

検体名	血中 ウイルス RNA コピー数 (cps/ml)	CD4 (cells/μl)	population- based sequencing 結果		deep sequencing 結果			population-based sequencingとdeep sequencingで決定した 塩基配列の一致の有無
			判定	FPR	R5率 種類)	X4率 種類)	割合グラフ	
C055	17000	56	R5	19.4%	98.2% (22)	1.8% (1)		非主要株と一致
C095	78000	87	R5	37.4%	95.0% (28)	5.0% (3)		主要株と一致
C098	100000	165	R5	67.3%	100.0% (29)	0.0% (0)		塩基配列の一致無し
C111	3100	228	R5	44.6%	98.0% (35)	2.0% (1)		非主要株と一致
C119	44000	195	R5	86.8%	97.8% (23)	2.2% (2)		塩基配列の一致無し
C122	15000	189	R5	87.1%	100.0% (34)	0.0% (0)		塩基配列の一致無し
C132	93000	54	R5	86.2%	100.0% (24)	0.0% (0)		非主要株と一致
C135	31000	110	R5	24.7%	100.0% (29)	0.0% (0)		塩基配列の一致無し
C137	14000	258	R5	31.1%	80.5% (21)	19.5% (5)		塩基配列の一致無し
C175	28000	451	R5	42.6%	100.0% (8)	0.0% (0)		非主要株と一致
C193	21000	413	R5	86.2%	98.4% (35)	1.6% (1)		塩基配列の一致無し
C196	24000	256	R5	28.8%	100.0% (27)	0.0% (0)		塩基配列の一致無し
C198	6700	84	R5	10.5%	72.5% (24)	27.5% (4)		非主要株と一致
C219	15000	205	R5	22.0%	100.0% (21)	0.0% (0)		主要株と一致
C229	460000	38	R5	76.0%	100.0% (21)	0.0% (0)		塩基配列の一致無し
C271	9300	585	R5	95.5%	100.0% (27)	0.0% (0)		非主要株と一致
C305	270000	245	R5	15.7%	100.0% (29)	0.0% (0)		主要株と一致

図3 population-based sequencing による指向性検査の結果が R5 であった 17 例の検体について
PBMC 由来プロウイルス DNA における population-based sequencing と deep sequencing の比較

検体名	血中 ウイルス RNA コピー数 (cps/ml)	CD4 (cells/μl)	population- based sequencing 結果		deep sequencing 結果			population-based sequencingとdeep sequencingで決定した 塩基配列の一致の有無
			判定	FPR	R5率 種類)	X4率 種類)	割合グラフ	
C055	17000	56	R5	17.1%	100.0% (24)	0.0% (0)		主要株と一致
C095	78000	87	R5	37.4%	92.5% (19)	7.5% (3)		主要株と一致
C098	100000	165	R5	28.8%	100.0% (25)	0.0% (0)		塩基配列の一致無し
C111	3100	228	R5	44.6%	100.0% (25)	0.0% (0)		非主要株と一致
C119	44000	195	R5	87.4%	98.5% (17)	1.5% (1)		塩基配列の一致無し
C122	15000	189	R5	91.2%	100.0% (22)	0.0% (0)		主要株と一致
C132	93000	54	R5	86.2%	100.0% (25)	0.0% (0)		非主要株と一致
C135	31000	110	R5	15.0%	97.8% (16)	2.2% (1)		塩基配列の一致無し
C137	14000	258	R5	17.9%	71.1% (7)	28.9% (4)		塩基配列の一致無し
C175	28000	451	R5	42.6%	100.0% (13)	0.0% (0)		非主要株と一致
C193	21000	413	R5	86.2%	100.0% (23)	0.0% (0)		非主要株と一致
C196	24000	256	R5	77.6%	100.0% (25)	0.0% (0)		非主要株と一致
C198	6700	84	R5	10.5%	100.0% (16)	0.0% (0)		主要株と一致
C219	15000	205	R5	22.0%	100.0% (16)	0.0% (0)		塩基配列の一致無し
C229	460000	38	R5	91.0%	100.0% (16)	0.0% (0)		塩基配列の一致無し
C271	9300	585	R5	91.0%	100.0% (23)	0.0% (0)		非主要株と一致
C305	270000	245	R5	15.7%	100.0% (11)	0.0% (0)		主要株と一致

図4 population-based sequencing による指向性検査の結果が R5 であった 17 例の検体について
血漿由来ウイルス RNA における population-based sequencing と deep sequencing の比較

PBMC由来プロウイルスDNA

検体名	血中ウイルス RNA コピー数 (cps/ml)	CD4 (cells/u)	population-based sequencing 結果		deep sequencing 結果			population-based sequencing と deep sequencing で決定した塩基配列の一致の有無
			判定	FPR	R5率 (種類)	X4率 (種類)	割合グラフ	
C109	120000	11	X4	1.7	0.0% (0)	100.0% (18)		主要株と一致
C125	32000	9	X4	6.9	0.0% (0)	100.0% (14)		非主要株と一致
C148	4900	516	X4	1.7	0.0% (0)	100.0% (2)		主要株と一致
C149	27000	28	X4	3.4	0.0% (0)	100.0% (21)		主要株と一致
C201	210000	16	X4	1.7	3.9% (2)	96.1% (25)		塩基配列の一致無し
C202	30000	169	X4	9.9	27.7% (9)	72.3% (21)		塩基配列の一致無し

血漿由来ウイルスRNA

検体名	血中ウイルス RNA コピー数 (cps/ml)	CD4 (cells/u)	population-based sequencing 結果		deep sequencing 結果			population-based sequencing と deep sequencing で決定した塩基配列の一致の有無
			判定	FPR	R5率 (種類)	X4率 (種類)	割合グラフ	
C109	120000	11	X4	1.7	0.0% (0)	100.0% (25)		主要株と一致
C125	32000	9	X4	6.9	0.0% (0)	100.0% (15)		主要株と一致
C148	4900	516	X4	1.7	0.0% (0)	100.0% (2)		主要株と一致
C149	27000	28	X4	3.4	0.0% (0)	100.0% (17)		主要株と一致
C201	210000	16	X4	7.6	0.0% (0)	100.0% (12)		非主要株と一致
C202	30000	169	X4	9.9	6.7% (2)	93.3% (20)		塩基配列の一致無し

図5. population-based sequencing による指向性検査の結果が X4 であった 6 例の検体について PBMC 由来プロウイルス DNA、血漿由来ウイルス RNA における population-based sequencing と deep sequencing の比較

PBMC由来プロウイルスDNA

検体名	血中ウイルス RNA コピー数 (cps/ml)	CD4 (cells/u)	population-based sequencing 結果		deep sequencing 結果			population-based sequencing と deep sequencing で決定した塩基配列の一致の有無
			判定	FPR	R5率 (種類)	X4率 (種類)	割合グラフ	
C093	170000	112	R5	14.3	63.4% (19)	36.6% (14)		塩基配列の一致無し
C097	64000	390	X4	1.7	31.0% (13)	69.0% (13)		主要株と一致
C194	5800	419	X4	7.4	32.0% (10)	68.0% (13)		塩基配列の一致無し
C180	33000	242	X4	1.7	37.7% (14)	62.3% (15)		塩基配列の一致無し
C310	330000	113	X4	1.1	8.5% (3)	91.5% (32)		塩基配列の一致無し

血漿由来ウイルスRNA

検体名	血中ウイルス RNA コピー数 (cps/ml)	CD4 (cells/u)	population-based sequencing 結果		deep sequencing 結果			population-based sequencing と deep sequencing で決定した塩基配列の一致の有無
			判定	FPR	R5率 (種類)	X4率 (種類)	割合グラフ	
C093	170000	112	X4	8.7	36.2% (9)	63.8% (14)		非主要株と一致
C097	64000	390	R5	40.1	57.3% (16)	42.7% (8)		塩基配列の一致無し
C194	5800	419	R5	14.7	37.9% (7)	62.1% (9)		塩基配列の一致無し
C180	33000	242	R5	62.5	89.0% (20)	11.0% (2)		塩基配列の一致無し
C310	330000	113	R5	89.1	89.8% (17)	10.2% (6)		非主要株と一致

図6. population-based sequencing による指向性検査の結果が PBMC 由来プロウイルス DNA、と血漿由来ウイルス RNA で異なった 6 例の検体について population-based sequencing と deep sequencing の比較

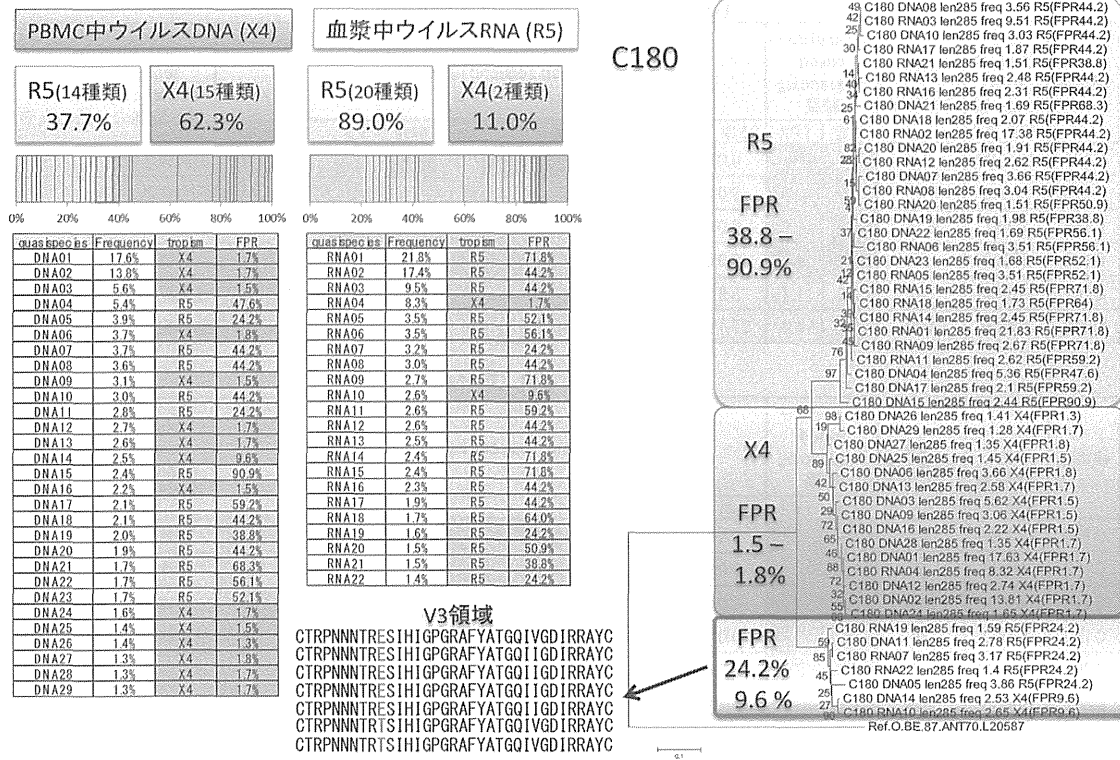


図7. PBMC 由来 DNA シークエンスと血漿由来 RNA シークエンスで指向性が異なった例における各微小集団の指向性 (C180)

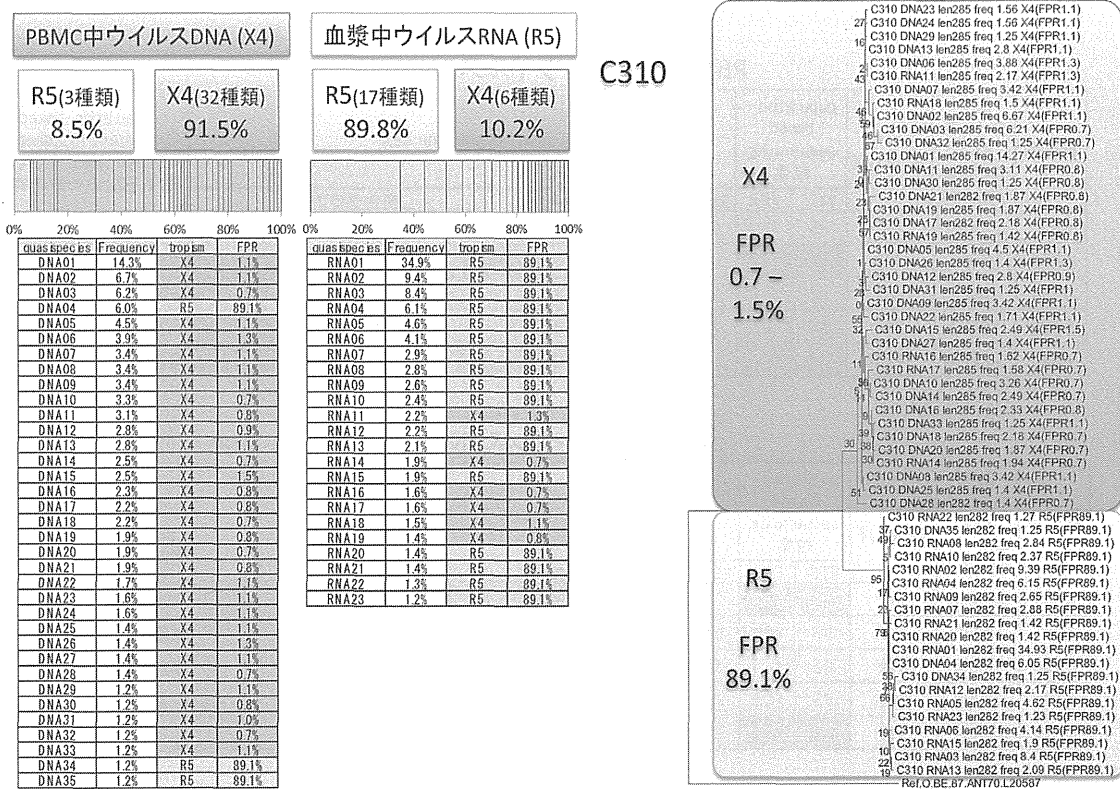


図8. PBMC 由来 DNA シークエンスと血漿由来 RNA シークエンスで指向性が異なった例における各微小集団の指向性 (C310)

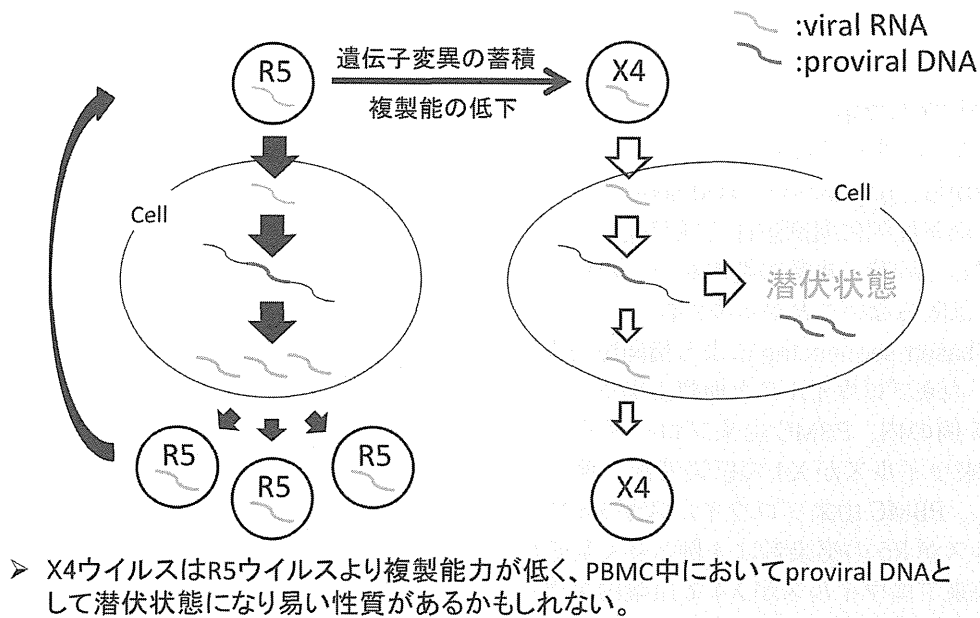


図9. 遺伝変異の蓄積によるX4ウイルスへの移行

C. 研究結果

PBMC由来プロウイルスDNAと血漿由来ウイルスRNAともに指向性がR5であった感染者17人のPBMC由来プロウイルスDNAを用いてdeep sequencingを行った結果、population-based sequencingで決定した塩基配列がdeep sequencingで決定した全塩基配列の主要株と一致した例は3例、主要株以外の何れかの非主要株と一致した例は6例、どの株とも不一致であった例は8例であった。また17例の検体それぞれについて、deep sequencingで決定した塩基配列すべての指向性を推定した結果、17例の内1例では主要株が、6例では何れかの非主要株がX4であった（図3）。同様に血漿由来ウイルスRNAを用いてdeep sequencingを行った結果、population-based sequencingとdeep sequencingの主要株の塩基配列が一致した例は5例、非主要株が一致した例は6例、不一致例は6例であった。また17例の内4例では何れかの非主要株がX4と推定された（図4）。

PBMC由来プロウイルスDNAと血漿由来ウイルスRNAともに指向性がX4であった感染者6人のPBMC由来プロウイルスDNAを用いてdeep sequencingを行った結果、population-based sequencingとdeep sequencingの主要株の塩基配列が一致した例は3例、非主要株が一致した例は1例、不一致例は2例であった。また6例の内2例では何れかの非主要株がR5と推定された。同様に血漿由来ウイルスRNAを用いてdeep sequencingを行

った結果、population-based sequencingとdeep sequencingの主要株の塩基配列が一致した例は4例、非主要株が一致した例は1例、不一致例は1例であった。また6例の内1例では何れかの非主要株がR5と推定された（図5）。

PBMC由来プロウイルスDNAと血漿由来ウイルスRNAの指向性が異なった感染者5人のPBMC由来プロウイルスDNAを用いてdeep sequencingを行った結果、population-based sequencingとdeep sequencingの主要株の塩基配列が一致した例は1例、不一致例は4例であった。同様に血漿由来ウイルスRNAを用いてdeep sequencingを行った結果、population-based sequencingとdeep sequencingの非主要株の塩基配列が一致した例は2例、不一致例は3例であった（図6）。これら5例それぞれについて、deep sequencingで決定した全塩基配列を系統樹解析した結果、R5とX4でそれぞれ別のクラスターを作成する検体が2例見られた（C180：図7、C310：図8）。

D. 考察

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。

population-based sequencing による指向性検査の結果が PBMC 由来プロウイルスと血漿由来ウイルスで異なった5例の内、PBMC 由来プロウイルスが R5 で血漿由来ウイルスが X4 の感染者が1例と少数なのに対し、PBMC 由来プロウイルスが X4 で血漿由来ウイルスが R5 の感染者は4例と多く見られた。PBMC 由来プロウイルスが X4 で血漿由来ウイルスが R5 である感染者4例の内、2例が R5 ウイルスと X4 ウイルスの重複感染と考えられた。2例とも R5 ウイルスは PBMC 中でそれぞれ頻度が 37.7%、8.5% と非主要株であったが、血漿中ではそれぞれ頻度が 89.0%、89.8% と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(図9)

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1) 原著論文

1. 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 Res Hum Retroviruses*. (in press)
2. Tsuchiya K, Hayashida T, Hamada A, Kato S, Oka S, Gatanaga H. Low raltegravir concentration in cerebrospinal fluid in patients with ABCG2 genetic variants. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 15;66 (5) :484-6, 2014.
3. 大多和由美、前田憲昭、溝部潤子、的野 慶、池野 良、中川裕美子、加藤真吾：院内ポスター

を活用した HIV 検査へ繋げる 歯科診療. 日本エイズ学会誌 (印刷中)

4. 矢永由里子、今井光信、加藤真吾. 研修事業の取り組み：研修をデザインするということ. 日本エイズ学会誌. 16 (3) :185-193, 2014.

2) 口頭発表

1. 加藤真吾：HIV 検査の体制—早期検査と早期治療に向けて—、第28回日本エイズ学会学術集会・総会、2014年12月、大阪
2. 近藤真規子、佐野貴子、椎野禎一郎、井戸田一朝、山中晃、岩室紳也、吉村幸浩、立川夏夫、今井光信、武部豊、加藤真吾：日本で検出した HIV-1 組み換え型流行株の解析、第28回日本エイズ学会学術集会・総会、2014年12月、大阪
3. 武部豊、内藤雄樹、草川茂、加藤真吾、俣野哲郎、近藤真規子：男性同性愛者 (MSM) 間の HIV-1 流行の国際的感染ネットワークの解明に向けて：我が国—中国—世界流行間のこれまで明らかにされてこなかった相互関係について、第28回日本エイズ学会学術集会・総会、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・総会、2014年12月、大阪
5. 吉田繁、熊谷菜海、松田昌和、橋本修、岡田清美、伊部史朗、和山行正、西澤雅子、佐藤かおり、藤澤真一、遠藤和之、藤本勝也、豊嶋崇徳、加藤真吾、杉浦互：外部精度評価をもとにした HIV 薬剤耐性検査推奨法の考案、第28回日本エイズ学会学術集会・総会、2014年12月、大阪
6. 親泊あいみ、田水映子、須藤弘二、戸時祐子、藤原宏、長谷川直樹、加藤真吾：準完全長 HIV-1 プロウイルスの定量とその臨床的意義、第28回日本エイズ学会学術集会・総会、2014年12月、大阪
7. 土屋亮人、林田庸総、濱田哲暢、加藤真吾、菊池嘉、岡慎一、瀧永博之：HIV 患者におけるラルテグラビル髄液中濃度と薬剤トランスポータ

- の遺伝的多型についての検討、第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会、2014 年 12 月、大阪
8. 須藤弘二、藤原宏、佐野貴子、近藤真規子、井戸田一朗、今井光信、長谷川直樹、加藤真吾：次世代シーケンサーを用いた HIV 感染時期推定法の研究、第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会、2014 年 12 月、大阪
 9. 須藤弘二、佐野貴子、近藤真規子、今井光信、加藤真吾：HIV 郵送検査に関する実態調査と検査精度調査 (2013)、第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会、2014 年 12 月、大阪
 10. 佐野貴子、山田里佳、矢永由里子、近藤真規子、塚原優己、今井光信、加藤真吾：保健所の HIV 検査相談を利用した妊婦の受検動機等に関する調査、第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会、2014 年 12 月、大阪
 11. 藤原宏、須藤弘二、加藤真吾、親泊あいみ、上蓑義典、南宮湖、小谷宙、戸蒔祐子、長谷川直樹、岩田敏：慶應義塾大学病院における HIV-1 複合感染 (dual infection) 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
 12. 木内英、加藤真吾、細川真一、田中瑞恵、中西美紗緒、定月みゆき、田沼順子、瀧永博之、矢野哲、菊池嘉、岡慎一：成人と新生児における AZT リン酸化物細胞内濃度の比較、第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会、2014 年 12 月、大阪
 13. 南宮湖、藤原宏、西松直美、小谷宙、戸蒔祐子、加藤真吾、岩田敏、長谷川直樹：肺門・縦隔リンパ膨張の縮小を画像上、観察し得た MAC による免疫再構築症候群の一例、第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会、2014 年 12 月、大阪
 14. 小谷宙、須藤弘二、藤原宏、上蓑義典、山口雅也、長谷川直樹、岩田敏、岡本真一郎、加藤真吾：HIV-1 の viral RNA および proviral DNA を用いた chemokine receptor 指向性結果の乖離に対する deep sequencing を用いた系統樹解析による原因の検討、第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会、2014 年 12 月、大阪
 15. 堀亮介、藤原宏、南宮湖、上蓑義典、親泊あいみ、小谷宙、戸蒔祐子、加藤真吾、長谷川直樹、岩田敏：結核合併 AIDS 症例 3 例に関する臨床的検討、第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会、2014 年 12 月、大阪
 16. 山田瑛子、高木律男、矢倉裕輝、吉野宗宏、加藤真吾：血中とだ液中のアタザナビル濃度の検討、第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会、2014 年 12 月、大阪

H. 知的所有権の出願・取得状況 なし

国内で流行する HIV 株および薬剤耐性 HIV 株の 動向把握調査研究

研究分担者 古賀 道子 東京大学医科学研究所 先端医療研究センター 助教
研究協力者 宮崎 菜穂子 東京大学医科学研究所 附属病院薬剤部

研究要旨

東京大学医科学研究所附属病院において、2014 年 1 月から 2014 年 12 月の間、新規に診断され、同意の得られた HIV-1 感染者 15 人に、HIV-1 プロテアーゼ領域、逆転写領域、インテグラーゼ領域の遺伝子配列解析を施行した。サブタイプは、B ; 13 人、C ; 1 人、O2_AG ; 1 人であり、逆転写領域の K101E;1 例、V179D;1 例、プロテアーゼ領域は一時変異を認めず、インテグラーゼ領域では E138K;1 例の耐性変異を認めた。HIV の治療薬は年々変遷しており、今後も耐性 HIV-1 の出現動向を注意深く解析する必要がある。

A. 研究目的

全国的な薬剤耐性 HIV-1 の動態把握のため、東京大学医科学研究所附属病院で新規に診断された HIV-1 感染者の薬剤耐性変異を調べる。

(倫理面への配慮)

本研究は東京大学医科学研究所の倫理審査委員会承認されたものである (25-50)。

患者様に担当医師より本研究の説明を行い、研究対象者として書面で同意を頂いている。本研究によって被る不利益は全くなく、診療とは別であり、同意の撤回も可能である。個人情報保護も厳守されている。

B. 研究方法

当院にて新規に診断された HIV-1 感染者の血漿を名古屋医療センターに送付し、HIV-1 プロテアーゼ領域、逆転写領域、インテグラーゼ領域の遺伝子配列解析を依頼し、薬剤耐性変異調査研究を施行した。また、一部、臨床診療において必要である為、既に外部検査機関を通じ得ている薬剤耐性検査結果を患者の同意を得て調査票として名古屋医療センターに提出し、集計の加算とする。

C. 研究結果

東京大学医科学研究所附属病院において、2014 年 1 月から 2014 年 12 月の間、新規に診断され、同意書の得られた HIV-1 感染者 15 人に、HIV-1 プロテアーゼ領域、逆転写領域、インテグラーゼ領域の遺伝子配列解析を施行した。サブタイプは、B ; 13 人、C ; 1 人、O2_AG ; 1 人であり、逆転写領域の K101E;1 例、V179D;1 例、プロテアーゼ領域は一時変異を認めず、インテグラーゼ領域では E138K;1 例の耐性変異を認めた。

また、東京大学医科学研究所附属病院において、2013 年 4 月から 2013 年 12 月の間、新規に診断され、本研究に参加していない未治療患者のうち、既に外部検査機関を通じ薬剤耐性検査結果が得ており、同意が得られた HIV-1 感染者 5 人の耐性検査結果を、調査票として名古屋医療センターに提出し、集計の加算とした。

D. 考察

2013 年は研究班が新体制になり、当院での倫理委員会での承認にも時間がかかったことから、名古屋医療センターに送付した検体数が少なくなった

が、2014 年は前年を上回る検体数を送付し、解析することができた。加えて、2013 年 4 月以降 12 月までに新規診断され、本研究に参加しなかった未治療患者の中で、臨床上、得ることができている HIV 遺伝子型（薬剤耐性株の有無）情報を、患者同意を得て、調査票の形式で本研究に参加することができた。HIV の治療薬は年々変遷しており、今後も耐性 HIV-1 の出現動向を注意深く解析する必要がある。

E. 結論

今後も薬剤耐性 HIV-1 の出現動向を把握するために、新規診断症例の薬剤耐性検査を継続する必要があると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 原著論文

1. Kikuchi, Iwabu, Tada, Kawana Tachikawa, Koga, Hosoya, Nomura, Brumme, Jessen, Pereyra, Piechocka-Trocha, D. Walker, Iwamoto, Tokunaga, and Miura Anti-APOBEC3G activity of HIV-1 Vif protein is attenuated in elite controllers. *J Virology*. in press
2. Nakayama-Hosoya, Ishida, Youngblood, Nakamura, Hosoya, Koga, Koibuchi, Iwamoto, Kawana-Tachikawa. Epigenetic Repression of Interleukin 2 Expression in Senescent CD4+ T Cells During Chronic HIV Type 1 Infection. *J Infect Dis*. 211:28-39, 2015.
3. Gu, Kawana-Tachikawa, Shiino, Nakamura, Koga, Kikuchi, Adachi, Koibuchi, Ishida, Gao, Matsushita, Sugiura, Iwamoto, Hosoya. Development and customization of a color-coded microbeads-based assay for drug resistance in HIV-1 reverse transcriptase. *PLoS One*. 9:e109823, 2014.
4. Han, Kawana-Tachikawa, Shimizu, Zhu, Nakamura, Adachi, Kikuchi, Koga, Koibuchi, Gao, Sato, Yamagata, Martin, Fukai, Brumme, Iwamoto. Switching and emergence of CTL epitopes in HIV-1 infection. *Retrovirology*. 11:38, 2014.
5. Okame, Takaya, Sato, Adachi, Ohno, Kikuchi, Koga, Oyaizu, Ota, Fujii, Iwamoto, Koibuchi. Complete regression of early-stage gastric diffuse large B-cell lymphoma in an HIV-1-infected patient following *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Clin Infect Dis*. 58:1490-2, 2014.

H. 知的所有権の出願・取得状況

なし

神奈川県における薬剤耐性 HIV の動向調査研究

～神奈川県における薬剤耐性 HIV-1 発生動向把握調査研究（2014 年）～

研究分担者 近藤真規子 神奈川県衛生研究所

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

¹ 横浜市立市民病院、² 厚木市立病院、³ しらかば診療所、

⁴ 新宿東口クリニック、⁵ 神奈川県衛生研究所、⁶ 慶應義塾大学医学部

研究要旨

新規 HIV-1 感染者における薬剤耐性株の出現状況を調査するため、2014 年 1 月から 10 月に主として神奈川県および東京都内の医療機関に来院した新規 HIV 感染者 74 例について薬剤耐性変異の解析を行った。IAS-USA(2013) リスト、Shafer' s criteria、スタンフォードデータベースに基づき薬剤耐性変異の有無を調べた結果、74 例中 7 例に RTI の耐性関連変異が確認され、耐性変異出現率は 9.8%であった。変異の検出された 7 例は全て日本男性、サブタイプ B で、例年と同様に AZT 耐性変異のリバータントが最も多く 5 例から検出された。リバータント T215X は、2004 年から 2014 年までの神奈川の調査において耐性関連変異が検出された 52 例中 23 例（44%）と高率に検出されている。T215X は全国調査においても高頻度に検出されており、polymorphism として流行していると考えられた。

2014 年新規感染者 74 例の HIV-1 サブタイプは B が最も多く 67 例（91%）で、CRF01_AE (01AE) が 4 例、組換え体が 3 例（B/AE、G/A1、07BC）確認された。01AE 4 例中 2 例は中国の MSM 間で大流行している CN.MSM.01-1 バリエントであったが、2010 年から 2012 年に日本の MSM に確認した JP.CN.MSM.01-1 バリエントとは異なっていた。日本男性の中に中国型バリエントの浸淫が少しずつ進行しており、今後も 01AE の動向が注目される。

A. 研究目的

HIV-1 感染者の治療は多剤併用療法（HAART）の普及により飛躍的に進歩し、HIV-1 感染者の病態の進行をコントロールすることが可能となった。その一方で、薬剤の長期投与に伴い薬剤耐性 HIV-1 株を保有する感染者が増加し、新規感染者が薬剤耐性株に感染している症例も見つかってきている。欧米では薬剤耐性ウイルスによる感染が広がりつつあり、新規感染者の数%から十数%が何らかの抗 HIV 薬に対する耐性変異が認められると報告されている。日本においては 2004 年から調査が開始され、当施設においては全国平均よりも低く、2004 年から 2005 年の耐性変異検出率は約 5%であったが、その後、漸増傾向にあり、2010 年から 2012 年の調査では約 7%、2013 年は 11.4%に増加した。日本でのこの数字は欧米に比べまだ低いものの、薬剤耐

性ウイルスの蔓延を制御するためにも継続した調査は重要である。

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

B. 研究方法

1) 調査対象

2014 年 1 月から 9 月末までに主として神奈川県および東京都内の医療機関に来院した未治療の新規 HIV 感染者 74 名について、薬剤耐性変異検査を実施した。

2) HIV-1 薬剤耐性変異の解析

患者血漿より HIV-1 遺伝子を抽出（ハイピュア

表 1 新規 HIV 感染者から検出された薬剤耐性関連変異検出頻度

陽性判明年	解析数 (人)	耐性変異 出現頻度	感染経路 サブタイプ	国籍	薬剤耐性関連変異		
					Pro	RT	IN
2014年	74	7* (9.5%)	不明 B	JP	—	T215E	—
			不明 B	JP	—	T215E	—
			不明 B	JP	—	T215D	—
			不明 B	JP	—	T215D	—
			同性間 B	JP	—	T215S	—
			不明 B	JP	—	M184V	—
			不明 B	JP	—	K103N	—

表 2 新規 HIV 感染者 74 名の感染経路とサブタイプ (2014 年)

感染経路		合計	HIV-1サブタイプ (envC2V3, PR-INT)				
			B	AE	B/AE	G/A1	07BC
男性同性間	日本	26	24	1 (1)*	1		
	外国	2	1	1 (1)*			
不明男性	日本	44	41	2		1	
	外国	1					1
異性間	女性 日本	1	1				
合計		74	67	4	1	1	1

* ()内はCN.MSM.01-1 variant

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

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

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

(倫理面への配慮)

主治医から患者に研究内容について説明を行い、研究への同意の得られた症例について研究を実施した。患者名はすべて記号化して扱っており、プライバシーの流出防止など患者の人権保護に十分配慮した。尚、本研究は当研究所の倫理委員会で承認されている。

C. 研究結果

IAS-USA (2013) リスト、Shafer' s criteria、スタンフォードデータベースに基づき 74 例の HIV-1pol 領域のアミノ酸について解析した結果を表 1 に示した。74 例中 7 例に RTI 耐性関連変異が検出され、耐性検出頻度は 9.5% であり、2013 年の調査とほぼ同程度であった。検出された変異は、例年頻度の高い AZT 耐性変異 T215Y/F のリバータントが 7 例中 5 例 (71%) と最も多く、NNRTI に高度耐性の K103N、3TC に高度耐性の M184V が 1 例ずつ検出された。7 例の疫学情報は、全て日本男性、感染経路は同性間 1 例、不明 6 例で、遺伝子型はすべてサブタイプ B であった (表 1)。

PR および IN 領域には Major 変異は検出されず、IN 領域においてアクセサリー変異の L74I が 7 例、この他 E157Q、V151I、G163R/E が検出されたが、これら変異のみでは各薬剤に対して影響を与えない。

感染経路別サブタイプを表 2 に示した。74 例中サブタイプ B が最も多く 67 例 (91%)、次いで O1AE が 4 例で、サブタイプ B と O1AE の組換え (B/AE)、サブタイプ G と A1 の組換え (G/A1)、CRF07_BC が 1 例ずつ検出された。感染経路別では、

同性間および不明の日本男性が 70 例 (95%) と最も多く、このうち 65 例の遺伝子型はサブタイプ B で、O1AE、B/AE、G/A1 が 1 例ずつ検出された。また外国男性 3 例 (中国、オーストラリア、中国) からはサブタイプ B、O1AE、O7BC が検出された。分子系統樹解析の結果、O1_AE 4 例の内 2 例は中国の MSM 間で大流行している CN.MSM.01-1 バリエーションであり、この内日本男性 1 例から得られたバリエーションは 2013 年に検出した 2 例と同一のクラスターを形成した (bootstrap 値: 100%、JP.CN.MSM.01-2)。もう 1 例 (オーストラリア、男性) は CN.MSM.01-1 クラスター内に含まれる 2 種類の日本バリエーション (JP.CN.MSM.01-1、JP.CN.MSM.01-2) とは関連が認められず、O7CN.JSWX045.IDU 株と近縁 (bootstrap 値: 84%) であった (図 1)。

D. 考察

我々は、薬剤耐性 HIV の発生動向を把握するため、2004 年より全国規模での調査に参加し、主として神奈川県および東京都内の医療機関に来院した新規 HIV-1 感染者について薬剤耐性変異の解析を行って

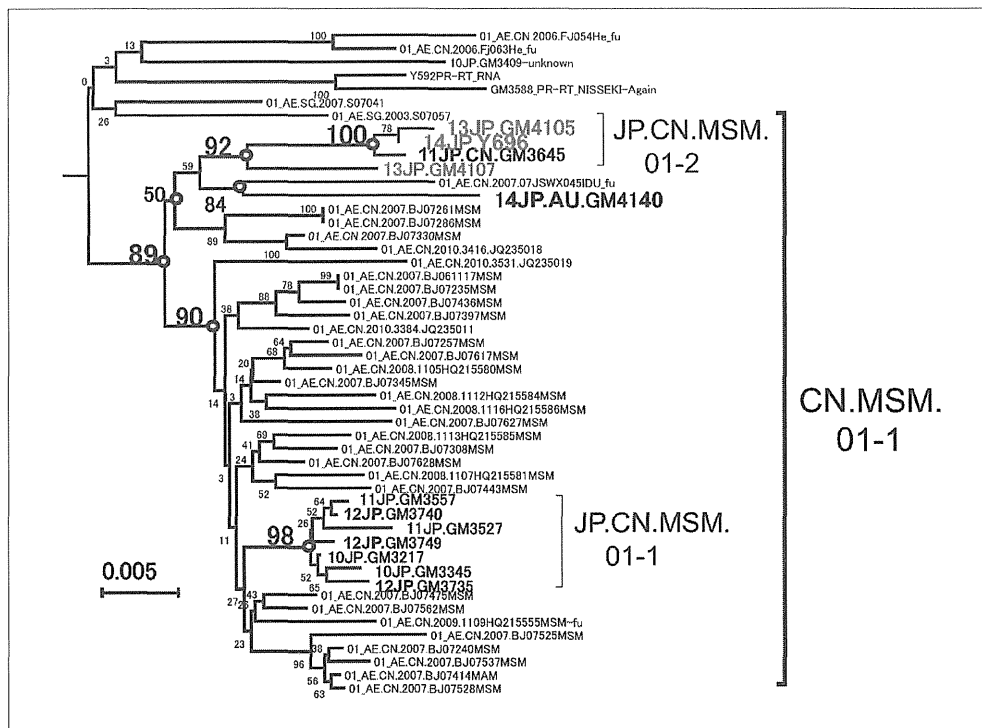


図 1 系統樹解析 (1.1 kb PR-RT 領域)

いる。耐性関連変異は 2004 年の 4.3% から僅かずつではあるが上昇し続け 2010 年から 2012 年の 3 年間では 6.8%、2013 年は 11.4%、2014 年は 9.5% (74 例中 7 例) であった。7 例は全てサブタイプ B、日本男性、感染経路は不明 6 例、同性間性行為 1 例で例年と同様の傾向であった。

耐性関連変異の検出された 7 例中 5 例から AZT 耐性変異 T215Y/F のリバータント T215E/D/S が検出された。リバータント T215X は、2004 年から 2014 年までの神奈川の調査において耐性関連変異が検出された 52 例中 23 例 (44%) と高率に検出されている。T215X は全国調査においても高頻度に検出されており、polymorphism として流行していると考えられる。しかし、T215X はスタンフォードデータベースでは NRTI に低レベル耐性と判定され、薬剤選択の際には考慮する必要があると考えられた。

2014 年新規感染者 74 例の HIV-1 サブタイプは B がほとんど (91%) で、01AE が 4 例、組換え体が 3 例 (B/AE、G/A1、07BC) 確認された。我々は 2010 年以降、感染経路が異性間性行為以外の日本男性において総数は僅かではあるが、01AE が有意に増加していること ($P < 0.01$)、その増加の原因の一端が中国の MSM 間で流行している CN.MSM.01-1 バリエーションの影響であることを報告した (表 3)。2013 年から 2014 年に検出した 01AE の 11 例中 3 例が CN.MSM01-1 バリエーションであったが、これらは 2010 年から 2012 年に検出された JP.

CN.MSM.01-1 バリエーションとは異なるクラスターを形成していた。また滞日オーストラリア男性からも CN.MSM.01-1 バリエーションが検出されており、中国型バリエーションの浸淫が少しずつではあるが進行していると考えられた。

感染経路不明の日本男性から G/A1 (PR-RT、INT : G、env : A1) が検出された。Los Alamos データベースでの Blast 解析の結果、3 領域とも CRF25_cpx の J11233 株 (EU697906) との相同性が最も高かった。J11233 株は 2008 年にサウジアラビアで確認された株であるが、本症例との関連は不明である。

E. 結論

2012 年 1 月から 10 月に主として神奈川県および東京都内の医療機関に来院した未治療の新規 HIV 感染者 74 名について薬剤耐性変異の解析した結果、74 例中 7 例に RTI の耐性関連変異が確認され、耐性変異出現率は 9.8% であった。変異の検出された 7 例は全て日本男性、サブタイプ B で、例年と同様に AZT 耐性変異のリバータントが最も多く 5 例から検出された。2013 年から 2014 年に検出した 01AE の 11 例中 3 例が CN.MSM01-1 バリエーションであったが、これら 3 例は 2012 年までに検出された JP.CN.MSM.01-1 バリエーションとは異なっていた。日本男性において中国型バリエーションの浸淫が少しずつ進行しており、今後も 01AE の動向が注目される。

表 3 日本男性 (MSM, unknown) における CRF01_AE および CN.MSM.01-1 バリエーション検出率

n=589

Year of collection	CRF01_AE 検出率	CN.MSM.01-1 / CRF01_AE
2004-2009	1.8% (4/218)	— (0/4)
2010-2012	8.5% (19/223)	47.4% (9/19)
2010	12.9% (9/70)	44.4% (4/9)
2011	8.1% (6/74)	33.3% (2/6)
2012	5.1% (4/79)	75.0% (3/4)
2013	9.0% (7/78)	28.6% (2/7)
2014	5.7% (4/70)	25.0% (1/4)

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Takebe Y, Naito Y, Raghwan J, Fearnhill E, Sano T, Kusakawa S, Mbisa JL, Zhang H, Matano T, Brown AJL, Pybus OG, Dunn D, Kondo M: Intercontinental dispersal of HIV-1 subtype B associated with transmission among Men Who have sex with Men in Japan, *J. Virol.* 88, 9864-9876, 2014.

2) 学会発表

1. 近藤真規子、佐野貴子、今井光信、椎野禎一郎、武部豊、加藤真吾：日本における HIV-1 組換え型流行株 (CRF) および孤立型組換えウイルス (URF) の新生、第 62 回日本ウイルス学会学術集会・総会 (2014 年 11 月 11 ~ 13 日、横浜市)。

2. Saeng-aroon S, Loket R, Plipat T, Sangkitporn S, 近藤真規子、武部豊、中山英美、武田直和、本村和嗣、塩田達雄：Distribution of HIV-1 subtypes in female sex workers recently infected with HIV-1 in Thailand、第 62 回日本ウイルス学会学術集会・総会 (2014 年 11 月 11 ~ 13 日、横浜市)。

3. 近藤真規子、佐野貴子、今井光信、加藤真吾、武部豊他：日本で検出した HIV-1 組換え型流行株の解析、第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会 (2014 年 12 月 3 ~ 5 日、大阪市)。

4. 武部豊、内藤雄樹、草川茂、加藤真吾、俣野哲郎、近藤真規子：男性同性愛者 (MSM) 間の HIV-1 流行の国際的感染ネットワークの解明に向けて：我が国—中国—世界流行間のこれまで明らかにされてこなかった相互関係について、第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会 (2014 年 12 月 3 ~ 5 日、大阪市)。

5. 佐野貴子、近藤真規子、山田里佳、矢永由里子、塚原優己、今井光信、加藤真吾：保健所の HIV 検査相談を利用した妊婦の受検動機等に関する調査、第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会 (2014 年 12 月 3 ~ 5 日、大阪市)。

6. 椎野禎一郎、近藤真規子、杉浦互、他：国内感染者集団の大規模塩基配列解析 5：MSM

コミュニティへのサブタイプ B 感染の動態、第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会 (2014 年 12 月 3 ~ 5 日、大阪市)。

7. 井戸田一朗、星野慎二、佐野貴子、近藤真規子、金子典代：ハッテン場における HIV 感染リスク低減に向けた意識行動調査、第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会 (2014 年 12 月 3 ~ 5 日、大阪市)。

8. 岡崎玲子、近藤真規子、蜂谷敦子、杉浦互、他：新規 HIV/AIDS 診断症例における薬剤耐性 HIV の動向、第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会 (2014 年 12 月 3 ~ 5 日、大阪市)。

9. 須藤弘二、藤原宏、佐野貴子、加藤真吾、近藤真規子、井戸田一朗、今井光信、長谷川直樹、加藤真吾：次世代シーケンサーを用いた HIV 感染時期推定法の研究、第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会 (2014 年 12 月 3 ~ 5 日、大阪市)。

10. 須藤弘二、佐野貴子、近藤真規子、今井光信、加藤真吾：HIV 郵送検査に関する実態調査と検査精度調査 (2013)、第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会 (2014 年 12 月 3 ~ 5 日、大阪市)。

11. 渡邊寿美、佐野貴子、伊達佳美、近藤真規子、黒木俊郎：神奈川県で検出されたオセルタミビル耐性インフルエンザウイルス AH1pdm09 株について、地研全国協議会第 29 回関東甲信静支部ウイルス研究部会 (2014 年 9 月 25 ~ 26 日、長野市)。

12. 鈴木理恵子、金城恵子、近藤真規子、黒木俊郎：神奈川県における麻疹ウイルス検出状況、地研全国協議会第 29 回関東甲信静支部ウイルス研究部会 (2014 年 9 月 25 ~ 26 日、長野市)。

H. 知的所有権の出願・取得状況

なし



東京都及び近郊における薬剤耐性 HIV の動向調査研究

～ HIV 検査陽性例の HIV-1 薬剤耐性遺伝子の解析 (2014 年) ～

研究分担者 貞升 健志 東京都健康安全研究センター 微生物部

研究協力者 長島 真美、北村 有里恵、林 志直、甲斐 明美

東京都健康安全研究センター

研究要旨

都内で流行している HIV 株を遺伝子学的に調査する目的で、南新宿検査・相談室等の検査陽性例より検出された HIV のサブタイプ型別並びに Protease(PR), Reverse transcriptase(RT) および Integrase (IN) 領域における薬剤耐性変異の有無を検索した。2014 年の HIV 検査陽性例について調査した結果、検出された HIV の 83.5% がサブタイプ B であり、non-B は 16.5% を占めそのうち 5 例が CRF07_BC であった。薬剤耐性関連変異については 10.6% と昨年調査より増加し、PR 領域では M46L、M46I、RT 領域の核酸系逆転写酵素阻害薬 (NRTI) の耐性変異では M41L+L210W+T215D 等が認められ、IN 領域では T66I、T215X-revertant は T215C が認められた。

A. 研究目的

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

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

B. 研究方法

1. 塩基配列の決定

2014 年に南新宿検査・相談室 (南新宿) 等の HIV 検査で陽性例 (血清) を対象とした。各検体 200 μ L よりウイルス核酸 RNA を抽出後、RT-nested PCR 法により Protease(PR)、Reverse transcriptase(RT) および Integrase(IN) 領域を増幅後、特異バンドの精製を行い、精製 DNA を得た。Dye-terminator-cycle-sequencing 法を用いた Direct-Sequencing 法により精製 DNA の塩基配列を決定し、

得られたアミノ酸配列の薬剤耐性関連変異の有無を検索した。

2. PR, RT および IN 領域の解析

サブタイプ型別は、得られた RT 領域の塩基配列を基に、スタンフォード HIV Drug Resistance Database または遺伝子解析ソフト MEGA6 を用いて系統樹を作成し決定した。

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

3. BED assay による感染時期の推定

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

明書に準じた。

(倫理面の配慮)

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

C. 研究結果

1. サブタイプ型別

南新宿等の HIV 検査で HIV-1 陽性となった検体について、RT 領域の分子系統樹解析を実施した結果、83.5%がサブタイプ B、16.5%が non-B であり、その内訳として CRF01_AE が 8.2%、その他のサブタイプが 8.2%であった。その他の内訳として CRF02_AG が 1 例、CRF07_BC が 5 例および D が 1 例認められた (図 1)。サブタイプ B が大部分を占

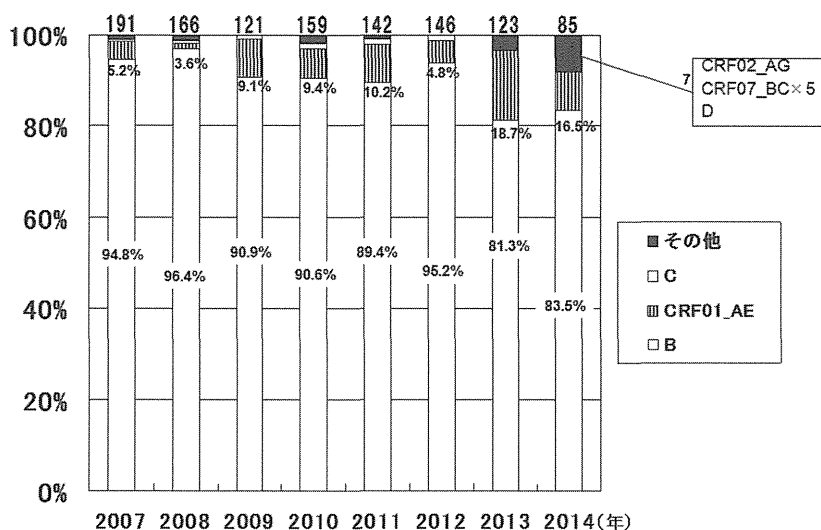


図 1 HIV サブタイプ型別 (南新宿・検査相談室等) (2007 ~ 2014 年)

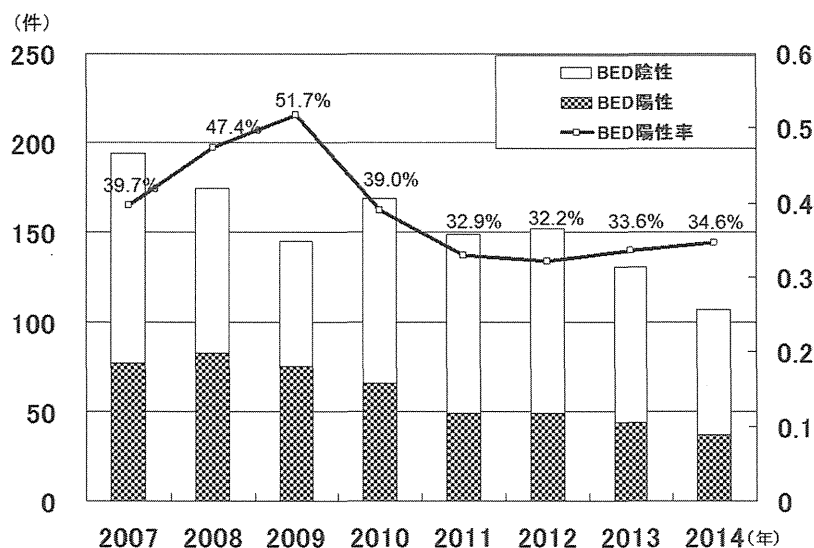


図 2 BED 陽性率の推移

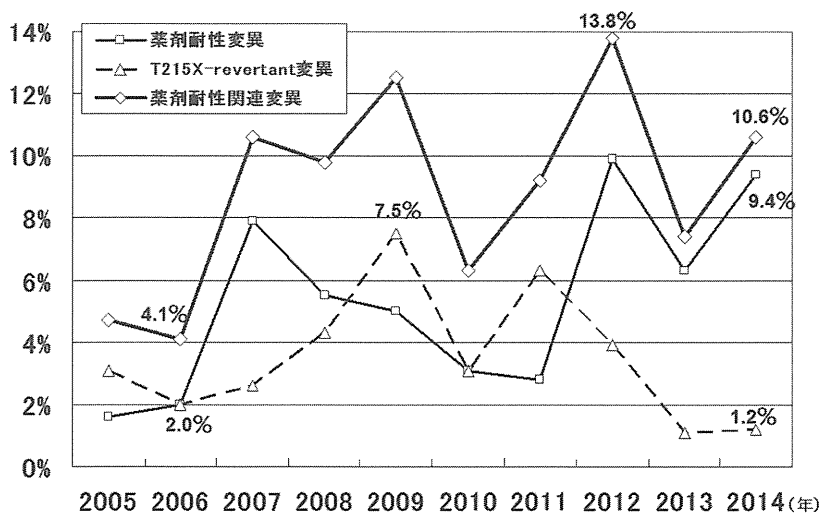


図4 HIV 薬剤耐性関連変異出現率の推移・東京都（2005～2014年）

E. 結論

都内で流行している HIV 株を遺伝子学的に調査する目的で、南新宿検査・相談室等の検査陽性例より検出された HIV のサブタイプ型別並びに PR、RT および INT 領域における薬剤耐性変異の有無を検索した。2014 年の HIV 検査陽性例について調査した結果、検出された HIV の 83.5% がサブタイプ B であり、薬剤耐性関連変異については 9 例で薬剤耐性に関連する変異を認めた（耐性変異 8 例、revertant 変異 1 例）。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 論文発表

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

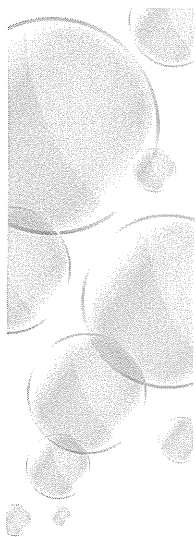
報. 64, 2013.

2) 学会発表

- 貞升健志：東京都の HIV 検査体制 - これまでの成果と今後の方向性, 第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2014 (大阪)
- 長島真美, 宮川明子, 新開敬行, 林志直, 貞升健志, 甲斐明美：東京都内公的検査機関における HIV 検査数および陽性例の解析 (2008 年と 2013 年の比較), 第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2014 (大阪)
- 長島真美, 宮川明子, 新開敬行, 林志直, 貞升健志, 甲斐明美：東京都における HIV 検査陽性例より検出された T215X-revertant の解析, 第 27 回日本エイズ学会学術集会, 2013 (熊本)
- 川畑拓也, 長島真美, 貞升健志, 小島洋子, 森治代：HIV 急性感染期の診断における第 4 世代 HIV 迅速検査試薬エスプライン HIV Ag/Ab の性能評価, 第 27 回日本エイズ学会学術集会, 2013 (熊本)

H. 知的所有権の出願・取得状況

なし



HIV の分子進化学的解析

研究分担者 椎野 禎一郎 国立感染症研究所・感染症疫学センター 主任研究官

研究要旨

わが国の HIV-1 感染者における薬剤耐性変異の状況を調べるために、我々は患者・検体・塩基配列情報のデータベースの作成事業を行っている。当課題は、データベースに集められた配列情報を分子進化学的手法で解析することでわが国における HIV-1 感染の動態を明らかにすることを目的とする。本年度は、データベースにある患者情報から、2002 年～2012 年の初診時に採取された検体（8551 検体）から Protease-RT 領域（HXB2:253-3269）の全塩基が解析可能な配列（全 5018 配列）を対象に、サブタイピングと subtype B の感染クラスタの同定を行い、MSM リスクを持つ顕著なクラスタについて感染ネットワーク解析を行った。ウインドウ・スライド法による組換え構造の解析を含むサブタイピングにより、5018 配列のうち 4398 配列が subtype B, 358 配列が CRF01_AE であった。Subtype B に感染した検体は、男性（97%）・MSM（84%）・日本人（95%）が多く、3713 検体が 312 個の感染クラスタを形成し、残りの 685 検体が孤発例であった。Subtype B の感染クラスタのうち、MSM を主要な感染リスクとするものは 292 個あり、そのうち 121 個が 5 名より多くの感染者で構成される「大きな」クラスタであった。MSM を主要感染リスクとしないクラスタに「大きな」ものはなかった。MSM 関連感染クラスタの共通祖先発生時間（tMRCA）は、主に 1995 年～2005 年の間に分布しており、subtype B ウイルスは我が国において 90 年代後半から MSM に流行しだしたことが示唆された。大きな感染クラスタは、特定の地域と関連付けられる傾向があった。100 以上の感染者を含む顕著に大きな感染クラスタにおいては複数の地域が均等に含まれることも多いが、これらのクラスタの推定感染ネットワーク構造は、クラスタが複数のサブネットワークの集合体であり、サブネットワークには地域性が反映されていることを明らかにした。これらの感染ネットワークの点中心性指標を解析したところ、サブネットワークの結合点で両者のウイルス伝播を仲介している感染者が観察された。こうした感染者は、MSM のコミュニティを超えた HIV-1 の流行に重要な役割を持っていることが推測され、感染予防の戦略を策定する際に点中心性指標を解析することで貴重な情報を提供できると考えられる。

A. 研究目的

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

- 患者・検体・塩基配列情報のデータベース入力・検索・解析システムを構築すること
- データベースに蓄積した塩基配列データを用いて、わが国における HIV-1 感染伝播過程の動態を再構築すること
- 上記の再構築された過程を、経時的・地理的・サブタイプ等の観点から解析し、伝播過程の特徴を把握することで、感染予防戦略に寄与すること

B. 研究方法（倫理面への配慮）

- DB サーバ連携 Web システムの構築によって、研究班が集める患者／検体情報を効率的に収集・集積し、公開する。
- 上記の情報システムに蓄積された Protease-RT 領域の塩基配列データを用いて、領域毎距離行列の計算による領域ごとのサブタイピングを行う。
- 距離行列法、最尤法、Bayesian Markov Chain Monte-Carlo 法（ベイズ MCMC 法）などの複数の分子系統樹から得られる統計学的パラメータを解析し、感染クラスタを高精度で同定する。
- 各サブタイプの塩基配列データをベイズ MCMC 法で解析し、最適塩基置換モデル・進化パラメ

ーター・時間系統樹トポロジー・感染クラスタの tMRCA 推定を行う。

- ウイルス遺伝子の遺伝的距離に基づく伝播ネットワークの推定を行い、グラフ理論によるネットワーク解析によって HIV の感染クラスタの拡大に影響を及ぼす因子を解明する。

(倫理面の配慮)

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

C. 研究結果

検体配列とサブタイプリファレンス配列のアライメントからウインドウ・スライド法によって部分配列を抽出したのち、それぞれの領域についてリファレンスとの平均置換塩基率を算出・サブタイプと組換え体を判定する迅速法を開発し、2002年～2012年の初診時に採取された検体(8551検体)から Protease-RT 領域 (HXB2:253-3269) の全塩基が解析可能な配列 (全 5018 配列) を対象に、サブタイピングを行った。その結果、サブタイプ毎の検体数は B=4398, O1_AE=358, C=49, O2_AG=29, G=22, F=9, D=1 であり、111 配列が何らかの組換え体、41 検体が所属不明であった (図 1)。サブタイプ B の 4398 検体について、昨年の本研究で確立された分子進化学的証拠に基づく感染クラスタの推定

法 (図 2) を使って感染クラスタの推定を行ったところ、312 個のクラスタが同定された (図 3)。感染クラスタに内包される検体は、3713 検体 (84.5%) であった。感染クラスタのサイズ分布 (図 4) をみると、感染者数が少ない「小さい」感染クラスタが多い一方でごく少数の「大きな」クラスタがあるスケールフリー性が観察された。これは、ごく少数の感染者が感染の拡大に多くの寄与をしている場合にみられる現象である。感染クラスタの多くでは同じ地域由来の感染者が大半を占めており、感染クラスタには地域特異性があることがわかった (図 5)。内包感染者の感染リスクから感染クラスタの主要感染リスクを推定すると、MSM が 292 個 (93.6%) で際立って多かった (図 6)。感染クラスタの共通祖先の存在時間 (tMRCA) の推定値 (図 6) から考えて、感染クラスタの多くは主要感染地域に依らず 90 年代後半に MSM に広がったと推測された。内包感染者の多い感染クラスタのクラスタ内伝播動態を調べるため、クラスタ毎に時間系統樹を推定した (図 7) が、目立った構造は観察されなかった。一方、ウイルス遺伝子の遺伝的距離が一定以下の検体対を感染リンクがあるとする方法で感染ネットワーク (グラフ) を構築したところ、感染クラスタの多くはいくつかのサブネットワークに分かれる構造を持つことがわかった (図 8)。サブネットワークは、概ね単一の感染地域由来の感染者で構成されていた。さらに、サブネットワーク同士を媒介する点に、ネットワーク解析でいうところの媒介中心性の高い

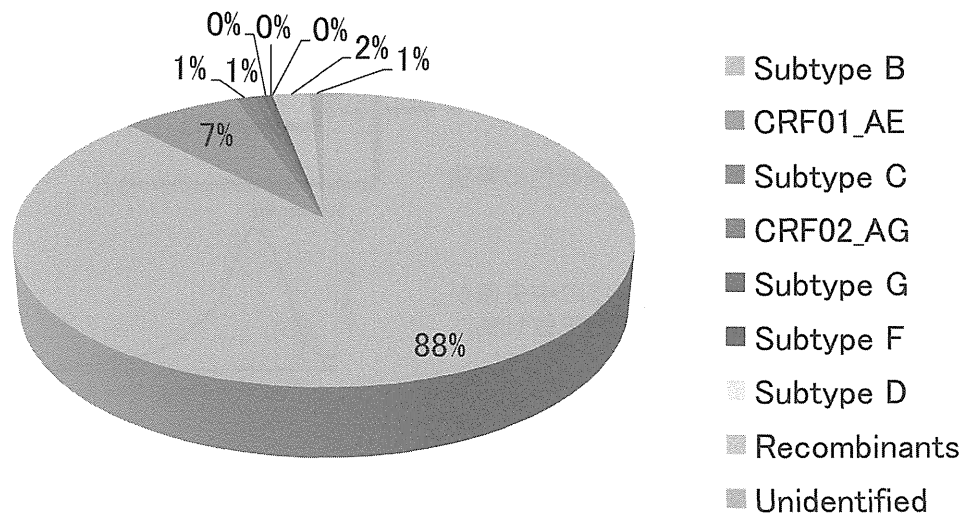


図 1 2002 年～ 2012 年の検体のサブタイプ頻度

少数の感染者の存在があることがわかり、巨大 MSM クラスターの多くはこうした少数の感染者がいくつかの地域コミュニティをつないだ形を取ることがわかった。ネットワーク解析における点中心性については、すでに度数中心性が感染者の伝播リスクと関連するという報告がある（参考文献）。そこで、本研究の感染ネットワークにおいて媒介中心性とともなう度数中心性も算出し、両者の関連を示した（図 9）。度数中心性が高いノードは媒介中心性も高いが、媒介中心性が高いノードは度数中心性が必ずしも高くありません。また、感染者の年齢と中心性については、度数中心性の場合には相関がなく、媒介中心性では左の図のように高年齢層では中心性が低いものは少なかった。

D. 考察

本研究は、我が国のほとんどの地域を網羅的に調査した定点サーベイランスで集められたウイルス塩基配列を用いた国内最大規模の HIV-1 動向解析である。昨年までの研究において、我が国の HIV-1 感染は 90 年代の CRF01_AE の小規模な侵淫に続いて 90 年代終わりから多くの subtype B 株が侵淫したこと・CRF01_AE は当初異性間および IVDU 関連集団への感染が多かったが 2000 年代に入ってから

MSM が初期感染の主体になっていること、またリスク因子ごとの平均 RO は MSM,IVDU で高いこと・サブタイプ B の感染クラスターは殆ど MSM であり、その感染クラスター内 RO は 1.8-5.8 の範囲でばらばらについていること・CRF02_AG, サブタイプ G は女性主体に増えており平均 RO が 7 付近と高いこと・多彩な組換え体ウイルスが増えていることなどがわかってきている。本年度は、もっとも感染者数の多いサブタイプ B について、2012 年までの配列データを再解析したうえで 312 個の感染クラスターを同定し、その大半が MSM を主体に感染を広げているクラスターであることを明らかにした。サブタイプ B が MSM を中心に見いだされることは従来から言われているが、本研究の結果はこれらが MSM における集団感染ケースであることを分子系統樹からの証拠によって明確に示している。集団感染の多くは、90 年代後半から開始されており、また大きなクラスターではそれより古い起源を持っていることは、MSM における HIV-1 感染が輸入感染症ではなくコミュニティ内の再感染としての問題となってから相当の時間が経っていることを示している。さらに、クラスターの系統的末端部に外国籍の感染者が見いだされることは、これらの集団感染が国外にも輸出されつつあることを示唆している。感染クラスターのスケール

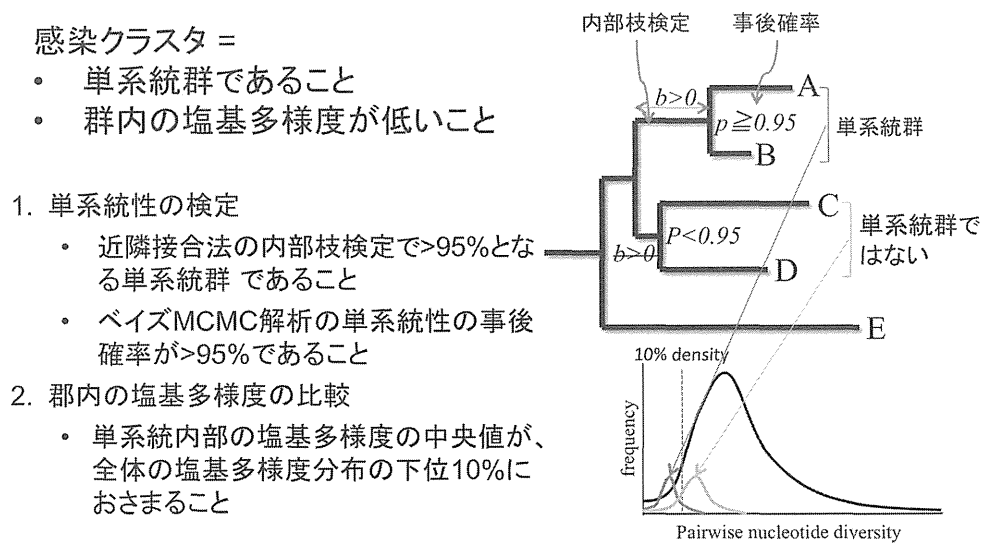


図 2 感染クラスターの同定法