

D67D/N、V106I、K219Q がそれぞれ 1 検体に検出された。IN 領域の耐性変異は検出されなかった。

2. BED assay による感染時期推定及び HBs 抗原及び HCV 抗体検査

14 検体中 5 検体 (35.7%) が recent、9 検体 (64.3%) が not recent と判定された。

HBs 抗原及び HCV 抗体検査は、検体量不足の 1 検体を除く 13 検体で実施し、13 検体全てで HBs 抗原、HCV 抗体陽性は検出されなかった。

D. 考察

今年度調査した新規感染の 14 例は、全て日本国籍、男性の例であった。サブタイプは、CRF 01_AE 1 例を除き、全て B であり、日本国籍、男性の新規感染者において、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 領域の Major mutation、IN 領域の耐性変異は検出されず、RT 領域の耐性変異は 4 検体で 1 ケ所ないし 2 ケ所に認められ、多くの耐性変異を持つ HIV 株は検出されなかった。感染初期と推定される例は 35% で、B 型肝炎、C 型肝炎の陽性例は検出されなかった。感染の早期発見の割合を改善することが望まれ、今後も動向に注視し、調査を継続する必要がある。

E. 結論

2012 年から 2013 年に埼玉県、茨城県、栃木県、山梨県及び長野県で採取された新規 HIV 感染 14 例の検体について HIV のサブタイプ及び薬剤耐性変異の調査を実施した。サブタイプは、14 例中 B が 13 例、CRF01_AE が 1 例であった。薬剤耐性変異は、PR 領域の Major mutation は検出されず、Minor mutation が 13 検体で認められた。RT 領域の耐性変異は、V179D が 2 検体に検出された他、D67D/N、V106I、K219Q がそれぞれ 1 検体に検出された。IN 領域の耐性変異は検出されなかった。14 例中 5 例 (35.7%) が感染初期と判定され、HBs 抗原、HCV 抗体陽性検体は検出されなかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 学会発表

1. 重見麗、服部純子、蜂谷敦子、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、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、松田昌和、林田庸総、横幕能行、上田幹夫、大家正義、田邊嘉矢、白阪琢磨、小島洋子、藤井輝久、高田昇、高田清式、山本政弘、松下修三、藤田次郎、建山正男、杉浦互：新規 HIV/AIDS 診断症例における薬剤耐性 HIV の動向：第 27 回日本エイズ学会、熊本、2013.11

H. 知的所有権の出願・取得状況

なし

帝京大学における薬剤耐性 HIV の動向調査研究

～帝京大学医学部附属病院における新規 HIV 症例の薬剤耐性の解析～

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 25 (2013) 年 11 月現在で 87 名の HIV 感染症患者在通院しているが、平成 18 年度以前から通院を継続しているのはそのうち 26 名で、61 名 (70.1%) は平成 19 年以降の初診症例が占めている。平成 19 年以降、78 名が新規に HIV 感染症患者として当院を受診し、うち 19 名が AIDS と診断された。これら新規患者の大半は初診時の AIDS 発症の有無にかかわらず、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。

2013 年は、治療開始前の患者 9 名、治療開始後の 1 名について薬剤耐性検査を実施した。治療開始前の 9 名について、3 名について逆転者酵素 (RT) 領域に薬剤耐性変異を認め、いずれも非核酸系逆転写酵素阻害薬関連変異であった。プロテアーゼ (PR) 領域に関しては全ての患者で薬剤耐性変異を認めたが、major mutation を含むのは 1 例のみであった。またインテグラーゼ (INT) 領域についてはいずれも薬剤耐性変異を認めなかった。治療開始前の患者 9 名のうち 8 名について細胞指向性検査も同時に実施し、その結果 2 名が CXCR4 指向型と診断され、7 名が 10% を上回り CCR5 と診断された。Pol 領域の解析の結果、9 名のうち 8 名がサブタイプ B、1 名は CRF_AE であると推測された。1 名の治療中の患者に行った解析結果では、RT 領域、INT 領域については耐性変異を認めず、PR 領域については minor mutation のみ確認された。

A. 研究目的

帝京大学医学部附属病院には、平成 25 (2013) 年 11 月現在で 87 名の HIV 感染症患者在通院している。患者数は年々増加傾向にあり平成 19 (2007) 年から平成 25 (2013) 年 11 月までの間に 78 名の新規患者が当院の受診を開始した。現在通院中の 87 名のうち 61 名 (70.1%) 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 (2007) 年度以降 19 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 7 年でわずかに 3 名であり、また抗レトロウイルス療法を導入されていない未治療経過観察中の患者もわずかに 5 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、CD4 数の減少がなくとも ART 導入する事も考慮されるようになり、HIV 感染症患者の大半は ART を導入され継続されている。今後 HIV 感染症診療の主体は、診断確定後の速やかな ART の導入と導入後の長期間の外來通院加療が主体となりつつある。HIV 診療に携わる医療機関は、安定した血中 HIV の抑制と、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が不可欠になると考えられる。

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を治療薬として選択することが多いが、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、治療効果を予測する意味でも、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、患者 HIV の細胞指向性の推定と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。

年度別新規受診患者内訳

年度	HIV	AIDS	合計	男性	女性	年度末通院者
2007	5	4	9	6	3	38
2008	3	2	5	5	0	39
2009	6	4	10	10	0	45
2010	17	1	18	18	0	61
2011	10	5	15	15	0	75
2012	7	1	8	8	0	75
2013	11	2	13	12	1	87
合計	59	19	78	74	4	

2013年11月末現在

Fig.1 平成 19 (2007) 年から平成 25 年までの帝京大学医学部附属病院における年度別新規患者内訳

左から HIV (非 AIDS) 患者数、AIDS 患者数、合計、男性患者数、女性患者数、年度末の通院患者数を示す。

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。

(倫理面への配慮)

帝京大学医学部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 74 名、女性は 4 名の計 78 名であった (Fig1)。平成 25 年 1 月から 11 月までに新規に抗レトロウイルス療法開始前の患者 9 名、

治療開始後の患者 1 名について HIV 薬剤耐性検査を実施した。新規患者 9 名のうち、5 名で RT 領域に薬剤耐性変異を認め、そのうち 3 名は非核酸系逆転写酵素阻害薬関連変異部位に確認された。しかしながら、1 名の K101Q はほとんど薬剤耐性に寄与せず、もう 1 名の K103KR は polymorphism とされていることから、真に薬剤耐性に寄与している変異を持つのは K108I を持つ 1 名のみであった。protease 領域については 9 名全てで polymorphism を含め 1 カ所以上の変異が確認され、1 名は major mutation が 1 カ所認められた。integrase 領域については全員薬剤耐性変異を認めなかった。9 名のうち 8 名について指向性検査を実施したところ、8 名のうち 2 名の HIV は false positive rate が cutoff 値の 10% を下回り CXCR 4 指向性と推定され、6 名は CCR5 指向性と推定された。治療開始後の 1 名 (Fig.2 上から 2 症例目、太枠内) についても、同様の解析をおこなった結果、RT 領域、integrase 領域には薬剤耐性変異を認めず、protease 領域には

polymorphism のみ確認された。なお細胞指向性検査は未実施であった。
 10 名のサブタイプは、Pol 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、新規患者 8 名と治療開始後の 1 名がサブタイプ B であり、新規患者 1 名が CRF_AE であった。

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。その一方、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る事から、耐性変異を持つ少数株を網羅的かつ効率的に検出する系の確立が期待される。

年月	年齢	性別	CD4	VL	Sub-type	RT	PR	INT	FPR
2013.02	27	F	125	240000	CRF_AE	なし	L10X,I13V,G16E,K20KR,E35D,M36I,L63S,H69K,L89M	なし	2.9
2013.04	42	M	197	6600	B	なし	E35D,L63S,A71T,I93L	なし	
2013.05	27	M	453	11000	B	K103RK	I62V,L63A,V77I,I93L	なし	74.4
2013.05	33	M	198	57000	B	なし	I62V,L63T,A71V,I74A,I93L	なし	57.1
2012.05	31	M	395	78000	B	なし	G16E,I62V,L63S,V77I	なし	36.9
2013.06	46	M	155	390000	B	なし	L63P,V71T	なし	45.4
2013.06	36	M	325	86000	B	V179E	L63S,V77I	なし	
2013.07	43	M	42	14000	B	A98S,V179D	E35D,L63P,V77I	なし	3.4
2013.08	34	M	266	5400	B	K101Q	L10I,I13V,K43R,I62V,L63A,A71T	なし	13.7
2013.09	46	M	157	24000	B	V108I	I13V,D60E,L63A	なし	43.0

Fig.2 平成 25 年 1 月から 11 月に薬剤耐性検査を実施した 10 名の結果を示す。

RT: 逆転写領域、PR: プロテアーゼ領域
 INT: インテグラーゼ領域
 FPR: HIV 細胞指向性検査の false positive rate。

逆転写酵素領域においては、核酸系逆転写酵素阻害剤関連耐性変異は認められなかった。内服履行率の低下によりプロテアーゼ阻害薬に比べて薬剤耐性変異を誘導しやすいとされる非核酸系逆転写酵素阻害剤関連耐性変異が 10 名中 3 名に確認されたが、そのうち真に薬剤耐性に強く寄与するとされる変異を持つ患者は 1 名のみであった。同じくインテグラーゼ阻害薬もまた内服履行率の低下によりプロテアーゼ阻害役に比べて薬剤耐性が生じやすいと指摘されているが、インテグラーゼ阻害剤関連耐性変異は確認されなかった。

また、HIV 細胞指向性については、新規に抗レトロウイルス療法を開始する患者のうち 2 名で CXCR4 指向性 HIV が確認された。

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、10 例中 5 例に逆転写酵素領域に、10 例すべてに protease 領域の変異を認めた。また解析を行った 10 例は、9 名がサブタイプ B、1 名が CRF_AE であることが推定された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 原著論文

1. Koga I, Yoshino Y, Kitazawa T, Kurahashi I, Ota Y. Prevalence and Risk Factors for Loss of Bone Mineral Density in Male Japanese Patients With HIV. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 62(1):e25-7, 2013.
2. 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*. 141(9):1840-8, 2013.

2) 学会発表

1. Ichiro Koga, Kazunori Seo, Yusuke Yoshino, Takatoshi Kitazawa, Yasuo Ota. Prevalence and risk factors for osteopenia and osteoporosis in male Japanese HIV patients. 2013 2nd Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and The Japanese Society for Bone and Mineral Research, 28May-1June2013 Kobe, Japan.
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 darunavir を併用した症例と darunavir のみの使用例の投与開始後 12 ヶ月の治療効果の比較、第 27 回日本エイズ学会学術集会 (2013 年 11 月 20-22 日、熊本)
3. 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 感染症患者における 25-hydroxyvitamin D の 評 価 と 1,25-dihydroxyvitamin D との相関、第 27 回日本エイズ学会学術集会 (2013 年 11 月 20-22 日、熊本)
4. 古賀 一郎, 妹尾 和憲, 吉野 友祐, 北沢 貴利, 太田 康男. cART にて治療中の日本人男性 HIV 感染者における骨密度の経時的変化の解析、第 27 回日本エイズ学会学術集会 (2013 年 11 月 20-22 日、熊本)
5. 服部 純子, 蜂谷 敦子, 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, 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, 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, 高田 清式, 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 27 回日本エイズ学会学術集会 (2013 年 11 月 20-22 日、熊本)

H. 知的所有権の出願・取得状況

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 25 年 1 月から 6 月の間に、78 人の HIV-1 感染者が新規に診断された。この 78 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、7 人の患者 (9.0%) に主要な薬剤耐性変異が認められた。逆転写酵素の K103N が 1 人、E138G が 1 人、T215C が 1 人、T215L が 1 人、プロテアーゼ領域の M46L が 2 人、Q58E が 1 人、であった。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 69 人、AE が 7 人、AG が 1 人、G が 1 人であった。急性感染が確認できた症例は 14 例 (18%) で、2011 年の 7%、2013 年の 13% に比較し徐々に増加傾向にあると思われた。

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

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 25 年 1 月から 6

月の間に、78 人の HIV-1 感染者が新規に診断された。この 78 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、7 人の患者 (9.0%) に主要な薬剤耐性変異が認められた。逆転写酵素の K103N が 1 人、E138G が 1 人、T215C が 1 人、T215L が 1 人、プロテアーゼ領域の M46L が 2 人、Q58E が 1 人、であった。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 69 人、AE が 7 人、AG が 1 人、G が 1 人であった。急性感染が確認できた症例は 14 例 (18%) で、2011 年の 7%、2013 年の 13% に比較し徐々に増加傾向にあると思われた。

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

なし

G. 研究発表

1) 原著論文

1. Nishijima T, Gatanaga H, Komatsu H, Takano M, Ogane M, Ikeda K, Oka S. High Prevalence of Illicit Drug Use in Men Who Have Sex with Men with HIV-1 Infection in Japan. *PLoS One*. 2013;8(12):e81960.
2. Mizushima D, Tanuma J, Kanaya F, Nishijima T, Gatanaga H, Lam NT, Dung NT, Kinh NV, Kikuchi Y, Oka S. WHO antiretroviral therapy guidelines 2010 and impact of tenofovir on chronic kidney disease in Vietnamese HIV-infected patients. *PLoS One*. 2013;8(11):e79885.
3. Nishijima T, Hamada Y, Watanabe K, Komatsu H, Kinai E, Tsukada K, Teruya K, Gatanaga H, Kikuchi Y, Oka S. Ritonavir-boosted darunavir is rarely associated with nephrolithiasis compared with ritonavir-boosted atazanavir in HIV-infected patients. *PLoS One*. 2013;8(10):e77268.
4. Watanabe K, Murakoshi H, Tamura Y, Koyanagi M, Chikata T, Gatanaga H, Oka S, Takiguchi M. Identification of cross-clade CTL epitopes in HIV-1 clade A/E-infected individuals by using the clade B overlapping peptides. *Microbes Infect*. 2013;15(13):874-86.
5. Nishijima T, Gatanaga H, Shimbo T, Komatsu H, Endo T, Horiba M, Koga M, Naito T, Itoda I, Tei M, Fujii T, Takada K, Yamamoto M, Miyakawa T, Tanabe Y, Mitsuya H, Oka S; SPARE study team. Switching tenofovir/emtricitabine plus lopinavir/r to raltegravir plus Darunavir/r in patients with suppressed viral load did not result in improvement of renal function but could sustain viral suppression: a randomized multicenter trial. *PLoS One*. 2013;8(8):e73639.
6. Nishijima T, Gatanaga H, Komatsu H, Takano M, Ogane M, Ikeda K, Oka S. Illicit drug use is a significant risk factor for loss to follow up in patients with HIV-1 infection at a large urban HIV clinic in Tokyo. *PLoS One*. 2013;8(8):e72310.
7. Tanuma J, Sano K, Teruya K, Watanabe K, Aoki T, Honda H, Yazaki H, Tsukada K, Gatanaga H, Kikuchi Y, Oka S. Pharmacokinetics of rifabutin in Japanese HIV-infected patients with or without antiretroviral therapy. *PLoS One*. 2013;8(8):e70611.
8. Tsuchiya K, Ode H, Hayashida T, Kakizawa J, Sato H, Oka S, Gatanaga H. Arginine insertion and loss of N-linked glycosylation site in HIV-1 envelope V3 region confer CXCR4-tropism. *Sci Rep*. 2013;3:2389.
9. Iijima K, Okudaira N, Tamura M, Doi A, Saito Y, Shimura M, Goto M, Matsunaga A, Kawamura YI, Otsubo T, Dohi T, Hoshino S, Kano S, Hagiwara S, Tanuma J, Gatanaga H, Baba M, Iguchi T, Yanagita M, Oka S, Okamura T, Ishizaka Y. Viral protein R of human immunodeficiency virus type-1 induces retrotransposition of long interspersed element-1. *Retrovirology*. 2013;10:83.
10. Hamada Y, Nagata N, Shimbo T, Igari T, Nakashima R, Asayama N, Nishimura S, Yazaki H, Teruya K, Gatanaga H, Kikuchi Y, Akiyama J, Ohmagari N, Uemura N, Oka S. Assessment of antigenemia assay for the diagnosis of cytomegalovirus gastrointestinal diseases in HIV-infected patients. *AIDS Patient Care STDS*. 2013;27(7):387-91.
11. Motozono C, Miles JJ, Hasan Z, Gatanaga H, Meribe SC, Price DA, Oka S, Sewell AK, Ueno T. CD8(+) T cell cross-reactivity profiles and HIV-1 immune escape towards an HLA-B35-restricted immunodominant Nef epitope. *PLoS One*. 2013;8(6):e66152.
12. Gatanaga H, Murakoshi H, Hachiya A, Hayashida T, Chikata T, Ode H, Tsuchiya K, Sugiura W, Takiguchi M, Oka S. Naturally selected rilpivirine-resistant HIV-1 variants by host cellular immunity. *Clin Infect Dis*. 2013;57(7):1051-5.
13. Mizushima D, Nishijima T, Gatanaga H, Tsukada K, Teruya K, Kikuchi Y, Oka S. Preemptive therapy prevents cytomegalovirus end-organ disease in treatment-naïve patients with advanced HIV-1 infection in the HAART era. *PLoS One*. 2013;8(5):e65348.
14. Nishijima T, Komatsu H, Teruya K, Tanuma J, Tsukada K, Gatanaga H, Kikuchi Y, Oka S. Once-daily darunavir/ritonavir and abacavir/lamivudine versus tenofovir/emtricitabine for treatment-naïve patients with a baseline viral load of more than 100000copies/ml. *AIDS*. 2013;27(5):839-42.
15. Yanagisawa K, Tanuma J, Hagiwara S, Gatanaga H, Kikuchi Y, Oka S. Epstein-Barr viral load in cerebrospinal fluid as a diagnostic marker of central nervous system involvement of AIDS-related lymphoma. *Intern Med*. 2013;52(9):955-9.
16. Nishijima T, Takano M, Ishisaka M, Komatsu H, Gatanaga H, Kikuchi Y, Endo T, Horiba M, Kaneda S, Uchiumi H, Koibuchi T, Naito T, Yoshida M, Tachikawa N, Ueda M, Yokomaku Y,

- Fujii T, Higasa S, Takada K, Yamamoto M, Matsushita S, Tateyama M, Tanabe Y, Mitsuya H, Oka S; Epzicom-Truvada study team. Abacavir/lamivudine versus tenofovir/emtricitabine with atazanavir/ritonavir for treatment-naïve Japanese patients with HIV-1 infection: a randomized multicenter trial. *Intern Med.* 2013;52(7):735-44.
17. Shindo T, Nishijima T, Teruya K, Mizushima D, Gatanaga H, Oka S. Combination of high-dose dexamethasone and antiretroviral therapy rapidly improved and induced long-term remission of HIV-related thrombocytopenic purpura. *J Infect Chemother.* 2013 Dec;19(6):1170-2.
 18. Gatanaga H, Hayashida T, Tanuma J, Oka S. Prophylactic effect of antiretroviral therapy on hepatitis B virus infection. *Clin Infect Dis.* 2013;56(12):1812-9.
 19. Lee JH, Hachiya A, Shin SK, Lee J, Gatanaga H, Oka S, Kirby KA, Ong YT, Sarafianos SG, Folk WR, Yoo W, Hong SP, Kim SO. Restriction fragment mass polymorphism (RFMP) analysis based on MALDI-TOF mass spectrometry for detecting antiretroviral resistance in HIV-1 infected patients. *Clin Microbiol Infect.* 2013;19(6):E263-70.
 20. Nishijima T, Shimbo T, Komatsu H, Takano M, Tanuma J, Tsukada K, Teruya K, Gatanaga H, Kikuchi Y, Oka S. Urinary beta-2 microglobulin and alpha-1 microglobulin are useful screening markers for tenofovir-induced kidney tubulopathy in patients with HIV-1 infection: a diagnostic accuracy study. *J Infect Chemother.* 2013;19(5):850-7.
 21. Hamada Y, Nagata N, Honda H, Teruya K, Gatanaga H, Kikuchi Y, Oka S. Idiopathic oropharyngeal and esophageal ulcers related to HIV infection successfully treated with antiretroviral therapy alone. *Intern Med.* 2013;52(3):393-5.
 22. 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 cytotoxic T cells with identical epitope specificity. *J Virol.* 2013;87(4):2253-63.

H. 知的所有権の出願・取得状況

該当なし

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

～服薬アドヒアランスの評価法の開発に関する研究～

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
研究協力者 須藤 弘二 慶應義塾大学医学部微生物学・免疫学教室
小谷 宙 慶應義塾大学医学部感染制御センター、慶應義塾大学病院薬剤部
藤原 宏 慶應義塾大学医学部感染制御センター、慶應義塾大学病院呼吸器内科
長谷川直樹 慶應義塾大学医学部感染制御センター、慶應義塾大学病院呼吸器内科

研究要旨

薬剤耐性 HIV 微少集団の出現は、ART 治療失敗の原因の一つであり、感染初期の HIV 感染者の間で一定の割合で存在すると考えられている。今回我々は ART 未治療の感染者について、血漿および PBMC 中に存在するウイルス集団の V3 領域の塩基配列決定を行い、得られた各シーケンス群の指向性を調べることにより、CCR5 阻害剤非感受性微少集団の検出と、その割合の定量を行った。血漿中ウイルスと PBMC 中ウイルスの指向性が異なった 4 人の感染者について両ウイルス集団 8 検体の指向性を求めた結果、すべての検体において R5 指向性と X4 指向性両方の微少集団が見られた。血漿中ウイルスと PBMC 中ウイルスともに指向性が R5 であった 9 人の感染者について両ウイルス集団 18 検体の指向性を求めた結果、血漿中ウイルスでは 9 検体中 4 例、PBMC 中ウイルスでは 9 例中 7 例で X4 指向性微少集団が検出された。これらの X4 指向性ウイルスの臨床的意味については、臨床の結果を含むより詳細な検討が必要であると考えられる。

A. 研究目的

薬剤耐性 HIV 微少集団の出現は、ART 治療失敗の原因の一つであり、感染初期の HIV 感染者の間で一定の割合で存在すると考えられている。現在、微少集団の定量は、主に対立遺伝子に特異的なプライマーを用いた real-time PCR により行われているが、この方法は特定された既知の 1 塩基変異にのみ対応し、変異後の塩基が明らかでない場合や、2 塩基の変異の場合は微少集団を定量することが難しいという問題点を持っている。今回我々は ART 未治療の感染者について、血漿および PBMC 中に存在するウイルス集団の V3 領域の塩基配列決定を行い、得られた各シーケンス群の指向性を調べることにより、CCR5 阻害剤非感受性微少集団の検出と、その割合の定量を行った。

B. 研究方法

慶應義塾大学病院に通院する ART を受けていないサブタイプ B の HIV 感染者で、通常のシーケンスによる指向性検査において血漿中ウイルスと PBMC 中ウイルスの指向性が異なった 4 人の感染者、および血漿中ウイルスと PBMC 中ウイルスともに指向性が R5 であった 9 人の感染者の血液を用いた。指向性の推定には geno2pheno coreceptor (<http://coreceptor.bioinf.mpi-inf.mpg.de/>) を用いた (FPR10% で推定)。

(倫理面の配慮)

本研究は慶應義塾大学医学部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血液の採取を行った。

血液からフィコールパックを用いて PBMC を分離し、PBMC から QIAamp DNA Blood Mini Kit を用いて DNA を抽出した。また血漿から QIAamp Viral

表 1 C2V3 領域増幅プライマー

name	sequence	region
KTRB-1F	GTCAGCACAGTACAATGYACACATGG	env 1st F
KTRB-1R	TGTGTTGTATTACAGTAGAAAAATTCYCC	env 1st R
KTRB-2F	GCTGTTAAATGGCAGTYTAGCAGA	env 2nd F
KTRB-2R	AATTTCTGGGTCYCCCTCTG	env 2nd R

RNA Mini Kit を用いて RNA を抽出した。表 1 のプライマーを用いた (RT-)nested PCR により env の C2V3 領域付近を増幅し、Roche の次世代シーケンサー GS Junior を用いて次世代シーケンスを行った。得られたシーケンスの割合から微少集団の割合を定量し、それぞれのシーケンスについて通常の指向性検査と同様に geno2pheno coreceptor を用いて微少集団の指向性の推定を行った。

C. 研究結果および考察

血漿中ウイルスと PBMC 中ウイルスの指向性が異なった 4 人の感染者について両ウイルス集団 8 検体の指向性を求めた結果、すべての検体において R5 指向性と X4 指向性両方の微少集団が見られた (図 1、図 2)。ダイレクトシーケンスによる指向性検査の結果と比較すると、8 検体中 7 例において各指向性の割合の多い集団の結果を反映していた。

V3 領域を用いて各人毎に系統樹解析を行った結果、4 人中 3 人 (C180、C310、C097) について各指向性での緩やかなクラスタリングが見られた (図 3、4)。その内 C180 と C310 については通常

検査での系統樹解析で血漿中ウイルスと PBMC 中ウイルスの遺伝距離が離れており (図 5)、このことから重複感染例であることが考えられた。C097 については、V3 領域の長さが 102、105、111 mer の各微少集団が検出されており、102、105 mer は R5、111 mer は挿入変異が入ることにより X4 と判定されていた (図 6)。C093 については、R5 指向性の最大集団と X4 指向性の最大集団の V3 領域の違いが 1 変異のみであり、両集団は遺伝的に非常に近縁であることが考えられた (図 7)。以上の解析は V3 領域のみで行っており、今後 C2 領域を含むより長いシーケンスを用いた詳細な解析を行う予定である。

血漿中ウイルスと PBMC 中ウイルスともに指向性が R5 であった 9 人の感染者について両ウイルス集団 18 検体の指向性を求めた結果、血漿中ウイルスでは 9 検体中 4 例、PBMC 中ウイルスでは 9 例中 7 例で X4 指向性微少集団が検出された (表 2)。これらの X4 指向性ウイルスの臨床的意味については、臨床の結果を含むより詳細な検討が必要であると考えられる。

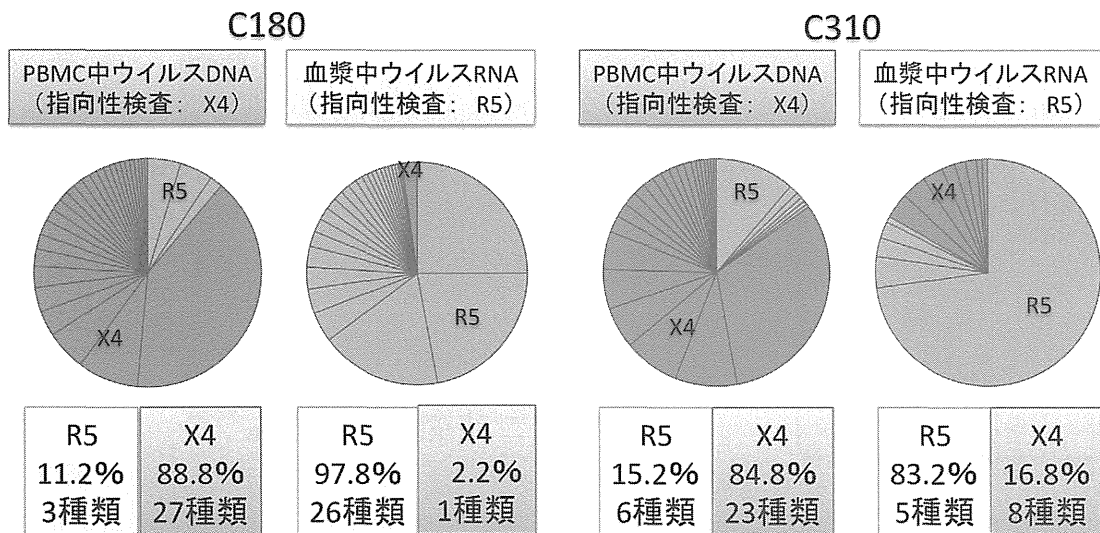


図 1 血漿中ウイルスと PBMC 中ウイルスで指向性が異なった例における各微少集団シーケンスの指向性結果 (1)

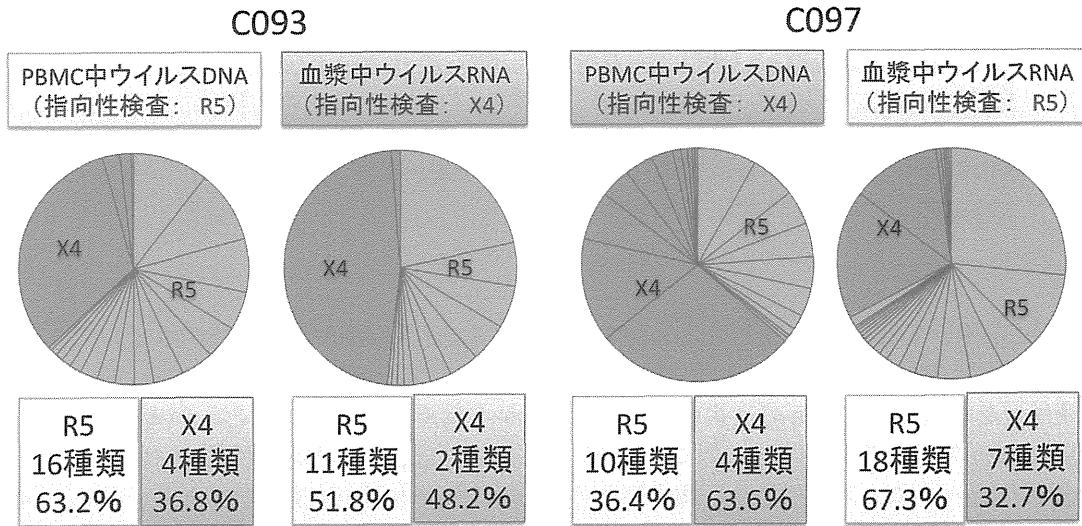


図 2 血漿中ウイルスと PBMC 中ウイルスで指向性が異なった例における各微少集団シークエンスの指向性結果 (2)

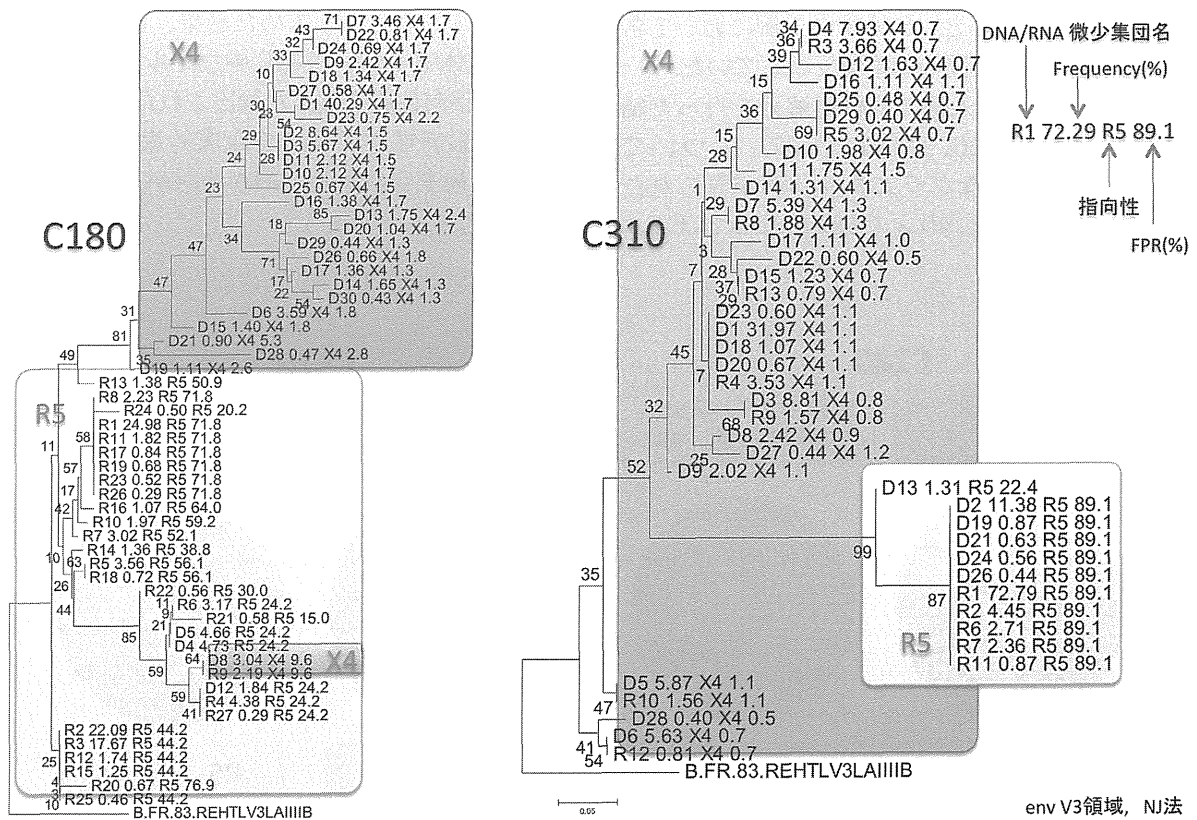


図 3 血漿中ウイルスと PBMC 中ウイルスで指向性が異なった例における各微少集団シークエンスの系統樹解析 (1)

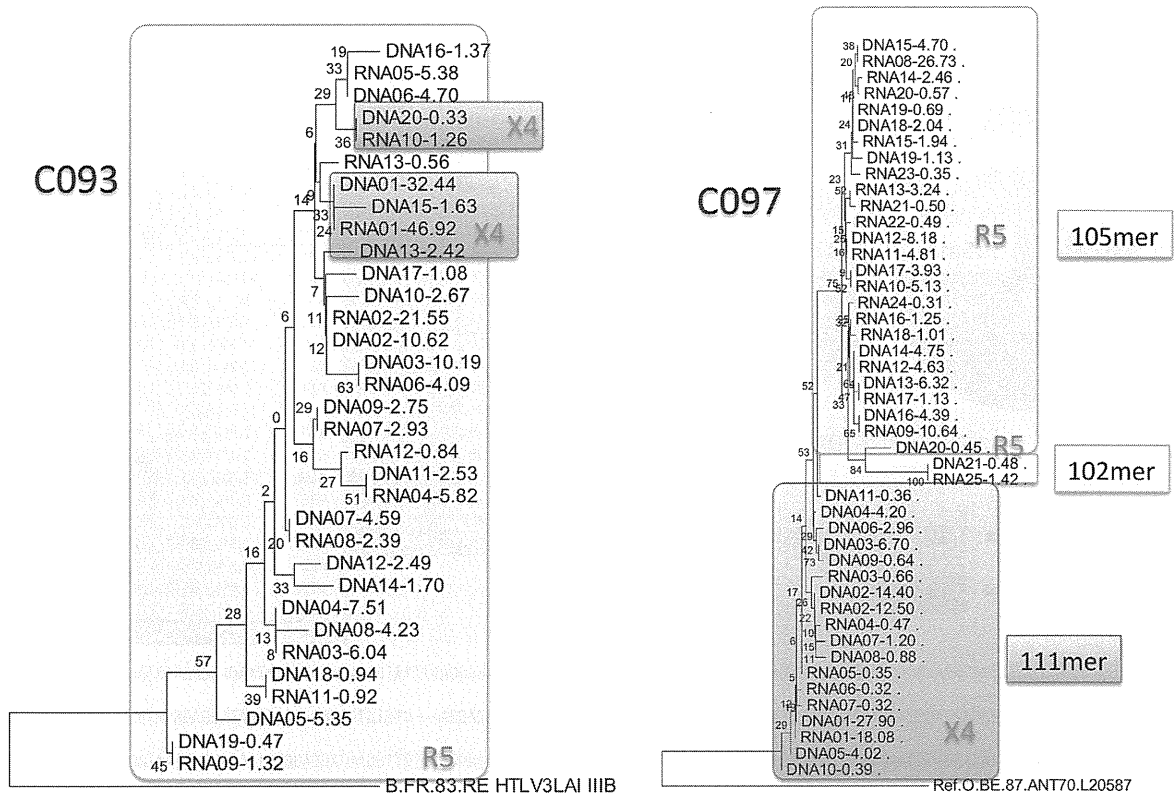


図4 血漿中ウイルスと PBMC 中ウイルスで指向性が異なった例における各微小集団シーケンスの系統樹解析 (2)

ダイレクトシーケンスによる指向性検査で用いた 50 例の DNA、RNA のシーケンスについて系統樹解析を行った。

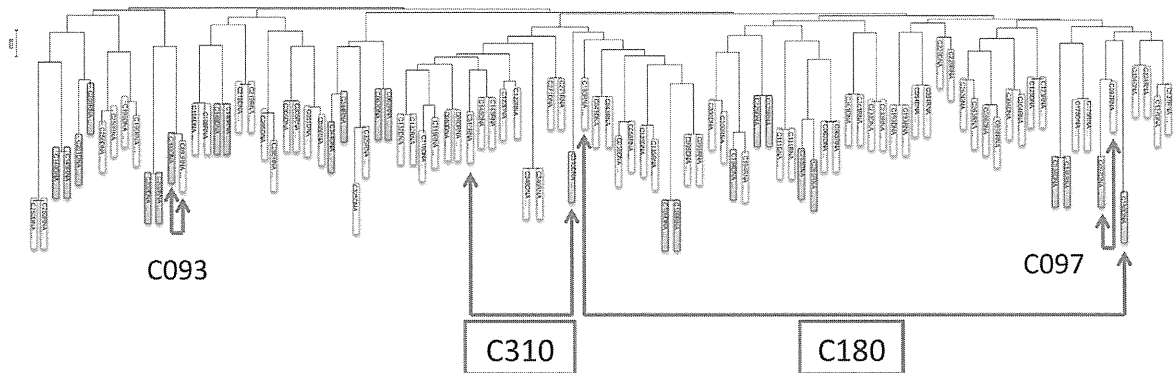


図5 ダイレクトシーケンスによる指向性検査で得られたシーケンスの系統樹解析

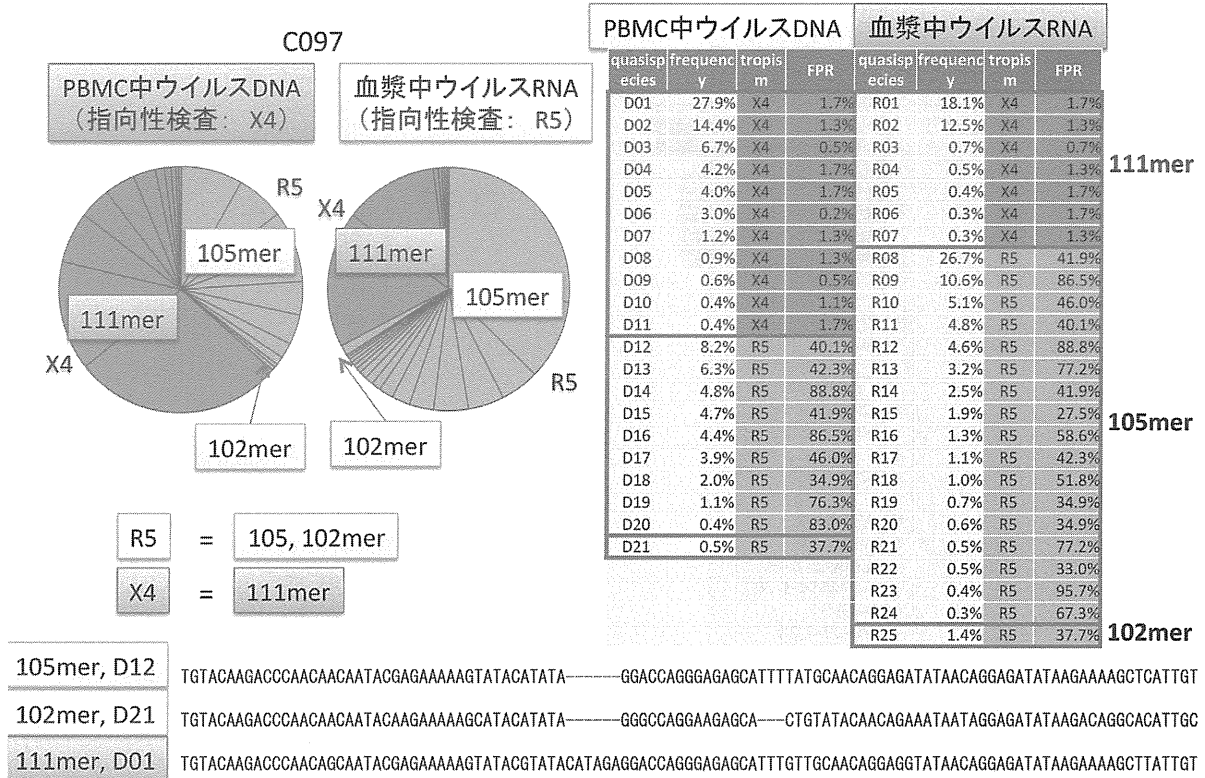


図 6 C097 の解析

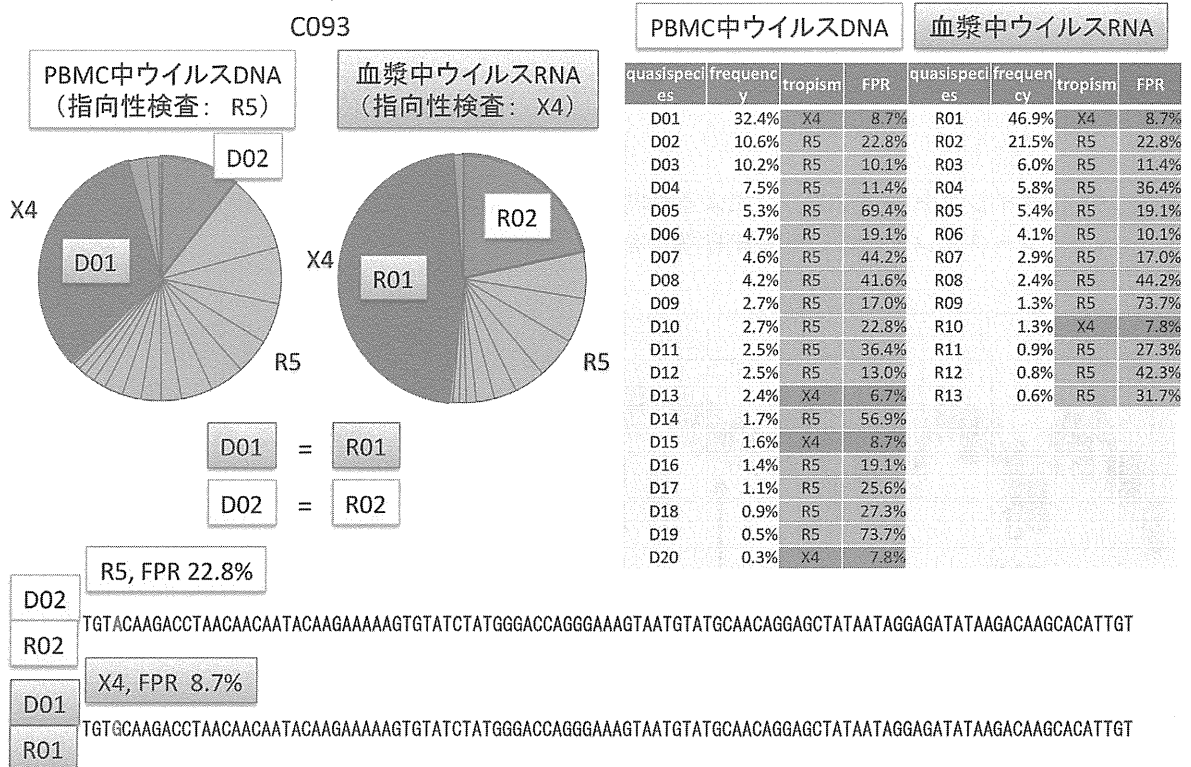


図 7 C093 の解析

表2 血漿中ウイルスと PBMC 中ウイルスともに指向性が R5 であった例

	VL (copies/ml)	CD4	PBMC 中ウイルスDNA				血漿中ウイルスRNA			
			通常シーケンス		次世代シーケンス		通常シーケンス		次世代シーケンス	
			指向性 判定	FPR (GP, %)	R5 (variants)	X4 (variants)	指向性 判定	FPR (GP, %)	R5 (variants)	X4 (variants)
C055	17000	56	R5	19.4	98.8% (14)	1.1% (1)	R5	17.1	100% (13)	0% (0)
C095	78000	87	R5	37.4	92.5% (12)	7.5% (5)	R5	37.4	93.2% (7)	6.8% (3)
C098	100000	165	R5	67.3	100% (14)	0% (0)	R5	28.8	100% (12)	0% (0)
C111	3100	228	R5	44.6	98.4% (16)	1.6% (1)	R5	44.6	100% (11)	0% (0)
C119	44000	195	R5	86.8	89.1% (22)	10.9% (1)	R5	87.4	90.3% (19)	9.7% (2)
C122	15000	189	R5	87.1	100% (33)	0% (0)	R5	91.2	100% (24)	0% (0)
C132	93000	54	R5	86.2	97.0% (9)	3.0% (2)	R5	86.2	100% (9)	0% (0)
C135	31000	110	R5	24.7	99.4% (14)	0.6% (1)	R5	15.0	97.1% (15)	2.9% (3)
C137	14000	258	R5	31.1	80.5% (20)	19.4% (4)	R5	17.9	74.0% (12)	26.0% (5)

4. 加藤真吾. わが国の HIV 流行終息にむけて. IASR 33:237-239, 2013..

D. 健康危険情報 なし

E. 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 transmission among men who have sex with men (MSM) in China: first indication of the International Dissemination of the Chinese MSM lineage. J Virol. 87(10):5351-61, 2013.
2. 井戸田一朗, 星野慎二, 沢田貴志, 佐野貴子, 上田敦久, 加藤真吾, 今井光信. コミュニティセンター「かながわレインボーセンター SHIP」の夜間 HIV/STIs 即日検査相談を受けた MSM (men who have sex with men) の特徴及び罹患率. 日本公衆衛生雑誌 60(5):253-261, 2013.
3. 佐野貴子, 近藤真規子, 吉村幸浩, 立川夏夫, 相楽裕子, 井戸田一朗, 山中晃, 須藤弘二, 加藤真吾, 今井光信. HIV-1 p24 抗原検出感度が向上した改良型 HIV 抗原抗体同時検出試薬の検討. 感染症学雑誌 87(4):415-423, 2013.

2) 口頭発表

1. 加藤真吾, 須藤弘二: 病院における HIV を含む感染症検査の実態調査, 第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2013 年 11 月, 熊本
2. 矢永由里子, 長谷川直樹, 岩田敏, 加藤真吾: 病院での HIV 検査東欧の実際, 現場の教育・研修のニーズの内容把握と医療者主体の検査のあり方の検討, 第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2013 年 11 月, 熊本
3. 佐野貴子, 井戸田一朗, 川畑拓也, 千々和勝己, 須藤弘二, 近藤真規子, 今井光信, 加藤真吾: 民間クリニックにおける HIV 即日検査の導入支援および結果解析, 第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2013 年 11 月, 熊本
4. 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と検査精度調査 (2012), 第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2013 年 11 月, 熊本
5. 星野慎二, 井戸田一朗, 日高庸晴, 加藤真吾, 白阪琢磨: MSM 商業施設の訪問経験がない若年層を対象にした行政・教育・医療連携による多目的支援施設のあり方の検討, 第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2013 年 11 月, 熊本
6. 山田瑛子, 高木律男, 田邊嘉也, 永井孝宏, 村山

- 正晃、池野良、児玉泰光、親泊あいみ、須藤弘二、戸蒔祐子、藤原宏、長谷川直樹、加藤真吾：抗 HIV 薬のだ液中薬剤濃度の検討、第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会、2013 年 11 月、熊本
7. 近藤真規子、佐野貴子、井戸田一朗、吉村幸浩、立川夏夫、山中晃、岩室紳也、今井光信、武部豊、加藤真吾：中国の MSM 間で大流行している HIV-1 CRF01_AE variant の日本への流入、第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会、2013 年 11 月、熊本
8. 重見麗、服部純子、蜂谷敦子、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、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、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、高田清式、山本政弘、松下修三、藤田次郎、武山正男、杉浦互：新規 HIV/AIDS 診断症例における薬剤耐性 HIV の動向、第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会、2013 年 11 月、熊本
9. 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：2012 年度 HIV 薬剤耐性検査外部精度管理の報告、第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会、2013 年 11 月、熊本
10. 丹羽一貴、山元泰之、近澤悠志、備後真登、清田育男、四本美保子、大瀧学、尾形享一、萩原剛、鈴木隆史、天野景裕、高谷紗帆、鯉淵智彦、岩本愛吉、親泊あいみ、加藤真吾、杉浦互、福武勝幸：「診療における HIV-1/2 感染症の診断ガイドライン 2008（日本エイズ学会・日本臨床検査医学会標準推奨法）」逸脱症例、第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会、2013 年 11 月、熊本
11. 山崎さやか、近藤真規子、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 27 回日本エイズ学会学術集会・総会、2013 年 11 月、熊本

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

研究分担者 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 附属病院薬剤部

研究要旨

東京大学医科学研究所附属病院において、2013 年 1 月から 2013 年 12 月の間、新規に診断され、同意の得られた HIV-1 感染者 10 人に、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た。全員サブタイプ B であり、逆転写領域の D67N;1 例、V106I;1 例、V179D;2 例、T215E;2 例、プロテアーゼ領域 M36I;3 例認め、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。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。

A. 研究目的

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。

(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 (25-50)。

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、診療とは別であり、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。

B. 研究方法

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。

C. 研究結果

東京大学医科学研究所附属病院において、2013 年 1 月から 2013 年 12 月の間、新規に診断され、

同意書の得られた HIV-1 感染者 10 人に、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た。全員サブタイプ B であり、逆転写領域の D67N;1 例、V106I;1 例、V179D;2 例、T215E;2 例、プロテアーゼ領域 M36I;3 例認め、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。

D. 考察

今年は研究班が新体制になり、当院での倫理委員会での承認にも時間がかかったことから、名古屋医療センターに送付した検体数が少なくなった。2013 年 4 月以降、本研究に参加しておらず、検体送付せず、臨床上、得ることができている未治療患者の HIV 遺伝子型 (薬剤耐性株の有無) 情報を、患者同意を得て、調査票の形式で本研究に参加する予定である。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。

E. 結論

今後も薬剤耐性 HIV-1 の出現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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 原著論文

1. Okame M, Takaya S, Sato H, Adachi E, Ohno N, Kikuchi T, Koga M, Oyaizu N, Ota Y, Fujii T, Iwamoto A and Koibuchi T. Complete regression of early-stage gastric diffuse large B-cell lymphoma in an HIV-1 infected patient following *Helicobacter pylori* eradication therapy Clin Infect Dis. in press
2. Teeranaipong P, Hosoya N, Kawana-Tachikawa A, Fujii T, Koibuchi T, Nakamura H, Koga M, Kondo N, Gao GF, Hoshino H, Matsuda Z, Iwamoto A. Development of a rapid cell-fusion-based phenotypic HIV-1 tropism assay. J Int AIDS Soc. Sep 18;16(1):18723. 2013.
3. Nishijima T, Gatanaga H, Shimbo T, Komatsu H, Endo T, Horiba M, Koga M, Naito T, Itoda I, Tei M, Fujii T, Takada K, Yamamoto M, Miyakawa T, Tanabe Y, Mitsuya H, Oka S; SPARE study team. Switching tenofovir/emtricitabine plus lopinavir/r to raltegravir plus Darunavir/r in patients with suppressed viral load did not result in improvement of renal function but could sustain viral suppression: a randomized multicenter trial. PLoS One. Aug 8;8(8):e73639. 2013.
4. Adachi E, Koibuchi T, Imai K, Kikuchi T, Shimizu S, Koga M, Nakamura H, Iwamoto A, Fujii T. Hemophagocytic syndrome in an acute human immunodeficiency virus infection. Intern Med.52(5):629-32. 2013.

2) 口頭発表

1. Kaori Nakayama-Hosoya, Takaomi Ishida, Noriaki Hosoya, Hitomi Nakamura, Michiko Koga, Tomohiko Koibuchi, Aikichi Iwamoto, Ai Kawana-Tachikawa The essential role of epigenetic regulation for CD4+ T cell dysfunction during chronic HIV-1 infection AIDS Vaccine 2013, Barcelona, Spain

H. 知的所有権の出願・取得状況

なし