

200100744A

厚生科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

東アジア及び太平洋沿岸地域における HIV 感染症の疫学に関する研究

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者

武 部 豊

平成14（2002）年3月

厚生科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

東アジア及び太平洋沿岸地域における HIV 感染症の疫学に関する研究

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者

武 部 豊

平成14（2002）年3月

厚生科学研究費補助金研究報告書目次

I. 総括研究報告書

武部 豊

-1-

[東アジア及び太平洋沿岸地域における HIV 感染症の疫学に関する研究]

II. 分担研究報告書

武部 豊

-7-

有吉 紅也

-14-

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

-24-

IV. 研究成果の刊行物・別刷り

-26-

総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

（H13 年度総括研究報告書）

東アジア及び太平洋沿岸地域における HIV 感染症の疫学に関する研究

主任研究者：武部 豊 国立感染症研究所エイズ研究センター第1室・室長
分担研究者：有吉 紅也 国立感染症研究所エイズ研究センター主任研究官

研究要旨

HIV-1 流行の急速な拡大が進行している東南・東アジア地域をフィールドとして、次の2つの柱からなる研究を進め、以下に述べる研究成果を得た。

（柱 I）「アジアにおける HIV/AIDS 流行の分子疫学研究」（武部班員）

中国における HIV-1 流行の起震地（epicenter）と考えられる中国南西部（雲南省）の HIV 流行の分子疫学的解析を行い、その結果、雲南省西部に、世界的にも極めてユニークな、組換えウイルスが新生するホットスポットの存在することを明らかにした。この知見は中国各地における流行形成のメカニズムとその起源の解明に重要な示唆を与えるものと考えられる。

（柱 II）「HIV 感染症の免疫学／分子生物学研究に应用可能なコホート研究」（有吉班員） HIV・エイズの病原性を探求する上で、宿主・病原体の相互関係を解明することは不可欠である。この目的のためにランパン県病院エイズ専門外来受診患者およびその配偶者を対象に、免疫学・遺伝学的研究に应用可能なコホート研究を開始し、平成13年末までに、計680名（88名の抗 HIV 抗体陰性配偶者を含む）がリクルートされ、今後の解析の基盤となるデータ・ベースの構築が完了した。

また、同外来受診感染者を対象にしたレトロスペクティブな生存解析を行い、抗 HIV 薬一剤および2剤併用療法は無治療群に比べそれぞれ40%、63%死亡率を低下させるという結果が得られ、CRF01_AE（サブタイプ E）感染者における抗 HIV 薬の死亡率における影響を始めて定量的に示した。

また本研究の技術的基盤として昨年度開発された新規の CTL 評価系を用いて、CTL エピト - プ領域のアミノ酸変異とそのエピト - プの細胞表面上抗原提示効率を調べた結果、CTL エピト - プの意義を評価する際、抗原提示効率を念頭に検討することの重要性を示した。

A 研究目的

アジア地域をフィールドとして、以下の研究を推進することを目的とする。

（柱 I）「アジアにおける HIV/AIDS 流行の分子疫学研究」（武部班員）

中国は、アジア地域の中でも今後 HIV 流行の急速な拡大が最も懸念されている地域である。その中でも中国南西部の雲南省は、中国における HIV 流行の起震地と考えられ、この地域から中国全土へと流行が急速に拡大している。しかしそのような重要性にも関わらず、分布するウイルス流行株に関する研究は殆どなされていない現状にある。そこで我々は、中国における流行のエピセンターともいべき雲南省に分布する HIV-1 株の分子疫学的解析を開始し、その全容を解明しようとする。

（柱 II）「HIV 感染症の免疫学／分子生物学

研究に应用可能なコホート研究」（有吉班員）

宿主側の免疫学的・遺伝学的因子と免疫不全の進行速度との関連を探るためタイ国立衛生研究所（NIH）とランパン県病院との共同で、ランパン県病院エイズ専門外来受診患者を対象に、免疫学・遺伝学的研究に应用可能なコホート研究を行う。また野外株 HIV Gag タンパクの CTL エピト - プ抗原提示効率を評価する実験系を確立させ、将来的にタイのコホート患者の宿主・ウイルス相互関係の解明に役立てることを目的とする。

B 研究方法

（柱 I）「アジアにおける HIV/AIDS 流行の分子疫学研究」（武部班員）

a)雲南省の西部（Dehong）東南部（Honghe）東部（Wenshan）の3地域において収集さ

れた注射薬物乱用者 (IDUs) (同意者) 血液から、健常者 PBMCs との共培養法によって HIV-1 株を分離した。

b) 血漿あるいはウイルス培養液上清の *env* (C2/V3) (324 bp) および, *gag* (p17)-RT (2.6 kb) 領域を RT-nested-PCR 法によって増幅させ、塩基配列を cycle sequencing 法によって決定。

c) 標準株の塩基配列とのアライメントをもとに、近隣結合法による系統樹を作成し、遺伝子型 (サブタイプ) の決定を行った。

d) 遺伝子組み換えゲノムが疑われる検体については、さらにアクセサリ-遺伝子領域の塩基配列を決定し、diversity plot および, bootscanning 法によって組み換え点の検索を行った。

(柱 II) 「HIV 感染症の免疫学/分子生物学研究に応用可能なコホート研究」(有吉班員)

a) ランパン県病院デイケアセンター受診患者のレトロスペクティブ生存解析

1995 年 10 月 2 日から 1999 年 10 月 31 日までに受診した HIV 感染者を対象に人口統計学的データ、臨床データ、生存データを収集。EpiInfo6(version6.03)プログラムを用いてデータベース構築を行った。さらに STATA ソフトを用いて、Kaplan-Meier 生存曲線および Cox Proportional Hazard Model により、死亡と関連するリスク因子の解析を行った。

b) ランパン県病院デイケア - センターにおけるプロスペクティブコホート研究

同センターを受診するすべての感染者およびその配偶者を対象とし、平成 12 年 7 月よりリクルートを開始。インフォームド consent が得られた対象者にインタビューにより詳細な質問票記入、スタディ臨床医 (2 名) による臨床的診察、血液サンプル採取、血算・CD4 値検査等ルーチン検査、血漿・リンパ細胞・パッフィーコートの分離・凍結保存を行った。

c) HIV エピト - プ特異的 CTL による野外株 Gag タンパクの認識効率に関する研究

新規に開発された野外株 HIV Gag タンパクに対する CTL 評価系を用いて、臨床株 Gag 発現標的細胞と変異ペプチドパルスにより作製された標的細胞認識との CTL 認識比較検討を行った。CTL ラインによる認識比較は ⁵¹Cr release 法により ⁵¹Cr の放出即ち specific lysis (%) の測定により検討した。

(倫理面への配慮)

研究はすべて unlinked anonymous の手法によって行われる。研究方法による研究対象者に対する不利益について充分の説明を加え、起こりえる危険性の排除に可能なかぎりの方策をとる。またアジア各国エイズ研究機関との共同研究に関しては各国政府所轄機関の指示する倫理規程に従って遂行されている。

なお、タイ国におけるコホート研究の目的・概要については 1999 年 11 月にタイ国立衛生研究所より申請を行い、1999 年 12 月にタイ政府保健省医学研究倫理委員会における協議の後、2000 年 1 月に承認された。タイ国におけるコホート研究の目的・概要については 1999 年 11 月にタイ国立衛生研究所より申請、1999 年 12 月にタイ政府保健省医学研究倫理委員会にて協議され、2000 年 1 月に承認された。

C 研究結果

(柱 I) 「中国南西部 (雲南省) における HIV/AIDS 流行の分子疫学研究」(武部班員)

中国雲南省の 3 地域 (西部<Dehong>, 東南部<Honghe>, 東部<Wenshan>) の注射薬物乱用者 (IDUs) から 39 の HIV-1 株の分離に成功し、その遺伝学的系統関係を解析し、次のことを明らかにした。

① 雲南省東部地域 (Wenshan, Honghe 地域) では、サブタイプ B/C 間の組換え型流行株 (CRF08_BC, CRFs=circulating recombinant forms) が 81-89% を占める主要な流行株であること。

② 東部地域では、中国北西部 (新疆ウイグル自治区) における流行に関与する CRF07_BC が 5% 弱のごく少数見いだされるが、それに加えて、CRF07 が母体となって形成されたと推定される 2 次的 (あるいは第 2 世代の) 組換えウイルス (secondary or second-generation recombinants) (07-URFs, URFs=unique recombinant forms) が 2 株発見された。

③ 一方、雲南省西部 (Dehong 地域) では、他地域では全く検出されないサブタイプ B' (タイ B 型ウイルス、東南アジア地域の IDU に見いだされるサブタイプ B variant) が流行ウイルス株の約 1/3、残り 2/3 が、主にサブタイプ B'/C 間の様々なタイプの新規の組換えウイルス (URFs) であることを見出した。この知見は、ミャンマー北中部と共に雲南省西部は HIV-1 組み換えウイルスが新生するホットスポットが存在

することを示すもので、世界的に見ても極めてユニークな発見となった。

(柱 II)「HIV 感染症の免疫学／分子生物学研究に応用可能なコホート研究」(有吉班員)

a)ランパン県病院デイケアセンター受診患者のレトロスペクティブ生存解析

平成 13 年 12 月 27 日までに、計 680 名の生存解析を Cox Proportional Hazard Model を用いて完了させ、抗 HIV 薬一剤および 2 剤併用療法は無治療群に比べそれぞれ 40%、63%死亡率を低下させるという結果が得られ、CRF01_AE (サブタイプ E) 感染者における抗 HIV 薬の死亡率における影響が初めて定量的に示された。

b)ランパン県病院デイケアセンターにおけるプロスペクティブコホート研究

2000 年 7 月 6 日から徐々にリクルートを開始し、2002 年 12 月 27 日の時点で、計 680 名の感染者およびその配偶者がリクルートされた。内双方の配偶者が HIV 陽性の夫婦(concordant couple)が、89 カップル、片方が HIV 陰性の夫婦(discordant couple)が 56 カップルがリクルートされ、本コホートに基づく遺伝学的・免疫学的解析のための基盤が整備された。

c)野外株 HIV Gag タンパクの CTL エピトープ抗原提示効率の新しい評価実験系を応用して、A*0201 拘束性の p17 領域にある CTL エピトープ領域のアミノ酸変異を調べ、各々の変異株についてエピトープの細胞表面上抗原提示効率を解析した。その結果、今回解析した 4 つのエピトープ変異のうち 2 つについては、ペプチド認識がされるにもかかわらず、同じ変異エピトープを有する Gag タンパクを細胞内発現する標的細胞は全く認識されないことが示され、変異株の間で CTL エピトープ細胞表面上抗原提示効率に大きな差があることが明らかにされた(図 4)。

D 考察

①現在、アジア地域では年間 130 万人以上の感染者が発生し、サハラ以南のアフリカ地域に次ぐ地球上で最も深刻な流行地の一つとなっている。しかし、この地域の急激な流行がどのような起源のウイルス株によって形成され、またどのように拡大しているかはタイを除いては必ずしも解明は進んでいない。本研究は、とりわけ情報の乏しいアジア諸国の HIV 流行の形成のメカニズムを明らかにするものとして、その学術的また国際的な意義は大きいと考えら

れる。

①雲南省西部地域および前年度の研究で明らかにされたようにミャンマー北中部地域など、アジアと特定地域では、新型の組換えウイルスが刻々と生み出されていることが世界で始めて明らかにされた。今後、感染性分子クローンの確立などを通じて、その生物学的特性の解明を目指したいと考える。

②東南アジアで遺伝因子(HIV 感染・エイズ発症抵抗性の遺伝的背景)や免疫因子(特に CTL エピトープ認識パターン)と結びつけたコホート研究は例がない。またこの研究を通じてタイ国内の研究者育成が行われ、国際協力につながる貢献が期待されよう。

③サブタイプ E (CRF01_AE)に感染した患者群で、抗エイズ薬の生存におよぼす影響を定量化した研究は例を見ない。抗エイズ薬の延命効果を明らかにすることは、医療財政に制約のある国々における抗エイズ薬剤使用指針を考える上で非常に重要な課題と考えられる。

③CTL エピトープ変異株の間で CTL エピトープ細胞表面上抗原提示効率に顕著な差があることが見い出され、それぞれの CTL エピトープの意義を評価する際、抗原提示効率を念頭に検討することの重要性が示された。この事実はこれまで明かにされてこなかった知見で、今後の解析が注目される。

E 結論

1)中国の HIV 流行のエピセンターともいべき雲南省における HIV-1 流行の分子疫学的解析を行い、その結果、次のことが明らかにされた。

①雲南省東部地域に CRF08_BC が主に分布し、隣接する広西壮族自治区における CRF08_BC 流行との密接な関連性が明らかにされた。

②雲南省西部地域には様々なタイプの組み換えウイルスの新生するホットスポットが存在することが見い出された。

③これらの知見は、中国における流行形成のメカニズムを考察する上で重要な示唆を与えるものとなった。

2) 北タイランパンでの疫学的調査研究が進展し、次の成果が得られた。

①CRF01_AE 感染者においても、抗 HIV 薬 1 剤療法(AZT)および 2 剤療法(AZT・

DDI または AZT・DDC) は、サブタイプ B 感染者と同程度の死亡率低下効果があることが示された。

②ランパン県病院デイケア - センター受診患者およびその配偶者を対象として高い追跡率を維持したコホート研究が進展し、それをベースとする遺伝学的・免疫学的解析の基盤が整備された。

③CTL エピト - プ変異株の間で CTL エピト - プ細胞表面上抗原提示効率に顕著な差がある。従って、それぞれの CTL エピト - プの意義を評価する際、抗原提示効率を念頭に検討する必要があることが示された。

F 健康危険情報

該当する情報なし

G 研究発表

論文発表 (欧文誌)

(武部班員)

1. Kato, K., Kusagawa, S., Motomura, K., Yang, R., Shiino, T., Nohtomi, K., 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. (2001). Closely related HIV-1 CRF01_AE variants among injecting drug users in northern Vietnam: Evidence of HIV spread across the Vietnam-China border. *AIDS Res and Human Retroviruses* 17: 113-123.
2. Uno-Furuta, S., Tamaki, S., Takebe, Y., Takamura, S., Kamei, A., Kim, G., Kuromatsu, I., Kaito, M., Adachi, Y., and Yasutomi, Y. (2001). Induction of virus-specific cytotoxic T lymphocytes by in vivo electric administration of peptides. *Vaccine* 19: 2190-2196.
3. Kusagawa, S., Takebe, Y., Yang, R., Motomura, K., Ampofo, W., Brandful, J., Koyanagi, Y., Yamamoto, N., Ishikawa, K., Sata, T., Nagai, Y., and Tatsumi, M. (2001). Isolation and characterization of full-length molecular DNA clones of Ghanaian HIV-1 intersubtype A/G recombinant (CRF02_AG) which is replication-competent in restricted host-range. *AIDS Research and Human Retroviruses* 17 (7): 649-655 (2001).
4. Sato, H., Tomita, Y., Ebisawa, K., Hachiya, A., Shibamura, K., Shiino, T., Yang, R., Tatsumi, M., Gushi, K., Umeyama, H., Oka, S., Takebe, Y., and Nagai, Y. (2001). Augmentation of human immunodeficiency virus type 1 subtype E (CRF01_AE) multiple-drug resistance by insertion of a foreign 11-amino-acid fragment into the reverse transcriptase. *J. Virol.* 75 (12): 5604-5613.
5. Kuromatsu, I., Matsuo, K., Takamura, S., Kim, G., Takebe, Y., Kawamura, J., and Yasutomi, Y. (2001). Induction of effective antitumor immune responses in a mouse bladder tumor model by using DNA of an antigen from mycobacteria. *Cancer Gene Therapy* 8: 483-490 (2001).
6. The Members of WHO-UNAIDS Vaccine Advisory Committee (2001). Approaches to the development of broadly protective HIV vaccines: Challenges posed by genetic, biological and antigenic variability of HIV-1. *AIDS* 15: W1-W25.
7. Kusagawa, S., Sato, H., Tomita, Y., Tatsumi, M., Kato, K., Motomura, K., Yang, R., Nohtomi, K., and Takebe, Y. (2002). Isolation and characterization of replication-competent molecular DNA clone of CRF01_AE with different coreceptor usages. *AIDS Res and Human Retroviruses* 18 (2): 115-122.
8. Louisirrotchanakul, S., Liu, H., Roongpisuthipong, A., Nakayama, E. E., Chaiyakool, P., Sangsung, S., Takebe, Y., Shioda, T., and Wasi, C. (2001). Genetic analysis of HIV-1 discordant couples in Thailand: CCR2 641 homozygosity is associated with HIV-1 negative status. *AIDS* (in press).
9. Zhang, C., Yang, R., Xia, X., Tan, S., Dai, J., Zhang, Z., Peng, Z., Wei, T., Liu, H., Pu, D., Luo, J., Takebe, Y., and Ben, K. (2002). High prevalence of HIV-1 and HCV coinfection among injecting drug users in the southeast region of Yunnan, China. *J. AIDS* (in press).
10. Fukuda, K., Tomiyama, H., Wasi, C., Matsuda, T., Kuasagawa, S., Sato, H., Oka, S., Takebe, Y., and Takiguchi, M. (2002). Cytotoxic T cell recognition of HIV-1 cross-clade and clade-specific epitopes in HIV-1-infected Thais and Japanese patients. *AIDS* (in press).
11. Murakami, Y., Fukasawa, H., Kobatake, T., Takebe, Y., Tobiume, M., Matsuda, M.,

- and Uehara, Y. (2002). An *in vivo* high-throughput screening system for inhibitors of interaction between Nef and Hck. *Antiviral Research* (in press).
12. Yang, R., Xia, X., Kusagawa, S., Zhang, C., Ben, K., and Takebe, Y. (2002). On-going generation of multiple forms of HIV-1 intersubtype recombinants in Yunnan province of China. *AIDS* (accepted).

(有吉班員)

1. Frater AJ, Beardall A, Ariyoshi K, Chrchill D, Galpin S, Clarke JR, Weber JN, McClure MO. Impact of baselyne polymorphisms in RT and protease on outcome of highly active antiretroviral therapy in HIV-1-infected African patients. *AIDS* 2001; 15: 1493-502
2. Van der Loeff MFS, Aaby P, Ariyoshi K, Vincent T, Awasana AA, Da Costa C, Pembery L, Dias F, Harding E, Weiss HA, Whittle HC. HIV-2 does not protect against HIV-1 infection in a rural community in Guinea-Bissau. *AIDS* 2001; 15: 2303-10

論文発表 (邦文誌)

(武部班員)

1. 武部 豊. HIV-1 分類・命名法の新ガイドラインとサブタイプ分類を巡る諸問題. *ウイルス* 50 (2): 123-138. 日本ウイルス学会. 東京 (2001).
2. 武部 豊・本村和嗣. 「HIV のサブタイプとその分布」 特別企画「エイズとHIV 感染症の現状と今後の展望」(木村哲編集 総 126 頁) 10. HIV の起源とタイプ. 「カレントセラピー」19 (2): 109-115. カレントセラピー社. 東京 (2001).
3. 武部 豊. トピックス「エイズ流行: 世界の動向とその将来」. 病原微生物検出情報 Infectious Agents Surveillance Report (IASR) [<http://idsc.nih.go.jp/iasr/index-j.html>]
4. 武部 豊 (2001). HIV-1 サブタイプの世界分布: 世界流行形成のメカニズム. *日本エイズ学会雑誌 (The Journal of AIDS Research)*. 3 (3): 140-154. 日本エイズ学会. 東京.
5. 武部 豊 (2001). HIV のゲノム変異性. 特集「2001 感染症対策ストラテジー」(木村哲編集) トピックス. 総合臨

- 床 50 (10): 2686-2692. 永井書店. 大阪.
6. 武部 豊. HIV のゲノム多様性: メカニズムとその生物学的意義. 総説. *ウイルス* 51 (2): 123-133 日本ウイルス学会. 東京. (2001).
7. 佐藤裕徳, 武部 豊 (2001). HIV の変異 (総説) 「ヒトレトロウイルス研究の最前線」(山本直樹編集) HIV の変異 (総説). シュプリンガー・フェアラーク. 東京. (in press)
8. 武部 豊 (2001). HIV 感染症の分子疫学: 原理とその応用. 特集「HIV/AIDS 研究の進歩」. 60 (4): 652-661. 日本臨床社. 東京.
9. 武部 豊. (2001). HIV のゲノム多様性: メカニズムとその生物学的意義. *ウイルス* 51 (2): 123-133. 日本ウイルス学会. 東京.

学会発表

(武部班員)

1. Takebe, Y., Motomuta, K., Kusagawa, S., Lowin, H.H., and Zaw, M. (2001). Identification and characterization of multiple forms of unique HIV-1 intersubtype recombinants in Myanmar. *AIDS vaccine* 2001. (September 5-8, 2001. Philadelphia, PA, USA.).
2. 武部豊 (2001). アジアにける HIV-1 流行株のゲノム多様性: 集団におけるウイルス進化. 第 4 回白馬シンポジウムエイズ研究最前線 2001. (July 27, 2001, 白馬東急ホテル, 長野)
3. 椎野禎一郎, 蜂谷敦子, 芝村佳代, 岡慎一, 武部豊, 佐藤裕徳 (2001). HIV-1 逆転写酵素の分子進化: 分子進化的多剤耐性形質の進化過程の再構築. 第 4 回白馬シンポジウムエイズ研究最前線 2001. (July 27, 2001, 白馬東急ホテル 01). 「第 2 回熊本エイズセミナー」 (September 20-21, 2001, 熊本市)
4. 佐藤裕徳, 富田康浩, 椎野禎一郎, 蜂谷敦子, 海老沢計慶, 梅山秀明, 岡慎一, 武部豊, 永井美之 (2001). HIV-1 薬剤耐性と逆転写酵素の分子進化. 第 15 回日本エイズ学会シンポジウム.
5. 武部豊, 楊栄閣, 本村和嗣, 草川茂 (2002). HIV の世界流行に果たす組換えウイルスの役割: 共同研究集会「HIV 感染症の変貌とその対策」 (February 8, 2002, 長崎大熱帯医学研究所, Nagasaki).

6. 草川茂, 楊榮閣, 本村和嗣, Kay Thi Aye, 巽正志, 加藤佳代子, Hla Htut Lwin, Myint Zaw, Kunlong Ben, 武部豊 (2001)。ミャンマーおよび隣接する中国側国境地域における HIV-1 流行の分子疫学。第49回日本ウイルス学会 (2001.11.18-20。大阪)
 7. 伊藤優子, 松原明弘, 武部豊, 草川茂, 高村史記, 保富康宏 (2001)。HIV-1 サブタイプ E-DNA ワクチンの開発およびサブタイプ B との交差性の検討。第49回日本ウイルス学会 (2001.11.18-20。大阪)
 8. 本村和嗣, 草川茂, 巽正志, 加藤佳代子, 今村裕子, Hla Htut Lwin, Myint Zaw, 武部豊 (2001)。ミャンマーにおける HIV-1 流行形成に関わる流行株のゲノム多様性。第15回日本エイズ学会 (2001.11.29-31。東京)
 9. 楊榮閣, 草川茂, 本村和嗣, Kunlong Ben, 武部豊 (2001)。中国雲南省に流布する HIV-1 流行株の分子疫学的解析。第15回日本エイズ学会 (2001.11.29-31。東京)
 10. 松原明弘, 伊藤優子, 武部豊, 草川茂, 高村史記, 保富康宏 (2001)。サブタイプ E HIV に対する DN ワクチンの開発とサブタイプ B HIV に対する交差反応性の検討。第15回日本エイズ学会 (2001.11.29-31。東京)
 11. 森一泰, 保富康宏, 扇本真二, 武部豊, 齋藤紀子, 杉本千恵, 永井美之 (2001)。糖鎖変異 env による感染防御免疫誘導能の検討。第15回日本エイズ学会 (2001.11.29-31。東京)
 12. Takebe, Y., Yang, R., Kusagawa, S., Xia, X., Zhang, C., and Ben, K. Ongoing generation of multiple forms of HIV-1 intersubtype recombinants in China. The 14th US-Japan AIDS Panel Meeting (March 19-21, 2002. Seattle, USA)
2. P Pathipvanich, K Ariyoshi, A Rojanawiwat, S Wongchoosie, P Yingsaree, P Warachit, P Sawanpanyalert. The influence of anti-retroviral drug therapy on the mortality of HIV-1 infected patients attending a single clinic in northern Thailand. Sixth International Conference on AIDS in Asia and the Pacific. October 5-10, 2001.
 3. L Myint, K Ariyoshi, AJ Frater, M Matsuda, A Okano, T Chiba, H Abumi, K Yamada, W Auwanit, P Pathipvanich, W Sugiura. Detection of M41L and K70R AZT resistant mutations in subtype E HIV-1 by Mutagenically Separated PCR. Sixth International Conference on AIDS in Asia and the Pacific. October 5-10, 2001.
 4. W Sugiura, M Matsuda, H Miura, K Yamada, K Ariyoshi. Genotypes related to nelfinavir resistance in subtype E infection differ from subtype B in Japan. Sixth International Conference on AIDS in Asia and the Pacific. October 5-10, 2001.

H 知的財産権の出願・登録状況

(武部班員)

1. 「リボザイム発現系」(平成13年3月出願)(感染研エイズ研究センター協力研究員 大川淳博士と共同出願)
2. 「感染性 HIV ゲノムをコードする DNA」(平成13年6月出願)(感染研エイズ研究センター 佐藤裕徳博士他10名と共同出願)

(有吉班員)

該当なし

(有吉班員)

- 1 三浦秀佳、横幕能行、建石幸子、後藤

分担研究報告書

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
平成 13 年度分担研究報告書

中国南西部（雲南省）の HIV 流行の分子疫学

主任研究者： 武部 豊（国立感染症研究所エイズ研究センター）
協力研究者： 楊 栄閣、草川 茂、加藤佳代子（国立感染症研究所）
Kunlong Ben（中国科学院昆明動物学研究所）

研究要旨

中国における HIV-1 流行の起震地 (epicenter) と考えられる中国南西部（雲南省）における HIV 流行の分子疫学的解析を行い、その結果、① 雲南省東部では CRF08_BC が IDUs の 80-90% を占める最も主要な流行株であり、隣接する広西省における流行形成と密接な関係があること。② 一方、雲南省西部では、他地域に見られないサブタイプ B' が約 1/3 を占めるが、残りの 2/3 は、相互に異なる構造をもつ多様な組換えウイルスであることを明らかにした。これらの知見は、雲南省西部に、新たな組換えウイルスの新生するホットスポットが存在することを意味しており、この地域を標的とするワクチン設計・開発に重要な示唆を与えるものと考えられる。

A 研究目的とその背景

中国は、アジア地域の中でも今後 HIV 流行の急速な拡大が最も懸念されている地域である。その中でも中国南西部の雲南省は、中国における HIV 流行の起震地と考えられ、この地域から中国全土へと流行が急速に拡大している。しかしそのような重要性にも関わらず、分布するウイルス流行株に関する研究は殆どなされていない現状にある。そこで我々は、中国における流行のエピセンターともいべき雲南省に分布する HIV-1 株の分子疫学的解析を開始し、その全容を解明しようとする。

B 研究方法

- ①雲南省の西部 (Dehong) 東南部 (Honghe) 東部 (Wenshan) の 3 地域において収集された注射薬物乱用者 (IDUs) (同意者) 血液から、健常者 PBMCs との共培養法によって HIV-1 株を分離した。
- ②血漿あるいはウイルス培養液上清の *env* (C2/V3) (324 bp) および、*gag* (p17)-RT (2.6 kb) 領域を RT-nested-PCR 法によって増幅させ、塩基配列を cycle sequencing 法によって決定した。
- ③得られた塩基配列と標準株の塩基配列とのアライメントをもとに、近隣結合法による系統樹を作成し、遺伝子型 (サブタイプ) の決定を行った。
- ④遺伝子組み換えゲノムが疑われる検体については、さらにアクセサリー遺伝子領域の塩基配列を決定し、diversity plot および、bootscanning 法によって組み換え点の検索を行った。

(倫理面への配慮)

研究はすべて unlinked anonymous の手法によって行われた。研究方法による研究対象者に対する不利益について充分の説明を加え、起こりえる危険性の排除に可能なかぎりの方策をとった。またアジア各国エイズ研究機関との共同研究に関しては各国政府所轄機関の指示する倫理規程に従って遂行されている。

C 研究結果

中国雲南省の 3 地域の注射薬物乱用者 (IDUs) から 39 の HIV-1 株の分離に成功し、2.6-kb *gag* (p17)-RT および 324-bp *env* (C2/V3) の塩基配列に基づいて遺伝子型の決定を行った結果、次のことが明らかにされた (表 1, 図 1)。

- ①雲南省東部地域 (Wenshan および Honghe) の IDU 間では、サブタイプ B/C 間の組換え型流行株 (CRF08_BC, CRFs=circulating recombinant forms) が 81-89% を占める主要な流行株であること。
- ②同地域では、中国北西部 (新疆ウイグル自治区) における流行に関与する CRF07_BC が 5% 弱のごく少数見出されるが、それに加えて、CRF07_BC のもつ組み換え点のいくつかを共用する、おそらく CRF07 が母体となって形成されたと推定される 2 次的 (あるいは第 2 世代の) 組換えウイルス (secondary or second-generation recombinants) (07-URFs, URFs=unique recombinant forms) が 2 株 (HH086, HH069) 発見された (図 2C)。
- ③一方、雲南省西部 (Dehong 地域) では、

他地域では全く検出されないサブタイプ B' (タイ B 型ウイルス、東南アジア地域の IDU に見い出されるサブタイプ B variant) が約 1/3 の感染者に検出された (表 1)。

しかし、驚くべきことに、残り 2/3 は、主にサブタイプ B'/C 間の多様な組換えウイルス (unique recombinant forms, URFs) であった (図 2 D)。

D 考察

これらの知見は、先の研究で明らかにしたようにミャンマー北中部と共に、雲南省西部に HIV-1 組換えウイルスが新生するホットスポットが存在することを示唆する (図 3)。すなわち、アジアの特定地域では、新型の組換えウイルスが刻々と生み出されているという世界的に見ても極めてユニークな流行状況が明らかにされた。

また、すでに発生した組換えウイルスがさらに他系統のウイルスと 2 次的な遺伝子組換えを起こしていることが示された。

次々と組換えウイルスが生成している事実は、将来のワクチン開発に新たな困難があることを示すものと考えられる。

また母体となるウイルスに比べ組換えウイルスがどのような生物学的優位性を獲得しているのか、今後の重要な研究課題の一つと考えられる。

今後、完全長の塩基配列の決定、感染性分子クローンの確立などを通じて、その生物学的特性の解明を目指したいと考える。

E 結論

中国の HIV 流行のエピセンターともいえるべき雲南省における HIV-1 流行の分子疫学的解析を行い、その結果、

1) 雲南省東部地域に CRF08_BC が主に分布し、隣接する広西壮族自治区における CRF08_BC 流行との密接な関連性が明らかにされた。

2) 雲南省西部地域には様々なタイプの組換えウイルスの新生するホットスポットが存在することが見い出された。

3) これらの知見は、中国における流行形成のメカニズムを考察する上で重要な示唆を与える。

F 健康危険情報

該当する情報なし

G 研究発表

1) 論文発表 (2001-2002)

1. Kato, K., Kusagawa, S., Motomura, K., Yang, R., Shiino, T., Nohtomi, K., 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. (2001). Closely related HIV-1 CRF01_AE variants among injecting drug users in northern Vietnam: Evidence of HIV spread across the Vietnam-China border. *AIDS Res and Human Retroviruses* 17: 113-123.
2. Uno-Furuta, S., Tamaki, S., Takebe, Y., Takamura, S., Kamei, A., Kim, G., Kuromatsu, I., Kaito, M., Adachi, Y., and Yasutomi, Y. (2001). Induction of virus-specific cytotoxic T lymphocytes by in vivo electric administration of peptides. *Vaccine* 19: 2190-2196.
3. Kusagawa, S., Takebe, Y., Yang, R., Motomura, K., Ampofo, W., Brandful, J., Koyanagi, Y., Yamamoto, N., Ishikawa, K., Sata, T., Nagai, Y., and Tatsumi, M. (2001). Isolation and characterization of full-length molecular DNA clones of Ghanaian HIV-1 intersubtype A/G recombinant (CRF02_AG) which is replication-competent in restricted host-range. *AIDS Research and Human Retroviruses* 17 (7): 649-655 (2001).
4. Sato, H., Tomita, Y., Ebisawa, K., Hachiya, A., Shibamura, K., Shiino, T., Yang, R., Tatsumi, M., Gushi, K., Umeyama, H., Oka, S., Takebe, Y., and Nagai, Y. (2001). Augmentation of human immunodeficiency virus type 1 subtype E (CRF01_AE) multiple-drug resistance by insertion of a foreign 11-amino-acid fragment into the reverse transcriptase. *J. Virol.* 75 (12): 5604-5613.
5. Kuromatsu, I., Matsuo, K., Takamura, S., Kim, G., Takebe, Y., Kawamura, J., and Yasutomi, Y. (2001). Induction of effective antitumor immune responses in a mouse bladder tumor model by using DNA of an antigen from mycobacteria. *Cancer Gene Therapy* 8: 483-490 (2001).
6. The Members of WHO-UNAIDS Vaccine Advisory Committee (2001). Approaches to the development of broadly protective HIV vaccines: Challenges posed by genetic, biological and antigenic variability of HIV-1. *AIDS* 15: W1-W25.

7. Kusagawa, S., Sato, H., Tomita, Y., Tatsumi, M., Kato, K., Motomura, K., Yang, R., Nohtomi, K., and Takebe, Y. (2002). Isolation and characterization of replication-competent molecular DNA clone of CRF01_AE with different coreceptor usages. *AIDS Res and Human Retroviruses* 18 (2): 115-122.
8. Louisirirothanakul, S., Liu, H., Roongpisuthipong, A., Nakayama, E. E., Chaiyakool, P., Sangsung, S., Takebe, Y., Shioda, T., and Wasi, C. (2001). Genetic analysis of HIV-1 discordant couples in Thailand: CCR2 64I homozygosity is associated with HIV-1 negative status. *AIDS* (in press).
9. Zhang, C., Yang, R., Xia, X., Tan, S., Dai, J., Zhang, Z., Peng, Z., Wei, T., Liu, H., Pu, D., Luo, J., Takebe, Y., and Ben, K. (2002). High prevalence of HIV-1 and HCV coinfection among injecting drug users in the southeast region of Yunnan, China. *J. AIDS* (in press).
10. Fukuda, K., Tomiyama, H., Wasi, C., Matsuda, T., Kuasagawa, S., Sato, H., Oka, S., Takebe, Y., and Takiguchi, M. (2002). Cytotoxic T cell recognition of HIV-1 cross-clade and clade-specific epitopes in HIV-1-infected Thais and Japanese patients. *AIDS* (in press).
11. Murakami, Y., Fukasawa, H., Kobatake, T., Takebe, Y., Tobiume, M., Matsuda, M., and Uehara, Y. (2002). An *in vivo* high-throughput screening system for inhibitors of interaction between Nef and Hck. *Antiviral Research* (in press).
12. Yang, R., Xia, X., Kusagawa, S., Zhang, C., Ben, K., and Takebe, Y. (2002). On-going generation of multiple forms of HIV-1 intersubtype recombinants in Yunnan province of China. *AIDS* (accepted).

2) 和文論文

1. 武部 豊. HIV-1 分類・命名法の新ガイドラインとサブタイプ分類を巡る諸問題. *ウイルス* 50 (2): 123-138. 日本ウイルス学会. 東京 (2001).
2. 武部 豊・本村和嗣. 「HIV のサブタイプとその分布」 特別企画「エイズとHIV 感染症の現状と今後の展望」(木村哲編集 総 126 頁) 10. HIV の起源とタイプ. 「カレントセラピー」 19 (2): 109-115. カレントセラピー社. 東京

- (2001).
3. 武部 豊. ケモカイン受容体とエイズ発症機構を巡る最新知見. 別冊・医学のあゆみ「7回膜貫通型受容体研究の新展開」(佐藤公道・赤池昭紀編集 総 278 頁)II: 7回膜貫通型受容体と疾患・創薬研究 節: ケモカイン受容体. 第 50 章. (分担) pp. 261-268. 医歯薬出版. 東京. (2001).
4. 武部 豊. ウイルス感染とケモカイン. ケモカインの基礎と臨床 (松島綱治編集) 基礎 第 10 章. 現代医療 33 (6): 現代医療社. 東京 (2001).
5. 武部 豊. トピックス「エイズ流行: 世界の動向とその将来」. 病原微生物検出情報 Infectious Agents Surveillance Report (IASR) [http://idsc.nih.gov/iasr/index-j.html]
6. 武部 豊 (2001). HIV-1 サブタイプの世界分布: 世界流行形成のメカニズム. 日本エイズ学会雑誌 (The Journal of AIDS Research). 3 (3): 140-154. 日本エイズ学会. 東京.
7. 武部 豊 (2001). HIV のゲノム変異性. 特集「2001 感染症対策ストラテジー」(木村哲編集) トピックス. 総合臨床 50 (10): 2686-2692. 永井書店. 大阪.
8. 武部 豊 (2001). エイズウイルス. セミナー「エイズ 2001-2002」感染症 31 (6): 33-39 藤沢薬品工業. 大阪.
9. 武部 豊. HIV のゲノム多様性: メカニズムとその生物学的意義. 総説. *ウイルス* 51 (2): 123-133 日本ウイルス学会. 東京. (2001).
10. 佐藤裕徳, 武部 豊 (2001). HIV の変異 (総説)「ヒトレトロウイルス研究の最前線」(山本直樹編集) HIV の変異 (総説). シュプリングー・フェアラー. 東京. (in press)
11. 武部 豊 (2001). HIV 感染症の分子疫学: 原理とその応用. 特集「HIV/AIDS 研究の進歩」. 60 (4): 652-661. 日本臨床社. 東京.
12. 武部 豊. (2001). HIV のゲノム多様性: メカニズムとその生物学的意義. *ウイルス* 51 (2): 123-133. 日本ウイルス学会. 東京.

学会発表その他

1. Takebe, Y., Motomura, K., Kusagawa, S., Lowin, H.H., and Zaw, M. (2001). Identification and characterization of multiple forms of unique HIV-1 intersubtype

- recombinants in Myanmar. AIDS vaccine 2001. (September 5-8, 2001. Philadelphia, PA, USA.).
2. 武部豊(2001). アジアにおける HIV-1 流行株のゲノム多様性：集団におけるウイルス進化. 第4回白馬シンポジウムエイズ研究最前線 2001. (July 27, 2001, 白馬東急ホテル, 長野)
 3. 椎野禎一郎, 蜂谷敦子, 芝村佳代, 岡慎一, 武部豊, 佐藤裕徳 (2001). HIV-1 逆転写酵素の分子進化：分子進化的多剤耐性形質の進化過程の再構築. 第4回白馬シンポジウムエイズ研究最前線 2001. (July 27, 2001, 白馬東急ホテル01). 「第2回熊本エイズセミナー」 (September 20-21, 2001, 熊本市)
 4. 佐藤裕徳, 富田康浩, 椎野禎一郎, 蜂谷敦子, 海老沢計慶, 梅山秀明, 岡慎一, 武部豊, 永井美之 (2001). HIV-1 薬剤耐性と逆転写酵素の分子進化. 第15回日本エイズ学会シンポジウム.
 5. 武部豊, 楊栄閣, 本村和嗣, 草川茂 (2002). HIV の世界流行に果たす組換えウイルスの役割：共同研究集会「HIV 感染症の変貌とその対策」 (February 8, 2002, 長崎大熱帯医学研究所, Nagasaki).
 6. 草川茂, 楊栄閣, 本村和嗣, Kay Thi Aye, 巽正志, 加藤佳代子, Hla Htut Lwin, Myint Zaw, Kunlong Ben, 武部豊 (2001). ミャンマーおよび隣接する中国側国境地域における HIV-1 流行の分子疫学. 第49回日本ウイルス学会 (2001.11.18-20. 大阪)
 7. 伊藤優子, 松原明弘, 武部豊, 草川茂, 高村史記, 保富康宏 (2001). HIV-1 サブタイプ E-DNA ワクチンの開発およびサブタイプ B との交差性の検討. 第49回日本ウイルス学会 (2001.11.18-20. 大阪)
 8. 本村和嗣, 草川茂, 巽正志, 加藤佳代子, 今村裕子, Hla Htut Lwin, Myint Zaw, 武部豊 (2001). ミャンマーにおける HIV-1 流行形成に関わる流行株のゲノム多様性. 第15回日本エイズ学会 (2001.11.29-31. 東京)
 9. 楊栄閣, 草川茂, 本村和嗣, Kunlong Ben, 武部豊 (2001). 中国雲南省に流布する HIV-1 流行株の分子疫学的解析. 第15回日本エイズ学会 (2001.11.29-31. 東京)
 10. 松原明弘, 伊藤優子, 武部豊, 草川茂, 高村史記, 保富康宏 (2001). サブタイプ E-HIV に対する DN ワクチンの開発とサブタイプ BHIV に対する交差反応性の検討. 第15回日本エイズ学会 (2001.11.29-31. 東京)
 11. 森一泰, 保富康宏, 扇本真二, 武部豊, 齋藤紀子, 杉本千恵, 永井美之 (2001). 糖鎖変異 env による感染防御免疫誘導能の検討. 第15回日本エイズ学会 (2001.11.29-31. 東京)
 12. Takebe, Y., Yang, R., Kusagawa, S., Xia, X., Zhang, C., and Ben, K. Ongoing generation of multiple forms of HIV-1 intersubtype recombinants in China. The14th US-Japan AIDS Panel Meeting (March 19-21, 2002. Seattle, USA)
- H 知的財産権の出願・登録状況
1. 「リボザイム発現系」(平成13年3月出願)
(感染研エイズ研究センター協力研究員 大川淳博士と共同出願)
 2. 「感染性 HIV ゲノムをコードする DNA」(平成13年6月出願)
(感染研エイズ研究センター 佐藤裕徳博士他10名と共同出願)

Table 1. Distribution of Subtypes and CRF Clades in Yunnan Province of China

Location	Risk factor	Number Subtyped	B'	C	CRF01_AE	CRF07_BC	CRF08_BC	URFs ^a		
								Total	07-URF ^b	Other
Kunming (Central)	STD	7	4 (57.1%)	0	1 (14.3%)	1 (14.3%)	1 (14.3%)	0	0	0
Wenshan (East)	IDU	9	0	0	0	1 (11.1%)	8 (88.9%)	0	0	0
Honghe (Southeast)	IDU	16	0	0	0	1 (6.2%)	13 (81.3%)	2 (12.5%)	2	0
Dehong (West)	IDU	14	4 (28.6%)	0	0	0	0	10 (71.4%)	0	9
IDU Total		39	4 (10.3%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	2 (5.1%)	21 (53.9%)	12 (30.8%)	2	9

^aUnique recombinant forms

^bCRF07_BC related unique recombinant form

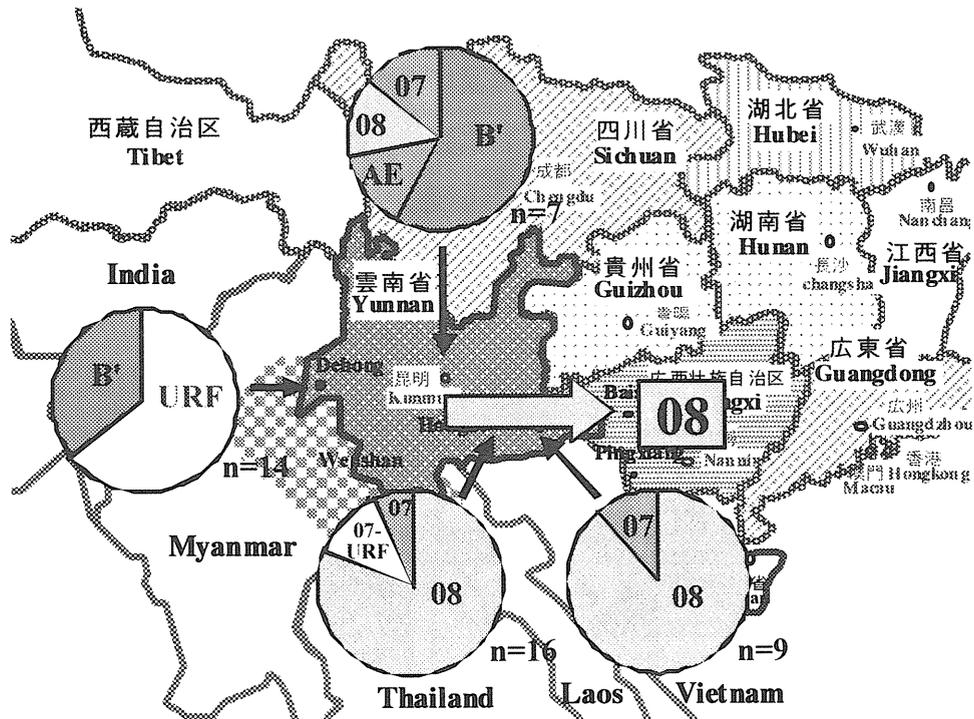


図 1. 雲南省各地域の IDU における HIV-1 サブタイプ分布
 昆明のデータは 1994-97 に収集された STD 患者血清に基づく。07, CRF07_BC;
 08, CRF08_BC; URF, unique recombinant form; 07-URF, CRF07_BC-related URF

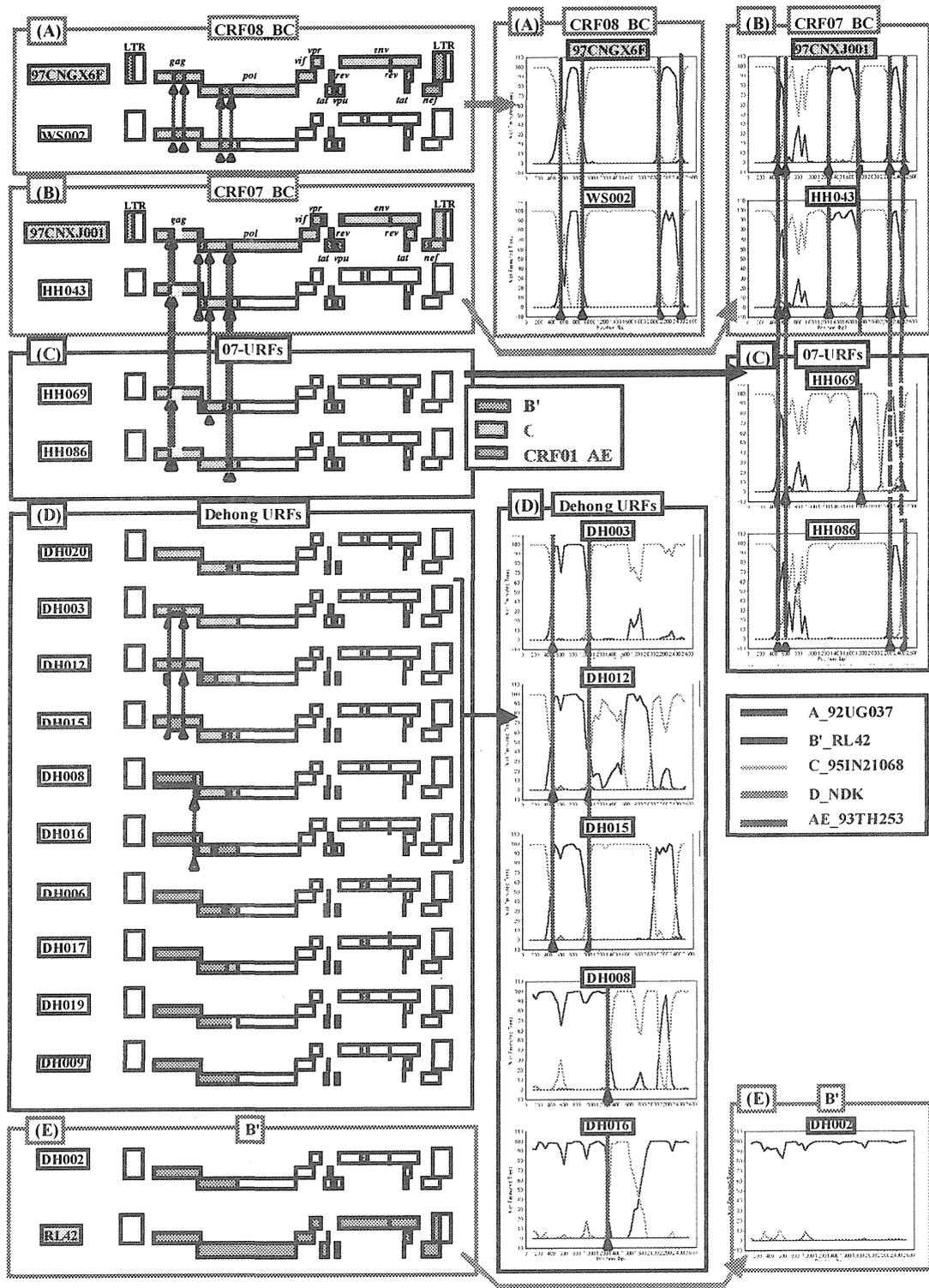


図 2. 雲南省各地域に見い出される HIV-1 のサブタイプ構造と 2.6-kb gag-RT 領域の boot scanning plot
 (A) CRF08_BC; (B) CRF07_BC; (C) CRF07_BC-related unique recombinant forms (07-URF); (D) Dehong URFs

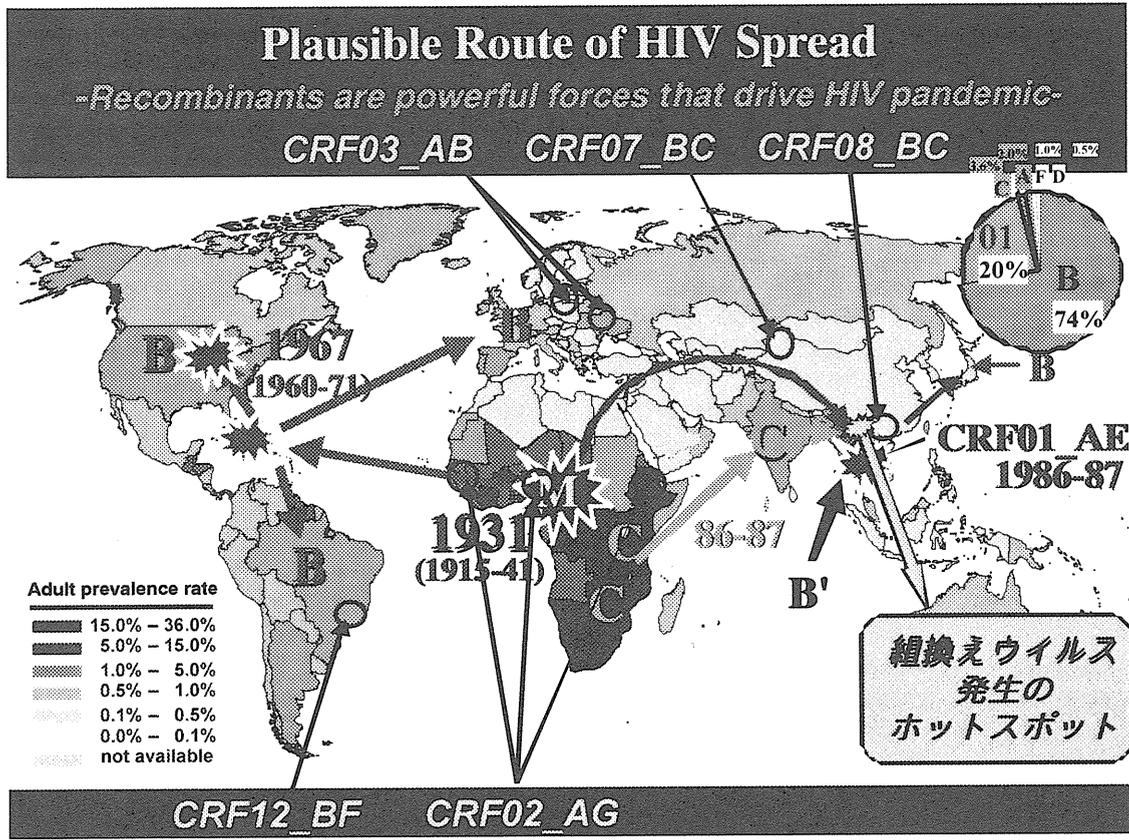


図3. アジアにおける HIV-1 組み換えウイルス発生のホットスポット

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
平成 13 年度分担研究報告書

HIV 免疫学・遺伝学的研究に応用可能なコホート研究の開発

分担研究者：有吉紅也 国立感染症研究所エイズ研究センター主任研究官

協力研究者：三浦秀佳、横幕能行（国立感染症研究所）、Pathom Sanwayanwalert（タイ国立衛生研究所所長）、Panita Pavatit（ランパン県病院院長補佐）

研究要旨

HIV・エイズの病原性を探求する上で、宿主・病原体の相互関係を解明することは不可欠である。平成 12 年 7 月 6 日より、タイ国立衛生研究所（NIH）とランパン県病院との共同で、ランパン県病院エイズ専門外来（デイケアセンター）受診患者およびその配偶者を対象に、免疫学・遺伝学的研究に応用可能なコホート研究を開始した。平成 13 年度においても、引き続きリクルートを継続、参加者の追跡を行った。その結果、平成 13 年 12 月 27 日までに、計 680 名（88 名の抗 HIV 抗体陰性配偶者を含む）がコホートに参加、12 ヶ月で 90%以上の追跡率が維持された。加えて、平成 13 年 7 月 12 日までの 1 年間に参加したコホート参加者のデータ・ベース構築を行い、断面的解析を可能にした。また、同外来受診感染者を対象にしたレトロスペクティブ研究の生存解析を Cox Proportional Hazard Model を用いて完了させ、抗 HIV 薬一剤および 2 剤併用療法は無治療群に比べそれぞれ 40%、63%死亡率を低下させるという結果が得られ、CRF01 AE（サブタイプ E）感染者における抗 HIV 薬の死亡率における影響を始めて定量的に示した。

本邦においては、細胞障害性 T-リンパ細胞（CTL）に焦点を絞り、昨年度確立された野外株 HIV Gag タンパクの CTL エピトープ抗原提示効率の新しい評価実験系を応用して、A*0201 拘束性の p17 領域にある CTL エピトープ領域のアミノ酸変異を調べ、各々の変異株についてエピトープの細胞表面上抗原提示効率を探求した。その結果、今回調べた 4 つのエピトープ変異のうち 2 つについては、ペプチド認識がされるにもかかわらず、同じ変異エピトープを有する Gag タンパクを細胞内発現する標的細胞は全く認識されないという結果が得られ、変異株の間で CTL エピトープ細胞表面上抗原提示効率に大きな差があることを示した。このことは、それぞれの CTL エピトープの意義を評価する際、抗原提示効率を念頭に検討することの重要性を示す。

A 研究目的

HIV・エイズ病原性を探求する上で、宿主・病原体相互関係を解明することは不可欠である。この場合、ホスト側の重要な因子として感染者の有する抗 HIV 免疫やホスト遺伝因子が挙げられるが、それぞれの免疫学的あるいは遺伝学的因子と免疫不全の進行速度との関連を探る際、対象患者の選択方法、対象患者の人口統計学的・臨床的背景情報が明確な、しかも追跡率の高いコホート研究が必須である。そこで、本分担研究では、タイ国立衛生研究所（NIH）とランパン県病院との共同で、ランパン県病院エイズ専門外来（デイケアセンター）受診患者を対象に、免疫学・遺伝学的研究に応用可能なコホート研究を開始・継続させ、さらには免疫学・遺伝学的研究に活用させて行くことを目的とした。また本邦においては、細胞障害性 T-リンパ細胞（CTL）に焦点を絞り、野外株 HIV Gag タンパク

の CTL エピトープ抗原提示効率を評価する実験系を確立させ、将来的にタイのコホート患者の宿主・ウイルス相互関係の解明に役立てることを目的とした。

B 研究方法

a) ランパン県病院デイケアセンター受診患者のレトロスペクティブ生存解析

ランパン県病院は、病床数約 800、1 日外来患者総数約 1,400、約 80 名の医師と 600 名の看護婦を擁する北タイランパン県の中核病院である。昨年度行ったレトロスペクティブ研究にて、同病院 HIV/エイズ専門外来（デイケアセンター）へ 1995 年 10 月 2 日から 1999 年 10 月 31 日までに受診した HIV 感染者を対象に人口統計学的データ、臨床データ、生存データを収集、EpiInfo6(version6.03)プログラムを用いてコンピューター double entry 入力・データベース構築を行った。本年度は、さらに STATA

ソフトを用いて、Kaplan-Meier 生存曲線および Cox Proportional Hazard Model により、死亡と関連するリスク因子の解析を行った。

b) ランパン県病院デイケア - センターにおけるプロスペクティブコホート研究

このコホート研究では、可能な限り参加患者のバイアスを減らす為にランパン県病院デイケア - センターを受診するすべての感染者およびその配偶者を対象にした。またより多くの HIV に感染した夫婦の参加を促す為に、コホート研究開始に先だて、ランパン県にある 17 の患者支援団体から協力を呼びかけた。

昨年度の平成 12 年 7 月 6 日よりリクルートが開始、具体的研究活動としては、研究目的・概要を説明、インフォームドコンセントフォームへ署名したのからスタディ調整員がインタビューにより詳細な質問票記入、スタディ臨床医 (2 名) による臨床的診察、血液サンプル採取、血算・CD4 値検査等ルーチン検査、血漿・リンパ細胞・バツフィーコート分離・凍結保存を行った。さらに、配偶者を同伴したカップルについては全例、配偶者を同伴しなかった感染者からも CD4 値が 200 以上のものを優先的に選択し、積極的追跡を行った。即ち 3 ヶ月毎の臨床的診察、追跡用質問票記入、6 ヶ月毎の血液採取、コホート参加時と同様の検査・検体処理を行い、定期的検診に訪れなかった感染者については、手紙ないしは電話で感染者と直接連絡した。その他の感染者については、予算上および時間的制約から、細かな情報収集はコホート参加時のみに行い、生存率のみの追跡を行うことにした。

本年度は、これらコホート患者のコホート研究参加時の断面的解析を行う為、収集した人口統計学的、臨床的、性行動などに関するデータや血液検査結果をコンピュータ入力する為のプログラムを access により作製、平成 12 年 7 月 6 日から平成 13 年 7 月 12 日までに参加した者の基礎データをコンピューターへ double entry 入力、予備的解析を行った。また、コホート参加時の血漿中 HIV-1 RNA ウイルス量をアンプリコアー HIV-1 モニター (v1.5) キットにて測定した。

c) HIV エピト - プ特異的 CTL による野外科株 Gag タンパクの認識効率に関する研究

昨年度までの研究で、臨床株 HIV Gag タンパクの CTL 認識エピト - プ抗原の細胞表面上抗原提示効率を調べる為に、臨床

株 Gag タンパクを発現できる HIV-1 ベクターを構築、VSV-G pseudo-typed virion 形成により、ヒト B リンパ細胞へ形質導入・タンパク発現させ、CTL の標的とするシステムを確立した。本年度は、岩本愛吉教授の協力を得て、サブタイプ B に感染した東大医科学研究所付属病院通院感染者から採取された末梢血単核細胞より gag クローン 11 例を作製、シーケンスによりストップコドンのないことが確認された 7 クローンについて、それら Gag タンパクを発現する標的細胞を新しく確立されたシステムにより作製、p17 領域 A*0201 拘束性 CTL エピト - プ “SLYNAVATL” によって刺激誘導した CTL ラインを用いて、臨床株 Gag 発現標的細胞と変異ペプチドパルスにより作製された標的細胞認識との CTL 認識比較検討を行った。CTL ラインによる認識比較は 51Cr release 法により 51Cr の放出即ち specific lysis (%) の測定により検討した。

(倫理面への配慮)

尚タイ国におけるコホート研究の目的・概要については 1999 年 11 月にタイ国立衛生研究所より申請、1999 年 12 月にタイ政府保健省医学研究倫理委員会にて協議され、2000 年 1 月に承認された。

C 研究結果

a) ランパン県病院デイケア - センター受診患者のレトロスペクティブ生存解析

1995 年 10 月 2 日より 1999 年 10 月 31 日までに、同センターを受診した感染者 1,110 名の生存解析を行った結果、1,081 (97%) 名の生存期間について情報収集可能であった。その結果、合計 1251 person - year - observation (PYO) の生存期間が観察され、中央値 (Inter-quartile range; IQR) 追跡期間は、284 (113, 609) 日であった。表 1 に、各リスク因子と死亡率との比較、また Cox Proportional Hazard Model によって解析された各リスク因子を補正した後の hazard ratio 結果をまとめた。CD4 が 100 以下の群で、死亡率が 77/100PYO と非常に高い事が判明した。Univariate 解析によると、解析したすべてのリスク因子と死亡率との間に有意な関連が認められたが、multivariate 解析によると、死亡率と独立した関連があったのは、登録した年が 1999 年以降の群、臨床的に有症候の群、初期 CD4 値、抗 HIV 薬の治療有無であった。性別および年齢群については、死亡率との間に独立した関係は認められなかった。他のリスク因子を補正後の抗 HIV 薬 1 剤療法 (AZT 単独) の