

表 1-3 LOS ALAMOS HIV データベースおよび日本人患者サンプルの多型をもとに設計したプライマー一覧

塩基番号(HXB2)	A	A	A	T	C	C	A	G	A	C	A	T	A	G	T	T	A	T	C	T	A	T	C	A	A	T	A	C	A	混合比率(%)
M184V-1Fnew	A	A	A	Y	C	C	A	G	A	M	A	T	A	G	T	T	A	T	Y	T	R	T	C	A	A	G	C	C	G	25
M184V-2Fnew	A	A	A	T	C	C	A	G	A	M	A	T	A	G	T	T	A	T	C	T	R	Y	C	A	A	G	C	C	G	25
M184V-3Fnew	A	A	A	Y	C	C	A	G	A	M	A	T	R	R	T	T	A	T	C	T	R	T	C	A	A	G	C	C	G	30
M184V-4Fnew	A	A	A	T	C	C	A	G	A	C	A	T	A	G	T	T	A	T	C	T	R	T	C	A	A	G	C	Y	G	10
M184V-5Fnew	A	A	A	T	C	C	A	G	A	A	A	T	A	A	T	T	A	T	C	T	R	T	C	A	A	G	C	C	G	5
M184V-6Fnew	A	A	A	T	C	C	A	G	A	G	A	T	G	A	T	A	A	T	T	T	R	T	C	A	A	G	C	C	G	5

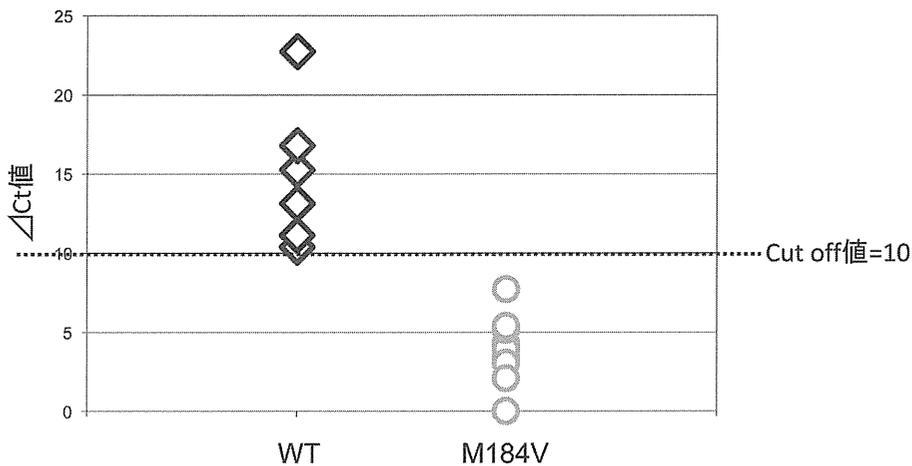


図 1 WT と M184V を持つクローンの ΔCt 値の比較

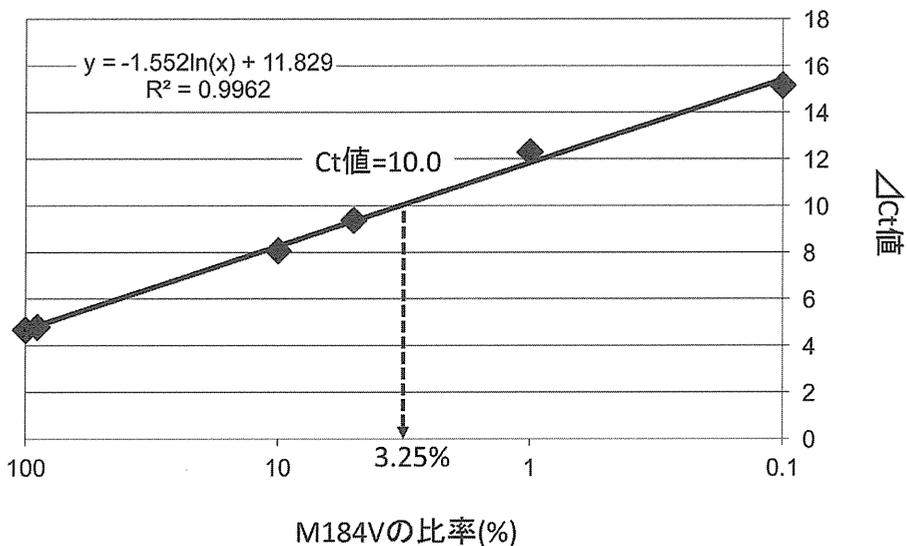


図 2 M184V-Ver2F の理論的定量限界の解析

した(表1-3)。このM184V検出プライマーとして用いるプライマーミックスをM184V-Ver2Fとした。

(2)M184V-Ver2F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7症例から得たPR-RT領域をクローニングした7種類のベクターサンプルをM184V-Ver2F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 $\Delta$ Ct値が10を上回った( $\Delta$ Ct値の平均値は14.25)。M184V変異を持ち、またM184V検出プライマー結合部位の配列が異なる8症例由来の8検体を用いて解析した結果、 $\Delta$ Ct値は全て10以下(平均値は4.37)だった。M184V陽性・M184V陰性で $\Delta$ Ct値に大きな差が認められ、また非特異的な検出は見られないことが確認された(図1)この結果から、M184V-Ver2FによるM184V解析のCut off値を $\Delta$ Ct=10と決定した。M184V-Ver2Fの理論的定量限界を解析するために、HXB2のPR-RT領域をクローニングしたWTクローン(HXB2-WT)と、このクローンにsite-direct mutagenesisでM184Vを導入したM184Vクローン(HXB2-M184V)を作製した。これらのベクターを段階的に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-Ver2F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 $\Delta$ Ct値と希釈倍率とをグラフにプロットし、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、HXB2-M184Vを用いて計算される理論的検出限界は3.25%だった(図2)。

(3)臨床検体由来のサンプルでもM184Vが検出

可能かどうかを検討するために、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、M184V-Ver2Fを用いた高感度法を検討し $\Delta$ Ct値を比較した。また、平成24年度にM184V解析の依頼を受け、従来M184V検出プライマーでは解析できなかった大阪医療センターの4症例についても同様に検討を行った。その結果、CDCで開発されたオリジナルのM184V検出プライマー(M184V-original)、平成24年度に開発したM184V検出プライマー(M184V-new)では解析できなかったOsaka-3とOsaka-4についてもM184Vが検出された。また、国立感染症研究所エイズ研究センターの臨床患者検体7例のM184Vも問題なく検出可能だった(表2)。

#### D. 考察

今年度新たに開発したM184V検出プライマーを用いることで、これまでのM184V検出プライマーでは対応できなかった臨床検体でも解析が可能になった。M184V検出プライマーの結合部位は全体に渡り多型が存在していたが、その中でもM184V検出に大きく影響する部位は6か所と考えられた。また、これらの多型を全て持つような臨床検体は極めてまれで、この6か所の変異のうち数個を持つ組み合わせが複数存在していた。そこで、臨床検体で見られる多型の組み合わせを持つプライマーを設計したことで、これまでM184Vを検出できなかった臨床検体でもM184Vを検出できるようになったと考えられる。ALAMOSのデータベースの解析の結果、これらの多型を持つ臨床検体の割合は15%以

表2 M184V検出プライマーの結果比較

サンプル番号	M184V Primerターゲット領域の配列	M184V-Original <sup>(1)</sup>	M184V-new <sup>(2)</sup>	M184V-Ver2F <sup>(3)</sup>
HXB2	AAATCCAGACATAGTTATCTATCAATACA	-	-	-
A-1	AAATCCAGACATAGTTATCTACCAATACG	8.27	2.11	ND
A-2	AAATCCAGACATAGTTATCTGCCAATACG	11.61	2.12	2.07
B-1	AAATCCAGACATAGTTATCTACCAATACG	10.29	2.85	4.28
C-1	AAATCCAGACATAGTTATCTATCAATACG	7.99	3.28	3.4
C-2	AAACCCAGACATAGTTATCTATCAATACG	9.93	5.49	3.93
D-1	AAATCCAGACATAGTTATCTACCAATACG	14.75	7.99	7.71
E-1	AAAYCCAGACATAGTTATCTATCAATACG	8.47	5.26	3.04
E-2	AAACCCAGACATAGTTATCTATCAATACG	14.11	7.69	5.13
F-1	AAACCCAGACATAGTTATCTATCAATACG	7.96	3.8	-1.22
F-2	AAACCCAGACATAGTTATCTATCAATACG	7.15	3.73	ND
G-1	AAATCCAGAAATAATTATYATCAATACG	5.64	7.74	5.59
Osaka-1	GAATCCAGACATAGTTATCTATCAATACA	9.39	6.65	ND
Osaka-2	AAATCCAGACATAGTTATCTACCAATACG	8.65	2.87	ND
Osaka-3	AAATCCAGACATGATAATCTATCAATACG	9.7	9.31	7.73
Osaka-4	AAACCCAGACATAGTTATTTATCAATACG	17.69	12.17	5.71

(1),(2)のM184V検出プライマーのCut off値は $\Delta$ Ct=8.5、(3)のM184V検出プライマーのCut off値は $\Delta$ Ct=10.0とした。

下であったが、HIV 感染患者の薬剤耐性を正確に把握するには、このような例数の少ない臨床検体でも解析可能な検出系は重要である。今年度開発した M184V-Ver2F 理論的検出限界は 3.25% と計算され、高感度法が目標とする 5% 以下の薬剤耐性変異の検出を満たしていた。これらの結果から、M184V-Ver2F は M184V 検出プライマーとして有効であり、今後この検出系を用いて、これまでに M184V-original で解析した未治療患者検体を再解析する予定である。

## E. 結論

平成 24 年度に引き続き、M184V 検出プライマーの改良を行った。今年度は CDC で開発されたオリジナルのプライマーの改良ではなく、LOS ALAMOS のデータベースの情報を元に M184V 検出プライマー結合部位の多型を解析し、多型を 6 種類のパターンに分け、6 種類のプライマーを設計し、これを混合して新しい M184V 検出プライマー (M184V-Ver2F) とした。M184V-Ver2F の非特異的な M184V 検出を解析するために、新規未治療患者由来の各々異なる 7 症例から得た PR-RT 領域をクローニングした 7 種類のベクターサンプルを検討した結果、非特異的な検出は見られなかった。M184V を持たないサンプルの  $\Delta Ct$  値の平均値は 14.25 だった。WT クローン (HXB2-WT) と、この M184V クローン (HXB2-M184V) 用いた解析の結果、理論的検出限界は 3.25% と計算され、高感度法としての検出感度は十分であった。臨床検体として、M184V 検出プライマー結合部位の配列が異なる 8 症例由来の 8 検体を用いて解析した結果、 $\Delta Ct$  値は全て 10 以下 (平均値は 4.37) で、M184V 陰性のサンプルと  $\Delta Ct$  値に大きな差がみられ、特異性も十分であった。また、これまでの M184V 検出系では解析できなかった大阪医療センター由来のサンプル Osaka-3 と Osaka-4 も M184V を検出することができ、多様な多型を持つ臨床検体の解析にも利用可能であることが示された。

## 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. 2013 Dec 16;8(12):e83150

### 2) 口頭発表

#### 国内

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、2013 年 11 月、熊本。

## 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解析～

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

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

山崎 尚也 広島大学病院輸血部医科診療医・血液内科

## 研究要旨

本院受診中の未治療 HIV 感染者 25 名、ウイルス学的治療失敗の感染者 2 名において HIV 薬剤耐性関連変異について解析・検討し、考察した。特にプロテアーゼ領域における変異は、数年前本邦で頻用されていた薬剤に対するものであり、今後は最近使用頻度の少なくなった薬剤の耐性関連変異株が流行する可能性が示唆された。また並行して行ったサブタイプと指向性検査では、X4 指向性はサブタイプ AE に多いことが分かった。

### 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、広島大学病院における未治療 HIV 感染者において薬剤耐性検査を行い、中国ブロックにおいて流行している HIV 遺伝子型 (サブタイプ) や薬剤耐性株を推定することを本研究の目的とした。また未治療時または治療経過中におけるウイルス指向性の変化も把握する目的で、ウイルスジェノタイプ指向性検査も追加して行った。

### B. 研究方法

2013 年 1 月 1 日から 12 月 31 日までに広島大学病院を受診した 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 EDTA 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。結果について患者のプロファイルと照らし合わせ、本院で一部統計学的処理を行い解析した。

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.7 を参照した。

ウイルスジェノタイプ指向性検査についても同様に口頭で説明し、承諾が得られた場合には前述の名古屋医療センターに検査を追加依頼した。検査の方法は、Beerenwinkel らの用いた遺伝子型より指向性を類推するものであり、遺伝子型から X4 指向性の確率を評価する Geno2Pheno を用いて、CXCR4(X4) 指向性の確率を False Positive として表示し、その値が 12.5%以上 (cut off index) であれば CCR5(R5) 指向性とした。

期間中、検体採取し結果を得た症例数は、新規未治療 24 例、未治療再検 1 例、治療中ウイルス再検出例 2 例の計 27 例であった【表 1】。

(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、分担研究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) 対象者の概略

期間内の本院初診患者は25人であり、そのうち8人がエイズ発病の患者であった。検体採取し結果を得た人数は27人で、2012年本院初診患者で本年同意取得した者2人を含む24人が未治療患者、そして治療前2回目、すなわち前述の「未治療再検例」は1人であった。また、残りの2人は治療中にも関わらずウイルス学的失敗をした者であった。27人中の発病者は10人であり、うち8人は前述の通り本年の初診患者であった。また1人は昨年末エイズ

発病にて初診となり、越年後検体を採取し得た者であった。残りの1人は初診時はエイズ発病ではなかったが、ART施行後に免疫再構築症候群としてニューモシスチス肺炎を発症したため発病に含めた。性別は1人のみ女性で他は男性であった。出生地は1人がインドネシア、1人がフィリピンであり、その他は全員日本であった。現在の居住地は山口県、島根県が1人ずつで、その他は全て広島県内であった。

(2) 薬剤耐性遺伝子変異について

薬剤耐性遺伝子変異のプロファイルを表1に示す。HIV 薬剤耐性検査ガイドライン ver.7などと照らし合わせ、明らかに薬剤耐性ウイルスであったものは、今年も1例も認められなかった。しかし、プロテアーゼ領域に耐性関連変異を持たないものは、わずか2例であった。平均薬剤耐性関連変異数は2.4であり、比較的頻度の多い変異としては、I15V(8例)、M36I(5例)、I62V(7例)、L63P(9例)、A71V/T(5例)、V77I(13例)であった。エイズ発病

表1 期間中に薬剤耐性検査を行った未治療 HIV 感染者

No	Age	発病	Subtype	プロテアーゼ領域関連変異	#	RT領域 <sup>*1</sup>	#	I領域 <sup>*2</sup>	#	指向性 <sup>*3</sup>
1	58	○	B	I62V, L63P, V77I	S	-	S	-	S	R5(87.4%)
2 <sup>*4</sup>	67	×	B	I62V, L63P, V77I, L89M	S	V179D	S	V72I	S	R5(48.4%)
3	42	○	B	V77I	S	-	S	E157Q	S	R5(22.6%)
4	41	×	B	A71V	S	V179D	S	-	S	R5(92.2%)
5	43	○	B	L63P, V77I,	S	-	S	E157Q	S	R5(19.4%)
6	30	×	B	D60E, L63P, V82A	S	-	S	E157Q	S	R5(31.0%)
7	38	×	B	I15V	S	-	S	T66I	S	R5(81.3%)
8 <sup>*5</sup>	48	○	B	L63P, H69K, V77I	S	-	S	-	S	R5(48.9%)
9	22	×	B	M36I, L63P	S	V90I	S	-	S	R5(32.9%)
10	33	×	B	A71V, V77I	S	-	S	-	S	R5(26.5%)
11	30	×	B	H69Y	S	-	S	-	S	R5(35.3%)
12	34	×	B	I15V, L63P	S	-	S	-	S	R5(37.1%)
13	30	×	B	M36I	S	-	S	-	S	R5(31.4%)
14	64	○	B	I15V	S	-	S	-	S	R5(43.8%)
15	36	×	B	I15V, G16E, I62V, H69Y, V77I	S	-	S	-	S	X4(5.8%)
16	45	×	B	L63P, H69N, A71V, V77I	S	-	S	-	S	R5(87.0%)
17	29	○	AE	K20R, M36I, L63P, V77I	S	-	S	-	S	X4(6.8%)
18	40	×	B	I15V, I62V	S	-	S	-	S	R5(28.4%)
19	25	×	B	-	S	-	S	-	S	R5(28.5%)
20	64	×	AE	L10V, M36I, V77I	S	-	S	-	S	X4(6.7%)
21 <sup>*5</sup>	36	○	B	I15V, I62V	S	-	S	-	S	R5(97.0%)
22	28	○	B	-	S	-	S	-	S	R5(21.4%)
23	29	×	B	I62V, A71T	S	-	S	-	S	X4(9.0%)
24	26	×	B	M36I, I62V, A71V, V77I	S	V179I	S	-	S	R5(25.6%)
25	48	○	B	I15V, I62V, L63P, H69Y, V77I	S	V179D	S	-	S	R5(38.8%)
26	43	○	B	I15V	S	V179D	S	-	S	R5(32.0%)
27	25	×	B	L10V, L63P, H69K/N/Q, A71T, V77I	S	V179I	S	-	S	R5(48.4%)

# 感受性: S; sensitive, R; resistant

\*1 逆転写酵素領域耐性関連変異, \*2 インテグラーゼ領域耐性関連変異, \*3 ( )内はfalse positive rate

\*4 未治療再検例 \*5 治療中ウイルス再検出例

表 2 X4 指向性の患者プロフィール

No (年)	18 (2012)	19 (2012)	15 (2013)	17 (2013)	20 (2013)	23 (2013)
年齢	29	36	36	29	64	29
感染期間、地域*1	約2年 大阪	約1年 広島	約3カ月 広島	約4~6年 インドネシア	約4年前 タイ	約1カ月 大阪
急性感染*2	有	有	有	無	無	有
サブタイプ	AE	AE	B	AE	AE	B
耐性関連変異(PI)	L10I, G16E, D60E, I62V	L10I, G16E, D60E, I62V	I15V, G16E, I62V, V77I	K20R, M36I, L63P V77I	L10V, M36I, V77I	I62V, A71T
VL(c/ml)	280	310,000	273,000	60,200	194,000	1,330,000
CD4( $\mu$ l)	496	693	258	154	546	254
その他	9カ月前は R5指向性 RT;V179I PI;K20R, M36I, L63P, D60E	9カ月前はR5 指向性 RT;V179I PI;G16E, M36I, D60E		結核性 リンパ節炎	既往歴で 年2回の 肺炎	

\*1患者からの聴取による \*2急性感染症状(患者からの聴取)

と未発病とで、変異数に特に有意な差は認めなかった ( $P=0.317$ )。

また逆転写酵素領域では、7例に耐性関連変異を認め、そのうち6例がV179D/Iであった。インテグラーゼ領域はV72I 1例、E157Qが3例、T66Iは1例であった。

### (3) ウイルス遺伝子型 (サブタイプ) について

サブタイプはAEが2例、他は全例Bであった。AE 2例共にO1\_AEであり、1人はインドネシア人女性で、1人はタイでの感染が疑われている日本人男性であった。共にAEで野生株とされるプロテアーゼ領域のM36Iが認められた。

### (4) ウイルス指向性について

27例中4例がX4指向性で、残りは全てR5指向性であった。サブタイプAE 2例はいずれもX4指向性であった。エイズ発病例と未発病例のfalse positive rateを比較すると、発病例が平均41.8%、未発病例は36.8%であり、両群に有意な差は認めなかった ( $p=0.618$ )。また年齢とfalse positive rate、プロテアーゼ領域の変異数に有意な相関は認めなかった。

表2に、2012年と2013年におけるX4指向性例のプロファイルを示す。6例中4例がサブタイプAEであり、また4例が急性感染症状と思われる症状を記憶していた。ウイルス量は1例を除き一般に高く、4例が高ウイルス量と定義される100,000コピー/ml以上であった。年齢は比較的若くエイズ発病とは特に関連はなかった。

## D. 考察

未治療 HIV 感染者の結果について、今年の薬剤耐性率は0%であり、著者が分担研究者になって初めてことであった。検査している症例数は増えているので、明らかに薬剤耐性株は広島県その周辺では少なくなっていると想像される。しかし、一方でprimary mutationではないものの、プロテアーゼ領域の薬剤耐性関連変異は多くの症例で認められている。今年よく見られた変異としては、I15V、I62V、L63P、A71I/T、V77Iであった。特にL63P、V77Iの増加は大きな特徴である。昨年多く見られたA71Vはdarunavir、fosamprenavir以外全てのプロテアーゼ阻害剤に対する二次耐性変異であるが、今年のA71はI/Tの変化が多かった。つまり核酸レベルでは昨年はGへの変異が多かったが、今年はAへの変異が多いことを示している。

L63Pはlopinavirに特異的な耐性変異であるが、昨年の4例から9例と倍増した。これはカレトラ使用者からの感染を疑わせる事象である。カレトラはgenetic barrierが高く耐性を獲得しにくいとされるが、近年その副作用から敬遠され、かつDHHSや日本のガイドラインからも第一選択ではなくなっている。そのため、現在の使用頻度は低いと予想される。同様にV77Iは、以前第一選択で頻用されたsaquinavir、indinavir、nelfinavir耐性変異であるが、現在これらの薬剤の使用は皆無に近い。

つまり、プロテアーゼ領域の耐性変異の推移は、数年前の本邦での使用頻度が高い「トレンド」の薬剤を見ている可能性が示唆される。この仮説が正し

ければ、今後は atazanavir 関連耐性変異である G16 や D60、I64 の変異が増えて行くかも知れない。

逆転写酵素領域の耐性関連変異がみられたものは 7 例で、うち 6 例が V179 の etravirine 関連耐性変異である。また残り 1 例は V90I で、これも etravirine 関連耐性変異である。Etravirine 耐性変異はごく近年散見されるようになっており、これも使用経験者の増加を伺わせる知見である。1 昨年より rilpivirin が国内でも使用できるようになった。現在までそれに対する変異は認めていないが、179 のバリンがロイシンに変異すれば、耐性となるため注意が必要である。

3 年前に初めて E157Q の変異が検出されたインテグラーゼ領域であるが、今年 E157Q が 3 例認められた。しかし、本年 7 月発行の HIV 薬剤耐性検査ガイドライン ver.7 より、耐性変異ではないとして削除された。同様に昨年 12 例、今年 19 例に認められた V72I 変異であるが、同様に耐性関連変異ではない、といった結論となり削除された。そのため、期間前半の症例 No.2 しか示されていない。また興味深いことに、今年初めて T66I といった dolutegravir 関連変異を持つ未治療者が 1 例あった (表 1、No.7)。インテグラーゼ領域の 66 番は CTL の認識部位であり、その変異は CTL に対する逃避変異の可能性がある。このことについて現在試料提供者の同意の下、MHC クラス I (特に HLA1501 の有無) を検索中である。試料提供者は未発病者で、患者の提供時時点での CD4=417/ $\mu$ L であり、VL=890 コピー/ml と低ウイルス量であった。現在は治療中であり、血中 VL は検出感度未満になっている。

X4 指向性は 4 例に認めたが、特にエイズ発病との関連性は見いだせなかった。昨年報告した 2 例を含めた 6 例のプロファイルを見ると、特徴として、高ウイルス量であること、サブタイプ AE であることが伺える。R5 指向性例に比べ高ウイルス量かどうかの検討は、症例の蓄積を待たないといけない。一方、サブタイプ AE は明らかに X4 指向性例に多い印象となったが、現行の検査法では「サブタイプ AE は false positive rate が低くなりやすい」といったことも分かってきたため、今後の検討や方法の改良が期待されるところである。

本報告は「中国ブロックの…」と題しているが、実情は本院の患者の解析である。他ブロックと違い、自施設で薬剤耐性検査を行っていないため、中国ブロック全体の検体を集約できず、ひいてはブロック内の状況を把握できないでいる。しかしその代替えとして、本研究の意義を中国四国ブロック内のエイ

ズ拠点病院に理解してもらい、研究協力機関を増やすべく活動を行っている。本年度、広島市立広島市民病院、山口大学医学部附属病院といった中核拠点病院が協力機関となった。今後はそれらの施設からのデータを本院で集約し解析するための何らかのスキームが必要であると思われる。

## E. 結論

本院の受診中の HIV 感染症患者において、そのウイルスサブタイプや指向性、薬剤耐性関連変異パターンについて考察した。プロテアーゼ領域の耐性関連変異は、数年前第一選択とされた薬剤に対するものが多く出現しており、今後は lopinavir や atazanavir 関連耐性変異が出現する可能性が示唆された。今後もさらに研究を継続・発展させるために、中国ブロック内のエイズ拠点病院、中核拠点病院に、この研究の意義をよく理解していただき、参加する施設を増やしていく必要がある。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1) 原著論文

1. Takeshi Nishijima, Hiroyuki Gatanaga, Takuro Shimbo, Hirokazu Komatsu, Tomoyuki Endo, Masahide Horiba, Michiko Koga, Toshio Naito, Ichiro Itoda, Masanori Tei, Teruhisa Fujii, Kiyonori Takada, Masahiro Yamamoto, Toshikazu Miyakawa, Yoshinari Tanabe, Hiroaki Mitsuya, Shinichi Oka, 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(8): e73639, 2013.
2. 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, Abacavir/lamivudine versus tenofovir/emtricitabine with atazanavir/ritonavir for treatment-naive Japanese patients with HIV-1 infection: a randomized multicenter trial. *Int Med*. 52(7):735-44, 2013.

### 2) 学会発表

1. 藤井輝久 (代理:高田 昇), 喜花伸子, 鍵浦文子: HIV 陽性。そのときあなたは どうしますか～

- HIV チーム医療の現状とこれからの課題, 第 62 回日本医学検査学会, 2013 年 5 月 19 日, 高松
2. 齊藤誠司, 鍵浦文子, 藤井健司, 藤田啓子, 畝井浩子, 木平健治, 藤井輝久, 高田昇, 大毛宏喜, 一戸辰夫: 急性 C 型肝炎の発症を捉え, 早期に治療導入に到った HIV 感染例, 第 87 回日本感染症学会学術講演会, 2013 年 6 月 5 日 -6 日, 横浜
  3. 齊藤誠司, 石原麻彩, 鍵浦文子, 喜花伸子, 藤井健司, 藤田啓子, 畝井浩子, 山崎尚也, 藤井輝久, 高田昇: 中国四国ブロックにおけるエイズ診療拠点病院医師向け研修会に対する評価とそのあり方について, 第 27 回エイズ学会学術集会, 2013 年 11 月 20 日 -22 日, 熊本
  4. 西島 健, 瀧永博之, 遠藤知之, 堀場昌英, 古賀道子, 内藤俊夫, 井戸田一郎, 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 回エイズ学会学術集会, 2013 年 11 月 20 日 -22 日, 熊本
  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 回エイズ学会学術集会, 2013 年 11 月 20 日 -22 日, 熊本

#### H. 知的所有権の出願・取得状況

なし



## 治療患者における薬剤耐性 HIV 調査・サブタイプの調査

研究分担者 松下 修三 熊本大学エイズ学研究センター 教授

### 研究要旨

我々は、昨年度までの研究を継続し、HIV-1 感染症例の envelope の V3-tip、特に 315 番目のアミノ酸の codon usage に注目した subtype 分類を試みた。総数 138 名の解析の中で、315 番に複数の codon usage が見られた症例が 18 例あり、従来の分離株に見られる 315R(AGA) 及びこれから進化したと考えられる codon を持つ CB/EB: classical B/evolved B と非 subtype B に見られる 315Q (CAA or CAG) から 315R (CGA or CGG) と変異したと考えられる NB/RB: non-subtype B/recombinant B 型に分類可能であることを確認した。subtype B の 122 例に関して、V3-tip の 315 番目のアミノ酸の codon usage を検討した結果、2000 年以前の感染例の多くは CB/EB 型であった。一方、RB 型の感染は、1999 年ころから散見され、2008 年~2009 年まで増加したが、2010 年より減少した。対照的に EB 型の代表 (EB-K) である 315K(AAA) を持つウイルスはここ数年にわたり増加し、2008 年以降の 30% を占めるようになり、集団の中での進化 (G to A mutation) が考えられた。これらの知見は HIV-1 の進化の方向性を知る上で、また今後の治療やワクチン開発を考えるうえで重要な知見と考えられる。

### A. 研究目的

既承認薬や新薬に対する耐性出現の調査は、長期治療継続が可能になった現在、最も重要な研究テーマの一つである。一方、エンベロプの進化の研究から、最近の感染動向を分子レベルで解析可能にするマーカーを見出した。我々は、新規診断症例に関して、ウイルス分離を行い、治療用に開発中の抗 V3 抗体を用いて中和抗体への感受性の検討を行ってきたが、その過程で興味深い観察をした。すなわち、subtype B に分類されるウイルスのなかで、V3 抗体に中和抵抗性のウイルスの V3-tip のアミノ酸配列が GPGR と GPGQ が混在する症例と GPGK のみまたは GPGR と GPGK が混在する症例があることを観察した。特に、後者は、最近の数年に急激に増加しているという印象を受けており、これらの解析は中和抗体が関わるワクチン開発に示唆を与えるだけでなく、感染拡大を調査する疫学的解析にも貢献するものと考えられる。

### B. 研究方法 (倫理面への配慮)

IHIV-1 感染症例末梢血単核球より、CD8-immunobeads を用いて CD8+ 細胞を除去し、抗 CD3 抗体 及び IL2 を用いて CD4+ 細胞を増殖させ、その培養上清中のウイルスを envelope primer を用いて RT-PCR で増幅し、envelope 全長をシークエンスした。また、EDTA 加血漿に対して直接 RT-PCR にて C2-V3 の塩基配列を同定し、HIV の集団内での進化を考察し、これによる分類を試みた。envelope シークエンスによる subtype 分類は NCBI のホームページの viral genotyping tool の subtype 分類機能を用いて同定した。Coreceptor usage の判定には、遺伝子型から X4 指向性の確率を評価する geno2pheno (coreceptor) (<http://coreceptor.bioinf.mpi-inf.mpg.de/>) を用いた。

(倫理面の配慮) HIV 感染症例由来の血液検体を用いたウイルス分離及び塩基配列同定、中和抗体感受性試験などに関しては、臨床研究に関する倫理指針に従い、学内倫理委員会の承認を得た説明と同意書を用いて同意を得たのちに採血した (臨床研究登録 UMIN000004720)。

C. 研究結果

我々は、新規診断症例を含む HIV-1 感染症例の envelope シークエンスを行い、特に V3-tip の 4 アミノ酸 (subtype B の consensus では GPGR) のうち 315 番目のアミノ酸の codon usage に注目して解析した。総数 138 名の解析の中で、V3-tip の 315 番目のアミノ酸に複数の codon usage が見られた症例が 18 例あった (表 1)。このうち 16 例は subtype B に分類されるウイルスであるが、ほとんどの実験室株や血友病症例に見られる R(AGA) と、これから A to G または G to A 変異を起こしたと考えられる R(AGG) または K(AAA) および A to T or C に起因すると考えられる S(AGT,AGC) の症例が 12 例であった。これらは、従来から認知されている subtype B であり、総称して CB/EB: classical B/evolved B と分類可能である。

一方、非 subtype B の 2 例を含む他の 6 症例では、315 番目のアミノ酸とそれをコードする codon が Q(CAG) と R(CGG) または Q(CAA) と R(CGA) の混在であり、いずれも A to G 変異によっておこった Q から R への変化が関与するものと考えられた。これらの HIV-1 感染者から、HIV-1 を分離し、envelope 全長の塩基配列を決定し subtype 分類を行った結果、subtype B と non-B のキメラのシークエンスを持つ

症例の増加が認められた。NCBI のホームページの viral genotyping tool の subtype 分類機能を用いて解析すると、subtype B の配列を基本にしなが、CRF03\_AB や CRF14\_BG や CRF15\_01B などを含むキメラ化されたエンベロープ配列であることが分かった。これらは“組み換え型 B (recombinant type B)”として区別可能であり、非 subtype B も含めて NB/RB: non-subtype B/recombinant B 型の V3 と呼ぶことが可能である。このような症例が 18 例の解析のうち 6 例認められた。これまでの解析で、CB/EB 型と NB/RB 型は系統樹解析するとまったく別のクラスターを作ることから、subtype B の中に二つの異なった進化経路があったことが想像できる。そして、各ウイルスがどの分類に属するかは、V3-tip の 315 番目のアミノ酸の codon usage から予想可能である。

1980 年代に感染したと考えられる血友病症例を含む 138 例に関して、V3-tip の 315 番目のアミノ酸の codon usage を検討した。その結果、血友病症例 15 例の解析では、全例 CB/EB 型であった。また、症例数は少ないものの NB/RB 型の感染は、1999 年ころから散見され、2008 年~2009 年まで増加している。しかし、2010 年より減少し、2011 年以降は、新規症例は 1 例のみとなった。一方、EB 型の代表

表 1 315Q/R in V3-tip に複数の codon usage が見られた 18 症例

	YOD	PtsID	V3 tip AA	codon usag of GPGX	RB/NB-Q1	RB/NB-Q2	RB-R1	RB-R2	CB-R1	CB-R2	EB-K	EB-G1	EB-G2	EB-S1	EB-S2	geno2phen o	subtype	FPR
1	May 1995	TIK	GPGR	GGA CCA GGG AGG	CAG	CAA	GGG	GGA	AGA	AGG	AAA	GGA	GGC	AGT	AGC	B	ND	
			GPGR	GGA CCA GGG AGA					AGA	AGG						B	ND	
2	Sept.1995	AMI	GPGR	GGA CCC GGG AGG						AGG						B	22	
			GPGR	GGA CCC GGG AGA					AGA	AGG						B	6.3	
3	Apr.1998	YIS	APGR	GCA CCA GGG AGA					AGA							B	92.2	
			APGS	GCA CCA GGG AGC										AGC		B	90.3	
4	Sep.1998	YKI	GPGR	GGA CCA GGG AGA					AGA							B	25.6	
			GPGR	GGA CCA GGG AGT									AGT			B	38.4	
5	Feb.1999	NSI	GPGR	GGA CCA GGA CAA		CAA		CGA								AE	0.2	
			GPGR	GGA CCA GGA CGA												AE	18.5	
6	Apr.1999	MIS	GPGR	GGA CCA GGG CAA		CAA		CGA								B	86.5	
			GPGR	GGA CCA GGG CGA					AGA							B	62.4	
7	Sep.2000	kKGO	GPGR	GGA CCG GGG AGA					AGA							B	0	
			GPGR	GGA CCG GGG AGC										AGC		B	9.6	
8	June.2003	MNIS	GRGR	GGA CGA GGG CGA				CGA								B	3.2	
			GRGR	GGA CGA GGG CGG				GGG								B	3.2	
9	May.2007	MNA	GPGR	GGA CCA GGG CGG				GGG								B	5.7	
			GPGR	GGA CCA GGG CAG	CAG											B	63.5	
10	July.2007	YUNA	GPGR	GGA CCA GGG AGA					AGA							B	41.4	
			GPGR	GGA CCA GGG AGG						AGG						B	41.4	
11	Jan.2008	YANA	GPGR	GGA CCA GGC AAA							AAA					B	41.2	
			GTGR	GGA ACA GGC AGA					AGA							B	1.7	
12	Feb.2008	HTA	GPGR	GGA CCA GGG CAA		CAA		CGA								B	63.1	
			GPGR	GGA CCA GGG CGA												B	13	
13	Sep.2008	mYHI	GPGR	GGA CCA GGA CAA		CAA		CGA								C	72.6	
			GPGR	GGA CCA GGA CGA				CGA								C	16.9	
14	Apr.2008	TAKO	GLGR	GGA CTA GGC AGA					AGA							B	13.1	
			GPGR	GGA CCA GGC AAA							AAA					B	37.2	
15	Nov.2009	YMI	GPGR	GGA CAA GGG AGA					AGA							B	3.7	
			GPGR	GGA CAA GGG AAA							AAA					B	4	
16	Apr.2010	KMA	GQGR	GGA CAA GGG AGA					AGA							B	2.9	
			GQGR	GGA CAA GGG AAA							AAA					B	19.6	
17	May.2010	JNA	GQGR	GGA CAA GGG AAA							AAA					B	17.1	
			GQGR	GGA CAA GGG AGA					AGA							B	29.1	
18	Dec.2011	NIK	GPGR	GGA CCA GGC AAA							AAA					B	45.5	
			GLRR	GGA CTA AGA AGA					AGA							B	0.2	

CB/EB: classical B/evolved B: 315R(AGA) to R(AGG) to K(AAA) to S(AGT,AGC).  
 NB/RB: non-subtype B/recombinant B: 315Q(CAG) to R(CGG),Q(CAA) to R(CGA).

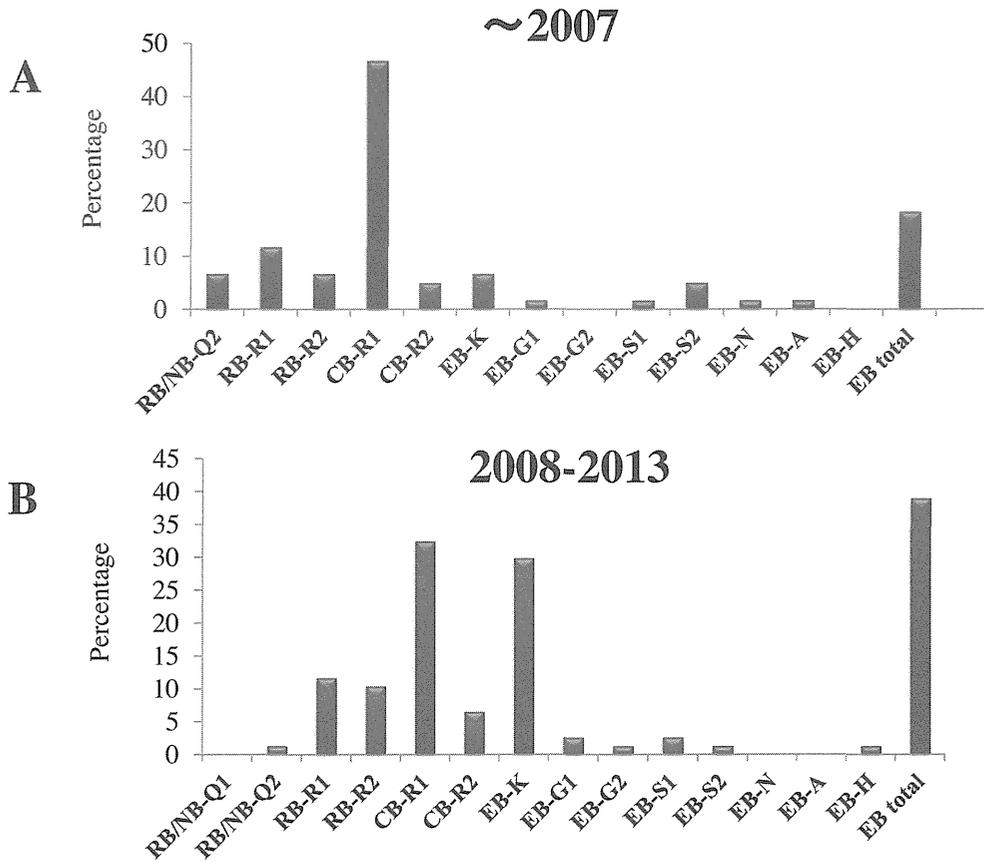


図1 V3-tip の 315 番目のアミノ酸の codon usage による分類、A;2007 年までの診断症例、B;2008 年から 2013 年までに来院し、診断された症例における頻度 (%)

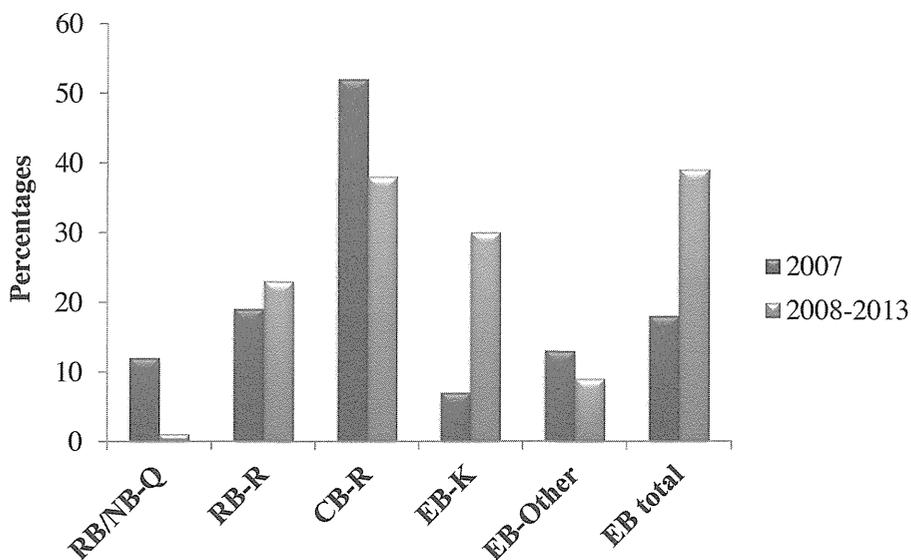


図2 V3-tip の 315 番目のアミノ酸の codon usage による分類、A;2007 年までの診断症例と 2008 年から 2013 年に診断された症例における頻度 (%) の比較

表 2 非サブタイプ B 症例における V3 tip の codon usage

	V3	codon usag of GPGX	RB/NB-Q1	RB/NB-Q2	RB-R1	RB-R2	CB-R1	CB-R2	EB-K	EB-G1	EB-G2	geno2pheno	
			CAG	CAA	CGG	CGA	AGA	AGG	AAA	GGA	GGC	subtype	FPR
1998.11.13	CTRPNNNTRKSIPIGPGRAFATGEIIGDIRQAH	GGA CCA GGG AGA					AGA					B	78.8
2000.01.21	CTRPNNNTRKSIPIGPGRAFATGEIIGDIRQAH	GGA CCA GGG AGA					AGA					B	78.8
2000.04.28	CTRPNNNTRKSIPIGPGRAFATGEIIGDIRQAH	GGA CCA GGG AGA					AGA					B	78.8
2000.07.07	CTRPNNNTRKSIPIGPGRAFATGEIIGDIRQAH	GGA CCA GGG AGA					AGA					B	60.1
2012.02.22	CTRPNNNTRKSIHLGPGQAFYATGEIIGDIRQAH	GGA CCA GGG CAA		CAA								B	85.3
2012.05.09	CTRPNNNTRKSIHLGPGQAFYATGEIIGDIRQAH	GGA CCA GGG CAA		CAA								B	85.3

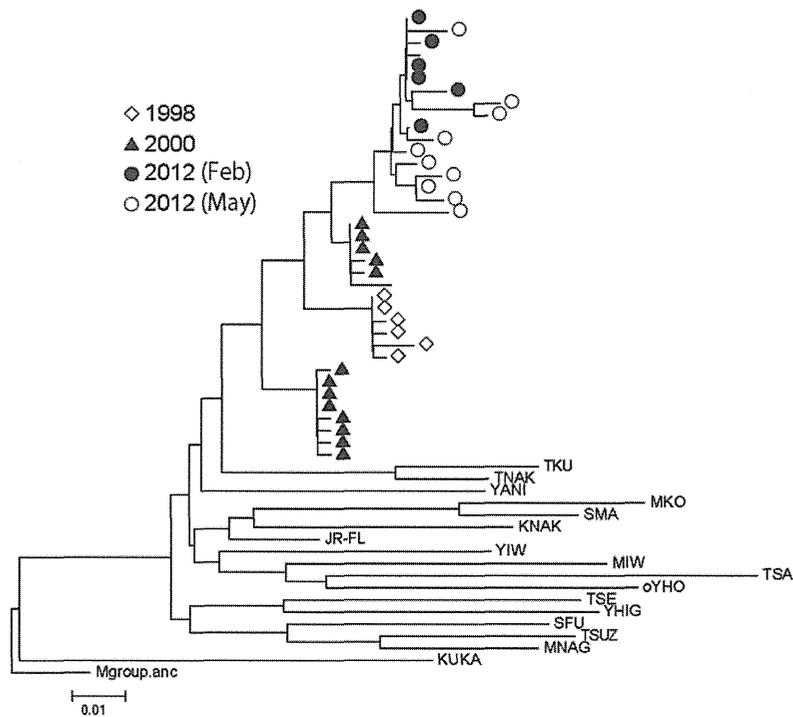


図 3 V3-tip の 315Q/R に異なる進化の codon usage が見られた症例。C2-V3 の全領域の核酸配列を使い、Neighbor-joining method で解析した。

である 315K(AAA) の変異を持つウイルスは 2004 年から存在しているが、ここ数年にわたり増加している傾向が観察された。2007 年までに来院した症例と 2008 年から 2013 年までに診断された例に分けて、これらをグラフ化して解析した (図 1)。V3-tip の 315 番目のアミノ酸の codon usage による分類で、CB/EB の比率が 2007 年までが 70%、2008 年以降が 77% とほぼ同等であるのに対し、2007 年までは 7% であった EB-K が 2008 年以降 30% を占めていることは特筆すべきである。いわゆる進化型の B (evolved B: EB) を総数で見ても 18% から 39% になっている。これらのことは、codon

usage が CB 型の R に対し選択圧がかかり、最近では、EB 型の感染が増加し、CB とほぼ同数になっていることを示唆する。一方、EB-K 以外の EB 型の頻度は 2 グループ間に差はない。この理由は不明であるが、EB-K の変異が G to A 変異であることが関係している可能性がある。図 2 にこれらの変化をわかりやすく示した。RB/NB に分類されていた中で、subtype B で V3-tip が GPGQ の症例は 2008 年以降みられず、これらから進化したと考えられる RB/NB-R の症例の発生が認められる。CB-R は 52% から 38% に減少し EB-K の 7% から 30% に至る増加が明らかに観察できた。RB/NB-Q から RB/NB-R への変化は codon

usage では A to G 変異によるものが考えられ、CB から EB-K への変異が G to A 変異であることと対照的である。

本研究の経過中に特異な症例を観察した (表 2)。本例は、血液製剤での感染で、2000 年までの検体の検討ではいずれも CB-R1 (AGA) であったのに対し、マラビロック (MVC) 投与のために行った 2012 年の V3 のジェノタイプ検査では、RB/NB-Q2(CAA) であった。これは、単純な変異では説明できない変化であり、検体のコンタミネーションの可能性を否定するため、それぞれ多数の検体のシーケンスを検査するとともに、C2-V3 の全領域の核酸配列を使い、Neighbor-joining method で解析した。図 3 に示すようにこれらの異なるリネージの V3 には関連性があり、もともと両方のウイルスが存在していてリコンビネーションを起こした可能性と未知の進化のパスウェイがある可能性がある。本症例に感染したウイルスの全貌は、今後 Deep sequencing などでの解析が必要と考えられる。

#### D. 考察

subtype B 症例において、同一患者の V3 tip のシーケンスで GPGR と GPGK、あるいは GPGR と GPGQ は混在していたが、GPGQ と GPGK の混在は確認されていない。これは、Q → R の変異と R → K の変異は全く異なるルートの進化であるためということが考えられた。従来 subtype B からの進化と、新たな組み替えによる進化の 2 つの進化のルートの存在が V3 tip の 4 つ目のアミノ酸のコドンを調べることで判断できることを示した。2007 年までに来院した症例と 2008 年から 2013 年までに診断された例に分けて解析すると、2007 年までは 7% であった EB-K が 2008 年以降 30% に急増していた。一方、RB/NB-Q は 2008 年以降見られず、これから進化したと考えられる RB/NB-R のみ観察された。この変化の codon usage change は A to G 変異によっていて、CB から EB-K への変異が G to A 変異であることと対照的であった。

#### E. 結論

HIV-1 は感染を拡大させながら、進化し続けるという特徴を持っている。我々は、V3 tip の 315R のコドン調べることで、subtype B に分類されていたものの中に、明らかに 2 つの全く異なった進化由来のウイルスが存在することを提唱し 138 名の症例に関して解析した。2007 年までに診断された症例では 7% であった EB-K が、2008 年以降に診断された症例では 30% を占めていた。このことは、今

後のウイルスの進化の方向性を知る上において非常に重要な情報と考えられる。異なる進化のウイルスの存在の臨床的意義は明らかではないが、ウイルスの個体内、集団内進化 についての知見が得られ、HIV/AIDS ワクチンの開発や中和抗体療法の開発に役立つと考えられる。わが国では subtype B ウイルス感染の増加が報告されているが、この解析法を疫学調査ツールとして、組み換えタイプ NB/RB の動向と進化型 EB の動向に関して、今後も規模を拡大して研究を行う必要がある。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1) 原著論文

1. Hashimoto C, Narumi T, Otsuki H, Hirota Y, Arai H, Yoshimura K, Harada S, Ohashi N, Nomura W, Miura T, Igarashi T, Matsushita S, Tamamura H. A CD4 mimic as an HIV entry inhibitor: Pharmacokinetics. *Bioorg. Med. Chem.* 21: 7884-7889. 2013.
2. Otsuki H, Hishiki T, Miura T, Hashimoto C, Narumi T, Tamamura H, Yoshimura K, Matsushita S, Igarashi T. Generation of a replication-competent simian-human immunodeficiency virus, the neutralization sensitivity of which can be enhanced in the presence of a small-molecule CD4 mimic. *J. Gen. Virol.* 94: 2710-2716. 2013.
3. 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, behalf of the 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. *Internal Medicine.* 52: 735-744. 2013.
4. Mind Exchange Working Group (Antinori A, Arendt G, Grant I, Letendre S, Matsushita S, et al.). Assessment, Diagnosis, and Treatment of HIV-Associated Neurocognitive Disorder: A Consensus Report of the Mind Exchange Program. Assessment, Diagnosis, and Treatment of HIV-Associated Neurocognitive Disorder: A Consensus Report of the Mind Exchange Program. *Clin Infect Dis.* 56(7):1004 -1017. 2013.
5. Narumi T, Arai H, Yoshimura K, Harada S, Hirota Y, Ohashi N, Hashimoto C, Nomura W,

- Matsushita S., Tamamura H. CD4 mimics as HIV entry inhibitors: lead optimization studies of the aromatic substituents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 21:2518-2526. 2013.
6. Kuwata T, Takaki K, Yoshimura K, Enomoto I, Wu F, Ourmanov KI, Hirsch VM, Yokoyama M, Sato H, Matsushita S. Conformational Epitope Consisting of the V3 and V4 Loops as a Target for Potent and Broad Neutralization of Simian Immunodeficiency Viruses. *J. Virol.* 87:5424-5346. 2013.
  7. Harada S, Yoshimura K, Yamaguchi A, Yusa K, Matsushita S. Impact of antiretroviral pressure on selection of primary HIV-1 envelope sequences in vitro. *J. Gen. Virol.* 94:933-943. 2013.
  8. Kuwata T, Takaki K, Enomoto I, Kazuhisa Y, Matsushita S. Increased infectivity in human cells and resistance to antibody-mediated neutralization by truncation of the SIV gp41 cytoplasmic tail. *Frontiers in Microbiology/Virology*. 4:1-7.2013.
- 2) 学会発表
1. Matsushita S, Yoshimura K, Maeda T, Murakami T. KD-1002 Principal Investigators and The Protocol Team of Quintiles. Passive transfer of neutralizing monoclonal antibody KD-247 reduces plasma viral load in patients chronically infected with HIV-1: a phase-1b clinical study of a humanized monoclonal antibody KD-247 (KD-1002). 7th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention (IAS 2013) 30 June -3 July 2013, Kuala Lumpur, Malaysia.
  2. Matsushita S. Passive transfer of neutralizing monoclonal antibody KD-247 reduces plasma viral load in patients chronically infected with HIV-1 : A Phase-1b clinical study of a humanized monoclonal antibody KD-247 (KD-1002). IAS Towards an HIV Cure Symposium. 29th-30th June 2013, Kuala Lumpur, Malaysia.
  3. Kuwata T, Takaki K, Yoshimura K, Enomoto I, Wu F, Ourmanov I, Hirsch VM, Yokoyama M, Sato H, Matsushita S. Analysis of Env regions important for binding and resistance to B404, a potent neutralizing antibody against SIV. *AIDS Vaccine* 2013. 7-10 October 2013. Barcelona, Spain.
  4. Ramirez K, Kuwata T, Maruta Y, Tanaka K, Alam M, Rahman K, Kawanami Y, Enomoto I, Tamamura H, Yoshimura K, Matsushita S. Improving the broadness and potency of neutralizing anti-HIV-1 antibodies with a CD4 mimetic compound. *AIDS Vaccine* 2013. 7-10 October 2013. Barcelona, Spain.
  5. Kuwata T, Takaki K, Yoshimura K, Enomoto I, Wu F, Ourmanov I, Hirsch VM, Yokoyama M, Sato H, Matsushita S. Identification of the Env region responsible for the resistance to B404, a potent neutralizing antibody against SIV. 14th Kumamoto AIDS Seminar. 29-31 October 2013, Kumamoto.
  6. Ramirez K, Kuwata T, Maruta Y, Tanaka K, Alam M, Rahman K, Egami Y, Kawanami Y, Enomoto I, Tamamura H, Yoshimura K, Matsushita S. Can antibodies contribute to controlling infection with transmitted/founder virus? 14th Kumamoto AIDS Seminar. 29-31 October 2013, Kumamoto.
  7. Tanaka K, Kuwata T, Maruta Y, Ramirez K, Kawanami Y, Enomoto I, Matsushita S. Miniaturization of antibodies against CD4-induced epitope on gp120. 14th Kumamoto AIDS Seminar. 29-31 October 2013, Kumamoto.
  8. Maruta Y, Kuwata T, Tanaka K, Nakahara Y, Ramirez K, Alam M, Egami Y, Suwa Y, Morioka H, Matsushita S. Post-attachment neutralization as a mechanism of efficient activities of scFv from anti-V3 monoclonal antibody. 14th Kumamoto AIDS Seminar. 29-31 October 2013, Kumamoto.
  9. Alam M, Kuwata T, Ramirez K, Enomoto I, Maruta Y, Tanaka K, Rahman K, Egami Y, Kawanami Y, Murayama H, Shimura K, Matsuoka M, Matsushita S. Effects of Enfuvirtide resistant mutations on the sensitivity to neutralizing antibodies. 14th Kumamoto AIDS Seminar. 29-31 October 2013, Kumamoto.
  10. 松下修三, 大類 諭, Post F, Winston J, Hendry B, Gazzard B, Molina J, Liu HC, Piontkowsky D, Cheng AK, Rhee MS, Szwarcberg J. EVG/COBI/FTC/TDF 第 III 相臨床試験における腎機能に関連する安全性の評価 (投与 96 週時点) -アジア人についての層別集計結果を含む-. 第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2014 年 11 月 20 日 -22 日, 熊本.
  11. 桑田岳夫. シンポジウム 6 - 中和抗体と抗 CCR5 阻害薬 (Env). 第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2014 年 11 月 20 日 -22 日, 熊本.
  12. Ramirez K, Kuwata T, Maruta Y, Tanaka K, Alam M, Kawanami Y, Enomoto I, Tamamura H, Yoshimura K, Matsushita S. Combination of anti-V3 antibodies as a possible strategy for controlling transmitted/founder virus. 第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2014 年 11 月 20 日 -22 日, 熊本.
  13. 丸田泰広, 桑田岳夫, 田中和樹, Ramirez K, Alam M, 江上由華, 中原悠介, 諏訪喜昭, 森岡弘志, 松下修三. 抗 V3 抗体の小型化による CD4 結合後の HIV-1 中和活性の増進. 第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2014 年 11 月 20 日 -22 日, 熊本.
  14. Alam M, Kuwata T, Ramirez K, Enomoto I,

Maruta Y, Tanaka K, Rahman K, Egami Y, Kawanami Y, Murayama H, Shimura K, Matsuoka M, Matsushita S. Enfuvirtide resistant mutation N43Dis associated with the enhanced neutralization by 10E8, a broadly neutralizing antibody against gp41 MPER. 第27回日本エイズ学会学術集会・総会. 2014年11月20日-22日, 熊本.

15. 田中和樹, 桑田岳夫, 丸田泰広, Ramirez K, 松下修三. gp120のCD4-induced epitopeに結合する中和抗体の小型化とその特性の検討. 第27回日本エイズ学会学術集会・総会. 2014年11月20日-22日, 熊本.

#### H. 知的所有権の出願・取得状況

なし



# 九州ブロックにおける薬剤耐性 HIV の動向調査研究

～九州地区における薬剤耐性 HIV-1 の動向～

研究分担者 南 留美 国立病院機構九州医療センター 免疫感染症科 医長

研究協力者 山本 政弘 国立病院機構九州医療センター AIDS/HIV 総合治療センター  
センター長

## 研究要旨

近年、genetic barrier の高い薬剤の開発、服用回数や服用錠数の低減、副作用の軽減によるアドヒアランスの向上によって抗 HIV 療法経過中に薬剤耐性を獲得する比率は以前に比べ減少している。また従来の薬剤に耐性を示し治療に難渋していた症例でもウイルスコントロールが可能になる例も出てきている。一方、未治療の新規感染者のなかに耐性ウイルスを持つ症例が認められることがあり、抗 HIV 療法を行う際に大きな課題となっている。当院では 2003 年以降、九州地区の新規感染患者における薬剤耐性変異の頻度を評価するため新規感染患者の薬剤耐性変異の解析 (RT 領域, PR 領域、インテグラーゼ領域) およびサブタイプの解析を行っている。さらに 2011 年度より HIV 指向性検査 (genotype) も行っている。今年度の登録症例は 43 例。サブタイプは AE 1 例, AG 2 例、残りは全例 B であった。耐性変位に関しては、PI に関する変異 (V11I:1 例, K20I:1 例)、NNRTI に関連する耐性変異 (K103R:2 名, E138A, V179D, V179T, K236L: 各 1 例ずつ)、およびインテグラーゼ領域に関する変異 (E157Q:2 例) が認められた。指向性検査は登録症例中 43 例で解析し、33 名 (76.7%) が CCR5 指向性であった。急性感染の割合は 2009 年をピークに減少傾向にあったが今年度は 23.3% で昨年度に比して増加していた。

### A. 研究目的

九州地区における急性 HIV-1 感染者および未治療慢性 HIV-1 感染者における薬剤耐性変異の頻度を調査し、薬剤耐性 HIV-1 伝播の疫学的動向を明らかにする。同時にウイルスサブタイプおよびウイルス指向性の解析を行い九州におけるこれらの頻度について考察する。

### B. 研究方法

2013 年に HIV 感染が判明し当院免疫感染症科を受診した未治療慢性 HIV-1 感染患者および急性 HIV-1 感染患者を対象に、informed consent のもとに採血を行い、血清中 HIV-1 のプロテアーゼ (PR) 領域、逆転写 (RT) 領域、インテグラーゼ領域の薬剤耐性遺伝子解析を行った。薬剤耐性変異の評価は IAS-USA (Feb/Mar:2013) および Shafer' s criteria を参考にした。同時に EnvC2V3 領域、Gag p17 領域、Pol (protease, RT) 領域の遺伝子解析を行い、サブタ

イピングも施行した。感染時期を推定する BED assay (抗体陽転後 155 日以内であるかを鑑別) に関しては Calypte® HIV-1 BED Incidence EIA (IgG-Capture HIV-EIA) を用いた。指向性検査に関しては EnvC2V3 領域が解析可能であった症例において指向性を予測する解析ソフト (Geno2Pheno) を用いて検討した。なお、当院では FPR の cut off 値を 10% にしている。

解析結果は、九州医療センターにて連結可能匿名化したデータとして、そのデータを研究代表施設 (名古屋医療センター) に集約し、解析を行うので、個人の人権を侵害することは無く、個人の人権は確実に守られる。

### C. 研究結果

2013 年において検討した新規未治療患者数は 43 名であった。解析症例数は 2010 年をピークに昨年までは減少していたが今年度は昨年より増加した。

(2003年:10名、2004年:12名、2005年:25名、2006年:26名、2007年:29名、2008年:33名、2009年:38名、2010年:48名、2011年:43名、2012年:37名)。急性感染者の割合も2009年をピークに減少していたが、今年度は43名中10名(23.2%)が急性感染であり昨年の16.2%より増加した。BED assayにて recent と診断された症例は12例(27.9%)であった。

【耐性変異の頻度】RT領域ではK103R 2例、E138A 1例、V179D 1例、V179T 1例、K236L 1例(V179T以外副次変異)、PR領域ではV11I 1例、K20R 1例(副次変異)、インテグラーゼ領域ではE157Q 2例(副次変異)を認め、計8例(重複あり)(18.6%)に変異を認めた。またPR領域に関しては全例に何らかの変異を認めたが、polymorphismがほとんどであった。なかでもA71T/V、I93Lをもつ割合が例年通り多かった(A71T:2010年2名、2011年7名、2012年10名、2013年9名、I93L:2010年32名、2011年24名、2012年30名、2013年31名)。今年度の登録症例のうち3例においてRT領域、PR領域、インテグラーゼ領域における耐性変異結果が一致したためenv領域で系統樹解析を行った(2009-2013年の当院登録症例にて検討)。3例中2例は同一の株由来と考えられたが、その他の症例とclusterを作っていることはなかった。サブタイプに関しては、AG 2例、AE 1例、残りは全例Bであった。AGの2例はともに女性であり、1例はアフリカ人からの感染、1例はcommercial sex workerであった。当院で2006年以降登録されたサブタイプAGの症例で系統樹解析をおこなったが各々由来は異なることが示唆された。

【BED assayについて】BED assayによる感染時期の推定では、12名がrecent infectionであった。最終抗体検査陰性日およびWBによる結果から判定した場合、急性感染は10名であった。当院で施行したBED assayの感度は80%、特異度は87.8%であった。

【CCR5指向性検査】EnvC2V3領域の解析が可能であった症例43名において指向性検査を施行した。33名がCCR5指向性、10名がCXCR4指向性であった。CCR5指向性の割合は2009年68.4%、2010年75.5%、2011年89.4%、2012年72.3%と2011年までは増加傾向にあったが、今年度は昨年とほぼ同率であった。

指向性検査については他施設からの依頼も増えており、今年度は九州大学、産業医科大学、鹿児島大学など大学病院を中心に21件の依頼があった。

## D. 考察

【耐性変異について】:NRTI領域においては2006年以降、L210、T215の変異が2-5%の割合で認められていたが今年度は双方の変異とも認められなかった。NNRTI領域の変異に関しては、2009年以降増加している。特にK103やV179の変異の割合が高くなっている。全国的にも同様の傾向がありNRTI領域の変異の割合は変化ないがNNRTI領域の変異は徐々に増加している。PR領域に関しては、polymorphismと考えられるものが主体であった。A71T、L93Lが年々増加しており、特にI93Lにおいては2006年38.5%であったが、今年度は31例で72.1%と増加していた。インテグラーゼ領域のE157Qは感染源不明である。インテグラーゼ領域の耐性変異は年間0-1名で経過しており、現在のところ増加傾向はない。

サブタイプについては、今年度2例がAGであった。1例は海外での感染、1例はCSWとして感染しており、系統樹解析でも由来は異なると考えられた。当院で経験したほかの2例とも系統樹的に異なる由来と考えられた。国内のほかの地域で認められたサブタイプAGとの関連が検討できれば国内でのサブタイプAGウイルス伝播経路が推測できる可能性がある。

【CCR5指向性検査について】:今年度は43名全例解析可能であった。33名がCCR5指向性、10名がCXCR4指向性であった(サブタイプAEの症例も含む)。初診時のCD4陽性細胞数はCCR5指向性の症例は262/ $\mu$ l、CXCR4指向性の症例は353/ $\mu$ lでCXCR4指向性のほうが多い傾向があった(有意差なし)。HIV-RNA量はCCR5指向性の症例は4.67x10<sup>5</sup>コピー/ml、CXCR4指向性の症例は3.48x10<sup>5</sup>コピー/mlでCXCR4指向性のほうが多い傾向があった(有意差なし)。CCR5指向性の症例に急性感染の症例が含まれていることによると考えられた。

## E. 結論

- NNRTI領域の変異が増加傾向にある。
- プロテアーゼ領域の変異はpolymorphismがほとんどであった。
- CCR5指向性ウイルスはほぼ80%で推移している。

## F. 健康危険情報

なし