

| 年齢・性別 | 初診年 | サブタイプ | 初診時のCD4 | 初診時のウイルス量 | 初診時の病期 |
|-------|------|-------|---------|-----------|--------|
| 40M | 2008 | C | 194 | 58000 | AC |
| 17M | 2008 | B | 552 | 54200 | AC |
| 34M | 2011 | B | 489 | 1330000 | acute |
| 25M | 2012 | B/AE | 192 | 37900 | AC |
| 39F | 2012 | AE | 72 | 40000 | AIDS |
| 36M | 2011 | B | 356 | 822 | AC |
| 41F | 2011 | C | 245 | 8040 | AC |

表2 QNMEが付加された症例

急性感染後の急速な病期進行については、2003年から2010年に急性HIV感染症と診断された91例について検討した(AIDS research and therapy. 2015;12:19.)。HIV感染からCD4数が350/ μ L未満に低下する推定期間の中央値は0.8年であった。その期間は、オランダ(PLoS ONE. 2013;8(5):e64437.)・SPARTAC(多国籍、N Engl J Med. 2013 Jan 17;368(3):207-17.)・フランス(Clin Infect Dis. 2006 Mar 1;42(5):709-15.)・ブラジル(PLoS ONE. 2012 Jan 1;7(1):e30292.)・アルゼンチン(J Int AIDS Soc. 2011 Jan 1;14:40.)からの報告と比較すると短いものの、東京(Intern Med. 2011 Jan 1;50(2):95-101.)・オランダ(PLoS Med. 2012;9(3):e1001196.)・ドイツ(Eur J Med Res. 2009 Jul 22;14(7):277-83.)からの報告とほぼ同等の期間であった。また、当院の91例の急性HIV感染症と診断された症例のうち、急性期にAIDSを発症した症例は2例であった。以上のことから、当院における急性HIV感染症の症例は予想外に病期の進行が早いことが示された。

| | |
|---------------|-------|
| 大阪(2015) | 0.8年 |
| 東京(2011) | <1年 |
| オランダ(2012) | <1年 |
| ドイツ(2009) | 8.3ヶ月 |
| オランダ(2013) | 2.2年 |
| SPARTAC(2013) | 3.3年 |
| フランス(2006) | 3.6年 |
| ブラジル(2012) | >1.9年 |
| アルゼンチン(2011) | >1年 |

表3 各地域における急性感染者/感染早期者の感染時期からCD4<350/ μ Lまでの推定期間

2003年から2015年にセロネガティブ感染を5例経験した。急性感染直後からセロネガティブとなった症例は2例と考えられ、両者に感染したHIVのインテグラーゼ領域のC末端にQNMEの付加はなく、新型変異HIV感染は否定された。

D. 考察

2011年以前の検体を中心に解析を行った。インテグラーゼ領域の解析からは新型変異HIV感染疑いの症例は多く見積もっても1.6%しか認めなかった。半数でサブタイプB以外の感染があり、海外に在住していたことがあった・パートナーが外国人など、3例で海外での感染や外国人からの感染が強く示唆され、これらの症例は新型変異HIV感染ではないと考えられた。現在、解析途中の症例を含めると、新型変異HIV感染が疑われる症例は上記に記載した2例に加え3例存在し、うち2例は2012年の初診例である。川畑らは2012年に感染件数のピークがあったことを報告しており、2012年以後の解析が必要である。また、インテグラーゼ領域にQNMEの付加がある症例についてはp6のシーケンズを行い、新型か否かの確定も急がれる。

急性HIV感染者においては過去に想定された以上の速度で免疫が低下していた。2011年以前の症例を対象に免疫低下速度を検討したため、新型変異HIV感染の症例は存在していてもごくわずかと思われる。従って、2010年以前の症例と新型変異HIV感染により急性HIV感染症となった症例の経過を比較することにより、新型変異HIVの毒性を推測することが可能である。

当院のセロネガティブ感染の2症例には新型変異HIVは関与していないことが示された。このような症例における宿主側の要因の検索が期待される。

E. 結論

2011年以前は新型変異HIV感染者が存在していてもわずかであり、2012年以降の解析が期待される。

F. 健康危機情報

特になし。

G. 発表論文等

(英文)

1. Watanabe D, Suzuki S, Ashida M, Shimoji Y, Hirota K, Ogawa Y, Yajima K, Kasai D, Nishida Y, Uehira T, and Shirasaka T. Disease progression of HIV-1 infection in symptomatic and asymptomatic seroconverters in Osaka, Japan: a retrospective observational study. AIDS Res Ther. 12:19, 2015.

2. Yagura H, Watanabe D, Ashida M, Kushida H, Hirota K, Ikuma M, Ogawa Y, Yajima K, Kasai D, Nishida Y, Uehira T, Yoshino M, and Shirasaka T. Correlation between UGT1A1 polymorphisms and raltegravir plasma trough concentrations in Japanese HIV-1-infected patients. J Infect Chemother. 21(10):713-7, 2015

(和文)

1. 渡邊 大：診断と治療の Topics「ドルテグラビルの臨床評価」、HIV 感染症と AIDS の治療 (メディカルレビュー社)、6 巻 1 号、P19-24、2015 年
2. 小川吉彦、渡邊 大：エイズに見られる感染症と悪性腫瘍 (24)「マルネッフエイ型ペニシリウム症」、化学療法領域 (医薬ジャーナル社)、31 巻 6 号、P1228-1234、2015 年
3. 榎田宏幸、富島公介、矢倉裕輝、吉野宗宏、廣田和之、伊熊素子、小川吉彦、矢嶋敬史郎、笠井大介、渡邊 大、西田恭治、上平朝子、白阪琢磨。当院 HIV 感染症症例におけるニューモシスチス肺炎に対するアトバコンの使用状況。日本エイズ学会誌、17 巻、P101-105、2015 年

(口頭発表) -国内

1. 小川吉彦、廣田和之、伊熊素子、矢嶋敬史郎、笠井大介、渡邊 大、西田恭治、上平朝子、白阪琢磨：髄液中 Adenosine deaminase 高値を示した急性 HIV 感染症の一例。第 89 回日本感染症学会学術講演会、京都、2015 年 4 月
2. 渡邊 大、鈴木佐知子、蘆田美紗、松本絵梨奈、廣田和之、伊熊素子、矢嶋敬史郎、笠井大介、西田恭治、上平朝子、白阪琢磨：HIV 感染者におけるカポジ肉腫関連ヘルペスウイルスに対する抗体保有率と抗体陽転率の検討。第 29 回近畿エイズ研究会学術集会、大阪、2015 年 6 月
3. 矢倉裕輝、渡邊 大、蘆田美紗、榎田宏幸、富島公介、廣田和之、伊熊素子、矢嶋敬史郎、笠井大介、西田恭治、吉野宗宏、上平朝子、白阪琢磨：日本人 HIV-1 感染症患者における UGT1A1 遺伝子多型とラルテグラビル血漿トラフ濃度の関連。第 29 回近畿エイズ研究会学術集会、大阪、2015 年 6 月
4. 渡邊 大、上平朝子、山本雄大、湯川理己、上地隆史、廣田和之、伊熊素子、矢嶋敬史郎、笠井大介、西田恭治、白阪琢磨：当院の HIV 感染者における長期合併症の有無と

抗 HIV 薬の選択の関連性の検討。第 29 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2015 年 11 月

5. 小川吉彦、渡邊 大、小川 拓、米川真輔、宇野健司、中村 (内山) ふくみ、古西 満、笠原敬、白阪琢磨、三笠桂一：長期間 HIV western blot 法の陽転化を認めず免疫機能不全を呈した HIV 感染症の一例。第 29 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2015 年 11 月
6. 伊熊素子、廣田和之、小川吉彦、矢嶋敬史郎、笠井大介、渡邊 大、西田恭治、上平朝子、白阪琢磨：HIV 患者に生じた *Penicillium marneffeii* の脳膿瘍の一例。第 29 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2015 年 11 月
7. 矢嶋敬史郎、矢倉裕輝、山本雄大、湯川理己、廣田和之、伊熊素子、笠井大介、渡邊 大、西田恭治、上平朝子、白阪琢磨：当院におけるドルテグラビル中止例に関する検討。第 29 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2015 年 11 月
8. 矢倉裕輝、榎田宏幸、富島公介、山本雄大、湯川理己、廣田和之、伊熊素子、上地隆史、矢嶋敬史郎、笠井大介、渡邊 大、西田恭治、吉野宗宏、上平朝子、白阪琢磨：日本人 HIV-1 感染症患者における 1 日 1 回ドルテグラビル投与時の血漿トラフ濃度に関する検討。第 29 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2015 年 11 月

H. 知的財産の出願・登録状況

特になし。

I. 引用文献

特になし。

4. 急速な病期進行あるいはセロネガティブ感染を示す HIV 感染症例における 宿主側因子の解析

研究分担者：塩田 達雄（大阪大学微生物病研究所）
研究協力者：中山 英美（大阪大学微生物病研究所）
研究代表者：川畑 拓也（大阪府立公衆衛生研究所）

研究要旨

セロコンバージョンまでの期間が通常よりも長い、世界でも報告の少ないセロネガティブ HIV 感染の事例について、感染者の遺伝子解析を行い、病態進行を早める遺伝的素因が集積しているか否かを検討することを目的として準備を進めた。本報告書を作成している 2016 年 2 月 15 日現在、主たる研究機関であり試料のとりまとめを行う大阪府立公衆衛生研究所での倫理審査が終了し、それを受けて大阪大学における倫理審査で承認を得た。現在、実際に試料を頂くその他の機関での審査申請中である。

A. 研究目的

HIV 感染者のうちには治療しなくても病気が進行しない長期未発症者が知られている。これまでの研究からウイルスのレセプターとなるケモカインレセプターの変異を持つ感染者はウイルスの増殖が抑制され薬剤治療に頼らなくても発症が遅れることが明らかになっている。一方で抗体陽転の既往がなく、急激な病態進行を示してエイズ発症で来院する劇症型の経過を取る感染者も存在する。臨床経過が急激な感染者の遺伝子を解析して病態進行を早める遺伝的素因が集積しているか否かを検討し、臨床における治療方針を考える上での参考データを与えることを目的とする。

B. 研究方法

HIV 感染症の進行には大きな個人差がある。実施計画としては臨床経過のはっきりした HIV 感染者を対象に説明文書により同意を得た後、1 ml の静脈採血により試料を提供していただく。試料提供後 DNA を抽出し、HIV のレセプターなど HIV 増殖に必要な宿主因子と HIV 制御に与る免疫関連の宿主因子の遺伝子多型を決定する
(倫理面への配慮)

「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守し、筆者の所属する大阪大学や試料を頂く各機関の倫理審査を経て研究を実施する（大阪大学の承認番号：625、大阪府立公衆衛生研究所の承認番号：大公研第 4 6 1 6 号）。

C. 研究結果

本報告書を作成している 2016 年 2 月 15 日現在、主たる研究機関であり試料のとりまとめを行う大阪府立公衆衛生研究所での倫理審査が終了し、それを受けて大阪大学における倫理審査で承認を得た。現在、大阪府公衆衛生研究所と大阪大学での承認を受けて、実際に試料を頂くその他の機関での審査申請中である。

D. 考察

多施設共同でヒトゲノム・遺伝子解析研究を行うのは始めてであったが、施設により倫理委員会の判断が大きく異なることが分かった。

E. 結論

セロコンバージョンまでの期間が通常よりも長い、世界でも報告の少ないセロネガティブ HIV 感染の事例について遺伝子解析を行い、病態進行を早める遺伝的素因が集積しているか否かを検討することを目的として準備を進めた。現在、主たる研究機関であり試料のとりまとめを行う大阪府立公衆衛生研究所での倫理審査が終了し、それを受けて大阪大学における倫理審査で承認を得た。現在、実際に試料を頂くその他の機関での審査申請中である。

F. 健康危機情報

特に無し。

G. 発表論文等

(英文)

1. Hayasaka H, Kobayashi D, Yoshimura H, Nakayama EE, Shioda T, Miyasaka M: The HIV-1 Gp120/CXCR4 axis promotes CCR7 ligand-dependent CD4 T cell migration: CCR7 homo- and CCR7/CXCR4 hetero-oligomer formation as a possible mechanism for up-regulation of functional CCR7. PLoS One. 10(2):e0117454, 2015.
2. Takeda E, Kono K, Hulme AE, Hope TJ, Nakayama EE, Shioda T: Fluorescent image analysis of HIV-1 and HIV-2 uncoating kinetics in the presence of old world monkey TRIM5 α . PLoS One. 10(3):e0121199, 2015.
3. Uttayamakul S, Oudot-Mellakh T, Nakayama EE, Tengtrakulcharoen P, Guernon J, Delfraissy JF, Khusmith S, Sangsajja C, Likansakul S, Theodorou I, Shioda T: Genome-wide association study of HIV-related lipodystrophy in Thai patients: Association of a DLGAP1 polymorphism with fat loss. AIDS Res Hum Retroviruses. 31(8):792-796, 2015.
4. Nakayama EE, Shioda T: Impact of TRIM5 α *in vivo*. AIDS 29(9):1733-1743, 2015.
5. Sakuragi S, Shioda T, Sakuragi JI: Properties of HIV-1 reverse transcriptase recombination upon infection. J Gen Virol. In press.
6. Sultana T, Nakayama EE, Tobita S, Yokoyama M, Seki Y, Saito A, Nomaguchi M, Adachi A, Akari H, Sato H, Shioda T: Novel mutant human immunodeficiency virus type 1 strains with high degree of resistance to cynomolgus macaque TRIMCyp generated by random mutagenesis. J Gen Virol. In press.
7. Likansakul S, Suntisuklappon B, Nitiyanontakij R, Prasithsirikul W, Nakayama EE, Shioda T, Sangsajja C: A Single-Nucleotide Polymorphism in ABCC4 Is Associated with Tenofovir-Related Beta2-Microglobulinuria in Thai Patients with HIV-1 Infection. PLoS One. 11(1):e0147724, . 2016.

(口頭発表) -国内

1. Sultana Tahmina, Emi E. Nakayama, Satoshi Tobita, Akatsuki Saito, Masako Nomaguchi, Akio Adachi, Hirohumi Akari, Tatsuo Shioda: Novel mutant HIV-1 strains with

high degree of resistance to cynomolgus macaque TRIMCyp generated by random mutagenesis. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会, 2015 年 11 月 22 日, 福岡県。

2. 中山 英美, Sirirat Likansakul, Bussakorn Suntisuklappon, Ravee Nitiyanontakij, Pimrapat Tengtrakulcharoen, Wisit Prasithsirikul, Chariya Sangsajja, 塩田達雄: 第 29 回日本エイズ学会学術集会, 2015 年 12 月 1 日. 東京都.

(口頭発表) -海外

1. Tatsuo Shioda: Host factors involved in HIV diseases, 18th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID) AIDS Panel Meeting, 2016 年 1 月 13 日, Bethesda, USA.

H. 知的財産の出願・登録状況

特に無し。

I. 引用文献

特に無し。

5. 新型変異 HIV の遺伝子解析および分子疫学解析

研究分担者：森 治代（大阪府立公衆衛生研究所 主任研究員）
小島洋子（大阪府立公衆衛生研究所 主任研究員）
研究協力者：駒野 淳（国立病院機構名古屋医療センター）、
松浦基夫（堺市立総合医療センター）、宇野健司（奈良県立医科大学付属病院）
研究代表者：川畑拓也（大阪府立公衆衛生研究所）

研究要旨

2013年1月から2015年12月末までに当所に搬入された HIV-1 陽性検体 102 例のうち、9 例に IN-C 末端に 4 アミノ酸の付加が認められ、そのうち 3 例は *p6^{gag}* に特徴的な 5 アミノ酸の重複挿入変異を合わせ持つ新型変異 HIV-1 であった。これまでに解析した当所保有の検体の HIV-1 で IN-C 末端に変異を持つ株は、サブタイプ B が 668 例中 26 例（3.9%）であるのに対し non-B は 61 例中 4 例（6.6%）であり、比率的には non-B サブタイプに多い傾向が見られた。新型変異 HIV-1 の PBMC における増殖能は高く、長期間に渡って培養上清中にウイルスの産生が観察された。各種 HIV 治療薬に対する新型変異 HIV-1 の感受性は、実験室株である Ba-L とほぼ同等であった。国内他地域においても、新型変異 HIV-1 に近縁なウイルスの存在が確認された。

A. 研究目的

我々は、2011年から2012年にかけて大阪府南部で地域的な集積が見られた急速な病期進行を伴う一群の感染初期症例に、共通した特徴的変異、すなわち *p6^{gag}* における 5 アミノ酸重複挿入（P6 変異）とインテグラーゼ（IN）C 末端の 4 アミノ酸付加（IN 変異）を持つ新型変異 HIV-1 を検出した（引用文献 1）。

本研究では、2013年以降の新型変異 HIV-1 の動向およびウイルス学的特徴、ならびに他地域における新型変異 HIV-1 の流行状況を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

(1) 新型変異 HIV-1 の遺伝子疫学解析

2013年1月から2015年12月の間に当所に搬入された HIV-1 陽性検体 102 例より HIV-1 RNA を抽出し、HIV-1 *gag-pol* 領域の塩基配列を RT-nested PCR/ダイレクトシーケンシング法により決定し、新型変異 HIV-1 に特徴的な P6 変異および IN 変異の有無を解析した。また、新型変異 HIV-1 の IN 遺伝子配列について blast 検索 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) を実施し、他地域における新型変異 HIV-1 近縁株の検出状況を調査した。

(2) 新型変異 HIV-1 のウイルス学的解析

新型変異 HIV-1 感染患者由来の末梢血単核球（PBMC）と健常人 PBMC を共培養することにより得られた新型変異 HIV-1 の臨床分離株について、PBMC における増殖能を検討した。さらに、MAGIC5細胞およびPBMCを用いて各種 HIV 治療薬（AZT、EFV、IDV、RAL）に対する新型変異 HIV-1 の薬剤感受性を調べた。

（倫理面への配慮）

各種ガイドラインを遵守し、大阪府立公衆衛生研究所倫理審査委員会の承認を得た上で、HIV 感染者の人権に最大限配慮して実施している。

C. 研究結果

(1) 新型変異 HIV-1 の遺伝子疫学解析

2013年1月から2015年12月末までに当所に搬入された HIV-1 陽性検体 102 例について、HIV-1 *gag-pol* 領域の塩基配列を解析した結果、9 例の IN-C 末端に 4 アミノ酸の付加が認められ、そのうち 3 例（2013年1例、2015年2例）は *p6^{gag}* に特徴的な 5 アミノ酸の重複挿入変異を合わせ持つ新型変異 HIV-1 であった（Fig. 1）。しかしながら、3 例とも慢性感染期であり、新たな感染拡大を示唆するものではなかった（Fig. 2-a）。

残りの 6 例中 5 例の *p6* にも新型変異とは異なる多様な挿入変異が検出され、なかでも日本人 MSM で見つかったウイルスは、*gag-pol* 領域が CRF01_AE であるが *p6* に新型と

類似の重複変異があり、全長ゲノムを解析したところ CRF15_01B に似た遺伝子構造を持つウイルスであることが判明した。

これまでに解析した当所保有の検体の中で IN-C 末端に変異を持つ株は、サブタイプ B が 668 例中 26 例 (3.9%) であるのに対し non-B は 61 例中 4 例 (6.6%) であり、比率的には non-B サブタイプに多い傾向が見られた (Fig. 2-b)。

また、新型変異 HIV-1 の IN 遺伝子配列を用いて blast 検索を行ったところ、東京、名古屋など大都市圏において新型変異 HIV-1 に近縁な HIV-1 が検出されていることが確認された (Fig. 3)。

(2) 新型変異 HIV-1 のウイルス学的解析

i) PBMC における増殖能

2 例の新型変異 HIV-1 感染患者より分離された臨床分離 HIV-1 株の PBMC における増殖性を検討したところ、2 株ともに高い増殖能を示し、少なくとも 1.5 ヶ月に渡って培養液中にウイルスを産生し続けることがわかった (Fig. 4)。

ii) 各種 HIV 治療薬に対する薬剤感受性

新型変異 HIV-1 臨床分離株の HIV 治療薬に対する薬剤感受性を、MAGIC5 細胞および PBMC を用いて検討した。その結果、新型変異 HIV-1 は各種治療薬に対して、R5 タイプの実験室 HIV-1 株である Ba-L とも X4 タイプの臨床分離株ともほぼ同等の感受性を示した (Fig. 5)。

D. 考察

2013 年以降、新型変異 HIV-1 は散見されるものの新たな感染拡大を示唆する状況は認めなかった。しかしながら、流行が終息したか否かはまだ不明であり、その動向については今後も継続して調査を行う必要があると思われる。新型変異 HIV-1 のサブタイプは B であるが、その出現には MSM のコミュニティに侵淫した non-B HIV-1 の関与が推察された。また、新型変異 HIV-1 に近縁な株が東京や名古屋など大阪以外の地域でも検出されていることから、今後は他地域と連携した遺伝子疫学調査も必要である。

先行研究では *gag* の *p6* 遺伝子変異と HIV 治療薬に対する薬剤耐性との関連が報告されており (引用文献 2、3)、新型変異 HIV-1 は P6 変異に加えて IN にも変異を有していることから、新型変異 HIV-1 の治療薬に対する感受性が懸念されたが、今回検討した限りでは新型変異 HIV-1 に対して治療薬は有効に作用すると考えられた。

E. 結語

新型変異 HIV-1 について今後も動向調査を継続すると共に、病態進行との関わりを明らかにするためには、より詳細なウイルス学的解析および宿主側因子との統合した解析が必要であると考えられる。

F. 健康危機情報

特に無し。

G. 発表論文等

欧文

1. Mori H., Kojima Y., Kawahata T., Matuura M., Uno K., Konishi M., Komano J. A cluster of rapid disease progressors upon primary HIV-1 infection shared a novel variant with mutations in the *p6^{gag/pol}* and *pol/vif* genes. AIDS, 29:1717-1719, 2015.
2. Kojima Y., Kawahata T., Mori H., Furubayashi K., Taniguchi Y., Itoda I., Jun Komano J. Identification of Novel Recombinant Forms of Hepatitis B Virus Generated from Genotypes Ae and G in HIV-1-Positive Japanese Men Who Have Sex with Men. AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES, 31:760-767, 2015.

(学会発表) -国内

1. 森 治代、小島洋子、川畑拓也、駒野 淳. *p6^{gag}* および *pol/vif* 遺伝子に特徴的変異を持つ新型変異 HIV-1 の流行状況. 日本エイズ学会、2015 年、東京.
2. 藤野真之、引地優太、森 治代、小島洋子、川畑拓也、俣野哲朗、駒野 淳、村上 努. 新型変異 HIV のウイルス学的解析. 日本エイズ学会、2015 年、東京.
3. 近藤真規子、佐野貴子、井戸田一朗、山中晃、川畑拓也、森 治代、岩室紳也、吉村幸浩、立川夏夫、今井光信、加藤真吾. 新規 HIV 感染者における年次別感染初期割合の推移. 日本エイズ学会、2015 年、東京.
4. 岡崎玲子、蜂谷敦子、瀧永博之、渡邊 大、長島真美、貞升健志、近藤真規子、南 留美、吉田 繁、小島洋子、森 治代、他 35 名. 本邦の新規 HIV/AIDS 診断症例における薬剤耐性 HIV の傾向. 日本エイズ学会、2015 年、東京.
5. 椎野禎一郎、蜂谷敦子、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、中谷安宏、田邊嘉也、渡邊 大、森 治代、南 留美、健山正男、杉浦 互、吉村和久. 国内感染者集団の大規

模塩基配列解析に見る MSM 伝播ネットワークの感染拡大パターン. 日本エイズ学会、2015 年、東京.

H. 知的財産の出願・登録状況

特に無し。

I. 引用文献

1. Mori H, Kojima Y, Kawahata T, Matuura M, Uno K, Konishi M, Komano J. A cluster of rapid disease progressors upon primary HIV-1 infection shared a novel variant with mutations in the $p6^{gag/pol}$ and pol/vif genes. AIDS, 29:1717-1719, 2015.
2. Frank Bally, Raquel Martinez, Solange Peters, Philippe Sudre, and Amalio Telenti. Polymorphism of HIV Type 1 Gag p7/p1 and p1/p6 Cleavage Sites: Clinical Significance and Implications for Resistance to Protease Inhibitors. AIDS Research and Human Retroviruses, 16:1209-1213, 2004.
3. Neogi U, Rao SD, Bontell I, Verheyen J, Rao VR, Gore SC, Soni N, Shet A, Schülter E, Ekstrand ML, et al., Novel tetra-peptide insertion in Gag-p6 ALIX-binding motif in HIV-1 subtype C associated with protease inhibitor failure in Indian patients. AIDS, 28:2319-22, 2014

Fig.1 IN領域の系統樹

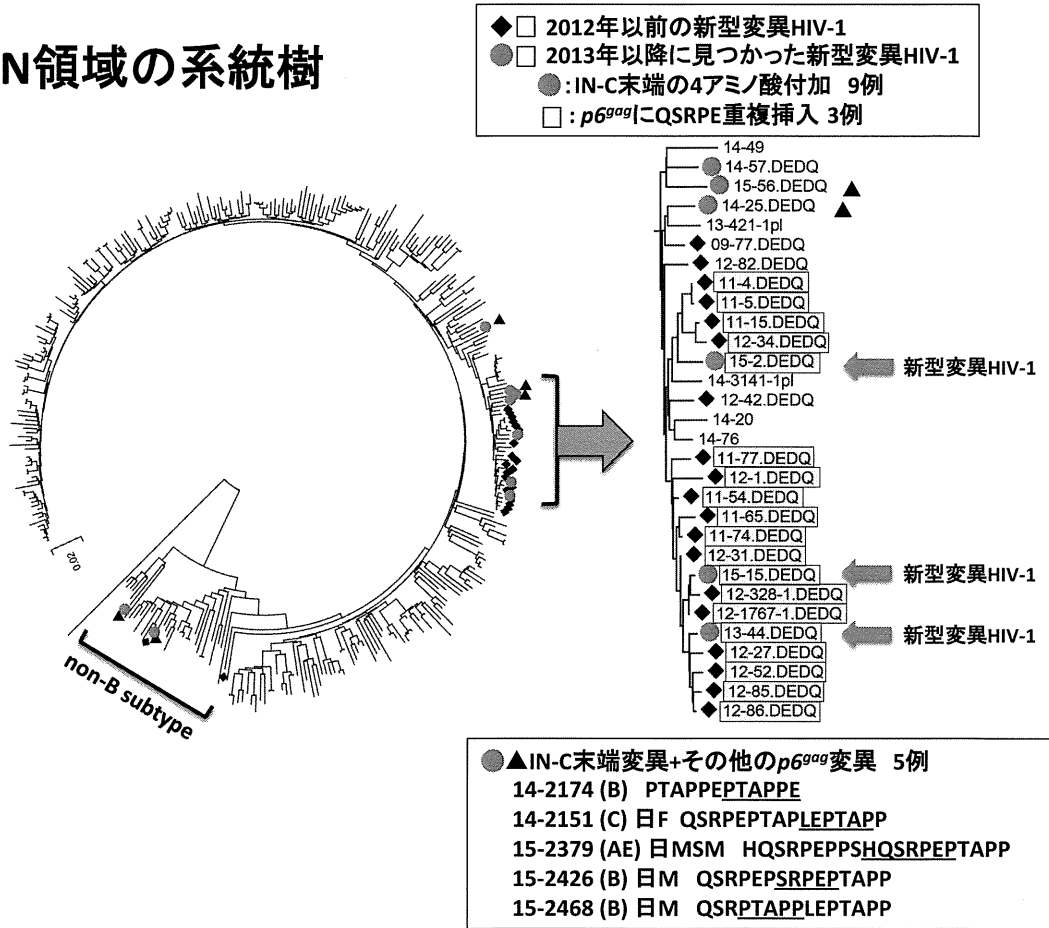
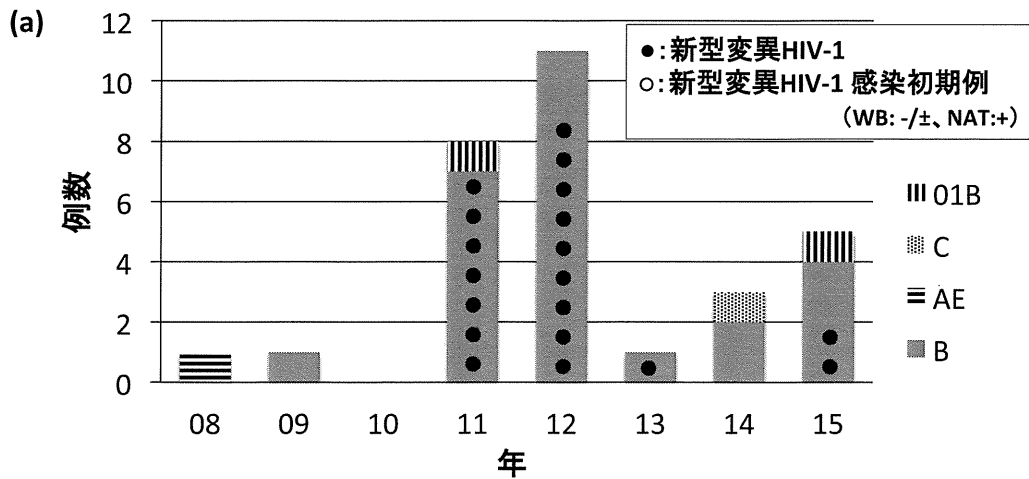


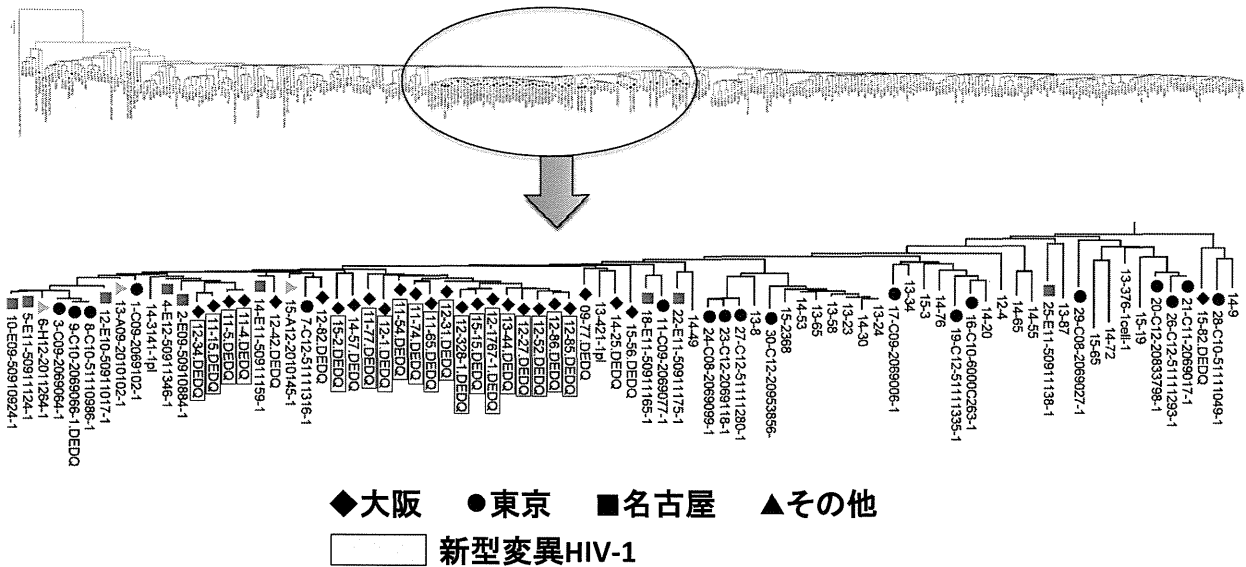
Fig.2 IN-C末端変異株の年次推移



(b)

| subtype | IN-C末端変異株／解析数 | % |
|---------|---------------|-----|
| B | 26 / 668 | 3.9 |
| non-B | 4 / 61 | 6.6 |

Fig.3 他の地域における新型変異HIV-1近縁株



新型変異HIV-1のインテラーゼ領域の遺伝子配列を用いてBLAST検索
 →新型変異HIV-1に近縁な株が東京、名古屋に多く見られる

Fig.4 新型変異HIV-1株のPBMCにおける増殖性

◆ Isolation

新型変異HIV-1感染者のPBMCと健常人PBMCを共培養することによりHIV-1を分離

■ Infection

分離されたHIV-1株を健常人PBMCに再感染させ培養

培養上清を3~4日毎に半量交換し、新しいPBMCを添加せずに小フラスコで培養を継続

培養上清中の感染性ウイルス量をMAGIC5細胞を用いて計測

(BFU: Blue Focus Unit)

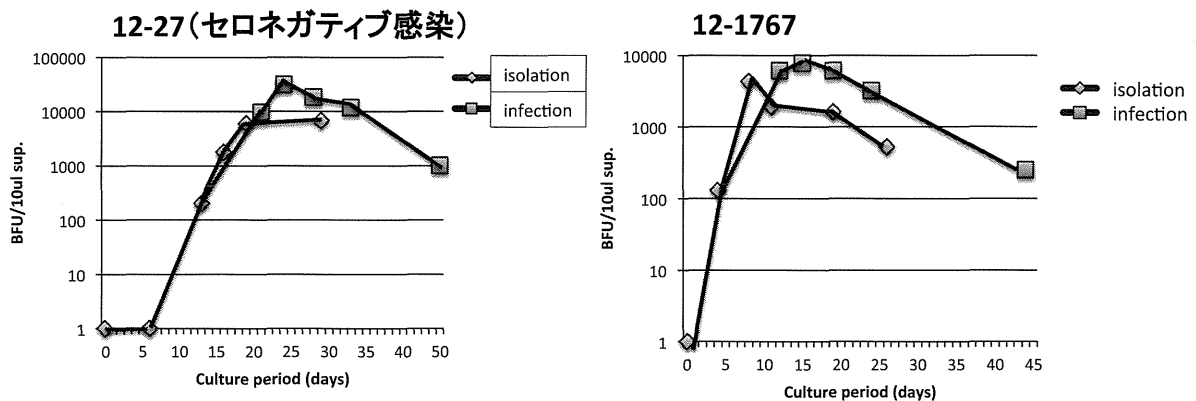


Fig.5 HIV治療薬に対する薬剤感受性

MAGIC5細胞

| | IC50 (nM) | | | | |
|----------------|-----------|------|------|-----|------|
| | IDV | NFV | RAL | EFV | AZT |
| 12-27(セロネガティブ) | 19.8 | 12.9 | 28.4 | 1.4 | 17.9 |
| 12-1767 | 18.3 | 11.7 | 36.7 | 2.2 | 15.9 |
| X4 HIV-1分離株 | NT | NT | 32.0 | 1.8 | 16.5 |
| Ba-L | 15.0 | 11.5 | 21.9 | 1.7 | 14.9 |

NT: not tested

PBMC

| | IC50 (nM) | | | |
|----------------|-----------|-----|------|-----|
| | IDV | RAL | EFV | AZT |
| 12-27(セロネガティブ) | 19.0 | 3.8 | 0.38 | 1.2 |
| 12-1767 | 16.5 | 3.2 | 0.45 | 2.6 |
| Ba-L | 27.5 | 3.5 | 1.5 | 2.8 |

6. 地域における個別施策層向け HIV 検査体制の強化

研究代表者：川畑拓也（大阪府立公衆衛生研究所）
研究分担者：森 治代（大阪府立公衆衛生研究所）
小島洋子（大阪府立公衆衛生研究所）
研究協力者：岩佐 厚（岩佐クリニック）、亀岡 博（亀岡クリニック）、
菅野展史（菅野クリニック）、清田敦彦（清田クリニック）、
近藤雅彦（近藤クリニック）、杉本賢治（京橋杉本クリニック）、
高田昌彦（高田泌尿器科）、田端運久（田端医院）、
中村幸生（中村クリニック）、伏谷加奈子（ふしたにクリニック）
古林敬一（そねざき古林診療所）、塩野徳史（MASH 大阪）、
柴田敏之（大阪府健康医療部医療対策課）

研究要旨

新型変異 HIV の流行状況を把握し感染拡大を阻止する目的で、地域における HIV 検査体制を強化した。方法として、平成 27 年度夏期に大阪府が実施した診療所における MSM 向け HIV/STI 即日検査事業に併せ、通常検査を受けられる診療所を準備し並行して実施した。さらに冬期にも同様の検査事業を研究班の負担で実施した。また、急性感染やセロネガティブ感染を見逃さない目的で、高感度な EIA 法の抗原抗体検査を即日検査陰性例に併用した。

平成 27 年度の MSM 向け検査受検者数は 547 名で、そのうち 14 名が HIV-1 抗体陽性であった（陽性率 2.6%）。EIA 法の抗原抗体検査は 538 件実施したが、今回 IC 法陰性の HIV 急性感染事例はみつからなかった。

遺伝子解析の結果、新規 HIV 陽性者 11 件の HIV-1 のうち、解析の終了した 5 例はいずれも新型変異 HIV-1 ではなかった。

A. 研究目的

大阪府南部で同時期に感染が診断された集団に、低抗体価・核酸増幅検査（NAT）陽性例や、診断後短時間で発症（rapid disease progression）した例が集積していることが判明し、その中には、通常抗体が上昇するまでの期間よりも長い間抗体陰性が続く、世界でも報告の稀な「セロネガティブ感染」例も含まれていた。分子疫学的解析の結果、これらの症例から検出された HIV-1 は遺伝学的に非常に近縁で、世界的にも稀な変異を併せ持つ新型変異 HIV であることが明らかとなった（文献 1）。

現在までの所、著しく早い病期進行と HIV 遺伝子変異の関連性がはっきりと証明されたわけではないが、この新型変異 HIV の全国への急拡大を防ぐには、地域（大阪府内）におけるサーベイランスを強化し、当該 HIV に感染している者を効率的に把握する必要がある。

そこで本研究では、新型変異 HIV を効率的に

検出することを目的として、大阪府内における HIV 検査体制をより強化し、新型変異 HIV の探索を行う。

B. 研究方法

大阪府では同性間性的接触を主な感染経路として感染が拡大している HIV の対策として、診療所における MSM 向け HIV/STI 検査事業を実施している（文献 2）。平成 27 年度は前年度と同様に、府が実施する即日検査実施診療所での検査に加えスクリーニング検査で第 4 世代の EIA 法を用いる通常検査実施診療所でも HIV/STI 検査を受検できるようにした。さらに、冬期（12～2 月）にも府の検査事業と同様の検査を、同じ診療所の協力のもと実施した。

即日検査実施診療所では IC 法による HIV-1/2 抗体検査、梅毒 TP 抗体検査、B 型肝炎の HBs 抗原検査を、通常検査実施診療所では HIV 抗原抗体検査、梅毒の TP 抗体検査と STS

検査、B型肝炎のHBs抗原検査、C型肝炎のHCV抗体検査の他に、尿を検体としたクラミジア核酸増幅検査を実施した。

セロネガティブ感染を見逃さない目的で、同検査事業における即日HIV抗体検査の結果にかかわらず、すべての検体に抗原検出感度の高いEIA法の第四世代スクリーニング検査を実施し、結果を1週間後以降に受け取れるようにした。

診療所は今年の協力診療所9ヶ所に加え、夏期には新たに1ヶ所、冬期にはさらに1ヶ所の診療所の協力を得て、MSM向け検査を実施した。

広報はCBO (Community-based Organization コミュニティベースド オーガニゼーション、当事者集団) であるMASH大阪の協力を得て、大阪府の承諾のもと、大阪府が実施するMSM向けHIV/STI検査事業と一体で行った。

検査希望者から採血された検体は、即日検査実施診療所においてはHIV即日検査後に、通常検査実施診療所においては採血後に、委託臨床検査会社にてHIV/STIの追加検査が実施され、結果は受け付けた診療所医師と研究班に伝えられた。スクリーニング検査においてHIV陽性が判明した検体は、大阪府立公衆衛生研究所に搬入され、HIV確認検査を実施した。確認検査の結果は医師に返され、受検者に告知され、拠点病院を受診する様、紹介された。

C. 研究結果

平成27年度の大阪府のMSM向けHIV/STI検査事業の即日検査受検者数は、夏期(7/1~9/30)の275名のみであったが、当研究において強化した冬期(12/1~2/29)の即日検査受検者数は167名、通常検査受検者数は105名(夏期66名、冬期39名)であり、検査事業全体の受検者数は547名で陽性数は14名だった。また、即日検査受検者のうち442名に実施したEIA法の第四世代スクリーニング検査は、IC法が陽性だった12名を除き全て陰性であった。

大阪府のMSM向けHIV/STI検査事業の陽性例5例、および本研究により検査体制を強化したことで検出された9例のHIVについて、遺伝子解析を実施した(分担研究課題1)結果、平成28年2月末までに解析の終了した5例いずれのHIV-1も新型変異HIV-1ではないことが明らかとなった。

D. 考察

平成26年度に引き続き、平成27年度も新型変異HIVの流行状況を把握し、感染拡大を阻止する目的で、費用対効果を一番に念頭におき、大阪府が実施するMSM向け検査事業を補足す

る形でHIV検査体制の強化を行った。強化目的で実施したHIV検査における陽性率は3.3%と、昨年の3.8%よりも高くなった。MSM向け検査事業全体の陽性率は2.6%(受検者数547名、内陽性14名)であるが、これは昨年の2.4%と比較して上昇している。ここ数年、同検査事業におけるHIV陽性率は減少傾向にあったが、下げ止まったかどうかは、今後の状況を注視して判断する必要があると思われる。

また、セロネガティブ感染を見逃さず、セロコンバージョンを起こしていない感染者を把握する目的で、即日抗体検査における抗体陰性者に実施したEIA法の第四世代スクリーニング検査では、検査を実施した442名のうち即日検査で陽性だった12名を除き全員が陰性となり、昨年報告したHIV迅速抗体検査でのHIV陽性者の見逃しは、今回起こっていなかった。

E. 結論

検査体制を強化し、通院治療中と本人が申告した3名を含め14名のHIV陽性者を確認した。遺伝子解析の結果、これら14名から得られたHIVのうち、解析が終了した5例のHIVは新型変異HIVではないことが明らかとなった。

F. 発表論文等

(論文) -英文

1. Haruyo Mori, Yoko Kojima, Takuya Kawahata, Motoo Matsuura, Kenji Uno, Mitsuru Konishi and Jun Komano. A cluster of rapid disease progressors upon primary HIV-1 infection shared a novel variant with mutations in the *p6^{gag/pol}* and *pol/vif* genes. AIDS. 2015 Aug 24;29(13):1717-9.
2. Yoko Kojima, Takuya Kawahata, Haruyo Mori, Keiichi Furubayashi, Yasushi Taniguchi, Ichiro Itoda, Jun Komano. Identification of novel recombinant forms of Hepatitis B virus generated from genotypes Ae and G in HIV-1-positive Japanese men who have sex with men. AIDS Res Hum Retroviruses. 2015 Jul;31(7):760-7.

(論文) -和文

1. 白井千香、古林敬一、川畑拓也、吉田弘之、荒川創一. 性感染クリニック及び産科における口腔内性感染症に関するアンケートと検体検査の試み. 日本性感染症学会誌、Vol. 26, No. 1 91-96 2015.

(発表) -国内

1. 川畑拓也. 大阪府における梅毒とHIVの発生動向について. 大阪STI研究会 第38回

- 学術集会、大阪、2015年。
2. 川畑拓也、HIV 検査・サーベイランスの現状と課題。第 8 回近畿 HIV FRONTIER 研究会、大阪、2015 年
 3. 駒野 淳、小島洋子、川畑拓也、森 治代。日本人 HIV 感染者における新たな B 型肝炎ウイルス組替えウイルスの発見。第 74 回日本癌学会学術総会、名古屋、2015 年
 4. 川畑拓也、森 治代、小島洋子、駒野 淳、古林敬一、岩佐 厚、田端運久、亀岡 博、中村幸生、杉本賢治、近藤雅彦、高田昌彦、菅野展史、塩野徳史、柴田敏之。MSM 向け HIV 即日抗体検査における急性感染期の抗体陰性例の検出。第 29 回日本エイズ学会学術集会、東京、2015 年
 5. 藤野真之、引地優太、森 治代、小島洋子、川畑拓也、俣野哲朗、駒野 淳、村上 努。新型変異 HIV のウイルス学的解析。第 29 回日本エイズ学会学術集会、東京、2015 年
 6. 小島洋子、川畑拓也、森 治代、駒野 淳。HIV 陽性者における性感染症の感染実態について。第 29 回日本エイズ学会学術集会、東京、2015 年
 7. 森 治代、小島洋子、川畑拓也、駒野 淳。p6^{gag} および pol/vif 遺伝子に特徴的変異を持つ新型変異 HIV-1 の流行状況。第 29 回日本エイズ学会学術集会、東京、2015 年
 8. 近藤真規子、佐野貴子、井戸田一朗、山中晃、川畑拓也、森 治代、岩室紳也、吉村幸浩、立川夏夫、今井光信、加藤真吾。新規 HIV 感染者における年次別感染初期割合の推移。第 29 回日本エイズ学会学術集会、東京、2015 年
 9. 中瀬克己、中谷友樹、川畑拓也、中島一敏、神谷信行、杉下由行、高野つる代、尾本由美子、山内昭則、高橋裕明、檜原摩紀、山岸拓也、白井千香。England と比較した我が国の性感染症サーベイランスの特徴。第 28 回日本性感染症学会学術大会、東京、2015 年
 10. 川畑拓也、中山周一、古林敬一、亀岡 博、安本亮二、志牟田健、石原朋子、大西 真。大阪府内で分離された淋菌株におけるアジスロマイシン感受性率の低下。第 28 回日本性感染症学会学術大会、東京、2015 年
 11. 川畑拓也、小島洋子、森 治代、柴田敏之、中山周一、大西 真。大阪地域における梅毒感染拡大阻止の取り組み(2013-2015 前半)。第 28 回日本性感染症学会学術大会、東京、2015 年
 12. 細井舞子、松本健二、高野つる代、金谷泰宏、尾本由美子、川畑拓也、砂川富正、中瀬克己。大阪市における梅毒の発生動向と

取り組み。第 29 回公衆衛生情報研究協議会研究会、東京、2016 年

13. 高野つる代、中谷友樹、細井舞子、尾本由美子、川畑拓也、砂川富正、中瀬克己。地方感染症情報センターにおける STI サーベイランスの運用の現状。第 29 回公衆衛生情報研究協議会研究会、東京、2016 年
14. 中瀬克己、高野つる代、細井舞子、尾本由美子、川畑拓也、砂川富正、金谷泰宏。特定感染症予防指針の期待する性感染症発生動向の活用。第 29 回公衆衛生情報研究協議会研究会、東京、2016 年

G. 引用文献

1. Haruyo Mori, Yoko Kojima, Takuya Kawahata, Motoo Matsuura, Kenji Uno, Mitsuru Konishi and Jun Komano. A cluster of rapid disease progressors upon primary HIV-1 infection shared a novel variant with mutations in the p6^{gag/pol} and pol/vif genes. AIDS. 2015 Aug 24;29(13):1717-9.
2. 森 治代、川畑拓也、小島洋子、他：大阪府における HIV/AIDS の現状と対策について、IASR 35, 205-206, 2014

Ⅲ. 研究成果の刊行物一覧

研究成果の刊行物一覧

書籍 なし

| 著者氏名 | 論文タイトル名 | 書籍全体の編集者名 | 書 籍 名 | 出版社名 | 出版地 | 出版年 | ページ |
|------|---------|-----------|-------|------|-----|-----|-----|
| | | | | | | | |

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|---|---|--------------------------------------|--------|--------|------|
| Haruyo Mori, Yoko Kojima, Takuya Kawahata, Motoo Matsuura, Kenji Uno, Mitsuru Konishi and Jun Komano. | A cluster of rapid disease progressors upon primary HIV-1 infection shared a novel variant with mutations in the p6 ^{gag/pol} and pol/vif genes. | AIDS | 29(13) | 1717-9 | 2015 |
| Yoko Kojima, Takuya Kawahata, Haruyo Mori, Keiichi Furubayashi, Yasushi Taniguchi, Ichiro Itoda and Jun Komano. | Identification of novel recombinant forms of Hepatitis B virus generated from genotypes Ae and G in HIV-1-positive Japanese men who have sex with men. | AIDS Research and Human Retroviruses | 31(7) | 760-7 | 2015 |

Research Letter

AIDS 2015, 29:1717–1719

A cluster of rapid disease progressors upon primary HIV-1 infection shared a novel variant with mutations in the $p6^{gag/pol}$ and pol/vif genes

Haruyo Mori^a, Yoko Kojima^a, Takuya Kawahata^a, Motoo Matsuura^b, Kenji Uno^c, Mitsuru Konishi^c and Jun Komano^d

Few studies have described the etiologic factors associated with rapid AIDS onset during primary HIV-1 infection. Our molecular epidemiological study identified a cluster of individuals infected with HIV-1 variants characterized by novel mutations in the $p6^{gag/pol}$ and pol/vif genes during 2011 and 2013 in Osaka, Japan. Individuals positive for the novel HIV-1 variant showed rapid disease progression, suggesting a role of viral mutations in the fostering of the clinical course of HIV-1 infection.

HIV-1 infection usually progresses to AIDS. Some HIV-1-infected individuals, known as long-term nonprogressors, maintain a CD4⁺ T-cell count above 500 cells/ μ l and do not develop AIDS for more than 10 years after the primary HIV-1 infection (PHI) even without antiretroviral treatment [1]. Some long-term nonprogressors are categorized as elite controllers who can retain viral loads to undetectable levels [2]. In contrast, a small percentage of individuals develop AIDS within 2–3 years after a PHI [3,4]. Many factors, both viral and host, have been described as regulators of HIV-1 disease progression [5–7]. However, factors that foster HIV-1 disease progression remain to be clarified. Here, we describe a local epidemic involving an HIV-1 variant carrying novel mutations in $p6^{gag/pol}$ and pol/vif in individuals with PHI and rapid disease progression.

Since 1992, we have maintained a centralized confirmatory examination system at Osaka Prefectural Institute of Public Health for monitoring HIV-1 infection; this system involves a regional network of public health centers and primary care clinics that treat sexually transmitted infections. Serological and nucleic acid-based tests are performed, and HIV-1-positive specimens from the network are subjected to molecular epidemiological analysis of HIV-1 in Osaka prefecture based on HIV-1 C2V3 sequences of *env* [8].

In 2012, we encountered a case of a seronegative HIV-1 infection that refers to an individual negative for anti-HIV-1 antibody for prolonged period of time, although positive for p24 viral antigen and/or viral RNA; such

cases have been rarely reported worldwide [9,10]. This case visited a hospital in the southern part of Osaka prefecture and was diagnosed with PHI via nucleic acid-based tests. However, it required more than 8 months until the results of western blot become fully positive for anti-HIV-1 antibodies (Fig. 1a). The virus infecting this individual clustered genetically with viruses isolated from six other individuals with PHI; these seven cases were mostly from the same district and were reported during 2011–2012. Those viruses were of subtype B with a putative CCR5 tropism based on the geno2pheno algorithm [11]. Interestingly, the clinical features of those PHIs were similar in that they involved extremely high plasma viral loads ($>10^7$ copies/ml) and low CD4⁺ T-cell counts less than 200 cells/ μ l (range, 64–184). Of the seven individuals, four initiated antiretroviral therapy immediately after diagnosis of HIV-1 infection due to severe clinical symptoms; two of these four cases progressed to AIDS despite the early phase of HIV-1 infection.

We investigated whether the viruses infecting these seven individuals with PHI shared any genetic features. Population sequencing of the HIV-1 *gag-pol* gene (Methods, Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/QAD/A730>), which is routinely used for monitoring antiretroviral drug resistance, demonstrated that these viruses shared the following genetic signatures: a 15-nucleotide insertion into $p6^{gag/pol}$, the *gag-pol* transframe region, resulting in duplication of the N-QSRPE-C pentapeptidic sequence in the $p6^{gag}$ open reading frame and of N-EQTRA-C in the $p6^{pol}$ open reading frame (Fig. 1b) and two substitution mutations in the *pol/vif* overlapping region; one mutation changed the *pol* stop codon into a Gln-coding codon (TAG to CAG), whereas the second mutation, located 12 nucleotides downstream of the other mutation, generated both an aberrant stop codon in the *pol* gene (AAG to TAG) and a Lys-to-Asn codon replacement (AAA to AAT) in the 22nd amino acid of the Vif protein (Fig. 1c). The insertion mutation was located immediately upstream of the $p6^{gag}$ PTAP motif, which is known to support viral budding [12,13]. The substitution mutations should result in the addition of an aberrant tetrapeptide N-QNME-C at the Pol carboxy terminus, namely integrase. The Vif amino acid alteration was positioned near the interface between Vif and core binding factor β ; therefore, this change might affect Vif-APOBEC3G interactions [14,15]. Although insertional mutations in $p6^{gag}$ are described frequently [16,17], the N-QSRPE-C duplication is very rare. Moreover, an HIV-1 variant carrying both $p6^{gag/pol}$ and *pol/vif* mutations has not, to our

DOI:10.1097/QAD.0000000000000771

(a)

| Patient ID | HIV risk factor | Sampling time | | pVL | CD4 cell count | | |
|---------------|-----------------|---------------|------------|-------------|-----------------------|-----------|-----|
| | | month/year | month/year | copies/mL | cells/mm ³ | WB status | ART |
| 11-65 | MSM | 08/2011 | | >10,000,000 | 136 | ± | - |
| | | 09/2011 | | 1,800,000 | 70 | ND | + |
| <u>12-27*</u> | unknown | 03/2012 | | >10,000,000 | 241 | - | - |
| | | 07/2012 | | 1,200,000 | 64 | - | - |
| | | 09/2012 | | 15,000 | 198 | - | + |
| | | 11/2012 | | 1,100 | 221 | ± | + |
| | | 01/2013 | | 96 | 264 | + | + |
| 12-52 | MSM | 06/2012 | | >10,000,000 | 184 | - | - |
| | | 09/2012 | | 99,000 | 530 | + | - |
| | | 07/2013 | | 11,000 | 410 | + | - |
| <u>12-86</u> | MSM | 10/2012 | | >10,000,000 | 117 | - | - |
| | | 11/2012 | | 9,300,000 | 334 | ± | - |
| | | 12/2012 | | 9,700 | 651 | + | + |
| 12-1767 | MSM | 07/2012 | | ND | ND | - | - |
| | | 08/2012 | | >10,000,000 | 79 | ± | + |

(b)

| p1 | p6 |
|-------------|---|
| 450 | |
| AA Pol | S S E Q T R A - - - - N S P T R R E L Q V W |
| AA Gag | F L Q S R P E - - - - P T A P P E E S F R S G |
| HXB2 | TTTCTTCAGAGCAGACCAGAG-----CCAACAGCCCCACCAGAAGAGAGCTTCAGGTCTGGG |
| Novel HIV-1 | TTTCTTCAGAGCAGACCAGAG <u>CAGAGCAGACCAGAG</u> CCAACAGCCCCACCAGAGGAGAGCTTCAGGTCTGGG |
| AA Gag | F L Q S R P E <u>Q S R P E</u> P T A P P E E S F R F G |
| AA Pol | S S E Q T R A <u>E Q T R A</u> N S P T R G E L Q V W |

(c)

| | |
|-------------|--|
| AA Vif | M E N R W Q V M I V W Q V D R M R I R T W K S |
| AA IN | Y G K Q M A G D D C V A S R Q D E D * |
| HXB2 | TATGGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATTAGAACATGGAAAAGT |
| Novel HIV-1 | TATGGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGAT <u>C</u> AGAACATGGAA <u>T</u> AGT |
| AA IN | Y G K Q M A G D D C V A S R Q D E D <u>Q N M E</u> * |
| AA Vif | M E N R W Q V M I V W Q V D R M R I R T W <u>N</u> S |

Fig. 1. Clinical and genetic features of the novel HIV-1 variants. (a) Serological examination data were available from five patients infected with the novel HIV-1 variants; one case involved a seronegative infection (*), and two cases involved rapid onset of AIDS (underlined). High plasma viral loads and low CD4 counts were observed before or at seroconversion. pVL, plasma viral load; ART, antiretroviral therapy. Western blot status: -, negative; ±, indeterminate; +, positive; ND, not determined. (b and c) Genetic signatures of the novel HIV-1 variants. HXB2 is a molecular clone representing the standard HIV-1 clade B. (b) A duplication within *p6^{gag/pol}* resulted in a 5-amino acid repeat (underlined), and (c) substitution mutations within *pol/vif* resulted in the addition of four amino acids at the integrase C-terminus and an amino acid substitution in Vif (underlined).

knowledge, been previously reported. These HIV-1 variants were not predicted to have major mutations conferring resistance to any of the antiretroviral drugs.

Careful re-evaluation of our regional molecular surveillance data revealed that this novel HIV-1 variant was present in another 10 specimens examined between 2011 and 2013; these variants genetically clustered with the seven variants described above. Interestingly, HIV-1 variants bearing similar substitution mutations in the

integrase were also detected in eight specimens collected between 2009 and 2014. Of these eight variants, three were non-B subtypes that were located separately in the genetic phylogeny (Figure, Supplemental Digital Content 2, <http://links.lww.com/QAD/A730>). Most of the novel HIV-1 variants and closely related variants were detected in specimens collected from MSM and were from the same geographical area in Osaka. The novel HIV-1 variant described here was not captured before 2011.

Molecular epidemiology and clinical indicators of the seven PHI cases, including the two AIDS cases, suggested that these individuals might have been subject to rapid HIV-1 disease progression due to the infection of HIV-1 variants bearing a unique set of mutations. To our knowledge, this is the first study describing a link between the rapidness of HIV-1 disease progression and the genetic features of HIV-1 isolates from a local epidemic. Molecular epidemiology indicated that each unique genetic mutation in these novel HIV-1 variants probably emerged independently in recent years and then converged via recombination in the local community. Clinical and virological details should provide insights into the pathogenesis of HIV-1 infection. Previously, it was noted that the seronegative HIV-1 infection could be observed upon PHI in which a massive destruction of host immunity took place quickly [9]. This pathophysiology is closely related to rapid disease progression. Seronegative HIV-1 infection is problematic because rapid HIV-antibody tests are still widely used as primary screening tests at voluntary counseling and testing sites. Consequently, we would like to call attention to these novel HIV-1 variants.

Acknowledgements

This study was approved by the ethical review board of Osaka Prefectural Institute of Public Health (approval numbers:0703-06, 1310-08 and 1409-05).

Author contributions: H.M., T.K. and J.K. conceived the study. M.M., K.U. and M.K. provided clinical data. H.M., Y.K. and T.K. contributed to laboratory work. H.M., Y.K., T.K. and J.K. wrote the article. All authors have read and approved the final article as submitted to AIDS.

Source of funding: This study was supported by Grants-in-Aid for research on HIV/AIDS from the Ministry of Health, Labour, and Welfare of Japan (H25-AIDS-004 and H26-AIDS-006).

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

^aDepartment of Infectious Diseases, Osaka Prefectural Institute of Public Health, Osaka; ^bDepartment of Nephrology, Metabology and Immunology, Sakai City Hospital, Sakai; ^cCenter for Infectious Diseases, Nara Medical University, Nara; and ^dDepartment of Clinical Laboratory, National Hospital Organization, Nagoya Medical Center, Nagoya, Japan. Correspondence to Haruyo Mori, PhD, Department of Infectious Diseases,

Osaka Prefectural Institute of Public Health 1-3-69 Nakamichi, Higashinari-ku, Osaka 537-0025, Japan. Tel: +81 6 6972 1321; fax: +81 6 6972 2393; e-mail: mori@iph.pref.osaka.jp

Received: 21 May 2015; revised: 9 June 2015; accepted: 9 June 2015.

References

1. Poropatich K, Sullivan DJ Jr. **Human immunodeficiency virus type 1 long-term nonprogressors: the viral, genetic and immunological basis for disease non-progression.** *J Gen Virol* 2011; **92**:247–268.
2. Piacentini L, Biasin M, Fenizia C, Clerici M. **Genetic correlates of protection against HIV infection: the ally within.** *J Intern Med* 2009; **265**:110–124.
3. Silva MO, Bastos M, Netto EM, Gouvea NAL, Torres AJL, Kallas E, et al. **Acute HIV infection with rapid progression to AIDS.** *Braz J Infect Dis* 2010; **14**:291–293.
4. Kouri V, Khouri R, Alemán Y, Abrahantes Y, Vercauteren J, Pineda-Peñaet A-C, et al. **CRF19_cpx is an evolutionary fit HIV-1 variant strongly associated with rapid progression to AIDS in Cuba.** *EBioMedicine* 2015; **2**:244–245.
5. Langford SE, Ananworanich J, Cooper DA. **Predictors of disease progression in HIV infection: a review.** *AIDS Res Ther* 2007; **4**:11.
6. Yang X, Jiao Y-m, Wang R, Ji Y-x, Zhang H-w, Zhang Y-h, et al. **High CCR5 density on central memory CD4+ T cells in acute HIV-1 infection is mostly associated with rapid disease progression.** *PLoS One* 2012; **7**:e49526.
7. Olson AD, Guiguet M, Zangerle R, Gill J, Perez-Hoyos S, Lodi S, et al. **Evaluation of rapid progressors in HIV infection as an extreme phenotype.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 2014; **67**:15–21.
8. Kojima Y, Kawahata T, Mori H, Oishi I, Otake T. **Recent diversity of human immunodeficiency virus type 1 in individuals who visited sexually transmitted infection-related clinics in Osaka.** *Japan J Infect Chemother* 2008; **14**:51–55.
9. Spivak AM, Sydnor ER, Blankson JN, Gallant JE. **Seronegative HIV-1 infection: a review of the literature.** *AIDS* 2010; **24**:1407–1414.
10. Patel AK, Patel KK, Ranjan R, Patel AR, Patel JK. **Seronegative HIV-1 infection, a difficult clinical entity: a case report.** *J AIDS Clin Res* 2010; **1**:106.
11. Geno2pheno coreceptor prediction algorithm. <http://coreceptor.bioinf.mpi-inf.mpg.de/>.
12. Martin-Serrano J, Zang T, Bieniasz PD. **HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress.** *Nat Med* 2001; **7**:1313–1319.
13. Holguín A, Alvarez A, Soriano V. **Variability in the P6^{Gag} domains of HIV-1 involved in viral budding.** *AIDS* 2006; **20**:624–625.
14. Jäger S, Kim DY, Hultquist JF, Shindo K, LaRue RS, Kwon E, et al. **Vif hijacks CBF-β to degrade APOBEC3G and promote HIV-1 infection.** *Nature* 2012; **481**:371–375.
15. Zhou X, Han X, Zhao K, Du J, Evans SL, Wang H, et al. **Dispersed and conserved hydrophobic residues of HIV-1 Vif are essential for CBFβ recruitment and A3G suppression.** *J Virol* 2014; **88**:2555–2563.
16. Martins AN, Arruda MB, Pires AF, Tanuri A, Brindeiro RM. **Accumulation of P(T/S)AP late domain duplications in HIV type 1 subtypes B, C, and F derived from individuals failing ARV therapy and ARV drug-naïve patients.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 2011; **27**:687–692.
17. Brumme ZL, Chan KJ, Dong WWY, Wynhoven B, Mo T, Hogg RS, et al. **Prevalence and clinical implications of insertions in the HIV-1 p6^{Gag} N-terminal region in drug-naïve individuals initiating antiretroviral therapy.** *Antivir Ther* 2003; **8**:91–96.

Supplemental Digital Content

Methods. SDC 1.

Serological and nucleic acid examination:

Serum samples positive in HIV-screening tests were sent to Osaka Prefectural Institute of Public Health, and HIV-1 infection was confirmed via western blot (WB) assays using LAV BLOT 1 (Bio-Rad, Tokyo, Japan). Samples negative and/or indeterminate on WB assays were subjected to in-house real-time PCR assays using KK-TaqMan probes [S1] or to COBAS TaqMan assays at a commercial laboratory.

Genetic analysis:

Viral RNA was extracted from serum samples, and reverse transcription (RT) and nested PCR were performed as previously described [8]. The primer sequences were as follows: SK38 5'-ATA ATC CAC CTA TCC CAG TAG GAG AAA T-3' and RT20 5'-CTG CCA GTT CTA GCT CTG CTT C-3' for RT and the initial PCR, PR05 5'-AGA CAG GYT AAT TTT TTA GGG A-3' and RT4L 5'-TAC TTC TGT TAG TGC TTT GGT TCC-3' for nested PCR amplification of the *gag*-RT region, IN-Fout 5'-CAG ACT CAC AAT ATG CAT TAG G-3' and IN-Rout 5'-CCT GTA TGC AGA CCC CAA TAT G-3' for RT and the initial PCR, and IN-Fin 5'-CTG GCA TGG GTA CCA GCA CAC AA-3' and IN-Rin 5'-CCT AGT GGG ATG TGT ACT TCT GAA CTT A-3' for nested PCR amplification of the integrase region. Nucleic acid sequencing was performed via the dideoxy method with BigDye terminator (Applied BioSystems, Tokyo, Japan). Nucleic acid sequences were determined with a ABI 3130 Genetic

Analyzer (Applied BioSystems) via direct sequencing. The nucleic acid and amino acid sequences were compared with those of the reference strain HXB2 (accession No. K03455). A phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining method in MEGA 5 software [S2].

Nucleotide sequence accession numbers:

The novel HIV-1 *p6* and integrase sequences are available in GenBank under the following accession numbers:

LC033998-LC034020; LC033853-LC033869; AB870487; AB870497; AB870499;
AB870503; AB870516; AB870509; AB870512; AB870525

References

[S1] Kondo M, Tanaka R, Sudo K, Sano T, Tachikawa N, Sagara H, *et al.* The development of quantitative HIV-1 RNA assay using general real time PCR machines.

AIDS 2010 - XVIII International AIDS Conference: Abstract no. MOPE0090

[S2] Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumár S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 2011; **28**: 2731-2739.