

中国四国ブロックにおける薬剤耐性 HIV の動向調査研究 ～広島大学病院における未治療 HIV 感染者における薬剤耐性の解析～

研究分担者 藤井 輝久 広島大学病院輸血部 准教授・エイズ医療対策室 室長
研究協力者 齋藤 誠司 広島大学病院輸血部助教・エイズ医療対策室
高田 昇 広島文化学園大学看護学部 教授

研究要旨

未治療 HIV 患者における HIV の薬剤耐性関連変異について解析、検討したところ、本年度耐性株保有者は部分耐性を含め 3 名であった。また今年はパートナー同士の薬剤耐性を検査する機会が 4 組あり、それらの変異パターンや変異数を比較することにより、どちらからかの感染かを推測できる可能性が示唆された。またインテグラーゼ領域には、あらたな耐性変異が出現していた。また並行して行った指向性検査では、必ずしもエイズ期には CXCR4 指向性株に変化しているわけではないことが分かった。

A. 研究目的

国内で流行している薬剤耐性ウイルスを全国レベルで把握するために、広島大学病院における新規 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 24 年 1 月 1 日から平成 24 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 の採血を行った。採血検体は著者または研究協力者が記号化を行い、患者のプライバシーを保護するように配慮した。採血検体は国立病院機構名古屋医療センターに送付し、そこで HIV のサブタイプ解析及び薬剤耐性遺伝子型検査、またジェノタイプ指向性検査を行

った。測定方法は既報の方法で行われた。結果について患者のプロファイルと照らし合わせ、本院で一部統計学的処理を行い解析した。

解析の際、米国スタンフォード大学の HIV DRUG RESISTANCE DATABASE (<http://hivdb6.stanford.edu/index.html>) と、本研究事業成果の一部である HIV 薬剤耐性検査ガイドライン ver.6 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、米国モノグラムバイオサイエンス社のフェノタイプ試験ではなく、Beerenwinkel らの用いた遺伝子型より指向性を類推するジェノタイプ試験である。遺伝子型から X4 指向性の確率を評価する Geno2Pheno (<http://coreceptor.bioinf.mpi-inf.mpg.de/>) を用いて、CXCR4(X4) 指向性の確率を False Positive として表示し、その値が 5 % 以上 (cut off index) であれば CCR5(R5) 指向性とした。

期間中、検体採取し結果を得た例数は、新規未治療 14 例、未治療再検 6 例 (内血友病合併 2 例)、治療中 1 例、治療中断 1 例の計 22 例であった。

(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、著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24人であり、そのうち7人が既に前医で治療中であり17人が未治療患者であった。しかし、既治療例のうち1人は治療を中断していた。治療前2回目、すなわち前述の「未治療再検例」は6人であった。性別は1人のみ女性で他は男性であった。2人のカンボジア国籍の夫婦を除き全員日本国籍であり、現在の居住地は全て広島県内であった。治療中の1例及び無治療にも関わらず血中ウイルス量が非常に低値である1例の計2例は、増幅産物が得られず、薬剤耐性遺伝子検査を施行し得なかった。一方、ジェノタイプ指向性検査は、前述の治療例でも施行し得たので、全21検体であった。

(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。表中No.8は治療中、No.12が前述の低ウイルス量例であり、増幅産物が得られないことより、検査施行し得ず(Not done; ND)とした。施行し得た20検体のうち、HIV 薬剤耐性検査ガイドライン ver.6などと照らし合わせ、明らかに薬剤耐性ウイルスで

あったものが1例見られた(No.20)。

その耐性関連変異はプロテアーゼ領域にL10F, L33F, M46I, I62V, V77IでIndinavir, Atazanavir耐性であった。また逆転写酵素領域でT215I/Lを認め、thymidine analogue related mutations (TAM)ではないとしてもAZT, d4Tに部分耐性とした。他にNo.13でプロテアーゼ領域にL10V, I15V, I62V, A71T, No.21にL10V, I62V, A71Vで、共にSaquinavir部分耐性であった。

No.3とNo.4, No.5とNo.6, No.13とNo.17, No.18とNo.19はそれぞれセクシャルパートナー同士(カップル)であった。No.18とNo.19のカップルの薬剤耐性変異パターンは全く同一であったが、残りの3組の変異パターンは似ているものの同一ではなかった。さらにその3組全て年長者の方が薬剤耐性関連変異を含め付加変異が多く見られた。

逆転写酵素領域では、TAMと呼ばれる変異(M41L, D67N, K70R, L210W, T215F/Y, K219Q/E)は、全例検出されなかったが、前述のT215I/L以外では、V179Iが比較的多く見られた。インテグラーゼ領域の変異はE157Qが2例であったが、V72Iが12例認められた。また今年初めてI74Mの変異が認められた。

(3) ウイルス遺伝子型(サブタイプ)について

表2に患者における血友病やエイズ発症の有無及びそのサブタイプ、ウイルス指向性検査の結果を示す。サブタイプはAEが4例、他は全例Bであった。AE4例はNo.3とNo.4のカンボジア国籍の夫婦と、

表1 薬剤耐性検査を行った症例の一覧とその変異

No.	プロテアーゼ領域	判定	逆転写酵素領域	判定	インテグラーゼ領域	判定
1	I15V	S	-	S	V72I	S
2 ^{*1}	M36I, I15V, D60E, I62V	S	-	S	V72I, I74M	S
3	K20R, M36I, L63P, D60E	S	V179I	S	-	S
4	M36I, G16E, D60E	S	V179I	S	-	S
5	I15V, I62V, H69N, V77I	S	-	S	V72I	S
6	L63P, H69N, V77I	S	-	S	-	S
7	I15V, M36I	S	-	S	-	S
8 ^{*2}	ND	-	ND	-	ND	-
9 ^{*1}	L10V, I15V, V77I	S	-	S	V72I	S
10	L63P	S	-	S	V72I, E157Q	S
11 ^{*1}	-	S	-	S	-	S
12	ND	-	ND	-	ND	-
13	L10V, I15V, I62V, A71T	PR	-	S	V72I	S
14	-	S	V179I	S	V72I	S
15 ^{*1}	L63P	S	-	S	V72I, E157Q	S
16 ^{*1}	L10V, I15V, A71V	S	-	S	-	S
17	I15V	S	-	S	V72I	S
18 ^{*1}	L10I, G16E, D60E, I62V	S	-	S	-	S
19 ^{*1}	L10I, G16E, D60E, I62V	S	-	S	-	S
20	I15V, I62V, A71V	S	-	S	V72I	S
21 ^{*1}	L10F, L33F, M46I, I62V, V77I	R	V179I, T215I/L	PR	V72I	S
22	L10V, I62V, A71V	PR	-	S	V72I	S

*1未治療再検例, *2治療中例, 判定の欄(S;感受性, R;ある薬剤に明らかな耐性, PR;部分耐性)

表 2 遺伝子型及び指向性検査結果とプロテアーゼ領域変異

No.	血友病	発病	年齢	サブタイプ	指向性(%)	プロテアーゼ領域
1	×	×	81	B	R5(87.1%)	I15V
2 ^{*1}	○	×	45	B	R5(11.7%)	M36I, I15V, D60E, I62V
3	×	○	68	AE	R5(83.5%)	K20R, M36I, L63P, D60E
4	×	×	68	AE	R5(53.5%)	M36I, G16E, D60E
5	×	×	37	B	R5(5.3%)	I15V, I62V, H69N, V77I
6	×	×	24	B	R5(84.0%)	L63P, H69N, V77I
7	×	×	22	B	R5(74.4%)	I15V, M36I
8 ^{*2}	×	○	38	B	R5(95.4%)	ND
9 ^{*1}	×	×	29	B	R5(43.0%)	L10V, I15V, V77I
10	×	×	32	B	R5(19.4%)	L63P
11 ^{*1}	○	×	48	B	R5(17.9%)	-
12	×	×	37	ND	ND	ND
13	×	○	60	B	R5(11.5%)	L10V, I15V, I62V, A71T
14	×	×	24	B	R5(71.2%)	-
15 ^{*1}	×	×	40	B	R5(24.2%)	L63P
16 ^{*1}	×	×	66	B	R5(44.4%)	L10V, I15V, A71V
17	×	×	39	B	R5(26.9%)	I15V
18 ^{*1}	×	×	29	AE	X4(3.5%)	L10I, G16E, D60E, I62V
19 ^{*1}	×	×	36	AE	X4(3.5%)	L10I, G16E, D60E, I62V
20	×	○	47	B	R5(84.6%)	I15V, I62V, A71V
21 ^{*1}	×	×	27	B	R5(34.6%)	L10F, L33F, M46I, I62V, V77I
22	×	×	75	B	R5(89.1%)	L10V, I62V, A71V

*¹未治療再検例, *²治療中例, ND; Not done(施行し得ず)

No.18 と No.19 のゲイのカップルで、共にどちらからからの感染と考えられるものであった。また AE で野生株とされる M36I が No.3 と No.4 で見られたが、No.18 と No.19 では認めなかった。

(4) ウイルス指向性について (表 2)

22 例のうち 21 例でウイルス増幅に成功し検査し得た。増幅不可であった 1 例の血中ウイルス量は 24 コピー/ml と非常に低値であった。No.18 と No.19 以外は全て R5 指向性であった。感染からの期間が 30 年近い血友病 2 例や、同様に感染からの期間が比較的長いと予想されるエイズ発病例 4 例は、いずれも R5 指向性であった。しかもエイズ発病例 4 例のうち、1 例を除く 3 例は false positive rate が 80% 以上と高かった。一方、血友病症例 2 例はいずれも false positive rate が、10% 台であった。また年齢と false positive rate, プロテアーゼ領域の変異数に統計的有意な関連はなかった。

D. 考察

未治療 HIV 感染者の結果について、今年の薬剤耐性株は部分耐性も含めて 21 例中 3 例であった。薬剤耐性関連変異を持つ割合はプロテアーゼ領域に多く、全く変異の認められないものは 21 例中わずか 2 例であった。今年よく見られる変異としては、L10F/V, I15V, I62V, A71V であり、うち I15V, A71V の増加は大きな特徴である。A71V は darunavir, fosamprenavir 以外全てのプロテアーゼ阻害剤に対する二次耐性変異である。キードラッグとして使用された darunavir, fosamprenavir 以外のプロテアー

ゼ阻害剤の使用頻度が、従来は高かったことが関連していると思われる。もしそうであるなら、この変異は自然変異ではなく服用者あるいは服用経験者からの感染が広がっていることを示唆する。今後 darunavir が第一選択として使用される頻度が増えていくにつれ、この変異が減っていけば著者の予想を裏付けることになる。

逆転写酵素領域の耐性関連変異がみられたものは 3 例のみで、いずれも V179I である。これも最近散見されるようになった変異であるが、その意義については不明である。

一昨年初めて E157Q の変異が検出されたインテグラーゼ領域であるが、今年は E157Q が 2 例、V72I が 12 例認められた。また初めて I74M が見られた。共に高度耐性変異ではないが、既知の薬剤耐性変異である Y143, Q148, N155 との関連がいかなるものか、この変異が先んじて出現するのかどうかデータの蓄積が必要になるとと思われる。ただ、V72I が急激に増加している背景には、Raltegravir の使用頻度の増加と関連があるのではないかと想像させる。こちらも注視して行く必要がある。

前年も報告したが、カップルでの薬剤耐性変異の比較を行うと、興味深い結果が得られる。この度、4 組のカップルの薬剤耐性検査を行う機会を得た。No.3 と No.4 は、カンボジア国籍の 60 歳代の夫婦であり、日本在住歴はすでに 20 年近い。No.3 の方が薬剤関連変異を含む変異数が多いことより、No.3 が先行感染しその後 No.4 への感染が起こったものと思われる。しかし、No.4 の変異に No.3 にはない

G16E が認められている。No.4 は No.3 以外のパートナーがいないと仮定すると、この変異は自然変異であることが示唆される。No.5 と No.6 のゲイのカップルにも変異の数での推測を当てはめると、年上の No.5 から年下の No.6 へ HIV が伝播したと思われる。No.13 と No.17 も同様である。No.18 と No.19 は前年報告したゲイのカップルで耐性関連変異が同一である。しかしそれ以外の付加変異が No.18 の方が多い。両者の問診により、年下の No.18 が先行感染し年上の No.19 へウイルスが伝播したことが想像されており、感染期間が長い方がより変異が多くなることが示唆された。このようにどちらが先行感染したか分からない場合には、耐性関連変異パターンを見ることで想像できる。

昨年度途中より測定を開始したウイルス指向性検査であるが、本年は薬剤耐性検査を行う際にルーチンに測定を行うよう依頼した。21 例測定したが、2 例を除き全て R5 指向性であった。一般に R5 指向性は、感染初期に多く見られその後病状が進行すると X4 指向性に変化すると言われている。つまりエイズ期においては、X4 指向性が多く検出されることが想像されるが、自験例ではエイズ発病者は全て R5 指向性であった。また本研究の指向性検査はジェノタイプ検査であり、false positive rate にて判断されるものである。そのため、R5 指向性と判定されても経過と共に徐々に false positive rate が低下し、X4 指向性に近づくのではないかと考えた。そのため、エイズ発病者でないが感染からの期間が長い未治療血友病患者での指向性検査結果及びその false positive rate に注目してみた。2 例と少数ではあるが、明らかにその値は低く共に 10% 台であった。一方、明らかな感染時期が全例分かっているわけではない性行為による感染者において、その年齢で false positive rate に関連があるか、相関係数やノンパラメトリック検定など統計学的処理を行ったが、有意または関連あり、といった結果にはならなかった。このことより、あくまでも感染からの期間の方が false positive rate に対してより関連をもたらす因子であることが想像された。

CCR5 阻害剤の Maraviroc が DHHS ガイドラインにおいて、未治療患者の ART のキードラッグとして acceptable regimen に追加されて 2 年経過した。そのウイルス抑制機序から考えると、未治療者特に新規感染者に適した薬剤であると想像される。本院の未治療血友病患者 (No.11) において、十分な説明と同意を行い初めてキードラッグとして使用した。副作用もなく、また内服 4 週間後に血中ウイルスは未検出となった。最近、エンتری阻害薬は細

胞外ウイルス量を増加させる可能性を示唆する報告がなされた。該当患者は低ウイルス量で推移している elite controller であるが、その患者においてはウイルス量の増加は認めていない。今後ウイルス量の推移を注視する必要がある。

本報告は前年まで「中国四国ブロックの…」としていたが、実情は本院の患者の解析であり、必ずしも中国四国ブロック全体を示しているものではない。本年度より四国ブロックでは、愛媛大学医学部附属病院がその中心を担うことになったが、それでも本院は中国地方他県の情報を得ているわけではない。本研究の意義を中国四国ブロック内のエイズ拠点病院に理解してもらい、研究協力機関を増やすべきであると考え、この 1 年ホームページやブロック内での研究会・研修会などで周知を図ってきた。少しずつではあるが、理解してくれる医療機関が見られ始めている。それらのデータを今後本院で集約し解析するための何らかのスキームが必要であると思われる。

E. 結論

本院を受診中の HIV 患者においてその薬剤耐性関連変異パターン及びウイルス指向性について考察した。部分耐性を含め耐性株保有者は未治療患者 21 人中 3 人に認められた。また耐性関連以外の変異やウイルス指向性検査を見ることで、感染からの時間経過や病状進行を予測できる可能性が示唆されたが、必ずしもエイズ発病者に X4 指向性が多いという結果にはならなかった。今後もさらに研究を発展・継続するために、中国ブロック内の診療施設への宣伝活動と共に、商業ベースで行っている薬剤耐性検査結果を集約し、解析するスキームが必要であると考えた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 原著論文

1. 齊藤誠司, 鍵浦文子, 喜花伸子, 船附祥子, 藤田啓子, 畝井浩子, 藤井輝久, 高田昇, 木村昭郎: HIV/HBV 重複感染症例における HBV に対する治療経験とその考察。日本エイズ学会雑誌, 14(2):111-117, 2012.
2. 藤井輝久, 中国四国地方における HIV 感染症の動向と現状, 医学の門, 53(4):262-267, 2012.
3. 藤井輝久, エイズ/HIV 感染症の概略と検査の勧め方-実習を通じて-, 広島市医師会だより, 554(6):7-9, 2012.

2) 学会発表

1. 藤井輝久, 齋藤誠司, 鍵浦文子, 高田昇, 本院のエイズ患者における免疫再構築症候群の現状と考察, 第 86 回日本感染症学会学術集会 (平成 24 年 4 月 25 日~4 月 26 日, 長崎)
2. 鍵浦文子, 藤井輝久, 齋藤誠司, 高田昇, 広島大学病院 HIV/AIDS 患者の初診時における梅毒罹患の状況, 第 86 回日本感染症学会学術集会 (平成 24 年 4 月 25 日~4 月 26 日, 長崎)
3. 藤田啓子, 藤井健司, 畝井浩子, 鍵浦文子, 藤井輝久, 齋藤誠司, 高田昇, 木平健治, 当院における HIV 感染者に対する B 型肝炎ワクチン接種の効果について, 第 86 回日本感染症学会学術集会 (平成 24 年 4 月 25 日~4 月 26 日, 長崎)
4. 高田昇, 齋藤誠司, 藤井輝久, 藤田啓子, 藤井健司, 畝井浩子, 木平健治, 広島大学病院の抗 HIV 療法の変遷, 第 82 回日本感染症学会西日本地方学術集会 (平成 24 年 11 月 5 日~11 月 7 日, 福岡)
5. 西島健, 高野 操, 石坂美千代, 渦永博之, 菊池嘉, 遠藤知之, 堀場昌英, 金田 暁, 鯉渕智彦, 内藤俊夫, 吉田正樹, 立川夏夫, 横幕能行, 藤井輝久, 高田清式, 山本政弘, 松下修三, 健山正男, 田邊嘉也, 満屋裕明, 岡慎一, 初回治療でアタザナビル/リトナビルを固定しエプジコムとツルバダを無作為割付するオープンラベル多施設臨床試験 :ETstudy 96 週結果, 第 26 回日本エイズ学会学術集会 (平成 24 年 11 月 24 日~11 月 26 日, 横浜)
6. 福武勝幸, 篠澤圭子, 味澤篤, 岩本愛吉, 菊池嘉, 白阪琢磨, 藤井輝久, 花房秀次, 三間屋純一, 関根祐介, 山元泰之, エイズ治療薬研究班の活動 (1996 年から 2011 年), 第 26 回日本エイズ学会学術集会 (平成 24 年 11 月 24 日~11 月 26 日, 横浜)
7. 四本美保子, 篠澤圭子, 山元泰之, 青木眞, 関根祐介, 味澤篤, 岩本愛吉, 菊池嘉, 白阪琢磨, 藤井輝久, 花房秀次, 福武勝幸, 本邦における HIV 感染症患者のアトバコン使用状況と副作用, 第 26 回日本エイズ学会学術集会 (平成 24 年 11 月 24 日~11 月 26 日, 横浜)
8. 高田昇, 齋藤誠司, 木下一枝, 西坂理絵, 鍵浦文子, 杉原清香, 藤井輝久, 広島大学病院の HIV 感染症の疾病統計, 第 26 回日本エイズ学会学術集会 (平成 24 年 11 月 24 日~11 月 26 日, 横浜)
9. 服部純子, 渦永博之, 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, 佐藤典宏, 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, 伊部史朗, 松田昌和, 林田庸総, 横幕能行, 上田幹夫, 大家正義, 田邊嘉也, 白阪琢磨, 小島洋子, 藤井輝久, 高田昇, 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 26 回日本エイズ学会学術集会 (平成 24 年 11 月 24 日~11 月 26 日, 横浜)
10. 齋藤誠司, 鍵浦文子, 木下一枝, 西坂理絵, 喜花伸子, 石原麻彩, 藤井健司, 藤田啓子, 畝井浩子, 中村毅, 藤井輝久, 高田昇, ART 施行例の動脈硬化症評価における PWV/ABI の有用性について, 第 26 回日本エイズ学会学術集会 (平成 24 年 11 月 24 日~11 月 26 日, 横浜)
11. 松井加奈子, 柴秀樹, 鍵浦文子, 木下一枝, 西坂理絵, 岩田倫幸, 高田昇, 齋藤誠司, 藤井輝久, 広島大学病院における HIV 陽性者の歯科医療への取り組み, 第 26 回日本エイズ学会学術集会 (平成 24 年 11 月 24 日~11 月 26 日, 横浜)
12. 藤井輝久, 杉原清香, 齋藤誠司, 鍵浦文子, 木下一枝, 高田昇, CD4 数増加しない症例において CD4/CD8 比率のモニタリングは有用である, 第 26 回日本エイズ学会学術集会 (平成 24 年 11 月 24 日~11 月 26 日, 横浜)

H. 知的所有権の出願・取得状況
なし