

厚生労働科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

アジア・太平洋地域における HIV 感染症の疫学に関する研究

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者

武 部 豊

平成16（2004）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 -
「アジア・太平洋地域における HIV 感染症の疫学に関する研究」	
II. 分担研究報告書	
武部 豊	- 9 -
「ミャンマーおよび中国における流行形成メカニズムに関する分子疫学的解析」	
有吉 紅也	-15-
「北タイにおける HIV 感染者および配偶者コホートの維持と基礎医学研究への応用」	
草川 茂	-26-
「HIV-1 CRF08_BC 感染性分子クローンの樹立とその性状に関する研究」	
椎野禎一郎	-33-
「タイ型 HIV-1 ヴァリアント CRF01_AE の高度薬剤耐性変異に関する分子進化学的解析とそれを用いたレトロウイルス組換え解析系の開発の試み」	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-39-
IV. 研究成果の刊行物・別刷り	-41-

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）
H15 総括報告書

研究課題：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

課題番号：H15-エイズ-019

主任研究者：所属施設 国立感染症研究所エイズ研究センター 武部 豊

分担研究者：所属施設 国立感染症研究所エイズ研究センター 有吉 紅也

草川 茂・椎野禎一郎

(同エイズ研究センター 主任研究官)

研究要旨

本研究班は、アジアにおける流行形成のメカニズムに関する分子疫学的研究とタイにおけるコホート研究を主要な柱として HIV-1 感染症の疫学に関する研究を推進し、次の成果を得た。

(I) 「アジアにおける HIV 流行の分子疫学」 (武部班員)

これまでの研究によって、ミャンマー中部に、多様な組換えウイルス (unique recombinant forms, URF) が新生する世界的にも類例のないユニークなホットスポットが存在することを見出し、ミャンマーに分布する URF の組換え構造を詳細に解析した結果、中国の流行に重要な役割をもつ 2 種の組換え型流行株 (circulating recombinant form, CRF) (CRF07_BC と CRF08_BC) と構造的に密接な関連性が見いだされることから、両地域の流行が、その起源を共有し、相互に密接不可分の関係にあることをはじめて示した。

(II) 「北タイにおける HIV 感染者および配偶者コホートの維持と基礎医学研究への応用」 (有吉班員)

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、2 年 3 ヶ月を経た現在の時点 (平成 14 年 10 月) で、計 865 名 (106 名の抗 HIV 抗体陰性配偶者を含む) を非常に良好な追跡率 (93%) を持って追跡することが可能となっている。断面的観察による HIV 伝播リスク因子解析を行った結果、Index 症例の血中ウイルス量、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と考えられること。CCR2 と MHC クラス I 遺伝子領域のいずれの遺伝子多型も抗 HIV 抗体陰性配偶者との関連はみられないが、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 ($p=0.01$)、この傾向は、薬剤治療を受けた群でより強く見られること ($p=0.002$)。また 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 (抗 HIV 薬 1 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こと) を始めて定量的に示すなどの成果を得た。

(III) 「アジア型 HIV-1 ヴァリエントに関するウイルス学的研究」 (草川・椎野班員)

アジア型ウイルスの解析試薬として重要な意義をもつ感染性分子クローンの樹立のために、特に中国における HIV 流行に重要な HIV-1 subtype B', CRF07_BC, CRF08_BC の感染性分子クローン樹立の試みを進めている。現時点では CRF08_BC のみについて成功しているが、他のクローンの樹立のための取組みが進行中である。

これらの成果は、アジアの流行の成立、流行拡大の背景にある宿主側要因の解明、またアジアの中での我が国の HIV 感染症の将来動向の把握など公衆衛生上重要な意義があると考えられる。

A. 研究目的とその背景

アジアにおける HIV 累積感染者数は約 800 万人、昨年度 1 年間の新規感染者数は 100 万人、エイズ死者は約 50 万人と推測されており (図 1)、アジアにおけるエイズ危機はさらに深刻化する傾向にある

本研究班は、アジアにおける流行の最新動向の把握と流行形成のメカニズム、流行ウイルス株の生物学的性質の解明を目的として、次の 3 つの柱からなる研究を推進し、我が国およびアジアでの流行動向・将来動向を探ると共にアジアにおける流行制圧と予防に向けた研究の「科学的基盤」

の構築を目指すものである (図 2)。

(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)

アジア地域の HIV 流行の分子疫学研究を推進し、この地域における流行形成のメカニズムの全容解明を目指す。また海外共同研究者の協力のもとに東アジアにおける HIV 感染症の遺伝学的サーベイを行うと共に、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) 「北タイにおける HIV 感染者および配偶者コ

ホートの維持と基礎医学研究への応用」(有吉班員)

タイ北部ランバン県にて、HIV 感染者夫婦を対象としたコホート研究を開発・維持し、HIV 伝播機序・エイズ病態生理の解明のための免疫学的・遺伝学的研究を進める。

(柱 III)「アジア方 HIV ヴァリアントに関するウイルス学的研究」(草川・椎野班員)

アジアの流行の中で、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などアジアに特徴的な HIV 流行株に関するウイルス学的解析を進め、将来のワクチン開発の基盤整備を進める(草川班員)。また HIV のゲノム多様性拡大の重要な動因である組換え機構の解析のための *in vitro* 評価系の開発を目指す(椎野班員)。

B. 研究方法

(柱 I)「分子疫学研究」(武部班員)

① アジア各地域(中国雲南省、ミャンマー、タイなど)の感染者血液から、2.6-kb gag-RT 領域および *env* (C2/V3) 領域の塩基配列を決定、遺伝子型スクリーニングを行う。

① 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。

① 近隣結合法による系統樹解析および各種組換え点解析プログラム(bootscanning analysis, informative site analysis, subregion tree analysis)を用いて、組換え点の微細マッピングを行い、流行ウイルス株の系統関係、相互関係を検討した。

① 我が国に最も近い東アジア地域(韓国、台湾)の協力研究者の協力を得て、HIV 感染者のサブタイプ分布を調査。

(柱 II)「コホート研究」(有吉班員)

① ランバン県病院 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 アリールを PCR-MPH (Microtiter plate hybridization) 法により解析、患者データと比較検討した。③ コホート感染者 45 名(CD4 値>200、無治療)の末梢血リンパ細胞より 99 本の gag クローンを作成し、遺伝子解析を行った結果から、これらの Gag アミノ酸配列の中でもっとも頻度の高い Gag アミノ酸配列をベースにオーバーラッピングペプチド(それぞれ 10 アミノ酸が重複した 15-mer ペプチド 100 本)を作成、HIV 感染者および抗 HIV 抗体陰性配偶者の有する細胞性免疫反応を、このオーバーラッピングペプチドをマトリックス法により 10 本ずつプールしたものを抗原として用い、ペプチドを特異的に認識し IFN γ を産生する細胞を、Elispot assay により定量的に判定した。

(柱 III)「ウイルス学的研究」(草川・椎野班員)

① longPCR 法によって、中国型 HIV-1 ヴァリアントの完全長 HIV-1 クローンを構築、PBMC での感染性を指標として感染性の分子クローンを樹立し、そのウイルス学的性状を検討した。

① 逆転写酵素のフィンガー・パーム領域の変異が共同して高度多剤耐性をもたらす系を利用し、マーカー遺伝子として制限酵素切断サイトに同義置換変異を導入し、両領域の組換えを高度多剤耐性出現で評価する *in vitro* 系の構築を行った。

(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)「分子疫学研究」(武部班員)

① 中国雲南省西部に新生している新規組換えウイルス(unique recombinant form, URF)の詳細な構造解析の結果、中国に固有な組換え型流行株(CRF07_BC および CRF08_BC)と組換え点を共有するものが高頻度に検出されることを明らかにした。

① また、組換え点の微細マッピングの結果、中国型 CRF は、ミャンマー中部で検出される URF と直接的な構造的関連性があることを明らかにした。

① 組換え点周辺の塩基配列上の特徴を解析した結果、組換え点近傍には、逆転写酵素反応の減速をもたらす homopolymeric tract (同一塩基が 4 個以上連続している配列、G の場合は 3 個以上)が見い出され、homopolymeric tract が現実のフィールドの組換えウイルスにおける組換えのホットスポットとなっている可能性を示した。

① 東アジア諸国(韓国・台湾)の HIV 感染者のサブタイプ分布は次のようであった(図 3)。韓国(n=131): B (78.6%); A (9.9%); CRF01_AE (6.1%); C (3.1%); D (1.5%); G (0.8%)。台湾(n=1,012): B (67.6%); CRF01_AE (29.4%); C (1.5%); A (0.4%); D (0.1%); G (0.4%); unknown (0.6%)。台湾のサブタイプ分布はとりわけ我が国のそれに近いものであった。韓国では、これまでに 9 例の HIV-2 感染者が報告されている。遺伝子型が判明しているものは全例 HIV-1 subtype A で、一昨年われわれが報告した韓国に関連する HIV-2 subtype B 感染例は他には見い出されていない。

(柱 II)「コホート研究」(有吉班員)(図 7,8)

① コホート参加者 756 名のうち、96.3% (728 名)の極めて高い追跡率で追跡データが得られている。追跡期間の中央値は、602 日、追跡期間の合計は、456,274 日、1250 person-year-observation (PYO) である。

② 上記追跡情報が得られた 728 名について、各リスクグループの生存解析を行い、さらに Cox 比例ハザードモデルを用いてそれぞれの死亡リスク因子を補正した解析を行った結果、臨床症状{AIDS、その他 HIV 関連症状の有無}、CD4 値、ウイルス量と死亡との間に独立した関連性が確認された。

① 1995 年 10 月 2 日から 1999 年 10 月 31 日までに同外来を受診した感染者対象に生存解析を Cox Proportional Hazard Model により行い、抗 HIV 薬 1 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を得た。

① 死亡に関するハザード比の観点から、治療を必要とする患者の優先順位は、CD4 値 100 未満の有症状患者、CD4 値 100 未満の無症状患者、CD4 値 100 以上 200 未満の有症状患者、CD4 値 200 以上の有症状患者であり、初診時 CD4 値が 200 未満であっても 100 以上であれば HIV 関連症状のない患者の死亡率は、CD4 値が 200 以上の患者と統計的に明らかな有意差は見られなかった。

① 薬剤投与歴のない、しかも女性患者に限って、IL4-589T アリールをホモ接合体は、ヘテロ接合体あるいは野外型アリールのホモ接合体よりも、ウイルス量が有意に低く、CD4 値が有意に高かったが、その傾向は薬剤投与群で明確であった。また HLA-B*56 アリールを有するものが、そうでないものよりも有意にウイルス量が高く、さらには HLA-B*57 アリールを有するものが、そうでないものよりも有意にウイルス量が低いことが明らかにされた。

① p17 領域 A24 拘束性 CTL エピト - プ "KYKLVKLV" 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 - 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。

① 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 組であるが、興味あることに、いずれの宿主遺伝子多型も HIV 夫婦間伝播と有意な関連は見られず、他の未同定の宿主因子の関与が疑われる。また夫婦間で HLA アリールが一致している場合、コンタクト症例である妻のウイルス量が著しく高くなることを示唆する結果が得られた。

(柱 III)「ウイルス学的研究」(草川・椎野班員)

① 中国における重要な流行株である CRF08_BC の感染性分子クローンの分離に世界ではじめて成功し、そのウイルス学的・構造的特徴を明らかにした。

② 組換えと新たな点突然変異を区別するために、同義置換での改変が可能な 17 箇所の制限酵素切断部位をすべて改変した CRF01AE をベースとする組換えウイルスを作製し、*in vivo* 評価系開発の準備が進んだ。

D. 考察

(柱 I)「分子疫学研究」(武部班員)

① ミャンマー北中部と雲南省西部に分布する組換えウイルスの組換え点の中には相互に共通するものが多いことから、この地域の流行株が過去における共通の組換えに起源をもち、その後に行った2次的、3次的な組換えの結果、現在の URF が発生したものと示唆される。

① 雲南省西部地域は中国における IDU 流行の起源地と考えられ、この地域に新生した URF の中から現在の CRF07 と CRF08_BC の共通祖先が生まれたと推定される。

① HIV-1 の遺伝子組換えには塩基配列上の要因と harmful あるいは disadvantage をもち組換えを排除する選択圧の総合的な結果として選択されるものと考えられる。

(柱 II)「コホート研究」(有吉班員)

① ランバンカップル HIV コホートは、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 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ことは、特に医療上制約のある開発途上国における薬剤療法の指針作成に有意義な提言を与えるものと考えられる。

③ CTL からのエスケープ機序に関する我々のデータは、細胞内のエピト - 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 - 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、意義が大きいと考えられる。

⑤ 夫婦間で HLA アリールが一致している場合、コンタクト症例である妻のウイルス量が著しく高くなることを示唆する結果が得られた。夫婦間で HLA アリールが一致している場合、コンタクト症例である妻のウイルス量が著しく高くなることを示唆する結果が得られたことは重要である。これが確認されると、インデックス症例の HLA 環境下に適応・進化したウイルスが、その性質を維持したまま異性間伝播することを意味するデータとなり、この発見は、今後

のワクチン開発に重要な意味を含む。この現象が多様性の低い HLA-A 遺伝子座においては見られなかった点も重要である。これらのことは、ウイルスを制御する細胞性免疫として、頻度が比較的まれな HLA-B 遺伝子座によって拘束・認識される CTL が重要であることを示唆すると考えられる。

(柱 III)「ウイルス学的研究」(草川・椎野班員)

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。

E. 結論

① 組換えウイルスの詳細な構造解析から中国南西部が中国における IDU 流行のエピセンターであること、また中国とミャンマーにおける流行が相互に密接な関連性をもつことが組換えウイルスの構造の詳細な解析の結果明らかにされた。

① 中国におけるエイズの爆発的流行の原因の一つとなっている重要な組換えウイルス株である CRF08_BC の感染性分子クローンの分離に世界ではじめて成功した。

① 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と期待される。

① タイ・ランバンにおける HIV 感染者およびその配偶者コホート研究が進み、HIV 伝播・エイズ発症に関連する遺伝学的・免疫学的因子の解析が進んだ。

F. 健康危険情報

本年度は当班よりの報告はありません。

G. 研究発表

論文発表

(欧文)

主任研究者 (武部 豊)

1. Takebe, Y., Kusagawa, S., and Motomura, K. (2004). Molecular epidemiology of HIV: Tracking AIDS Pandemic. *Pediatric International*. (in press).

1. Takamura, S., Niikura, M., Li, T.C., Takeda, N., Kusagawa, S., Takebe, Y., Miyamura, T., and Yasutomi, Y. (2004). DNA vaccine-encapsulated virus like particles derived from an orally transmissible virus stimulates mucosal and systemic immune responses by oral administration. *Gene Ther*. (in press).

1. Kusagawa, S., Imamura, Y., Yasuoka, A., Hoshino, H., Oka, S., and Takebe, Y. (2003). Identification of HIV-2 subtype B transmission in East Asia. *AIDS Res Hum Retroviruses*. **19** (11): 1045-1049.

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* **17**: 2077-2087.

1. 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. Arch Virol*. **148** (5): 973-88.

1. 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* 17 (4): 14-17.

1. 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.
1. 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.

有吉班員

1. Yokomaku Y, Miura H, Tomiyama H, Kawana-Tachikawa A, Takiguchi M, Kojima A, Nagai Y, Iwamoto A, Matsuda Z, Ariyoshi K. Impaired Processing and Presentation of Cytotoxic-T-Lymphocyte (CTL) Epitopes Are Major Escape Mechanisms from CTL Immune Pressure in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *J Virol.* 2004 Feb; 78(3): 1324-32.
2. Ariyoshi K., Berry N, Cham F, Jaffar S, Schim van der Loeff M, Jobe O, N'Gom PT, Larsen O, Andersson S, Aaby P, Whittle H. Quantification of Human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-I) provirus load in a rural West African population: no enhancement of human immunodeficiency virus type 2 pathogenesis, but HTLV-I provirus load relates to mortality. *J Infect Dis.* 2003 Dec 1; 188(11): 1648-51.
3. Schim Van Der Loeff MF, Hansmann A, Awasana AA, Ota MO, O'Donovan D, Sarge-Njie R, Ariyoshi K., Milligan P, Whittle H. Survival of HIV-1 and HIV-2 perinatally infected children in The Gambia. *AIDS.* 2003 Nov 7; 17(16): 2389-2394.
4. Ariyoshi K., Matsuda M, Miura H, Tateishi S, Yamada K, Sugiura W. Patterns of point mutations associated with antiretroviral drug treatment failure in CRF01_AE (subtype E) infection differ from subtype B infection. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2003 Jul 1; 33(3): 336-42.
5. Alabi AS, Jaffar S, Ariyoshi K., Blanchard T, Schim van der Loeff M, Awasana AA, Corrah T, Sabally S, Sarge-Njie R, Cham-Jallow F, Jaye A, Berry N, Whittle H. Plasma viral load, CD4 cell percentage, HLA and survival of HIV-1, HIV-2, and dually infected Gambian patients. *AIDS.* 2003 Jul 4; 17(10): 1513-20.
6. Pathipvanich P, Ariyoshi K., Rojanawiwat A, Wongchoosie S, Yingseree P, Yoshiike K, Warachit P, Sawanpanyalert P. Survival benefit from non-highly active antiretroviral therapy in a resource-constrained setting. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2003 Feb 1; 32(2): 157-60.

草川班員

1. Takamura, S., Niikura, M., Li, T.C., Takeda, N., Kusagawa, S., Takebe, Y., Miyamura, T., and Yasutomi, Y. (2004). DNA vaccine-encapsulated virus like particles derived from an orally transmissible virus stimulates mucosal and systemic immune responses by oral administration. *Gene Ther.* (in press).
2. Kusagawa, S., Imamura, Y., Yasuoka, A., Hoshino, H., Oka, S., and Takebe, Y. (2003). Identification of HIV-2 subtype B transmission in East Asia. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 19 (11): 1045-1049.

3. 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* 17: 2077-2087.
4. 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* 17 (4): 14-17.
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.

(和文論文・総説)

武部班員 (主任研究者)

1. 武部 豊, 馬 艶玲, 楊 朝軍. 中国におけるエイズ流行: 迫り来る巨大危機とその分子疫学 特集・中国におけるエイズ対策の現状. *日中医学* 18 (4): 14-20 (財) 日中医学協会. 東京 (2003).
2. 武部 豊. ケモカインと HIV 感染. 「サイトカイン・ケモカインの統べて—基礎から最新情報まで—」 (笠松新平・松島綱治編集) 日本医学館. 東京 (2003) (in press).
3. 武部 豊. 後天性免疫不全症候群 (エイズ) の分子予防医学. 「分子予防環境医学—生命科学研究の予防・環境医学への統合」 (松島綱治 編集) 各論 2) 感染症. (分担) pp. 170-186. 医学書院. 東京 (2003).
4. 武部 豊. 「HIV 感染症への分子疫学的アプローチ」 「臨床とウイルス」 特集「エイズ」日本臨床ウイルス学会. 東京 (2003).
5. 武部 豊 (分担執筆). HIV-1 の組換え型流行株 (CRF). <特集> 内科キーワード 2003. *内科* 91 (6): (2003).
6. 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編). 朝倉書店. 東京 (2003) (in press).
7. 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).
8. 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).
9. 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).

有吉班員

- 1) 有吉紅也 「東南アジアにおける HIV・エイズ対策の取り組み」 *臨床とウイルス* 2003; 31(4): 283-291
- 2) 有吉紅也 「第 16 回日本エイズ学会シンポジウム記録 タイにおける取り組みと日本の協力」 *日本エイズ学会誌* 2003; 5(3): 194-196

学会発表

武部班員 (主任研究者)

1. 武部豊, 草川茂, 安岡彰, 岡慎一 (2003). HIV-2 感染国内症例の同定とその解析. 第 77 回日本感染症学会. (2003. 4. 17-18. 福岡)
2. 武部豊, 楊栄閣, 今村裕子, 本村和嗣, 草川茂, Kunlong Ben. (2003). 中国における HIV 流行はいかにして

- 形成されたか：流行のエピセンターとしての中国南西部（雲南省）。第 77 回日本感染症学会（2003. 4. 17-18. 福岡）
3. 武部豊. (2003). アジアにおける HIV 流行の分子疫学—新たな HIV-1 組換えウイルスについて. 平成15年度 微生物生物技術協議会第24回研究会 シンポジウム「HIV」(2003.7.11 福岡)
 4. 武部豊. (2003). アジアにおけるエイズ危機—流行形成のメカニズムを探る—. 合同学術集会ワークショップ「基礎と臨床の調和と融合」—「日本の AIDS, 世界の AIDS」(平成15年10月30日, 横浜)
 5. 武部豊, 横田侑子, 上原理恵子, 今村裕子, 草川茂. (2003). HIV-1 遺伝子組換えの特異点: *in vivo* 組換え点の微細マッピング. 第51回日本ウイルス学会 (2003.10.27-29. 京都)
 6. 武部豊, 今村裕子, 草川茂. (2003). HIV-1 サブタイプ B'の起源に関する進化的解析. 第51回日本ウイルス学会 (2003.10.27-29. 京都)
 7. 草川茂, 楊栄閣, 武部豊. (2003). HIV-1 CRF08_BC 感染性分子クローンの樹立とその性状の解析. 第51回日本ウイルス学会 (2003.10.27-29. 京都)
 8. 武部豊, 今村裕子, 草川茂. (2003). HIV-1 サブタイプ B'の起源とアジアにおける流行拡大に果たす役割. 第17回日本エイズ学会 (2003.11.27-29. 神戸)
 9. 武部豊, Ma Yanling, Yang Chaojun, 今村裕子, 横田侑子, 上原理恵子, 草川茂, Yang Rongge, Ben Kunlong. (2003). 中国におけるエイズ流行の巨大危機とその形成のメカニズム. 第17回日本エイズ学会 (2003.11.27-29. 神戸).
 10. Yutaka Takebe, Yuko Yokota, Shigeru Kusagawa, Yuko Imamura, Rieko Uehara, Yanling Ma, Chaojun Yang, Xiaojie Li, Xinming Li, Masakazu Yamamuro, Min Thwe, Tin Aung, Khin Yi Oo, and Hla Htut Lwin.(2004). Precise mapping of recombination breakpoints of HIV-1 unique recombinant forms circulating in Myanmar: *in vivo* sequence preference for recombination and the biological implications. XVIth Joint Scientific Meeting of the AIDS Panels, U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program (March 8-11,2004. Nashville, USA).

有吉班員

- 1) 横幕能行 ジラワン・シーサワット、ブサラワン・シーワンタナ、松田善衛、有吉紅也「タイ流行株臨床検体由来 gag-pol 発現 CTL 標的細胞パネル作成の試み」第51回日本ウイルス学会学術集会 2003年10月(京都)
- 2) 梅田知幸 有吉紅也 三浦秀佳 松田昌和 千葉智子 巖華 Myint Lay 柿沢淳子 濱武牧子 西澤雅子 杉

浦互 「CRF01_AE 感染症例に見出された新たな薬剤耐性獲得機序」 第17回日本エイズ学会学術集会 2003年11月27日~29日(神戸)

草川班員

1. 武部豊, 草川茂, 安岡彰, 岡慎一 (2003). HIV-2 感染国内症例の同定とその解析. 第77回日本感染症学会. (2003. 4. 17-18. 福岡)
2. 武部豊, 楊栄閣, 今村裕子, 本村和嗣, 草川茂, Kunlong Ben. (2003). 中国における HIV 流行はいかにして形成されたか：流行のエピセンターとしての中国南西部（雲南省）。第77回日本感染症学会（2003. 4. 17-18. 福岡）
3. 武部豊, 横田侑子, 上原理恵子, 今村裕子, 草川茂. (2003). HIV-1 遺伝子組換えの特異点: *in vivo* 組換え点の微細マッピング. 第51回日本ウイルス学会 (2003.10.27-29. 京都)
4. 武部豊, 今村裕子, 草川茂. (2003). HIV-1 サブタイプ B'の起源に関する進化的解析. 第51回日本ウイルス学会 (2003.10.27-29. 京都)
5. 草川茂, 楊栄閣, 武部豊. (2003). HIV-1 CRF08_BC 感染性分子クローンの樹立とその性状の解析. 第51回日本ウイルス学会 (2003.10.27-29. 京都)
6. 武部豊, 今村裕子, 草川茂. (2003). HIV-1 サブタイプ B'の起源とアジアにおける流行拡大に果たす役割. 第17回日本エイズ学会 (2003.11.27-29. 神戸)
7. 武部豊, Ma Yanling, Yang Chaojun, 今村裕子, 横田侑子, 上原理恵子, 草川茂, Yang Rongge, Ben Kunlong. (2003). 中国におけるエイズ流行の巨大危機とその形成のメカニズム. 第17回日本エイズ学会 (2003.11.27-29. 神戸).
8. Yutaka Takebe, Yuko Yokota, Shigeru Kusagawa, Yuko Imamura, Rieko Uehara, Yanling Ma, Chaojun Yang, Xiaojie Li, Xinming Li, Masakazu Yamamuro, Min Thwe, Tin Aung, Khin Yi Oo, and Hla Htut Lwin.(2004). Precise mapping of recombination breakpoints of HIV-1 unique recombinant forms circulating in Myanmar: *in vivo* sequence preference for recombination and the biological implications. XVIth Joint Scientific Meeting of the AIDS Panels, U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program (March 8-11,2004. Nashville, USA).

H 知的財産権の出願・登録状況

- (主任研究者 武部 豊) (草川班員)
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)

図1. アジアにおけるHIV流行の現状

アジアにおけるエイズ流行の連鎖反応

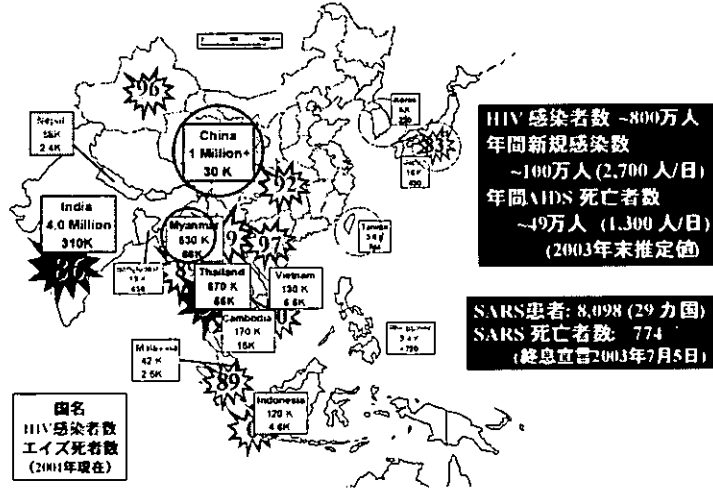


図2. 班の構成と研究目標

アジア・太平洋地域におけるHIV感染症の疫学研究班

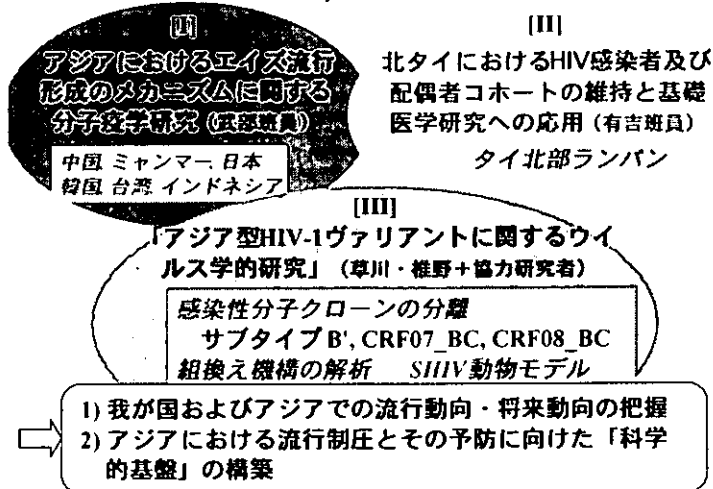


図3. ミャンマーURFは中国型CRFと組換え点を共有している - ミャンマーと中国の流行の密接な相互関係

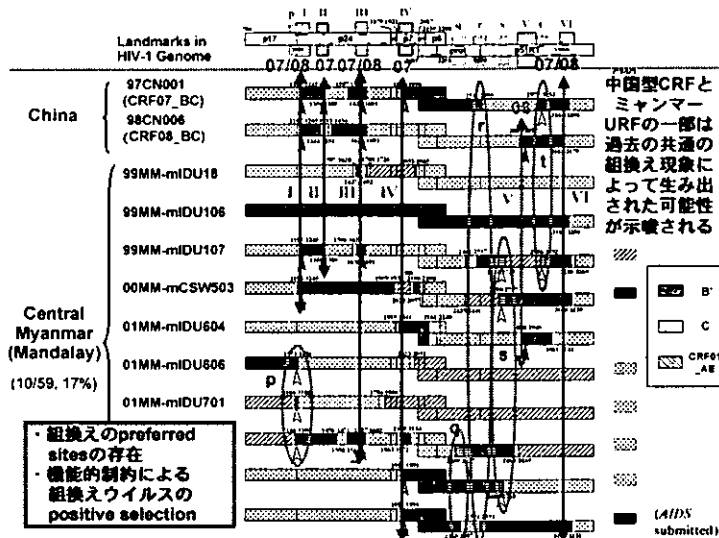


図4. アジアにおけるウイルスの流れと近隣の東アジア諸国（韓国・台湾および日本）におけるサブタイプ分布

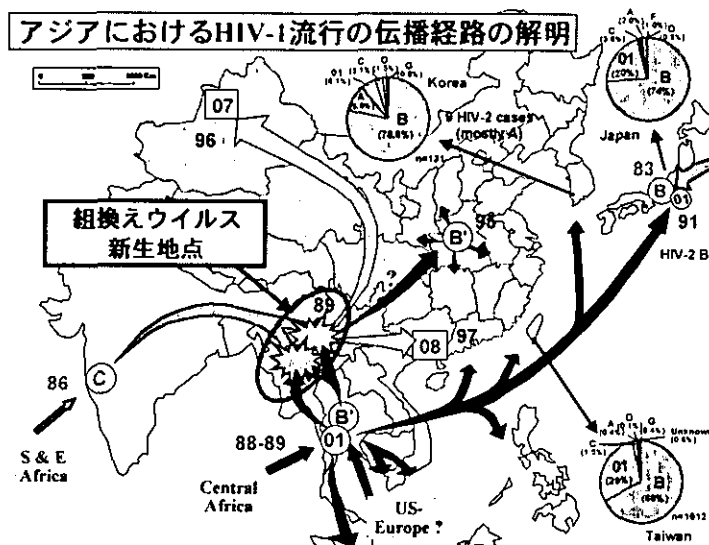


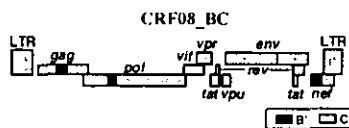
図5. アジア型HIV-1ヴァリエントに関するウイルス学的研究（草川班員+研究協力者）

「アジア型HIV-1ヴァリエントに関するウイルス学的研究」

アジア型HIV-1 variantの感染性分子クローニングの分離とそれを用いた研究試薬・解析系の整備（草川班員）

→アジア型（特に中国型）HIVヴァリエントの生物学的性質の解明と将来のワクチン開発に向けた基礎研究推進への研究基盤の整備

CRF08_BC (JV submitted)
CRF07_BC (on-going)
B' (on-going)



SHIV
Clade-specific HIV-1 gene expression → RT/Protease
Serological subtyping of HIV-1 infections
Drug-resistance study (clade-specific properties)
mAb

図6. 薬剤耐性を利用したin vitro組換え検出系の開発（椎野班員）

薬剤耐性を利用したin vitro組換えウイルス簡易検出系の開発

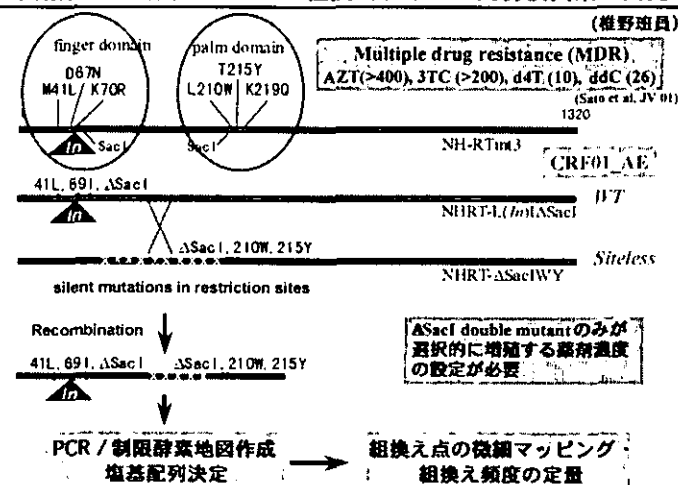


図7. ランバン・コホートの国際的ネットワーク

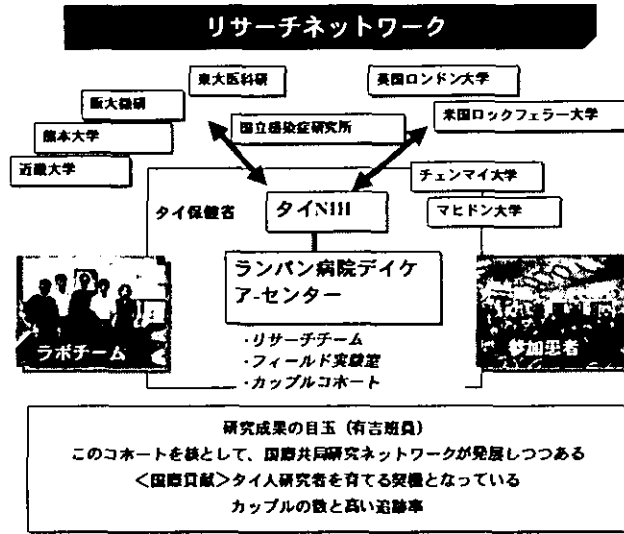
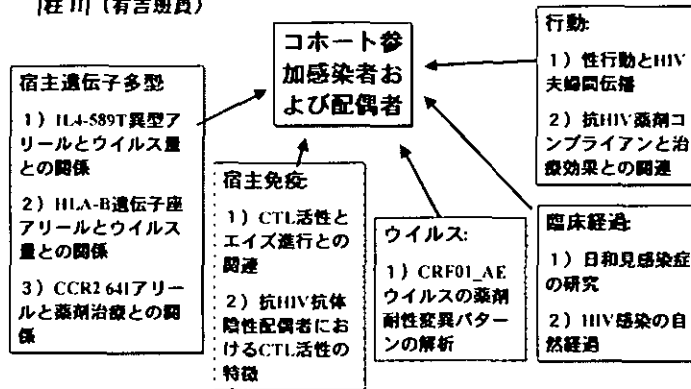


図8. ランバン・コホートの現状と研究プロジェクト

北部タイ・ランバンコホート：基礎医学研究への応用

(注 川) (有吉班員)



759 名のHIV感染者+106名の未感染配偶者(うち74例がdiscordant couple)
 (2000年7月-2002年10月) 追跡率(90%);
 観察期間(中間値) 602 (338-1002) 日; 計 1,250 person-years of observation

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 15 年度分担研究報告書

研究課題：ミャンマーおよび中国における流行形成メカニズムに関する分子疫学的解析

分担研究者： 武部 豊（国立感染症研究所エイズ研究センター 室長）
研究協力者： 草川 茂・椎野禎一郎（同エイズ研究センター 主任研究官）
Yanling Ma, Chaojung Yang（日中医学協会研究者）
Xinming Li, Xiaojie Li, 山室雅一
（エイズ予防財団リサーチレジデント）
Hlat Htut Lwin, Min Thwe, Tin Aung, Khin Yi Oo
（ミャンマー保健省エイズ対策プログラム）
Xueshan Xia, Kunlong Ben（中国科学院昆明動物学研究所）

研究要旨 これまでの研究によって、ミャンマーおよび隣接する中国雲南省に世界的にも類例のない組換えウイルスの新生地点が存在することを明らかにした。これら地域における HIV 流行は、タイでの流行発生の一年後の 1989 年に、ほぼ軌を一にして開始しており、流行相互に極めて密接な関係が存在することが推測される。そこで、われわれは、ミャンマーで見出した 10 種の組換えウイルス (unique recombinant forms, URFs) の構造を決定し、それらのもつ組換え点の位置の詳細な相互比較を行い、両地域における流行の相互関係の解明を目指した。その結果、

ミャンマー-URFs のもつ組換え点の多くは、中国における流行に重要な役割をもつ組換え型流行株 (circulating recombinant form, CRF) (CRF07_BC と CRF08_BC) のもつ組換え点と一致しており、両地域における流行が起源を共有する可能性をはじめて示した。

この知見は、とりわけ、アジア地域における新たな流行のフォーカスとして注目されている中国での流行の成立ちを理解し、我が国を含むアジア地域におけるエイズ流行の予防制圧に向けた取組みを考える上で重要な情報を与えるものと考えられる。

A 研究の背景とその目的

われわれは、これまでの研究によって、ミャンマー中部および隣接する中国雲南省西部に世界的にもほとんど類例のないユニークな組換えウイルス新生のホットスポットを見出した。これら 2 地域の流行は、歴史的にみると、タイの注射薬物乱用者 (injecting drug user, IDU) 間の HIV outbreak の 1 年後の 1989 年に、ほぼ軌を一にして始まっており、流行相互に何らかの関係がある可能性が推測される。

そこで、われわれは、ミャンマー中部で発見した 10 種の組換えウイルス—われわれはこれをマンダレー-URF (unique recombinant forms) と名づける—と中国に分布する 2 種の組換え型流行株 (CRF07_BC と CRF08_BC) との構造比較を行い、両地域間における流行の相互関係の解明を目指した。

本研究は、中国での巨大流行 (Titanic peril, UNAIDS) というアジア地域の流行の様相を一変させる大きなインパクトを及ぼしうる危機がどのようにして生まれたかを理解し、それに対する予防制圧の取組みを考える上で重要な情報をもたらすものと期待されよう。

B 研究方法

① ミャンマーの首都ヤンゴンと中部の都市マンダレーの IDU および性的ルートによる感染

者から得られた血漿検体を鋳型として、gag (p17), env (C2/V3) および 2.6 kb の gag-RT 領域の塩基配列を決定した。

② 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した。

③ diversity plot, 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、組換え点の微細マッピングを行い、分離ウイルスの組換え構造の詳細を検討した。組換え点の座標は Informative site analysis によって得られた情報をもとに HXB2 numbering engine (HIV/SIV sequence locator) によって決定し、HXB2 標準座標に対する相対位置を明らかにすることによって、各ウイルス株のもつ組換え点を相互比較した。

(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 ヤンゴンおよびマンダレーの IDU および性感染ルートによる感染者の両集団におけるサブタイプ分布 (図 1) に示すように、マンダレーの IDU の約 30% ; 性感染者の約 10% の高い頻度に組換えウイルスが見い出される。一方ヤンゴンでは、性感染者の 25% に組換えウイルスが検出されるが、IDU では B' が強力な founder 株となっていることが明らかになった。

② 組換えウイルス解析の手順を図 2 に示す。2.6-kb の gag-RT 配列に基づく解析の結果、ミャンマー由来の 59 株のうち 10 株 (17%) が、サブタイプ B' (サブタイプ B のタイ型ヴァリアント)、C および CRF01_AE の間の様々な組み合わせによる多様な組換えウイルスであることがわかった (図 2)。組換えが疑われる検体は、系統樹上、既知の遺伝子型のクラスターの外側に一種の outlier として検出される (図 2)。

③ ミャンマー由来の 10 株の組換えウイルスにおける組換え点は 2.6-kb の gag-RT 領域に 1-6 個 (平均 3.3 個) の高い頻度で見い出される (図 3)。

④ 組換え点の座標 (coordinate) の相互比較から、マンダレー URF の組換え点が、中国での流行に重要な 2 種の CRFs (CRF07_BC と CRF08_BC) のもつ組換え点の多くと共通であることが明らかとなった (図 3)。そのような組換え点は、CRF07_BC と CRF08_BC の両者に共通するサイト (サイト I, III, VI)、CRF07_BC と共通するサイト (II, IV)、と CRF08_BC と共通するサイト (V) の 3 種に分類された (図 4)。これらをカテゴリー 1 のサイトと名付ける。

⑤ 一方、組換え点には、サイト p のように、異なるサブタイプの間での組み合わせによる組み換えであるにもかかわらず、位置をほぼ共通とするサイトが 5 個 (サイト p-t) 見い出された (図 4)。これらのサイトを前者と区別して、カテゴリー 2 のサイトとよぶ。カテゴリー 2 のサイトにはサイト p や r のように、機能的タンパク質の読み取り枠 (ORF) のちょうど境界部に存在するケースがあることが指摘される (図 4, 5)。このことは遺伝子組換えがタンパク質の機能的な integrity を保持するように起っている可能性を示唆するものと考えられる。

D 考察

① マンダレー URF は、サブタイプ B', C および CRF01_AE の間の複雑な構造をもつ多重組換えウイルスであり、2.6-kb の gag-RT 領域における頻度から推定して、全ゲノム (9.7 kb) 当たり 10 個以上の組換え点をもっている可能性が示唆される。

② このような複雑な構造をもつ組換えウイルスの存在は、この地域のハイリスク集団が著しく高いリスク行動を行い、多種のウイルスに暴露されていること、またウイルスの高率の伝播を可能とする社会的ネットワークが存在することを示唆するものである。

③ マンダレー URF の組換え点が、中国の組み

換え型流行株 (CRF07_BC と CRF08_BC) の組換え点の多くと共通であるという発見は、中国における流行が、ミャンマーにける流行に密接不可分の関係があることを示すものである (図 6)。

④ サイト p-t のように、異なるサブタイプの間での組み合わせによる組換えであるにもかかわらず、位置をほぼ共通とするサイト (カテゴリー 2 のサイト) が見い出されることは、組換えの後に、viral fitness を維持や免疫学的なウイルスの排除メカニズムによる選択がおこっていることを示唆するものと考えられる。

E 結論

ミャンマー URF のもつ組換え点の詳細な解析から、ミャンマーの流行と中国の流行の密接な関連性を証明するはじめての実験的証拠が得られた。このことは、アジアの流行の中でも、取り分け注目され、また憂慮されている中国における巨大流行の成立を理解する上で重要な知見と考えられる。

またすでに明かにされているように、遺伝子組換えによって、複製エラーによって蓄積された変異群を一挙に獲得・シャッフルする (非連続変異の) メカニズムは HIV のゲノム多様性を飛躍的・加速度的に高める能率的な機構であり、HIV が環境変化に対応して、機敏かつ高能率に適應する現象 (抗エイズ薬に対する耐性、免疫学的エスケープ) のウイルス学的基盤であるとされる。本研究はその現象を現実のフィールドで見い出される組み換え株の構造解析によって明確にしたことに、もう一つの意義があるとされる。

F 健康危険情報

本年度は当班よりの報告はありません。

G 研究発表

論文発表

(欧文)

1. Takebe, Y., Kusagawa, S., and Motomura, K. (2004). Molecular epidemiology of HIV: Tracking AIDS Pandemic. *Pediatric International*. (in press).
2. Takamura, S., Niikura, M., Li, T. C., Takeda, N., Kusagawa, S., Takebe, Y., Miyamura, T., and Yasutomi, Y. (2004). DNA vaccine-encapsulated virus like particles derived from an orally transmissible virus stimulates mucosal and systemic immune responses by oral administration. *Gene Ther*. (in press).
3. Kusagawa, S., Imamura, Y., Yasuoka, A., Hoshino, H., Oka, S., and Takebe, Y. (2003). Identification of HIV-2 subtype B transmission in East Asia. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 19 (11): 1045-1049.
4. 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* 17: 2077-2087.

5. 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. Arch Virol.* 148 (5): 973-88.
6. 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* 17 (4): 14-17.
7. 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.
8. 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.

(和文論文・総説)

1. 武部 豊, 馬 艶玲, 楊 朝軍. 中国におけるエイズ流行: 迫り来る巨大危機とその分子疫学 特集・中国におけるエイズ対策の現状. *日中医学* 18 (4): 14-20 (財) 日中医学協会. 東京 (2003).
2. 武部 豊. ケモカインと HIV 感染. 「サイトカイン・ケモカインの統べてー基礎から最新情報までー」(笠松新平・松島綱治編集) 日本医学館. 東京 (2003) (in press).
3. 武部 豊. 後天性免疫不全症候群 (エイズ) の分子予防医学. 「分子予防環境医学ー生命科学の予防・環境医学への統合」(松島綱治 編集) 各論 2) 感染症. (分担) pp. 170-186. 医学書院. 東京 (2003).
4. 武部 豊. 「HIV 感染症への分子疫学的アプローチ」 「臨床とウイルス」 特集「エイズ」 日本臨床ウイルス学会. 東京 (2003).
5. 武部 豊 (分担執筆). HIV-1 の組換え型流行株 (CRF). <特集> 内科キーワード 2003. 内科 91 (6): (2003).
6. 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).
7. 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).

8. 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).
9. 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).

学会発表

1. 武部 豊, 草川茂, 安岡彰, 岡慎一 (2003). HIV-2 感染国内症例の同定とその解析. 第 77 回日本感染症学会. (2003. 4. 17-18. 福岡)
2. 武部 豊, 楊栄閣, 今村裕子, 本村和嗣, 草川茂, Kunlong Ben. (2003). 中国における HIV 流行はいかにして形成されたか: 流行のエピセンターとしての中国南西部 (雲南省). 第 77 回日本感染症学会 (2003. 4. 17-18. 福岡)
3. 武部 豊. (2003). アジアにおける HIV 流行の分子疫学ー新たな HIV-1 組換えウイルスについて. 平成 15 年度 微生物生物技術協議会第 24 回研究会 シンポジウム「HIV」 (2003.7.11 福岡)
4. 武部 豊. (2003). アジアにおけるエイズ危機ー流行形成のメカニズムを探るー. 合同学術集会ワークショップ「基礎と臨床の調和と融合」ー「日本の AIDS, 世界の AIDS」 (平成 15 年 10 月 30 日, 横浜)
5. 武部 豊, 横田侑子, 上原理恵子, 今村裕子, 草川茂. (2003). HIV-1 遺伝子組換えの特異点: *in vivo* 組換え点の微細マッピング. 第 51 回日本ウイルス学会 (2003.10.27-29. 京都)
6. 武部 豊, 今村裕子, 草川茂. (2003). HIV-1 サブタイプ B' の起源に関する進化的解析. 第 51 回日本ウイルス学会 (2003.10.27-29. 京都)
7. 草川茂, 楊栄閣, 武部 豊. (2003). HIV-1 CRF08_BC 感染性分子クローンの樹立とその性状の解析. 第 51 回日本ウイルス学会 (2003.10.27-29. 京都)
8. 武部 豊, 今村裕子, 草川茂. (2003). HIV-1 サブタイプ B' の起源とアジアにおける流行拡大に果たす役割. 第 17 回日本エイズ学会 (2003.11.27-29. 神戸)
9. 武部 豊, Ma Yanling, Yang Chaojun, 今村裕子, 横田侑子, 上原理恵子, 草川茂, Yang Rongge, Ben Kunlong. (2003). 中国におけるエイズ流行の巨大危機とその形成のメカニズム. 第 17 回日本エイズ学会 (2003.11.27-29. 神戸).
10. Yutaka Takebe, Yuko Yokota, Shigeru Kusagawa, Yuko Imamura, Rieko Uehara, Yanling Ma, Chaojun Yang, Xiaojie Li, Xinming Li, Masakazu Yamamuro, Min Thwe, Tin Aung, Khin

Yi Oo, and Hla Htut Lwin.(2004). Precise mapping of recombination breakpoints of HIV-1 unique recombinant forms circulating in Myanmar: *in vivo* sequence preference for recombination and the biological implications. XVIth Joint Scientific Meeting of the AIDS Panels, U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program (March 8-11,2004. Nashville, USA).

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)

図1. ミャンマーの2主要都市におけるサブタイプおよび組換えウイルスの分布

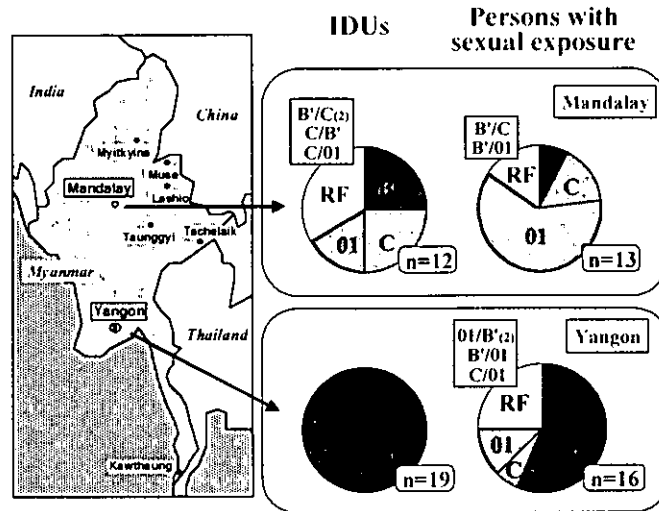


図2. 組換えウイルス検出・解析の手順

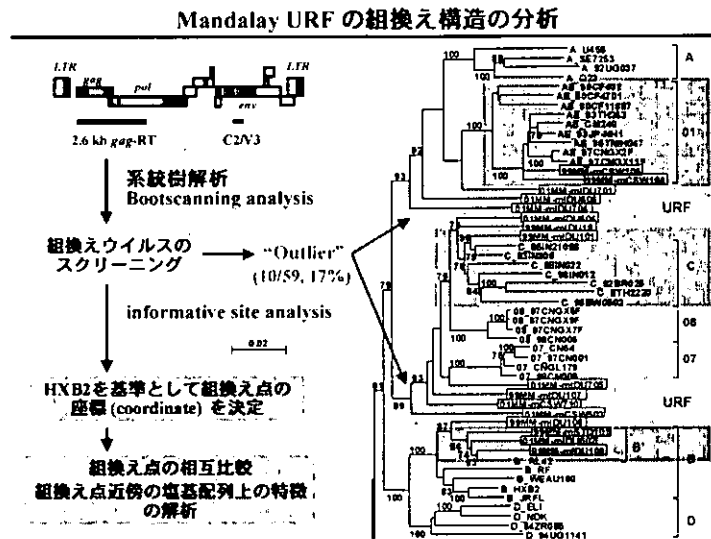


図3. Mandalay URFsと中国型CRF (CRF07_BCとCRF08_BC)のgag-RT (2.6 kb)領域のサブタイプ構造

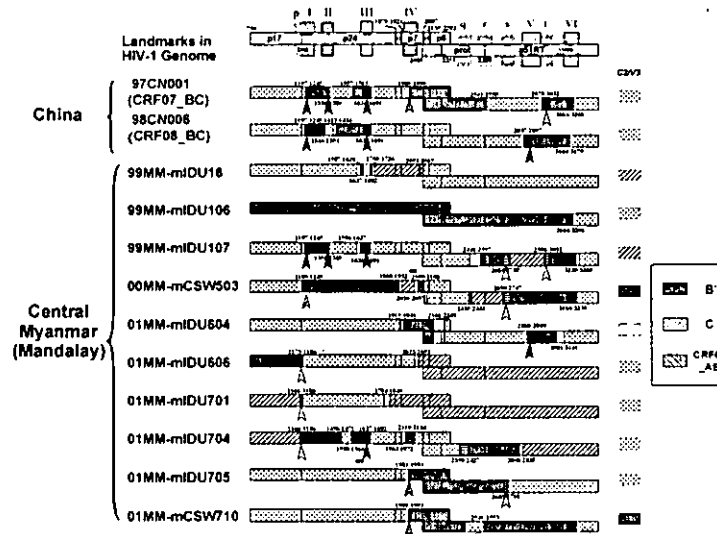


図4. Mandalay URFsと中国型CRF (CRF07_BCとCRF08_BC)の組換え点の多くが共有されている

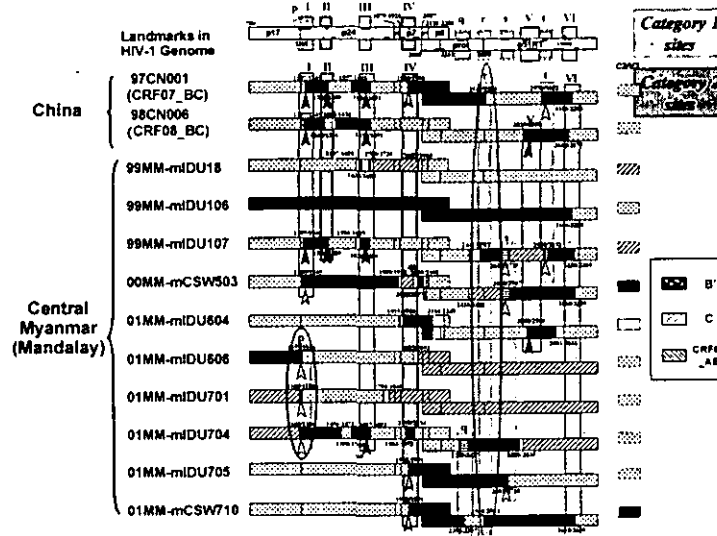


図6. ミャンマー中部における流行は中国における流行と密接な関連性をもっている

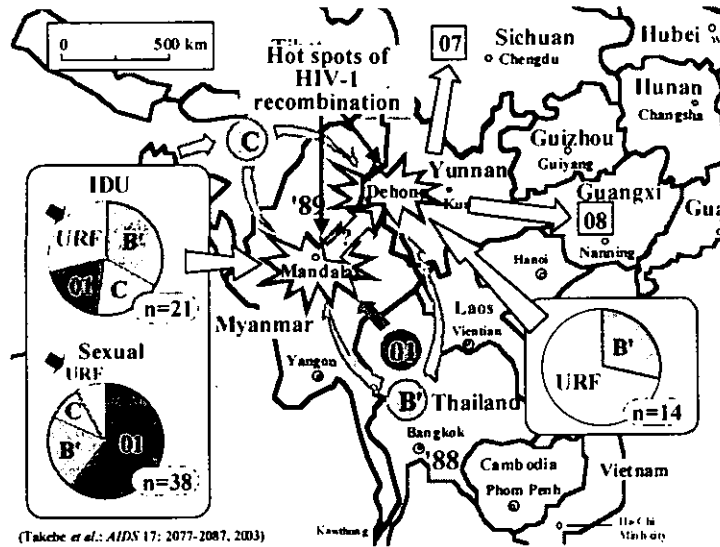
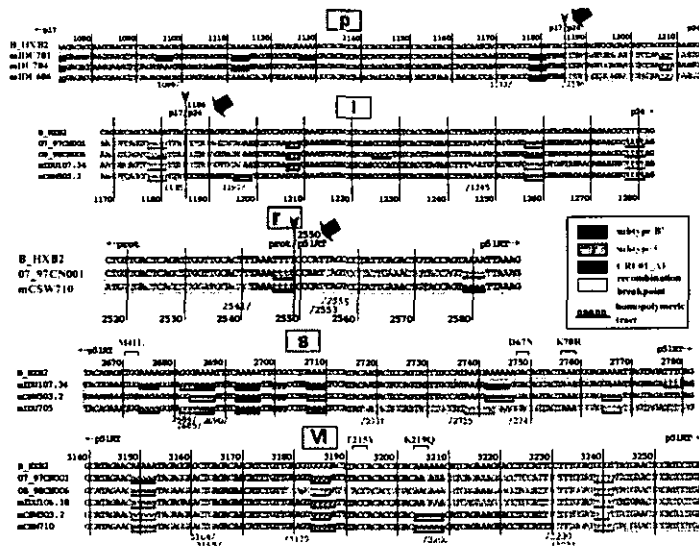


図5. 組換え点近傍の塩基配列上の特徴



厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
分担研究総合報告書

北タイにおける HIV 感染者および配偶者コホートの維持と
基礎医学研究への応用

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： Pathom Sanwanwalert (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。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。同時に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。さらに、CCR2 と MHC クラス I 遺伝子領域のホスト遺伝子多型研究への応用が進み、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 $p=0.04$)。

コホート研究開始に先駆けて、1995 年 10 月 2 日から 1999 年 10 月 31 日までに同外来を受診した感染者対象に生存解析を Cox Proportional Hazard Model により行い、抗 HIV 薬 1 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、初年度に確立された野外株 HIV Gag タンパクを env 欠損 HIV-1 ベクターによって細胞内発現させ、CTL エピト-ブ細胞表面上抗原提示効率を調べる新しい実験系を用い、A*0201 および A24 拘束性 p17 領域 CTL エピト-ブ変異体のエピト-ブ細胞表面上提示効率を探索した。その結果、A*0201 エピト-ブでは、調べた 4 つのエピト-ブ変異のうち 2 つについて、A24 エピト-ブでは、調べた 5 種類のエピト-ブ変異のうち 3 つについて、細胞外から加えたペプチド認識がされるにもかかわらず、同じ変異エピト-ブを有する 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、変異ウイルスタンパクのエピト-ブ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。

1. 研究目的：

HIV の病態生理・伝播機序について、基礎科学的観点から探求するには、患者選択方法が明確で、人口統計学的・臨床的・行動学的情報が揃っており、検体が継続的に採取・保存された、充分数の対象群を高い追跡率で追跡したコホート研究が有益である。本分担研究者は、タイ国立衛生研究所 (NIH) とランパン県病院との共同で、北タイにて HIV 感染者およびその配偶者を対象にしたコホート研究を立ち上げたが、コホートとしての成果を挙げるには、まだ追

跡年数が浅い。そこで、本分担研究では、より深く HIV 感染者の自然経過や抗 HIV 抗体陰性配偶者の HIV 非伝播機序について調べるために、同コホート研究を維持させ、追跡情報をさらに集積することを目的とした。さらに、コホート研究から得られた患者検体を本分担研究者自ら、または共同研究者を通じて免疫学、遺伝子医学、ウイルス学などの基礎医学研究へ応用させることを目的とした。

2. 研究方法：

a) ランパン県病院 HIV コホートの維持と生存追跡調査の実施

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。2000 年 7 月 6 日より、同病院の HIV 専門外来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。昨年度は、2002 年 10 月 15 日までに参加した 759 名の HIV 感染者の基礎情報について解析用データベース構築を行い、初期解析結果について報告した。本年度は、これらデータベースの検証作業をさらに進め、データベースを完成させるとともに、コホート参加時のみの情報収集を行いその後積極的な追跡は行わなかった 299 名の感染者（特に HIV 感染末期の感染者については、積極的追跡は行わなかった）、および 3 ヶ月毎の積極的追跡を行ってきた 457 名の感染者のうち追跡不明となっていた 55 名の感染者について、2003 年 10 月 1 日時点での生存状態をランパン病院診療記録、ランパン県保健局死亡届データベース、ランパン県内 17 つの患者団体からの情報、さらには質問票の郵送により調査した。

b) ランパン病院レトロスペクティブコホートの抗 HIV 薬治療ガイドラインへの応用

タイ政府による抗 HIV ジェネリック薬の国内大量生産が開始され薬価が下がったのを機に、ランパン病院でも 2002 年 4 月より d4T・3TC・nevirapine の合剤である "GPOvir" 薬剤治療が急速に普及した。それに伴い、治療を開始する患者群の優先順位を知る必要が出てきた。そこで、本年度は、平成 12・13 年度に行ったランパン病院レトロスペクティブコホート 1,110 名の生存データを用い、実際の臨床で使われている HIV 関連症状有無と CD4 値による臨床ステージ分類に基づき患者を分類した際の各グループの死亡率を Cox 比例ハザードモデルを用いて再検討した。

c) ランパンコホートの基礎医学研究への応用

上記 a) 患者情報データベースが基礎となり、同コホート患者検体を用いて行った遺伝子医学実験、細胞性免疫実験、薬剤耐性結果を患者背景情報・臨床経過情報などと連携した解析が可能になった。

c-1) 遺伝子多型研究への応用

大阪大学塩田達雄教授の指導下、博士課程在籍タイ人大学院生により、コホート患者末梢血より、DNA を抽出、IL4-C589T, CCR2 64I, CCR5-P1, RANTES-G403A, RANTES-C28G, RANTES-Int1.1, RANT-ES-3'UTR アリール診断を PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) により判定した。また、本分担研究者の指導下、湧永製薬の協力を得て、同大学院生により HLA Class I アリールタイピングを PCR-MPH (Microtiter plate hybridization) 法を用いて行った。

c-2) 免疫学的研究への応用

免疫学的研究への応用は、本分担研究者の指導下、博士号を有するタイ人研究者が行った。コホート感染者 45 名 (CD4 値 >200、無治療) の末梢血リンパ細胞より 99 本の gag クローンを作成し、遺伝子解析を行った結果から、これらの Gag アミノ酸配列の中でもっとも頻度の高い Gag アミノ酸配列をベースにオーバーラッピングペプチド (それぞれ 10 アミノ酸が重複した 15-mer ペプチド 100 本) を作成、HIV 感染者および抗 HIV 抗体陰性配偶者の有する細胞性免疫反応を、このオーバーラッピングペプチドをマトリックス法により 10 本ずつプールしたものを抗原として用い、ペプチドを特異的に認識し IFN γ を産生する細胞を、Elispot Assay により定量的に判定した。

c-3) 抗 HIV 薬剤耐性 HIV ウイルス研究への応用

本研究は、国立感染症研究所エイズ研究センターの杉浦互博士の指導下、タイ国立衛生研究所スタッフが行った。アンプリコアーウイルス量定量キットにて抽出された RNA を検体として用い、RNA-PCR キット (AMV one step RNA PCR kit, Takara, Osaka, Japan) により、逆転写酵素領域の cDNA を PCR 増幅、さらに high-fidelity DNA polymerase (KOD DAN polymerase, OYOBO, Osaka Japan) によって増幅した後、PCR 増幅物を Dye-terminators (BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit; Applied Biosystems, Foster City, CA) によりシーケンス反応させ、ABI-3100 自動シーケンサー (Applied Biosystems, CA, USA) によって直接シーケンスを行った。

(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