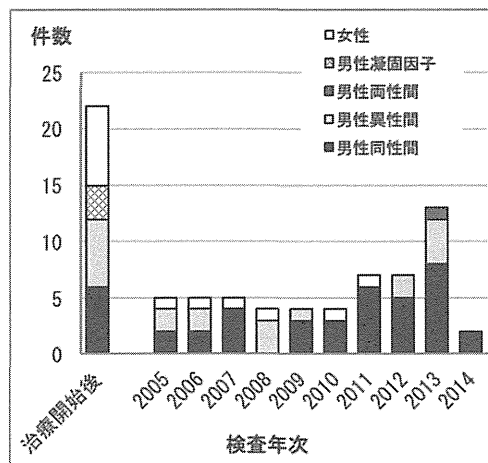


嘉也、羽柴知恵子、横幕能行、高山次代、上田幹夫、下司有加、白阪琢磨、木下一枝、藤井輝久、城崎真弓、山本政弘、岡 慎一、生島 嗣：ブロック拠点病院と A C C における「健康と生活調査」—基本的属性と感染判明後の生活変化—。第 28 回日本エイズ学会学術集会、総会、大阪、2014 年 12 月

H. 知的所有権の出願・取得状況
なし

A 感染経路



B ウイルスのクレイド

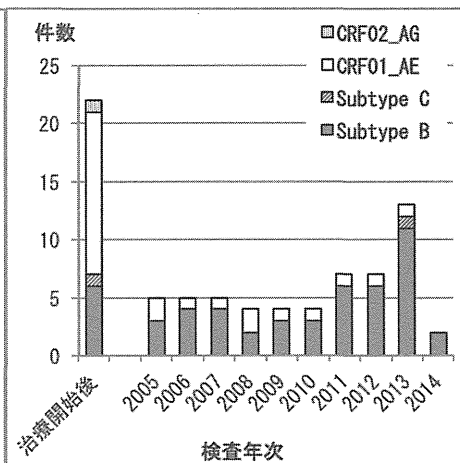


図 2. 本調査症例の感染経路 (A)、および感染ウイルスのクレイド (B) の内訳

注 1 データはすべて新潟県内の病院を受診した患者についてのものである。

注 2 治療開始後症例は本調査治療開始 (2005 年) 以前から治療を受けており、その後耐性検査で性状が明らかになった症例すべてを含む。検査自体は現在までの複数年にわたって実施されたものである。

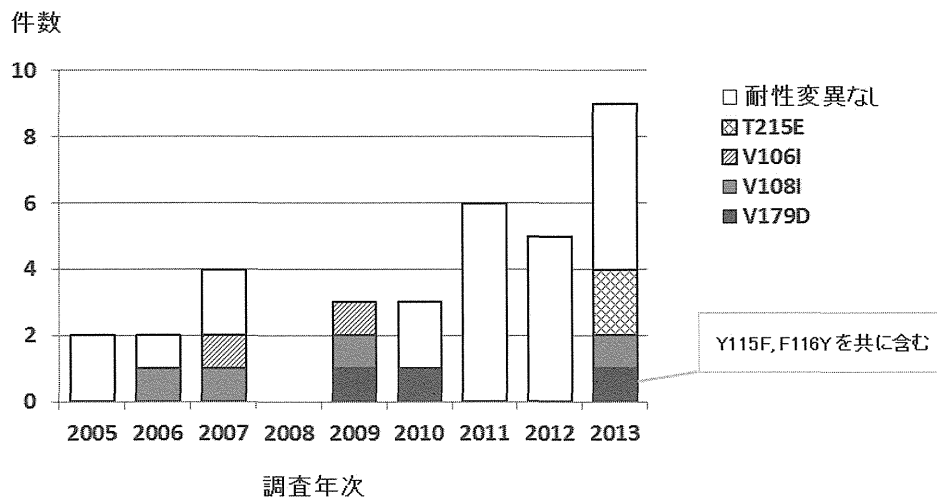


図 3. 本 MSM 症例から検出された薬剤耐性変異の頻度

注 データはすべて新潟県内の病院を受診した患者についてのものである

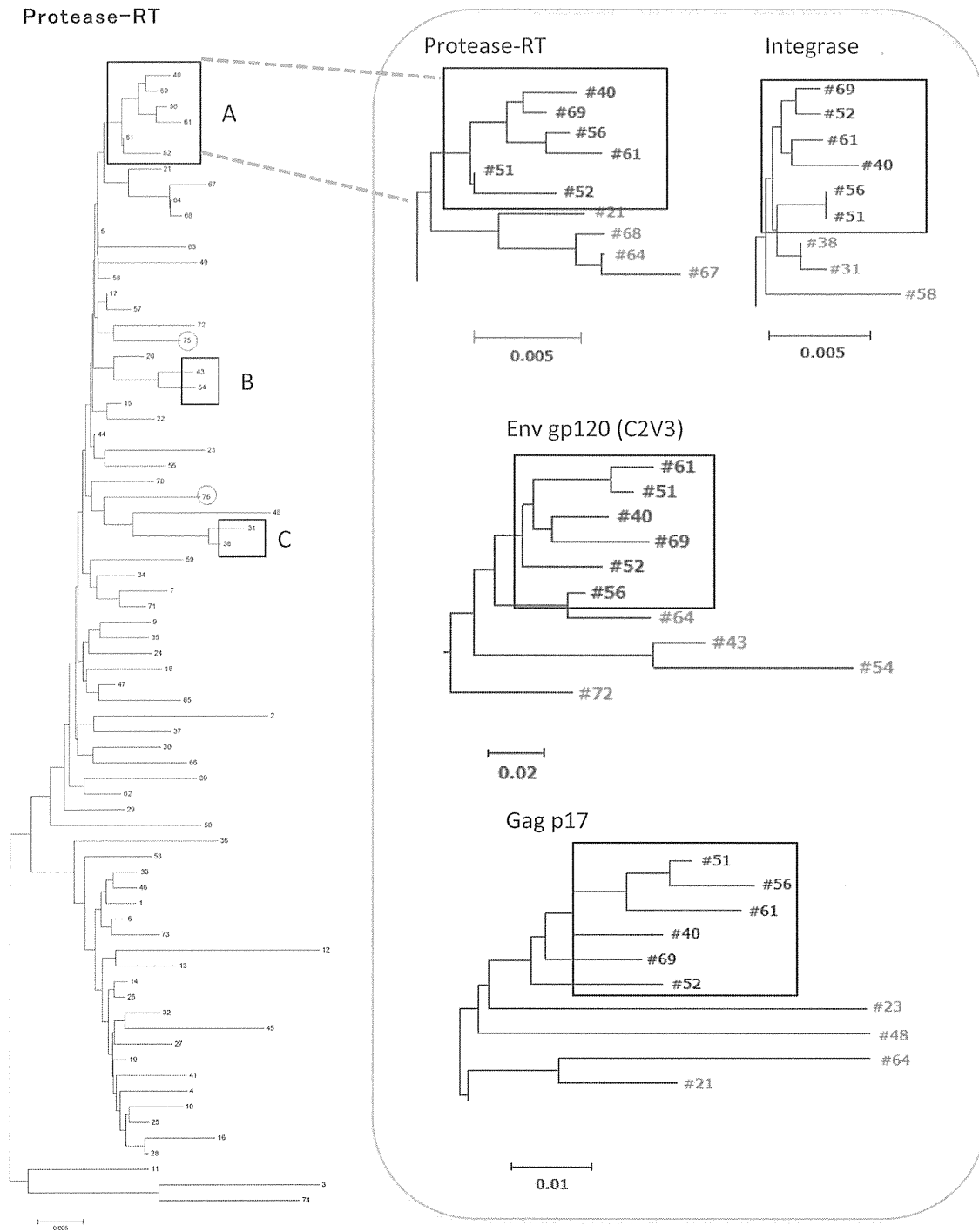


図 4. 新潟県で検出されたウイルスの系統学的関係

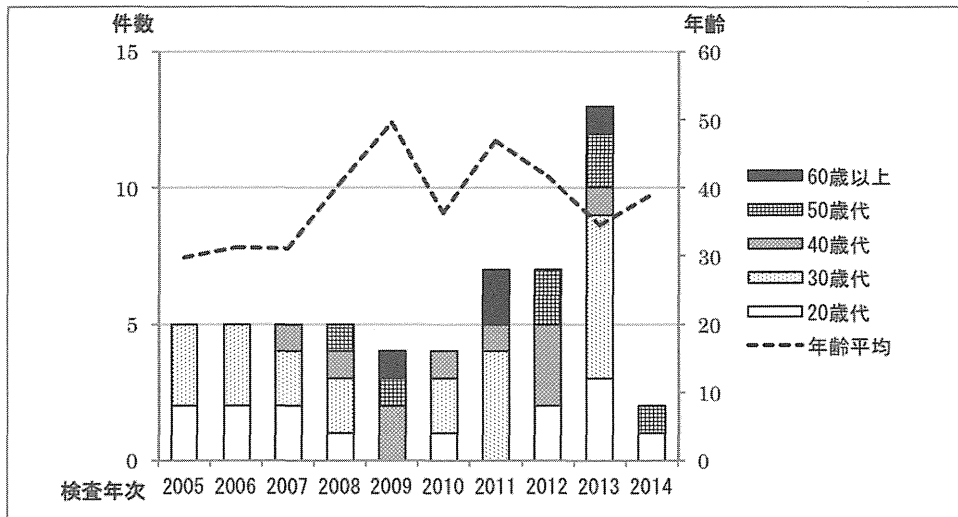


図5. 新潟県における年齢別年次別、新規 HIV 感染者 / AIDS 発症者数

北陸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 中谷 安宏 石川県立中央病院 免疫感染症科 診療部長

研究要旨

北陸ブロックにおける薬剤耐性 HIV 伝播の現状を把握するために、2014 年新規未治療患者 12 例の薬剤耐性検査とサブタイプ解析を行った。その結果、プロテアーゼ領域では一次変異は認められず、逆転写酵素領域では高度耐性変異が 1 例 (T69S) に認められた。しかし、プロテアーゼ領域の二次変異は全ての症例で検出され、逆転写酵素領域では V106I、V179D/I、T215D/E/I/L など 6 種類の変異が 7 症例に検出されたが、非逆転写酵素領域では変異は検出されなかった。また、インテグラーゼ領域でも耐性変異は検出されなかった。サブタイプ解析では、8 例中 7 例で B、1 例で A であった。

A. 研究目的

本邦における薬剤耐性 HIV 伝播の状況を把握する研究の分担として、北陸ブロックにおける新規未治療 HIV 感染者における薬剤耐性変異の状況を調査し、薬剤耐性 HIV の発生動向を把握する。同時にサブタイプ及びトロピズム解析を行い、新規診断患者の HIV サブタイプとトロピズムの動向についても調査する。

B. 研究方法

薬剤耐性検査 (genotype)、サブタイプ及びトロピズム解析は、初診時または服薬開始前の検体を用いて行った。検査の同意を得た後、検査は研究代表者である杉浦互先生 (名古屋医療センター) に依頼した。外注による薬剤耐性検査が出された場合は、サブタイプ及びトロピズム解析は指定されない限り施行されなかったが、検査全ては名古屋医療センターに送られて解析された。

(倫理面への配慮)

HIV 感染者には担当医から説明を行い、同意を得

た後、検査を行った。また、サンプルの患者情報は記号化し、プライバシーの保護に配慮した。なお、本研究は石川県立中央病院倫理委員会で承認されている。

C. 研究結果

当院における 2014 年 1 月から 12 月までの HIV 感染者・AIDS 患者の新規登録は 17 例で、そのうち未治療は 12 例であった。耐性検査は 12 例全例で施行し、2014 年 12 月末までに結果が得られているのは 12 例であった。この 12 例のうち、問診と免疫機能検査成績などから、感染初期と判断される例は 1 例 (表 1 の No.8) であった。

2013 年 12 月に新規登録されたが 2014 年 1 月に耐性検査が施行された 2 例を含めた 14 例の耐性検査の結果、プロテアーゼ領域では 14 例全例に耐性に関与する変異が確認されたが、全て二次変異であった (表 1)。それらの変異の中で頻度の多いものとしては、L15V (9 例)、V77I (7 例)、L63P (6 例)、I62V (6 例) であった。逆転写酵素領域では高度体

制変異 (T69S) が 1 例に認められたが、その他の逆転写酵素領域の変異は T215L (3 例)、V179D (2 例)、V179I (2 例)、そして K103R、V106I、T215D/F、T215I、がそれぞれ 1 例に観察された。非逆転写酵素領域の薬剤耐性変異は認められなかった。また、インテグラーゼ領域でも、薬剤耐性変異は認めなかった。サブタイプ解析では、解析が施行

された 8 例中サブタイプ B が 7 例 (87.5%) で、残りの 1 例がサブタイプ A (12.5%) であった。トロピズムについては、9 例について解析が施行され、7 例が CCR5 (77.8%) であり、2 例 (22.2%) が CXCR4 であった。ただし、この 2 例中、CCR5/CXCR4 が混在した例と純粋に CXCR4 の例の区別は不明である。

表 1 新規登録未治療患者における薬剤耐性変異 (2014 年 1 ~ 12 月末)

No.	性別	国籍	Subtype	PRO	RT	IN	Tropism
*	F	日本	A	M36I, L63P	—	—	R5
*	F	日本	B	L63P, V77I	V106I	—	X4
1	M	日本	NT	I15V, M36I, I62V, V77I	V179I, <u>T215D/E</u>	—	NT
2	F	日本	NT	L10I, I15V	—	—	NT
3	M	日本	B	I15V, V77I	—	—	R5
4	M	日本	NT	L10I, I15V, M36I, I62V	T69S , V179D, <u>T215L</u>	—	NT
5	M	日本	NT	L63P, V77I	—	—	NT
6	M	日本	NT	I15V, I62V, L63P, H69N, V77I	<u>T215I</u>	—	R5
7	M	日本	NT	L63P, H69K, A71T, V77L	—	—	NT
8	M	日本	B	I15V	V179D	—	R5
9	M	日本	B	I15V, M36I, I62V, H69Y, V77I	V179I, <u>T215L</u>	—	X4
10	M	日本	B	I15V, I62V, A71V	<u>T215L</u>	—	R5
11	M	日本	B	I15V, L63P, H69N, V77I	—	—	R5
12	M	日本	B	I62V, A71T	K103R	—	R5

* 2013 年末新規登録、2014 年 1 月耐性検査施行。
検査は全て名古屋医療センターに依頼した。

表 2 抗 HIV 治療 (ART) 中の患者数の推移 (北陸)

	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
診療患者数	84	82	102	105	120	147	163	175	192
ART中(人)	49	58	75	90	99	120	138	158	181
ART(%)	58.3	70.7	73.5	85.7	82.5	81.6	84.7	90.3	94.3

D. 考察

2014 年 1 月から 12 月末までに薬剤耐性動向調査の研究に登録した新規未治療 HIV 感染者数は 12 例であった。このうち 2014 年 12 月末までに検査結果が得られた 12 例と、2013 年 12 月に登録されたが薬剤耐性検査が 2014 年 1 月に施行された 2 例を含めた合計 14 例については、プロテアーゼ領域では一次変異は認めなかったが、二次変異は L15V、V77I、L63P、I62V をはじめとして 11 種類の変異が検出された。逆転写酵素領域では、薬剤高度耐性変異は T69S が 1 例 (7.1%) 検出され、全国平均の約 9% とほぼ同程度であった。非逆転写酵素領域やインテグラーゼ領域では薬剤耐性変異は認められなかった。抗 HIV 治療 (ART) を受けている患者数は北陸においても増加しており (表 2)、2014 年には治療失敗例はなかったが、以前のウイルス学的治療失敗例には多剤耐性ウイルスも検出されている。今後、北陸においても耐性 HIV の出現や伝播が危惧されるので、臨床の現場では服薬アドヒアランスの向上や HIV 二次感染予防の啓発に努めなければならない。

E. 結論

2014 年 1 月から 12 月末までに、新規に HIV 感染が診断され登録された 13 例全例に対して薬剤耐性検査を行った。このうち 12 月末までに薬剤耐性検査の結果が得られた 11 例と 2013 年 12 月に登録されたが薬剤耐性検査が 2014 年 1 月に施行された 2 例を加えた 13 例について、プロテアーゼ領域で一次変異は 0 例、二次変異は 13 例全例に認めた。逆転写酵素領域で高度耐性変異の T69S が 1 例に認められ、その他 K103R、V106I、V179D、V179I、T215D/E、T215I、T215L を単独または複数変異として検出した。これらの変異は HIV 感染者 14 例中 8 例 (57.1%) に認められた。非逆転写酵素領域及びインテグラーゼ領域では耐性変異はみられなかった。サブタイプは検査された 8 例中 7 例が B で、1 例が A であった。トロピズムは 9 例で解析され、7 例が CCR5 で、2 例が CXCR4 であった。ただし、CCR5 と CXCR4 の混合トロピズムの割合は不明である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 学会発表

1. 椎野禎一郎, 服部純子, 瀧永博之, 吉田繁, 石ヶ坪良明, 近藤真規子, 貞升健志, 横幕能行, 古賀道子, 上田幹夫, 田邊嘉也, 渡邊大, 森治代, 南留美, 健山正男, 杉浦互: 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, 大阪, 2014 年.
2. 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, 大阪, 2014 年.
3. 安田明子, 下川千賀子, 林志穂, 柏原宏暢, 山田三枝子, 辻典子, 小谷岳春: 石川県立中央病院におけるドルテグラビル使用状況について. 第 28 回日本エイズ学会, 大阪, 2014 年.
4. 塩田ひとみ, 大金美和, 渡部恵子, 坂本玲子, 伊藤ひとみ, 川口玲, 石塚さゆり, 山田三枝子, 高山次代, 羽柴知恵子, 鍵浦文子, 木下一枝, 長與由紀子, 城崎真弓, 池田和子, 瀧永博之, 岡慎一: HIV 感染血友病患者の医療と福祉の連携へのアプローチ～療養支援アセスメントシートの検討～. 第 28 回日本エイズ学会, 大阪, 2014 年.
5. 山中京子, 辻麻理子, 阪木淳子, 松岡垂由子, 塚本琢也, 大川満生, 早津正博, 小松賢亮, 渡邊愛祈, 仲里愛, 北志保里, 鍛冶まどか, 仲倉高広, 喜花伸子: ブロック拠点病院などでの心理検査の実施に関する研究. 第 28 回日本エイズ学会, 大阪, 2014 年.
6. 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, 羽柴知恵子, 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 回日本エイズ学会, 大阪, 2014 年.
7. 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, 羽柴知恵子, 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 回日本エイズ学会, 大阪, 2014 年.

8. 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, 羽柴知恵子, 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 回日本エイズ学会, 大阪, 2014 年.
9. 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, 羽柴知恵子, 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 回日本エイズ学会, 大阪, 2014 年.
10. 秋野憲一, 遠藤浩正, 田村光平, 宮田勝, 前田憲昭, 宇佐美雄司: 中核拠点病院における地域歯科医療確保に向けた取組の現状と課題～エイズ治療中核拠点病院及びブロック拠点病院における地域歯科医師体制整備に関する実態調査～. 第 28 回日本エイズ学会, 大阪, 2014 年.
11. 須貝恵, 吉用緑, 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 回日本エイズ学会, 大阪, 2014 年.
12. 宮田勝, 高木純一郎, 藤邑守成, 能島初美, 宮浦朗子, 山本裕佳, 上田幹夫, 山田三枝子, 辻典子, 前田憲昭, 宇佐美雄司: 拠点病院と歯科診療所との連携に関する考察 第 4 報—石川県歯科医師会と歯科医療体制のネットワーク化の取り組み—. 第 28 回日本エイズ学会, 大阪, 2014 年.
13. 宮森敦子, 濱口優子, 鈴野千鶴子: 当院における HIV 感染者に対する外来個別栄養指導の実績. 第 28 回日本エイズ学会, 大阪, 2014 年.
14. 小谷岳春, 上田幹夫: CD4 リンパ球数増加を狙ってマラビロクを上乗せした 3 例. 第 28 回日本エイズ学会, 大阪, 2014 年.
15. 高山次代, 山下美津江, 北志保里, 古川夢乃, 小谷岳春: 地域における HIV 感染症患者の連携支援に関する調査. 第 28 回日本エイズ学会, 大阪, 2014 年.
16. 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, 羽柴知恵子, 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 回日本エイズ学会, 大阪, 2014 年.
17. 下川千賀子, 安田明子, 林志穂, 辻典子, 山田三枝子, 柏原宏暢, 小谷岳春: 石川県立中央病院での院外処方せんの発行状況とその傾向. 第

28 回日本エイズ学会, 大阪, 2014 年.

H. 知的所有権の出願・取得状況 該当なし

高感度薬剤耐性 HIV 検査法を用いた 微小集簇薬剤耐性 HIV の検出と存在比率に関する研究

～定量 PCR を応用した高感度薬剤耐性検査法の開発～

研究分担者 西澤 雅子 国立感染症研究所エイズ研究センター 主任研究官

研究要旨

患者血漿中の微小集簇薬剤耐性変異 HIV の存在が抗 HIV 療法 (cART) の失敗に関与することが近年報告されている。本研究では定量 PCR の原理を応用し、通常の薬剤耐性検査で用いられるダイレクトシーケンス法 (通常法) では検出不可能な、微小集簇として患者血漿中に存在する薬剤耐性変異 HIV の検出を試みた。これまでに逆転写酵素阻害剤 (NRTI, NNRTI) に対する耐性変異 M41L, K65R, K70R, K103N, Y181C, M184V, T215F/Y の 8 変異とプロテアーゼ阻害剤 (PI) に対する耐性変異 M46I/L, L90M の 3 変異が解析可能となっているが、この中でラミブジン (3TC)、エムトリシタビン (FTC)、アバカビル (ABC) に対する耐性変異の M184V の検出系の感度が低いことが分かっており、昨年度から検出系の改良を行ってきた。その結果理論的検出限界 3.25%、臨床検体を用いた解析でも特異性の高い系の確立に成功した。今年度は確立した新規 M184V 検出系を用いて 2008 年から 2009 年度にかけて名古屋医療センターで収集された 149 例の患者検体について再解析を行った。以前の方法を用いた解析からは、微小集簇として M184V を持つ患者検体は 1 例のみだったが、改良法で解析した結果 8 例から M184V が微小集簇として検出され、検出頻度は 5.4% だった。8 症例は全症例男性で、うち 7 症例は日本人で同性間の感染だった。これらの症例から通常法によって得られた逆転写酵素 (RT) 領域の配列を用いて系統樹解析を行った結果、症例番号 2,4,7,8 から得られた配列と症例番号 3,5 から得られた配列がそれぞれ系統樹上で近傍に位置し、関連性が示唆された。

A. 研究目的

M184V は単独で NRTI のラミブジン (3TC)、エムトリシタビン (FTC)、アバカビル (ABC) に対して高感度薬剤耐性を与える。これらの NRTI は現在の標準的な cART の中でも重要な位置を占める薬剤で、このため M184V の有無を高感度薬剤耐性検査で正確に把握することは効果的な cART のために重要である。近年になって M184V を微小集簇として持つ患者がラミブジンを含む cART 治療に失敗した例が報告され、高感度法による薬剤耐性検査の重要性が改めて示された。昨年度の解析から、従来の高感度 M184V 検出系は感度や特異性に問題があるため微小な M184V を見逃している可能性が示唆された。この結果を踏まえて昨年度は高感度 M184V 検出系の改良を行い良好な結果を得た。今年度は本法を用

いて 2008 年から 2009 年にかけて薬剤耐性検査を行った新規未治療 HIV 感染患者 149 例を再解析し、微小集簇として存在する M184V の再解析を行った。

B. 研究方法

(1)2008 年から 2009 年にかけて名古屋医療センターで薬剤耐性検査を行った患者検体 149 症例 (Subtype B) を解析対象とし、平成 25 年度に改良した高感度 M184V 検出系を用いて微小集簇 M184V の検出を試みた。また、微小集簇として M184V を持つ患者検体から通常法によるシーケンス解析で得られた RT 領域の配列 (主要な集簇として患者血中に存在する HIV) を系統樹解析により検討し、これらの患者間での HIV 伝播について解析した。また高感度法で得られた M184V を持つ配列 (

微少集簇として患者血中に存在する HIV) と通常法によって得られた RT 配列について系統樹解析を行い、異なる二つの HIV 株が同一患者内で重感染している可能性について検討した。

(2) (倫理面への配慮)

本研究では薬剤耐性変異を組み込んだベクターの作製で組換え DNA 実験を行うので、組換え DNA 実験安全委員会に実験申請を行いその許可を得た。またヒト由来検体を使用するため、国立感染症研究所の医学研究倫理審査委員会へ倫理審査を申請し許可を得た。

C. 研究結果

従来の高感度法では、2009 年の症例から 184V を微少集簇として持つ例が 1 症例検出されていた。改良した高感度 M184V 検出系を用いて 149 症例を再解析した結果、さらに 7 症例から微少集簇として存在する M184V が検出された。従来の高感度法で検出された 1 症例を追加して患者背景について解析した (表 1)。その結果、8 例中全症例が男性、うち 7 例が日本人、同性間接触による感染、2008 年で 3 症例、2009 年で 5 症例の検出で M184V を持つ患者群に特徴的な背景は見られなかった (表 1)。M184V を微少集簇として持つ 8 症例を通常法で解析した RT 領域の配列 (患者血中で主要な集簇として存在する HIV の RT 配列) について系統樹解析を行い互いの配列の関連性について解析した結果、症例番号 2,4,7,8 と症例番号 3,5 がそれぞれ系統樹上でクラスターを形成していた (図 1)。Bootstrap value は症例番号 3 と 5 で 100%、症例番号 4 と 7

で 77%、症例番号 2、4、7 のクラスターと症例番号 8 の間で 92% であり、これらの患者の間における HIV の伝播が疑われた。症例番号 1 と 3 で、通常法で得られた RT 領域の配列 (主要な集簇として存在する HIV の RT 領域配列) と、高感度法によって得られた M184V を持つ微少集簇 HIV の RT 配列を系統樹解析で比較した結果、主要な集簇の RT 配列と微少集簇の RT 配列はそれぞれ近傍に位置し、2 種類の異なる HIV の重感染ではなく M184V を持つ微少集簇として存在する HIV は主要な集簇として存在する HIV と同じ origin であることが示唆された (図 2)。

D. 考察

今改良した高感度 M184V 検出系で解析した結果、149 症例中 8 症例から微少集簇として存在する M184V が検出され、存在比率は 5.4% だった。M184V は現在 cART に汎用される 3TC、FTC、ABC といった抗 HIV 薬剤に対して高度耐性を付与する重要な耐性変異であり、これが血中に微少集簇として存在していた場合その患者はこれらの抗 HIV 薬剤を含む cART で治療失敗に陥る可能性がある。M184V に限らず、cART に影響を及ぼしうる薬剤耐性変異を cART 開始前に高感度法によって把握することは、効果を期待できる抗 HIV 薬剤を選択する上で重要であると思われる。今回の解析で、微少集簇として M184V を持つ患者から得られた RT 領域の配列は系統樹上でクラスターを形成しており、クラスター内に存在する患者間での HIV の伝播が示唆された。これは微少集簇として存在する M184V も患者から

表 1 M184V が検出された 8 症例一覧

ID	VL	CD4	性別	感染経路	初診	国籍	年齢	Bulk-seq		AS-PCR	
								RT	PR	RT	PR
1	2.6.E+04	481	M	同性間	2008	日本	49	-	-	M184V	M46I/L
2	1.5.E+04	356	M	同性間	2008	日本	39	-	-	M184V	L90M
3	1.7E+07	4	M	同性間	2008	日本	32	-	-	M184V	
4	3.9E+05	441	M	同性間	2009	日本	32	-	-	M184V	
5	1.20E+04	22	M	異性間	2009	アジア(中国)	26	-	-	M184V	
6	9.6E+04	63	M	同性間	2009	日本	42	-	-	M184V	
7	6.2E+03	543	M	同性/異性	2009	日本	44	-	-	M184V	
8	4.5.E+05	3	M	同性間	2009	日本	40	-	-	M41L, K70R, M184V	M46I/L,L90M

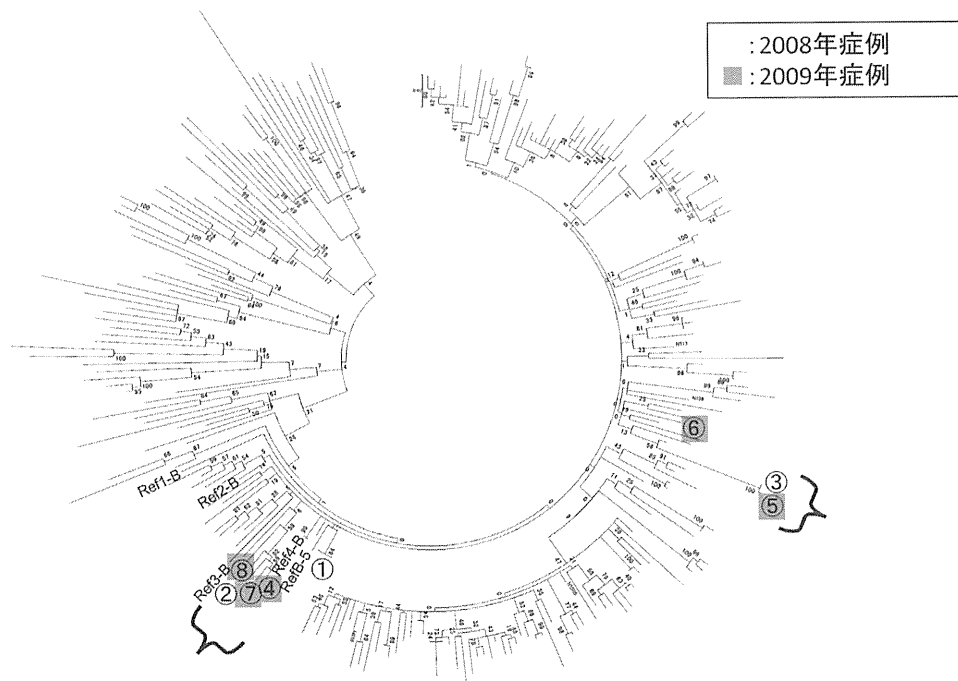


図 1 2008-2009 年に名古屋医療センターで薬剤耐性検査を行った新規未治療患者検体の RT 領域の系統樹解析

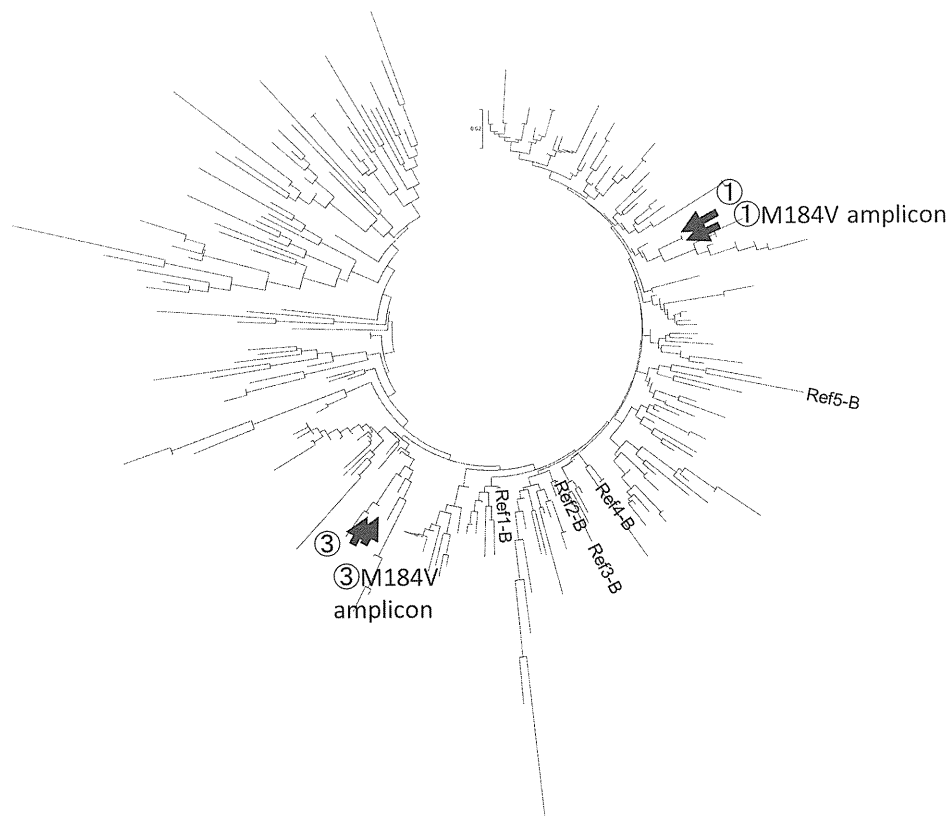


図 2 症例番号 1、3 における主要集簇の RT 配列と M184V を持つ微少簇の RT 配列の系統樹解析

患者へ伝播している可能性を示しており、新規未治療患者における薬剤耐性 HIV の伝播は通常法では検出できない微小集簇薬剤耐性変異でも起きている可能性が示された。

E. 結論

新たに開発した高感度 M184V 検出系を用いて、2008 年から 2009 年にかけて薬剤耐性検査を行った Subtype B の患者検体 149 症例について再解析を行った。その結果、従来の高感度法で M184V が検出された 1 症例に加えて 7 症例から M184V が微小集簇として検出された。これらの 8 症例は全員男性、うち 7 症例は日本人・感染経路は同性間で、日本人の HIV 感染患者の背景と違いは見られなかった。これらの患者の血中に主要な集簇として存在する HIV の RT 領域について系統樹解析を行った結果、症例番号 2,4,7,8 と症例番号 3, 5 がそれぞれクラスターを形成しており、Bootstrap value の値から HIV の感染がこのクラスター間で起こっていた可能性が示唆された。症例番号 1, 3 の患者検体中で主要な集簇として存在する HIV の RT 配列と M184V を持つ微小集簇として存在する HIV RT 配列を系統樹で解析した結果、それぞれ系統樹上で近傍に位置していた。これは微小集簇として存在する M184V を持つ HIV が、野生型の HIV と共に患者に重感染して存在しているのではなく、患者血中に存在する野生型 HIV を origin として出現した可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 口頭発表

国内

- 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、2014 年 12 月、大阪.
- 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、遠藤知之、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、2014 年 12 月、大阪.

- 西澤雅子、Jeffrey A. Johnson、Walid Heneine、杉浦 互. 抗 HIV 治療患者から臨床経過観察中に検出される微小集簇薬剤耐性変異の特性と臨床的意義の解析. 第 28 回日本エイズ学会、2014 年 12 月、大阪.

H. 知的所有権の出願・取得状況

なし



中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 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 16 人，治療中断者 1 人，ウイルス学的治療失敗者 1 人において 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，全例サブタイプ B であるものの X4 指向性が増加している。

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

平成 26 年 1 月 1 日から平成 26 年 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連結可能匿名化処理を行い，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. 8 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 Rate(FPR) として表示した。今年度から 2011 年 European ガイドラインに従い，3 重測定の場合は，その最低値が 10% 未満 (cut off index) であれば CXCR4 (X4) 指向性と判定し，得られたサンプルが少なく 1 重測定の場合は，20% 未満を X4 と判定した。

期間中，検体採取し結果を得た症例数は，新規未治療 16 例，未治療再検 1 例，ウイルス学的治療失

敗例 1 例の計 18 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 20 人であり、そのうち 6 人がエイズ発病の患者であった。そのうち本院受診時未治療者は 15 人で、うち 14 人より研究の同意を得て検体採取を行った。2013 年本院初診患者で 2014 年に同意取得し研究に参加した者が 2 人いた。さらに、半年以上抗 HIV 療法を自己中断し再受診を始めた者 1 人、未治療患者 1 人にも、再度文書によって説明し同意を得て検査を行った。また 2013 年に治療を開始したが、服薬アドヒアランス良好にも関わらず、血漿ウイルス量が数百コピー/ml を推移している者がおり、それも対象に加えた。性別は全員男性で、出生地も全員日本であった。現在の居住地は沖縄、徳島が、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, 8 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なかった。平均薬剤耐性関連変異数は 3.88 であり昨年度より多かった。比較的頻度の多い変異は、L10V/I (5 例), I15V (9 例), I62V(7 例), L63P/A/T/S (14 例), A71V/T(8 例), V77I(7 例) であった。エイズ発病と未発病とで、変異数に特に有意な差は認めなかった (P=0.223)。

また逆転写酵素領域では、10 例に耐性関連変異を認め、うち 8 例が V179 の変異であった。エイズ発病者 6 例のうち 3 例が V179D の変異を有していた。また 1 例 L210W があったが、M41L, T215Y は伴っていなかった。インテグラーゼ領域は V74I/M が 2 例であり、他の意味のある耐性関連変異は認めなかった。

(3) ウイルス遺伝子型 (サブタイプ) について

サブタイプは全例 B であった。ここ何年か検出された O1_AE はなかった。症例 16 はプロテアーゼ領域の M36I を有していたが、これもサブタイプ B であった。

(4) ウイルス指向性について

18 例中 6 例が X4 指向性で、残りは全て R5 指向性であった。未治療再検例とウイルス学的治療失敗例はいずれも X4 指向性であり、かつ初診時(未治療)

表 1 期間中に研究班にて薬剤耐性検査を行った患者

No	Age	発病	Subtype	プロテアーゼ領域関連変異	#	RT領域*1	#	I領域*2	#	指向性*3
1	43	○	B	I15V	S	V179D	S	-	S	R5(32.0%)
2	25	×	B	L10V, H69K/N/Q, L63P, A71T, V77I	S	V179I	S	-	S	R5(48.4%)
3	38	○	B	L10I, L63S, V77I	S	V179D	S	-	S	R5(31.0%)
4	40	×	B	I15V, L63P	S	V179E	S	-	S	X4(8.6%)
5	31	×	B	L10I, M36I, I62V, L63P, A71V,	S	V106I	S	-	S	R5(27.3%)
6	34	○	B	I15V, I62V, L63A/T	S	-	S	-	S	R5(17.3%)
7	48	×	B	I62V, A71T, V77I	S	V179E	S	-	S	R5(11.7%)
8	30	×	B	I15V, I62V, A71V	S	V179E	S	L74I/M	S	R5(19.4%)
9	43	×	B	I15V, I62V, L63A/T, A71T, L10V,	S	L210W	S	-	S	R5(26.2%)
10	32	×	B	I15V, M36I, L63T	S	V179E	S	-	S	R5(71.7%)
11	56	○	B	I15V, L63A/T, A71V	S	V179D	S	-	S	X4(5.1%)
12	40	×	B	L63P, H69R	S	-	S	-	S	X4(7.8%)
13	67	×	B	I15V, L63A	S	-	S	L74I/M	S	R5(95.8%)
14	30	×	B	I15V, D60E, L63T	S	-	S	-	S	R5(17.1%)
15	42	×	B	I62V, L63P, V77I	S	-	S	-	S	X4(7.8%)
16*4	39	×	B	M36I, L63P, H69K, A71T, V77I	S	-	S	-	S	X4(7.4%)
17*5	49	○	B	L63P, V77I	S	-	S	-	S	X4(0.8%)
18*6	48	○	B	L10I, I62V, L63P, A71T, V77I	S	-	S	-	S	R5(86.2%)

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 ウイルス学的治療失敗例 *6 治療中断例

表 2 R5 → X4 指向性の患者プロフィール

No (年)	18 (2012)	19 (2012)	16 (2014)	17 (2014)
年齢	29	36	39	49
感染期間, 地域*1	約2年 大阪	約1年 広島	約2年 東京	約10年 不明(国内)
指向性変化の 期間	9ヵ月	9ヵ月	1年6ヵ月	10ヵ月
サブタイプ	AE	AE	B	B
耐性関連 変異(PI)	L10I, G16E, D60E, I62V	L10I, G16E, D60E, I62V	M36I, L63P, H69K, A71V, V77I	L63P, V77I
VL(c/ml)	280	310,000	10300	289
CD4(μ l)	496	693	664	64
ART	無	無	無	有
その他	9ヵ月前の変異 RT; V179I PI; K20R, M36I, L63P, D60E	9ヵ月前の変異 RT; V179I PI; G16E, M36I, D60E	1年6ヵ月前はウイ ルス量少なく耐性 変異は解析不可	10ヵ月前の変異 RT; V179D PI; I15V, I62V, L63P, H69Y, V77I

*1患者からの聴取による

には R5 指向性であった。治療自己中断例は R5 指向性であったが、未治療初診時にはウイルス指向性検査は施行できない時期だったため、以前との比較はできなかった。

エイズ発病例と未発病例の false positive rate を比較したが、両群に有意な差は認めなかった ($p=0.925$)。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 年からの 3 年間に 2 回以上指向性検査を行い、R5 から X4 指向性に変化した 4 例のプロファイルを示す。4 例中 2 例はサブタイプ AE であった。

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昨年に続き 0 % であり、薬剤耐性株は広島県その周辺では少ないことが想像される。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。今年よく見られたのは、L10, I15, I62, L63, A71, V77 の変異であった。特に I15V, I62V, V77I の増加は大きな特徴である。昨年 9 例と多く見られた L63P は lopinavir に特異的な耐性関連変異であるが、今年も 8 例で、かつ P 以外への変異も多く見られた。これはカレトラに使用歴のある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

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が、逆に未治療者においては当分の間多く見られる耐性変異かも知れない。同様に V77I は、以前第一選択で頻用された saquinavir, indinavir, nelfinavir 耐性関連変異であるが、現在これらの薬剤の使用は皆無に近い。

一方 L10V は nelfinavir, darunavir 以外の非特異的なプロテアーゼ阻害剤耐性関連変異であるが、現在頻用されているプロテアーゼ阻害剤は darunavir であり、他のプロテアーゼ阻害剤の使用は減少していることから、治療選択に困ることはない。

以上を踏まえると、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」な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 耐性関連変異である G16 や D60, I64 の変異が増えて行くかも知れない。また今年多く報告された I15V については、米国スタンフォード大学の HIV DRUG RESISTANCE DATABASE では耐性関連変異とは見なされていない。ただ耐性関連変異数が少ない症例において(表 1: No.1,4,13 など) よく見られ、変異数が増えると消失していくように見える(表 1: No.2,5,18 など)。プロテアーゼ領域における耐性関連変異の始まりを示すものかも知れず、今後症例を蓄積して注視すべき変異と言えよう。

逆転写酵素領域の耐性関連変異がみられたものは 10 例で、うち 8 例が V179 である。HIV DRUG RESISTANCE DATABASE によると V179D は、

efavirenz 治療歴のある患者における polymorphic なアクセサリ遺伝子としている。そのため etravirine のみならず、強さの違いはあれ他の非核酸系逆転写酵素阻害剤全てに耐性を有している可能性がある。Efavirenz は 10 年以上にわたり、抗レトロウイルス療法のキードラッグの第一推奨薬であり使用経験者は多い。しかし日本ではその副作用から敬遠されている薬剤であり、前述の各種プロテアーゼ阻害剤同様、使用頻度は減少している。とはいえ、無条件第一推奨ではないもののその飲みやすさより使用量が増えている rilpivirin や、救済療法の薬剤として不可欠な地位を持つ etravirine に耐性を獲得している、またはする可能性が高いと考えられ、注目すべき変異である。また今年 V106I が初めて検出された。これは etravirine に特異的な耐性関連変異であるが、今後 179 の変異などいくつかの変異が重なれば耐性を獲得する可能性がある。

インテグラーゼ領域であるが、今年 L741/M が 2 例検出された。これは 2013 年版 IAS-USA では raltegravir 耐性関連変異とされており、かつ in vitro では elvitegravir 耐性関連とも言われている。いずれにしても中～高度耐性ではないが、raltegravir の使用量が 2-3 年前多かったことを考えると、今後同様の耐性関連変異が出現、蓄積される可能性を示唆している。

X4 指向性は 6 例であり、前年度に比べ例数、比率とも増加したが、特にエイズ発病との関連性は見いだせなかった。昨年サブタイプ AE は容易に R5 指向性から X4 指向性へ変化しうる、といった仮説を提唱した。しかし、今年度はサブタイプ AE の症例はおらず、症例の蓄積は次年度へ先送りとなった。但し同一症例で観察期間中に R5 指向性から X4 指向性へ変化した例を検討した。2 年弱の経過の中で、該当例は 4 例で 2 例がサブタイプ AE であり、2 例は B であった (表 2)。サブタイプ AE 2 例はゲイのカップルであり、患者からの聴取より No.18 より No.19 へウイルス伝播があったことが確認された珍しいケースである。薬剤耐性関連変異も酷似しており、前述のことを示唆する所見が得られているが、ウイルス量は No.19 が非常に多い。しかし、その 1 例を除けばウイルス量が非常に少ないのが特徴と言える。昨年の報告書で「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。」としたが、逆の結果を出る可能性はある。

また今年度から、false positive rate (FPR) の考え方を変更し、従来の German-Austrian ガイドラインから、2011 年 European ガイドラインに準拠することとした。そのため X4 指向性が症例数、比率共に

増加したとする反論はあるかも知れない。しかし FPR の値を見ると、従来の cut off 値 (20%) を使用しても全例 X4 指向性となっていた。2011 年 European ガイドラインは cut off 値が下がっており、むしろ R5 指向性と判定しやすい基準である。さらに、cut off 値を 5.75% とすべき専門家もいる。しかし、元来指向性検査は、CCR5 阻害剤である Maraviroc を使用すべきかどうか臨床医が判断するために必要な検査である。そのため、実際には Maraviroc の効果が低いにも関わらず有用性が高い (X4 指向性なのに R5 指向性)、と誤判定されるリスクをなくすためにも、現在の基準がよいのではないかと思われる。今後検討されるべき事項である。

E. 結論

本院を受診中の 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、数年前第一推奨とされた薬剤に対するものが多く出現しており、今後は atazanavir や efavirenz 耐性関連変異が出現する可能性を示唆された。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) 学会発表

1. 齊藤誠司、山崎尚也、藤井輝久、鍵浦文子、藤井健司、藤田啓子、畝井浩子、大毛宏喜：診断の遅れからエイズ指標疾患を発症し、輸血前感染症検査にて診断に到った HIV/AIDS の 3 症例。第 88 回日本感染症学会学術講演会。[感染症学会誌 .2014;88:362]2014 年 6 月 18 日 -19 日。博多
2. 鍵浦文子、木下一枝、山崎尚也、齊藤誠司、藤井輝久、高田昇：広島大学病院に通院する HIV 感染者の梅毒治療の現状。第 88 回日本感染症学会学術講演会。[感染症学会誌 .2014;88:364]2014 年 6 月 18 日 -19 日。博多
3. 藤田啓子、藤井健司、畝井浩子、鍵浦文子、藤井輝久、齊藤誠司、山崎尚也、高田昇、木平健治：広島大学病院における抗 HIV 療法のレジメン変更状況～バックボーンについて～。第 88 回日本感染症学会学術講演会。[感染症学会誌 .2014;88:365]2014 年 6 月 18 日 -19 日。博多
4. 藤井健司、藤井輝久：当院におけるスタリビルド配合錠使用例の報告。第 24 回日本医療薬学会年会。2014 年 9 月 27 日 -28 日。名古屋

5. 山崎尚也、齊藤誠司、藤井輝久：細菌性心外膜炎を発症し診断に至った HIV 感染例 . 第 36 回広島感染症研究会 . 2014 年 11 月 29 日 . 広島
6. 齊藤誠司、木下一枝、小川良子、喜花伸子、浅井いづみ、塚本弥生、藤井健司、藤田啓子、畝井浩子、山崎尚也、藤井輝久、高田昇：広島大学病院における中枢神経病変合併 HIV 感染者の現状と課題 . 第 28 回エイズ学会学術集会 . [日本エイズ学会誌 . 2014;16(4):449] 2014 年 12 月 3 日 -5 日 . 大阪
7. 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 回エイズ学会学術集会 . [日本エイズ学会誌 . 2014;16(4):453] 2014 年 12 月 3 日 -5 日 . 大阪
8. 藤井輝久、齊藤誠司、山崎尚也、小川良子、木下一枝、藤井健司、藤田啓子、畝井浩子、高田昇：ART 導入例におけるレジメンとウイルス量及び CD4 数の変化の関係 . 第 28 回エイズ学会学術集会 . [日本エイズ学会誌 . 2014;16(4):465] 2014 年 12 月 3 日 -5 日 . 大阪
9. 山崎尚也、木下一枝、小川良子、喜花伸子、浅井いづみ、塚本弥生、藤井健司、藤田啓子、畝井浩子、齊藤誠司、藤井輝久、高田昇 広島大学病院における HIV 感染者の骨代謝異常の現状と原因の検討 . 第 28 回エイズ学会学術集会 . [日本エイズ学会誌 . 2014;16(4):469] 2014 年 12 月 3 日 -5 日 . 大阪
10. 木下一枝、喜花伸子、塚本弥生、齊藤誠司、小川良子、藤井健司、畝井浩子、山崎尚也、藤井輝久、高田昇：知的能力障害を有する HIV 患者への療養支援一週間に HIV 感染を告知しないことを選択した一事例一 . 第 28 回エイズ学会学術集会 . [日本エイズ学会誌 . 2014;16(4):525] 2014 年 12 月 3 日 -5 日 . 大阪
11. 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、羽柴知恵子、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一 . 第 28 回エイズ学会学術集会 . [日本エイズ学会誌 . 2014;16(4):565] 2014 年 12 月 3 日 -5 日 . 大阪
12. 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、羽柴知恵子、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一 . 第 28 回エイズ学会学術集会 . [日本エイズ学会誌 . 2014;16(4):566] 2014 年 12 月 3 日 -5 日 . 大阪
13. 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、羽柴知恵子、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」－就労と職場環境一 . 第 28 回エイズ学会学術集会 . [日本エイズ学会誌 . 2014;16(4):580] 2014 年 12 月 3 日 -5 日 . 大阪
14. 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、羽柴知恵子、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」－薬物使用の状況一 . 第 28 回エイズ学会学術集会 . [日本エイズ学会誌 . 2014;16(4):580] 2014 年 12 月 3 日 -5 日 . 大阪
15. 岩田倫幸、柴秀樹、松井加奈子、新谷智章、岡田美穂、濱本京子、畝井浩子、齊藤誠司、高田昇、藤井輝久：広島大学病院が実施した HIV 歯科診療体制構築事業後のアンケートから伺える課題 . 第 28 回エイズ学会学術集会 . [日本エイズ学会誌 . 2014;16(4):582] 2014 年 12 月 3 日 -5 日 . 大阪
16. 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、羽柴知恵子、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一 . 第 28 回エイズ学会学術集会 . [日本エイズ学会誌 . 2014;16(4):620] 2014 年 12 月 3 日 -5 日 . 大阪

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

本研究の目的は、HIV-1 の進化に関わる分子マーカーが、新たな疫学的指標となるかどうか調べるところにある。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 153 名の解析の中で、315 番に複数の codon usage が見られた症例が 22 例あり、従来に分離株に見られる 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 137 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

我が国では、2008 年頃より毎年、約 1000 名の新規 HIV 感染例と 500 例の新規 AIDS 患者が登録されている。新感染症例の中には、感染から発症までの期間が短いと考えられる症例も観察される。我々は新規診断症例に関して、ウイルス分離を行い、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、最近の数年間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に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。HIV-1 は感染を拡大させながら、進化し続けていることが大きな特徴である。本研究の目的は、このような進化に関わる分子マーカーが、新たな臨床的または疫学的指標として提唱可能かどうか調べ

るところにある。

B. 研究方法 (倫理面への配慮)

HIV-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 全長をシーケンスした。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 シーケンスによる 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

表 1 3V3-tip の 315Q/R に複数の codon usage が見られた 22 症例

		V3 tip AA	codon usage 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	
1	YOD	PtSID	GPGR	GGA CCA GGG				AGA		AAA	GGA	GGC	AGT	AGC	subtype	FFR
	May-95	TIK	GPGR	GGA CCA GGG				AGA							B	ND
			GPGR	GGA CCA GGG											B	ND
2	Sept.1995	AMI	GPGR	GGA CCC GGG					AGG						B	22
			GPGR	GGA CCC GGG				AGA							B	6.3
3	Apr.1998	YIS	APGR	GCA CCA GGG				AGA							B	92.2
			APGS	GCA CCA GGG										AGC	B	90.3
4	Sep.1998	YKI	GPGR	GGA CCA GGG				AGA							B	25.6
			GPGR	GGA CCA GGG											B	38.4
5	Aug.1998	YKA	GPGR	GGA CCA GGG GGA							GGA				B	10.8
			GPGR	GGA CCA GGG GGA				AGA							B	33.6
6	Feb.1999	NSI	GPGR	GGA CCA GGA											AE	0.2
			GPGR	GGA CCA GGA											AE	18.5
	Apr.1999	MIS	GPGR	GGA CCA GGG											B	36.5
			GPGR	GGA CCA GGG											B	62.4
8	Sep.2000	KKGO	GPGR	GGA CCG GGG				AGA							B	0
			GPGR	GGA CCG GGG											B	0
	June.2003	MNIS	GRGR	GGA CGA GGG										AGC	B	9.6
			GRGR	GGA CGA GGG											B	3.2
			GRGR	GGA CGA GGG											B	3.2
10	May.2007	MNA	GPGR	GGA CCA GGG											B	5.7
			GPGR	GGA CCA GGG											B	63.5
11	July.2007	YUNA	GPGR	GGA CCA GGG				AGA							B	41.4
			GPGR	GGA CCA GGG											B	41.4
12	Jan.2008	YANA	GPGR	GGA CCA GGC						AAA					B	41.2
			GPGR	GGA CCA GGC				AGA							B	1.7
13	Feb.2008	HTA	GPGR	GGA CCA GGG											B	63.1
			GPGR	GGA CCA GGG											B	13
14	Sep.2008	mYHI	GPGR	GGA CCA GGA											C	72.6
			GPGR	GGA CCA GGA											C	16.9
15	Apr.2008	TAKO	GPGR	GGA CTA GGC				AGA							B	13.1
			GPGR	GGA CCA GGC						AAA					B	37.2
16	May-08	fdNA	GPGR	GGA CCA GGG CGA											B	17.3
			GPGR	GGA CCA GGG CCG											B	17.3
17	Nov.2009	YMI	GPGR	GGA CAA GGG				AGA							B	3.7
			GPGR	GGA CAA GGG						AAA					B	4
18	Apr.2010	KMA	GPGR	GGA CAA GGG				AGA							B	2.9
			GPGR	GGA CAA GGG						AAA					B	19.6
19	May.2010	JNA	GPGR	GGA CAA GGG						AAA					B	17.1
			GPGR	GGA CAA GGG				AGA							B	29.1
20	Dec.2011	NIK	GPGR	GGA CCA GGC						AAA					B	45.5
			GLRR	GGA CTA AGA				AGA							B	0.2
21	Jan.2013	ASU	GLGG	GGA CTA GGA GGA							GGA				B	26.5
			GPGR	GGA CCA GGA AGA				AGA							B	74.9
22	Apr.2014	NWA	GPGR	GGA CCA GGC AGA				AGA							B	8.1
			GPGR	GGA CCA GGC AAA						AAA					B	9.6

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).

得たのちに採血した (臨床研究登録 UMIN000004720)。

C. 研究結果

我々は、昨年度までの研究を継続し、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 153 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 22 例あった(表 1)。このうち 20 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)、G(GGA) 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 15 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 7 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ら、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 22 例の解析のうち 8 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

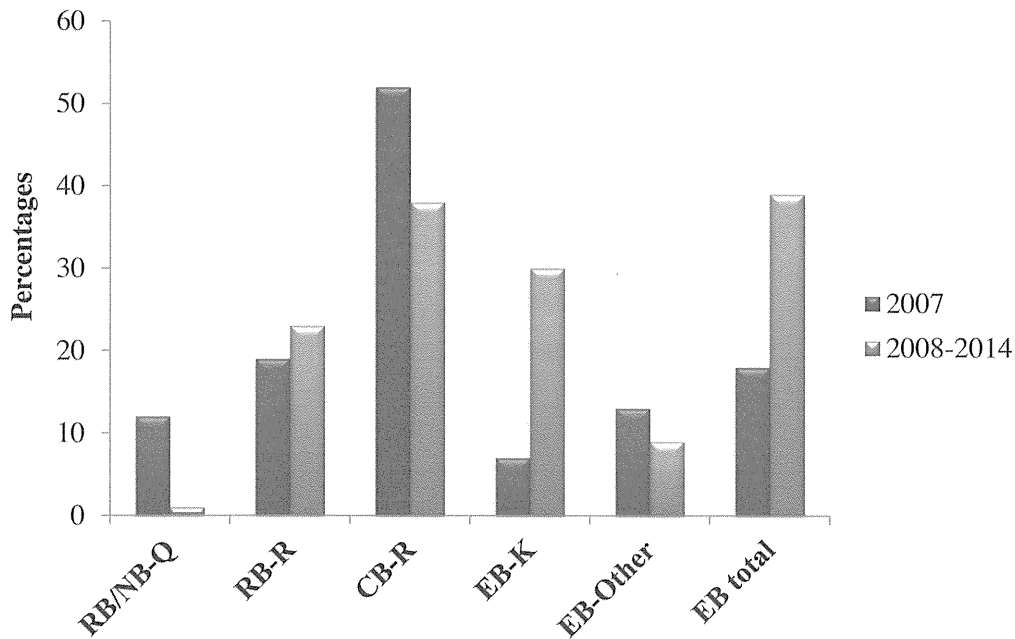


図1 V3-tip の 315 番目のアミノ酸の codon usage の頻度による分類、A;2007 年までの診断症例と 2008 年から 2014 年に診断された症例における頻度 (%) の比較

含む 153 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 2014 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 69% 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。

これらの分類が、ウイルスの生物学的な性質の違いと関連するかどうか調べるために、コレセプター指向性に関して、geno2pheno ソフトウェアを用いて解析した。図 2 に示すように、RB/NB で 315Q のウイルスは、高い FPR 値を示し、すべて CCR5 指向性 (R5) であった。一方、この中から進化したと考えられる、RB-R1 と R2 では 25 ~ 30% が CXCR4 指向性のウイルスを含む dual /mixed (D/M) phenotype に分類されるウイルスへと変化したものと考えられた。CB に属するウイルスに関しては、もともと 25% が D/M ウイルスの可能性があり、むしろ 315K/G/S と進化したと考えられるウイルスのほとんどは R5 ウイルスと考えられた。これらから、ウイルスの個体内変異は、一部のウイルスでは、R5 から D/M へと向かうものではなく、中和抗体などの免疫圧からの逃避などによって 315R からの変異が促進されている可能性が考えられた。

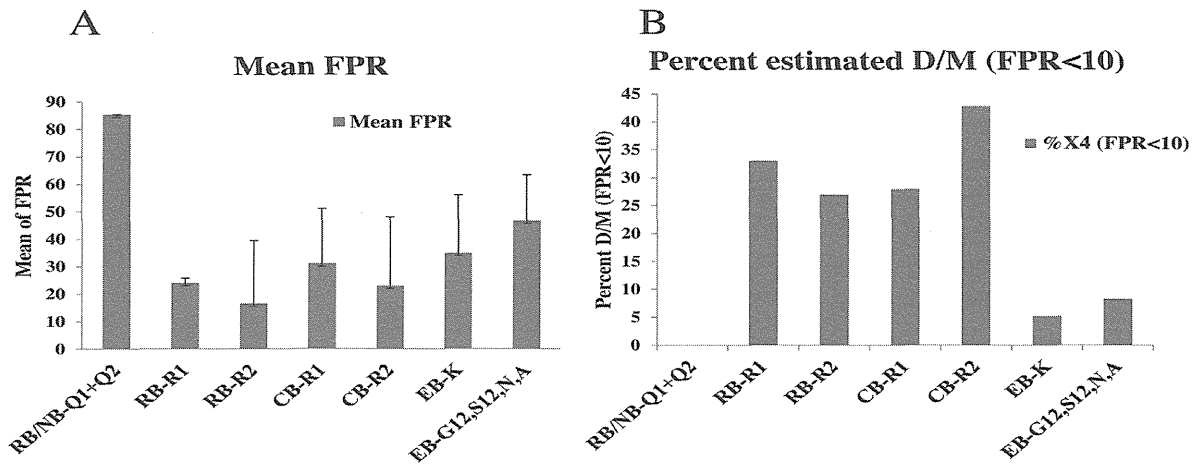


図2 VサブタイプBウイルスの codon usage の違いで分類した場合の coreceptor usage (geno2pheno)。A:Mean +SD of FPR, B:Percentage of estimated D/M virus (FPR<10)

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 GPCR と GPGK、あるいは GPCR 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。従来の 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。RB/NB で 315Q のウイルスは、すべて CCR5 指向性 (R5) であり、これから進化したと考えられる、RB-R1 と R2 では 25 ~ 30% が D/M ウイルスへと変化したものであった。一方、CB ウイルスでは、逆に 315R の 25% が D/M ウイルスで、むしろ 315K/G/S と進化したウイルスは R5 ウイルスと考えられた。これらから、ウイルスの個体内進化による指向性変化は、ウイルスによ

って異なる可能性が示された。

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によって、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 153 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で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