

## 献血者に見出される HIV-1 のサブタイプと薬剤耐性変異の変遷

五十嵐正志 松本千恵子 蕎麦田理英子 古居 保美 内田 茂治  
佐竹 正博 田所 憲治

献血者に見出された HIV-1 の感染動態を明らかにするために、過去及び現在の HIV-1 陽性検体についてサブタイプ、薬剤耐性変異の有無を比較検討した。全国で献血された 1992 年から 2001 年 9 月までの HIV-1 陽性検体 237 例（過去検体）と、2009 年 9 月から 2012 年 5 月までの 212 例（現在の検体）について解析した結果、過去検体のサブタイプは B が 86.5%，CRF01\_AE が 10.1%，CRF02\_AG が 0.8%，その他が 2 例 0.8% であった。現在の検体ではサブタイプ B が 90.6%，CRF01\_AE が 5.2%，CRF02\_AG が 2.4% であった。薬剤耐性変異は、過去検体で 8.6%，現在の検体は 21.4% であった。また、薬剤耐性変異群におけるリバータント T215X の割合は過去検体で 12.5%，現在の検体で 12.9% であった。これらから国内の HIV-1 サブタイプのリコンビナントは、献血者全体で見ると増加は認められなかった。また、薬剤耐性変異は過去に比べ現在は増加しており、HIV 治療者を含まない未発症感染者にも耐性変異株が広まっていると考えられた。

キーワード：HIV-1 サブタイプ、薬剤耐性、リバータント変異、献血者

### はじめに

日本における HIV 新規感染者・AIDS 患者数は厚生労働省エイズ動向委員会により 3 カ月ごとに公表され、感染経路、性別、年齢別、異性間・同性間性的接触感染者、感染地域などが報告されている。しかし、サブタイプについては報告されていない。2003 年から 2007 年にかけてのサブタイプの変遷について調査されているが、これまで行われた研究は検体数や採取地域が限定的で、日本国内の状況を十分に明らかにしていない。全国の献血者に見出される陽性者数の推移とともに、サブタイプ等の動向を調査することは疫学調査の一助となるものと思われる。尚、本調査は輸血の安全対策を講ずるための情報収集の一環として行われた。

### 対象及び方法

#### 1. 対象

全国で採血された 1992 年から 2001 年 9 月までの HIV-1 抗体がスクリーニング及びウェスタンブロット検査で陽性となった 517 例のうち、血漿の確保できた 237 例（過去検体）と、2009 年 9 月から 2012 年 5 月までの全ての陽性検体 212 例（現在の検体）について解析を行った。同一ドナーは除いた。尚、全ての献血者から献血時において安全性を目的とした解析を行うことの同意を得ている。

年齢別陽性者数の分布を Fig. 1 に示した。過去検体では 20 代が最も多かったが、現在の検体では 30 代が多くなっている。また、男女別では男性が約 95%，女性が約 5% で過去検体と現在の検体では差が無い。

#### 2. 方法

##### 1) HIV-1 遺伝子核酸配列の決定

自動核酸抽出装置 QIAamp Virus BioRobotMDx Kit (QIAGEN 社) を用いて血漿 300 $\mu$ l からウイルス RNA を抽出し、Super Script RTIII (Life Technologies 社) を用いて逆転写し cDNA とした。DAN ポリメラーゼ KAPA 2G Robust (KAPA BIOSYSTEMS 社、米国) を

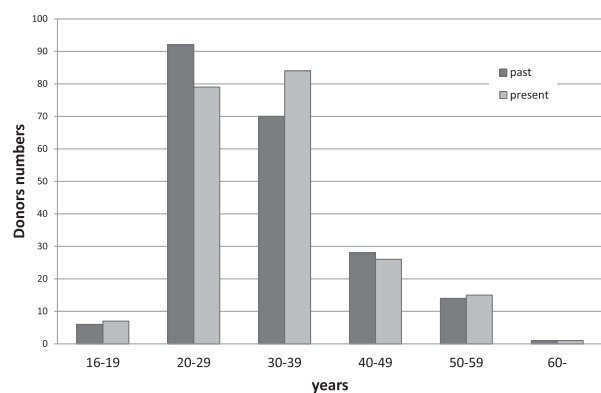


Fig. 1 Age of HIV-1 positive blood donors

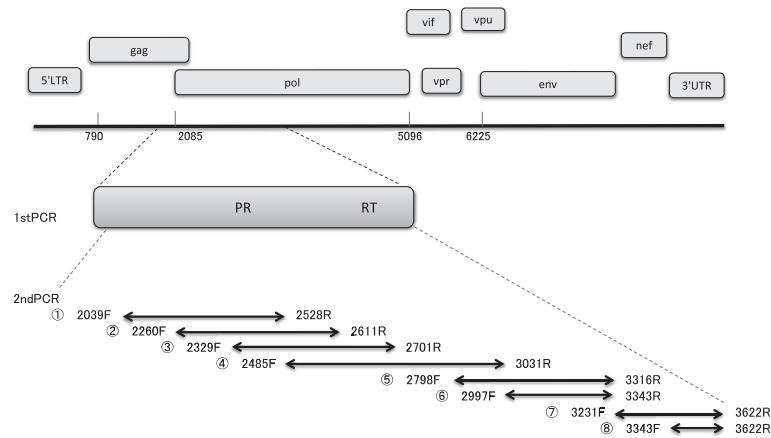


Fig. 2 Eight positions of 2nd PCR of the pol region

Table 1 HIV-1 subtypes among past and present donors

1992-2001 (year)				2009-2011 (year)			
Subtype	Number of Donors	Male	Female	Subtype	Number of Donors	Male	Female
Subtype B	205	180	4	Subtype B	192	189	3
CRF01_AE	24	18	2	CRF01_AE	11	8	3
CRF02_AG	2	0	2	CRF02_AG	5	0	5
Others	2	0	2	Others	2	1	1
PCR (-)	4	4	0	PCR (-)	2	2	0
Total	237*	202	10	Total	212	200	12

\*Including 25 samples with no information about sex

用いて Nested PCR からダイレクトシーケンシングを行った。env 領域は今井らの方法<sup>1)</sup>に従い、envC2V3 領域を RT nested PCR 法で増幅した。gag, pol 領域は Fujisaki らの方法<sup>2)</sup>に従い RT nested PCR 法で増幅した。pol 領域については、プライマーが合わず検出できない検体もあることから 2ndPCR を 8つのフラグメントに分けて行った (Fig. 2)。QIAxcel (QIAGEN 社) を用いて電気泳動を行い、増幅産物のサイズと濃度を確認し、非特異産物がほとんどなければ増幅産物の精製は行わず DW で数百倍に希釈した。BigDye terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies 社) を用いたシーケンス反応を行い、BigDyeXterminatorPurification kit (Life Technologies 社) による精製を行い PRISM3130(Life Technologies 社)を用い配列を得た。

2) サブタイプの判定

env, gag, pol 領域の配列を系統樹解析 (NJ 法) によりサブタイプの判定を行った。

さらに、データベースの NCBI Genotyping Tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/project/Genotyping/formpage.cgi>) と、BioAfrica Viruses Genotyping Tool (<http://bioafrica.net/Subtypetool/html>) を利用した判定も行った。

3) 薬剤耐性変異の検出

スタンフォード薬剤耐性データベース HIV DRUG RESISTANCE DATABASE (<http://hivdb.stanford.edu/>) を利用して、pol 領域のプロテアーゼ (PI Major Resistance Mutations, PI Minor Resistance Mutations), 逆転写酵素 (NRTI Resistance Mutations, NNRTI Resistance Mutations) を対象として解析した。

結 果

1. 過去と現在のサブタイプ

過去検体の 237 例のサブタイプは B が 205 例 (86.5%), CRF01\_AE が 24 例 (10.1%), CRF02\_AG が 2 例 (0.8%), その他が 2 例 (0.8%), PCR (-) が 4 例 (1.6%) であった。

現在の検体 212 例ではサブタイプ B が 192 例 (90.6%), CRF01\_AE が 11 例 (5.2%), CRF02\_AG が 5 例 (2.4%), その他が 2 例 (0.9%), PCR (-) が 2 例 (0.9%) であった (Table 1)。リコンビナントについては地域間差があり、例数の多かった東京都、神奈川県、千葉県、愛知県、大阪府のうち、とくに千葉県では過去検体で多くのリコンビナントタイプが検出されている (Table 2)。

男性のサブタイプ B は過去検体で 89.1%, 現在の検

Table 2 HIV-1 subtype transition in endemic areas

Prefecture Subtype Year	Tokyo		Kanagawa		Chiba			Aichi		Osaka	
	B	CRF	B	CRF	B	CRF	Others	B	CRF	B	CRF
1995	6	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1996	12	0	0	0	9	10	0	0	0	0	0
1997	10	2	2	0	4	1	0	1	0	8	0
1998	18	1	3	0	0	3	0	4	0	13	0
1999	19	2	2	0	2	0	0	1	0	5	0
2000	18	0	2	0	2	3	0	6	0	5	0
2001	22	2	2	0	1	3	0	3	0	17	0
2002	18	1	0	1	0	2	0	2	0	8	0
2003	21	1	2	0	1	0	1	2	0	10	1
2004	21	1	5	0	3	0	0	2	1	14	0
2005	17	1	3	0	0	1	0	4	1	15	2
2006	22	1	3	2	2	0	0	5	0	16	0
2007	10	1	3	0	4	0	0	2	2	17	2
2008	17	2	4	1	5	2	1	9	1	24	2
2009	16	1	0	0	4	1	0	3	1	14	0
2010	22	2	2	0	5	1	0	1	1	16	2
2011	14	4	3	1	7	1	0	4	0	16	1

体で94.5%と増加傾向にあった。女性は症例が少ないがサブタイプBの他にCRF01\_AE, CRF02\_AG, C, Gが検出された。特にCRF02\_AGは過去2例、現在5例の合わせて7例全て女性であった。外国籍と思われる陽性者は今回の調査で男性2名、女性1名でいずれもサブタイプBであった。

## 2. 薬剤耐性変異

薬剤耐性変異について解析可能であったのは、過去検体237例中187例であった。これは*pol*領域のPCRが増幅しない例があったため、検体の保管状態が悪かったことが主な原因と思われた。現在の検体ではPCR陰性であった2例を除き全て解析できた。他の調査研究でプロテアーゼ領域において耐性関与が低い変異の増加がみとめられたと報告されていることから、献血者においても同様であるか検証するためデータベースから判定された全てを対象に解析した。結果は過去検体187例中32例(17.1%)、現在の検体は210例中93例(44.3%)で何らかの薬剤耐性変異が検出された。しかし、最も多く検出されたプロテアーゼ領域のMinor Resistance Mutationである二次変異部位のA71V/TとL10I/Vを除くと、過去検体で187例中16例(8.6%)、現在の検体で210例中45例(21.4%)となった。また、リバータント変異と呼ばれ、薬剤耐性由来でウイルスに有利な変異であるT215Xは薬剤耐性群の中で、過去検体32例中の4例(12.5%)、現在の検体93例中の12例(12.9%)であった(Fig. 3)。

## 考 察

わが国におけるHIV/AIDSの歴史は1985年に、アメ

リカ在住経験のある日本人男性同性愛者(MSM: men who have sex with men)と、血友病患者にHIV-1に汚染された非加熱製剤を介しての感染が確認されたことに始まる。感染経路は異なるが、いずれもHIV-1は北米由来でその遺伝子型はサブタイプBであった。1990年代に入り、東南アジアを起源とするサブタイプAとEのリコンビナントであるCRF01\_AEが日本人感染者からも検出されるようになった。以後、わが国で流行しているHIV-1のサブタイプの主流はBとCRF01\_AEとなっている<sup>3)</sup>。

今回の結果では、全国の献血者に見出されるHIV-1陽性者のサブタイプBが増加傾向にあり、リコンビナントは減少傾向であった。わが国で流行しているHIV-1サブタイプの主流はBとCRF01\_AEの2種類と報告されているとおり、献血者に見出されるHIV-1サブタイプも同様であった。しかし、CRF02\_AGは2011年度に5例とCRF01\_AEの4例を上回っており、すべて20代、30代の若い女性の献血者であり、このうち4例は関東(東京、千葉、神奈川)で、東京と神奈川の2例では相同性がきわめて高いことから感染源が同一である可能性が考えられた。このように特定のサブタイプ・リコンビナントが地域的にあるいは同一地域においてもリスク集団(MSMや性風俗産業従事者等)ごとに偏在していると思われることから、例数の少ない今回の調査だけでリコンビナントが減少しているとは断言できない。なお、結果1でPCR(-)となった検体については、抗体検査の非特異的反応によるものか、ウイルス量が検出感度以下なのかなど精査する必要がある。

今回の解析では薬剤耐性変異は過去検体で17.1%、現

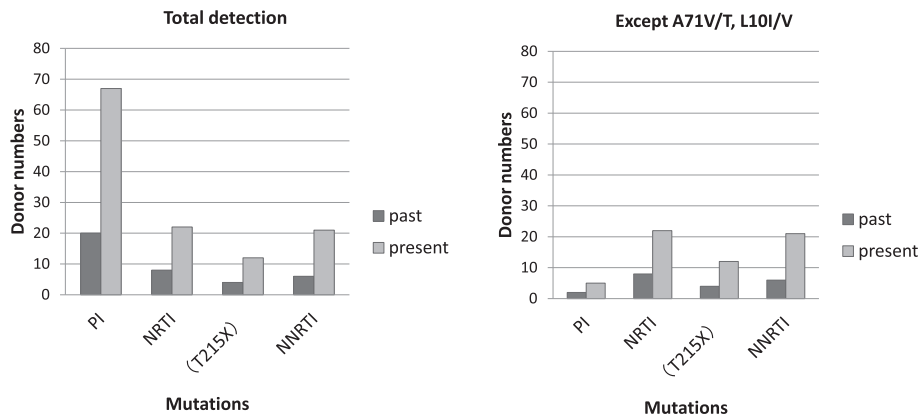


Fig. 3 Comparison of drug resistance mutations between past and present HIV-1 positive donors

PI: Protease Inhibitor

NRTI: Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibition (NRTI contains T215X)

NNRTI: Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor

\*All "present" donors have duplications for PI, NRTI and NNRTI

在の検体で44.3%と増加しており、これは他の疫学調査の結果と傾向が一致している<sup>4)</sup>。しかし、厚生労働省エイズ対策事業の研究班「国内で流行するHIV遺伝子型および薬剤耐性株の動向把握と治療方法の確立に関する研究班(以下薬剤耐性調査班)」の報告2010年度11.9%に比べ高率である。これは薬剤耐性調査班の報告ではプロテアーゼ耐性のMinor Resistance MutationであるA71V/TとL10I/Vが省かれている為で、この2つを除くと変異を持つ検体は過去検体で8.6%、現在の検体で21.4%であった。通常このA71, L10は二次変異で、薬剤プレッシャによる一次変異であるMajor Resistance Mutationに続いて出現してくるとされている<sup>5)</sup>。プロテアーゼ阻害剤の特徴として複数の耐性変異をひき起こすことから、治療に失敗した患者であれば通常、数カ所のアミノ酸変異が見られる。治療を受けていないHIV陽性献血者におけるA71またはL10の一カ所の変異出現は耐性変異とは考えにくい。薬剤耐性調査班の調査研究報告<sup>6)</sup>からも、プロテアーゼ領域では未治療者からも多くの二次変異である耐性変異が検出されており、既知の耐性関連変異ではないとしている。よってA71とL10単独変異は薬剤に起因した変異ではなく、感染を繰り返している間に獲得した変異と考えられ、薬剤耐性変異株から除外するのが妥当であろう。しかし、これらを除いてもRT領域における薬剤耐性変異は増加している。献血で新規感染者として見出される人が薬剤耐性変異をもつのは、治療失敗により耐性変異を生じたHIV/AIDS患者からの感染があるのかも知れない。理由の一つとして、AIDS治療は新薬の開発に伴い大きく改善されたことがあげられる。平均余命が延び通常の生活が送れるようになってきたことから、治療を受けている患者からの感染機会が増えていると推

定される<sup>7)</sup>。薬剤耐性HIV-1による新たな感染拡大を防止する為にも、治療中の患者が二次感染の予防行動を取れるような生活指導を行うことが、今後重要になってくると思われる。また、日本赤十字社ではこのような二次感染者からの献血を防ぐために、献血受付時の問診票でエイズ感染リスクを判断する質問についての記載を変更(平成23年4月1日より)している。

今回の調査で献血者においても薬剤耐性変異が増加していること、また薬剤に関連しない変異も増加していることが明らかになった。これは、HIV-1が薬剤耐性以外にも人の免疫機能から逃れるような変異を繰り返している<sup>8)</sup>ことを反映していると推測される。

HIV-1の解析はサブタイプだけでなく、薬剤耐性検査の領域など広い範囲を解析し、他のウイルス感染症以上に感染動態に注意を払っていくことが重要だと思われる。

## 文 献

- 1) 今井光信, 近藤真規子, 須藤弘二, 他: PCRによるHIV-1サブタイプ(BとE)の鑑別. 感染症学雑誌, 71(9): 918-923, 1999.
- 2) Fujisaki S, Ibe S, Hattori J, et al: An 11-Year Surveillance of HIV Type1 Subtypes in Nagoya, Japan. AIDS Research and Human Retrovirus, 25: 15-21, 2009.
- 3) Hattori J, Kondo M, Kato S, et al: Trends in transmitted drug-resistant HIV-1 and demographics of newly diagnosed patients: Nationwide surveillance from 2003 to 2008 in Japan. Antiviral Res, 88: 72-79, 2010.
- 4) 服部純子, 湯永博之, 吉田 繁, 他: 2003年-2008年の新規HIV/AIDS診断症例における薬剤耐性頻度の動向. 日本エイズ学会誌, 11(4): 445, 2009.

- 5) 平成 23 年度厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業：HIV 感染症の医療体制の整備に関する研究. HIV 薬剤耐性検査ガイドライン Ver. 6, 2012, 11—16.
- 6) 平成 22 年度厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業：中国四国ブロックにおける薬剤耐性 HIV の調査研究, 2011, 113—114.
- 7) IASR ホームページ：日本における薬剤耐性 HIV の動向 2003～2010 年 <http://idsc.nih.go.jp/iasr/31/361/tpc361-j.html> (2012 年 10 月現在).
- 8) Kawashima Y, Pfafferoth K, Frater J, et al: Adaptation of HIV-1 to human leukocyte antigen class I. *Nature*, 458: 641—645, 2009.

## SUBTYPES AND DRUG RESISTANCE OF HIV-1 IDENTIFIED AMONG BLOOD DONOR

*Masashi Igarashi, Chieko Matsumoto, Rieko Sobata, Yasumi Furui, Shigeharu Uchida, Masahiro Satake and Kenji Tadokoro*

Central Blood Institute, Blood Service Headquarters, Japanese Red Cross Society

### **Abstract:**

To clarify the infection dynamics of HIV-1 found in blood donors, the subtypes and drug resistant mutations of past and present HIV-1 positive specimens were examined comparatively. After analyzing 237 cases of HIV-1 positive specimens “past” specimens in blood donated nationwide from 1992 to December 2001 and 212 cases “present” specimens from September 2009 to December 2011, we found that the subtypes of “past” specimens included 86.5% B, 10.1% CRF01\_AE, 0.8% CRF02\_AG, and 0.8% others. As for “present” specimens, B accounted for 90.6%, CRF01\_AE for 5.2%, and CRF02\_AG for 2.4% of subtypes. Drug resistant mutations were present in 8.6% of past specimens and 21.4% of present specimens. The proportion of revertant T215X in drug resistant mutations was 12.5% in past specimens and 12.9% in present specimens. These results suggest that no increase in HIV-1 subtype recombinant has occurred in the blood of donors on the whole within Japan. We also noted more drug-resistant mutations among present specimens than among past ones, suggesting the prevalence of drug-resistant mutations even among infected carriers, excluding people undergoing HIV-1 treatment.

### **Keywords:**

HIV-1 Subtype, Drug resistance, Revertant Mutation, Blood Donor