

は全てウェスタン・ブロット検査で HIV-2 診断が確定できたが、邦人女性症例 NMC678 では HIV-2 に特化した RT-PCR 法で増幅を認められずウイルス量は不明であった。これらの症例では通常の PBMC 共培養法でウイルス分離を試みたが明確に分離を確認できなかった。そこで名古屋医療センターで感染者 PBMC DNA からウイルスゲノムの前半部と後半部を PCR 法で増幅し、両者を繋げて分子クローンを得て解析したところ、NMC307, NMC716 および NMC842 は HIV-2 組換え流行株 CRF01_AB 感染症例であり、NMC786 は Group A 感染症例と判明した。NMC307, NMC716 および NMC786 症例は CD4 count 低値で AIDS 指標疾患を発症し HIV-2 感染症例としては病態進行が早いことが注目された。

一方、多剤耐性 HIV-1 感染症例のプロファイルを表 2 に示す。それぞれ IN あるいは RT 領域に特徴的な薬剤耐性変異が認められ、感染性分子クローンが得られれば、これらの薬剤耐性獲得機序の解析の進展が期待される感染症例である。

今回ウイルス分離に用いた血漿は、受診時に採取し 4 年から 8 年間凍結保存したものである。磁気ビーズと MAGIC-5 細胞を用いたウイルス分離は以下の様に行った。まず感染者血漿 200 μ l に 20 μ l の磁気ビーズ (Viro-Adembeads : Ademtech com 商品コード 07010 フナコシ扱い) を添加し、回転ローテーターで室温 20 分程緩やかに混合した。磁気スタンドで磁気ビーズ分離し、PBS で洗浄し、培養液に再懸濁して、予め 24 穴プレートに単層培養した MAGIC-5 細胞に添加し、培養プレートを 24 穴プレート用磁気プレートに重層して 1 時間培養した。そ

の後磁気プレートを除いて、顕微鏡下で HIV-1/2 感染による細胞変性作用が出現するまで培養を続けた。培養開始後 2 週間ほどで細胞変性作用が認められ、MAGIC-5 細胞測定による感染価が 10^7 bfu/mL (Blue Focus Unit / mL) に達した。改めて新鮮な MAGIC-5A 細胞に M.O.I = 0.05 で感染させ 2 日後に HIV-1/2 proviral genome を含む感染細胞ゲノムを精製し Long PCR 法の鋳型試料とした。

HIV-1/2 ウイルスのクローニングおよび Long PCR と全長ゲノム Plasmid 構築は先に報告した HIV 感染価測定系 Indicator 細胞 MAGIC-5/HeLa4.5 nEGFP 細胞株を用いた HIV ウイルスクローニングと感染性クローンの構築系 (HIV Trapping System ; HIV 捕捉実験系) により行った。まずそれぞれの検体ウイルスの provirus 5' LTR 配列に則した Primer と HIV-1 or 2 で高度に保存されている PBS 領域の配列で 5' LTR を増幅し、Cloning Vector pMT1 に組み込み pMT1/LTR を構築した。Not I 切断した pMT1/LTR を鋳型に、HIV-1/2 PBS 領域と pMT1 Not1 下流の配列と HIV-1/2 poly A 下流の 15 塩基が相同する配列で pMT1/LTR Amplicon を増幅した。一方、HIV-1/2 PBS から Poly A 下流領域までの Near Full-length 9.5 ~ 10 Kbp Amplicon を先に精製した感染細胞ゲノムを鋳型に増幅し、アガロースゲル電気泳動後精製し、先の精製した pMT1/LTR と In-Fusion Cloning Kit を用いて全長クローンを得た。得られた全長クローンは HeLa4.5nEGFP 細胞と 293FT 細胞の混合培養に Transfection し、その 2 日後の培養上澄を MAGIC-5A 細胞に接種し感染性を確認した。感染性が確認された 50 以上のクローンか

表 1 HIV-2 国内感染症例

患者コード	採血年	性別	年齢(歳)	国籍	危険因子	CD4カウント	ウイルス量 (Copies/mL)		ウイルス分離		ウェスタンブロット		日和見感染
							HIV-1	HIV-2	PBMC	MAGIC-5	HIV-1	HIV-2	
NMC307	2004	M	28	ナイジェリア	異性間性交渉	241	<50	350,000	陰性	陽性	判定保留	陽性	結核
NMC678	2007	F	28	日本	異性間性交渉	883	<50	検出せず	陰性	陰性	判定保留	陽性	
NMC716	2007	M	36	ナイジェリア	異性間性交渉	4	<50	680,000	陰性	陽性	判定保留	陽性	カンジダ症
NMC786	2008	M	38	ガーナ	異性間性交渉	1	<50	60,000	陰性	陽性	陰性	判定保留	カンジダ症、サイトメガロ感染症
NMC842	2008	F	34	日本	異性間性交渉	110	<50	25,000	陰性	陽性	陰性	陽性	

Ibe, S et al J Acquir Immune Defic Syndr 2010;54:241 - 247

表 2 HIV-2 感染性分子クローン プロファイル

患者コード	感染性分子クローン	全ゲノム塩基数	グループ
NMC307	04JP_NMC307-20, -62	10,222bp	CRF01_AB
NMC716	07JP_NMC716-01, 03	10,213bp	CRF01_AB
NMC786	08JP_NMC786-41, -43	10,301bp	A
NMC842	08JP_NMC842-10, -23	10,240bp	CRF01_AB

表 3 多剤耐性症例プロフィール

症例番号	採血年月	主な治療歴	特徴的な耐性変異	ウイルス量	MAGIC-5によるウイルス分離
NMC127	2009.1	TDF + FTC + RAL	IN:G140S, Q148H	220,000	分離
NMC843	2009.12	TDF + FTC + RAL	IN:N155H	2,300	分離できず
NMC851A	2009.1	Narve	IN:None	86,000	分離
NMC851B	2011.2	TDF + FTC + RAL	IN:Y143C	9,640	分離
NMC851C	2011.4	TDF + FTC + RAL	IN:Y143A	88,200	分離
NMC104	2008.5	TDF + 3TC + d4T + ATV + FPV + RTV	RT: 69 insertion	4,000 - 44,000	分離

表 4 多剤耐性ウイルス由来感染性分子クローンプロフィール

感染性分子クローン	全ゲノム塩基集	subtype	耐性変異			
			PI	NRTI	NNRTI	INI
p09JP_NMC127-07 and -27	9,681bp	B	V32I, M46I, I47V, I54L, I84V, L10I, L33F, A71V	M41L, D67N, T69N, K70R, M184V, T215F, K219Q	N348I	G140S, Q148H
p09JP_NMC851A-14 and 18	9,721bp	B	M46I	None	None	None
p09JP_NMC851B-21 and 29	9,721bp	B	M46I	None	None	None
p11JP_NMC851C-13 and 48	9,721bp	B	M46L, A71T	K65R, M184V	None	T97A, Y143A
p08JP_NMC104-01 and 09	9,661bp	B	V32I, M46I, I54L, V82T, L90M, L10I, K43T, A71V, G73S, T74P, L89V	M41L, A62V, T69N-INS, M184I, L210W, T215Y	V90I, K103S	None

ら任意に 2 クローンを選択し Transposon を用いた GPS-1 Genome Priming System (NEB) と Primer Walking 法で全長ゲノムの配列を決定した。全ゲノム配列が決定されたクローンについて HIV-1/2 グループの参考クローンとともに全ゲノム配列を対象に系統樹解析を行った。

C. 研究結果

昨年度報告した症例 NMC842 は HIV-2 では初めての国内感染症例と報告されている。もう一例の邦人女性感染症例 NMC678 は国外での感染が疑われる症例であるが、試みた限りのプライマーセットでは遺伝子増幅が得られず遺伝子解析が出来なかった。血清学的には HIV-2 の単独感染であるが、今回の MAGIC-5 細胞の磁気ビーズ法によってもウイルス分離に至らなかった。CD4 細胞カウントが高く保たれていることから、HIV-2 感染例で報告されているように血中ウイルス量が極めて少ないことが推測された。残りの 2 人の Nigeria 男性症例 (NMC307 と NMC716) と一人の Ghana 男性症例 (NMC786) では低い CD4 細胞カウントと高いウイルス量を示し、それぞれ結核、カンジダ症、サイトメガロウイルス感染などエイズ指標症候群を発症していることから、HIV-2 感染症では希な病態進行が早い、特異な症例であった。これら 3 症例の保存血漿から

MAGIC-5 細胞の磁気ビーズ法によって、高い感染価のウイルス分離が可能であった (表 1)。

それぞれの分離ウイルスを感染させた MAGIC-5A 細胞ゲノムを鋳型に全長ゲノムクローンを In-Fusion Cloning Kit により構築し、HIV Trapping System ; HIV 捕捉実験系で感染性分子クローンを選別した。それぞれのウイルスについて感染性が確認された 50 以上のクローンから 2 クローンを選択し、全ゲノム配列を決定した (表 2)。決定された全ゲノム配列をもとに HIV Database で Blast Search すると、想定どおり第一位にそれぞれのウイルスを感染者末梢血ゲノムから増幅した塩基配列がヒットし、塩基配列の相同性は 97% 以上であり、塩基配列の違いの多くは env 領域に集積していた。これらの感染性分子クローン全ゲノムの系統樹解析により 2 人の Nigeria 男性症例 (NMC307 と NMC716) と昨年報告した邦人女性症例 (NMC842) は HIV-2 CRF01_AB 組換え体の prototype である Cote d'ivoire で分離された HIV7312A の系統に Cluster され、一人の Ghana 男性症例 (NMC786) のウイルスは HIV-2 Group A 系統に Cluster された (図 1)。これら NMC307, NMC716 および NMC842 のクローンのゲノム構造は HIV-2 CRF01_AB 組換え体の共通構造を示し (図 2)、この組換え体が既に西アフリカ地域のみならず、日本を含め世界中の広い範囲に浸淫

Phylogenetic Analysis of infectious HIV-2 clones

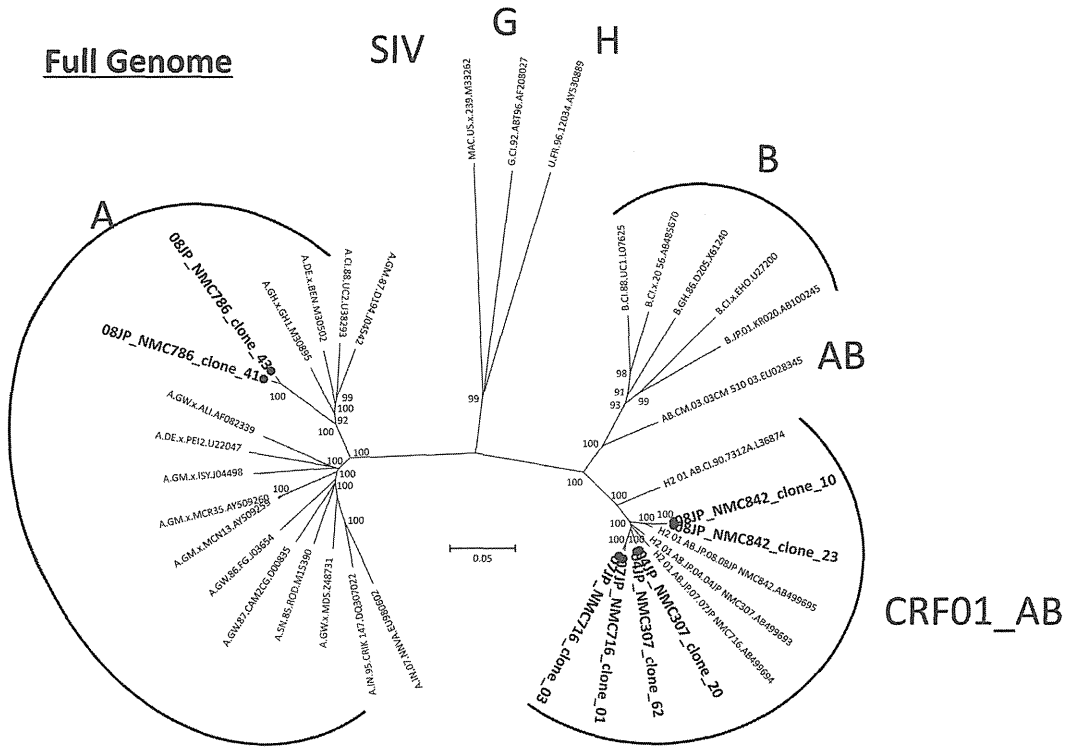


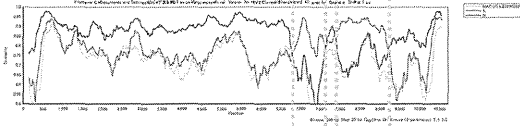
図 1

Genome Structure of infectious HIV-2 clones

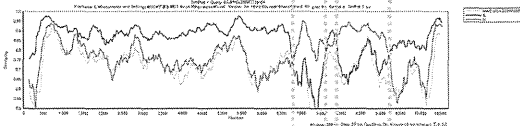
HIV-2 CRF01_AB
consensus



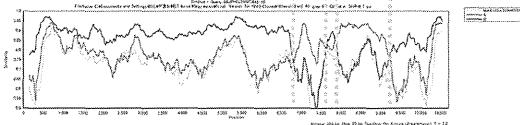
04JP_NMC307_
clone_20



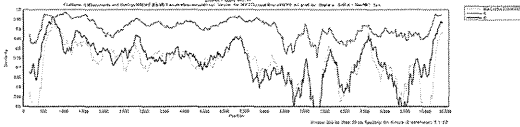
07JP_NMC716_
clone_01



08JP_NMC842_
clone_10



08JP_NMC786_
clone_41



CRF01_AB

Group A

図 2

Profile of multi-drug resistant cases

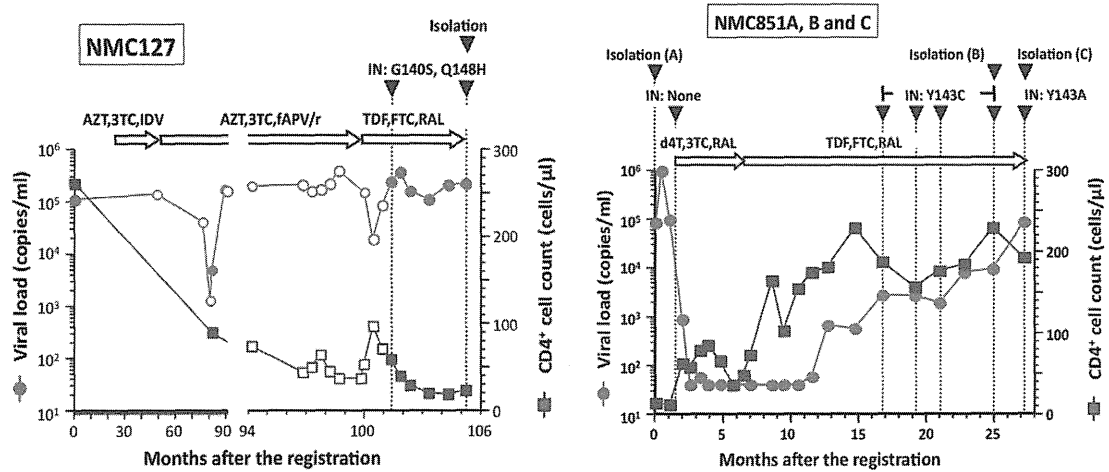


図 3

している事を示唆している。

2人のNigeria男性症例(NMC307とNMC716)由来感染性分子クローンからTransfectionで得られたウイルスはMAGIC-5A細胞で速やかに増殖し、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、昨年報告した邦人女性症例(NMC842)由来感染性分子クローン由来ウイルスと同様に、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単独で膨満して細胞死するSingle Cell Deathによる細胞変性作用が顕著であった。

一方、今年度分離を試みたHIV-1多剤耐性ウイルス症例は主にTDF, FTC及びRALの多剤治療によっても血中ウイルス量の抑制が認められなかった3症例(NMC127, NMC843, NMC851)で(表3)、他にRT領域に特異な挿入変異が認められた症例NMC104も含めた。NMC851とNMC127の治療歴およびCD4カウントとウイルス量の継時的な動態を図3に示す。症例NMC851は図で示すように3点の採血検体からのウイルス分離を試みた。ウイルス量が少ない症例NMC843以外の5検体からMAGIC-5の磁気ビーズ法によってウイルスが分離できた。それぞれの分離ウイルスを感染させたMAGIC-5A細胞ゲノムを鋳型に全長ゲノムクローンをIn-Fusion Cloning Kitにより構築し、HIV Trapping System; HIV捕捉実験系で感染性分子クローンを選別した。それぞれのウイルスについて感染

性が確認された50以上のクローンから2クローンを選択し、全ゲノム配列を決定した。血漿検体の遺伝子解析によって認められた特異的な耐性変異は、それぞれの感染性分子クローンの対応する遺伝子領域に認められたが、症例NMC851BのIN領域のY143C変異はクローンには認められなかった(表4)。症例NMC127とNMC104由来クローンには、特徴的な耐性変異に加えて多彩な薬剤耐性変異が蓄積していた。

D. 考察

本年度は昨年度報告した初めての国内感染例NMC842由来感染性分子クローンに加えて、名古屋地域で検出された4症例の血漿から、MAGIC-5A細胞/磁気ビーズ法によるウイルス分離を試み、3症例からウイルスが分離できた。分離出来なかった邦人女性症例NMC678の検体は、CD4カウントが高く、血漿中のウイルス遺伝子が、様々なプライマーセットを用いた試みでも特異的増幅が認められなかったことから、これまで報告されてきた病原性の低いHIV-2感染症例の典型である可能性が高い。これらのウイルス分離の成績から、ある程度のウイルス量がある検体においてはMAGIC-5A細胞/磁気ビーズ法は、HIV-1のみならずHIV-2においても有効なウイルス分離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。樹立した感染性分子クローンの全ゲノム塩基配列による系統樹解析から2名のナイジェリア男性症例から分離したクローンは昨年度に報告した NMC842 と同様に CRF01_AB 組換体であった。一方ガーナ男性症例 NMC786 由来クローンはグループ A に属していた。樹立した CRF01_AB に属する感染性分子クローン由来のウイルスは分離ウイルスの特性を保持していた。MAGIC-5A 細胞を標的細胞とした感染により幾つかの特徴を示していた。昨年度分離した NMC842 由来ウイルスと同様に、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軽度で、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、ウイルス増殖は高かった。このウイルスの特徴的な性状は、これら CRF01_AB 組換体感染症例が、いずれも HIV-2 感染例としては病態進行が早く、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ウイルスである可能性が高い。このような特徴を示す HIV-2 の感染性分子クローンが複数得られたことは、国内感染症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 のグループ間の組換え体形成が HIV-2 の病原性発現にどのように影響しているのか、その病理発生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。

一方、主に TDF, FTC 及び RAL の多剤治療によっても血中ウイルス量抑制が認められなかった3症例と RT 領域に特異な挿入変異が認められた症例から磁気ビーズ/MAGIC-5A 細胞法によりウイルス分離を行い、感染性分子クローンを樹立した。症例 NMC851B 以外の分離ウイルスから血漿による遺伝子解析で検出された特徴的な耐性変異を保持した感染性分子クローンを樹立することが出来た。症例検体 NMC851B の IN 領域の特徴的な耐性変異 Y143C を有するクローンが得られなかったのは、この耐性変異を持つヴァリアントのフィットネスが低く、培養分離ウイルスは検体中に低い比率で残存していた、よりフィットネスが高い Y143I がドミナントになった可能性が考えられる。ウイルス量が少なかった症例 NMC843 からはウイルス分離が出来なかった。このことは磁気ビーズ/MAGIC-5A 細胞法によるウイルス分離には、ある程度のウイルス量が必須なのか、あるいは「生きた」ウイルスがごく少数検体に含まれていればウイルス分離が可能なのか、そ

の検証には採血後凍結せずに新鮮な検体で試みる必要がある。今回樹立したクローン群は TDF, FTC 及び RAL による多剤治療によって抑制できない耐性機序獲得の解析に有用なツールを提供し、今後の解析が期待される。

E. 結論

複数の HIV-2 国内感染症例および多剤耐性 HIV-1 症例から磁気ビーズ/MAGIC-5A 細胞によってウイルスを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、それぞれ国内 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り、HIV-1 多剤耐性獲得機序解析に有用と期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 原著論文

1. Hoque SA, Ohtsuki T, Tatsumi M, Shimizu N, Islam S, Jinno-Oue A, Hoshino H. Lack of the trans-receptor mechanism of HIV-1 infection: CD4- and coreceptor-independent incorporation of HIV-1-resistant cells into syncytia induced by HIV-1. *Microbes Infect.* 2012 Apr;14(4):357-68.
2. Koyama T, Sun B, Tokunaga K, Tatsumi M and Ishizaka Y. DNA damage enhances integration of HIV-1 into macrophages by overcoming integrase inhibition. *Retrovirology.* 2013 Feb 21 10:21.

H. 知的所有権の出願・取得状況

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, 島袋未美², 上地幸平²,
宮城綾乃², 名護珠美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 2012 年 1 月 1 日～2012 年 12 月 31 日で、同期間に 25 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 11 人認められた。Pro 領域は 14 人に認められた。台湾での感染と思われる Pro 領域で多くの耐性遺伝子を獲得したのが 1 名いた。

当院の初診患者の届出地は 30% が県外である。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。

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（2012 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) IAS-USA パネル

3) スタンフォード薬剤耐性データベース

8. 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 (表 1, 表 2)

対象期間内に当院外来を受診した HIV/AIDS 患者は 25 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

表 1 2012 年 新規患者背景と耐性関連遺伝子

No.	age	stage	CD4 cell	HIV-VL	sub-type	TROPISM ASSAYS	RT	PI	In
1	19	HIV	363	241000	AE	X4	V179L, L210M	H15V, K20R, M36L, H69K, V82I, L89M, I93L	ND
2	29	HIV	580	12300	B	R5	K103R	I62V, L63A, V77I, I93L	V72I
3	31	HIV	568	3450	B	R5	M184V	L10I, D30N, L33F, M36L, M46I, L63P, A71T, V82A, N88D	ND
4	33	HIV	444	338000	B	ND	D67N/D	L63A, I93L	V72I
5	28	HIV	375	265	B	R5	335D, A98S, K101Q	H15V, L63P	V72I, L74M
6	34	HIV	307	771	B	R5	ND	V77I	V72I
7	36	HIV	187	1430	B	R5	ND	H15V	V72I
8	46	HIV	57	189000	B	ND	ND	I62V, L63P, V77I	V72I
9	40	AIDS	157	84700	B	R5	K103R, E138A, V179I	L10I, L33V, I62V, L63P, I64V, H69Y, V77I, I93L	V72I
10	36	AIDS	84	2000000	B	R5	A98S, V179I	G16E, M36I/M, I62V, L63T/H/A/V, H69K, V77I/V	V72I
11	40	AIDS	67	3800000	B	X4	V179I/V, T215D, M230M/L	H15V, D60E, L63P	V72I
12	46	AIDS	38	195000	B	R5	M230M/L	H15V, I62V, L63A, A71T, V77I, I93L	V72I
13	33	AIDS	66	440000	B	R5	V179I, T215D, M230M/L	I62V, L63T/A, V82I	V72I
14	33	AIDS	6	379000	B	R5	M230M/L	H15V, I62V, L63A, A71T, V77I, I93L	ND

ND: not detect

表 2 一年間のまとめ

対象期間は2012年1月1日～12月31日

12月31日までにHIV薬剤耐性検査を完了した14人。

◆ステージ : HIVキャリアは8人、AIDSは6人

◆サブタイプ: AEが1人、Bが13人

◆TROPISM ASSAYS R5 10人, X4 2人, 増幅無し 2人

◆感染経路 全員 MSM

<2012年度新規登録患者の薬剤耐性遺伝子変異結果>

領域	薬剤耐性遺伝子変異	患者数
RT	D67N/D	1
	E138A, M184V, M230L	2
Pro	L10I/F, K20R, D30N, L33F/V, M46I, D60E, I64V, H69K, V82A, N88D, L89M	1
	M36I, V82I,	2
	G16E, A71T	3
	I15V	4
	V77I, I93L	6
	I62V, L63P	8
INT	V72I	12

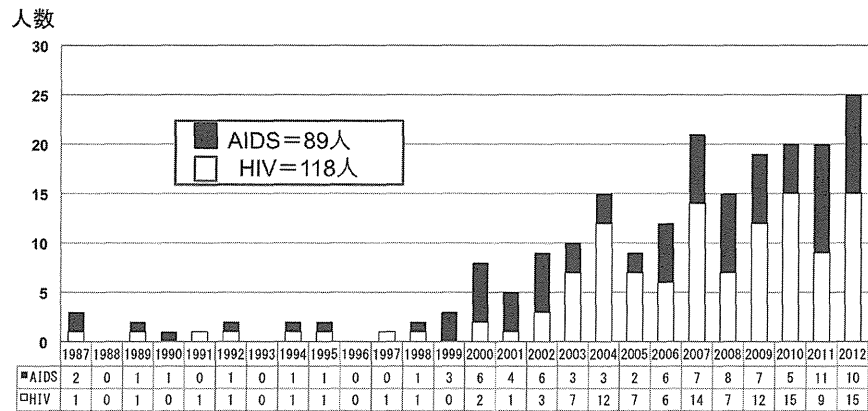


図 1. 当院の年度別 HIV・AIDS 患者数の推移
2012/12/31 現在 N = 207

果を表 1 に示した。感染経路は 14 人全員が同性間であり、病期は HIV キャリアーが 8 人、AIDS が 6 人であった。性別は x 全員男性であった。サブタイプは 1 人が AE で残り 13 人は B であった。平均年齢は 34.6 歳であった。CD4 数の平均値は HIV キャリアーは $360.1 \text{ cells}/\mu\text{l}$ 、AIDS は $69.7 \text{ cells}/\mu\text{l}$ であった。一方 HIV-RNA 量の平均値は、HIV キャリアーは $9.8 \times 10^4 \text{ コピー}/\text{ml}$ ($2.65 \times 10^2 \sim 3.4 \times 10^5$)、AIDS は $1.1 \times 10^6 \text{ コピー}/\text{ml}$ ($1.9 \times 10^5 \sim 3.8 \times 10^6$) であった。

薬剤耐性 HIV-1 遺伝子変異では RT 領域では耐性に関与する変異 D67N/D、E138A、M184V、M230L が認められた。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。台湾での感染が疑われる 1 名では RT 領域で M184V、Pro 領域では L10F、D30N、L33F、M36L、M46I、L63P、A71T、V82A と Darunavir を除く全ての PI 剤に耐性を示した。

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 2012 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国外感染者において多数の耐性遺伝子を獲得した患者を検出した。

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。

E. 結論

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. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1) 原著論文

- Hibiya K, Tateyama M, Niimi M, Teruya H, Karimata Y, Hirai J, Tokeshi Y, Haranaga S, Tasato D, Nakamura H, Ihama Y, Haroon A, L Cash H, Higa F, Hokama A, Ogawa K, Fujita J. Acquired Immune-deficiency Syndrome with Focal Onset of Mycobacterium avium Infection Displaying a Histological/Genetic Pattern of Disseminated Mycobacteria. Intern Med 51(21):3089-3094. 2012.

2) 学会発表

- 健山正男, 田里大輔, 仲村秀太, 仲松正司, 宮城一也, 原永修作, 比嘉太, 藤田次郎. HIV に関連した神経認知障害の臨床的検討. 第 86 回日本感染症学会総会・学術講演抄録 86:326, 2012.
- 健山正男, 比嘉太, 田里大輔, 宮城一也, 原永修作, 藤田次郎. 行政と連携し集団予防内服により 2 次感染を抑制できた劇症型髄膜炎菌性肺血症症例. 第 60 回日本化学療法学会学術集会プログラム・抄録集, 60:287, 2012.
- 前城達次, 田中照久, 平田哲生, 田里大輔, 比嘉太,

- 健山正男, 金城福則, 藤田次郎. HIV/HBV 重複感染症における Tenofovir 及び Emtricitabine による抗 HBV 効果の検討. 第 86 回日本感染症学会総会・学術講演抄録 86 : 437, 2012.
4. 田里大輔, 健山正男, 仲村秀太, 古堅誠, 宮城一也, 原永修作, 屋良さとみ, 比嘉太, 藤田次郎. AIDS 患者に発症した非結核性抗酸菌症 5 例の検討. 第 87 回日本結核病学会総会講演集 87 : 309, 2012.
 5. 田里大輔, 健山正男, 仲村秀太, 狩俣洋介, 仲松正司, 金城武士, 古堅誠, 宮城一也, 前城達次, 原永修作, 屋良さとみ, 比嘉太, 藤田次郎. 赤痢アメーバ大腸炎・肝膿瘍に腸結核および肝結核を合併した AIDS の 1 例. 第 82 回日本感染症学会西日本地方会学術集会プログラム・講演抄録集, 225, 2012.
 6. 山腰晃治, 田里大輔, 健山正男, 仲村秀太, 狩俣洋介, 仲松正司, 金城武士, 古堅誠, 宮城一也, 原永修作, 屋良さとみ, 比嘉太, 藤田次郎. HIV 感染症に合併した治療に難渋した陰部単純疱疹 (HSV-1) の 1 例. 第 82 回日本感染症学会西日本地方会学術集会プログラム・講演抄録集, 227, 2012.
 7. 狩俣洋介, 比嘉太, 平井潤, 仲村秀太, 田里大輔, 仲松正司, 玉寄真紀, 金城武士, 宮城一也, 原永修作, 健山正男, 藤田次郎. ヒト・メタニューモウイルス感染症に合併した肺炎 24 例の臨床的検討. 第 82 回日本感染症学会西日本地方会学術集会プログラム・講演抄録集, 288, 2012.
 8. 新里彰, 宮城一也, 稲嶺盛史, 田里大輔, 金城武士, 玉寄真紀, 原永修作, 比嘉太, 健山正男, 藤田次郎. インフルエンザ肺炎との鑑別を要したサイトメガロ、ニューモシスチス合併肺炎の 1 症例. 第 69 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プログラム・講演抄録, 119, 2012.
 9. 平井潤, 原永修作, 狩俣洋介, 仲村秀太, 上地華代子, 仲松正司, 宮城一也, 屋良さとみ, 比嘉太, 健山正男, 藤田次郎. 遺伝子解析で明らかとなったマクロライド耐性
 10. 仲村秀太, 健山正男, 田里大輔, 前田サオリ, 宮城京子, 原永修作, 比嘉太, 藤田次郎. 当院 HIV 感染者における骨代謝以上の有病率とその危険因子に関する検討 - 第 2 報 -. 第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会プログラム・抄録集, 14 : 455, 2012.
 11. 仲里愛, 富永大介, 健山正男, 田里大輔, 仲村秀太, 宮城京子, 前田サオリ, 原永修作, 比嘉太, 石内勝吾, 藤田次郎. HAND における前頭葉機能障害と精神症状の関連. 第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会プログラム・抄録集, 14 : 409, 2012.
 12. 仲里愛, 健山正男. HIV 関連神経認知障害 (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・総会プログラム・抄録集, 14 : 199, 2012.
 13. 健山正男, 井濱容子, 深沢真希, 田里大輔, 仲村秀太, 仲里愛, 原永修作, 宮城一也, 比嘉太, 藤田次郎, 宮崎哲次, 宮城京子, 前田サオリ. 沖縄県の法医解剖症例における HIV 感染率の前方視的検討. 第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会プログラム・抄録集, 14 : 412, 2012.
 14. 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, 南留美, 健山正男, 杉浦瓦. 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・総会プログラム・抄録集, 14 : 211, 2012.
 15. 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, 大屋正義, 田邊嘉也, 白阪琢磨, 小島洋子, 藤井輝久, 高田昇, 山元政弘, 松下修三, 藤田次郎, 健山正男, 杉浦瓦. 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・総会プログラム・抄録集, 14 : 245, 2012.
 16. 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, 鯉淵智彦, 内藤俊夫, 吉田正樹, 立川夏夫, 横幕能行, 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/リトナビルを固定シエブ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 : ETstudy96 週結果. 第 17. 前田サオリ, 宮城京子, 健山正男, 石川章子, 田里大輔, 仲村秀太, 石郷岡美穂, 大城市子, 吉本なるよ, 新江裕貴, 諸見牧子, 仲里愛, 下地孝子, 藤田次郎. 定期受診が遵守できない患者の要因の検討. 第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会プログラム・抄録集, 14 : 361, 2012.
 18. 宮城京子, 前田サオリ, 健山正男, 石川章子, 田里大輔, 仲村秀太, 石郷岡美穂, 大城市子, 吉本なるよ, 新江裕貴, 諸見牧子, 仲里愛, 下地孝子, 藤田次郎. 沖縄県におけるコーディネーターの活動状況. 第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会プログラム・抄録集, 14 : 373, 2012.
 19. 仲村秀太, 健山正男, 田里大輔, 平井潤, 宮城一也, 狩俣洋介, 金城武士, 玉寄真紀, 仲松正司, 古堅誠, 原永修作, 比嘉太, 藤田次郎. S 状結腸穿孔から右大腿部筋膜間膿瘍を併発した一例. 第 82 回日本感染症学会西日本地方会学術集会プログラム・講演抄録, 244, 2012.
- H. 知的所有権の出願・取得状況
該当なし

HIV 存在下における HBV 及び HCV 遺伝子解析

～ HIV 存在下における HBV 治療法の検討～

研究分担者 田中 靖人 名古屋市立大学大学院医学研究科 教授

研究協力者 渡邊 綱正 名古屋市立大学大学院医学研究科 講師

研究要旨

HIV-1 感染者の約 6% に B 型肝炎ウイルス (HBV) との重感染が検出される。現在の HBV 治療は HBV-DNA のコントロールのみではなく HBs 抗原陰性化が目標とされ、NA 剤のみでは HBs 抗原陰性化に至る例は限られている。抗 HBV 活性を有する NA (テノフォビル; TDF) を含む抗 HIV 療法 (ART) 開始後も HBs 抗原持続陽性で推移する HIV/HBV 重複感染例に対して、PEG-IFN を追加する NA add-on PEG-IFN 併用療法による HBs 抗原セロコンバージョンの可能性を検討した。対象は 4 例で、いずれも ART 開始後に免疫再構築による肝炎を発症したが HBs 抗原陰性化までは至らず、TDF を含んだ ART が 2 年以上継続投与されていた。PEG-IFN 併用開始直前の HBs 抗原量は、2 例が低値、2 例は高値であった。併用開始前 HBs 抗原低値の 2 例では、当初の目的である HBs 抗原陰性化を呈し、さらに 1 例では HBs 抗体陽性 (いわゆる HBs のセロコンバージョン) となった。

また、併用前の HBs 抗原高値例において PEG-IFN の増量 (90 μ g から 180 μ g) による治療効果の増強を認めた。2 年以上の長期にわたる ART を行った HIV 合併 HBV 例のうち、HBV 遺伝子型 A で HBs 抗原が陰性化しない 4 症例に対する NA add-on PEG-IFN 併用療法は HBs 抗原陰性化を目指す治療方針に合致し、また HIV 耐性ウイルス出現を 1 例も認めることなく、今後の有用性が示唆された。

A. 研究目的

本邦のデータでは、HIV-1 感染者の約 6% に B 型肝炎ウイルス (HBV) との重感染が検出される。HIV/HBV 重複感染症例に対する治療は、HIV 単独感染例と異なり、抗 HBV 活性を有する核酸アナログ製剤 (NA) が必須とされる。一方、現在の HBV 治療は HBV-DNA のコントロールのみではなく HBs 抗原陰性化が目標とされ、NA 剤のみでは HBs 抗原陰性化に至る例は限られている。そこで、HBs 抗原陰性化率が高いとされるペグインターフェロン製剤 (PEG-IFN; ペガシス) を用い HIV/HBV 重複感染症例に対する治療効果を検証し、その有効性を明らかにすることを今回の目的とした。

B. 研究方法

抗 HBV 活性を有する NA (テノフォビル; TDF) を含む抗 HIV 療法 (ART) 開始後も HBs 抗原持続陽性で推移する HIV/HBV 重複感染例に対して、PEG-IFN を追加する NA add-on PEG-IFN 併用療法による HBs 抗原セロコンバージョン (SC) の可能性を検討した。HIV 合併 HBV 遺伝子型 A (HBV/A)

と診断後、抗 HIV 療法 (TVD を含めた ART) を開始し良好な HIV コントロールを示すが、2 年以上 HBs 抗原陽性で推移したため PEG-IFN を add-on した全 4 症例を対象とした。HIV 血清マーカーおよび HBV 血清マーカーを経時的に評価し、NA add-on PEG-IFN 併用療法による臨床的な治療効果を判定した。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、使用にあたっては連結不可能匿名化を行う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めないこととし、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

PEG-IFN の add-on 療法を開始した HIV 合併 HBV/A の 4 症例の臨床背景は、全例が男性かつ MSM (men who have sex with men) で 年齢分布は 2 例が 30 歳代、1 例が 40 歳代、残り 1 例が 60 歳代であった。いずれのケースも ART 開始後に免疫再構築による肝炎を発症したが HBs 抗原陰性化までは至らず、TDF を含んだ ART が 2 年以上継続投与されていた。PEG-IFN 併用開始直前の HBs 抗原量は、2 例が低値、2 例は高値を呈していた。全例で PEG-IFN 併用療法による HBs 抗原低下効果を認め、特に併用開始前 HBs 抗原低値の 2 例では、いずれも当初の目的である HBs 抗原陰性化を呈し、さらに 1 例では HBs 抗体陽性 (いわゆる HBs のセロコンバージョン) となった。また、併用前の HBs 抗原高値例において PEG-IFN の増量 (90 μ g から 180 μ g) による治療効果の増強を認めた。通常では PEG-IFN 投与は 1 年間を目安に行われ、さらにその効果は持続することが報告されている。今回 PEG-IFN を add-on した 4 例の長期治療効果は、現在も継続して観察中である。

D. 考察

HIV 感染に対する ART の導入により HIV 感染例の生命予後は大幅に改善したが、今後は非 AIDS 関連死、特に発癌リスクの増加などが新たな問題が挙げられる。HBV 感染症は、長期予後として肝臓癌を発症することが知られている。この肝臓癌のリスク因子は、これまでは HBV-DNA 量のみ報告があったが、現在では HBs 抗原量もあらたな発癌リスク因子として認識され始めている。TDF を含んだ ART のみで HBs 抗原陰性化が得られない例では、長期的な発癌の問題が解消されない。したがって、今回の PEG-IFN を add-on する治療法により HBs 抗原を陰性化することができれば、HIV/HBV 重複感染例の予後を改善させることが期待される。また、HIV/HBV 重複感染に対する第一選択薬である TDF には長期使用に伴う腎機能障害の副作用が懸念されるため、PEG-IFN 併用により HBs セロコンバージョンが得られれば HBV に対する治療効果を考慮しない ART に変更が可能となる。さらに、治療薬選択の幅が広がることにより、HIV 耐性ウイルス出現リスクの軽減にも繋がると考える。

E. 結論

2 年以上の長期にわたる ART を行った HIV 合併 HBV 例のうち、HBV 遺伝子型 A で HBs 抗原が陰性化しない 4 症例に対する NA add-on PEG-IFN 併用療法は、HBs 抗原陰性化を目指す治療方針に合致し、

また HIV 耐性ウイルス出現を 1 例も認めることなく今後の有用性が示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1) 原著論文

1. Watanabe T, and Tanaka Y. Reactivation of hepatitis viruses following immunomodulating systemic chemotherapy. *Hepatology Research* 2012; in press.
2. Zhou B, Wang Z, Yang J, Sun J, Li H, Tanaka Y, Mizokami M, Hou J. Novel evidence of HBV recombination in family cluster infections in western China. *PLoS One*. 2012;7(6):e38241.
3. Iijima S, Lee YJ, Ode H, Arold ST, Kimura N, Yokoyama M, Sato H, Tanaka Y, Strebel K, Akari H. A noncanonical mu-1A-binding motif in the N terminus of HIV-1 Nef determines its ability to downregulate major histocompatibility complex class I in T lymphocytes. *J Virol*. 2012;86(7):3944-51.

2) 学会発表雑誌名

1. 肝臓、53 巻 Suppl.3, PA95、B 型肝炎診療「ウイルス増殖と免疫反応から」HIV 治療に伴う B 型肝炎免疫再構築症候群の検討、渡邊 綱正、杉浦 互、田中 靖人
2. 日本エイズ学会誌、14 巻 4 号、P404、HIV 合併 HBV 感染例に対するペグインターフェロン治療、渡邊 綱正、横幕 能行、今村 淳治、杉浦 互、田中 靖人
3. 肝臓、53 巻 Suppl.2, PA741、B 型肝炎既往感染患者における HBs 抗体価の性差、飯尾 悦子、渡邊 綱正、松浦 健太郎、日下部 篤宣、新海 登、藤原 圭、宮木 知克、野尻 俊輔、城 卓志、田中 靖人
4. 肝臓、53 巻 Suppl.2, PA678、HIV 合併 HBV 感染例において核酸アナログ add-on ペグインターフェロン併用療法による HBs 抗原セロコンバージョンの可能性、渡邊 綱正、横幕 能行、杉浦 互、田中 靖人

H. 知的所有権の出願・取得状況

該当なし

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 2012～

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 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

研究要旨

平成 24 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。患者はすべて日本人男性 (20 歳代 2 名、40 歳代 3 名、50 歳代 2 名) であった。感染経路は 5 例が同性間、2 例が異性間の性感染で、いずれも国内で感染している。同性間感染 2 例は、正確な感染時は不明ながら 2010 年と 2011 年にそれぞれ血液検査で陰性が確認されており、従来の検査では稀な感染の早期発見に属するものであったが、前者では免疫機能の低下が進み、すでにエイズ発症の段階に至っていた。

塩基配列から推定された感染ウイルスのクレイドはサブタイプ B が 6 例、CRF01_AE が 1 例であったが、異性間感染の 2 例で検出されたウイルスはいずれもサブタイプ B の特徴をもち、CRF01_AE タイプのウイルスは男性同性間感染の 1 症例のみでみついている。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。

新潟県の HIV 感染／エイズ発症の発生数は 1999 年 (計 14 件；エイズ動向委員会報告) 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。ウイルスの遺伝子の塩基配列から推定した県内で検出されるウイルス相互の遺伝的関係は、2000 年代後半に至るまでは近縁と認められるものはなく、地域内での感染の蓄積がないことが低い発生率の最大の理由とみてきた。しかし昨年の感染・発症の報告数は 12 年ぶりに年間 10 件の大台に達し、本年も第三四半期までの報告数は 6 件と増加傾向は続いているとみられる。これに対応するように、最近明らかに遺伝的近縁性が高いと認められるウイルスが MSM 症例で相次いで観察されるようになり、本年新たに解析した 2 症例を加えて、3 組 9 症例がこうした範疇に入る結果となった。新潟県における感染の態様は、県域外での感染を主体とするものから県内の MSM 集団内での蓄積へと変化しつつあり、今後の発生数の増加が危惧される。

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はめざましいが、治療を受ける患者数の増加とその長期化は一方で薬剤への耐性変異をもったウイルスの増加を招いている。その社会への漏出は今後治療の大きな障害として立ちだかってくる可能性があり、実態の監視が急務といえる。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の把握に寄与するものと自負している。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、県内在住者間での感染はまれで、これまでに解析したウイルスのほとんどは県外、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限局しており、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楽観はできない。実際、新潟県における HIV 感染は拡大期に入る徴候を見せており、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なお調査を続けたい。

(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定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 0.2 ml から High Pure Viral RNA kit® (Roche, 1858-882) を用いて RNA を抽出し、50 μl 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 ~ 10 μl 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 (5 μl) 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、シーケンシングに供した。シーケンシング反応には 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 24 年中、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、被検者はすべて日本人男性であった。全例性行為による感染で、同性間の感染が 5 例、異性間の感染が 2 件となっている。年齢構成は 20 歳代が 2 名、40 歳代 3 名、50 歳代 2 名で、従来最多の年齢層である 30 歳代は本年の検査ではみられなかった。新潟県では近年初診時にすでに高齢に達している感染者の増加が顕著になってきている (図 1)。本年の検査では 20 歳代の 2 名が含まれるため、解析した症例の平均年齢 (41.7 歳) は昨年値 (46.9 歳) より約 5 歳低下しているが、感染者の高齢化傾向の基調には変わりがないように見受けられる。

新潟県ではかつて異性間の性行為で感染した患者が過半を占め、また感染ウイルスとして CRF01-AE が検出されることが多かった。しかし、図 2 に示したように、2009 年以降感染経路、検出ウイルスともに、全国と同様、男性同性間の感染 (MSM)、サブタイプ B のウイルスが主となっている。この状況は今年度の調査でもそのまま継続されていた。

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

表 1 本年（2012 年）新規感染 / 発症者を対象におこなった検査数とその概要
 （検体はすべて新潟県内の病院から委託されたもの）

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/ μ l	Viral load (per ml)	感染ウイルス
1	男	50	日本	異性間	国内	不明	294	1.2×10^5	Subtype B
2	男	43	日本	同性間	国内	不明	391	2.1×10^4	Subtype B
3	男	25	日本	同性間	国内	2011~12年	685	2.2×10^4	Subtype B
4	男	49	日本	同性間	国内	不明	596	4.2×10^4	Subtype B
5	男	40	日本	異性間	国内	不明	144	2.4×10^4	Subtype B
6	男	27	日本	同性間	国内	2010~12年	21	1.6×10^5	CRF01_AE
7	男	54	日本	同性間	国内	不明	16	4.2×10^3	Subtype B

表 2 薬剤耐性変異の検出頻度

	未治療群 (N=52)	治療群 (N=33)		未治療群 (N=52)	治療群 (N=33)		未治療群 (N=52)	治療群 (N=33)
NRTI			NNRTI			PI major		
M41L	0	4	K101EHP	0	2	D30N	0	1
D67L	0	4	K103N	(2) ^f	7	M46IL	0	4
T69_ins	(2) ^{ab}	(2) ^{bc}	V106IAM	3	0	I54ML	0	1
K70R	0	2	V108I	1	1	V82AFLS	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 本表に掲げた症例数は、新潟県以外の都病院から依頼されておこなった検査分も含まれる。

注 2 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検出された非典型的なアミノ酸置換が認められた症例数を示す。a: T69A, b: T69Nb: c: T69S, d: L210F, e: T215E, f: K103R, g: V179A。

注 3 インテグラーゼ阻害薬（ラルテグビ）に対する耐性変異についても調査している（新規症例 24, 既治療症例 11）が、これまでに検出例はない。

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 6 例（V106I 2 例、V108I 1 例、V179D 3 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、薬剤への耐性付与の程度は比較的軽微とされる。これらが検出されたのはいずれも MSM 症例で 2006～2010 年の期間に検出されているが、対象症例数をもっとも多かった 2011 年に引き続き、本年も 1 例もみいだされなかった（図 3）。

新規症例でこれまでに検出されている耐性変異に

ついては、薬剤治療といった実際面への影響はすくないものの、その由来については示唆に富むものといえる。これらの変異は薬剤治療の継続中に単独で現われることはまずなく、より強い耐性を獲得したウイルスに後から付加的に生じるのが普通で、既知量患者から検出されるのはむしろ稀である（表 2）。おそらく治療歴のある感染者から広がったウイルスが、その後伝播を繰り返していく過程で薬剤の存在しない環境下ではフィットネスが劣る強い耐性変異を失い、耐性への関与が小さい代わりにそうした排除の影響も比較的受けにくい V179D などの変異だけが生き残った姿と考えられる。耐性変異が検出された 6 例の中には、それ自体は薬剤耐性をもたらすものではないが、同一部位での別種のアミノ酸置

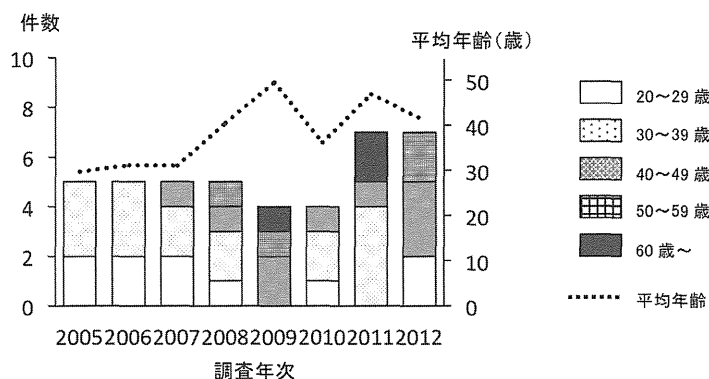


図 1. 新潟県内における新規症例の被験者の年齢（調査時）分布

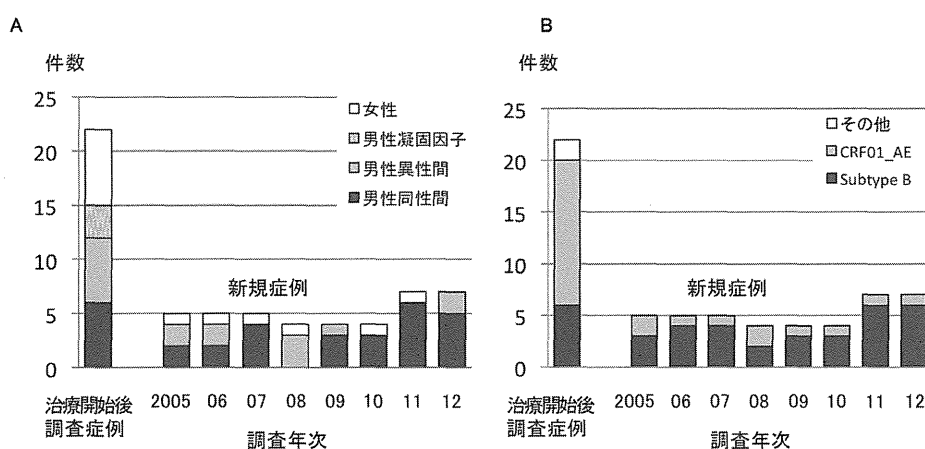


図 2. 調査症例の感染経路 (A), および感染ウイルスのクレイド (B) の内訳

注 1 データはすべて新潟県内の病院を受診した患者についてのものである。

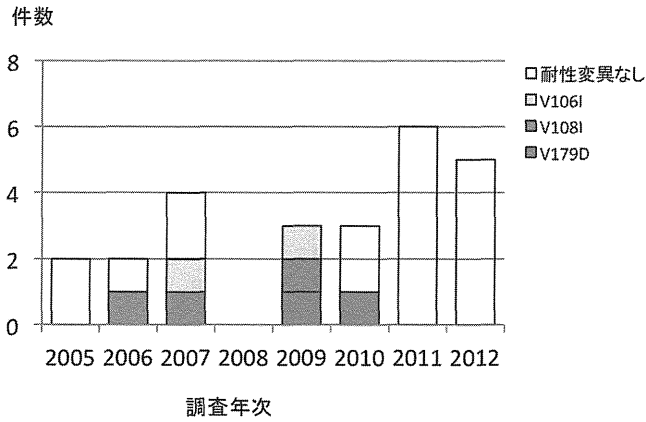
注 2 治療開始後症例は本調査治療開始 (2005 年) 以前から治療を受けており、その後耐性検査で性状が明らかになった症例すべてを含む。検査自体は現在までの複数年にわたって実施されたものである。

換が強い耐性を生じるような変異 (T69A /N/T/S、L210F、T215E、K103R、V179A) を (ときに複数) 含むウイルスがいくつか存在する。こうした疑似耐性変異を低下したフィットネスを代償するために生じた不完全な復帰変異とみるならば、これらが元は強い薬剤耐性をもったウイルスに由来するものであるとの推定を支持するデータといえる。

新潟県で検出されるウイルスの特徴

本年の 7 件を加え、これまでの調査で新潟県内の病院を受診する HIV 感染者 63 名 (新規症例 43 例、治療開始後症例 20 例) についてウイルスの性状解析をおこなっている。図 4 はこれらウイルスの RNA 配列を、gag p17、プロテアーゼ - 逆転写酵素 (1-240 aa)、インテグラーゼ、gp120 (C2V3) の 4 遺伝子

領域について、分子系統樹を作成し比較したものである。比較する配列の系統関係を構築する際、対応部医の塩基が同一のものであった場合、この部位については分岐後に突然変異は生じていないと見なし処理される。また、これら 2 配列の違いは最少個数の突然変異によって生じたものとして共通の祖先配列が推定される。こうしたアルゴリズムにより作成された分子系統樹は、比較的近縁の生物間では進化の過程における分岐をよく説明するが、変異頻度の高い HIV の配列の比較に適用した場合、しばしば推定と実際の間には大きな乖離が生じる。図 4 の 4 領域についてみれば、クレイドごとのまとまりは一致しているものの、そのメンバーであるウイルス個々の系統関係は領域ごとに大きく異なる。県内で検出



注 データはすべて新潟県内の病院を受診した患者についてのものである

図 3. MSM 症例から検出された薬剤耐性変異の頻度

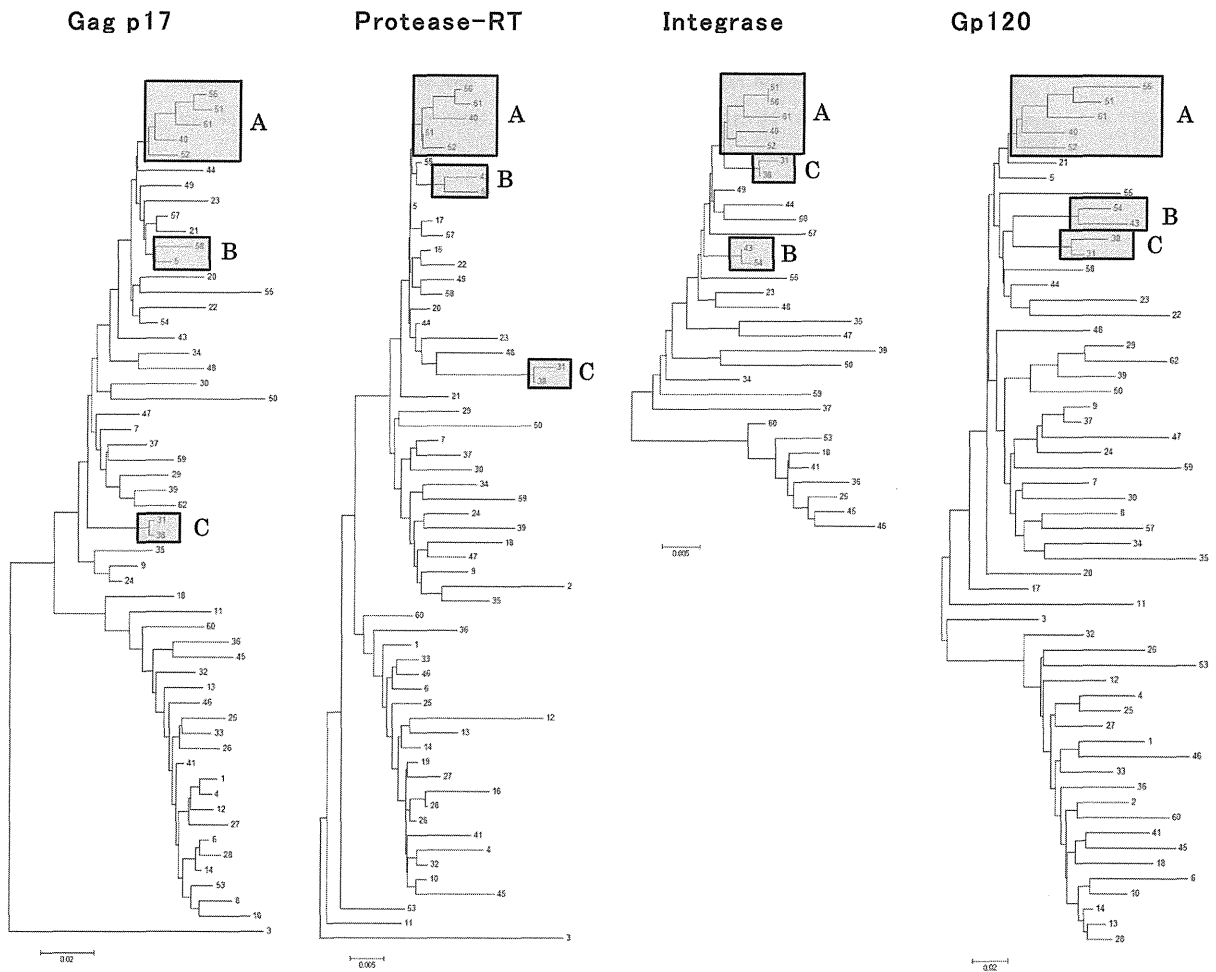


図 4. 新潟県で検出されたウイルスの系統学的関係

されるウイルス相互の遺伝学的関係を調べる際、われわれは配列決定をおこなった 4 領域すべてで他のウイルスから区別されて明確なクラスタを形成し、かつ系統樹上での分岐パターンがトポロジカルに矛盾しないという条件を設けて近縁性が高いと判定する条件とし、方法論的な弱点から生じる誤りの可能性を補っている。

この基準に照らしてウイルス間の遺伝的関係を推定すると、2008 年までの調査では遺伝学的な近縁性を想起させるウイルスは全く検出されてこなかった。由来が雑多なウイルスはおそらく県域外の地域（おそらく大部分は東京）で、いわば偶発的に感染し、県内に持ち込まれたものと考えられる。しかし、2009 年に既知のウイルス（2007 年に解析）と近縁性が高いウイルスの最初の例が検出されたのを皮切りに、同様の事例が相次いで検出され、本年までに 9 例のウイルスが近縁関係にあると同定されている。これらはすべて男性同性間の感染とされるケースで見いだされており、2009 年以降の新規症例で解析した MSM 症例の約半数（8/17）がこうしたウイルスの感染によるものとなっている。

われわれがとりわけ注目しているのは、図 4 中で A と表記したウイルスのクラスタで、2010 年に最初のウイルスが解析された後、昨年、今年にそれぞれ 2 例がその近縁ウイルスの感染と判定されている。感染者の検査時の年齢は 43 歳～74 歳と幅広く、多様な年齢層の人間が出入りする、おそらく県内の場所で感染が広がっていったものと考えられる。このクラスタの今後について、現時点での判断は早計であろうが、やがて新潟県における HIV 感染拡大の重要な要因になっていく可能性を秘めていることは間違いない。

D. 考察

われわれがこれまでにこなってきた調査のデータを通覧すると、新潟県の HIV 感染の様相が比較的短期間に次々に変化して様子が見取れる。

新潟県では 1990 年代の後半、感染 / 発症者の報告数（エイズ動向委員会報告）が一過的に急増した時期があるが、この時期の感染者の大半は異性間の感染によるもので、女性も高い割合（約 1/3）で含まれていたことが、調査開始後（2005 年以降）既治療症例として依頼された薬剤耐性検査を通じてわかっている。検体の解析により明らかになったのは、感染ウイルスの大半は CRF01_AE に属するもので、サブタイプ C や CRF02_AG など国内では稀なクレイドに属するウイルスも検出されている一方で、当時すでに国内感染の大部分を占めていたサブタイプ

B のウイルスはむしろ少数である事実であった。RNA 配列から見たウイルス相互の遺伝学的関係はきわめて希薄で、その由来は新潟県との人的交流が活発で HIV の浸透がもっとも進んでいた東京にあったことはほぼ間違いないと思われる。MSM の感染が主となりサブタイプ B がそのほとんどであった当時の東京と、上述のような新潟県でのウイルス検出状況の間の際だった違いは、新潟県の感染者の多くは免疫不全が相当に進行した段階で発見、診療を受けているという事実でおおよそは説明できる。新規の発生としてみている感染状況が実際には 10 年近く遡った時点で起きた事象の反映であるとするならば、新潟県で観察されている 1990 年代の後半の異性間感染を中心とした報告数の増加は、1990 年前後の東京など大都市圏での状況、海外へのセックスツアーや性産業に従事する外国人女性によって持ち込まれたウイルスの蔓延、とよく符合する。また、その後の感染 / 発症者の急減は行政機関によっておこなわれたエイズ防止キャンペーン、マスコミ報道による注意喚起の効果と見られよう。

全国統計で見る限り、こうした感染減少を示す事象は外国人女性の患者発生が顕著に減少した点以外には観察することができない。この頃から MSM 症例の増加が顕著となり、たとえ異性間感染が一過的にせよ減少していたとしても、それを凌駕していったからである。たしかに新潟県でも異性間感染の割合はその後減少を続け、MSM 症例がしだいに主になっていったものの、発生数自体は年間 4～5 件という低い状態が 2000 年代に入って続いた点は、この間の右肩上がりの感染者増加という全国状況と著しい対照をなすものであった。2001 年～2010 年の 10 年間の新潟県での新規感染 / 発症者数の合計は 47 人、対人口 10 万人当たりでは 1.97 人で全国平均の 9.84 人を大きく下回り、47 都道府県中 45 位の低さとなっている。かつては比較的エイズが多発する県のひとつに数えられたことを考えれば隔世の感があるが、検出されるウイルスが遺伝学的に多様な状況が引き続き観察されていることから、感染のほとんどは県域外で生じており、県内での感染の広がりがなかったことがこのひくい HIV 感染の理由であったことは疑いないところであった。

社会的、経済的要因によって首都圏への人の行き来はかつてに比べ量的に減少し、また質的にも大きく変化しているが、交通の利便性を考えればこの地域から新潟にいわば偶発的な感染が一定数（あるいは漸増的に）流入してくる状態は当面続くであろうとわれわれは予想していた。しかし、最近 2～3 年の調査結果は、この予想をやや覆すものとなってい

る。この期間に観察された MSM 症例で明らかに遺伝学的に近縁と認められるウイルスが検出される例が目立ち初め、その傾向は年々顕著になってきている。MSM 症例についても、異性間感染の場合と同様に、県域外からの流入は減少しつつあり、代わって県内にウイルスの感染源が成立し、近年これが感染を広げる要因となって減少を補ってきていることは明らかである。こうした事象の始まりは、実際には 2000 年代の前半、われわれが本調査を始めた時期にほぼ重なるのではないかと想定している。今になってようやくその徴候をつかんだのが調査の現状といえる。一時 MSM 症例で高頻度に見られた弱い薬剤耐性をもったウイルスが姿を消した点、また感染者の年齢が高年齢層に広がってきた点なども、おそらくこうした感染傾向の遷移に対応したものと思われる。

把握されたウイルスのクラスタが一過的なもので、現に治療中の患者以外には拡大していない可能性はもちろん考えられるが、まだ目に見えない形ですでに県内に広く拡散している事態もまた予想することができよう。いずれが事実であるかは、今後の調査結果を待たなければならないが、図 4 の A で示したクラスタはこれらが検出された患者の年齢層が広く、性的嗜好以外にも何らかの共通項があってできあがったグループというより、いわゆる「ハッテン場」的な不特定多数が出入りする場所で広がった可能性が強いように思われる。

本年の調査で感染の最終陰性時期が明記されている症例が 2 件あったことは、従来調査にはなかった点で注目に値するかも知れない。実際に感染リスクを自覚する人達の間で警戒心が現れ始め、血液検査を受ける人が増加したことを意味するのであれば、歓迎すべき徴候ともいえる。残念ながら、うち 1 例では症状の進行が急速ですでに重度の免疫不全の状態に陥っていたが、感染の早期発見がきわめて重要であることは間違いない。血液検査受診の推進キャンペーンを強化し、薬剤治療を受ければエイズ症状が相当に進行した後でも旧の健康体に復するかなのような誤った観念を改める、啓発活動をおこなう時期に来ていると考える

E. 結論

新潟県における新規の HIV 感染 / エイズ発症数は、昨年に続き、今年も従来に比べやや増加したが、なお低い水準を維持している。MSM 症例が感染の大多数を占める傾向は最近 4 年間でほぼ定着したとみられるが、その内実は、首都圏（東京）とみられる県域外での感染から、県内に成立した感染集団内部

での拡大へと推移しつつあると思われる。今後の調査ではこうした県内感染集団の動向に十分な注意を払っていく必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 学会発表

1. 椎野禎一郎、田邊嘉也他：国内感染者集団の大規模塩基配列解析 3 ～稀少サブタイプとサブタイプ間組み換え体の動向～. 日本エイズ学会. 2012 年 11 月 24 日～ 26 日 横浜
2. 西島健、田邊嘉也他：HIV 感染症の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り付けするオープンラベル多施設共同臨床試験：ET study 96 週結果. 日本エイズ学会. 2012 年 11 月 24 日～ 26 日 横浜
3. 石塚さゆり、田邊嘉也他：「HIV / エイズ出張研修実施における行政との連携とその効果」. 日本エイズ学会. 2012 年 11 月 24 日～ 26 日 横浜
4. 影向 晃、田邊嘉也他：テノホビルによる尿細管細胞機能障害の可逆性. 日本エイズ学会. 2012 年 11 月 24 日～ 26 日 横浜
5. 服部純子、田邊嘉也他：新規 HIV/AIDS 診断症例における薬剤耐性 HIV の動向. 日本エイズ学会 2012 年 11 月 24 日～ 26 日 横浜

H. 知的所有権の出願・取得状況

なし

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

研究要旨

HIV 感染患者血中に微小集族として存在する薬剤耐性 HIV が抗 HIV 療法 (cART) の予後に影響を及ぼす可能性が示唆されてきたが、このような患者血中に 20%以下の比率で微小集族として存在する薬剤耐性 HIV 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) で検出する事は難しい。本研究では定量 PCR を応用した高感度薬剤耐性検査法 (高感度法) を用いて、5%以下の割合で存在する薬剤耐性変異の検出を可能にした。現在逆転写酵素阻害剤 (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 変異が解析可能となった。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、6 種類の微小集族耐性変異が検出された症例が 1 例存在した。この症例の高感度法で解析する際に得られる M46I/L, L90M amplicon のシーケンス解析から、この症例から検出された M46I/L と L90M は互いに連鎖せず、異なる HIV 株の重感染の可能性が示唆された。また東京都健康安全研究センターで薬剤耐性検査を行った別の症例でも M46I, L90M の 2 種類の PI 耐性変異が微小集族として検出されたが、PI 耐性変異の M46I, L90M の高感度法 amplicon のシーケンス解析から、この症例から検出された M46I と L90M は互いに連鎖しておらず重感染の可能性が示唆されたため、詳細な解析のためこれらの症例の PR 領域のクローニングを行い M46I/L, L90M 変異の関連性について検証した。また NRTI 耐性変異 M184V を検出するプライマーの感度が十分でない可能性が示唆されたため、M184V 検出系の改良を行った。

A. 研究目的

薬剤耐性 HIV の出現は抗 HIV 療法 (cART) の大きな障害であり、効果的な cART を行うためには薬剤耐性検査を行って正確に薬剤耐性変異を把握し、適切な抗 HIV 薬剤を選択することが重要である。しかし一般的なダイレクトシーケンス法 (通常法) では患者血中に 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く、それ以下の存在で存在している微小集族薬剤耐性 HIV を検出する事は困難である。微小集族薬剤耐性 HIV が将来の cART に悪影響を及ぼす可能性が近年報告され、これらの微小集族薬剤耐性 HIV を検出する検査法が考案されてきた。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ている。今年度は、高感度法で増幅される amplicon の解析から HIV の重感染が検証可能かどうかを検討した。また NRTI の耐性変異である M184V の検出系が一部の患者検体では有効に M184V を検出できないことが明らかになったため、M184V 検出系の改良を試みた。

(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