

厚生労働科学研究費補助金

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14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者

武 部 豊

平成15（2003）年3月

厚生労働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	-11-
「中国南西部（雲南省）における HIV 流行の分子疫学：2種の組換え型流行株（CRF07_BC および CRF08_BC）からなる新しいクラスの HIV-1 組換えウイルスの同定」	
有吉 紅也	-16-
「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」	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-25-
IV. 研究成果の刊行物・別刷り	-27-

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）
（H14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／分子生物学研究に応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バ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・遺伝学的研究に応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2つの柱の研究を推進する。

(柱 I)「アジアにおけるエイズ流行の分子疫学およびアジア型 HIV-1 ヴァリエントに関するウイルス学的研究」（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。UNAIDS は6月に出した緊急報告書の中で、中国におけるエイズ感染爆発の危機を「Titanic Peril（迫り来る巨大危機）」と形容しているが、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、中国における巨大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行い、その全容解明を目指した。またアジアの流行の中で、その重要性が急速に増しつつある中国型 HIV-1 variants の感染性分子クローンの分離を含む、アジア型 HIV-1 ヴァリエントに関するウイルス学的解析を進めると

共に、我が国における HIV の遺伝学的サーベイを引き続き継続し、我が国における HIV 感染症の新規動向の把握に努める。

(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 伝播機序・エイズ病態生理について深く探求する為には、詳細な情報を有する充分数の HIV-1 感染者群を継時的に追跡、解析する必要がある。そこで、タイ北部ランパン県にて、HIV 感染した夫婦を対象としたコホート研究を開発・維持し、得られた患者検体を免疫学的・遺伝学的研究に応用させることを目的とした。

B 研究方法

(柱 I)「分子疫学・ウイルス学研究」 (武部班員)

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。ほぼ完全長の HIV-1 ゲノムをクローニングして、全塩基配列を決定し、系統樹解析および組換え点解析プログラムによって、系統関係、組換え構造を詳細に検討した。②また中国の代表的流行株に関して感染性クローンの分離を行った。③また同様な解析を国内検体を用いて進めた。

(柱 II)「コホート研究」 (有吉班員)

①ランパン県病院 HIV 専門外来にて、同外来受診者全員を対象にリクルートし、特に HIV 感染した夫婦は、3ヶ月毎追跡、6ヶ月毎に血液検体分離・保存、患者情報のコンピューター二重入力、検証を行った。②コホート検体を用いて HIV 伝播・エイズ病態に関連する遺伝子領域における SNIP を PCR-RFLP により、また、HLA Class I アレルを PCR-MPH (Microtiter plate hybridization) 法により解析、患者データと比較検討した。③CRF01_AE(サブタイプ E) Gag 領域内にある CTL エピト-プの同定を試みる為に、サブタイプ B で報告された A*0201, A11, A24 拘束性 Gag CTL エピト-プ領域における CRF01_AE 株の変異パターンをデータ・ベースにて検索、それに相応

する合成ペプチドを作成し、Elispot Assay を行った。④新しく開発された VSVG 偽粒子・env 欠損 HIV ベクターを用いて、本邦 HIV 感染者の A24 拘束性野外株 Gag タンパク中の CTL エピト-プ抗原発現に関する研究を進めた。また、ランパン HIV コホート検体より、野外株 Gag・Pol を PCR 増幅・クローニングし、CRF01 由来 Gag/Pol タンパクを発現する CTL 標的細胞作成を試みた。

(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。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た。なお、タイ国におけるコホート研究は、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 月に承認済であり、すべてのコホート参加者から、サイン入り同意書が得られている。

C 研究結果

(柱 I)「分子疫学・ウイルス学研究」 (武部班員)

①昨年度、中国雲南省東南部 (図 1) に見出した帰属不明の組換えウイルス (HH069 と HH086) の全塩基配列を決定し、組換え構造の詳細な解析を行った。その結果、これらが中国に分布する第 1 世代の組換え型流行株 (CRF07_BC と CRF08_BC) 間の 2 次的な遺伝子組換えによって生まれた第 2 世代の組換えウイルスであることを明らかにした (図 2)。これは世界で最初の発見例である。われわれは、この新しいクラスの組換えウイルスを inter-CRF recombinant (ICR_07/08) と命名した。

②このタイプのウイルスの疫学的重要性を明らかにするために、雲南省の IDU から得られた 57 検体をスクリーニングした結果、同様な組換え構造をもつウイルスをさらに 3 株同定し、このタイプの新規組換えウイルスが、雲南省の IDU 由来の検体に相当の割合 (8.8%, 5/57) で見いだされることを明らかにした。一般に新種の組換え型流行株が認められるには、少なくとも 2 例の疫学的に独立な (epidemiologically-unlinked) 感

染者からの（ほぼ）完全長の塩基配列と1例以上の部分配列が必要であるが、ICR_07/08はそれ自身が組換え型流行株としての資格を満たしていることから、新たにCRF16_07/08という名称を提唱している(Los Alamos HIV sequence Databaseに申請・登録中である) (図2)。

③一方、昨年度報告したように雲南省西部(Dehong地域)に分布するウイルスの2/3は、多様な構造をもつ組換えウイルス(URFs)であり、ミャンマー北中部と共に雲南省西部にHIV-1サブタイプ間組換えウイルスが新生するホットスポット(図3)が存在することを明らかにしたが、現在、さらに中国型HIV-1組換えウイルスのプロトタイプ株を求めて、その詳細な構造解析が進行中である。

④CRF08_BCに関する感染性分子クローンの分離に世界ではじめて成功し(図4)、そのウイルス学的・遺伝子構造上の性質の詳細な検討を進めている。また将来のワクチン開発を視野に入れ、それをを用いた様々な研究試薬の開発に着手しつつある。

⑤国立国際医療センターの岡先生との共同研究により、最初のHIV-2国内株(00JP-IMCJ/KR020)の分離に成功し、その全塩基配列を決定した。その結果、このウイルスがアジア地域で最初のHIV-2サブタイプB株であることを明らかにした。本症例は長期に我が国に在住する韓国籍男性であり、韓国あるいは日本での異性間接触によって感染したと推定される例である(図5)(厚生労働省健康危険情報通報10/2/02発令)。

(協力班員 国立感染研エイズ研究センター 草川茂主任研究官の協力による)

(柱II)「コホート研究」(有吉班員)

①2000年7月より2002年11月30日までに、計894名が本コホートへ参加、うち夫婦双方がHIVに感染したConcordant coupleが120組、一方のみが感染しているDiscordant coupleが75組であった。540名については、3ヶ月毎の追跡を行った結果、追跡率は93%で、104名が死亡した。また、コホート参加者のカウンセリングおよびコンドームの配布を行ってきたが、3例の抗HIV抗体の陽

転化が見られた。

②2002年10月1日までに、コホートに参加した730名の感染者を予備的解析したところ、既婚者474例について配偶者のHIV感染が判明していた。男性をIndex caseと仮定した場合、59例は、妻が抗HIV抗体陰性であったのに対し、105例は、陽性であった。この両群のIndex caseについて、血中ウイルス量、CD4値、また、夫婦間の性的接触回数について比較を行ったが、統計的有意差は認められなかった。

③HIV-1免疫不全進行と関連が示されているCCR2-64Iアリアルとウイルス量との関連をランパンコホート患者489名にて、比較検討したところ、CCR2-64Iアリアルの本モ接合体が18症例(3.7%)、ヘテロ接合体が131症例(26.8%)見つかり、同アリアルを有する患者群のウイルス量は、同アリアルを持たない患者群に比べて、有意に低かった(mean log viral load, 4.79 vs 5.02; p=0.01)。また、この傾向は、薬剤が投与された144患者群において、さらに顕著な差が見られた(mean log viral load, 4.09 vs 4.67; p=0.002)。

④感染者84症例と、非感染配偶者60症例で、HLA class Iアリアルを調べたところ、高頻度のAアリアルとして、A*1101/02/+ (55%)、A*0201/02/+ (34%)、A*2402/03/+ (32.6%)、A*3301/03/05(19.4%)、また、Bアリアルでは、B*1501/02/+ (30.6%)、B*4601/02 (27%)、B*4001/14/+ (16.8%)、B*1301/02 (16.1%)が見られ、両群でHLAアリアルの頻度差は認められなかった。AとB座の双方でホモ接合体であった3症例は、いずれもCD4値が100以上の症例であったが、ウイルス量は、他のCD4値が100以上の症例に比べて、有意に高かった(p=0.005)。現在、さらに100症例以上の感染者において、HLAアリアルのタイピングを行い、ウイルス量との比較検討を行っている。

⑤これまで、ランパンコホート患者8名の感染者を調べたところ、7名が12種類の合成ペプチドのいずれかに対し有意な反応が見られた。今後、100名以上のコホート患者のペプチド反応パターンを調べると共に、反応ペプチドを用いて、CTLラインの誘導を試み、⁵¹Cr release assayによりkilling活

性と拘束 HLA の確認を行う予定である。

⑥昨年度、野外株 HIV 由来 Gag タンパクにおける p17 領域 A*0201 拘束性 CTL エピトープ” SLYNTVATL” の標的細胞上のエピトープ発現について調べたが、本年度は、さらに p17 領域 A24 拘束性 CTL エピトープ” KYKLVKLVW” について、解析を加えた。その結果、日本人感染者の間では、” KYRLKHIVW” 配列が最も多く、野生株配列を認識する TCR 認識からエスケープしていた。さらに、これら変異株配列の細胞上エピトープ発現について、HIV-1 発現ベクターを用いて調べたところ、エスケープした 4 つの変異体のうち 3 つが、細胞内におけるエピトープのプロセッシングからのエスケープであることが示された。

また、ランパンコホート由来の 45 検体から、それぞれ 3 つ、合計 135 の whole gag/pol クローンを作成が完了し、現在これらのクローンが組みこまれた HIV-1 発現ベクターを作成中である。

D 考察

(柱 I)「分子疫学・ウイルス学研究」(武部班員)

①昨年度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が示唆され(図 3)、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。

②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 次的な遺伝子組み換えを起こしうることが示された(図 1, 2)。次々と組み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。

③母体となるウイルスに比べ組み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。

④今年度、中国型 HIV-1 ヴァリアントの一つである CRF08_BC の感染性分子クローン(図 4)が確立されたことは、今後の東アジ

ア地域を標的とするワクチン開発に向けた重要な一歩となると考えられる。

⑤今回の我が国における HIV-2 同定(図 5)は、東アジア地域では、韓国における 5 例(うち 3 例は HIV-2 サブタイプ A であることが示されている)に次ぐ、東アジア地域で 6 例目の発見である。今回のウイルスがこれまで韓国を含むアジア地域で見い出されてきたものとは異なるサブタイプ B であることから、東アジア地域に HIV-2 の無視できない拡がりがあることが示唆される。今後、注意深いサーベイが必要と考えられる。

(柱 II)「コホート研究」(有吉班員)

①ランパンカップル HIV コホート(図 7, 8)は、開始以来 2 年が過ぎた現在も高い追跡率を維持し、順調に進行している。また、過去にカップル間の HIV 伝播危険因子として報告されたウイルス量、CD4 値、臨床症状が、我々のコホートで、HIV 伝播危険因子として観察できなかったのは、我々のコホートは、病院ベースであり、夫婦間で HIV を暴露しあった期間が長かったことも、ひとつの原因として考えられる。

②薬剤が投与された患者群において、CCR2 64I による差がより顕著に見られた原因については、現在、これらの感染者の薬剤耐性株出現頻度を比較しながら、検討中である。

③p17 領域 A24 拘束性 CTL エピトープ” KYKLVKLVW” の 3 つの変異体について、CTL からのエスケープ機序が、細胞内におけるエピトープのプロセッシングからのエスケープにあることを示した。我々のデータは、細胞内のエピトーププロセッシングが、CTL 攻撃から逃れる重要な機序であることを示唆し、将来における CTL エピトープ研究は、タンパクの細胞内発現を無視して行うことは出来ないことを結論付ける意味で、意義が深い。

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研究の結果、この地域に組換えウイルス新生のホットスポットの存在すること、また新しいカテゴリーの第

2世代の新種の組換え型流行株 (ICR07/08) を発見した。さらに爆発的流行の原因となっている中国型ヴァリアントの一つである CRF08_BC 感染性分子クローンの分離に世界ではじめて成功した。これらの成果は、アジアにおけるエイズ流行形成のメカニズムの解明に重要な手掛かりを与えると共に、今後のワクチン開発に向けた基礎研究の推進に重要な礎となるものである。

2) 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。①ランパン県病院 HIV 外来をサイトとし、相当数の HIV 感染者およびその配偶者をリクルートし、高い追跡率でもって、追跡を行うことが可能である。②ランパン HIV カップルコホートは、遺伝子医学研究および免疫学的研究に充分応用可能であり、その他の研究分野にも、貢献する可能性がある。③同病院ベースコホート患者群において、HIV 伝播に関連する因子としての index case のウイルス量および CD4 値に有意な関連は認められなかった。④特に薬剤投与された患者群において CCR2-64I アリールとウイルス量との有意な関連が見られた。⑤ HIV 感染において、細胞内のエピト-プロセッシングからのエスケープは、CTL 攻撃から逃れる為の、重要な機序であることが判明した。

F 健康危険情報

「我が国における HIV-2 感染例の同定」に関する健康危険情報を厚労省に報告 (10/20/02)

G 研究発表

(武部班員)

論文発表 (欧文誌)

1. Takebe, Y., Motomura, K., Tatsumi, M., Yang, R., Lwin, H. H., Zaw, M., and Kusagawa, S. (2003). Geographical hot spot of extensive recombination of HIV-1s in Myanmar: high prevalence of diverse forms of intersubtype recombinants. AIDS (accepted).
2. Kaizu, M., Sato, H., Ami, Y., Isumi, Y., Nakasone, T., Tomita, Y., Someya, K., Takebe, Y., Kitamura, K., Tochikubo, O., and Honda, M. (2003). Infection of macaques with an R5-tropic SHIV bearing a chimeric envelope carrying subtype E V3 loop among subtype B framework. Archives of Virology. (accepted).
3. Motomura, K., Kusagawa, S., Lwin, H. H., Thwe, M., Kato, K., Ohishi, K., Yamamoto, N., Zaw, M., Nagatake, T., and Takebe, Y. (2003). Different subtype distribution in the two cities in Myanmar: Evidence for independent clusters of HIV-1. AIDS (in press).
4. Matsuoka-Aizawa, S., Sato, H., Hachiya, A., Tsuchiya, K., Takebe, Y., Kimura, S., and Oka, S. (2003). Nelfinavir (NFV) can potentiate the infectivity and replication capacity of human immunodeficiency virus type 1 whose fitness is otherwise compromised upon the acquisition of mutations in Gag p17 in association with protease mutations conferring NFV resistance. J. Virol. **77** (1): 318-327.
5. Yang, R., Kusagawa, S., Zhang, C., Xia, X., Ben, K., Takebe, Y. (2003). Identification and characterization of new class of HIV-1 recombinants comprised of two circulating recombinant forms, CRF07_BC and CRF08_BC, in China. J. Virol. **77** (1): 685-695.
6. 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 **16**: 1401-1407.
7. Murakami, Y., Fukasawa, H., Kobatake, T., Yamagoe, S., Takebe, Y., Tobiume, M., Matsuda, M., and Uehara, Y. (2002). A mammalian two-hybrid screening system for inhibitors of interaction between HIV Nef and the cellular tyrosine kinase Hck. Antiviral Research **55**:161-168.
8. Fukuda, K., Tomiyama, H., Wasi, C., Matsuda, T., Kusagawa, 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

16: 701-711

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 Acquir Immune Defic Syndr* **29** (2):191-196.
10. 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.

論文 (邦文誌) 発表

1. 武部 豊 (分担執筆). エイズの話「感染症の事典」(国立感染症研究所学友会編集). 朝倉書店. 東京. (2003) (in press).
2. 武部 豊 (分担訳). 「Black 微生物学 (Black, JG: "Microbiology-Principles and Exploration. 5th ed", Wiley (2002)) (林英生、岩本愛吉、高橋秀実、神谷茂教授監訳) 第 15 章 疫学と院内感染症 (Epidemiology and nosocomial infections) 丸善. 東京. (2003) (in press).
3. 武部 豊, 草川 茂 (分担執筆). 病原体診断マニュアル. 国立感染症研究所編 (in press).
4. 佐藤裕徳, 武部 豊. 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. (2003) (in press).
5. 武部 豊. HIV のサブタイプ「HIV Q & A」(岡慎一編集). (単行本) pp. 17-19. 医薬ジャーナル社. 東京. (2002) .
6. 武部 豊. 感染症の話「エイズ (ヒト後天性免疫不全症候群)」(改訂版). Japan IDWR (Infectious Diseases Weekly Report) 感染症週報 [厚生省ホームページ (<http://www.mhw.go.jp>)] (2002).
7. 武部 豊. HIV 感染症への分子疫学的アプローチ. 「HIV 感染症の基礎と臨床」.

化学療法の領域. **18** (4): 503-511. 医薬ジャーナル社. 東京. (2002) .

8. 武部 豊. ゲノム情報に基づく HIV の分子疫学. 「微生物ゲノム情報と医学—基礎と臨床」. 基礎. 現代医療. **34** (5): 1047-1059. 現代医療社. 東京. (2002)
9. 武部 豊. 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. (2002)

学会発表その他

1. Matsuoka, S., Sato, H., Hachiya, A., Tsuchiya, K., Takebe, Y., Kimura, S., and Oka, S. (2002). Nelfinavir (NFV) can Potentiate the Infectivity and Replication of HIV-1 Whose Fitness is Otherwise Compromised upon the Acquisition of Gag p17 in Association with Protease Mutations Conferring NFV Resistance. 42rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (June, 2002. San Diego)
2. Yang, R., Xia, X., Kusagawa, S., Zhang, C., Ben K., Takebe, Y. (2002). Ongoing generation of multiple forms of HIV-1 intersubtype recombinants in China's Yunnan province. Abstract for the 4th Japan-China Virology Meeting (June 27-28, 2002. Kunming, China)
3. Takebe, Y., Yang, R., Xia, X., Kusagawa, S., Zhang, C., Ben, K. (2002). Molecular epidemiology of HIV in Yunnan Province of China. 2002 International Meeting of the Institute of Human Virology (September 9-13, 2002. Baltimore, USA)
4. 草川 茂, 武部 豊 (2002). ポリプロリンモチーフ (PXXP) を介する蛋白質間相互作用に対する新規阻害剤 UCS15A の抗 HIV-1 効果. 第 50 回日本ウイルス学会 (2002.10.16-18. 札幌)
5. 草川 茂, 今村裕子, 安岡 彰, 岡 慎一 (2002). 国内で初めて分離された HIV-2 臨床分離株の解析. 第 50 回日本ウイルス学会 (2002.10.16-18. 札幌)
6. 武部 豊, 楊 栄閣, 草川 茂 (2002).

組換型流行株 (CRF) 間の遺伝子組換えによる新しいクラスの HIV-1 組換株 (Inter-CRF Recombinants) の分離とその解析. 第 5 0 回日本ウイルス学会 (2002.10.16-18. 札幌)

7. Takebe, Y. (2002). Intertwined epidemic in the Asia and Pacific: from the molecular epidemiological view points. 第 16 回日本エイズ学会 (2002.11.28-39. 名古屋).
8. 松岡佐織, 蜂谷敦子, 土屋亮人, 佐藤裕徳, 武部 豊, 岡 慎一 (2002). NFV 存在下において感染効率の上昇が認められた薬剤耐性株の解析. 第 16 回日本エイズ学会 (2002.11.28-39. 名古屋)
9. 楊 栄閣, 草川 茂, Ben, Kunlong., 武部 豊 (2002). HIV-1 組換え型流行株 (CRF) 間の新規組換えウイルスの分離とその解析. 第 16 回日本エイズ学会 (2002.11.28-39. 名古屋)
10. 巽 正志, 草川 茂, 武部 豊, 松田道行 (2002). HIV-1 subtype A 感染性クローンの樹立. 第 16 回日本エイズ学会 (2002.11.28-39. 名古屋)
11. 高村史記, 森 一泰, 武部 豊, 草川 茂, 永井美之, 保富康宏 (2002). サル免疫不全ウイルス糖鎖欠損エンベロープ蛋白の免疫誘導能の解析. 第 16 回日本エイズ学会 (2002.11.28-39. 名古屋)
12. 海津雅彦, 網 康至, 泉 泰之, 佐藤裕徳, 武部 豊, 仲宗根正, 染谷健二, 北村勝彦, 枏久保修, 本多三男 (2002). エンベロープ V3 ループ領域の入れ替えが SHIV に与えた in vitro および in vivo におけるコレセプター使用への影響. 第 16 回日本エイズ学会 (2002.11.28-39. 名古屋)
13. 加藤佳代子, 大川 淳, 武部 豊 (2002). CXCR4 利用能をもつ HIV-1 サブタイプ C 株の解析. 第 16 回日本エイズ学会 (2002.11.28-39. 名古屋)
14. 森 一泰, 杉本智恵, 保富康宏, 草川 茂, 武部 豊, 中山英美, 塩田達雄, 永井美之 (2002). Env エイズワクチンへの糖鎖欠失変異の効果. 第 16 回日本エイズ学会 (2002.11.28-39. 名古屋)

(有吉班員)

論文発表 (欧文誌)

1. Pathipvanich P, Ariyoshi K, Rojanawiwat A, Wongchoosie S, Yingsaree P, Warachit P, Sawanpanyalert P. Survival Benefit from Non-HAART in a Resource Constrained Setting. J Acquir Immune Defic Syndr. (in press).
2. Myint L, Ariyoshi K, Yan H, Frater AJ, Auwanit W, Pathipvanich P, Yamada K, Mastuda M, Chiba T, Fujita K, McClure M, Weber JN, Sugiura W. Mutagenically Separated PCR Assay for Rapid Detection of M41L and K70R Zidovudine Resistance Mutations in CRF01_AE (Subtype E) Human Immunodeficiency Virus Type 1. Antimicrobial Agents and Chemotherapy (Inpress)
3. Berry N, Jaffar S, Van Der Loeff MS, Ariyoshi K, Harding E, N'Gom PT, Dias F, Wilkins A, Ricard D, Aaby P, Tedder R, Whittle H. (2002). Low Level Viremia and High CD4% Predict Normal Survival in a Cohort of HIV Type-2-Infected Villagers. AIDS Res Hum Retroviruses. 2002 Nov 1;18(16):1167-73.
4. Schim van der Loeff MF, Jaffar S, Aveika AA, Sabally S, Corrah T, Harding E, Alabi A, Bayang A, Ariyoshi K, Whittle HC. (2002). Mortality of HIV-1, HIV-2 and HIV-1/HIV-2 dually infected patients in a clinic-based cohort in The Gambia. AIDS. 2002 Sep 6;16(13):1775-83.
5. Ariyoshi K, Promadej N, Ruxrungtham K, Suthent R. (2002). Toward improved evaluation of cytotoxic T-lymphocyte (CTL)-inducing HIV vaccines in Thailand. AIDS Res Hum Retroviruses. 2002 Jul 1;18(10):737-9. No abstract available.
6. Holmgren B, Andersson S, Harding E, van der Loeff MS, Vastrup P, Aaby P, Ariyoshi K, Whittle H. (2002). Increased prevalence of HTLV-1 among HIV-2-infected women but not HIV-2-infected men in rural Guinea-Bissau. J Acquir Immune Defic Syndr. 2002 Jul 1;30(3):342-50.

7. Frater AJ, Dunn DT, Beardall AJ, Ariyoshi K, Clarke JR, McClure MO, Weber JN. (2002). Comparative response of African HIV-1-infected individuals to highly active antiretroviral therapy. AIDS. 2002 May 24;16(8):1139-46.
8. Yagyu F, Ikeda Y, Ariyoshi K, Sugiura W, Wongkhomthong SA, Masuda M, Ushijima H. (2002). Differentiation of subtypes B and E of human immunodeficiencyvirus type 1 by polymerase chain reaction using novel env gene primers. J Virol Methods. 2002 Mar;101(1-2):11-20.
3. Ruchusatsawat N, Nakayama E, Rojanawiwat A, Pathipvanich P, Auwanit W, Vongsheree S, Yoshiike K, Ariyoshi K, Shioda T, Sawanpanyalert P. Study of Genetic Mechanisms of AIDS Pathogenesis in Thailand. 第 16 回日本エイズ学会、2002 年 11 月、名古屋
4. 横幕能行、三浦秀佳、有吉紅也、松田善衛 Non-clade B HIV-1 の臨床検体由来 gag-pol 発現標的細胞作成系の確立 第 16 回日本エイズ学会、2002 年 11 月、名古屋
5. 横幕能行、三浦秀佳、富山宏子、川名愛、滝口雅文、岩本愛吉、松田善衛、有吉紅也 HIV-1 の CTL epitope 及び周辺領域のアミノ酸変異が特異的 CTL の認識および抗原提示機構に与える影響の解析 第 50 回日本ウイルス学会学術集会 札幌 2002.1

2) 学会発表

国際学会

1. K Ariyoshi, M Matsuda, H Miura, K Yamada, NS Hellmann, W Sugiura Unique Drug Resistant Mutation Patterns Found in HIV-1 CRF01_AE(subtype E) with Anti- Retroviral Treatment Failure. XI Internatonal HIV Drug Resistance Workshop. Jul.2-5,Seville-Spain

国内学会

1. Pathipvanich P, 有吉紅也 Collaborative Activities on HIV/AIDS between Day Care Center, Lampang Hospital and the JICA-NIH Project. 第 16 回日本エイズ学会、2002 年 11 月、名古屋
2. Rojanawiwat A, Ariyoshi K, Pathipvanich P et al., Lack of association between the

H 知的財産権の出願・登録状況

(武部班員)

「中国型 HIV-1 組換えウイルスの感染生分子クローン」(特願 2003 - 026950 平成 15 年 2 月 4 日 (2003.2.4) 出願 (感染研エイズ研究センター 草川茂博士・楊栄閣博士と共同出願)

(有吉班員)

該当なし

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 14 年度分担研究報告書

中国南西部（雲南省）における HIV 流行の分子疫学：2 種の組換え型流行株（CRF07_BC
および CRF08_BC）からなる新しいクラスの HIV-1 組換えウイルスの同定

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

われわれは、中国雲南省において、CRF07_BC と CRF08_BC がさらに 2 次的な遺伝子組換えを起こすことで生成した新しいクラスの HIV-1 組換えウイルス（00CN-HH069 と 00CN-HH086）を同定した。これら 2 株は中国雲南省東部地域の注射薬物乱用者（Injecting drug user, IDU）のコホート研究から得られた 57 検体の中に見い出され、ブートスキャンニング解析、探索的系統樹解析および情報座位解析（Informative site analysis）によって、これらが中国に分布する 2 種の CRFs（CRF07_BC と CRF08_BC）からなる相互に近縁なキメラ構造をもつ第 2 世代の組換えウイルスであることが確認された。雲南省東部地域からの 57 検体に関して gag-RT 領域の遺伝子型の再スクリーニングを行ったところ、雲南省東部に分布するウイルス株の大多数（82.2%；47/57）が CRF08_BC、5 株（8.8%）が CRF07_BC であったが、それに加えて、同様なカテゴリーに属する新型組換えウイルスをさらに 3 株を見出した。このタイプの新しい第 2 世代の組換えウイルスは、従って、雲南省東部の IDU 集団にかなりの頻度（8.8%；5/57）で分布していることが明らかになり、新たな CRF である可能性が示唆された。これは、CRF 間の組換えによる第 2 世代の組換えウイルスの世界最初報告例であり、中国南西部に多様な組換えウイルスの新生している地域が存在することを示唆するものと考えられる。

A 研究の背景とその目的

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。1989 年に中国南西部の雲南省で注射薬物乱用者（Injecting drug user, IDU）の間で最初の HIV-1 アウトブレイクが発生して以来、中国北西部の新彊や南東部の広西壮族自治区など中国の様々な地域に流行が拡大している。雲南省は中国における流行のエピセンターであり、中国における流行の成立を考える上で、極めて重要な位置にあると考えられるにもかかわらず、雲南省内に分布するウイルスの詳細についてはほとんど明らかにされていない。一方、われわれは、昨年度の研究で、雲南省の各地域に分布するウイルス株の構造解析を進め、その結果、雲南省東部地域に 2 種の帰属不明のウイルス株を同定し、それらが、中国に分布する CRF の一つと近縁な構造的特徴をもつ可能性を示した。今年度の研究では、これら新種のウイルスの構造的特徴の詳細を明らかにすると共に、その疫学的意義について解析を進めたいと考える。

B 研究方法

① 東南部（Honghe）から分離された HIV-

1 株（00CN-HH069 と 00CN-HH086）の 2 種の HIV-1 分離株を CD8-depleted PBMC に感染後、total DNA を抽出。それを鋳型として Long PCR 法によって、ほぼ完全長（9.1-kb）の HIV-1 ゲノムを増幅して、pXL TOPO ベクターにクローニングした。

② プライマー・ウォーキング法によって HIV-1 の全塩基配列を決定した。

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て、サブタイプ帰属を決定

④ diversity plot および、bootscanning 法、探索的系統樹解析および情報座位解析（Informative site analysis）によって、組換え点の検索とともに組換え構造の詳細を検討した。

（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

① 00CN-HH069 と 00CN-HH086 ほぼ完全長の遺伝子配列に基づく系統樹解析の結果、両株は CRF07_BC と CRF08_BC のクラスターのほぼ中間に位置する outlier であった (図 1)。

② ブーツキャニング解析の結果、00CN-HH069 と 00CN-HH086 はいずれも、サブタイプ B' (サブタイプ B のタイ型ヴァリエント) と C 間の組換えウイルスであり、CRF07_BC と CRF08_BC と近縁な組換え構造をもつことが明らかになった。さらに CRF07_BC と CRF08_BC の標準株をレファレンスとしたブーツキャニング解析により、これら両株が CRF07_BC あるは CRF08_BC に属するゲノム領域が交互に混じった複雑な組換えウイルスであることが分かった (図 2)。

③ ブーストラップ解析によって推測される組換え構造は探索的系統樹解析 (exploratory tree analysis)、情報座位解析 (informative tree analysis) によっても確認された。

④ これらの知見から、両株は中国に存在する CRF07_BC と CRF08_BC の間の 2 次的な遺伝子組換えによって新生した新しいクラスの組換えウイルスであることが明らかになった。

⑤ このタイプの組換えウイルスの疫学的重要性を明らかにするために、雲南省由来の検体の遺伝子型を再解析したところ、この両株と合わせ計 5 株 (8.8%, 5/57) が同様な組換え構造をもつことを明らかにした。

D 考察

われわれが中国雲南省東部の IDU 集団に見出した CRF07_BC と CRF08_BC からなる第 2 世代の組換えウイルスは世界で最初の報告例である。この CRF 間組換えウイルス (Inter-CRF recombinant, ICR) ともいうべき新しいクラスの組換えウイルスは、雲南省東部地域において、決して稀なウイルスではなく、約 8% 程度に見い出されることから、新たな組換え型流行株 (CRF) として認められる可能性がある。このような組換えウイルスの存在は、この地域の IDU が高いリスク行動を行い、またウイルス伝播のネットワークをもっていることを示唆するものである。また遺伝子組換えは複製エラーに基づく変異とともに HIV-1 のゲノム多様性の獲得を加速する重要な要因であり、有効なワクチン開発に重要な障害となる可能性がある。

E 結論

中国の HIV 流行のエピセンターともいうべき雲南省東部における HIV-1 流行株の分子疫学的解析を行い、その結果、CRF07_BC と CRF08_BC からなる第 2 世代の組換えウイルス (CRF 間組換えウイルス、Inter-CRF recombinant, ICR) を同定した。また同様なカテゴリーに属する組換えウイルスは雲南省東部地域にフォーカルな拡がりがあることが明らかとなった。この地域に見られる多様な組換え現象は、将来のワクチン開発の上で考慮すべき問題点を示すものと考えられる。

F 健康危険情報

「我が国における HIV-2 感染例の同定」に関する健康危険情報を厚労省に報告 (10/20/02)

G 研究発表

1) 論文発表 (2002-2003)

1. Takebe, Y., Motomura, K., Tatsumi, M., Yang, R., Lwin, H. H., Zaw, M., and Kusagawa, S. (2003). Geographical hot spot of extensive recombination of HIV-1s in Myanmar: high prevalence of diverse forms of intersubtype recombinants. AIDS (accepted).
2. Kaizu, M., Sato, H., Ami, Y., Isumi, Y., Nakasone, T., Tomita, Y., Someya, K., Takebe, Y., Kitamura, K., Tochikubo, O., and Honda, M. (2003). Infection of macaques with an R5-tropic SHIV bearing a chimeric envelope carrying subtype E V3 loop among subtype B framework. Archives of Virology. (accepted).
3. Motomura, K., Kusagawa, S., Lwin, H. H., Thwe, M., Kato, K., Ohishi, K., Yamamoto, N., Zaw, M., Nagatake, T., and Takebe, Y. (2003). Different subtype distribution in the two cities in Myanmar: Evidence for independent clusters of HIV-1. AIDS (in press).
4. Yang, R., Kusagawa, S., Zhang, C., Xia, X., Ben, K., Takebe, Y. (2003). Identification and characterization of new class of HIV-1 recombinants comprised of two circulating recombinant forms, CRF07_BC and CRF08_BC, in China. J. Virol. 77 (1): 685-695.
5. Matsuoka-Aizawa, S., Sato, H., Hachiya, A., Tsuchiya, K., Takebe, Y., Kimura, S., and Oka, S. (2003). Nelfinavir (NFV) can potentiate the infectivity and replication capacity of human immunodeficiency virus type 1 whose fitness is

otherwise compromised upon the acquisition of mutations in Gag p17 in association with protease mutations conferring NFV resistance. *J. Virol.* 77 (1): 318-327.

6. 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* 16: 1401-1407.
7. Murakami, Y., Fukasawa, H., Kobatake, T., Yamagoe, S., Takebe, Y., Tobiume, M., Matsuda, M., and Uehara, Y. (2002). A mammalian two-hybrid screening system for inhibitors of interaction between HIV Nef and the cellular tyrosine kinase Hck. *Antiviral Research* 55:161-168.
8. 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* 16: 701-711
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 Acquir Immune Defic Syndr.* 29 (2):191-196.
10. 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.

2) 和文論文

1. 武部 豊 (分担執筆). エイズの話「感染症の事典」(国立感染症研究所学会友会編集). 朝倉書店. 東京. (2003) (in press).
2. 武部 豊 (分担訳). 「Black 微生物学 (Black, JG: "Microbiology-Principles and

Exploration. 5th ed", Wiley (2002)) (林英生、岩本愛吉、高橋秀実、神谷茂教授監訳) 第15章 疫学と院内感染症 (Epidemiology and nosocomial infections)

丸善. 東京. (2003) (in press).

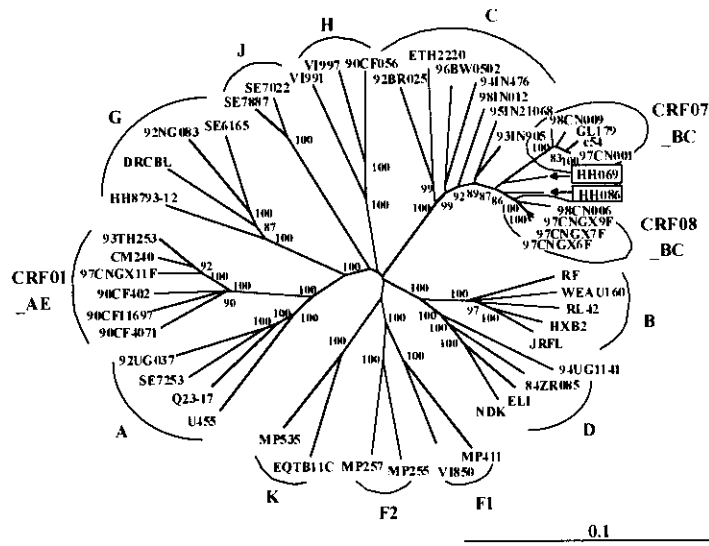
3. 武部 豊, 草川 茂 (分担執筆). 病原体診断マニュアル. 国立感染症研究所編 (in press).
4. 佐藤裕徳, 武部 豊. HIVの変異 (総説) 「ヒトレトロウイルス研究の最前線」(山本直樹編集) HIVの変異 (総説). シュプリンガー・フェアラーク. 東京. (2003) (in press).
5. 武部 豊. HIVのサブタイプ「HIV Q & A」(岡慎一編集). (単行本) pp. 17-19. 医薬ジャーナル社. 東京. (2002) .
6. 武部 豊. 感染症の話「エイズ(ヒト後天性免疫不全症候群)」(改訂版). Japan IDWR (Infectious Diseases Weekly Report) 感染症週報 [厚生省ホームページ (<http://www.mhw.go.jp>)] (2002).
7. 武部 豊. HIV感染症への分子疫学的アプローチ. 「HIV感染症の基礎と臨床」. 化学療法の領域. 18 (4): 503-511. 医薬ジャーナル社. 東京. (2002) .
8. 武部 豊. ゲノム情報に基づく HIV の分子疫学. 「微生物ゲノム情報と医学—基礎と臨床」. 基礎. 現代医療. 34 (5): 1047-1059. 現代医療社. 東京. (2002)
9. 武部 豊. 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. (2002)

学会発表その他

1. Matsuoka, S., Sato, H., Hachiya, A., Tsuchiya,

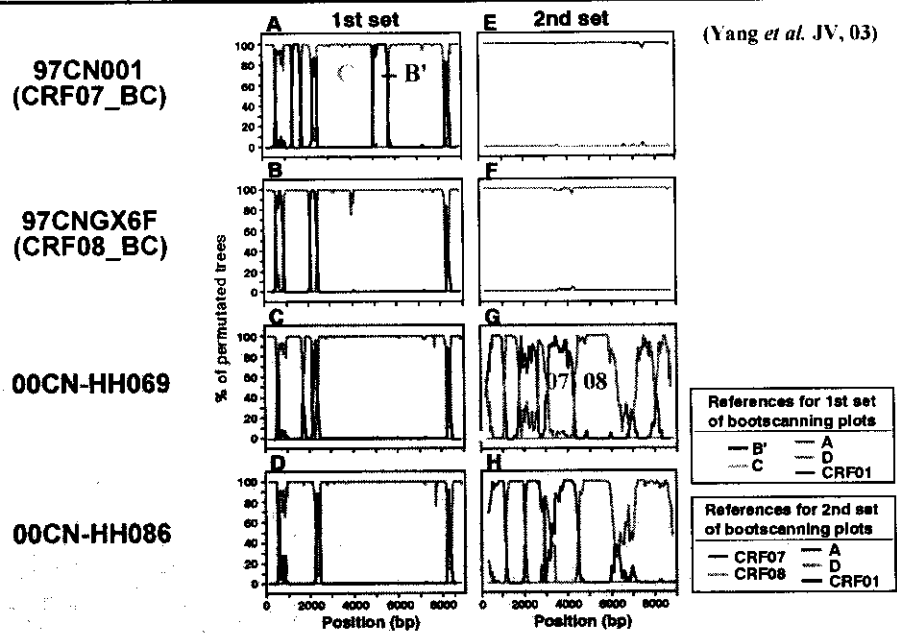
- K., Takebe, Y., Kimura, S., and Oka, S. (2002). Nelfinavir (NFV) can Potentiate the Infectivity and Replication of HIV-1 Whose Fitness is Otherwise Compromised upon the Acquisition of Gag p17 in Association with Protease Mutations Conferring NFV Resistance. ICAAC (June, 2002. San Diego)
2. Yang, R., Xia, X., Kusagawa, S., Zhang, C., Ben, K., Takebe, Y. (2002). Ongoing generation of multiple forms of HIV-1 intersubtype recombinants in China's Yunnan province. Abstract for the 4th Japan-China Virology Meeting (June 27-28, 2002. Kunming, China)
 3. Takebe, Y., Yang, R., Xia, X., Kusagawa, S., Zhang, C., Ben, K. (2002). Molecular epidemiology of HIV in Yunnan Province of China. 2002 International Meeting of the Institute of Human Virology (September 9-13, 2002. Baltimore, USA)
 4. 草川 茂, 武部 豊 (2002). ポリプロリンモチーフ (PXXP) を介する蛋白質間相互作用に対する新規阻害剤 UCS15A の抗 HIV-1 効果. 第50回日本ウイルス学会 (2002.10.16-18. 札幌)
 5. 草川 茂, 今村裕子, 安岡 彰, 岡 慎一 (2002). 国内で初めて分離された HIV-2 臨床分離株の解析. 第50回日本ウイルス学会 (2002.10.16-18. 札幌)
 6. 武部 豊, 楊 栄閣, 草川 茂 (2002). 組換え型流行株 (CRF) 間の遺伝子組換えによる新しいクラスの HIV-1 組換え株 (Inter-CRF Recombinants) の分離とその解析. 第50回日本ウイルス学会 (2002.10.16-18. 札幌)
 7. 松岡佐織, 蜂谷敦子, 土屋亮人, 佐藤裕徳, 武部 豊, 岡 慎一 (2002). NFV 存在下において感染効率の上昇が認められた薬剤耐性株の解析. 第16回日本エイズ学会 (2002.11.28-39. 名古屋)
 8. 楊 栄閣, 草川 茂, Ben, Kunlong., 武部 豊 (2002). HIV-1 組換え型流行株 (CRF) 間の新規組換えウイルスの分離とその解析. 第16回日本エイズ学会 (2002.11.28-39. 名古屋)
 9. 巽 正志, 草川 茂, 武部 豊, 松田道行 (2002). HIV-1 subtype A 感染性クローンの樹立. 第16回日本エイズ学会 (2002.11.28-39. 名古屋)
 10. 高村史記, 森 一泰, 武部 豊, 草川 茂, 永井美之, 保富康宏 (2002). サル免疫不全ウイルス糖鎖欠損エンベロープ蛋白の免疫誘導能の解析. 第16回日本エイズ学会 (2002.11.28-39. 名古屋)
 11. 海津雅彦, 網 康至, 泉 泰之, 佐藤裕徳, 武部 豊, 仲宗根正, 染谷健二, 北村勝彦, 朽久保修, 本多三男 (2002). エンベロープ V3 ループ領域の入れ替えが SHIV に与えた in vitro および in vivo におけるコレセプター使用への影響. 第16回日本エイズ学会 (2002.11.28-39. 名古屋)
 12. 加藤佳代子, 大川 淳, 武部 豊 (2002). CXCR4 利用能をもつ HIV-1 サブタイプ C 株の解析. 第16回日本エイズ学会 (2002.11.28-39. 名古屋)
 13. 森 一泰, 杉本智恵, 保富康宏, 草川 茂, 武部 豊, 中山英美, 塩田達雄, 永井美之 (2002). Env エイズワクチンへの糖鎖欠失変異の効果. 第16回日本エイズ学会 (2002.11.28-39. 名古屋)
- H 知的財産権の出願・登録状況
1. 「中国型 HIV-1 組換えウイルスの感染性分子クローン」 (特願 2003-026950, 2003.2.4) (感染研エイズ研究センター 草川茂博士・楊栄閣博士と共同出願)

☒ 1



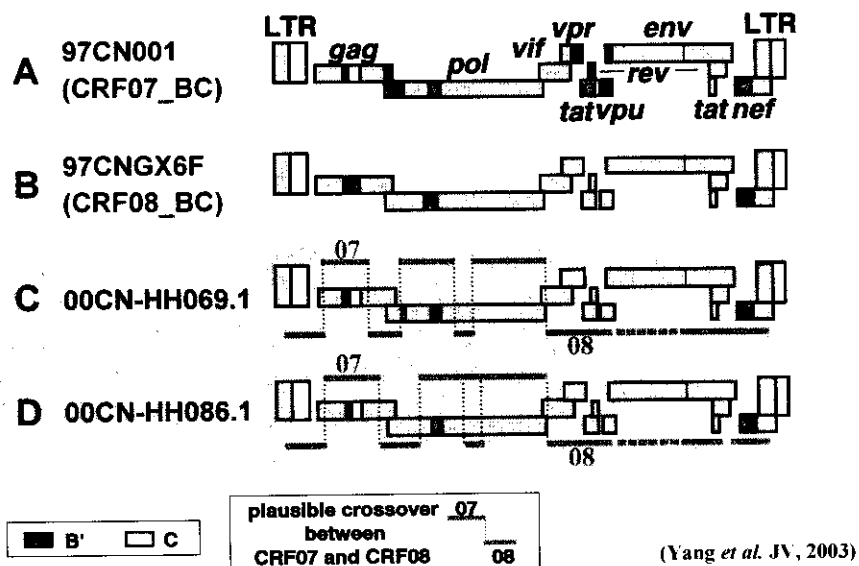
Honghe URFs Are New Class of HIV-1 Recombinants Comprised of Two Previously Established CRFs (CRF07_BC and CRF08_BC)

☒ 2



Subtype Structure of a New Class of Inter-CRF Recombinants (ICRs) Identified in Yunnan Province

☒ 3



厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
平成 14 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：、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・エイズ病態生理を探求する上で、宿主・病原体相互関係を解明することは不可欠である。タイ国立衛生研究所（NIH）とランパン県病院との共同で、平成 12 年 7 月 6 日より、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。2 年 3 ヶ月を経た平成 14 年 10 月 15 日時点で、計 865 名（106 名の抗 HIV 抗体陰性配偶者を含む）がコホートに参加、93% の追跡率を持って追跡された。本年度はこれらコホート参加者のデータ・ベース構築を行い、断面的観察による HIV 伝播リスク因子解析を行った。その結果、Index 症例（男性配偶者と仮定）の血中ウイルス量、CD4 値、HIV 症状発症、また、夫婦間の性的接触回数、婚姻年数と HIV 伝播との間に有意な関連は認められず、これらの因子とは独立した contact 症例側の生物学的宿主因子が関与している症例が抗体陰性配偶者群に集積していると考えられた。

本年度はホスト遺伝子多型の中でも、CCR2 と MHC クラス I の多型診断・解析が進み、どちらの遺伝子多型も抗 HIV 抗体陰性配偶者との関連はみられなかった。しかし、CCR2 64I アリールを有する感染者群でウイルス量が有意に低く ($p=0.01$)、また、この傾向は、薬剤治療を受けた群でより強く見られた ($p=0.002$)。MHC クラス I ホモ接合体の患者および B*3510/13/16 を有する患者で、ウイルス量が高い傾向が見られた（両者共に $p=0.04$ ）。免疫学的研究への応用については、本年度より、CD4 値が高い薬剤非治療感染者を対象に、合成ペプチドと ELISPOT による細胞障害性 T-リンパ細胞（CTL）エピト-プマッピングが開始された。本コホート研究は、その他、抗 HIV 液性因子の解明、日和見感染症の罹患率、サブタイプ E 薬剤耐性変異株などの研究分野に広く応用・活用された。

本邦においては、CTL エピト-プ抗原提示効率に焦点を絞り、A24 拘束性 p17 領域 CTL エピト-プ内アミノ酸配列の異なる変異株 Gag を env 欠損 HIV-1 ベクターによって細胞内発現させ、このエピト-プの細胞表面上抗原提示効率を調べた。その結果、5 種類のエピト-プ変異のうち 3 つについては、細胞外から加えたペプチドは認識されるが、同じ変異エピト-プを有する Gag タンパクを細胞内発現させた場合、全く認識されないことが判明し、昨年度の A*0201 拘束性 CTL エピト-プの研究結果に引き続き変異ウイルスタンパクのエピト-ププロセッシングからの逃避が CTL 攻撃から逃れる重要な機序であることを示した。

A 研究目的

HIV・エイズ病態生理について深く探求する上で、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、宿主側の重要な因子として、感染者の有する抗 HIV 免疫やホスト遺伝子多型が挙げられるが、これら因子と免疫不全進行との関連を探る際、対象患者の選択方法が明確で、人口統計学的・臨床的情報が詳細に渡って計画的に採取された充分数の HIV-1 感染者群を、高い追跡率で継続的に追跡したコホート研究が重要となる。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発・維持させ、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-プ抗原提示を評価する CTL 実験を昨年に引き続き継続し、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 HIV コホート

ランパン県病院は、病床数約 800 床、一日外来患者総数 1,400 名、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。この病院の HIV 専門外来を担う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コホートを立ち上げた。本コホート研究は、より高い

追跡率を得、より多くの HIV に感染した夫婦の参加を促す為に、県内 17 の患者団体からの協力を得た。2000 年 7 月 6 日よりリクルートを開始した。

具体的研究活動は、昨年度の報告書でも記載されたとおりで、インフォームドコンセントフォームへ署名後、スタディ調整員がインタビューを行い詳細な患者基礎情報を収集、スタディ臨床医による問診・診察の後、血液サンプル採取、ルーチンラボ検査、血漿・リンパ細胞・buffy coat 分離および凍結保存を行った。さらには、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も、CD4 値が 200 以上のものを選択し、3ヶ月毎臨床診察による追跡、6ヶ月毎の臨床診察および血液検体分離・保存による追跡を行った。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、ディケアセンターにおけるリサーチ要因のキャパシティーに限界があり、細かな情報収集はコホート参加時のみとし、生存率のみの追跡を行った。本年度は、2002 年 10 月 15 日までに参加した感染者の断面的解析を行う為、収集した人口統計学的、臨床的、治療歴、性行動などに関する患者情報をコンピューターへ二重入力し、解析前の入力データ検証を行った。また、コホート参加時の血漿中 HIVRNA ウイルス量をアンプリコアー HIV-1 モニターキット(v1.5)にて測定した。

b) 遺伝子多型検出方法

コホート患者から採取・凍結保存された buffy coat より、DNA 抽出キット (キアゲン) を用いて検体を用いて DNA を抽出、欧米にて HIV-1 免疫不全進行との関連が報告されている SNIP である CCR2 64I アリール診断を PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) により判定した。また、HLA Class I アリールタイピングを PCR-MPH (Microtiter plate hybridization) 法により行った。CCR2 遺伝子多型判定実験は、大阪大学塩田達雄教授の指導のもと、タイ人博士課程在籍大学院生が行った。本分担研究者は、現地でタイ国立衛生研究所における HLA タイピングを監督すると共に、ランパンコホートから必要となる患者情報を抽出し、それら実験結果とを組み合わせた解析用データセットの作成を担当した。HLA データと患者情報との接合および解析は、分担研究者が行った。

c) 免疫学的研究への応用

CRF01_AE(サブタイプ E) Gag 領域内にある

CTL エピト-プの同定を試みる為に、サブタイプ B で報告された A*0201, A11, A24 拘束性 Gag CTL エピト-プ領域における CRF01_AE 株の変異パターンをデータベースにて検索、最も頻度の高い変異パターンに相応した 8~13-mer の合成ペプチド 15 種類を作成、ランパンコホート患者由来の末梢血リンパ細胞のうち、これらペプチドを認識し IFN γ を産生する細胞を、Elispot Assay により定量的に判定した。

d) 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

昨年度は、東京大学岩本愛吉教授の協力を得て、東大医科学研究所付属病院通院感染者 6 名をリクルートし、末梢血細胞由来 DNA より gag クローンを作成、それらを新しく開発された VSVG 偽粒子・env 欠損 HIV ベクターへ組み込み、これら野外株 Gag タンパクの発現ベクターを作成した。本年度は、このベクターを A24 B-リンパ細胞へ感染させ、puromycin により選択的培養を行い、A24 拘束性野外株 Gag タンパクの CTL エピト-プ抗原発現に関する研究を進めた。実験に用いた CTL ラインは、A24 拘束性 Gag エピト-プ領域に相応する合成ペプチドによって、A24 感染者から刺激誘導して作成した。ペプチド認識は、同 CTL エピト-プの変異配列に相応するペプチドを合成、飽和レベル (10 μ M) のペプチドによってパルスし、細胞外から目的の MHC へ結合させることにより、ペプチド標的細胞を作成した。CTL 認識は、51Cr release assay により 51Cr の細胞外放出をシンチレーションカウンターにて測定し、%specific lysis を求めて検討した。

(倫理面への配慮)

タイ国におけるコホート研究は、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 月に承認済である。すべてのコホート参加者から、サイン入り同意書が得られている。

C 研究結果

a) 参加感染者、抗体陰性配偶者数、カップル数、追跡率などについて

2000 年 7 月より 2003 年 1 月 15 日までに、計 759 名の HIV 感染者および 106 名の HIV 感染者を配偶者にもつ抗 HIV 抗体陰性配偶者が本コホートへ参加した。このうち夫婦双方が HIV に感染した Concordant couple が 119 組と一方のみが感染している Discordant couple が 74 組、含まれていた。458 名について