

明書に準じた。

#### (倫理面の配慮)

本研究はヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針等の倫理規定に準拠して実施した。本研究は個人が特定できるようなデータを含まない、連結不可能匿名化されている検体から抽出した HIV 遺伝子の解析を目的とした調査研究であり、東京都健康安全研究センター倫理審査委員会において承認されている (21 健研管第 1955 号、24 健研健第 1014 号)。

## C. 研究結果

### 1. サブタイプ型別

南新宿等の HIV 検査で HIV-1 陽性となった検体について、RT 領域の分子系統樹解析を実施した結果、92.7%がサブタイプ B で、7.3%が CRF01\_AE、C が 1.0%で認められた (図 1)。

### 2. BED assay による感染時期の推定

BED assay により血清学的に感染初期 (ODn 値 $\leq$ 0.8) と判定された例は、29.2%であった (図 2)

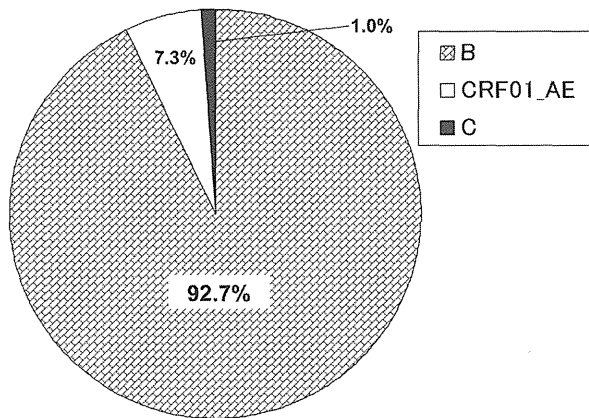


図 1 HIV サブタイプ型別 (南新宿・検査相談室等)  
(2012年)

BED 陽性率は 2009 年の 51.7% をピークに年々低下しており、南新宿等における感染初期の占める割合が減少傾向にある。

### 3. PR、RT および IN 領域の薬剤耐性変異の検出

PR 領域について遺伝子解析を実施した結果 (図 3)、1 例でプロテアーゼ阻害薬 (PI) の薬剤耐性変異である I54IL の薬剤耐性変異と、RT 領域の核酸系逆転写酵素阻害薬 (NRTI) の耐性変異である M41L、M184V が認められ、非核酸系逆転写酵素阻害薬 (NNRTI) の耐性変異である V108I/V が 2 例、K103N、G190A/G が各 1 例認められた。さらに、T215E、T215S、T219IT 変異を有する revertant が認められた。なお、IN 領域の薬剤耐性変異である Y143R/H/C、Q148H/K/R および N155H 等の耐性変異は認められなかった。

薬剤耐性変異の検出率は 7.3% と 2011 年より増加しているが (図 4)、revertant 検出率は 3.0% と昨年より減少し、薬剤耐性変異および revertant を合わせると 10.4% と昨年同様の頻度となった。

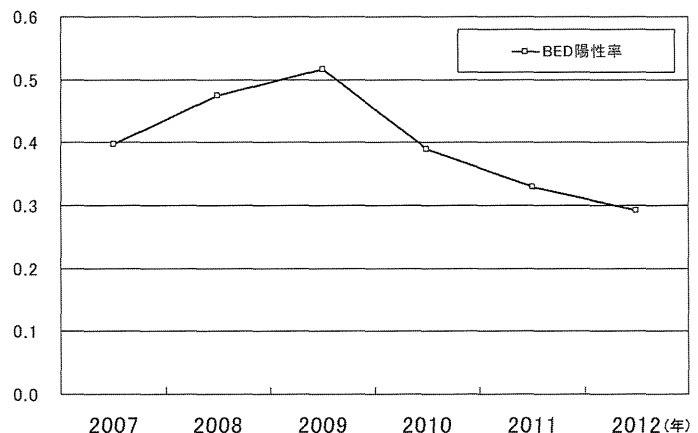


図 2 BED 陽性率

year	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
multi			I84V,I,90M/D67N,K70R,M184V,T215V,K219Q M46I,L90M/M41L,D67N,K70K/R,T215F,K219Q			M46I,T215S,K219Q		
nRTIs			M41L M41L M41L		L74LV		M184V	M41L M184V
NNRTIs		V108I	K103N K103N	V108I K103N		K103N K103N	V108I V108I	V108IV V108I K103N G190AG
PI	M46L M46L		V32V/I M46I M46I M46I/L M46L M46L M46L M46L	M46I M46L M46L M46L M46L M46L	Q58E M46I M46L M46L	M46I M46I		I54IL
Revertant	T215D T215D T215D T215E	T215D	T215C T215D T215D T215D	T215C T215D T215C T215E T215D T215E T215E T215E T215E T215S T215S	T215C T215C T215C T215D T215E T215E T215E T215E T215E T215S T215L	T215E T215E T215E T215S	T215C T215D T215D T215D T215D T215E T215S T215S T215S	T215E T215S T215S T215IT

図 3 HIV 薬剤耐性変異の検出 (2005~2012年)

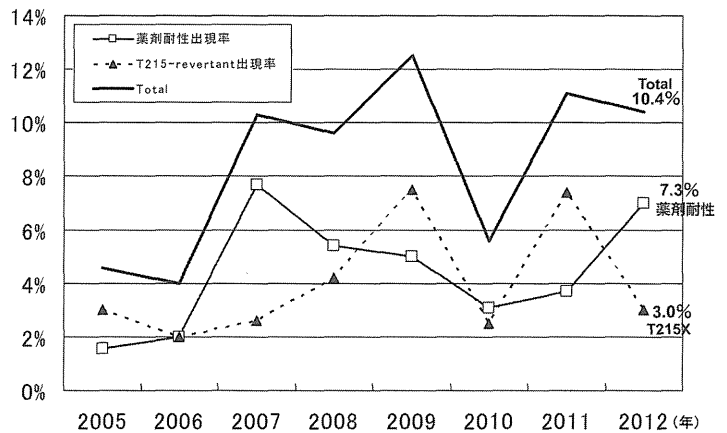


図 4 東京都における薬剤耐性変異・revertant 検出率

D. 考察

2012年に南新宿等のHIV検査で陽性となった検体より検出されたHIV-1のPR、RTおよびIN領域の遺伝子解析を実施した結果、92.7%がサブタイプBで、10例で薬剤耐性に関連する変異を認めた(耐性変異7例、revertant変異3例)。

耐性変異が認められた7例は、すべて単独の変異であり、V108Iが複数例(2例)認められた以外はすべて1例のみの検出であった。

今回の検討で、薬剤耐性関連変異の検出率は2007年とほぼ同じレベルまで上昇したが、一方でT215Xの検出率が減少し、全体では10%前後の関連変異率を示している。

抗HIV薬は年々進化してきており、薬剤耐性変異の検出結果も年によって特徴的である。

E. 結論

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PR、RTおよび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I54ILの変異を有する例が1例、RT領域でM41L、M184V、V108I等の異変が6例、T215-revertant変異が3例認められた。

F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1) 学会発表

1. 長島真美、新開敬行、尾形和恵、吉田 勲、原田幸子、林志直、貞升健志、甲斐明美：2007年～2011年の東京都内における HIV 検査陽性例の解析、第26回日本エイズ学会学術集会、2012（横浜）
2. 長島真美、新開敬行、尾形和恵、吉田 勲、原田幸子、林志直、貞升健志、甲斐明美：東京都内公的検査機関における HIV 検査数の解析（2007-2011年）、第26回日本エイズ学会学術集会、2012（横浜）

## H. 知的所有権の出願・取得状況

なし

# 千葉県及び近郊における薬剤耐性 HIV の動向調査研究 ～ HIV 母子感染予防における薬剤耐性 HIV 検査についての研究～

研究分担者 佐藤 武幸 千葉大学医学部附属病院感染症管理治療部 部長

## 研究要旨

HIV 耐性検査が可能となった 2004 年以降に当院で出産した 10 例の HIV 妊婦の薬剤耐性と治療効果をまとめた。8 例が外国籍であり、内 5 例が公的医療保険を有しておらず、医療機関へのアクセスが遅れ、出産までの抗 HIV 薬治療期間が短縮された。薬剤耐性は 2 例で認められたが、1 例は AZT の耐性関連遺伝子変異 + (M41L、感受性は有りとの判定)、1 例は NVP および EFV の 2 剤耐性 (K101E) であったが、妊婦での一般的使用薬剤でなかったため、全例でウイルス量低下が得られた。

児については現時点で全例 HIV 陰性であり、健康に発育している。

今後も外国籍の母親からの出産例が続くと推定され、さらに妊婦で使用される他の薬剤についての使用実績も多くなり、薬剤選択の幅の拡大が予想される中で、薬剤耐性検査の重要性が増すと思われる。

## A. 研究目的

HIV 薬剤耐性検査が可能となった 2004 年より本院にて出産した 10 例の HIV 陽性妊婦の薬剤耐性検査について、国籍、初診と出産までの間隔、薬剤耐性結果について検討し、本邦での HIV 薬剤耐性検査の問題点を論じる。

## B. 研究方法

### 1. 患者

2004 年より 2012 年 7 月の間に当院にて出産した HIV 陽性妊婦である。出産例は 10 例であるが、内 1 名は 2 回の出産例であり (No.8 と No.10)、妊婦としては 9 名となる。

### 2. HIV 母子感染予防法

全例が診断前の抗 HIV 薬を受けておらず、緊急当日手術の No.5 を除き、初診後 (診断後) 直ちに抗 HIV 薬投与を開始した。予防法は世界的な標準法にのっとり以下に従った。

母親への抗 HIV 薬投与は初診時期により投与期間に差が生じたが、(2) と (3) については全例施行できた。

### (1) 母親への抗 HIV 薬

AZT + 3TC + NFV : No.1 - 3

AZT + 3TC + LPV/RTV : No.4 - 10

### (2) 選択的帝王切開と術中の AZT 持続静注

### (3) 児への 6 週間の AZT 経口投与

## 3. 検討項目

### (1) 国籍 (本人とパートナー)

### (2) 出産週数

### (3) 母親の抗 HIV 薬治療期間 (初診日から出産日)

### (4) 抗 HIV 薬開始前と出産時の母親の血中 HIV 量

### (5) 抗 HIV 薬開始前の薬剤耐性検査

### (6) 児の予後

## C. 研究結果 (表)

### 1. 国籍

#### (1) 母親

日本は、2 名のみであり、他は外国籍であった。大別して、アジア 2 名 (タイ、インドネシア)、アフリカ 3 名 (南部地域、ウガンダ、エチオピア)、南米 1 名 (アルゼンチン)、東欧 1 名 (ルーマニア) であった。

表 当院での HIV 陽性妊婦の出産例

年	年齢	国籍 (本人/夫)	出産 週数	治療 週数	治療薬	RNA量 (copies/mL)		薬剤 耐性	公的医 療保険	
						開始前	分娩前			
1	2004	34	タイ/日本	37w5d	4w5d	A	3900	<400	-	-
2	2004	34	アルゼンチン/日本	37w2d	5w1d	A	3800	100	AZT	+
3	2006	23	ルーマニア/日本	37w0d	5w2d	A	不明 (服用2w: 472)	<50	未検査	+
4	2008	33	日本/ウガンダ	36w0d	20w0d	B	3890	<50	-	+
5	2009	30	アフリカ南部/不明	38w4d	0d	なし	1050	1050	未検査	-
6	2010	23	インドネシア/日本	35w6d	21w0d	B	24000	<50	NVP EFV	+
7	2011	35	ウガンダ/ウガンダ	35w6d	3w0d	B	8010	149	-	-
8	2011	23	エチオピア/日本	38w4d	1w4d	B	52000	778	-	-
9	2012	26	日本/日本	38w1d	1w3d	B	4280	<50	-	+
10	2012	24	エチオピア/日本	37w6d	2w0d	B	38000	510	-	-

全例が帝王切開、 A: AZT・3TC・NFV B: AZT・3TC・LPV/RTV

## (2) パートナー

日本 6 名、ウガンダ 2 名、不明 1 名である。日本人同士の組み合わせは 1 例のみであり、外国籍同士も 1 例のみであった（ウガンダ）。

## 2. 出産週数

35 週 6 日から 38 週 1 日（平均 37 週 3 日）であり、全例が帝王切開での出産であった。36~37 週での出産を目標としたが、妊婦の状況、手術室の確保で若干の変動が生じた。

38 週を超えた 3 例中、1 例は成田空港からの緊急搬送での同日出産、2 例は抗 HIV 薬開始の遅れ（初診の遅れ）のため、出産時のウイルス量低下目的で帝王切開予定日を延ばした例（1 週 1 日と 1 週 6 日）である。

数例が破水状況により若干の予定日（時）が早められたが、リスクを伴うほどの緊急性はなく、定められた方法（基本的にウイルス性肝炎と同様）によって、順調に出産された。

## 3. 母親の抗 HIV 薬治療期間

早期より治療を開始できたのは妊娠 14 週 (No.6)、16 週 (No.4) の 2 例のみであり、他の 8 例は最大で 5 週 2 日であり、全例が初診時（診断日）に直ちに抗 HIV 薬が開始されていた。1 例 (No.5) は緊急搬送当日の出産のため母親への抗 HIV 薬が間に合わず、術前～術中の AZT 点滴静注、児への 6 週間の AZT 経口投与のみとなった。

## 4. 初診時と出産時の母親の血中 HIV 量

他院よりの連絡後直ちに抗 HIV 薬を開始され、開始前の HIV 量不明の No.3（服用 2 週で当院の受診

となり、その時点での HIV 量は 472) と No.5 を除き、全例が 3000 以上であったが、全体に低めであり、1 万以上は 3 例のみであった。

投与期間が 3 週以下と短期であった 4 例 (No.7-10) を含め、全例で出産時には 1000 未満となっていた。

## 5. 初診時の薬剤耐性検査

他院で抗 HIV 療法開始の No.3 と緊急帝王切開の No.5 を除く 8 例で検討できた。AZT 耐性関連遺伝子変異 + (M41L、感受性は有りとの判定) 1 例 (No.1)、NVP および EFV 耐性 (K101E) 1 例 (No.6) 以外は薬剤耐性は認められなかった。耐性の 2 例を含め全例が結果判明前から治療開始されており、結果による薬剤変更例はなかった。

## 6. 児の予後

現時点で全例 HIV 陰性であり、健康に発育している。2012 年出産の 2 例を除き 8 例が 1 年 6 か月健診 (HIV-RNA 含む) を終え、HIV に関するフォローは中止となっている。他の 2 例についても、生後 6 ヶ月検診の HIV - RNA は陰性となっている。

## D. 考察

今回の検討では、10 例中 8 例は外国籍であり、この内妊娠初期から HIV 陽性が診断出来、余裕をもって抗 HIV 薬を開始できたのは 1 例のみであり、他は妊娠末期での診断であった。このため選択的帝王切開までの抗 HIV 薬治療期間が短くなり、出産時の HIV-RNA 量の減少には不利な状況となっている。外国籍との点より、薬剤耐性の可能性を考慮しつつも、

第一選択としては、国際的に推奨され胎児への影響も少ないとされる、AZT + 3TC + LPV/RTV (当初は AZT + 3TC + NFV) で開始したが、幸いにも全例において短期間でウイルス量の低下が得られた。

耐性検査では No.2 が AZT 耐性関連遺伝子変異 + (M41L、感受性は有りとの判定)、No.5 が NVP および EFV の耐性 (K101E) であった。前者 (No.2) については、ウイルス量の低下もよく、臨床的には反応していたため、そのまま継続使用した。CD4 は 350 程度のため、第 2 子の希望もあり、出産後も AZT + 3TC + NFV (途中より NFV を LPV/RTV に変更) 継続し、HIV-RNA 感度未満、CD4 正常範囲を維持している。後者 (No.5) では投与薬剤についての耐性はなく、AZT + 3TC + LPV/RTV を出産後も含め継続使用し、HIV-RNA 感度未満、CD4 正常範囲を維持している。

外国籍妊婦の問題点として、薬剤耐性ウイルスと妊婦健診等の医療機関へのアクセスが貧困の 2 点があげられる。耐性ウイルスについては、国内の状況とは異なる変異が存在する可能性が高く、出産までの治療期間が短い時には、耐性薬剤が選択され十分な治療効果が得られない可能性がある。医療機関へのアクセスについては、妊娠初期からの妊婦健診がされないまま、妊娠後期になってはじめて受診する例が多く、耐性薬剤が選択される危険が増すと同時に、薬剤変更の余裕がなくなる。外国籍 8 例中公的医療保険を有していたのは 3 例のみであり (全例パートナーは日本人)、残りの 5 例は無保険者であった点も医療機関へのアクセスが遅れた原因となっている。

無保険者 5 例中 4 例は当院への支払いが滞り多額の損金が発生している。1 例は NPO (難民支援) の尽力で当院の損金は免れた。高額な耐性検査については本研究費の中で行われたため患者負担は発生しなかったが、帝王切開・抗 HIV 薬等が人道的見地より損金覚悟で施行せざるを得なかった。児は全例日本国籍を有している点も考慮いただき、公的援助の整備を期待したい。

今回幸いにも全例で臨床的に有効ではあったが、今後も当面は外国籍の母親からの出産例が続くと推定される。妊婦への投与薬としては、現在 AZT + 3TC + LPV/RTV が最も汎用されているが、今後他の薬剤についての使用実績も多くなり、薬剤選択の幅の拡大が予想される中で、薬剤耐性検査の重要性が増すと思われる。

## E. 結論

10 例中 8 例が外国籍であり、内 5 例が公的医療保

険を有しておらず、医療機関へのアクセスが遅れ、出産までの抗 HIV 薬治療期間が短縮されていた。薬剤耐性は 2 例で認められたが、耐性が軽度あったためと、妊婦での一般的な使用薬剤でなかったため、全例でウイルス量低下が得られた。今後も外国籍の母親からの出産例が続くと推定され、さらに妊婦で使用される他の薬剤についての使用実績も多くなり、薬剤選択の幅の拡大が予想される中で、薬剤耐性検査の重要性が増すと思われる。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1) 論文

1. 佐藤武幸. 性感染症. 日本医師会雑誌 141 : S254-S257,2012.
2. 佐藤武幸. 後天性免疫不全症候群. 小児内科 44 : 248-249,2012.
3. 佐藤武幸. 性感染の診断. 小児科臨床 65 : 2607-2614,2012.

## H. 知的所有権の出願・取得状況

なし



## 北海道ブロックにおける薬剤耐性 HIV の動向調査研究

研究分担者 佐藤 典宏 北海道大学病院高度先進医療支援センター 教授

研究協力者 吉田 繁 北海道大学大学院保健科学研究院病態解析学分野 助教

### 研究要旨

北海道ブロックにおける新規 HIV 感染者数の動向ならびに薬剤耐性 HIV の検出率の調査を目的に、新規感染者血液中の HIV 遺伝子解析をおこなった。2012 年 1 月～12 月に北海道大学病院を新規受診した HIV 感染者は 25 名であり、そのうち新規感染者は 16 名であった。これら新規感染者の HIV 遺伝子解析をおこなった結果、高度耐性変異は検出されなかったが、1 名から T215L リバータントが検出された。今年度の新規感染者数は前年度と比較し、やや減少傾向であったが、感染者数は着実に増加していることから今後も継続的な調査が必要である。

### A. 研究目的

本邦における薬剤耐性 HIV の発生動向把握を目的とし、北海道ブロックにおける新規 HIV 感染者数の動向調査ならびに新規感染者血液中の HIV 遺伝子の解析をおこなった。

### B. 研究方法

北海道ブロックにおける 2012 年度の新規 HIV 感染者数を調査した。調査期間中に本院を受診した新規 HIV 感染患者の血漿 / 血清および血球を凍結保存し、血漿 / 血清中に存在する遊離 HIV-1 の pol、gag、env 領域の遺伝子配列を解析し、薬剤耐性ならびサブタイプの決定をおこなった。

(倫理面への配慮)

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

### C. 研究結果

2012 年 1 月～12 月に北大病院を新規受診した

HIV 感染者は 25 名であり、そのうち新規 HIV 感染者は 16 名であった。エイズ動向委員会の報告では、2012 年 1 月～9 月における北海道ブロックでの新規 HIV/AIDS 感染者は 23 名であり、同時期での本院の新規 HIV 感染者は 14 名であったことから、本調査の新規感染者捕捉率は 61%であった。新規感染者 16 名はすべて男性であり、年齢は 30 歳代が最も多く 6 名 (37.5%) であり、次いで 60 歳以上が 3 名 (18.8%) であった。感染経路は MSM 10 名 (62.5%)、異性間 5 名 (31.3%)、不明 1 名 (6.2%) であり、初診時に AIDS を発症していた患者は 4 名 (25.0%) であった。

これら新規感染者について、初診時血液を用い薬剤耐性検査により変異の解析をおこなったところ 16 名中 15 名 (93.8%) に薬剤耐性関連変異 (international AIDS society-USA もしくは stanford drug resistance database にて採用されている変異) を認め、うち 1 名からは T215L リバータントが検出された。しかしながら、高度薬剤耐性に関与するプライマリーな耐性変異は検出されなかった (図 1)。これら HIV のサブタイプは B が 15 名 (93.7%)、C が 1 名 (6.3%) であり、サブタイプ C はアフリカ国籍患者であった。また、HCV 抗体陽性者は確認されなかったものの、HBs 抗原陽性者が 4 名確認された。



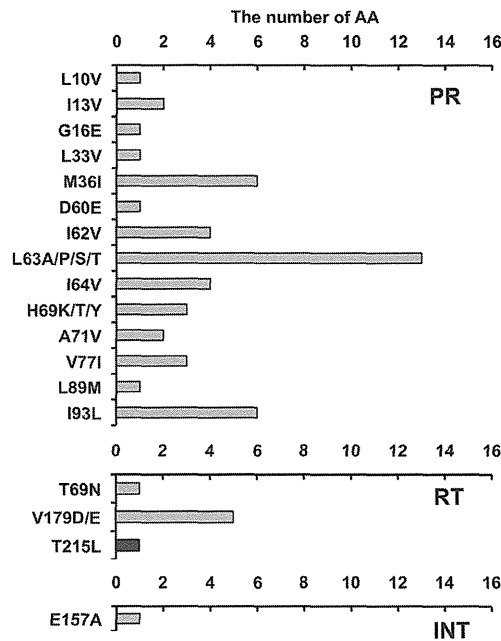


図1 2012年度新規HIV感染者16名から検出された薬剤耐性変異

#### D. 考察

本年度の新規感染者は16名であり、薬剤耐性HIVは検出されなかった。本院における新規感染者は他地域と同様に30-40歳代、同性間、日本男性が多いが、今年度は60歳以上の新規感染者の割合が例年と比較し増加した。また、感染経路は依然として同性間が多いものの、異性間感染の割合が本年度31.3%、前年度36.8%と、それ以前の2009、10年(17.6%、20%)と比較し増加している。今後、感染者の分布の拡大や感染者数の増加の可能性があると考えられ、異性間感染者の動向については注意する必要があると考えられる。

HIV遺伝子の解析から、高度な薬剤耐性に関与する変異は検出されなかったが、ほとんどの患者からマイナー変異が検出された。また、1名からT215Lリバータントが検出された。T215Xリバータントは他地域では高頻度に検出される変異であるが、北海道ブロックでの検出率は他地域に比べ低い。遺伝子解析の結果も北海道ブロックにおける感染変化の可能性を支持すると考える。今年度の北海道ブロックでの新規感染者数は前年と比較しやや減少を示したが、全体的には横ばいであった。しかしながら、新規感染者の年齢や感染経路の変化が伺えた。北海道ブロックは首都圏に比べ新規感染者数は少ないものの、着実に増加している。今後の更なる調査の継続と北海道ブロックにおける調査体制の充実が重要であると考えられる。

#### E. 結論

- 1) 2012年度に北大病院を受診した新規感染者数は16名であった。
- 2) 高齢の新規感染者、異性間感染の増加が目立った。
- 3) 高度耐性HIVは検出されなかったが、T215Lリバータントが1例検出された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1) 学会発表

1. 吉田 繁、服部純子、松田昌和、橋本 修、岡田清美、和山行正、伊部史朗、巽 正志、杉浦 互：HIV薬剤耐性検査の外部精度管理．第22回日本臨床化学会北海道支部例会、旭川、2012.10.
2. 吉田 繁、服部純子、松田昌和、橋本 修、岡田清美、和山行正、加藤真吾、伊部史朗、巽 正志、杉浦 互：2011年度HIV薬剤耐性検査外部精度管理の報告．第26回日本エイズ学会、横浜、2012.11.
3. 吉田 繁、服部純子、松田昌和、橋本 修、岡田清美、和山行正、加藤真吾、伊部史朗、巽 正志、杉浦 互：In vitro transcribed RNAを用いたHIV薬剤耐性検査の外部精度管理．第59回日本臨床検査医学会、京都、2012.11.

#### H. 知的所有権の出願・取得状況

なし

## HIV の分子進化学的解析

研究分担者 椎野 禎一郎 国立感染症研究所・感染症情報センター 主任研究官

### 研究要旨

わが国の HIV-1 感染者における薬剤耐性変異の状況を調べるために、我々は患者・検体・塩基配列情報のデータベースの作成事業を行っている。このデータベースに集められた配列情報を分子進化学的手法で解析し、わが国における HIV-1 感染の動態を明らかにすることを目的として、解析を進めている。本年度は、データベースにある患者情報から、2002 年～2011 年の初診時に採取された検体の Protease-RT 領域の塩基配列（全 4393 配列）について、以下の解析を行なった。まず、検体配列をサブタイプリファレンス配列と共にアライメントし、ウインドウをスライドさせながらウインドウに入った配列について検体とリファレンス間の平均置換塩基率を各々算出する自作のプログラムを用いて、検体配列の微細なサブタイプ構造を大量解析した。4393 配列のうち、95% 以上の領域が同じサブタイプである検体は、B=3899, CRF01\_AE=344, C=46, G=15, F=9, D=1 であった。既知の CRF は、02\_AG=36, 06\_cpx=3, 07\_BC, 12\_BF, 33\_01B が各 2 検体, 08\_BC と 28 または 29\_BF が 1 検体ずつであった。また、32 検体は、未知のサブタイプ間組換え体 (URF) であった。組換え体それぞれについて記述疫学および分子疫学的解析を行なったところ、CRF02\_AG は顕著に感染クラスタが多い特徴を持ち女性に多いこと、その他の CRF は元来の流行地出身者や渡航者の感染が多いこと、URF は構成要素であるサブタイプの流行地出身者や渡航者の感染が多いが、B-01 間のは国内での生成も疑われる結果となった。組換え体ウイルスは数こそ少ないが、サブタイプごとに薬剤耐性変異、免疫への応答性等が異なるとの報告があることを考えると、疾病対策上特異な地位を占める。今回の結果は、日本国内で様々なサブタイプが主に組換え体として輸入されてきていることを示しており、今後の動向調査・感染対策・診断治療等に問題を投げかけるものである。

### A. 研究目的

- 研究班で収集された患者・検体・塩基配列情報をデータベース化し、情報システムに載せた上で、データ収集・利用のための簡便なインターフェースを開発すること。
- データベースに蓄積した塩基配列データを用いて、わが国における HIV-1 感染の動態を経時的・地理的・サブタイプ依存的に描き出すため、分子進化学的手法を用いた塩基配列の大量解析を行うこと。

### B. 研究方法（倫理面への配慮）

- Web サーバと DB サーバの連携によって、研究班

が集める患者／検体情報を情報ネットワークを活用して効率的に収集・集積・検索するシステムを構築する。

- 上記の情報システムに蓄積された Protease-RT 領域の塩基配列データを用いて、領域毎距離行列の計算による領域ごとのサブタイピングを行う。
- 距離行列法、最尤法、Bayesian Markov Chain Monte-Carlo 法（ベイズ MCMC 法）などの複数の分子系統樹から得られる統計学的パラメータを解析し、感染クラスターを高精度で同定する。
- 各サブタイプの塩基配列データをベイズ MCMC 法で解析し、最適塩基置換モデル・進化パラメーター・時間系統樹トポロジー・感染クラスター

一の tMRCA 推定を行う。

- 感染クラスターについて、記述疫学的解析を行う。

### C. 研究結果

本年度は、日本国内の non-B, non-AE 感染者、について上に記した方法で解析を行った。特に、これらのウイルスの約半数を占める組換え体ウイルスの動態の解明を行なった。検体配列には、未知の組換え体が存在する可能性がある。組換え体のサブタイプは通常系統樹解析で既知のタイプとクラスタリングしないことを指標に行うが、4000 検体以上の配列を一度に系統樹解析することは非現実的である。本研究では、組換え体の迅速な判別を目的に、検体配列とサブタイプリファレンス配列のアライメントにおいて、配列ウインドウ設定し、それをスライドさせることで部分配列アライメントを多数抽出し、これらについて検体とリファレンス間の平均置換塩基率を各々算出して比較する方法を用いた。この解析は、Perl5 で書かれた自作プログラムを用いて行い、検体配列の微細なサブタイプ構造の大量分類に成功した。分類後、それぞれのタイプにある配列は、各々系統樹解析にかけられ、サブタイプ・既知の CRF との関係が再検討された。結果、95% 以上の領域が Subtype B の配列が 3899、CRF\_01 の配列は 344、Subtype C の配列は 46、Subtype G の配列は 15、Subtype F の配列は 9、Subtype D の配列は 1 であった (図 1)。残り 79 配列は、2 つ以上のサブタイプ間の組換え体である。これらの配列は、改めて CRF を含むサブタイプリファレンス配列と共にアライメントされ、分子系統樹解析にかけら

れた。その結果、CRF02\_AG が 36 配列、CRF06\_cpx が 3 配列、CRF07\_BC, CRF12\_BF, CRF33\_01B がそれぞれ 2 配列、CRF08\_BC, CRF28 または 29\_BF (pol 領域の構造が同じで判別できない) がそれぞれ 1 配列見つかった。残りの 32 配列は、どの CRF ともクラスタリングせず、独特の組換え体 (URF) と考えられた (図 2)。次に、組換え体に分類された検体群について、さらに疫学的解析を行なった。CRF02\_AG に分類された検体は、検出地、感染国、年齢は全体と変わらなかったが、外国人が多く、また女性が顕著に多いという国内のサブタイプには見られない特異性を持っていた (図 3)。これらの配列をベイズ MCMC 法の系統樹解析した結果、6 つの国内感染クラスターが見出された (図 4)。これらの感染クラスターは規模や地理的分布が比較的大きく、また 90 年代にまで祖先を辿れるものがあるなど、感染を広めやすくネットワークの寿命が長い傾向があった。その他の CRF に分類された検体は、元来の流行地から来日した外国人、または流行地での感染ケースに由来するものが多かった (図 5)。これらは、2000 年代に入ってから報告数が増える傾向にあり、世界における CRF の流行の広がりを反映していると思われる。URF は、Subtype A, B, C, F, G, H, CRF02, 03, 07, 08, 40 の組み合わせからなる多様なものが発見された。そのうち 4 種類は、2 検体以上の患者に同一構造のウイルスであった (図 6)。Subtype B と CRF01\_AE をもとにしたものは 11 種類あった。詳細な構造解析と部分系統樹解析からこれらのいくつかは共通する領域を持っていることがわかり、国内も含めた B-AE の共感染集団の

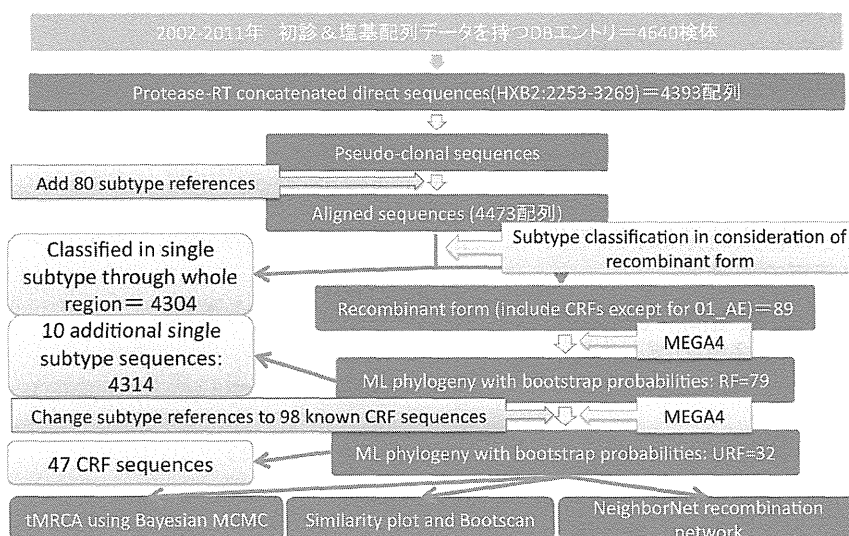


図 1 サブタイプ分類の手順

可能性を示した (図 7)。B-F をもとにしたものは 4 種類あった (図 8)。CRF07, 08 を含んでいるもの、CRF16\_A2D を含んでいるものがそれぞれ 1 種類 (図 9)、B-C をもとにしたものが 2 種類 (図 10) それぞれミャンマー・中国といった元の流行地域で感染

した者から見出された。そのほか、海外でもマイナーなサブタイプの断片を含むものが 4 種類見出されたが、その多くはアフリカと関係がある者に感染していた (図 10)。

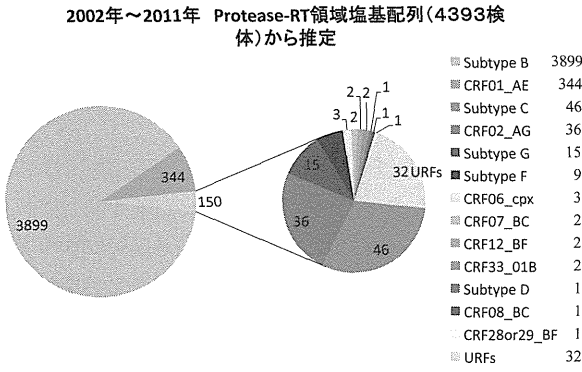


図 2 日本国内の HIV-1 サブタイプ・CRF の検出頻度

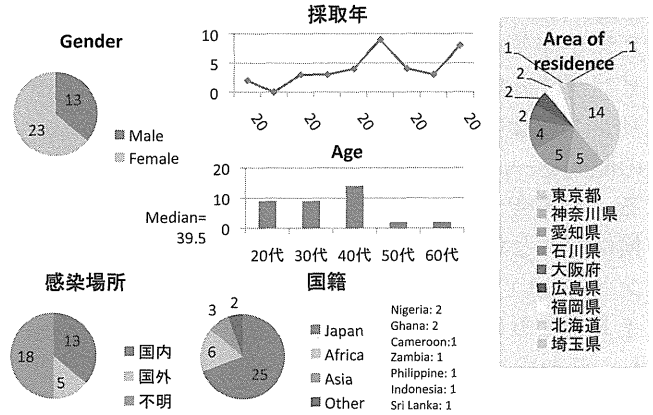


図 3 CRF02\_AG 感染者の人口学的パラメータ分布

- 単系統性の検定が有意 = 感染クラスターが、6つ見出された
- 22/36=61%の感染者が、これらの感染クラスターのいずれかに所属している
- 5/6は、海外・外国人ではなく、国内で流行している特徴を持つ
- 海外からの移入時期は、90年代～2004年まで散発的
- 感染因子は、異性間・同性間の両方で両性嗜好者の関与も疑われる

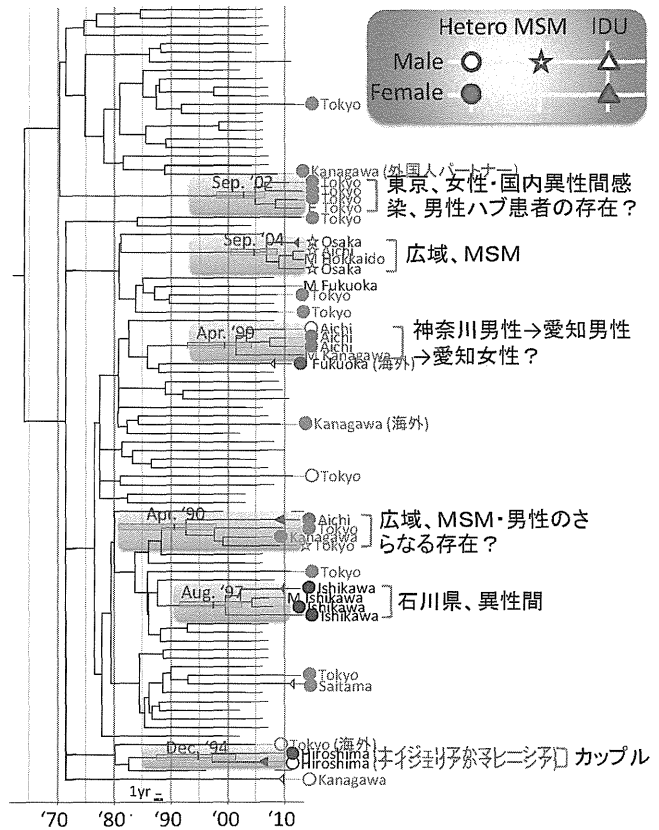
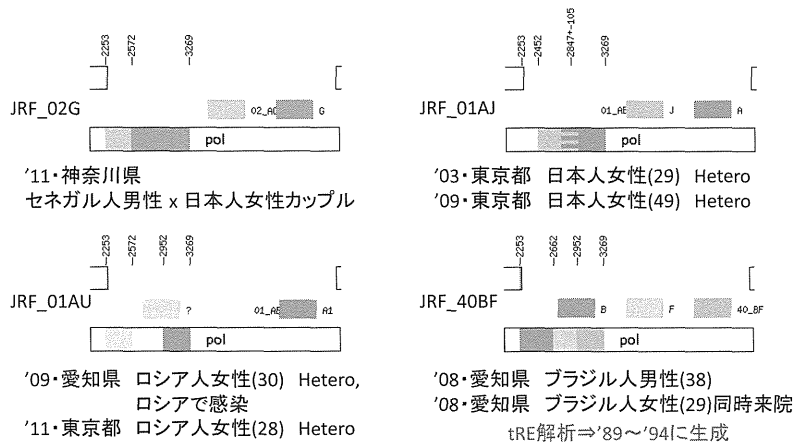


図 4 我が国の CRF02\_AG ウイルスの時間系統樹

CRF	地域	年	性別	年齢	リスク	感染場所	国籍	
06_cpx	北海道	'08	M	42	?	海外	外国人	Cluster
	愛知県	'09	M	36	Hetero	Nigeria	Nigeria	
	愛知県	'09	F	36	Hetero	Nigeria 日本	日本	
07_BC	東京都	'08	M	57	?	?	日本	遺伝的関連はない
	大阪府	'10	F	34	Hetero	海外	外国人	
08_BC	東京都	'10	M	26	?	?	外国人	
12_BF	東京都	'10	M	?	?	?	?	Cluster
	東京都	'10	M	23	Hetero	?	Peru	
28 29_BF	愛知県	'05	M	35	Hetero	?	Brazil	
33_01B	北海道	'09	M	49	Hetero	?	日本	遺伝的関連はない
	大阪府	'03	M	34	MSM	海外	Malaysia	

- 外国人および外国人との接触が多い(9/11)。元来の感染地域からの輸入
- 5年以内の直近の報告が多い(9/11)

図5 その他のCRFへの感染者の検体情報



- 構成サブタイプ/CRFの流行地で生成→現地人の来日に伴って侵入というケースが多い
- JRF\_01AJは、把握されていない男性患者の存在が示唆される

図6 日本国内で見出された二名以上の感染者に感染していたURF

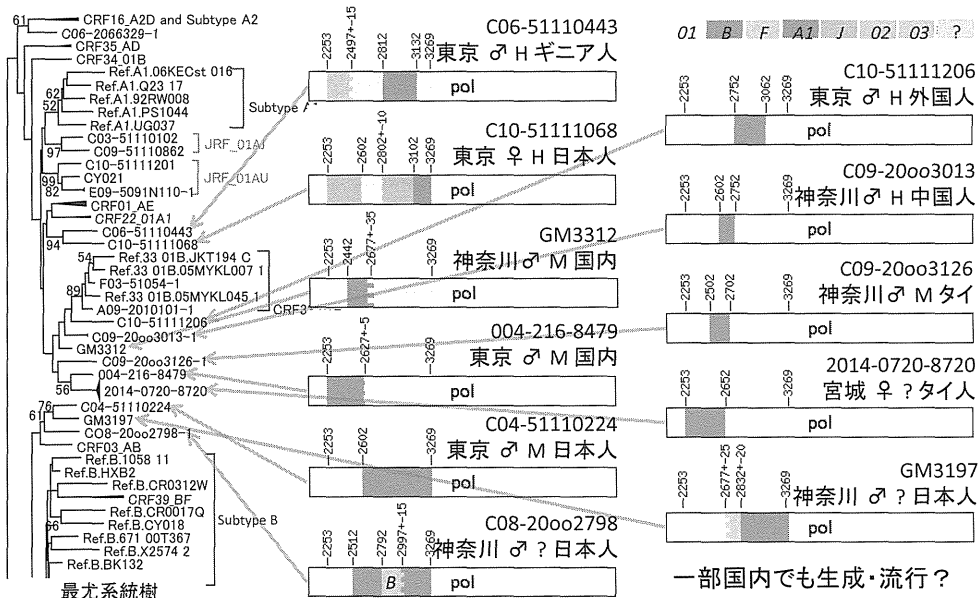


図7 日本国内で見出されたBとAEを主成分としたURF

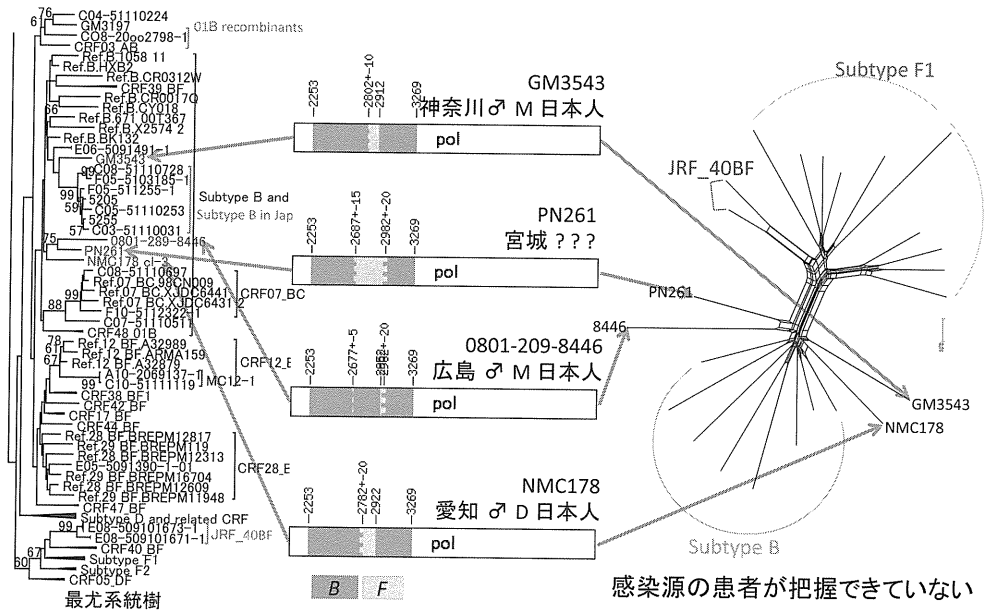


図 8 日本国内で見出された B と F を主成分とした URF

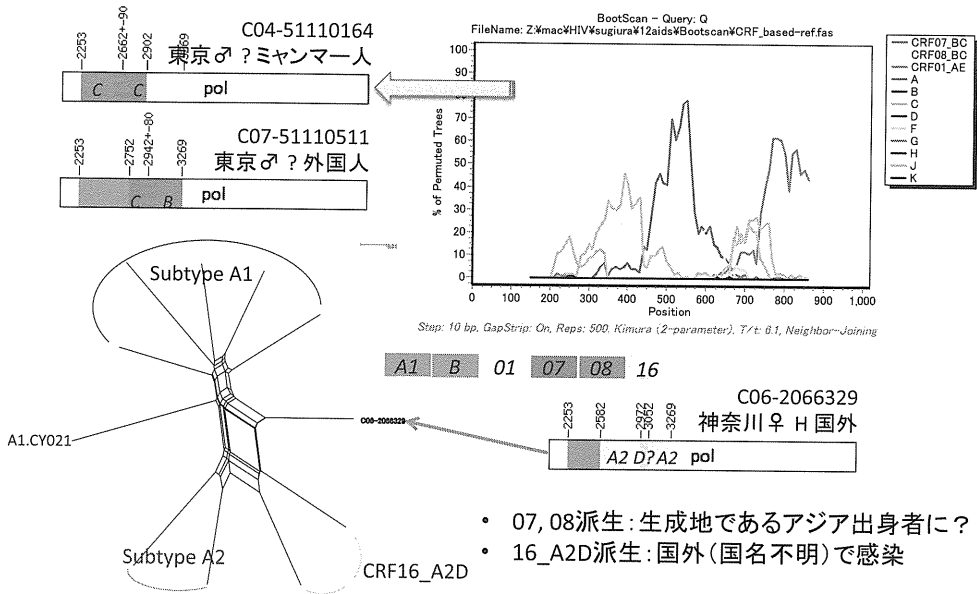
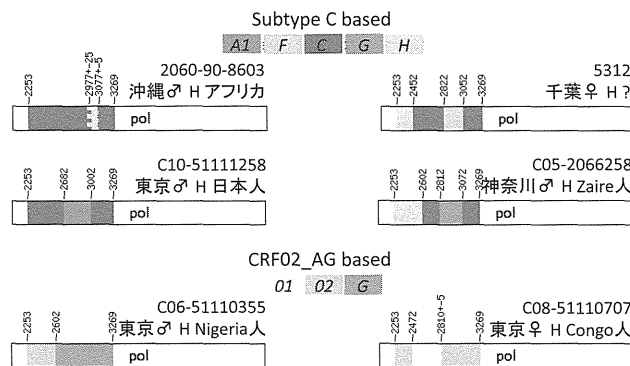


図 9 日本国内で見出された CRF07, 08, 16 を含む URF

#### D. 考察

本研究は、日本国内の HIV-1 感染者の組換え体を含めた正確なサブタイプ分布を解明した初めての解析である。大量の塩基配列データの組換え構造を含んだサブタイプ分析のために、新たな自動化プログラムが開発された。この結果、従来は不明または単一サブタイプと考えられてきたいくつかの配列のな

かに、未知のサブタイプ間組換え体を多数検出することが可能となり、組換え体ウイルスの動態は、我が国の主要なサブタイプである Subtype B と CRF01\_AE (前年度、前々年度の本研究成果) とは異なっていた。組換え体ウイルスは 01\_AE, 02\_AG などの古くから存在するものを除くと、2000 年代になって急激にその種類を増やしていた。こうした



・ C, AGの流行地である、アフリカ出身またはアフリカでの感染が多い

図 10 日本国内で見出された C と希少サブタイプからなる URF と、CRF02\_AG を主成分とした URF

ウイルスは、生成地から直接輸入されていることが推測され、輸入感染症といって差し支えないと思われる。一方、我が国に流行する 2 つのウイルス型であるサブタイプ B と CRF01\_AE の間には、すでに国内産の組換え体が生成している可能性がある。このことは、我が国も少ない割合ではあるが新たな HIV-1 変異体の供給元になっていることを示しており、アジア全体の公衆衛生を考える際に考慮すべき問題であろう。CRF02\_AG については、特定の感染が広がりやすいコミュニティを通じてわが国に広がりつつあるという結果が得られた。これらのコミュニティは、女性が主要な構成要員である点が従来のサブタイプと大きく異なり、今後の動向調査が望まれる。組換え体ウイルスは数こそ少ないが、サブタイプごとに薬剤耐性変異、免疫への応答性等が異なるとの報告があることを考えると、疾病対策上特異な地位を占める。こうした組換え体ウイルスの動向を把握し診断等に反映することが、今後の HIV 制圧戦略に必要とされるだろう。

## E. 結論

我が国において、非 B 非 AE 型の HIV-1 は全体の約 3.4% と低頻度だが、疫学的な特徴が異なることから、公衆衛生上無視できない。CRF02\_AG は、外国人を含む異性接触コミュニティで、特に女性に多く感染する特異性を持っていた。その他の CRF と URF は、構成するサブタイプの元の分布地と関連を持ち、海外での発生と日本への感染という新興輸入感染症の様相を呈していた。一方、B と AE の間の URF は、国内でも発生している可能性が示唆された。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1) 原著論文

1. Shiino T. Phylodynamic analysis of a viral infection network. *Front. Microbiol.* 3:278-282, 2012.

### 2) 口頭発表

1. 椎野禎一郎、服部純子、瀧永博之、吉田 繁、伊藤俊広、上田敦久、近藤真規子、貞升健志、藤井毅、横幕能行、上田幹夫、田邊嘉也、渡邊 大、森治代、藤井輝久、南 留美、健山正男、杉浦互国内感染者集団の大規模塩基配列解析 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。横浜

## H. 知的所有権の出願・取得状況

該当なし

## 愛媛県及び近郊における薬剤耐性 HIV の動向調査研究 ～四国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 高田 清式 愛媛大学医学部附属病院総合臨床研修センター・感染症内科教授

研究協力者 村上 雄一 愛媛大学医学部附属病院 感染症内科  
井門 敬子 愛媛大学医学部附属病院 薬剤部

### 研究要旨

四国における新規感染者の HIV 伝搬の現状を把握する目的で、未治療 HIV 感染者の薬剤関連変異について解析、検討した。本年度の解析では、明らかな耐性株はなくプロテアーゼ領域で二次変異を認めるのみであった。また逆転写酵素領域でも明らかな一次変異は認めなかった。なお、インテグラーゼ領域においては V 7 2 I が多くで検出され、薬剤耐性のレベルは低く有効性に影響はないと考えられている E 1 5 7 Q も 1 例で検出された。今後四国全体の HIV 診療の充実を目的に、さらに薬剤関連変異を多くの施設で検討・把握し、HIV に対する治療効果を上げていくことが必要と考える。

### A. 研究目的

本邦における薬剤耐性 HIV の動向把握調査において、四国ブロックにおける HIV 感染者の HIV 伝搬の現状を把握する目的で、新規あるいは未治療 HIV 感染者の薬剤関連変異について調査し、解析検討した。さらに、これらの調査研究を行うことにより、四国全体の HIV 診療の充実に繋がることが期待される。

### B. 研究方法

対象は、平成 24 年 1 月から 12 月までに愛媛大学医学部附属病院を受診した HIV 感染者のうち新規あるいは未治療者とし、うち 7 名を検査した。薬剤耐性検査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、検査は外部の委託機関と検査会社に委託した。

(倫理面への配慮)

患者には担当医から十分な説明を行った後、同意を得た者に検査を行った。なお、患者および関係者に対する人権の保護に配慮して行い、調査に協力できない場合も不利益にならないようにした。また本

研究は、愛媛大学医学部附属病院倫理委員会で承認を受けている。

### C. 研究結果

期間中の当院新規患者は、13 名であったがすでに 4 名は前医で治療を受けていた。残り 9 名の患者のうち 7 名に対して耐性検査を行った。問診と免疫学的検査結果からは、感染初期と判断される例はなかった。

耐性検査の結果(表 1)、プロテアーゼ領域では 7 例中全例で耐性に関する変異が見られたが、いずれも二次変異であった。それらのうち頻度の高い変異としては、L 6 3 P が 4 例、I 1 5 V、I 6 2 V、A 7 1 T、V 7 7 I などが 3 例に認められた。また、逆転写酵素領域では V 1 7 9 D が 2 例、A 9 8 S が 1 例に認められた。インテグラーゼ領域では、V 7 2 I が 3 例で、薬剤耐性のレベルは低く有効性に影響はないと考えられている E 1 5 7 Q も 1 例で検出された。なお、サブタイプ解析では、いずれも B であった。



表 1 薬剤耐性変異検査を行った新規未治療 HIV 感染者の解析 (平成 24 年)

	プロテアーゼ領域変異	判定	逆転写酵素領域変異	判定	インテグラーゼ領域変異	判定
1	A71T, V77I	S	—	S	V72I	S
2	I62V, L63P	S	—	S	V72I	S
3	V77I, I15V, I62V, L63P	S	—	S	V72I	S
4	L33F, M36I, L63P	S	V179D	S	—	S
5	L10I, I15V, I62V, A71T	S	—	S	—	S
6	I15V, G16E	S	V179D	S	—	S
7	L63P, A71T, V77I	S	A98S	S	E157Q	R*1

R\*1:RALに耐性

#### D. 考察

今回、平成 24 年における新規あるいは未治療 HIV 感染者の薬剤関連変異について調査し、解析検討した。プロテアーゼ領域では 7 例中全例、逆転写酵素領域で 3 例、インテグラーゼ領域では 4 例で薬剤関連変異が認められたが、二次変異などであり薬剤耐性に高度となるような変異は今回の調査研究では認められなかった。なお、インテグラーゼ領域での E 1 5 7 Q の変異は薬剤耐性のレベルは低く有効性に影響はないと考えられているが、今回初めて四国でも検出された。本症例は T D F / F T C および F P V / R T V にて加療し良好な治療効果を得つつあるが、今後の多くの症例の積重ねにより E 1 5 7 Q などの変異の新たな増加の有無を検討する必要があると考える。

当院では現在累計 120 名以上の HIV 診療経験があり (県内の大半の HIV 診療を担当)、愛媛県の中核拠点病院の立場にある。HIV 感染者・エイズ患者が全国的に増加する傾向にあるが、四国も例外ではなく、愛媛県においても新たに毎年 10 名前後の新規感染者・患者が報告される現状があり、HIV 診療の充実は早急に迫りつつある課題であると考えられる。今後四国全体の HIV 診療の充実を目的に、さらに薬剤関連変異を多くの施設で検討・把握し、HIV に対する治療効果を上げていくことが必要と考える。

#### E. 結論

平成 24 年における新規あるいは未治療 HIV 感染者の薬剤関連変異について調査し、解析検討した。今回の調査・研究を行った結果、プロテアーゼ領域では全例、逆転写酵素領域で 3 例、インテグラーゼ

領域では 4 例で薬剤関連変異が多くの例で認められた。四国でも HIV 感染者は増加が著しく、薬剤関連変異を多くの施設で検討・把握し、HIV に対する治療効果を上げていくことが必要と考える。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1) 論文発表

1. 高田清式、四国における HIV 感染症の動向と現状、医薬の門、52:272-275、2012

##### 2) 学会発表

1. 村上雄一、本間義人、末盛浩一郎、三好一宏、山之内純、東太地、薬師神芳洋、長谷川均、高田清式、安川正貴、愛媛大学医学部附属病院における HIV 診療の現況。第 86 回日本感染症学会総会、長崎、2012 年 4 月
2. 加藤高英、高田清式、三好一宏、本間義人、村上雄一、末盛浩一郎、安川正貴、総合内科受診を契機に診断された急性 HIV 感染症の 1 例。第 106 回日本内科学会四国地方会、徳島、2012 年 6 月
3. 末盛浩一郎、東太地、村上雄一、本間義人、長谷川均、安川正貴、高田清式、食道リンパ増殖性疾患から判明した高齢者 HIV 感染症 / AIDS の 1 例。第 106 回日本内科学会四国地方会、徳島、2012 年 6 月
4. 高田清式、村上雄一、三好一宏、末盛浩一郎、東太地、薬師神芳洋、長谷川均、安川正貴、高次機能障害が ART 治療にて改善した HIV 関連神経認知機能障害患者の 1 例。第 82 回日本感染症学会西日本地方会学術集会、福岡、2012 年 11 月
5. 高田清式、岸田修二、健山正男、仲里愛、田沼順

- 子、飯田敏晴、大金美和、山本政弘、HIV 関連神経認知症 (HAND)、診断の実際と今後の展開。第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会 共催セミナー 3、神奈川、2012 年 11 月
6. 松下修三、村上雄一、森岡悠、HAND (HIV 関連神経認知障害) とは? 第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会 共催セミナー (昼食付き) 3、神奈川、2012 年 11 月
7. 高田清式、村上雄一、辻井智明、西川典子、野元正弘、三好一宏、末盛浩一郎、東太地、薬師神芳洋、長谷川均、安川正貴、井門敬子、木村博史、荒木博陽、藤原光子、中村真理子、若松綾、岡本愛、西宮達也、髄液中の HIV-RNA 量、ネオプテリン量を経時的に測定した HIV 脳症の 1 治験例。第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会、神奈川、2012 年 11 月
8. 井門敬子、木村博史、田中守、荒木博陽、高田清式、6 年生薬学部長期実習における HIV 実習の検討。第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会、神奈川、2012 年 11 月
9. 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、松下秀三、健山正男、田邊嘉也、満屋裕明、岡慎一、初期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無作為に割付するオープンラベル多施設臨床試験: ETstudy 9 6 週結果。第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会、神奈川、2012 年 11 月

#### H. 知的所有権の出願・取得状況

なし



## 薬剤耐性ウイルス感染性分子クローンの整備

～国内 HIV-2 感染症例及び多剤耐性 HIV-1 感染症例からの標準株クローン整備～

研究分担者 巽 正志 国立感染症研究所エイズ研究センター

研究協力者 伊部史朗、梅木優子、永井美智、横幕能行、岩谷靖雄、杉浦 互

### 研究要旨

国内 HIV-2 感染症例 (CRF01\_AB: NMC307, NMC716, NMC842; Group A: NMC786) 及び国内多剤耐性 HIV-1 感染症例の保存血漿から MAGIC-5 細胞と磁気ビーズを用いてウイルスを分離し、In-Fusion Cloning Kit と HIV Trapping System により感染性分子クローンを樹立した。本クローン群は国内 HIV-2 感染遺伝子診断における標準株として、および HIV-1 多剤耐性獲得機序の解析に有用と期待される。

#### A. 研究目的

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

このような状況から国内 HIV-2 感染症例の詳細な分子遺伝学的な解析と、遺伝学的診断のための国内感染症例からの標準株の整備が望ましい。そこで本年度は昨年に引き続き複数の国内 HIV-2 感染症例からの磁気ビーズと MAGIC-5 細胞を用いたウイルス

分離とウイルス特性解析のため感染性分子クローンの樹立を試み、もって国内 HIV-2 感染診断における遺伝学的確定診断の為に標準株を整備することと、併せて多剤耐性 HIV-1 感染症例からのウイルス分離と感染性分子クローン樹立を行い薬剤耐性試験の為に基盤整備に資することを目的に研究を行った。

(倫理面への配慮)

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

#### B. 研究方法

対象とした国内 HIV-2 感染 5 症例のプロフィールの概要を昨年度に報告した NMC842 を含めて表 1 に示した。ガーナ人男性症例 NMC786 以外の症例