

で開発された高感度薬剤耐性 HIV 検査法(高感度法)を用いて新規未治療感染患者検体の微小集族薬剤耐性 HIV 検出を試みた。また、高感度法で増幅される amplicon の解析から、重感染の検出の可能性について検討を行った。さらに核酸系逆転写酵素阻害剤(NRTI)に対する耐性変異の M184V の検出系の感度が十分でない可能性が明らかになったため、M184V を検出するプライマーを開発して M184V 検出系の改良を試みた。

(倫理面への配慮)

本研究では薬剤耐性変異を組み込んだベクターの作製で組換え DNA 実験を行うので、組換え DNA 実験安全委員会に実験申請を行いその許可を得た。またヒト由来検体を使用するため、国立感染症研究所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。

表 1 2008 年 1 月から 2009 年 12 月までに名古屋医療センターで薬剤耐性検査を行ったサブタイプ B 新規未治療患者検体の一覧

	2008	2009	Total
合計	75	74	149
性別			
男	74	73	147
女	1	1	2
不明	0	0	
年齢			
平均値(歳)	39	38	39
感染経路			
同性間	52	49	101
異性間	9	11	20
同性間/異性間	8	13	21
血液製剤	1	0	1
不明	5	1	6
国籍			
日本	67	67	134
アジア(日本を除く)	2	2	4
オセアニア	0	1	1
北アメリカ	1	0	1
南アメリカ	3	3	6
ヨーロッパ	0	1	1
アフリカ	0	0	0
不明	2	0	2
HIV RNA 量 (copies/mL)			
平均値	9.70E+04	7.00E+04	7.90.E+04
最頻値	1.10E+05	2.70E+04	1.10.E+05
CD4			
平均値(count/mL)	199.7	225.4	212.0

B. 研究方法

微小集族薬剤耐性 HIV の解析には、CDC との共同研究で開発された定量 PCR の原理を応用した高感度薬剤耐性 HIV 検査法(高感度法)を用いた。解析した薬剤耐性変異は逆転写酵素阻害剤(NRTI, NNRTI)に対する 8 耐性変異(M41L, K65R, K70R, K103N, Y181C, M184V, T215Y/F)及びプロテアーゼ阻害剤(PI)耐性変異の M46I/L, L90M の 3 変異の合計 11 変異とした。解析対象は 2008 年 1 月～2009 年 12 月までに名古屋医療センターで薬剤耐性検査を行ったサブタイプ B の 149 症例(表 1)とした。これらの検体を高感度法により解析し、通常法による薬剤耐性検査の結果と比較した。また、高感度法で異なる HIV 株による重感染を解析するために、東京都健康安全研究センターで通常法による薬剤耐性検査を行った症例を解析対象とした。M184V 検出系の改良のために、大阪医療センター

表 2 高感度法で検出された微小集族薬剤耐性変異の一覧

	2008-2009 合計 (149)			
	通常法	高感度法	合計	(%)
逆転写酵素阻害剤耐性変異				
M41L	0	1	1	0.67
K65R	0	2	2	1.34
K70R	0	2	2	1.34
K103N	0	0	0	0.00
Y181C	0	0	0	0.00
M184V	0	1	1	0.67
T215Y	2	2	2	1.34
T215I	0	0	0	0.00
T215F	0	0	0	0.00
T215L	2	2	2	1.34
PI 耐性変異				
M46I	14	29	29	19.46
M46L	0	5	5	3.36
L90M	0	4	4	2.68
Total	18	48	48	
(%)	12.08	32.21	32.21	

で薬剤耐性検査を行った 4 検体について PCR 増幅サンプルを用いた。

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

解析対象とした新規未治療患者 149 例を高感度法で解析した結果、逆転写酵素領域に M41L が 1 個、K65R が 2 個、K70R が 2 個、M184V が 1 個、プロテアーゼ領域に M46I が 15 個、M46L が 5 個、L90M が 4 個微小集族として新たに検出された。解析した 149 例の、上記逆転写酵素領域の 8 耐性変異とプロテアーゼ領域の 3 耐性変異の薬剤耐性検出

率は通常法で 12.08% だったのに対し、高感度法では 32.21% に上昇した (表 2)。微小集族薬剤耐性変異を検出した 23 症例のうち、1 例 (症例 1) からは逆転写酵素領域に 3 個、プロテアーゼ領域に 3 個薬剤耐性変異が検出された (表 3)。また、東京都健康安全研究センターの検体 (症例 2) からも PR 領域に M46I が微小集族として高感度法により検出された (表 4)。症例 1 と症例 2 の L90M amplicon を解析した結果 M46I/L が L90M amplicon と連鎖して存在していなかった (表 4)。この結果から、症例 1、症例 2 では M46I を持つ HIV 株と L90M を持つ HIV 株が重感染している可能性が考えられたため、これらの症例の 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

表 3 微小集族薬剤耐性変異が検出された 23 症例の一覧

	Subtype	性別	感染経路	診断年	国籍	HIV RNA量	CD4
逆転写酵素阻害剤耐性変異							
M41L	B*	M	同性間	2009	日本	4.5. E+05	3
K65R	B	M	同性間	2008	日本	2.1. E+04	391
	B	M	同性間	2009	日本	2.9. E+04	nt
K70R	B**	M	同性間	2008	日本	2.2. E+04	154
	B*						
M184V	B*						
PI耐性変異							
M46I	B	M	同性間/異性間	2008	日本	5.8. E+05	222
	B***	M	同性間	2008	日本	2.6. E+04	481
	B	M	同性間	2008	日本	1.7. E+06	10
	B	M	同性間	2008	日本	1.2. E+03	45
	B	M	同性間	2008	日本	8.4. E+04	11
	B	M	同性間	2008	日本	1.1. E+05	1050
	B**						
	B	M	同性間	2009	日本	2.9. E+04	185
	B	M	同性間	2009	アメリカン	2.0. E+05	28
	B*						
	B	M	同性間	2009	オーストラリア	1.5. E+04	1
	B	M	同性間	2009	日本	6.0. E+04	373
	B	M	異性間	2009	日本	4.5. E+03	974
	B	F	異性間	2009	日本	8.0. E+04	nt
B	M	同性間	2009	日本	1.4. E+04	300	
M46L	B***						
	B	M	同性間	2008	日本	2.2. E+05	10
	B	M	同性間	2009	日本	7.2. E+03	319
	B	M	同性間	2009	ブラジル	8.6. E+04	14
B*							
L90M	B	M	同性間	2008	日本	1.5. E+04	356
	B	M	同性間	2008	日本	2.1. E+05	553
	B*						
	B	M	同性間	2009	日本	2.2. E+04	324

B* 逆転写酵素領域に3 個、PR 領域に3個変異が検出された症例。
 B** 逆転写酵素領域に1 個、PR 領域に1個変異が検出された症例。
 B*** PR領域に2個変異が検出された症例。

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。本研究で用いてきた M184V の高感度検出法がによって M184V を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

表 4 症例 1、症例 2 の通常法による薬剤耐性変異検出結果と高感度法 amplicon のシーケンス解析結果の比較

検体番号	サブタイプ	ダイレクトシーケンスによる薬剤耐性検出	高感度法 amplicon のシーケンス解析		
			M46I amplicon	M46L amplicon	L90M amplicon
症例 1	B	無	M46I	M46L	L90M
症例 2	B	I84V, L90M, L33I, A71L, N88D	I84V, L90M, M46I, A71L	-	I84V, L90M, L33I, A71L, N88D

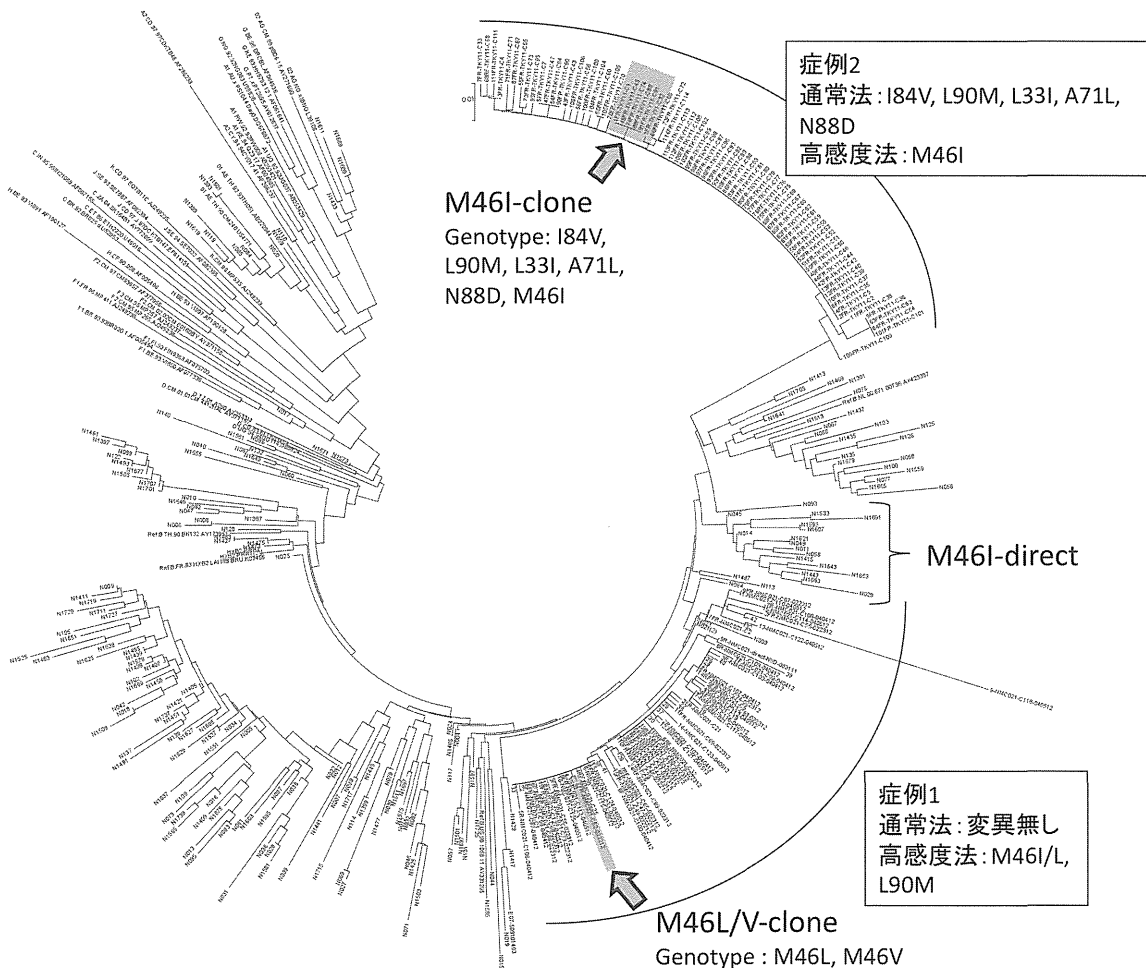


図 1

M184V が検出不可能だった大阪医療センターの HIV 感染患者 4 症例の塩基配列を比較した (表 5)。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 (表 6)、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 ΔCt 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 ΔCt 値が低く M184V の検出に適していることが示された (表 7)。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 (表 7)。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 ΔCt 値がこれまでの M184V の Cut off 値の 8.5 を上回り (ΔCt 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 クロノンを作製し、HXB2 の PR-RT 領域をクローニングした WT クロノンと M184V クロノンを段階的に 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 ΔCt 値と希釈倍率とをグ

表 5 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	AAATCCARAMMTARTTATMTRTCAGCACG
M184V-2F	AAATCCARAMATAGWRATMTRTCAGCACG
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 C CAATACG
Osaka-3	AAATCCAGACATG A T ATCTATCAATACG
Osaka-4	AA C 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 6 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*	AAAY <u>Y</u> CCARAMMTARTTAT <u>Y</u> TR <u>Y</u> CAGCACG			○
M184V-2F	AAATCCARAMATAGWRATMTRTCAGCACG	○	○	
M184V-2F-2*	AAAY <u>Y</u> CCARAMATAR <u>R</u> WRAT <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

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 クローンを用いて計算される理論的検出限界は 1.3% だった (図 3)。

D. 考察

高感度法で解析した結果、これまで通常法では検出できなかった薬剤耐性変異を検出する事が可能になった。本研究で解析対象とした計 11 変異で、薬剤耐性変異の検出頻度は 12.08% から 32.21% と約 2.7 倍に上昇した。微少集族として検出された耐性変異の中には K65R, M184V など現在 cART によく用いられる TDF や FTC に対して高い耐性を与える変異が含まれており、微少集族薬剤耐性変異の解析は抗 HIV 薬を選択する上でこれらの変異の存在を考慮することは重要と思われる。また PI 耐性変異である M46I についても高感度法で解析した結果、検出頻度が通常法の 9.3% から 19.46% に上昇した。また、M46L, L90M も通常法では検出されていなかったが高感度法では検出され、PI 耐性変異も微少集族として患者血中に存在していることが示された。微少集族が検出された症例のうち 3 症例では 2 個以上の変異が検出され、HIV 感染時に複数の抗 HIV 薬に対して既に耐性を持っている未治療患者症例があることも示された。L90M の amplicon に M46I, M46L が存在していなかったことから (症例 1、2、表 3)、症例 1、症例 2 ではこれらの耐性変異が独立

して存在する可能性が示された。クローニングと系統樹解析の結果からは、症例 1、症例 2 とも M46I を持つクローンと持たないクローンは起源が同じ HIV 株だったが、クローン数を増やして L90M のクローンを解析すればさらに情報を得られたと思われる。これらの結果から、高感度法で解析することで重感染の可能性も検討可能と考えられた。また M184V 検出系は、プライマーを改良することによって感度を改善できた。まだ検出できない検体があることから、M184V 検出の感度の改善にはプライマーの改良がさらに必要である。高感度法を用いることで、通常法では検出できない薬剤耐性変異が検出可能になり、また高感度法の amplicon を解析することで、患者に感染している HIV についてさらに情報を得られることが示された。これらの結果から、抗 HIV 治療開始前の微少集族薬剤耐性 HIV 解析は、cART に用いる抗 HIV 薬剤選択に重要な情報を得られると考えられる。

E. 結論

高感度法による薬剤耐性検査によって、通常法では検出できない微少集族薬剤耐性 HIV を検出可能になった。2008 年から 2009 年にかけて名古屋医療センターで通常法による薬剤耐性検査を行った、新規未治療患者検体 Subtype B 149 症例を高感度法で解析した。対象とした逆転写酵素阻害剤 (NRTI,

表 7 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	AAACCCAGACATAGTTATCTATCAATACG	-	+	+
D-1	AAATCCAGACATAGTTATCTACCAATACG	-	+	+
E-1	AAAYCCAGACATAGTTATCTATCAATACG	+	+	+
F-1	AAACCCAGACATAGTTATCTATCAATACG	+	+	+
G-1	AAATCCAGAAATAATTATYTTATCAATACG	+	+	+
Osaka-1	GAATCCAGACATAGTTATCTATCAATACA	-	+	ND
Osaka-2	AAATCCAGACATAGTTATCTACCAATACG	-	+	ND
Osaka-3	AAATCCAGACATGATAATCTATCAATACG	-	-	-
Osaka-4	AAACCCAGACATAGTTATTTATCAATACG	-	+	+

※：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

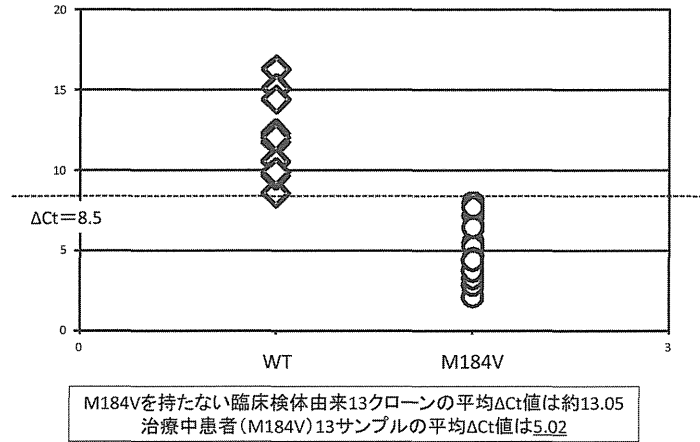


図2 M184Vを持たない臨床検体(13例)とM184Vを持つ臨床検体(13例)を用いた検討

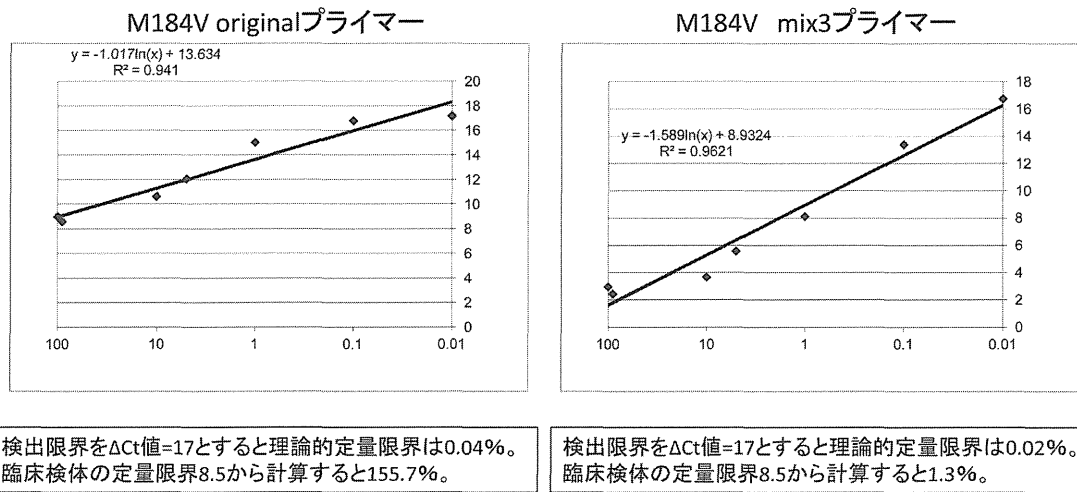


図3 M184VをクローンとWTクローンを用いた理論的定量限界の解析

NNRTI) に対する耐性変異 M41L, K65R, K70R, K103N, Y181C, M184V, T215F/Y の 8 変異と PI に対する耐性変異 M46I/L, L90M の 3 変異を解析した結果、薬剤耐性変異の検出頻度は 12.08% から 32.21% に上昇した。M46I/L, L90M を微少集族として持つ症例 1 と M46I, L90M を微少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 を持つクローンが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。これらの結果を合わせ、高感度法を用いる事によって通常法では検出できない微少な耐性変異も検出可能になり、効果的な cART を行う上で有用な情報が得られることが示された。

F. 健康危険情報
該当なし

G. 研究発表

1) 口頭発表

海外

1. Masako Nishizawa, Junko Hattori, Walid Heneine, Jeffrey A. Johnson and Wataru Sugiura. Sensitive testing identifies a greater prevalence of transmitted HIV drug resistance in Japan. 5th International Workshop on HIV Transmission, 2010年7月、ウイーン.
2. Masako Nishizawa, Walid Heneine, Jeffrey A. Johnson, and Wataru Sugiura. Highly-sensitive allele-specific PCR demonstrated that minority-population of drug resistance mutations may affect ART in ART-treated patients. 2011年7月、ローマ.
3. 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..
4. 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25回日本エイズ学会、2011年12月、東京.
5. 田中勇悦、児玉晃、西澤雅子、杉浦 互、田中礼子. CXCR4 架橋による CXCR4 および CCR5 親和性 HIV-1 の感染制御. 2011年12月、東京.
6. 西澤雅子、Jeffrey Johnson、Walid Heneine、杉浦 互. 微少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少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.
7. 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.
8. 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.

国内

1. 西澤雅子、服部純子、横幕 能行、Jeffrey A. Johnson、Walid Heneine、杉浦互. 高感度薬剤耐性検査法を用いた新規未治療 HIV/AIDS 症例における微少集族薬剤耐性 HIV 調査研究. 第24回日本エイズ学会、2010年11月、東京.
2. 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、2010年11月、東京.
3. 西澤雅子、Jeffrey A. Johnson、Walid Heneine、杉浦互. 定量 PCR を応用した高感度薬剤耐性検査法による抗 HIV 治療患者からの微少集族薬剤耐性変異検出の試み. 第25回日本エイズ学会、2011年12月、東京.
4. 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、

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

東京医大における薬剤耐性 HIV の動向調査研究

～第一研究 HIV-1 RNA 測定法のリアルタイム PCR 法への変更に伴う問題点の検討～
 ～第二研究 東京医科大学病院における最新の診療状況の把握と治療体制の確立に関する研究～
 ～第三研究 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

HIV 1/2 抗原抗体検査 (ELISA) 陽性であり、Western blot(WB) では判定保留 (gp160(env)+, p55(gag)+, p24/25(gag)+, p18/17(gag)+) であったことから急性 HIV 感染症の可能性が疑われた症例において、COBAS TaqMan HIV-1 real-time PCR assay ver.1.0 (CTM v1.0 assay) による初回の HIV-1 RNA 量は 6.1×10^2 copies/ml であったが、HIV-1 RNA 量を再検したところ、CTM v1.0 assay において「検出せず」を示した。HIV-2 の WB は判定保留であり、HIV-1 感染は偽陽性の可能性も考えられたが、1 ヶ月後の HIV-1 の WB では全てのバンドが揃い、HIV-1 感染が確定した。その際の CTM v1.0 assay による HIV-1 RNA 量は 4.9×10^1 copies/ml であった。これと同じ検体をアンプリコア法にて検査したところ、 5.48×10^4 copies/ml を呈し、CTM v1.0 assay との著明な乖離が明らかとなった。CTM v1.0 assay ではプライマー下位の single point mutation によって 100 倍以上 HIV-1 RNA 量を低く検出することが報告されており、この症例のウイルス変異について検討した。ただし、COBAS TaqMan HIV-1 Real-Time PCR Assay の Probe および Primer の塩基配列は非公開であるため、公表されているアンプリコア法の領域について野生株との違いをもとに考察した。患者の COBAS AMPLICOR の PCR 領域内には Wild-type (HXB2) と比較して、13 箇所の変異、Probe 領域内には 5 箇所の変異、Downstream Primer 領域内には 5 箇所の変異が検出された。CTM v1.0 assay による低反応性にこれらの変異が影響したと推定される。急性期症例において「検出せず」を呈したという事実は、診断や治療方針の決定などについて実臨床における判断を誤らせる可能性のある重要な事態であり、変異の影響を受けない測定法の開発が求められる。東京都新宿区西新宿において HIV/ エイズ診療拠点病院として約 30 年に渡り診療行っている東京医科大学病院における最近の受診者の状況は変化しており、従来からの診療体制に加え、これから提供すべき診療体制について再検討すべき時期に来ている。この研究は本施設をこれまでに受診した患者の動向を明らかにしたうえで、昨年 1 年間に新たに受診した HIV 感染者の状況から今後の対策を検討した。新患として受診した HIV 感染者数は 1997 年以降増加傾向を続け、2006 年までの 10 年間で約 6 倍となった。2010 年は過去最高の 137 人となった。保健所や他の病院・診療所からの未発症患者の紹介が多い状況は続いていて、多くの感染者が居住し活動する地域性を反映して、何らかの診療のために東京医科大学病院を受診し、HIV 感染症の診断に至った患者 (院内診断による患者) 数が 2010 年には 31 例と増加し、保健所などからの紹介を上回った。診断時の症状や検査受検のきっかけとして、HIV 感染症の急性期症状を疑った例 (実際には急性期ではなかった例も含む) が最も多く 26 例となった。このような状況は当地域における HIV 感染症の伝搬が早いペースで進んでいる可能性を示唆している。

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まだ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 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

HIV-1 感染症の治療のモニタリングと耐性ウイルスの検出において HIV-1 RNA の測定は必須である。2007 年末より、HIV-1 RNA 測定法に新しいリアルタイム PCR 法 (TaqMan 法) が導入され変更が進んでいる。新法変更後に検査値が従来法と比べ高値を示したり、変動する症例が経験されており、治療のモニタリング特に耐性ウイルスの早期発見に大きな障害となった。この原因として採血管の分離剤の上に沈殿した血球成分の再浮遊が原因と考えられ、分離剤入り採血管で輸送された検体の処理法に問題があったことが判明し、分離剤入り採血管で輸送された検体は、検査前に再度遠心分離を行うなどの手順改善措置が必要であることが明らかとなった。

一方、HIV 1/2 抗原抗体検査 (ELISA) 陽性であり、Western blot (WB) では判定保留 (gp160(env)+, p55(gag)+, p24/25(gag)+, p18/17(gag+)) であったことから急性 HIV 感染症の可能性が疑われた症例において、COBAS TaqMan HIV-1 real-time PCR assay ver.1.0 (CTM v1.0 assay) による初回の HIV-1 RNA 量は 6.1×10^2 copies/ml であったが、HIV-1 RNA 量を再検したところ、CTM v1.0 assay において「検出せず」を示した事例を受けて、アンプリコア法にて検査したところ、 5.48×10^4 copies/ml を呈し、CTM v1.0 assay との著明な乖離が明らかとなった。CTM v1.0 assay ではプライマー下位の single point mutation によって 100 倍以上 HIV-1 RNA 量を低く検出することが報告されており、初年度の第一研究では、乖離の原因を検索しその影響を評価するためにこの症例のウイルス変異について検討した。

東京都新宿区西新宿において HIV/エイズ診療拠点病院として約 30 年に渡り診療行っている東京医

科大学病院における最近の受診者の状況は変化しており、従来からの診療体制に加え、これから提供すべき診療体制について再検討すべき時期に来ている。2 年次の第二研究は、本施設をこれまでに受診した患者の動向を明らかにしたうえで、平成 22 年 1 年間に新たに受診した HIV 感染者の状況から今後の対策を検討し、当該地域に相応しい診療体制を確立するための方策の構築を目指した。

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。3 年次の第三研究は、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

【第一研究】

I. 血中 HIV-1 RNA 量測定法

①コバス TaqMan HIV-1 「オート」

リアルタイム PCR 法であるコバス TaqMan HIV-1 「オート」(ロシュ・ダイアグノスティックス株) を使用し、測定は添付文書記載の操作方法に従って行われた。

②コバスアンプリコア HIV-1

従来用いられていた PCR 法であるコバスアンプリコア HIV-1 (ロシュ・ダイアグノスティックス株) を使用し、測定は添付文書記載の操作方法に従って行

われた。

II. P24 領域のダイレクトシーケンス

塩基配列のミスマッチを検出するために、HIV-1 の Gag-P24 領域を P C R 法にて増幅し、ダイレクトシーケンスを行った。P C R には独自のプライマーを作成して増幅し、患者と野生株 (HXB2) のダイレクトシーケンスの結果を比較した。

【第二研究】

I. HIV 感染初診患者数の推移

東京医科大学病院において HIV 感染症の診療担当科となっている臨床検査医学科の受診者記録を基に、1997 年以降の HIV 感染症で初診となった患者数を 1 年ごとに調査した。

II. HIV 感染初診患者の受診経路

東京医科大学病院臨床検査医学科の受診者記録を基に、2009 年と 2010 年について HIV 感染症で初診となった患者の受診経路を、①自発検査・保健所からの紹介など、②院内診断による患者発生、③転院・転居、④一般病院からの紹介、⑤診療所からの照会、⑥術前検査での診断、⑦献血時検査での診断、⑧警察署からの診療依頼に分類し検討した。

III. 院内診断による HIV 感染患者数の推移

何らかの診療のために東京医科大学病院を受診し、HIV 感染症の診断に至った患者（院内診断による患者）数の推移を臨床検査医学科の受診者記録を基に、1997 年以降 1 年ごとに調査した。

IV. 初診 HIV 感染患者の受診時合併症または検査受検のきっかけ

2010 年 1 月から 12 月の間に、東京医科大学病院を HIV 感染症患者として初診受診した患者から、無症候で自発検査を受けて感染が判明した例などを除いた 78 例の患者の受診時合併症または検査受検のきっかけについて、臨床検査医学科の受診者記録を基に調査した。

【第三研究】

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・ダイアグノスティッ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。

(倫理面への配慮)

この内容は対象患者の病態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、対象患者への十分な説明と同意のもとに行われた。

本研究に使用した臨床成績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、収集したものである。

C. 研究結果

【第一研究】

当該患者の HIV-1 の Gag-P24 領域を P C R 法にて増幅し、ダイレクトシーケンスを行った結果は図 1 に示す。

- ①患者ウイルスの COBAS AMPLICOR の PCR 領域内には、野生株 (HXB2) と比較して、13 箇所の変異が検出された。
- ②患者ウイルスの COBAS AMPLICOR の Probe 領域内には、野生株 (HXB2) と比較して、5 箇所の変異が検出された。
- ③患者ウイルスの COBAS AMPLICOR の Downstream Primer 領域内には、5 箇所の変異が検出された。

【第二研究】

① HIV 感染初診患者数の推移

東京医科大学病院の臨床検査医学科を新患として受診した HIV 感染者数は 1997 年以降増加傾向を続け、2006 年までの 10 年間で約 6 倍となった。図 2 に示すように、その後、2008 年に一旦減少したが再び増加傾向を続けて 2010 年は過去最高の 137 人

HXB2-Gag P24 Sequence 結果 20101205

nt.1141 Patient *HXB2-1F(Kel-Primer)* *Gag P17 End* *Gag P24 Start*
 gcagcagctg acacaggaca cagcaatcag gtcagccaaa attacctat agtgcagaac
 gcagcagctg acacaggaca cagcaatcag gtcagccaaa attacctat agtgcagaac

nt.1201 Patient *HXB2-42F(Kel-Primer)*
 atccaggggc aaatggtaca tcaggccata tcaccltagaa ctttaaatgc atggglaaaa
 atccaggggc aaatggtaca tcaggccata tcaccltagaa ctttaaatgc atggglaaaa

nt.1261 Patient *COBAS AMPLICOR Upstream Primer*
 gtagtagaag agaaggcttt cagcccagaa gtagatacca tgtttcagc attatcagaa
 gtagtagaag aagaggcttt cagcccagaa gtagatacca tgtttcagc attatcagaa

nt.1321 Patient *COBAS AMPLICOR Downstream Primer*
 ggagccacc cacaagattt aaacaccatg ctaaacacag tggggggaca tcaagcagcc
 ggagctacc cacaagattt aaacaccatg ctaaacacag tggggggaca tcaagcagcc

nt.1381 Patient *Predicted TaqMan Probe* *COBAS AMPLICOR Probe*
 atgcaaatg taaa aggc ccaatgag gaaactcag aatgc atag agtgcattca
 atgcaaatg taaa aggc ccaatgag gaaactcag aatgc atag agtgcattca

nt.1441 Patient *nt.1488* *COBAS AMPLICOR Downstream Primer*
 gtgctgtag ggctaatcc accagccagc atgagagaac caaggggag tgacatacca
 gtgctgtag ggctaatcc accagccagc atgagagaac caaggggag tgacatacca

nt.1501 Patient *nt.1488*
 ggaactacta gtaacctca ggaacaata ggalggatga caaataatcc acctatccca
 ggaactacta gtaacctca ggaacaata ggalggatga caaataatcc acctatccca

nt.1561 Patient *nt.1488*
 gtaggagaaa ttataaaa atggataatc ctgggatgaa ataaaatagt aagaatgat
 gtaggagaaa ttataaaa atggataatc ctgggatgaa ataaaatagt aagaatgat

nt.1621 Patient *HXB2-N2R(Kel-Primer)*
 agccctacca gcattctgga cataagacaa ggaccaaaagg aacccttag agactatgta
 agccctacca gcattctgga cataagacaa ggaccaaaagg aacccttag agactatgta

nt.1681 Patient
 gaccggttct ataaaactct aagagccgag caagctcac aggagglaaa aaattggatg
 gaccggttct ataaaactct aagagccgag caagctcac aggagglaaa aaattggatg

nt.1741 Patient
 acagaaactc tttgggtcca aaatgccaac ccagatgta agactatgtt aaaagcatg
 acagaaactc tttgggtcca aaatgccaac ccagatgta agactatgtt aaaagcatg

nt.1801 Patient *HXB2-1R(Kel-Primer)*
 ggaccagcgg ctacactaga agaaatgatg acagcatgac agggagtagg aggaccggcc
 ggaccagcgg ctacactaga agaaatgatg acagcatgac agggagtagg aggaccggcc

nt.1861 Patient *Gag P24 Capset End* *Gag P2 Start*
 cataaggcaa gagttttg gc tgaagcaatg agccaagtaa caaattcagc taccataatg
 .cataaggcaa gagttttg gc tgaagcaatg agccaagtaa caaattcagc taccataatg

図1 HIV-1 野生株 (HXB2) と患者ウイルスの Gag-P24 領域のダイレクトシーケンス

初診HIV感染者数 年次推移

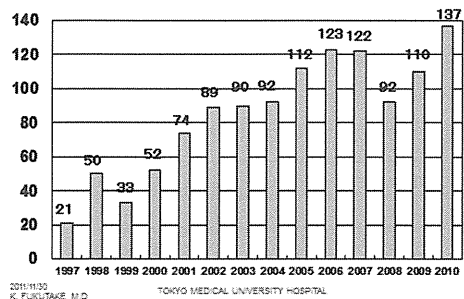


図2 新患として受診した HIV 感染者数

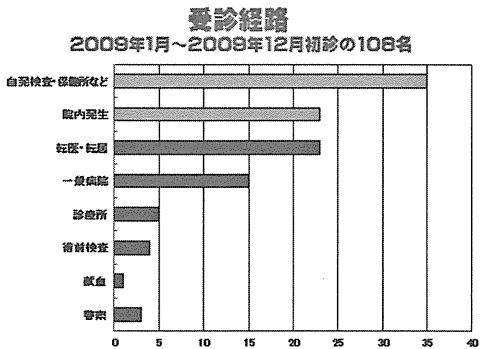


図3 2009年の受信経路

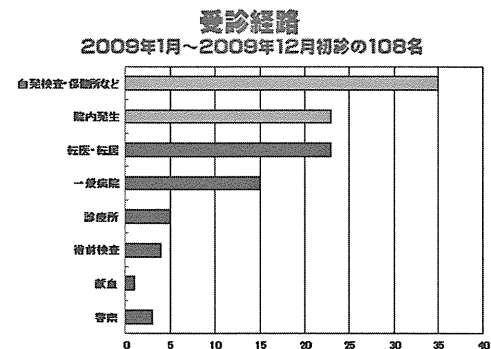


図4 2010年の受信経路

となった。

② HIV 感染初診患者の受診経路

東京医科大学病院臨床検査医学科に、2009年と2010年に HIV 感染症で初診となった患者の受診経路を比較すると、2009年(図3)検査・保健所からの紹介などが35件と最も多く、続いて、院内診断による患者発生であったが、2010年(図4)は順位が逆転しており、院内診断による患者発生が33件と最多で、自発検査・保健所からの紹介などが23件となった。

③ 院内診断による HIV 感染患者数の推移

何らかの診療のために東京医科大学病院を受診し、HIV 感染症の診断に至った患者(院内診断による患者)数の推移は1997年以降増加のトレンドを示してきたが、2010年には31例と過去最高を示した。

④ 初診 HIV 感染患者の受診時合併症または検査受検のきっかけ

2010年1月から12月の間に、東京医科大学病院を HIV 感染症患者として初診受診した患者から、無症候で自発検査を受けて感染が判明した例を除い

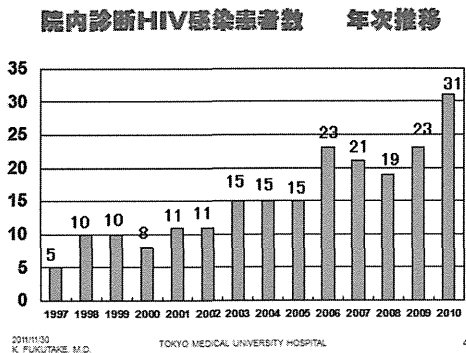


図 5 院内診断による HIV 感染患者数の推移

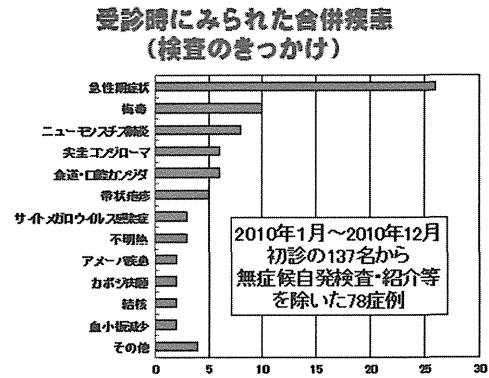


図 6 受診時合併症

表 1 対象症例の CD4 細胞数と HIV-1 RNA

Pt. ID	CD 4 (/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	41	ND
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	52	<20
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

表2 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; ノーピア
S; ストックリン T; ツルバダ V; ヴァイリード Ep; エブジコム

た患者 78 例の受診時合併症または検査受検のきっかけは、HIV 感染症の急性期症状を疑った例（実際には急性期ではなかった例も含む）が最も多く 26 例となった。次いで梅毒が 10 例であり、PCP で発症のいわゆる「いきなりエイズ」例は 8 例であった（図 6）。

【第三研究】

① 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）。

② グループ別の特徴

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

【第一研究】

COBAS TaqMan HIV-1 Real-Time PCR Assay の Probe および Primer の塩基配列は非公開である。PCR Primer の設計方法を考えると、Probe の位置は大きく変化はないと考えられる（30 塩基）。ゆえに、TaqMan HIV-1 Real-Time PCR Assay の Probe の配列として、2 通りの Probe を推測してみた。①は上

流側 g より始まる Predicted Probe で、②は AMPLICOR Probe の上流側から下流へ 9 塩基めの c より始まる Probe である。①の Probe は 30 塩基中の上流側に集中して 4 箇所のミスマッチが認められ、②の Probe は上流および下流の両端にミスマッチが認められる。いずれもプローブの 30 塩基中に 5 箇所のミスマッチがあり、Template に Probe が相補的な結合ができなかったと推測される。

Primer の推測位置については、この領域の PCR には COBAS AMPLICOR の Primer の位置が適切であることを Primer 3.1 software にて確認した。COBAS AMPLICOR の Downstream Primer 内には、患者から 1 箇所の Mismatches が検出されたが、Primer 内の中心部なので影響はないと考えられた。

これらのことから、TaqMan Real-Time の Downstream Primer を予測すると COBAS AMPLICOR の 4 塩基上流の a が Primer の 3' に相当するのではないかと考えられる。また、5 名の解析を行っている Korn らの論文と、今回の患者の検出された変異の位置から、TaqMan Real-Time の Downstream Primer は COBAS AMPLICOR の Primer 配列よりもさらにおよそ 30 塩基上流に Primer の 3' が位置するのではないかとすることも推測された。

しかし、TaqMan Real-Time の Upstream と Downstream の Primer の位置に関しては正確にはわからない。

【第二研究】

東京医科大学病院の臨床検査医学科を新患として受診した HIV 感染者数は 1997 年以降増加傾向を続け、2006 年までの 10 年間で約 6 倍となった。周辺の医療機関の受け入れ体制の強化の影響もあり 2008 年に一旦減少したが、その後は再び増加傾向を続けて 2010 年は過去最高の 137 人となった。長期の診療実績とアクセスのしやすさなどから、保健所や他の病院・診療所からの未発症患者の紹介が多い状況は続いている。しかし、多くの感染者が居住し活動する地域性を反映して、何らかの診療のために東京医科大学病院を受診し、HIV 感染症の診断に

至った患者（院内診断による患者）数が 31 例と増加し、2010 年に保健所などからの紹介を上回った。当院の年間初診患者数が約 60,000 人であることから、初診患者の 2,000 人に 1 人が HIV 感染者であったという計算になった。また、診断時の症状や検査受検のきっかけとして、HIV 感染症の急性期症状を疑った例（実際には急性期ではなかった例も含む）が最も多く 26 例となった。この様な状況は当地域における HIV 感染症の伝播が早いペースで進んでいる可能性を示唆している。

【第三研究】

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ると、92% は良好な治療環境にあるということが出来る。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 までウイルス量が増加しているが、一定の傾向はなく、CD 4 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-1 RNA 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のが少ないが、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-1 RNA 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 測定の技術水準では、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い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

【第一研究】

今回、COBAS TaqMan HIV-1 Real-Time PCR Assay において、低値が認められた患者の HXB2-Gag-P24 領域のダイレクトシーケンスにより塩基配列のミ

スマッチを検出した。これらの変異は、COBAS AMPLICOR の測定には影響しなかったが、TaqMan HIV-1 Real-Time PCR の Probe や Primer の結合を阻害し、TaqMan HIV-1 Real-Time PCR Assay において低値を示したと考えられた。急性期症例のみならず、HIV-1 感染症において HIV-1 RNA 測定法が「検出せず」を呈したという事実は、診断や治療方針の決定などについて実臨床における判断を誤らせる可能性のある重要な事態であり、変異の影響を受けない測定法の開発が求められる。

【第二研究】

今回の調査では、院内の様々な診療科における日常診療のなかで診断された例の増加と急性症状を基にした診断の増加が特に目立つ結果となった。これは、国内での流行地域の状況を反映したものであると考えられるが、この様な状況は当地域における HIV 感染症の伝播が早いペースで進んでいる可能性を示唆している。

これまでの診療体制は、エイズ関連疾患の発症者の治療とその後の抗 HIV 療法あるいは自発検査受検で判明した感染者の抗 HIV 療法を中心に専門診療科が当たる体制であったが、今後は全病院的に積極的に HIV 感染症に対応し、関連症状の早期発見による早期診断を進める必要がある。特に急性感染の症状での診断を確実にを行うよう、HIV 検査の実施への敷居を引き下げることが必要であり、検査体制においても抗体と抗原を同時に検出する第 4 世代のスクリーニング試薬を必ず導入することと HIV-1 RNA の測定も考慮すべきであると考えられる。

【第三研究】

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ると、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, Eric L. Delwart, Philip J. Norris, Tzong-Hae Lee, Joan Dunn-Williams, Peter W. Hunt, Rebecca Hoh, Susan L. Stramer, Jeffrey M. Linnen, Joseph M. McCune, Jeffrey N. Martin, Michael P. Busch, and Steven G. Deeks. 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 Hatano¹, Eric L. Delwart, Philip J. Norris¹, Tzong-Hae Lee, Torsten B. Neilands, Colleen F. Kelley, Peter W. Hunt¹, Rebecca Hoh, Jeffrey M. Linnen, Jeffrey N. Martin¹, Michael P. Busch, 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, Laurent Debaisieux, Ellen Vancutsem, Annelies DeBel, Marie-Luce Delforge, Denis Piérard and Patrick Goubau¹ 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 —Vol308, No.4

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 論文発表

1. 福武 勝幸. 低レベル HIV ウイルス血症の評価と検査方法の変遷. HIV 感染症と AIDS の治療. 3(2) 47-53 2012
2. Mihoko Yotsumoto, Shotaro Hagiwara*, Atsushi Ajisawa*, Junko Tanuma*, Tomoko Uehira*, Hirokazu Nagai*, Yuko Fujikawa*, Shunichi Maeda*, Kiyoshi Kitano*, Nobuyoshi Arima*, Kenji Uno*, Toshiki Iwai*, Igen Hongo*, Yasunori Ota*, Katsuyuki Fukutake, Seiji Okada*. Clinical characteristics of human immunodeficiency virus-associated Hodgkin lymphoma patients in Japan, International Journal of Hematology 96(2) 247-253 2012

2) 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年次推移とその考察～

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 (平成 24 年度)
木村 昭郎 広島大学原爆放射線医科学研究所血液・腫瘍内科 教授(平成22,23年度)
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

過去 3 年において未治療 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, 部分耐性を含む耐性株保有率は, 2010 年 4.1%, 2011 年 15.7%, 2012 年 14.2%であった。Backbone である核酸系逆転写酵素阻害薬に対する強い耐性ウイルスは認めなかったが, Key drug であるプロテアーゼ阻害薬では, Indinavir, Saquinavir などの比較的以前に処方例が多い薬剤に対する耐性関連変異が散見された。またインテグラーゼ領域では, V72 の変異が急激に増えている。近年 raltegravir, darunavir の処方例が増加しており, 今後これらの薬剤に対する耐性関連変異を注視する必要がある。

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, 広島大学病院では新規 HIV 感染者において薬剤耐性検査を行い, この地域で流行している HIV 遺伝子型 (サブタイプ) や薬剤耐性株を解析している。さらに平成 22 年～24 年における動向を解析し, その間の治療薬の推移などの関連をみることを目的とした。

B. 研究方法

平成 22 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未治療 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

果について患者への処方状況を含むプロファイルと照らし合わせ, 本院で集計し解析した。

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。

3 年間の期間中の試料提供者症例数は, 2010 年 18 例, 2011 年 14 例 (内 2 回目 3 例), 2012 年 21 例 (内 2 回目 6 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) 薬剤耐性検査件数の年次推移及び耐性関連変異の年次推移

年次別の試料提供者症例数と再検数の推移を【表 1】に示す。実際に検査依頼をしたものはこの

数より多いが、既治療例は除いた。本院の中でも本研究が認知され、新規未治療患者にはルーチンにこの研究に入る体制をとった2010年より対象症例数が増えているのが分かる。しかし一方で、“いきなりエイズ”例が増えてきており、治療を急ぐ余り、十分な説明とそれに対する同意が得られず、商業ベースの検査に提出するケースもままある。

耐性関連変異の年次推移を【表2】に示す。

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、全例検出されず、V179の変異が散見される程度である。2012年にはT215の変異は1例みられたが、TAMではなかった。この患者は3年前に東京で感染し、その後無治療で経過し転居に伴い本院に初診となった。プロテアーゼ領域にも多くの耐性関連変異があり、感染者からの伝播を疑わせた。インテグラーゼ

表1 年次別試料提供者数, 再検査件数の推移

	試料提供者数	内再検査件数
2004	17	0
2005	11	0
2006	4	2
2007	7	0
2008	11	0
2009	18	0
2010	24	0
2011	14	3
2012	21	6
合計	125	11

表2 初回検査で検出された変異部位の年次推移

年	数	逆転写領域			プロテアーゼ領域													*							
		T 69 S	V 179 D/I	T 215 I/L	L 10 I/V/ F	I 15 V	G 16 E	K 20 M/ I/R	D 30 N	M 36 I/L	R 41 K	M 46 I/L	D 60 E	I 62 V	L 63 P	A 71 V/T	V 77 I	L 89 M/I	E 157 Q	V 72 I	L 74 M				
04	10		1		2						2														
05	10				2						2														
06	3				2						1														
07	4				1																				
08	9	1			1	2	1				1														
09	12	1			3	3	1				1														
10	18	1	1		3	10																			
11	11		2		4	5	2				4														
12	15		1	1	7	12	2	1			3														
計	83	3	5	1	25	32	6	3	1	17	16	6	7	25	8	26	23	6	4	21	1				

*インテグラーゼ領域

領域の変異は E157Q が 2010 年から出現しているが、ここ 2 年は V72I がよく認められるようになった。

プロテアーゼ領域であるが、大きく 3 つのタイプに分かれる。①以前よりよくあるもの、②最近よくみられるもの、③ある年のみ多くみられるもの、である。①は L10, M36, A71, V77 などの変異である。②は G16E, I62, L89 の変異、③は I15, R41, L63 の変異である。また多くの未治療患者において、何らかの耐性関連変異は治療前に既に存在しているようで、2012 年には 1 例を除き全て変異を認めた【図 1】。しかし部分耐性 (PR) も含めた未治療者における耐性率は、2010 年 4.1%, 2011 年 15.7%, 2012 年 14.2%であった。

(2) 広島大学病院における抗 HIV 薬使用の推移
【図 2-1, 2-2】

日本で初めてインテグラーゼ阻害薬が承認された 2008 年からの広島大学病院における抗 HIV 薬の処方推移を示す。なお各年 1 月 1 日の時点の服薬とした。2012 年に初めて処方例が 100 人を超え、2013 年 1 月 1 日現在では、114 人が抗 HIV 薬を使用している。核酸系逆転写酵素阻害剤である Key drug では、期間中 ddI の処方量が 0 になり、AZT も 1 例のみである。代わって ABC/3TC の合剤である epzicom が処方例を伸ばし、2013 年には TDF/FTC(turuvada) を逆転した。また 1 剤も Key drug を服用していない者は 4 例いた。

一方、Key drug では、インテグラーゼ阻害薬である raltegravir の処方量が 46 例と急激に増加している。非核酸系逆転写酵素阻害薬の nevirapine は 2011 年に処方例が 0 になったのをはじめ efavirenz も使用

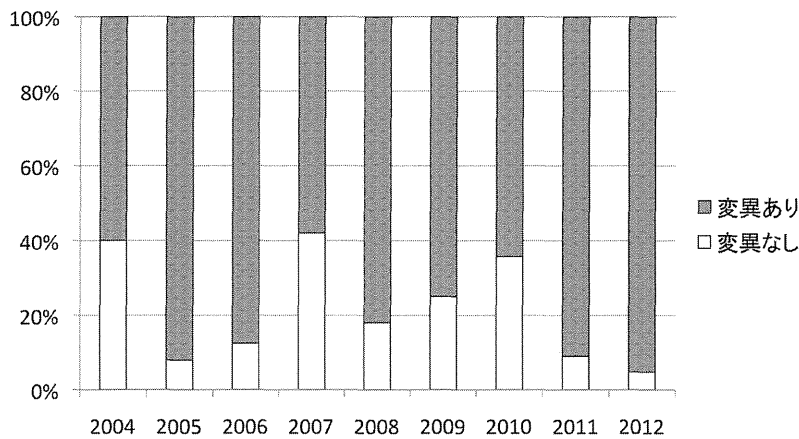


図 1 未治療患者での耐性関連変異発現率の年次推移

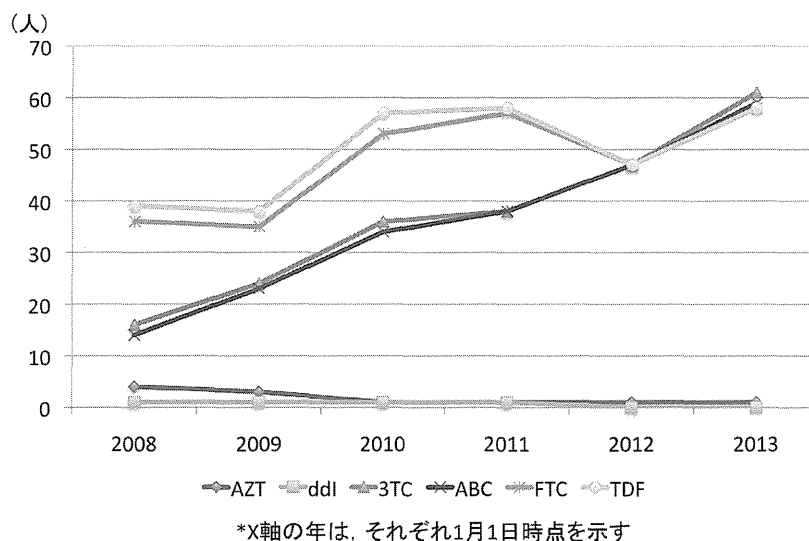


図 2-1 広島大学病院における Back bone 薬服用者数の推移