

の医学研究倫理審査委員会へ倫理審査を申請し許可を得た。

B. 研究方法

(1) 微小集族の薬剤耐性変異が検出された症例 1、症例 2 (表 1) について、重感染の可能性を検討するために PR 領域 (アミノ酸配列 1-99) を市販のクローニングキット (Zero Blunt® PCR Cloning Kit, Life technologies) でクローニングし、取れたクローンの塩基配列を各々決定し系統樹解析を行った。

(2) M184V 検出系検討のためには、M184V 検出プライマーを新たに 3 種類開発し (表 2)、M184V 検出プライマー結合部位の配列が異なる 7 症例由来の 7 検体を用いて、開発した新規 M184V プライマーによって高感度法による解析を行い Δ Ct 値を比較した。特異性の解析には、新規未治療患者由来の各々異なる 13 症例から得た PR-RT 領域をクローニングした 13 種類のベクターを用い、野生型の RT 領域に対して新規 M184V 検出プライマーが非特異的な増幅をしないかどうかを確認した。新規 M184V 検出プライマーの検出限界解析には、M184V をもつ患者由来の PR-RT 領域をクローニングした M184V クローンを用いて解析した。

参考文献: Simple PCR assays improve the sensitivity of HIV-1 subtype B drug resistance testing and

allow linking of resistance mutations. Johnson JA et al. PLoS ONE. 2007 Jul 25;2(7):e638

C. 研究結果

(1) 名古屋医療センターで薬剤耐性検査を行った症例 1 と、東京都健康安全研究センターで薬剤耐性検査を行った症例 2 (表 1) について、PR 領域をクローニングして M46I/L、L90M を持つ配列・持たない配列が系統樹上でどのような位置に出現するかを解析した。症例 1 から 26 個、症例 2 から 52 個のクローンの配列を決定し、系統樹解析を行った (図 1)。その結果、症例 1 では M46V をもつ配列が 1 個検出されたが、系統樹上ではその他の 25 個のクローンと同じ集団を形成し、同一の HIV 株由来であったことが示唆された。また症例 2 では M46I を持つクローンが 52 個中 6 個同定されたが、これらの M46I をもつ 6 個のクローンの配列も系統樹上ではその他の 46 個のクローンと同じ集団を形成し、同一の HIV 株由来であったことが示唆された。L90M を持つクローンは症例 1、症例 2 とも検出できなかった。

(2) CDC で既に開発された NRTI 耐性変異の M184V が検出できない症例がある可能性が示唆されたため、現在の M184V 検出プライマーの配列と M184V が検出不可能だった大阪医療センターの

表 1 症例一覧

症例	施設	通常法(PR)	高感度法(PR)
1	名古屋医療センター	なし	M46I ¹ , M46L ¹ , L90M ¹
2	東京都健康安全研究センター	I84V, L90M ¹ , L33I, A71L, N88D	M46I ¹ , L90M ¹

※¹: 高感度法で検出可能な薬剤耐性変異

表 2 M184V 検出用プライマー一覧

プライマー名	配列	検出用プライマーmix の組み合わせ		
		Original(CDC)	mix2	mix3
M184V-1F	AAATCCARAMMTARTTATMTRTCAGCACG	○		
M184V-1-3F*	AAATCCARAMMTARTTATMTR <u>Y</u> CAGCACG		○	
M184V-1F-4*	AAA <u>Y</u> CCARAMMTARTTAT <u>Y</u> TR <u>Y</u> CAGCACG			○
M184V-2F	AAATCCARAMATAGWRATMTRTCAGCACG	○	○	
M184V-2F-2*	AAA <u>Y</u> CCARAMATARWRAT <u>Y</u> TR <u>Y</u> CAGCACG			○
M184V-3F	AAAYCCARAMATARTTATCTRYCAGCATG	○	○	○

*: 新たに開発した M184V 検出用プライマー

表 3 M184V 検出プライマー配列と大阪医療センター臨床検体のプライマー結合領域配列の比較

M184V 検出用プライマー	
プライマー	配列
M184V-1F	AAATCCARAMMTARTTATMTRTCAGCAGC
M184V-2F	AAATCCARAMATAGWRATMTRTCAGCAGC
M184V-3F	AAAYCCARAMATARTTATCTRYCAGCATG

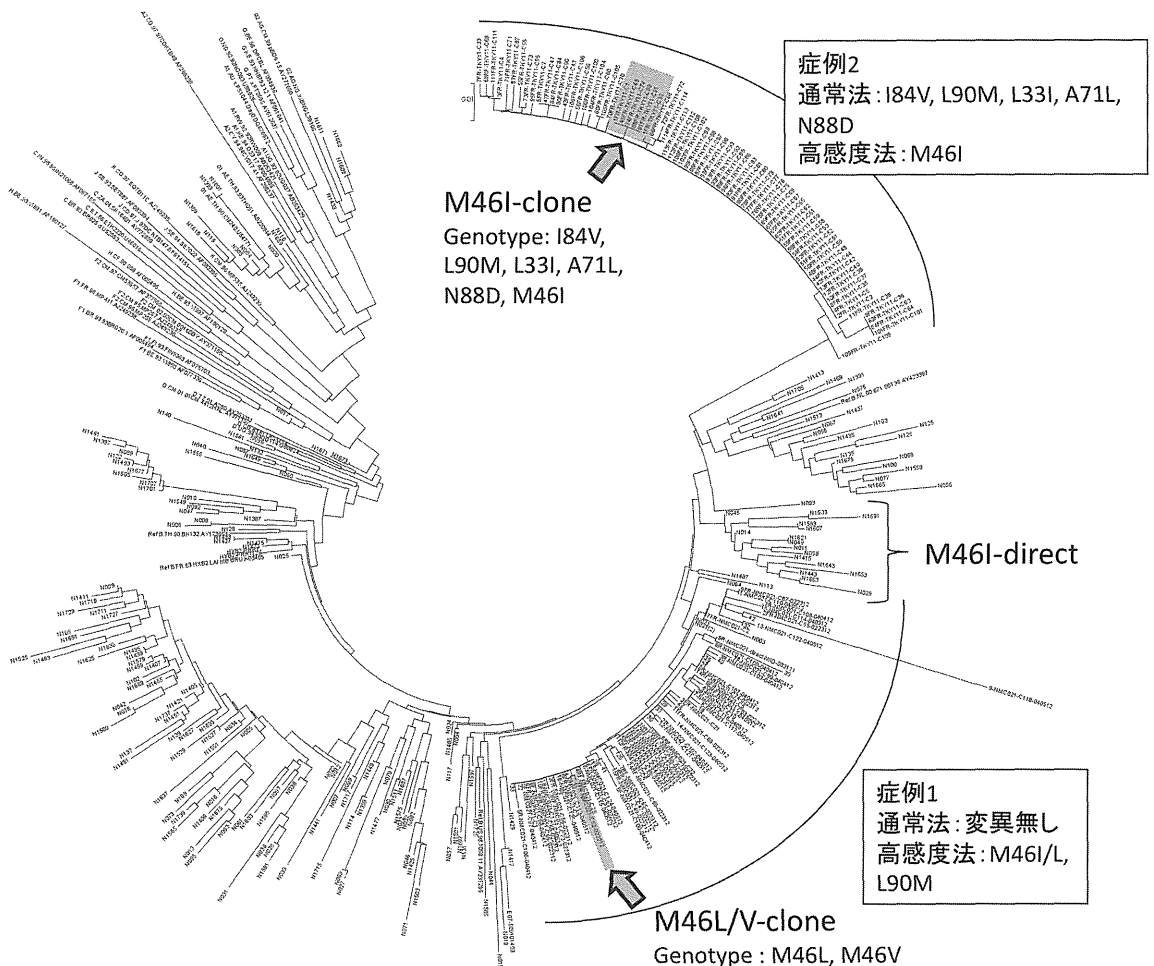
大阪医療センター臨床検体	
検体名	配列
Osaka-1	GAATCCAGACATAGTTATCTATCAATACA
Osaka-2	AAATCCAGACATAGTTATCTA□CCAAATACG
Osaka-3	AAATCCAGACATGATA□ATCTATCAATACG
Osaka-4	AA□CCAGACATAGTTATTTATCAATACG

□ : M184V 検出用プライマーと異なる塩基が認められた部位

表 4 各 M184V 検出用プライマー mix による臨床検体解析結果

症例番号	M184V プライマー結合領域の配列	Original(CDC)	mix2	mix3
HXB2	AAATCCAGACATAGTTATCTATCAATACA	-	-	-
A-1	AAATCCAGACATAGTTATCTACCAATACG	-	+	+
B-1	AAATCCAGACATAGTTATCTACCAATACG	-	+	+
C-2	AAATCCAGACATAGTTATCTATCAATACG	-	+	+
D-1	AAATCCAGACATAGTTATCTACCAATACG	-	+	+
E-1	AAAYCCAGACATAGTTATCTATCAATACG	+	+	+
F-1	AAATCCAGACATAGTTATCTATCAATACG	+	+	+
G-1	AAATCCAGAAATAATTATYATCAATACG	+	+	+
Osaka-1	GAATCCAGACATAGTTATCTATCAATACA	-	+	ND
Osaka-2	AAATCCAGACATAGTTATCTACCAATACG	-	+	ND
Osaka-3	AAATCCAGACATGATAATCTATCAATACG	-	-	-
Osaka-4	AAATCCAGACATAGTTATTTATCAATACG	-	+	+

※ : グレー網掛けは高感度法で ΔCt 値が 8.5 以下になって陽性と判定されたもの。



M184Vを持たない臨床検体(13例)とM184Vを持つ臨床検体(13例)を用いた検討

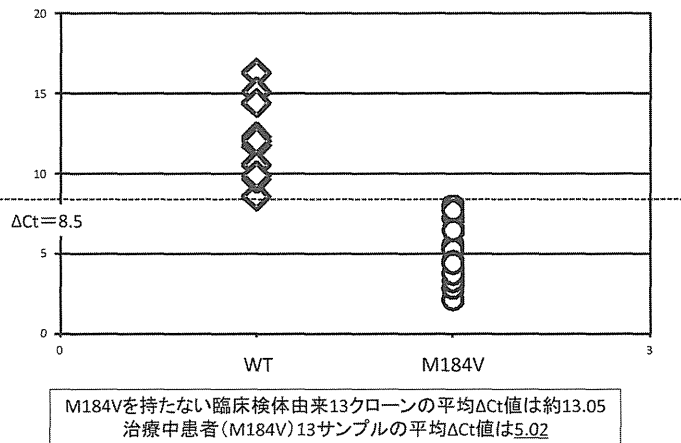


図2 M184Vを持たない臨床検体(13例)とM184Vを持つ臨床検体(13例)を用いた検討

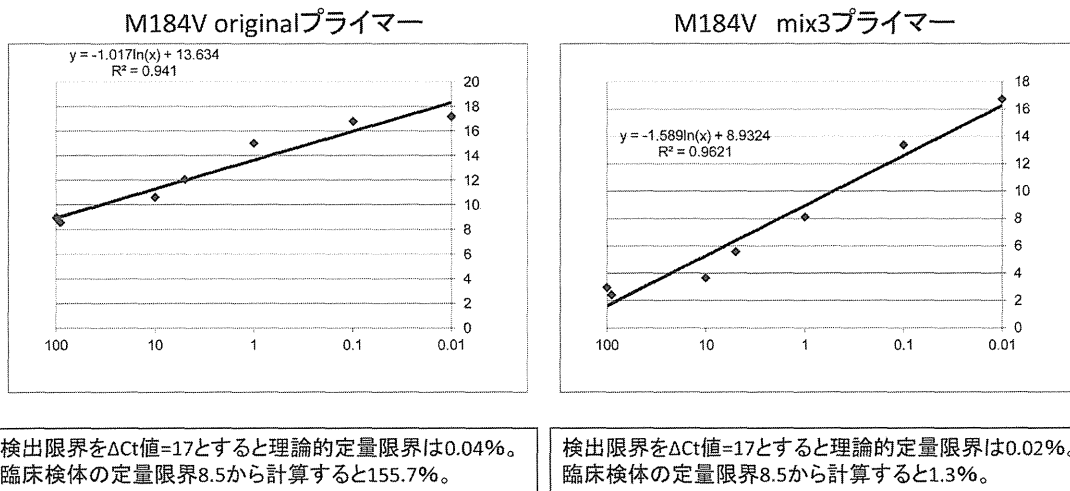


図3 M184VをクローンとWTクローンを用いた理論的定量限界の解析

HIV 感染患者 4 症例の塩基配列を比較した (表 3)。その結果、4 か所に従来のプライマーと一致しない塩基配列が存在していた。この結果を基にして新たに 3 種類の M184V 検出用プライマーを開発し、M184V 検出プライマー結合部位の配列が異なる 7 症例由来の 7 検体を用いて各々の開発したプライマー混合液を用いて M184V を検出した際の Δ Ct 値を比較した。その結果、M184V プライマー混合液 M184V-mix3 を用いた場合が最も Δ Ct 値が低く M184V の検出に適していることが示された (表 4)。また大阪医療センターから提供された 4 症例について解析した結果、3 症例については M184V を検出可能だったが 1 症例については検出出来なかった。今回開発した M184V-mix3 の特異性について検討するため、新規未治療患者由来の各々異なる 13 症例から得た PR-RT 領域をクローニングした 13 種類のベクターサンプルを M184V-mix3 を用いて高感

度法で解析し、これらのサンプルから M184V 非特異的検出があるかどうか検討した。その結果、全てのサンプルの Δ Ct 値がこれまでの M184V の Cut off 値の 8.5 を上回り (Δ Ct 値の平均値は 13.05)、非特異的な検出は見られないことが確認された (図 2)。M184V-mix3 を用いての理論的定量限界を解析するために、M184V を持つ患者検体の PR-RT 領域をクローニングした M184V クローンを作製し、HXB2 の PR-RT 領域をクローニングした WT クローンと M184V クローンを段階的に 100:0 から 0.0001:99.9999 まで 10 倍ずつ混合比率を変えて調製したサンプルを調製し、このサンプルを M184V-mix3 を用いた高感度検出法により解析した。解析により得られた Δ Ct 値と希釈倍率とをグラフにプロットし、どの希釈倍率まで直線的な関係が得られるか解析した結果、M184V クローンをを用いて計算される理論的検出限界は 1.31% だった (図 3)。

D. 考察

今回の 2 つの症例で、L90M amplicon に M46I/L が連鎖して存在していなかったことから、2 種類の異なる HIV の重感染である可能性が考えられたため、クローニングして確認を行ったが、今回のクローニングでは重感染の事実は確認されず、M46V や M46I を持っている配列と持たない配列は系統樹上で同じクラスターに出現し、同じ HIV 株由来であることが示された。しかし今回は検討したクローン数が少なく L90M を持つクローンを検証できなかったため、重感染を完全に否定する事は出来なかった。今回の結果から、高感度法で微小集族の耐性変異が検出された場合には、その amplicon のシーケンス解析を行うことで重感染について検討することも可能と考えられた。

今回新たに開発した M184V 検出用プライマーは、従来のプライマーよりも高感度で M184V を検出可能であることが示された。M184V は ARV で多く用いられるエムトリバ (FTC) やエビビル (3TC) に対する重要な耐性変異で、この変異を高感度で検出する事は効果的な ARV のために重要である。M184V をより高感度で検出可能になったことで、本研究で用いた高感度法の有用性も高まった。しかし今回新たに開発した M184V 検出系でも M184V を検出できない症例が存在することから、さらにプライマーを改良する必要があると思われる。

E. 結論

M46I/L, L90M を微小集族として持つ症例 1 と M46I, L90M を微小集族として持つ症例 2 の PR 領域をクローニングしてクローンの塩基配列を決定し系統樹解析を行った。その結果 M46I を持つ配列は、持たない配列と同じクラスター内に存在し、同じ HIV 株由来である事が示された。L90M を持つクローンは今回得られなかったことから、重感染の可能性を完全に否定するには至らなかった。NRTI の耐性変異である M184V 検出系を改良するために、新たに 3 種類のプライマーを合成し 3 種類のプライマーの組み合わせを検討し、これまで M184V を検出できなかった症例についても M184V 検出が可能になったこと、また非特異的な M184V 検出が見られないこと、またこれまで M184V を検出できなかった症例でも理論的定量限界で、約 1.3% の頻度の M184V を検出可能な事を確認した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 口頭発表

海外

1. Masako Nishizawa, Walid Heneine, Jeffrey A. Johnson, Wataru Sugiura. Application of allele-specific PCR for identifying minority drug-resistant populations that impact salvage therapies. 7th International Workshop on HIV Transmission, 2012 年 7 月、ワシントン D.C..

国内

1. 西澤雅子, Jeffrey Johnson, Walid Heneine, 杉浦 互. 微小集族として存在するプロテアーゼ阻害剤耐性変異の高感度法の開発と、抗 HIV 治療患者に存在する微小集族プロテアーゼ阻害剤耐性変異解析. 第 26 回日本エイズ学会、2012 年 11 月、横浜.
2. 鈴木寿子, 大出浩高, 前島雅美, 西澤雅子, 杉浦 互. インテグラーゼ多様性がラルテグラビル耐性獲得に及ぼすウイルス学的構造学的影響の解析. 第 26 回日本エイズ学会、2012 年 11 月、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、2012 年 11 月、横浜

H. 知的所有権の出願・取得状況

なし

東京医大における薬剤耐性 HIV の動向調査研究

～抗レトロウイルス療法 (cART) 中の患者に見られる低レベル HIV-1 RNA の意義と耐性ウイルス発現との関係に関する研究～

研究分担者 福武 勝幸 東京医科大学臨床検査医学講座 主任教授

研究協力者 天野 景裕¹、一木 昭人¹、大瀧 学¹、尾形 享一¹、塩塚 美歌¹、篠澤 圭子²、鈴木 隆史¹、清田 育男¹、近澤 悠志¹、萩原 剛¹、備後 真登¹、村松 崇¹、山元 泰之¹、四本 美保子¹

¹ 東京医科大学臨床検査医学講座

² 東京医科大学血液凝固異常症遺伝子研究寄附講座

研究要旨

抗レトロウイルス療法 (cART) 中の患者に見られる持続する低レベルの HIV ウイルス血症 (Low-Level HIV Viremia ; LLV) や弧発するブリップはしばしば経験するものであるが、それらの診療における意味はいまだに明確ではない。低レベルウイルス血症の定義自体が曖昧であり、研究者の意図や技術的環境により <50 copies/ml、50-200 copies/ml、50-1000 copies/ml などと使い分けられているのが現状である。cART 開始後、日常検査の HIV-1 RNA が定量感度未満となった後も、超高感度法では HIV-1 RNA が検出され微量のウイルス複製が続いていることが示されている。このような低レベルの複製下でも、ウイルス量に応じてウイルス学的失敗の頻度が高くなる。一方、ブリップも超高感度法でウイルス量の多い症例に多いことから好ましくない徴候である。しかし、低レベルの HIV-1 RNA の測定においては日常臨床検査の信頼性が十分とは言えず、臨床医としてはこの点を認識した上で、そのブリップが患者に悪い影響をもたらす徴候か、薬剤耐性ウイルスの発生に結びつく現象なのかを吟味する必要があると思われる。

今回、研究者自身が担当する診療のなかで経験している低レベル HIV-1 RNA の実際を調査し、その意義と耐性ウイルス発現との関係について検討し、既報を踏まえて考察を試みた。研究者自身が任意の 1 ヶ月に担当した HIV-1 感染者のうち、既に 1 年以上 cART を続けている患者の連続 50 症例を対象として、連続 6 回の HIV-1 RNA と CD4 細胞数の臨床検査値について後方視的に検討した。

50 症例中、8 症例は全経過を通じて HIV-1 RNA が定性的測定感度以下、17 症例は最高値でウイルスが測定されるも定量限界の 20 コピー /ml 未満、14 症例は最高値で 20 コピー /ml 以上 50 コピー /ml 未満、11 症例は 1 回以上の測定で 50 コピー /ml を越えていた。このうち 2 症例は 200 コピー /ml を越え、50 コピー /ml 未満の 1 例と 200 コピー /ml 以上の 1 例で薬剤が変更されたが、薬剤耐性を示した症例はなかった。

A. 研究目的

抗レトロウイルス療法 (cART) 中の患者に見られる持続する低レベルの HIV ウイルス血症 (Low-Level HIV Viremia ; LLV) や弧発するブリップはしばしば経験するものであるが、それらの診療における意味はいまだに明確ではない。日常診療のなかで経験している低レベル HIV-1 RNA の実際を調査し、その意義と耐性ウイルス発現との関係について検討し、既報を踏まえて考察を試み、適切な診療体制を確立していくことを目的とした。

B. 研究方法

I. 測定試薬および機器

試薬 TaqMan HIV-1 「オート」 v2.0 法 (v2.0 法) は Roche Molecular Systems Inc. (米国・プレザントン) の製造であり本邦ではロシュ・ダイアグノスティクス株式会社から供給されている。リアルタイム PCR を原理としており、検体は血漿を用い、測定は各添付文書に従い行った。また、核酸抽出工程から核酸増幅・検出工程まで全自動システムであ

る TaqMan「オート」システム A (核酸抽出工程：コバス AmpliPrep、核酸増幅・検出：コバス TaqMan) を用いて、東京医科大学病院中央検査部にて測定した。

II. 対象

東京医科大学病院臨床検査医学科の受診者のうち、分担研究者自身が任意の 1 ヶ月に担当した HIV-1 感染者のうち、既に 1 年以上 c ART を続けている患者の連続 50 症例を対象として、連続 6 回の HIV-1 RNA 量と CD4 細胞数の臨床検査値について後方視的に検討した

III. 診療情報の抽出と匿名化

対象患者の直近 6 回の HIV-1 RNA 量と CD4 細胞数および検査日の治療薬を抽出し、連結不可能匿名化して患者 ID を本研究用 ID に変換した後、研究用データベースを構築した。

(倫理面の配慮)

本研究内容は対象患者の診療のために行われた検査結果と治療内容を連結不可能匿名化した後、収集しており、HIV-1 感染症の病態と治療効果を明らかにすることを目的に進められたものであり、世界医師会によるヘルシンキ宣言に示された倫理規範を遵守し実施した。

表 1 対象症例の CD4 細胞数と HIV-1 RNA

Pt. ID	CD4 (/mc1)							HIV-1 RNA (copies/ml)					
	1	2	3	4	5	6	Ave.	1	2	3	4	5	6
1	366	435	284	297	332	274	331	ND	<20	ND	<20	<20	<20
2	320	310	405	371	401	379	364	ND	ND	ND	ND	<20	32
3	783	950	747	911	943	896	872	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4	409	376	465	531	499	550	472	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5	393	331	468	320	320	339	362	21	<20	29	33	ND	ND
6	384	227	373	392	360	371	351	<20	25	32	23	31	<20
7	325	269	286	277	248	351	293	ND	ND	ND	ND	ND	ND
8	399	444	378	456	419	426	420	<20	<20	<20	<20	<20	<20
9	192	301	316	295	338	392	306	69	ND	ND	ND	ND	ND
10	372	430	458	382	410	560	435	30	<20	<20	37	<20	ND
11	535	399	462	430	393	478	450	ND	ND	ND	ND	<20	ND
12	125	116	119	117	102	120	117	ND	ND	ND	ND	ND	<20
13	99	100	121	162	154	173	135	ND	ND	ND	ND	<20	<20
14	266	239	223	190	313	265	249	ND	ND	ND	ND	ND	ND
15	623	790	702	624	683	733	693	ND	ND	ND	ND	<20	ND
16	236	210	194	233	252	270	233	ND	ND	ND	<20	<20	<20
17	747	937	1091	1121	910	771	930	ND	ND	ND	ND	ND	ND
18	250	357	354	277	322	259	303	<20	<20	160	<20	120	51
19	444	675	520	604	570	531	557	21	ND	72	67	200	ND
20	597	687	780	713	825	704	718	<20	<20	<20	ND	<20	66
21	478	457	361	400	353	409	410	ND	ND	ND	ND	ND	<20
22	368	298	411	410	423	275	364	<20	<20	<20	ND	75	<20
23	459	509	598	489	478	392	488	ND	ND	ND	ND	ND	<20
24	994	801	755	787	1011	963	885	21	ND	<20	ND	<20	ND
25	580	726	873	836	757	746	753	ND	ND	40	ND	ND	ND
26	788	867	849	880	1006	814	867	<20	<20	ND	ND	ND	<20
27	562	736	758	541	564	607	628	34	ND	<20	25	ND	24
28	497	572	591	478	691	589	570	<20	<20	33	46	ND	ND
29	455	514	472	441	391	516	465	ND	ND	ND	ND	ND	ND
30	237	227	323	265	337	271	277	ND	ND	<20	29	ND	<20
31	714	626	483	381	564	672	573	ND	<20	400	470	790	<20
32	385	294	238	294	238	242	282	ND	<20	ND	ND	ND	ND
33	532	565	609	613	738	792	642	<20	28	29	ND	<20	<20
34	633	427	572	512	548	708	567	62	41	<20	39	<20	38
35	438	442	522	512	572	504	498	ND	ND	91	ND	ND	ND
36	523	746	521	586	648	720	624	34	<20	23	<20	<20	26
37	296	324	342	264	240	292	293	<20	ND	ND	<20	<20	ND
38	302	257	423	244	276	272	296	ND	ND	<20	ND	<20	ND
39	548	842	727	857	830	711	753	<20	ND	ND	<20	<20	41
40	550	694	624	586	468	635	593	ND	ND	ND	ND	ND	ND
41	429	451	520	481	484	580	491	ND	ND	ND	ND	ND	ND
42	459	571	647	662	600	562	584	<20	37	ND	ND	<20	<20
43	290	271	260	248	291	273	272	<20	ND	<20	<20	<20	52
44	477	413	632	565	583	621	549	ND	ND	<20	ND	<20	ND
45	608	669	852	708	851	748	739	ND	ND	ND	<20	ND	ND
46	627	585	566	732	543	579	605	<20	ND	ND	ND	<20	ND
47	491	442	534	614	735	706	587	27	<20	<20	60	<20	<20
48	298	354	359	393	369	327	350	120	51	140	<20	ND	ND
49	923	817	628	860	731	734	782	<20	ND	ND	ND	ND	24
50	674	695	691	641	566	749	669	ND	ND	<20	ND	<20	ND

ND: 定性的測定感度未満 <20: 定量的測定感度 (20 コピー/ml) 未満で定性的陽性

C. 研究結果

I. 対象患者の HIV-1 RNA 量と CD4 細胞数の推移

分担研究者自身が任意の 1 ヶ月に担当した HIV-1 感染者のうち、既に 1 年以上 c ART を続けている患者の連続 50 症例を対象として、連続 6 回の HIV-1 RNA と CD4 細胞数の臨床検査値について後方視的に検討した。50 症例の測定値を表 1 に示すが、8 症例は全経過を通じて HIV-1 RNA が定性的測定感度以下 (グループ A)、17 症例は 1 回以上でウイルスが測定されるも定量限界の 20 コピー /ml 未満 (グループ B)、14 症例はウイルスが測定されるも最高値で 20 コピー /ml 以上 50 コピー /ml 未満 (グループ C)、11 症例は 1 回以上の測定で 50 コピー /ml を越えていた (グループ D)。

II. グループ別の特徴

グループ	N	CD4 平均値	治療レジメン (症例数)									外来日	
			EI	EK	ERN	ES	TI	TK	TRN	TS	VEpS	MON	FRI
A	8	545	1	1	0	0	1	0	3	2	0	5	3
B	17	453	3	1	3	0	4	1	3	1	1	7	10
C	14	572	2	0	4	1	5	0	1	1	0	4	10
D	11	463	2	0	1	0	5	0	2	1	0	1	10
合計	50	501	8	2	8	1	15	1	9	5	1	17	33

E; エブジコム I; アイセントレス K; カレトラ R; レイアタツツ N; ノービー S; ストックリン T; ツルバダ V; ヴァイリッド Ep; エブジコム

分担研究者が担当する外来は月曜と金曜の各午前中であるが、休日により月曜の患者数が 1 日少なかった。このうち 2 症例は 200 コピー /ml を越え、50 コピー /ml 未満の 1 例 (Pt28) が患者の希望により、200 コピー /ml 以上の 1 例 (Pt31) で 1 日 2 回服用のアドヒアランスが得られないために薬剤が変更されたが、薬剤耐性を示した症例はなかった。

D. 考察

東京医科大学病院の臨床検査医学科外来で主に分担研究者を受診してきた HIV 感染者について、任意の 1 ヶ月に担当した HIV-1 感染者のうち、既に 1 年以上 c ART を続けている患者の連続 50 症例を対象として、連続 6 回の HIV-1 RNA と CD4 細胞数の臨床検査値について後方視的に検討した。当該 50 症例のうち、8 症例は全経過を通じて HIV-1 RNA が定性的測定感度以下 (グループ A)、17 症例は 1 回以上でウイルスが測定されるも定量限界の 20 コピー /ml 未満 (グループ B)、14 症例はウイルスが測定されるも最高値で 20 コピー /ml 以上 50 コピー /ml 未満 (グループ C)、11 症例は 1 回以上の測定で 50 コピー /ml を越えていた (グループ D)。全経過を通して測定感度未満を示した症例は 16% であり、20 コピー /ml 未満を含めても 50% にとどま

っている。ただし、グループ D の 11 症例のうち 7 症例は 6 回のうち 1 回のみが 52 から 91 コピー /ml を示したもので、いわゆる弧発ブリップ症例と考えられた。50 コピー /ml 未満と弧発ブリップ症例までを治療が順調に推移している群と考え、92% は良好な治療環境にあると言えることが出来る。グループ D の他の症例はそれぞれ 3 回ずつ 50 コピー /ml を越えたが、そのうちの 1 例は消化器症状の改善のために処方 ERN から EI へ変更していたが、1 日 2 回の服用が困難であるとの理由があり 790 コピー /ml までウイルス量の増加を認めたため、レジメンをもとの ERN へ戻してアドヒアランスは改善し、治療効果も復活した。HIV-1 RNA が 790 コピー /ml の時 (EI レジメン時) にエスアールエルへ依頼した RTI, NNRTI, PI, INI への耐性検査では薬剤耐性は認められなかった。残る 3 症例は最大で 200 コピー /ml までウイルス量が変動しているが、一定の傾向はなく、CD4 細胞数にも明らかな変化は認められなかった。

一方、エリートコントローラー症例における知見が Hatano (2009) 1) らにより示されており、HIV-1 に感染しながら、無治療で血中の HIV-1 RNA レベルを測定感度 (PCR 法で 50 copies/ml、b-DNA 法で 75 copies/ml) 未満、かつ CD4 陽性細胞数も維持しているいわゆるエリートコントローラー症例 46 例について低レベルウイルス血症が検討された。この研究では HIV-1 RNA の測定に超高感度測定法として、4 重測定することにより検出感度を 3.5 copies/ml 未満にまで高めた isothermal transcription-mediated amplification (TMA) assay (Aptima; Gen-Probe, San Diego, CA) を使い、通常の臨床検査に比べて高感度で、再現性の良い方法によって検証している。この結果、46 例中 15 例は全経過で HIV-1 RNA が陽性であり、1 例のみが全測定ポイントで陰性を示し、エリートコントローラーにおいても、低レベルの HIV-1 RNA が血中に存在し、ナチュラルコースとして変動していることが示された。

また、抗レトロウイルス療法 (ART) により長期間コントロール良好症例における知見としては、Hatano (2010) 2) らは前述同様の超高感度 HIV-1 RNA 測定系を使用し、HIV-1 に感染して ART により長期間コントロール良好症例における低レベルウイルス血症を検討した。選択基準は ART 下で連続して 2 回以上通常法の HIV-1 RNA が測定感度未満を示した症例であり、180 症例について 483 検体が時系列として測定された。この結果、ART 開始後の通常法の HIV-1 RNA が測定感度未満となった後

も1年間は超高感度法による HIV-1 RNA が有意に低下したが、12ヶ月以降は低下傾向が認められないことが示された。また、この初期の低下に続く安定状態は ART のレジメンとの関係は認められなかった。この様に日常臨床では PCR 法により測定された HIV-1 RNA が測定感度未満を長期間続けているコントロール良好症例においても微量ながらウイルスの増殖が続き、また変動していることが示された。

日本の臨床での血中 HIV-1RNA の定量測定はリアルタイム PCR の技術が導入され、現在では Cobas Ampliprep / Cobas Taqman HIV-1 v2.0 となっている。定量可能下限値も 40 copies/ml から 20 copies/ml となり、定性的には 10 copies/ml 程度までの検出が可能となってきた。一般の臨床医の視点では目にとまることが少ないが、医学研究にとって重大な要素である検査の変遷と信頼性確保の問題について、市販のリアルタイム PCR 法による HIV-1 RNA 定量測定についての地味ではあるが堅実で興味深い報告があるので紹介する。Ruelle ら (2012) 3) は現在世界で利用されている3種の PCR (Versant HIV-1RNA 1.0 kPCR (Siemens), Abbott Realtime HIV-1, Cobas Ampliprep / Cobas Taqman HIV-1 v2.0 (Roche) について、低 RNA 量検体やブリップを示した臨床検体を用いて実践的な検討が行われた。

ベルギーで使われている基準 HIV-1 RNA を非感染血漿により希釈して、終濃度が 100、50、25 および 12copies/ml (2、1.7、1.4、および 1.1 log copies/ml) となる様に調整し、それぞれを各機器・試薬により 10 重測定した。どの機器・試薬でも測定値の再現性を示す CV% が一般の臨床検査とは異なり約 40% と非常に大きく、50 copy/mL 以下になると機種間で再現性の差が目立つようになり、12 コピーレベルでは Abbott Realtime HIV-1 では 10 回のうち 7 回が検出感度以下となった。また、検査施設間の関係でも結果は同様であり低値域での再現性が著しく悪いために施設間差が大きいことを示している。

また、50 copies/ml 未満で RNA が検出された臨床検体について、3 機種で 3 重測定した同時再現性と 3 検査施設で測定した施設間差が検討されたが、どの測定系においても 50% 以上の検体で少なくとも 3 回測定のうち 1 回は検出感度未満となり、20% 程度の検体では 3 回測定のうち 1 回のみ検出できた状態であった。ブリップとして 50 copies/ml 以上で 100copies/ml 未満を示し、前後の測定が 50copies/ml 未満であった 26 症例を抽出してブリ

ップとその前後の計 3 点を同時に測定し直した結果、同じ状態が再現できたのは 5 症例 (19.2%) に過ぎず、残る 21 例のうち 16 例は 50copies/ml 未満であり、5 例は検出感度未満であった。

これらの結果は困ったことであるが、検査法の性質として当初から分かっていたことである。低値域での検出は確率の問題であり検出されたことを知ることは臨床的に必要な情報とする考えから提供される情報である。従って、臨床医は非検出はウイルスの存在を否定したり、定量感度未満検出例より低いウイルス量である事を必ずしも示すものではないことを理解していることが重要である。もちろん、非感染者や十分にウイルスの複製が抑制されている症例で検出される事はほとんどないことは確認されている。この様に現在の臨床検査としての HIV-1RNA 測定の水準では、低レベルの RNA 量について 1 回の測定結果から判断を下すことは難しく、病態の解析については十分な注意が必要である。

治療中の低レベルウイルス・ブリップ検出例への対応は問題が大きく、低レベルウイルス血症の定義自体が曖昧であり、研究者の意図により、または測定技術の進歩により <50copies/ml、50-200copies/ml、50-1000copies/ml などと使い分けられているのが現状である。前項の Ruelle ら (2012) 3) の検討で示されたように、現在の臨床検査としての HIV-1RNA 測定の水準では、低レベルの RNA 量について 1 回の測定結果から正確な判断を下すことは難しく、病態の解析については十分な注意が必要である。これまでの低レベルウイルスやブリップに関する多くの研究成果に水を差すようではあるが、それらの成績は誤りではないものの信頼性は不十分なものが多くと言わざるを得ない。50copies/ml 以上を低ウイルス血症とした検討の結果は正しいが、超高感度法による検討では 3copies/ml から同様のことが起きている可能性がある。ブリップについてもブリップ自体の再現性が低く信頼性の問題は大きい。ウイルス複製が十分に抑制されていない例で発生しやすいことは明らかであり、真のブリップ症例に対して結論は誤りではないはずである。我々臨床医が頼りにしている治療ガイドラインはこの様な研究結果の集積により出来上がっている。EACS の Guidelines (2011) 4) で cART 開始またはレジメン変更から 6 ヶ月の時点で 50copies/ml 以上の場合にウイルス学的失敗を疑い経過を追うことを勧めている。IAS-USA の 2012 年の推奨 5) では、同様に cART 開始またはレジメン変更の 24 週後のウイルス量が 50copies/ml 未満であることを治療が有効な条件とし、200copies/ml 以上をウイルス学的失敗

としている。同時に 10copies/ml 以下の研究結果にも触れており、50copies/ml 未満の存在でも耐性発現が予測されることを示しながらも検討が不十分であり、200copies/ml 未満への治療の対応にはコンセンサスがないとしている。ただし、低レベル検出例には頻回の測定を勧めており、少なくともウイルス量の増加を疑う場合には 50copies/ml 未満の低レベルウイルス血症であっても何らかの対策が必要であろう。今後、超高感度測定による検討が進むことにより、ガイドラインも変化すると思われる。これらの症例に対して現時点で行うべきことは、アドヒアランスの確認、食事など薬剤濃度の維持への工夫、治療歴の確認と耐性リスクの評価、可能な症例には耐性検査、治療薬の genetic barrier の評価などで有り、条件が悪いと判断した場合には他の薬剤の変更を考慮すべきであろう。

E. 結論

今回の調査では、長期 cART 下にある症例で全経過を通して測定感度未満を示した症例は 16% であり、20 コピー /ml 未満を含めても 50% にとどまっていた。ただし、グループ D の 11 症例のうち 7 症例は 6 回のうち 1 回のみが 52 から 91 コピー /ml を示したもので、いわゆる弧発ブリップ症例と考えられた。50 コピー /ml 未満と弧発ブリップ症例までを治療が順調に推移している群と考えれば、92% は良好な治療環境にあるとすることが出来る。実際に今回の調査対象では薬剤耐性ウイルスの発生は一例もなく経過した。

一方、今回の調査では薬剤耐性の獲得と直接結びつく関係は得られなかったが、文献的には弧発ブリップ症例を含めて低レベルウイルスの存在は治療失敗のリスクを増大させる因子、すなわち薬剤耐性の獲得を助長する因子と考えられることから、検査間隔の短縮など入念な治療管理が必要であると考えられた。

文献

- 1) Hiroyu Hatano, 1*Eric L. Delwart, 1,2Philip J. Norris, 1,2 Tzong-Hae Lee, 2 Joan Dunn-Williams, 2 Peter W. Hunt, 1 Rebecca Hoh, 1 Susan L. Stramer, 3 Jeffrey M. Linnen, 4 Joseph M. McCune, 1 Jeffrey N. Martin, 1 Michael P. Busch, 1,5 and Steven G. Deeks 1 . Evidence for Persistent Low-Level Viremia in Individuals Who Control Human Immunodeficiency Virus in the Absence of Antiretroviral Therapy JOURNAL OF VIROLOGY, Jan. 2009, p. 329-335 Vol. 83, No. 1
- 2) Hiroyu Hatano 1, *, Eric L. Delwart 2, 3, Philip J. Norris 1, 2, 3, Tzong-Hae Lee 2, Torsten B. Neilands 4, Colleen F. Kelley 5, Peter W. Hunt 1, Rebecca Hoh 1, Jeffrey M. Linnen 6, Jeffrey N. Martin 1, Michael P. Busch 2, 3, and Steven G. Deeks Evidence of Persistent Low-level

Viremia in Long-term HAART-suppressed, HIV-Infected Individuals AIDS. 2010 October 23; 24(16): 2535-2539.

- 3) Jean Ruelle 1*, Laurent Debaisieux 2, Ellen Vancutsem 3, Annelies DeBel 3, Marie-Luce Delforge 2, Denis Piérard 3 and Patrick Goubau 1 HIV-1 low-level viraemia assessed with 3 commercial real-time PCR assays show high variability BMC Infectious Diseases 2012, 12:100
- 4) The European AIDS Clinical Society (EACS) Guideline Version 6 - October 2011
- 5) Antiretroviral Treatment of Adult HIV Infection 2012 Recommendations of the International Antiviral Society-USA Panel JAMA, July 25, 2012 —Vol 308, No. 4

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 学会発表

1. 村松 崇, 天野 景裕, 四本 美保子, 大瀧 学, 四本 美保子, 大瀧 学, 尾形 享一, 萩原 剛, 福武 勝幸, テノホビルからアバカビルを含むレジメンに変更した HIV 症例の検討, 第 86 回日本感染症学会総会 長崎市, H24.4.26
2. 村松 崇, 山元 泰之, 大瀧 学, 尾形 享一, 鈴木 隆史, 萩原 剛, 天野 景裕, 福武 勝幸, HIV 感染者における HBc 抗体陽性例の検討, 第 16 回日本肝臓学会大会 神戸市, H24.10.10
3. 福武 勝幸, 篠澤 圭子, 味澤 篤, 岩本 愛吉, 菊池 嘉, 白阪 琢磨, 藤井 輝久, 花房 秀次, 三間屋 純一, 関根 祐介, 山元 泰之, エイズ治療薬研究班の活動 (1996 年から 2011 年), 第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会, 横浜市, H24.11.24
4. 四本 美保子, 篠澤 圭子, 山元 泰之, 青木 眞, 関根 祐介, 味澤 篤, 岩本 愛吉, 菊池 嘉, 白阪 琢磨, 藤井 輝久, 花房 秀次, 福武 勝幸, 本邦における HIV 感染症患者のアドバコン使用状況と副作用, 第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会, 横浜市, H24.11.24

H. 知的所有権の出願・取得状況

なし

中国四国ブロックにおける薬剤耐性 HIV の動向調査研究 ～広島大学病院における未治療 HIV 感染者における薬剤耐性の解析～

研究分担者 藤井 輝久 広島大学病院輸血部 准教授・エイズ医療対策室 室長
研究協力者 齋藤 誠司 広島大学病院輸血部助教・エイズ医療対策室
高田 昇 広島文化学園大学看護学部 教授

研究要旨

未治療 HIV 患者における HIV の薬剤耐性関連変異について解析，検討したところ，本年度耐性株保有者は部分耐性を含め 3 名であった。また今年はパートナー同士の薬剤耐性を検査する機会が 4 組あり，それらの変異パターンや変異数を比較することにより，どちらからかの感染かを推測できる可能性が示唆された。またインテグラーゼ領域には，あらたな耐性変異が出現していた。また並行して行った指向性検査では，必ずしもエイズ期には CXCR4 指向性株に変化しているわけではないことが分かった。

A. 研究目的

国内で流行している薬剤耐性ウイルスを全国レベルで把握するために，広島大学病院における新規 HIV 感染者において薬剤耐性検査を行い，中国ブロックにおいて流行している HIV 遺伝子型 (サブタイプ) や薬剤耐性株を推定することを本研究の目的とした。また未治療時または治療経過中におけるウイルス指向性も把握する目的で，ウイルスジェノタイプ指向性検査も追加して行った。

B. 研究方法

平成 24 年 1 月 1 日から平成 24 年 12 月 31 日までに広島大学病院を受診した HIV 感染者を対象とした。対象者に対して本研究の目的や方法などを文書によって事前に説明し，初回は本人から書面で，2 回目以降は口頭で同意を得て末梢血約 7ml の採血を行った。採血検体は著者または研究協力者が記号化を行い，患者のプライバシーを保護するように配慮した。採血検体は国立病院機構名古屋医療センターに送付し，そこで HIV のサブタイプ解析及び薬剤耐性遺伝子型検査，またジェノタイプ指向性検査を行

った。測定方法は既報の方法で行われた。結果について患者のプロファイルと照らし合わせ，本院で一部統計学的処理を行い解析した。

解析の際，米国スタンフォード大学の HIV DRUG RESISTANCE DATABASE (<http://hivdb6.stanford.edu/index.html>) と，本研究事業成果の一部である HIV 薬剤耐性検査ガイドライン ver.6 を参照した。

ウイルスジェノタイプ指向性検査についても同様に口頭で説明し，承諾が得られた場合には前述の名古屋医療センターに検査を追加依頼した。検査の方法は，米国モノグラムバイオサイエンス社のフェノタイプ試験ではなく，Beerenwinkel らの用いた遺伝子型より指向性を類推するジェノタイプ試験である。遺伝子型から X4 指向性の確率を評価する Geno2Pheno (<http://coreceptor.bioinf.mpi-inf.mpg.de/>) を用いて，CXCR4(X4) 指向性の確率を False Positive として表示し，その値が 5 % 以上 (cut off index) であれば CCR5(R5) 指向性とした。

期間中，検体採取し結果を得た例数は，新規未治療 14 例，未治療再検 6 例 (内血友病合併 2 例)，治療中 1 例，治療中断 1 例の計 22 例であった。

(倫理面への配慮)

検査が同一対象者で2回以上にわたる場合には、その都度説明し同意を得た。検体送付に際しては、著者または研究協力者が連結可能匿名化を行い、患者のプライバシーに抵触しないように配慮した。

C. 研究結果

(1) 対象者の概略

期間内の本院初診患者は24人であり、そのうち7人が既に前医で治療中であり17人が未治療患者であった。しかし、既治療例のうち1人は治療を中断していた。治療前2回目、すなわち前述の「未治療再検例」は6人であった。性別は1人のみ女性で他は男性であった。2人のカンボジア国籍の夫婦を除き全員日本国籍であり、現在の居住地は全て広島県内であった。治療中の1例及び無治療にも関わらず血中ウイルス量が非常に低値である1例の計2例は、増幅産物が得られず、薬剤耐性遺伝子検査を施行し得なかった。一方、ジェノタイプ指向性検査は、前述の治療例でも施行し得たので、全21検体であった。

(2) 薬剤耐性遺伝子変異について

薬剤耐性遺伝子変異のプロファイルを表1に示す。表中No.8は治療中、No.12が前述の低ウイルス量例であり、増幅産物が得られないことより、検査施行し得ず(Not done;ND)とした。施行し得た20検体のうち、HIV薬剤耐性検査ガイドライン ver.6などと照らし合わせ、明らかに薬剤耐性ウイルスで

あったものが1例見られた(No.20)。

その耐性関連変異はプロテアーゼ領域にL10F, L33F, M46I, I62V, V77IでIndinavir, Atazanavir耐性であった。また逆転写酵素領域でT215I/Lを認め、thymidine analogue related mutations (TAM)ではないとしてもAZT, d4Tに部分耐性とした。他にNo.13でプロテアーゼ領域にL10V, I15V, I62V, A71T, No.21にL10V, I62V, A71Vで、共にSaquinavir部分耐性であった。

No.3とNo.4, No.5とNo.6, No.13とNo.17, No.18とNo.19はそれぞれセクシャルパートナー同士(カップル)であった。No.18とNo.19のカップルの薬剤耐性変異パターンは全く同一であったが、残りの3組の変異パターンは似ているものの同一ではなかった。さらにその3組全て年長者の方が薬剤耐性関連変異を含め付加変異が多く見られた。

逆転写酵素領域では、TAMと呼ばれる変異(M41L, D67N, K70R, L210W, T215F/Y, K219Q/E)は、全例検出されなかったが、前述のT215I/L以外では、V179Iが比較的多く見られた。インテグラーゼ領域の変異はE157Qが2例であったが、V72Iが12例認められた。また今年初めてI74Mの変異が認められた。

(3) ウイルス遺伝子型(サブタイプ)について

表2に患者における血友病やエイズ発症の有無及びそのサブタイプ、ウイルス指向性検査の結果を示す。サブタイプはAEが4例、他は全例Bであった。AE4例はNo.3とNo.4のカンボジア国籍の夫婦と、

表1 薬剤耐性検査を行った症例の一覧とその変異

No.	プロテアーゼ領域	判定	逆転写酵素領域	判定	インテグラーゼ領域	判定
1	I15V	S	-	S	V72I	S
2*1	M36I, I15V, D60E, I62V	S	-	S	V72I, I74M	S
3	K20R, M36I, L63P, D60E	S	V179I	S	-	S
4	M36I, G16E, D60E	S	V179I	S	-	S
5	I15V, I62V, H69N, V77I	S	-	S	V72I	S
6	L63P, H69N, V77I	S	-	S	-	S
7	I15V, M36I	S	-	S	-	S
8*2	ND	-	ND	-	ND	-
9*1	L10V, I15V, V77I	S	-	S	V72I	S
10	L63P	S	-	S	V72I, E157Q	S
11*1	-	S	-	S	-	S
12	ND	-	ND	-	ND	-
13	L10V, I15V, I62V, A71T	PR	-	S	V72I	S
14	-	S	V179I	S	V72I	S
15*1	L63P	S	-	S	V72I, E157Q	S
16*1	L10V, I15V, A71V	S	-	S	-	S
17	I15V	S	-	S	V72I	S
18*1	L10I, G16E, D60E, I62V	S	-	S	-	S
19*1	L10I, G16E, D60E, I62V	S	-	S	-	S
20	I15V, I62V, A71V	S	-	S	V72I	S
21*1	L10F, L33F, M46I, I62V, V77I	R	V179I, T215I/L	PR	V72I	S
22	L10V, I62V, A71V	PR	-	S	V72I	S

*1未治療再検例, *2治療中例, 判定の欄(S;感受性, R;ある薬剤に明らかな耐性, PR;部分耐性)

表 2 遺伝子型及び指向性検査結果とプロテアーゼ領域変異

No.	血友病	発病	年齢	サブタイプ	指向性 (%)	プロテアーゼ領域
1	×	×	81	B	R5(87.1%)	I15V
2*1	○	×	45	B	R5(11.7%)	M36I, I15V, D60E, I62V
3	×	○	68	AE	R5(83.5%)	K20R, M36I, L63P, D60E
4	×	×	68	AE	R5(53.5%)	M36I, G16E, D60E
5	×	×	37	B	R5(5.3%)	I15V, I62V, H69N, V77I
6	×	×	24	B	R5(84.0%)	L63P, H69N, V77I
7	×	×	22	B	R5(74.4%)	I15V, M36I
8*2	×	○	38	B	R5(95.4%)	ND
9*1	×	×	29	B	R5(43.0%)	L10V, I15V, V77I
10	×	×	32	B	R5(19.4%)	L63P
11*1	○	×	48	B	R5(17.9%)	-
12	×	×	37	ND	ND	ND
13	×	○	60	B	R5(11.5%)	L10V, I15V, I62V, A71T
14	×	×	24	B	R5(71.2%)	-
15*1	×	×	40	B	R5(24.2%)	L63P
16*1	×	×	66	B	R5(44.4%)	L10V, I15V, A71V
17	×	×	39	B	R5(26.9%)	I15V
18*1	×	×	29	AE	X4(3.5%)	L10I, G16E, D60E, I62V
19*1	×	×	36	AE	X4(3.5%)	L10I, G16E, D60E, I62V
20	×	○	47	B	R5(84.6%)	I15V, I62V, A71V
21*1	×	×	27	B	R5(34.6%)	L10F, L33F, M46I, I62V, V77I
22	×	×	75	B	R5(89.1%)	L10V, I62V, A71V

*1未治療再検例, *2治療中例, ND; Not done(施行し得ず)

No.18 と No.19 のゲイのカップルで、共にどちらからからの感染と考えられるものであった。また AE で野生株とされる M36I が No.3 と No.4 で見られたが、No.18 と No.19 では認めなかった。

(4) ウイルス指向性について (表 2)

22 例のうち 21 例でウイルス増幅に成功し検査し得た。増幅不可であった 1 例の血中ウイルス量は 24 コピー /ml と非常に低値であった。No.18 と No.19 以外は全て R5 指向性であった。感染からの期間が 30 年近い血友病 2 例や、同様に感染からの期間が比較的長いと予想されるエイズ発病例 4 例は、いずれも R5 指向性であった。しかもエイズ発病例 4 例のうち、1 例を除く 3 例は false positive rate が 80% 以上と高かった。一方、血友病症例 2 例はいずれも false positive rate が、10% 台であった。また年齢と false positive rate、プロテアーゼ領域の変異数に統計的有意な関連はなかった。

D. 考察

未治療 HIV 感染者の結果について、今年の薬剤耐性株は部分耐性も含めて 21 例中 3 例であった。薬剤耐性関連変異を持つ割合はプロテアーゼ領域に多く、全く変異の認められないものは 21 例中わずか 2 例であった。今年よく見られる変異としては、L10F/V, I15V, I62V, A71V であり、うち I15V, A71V の増加は大きな特徴である。A71V は darunavir, fosamprenavir 以外全てのプロテアーゼ阻害剤に対する二次耐性変異である。キードラッグとして使用された darunavir, fosamprenavir 以外のプロテアー

ゼ阻害剤の使用頻度が、従来は高かったことが関連していると思われる。もしそうであるなら、この変異は自然変異ではなく服用者あるいは服用経験者からの感染が広がっていることを示唆する。今後 darunavir が第一選択として使用される頻度が増えていくにつれ、この変異が減っていけば著者の予想を裏付けることになる。

逆転写酵素領域の耐性関連変異がみられたものは 3 例のみで、いずれも V179I である。これも最近散見されるようになった変異であるが、その意義については不明である。

一昨年初めて E157Q の変異が検出されたインテグラーゼ領域であるが、今年は E157Q が 2 例、V72I が 12 例認められた。また初めて I74M が見られた。共に高度耐性変異ではないが、既知の薬剤耐性変異である Y143, Q148, N155 との関連がいかなるものか、この変異が先んじて出現するのかどうかデータの蓄積が必要になると思われる。ただ、V72I が急激に増加している背景には、Raltegravir の使用頻度の増加と関連があるのではないかと想像させる。こちらにも注視して行く必要がある。

前年も報告したが、カップルでの薬剤耐性変異の比較を行うと、興味深い結果が得られる。この度、4 組のカップルの薬剤耐性検査を行う機会を得た。No.3 と No.4 は、カンボジア国籍の 60 歳代の夫婦であり、日本在住歴はすでに 20 年近い。No.3 の方が薬剤関連変異を含む変異数が多いことより、No.3 が先行感染しその後 No.4 への感染が起こったものと思われる。しかし、No.4 の変異に No.3 にはない

G16E が認められている。No.4 は No.3 以外のパートナーがいないと仮定すると、この変異は自然変異であることが示唆される。No.5 と No.6 のゲイのカップルにも変異の数での推測を当てはめると、年上の No.5 から年下の No.6 へ HIV が伝播したと思われる。No.13 と No.17 も同様である。No.18 と No.19 は前年報告したゲイのカップルで耐性関連変異が同一である。しかしそれ以外の付加変異が No.18 の方が多い。両者の問診により、年下の No.18 が先行感染し年上の No.19 へウイルスが伝播したことが想像されており、感染期間が長い方がより変異が多くなることが示唆された。このようにどちらが先行感染したか分からない場合には、耐性関連変異パターンを見ることで想像できる。

昨年度途中より測定を開始したウイルス指向性検査であるが、本年は薬剤耐性検査を行う際にルーチンに測定を行うよう依頼した。21 例測定したが、2 例を除き全て R5 指向性であった。一般に R5 指向性は、感染初期に多く見られその後病状が進行すると X4 指向性に変化するとされている。つまりエイズ期においては、X4 指向性が多く検出されることが想像されるが、自験例ではエイズ発病者は全て R5 指向性であった。また本研究の指向性検査はジェノタイプ検査であり、false positive rate にて判断されるものである。そのため、R5 指向性と判定されても経過と共に徐々に false positive rate が低下し、X4 指向性に近づくのではないかと考えた。そのため、エイズ発病者でないが感染からの期間が長い未治療血友病患者での指向性検査結果及びその false positive rate に注目してみた。2 例と少数ではあるが、明らかにその値は低く共に 10% 台であった。一方、明らかな感染時期が全例分かっているわけではない性行為による感染者において、その年齢で false positive rate に関連があるか、相関係数やノンパラメトリック検定など統計学的処理を行ったが、有意または関連あり、といった結果にはならなかった。このことより、あくまでも感染からの期間の方が false positive rate に対してより関連をもたらす因子であることが想像された。

CCR5 阻害剤の Maraviroc が DHHS ガイドラインにおいて、未治療患者の ART のキードラッグとして acceptable regimen に追加されて 2 年経過した。そのウイルス抑制機序から考えると、未治療者特に新規感染者に適した薬剤であると想像される。本院の未治療血友病患者 (No.11) において、十分な説明と同意を行い初めてキードラッグとして使用した。副作用もなく、また内服 4 週間後に血中ウイルスは未検出となった。最近、エンتری阻害薬は細

胞外ウイルス量を増加させる可能性を示唆する報告がなされた。該当患者は低ウイルス量で推移している elite controller であるが、その患者においてはウイルス量の増加は認めていない。今後ウイルス量の推移を注視する必要がある。

本報告は前年まで「中国四国ブロックの…」としていたが、実情は本院の患者の解析であり、必ずしも中国四国ブロック全体を示しているものではない。本年度より四国ブロックでは、愛媛大学医学部附属病院がその中心を担うことになったが、それでも本院は中国地方他県の情報を得ているわけではない。本研究の意義を中国四国ブロック内のエイズ拠点病院に理解してもらい、研究協力機関を増やすべきであると考え、この 1 年ホームページやブロック内での研究会・研修会などで周知を図ってきた。少しずつではあるが、理解してくれる医療機関が見られ始めている。それらのデータを今後本院で集約し解析するための何らかのスキームが必要であると思われる。

E. 結論

本院を受診中の HIV 患者においてその薬剤耐性関連変異パターン及びウイルス指向性について考察した。部分耐性を含め耐性株保有者は未治療患者 21 人中 3 人に認められた。また耐性関連以外の変異やウイルス指向性検査を見ることで、感染からの時間経過や病状進行を予測できる可能性が示唆されたが、必ずしもエイズ発病者に X4 指向性が多いという結果にはならなかった。今後もさらに研究を発展・継続するために、中国ブロック内の診療施設への宣伝活動と共に、商業ベースで行っている薬剤耐性検査結果を集約し、解析するスキームが必要であると考えた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 原著論文

1. 齊藤誠司, 鍵浦文子, 喜花伸子, 船附祥子, 藤田啓子, 畝井浩子, 藤井輝久, 高田昇, 木村昭郎: HIV/HBV 重複感染症例における HBV に対する治療経験とその考察。日本エイズ学会雑誌, 14(2):111-117, 2012.
2. 藤井輝久, 中国四国地方における HIV 感染症の動向と現状, 医学の門, 53(4):262-267, 2012.
3. 藤井輝久, エイズ/HIV 感染症の概略と検査の勧め方 - 実習を通じて -, 広島市医師会だより, 554(6):7-9, 2012.

2) 学会発表

1. 藤井輝久, 齋藤誠司, 鍵浦文子, 高田昇, 本院のエイズ患者における免疫再構築症候群の現状と考察, 第86回日本感染症学会学術集会(平成24年4月25日~4月26日, 長崎)
2. 鍵浦文子, 藤井輝久, 齋藤誠司, 高田昇, 広島大学病院 HIV/AIDS 患者の初診時における梅毒罹患の状況, 第86回日本感染症学会学術集会(平成24年4月25日~4月26日, 長崎)
3. 藤田啓子, 藤井健司, 畝井浩子, 鍵浦文子, 藤井輝久, 齋藤誠司, 高田昇, 木平健治, 当院における HIV 感染者に対する B 型肝炎ワクチン接種の効果について, 第86回日本感染症学会学術集会(平成24年4月25日~4月26日, 長崎)
4. 高田昇, 齋藤誠司, 藤井輝久, 藤田啓子, 藤井健司, 畝井浩子, 木平健治, 広島大学病院の抗 HIV 療法の変遷, 第82回日本感染症学会西日本地方学術集会(平成24年11月5日~11月7日, 福岡)
5. 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, 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:ETstudy 96 週結果, 第26回日本エイズ学会学術集会(平成24年11月24日~11月26日, 横浜)
6. 福武勝幸, 篠澤圭子, 味澤篤, 岩本愛吉, 菊池嘉, 白阪琢磨, 藤井輝久, 花房秀次, 三間屋純一, 関根祐介, 山元泰之, エイズ治療薬研究班の活動(1996年から2011年), 第26回日本エイズ学会学術集会(平成24年11月24日~11月26日, 横浜)
7. 四本美保子, 篠澤圭子, 山元泰之, 青木眞, 関根祐介, 味澤篤, 岩本愛吉, 菊池嘉, 白阪琢磨, 藤井輝久, 花房秀次, 福武勝幸, 本邦における HIV 感染症患者のアトバコン使用状況と副作用, 第26回日本エイズ学会学術集会(平成24年11月24日~11月26日, 横浜)
8. 高田昇, 齋藤誠司, 木下一枝, 西坂理絵, 鍵浦文子, 杉原清香, 藤井輝久, 広島大学病院の HIV 感染症の疾病統計, 第26回日本エイズ学会学術集会(平成24年11月24日~11月26日, 横浜)
9. 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(平成24年11月24日~11月26日, 横浜)
10. 齋藤誠司, 鍵浦文子, 木下一枝, 西坂理絵, 喜花伸子, 石原麻彩, 藤井健司, 藤田啓子, 畝井浩子, 中村毅, 藤井輝久, 高田昇, ART 施行例の動脈硬化症評価における PWV/ABI の有用性について, 第26回日本エイズ学会学術集会(平成24年11月24日~11月26日, 横浜)
11. 松井加奈子, 柴秀樹, 鍵浦文子, 木下一枝, 西坂理絵, 岩田倫幸, 高田昇, 齋藤誠司, 藤井輝久, 広島大学病院における HIV 陽性者の歯科医療への取り組み, 第26回日本エイズ学会学術集会(平成24年11月24日~11月26日, 横浜)
12. 藤井輝久, 杉原清香, 齋藤誠司, 鍵浦文子, 木下一枝, 高田昇, CD4 数増加しない症例において CD4/CD8 比率のモニタリングは有用である, 第26回日本エイズ学会学術集会(平成24年11月24日~11月26日, 横浜)

H. 知的所有権の出願・取得状況
なし

治療患者における薬剤耐性 HIV 調査・サブタイプの調査

研究分担者 松下 修三 熊本大学エイズ学研究センター 教授

研究要旨

我々は、新規診断症例を含む HIV-1 感染症例の envelope シークエンスの研究を継続し、V3-tip の 315 番目のアミノ酸の codon usage に注目した subtype 分類を試みた。総数 107 名の解析の中で、315 番に複数の codon usage が見られた症例が 17 例あり、従来の分離株に見られる 315R(AGA) 及びこれから進化したと考えられる codon を持つ CB/EB: classical B/evolved B と非 subtype B に見られる 315Q (CAA or CAG) から 315R (CGA or CGG) と変異したと考えられる NB/RB: non-subtype B/recombinant B 型に分類可能であることを確認した。107 例に関して、V3-tip の 315 番目のアミノ酸の codon usage を検討した結果、2000 年以前の感染例の多くは CB/EB 型であった。一方、RB 型の感染は、1999 年ころから散見され、2008 年～2009 年まで増加したが、2010 年より減少した。対照的に EB 型の代表である 315K(AAA) を持つウイルスは 2004 年から存在しているが、ここ数年にわたり増加する傾向が観察された。geno2pheno を用いた指向性検査の解析を試みると、RB 症例のうち 315Q の症例はすべて R5 ウイルスであり、EB 型では D/M ウイルスの頻度が低いことが明らかとなった。これらの知見は HIV-1 の進化の方向性を知る上で、また今後の治療やワクチン開発を考えるうえで重要な知見と考えられる。

A. 研究目的

HIV-1 は感染を拡大させながら、進化し続けるという特徴を持っている。我々は、新規診断症例に関して、ウイルス分離を行い、治療用に開発中の抗 V3 抗体を用いて中和抗体への感受性の検討を行ってきたが、その過程で興味深い観察をした。すなわち、subtype B に分類されるウイルスのなかで、V3 抗体に中和抵抗性のウイルスの V3-tip のアミノ酸配列が GPGR と GPGQ が混在する症例と GPGK のみまたは GPGR と GPGK が混在する症例があることを観察した。特に、後者は、最近の数年に急激に増加しているという印象を受けており、これらの解析は中和抗体が関わるワクチン開発に示唆を与えるだけでなく、感染拡大を調査する疫学的解析にも貢献するものと考えられる。本研究の目的は、このような進化に関わる分子マーカーが、新たな疫学的指標として提唱可能かどうか調べるところにある。

B. 研究方法（倫理面への配慮）

HIV-1 感染症例末梢血単核球より、CD8-

immunobeads を用いて CD8+ 細胞を除去し、抗 CD3 抗体 及び IL2 を用いて CD4+ 細胞を増殖させ、その培養上清中のウイルスを envelope primer を用いて RT-PCR で増幅し、envelope 全長をシークエンスした。また、EDTA 加血漿に対して直接 RT-PCR にて C2-V3 の塩基配列を同定し、HIV の集団内での進化を考察し、これによる分類を試みた。envelope シークエンスによる subtype 分類は NCBI のホームページの viral genotyping tool の subtype 分類機能を用いて同定した。Coreceptor usage の判定には、遺伝子型から X4 指向性の確率を評価する geno2pheno (coreceptor) (<http://coreceptor.bioinf.mpi-inf.mpg.de/>) を用いた。

（倫理面の配慮）HIV 感染症例由来の血液検体を用いたウイルス分離及び塩基配列同定、中和抗体感受性試験などに関しては、臨床研究に関する倫理指針に従い、学内倫理委員会の承認を得た説明と同意書を用いて同意を得たのちに採血した（臨床研究登録 UMIN000004720）。

C. 研究結果

我々は、昨年度までに引き続き、新規診断症例を含む HIV-1 感染症例の envelope シークエンスを行い、特に V3-tip の 4 アミノ酸 (subtype B の consensus では GPGR) のうち 315 番目のアミノ酸の codon usage に注目して解析した。総数 108 名の解析の中で、V3-tip の 315 番目のアミノ酸に複数の codon usage が見られた症例が 17 例あった(表 1 にまとめた)。このうち 15 例は subtype B に分類されるウイルスであるが、ほとんどの実験室株や血友病症例に見られる R(AGA) と、これから A to G または G to A 変異を起こしたと考えられる R(AGG) または K(AAA) および A to T or C に起因すると考えられる S(AGT,AGC) の症例が 11 例であった。これらは、従来から認知されている subtype B であり、総称して CB/EB: classical B/evolved B と分類可能である。

一方、非 subtype B の 2 例を含む他の症例では、315 番目のアミノ酸とそれをコードする codon が Q(CAG) と R(CGG) または Q(CAA) と R(CGA) の混在であり、いずれも A to G 変異によっておこった Q から R への変化が関与するもの考えられた。これらの HIV-1 感染者から、HIV-1 を分離し、envelope 全長の塩基配列を決定し subtype 分類を行った結果、subtype B と non-B のキメラのシークエンスを持つ

症例の増加が認められた。NCBI のホームページの viral genotyping tool の subtype 分類機能を用いて解析すると、subtype B の配列を基本にしなが、CRF03_AB や CRF14_BG や CRF15_01B などを含むキメラ化されたエンベロップ配列であることが分かった。これらは“組み換え型 B(recombinant type B)”として区別可能であり、非 subtype B も含めて NB/RB: non-subtype B/recombinant B 型の V3 と呼ぶことが可能である。このような症例が 17 例の解析のうち 6 例認められた。これまでの解析で、CB/EB 型と NB/RB 型は系統樹解析するとまったく別のクラスターを作ることから、subtype B の中に二つの異なった進化経路があったことが想像できる。そして、各ウイルスがどの分類に属するかは、V3-tip の 315 番目のアミノ酸の codon usage から予想可能である。

1980 年代に感染したと考えられる血友病症例を含む 107 例に関して、V3-tip の 315 番目のアミノ酸の codon usage を検討した。その結果、血友病症例 15 例の解析では、1 例の例外 315 Q(CAA) を除けば、全例 CB/EB 型であった。また、症例数は少ないものの NB/RB 型の感染は、1999 年ころから散見され、2008 年~2009 年まで増加している。しかし、2010 年より減少し、2011 年以降は、新規症

表 1 315Q/R in V3-tip に複数の codon usage が見られた 17 症例

YOD	Pt'sID	V3 tip AA	codon usage of GPGR				RB/NB-Q1	RB/NB-Q2	RB-R1	RB-R2	CB-R1	CB-R2	EB-K	EB-G1	EB-G2	EB-S1	EB-S2	geno2pheno	
			CAG	CAA	CGG	CGA	AGA	ACC	AAA	GGA	GCC	AGT	AGC	subtype	FPR				
1	1996	TIK	GPGR	GGA CCA GGG AGG						AGA								B	ND
			GPGR	GGA CCA GGG AGA							AGG								B
2	Apr.1998	YIS	APGR	GCA CCA GGG AGA						AGA								B	92.2
			APGS	GCA CCA GGG AGC													AGC		B
3	Sep.1998	YKI	GPGR	GGA CCA GGG AGA						AGA								B	25.6
			GPGR	GGA CCA GGG AGT												AGT			B
4	Feb.1999	NSI	GPGR	GGA CCA GGA CAA		C-A												AE	0.2
			GPGR	GGA CCA GGA CGA				C-A											AE
5	Apr.1999	MIS	GPGR	GGA CCA GGG CAA		C-A												B	88.5
			GPGR	GGA CCA GGG CGA				C-A											B
6	Sep.2000	kKGO	GPGR	GGA CCG GGG AGA						AGA								B	0
			GPGR	GGA CCG GGG AGC													AGC		B
7	June.2003	MNIS	GRGR	GGA CGA GGG CGA					C-A									B	3.2
			GRGR	GGA CGA GGG CCG				C-G											B
8	May. 2007	MNA	GPGR	GGA CCA GGG CCG				C-G										B	5.7
			GPGR	GGA CCA GGG CAG		C-A													B
9	July. 2007	YUNA	GPGR	GGA CCA GGG AGA						AGA								B	41.4
			GPGR	GGA CCA GGG AGG							AGG								B
10	Jan. 2008	YANA	GPGR	GGA CCA GGC AAA								AAA						B	41.2
			GTGR	GGA ACA GGC AGA							AGA								B
11	Feb. 2008	HTA	GPGR	GGA CCA GGG CAA		C-A												B	63.1
			GPGR	GGA CCA GGG CGA				C-A											B
12	Sep. 2008	mYHI	GPGR	GGA CCA GGA CAA		C-A												C	72.6
			GPGR	GGA CCA GGA CGA				C-A											C
13	Apr. 2008	TAKO	GLGR	GGA CTA GGC AGA						AGA								B	13.1
			GPGR	GGA CCA GGC AAA									AAA						B
14	Nov. 2009	YMI	GPGR	GGA CAA GGG AGA						AGA								B	3.7
			GPGR	GGA CAA GGG AAA									AAA						B
15	Apr. 2010	KMA	GPGR	GGA CAA GGG AGA						AGA								B	2.9
			GPGR	GGA CAA GGG AAA									AAA						B
16	May. 2010	JNA	GPGR	GGA CAA GGG AAA								AAA						B	17.1
			GPGR	GGA CAA GGG AGA							AGA								B
17	Dec. 2011	NIK	GPGR	GGA CCA GGC AAA								AAA						B	45.5
			GLRR	GGA CTA AGA AGA							AGA								B

CB/EB: classical B/evolved B: 315R(AGA) to R(AGG) to K(AAA) to S(AGT,AGC).
 NB/RB: non-subtype B/recombinant B: 315Q(CAG) to R(CGG),Q(CAA) to R(CGA).

表 2 非サブタイプ B 症例における V3 tip の codon usage

Pt. No.	YOD	V3 tip AA	codon usag of GPGX	RB/NB-O1	RB/NB-O2	RB-R1	RB-R2	CB-R1	CB-R2	EB-K	EB-G1	EB-G2	EB-S1	EB-S2	EB-N	EB-A	EB-H	geno2pheno subtype	FPR
1	Jun.1998	GPGQ	GGA CCA GGA CAA	CAA	CAA					AAA	GGA	GGC	AGT	AGC	AAT	GCA	CAT	C	41.3
2	Feb.1999	GPGQ	GGA CCA GGA CAA	CAA	CAA													AE	6.2
		GPR	GGA CCA GGA CGA				CGA											AE	18.5
3	Apr.2004	GPGQ	GGA CCA GGG CAA		CAA													C	10.1
4	June.2005	GPGH	GGA CCA GGA CAT														CAT	AE	48.4
5	Aug.2005	GPGQ	GGA CCA GGA CAA		CAA													AE	2.7
6	Oct.2005	GPR	GGA CCA GGA AAA							AAA								AE	1.7
7	Dec. 2005	GPGQ	GGA CCT GGA CAA		CAA													*C(G?)	67.9
8	Dec. 2005	GPGQ	GGA CCA GGA CAA		CAA													AE	39.7
9	July. 2006	GPGQ	GGA CCA GGG CAA		CAA													C	38.4
10	Feb. 2007	GPGQ	GGA CCA GGA CAA		CAA													AG	45.7
11	Mar. 2008	GQQQ	GGA CAA GGA CAA		CAA													AE	13.1
12	May. 2008	GPGQ	GGA CCA GGA CAA		CAA													BC	7.2
13	Sep. 2008	GPGQ	GGA CCA GGA CAA		CAA													C	72.6
		GPR	GGA CCA GGA CGA				CGA											C	16.9
14	Jan. 2010	GPGQ	GGA CCA GGG CAA		CAA													AE	5
15	Mar. 1996	GPGH	GGA CCA GGA CAT														CAT	AE	1.1

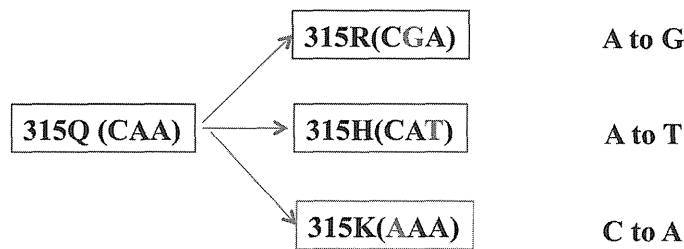


図 1 非サブタイプ B 症例における V3-tip の codon usage の変化
 多くの症例では、315Q (CAA) が単独で用いられる CRF01_AE
 の 2 例で 315R(CGA), 2 例で 315H(CAT), 1 例で 315K(AAA)

例は 1 例のみとなった。一方、EB 型の代表である 315K(AAA) の変異を持つウイルスは 2004 年から存在しているが、ここ数年にわたり増加している傾向が観察された。

15 例の非 subtype B ウイルス感染症例に関しても同様の検討を行った (表 2)。15 例中 10 例の V3 tip の 315 番目のアミノ酸は、315Q(CAA) であったが、2 例は、315R と Q の混在が確認され (CRF01_AE 2 例)、その R の codon は CAA → CGA のパターン (A to G mutation) であった。また、2 例で 315H (CAT)、1 例で 315K (AAA) が認められ、それぞれ、A to T または C to A mutation が想定可能と考えられた (図 1)。Subtype B の RB で認められる 315Q(CAG) の codon usage が、非 subtype B ウイルスで認められない理由は不明であるが、解析数が少ないためである可能性も残る。

例外的に、315K (AAA) となった非 subtype B 症例の V3 周辺のアミノ酸配列を示す (図 2A)。

V3-tip の codon usage は GGA CCA GGA AAA であり、315K に関しては EB と同じ codon になるが、314G の codon usage には、非 subtype B ウイルスの特徴である 314G (GGA) が見られた。一方、Subtype B の GPGK は、18 例認められ、314G の Codon usage は GGC が 13 例、GGG が 5 例で、GGA は一例もない。非 subtype B では 14/17 が GGA であった。C2-V3 領域の系統樹解析を行ったところ、本例の ENV は CRF_01AE のクラスターに入ることが分かった (図 2B)。

本研究の分類の臨床的意義に関する研究として、診断時の検査所見 (CD4、VL) や Clinical stage の検討を行ったが、2 系統間に明らかな差はなかった。一方、geno2pheno を用いた指向性検査のデータを用いて、統計学的な解析を試みると、RB 症例のうち 315Q の症例は、すべて R5 ウイルスであり、FPR も有意に高い値であった。対照的にこれらから進化したと考えられる RB-R1 および RB-R2 では