

北海道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 豊嶋 崇徳 北海道大学病院血液内科 教授

研究協力者 吉田 繁 北海道大学大学院保健科学研究院病態解析学分野 助教

佐藤かおり 北海道大学病院検査・輸血部 主任臨床検査技師

研究要旨

北海道ブロックにおける新規 HIV 感染者数の動向ならびに薬剤耐性 HIV の検出率の調査を目的として、新規感染者血液中の HIV の遺伝子解析をおこなった。2013 年 1 月～12 月に北海道大学病院を新規受診した HIV 感染者は 28 名であり、そのうち新規感染者は 22 名であった。これら新規感染者の HIV 遺伝子解析をおこなった結果、1 名から逆転写酵素阻害剤の薬剤耐性変異である L210W、1 名から T215E リバータントが検出された。本院における新規感染者数は、ここ数年横ばいであったが、今年度は過去最高数であった。

A. 研究目的

本邦における薬剤耐性 HIV の発生動向把握を目的とし、北海道ブロックにおける新規 HIV 感染者数の動向調査ならびに新規感染者血液中の HIV 遺伝子の解析をおこなった。

B. 研究方法

北海道ブロックにおける 2013 年度の新規 HIV 感染者数を調査した。調査期間中に本院を受診した新規 HIV 感染患者の血漿を凍結保存し、血漿中に存在する遊離 HIV-1 の pol, gag, env 領域の遺伝子配列を解析し、薬剤耐性変異の有無ならびサブタイプの決定をおこなった。

(倫理面への配慮)

本研究は北海道大学医学研究科・医学部医の倫理委員会により承認されたものであり、担当医から患者へ研究の説明を行い、同意書に署名をしていただいた患者について検査をおこなった。情報保護に関してはアクセスユーザー制限、パスワード設定、匿名コード化をおこなった。

C. 研究結果

2013 年 1 月～12 月に北大病院を新規受診した

HIV 感染者は 28 名であり、そのうち新規発生者は 22 名であった。エイズ動向委員会の報告では、2012 年 1 月～9 月における北海道ブロックでの新規 HIV/AIDS 感染者は 25 名であり、同時期での本院の新規 HIV 感染者は 12 名であったことから、本調査の新規感染者捕捉率は 48% であった。新規感染者 22 名はすべて男性であり、年齢は 30 歳代が最も多く 7 名 (31.8%) であり、次いで 20 歳代が 6 名 (27.3%) であった。感染経路は MSM 18 名 (81.8%)、異性間 4 名 (18.2%) であり、初診時に AIDS を発症していた患者は 8 名 (36.4%) であった。

これら新規感染者について、初診時もしくは治療開始時の血液を用い薬剤耐性検査により薬剤耐性変異の解析をおこなったところ、全患者から何らかの薬剤耐性関連変異 (international AIDS society-USA もしくは stanford drug resistance database にて採用されている変異) が検出され、うち 1 名からは逆転写酵素阻害剤の AZT や d4T に低度耐性を示す L210W が検出された。また、他 1 名からは薬剤耐性 HIV 感染を示唆する T215E リバータントが検出された (図 1)。HIV のサブタイプは全症例が B であった。また、HCV 抗体陽性者は確認されなかったものの HBs 抗原陽性者が 3 名確認された。

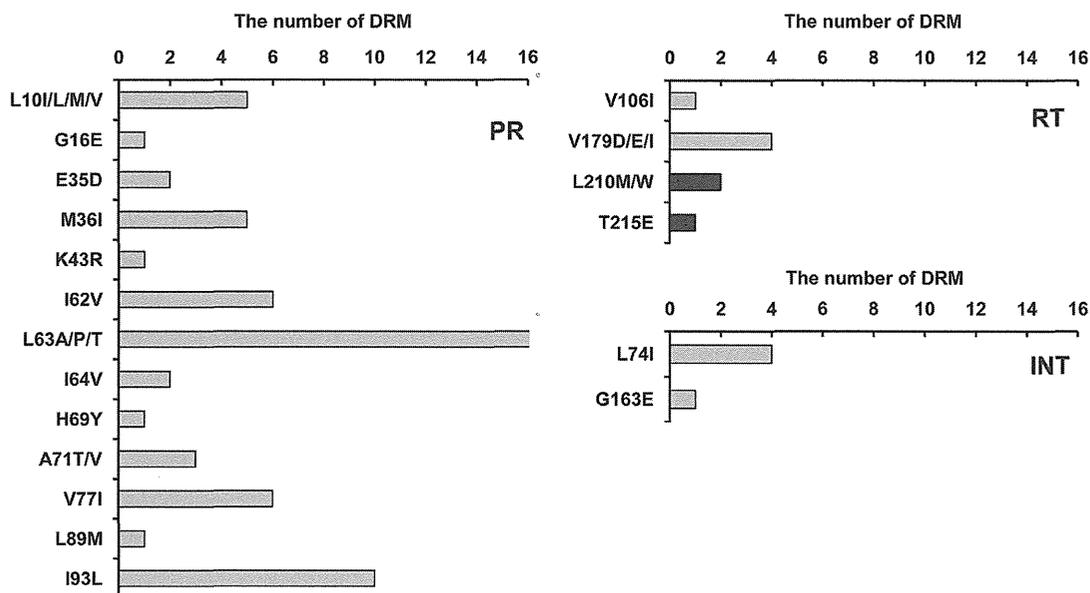


図1 2013年度新規 HIV 感染者 22 名から検出された薬剤耐性変異

D. 考察

本年度の新規感染者は 22 名と過去最高であり、1 名から耐性は低度ではあるものの薬剤耐性 HIV が検出された。本院における新規感染者は日本での傾向と同様に 30 歳代の日本人男性、同性間感染が多いが、今年度は 20 歳代の新規感染者の割合が例年と比較し増加していた。また、2011 年より 60 歳以上の新規感染者が毎年確認されている。感染経路に関しては、例年、その多くは MSM であり、異性間感染の割合は 30% 台であったが、本年は異性間感染が 18.2% に減少し MSM の割合が増加した。今後、若年層や高齢者の感染者数の動向については注意する必要があると考えられる。

HIV 遺伝子の解析から、1 名より薬剤耐性 HIV が検出され、他 1 名より T215E リバータントが検出された。T215X リバータントは他地域で比較的高頻度に検出される変異であるが、北海道ブロックでは 2009 年まで本変異は確認されなかった。しかしながら、2010 年 2 件、2012 年 1 件、2013 年 1 件と、ここ数年で頻繁に検出されるようになった。今年度の北海道ブロックでの新規感染者数は過去最高であったこと、T215X リバータントが近年毎年のように検出されていることから、北海道における薬剤耐性 HIV の伝播が増加傾向にあると示唆される。今後、更に調査を継続するとともに北海道ブロックにおける調査体制の充実が重要であると考えられる。

E. 結論

- 1) 2013 年度に北大病院を受診した新規感染者数は 22 名と過去最高数であった。
- 2) 20 歳代の新規感染者の増加が目立った。
- 3) 薬剤耐性 HIV (L210W) が 1 例、T215E リバータントが 1 例検出された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

- 1) 学会発表
 1. 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, 熊本, 2013.11.
 2. 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 23 回日本臨床化学会北海道支部例会, 札幌, 2013.12.
 3. 井上歩美, 吉田 繁: HIV 薬剤耐性検査のための精度管理サンプルの開発と評価. 第 23 回日本臨床化学会北海道支部例会, 札幌, 2013.12.

H. 知的所有権の出願・取得状況

なし

沖縄における薬剤耐性 HIV の動向調査研究

～平成 25 年度沖縄県における薬剤耐性 HIV-1 調査体制確立のための研究～

研究分担者 健山 正男 琉球大学大学院医学研究科 感染症・呼吸器・消化器内科学

研究協力者 仲村秀太¹, 田里大輔¹, 前城達次¹, 原永修作¹, 比嘉 太¹,
藤田次郎¹, 翁長 薫¹, 島袋末美², 上地幸平², 宮城綾乃²,
名護珠美², 山根誠久^{2,5}, 宮城京子³, 前田さおり³, 新江裕貴⁴

¹ 琉球大学大学院医学研究科 感染症・呼吸器・消化器内科学

² 同 検査部

³ 同 看護部

⁴ 同 薬剤部

⁵ 先進検査医学講座

研究要旨

今回、我々は前年度に引き続き当院での薬剤耐性の現状を把握するため、新規感染者における薬剤耐性サーベイランスを実施した。対象期間は 2013 年 1 月 1 日～2013 年 12 月 31 日で、同期間に 20 人が当院に HIV 感染者として初診外来受診した。新規感染者の定義を満たした 18 人に薬剤耐性 HIV 検査を施行した。Major な薬剤耐性関連変異は RT 領域では 3 人認められた。Pro 領域は 1 人に認められた。

当院の初診患者の届出地は 30% が県外である。本県は観光地であるため国内、国外からの人の入域が活発であり、薬剤耐性 HIV-1 が持ち込まれる可能性が危惧されている。引き続き新規登録患者の薬剤耐性調査を行うことが必要と思われた。

A. 研究目的

沖縄県の新規患者の 75% を診療する当院における新規 HIV-1 感染者における薬剤耐性変異の頻度を調査し、本県の HIV-1 薬剤耐性の浸淫度を明らかにする。

B. 研究方法

1. 当院を日本薬剤耐性 HIV-1 調査研究グループとして登録した。
2. 新規登録患者の定義：対象期間内（2013 年 1 月 1 日～2013 年 12 月 31 日）の期間に初めて感染が確認された者。
3. 検体のサンプリングポイント。下記のいずれかで行った。
 - a). 初診時
 - b). 治療開始時
4. 新規登録患者において、本調査の参加の同意を文書にて取得した。
5. 3. a) または b) のポイントで採血し、院内および国立感染症研究所エイズ研究センター第 2 研究グ

ループにて薬剤耐性 HIV-1 検査を行った。

6. 増幅対象

Protease 領域：アミノ酸 1 から 99 番
逆転写酵素領域：アミノ酸 1 から 240 番
Integrase 領域：アミノ酸 1 から 288 番

解析ソフトウェア：Seq Scape v 2.6 (Applied Biosystems)

7. 薬剤耐性遺伝子の判定法

- 1) The Agence Nationale de Recherche sur le SIDA (ANRS) 薬剤耐性評価 (<http://www.hivfrenchresistance.org/table.html>)
- 2) IAS-USA パネル
- 3) スタンフォード薬剤耐性データベース

8. 倫理面での配慮

- 1) 個人情報の取得について
利用目的を明確にしたうえで、必要とする範囲内に限り、適法かつ公正な手段によって、個人情報を取得した。
- 2) 個人情報の利用について
個人情報を取得する際に示した本研究の範囲内

で、研究の遂行上、必要な限りにおいて利用した。

3) 個人情報の第三者提供について

取得した個人情報は、適切に管理し、個人情報保護法に定める例外事項を除き、本人の同意を得ることなく、第三者に提供、開示しなかった。

4) 個人情報の開示・訂正・削除・利用停止について

本人から自己の個人情報について、開示・訂正・削除・利用停止などの申し出を受けた場合は、すみやかに必要な措置をとる旨説明したが、研究の全期間を通して申請者はいなかった。

5) 個人情報の管理について

個人情報の紛失、流出、改ざんおよび漏洩などを防ぐため、個人情報を保有するのは研究代表者のみとし、情報管理上問題は発生しなかった。

6) 法令等の順守について

個人情報保護に関して適用される法令、国のガイドラインを熟読し順守した。

C. 研究結果

対象期間内に当院外来を受診した HIV/AIDS 患者は 20 人であった (図 1)。その内、新規登録患者の定義を満たした 18 人全員に薬剤耐性検査を施行した。検体のサンプリングポイントは、全員、治療開始前に設定した。

薬剤耐性 HIV-1 検査を施行した 18 人の背景と結果を表 1～4 に示した。性別は男性 16 人であった。感染経路は 15 人が同性間であり、異性間は 3 人であった。病期は HIV キャリアーが 10 人、AIDS が 8

人であった。サブタイプは 1 人が AE で、15 人が B、B/AE、C が 1 人であった (表 1)。

HIV 指向性遺伝子検査：CCR5 指向性ウイルス (14 人)、CXCR4 指向性ウイルス (3 人)、1 人は遺伝子産物が得られず解析できなかった。

CD4 数の平均値は HIV キャリアーは 220cells/ μ l、AIDS は 213.8cells/ μ l であった。

一方 HIV-RNA 量の平均値は HIV キャリアーは 4.5×10^6 コピー/ml ($5.29 \times 10^2 \sim 2.6 \times 10^7$)、AIDS は 3.9×10^5 コピー/ml ($3.5 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^6$) であった。HIV キャリアーの HIV-RNA 定量が高いのは急性 HIV 感染症が HIV キャリアーの半数を占めたことによる。(表 2～4)

薬剤耐性 HIV-1 遺伝子変異では RT 領域では耐性に関与する変異：K101E、E138K、V179D、Y181C、K103N、V179E、R356E が認められた。Pro 領域では耐性に関連する変異は M36I、H69K、L89M が認めた。(表 5)。

HIV-RNA 陰性 (抗 HIV 抗体・WB 陽性) の急性 HIV 感染症が 1 例認められた。本患者は 5 回の HIV-RNA 定量で 1 回のみ 21copies/ml 認められた。proDNA は検出されなかった。

D. 考察

沖縄県における HIV 感染者の増加は 1999 年より顕著となり、2008 年以降、人口 10 万人あたりの新規 HIV/AIDS は全国的に上位を占めている。

琉球大学附属病院はエイズ拠点病院として 2013

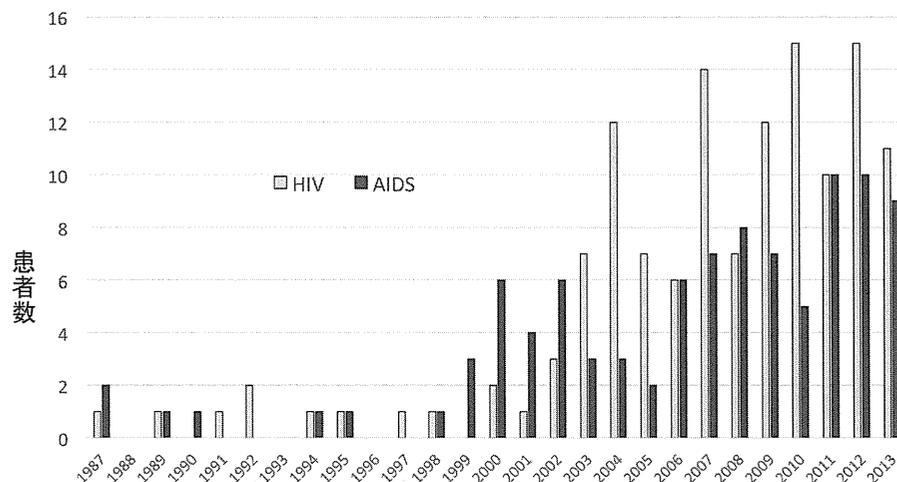


図 1. 琉球大学医学部附属病院の HIV/AIDS 初診患者数の年次推移
2013.12.31 現在 N = 222

年は県内の新規患者の 80%以上を診療しており、当院における検査結果は県内の状況を反映していると思われる。

以上の検査結果から沖縄県はこれまで薬剤耐性 HIV-1 の低浸淫地域であったが今回 4 人から耐性遺伝子を検出した。

当院の初診患者の届出地は血友病を除く 30% が県外からの移住患者である。本県は観光地であるため国内、国外からの人の入域が活発であり、薬剤耐性 HIV-1 が持ち込まれる可能性が危惧されている。引き続き新規登録患者の薬剤耐性調査を行うことが必要と思われた。

HIV-RNA 陰性 (抗 HIV 抗体・WB 陽性) の急性 HIV 感染症が一例検出された。本患者は 5 回の HIV-RNA 定量で 1 回のみ 21copies/ml 認められ、proDNA は検出されなかった。ウエスタンブロットは陽性であった。

今後、そのウイルス学のおよび宿主特性を継続して検査する予定である。

E. 結論

沖縄県はこれまで薬剤耐性 HIV-1 の低浸淫地域であったが、耐性変異が 22%に検出された。今後の動向に注視する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 原著論文

- Hibiya K, Teruya K, Tateyama M, Oka S, Fujita J. Enteral entrance of Mycobacterium avium in patients with disseminated mycobacterial disease. International Journal of Mycobacteriology. 121-122. 2013
- Hibiya K, Tateyama M, Teruya K, Mochizuki M, Nakamura H, Tasato D, Furugen M, Higa F, Endo H, Kikuchi Y, Oka S, Fujita J. Depression of Local Cell-mediated Immunity and Histological Characteristics of Disseminated AIDS-related Mycobacterium avium Infection after the Initiation of Antiretroviral Therapy. Intern Med . 52(16):1793-1803.2013.

H. 知的所有権の出願・取得状況

該当なし

表 1. 患者背景

<ul style="list-style-type: none"> ・新規登録患者数: 18人(男性16人、女性2人) ・ 国 籍 :全員が日本人 ・ 平均年齢 :37.0歳(20~53歳) ・ 感染経路 :MSM(15人)、異性間(3人) ・ ステージ : HIV ...10人 AIDS ...8人 ・サブタイプ :B(15人) AE(1人) B/AE(1人)・・・PR・RT領域→“B”判定 env・gag領域→“01_AE”判定 C(1人) ・HIV指向性遺伝子検査:CCR5指向性ウイルス(14人) CXCR4指向性ウイルス(3人) 	<p>※1人、遺伝子産物が得られず解析不能。</p>
---	----------------------------

表 2. 新規登録患者 薬剤耐性検査結果 (H I V)

Stage (subtype)	Age	CD4 (cells/ μ l)	指向性検査	HIV-RNA (copies/ml)	薬剤耐性関連変異			判定施設
					Pro	RT	INR	
① HIV (B)	41	372	R5	5.29×10^3	I15V, A71wt/T, A71T, I93L	none	none	virco 名古屋
② HIV (AE)	20	82	X4	2.17×10^4	I15V, K20R, M36I, H69K, V82I, L89M, I93L	V179I, L210M	none	virco 名古屋
③ HIV (B/AE)	43	253	R5	3.26×10^4	none	K103N	none	名古屋
④ HIV (B)	46	66	R5	1.62×10^5 (1.18×10^4)	I15V, D60E, V77I	K219Q	none	名古屋
⑤ HIV (B)	53	343	R5	9.14×10^4 (3.67×10^3)	I15V, V77I	V106I	none	琉大 名古屋

※()は髄液のウイルス量

表 3. 新規登録患者 薬剤耐性検査結果 (急性 H I V 感染症)

Stage (subtype)	Age	CD4 (cells/ μ l)	指向性検査	HIV-RNA (copies/ml)	薬剤耐性関連変異			判定施設
					Pro	RT	INR	
⑥ HIV (B)	37	155	R5	4.76×10^7 (4.46×10^2)*	I15V, M36I	none	none	琉大 名古屋
⑦ HIV (B)	47	252	R5	2.68×10^7	L10I, A71T, V77I	none	none	名古屋
⑧ HIV (B)	27	778	解析不能	(初診：検出せず) 2.17×10^1	I93L	none	L74M	名古屋
⑨ HIV (B)	36	475	R5	3.54×10^6	L63P, H69K, A71T, V77I	none	none	virco 名古屋
⑩ HIV (B)	23	369	X4	4.19×10^5	I62V, A71T	none	none	Virco 名古屋

* ()は髄液のウイルス量

表 4. 新規登録患者 薬剤耐性検査結果 (AIDS)

Stage (subtype)	Age	CD4 (cells/ μ l)	指向性検査	HIV-RNA (copies/ml)	薬剤耐性関連変異			判定施設
					Pro	RT	INR	
⑪ AIDS (B)	39	33	R5	5.91×10^5	L10V/L,I15V,I64I/V L10V, I15V, I64V	K101E,E138K/E, V179D,Y181Y/C	V72I	琉大 名古屋
⑫ AIDS (B)	44	53	R5	1.84×10^5	I15V, V82I/V, I93L I15V,I62V,V82I,I93L	none T69N	V72I	琉大 名古屋
⑬ AIDS (B)	48	174	R5	1.04×10^6 (2.07×10^4)	L10I,I15V,A71T,I93L	none	none	琉大 名古屋
⑭ AIDS (B)	29	7	X4	1.57×10^5	I15V, I62V, V77I	none	V72I	琉大 名古屋
⑮ AIDS (B)	37	143	R5	3.59×10^5 (2.50×10^4)	L10V, I15V, I93L	none	none	琉大 名古屋
⑯ AIDS (B)	30	55	R5	4.85×10^5	L63P	none	none	名古屋
⑰ AIDS (C)	34	65	R5	4.82×10^5 (4.34×10^4)	G16E,K20R M36I,V77I	V179D, V179E,R356K	none	名古屋 琉大 virco
⑱ AIDS (B)	32	9	R5	1.60×10^5 (2.77×10^4)	L10I,Q58E I62V,L63P,V77I	V106I	none	琉大 名古屋

表 5. 薬剤耐性変異のまとめ

耐性変異4例(Pro領域1例、RT領域3例)。

(ANRS: September2013-Version n° 23)

Pro領域: M36I, H69K, L89M

→ Tipranavir耐性

RT領域: K101E, E138K, V179D, Y181C

→ Etravirineに中度耐性

Efavirenz、Nevirapine、Ralpivirineに高度耐性

K103N

→ Etravirine、Nevirapineに高度耐性

V179E、R356E (virco社の判定)

→ Efavirenzに耐性

関東甲信越ブロックにおける薬剤耐性 HIV の 動向調査研究 ～新潟県における状況 2013～

研究分担者 田邊 嘉也 新潟大学医歯学総合病院感染管理部
研究協力者 大家 正泰 新潟大学大学院医歯学総合研究科地域疾病制御医学専攻・
国際感染医学講座

研究要旨

平成 25 年（2013 年）1 月～12 月の間に、新潟県内の病院で HIV 感染と診断された新規患者 13 名の血中ウイルスについて遺伝子塩基配列の解析をおこない、薬剤耐性変異の検出とウイルスの性状の分析をおこなった。この数は本調査の開始（2005 年）以来新規症例としては最多であり、昨年約 2 倍に当たる。対象となった症例のうち 2 例は急性感染と診断されたものであった。感染／発症者はすべて日本人男性で、年齢は 20 歳代 3 名、30 歳代 6 名、40 歳代 1 名、50 歳代 2 名、70 歳代 1 名であった。感染経路は 8 例が同性間、4 例が異性間の性感染で、1 名がバイセクシャルとなっている。海外での感染が 1 例で、残りは国内での感染であった。

解析の結果、感染ウイルスはサブタイプ B が 11 例、サブタイプ C が 1 例、CRF01_AE が 1 例と判定された。同性間感染の全例はサブタイプ B によるものであった。異性間感染のうち 2 例はサブタイプ B、2 例は他のクレイドのウイルスが感染していた。薬剤耐性変異は逆転写酵素阻害薬に対するものが 5 例で検出されたが、うち 1 例にはこれまではみられなかった強い耐性を生じる変異が含まれていた。

本年解析したウイルスの遺伝子塩基配列を従来の調査でえられた県内のウイルスのものと比較すると、1 例が既知のクラスターに属すると判定されたが、他については互いの遺伝学的関係が低く、またこれまでに知られる県内検出のウイルスと強い近縁関係は見いだせなかった。2009 年頃から県内感染と推定されるケースが漸次増加し、おもに東京など首都圏と考えられる県域外での感染は近年減少傾向にあったが、本年の検査数の増加は県外感染が再び増勢に転じたことがその主因といえる。また、検査症例の中には過去の血液検査の陰性結果から感染がここ 3、4 年以内であることが判明しているケースが 2 例あり、急性感染 2 例を合わせ、早期発見が重なったことも検査数が増加した要因のひとつとなっている。

A. 研究目的

抗 HIV 薬多剤併用治療の普及によるエイズ死亡の減少はめざましいが、治療を受ける患者数の増加とその長期化は一方で薬剤への耐性変異をもったウイルスの増加を招いている。その社会への漏出は今後治療の大きな障害として立ちはだかってくる可能性があり、実態の監視が急務といえる。われわれは 2004 年にはじまる厚生労働省「薬剤耐性 HIV の動向把握のための調査体制確立およびその対策に関する研究」に参加して以来、新潟県内であらたに発生

した HIV 感染／エイズ発症の全例について、感染ウイルスの分析と耐性変異の保有状況の調査をおこなってきた。大都市圏に比較して地方における感染事例の捕捉が手薄な中であって、われわれのデータはこの弱点を補い、国内で流行するウイルスのより正確な全体像の把握に寄与するものと自負している。長期にわたる定点観測的な調査は、耐性変異の問題にとどまらず、さまざまな観点から HIV 感染症の特徴や問題点を浮かび上がらせることにもつながっている。

本研究班の年次報告でこれまでしばしば述べたように、新潟県内で採取されたウイルスのほとんどは遺伝学的に大きく懸け離れており、それぞれ感染源を異にしている。この事実は、近年まで県内居住者間の感染はまれで、これまでに解析したウイルスは県外、おそらく東京など首都圏に由来するものであることを意味すると思われる。われわれのデータも現在構築が進んでいる国内 HIV のシーケンスデータベースに加えられており、その整備によって県内で採取されたウイルスの由来について時系列的なトレースが可能になると期待している。現在進行している HIV 感染の拡大は、大都市を含む一部の地域にほぼ限局しており、多くの地域では比較的少数にとどまったまま推移してきたが、最近のエイズ問題への関心の低下、危機感の減退を考えると、この状況が将来にわたって継続するかどうかは必ずしも楽観はできない。実際、新潟県における HIV 感染は拡大期に入る徴候を見せており、これには近年増加している県内での感染が主にかかわっていると考えてきたが、本年の調査結果からはさらに減少傾向にあった県外での感染も増加に転じた可能性もうかがわれる。本研究班の主要な課題である薬剤耐性ウイルスの現状分析に加えて、ウイルス遺伝子の解析で同時に明らかになる感染の疫学的側面をも視野に入れつつなお調査を続けたい。

(倫理面への配慮)

本研究は新潟大学医学部遺伝子倫理審査委員会の承認のもとに行っている。用いた血液サンプルの解析結果のうち薬剤耐性に関する情報は提供先医療機関に通知しており、治療薬剤の選択の目安として患者本人の利益に還元されるため、単なる調査研究の目的のみの利用とは性格をこととする。サンプル受け入れの際、患者の生年月日、性別、感染時期、感染ルートなど疫学研究に必要な情報の提供を求めているが、氏名、住所などただちに個人の特定に結びつく項目は含まれない。また文書で通知された内容は直ちにデジタル化した後、原書類をシュレッダーで切断廃棄しており、転記したファイルはスクランブル化して保存するなど、情報漏洩により患者が不利益を蒙る恐れを最小にとどめるよう配慮している。

B. 研究方法

医療機関から送付された EDTA 添加患者血液 (~7ml) を到着後直ちに遠心分離し (3,000rpm × 10min)、血漿を分離した。血漿 0.2 ml から High Pure Viral RNA kit® (Roche, 1858-882) を用いて RNA を抽出し、50 μl の溶出バッファーに回

収して -90°C で保存した。ウイルス RNA の塩基配列の決定は逆転写酵素 (RT)、プロテアーゼ、gp120(C2/V3)、マトリックス (p17) の各タンパク質をコードする領域についておこなった。RNA サンプル 5 ~ 10 μl を目的領域に特異的なプライマー対を用いて RT-PCR 法で増幅した後 (One-step RNA PCR Kit®, TaKaRa RR024A)、反応液の一部 (5 μl) に第 1 段の反応で増幅される領域の内部に設定した第 2 のプライマー対を加える nested PCR によって再増幅し、シーケンシングに供した。シーケンシング反応には nested PCR と同じプライマーを使用した。増幅したウイルス遺伝子の cDNA サンプルとプライマーを BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) の試薬と混合して反応させた後、反応産物をエタノール沈殿により回収、ホルムアミド溶液中で加熱変性し、ABI PRISM®310 Genetic Analyzer で解析した。

薬剤耐性変異の同定は基本的に International AIDS Society-USA の定義にしたがったが、適宜 Stanford 大学 (<http://hivdb.stanford.edu/>)、Max Plank 研究所 (<http://coreceptor.Bioinf.mpi-inf.mpg.de/>) が提供する薬剤耐性判定プログラムを参照した。決定した遺伝子配列相互の系統学的関係は、専用アプリケーション Mega4 を用いて推定をおこなった。

C. 研究結果

解析したサンプル

平成 25 年中、13 件の新規検体を解析した (表 1)。いずれも新潟県内の病院からの依頼を受け解析を行ったもので、被検者はすべて日本人男性である。全例が性行為による感染で、同性間の感染が 8 例、異性間の感染が 4 例、1 例はバイセクシャルと報告されている。年齢構成は 20 歳代 3 名、30 歳代 6 名、40 歳代 1 名、50 歳代 2 名、70 歳代 1 名と幅広い。最近目立っていた高齢に至って感染/発症が発見されるケースが変わらず見られるものの、むしろ 20、30 歳代の患者が急増したのが本年おこなった検査の大きな特徴となっている。感染場所は 1 例を除き国内で、海外 (おそらくミャンマー) 感染のケースは異性間の感染と考えている。

本年の検査で特筆すべきは、従来新潟県では報告がなかった急性感染症状によって感染が明らかになるケースが 2 件重なった点である。いずれも発熱など非特異的症状で医療機関を受診しており、抗体検査による確定診断が可能になる以前の時点で血中ウイルスの検出によって感染が確認されている。塩基配列の特徴から判定した感染ウイルスのクレイ

表 1 本年（2013 年）新規感染 / 発症者を対象におこなった検査数とその概要
(検体はすべて新潟県内の病院から委託されたもの)

Case No	性別	年齢	国籍	感染ルート	推定感染地	推定感染時期	感染様式	CD4/ μ l	Viral load (per ml)
1	男	39	日本	同性間	国内	不明	慢性感染	209	9,700
2	男	26	日本	両性間	国内	2013/1	急性感染	342	400,000
3	男	23	日本	同性間	国内	不明	慢性感染	165	69,000
4	男	37	日本	同性間	国内	不明	慢性感染	259	31,000
5	男	73	日本	同性間	国内	不明	慢性感染	107	400,000
6	男	23	日本	同性間	国内	不明	慢性感染	224	8,100
7	男	55	日本	異性間	国内	不明	慢性感染	34	79,000
8	男	49	日本	同性間	国内	2011	慢性感染	363	17,000
9	男	35	日本	異性間	国内	不明	慢性感染	355	3,600
10	男	33	日本	同性間	不明	2013/6	急性感染	636	520,000
11	男	32	日本	同性間	不明	不明	慢性感染	26	530,000
12	男	35	日本	異性間	国内	不明	慢性感染	1	170,000
13	男	57	日本	異性間	海外	不明	慢性感染	175	64,000

表 2 本年（2013 年）の検査で検出されたウイルスの性状
(症例に付した番号は表 1 に対応)

Case No	感染ルート	サブタイプ	薬剤耐性変異			
			PI (major)	NRTI	NNRTI	RAL
1	同性間	B				
2	両性間	B	—	—	—	—
3	同性間	B	—	T215E	—	—
4	同性間	B	—	Y115F、F116Y	V108I	—
5	同性間	B	—	—	V179D	—
6	同性間	B	—	T215E	—	—
7	異性間	B	—	T215E	—	(E157Q)
8	同性間	B	—	—	—	(E157Q)
9	異性間	B	—	—	—	(A128T)
10	同性間	B	—	—	—	(E157Q)
11	同性間	B	—	—	—	—
12	異性間	CRF01_AE	—	—	—	—
13	異性間	C	—	—	—	(L74I、V151I)

ドはサブタイプ B が 11 例、サブタイプ C が 1 例、CRF01_AE が 1 例であった (表 2)。同性間および両性間の感染は 9 例全例がサブタイプ B のウイルスにより、異性間の感染 4 例にはサブタイプ B とその他のクレイドに属するウイルスがそれぞれ半数ずつに関与していた。サブタイプ C のウイルスが検出されたのは新潟県では 2 例目であるが、いずれも感染者は男性で異性間の感染、推定される感染地は海外となっている。

薬剤耐性変異

薬剤治療継続中の症例、および他県医療機関からの依頼分を含め、われわれがこれまでに解析した検体

から検出された薬剤耐性変異の数を表 3 に掲げている。

今回の新規 13 症例のうち 4 例に逆転写酵素阻害薬に対する耐性変異が検出された (表 2)。このうち 3 例は T215E の変異を単独で含んでおり、2 件は男性同性感染、1 件は異性間感染とされるものである。T215E 変異は AZT、D4T などの薬剤に対してより強い耐性を生じる T215YF からの復帰変異と見なされるもので、本研究班に参加する全国の多くの施設でしばしば検出されてきたものである。新潟県で検出されたのは異性間感染とされる最初の症例 (2005 年) 以来のこととなるが、1 年間に 3 件も検出が重

表 3 これまでの検査 (2001 ~ 2013) で検出された薬剤耐性変異の累計

	未治療群 (N=65)	治療群 (N=33)	未治療群 (N=65)	治療群 (N=33)	未治療群 (N=65)	治療群 (N=33)		
NRTI			NNRTI		PI major			
M41L	0	4	K101EHP	0	2	D30N	0	1
D67L	0	4	K103N	(2) f	7	M46IL	0	5
T69_ins	(2) ab	(2) bc	V106IAM	3	0	I54ML	0	2
K70R	0	2	V108I	2	1	V82AFSL	0	2
L74V	0	2	V179DF	5(1) g	1	I84V	0	1
Y115F	1	0	Y188CLH	0	3	N88S	0	2
F116Y	1	0	P236L	0	1	L90M	0	2
M184VI	0	12						
L210W	(1) d	2						
T215YF	(4) e	3						
K219QE	0	2						

注 1 本表に掲げた症例数には、新潟県以外の都県の病院から依頼されておこなった検査分も含まれる。

注 2 薬剤耐性変異の定義は International AIDS Society-USA 2010 による。() 内の数字は定義部位に検出された非定型的なアミノ酸置換が認められた症例数を示す。a: T69A、b: T69N、c: T69S、d: L210F、e: T215E、f: K103R、g: V179A。

注 3 インテグラーゼ阻害薬 (ラルテグラビル) に対する耐性変異についても調査している (新規症例 24、既治療症例 11) が、これまでに検出例はない。

表 4 最終陰性日が確認されている検査症例数

調査年次	確認症例/全症例	最終陰性日から本調査までの期間				
		1年以内	1~2年	2~3年	3~4年	4年以上
2005	1/5	—	—	—	—	1
2006	0/5	—	—	—	—	—
2007	0/5	—	—	—	—	—
2008	0/4	—	—	—	—	—
2009	0/4	—	—	—	—	—
2010	0/4	—	—	—	—	—
2011	0/7	—	—	—	—	—
2012	2/6	1	—	1	—	—
2013	2/13	—	—	—	2	—

なった点は目を引く。ただし、これらの症例で検出されたウイルス間に明確な遺伝学的近縁関係は認められず、その意味については今のところ不明である。

もうひとつの症例では、逆転写酵素領域に V108I、Y115F および F116Y の 3 つの耐性変異が含まれていた。V108I は一部の非ヌクレオシド系の RT 阻害薬に対して弱い耐性を生じる変異で、過去にも新規症例から検出されたことがある。残る 2 つの変異はわれわれの調査では初めて検出されたもので、ヌクレオチド系の阻害薬、とくにアバカビル (ABC) に対して比較的強い耐性を生じることが知られる。V108I をはじめ、V106I、V179D などの

非ヌクレオシド系 RT 阻害薬に弱い耐性を生じる変異はこれまでもしばしば新規の症例に関わるウイルスから検出されている。薬剤治療下において、こうした変異が単独でウイルス遺伝子に定着することは考えにくく、元をたどれば多数の薬剤耐性変異を含んでいたウイルスが、未治療の感染者の間で伝播を繰り返すうちに、フィットネスを低下させる強い耐性変異が失われて残った姿と解するのが妥当と考えている。ABC が現在でも広く使われている抗エイズ薬であることを考えれば、この Y115F 変異を含むウイルスに関しては、薬剤治療中の感染者から直接伝播した可能性も考えられるかも知れない。いずれ

表 5 新潟県における HIV 感染の推移

分類	期間	期間中の代表的な感染様式				
		おもな感染経路	おもな年齢層	おもな感染場所	検出されるウイルス	その他
第 1 期	1980 年代～ 90 年代初頭	異性間	男性：20～50 代 女性：10 代後半～ 20 代前半	県外（東京 など首都 圏）	CRF01_AE 薬剤耐性変 異を含まな い	血液検査受診 歴なし 顕在化までに 長期間（平均 7 年程度）
第 2 期	1990 年代後半	男性同性間	20～30 歳代	同上	Subtype B NNRTI に 対する耐性 変異を高頻 度を含む	同上
第 3 期	2000 年代前半	男性同性間	40～60 歳代	半数近くが 新潟県内	Subtype B 薬剤耐性変 異を含まな い	同上
第 4 期	2010 年代	男性同性間	30 歳前後	県外（東京 など首都 圏）	Subtype B 薬剤耐性変 異を含まな い～低頻度	血液検査受診 等による早期 発見例が多い

にしても、このような強い耐性変異が新規症例で検出されたのは、調査開始以来本例が最初のものである。

新潟県で検出されるウイルスの特徴

本今年の 13 件を加え、これまでに新潟県内の病院を受診した HIV 感染者 74 名（新規症例 54 例、治療開始後症例 20 例）から検出されたウイルスの性状解析をおこなっている。図 4 にはこれらウイルスのプロテアーゼ-逆転写酵素領域（1-339 aa）に関する分子系統樹を掲げている。同様の解析は pol インテグラーゼ領域、env gp120 の C2V3 領域、gag p17 領域に 3 つについてもおこなっている。これらを通覧して見えてくる新潟県の HIV 感染の顕著な特徴は、比較的少数の感染者に比べて検出されるウイルスがきわめて遺伝学的多様性に富んでいる点であろう。感染源が個別的で共通性が見られないことは、それらの感染源が県外のウイルスの浸透が進んだ地域、人的往来の状況を考えれば東京を中心とする首都圏にあると解するのが妥当であろう。実際、検査時に付されたデータシートには推定感染地が東京であるとの記載がしばしば見受けられる。

この状況は基本的には現在まで変わらないものの、2009 年頃から解析している 4 遺伝子領域のいずれにおいても遺伝学的に近縁と見なしうるウイルスが検出されるようになってきた。図 4 の分子系統樹に A～C で示したクラスタがそれで、これまでに 10 症例からこうしたウイルスが検出されている。中でも A で示したクラスタは本年検出された 1 例（表 1、2 Case #8）を加え、6 例が互いに関連した

ウイルスによる感染であることを示しており、県内でもっとも活動的な感染集団を意味すると思われる。これら県内感染と見なされる症例はすべて男性同性間の感染で、検出されるウイルスはサブタイプ B にかざられている。

感染/発症者の多くが発見時点で高齢に達しているのも、これら県内感染と推定される症例の特徴で、10 症例の検査時の年齢は平均 50.5 歳、クラスタ A に含まれる症例では更に高く、平均 57.7 歳、最高齢は 74.5 歳にもなり、県外感染と判定された症例の検査時年齢の平均 37.3 歳を大きく上回る。調査の初期には 20～30 歳代の若年層が感染の大部分を占め、平均年齢は 30 歳前後であったが、図 5 に示すように 2008 年頃から急速に高齢化が進み、一時平均年齢は 50 歳を超えるに至っていた。しかし、本年県内感染と推定された症例は 49.1 歳の男性の 1 例にとどまり、20～30 歳代の感染/発症者が全体の 2/3 を占めた。このため本年の調査 13 症例の平均年齢は 30 歳代半ばにまで低下することになり、旧に復した感がある。

男性同性間感染の症例で高頻度に検出される NNRTI に対する耐性変異がこれまで全く検出されてこなかったことも県内感染症例の特徴のひとつといえる。2011、2012 年の新規症例から 1 例も検出されなかった薬剤耐性変異が 4 件と急増した理由もまた、県外感染の増加に関連すると思われる。

感染発見の早期化傾向

本年の調査に急性感染期であることが確認された症例が 2 例含まれることは前述したが、感染が比較

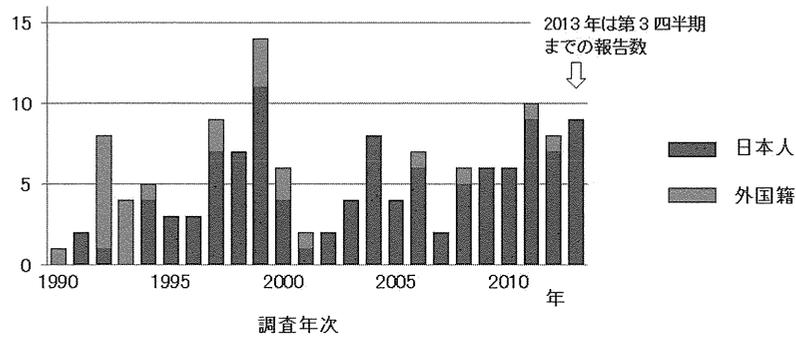


図 1. 新潟県で報告された新規 HIV 感染 / AIDS 発症の年次別発生数 (エイズ動向委員会報告による)

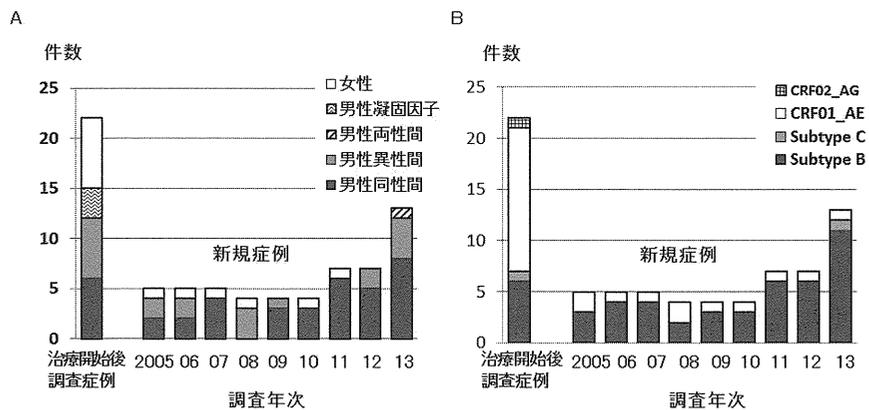


図 2. 調査症例の感染経路 (A)、および感染ウイルスのクレイド (B) の内訳

注 1 データはすべて新潟県内の病院を受診した患者についてのものである。
 注 2 治療開始後症例は本調査治療開始 (2005 年) 以前から治療を受けており、その後耐性検査で性状が明らかになった症例すべてを含む。検査自体は現在までの複数年にわたって実施されたものである。

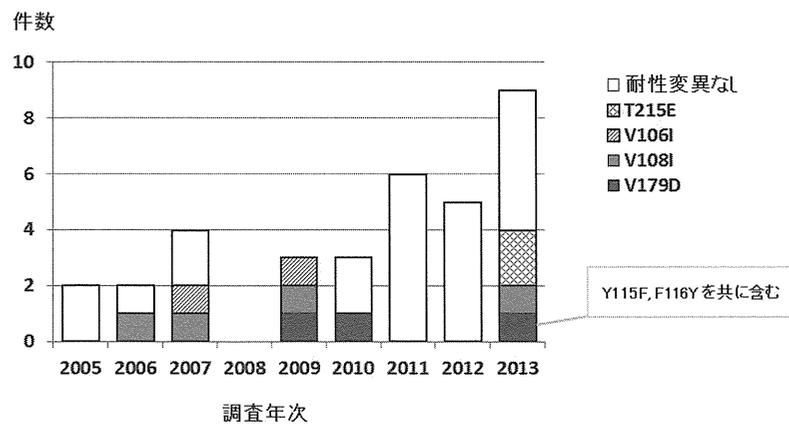


図 3. MSM 症例から検出された薬剤耐性変異の頻度

注 データはすべて新潟県内の病院を受診した患者についてのものである

的最近であると判断されるケースが他にも存在する。過去に血液検査を受診しており最終陰性日が知られるケースが 2 例あり (表 1、2 Case #9、10)、うち 1 例 (Case #10) は急性感染とされる症例であるが、もう 1 例は慢性感染としているものの感染は遡ってここ 4 年以内のことと判断できる。従来こうした最終陰性日が判明している症例に出会うことはほとんどなかったのであるが、前年の 2 件に続いて 2013 年にも複数例が現われたことは新しい傾向として注目される (表 4)。これらと別に、感染者自身からの聞き取りから感染の時点が 2011 年と推定されている症例も 1 例 (Case #8) 本年の調査に含

まれている。いずれの症例も血中 CD4 の数は 300 を超え (342 ~ 636)、免疫機能が極度に低下する以前の早期段階で受診したことが分る。

次の考察の項で述べるように、新潟県で発見される感染/発症の事例は実際の感染から平均 7 年程度が経過している可能性が高い。上述の症例は、従来通りの経緯であれば数年先に発見されたはずのもので、いわば前倒しの形で本年の調査に提供された結果、検査数を増加させる一因となっている。この影響を勘案すれば、本年の検査数をもって直ちに感染の急増と判断することはできない。

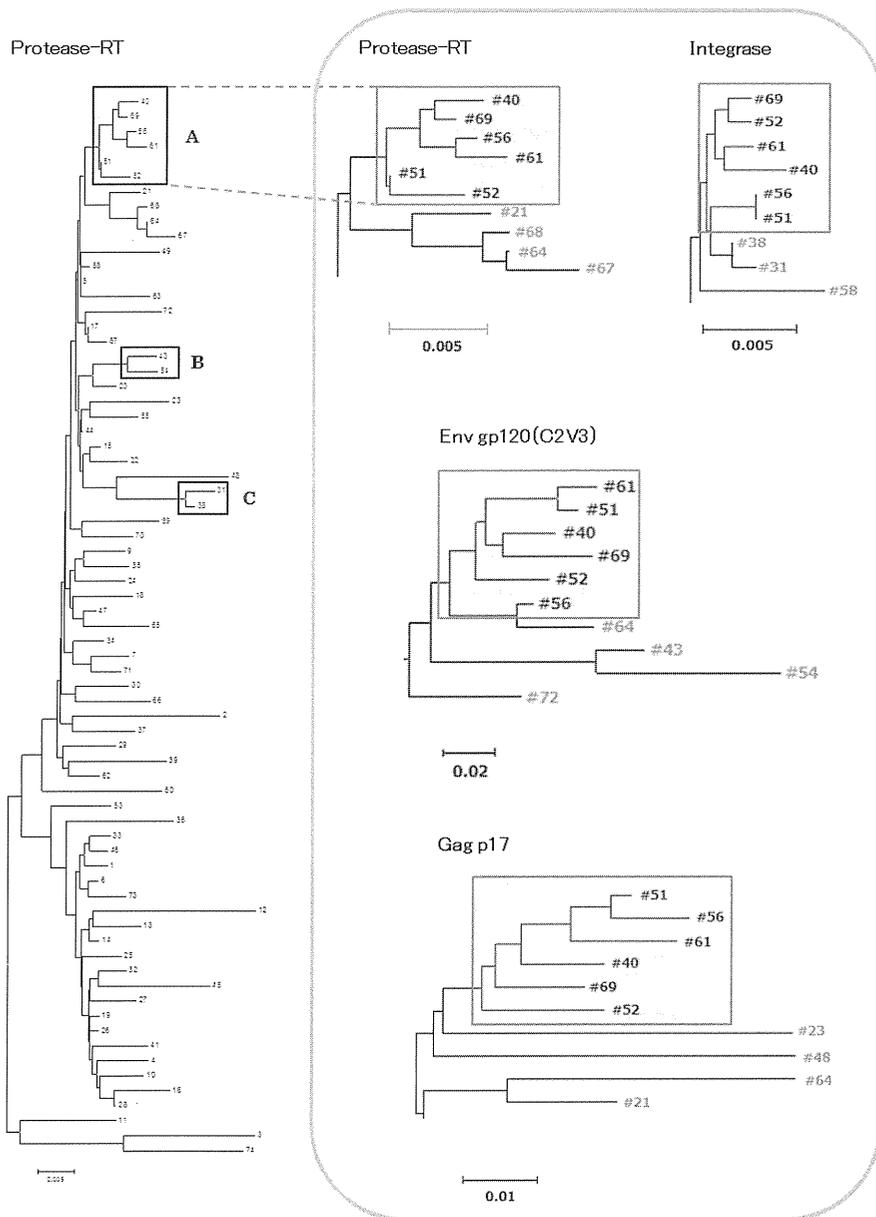


図 4. 新潟県で検出されたウイルスの系統学的関係

D. 考察

新潟県では 1990 年代の後半、HIV 感染／エイズ発症の報告数（エイズ動向委員会報告）が急増した時期がある。この時期の感染者の大半は異性間の感染によるもので、女性も高い割合（約 1/3）が含まれていたことが、調査開始後（2005 年以降）既治療症例として依頼された薬剤耐性検査を通じてわかっている。感染ウイルスの大半は CRF01_AE に属するもので、サブタイプ C や CRF02_AG など国内では稀なクレイドに属するウイルスも検出される一方で、当時国内感染の大部分を占めていたサブタイプ B のウイルスはむしろ少数であった。RNA 配列から見たウイルス相互の遺伝学的関係はきわめて希薄で、その由来は新潟県との人的交流が活発で HIV の浸透がもっとも進んでいた東京にあったことはほぼ間違いないと思われた。感染／発症者数は 2000 年に急減し、その後年ごとに若干の増減はあるものの、最近まで低い発生数のまま推移してきた。2001 年から 2010 年までの 10 年間に報告された新潟県の新規感染・発症の合計は 47 件にとどまり、人口 10 万人当りの発生率 1.97 で、この値は全都道府県中島根県（1.38）、佐賀県（1.87）に次いで低いものとなっている。

このような新潟県の感染動向は 2 つの点で特異なものにみえる。ひとつは 1990 年代を通じて国内の HIV 感染が圧倒的に男性同性間の感染が中心のものになっていった中で、なぜ新潟県では 2000 年代の半ばまで異性間の感染が優勢であったかという点、またひとつは 2000～2010 年の間大都市圏を中心にみられた男性同性間感染の急速な増加の影響が新

潟県に及ばなかった理由は何かという点である。第 1 の点については以後の調査から理由が明らかになっている。新潟県内の病院から新規症例として送られてくる検体はすでにエイズを発症しているか、またはそれに近い段階まで免疫機能が低下したケースがほとんどで、感染から相当の期間を経ている。つまり実際の感染時期を考慮すると 1980 年代後半急速に拡がった国内の風俗店、海外へのセックスツアーなどによる HIV 感染と、その阻止に向けて 90 年代初めに活発におこなわれた啓発活動と時期的に重なることになる。感染から発見までのこの時間差を考慮することにより、2000 年代の半ばまで新潟県の HIV 感染が異性間感染中心のものであった理由が無理なく理解できることになるが、男性同性間の感染が現時点でも少ない理由については人口の密度や発展場の有無等で説明できる可能性があるが推察の域はでない。

表 5 は 9 年間にわたるわれわれの調査の間に観察された新潟県の感染動向を整理したものである。第 1～第 3 期とした期間の感染については、調査されるまでに 7 年程度のタイムラグがあるものとしてその時期を示している。すべての調査症例についてこの基準を適用した場合、2000 年代後半以降の感染をわれわれはまだ目にしていないことになるが、前年に引き続き本年も早期発見と見なされる症例が相次いだため、仮にこれを第 4 期の感染としてその性状も表に含めている。相当する期間に起きているはずの感染の多くは今後数年を経て調査に提供されるはずで、その結果によっては記載内容の変更が必要になるかも知れない。第 2 期以降、男性同性間の感

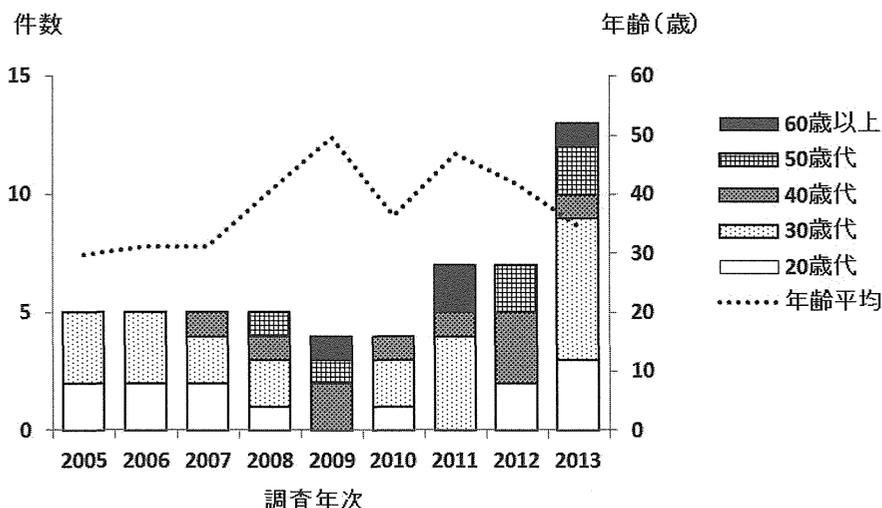


図 5.

染が主となりこの傾向は現在定着しているが、検出されたウイルスの遺伝子塩基配列を比較した結果、新潟県で検査された症例中県外感染と判定されるケースは、2000 年代初め頃から東京など大都市圏での増加に反してむしろ減少傾向を示し、これを補うように県内で拡がったと推定される症例が増加していることが分った（第 3 期）。感染態様の変化は検出されたウイルスの分子遺伝学的解析によって明らかになったものであるが（図 4）、RT 遺伝子領域の薬剤耐性変異の検出頻度（図 3）や感染／発症者の年齢分布（図 5）などにもその形跡が顕著に表れている。

県内感染と判定される最初の事例は 2009 年に見いだされているが、以来毎年その数を増し本年の調査の 1 例を加えて 10 症例が同定されている。感染が広がり始めたのは 2000 年代初め頃と推定されるが、その時点までこうした感染が見られなかった理由は感染者の多くが高齢であることに求められると思われる。これらの感染者を含むサークルはおそらくさらに以前から県内に存在したと思われるが、メンバーの行動範囲が居住地周辺の比較的狭い範囲に限局していたため、大都市圏での HIV の蔓延の影響を遅くまで免れてきたのかも知れない。県内感染と判定される事例が増加していく中、とくに拡大が顕著なクラスター（図 4、クラスター A）が現われたことから、この中にスーパースプレッダー的な存在が含まれることも危惧される。このクラスターに属する感染の発生状況を追跡すると、2009 年に 1 件、2011 と 2012 年に各 2 件、2013 年に 1 件と、等比級数的に数を増しているようには今のところ見えないので、感染者の検査時年齢の平均が 58 歳というメンバーの構成も考慮すれば、この懸念はそれほど過大視するには当たらない可能性が大きいものの、引き続き注意を払っていく必要がある。

近年の県内感染例の増加と県外からの流入の減少傾向を受けて、将来新潟県の HIV 感染が増加に向かうとすればクラスター A に見られるような県内における男性同性愛者間の感染拡大が最大の要因になると予測していた。しかし、本年の調査結果に限っているならば、検出されたウイルスの遺伝子塩基配列は、1 例を除いて県内で既知のものとは明らかに異なる系列に属しており、前年に比べ倍増した症例の中に県内感染拡大を示す兆候は見られない。検査症例の 3 / 4 は男性同性間の感染によるものであるが、RT 領域に薬剤耐性変異が高頻度に含まれる点や若年の感染者が多い点などはむしろ第 2 期の感染の特徴に近い。また最近年間 1 ～ 2 例程度の発生であった異性間感染が 4 例も含まれることも感染動向に変化が

生じていることを示唆している。同性間／異性間の記載は基本的に感染者の申し立てに基づいており、とくに異性間とされる男性の感染には疑いをもたれるケースが多いとされるが、本調査に供される症例はすべてエイズ拠点病院の経験を積んだ医師の診断を経たもので、従来結果を見ても感染ルートの判定はおおむね信頼できると判断している。異性間感染も含めて過去のある時点から県外での感染が増加に転じ、それが明らかな形で反映し始めたとするならば、それは 1990 年代から 2000 年代半ばにかけて歯止めとなっていた何らかの要因の効力が減じた結果と受け取れる。原因はひとつではないかも知れないが、エイズという疾患に対する警戒心の低下がもっとも考えられるのではないだろうか。

新潟県における保健所等における血液検査の受診状況は、数の上では全国水準と比較して決して見劣りするものではないにもかかわらず、従来それによって感染が発見されるケースはきわめて少なかった。本来検査を受診すべき集団と実際の受診者との間にミスマッチがあったことは明らかであるが、前年に続き本年も 2 件の血液検査の複数回受診によると思われる早期発見例が現われたことは、この問題の解消の兆しが現われたようにうけとれる。感染の早期発見傾向は治療面でのメリットはいうまでもないが、感染動向をリアルタイムに近い形で把握したいわれわれの調査にとっても望ましい。

E. 結論

新潟県において 2000 年代を通じて低い水準で推移してきた HIV 感染の発生が、最近再び増加の段階に入っていることが本年の調査でより明瞭になった。その主な原因として、一時減少傾向にあった県外、おそらく東京など首都圏での感染が、男性同性間、異性間の感染がともに増加に転じたことが示唆された。背景には薬剤治療の進展によってエイズという疾患への警戒心の低下があると考えられ、現状に即したエイズ防止対策の必要を感じる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Nishijima T, Takano M, Ishisaka M, Komatsu H, Gatanaga H, Kikuchi Y, Endo T, Horiba M, Kaneda S, Uchiyama 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-naive Japanese Patients with HIV-1 Infection: A Randomized Multicenter Trial. Intern Med. 52:735-44, 2013
2. Takeshi Nishijima, Hiroyuki Gatanaga, Takuro Shimbo, Hirokazu Komatsu, Tomoyuki Endo, Masahide Horiba, Michiko Koga, Toshio Naito, Ichiro Itoda, Masanori Tei, Teruhisa Fujii1, Kiyonori Takada, Masahiro Yamamoto, Toshikazu Miyakawa, Yoshinari Tanabe, Hiroaki Mitsuya, Shinichi Oka, on behalf of the 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 8:e73639, 2013
- 2) 学会発表
1. 西島 健、瀧永博之、遠藤知之、堀場昌英、古賀道子、内藤俊夫、井戸田一朗、鄭 真徳、藤井輝久、高田清式、山本政弘、宮川寿一、田邊嘉也、満屋裕明、岡 慎一：テノホビル/エムトリシタビン・ロピナビル/リトナビル内服例を現行レジメンとラルテグラビル・ダルナビル/リトナビルに無作為割付する多施設共同臨床試験、第 27 回日本エイズ学会学術集会 熊本 2013 年 11 月 20-22 日
 2. 永井孝宏、児玉泰光、山田瑛子、村山正 晃、池野良、田邊嘉也、高木律男：新潟大学医歯学総合病院歯科における HIV 感染症患者の臨床的検討、第 27 回日本エイズ学会学術集会 熊本 2013 年 11 月 20-22 日
 3. 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、岩田 敏、加藤真吾：抗 HIV 薬の唾液中薬剤濃度の検討、第 27 回日本エイズ学会学術集会 熊本 2013 年 11 月 20-22 日
 4. 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 熊本 2013 年 11 月 20-22 日
 5. 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、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 熊本 2013 年 11 月 20-22 日
 6. 齋藤直美、笹原浩康)、荒川圭子)、外山 聡、佐藤博、田邊嘉也：新潟大学医歯学総合病院におけるリルピビリンの使用状況、第 27 回日本エイズ学会学術集会 熊本 2013 年 11 月 20-22 日
 7. 石塚さゆり、川口 玲、内山正子、田邊嘉也：新潟県内病院における HIV 感染症の知識に関する調査、第 27 回日本エイズ学会学術集会 熊本 2013 年 11 月 20-22 日
 8. 須貝 恵、吉用 緑、センテノ田村恵子、鈴木智子、辻 典子、井内亜紀子、濱本京子、田邊嘉也、伊藤俊広：拠点病院診療案内からみる拠点病院の現状、第 27 回日本エイズ学会学術集会 熊本 2013 年 11 月 20-22 日
- H. 知的所有権の出願・取得状況
なし

高感度薬剤耐性 HIV 検査法を用いた 微小集族薬剤耐性 HIV の検出と存在比率に関する研究 ～定量 PCR を応用した高感度薬剤耐性検査法の開発～

研究分担者 西澤 雅子 国立感染症研究所エイズ研究センター 研究員

研究要旨

本研究では、患者血漿中に 5% 以下の割合で存在する薬剤耐性変異 HIV を検出することを目的として、定量 PCR の原理を用いた高感度薬剤耐性検査法（高感度法）を開発し、患者血漿中に微小集族として存在する薬剤耐性 HIV の検出を試みてきた。この高感度法では、通常の薬剤耐性検査で使用されるダイレクトシーケンス法（通常法）では検出が難しい、患者血漿中に 20% 以下の比率で存在する微小集族薬剤耐性 HIV を検出可能である。このような通常法では検出できない微小集族薬剤耐性 HIV が、患者の将来の抗 HIV 療法（cART）に悪影響を及ぼす可能性が示唆され、より効果的な抗 HIV 薬剤（ARV）の選択のためには微小集族薬剤耐性の検出が重要であると考えられている。現在、高感度法で逆転写酵素阻害剤（NRTI, NNRTI）に対する耐性変異 M41L, K65R, K70R, K103N, Y181C, M184V, T215F/Y の 8 変異とプロテアーゼ阻害剤（PI）に対する耐性変異 M46I/L, L90M の 3 変異が解析可能となっている。NRTI のラミブジン（3TC）、エムトリシタビン（FTC）、アバカビル（ABC）は、最新の cART でも初回療法によく用いられる ARV であり、これらの薬剤に耐性を示す M184V 変異の有無を検査で正確に判定することは、効果的な cART 選択のために重要である。しかし M184V 検出プライマーが結合する部位は高度に多様性があり、現在の M184V 検出プライマーで検出できない患者検体が存在することが明らかになった。そこで、より正確で高感度な M184V 検出系を確立するためにプライマーの改良を試みた。

A. 研究目的

NRTI のラミブジン（3TC）、エムトリシタビン（FTC）、アバカビル（ABC）に対する薬剤耐性変異の M184V は、単独でこれらの ARV に対して高度耐性を与える薬剤耐性変異であり、耐性検査で M184V の有無を正確に判定することは効果的な cART を行う上で重要である。しかし現在の高感度法で使用されている CDC で開発された M184V 検出プライマーは、日本の患者検体から M184V を検出できない、あるいは感度が不足していることが明らかになった。昨年度 CDC で開発されたプライマーを元にして新たにプライマーを再設計して解析を行ったが、まだ M184V を検出できない症例が存在することが

明らかになった。今年度は、M184V 検出用プライマーの結合部位の多様性を LOS ALAMOS の HIV database に登録されている日本人由来のデータから解析し、日本人患者検体の M184V 検出に適した系の開発を試みた。

（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。

B. 研究方法

(1)M184V 検出用プライマー結合部位配列の多様性について、LOS ALAMOS に登録されている日本人患者由来の HIV 配列をもとに解析した。924 例分の、M184V 検出プライマー結合領域の塩基番号 3072-3100 の 29 塩基長の Fasta file を LOS ALAMOS データベースより入手し、それぞれの塩基位置の塩基の出現比率を計算した。また、従来の M184V 検出プライマーで検出できない、あるいは Cut Off 値に近い ΔCt 値を示す臨床患者検体の M184V 検出プライマー結合部位の塩基配列を比較し、共通に持つ多型について解析した。これらの解析結果を元に、M184V 検出に影響のある塩基多型を持つ配列にも結合可能な、塩基多型部位に混合塩基を持つプライマーを複数作製し、各々のプライマーの混合比を決定した。

(2)(1) で作製した新規 M184V 検出系の性能を検討するために、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、開発した新規 M184V プライマーを用いた高感度法を検討し ΔCt 値を比較した。また、大阪医療センターから依頼を受けた 4 症例に関しても同様に検討を行った。特異性の解析には、新規未治療患者由来の各々異なる 8 症例から得た PR-RT 領域をクローニングした 8 種類のベクターを用い、野生型の RT 領域に

対する新規 M184V 検出プライマーの非特異的な増幅について解析した。新規 M184V 検出プライマーの検出限界解析には、HXB2 の PR-RT をクローニングしたベクター (WT) と、これに site-direct mutagenesis で M184V を導入したベクター (HXB2-M184V) 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

(1)LOS ALAMOS の HIV データベースより、日本人 HIV 感染患者由来の M184V 検出プライマーの結合領域の配列を 924 例分入手し、M184V 検出プライマーの結合領域の多型を解析した (表 1-1)。その結果、多型は結合領域全体に存在していた。しかしその中でも、塩基番号 3075、3081、3084、3085、3087、3090 に多型がある配列の臨床検体では、M184V 検出効率が悪いことが明らかになった (表 1-2)。そこで、この部位に特に着目してプライマーの再設計を行った。すべての多型を持つ臨床検体はなく、いくつかの組み合わせで多型を示すことが分かったので、6 種類のプライマーを設計し、それぞれを多型の出現比率を計算して混合比を決定

表 1-1 LOS ALAMOS HIV データベースより取得した M184V 検出プライマー結合領域の多型

塩基番号(HXB2)	塩基の比率(%)																															
	A	A	A	T	C	C	A	G	A	C	A	T	A	G	T	T	A	T	C	T	A	T	C	T	A	T	C	A	A	T	A	C
A	93.4	99.2	100	0	0.54	0.22	98.4	0.97	99.2	14.4	93.6	0	91	4.44	0	0	99	0	0.76	0	99.5	0	0	100	94.7	0	100	0	97.4			
G	4.98	0	0	0	0	0	0.97	98.7	0.43	1.3	0.87	0	5.41	93.1	0	0	0.11	0	0	0.32	0	0	0	3.68	0	0	0	2.38				
C	0.32	0.11	0	5.3	98.4	99.6	0.22	0	0	79.7	2.71	0	0.11	0	0	0	0.22	0	98.4	0	0	7.25	100	0	0	0.22	0	99	0			
T	0	0.43	0	93.2	0.54	0.11	0	0	0	2.06	0.98	100	0.11	0.32	98.2	97.6	0	99.9	8.77	99.9	0	91.8	0	0	0.11	99.8	0	0	0			
R (A/G)	0.87	0	0	0	0.11	0	0.32	0.32	0.32	0.11	0.33	0	2.92	2.16	0	0	0.43	0	0	0	0.22	0	0	0	1.52	0	0	0	0.22			
Y (C/T)	0	0	0	1.52	0.32	0	0	0	0	0.43	0.22	0	0	0	0.32	1.63	0	0.11	1.52	0.11	0	0.97	0	0	0	0	0	0	0.97	0		
K (G/T)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.11	0	0	0	0	0.43	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
M (A/C)	0.22	0.11	0	0	0.11	0.11	0.11	0	0	1.74	1.08	0	0	0	0.11	0	0.22	0	0.54	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
S (G/C)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
W (A/T)	0.22	0.11	0	0	0	0	0	0	0	0	0.22	0	0.43	0	1.41	0.33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	

表 1-2 従来の M184V 検出プライマーで検出困難な患者検体の M184V 検出プライマー結合領域の多型

塩基番号(HXB2)	塩基の比率(%)																													ΔCt値* (M184V-original)			
	A	A	A	T	C	C	A	G	A	C	A	T	A	G	T	T	A	T	C	T	A	T	C	T	A	T	C	A	A		T	A	C
A-2	A	A	A	T	C	C	A	G	A	C	A	T	A	G	T	T	A	T	C	T	G	C	C	A	A	T	A	C	G			11.61	
D-1	A	A	A	T	C	C	A	G	A	C	A	T	A	G	T	T	A	T	C	T	A	C	C	A	A	T	A	C	G			14.75	
E-2	A	A	A	C	C	C	A	G	A	C	A	T	A	G	T	T	A	T	C	T	A	C	C	A	A	T	A	C	G			14.11	
G-1	A	A	A	T	C	C	A	G	A	C	A	T	A	A	T	A	T	A	T	Y	T	A	T	C	A	A	T	A	C	G			5.64
OSAKA-3	A	A	A	T	C	C	A	G	A	C	A	T	G	A	T	A	T	A	T	C	T	A	T	C	A	A	T	A	C	G			9.7
OSAKA-4	A	A	A	C	C	C	A	G	A	C	A	T	A	G	T	T	A	T	T	T	A	T	C	A	A	T	A	C	G			17.69	

*: M184V-originalのΔCt値のCut offは8.5