

をもたらすと考えられている。ポリメラーゼ γ は α 、 β の二つのサブユニットからなるヘテロダイマーであり、酵素活性は 140kDa からなる α サブユニットにある。 α サブユニット遺伝子は *POLG* と呼ばれ、23 個のエクソンにわかれ、その 5'側に 3'→5'エクソヌクレアーゼ motif (I, II, III) があり、3'側にポリメラーゼ motif (a, b, c) がある (図 4)。

本研究の目的は、*POLG* 遺伝子のプロモーター領域及び 3'側のポリメラーゼ motif のある領域を中心に多型性を検索すると共に、その多型性と抗 HIV 薬による副作用との関連について検討することである。

B. 研究方法

PGC-1の遺伝子は染色体 4 番p15.1にあり、約67kbase pairの長さを持ち、13個のExonから成る。東京大学医科学研究所ヒトゲノムセンターのSNPs情報および今までに論文発表されているSNPs情報に基づいて、Exon, Promoter領域を中心にしたPGC-1のSNPs 13カ所を検索した。(Exon8 Thr394Thr, Exon8 Gly482Ser の2ヶ所については論文発表されている。IMS-JST番号の付記されていないSNPsについては未公表のものである。) SNPs情報に公表されているプライマーを用いてPCR増幅し、ABI PRISM SNaPshot Multiplex Kit (PE Biosystems, Foster City, Calif. USA)を用いてSNPsを決定した。

1995年から2001年3月まで、東京大学医科学研究所附属病院に通院し、抗HIV薬の投与を受けたHIV-1感染症患者35人(多くはHAARTとして治療されていた)、及び29人のHIV-1陰性健常コントロール群として*POLG*遺伝子の多型性を検討した。EDTA血よりPBMCsをFicoll-Conrayにより分離し、QIAamp DNABlood Mini Kit(QIAGEN, Valencia, California, USA)を用いてDNAを抽出した。得られたDNAは使用時まで-80°Cに保存した。*POLG*の14から23番までのエ

クソン、及びエクソン1番とプロモーター領域(エクソン1の5'末端より250bp上流まで)、及びよく知られたエクソン2内のCAG繰り返し配列部をBigDye™ terminator cycle sequencing readymade reaction及びABI PRISM™ 377 DNA sequencer (PE Applied Biosystems)を用いてダイレクトシーケンスした。29人の健常人における配列の解析で認められた多型性部位について、35人のHIV-1感染症患者でも、同部の配列を決定した。認められた多型性と、29人の健常人、及び未治療時のサンプルがあった33人のHIV-1感染症患者のPBMCs中mtDNA量との関連を統計学的に解析した。認められた多型性部位について、治療開始後1年の血液学的パラメータの変化率との関連、リポアトロフィー、及び末梢神経障害の有無との関連を統計学的に解析した。

(倫理面への配慮)

遺伝子研究については、医科学研究所倫理審査委員会に申請し、承認を受けた。HIV感染者の遺伝子多型性研究においては倫理審査委員会で承認を得た同意書に従って研究の趣旨を説明し、文書によるインフォームドコンセントを得た。

C. 研究結果

HIV感染患者65人について13ヶ所のPGC-1のSNPs解析を行った。解析した内訳を以下に示す。

Promoter IMS-JST108966 (T→C); T/T n=58 (89.2%), T/C n=6 (9.2%), C/C n=1 (1.5%), promoter IMS-JST pGCpr60 (C→G); C/C n=15 (23.1%), C/G n=35 (53.8%), G/G n=15 (23.1%), promoter IMS-JST108967 (A→G); A/A n=20 (30.8%), A/G n=32 (49.2%), G/G n=13 (20.0%), promoter IMS-JST 108968 (C→T); C/C n=13 (20.0%), C/T n=29 (44.6%), T/T n=23 (35.4%), intron4 in 4SNP1F (T→G); T/T n=50 (76.9%), T/G n=15 (23.1%), G/G n=0, intron4 in 4SNP2R

(T→C); T/T n=41 (63.1%), T/C n=22 (33.8%), C/C n=2 (3.1%), Exon8 Thr394Thr (G→A); G/G n=43 (66.2%), G/A n=19 (29.2%), A/A n=3 (4.6%), Exon8 Gly482Ser (G→A); G/G n=19 (29.2%), G/A n=29 (44.6%), A/A n=17 (26.2%), Exon8 IMS-JST 108973 (G→A); G/G n=19 (29.2%), G/A n=29 (44.6%), A/A n=17 (26.2%), Exon9 IMS-JST 080370 (C→T); C/C n=41 (63.1%), C/T n=22 (33.8%), T/T n=2 (3.1%), Exon13-3UTR (G→A); A/A n=65 (100.0%), Exon13-3UTR IMS-JST 130419 (G→A); G/G 42 (64.6%), G/A n=21 (32.3%) A/A n=2 (3.1%), Exon13-3UTR IMS-JST 027281 (A→G); A/A n=47 (72.3%), A/G n=16 (24.6%), G/G n=2 (3.1%)

65人の患者背景は、男性55人、女性10人、抗HIV治療を受けたことがない患者7人、PIを含む抗HIV療法を受けた患者45人であった。未治療患者の1年間の臨床検査成績の変動とPGC-1 SNPsに相関のあるものはなかった。抗HIV療法を受けた患者のうちNFVを含む療法群で、PGC-1SNPと相関がみられた。PGC-1 promoter IMS-JST 108968の変異をもつ患者群で治療前の血糖値は野生型に比べ高値であったが、治療後1年経過後の血糖値はむしろ有意に低かった。(Mann-Whitney U test $p=0.029$; 図1, 2) また統計学的な有意差はなかったもののPGC-1 Exon8の Gly482SerとIMS-JST 108973の変異をもつ患者群で同様に血糖値が低下する傾向にあった。(図3)

POLG 遺伝子の解析を開始した1999年7月の時点で、POLGの多型性は主要なSNPデータベース(NCBI、東京大学医科学研究所)に見あたらなかった。当初は、29人の健常人において、よく知られたエクソン2内のCAGの繰り返し配列部分及び、エクソン14から22番までをシーケンシングした。その結果、CAGの繰り返しの数は29人中28人が10個のホモ接合体と、バリエーションに乏しく、エクソン

14から22番までのエクソン内には多型性を認めなかった。しかし、図4に示すように、エクソン17~18間のイントロン内に4bpの欠失と一つのSNP、エクソン19~20間のイントロン内に二個のSNPを発見した。引き続きCAG繰り返し部分を含めたこの五カ所の多型性部位について、35人のHIV-1感染症患者についても解析したところ、図4に示すような結果を得た。その後、2002年にはNCBIのSNPデータベースに、エクソン23内の非翻訳領域にグアニンの欠失が報告されたため、新たに、エクソン23及び、プロモーター領域(エクソン1を含む)についても解析したところ、プロモーター領域(エクソン1を含み-250まで)及びエクソン23の翻訳領域には多型性を認めなかったが、データベースと同様、エクソン23内の非翻訳領域にグアニンの欠失を認めた。この欠失部分に関して、さらに35人のHIV-1感染症患者についても解析したところ、図4に示すような結果を得た。

CAGrepeatを除いた5箇所の多型性と健常人29人のPBMCs中mtDNA量に関連があるか調べたが、genotypeによりmtDNA量に有意な違いは認められなかった。また、患者33人において、未治療時のmtDNA量との関連を検討したが、同様の結果であった。

35人中21人(60%)という高い頻度で、リポアトロフィー患者を認めた。しかし、POLGの各多型性とリポアトロフィーの有無の間に関連を認めなかった。また、5人の明かな薬剤性末梢神経障害患者を認めたが、その経過中にmtDNAの減少を認めなかった。

各多型性とHIV-1感染症患者の治療開始12ヶ月後の血液学的パラメータの変化(ベースラインを1.0として)との関連を統計学的に解析したところ、4bpの欠失(AGGT/AGGT, AGGT/del vs del/del)がLDH(1.37 ± 0.47 vs 1.07 ± 0.24 倍, $p=0.038$), ALP(1.16 ± 0.26 vs 0.95 ± 0.32 倍, $p<0.05$)及びTC(1.42 ± 0.46 vs

1.10±0.21倍, p=0.025)で、15482(G/G, G/A vs A/A)及び15507(C/C, C/T vs T/T)がRBC(0.84±0.16 vs 0.90±0.10倍, p<0.05)で、17915Gの欠失(G/G, G/del vs del/del)がWBC(1.10±0.43 vs 1.20±0.42, p<0.05)及びALP(1.01±0.31 vs 1.17±0.28, p<0.01)で、genotypeの違いにより有意な差を認めた。

D. 考察

PGC-1は、peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR γ)や他の核内ホルモンレセプター、エネルギー産生に関わる遺伝子転写の調節のcoactivatorとして働く。最近ではcyclic AMP response element binding (CREB) proteinによりPGC-1が活性化されると、肝臓での糖新生に関わる主要な酵素(phosphoenolpyruvate carboxykinase; PEPCKやglucose-6-phosphataseなど)の働きが活性化され糖新生が増加することが知られている。また、インスリンはPEPCKやPGC-1遺伝子発現をブロックすることで肝での糖新生を抑えると言われている。空腹時高血糖は2型糖尿病と密接な関係にあり、CREBによるPGC-1活性化は2型糖尿病の発症に関わっていることが示唆される。日本人におけるPGC-1遺伝子多型と2型糖尿病との関係は2002年に原らにより、PGC-1 Thr394ThrとGly482Serの変異型をもつ群で2型糖尿病との相関が報告されている。

本研究では、Thr394ThrとGly482Serの変異型をもつ群で2型糖尿病との関連は見られなかった。むしろNFV投与群において変異型をもつ群で統計学的な差はないものの血糖値が低下する傾向があり、IMS-JST 108968の変異型を持つ群では有意差を認めた。

NFVは、3T3-L1 adipocyteを用いた研究でインスリンを介したグルコース細胞内への取り込みを障害し、lipolysisを活性化することにより高血糖、高脂血症を起こすと言われている。本研究の結果は、今までに報告されているようなPGC-1変異型とNFVの副作用にむしろ逆

相関しており、PGC-1の変異型をもつとNFVの作用に何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆される。それはPGC-1変異型が糖新生に関わる転写調節にどのような影響を与えるのか、あるいはNFVの代謝や作用にどのような影響を与えるのか、まだ明らかになっていない。糖新生に重要なPGC-1とNFVの研究をさらにすすめることで、NFVが高血糖をもたらすメカニズムを解く糸口となるだろう。

少なくとも日本人においては、POLGのプロモーター領域(-250bpまで)とエクソン1番、及びポリマーゼmotif (a, b, c)を含む3'側のエクソン(14~23番)に、頻度の高い多型性は存在しないと考えられた。また、エクソン2内のCAGの繰り返し配列に関しては、繰り返し10個のアリル頻度が、97.7%とバリエーションに乏しく、この繰り返し数が、ミトコンドリアDNAを介した副作用発現と関係している可能性は低いと考えられた。イントロン、及びエクソン23の非翻訳領域に認められた多型と、PBMCs中のミトコンドリアDNA量、リポアトロフィー及び末梢神経障害発症の有無との関連は認められなかったが、治療開始一年後の血液学的データの変化において、幾つかのパラメータとPOLG多型性との間に有意な関連を認めた。しかし、本研究では対象者数が少なかったため、その意義に関して、現段階では不明であった。2002年に、Chenらは、7人の末梢神経障害のHIV-1感染症患者及び3人の無症状の患者において、POLGエクソン3、8、19番の配列を検討したところ、末梢神経障害の1患者と無症状の1患者において、エクソン8番にヘテロ接合体として silent mutationを認めたのみであったと報告している。また、乳酸アシドーシスのHIV-1感染症患者三人においては、全てのエクソンをシークエンスしたが変異を認めなかったと報告している。POLGの多型性と抗HIV薬による副作用の関連を検討したものは、本研究を含めて2つしか見あたらないが、

どちらもスケールが小さかったため、より大きなスケールでの検討が必要であろう。

E. 結論

NFV投与群におけるPGC-1の遺伝子多型をもつ患者群はNFV内服1年後の血糖値は低下傾向にあった。PGC-1の遺伝子多型は、NFVが血糖値に与える影響に関与していることが示唆された。

ヌクレオシド系逆転写酵素阻害薬の副作用発現の中心的ターゲットと考えられているDNAポリメラーゼγ遺伝子の多型性について検討をした。その結果、プロモーター領域、及びエクソンの翻訳領域には多型部位を認めなかった。イントロン、及び非翻訳領域のエクソンに認められた多型部位と幾つかの血液学的パラメータとの間に関連を認めたが、これらの意義については、より大きなスケールでの検証が必要と考えられた。

F. 健康危険情報

該当しない。

G. 研究発表

1 論文発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

1. Sakuragi, J., Iwamoto, A., and Shioda, T. Dissociation of genome dimerization from packaging functions and virion maturation of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 76:959-967, 2002.
2. Ohmine, T., Katsube, T., Tsuzaki, Y., Kazui, M., Kobayashi, N., Komai, T., Hagihara, M., Nishigaki, T., Iwamoto, A., Kimura, T., Kashiwase, H., and Yamashita, M. Anti-HIV-1 activities and pharmacokinetics of new arylpiperazinyl fluoroquinolones. *Bioorganic & Medical Chemistry Letters* 12:739-742, 2002.
3. Takahashi, T., Endo, T., Nakamura, T., Sakashita, H., Kimura, K., Ohnishi, K., Kitamura, Y., and Iwamoto, A. Dihydrofolate reductase gene polymorphisms in *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* in Japan. *J. Med. Microbiol.* 51:510-515, 2002.
4. Nakayama, E.E., Meyer, L., Iwamoto, A., Persoz, A., Nagai, Y., Rouzioux, C., Delfraissy, J.-F., SEROCO Study Group, Debre, P., McIlroy, D., Theodorou, I., and Shioda, T. Protective effect of IL4 -589T polymorphism on HIV-1 disease progression: Relationship with viral load. *J. Infect. Dis.* 185:1183-1186, 2002.
5. Tobiume, M., Takahoko, M., Yamada, T., Iwamoto, A., and Matsuda, M. Inefficient enhancement of viral infectivity and CD4 downregulation by Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nef from Japanese long-term nonprogressors. *J. Virol.* 76:5959-5965, 2002.
6. Koibuchi, T., Takahashi, T., Nakamura, T., Suzuki, M., Minamoto, F., Oyaizu, N., Yazawa, K., Mikami, Y., and Iwamoto, A. The first isolation of *Nocardia nova* from an HIV-1 infected individual in Japan. *J. Infect. Chemother.* 8:358-360, 2002.
7. Kobayashi, N., Taguchi-Nakamura, H., Goto, M., Nakamura, T., Nakamura, K., Sugiura, W., Iwamoto, A., and Kitamura, Y. Polymorphisms and haplotypes of the CD209L gene and their association with the clinical courses of HIV-positive Japanese patients. *Jpn. J. Infect. Dis.* 55:131-133, 2002.
8. Kawana-Tachikawa, A., Tomizawa, M., Nunoya, J., Shioda, T., Kato, A.,

- Nakayama, E.E., Nakamura, T., Nagai, Y., and Iwamoto, A. An efficient and versatile mammalian viral vector system for MHC class I/peptide complexes. *J. Virol.* 76:11982-11988, 2002.
9. Yamada, T., Kaji, N., Odawara, T., Chiba, J., Iwamoto, A., and Kitamura, Y. Proline 78 is crucial for human immunodeficiency virus type 1 Nef to down-regulate class I human-leukocyte antigen. *J. Virol.* 77:1589-1594, 2003.
10. Endo, T., Miura, T., Koibuchi, T., Nakamura, H., Takahashi, T., Odawara, T., Goto, M., Ajisawa, A., Iwamoto, A., and Nakamura, T. Molecular analysis of human herpesvirus 8 using single nucleotide polymorphisms in open reading frame 26. *J. Clin. Microbiol.* In press.
11. Miura, T., Goto, M., Hosoya, N., Odawara, T., Kitamura, Y., Nakamura, T., and Iwamoto, A. Depletion of mitochondrial DNA in HIV-1 infected patients and its amelioration by antiretroviral therapy. *J. Med. Virol.* In press.

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1.特許取得 なし
- 2.実用新案登録 なし
- 3.その他 なし

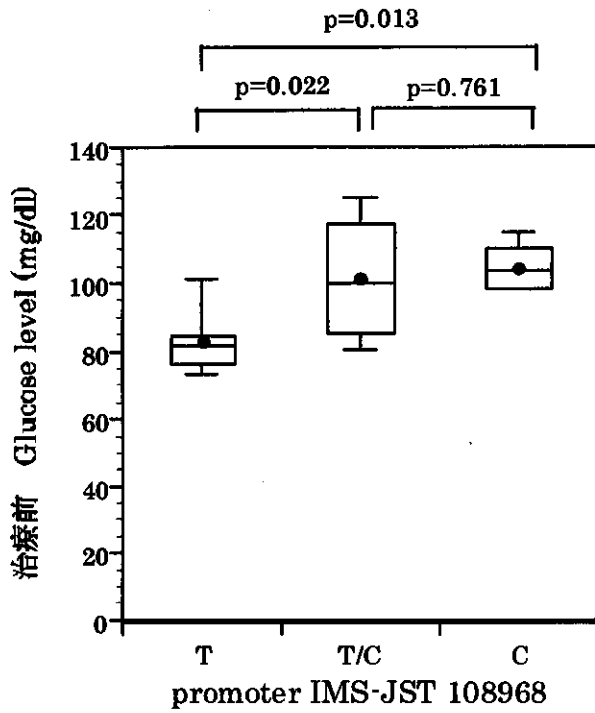


図 1

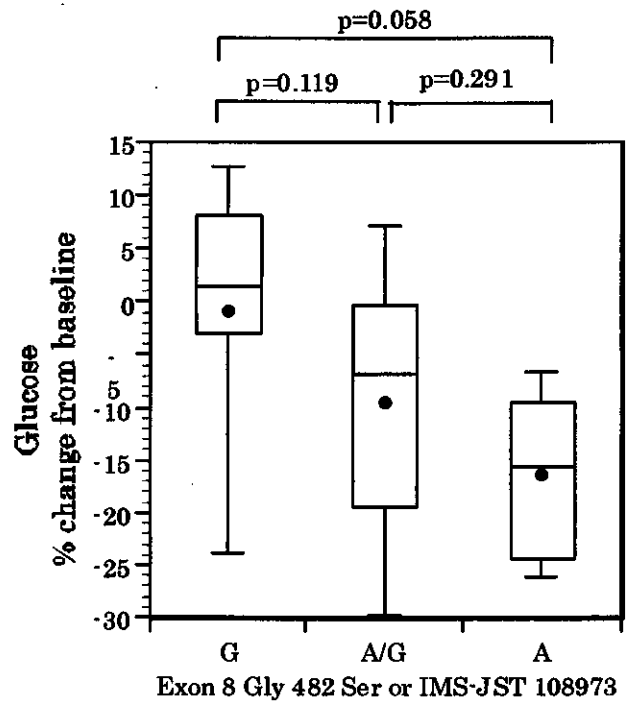


図 3

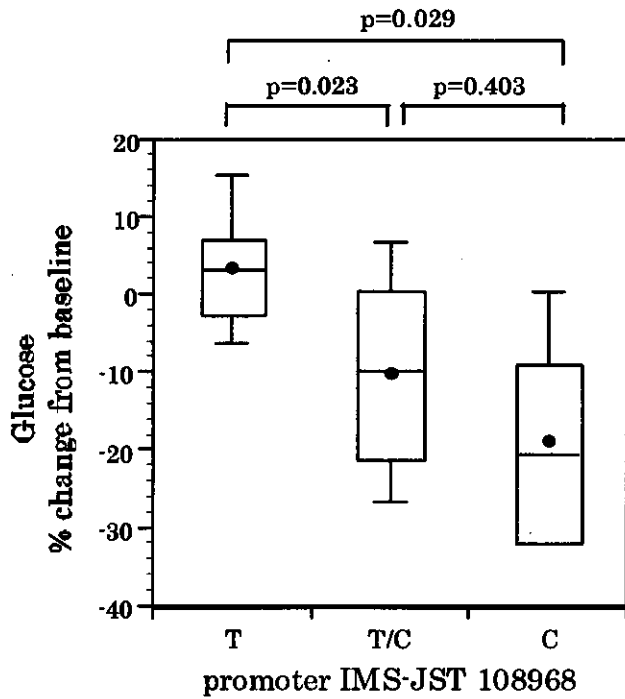


図 2

Box plots were 10 th, 25 th, 50 th, 75 th and 90 th percentile of glucose changes from baseline respectively. Circle plots were average percentile of changes.

図4. DNA ポリメラーゼ γ ・ α サブユニットの遺伝子多型とその頻度



	CAG repeat		13526-9 AGGT 欠失		13554 A→G		15482 G→A		15507 C→T		17915 G 欠失	
健康人	10/10	28	AGGT/AGGT	5	A/A	26	G/G	3	C/C	3	G/G	3
	10/11	1	AGGT/del	8	A/G	3	G/A	7	C/T	7	G/del	8
			del/del	16	G/G	0	A/A	19	T/T	19	del/del	18
HIV-1 感染 症患者	10/10	33	AGGT/AGGT	4	A/A	30	G/G	3	C/C	3	G/G	3
	10/11	2	AGGT/del	16	A/G	5	G/A	12	C/T	12	G/del	12
			del/del	15	G/G	0	A/A	20	T/T	20	del/del	20
アレル頻度	10repeat	125	AGGT	42	A	120	G	31	C	31	G	32
	(97.7%)		(32.8%)		(93.8%)		(24.2%)		(24.2%)		(25.0%)	
	11repeat	3	deletion	86	G	8	A	97	T	97	deletion	96
	(2.4%)		(67.2%)		(6.3%)		(75.8%)		(75.8%)		(75.0%)	
計		128		128		128		128		128		128

厚生労働科学研究費補助金（創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業）
「ゲノム情報を基盤としたエイズ病態制御因子の解明」分担研究報告書

HIV 母子感染ならびに小児エイズ発症に影響するウイルス側ならびに宿主側因子の解明に関する研究

分担研究者 市村 宏 金沢大学大学院医学系研究科教授

研究要旨 ケニア西部において逆転写酵素阻害剤であるジドブジン (Zdv) 短期投与による HIV 母子感染予防のコホート研究を行った。HIV 陽性の母親に分娩前 1 ヶ月間 Zdv を投与することにより（ほとんどの妊婦が自宅でお産するため分娩中の Zdv 投与は無いにもかかわらず）HIV の母子感染が有意（約 1/3）に減少すること、また短期 Zdv 投与を受けた母親から生まれた児は Zdv 投与を受けなかった母親から生まれた児に比べ有意に死亡率が低いことが明らかになった (Am. J. Trop. Med. Hyg. (in press).)。本年度の研究では、短期 ZDV 投与にもかかわらず母子感染が成立した原因が薬剤耐性ウイルスの誘導によるのかどうかを明らかにするために、これらの HIV 母子感染例から得られた検体を用いて、短期 ZDV 投与による薬剤耐性ウイルス誘導の有無と薬剤耐性ウイルスの児への感染の有無を検討した。上記のコホート研究で短期 ZDV 投与を受けたグループの母子感染例 3 組と、受けていないグループの母子感染例 3 組を対象とした。プロウイルス DNA 中の逆転写酵素領域を PCR (polymerase chain reaction) 法を用いて増幅し、ジデオキシ法を用いて塩基配列を決定した。その後、ZDV 耐性をひきおこすとされる既知のアミノ酸置換の有無を調べ、得られた塩基配列について近隣結合法を用いて分子解析を行った。その結果、児のウイルスには ZDV 耐性をひきおこすとされる既知のアミノ酸置換はみられなかった。また、短期 ZDV 投与前後の母親のウイルスクローンの一部に ZDV 耐性をひきおこすとされる既知のアミノ酸置換がいくつかみられたが、いずれも 2 次変異のみであった。したがって、短期 ZDV 投与にもかかわらず母子感染が起こった原因は、ZDV 耐性ウイルスが誘導され児へ感染したことによるものではないことが示唆された。次年度は、HIV 母子感染ならびに小児エイズ発症に影響する宿主側因子について検討を行う予定である。

A. 研究目的

ケニア西部において「短期 zidovudine (ZDV) 投与によるヒト免疫不全ウイルス (HIV) 母子感染予防のコホート研究」プロジェクトを 1996 年から 2001 年にかけて行った。このコホート研究において、自宅分娩が主流のケニア西部においても HIV に感染している妊婦に分娩前 1 ヶ月間逆転写酵素阻害剤である ZDV を投与することにより HIV

の母子感染を約 3 分の 1 に減少させることができることを確認した。しかし、ZDV の短期投与にもかかわらず 10% 余りの児に母子感染が成立した。本年度の研究は、短期 ZDV 投与にもかかわらず母子感染が成立した原因が、薬剤耐性ウイルスの誘導によるのかどうかを明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

前述のコホート研究で短期 ZDV 投与を行ったグループの母子 3 組と、行っていないグループの母子 3 組を用いた。ZDV 投与を受けた母親については ZDV 投与前と分娩後に 1 回ずつ、ZDV 投与を受けていない母親については分娩前に 1 回、児については両グループ共に 1 回ずつ血液を採取した。分娩の時期、ZDV 投与期間、血液採取時期について図 1 に示す。

これらの母子の末梢血リンパ球からゲノム DNA を抽出し、プロウイルス DNA のうち pol 領域の一部 (697 塩基) を PCR (polymerase chain reaction) 法を用いて増幅した。次に、その DNA 断片をクローニングし、ジデオキシ法を用いて塩基配列を決定し、ZDV 耐性をひきおこすとされる既知のアミノ酸置換の有無を調べた (図 2)。また、得られた塩基配列について近隣結合法を用いて分子系統樹を作成し、解析した。

(倫理面への配慮)

ケニア西部における「短期 zidovudine (ZDV) 投与によるヒト免疫不全ウイルス (HIV) 母子感染予防のコホート研究」プロジェクトは、ケニア中央医学研究所の研究審査委員会と倫理審査委員会の許可を受けて行われたものである。

C. 研究結果

1. 母親が感染していた HIV-1 サブタイプ (図 3)

6 人の母親のうち 4 人 (KS051, BU025, BU069, KS006) はいずれも HIV-1 サブタイプ A1 に感染していた。残りの母親の一人 (KS012) は 2 種類の異なる HIV-1 型サブタイプ A1 に重感染していた。残りの一人 (KS004) は HIV-1 型サブタイプ A1 と D に

重感染していた。

2. ZDV 耐性をひきおこすとされる既知のアミノ酸置換の有無 (表 1)

短期 ZDV 投与グループと非投与グループのいずれの母親から生まれた児のウイルスに ZDV 耐性をひきおこすとされる既知のアミノ酸置換はみられなかった。

短期 ZDV 投与グループの母親 KS012 と BU025 では、短期 ZDV 投与前後のウイルスクローンに ZDV 耐性をひきおこすとされる既知のアミノ酸置換はみられなかった。しかし、BU069 では、短期 ZDV 投与前のウイルスクローンには ZDV 耐性をひきおこすとされる既知のアミノ酸置換はみられなかったが、ZDV 投与後のウイルスクローンの一部 (調べた 20 クローンのうち 2 クローン) に ZDV 耐性をひきおこすとされる既知のアミノ酸置換 (いずれも 67 番目のアミノ酸がアスパラギン酸からアスパラギンへ置換) がみられた (図 4)。

一方、短期 ZDV 非投与グループの母親 KS006 と KS012 においても、ウイルス株にそれぞれ 1 クローンずつ ZDV 耐性をひきおこすとされる既知のアミノ酸置換 (KS006 : 67 番目のアミノ酸がアスパラギン酸からアスパラギンへ置換、KS012 : 70 番目のアミノ酸がリジンからアルギニンへと置換) がみられた。KS004 のウイルスクローンに ZDV 耐性をひきおこすとされる既知のアミノ酸置換はみられなかった。

3. 分子系統解析 (図 5, 6)

母親のウイルスクローンのうち ZDV 耐性をひきおこすとされる既知のアミノ酸置換がみられたクローンは、いずれも児のウイルスクローンとは同一の集団を形成していなかった。

D. 考察

短期 ZDV 投与グループの 1 例 (BU069) において、ZDV 投与後の母親のウイルスクローン 2 つに ZDV 耐性をひきおこすとされる既知のアミノ酸置換がみられた。しかし、これらのアミノ酸置換は二次変異であり、単独ではウイルスに耐性を付与しないとされている。また、ZDV 非投与グループの母親のウイルスクローンの一部にも ZDV 耐性をひきおこすとされる既知のアミノ酸置換がみられた。これらのことから、ZDV 投与後 BU069 の母親のウイルスクローンにみられた二次変異は短期 ZDV 投与により誘導されたものではないと考えられる。また、いずれの児のウイルスクローンにも ZDV 耐性をひきおこすとされる既知のアミノ酸置換はみられなかった。したがって、短期 ZDV 投与による ZDV 耐性ウイルスの誘導ならびに ZDV 耐性ウイルスの児への感染は無かったと考えられる。

今回、研究に参加した妊婦のほとんどが自宅で分娩しており、一部の妊婦では ZDV のコンプライアンスが良好ではなかった可能性が否定できない。また、HIV の母子感染は妊婦の分娩時血中ウイルス量が高い程、起こりやすいといわれている。これらのことから、ケニアの母子感染予防コホート研究において短期 ZDV 投与にもかかわらず母子感染が成立した例では、妊婦の分娩時血中ウイルス量が十分に減少していなかった可能性が考えられる。しかし、このコホート研究に参加した妊婦のほとんどが自宅で分娩しており、分娩時の血液を採取することができておらず、分娩時血中ウイルス量と母子感染率との関係について検討することはできなかった。

本研究で対象とした母子感染例の母親はい

ずれも HIV-1 型サブタイプ A1 に感染していた。HIV 母子感染予防に関する研究は、サブタイプ B (主に欧米やアメリカで流行) やサブタイプ C (主にインドで流行)、CRF01 (主にタイで流行) に関してはいくつか報告されているものの、サブタイプ A に関する研究 (特に、分子進化的研究) はこれまで報告がない。今後、HIV-1 サブタイプ A の母子感染について、さらに症例を増やし検討していきたい。

E. 結論

短期 ZDV 投与にもかかわらず 10% あまりの児に母子感染が起こっていた原因は ZDV 耐性ウイルスの誘導ならびに児への感染によるものではないことが示唆された。このように、短期 ZDV 投与による HIV 母子感染予防は比較的安全で、HIV 感染者の多くが生活している医療施設の十分でない地域においても有効であることが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Songok EM, Fujiyama Y, Tukei PM, Vulule JM, Kiptoo MK, Adungo NO, Kakimoto K, Kobayashi N, Genga IO, Mpoke SO, Ichimura H.: Experiences on the use of short course zidovudine to prevent perinatal transmission of HIV in rural Kenya. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* (in press).
- Ndemi N, Yumo H, Takehisa J, Takemura T, Kobayashi E, Ngansop C, Songok EM, Miura T, Ido E, Hayami M, Kaptue L and Ichimura H.: HIV-1 infection in Pygmy hunter gatherers is from contact with Bantu rather than with nonhuman primates. *AIDS*

Res. Hum. Retroviruses (in press).

- Songok EM, Lihana RW, Kiptoo MK, Lwenbe R, Genga IO, Kibaya R, Odhianmbo F, Kobayashi K, Ago Y, Ndemi N, Okoth F, Fujiyama Y and Ichimura H.: Identification of Env CRF 10 among HIV Variants Circulating in Rural Western Kenya. AIDS Res. Hum. Retroviruses 19 (2): 161-165, 2003.
- Haga T., Shimizu Y., Okoba M., Kumabe S., Goto Y., Shinjo T., Ichimura H., Kuwata T., Hayami M. and Miura T.: Construction and in vitro properties of chimeric simian and human immunodeficiency virus with the human TNF- α gene. Microbiol. Immunol. 46 (12): 849-855, 2002.
- Taniguchi Y, Takehisa J, Bikandou B, Mboundjelea I, N' Doundou-N' Kodja M-Y, M' Paudi OM, M' Pele P, Harada Y, Hayami M, Ichimura H., Parra HJ.: Genetic subtypes of HIV type 1 based on the *vpu/env* sequences in Republic of Congo-Brazzaville. AIDS Res. Hum. Retroviruses 18 (1):79-83, 2002.

2. 学会発表

- 小林永治、Nicaise NDEMBI、武久 盾、竹村太地郎、井戸栄治、速水正憲、市村 宏: カメルーンにおいては HIV 感染が HBV 感染、特に genotype E の感染に影響を与えている、第 50 回日本ウイルス学会学術集会総会、札幌、2002 年 10 月 16-18 日。
- 武久 盾、Nicaise NDEMBI、竹村太地郎、Elijah SONGOK、喜多佳世子、小林かな、井戸栄治、三浦智行、速水正憲、市村 宏: PCR 法を用いた新型 HIV 検出システムの確立、第

16 回日本エイズ学会総会、名古屋、2002 年 11 月 28-30 日。

- 喜多佳世子、Nicaise NDEMBI、武久 盾、Raphael LIHANA, Elijah SONGOK、小林かな、竹村太地郎、井戸栄治、三浦智行、速水正憲、市村 宏: コンゴ民主共和国における HIV-1 流行株の分子系統解析、第 16 回日本エイズ学会総会、名古屋、2002 年 11 月 28-30 日。
- Raphael LIHANA, Elijah SONGOK、武久 盾、Nicaise NDEMBI、小林かな、喜多佳世子、大石 功、藤山佳秀、市村 宏: Genetic subtypes of HIV-1 among the patients with sexually transmitted diseases (STD) in Nairobi, Kenya、第 16 回日本エイズ学会総会、名古屋、2002 年 11 月 28-30 日。
- Nicaise NDEMBI、武久 盾、竹村太地郎、小林永治、井戸栄治、三浦智行、速水正憲、市村 宏: HIV-1 infection in pygmy "hunter gatherers" is from contact with Bnatu rather than from contact with non-human primates、第 16 回日本エイズ学会総会、名古屋、2002 年 11 月 28-30 日。
- Elijah SONGOK、Rukia KIBAYA、武久 盾、Raphael LIHANA、小林かな、Nicaise NDEMBI、喜多佳世子、小林伸好、藤山佳秀、市村 宏: Evolution of HIV-1 in a dually infected individual: appearance and dominance of intersubtype recombination form、第 16 回日本エイズ学会総会、名古屋、2002 年 11 月 28-30 日。

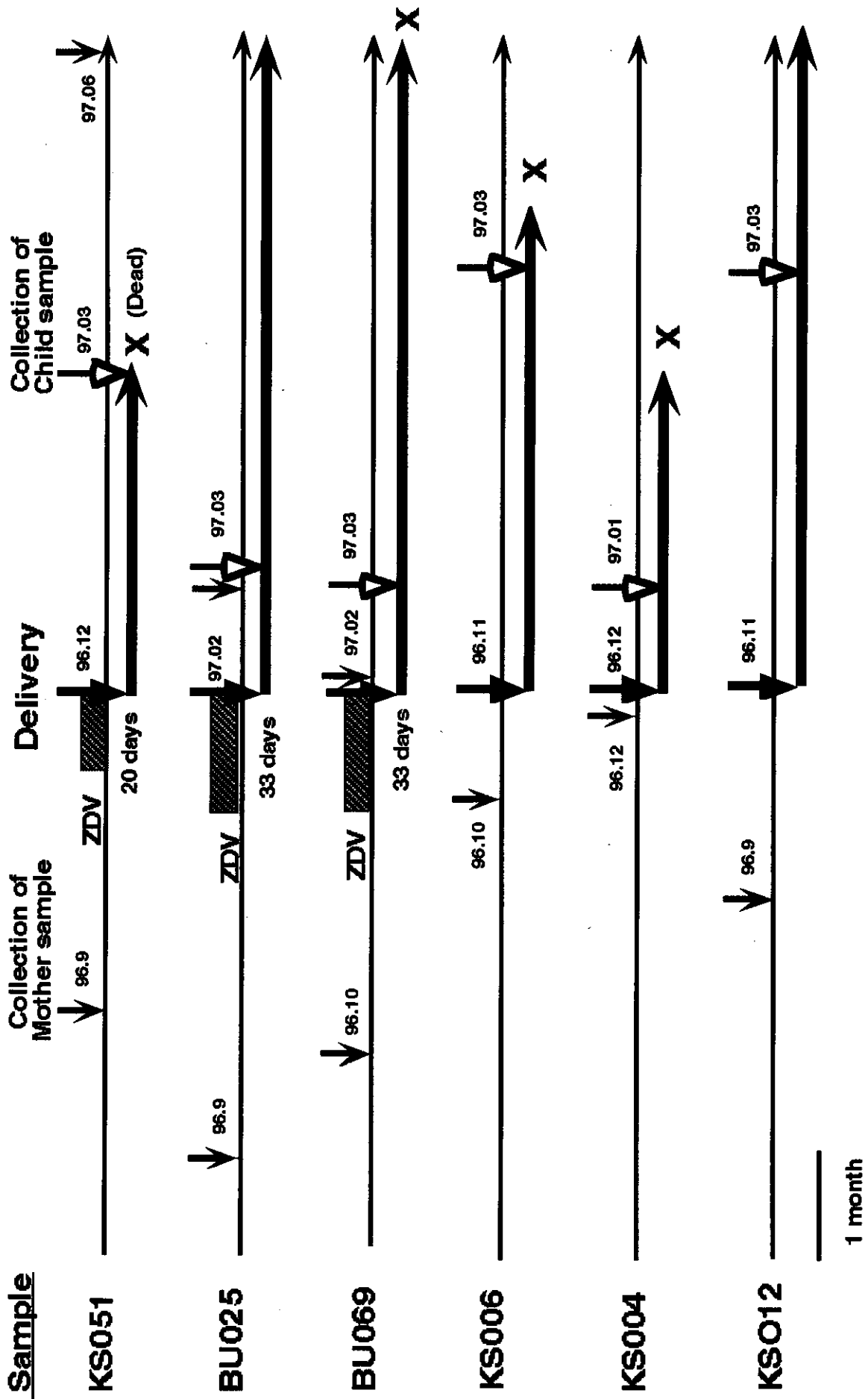
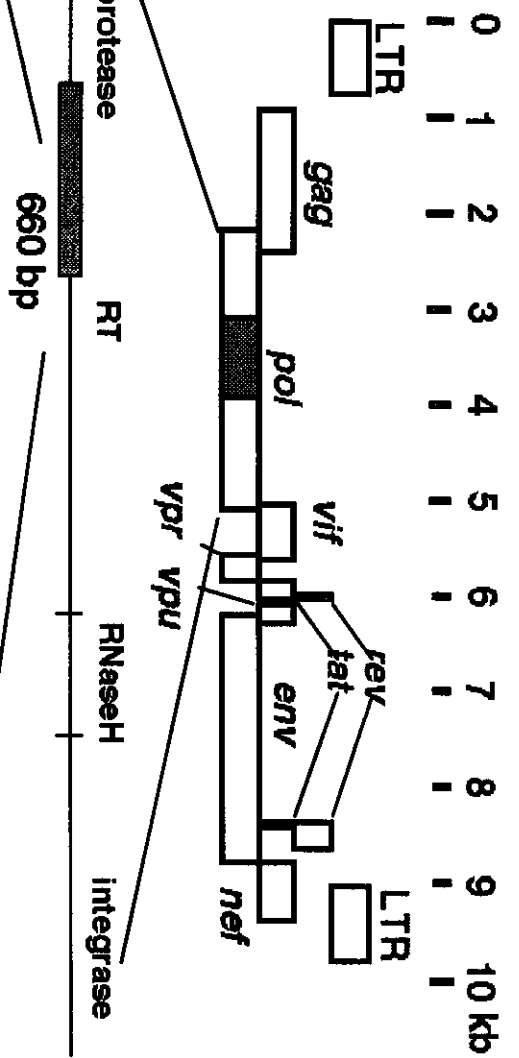


Fig. 1. The duration of zidovudine (ZDV) treatment and the time of sample collection.



Amino Acid Letter Codes									
A	Alanine	E	Glutamic acid	H	Histidine	L	Leucine	P	Proline
C	Cysteine	F	Phenylalanine	I	Isoleucine	M	Methionine	Q	Glutamine
D	Aspartic acid	G	Glycine	K	Lysine	N	Asparagine	R	Arginine
●	Primary Mutations	●	Secondary Mutations	▲	Insertion Mutation	⋮	Seldom observed in patient isolates		

Fig. 2. Mutations in the HIV-1 Reverse Transcriptase (RT) Gene Selected by AZT (Zidovudine)

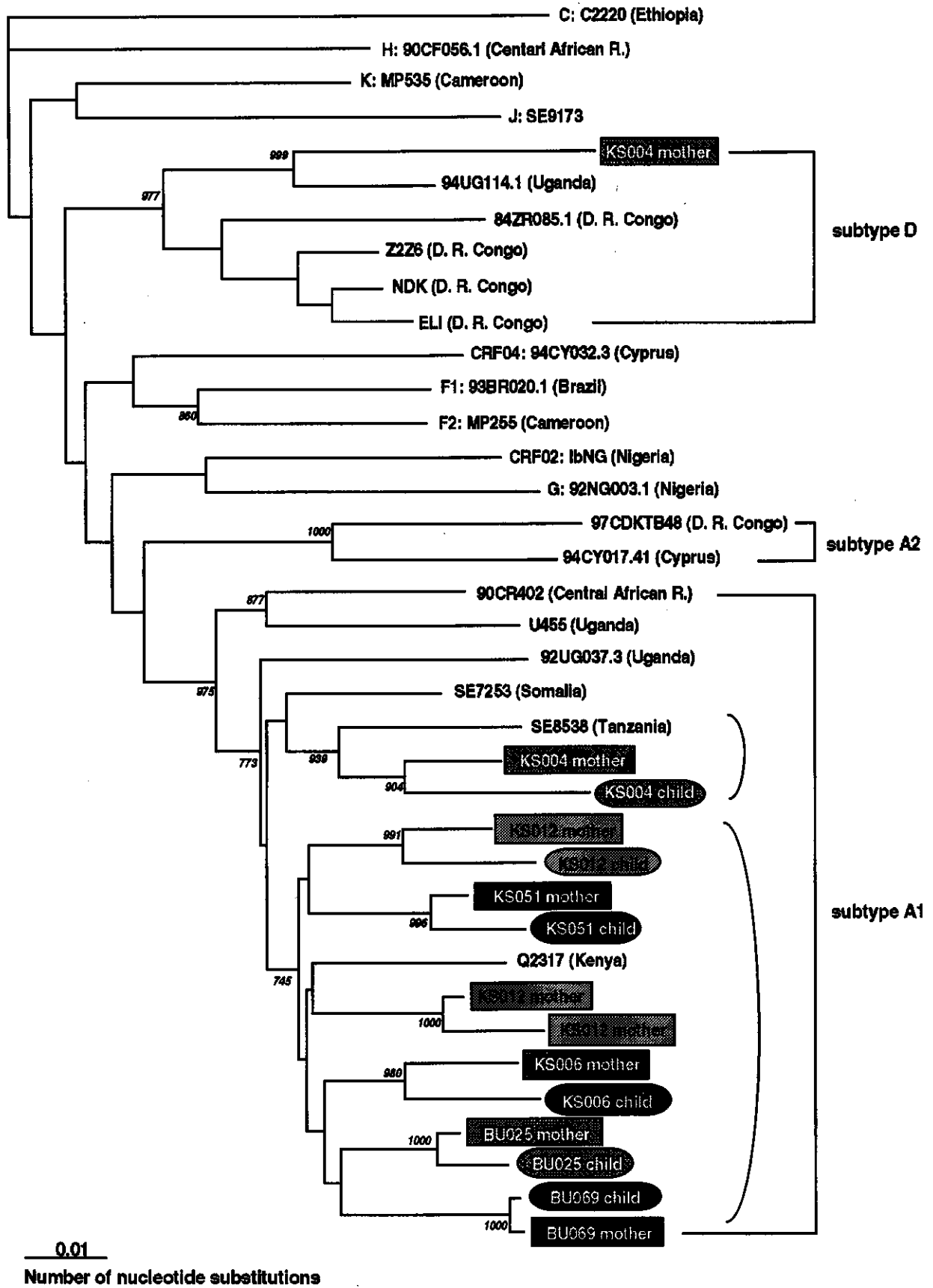


Fig. 3. A phylogenetic tree of the representative HIV-1 strains of the Kenyan mother-child pairs based on RT region.

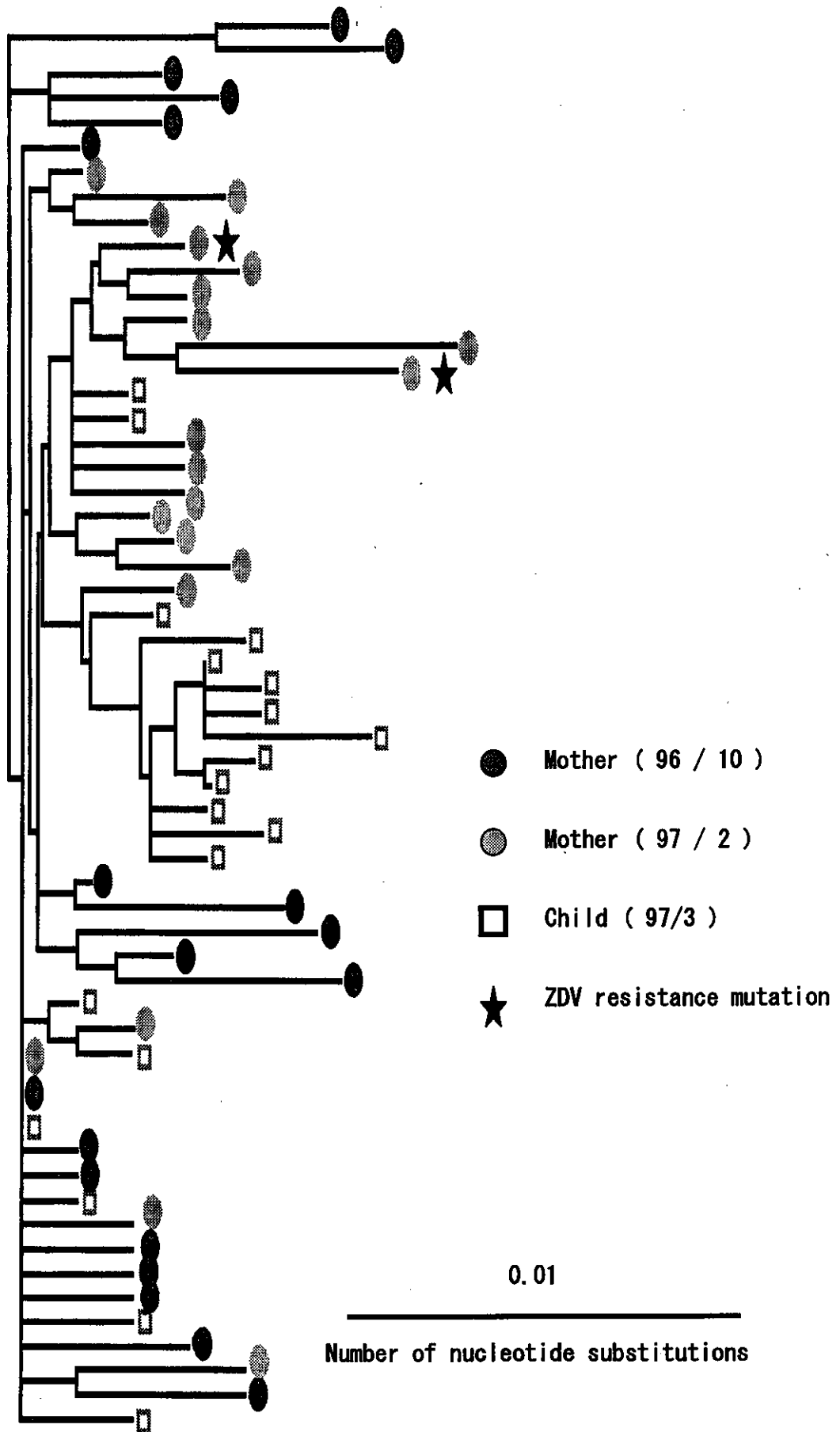


Fig. 5. A phylogenetic tree of the HIV-1 strains of the BU069 in ZDV groups based on RT region.

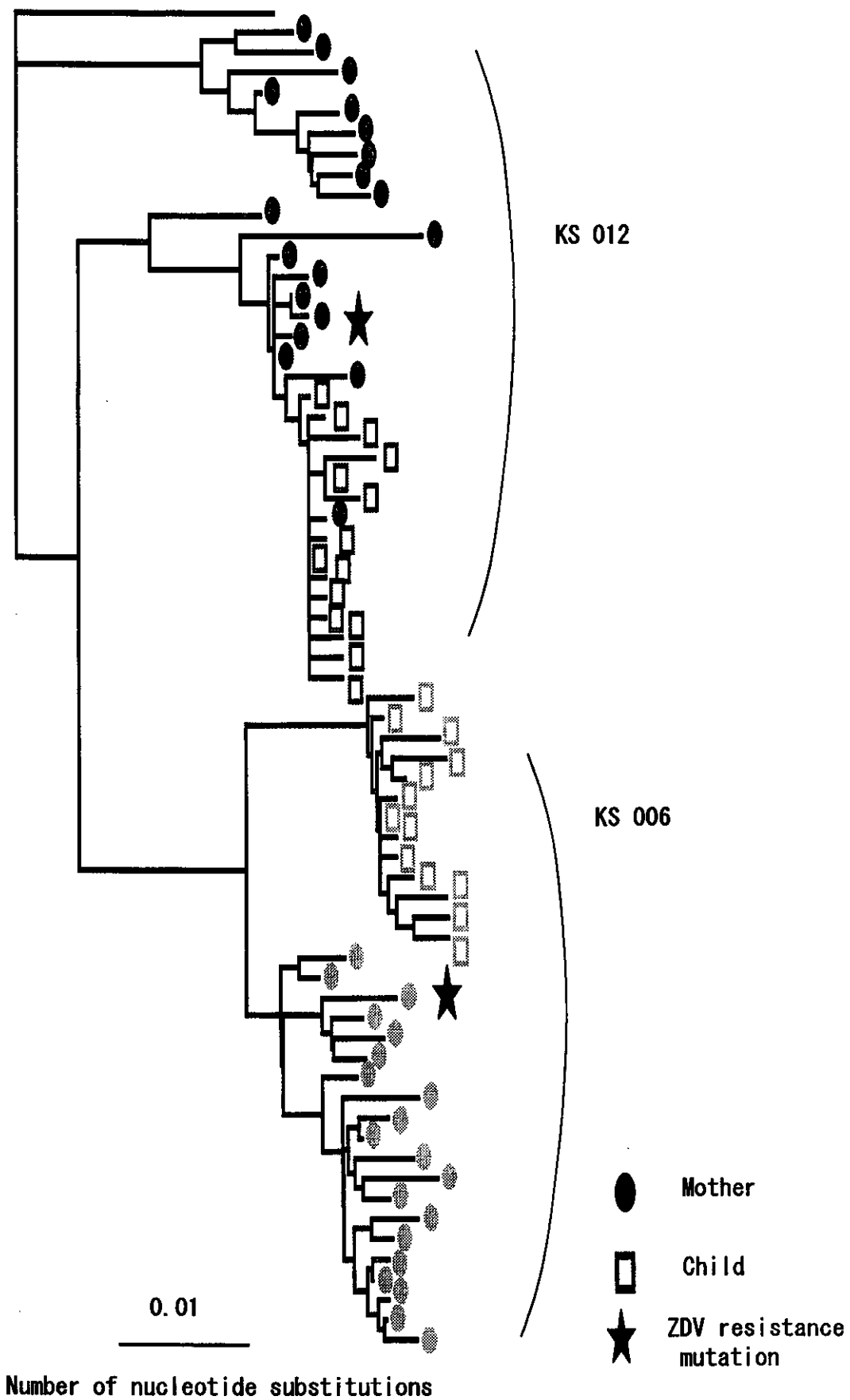


Fig. 6. A phylogenetic tree of the HIV-1 strains of the KS012 and KS006 based on RT region.

Subject	ZDV treatment	AA site												
		41	67	70	210	215	219	41	67	70	210			
	wild	M (Met)	D(Asp)	K (Lys)	L (Leu)	T (Thr)	K (Lys)							
	mutant	L (Leu)	N(Asn)	R (Arg)	W (Trp)	Y (Tyr), F (Phe)	Q (Gln)							
KS051		Mother (96/9)	0/19	0/19	0/19	0/19	0/19							
	Yes	Mother (97/6)	0/18	0/18	0/18	0/18	0/18							
		Child (97/3)	0/17	0/17	0/17	0/17	0/17	0/17						
BU025		Mother (96/9)	0/22	0/22	0/22	0/22	0/22							
	Yes	Mother (97/3)	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12							
		Child (97/3)	0/16	0/16	0/16	0/16	0/16	0/16						
BU069		Mother (96/10)	0/22	0/22	0/22	0/22	0/22							
	Yes	Mother (97/2)	0/20	2/20	0/20	0/20	0/20							
		Child (97/3)	0/16	0/16	0/16	0/16	0/16	0/16						
KS006		Mother (96/10)	0/20	1/20	0/20	0/20	0/20							
	No	Child (97/3)	0/13	0/13	0/13	0/13	0/13							
KS012		Mother (96/9)	0/19	0/19	1/19	0/19	0/19							
	No	Child (97/3)	0/14	0/14	0/14	0/14	0/14							
KS004		Mother (96/12)	0/21	0/21	0/21	0/21	0/21							
	No	Child (97/1)	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15							

Table 1. The number of the amino acid (aa) substitutions in RT gene associated with the reduction of ZDV sensitivity.

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

なし

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Suda Louisirochanakul, Huanliang Liu, Anuvat Roongpisuthipong, Emi E. Nakayama, Yutaka Takebe, <u>Tatsuo Shioda</u> and Chantapong Wasi.	Genetic analysis of HIV-1 discordant couples in Thailand: Association of CCR2 64I homozygosity with HIV-1 negative status.	J. AIDS.	29	314-315	2002
Yoshihiko Hoshino, Koh Nakata, Satomi Hoshino, Yoshihiro Honda, Doris Tse, <u>Tatsuo Shioda</u> , William N. Rom, Michael Weiden.	Maximal HIV-1 replication in alveolar macrophages during tuberculosis requires both lymphocyte contact and cytokines.	J. Exp. Med.	195	495-505	2002
Munehide Kano, Tetsuo Matano, Atsushi Kato, <u>Tatsuo Shioda</u> and Yoshiyuki Nagai.	Induction of HIV-1-Specific Neutralizing Antibodies in Mice Vaccinated with a Recombinant Sendai Virus Vector.	Jpn. J. Infect. Dis.	55	59-60	2002
Murakami N, Ye Y, Kawanishi M, Aoki S, Kudo N, Yoshida M, Nakayama EE, <u>Shioda T</u> , Kobayashi M.	New Rev-transport inhibitor with anti-HIV activity from Valeriana Radix.	Bioorg Med Chem Lett.	12	2807-2810	2002

<p>Jun-Ichi Sakuragi, Shigeharu Ueda, Aikichi Iwamoto, and <u>Tatsuo</u> <u>Shioda</u>.</p>	<p>Relationship between dimerization and packaging of HIV-1 genome RNA; a possible role of dimerization in genome packaging.</p>	<p>J. Virol</p>	<p>In press.</p>		
---	--	-----------------	------------------	--	--