

Fig 3. 他施設における新規 HIV/AIDS 診断症例の背景 (n=191)

ウイルスが流行株として蔓延していることが示唆された。現在の抗 HIV 薬のガイドラインには Efavirenz が第 1 選択薬剤の一つとして挙げられている。本邦で長期使用されている Efavirenz は、K103N をもつウイルスに対し無効であることが知られているため、このような症例に対し最適な抗ウイルス薬を選択するためにも抗 HIV 療法開始前の薬剤耐性検査の施行が必要であると示唆された。

昨年まで測定していた BED アッセイはキットの入手が出来ず、一部の検体において測定ができなかった。この BED アッセイは新規感染と判断される偽陽性率が高いことや世界的に流行しているサブタイプ C に対応していないことが問題点として指摘されている。また膨大なサンプル数を用いた Consortium for Evaluation and Performance of HIV Incidence Assays (CEPHIA) による市販のキット (5 種) の評価が AIDS (Kassanjee R. *et al.* 2014, *AIDS*, 28, 2439-49) に報告されているが、「WHO/UNAIDS Technical update on HIV incidence assays for surveillance and epidemic monitoring」で推奨されている Limiting-Antigen(LA g) Avidity EIA が他のキットに比べ比較的良好な結果を示していた。今後、本研究において、より正確な評価をしていくために偽陽性率の低い、またより短い新規感染期間を判定

できる特異性の高いキットを検討、導入していく必要があると考えられた。

2014 年リコンビナントウイルスによる感染が疑われる症例が東海地区では見つからなかったが、全国 (他施設) から 1 例 (C と CRF01_AE) 見つかった。この症例について全長遺伝子配列を対象とした Breakpoint の解析をおこなったところ、6 箇所 Breakpoint が見付き、ロスアラモスが定義する CRF (Circulating Recombinant Form) にいずれも当てはまらないものであった。そのため新しい URF (Unique Recombinant Form) が本邦に入ってきていることが示唆され、今後の動向に注意する必要があると思われた。

HIV 感染拡大防止には HIV 検査の機会を増やし、早期診断と早期治療が重要であることが知られている。また Little S. J. *et al.* によると、遺伝子配列のデータと感染リスクといった患者背景を融合した解析から Transmission network を予測し、その情報を臨床現場へフィードバックさせることで、より効果的な予防介入が進められると報告していることから (*PLoS One*, 2014, 9, 6, e98443)、今後この東海地域においてもこの手法を導入し、検討する必要があると考えられた。最適な治療の施行への情報提供と伝播性薬剤耐性変異の流行阻止をするため、更なる

調査・解析を重ね、日本で流行している HIV の正確な動向を把握していくことが必要であると思われる。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1) 原著論文

欧文

1. Sakurai, D., Iwatani, Y., Ohtani, H., Naruse, T., Terunuma, H., Sugiura, W., Kimura, A. APOBEC3H polymorphisms associated with the susceptibility to HIV-1 infection and AIDS progression in Japanese. *Immunogenetics*, in press.
2. Yoshida S, Hattori J, Matsuda M, Okada K, Kazuyama Y, Hashimoto O, Ibe S, Fujisawa SI, Chiba H, Tatsumi M, Kato S, Sugiura W. Japanese External Quality Assessment Program to Standardize HIV-1 Drug-Resistance Testing (JEQS2010 Program) Using In Vitro Transcribed RNA as Reference Material. *AIDS research and human retroviruses*. 2014. (in press)
3. Watanabe T, Hamada-Tsutsumi S, Yokomaku Y, Imamura J, Sugiura W, Tanaka Y. Post-Exposure Prophylactic Effect of HBV-active Antiretroviral Therapy Against Hepatitis B Virus Infection. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 59(2):1292-8. 2015.
4. Shiino T, Hattori J, Yokomaku Y, Iwatani Y, Sugiura W. Phylodynamic Analysis Reveals CRF01_AE Dissemination between Japan and Neighboring Asian Countries and the Role of Intravenous Drug Use in Transmission. *PloS one*. 9(7):e102633. 2014.
5. Kudoh A, Takahama S, Sawasaki T, Ode H, Yokoyama M, Okayama A, Ishikawa A, Miyakawa K, Matsunaga S, Kimura H, Sugiura W, Sato H, Hirano H, Ohno S, Yamamoto N, Ryo A. The phosphorylation of HIV-1 Gag by atypical protein kinase C facilitates viral infectivity by promoting Vpr incorporation into virions. *Retrovirology*. 11:9. 2014.
6. Imahashi M, Izumi T, Watanabe D, Imamura J, Matsuoka K, Ode H, Masaoka T, Sato K, Kaneko N, Ichikawa S, Koyanagi Y, Takaori-Kondo A, Utsumi M, Yokomaku Y, Shirasaka T, Sugiura W, Iwatani Y, Naoe T. Lack of Association between Intact/Deletion Polymorphisms of the APOBEC3B Gene and HIV-1 Risk. *PloS one*. 9(3):e92861. 2014.
7. Gu L, Kawana-Tachikawa A, Shiino T, Nakamura

H, Koga M, Kikuchi T, Adachi E, Koibuchi T, Ishida T, Gao GF, Matsushita M, Sugiura W, Iwamoto A, Hosoya N. Development and Customization of a Color-Coded Microbeads-Based Assay for Drug Resistance in HIV-1 Reverse Transcriptase. *PloS one*. 9(10):e109823. 2014.

2) 学会発表

海外

1. Wataru Sugiura, Séverine Louvel, Nico Pfeifer, Masakazu Matsuda, Yoshiyuki Yokomaku, Rolf Kaiser, Thomas Klimkait. Discordant Tropism Determination For HIV-1 Isolates Of CRF01_AE From Asia. 14th International HIV Drug Resistance Workshop. Seattle, USA, February 21-22, 2015.
2. Shiino T, Sadamasu K, Nagashima M, Hattori J, Hachiya A, Sugiura W. Phylodynamic analysis of HIV-1 subtype B population in Japan: Identification of large transmission clusters and their network structure. 9th HIV Transmission Workshop 2014 Cape Town, South Africa, Oct 25-26, 2014.
3. Nemoto M, Iwatani Y, Maeda N, Horibe K, Sugiura W. Exome Sequencing Identified a Novel TYK2 Compound Heterozygous Mutation in 2 Siblings with Primary Immunodeficiency Joint Meeting of the 1st Africa International Biotechnology & Biomedical Conference and the 8th International Workshop on Approaches to Single-Cell Analysis, Nairobi, Kenya, Sep 10-12, 2014.
4. Nakashima M, Kitamura S, Kurosawa T, Ode H, Kawamura T, Imahashi M, Yokomaku Y, Watanabe N, Sugiura W, Iwatani Y. Crystal structure of the Vif-inteaction domain of the anti-viral APOBEC3F. 23rd Congress of the International Union of Crystallography (IUCr2014), Montreal, Canada, Aug 5-12, 2014.
5. Yokomaku Y, Kito Y, Matsuoka K, Ode H, Matsuda M, Shimizu N, Iwatani Y, Sugiura W. CCR3 and CCR5 Dual Tropic HIV-1 is a Possible Major Escape Mechanism Frommaraviroc-Containing Antiretroviral Therapy. International Workshop on Antiviral Drug Resistance(Meeting the Global Challenge), Berlin, Germany, Jun 3-7, 2014.
6. Ode H, Matsuoka K, Matsuda M, Hachiya A, Hattori J, Yokomaku Y, Iwatani Y, Sugiura W. HIV-1 Near Full-Length Genome Analysis by Next-Generation Sequencing: Evaluation of Quasispecies and Minority Drug Resistance. International Workshop on Antiviral Drug Resistance(Meeting the Global Challenge), Berlin, Germany, Jun 3-7, 2014.
7. Hattori J, Shiino T, Sugiura W, Japanese Drug Resistance HIV-1 Surveillance Network

Molecular Epidemiology of Recent Seroconverters and Drug-Resistant HIV-1 Transmission Networks in Japan. International Workshop on Antiviral Drug Resistance (Meeting the Global Challenge), Berlin, Germany, Jun 3-7, 2014.

8. Imahashi M, Izumi T, Imamura J, Matsuoka K, Ode H, Masaoka T, Sato K, Koyanagi Y, Takaori-Kondo A, Yokomaku Y, Sugiura W, Iwatani Y. Lack of Association between Intact/Deletion Polymorphisms of the APOBEC3B Gene and HIV-1 Risk. Cold Spring Harbor Laboratory Meetings & Courses Program, New York, USA, May 19-24, 2014.
9. Nakashima M, Kitamura S, Kurosawa T, Ode H, Kawamura T, Mano Y, Naganawa Y, Yokomaku Y, Watanabe N, Sugiura W, Iwatani Y. Fine-tuned HIV-1 Vif-interaction Interface of Anti-retroviral Cytidine Deaminase APOBEC3F. Cold Spring Harbor Laboratory Meetings & Courses Program, New York, USA, May 19-24, 2014.

国内

1. 魚田慎, 今村淳治, 古川聡美, 大出裕高, 横幕能行, 杉浦互. 次世代シーケンサを用いた Human Papillomavirus の検出及び解析方法の開発. 第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会, 大阪, 12 月 3-5 日, 2014 年.
2. 重見麗, 蜂谷敦子, 松田昌和, 今村淳治, 渡邊綱正, 横幕能行, 岩谷靖雅, 杉浦互. HIV-1 感染急性期における HIV 特異的な病態バイオマーカーの探索について. 第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会, 大阪, 12 月 3-5 日, 2014 年.
3. 芳田剛, 齋藤暁, 松岡和弘, 大出裕高, 岩谷靖雅, 保富康宏, 俣野哲朗, 三浦智行, 杉浦互, 明里宏文. サル指向性 HIV-1 の感染個体における増殖効率を上昇させる要因. 第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会, 大阪, 12 月 3-5 日, 2014 年.
4. 松田昌和, 大出裕高, 松岡和弘, 蜂谷敦子, 横幕能行, 岩谷靖雅, 杉浦互. Illumina MiSeq を用いた HIV-1 近全長遺伝子配列解析の試み. 第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会, 大阪, 12 月 3-5 日, 2014 年.
5. 岡崎玲子, 蜂谷敦子, 服部純子, 瀧永博之, 渡邊大, 長島真美, 貞升健志, 近藤真規子, 南留美, 吉田繁, 森治代, 内田和江, 椎野禎一郎, 加藤真吾, 千葉仁志, 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, 岩谷靖雅, 松田昌和, 重見麗, 保坂真澄, 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 28 回日本エイズ学会学術集会・総会, 大阪,

12 月 3-5 日, 2014 年.

6. 大出裕高, 中島雅晶, 河村高志, 北村紳悟, 長縄由里子, 黒澤哲平, 真野由有, 粟津宏昭, 松岡和弘, 横幕能行, 渡邊信久, 杉浦互, 岩谷靖雅. HIV-1 Vif における APOBEC3C/F 結合インターフェース. 第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会, 大阪, 12 月 3-5 日, 2014 年.
7. 杉浦互. フローサイトメトリー検査における 5-color 解析法の導入による影響. 第 68 回国立病院総合医学会, 横浜, 11 月 14-15 日, 2014 年.
8. 東濃篤徳, 鈴木紗織, 森健一, 大出裕高, 松岡和弘, 片貝祐子, 岡林佐知, 榎昇, 岩谷靖雅, 杉浦互, 明里宏文. 小型霊長類において持続感染した GBV-B の変異解析. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 11 月 10-12 日, 2014 年.
9. 芳田剛, 齋藤暁, 松岡和弘, 大出裕高, 岩谷靖雅, 杉浦互, 保富康宏, 俣野哲朗, 三浦智行, 明里宏文. In vivo におけるサル指向性 HIV-1 の増殖効率を上昇させる要因. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 11 月 10-12 日, 2014 年.
10. 本村和嗣, 飯塚節子, 中村昇太, 元岡大祐, 大出裕高, 杉浦互, 佐藤裕徳, 田中智之, 武田直和. ノロウイルス集団食中毒事例における混合感染の解析. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 11 月 10-12 日, 2014 年.
11. 中島雅晶, 大出裕高, 河村高志, 北村紳悟, 長縄由里子, 黒澤哲平, 真野由有, 粟津宏昭, 松岡和弘, 横幕能行, 渡邊信久, 杉浦互, 岩谷靖雅. 空間的に異なる APOBEC3 結合インターフェースをもつ HIV-1 Vif. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 11 月 10-12 日, 2014 年.
12. 大出裕高, 松岡和弘, 松田昌和, 蜂谷敦子, 横幕能行, 岩谷靖雅, 杉浦互. Deep sequencing による HIV-1 臨床検体の近全長ゲノム配列解析系の構築. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 11 月 10-12 日, 2014 年.
13. 大出裕高, 松岡和弘, 松田昌和, 蜂谷敦子, 服部純子, 横幕能行, 岩谷靖雅, 杉浦互. Deep Sequencing による近全長 HIV-1 ゲノムの Quasispecies 解析と微少薬剤耐性変異の検出. 第 16 回白馬シンポジウム, 熊本, 6 月 13-14 日, 2014 年.

G. 知的所有権の出願・取得状況

なし

横浜および近郊における薬剤耐性 HIV の動向調査研究

研究分担者 石ヶ坪 良明 横浜市立大学大学院医学研究科 病態免疫制御内科 教授
研究協力者 上田 敦久 横浜市立大学附属病院 リウマチ・血液・感染症内科

研究要旨

神奈川県における HIV/AIDS 診療の実態を把握するため平成 26 年度 1 月より 12 月に当院初診の新規未治療感染患者 18 名を対象に薬剤耐性検査と BED アッセイを継続して行った。最近の感染を疑う ODn <0.8 に該当する患者は 3 名おられ、うち 2 名は临床上初期 HIV 感染と診断できた。耐性検査は 14 名になされ临床上問題となりうる耐性として 2 名より T215C, T215D の耐性が認められた。14 名全員が指向性 R5 であった。また 3 名がサブタイプ 01_AE であり、残り 13 名はサブタイプ B であった。

A. 研究目的

当院診療圏（横浜市南部・三浦湘南地区）における HIV 感染の動向把握のために 8 年前より施行している新規未治療感染患者の薬剤耐性検査と BED アッセイを継続して行った。

（倫理面への配慮）

サンプリングは採血のみであり、多くは他の検査項目と一緒に行われた。薬剤耐性検査の解析結果は、治療開始時の薬剤選択において大いに有用であり、不利益な点はない。BED アッセイは患者の要請に基づき通知するが、偽陽性や偽陰性の頻度が高いこと同時に知らせ、また診療方針の決定には影響しない。情報の扱いには細心の注意が払われる。施設から出る情報は匿名化されたものを用い、個人を特定する情報の流出はない。本解析は当院の倫理委員会で承認されており、これに基づき研究の目的、研究に協力いただいたときの利益と不利益、参加の方法と内容、研究調査の適切な運営と情報の保護、研究成果の公表、協力して頂くことを説明し、同意のもとに行われた。

B. 研究方法

薬剤耐性検査および BED アッセイ； 2014 年度に当院を新規感染患者として受診した 18 名に研究の内容に同意を得た後に薬剤耐性検査および BED アッセイを施行した。薬剤耐性検査、指向性検査、サブタイプ解析は国立病院機構名古屋医療センターに検査を依頼、BED アッセイは calypte® HIV-1 BED incidence EIA キット（Calypte Biochemical Co., Rockville, MD）および CEDIA BED HIV-1 incidence EIA キット（SEDIA Biosciences, Portland, OR）を用いて調べた。

C. 研究結果

薬剤耐性検査および BED アッセイ

平成 19 年より平成 26 年の 8 年間に当院を初診した患者さんは 200 名であった。59 名（29.5%）が AIDS 発症を契機に診断された新規感染判明患者、102 名（51%）が AIDS 非発症の新規感染判明患者、39 名（19.5%）が紹介転院で当院を初診された患者で多くが治療を導入されていた。新規感染判明患者のうち 152 名に BED アッセイを行い 44 名（29%）

に最近の感染が疑われた。耐性検査は 141 名に施行され、11 名 (7.2%) に臨床上問題となりうる耐性を認めた [rtT215X(7),rtK103N(1), rtE138X(2), prM46I(1)]。

この比率はこの 8 年間で大きな変化はなく、平成 26 年度に当院を初診した HIV 感染患者も 21 名で、AIDS 発症 8 名 (38%)、非発症 10 名 (48%)、紹介転院が 3 名 (14%) であった。内訳は男性 20 名、女性 1 名、邦人 20 名、外国籍 1 名 (ベトナム) であった。このうち、未治療例は 18 名、新規感染判明患者は 18 名であった。未治療例 18 名中 18 名に BED アッセイを施行した。ODn <0.8 は 3 名 (14%) であった。そのうち 2 名は抗体検査の結果から初期 HIV 感染と診断されていた。1 名は 7 ヶ月前に感染を強く疑うエピソードがあったが、諸検査から初期感染の診断には至らなかった。14 名に耐性検査、指向性検査、サブタイプ解析が施行された。薬剤耐性変異は 2 名 (9.5%) にそれぞれ T215C、T215D を認めた。指向性は全員が R 4 であり、サブタイプ解析では 3 例が O1_AE であり、他はすべて B であった。AE 症例は日本国籍の方であった。

D. 考察

BED 陽性で最近の感染が疑われる患者比率は、8 年前より増加傾向であったが、最近は転じて減少傾

向にある。全体を通しては大きな変化は見取れない。臨床上問題となる耐性変異もこの 8 年間で年間 0~4 名で平均 7.2%、昨年も 9.5% であり例年どおりであった。

当院の初診患者は、この 8 年間で増加傾向であったが、昨年度は 21 名と減少に転じている。同じ横浜で新たに HIV 感染患者の診療を開始した病院があり、その影響も考えられる。

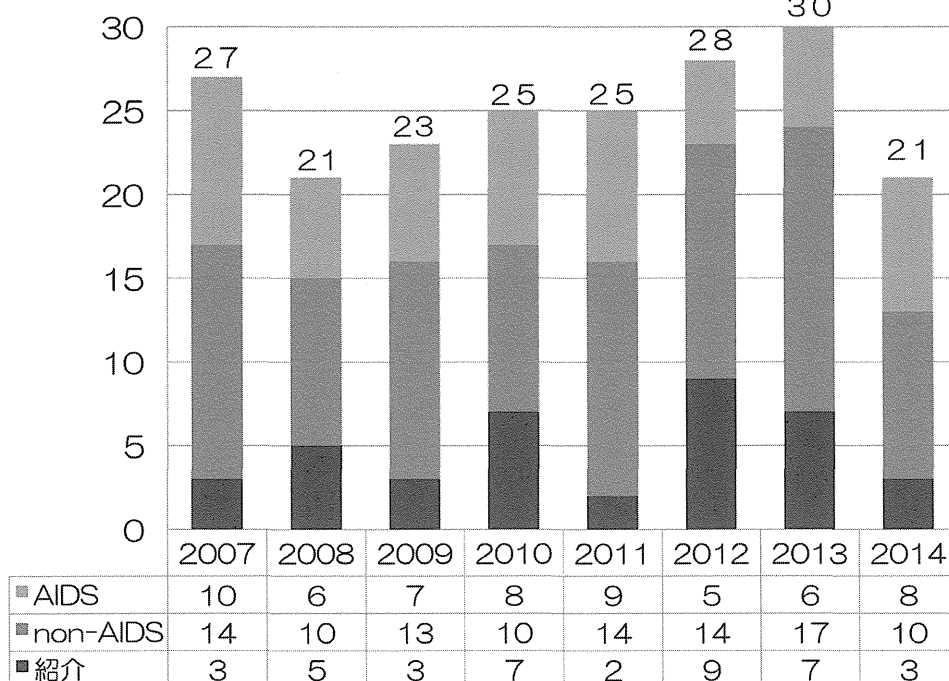
E. 結論

神奈川県東南部に診療圏を持つ横浜市立大学附属病院の新規感染患者を対象に薬剤耐性変異検査および BED アッセイを施行した。薬剤耐性変異は 26 年度の新規感染判明患者に 2 名認め、傾向を慎重に見守る必要がある。ODn <0.8 の頻度は当診療圏において大きな変動はみられない。耐性変異の動向を明らかにするために今後もデータの蓄積を継続するべきと考えられる。

F. 健康危険情報

なし

当院初診年次患者数



Sex	Age	初診日	感染時期	AIDS発症	CD4	ウイルス量	ODn
558 M	55	3/3	不明	PCP	9	130000	1.40
559 M	32	3/6	PHI		195	2900000	0.05
560 M	32	4/2	不明		355	21000	3.23
561 M	46	3/18	不明	NTM	6	330000	3.97
562 M	26	3/27	2013/8月		514	37000	0.18
564 M	56	5/14	PHI		226	1600000	0.04
565M	36	4/17	不明	PCP	88	250000	3.26
566 M	29	5/26	不明		188	51000	3.69
567 M	38	6/12	不明	PCP	75	2700000	1.53
570 M	28	6/19	不明		664	28000	0.86
571 M	51	6/24	不明	PCP	43	240000	2.15
572 M	50		不明	PCP	32	520000	1.73
573 M	35	7/9	不明	PCP	185	4600000	2.43
575 M	30	9/4	不明		339	56000	2.70
576 M	39	7/11	不明	KS	50	180000	2.34
577 M	23	11/10	不明		518	22000	3.22
578 M	21	9/18	不明		613	29000	2.81
580 M	60	12/1	不明				2.71

Sex	Age	PI	RT	INT	Subtype	トロピズム	Odn
558 M	55	I15V, G16E, K20R, M36I, L63P	(-)	(-)	AE	R5	1.40
559 M	32	M36I, L63P, A71T	T215C	(-)	B	R5	0.05
560 M	32	I15V	T215D	(-)	B	R5	3.23
561 M	46	(-)	(-)	(-)	B	R5	3.97
562 M	26	I15V, M36I, I62V	(-)	(-)	B	R5	0.18
564 M	56	L63P, A71T, V77I	(-)	(-)	B	R5	0.04
566 M	29	I62V, A71T, V77I	(-)	L74M	B	R5	3.69
570 M	28	L10V, K20R, M36I, L63P	V106I, V179I	(-)	AE	R5	0.86
571 M	51	L10I/V, G16E, M36I, I62V	(-)	E157Q	B	R5	2.15
573 M	35	V77I	(-)	(-)	B	R5	2.43
575 M	30	L10V, L63P, V77I	(-)	(-)	B	R5	2.70
576 M	39	I62V, V77I	(-)	(-)	B	R5	2.34
577 M	23	L10V, I15V, H69Q, V77I	(-)	(-)	B	R5	3.22
578 M	21	L10V, K20R, M36I, L63P	(-)	(-)	AE	R5	2.81

G. 研究発表

1) 口頭発表

1. 上田 敦久、白井 輝、加藤 英明、比嘉 令子、寒川 整、石ヶ坪 良明、横浜市立大学附属病院における抗 HIV 薬スタリビルドの使用経験、第 88 回日本感染症学会総会 2014 年 6 月 横浜
2. 筑丸 寛、大久保牧子、上田敦久、白井 輝、竹林早苗、松山奈央、石川好美、金子明寛、太田嘉英、石ヶ坪良明、藤内 祝 HIV 感染者の口腔前癌病変発症リスクの 検討 第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会 2014 年 12 月 大阪
3. 仲野寛人、上田敦久、寒川 整、比嘉令子、石ヶ坪良明、17 例の急性 HIV 感染症の報告 第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会 2014 年 12 月 大阪
4. 上田敦久、寒川 整、松山奈央、竹林早苗、白井 輝、田原 秀、石ヶ坪良明神奈川県 HIV 診療の現状についてのアンケート調査 第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会 2014 年 12 月 大阪
5. 加藤英明、石井哲人、上田敦久、石ヶ坪良明 HIV 診療を再開したエイズ診療拠点病院 での患者受診状況と院内での受け入れに対する考察 第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会 2014 年 12 月 大阪
6. 比嘉令子、上田敦久、寒川 整、仲野寛人、筑丸 寛、石ヶ坪良明、多彩な合併症を呈した Cryptococcus 髄膜炎の二症例 第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会 2014 年 12 月 大阪

H. 知的所有権の出願・取得状況

なし

東北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 伊藤 俊広 仙台医療センター HIV/AIDS 包括医療センター 室長
研究協力者 佐々木 悟 仙台医療センター臨床検査科 細菌主任

研究要旨

平成 25 年度（平成 25 年 12 月～平成 26 年 3 月）及び平成 26 年度（平成 26 年 4 月～11 月まで）「国内で流行する HIV とその薬剤耐性株の動向把握に関する研究」の分担研究として東北地方における新規 HIV 感染者における薬剤耐性 HIV の現状を調査した。検査対象は新規感染者 14 症例と HIV 感染症診断後未治療期間をおいたのち ART 開始前に耐性検査を行った 1 例の計 15 例である。サブタイプでは B14 例、AG1 例であった。MSM11 例、異性間感染 4 例（男性 2 例、女性 2 例）。AIDS 発症 9 例。耐性変異：RT 領域では 6 例に耐性変異を認め（A98S、V179E、V118IV、V106I、V90I、K103KR、K103R）、プロテアーゼ領域では A71V（2 例）、L10I（2 例）、L10V（1 例）、L89I（1 例）、I62V（5 例）、I62IV（3 例）、I64V（1 例）、I15V（2 例）、K20KM（1 例）、K20I（1 例）、V77IV（2 例）の変異を検出した。インテグラーゼ領域の検査が可能であった 10 例中 6 例で変異が検出され、T206S（2 例）、S230N（1 例）、T124A（2 例）、K156N（3 例）L74I（1 例）であった。

A. 研究目的

すでに慢性疾患と認識される HIV 感染症であるが、今後も継続的に問題とすべきものの一つに薬剤耐性ウイルスの出現がある。HIV それ自体が持つ易変異性と治療を受ける患者側の薬剤服用アドヒアランスがその出現に大きな影響力を持つが、感染拡大と疾患コントロールの観点から耐性ウイルスの発生動向の把握は重要であり、現状把握が必要である。耐性ウイルスをサーベイすることにより適切な初期治療の選択や新薬の開発、また同系の耐性ウイルスの拡がりを把握することにより感染集団の同定やその広がりを知ることができる可能性が高い。

国内で流行する HIV とその薬剤耐性株の動向を把握するため、東北地方における新規感染者における薬剤耐性 HIV の発生状況を調査した。

本研究の目的は、臨床サイドで分離されるこれらウイルスの耐性遺伝子部位の変化を調べることにより、ウイルスの持つ性格と動向を知り、治療法の評価や HIV 基礎研究に役立てることである。今回は平成 25 年 12 月～平成 26 年 11 月の新規症例分に、平成 23 年初診し ART 開始直前に耐性検査を行った 1 例を加え報告する。

B. 研究方法

対象症例の血漿中 HIV RNA を用い、これらウイルスが持つ性質の一つである薬剤耐性遺伝子変異について検討した。方法：「国内で流行する HIV とその薬剤耐性株の動向把握に関する研究」班および「HIV 検査相談の充実と利用機会の促進に関する研究」班による HIV-1・-2 技術研修会での HIV-1 薬剤耐性遺伝子検査法に準じて実施した。すなわち、RT-PCR とそれに引き続き Nested PCR で遺伝子増幅を行い、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer で増幅した遺伝子産物の塩基配列解析を実施した。得られた塩基配列は STANFORD UNIVERSITY HIV DRUG RESISTANCE DATABASE で薬剤耐性遺伝子変異を検索した。

（倫理面への配慮）

耐性遺伝子変異データの集計においては個人名、個人情報の同定は不可能であり、HIV 関連遺伝子以外の遺伝学的研究には用いない。

C. 研究結果

仙台医療センターにおける平成 26 年 11 月末日

までの HIV/AIDS 感染者の累計は 275 名である。東北全体での平成 26 年 9 月までの累計では 521 名で、全国と同様に増加している。平成 25 年 12 月～平成 26 年 11 月の期間に当院を初診した HIV 感染者は 24 例（女性 3 例）で、すべて性的接触による感染（MSM: 19 例、異性間: 5 例）であった。治療歴のない HIV 感染者で本研究の対象となった症例はこれら 24 例中の 14 例（MSM: 10 例、異性間男性 2 例、女性 2 例）と ART 開始直前の 1 例（MSM）、全 15 例である。年齢は 17 歳から 52 歳で平均 37.7 歳、中央値は 38 歳で AIDS 発症 9 例、キャリアー 6 例。耐性検査時の HIV ウイルス量は $1.1 \times 10^3 \sim 5.9 \times 10^5$ コピー / ml、ウイルス subtype は 14 例が B、黒人男性からの感染と考えられた女性 1 例で AG であった。

RT 領域では 6 例に耐性変異を認め（A98S、V179E、V118IV、V106I、V90I、K103KR、K103R）、プロテアーゼ領域では A71V（2 例）、L10I（2 例）、L10V（1 例）、L89I（1 例）、I62V（5 例）、I62IV（3 例）、I64V（1 例）、I15V（2 例）、K20KM（1 例）、K20I（1 例）、V77IV（2 例）の変異を検出した。インテグラーゼ領域の検査が可能であった 10 例中 6 例で変異が検出され、T206S（2 例）、S230N（1 例）、T124A（2 例）、K156N（3 例）、L74I（1 例）であった。

D. 考察

東北においても全国と同様に HIV 感染者は同性間の性的接触（MSM）を中心に増加傾向にある。治療（多剤併用療法：cART）開始時に耐性ウイルスの存在の有無を確認することは治療薬剤の選択だけでなく、その後のさらなる耐性出現を防ぐ上でも重要である。新規に開発される薬剤についても適時サーベイして行く必要がある。インテグラーゼ領域の耐性検査において少なからず変異が検出されたが、現時点において実際の診療上、抗 HIV 療法の薬剤選択に大きな混乱は生じていない。

E. 結論

平成 25 年 12 月～平成 26 年 11 月の期間の HIV 感染症新規症例 14 例と ART 開始前症例 1 例に対し薬剤耐性検査を施行し、13 例で耐性変異を検出した。今後も継続的サーベイランスが必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 論文発表

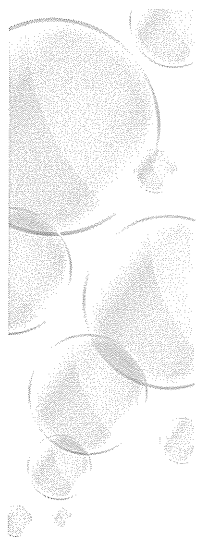
1. 佐藤麻希、阿部憲介、山本善彦、諏江裕、伊藤俊広：東日本大震災の経験から考える災害時の抗 HIV 薬供給と服薬支援策の課題：日本エイズ学会誌、16: 105-109、2014.
2. 阿部憲介、佐藤麻希、神尾咲留未、小山田光孝、塚本琢也、佐々木晃子、伊藤ひとみ、佐藤功、伊藤俊広：当院における TDF 関連高 CK 血症の検討：仙台医療センター医学雑誌、4: 20-24、2014.
3. 木村 哲、山本政弘、橋野聡、伊藤俊広、上平朝子：HIV 感染症の検査・診断・治療における『連携』の諸問題を考える（座談会）：医薬の門、53:356-365、2014.

2) 学会発表

1. 神尾咲留未、佐藤麻希、阿部憲介、小山田光孝、塚本琢也、佐々木晃子、伊藤ひとみ、佐藤 功、伊藤俊広：インテグラーゼ阻害剤による出血症状の増悪が疑われた HIV/ 重症血友病 A の一例：第 28 回日本 AIDS 学会、2014、12 月、大阪
2. 池田和子、若林チヒロ、岡本 学、渡部恵子、遠藤知之、伊藤ひとみ、伊藤俊広、川口 玲、田邊嘉也、羽柴智恵子、横幕能行、高山次代、上田幹夫、下司有加、白阪琢磨、木下一枝、藤井輝久、城崎真弓、山本政弘、岡 慎一、生島 嗣：ブロック拠点病院と ACC における「健康と生活調査」－ HIV 治療と他疾患管理の課題－：第 28 回日本 AIDS 学会、2014、12 月、大阪
3. 大金美和、池田和子、若林チヒロ、坂本玲子、遠藤知之、伊藤ひとみ、伊藤俊広、川口 玲、田邊嘉也、羽柴智恵子、横幕能行、山田三枝子、上田幹夫、下司有加、白阪琢磨、鍵浦文子、藤井輝久、城崎真弓、山本政弘、岡 慎一、生島 嗣：ブロック拠点病院と ACC における「健康と生活調査」－自覚症状とメンタルヘルス－：第 28 回日本 AIDS 学会、2014、12 月、大阪
4. 岡本 学、生島 嗣、大金美和、坂本玲子、遠藤知之、伊藤ひとみ、伊藤俊広、川口 玲、田邊嘉也、羽柴智恵子、横幕能行、山田三枝子、上田幹夫、下司有加、白阪琢磨、鍵浦文子、藤井輝久、城崎真弓、山本政弘、岡 慎一、若林チヒロ：ブロック拠点病院と ACC における「健康と生活調査」－就労と職場環境－：第 28 回日本 AIDS 学会、2014、12 月、大阪
5. 岡崎玲子、蜂谷敦子、服部純子、瀧永博之、渡邊大、長島真美、貞升健志、近藤真規子、南留美、吉田 繁、森 治代、内田和江、椎野禎一郎、加藤真吾、千葉仁志、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、岩谷靖雅、松田昌和、重見麗、保坂真澄、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 28 回日本 AIDS 学会、2014、12 月、大阪
6. 生島 嗣、岡本 学、池田和子、渡部恵子、遠藤知之、伊藤ひとみ、伊藤俊広、川口 玲、田邊嘉也、羽柴智恵子、横幕能行、高山次代、上田幹夫、下司有加、白阪琢磨、木下一枝、藤井輝久、城崎真弓、山本政弘、岡 慎一、若林チヒロ：ブロック拠点病院と ACC における「健康と生活調査」－薬物使用の状況－：第 28 回日本 AIDS 学会、2014、12 月、大阪
 7. 須貝 恵、吉田 緑、センテノ田村恵子、鈴木智子、辻 典子、築山亜紀子、濱本京子、田邊嘉也、伊藤俊広：拠点病院診療案内 2014 年度版からみる拠点病院の現状：第 28 回日本 AIDS 学会、2014、12 月、大阪
 8. 阿部憲介、佐藤麻希、若生治友、神尾咲留未、伊藤俊広、小山田光孝、水沼周市：薬学部実務実習生における HIV/AIDS に関する意識調査：第 28 回日本 AIDS 学会、2014、12 月、大阪
 9. 若林チヒロ、池田和子、岡本 学、渡部恵子、遠藤知之、伊藤ひとみ、伊藤俊広、川口 玲、田邊嘉也、羽柴智恵子、横幕能行、高山次代、上田幹夫、下司有加、白阪琢磨、木下一枝、藤井輝久、城崎真弓、山本政弘、岡 慎一、生島 嗣：ブロック拠点病院と ACC における「健康と生活調査」－基本的属性と感染判明後の生活変化－：第 28 回日本 AIDS 学会、2014、12 月、大阪
 10. 須藤美絵子、山本奈津子、阿部直美、工藤麻子、伊藤ひとみ、伊藤俊広、阿部憲介：視力障害を持つ AIDS 患者の服薬支援：第 28 回日本 AIDS 学会、2014、12 月、大阪
 11. 伊藤俊広：HIV 診療になぜネットワークが必要か 紹介事業に必要な支援のあり方：第 28 回日本 AIDS 学会（シンポジウム 2、歯科等医療体制：HIV 診療と医療ネットワーク（患者紹介システム））、2014、12 月、大阪
 12. 伊藤俊広：医師の立場から：第 28 回日本 AIDS 学会（シンポジウム 9、HIV カウンセリングにおいて変化すること・変化しないこと－カウンセラーの経験から読み解く－）、2014、12 月、大阪
 13. 阿部憲介、佐藤麻希、小山田光孝、神尾咲留未、塚本琢也、鈴木智子、伊藤俊広、吉野宗宏、木平健治：宮城県における学校薬剤師と病院薬剤師の連携による性感染症の予防啓発に関する検討：第 47 回日本薬剤師会学術大会、2014、10 月、山形
 14. 神尾咲留未、阿部憲介、小山田光孝、塚本琢也、佐々木晃子、伊藤ひとみ、佐藤 功、伊藤俊広：抗 HIV 薬と精神科薬剤との薬物相互作用に関する取り組み：第 68 回国立病院総合医学会、2014、11 月、横浜
 7. 山本善彦、佐藤 功、伊藤俊広：仙台医療センターにおける HIV 感染患者の合併慢性感染症の検討：第 27 回日本 AIDS 学会、2013、11 月、熊本

H. 知的所有権の出願・取得状況 なし



首都圏近郊における薬剤耐性 HIV の動向調査研究

～首都圏及び近郊における HIV と薬剤耐性株の動向把握に関する研究～

研究分担者	内田 和江	埼玉県衛生研究所 ウイルス担当
研究協力者	鈴木 典子	埼玉県衛生研究所 ウイルス担当
	宇野 優香	さいたま市健康科学研究センター 保健科学科
	永田 紀子	茨城県衛生研究所 ウイルス部
	人見 重美	筑波大学大学院 人間総合科学研究科
	鈴木 兼一	栃木県保健環境センター 微生物部
	長島 史子	宇都宮市衛生環境試験所 微生物担当
	大沼 正行	山梨県衛生環境研究所 微生物部
	藤井ますみ	長野県環境保全研究所 感染症部

研究要旨

首都圏のうち埼玉県、茨城県、栃木県及び山梨県とその近郊である長野県で 2013 年から 2014 年に保健所等検査受診により、新たに HIV 感染が確認された 12 例の検体について HIV の薬剤耐性変異及び遺伝子型（サブタイプ）を調査した。薬剤耐性変異は、プロテアーゼ領域の Major mutation は 12 例全てに検出されず、Minor mutation は 9 例に 1 ケ所以上検出された。逆転写酵素領域では、V108IV が 1 例に、V179D/V が他の 1 例に検出された。インテグラーゼ領域では、L74I が 2 例、E157Q が 1 例に検出された。サブタイプは 12 例全て B であった。

A. 研究目的

国内で流行している薬剤耐性 HIV の発生動向及び疫学的動向を把握するため、その一環として、首都圏のうち埼玉県、茨城県、栃木県及び山梨県とその近郊である長野県を対象とし、新規 HIV 感染例について、薬剤耐性変異、遺伝子のサブタイプを調査した。また、HIV との重感染の増加や使用薬剤の HIV への影響が懸念される B 型肝炎 (HB)、C 型肝炎 (HC) についても抗原、抗体の有無を調査した。

B. 研究方法

1. 調査対象

2013 年から 2014 年に埼玉県、茨城県、栃木県、山梨県及び長野県の保健所等での HIV 検査で HIV 抗体陽性と判定された新規 HIV 感染者 12 例からの血清または血漿検体（2013 年：1 検体、2014 年 11 検体）を供試した。

2. 方法

1) 薬剤耐性変異及び HIV サブタイピングの解析

各検体 200 μ l からウイルス RNA を抽出し、RT-nested PCR 法により得たプロテアーゼ (PR)、逆転写酵素 (RT)、インテグラーゼ (IN)、エンベロープ (env) 及び gag 領域の増幅 DNA の塩基配列をダイレクトシーケンスにより解析した。シーケンス反応は BigDye Terminators v1.1 Cycle sequencing Kit (ライフテクノロジー ジャパン株式会社)、解析は ABI 3500 Genetic Analyzer を用いた。PCR 及びシーケンス反応のプライマーは、国立感染症研究所病原体検出マニュアルに記載されたものを使用した。

得られた PR、RT、IN 領域のアミノ酸配列 (PR 領域の 1～99 番目、RT 領域の 1～240 番目及び IN 領域の 1～288 番目) は、IAS-USA 報告

表 1 新規感染例の調査結果 (2014 年)

診断年	症例 No.	年齢	国籍	感染経路	薬剤耐性変異			Subtype	HBs 抗原	HCV 抗体
					PR	RT	IN			
2013	1	21	日本	同性間	V82I,I93L	-	-	B	(-)	(-)
2014	2	26	日本	同性間	-	-	-	B	(-)	(-)
2014	3	60	日本	同性間	I64M,A71V,I93L	-	L74I	B	(-)	(-)
2014	4	26	日本	同性間	-	-	-	B	(-)	(-)
2014	5	25	日本	同性間	I62V,A71V,V77I,I93L	V108IV	-	B	(-)	(-)
2014	6	25	日本	同性間	I62V,V77I(/V),I93L	-	-	B	(-)	(-)
2014	7	37	日本	同性間	I62V,V77IV	-	-	B	(-)	(-)
2014	8	45	日本	同性間	-	V179DV	-	B	(-)	(-)
2014	9	32	日本	同性間	L10I,I62V,A71T,V77I,I93L	-	L74I,E157Q	B	(-)	(-)
2014	10	37	日本外	同性間	V77I,I93L	-	-	B	(-)	(-)
2014	11	25	日本	同/異性間	I64V	-	-	B	(-)	(-)
2014	12	30	日本	同性間	I62V,L63P,V77I,I93L	-	増幅せず	B	(-)	(-)

性別:すべて男性

(Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1: March 2013) 及び Shafer' s criteria に基づき薬剤耐性変異の有無を判定した。サブタイプは、PR/RT、env、gag 領域の塩基配列について、スタンフォード大学の HIV Drug Resistance Database (<http://hivdb.stanford.edu/>) 及びロスアラモス国立研究所の HIV Databases (<http://www.hiv.lanl.gov/content/index>) のプログラムを使用し決定した。

(倫理面への配慮)

本研究は、埼玉県衛生研究所倫理審査委員会の承認を受けて実施した。保健所で採取された検体は、匿名で検査受付された。保健所及び拠点病院から検体及び臨床情報の提供を受けるに当たっては、すべて匿名化し個人が特定できないようにする等、研究対象者に不利益が生じないよう十分に配慮した。

C. 研究結果

1. 薬剤耐性変異の解析及び HIV サブタイプ

調査検体 12 例の概要と検査結果を表 1 に示した。12 例の感染者の国籍は日本 11 例、日本外 1 例であった。性別は全て男性であった。問診から得た感染経路は、同性間性的接触 11 例、同性または異性間の性的接触 1 例であった。年齢は 20 歳代から 60 歳代であり、20 歳代が 6 例と最も多

かった。また、12 例のサブタイプは、全て B であった。

薬剤耐性変異は、PR 領域では Major mutation は検出されず、1 ヶ所以上の Minor mutation が 9 例に検出された。検出された Minor mutation では、I93L (7 例、77.8%)、V77I(/V) (6 例、66.7%) が比較的高い頻度で検出された。RT 領域の耐性変異は、V108I/V、V179D/V がそれぞれ異なる 1 例に検出された。IN 領域の耐性変異は、L74I が 2 例に検出され、うち 1 例には E157Q も検出された。

2. HBs 抗原及び HCV 抗体検査

12 例全てで 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 12 例は全て男性であり、また 1 例を除き全て日本国籍であった。サブタイプは 12 例全て B であった。以上のことから、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 12 例のうち、PR 領域の Minor mutation が 9 例に検出され、RT 領域、IN 領域に 1 ~ 2 ヶ所の耐性変異があるものが 4 例認められた。しかし治療に問題が生じるような多くの耐性変異を持つ例は検出されなかった。また、B 型肝炎、

C 型肝炎の陽性例は検出されなかった。今年度は試薬の入手ができなかったため、BED assay を実施しなかったが、来年度研究に合わせて実施する予定である。感染拡大阻止のためにも、今後も継続的に HIV 感染症における流行株の耐性変異、サブタイプ、肝炎との重感染、感染の早期発見の割合等のデータを収集していく必要があると考える。

E. 結論

2013 年から 2014 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 12 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、12 例全て B であった。薬剤耐性変異は、PR 領域の Major mutation は検出されず、1ヶ所以上の Minor mutation が 9 例で認められた。RT 領域の耐性変異は、V108IV、V179D/V がそれぞれ異なる 1 例に検出された。IN 領域の耐性変異は L74I が 2 例に、E157Q が 1 例に検出された。HBs 抗原、HCV 抗体陽性例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

- 岡崎玲子, 蜂谷敦子, 服部純子, 瀧永博之, 渡邊大, 長島真美, 貞升健志, 近藤真規子, 南留美, 吉田繁, 森治代, 内田和江, 椎野禎一郎, 加藤真吾, 千葉仁志, 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, 岩谷靖雅, 松田昌和, 重見麗, 保坂真澄, 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 28 回日本エイズ学会学術集会・総会, 大阪, 12 月 3-5 日, 2014 年

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 26 (2014) 年 11 月現在で 101 名の HIV 感染症患者が通院しているが、それらの多くは平成 19 年以降の初診症例が占めている。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 HIV 療法に導入に至っている。我々は、抗 HIV 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 HIV 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。

2014 年は、治療開始前の患者 13 名、治療開始後の 1 名の計 14 名について薬剤耐性検査を実施した。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したが、major mutation を含むのは 1 例のみであった。また逆転写酵素 (RT) 領域およびインテグラーゼ (INT) 領域についてはいずれも主要な薬剤耐性変異を認めなかった。Pol 領域の解析の結果、14 名のうち 13 名がサブタイプ B、1 名は G であると推測された。

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 101 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 26 (2014) 年 11 月までの間に 98 名の新規患者が当院を受診した。AIDS 発症例は、平成 19 (2007) 年度以降 24 名を数える。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 cART 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 cART 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来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 HIV 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 HIV 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。

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 26 年度に当院を新規受診した患者は、HIV 感染症患者 7 名、AIDS 症例 4 名の計 11 名であった (Fig1)。AIDS 症例の割合が最近では比較的高かった。

平成 25 年 1 月から 11 月までに新規に cART 開始前の患者 13 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 (Fig. 2)。14 名中 6 名で RT 領域に薬剤耐性変異を認めた。1 名は T215C の revertant であった。主要な薬剤変異は認めなかった。protease 領域については 14 名全てで

polymorphism を含め 1 カ所以上の変異が確認された。1 名に I150V の major mutation が認められた。integrase 領域については、主要な薬剤耐性変異を認めなかった。

REGA HIV-1 Subtyping Tool-Version2.0 (<http://dbpartners.stanford.edu/RegaSubtyping/>) を用いて、Pol 領域の配列をもとにサブタイプを解析した結果、14 名のうち 13 名がサブタイプ B、1 名は G であると推測された。

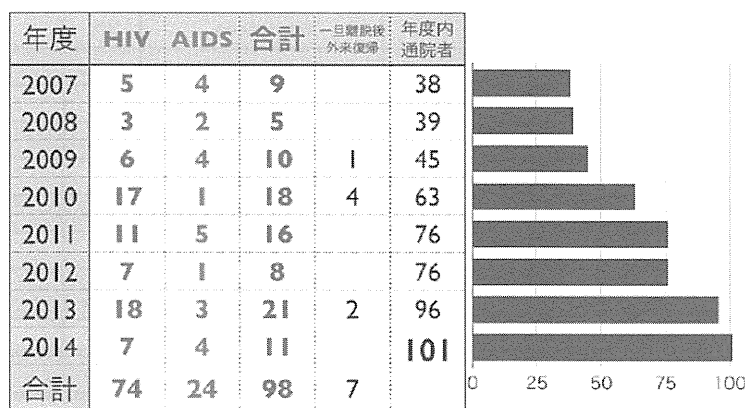
また枠で囲ってある 25 歳女性症例は、当院に救急搬送された墜落分娩の症例であった。

D. 考察

抗 HIV 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 HIV 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。

逆転写酵素領域およびインテグラーゼ領域においては、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認めなかった。プロテアーゼ領域においては、1 名にのみ I50V 変異を認めたのみで、薬剤

年度別新規受診患者内訳



2014年11月末現在

Fig.1 平成 19 (2007) 年から平成 26 (2014) 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、一旦離脱後外来再通院患者数、年度末の通院患者数を示す。右のグラフは年度別の当院通院者数を示す。

耐性変異の割合は低かった。

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、14 例全例に逆転写酵素領域の変異を認めしたが、主要な薬剤耐性は 1 例のみであった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 原著論文

1. Kitazawa T, Yoshino Y, Suzuki S, Koga I, Ota Y. Lopinavir inhibits insulin signaling by promoting protein tyrosine phosphatase 1B expression. *Exp Ther Med.* 2014 8:851-855.

2) 学会発表

1. I. Koga, K. Seo, Y. Wakabayashi, S. Suzuki, Y. Yoshino, T. Kitazawa, I. Kurahashi, Y. Ota. Increased urinary NTX predicts progressive decreases in bone mineral density among HIV patients on CART. 24th ECCMID. May, 2014, Barcelona, Spain.
2. 古賀 一郎、妹尾 和憲、若林 義賢、鈴木 智史、吉野 友祐、北沢 貴利、太田康男。HIV 感染症患者に認

めた脆弱性骨折とその対策の検討。第 88 回日本感染症学会学術集会。2014 年 6 月、福岡。

3. 古賀一郎、妹尾和憲、若林義賢、吉野友祐、北沢貴利、太田康男。cART 開始前の HIV 感染症患者における骨密度低下の頻度と臨床マーカーの解析。第 28 回日本エイズ学会学術集会。2014 年 12 月、大阪。
4. 岡崎玲子、蜂谷敦子、服部純子、瀧永博之、渡邊大、長島真美、貞升健志、近藤真規子、南留美、吉田繁、森治代、内田和江、椎野禎一郎、加藤真吾、千葉仁志、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、岩谷靖雅、松田昌和、重見麗、保坂真澄、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 28 回日本エイズ学会学術集会。2014 年 12 月、大阪。

H. 知的所有権の出願・取得状況

なし

年月	年齢	性別	CD4	VL	Sub type	RT	PR	INT	FPR
2014.04	32	M	204	51000	B	V179E	L63P, A71V, I93L	なし	
2014.04	36	M	357	9500	B	なし	E35D, M36I, L63A, H69R	なし	
2013.04	47	M	126	230000	G,G/A	なし	L10V, I13VA, K20I, M36I, L63P, H69K, L89M	なし	
2014.04	43	M	955	27000	B	なし	I13V, I50VI, L63A	なし	
2014.04	48	M	18	63000	B	なし	G16E, I62V	なし	
2014.05	42	M	455	400	B	K101Q	L10LI, I62V, L63A, H69HY, I85IV, I93IL	E157Q	
2014.05	30	M	346	14000	B	L210F	I62V, L63A, A71V, I93L	なし	
2014.08	41	M	274	6200	B	T69N, L100I, K103N, V179I, T215C	L10I, I62VI, L63Q, V77I, I93L	G163D, D232N	
2014.07	28	M	239	3000	B	V179D	L63T, A71V, V77T, I93L		
2014.07	25	F	352	5600	G	なし	I13V, K20I, M36I, L63P, H69R, L69M	L74M	
2014.07	41	M	410	4600	B	なし	E35D, L63P, H69K, I93L	E157Q/E	
2014.07	61	M	39	41000	B	なし	M36I, I62V, L63P, A71V, V77I	なし	
2014.11	22	M	34	58000	B,B/D	V179I	L63A, V82I	なし	
2014.12	45	M	152	300000	B	なし	E35D/E, L63A, A71V, I93L	G163R	

Fig.2 平成 26 年 1 月から 11 月に薬剤耐性検査を実施した 14 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 を示す

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 26 年 1 月から 12 月の間に、124 人の HIV-1 感染者が新規に診断された。これらの感染者に対して 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、8 人の患者 (6.5%) に主要な薬剤耐性変異が認められた。逆転写酵素の E138A が 2 人、T215D が 1 人、T215E が 3 人、プロテアーゼ領域の M46L と Q58E が同時に 1 人の感染者に認められ、インテグラーゼ領域の T66I が 1 人に認められた。サブタイプは、B が 102 人、01_AE が 10 人、02_AG が 2 人、07_BC が 3 人、A が 1 人、C が 2 人、F1 が 1 人、G が 2 人であった。1 人は PCR 陰性でシーケンスが得られず、サブタイプの決定ができなかった。

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た。

(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た。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 26 年 1 月から 12

月の間に、124 人の HIV-1 感染者が新規に診断された。これらの感染者に対して 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、8 人の患者 (6.5%) に主要な薬剤耐性変異が認められた。逆転写酵素の E138A が 2 人、T215D が 1 人、T215E が 3 人、プロテアーゼ領域の M46L と Q58E が同時に 1 人の感染者に認められ、インテグラーゼ領域の T66I が 1 人に認められた。サブタイプは、B が 102 人、01_AE が 10 人、02_AG が 2 人、07_BC が 3 人、A が 1 人、C が 2 人、F1 が 1 人、G が 2 人であった。1 人は PCR 陰性でシーケンスが得られず、サブタイプの決定ができなかった。

D. 考察

主要な耐性変異を持つ患者の割合は、毎年散見される。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. Kuse, Akahoshi, Gatanaga, Ueno, Oka, Takiguchi. Selection of T18-8V mutant associated with long-term control of HIV-1 by cross-reactive HLA-B*51:01-restricted cytotoxic T cells. *Journal of Immunology*. 193(10):4814-4822. 2014.
2. Mizushima, Tanuma, Dung, Trung, Lam, Gatanaga, Kikuchi, Van Kinh, Oka. Low body weight and tenofovir use are risk factors for renal dysfunction in Vietnamese HIV-infected patients. A prospective 18-month observation study. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 20(12):784-788. 2014.
3. Nishijima, Kawasaki, Tanaka, Mizushima, Aoki, Watanabe, Kinai, Honda, Yazaki, Tanuma, Tsukada, Teruya, Kikuchi, Gatanaga, Oka. Long-term exposure to tenofovir continuously decrease renal function in HIV-1-infected patients with low body weight: results from 10 years of follow-up. *AIDS*. 28(13):1903-1910. 2014.
4. Nishijima, Tsuchiya, Tanaka, Joya, Hamada, Mizushima, Aoki, Watanabe, Kinai, Honda, Yazaki, Tanuma, Tsukada, Teruya, Kikuchi, Oka, Gatanaga. Single-nucleotide polymorphisms in the UDP-glucuronosyltransferase 1A-3' untranslated region are associated with atazanavir-induced nephrolithiasis in patients with HIV-1 infection: a pharmacogenetic study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 69(12):3320-3328. 2014.
5. Nishijima, Gatanaga, Teruya, Tajima, Kikuchi, Hasuo, Oka. Brain magnetic resonance imaging screening is not useful for HIV-1-infected patients without neurological symptoms. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 30(10):970-974. 2014.
6. Watanabe, Nagata, Sekine, Watanabe, Igari, Tanuma, Kikuchi, Oka, Gatanaga. Asymptomatic intestinal amebiasis in Japanese HIV-1-infected individuals. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 91(4):816-820. 2014.
7. Ishikane, Watanabe, Tsukada, Nozaki, Yanase, Igari T, Masaki N, Kikuchi, Oka, Gatanaga. Acute Hepatitis C in HIV-1 Infected Japanese Cohort: Single Center Retrospective Cohort Study. *PLoS One*. 9(6):e100517. 2014.
8. Sun, Fujiwara, Shi, Kuse, Gatanaga, Appay, Gao, Oka, Takiguchi. Superimposed epitopes restricted by the same HLA molecule drive distinct HIV-specific CD8+ T cell repertoires. *Journal of Immunology*. 193(1):77-84. 2014.
9. Tsuchiya, Hayashida, Hamada, Kato, Oka, Gatanaga. Low raltegravir concentration in cerebrospinal fluid in patients with ABCG2 genetic variants. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 66(5):484-486. 2014.
10. Tanuma, Quang, Hachiya, Joya, Watanabe, Gatanaga, Van Vinh Chau, ChinhT, Oka. Low prevalence of transmitted drug resistance of HIV-1 during 2008-2012 antiretroviral therapy scaling up in Southern Vietnam. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 66(4):358-364. 2014.
11. Eguchi, Takatsuki, Soyama, Hidaka, Nakao, Shirasaka, Yamamoto, Tachikawa, Gatanaga, Kugiyama, Yatsunami, Ichida, Kokudo. Analysis of the hepatic functional reserve, portal hypertension, and prognosis of patients with human immunodeficiency virus/hepatitis C virus coinfection through contaminated blood products in Japan. *Transplantation Proceedings*. 46(3):736-738. 2014.
12. Rahman, Kuse, Murakoshi, Chikata, Gatanaga, Oka, Takiguchi. Raltegravir and elvitegravir-resistance mutation E92Q affects HLA-B*40:02-restricted HIV-1-specific CTL recognition. *Microbes and Infection*. 16(5):434-438. 2014.
13. Gatanaga, Nishijima, Tsukada, Kikuchi, Oka. Clinical importance of hyper-beta-2-microglobulinuria in patients with HIV-1 infection on tenofovir-containing antiretroviral therapy. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 65(4):e155-157. 2014.
14. Chikata, Carlson, Tamura, Borghan, Naruto, Hashimoto, Murakoshi, Le, Mallal, John, Gatanaga, Oka, Brumme, Takiguchi. Host-specific adaptation of HIV-1 subtype B in the Japanese population. *Journal of Virology*. 88(9):4764-4775. 2014.

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

～ population-based sequencing により決定した塩基配列と次世代シーケンサーを用いて決定した deep sequencing による塩基配列群との比較～

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

指向性検査の多くは、population-based sequencing によって行われているが、その塩基配列が血漿中で最も頻度の高いウイルス株（主要株）の塩基配列を反映するかどうかはわかっていない。今回の研究では、次世代シーケンサーを用いて、PBMC または血漿中に存在するウイルス集団の C2V3C3 領域の塩基配列を deep sequencing で決定し、population-based sequencing による塩基配列と比較した。今回解析を行った 28 例の PBMC 由来プロウイルス DNA において、population-based sequencing で決定した塩基配列と deep sequencing で決定した塩基配列の主要株が一致した例は 7 例（25%）、非主要株が一致した例は 7 例（25%）、不一致例は 14 例（50%）であった。また血漿由来ウイルス RNA において、主要株が一致した例は 9 例（32%）、非主要株が一致した例は 9 例（32%）、不一致例は 10 例（36%）であった。すなわち population-based sequencing で決定した塩基配列は deep sequencing で決定した塩基配列群の中に必ずしも存在しなかった。このことから、population-based sequencing により得られた塩基配列に薬剤耐性変異が複数存在した場合、必ずしも同時に複数の変異を持った耐性株が存在するとは限らないことが示唆された。また、今回の検討で 2 例の検体が重複感染と考えられたが、2 例とも R5 ウイルスは PBMC 中で非主要株であるのに対し、血漿中では主要株となっており、R5 ウイルスは X4 ウイルスより複製能力が高いことが考えられた。このことから、X4 ウイルスは R5 ウイルスより複製能力が低く、PBMC 中においてプロウイルスとして潜伏状態になりやすい性質がある可能性が考えられた。

A. 研究目的

マラビロックに代表される HIV 侵入阻害剤は CCR-5 指向性ウイルスのみ阻害することが知られており、その使用に際して感染者のウイルスの指向性を調べる検査が必要とされている。指向性検査の多くは、population-based sequencing によって血漿中ウイルスの env 領域の塩基配列を決定し、geno2pheno 等で塩基配列を解析することによって行われている。しかし population-based sequencing

で決定した塩基配列が、血漿中で最も頻度の高いウイルス株（主要株）の塩基配列を反映するかどうかはわかっていない。

今回の研究では、次世代シーケンサーを用いて、PBMC または血漿中に存在するウイルス集団の C2V3C3 領域の塩基配列を deep sequencing で決定し、population-based sequencing による塩基配列と比較した。また deep sequencing で決定した塩基配列についてそれぞれ指向性を調べた。

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、population-based sequencing による指向性検査において PBMC 中プロウイルスと血漿中ウイルスともに指向性が R5 であった感染者 17 人、PBMC 中プロウイルスと血漿中ウイルスともに指向性が X4 であった感染者 6 人、PBMC 中ウイルスと血漿中ウイルスの指向性が異なった感染者 5 人、合計 28 人の血液を用いた (図 1)。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)。

(倫理面への配慮)

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 RNA Mini Kit を用いて RNA を抽出した。この DNA と RNA を鋳型として図 2 のプライマーを用いた (RT-) nested PCR により env の C2V3C3 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 PCR 産物の deep sequencing を行った。得られた全ての塩基配列のアライメントを行い、塩基配列が同一のリードについて、それぞれの種類ごとにリード数を求めた。全リード数に対する各種類のリード数をもとに、対応する塩基配列を持つウイルス集団の全ウイルスに対する頻度をそれぞれ定量した (1% 以上)。またそれぞれのウイルス集団の塩基配列について、population-based sequencing による指向性検査と同様に geno2pheno coreceptor による指向性の推定を行った。

R5: 17例

検体 No.	RNA (cps/ml)	CD4 (cells/ul)	PBMC 中ウイルス		血漿中ウイルス	
			指向性判定	FPR (G.P.%)	指向性判定	FPR (G.P.%)
C055	17000	56	R5	19.4	R5	17.1
G095	78000	87	R5	37.4	R5	37.4
C098	100000	165	R5	67.3	R5	28.8
C111	3100	228	R5	44.6	R5	44.6
C119	44000	195	R5	86.8	R5	87.4
C122	15000	189	R5	87.1	R5	91.2
C132	93000	54	R5	86.2	R5	86.2
C135	31000	110	R5	24.7	R5	15.0
C137	14000	258	R5	31.1	R5	17.9
C175	28000	451	R5	42.6	R5	42.6
C193	21000	413	R5	86.2	R5	86.2
C196	24000	256	R5	28.8	R5	77.6
C198	6700	84	R5	10.5	R5	10.5
C219	15000	205	R5	22.0	R5	22.0
C229	460000	38	R5	76.0	R5	91.0
C271	9300	585	R5	95.5	R5	91.0
C305	270000	245	R5	15.7	R5	15.7

X4: 6例

検体 No.	RNA (cps/ml)	CD4 (cells/ul)	PBMC 中ウイルス		血漿中ウイルス	
			指向性判定	FPR (G.P.%)	指向性判定	FPR (G.P.%)
C109	120000	11	X4	1.7	X4	1.7
C125	32000	9	X4	6.9	X4	6.9
C148	4900	516	X4	1.7	X4	1.7
C149	27000	28	X4	3.4	X4	3.4
C201	210000	16	X4	1.7	X4	7.6
C202	30000	169	X4	9.9	X4	9.9

R5/X4: 5例

検体 No.	RNA (cps/ml)	CD4 (cells/ul)	PBMC 中ウイルス		血漿中ウイルス	
			指向性判定	FPR (G.P.%)	指向性判定	FPR (G.P.%)
C093	170000	112	R5	14.3	X4	8.7
C097	64000	390	X4	1.7	R5	40.1
C180	33000	242	X4	1.7	R5	62.5
C194	5800	419	X4	7.4	R5	14.7
C310	330000	113	X4	1.1	R5	89.1

図 1 使用検体

population-based sequencing による指向性検査で、PBMC 由来ウイルス DNA、血漿由来ウイルス RNA とも R5 と判定された検体 17 例、PBMC、血漿とも X4 と判定された検体 6 例、PBMC と血漿の指向性の判定が異なる検体 5 例、計 28 例を検体として用いた。

name	sequence	region
KTRB-1F	GTCAGCACAGTACAATGYACACATGG	env 1st F
KTRB-1R	TGTGTTGTATTACAGTAGAAAAATTCYCC	env 1st R
KTRB-2F	GCTGTAAATGGCAGTYTAGCAGA	env 2nd F
KTRB-2R	AATTTCTGGGTCYCCTCCTG	env 2nd R

図 2 C2V3C3 領域増幅プライマー