

# 神奈川県における薬剤耐性 HIV の動向調査研究

～神奈川県における薬剤耐性 HIV-1 発生動向把握調査研究 (2013 年) ～

研究分担者 近藤真規子 神奈川県衛生研究所 専門研究員

研究協力者 吉村 幸浩<sup>1</sup>、立川 夏夫<sup>1</sup>、岩室 紳也<sup>2</sup>、井戸田一朗<sup>3</sup>、山中 晃<sup>4</sup>、  
佐野 貴子<sup>5</sup>、加藤 真吾<sup>6</sup>

<sup>1</sup> 横浜市立市民病院、<sup>2</sup> 厚木市立病院、<sup>3</sup> しらかば診療所、

<sup>4</sup> 新宿東口クリニック、<sup>5</sup> 神奈川県衛生研究所、<sup>6</sup> 慶應義塾大学医学部

## 研究要旨

新規 HIV-1 感染者における薬剤耐性株の出現状況を調査するため、2012 年 11 月末から 2013 年に主として神奈川県および東京都内の医療機関に来院した新規 HIV 感染者 62 例 (2012 年 9 例、2013 年 53 例) について薬剤耐性変異の解析を行った。IAS-USA(2013) リスト、Shafer' s criteria、スタンフォードデータベースに基づき薬剤耐性変異の有無を調べた結果、2013 年の新規感染者 53 例中 6 例に逆転写酵素阻害剤 (RTI) に対する耐性関連変異が検出された。耐性変異出現頻度は 11.6% であり、2004 年の調査開始から始めて 10% を超えるに至った。

変異の検出された 6 例は全て日本男性であり、サブタイプ B が 4 例、CRF01\_AE (01AE) と B と 01AE の組み換え疑い例 (B/01AE) が 1 例ずつであった。サブタイプ B においては例年と同様に AZT 耐性変異のリバータントが最も多く 3 例から検出された。01AE と B/01AE の 2 例からは極めて稀な変異 L100V、Q151L が 1 例ずつ検出され、スタンフォードデータベースで RTI に中程度耐性と判定された。

2013 年の調査では 2010 年から 2012 年に検出された中国の MSM 間で流行している 01AE バリエーションは検出されていないが、ユニークな耐性変異を持つ 01AE が検出され、今後も日本男性における 01AE の動向が注目される。

## A. 研究目的

HIV-1 感染者の治療は多剤併用療法 (HAART) の普及により飛躍的に進歩し、HIV-1 感染者の病態の進行をコントロールすることが可能となった。その一方で、薬剤の長期投与に伴い薬剤耐性 HIV-1 株を保有する感染者が増加し、新規感染者が薬剤耐性株に感染している症例も見つかってきている。欧米では薬剤耐性ウイルスによる感染が広がりつつあり、新規感染者の数%から十数%が何らかの抗 HIV 薬に対する耐性変異が認められると報告されている。日本においては 2004 年から調査が開始され、当施設においては全国平均よりも低いものの、2004 年から 2005 年の耐性変異検出率は約 5% であったが、その後、漸増傾向にあり、2010 年から 2012 年の調査では約 7% であった。日本でのこの数字は欧米に比べまだ低いものの、薬剤耐性ウイルスの蔓延を

制御するためにも継続した調査は重要である。

我々は、薬剤耐性 HIV の発生動向把握とその増加を抑制するため全国規模での調査に参加し、主として神奈川県および東京都内の医療機関を受診した HIV 感染者についてサブタイプおよび薬剤耐性変異の解析を行うとともに流行株の特徴を解析した。

## B. 研究方法

### 1) 調査対象

2012 年 12 月から 2013 年に主として神奈川県および東京都内の医療機関に来院した未治療の新規 HIV 感染者 62 名について、薬剤耐性変異検査を実施した。

### 2) HIV-1 薬剤耐性変異の解析

患者血漿より HIV-1 遺伝子を抽出 (ハイピュア Viral RNA 抽出キット: ロシュ・ダイアグノスティ

ックス) し、RT nested PCR 法 (One step RNA PCR キット: タカラバイオ) によりプロテアーゼ (PR)、逆転写酵素 (RT) およびインテグラーゼ (IN) 領域の 3 カ所を増幅後、ダイレクトシーケンス法 (BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit: アプライドバイオシステムズ) により塩基配列を決定した。PCR プライマーおよび PCR 条件は国立感染症研究所の方法に従った。

IAS-USA (2013) リスト、Shafer' s criteria、スタンフォードデータベースを基にプロテアーゼ阻害剤 (PRI: IDV、LPV、RTV、SQV、NFV、FPV、ATV、DRV、TPV)、核酸系逆転写酵素阻害剤 (NRTI: AZT、d4T、ddI、3TC、ABC、TDF、FTC)、非核酸系逆転写酵素阻害剤 (NNRTI: RPV、EFV、ETR、NVP)、インテグラーゼ阻害剤 (INI: RAL、EVG) に対する薬剤耐性変異について解析した。

また、同時にスタンフォードデータベース (インターネット上で公開) を用い各種抗 HIV 薬に対する耐性度の判定を行った。スタンフォードデータベースの耐性度は susceptible、potential low-level resistance、low-level resistance、intermediate resistance (中程度耐性)、High-level resistance (高度耐性) の 5 段階評価で示される。各領域のサブタイプ型別は PR、RT、env C2V3 領域については Neighbor joining 法による系統樹解析で、IN 領域はスタンフォードデータベースを用いて決定した。

(倫理面への配慮)

主治医から患者に研究内容について説明を行い、研究への同意の得られた症例について研究を実施し

た。患者名はすべて記号化して扱っており、プライバシーの流出防止など患者の人権保護に十分配慮した。尚、本研究は当研究所の倫理委員会で承認されている。

C. 研究結果

IAS-USA (2013) リスト、Shafer' s criteria、スタンフォードデータベースに基づき 62 例の HIV-1pol 領域のアミノ酸について解析した結果を表 1 に示した。2013 年の陽性判明者 53 例中 6 例に逆転写酵素阻害剤に対する耐性関連変異が認められたが、2012 年の追加分 9 例からは検出されなかった。2013 年の耐性検出頻度は 11.3% であり、2012 年の検出頻度 6.4% に比べ増加していた。検出された変異は、例年頻度の高い AZT 耐性変異 T215Y/F のリバータントが 2013 年も 6 例中 3 例 (50%) と多く、この他 M41L、L100V、Q151L が 1 例ずつ検出された。L100V、Q151L は IAS-UAS2013 リストや Shafer' s criteria では耐性変異として認識されていないが、スタンフォードデータベースでは L100V は NNRTI の EFV に、Q151L は NRTI の ABC、AZT、D4T、DDI に中程度耐性と判定された。

6 例の疫学情報は、全て日本男性、感染経路は同性間 2 例、不明 4 例で、遺伝子型はサブタイプ B が 4 例、CRF01\_AE (O1AE) が 1 例、B と O1AE の組み換え疑い例 (B/O1AE: pol/env C2V3) が 1 例であった (表 1)。

PR および IN 領域には Major 変異は検出されず、IN 領域においてアクセサリー変異の T97A、

表 1 新規 HIV 感染者から検出された薬剤耐性関連変異検出頻度

陽性判明年	解析数 (人)	耐性変異 出現頻度	感染経路 サブタイプ	国籍	薬剤耐性関連変異		
					Pro	RT	IN
2012年	94	6* (6.4%)	同性間 B	JP	—	T215E	—
			同性間 B	JP	—	T215C	—
			不明 B	JP	—	T215S	—
			不明 B	JP	—	M184V	—
			同性間 B	JP	M46L	—	—
			不明 B	JP	M46I	—	—
2013年	53	6* (11.3%)	不明 B	JP	—	T215C	—
			不明 B	JP	—	T215C	—
			同性間 B	JP	—	T215L	—
			同性間 B	JP	—	M41L	—
			不明 AE	JP	—	L100LV	—
不明 B/AE	JP	—	Q151L,V179D	—			
合計	147	12 (8.2%)					

E138K、V151I、S153F、E157Q が 6 例から検出された。

53 例の感染経路別サブタイプを表 2 に示した。サブタイプの内訳は、サブタイプ B が 45 例 (85%) と最も多く、次いで O1AE が 6 例で、サブタイプ B と B/O1AE、CRF07\_BC が 1 例ずつ検出された。

感染経路別に見てみると、同性間および不明の日本男性が 46 例 (87%) で最も多く、このうち 41

例の遺伝子型はサブタイプ B で、O1AE 4 例、B/O1AE 1 例であった。分子疫学解析の結果、これら 5 例の O1AE 遺伝子に系統樹上特別なクラスタリングは認められず、2010 年から 2012 年に検出された中国型バリエーションとは異なっていた。

外国人男性 6 例のうち 5 例は同性間性行為感染で、国籍は米国、コロンビア、ブラジル、ベトナム、中国と多岐にわたっていた。

表 2 新規 HIV 感染者 53 名の感染経路とサブタイプ (2013 年)

感染経路	合計	HIV-1サブタイプ (envC2V3, Pr-RT)			
		B	AE	B/AE	07BC
男性同性間	日本	13			
	外国	5	3	1	1
異性間 男性	日本	1		1	
不明男性	日本	33	28	4	1
	外国	1	1		
合計	53	45	6	1	1

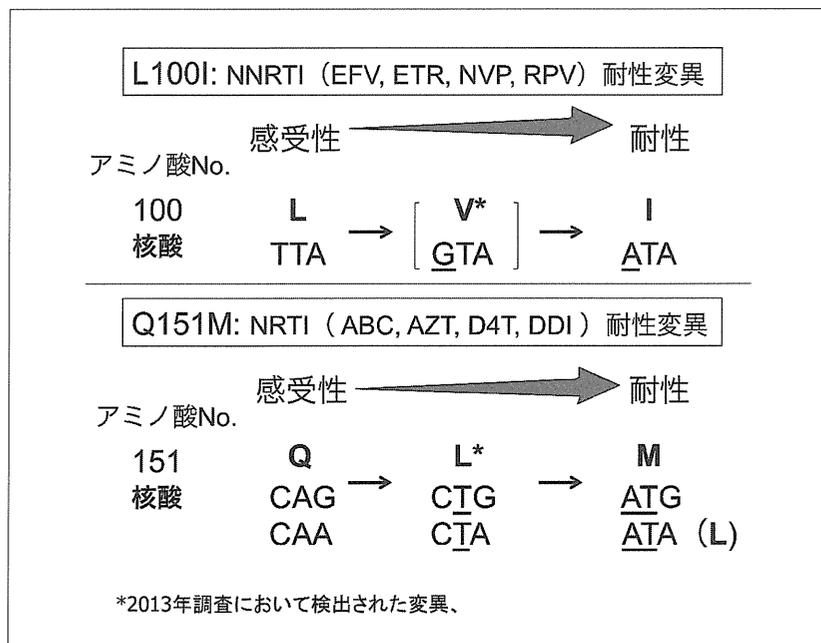


図 1 RT 領域アミノ酸 L100、Q151 の耐性変異獲得機序

## D. 考察

我々は、薬剤耐性 HIV の発生動向を把握するため、2004 年より全国規模での調査に参加し、主として神奈川県および東京都内の医療機関に来院した新規 HIV-1 感染者について薬剤耐性変異の解析を行っている。耐性関連変異は 2004 年の 4.3% から僅かずつではあるが上昇し続け 2010 年から 2012 年の 3 年間では 6.8% となり、2013 年の調査では、11.3% (53 例中 6 例) に増加した。

耐性関連変異の検出された 6 例の内サブタイプ B の 3 例は AZT 耐性変異 T215Y/F のリバータント T215C/L を有していた。リバータント T215X は、2004 年から 2012 年までの神奈川の調査において耐性関連変異が検出された 35 例中 15 例と高率に検出されている。T215X は全国調査においても高頻度に検出されており、polymorphism の可能性も考えられるが、スタンフォードデータベースによると NRTI に低レベル耐性と判定され、薬剤選択の際には考慮する必要があると考えられた。

スタンフォードデータベースでは RTI に中程度耐性と判定されるが、IAS-UAS2013 リストでは耐性と認識されていない 2 つの変異 L100V、Q151L が検出された。

スタンフォードデータベースでは L100V について、極めて稀な nonpolymorphic mutation であるが、NNRTI に対する感受性を減少させる変異であると、また Q151L については 151M の出現に先行する極めて稀な変異であると説明している (151:Q (CAG) → L (CTG) → M (ATG) 図 1)。データベースによって判定が異なる例は時々存在するが、これら 2 つの変異は完全な耐性を獲得するまでの途中の変異と推定される。これらの変異は今回初めての検出であり、今後の動向に注目したい。

耐性関連変異を検出した 6 例は全て日本男性で、感染経路は不明、あるいは同性間性行為であり例年と同様の傾向であり、遺伝子型はサブタイプ B 以外に O1AE、B/O1AE が 1 例ずつ確認された。我々は 2010 年以降、感染経路が異性間性行為以外の日本男性において全体数は僅かではあるが、O1AE が有意に増加していること ( $P < 0.01$ )、その増加の原因の一端が中国の MSM 間で流行している CN.MSM.01-1 バリエーションの影響であることを報告した。2013 年の解析では今のところ中国型バリエーションは検出されていないが、ユニークな耐性変異を持つ O1AE が検出され (表 1)、今後も日本男性における O1AE の動向が注目される。

## E. 結論

2012 年 12 月から 2013 年に主として神奈川県および東京都内の医療機関に来院した未治療の新規 HIV 感染者 62 名について薬剤耐性変異の解析した結果、2013 年に登録された 53 例中 6 例に RTI の耐性関連変異が確認され、耐性変異出現率は 11.3% であり、2004 年の調査開始から始めて 10% を超えるに至った。変異の検出された 6 例は全て日本男性であり、このうちサブタイプ B の 4 例からは、例年と同様に AZT 耐性変異のリバータントが最も多く 3 例から検出されたが、O1AE と B/O1AE の 2 例から極めて稀な変異 L100V、Q151L が 1 例ずつ検出され、これら 2 例は RTI に中程度耐性と判定された。2013 年の調査では、昨年までに検出した中国の MSM 間で流行している O1AE バリエーションは検出されていないが、ユニークな耐性変異を持つ O1AE が検出され、今後も日本男性における O1AE の動向が注目される。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1) 論文発表

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) ,5351-5361,2013.
2. 鈴木理恵子、近藤真規子他：神奈川県風疹流行状況と麻疹疑い患者からの風疹ウイルスの検出：病原微生物検出情報、34 (4)、96-97、2013。
3. 近藤真規子、佐野貴子、今井光信、加藤真吾：保健所等における無料匿名 HIV 検査の現状とその課題：病原微生物検出情報、34 (9)、253-254、2013。
4. 鈴木理恵子、木村睦未、金城恵子、近藤真規子、丹羽加代子：麻疹疑い患者からの風疹ウイルス検出状況と遺伝子解析、神奈川県衛生研究所研究報告、43、10-13、2013。

### 2) 学会発表

1. 武部豊、近藤真規子、内藤雄樹：中国における HIV-1 CRF01\_AE 流行を形成するファウンダー株の同定：我が国および周辺アジア諸国における流行との相互関係の解析、第 61 回日本ウイルス学会学術集会(2013 年 11 月 10 ~ 12 日、神戸)。
2. 鈴木理恵子、渡邊寿美、佐野貴子、近藤真規子：

- 神奈川県における風疹ウイルス検出状況と遺伝子解析、第 61 回日本ウイルス学会学術集会 (2013 年 11 月 10 ~ 12 日、神戸)。
3. 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-1CRF01\_AE variant の日本への流入、第 27 回日本エイズ学会学術集会 (2013 年 11 月 20 ~ 22 日、熊本)。
  4. 井戸田一朗、星野慎二、佐野貴子、近藤真規子、金子典代：ハッテン場における HIV 感染リスク低減に向けた意識行動調査、第 27 回日本エイズ学会学術集会 (2013 年 11 月 20 ~ 22 日、熊本)。
  5. 武部豊、近藤真規子：中国における CRF01\_AE 流行の動因となっているファウンダー株の分析：我が国および周辺アジア諸国における流行との相互関係、第 27 回日本エイズ学会学術集会 (2013 年 11 月 20 ~ 22 日、熊本)。
  6. 椎野禎一郎、近藤真規子、杉浦互 他：国内感染者集団の大規模塩基配列解析 4：サブタイプと感染リスクによる伝播効率、第 27 回日本エイズ学会学術集会 (2013 年 11 月 20 ~ 22 日、熊本)。
  7. 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 (2013 年 11 月 20 ~ 22 日、熊本)。
  8. 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 (2013 年 11 月 20 ~ 22 日、熊本)。
  9. 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 (2013 年 11 月 20 ~ 22 日、熊本)。
  10. 重見麗、近藤真規子、杉浦互 他：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)。
  11. 渡邊寿美、佐野貴子、伊達佳美、近藤真規子、黒木俊郎、2012/2013 シーズンの神奈川県域におけるインフルエンザ検出状況、第 28 回関東甲信静支部ウイルス研究部会、(2013 年 9 月 26 ~ 27 日、千葉市)。
  12. 鈴木理恵子、木村睦未、近藤真規子、黒木俊郎、神奈川県における麻疹疑い患者からの風疹ウイルス検出状況と遺伝子解析、第 28 回関東甲信静支部ウイルス研究部会、(2013 年 9 月 26 ~ 27 日、千葉市)。

#### H. 知的所有権の出願・取得状況

なし



# 東京都及び近郊における薬剤耐性 HIV の動向調査研究

～ HIV 検査陽性例の HIV-1 薬剤耐性遺伝子の解析 (2013 年) ～

研究分担者 貞升 健志 東京都健康安全研究センター 微生物部  
研究協力者 長島 真美、宮川明子、新開敬行、林 志直、甲斐明美  
東京都健康安全研究センター

## 研究要旨

都内で流行している HIV 株を遺伝子学的に調査する目的で、南新宿検査・相談室等の検査陽性例より検出された HIV のサブタイプ別並びに Protease(PR)、Reverse transcriptase(RT) および Integrase (IN) 領域における薬剤耐性変異の有無を検索した。2013 年の HIV 検査陽性例について調査した結果、検出された HIV の 83.2% がサブタイプ B であった。薬剤耐性関連変異については 7.4% と昨年調査より減少し、PR 領域で D30N、D30DN、M46L、M46V、Q58E の変異が各 1 例 (5.3%)、RT 領域の核酸系逆転写酵素阻害薬 (NRTI) の耐性変異では A62AV が認められ (1.1%)、T215X-revertant については T215L が 1 例 (1.1%) 認められた。

### A. 研究目的

薬剤治療を受けている HIV 患者数の増加に伴い、薬剤耐性変異を有する HIV の出現および新規 HIV 感染者における薬剤耐性ウイルスが新たな問題になりつつある。

都内の新規 HIV 感染者における薬剤耐性 HIV の出現状況を把握する目的で、南新宿検査・相談室 (南新宿) 等の HIV 検査陽性例を対象とし、サブタイプ型、薬剤耐性 HIV の検出状況を調査した。

### B. 研究方法

#### 1. 塩基配列の決定

2013 年に南新宿検査・相談室 (南新宿) 等の HIV 検査で陽性となった血清を対象とした。各検体 200  $\mu$ L よりウイルス核酸 RNA を抽出後、RT-nested PCR 法により Protease(PR)、Reverse transcriptase(RT) および Integrase(IN) 領域を増幅後、特異バンドの精製を行い、精製 DNA を得た。Dye-terminator-cycle-sequencing 法を用いた Direct-Sequencing 法により精製 DNA の塩基配列を決定し、

得られたアミノ酸配列の薬剤耐性関連変異の有無を検索した。

#### 2. PR, RT および IN 領域の解析

サブタイプ型別は、得られた RT 領域の塩基配列を基に、スタンフォード HIV Drug Resistance Database または遺伝子解析ソフト MEGA4 を用いて系統樹を作成し決定した。

薬剤耐性関連変異の有無については IAS-USA、Shafer らの報告またはスタンフォード HIV Drug Resistance Database に基づき判定した。PR 領域については 1～90 番目、RT 領域では 41～236 番目、IN 領域については 1～288 番目のアミノ酸を対象とした。また、RT 領域の T215 については revertant 変異についても調査を行った。

#### 3. BED assay による感染時期の推定

血清を 101 倍に希釈後、AWARE™ BED™ EIA TEST (Calypte 社) を用いて検査を実施し、ODn 値  $\leq$  0.8 となったものを、感染初期 (155 日以内) と判定した。尚、検査の実施手順はキットの取り扱い説

明書に準じた。

#### (倫理面の配慮)

本研究はヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針等の倫理規定に準拠して実施した。本研究は個人が特定できるようなデータを含まない、連結不可能匿名化されている検体から抽出した HIV 遺伝子の解析を目的とした調査研究であり、東京都健康安全研究センター倫理審査委員会において承認されている (21 健研管第 1955 号、24 健研健第 1014 号)。

## C. 研究結果

### 1. サブタイプ型別

南新宿等の HIV 検査で HIV-1 陽性となった検体について、RT 領域の分子系統樹解析を実施した結果、83.2%がサブタイプ B、13.7%が CRF01\_AE、その他の内訳として CRF02\_AG、CRF07\_BC および F が認められた (図 1)。サブタイプ B が大部分を占める傾向に変化はないが、

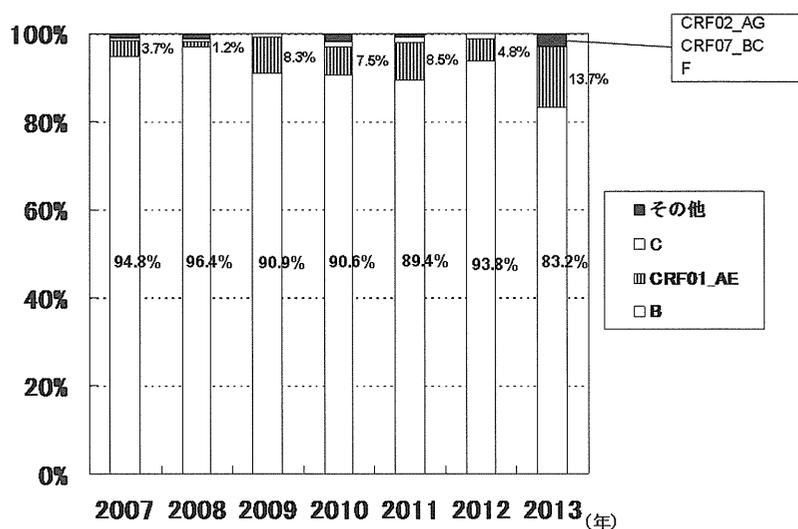


図 1 HIV サブタイプ型別 (南新宿・検査相談室等)  
(2007 ~ 2013 年)

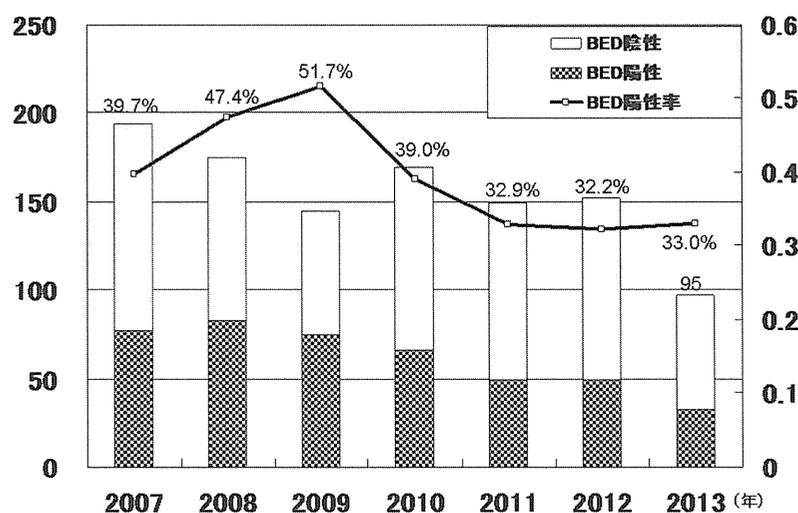


図 2 BED 陽性率の推移 (2007 ~ 2013 年)



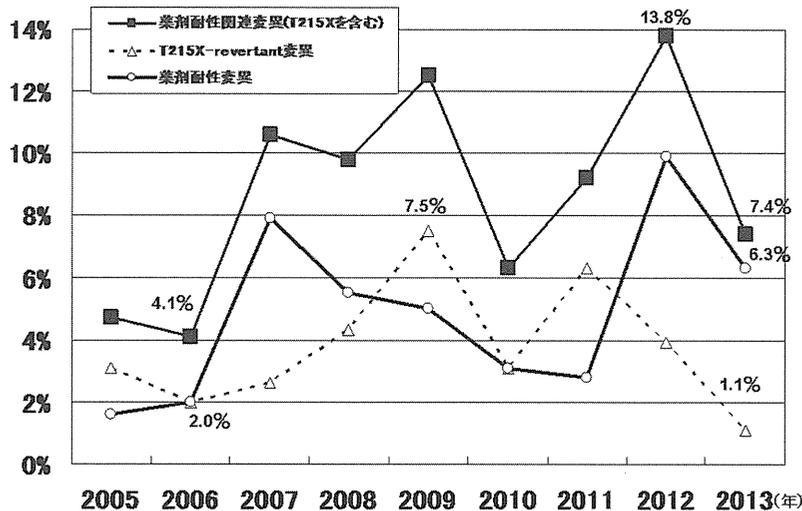


図4 HIV 薬剤耐性変異検出率の推移 (2005～2013年)

M46L、M46V、Q58E の変異が各 1 例認められた (5.3%)。RT 領域の核酸系逆転写酵素阻害薬 (NRTI) の耐性変異では A62AV が認められ (1.1%)、T215X-revertant については T215L が 1 例 (1.1%) 認められた (図3)。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1) 論文発表

- 川畑拓也, 長島真美, 貞升健志, 小島洋子, 森治代: HIV 急性感染期の診断における第 4 世代迅速検査試薬の性能評価, 感染症誌, 87, 431-434, 2013.
  - 長島真美, 宮川明子, 新開敬行, 林 志直, 貞升健志, 甲斐明美: 東京都における HIV 検査数と陽性例の解析, 病原微生物検出状況, 34, 254-255, 2013.
  - 三宅啓文, 島田信子, 高野弘紀, 長島真美, 宮川明子, 林 志直, 貞升健志, 甲斐明美: 東京都内の HIV 検査陽性例における梅毒・クラミジア抗体検査成績, 東京都健康安全研究センター年報, 64, 2013.
- ##### 2) 学会発表
- 長島真美, 宮川明子, 新開敬行, 林 志直, 貞升健志, 甲斐明美: 東京都における HIV 検査陽性

例より検出された T215X-revertant の解析, 第 27 回日本エイズ学会学術集会, 2013 (熊本)

- 川畑拓也, 長島真美, 貞升健志, 小島洋子, 森治代: HIV 急性感染期の診断における第 4 世代 HIV 迅速検査試薬エスプライン HIV Ag/Ab の性能評価, 第 27 回日本エイズ学会学術集会, 2013 (熊本)

#### H. 知的所有権の出願・取得状況

なし

## HIV の分子進化学的解析

研究分担者 椎野 禎一郎 国立感染症研究所・感染症情報センター 主任研究官

### 研究要旨

わが国の HIV-1 感染者における薬剤耐性変異の状況を調べるために、我々は患者・検体・塩基配列情報のデータベースの作成事業を行っている。このデータベースに集められた配列情報を分子進化学的手法で解析し、わが国における HIV-1 感染の動態を明らかにすることを目的として、解析を進めている。本年度は、データベースにある患者情報から、2002 年～2011 年の初診時に採取された検体の Protease-RT 領域の塩基配列（全 4393 配列）について、感染クラスタを同定した上でクラスタ毎の基本再生産数（ $R_0$ ）を推定し、サブタイプやリスク因子との関係を検討した。ウインドウ・スライド法によるサブタイプ構造の大量解析は、これらの配列のサブタイプ毎の検体数を  $B=3899$ ,  $01\_AE=344$ ,  $C=46$ ,  $02\_AG=36$ ,  $G=15$ ,  $F=9$ ,  $06\_cpx=3$ ,  $07\_BC=2$ ,  $12\_BF=2$ ,  $33\_01B=2$ ,  $D=1$ ,  $08\_BC=1$ ,  $28|29\_BF=1$ , ユニークな組換え体 =32 であると明らかにした。HIV の感染集団における  $R_0$  の推定は、時間系統樹の各変異の生成・消失モデル（BDM）を構築して数理疫学パラメータを推定する方法で行った。サブタイプ毎の  $R_0$  推定値の平均は、B, AE, C, F はそれぞれ 3.2, 3.7, 3.2, 2.1 である一方で、一人の外国人男性と多数の女性という特異な HIV 伝播集団を持っていた 02\_AG と G においてそれぞれ 7.7, 6.9 と高かった。CRF01\_AE におけるリスク因子ごとの平均  $R_0$  は、異性間接触が  $3.9 \pm 0.2$ 、MSM と IVDU がそれぞれ  $5.1 \pm 0.3$ ,  $5.4 \pm 0.4$  となり、ウイルスの再生産は MSM, IVDU で高かった。Subtype B の MSM 関連感染クラスタの各々の  $R_0$  は 1.2-5.8 の範囲でばらついており、クラスターのサイズおよび tMRCA と相関関係にないことがわかった。また、感染サイズの大きな 4 つのクラスタはいずれも  $R_0$  が比較的低く、クラスタサイズと基本再生産数が相関しない原因となっていると思われた。感染クラスタ間の  $R_0$  の差異は、過去の研究でも指摘されているが、その説明因子はいまだ説明できていない。今回の研究は、その差異の原因はサブタイプやリスク行動などの単純なものではなく感染ネットワーク内のコミュニティ上の差異である可能性があることを示唆した。

### A. 研究目的

わが国の HIV-1 感染者における薬剤耐性変異の状況を調べるために、我々は患者・検体・塩基配列情報のデータベースの作成事業を行っている。本研究の目的は、以下の通りである：

- 患者・検体・塩基配列情報のデータベース入力・検索・解析システムを構築すること
- データベースに蓄積した塩基配列データを用いて、わが国における HIV-1 感染の動態を経時的・地理的・サブタイプ依存的に描き出すため、分子進化学的手法を用いた塩基配列の大量解析を行うこと。

### B. 研究方法（倫理面への配慮）

- Web サーバと DB サーバの連携によって、研究班が集める患者／検体情報を情報ネットワークを活用して効率的に収集・集積・検索するシステムを構築する。
- 上記の情報システムに蓄積された Protease-RT 領域の塩基配列データを用いて、領域毎距離行列の計算による領域ごとのサブタイピングを行う。
- 距離行列法、最尤法、Bayesian Markov Chain Monte-Carlo 法（ベイズ MCMC 法）などの複数の分子系統樹から得られる統計学的パラメータを解析し、感染クラスターを高精度で同定する。
- 各サブタイプの塩基配列データをベイズ MCMC

法で解析し、最適塩基置換モデル・進化パラメーター・時間系統樹トポロジー・感染クラスタの tMRCA 推定を行う。

- 検出された感染クラスタの各々について、時間系統樹を BDM で解析する Stadler ら (2011) の方法によって数理疫学的解析を行い、基本再生産数 (R0) を推定する。

(倫理面の配慮)

当研究を行うにあたっては、データベースに保管する患者情報の種類について、初回診断時に各患者に総括報告書にあるとおりのインフォームドコンセントを行った。

C. 研究結果

検体配列とサブタイプリファレンス配列のアライメントからウインドウ・スライド法によって部分配列を抽出し、これらについて検体とリファレンス間の平均置換塩基率を各々算出して比較する方法によって、サブタイプと組換え体の迅速な判別を行った。この解析は、Perl5 で書かれた自作プログラムを用いて行い、検体配列の微細なサブタイプ構造の大量分類に成功した。この方法で、HXB2:2253 - 3269 の領域が揃っている 4393 配列を解析したところ、全領域がほぼ同じサブタイプである検体は、B=3899, O1\_AE=344, C=46, O2\_AG=36, G=15, F=9, O6\_cpx=3, O7\_BC=2, 12\_BF=2, 33\_O1B=2, D=1, O8\_BC=1, 28|29\_BF=1 であり、残りの 32 配列はユニ

ークな組換え体であった (図 1)。比較的多くの検体が得られたサブタイプ B, C, F, G, CRF01\_AE, CRF02\_AG について、分子進化的証拠に基づく感染クラスタの推定と tMRCA の推定を行った (図 2)。HIV の感染集団における R0 を推定する試みは、疫学的指標を用いる方法の他に、系統樹上の coalescence から導き出せる集団サイズから推定する方法、さらに時間系統樹の各変異の生成・消失をモデル化し (BDM) 数理疫学パラメータを推定する方法が提唱されている (表 1)。それぞれの方法での推定値は、方法によらず 0.76-4.1 と相当に異なっており、おそらく国ごと・transmission group ごとに R0 が大きく違うことが示唆されている (Stadler et al. 2012)。本研究では、この R0 の差異に影響を与える因子を同定するため、我が国に流行している HIV のサブタイプ・感染クラスタそれぞれにおいて R0 を推定した。サブタイプ毎の R0 推定値の平均は、B, AE, C, F はそれぞれ 3.2, 3.7, 3.2, 2.1 である一方で、O2\_AG と G はそれぞれ 7.7, 6.9 と高かった (図 3)。これらのサブタイプは、ネットワーク解析において一人の外国人男性と多数の女性という特異な HIV 伝播集団が頻繁に観察されていることが共通していた。感染クラスタごとに異なるリスク因子が観察されている CRF01\_AE においてリスク因子ごとの平均 R0 を推定したところ、異性間接触が  $3.9 \pm 0.2$ 、MSM と IVDU がそれぞれ  $5.1 \pm 0.3$ 、 $5.4 \pm 0.4$  となり、ウイルスの再生産は MSM, IVDU で高かった (図 4)。一方、多数 (233 個) の MSM

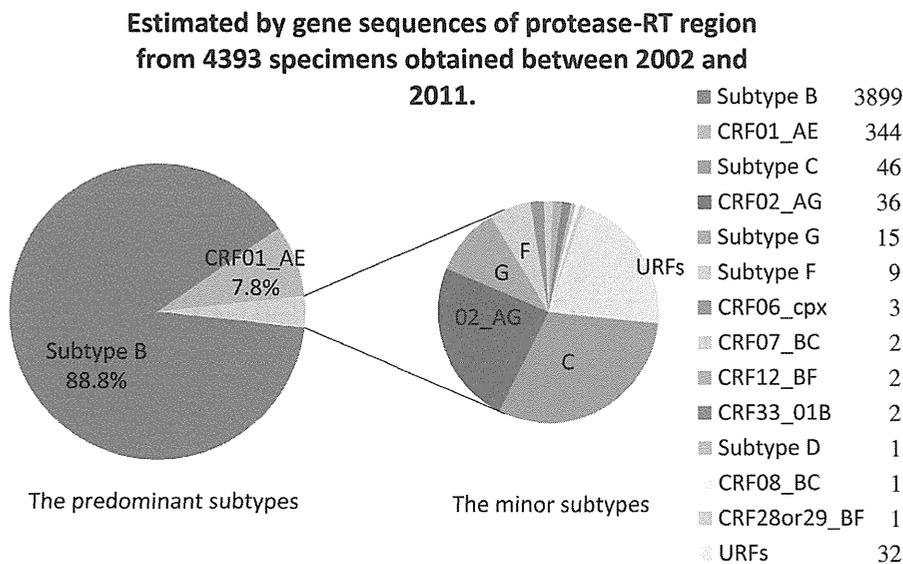


図 1 我が国における HIV-1 サブタイプの感染頻度

関連感染クラスターが観察された subtype B においては、クラスター内  $R_0$  は 1.2-5.8 の範囲でばらついていた (図 5)。 $R_0$  は、これらのクラスターのサイズおよび tMRCA と相関関係にないことがわかった。また、感染サイズの大きな 4 つのクラスターはいずれも  $R_0$  が比較的低く、クラスターサイズと基本再生産数が相関しない原因となっていると思われる (図 6)。

#### D. 考察

本研究は、日本国内の HIV-1 感染者の正確なサブタイプ分布を解明し、感染クラスターの網羅的推定を行った初めてのものである。昨年までの研究において、我が国の HIV-1 感染は 90 年代の CRF01\_AE の小規模な侵淫に続いて 90 年代終わりから多くの subtype B 株が侵淫したこと・CRF01\_AE は当初異性間および IVDU 関連集団への感染が多かったが 2000 年代に入ってから MSM が初期感染の主体になっていること・subtype B の感染クラスターは殆ど MSM であること・多彩な組換え体ウイルスが増えていること・CRF02\_AG, subtype G は女性主体に増えていることがわかっている。IVDU と MSM を通じたアジア各国での感染拡大過程が日本でも観察されていることは、憂慮すべき問題であろう。こ

れらの各クラスター集団の  $R_0$  の推定値は、過去の研究と同様に相当の差異を示している。その説明因子はいまだ解明できていないが、サブタイプやリスク行動などの単純な因子との関連がないこと、極端に大きな MSM クラスターでは逆に感染の抑制が観察されたことから、感染者のコミュニティ間の差異に原因を求めるのが適当と思われる。MSM のコミュニティには、古くからある発展場を主体としたタイプのほかに、インターネットを用いたタイプがあるという。この 2 つは、構成者の年齢等に若干の差異がある。今後、感染クラスターの構成年齢や地域構成の詳細な解析を行うことで、ウイルスの伝播しやすさに影響を与えている因子の同定を行いたい。

#### E. 結論

我が国に流行している HIV の感染クラスターを推定し、そのそれぞれの  $R_0$  を計算した。サブタイプ毎の平均  $R_0$  推定値は、多くが 2~3 だったが 02\_AG と subtype G のみ 7 付近と高かった。リスク因子ごとの平均  $R_0$  を CRF01\_AE 内で比較したところ、ウイルスの再生産は MSM, IVDU で高かった。subtype B の MSM 関連感染クラスター内  $R_0$  は 1.8-5.8 の範囲でばらついていたが、ばらつきを説明できる因子は同定できなかった。

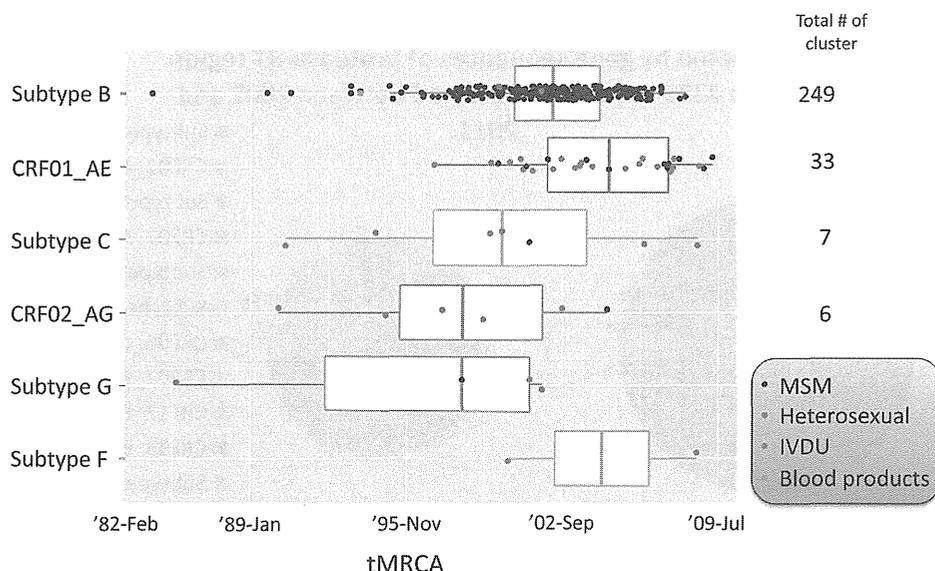


図 2 各サブタイプ毎の感染クラスターの tMRCA 分布

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 原著論文

1. Nishizawa M, Hattori J, Shiino T, Matano T, Heneine W, Johnson JA, Sugiura W. Highly-sensitive allele-specific PCR testing identifies a greater prevalence of transmitted HIV drug resistance in Japan. PLoS ONE. 8(12): e83150. doi:10.1371/journal.pone.0083150. 2013.

2) 学会発表

1. Shiino T, Sadamasu K, Hattori J, Nagashima M, Iwatani Y, Yokomaku Y, Sugiura W, on behalf of the Japanese Drug Resistance HIV-1 Surveillance Network. Molecular Phylodynamic Analysis of Drug resistance Transmissions in HIV-1 Subtype B. International Workshop on HIV&Hepatitis Virus Drug Resistance And Curative Strategies 2013. The Fairmont Royal York • Toronto, Canada. 4-8 June 2013
2. Shiino T, Sadamasu K, Nagashima M, Hattori J, Iwatani Y, Yokomaku Y, Sugiura W. Nationwide HIV-1 transmission dynamics estimated by molecular evolutionary analysis in Japan. 8th

International Workshop on HIV Transmission, Balcelona, Spain, 4-5 October 2013

3. 椎野禎一郎, 服部純子, 瀧永博之, 吉田 繁, 石ヶ坪良明, 近藤真規子, 貞升健志, 横幕能行, 古賀道子, 上田幹夫, 田邊嘉也, 渡邊 大, 森 治代, 南留美, 健山正男, 杉浦 互, 日本薬剤耐性 HIV 調査研究グループ. 国内感染者集団の大規模塩基配列解析 4 : サブタイプと感染リスクによる伝播効率の差異. 第 27 回日本エイズ学会学術集会総会. 熊本. 2013 年 11 月.

H. 知的所有権の出願・取得状況

該当なし

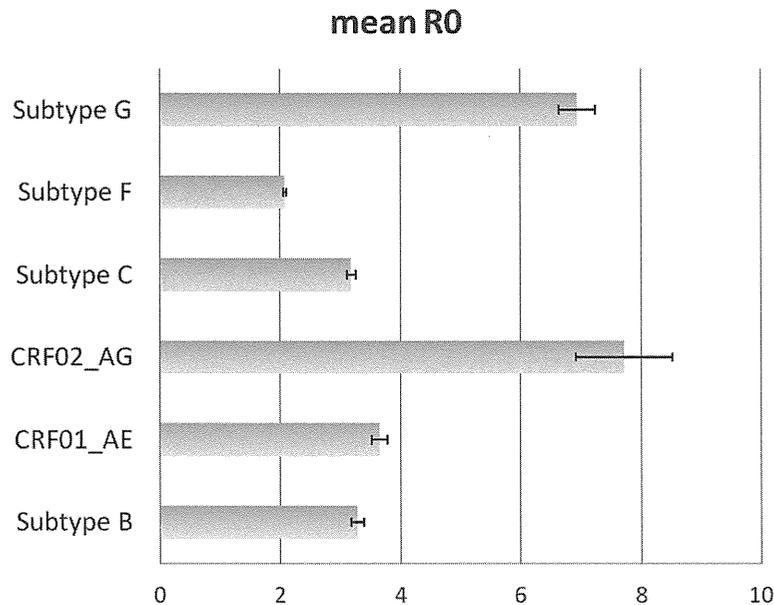


図3 サブタイプ間の平均 RO の差異

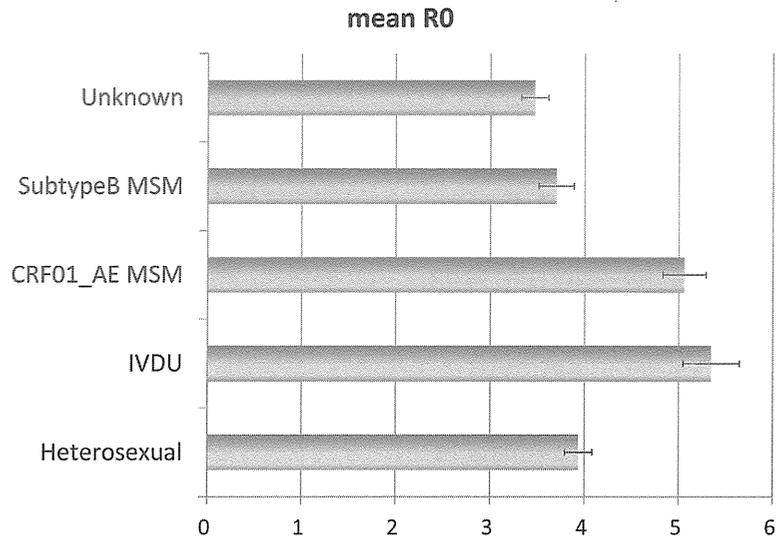


図4 リスク因子ごとの平均 R0 の差異

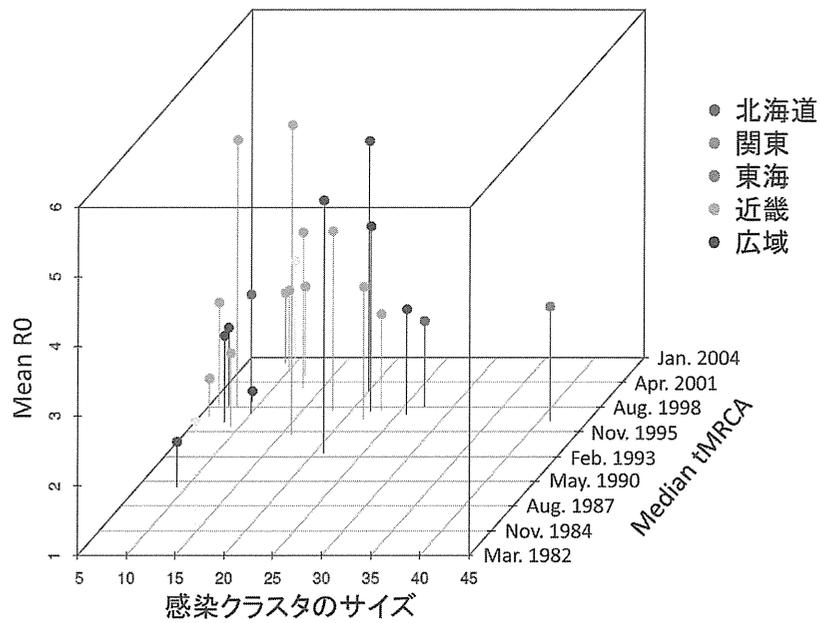


図5 サブタイプ B の感染クラスタの R0 とクラスタサイズ・tMRCA・感染地域との関係

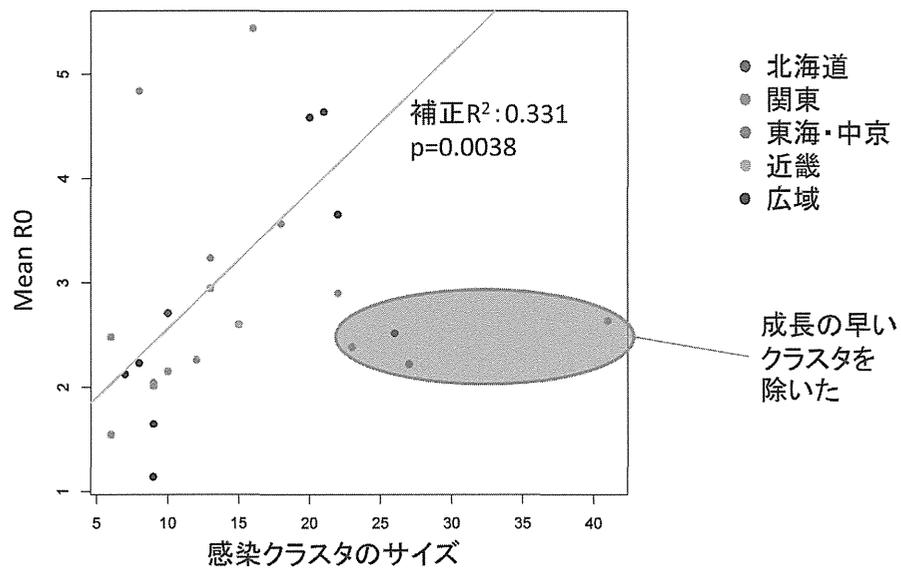


図6 サブタイプ B の感染クラスタと R0 の相関

表1 過去の研究における HIV-1 の基本再生産数 (R0)

Article	Method	Population	Year	R0 estimates
Volts et.al. 2009	Mod. coalescent	US	1993	2.29
Nishiura 2010	Epi-data	West. Europe	Until 1984	3.5 – 4.1
Bezemer et.al. 2010	Epi-data	MSM group in the Netherlands	'80-'83	2.39 (2.17-2.76)
			'84-'95	0.89 (0.85-0.93)
			'96-'99	0.76 (0.70-0.86)
			'00-'03	1.04(0.98-1.09)
Stadler et.al 2012	Bayesian BDM*	Swiss HIV cohort	-2010	2.29 (1.61-3.05)

\* Method used in this study.

# 愛媛県及び近郊における薬剤耐性 HIV の動向調査研究

～四国ブロックにおける薬剤耐性 HIV の動向調査研究～

研究分担者 高田 清式 愛媛大学医学部附属病院総合臨床研修センター・感染症内科教授

研究協力者 村上 雄一 愛媛大学医学部附属病院 感染症内科

井門 敬子 愛媛大学医学部附属病院 薬剤部

## 研究要旨

四国における新規感染者の HIV 伝搬の現状を把握する目的で、未治療 HIV 感染者 8 例の薬剤関連変異について解析、検討した。本年の解析では、明らかな耐性株はなくプロテアーゼ領域で二次変異を認めるのみで、また逆転写酵素領域でも明らかな一次変異は認めなかった。なお、インテグラーゼ領域においても、今年は全例で変異は認めなかった。今後四国全体の HIV 診療の充実を目的に、さらに薬剤関連変異を多くの施設で検討・把握し、HIV に対する治療効果を上げていくことが必要と考える。

### A. 研究目的

本邦における薬剤耐性 HIV の動向把握調査において、四国ブロックにおいても HIV 感染者が増加しつつあり、HIV 伝搬の現状を把握する目的で新規あるいは未治療 HIV 感染者の薬剤関連変異について調査し、解析検討した。さらに、これらの調査研究を行うことにより、四国全体の HIV 診療の充実に繋がることが期待される。

### B. 研究方法

対象は、平成 25 年 1 月から 12 月までに愛媛大学医学部附属病院を受診した HIV 感染者のうち新規あるいは未治療者とし、うち 8 名を検査した。薬剤耐性検査とサブタイプ解析は、初診時または服薬開始前の検体を用いて行った。検査の同意を得た後、検査は外部の委託機関と検査会社に委託した。

(倫理面への配慮)

患者には担当医から十分な説明を行った後、同意を得た者に検査を行った。なお、患者および関係者に対する人権の保護に配慮して行い、調査に協力できない場合も不利益にならないようにした。また本

研究は、愛媛大学医学部附属病院倫理委員会で承認を受けている。

### C. 研究結果

期間中の当院新規患者は 10 名であったが、すでに前医で治療を受けていた患者を除き 8 名に対して耐性検査を行った。問診と免疫学的検査結果からは、感染初期と判断される例はなかった。

耐性検査の結果(表 1)、プロテアーゼ領域では 8 例中 7 例で耐性に関する変異が見られたが、いずれも二次変異であった。それらのうち頻度の高い変異としては、I 1 5 V が 6 例、I 6 2 V が 4 例、V 7 7 I が 3 例に認められた。なお、昨年多かった L 6 3 P や A 7 1 T は今年の検査では認められなかった。また、逆転写酵素領域では T 2 1 5 D、V 1 7 9 D、M 1 8 4 V、T 2 1 5 N などが 1 例ずつに認められた。インテグラーゼ領域においては、昨年は V 7 2 I が複数例検出され、E 1 5 7 Q も 1 例で検出されたが、今年は全例で変異は認めなかった。なお、サブタイプ解析ではいずれも B であった。また、トロピズムの検査もいずれも R 5 であった。

表 1 薬剤耐性変異検査を行った新規未治療 HIV 感染者の解析 (平成 25 年)

	プロテアーゼ領域変異	判定	逆転写酵素領域変異	判定	インテグラーゼ領域変異	判定
1	I15V、M36I、V77I、I62V	S	—	S	—	S
2	L10I、I15V	S	—	S	—	S
3	I15V、I62V	S	T215D	S	—	S
4	I15V、G16E、M36I、I62V	S	—	S	—	S
5	—	S	—	S	—	S
6	I15V、A71I	S	Y179D	S	—	S
7	I15V、I62V、V77I	S	M184V、T215N	PR	—	S
8	V77I	S	—	S	—	S

#### D. 考察

今回、平成 25 年における新規あるいは未治療 HIV 感染者の薬剤関連変異について調査し、解析検討した。プロテアーゼ領域では 8 例中 7 例、逆転写酵素領域では 3 例で薬剤関連変異が認められたが、二次変異などであり薬剤耐性に高度となるような変異は今回の調査研究では認められなかった。なお、本年の解析では、プロテアーゼ領域で二次変異を認めるのみであったものの、昨年 7 例中 4 例に認めた L 6 3 P の変異を今年は全例認めないなど、昨年と比べやや変異の部位に差が見られた。インテグラーゼ領域では、昨年は E 1 5 7 Q の変異などが (薬剤耐性のレベルは低く有効性に影響はないものの) 初めて四国でも検出されたが、今年は全例で変異を認めなかった。

当院では現在累計 120 名以上の HIV 診療経験があり (県内の大半の HIV 診療を担当、四国の他県からも受診)、愛媛県の中核拠点病院の立場にある。HIV 感染者・エイズ患者が全国的に増加する傾向にあるなか、四国も例外ではなく、愛媛県においても新たに毎年 10 名前後の新規感染者・患者が報告される現状であり、HIV 診療の充実は早急に迫りつつある課題である。また、以前からの内服者や個々の食生活に応じた内服薬の希望、さらには他府県からの転居で同一薬剤継続の希望もあり現在 ART 療法 64 名において 23 パターンの多種類の薬剤組み合わせを行っているため幾分複雑な感は否めない (表 2)。今後は新薬の発売も見据えさらに薬剤耐性変異の有無を多くの施設で検討・把握し、より効果

的な治療を行いつつ四国全体の HIV 診療の充実に努めていくことが必要と考える。

#### E. 結論

平成 25 年における新規あるいは未治療 HIV 感染者の薬剤関連変異について調査し、解析検討した。今回の調査・研究を行った結果、プロテアーゼ領域では 8 例中 7 例、逆転写酵素領域では 3 例で薬剤関連変異が認められ、インテグラーゼ領域では変異は認めなかった。四国でも HIV 感染者は増加が著しく、薬剤関連変異を多くの施設で検討・把握し HIV に対する治療効果を上げていくことが必要と考える。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1) 論文発表

1. Nishijima T, Gatanaga H, Shimbo T, 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 : Switchig 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 8: e73639. doi:10.1371/journal. (2013)

表 2 当院における ART の組み合わせ (平成 25 年 12 月現在)

組み合わせ	人数
AZT+3TC+EFV	1
AZT+3TC+NFV	3
COM+EFV	2
COM+NFV	1
EZC+EFV	2
EZC+ATV+RTV	5
EZC+FPV	1
EZC+LPV/RTV	2
EZC+RAL	5
EZC+DRV+RTV+RAL+MVC	1
ABC+3TC+RAL	1
ABC+IDV+RTV+EFV	1
TVD+ATV+RTV	14
TVD+FPV+RTV	5
TVD+LPV/RTV	3
TVD+DRV+RTV	3
TVD+EFV	3
TVD+RAL	1
TDF+3TC+EFV	5
TDF+TDF+EFV	1
TDF+FTC+ATV+RTV	1
TDF+FTC+DRV+RTV+MVC	1
DRV+RTV+RAL	2
TOTAL	64

## 2) 学会発表

- 村上雄一、高田清式、末盛浩一郎、三好一宏、東太地、薬師神芳洋、長谷川均、安川正貴、髄液中の HIV-RNA 量、ネオプテリン値を経時的に測定した HIV 脳症の 1 症例。第 87 回日本感染症学会学術講演会・第 61 回日本化学療法学会総会 合同学会、横浜、2013 年 6 月
- 末盛浩一郎、村上雄一、池田宜央、高田清式、安川正貴、EB ウイルス感染との関連が示唆された食道多発潰瘍の 2 例。第 21 回日本消化器関連学会週間、東京、2013 年 10 月
- 小野恵子、橋本一晃、藤原光子、井門敬子、中尾 綾、高田清式、愛媛大学医学部附属病院における MSW 介入事例の現状と課題の一考察。第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会、熊本、2013 年 11 月
- 村上雄一、末盛浩一郎、安川正貴、佐藤裕一、安念 優、高田清式、井門敬子、森健一郎、HIV 感染症に潰瘍性大腸炎を合併した一症例。第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会、熊本、2013 年 11 月
- 高田清式、村上雄一、末盛浩一郎、安川正貴、辻井智明、西川典子、木村博史、井門敬子、中村真理子、藤原光子、中尾 綾、小野恵子、

HIV 関連神経認知障害 (HAND) における髄液中の HIV-RNA 量、ネオプテリン量の測定。第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会、熊本、2013 年 11 月

H. 知的所有権の出願・取得状況  
なし

