

研究課題：薬剤耐性のモニタリングに関する技術開発研究

課題番号：H13-エイズ-001

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

氏名 杉浦 亙

分担研究者： 所属施設 慶応大学医学部微生物免疫学教室

氏名 加藤真吾

所属施設 国立名古屋病院臨床検査部

氏名 金田次弘

所属施設 東京大学医科学研究所先端医療研究センター感染症分野

氏名 北村義浩

所属施設 国立国際医療センターエイズ治療研究開発センター

氏名 平林義弘

所属施設 国立病院大阪医療センター 免疫感染症科

氏名 白阪琢磨

所属施設 熊本大学エイズ学研究センター、病態制御分野

氏名 松下修三

## 1. 研究目的

HIV-1 感染症における多剤併用療法は 1995 年以來先進諸国において標準的な治療として定着しているが、その成功率は高くはなく、およそ 40% 近い患者が初回治療に失敗するとされている。治療の転帰に影響する因子としては服薬アドヒアランス、治療薬剤に対する耐性獲得などが挙げられる。この約半数近い初回治療脱落症例、そしてその後多剤耐性に陥っている症例を救済することは重要な課題である。この研究班では薬剤耐性検査（遺伝子検査、感受性検査）、薬剤血中濃度測定、そして遺伝子診断を統合した治療モニタリングシステムを構築運用し、個々の患者に適切な治療プロトコルを提供することを目的とする。この目的を達成するために以下 4 つの研究を進める

- 1) 治療薬剤血中濃度測定の至適治療実現における意義：血中薬物濃度測定技術は HPLC を用いた手法が一般化している。この課題では HIV-1 感染症治療現場における血中濃度測定の意義を薬剤耐性の克服、副作用の軽減という点から検討する。
- 2) 細胞内薬剤濃度の測定技術の開発とその臨床的意義の検討：抗 HIV-1 治療薬剤の主要な作用部位は感染宿主細胞内であることから細胞内薬剤濃度測定法の開発を試み、細胞内薬剤濃度と治療効果、副作用、そして薬剤耐性ウイルス誘導との関連を明らかにする。
- 3) 簡易薬剤血中濃度測定検査技術の開発とその有用性の評価：薬剤血中濃度測定を治療現場で定着させるためには手法が簡便で迅速な評価系が必要と思われる。この課題では新たな測定方法の開発を試みる。
- 4) 薬剤の有効性を修飾するヒト遺伝子多型の解析：薬剤の吸収代謝には種々の代謝酵素、膜タンパク分子が関与している。近年ヒトゲノム解析の進展に伴い、これらのたんぱく質をコードする遺伝子の特定部位に点変異が存在し (single nucleotide polymorphism: SNP)、特定の点変異と特定の薬剤の薬効が密接に関連していることが明らかになりつつある。この研究では SNP と薬剤濃度、そして治療効果との関連を明らかにする。

## 2. 研究方法

- 1) 治療薬剤血中濃度測定と薬剤耐性検査の評価の検討：研究班のホームページ作成し、薬剤血中濃度測定検査をホームページを介して受け付けた。測定は株 BML に委託した。採血した検体を専用の調査用紙とともに株 BML に送付し、株 BML では HPLC で薬剤濃度を測定し、結果を主治医に報告した。治療効果、副作用と薬剤血中濃度測定の関連を解析し、その意義について検討した。プロテアーゼ阻害剤 (PI)、非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤 (NNRTI) 使用症例を対象に解析を行った。
- 2) 細胞内薬剤濃度の測定技術の開発とその臨床的意義の検討：末梢血単核球 (PBMC)、MT-2、HPB-(a) 細胞における PI、NNRTI の細胞内濃度測定を HPLC を用いて試みた。ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤 (NRTI) については細胞内における AZT-MP、AZT-DP、AZT-TP の定量を LC-MS/MS を用いて行った。
- 3) 簡易薬剤血中濃度測定検査技術を開発とその有用性の評価：*in vitro* プロテアーゼ (PR) 活性測定系を用いた PI 血中濃度測

定系の構築を試みている。大腸菌で発現精製した PR と gag タンパクの混合液中に患者血清を添加し、gag 切断の阻害率より血清中に含まれている PI 薬剤濃度の評価を行う。

4) 抗 HIV-1 薬剤の有効性を修飾する SNP の解析。MDR-1 イントロン内の 3 箇所の 1 塩基多型、T2136C、G2677T/A、C3435T について遺伝子多型の解析を行った。HIV-1 感染病態との関連を調べるために CD209L 遺伝子の 5 カ所の SNP と 1 カ所の反復回数多型 (VNTR) をについて遺伝子多型の解析を行った。3~5x10<sup>6</sup> 個の PBMC よりゲノム DNA を抽出し、それを鋳型に個 SNP ポイント毎に周辺領域約 1.0Kb を含めた標的遺伝子断片を PCR で増幅した。各 SNP ポイントの型判定は SNP ポイントの一塩基上流が 3' 端に一致する様に設計した検出プローブを用いた。検出プローブを増幅した標的遺伝子断片に結合させた後、ddNTP を加えた一塩基伸長反応を行い、取り込まれた ddNTP のパターンから遺伝子多型の判定を行った。

(倫理面への配慮)

研究の倫理的・科学的妥当性については施設毎の倫理委員会にて審査承認されている。患者に研究の必要性和意義について十分に説明し、書面にて同意を得ている。被検者やその家族が社会的不利益を被ることがないように検査検体の匿名性を確保している。

## 3. 研究結果

- 1) 治療薬剤血中濃度測定と薬剤耐性検査の評価の検討  
(i) 血中濃度測定検査：平成 15 年 4 月から 11 月にかけて血中濃度ホームページには通産 1326 回のアクセスがあり、91 名の新たなパスワード取得者があった。血中濃度測定検査は総計 125 検体の測定依頼があった。件数の内訳はサキナビル (SQV): 3、リトナビル (RTV): 50、エファビレンツ (EFV): 12、アンブレナビル (APV): 4、ロビナビル (LPV): 53、ネルフィナビル (NFV): 3、インジナビル (IDV): 0 であった。  
(ii) 薬剤耐性症例におけるカレトラ血中濃度測定の意義：カレトラ服用後の血中 LPV 濃度を 12 症例について解析した結果、定常状態ではトラフ値と C<sub>max</sub> に大きな変動が無いことが明らかになった。LPV 血中濃度は一点のみの測定で評価できることが示唆された。LPV を用いてサルヴェージ療法が成功した症例で LPV の血中濃度と薬剤耐性レベルとの関連を検討した結果「トラフ値 ÷ IC50」の値が高い症例においてサルヴェージ療法が成功する可能性が示唆された。  
(iii) 治療最適化のための SQV ル+RTV 併用療法での血中濃度測定の意義：DHHS の治療ガイドラインでは RTV (400mg) + SQV (400mg) の併用が推奨されているが、我々は SQV の量を増やし、毒性の強い RTV の量を減らした RTV (100~400mg) + SQV (800~1000mg) による併用療法を SQV 血中濃度測定を行いながら 10 名の患者に実施した。この療法では定常状態で C<sub>max</sub> は 4~8 時間、トラフ値は服薬直前ではなく、むしろ服薬後 1~2 時間後であることがわかった。10 例中 8 例は SQV のトラフ濃度を 6 ヶ月おきに測定しながら治療が進められた。その結果これらの症例では、SQV トラフ値の症例平均値は、2070 ± 1317 ng/ml で、目標血中濃度レベルより 1Log 高い値に維持されていた。また副作用は観察されず、耐性変異の出現も認められなかった。薬剤血中濃度測定を行いながら RTV と SQV の投与量を決定し、SQV トラフ値を 2070 ± 1317 の範囲でコントロールすることにより、良好な臨床効果が得られたと考

えられた。  
(iv)副作用を抑えるための血中濃度測定の意義: EFV による精神神経系の副作用と EFV 血中濃度の関連を調べた。その結果、副作用を認めなかった群の 8185+3175 nM に対し副作用を認められた群では 10577+5813nM と有意(p=0.0281)に高い EFV 血中濃度が観察された。IDV/RTV 併用療法患者における腎結石と IDV 血中濃度の相関を調べた結果、腎結石が認められた群では IDV 血中濃度が有意に高いことが明らかになった。また、副作用が出現したカレトラと EFV 併用患者において血中濃度測定結果に基づく服薬量の調整を行った。副作用出現時、EFV 血中濃度は約 16 g/ml と一般的な血中濃度の4倍以上に達していたことから、EFV 過量摂取を疑い、服用量を2/3に減量した。その結果副作用症状も消退した。血中濃度測定が有効であったと思われる。

## 2)細胞内薬剤濃度の測定技術の開発とその臨床的意義の検討

健康人 PBMC(n=3)における PI と NNRTI の細胞内濃度を調べたところ、有意な個人差は認められなかった。細胞内の濃度を測定し、PBMC の平均体積を用いて計算した結果、細胞内では薬物が濃縮されていることが明らかになった。薬剤によって濃縮の度合いは異なり、PBMC では、NFV が 327 倍、EFV が 101 倍、SQV が 60.5 倍、RTV が 16.1 倍、IDV が 15.8 倍、APV が 1.14 倍、NVP が 1 倍以下であった。細胞に取り込まれた薬物の排泄動態を明らかにするために、薬剤暴露後細胞を薬剤無添加の培地に移し経時的に細胞内薬剤濃度を追跡した。その結果細胞内の薬剤は 5 分以内にほぼ排泄されたが、一部は 24 時間後も細胞内に残留していることが明らかになったこの残留薬剤の抗 HIV-1 活性について解析した結果、SQV、RTV、NFV の 3 薬剤では抗 HIV-1 活性が保持されていることが明らかになった NRTI については AZT の取り込みとリン酸化について解析を行った。その結果、AZT、AZT-MP、AZT-DP は培地濃度が高くなるに連れて高くなったが、AZT-TP 濃度は変化が認められなかった。

## 3)簡易薬剤濃度測定検査技術の開発

従来 HPLC による血中濃度測定方法は薬剤毎に異なるプロトコルが使用されていたが、病院等の検査室でも実施がしやすいように P16 種類と代表的な活性代謝産物 2 種類さらに EFV の合計 9 剤の同一測定が可能な統一プロトコルを構築した。合成 PR、Gag を利用した簡易血中濃度測定系についてはそれぞれを発現するベクターを構築し、現在反応系の成立の可否を検討している。

## 4)薬剤の有効性を修飾する SNP 解析

MDR-1 遺伝子の SNP 解析を健康人 25 名および同意の取れた感染者 32 名について MDR-1 イントロン内の 3 箇所の SNP 解析を終了した。現在抗 HIV-1 療法転帰と MDR-1 多型との関連について検討を行っている。CD209L の SNP および VNTR 解析を 115 人(59 人の HIV 感染者と 56 人の非感染者)の日本人について行った。この結果を基にハプロタイプ解析を行った結果 13 種のハプロタイプが存在することが明らかになった。59 人の HIV 感染者について 5 か所の SNP の遺伝型と HIV RNA 量、CD4 細胞数の関係を調べた。その結果イントロン 5 の SNP と CD4 細胞数の動態に統計的に有意に高い傾向が認められた(p=0.0069)。さらに分担研究者松下が報告した RTV 100-400mg+ SQV 800-1000mg の症例について ABCB1、ABCC4 の SNP 解析を行い SNP と血中濃度の関連について検討した。

## 4. 考察

薬剤血中濃度測定法はすでに基本的な技術は完成しており、課題は検査の普及と活用である。新たな検査を普及させるには検査データーが治療を進めていく上で有益であることと、多くの施設で実施できるように検査手順の簡略化や検査体制を構築することが必要である。我々は、薬剤血中濃度測定が至適治療に有効であることを、多数の症例を詳細に解析し、具体的なデーター示すことにより明らかにした。検査体制については研究班の積極的な活動により血中濃度測定のホームページがうまく機能し多くの医師に利用されるようになった。細胞内薬剤濃度の測定は、NNRTI と PI では HPLC を用いたプロトコルが完成した。得られた結果を見る限りにおいて、細胞内で PI は明らかに濃縮されており、この現象は従来考えられていたような薬物取り込みが濃度勾配によって能動的に行われるという考え方では説明が困難である。細胞内に薬物を吸着する因子の存在、受動的な取り込みポンプの存在が示唆された。NRTI の細胞内におけるリン酸化体の定量は LC-MS/MS を使用することにより可能となった。興味深いことに AZT-TP の濃度は細胞外の AZT 濃度の影響をほとんど受けず、常に一定の値を示した。これは細胞内における dNTP 量を一定に保つホメオスタシスを示している可能性が考えられた。

MDR-1 の SNP と血中濃度の関連は我々の解析の結果からは明確な結論を出すことはできなかった。

## 5. 自己評価

### 1) 達成度

我々は症例の積み重ねから薬剤血中濃度測定による薬剤量の調節が薬剤耐性症例の救済と副作用の軽減に有効であることを明らかにした。このような成果は今後治療現場において血中濃度測定が普及していく上で大変有用である。基礎的研究では細胞内濃度測定の基礎的なプロトコルが出来上がった。PI と NNRTI は HPLC で濃度測定を、NRTI は LS-MS/MS を用いて細胞内におけるリン酸化体の濃度を測定する系を確立した。簡易測定系の構築に関しては複数の薬剤を同時に測定するプロトコルを確立したが、HPLC を用いない系に関しては途中で手法を切り替えたこともあり、残念ながらこの 3 年間の研究では完成させることが出来なかった。SNP 解析は倫理委員会の承認、患者の同意などの倫理問題があるため解析可能なサンプル確保に予想外の時間を費やしたが最終的に数十名の解析を行うことが出来た。以上、一部達成できなかった目標もあるが、概ね研究班当初の目標を到達したと考えている。さらに、この研究班では異なる施設間、そして基礎研究と臨床研究の連携と統合を目指してきたが、この点に関してのみ分担研究者間の研究協力が極めて良く機能しており研究班終了後も参加分担研究者間での活発な共同研究が期待される。

### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

HIV 感染症の治療の目標は長期にわたる良好な治療効果を得ることである。しかしながら、世界的にも副作用や耐性変異の出現のために 1-2 年のうちに治療変更せざるを得ない症例が多い。我々の研究班が目指してきた目標は至適治療プロトコルの実現であり、その社会的な意義は高いと思われる。今日わが国では米国のガイドラインがそのまま適用されているが、そこに示されたものに必ずしも科学的な根拠があるわけではない。たとえば DHHS の治療ガイドラインの薬剤量{RTV ル(400mg)+ SQV (400mg BID)}は十分な臨床試験の根拠があつて提唱されたものではない。したがって今回我々が試みた日本人のデーターに基づく薬剤量の調整の試みは、薬剤濃度測定の有効性を議論するうえで学術的に重要なデーターである。また、近年明らかにされた MDR-1 等の SNP の存在は薬物代謝、薬物毒性、副作用などの表現型が人種により異なることを示しており、日本人における遺伝子多型の把握は重要な命題である。今まで、薬剤血中濃度に関する研究は多数行われてきたが、薬剤が作用する細胞内における濃度と治療効果、薬剤耐性ウイルスとの関連はあまり議論されていない。また薬剤の細胞内取り込みと排泄に関しては MDR-1 研究が主であり、詳細な検討は多くない。今回我々の研究成果はその意味においても先駆的なものであり学術的に意義が高い。また今まで報告されてきた細胞内薬剤濃度測定方法は RI 標識薬剤を用いて行われており、患者における応用は不可能であった。この点を解決し患者における解析を実現させるため、我々は細胞内からの新たな薬剤抽出法を検討し、HPLC あるいは LC-MS/MS を用いた測定系の確立に成功した。このような技術的な打開はこれからこの分野の研究を進展させていく上で大きな意義を持っている。

### 3) 今後の展望

我々が取り組んできた研究は今後大きく二つの方向に発展していく可能性を秘めている。一つは実用的な検査として治療現場で我々の開発した技術が普及していく展開である。血中ならびに細胞内薬剤濃度測定の治療現場での普及と定着、そしてそれに基づく質の高い治療の提供という HIV-1 感染者たちに直接に恩恵をもたらす展開である。二つ目は薬物動態に関する基礎的研究、そして創薬研究への展開である。我々の研究で得られた細胞内薬物代謝および薬物代謝に関連した遺伝子多型の解析結果に今後、細胞内におけるウイルス複製メカニズム等の解析を加えることにより、抗ウイルス作用に関する新たな知見、未知の細胞内因子の発見につながっていくことが期待される。これは新たな作用機転による新しい創薬戦略の可能性を示しており、今後の製薬産業の発展に寄与することが期待される。

## 6. 結論

PI と NNRTI 使用に薬剤血中濃度測定が至適治療の実現に有用であることが治療効果と副作用軽減の点から明らかになった。細胞内薬剤濃度技術が完成した。簡易血中濃度測定系の構築は基本的な戦略が決定したが、実際の系の構築は現在まだ進行中である。ヒトゲノム解析は解析症例数を増やし、データーを蓄積しつつある。研究班の目標は概ね達成された。

## 7. 知的所有権の出願・取得状況

該当なし

研究課題：HIV 及びその関連ウイルスの増殖機構及び増殖制御に関する研究

課題番号：H13-エイズ-002

主任研究者：佐藤 裕徳（国立感染症研究所・遺伝子解析室・主任研究官）

分担研究者：原田 信志（熊本大学大学院・医学薬学研究部感染防御分野・教授）、服部 俊夫（東北大・感染症呼吸器内科・教授）、田代 啓（京都大学遺伝子実験施設・遺伝病解析分野・助教授）、間 陽子（理化学研究所・分子ウイルス学研究ユニット・ユニットリーダー）、増田 貴夫（東京医科歯科大学大学院・歯学総合研究科・助教授）、岡本 尚（名古屋市立大学大学院・医学研究科生体機能分子医学講座・教授）、生田 和良（大阪大学微生物病研究所・ウイルス免疫分野・教授）、足立 昭夫（徳島大学大学院・医学研究科ウイルス病原学分野・教授）、増田 道明（獨協医科大学・微生物学講座・教授）、松田 善衛（国立感染症研究所・エイズ研究センター・室長）、仲宗根 正（国立感染症研究所・エイズ研究センター・主任研究官）、小島 朝人（国立感染症研究所・感染病理部・室長）、高橋 秀宗（国立感染症研究所・感染病理部・室長）、巽 正志（国立感染症研究所・獣医科学部・主任研究官）、櫻木 淳一（大阪大学微生物病研究所・ウイルス感染分野・助手）、森川 裕子（北里大学附属北里生命科学研究所・ウイルス感染制御学教室・教授）。

研究協力者：村上 努（琉球大学大学院・医学研究科免疫学分野・助教授）、三隅 将吾（熊本大学大学院・医学薬学研究部薬学生化学分野・助教授）、明里 宏文（国立感染症研究所・豊長類センター・主任研究官）、久保 嘉直（長崎大熱帯医学研究所・エイズ感染防御分野・助手）、駒野 淳（国立感染症研究所・エイズ研究センター・研究官）。

## 1. 研究目的

HIV 複製・変異（HIV 分子-細胞装置の相互作用、HIV 分子の機能発現）について理解を深め、新たな作用点をもつ HIV 増殖制御法の開発に資する。

## 2. 研究方法

1) 全体計画：以下を3年計画で遂行。本年度は最終年度。  
①研究の2本の柱を設定（HIV 複製と易変異性発現の分子素過程研究）。②研究組織：17人の主任・分担研究者と5名の研究協力者。③立体構造研究の推進。④萌芽的研究の推進：研究協力者としての参画による研究の活性化。⑤成果の情報収集と班員間の交流推進：シンポジウム、テーマ別ワークショップ開催。⑥成果評価：基礎（成果が HIV 複製・変異素過程の理解向上に果たした役割）・応用（抗 HIV 薬開発研究への適用）の2点を考察する。  
2) 分担研究方法：分子生物学、分子遺伝学、細胞生物学、ウイルス学の諸手法を用いて HIV 複製・変異の新たな調節因子を同定する。解析法は、各研究者の創意工夫による。本研究班で用いられた代表的方法を以下に記す。  
①蛋白質相互作用解析：酵母 two-hybrid 系、pull-down assay、pulse-chase 免疫沈降法。②蛋白質同定・修飾状態・構造解析：Western blot 法、免疫沈降法、MALDI TOF-MS 質量分析（翻訳時・後修飾の同定）、計算科学解析（MOE）、構造特異的単抗体解析。③蛋白質機能・細胞内局在解析：変異導入・活性変化解析、反応速度解析、免疫蛍光染色。④HIV 粒子内ゲノム RNA 構造解析：ウイルス粒子精製/Northern blot 法・RNase protection 法・RT-PCR。⑤脂質構造機能解析：電子スピンラベル法、蛍光色素ラベル標識/膜融合解析、特定脂質除去剤/機能変化解析。⑥HIV 複製能解析：感染性分子クローン/CD4 陽性細胞/RT・p24 assay、luciferase・pseudotype virus/luciferase assay。⑦細胞蛋白質の HIV 複製関与の検証：変異導入解析、RNAi による特定 mRNA 機能の不活化、dominant negative

変異体による特定蛋白質機能の不活化。

3) 立体構造解析：生体高分子の立体構造解析と分子認識解析は、HIV 複製・変異調節の理解と新規薬剤開発に必須。①計算科学解析（カナダ CCG 社統合計算化学システム MOE）、②X線結晶構造解析の基盤導入。

## （倫理面への配慮）

本研究では、人と動物を用いた研究は行わなかった。

## 3. 結果

1) HIV 分子と直接相互作用し、複製・変異に関与しうる細胞分子の同定：①核内輸送調節因子 Rch-1（Vpr またはインテグラーゼに結合し、プロウイルス DNA 核内移行に関与）（間、増田貴）、②分子シャペロン calnexin、calreticulin（Env 前駆体に結合し、③小胞体での Env 高次構造形成に関与）（佐藤）、④DNA 複製制御因子 topoisomerase I（ゲノム RNA に結合し、粒子内 RNA に生じるニックの修復に関与）（高橋）、⑤ATP（逆転写酵素に結合し、基質選択性の向上に関与）（佐藤）、⑥転写因子 AP-4（Tat と結合し OGG1 産生を誘導することでゲノム変異=transversionを抑制する）。  
2) 複製を制御しうる細胞因子の同定（HIV 分子との直接相互作用は無い、もしくは未解析）：①アクチン新鎖合成制御因子 Arp2/3（ウイルス侵入とゲノム逆転写の間の反応に関与）（駒野）、②転写制御因子 RAI（NF- $\kappa$ B に結合し、プロウイルスゲノム転写に関与）（岡本）、③エンドソーム因子 end3, 4, 5, 6, Tlg2, Pep12（酵母での Gag 細胞質輸送・集合に関与）（森川）、④細胞周期制御因子 WEE1, 14-3-3（酵母での Vpr 依存 G2 arrest 誘導に関与）（増田道）、⑤CD4<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>T 細胞サブセット特異的転写因子 AP-1（X4 ウイルス転写に関与）（生田）、⑥炎症由来血中因子トロンピン（Gp120 構造変化誘導活性と HIV 感染促進効果をもつ）（服部）、⑦細胞膜流動性（原田）、およびコレステロール（久保）。

### 3) HIV 分子の機能制御領域・相互作用・修飾の同定:

①Env Gp41 膜貫通領域 Cxxx motif (HIV 粒子吸着・侵入の際の膜融合孔形成と拡大に関与) (松田)、②Gag MA と Env Gp41 細胞質領域相互作用 (ウイルス粒子の Gp41 膜融合活性の発現に関与) (村上)、③Vif アミノ酸残基 86-89、63-70  $\beta$ -ストランド構造 (Vif 発現量とウイルス感染性の維持に関与) (足立)、④Vif アミノ酸残基 4-23 (Vif 依存 p2/NC プロセッシング阻害に関与) (明里)、⑤粒子内ゲノム二量体化シグナル (ゲノム RNA 二量体化に関与) (櫻木)、⑥ウイルス粒子内蛋白質修飾の同定 (Gag p24 N 末プロリンホルミル化とサイクロフィリン A isoform、生理的意義不明) (三隅)。

4) 新規技術・方法論の樹立: ①感染性 HIV 分子クローン樹立の効率化 (MAGIC5 細胞+PCR 増幅系) (巽)、②HIV 細胞侵入を再現する無細胞系の予備的樹立 (精製細胞膜画分+精製 HIV 粒子) (小島)、④サイトカイン (SDF-1, IL-2, -4, -8, -10, MCP-1, Eotaxin, GM-CSF, TGF- $\beta$ 1, FN- $\gamma$ ) の高精度測定系の樹立 (田代)。

5) 立体構造解析: 計算科学: ①Tat と種々の結合因子との複合体分子モデルの作製 (岡本)、②蛋白質機能領域の立体構造の違いを基にして変異蛋白質準種の系統関係を予測する蛋白質構造系統樹解析ソフト (ProCluster) を開発 (MOE) (仲宗根)。X 線結晶構造解析: 蛋白質大量発現・精製系の導入、構造解析研究者との研究交流・共同研究の開始 (佐藤、間、足立)。

## 4. 考察

本研究により、HIV 複製・変異の新たな制御要因が多数見出された。各分担・協力研究の成果が HIV 複製・変異素過程の理解向上に果たした役割は、平成 13~15 年度総合研究報告書で個別に整理し議論する。ここでは、新規抗 HIV 薬開発のための着目点と課題を考察する。

1) HIV の複製・変異機能分子と直接相互作用する細胞分子の制御機構解明と薬剤開発: 薬剤標的の第一候補は、HIV 分子と細胞分子の直接相互作用と考える。相互作用の遮断は HIV 分子特異的で副作用も少なく、複製・変異の抑制をもたらすと期待される。これに該当する相互作用の候補としては、①Rch1 と Vpr (間)、またはインテグラーゼ (増田貴) 相互作用、②AP-4 と Tat 相互作用 (岡本)、③topoisomerase I とゲノム RNA 相互作用 (高橋)、④ATP と逆転写酵素相互作用 (佐藤)、⑤calnexin、calreticulin と Env 相互作用 (佐藤)、が挙げられる。ただし⑤は Env 糖鎖が中心となっている可能性が高く、HIV 特異的阻害剤の開発には何らかの工夫が要る。

2) 複製に必要な細胞分子機能を制御する細胞因子群の解明と薬剤開発: 複製に関わる細胞因子とその制御因子間相互作用の遮断を目指すもので、副作用の懸念はあるが、ウイルス変異による耐性株出現の確率が低いと予想され、必要なアプローチの一つと考える。これに該当する相互作用、または細胞因子の候補としては、①RAI と NF- $\kappa$ B 相互作用 (岡本)、②Arp2/3 制御系 (駒野)、③エンドソーム因子制御系 (森川)、④14-3-3 制御系 (増田道)

が挙げられる。

3) HIV 分子機能の制御領域の解明と薬剤開発: HIV 分子機能の制御領域は比較的保存性が高く、耐性株出現の確率が低いと予想される。ただし、薬剤開発には、制御機構 (HIV 分子の立体構造、HIV 分子間または HIV-細胞分子間の相互作用機構、機能発現の際の構造変化など) を明らかにすることが重要と考える。これに該当するものは、①Vif の推定  $\beta$ -ストランド構造 (足立)、または N 末端領域 (明里)、②Gp41 膜貫通領域 (松田)、③Gp41 細胞質領域と Gag MA の相互作用 (村上)、④粒子内ゲノム二量体化シグナル (櫻木) が挙げられる。

## 5. 自己評価

1) 達成度について: HIV 複製・変異の新たな制御要因が多数見出されたことから、当該研究期間内の重点目標 (HIV 複製・変異の理解と人為制御につながる新規の HIV 分子制御要因の同定) はほぼ達成されたと考える。また、一部分担研究者において計算科学の適用、X 線結晶構造解析研究者との共同研究が開始したことから、HIV 基礎研究と薬剤開発研究に向けた立体構造解析の基盤づくりも順調に進んだと考える。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について: 研究成果は、国際的に評価の高い一般科学雑誌に採択されたことから、学術的・国際的意義は高いと考える。また、本成果は全てのエイズ制御研究の基礎となり、他のエイズ対策研究事業課題への波及効果が大きいことから、社会的意義も高いと考える。

3) 今後の展望について: 成果を発展させることで、HIV 複製・変異の分子機構の理解と新規抗 HIV 薬開発への展開が期待されるが、まだ時間が必要である。薬剤開発への展開には、課題の継続、並びに立体構造解析研究者を中心とする創薬関連研究者との連携が必要と考える。

## 6. 結論

当該研究により、HIV 複製・変異の理解と人為制御につながりうる新規の HIV 分子制御要因が数多く見出され、当該研究期間内の重点目標はほぼ達成された。成果は、国際的評価の高い科学雑誌 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2 報、J. Virol. 1 6 報他多数) に公表され、生命科学の進展に大きな貢献をした。成果を発展させることで、HIV 複製・変異の分子機構の理解が進み、新規抗 HIV 薬開発への展開が期待されるが、まだ時間が必要である。薬剤開発への展開には、本課題研究の継続による制御機構の明確化と立体構造解析研究者を中心とする創薬研究者との連携強化が必要と考える。

## 7. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許出願・取得 (平成 15 年)

間陽子: 出願番号 2003-346377、「HIV-Vpr の機能に関する発明」、平成 15 年 10 月 3 日出願。

2. 実用新案登録: なし。

3. その他: なし。

研究課題名 : HIV 感染予防に関する研究  
課題番号 : H15-エイズ-010  
主任研究者名 : 佐多徹太郎 (国立感染症研究所感染病理部 部長)  
分担研究者名 : 俣野哲朗 (東京大学大学院医学研究科微生物学 助教授)  
三浦智行 (京都大学ウイルス研究所感染症モデル研究センター 助教授)  
本多三男 (国立感染症研究所エイズ研究センター 室長)  
森 一泰 (国立感染症研究所エイズ研究センター 主任研究官)  
庄司省三 (熊本大学薬学部 教授)  
向井鏡三郎 (国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センター 室長)  
保富康宏 (三重大学医学部 助教授)  
神奈木真理 (東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 教授)  
牧野正彦 (国立感染症研究所ハンセン病研究センター 部長)  
横田恭子 (国立感染症研究所免疫部 室長)  
横幕能行 (千葉大学医学部附属病院感染症管理治療部 助手)  
中島典子 (国立感染症研究所感染病理部 主任研究官)  
高橋秀美 (日本医科大学医学部 教授)

### 1. 研究目的

HAART の開発により HIV 感染者の予後は改善されたが、コンプライアンスやコストそして薬剤耐性などの問題があるため、エイズ克服には HIV 感染の予防に優るものではなく、なかでもワクチン開発が最重要課題である。一方で防御免疫機構やいまだ明らかではない HIV 感染病態の解明はワクチン開発のみならず HIV 感染予防にとって重要な課題である。本研究班ではわが国のサルを用いたエイズワクチン研究者や HIV 感染防御免疫機構や HIV 感染病態研究者による HIV 感染予防を目的とした研究を推進することにより、ヒトでの実用化に耐えるワクチンの開発研究を行うことを目的とする。

### 2. 研究方法

1) サルを用いた有効かつ安全なワクチン開発研究: DNA プライム/Gag 発現 SeV(SeV-Gag)ブーストワクチン接種サルに SIVmac239 チャレンジ実験を行い検討した。チャレンジ 5 週後に SIV RNA gag 領域の変異および変異 SIV の複製効率を調べた (俣野)。弱毒生ワクチン株のサルにおける安全性の確認、免疫原性と感染防御効果、そして半生 DNA ワクチンの改良を行った (三浦)。組換え BCG 及び組換え DIs プライムブーストワクチンの効果、サルやヌードマウスでの安全性を検討した (本多)。アカゲザル用いて野生型 Env ワクチンと糖鎖欠失変異を導入した d-5G Env ワクチンを vaccinia-boost 法で免疫した。各免疫群 2 頭ずつにブースト免疫後 8 週にウイルスをチャレンジ感染し、real time PCR 法で測定した (森)。カニクイサルに免疫し抗血清をえ、in vitro で解析した (庄司)。エイズ脳炎発症サル脳組織から分離した SIV 産生無限増殖性細胞株由来のクローン化 SIV を血液系細胞に感染させその動態を解析した (向井)。

2) ワクチン免疫による防御機構の解明: 非結核性抗酸菌 *Mycobacterium kansasii* 由来の  $\alpha$  抗原遺伝子を哺乳類細胞発現プラスミドに組み込み HIVenv とともに筋肉内に electroporation で混合接種した (保富)。CD28 ファミリー分子に対するモノクローナル抗体で HIV-1 感染 CD4 陽性 T 細胞を刺激しウイルス産生量の変化を調べた (神奈木)。DC-SIGN に種々の変異を加えた後、DC-SIGN 非発現系細胞株 K562 に導入し発現させ、DC-SIGN 抗原と HIV および抗酸菌由来分子の結合様式を解析した (牧野)。Yeast 由来 VLP が cross-presentation を介して Gag 特異的 CD8 陽性 T 細胞を活性化する効率とウイルスベクターによる内在性抗原の提示効率とを比較評価した (横田)。臨床検体由来 gag-pol が組み込まれた provirus DNA を簡易かつ迅速に作成可能な新規 plasmid の構築を行った (横幕)。

3) いまだあきらかとなっていない HIV 感染病態の解析: HGV の各遺伝子断片の増幅を行い、それをもとに HGV の全長クローニングを行った (佐多)。サル胎児脳から分離培養した神経幹細胞に細胞向性の異なる SIV クローンを感染し、ニューロンやグリアに直接及ぼす影響について調べた (中島)。HIV-V3 ペプチド特異的 CTL 遺伝子を発現する Tg マウスの粘膜組織内 CTL を tetramer で検索した (高橋)。

(倫理面への配慮)

健常人の末梢血単核球や感染者の検体の利用に関しては研究倫理委員会の承認を受け、インフォームドコンセントを得た上で提供を受けた。動物実験は、各施設の動物実験委員会の審査をうけ、その承認を得た。研究の実施にあたっては、動物愛護の精神で動物に与える苦痛の軽減と排除に勤めた。

### 3. 研究結果

1) サルを用いた有効かつ安全なワクチン開発研究: ワクチン接種により 8 頭に高い Gag 特異的 CTL が誘導され、SIVmac239 チャレンジ実験では 5 頭に感染初期の SIV 複製制御が認められ、チャレンジ後 5 週目には CTL エスケープ変異のみが選択されており、wild-type SIV が排除されていた (俣野)、種々の組換え SHIV 弱毒生ワクチンを作製し感染発症防御能をもつことを確認した。ワクチン元株のサル継代を 5 代行ったが強毒化しなかった。nef 欠失弱毒 SHIV ないし nef 欠失部位へのサイトカイン遺伝子組込みウイルス接種後、強毒 SHIV 攻撃でもある程度の防御効果が誘導されていた (三浦)、BCG と DIs を用いたプライムブースト法によりサルでの防御免疫誘導を確認し、サル 4 1 頭を用いてその安全性を明らかにし、また免疫不全動物でも病原性を示さなかった (本多)、糖鎖欠

失変異 d-5G-Env のワクチン効果は Wt-Env ワクチンと同等であったが、初期感染後の感染制御能は低かった(森)、CCR5 に対するサル自己抗体が *in vitro* で clade B 及び Non-clade B HIV-1 ウイルスの感染を有意に阻害した(庄司)、クローン化 SIV をサル自己血球系細胞に感染増殖させたところ、骨髄由来細胞が最も効率よいことが明らかになった(向井)。

2) ワクチン免疫による防御機構の解明： $\alpha$  抗原が強い細胞性免疫を誘導することおよび酵母産生系を確立し大量精製に成功した。Th1 型の誘導が認められ、*in vivo* において抗ウイルス活性を示した(保富)。CD28 と ICOS の刺激が HIV-1 感染の初期過程の抑制につながるシグナルを下流へ伝達することが分かった(神奈木)、HIV 感染者の樹状細胞を抗原提示細胞として用い HIV 特異的 T 細胞活性化や CTL 分化増殖能を解析した。樹状細胞上の DC-SIGN 抗原をマスクすると、抗酸菌に対する細胞性免疫活性および樹状細胞の活性化が著しく抑制されることを見出し、さらに抗酸菌の新しい DC-SIGN リガンドの存在を示唆した(牧野)。Yeast VLP とウイルスベクターとを組み合わせて樹状細胞に Gag 抗原を提示させることにより、T 細胞の *in vitro* プライミングも可能であることを明らかにした(横田)。新たに作製した HIV-1 ベクターを用いた臨床検体由来 gag 発現標的細胞系で特異的 CTL 逃避を明らかにし、その原因が MHC-I/peptide 複合体形成過程に与えた影響によることを明らかにした(横幕)。

3) いまだあきらかとなっていない HIV 感染病態の解析：HGV DNA の全長クローンを作製したが蛋白の発現はみられなかった(佐多)。サル神経幹細胞に種々の SIV クローンを感染させたところ神経向性の SIV17E-Fr が高い感染性を示し培養上清中に感染性ウイルスが検出された。SIV17E-Fr $\Delta$ nef-GFP を感染させると GFP 陽性細胞はアストロサイトやニューロンであった(中島)。HIV 感染制御に関わる特異的 CTL の解析を行い、特異的 TCR 発現 CTL が effector として機能するとは限らないこと、および  $\gamma\delta$  T 細胞群も感染防御に関わることを見出した(高橋)。

#### 4. 考察

SIV 制御が認められたサルでは wild-type SIV が CTL により迅速に排除されたと考えられ、そのエスケープ変異 SIV は複製効率が低いため制御されたと考えられた(保野)。弱毒 SHIV の安全性および防御効果が確認され、生ワクチン接種により初期に誘導される免疫系とともに獲得免疫系まで誘導される時間が必要であり、サイトカインの効果は個体レベルの解析が必要である(三浦)。宿主免疫が感染制御に必要な抗原エпитープ(中和抗体、CTL が認識)が糖鎖欠失変異により影響を受けていない可能性を示唆した(森)。従来の治療薬やワクチンの概念を超越し、HIV-1 の感染・発症制御に有効と考えられる(庄司)。エイズ脳炎発症機構の一つの機序を解明できる可能性が示唆される(向井)。 $\alpha$  抗原は抗酸菌の細胞性免疫を誘導するタンパクで生物活性はアジュバントとしての利点を多く備え、さらに生体が抗酸菌で感作されていれば効果が増大するので広く用いられよう(保富)。HIV-1 抑制は細胞毒性や増殖抑制ではなく、また HIV-1 レセプター発現変化によるものでもないと考えられた(神奈木)。DC-SIGN 抗原は両病原体に対する生体防御反応を司る上で重要な役割を果たしていると想定された(牧野)。樹状細胞による cross-presentation が CD8 陽性 T 細胞の活性化に重要であろう(横田)。マイクログリア向性とは異なるニューロン・グリア向性のクローンがあることが示唆された(中島)。ウイルスが集積する粘膜組織が真の生体防御に関わる場所ではないかと考えられる(高橋)。

#### 5. 自己評価

##### 1) 達成度について

各分担研究者の初年度研究計画はおおむね達成されたと考えられた。

##### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

CTL による SIV 複製制御の可能性を世界に先駆けて証明し、CTL 誘導型エイズワクチン開発や構造タンパク由来のエピトープをワクチン抗原とすることの合理性も示した意義は大きい。SHIV の個体継代でも強毒化しないことを明らかにできたのは初めてである。ICOS 刺激による HIV-1 抑制は今回が初めての報告である。

##### 3) 今後の展望について

感染後期の SIV 複製制御維持の解析はエイズ発症阻止へのステップとして重要であろう。マウスやモルモットなどの小動物の安全性のみならず、サルを用いた安全性や安定性についても検討されてきた。 $\alpha$  抗原は核酸のみならず蛋白でもアジュバントの可能性が広げられよう。gag-pol のパネルを充実させ、また感染細胞における抗原提示量を定量化するシステムの研究は興味深い。

#### 6. 結論

CTL による SIV 複製制御の可能性が証明され CTL 誘導型エイズワクチン開発の合理性が示された。サル個体継代実験により弱毒 SHIV の非病原性が支持された。糖鎖修飾による抗原性の変化は防御免疫誘導に働かなかった。*in vitro* の系を用いてワクチン抗原の免疫誘導能の評価およびその効率の改善を図ることは種々の感染症対策としても有用であろう。PCR で増幅された gag-pol を制限酵素を用いることなく provirus DNA に迅速かつ容易に固定することができる plasmid を構築した。

#### 7. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

- 1)  $\alpha$  抗原のワクチンにおけるアジュバント剤としての利用(保富、特許出願中、特開 2002-114708)
- 2)  $\alpha$  抗原のアレルギー性疾患治療剤としての利用(保富、特許出願中、PCT/JP/01459)

研究課題：エイズ発症阻止に関する研究

課題番号：H15 - エイズ - 011

主任研究者：岩本愛吉（東京大学医科学研究所教授）

分担研究者：塩田達雄（大阪大学微生物病研究所・教授），三間屋純一（静岡県立こども病院・血液腫瘍科・科長），渡辺慎哉（東京医科歯科大学），宮澤正顯（近畿大学医学部・教授），滝口雅文（熊本大学エイズ学研究センター・教授），松下修三（熊本大学エイズ学研究センター，教授），竹森利忠（国立感染症研究所・部長），小柳義夫（京都大学・教授），田中勇悦（琉球大学医学部附属沖縄・アジア医学研究センター・教授），石坂幸人（国立国際医療センター研究所・部長）

## 1. 研究目的

抗 HIV 薬の併用（HAART）によって HIV 感染者の治療状況は大幅に改善された。しかし，長期間の HAART によってもウイルスは排除できないうえに，薬剤耐性や HAART の長期毒性などの諸問題が既に明らかとなっている。エイズ発症阻止のためには，HAART の代替治療あるいは，HAART を補填する治療法の開発が必須である。われわれは，(1) ヒトゲノム多型性 (SNPs) 及びトランスクリプトーム，(2) HIV 特異的細胞性及び液性免疫，(3) HIV の病態に関わる宿主側及びウイルス側の因子，などの研究を通じて新しい視点からエイズ発症阻止を目指した総合的な研究を行う。

（倫理面への配慮）

本研究に臨床材料が使用される場合には，血液など臨床材料提供者の個人情報が出漏らないよう厳格にプライバシーを保護する。臨床材料の保存・使用に際しては，インフォームドコンセントを得ることとし，ヒトゲノム研究に関しては研究者の所属する機関の承認を得，個人を特定できないようにすべて匿名化を行う。本研究の成果をヒトに応用する場合には，研究対象者の安全性に細心の注意を払い，研究担当者の所属する機関の承認を得ることとする。また，研究対象者から必ず文書によるインフォームドコンセントを取ることとする。動物を用いる実験に関しては，動物愛護の精神に則って研究を行う。

## 2. 研究方法

核酸の解析や細胞培養は常法にて行った。感染時期の特定できる HIV 感染血友病者のコホート研究を行うため，全国レベルで症例の登録を行った。患者を匿名化した上で，ヘルペスウイルス・サイミリを用いて T リンパ球株の樹立を行い，RNA 抽出して独自の DNA マイクロアレイにより，長期未発症との関連遺伝子を解析した。日本人症例における HLA-A24 によって提示される HIV 上の CTL エピトープの解析を行った。その結果に基づき，GMP レベルのペプチドと患者個人由来の樹状細胞を

用いた治療ワクチン開発のプロトコールを作成した。

## 3. 研究結果

### (1) ヒトゲノム多型性 (SNPs) 及びトランスクリプトーム

タイ国ランパンのコホートに登録された HIV-1 感染者 595 名について，IL4 および RANTES の遺伝子多型を PCR-RFLP 法で解析した。女性では，AIDS 発症遅延と相関する IL4 の多型 IL4 -589T のホモ接合の感染者の方が，ヘテロ接合や野生型の感染者と比べ，有意に血清中の HIV 量が低く，CD4 細胞数が多かった（塩田）。日本人血友病 HIV 感染者のコホートの確立を目指しており，現在 117 名の検体を収集・保存した。そのうち，16 年以上にわたって抗ウイルス薬の使用がなく，CD4 細胞数が  $500/\mu\text{l}$  以上の長期未発症者の検体は 19 例ある。現在までに 33 例から 305T 細胞株を樹立したところ，114 株（37%：85 株が CD4，29 株が CD8）の培養上清に HIV 抑制効果を認めた（三間屋）。平成 15 年度には，マイクロアレイ技術が進歩したため，平成 14 年度までのデータとの比較が困難となり，あらためて 41 検体（長期未発症者 3 検体）について遺伝子プロファイルを取り直し，長期未発症者及び 1 名の非感染者計 4 名と他とでは明確に発現が異なる 21 遺伝子を同定した（渡辺）。マウスの第 15 染色体上に見出した抗レトロウイルス中和抗体産生を制御する宿主遺伝子のマッピングを狭い領域にまで追い込んだ。一方，ヒト第 22 染色体に存在するそのヒト相同遺伝子領域の多型性マーカーの複数が，イタリアの HIV 暴露非感染コホートで有意に集積することを見出し，タイ国ランパンの HIV 感染状態が非一致の夫婦コホートでもさらに解析を進め，予備的な解析によりイタリアと同様の結果を見出した（宮澤）。

### (2) HIV 特異的細胞性及び液性免疫

日本人の約 70%が発現する HLA-A24 によって提示される HIV 上の CTL エピトープを複数解析したと

ころ、Gag, Env, Nef などの遺伝子内において、ステレオタイプな変異を見出した。4 箇所の CTL エピトープを選び、アミノ酸変異を考慮に入れて計 7 種の GMP レベルのペプチドを作製した。このペプチドを患者末梢血から分離誘導した自身の樹状細胞にパルスして、HAART 治療中の患者に“治療ワクチン”として投与し、その後計画的に治療中断 (Strategic treatment interruption: STI) を行うという第 1 相臨床試験のプロトコールを作成した。患者のウイルス学的・免疫学的反応の解析は来年度になるが、5 名の予定者のうち 2 名に対して既に安全に行われている (岩本)。HIV 特異的 CTL クローンの中から、HIV 感染細胞に機能的に作用しない CTL を見出し、それが CTL の抗原認識レベルで起こっていることを明らかにした (滝口)。同一ドナーより得られた中和抵抗性株と中和感受性株のエンベロープをキメラ化し、中和抵抗性に関連するエピトープを同定した (松下)。

### (3) HIV の病態に関わる宿主側及びウイルス側の因子

HIV 抵抗性のサル細胞のゲノム DNA を感染感受性細胞に導入し、サル細胞の持つ HIV 感染抵抗性を感染感受性細胞に付与できた (塩田)。HIV DNA と蛋白質複合体 (Preintegration complex: PIC) の核移行過程をアッセイする系を確立した。核膜孔を構成する蛋白質群 (Nucleoporin) のうち、Nup98 に結合する VSV の M 蛋白質が HIV DNA の核移行を阻害して HIV を抑制すること、Nup98 を RNA 干渉作用 (siRNA 法) により減少させると同様に HIV 感染が抑制されることを見出した (小柳)。マウスのモデル実験で、T 細胞に Nef を発現させると生体内での細胞動態が影響を受けることを見出した (竹森)。Vpr のアミノ酸 60-80 の部分 (LR-20) が Vpr 自身に結合し、その機能を抑制することを見出しているが、約 2000 種類の抽出エキスから LR-20 と同様の阻害効果のある物質を見出した (石坂)。Hu-PBL-SCID マウスのモデル系により、HIV コレセプター阻害薬の評価を行い、また、樹状細胞を用いて HIV 特異的免疫を非常に効果的に誘導するための技術を開発した (田中)。

## 4. 考察

### (1) ヒトゲノム多型性 (SNPs) 及びトランスクリプトーム

タイでは、HIV 感染が男性から主婦へと拡大した

ため、男性の多くはすでに AIDS を発症しており、特に感染初期に AIDS 発症遅延効果を示すと考えられる IL4 -589T の効果が男性では認められなかったものと思われる。日本人血友病者の検体解析をさらに進める。

### (2) HIV 特異的細胞性及び液性免疫

医科学研究所において HIV 感染者に対する治療ワクチンの第 1 相試験を開始したが、2 名においては安全に施行された。さらに 2 名について、アフレーシスによる細胞採取を済ませている。さらに安全性を確認すると同時に、HIV 特異的な面積増強効果を確認していく。

### (3) HIV の病態に関わる宿主側及びウイルス側の因子

琉球大学においてマウスモデルで検証している樹状細胞による効果的な HIV 特異的免疫作用の増強法は、医科研における臨床試験に応用可能である。

## 5. 自己評価

本研究班は、感染時期の特定できる日本人 HIV 感染血友病者のコホートを多施設の共同作業で確立するところに困難も存在するが、長期末発症者を含む多数の症例と検体が集まりつつあり、研究は軌道に乗り始めた。タイ国ランパンにおける HIV 感染コホート (多数の感染者と非感染者のカップルを含む) における国際共同研究も順調に進んでいる。CTL エピトープに基づく治療ワクチンの研究は、緻密なプロトコールが作成でき、第 1 相臨床試験が開始できた。以上のように、臨床と基礎が蜜に連携した研究が順調に滑り出したといえる。新たな宿主因子を発見する試みも期待の持てる成果を出しつつある。

## 6. 結論

3 年計画の 1 年目として順調に滑り出したと考えている。2 年目に向けて全員一丸となってエイズ発症阻止の研究に進捗する。

## 7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

(1) 宮澤正顯: Miyazawa, M. and M. Clerici, inventors. Marker Genes (Application of polymorphic genetic markers on chromosome 22 for determination of immune resistance against HIV-1 infection). 国際特許出願済み: PCT/GB2003/004493)



研究課題：HIVの潜伏感染・再活性化のエピジェネティック制御機構を標的とした根治療法開発の基礎研究

課題番号：H15-エイズ-012

主任研究者：渡邊 俊樹（東京大学医科学研究所 助教授）

分担研究者：石田 尚臣（東京大学医科学研究所 助手）、堀江 良一（北里大学医学部 助教授）

## 研究目的

HAART 療法の導入後直ちに明らかになった、HIV の潜伏感染リザーバーの存在と既存の治療法に対するその抵抗性は、AIDS 治療に対する楽観論を一掃した。しかし、現在に至るまで潜伏感染 HIV に対する有効な治療戦略は未だに存在せず、感染個体からの HIV の排除、再発を防止することは未だに困難である。従って、HIV 潜伏感染と再活性化の制御機構の理解を基盤とした根治療法の戦略を可能にする基礎的知見を得ることは急務である。本研究計画は、ウイルス遺伝子発現のエピジェネティクス制御という観点から、潜伏感染 HIV の制御を目的とした治療法開発の基礎となる知見を明らかにすることを目的とする。

## 研究方法

本研究では、申請者らのこれまでの研究実績を背景に、3年間の研究期間内に以下の3点について検討する。①*in vivo* リザーバープールの HIV プロウイルス CpG メチル化の有無を、SHIV 感染モデルのサル検体と、シドニーの Cooper 博士らのコホートで集積されている検体を用いて明らかにする。②潜伏感染成立と維持に関わるエピジェネティック制御機構をヒストンの化学修飾を介したクロマチン構造制御＝ヒストンコードの観点から明らかにする。③DNA 標的 siRNA および新規 NF-κB 阻害剤を利用した潜伏・再活性化のエピジェネティクス制御の試みを検討する。以上の検討事項について、メチル化解析は Bisulfite Genomic PCR 法を、ヒストン化学修飾の解析にはクロマチン免疫沈降法 (ChIPs) を用い解析する。再活性化阻止実験には慢性感染細胞株を TNFα で再活性化誘導の実験系を用いる。

(倫理面への配慮) 臨床検体：研究協力に基づき検体

供給をしてもらうシドニーのコホートスタディは、St. Vincent Hospital の Research Ethics Committee の承認を得て、全ての参加者から書面でのインフォームドコンセントが得られている。サル感染モデル検体：研究協力に基づき検体供給をもらう京都大学ウイルス研究所、速水正憲教授らの実験は、実験動物への動物愛護上の配慮を含めて、倫理審査委員会での承認を得ている。

## 3. 研究結果

SHIV を接種し 4-8 週間後に血中ウイルス量が検出限界以下となった 5 頭分の各種検体を用いメチル化解析を行った。結果、メチル化 LTR を検出する事ができたが、メチル化は低頻度、低密度であった。また、リンパ組織における解析では、*de novo* メチル酵素の標的配列がメチル化されている検体が存在した。

St. Vincent Hospital に保存されている検体 (PBMC) よりサンプルとして 24 検体を用い、プロウイルスロードを検討した。その結果、その多くが  $10^4 \sim 10^2$  copy/μg DNA の値を示した。このことは、これらの検体がメチル解析の対象となりうることを示している。

非メチル化潜伏様式を示す OM10.1 細胞において、ChIPs 解析を行い、HIV-LTR のヒストンの化学修飾状況を解析した。その結果、OM10.1 のプロウイルス LTR 上のヒストンの化学修飾状態はヒストン H3 のメチル化が亢進し、H1 のクロマチン結合が認められる典型的な「抑制型ヒストンコード」をとっており、再活性化にともない H3 のメチル化が減少、アセチル化が亢進し、H1 が乖離することが明らかとなった。

メチル化潜伏様式の ACH-1 および非メチル化潜伏様式の OM10.1 を用い、新規 NF-κB 阻害剤 DHMEQ

を用いた再活性化阻害実験を行った。その結果 ACH-2 では全く効果を示さなかったが、OM10.1 において阻害効果を認めた。

#### 4. 考察

*in vivo* における LTR のメチル化は低頻度、低密度であった。このことは、感染初期においてウイルス遺伝子発現抑制の分子機構は非メチル化潜伏様式が基本であることを示唆している。*in vitro* の解析では、非メチル化潜伏様式の本体はヒストン化学修飾によるクロマチン構造制御機構であることが示唆されることから、感染初期においてはヒストンの化学修飾による遺伝子発現制御が主要な制御機構であると考えられる。次年度以降 *in vivo* のヒストン化学修飾の検討が急務であると思われる。*de novo* DNA メチル化酵素の標的配列である CXG あるいは GCxxG 配列のシトシンのメチル化が複数の組織で認められたことから、*in vitro* の実験から提唱されている「抑制型ヒストンコードによる発現抑制→CpG メチル化による抑制状態の固定」モデルが、*in vivo* においても存在する可能性が示唆された。また、シドニーコホートの検体サンプルでは 24 検体中 14 検体でメチル化解析可能であるプロウイルスロードを示した。同様の検体が St. Vincent Hospital には多数存在し、今後大規模な *in vivo* メチル化解析を遂行することにより、*in vivo* におけるメチル化の有無についての知見が明らかになるとと思われる。新規化合物 DHMEQ を用いた再活性化阻止実験では、非メチル化潜伏様式とメチル化潜伏様式の細胞とで阻止能に差が認められた。このことは、再活性化シグナル伝達系において、NF- $\kappa$ B の寄与が潜伏様式によって異なることを示唆している。いくつかのシグナル伝達系阻害薬を用いて、再活性化シグナル伝達系の解析を行い DHMEQ の有効性についてさらに追求することが必要であろう。

#### 5. 自己評価

##### 1) 達成度について

*in vitro* 解析の一部で計画の遅れが認められるが、全

体を通し、目標は達成されていると考える。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について  
申請者らの研究は論文発表、学会発表を通じて、すでに国内外に認知され評価を受けていると確信している。社会的意義については、研究計画とおり実行すれば必ず高い評価を受けると確信する。

##### 3) 今後の展望について

今後、計画通りに研究をすすめ、HIV ウイルス遺伝子発現のエピジェネティック制御という観点から、潜伏感染 HIV の制御を目的とした治療法開発の基礎となる知見を明らかにすることができる。

#### 6. 結論

潜伏感染細胞を母体とするリザーブプールは、感染初期に形成されると考えられている。申請者らの研究結果から、感染初期における非メチル化潜伏機構の重要性が示唆された。*in vitro* の実験による解析結果からは、非メチル化潜伏機構はヒストン化学修飾によるクロマチン構造制御による負の調節、「抑制型ヒストンコード」によることが示唆され、従って、リザーブプール形成におけるヒストン化学修飾系の関与が考えられる。この仮説は、次年度の解析により明らかになるであろう。新規 NF- $\kappa$ B 阻害剤を用いた再活性化阻害実験から、NF- $\kappa$ B は非メチル化潜伏様式からの再活性化を抑制する可能性が示唆されており、感染初期のリザーブからの再活性化を有意に抑制する可能性が示唆される。さらに解析を進め、サルモデル系に組み込むことも視野に入れたい。

#### 7. 知的所有権の出願・取得状況

特許申請

出願番号：特願 2002-217536

出願日：2002 年 7 月 26 日

発明の名称：リンパ系悪性腫瘍の予防・治療剤

発明者：堀江良一、渡邊俊樹、梅澤一夫

研究課題：HIV による新しい宿主免疫回避機構に関する基礎研究

課題番号：H15-エイズ-024

主任研究者：草野 秀一（聖マリアンナ医科大学医学部 助手）

分担研究者：粕壁 隆（埼玉県立がんセンター研究室 主任研究員）

## 1. 研究目的

Tat は HIV 及び宿主細胞の遺伝子発現の調節や宿主細胞のアポトーシスの阻害などの機能をもつ、HIV の感染に必須なタンパク質である。Phospholipid (PL)-Scramblase は、がん、アポトーシス状態などの不要な細胞の細胞膜の非対称構造を破壊しフォスファチジルセリン (PS) を細胞表面に提示する酵素である。PL-Scramblase によって提示された PS は、マクロファージによる食食の標的となり、それら不要な細胞は生体内から排除されることになること示唆されている。我々は、Tat が PL-Scramblase と細胞内で特異的に複合体を形成することを他に先駆けて見いだした。持続的な感染を示す HIV のタンパク質である Tat が、生体内における不要な細胞の排除に関する PL-Scramblase と相互作用することは非常に興味深く、HIV が感染細胞において PL-Scramblase の機能に影響をおよぼすことで、宿主の免疫機構を回避し、感染を持続させている可能性が示唆された。そこで、本研究では、HIV Tat タンパク質が PL-Scramblase との相互作用を介して、宿主の免疫機構に及ぼす影響を分子生物学的に解析することで、Tat による新しい宿主免疫回避機構を明確にし、エイズ発症機構の解明に貢献することを目的とする。

## 2. 研究方法

### (I) in vitro 実験

#### (1) Tat と PL-Scramblase との相互作用に必須な Tat 内のアミノ酸領域の同定

野生型 (72 アミノ酸)、アミノ末端 11 アミノ酸欠失 (12-72 アミノ酸領域)、アミノ末端 21 アミノ酸欠失 (22-72 アミノ酸領域) Tat をコードする cDNA を野生型の PL-Scramblase をコードする cDNA とともに細胞株に形質移入し、免疫沈降法により細胞内における複合体形成能を検討した。

#### (2) Tat と PL-Scramblase との相互作用に必須な PL-Scramblase 内のアミノ酸領域の同定

野生型 (318 アミノ酸)、白血病誘導型 (119-318 アミノ酸領域)、システインに富む領域の欠失 (148-154、181-189、214-240 アミノ酸領域を欠失させた 3 種)、カ

ルボキシル末端の EF-hand 領域欠失 (1-271 アミノ酸領域) PL-Scramblase をコードする cDNA を野生型の Tat をコードする cDNA とともに細胞株に形質移入し、免疫沈降法により細胞内における複合体形成能を検討した。

#### (3) Tat が PL-Scramblase の細胞内分布及び安定性に与える影響の解析

野生型 Tat をコードする cDNA と野生型の PL-Scramblase をコードする cDNA を細胞株に形質移入した。細胞分画法により、細胞質、膜、核の各々の画分の細胞溶解液を作製し、Tat および PL-Scramblase の細胞内分布および各画分における安定性をウェスタンブロッティング法により検討した。

### (II) in vivo 実験

#### PL-Scramblase の変異により白血病誘発性を獲得した Mm-P 細胞株への野生型 PL-Scramblase cDNA の導入および SL マウスへの移植

野生型 Tat をコードする cDNA を Mm-P 細胞株に導入するための前段階として、野生型 PL-Scramblase をコードする cDNA を GFP 発現ベクターに組み込んだ後、Mm-P 細胞株に導入した。薬剤耐性および GFP の発現を元に細胞のクローニングを行い、野生型 PL-Scramblase を恒常的に発現するクローンを分離した。得られた複数個の PL-Scramblase 発現 Mm-P 細胞クローンを SL マウスに移植し、野生型の PL-Scramblase が機能しているクローンの選別を試みた。

### (倫理面への配慮)

マウスを用いた実験は、動物愛護の立場からの倫理的配慮を行い、研究を実施した。

## 3. 研究結果

### (1) Tat と PL-Scramblase との相互作用に必須な Tat 内のアミノ酸領域の同定

免疫沈降実験の結果、Tat タンパク質のアミノ末端の 11 アミノ酸が PL-Scramblase との相互作用に重要であることが明らかになった。

### (2) Tat と PL-Scramblase との相互作用に必須な PL-Scramblase 内のアミノ酸領域の同定

免疫沈降実験の結果、PL-Scramblase のアミノ末端の 118 アミノ酸領域、3 つのシステインに富んだ領域

(148-154、181-189、214-240)、カルボキシル末端の EF-hand 領域 (272-318) のいずれも Tat との相互作用に必須ではなく、この相互作用には特徴的な配列が関与しないことが明らかになった。

### (3) Tat が PL-Scramblase の細胞内分布及び安定性に与える影響の解析

Tat の非存在下では、PL-Scramblase は細胞質および膜画分にのみ検出された。しかし、Tat の存在下では核画分に強いシグナルが検出され、且つ、細胞質画分において PL-Scramblase の分解が見られた。

### (4) PL-Scramblase の変異により白血病誘発性を獲得した Mm-P 細胞株への野生型 PL-Scramblase cDNA の導入および SL マウスへの移植

薬剤による選択で複数個のクローンを得た。その中の 2 つのクローンを SL マウスに移植し、白血病誘導性の喪失の確認を行っている。

## 4. 考察

本研究により、HIV Tat は PL-Scramblase と細胞内で相互作用することで、PL-Scramblase を核画分へ移行させ、細胞質内において分解を促進することが明らかになった。PS の細胞表面提示を行うためには、PL-Scramblase は細胞膜上に存在することが必須であり、本研究により得られた結果は、Tat が PL-Scramblase の機能を負に調節する可能性を強く示唆している。また、実験は完了していないが、野生型 PL-Scramblase を恒常的に発現させた Mm-P 細胞は、白血病誘導性を喪失していると思われる結果を得ており、この Mm-P 細胞を用いた実験系は Tat による PL-Scramblase を介した免疫回避機構の解析に有用であることが再確認されたと考えている。

## 5. 自己評価

### 1) 達成度について

本研究は、本年度内にマウスを用いた *in vivo* 解析の完了までを目標に掲げており、達成度は低いと言わざるをえない。しかし、遺伝子導入が非常に困難である Mm-P 細胞株に PL-Scramblase cDNA の導入を完了していること、また、Tat cDNA を効率よく細胞に導入するためのレトロウイルス・アデノウイルスベクターの構築を終了させていることから、本研究を継続することで *in vitro*、*in vivo* 解析ともに、我々の研究目標を速やかに完了できる地点にまで到達できたといってもよいと考えている。

### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

PL-Scramblase は生体内の不要な細胞の積極的な排除に関与するタンパク質であり、ウイルス感染細胞の排除にも関与していると考えられる。PL-Scramblase とウイルスタンパク質との相互作用は、われわれ以外の研究グループから一切報告されておらず、ウイルスタンパク質と PL-Scramblase の機能との関係に関する解析はわれわれ独自の発想である。そして、本研究から得られた結果は、Tat が PL-Scramblase の機能を負に調節する可能性を示唆していた。これは、HIV のみならずウイルスによる新しい宿主免疫回避機構の存在を強く示唆するものであり、学術的意義は非常に高いと考えている。

### 3) 今後の展望について

本研究により得られた結果は、Tat が PL-Scramblase の機能を負に調節する可能性を強く示唆している。そこで、Tat が PL-Scramblase 依存的な PS の細胞表面への提示におよぼす影響を *in vitro* 実験系によって、また、Tat が PL-Scramblase 依存的な白血病誘導性におよぼす影響を *in vivo* 実験系によって明らかにすることで、この仮説を証明できるものと確信している。

## 6. 結論

HIV Tat タンパク質は、PL-Scramblase と細胞内で複合体を形成した。この相互作用には、プロリンに富んだ Tat のアミノ末端の 11 アミノ酸が重要であったが、PL-Scramblase に関しては特徴的なアミノ酸配列を要求しなかった。この相互作用は、PL-Scramblase を核画分へと移行させ、且つ、細胞質内における安定性に影響を与えた。このことは、Tat が PL-Scramblase の機能を負に調節する可能性を強く示唆した。また、野生型 PL-Scramblase を恒常的に発現する Mm-P 細胞株を樹立し、2 種のクローンを SL マウスに移植した。これらの細胞株は、白血病誘導性を喪失していると思われる結果を得ており、この Mm-P 細胞を用いた実験系は Tat による PL-Scramblase を介した免疫回避機構の解析に有用であることが再確認された。今後は、これらの細胞株にウイルスベクターにより Tat を導入し、速やかに、Tat が PL-Scramblase に及ぼす影響を *in vitro*、*in vivo* 系により明らかにできると確信された。

## 7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

該当するものはない。

# 疫 学 研 究

研究課題:HIV 感染症の動向と予防戦略の開発・普及に関する社会疫学的研究

課題番号:H15-エイズ-018

主任研究者

木原正博 (京都大学大学院医学研究科社会疫学分野 教授)

分担研究者

橋本修二 (藤田保健衛生大学医学部衛生学 教授)

小野寺昭一 (東京慈恵会医科大学医学部泌尿器科 教授)

和田 清 (国立精神・神経センター精神保健研究所 部長)

木原雅子 (京都大学大学院医学研究科社会疫学分野助教授)

### 1. 研究目的

わが国の HIV/AIDS 流行および関連事象の動向に関する疫学情報の提供と、わが国において有効かつ実施可能な予防対策の開発を行い、社会疫学的エビデンスに基づく効果的かつ効率的なエイズ予防行政施策の提言を行う。

### 2. 研究方法と研究結果

#### 1) HIV/AIDS の発生動向解析に関する研究(橋本修二)

①発生動向情報の解析:[方法]エイズ発生動向のより正確な推計・予測を行うための準備として、HIV 感染・自覚・検査までの各期間に関する質問調査を HIV 感染者(170 人)を対象に実施した。またわが国の HIV 流行の特徴を分析するためにエイズ発生動向調査の結果を先進国のサーベイランスデータと比較分析した。[結果] HIV 感染から自覚までの期間は、1 年未満 62%、1-3 年未満 21%、3 年以上 17%とかなり長かった。自覚から医療施設受診までの期間は、1 か月未満 69%、1 か月-1 年未満 29%、1 年以上 2%と比較的短かった。AIDS 発病者 34 人中で、発病前に HIV 検査の受検は 24%、未受検は 76%。以上から、HIV 感染者には未検査・未診断・未自覚・未報告がかなりあることが示唆された。先進国との発生動向比較については、新しい年次データを収集し、感染経路や年齢を考慮した分析を進行中。

②保健所情報の解析:[方法と結果]保健所の匿名検査受検者に質問票調査(131 保健所)を行い、受診者特性の地域格差を分析中。

③HIV/AIDS 医療関連経費の調査:[方法] HIV/AIDS 患者の治療に伴う経済的インパクトの全貌を明らかにするために、HIV 感染者 170 人について、質問票により、医療費の自己負担額、通院費、民間療法等の費用などを調べた。[結果]1 か月あたりの中央値は、それぞれ 4,000 円、640 円、1,000 円であった。いずれも高額な者が少数見られた。

#### 2) 個別施策層の HIV 感染動向に関する研究

①薬物乱用・依存者(和田):[方法と結果]全国 6 主要

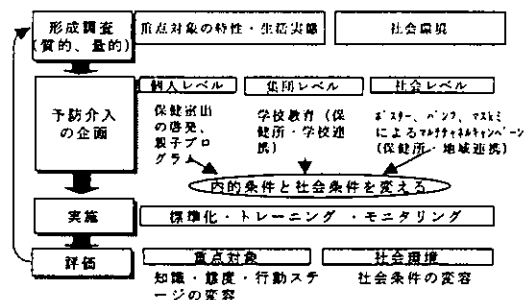
薬物依存治療施設の入院患者(全国の約 20%相当)の HIV/STI 罹患状況、薬物使用行動、性行動を調査した。薬物乱用・依存者の支援組織との共同で、非入院 IDU でも同様の調査を実施した。現在集計中。

②STD 診療施設受診者(小野寺):[方法と結果]札幌から福岡に至る全国 17 の STD 診療施設において、希望者について HIV 感染率、性行動、検査行動を調査する。本年度は、HIV 感染率を調査。現在集計中。

③検査受検者(木原正):[方法と結果]東京都内某検査所で HIV 抗体検査と共に質問票調査を行い、感染経路・性・年齢別の推定 HIV 感染率の年次推移を分析した。現在集計中。

#### 3) 個別施策層の予防介入に関する研究

①若者の予防介入研究(木原雅):[方法]ソーシャルマーケティング理論、準実験的デザイン、**研究班**・**保健所**・**学校**・**保護者**・**若者**の連携による大規模なマルチレベル(社会、集団、個人)の地域予防プロジェクト(WYSH プロジェクト N)を実施し、プロセス評価と効果評価を行った。本年度は、ポスター、パンフを大幅に増やし(各 5 万部)、保健所・学校連携(出前授業、チームティーチング)と保護者プログラムを強化した。また、33 校の高校 2 年生(5629 人)の予防授業に加えて、初めて中学校の予防教育プログラムを開発し、某市全中学校(22 校全学年 7089 人)を対象に、予防介入の実施と効果評価を行った。



[結果]介入を実施した学校別の事後調査は高校・中学現在実施中。高校生の事前調査では前年度に比べ、コンドーム使用率が男女とも 10%上昇していた(集計中)。中学生の事前調査では、性交経験率は、中 1 約 2%、中 2 約 3.5%、中 3 約 7%で、中学生のセックス

を許容する者は、中1約22%、中2約30%、中3約39%と予想を超えた高さを示し、準備状態が中学で形成されること、反面、知識が極めて不十分なことが判明し、中学レベルでの予防教育の重要性が示唆された(集計中)。本年度は、全国から地域・学校レベルでの研究参加希望が数多く寄せられ、次年度の研究の基盤が拡大した。

②滞日外国人の予防介入研究(木原正):[方法]平成13年以來のブラジル保健省との共同プロジェクト。ポルトガル語の全国有料テレビによる3ヶ月間のスポットキャンペーンや、昨年度ブラジル保健省と共同開発したポスター、パンフの掲示・配布、コントロールのソーシャルマーケティングを実施し、その効果を前年度との比較で評価した。また、学校レベルでの介入を講演形式、ワークショップ形式で実施し、効果を比較評価した。[結果]HIV/STD 関連知識は前年度より増加し、特に保健所の無料匿名検査の認知率が上昇したが、コントロール使用率は上昇しなかった。学校レベルの介入は、講演会形式よりもワークショップ形式で大幅に知識が上昇した。

③HIV 感染者の支援研究(木原正):[方法]HIV 感染者の性生活の困難を分析し、支援方を開発するために、4つの拠点病院で170人のHIV感染者(回収率57%)に質問票調査を実施し、因子構造を多変量解析した。また、支援のあり方を探求するために、医療者側で4つのフォーカスグループインタビューを行い、内容を質的に分析した。[結果]74%が性活動を行い、コントロール常用率は48%であった。各種性行動における使用意図と行動の因子関係が明らかになった。質的分析では、医療者がHIV感染者の性生活に関わることの困難・可能性に関する概念が抽出された。

④ブリアンソングスマネジメント法の開発に関する研究(木原正):[方法と結果]米国で開発された個別契約式の個人レベルの予防介入法であるPCM法の文化的な咀嚼を終え、PCMを実施しうる人材(ケースマネージャー)を全国で10名開発し、パイロット研究の経験を分析し、次年度の予防介入の準備を整えた。

#### 4. 考察

行動疫学の段階(97-00年)を経て、02年より本格的な予防研究の段階に入った。予防研究は、まず一部で集中的にソーシャルマーケティング原理に基づく有効なモデルを開発し、それを全国普及させつつモデルを洗練するという戦略で行ってきたが、研究成果の全国的に普及に伴って、多くの地域や学校(小中高)から研究依頼が集中しており、予防研究の開発と普及の機会が大きく拡大し、それが予防モデルの精緻化

と多様化につながるという良循環が生まれつつあり、戦略の妥当性が示唆されている。問題は、人材蓄積であり、全ての研究要請に対処できる質の高い人材を早急に育成することが今後の展開上不可欠である。

#### 5. 自己評価

##### 1) 達成度について

予定どおり研究を進展させ、中学生の実態調査や予防介入、HIV感染者の性行動など、わが国初の重要な研究成績が得られた。

##### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

本研究班の予防研究は、疫学・社会科学、量・質的方法を組み合わせた学際的研究であり学術的に重要な試みである。地域・社会単位での大規模で現実的な予防方法の開発を目指し、行動変容のエビデンスを示しており、実際に地域やコミュニティに大きな影響を与えている。この成果は多くのメディアを通じて全国に知られ、数多くの研究要請が寄せられており、中国やコートジボワールとの共同研究も始まっている。また、動向関係の研究は、エイズ発生動向調査が提供し得ない重要な流行監視情報を提供している。

##### 3) 今後の展望について

予定どおり研究を実施するが、STD診療施設受診者に関する研究は、さらにネットワークを拡大し、わが国の安定したセクシュアルヘルスへの発展を目指す。また、受診者のHIV検査受検率が6.5%にとどまるため、それを上昇させるソーシャルマーケティング手法の開発と評価を試みる。若者研究は、これまでのモデルを更に進化させるが、他の自治体や数多くの学校、全国PTA協議会などから研究依頼が寄せられているため、研修プログラムを導入して、予防研究の範囲を全国的に拡大すると共に、高校生全国性行動調査を実施する。また、移民の研究は、全国レベルのコントロールマーケティングやTVキャンペーンによっても行動変容が生じなかったことから、若者同様、地域集中型の予防介入に展開する。

#### 6. 結論

わが国の若者の性行動の現状やアジア大流行の接近を考えれば、リスクの高い層における流行・行動監視と有効な予防介入の開発と普及は緊要の課題であるが、本研究は、その目的に沿って順調に発展しており、わが国の予防対策に展望を拓くものとなっている。

##### 6. 知的所有権の出願・取得状況

特になし。

研究課題：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

課題番号： H15-エイズ-019

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 室長)

分担研究者： 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)

## 1. 研究目的

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。

### (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アジア特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)

タイ北部ランパン県にて、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・遺伝学的研究に応用する。

### (柱 III)「アジア型 HIV 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)。

## 2. 研究方法

### (柱 I)「分子疫学研究」(武部班員・草川班員)

① アジア諸地域(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。

② 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た。

③ 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。

④ 我が国に最も近い東アジア地域(韓国、台湾)の研究者の協力を得て、HIV 感染者のサブタイプ分布を調査し、我が国における HIV 感染症の動向と比較検討した。

### (柱 II)「コホート研究」(有吉班員)

① 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比較を Cox 比例ハザードモデルを用いて行った。

② 上記の患者背景情報・臨床経過情報などを基礎として、コホート患者検体を用い、遺伝子医学、細胞性免疫、薬剤耐性に関する研究を行った。

### (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 ヴァリエントの完全長 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。

② 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* 系の構築に着手した。

### (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。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。

## 3. 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。

② 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。

③ 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。

④ 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。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-2 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 感染例は見い出されていない。

### (柱 II)「コホート研究」(有吉班員)

① 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 Kaplan-Meier 生存推測曲線によって行い、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のあることを示した。

② 上記患者情報を基礎とすることで、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、薬剤耐性検査結果を臨床経過などと関連させて、解析することが可能になった。なお、本コホート研究では、HIV 感染抵抗性に関与する既知の遺伝子多型との関連は見つからない。新たな遺伝子が関与している可能性を残



している。

#### (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 CRF01\_AE 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。

### 4. 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、その後の 2 次的、3 次的な組換えに結果、現在の URF が発生したものと示唆される。

②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。

③ HIV-1 の遺伝子組換えには塩基配列上の要因とウイルスの生存にとって *disadvantage* をもつ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。

④東アジア地域の中で、特に台湾は我が国と非常に類似した分子疫学的プロフィールを示す。一方韓国は HIV-2 を含めアフリカ起源のウイルスの侵淫が目立つ。

#### (柱 II)「コホート研究」(有吉班員)

ランパン HIV コホート開始以来 3 年が過ぎた現在も高い追跡率を維持し、Kaplan-Meier 生存解析や Cox 比例ハザードモデルなど詳しい生存解析が可能であることが示された。本コホートは、大都市で行われるコホートとは異なり、患者の出身地にある拠点病院内にサイトを設置した地域密着型であること、ランパン県内住民の死亡届けを過去 4 年以上にわたりコンピュータ管理しているランパン県保健局のインフラも、高い追跡率を可能とした大きな要因と考えられる。

#### (柱 III)「ウイルス学的研究」(草川・椎野班員)

中国型 HIV-1 ヴァリエントの一つである 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。もう一つの中国型 CRF である CRF07\_BC の感染性分子クローンの分離が急がれる。

### 5. 自己評価

#### 1) 達成度について

①アジアにおける新型ウイルス新生のホットスポットの同定、中国とミャンマーにおける流行の直接的相互関係の証明、中国における巨大流行の起源の解明、感染性分子クローンの分離成功はいずれも世界に先駆ける重要な研究成果と考えられ、高い達成度にあると評価する。

②コホート開始以来 2 年が過ぎ、当初の目的であったコホート研究の立ち上げと高い追跡率をともなうコホートの維持が達成できた。また、本研究の遺伝子医学分野および免疫学分野への応用についても、順調に進んでいると評価される。

#### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

①中国におけるエイズ・クライシスに代表されるように、アジアにおける流行は一層深刻化している。この地域の急激な流行がどのような起源のウイルスによって形成され、またどのように拡大しているかは、アジアまた東アジア地域における予防・ワクチン戦略の礎となる研究であり、研究の学術的・国際的意義は大き

いと考えられる。

②また、アジア地域における流行拡大は、我国における HIV 感染症の将来動向を探る上で、重要な関連性があり、本研究の社会的意義は大きいと言えよう。

③ランパン・コホートは、アジア人を対象にしている点、CRF01\_AE サブタイプを対象にしている点、抗 HIV 抗体陰性配偶者を含めた夫婦を対象にしている点において、ユニークであり、現在解析中の結果から、学術的に新しい事実が発見される可能性が期待される。また、開発途上国の若手研究者の育成という国際貢献として意義も高いと考えられる。

#### 3) 今後の展望について

①東アジアにおけるエイズ流行状況の急速な変貌は、90 年代初頭にみられた CRF01\_AE の東南アジア地域からの我が国への急速な侵淫の例を引くまでもなく、我が国における HIV-1 感染症の将来動向に今後極めて大きなインパクトをもたらす可能性があり、今後一層注意深いサーベイを進める必要がある。

②分布する HIV-1 株の 10-30% が組換えウイルスであるという、世界でも例をみないミャンマー中部の地域的特徴を生かして、感染者の継続的なフォローアップ研究を進め、遺伝子組換えの AIDS pathogenesis に果たす意義に関する解明を進めたいと考える。

③アジア型 HIV-1 の感染性分子クローンの分離は、アジアを対象とする基礎・応用研究の礎になるものであり、将来のワクチン開発をも視野に入れ、非 B 型 SHIV の構築など研究の基盤整備に力を注ぎたいと計画している。

④国際レベルのコホートとして認識されるのには、少なくとも 5 年間の追跡が必要であろう。タイでも 2003 年からジェネリック薬が急速に普及しているが、その生命予後に関する研究へと発展させることが可能である。また、本コホートの基礎医学研究への応用として、遺伝子学研究、免疫学研究、薬剤耐性ウイルス研究への多岐にわたる学術的研究への発展が期待される。

### 6. 結論

①これまでの研究によっても明らかにされているように、ミャンマー中部-雲南省西部を結ぶ地域では、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相互の密接な関連性を証拠立てる新知見が得られた。

③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。

④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。

⑤タイ・ランパンにおける HIV 感染者およびその配偶者コホートを高い追跡率で維持でき、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。

### 7. 知的所有権の出願・取得状況 (2001-2003)

(主任研究者：武部) (草川班員)

1. 「「感染性 HIV 分子クローン」(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) (草川班員と共同出願)

2. 「感染性 HIV ゲノムをコードする DNA」(特願 2001-191467) (2001.6.25) (佐藤博士らと共同出願)

3. 「リボザイム発現系」(特願 2001- 67253) (2001.3.9) (大川博士と共同出願)

研究課題名：非サブタイプB型HIVにおける薬剤耐性ジェノタイプ解析アルゴリズムに関する研究

課題番号：H15-エイズ-020

主任研究者：山本 直彦（名古屋大学大学院医学系研究科 助教授）

分担研究者：市村 宏（金沢大学大学院医学系研究科 教授）、金田 次弘（国立名古屋病院 室長）

大竹 徹（大阪府立公衆衛生研究所 課長）、森下 高行（愛知県衛生研究所 主任研究員）

## 1. 研究目的

近年、HAART 療法が導入されて以来、薬剤耐性 HIV に対する対策が大きな課題となっている。アジアやアフリカの開発途上国においては十分な服用指導が行なわれていないまま、抗 AIDS 薬を安価に提供したり、また、ある地域では中身が不確かな製剤が広まっており、その事がいっそう薬剤耐性 HIV の出現を助長しているのが現状である。一方で、現在広く利用されている薬剤耐性に関するデータはサブタイプ B におけるものであり、開発途上国に多いサブタイプ A や C、日本の性的接触による感染に多いサブタイプ AE などのいわゆる non-B 型の HIV におけるデータに乏しいのが現状である。本研究の目的は、非サブタイプ B のデータから導かれたジェノタイプ解析アルゴリズムの必要性が急務と考え、永年我々と研究協力関係にあるインド、パキスタン、およびアフリカ・ケニアの政府関係者、病院、大学の医師らと協力し、これらの地域に多く流行する非サブタイプ B を中心に、薬剤耐性 HIV の遺伝学的特徴 (genotype) と感染性 (phenotype) との関連を構築し、開発途上国における将来の薬物治療など、AID 対策に重要な基盤的および臨床的データを提供することを目的とする。

## 1. 研究方法

インドにおいては Sanjay Gandhi Postgraduate Institute Medical Sciences の Dr. Dhole 博士、パキスタンにおいては Karachi Awan Hospital の Dr. Rafiq 博士、アフリカ・ケニアにおいては Kenya Medical Research Institute の Dr. Ochieng 博士の協力を得て、抗 AIDS 治療に抵抗を示した症例より、患者血清を採取し、逆転写酵素およびプロテアーゼ領域の変異部位を解析する。その結

果と、関連する臨床的データおよびサブタイプ B を基にした薬剤耐性のデータと比較検討し、新たに得られた逆転写酵素あるいはプロテアーゼ領域の変異部位における phenotype を検討する。

## 《倫理面への配慮》

調査研究実施国の実情にあわせ、その国の方針を尊重しつつ、原則としてわが国の基準すなわち「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成13年3月29日文科省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）」を遵守して研究を遂行する。すなわち、検体収集にあたっては、現地側共同研究者によるインフォームドコンセントを確認後、被検者に遺伝子解析の研究目的であり、被検者のプライバシーの守秘義務に十分配慮する旨、説明し同意を得た上で血液を採取する。論文作成にあたっては被検者の氏名や年齢等、個人が特定できるような記載を避け、個人情報とは全て現地側共同研究者の管理とする。得られた検体は日本に持ち帰り、遺伝子解析で得られたデータは全て現地側共同研究者に提供する。

## 2. 研究結果

インドにおいて逆転写酵素阻害剤およびプロテアーゼ阻害剤による治療がおこなわれたサブタイプ C の AIDS 患者で解析が可能であった19例のうち、治療に対し抵抗性を示したものが2例みられた。この2例について、逆転写酵素領域およびプロテアーゼ領域の薬剤耐性変異の部位を解析したところ、逆転写酵素領域において K70R, M184V, T215F, K103N, G190A が、プロテアーゼ領域において M46I, L90M がサブタイプ B と同様にサブタイプ C にもみられたが、逆転写酵素領域 T69N, L74I, V106M がサブ

イブ B にはみられず、これらサブタイプ C において新たな変異がみられた。さらに興味深いことに、逆転写酵素領域 H208Y の変異が、治療に反応した 17 例にはみられず、治療に抵抗した 2 例のみに共通してみられた。これらの変異がサブタイプ C のみに見られる特徴的な耐性関連変異であるかは、今後、詳細に検討する必要がある。

### 3. 考察

今回、逆転写酵素阻害剤およびプロテアーゼ阻害剤による治療に抵抗を示し、解析し得たのはわずか 2 例であったが、この 2 例共に、従来のサブタイプ B のデータを基にした薬剤耐性関連遺伝子とは異なる変異がみられた。すなわち、これまで逆転写酵素領域 T69D, L74V, V106A が薬剤耐性関連変異とされていたが、上記のサブタイプ C ではそれぞれ T69N, L74I, V106M になっており、このうち、V106M は昨年 Brenner らによって、すでに報告されており (AIDS, 17(1):F1-5, 2003 Jan 3)、今回の他の 2 ヶ所の変異、T69N, L74I についても、少なくともサブタイプ C に特徴的な耐性関連変異である可能性が高い。さらに、治療に反応した 17 例にはみられず、治療に抵抗した 2 例のみに共通してみられた逆転写酵素領域の H208Y の変異も、non-B サブタイプにみられる新しい薬剤耐性関連変異である可能性がある。今後さらにサブタイプ C 以外の non-B サブタイプの症例を重ねると同時に、新たに見つかった変異についての phenotype の解析を行なう必要がある。

### 5. 自己評価

#### 1) 達成度について

初年度 1 年間に採集し得た、逆転写酵素阻害剤およびプロテアーゼ阻害剤による治療が行なわれたインドの non-B サブタイプの症例のうち、検体の状態がよく、解析し得たのは 19 例で、そのうち治療に抵抗を示したのはわずか 2 例であったが、その 2 例において、従来のサブタイプ B のデータを基にした薬剤耐性関連遺伝子とは異なる変異がみられた。しかしまだ、検体数が不十分であり、また、サブタイプ C 以外の non-B サブタイプの解析を行なってい

く必要がある。

#### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

地球上で最も広く流行しているサブタイプ C をはじめとする non-B サブタイプの多いアジア・アフリカの途上国において、今後さらに積極的に抗 AIDS 薬の治療が行なわれる機会が多くなる中で、従来のサブタイプ B のデータを基にした薬剤耐性関連遺伝子とは異なる非サブタイプ B に特徴的なジェノタイプ解析アルゴリズムを構築する事は、治療を開始する際あるいは抵抗を示した際の薬剤の選択をする上で、極めて有益な事と思われる。

#### 3) 今後の展望について

解析し得たわずか 2 例において、従来のサブタイプ B のデータを基にした薬剤耐性関連遺伝子とは異なる変異がみられるという高い検出率から推察すると、今後症例を重ねることにより、さらに多くのサブタイプ B に見られない non-B サブタイプに特徴的な耐性関連変異および関連遺伝子が見出される可能性がある。今後、さらにサブタイプ C の多いインドでの症例数を増やすとともに、サブタイプ A や D などの non-B サブタイプが流行しているケニアでの検体の解析も行なう予定である。

### 6. 結論

逆転写酵素阻害剤およびプロテアーゼ阻害剤による治療に抵抗を示したサブタイプ C の 2 例において、従来のサブタイプ B のデータを基にした薬剤耐性関連遺伝子とは異なる T69N, L74I, V106M が逆転写酵素領域にみられた。さらに、治療に反応した 17 例にはみられず、治療に抵抗した 2 例のみに共通して、H208Y の変異が逆転写酵素領域にみられ、これも non-B サブタイプにみられる新しい薬剤耐性関連変異である可能性がある。今後症例を重ねることにより、さらに多くのサブタイプ B に見られない non-B サブタイプに特徴的な耐性関連変異および関連遺伝子が見出される可能性がある。

#### 6. 知的所有権の出願・取得状況

特になし。

研究課題：アジア太平洋地域における国際人口移動から見た危機管理としての HIV 感染症対策に関する研究

課題番号：H15・エイズ・021

主任研究者：石川信克（結核予防会結核研究所 副所長）

分担研究者：丸井英二（順天堂大学医学部 教授）、吉原なみ子（国立感染症研究所 エイズ研究センター室長）、

鎌倉光宏（慶應義塾大学看護医療学部 助教授）、沢崎康（エイズ予防財団 主任）、野内英樹（結核研究所

研究部主任研究員）、吉山崇（結核研究所研究部 部長）、小野崎郁史（ちば県民健康予防財団 診療部長）

人口移動に関する危機管理ガイドライン素案の作成

## 1. 研究目的

本研究は、アジア太平洋地域において HIV 感染症に対する国際人口移動の影響の検証と、結核を入り口とした HIV 流行の実態把握を通じ、今後の危機管理政策への提言を模索することを目的としている。

## 2. 研究計画・方法

具体的に3項目に沿って3年間の研究を進めている。

1. 在日外国人の HIV 感染に関する研究；1.1 外国人人口推計：法務省による出入国管理統計資料を用いて、入国年別、出身国別、入国後滞在年数別に推計する。1.2 母国の成人 HIV 感染率と 1.1 で求めた推計人口を掛け合わせ、在日外国人の HIV 推定患者数を計算する。1.3 エイズサーベイランス等の患者情報より実際に診療されている患者数と上記推定 HIV 患者数との比を特にエイズ合併結核に関して、患者発見方法の情報を用いて解釈する。1.4 モデル地域を設定し結核問題とリンクしたエイズ対策について検討する。

2. アジア太平洋地域の HIV 疫学と人口移動に関する研究；2.1 タイ：ミャンマーとの国境問題をエイズと結核コホートを活用して治療脱落率・薬剤耐性頻度の国籍比較より推定する。2.2 カンボジア：国家結核プログラムに登録された全国結核患者中の HIV 感染率と分子疫学手法も併用して国境問題を分析する。2.3 他に重要な中国等の国々に関して、タイ、カンボジア事例の応用性を検討する。2.4 旧島尾班の成果であるジェンダー分析の国際人口移動・危機管理分野での応用する。2.5 近隣 HIV 蔓延国への日本人渡航者の HIV 感染リスクの検討する。

3. 政策分析とガイドライン素案の作成；3.1 先進国のエイズ、結核等感染症の移民対策、危機管理（アメリカ・カナダ型、イギリス・ヨーロッパ諸国型）政策分析、重症急性呼吸器症候群（SARS）による危機管理体制の変化の動向。3.2 日本の感染症危機管理体制の現状を踏まえた HIV 等感染症の国際人口移動に関連した危機管理ガイドライン素案の作成。3.3 先進国のエイズ動向（厚労省より追加研究要請）は、鎌倉を中心として、経年的蓄積の上で質的価値が高い英国の Health Protection Agency（旧称 Public Health Laboratory Centre）のデータを中心に分析し日本のエイズ対策と比較検討する。

（倫理面への配慮）

研究は現地政府と倫理委員会の許可の元で行われ、現地の結核・エイズ対策責任者、研究協力機関との共同研究を組んで行われた。患者の1次情報の活用時は、インフォームド・コンセントを得た。サーベイランス等の2次情報に関しては、情報分析の前に匿名化を行い、患者を特定する個人情報の漏洩防止を厳密にした。

## 3. 研究結果（平成 15 年度）

1.1-1.2 で実施した現在までの単純推計では、年末現在国別登録外国人から得た 2001 年末滞在者数は、南アメリカ地域、東南アジア・南アジア地域、中東・北アフリカ地域、サハラ以南アフリカ地域からそれぞれ 329,510 名、286,417 名、11,528 名、6,860 名であった。これらと HIV 有病率の積により推計された在日外国人における HIV 点粗感染者数は合計 3718.9 人であり、内訳は地域別に南アメリカ地域が 2,106.6 人、東南アジア・南アジア地域が 1,127.6 人と多くを占めた。サハラ以南アフリカ地域は入国者数が少ないのに比して HIV 有病率が高いために 472.4 人と推計され、中東・北アフリカ地域が 12.3 人であった。在日外国人 HIV 粗感染者数推計が大きかった 5 カ国について出入国・再入国者数から計算した 2001 年度在日外国人滞在者数を直接に出入国統計から得た年末時点滞在者数と比較したが各国とも 20% 誤差以内であり、国別粗感染者数比が大きく異なることはなかった。

2.2 で、カンボジアの1ヶ月の新規登録結核患者 2,270 症例のうち、2,240(97.8%)の患者より血清が採取され、HIV 陽性率は 11.8%であった。ロジスティック分析では、HIV 陽性に対する独立した相関因子は、居住地がタイ国境の県（調整オッズ比（AOR）=1.92, 95%信頼区間（CI）1.31-2.79）、沿岸地域（AOR=2.47, 95%CI:1.44-4.21）、プノンペン市（AOR=4.63, 95%CI:2.12-6.87）、年齢 25~34 才（AOR=6.73, 95%CI:3.52-12.88）、塗沫陰性肺結核（AOR=2.55, 95%CI:1.77-3.67）、肺外結核（AOR=1.99, 95%CI:1.36-2.91）と西部国境と海岸部からの国際人口移動の影響が示唆された。吉原は、この HIV の分子疫学分析よりタイ由来の蔓延が起きている事を明示した。