

## 研究要旨

# 北海道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 佐藤 典宏 北海道大学病院高度先進医療支援センター 教授

研究協力者 吉田 繁 北海道大学大学院保健科学研究院病態解析学分野 助教

北海道ブロックにおける新規 HIV 感染者数の動向ならびに薬剤耐性 HIV の検出率の調査を目的に、新規感染者血液中の HIV の遺伝子解析をおこなった。2011 年 1 月～12 月に北海道大学病院を新規受診した HIV 感染者は 23 名であり、そのうち新規感染者は 19 名であった。薬剤耐性変異については新規感染者 1 名からプロテアーゼ阻害剤の耐性変異 M46L を有する薬剤耐性 HIV が検出された。今年度は新規感染者数が過去最高であったが、薬剤耐性 HIV の検出数に大きな変化はみられなかった。新規感染者数の増加に伴い、薬剤耐性 HIV の検出数も増加する可能性があることから、継続的な調査が必要である。

## A. 研究目的

本邦における薬剤耐性 HIV-1 の発生動向把握のため、北海道ブロックにおける新規 HIV 感染者数の動向ならびに新規感染者における薬剤耐性 HIV-1 の遺伝子解析を目的とする。

## B. 研究方法

北海道ブロックにおける 2011 年度の新規 HIV 感染者数を調査する。調査期間中に認められた新規 HIV 感染患者の血清および血球を凍結保存し、血清中に存在する遊離 HIV-1 の pol, gag, env 領域の遺伝子配列を解析し、薬剤耐性ならびに subtype の決定をおこなう。

### (倫理面への配慮)

本研究は北海道大学医学研究科・医学部医の倫理委員会により承認されたものであり、担当医から患者へ研究の説明を行い、同意書に署名をしていただいた患者について検査をおこなっている。情報保護に関してはアクセスユーザー制限、パスワード設定、匿名コード化をおこなっている。

## C. 研究結果

2011 年 1 月～12 月に北大病院を新規受診した HIV 感染者は 23 名であり、そのうち新規発生者は

19 名であった。エイズ動向委員会からの報告では、北海道ブロックでの 2011 年 1 月～9 月の新規 HIV 感染者は 12 名であり、同期間での本院での新規 HIV 感染者も 12 名であったことから、この期間内における北海道ブロックで発生した新規感染者捕捉率は約 100%であった。新規感染者 19 名は男性 18 名、女性 1 名であり、年齢は 30～39 歳が最も多く 9 名 (47.4%)であった。感染経路は同性間 10 名 (52.6%)、異性間 7 名 (36.8%)、不明 2 名 (10.6%)であり、受診時の病期は HIV 感染期 13 名 (68.4%)、AIDS 期 6 名 (31.6%)であった。

これら新規感染者について受診時サンプルを用い薬剤耐性検査により変異の解析をおこなったところ 19 名中 8 名 (42.1%)に IAS-USA もしくは stanford で報告されている薬剤耐性変異を認めた (図 1)。8 名中 1 名にプロテアーゼ阻害剤耐性に強く関係する変異 M46L が検出された。インテグラーゼ領域の耐性変異は検出されなかった。Subtype は B が 15 名 (78.9%)、AE が 3 名 (15.8%)、AG が 1 名 (5.3%)であった。また、HBs 抗原陽性者が 3 名確認された。

## D. 考察

今年度の新規感染者は 19 名と過去最高であった。本院における新規感染者の特徴は日本国内と同様に

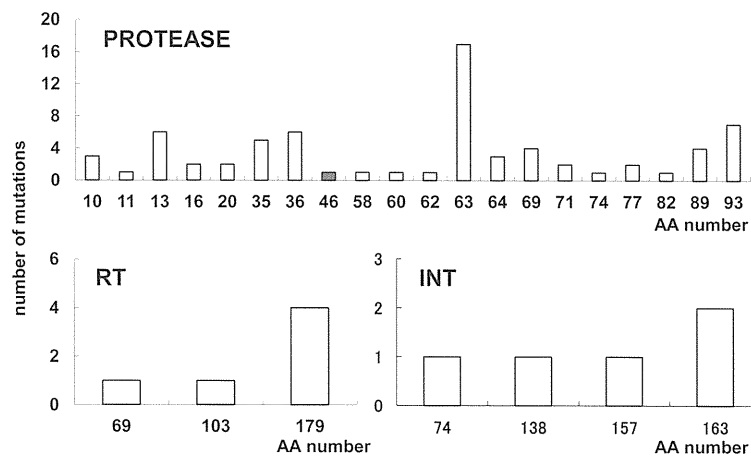


図1 2011年度新規HIV感染者から検出された薬剤耐性変異  
Major mutation (■), minor mutation (□)

30-40歳代、同性間、日本男性であった。また本年度の特徴として異性間感染者が例年15-20%であったが本年度は36.8%と高値であったことがあげられる。異性間感染者において年齢や性別などの分布に変化はなく、subtypeはBが5名(71.4%)、AEが2名(28.6%)であることから海外もしくは外国人との接触による感染よりはむしろ国内での感染であると思われる。今後、異性間感染者の動向については注意する必要がある。また、薬剤耐性HIVはプロテアーゼのM46Lを有する1検体のみであった。しかしながら、マイナー変異を有する株が約40%の患者から検出されている。これらのマイナー変異株は流行株として定着しつつあることが考えられた。今年度の北海道ブロックでの新規感染者数は過去最高であり、首都圏と比較するとまだその数は少ないものの、薬剤耐性HIVによる新規感染者が増加する可能性は否定できない。今後の更なる調査の継続と北海道ブロックにおける調査体制の充実が重要であると考えられる。

## E. 結論

- 1) 2011年度に北大病院を受診した新規感染者数は19名と過去最高であった。
- 2) 異性間感染者の増加が目立った。
- 3) 薬剤耐性HIV(プロテアーゼM46L)は1検体であった。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

#### 口頭発表

#### 国内

- 1) 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回日本エイズ学会総会・学術集会 2011年12月 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

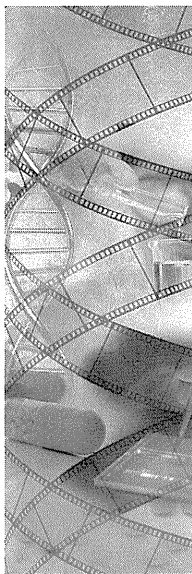
なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし



## 研究要旨

# HIV の分子進化学的解析

研究分担者 **椎野 禎一郎** 国立感染症研究所・感染症情報センター 主任研究官

わが国の HIV-1 感染者における薬剤耐性変異の状況を調べるために、我々は患者・検体・塩基配列情報のデータベースの作成事業を行っている。このデータベースに集められた配列情報を分子進化学的手法で解析し、わが国における HIV-1 感染の動態を明らかにすることを目的として、解析を進めている。データベースにある患者情報から、2002 年～2008 年の初診時に採取された検体の Protease-RT 領域の塩基配列のうち、Subtype B に分類される検体を抽出し、解析に供した。分子系統樹解析の結果、247 個の国内採取検体のみからなる微小系統群が見出された。これらは、国内感染クラスターを示していると考えられる。感染クラスターに含まれる患者数は、2 患者のペアからなるものが最も多いが、41 人の感染者が集まるクラスターも見出された。この度数分布はべき乗則に従うため、クラスターのネットワーク構造はスケールフリーネットワークとみなされる。我が国の HIV-1 感染者においては、すでに CRF01\_AE でもスケールフリー性が示唆されているが、Subtype B でも感染クラスターに注目した対策が求められる。各感染クラスターの祖先配列の存在時期 (tMRCA) を、Bayesian Markov Chain Monte-Carlo 法で解析したところ、感染クラスターは 1990 年代後半から発生し始め、2000 年ごろにピークを迎えていることが明らかになった。クラスターのサイズと tMRCA には弱い相関が見られた。一方、地理的分布の多様性と tMRCA には相関がなく、侵淫後に時間を経たクラスターにおける感染者の分布が特定の地域にとどまる場合と、はやくから分布を広げる場合が見出された。大きなクラスターのいくつかは、薬剤耐性アミノ酸変異の伝播過程と関連付けられた。また、ペアをのぞくクラスターの殆どは、日本人男性同性愛者のみで構成されていた。我が国において、Subtype B は日本人男性同性愛者のコミュニティで感染クラスターを形成して感染を広げているが、感染拡大の様式は個々のコミュニティの特性に依存して様々であると推測される。

## A. 研究目的

研究班で収集された患者・検体・塩基配列情報をデータベース化し、わが国における HIV-1 感染の動態を経時的・地理的・サブタイプ依存的に描き出す

わが国における HIV-1 感染の実態の把握に必要な

通常の疫学情報の解析とともに、分子進化学的手法を用いた塩基配列の大量解析を行う

## B. 研究方法（倫理面への配慮）

Web サーバと DB サーバの連携によって、研究班が集める患者／検体情報を情報ネットワークを活用して効率的に収集・集積・検索するシステムを構築する。

上記の情報システムに蓄積された Protease-RT 領域の塩基配列データを用いて、距離行列／近隣接合法を用いたサブタイピングとクラスター候補の高速・逐次抽出を行う。

各サブタイプの塩基配列データを、Bayesian Markov Chain Monte-Carlo 法で解析し、最適塩基置換モデル・進化パラメーター・時間系統樹トポロジー・クラスター候補の tMRCA 推定を行う。

Bayesian Markov Chain Monte-Carlo 法でスカイラインプロット解析を行い、ウイルス集団サイズの経時変化を推定する。

### C. 研究結果

本年度は、日本国内の Subtype B 感染者 について上に記した方法で解析を行った。2002 年～2008 年までの 8 年間に pol 領域の塩基配列が解析できた検体は、protease 領域が 2319、RT 領域が 2317 であった。これらの配列のうち、患者・検体データベースとの再照合で重複やデータリンク途絶があった検体を除いたのちに、両領域を連結し、HXB2 番地 2253～3269 が揃っているものを抽出したところ、対象配列は 2150 に減じた。これらの配列を、100bp のウィンドウをずらしながらサブタイプ基準配列との平均塩基置換数を調べる方法で組換え体を考慮したサブタイピングを行った結果、全領域が Subtype B であるものは 1882 配列であった。これらを以下の解析に entry した。これらの配列のウイルスに感染した患者は、男性 1797 名 (95.5%)、MSM 1346 名 (71.5%)、日本人 1681 名 (89.3%) が優勢だった (図 1)。これらの配列に公開データベースにある国外採集の Subtype B 検体の 322 配列を加え、距離行列法 (図 2) で分子系統樹を推定した。これまでの研究で、感染

症の感染ネットワークの次数分布には一般にべき乗則がある (スケールフリー性がある) ことがわかっている。そこで、分子系統樹におけるクラスタの有意性の指標であるブートストラップ値の閾値を知る手法ために、各ブートストラップ値において有意なクラスタの構成配列数の次数分布の両対数値を回帰分析し、決定変数 ( $R^2$ ) の変動が最大になるブートストラップ値をもって、有意なクラスタとした。さらに、国外採取配列を含まないクラスタの最大値を選び、国内感染集団の微小系統群 (MC) を決定した。 $R^2$  の変動が最大になるブートストラップ値は 76%、検出された MC は 247、MC に属する患者の総数は 756 名であった。自分以外の日本由来の患者と直接の遺伝的関係を持たないウイルスに感染している患者は 1126 名であった。感染ネットワークのスケリング指数は、異性間接触が主な要因である CRF01\_AE の約半分で、MSM ネットワークでより感染が広がりやすいことが示された (図 3)。また、ペアをのぞく MC の殆どは、日本人男性同性愛者のみで構成されていた。距離行列法の樹形を 12 に分割して、個々のサブツリーについて Bayesian coalescence MCMC 法を用いて時間系統樹の推定と各 MC の起源配列の発生時期 (tMRCA) の推定を行った。MC の tMRCA から推測された感染クラスタの日本への伝播時期の分布は、1990 年代後半に始まり 2000 年ごろにピークとなっていた。MC の患者サイズと tMRCA の間には弱い相関が見られた (図 4)。一方、MC 内の患者の来院地域の多様性と

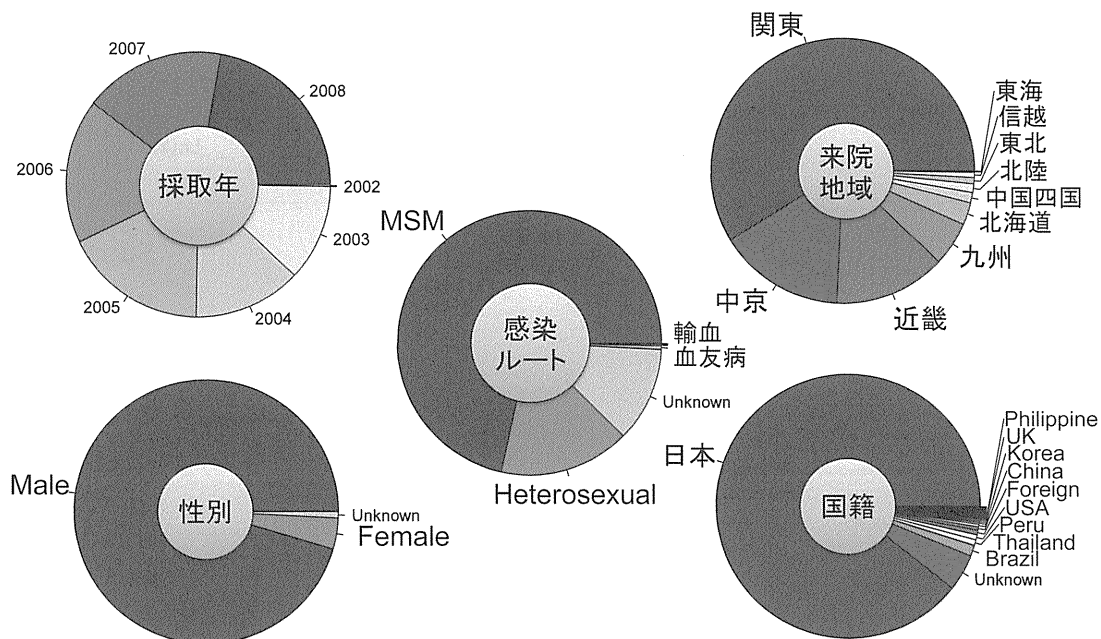


図 1 検体概要

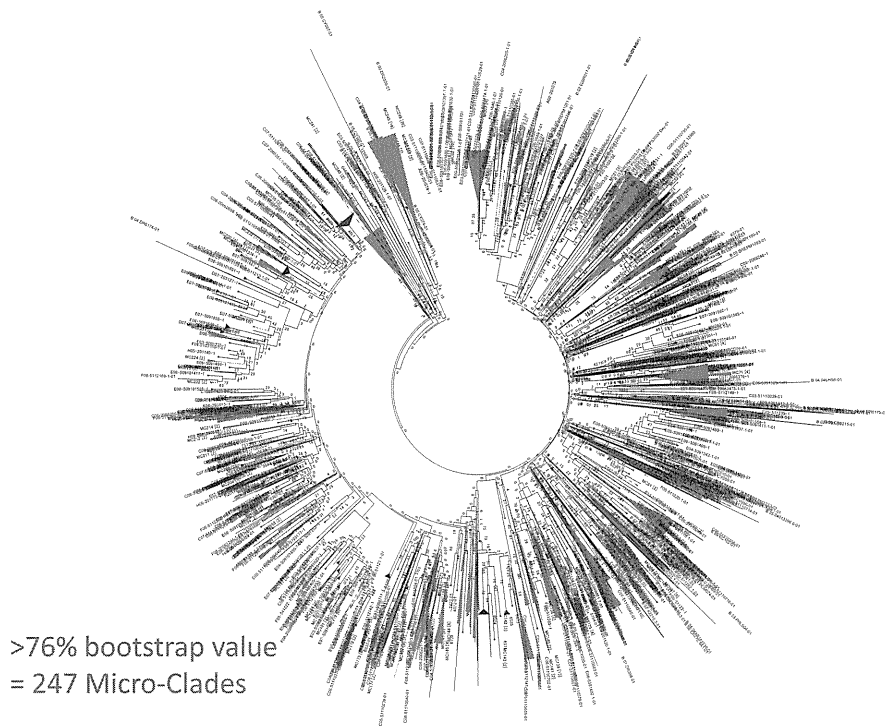


図 2 距離行列法と近隣接合法による日本国内の Subtype B の分子系統樹

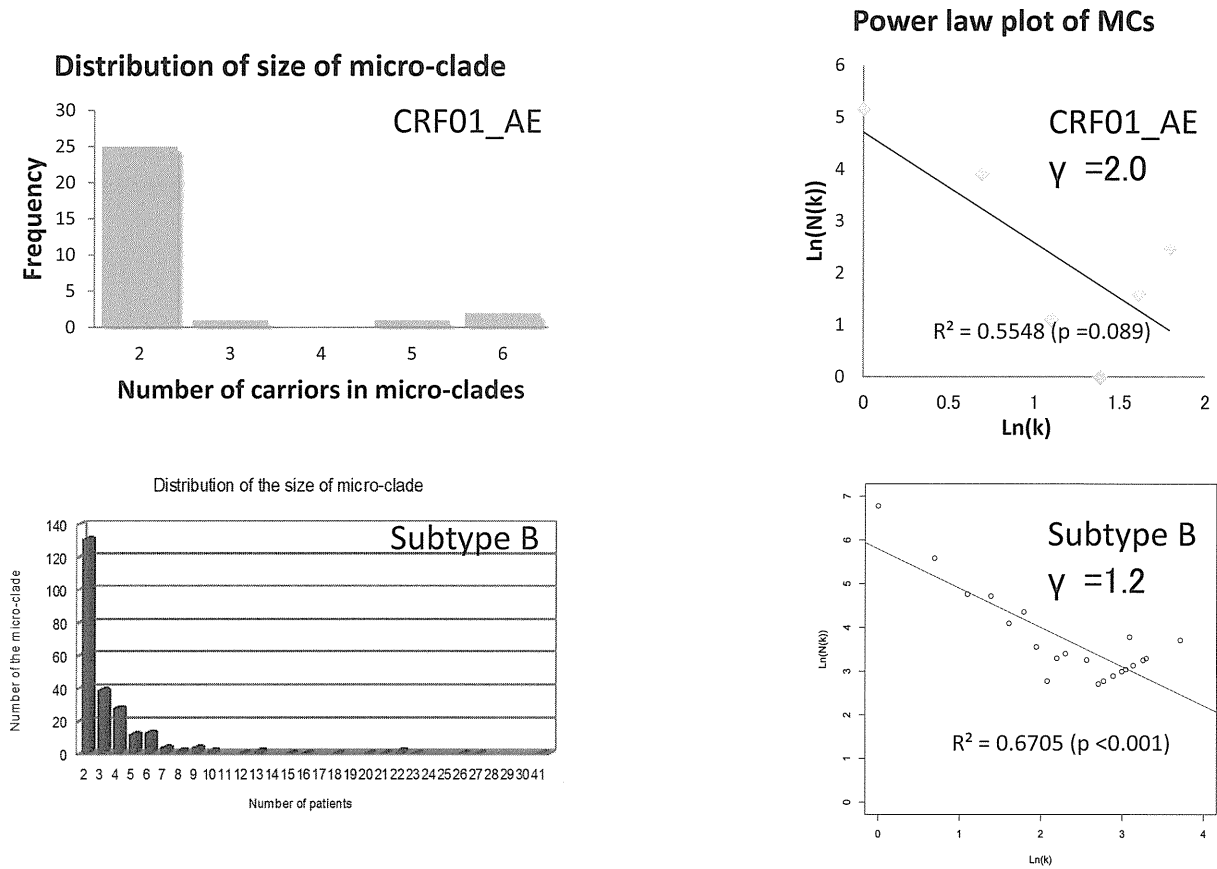


図 3 感染クラスタのスケールフリー性

tMRCA の間には相関がなく、侵淫後に時間を経たしたクラスターにおける感染者の分布が特定の地域にとどまる場合と、複数の地域に分布を広げる場合が見出された (図4)。大きな MC について詳細な分岐構造を調べたところ、複数の地域に分布を広げる場

合の様相には、特定の傾向が見いだせなかった (図5)。一方、いくつかの MC においては、配列の分岐過程と薬剤耐性アミノ酸変異の伝播が明確に関連付けられた (図5)。

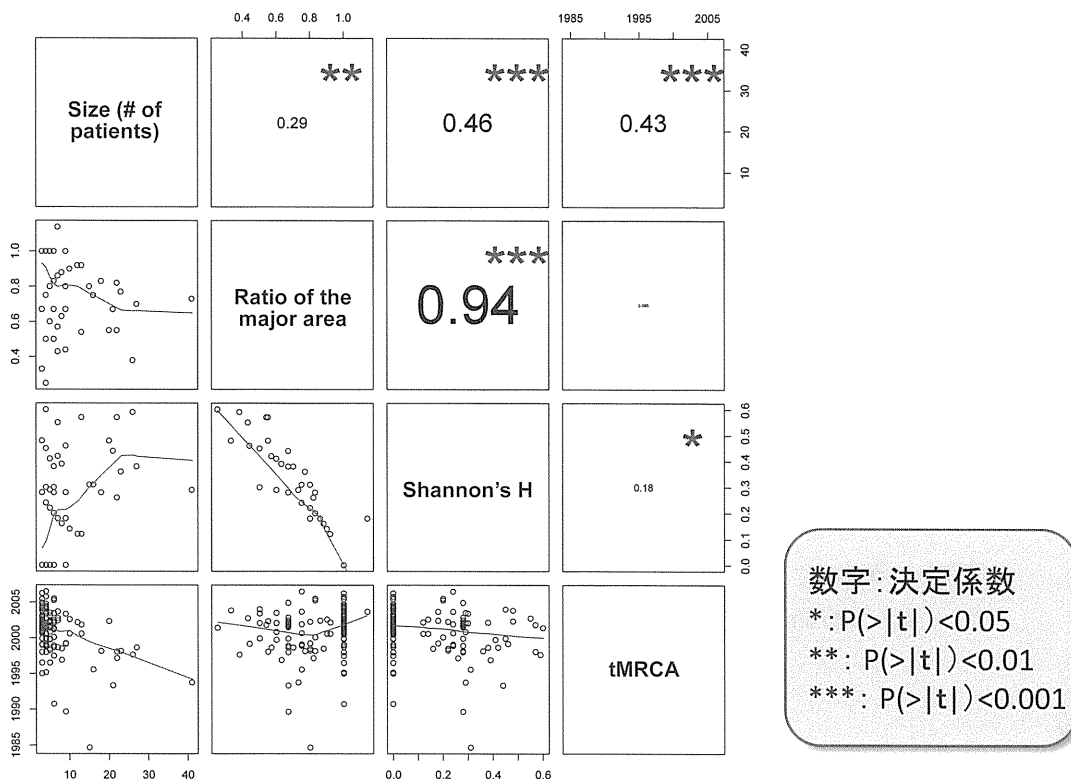


図4 Clusterの相関分析

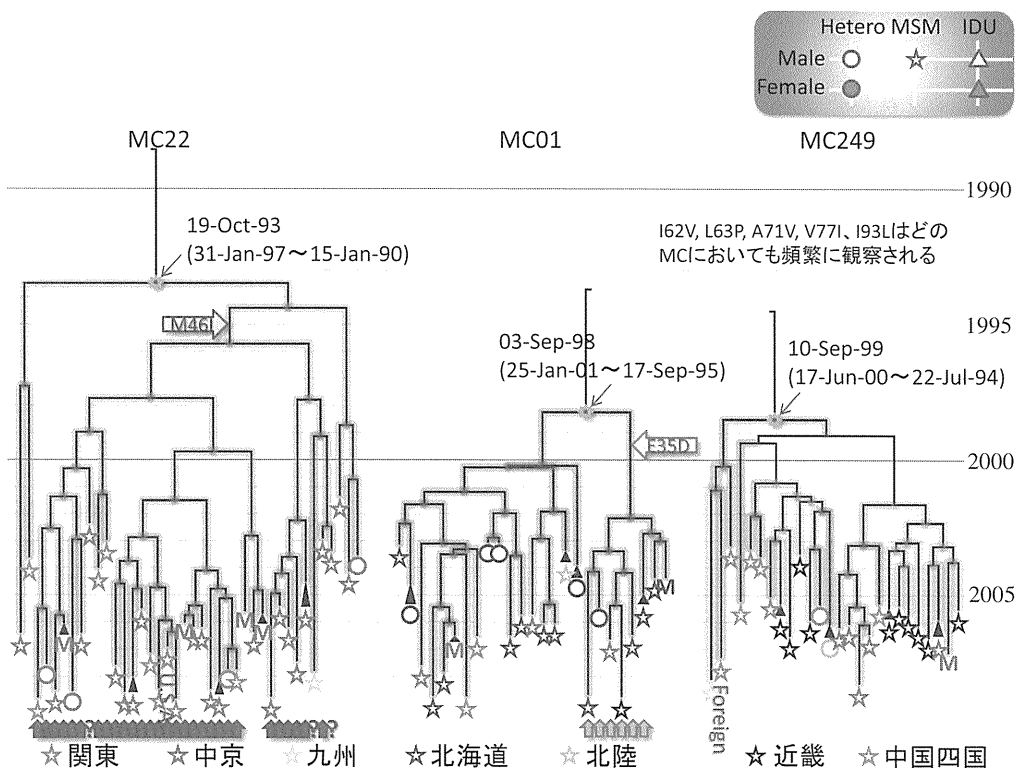


図5 Maximum clade credibility trees of some large Micro-Clades

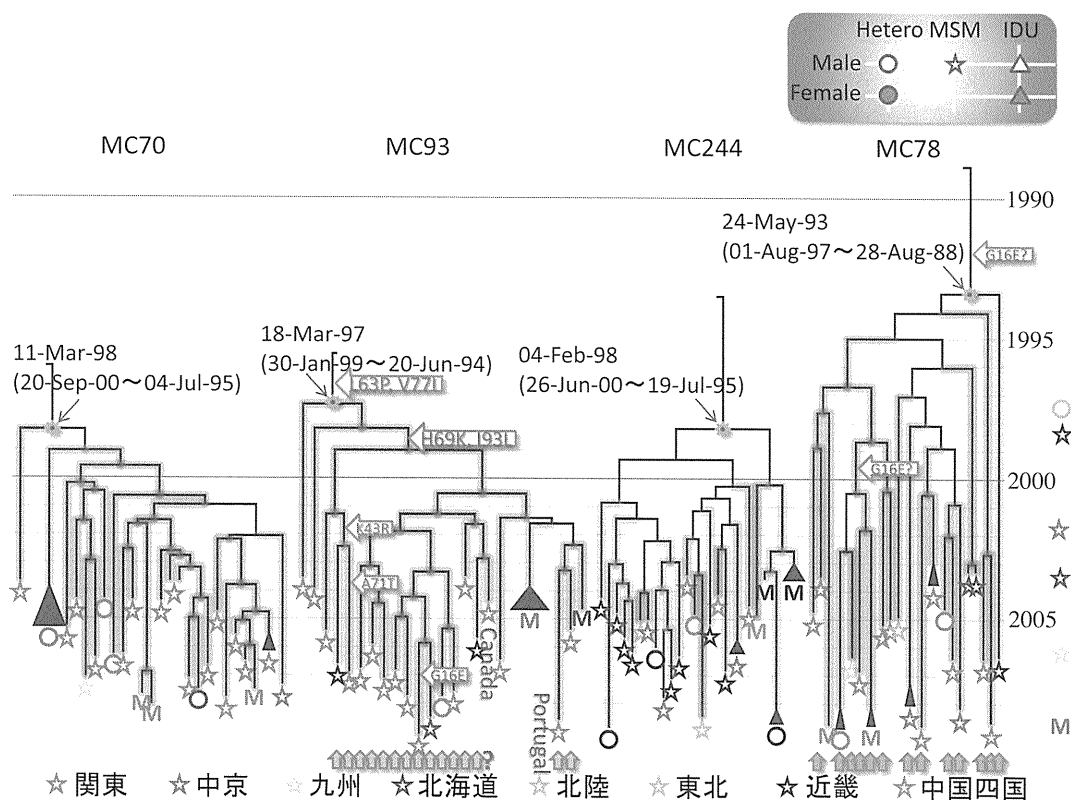


図 5 Maximum clade credibility trees of some large Micro-Clades (続き)

**D. 考察**

本研究は、日本国内の Subtype B 感染者を対象とした初めての大規模な塩基配列解析である。2000 以上の検体を効率的に解析するために、サブタイピング・クラスタリング・高度解析法の各段階で新たな自動化手法が取り入れられている。とりわけ、大量配列の一括・組換え体検出のサブタイピング手続と、べき乗則にしたがって判定するクラスタリング手続は、本研究で初めて提案された手法であり、今後の大量分子疫学解析の指針となるだろう。解析の結果、国内の Subtype B 感染は、これまで示唆されていた以上に MSM が感染拡大に関わっていることが明らかとなった。MSM はまた、ほかのリスク因子に比べて、ネットワークの形成規模が大きい。一方で、地域的な伝播については、個々の感染クラスターによってかなり異なる結果が得られている。このことは、国内の MSM の社会的ネットワークが、地域との関わりが多様な多数の分集団からなりたっていることを示している。これらの知見は、我が国で最も感染を拡大している HIV-1 サブタイプである Subtype B の感染防止を考える際に、MSM コミュニティごとのきめ細やかな対策が必要であることを示している。今後の Subtype B 感染対策には、臨床分野のみならず社会学分野とこうした認識を共有することが大切であると思われる。

**E. 結論**

我が国において、Subtype B は日本人男性同性愛者のコミュニティで 200 を超える多数の感染クラスターを形成して感染を広げているが、感染拡大の様相は個々のコミュニティの特性に依存して様々である。

**F. 健康危険情報**

**G. 研究発表**

1. 原著論文

欧文

和文

2. 口頭発表

海外

- 1) [T Shiino](#), K Sadamasu, J Hattori, M Nagashima, Y Iwatani, Y Yokomaku, W Sugiura, Molecular phylogenetic analysis of nationwide HIV-1 infection in Japan. Spreading dynamics of the epidemic estimated from surveillance data from 2003 to 2009. 6<sup>th</sup> IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention. 17-20 July 2011. Roma. Italy.

国内

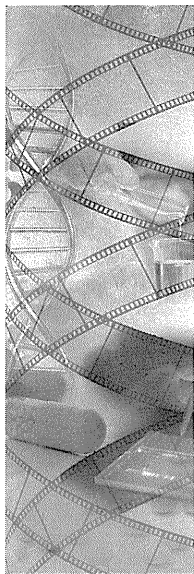
- 1) [榎野 禎一郎](#)、[服部 純子](#)、[瀧 永博之](#)、[吉田 繁](#)、[伊](#)



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 回日本エイズ学会学術集会総会 2010 年 12 月 東京

#### 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



## 研究要旨

# 近畿ブロックにおける薬剤耐性 HIV の動向調査研究 ～近畿地区における薬剤耐性検査体制確立のための研究～

研究分担者 白阪 琢磨 国立病院機構大阪医療センター臨床研究センター 部長

研究協力者 渡邊 大<sup>1</sup>、上平 朝子<sup>2</sup>、鈴木 佐知子<sup>1</sup>、岡本 瑛里子<sup>1</sup>、蘆田 美紗<sup>1</sup>、土肥 浩美<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 大阪医療センター・臨床研究センター

<sup>2</sup> 大阪医療センター・感染症内科

新規診断 HIV 感染者における薬剤耐性のサーベイランスを行った。また、新規クラスの抗 HIV 薬である raltegravir (RAL) の耐性変異が出現した症例について検討した。2011 年に診断され、未治療のまま薬剤耐性検査が行われた 99 症例がサーベイランスの対象となった。抗 HIV 薬の選択に関わる耐性変異を認めなかった。2011 年に RAL の耐性変異を 3 症例に認めた。それらの症例の患者背景として、既存の他のクラスの薬剤耐性や、アドヒアランス等の問題があげられた。RAL はウイルス学的効果や忍容性に優れる一方で、耐性獲得に対する genetic barrier が低く、耐性変異の出現には注意が必要である。

## A. 研究目的

薬剤耐性ウイルスの出現は、抗 HIV 療法の成功を妨げる因子の一つである。そのため、適切な薬剤耐性検査の実施が必要とされる。また、その結果を臨床に反映させるノウハウも必要となる。このような背景から、当院における新規に診断された HIV 感染者における薬剤耐性変異の頻度の調査と、新しいクラスの抗 HIV 薬である raltegravir (RAL) に対する耐性変異を認めた症例の調査を行った。

## B. 研究方法

患者から採血後、血漿を分離し、ウイルス RNA を抽出した。その後特定のプライマーを用いて RT-PCR 法で HIV の逆転写酵素 (RT) およびプロテアーゼ (PR) 領域を増幅した。一部の症例ではインテグラーゼ (IN) 領域についても増幅を行った。増幅された DNA を direct sequencing 法にて決定した。決定された塩基配列を既報告の薬剤耐性に関連する変異と照合した。これらの解析は Seqscape Ver 2.6 (Applied Biosystems) と Stanford University HIV drug resistance database を用いた。2011 年に独立行政法人国立病院機構大阪医療センターで薬剤耐性検査を実施した症例のうち、2011 年に初めて感染が確認されたものを対象とし、カルテから情報を収集し検討を

行った。

RAL を含む抗 HIV 療法を施行中の症例のうち、2011 年に IN 領域に耐性変異を認めた症例の経過について、カルテから情報を収集した。

## (倫理面への配慮)

研究の遂行に関しては、当院の倫理委員会に相当する受託研究審査委員会で承認を得た。いずれも個人情報の取り扱いについては厳重に行った。

## C. 研究結果

国立病院機構大阪医療センターの年間初診患者数は、2009 年度に低下を示すも、2010 年度は 260 名と過去最高の患者数であった (図 1)。累積患者数も 2000 例を超え、年間の CD4 数やウイルス量の検査数も 8000 件以上となった (図 2)。年間の耐性検査の検査数も、変動を認めるものの、2010 年度は過去最大の 176 件であった。2011 年に初めて感染が確認され、未治療のまま薬剤耐性検査が実施された症例は 99 症例であった。その症例の患者背景を図 3 に示した。抗 HIV 療法の導入前に耐性検査が実施された症例を多く認めたため、CD4 陽性 T リンパ球数の中央値が 161/ $\mu$ L と、免疫が低下していた症例が多数を占めていた。推定感染経路やサブタイプは例年

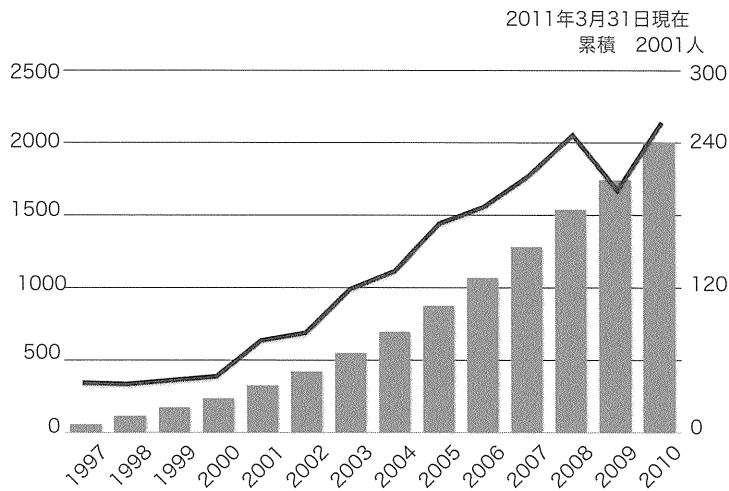


図1 累積患者数と年間新規患者数の推移

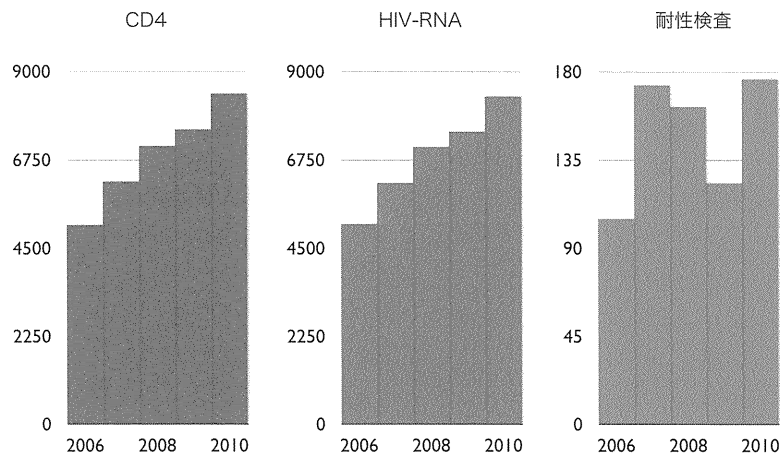


図2 年間の検査数

推定感染経路		サブタイプ		肝炎	
同性間	71例	B	95例	HBsAg陽性	5例
異性間	10例	01_AE	3例	HCV-RNA陽性	3例
不明	18例	02_AG	1例	CD4数	
推定感染場所		検査歴		中央値	161/ $\mu$ L
国内	83例	初回検査	46例	最大	661/ $\mu$ L
国外	1例			最小	1/ $\mu$ L
不明	15例			HIV-RNA量	
国籍				中央値	123,000cp/ml
日本	99例			最小	165cp/ml
				最大	12,600,000cp/ml

図3 2011年 耐性検査 患者背景 新規診断患者、99名から検体採取

通りであり、最も多く認めた項目はそれぞれ同性間性的接触とサブタイプ B をであった。耐性検査の結果を図 4 に示した。本年度は新規診断患者において治療の変更を必要とするような耐性変異を認めなかった。

2011 年に行った薬剤耐性検査のうち、RAL の耐性変異を 3 症例に認めた。症例 1 は過去に治療失敗歴のある症例であった (図 5)。ABC/3TC+EFV で経過が良好であったが、初診後 1900 日あたりでアドヒアランスが低下し、それまで測定感度未満で維持されていた血中 HIV-RNA 量が上昇した。薬剤耐性検査 (図 5 の白矢印) を行ったところ、RT 領域に M184V と K103N の耐性変異を認め (図 6)、3TC お

よび EFV に対する高度耐性が推測された。抗 HIV 療法を ABC/3TC+EFV から ABC/3TC+DRV/r に変更し、その後 ABC/3TC+RAL に変更となった。しかし、抗 HIV 薬の副作用や合併症の悪化などが重なり、アドヒアランスの改善も乏しく、2 回目の薬剤耐性検査 (図 5 の黒矢印) では、IN 領域に G140S、Q148H の耐性変異を認め、RAL に対する高度耐性が推測された (図 7)。

症例 2 は回盲部悪性リンパ腫があり、人工肛門を増設していた症例であった (図 8)。Entecavir が約半年投与されていたが、初診時の耐性検査では RT 領域の M184 に耐性変異を認めなかった (図 9)。ABC/3TC+LPV/r で初回治療が導入された。

PR領域 (99症例)			RT領域 (97症例)		
L10I/V	19	I62V	35	A62V	1
I13V/A	19	L63A/V/D/N/ P/Q/S/T	84	T69N/S/A/Y	3
G16E	8	I64V/L/M	18	A98S/G/S	4
K20R/I	8	H69Q/K/Y	7	V90I	1
L33F/I	1	A71T/I/V	22	K101R	1
E35K/D	22	T74A/S	4	K103R	5
M36I/L	24	V77I	32	V106I	2
K43R	2	V82I	4	E138A	1
M46L	1	L89F/M	11	V179D/I/E/S	16
G48R	1	I93L	51	L210C/D/E/L	5
I54T	1				(人)
Q58E	1				
D60E/N	7		(人)		

図 4 2011 年 耐性検査 結果

症例 1 40 歳代男性 2003 年新規診断例 サブタイプ B  
合併症：糖尿病・高コレステロール血症  
高血圧症

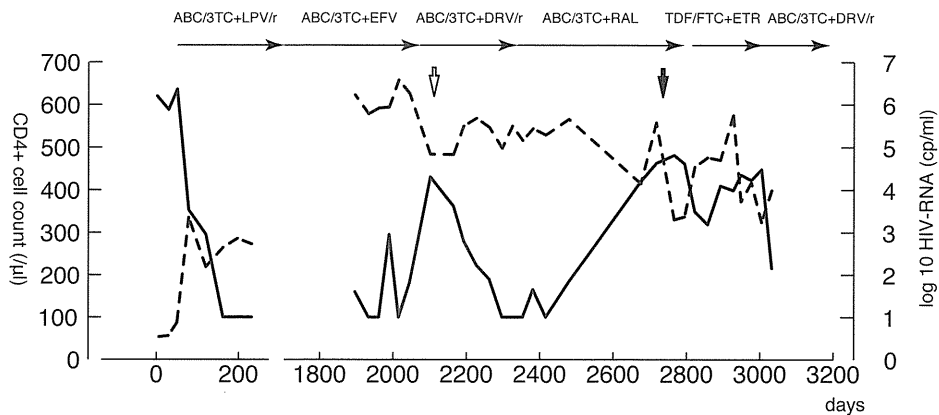


図 5 症例 1 (経過)

↓ 初回 PR: A71T  
 RT: A62V, M184V, K103N  
 IN: 未検査

Mutation Scoring

PR	ATV/r	DRV/r	FPV/r	IDV/r	LPV/r	NFV	SQV/r	TPV/r
A71T	0	0	0	0	0	5	0	0
Total:	0	0	0	0	0	5	0	0

RT	3TC	ABC	AZT	d4T	ddl	FTC	TDF	EFV	ETR	NVP	RPV
A62V	0	2	2	2	2	0	2				
M184V	60	12	-8	-5	5	60	-8				
K103N								60	0	60	0
Total:	60	14	-6	-3	7	60	-6	60	0	60	0

Mutation Scoring  
 0-9: susceptible  
 10-14: potential low-level resistance  
 15-29: low-level resistance  
 30-59: intermediate resistance  
 >=60: high-level resistance

図6 症例1 (耐性検査 初回)

↓ RAL投与後 PR: A71T  
 RT: A62V, M184V, K103N  
 IN: G140S, Q148H

Mutation Scoring

PR	ATV/r	DRV/r	FPV/r	IDV/r	LPV/r	NFV	SQV/r	TPV/r
A71T	0	0	0	0	0	5	0	0
Total:	0	0	0	0	0	5	0	0

RT	3TC	ABC	AZT	d4T	ddl	FTC	TDF	EFV	ETR	NVP	RPV
A62V	0	2	2	2	2	0	2				
M184V	60	12	-8	-5	5	60	-8				
K103N								60	0	60	0
Total:	60	14	-6	-3	7	60	-6	60	0	60	0

IN	RAL	EVG
G140S	30	30
Q148H	60	60
Total:	90	90

Mutation Scoring  
 0-9: susceptible  
 10-14: potential low-level resistance  
 15-29: low-level resistance  
 30-59: intermediate resistance  
 >=60: high-level resistance

図7 症例1 (耐性検査 RAL投与後)

症例2 50歳代男性 2010年新規診断例 サブタイプB

合併症：回盲部悪性リンパ腫、人工肛門増設、HBsAb陽性 (ETV単独投与歴あり)

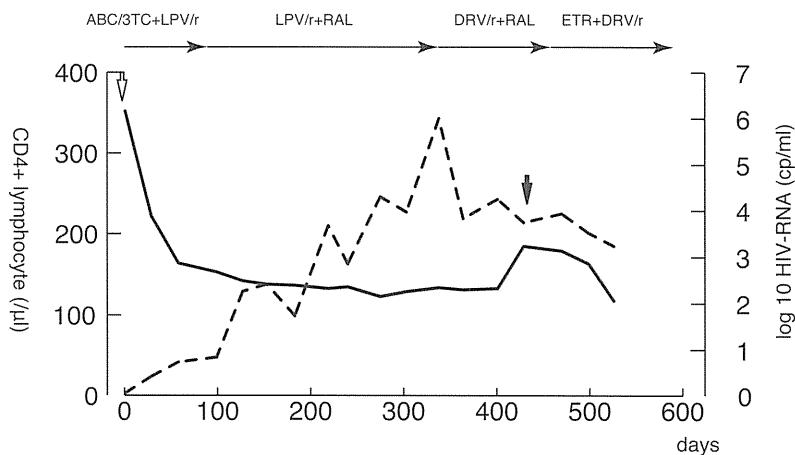


図8 症例2 (経過)

ABC/3TC による骨髄抑制の疑い、LPV/r による下痢の悪化を認めたため、LPV/r+RAL に変更され、その後に DRV/r+RAL が投与された。血中 HIV-RNA 量が 200 前後で推移していたが、1000 まで上昇したために、薬剤耐性検査が実施された (図 8 の黒矢印)。IN 領域に Q148K の耐性変異の出現を認めた (図 10)。

症例 3 は生活習慣病の合併があるうえに、非定型

精神病で加療中のため、当初からアドヒアランスが危惧された症例であった (図 11)。初診時の耐性検査では、明らかな耐性変異を認めなかった (図 12)。初回治療を導入するも、血中 HIV-RNA 量は乱高下し、初診約 500 日後で行われた耐性検査で、RT 領域に M184V、IN 領域に N155H の耐性変異を認めた (図 13)。

▽ 初診時

PR: A71V  
 RT: T69NSTY, V75LV, K103R  
 IN: (-)

Mutation Scoring

PR	ATV/r	DRV/r	FPV/r	IDV/r	LPV/r	NFV	SQV/r	TPV/r
A71V	2	0	2	2	2	2	2	0
Total:	2	0	2	2	2	2	2	0

RT	3TC	ABC	AZT	d4T	ddl	FTC	TDF	EFV	ETR	NVP	RPV
T69NSTY	5	5	5	10	10	5	5				
V75LV	0	2	2	2	2	0	2				
K103R								0	0	0	0
Total:	5	7	7	12	12	5	7	0	0	0	0

IN	RAL	EVG
Total:	0	0

Mutation Scoring  
 0-9: susceptible  
 10-14: potential low-level resistance  
 15-29: low-level resistance  
 30-59: intermediate resistance  
 >=60: high-level resistance

図 9 症例 2 (耐性検査 初診時)

▽ RAL投与後

PR: A71V  
 RT: T69ST, K103R  
 IN: Q148K

Mutation Scoring

PR	ATV/r	DRV/r	FPV/r	IDV/r	LPV/r	NFV	SQV/r	TPV/r
A71V	2	0	2	2	2	2	2	0
Total:	2	0	2	2	2	2	2	0

RT	3TC	ABC	AZT	d4T	ddl	FTC	TDF	EFV	ETR	NVP	RPV
T69ST	2	2	2	2	5	2	2				
K103R								0	0	0	0
Total:	2	2	2	2	5	2	2	0	0	0	0

IN	RAL	EVG
Q148K	60	60
Total:	60	60

Mutation Scoring  
 0-9: susceptible  
 10-14: potential low-level resistance  
 15-29: low-level resistance  
 30-59: intermediate resistance  
 >=60: high-level resistance

図 10 症例 2 (耐性検査 RAL 投与後)

症例3 50歳代男性 2010年新規診断例 サブタイプB

合併症：非定型精神病、糖尿病、高血圧、高脂血症

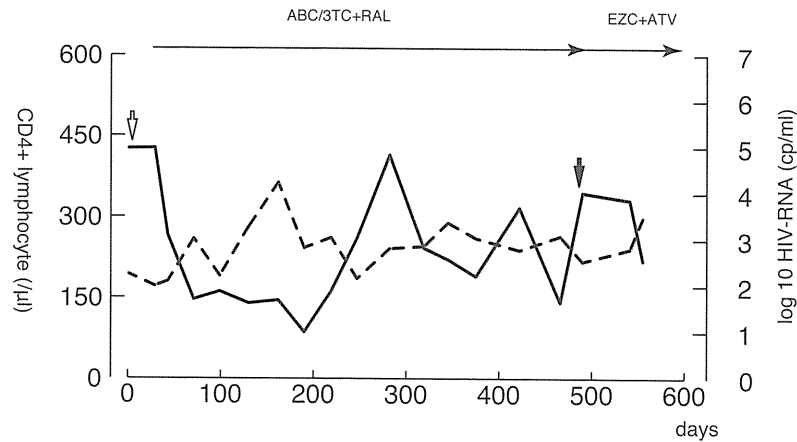


図 11 症例 3 (経過)

↓ 初診時

PR: (-)  
RT: V179E  
IN: 未検査

Mutation Scoring

PR	ATV/r	DRV/r	FPV/r	IDV/r	LPV/r	NFV	SQV/r	TPV/r
Total:	0	0	0	0	0	0	0	0

RT	3TC	ABC	AZT	d4T	ddl	FTC	TDF	EFV	ETR	NVP	RPV
V179E								10	10	10	0
Total:	0	0	0	0	0	0	0	10	10	10	0

Mutation Scoring  
0-9: susceptible  
10-14: potential low-level resistance  
15-29: low-level resistance  
30-59: intermediate resistance  
≥60: high-level resistance

図 12 症例 3 (耐性検査 初診時)

↓ RAL投与後

PR: (-)  
RT: M184V, V179E  
IN: N155H, L68V

Mutation Scoring

PR	ATV/r	DRV/r	FPV/r	IDV/r	LPV/r	NFV	SQV/r	TPV/r
Total:	0	0	0	0	0	0	0	0

RT	3TC	ABC	AZT	d4T	ddl	FTC	TDF	EFV	ETR	NVP	RPV
M184V	60	12	-8	-5	5	60	-8				
V179E								10	10	10	0
Total:	60	12	-8	-5	5	60	-8	10	10	10	0

IN	RAL	EVG
N155H	60	60
L68V	0	0
Total:	60	60

Mutation Scoring  
0-9: susceptible  
10-14: potential low-level resistance  
15-29: low-level resistance  
30-59: intermediate resistance  
≥60: high-level resistance

図 13 症例 3 (耐性検査 RAL 投与後)

## D. 考察

抗 HIV 療法の開始前に薬剤耐性検査を行い、薬剤耐性の有無を確認することが、ガイドライン等で勧められている。また、治療開始前の薬剤耐性検査は保険適用ともなっている。2011 年は 99 例の新規診断症例の薬剤耐性検査を行ったが、抗 HIV 薬の選択に関わるような耐性を有する症例は認めなかった。一方で、B 型肝炎治療薬の核酸アナログである entecavir が先行投与されていた症例も 1 症例認めていた。初診時の薬剤耐性検査では M184V は検出されなかったが、これは検査のための採血を行う前に entecavir がすでに中止されていたためと考えられた。新規診断症例における薬剤耐性調査では、entecavir によって誘導されたと考えられる RT 領域の M184V 変異をここ数年、毎年のように認めている。B 型肝炎と診断した時や、核酸アナログ製剤を使用するときは、必ず HIV 検査が必要であることを、さらに周知する必要がある。

RAL は血中 HIV-RNA 量を低下させるスピードが早いことに加え、副作用や薬物相互作用で問題となることが少ないことが特徴としてあげられる。しかし、耐性獲得に対する genetic barrier が低いことも問題視されている。忍容性に優れるため、HIV 感染症以外に問題点があるような症例に対して使用されがちである。今回の症例でいうと、生活習慣病・精神疾患といったもの相当する。しかし、そのような症例ではウイルス学的治療が懸念されることになる。昨年度の報告や、過去の臨床試験の結果も踏まえると、失敗過去の治療失敗歴のある症例、RT 領域に薬剤耐性を有する症例、アドヒアランスが不良の症例に対しては、raltegravir に対する変異の出現に十分注意して投与する必要がある。

## E. 結論

新規患者における HIV の薬剤耐性遺伝子の検索を 99 名に対して行った。治療の変更を要する耐性変異を認めなかった。RAL 投与後のウイルス学的治療失敗例を 3 例経験し、ウイルス学的治療失敗に関連して IN 領域の耐性変異の出現を認めた。

## F. 健康危険情報

該当なし。

## G. 研究発表

### 論文発表

- 1) Watanabe D, Taniguchi T, Otani N, Tominari S, Nishida N, Uehira T, Shirasaka T. Immune reconstitution to parvovirus B19 and resolution of anemia in a patient treated with highly active

antiretroviral therapy: A case report. *J Infect Chemother.* 17(2):283-7, 2011.

- 2) Watanabe D, Ibe S, Uehira T, Minami R, Sasakawa A, Yajima K, Yonemoto H, Bando H, Ogawa Y, Taniguchi T, Kasai D, Nishida Y, Yamamoto M, Kaneda T, Shirasaka T. Cellulr HIV-1 DNA levels in patients receiving antiretroviral therapy strongly correlate with therapy initiation timing but not with therapy duration. *BMC Infect Dis.* 11:146
- 3) Yoshino M, Yagura H, Kushida H, Yonemoto H, Bando H, Ogawa Y, Yajima K, Kasai D, Taniguchi T, Watanabe D, Nishida Y, Kuwahara T, Uehira T, Shirasaka T. Assessing recovery of renal function after tenofovird isoproxil fumarate discontinuation. *J Infect Chemother.* in press.
- 4) Watanabe D, Koizumi Y, Yajima K, Uehira T, Shirasaka T. Diagnosis and Treatment of AIDS-Related Primary Central Nervous Lymphoma. *J Blood Disord Transfus.* in press.
- 5) Watanabe D, Yoshino M, Yagura H, Hirota K, Yonemoto H, Bando H, Yajima K, Koizumi Y, Otera H, Tominari S, Nishida Y, Kuwahara T, Uehira T, Shirasaka T. Increase in serum mitochondrial creatine kinase levels induced by tenofovir administration. *J Infect Chemother.* in press.

### 学会発表

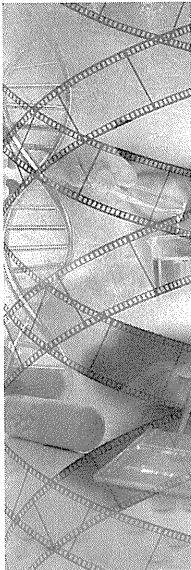
- 1) 渡邊 大、蘆田美紗、岡本瑛里子、鈴木佐知子、廣田和之、米本仁史、坂東裕基、矢嶋敬史郎、小泉祐介、大寺 博、富成伸次郎、西田恭治、上平朝子、白阪琢磨：Population-based genotypic tropism test による HIV 感染血友病患者の HIV の指向性の検討 第 25 回近畿エイズ研究会学術集会 京都 2011 年 6 月
- 2) 蘆田美紗、渡邊 大、岡本瑛里子、鈴木佐知子、廣田和之、米本仁史、坂東裕基、矢嶋敬史郎、小泉祐介、大寺 博、富成伸次郎、西田恭治、上平朝子、白阪琢磨：大阪医療センターにおける HLA-B\*51 逃避変異ウイルスを保有する HIV 感染者の動向 第 25 回近畿エイズ研究会学術集会 京都 2011 年 6 月

## H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし。







## 研究要旨

# 薬剤耐性ウイルス感染性分子クローンの整備 ～感染性分子クローンパネルの整備：国内 HIV-2 感染症例からの 標準株クローン整備の試み～

研究分担者 巽 正志 国立感染症研究所エイズ研究センター 第2室 室長

国内 HIV-2 感染症例 (NMC842 ; CRF01\_AB) の保存血漿から MAGIC-5 細胞と磁気ビーズを用いてウイルスを分離し、In-Fusion Cloning Kit と HIV Trapping System により感染性分子クローン pHIV-2 NMC842-23 を樹立した。本クローンは国内 HIV-2 感染遺伝子診断における標準株としてのみならず、その高い増殖能と病原性から HIV-2 における遺伝子組換えによる病原性獲得機序の解析に有用と期待される。

## A. 研究目的

現在国内での HIV-2 感染症例は HIV-1 感染症例に比べれば依然として希である。しかしながら、近年名古屋地区において複数の HIV-2 感染症例の報告があり、HIV-2 国内感染状況の把握に関心が高まっている。国内でスクリーニング検査として導入されている感染診断薬の多くは HIV-1/HIV-2 に対する抗体を同時に検出するが、区別は出来ない。また血清学的な確認試験として用いられているウェスタン・ブロット法では HIV-1 と HIV-2 の間に抗原の交差反応が存在するため、その解釈に一部混乱を導きやすい。従って血清学的な HIV-2 感染診断のアルゴリズムは、HIV-1 と比較して複雑ならざるを得ない。そのため HIV-2 の確定診断には遺伝学的診断が望まれている。しかしながら、HIV-2 の遺伝学的多様性は HIV-1 に比較してより高く、HIV-2 遺伝学的確定診断の標準化を困難にしている。

このような状況では国内 HIV-2 感染症例の詳細な分子遺伝学的な解析と、遺伝学的診断のための標準株の整備が望ましい。そこで本年度は国内 HIV-2 感染症例からの磁気ビーズと MAGIC-5 細胞を用いた効率的なウイルス分離とウイルス特性解析のため感染性分子クローンの樹立を試み、もって国内 HIV-2 感染診断における遺伝学的確定診断の為の標準株を

整備することと、更には HIV-2 感染患者の治療における薬剤耐性試験の整備に資することを目的に研究を行った。

### (倫理面への配慮)

本研究では、血液などヒト臨床材料が使用される場合には、材料提供者の個人情報が出漏しないよう厳格なプライバシー保護に努めた。このためヒト材料を用いた研究は連結不可能匿名化 (unlinked anonymous) の手法を行って個人情報の漏洩を防ぎ、患者の非特定性を保った。また、研究方法および研究により生じうる研究対象者に対する不利益、危険性の排除について十分な説明を加え、守秘義務を守った。以上を遵守することで倫理面の問題は無いものと判断した。

## B. 研究方法

対象とした国内 HIV-2 感染症例 (NMC842) のプロフィールの概要は以下の通りである。本症例は 2008 年に名古屋国立医療センターに受診、日本人女性で、34 歳、感染リスクは異性間性接触であり、受診時の CD4 陽性細胞数は 110 cells/mL、HIV-1 viral load は <40 copies/mL、HIV-2 viral load は 25,000 copies/mL、ウェスタン・ブロット検査では HIV-1 陰性 HIV-2 陽

性で日和見感染症はなし。今回ウイルス分離に用いた血漿は、受診時に採取し凍結保存したものである。

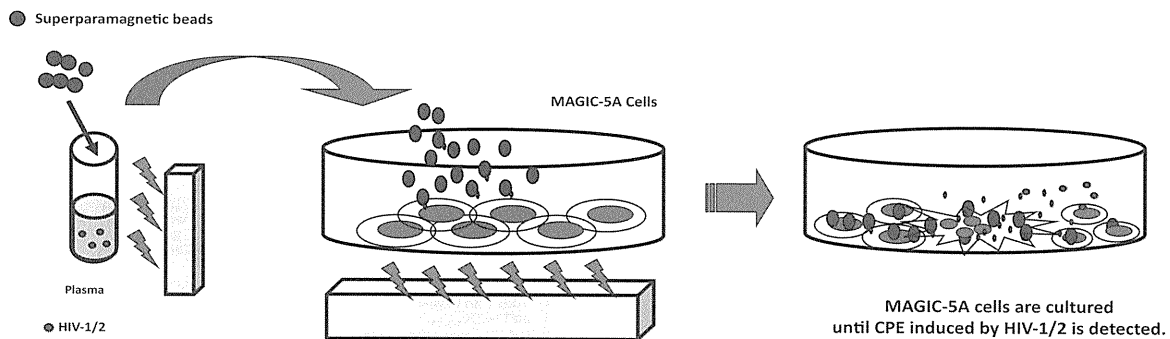
通常の PBMC 共培養法でウイルス分離を試み、培養上清中に 3,000 copies/mL 程度のウイルス核酸数を確認した検体で試みたが、MAGIC-5A への感染が確認できず分子クローン化作業には進めなかった。名古屋医療センターで感染者 PBMC DNA からウイルスゲノムの前半部と後半部を PCR 法で増幅し、両者を繋げて分子クローンを得て解析したところ、HIV-2 組換え流行株 CRF01\_AB 感染例と判明した。本症例は CD4 count 低値で HIV-2 感染例としては病態進行が早いことが注目された。

今回用いた磁気ビーズと MAGIC-5 細胞を用いたウイルス分離は概略、以下の様に行った。まず感染者血漿 200 $\mu$ L に 20 $\mu$ L の磁気ビーズ (Viro-Adembeads : Ademtech com 商品コード 07010 フナコシ扱い) を添加し、回転ローテーターで室温 20 分程緩やかに混合した。磁気スタンドで磁気ビーズ分離し、PBS で洗浄し、培養液に再懸濁して、予め 24 穴プレートに単層培養した MAGIC-5 細胞に添加し、培養プレートを 24 穴プレート用磁気プレートに重層して 1 時間培養した。その後磁気プレートを除いて、顕微鏡下で HIV-2 感染による細胞変性作用が出現するまで培養を継続した (図 1)。培養開始後 2 週間ほどで細胞変性作用が認められ、MAGIC-5 細胞測定による感染価が 10<sup>7</sup> bfu/mL (Blue Focus Unit/mL) に

達した。改めて新鮮な MAGIC-5A 細胞に M.O.I = 0.05 で感染させ 2 日後に HIV-2 proviral genome を含む感染細胞ゲノムを精製し Long PCR 法による鋳型試料とした。

HIV-1 ウイルスのクローニングおよび Long PCR と全長ゲノム Plasmid 構築は先に報告した HIV 感染価測定系 Indicator 細胞 MAGIC-5/HeLa4.5 nEGFP 細胞株を用いた HIV ウイルスクローニングと感染性クローンの構築系 (HIV Trapping System ; HIV 捕捉実験系) により行った。まず図 2 に示すように NMC842 provirus 5'LTR 配列に則した Primer と HIV-2 で高度に保存されている PBS 領域の配列で 5'LTR を増幅し、Cloning Vector pMT1 に組み込み pMT1/LTR を構築した。Not I 切断した pMT1/LTR を鋳型に、HIV-2 PBS 領域と pMT1 NotI 下流の配列と HIV-2 poly A 下流の 15 塩基が相同する配列で pMT1/LTR Amplicon を増幅した。一方、HIV-2 PBS から Poly A 下流領域までの Near Full-length ~ 10.0 Kbp Amplicon を先に精製した感染細胞ゲノムを鋳型に増幅し、アガロースゲル電気泳動後精製し、先の精製した pMT1/LTR と In-Fusion Cloning Kit を用いて全長クローンを得た。得られた全長クローンは HeLa4.5nEGFP 細胞と 293FT 細胞の混合培養に Transfection し、その 2 日後の培養上澄を MAGIC-5A 細胞に接種し感染性を確認した。感染性が確認された 25 クローンから 2 クローンを選択し

磁気粒子によるウイルス分離



HIV-1

Subtype B : JRC3 JRC5 JRC39 JRC53 JRC57 JRC65  
CRF01\_AE: JRC77

HIV-2

Group A : NGY  
Group B : UC1  
CRF01\_AB : 08JP\_NMC842, 07JP\_NMC716, 04JP\_NMC307

Superparamagnetic beads: Viro-Adembeads  
Reference Site : [www.ademtech.com](http://www.ademtech.com)

Virus Isolation : 7 / 84 JRC samples stored at -30 C  
rate 8.3% from high viral load samples

? Isolation Rate for Clinical samples

Transposon を用いた GPS-1 Genome Priming System (NEB) と Primer Walking 法で全長ゲノムの配列を決定した。

全ゲノム配列が決定されたクローンについて HIV-2 グループの参考クローンとともに全ゲノム配列を対象に系統樹解析を行った。

### C. 研究結果

本症例 NMC842 は HIV-2 では初めての国内感染例と報告されている。そのプロフィール概要から西アフリカ出身者との異性間性交渉により感染し、これまでの HIV-2 の病態推移と異なり CD4 陽性細胞数の急速な減少を認め、エイズ発症に至った症例である。当初、血清学的感染診断により HIV-2 単独感染であることが判明してから末梢単核球共培養法によるウイルス分離が幾度か試みられたが、明確なウイルス分離に至らなかった。今回、新たに凍結保存患者血漿から磁気ビーズと MAGIC-5 細胞による継代培養により高い感染価のウイルス液が採取できた。

分離ウイルスを感染させた MAGIC-5A 細胞ゲノムを鋳型に全長ゲノムクローンを In-Fusion Cloning Kit により構築し、HIV Trapping System ; HIV 捕捉実

験系で感染性分子クローンを選別した。感染性が確認された 50 以上のクローンから pHIV-2<sub>NMC842-10</sub> と pHIV-2<sub>NMC842-23</sub> の 2 クローンを選択し、全ゲノム配列を決定したところこの 2 クローンは 10,240bp からなり、同じ配列を持つクローンであった。決定された全ゲノム配列をもとに HIV Database で Blast Search をすると、想定どおり第一位に本ウイルス 08JP\_NMC842 が、以下 04JP\_NMC307、07JPNMC716 と名古屋医療センターが登録した HIV-2 CRF01\_AB 組換え体がヒットした。本ウイルスの感染者 PBMC の Direct PCR での全長配列決定による配列と感染性分子クローンの塩基配列の相同性は 9945/10240 (97%) であり、その違いの多くは env 領域に集積していた。この感染性分子クローン全ゲノムの系統樹解析により HIV-2 CRF01\_AB 組換え体の prototype である Cote d'ivoire 分離の HIV7312A と Cluster された (図 3)。

感染性分子クローン pHIV-2<sub>NMC842-23</sub> 由来のウイルス HIV-2<sub>NMC842-23</sub> を MOI = 0.1 で MAGIC-5A 細胞へ感染させウイルス増殖を測定した。対照として HIV-1 subtype C クローン pIndie-C1 及び HIV-1 subtype B クローン由来ウイルスを同様に感染測定した。図 4 に示すように HIV-2<sub>NMC842-23</sub> ウイルスは感

