



# 北陸ブロックにおける薬剤耐性 HIV の動向調査研究

研究分担者 上田 幹夫 石川県立中央病院免疫感染症科 部長

## 研究要旨

2010 年から 2012 年までに新規に HIV 感染が診断された 25 例に対して、薬剤耐性検査とサブタイプ解析を行った。25 例は、全て慢性未治療患者であり、全ての検体で、耐性に関与するとされる部位に変異を確認したが、治療に影響を与えるような高度耐性変異は検出されていない。(2007 年から 2009 年までに 18 例検査し、高度耐性変異は 0 件であった。)

サブタイプ解析の結果、サブタイプ B が 21 例、AE が 2 例、AG が 1 例、C が 1 例であり、サブタイプ B が流行しているのは以前と同じである。

## A. 研究目的

我が国における薬剤耐性 HIV-1 伝播の状況を把握するために、北陸ブロックにおける新規あるいは慢性未治療 HIV-1 感染者における、薬剤耐性変異の状況を調査する。同時にサブタイプ解析を行い、その動向についても調査する。また、北陸ブロック内の診療拠点病院間の連携を強化する。

## B. 研究方法

薬剤耐性検査 (genotype) とサブタイプ解析は、初診時または服薬開始前の検体を用いて行った。検査の同意を得た後、検査は研究代表者である杉浦互先生 (名古屋医療センター) に依頼した。北陸ブロック内の拠点病院担当者に、研究参加を依頼し協力していただく。

(倫理面への配慮)

患者には担当医から説明を行い、同意を得た後、検査を行った。また、サンプルの患者情報は記号化し、プライバシーの保護に配慮した。なお、本研究は石川県立中央病院倫理委員会で承認されている。

## C. 研究結果

2010 年から 2012 年の間に研究にエントリーしたのは 25 例で、新規急性感染の定義に当てはまる症例はおらず、全ての症例は慢性未治療者であった。

この 25 例の初診時の検体で耐性検査を行った結果、治療に影響するとされる高度耐性変異は検出されなかったが、逆転写酵素領域では、T69N と T69N/D をそれぞれ 1 例、V75I を 1 例、V106I を 1 例、V179D と V179I をそれぞれ 1 例認めた (図 1)。前回、2007 年から 2009 年のまとめでは、T215 の変異を 5 例認めていた (図 2) が、今回は 1 例もなかった。プロテアーゼ領域では、25 例のうち 24 例に、図 3 に示す変異が確認された。合計 14 の部位について変異が見られ、M36I、I62V、L63P、A71T、V77I、I93L 変異は、2007 年から 2009 年のまとめ (図 4) と同じように高頻度であった。インテグラーゼ領域については、検査できた 24 例のうち 17 例に、図 5 に示す変異が見られた。1 例 (L74M) を除き、全例 V72I 変異であった。

サブタイプ解析では、25 例中 21 例がサブタイプ B、AE が 2 例、AG が 1 例、C が 1 例であった。

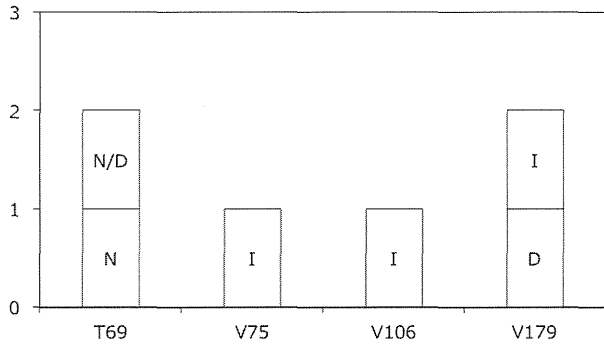


図1 逆転写酵素領域 (RT) の耐性に関する変異 (2010～2012年, 初診25例)

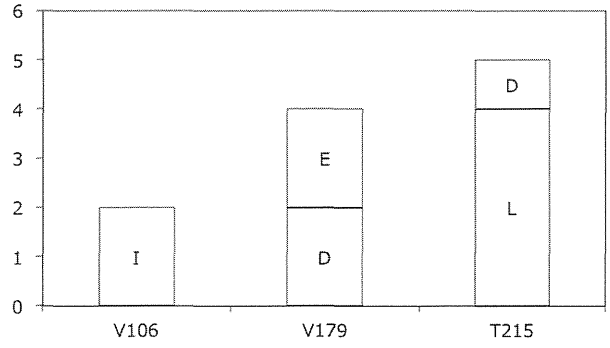


図2 逆転写酵素領域 (RT) の耐性に関する変異 (2007～2009年, 初診18例)

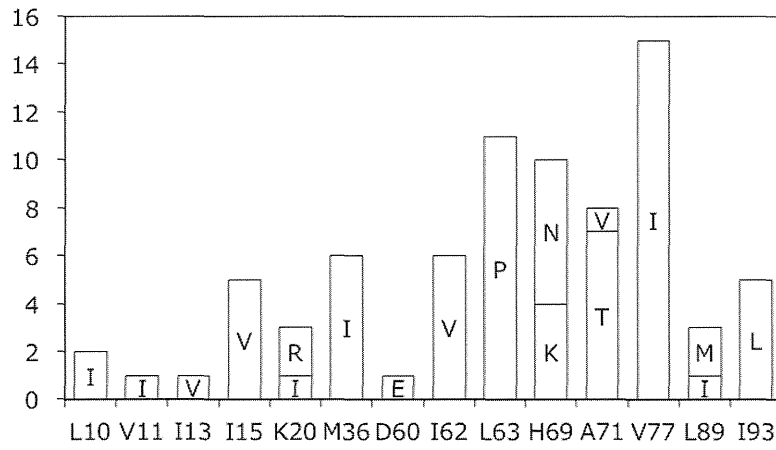


図3 プロテアーゼ領域 (PR) の耐性に関する変異 (2010～2012年, 初診25例)

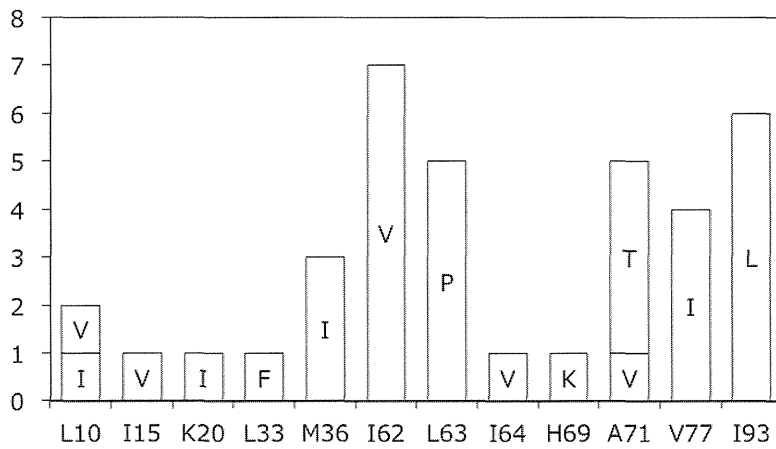


図4 プロテアーゼ領域 (PR) の耐性に関する変異 (2007～2009年, 初診17例)

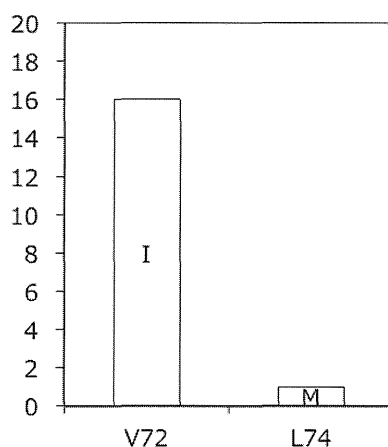


図5 インテグラーゼ領域 (Int) の耐性に関する変異  
(2010～2012年, 初診24例)

#### D. 考察

2010年から2012年までに、新たにHIV-1感染と診断された25例について、薬剤耐性検査を行った。その結果、逆転写酵素領域、プロテアーゼ領域、インテグラーゼ領域のいずれにも、治療に影響を及ぼすような高度耐性変異は見られなかった。前回、2007年から2009年に18例検査し、高度耐性変異は認めておらず、北陸では耐性HIV-1伝播はまだ少ない可能性がある。2007年から2009年の成績と比べると、逆転写酵素領域においては、変異部位の数は少し増加していたが、T215L or D変異は全く見られなくなっている。このことは、AZT使用がほとんどなくなり時間が経過してきていることと関係するのかもしれない。同様に、プロテアーゼ領域の変異を比べてみると、M36I、I62V、L63P、A71T、V77I、I93L変異が多くみられる傾向は同じであった。2007年から2009年に17例、2010年から2012年に25例検討し、現在までのところ一次変異は1例も確認されていない。しかし、北陸地方においても、HIV治療を受けている例は増加し続けており、また新規にHIV感染が診断される例も増えてきている状況の中で、耐性HIVの新たな出現やその伝播は危惧される。今後も、薬剤耐性変異の解析を継続していくことが重要と考えられる。

サブタイプ解析では、Bが全体の84%を占めており、これは2007年から2009年まとめの86%と同じ傾向であった。

#### E. 結論

- 2010年から2012年に新規にHIV-1感染を診断された25例に対し、初診時あるいは服薬開始前に薬剤耐性検査を行い、逆転写酵素領域ではT69NとT69N/Dをそれぞれ1例、V75Iを1例、V106Iを1例、V179DとV179Iをそれぞれ1例に認めた。プロテアーゼ領域では、25例中24例にさまざまな変異を認めたが、全て二次変異であった。
- 検査可能であった25例のうち、21例がサブタイプB、2例がAE、1例がAG、1例がCであった。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1) 原著論文

欧文

- Miwako Honda, Michiyo Ishisaka, Naoki Ishizuka, Satoshi Kimura, Shinichi Oka, and behalf of Japanese Anti-HIV-1 QD Therapy Study Group : Koji Watanabe, Tamayo Watanabe, Yasuhisa Abe, Ikumi Genka, Haruhito Honda, Hirohisa Yazaki, Junko Tanuma, Kunihisa Tsukada, Hiroyuki Gatanaga, Katsuji Teruya, Yoshimi Kikuchi, Misao Takano, Mikiko Ogata, Mizue Saida, Toshio Naito, Yoshiyuki Yokomaku, Motohiro Hamaguchi, Keiko Ido, Kiyonori Takada, Toshikazu

Miyagawa, Shuzo Matsushita, Takeyuki Sato, Masaki Yoshida, Takafumi Tezuka, Yoshiya Tanabe, Isao Sato, Toshihiro Ito, Masahide Horiba, Mieko Yamada, Mikio Ueda, Kazufumi Matsumoto, Takeshi Fujii, Mariko Sano, Shin Kawai, Munehiro Yoshino, Takuma Shirasaka, Satoshi Higasa, Tomoyuki Endo, Norihiro Sato, Katsuya Fujimoto, Rumi Minami, Masahiro Yamamoto, Yukiko Nakajima : Open-Label Randomized Multicenter Selection Study of Once Daily Antiretroviral Treatment Regimen Comparing Ritonavir-Boosted Atazanavir to Efavirenz with Fixed-Dose Abacavir and Lamivudine. *Internal Medicine* 50: 699-705, 2011.

2. Junko Hattori, Teiichiro Shiino, Hiroyuki Gatanaga, Shigeru Yoshida, Dai Watanabe, Rumi Minami, Kenji Sadamasu, Mikiko Kondo, Haruyo Mori, Mikio Ueda, Masao Tateyama, Atsuhisa Ueda, Shingo Kato, Toshihiro Ito, Masayasu Oie, Noboru Takata, Tsunefusa Hayashida, Mami Nagashima, Masakazu Matsuda, Shiro Ibe, Yasuo Ota, Satoru Sasaki, Yoshiaki Ishigatsubo, Yoshinari Tanabe, Ichiro Koga, Yoko Kojima, Masahiro Yamamoto, Jiro Fujita, Yoshiyuki Yokomaku, Takao Koike, Takuma Shirasaka, Shinichi Oka, Wataru Sugiura : Trends in transmitted drug-resistant HIV-1 and demographic characteristics of newly diagnosed patients: Nationwide surveillance from 2003 to 2008 in Japan. *Antiviral Research* 88: 72-79, 2010.

## 和文

1. 上田幹夫：北陸地方における HIV 感染の動向と現状. *医薬の門* 52(1) : 16-20, 2012.
2. 松井祥子, 安村敏, 喜多博文, 北啓一朗, 鳴河宗聡, 上田幹夫：第 10 回日本内科学会専門医部会北陸支部オープンカンファレンスまとめ 1 ヶ月間に呼吸困難が進行した中年男性. *日本内科学会誌* 99(7) : 164-171, 2010.

## 2) 学会発表

1. 椎野貞一郎, 服部純子, 瀧永博之, 吉田繁, 上田敦久, 近藤真規子, 貞升健志, 藤井毅, 横幕能行, 上田幹夫, 田邊嘉也, 渡邊大, 森治代, 南留美, 健山正男, 杉浦互：国内感染者集団の大規模塩基配列解析 3 : 希少サブタイプとサブタイプ間組み替え体の動向. 第 26 回日本エイズ学会, 横浜, 2012 年.
2. 井内亜紀子, センテノ田村恵子, 鈴木智子, 須貝恵, 辻典子, 濱本京子, 吉用緑, 山本政弘：ブロック拠点病院と中核拠点病院における連携の在り方についての検討～中核拠点病院におけるチーム医療と研修の実績～. 第 26 回日本エイズ学会, 横浜, 2012 年.
3. 北志保里, 上田幹夫, 山下美津江, 石坂憲寿：

不安感を抱えた患者への支援について—他職種でかかわって—. 第 26 回日本エイズ学会, 横浜, 2012 年.

4. 古谷野淳子, 早津正博, 加藤朋子, 塚本琢也, 北志保里, 松岡亜由子, 大谷ありさ, 倉谷昂志, 仲倉高広, 藤本恵理, 宮本哲雄, 森田眞子, 安尾利彦, 喜花伸子, 辻麻理子, 阪木淳子, 飯田敏晴, 山中京子：中核拠点病院におけるカウンセリング従事者調査 第 1 報—カウンセリング体制の現状. 第 26 回日本エイズ学会, 横浜, 2012 年.
5. 早津正博, 古谷野淳子, 加藤朋子, 塚本琢也, 北志保里, 松岡亜由子, 大谷ありさ, 倉谷昂志, 仲倉高広, 藤本恵理, 宮本哲雄, 森田眞子, 安尾利彦, 喜花伸子, 辻麻理子, 阪木淳子, 飯田敏晴, 山中京子：HIV 治療の中核拠点病院におけるカウンセリング従事者調査 第 2 報—カウンセリング環境の課題. 第 26 回日本エイズ学会, 横浜, 2012 年.
6. 安田明子, 表志穂, 下川千賀子, 山田三枝子, 上田幹夫：外国籍感染妊婦出産に対する薬剤師の関わり. 第 26 回日本エイズ学会, 横浜, 2012 年.
7. 服部純子, 瀧永博之, 渡邊大, 長島真美, 貞升健志, 近藤真規子, 南留美, 吉田繁, 森治代, 内田和江, 椎野貞一郎, 加藤真吾, 千葉仁志, 佐藤典宏, 伊藤俊広, 佐藤武幸, 上田敦久, 石ヶ坪良明, 古賀一郎, 太田康男, 山元泰之, 福武勝幸, 古賀道子, 岩本愛吉, 西澤雅子, 岡慎一, 伊部史朗, 松田昌和, 林田庸総, 横幕能行, 上田幹夫, 大家正義, 田邊嘉也, 白阪琢磨, 小島洋子, 藤井輝久, 高田昇, 山本政弘, 松下修三, 藤田次郎, 健山正男, 杉浦互：新規 HIV/AIDS 診断症例における薬剤耐性 HIV の動向. 第 26 回日本エイズ学会, 横浜, 2012 年.
8. 上田幹夫, 小谷岳春, 重山郁子, 山副有子, 上野朱美, 高山次代, 山田三枝子, 北志保里, 辻典子：術前 HIV 抗体検査ルーチン化に向けた取り組み. 第 26 回日本エイズ学会, 横浜, 2012 年.
9. 宮田勝, 能島初美, 高木純一郎, 山本裕佳, 上田幹夫, 山田三枝子, 辻典子, 前田憲昭：拠点病院と歯科診療所との連携に関する考察 第 1 報～当院における歯科診療の現状～. 第 26 回日本エイズ学会, 横浜, 2012 年.
10. 能島初美, 宮田勝, 高木純一郎, 山本裕佳, 上田幹夫, 山田三枝子, 辻典子, 前田憲昭：拠点病院と歯科診療所との連携に関する考察 第 2 報. 第 26 回日本エイズ学会, 横浜, 2012 年.
11. 服部純子, 椎野貞一郎, 瀧永博之, 林田庸総, 吉田繁, 千葉仁志, 小池隆夫, 佐々木悟, 伊藤俊広, 内田和江, 原孝, 佐藤武幸, 上田敦久, 石ヶ坪良明, 近藤真規子, 長島真美, 貞升健志, 古賀一郎, 太田康男, 山元泰之, 福武勝幸, 加藤真吾, 藤井毅, 岩本愛吉, 西澤雅子, 岡慎一, 伊部史朗, 横幕能行, 上田幹夫, 大家正義, 田邊嘉也, 渡辺香奈子, 渡邊大, 白阪琢磨, 小島

- 洋子, 森治代, 中桐逸博, 藤井輝久, 高田昇, 木村昭郎, 南留美, 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 25 回日本エイズ学会, 東京, 2011 年.
12. 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, 日本薬剤耐性 HIV 調査研究グループ: 国内感染者集団の大規模塩基配列解析 2: SubtypeB の動向と微小系統群の同定. 第 25 回日本エイズ学会, 東京, 2011 年.
  13. 千田昌之, 植田孝介, 國本雄介, 井上正朝, 佐藤麻希, 山田徹, 斎藤美保, 田川尚行, 下川千賀子, 柴田雅章, 吉野宗宏, 畝井浩子, 松本俊治, 松浦清隆, 大石裕樹, 増田純一, 中村真依, 西澤優子, 三上二郎: HIV/AIDS 中核拠点病院薬剤部 (科) における HIV に関するアンケート結果について. 第 25 回日本エイズ学会, 東京, 2011 年.
  14. 山田三枝子, 高山次代, 武田謙治, 小山美紀, 大金美和, 池田和子, 島田恵, 岡慎一: エイズ拠点病院 HIV 担当看護師に対する支援の検討「HIV/AIDS 看護に関する調査」結果から (その 1) ~診療報酬の算定状況から見た看護ケアの状況と課題~. 第 25 回日本エイズ学会, 東京, 2011 年.
  15. 武田謙治, 小山美紀, 山田三枝子, 高山次代, 大金美和, 池田和子, 島田恵, 岡慎一: エイズ拠点病院 HIV 担当看護師に対する支援の検討「HIV/AIDS 看護に関する調査」結果から (その 2) ~自由回答から見た看護上の課題と支援ニーズ~. 第 25 回日本エイズ学会, 東京, 2011 年.
  16. 牧野麻由子, 古谷野淳子, 加藤朋子, 塚本琢也, 北志保里, 松岡亜由子, 仲倉高広, 森田眞子, 安尾利彦, 大谷ありさ, 藤本恵里, 倉谷昂志, 宮本哲雄, 喜花伸子, 辻麻理子, 高橋佳子, 飯田敏晴, 山中京子: HIV カウンセリングの実践内容の明確化の試み. 第 25 回日本エイズ学会, 東京, 2011 年.
  17. 上田幹夫, 辻典子, 山田三枝子, 北志保里, 古谷智慧, 高山次代: 自発的 HIV 抗体検査数と“いきなりエイズ”について~全国データと北陸の解析から~. 第 25 回日本エイズ学会, 東京, 2011 年.
  18. 下川千賀子, 表志穂, 亀井勝一郎, 山田三枝子, 辻典子, 上田幹夫: TDF/FTC から ABC/3TC への変更による血清クレアチニンへの影響について. 第 25 回日本エイズ学会, 東京, 2011 年.
  19. 菊池嘉, 遠藤知之, 宮城島拓人, 伊藤俊広, 中村仁美, 田邊嘉也, 上田幹夫, 横幕能行, 渡邊大, 藤井輝久, 南留美, 健山正男: 多施設共同疫学調査における HAART の有効率 2010. 第 25 回日本エイズ学会, 東京, 2011 年.
  20. 山本裕佳, 能島初美, 宮田勝, 高木純一郎, 山田三枝子, 辻典子, 上田幹夫, 前田憲昭: HIV 診療における北陸地区歯科衛生士の意識調査. 第 25 回日本エイズ学会, 東京, 2011 年.
  21. 辻典子, 田村恵子, 鈴木智子, 須貝恵, 小塚雅子, 井内亜紀子, 濱本京子, 吉用緑, 山本政弘: エイズ拠点病院から地域医療機関への患者紹介の現状 その 1 ~拠点病院から一般病院への紹介~. 第 25 回日本エイズ学会, 東京, 2011 年.
  22. 吉用緑, 田村恵子, 鈴木智子, 須貝恵, 辻典子, 小塚雅子, 井内亜紀子, 濱本京子, 山本政弘: エイズ拠点病院から地域医療機関への患者紹介の現状 その 2 ~拠点病院から診療所/クリニックへの紹介~. 第 25 回日本エイズ学会, 東京, 2011 年.
  23. 表志穂, 下川千賀子, 亀井勝一郎, 山田三枝子, 辻典子, 上田幹夫: 院外処方せんの発行促進へ向けた取り組み. 第 25 回日本エイズ学会, 東京, 2011 年.
  24. 宮田勝, 高木純一郎, 名倉功, 坂下英明, 池田正一: エイズ北陸ブロック拠点病院における歯科の HIV 診療体制整備の取り組みの現状と問題点. 第 64 回日本口腔外科学会学術集会, 札幌, 2010.6.24.
  25. 上田幹夫, 小谷岳春, 山田三枝子, 辻典子, 北志保里, 高山次代, 山下美津江, 下川千賀子, 安田明子: 北陸ブロックでの HIV/AIDS 出前研修 7 年を振り返って. 第 24 回日本エイズ学会, 東京, 2010 年.
  26. 宮田勝, 高木純一郎, 能島初美, 山本裕佳, 山田三枝子, 辻典子, 下川千賀子, 上田幹夫, 池田正一, 前田憲昭: ブロック拠点病院における HIV 歯科医療体制整備のための研修会の現状と課題. 第 24 回日本エイズ学会, 東京, 2010 年.
  27. 下川千賀子, 安田明子, 表志穂, 亀井勝一郎, 山田三枝子, 上田幹夫: 当院における抗 HIV 薬レジメンの変更状況について. 第 24 回日本エイズ学会, 東京, 2010 年.
  28. 服部純子, 椎野禎一郎, 瀧永博之, 林田庸総, 吉田繁, 千葉仁志, 小池隆夫, 佐々木悟, 伊藤俊広, 内田和江, 原孝, 佐藤武幸, 上田敦久, 石ヶ坪良明, 近藤真規子, 今井光信, 長島真美, 貞升健志, 古賀一郎, 太田康男, 山元泰之, 福武勝幸, 加藤真吾, 藤井毅, 岩本愛吉, 西澤雅子, 仲宗根正, 岡慎一, 伊部史朗, 横幕能行, 上田幹夫, 大家正義, 田邊嘉也, 渡辺香奈子, 渡邊大, 白阪琢磨, 小島洋子, 森治代, 中桐逸博, 高田昇, 木村昭郎, 南留美, 山本政弘, 松下修三, 藤田次郎, 健山正男, 杉浦互: 2003 ~ 2009 年の新規 HIV/AIDS 診断症例における薬剤耐性頻度の動向. 第 24 回日本エイズ学会, 東京, 2010 年.
  29. 菊池嘉, 遠藤知之, 南留美, 伊藤俊広, 田邊嘉也, 上田幹夫, 横幕能行, 渡邊大, 藤井輝久, 宮城島拓人, 健山正男, 中村仁美: 他施設共同疫学調査における HAART の有効率 2009. 第 24 回日本エイズ学会, 東京, 2010 年.
  30. 能島初美, 前田憲昭, 溝部潤子, 中川祐美子,

中野恵美子, 三村文子, 藤本千夏, 趙春麗, 山本裕佳: HIV 協力歯科診療所に勤務する歯科衛生士の意識調査. 第 24 日本エイズ学会, 東京, 2010 年.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 免疫制御が HIV 流行株および耐性獲得に及ぼす影響

研究分担者 上野 貴将 熊本大学エイズ学研究センター 准教授

### 研究要旨

国内で流行している HIV-1 株の特徴とヒト免疫系の選択圧がどのようにかかわっているかを、長期的な視点で解析することを目的としている。HIV-1 の全蛋白質の中で、最も多型性の著しい Vpu と Nef について、遺伝子配列を解析して、その特徴と、ヒトゲノム多型 (HLA クラス I アリル) との相関の有無を検討した。240 例の検体を用いたところ、Vpu では MHC 多型性と関連する変異は極めて少数であった。それと比較して、Nef では MHC 多型性と関連する変異が多く見つかった。とくに、日本人に多くみられる HLA-A2402, A0206 等のアリルで有意な相関を見出した。これからのことから、免疫学的な選択圧は、顕著にウイルスの遺伝子型に影響を与えているが、その与え方は、ウイルス蛋白質によって著しく異なることが明らかとなった。国内で流行する HIV 遺伝子型の動向を把握するうえで、免疫学的な制御の重要性が明らかとなった。

### A. 研究目的

本研究は、本邦で流行している HIV 株に、ヒト免疫系の選択圧がどのように影響しているか、長期的な視点で解析することを目的としている。H23 年度および H24 年度にかけて、HIV-1 の中で最も多型性の著しいタンパク質である Vpu と Nef について、本邦で流行するウイルスをもとに、その免疫淘汰圧が与える影響を MHC 免疫制御という観点から解析した。

### B. 研究方法

薬剤治療経験のない慢性感染期の HIV 感染者 240 名から提供された血漿サンプルを用いて (国立国際医療センター・岡先生および瀧永先生の協力の下)、ウイルス RNA を調製した。RT-PCR 法により、nef および vpu 遺伝子の特異的に増幅したのち、ダイレクトシーケンス法によって遺伝子配列を解析した。その後、HXB2 配列に対してアラインメントを行い、系統樹解析や、感染者の HLA クラス I アリルとの相関を統計学的手法により解析した。その後、国立国際医療センターから 200 例、および東

京大学医科学研究所病院 (岩本先生の協力の下) から 218 例 (取得時の異なる重複した検体が 18 例あったため、これらを除いた 200 例で横断的な解析を進めた) の検体を追加して、解析を進めた。

(倫理面への配慮)

HIV 感染者から供与いただいた検体を用いた研究に関しては、関連する機関 (熊本大学、国立国際医療センター、東京大学医科学研究所) の倫理審査会の審議を受け、承認を得ている。文書による説明を行い、文書による同意を得た感染者の検体のみ用いた。個人情報保護に万全を期すことを含め、承認を受けた研究計画に厳密にしたがって遂行した。

### C. 研究結果

#### (1) Vpu 多型性と MHC 制御

240 例の検体を用いて、Vpu の各コドンと、感染者の HLA クラス I アリルとの相関関係を解析した (図 1)。

その結果、統計学的に有意な相関が 3 つ認められた。強い統計学的有意性をしめしたものは、37 番





図1 国内における Vpu 遺伝子変異と MHC 制御の相関

目のアミノ酸に関するものである。HLA-A\*33:03 を持つ人では、Lys であるケースが有意に多く、Arg であることが有意に少ないというものである (図1)。

この37番目の変異は、既に報告されている HLA-A:33:03 拘束性エピートープである EYRKILRQR のC 末端部位に相当している。免疫学的な解析はされていないが、おそらく、このエピートープに特異的な CTL によって選択された CTL 逃避変異ではないかと推測された。

(2) Nef 多型性と MHC 制御

240名の HIV-1 慢性感染者から横断的に集めた検体を用いて、血漿ウイルス由来 nef 遺伝子の増幅と配列解析を試みた。その結果、220名の感染者の検体で、nef 遺伝子の配列を得た (図2)。

アラインメントをかけたデータを用いて、各アミノ酸の多型性と、感染者の HLA クラス I アリルの多型性との相関解析を行った。その結果、HLA-A2402、A0206、A0207 や B3501 など日本人に比較的多い HLA アリルに関しては、Nef の多型変異との間で統計的に有意な相関が観察された。これらは、すべて、これまでに個々に CTL クローンを用いた解析で報告された結果と一致しており、この方法論の有用性が示された。しかしながら、他にいくつも関連がありそうな変異が見えているが、いずれも統計的に有意なレベルに達していなかった。

D. 考察

HIV-1 の全蛋白質の中で、最も多型性の著しい Vpu と Nef について、遺伝子配列を解析して、その特徴と、ヒトゲノム多型 (HLA クラス I アリル) との相関の有無を検討した。240 例の検体を用いたところ、Vpu では MHC 多型性と関連する変異は極めて少数であった。それと比較して、Nef では MHC 多型性と相関する変異が多く見つかった。とくに、日本人に多くみられる HLA-A2402, A0206 等のアリルで有意な相関を見出した。この結果は、北米やオーストラリアの subtype B ウイルスで調べられた同様の報告と違うパターンを示しており、人種の違いがウイルス流行株に影響することを示唆している。

E. 結論

これからのことから、免疫学的な選択圧は、顕著にウイルスの遺伝子型に影響を与えているが、その与え方は、ウイルス蛋白質によって著しく異なることが明らかとなった。国内で流行する HIV 遺伝子型の動向を把握するうえで、免疫学的な制御の重要性が強く示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし

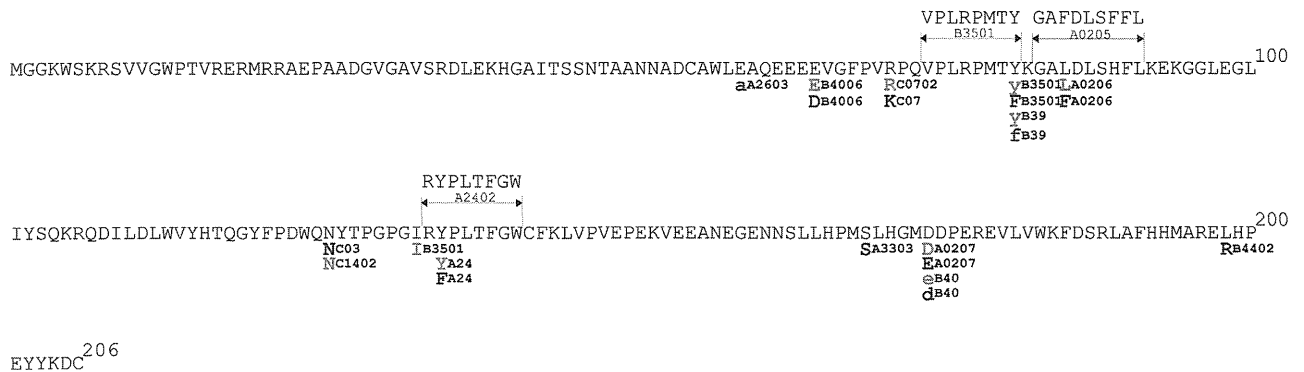


図2 国内における Nef 遺伝子変異と MHC 制御の相関

## G. 研究発表

## 1) 原著論文

1. Koizumi, H., Hashimoto, M., Fujiwara, M., Murakoshi, H., Chikata, T., Borghan, M.A., Hachiya, A., Kawashima, Y., Takata, H., Ueno, T., Oka, S., Takiguchi, M. Different in vivo effects of HIV-1 immunodominant epitope-specific CTLs on selection of escape mutant viruses. *J. Virol.* 84: 5508-5519, 2010
2. Motozono, C., Mwimanzi, P., Ueno, T. Dynamic interplay between viral adaptation and immune recognition during HIV-1 infection. *Protein & Cell* 1, 514-519, 2010
3. Sato, Y., Takata, H., Kobayashi, N., Nagata, S., Nakagata, N, Ueno, T. Takiguchi, M. Failure of effector function of human CD8+ T cells in NOD/SCID/JAK3-/- immunodeficient mice transplanted with human CD34+ hematopoietic stem cells. *PLoS ONE* 5: e13109, 2010
4. Mwimanzi, P., Hasan, Z., Tokunaga, M., Gatanaga, H., Oka, S., Ueno, T. Naturally arising HIV-1 Nef variants conferring escape from cytotoxic T lymphocytes influence viral entry co-receptor expression and susceptibility to superinfection. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 403, 422-427, 2010
5. Philip Mwimanzi, Zafrul Hasan, Ranya Hassan, Shinya Suzu, Masafumi Takiguchi and Takamasa Ueno. Effects of naturally-arising HIV Nef mutations on cytotoxic T lymphocyte recognition and Nef's functionality in primary macrophages. *Retrovirology* 8:50, 2011.
6. Nopporn Chutiwitoonchai, Masateru Hiyoshi, Philip Mwimanzi, Takamasa Ueno, Akio Adachi, Hiroataka Ode, Hironori Sato, Oliver T. Fackler, Seiji Okada, Shinya Suzu. The identification of a small molecule compound that reduces HIV-1 Nef-mediated viral infectivity enhancement. *PLoS ONE* 6(11): e27696, 2011.
7. Zafrul Hasan, Jonathan M Carlson, Hiroyuki Gatanaga, Anh Q. Le, Chanson J Brumme, Shinichi Oka, Zabrina L Brumme, Takamasa Ueno. Minor contribution of HLA class I-associated selective pressure to the variability of HIV-1 accessory protein Vpu. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 421, 291-295, 2012.
8. Philip Mwimanzi, Tristan J. Markle, Takamasa Ueno, Mark A. Brockman. HLA class I down-regulation by HIV-1 Nef: What might we learn from natural sequence variants? *Viruses* 4, 1844-, 2012.
9. Philip Mwimanzi, Tristan J Markle, Eric Martin, Yoko Ogata, Xiaomei T Kuang, Michiyo Tokunaga, Macdonald Mahiti, Florencia Pereyra, Toshiyuki Miura, Bruce D Walker, Zabrina L

Brumme, Mark A Brockman and Takamasa Ueno. Attenuation of multiple Nef functions in HIV-1 elite controllers. *Retrovirology* 10: 1, 2013.

## 2) 学会発表

1. Mwimanzi, P., Oniangue-Ndza, C., Allen T.M., and Ueno, T. Nef activity in down regulation of viral receptors and protection of HIV superinfection is modulated by Nef mutations that confer CTL escape during acute infection. 11th KUMAMOTO AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, Hotel Nikko Kumamoto and Aso Grand Vrio Hotel, Kumamoto, Japan, October 6-8, 2010.
2. Mwimanzi P., Ueno T. CTL-escape Nef variants influence CCR5 down regulation and HIV superinfection susceptibility. The 14th International Conference of Immunology (ICI), Kobe International Exhibition and Portopia Hotel, Kobe, Japan, August 23-27, 2010.
3. Mwimanzi P., Masafumi T., and Ueno T. CTL-escape Nef variants influence CCR5 down-regulation and HIV superinfection susceptibility. Keystone Symposia HIV Vaccines (X5), Fairmont Banff Springs, Banff, Alberta, Canada, March 21-26, 2010.
4. Mwimanzi, P., Hassan R., Suzu S., Takiguchi M., Ueno T. The effects of CTL-escape conferring mutations on Nef's pathogenic functions in primary macrophages. 1st International Young Investigator Symposium, Gene Laboratory, Kumamoto University lecture hall, Center for AIDS Research, Kumamoto University, Kumamoto, Japan, March 4-5, 2010.
5. Zafrul Hasan, Hiroyuki Gatanaga, Shinichi Oka, and Takamasa Ueno. Implication of the effects of host immune responses on the HIV-1 vpu gene evolution. The 11th KUMAMOTO AIDS Seminar and GCOE Joint International Symposium. Hotel Nikko Kumamoto and Aso Resort Grandvrio Hotel, Kumamoto, Japan; October 6-8, 2010.
6. Zafrul Hasan, Hiroyuki Gatanaga, Shinichi Oka, and Takamasa Ueno. Implication of the effects of host immune responses on the HIV-1 vpu gene evolution. 24th Annual Meeting of the Japanese Society for AIDS Research. Grand Prince Hotel Takanawa, Prince Sakura Tower, Takanawa, Tokyo; November 24-26, 2010.
7. Philip Mwimanzi, Tristan Markle, Michiyo Tokunaga, Toshiyuki Miura, Eric Martin, Florencia Pereyra, Bruce Walker, Zabrina Brumme, Mark Brockman, Takamasa Ueno. Impaired viral infectivity and viral replication

- capacity by nef alleles from HIV elite controllers. 25th Annual Meeting of Japanese Society for AIDS Research, Tokyo Hyatt Regency, Tokyo, Japan. November 30th - 2nd December, 2011.
8. Philip Mwimanzi, Tristan Markle, Michiyo Tokunaga, Toshiyuki Miura, Eric Martin, Florencia Pereyra, Bruce Walker, Zabrina Brumme, Mark Brockman, Takamasa Ueno. Population analysis of viral replication capacity by nef alleles of HIV elite controllers. 12th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, 19-21 October 2011.
  9. Philip Mwimanzi, Tristan Markle, Michiyo Tokunaga, Toshiyuki Miura, Eric Martin, Florencia Pereyra, Bruce Walker, Zabrina Brumme, Mark Brockman, Takamasa Ueno. Impairment of viral replication capacity by nef alleles from HIV elite controllers. *Frontiers of Retrovirology, Complex retroviruses, retroelements and their hosts*, Amsterdam, Netherlands, 3-5 October 2011.
  10. Philip Mwimanzi, Tristan Markle, Michiyo Tokunaga, Toshiyuki Miura, Eric Martin, Florencia Pereyra, Bruce Walker, Zabrina Brumme, Mark Brockman, Takamasa Ueno. Impairment of virion infectivity by nef alleles from HIV elite controllers. Nef activity in enhancement of virion infectivity is impaired in HIV elite controllers. XV, International Congress of Virology, Sapporo, Japan, 11-16 September 2011.
  11. Philip Mwimanzi, Tristan Markle, Michiyo Tokunaga, Toshiyuki Miura, Eric Martin, Florencia Pereyra, Bruce Walker, Zabrina Brumme, Mark Brockman, Takamasa Ueno. Impairment of virion infectivity by nef alleles from HIV elite controllers. Keystone Symposia HIV Evolution, Genomics and Pathogenesis (X7), Whistler Conference center, Whistler, Canada, March 20-25, 2011.
  12. Zafrul Hasan, J. Carlson, H. Gatanaga, A. Le, C. Brumme, S. Oka, Z. Brumme, T. Ueno. Impact of HLA class I-driven genetic variability in HIV-1 accessory genes in Japanese sequences. Keystone Symposia HIV Evolution. Genomics and Pathogenesis (X7): Whistler Conference Centre, Whistler, Canada; March 20 - 25, 2011.
  13. Zafrul Hasan, J. Carlson, H. Gatanaga, A. Le, C. Brumme, S. Oka, Z. Brumme, T. Ueno. Subtle effect of HLA class I-driven selective forces on the variability of HIV-1 accessory genes. 12th Kumamoto AIDS Seminar and GCOE Joint International Symposium. Hotel Nikko Kumamoto and Aso Resort Grandvrio Hotel, Kumamoto, Japan; October 19-21, 2011.
  14. Zafrul Hasan, J. Carlson, H. Gatanaga, A. Le, C. Brumme, S. Oka, Z. Brumme, T. Ueno. Effect of HLA class I-mediated selective pressure on HIV-1 accessory genes. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress: Virus and host response, Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan; September 11-16, 2011.
  15. Zafrul Hasan, J. Carlson, H. Gatanaga, A. Le, C. Brumme, S. Oka, Z. Brumme, T. Ueno. Impact of HLA class I-driven genetic variability in HIV-1 accessory genes. 2011 The Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology. Chiba, Makuhari Messe, Japan; November 27-30, 2011.
  16. Chihiro Motozono, John J. Miles, Linda Wooldridge, David A. Price, Takamasa Ueno, Andrew K. Sewell. The cross-reactivity footprints of HIV-specific CTLs. 12th Kumamoto AIDS Seminar and GCOE Joint International Symposium. Hotel Nikko Kumamoto and Aso Resort Grandvrio Hotel, Kumamoto, Japan; October 19-21, 2011.
  17. 緒方陽子、大津家裕仁、Philip Mwimanzi、徳永美知代、Tristan Markle、三浦聡之、Bruce Walker、Zabrina Brumme、Mark Brockman、上野貴将：Nef のウイルスレセプター発現低下機能と病態、一般演題「アクセサリー遺伝子-2」第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、ハイアットリージェンシー東京、2011 年 11 月 30 日 - 12 月 2 日
  18. Zafrul Hasan, J. Carlson, H. Gatanaga, A. Le, S. Oka, Z. Brumme, Takamasa Ueno. Impact of HLA class I-driven genetic variability in HIV-1 accessory gene vpu. COLD SPRING HARBOR ASIA CONFERENCES: Frontiers of Immunology in Health and Disease. Suzhou Dushu Lake Conference Center, China. September 3 - 7, 2012.
  19. Zafrul Hasan, J. Carlson, H. Gatanaga, A. Le, C. Brumme, S. Oka, Z. Brumme, Takamasa Ueno. HLA class I-mediated sequence polymorphism in HIV-1 accessory protein Vpu. The 13th KUMAMOTO AIDS Seminar and GCOE Joint International Symposium, Hotel Nikko Kumamoto and Aso Resort Grandvrio Hotel, Kumamoto, Japan. October 24-26, 2012.
  20. Chihiro Motozono, John S. Bridgeman, Masaaki Miyazawa, Andrew K. Sewell and Takamasa Ueno. The impact of a single amino acid difference in CDR3 $\alpha$  on TCR  $\alpha\beta$  cross-reactivity、ワークショップ 32 ヒト免疫、第 41 回日本免疫学会総会・学術集会、神戸、兵庫、2012 年 12 月 5-7 日
  21. Chihiro Motozono, John J. Miles Zafrul Hasan Hiroyuki Gatanaga, Meribe Stanley. C, Shinichi Oka, Masaaki Miyazawa, Andrew K. Sewell, and Takamasa Ueno. HIV-1 immune escape and cross-reactivity profiles of virus-specific

cytotoxic T lymphocytes, YIS-A Session II, 13th Kumamoto AIDS Seminar Global COE Joint International Symposium, Aso Resort GRANDVRIO, Kumamoto, Japan, October 24-26, 2012

22. 本園千尋、John J. Miles、宮澤正顯、上野貴将、Andrew K. Sewell: HLA-B35 拘束性 HIV 特異的 TCR は野生型抗原に高い特異性を有する、学術賞ならびに学術奨励賞候補口演、第 21 回組織適合性学会大会、明治大学、東京、2012 年 9 月 15 ~ 17 日
23. 緒方陽子、Philip Mwimanzi、徳永美知代、Tristan Markle、三浦聡之、Bruce Walker、Zabrina Brumme、Mark Brockman、上野貴将：Nef のウイルスレセプター発現低下機能と病態、第 14 回白馬シンポジウム in 京都、京都市国際交流会館、2012 年 6 月 7 日 - 6 月 8 日
24. 上野貴将：HIV-1 Nef の遺伝子多型性と機能的可塑性、第 14 回白馬シンポジウム in 京都、京都市国際交流会館、2012 年 6 月 7 日 - 6 月 8 日
25. 上野貴将、Mwimanzi Philip、Markle Tristan、緒方陽子、徳永美知代、Mahiti Macdonald、三浦聡之、Pereyra Florencia、Walker Bruce、Brumme Zabrina、Brockman Mark：Genetic and functional analyses of HIV-1 Nef in elite controllers. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、グランキューブ大阪（大阪国際会議場）、2012 年 11 月 13 日 - 11 月 15 日
26. 緒方陽子、Philip Mwimanzi、李小光、徳永美知代、Tristan Markle、三浦聡之、Bruce Walker、Zabrina Brumme、Mark Brockman、上野貴将：Nef のウイルスレセプター発現低下機能と病態、第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会、慶應義塾大学日吉キャンパス、2012 年 11 月 24 日 - 11 月 26 日
27. T. Ueno. Functional impairment of HIV-1 Nef in elite controllers and its correlation with immune-mediated selective pressure. 13th Kumamoto AIDS Seminar Global COE Joint International Symposium, Kumamoto, Japan. October 24th - October 26th, 2012.
28. M. Mahiti, P. Mwimanzi, Y. Ogata, M. Tokunaga, B. Walker, Z. Brumme, M. Brockman, T. Ueno. Modulation of HIV-1 Nef-mediated HLA class I down-regulation activity during disease progression. 13th Kumamoto AIDS seminar Aso Resort Grandiovrio Hotel, Kumamoto, Japan 24th -26th October, 2012.
29. X. Kuang, A Le, P Mwimanzi, T Markle, R Danroth, T Ueno, T Miura, B Walker, Z Brumme, M Brockman, and the Acute HIV and International HIV Controllers study group. Reduced HIV-1 Nef Function in Acute/Early Individuals who become Viremic Controllers. 20th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI), Georgia World Congress Center, Atlanta, USA. March 3-6, 2013.

#### H. 知的所有権の出願・取得状況 なし



## 首都圏近郊における薬剤耐性 HIV の動向調査研究

～首都圏及び近郊における HIV 流行株の遺伝子型及び薬剤耐性株の動向把握に関する研究～

研究分担者	内田 和江	埼玉県衛生研究所 ウイルス担当
研究協力者	鈴木 典子	埼玉県衛生研究所 ウイルス担当
	宇野 優香	さいたま市健康科学研究センター 保健科学科
	原 孝	茨城県衛生研究所 ウイルス部
	人見 重美	筑波大学大学院 人間総合科学研究科
	今井 一穂	栃木県保健環境センター 微生物部
	岡本その子	栃木県保健環境センター 微生物部
	池ヶ谷美穂	宇都宮市衛生環境試験所 微生物担当
	大沼 正行	山梨県衛生環境研究所 微生物部
	畔上 由佳	長野県環境保全研究所 感染症部
	小林 広記	長野県環境保全研究所 感染症部
	嶋崎 真実	長野県環境保全研究所 感染症部

### 研究要旨

埼玉県をはじめとする首都圏近郊では、全国の他の地域と比較し、HIV 感染者及び AIDS 患者の 10 万人当たりの報告数が多い。本分担研究は、埼玉県、茨城県、栃木県、山梨県、長野県で 2009 年から 2012 年に新たに感染が確認された保健所検査受診例 40 検体及びエイズ拠点病院の未治療例 7 検体、合計 47 検体について HIV の遺伝子型（サブタイプ）及び薬剤耐性変異を調査した。サブタイプは B が 43 検体（91.5%）と最も多く検出され、他に CRF01\_AE が 3 検体（6.4%）、サブタイプ C が 1 検体（2.1%）であった。薬剤耐性変異の調査では、プロテアーゼ領域の Major mutation では、M46L が 1 検体に検出された他、Minor mutation では、数ヶ所の変異が 43 検体（91.5%）に検出された。逆転写酵素領域は V90I、K101E、V179D、V179D/E がそれぞれ異なる 1 検体に検出された。インテグラーゼ領域は L74I の変異が 2 検体に、T97A/T、V151I、G163E がそれぞれ異なる 1 検体に検出された。

### A. 研究目的

HIV 感染の広がり防止及び効果的な治療法の確立のためには、国内に流行する HIV の疫学及び薬剤耐性株の動向を把握することが欠かせない。埼玉県をはじめとする首都圏近郊は、人口も多く、HIV 感染者及び AIDS 患者の 10 万人当たり報告数が比較的多い地域が存在するため、この地域の動向を把握することは重要である。

本研究は、国内で流行している HIV 遺伝子型および薬剤耐性株の動向把握に関する研究の分担研究として、埼玉県とその隣接する県を対象地域とし、新規または未治療の感染者から検出された HIV 株の遺伝子型と薬剤耐性変異を調査した。併せて HIV の推

定感染時期及び感染経路や治療薬が共通する B 型肝炎、C 型肝炎との重複感染の有無を調査し、HIV 流行との関連と治療への影響の可能性を把握することを目的とした。

### B. 研究方法

#### 1. 調査対象

2009 年から 2012 年に埼玉県、茨城県、栃木県、山梨県、長野県の保健所及び拠点病院での HIV 検査で HIV 抗体陽性と判定された新規または未治療 HIV 感染者 47 名からの血清または血漿検体（保健所 40 検体、拠点病院 7 検体）を供試した。

2. 方法

1) HIV サブタイピング及び薬剤耐性変異の解析

各検体 200 μl からウイルス RNA を抽出し、RT-nested PCR 法によりプロテアーゼ (PR)、逆転写酵素 (RT)、インテグラーゼ (IN)、エンベロープ (env) 及び gag 領域の遺伝子を増幅した。得られた DNA をダイレクトシーケンスにより塩基配列を解析した。PCR 及びシーケンス反応のプライマーは、国立感染症研究所病原体検出マニュアルに記載されたものを使用した。サブタイプは PR、RT、env、gag 領域の塩基配列をスタンフォード大学の HIV Drug Resistance Database (<http://hivdb.stanford.edu/>) 及びロスアラモス国立研究所の HIV Databases (<http://www.hiv.lanl.gov/content/index>) のプログラムを使用し、決定した。薬剤耐性変異は PR、RT、IN 領域のアミノ酸配列 (PR 領域の 1 ~ 99 番目、RT 領域の 1 ~ 240 番目及び IN 領域の 1 ~ 288 番目) について、IAS-USA の 2009、2010、2011 年の報告、Shafer' s criteria 及びスタンフォード大学の HIV Drug Resistance Database に基づき判定した。

hiv.lanl.gov/content/index) のプログラムを使用し、決定した。

薬剤耐性変異は PR、RT、IN 領域のアミノ酸配列 (PR 領域の 1 ~ 99 番目、RT 領域の 1 ~ 240 番目及び IN 領域の 1 ~ 288 番目) について、IAS-USA の 2009、2010、2011 年の報告、Shafer' s criteria 及びスタンフォード大学の HIV Drug Resistance Database に基づき判定した。

2) BED assay による感染時期の推定

調査対象者の HIV 感染が感染初期のものであるかどうかを推定するため、Aware BED EIA HIV-1 Incidence Test (CALYPTE 社 USA) を用い BED assay を実施した。検査はキットの添付説明書に従い実施し、ODn<0.8 となったものを感染初期

表 1 年別調査検体数とサブタイプ (2009-2012 年)

陽性 確認年	調査 検体数	男性			女性	
		サブタイプ			サブタイプ	
		B	CRF01_AE	C	B	CRF01_AE
2009	2	2				
2010	17	13* <sup>1</sup>	2* <sup>1</sup>	1* <sup>2</sup>	1	
2011	16	16				
2012	12	11				1* <sup>2</sup>
計	47	42	2	1	1	1

\* 1: 国籍不明者1例含む

\* 2: 国籍日本外

表 2 薬剤耐性変異、BED assay、HBs 抗原、HCV 抗体検査結果

陽性 確認年	検査 例数	薬剤耐性変異(検体数)			BED assay recent	HBs 抗原 陽性数	HCV抗体 陽性数
		PR(Major)	RT	IN			
2009	2				1	0	0
2010	17* <sup>1</sup>		V90I (1) V179D/E (1) T215S(2)* <sup>2</sup>	G163E(1)	5	4	1
2011	16		K101E (1) T215S(2)* <sup>2</sup>	L74I(2) T97AT (1)	2	1	1
2012	12	M46L (1)	V179D (1)	V151I (1)	5	0	0
計	47				13 (27.7%)	5 (10.9%)	2 (4.3%)

\* 1: 1検体でHBs抗原、HCV抗体検査未実施

\*2: リバート変異

表 3 PR 領域の薬剤耐性変異 (Minor mutation) 出現頻度

変異	検体数 (n=47)	変異	検体数 (n=47)
L10V	5 (14.9%)	L63P	13 (27.6%)
I13V	5 (14.9%)	H69K	6 (12.8%)
G16E	2 (4.3%)	A71V/T	9 (21.3%)
M36I	12 (25.5%)	V77I	16 (34.0%)
I62V	16 (34.0%)	I93L	28 (59.6%)

(recent: 感染後 155 日以内) とした。

### 3) B 型肝炎 (HBs) 抗原及び C 型肝炎 (HCV) 抗体検査

B 型肝炎、C 型肝炎と HIV 感染の関連性及び薬剤耐性変異への影響を調べるため、HBs 抗原及び HCV 抗体の有無を検査した。HBs 抗原の検査はエスプライン HBs Ag (富士レボ株式会社)、HCV 抗体は HCV Ab PA テスト II (オーソ・クリニカル・ダイアグノスティックス株式会社) を用い添付説明書に従い実施した。

(倫理面への配慮)

本研究は、埼玉県衛生研究所倫理審査委員会の承認を受けて実施した。保健所で採取された検体は、匿名で検査受付された。保健所及び拠点病院から検体及び臨床情報の提供を受けるに当たっては、すべて匿名化し個人が特定できないようにする等、研究対象者に不利益が生じないように十分に配慮した。

## C. 研究結果

### 1. HIV サブタイプ

調査した 47 検体のサブタイプを年別、性別に表 1 に示した。検体提供者の性別は男性 45 人、女性 2 人、年齢構成は 31~40 歳 21 人と最も多く、20 歳以下 3 人、21~30 歳 9 人、41~50 歳 9 人、51~60 歳 2 人、61~70 歳 3 人であった。国籍は、日本 43 人、日本外 2 人、不明 2 人であった。PR-RT 領域の塩基配列に基づき解析した 47 検体のサブタイプは、サブタイプ B が 43 検体 (91.5%) と最も多く、CRF01\_AE が 3 検体 (6.4%)、サブタイプ C が 1 検体 (2.1%) であった。env 領域及び gag 領域の配列に基づくサブタイプは、PR-RT 領域に基づくものと全ての検体で一致した。

男性 45 人の感染経路はサブタイプ B の 42 例では、同性間性的接触 25 例 (59.5%)、異性間性的接触 7 例 (16.7%)、同性異性未確定の性的接触 5 例

(11.9%)、不明 5 例 (11.9%) であり、CRF01\_AE の 2 例は共に異性間性的接触であった。

### 2. 薬剤耐性変異

PR 領域の薬剤耐性変異は、Major mutation では 47 検体中 1 検体に M46L が検出され (表 2)、Minor mutation は 43 検体 (91.5%) に 1~6 ヶ所の変異が検出された。特に I93L、V77I、I62V がそれぞれ 59.6%、34.0%、34.0% と他の変異と比較し高い頻度で検出された (表 3)。RT 領域は V90I、K101E、V179D、V179D/E がそれぞれ異なる 1 検体の計 4 検体に検出された。また T215 リバータント変異である T215S が 4 検体に検出された。IN 領域では、PCR により増幅産物が得られなかった 1 検体を除く 46 検体について解析した結果、L74I が 2 検体に、T97A/T、V151I、G163E がそれぞれ異なる 1 検体の計 5 検体に検出された。PR 領域の Major mutation、RT 領域及び IN 領域の耐性変異が検出された検体のサブタイプは、いずれも B であった。

### 3. BED assay による感染時期の推定 HBs 抗原及び HCV 抗体検査

BED assay では、47 検体中 13 検体 (27.7%) が recent、34 検体 (72.3%) が not recent と判定された (表 2)。HBs 抗原、HCV 抗体は 46 検体を検査し、HBs 抗原陽性は 5 検体 (10.9%)、HCV 抗体陽性は 2 検体 (4.3%) であった。HBs 抗原、HCV 抗体の両方が検出された検体はなかった。

## D. 考察

本分担研究の対象地域である埼玉県、茨城県、栃木県、山梨県及び長野県は、人口 10 万人当たりの HIV 感染者 / AIDS 患者の報告数が全国の府県の中で上位に位置している。

2010~2012 年度に得られた 47 検体は、95% 以上が男性からのもので、年齢層は 20 歳未満から 60 歳以上と幅広く、中でも 30 歳代が 4 割以上と最も



多かった。検出されたサブタイプは B が圧倒的に多数であり、その他のサブタイプが拡大している傾向は認められなかった。

薬剤耐性変異の調査では、PR 領域では、Major mutation の M46L が 1 検体に、Minor mutation は 90% 以上の検体に認められた。M46L は近年新規感染者に検出されることがあるが、この変異単独では高い耐性を呈することはないとされている。Minor mutation は最高で 6 ケ所に変異を持つ例が検出された。これら複数の変異を持つ例について、HIV 薬剤耐性変異ガイドライン ver.6(2012 年、HIV 感染症の医療整備に関する研究班)に基づき AZT、LPV、DRV における耐性変異の集積を調べた結果、中度以上の耐性を生じると考えられる例は認められなかった。

また、RT 領域、IN 領域においても、1 検体中に検出された耐性変異は 1 ケ所であった。従ってこの 3 年間の本地域における調査では、変異の集積のため深刻な耐性を持つと考えられるような例は検出されなかったと言える。

BED assay により感染初期と推定される検体および HBs 抗原陽性の割合は、年度によって異なる傾向が見られ、これは単年度の検体数が 10 数件程度と少数であるためと考えられた。

今後も調査を継続し、流行 HIV 株の特徴、推定感染時期、肝炎との重複感染の有無等、HIV 感染の動向に関する情報を収集することは、より効果的な治療法や流行防止策の検討にあたり有用と考える。

## E. 結論

2009 年から 2012 年に埼玉県、茨城県、栃木県、山梨県、長野県の 5 県で採取された新規または未治療 HIV 感染例の 47 検体について HIV のサブタイプ調査及び薬剤耐性変異の調査を実施した。サブタイプは、47 検体中サブタイプ B が 43 検体、CRF01\_AE が 3 検体、C が 1 検体であった。薬剤耐性変異の調査では、PR 領域の Major mutation、M46L が 1 検体に、Minor mutation がほぼ 90% の検体で認められた。RT 領域では V90I、K101E、V179D、V179D/E がそれぞれ異なる 1 検体に、IN 領域では、L74I が 2 検体に、T97A/T、V151I、G163E がそれぞれ異なる 1 検体に検出された。今後も HIV 流行株の動向を注視していく必要がある。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 帝京大学における薬剤耐性 HIV の動向調査研究

研究分担者 太田 康男 帝京大学医学部内科学講座 教授

研究協力者 古賀 一郎 帝京大学医学部内科学講座 助教

### 研究要旨

帝京大学医学部附属病院には、平成 24 (2012) 年 12 月現在で 72 名の HIV 感染症患者が通院しているが、平成 19 年度以降の初診症例が過半数を占めている。初診時の AIDS 発症の有無にかかわらず、大半が初診後数年以内に抗レトロウイルス療法に導入に至っている。我々は、抗レトロウイルス療法の導入に際し、確実な効果の発現と治療失敗の未然防止を目的とし、抗レトロウイルス療法導入前の患者および治療開始後に血中 HIVRNA 量が増加した患者を対象に、血中 HIVRNA の薬剤耐性変異の同定を行なった。同時に、HIVRNA の Pol 領域を解析し、HIV サブタイプの推定を試みた。

2010-12 年は、治療開始前の患者 21 名について薬剤耐性検査を実施した。そのうち 6 名に逆転写酵素 (RT) 領域、またはプロテアーゼ領域に複数の耐性関連変異を認めた。また 19 名がサブタイプ B、2 名が CRF<sub>AE</sub> であると推測された。3 例について治療開始前、治療開始 4 週間後の血中 HIVRNA を用いてクローニング解析を行ったところ、3 例中 2 例に治療開始 4 週間後に、新たな薬剤耐性変異が少数集族で確認された。ただし、この変異が今後の治療失敗に関与するのかどうかの判断は、今後の治療経過を待たなければならない。今後さらに検討症例を増やし同様の解析を行うことで、少数集族を効率的に発見する点において、我々が用いた方法の有効性を検証していきたい。

### A. 研究目的

帝京大学医学部附属病院には、2012 年 12 月現在で 72 名の HIV 感染症患者が通院している。半数以上が平成 19 年度以降に当院を新規に受診した症例である。来院時に抗レトロウイルス療法の導入が必要となる AIDS 発症例は、平成 19 年度以降 17 名を数えるが、AIDS 指標疾患やその他の日和見感染症による死亡者はこの 6 年でわずかに 2 名にすぎない。未治療経過観察中の患者はわずかに 7 名に留まる。ART の導入開始基準となる CD4 数が高く設定されるようになったことで、今後 HIV 感染症診療の主体は、初診後の速やかな ART の導入と導入後の長期間の外来通院加療が主体となることが予想される。HIV 診療に携わる医療機関は、薬剤耐性変異の獲得に伴う治療失敗への対応、ART の長期合併症への迅速かつ的確な対応をこれまで以上に要求されるものと考えられる。

抗レトロウイルス療法の導入にあたり、多くの臨床治験の結果に基づいて決定された抗 HIV 治療ガイドライン推奨の薬剤の組み合わせが、治療薬として選択されることが多いが、その一方で、個々の症例

で薬剤耐性変異の有無を確認することは、治療効果を予見する意味でも、また治療の失敗を未然に防止する意味でも重要である。そこで我々は、HIV 感染症診療に際し、より確実に抗レトロウイルス効果を発現させる治療薬を選択し、可能な限り治療の失敗を防ぐことを目的とし、HIV 感染症患者の血中 HIVRNA の薬剤耐性変異を同定することを試みた。同時に、薬剤耐性変異の同定のために解析した HIVRNA の Pol 領域の解析結果から、REGA HIV subtyping tool を用いて HIV サブタイプの同定を行った。

さらに保険診療下での薬剤耐性検査は、主要な集族の塩基配列のみを判定結果として表示するダイレクトシーケンスであることから、少数薬剤耐性変異の同定には限界があり、体内に耐性変異を有する HIV がごく少数存在しても同定できない。一般に、変異株は野生株に比しウイルスの増殖能が劣るため、微小集族として存在している事が多く、ダイレクトシーケンスの結果において、一定比率に満たない微小集族の塩基配列は反映されない。そこで我々は、新たに治療開始前と治療開始直後の血中

HIVRNA を用いて、クローニングシーケンスを行い、微小集族として存在する薬剤耐性変異を同定する試みも合わせて行った。

**B. 研究方法**

- 1) 当院を受診する HIV 感染症患者の抗レトロウイルス療法導入前の血中 HIV の薬剤耐性変異の解析を行った。
- 2) 上記の薬剤耐性変異の解析で得られた HIV Pol 領域の遺伝子配列を用いた HIV サブタイプの推定を行った。
- 3) 新たな試みとして、ART 導入後一定量まで血中 HIVRNA 量が減少した時点でのクローンの解析を行った。

(倫理面への配慮)

平成 19 年以降 HIV 薬剤耐性検査は、診療の一環として、保険診療下で外部検査会社に委託して実施してきたが、平成 21 年度より従来の外部委託による薬剤耐性検査に加えて、HIVRNA 遺伝子解析を院内で実施することとした。遺伝子解析研究を実施するにあたり、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」などの指針に基づき、院内の倫理委員会において研究内容の承認を得た。研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究による対象者への不利益や危険性の排除に留意し、説明と理解（インフォームドコンセント）を書面にて確認し、保管をおこなっている。

**C. 研究結果**

平成 19 年度以降、当院に新規に通院を開始した HIV 感染症患者は、男性 59 名、女性は 3 名の計 62 名であった。これらの患者のうち平成 22 年度は 7 名、平成 23 年度は 9 名、平成 24 年度は 5 名についてそれぞれ治療開始前に HIV 薬剤耐性検査を実施した。

治療開始前の時点で薬剤耐性変異を認めたのは、平成 22 年で 7 名中 2 名、平成 23 年度で 9 名中 4 名、平成 24 年度で 5 名中 0 名であった。薬剤耐性変異を認めた 6 名のうち、RT 領域に認めたものが 2 名、プロテアーゼ領域に認めたものが 4 名であり、RT 領域、プロテアーゼ領域の両方に変異を認めたものが 2 名であった。

これら 21 名のサブタイプを Pol 領域、Int 領域の配列をもとに REGA HIV-1 Subtyping Tool-Version2.0 (<http://dbpartners.stanford.edu/RegaSubtyping/>) を用いて解析した結果、19 名がサブタイプ B、2 名がサブタイプ CRF\_AE であった。

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

さらに、3 例に関しては、前後で 20 クローンの

年月	年齢	性別	CD4	VL	Sub type	RT	PR	INT
2010.05	36	M	388	18000	B		93I/L	
2010.06	28	M	296	26000	B	103R	63I, 77V/I	
2010.08	36	M	4	220000	B		62V, 63A	
2010.08	35	M	47	20000	B	101Q	10I, 62V, 71T	
2010.11	37	M	232	77000	B	90I	10L/F, 13I/V, 16G/E, 62V, 63S/T,	
2010.11	25	M	158	390,000	B		36M/I, 62V, 63S, 71T, 93L	
2010.12	40	M	508	4400	B		62IV, 63PA, 71V, 93L	
2011.04	27	M	450	110,000	B	T215S	60E, V82IV	
2011.05	36	M	428	3,700	AE		13V,20R,35D,36I,69K,89M	E157Q
2011.07	43	M	545	16,000	B	101Q	M36M/I, L63P, I64L, V82I	
2011.07	42	M	327	720,000	B		62V, 63P, 69N, 77I, 93L	
2011.07	39	M	5	370,000	B		Q58E, 62V, 63S, 71T, 77I, 93L	
2011.09	37	M	401	110,000	B	179I, T215S	60E, V82IV	
2011.09	33	M	163	190,000	B		63A, 93L	
2011.10	23	M	294	36,000	B		35D, 63X, 93L	
2011.10	30	M	260	26,000	B	179E	71V, 93L	
2012.04	44	M	143	84000	B		63A, 93L	
2012.05	23	M	12	160,000	B		62V, 63N, 71V, 77VI, 93L	
2012.05	37	M	239	63,000	B		10I, 64T, 77I, 93L	232E
2012.05	33	M	289	20,000	B		10V, 63A, 77I, 93L	
2012.07	58	M	7	1,300,00	AE		13V, 35ED, 36I, 63P/L, 69K, 89M	

Fig.1 平成 22-24 年度に解析した症例の薬剤耐性変異のまとめ

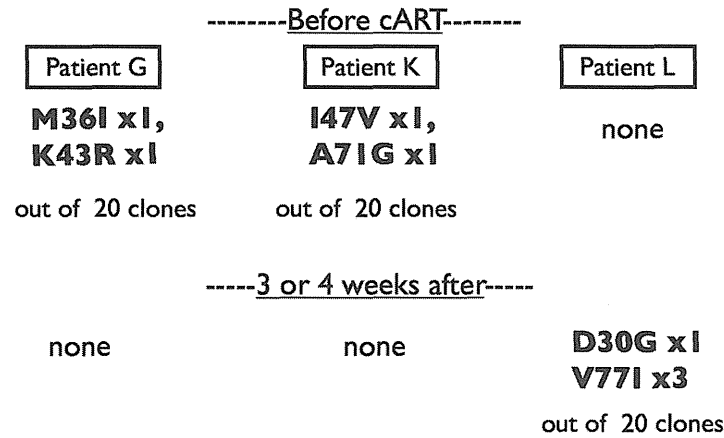


Fig. 2 少数集族に認めたプロテアーゼ領域の耐性関連変異

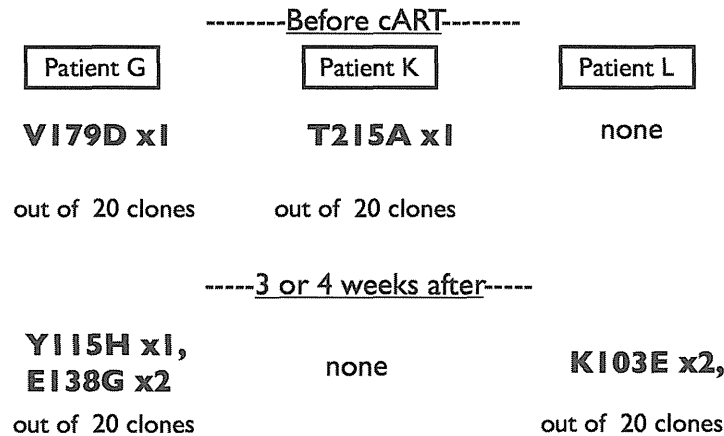


Fig. 3 少数集族に認めた RT 領域の薬剤耐性変異

クローニング解析を行ったが、それぞれ特徴的な結果となった (Fig. 2, 3)。一例目の症例 G ではプロテアーゼ領域薬剤耐性変異が確認されていたが、これらの変異を持つ少数株は治療開始後に消失した。RT 領域でも薬剤耐性変異を認めていたが、治療開始後に消失し、代わって本例には投与されていない非核酸系逆転写酵素阻害薬 (NNRTI) に関連した耐性変異を伴う新たな微小集族が確認された。二例目の症例 K では、治療開始前にプロテアーゼ領域、RT 領域の耐性変異を微小集族に認めていたが、治療開始後にこれらの微小集族は消失した。三例目の症例 L では、治療開始前に薬剤耐性変異を確認することが出来なかったが、治療開始後にはプロテアーゼ領域、RT 領域にそれぞれ耐性変異が微小集族で確認された。

#### D. 考察

抗レトロウイルス療法開始前の薬剤耐性変異の解析は、当院を含め多くの医療機関で行われるようになり、抗レトロウイルス薬の選択に寄与している。当院でも新規に治療を開始する患者の 28.5% に薬剤耐性変異を認めた。その一方、保険診療の範囲での検査はダイレクトシーケンスによる解析であるため、微小集族に存在する薬剤耐性変異の解析には限界がある。一般に耐性変異を持つ株の増殖能は野生株に劣るとされ、耐性変異を持つ少数株を効率的に検出する系の確立を検討する必要があると考えられる。

今回我々は、ダイレクトシーケンスでは確認出来なかった薬剤耐性変異を、治療開始 3 ないし 4 週間後の血中 HIVRNA を用いたクローニングシーケ