

Phylogenetic Analysis of NMC842-23 in HIV-2 full-genome

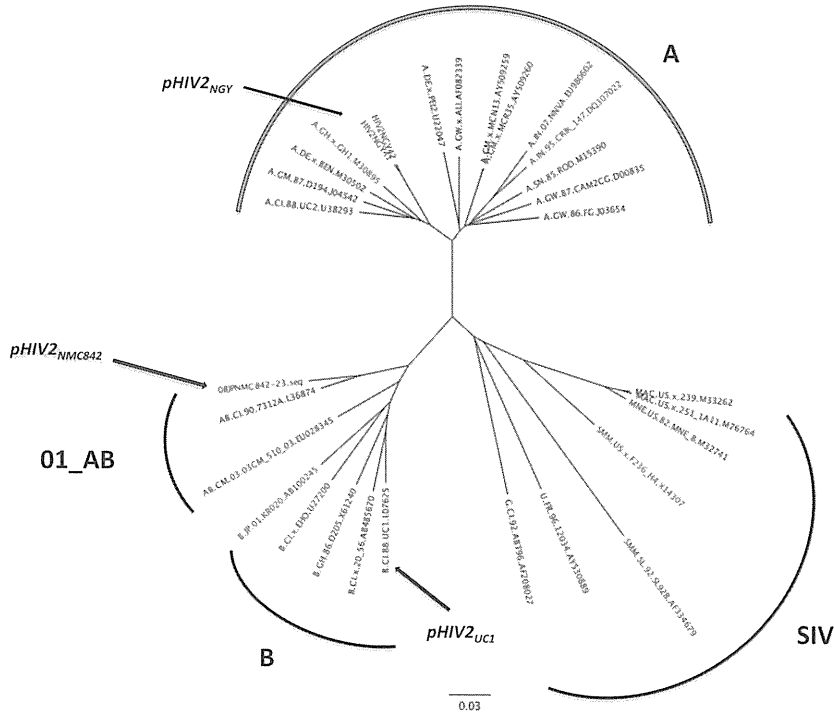


図 3

Profile of cloned HIV-2 NMC842-23

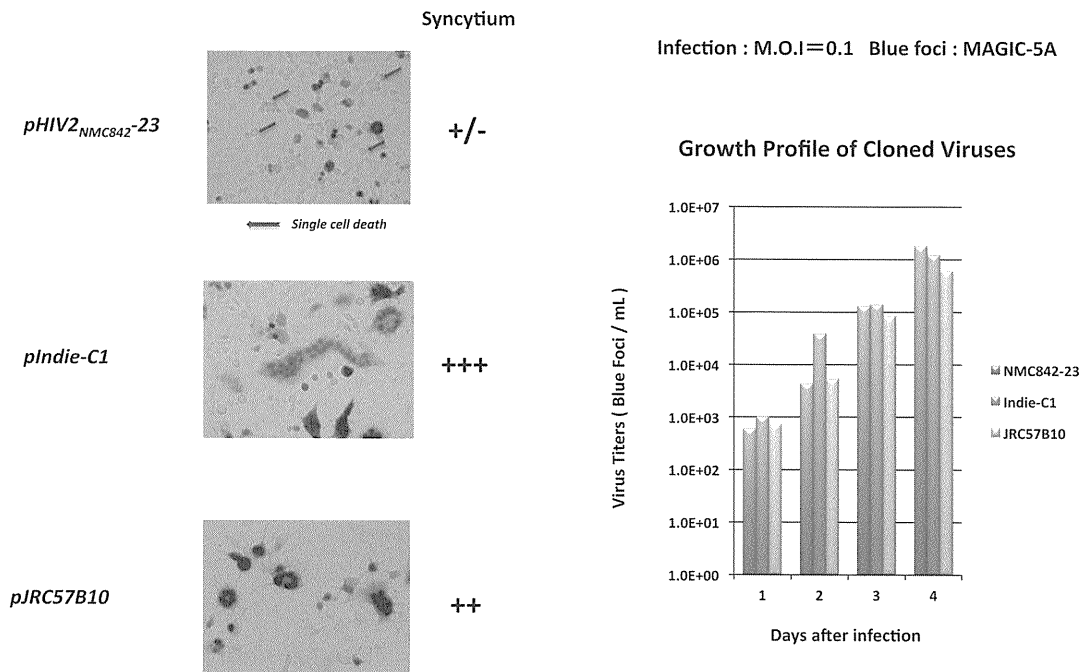


図 4

表 1

Optimal Conditions for Real-Time RT-PCR of HIV-2/pHIV-2_{NMC842-23}

実施日: 110711

試薬: HIV-2 QuantiFast™ Probe RT-PCR Test (QIAGEN: Cat.No.204454)

Design of primers and probes for HIV-2 Detection

Set	Code Name	Sequence	bp	Position	Size	Note
A	HIV2LTR575(+)	GCAGGTAGAGCCTGGGTGTTTC	21	575 -> 595	122	J.Virol.Meth 135: 102 -108, 2006
	HIV2LTR696(-)	CTTGCTTCTAAYTGGCAGCTTTATT	25	696 -> 671		
	HIV2LTR629TaqManProbe	FAM -TGGGCAGAYGGCTCCACGC -TAMRA	19	629 -> 648		
B	HIV2NCRgag1048(+)	GGGAGATGGGCGCGAGA	17	1048 -> 1064	160	J.Clin.Micro 39: 4264, 2001
	HIV2gag1207(-)	TCCAACAGGCTCTCTGCTAATCC	23	1207 -> 1185		
	HIV2gag1109TaqManProbe	JOE-TAGGTTACGGCCCGCGGAAAGA-TAMRA	23	1109 -> 1131		
C	HIV2LTR528(+)	CGGAGAGGCTGGCAGAT	18	528 -> 545	74	Designed by Tatsumi
	HIV2LTR601(-)	AGCAGGGAACACCCAGGC	18	601 -> 584		
	HIV2LTR556(+)-Probe	FAM-GAGGTTCTCTCCAGCACTAGCAGGTAGA-TAMRA	28	556 -> 583		
D	HIV2LTR528(+)	CGGAGAGGCTGGCAGAT	18	528 -> 545	201	Designed by Tatsumi
	HIV2LTR728(-)	CGGCGACTAGGAGAGATGGGA	21	728 -> 708		
	HIV2LTR556(+)-Probe	FAM-GAGGTTCTCTCCAGCACTAGCAGGTAGA-TAMRA	28	556 -> 583		

Standard

Name	Size
pNMC842-23	13950bp

Viral Sample

No.	Code
1	NMC842/RNA(6/14)
2	NMC842/RNA(6/15)
3	NMC842/RNA(6/16)
4	NMC842/RNA(7/8)
5	NMC842/M5/DNA(7/8)

<Mixture>	n=1	<Realtime cycler condition>
2xMaster mix	12.5	X 40
Primer F	1	
Primer R	1	
TaqMan Probe	0.5	
QuantiFast RT Mix	0.25	
template	2	
ddw	7.75	
Total(μL)	25	

染 2 日以降、対照ウイルスよりも速やかに増殖し、4 日後には培養上澄に 10^6 bfu/mL 以上の高い感染価のウイルスが産生された。HIV-2_{NMC842-23} に特徴的な CPE は対照ウイルス Indie-C1 及び JRC57B10 で認められる多核巨細胞形成が余り認められず、それぞれの感染細胞が膨満して細胞死する Single Cell Death による細胞変性作用が認められた。

HIV-2 のウイルス量を定量するために、これまで報告された幾つかの Primer と Probe の組み合わせで Real-time RT-PCR の測定系を検討したところ表 1 の A 組による測定が HIV-2_{NMC842-23} ウイルスの定量に適当であることが判明した。この測定系で MAGIC-5A 細胞への感染で得られた HIV-2_{NMC842-23} ウイルス・ストックのウイルス量を測定したところ 10^8 copies/mL まで増殖できることがわかった。

D. 考察

HIV-2 では初めての国内感染例 NMC842 から MAGIC-5A 細胞 / 磁気ビーズ法によってウイルスが分離できた。この症例では PBMC 共培養によっては効率的にウイルス分離ができなかったことから、本法は、そのようなケースでの有効なウイルス分離の代替法となりうることを示している。分離ウイルスから HIV Trapping System ; HIV 捕捉実験系と

In-Fusion Cloning Kit を用いて Near Full-length の Amplicon をクローニングすることにより多数の感染性分子クローンを樹立することが可能であった。選別した 2 クローンの全ゲノム配列が同一であったことは、分離ウイルスの均一性が高いことが伺われる。このことは MAGIC-5A 細胞 / 磁気ビーズ法によりウイルス分離が高いウイルス量の検体からは概ね 1 週間以内に分離できることが多いにも拘わらず、本症例では 2 週間ほど分離に要したことから、本症例の血漿検体にはウイルス コピー数は高くとも感染性を保ったウイルスがごく少なかった可能性がある。

樹立した感染性分子クローン由来のウイルスは分離ウイルスの性状を保持していた。MAGIC-5A 細胞を標的細胞とした感染により HIV-2_{NMC842-23} は幾つかの特徴を示していた。感染後多くの HIV-1 および HIV-2 で認められる多核巨細胞形成が少なく、感染細胞単独のバルーン化などの Single Cell Death の細胞変性作用が強く認められた。このような感染細胞の特徴があるにも拘わらず、ウイルス増殖は対照とした subtype C あるいは B のウイルスより高く、培養 4 日後に 10^8 copies/mL まで増えた。このウイルスの特徴的な性状は、本症例が HIV-2 感染例としては想定される感染時期から急速に CD4 count が減少し、エイズ症候を示したことを裏付けており、これ

までの HIV-2 の一般的な特徴である低い病原性に反して高い増殖能に裏付けされた高い病原性を示す可能性が高い。このような特徴を示す HIV-2 の感染性分子クローンが得られたことは、国内感染例からの標準株が得られたのみならず、このウイルスの特徴である HIV-2 group A と B の組換え体形成が HIV-2 の病原性発現にどのように影響しているのか、その機序を解析する有用なツールを得たことになり今後の解析が期待される。

E. 結論

HIV-2 では初めての国内感染例 NMC842 から磁気ビーズ /MAGIC-5A 細胞によってウイルスが分離し感染性分子クローンを樹立した。クローン由来ウイルスは高い増殖能を有し、今後国内 HIV-2 感染診断の標準株となるに留まらず、HIV-2 組換え体の病原性獲得機序の解析に有用であるものと期待される。

F. 健康危険情報

該当する事項はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

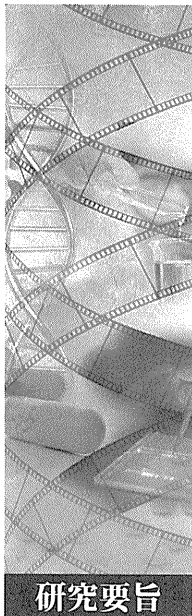
該当する事項はない。

2. 学会発表

該当する事項はない。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

該当なし。



沖縄における薬剤耐性 HIV の動向調査研究

～平成 23 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・呼吸器・消化器内科学 准教授

研究協力者 **田里大輔¹、仲村秀太¹、日比谷健司¹、前城達次¹、原永修作¹、
比嘉太¹、藤田次郎¹、仲里 愛¹、上地幸平²、木佐貫京子²、
宮城綾乃²、名護珠美²、又吉 拓²、山根誠久²、宮城京子³、
前田さおり³**

¹ 琉球大学大学院医学研究科感染症・呼吸器・消化器内科学

² 同 検査部、³ 同 看護部、

研究要旨

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 2011 年 1 月 1 日～2011 年 12 月 31 日で、同期間に 20 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した 14 人に薬剤耐性 HIV 検査を施行した。薬剤耐性関連変異は RT 領域では K103N、T69N、G190E が認められた。PI 領域では薬剤耐性 HIV-1 と判定された HIV-1 は認めなかった。当院の初診患者の届出地は 30%が県外からの移住患者である。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。

A. 研究目的

沖縄県の新規患者の 75%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（2011 年 1 月 1 日～2011 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

解析ソフトウェア：Seq Scape v 2.6 (Applied Biosystems)

7. 薬剤耐性遺伝子の判定法

- 1) The Agence Nationale de Recherche sur le SIDA (ANRS) 薬剤耐性評価 (<http://www.hivfrenchresistance.org/table.html>)
- 2) This November 2011 edition of the IAS-USA drug resistance mutations list updates the figures last published in December 2010 (Johnson VA et al, Top HIV Med, 2010;18:156-163) .
- 3) スタンフォード薬剤耐性データベース

(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 20 人であった (図 1)。その内、新規登録患者の定義を満たした 14 人全員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 14 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 4 人、AIDS が 9 人、急性感染例が 1 例であった。性別は女性が 1 人であり他は全て男性であった。サブタイプは同性間感染は全て B であった。異性間感染で C が 1 例認めたが感染推定地域はアフリカであった。平均年齢は AIDS は 44.6 歳、HIV は 32.8 歳であった。CD4 数の平均値は HIV キャリアーは 326.6 cells/ μ L、AIDS は 33.4 cells/ μ L であった。一方 HIV-RNA 定量の平均値は、HIV キャリアーは急性感染例 1 例を除くと 1.8×10^3

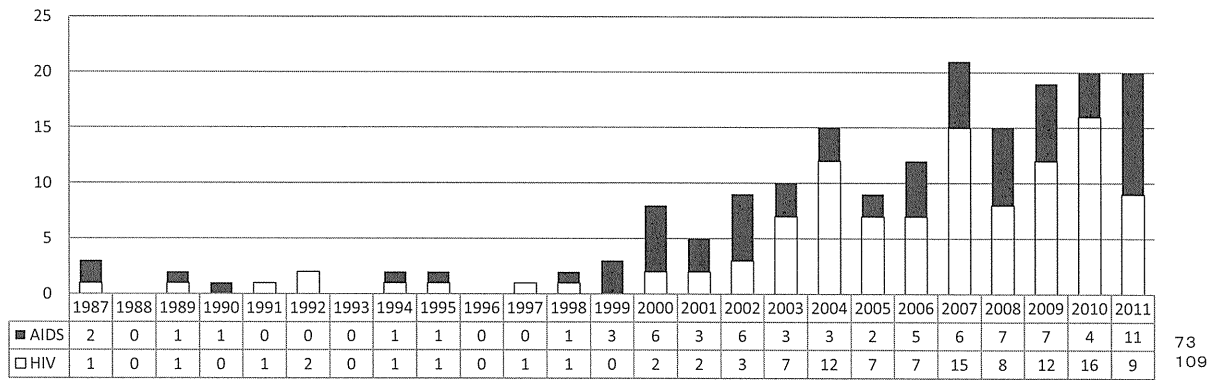


図 1. 当院の年度別 HIV・AIDS 患者数の推移
 2011/12/31 現在 N = 184

表 1. 2011 年新規患者背景と耐性関連遺伝子

No.	age	stage	CD4 cell / μ L	HIV-1 RNA copies/ml	sub-type	RT	Pro	In
1	40	AIDS	12	1.5×10^6	B	ND	A71T, V77I, I93L	ND
2	65	AIDS	44	6.2×10^4	C	T69T/A,	M36I, D60E, H69K, L89M, I93L	ND
3	49	AIDS	55	4.1×10^4	B	ND	L63P, H69K, A71T, V77I	ND
4	32	AIDS	40	2.8×10^5	B	ND	I62V, A71T, 72T, I93L	ND
8	37	AIDS	34	1.6×10^5	/	ND	M36M/I	ND
9	45	AIDS	25	1.87×10^6	B	ND	L33I/L, M46I, I62V, I64V, V77I, I93L	ND
11	56	AIDS	52	8.85×10^3	AE	ND	M36I, H69K, V82I/V, L89M	ND
12	35	AIDS	9	2.12×10^5	B	T69N	G16E, E35E/D, L63P, I64V	ND
13	42	AIDS	30	1.83×10^5	B	ND	M36I/M, I62V, A71V, I93L	ND
5	29	HIV	331	1.5×10^4	B	ND	I62V, A71T	ND
6	34	HIV	241	1.2×10^4	/	G190E	I62V, V77I, A71V, V77I, I93L	ND
7	45	HIV	538	6.2×10^3	B	ND	L10I, V77I, L89M, I93L	ND
10	37	HIV	266	3.1×10^6	B	K103N	V82I, I93L	ND
14	19	HIV	257	3.8×10^4	/	ND	K20R, M36I, H69K, L89M, I93L	ND

ND: not detect

コピー /mL ($6.2 \times 10^3 \sim 3.8 \times 10^4$)、AIDS は 3.3×10^5 コピー /mL ($8.9 \times 10^3 \sim 1.9 \times 10^6$) 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が K103N, T69N, G190E が各 1 例ずつ認められた。バーチャルフェノタイプによる薬剤感受性評価では 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。Pro 領域では耐性に関連する変異は表 1 に示すように全例に認めた。バーチャルフェノタイプでは 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 (図 1)。

琉球大学附属病院はエイズ拠点病院として 2011 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。

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県内感染者において急性感染症症例において NNRTI 初回耐性 HIV-1 が検出された。

当院の初診患者の届出地は血友病を除く 30% が県外からの移住患者である。本県は観光地であるため国内、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 14 人では薬剤耐性 HIV-1 遺伝子変異は RT 領域では 4 例認められた。薬剤感受性評価では Possible Resistance/ Resistance が 2 例認められた。PI 領域では薬剤耐性と判定された HIV-1 は認めなかった。

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、K103N が検出された。今後の動向に注視する必要がある。

F. 健康危惧情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

欧文

- 1) 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.

- 2) Hideta Nakamura, Masao Tateyama, Daisuke Tasato, Syusaku Haranaga, Satomi Yara, Futoshi Higa, Yuji Ohtsuki, Jiro Fujita. Clinical utility of serum β -d-glucan and KL-6 levels in Pneumocystis jirovecii pneumonia. *Intern Med.* 48:195-202. 2009.
- 3) Hibiya K, Kazumi Y, Nishiuchi Y, Sugawara I, Miyagi K, Oda Y, Oda E, Fujita J. Descriptive analysis of the prevalence and the molecular epidemiology of Mycobacterium avium complex-infected pigs that were slaughtered on the main island of Okinawa. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 33:401-21. 2010.
- 4) 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.
- 5) Satoshi Toma1, Tsuyoshi Yamashiro2*, Shingo Arakaki1, Joji Shiroma1, Tatsuji Maeshiro 1, Kenji Hibiya1, Naoya Sakamoto 3, Fukunori Kinjo4, Masao Tateyama1, and Jiro Fujita1. Inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by nelfinavir and synergistic effect with interferon- α . *J Viral Hepat.* 16:506-12. 2009

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、日比谷健司、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－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－ 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 p 77-88
- 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

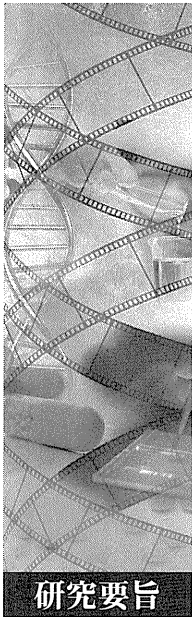
なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



研究要旨

HIV存在下におけるHBVおよびHCV遺伝子解析

研究分担者 田中 靖人 名古屋市立大学 教授

ウイルス学的に近縁な集団を多く認める東海ブロック拠点病院における HBV 感染症の臨床的特徴を HIV 合併の有無により比較検討し、その臨床像および抗 HIV 剤による治療効果を明らかとし薬剤耐性 HIV の関与を調査した。HIV 陰性 HBV 感染 28 症例と HIV 合併 HBV 感染 45 例の検討から、HIV 非合併 HBV 例に比べて HIV/HBV 重感染例は臨床背景の均一な集団であることが確認された。また、HIV 存在下の HBV 感染症では免疫能の低下を示唆する血中 HBV DNA 高値と肝炎の程度が軽微であることが明らかとなった。さらに、より均一な集団である HBV 遺伝子型 A の HIV/HBV 重感染症例では、32%が自然発症の急性肝炎を呈し、54%が抗 HIV 療法開始後の免疫再構築症候群 (IRS) を呈した。HIV 合併 HBV に対する抗 HIV 療法の開始後、HIV、HBV ともに耐性ウイルス出現は 1 例も認めず、抗 HIV 療法は HIV のみならず血中 HBV DNA 制御に対しても有効であった。IRS 発症 HIV/HBV 重感染例の HBs 抗原消失に関連する因子として、肝炎の程度 (ALT; $p=0.011$, AST; $p=0.019$) に有意差を認めしたが、IRS 前の HBV DNA 量、HIV RNA 量、CD4/CD8 数は差を認めず、全身を循環する CD4/CD8 細胞数では HBV を制御する肝浸潤性 T 細胞の分布は推定できないことが示唆された。

A. 研究目的

現在日本の B 型肝炎ウイルス (HBV) 感染は、HIV 感染と同様、主に性感染症として伝播し、一部の HIV-1 感染者間に HBV 重感染が検出される。特に、東海ブロックの拠点病院である名古屋医療センターにおける HIV/HBV 重感染症例のウイルスゲノム系統樹解析から、HIV サブタイプの分布に比べて HBV 遺伝子型は均一なクラスターを形成していることが報告された。今回、HBV 重感染者における薬剤耐性 HIV の関与について調査するため、HIV/HBV 重感染者の臨床的特徴を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

HBV 単独感染例と HIV 合併 HBV 感染例のウイルス動態ならびに治療薬剤への応答性について、臨床経過を対比し検討した。2005 ~ 2010 年までに名古屋

市立大学病院および名古屋医療センターで HBV 初感染と診断された HIV 陰性 HBV 感染 28 例と HIV 合併 HBV 感染 45 例を対象とした。今回検討した事項は、既存の臨床検査データとカルテ記載内容に留めることとし、解析データの公表に際しては個人情報保護を徹底した。具体的には、本検討に用いた HIV 関連血清マーカー、HBV 関連血清マーカーは通常診療において測定された結果を用いたものであり、追加の検体採取は行わないため安全性に問題はない。またインフォームドコンセントの取得された症例のみを取り扱い、使用にあたっては匿名化することで被験者のプライバシーは完全に保護することとした。本試験で結果を公表する際は、被験者・協力者を特定できる情報を含まないこととし、ヘルシンキ宣言の精神、「臨床研究に関する倫理指針」を遵守して実施した。

C. 研究結果

HIV 合併 HBV 例の特徴は、HIV 陰性 HBV 例に比べて年齢（中央値）が若く（38 歳 VS 42 歳）、HIV 合併例では全例が男性であり、うち 58% が MSM（Men who have sex with men）であった。さらに HBV 遺伝子型については、HIV 陰性 HBV 例では 43% が遺伝子型 A であるのに対して HIV 合併 HBV 例では 89% が HBV 遺伝子型 A であった。HBV 診断までの臨床経過については、HIV 陰性 HBV 例では 28 例全例が急性肝炎を発症し病院を受診する一方、HIV 合併 HBV 例では 22% のみ肝炎発症を診断され、49% は診断時に無症候性キャリアであった。経過中の血中 HBV DNA 値は HIV 陰性例に比較し HIV 合併例で高値を示し（6.3 vs 7.7 Log copy/mL）、肝炎の程度（AST, ALT, T-Bil）は HIV 合併例で有意に軽微であった。さらに HBV 排除を示唆する HBs 抗原消失までの期間は、HIV 非合併 HBV 例では全例が約 1 年以内に HBs 抗原陰性化するのに対し、HIV 合併 HBV 例では HBs 抗原陰性化までの期間が長く、さらに約 3 割が HBs 抗原持続陽性で推移した。次に HBV 遺伝子型 A のみに限定し検討すると、HIV 合併 HBV 例における肝炎の病態は 32% が自然発症の急性肝炎を呈し、54% が抗 HIV 療法開始後の免疫再構築症候群（IRS）を呈した。HIV 合併 HBV 遺伝子型 A の急性肝炎発症例では、HIV 陰性 HBV 遺伝子型 A 症例に比して有意に肝炎の程度が軽微であったが（ALT; $p=0.009$, T-Bil; $p=0.024$ ）、抗 HIV 療法開始後 2 年以内に全例が HBs 抗原の消失を認めた。IRS 発症後の HBs 抗原消失に関連する因子として、肝炎の程度（ALT; $p=0.011$, AST; $p=0.019$ ）が有意差を呈したが、治療開始前の HBV DNA 量、HIV RNA 量、CD4/CD8 数は差を認めなかった。

D. 考察

HBV 感染における肝炎の主因である細胞性免疫に影響を与える HIV 合併 HBV 感染例の検討より、経過中の血中 CD4/CD8 値と HBs 抗原抗体のセロコンバージョンには関連性を認めなかった。このことから、全身を循環する CD4/CD8 細胞数では、HBV を制御する肝浸潤性 T 細胞の分布は推定できないことが類推された。

E. 結論

HIV 合併 HBV 例に対する現行の抗 HIV 療法は HBV 制御に対して有効であり、また今回対象とした 45 例の HIV/HBV 重感染例中に耐性ウイルス出現は 1 例も認めることなく、HIV に対しても良好な治療効果を呈していた。

F. 健康危険情報

無

G. 研究発表

1. 論文発表

無

2. 学会発表雑誌名

- 1) 日本エイズ学会誌 13 巻 4 号 P205 HBV 新規感染における HIV 重感染の影響についての検討 渡邊綱正、横幕能行、今村淳治、杉浦 互、田中靖人
- 2) 日本肝臓学会雑誌 第 52 巻別冊 3 P733 HIV 合併例を含めた B 型急性肝炎症例の検討 渡邊綱正、杉浦 互、田中靖人

H. 知的所得権の所得状況

1. 特許取得

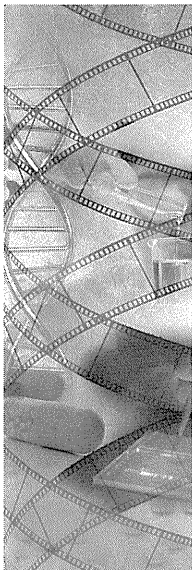
無

2. 実用新案登録

無

3. その他

無



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 2011～

研究分担者 **田邊 嘉也** 新潟大学医歯学総合病院感染管理部

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 23 年新潟県内の病院で HIV 感染と診断された新規患者 7 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、日本人男性 6 名（36～74 歳）、外国人女性 1 名（36 歳）である。男性はすべて MSM で国内感染、女性は異性間の性感染で感染場所は不明となっている。感染時期は 1 年前と 15 年前と推定される各 1 例を除いていずれも不明となっている。感染ウイルスは男性が 6 例はすべてサブタイプ B、女性のケースは CRF01_AE であった。薬剤耐性変異は、プロテアーゼ阻害薬に対するマイナー変異を除いて、いずれの症例にも検出されなかった。

エイズ動向委員会の報告によると、新潟県の HIV 感染 / エイズ発症の発生数は 1999 年（計 14 件）にピークをつけた後、急減して近年は年間 4～5 例で推移してきた。しかし 2011 年の発生数は、第 3 四半期に一举に 5 件が報告された影響で、12 年ぶりに年間 10 件を超えた。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、地域内での感染がきわめて少ないことが、これまで低い発生率で推移してきた最大の理由とみているが、本年度新たに解析した MSM の 3 症例で既知のものと遺伝的に近縁性の高いウイルスがみいだされた。この知見は、新潟県における感染の様相が県域外での感染から県内の MSM 集団内での感染を主体とするものに変化しつつあることを示唆しており、今後の発生数急増の前触れであることが危惧される。

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治療の大きな障害として今後さらに大きく立ちのぼることが懸念される。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ほぼ局限しており、多くの地域では比較的少数にとどま

ったまま推移してきたが、最近のエイズ問題への関心の低下、危機感の減退を考えると、この状況が将来にわたって継続するかどうかは必ずしも樂觀はできない。実際、本年度の調査では新潟県における HIV 感染はすでに拡大期に入っており、これには県域内での感染が主にかかわっていることをうかがわせる結果がえられている。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、さらに調査を続けていきたい。

(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長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°C 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、シークエンシングに供した。シークエンシング反応には 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 23 年中に 7 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、いずれも血中 CD4 細胞の数が 1μL あたり 300 以下に低下しており、最も甚だしいケースでは数値は 4 まで減少していた。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。被検者は男性が 6 名、女性が 1 名で、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った。男性被検者のうち 4 名は 30 歳代後半 ~ 40 歳代前半の新規に感染が報告される最多の年齢層に属するが、60 歳代 1 名、70 歳代 1 名と高齢での新規感染・発症が目立ったのも本年の特徴といえる。感染したウイルスは同性間

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	36	日本	同性間	国内	2010 年	168	1.7×10^4	Subtype B
2	男	42	日本	同性間	国内	不明	265	1.0×10^4	Subtype B
3	男	37	日本	同性間	国内	不明	216	1.2×10^3	Subtype B
4	男	62	日本	同性間	国内	不明	96	9.4×10^4	Subtype B
5	男	74	日本	同性間	国内	1996 年?	92	2.1×10^4	Subtype B
6	女	36	タイ	異性間	国外?	不明	4	1.9×10^6	CRF01_AE
7	男	38	日本	同性間	国内	不明	274	9.1×10^3	Subtype B

感染の男性全例が Subtype B、女性が CRF01_AE となっており、感染ルートによって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。女性被検者はタイ出身者で医師の問診では感染地は不明となっているが、解析の結果感染ウイルスはタイ、ベトナムなどで分離されているものと酷似することが明らかになり、おそらく出身国での感染であると推定された。男性の感染地はすべて国内と推定

されている。男性被検者のうち 1 名は (Case #1) 問診によれば推定感染時期が 1 年前となっているが、すでにエイズ発症の段階にいたっていた。本人の申し出どおりであればほとんど潜伏期を経ることなく病状が進展したケースということになるが、この点の確証はえていない。他の症例については、感染時期は不明、または感染後 15 年程度経過していると推定されており、慢性感染の範疇に入ると思われる。

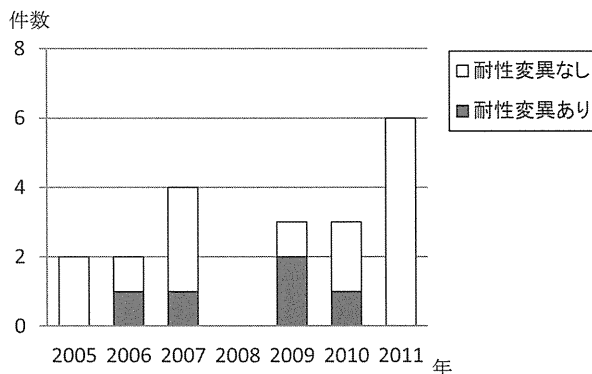
表 2：薬剤耐性変異の検出頻度

	未治療群 (N=46)		治療群 (N=32)			未治療群 (N=46)		治療群 (N=32)	
	未治療群 (N=46)	治療群 (N=32)	未治療群 (N=46)	治療群 (N=32)		未治療群 (N=46)	治療群 (N=32)		
NRTI					NNRTI				
M41L	0	4	K101EHP	0	2	PI major			
D67L	0	4	K103N	(2) ^f	7	D30N	0	1	
T69_ins	(2) ^{ab}	(2) ^{bc}	V106IAM	3	0	M46IL	0	4	
K70R	0	2	V108I	1	1	V82AFSL	0	1	
L74V	0	2	V179DF	4(1) ^g	1	I84V	0	1	
M184VI	0	12	Y188CLH	0	3	N88S	0	2	
L210W	(1) ^d	2	P236L	0	1	L90M	0	2	
T215YF	(1) ^e	3							
K219QE	0	2							

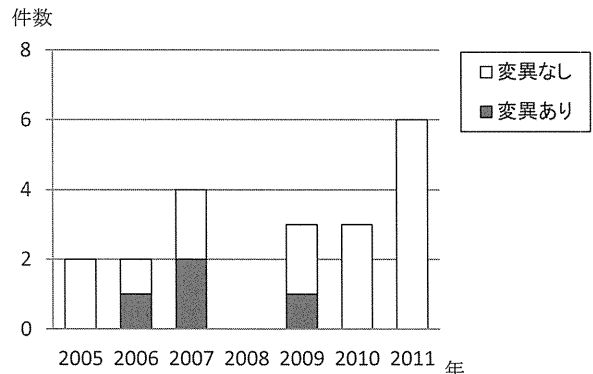
注 1 薬剤耐性変異の定義は International AIDS Society-USA 2010 による。() 内の数字は定義部位に検出された非定型的なアミノ酸置換が認められた症例数を示す。a: T69A, b: T69N, c: T69S, d: L210F, e: T215E, f: K103R, g: V179A。

注 2 インテグラーゼ阻害薬 (ラルテグラビル) に対する耐性変異についても調査している (新規症例 18、既治療症例 10) が、これまでに検出例はない。

a. NNRTI に対する耐性変異



b. 疑似耐性変異(強い耐性変異を生じうる部位)のアミノ酸置換



c. プロテアーゼ阻害薬に対する minor 変異

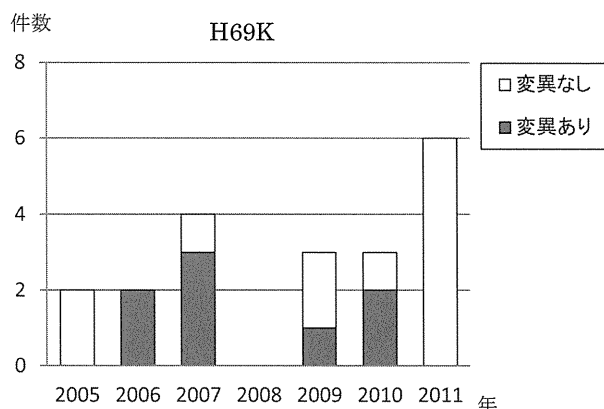
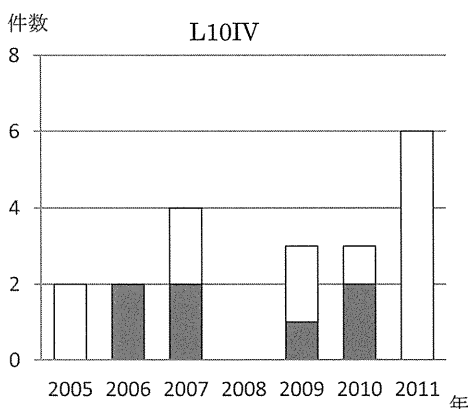


図 1 MSM 症例から検出された薬剤耐性変異の頻度

薬剤耐性変異

本年の解析分を含め、われわれがこれまでに取り扱った検体から検出された薬剤耐性変異の数を表2に掲げている。今回の新規7症例については、プロテアーゼ阻害薬に対する minor 変異を除き、耐性変異は検出されなかった。

これまで新潟県内の病院から寄せられた未治療症例の検体から薬剤耐性変異が検出されたのはあわせて5例 (V106I 2例、V108I 1例、V179D 2例) あるが、これらはすべて非ヌクレオシド系の RT 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なものであった。これらは2006～2010年の期間に、いずれも MSM 症例でみだされている (図1a)。またこの期間 MSM の新規症例に K103, T215 など RT 領域の耐性変異を生じうる部位に復帰変異の可能性のあるアミノ酸置換がみられる症例がしばしば検出されたが、最近の2年間こうした例はない (図1b)。新潟県で発生している MSM 症例で検出されたウイルスのプロテアーゼ阻害薬に対する minor 変異の組成を比べると、2010年ころを境に関与するウ

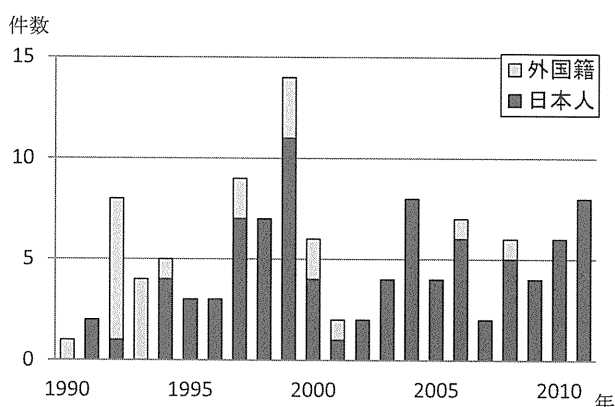
イルスの置き換わりが生じていることがより強く示唆される。すなわち、以前ほとんどのウイルスに含まれていた L10I/V, H69K が、今年度の解析では全く姿を消している (図1c)。

新潟県の状況に関する限り、新規症例で検出される変異は、いまのところ薬剤治療に大きな影響を及ぼしてはいない。しかし、薬剤耐性変異の検出状況を経時的に追跡していくことで、感染動向の変化など HIV 感染症に関するより深い理解がえられる可能性がある。

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2a)。われわれが本調査を開始したのは2005年で、把握しているデータで2004年以前に感染が判明している被検者の分は、すべて治療中に薬剤耐性の発生が疑われ血液サンプルの検査を依頼された時点のものとなっている。したがって、調査開始以前の感染実態については必ずしも十分に理解できているとはいえないが、性別、感染ルート、感染ウイルスのサブタイプなどからみえてくるその状況は、われわれが新規症例として扱っているものとは大きく性質を異にしているようにみえる。すなわち、2004年以前より治療を受けている21人については大部分が異性間の感染によるものであり、女性患者の割合が比較的高く、またウイルスのサブタイプは CRF01_AE が主であったのに対して、2005年以降新規症例として検査したものは男性同性間の感染が多数を占め、感染しているウイルスはサブタイプ B であることが多い (図2b)。新規症例におけるこの傾向は年々強まっており、感染者の内訳からみれば新潟県はいまや県外地域とほぼ同様の状況に至ったといつてよ

a. エイズ動向委員会報告による発生件数



注: 2011年の報告数は第3四半期まで。

b. 本研究班の検査データに基づく感染動向

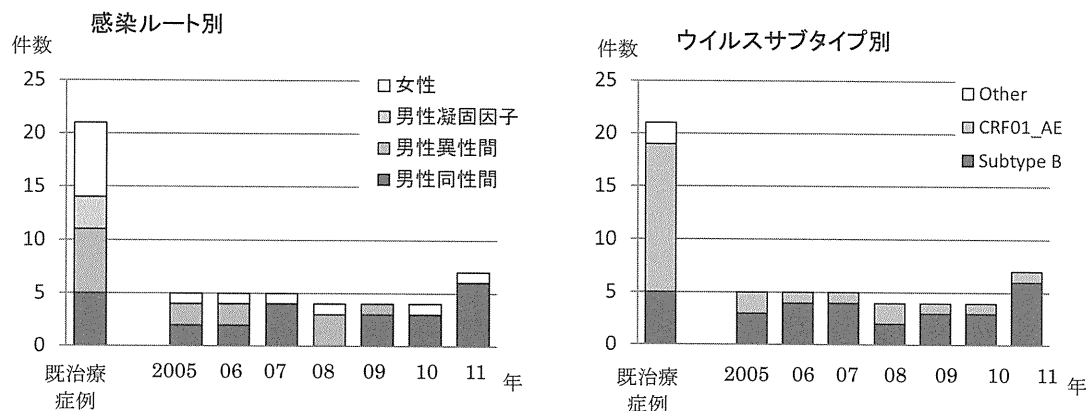


図2 新潟県で発生した HIV 感染/エイズ発症数の推移

いだろう。一方で、MSM 症例の数自体は調査開始以来大きく変化することなく推移してきたのであるが、本年に入り検査件数はこれまでで最高の数となり、また動向委員会報告においても県内の感染増加をうかがわせる状況が現れてきた。これが単年度かぎりの事象か、あるいは今後の傾向として定着するのか、現時点ではあきらかではないが、注意深く見守っていく必要があるだろう。

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、新潟県の被検者から検出された約 50 件のウイルス遺伝子の配列は、2007 年と 2009 年に検査した各 1 件が解析した 5 遺伝子領域の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、遺伝的にきわめて多様なものであった (図 3)。県内の感染状況からみて、このようなウイルスの多様化が域内で進行することは考えにくく、感染の少なくとも大部分は県外地域、おそらくは高度にウイルスの多様化が進んだ首都圏でおきているのであろうと推定してきた (実際、感染場所として東京をあ

げた被検者が何人かいる)。しかし、本年えられた 7 件のシーケンスを既存のデータセットに加えると、この状況に大きな変化が生じているように見える。図 3 に示したとおり、MSM3 症例からえられた新たなデータは、感染しているウイルスがこれまでに解析しているものと遺伝学的にきわめて近い関係にあることを示した。図中、A と表記したグループはいずれも 60 ~ 70 歳代の高齢者で、B および C は 30 歳代後半 ~ 40 歳代前半の年齢層に属する (C は以前から近縁性が知られていたものである)。パートナー、あるいは同じ男性同性愛者のサークルのメンバーとみても不自然ではないと思われる。

こうした遺伝的に近いと推定されるウイルスが県内で検出され始めたことは、感染の主体が、しばしば異性間の感染を含む県外域からの流入から、県内の MSM 集団内の拡大へと移り変わりつつあることを意味するのかもしれない。薬剤耐性変異の項で触れた、最近 MSM 症例から検出されるウイルスが以前のものとは系列的に異なることを示唆する知見は、上記の感染様式の変化に対応しているように思われる。

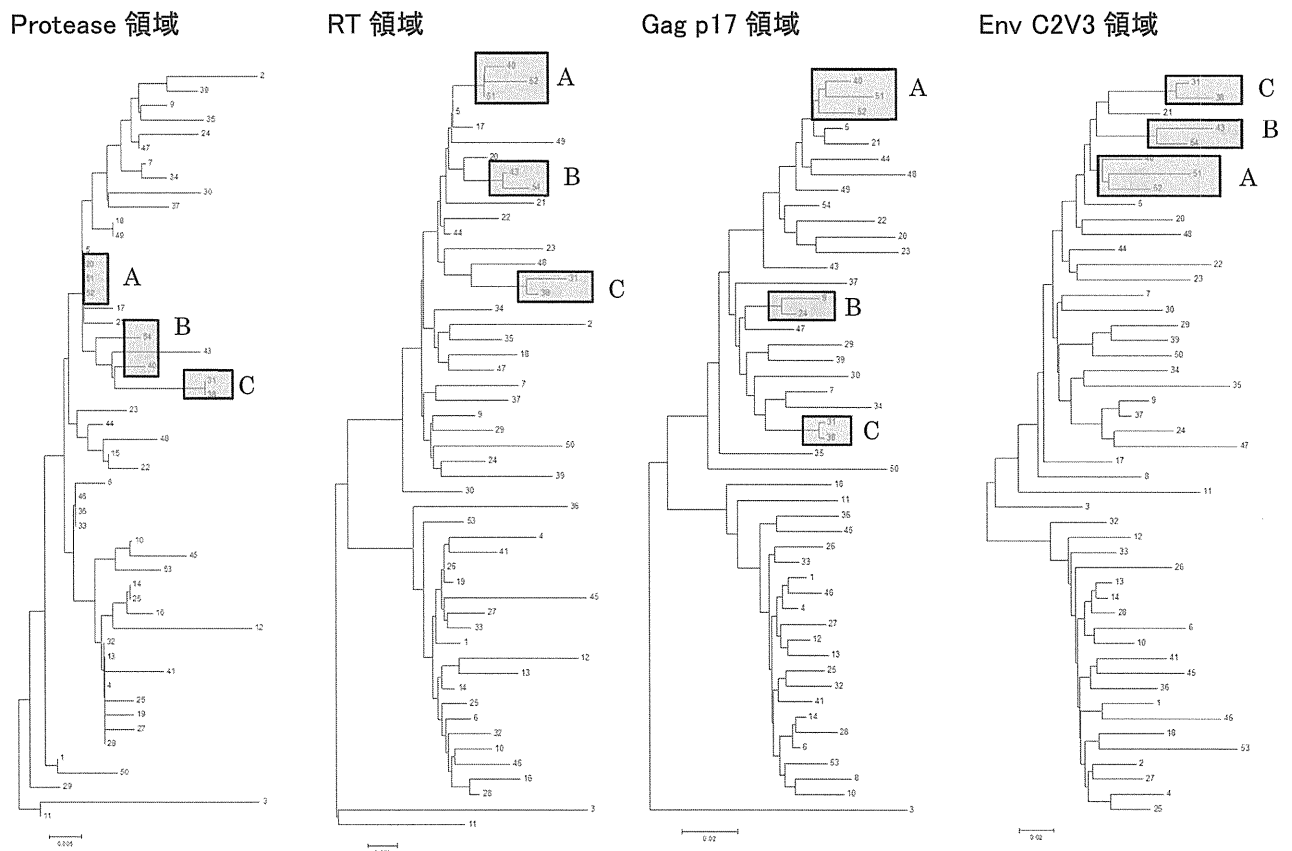


図 3 新潟県で検出されたウイルスの系統学的関係 (インテグラーゼ領域の分子系統樹は解析数が少ないため省略)

D. 考察

新潟県での HIV 感染/エイズ発症者数は 1990 年代後半に急増して 1999 年にピークに達した後、急減して以後 10 年間低い水準のまま推移するという、他地域にあまり類のない特異な動向を示してきた。全国的にはこの 10 年間に MSM 集団の感染がおもに大都市圏で爆発的に増加したことにより、感染/発症者数は右肩上がりに増加したことにより、かつては好発地の一つであった新潟県の人口当たりの感染率は、今では全都道府県中で最低に近いところまで低下している。われわれが把握している被検者の大部分は感染時期が不明となっており、またその時期が推定されている者は感染後 6 年以上、ときには 10 数年が経過しているものが圧倒的に多く、この潜在期間を考慮すると、実際に感染がおきた時点と動向委員告などにみえる感染統計との間には、平均 7～8 年のタイムラグがあるとみるべきである。統計上は 90 年代後半にみえる新潟県の一過的感染増加は、実際には 80 年代末から 90 年代初頭に起きた出来事とみられ、これに主にかかわった CRF01_AE のウイルスが東南アジアに起源をもつものであり、また多くが異性間感染によって広がったことを考えるなら、この時期の増加には売買春が重要な役割を果たしたと推定できる。その後起きた感染/発症者数の急減は 1992 年頃からこうした行為がエイズ汚染を拡大しているとの認識が社会に急速に浸透したことを反映しているのであろう。

それではなぜ新潟県では MSM の感染増加が起きなかったのだろうか？これにはさまざまな社会的、人文的要因がかかわっていようが、本研究班の報告でこれまでに何度も触れてきたように、多数のメンバーが出入りし感染拡大の温床となりうる男性同性愛者のサークルにウイルスが本格的に侵入していなかったというのが最大の理由とわれわれは考えている。この見方が当たっているとすれば、新潟県のこれまでの状況は僥倖ともいえる基盤に支えられたものであり、ひとたびこうしたサークルにウイルスが侵入したならば、急速な感染拡大が生じることは容易に想像できよう。本年の調査結果はこうした懸念が現実のものになりつつあることを強く予感させるものとなった。来年以降も MSM 症例が増加を続け、かつ遺伝的に近縁性を有するウイルスが次々に見つかるならば、県内感染によるエイズ拡大がすでに定着してしまったことを確認せざるをえないこととなろう。

E. 結論

本年検査を行った新規検体数は 7 件 (MSM6 件、

女性異性間感染 1 件) で新潟県の症例に限ればこれまでで最大の数となった。遺伝子配列の解析では、従来新規の MSM 症例でしばしば観察された非ヌクレオシド系の RT 阻害薬に対する弱い耐性変異を含め、薬剤耐性変異は 1 例も検出されなかった。また、配列に含まれるプロテアーゼ阻害薬に対する minor 変異の種類も、これまでにわれわれが解析してきた多くのウイルスとは傾向が異なるものであった。

解析した MSM6 症例のうち 3 件で、以前に県内で発生した患者のものとウイルスの遺伝子配列が類似することが明らかになった。

これらの結果を勘案すると、新潟県における HIV 感染が従来の県域外での感染から県内感染を中心とするものに質的に変化しつつあることが推認された。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

学会報告

口演

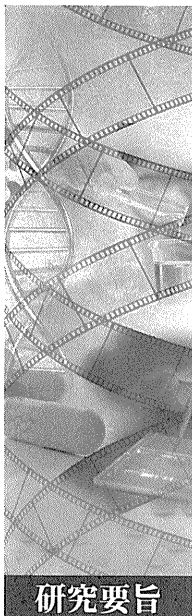
- 1) 村山正晃：HIV-1 陽性者の唾液中に存在するウイルス DNA の完全性に関する研究
(日本エイズ学会 2011 年 11 月 30 日～12 月 2 日 於：東京)
- 2) 牧野麻由子 他：HIV カウンセリングの実践内容の明確化の試み
(日本エイズ学会 2011 年 11 月 30 日～12 月 2 日 於：東京)
- 3) 牧野麻由子：「看護師のためのケースカンファレンス～第 2 弾 多職種との包括的アセスメントから看護支援を考える～」
(日本エイズ学会 2011 年 11 月 30 日～12 月 2 日 於：東京)
- 4) 田邊嘉也：免疫再構築症候群として発症した CMV 脳室炎の 1 例
(第 12 回北関東・甲信越 HIV 感染症症例検討会 2012 年 1 月 28 日 於：高崎市)

ポスター発表

- 1) 須貝めぐみ 他：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、その 2
(日本エイズ学会 2011 年 11 月 30 日～12 月 2 日 於：東京)
- 2) 石塚さゆり 他：「新潟県内診療所における HIV 抗体検査に関する調査」
(日本エイズ学会 2011 年 11 月 30 日～12 月 2 日 於：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
- 特になし



研究要旨

高感度薬剤耐性 HIV 検査法を用いた 微小集族薬剤耐性 HIV の検出と存在比率に関する研究

～定量 PCR を応用した高感度薬剤耐性検査法の開発～

研究分担者 西澤 雅子 国立感染症研究所エイズ研究センター 研究員

患者血中に微量な集族として存在する微小集族薬剤耐性 HIV は、抗 HIV 治療の予後に影響する事が示唆されているが、これを通常の薬剤耐性検査で使用されているダイレクトシーケンス法（通常法）で検出するのは難しい。そこで患者血中に 5%以下の割合で存在する薬剤耐性変異を検出可能な、定量 PCR を応用した高感度薬剤耐性検査法（高感度法）を用いて、逆転写酵素阻害剤（NRTI, NNRTI）に対する耐性変異 M41L, K65R, K70R, K103N, Y181C, M184V, T215F/Y の 8 変異と、今年度新たに開発したプロテアーゼ阻害剤（PI）に対する耐性変異 M46I/L, L90M の 3 変異について解析した。2008 年から 2009 年にかけて名古屋医療センターで薬剤耐性検査を行った新規未治療患者の Subtype B 149 症例を解析した結果、通常法では検出されなかった薬剤耐性変異が逆転写酵素領域で新たに計 6 個、プロテアーゼ領域で新たに計 24 個検出され、薬剤耐性変異の検出頻度はダイレクトシーケンス法の 12.08%から 32.21%に上昇した。また、解析した症例の中に 6 つの耐性変異が検出された症例が 1 例存在した。L90M、M46I/L の 3 つの PI 耐性変異が検出された症例の M46I/L, L90M amplicon のシーケンス解析をした結果、L90M amplicon には M46I/L が検出されず、これらの薬剤耐性変異は患者血中で独立して存在している可能性が示唆された。

A. 研究目的

日本における新規 HIV 感染患者の集団内で薬剤耐性 HIV の拡大が報告されており、効果的な抗 HIV 治療のためには治療開始時の正確な薬剤耐性変異の把握が重要とされる。薬剤耐性検査には一般的に簡便なダイレクトシーケンス法（通常法）が用いられているが、通常法は患者血中に 20%以下の比率で微小集族として存在する薬剤耐性変異を検出するのは難しい。微小集族として患者血中に存在する薬剤耐性 HIV が将来の抗 HIV 治療に悪影響を及ぼす可能性が近年報告されているが、このような微小集族薬剤耐性変異の拡大や頻度についてはまだ詳細な解析が行われていない。本研究では 5%以下の比率で存在する薬剤耐性変異を検出可能な高感度薬剤耐性検査法（高感度法）を開発し、新規未治療患者検体における薬剤耐性変異の検出を試みた。また今年度新

たに開発したプロテアーゼ阻害剤耐性変異の M46I/L 検出系を用いて PI 耐性変異の解析を試みた。

（倫理面への配慮）

本研究では薬剤耐性変異を組み込んだベクターの作製で組換え DNA 実験を行うので、組換え DNA 実験安全委員会に実験申請を行いその許可を得た。またヒト由来検体を使用するため、国立感染症研究所の医学研究倫理審査委員会へ倫理審査を申請し許可を得た。

B. 研究方法

微小集族薬剤耐性 HIV の解析には、米国疾病対策局（CDC）との共同研究で開発された、定量 PCR の原理を応用した高感度薬剤耐性 HIV 検査法（高感度法）を用いた。解析した薬剤耐性変異は逆転写酵

素阻害剤 (NRTI, NNRTI) に対する 8 耐性変異 (M41L, K65R, K70R, K103N, Y181C, M184V, T215Y/F)、PI に対する 3 耐性変異 (M46I/L, L90M) とした。解析対象は 2008 年 1 月～2009 年 12 月までに名古屋医療センターで薬剤耐性検査を行った Subtype B 149 症例 (表 1) とした。これらの検体を高感度法により解析し、通常法による薬剤耐性検査の結果と比較した。また高感度法で得られた M46I/L, L90M amplicon のシーケンス解析を行い、通常法のシーケンス結果や同検体から得られた異なる amplicon のシーケンス結果との比較を行った。

参考文献: Simple PCR assays improve the sensitivity of HIV-1 subtype B drug resistance testing and allow linking of resistance mutations. Johnson JA et al. PLoS ONE. 2007 Jul 25;2(7):e638

表 1 2008 年 1 月から 2009 年 12 月までに名古屋医療センターで薬剤耐性検査を行った Subtype B 新規未治療患者検体の一覧

	2008	2009	Total
合計	75	74	149
性別			
男	74	73	147
女	1	1	2
不明	0	0	
年齢			
平均値 (歳)	39	38	39
感染経路			
同性間	52	49	101
異性間	9	11	20
同性間/異性間	8	13	21
血液製剤	1	0	1
不明	5	1	6
国籍			
日本	67	67	134
アジア (日本を除く)	2	2	4
オセアニア	0	1	1
北アメリカ	1	0	1
南アメリカ	3	3	6
ヨーロッパ	0	1	1
アフリカ	0	0	0
不明	2	0	2
HIV RNA 量 (copies/mL)			
平均値	9.70E+04	7.00E+04	7.90.E+04
最頻値	1.10E+05	2.70E+04	1.10.E+05
CD4			
平均値 (count/mL)	199.7	225.4	212.0

C. 研究結果

対象とした新規未治療患者 149 例を高感度法で解析した結果、逆転写酵素領域に M41L が 1 個、K65R が 2 個、K70R が 2 個、M184V が 1 個、プロテアーゼ領域に M46I が 15 個、M46L が 5 個、L90M が 4 個微少集族として新たに検出された。解析した 149 例の、上記逆転写酵素領域の 8 耐性変異とプロテアーゼ領域の 3 耐性変異の薬剤耐性検出率は通常法で 12.08% だったのに対し、高感度法では 32.21% に上昇した (表 2)。微少集族薬剤耐性変異を検出した 23 症例のうち、1 例 (Case A) からは逆転写酵素領域に 3 個、プロテアーゼ領域に 3 個薬剤耐性変異が検出された。また別の 1 例 (Case B) ではプロテアーゼ領域に 2 個の耐性変異を検出した。さらに別の 1 例 (Case C) では逆転写酵素領域とプ

表 2 高感度法で検出された微少集族薬剤耐性変異の一覧

	2008-2009 合計 (149)			
	通常法	高感度法	合計	(%)
<i>逆転写酵素阻害剤耐性変異</i>				
M41L	0	1	1	0.67
K65R	0	2	2	1.34
K70R	0	2	2	1.34
K103N	0	0	0	0.00
Y181C	0	0	0	0.00
M184V	0	1	1	0.67
T215Y	2	2	2	1.34
T215I	0	0	0	0.00
T215F	0	0	0	0.00
T215L	2	2	2	1.34
<i>PI 耐性変異</i>				
M46I	14	29	29	19.46
M46L	0	5	5	3.36
L90M	0	4	4	2.68
Total	18	48	48	
(%)	12.08	32.21	32.21	

ロテアーゼ領域に 1 個ずつ耐性変異を検出した (表 3)。微少集族薬剤耐性変異を検出した症例の主な属性は、国籍は日本、性別は男性、感染経路は同性間、血中 HIV RNA 量の平均値は 1.7×10^5 /mL、CD4 count の平均値は 276 で、母集団の 149 症例の属性と差異は見られなかった (表 3)。また、Case A, B, C から高感度法によって増幅された M46I/L, L90M amplicon のシーケンス解析を行った結果、Case A では L90M amplicon には M46I, M46L とともに検出されず、これ

らの変異が独立して存在している可能性が示唆された (表 4)。また Case A では通常法のシーケンスと M46L, L90M の amplicon からは I72V が検出されたが M46I の amplicon からは I72V が検出されず、また Case B では M 46L amplicon からは A71T が検出されたが、通常法と M46I の amplicon からは A71T は検出されなかった。

表 3 微少集族薬剤耐性変異が検出された 23 症例の一覧

	Subtype	性別	感染経路	診断年	国籍	HIV RNA量	CD4
<i>逆転写酵素阻害剤耐性変異</i>							
M41L	B*	M	同性間	2009	日本	4.5.E+05	3
K65R	B	M	同性間	2008	日本	2.1.E+04	391
	B	M	同性間	2009	日本	2.9.E+04	nt
K70R	B**	M	同性間	2008	日本	2.2.E+04	154
	B*						
M184V	B*						
<i>PI耐性変異</i>							
M46I	B	M	同性間/異性間	2008	日本	5.8.E+05	222
	B***	M	同性間	2008	日本	2.6.E+04	481
	B	M	同性間	2008	日本	1.7.E+06	10
	B	M	同性間	2008	日本	1.2.E+03	45
	B	M	同性間	2008	日本	8.4.E+04	11
	B	M	同性間	2008	日本	1.1.E+05	1050
	B**						
	B	M	同性間	2009	日本	2.9.E+04	185
	B	M	同性間	2009	アルゼンチン	2.0.E+05	28
	B*						
	B	M	同性間	2009	オーストラリア	1.5.E+04	1
	B	M	同性間	2009	日本	6.0.E+04	373
	B	M	異性間	2009	日本	4.5.E+03	974
	B	F	異性間	2009	日本	8.0.E+04	nt
B	M	同性間	2009	日本	1.4.E+04	300	
M46L	B***						
	B	M	同性間	2008	日本	2.2.E+05	10
	B	M	同性間	2009	日本	7.2.E+03	319
	B	M	同性間	2009	ブラジル	8.6.E+04	14
B*							
L90M	B	M	同性間	2008	日本	1.5.E+04	356
	B	M	同性間	2008	日本	2.1.E+05	553
	B*						
	B	M	同性間	2009	日本	2.2.E+04	324
B*	逆転写酵素領域に3個、PR領域に3個変異が検出された症例。						
B**	逆転写酵素領域に1個、PR領域に1個変異が検出された症例。						
B***	PR領域に2個変異が検出された症例。						