

者についてはサブタイプ E の増加に注目する必要があると思われた。今後も、東海地区の HIV 感染者について血清疫学調査および分子疫学的解析を継続して行きたい。

# HIVの血漿ウイルスと末梢血単核球DNAでの薬剤耐性変異の違いについて

分担研究者 田村 正秀 (北海道立衛生研究所)  
研究協力者 工藤伸一、吉澄志磨、三好正浩、  
伊木繁雄、沢田春美、矢野昭起

## 研究要旨

抗HIV薬剤による治療において薬剤耐性ウイルスの出現は治療効果を損なう原因となっており、そのため耐性ウイルスであるかどうかの判定はよりの確に行われることが必要である。最近では、HIV遺伝子上の薬剤耐性変異部位に関する情報が蓄積されてきており、遺伝子解析の結果(Genotype)が耐性ウイルスであるか否かの有力な判断材料になっている。一方、この薬剤耐性に関する遺伝子解析では、血漿中のHIVを調べた時と末梢血単核球のDNAを調べた時とで異なった結果になる場合があることが知られている。我々は治療薬を変更後に遺伝子解析上、逆転写酵素阻害剤とプロテアーゼ阻害剤に対する耐性に関して、血漿ウイルスとリンパ球DNAとで異なる結果を示した症例を経験した。今回、我々はこの違いの理由をより理解するため、感染リンパ球内のHIV-RNAと分離ウイルスについて薬剤耐性変異の詳しい解析を行ったので報告する。

## 研究結果と考察

平成8年より私共ではこれまで24例のHIV感染者のGenotypeによる薬剤耐性ウイルスの判定を行った。この中で解析の対象として血漿ウイルスと末梢血単核球DNAを調べた際に、異なる結果になる場合が2例で見られた。その内1例においてフォローアップを行うことができ変異の推移を調べることが出来た。この症例はAZT、3TCとNelfinavirによる3剤の併用療法を受けており、過去にddIも3剤の併用療法に使用されていた症例である。CD4数は比較的維持できているがHIV-RNAコピー数が104前後と高値を示したため3剤の併用療法開始後1年11か月目に薬剤耐性に関するGenotypeの検査を行った。この際、

解析に血漿HIV-RNAと末梢血単核球のDNAを用いて行ったところ、薬剤耐性変異部位において一部異なる結果が得られた。逆転写酵素阻害剤に関しては、AZT耐性を示す逆転写酵素の41番目と215番目のアミノ酸と3TC耐性を示す184番目のアミノ酸に血漿HIV-RNAでは変異がみられたが、一方末梢血単核球のDNAではこうしたアミノ酸変異は見られなかった。また、プロテアーゼ阻害剤に関しては血漿HIV-RNAではNelfinavir耐性に関わるプロテアーゼの30番目、63番目、71番目、77番目と88番目のアミノ酸に変異がみられたが、末梢血単核球のDNAのほうでは、この内63番目と77番目にアミノ酸変異はみられたが

その他の30番目、71番目と88番目のアミノ酸に変異は見られなかった。その後治療薬はHIV-RNAのGenotypeの結果にもとづき、d4T、3TCと Indinavirの3剤併用療法に変更された。この多剤併用療法によってHIV-RNAコピー数は一旦検出限界（400コピー）以下にまで低下したが5か月後に再度検出され始め $4 \times 10^3$ に増加したためGenotype検査を行った。その結果、血漿HIV-RNAを用いた解析では、前回の逆転写酵素領域とプロテアーゼ領域の耐性変異に加えIndinavir耐性に関わるプロテアーゼの46番目のアミノ酸変異がみられた。一方、末梢血単核球のDNAを用いた解析では、前回HIV-RNAでみられたAZT耐性の逆転写酵素領域の41番目と215番目、それに3TC耐性の184番目のアミノ酸変異が今回はみとめられた。また、プロテアーゼ領域では、前回血漿HIV-RNAではみられていて末梢血単核球のDNAで変異のみられなかった30番目と88番目のアミノ酸変異が新たに前回の耐性部位に加えてみられた。今回、血漿HIV-RNAのほうでは46番目のIndinavir耐性の変異がみられたが、末梢血単核球のDNAではこの変異はみられなかった。こうして、GenotypeをみるとHIV-RNAのほうが耐性変異がより早く出現し、末梢血単核球のDNAでは同様の変異が遅く出現する結果となった。こうした耐性変異の出現がHIV-RNAと末梢血単核球のDNAで異なり、前者で早く後者で遅いことがAZT治療中に耐性になった症例で報告されている<sup>1)</sup>。そこで、こうした違いの理由をより理解するため、感染者の末梢血単核球を健常者の末梢血単核球と混合培養を行いウイルスの分離を行った。培養上清中に産生されているHIVのRNAと

混合培養している末梢血単核球DNAをそれぞれ用いてGenotypeの解析を行ったところ、得られた結果は一致していた。興味あることにこれらの結果は、ウイルス分離に感染者の末梢血単核球を用いているにもかかわらず、血漿HIV-RNAで得られた結果とほぼ一致していた。この分離ウイルスについて実際に培養細胞を用いて薬剤耐性(Phenotype)を調べたところ、3TC、NelfinavirそれにIndinavirに対してはかなり強い耐性を示し、AZTに対しても耐性を示した。分離ウイルスではIndinavir耐性に関わるプロテアーゼ領域の46番目のアミノ酸変異もみられた。このことから感染者の末梢血単核球中のウイルスDNAは活動的なウイルスの遺伝子の他に不活化されたウイルス遺伝子も多く存在し、それがGenotypeに強く反映していることが推測された。HIVは複製の過程で細胞内でRNAからDNAに変えられ、それが一旦環状になって細胞のゲノム中に組み込まれるが、Chunらは、感染者の末梢血単核球中にはHIVのDNAの多くは線状二本鎖DNAの状態では不活化された形で存在していると報告している<sup>2)</sup>。そこで、次ぎに我々は感染者の末梢血単核球中のTotal RNAを分離し、そこから細胞ゲノム中に組み込まれたプロウイルスからの転写と考えられるHIV-RNAの解析を行った。その結果は、薬剤耐性に関して感染者の末梢血核単球DNAを用いた時の結果と一致していた。このことは、末梢血単核球中のHIVのDNAはかならずしも不活化された状態ではない可能性があり、また末梢血単核球の細胞内で転写されているHIV-RNAの多くは血漿中のHIV産生には関わっていないことが考えられる。分離ウイルスが血漿 HIV-

RNAと薬剤耐性に関して一致したことから、活発に増殖できるウイルス産生をするリンパ球細胞はHIV感染リンパ球の中でも末梢血においてはごく一部の集団である可能性が考えられる。これらのことから末梢血単核球DNAを用いた薬剤耐性検査を行う際には、HIVのウイルス動態を考慮する必要があり、その判定にはより注意が必要であると思われる。

本研究で技術的指導をいただいた大阪府立公衆衛生研究所の大竹徹先生と森治代先生に感謝申し上げますと共に、本研究にご理解とご協力いただいた担当医の先生並びに感染者の方に感謝申し上げます。健常者末梢血単核球の調製のためのバフィーコートは北海道赤十字血液センターから譲渡いただきました。Phenotypeの解析に使用した原末は、リトナビルはダイナボット、サキナビルは日本ロシュ、ネルフィナビルは日本たばこ、インジナビルはメルク社より譲渡いただきました。

#### 参考文献

- 1) Kroodsma, K. L. et al. Detection of drug resistance mutations in the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) pol gene: Difference in semen and blood HIV-1 RNA and proviral DNA. *J. Inf. Diseases* 170:1292-1295 (1994).
- 2) Chun, T-W. et al. Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature* 387:183-188 (1997).

## 平成11年度「HIV感染症の疫学に関する研究」班報告書

### 「北部ベトナムの薬物乱用者間のHIVアウトブレイクに関する分子疫学的解析」

班員 武部 豊 (国立感染症研究所エイズ研究センター)

研究協力者 加藤佳代子, 草川 茂, 本村和嗣, 椎野禎一郎, 佐藤裕徳, 納富香子, 楊栄閣  
(国立感染症研究所 エイズ研究センター)  
Nguyen Tran Hien, Hoang Thuy Lon  
(国立衛生疫学研究所, ベトナム保健省 AIDS 予防対策プログラム)

**研究要旨** これまで、ベトナムにおけるHIV流行は、ホーチミン市を中心とするベトナム南部地域に限定されていたが、1996年末から1997年以降、中国国境に近い北部ベトナムの注射薬物乱用者(IDU)の間で、HIV-1感染の複数の急激なアウトブレイクが発生している。このアウトブレイクの原因となっているウイルス流行株に関する分子疫学的解析を行った結果、この地域に流布するウイルスが隣接する中国南部広西省チワン族自治区のピンシャンに分布するHIV-1 サブタイプEに極めて近い構造的特徴をもっていて、同一起源のウイルスと推定できることを明らかにした。この結果はこの地域におけるHIV流行の成り立ちを考える上で重要な知見と考えられる。

#### A. 研究目的と背景

AIDSの病因ウイルスであるHIVは、血清学的・遺伝学的性状の異なるHIV-1とHIV-2に大別される。HIV-1は現在の世界流行(Pandemic)の主体となっているウイルスで遺伝学的系統関係の解析結果、グループM、Oと最近同定されたNの3群に分類される。このうち、グループMは最も主要な系統であるが、このグループは、さらにサブタイプA-Jの少なくとも10サブタイプに分類される。このようにHIVのより詳細な遺伝学サブタイピングが可能になったことで、各流行地におけるウイルスの起源やその伝播の様相が、世界的な規模で明らかになりつつある。

われわれは、我が国とも重要な関わりのある東南アジア地域のHIV流行について焦点をあて、分子疫学的手法を用いて流布するウイルスの起源、系統関係を解析してきた。今年(最終)年度は、タイ、ミャンマー、カンボジアについて、将来のHIV流行が懸念されるベトナムとりわけ、これまで知られることの少なかったベトナム北部地域におけるHIV流行の急激な拡大状況に焦点を当て解析を進めた。

この地域では、1996年末から1997年にかけて、中国国境に近い北部ベトナムのランソン、クインニン県およびハノイ近郊の諸地域(バク・ジャン、ハイゾン、ナムディン、ハタイ県)の注射薬物乱用者(IDU)の間で急激なHIV流行が発生した。しかし、このoutbreakの原因となっているウイルス流行株の

由来は明らかでなかった。そこで、われわれは、ベトナム北部地域に流布するウイルス株の起源とその他地域における流行株との関連性を分子疫学的手法を用いて解析を行い、近隣諸国における流行との関連性を解明することを目的に解析を進めようと考えた。

#### B. 研究方法

(1) 1998年に、北部ベトナムの首都ハノイ近郊の4県(バク・ジャン、ハイゾン、ナムディン、ハタイ県)において注射薬物乱用者(IDU)、売春婦(CSW)、STD患者からHIV感染者血清を合計17検体収集した(図1)。

(2) V3 peptide ELISA法(Pau et al. AIDS 7: 337-340, 1993)およびセンダイウイルスで発現した組換えgp120を用いたELISA法(5)を用いて血清学的HIV-1サブタイピングを行い、タイにおいて流布しているHIV-1サブタイプとの関連性を検討した。

(3) 感染者血清中のウイルスRNAを鋳型として、gag p17およびC2/V3領域の塩基配列を、RT-PCR法で増幅後、ABI 310 autosequencerを用いたdirect sequence法によって決定した。

(4) 得られた塩基配列および推測されるアミノ酸配列を、ベトナム南部や中国南部における配列と比較検討し、アミノ酸配列上のsequence signatureを検索した。

(5) Clustal Wプログラムによるアラインメントの後、近隣結合法によって系統樹を作成し、得られた塩基配列の系統関係を解析した。系統樹の各分岐点の信頼性はbootstrap法(100回反復)によって検定した。

#### C. 研究成果

(1) 南北いずれの地域においてもベトナムにおけるHIV株は、1990年にホーチミン市で見いだされたベトナムにおける最初の報告例(欧米型サブタイプB)を除いて、全例が、タイに分布するHIV-1サブタイプA/E組換体であった(図2)。

(2) 北部ベトナムのIDUに分布するHIV-1サブタイプEは隣接する中国広西省ピンシャンPingxiangのIDU間に報告されていたものと極めて近縁性が高く、C2/V3領域に、他地域のサブタイプE株には見られない両者に共通するアミノ酸配列上の特徴をもつことを明らかにした。図3に示すように、ピンシャンのIDUに分布するHIV-1サブタイプEのほぼ全例

(11/12)、ベトナム北部のIDU間のサブタイプEの80%以上(10/12)に、V3ループから数えて12番目のアミノ酸にバリン置換が見いだされた。このアミノ酸置換は、他のいかなる地域に分布するサブタイプEにも、またベトナム北部の他のリスク集団にも見られず、中国南部とベトナム北部に分布するHIV-1サブタイプEに特徴的なsequence signatureと考えられた。

(3) ピンシャンおよびベトナム北部のIDU間に分布するHIV-1サブタイプEの塩基配列上の変異の多様性nucleotide diversityは $0.4 \pm 1.4\%$ ,  $n=12$ ; ベトナム北部では $2.7 \pm 1.3\%$ ,  $n=12$ と、両地域に分布する流行株は極めて均一性が高く、流行の発生が極めて最近に起こっていることを裏付ける結果を得た(図4)。またベトナム北部の性感染者の間のnucleotide diversityは $5.7 \pm 2.2\%$  ( $n=5$ )で、IDU間のそれに比べて有意に高く、従って性感染者間の流行がより、早期からこの地域に分布していたか、あるいは既に多様性の増した他地域(おそらくタイ、カンボジア、ベトナム南部)のウイルスがこの地域に持ち込まれている可能性が示唆された。

#### D. 考察

これらの結果は北部ベトナムおよび隣接する南部中国のIDUに分布するHIV-1サブタイプEは同一起源のウイルスであることを強く示唆するものである。また両地域に分布するウイルスが高い均一性を示すことから、この地域の流行を形成するfounder strain

が極めて最近にIDUs集団に持ち込まれ、その集団内で急激に伝播・拡大している様相が推測された。

#### E. 今後の展望

本研究班の中で、われわれは、タイ周辺のミャンマーとカンボジアついでベトナムにおける流行ウイルス株の分子疫学研究を行い、この地域における流行の相互関係を明らかにした。今後われわれは、中国・東インドを含む東南アジア・南アジア諸国全域でのHIV流行の全容解明を目指して研究を展開していきたいと考える。

#### F. 研究発表(1999-2000)

[欧文原著論文]

1. Kusagawa, S., Sato, H., Kato, K., Nohtomi, K., Shiino, T., Samrith, C., Leng, H.B., Phalla, T., Heng M. B., and **Takebe, Y.** (1999). HIV-1 env subtype E in Cambodia. *AIDS Research & Human Retroviruses*. **15**: 91-94.
2. Sato, H., Shiino, T., Kodaka, N., Taniguchi, K., Tomita, Y., Kato, K., Miyakuni, T., and **Takebe, Y.** (1999). Evolution and biological characterization of human immunodeficiency virus type 1 subtype E gp120 V3 sequences following horizontal and vertical virus transmission in a single family. *J. Virol.* **73**: 3551-3559.
3. Sato, H., Kato, K., and **Takebe, Y.** (1999). Functional complementation of the envelope hypervariable V3 loop of human immunodeficiency virus type 1 subtype B by subtype E V3 loop. *Virology*. **257**: 491-501.
4. Kato, K. and Sato, H., and **Takebe, Y.** (1999). Role of naturally-occurring basic amino acid substitutions on viral coreceptor usage and cell tropism in the immunodeficiency virus type 1 subtype E envelope V3 loop. *J. Virol.* **73**: 5520-5526.
5. Toriyoshi, H. Shioda, T., Sato, H., Sakaguchi, M., Eda, Y., Tokiyoshi, S., Kato, K., Nohtomi, K., Kusagawa, S., Taniguchi, K., Shiino, T., Kato, A., Foongladda, S., Linkanonsakul, S., Oka, S., Iwamoto, I., Wasi, C., Nagai, Y., and **Takebe, Y.** (1999).

- Sendai virus based production of HIV-1 subtype B and subtype E gp120 antigens and their use for highly sensitive detection of subtype-specific serum antibodies. *AIDS Research and Human Retroviruses*. **15**: 1109-1120.
6. Kato, K., Shiino, T., Kusagawa, S., Sato, H., Nohtomi, K., Shibamura, K., Nguyen, H. T., Chi, P. K., Lien, T. X., Anh, M. H., Long, H. T., Bunyaraksyotin, G., Fukushima, Y., Honda, M., Wasi, C., Yamazaki, S., Nagai, Y., and **Takebe, Y.** (1999). Genetic similarity of HIV-1 subtype E in a recent outbreak among IDUs in northern Vietnam to strains in Guangxi province of southern China. *AIDS Research and Human Retroviruses* **15**: 1157-1168.
7. Mochizuki, N., Otsuka, N., Matsuo, K., Shiino, T., Kojima, A., Kurata, T., Sakai, K., Yamamoto, N., Isomura, S., Dhole, TN., **Takebe, Y.**, Matsuda, M., and Tatsumi, M. (1999). An infectious DNA clone of HIV type 1 subtype C. *AIDS Research and Human Retroviruses* **14**: 1321-1324.
8. Shiino, T., Kato, K., Kodaka, N., Miyakuni, T., **Takebe, Y.**, and Sato, H. (2000). A group of V3 sequences of human immunodeficiency virus type 1 subtype E nonsyncytium-inducing, CCR-using variants are resistant to positive selection pressure. *J. Virol.* **74** (3): 1069-1078.
9. Kato, K., Kusagawa, S., Motomura, K., Nohtomi, K., Shiino, T., Sato, H., Shibamura, K., Hien, N. T., Chi, P. K., Thang, P. H., Thang, D. C., Quoc, N. C., Thang, B. D., Long, H. T., Yamazaki, S., Nagai, Y., and **Takebe, Y.** (2000). Cross-border spread of closely-related HIV-1 subtype E variant among injecting drug users in Chino-Vietnam boundary. in submission (JAIDS).
10. Motomura, K., Kusagawa, S., Kato, K., Lwin, H. H., Tun, K. M., Thwe, M., Oo, K. Y., Kyaw, O., Zaw, M., Nagai, Y., and **Takebe, Y.** (2000). Emergence of new forms of human immunodeficiency virus type 1 intersubtype recombinants in Central Myanmar. in submission (*J. Virology*).
- [和文総説・公刊図書]
11. 加藤佳代子, 納富香子, 椎野禎一郎, 佐藤裕徳, **武部 豊** (1999). HIVコレセプターとしてのケモカイン受容体. *組織培養工学* **24**: 13-17.
12. **武部 豊** (1999). ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 感染症. 「エマージング・ディゼース」(竹田美文、五十嵐章、小島荘明編集). pp. 198-204. 近代出版 1999.4.20.
13. **武部 豊** (1999). 後天性免疫不全症候群 (エイズ) の分子予防医学. 「分子予防医学」各論 2) 感染症 (松島綱治編集). 1999年7月. 医学書院.
14. **武部 豊** (1999). 東南アジア地域における HIV流行の分子疫学—アジアにおけるエイズ流行はいかにして形成されたか (上田恵介編集). *生物科学*.
15. **武部 豊** (1999). ケモカインとHIV感染 (連載講座「サイトカインと病気のかかわり」) 炎症と免疫: 1999年11月号. 先端医学社.
16. **武部 豊**, 義江 修, 塩田達雄, 永井美之 (2000). エイズとケモカイン/ケモカイン受容体 「ケモカインと疾患—その基礎と臨床」 (荏原順一編集). *医薬ジャーナル*.

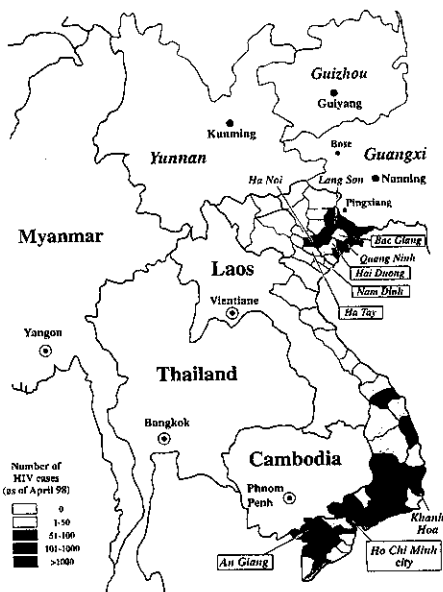


図1. ベトナムにおける解析サイトと近隣東南アジア地域に関する地図

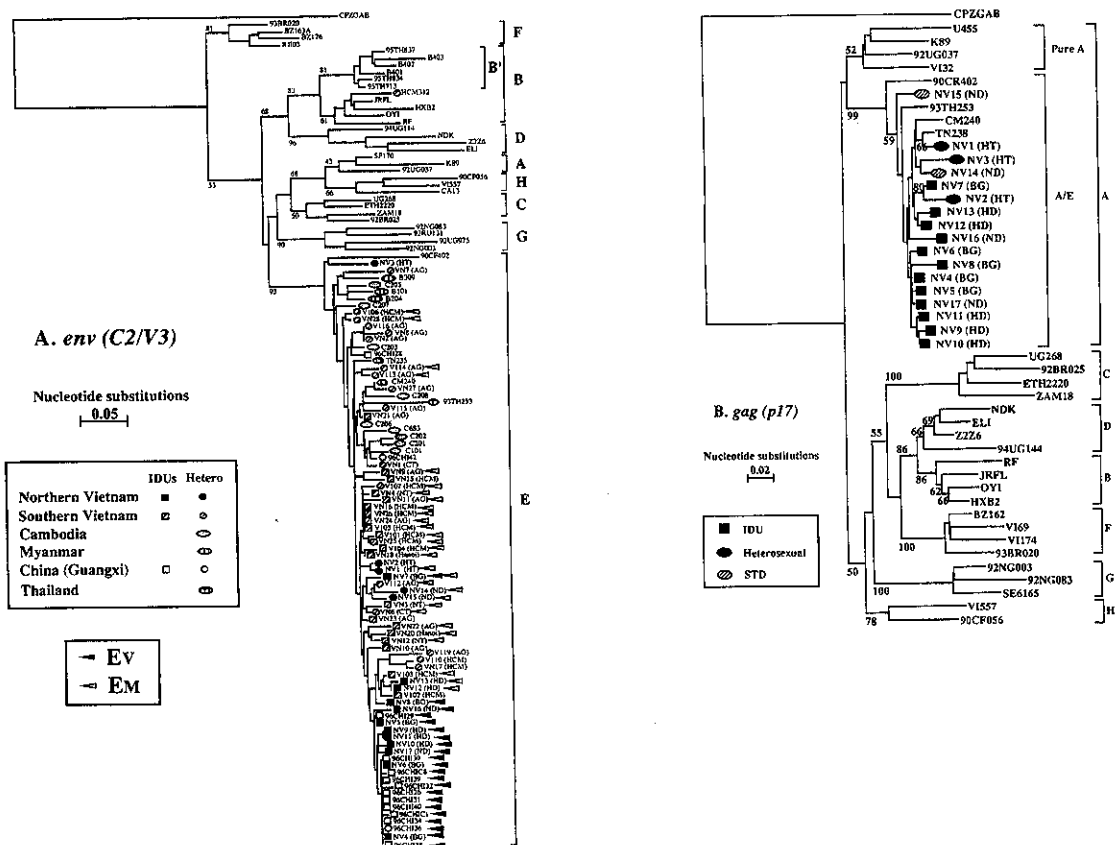


図2. ベトナム北部に分布するHIV-1株のgag (p17)領域 (A) およびenv (C2/V3) 領域 (B) の系統樹。中国広西省チワン族自治区ピンシャンに分布するHIV-1サブタイプEとの近縁性を示す。



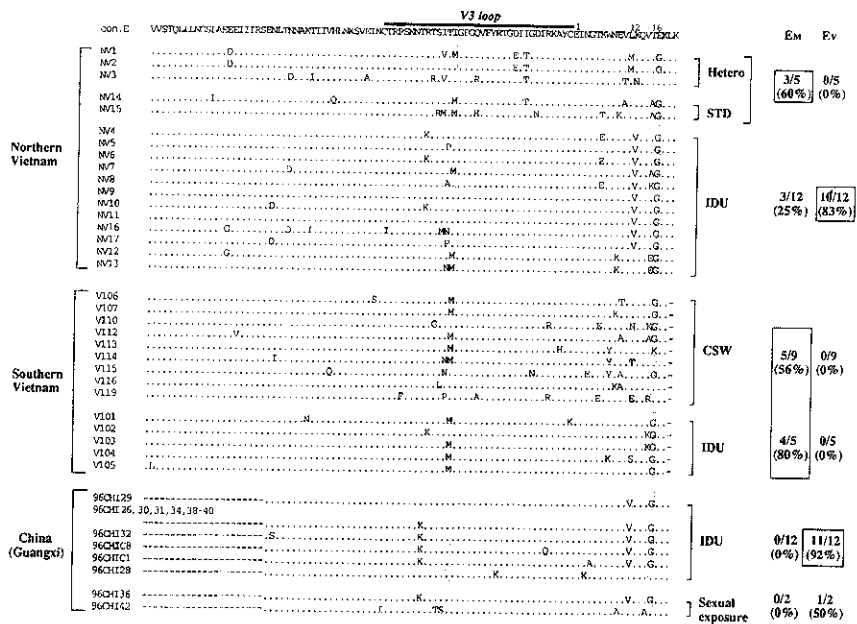


図3. ベトナムおよび中国に分布するHIV-1サブタイプEのenv (C2/V3)領域のアミノ酸アラインメント。Ev: V3ループから12番目にバリン置換をもつ中国南部とベトナム北部地域に特異的なサブタイプEヴァリエント。Em: V3ループ中央のGPGQモチーフ直前にメチオニン置換をもつベトナム南部に特徴的なサブタイプEヴァリエント

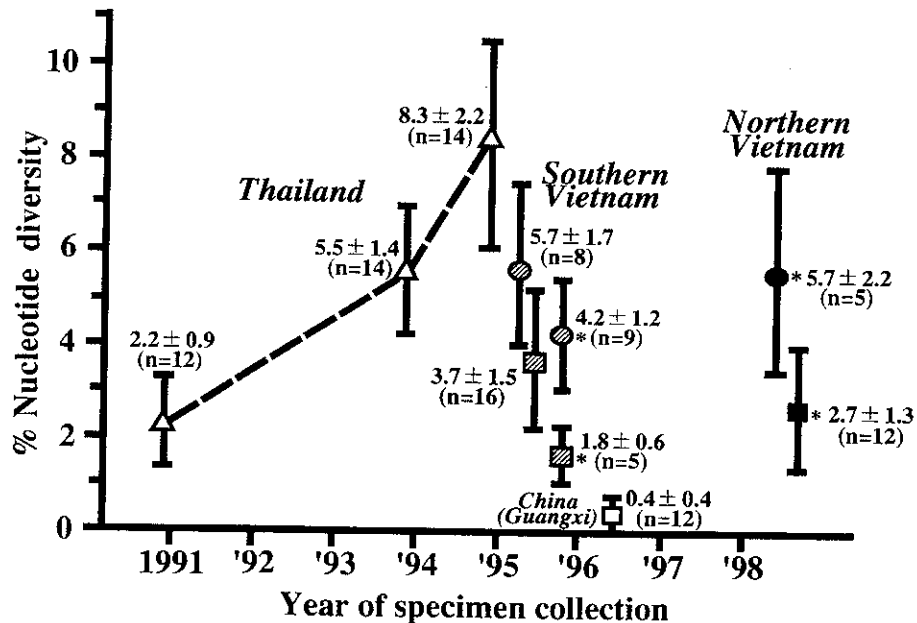


図4. HIV-1サブタイプEのenv (C2/V3)領域の多様性Nucleotide diversityの国/地域別・リスク集団別・年次別差異

## インド北部における HIV の分子疫学的研究

名古屋大学大学院医学研究科  
国際保健医療学  
山本直彦、磯村思无  
愛知県衛生研究所微生物部  
森下高行、佐藤克彦、

### 1. 目的

最近の WHO の報告によれば、世界の HIV 感染者は南および東南アジアに 20% が集中し、アジアにおける HIV の急増が懸念されている。しかし、これらアジアの発展途上国においては、タイおよびミャンマーを除くほとんどの地域では、HIV の分子疫学的研究は充分行なわれていないのが現状である。平成 9 年度および平成 10 年度の調査からインド北部においては南部とは異なる遺伝的浸淫状況がみられ、このことはインド北部においては、タイやミャンマーからインド北東部内陸を経て伝搬された事が推察され、アフリカからの伝搬が考えられる南部の大都市における伝搬様式とは異なる事が推察された。そこで今年度はインド北東部に位置し、ミャンマーと国境を同じくするインド・マニプール州の麻薬静注射者を対象に遺伝学的調査を行い、タイやミャンマーにおけるこれらのウイルスと遺伝子学的同一性を調べ関連を検討した。

### 2. 方法

方法はマニプール州在住の HIV 感染麻薬静注射者（表参照）の血清より ENV-V 3 領域を RT-PCR で増幅し、遺伝子解析が可能であった 9 例について、capillary sequence 法により塩基配列を決定し、近隣結合法により系統樹を作成し、遺伝子型を決定した。

### 3. 結果

遺伝子解析が可能であったマニプール州の HIV 感染麻薬静注射者 9 例の遺伝子型は 7 例がサブタイプ B であり、2 例がサブタイプ C であった。タイやミャンマーのそれにみられる HIV と遺伝子学的に関連を検討した結果、マニプール州の HIV 感染麻薬静注射者のサブタイプ B のうち 3 例はタイ、ミャンマーのサブタイプ B の cluster に近いものの別のグループに属していた。残る 4 例は MN 型あるいはアフリカでみられるサブタイプ B の cluster に属していることがわかった（系統樹参照）。

### 4. 考察

インド北部にみられたサブタイプ B は当初、地理的にタイ、ミャンマーの HIV 感染麻薬静注射者からマニプールの HIV 感染麻薬静注射者を通して伝搬したものと予想していたが、マニプールの HIV 感染麻薬静注射者に広がる HIV は遺伝子的にタイ、ミャンマーのそれに蔓延する HIV のタイプと若干異なっている事がみられた。

解析した例数が 9 例足らずであり、しかもインド・マニプール州の HIV 感染麻薬静注射者とタイやミャンマーにおけるこれらのウイルスとの遺伝子学的関連についての報告は例がないので、さらに今後も継続して調査解析が必要不可欠である。

### 5. 研究発表

第 13 回日本エイズ学会総会： 山本直彦、磯村思无、森下高行、佐藤克彦、

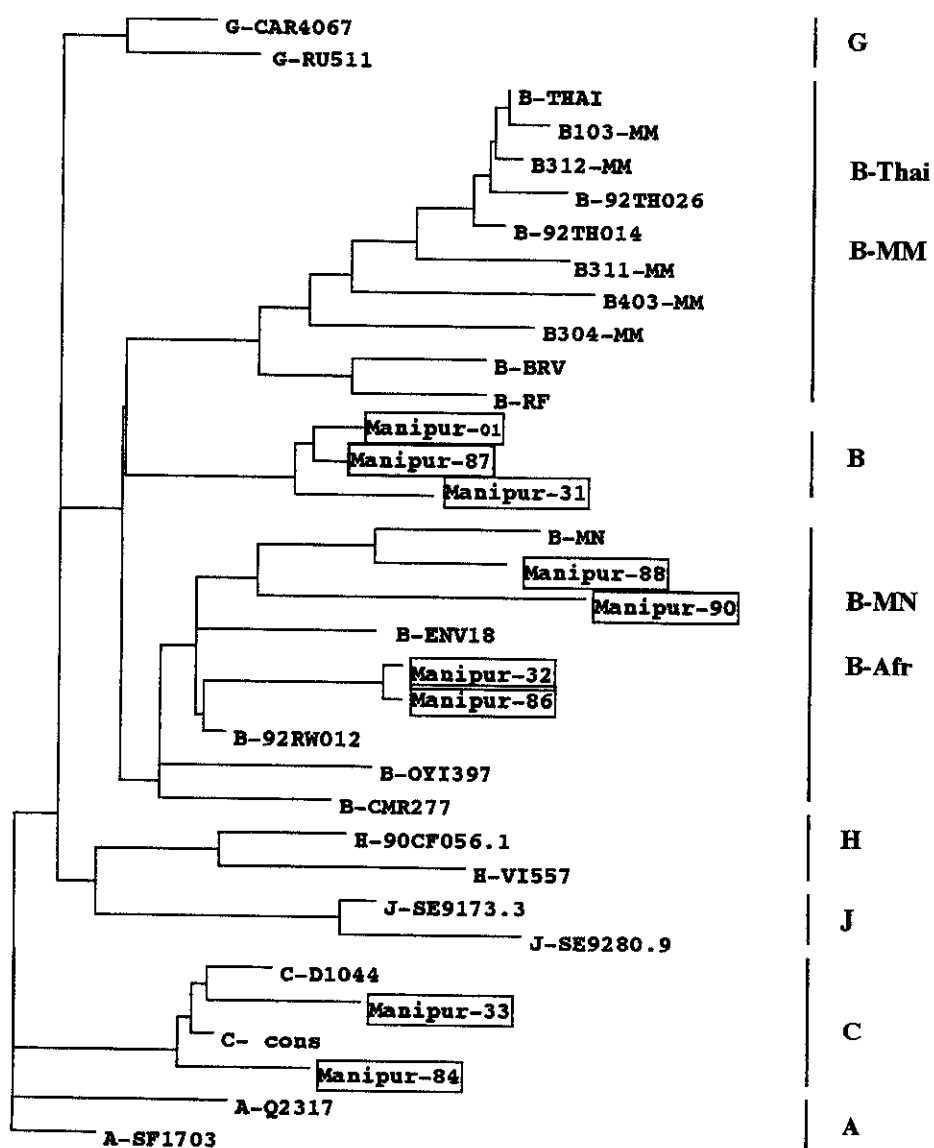
## Characteristics in Manipur IDUs

Sample No.	Age	Sex	Symptoms	HIV-I / II	Subtype
M01	30	male	AIDS	I	B
M31	27	male	ARC	I	B
M32	28	male	AIDS	I	B
M33	30	male	AIDS	I	C
M84	23	male	ARC	I	C
M86	27	male	ARC	I	B
M87	32	male	AIDS	I	B
M88	35	male	ARC	I	B
M90	25	male	ARC	I	B

[GENETYX-MAC: Evolutionary Tree]

Method: NJ

Bootstrap Trial: 10



## 分担研究報告書

### コンゴにおけるHIV-1のenv-vpuに基づく分子系統解析

分担研究者 速水正憲 京都大学ウイルス研究所

協力研究者 武久 盾、谷口裕子、原田陽介、山口由美、井戸栄治、三浦智行 京都大学ウイルス研究所

**研究要旨** HIV-1の起源地である可能性が高いアフリカ中央部において、コンゴ共和国のHIV感染の情報はほとんど知られていない。本研究では、そのコンゴ共和国において現在流行しているウイルスのタイプを明らかにすることを目的として、env V3 遺伝子に加えて、V3同様変異の激しいvpu遺伝子の分子疫学調査を行った。28株の分子系統解析の結果、サブタイプ別にみると、envではサブタイプAが12例(43%)、Gが6例(21%)、Hが5例(18%)で、他にD、J、既報のいずれのサブタイプにも属さないU型がみられた。一方、vpuではサブタイプGが17例(61%)と最も多く、Hが5例(18%)、他にA、D、U型がみられ、env-vpu遺伝子でサブタイプの一致しないリコンビナントは16例(57%)みられた。そのうちA/Gタイプ(envがA、vpuがG)が9例と極めて多かったが、これら9例はタイで流行のAEやIbNG型のように単一のリコンビナントではなく、それぞれ独自のリコンビネーションを経てきていると考えられた。多種多様なHIV-1の存在下で複数のウイルスに重感染する機会の多い中央アフリカにおいては、分離株のenv-vpu遺伝子を解析しただけでも半数を超えてリコンビナントが流行しており、全ゲノムではさらに多くのリコンビネーションが生じていることが予想された。また、env-vpu間では複数のA/Gリコンビナントが存在し、生き残り戦略上、他のA/A、A/H、G/A等の組合せよりも生物学的に優位であり、A-G間のリコンビネーションが選択的に起こりやすくなっていることが疫学的に推察される。

#### A. 研究目的

世界的に流行のみられるHIV-1のうち世界各地から分離されているウイルスの殆どは互いに遺伝的に近縁であるのに対して、アフリカ中央部のカメルーン、ガボンから分離されている株は遺伝的に非常に多様であり、変異株が蓄積されているといえる。この事実は、アフリカ中央部がHIV-1の起源地であると同時に、新たな型のウイルスがこの地域からの出現する可能性のあることを示唆している。HIV-1の変異と進化および起源と伝播を解明する上で最も重要な地域と考えられるアフリカ中央部に位置するコンゴ共和国(図1)における分子疫学的調査はこれまで行われていない。本研究では、この地域で実際にどのような系統関係に属するウイルスが現在流行しているのかを明らかにすることを目的とした。

#### B. 研究方法

ウイルス感染個体を探すために、2大都市ブラザヴィル(首都)とポアントノールにおいて主として臨床症状から見て

AIDS患者から血液を採取し、抗ウイルス抗体の存在を確認することによりHIV感染の実状を探った。ウイルス分離株28例の感染細胞からDNAを抽出した。通常サブタイプングに用いる、外皮蛋白をコードするenv遺伝子領域のV3領域周辺(550 bp)とV3領域同様、進化速度の速い、HIV-1/SIVcpzにのみ存在するvpu遺伝子を含む5'tat-env(360 bp)をPCR法により増幅し、その塩基配列を決定した。既に報告されている株の塩基配列も含め新たに解析したウイルス株の塩基配列情報を基に詳細な分子進化系統樹を作成し、HIV-1の系統関係を明らかにした。

#### C. 研究結果

解析の結果、以下に述べる知見が得られた。28株についてenvまたはvpu遺伝子の一部について塩基配列情報が得られ、その分子系統解析の結果、サブタイプ別にみると、envではサブタイプAが12例(43%)、Gが6例(21%)、Hが5例(18%)で、他にJが2例(7%)、Dが1例(4%)、既報のいずれの

サブタイプにも属さないU型が2例(7%)みられた。一方、*vpu*ではサブタイプGが17例(61%)と最も多く、Hが5例(18%)、Aが1例(4%)、Dが1例(4%)、既報のいずれのサブタイプにも属さないU型が4例(14%)みられた(図2、表1)。*env*で2割、*vpu*にいたっては6割がサブタイプGであり、近隣諸国、また世界の他地域と比較しても極めて高頻度であった。*env-vpu*遺伝子でサブタイプ的一致しないリコンビナントは28例中16例(57%)みられた(表1)。そのうちA/Gタイプ(*env*がA、*vpu*がG、以下同様)が9例と極めて多かったが、これら9例はタイで流行のAEやIbNG型のように同一のリコンビナントとして分子系統樹上グループを形成せず、それぞれの株ごとに独自に別個のリコンビネーションを経てきていると考えられた(図3)。このことは、HIV-1の重感染の機会が想像以上に高いことを示唆している。ただ、最近ナイジェリアとジブチをはじめ、アフリカ広域で報告されているIbNG型のA/Gリコンビナントはコンゴの分離株からはみつからなかった。

#### D. 考察

以上の結果から得られた情報を総合すると、分離株の*env-vpu*遺伝子を解析しただけでも半数を超えてリコンビナントが流行しており、全ゲノムではさらに多くのリコンビネーションが生じていることが予想された。また、*env-vpu*間では複数のA/Gリコンビナントが存在し、生き残り戦略上、他のA/A、A/H、G/A等の組合せよりも生物学的に優位であり、A-G間のリコンビネーションが選択的に起こりやすくなっていることが疫学的に推察された。

#### E. 結論

遺伝的に多様なタイプのHIV-1が混在するコンゴ共和国において単一でないリコンビナントが半数を超えて観察されたことは、HIV-1の適応戦略を考える上で貴重な情報を提供するものと考えられるのみならず、この地域における将来のワクチン開発計画にも直接役立つものと考えられる。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

1. Takehisa J, Zekeng L, Ido E, Yamaguchi-Kabata Y, Mboudjeka I, Harada Y, Miura T, Kaptue L, Hayami M: Human immunodeficiency virus type 1 intergroup (M/O) recombination in Cameroon. *J Virol.*, 73, 6810-6820, 1999.
2. Mboudjeka I, Zekeng L, Takehisa J, Miura T, Ido E, Yamashita M, Miura T, Kaptue L, Hayami M: HIV type 1 genetic variability in the northern part of Cameroon. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 15, 951-956, 1999.
3. Mboudjeka I, Bikandou B, Zekeng L, Takehisa J, Harada Y, Yamaguchi-Kabata Y, Taniguchi Y, Ido E, Yamashita M, Miura T, Kaptue L, M'Pelle P, Parra HJ, Ikeda M, Hayami M, Miura T.: Genetic diversity of HIV-1 group M from Cameroon and Republic of Congo. *Arch. Virol.*, 144, 2291-2311, 1999
4. Takehisa J, Bikandou B, Ido E, Mboudjeka I, M'Vouenze R, Nzoukoudi MY, Harada Y, Yamaguchi-Kabata Y, Miura T, M'Pandji M, Parra HJ, M'Pelle P, Hayami M: Natural infection of chimpanzees with new lentiviruses related to HIV-1/SIVcpz. *J. Med. Primatol.*, 28, 169-173, 1999
5. Bikandou B, Takehisa J, Mboudjeka I, Ido E, Kuwata T, Miyazaki Y, Moriyama H, Harada Y, Taniguchi Y, Ikeda M, Ndolo PJ, Nzoukoudi MY, M'Vouenze R, M'Pandji M., Parra HJ., M'Pelle P, Hayami M: Genetic subtypes of HIV type 1 in Republic of Congo. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, in press, 2000.

## 学会発表

6. Takehisa J, Mboudjeka I, Harada Y, Yamaguchi Y, Ido E, Miura T, Hayami M: Characterization of new SIVs from chimpanzees and a drill monkey closely related to HIV-1. Japan-U.S. Cooperative Medical Science Program, 11th Joint Meeting of AIDS Panel. (日米エイズ会議) Toyama, March 17-19, 1999.
7. Takehisa J, Bikandou B, Mboudjeka I, Harada Y, Yamaguchi-Kabata Y, Ido E, Miura T, Zekeng L, Kuate S, Parra HJ, M'Pele P, Kaptue L, Hayami M: Characterization of new SIVs from chimpanzees and drill monkeys closely related to HIV-1. 6th Annual International Discussion Meeting of HIV Dynamics and Evolution (Cross-species transmission). Atlanta, March 26-29, 1999
8. Mboudjeka I, Bikandou B, Zekeng L, Takehisa J, Harada Y, Miura T, Ido E, Kaptue L, M'Pele P, Parra HJ, Hayami M: The pol and env gene diversity of HIV-1 group M from Central Africa: evidence of two new emerging HIV-1 subtypes in Cameroon. 20th International Symposium on HIV, Leukemia, and opportunistic cancers (国際比較白血病会議), Marrakech, Morocco, May 23-28, 1999.
9. Takehisa J, Bikandou B, Ido E, Mboudjeka I, Nzoukoudi MY, M'Vouenze R, M'Pandji M, Harada Y, Yamaguchi-Kabata Y, Miura T, Parra HJ, M'Pele P, Hayami M: Natural infection of chimpanzees with new primate lentiviruses related to HIV-1/SIVcpz. 20th International Symposium on HIV, Leukemia, and opportunistic cancers (国際比較白血

病会議), Marrakech, Morocco, May 23-28, 1999.

10. Takehisa J, Zekeng L, Ido E, Yamaguchi-Kabata Y, Mboudjeka I, Harada Y, Miura T, Kaptue L, Hayami M: HIV-1 intergroup (M/O) recombination in Cameroon. 20th International Symposium on HIV, Leukemia, and opportunistic cancers (国際比較白血病会議), Marrakech, Morocco, May 23-28, 1999.

11. Bikandou B, Takehisa J, Mboudjeka I, Ido E, Kuwata T, Miyazaki Y, Moriyama H, Harada Y, Ndolo PJ, Nzoukoudi MY, M'Vouenze R, M'Pandji M, Parra HJ, M'Pele P, Hayami M: Genetic subtypes of HIV-1 in Republic of Congo. 20th International Symposium on HIV, Leukemia, and opportunistic cancers (国際比較白血病会議), Marrakech, Morocco, May 23-28, 1999.

12. 谷口裕子、Mboudjeka I、武久 盾、原田陽介、山口由美、桑田岳夫、宮崎恭行、三浦智行、井戸栄治、速水正憲：コンゴにおけるHIV-1のenv-vpuに基づく分子系統解析、第13回日本エイズ学会総会、東京、1999年12月2-4日

13. 武久 盾、原田陽介、田丸敬次郎、谷口裕子、Mboudjeka I、伊吹謙太郎、井戸栄治、三浦智行、速水正憲：新型霊長類レンチウイルス・マンドリル免疫不全ウイルスSIVmndの分離、第13回日本エイズ学会総会、東京、1999年12月2-4日

14. 原田陽介、武久 盾、山口由美、谷口裕子、Mboudjeka I、三浦智行、井戸栄治、速水正憲：新型霊長類レンチウイルス・マンドリル免疫不全ウイルスSIVmndの分子系統解析、第13回日本エイズ学会総会、東京、1999年12月2-4日

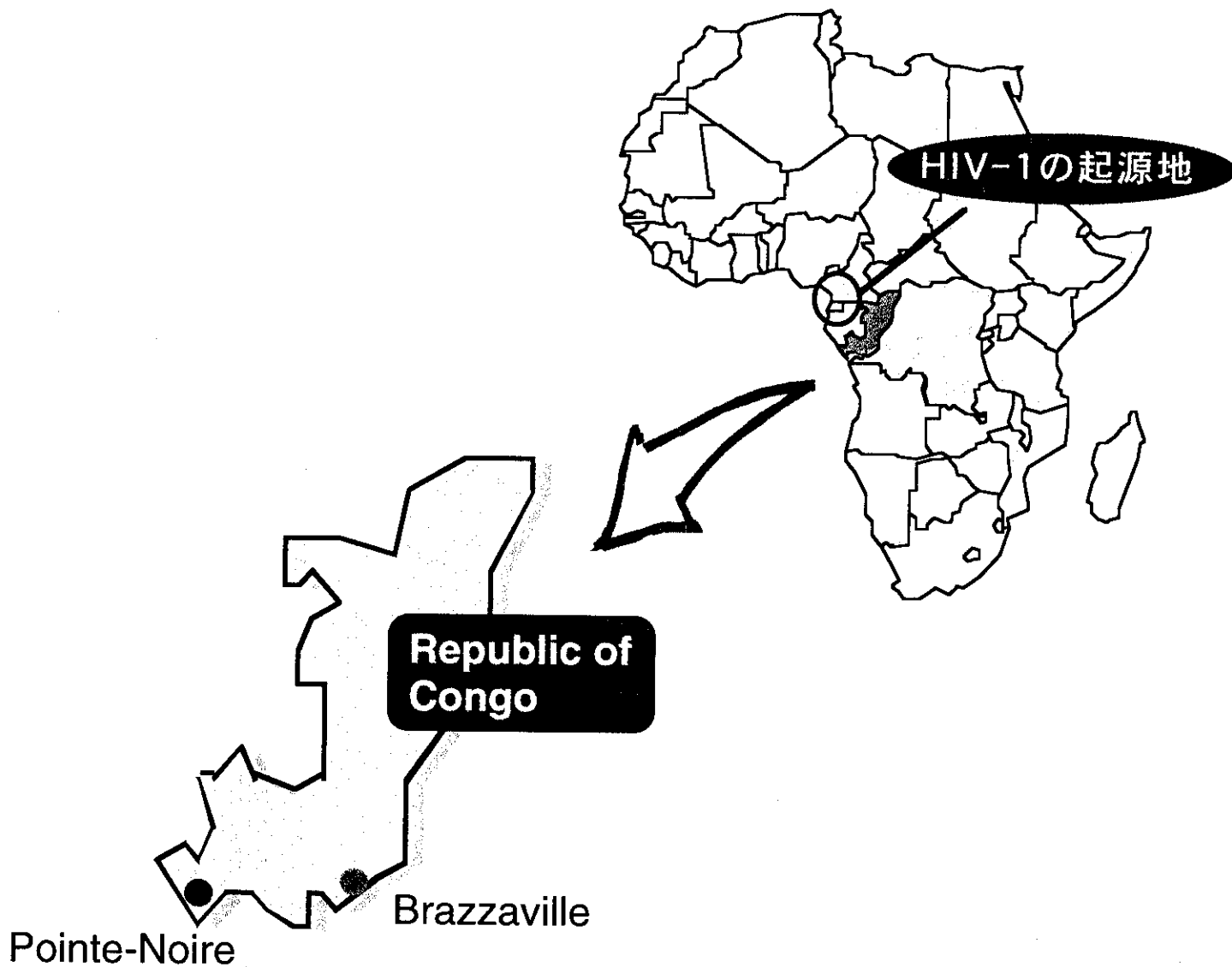


図1. コンゴ共和国。中央アフリカ諸国のひとつ。これまでHIVの分子疫学的解析が行われていない。二大都市ブラザヴィル（首都）とポアントノールで疫学調査を展開した。

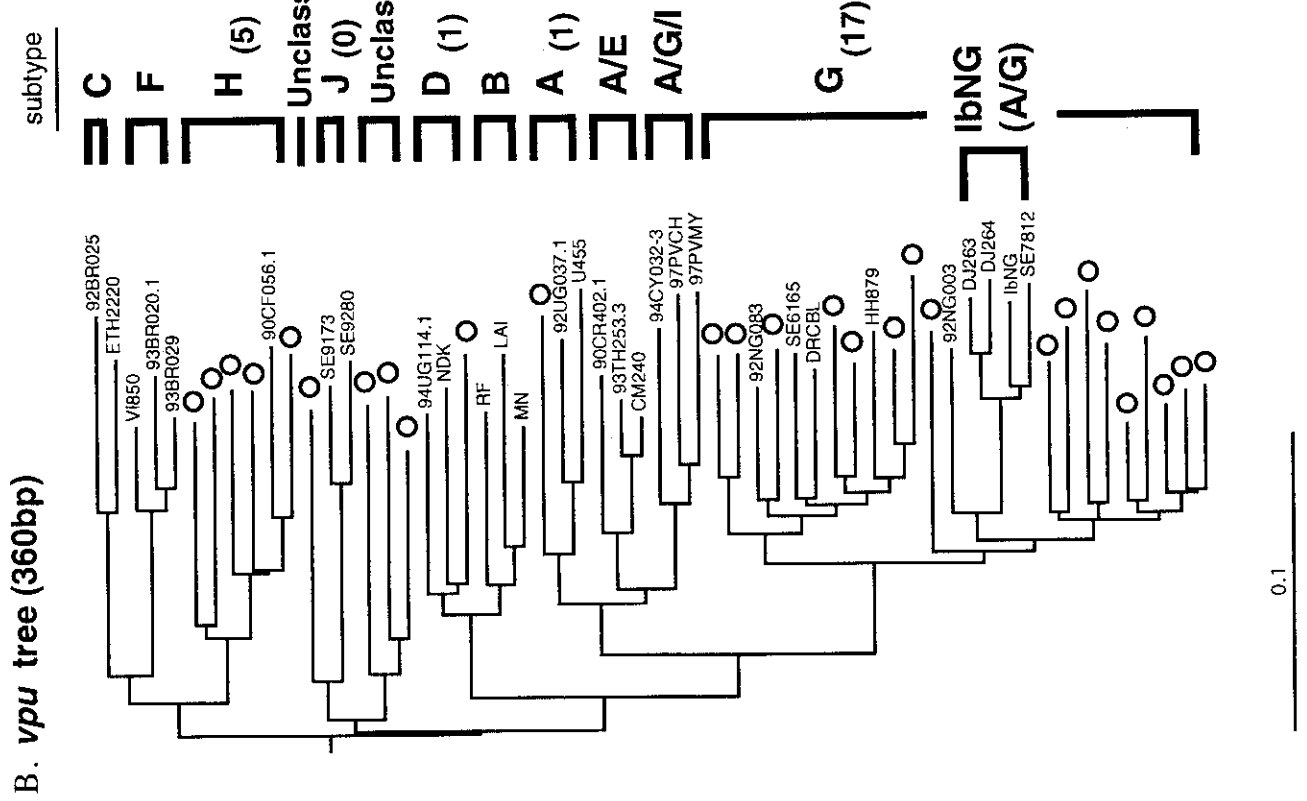
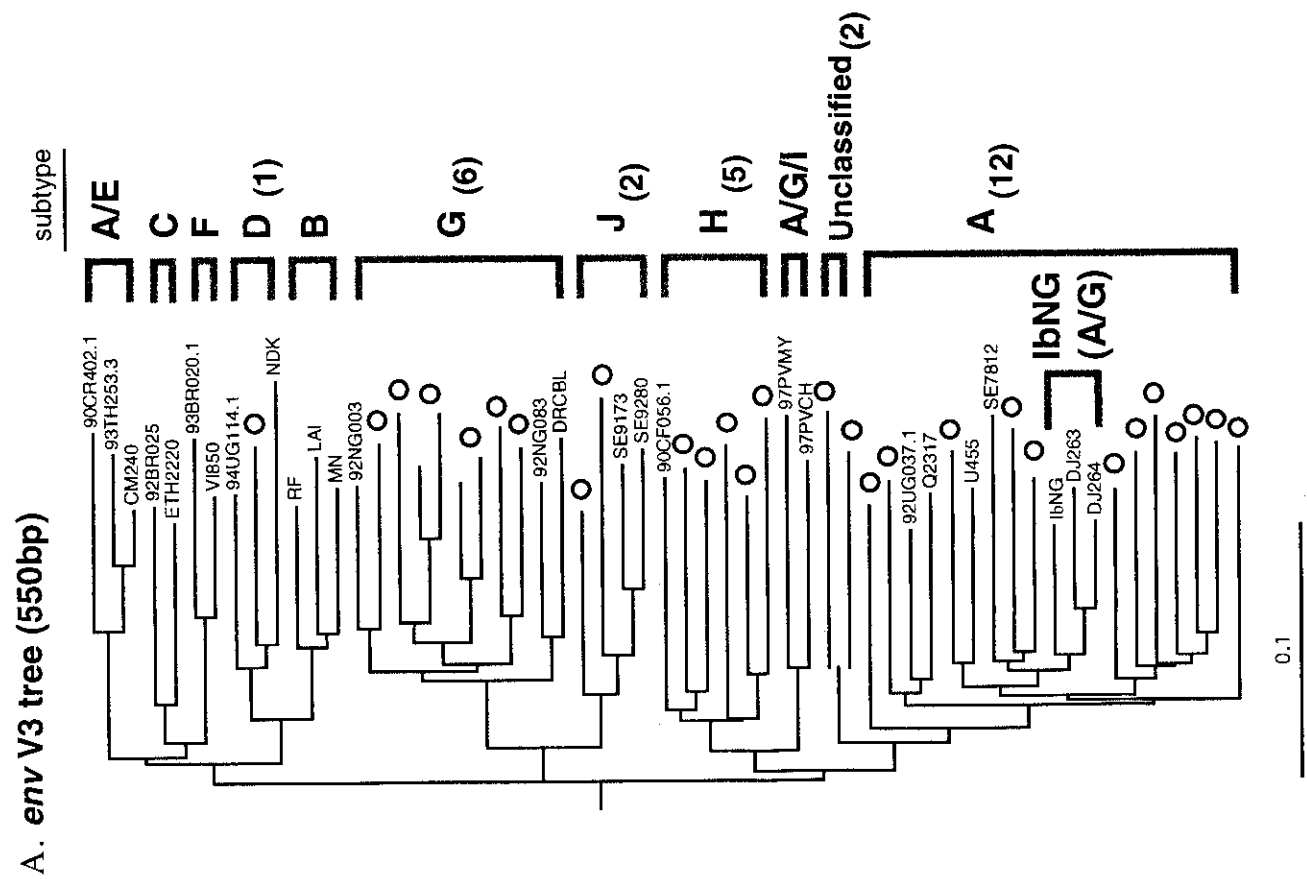


図2. コンゴのHIV-1の分子系統樹。28分離株のenv (C2-C5領域)遺伝子に基づく系統樹(A)、5'tat-env (vpuを含む)遺伝子に基づく系統樹(B)をそれぞれ示した。○はコンゴのHIV-1株で、各サブタイプの横に株数を付した。



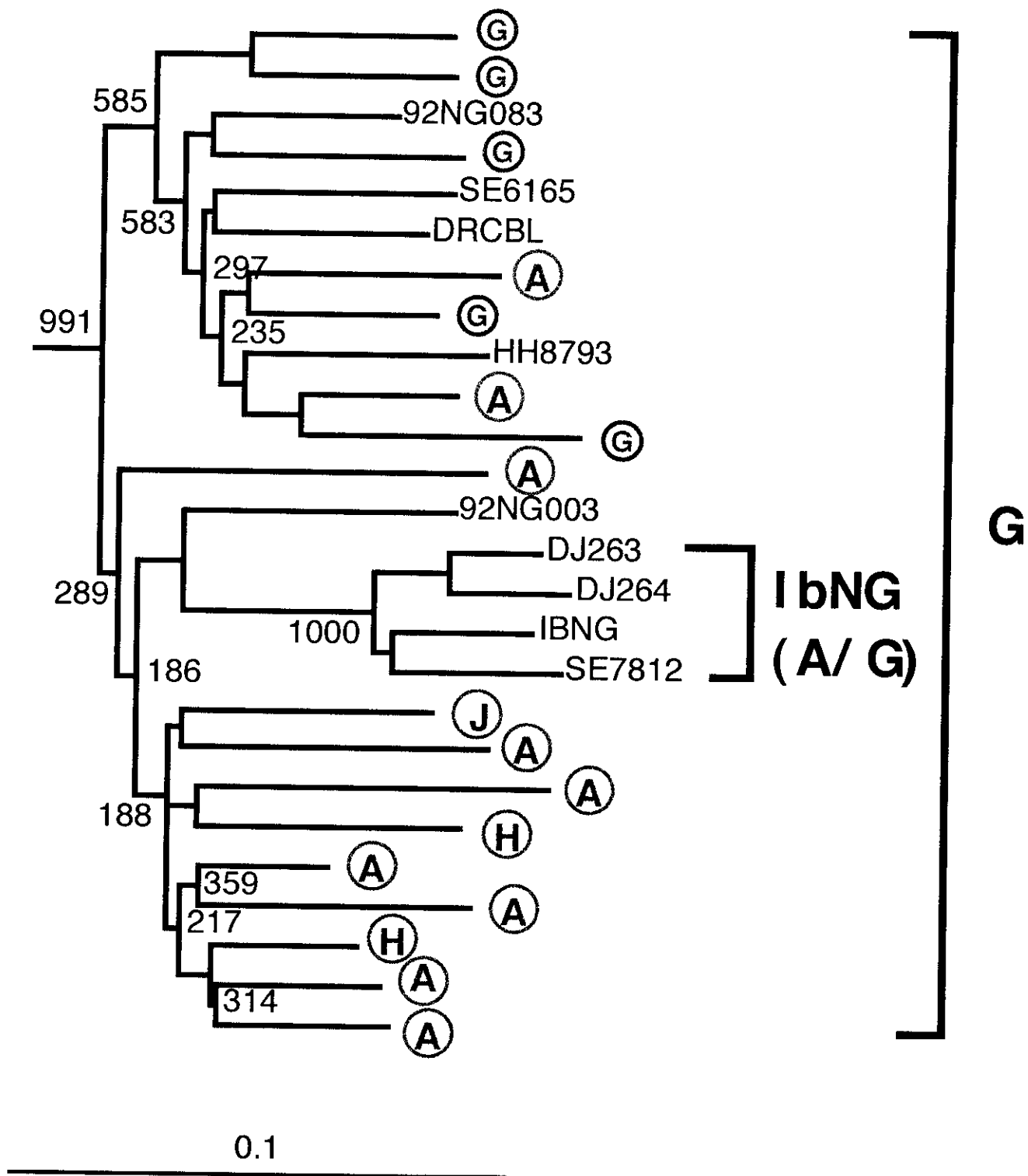


図3. 5' *tat-env* (*vpu*を含む)遺伝子でサブタイプGの分子系統樹。コンゴの28例中17株がサブタイプGであった。○中に *env* 遺伝子におけるサブタイプを示した。

		vpu (360bp)							%	
		A	G	H	J	D	U1			U2
env V3 (550bp)	A	1	9	1				1	12	43
	G		5	1					6	21
	H		2	3					5	18
	J		1				1		2	7
	D					1			1	4
	U						2		2	7
		1	17	5	0	1	3	1	28	100
%		4	61	18	0	4	11	4	100	

表1. コンゴのHIV-1 28株の *env* V3、*vpu* に基づくサブタイプ。 *env/vpu* でサブタイプ的一致しないリコンビナントは16/28株で57%に及んだ。また、*vpu* 遺伝子がサブタイプGのものが全体の6割を超え、近隣諸国と比較して極めて高かった。また、*env/vpu* でA/Gタイプのリコンビナントが9/28株で32%と非常に多かった。

## HIV-I 感染血友病患者の HLA タイプと病態発現との相関

分担研究者：園田俊郎 鹿児島大学医学部ウイルス学

共同研究者：屋敷伸治 鹿児島大学医学部ウイルス学

共同研究者：丸山芳一 鹿児島大学附属病院輸血部

### 【研究要旨】

AIDS 病態発症の宿主要因を明らかにする目的で HLA の遺伝的多型を解析した。その結果、HLA-DRB1\*0403, DQB1\*0302 は AIDS の病態発現進行に関与していること、AIDS を発症しない抵抗性遺伝子 HLA-DRB1\*1501, DQB1\*0602, DRB1\*0405、DQB1\*0401 が明らかになり、HIV 抗体陽性者の経過観察に HLA 解析が有用な診断情報と成り得ると考えられる。

### 【研究目的】

HIV-1 感染者のなかで、早期に AIDS を発症するものと長期間無症状のまま経過するもの (long-term nonprogressor: LTN P) が知られている。鹿児島県下の HIV-1 感染血友病患者にも LTR が認められ、その免疫遺伝学的宿主要因が注目されている。本研究では、AIDS 病態発症の宿主要因を HLA の遺伝的多型と免疫応答の個体差を明らかにすることを目的とした。

### 【研究方法】

我々は 1985 年以來、鹿児島県在住の血友病患者のうち HIV-1 汚染血液製剤を投与された 35 名 (HIV-1 抗体陽性者 17 名、HIV-1 抗体陰性者 18 名) の方の同意を得てリンパ球と血清を収集保存してきた。HIV-1 のウイルス分離と抗体検査は常法により行ない HIV-1 感染者を同定した。HLA-A,B,C 型は血清学的タイプピング法、HLA-DRB1,DQB1 型は DNA

タイプピング法により決定した。

### 【研究結果】

鹿児島県在住の血友病患者 35 名のうち、HIV-1 感染者 17/35 (48.6%) 例で、このうち AIDS 発症者は 9/17 (52.9%) 例で、5 名が HIV-1/HTLV-I 重複感染者であった。AIDS 発症者 9 名は 1985 年の観察開始から 6-10 年以内で全員死亡された。8 名の HIV-1 抗体陽性者血友病患者は、現在のところ無症状のままであった。9 名の AIDS 発症者は HLA-DRB1\*0403, DQB1\*0302 の頻度が非発症者に比し有意に増加していた。非発症者の HLA-DRB1\*1501 と DQB1\*0602 は AIDS 発症者に比し増加傾向であった。なお、AIDS 発症者のうち、2 例は DRB1\*1501 を保有していたが、いずれも HIV-1/HTLV-I 重複感染者で AIDS 発症も早く予後不良の患者であった (表 1)。さらに、HIV-1 抗体陰性者に有意に増加していた DRB1\*0405, DQB1\*0401 は、

AIDS 非発症者 2 名にみられた (データ省略)。一方、HLA-A,B,C 型は両者間でいずれも有意な差は認められなかった。

【考察】

以上の結果から HLA-DRB1\*0403, DQB1\*0302 は AIDS の病態発現進行に関与する HLA アレルと HIV-1 感染後も AIDS を発症しない抵抗性遺伝子 HLA-DRB1\*1501, DQB1\*0602, DRB1\*0405、DQB1\*0401 が明らかになった。今回の HLA 解析により、AIDS 発症リスクが宿主の HLA class II 遺伝子の多型とその CD4<sup>+</sup>ヘルパー細胞が関与する免疫応答機能で決定されていることが明らかになり、患者の経過観察に HLA 解析が有用

な情報と成り得ると考えられる。今後、塩田らと共同で解析しているケモカインレセプター (Liu et al. 1999) と HLA との相関について解析をすすめていきたい。

【研究発表】

Liu H, Chao D, Nakayama EE, Taguchi H, Goto M, Xin X, Takamatsu JK, Saito H, Ishikawa Y, Akaza T, Juji T, Takebe Y, Ohishi T, Fukutake K, Maruyama Y, Yashiki S, Sonoda S, Nakamura T, Nagai Y, Iwamoto A, Shioda T. Polymorphism in RANTES chemokine promoter affects HIV-1 disease progression. Proc Natl Acad Sci USA 96(8):4581-4585 (1999).

表 1 HIV-1 感染血友病患者の病態発現と HLA との相関

HLA alleles	AIDS 発症者(N=9)		未発症者(N=8)		$\chi^2$	p values
	18 alleles		16 alleles			
	N	%	N	%		
DRB1*0403	4/18	22.2	0/16	0	4.030	0.045
DQB1*0302	4/18	22.2	0/16	0	4.030	0.045
DRB1*1501	2/18	11.1	5/16	31.3	2.101	0.147
DQB1*0602	2/9	11.1	5/16	31.3	2.101	0.147
<sup>a</sup> DRB1*0403	3/8	37.5	0/16	0	6.857	0.009
<sup>a</sup> DQB1*0302	3/8	37.5	0/16	0	6.857	0.009
<sup>a</sup> DRB1*1501	0/8	0	5/16	31.3	3.158	0.075
<sup>a</sup> DQB1*0602	0/8	0	5/16	31.3	3.158	0.075

<sup>a</sup>HTLV-1/HTLV-I 重複感染者 5 名を除く