

サブタイピング解析を施行した。これら 92 症例の内訳は、男性が 94.6% (87 症例)、日本人が 93.5% (86 症例) と日本人男性が大部分を占めていた (図 1 a,b)。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 44.6% (41 症例) と最も高く、不明の 2 症例を除いて全例において性接触による感染であった。また、この内 12 例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 (図 1c)。サブタイピング解析の結果、サブタイプ B が 86 症例 (93.5%) と最も多く、non-B のサブタイプにおいては AE それぞれ 4 症例、A と AD がそれぞれ 1 症例であった (図 1d)。

薬剤耐性変異は 14 症例 (15.4%) から検出さ

れた (図 2a)。薬剤クラス別の内訳は、プロテアーゼ阻害剤耐性変異が 8 症例 (全例 M46I/L)、核酸系逆転写酵素阻害剤耐性変異が 5 症例 (全例 T215 リバータント)、非核酸系逆転写酵素阻害剤耐性変異が 3 症例 (K103N、P225H) であり、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 (表 1)。この内、2 症例についてはプロテアーゼ阻害剤、及び非核酸系逆転写酵素阻害剤耐性変異を保有する多剤耐性 HIV が認められた。

BED アッセイの結果、名古屋医療センターにおける HIV-1 感染者の診断 / 受診が recent と判定されたのは 27.2% (25 例) であることが明らかとなった。

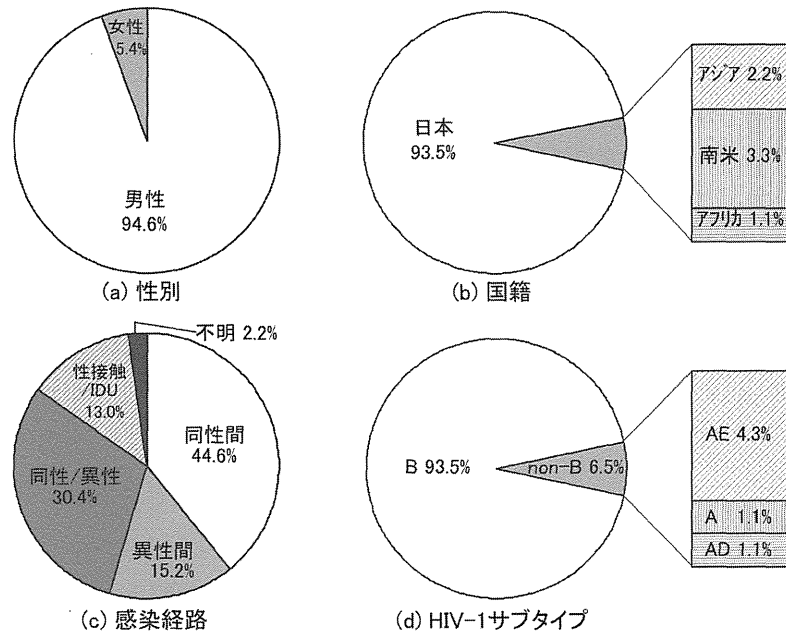


図 1 名古屋医療センターにおける新規 HIV/AIDS 診断症例の背景 (n=92)

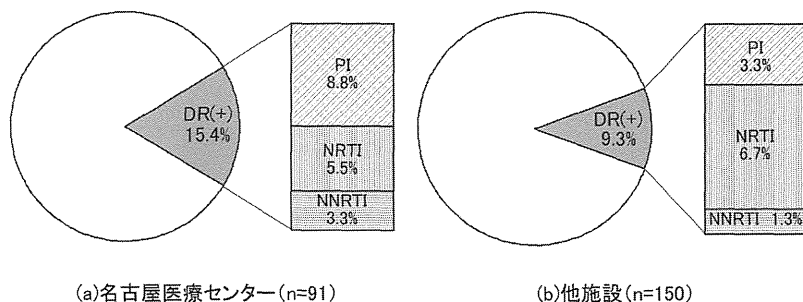


図 2 薬剤耐性 HIV の検出頻度と薬剤クラス別変異の内訳

## (2) 他施設における新規 HIV/AIDS 診断症例

名古屋医療センター以外では、58 施設、356 検体について検査依頼があり、その内 153 検体が診断後 1 年以内に受診した未治療症例であった。これら症例の 94.8% (n=145) が男性、91.5% (n=141) が日本人と大多数を占めた(図 3 a,b)。感染経路は、同性間の性接触による感染が 63.4% (n=98)、異性間の性接触が 23.5% (n=36)、同性/異性いずれかの性接触が 6.5% (n=10) であり、不明 9 例と静注薬物使用者 1 例を除き全例が性接触により感染していた(図 3c)。検査可能であった 150 症例のサブタイプ解析の結果、サブタイプ B が 89.3% (n=134) と大部分を占めた。Non-B サブタイプについては AE (n=15、10.0%) が高い頻度で検出された他は C が 1 症例認められたのみであった(図 3d)。

薬剤耐性 HIV-1 は 9.3% (14/150) に認められた(図 2b)。その内訳を表 1 に示すが、東海地区とは異なり、プロテアーゼ阻害剤耐性の D30N、V32I、M46I、V82A、N88D、L90M、核酸系逆転写酵素阻害剤耐性の M41L、M184V、T215 リバータント、非核酸系逆転写酵素阻害剤耐性の G190A/E とそれぞれの頻度は低いものの多様な耐性変異が検出された。この内 3 症例は、プロテアーゼ阻害剤、及び核酸系逆転写酵素阻害剤耐性変異を保有する多剤耐性 HIV であった。

薬剤耐性遺伝子検査の残余検体あった 119 検体について BED アッセイを施行した結果、19.3% (n=23) が recent 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 HIV/AIDS 診断症例の薬剤耐性 HIV-1 検出頻度は 15.4% で前年の 8.3% から約 2 倍弱に増加したことが明らかとなった。しかしながら、過去の動きを見てみると、2011 年、2010 年はそれぞれ 8.3%、26%、他施設からの依頼検体についても本年の 9.3% 以前は 2011 年 7.9%、2010 年 13.5% と年毎の増減が大きく、薬剤耐性 HIV の動向を見極めるためには継続的な調査が必要であると考えられる。東海地区の特徴としては検出される薬剤耐性変異の種類が少なく、また耐性変異を単独で持つ耐性 HIV 株が検出される傾向が強いのに対し、他の地域から依頼される症例については薬剤耐性変異の種類が多く、複数の耐性変異を持つ HIV 株が見つかり、地域ごとの流行株の存在が示唆された。その一方で、M46I や T215 リバータント変異は現在頻繁に処方されている抗 HIV 薬の効果に影響の無いとされるものの、東海ブロック、及び全国の検体から毎年必ず検出されることから、この変異を持つ耐性 HIV 株は既に全国的な流行株として蔓延していることも示唆された。

BED アッセイの結果から、感染後約半年以内に HIV 検査を受検し、病院を受診する症例の割合は東海地区で 27.2%、その他の地区では 19.3% と前年までと比して低下していることが明らかとなった。このことは HIV 感染拡大防止には早期診断が重要であり、またその為には HIV 検査の機会を増やしていく必要がある事を示しており、啓発の為にも、更なる調査・解析を重ねていくことが重要であると思

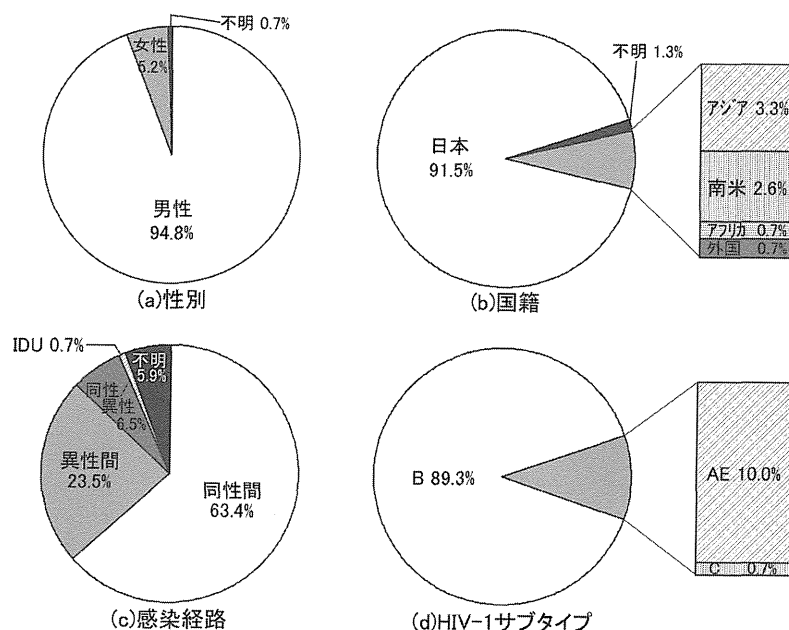


図 3 他施設における新規 HIV/AIDS 診断症例の背景 (n=153)

表 1 検出された薬剤耐性アミノ酸変異

	性別	国籍	感染経路	サブタイプ	PI耐性変異	NRTI耐性変異	NNRTI耐性変異	IN耐性変異
名古屋医療センター	M	日本	同性間	B	M46I	-	-	-
	M	日本	同性間	B	M46I	-	-	-
	M	日本	同性・異性	B	M46I	-	-	-
	M	日本	同性・異性	B	M46I	-	-	-
	M	日本	同性・異性	B	M46I	-	-	-
	M	日本	同性・異性/ DU	B	M46I	-	-	-
	M	日本	同性間	B	M46I	-	K103N	-
	M	日本	同性・異性	B	M46L	-	K103N	*
	M	日本	異性間	B	-	T215C	-	-
	M	日本	不明	B	-	T215D	-	-
	M	日本	同性間	B	-	T215D	-	-
	M	日本	同性間	B	-	T215E	-	-
	M	日本	異性間	B	-	T215S	-	-
	M	日本	同性間	B	-	-	K103N P225H	-
	他施設	M	日本	同性間	B	D30N M46I V82A N88D	M184V	-
M		日本	同性間	B	V32I M46I L90M	T215D	-	*
M		日本	異性間	B	V32I	T215E	-	*
M		日本	同性間	B	M46I	-	-	-
不明		日本	異性間	AE	M46I	-	-	-
M		日本	同性間	B	-	M41L	-	-
M		日本	同性・異性	B	-	M184V	-	-
M		日本	同性間	B	-	T215D	-	-
M		日本	同性間	B	-	T215D	-	-
M		日本	同性間	B	-	T215E	-	-
M		日本	同性間	B	-	T215E	-	-
M		日本	同性間	B	-	T215E	-	-
M		日本	同性間	B	-	-	G190A	-
M		日本	同性間	B	-	-	G190E	-

\* 2クラス以上の耐性症例  
INSTI耐性HIVは検出されなかった。

われた。

## E. 健康危険情報

なし

## F. 研究発表

### 1) 原著論文

欧文

- Bunupuradah T, Imahashi M, Iampornsint T, Matsuoka K, Iwatani Y, Puthanakit T, Ananworanich J, Sophonphan J, Mahanontharit A, Naoe T, Vonthanak S, Phanuphak P, Sugiura W. On Behalf Of The Predict Study Team. Association of APOBEC3G genotypes and CD4 decline in Thai and Cambodian HIV-infected children with moderate immune deficiency. *AIDS Res Ther.* 24;9(1):34. 2012.
- Tsuzuki T, Iwase H, Shimada M, Hirashima N, Hibino Y, Ryuge N, Saito M, Tamaki D, Kamiya A, Yokoi M, Yokomaku Y, Fujisaki S, Sugiura W, Goto H. Clinical evaluation of peginterferon alpha plus ribavirin for patients co-infected with HIV and HCV at Nagoya Medical Center. *Nihon Shokakibyō Gakkai zasshi = The Japanese journal of gastro-enterology.* 109(7):1186-1196. 2012.
- Ode H, Nakashima M, Kitamura S, Sugiura W, Sato H. Molecular dynamics simulation in virus research. *Frontiers in microbiology.* 3:258. 2012.
- Miyamoto T, Nakayama EE, Yokoyama M, Ibe S, Takehara S, Kono K, Yokomaku Y, Pizzato M, Luban J, Sugiura W, Sato H, Shioda T. The Carboxyl-Terminus of Human Immunodeficiency Virus Type 2 Circulating Recombinant form 01\_AB Capsid Protein Affects Sensitivity to Human TRIM5 $\alpha$ . *PloS one.* 7(10):e47757. 2012.
- Matsunaga S, Sawasaki T, Ode H, Morishita R, Furukawa A, Sakuma R, Sugiura W, Sato H, Katahira M, Takaori-Kondo A, Yamamoto N, Ryo A. Molecular and enzymatic characterization of XMRV protease by a cell-free proteolytic analysis. *Journal of proteomics.* 75(15):4863-4873. 2012.
- Kitamura S, Ode H, Nakashima M, Imahashi M, Naganawa Y, Kurosawa T, Yokomaku Y, Yamane T, Watanabe N, Suzuki A, Sugiura W, Iwatani Y. The APOBEC3C crystal structure and the interface for HIV-1 Vif binding. *Nature structural & molecular biology.* 19(10):1005-1010. 2012.
- Jahanbakhsh F, Ibe S, Hattori J, Monavari SH, Matsuda M, Maejima M, Iwatani Y, Memarnejadian A, Keyvani H, Azadmanesh K, Sugiura W. Molecular epidemiology of HIV-1 infection in Iran: genomic evidence of CRF35\_AD predominance and CRF01\_AE infection among individuals associated with injection drug use. *AIDS research and human retroviruses.* 29:198-203.2012.
- Hirano A, Ikemura K, Takahashi M, Shibata M, Amioka K, Nomura T, Yokomaku Y, Sugiura W.

Short communication: lack of correlation between UGT1A1\*6, \*28 genotypes, and plasma raltegravir concentrations in Japanese HIV type 1-infected patients. *AIDS research and human retroviruses*. 28(8):776-779. 2012.

## 和文

1. 都築智之, 岩瀬弘明, 島田昌明, 平嶋昇, 日比野祐介, 龍華庸光, 齋藤雅之, 玉置大, 神谷麻子, 横井美咲, 横幕能行, 藤崎誠一郎, 杉浦互, 後藤秀実. 当院における hiv、Hcv 重複感染症例に対するペグインターフェロン、リバビリン併用療法の治療成績. *日本消化器病学会雑誌*. 109(7):1186-1196. 2012.

## 2) 口頭発表

### 海外

1. J. Hattori, U. Shigemi, M. Hosaka, R. Okazaki, Y. Iwatani, Y. Yokomaku, W. Sugiura. Socio-demographic analysis of treatment-naïve HIV-1-positive populations with recent or long-term infection estimated by BED assay in Japan. XIX International AIDS Conference, Seattle, Washington, USA, Jul 22-27, 2012.
2. K Suzuki, H Ode, M Fujino, T Masaoka, J, Hattori, Y Yokomaku, Y Iwatani, A Suzuki, N Watanabe, W Sugiura. Molecular and Structural analysis of darunavirresistant HIV-1 protease. International Workshop on HIV&Hepatitis Virus Drug Resistance and Curative Strategies, Sitges, Spain, Jun 5-9, 2012.
3. S. Kitamura, H. Ode, M. Nakashima, A. Suzuki, N. Watanabe, W. Sugiura, Y. Iwatani. Conformational Conservation of the HIV-1 Vif-Binding Interface on APOBEC3C, DE, and F. Cold Spring Harbor Laboratory Meetings - Retroviruses, New York, USA, May 21-26, 2012.
4. S. Kitamura, H. Ode, M. Nakashima, M. Imahashi, Y. Naganawa, Y. Yokomaku, A. Suzuki, N. Watanabe, W. Sugiura aYI. The APOBEC3C Crystal Structure and the Interface for HIV-1 Vif Interaction. Cold Spring Harbor Laboratory Meetings - Retroviruses, New York, USA, May 21-26, 2012.

### 国内

1. 松岡和弘, 田邊史子, 重見麗, 服部純子, 正岡崇志, 森下了, 澤崎達也, 横幕能行, 岩谷靖雅, 杉浦互. コムギ無細胞蛋白質合成系を利用した HIV-1 逆転写酵素の in vitro 薬剤感受性解析法の開発. 第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会, 東京, 2012 年 11 月 24-26 日.
2. 大出裕高, 鈴木康二, 藤野真之, 前島雅美, 木村雄貴, 正岡崇志, 服部純子, 横幕能行, 鈴木淳巨, 渡邊信久, 岩谷靖雅, 杉浦互. 耐性誘導により得た高度ダルナビル耐性 HIV-1 プロテアーゼの構造

学的解析. 第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会, 東京, 2012 年 11 月 24-26 日.

3. 今橋真弓, 泉泰輔, 今村淳治 1, 松岡和弘, 金子典代, 市川誠一, 高折晃史, 内海眞, 横幕能行, 直江知樹, 杉浦互, 岩谷靖雅. HIV-1 感染伝播・病勢に対する APOBEC3B 遺伝子型の影響に関する解析. 第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会, 東京, 2012 年 11 月 24-26 日.
4. 松田昌和, 服部純子, 今村淳治, 横幕能行, 岩谷靖雅, 杉浦互. Plasma RNA と Proviral DNA による HIV 指向性遺伝子型の比較解析. 第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会, 東京, 2012 年 11 月 24-26 日.
5. 鬼頭優美子, 松田昌和, 服部純子, 伊部史朗, 大出裕高, 松岡和弘, 今村淳治, 岩谷靖雅, 杉浦互, 横幕能行. 臨床検体由来 env 全長組み換え HIV-1 による指向性検査法の確立. 第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会, 東京, 2012 年 11 月 24-26 日.
6. 服部純子, 瀧永博之, 渡邊大, 長島真美, 貞升健志, 近藤真規子, 南留美, 吉田繁, 森治代, 内田和江, 椎野禎一郎, 加藤真吾, 千葉仁志, 佐藤典宏, 伊藤俊広, 佐藤武幸, 上田敦久, 石ヶ坪良明, 古賀一郎, 太田康男, 山元泰之, 福武勝幸, 古賀道子, 岩本愛吉, 西澤雅子, 岡慎一, 伊部史朗, 松田昌和, 林田庸総, 横幕能行, 上田幹夫, 大家正義, 田邊嘉也, 白阪琢磨, 小島洋子, 藤井輝久, 高田昇, 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 26 回日本エイズ学会学術集会・総会, 東京, 2012 年 11 月 24-26 日.
7. 伊部史朗, 横幕能行, 前島雅美, 松岡和弘, 正岡崇, 岩谷靖雅, 杉浦互. 薬剤感受性プロファイリングに裏づけされた新規 HIV-2 組換え流行株 CRF01\_AB 感染例の良好な治療経過. 第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会, 東京, 2012 年 11 月 24-26 日.
8. 羽柴知恵子, 福山由美, 伊藤明日美, 長谷川真奈美, 渡邊智子, 藤谷和美, 小川恵子, 杉浦互, 横幕能行. HIV 陽性者への外来トリアージの必要性に向けて. 第 66 回国立病院総合医学会, 神戸, 2012 年 11 月 16-17 日.
9. 永見芳子, 塚本弥生, 杉本香織, 杉浦互, 福山由美, 横幕能行. 長期に療養が必要となった HIV 感染症患者への支援体制の現状と課題. 第 66 回国立病院総合医学会, 神戸, 2012 年 11 月 16-17 日.
10. 丸山笑里佳, 羽柴知恵子, 福山由美, 杉浦互, 横幕能行. 違法薬物使用歴を持つ HIV 陽性者に対する内科外来での心理的支援の検討. 第 66 回国立病院総合医学会, 神戸, 2012 年 11 月 16-17 日.
11. 榎原美穂, 福山由美, 羽柴知恵子, 長谷川真奈美, 伊藤明日美, 渡邊智子, 藤谷和美, 小川恵子, 杉浦互, 横幕能行. 外来看護師による HIV 陽性者受診継続のための看護介入判断基準の標準化に向けて. 第 66 回国立病院総合医学会, 神戸, 2012

- 年 11 月 16-17 日.
12. 渡邊英恵, 福山由美, 羽柴知恵子, 伊藤明日美, 長谷川真奈美, 渡邊智子, 藤谷和美, 小川恵子, 杉浦互, 横幕能行. HIV 陽性女性が安心して将来の妊娠について考えられる外来看護支援に向けて. 第 66 回国立病院総合医学会, 神戸, 2012 年 11 月 16-17 日.
  13. 福山由美, 大林由美子, 杉浦互, 横幕能行. 医療機関からみる愛知県内 HIV 陽性判明の動向 ~いきなりエイズ減少に向けて~. 第 66 回国立病院総合医学会, 神戸, 2012 年 11 月 16-17 日.
  14. 北村紳悟, 大出裕高, 中島雅晶, 今橋真弓, 長縄由里子, 黒沢哲平, 横幕能行, 山根隆, 渡邊信久, 鈴木淳巨, 杉浦互, 岩谷靖雅. APOBEC3C の構造解析と HIV-1 Vif 結合インターフェイスの同定. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 2012 年 11 月 13-15 日.
  15. 大出裕高, 鈴木康二, 藤野真之, 前島雅美, 木村雄貴, 正岡崇志, 服部純子, 横幕能行, 鈴木淳巨, 渡邊信久, 岩谷靖雅, 杉浦互. 高度ダルナビル耐性 HIV-1 の分子機序の解明. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 2012 年 11 月 13-15 日.
  16. 中島雅晶, 北村紳悟, 大出裕高, 今橋真弓, 長縄由里子, 黒沢哲平, 横幕能行, 山根隆, 渡邊信久, 鈴木淳巨, 杉浦互, 岩谷靖雅. APOBEC3 間における HIV-1 Vif 結合インターフェイスの違い. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 2012 年 11 月 13-15 日.
  17. 岩谷靖雅, 前島雅美, 北村紳悟, 大出裕高, 中島雅晶, 今橋真弓, 長縄由里子, 黒沢哲平, 伊部史朗, 横幕能行, 杉浦互. APOBEC3G の酵素活性非依存的な抗 HIV-1 作用メカニズム. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 2012 年 11 月 13-15 日.
  18. 北村紳悟, 大出裕高, 中島雅晶, 今橋真弓, 長縄由里子, 横幕能行, 鈴木淳巨, 渡邊信久, 杉浦互, 岩谷靖雅. APOBEC3C の結晶構造解析と HIV-1 Vif 結合インターフェイスの同定. 第 12 回日本蛋白質科学会年会, 名古屋, 2012 年 6 月 20-22 日.
  19. 伊部史朗, 横幕能行, 前島雅美, 松岡和弘, 正岡宗, 岩谷靖雅, 杉浦互. 新規 HIV-2 組換え流行株 CRF01\_AB 感染例の治療経過と薬剤感受性ポロファイリング. 第 14 回白馬シンポジウム in 京都, 京都, 2012 年 6 月 7-8 日.
  20. 松田昌和, 服部純子, 今村淳治, 横幕能行, 杉浦互. 遺伝子配列解析による HIV-1 指向性の判定とその動向. 第 86 回日本感染症学会総会, 長崎, 2012 年 4 月 25-26 日.
  21. 今村淳治, 横幕能行, 服部純子, 伊部史朗, 天羽清子, 塩見正司, 杉浦互. enofovir+Darunavir/r+Etravirine によるサルベージ療法が著効した多剤耐性 HIV 感染児の一例. 第 86 回日本感染症学会総会, 長崎, 2012 年 4 月 25-26 日.
  22. 今村淳治, 横幕能行, 片野晴隆, 安岡 彰, 杉浦互. 名古屋医療センターにおけるカポジ肉腫発症エイズ患者数の動向. 第 86 回日本感染症学会総会, 長崎, 2012 年 4 月 25-26 日.
  23. 伊部史朗, 近藤真規子, 今村淳治, 横幕能行, 杉浦互. HIV-1/HIV-2 重複感染疑い例における血清学および遺伝子学的精査解析. 第 86 回日本感染症学会総会, 長崎, 2012 年 4 月 25-26 日.
- G. 知的所有権の出願・取得状況  
なし

## 横浜およ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 病態制御免疫内科 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

### 研究要旨

神奈川県における HIV/AIDS 診療の実態を把握するため平成 24 年度 1 月より 12 月に当院初診の新規未治療感染患者 18 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 6 名おられ、うち 3 名は臨床初期 HIV 感染と診断できた。耐性検査は 12 名になされ臨床問題となる耐性を認めていない。12 名中 3 名が指向性 X4 であった。また 1 名がサブタイプ 01 AE であり、残り 11 名はサブタイプ B であった。

### 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 6 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行われた。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大いに有用であり、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；

2012 年度に当院を新規感染患者として受診した 18 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、指向性検査、サブタイプ解析は国立病院機構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

平成 24 年に当院を初診した HIV 感染患者は 28 名であった。内訳は男性 27 名（96%）、女性 1 名、邦人 24 名（86%）、外国籍 3 名（ブラジル、フィリピン、中国）であった。このうち、未治療例は 19 名、新規感染判明患者は 18 名であった。未治療例 19 名中 18 名に BED アッセイを施行した（表 1）。 $ODn < 0.8$  は 6 名であった。そのうち 3 名は抗体検査の結果から初期 HIV 感染と診断されていた。1 名は未治療ではあるが 3 年前に HIV 感染の診断と

なっており、偽陽性の原因は初診時の血中ウイルス量が 93 copy/ml と低く、nonprogressor が考えられた。12 名に耐性検査、指向性検査、サブタイプ解析が施行された。薬剤耐性変異はいずれの症例にも認められなかった。指向性は 3 症例が X 4 であり、9 症例が R 5 であった。サブタイプ解析では 1 例が O1 AE であり、他はすべて B であった。AE 症例は中国籍の方であった。

#### D. 考察

初期 HIV 感染は今年 3 名であり最近の傾向として年 3～4 名が同症状で受診される。5 年より以前では、初期 HIV 感染は年 0～1 名といった頻度であり、増加傾向は明らかである。BED 陽性例は 6 例、31.6% であり、昨年の 33% と引き続き同様の比率で推移している。薬剤耐性変異は本年度に新規感染判明した症例に認められなかった。例年 1～2 名が薬剤耐性変異を有し、T215S/E/D/L や M46I/L などが毎年認められていたが、本年度は認めていない。これが何らかの傾向であるかは、継続して観察していく必要がある。

#### 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。薬剤耐性変異は 24 年度の新規感染判明患者に認めず、傾向を慎重に見守る必要がある。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。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1) 原著論文

1. 松井周一、上田敦久、筑丸寛、白井輝、西川能治、石ヶ坪良明：1 日 2 回の服薬を必要とする抗 HIV 治療に対する患者服薬意識 Therapeutic Research 32 巻 11 号 Page1539-1544

##### 2) 口頭発表

1. 筑丸寛、上田敦久、中島英行、光永幸代、竹林早苗、松山奈央、松井周一、友田安政、白井輝、石ヶ坪良明、藤内祝：プラークコントロールによる HIV ウイルス量の減少が考えられた急性壊死性歯肉炎の 1 例 26 回日本エイズ学会学術集会・総会 2012. 11.24～11.26
2. 南部郁、渡部節子、金嶋祐加、上田敦久：HIV/AIDS 患者における感染及び疾患に関する周囲への告知の実態 26 回日本エイズ学会学術集会・総会 2012. 11.24～11.26
3. 竹林早苗、松山奈央、今津陽子、森みずえ、上田敦久、渡部節子：HIV/AIDS 患者の中長期における療養体験と看護支援 26 回日本エイズ学会学術集会・総会 2012. 11.24～11.26
4. 友田安政、上田敦久、白井輝、筑丸寛、水口由佳、高木愛子、若林美千子、竹林早苗、松山奈央、石ヶ坪良明：ソーシャルワーカーによる HIV 陽性患者との初回面接に関する調査 26 回日本エイズ学会学術集会・総会 2012. 11.24～11.26

#### H. 知的所有権の出願・取得状況

なし

表 1

症例	感染時期	CD4	VL (c/ml)	ODn
1 ♯	不明	25	500 000	1.88
2	初期 HIV 感染	88	200 000	0.13
3	不明	58	150 000	2.88
4 ♯	不明	7	200 000	1.13
5 ♯	不明	58	54 000	2.21
6	不明	200	5 400	0.68
7 ♯	不明	1	190 000	1.50
8	不明	121	3 300	1.35
9	不明	402	4 400	2.02
10	初期 HIV 感染	361	57 000	0.10
11	不明	188	96 000	2.012
12	不明	626	93	0.07
13	初期 HIV 感染	304	31 000	0.05
14	不明	275	380	2.64
15	不明	764	5 700	0.04
16	不明	34	74 000	3.40
17	不明	50	370 000	0.99
18 ♯	不明	86	1 300 000	1.42

♯ AIDS 発症例

赤字は BED <0.8

## 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 仙台医療センター感染症内科 医長  
 研究協力者 佐々木 悟 仙台医療センター臨床検査技師  
 葛西 淳 仙台医療センター臨床検査技師

### 研究要旨

平成 23 年度（平成 23 年 12 月～平成 24 年 3 月）及び平成 24 年度（平成 24 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。また、前年度未報告分の 3 例を加え解析した。その結果、検査可能であった新規感染者 11 症例（前年度未報告 3 例）中 7 例で耐性変異が検出された。2 例は女性で共にサブタイプ C であり、8 例は MSM でサブタイプ B、1 例男性で感染経路不明でありサブタイプ B であった。女性 2 例を含む 6 例は AIDS を発症していた。RT 領域では 3 例に耐性変異を認め、それぞれ V179D と V118I、K103N、T215S であり、プロテアーゼ領域では K20R（1 例）、A71T（1 例）、L10I（1 例）、L10Y（1 例）、I62V（3 例）、I62I（1 例）、I64V（2 例）、I15V（2 例）の変異を検出した。

### A. 研究目的

すでに慢性疾患と認識される HIV 感染症であるが、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 それ自身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やその広がりを知ることができる可能性が高い。

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 基礎研究に役立てれるよ

うな体制を確立することである。今回は平成 23 年 12 月～平成 24 年 11 月の症例分について報告する。

### B. 研究方法

平成 23 年 12 月～平成 24 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、c DNA 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 24 年 11 月末日までの HIV/AIDS 感染者の累計は 235 名である。東北全体での平成 24 年 9 月までの累計では 466 名で、全国と同様に増加している。平成 23 年 12 月～平成 24 年 11 月の期間に当院を初診した HIV 感染者は 20 例で、すべて性的接触による感染であり、女性が 3 例であった。治療歴のない HIV 感染者で本研究の対象となった症例は 8 例（すべて日本人で男性 MSM 7 例、女性 1 例）であり、前年度未報告分 3 例（男性 2 例、女性 1 例）を加え 11 症例で検討した。年齢は 22 歳から 62 歳で平均 34.2 歳、中央値は 31 歳で AIDS 発症 6 例、キャリアー 5 例。耐性検査時の HIV ウイルス量は  $8.9 \times 10^3 \sim 5.0 \times 10^6$  コピー/ml、CD4 は  $19 \sim 521/\mu\text{l}$ 。ウイルス subtype は女性は 2 例とも C で他 9 例（MSM：8 例、不明 1 例）はすべて B であった。女性 1 例はアフリカ出身の男性から、もう 1 例は海外（アメリカ）で黒人からの感染であったと考えられる。

耐性変異は 11 例中 7 例に認められた。すなわち、RT 領域では 3 例に耐性変異を認め、それぞれ V179D と V118I、K103N、T215S であり、プロテアーゼ領域では K20R (1 例)、A71T (1 例)、L10I (1 例)、L10Y (1 例)、I62V (3 例)、I62IV (1 例)、I64V (2 例)、I15V (2 例) の変異を検出した。

### D. 考察

東北においても全国と同様に HIV 感染者は同性間の性的接触 (MSM) を中心に増加傾向にある。核酸系及び非核酸系逆転写酵素阻害剤 (RTI)・プロテアーゼ阻害剤 (PI) を用いた多剤併用療法 (cART) 開始時に耐性ウイルスの存在の有無を確認することはその後のさらなる耐性出現を防ぐ上で重要である。近年耐性克服を考慮した薬剤 (インテグラーゼ阻害剤: raltegravir、非核酸系逆転写酵素阻害剤における etravirine プロテアーゼ阻害剤における darunavir、CCR5 阻害剤である maraviroc など) が開発され、すでに臨床に供されており、今後さらに新薬が登場する予定である。これら薬剤に対する耐性ウイルスの出現にも注意を払っていく必要がある。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継続的サーベイランスが必要である。

### E. 結論

平成 23 年 12 月～平成 24 年 11 月の期間の HIV 感染症新規症例、及び前年度の未報告症例を加えた全 11 例について薬剤耐性検査を施行し、7 例で耐性変異を検出した。今後も継続的サーベイランスが必要である。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1) 原著論文

1. 伊藤俊広: 東北における HIV 感染症の動向・現状・課題: 医薬の門、52(6): 456-460、2012

#### 2) 学会発表

1. 佐藤麻希、山本善彦、阿部憲介、水沼周市、諏江裕、伊藤俊広: 災害時に対応した抗 HIV 薬供給と服薬支援策の検討～東北ブロック中核拠点病院・拠点病院薬剤師間のさらなるネットワーク構築の第一歩～: 第 26 回日本 AIDS 学会、2012、11 月、横浜
2. 阿部憲介、佐藤麻希、佐藤 功、諏江 裕、伊藤俊広: 当院における TDF 関連高 CK 血症の検討: 第 26 回日本 AIDS 学会、2012、11 月、横浜
3. 服部純子、瀧永博之、渡邊 大、長島真美、貞升健志、林田庸総、近藤真規子、南留美、吉田 繁、森 治代、内田和江、椎野禎一郎、加藤真吾、千葉仁志、佐藤典宏、伊藤俊広、佐藤武幸、上田敦久、石ヶ坪良明、古賀一郎、太田康男、山元泰之、福武勝幸、古賀道子、岩本愛吉、西澤雅子、岡 慎一、伊部史朗、松田昌和、林田庸総、横幕能行、上田幹夫、大家正義、田邊嘉也、白阪琢磨、小島洋子、藤井輝久、高田 昇、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 26 回日本 AIDS 学会、2012、11 月、横浜

### H. 知的所有権の出願・取得状況

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、2012 年新規に診断された 10 例の HIV 感染者のうち 8 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 T69N と T69N/D がそれぞれ 1 例に、V106I が 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、7 例で V72I が検出された。サブタイプ解析では、B が 7 例、AE 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慢性未治療 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 サブタイプの動向についても調査する。

### B. 研究方法

薬剤耐性検査 (genotype) 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、検査は研究代表者である杉浦互先生 (名古屋医療センター) に依頼した。

(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 2012 年 1 月から 12 月までの HIV

感染者・AIDS 患者の新規登録は 13 例で、未治療は 10 例であった。その中で耐性検査を行った症例は 8 例で、問診と免疫機能検査成績などからは、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 8 例全例に耐性に関与する変異が確認されたが、全て二次変異であった (表 1)。それらの変異の中で頻度の多いものとしては、V77I (6 例)、L63P (4 例) であった。逆転写酵素領域では、T69N と T69N/D がそれぞれ 1 例に、V106I が 1 例に観察された。インテグラーゼ領域では、8 例のうち 7 例に V72I が観察され、L74M は 1 例に観察された。サブタイプ解析では、サブタイプ B が 7 例 (87.5%)、AE が 1 例 (12.5%) であった。

また抗 HIV 療法中の患者 1 例で、耐性ウイルスの出現を疑い薬剤耐性検査を行ったが、遺伝子増幅ができず解析はできなかった (表 2)。

### D. 考察

2012 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 8 例であった。プロテアーゼ領域では一次変異はなかったが、二次変異は

表 1 新規登録患者における薬剤耐性変異の解析結果 (2012 年)

2012年1月～12月10日						
No	性別	国籍	サブタイプ	PRO	RT	IN
1	M	日本	B	M36I, L63P, V77I	—	V72I
2	M	日本	B	L63P, H69N, V77I	—	V72I
3	M	日本	B	I15V, I62V	—	V72I
4	M	日本	B	I15V, A71T, V77I	—	V72I
5	M	日本	B	L10I, A71T, V77I	—	V72I, L74M
6	M	日本	B	L63P, H69N, A71T, V77I	T69N, V106I	V72I
7	M	日本	B	L63P, H69N, V77I	T69N/D	V72I
8	M	日本	AE	M36I, I62V	—	—

表 2 ART 患者における薬剤耐性変異の解析結果 (2012 年)

2012年1月～12月10日						
No	性別	国籍	サブタイプ	PRO	RT	IN
該当者なし						

L63P、V77Iをはじめとしていくつかの変異が検出された。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 変異は、2010 年以後は北陸においても観察されなくなった。AZT 使用状況と関係があるのかもしれない。以前に報告したように、北陸においても抗 HIV 治療 (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

2012 年、新規に HIV 感染が診断され登録された 10 例のうち 8 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 8 例全例に認められた。逆転写酵素領域では、核酸系逆転写酵素阻害剤耐性に寄与するとされる T69N と T69N/D 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 7 例で、AE が 1 例であった。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1) 原著論文

1. 上田幹夫：北陸地方における HIV 感染の動向と現状. 医薬の門 52(1)：16-20, 2012.

### 2) 学会発表

1. 椎野貞一郎, 服部純子, 瀧永博之, 吉田繁, 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, 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 3：希少サブタイプとサブタイプ間組み替え体の動向. 第 26 日本エイズ学会, 横浜, 2012 年.
2. 井内亜紀子, センテノ田村恵子, 鈴木智子, 須貝恵, 辻典子, 濱本京子, 吉用緑, 山本政弘：ブロック拠点病院と中核拠点病院における連携の在り方についての検討～中核拠点病院におけるチーム医療と研修の実績～. 第 26 日本エイズ学会, 横浜, 2012 年.
3. 北志保里, 上田幹夫, 山下美津江, 石坂憲寿：不安感を抱えた患者への支援について—他職種でかかわって—. 第 26 日本エイズ学会, 横浜,

2012 年.

4. 古谷野淳子, 早津正博, 加藤朋子, 塚本琢也, 北志保里, 松岡亜由子, 大谷ありさ, 倉谷昂志, 仲倉高広, 藤本恵理, 宮本哲雄, 森田眞子, 安尾利彦, 喜花伸子, 辻麻理子, 阪木淳子, 飯田敏晴, 山中京子: 中核拠点病院におけるカウンセリング従事者調査 第 1 報—カウンセリング体制の現状. 第 26 日本エイズ学会, 横浜, 2012 年.
5. 早津正博, 古谷野淳子, 加藤朋子, 塚本琢也, 北志保里, 松岡亜由子, 大谷ありさ, 倉谷昂志, 仲倉高広, 藤本恵理, 宮本哲雄, 森田眞子, 安尾利彦, 喜花伸子, 辻麻理子, 阪木淳子, 飯田敏晴, 山中京子: HIV 治療の中核拠点病院におけるカウンセリング従事者調査 第 2 報—カウンセリング環境の課題. 第 26 日本エイズ学会, 横浜, 2012 年.
6. 安田明子, 表志穂, 下川千賀子, 山田三枝子, 上田幹夫: 外国籍感染妊婦出産に対する薬剤師の関わり. 第 26 日本エイズ学会, 横浜, 2012 年.
7. 服部純子, 瀧永博之, 渡邊大, 長島真美, 貞升健志, 近藤真規子, 南留美, 吉田繁, 森治代, 内田和江, 椎野貞一郎, 加藤真吾, 千葉仁志, 佐藤典宏, 伊藤俊広, 佐藤武幸, 上田敦久, 石ヶ坪良明, 古賀一郎, 太田康男, 山元泰之, 福武勝幸, 古賀道子, 岩本愛吉, 西澤雅子, 岡慎一, 伊部史朗, 松田昌和, 林田庸総, 横幕能行, 上田幹夫, 大家正義, 田邊嘉也, 白阪琢磨, 小島洋子, 藤井輝久, 高田昇, 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 26 日本エイズ学会, 横浜, 2012 年.
8. 上田幹夫, 小谷岳春, 重山郁子, 山副有子, 上野朱美, 高山次代, 山田三枝子, 北志保里, 辻典子: 術前 HIV 抗体検査ルーチン化に向けた取り組み. 第 26 日本エイズ学会, 横浜, 2012 年.
9. 宮田勝, 能島初美, 高木純一郎, 山本裕佳, 上田幹夫, 山田三枝子, 辻典子, 前田憲昭: 拠点病院と歯科診療所との連携に関する考察 第 1 報—当院における歯科診療の現状—. 第 26 日本エイズ学会, 横浜, 2012 年.
10. 能島初美, 宮田勝, 高木純一郎, 山本裕佳, 上田幹夫, 山田三枝子, 辻典子, 前田憲昭: 拠点病院と歯科診療所との連携に関する考察 第 2 報. 第 26 日本エイズ学会, 横浜, 2012 年.

#### H. 知的所有権の出願・取得状況

該当なし



## 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

### 研究要旨

国内で流行している HIV-1 株の特徴とヒト免疫系の選択圧がどのようにかかわっているかを、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、ヒト T 細胞免疫系に最もよく標的とされる Nef 蛋白質について、遺伝子配列を解析して、その特徴と、ヒトゲノム多型 (HLA クラス I アリル) との相関の有無を検討した。当初、240 例の検体を用いて nef 遺伝子の解析と MHC アリルとの相関を実施し、日本人に良く見られる HLA-A2402, A0206 等のアリルで有意な相関を見出した。一方、頻度の低いアリルでは有意さが得られず、十分に全体の傾向をカバーできるレベルに達しなかった。検体数によって大幅に改善が期待できると考えられたため、我々は、検体を 400 例追加して、合計 640 例の検体から、517 例の nef 遺伝子の解析に成功した。遺伝子配列データのリファインメントを行うとともに、MHC との相関解析を進めている。

### 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、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、免疫学的な影響を最も強く受けていると想定される Nef 蛋白質について、国内感染者のウイルス遺伝子配列を解析するとともに、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、nef 遺伝子の特異的に増幅したのち、ダイレクトシーケンシング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。その後、国立国際医療センターから 200 例、および東京大学医科学研究所病院 (岩本先生の協力の下) から 218 例

(取得時の異なる重複した検体が 18 例あったため、これらを除いた 200 例で横断的な解析を進めた) の検体を追加して、解析を進めた。

(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、国立国際医療センター、東京大学医科学研究所) の倫理審査会の審議を受け、承認を得ている。文書による説明を行い、文書による同意を得た感染者の検体のみ用いた。個人情報の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) 小規模コホートでの検討

日本人の HLA クラス I アリルの多型性を考えると、頻度の低いアリルに関しては、500 例を超える検体が解析には必要と想定される (たとえば頻度が約 2% なら、500 名で 10 例が相当するため、統計的に解析可能)。大規模なコホートの検体集めと解析には多大な時間がかかるため、まずは、240 名

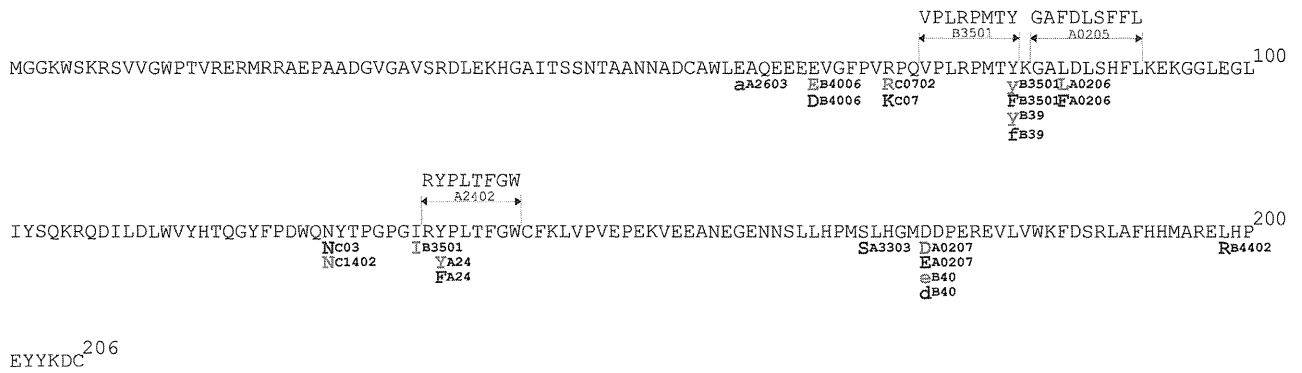


図1 国内における Nef 変異と MHC 制御の相関

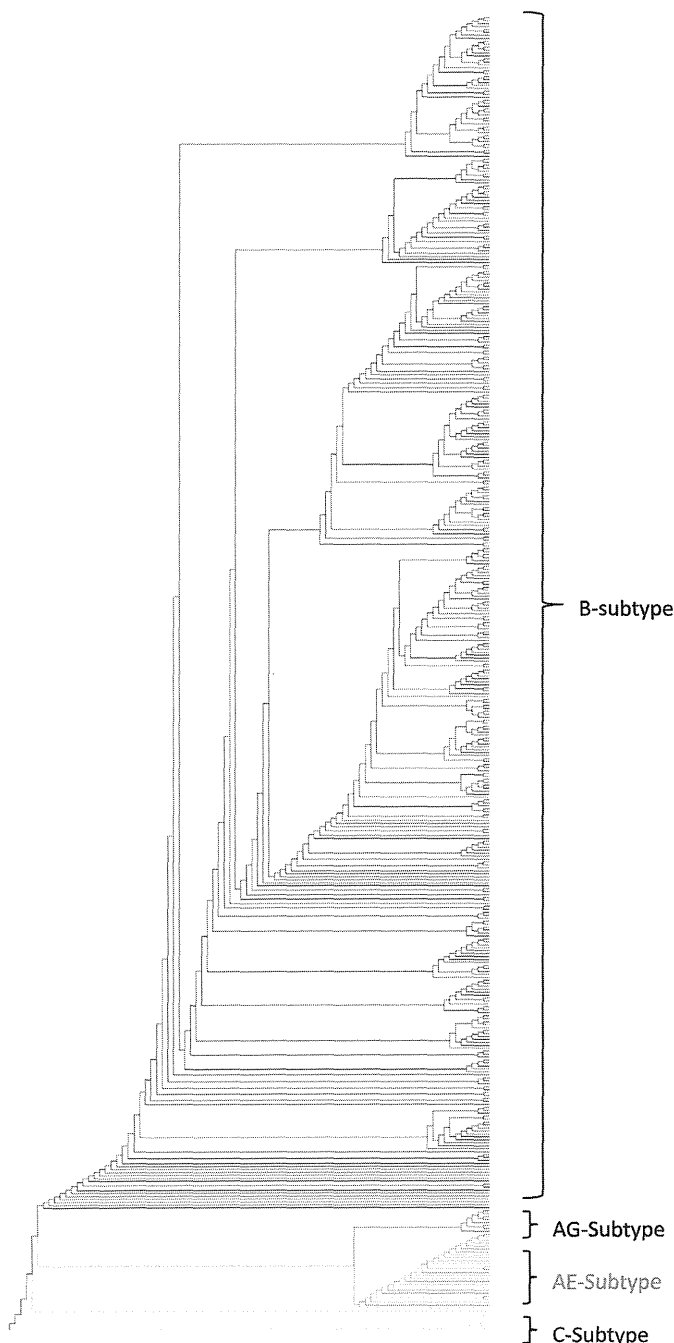


図2 国内における nef 遺伝子の系統樹解析 (n=517)

の HIV-1 慢性感染者から横断的に集めた検体を用いて、血漿ウイルス由来 nef 遺伝子の増幅と配列解析を試みた。その結果、220名の感染者の検体で、nef 遺伝子の配列を得た。アラインメントをかけたデータを用いて、各アミノ酸の多型性と、感染者の HLA クラス I アリルの多型性との相関解析を行った (図1)。その結果、HLA-A2402、A0206、A0207 や B3501 など日本人に比較的多い HLA アリルに関しては、Nef の多型変異との間で統計的に有意な相関が観察された (図1)。これらは、すべて、これまでに個々に CTL クローンを用いた解析で報告された結果と一致しており、この方法論の有用性が示された。しかしながら、相関が検出された変異の事例に限られており、おそらくコホートサイズが小さいために十分な解析結果が得られなかったものと示唆された。実際、他にいくつも関連がありそうな変異が見えているが、いずれも統計的に有意なレベルに達していなかった (データ未掲載)。

(2) コホートサイズの大規模化

そこで、検体数を大幅に増やして、MHC アリルと HIV 多型性との関連を包括的に解析できるよう研究計画を進めた。国立国際医療研究センターおよび東京大学医科学研究所病院から各200例の追加検体の提供を受けて、血漿ウイルス RNA 由来の nef 遺伝子の解析を進めた。全体として、640例の感染者の検体となった。これらの検体のウイルス量および CD4 カウントは、それぞれ、中央値 [IQR] が 41,000 [15,750-100,000]、308 [192-412] であった。nef 遺伝子の解析を進めたところ、用意したプライマーセットでは、517例の検体で、PCR の増幅が見られた。nef 領域の配列を用いて、系統樹解析とサブタイプ解析を行ったところ (図2)、

90%以上が subtype B で、その他の subtype は 8.6% であった。ウイルス量、CD4 カウントには、subtype 間での差は認められなかった。このデータをもとに、nef 遺伝子のリファインメントを行うとともに、MHC 多型性との相関解析を共同研究者である J Carlson (Microsoft Research) に依頼している。

#### D. 考察

Nef は、HIV-1 の中でも、最も多型性の著しい蛋白質である。欧米や南アフリカなどの解析から、ヒト MHC 多型性が、Nef の変異獲得に影響することが示唆されてきた。我々の解析では、Nef の多くの変異が、感染者の MHC アリルと相関することを見出した。その中には、日本人に多く見られる特徴的な MHC アリル (HLA-A2402, A0206 など) によるものも含まれており、国内における HIV-1 多型性の特徴の一部を明らかにしたと示唆される。一方、国内において、頻度の低い MHC アリルでは、十分な解析を行うには至っていない。今後、検体数を大幅に増やした解析の結果が待たれる。

#### E. 結論

本研究では、国内で流行している HIV-1 の Nef 遺伝子解析を 517 例の感染者で解析するとともに、うち 220 名のデータを用いて、MHC アリル多型との相関を解析した。その結果、日本に特有の MHC アリルで、Nef 蛋白質に特徴的な変異が選択されることを明らかとした。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1) 原著論文

1. Zafrul Hasan, Jonathan M Carlson, Hiroyuki Gatanaga, Anh Q. Le, Chanson J Brumme, Shinichi Oka, Zabrina L Brumme, Takamasa Ueno : Minor contribution of HLA class I-associated selective pressure to the variability of HIV-1 accessory protein Vpu. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 421, 291-295, 2012.
2. Philip Mwimanzi, Tristan J. Markle, Takamasa Ueno, Mark A. Brockman : HLA class I down-regulation by HIV-1 Nef: What might we learn from natural sequence variants? *Viruses* 4, 1844-, 2012.
3. Philip Mwimanzi, Tristan J Markle, Eric Martin, Yoko Ogata, Xiaomei T Kuang, Michiyo Tokunaga, Macdonald Mahiti, Florencia Pereyra, Toshiyuki Miura, Bruce D Walker, Zabrina L Brumme, Mark A Brockman and Takamasa Ueno

: Attenuation of multiple Nef functions in HIV-1 elite controllers. *Retrovirology* 10: 1, 2013.

##### 2) 学会発表

1. Zafrul Hasan, J. Carlson, H. Gatanaga, A. Le, S. Oka, Z. Brumme, Takamasa Ueno. Impact of HLA class I-driven genetic variability in HIV-1 accessory gene vpu. COLD SPRING HARBOR ASIA CONFERENCES: Frontiers of Immunology in Health and Disease. Suzhou Dushu Lake Conference Center, China. September 3 - 7, 2012.
2. Zafrul Hasan, J. Carlson, H. Gatanaga, A. Le, C. Brumme, S. Oka, Z. Brumme, Takamasa Ueno. HLA class I-mediated sequence polymorphism in HIV-1 accessory protein Vpu. The 13th KUMAMOTO AIDS Seminar and GCOE Joint International Symposium, Hotel Nikko Kumamoto and Aso Resort Grandvrio Hotel, Kumamoto, Japan. October 24-26, 2012.
3. Chihiro Motozono, John S. Bridgeman, Masaaki Miyazawa, Andrew K. Sewell and Takamasa Ueno. The impact of a single amino acid difference in CDR3 $\alpha$  on TCR  $\alpha\beta$  cross-reactivity, ワークショップ 32 ヒト免疫、第 41 回日本免疫学会総会・学術集会、神戸、兵庫、2012 年 12 月 5-7 日
4. Chihiro Motozono, John J. Miles Zafrul Hasan Hiroyuki Gatanaga, Meribe Stanley. C, Shinichi Oka, Masaaki Miyazawa, Andrew K. Sewell, and Takamasa Ueno. HIV-1 immune escape and cross-reactivity profiles of virus-specific cytotoxic T lymphocytes, YIS-A Session II, 13th Kumamoto AIDS Seminar Global COE Joint International Symposium, Aso Resort GRANDVRIO, Kumamoto, Japan, October 24-26, 2012
5. 本園千尋、John J. Miles、宮澤正顯、上野貴将、Andrew K. Sewell: HLA-B35 拘束性 HIV 特異的 TCR は野生型抗原に高い特異性を有する、学術賞ならびに学術奨励賞候補口演、第 21 回組織適合性学会大会、明治大学、東京、2012 年 9 月 15 ~ 17 日
6. 緒方陽子、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、第 14 回白馬シンポジウム in 京都、京都市国際交流会館、2012 年 6 月 7 日 - 6 月 8 日
7. 上野貴将 : HIV-1 Nef の遺伝子多型性と機能的可塑性、第 14 回白馬シンポジウム in 京都、京都市国際交流会館、2012 年 6 月 7 日 - 6 月 8 日
8. 上野貴将、Mwimanzi Philip、Markle Tristan、緒方陽子、徳永美知代、Mahiti Macdonald、三浦聡之、Pereyra Florencia、Walker Bruce、Brumme Zabrina、Brockman Mark : Genetic



- and functional analyses of HIV-1 Nef in elite controllers. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、グランキューブ大阪（大阪国際会議場）、2012 年 11 月 13 日 - 11 月 15 日
9. 緒方陽子、Philip Mwimanzi、李小光、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、第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会、慶應義塾大学日吉キャンパス、2012 年 11 月 24 日 - 11 月 26 日
10. T. Ueno. Functional impairment of HIV-1 Nef in elite controllers and its correlation with immune-mediated selective pressure. 13th Kumamoto AIDS Seminar Global COE Joint International Symposium, Kumamoto, Japan. October 24th - October 26th, 2012.
11. M. Mahiti, P. Mwimanzi, Y. Ogata, M. Tokunaga, B. Walker, Z. Brumme, M. Brockman, T. Ueno. Modulation of HIV-1 Nef-mediated HLA class I down-regulation activity during disease progression. 13th Kumamoto AIDS seminar Aso Resort Grandiovrrio Hotel, Kumamoto, Japan 24th -26th October, 2012.
12. X. Kuang, A Le, P Mwimanzi, T Markle, R Danroth, T Ueno, T Miura, B Walker, Z Brumme, M Brockman, and the Acute HIV and International HIV Controllers study group. Reduced HIV-1 Nef Function in Acute/Early Individuals who become Viremic Controllers. 20th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI), Georgia World Congress Center, Atlanta, USA. March 3-6, 2013.
- H. 知的所有権の出願・取得状況  
なし

## 首都圏近郊における薬剤耐性 HIV の動向調査研究

～首都圏及び近郊における HIV 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
研究協力者	鈴木 典子	埼玉県衛生研究所 ウイルス担当
	宇野 優香	さいたま市健康科学研究センター 保健科学科
	原 孝	茨城県衛生研究所 ウイルス部
	人見 重美	筑波大学大学院 人間総合科学研究科
	岡本その子	栃木県保健環境センター 微生物部
	池ヶ谷美穂	宇都宮市衛生環境試験所 微生物担当
	大沼 正行	山梨県衛生環境研究所 微生物部
	嶋崎 真実	長野県環境保全研究所 感染症部

### 研究要旨

東京やその近郊の都市では、全国の他の地域と比較し、HIV 感染者及び AIDS 患者の 10 万人当たりの報告数が多い。本分担研究は、埼玉県、茨城県、栃木県、山梨県、長野県で 2011 年から 2012 年に新たに感染が確認された保健所検査受診例 13 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 12 検体（92.3%）、CRF01\_AE が 1 検体（7.7%）であった。薬剤耐性変異は、プロテアーゼ領域で 13 検体中 1 検体に Major mutation の M46L が、13 検体全てに 1 か所以上の Minor mutation が検出され、逆転写酵素領域、インテグラーゼ領域でそれぞれことなる 1 検体に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。埼玉県、茨城県等首都圏近郊は 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

2011 年 12 月から 2012 年に埼玉県、茨城県、

栃木県、山梨県、長野県の保健所での HIV 検査で HIV 抗体陽性と判定された新規 HIV 感染者 13 名からの血清または血漿検体（2011 年：1 検体、2012 年 12 検体）を供試した。

#### 2. 方法

##### 1) 薬剤耐性変異及び HIV サブタイピングの解析

各検体 200  $\mu$ l からウイルス RNA を抽出し、RT-nested PCR 法により得たプロテアーゼ (PR)、逆転写酵素 (RT)、インテグラーゼ (IN)、エンベロープ (env) 及び gag 領域の増幅 DNA の塩基配列をダイレクトシーケンスにより解析した。シーケンス反応は BigDye Terminators v1.1 Cycle sequencing Kit (Applied Biosystems)、解析は ABI 3500 Genetic Analyzer を用いた。PCR 及びシーケンス反応のプライマーは、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。

得られた PR、RT、IN 領域のアミノ酸配列 (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) は、IAS-USA 報告 (2011 Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1) 及び Shafer' s criteria に基づき薬剤耐性変異の有無を判定した。

サブタイプは、PR/RT、env、gag 領域の塩基配列について、スタンフォード大学の HIV Drug Resistance Database (<http://hivdb.stanford.edu/>) 及びロスアラモス国立研究所の HIV Databases (<http://www.hiv.lanl.gov/content/index>) のプログラムを使用し決定した。

## 2) BED assay による感染時期推定及び B 型肝炎 s (HBs) 抗原、C 型肝炎 (HCV) 抗体検査

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。

B 型肝炎、C 型肝炎と HIV 感染の関連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十分に配慮した。

## C. 研究結果

### 1. 薬剤耐性変異の解析及び HIV サブタイプ

調査検体 13 例の概要と HIV サブタイプピニングの結果について表 1 に示した。13 例のサブタイプは、B が 12 例 (92.3%) (全て男性、日本籍)、CRF 01\_AE が 1 例 (7.7%) (女性、外国籍) であった。男性の 12 例の感染経路は、同性間性的接触 8 例、異性間性的接触 1 例、同異性間未確定性的接触 1 例、不明 2 例であった。また、13 例の年齢は 10 歳代から 60 歳代であった。

13 検体の薬剤耐性変異は、PR 領域では M46L の Major mutation が 1 検体、1 ケ所以上の Minor mutation が 13 検体全てに検出された。特に I93L が 61.5%、I62V、V77I が 46.2% と、他の変異と比較し高い頻度で検出された (表 2)。RT 領域は V179D の耐性変異が 1 検体に検出された他、T215

表 1 調査検体の概要とサブタイプ

陽性確認年	例数(計)	年齢	性別/国籍	サブタイプ	例数	感染経路
2011-2012	13	20歳以下:2 31-40歳:9 60-70歳:2	男性/日本	B	12	*同:8、*異:1、 *未:1、不明:2
			女性/日本外	CRF01_AE	1	異: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	I13V	G16E	M36I	I62V	L63P	H69K	A71V/T	V77I	I93L
変異株数 (n=13)	1	1	1	4	6	4	1	4	6	8
	( 7.7%)	( 7.7%)	( 7.7%)	(30.8%)	(46.2%)	(30.8%)	( 7.7%)	(30.8%)	(46.2%)	(61.5%)

リバータント変異である T215S が他の 1 検体に検出された。IN 領域では、V151I の耐性変異が 1 検体に検出された。

#### 2. BED assay による感染時期推定及び HBs 抗原及び HCV 抗体検査

13 検体中 5 検体 (38.5%) が recent、8 検体 (61.5%) が not recent と判定された。

HBs 抗原、HCV 抗体陽性検体は、共に検出されなかった。

#### 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 23 年の新規 HIV 感染者及び AIDS 患者の報告数は、それぞれ 78 人、39 人 (厚生労働省エイズ動向委員会報告) であり、これは全国の感染者及び患者報告数 (1056 人、473 人) のそれぞれ 7.4%、8.2% 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 13 例は 30 歳代のものが最も多かったが、一方、年齢層は 10 歳代から 60 歳代におよび拡大が見られた。検出されたサブタイプは、外国籍者 1 例を除き全て 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、Major mutation の M46L が 1 検体に、Minor mutation は全ての検体に検出された。RT 領域、IN 領域では、1 ケ所のみ耐性変異が認められる検体がそれぞれ 1 検体に留まった。感染初期と推定される検体はほぼ 4 割で、B 型肝炎、C 型肝炎の重複感染例は検出されなかった。今後も動向に注視し、調査を継続する必要がある。

#### E. 結論

2011 年から 2012 年に埼玉県、茨城県、栃木県、山梨県及び長野県で採取された新規 HIV 感染 13 例の検体について HIV のサブタイプ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、13 検体中サブタイプ B が 12 検体、CRF01\_AE が 1 検体であった。薬剤耐性変異は、PR 領域の Major mutation (M46L) が 1 検体、Minor mutation が全ての検体で認められた他、RT 領域の耐性変異 (V179D)、IN 領域 (V151I) の耐性変異がそれぞれ異なる 1 検体に認められた。また、RT 領域のリバータント変異 (T215S) が 1 検体に検出された。今後も首都圏及び近郊における HIV の動向を注視していく必要がある。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

なし

#### H. 知的所有権の出願・取得状況

なし