

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

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 25 名、ウイルス学的治療失敗の感染者 2 名において 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、X4 指向性はサブタイプ AE に多いことが分かった。

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

2013 年 1 月 1 日から 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.7 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 として表示し、その値が 12.5%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症例数は、新規未治療 24 例、未治療再検 1 例、治療中ウイルス再検出例 2 例の計 27 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25人であり、そのうち8人がエイズ発病の患者であった。検体採取し結果を得た人数は27人で、2012年本院初診患者で本年同意取得した者2人を含む24人が未治療患者、そして治療前2回目、すなわち前述の「未治療再検例」は1人であった。また、残りの2人は治療中にも関わらずウイルス学的失敗をした者であった。27人中の発病者は10人であり、うち8人は前述の通り本年の初診患者であった。また1人は昨年末エイズ

発病にて初診となり、越年後検体を採取し得た者であった。残りの1人は初診時はエイズ発病ではなかったが、ART施行後に免疫再構築症候群としてニューモシスチス肺炎を発症したため発病に含めた。性別は1人のみ女性で他は男性であった。出生地は1人がインドネシア、1人がフィリピンであり、その他は全員日本であった。現在の居住地は山口県、島根県が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.7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、わずか2例であった。平均薬剤耐性関連変異数は2.4であり、比較的頻度の多い変異としては、I15V(8例)、M36I(5例)、I62V(7例)、L63P(9例)、A71V/T(5例)、V77I(13例)であった。エイズ発病

表1 期間中に薬剤耐性検査を行った未治療 HIV 感染者

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	58	○	B	I62V, L63P, V77I	S	-	S	-	S	R5(87.4%)
2 ^{*4}	67	×	B	I62V, L63P, V77I, L89M	S	V179D	S	V72I	S	R5(48.4%)
3	42	○	B	V77I	S	-	S	E157Q	S	R5(22.6%)
4	41	×	B	A71V	S	V179D	S	-	S	R5(92.2%)
5	43	○	B	L63P, V77I,	S	-	S	E157Q	S	R5(19.4%)
6	30	×	B	D60E, L63P, V82A	S	-	S	E157Q	S	R5(31.0%)
7	38	×	B	I15V	S	-	S	T66I	S	R5(81.3%)
8 ^{*5}	48	○	B	L63P, H69K, V77I	S	-	S	-	S	R5(48.9%)
9	22	×	B	M36I, L63P	S	V90I	S	-	S	R5(32.9%)
10	33	×	B	A71V, V77I	S	-	S	-	S	R5(26.5%)
11	30	×	B	H69Y	S	-	S	-	S	R5(35.3%)
12	34	×	B	I15V, L63P	S	-	S	-	S	R5(37.1%)
13	30	×	B	M36I	S	-	S	-	S	R5(31.4%)
14	64	○	B	I15V	S	-	S	-	S	R5(43.8%)
15	36	×	B	I15V, G16E, I62V, H69Y, V77I	S	-	S	-	S	X4(5.8%)
16	45	×	B	L63P, H69N, A71V, V77I	S	-	S	-	S	R5(87.0%)
17	29	○	AE	K20R, M36I, L63P, V77I	S	-	S	-	S	X4(6.8%)
18	40	×	B	I15V, I62V	S	-	S	-	S	R5(28.4%)
19	25	×	B	-	S	-	S	-	S	R5(28.5%)
20	64	×	AE	L10V, M36I, V77I	S	-	S	-	S	X4(6.7%)
21 ^{*5}	36	○	B	I15V, I62V	S	-	S	-	S	R5(97.0%)
22	28	○	B	-	S	-	S	-	S	R5(21.4%)
23	29	×	B	I62V, A71T	S	-	S	-	S	X4(9.0%)
24	26	×	B	M36I, I62V, A71V, V77I	S	V179I	S	-	S	R5(25.6%)
25	48	○	B	I15V, I62V, L63P, H69Y, V77I	S	V179D	S	-	S	R5(38.8%)
26	43	○	B	I15V	S	V179D	S	-	S	R5(32.0%)
27	25	×	B	L10V, L63P, H69K/N/Q, A71T, V77I	S	V179I	S	-	S	R5(48.4%)

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 治療中ウイルス再検出例

表 2 X4 指向性の患者プロフィール

No (年)	18 (2012)	19 (2012)	15 (2013)	17 (2013)	20 (2013)	23 (2013)
年齢	29	36	36	29	64	29
感染期間, 地域*1	約2年 大阪	約1年 広島	約3カ月 広島	約4~6年 インドネシア	約4年前 タイ	約1カ月 大阪
急性感染*2	有	有	有	無	無	有
サブタイプ	AE	AE	B	AE	AE	B
耐性関連 変異(PI)	L10I, G16E, D60E, I62V	L10I, G16E, D60E, I62V	I15V, G16E, I62V, V77I	K20R, M36I, L63P V77I	L10V, M36I, V77I	I62V, A71T
VL(c/ml)	280	310,000	273,000	60,200	194,000	1,330,000
CD4(/ μ l)	496	693	258	154	546	254
その他	9カ月前は R5指向性 RT; V179I PI; K20R, M36I, L63P, D60E	9カ月前はR5 指向性 RT; V179I PI; G16E, M36I, D60E		結核性 リンパ節炎	既往歴で 年2回の 肺炎	

*1患者からの聴取による *2急性感染症状(患者からの聴取)

と未発病とで、変異数に特に有意な差は認めなかった ($P=0.317$)。

また逆転写酵素領域では、7例に耐性関連変異を認め、そのうち6例がV179D/Iであった。インテグラーゼ領域はV72I 1例、E157Qが3例、T66Iは1例であった。

(3) ウイルス遺伝子型(サブタイプ)について

サブタイプはAEが2例、他は全例Bであった。AE 2例共にO1_AEであり、1人はインドネシア人女性で、1人はタイでの感染が疑われている日本人男性であった。共にAEで野生株とされるプロテアーゼ領域のM36Iが認められた。

(4) ウイルス指向性について

27例中4例がX4指向性で、残りは全てR5指向性であった。サブタイプAE 2例はいずれもX4指向性であった。エイズ発病例と未発病例のfalse positive rateを比較すると、発病例が平均41.8%、未発病例は36.8%であり、両群に有意な差は認めなかった ($p=0.618$)。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年と2013年におけるX4指向性例のプロファイルを示す。6例中4例がサブタイプAEであり、また4例が急性感染症状と思われる症状を記憶していた。ウイルス量は1例を除き一般に高く、4例が高ウイルス量と定義される100,000コピー/ml以上であった。年齢は比較的若くエイズ発病とは特に関連はなかった。

D. 考察

未治療 HIV 感染者の結果について、今年の薬剤耐性率は0%であり、著者が分担研究者になって初めてことであった。検査している症例数は増えているので、明らかに薬剤耐性株は広島県その周辺では少なくなっていると想像される。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。今年よく見られた変異としては、I15V、I62V、L63P、A71I/T、V77Iであった。特にL63P、V77Iの増加は大きな特徴である。昨年多く見られた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が、今年のA71はI/Tの変化が多かった。つまり核酸レベルでは昨年はGへの変異が多かったが、今年はAへの変異が多いことを示している。

L63Pはlopinavirに特異的な耐性変異であるが、昨年の4例から9例と倍増した。これはカレトラ使用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や日本のガイド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。同様にV77Iは、以前第一選択で頻用されたsaquinavir、indinavir、nelfinavir耐性変異であるが、現在これらの薬剤の使用は皆無に近い。

つまり、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」の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 関連耐性変異である G16 や D60、I64 の変異が増えて行くかも知れない。

逆転写酵素領域の耐性関連変異がみられたものは 7 例で、うち 6 例が V179 の etravirine 関連耐性変異である。また残り 1 例は V90I で、これも etravirine 関連耐性変異である。Etravirine 耐性変異はごく近年散見されるようになっており、これも使用経験者の増加を伺わせる知見である。1 昨年より rilpivirin が国内でも使用できるようになった。現在までそれに対する変異は認めていないが、179 のバリンがロイシンに変異すれば、耐性となるため注意が必要である。

3 年前に初めて 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 E157Q が 3 例認められた。しかし、本年 7 月発行の HIV 薬剤耐性検査ガイドライン ver.7 より、耐性変異ではないとして削除された。同様に昨年 12 例、今年 19 例に認められた V72I 変異であるが、同様に耐性関連変異ではない、といった結論となり削除された。そのため、期間前半の症例 No.2 しか示されていない。また興味深いことに、今年初めて T66I といった dolutegravir 関連変異を持つ未治療者が 1 例あった (表 1、No.7)。インテグラーゼ領域の 66 番は CTL の認識部位であり、その変異は CTL に対する逃避変異の可能性がある。このことについて現在試料提供者の同意の下、MHC クラス I (特に HLA1501 の有無) を検索中である。試料提供者は未発病者で、患者の提供時時点での CD4=417/μL であり、VL=890 コピー/ml と低ウイルス量であった。現在は治療中であり、血中 VL は検出感度未満になっている。

X4 指向性は 4 例に認めたが、特にエイズ発病との関連性は見いだせなかった。昨年報告した 2 例を含めた 6 例のプロファイルを見ると、特徴として、高ウイルス量であること、サブタイプ AE であることが伺える。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。一方、サブタイプ AE は明らかに X4 指向性例に多い印象となったが、現行の検査法では「サブタイプ AE は false positive rate が低くなりやすい」といったことも分かってきたため、今後の検討や方法の改良が期待される場所である。

本報告は「中国ブロックの…」と題しているが、実情は本院の患者の解析である。他ブロックと違い、自施設で薬剤耐性検査を行っていないため、中国ブロック全体の検体を集約できず、ひいてはブロック内の状況を把握できないでいる。しかしその代替えとして、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く活動を行っている。本年度、広島市立広島市民病院、山口大学医学部附属病院といった中核拠点病院が協力機関となった。今後はそれらの施設からのデータを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

本院の受診中の 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、数年前第一選択とされた薬剤に対するものが多く出現しており、今後は lopinavir や atazanavir 関連耐性変異が出現する可能性が示唆された。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) 原著論文

1. Takeshi Nishijima, Hiroyuki Gatanaga, Takuro Shimbo, Hirokazu Komatsu, Tomoyuki Endo, Masahide Horiba, Michiko Koga, Toshio Naito, Ichiro Itoda, Masanori Tei, Teruhisa Fujii, Kiyonori Takada, Masahiro Yamamoto, Toshikazu Miyakawa, Yoshinari Tanabe, Hiroaki Mitsuya, Shinichi Oka, Switching Tenofovir/Emtricitabine plus Lopinavir/r to Raltegravir plus Darunavir/r in Patients with Suppressed Viral Load Did Not Result in Improvement of Renal Function but Could Sustain Viral Suppression: A Randomized Multicenter Trial. *PLoS One*. 8(8): e73639, 2013.
2. Nishijima T, Takano M, Ishisaka M, Komatsu H, Gatanaga H, Kikuchi Y, Endo T, Horiba M, Kaneda S, Uchiumi H, Koibuchi T, Naito T, Yoshida M, Tachikawa N, Ueda M, Yokomaku Y, Fujii T, Higasa S, Takada K, Yamamoto M, Matsushita S, Tateyama M, Tanabe Y, Mitsuya H, Oka S, Abacavir/lamivudine versus tenofovir/emtricitabine with atazanavir/ritonavir for treatment-naive Japanese patients with HIV-1 infection: a randomized multicenter trial. *Int Med*. 52(7):735-44, 2013..

2) 学会発表

1. 藤井輝久 (代理: 高田 昇), 喜花伸子, 鍵浦文子: HIV 陽性。そのときあなたは どうしますか〜

- HIV チーム医療の現状とこれからの課題, 第 62 回日本医学検査学会, 2013 年 5 月 19 日, 高松
2. 齊藤誠司, 鍵浦文子, 藤井健司, 藤田啓子, 畝井浩子, 木平健治, 藤井輝久, 高田昇, 大毛宏喜, 一戸辰夫: 急性 C 型肝炎の発症を捉え, 早期に治療導入に到った HIV 感染例, 第 87 回日本感染症学会学術講演会, 2013 年 6 月 5 日 -6 日, 横浜
 3. 齊藤誠司, 石原麻彩, 鍵浦文子, 喜花伸子, 藤井健司, 藤田啓子, 畝井浩子, 山崎尚也, 藤井輝久, 高田昇: 中国四国ブロックにおけるエイズ診療拠点病院医師向け研修会に対する評価とそのあり方について, 第 27 回エイズ学会学術集会, 2013 年 11 月 20 日 -22 日, 熊本
 4. 西島 健, 瀧永博之, 遠藤知之, 堀場昌英, 古賀道子, 内藤俊夫, 井戸田一郎, 鄭 真徳, 藤井輝久, 高田清式, 山本政弘, 宮川寿一, 田邊嘉也, 満屋裕明, 岡 慎一: テノホビル/エムトリシタビン・ロピナビル/リトナビル内服例を現行レジメンとラルテグラビル・ダルナビル/リトナビルに無作為割付する多施設共同臨床試験, 第 27 回エイズ学会学術集会, 2013 年 11 月 20 日 -22 日, 熊本
 5. 重見 麗, 服部純子, 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, 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, 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, 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 27 回エイズ学会学術集会, 2013 年 11 月 20 日 -22 日, 熊本

H. 知的所有権の出願・取得状況

なし