

帝京大学における薬剤耐性 HIV の動向調査研究 ～帝京大学医学部附属病院における新規 HIV 症例の薬剤耐性の解析～

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

研究要旨

帝京大学医学部附属病院には、平成 24 (2012) 年 12 月現在で 72 名の HIV 感染症患者在院しているが、平成 19 年度以降の初診症例が過半数を占めている。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 HIVRNA 量が増加した患者を対象に、血中 HIVRNA の薬剤耐性変異の同定を行なった。同時に、HIVRNA の Pol 領域を解析し、HIV サブタイプの推定を試みた。

2012 年は、治療開始前の患者 5 名について薬剤耐性検査を実施した。いずれの患者も逆転写酵素 (RT) 領域には薬剤耐性変異を認めない一方で、プロテアーゼ領域に複数の耐性関連変異を認めた。ただしこれらの変異は全て minor mutation であった。また 5 名はいずれもサブタイプ B であると推測された。

また 3 例について治療開始前、治療開始 4 週間後の血中 HIVRNA を用いてクローニング解析を行ったところ、3 例中 2 例に治療開始 4 週間後に、新たな薬剤耐性変異が少数集族で確認された。ただし、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ない。今後さらに検討症例を増やし同様の解析を行うことで、少数集族を効率的に発見する点において、我々が用いた方法の有効性を検証していきたい。

A. 研究目的

帝京大学医学部附属病院には、2012 年 12 月現在で 72 名の HIV 感染症患者在院している。半数以上が平成 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 17 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 6 年でわずかに 2 名にすぎない。未治療経過観察中の患者はわずかに 7 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確か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、多くの臨床治験の結果に基づいて決定された抗 HIV 治療ガイドライン推奨の薬剤の組み合わせが、治療薬として選択されることが多いが、その一方で、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 感染症患者在院の血中 HIVRNA 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 HIVRNA 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 HIV RNA 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 感染症患者の抗レトロウイルス療法導入前の血中 HIV の薬剤耐性変異の解析を行った。
- 2) 抗レトロウイルス療法導入後に血中 HIV RNA 量が増加した患者の血中 HIV の薬剤耐性変異の解析を行った。一部症例については複数の日時についてのクローンの解析を行った。
- 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) 新たな試みとして、ART 導入後一定量まで血中 HIV RNA 量が減少した時点でのクローンの解析を行った。

(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、HIV RNA 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」などの指針に基づき、院内の倫理委員会において研究内容の承認を得た。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、保管をおこなっている。

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 59 名、女性は 3 名の計 62 名であった。平成 24 年度は治療開始前の患者 5 名について HIV 薬剤耐性検査を実施した。いずれも RT 領域には変異を認めなかった。protease 領域については 5 名すべての患者で polymorphism を含め 1 カ所以上の変異が確認されたが、いずれの患者からも major mutation は認められなかった。5 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、いずれもサブタイプ B であった。

これまでに治療を開始した患者のうち、5 例について、微小集族の解析のために、治療開始前、治療開始 4 週後の血中 HIV RNA を用いて、ダイレクトシーケンスを行い、うち 3 例についてクローニングシーケンスを行った。ダイレクトシーケンス (Fig. 1) では、治療開始前、開始後の 2 点で 1 例を除いて同一の塩基配列であり、新たに確認された耐性変異、消失した耐性変異はなかった。

さらに、3 例 (Fig.2, Fig.3) に関しては、前後で 20

Pt	年齢	性別	interval	CD4	VL W0 / 3or4	Sub type	RT	PR	# of clones
G	37M	0	9	300,000	B			62V, 63A	20
			4w	98	2,400			62V, 63A	20
H	25M	0	158	390,000	B			62V, 63S, 71V, 93L	
			3w	160	6,400			62V, 63S, 71V, 93L	
K	36M	0	428	3,700	AE			I3V, 20R, 35D, 36I, 69K, 89M	20
			4w	636	160			I3V, 20R, 35D, 36I, 69K, 89M	20
J	34M	0	59	3,100	B			63P, 71T, 77I, 93L	
			3w	10	110			(T12A→T12), 63P, 71T, 77I, 93L	
L	33M	0	163	190,000	B			63A, 93L	18
			3w	277	9,300			63A, 93L	20

Fig. 1 ダイレクトシーケンスによる治療開始前、後の薬剤耐性変異の比較

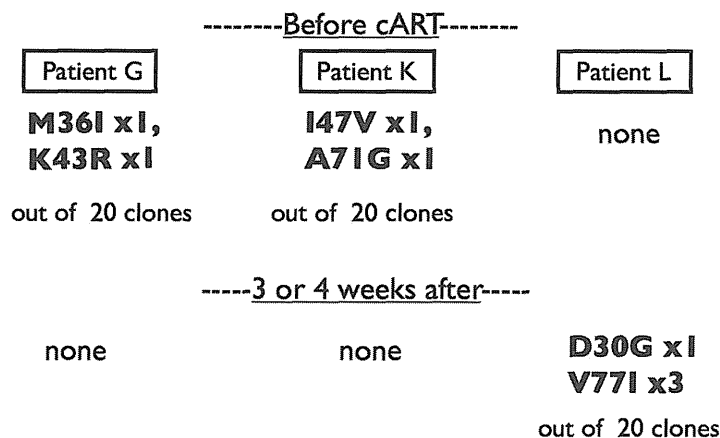


Fig. 2 少数集族に認めたプロテアーゼ領域の薬剤耐性変異

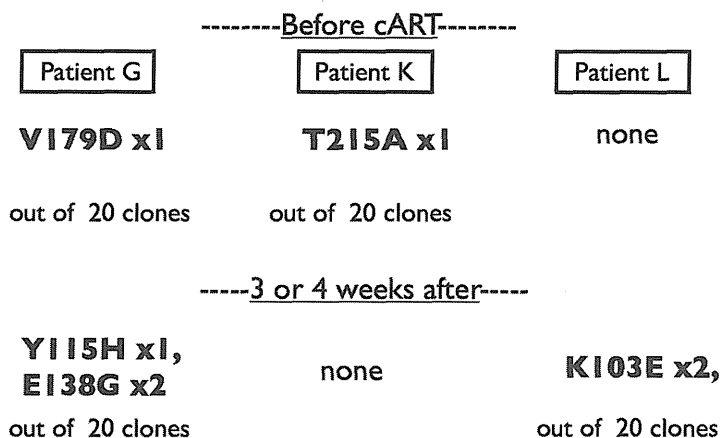


Fig. 3 少数集族に認めた RT 領域の薬剤耐性変異

クローンのクローニング解析を行った。1 例目の症例 G では、プロテアーゼ領域、RT 領域において、それぞれ微小集族に薬剤耐性変異が確認されていたが、これらの変異を持つ少数株は治療開始後にいずれも消失した。代わって RT 領域に本例には投与されていない非核酸系逆転写酵素阻害薬 (NNRTI) に関連した耐性変異を伴う新たな微小集族が確認された。2 例目の症例 K では、プロテアーゼ領域、RT 領域の耐性変異が微小集族に認めていたが、治療開始後にこれらの微小集族は消失した。3 例目の症例 L では、治療開始前に薬剤耐性変異を確認することが出来なかったが、治療開始後にプロテアーゼ領域、RT 領域にそれぞれ耐性変異が微小集族で確認された。

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、ダイレクトシーケンスでは確認出来なかった薬剤耐性変異を、治療開始 3 ないし 4 週間後の血中 HIVRNA を用いたクローニングシーケンスによって確認することが出来た。これらの症例の HIVRNA 量は、その後検出感度以下に減少しており、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ない。またこれらの症例の経過観察とともに、今後さらに検討症例を増やし同様の解析を行うことで、少

数集族を効率的に発見する点において、我々が用いた方法の有効性を検証していきたい。

E. 結論

当院を受診した患者についての薬剤耐性変異の解析の結果、5 例中、5 例すべてに protease 領域の変異を認めた。また解析を行った 5 例は、いずれもサブタイプ B であることが推定された。

これまでに薬剤耐性変異の解析を行って来た症例のうち 5 例について、治療開始前、治療開始 3 ないし 4 週間後の血中 HIVRNA を用いたダイレクトシーケンス解析を行い、新たな変異の出現の確認を試みたが、いずれの症例も治療開始後に新たな薬剤耐性変異の出現は確認できなかった。

さらに 3 例について、治療開始前、開始後 3 週間でのクローニング解析を行った結果、クローニングシーケンスにより治療開始前に微小集族として認められた変異の消失、治療開始後に変異を伴う新たな微小集族の出現が認められた。また、治療開始後に新たな薬剤耐性関連変異が 3 例のうち 2 例で確認されたが、一例は投与中のプロテアーゼ阻害薬に関連のある変異、もう一例は投与中の薬剤以外の薬剤に対する耐性関連変異であった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 原著論文

1. Koga I, Yoshino Y, Kitazawa T, Kurahashi K and Ota Y. Prevalence and risk factors for loss of bone mineral density in male Japanese patients with HIV. JAIDS; J. Acquired Immune Deficiency Syndromes 62; e25-27, 2013
2. Yoshino Y, Kitazawa T, Ikeda M, Tatsuno K, Yanagimoto S, Okugawa S, Yotsuyanagi H, and Ota Y. Clostridium difficile flagellin stimulates toll-like receptor 5, and Toxin B promotes flagellin-induced chemokine production via TLR5. Life Sci. 92:211-217, 2013.
3. Tsuchiya N, Pathipvanich P, Rojanawiwat A, Wichukchinda N, Koga I, Koga M, Auwanit W, Kilgore PE, Ariyoshi K, Sawanpanyalert P. Chronic hepatitis B and C co-infection increased all-cause mortality in HAART-naive HIV patients in northern Thailand. Epidemiol Infect. 2012, in press.
4. Yoshino Y, Seo K, Koga I, Matsunaga N, Kitazawa T, Takamori Y and Ota Y. Liver abscess with a markedly high level of carbohydrate antigen 19-9. Gastroenterol Res, 5 : 205-207, 2012.

5. Yoshino Y, Koga I, Kitazawa T, Ohkusu K, and Ota Y. Septicemia due to Campylobacter insulaenigrae in a patient with chronic myeloid leukemia: a case report. Brazil J Infect Dis. 2012, in press
6. Kitazawa T, Yanagimoto S, Tatsuno K, Fukushima A, Okugawa S, and Ota Y. Serum Cholesterol Levels at the Onset of Bloodstream Infection Have Prognostic Value. Advances Infect Dis. 2: 100-105, 2012.
7. Yoshino Y, Okugawa S, Kitazawa T, Koga I, Kimura S, Makita E, Seo K, Matsunaga N. and Ota Y. Infective endocarditis due to Enterobacter cloacae resistant to third- and fourth-generation cephalosporins. J Microbiol Immunol Infect. S1684-1182, 2012.
8. Yoshino Y, Kitazawa T, Ikeda M, Tatsuno K, Yanagimoto S, Okugawa S, Ota Y, and Yotsuyanagi H. Clinical features of Bacteroides bacteremia and their association with colorectal carcinoma. Infection. 40:63-7, 2012.

2) 学会発表

1. 古賀 一郎, 妹尾 和憲, 吉野 友祐, 北沢 貴利, 太田 康男. 日本人男性 HIV 感染者における骨密度低下の頻度とハイリスク群の同定、第 26 回日本エイズ学会学術集会、2012 年 11 月 24-26 日、横浜。
2. 古賀 一郎, 妹尾 和憲, 吉野 友祐, 北沢 貴利, 太田 康男. Key drug に maraviroc と protease inhibitor を併用した 6 例の使用成績、第 26 回日本エイズ学会学術集会、2012 年 11 月 24-26 日、横浜。
3. 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、2012 年 11 月 24-26 日、横浜。
4. 古賀 一郎、吉野 友祐、北沢 貴利、太田 康男。HIV 感染症患者の骨折頻度の解明と今後の課題 第 86 回日本感染症学会学術講演会、2012 年 4 月 25-26 日、長崎。

H. 知的所有権の出願・取得状況

なし

ACC における薬剤耐性 HIV の調査研究

研究分担者 瀧永 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 24 年 1 月から 9 月の間に、106 人の HIV-1 感染者が新規に診断された。この 106 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、7 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 K103N が 1 人、V108I が 1 人、Y181C が 1 人、L210W が 1 人、T215X が 3 人、K219Q が 2 人、プロテアーゼ領域の M46I が 1 人、M46L が 1 人、であった (重複あり)。インテグラーゼ領域の主要な耐性変異は認められなかった。サブタイプは、B が 93 人、AE が 9 人、C が 1 人、AG が 1 人、G が 1 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

106 人の HIV-1 感染者が新規に診断された。この 106 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、7 人 (6.6%) 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 K103N が 1 人、V108I が 1 人、Y181C が 1 人、L210W が 1 人、T215X が 3 人、K219Q が 2 人、プロテアーゼ領域の M46I が 1 人、M46L が 1 人、であった (重複あり)。インテグラーゼ領域の主要な耐性変異は認められなかった。サブタイプは、B が 93 人、AE が 9 人、C が 1 人、AG が 1 人、G が 1 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、かつてより増加している。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. Akahoshi T, Chikata T, Tamura Y, Gatanaga H, Oka S, Takiguchi M. Selection and accumulation of an HIV-1 escape mutant by three types of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes recognizing wild-type and/or escape mutant epitopes. *J Virol.* 86(4):1971-1981, 2012.
2. Nishijima T, Tsukada K, Teruya K, Gatanaga H, Kikuchi Y, Oka S. Efficacy and safety of once-daily ritonavir-boosted darunavir plus abacavir/lamivudine for treatment-naïve patients: a pilot study. *AIDS.* 26(5):649-651, 2012.
3. Hayashida T, Gatanaga H, Takahashi Y, Negishi F, Kikuchi Y, Oka S. Trends in early and late diagnosis of HIV-1 infections in Tokyoites from 2002 to 2010. *Int J Infect Dis.* 16(3):172-177, 2012.
4. Nishijima T, Gatanaga H, Komatsu H, Tsukada K, Shimbo T, Aoki T, Watanabe K, Kinai E, Honda H, Tanuma J, Yazaki H, Honda M, Teruya K, Kikuchi Y, Oka S. Renal function declines more in tenofovir- than abacavir-based antiretroviral therapy in low-body weight treatment-naïve patients with HIV infection. *PLoS One.* 7(1):e29977, 2012.
5. Hasan Z, Carlson JM, Gatanaga H, Le AQ, Brumme CJ, Oka S, Brumme ZL, Ueno T. Minor contribution of HLA class I-associated selective pressure to the variability of HIV-1 accessory protein Vpu. *Biochem Biophys Res Commun.* 421(2):291-295, 2012.
6. Naruto T, Gatanaga H, Nelson G, Sakai K, Carrington M, Oka S, Takiguchi M. HLA class I-mediated control of HIV-1 in the Japanese population, in which the protective HLA-B*57 and HLA-B*27 alleles are absent. *J Virol.* 86(19):10870-10872, 2012.
7. Hamada Y, Nishijima T, Watanabe K, Komatsu H, Tsukada K, Teruya K, Gatanaga H, Kikuchi Y, Oka S. High incidence of renal stones among HIV-infected patients on ritonavir-boosted atazanavir than in those receiving other protease inhibitor-containing antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis.* 55(9):1262-1269, 2012.
8. Nishijima T, Komatsu H, Higasa K, Takano M, Tsuchiya K, Hayashida T, Oka S, Gatanaga H. Single nucleotide polymorphisms in ABC2 associated with tenofovir-induced kidney tubular dysfunction in Japanese patients with HIV-1 infection: a pharmacogenetic study. *Clin Infect Dis.* 55(11):1558-1567, 2012.
9. Matthews PC, Koyanagi M, Klooverpris HN, Harndahl M, Stryhn A, Akahoshi T, Gatanaga H, Oka S, Juarez Molina C, Valenzuela Ponce H, Avila Rios S, Cole D, Carlson J, Payne RP, Ogwu A, Bere A, Ndung'u T, Gounder K, Chen F, Riddell L, Luzzi G, Shapiro R, Brander C, Walker B, Sewell AK, Reyes Teran G, Heckerman D, Hunter E, Buus S, Takiguchi M, Gpulder PJ. Differential clade-specific HLA-B*3501 association with HIV-1 disease outcome is linked to immunogenicity of a single Gag epitope. *J Virol.* 86(23):12643-12654, 2012.
10. Nishijima T, Yazaki H, Hinoshita F, Tasato D, Hoshimoto K, Teruya K, Gatanaga H, Kikuchi Y, Oka S. Drug-induced acute interstitial nephritis mimicking acute tubular necrosis after initiation of tenofovir-containing antiretroviral therapy in patient with HIV-1 infection. *Intern Med.* 51(17):2469-2471, 2012.
11. Kinai E, Hosokawa S, Gomibuchi H, Gatanaga H, Kikuchi Y, Oka S. Blunted fetal growth by tenofovir in late pregnancy. *AIDS.* 26(16):2119-2120, 2012.
12. Yagita Y, Kuse N, Kuroki K, Gatanaga H, Carlson JM, Chikata T, Brumme ZL, Murakoshi H, Akahoshi T, Pfeifer N, Mallal S, John M, Ose T, Matsubara H, Kanda R, Fukunaga Y, Honda K, Kawashima Y, Ariumi Y, Oka S, Maenaka K, Takiguchi M. Distinct HIV-1 escape patterns selected by CTLs with identical epitope specificity. *J Virol.* 87(4):2253-2263, 2013.
13. Honda H, Gatanaga H, Aoki T, Watanabe K, Yazaki H, Tanuma J, Tsukada K, Honda M, Teruya K, Kikuchi Y, Oka S. Raltegravir can be used safely in HIV-1-infected patients treated with warfarin. *Int J STD AIDS.* 23(12):903-904, 2012.
14. Sudo S, Haraguchi H, Hirai Y, Gatanaga H, Sakuragi JI, Momose F, Morikawa Y. Efavirenz enhances HIV-1 Gag processing at the plasma membrane through Gag-Pol dimerization. *J Virol.* (in press)
15. Hamada Y, Nagata N, Honda H, Teruya K, Gatanaga H, Kikuchi K, Oka S. Idiopathic oropharyngeal and esophageal ulcers related to HIV infection successfully treated with antiretroviral therapy alone. *Intern Med.* 52(3):393-395, 2013.

2) 口頭発表

1. 瀧永博之. HIV感染症の現状と将来の展望 第86回日本感染症学会総会・学術講演会 2012年4月長崎
2. 瀧永博之. HIV感染症の治療ガイドライン Update—ガイドラインに基づいた治療の実際 第86回日本感染症学会総会・学術講演会 2012年4月長崎
3. 瀧永博之. 最新の情報を明日の臨床に活かす— Year in Review 2012— 第26回日本エイズ

- 学会総会・学術集会 2012 年 11 月 横浜
4. 瀧永博之. NNRTI—その充実と今後の展望を考える 第 26 回日本エイズ学会総会・学術集会 2012 年 11 月 横浜
 5. 椎野禎一郎、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換え体の動向 第 26 回日本エイズ学会総会・学術集会 2012 年 11 月 横浜
 6. 西島健、照屋勝治、塚田訓久、杉原淳、柳川泰昭、新藤琢磨、山元佳、小林泰一郎、山内悠子、水島大輔、青木孝弘、渡辺恒二、木内英、本田元人、矢崎博久、田沼順子、瀧永博之、菊池嘉、岡慎一. 初回療法における一日一回投与 Darunavir の治療成績: 48 週データ 第 26 回日本エイズ学会総会・学術集会 2012 年 11 月 横浜
 7. 西島健、高野操、石坂美千代、瀧永博之、菊池嘉、遠藤知之、堀場昌英、金田暁、鯉渕智彦、内藤俊夫、吉田正樹、立川夏夫、横幕能行、藤井輝久、高田清式、山本政弘、松下修三、健山正男、田邊嘉也、満屋裕明、岡慎一. 初回治療でアタザナビル/リトナビルを固定しエプジコムとツルバダを無作為割付するオープンラベル多施設臨床試験: ET study 96 週結果 第 26 回日本エイズ学会総会・学術集会 2012 年 11 月 横浜
 8. 塚田訓久、橋本亜希、矢崎博久、水島大輔、西島健、小林泰一郎、青木弘、渡辺恒二、木内英、本田元人、田沼順子、照屋勝治、瀧永博之、菊池嘉、岡慎一. 当センターにおいて初回抗 HIV 療法の際に選択された抗 HIV 薬の変遷 第 26 回日本エイズ学会総会・学術集会 2012 年 11 月 横浜
 9. 林田庸総、瀧永博之、菊池嘉、岡慎一. 過去 10 年の東京における HIV 感染症の早期診断の動向について 第 26 回日本エイズ学会総会・学術集会 2012 年 11 月 横浜
 10. 田中瑞恵、細川真一、大熊香織、木内英、田沼順子、瀧永博之、菊池嘉、岡慎一、松下竹次. HIV 感染女性から出生した児の長期予後の検討 第 26 回日本エイズ学会総会・学術集会 2012 年 11 月 横浜
 11. 大金美和、池田和子、杉野祐子、伊藤紅、八鍬類子、高橋南望、塩田ひとみ、徳永紀子、畑野美智子、佐々木久美子、本田元人、木内英、塚田訓久、田沼順子、照屋勝治、瀧永博之、菊池嘉、岡慎一. 血友病包括外来の受診状況 第 26 回日本エイズ学会総会・学術集会 2012 年 11 月 横浜
 12. 小柳円、赤星智寛、Philippa Matthews、Henrik Kloverpris、瀧永博之、岡慎一、Philip Goulder、滝口雅文. サブタイプの異なる HIV-1 感染者の予後を左右する細胞障害性 T 細胞の解析 第 26 回日本エイズ学会総会・学術集会 2012 年 11 月 横浜
 13. 新藤琢磨、田沼順子、照屋勝治、瀧永博之、菊池嘉、岡慎一. 当院における HIV 関連血小板減少性紫斑病症例の検討 第 26 回日本エイズ学会総会・学術集会 2012 年 11 月 横浜
 14. 照屋勝治、山元佳、杉原淳、新藤琢磨、柳川泰昭、小林泰一郎、水島大輔、西島健、木内英、青木孝弘、渡辺恒二、本田元人、矢崎博久、田沼順子、塚田訓久、瀧永博之、菊池嘉、岡慎一. ニューモシスチス肺炎 (PCP) 症例の HAART 開始時期と免疫再構築症候群 (IRIS) の発生頻度に関する検討 第 26 回日本エイズ学会総会・学術集会 2012 年 11 月 横浜
 15. 土屋亮人、濱田哲賜、林田庸総、菊池嘉、瀧永博之、岡慎一. HIV 患者におけるラルテグラビル血中濃度とトランスポーターの遺伝子多型についての検討 第 26 回日本エイズ学会総会・学術集会 2012 年 11 月 横浜
 16. 青木孝弘、水島大輔、小林泰一郎、西島健、山内悠子、木内英、渡辺恒二、本田元人、矢崎博久、田沼順子、塚田訓久、照屋勝治、瀧永博之、菊池嘉、岡慎一. 唾液検体を用いた定量的 RT-PCR 法によるニューモシスチス肺炎と Pneumocystis jirovecii 定着の鑑別 第 26 回日本エイズ学会総会・学術集会 2012 年 11 月 横浜
 17. 柳川泰昭、杉原淳、新藤琢磨、山元佳、小林泰一郎、水島大輔、西島健、青木孝弘、渡辺恒二、木内英、本田元人、矢崎博久、田沼順子、照屋勝治、塚田訓久、瀧永博之、菊池嘉、岡慎一. 当院における HAART 時代の肺炎球菌感染症についての検討 第 26 回日本エイズ学会総会・学術集会 2012 年 11 月 横浜
 18. 渡辺恒二、柳川泰昭、杉原淳、新藤琢磨、山元佳、小林泰一郎、水島大輔、西島健、青木孝弘、本田元人、木内英、矢崎博久、田沼順子、塚田訓久、瀧永博之、照屋勝治、菊池嘉、岡慎一. HIV 感染者に対する赤痢アメーバ抗体測定の意義 第 26 回日本エイズ学会総会・学術集会 2012 年 11 月 横浜
 19. 渡辺恒二、杉原淳、新藤琢磨、山元佳、小林泰一郎、水島大輔、西島健、青木孝弘、本田元人、木内英、矢崎博久、田沼順子、塚田訓久、瀧永博之、照屋勝治、菊池嘉、岡慎一. HIV 感染者に対する赤痢アメーバ抗体測定の意義 第 26 回日本エイズ学会総会・学術集会 2012 年 11 月 横浜
 20. 本田元人、岩野真衣、杉原淳、新藤琢磨、山元佳、水島大輔、山内悠子、小林泰一郎、西島健、木内英、青木孝弘、渡辺恒二、矢崎博久、田沼順子、塚田訓久、瀧永博之、照屋勝治、菊池嘉、岡慎一. HIV 感染者における虚血性心疾患 第 26 回日本エイズ学会総会・学術集会 2012 年 11 月 横浜
 21. 木内英、叶谷文秀、山元佳、水島大輔、新藤琢磨、杉原淳、柳川泰昭、渡辺恒二、西島健、青木孝弘、

- 本田元人、矢崎博久、田沼順子、塚田訓久、照屋勝治、瀧永博之、菊池嘉、岡慎一． HIV 合併血友病患者における骨密度、およびその低下要因に関する研究 第 26 回日本エイズ学会総会・学術集会 2012 年 11 月 横浜
22. 叶谷文秀、Nguyen Thi Bich Ha、田沼順子、水島大輔、Cao Thi Thanh Thuy、Nguyen Thi Nhu Ha、渡辺恒二、瀧永博之、Nguyen Van Kinh、岡慎一． ハノイにおける ART 服用者の副作用および患者リテンションについての観察研究 第 26 回日本エイズ学会総会・学術集会 2012 年 11 月 横浜
23. 成戸卓也、瀧永博之、Nelson George、阪井恵子、Carrington Mary、岡慎一、滝口雅文． 日本人集団における HLA クラス 1 アレルの HIV-1 ウイルス制御の解析 第 26 回日本エイズ学会総会・学術集会 2012 年 11 月 横浜
24. 杉原淳、柳川泰昭、新藤琢磨、山元佳、小林泰一郎、水島大輔、西島健、青木孝弘、渡辺恒二、木内英、本田元人、矢崎博久、田沼順子、塚田訓久、照屋勝治、瀧永博之、菊池嘉、岡慎一． HIV 関連サイトメガロウイルス脳炎 14 例の臨床的検討 第 26 回日本エイズ学会総会・学術集会 2012 年 11 月 横浜
25. 山元佳、新藤琢磨、杉原淳、小林泰一郎、水島大輔、西島健、木内英、青木孝弘、渡辺恒二、本田元人、矢崎博久、塚田訓久、田沼順子、瀧永博之、照屋勝治、菊池嘉、岡慎一． 当施設における進行性多巣性白質脳症の予後についての後方視的検討 第 26 回日本エイズ学会総会・学術集会 2012 年 11 月 横浜
26. 服部純子、瀧永博之、渡辺大、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 回日本エイズ学会総会・学術集会 2012 年 11 月 横浜
27. 水島大輔、叶谷文秀、渡辺恒二、田沼順子、瀧永博之、菊池嘉、岡慎一． ハノイにおける HIV 感染者の腎機能障害に関する臨床的検討 第 26 回日本エイズ学会総会・学術集会 2012 年 11 月 横浜
28. 矢崎博久、小林泰一郎、山内悠子、水島大輔、西島健、木内英、青木孝弘、渡辺恒二、本田元人、田沼順子、塚田訓久、瀧永博之、照屋勝治、菊池嘉、岡慎一． HIV 感染者の H.pylori 新規感染について 第 26 回日本エイズ学会総会・学術集会 2012 年 11 月 横浜

H. 知的所有権の出願・取得状況

該当なし

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

～服薬アドヒアランスの評価法の開発に関する研究～

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
研究協力者 須藤 弘二 慶應義塾大学医学部微生物学・免疫学教室
吉野 宗宏 (独) 国立病院機構大阪医療センター
栞原 健 (独) 国立循環器病研究センター

研究要旨

血液中抗 HIV 剤濃度の測定は、治療効果の最適化と HIV の薬剤耐性獲得の防止のために重要である。しかし、薬剤の代謝は個人差があり、また薬剤血中濃度は日内変動が大きいことが知られている。一方、毛髪中の薬剤量は平均的な薬剤血中濃度を反映していると思われるため、毛根側から先端にかけて薬剤量を測定することにより血中濃度の長期的推移を判定できることが期待される。今回我々は、LC-MS/MS (liquid chromatography-tandem mass spectrometry) を用いた毛髪中薬剤定量法を用い、昨年度までに測定した 17 検体に加えて新たに ART 治療中の患者より採取した 6 例の毛髪中薬剤の測定を行った。

今回測定した臨床検体 6 例を加え、23 例すべてについて薬剤を定量することができた。毛根から毛髪の途中まで薬剤が検出された 14 例中 11 検体で ART 開始後日数と薬剤が検出された毛髪部分の距離がほぼ対応していた。今後測定薬剤と検体数を増やし、毛髪中薬剤量の測定結果から平均血中薬剤濃度の推定やアドヒアランスの評価を行う方法を確立する。

A. 研究目的

現在抗 HIV 剤として、逆転写酵素阻害剤、プロテアーゼ阻害剤、インテグラーゼ阻害剤、CCR-5 阻害剤等、作用機序が異なる多くの薬剤が用いられている。薬剤の代謝は個人差があり、血液中の薬剤濃度は患者によって異なることが知られている。血液中の抗 HIV 剤濃度の測定は、治療効果の最適化と HIV の薬剤耐性獲得の防止のために重要である。しかし薬剤血中濃度は日内変動が大きいことが知られている。一方、毛髪中の薬剤量は平均的な薬剤血中濃度を反映していると考えられるため、毛根側から先端にかけて薬剤量を測定することにより血中濃度の長期的推移を判定できることが期待される。

今までの研究で、LC-MS/MS を用いた毛髪中抗 HIV 剤の定量法を開発し、ダルナビル (DRV)、アタザナビル (ATV)、ラルテグラビル (RAL) をキードラッグとする 17 例の臨床検体の毛髪検体につい

て薬剤量の測定結果が得られている。今回は引き続き 6 例の検体について毛髪中の薬剤量を測定し、血漿中薬剤濃度との比較を行った。

B. 研究方法

測定のための LC-MS/MS の機器として LCMS-8030 (島津製作所) を用いた。LC のカラムは Inertsil ODS-3 C18 column [50 mm × 1.5 mm internal diameter, 5- μ m particles] (GL サイエンス) を用いた。移動相として、ATV、DRV、RAL の測定には A 液 (水層) に 5 mM ギ酸、B 液 (有機溶媒相) に 5 mM ギ酸/アセトニトリルを使用し、EFV の測定には A 液に 5 mM ギ酸アンモニウム、B 液に 5 mM ギ酸アンモニウム/90% アセトニトリル、10% メタノールを使用した。流速は 0.2 ml/min で固定し、測定時間は 1 検体あたり 20 分とした。移動相の濃度勾配にかんしては、B 液濃度 20% で開始

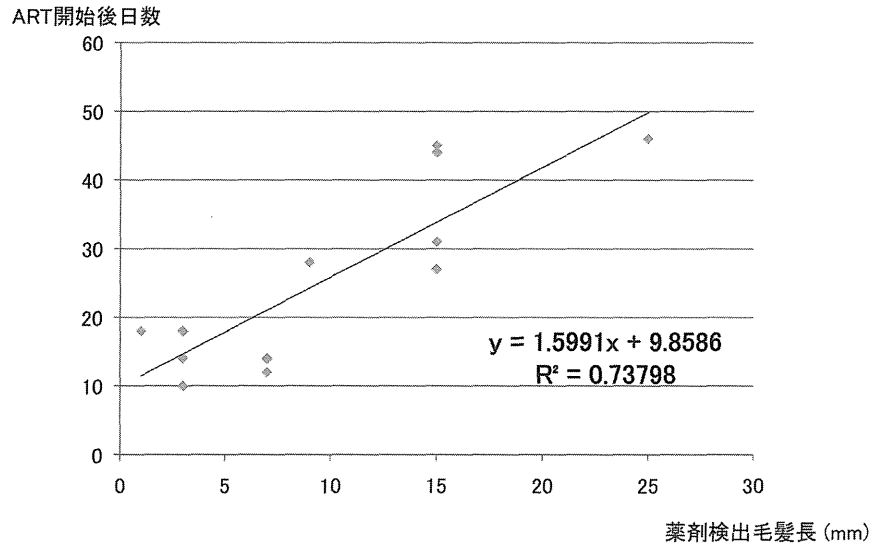
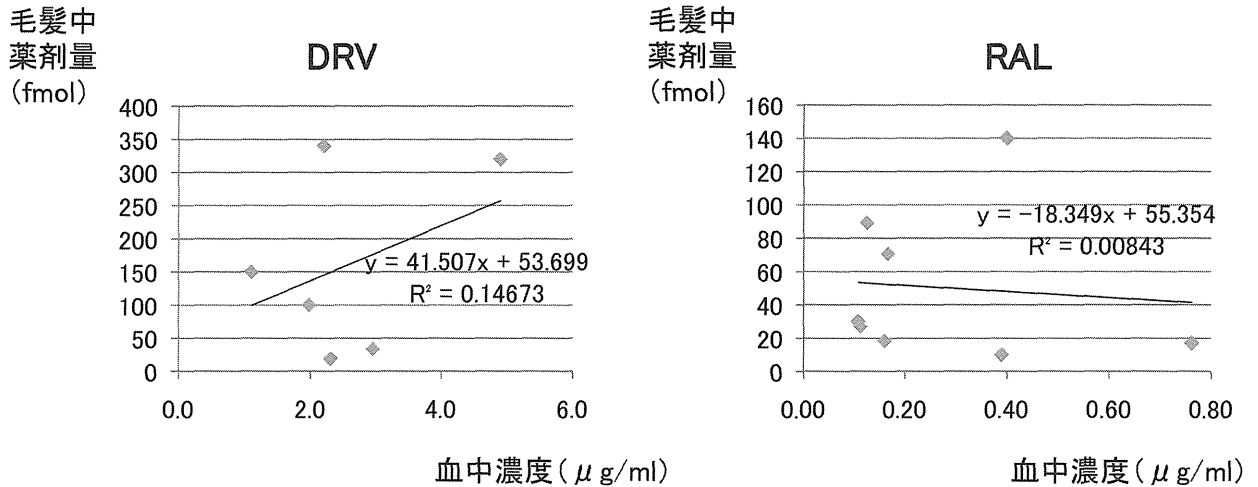


図 2 ART 開始後日数と薬剤検出毛髪長との相関

DRV、RAL の検体について、毛根直後の毛髪サンプルの薬剤量と血中濃度の相関を調べた。



→ 現在の検体数からは血中濃度と毛髪中薬剤量の間には相関があるとはいえなかった。

図 3 血中濃度と毛髪中薬剤量の比較

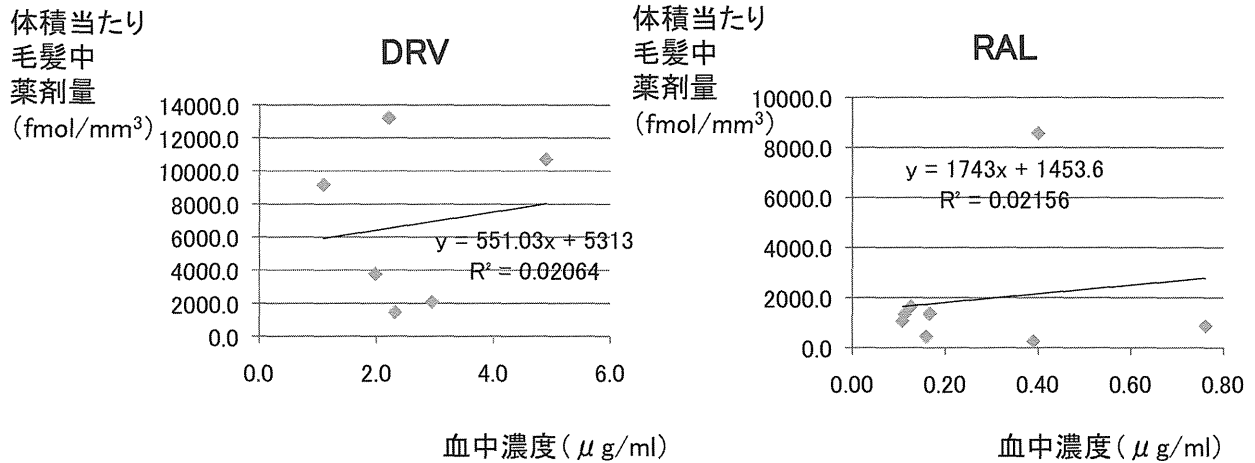
D. 考察

毛根から毛髪の途中まで薬剤が検出された 14 例について、ART 開始後の日数と薬剤が検出された毛髪の長さは、No.1、6、19 の 3 検体を除く 11 検体ではほぼ対応していた (図 2、 $R^2 = 0.738$)。No.1 の検体については血中薬剤濃度が低く、毛髪へ移行した薬剤量が測定限界以下だったことが考えられた。また No.6 と 19 の検体については患者の汗と一緒に分泌された薬剤が毛髪先端部に吸着したことが考

えられた。

DRV と RAL を服用している患者について、毛根側 2 mm の毛髪中の薬剤量と血中濃度の関係を調べた結果、両者の間に有意な相関が認められなかった (図 3)。また、毛根側 2 mm の体積当たり毛髪中薬剤量と血中濃度の関係を調べた結果も同様に、両者の間に有意な相関が認められなかった (図 4)。これらの結果についてはより多くの検体について比較を行い、最終的には毛髪中の薬剤量からの平均血中

DRV、RAL の検体について、毛根直後の毛髪サンプルの体積当たり薬剤量と血中濃度の相関を調べた。



→ 現在の検体数からは体積当たり毛髪中薬剤量と血中濃度の間に相関があるとはいえなかった。

図4 血中濃度と体積当たり毛髪中薬剤量の比較

薬剤濃度の推定とアドヒアランスの評価を行いたい。

毛髪中抗 HIV 剤量からのアドヒアランスの評価に関する研究はまだ報告されていない。非侵襲性の検体である毛髪から平均血中薬剤濃度の推定とアドヒアランスの評価ができるようにすることにより、患者に対して大きな負担をかけることなくより適切な治療薬の選択が可能となることが期待される。

E. 結論

毛髪中に存在する抗 HIV 剤の定量法を開発し、臨床株を用いてその有効性を検討した。23 例すべての検体で薬剤を検出することができ、毛根から毛髪の途中まで薬剤が検出された 14 例中 11 検体で ART 開始後日数と薬剤が検出された毛髪の長さほぼ対応していた。今後測定薬剤と検体数を増やし、毛髪中薬剤量の測定結果から平均血中薬剤濃度の推定やアドヒアランスの評価できる方法を確立する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 原著論文

1. Kondo M, Lemey P, Sano T, Itoda I, Yoshimura Y, Sagara H, Tachikawa N, Yamanaka K, Iwamuro S, Matano T, Imai M, Kato S, Takebe Y. Emergence in Japan of an HIV-1 variant associated with MSM transmission in China: First indication for the international dissemination of the Chinese MSM lineage. *J Virol*. 2013 Jan 30. [Epub ahead of print]
2. 加藤真吾. わが国の HIV 流行終息にむけて. *IASR* 33:237-239, 2013.

H. 知的所有権の出願・取得状況

なし

国内で流行する HIV 株および薬剤耐性 HIV 株の 動向把握調査研究

研究分担者 古賀 道子 東京大学医科学研究所 先端医療研究センター 助教
研究協力者 宮崎 菜穂子 東京大学医科学研究所 感染症国際研究センター

研究要旨

東京大学医科学研究所附属病院において、2010年1月から2012年12月の間、新規に診断された HIV-1 感染者 144 人に、HIV-1 プロテアーゼ領域、逆転写領域、インテグラーゼ領域の遺伝子配列解析を施行した。2010-2011年 (n=104) では逆転写領域の K103N1 例、Y181C1 例、V106M1 例、A98S(サブタイプ C) 3 例、M41L/T215C2 例、K70E1 例、インテグラーゼ領域 E157Q 3 例検出された。2012年 (n=40) では逆転写領域で T215E1 例、T215D 1 例と減少し、インテグラーゼ領域 E157Q 2 例、Y143H1 例、プロテアーゼ領域では V32I1 例、V32I/M46I/L90M 1 例が検出された。HIV の治療薬は年々変遷しており、今後も耐性 HIV-1 の出現動向を注意深く解析する必要がある。

A. 研究目的

全国的な薬剤耐性 HIV-1 の動態把握のため、東京大学医科学研究所附属病院で新規に診断された HIV-1 感染者の薬剤耐性変異を調べる。

(倫理面への配慮)

本研究は東京大学医科学研究所の倫理審査委員会で承認されたものである (21-65-0038)。

患者様に担当医師より本研究の説明を行い、研究対象者として書面で同意を頂いている。本研究によって被る不利益は全くなく、診療とは別で、同意の撤回も可能である。個人情報の保護も厳守されている。

B. 研究方法

当院にて新規に診断された HIV-1 感染者の血漿を名古屋医療センターに送付し、HIV-1 プロテアーゼ領域、逆転写領域、インテグラーゼ領域の遺伝子配列解析を依頼し、薬剤耐性変異調査研究を施行した。

C. 研究結果

2010年1月から2012年12月までに当院にて未治療の HIV-1 感染者 144 人に薬剤耐性検査を施

行した。2010-2011年 (n=104) では逆転写領域の K103N が 1 例、Y181C が 1 例、V106M が 1 例、A98S(サブタイプ C) が 3 例、M41L/T215C が 2 例、K70E が 1 例、インテグラーゼ領域 E157Q が 3 例検出された。2012年 (n=40) では逆転写領域で T215E が 1 例、T215D が 1 例と減少し、インテグラーゼ領域 E157Q が 2 例、Y143H が 1 例、プロテアーゼ領域では V32I が 1 例、V32I/M46I/L90M が 1 例検出された。

D. 考察

主要な耐性変異を持つ患者数は多くないが、2012年では2010-2011年に比較し、逆転写領域の薬剤耐性検出数は少なく、インテグラーゼ領域、プロテアーゼ領域の薬剤耐性変異が検出された。HIV の治療薬は年々変遷しており、今後も耐性 HIV-1 の出現動向を注意深く解析する必要がある。

E. 結論

今後も薬剤耐性 HIV-1 の出現動向を把握するため、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た。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 原著論文

1. Nomura S, Hosoya N, Brumme ZL, Brockman MA, Kikuchi T, Koga M, Nakamura H, Koibuchi T, Fujii T, Carlson JM, Heckerman D, Kawana-Tachikawa A, Iwamoto A, Miura T. Significant Reductions in Gag-Protease-Mediated HIV-1 Replication Capacity during the Course of the Epidemic in Japan. *J Virol*. 2013 Feb;87(3):1465-76.
2. Kikuchi T, Iwatsuki-Horimoto K, Adachi E, Koga M, Nakamura H, Hosoya N, Kawana-Tachikawa A, Koibuchi T, Miura T, Fujii T, Kawaoka Y, Iwamoto A. Improved neutralizing antibody response in the second season after a single dose of pandemic (H1N1) 2009 influenza vaccine in HIV-1-positive adults. *Vaccine*. 2012 Jun 6;30(26):3819-23
3. Adachi E, Koibuchi T, Imai K, Kikuchi T, Koga M, Nakamura H, Miura T, Iwamoto A, Fujii T. Favourable outcome of progressive multifocal leukoencephalopathy with mefloquine treatment in combination with antiretroviral therapy in an HIV-infected patient. *Int J STD AIDS* ;23(8):603-5. 2012.
4. Tsuchiya N, Pathipvanich P, Rojanawiwat A, Wichukchinda N, Koga I, Koga M, Auwanit W, Kilgore PE, Ariyoshi K, Sawanpanyalert P. Chronic hepatitis B and C co-infection increased all-cause mortality in HAART-naive HIV patients in northern Thailand. *Epidemiol Infect*. 2012 Nov 1:1-9.
5. Nakayama K, Nakamura H, Koga M, Koibuchi T, Fujii T, Miura T, Iwamoto A, Kawana-Tachikawa A. Imbalanced Production of Cytokines by T Cells Associates with the Activation/Exhaustion Status of Memory T Cells in Chronic HIV Type 1 Infection. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2012 Jul;28(7):702-14

2) 口頭発表

- 1 T. Kikuchi, Y. Iwabu, A. Kawana-Tachikawa, M. Koga, N. Hosoya, S. Nomura, Z.L. Brumme, H. Jessen, A. Kelleher, M. Markowitz, F. Pereyra, A. Trocha, B.D. Walker, A. Iwamoto, K. Tokunaga, T. Miura. Anti-APOBEC3G activity of HIV-1 Vif protein from elite controllers is attenuated compared to those from untreated chronic progressors or those from individuals with acute infection. 19th International AIDS Conference 2012, Washington, USA
2. M. Koga, T. Kikuchi, S. Nomura, N. Hosoya, H.

Nakamura, T. Koibuchi, T. Fujii, A. Kawana-Tachikawa, A. Iwamoto, T. Miura A combinational mutation of K65R/M184V/K103N/Y181C that makes HIV-1 highly resistant to TDF/FTC/EFV therapy significantly reduces viral replication capacity and which might be contributing to keep viremia at low-level in a patient with virological failure 19th International AIDS Conference 2012, Washington, USA

H. 知的所有権の出願・取得状況

なし

神奈川県における薬剤耐性 HIV の動向調査研究

～神奈川県における薬剤耐性 HIV-1 発生動向把握調査研究（2012 年）～

研究分担者 近藤真規子 神奈川県衛生研究所 主任研究員

研究協力者 吉村 幸浩¹、立川 夏夫¹、相楽 裕子¹、岩室 紳也²、井戸田一朗³、
山中 晃⁴、佐野 貴子⁵、今井 光信⁶

¹ 横浜市立市民病院、² 厚木市立病院、³ しらかば診療所、

⁴ 新宿東口クリニック、⁵ 神奈川県衛生研究所、⁶ 田園調布学園大学

研究要旨

新規 HIV-1 感染者における薬剤耐性 HIV-1 の出現状況を調査するため、2012 年の 1 年間に主として神奈川県および東京都内の医療機関に来院した新規 HIV 感染者 85 名について薬剤耐性変異の解析を行った。IAS-USA(2011) リスト、Shafer' s criteria、スタンフォードデータベースに基づき薬剤耐性変異の有無を調べた結果、薬剤耐性関連変異を有する症例が 6 例検出され、薬剤耐性変異出現頻度は 7.1%であった。

6 例中 4 例は核酸系逆転写酵素阻害剤（NRTI）に対する耐性関連変異で、このうち 3 例は AZT 耐性変異 T215Y/F のリバータント T215E/C/S、1 例は 3TC に対する高度耐性変異 M184V であった。2 例からはプロテアーゼ阻害剤（PRI）に対する耐性変異 M46/M/I が検出され、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。これら 6 例は全て日本男性、サブタイプ B で、感染経路は同性間性行為 3 例、不明 3 例で、昨年までと同様の傾向にあった。

2012 年に診断された同性間、感染経路不明の日本男性 70 例から CRF01_AE が 4 例検出され、うち 3 例は近年中国の MSM 間で大流行している CN.MSM.01-1 タイプであった。CN.MSM.01-1 感染者は 2010 年以降に診断された症例から見出されており、2012 年までの 3 年間に同性間、感染経路不明の日本男性 9 例から検出した。今後、中国株の動向にも注目し流行の解析を行うことが重要である。

A. 研究目的

HIV-1 感染者の治療は多剤併用療法（HAART）の普及により飛躍的に進歩し、HIV-1 感染者の病態の進行をコントロールすることが可能となった。その一方で、薬剤の長期投与に伴い薬剤耐性 HIV-1 株を保有する感染者が増加し、新規感染者が薬剤耐性株に感染している症例も見つかってきている。欧米では薬剤耐性ウイルスによる感染が広がりつつあり、新規感染者の数%から十数%が何らかの抗 HIV 薬に対する耐性変異が認められると報告されている。日本においては 2004 年から調査が開始され、当施設における 2004 年から 2005 年の調査では新規 HIV 感染者の薬剤耐性変異検出率は約 5%であったが、その後も漸増傾向にあることが明らかとなった。日本でのこの数字は欧米に比べまだ低いものの、薬剤耐性ウイルスの蔓延を制御するためにも継続した調

査は重要である。

我々は、薬剤耐性 HIV の発生動向把握とその増加を抑制するため全国規模での調査に参加し、主として神奈川県および東京都内の医療機関を受診した HIV 感染者についてサブタイプおよび薬剤耐性変異の解析を行うとともに流行株の特徴を解析した。

B. 研究方法

1) 調査対象

2012 年の 1 年間に主として神奈川県および東京都内の医療機関に来院した未治療の新規 HIV 感染者 85 名について、薬剤耐性変異検査を実施した。

2) HIV-1 薬剤耐性変異の解析

患者血漿より HIV-1 遺伝子を抽出（ハイピュア Viral RNA 抽出キット：ロシュ・ダイアグノスティックス）し、RT nested PCR 法（One step RNA

PCRキット：タカラバイオ）によりプロテアーゼ (PR)、逆転写酵素 (RT) およびインテグラーゼ (IN) 領域の3カ所を増幅後、ダイレクトシーケンス法 (BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit：アプライドバイオシステムズ) により塩基配列を決定した。PCRプライマーおよびPCR条件は国立感染症研究所の方法に従った。

IAS-USA (2011) リスト、Shafer's criteria、スタンフォードデータベースを基にプロテアーゼ阻害剤 (PRI：IDV、LPV、RTV、SQV、NFV、FPV、ATV、DRV、TPV)、核酸系逆転写酵素阻害剤 (NRTI：AZT、d4T、ddI、3TC、ABC、TDF、FTC)、非核酸系逆転写酵素阻害剤 (NNRTI：RPV、EFV、ETR、NVP)、インテグラーゼ阻害剤 (INI：RAL、EVG) に関与する薬剤耐性変異について解析した。

また、同時にスタンフォードデータベース (インターネット上で公開) を用い各種抗 HIV 薬に対する耐性度の判定と PR、RT、IN 領域のサブタイプ型別を行った。スタンフォードデータベースの耐性度は susceptible、potential low-level resistance、low-level resistance、intermediate resistance、High-level resistance の5段階評価で示される。

env C2V3 領域については塩基配列決定後、neighbor-joining 法による系統樹を作成しサブタイプを決定した。

(倫理面への配慮)

主治医から患者に研究内容について説明を行い、研究への同意の得られた症例について研究を実施した。患者名はすべて記号化して扱っており、プライバシーの流出防止など患者の人権保護に十分配慮した。尚、本研究は当研究所の倫理委員会で承認され

ている。

C. 研究結果

IAS-USA (2011) リスト、Shafer's criteria、スタンフォードデータベースに基づき85名のHIV-1pol領域のアミノ酸について解析した結果、RT領域に4例、PR領域に2例、計6例に薬剤耐性関連変異が認められた。2012年の耐性検出頻度は7.1%であり、2011年の6.9%に比べて漸増した(表1)。耐性関連変異の認められた6例は全て日本男性、サブタイプBで、感染経路は同性間3例、不明3例であった。

逆転写酵素領域については、例年検出頻度の高いAZT耐性変異T215Y/Fのリバータント変異が2012年も6例中3例(50%)検出され、1例から3TC、FTCに対する高度耐性変異M184Vが検出された。プロテアーゼ領域についてはMajor変異のM46L/Iが2例から検出された。インテグラーゼ領域にはMajor変異は認められず、Minor変異のL74M、G163Kが2例ずつ、Q95K、T97Aが1例ずつ検出された。

85例の感染経路別サブタイプを表2に示した。サブタイプの内訳は、サブタイプBが70例(82.4%)と最も多く、次いでCRF01_AEが11例で、サブタイプBとFの組換え疑い例(B/Fと略す)が2例、サブタイプCとF1が1例ずつ確認された。B/Fの2例はPRとRTがサブタイプB、INTおよびV3はサブタイプF1であった。

感染経路別に見てみると、同性間および不明の日本男性の遺伝子型はほとんどが欧米由来のサブタイプBであったが、4例からCRF01_AEが検出され、

表1 新規 HIV 感染者から検出された薬剤耐性関連変異検出頻度 (2011年-2012年)

陽性判明年	解析数 (人)	耐性変異 出現頻度	感染経路 サブタイプ	薬剤耐性関連変異			
				Pro	RT	IN	
2011年	87	6* (6.9%)	同性間	B	—	T69D,V75LV,K101Q	—
			不明	B	—	T215S	—
			不明	B	—	V108I	—
			不明	B	—	V108I	—
			不明	B	—	M41L,L210W,T215D	—
			同性間	B	—	T215C	—
2012年	85	6* (7.1%)	同性間	B	—	T215E	—
			同性間	B	—	T215C	—
			不明	B	—	T215S	—
			不明	B	—	M184V	—
			同性間	B	M46L	—	—
不明	B	M46I	—	—			
合計	172	12 (7.0%)					

*すべて日本男性

表 2 新規 HIV 感染者 85 名の感染経路とサブタイプ (2012 年)

感染経路	合計	HIV-1サブタイプ (envC2V3, Pr, RT)				
		B	AE	C	B/F	F1
男性同性間	日本 26 外国 3	25	1 (1)*			
異性間 男性	日本 2 外国 1	1	1		1	
異性間 女性	日本 4 外国 2	1	2		1	
不明 男性	日本 44 外国 3	39	3(2)* 1			1
合計	85	70	11	1	2*	1

*はCN.MSM.01-1/バリエント **はCN.MSM.B-1/バリエント

表 3 新規 HIV 感染者 187 名の感染経路とサブタイプ (2010-2011 年)

感染経路	合計	HIV-1サブタイプ (envC2V3, Pr, RT)				
		B	AE	AE/B	AG	C
男性同性間	日本 81 外国 2	75	3(2)*	3(1)*		
異性間 男性	日本 4 外国 4	3	1		1	1
異性間 女性	日本 3 外国 6	1	3	2	1	1
不明 男性	日本 63 外国 4	54	7(2)*	2(1)*		1
合計	167	138	16	8	3	2

*はCN.MSM.01-1/バリエント

表 4 日本男性 (MSM,unknown) における CRF01_AE および CN.MSM.01-1 バリエント検出率

Year of collection	CRF01_AE 検出率	CN.MSM.01-1 /CRF01_AE
1990-2009	2.3% (9/391)	—
2010-2012	8.9% (19/214)	47.4% (9/19)
2010	12.9% (9/70)	44.4% (4/9)
2011	8.1% (6/74)	33.3% (2/6)
2012	5.7% (4/70)	50.0% (3/6)

表 5 日本男性 (MSM,unknown) に検出された CN.MSM.01-1

risk	Year of collection	pro-RT 1.1 kb	env C2V3 325 bp
1 MSM	2010	CN.MSM.01-1	CN.MSM.01-1
2 MSM	2010	CN.MSM.01-1	CN.MSM.01-1
3 MSM	2010	JP.MSM.B-2	CN.MSM.01-1
4 unknown	2010	JP.MSM.B-1	CN.MSM.01-1/B(US)
5 unknown	2011	CN.MSM.01-1	CN.MSM.01-1
6 unknown	2011	CN.MSM.01-1	CN.MSM.01-1
7 MSM	2012	(解析中)	CN.MSM.01-1
8 unknown	2012	CN.MSM.01-1	CN.MSM.01-1
9 unknown	2012	CN.MSM.01-1	CN.MSM.01-1

内 3 例は近年中国の MSM 間で大流行している CRF01_AE バリエントの一つであるクラスター 1 (CN.MSM.01-1) と同一のクラスターを形成した。CN.MSM.01-1 は 2010 年から 2011 年に HIV 陽性と判断された感染経路不明、同性間の日本男性 6 例からも検出されており (表 3)、これら 9 例は系統樹上、枝の長さが非常に短いサブクラスター (CN-JP.MSM.01-1) を形成していた。

また、男性同性間感染の外国男性 3 例 (ペルー、台湾、中国) のうち中国男性 1 例から中国の MSM 間で流行しているサブタイプ B の CN.MSM.B-1 タイプが検出された。

D. 考察

我々は、薬剤耐性 HIV の発生動向を把握するため、2004 年より全国規模での調査に参加し、主として神奈川県および東京都内の医療機関に来院した新規 HIV-1 感染者について薬剤耐性変異の解析を行って

いる。2012 年の調査では、85 例中 6 例 (7.1%) に薬剤耐性関連変異が確認され、昨年に比べ若干検出頻度が増加した。6 例のサブタイプはすべて B であり、感染経路は男性同性間性行為 3 例、不明 3 例で、昨年までと同様の傾向にあった。

耐性関連変異の検出された 6 例の内 3 例は AZT 耐性変異 T215Y/F のリバータント T215E/C/S を有していた。リバータント T215X は、2004 年から 2012 年までの神奈川の調査において耐性関連変異が検出された 35 例中 15 例と高率に検出されている。T215X は全国調査においても比較的高頻度に検出されており、polymorphism の可能性も考えられるが、スタンフォードデータベースによると NRTI に低レベル耐性であり、薬剤選択の際には考慮する必要があると考えられた。

IN 領域に Major 変異は検出されず、Minor 変異の Q95K、T97A、G163K が検出されたが、2010 年の調査で比較的高率 (53 例中 4 例、7.5%) に検

出された E157Q は検出されなかった。

2012 年に診断された同性間、感染経路不明の日本男性から CRF01_AE が 4 例検出され、そのうち 3 例は近年中国の MSM 間で大流行している CN.MSM.01-1 タイプであった。当研究所では 1990 年から日本で流行している HIV のサブタイプ解析を実施しており、同性間および感染経路不明の日本男性における CRF01_AE 遺伝子は 2009 年までは 2.3% (9/391) に過ぎなかったが、2010 年には 12.9% (9/70) に増加し、2010 年から 2012 年の 3 年間の検出率は 8.9% (19/214) で、統計学上有意な上昇が認められた ($P < 0.01$) (表 4)。これら 19 例中 9 例 (47.4%) は CN.MSM.01-1 タイプであった (表 5)。CN.MSM.01-1 感染者は 2010 年以降に診断された症例から見出されており、また CN.MSM.01-1 クラスター内に系統樹上、枝の短いサブクラスターを形成することから、中国 MSM から日本への流入は最近のことであると推察された。

この他、同性間感染の中国人から中国 MSM 間で流行しているサブタイプ B バリエント、CN.MSM.B-1 も検出されており、今後、中国株の動向にも注目し流行の解析を行うことが重要である。

E. 結論

2012 年の 1 年間に主として神奈川県および東京都内の医療機関に来院した新規 HIV 感染者 85 名について薬剤耐性変異の解析した結果、85 例中 6 例に薬剤耐性関連変異が確認され、耐性変異出現率は 7.1% であった。6 例はすべて日本男性、サブタイプ B であり、感染経路は同性間性行為 3 例、不明 3 例で、昨年までとほぼ同様の傾向にあった。

2012 年に診断された同性間、感染経路不明の日本男性 70 例中 CRF01_AE が 4 例検出され、うち 3 例は近年中国の MSM 間で大流行している CN.MSM.01-1 タイプであった。我々の調査では CN.MSM.01-1 タイプは 2010 年に初めて検出され、2012 年までの 3 年間に同性間、感染経路不明の日本男性 9 例から検出した。今後、中国株の動向にも注目し流行の解析を行うことが重要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Kondo M, Lemey P, Sano T, Itoda I, Yoshimura Y, Sagara H, Tachikawa N, Yamanaka K, Iwamuro S, Matano T, Imai M, Kato S, Takebe Y; Emergence in Japan of an HIV-1 variant associated with

MSM transmission in China: First indication for the international dissemination of the Chinese MSM lineage. *J. Virol.* 2013, in press.

2. 武部豊、近藤真規子：中国における男性同性愛者 (MSM) 間の HIV-1 流行の急速な拡大と我が国への流行波及に関する知見：病原微生物検出情報、34、2013、in press

2) 学会発表

1. Kato S, Murayama M, Kondo M, Takagi R; Anti-HIV-1 activity of saliva through cleavage of viral RNA strands, The XIX International AIDS Conference (22-27 July 2012, Washington, D.C., USA).
2. 武部豊、近藤真規子：中国における男性同性愛者 (MSM) 間の HIV-1 流行の急速な拡大に関する分子疫学と我が国への流行波及を示す知見、第 60 回日本ウイルス学会学術集会 (2012 年 11 月 13 ~ 15 日、大阪)。
3. 近藤真規子、佐野貴子、須藤弘二、立川夏夫、相楽裕子、岩室紳也、井戸田一郎、山中晃、武部豊、今井光信、加藤真吾：日本で流行している HIV-1 サブタイプの変遷、第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会 (2012 年 11 月 24 ~ 26 日、横浜)。
4. 椎野禎一郎、近藤真規子、杉浦互 他：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換え体の動向、第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会 (2012 年 11 月 24 ~ 26 日、横浜)。
5. 佐野貴子、小林寛子、杉浦太一、須藤弘二、植田知幸、清水茂徳、近藤真規子、今井光信、加藤真吾：ホームページ「HIV 検査・相談マップ」による HIV 検査機関の情報提供およびサイト利用状況、第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会 (2012 年 11 月 24 ~ 26 日、横浜)。
6. 須藤弘二、佐野貴子、近藤真規子、今井光信、加藤真吾：HIV 郵送検査に関する実態調査 (2009-2011)、第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会 (2012 年 11 月 24 ~ 26 日、横浜)。
7. 服部純子、近藤真規子、杉浦互 他：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 (2012 年 11 月 24 ~ 26 日、横浜)。

H. 知的所有権の出願・取得状況

なし

東京都及び近郊における薬剤耐性 HIV の動向調査研究 ～ HIV 検査陽性例の HIV-1 薬剤耐性遺伝子の解析 (2012 年) ～

研究分担者 貞升 健志 東京都健康安全研究センター 微生物部 科長
研究協力者 長島 真美、新開敬行、林 志直、甲斐明美
東京都健康安全研究センター

研究要旨

都内で流行している HIV 株を遺伝子学的に調査する目的で、南新宿検査・相談室等の検査陽性例より検出された HIV のサブタイプ型別並びに Protease(PR)、Reverse transcriptase(RT) および Integrase(IN) 領域における薬剤耐性変異の有無を検索した。2012 年の HIV 検査陽性例について調査した結果、検出された HIV の 92.7% がサブタイプ B であり、薬剤耐性変異については PR 領域で I54L の変異を有する変異、RT 領域で M41L、M184V、V108I、K103N、G190AG および T215-revertant 変異が認められた。

A. 研究目的

薬剤治療を受けている HIV 患者数の増加に伴い、薬剤耐性変異を有する HIV の出現および新規 HIV 感染者における薬剤耐性ウイルスが新たな問題になりつつある。

都内の新規 HIV 感染者における薬剤耐性 HIV の出現状況を把握する目的で、南新宿検査・相談室（南新宿）等の HIV 検査陽性例を対象とし、サブタイプ型別、薬剤耐性 HIV の検出率を調査することを本研究の目的とする。

B. 研究方法

1. 塩基配列の決定

2012 年に南新宿検査・相談室（南新宿）等の HIV 検査で陽性例（血清）を対象とした。各検体 200 μ L よりウイルス核酸 RNA を抽出後、RT-nested PCR 法により Protease(PR)、Reverse transcriptase(RT) および Integrase(IN) 領域を増幅後、特異バンドの精製を行い、精製 DNA を得た。Dye-terminator-cycle-sequencing 法を用いた Direct-

Sequencing 法により精製 DNA の塩基配列を決定し、得られたアミノ酸配列の薬剤耐性関連変異の有無を検索した。

2. PR、RT および IN 領域の解析

サブタイプ型別は、得られた RT 領域の塩基配列を基に、スタンフォード HIV Drug Resistance Database または遺伝子解析ソフト MEGA4 を用いて系統樹を作成し決定した。

薬剤耐性関連変異の有無については IAS-USA、Shafer らの報告またはスタンフォード HIV Drug Resistance Database に基づき判定した。PR 領域については 1～90 番目、RT 領域では 41～236 番目、IN 領域については 1～288 番目のアミノ酸を対象とした。また、RT 領域は T215 については revertant 変異についても調査を行った。

3. BED assay による感染時期の推定

血清を 101 倍に希釈後、AWARE™ BED™ EIA TEST(Calypte 社) を用いて検査を実施し、ODn 値 \leq 0.8 となったものを、感染初期（155 日以内）と判定した。尚、検査の実施手順はキットの取り扱い説