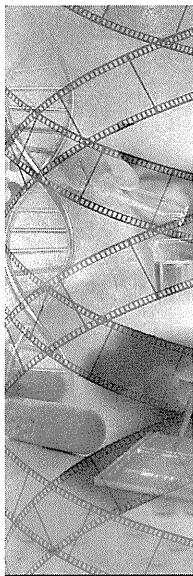
- 1) 加藤真吾、須藤弘二、今井光信：「マルコフモデルを用いた日本人 HIV 感染者数の推定」第 25 回日本エイズ学会学術集会 2011 年 11 月 30 日 -12 月 2 日 東京
- 2) 近藤真規子、佐野貴子、井戸田一朗、山中 晃、岩室紳也、相楽裕子、立川夏夫、今井光信、加藤真吾：「2010 年新規感染者から検出された CRF01\_AE/B リコンビナント HIV-1」第 25 回日本エイズ学会学術集会 2011 年 11 月 30 日 -12 月 2 日 東京
- 3) 服部純子、椎野禎一郎、渦永博之、林田庸総、吉田 繁、千葉仁志、小池隆夫、佐々木悟、伊藤俊広、内田和江、原 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」第 25 回日本エイズ学会学術集会 2011 年 11 月 30 日 -12 月 2 日 東京

- 4) 木内英、細川真一、五味淵秀人、田村久美、濱田洋平、橋本亜希、水島大輔、西島健、青木孝弘、渡辺恒二、本田元人、田沼順子、矢崎博久、塚田訓久、本田美和子、湯永博之、照屋勝治、菊池嘉、岡慎一、加藤真吾：「新生児における AZT-TP 細胞内濃度」第 25 回日本エイズ学会学術集会 2011 年 11 月 30 日 -12 月 2 日 東京
- 5) 田村久美、渡辺恒二、木内英、福田友彦、折戸征也、榎谷法生、野村耕太郎、細川真一、松下竹次、植田知幸、親泊あいみ、加藤真吾、湯永博之、菊池嘉、岡慎一：「妊娠 35 週に HIV スクリーニング陽性が判明したが、血中 HIV-RNA が検出されないために、診断と予防内服の判断に苦慮した 1 例」第 25 回日本エイズ学会学術集会 2011 年 11 月 30 日 -12 月 2 日、東京
- 6) 矢永由里子、高田千恵子、岳中美江、小泉京子、辻麻理子、加藤朋子、江崎直樹、井村弘子、紅林洋子、加藤真吾：「HIV 検査相談の研修ガイドライン策定と実践、今後の方向性について：相談対応の標準化を目指して」第 25 回日本エイズ学会学術集会 2011 年 11 月 30 日 -12 月 2 日 東京)
- 7) 須藤弘二、吉野宗宏、桑原健、白阪琢磨、加藤真吾：「LC-MS/MS を用いた毛髪中および血液中の抗 HIV 薬の定量」第 25 回日本エイズ学会学術集会 2011 年 11 月 30 日 -12 月 2 日 東京
- 8) 村山正晃、池野良、児玉泰光、田邊嘉也、山口玲、山崎さやか、加藤真吾、高木律男：「HIV-1 陽性者の唾液中に存在するウイルス RNA の完全性に関する研究」第 25 回日本エイズ学会学術集会 2011 年 11 月 30 日 -12 月 2 日、東京
- 9) 南宮湖、長谷川直樹、小林芳夫、加藤真吾、小谷宙、戸蒔祐子、別役智子、岩田敏、根岸昌功：「当院において HIV 患者に合併した悪性腫瘍の臨床的検討」第 25 回日本エイズ学会学術集会 2011 年 11 月 30 日 -12 月 2 日 東京
- 10) 柳瀬未季、吉田直子、坪井宏仁、木村和子、加藤真吾：「未承認 HIV 自己検査キット使用者における他検査の受検状況調査」第 25 回日本エイズ学会学術集会 2011 年 11 月 30 日 -12 月 2 日 東京
- 11) 佐野貴子、近藤真規子、須藤弘二、根岸昌功、山中晃、井戸田一朗、今井光信、加藤真吾：「HIV 迅速検査試薬の検討および即日検査への応用」第 25 回日本エイズ学会学術集会 2011 年 11 月 30 日 -12 月 2 日 東京

## 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

# 中国四国ブロックにおける薬剤耐性 HIV の動向調査研究 ～広島大学病院における未治療 HIV 感染者における薬剤耐性の解析～

研究分担者 **木村 昭郎** 広島大学原爆放射線医科学研究所血液・腫瘍内科 教授

研究協力者 **藤井 輝久**<sup>1</sup>、**齋藤 誠司**<sup>2</sup>、**高田 昇**<sup>3</sup>

<sup>1</sup> 広島大学病院輸血部准教授・エイズ医療対策室 室長

<sup>2</sup> 広島大学病院輸血部助教・エイズ医療対策室

<sup>3</sup> 広島文化学園大学看護学部 教授

未治療 HIV 患者における HIV の薬剤耐性関連変異について解析、検討した。本年度解析分では、明らかな耐性株保有者は 3 名であり、昨年より多かった。また今年はパートナー同士の薬剤耐性を検査する機会があり、それらの変異よりウイルスの自然変異のパターンを推測する可能性が示唆された。またインテグラーゼ領域には、あらたな耐性変異が多く出現していた。今後薬剤耐性のみならず指向性検査を行うにあたり、患者のウイルス量や結果の解釈が問題となることが予想された。

## A. 研究目的

我々は、厚生労働省研究班「国内で流行する HIV 遺伝子型及び薬剤耐性株の動向把握と治療法の確立に関する研究」に参加している。そこで広島大学病院における新規 HIV 感染者において薬剤耐性検査を行い、中国四国ブロックにおいて流行している HIV 遺伝子型や薬剤耐性株を把握する目的で本研究を行った。また初診時におけるウイルス指向性も把握する目的で、年度途中よりウイルスジェノタイプ指向性検査も追加して行った。遺伝子型や薬剤耐性、指向性の結果について、後方視的に集計し考察を行った。

## B. 研究方法

平成 22 年 12 月 1 日から平成 23 年 12 月 31 日までに広島大学病院を受診した HIV 感染者のうち、未治療者 14 名を対象とした。対象者に対して本検査の目的や方法などを文書によって検査前に説明し、初回は本人から書面で、2 回目以降は口頭で同意を得た。検体は研究協力者が記号化を行い、患者のプライバシーに触れることがないように配慮した。同意取得者より末梢血約 7mL を採血し、採血検体を国立病院機構名古屋医療センターに送付し、そこで HIV 薬剤耐性遺伝子型検査を行った。測定方法は既

報の方法で行われた。結果については本院で解析した。

解析の際、米国スタンフォード大学の HIV DRUG RESISTANCE DATABASE (<http://hivdb6.stanford.edu/index.html>) と、昨年度本研究事業成果の一部である HIV 薬剤耐性検査ガイドライン ver.5 を参照した。

さらに平成 23 年 8 月以降の新規未治療患者について、ウイルスジェノタイプ指向性検査についても口頭で説明し、承諾が得られた場合には前述の名古屋医療センターに検査を追加依頼した。検査の方法は、米国モノグラムバイオサイエンス社のフェノタイプ試験ではなく、Beerenwinkel らの用いた遺伝子型より指向性を類推するものである。遺伝子型から X4 指向性の確率を評価する Geno2Pheno (coreceptor) (<http://coreceptor.bioinf.mpi-inf.mpg.de/>) を使い、CXCR4 (X4) 指向性の確率を False Positive として表示し、その値が 5% 以上 (cut off index) であれば CCR5 (R5) 指向性とした。

### (倫理面への配慮)

検査が同一対象者で 2 回以上にわたる場合には、その都度説明し同意を得た。検体送付に際しては、研究協力者が連結可能匿名化を行い、患者のプライバシーに触れることのように配慮した。このため、



対象者 14 名全てより同意が得られた。

## C. 研究結果

### 対象者の概略

期間内の初診患者は 16 名であり、そのうち 5 名が既に前医で治療中であり 11 名が未治療患者であった。対象者 14 名であるが、そのうち 3 名は前年初診であり、治療前 2 回目の検査であった。全員日本国籍であり、全ての患者で HIV 薬剤耐性遺伝子検査を施行し得た。またジェノタイプ指向性検査は 5 名施行した。薬剤耐性遺伝子変異のプロファイルを表 1 に示す。

### 薬剤耐性遺伝子変異について

14 検体のうち、HIV 薬剤耐性検査ガイドライン ver.5 などと照らし合わせ、明らかに薬剤耐性ウイルスであったものが 3 例見られた (表 1)。そのうち No. 6 と No. 7 は両者ともプロテアーゼ領域に L10I, G16E, D60E, H69K, L89I の変異があり、Atazanavir, Tipranavir 耐性と考えられた。また薬剤耐性関連変異ではないものの、プロテアーゼ領域の変異は両者同一であり、かつ逆転写酵素領域、インテグラーゼ領域の変異も酷似していた。それらの領域における両者の差は、逆転写酵素領域で、No.6 が I47F, E204K, No.7 が D237N、インテグラーゼ領域で、No. 6 が Y83N, W108R の付加が見られるのみで、他は同一であった。さらにこの両者のウイルスサブタイプは AE であった。

逆転写酵素領域では、Thymidine Analog Mutation (TAM) と呼ばれる一連の遺伝子変異 (M41L, D67N, K70R, L210W, T215F/Y, K219Q/E) は、全例検出されなかった。Tenofovir 耐性と言われる K65R

や Lamivudine, Emtricitabine 耐性と言われる M184V, Nevirapine, Efavirenz 耐性と言われる K103 の変異などは、未治療者であるためか検出されていない。しかし 1 例のみ、Etravirine 耐性関連変異と考えられる V179D が検出された。逆転写酵素領域の全体の傾向として耐性変異はほとんど認められなかった。一方で、プロテアーゼ領域では今年も多くの変異が検出された。今年度の症例では、L10V, I15V, M36I/L, I62V が目立つ変異であった。昨年多くの症例で検出された R41K は、今年全く検出されなかった。前述の 2 例以外の薬剤耐性ウイルスは M46I, V77I であり、Indinavir 耐性と判断された。インテグラーゼ領域の変異は E157Q が 1 例であったが、V72I が 8 例認められた。表 2 に主な耐性関連変異の年次推移を示す。

### ウイルス指向性について

5 例のうち 4 例でウイルス増幅に成功し検査し得た。増幅不可であった 1 例の血中ウイルス量は 290 コピー /mL と非常に低値であった。4 例全て R5 指向性であった。

## D. 考察

未治療 HIV 感染者の結果について、今年の薬剤耐性株は 14 例中 3 例であり、症例数は少ないものの過去最高の頻度であった。しかしうち 2 例はパートナー同士での感染であった (表 1 中 No. 6 と No. 7)。この両者のサブタイプや薬剤耐性関連変異は同一で、かつ耐性関連以外の変異も酷似していた。両者の問診により、No. 6 が先行感染し No. 7 は性行為により No. 6 のウイルスに感染したことが想像された。先行感染と思われる No. 6 の方が、耐性関連以外の

表 1 2011 年に薬剤耐性検査を行った未治療 HIV 感染者の一覧とその変異

Case No.	プロテアーゼ領域変異	判定	逆転写酵素領域変異	判定	インテグラーゼ領域変異	判定
1	-	S	-	S	E157Q	S
2	A71V	S	-	S	-	S
3	-	S	-	S	-	S
4	L10V, M36I, I62V, L63P	S	-	S	-	S
5	M46I, I62V, L63P, V77I, L89I	R*1	V179D	S	V72I	S
6	L10I, G16E, M36L, D60E, I62V, H69K, L89I	R*2	-	S	-	S
7	L10I, G16E, M36L, D60E, I62V, H69K, L89I	R*2	-	S	-	S
8	I15V	S	-	S	V72I	S
9	L10V, I15V, A71V	S	-	S	V72I	S
10	I15V	S	-	S	V72I	S
11	M36I, I15V	S	-	S	V72I	S
12	I15V, V77I	S	-	S	V72I	S
13	I15V, I62V, A71V	S	-	S	V72I	S
14	I15V, I62V, A71T	S	-	S	V72I	S

判定の欄 S;感受性, R;耐性, R\*1;Indinavir耐性, R\*2;Atazanavir, Tipranavir耐性



ジやブロック内での研究会・研修会などを通じて周知していきたい。

## E. 結論

本院を受診した未治療 HIV 患者においてその薬剤耐性関連変異パターンを考察した。経年的にみると、今年に変異が増えており、明らかな耐性株保有者も3名認められた。また耐性関連以外の変異やウイルス指向性検査を見ることで、感染からの時間経過や病状進行を予測できる可能性が示唆された。今後もさらに研究を発展・継続するために、ブロック内の診療施設への宣伝活動が必要であると考えた。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 発表論文

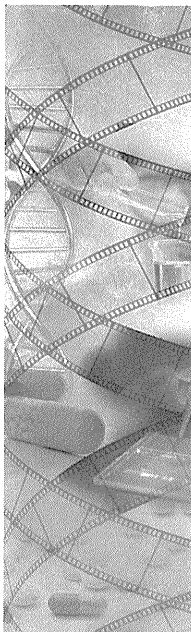
- 1) 齋藤誠司、鍵浦文子、喜花伸子、船附祥子、藤田啓子、畝井浩子、藤井輝久、高田昇、木村昭郎：HIV/HBV 重複感染症例における HBV に対する治療経験とその考察 日本エイズ学会雑誌 in press.

### 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、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頻度の動向 第25回日本エイズ学会学術集会（平成23年11月30日～12月2日 東京）
- 2) 齋藤誠司、鍵浦文子、藤井輝久、高田昇、木村昭郎：HIV 感染症に関連した甲状腺機能異常症8例の考察 第25回日本エイズ学会学術集会（平成23年12月30日～12月2日 東京）

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし



## 抗 HIV 薬の薬物動態に関する臨床研究

～抗 HIV 薬剤血中濃度モニタリング～

研究分担者 **栗原 健** 独立行政法人国立病院機構 京都都病院 薬剤科 薬剤科長  
 研究協力者 **芝田 信人**<sup>1</sup>、**加藤 真吾**<sup>2</sup>、**須藤 弘二**<sup>2</sup>、**上平 朝子**<sup>3</sup>、**白阪 琢磨**<sup>3</sup>、  
**吉野 宗宏**<sup>4</sup>、**矢倉 裕輝**<sup>4</sup>、**照屋 勝治**<sup>5</sup>、**土屋 亮人**<sup>5</sup>、**林田 庸総**<sup>5</sup>、  
**高橋 昌明**<sup>6</sup>、**小田原 隆**<sup>7</sup>、**味澤 篤**<sup>8</sup>、**今村 顕史**<sup>8</sup>、**牧江 俊雄**<sup>9</sup>  
<sup>1</sup> 同志社女子大学薬学部生物薬剤学教室  
<sup>2</sup> 慶應義塾大学医学部微生物学・免疫学教室  
<sup>3</sup> 独立行政法人国立病院機構大阪医療センター免疫感染症科  
<sup>4</sup> 独立行政法人国立病院機構大阪医療センター薬剤科  
<sup>5</sup> 独立行政法人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  
<sup>6</sup> 独立行政法人国立病院機構名古屋医療センター薬剤科  
<sup>7</sup> 三菱東京 UFJ 銀行健康管理センター、<sup>8</sup> 東京都立駒込病院感染症内科、  
<sup>9</sup> 医薬品医療機器総合機構

### 研究要旨

①研究班が開設したホームページは平成 23 年 11 月末現在、通算アクセス数 13344 件、パスワード取得者 218 名。平成 23 年 4 月～平成 23 年 11 月末までに研究班が (株) BML に委託し測定した検体の測定件数は 1161 件で、29 施設からの利用があった。件数の内訳はラルテグラビル:279、リトナビル:220、ダルナビル:219、ロピナビル:181、テノホビル:148、エファビレンツ:42、アタザナビル:29、エトラビリン:22、ホスアンプレナビル:9、ネルフィナビル:1、マラビロク:11 であった。また、CYP2B6 遺伝子検査の今年度依頼件数は 1 件であった。

②2011 年 1 月 10 日付けで改訂された DHHS ガイドラインには、エトラビリン(ETR)、ダルナビル(DRV)、ラルテグラビル(RAL)の過去の臨床試験で測定されたトラフ濃度の中央値とその範囲が示された。今回我々は DHHS ガイドラインで示されたデータと、国内で収集した血中濃度測定データの比較検討を行った。方法は 2008 年 8 月から 2011 年 10 月までに、当研究班で収集した ETR、DRV (QD)、RAL の血中濃度データからトラフ値のみを抽出し、中央値(範囲)、標準偏差を算出した。ETR (n=28) トラフ値の中央値(範囲) ± 標準偏差は 609 (164-1914) ± 410 (ng/mL)、DRV (QD) (n=117) は 1797 (175-11101) ± 2119 (ng/mL)、RAL (n=164) は 184 (15-3140) ± 414 (ng/mL) であった。改訂された DHHS ガイドラインには、ETR トラフ濃度の中央値とその範囲は 275 (81-2980) ng/mL と示され、DRV (1 日 2 回投与) は 3300 (1255-7368) ng/mL、RAL は 72 (29-118) ng/mL と示されている。収集した DRV のデータは、多くが 1 日 1 回で使用されているため、ガイドラインに示されたデータとの直接比較はできなかった。ETR、RAL は共に DHHS ガイドラインが示した数値より高値を示した。国内において新規抗 HIV 薬は、国内での治験は行わず、海外データのみで迅速承認申請が可能となったため、発売当初における日本人での体内動態は不明である。承認時に不明な日本人における抗 HIV 薬の薬物動態を明らかにすることで、安全で効果的な治療効果の向上を図ることが可能になると思われた。

### A. 研究目的

プロテアーゼ阻害剤 (PI)、非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤 (NNRTI)、インテグラーゼ阻害剤 (INSTI) は HIV 感染症治療薬として広く使われ、

めざましい改善をもたらした薬剤である。しかし、PI、NNRTI、INSTI の体内動態は、主に海外から報告されたもので、日本人でのデータが限られていることが問題とされている。また、近年発売されてい