

ンスによって確認することが出来た。これらの症例の HIVRNA 量は、その後検出感度以下に減少しており、この変異が今後の治療失敗に関与するのかどうかの判断は、今後の治療経過を待たなければならない。またこれらの症例の経過観察とともに、今後さらに検討症例を増やし同様の解析を行うことで、少数集族を効率的に発見する点において、我々が用いた方法の有効性を検証していきたい。

E. 結論

当院を受診した患者についての薬剤耐性変異の解析の結果、21 例中、6 例に protease 領域、または RT 領域に薬剤耐性変異を認めた。また解析を行った 21 例のうち、19 例はサブタイプ B、2 例は CRF_AE であることが推定された。

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

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

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1) 原著論文

1. Koga I, Yoshino Y, Kitazawa T, Kurahashi K and Ota Y. Prevalence and risk factors for loss of bone mineral density in male Japanese patients with HIV. *JAIDS; J. Acquired Immune Deficiency Syndromes* 62; e25-27, 2013
2. Yoshino Y, Kitazawa T, Ikeda M, Tatsuno K, Yanagimoto S, Okugawa S, Yotsuyanagi H, and Ota Y. Clostridium difficile flagellin stimulates toll-like receptor 5, and Toxin B promotes flagellin-induced chemokine production via TLR5. *Life Sci.* 92:211-217, 2013.
3. Tsuchiya N, Pathipvanich P, Rojanawiwat A, Wichukchinda N, Koga I, Koga M, Auwanit W, Kilgore PE, Ariyoshi K, Sawanpanyalert P.

Chronic hepatitis B and C co-infection increased all-cause mortality in HAART-naive HIV patients in northern Thailand. *Epidemiol Infect.* 2012, in press.

4. Yoshino Y, Seo K, Koga I, Matsunaga N, Kitazawa T, Takamori Y and Ota Y. Liver abscess with a markedly high level of carbohydrate antigen 19-9. *Gastroenterol Res*, 5 : 205-207, 2012.
5. Yoshino Y, Koga I, Kitazawa T, Ohkusu K, and Ota Y. Septicemia due to *Campylobacter insulaenigrae* in a patient with chronic myeloid leukemia: a case report. *Brazil J Infect Dis.* 2012, in press
6. Kitazawa T, Yanagimoto S, Tatsuno K, Fukushima A, Okugawa S, and Ota Y. Serum Cholesterol Levels at the Onset of Bloodstream Infection Have Prognostic Value. *Advances Infect Dis.* 2: 100-105, 2012.
7. Yoshino Y, Okugawa S, Kitazawa T, Koga I, Kimura S, Makita E, Seo K, Matsunaga N. and Ota Y. Infective endocarditis due to *Enterobacter cloacae* resistant to third- and fourth-generation cephalosporins. *J Microbiol Immunol Infect.* S1684-1182, 2012.
8. Yoshino Y, Kitazawa T, Ikeda M, Tatsuno K, Yanagimoto S, Okugawa S, Ota Y, and Yotsuyanagi H. Clinical features of *Bacteroides bacteremia* and their association with colorectal carcinoma. *Infection.* 40:63-7, 2012.
9. Kogure H, Tsujino T, Yamamoto K, Mizuno S, Yashima Y, Yagioka H, Kawakubo K, Sasaki T, Nakai Y, Hirano K, Sasahira N, Isayama H, Tada M, Kawabe T, Omata M, Harada S, Ota Y, Koike K. Fever-based antibiotic therapy for acute cholangitis following successful endoscopic biliary drainage. *J Gastroenterol.* 46: 1411-7, 2011
10. Atsukawa Y, Kawakami S, Asahara M, Ishigaki S, Tanaka T, Ono Y, Nishiya H, Fujisaki R, Koga I, Ota Y, Miyazawa Y. The usefulness of changing focus during examination using Gram staining as initial diagnostic clue for infective tuberculosis. *Infect Chemother.* 17:571-4. 2011.
11. Yoshino Y, Kitazawa T, Kamimura M, Tatsuno K, Ota Y, Yotsuyanagi H. *Pseudomonas putida* bacteremia in adult patients: five case reports and a review of the literature. *J Infect Chemother.* 17:278-82. 2011.
12. Yoshino Y, Kitazawa T, Tatsuno K, Ota Y, Koike K., Cryptococcal Pleuritis Containing a High Level of Adenosine Deaminase in a Patient with AIDS: A Case Report, *Respiration*, 79:153-156, 2010.
13. Oka Y, Tashiro H, Mizutani-Noguchi M, Koga I, Sugao T, Shirasaki R, Miura T, Akiyama N, Kawasaki K, Fujimori S, Shirafuji N. Successful

unrelated bone marrow transplantation for a human immunodeficiency virus type-1-seropositive acute myelogenous leukemia patient following HAART. Int J Hematol. 91:140-5, 2010..

2) 学会発表

1. 古賀 一郎, 妹尾 和憲, 吉野 友祐, 北沢 貴利, 太田 康男。日本人男性 HIV 感染者における骨密度低下の頻度とハイリスク群の同定、第 26 回日本エイズ学会学術集会、2012 年 11 月 24-26 日、横浜。
2. 古賀 一郎, 妹尾 和憲, 吉野 友祐, 北沢 貴利, 太田 康男。Key drug に maraviroc と protease inhibitor を併用した 6 例の使用成績、第 26 回日本エイズ学会学術集会、2012 年 11 月 24-26 日、横浜。
3. 服部 純子, 瀧永 博之, 渡邊 大, 長島 真美, 貞升 健志, 近藤 真規子, 南 留美, 吉田 繁, 森 治代, 内田 和江, 椎野 禎一郎, 加藤 真吾, 千葉 仁志, 佐藤 典宏, 伊藤 俊広, 佐藤 武幸, 上田 敦久, 石ヶ坪 良明, 古賀 一郎, 太田 康男, 山元 泰之, 福武 勝幸, 古賀 道子, 岩本 愛吉, 西澤 雅子, 岡 慎一, 伊部 史朗, 松田 昌和, 林田 庸総, 横幕 能行, 上田 幹夫, 大家 正義, 田邊 嘉也, 白阪 琢磨, 小島 洋子, 藤井 輝久, 高田 昇, 山本 政弘, 松下 修三, 藤田 次郎, 健山 正男, 杉浦 互。新規 HIV/AIDS 診断症例における薬剤耐性 HIV の動向、第 26 回日本エイズ学会学術集会、2012 年 11 月 24-26 日、横浜。
4. 古賀 一郎, 吉野 友祐, 北沢 貴利, 太田 康男。HIV 感染症患者の骨折頻度の解明と今後の課題 第 86 回日本感染症学会学術講演会、2012 年 4 月 25-26 日、長崎。
5. 古賀 一郎, 吉野 友祐, 松永 直久, 北沢 貴利, 太田 康男。Rifabutin associated uveitis と診断した日本人 HIV 感染症患者の一例、第 25 回日本エイズ学会学術集会、2011 年 11 月 30-12 月 2 日、東京。
6. 古賀 一郎, 吉野 友祐, 松永 直久, 北沢 貴利, 太田 康男。当院通院中の HIV 感染症患者における骨密度低下のリスク因子と経時的な変化についての考察、第 25 回日本エイズ学会学術集会、2011 年 11 月 30-12 月 2 日、東京。
7. 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, 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 回日本エイズ学会学術集会、2011 年 11 月 30-12 月 2 日、東京。
8. 古賀 一郎, 松永 直久, 北沢 貴利, 太田 康男。HAART 導入後患者における骨塩量の低下と測定部位別の傾向。第 24 回日本エイズ学会、2010 年 11 月 24-26 日、東京。
9. 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。最近の話題 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、2010 年 11 月 24-26 日、東京。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

ACC における薬剤耐性 HIV の調査研究

研究分担者 瀧永 博之 国立国際医療研究センター エイズ治療・研究開発センター
室長

研究協力者 林田 庸総 国立国際医療研究センター エイズ治療・研究開発センター

研究要旨

国立国際医療研究センター エイズ治療・研究開発センター (ACC) において、平成 22 年 1 月から平成 24 年 9 月の間に、409 人の HIV-1 感染者が新規に診断された。この 409 人に対して HIV-1 の遺伝子検査による薬剤耐性検査を施行したところ、41 人の患者に主要な薬剤耐性変異が認められた。逆転写酵素の M41L が 4 人、K70R が 1 人、K103N が 6 人、V108I が 5 人、Y181C が 1 人、M184V が 1 人、L210W が 6 人、T215X が 16 人、K219Q が 3 人、P225H が 2 人、プロテアーゼ領域の M46I が 1 人、M46L が 2 人、Q58E が 1 人、I84V が 2 人、であった (重複あり)。サブタイプは、B が 350 人、AE が 39 人、C が 10 人、AG が 4 人、A が 3 人で、G が 3 人であった。

A. 研究目的

全国的な薬剤耐性 HIV-1 の動態把握のため、国立国際医療研究センター ACC で新規に診断された HIV-1 感染者のサブタイプおよび薬剤耐性変異を調べる。

(倫理面への配慮)

研究に参加していただいた患者様からは、すべて文書による同意を得ている。拒否は自由であり、拒否することで、診療面での不利益は生じない。説明文書・同意文書は国立国際医療研究センターにおける倫理委員会で承認されている (IMCJ-H13-80)。

B. 研究方法

新規に診断された HIV-1 感染者の血漿から RNA を抽出し、HIV-1 の逆転写酵素遺伝子領域とプロテアーゼ遺伝子領域を RT-PCR と nested-PCR にて増幅し、シーケンスを解析した。

C. 研究結果

409 人の HIV-1 感染者が新規に診断された。この 409 人に対して HIV-1 の遺伝子検査による薬剤耐性

検査を施行したところ、41 人の患者に主要な薬剤耐性変異が認められた。逆転写酵素の M41L が 4 人、K70R が 1 人、K103N が 6 人、V108I が 5 人、Y181C が 1 人、M184V が 1 人、L210W が 6 人、T215X が 16 人、K219Q が 3 人、P225H が 2 人、プロテアーゼ領域の M46I が 1 人、M46L が 2 人、Q58E が 1 人、I84V が 2 人、であった (重複あり)。インテグラーゼ領域の主要な耐性変異は認められなかった。サブタイプは、B が 350 人、AE が 39 人、C が 10 人、AG が 4 人、A が 3 人で、G が 3 人であった。

D. 考察

主要な耐性変異を持つ患者の割合は、かつてより増加している。今後も注意深く解析していく必要があると思われる。

E. 結論

耐性 HIV-1 の動態を把握するため、今後も新規診断症例の薬剤耐性検査を継続する必要があると考えられる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1) 原著論文

1. Kawashima Y, Kuse N, Gatanaga H, Naruto T, Fujiwara M, Dohki S, Akahoshi T, Maenaka K, Goulder P, Oka S, Takiguchi M. Long-term control of HIV-1 hemophiliacs carrying slow-progressing allele HLA-B*5101. *J Virol.* 84(14):7151-7160, 2010.
2. Hattori J, Shiino T, Gatanaga H, Yoshida S, Watanabe D, Minami R, Sadamasu K, Kondo M, Mori H, Ueda M, Tateyama M, Ueda A, Kato S, Ito T, Oie M, Takata N, Hayashida T, Nagashima M, Matsuda M, Ibe S, Ota Y, Sasaki S, Ishigatsubo Y, Tanabe Y, Koga I, Kojima Y, Yamamoto M, Fujita J, Yokomaku Y, Koike T, Shirasaka T, Oka S, Sugiura W. Trends in transmitted drug-resistant HIV-1 and demographic characteristics of newly diagnosed patients: nationwide surveillance from 2003 to 2008 in Japan. *Antiviral Res.* 88(1):72-79, 2010.
3. Tanuma J, Hachiya A, Ishigaki K, Gatanaga H, Lien TT, Hien ND, Kinh NV, Kaku M, Oka S. Impact of CRF01_AE-specific polymorphic mutations G335D and A731V in the connection subdomain of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase (RT) on susceptibility to nucleoside RT inhibitors. *Microbes Infect.* 12(14-15):1170-1177, 2010.
4. Watanabe K, Gatanaga H, Escueta-de Cadiz A, Tanuma J, Nozaki T, Oka S. Amebiasis in HIV-1-infected Japanese men: clinical features and response to therapy. *PLoS Negl Trop Dis.* 5(9):e1318, 2011.
5. Nishijima T, Komatsu H, Gatanaga H, Aoki T, Watanabe K, Kinai E, Honda H, Tanuma J, Yazaki H, Tsukada K, Honda M, Teruya K, Kikuchi Y, Oka S. Impact of small body weight on tenofovir-associated renal dysfunction in HIV-infected patients: a retrospective cohort study of Japanese patients. *PLoS One* 6(7):e22661, 2011.
6. Nakamura H, Teruya K, Takano M, Tsukada K, Tanuma J, Yazaki H, Honda H, Honda M, Gatanaga H, Kikuchi Y, Oka S. Clinical symptoms and courses of primary HIV-1 infection in recent years in Japan. *Intern Med.* 50(2):95-101, 2011.
7. Akahoshi T, Chikata T, Tamura Y, Gatanaga H, Oka S, Takiguchi M. Selection and accumulation of an HIV-1 escape mutant by three types of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes recognizing wild-type and/or escape mutant epitopes. *J Virol.* 86(4):1971-1981, 2012.
8. Nishijima T, Tsukada K, Teruya K, Gatanaga H, Kikuchi Y, Oka S. Efficacy and safety of once-daily ritonavir-boosted darunavir plus abacavir/lamivudine for treatment-naïve patients: a pilot study. *AIDS.* 26(5):649-651, 2012.
9. Hayashida T, Gatanaga H, Takahashi Y, Negishi F, Kikuchi Y, Oka S. Trends in early and late diagnosis of HIV-1 infections in Tokyoites from 2002 to 2010. *Int J Infect Dis.* 16(3):172-177, 2012.
10. Nishijima T, Gatanaga H, Komatsu H, Tsukada K, Shimbo T, Aoki T, Watanabe K, Kinai E, Honda H, Tanuma J, Yazaki H, Honda M, Teruya K, Kikuchi Y, Oka S. Renal function declines more in tenofovir- than abacavir-based antiretroviral therapy in low-body weight treatment-naïve patients with HIV infection. *PLoS One.* 7(1):e29977, 2012.
11. Hasan Z, Carlson JM, Gatanaga H, Le AQ, Brumme CJ, Oka S, Brumme ZL, Ueno T. Minor contribution of HLA class I-associated selective pressure to the variability of HIV-1 accessory protein Vpu. *Biochem Biophys Res Commun.* 421(2):291-295, 2012.
12. Naruto T, Gatanaga H, Nelson G, Sakai K, Carrington M, Oka S, Takiguchi M. HLA class I-mediated control of HIV-1 in the Japanese population, in which the protective HLA-B*57 and HLA-B*27 alleles are absent. *J Virol.* 86(19):10870-10872, 2012.
13. Hamada Y, Nishijima T, Watanabe K, Komatsu H, Tsukada K, Teruya K, Gatanaga H, Kikuchi Y, Oka S. High incidence of renal stones among HIV-infected patients on ritonavir-boosted atazanavir than in those receiving other protease inhibitor-containing antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis.* 55(9):1262-1269, 2012.
14. Nishijima T, Komatsu H, Higasa K, Takano M, Tsuchiya K, Hayashida T, Oka S, Gatanaga H. Single nucleotide polymorphisms in ABCC2 associated with tenofovir-induced kidney tubular dysfunction in Japanese patients with HIV-1 infection: a pharmacogenetic study. *Clin Infect Dis.* 55(11):1558-1567, 2012.
15. Matthews PC, Koyanagi M, Kloverpris HN, Harndahl M, Stryhn A, Akahoshi T, Gatanaga H, Oka S, Juarez Molina C, Valenzuela Ponce H, Avila Rios S, Cole D, Carlson J, Payne RP, Ogwu A, Bere A, Ndung' u T, Gounder K, Chen F, Riddell L, Luzzi G, Shapiro R, Brander C, Walker B, Sewell AK, Reyes Teran G, Heckerman D, Hunter E, Buus S, Takiguchi M, Gpuldter PJ. Differential clade-specific HLA-B*3501

- association with HIV-1 disease outcome is linked to immunogenicity of a single Gag epitope. *J Virol.* 86(23):12643-12654, 2012.
16. Nishijima T, Yazaki H, Hinoshita F, Tasato D, Hoshimoto K, Teruya K, Gatanaga H, Kikuchi Y, Oka S. Drug-induced acute interstitial nephritis mimicking acute tubular necrosis after initiation of tenofovir-containing antiretroviral therapy in patient with HIV-1 infection. *Intern Med.* 51(17):2469-2471, 2012.
 17. Kinai E, Hosokawa S, Gomibuchi H, Gatanaga H, Kikuchi Y, Oka S. Blunted fetal growth by tenofovir in late pregnancy. *AIDS.* 26(16):2119-2120, 2012.
 18. Yagita Y, Kuse N, Kuroki K, Gatanaga H, Carlson JM, Chikata T, Brumme ZL, Murakoshi H, Akahoshi T, Pfeifer N, Mallal S, John M, Ose T, Matsubara H, Kanda R, Fukunaga Y, Honda K, Kawashima Y, Ariumi Y, Oka S, Maenaka K, Takiguchi M. Distinct HIV-1 escape patterns selected by CTLs with identical epitope specificity. *J Virol.* 87(4):2253-2263, 2013.
 19. Honda H, Gatanaga H, Aoki T, Watanabe K, Yazaki H, Tanuma J, Tsukada K, Honda M, Teruya K, Kikuchi Y, Oka S. Raltegravir can be used safely in HIV-1-infected patients treated with warfarin. *Int J STD AIDS.* 23(12):903-904, 2012.
 20. Sudo S, Haraguchi H, Hirai Y, Gatanaga H, Sakuragi JI, Momose F, Morikawa Y. Efavirenz enhances HIV-1 Gag processing at the plasma membrane through Gag-Pol dimerization. *J Virol.* (in press)
 21. Hamada Y, Nagata N, Honda H, Teruya K, Gatanaga H, Kikuchi K, Oka S. Idiopathic oropharyngeal and esophageal ulcers related to HIV infection successfully treated with antiretroviral therapy alone. *Intern Med.* 52(3):393-395, 2013.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

次世代シーケンサーによる薬剤耐性 HIV の 遺伝的多様性解析に関する研究

～次世代シーケンサーを用いた HIV-1 細胞指向性解析法の開発～

研究分担者 加藤 真吾 慶應義塾大学医学部微生物学・免疫学教室 専任講師

研究要旨

HIV-1 は細胞への侵入において細胞表面に存在するケモカインレセプターである CCR5 と CXCR4 のどちらを利用するかによって R5 株と X4 株に大別される。CCR5 拮抗薬である抗 HIV-1 薬マラビロクが登場して以来、HIV-1 のこのような細胞指向性を検査することは臨床的にも有意義なものとなった。PCR シーケンシングで決定した env 遺伝子 V3 ループの塩基配列をもとに細胞指向性を推定するジェノタイプ法は低価格で標準化しやすいという利点があるが、HIV-1 微少集団の細胞指向性を評価できないという問題がある。本研究では、次世代シーケンサーによる微少集団の検出感度が 1% 程度であることを実験的に求め、それをもとに 4 例の感染者の血液中 HIV-1 の RNA と DNA における微少集団と割合とそれぞれの細胞指向性を評価した。その結果、RNA あるいは DNA の中には、通常の指向性ジェノタイプ検査では検出できない、細胞指向性の異なる HIV-1 微少集団が共存することが明らかになった。また、RNA の方が DNA より X4 株が現れやすい傾向があることが分かった。微少 X4 株の存在は、マラビロクのような CCR5 拮抗薬の治療効果に影響を与える可能性が高い。HIV 治療の最適化のため、次世代シーケンサーを用いた HIV-1 指向性検査の実用化を図ることが今後重要になると考えられる。

A. 研究目的

HIV-1 はエンベロープタンパク質である gp120 と細胞表面に存在する CD4 レセプター及びケモカインレセプターと結合することにより細胞に侵入する。HIV-1 が利用する主要なケモカインレセプターには CCR5 と CXCR4 があり、CCR5 を利用するウイルスを R5 株、CXCR4 を利用するウイルスを X4 株と呼ぶ。HIV 感染症が進行するにしたがい R5 株は X4 株に変化していくことが知られている。また、CCR5 拮抗薬である抗 HIV-1 薬（マラビロクなど）が使用されるようになったため、このような HIV-1 の細胞指向性を知ることは臨床的にも有用となってきた。

HIV-1 の細胞指向性検査にはフェノタイプ法とジェノタイプ法がある。代表的なフェノタイプ法は Monogram Biosciences の Trofile 検査で、最も広く利用されているが、米国にある検査施設に検体を送る必要があることや検査費用が高価であるという問題がある。一方、ジェノタイプ法として、env 遺伝

子 V3 ループの塩基配列を PCR シーケンシングで決定し、バイオインフォマティクスを用いたアルゴリズムで細胞指向性を推定するという方法がある。この方法は低価格で標準化しやすいという利点があるが、CCR5 拮抗薬の治療効果に影響を与える可能性のある HIV-1 微少集団の細胞指向性を評価できないという問題がある。この問題に対処するため、膨大な数の塩基配列を一度に決定することができる次世代シーケンサーを用いたジェノタイプ検査の開発が進んでいる。

本研究では、まず次世代シーケンサーによるシーケンシング（以下、ディープシーケンシングという。）による塩基配列決定の誤り率を求めて有意な微少集団の存在率を決定し、それをもとに 4 例の感染者の血液中 HIV-1 の RNA と DNA における微少集団と割合とそれぞれの細胞指向性を評価することにより、ディープシーケンシングによる細胞指向性検査の有用性と実施可能性を検討した。

B. 研究方法

HIV-1 感染者の血液から Ficoll-Paque PLUS (GEヘルスケアバイオサイエンス) を用いて血漿と末梢血単核球を分離し、血漿からは QIAamp MinElute Virus Spin Kit (QIAGEN) で RNA を、末梢血単核球からは QIAamp DNA Blood Kit (QIAGEN) で DNA を調整した。これらの核酸を用いて HIV-1 の env 遺伝子 V3 ループを図 1 に示すプライマーを用いて (RT-) nested PCR により増幅した。2 回目の PCR のプライマーには、5 つの異なる検体を区別するためのバーコード配列を 5' 端に付加した。シーケンシングの誤り率を求める実験には HIV-1 LAI 株の RNA を限界希釈して RT-nested PCR で増幅したものを用いた。得られた PCR 産物を QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて精製し、北海道システム・サイエンス株式会社に Roche Genome Sequencer FLX を用いたシーケンシングを委託した。

次世代シーケンサーは塩基配列の読み誤り率が

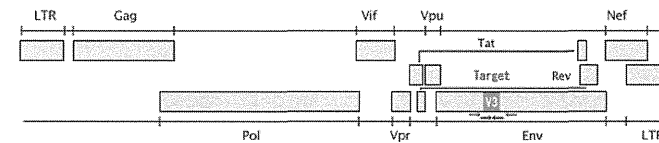
高い。特に、同じ塩基が並んだ配列の塩基数を正確に読み取ることを苦手とする。そのため、ディープシーケンシングで得られた塩基配列には 1 塩基あるいは 2 塩基の欠失や挿入が起こりやすい。そこで、V3 ループの塩基配列数が 3 の倍数でないリードは除外した。また、異なる箇所での欠失と挿入が起こったために塩基配列数が 3 の倍数になったことが明らかになりリードも除外した。

細胞指向性の推定はインターネット上の geno2pheno [coreceptor] 2.0 を用いて行った。Cut-off は 10% FPR を用いた。

変異株名は遺伝的距離を参考にして命名した。すなわち遺伝的距離が 10% 以上の場合は A、B、C、等とし、10% 以下の場合はその後ろに 1、2、3、等を付けた。

(倫理面の配慮)

本研究は大阪医療センターの倫理委員会で審査を行い、患者に対して研究の同意を得た上で毛髪検体の採取を行った。



Primers

1st-round PCR (424 bp)

Forward, TR1F: 5'-CAG TAC AAT GYA CAC ATG GA-3'

Reverse, TR1R: 5'-CAR TAG AAA AAT TCC CCT C-3'

2nd-round PCR (333 bp)

Forward, TR2F: 5'-TTA AAT GGC AGT CTA GCA GA-3'

Reverse, TRB2R: 5'-AAT TTC TGG GTC CCC TCC TG-3' (for subtype B)

TRE2R: 5'-AAT TTC TAG ATC TCC TCC TG-3' (for subtype CRF01_AE)

Barcode: AGCTAG (sample 1), GATTACT (sample 2), ATGAAC (sample 3),

CATGCG (sample 4), CGCTAT (sample 5)

図 1 HIV-1 細胞指向性検査のための PCR

表 1 クローン化 HIV-1 のディープシーケンシングの結果

実験1		実験2	
同一リード数	割合(%)	同一リード数	割合(%)
5048	91.62%	4366	92.87%
30	0.54%	14	0.30%
26	0.47%	13	0.28%
23	0.42%	12	0.26%
18	0.33%	12	0.26%
13	0.24%	11	0.23%
13	0.24%	9	0.19%
12	0.22%	9	0.19%
12	0.22%	9	0.19%
11	0.20%	9	0.19%
<11	5.52%	<8	5.04%

表 2 検体採取時の被験者の CD4 数とウイルス量

被検者	検体番号	CD4 count (cells/ μ l)	ウイルス量 (copies/ μ l)
C305	SP923	650	40,000
C310	SP939	113	330,000
C324	SP974	263	270,000
C137	SP971	7	860,000

C. 研究結果

ディープシーケンシングの誤り率を求めるために PCR でクローン化した HIV-1 LAI 株のシーケンシングを 2 回行った。得られた異なる塩基配列それぞれの出現頻度を高い順に 10 番まで表 1 に示す。元のクローンの塩基配列の次に頻度の高いリードの存在率は、実験 1 では 0.54%、実験 2 では 0.30% であった。すなわち、元の検体の中に存在しなかった塩基配列をもったリードが次世代シーケンサーの出力データとしてこのような頻度で出現することを示している。この結果から、ディープシーケンシングで検出できる有意な微小集団の存在率を 1% とした (P=0.05)。

HIV-1 感染者から血液検体を採取した時点での被験者の CD4 数とウイルス量を表 2 に示す。CD4 数の範囲は 7 ~ 650 copies/μl、ウイルス量の範囲は 40,000 ~ 860,000 copies/μl であった。これらの被験者はすべて未治療であった。感染時期については不明である。

HIV-1 感染者の血漿中 HIV-1 RNA と単核球中 HIV-1 DNA を用いたディープシーケンシングの結果

果それぞれ表 3 と表 4 に示す。以下、各感染者について HIV-1 RNA と DNA の結果を比較しながら説明する。

症例 C305 では、HIV-1 RNA から 4 種の変異株 A1 ~ A4 が同定され、最も優勢な株 A1 の存在率は 71.1% であった。HIV-1 DNA からは 6 種の変異株 A1 ~ A3 と A5 ~ A8 が同定された。すなわち、そのうちの 3 株は RNA から同定されたものと同一配列をもっていた。最も優勢な株は RNA と同じく A1 でその存在率は 41.7% であった。細胞指向性は、RNA と DNA のいずれから同定された変異株もすべて R5 株であった。

症例 C310 では、HIV-1 RNA から 9 種の変異株 A1 ~ A4 と B1 ~ B5 が同定され、最も優勢な株 A1 の存在率は 66.6% であった。変異株 A1 ~ A4 の細胞指向性は X4 株であったが、変異株 B1 ~ B5 の細胞指向性は R5 株であった。HIV-1 DNA からは 3 種の変異株 C1、B1、A1 が同定された。最も優勢な株は C1 で、その存在率は 47.6% であった。すなわち、RNA で最も優勢な株 A 1 は DNA では少数派で、DNA で最も優勢な株 C1 は RNA では同定されな

表 3-1 感染者血漿中 HIV-1 RNA のディープシーケンシングの結果 (1)

被検者	検体番号	変異株名	存在率	細胞指向性
C305	SP923	A1	71.1%	R5
		A2	11.5%	R5
		A3	2.0%	R5
		A4	1.5%	R5
C310	SP939	A1	66.6%	X4
		A2	3.9%	X4
		B1	2.1%	R5
		A3	1.8%	X4
		B2	1.7%	R5
		B3	1.6%	R5
		A4	1.4%	X4
		B4	1.4%	R5
		B5	1.0%	R5

表 3-2 感染者血漿中 HIV-1 RNA のディープシーケンシングの結果 (2)

被検者	検体番号	変異株名	存在率	細胞指向性
C324	SP974	A1	43.6%	R5
		A2	26.4%	R5
		A3	15.8%	R5
		A4	2.2%	R5
		A5	1.2%	R5
C137	SP971	A1	77.4%	R5
		B1	2.9%	X4
		A2	2.6%	R5

表 4-1 感染者末梢血単核球中 HIV-1 DNA のディープシーケンシングの結果 (1)

被検者	検体番号	変異株名	存在率	細胞指向性
C305	SP923	A1	41.7%	R5
		A2	24.8%	R5
		A5	8.9%	R5
		A3	4.5%	R5
		A6	4.3%	R5
		A7	1.2%	R5
		C1	0.6%	R5
C310	SP939	B1	36.7%	R5
		A1	6.8%	X4

表 4-2 感染者末梢血単核球中 HIV-1 DNA のディープシーケンシングの結果 (2)

被検者	検体番号	変異株名	存在率	細胞指向性
C324	SP974	A1	57.1%	R5
		A2	13.2%	R5
		A4	8.6%	R5
		A3	7.2%	R5
		A5	2.8%	R5
		A6	1.2%	R5
C137	SP971	A1	96.8%	R5

った。細胞 C1 株の細胞指向性は R5 であった。

症例 C324 では、HIV-1 RNA から 5 種の変異株 A1 ~ A5 が同定され、最も優勢な株 A1 の存在率は 43.6% であった。HIV-1 DNA からは 6 種の変異株 A1 ~ A6 が同定された。すなわち、DNA から新たに同定された変異株は A6 のみであった。最も優勢な株は RNA と同じく A1 でその存在率は 57.1% であった。細胞指向性は、RNA と DNA のいずれから同定された変異株もすべて R5 株であった。

症例 C137 では、HIV-1 RNA から 3 種の変異株 A1、A2、B1 が同定された。最も優勢な株 A1 の存在率は 77.4% であった。HIV-1 DNA からは変異株 A1 のみが同定され、その存在率は 96.8% であった。細胞指向性は、変異株 A1、A2 は R5 株であったが、変異株 B1 は X4 株であった。すなわち RNA からは R5 株と X4 株の両方が検出されたが、DNA からは R5 株のみが検出された。

次に、細胞指向性の違いに注目して変異株の存在率を各症例ごとに比較してみた。CD4 数が比較的高い症例 C305 と C324 では RNA も DNA も R5 株のみが検出された。CD4 数 113 の症例 C310 においては、RNA では R5 株が 7.6% で X4 株が 73.7% であり、DNA では R5 株が 84.3% で X4 株が 6.8% であった。また、CD4 数 7 の症例 C137 においては、RNA では R5 株が 80.0% で X4 株が 6.8% であり、DNA では R5 株のみが検出された。

D. 考察

次世代シーケンサー (Roche Genome Sequencer FLX) を用いて、HIV-1 微少集団における細胞指向性を定量する方法の開発を行った。

まず、微少集団の検出感度を求めるため、クローン化 HIV-1 LAI 株を用いてディープシーケンシングの誤り率を求め、その結果から $P=0.05$ で検出可能な微少集団の存在率を 1.0% とした。この検出感度をさらに高めるためには、ディープシーケンシングで誤りが起こる原因が PCR にあるのか、それともディープシーケンシングそのものにあるのかをまず調べる必要がある。後者の可能性に関しては、プラスミドベクター等に挿入してクローン化した DNA 断片をディープシーケンシングをすることによって検討することができる。もし、この過程が誤りの主要な原因であるならば、各種ディープシーケンシングによる誤り率を同じ検体を用いて比較することが必要となる。PCR の過程が誤りの主因であるならば、フィデリティの高い DNA ポリメラーゼを使用するなどの PCR 条件の改善が必要であろう。

細胞指向性が異なる HIV-1 微少集団が症例 C310 と C137 の検体で認められた。症例 C310 においては、RNA での多数変異株は X4 株であったが、DNA での多数派変異株は R5 株と結果が大きく異なっていた。もし通常の指向性ジェノタイプ検査を実施した場合、検査対象を RNA にするか DNA にするかによって結果が逆になったであろう。症例 C137 の RNA においては、多数派は R5 株であったが、2.9% の X4 株が検出された。この場合も、通常のジェノタイプ検査では微少 X4 株を見落とすことになる。CCR5 拮抗薬であるマラビロクの治療における有効性に対する微少 X4 株の影響に関してはまだ研究が十分ではないが、治療効果が低下する可能性は否定できない。

血漿中 RNA と末梢血単核球 DNA における HIV-1 の R5 株と X4 株の存在率を比較すると、両者が共存した症例 C310 と C137 においてどちらも RNA の方が X4 株の存在率が高かった。また、CD4 数の比較的高い症例 C305 と C324 では同定されたすべて変異株は R5 株であった。これらのことは、感染細胞は遊離ビリオンよりも半減期が相当長いために HIV-1 プロウイルスは過去に増殖した HIV-1 のアーカイブとなっており、HIV 感染症の進行にともない R5 株から X4 株に徐々に変化するというこれまでの知見とよく一致している。

本研究において、微少 HIV-1 集団における細胞指向性を次世代シーケンサーを用いて検査することが可能であることが示された。今後、このシーケンシング技術を HIV-1 指向性検査の一般的な方法として使用するためには、シーケンシングの正確性の向上、検体前処理の自動化、バーコード配列の多数利用によるコスト削減、操作性の高い解析ソフトウェアの開発などが必要であると考えられる。

E. 結論

次世代シーケンサーを用いて HIV-1 微少集団における細胞指向性を定量する方法を開発した。この方法により、抗 HIV 治療を受けている感染者の血漿 RNA あるいは末梢血単核球 DNA の中に R5 株と X4 株が共存することが示された。微少 X4 株の存在は、マラビロクのような CCR5 拮抗薬の治療効果に影響を与える可能性が高いと考えられる。抗 HIV 治療の最適化のため、次世代シーケンサーを用いた HIV-1 指向性検査を実用化を図ることが重要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 原著論文

1. Kondo M, Lemey P, Sano T, Itoda I, Yoshimura Y, Sagara H, Tachikawa N, Yamanaka K, Iwamuro S, Matano T, Imai M, Kato S, Takebe Y. Emergence in Japan of an HIV-1 variant associated with MSM transmission in China: First indication for the international dissemination of the Chinese MSM lineage. *J Virol.* 2013 Jan 30. [Epub ahead of print]
 2. 加藤真吾. わが国の HIV 流行終息にむけて. *IASR* 33:237-239, 2013.
 3. 加藤真吾. HIV 検査および HIV 関連検査. *化学療法の領域* 27(3):71-77, 2011.
 4. 加藤真吾, 今井光信. HIV 検査の新たな展開. *日本エイズ学会誌* 13(3):132-136, 2011.
 5. 近藤真規子, 佐野貴子, 今井光信, 加藤真吾. 日本における HIV 検査体制. *病原微生物検出情報* 32(10):287-288, 2011.
 6. Shima-Sano, T., Yamada, R., Sekita, K., Hankins, R. W., Horr, H., Seto, H., Sudo, K., Kondo, M., Kawahara, K., Tsukahara, Y., Inaba, N., Kato, S., Imai, M. A human immunodeficiency virus screening algorithm to address the high rate of false-positive results in pregnant women in Japan. *PLoS One* 5(2):e9382, 2010.
 7. Mizusawa, Y., Kuji, N., Tanaka, Y., Tanaka, M., Ikeda, E., Komatsu, S., Kato, S., and Yoshimura, Y. Expression of human oocyte-specific linker histone protein and its incorporation into sperm chromatin during fertilization. *Fertil. Steril.* 93(4):134 - 141, 2010.
 8. Ibe, S., Yokomaku, Y., Shiino, T., Tanaka, R., Hattori, J., Fujisaki, S., Iwatani, Y., Mamiya, N., Utsumi, M., Kato, S., Hamaguchi, M., Sugiura, W. HIV-1 CRF01_AB: First circulating recombinant from of HIV-2. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 54(3):241 - 247, 2010.
 9. 今井光信, 加藤真吾. HIV 検査—最近のスクリーニング検査と遺伝子検査の進歩—. *日本臨床* 68(3):433 - 438, 2010.
 10. 加藤真吾, 今井光信. HIV 検査と検査相談体制. *最新医学・別冊 新しい診断と治療の ABC* 65, 180 - 187, 2010.
- 2) 口頭発表
1. 加藤真吾: わが国の HIV 流行終息にむけて (共催セミナー 2)、第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会、2012 年 11 月、東京
 2. 加藤真吾: HIV-1 指向性推定システム geno2pheno の性能評価、第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会、2012 年 11 月、東京
 3. 小谷宙、須藤弘二、長谷川直樹、池谷修、河村俊一、加藤真吾、岡本真一郎、岩田敏: ウイルス RNA およびウイルス DNA を用いた指向性検査結果の比較検討、第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会、2012 年 11 月、東京
 4. 吉田繁、服部純子、松田昌和、橋本修、岡田清美、和山行正、加藤真吾、伊部史朗、巽正志、杉浦互: 2011 年度 HIV 薬剤耐性検査外部精度管理の報告、第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会、2012 年 11 月、東京
 5. 前田憲昭、加藤真吾、的野慶、溝部潤子、中川裕美子、池野良: 院内ポスターを活用した検査へ繋げる歯科診療、第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会、2012 年 11 月、東京
 6. 須藤弘二、佐野貴子、近藤真規子、今井光信、加藤真吾: HIV 郵送検査に関する実態調査 (2009-2011)、第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会、2012 年 11 月、東京
 7. 坪井宏仁、柳瀬未季、吉田直子、Mouhiuddin Hussain Khan、加藤真吾、木村和子: だ液および尿を検体とする HIV 自己検査キットの試買調査、第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会、2012 年 11 月、東京
 8. 小島賢一、花房秀次、久慈直昭、高桑好一、加嶋克則、加藤真吾: HIV 感染者の生殖補助医療を支援して—最近五年間の現状と課題—、第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会、2012 年 11 月、東京
 9. 近藤真規子、佐野貴子、須藤弘二、立川夏夫、相楽裕子、岩室紳也、井戸田一朗、山中晃、武部豊、今井光信、加藤真吾: 日本で流行している HIV-1 サブタイプの変遷、第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会、2012 年 11 月、東京
 10. 佐野貴子、小林寛子、杉浦太一、須藤弘二、植田知幸、清水茂徳、近藤真規子、今井光信、加藤真吾: ホームページ「HIV 検査・相談マップ」による HIV 検査機関の情報提供およびサイト利用状況、第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会、2012 年 11 月、東京
 11. 井部進、南宮湖、鎌田将史、藤原宏、長谷川直樹、加藤真吾、小谷宙、戸蒔祐子、岩田敏、根岸昌功: 脳悪性リンパ腫と HIV 脳症及び全身性カポジ肉腫の合併により死亡の転帰を辿った AIDS 患者の剖検例、第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会、2012 年 11 月、東京
 12. 鎌田将史、南宮湖、井部進、藤原宏、長谷川直樹、加藤真吾、小谷宙、戸蒔祐子、岩田敏、根岸昌功: HIV 患者におけるニューモシスチス肺炎回復後の呼吸機能の検討、第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会、2012 年 11 月、東京
 13. 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・総会、2012 年 11 月、東京
14. 加藤真吾、須藤弘二、今井光信. マルコフモデルを用いた日本人 HIV 感染者数の推定. 第 25 回日本エイズ学会学術集会 (2011 年 11 月 30 日-12 月 2 日、東京)
 15. 近藤真規子、佐野貴子、井戸田一朗、山中晃、岩室紳也、相楽裕子、立川夏夫、今井光信、加藤真吾. 2010 年新規感染者から検出された CRF01_AE/B リコンビナント HIV-1. 第 25 回日本エイズ学会学術集会 (2011 年 11 月 30 日-12 月 2 日、東京)
 16. 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、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 回日本エイズ学会学術集会 (2011 年 11 月 30 日-12 月 2 日、東京)
 17. 木内英、細川真一、五味淵秀人、田村久美、濱田洋平、橋本亜希、水島大輔、西島健、青木孝弘、渡辺恒二、本田元人、田沼順子、矢崎博久、塚田訓久、本田美和子、瀧永博之、照屋勝治、菊池嘉、岡慎一、加藤真吾. 新生児における AZT-TP 細胞内濃度. 第 25 回日本エイズ学会学術集会 (2011 年 11 月 30 日-12 月 2 日、東京)
 18. 田村久美、渡辺恒二、木内英、福田友彦、折戸征也、梶谷法生、野村耕太郎、細川真一、松下竹次、植田知幸、親泊あいみ、加藤真吾、瀧永博之、菊池嘉、岡慎一. 妊娠 35 週に HIV スクリーニング陽性が判明したが、血中 HIV-RNA が検出されないために、診断と予防内服の判断に苦慮した 1 例. 第 25 回日本エイズ学会学術集会 (2011 年 11 月 30 日-12 月 2 日、東京)
 19. 矢永由里子、高田千恵子、岳中美江、小泉京子、辻麻理子、加藤朋子、江崎直樹、井村弘子、紅林洋子、加藤真吾. HIV 検査相談の研修ガイドライン策定と実践、今後の方向性について：相談対応の標準化を目指して. 第 25 回日本エイズ学会学術集会 (2011 年 11 月 30 日-12 月 2 日、東京)
 20. 須藤弘二、吉野宗宏、桑原健、白阪琢磨、加藤真吾. LC-MS/MS を用いた毛髪中および血液中の抗 HIV 薬の定量. 第 25 回日本エイズ学会学術集会 (2011 年 11 月 30 日-12 月 2 日、東京)
 21. 村山正晃、池野良、児玉泰光、田邊嘉也、山口玲、山崎さやか、加藤真吾、高木律男. HIV-1 陽性者の唾液中に存在するウイルス RNA の完全性に
- 関する研究. 第 25 回日本エイズ学会学術集会 (2011 年 11 月 30 日-12 月 2 日、東京)
 22. 南宮湖、長谷川直樹、小林芳夫、加藤真吾、小谷宙、戸蒔祐子、別役智子、岩田敏、根岸昌功. 当院において HIV 患者に合併した悪性腫瘍の臨床的検討. 第 25 回日本エイズ学会学術集会 (2011 年 11 月 30 日-12 月 2 日、東京)
 23. 柳瀬末季、吉田直子、坪井宏仁、木村和子、加藤真吾. 未承認 HIV 自己検査キット使用者における他検査の受検状況調査. 第 25 回日本エイズ学会学術集会 (2011 年 11 月 30 日-12 月 2 日、東京)
 24. 佐野貴子、近藤真規子、須藤弘二、根岸昌功、山中晃、井戸田一朗、今井光信、加藤真吾. HIV 迅速検査試薬の検討および即日検査への応用. 第 25 回日本エイズ学会学術集会 (2011 年 11 月 30 日-12 月 2 日、東京)
 25. 加藤真吾. 日本の流行状況から求められる HIV 検査戦略の課題～根拠にもとづいた計画とその評価のために何を解決すべきか～「HIV 検査体制現在の課題」、第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会 (2010 年 11 月 24-26、東京)
 26. 加藤真吾、須藤弘二. 次世代シーケンサーを用いた薬剤耐性 HIV の遺伝的多様性解析法の開発. 第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会、2010 年 11 月、東京.
 27. 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、渡辺大、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、山元政弘、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 回日本エイズ学会学術集会・総会 (2010 年 11 月 24-26、東京)
 28. 須藤弘二、加藤真吾. LC-MS/MS を用いた毛髪中および血液中の抗 HIV 剤の定量. 第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会 (2010 年 11 月 24-26、東京)
 29. 伊部史朗、横幕能行、服部純子、岩谷靖雅、加藤真吾、杉浦互. 抗レトロウイルス療法のモニタリングのための plasma HIV-2 viral load 測定系の確立. 第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会 (2010 年 11 月 24-26、東京)
 30. 山崎さやか、加藤真吾. リアルタイム PCR を用いた HIV-1 と HIV-2 の同時検査法の開発. 第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会 (2010 年 11 月 24-26、東京)
 31. 村山正晃、池野良、児玉泰光、田邊嘉也、川口玲、山崎さやか、加藤真吾、高木律夫. 唾液中ウイルスと血中ウイルスの定量値とウイルス RNA 鎖

の比較、第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会
(2010 年 11 月 24-26、東京)

32. 南宮湖、長谷川直樹、小林芳夫、加藤真吾、小谷宙、戸蒔祐子、岩田敏、根岸昌功. 当院において糖代謝異常を来した HIV 患者の臨床的検討、第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会 (2010 年 11 月 24-26、東京)
33. 柳瀬未季、吉田直子、赤沢学、木村和子、加藤真吾. 未承認 HIV 自己検査キットの使用実態調査、第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会 (2010 年 11 月 24-26、東京)
34. Tomoyuki Ueda and Shingo Kato. Purine deoxynucleosides inhibit the replication of human immunodeficiency virus type 1 in non-stimulated peripheral blood mononuclear cells. The 5th Japan-Germany HIV/AIDS Symposium. 2010, May 10-11, Tokyo, Japan.

H. 知的所有権の出願・取得状況

なし

国内で流行する HIV 株および薬剤耐性 HIV 株の 動向把握調査研究 ～多剤耐性 HIV の全国調査研究を含む～

研究分担者 藤井 毅 東京大学医科学研究所 先端医療研究センター 講師
(現 東京医科大学八王子医療センター感染症科 教授)
古賀 道子 東京大学医科学研究所 先端医療研究センター 助教
研究協力者 宮崎 菜穂子 東京大学医科学研究所 感染症国際研究センター

研究要旨

我が国における薬剤耐性 HIV-1 の出現動向の把握と、薬剤耐性 HIV-1 感染に際しての薬剤選択の現状を明らかにするために、以下の 2 つの研究に取り組んだ。1、薬剤耐性変異調査研究：全国的な薬剤耐性 HIV-1 の動態把握のため、東京大学医科学研究所附属病院に 2010 年 1 月から 2012 年 12 月の間で新規に診断された HIV-1 感染者 144 人の HIV-1 プロテアーゼ領域、逆転写領域、インテグラーゼ領域の遺伝子配列解析を施行し、各々、2 例、11 例、6 例が検出された。2、多剤耐性 HIV の全国調査研究：全国 377 施設 6,296 例を対象に、新規 ARV (ダルナビル、ラルテグラビル、エトラビリン、マラビロク、T-20、Tipranavir) 使用状況についてアンケート調査を行った。新規 ARV 服用症例は 280 例 (4.4%) であり、新規 ARV への変更理由はウイルス学的失敗 (MDR 群) 34.6% (97 名)、副作用などの理由 (non-MDR 群) 64.2% (180 名) であった。導入前の CD4 陽性 T リンパ球数 (cells/ μ L) は、MDR 群の方が有意に低く (MDR 群 227、non-MDR 群 323($p=0.0304$)) と、総治療期間 (年) は、MDR 群の方が有意に長く (MDR 群 10.8、non-MDR 群 4.3($p<0.0001$))、使用経験のある既存 ARV 数 (剤) は、MDR 群の方が有意に多かった (MDR 群 7、non-MDR 群 5($p<0.0001$))。MDR 群における抗ウイルス効果 ($\log \Delta VL$ の中央値) は、新規 ARV 導入剤数に関しては 1 剤群：1.4、2 剤群：1.8、3 剤以上群：2.7 と導入剤数が多いほど下げ幅が大きく、1 剤群と 3 剤以上群で有意差が認められた ($p=0.0244$)。薬剤耐性検査実施の有無に関しては、検査実施群：1.8、非実施群：0.3 と、検査実施群の方が有意にウイルス量を減少させていた ($p=0.0223$)。治療経験者における耐性症例では、長期治療・かつ多数の薬剤使用経験があるが、新規抗 HIV 薬への変更により治療が奏功していることが判明した。また、耐性症例の治療においては、耐性検査の実施による治療の方針決定が効果的であることが示された。

A. 研究目的

我が国における薬剤耐性 HIV-1 の出現動向の把握と、薬剤耐性 HIV-1 感染に際しての薬剤選択の現状を明らかにするために、以下の研究に取り組む。

1、薬剤耐性変異調査研究：

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

2、多剤耐性 HIV の全国調査研究：

近年、本邦にて承認された抗 HIV 薬は、サルベージとしての用途を目的に承認されているものの、

副作用の軽減など他の理由にした薬剤変更も多数行われ使用実態は不明である。また、サルベージ症例は、各施設における症例数が非常に少ないため、直面した際の処方選択は難しい。全国的な新規抗 HIV 薬の使用調査を行い、使用状況の把握と、治療困難症例が直面する問題を明らかにする。

B. 研究方法

1、薬剤耐性変異調査研究：

当院にて新規に診断された HIV-1 感染者の血漿を名古屋医療センターに送付し、HIV-1 プロテアーゼ

領域、逆転写領域、インテグラーゼ領域の遺伝子配列解析を依頼し、薬剤耐性変異調査研究を施行した。

(倫理面への配慮)

本研究は東京大学医科学研究所の倫理審査委員会で承認されたものである(21-65-0038)。患者様に担当医師より本研究の説明を行い、研究対象者として書面で同意を頂いている。本研究によって被る不利益は全くなく、診療とは別で、同意の撤回も可能である。個人情報の保護も厳守されている。

2、多剤耐性 HIV の全国調査研究：

【研究デザイン】

各施設の既存資料(診療録等)を活用した後ろ向きの観察的研究を行った。背景因子を使用した解析も行うが、主たる目的は日本における新規抗 HIV 薬の使用状況と、その背景にある耐性実態を把握する記述的臨床疫学研究である。全国の HIV 診療拠点病院、及びクリニックの全 377 施設に対して実施した。新規抗 HIV 薬(ダルナビル(商品名プリジスタ)、ラルテグラビル(商品名アイセントレス)、エトラビルン(商品名インテレンス)、マラビロク(商品名シーエルセントリ)、T-20(商品名 fuzeon)、Tiplranavir(商品名 Aptivus))を投与中の全ての患者を調査対象とした。

【調査内容】

新規抗 HIV 薬の選択に至る背景、及び予後を中心に以下の調査を行った。(※は選択形式)

現在のメニュー：現在の新規抗 HIV 薬メニュー、及びその開始年月 ②患者背景：生年月、性別(※)、感染経路 ③検査データ：現メニューに切替え直前における CD4 数(個/ μ L)、及び HIV-RNA 量(コピー/mL)、最も直近の CD4 数(個/ μ L)、及び HIV-RNA 量(コピー/mL) ④切り替える直前の抗 HIV 薬メニュー ⑤新規抗 HIV 薬処方理由(※) ⑥新規抗 HIV 薬処方前の耐性検査実施の有無(※) ⑦現在までの使用薬剤(※)

【データの匿名性】

本研究では、多剤耐性 HIV の背景因子との関連性より、患者背景として生年月、性別、感染経路の情報を収集するが、当研究班では各患者を特定する情報(イニシャル、名前、住所、診療録番号等)は有しておらず、非連結匿名化された情報として維持する。また、本研究実施にあたって、対象症例データは各施設において匿名コード化されるが、この際、イニシャル、診療録番号は用いないようにし、匿名を保つ。

(倫理面への配慮)

本研究は、HIV 診療拠点病院、及びクリニックの

既存資料(診療録)からの情報を受け、疫学研究に関わる倫理指針を遵守して行った。

1) 全ての情報は、既存情報であり、生体資料を用いない観察研究である。2) 主たる研究機関である国立感染症研究所倫理委員会の承認をうけて実施する。3) 当該研究の目的を含む研究の実施についての情報を研究班ホームページ上で同指針第 3-1(2) 細則に準じて公開する。4) 情報は匿名化されていると判断される。5) 公表する情報は集計であり個人を特定できない。

以上より、同指針第 3-1 細則①～⑤、同第 4-3-(2) を適用し、インフォームドコンセント行わず実施することに倫理的問題はないと判断した。

C. 研究結果

1、薬剤耐性変異調査研究：

2010 年 1 月から 2012 年 12 月までに当院にて未治療の HIV-1 感染者 144 人に薬剤耐性検査を施行した。2010-2011 年 (n=104) では逆転写領域の K103N が 1 例、Y181C が 1 例、V106M が 1 例、A98S(サブタイプ C) が 3 例、M41L/T215C が 2 例、K70E が 1 例、インテグラーゼ領域 E157Q が 3 例であった。2012 年 (n=40) では逆転写領域で T215E が 1 例、T215D が 1 例と減少し、インテグラーゼ領域 E157Q が 2 例、Y143H が 1 例、プロテアーゼ領域では V32I が 1 例、V32I/M46I/L90M が 1 例であった。

2、多剤耐性 HIV の全国調査研究：

調査を依頼した 377 施設中、回答を得た 211 施設 (56.0%) における通院症例数は 9040 名、総服薬症例数 6296 名 (69.6%)、そのうち新規 ARV 使用症例数は 280 症例 (4.4%) であり、さらにこの 280 症例のうち、ウイルス学的失敗による変更 (MDR 群) は 97 症例 (34.6%)、副作用などの他の理由での変更・導入 (non-MDR 群) は 180 症例 (64.2%) であった。この 2 群間の背景を解析すると、導入前の CD4 陽性 T リンパ球数 (cells/ μ L) は、MDR 群 227、non-MDR 群 323 と、MDR 群の方が有意に低く ($p=0.0304$)、総治療期間 (年) は、MDR 群 10.8、non-MDR 群 4.3 と、MDR 群の方が有意に長く ($p<0.0001$)、使用経験のある既存 ARV 数 (剤) は、MDR 群 7、non-MDR 群 5 と、MDR 群の方が有意に多かった ($p<0.0001$)。

MDR 群 97 症例について、抗ウイルス効果を $\log \Delta$ VL の中央値 (\log copies/mL) として解析したところ、新規 ARV 導入剤数においては、1 剤群 (n=52) 1.4、2 剤群 (n=33) 1.8、3 剤以上群 (n=11) 2.7 と導入剤数が多いほど下げ幅が大きく、1 剤群と 3 剤以

上群で有意差が認められた ($p = 0.0244$)。薬剤耐性検査実施の有無においては、検査実施群 ($n=81$) 1.8、非実施群 ($n=15$) 0.3 と、検査実施群の方が有意に VL を減少させていた ($p = 0.0223$)。

D. 考察

1、薬剤耐性変異調査研究：

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

2、多剤耐性 HIV の全国調査研究：

治療経験者における耐性症例では、長期治療・かつ多数の薬剤使用経験があったが、新規抗 HIV 薬への変更により治療が奏功していることが判明した。また、耐性症例の治療においては、耐性検査の実施による治療の方針決定が効果的であることが示された。

E. 結論

今後も薬剤耐性 HIV-1 の動向を把握するために、新規診断症例の薬剤耐性検査を継続する必要があると考えられた。一方、既治療 HIV/AIDS 患者における薬剤耐性治療の状況は、薬剤耐性症例自体が少ないこともあり全体像の把握が難しく、今回施行した多剤耐性 HIV の全国調査研究にて、患者診療における薬剤選択の現状を把握することができた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1) 原著論文

- Nomura S, Hosoya N, Brumme ZL, Brockman MA, Kikuchi T, Koga M, Nakamura H, Koibuchi T, Fujii T, Carlson JM, Heckerman D, Kawana-Tachikawa A, Iwamoto A, Miura T. Significant Reductions in Gag-Protease-Mediated HIV-1 Replication Capacity during the Course of the Epidemic in Japan. *J Virol*. 2013 Feb;87(3):1465-76.
- Kikuchi T, Iwatsuki-Horimoto K, Adachi E, Koga M, Nakamura H, Hosoya N, Kawana-Tachikawa A, Koibuchi T, Miura T, Fujii T, Kawaoka Y, Iwamoto A. Improved neutralizing antibody response in the second season after a single dose of pandemic (H1N1) 2009 influenza vaccine in HIV-1-positive adults. *Vaccine*. 2012 Jun 6;30(26):3819-23
- Adachi E, Koibuchi T, Imai K, Kikuchi T, Koga M, Nakamura H, Miura T, Iwamoto A, Fujii T. Favourable outcome of progressive multifocal leukoencephalopathy with mefloquine treatment in combination with antiretroviral therapy in an HIV-infected patient. *Int J STD AIDS* ;23(8):603-5. 2012.
- Tsuchiya N, Pathipvanich P, Rojanawiwat A, Wichukchinda N, Koga I, Koga M, Auwanit W, Kilgore PE, Ariyoshi K, Sawanpanyalert P. Chronic hepatitis B and C co-infection increased all-cause mortality in HAART-naive HIV patients in northern Thailand. *Epidemiol Infect*. 2012 Nov 1:1-9.
- Nakayama K, Nakamura H, Koga M, Koibuchi T, Fujii T, Miura T, Iwamoto A, Kawana-Tachikawa A. Imbalanced Production of Cytokines by T Cells Associates with the Activation/Exhaustion Status of Memory T Cells in Chronic HIV Type 1 Infection. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2012 Jul;28(7):702-14
- Nakamura H, Miyazaki N, Hosoya N, Koga M, Odawara T, Kikuchi T, Koibuchi T, Kawana-Tachikawa A, Fujii T, Miura T, Iwamoto A. Long-term successful control of super-multidrug-resistant human immunodeficiency virus type 1 infection by a novel combination therapy of raltegravir, etravirine, and boosted-darunavir. *J Infect Chemother*. 17: 105-10, 2011
- Imai K, Koibuchi T, Kikuchi T, Koga M, Nakamura H, Miura T, Gono T, Yazawa K, Iwamoto A, and Fujii T, Pulmonary nocardiosis caused by *Nocardia exalbida* complicating *Pneumocystis pneumonia* in a HIV-infected patient. *J Infect Chemother*. 17: 547-51, 2011
- Koga M, Koibuchi T, Kikuchi T, Nakamura H, Miura T, Iwamoto A, Fujii T. Kinetics of serum β -D-glucan after *Pneumocystis pneumonia* treatment in patients with AIDS. *Intern Med*. 50: 1397-401, 2011
- Imai K, Koibuchi T, Kumagai T, Maeda T, Osada Y, Ohta N, Koga M, Nakamura H, Miura T, Iwamoto A, Fujii T. Cerebral schistosomiasis due to *Schistosoma haematobium* confirmed by PCR analysis of brain specimen. *J Clin Microbiol*. 49: 3703-6, 2011
- Adachi E, Koibuchi T, Okame M, Sato H, Imai K, Shimizu S, Tsurita G, Oyaizu N, Iwamoto A, Fujii T. Case of secondary syphilis presenting with unusual complications: syphilitic proctitis, gastritis, and hepatitis. *J Clin Microbiol*. 49: 4394-6, 2011
- Takuya Maeda, Akira Ito, Yasuhito Sako, Hiroshi Yamasaki, Naoki Oyaizu, Takashi Odawara,

- Aikichi Iwamoto, Takeshi Fujii. Neurocysticercosis case with tuberculoma-like epithelioid granuloma strongly suspected by serology and confirmed by mitochondrial DNA. *BMJ Case Reports* 2011; doi:10.1136 / bcr.04.2011.4125
12. Iwatsuki-Horimoto K, Horimoto T, Tamura D, Kiso M, Kawakami E, Hatakeyama S, Ebihara Y, Koibuchi T, Fujii T, Takahashi K, Shimojima M, Sakai-Tagawa Y, Ito M, Sakabe S, Iwasa A, Takahashi K, Ishii T, Gorai T, Tsuji K, Iwamoto A, Kawaoka Y. Seroprevalence of pandemic 2009 (H1N1) influenza A virus among schoolchildren and their parents in Tokyo, Japan. *Clin Vaccine Immunol.* 18: 860-6, 2011
 13. Fujisaki S, Yokomaku Y, Shiino T, Koibuchi T, Hattori J, Ibe S, Iwatani Y, Iwamoto A, Shirasaka T, Hamaguchi M, Sugiura W. Outbreak of infections by hepatitis B virus genotype A and transmission of genetic drug resistance in patients coinfecting with HIV-1 in Japan. *J Clin Microbiol.* 49:1017-24, 2011
 14. Tasaka S, Tokuda H, Sakai F, Fujii T, Tateda K, Johkoh T, Ohmagari N, Ohta H, Araoka H, Kikuchi Y, Yasui M, Inuzuka K, Goto H. Comparison of clinical and radiological features of pneumocystis pneumonia between malignancy cases and acquired immunodeficiency syndrome cases: a multicenter study. *Intern Med.* 49: 273-81, 2010.
 15. Kakugawa T, Mukae H, Hishikawa Y, Ishii H, Sakamoto N, Ishimatsu Y, Fujii T, Koji T, Kohno S. Localization of HSP47 mRNA in murine bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Virchows Arch.* 456:309-15, 2010.
 16. Koga, M., Kawana-Tachikawa, A., Heckerman, D., Odawara, T., Nakamura, H., Koibuchi, T., Fujii, T., Miura, T., and Iwamoto, A. Change in impact of HLA class I allele expression on HIV-1 plasma virus loads at a population level over time. *Microbiol. Immunol.* 54:196- 205, 2010. Apr 2010.
 17. Liu J, Wu P, Gao F, Qi J, Kawana-Tachikawa A, Xie J, Vavricka CJ, Iwamoto A, Li T, Gao GF. Novel immunodominant peptide presentation strategy: a featured HLA-A*2402 restricted CTL-epitope stabilized by intra-chain hydrogen-bonds from SARS-CoV nucleocapsid protein. *J Virol.* 84:11849-11857, 2010.
 18. Zhu D, Kawana-Tachikawa A, Iwamoto A, Kitamura Y. Influence of polymorphism in dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin-related (DC-SIGNR) gene on HIV-1 trans-infection. *Biochem Biophys Res Commun.* 393:598-602, 2010.
 19. Sun Y, Liu J, Yang M, Gao F, Zhou J, Kitamura Y, Gao B, Tien P, Shu Y, Iwamoto A, Chen Z, Gao GF. Identification and structural definition of H5-specific CTL epitopes restricted by HLA-A*0201 derived from the H5N1 subtype of influenza A viruses. *J Gen Virol.* 91:919-930, 2010 Apr 2010.
 20. Kondo, N., Miyauchi, K. Meng, F. Iwamoto, A. and Matsuda, Z. Conformational changes of the HIV-1 envelope protein during membrane fusion were inhibited by the replacement of its membrane-spanning domain. *J. Biol. Chem.* 285:14681-14688, 2010. May 7, 2010.
 21. Yu, L., Aoki, C., Shimizu, Y., Shimizu, K., Hou, W., Yagyu, F., Wen, X., Oshima, M., Iwamoto, A., Gao, B., Liu, W., Gao, GF., and Kitamura, Y. Development of a simple system for screening anti-hepatitis C virus drugs utilizing mutants capable of vigorous replication. *J. Virol Methods* 169: 380-384, 2010.
 22. Miyauchi, K., Curran, A.R., Long, Y., Kondo, N., Iwamoto, A., Engelman, D.M., and Matsuda, Z. The membrane-spanning domain of gp41 plays a critical role in intracellular trafficking of the HIV envelope protein. *Retrovirology* 2010, 7:95. doi: 10. 1186/1742-4690-7-95. E- published, November 13, 2010.
 23. Liu, S., Kondo, N., Long, Y., Xiao, D., Iwamoto, A., and Matsuda, Z. Membrane topology analysis of HIV-1 envelope glycoprotein gp41. *Retrovirology.* 7:100.
 24. 宮崎菜穂子、杉浦互. 我が国における抗 HIV 治療と多剤耐性症例の現状. *IASR* 31 (8); p233-234, 2010.
 25. 宮崎菜穂子. 専門薬剤師 Up-to-date 不測の事態への備え: 月刊薬事 52 (14); p2178, 2010.
 26. 宮崎菜穂子. 薬剤師が知っておきたい HIV/AIDS の知識: 日本病院薬剤師会雑誌 46 (8); p1049-1052, 2010.
 27. 藤井 毅. AIDS におけるニューモシスチス肺炎: 日本胸部臨床 69; 103-111, 2010.
 28. 藤井 毅. ヒト免疫不全ウイルス 1 型、2 型: 日本臨床 68 (増刊号 6); 473-477, 2010.
 29. 藤井 毅. AIDS 指標疾患としての真菌症: 深在性真菌症 SFI Forum; 6; 19-23, 2010.
 30. 藤井 毅. IDSA ガイドライン真菌症治療の UPTO-DATE 「クリプトコックス脳髄膜炎の治療戦略; HIV 感染患者における初期治療」: 河野茂編、医薬ジャーナル社; 242-245, 2010.
- ## 2) 学会発表
- 1 T. Kikuchi, Y. Iwabu, A. Kawana-Tachikawa, M. Koga, N. Hosoya, S. Nomura, Z.L. Brumme, H. Jessen, A. Kelleher, M. Markowitz, F. Pereyra, A. Trocha, B.D. Walker, A. Iwamoto, K. Tokunaga, T. Miura. Anti-APOBEC3G activity of HIV-1 Vif

- protein from elite controllers is attenuated compared to those from untreated chronic progressors or those from individuals with acute infection. 19th International AIDS Conference 2012, Washington, USA
2. M. Koga, T. Kikuchi, S. Nomura, N. Hosoya, H. Nakamura, T. Koibuchi, T. Fujii, A. Kawana-Tachikawa, A. Iwamoto, T. Miura A combinational mutation of K65R/M184V/K103N/Y181C that makes HIV-1 highly resistant to TDF/FTC/EFV therapy significantly reduces viral replication capacity and which might be contributing to keep viremia at low-level in a patient with virological failure 19th International AIDS Conference 2012, Washington, USA
 3. N. Miyazaki, F. Takeshi, A. Iwamoto, S. Matsushita, W. Sugiura, and Japanese HIV-MDR Study Group. Potential of recent antiretroviral treatments in controlling treatment-naïve and drug-resistant HIV cases in Japan. 19th The International HIV & Hepatitis Virus Drug Resistance Workshop. June 7-11, 2011, Baja California Sur, Mexico.
 4. S. Nomura, N. Hosoya, T. Kikuchi, M. Koga, H. Nakamura, T. Koibuchi, T. Fujii, A. Kawana-Tachikawa, A. Iwamoto, T. Miura. Replication capacities of chimeric NL4-3 encoding gag-protease from modern HIV-1 isolates are significantly reduced compared to those derived from isolates in the early days of epidemic in Japan. 6th International AIDS Society Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention. 17 July 2011, Roma, Italy
 5. T. Kikuchi, K. Iwatsuki-Horimoto, E. Adachi, K. Imai, S. Shimizu, N. Miyazaki, M. Koga, H. Nakamura, A. Kawana-Tachikawa, T. Koibuchi, T. Miura, T. Fujii, Y. Kawaoka, A. Iwamoto. Induction and maintenance of neutralizing antibodies after single dose of non-adjuvanted split 2009 pandemic H1N1 influenza A vaccine in HIV-1 positive population. 6th International AIDS Society Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention. 17 July 2011, Roma, Italy
 6. N. Miyazaki, S. Matsushita, T. Fujii, A. Iwamoto, W. Sugiura and Japanese HIV-MDR Study Group. Drug-Resistant Genotyping to Guide Selection of Etravirine, Darunavir and Raltegravir in Salvage Therapy for Multi-Drug-Resistant Cases Improves Outcomes. 18th International AIDS Conference. 2010, Vienna, Austria.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし