

研究課題：先進諸国におけるエイズ発生動向、調査体制、対策の分析に関する研究

課題番号：H16・エイズ・005

主任研究者：鎌倉 光宏（慶應義塾大学看護医療学部／医学部 助教授）

分担研究者：小松隆一（国立社会保障・人口問題研究所人口動向研究部室長）、池上清子（国連人口基金東京事務所所長）

1. 研究目的

先進諸国では、プロテアーゼ阻害剤が多剤併用療法に組み込まれるようになった1996年頃からAIDS症例報告数ならびにAIDS死亡者数が減少する傾向が見られるようになったが、わが国においては、1999年の感染症法施行による症例報告体制の変化という要因もあって一概には断定できないが、HIV感染報告のみならずAIDS患者報告も増加傾向が依然として続いているという憂慮される状況が続いている。このような状況下、世界の先進諸国の発生動向、動向調査、予防対策を整理・分析し、わが国における効果的かつ効率的な動向調査体制の確立と対策の立案に資することは、必要かつ緊急性の高い課題と考えられる。

本研究は先進諸国のHIV/AIDS発生動向とその調査体制について比較検討し、その特徴や教訓を明らかにすること、さらに実施された対策とその後の発生動向との関連を探り、わが国の今後の施策に資することを目的とした。

2. 研究方法

(1) 先進諸国におけるHIV/AIDSの発生動向の研究を国際機関および各国の発生動向報告書、websiteの情報等を活用し、とくに1980年代中期以降のHIV/AIDSの発生動向を比較検討することによって発生動向の変遷に注目した分析を行った。推計については時点推計と将来予測方法の結果及び使用されている先進国を対象とした共通の方法論の信頼性を検討した。

(2) 先進諸国の調査体制の現状及びその利点と問題点の比較研究を①サーベイランス（とくに症例報告）の法的体制、実施状況調査②捕捉率：多剤療法出現以降の先進国での捕捉率の効用と限界を文献等から明らかにすること③行動サーベイランス：各国の実施状況と実施体制、活用状況等を調査し、効用を明らかにすることにより行った。

(3) 先進諸国における感染経路別の対策と評価の研究に関して、各種施策集団ごとの対策とその評価を若年者、MSM、性産業従事者とクライアント、性産業従事者外国人、静脈薬物使用者等を対象に行った。平成16年度はとくに英、加の各種集団を対象とした事例を収集し、

その効果評価についての判定指標について情報を集積し、成功事例と不成功事例の検討・分析を行った。

（倫理面への配慮）

平成16年度は一般・感染者個人を直接対象とする調査は行わなかったため、倫理上検討すべき問題は生じなかった。今後、研究の展開上、一般・感染者個人を直接対象とする調査を行う必要が生じた場合は、説明と同意、参加者のプライバシー等に留意し、大学および調査対象病院等の倫理委員会による審査を受ける。専門家や担当官からの聴取や入手したデータで個人のプライバシーに関するような情報は、個人が特定できないよう今後も適宜管理する。

3. 研究結果

(1) 主要先進国においてもHIV/AIDSサーベイランスの対象および質的充実度はかなり異なり、とくに国レベルのHIV感染者の届出システムについては英、独、オーストラリア等を除いては全く行われていないか、開始してからの歴史がきわめて短い。症例報告に求められている内容、とくにCase Identifierについては国別の特徴を検討したところ、イニシャルおよびその変形を利用する事例が多く認められた。時点推計については、先進国に共通して適応できる方法論は存在せず、主として妊婦感染率を指標とした経験的推計が為されていることが多いことが明らかになった。

(2) 調査および評価の体制の現状については、文献による評価の高かったThe Global Fundのツールキットの汎用性について検討したが、現在までに得られている結果が限られており、特にHIV/AIDSについてはわが国よりも高い有病率を有する国のデータを集める必要性を認めた。感染者捕捉率に関する資料は各国ともに少なく、限られた臨床報告を基に概数を算出している国が多かった。行動サーベイランスについては、米国の健康リスク行動の全国調査BRFSS(Behavioral Risk Factor Surveillance System)のHIV/STIに関連する調査項目を整理・検討した。インターネットを通じて予防対策に関わる有用な情報の収集が可能で、その結果を地域に還元することも同様に可能であるが、感染に関わる守秘の問題および薬物使用など法律に触れる項目の調査方

法については、特に国内に導入する場合の問題点が認められた。

(3) 先進諸国の予防プロジェクトの事例研究については、カナダの Sex worker、英国のMSM等について検討を行ったが、リスク集団の規模の違い、また経済活動に関連する予防対策についてはわが国への導入が困難と思われる事例が認められた。また、コミュニティーベースの非政府組織の成熟度と政府の資金援助の形態についても差異が認められた。

4. 考察

先進諸国間においてもHIV/AIDSサーベイランスには質的相違があり、それぞれが必ずしも有効に機能しているとは限らず、また捕捉率に関するデータも十分ではない。わが国のシステム上の問題は病変とくにAIDS死亡に関するデータが極めて不足しており、経時的変化の観察、国際比較および薬剤の治療効果判定を行うことが不可能である。届出書式の改良、守秘性を保った個人識別指標の導入を早期に望めない状況下では、対象数の限界および選択バイアスは存在するものの、感染者・患者の集中する医療施設における臨床データに基づく死亡動向解析が有用であると考えられた。行動サーベイランスについては、米国のリスク行動調査が双方向の情報開示が可能であり、バイアスを認識した地域限定の予防活動に有効であると考えられ。但し、質問項目については、守秘および法律上の保証が求められる状況が予想された。予防プロジェクトの事例研究にはコミュニティー組織の協力が不可欠であるが、わが国の場合、複合のリスク要因を有する集団は他国よりも限られているものの、リスク集団の規模が小さく、効果について大きな成果が得られない可能性も大きい。この観点から最も重要な対象はMSM集団であり、行動サーベイランスと組み合わせた対策を行う価値があるものと考えられた。

5. 自己評価

1) 達成度について

平成16年度は先進諸国の動向調査体制、調査項目に付いて一定の整理・検討を行ったが、対象国数を増やし捕捉率などについて更に資料を集め検討を行うことが必要であると考えられる。行動サーベイランスの調査項目については、米国全国調査のシステムが有用であり、わが国に应用可能な基本的な枠組みを作成する資料が得られたものと考えられる。予防プロジェクトの事例研究については、英国、カナダの事例が集められ要点を表示することができたが、この調査も対象国数を増やし、わが国への応用適応についてさらに検討する必要がある。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

先進国のサーベイランスシステムは行動面も含め、各国の主要なリスク要因、法律の規定をもとに作成されて来ているが、その相互比較を行った研究は少ない。国際的な予防対策の主眼は歴史的に高有病率国の予防対策に注がれてきた経緯があり、本研究の成果は先進国を対象としてその各種予防対策の相互補完の資料として活用が期待される。

3) 今後の展望について

動向調査体制については、調査対象の国を増やすことによって、より多面的な考察が可能になるものと考えられる。捕捉率については、文献が乏しい可能性もあり、国際機関の専門家からの意見も聴取したい。リスク行動調査についてはわが国の地域を限定した応用可能性を検討している。また、対策研究については、本年度の英国、カナダに加え、今後はアジアの中で対策面での先進的事例を有するタイと香港、さらに予算上可能であれば米国の中で一定の対策が確立されているカリフォルニア州の事例を調査対象としたい。事例の選択については、引き続き、国レベルの政策・評価が行われたプロジェクトを対象とし、得られた経験を基にわが国の政策への適応可能性を検討する。調査対象の枠組みは若年者、女性、MSM、Sex Worker、IDUs、外国籍者とするは変化させず、各国の流行をさらに総括的に分析する方向に重点を置く。

6. 結論

主要先進国においてもHIV/AIDSサーベイランスの対象および質的充実度はかなり異なり、とくにHIV感染者の届出システムについては英、独、オーストラリア等を除いては、全く行われていないか、開始してからの歴史がきわめて短い。わが国の場合、諸先進国と比較して、感染法上、任意報告であることからAIDS死亡に関するデータが極めて不足しており、経時的変化の観察、国際比較および薬剤の治療効果判定を行うことが不可能である。届出書式の改良、守秘性を保った個人識別指標の導入を早期に望めない状況下では、対象数の限界および選択バイアスは存在するものの、感染者・患者の集中する医療施設における臨床データに基づく死亡動向解析が必要であると考えられた。また行動サーベイランスについては米国の全国調査BRFSSを参考に質問項目を検討することにより、特にMSM集団を対象とした双方向の情報開示がわが国においても地域を限定して応用の可能性があるものと考えられた。

7. 知的所有権の出願/取得状況(予定を含む)

知的所有権についての出願・取得はない。

研究課題: HIV 検査体制の構築に関する研究

課題番号: H15-エイズ-015

主任研究者名: 今井光信(神奈川県衛生研究所 所長)

分担研究者名: 河原和夫(東京医科歯科大学大学院 医療政策学 教授)、山口 剛(東京都南新宿検査・相談室 室長)

貞升健志(東京都健康安全研究センター 微生物部 主任研究員)、大竹 徹(大阪府立公衆衛生研究所 ウイルス課 課長)、
本間 寛(北海道立衛生研究所 所長)、中瀬克己(岡山市保健所 所長)、金光公浩(日本赤十字社 血液事業部 次長)、
木村和子(金沢大学大学院 医療薬理学 教授)、杉浦 互(国立感染症研究所 エイズ研究センター第2研究グループ 室長)、
加藤真吾(慶應大学医学部 微生物学 助手)、蜂谷敦子(国立国際医療センター エイズ治療研究開発センター 研究員)、
金田次弘(国立病院機構 名古屋医療センター 血液免疫研究部 室長)、吉村和久(熊本大学 エイズ学研究センター 助手)
近藤真規子(神奈川県衛生研究所 微生物部 主任研究員)、玉城英彦(北海道大学大学院 予防医学 教授)

1. 研究目的

本研究班は、HIV感染者の増加に伴い、自らのHIV感染に気づかずにいる感染者や献血者の中のHIV検査陽性者が増加し続けている現状を踏まえ、I. より効果的なHIVのスクリーニング検査体制を構築する、II. HIV検査陽性者(感染者)のケアのためのより効果的なHIVのフォローアップ検査体制を構築する、の二つの目的で研究を行う。

2. 研究方法

上記二つの目的のため、研究結果に示す項目の研究を行った。(具体的研究項目は研究結果を参照)
(倫理面への配慮: エイズ患者・HIV感染者・HIV検査希望者への対応に当たっては、特にプライバシーの保護に配慮するとともに、偏見差別のない接遇を心がけた。また、その血液等の扱いに関しても、感染防止の注意に加え、氏名等のプライバシーの保護に努めた。検査結果に関しては、そのプライバシーの保護に努めるとともに、エイズ患者・HIV感染者・HIV検査希望者等への迅速な還元を努めた。)

3. 研究結果

I. より効果的なHIVスクリーニング検査体制を構築するための研究

1. 保健所等におけるHIV無料検査をより受けやすく、より効果的なものにするための研究

① 保健所HIV検査への即日検査の導入: 栃木県小山市の保健所において平成15年1月から実施している即日検査の試験的導入をさらに1年間継続すると共に、北海道の26保健所においても、即日検査を導入し、その効果と問題点を解析した。また、これら保健所の検討結果に基づき、即日検査のガイドラインの作成と改訂を行い、即日検査の普及と拡大に努めた。来年度は、これらガイドライン、実施手順書等をさらに充実させ、即日検査実施担当者への研修の実施や支援を行うとともに、その評価を行う予定である。

② 毎年定点調査を行っている保健所等無料検査機関(15都道

府県)における2004年の検査数は63278件、陽性数は313例であり、前年に比べ、検査数は12%増、陽性数は42%増であった。特に東京都(32%増)、愛知県(75%増)、大阪府(78%増)における陽性数の増加が目立った。

2. 都市部でSTD受診者の多い民間クリニックとの連携により、STD受診者へのHIV検査の普及を図るとともに、STD患者におけるHIV感染の実態を把握するための研究(STDクリニックでのHIV検査の普及と定点調査)

即日検査を実施している12クリニックにおいて、2004年では10382名の受検者があり、陽性例は男性41例、女性1例であった。民間クリニックでの受検者数は前年の30%増、陽性例は10%増となった。保健所検査を補完する意味で、民間クリニックの即日検査の果たす役割が大きいことが確認されたため、最近さらに2カ所(渋谷、名古屋市)の民間クリニックの協力を得て、現在4カ所ですべて即日検査を実施し定点観測を行っている。

3. 日本赤十字社における、より安全な血液供給のためのHIV検査体制・ドナースクリーニングに関する研究

献血血液のHIV抗体検査、NAT検査、サブタイプ分類、等の解析により、献血者におけるHIV感染の実態と動向の把握を行った。献血者におけるHIV検査陽性例は、2004年は抗体陽性例が90例、NAT検査陽性例が2例であり、献血者におけるHIV検査陽性例は依然増加傾向にあった。昨年10月から日赤において献血時の本人確認が強化されており、現在その効果・影響等について解析中である。

4. 国際的な比較検証により、より効果的なHIV検査体制を構築するための研究

① 海外において利用されている検査キット・検査法(検査のアルゴリズム等)に関する詳細情報の収集・解析、② 海外のHIV検査体制(検査機関・医療機関との連携、検査数、受付時間、検査方法、陽性率、カウンセリングと告知、普及啓発等)に関す

る詳細情報の収集・解析を行い、その成果については現在のガイドラインの改訂にも反映させる予定である。

5. ホームページ「HIV検査・相談マップ」、紹介カード、各種製本の活用により、より効果的にHIV検査情報を提供するための研究

ホームページ「HIV検査・相談マップ」の掲載地域の拡大、HIV関連情報の充実(即日検査等利便性の高い検査の実施機関の情報提供、ガイドライン等の掲載)より、検査希望者のニーズや検査提供者のニーズをより反映した情報提供を行った。現在、ホームページの1日の平均アクセス数は2000件、積算のアクセス数は150万件を越えるなど、極めて有効な情報提供手段として機能しており、今後もさらにその有効活用を計っていく予定である。

II. HIV感染者のためのHIVフォローアップ検査体制を構築するための研究

1. HIV検査法の技術支援と各地の衛生研究所・民間検査センター等の検査・研究機関の連携による、HIV検査の全国ネットワークを構築するための研究

各地の衛生研究所および拠点病院等のHIV検査担当者を対象にHIV検査の技術講習会を実施し、技術移管と最新情報の提供を行うとともに、そのネットワークの構築に努めた。

2. 血中HIV-1の定量検査法のコントロールサーベイに関する研究

HIV-1の定量検査を実施している検査・研究機関(35施設)を対象に、本年度もコントロールサーベイを行い、現在その結果の解析中である。今回は、コントロールサーベイの実施時に49項目からなる検査工程チェックシートを配布し、HIV-1定量検査値の信頼性確保に努めた。

3. HIV-1プロウイルス定量法のバリデーションと臨床応用に関する研究

標準DNA標本を作成し、昨年バリデーションを行ったプロウイルス定量法(4種)を用いて、未治療患者、治療患者を対象にプロウイルスの定量を行い、血中RNA量、CD4数、予後等との関連について現在検討中である。

4. 薬剤耐性検査(特にサブタイプE等、非サブタイプB)の検査体制を構築するための研究

国内で治療中の患者を対象に、サブタイプE等、非サブタイプBの薬剤耐性変異のフォローアップ検査、ウイルス分離によるフェノタイプ検査を行い、ジェノタイプ検査との比較検討を実施し、そのデータを蓄積中である。

5. 希少HIV株の検査法の検証とその疫学調査

感染後長期に亘り、HIV遺伝子が検出されず、抗体の上昇も極めて緩やかであった、*nef*欠損変異HIVの感染例について経過観察と遺伝子解析およびウイルスの分離培養を行った。また、分離ウイルスのHIVクローンについて武部らとの共同で特許の出願を行った。

4. 考察

本研究班の重点課題の一つであるスクリーニング検査体制の構築に関して、本研究班で重点的に取り組んでいる3つのプロジェクト(①ホームページ「HIV検査・相談マップ」によるHIV検査情報の提供、②即日検査の試験的実施と評価、③即日検査のガイドラインの作成や研修資料作成と研修等による即日検査の普及)をリンクして機能させていくことで、非常に効果的な成果を上げていくことが出来ると考えている。今後、日赤との連携をさらに強化し、献血者のドナースクリーニングの強化と献血者へ効果的なHIV情報の提供をリンクさせることで、献血者のHIV検査陽性数の増加問題の解決にも努めていきたい。

5. 自己評価

達成度：ほぼ計画通りに進行している。

意義：即日検査のガイドラインの作成やホームページ「HIV検査・相談マップ」による検査情報の提供により、即日検査の普及や検査希望者がより検査を受けやすい環境づくりに貢献できた。

展望：来年度は即日検査等の利便性の高い検査システムの普及とガイドラインの改訂や研修資料の充実によりその質の向上に努めたい。日赤との連携を深め、日赤で昨年より実施している献血時の本人確認や問診の強化・検査情報の提供等の対策の効果についても評価できるようにしたい。

6. 結論

本研究班の研究はほぼ計画通り進行中である。特に即日検査に関しては、昨年度は1保健所で試験的に実施し、本年度はその成果に基づいて作成したガイドラインの配布やホームページでの情報提供により、即日検査の全国レベルでの普及拡大に貢献できた。来年度は、さらにその拡大に努めると共に、ガイドラインと研修用資料の改訂・充実により即日検査の質の向上を図ると共にその効果の評価を行う予定である。

7. 知的所有権の出願・取得状況

*nef*遺伝子欠損HIV分子クローンに関する特許を出願中(武部らとの共同出願)

研究課題：HIV 感染症の医療体制の整備に関する研究

課題番号：H15・エイズ・022

主任研究者：木村 哲（国立国際医療センターエイズ治療・研究開発センター センター長）

分担研究者：照屋 勝治（国立国際医療センターエイズ治療・研究開発センター 厚生労働技官）、杉浦 亙（国立感染症研究所エイズ研究センター第2研究グループ グループ長）、小池 隆夫（北海道大学大学院医学研究系研究科病態内科学・第二内科 教授）、佐藤 功（独立行政法人国立病院機構仙台医療センター統括診療部 部長）、下条 文武（新潟大学大学院医歯学総合研究科臨床感染制御学分野 教授）、上田 幹夫（石川県立中央病院血液免疫内科 部長）、内海 眞（高山厚生病院 院長）、白阪 琢磨（独立行政法人国立病院機構大阪医療センター HIV/AIDS 先端医療開発センター センター長）、木村 昭郎（広島大学病院血液内科 教授）、山本 政弘（独立行政法人国立病院機構九州医療センター内科 医長）、池田 正一（神奈川県立こども医療センター障害者歯科 部長）、島田 恵（国立国際医療センターエイズ治療・研究開発センター 看護支援調整官）、山中 京子（大阪府立大学社会福祉学部 助教授）、小西 加保留（桃山学院大学社会学部社会福祉学科 教授）

1. 研究目的

本研究は HIV 感染症の診療体制を更に整え、どの地域にあっても利便性が高く良質な医療を提供できる体制を整えることを目的としている。いまだに差別・偏見のある HIV 感染症においては、ケア/サポート体制の整備も必要であり、患者/感染者の少ない地域においては経験不足を補いつつ、適切な対応ができる体制を整えておく必要がある。最近、通院先の偏りが顕著となり問題となってきた。現状をハード・機能の両面から解析・評価することにより、拠点病院の機能向上を図り、安心してかかれる医療機関を増やして行くための具体策を見出していく。

2. 研究方法

1) 地域における HIV 医療体制評価と整備に関する研究

人的・物的状況、HIV 医療に必要な機能、HIV 医療の質などについて実態調査を通じて評価・検討し、患者増に伴う医療の質の低下を防ぐ方策を検討する。

2) 治療ガイドラインの作成

米国 DHHS、CDC、IAS-USA Panel、英国 BHIVA などによる最新のガイドラインを参考に、日本の状況にあった治療ガイドラインを作成する。毎年改訂する。

3) 通院患者に対する感染伝播防止の再教育と HIV 感染者の早期発見による発症予防、HIV 感染症拡大防止策

再教育などの手法を整理し、医療従事者用のマニュアルを作成する。HIV 感染症が見逃されていることが多いので、医師の判断を助ける情報を提供する。

4) HIV 職業感染防止対策の推進に向けた検討

各ブロックの医科および歯科で現在とられている院内感染防止予防策をスタンダードプリコーションの導入状況を含めて把握し、改善する。

（倫理面への配慮）

本研究では主たる研究対象が医療体制であり、人を研究対象とする部分は少ないが、施設名を含め個人情報漏れることのない様、守秘義務を守ると共に発表形式、調査形式に配慮する。制度、および体制を考える場合においても個人の権利を尊重し、社会倫理に沿ったものとなるよう配慮する。

3. 研究結果

1) 地域における HIV 医療体制の評価と整備

a) 拠点病院の評価

昨年度、全国の 364 の拠点病院を対象に診療実績、受け入れ状況その他について調査し、その集計結果を平成 9 年度に行われた同様の調査と比較した結果、緊急時の対応や受け入れの理解度、入院可能度、観血処置可能度、歯科処置可能度などにおいて大幅な改善が見られていたが、経験症例数の少ない所が多く、質の改善と連携が課題である。

b) 研修体制の見直しと強化策

HIV 医療体制整備のために全国のブロック拠点病院および ACC は各種の研修会、講演会などを実施した。平成 16 年度にブロック拠点病院は連絡会議 18 回、医師/看護師/コメディカル向け研修会 72 回、歯科向け研修会 4 回、公開講座 5 回など、各地で活発な教育・啓発活動を行った。ACC はこれらのカンファレンス、研修会に積極的に協力し、多数の講師を派遣した。また、ACC において医療従事者向けの臨床研修を短期コース 1 回、1 週間コース 6 回、1 ヶ月コース 1 回行い、多くの拠点病院で格差のない診療が行えるよう貢献した。更に ACC が中心となって首都圏の各都県に 1 ヶ所ずつ強化拠点病院を定め、5 病院で 3 回ずつ、計 15 回の出張研修を行った。毎回多数の参加者があり、当該病院では HIV 診療に対する理解と自覚、モチベーションが高まり、効果的であった。同様の試みは北陸ブロックでも行われ、6 ヶ所で出張研修を行った。東北ブロックでは各県毎の取り組みを具体化した。

c) 拠点病院のネットワーク化

これまでの全国の拠点病院のネットワークは不完全で機能していなかった。初年度（昨年度）において、そのネットワークの構築に着手し、約 60% の把握が出来た。今年度、更に促進し現時点までで 86% のネットワーク化が達成された。今後、このネットワークを通じ、情報を提供・交換し、また、ACC やブロック拠点病院の行う研修の教材を全国の拠点病院に送るなどにより、継続的研修と支援を行う。これにより、拠点病院のレベルアップがはかれる。

d) 研修終了者のネットワーク化と生涯研修体制の構築

ACC ではこれまで数百名の医療従事者に対し、HIV 研修（短期コース、1 週間コース、1 ヶ月コース）を行ってきた。しかし、研修を終え、各自の病院に戻ってもなかなか受け入れ体制が整わない、症例が少なく習得した知識・技能が生かせない、忘れてしまう、知識が古くなってしまふ、異動により担当からはずれてしまうなどの状況が考えられるが、定期的なフォローアップは行っていなかった。研修のやりっ放しでは効果が薄く、新しい情報を提供し、知識・技能をアップデートするなど長期的アフターケア研修がレベルとモチベーションの維持に重要と考えられる。そこで先ず 2002 年度以降の研修終了者を対象に、連絡網を作る作業を開始した。今後、ACC やブロック拠点病院の行う研修の教材をこれら研修終了者に送り、継続的研修と支援を行う。相互の連携にも有益である。

e) 患者/感染者の通院先の偏りについて

拠点病院では昨年度回答のあった 246 施設中、現在患者 0 の施設は 63 施設（26%）、1~10 名の施設が 117 施設（48%）で、合せて 73% で臨床経験が乏しい状況にあることが判明した。勿論患者/感染者が非常に少ない地域が多いので経験症例数が少ない施設があるのは当然であるが、患者/感染者の増加に備えておく必要がある。

患者/感染者の最も多い東京都についてみても、診療患

者数が1~10名をピークとする40名以下の施設群と400名以上(425名~817名)を診ている3施設との2極化が見られる。特に患者数の多い3施設で調査したところ、いずれも患者数の伸びが著しく、外来での医療が限界に近いことが判明している。

f) 首都圏問題および医療機関間の連携に関する具体策

昨年度の自らの提言に従い、具体的方策として、関東甲信越ブロックで患者/感染者数の多い東京都、神奈川県、千葉県、埼玉県、茨城県の1都4県を首都圏支部、栃木県、群馬県、山梨県、長野県、新潟県を北関東甲信越支部とし、ACCがブロック拠点病院を支援しつつ、首都圏支部内の拠点病院の研修を拡充することとした。この方針に則り、首都圏の1都4県に1ヶ所ずつの強化拠点病院を定め、ACCから出向き、1病院当たり3回ずつの研修会を行った。毎回多数の参加者があり、当該病院ではHIV診療に対する理解と自覚、モチベーションが高まり、効果的であったことは先に述べたとおりである。この研修を通じ、ACCと5つの強化拠点病院および地域拠点病院の連携も高まる。強化病院のレベルアップが達成されれば、患者が利便性に依りて拠点病院を選べるようになり、結果的に患者の分散にも繋がる。HAARTの導入は主として経験の多い施設で行い、安定期に入ったら連携病院に紹介し、連携病院は定期的に逆紹介する。このような連携システムを作ることにより経験の少なかった拠点病院でも経験が蓄積され独力で診療できるようになる。

g) 沖縄県における患者の急増と医療体制の問題点

沖縄県では患者・感染者急増の兆しがある。日本の他県からの観光客に加え、海外からの観光客も多く、開放的な環境がHIVの流行拡大に関与していると思われる。特に、感染者数に比し患者(発症者)数の多いことが注目される。県内の拠点病院が県南部にしかないことも、アクセスを悪くしている可能性があるが、海に囲まれた狭い社会であることから抗体検査も受けづらく、感染者が潜行してしまい、発症して初めて感染していたことに気づかれるケースが多いものと思われる。木原班、市川班との連携が必要である。

2) 治療ガイドラインの作成

治療ガイドラインは全国で均一なHIV診療を実現するために不可欠な道具である。新しい抗HIV薬も加わったので改訂版を作成することとし、現在準備中である。

3) 通院患者に対する伝播防止の再啓発と感染者の早期発見に関する活動

ここ数年HAARTの開始時期が遅くなり、ウイルス量の多い感染者が急増したので、これらの通院者が感染源とならないよう、再啓発することは、HIV感染症の拡大を防ぐためにも重要である。

感染者の健康の維持および発症予防のためには感染の早期発見が大切であり、HIV感染症の見落としを防ぐための教材を教育指定病院、拠点病院、医師会を通じ、全国の医師にメッセージを送付することとした。今年度得られた735例の新規患者の調査結果では、病院での主治医判断による検査の促進が効果的と推定される。

4) カウンセラー、ソーシャルワーカー、コーディネーターの役割とその体制の整備

都内のある医師会の会員を対象にHIV診療における病診連携の可能性について協議を重ねている。今後の病診連携に希望を抱かせる結果が得られており、連携の形成がコーディネーターの役割の一つとして注目される。

カウンセラー派遣事業について調査を継続し、その意義が確認された。HIV感染者の311名の就労状況の調査では

22%が非就労であった。非就労の理由として約50%が体力や健康上の問題を挙げていた。差別に対する不安が約20%であった。企業の理解と地域の理解が重要である。

6) 歯科診療体制の整備

歯科診療の受け入れは6年間で大幅に改善した(57%→72%)。これにはこの研究班が中心として行っている研修会も大きく貢献しており、今年度も各地で4回の研修を行った。感染予防対策について歯科医師の啓発を行っている。昨年度の調査で拠点病院歯科の実態調査ではハンドピースを必要本数揃えているもの51%、逆流防止ユニットを設置しているもの69%などであり、まだ整備は十分とは言えないことが判明した。今年度は整備不十分な施設に改善勧告を出し、その24%において改善が認められた。

4. 考察

各ブロックで地道な活動が続けられ、全国の拠点病院でのHIV感染者の受け入れ状況・体制に大幅な改善が見られた。しかし、一方において一部の拠点病院に患者が集中する傾向が多くブロックで顕著となってきた。特に患者/感染者の多い首都圏において著しい。十分なHIV診療を実践できる拠点病院を創出するために、首都圏の5ヶ所において出張研修を行ったことは効果的であったと思われる。拠点病院のネットワーク化、研修終了者のネットワーク化が出来たことから、今後、継続的情報交換・研修が可能となったことの意義は大きい。

また、感染者自身の健康維持・増進のため感染者の早期発見を促進しなければならない。2004年の新規感染者・患者は遂に1,000人を越え、累積患者・感染者は1万人を突破した。国として非常事態宣言を発し、抗体検査を更に普及する必要がある。研究班として全国の医師にHIV感染症の見落としを防ぐための教材を送付した。その効果を注視したい。

5. 自己評価

1) 達成度について

拠点病院に対する研修会・講習会は予定通り実行できた。ネットワーク化も80%以上達成できた。歯科の感染対策も部分的ながら改善できた。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

これまでの活動に加え、新しい形式の研修を取り入れ、拠点病院と研修終了者のネットワークを作った。その社会的意義は大きく、今後のHIV診療の状況を大きく変えていくものと思われる。日本独自の拠点病院体制の中での改善策であるが、患者の多い途上国を始めとし、海外でも応用できる見本となり、国際的意義も生じてくる。

3) 今後の展望について

これまでの拠点病院に対する情報提供、研修などを継続し、研究活動を進める基盤が整備されたので今後の進歩が期待できる。

6. 結論

地域および全国的HIV医療体制の整備に多くの活動を行った。新しく出張研修を取り入れ成果をあげた。拠点病院、研修終了者のネットワークを立ち上げた。感染者の早期発見のためのメッセージを全国的に配布した。

7. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

なし

研究課題:多剤併用療法服薬の精神的、身体的負担軽減のための研究

課題番号:H16-エイズ-001

主任研究者:白阪 琢磨 (独立行政法人国立病院機構大阪医療センター HIV/AIDS 先端医療開発センター長 免疫感染研究室長併任)

分担研究者:池田和子(国立国際医療センター 患者支援調整官)、栗原健(独立行政法人国立病院機構宇多野病院 副薬剤科長)、山中京子(大阪府立大学社会福祉学部 助教授)、上田良弘(関西医科大学洛西ニュータウン病院 内科部長)、小河原光正(独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター 第二呼吸器科医長)、西澤雅子(国立感染症研究所エイズ研究センター 厚生労働技官)、越智直哉(独立行政法人国立病院機構大阪医療センター 精神科・神経科医長)

1. 研究目的 HAART の治療効果を維持するためには適切な抗 HIV 療法の継続的実施が必須である。しかし、種々の精神的、身体的負担によって服薬が不適切となり治療失敗や薬剤耐性 HIV 出現の報告がある。本研究の目的は HAART が必要な全ての患者が適切で完璧な服薬を長期間遂行できる事にあり、そのため 1) 服薬の継続を阻む要因を患者側と医療者側から明らかにし、2) 服薬継続阻止因子(身体的、心理的負担など)を軽減するための支援方法(服薬支援ツール開発、服薬支援マニュアル作成を含む)を確立する。

2. 研究方法 上記目的を達成するため、本研究では構成を、

1) 患者側要因①治療開始・継続困難症例へのケア支援に関する研究(以下、ケア支援)、②副作用調査に関する研究(以下、副作用調査)、③服薬の心理・社会的要因と援助方法に関する研究(以下、心理支援)、④ HAART に伴う心理的負担、および精神医学的介入の必要性に関する研究(以下、精神的介入)、2) 医療者側要因⑤抗 HIV 療法の実施状況調査研究(以下、HAART 調査)、⑥拠点病院での服薬指導の調査研究(以下、服薬指導調査)、⑦日和見疾患合併例での抗 HIV 療法の研究(以下、合併例 HAART)、⑧服薬支援としての薬剤耐性検査の意義に関する研究(以下、耐性検査)、3) 服薬支援ツール開発⑨情報提供ホームページ(HP)の開発(以下、HP 開発)、⑩携帯電話を用いた服薬支援ツールの開発(以下、ツール開発)の 10 研究とした。研究毎に研究方法を述べる。

①ケア支援 国立国際医療センター/エイズ治療・研究開発センター(以下 ACC)あるいは国立大阪病院に通院する HIV 感染症患者で平成 11 年次から平成 13 年次までに初診で初回治療導入例を対象に、治療効果と服薬状況等を診療録から調査した。②副作用調査 本年度は研究⑨に用いる研究方法に付き検討した。③心理支援 カウンセラー(以下 Co)を対象に個別面接およびフォーカス・グループ・ディスカッションを実施し、その内容を質的に分析した。④精神的介入 社会的要因(職業、職場の理解、同居家族、周囲の人の理解、物質

依存歴、経済的困窮など)の調査様式を検討した。患者の精神状態は STAI、SDS、JHDS を用いて不安、抑うつ、知的障害の程度を評価する。これらの結果から要因の相互関係を検討する。⑤ HAART 調査 エイズ拠点病院(以下拠点病院)370 施設にアンケート調査を実施。平成 16 年 5 月の 31 日間の抗 HIV 処方薬の組み合わせ、採用・在庫状況、院外処方箋発行状況を調査した。⑥服薬指導調査 近畿圏の服薬指導の実態と、求められる情報提供方法(研修会、HP の開設、メールによる相談、服薬指導薬剤師派遣、院外での服薬相談会など)をアンケート調査した。経験豊富な薬剤師による派遣服薬指導を試みた。⑦合併例 HAART 国立病院機構の政策医療呼吸器(結核)ネットワーク参加病院(K-net 施設)の中で、拠点病院 27 施設と拠点病院ではない 30 施設、および K-net 施設以外の拠点病院 343 施設に対してアンケート調査を実施した。⑧耐性検査 国立感染症研究所で薬剤耐性検査を行った全症例の中で平成 11 年～13 年の間に初診を受け HAART を開始した感染者から対象症例を抽出した。⑨HP 開発 最新で、必要かつ的確な薬剤情報を発信し、患者の副作用発現状況を迅速に提供するシステム開発を行う。HP に掲載する薬剤情報の収集・検討を行った。⑩ツール開発 患者の携帯電話(以下携帯)の所有率や服薬支援ツールの必要性を調査し、既存の通信システムとして普及率の著しい携帯の電子メールと WEB 機能を利用した患者毎に、指定の時間に「服薬時間お知らせ」を自動的に通知する通信システムを作成・運用、利用状況を評価する。

(倫理面への配慮)③心理支援では、面接前に調査の目的、テープ録音、個人情報秘密保持などについて文書および口頭で説明し、それらに同意した対象者に面接を実施した。

④精神的介入では、院内倫理委員会に申請中。いずれの研究でもプライバシー保護に配慮した。

3. 研究結果 ①ケア支援 ACC では初診患者 421 名、初回治療導入者 145 名。計画的治療中断療法 20 名を除いた 125

名を対象とした。男性 113 名(90.4%)、平均年齢 37.9 歳、初回 CD4 平均値 92。帰国者・転院者 16 名を除いた 109 名で、ウイルス量再上昇例(一度感度未満になり、その後 2 回連続してウイルス量が検出)は 24 名(22.0%)。内服率低下例の 11 名では支援体制強化により 7 名が経過良好となった。国立大阪病院では初診患者 201 名、初回治療導入者 90 名(平均年齢 39.9 歳。初回 CD4 平均値 220。帰国・転院・死亡者の 7 名と出産時のみ内服者 4 名の計 11 名を除いた 79 名を対象とした。ウイルス量再上昇例は 19 名(24.1%)であった。19 名の内訳は、自己中断 6 名、不十分な抗ウイルス効果 5 名、服薬率低下 3 名、治療上判断での中止 4 名、その他 1 名であった。支援体制強化によって服薬率低下 3 名では 3 名とも経過良好となったが、自己中断 6 名はいずれも改善しなかった。③心理支援継続時:①検査値の変化や副作用の有無によって気分や意欲の変動が起こる、②長期服薬により閉塞感、日常生活の制限感、人生への拘束感が強まる、③服薬の意味を誤解している患者の存在が判明した。それに対して Co は服薬への心理的支援や情報提供を行い、服薬継続を支援できた。中断時:生きる意欲のなさが中断と密接に結びついていると推測された。Co は服薬中断期間でも受診維持を目標に患者に対して支持的な対応を続けた。⑤HAART 調査 回収率は 63.0% (233 施設)。採用薬剤は AZT、3TC、NFV、IDV、EFV、d4T、カレトラの順であった。調査施設の在庫金額は総額で ¥227,726,305、施設あたり ¥977,366、患者あたり ¥101,800。組み合わせ調査では総症例数 2237 例で 199 通りであった。⑥服薬指導調査 派遣専門薬剤師の外来服薬指導は、順調に経過していた患者からも高く評価された。一方、院内では薬剤部から「外部派遣への違和感」や、病院から「派遣薬剤師の契約、身分保証、対価、プライバシー開示の範囲」などの問題が指摘された。⑦合併例 HAART 合計 227 施設から回答を得た。HAART 導入後に免疫再構築症候群による結核/非結核性抗酸菌症の増悪を経験した施設が 20 あった。免疫再構築症候群の予防のため、抗結核/抗酸菌治療開始何ヶ月後に HAART を導入すればよいかに関する意見は、同時でよいとする意見から 1、2、3、6ヶ月後、結核治療終了後と様々であった。⑧耐性検査 全症例(血液製剤 351 例、同性間性的接触 473 例、異性間性的接触 374 例)から条件に合致する症例として 51 例を抽出した。⑨HP 開発 抗 HIV 薬の添付文書情報、抗 HIV 薬の患者向け情報提供カード、抗 HIV 薬服用に関する Q&A、海外での患者向け薬剤情報 Patient Information の

和訳版を作成した。添付文書情報は、副作用用語の解説、添付文書の読み方の解説を加え、より分かりやすい提供方法を検討した。⑩ツール開発 アンケート調査した外来患者 190 名で携帯保有率が 92%、携帯の電子メール利用率が 90%、服薬支援サービスについて「あったほうがいい」の回答が 55%であった。また「サービスを必要とする」という回答が服薬期間や年齢に関係なかった。HIV 患者に配慮した携帯の電子メールと WEB 機能を利用した服薬支援ツールを作成した。

4. 考察

ケア支援研究の結果から、両施設で 2 割の再上昇例があったが、内服率低下例では支援体制強化が有効であった。ただ自己中止例での支援には心理的支援の可能性が心理支援研究結果から示唆された。服薬継続成功例でも心理的負担の指摘は重要と考え、負担軽減が重要と考えられた。HAART 調査研究から拠点病院で抗 HIV 薬がデッドストックとなり廃棄に至る例が多く報告され対策が必要と考えられた。病院間格差の是正には相互の薬剤師間で交流を深める必要がある。HP 開発研究では抗 HIV 薬添付文書情報の新たな提供方法を開発した。副作用発現の頻度が高い抗 HIV 薬の情報を平易に解説し提供することは患者が服薬する上で重要な情報源となる。ツール開発研究では、今後、患者が飽きずに継続的に使用できる様な改良を加える事が服薬支援に必要と考えた。

5. 自己評価

- 1) 達成度について 研究毎に達成度に差異があるが概ね達成できた。
- 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について 調査に先立ち実施した国内外の文献研究によれば、日本での服薬継続の維持・阻害要因およびその介入に関する研究はいまだ限られており、本調査は日本における上記研究の基礎資料を提供するに十分なものと考え、意義は高い。
- 3) 今後の展望について 服薬マニュアルの作成は研究成果を踏まえて作成予定であり、当初計画を次年度で達成できると考える。

6. 結論

各研究から服薬による身体的、心理・精神的負担があり軽減のためには各種支援が必要である事がわかった。携帯を用いた服薬支援ツールモデルおよび情報提供のための HP を開発した。更なる研究の遂行が必要であり、次年度に解決策を提示する。

7. 知的財産権の出願・取得状況 現在、なし

基礎医学研究

研究課題: 薬剤耐性HIV発生動向把握のための検査方法・調査体制確立に関する研究

課題番号: (H16-エイズ-002)

主任研究者: 杉浦 互 (国立感染症研究所エイズ研究センター)

分担研究者: 浅黄 司 (独立行政法人仙台医療センター・臨床検査科・主任技師)、金田次弘 (独立行政法人名古屋医療センター・部長)、加藤真吾 (慶応義塾大学医学部・微生物学・免疫学教室・助手)、瀧永博之 (国立国際医療センター・エイズ治療研究開発センター・厚生労働技官)、栗原 健 (独立行政法人宇多野病院・副薬剤科 科長)、児玉栄一 (京都大学ウイルス研究所・附属エイズ研究施設・感染免疫研究領域・助手)、巽 正志 (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)、松下修三 (熊本大学エイズ学センター・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)、山口由美 (産業技術総合研究所・生物情報解析研究センター・研究員)、上田幹夫 (石川県立中央病院血液病治療部・部長)、下条文武 (新潟大学歯学総合病院・第二内科・教授・科長)、小池隆夫 (北海道大学大学院医学研究科・医学部付属病院教授)、山本政弘 (独立行政法人九州医療センター・医長)、山本善彦 (独立行政法人大阪医療センター・医員)

1. 研究目的

我が国における薬剤耐性 HIV-1 の発生・伝播動向を把握する調査体制の確立と、薬剤耐性 HIV-1 症例の増加を抑制する有効な対策を提案することを目的とする。

2. 研究方法

目的を達成するために下記3つの研究グループに分かれて研究を進めていく。

疫学調査研究グループ: 新規 HIV-1 感染者の捕捉と薬剤耐性検査体制と調査体制の確立を行う。全国ブロック拠点病院あるいは地方衛生研究所等において薬剤耐性検査を担当している研究者に、分担もしくは協力研究者として参加してもらい、調査プロトコルの作成、薬剤耐性検査の実施、データの整理・収集などを行う。調査により集積した HIV-1 遺伝子情報を元にわが国における薬剤耐性 HIV-1 の動向を把握し、薬剤耐性 HIV-1 が拡散する背景を推測し、対策を提案する。

治療最適化研究グループ: 抗 HIV-1 薬剤血中濃度維持のために、薬剤血中濃度モニタリング研究に取り組む。ホームページを介しての治療薬剤の情報発信と血中濃度測定検査の受付を行っていく。また、薬剤耐性 HIV-1 症例の増加抑制を目標に、薬剤耐性検査、薬剤血中濃度モニタリング、細胞内薬剤濃度の測定などの検査を組み合わせながら至適治療法について研究を進めていく。

薬剤耐性基礎研究グループ: 薬剤耐性 HIV-1 の増加を押しさえ込み、治療脱落症例の数を減らすためには薬剤耐性 HIV-1 のウイルス学的基礎研究を進め、その耐性化機序と病態を理解することが極めて重要である。この研究では薬剤耐性変異を獲得した HIV-1 の感染性クローンの樹立、未だ明らかになっていない逆転写酵素阻害剤 d4T の耐性機序、非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤の耐性化機序の解析、すでに米国では実用化された接着・進入阻害剤の耐性化機序の解析を進めていく。今日分子生物学的研究手法は急速に進歩しており、薬剤耐性 HIV-1 の検査方法も技術革新に応じて改良、新規開発していく努力が必要である。この研究では薬剤耐性 HIV-1 を同定する新たな検査法についても開発を試みていく。

倫理面への配慮

この研究を進めるには患者の協力が必要であり、研究の必要性和意義について十分に説明し、理解と協力を得ることが欠かせない。この研究は国立感染症研究所医学研究倫理審査の結果承認されている(平成 16 年 10 月 21 日付け、第 48 号)。参加医療機関についても各機関の倫理規定に従い同意を得る。その際には自筆のサインを記入してもらい、サインをした同意書原本は主治医あるいは各施設の担当者のもとで厳重に保管することを義務づける。

3. 研究成果

疫学調査研究:

(1) 北海道、東北、関東甲信越、北陸上越、東海、近畿、中国四国、九州ブロックおよび東京都、神奈川県、千葉県の薬剤耐性検査状況把握のための視察を実施。各ブロック拠点病院あるいは拠点病院を訪問し、新規感染者の状況、薬剤耐性検査状況についての説明を受けるとともに研究班の趣旨説明と協力を求めた(杉浦)。

(2) 感染症研究所の研究倫理委員会でこの研究班の調査研究の承認を受けた後、薬剤耐性検査を担当している各ブロックの検査技師および医師を招集しての薬剤耐性ワーキンググループ会議を 10 月 1 日名古屋に於いて開催し、調査プロトコルを作成した。そのプロトコルに従い、新規感染者におけるデータの収集を開始した。平成 16 年 10 月の時点で各ブロック拠点より 313 例の新規登録者のデータが提出された(小池、浅黄、瀧永、下条、上田、金田、山本(善)、山本(政)、杉浦)。

(3) 新規感染者の調査はマルチセンターで実施されるため、解析結果の施設間差を評価するヴァリデーションを計画し、その前段階として検査法のアンケートによる事前調査を実施した(浅黄、金田)。

治療最適化研究:

(1) 血中濃度測定研究に関してはホームページを立ち上げて検査の紹介、受付そして抗 HIV-1 薬の薬物動態に関する情報を提供しており、平成 16 年度はアクセス件数 1989 件、パスワード取得者 94 名、そして測定検体 297 検体を達成した(桑原)。

(2) LC-MS/MS を用いて細胞内 AZT, AZT-MP, AZT-DP, AZT-TP の定量を試みた。その結果 AZT-MP は細胞外の AZT 濃度に依存して増加するのに対して、-DP と -TP は細胞外濃度が 100nM 以上の領域では plateau に達することが明らかになった。服薬アドヒアランスを客観的にモニタリングする一つの方法として毛髪からの薬剤検出を試みた。LPV, NFV を服用している患者からの毛髪を用いて測定した結果、2mm 程の長さの毛髪より極めて高い感度で LFV, NFV を検出し定量することに成功した(加藤)。

(3) 治療最適化における血中濃度測定の有効性を 10 名の SQV+RTV 併用療法を受けている患者の追跡から立証した。抗 HIV-1 薬剤血中濃度とそれをコントロールすると考えられている宿主遺伝子 ABCB1 と ABCC4 の解析を行い、宿主遺伝子解析の有用性について検討を加えた(松下)。

薬剤耐性基礎研究:

薬剤耐性機序の理解を深め検査結果を正しく評価するために、分担研究者が基礎研究に取り組み以下の研究成果を得た。

(1) d4T の耐性変異責任領域の探索を行った。逆転写酵素領域には有意の変異を認めなかった。3TC を除く

既存の NRTI 新規 RT 阻害剤 4'-EfdA を同定した。NP-2 細胞を元に感受性検査のための新たな細胞株 NCK45 を樹立した(児玉)。
(2)塩基ラベリングによる SNP 検出法を用いた競合培養法を作成し、その解析精度について評価を行った(金田)
(3)新たな NNRTI 耐性変異 K238S を見出した。NNRTI 耐性変異の K103N の獲得機序について解析を行い K103R の重要性を明らかにした(湯永)。
(4)T7RNA ポリメラーゼトランスファーを介した膜融合の定量評価系を作成した。また envelope の膜貫通部分の変異が膜融合に影響を与えることが明らかになった(松田)。
(5)MAGIC5 細胞を用いた CRF01_AE 薬剤耐性感染性クローンを樹立した(巽)。
(6)超高感度 RT 活性測定法 RT2 を確立した。この方法による測定値は SHIV では RNA コピー数と高い相関を示した。しかし HIV-1 では一部のサンプルで相関が認められなかった。またこの方法を用いることにより AZT-TP と d4T-TP 耐性の検出が可能であった(仲宗根)。
(7)感染症研究所のデータベースを基に遺伝子配列とタンパクの構造に関する検討を行った(山口)。

4. 考察

治療薬剤に対する耐性の出現と拡散を如何に抑え込むかという命題は HIV-1 に特有の問題ではなく、結核、マラリアなど様々な感染症においても立ちはだかっている、不可避な感染症克服への険しい道りである。統計学的に薬剤耐性症例の比率が感染者総数の 5-10% に達すると、新規感染者への薬剤耐性ウイルスの感染リスクが高まると言われている。欧米各国では薬剤耐性 HIV-1 の状況はこの閾値を遥かに超えており、1998 年以降に行われた新規感染者の疫学調査では薬剤耐性が検出されている。その頻度は、調査が行われた国、時期、そして解析方法等により幅があるが、概して 10% 以上と高く、初回治療の薬剤の選択に大きな障害となりつつある。一方、わが国の状況を見てみると、既治療感染者のモニタリング調査(杉浦)では薬剤耐性症例の頻度は 20-30% に達しており、欧米同様に新規感染者への耐性拡散の危険水準に達していると考えられる。2003 年度に報告されたクロスセクショナルな 2 つの調査報告ではそれぞれ 5%、17% の耐性症例が新規感染者に認められたとしている。このように 2 つの報告では耐性出現頻度が大きく隔たっているが、これは薬剤耐性の拡散が調査対象に大きく左右される、つまり特定の集団に偏っていることを示唆している。この研究班では全国に調査の網を広げることにより、疫学的に偏りの無い新規感染症例における薬剤耐性の検出頻度を明らかにすることが出来ると考えている。また感染経路や地域における薬剤耐性の検出頻度を比較検討することにより、耐性拡散の hot spot を明らかにすることができれば、有効な対策も可能であると考えている。
初年度、調査を進めて来た結果、ブロックにより調査対象症例数に大きな差があり、当該地域を担当する分担研究者の負担が大きく、今後どのように負担を軽減できるかが調査の効率と継続性に重要であると思われる。
新規感染者の調査と合わせて取り組んでいる治療最適化研究と薬剤耐性基礎研究は薬剤耐性症例の増加を抑制する上で重要な研究課題であり、これらの研究成果が新規感染者への薬剤耐性拡散の抑制に繋がっていくことが期待される。

5. 自己評価

1) 達成度

新規感染者の調査研究は、平成 16 年度内に全国各ブロックにおける状況調査、HIV-1 診療に従事する医療機関への調査協力要請、薬剤耐性検査実務者によるワーキンググループの設立、そしてプロトコルの制定が終了しており、順調に滑り出している。症例数も 2004 年 10 月までの分として 113 症例を捉えており、初年度としては目標を概ね達成したと考えている。治療最適化研究の血中濃度モニタリングについては、利用者は確実に増えており、臨床において十分に活用されている。血中濃度に加えて細胞内濃度測定、アドヒアランス評価のための毛髪からの薬剤濃度測定に取り組んできたが、いずれも技術的に完成しており、次年度以降、実際に臨床現場で評価を検討する段階にまで到達している。基礎研究に関しては各分担研究者は着実に目標に向かって研究に取り組んでおり、その進捗状況は評価に値する。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について
わが国における HIV/AIDS 新規登録者数は増加しつつあるといっても 976 名(平成 15 年)と他国に比較するとまだまだ少なく、全症例の遺伝子配列解析することも可能な範疇の数値である。もちろん現実的には全例捕捉することは不可能であるが、今この時期に、まだ我々の掌中に全貌を捉えうる状況のうちに、全国規模の疫学調査体制を構築し機能させることは未来への備えとして極めて重要である。

3) 今後の展望について

疫学調査研究:平成 16 年度にワーキンググループで作成したタイムテーブルに従って新規感染者の薬剤耐性検査を進めていく。新規感染症例の捕捉率を高めることを目指して、新たに東京、神奈川、大阪、沖縄、広島地域を担当する研究者に新たに研究班に参加してもらう。また、研究班のホームページの立ち上げと検査情報などの情報発信を積極的に行い、調査の趣旨と必要性をアピールしていく事を計画している。

治療最適化研究:血中濃度測定に関しては引き続きホームページを介しての情報発信と検査受付を行う。アドヒアランスが良好であるにもかかわらず治療効果が不十分な症例について血中濃度、細胞内濃度の測定を行い、有効症例との差について検討を行う。疫学調査研究のワーキンググループを基盤として治療に関する調査を提案していく。

薬剤耐性研究:

既存および新規薬剤の薬剤耐性化機序について分子生物学的、生物情報学的な解析を進める。臨床症例からの薬剤耐性感染性クローンの樹立と感受性検査を行いその結果を臨床に還元していく。超高感度逆転写酵素活性測定法、細胞内濃度測定法等の新たな検査測定法については臨床検体での解析と実用化を目指す。

6. 結論

疫学調査研究ではワーキンググループの設立、調査プロトコルの策定、各施設における倫理委員会の承認等の新規感染者調査の基盤構築を行った。治療最適化研究では血中濃度モニタリングの情報発信と検査を提供した。また血中濃度測定の臨床的有効性について立証した。基礎研究では薬剤耐性化機序の解析と新たな検査技術開発に取り組んだ。

7. 知的所有権の出願・取得状況 該当なし

研究課題：新作用機序の抗 HIV-1 薬剤開発に関する研究

課題番号：H16-エイズ-003

主任研究者：岡田 誠治（熊本大学エイズ学研究センター予防開発分野 教授）

分担研究者：鈴 伸也（熊本大学エイズ学研究センター予防開発分野 講師）

1. 研究目的

HIV-1 Nef はエイズ発症の病原性因子として良く知られている。近年、Nef と宿主細胞内チロシンリン酸化酵素 Hck との会合が発症に大きな役割を果たす事が明らかにされた。Hck は単球・マクロファージ特異的酵素である事から、Nef が Hck との会合を通して単球・マクロファージに機能変化をもたらす事が発症の引き金と予想されるが、その分子機序は不明である。この分子機序を解明し、その作用点を選択的に標的とする薬剤を見出すことにより新たな作用機序を持つ抗 HIV-1 薬を開発し、薬剤耐性ウイルスの克服に貢献する事が本研究の大きな目的である。先ず、Nef-Hck 会合により単球・マクロファージ内のシグナル伝達機構がどのように攪乱されるかを明らかにすると共に薬剤の *in vitro* 評価系を確立する。特に、Hck はサイトカインシグナルの下流に於いても重要な働きを果たす分子である事から、Nef-Hck 会合のサイトカイン受容体経路に及ぼす影響に焦点を当て研究を行う。同時に、HIV-1 感染が可能な長期にヒト造血系・免疫系を構築する免疫不全マウスを作製して、*in vivo* における評価系を確立する。

2. 研究方法

Nef-Hck 会合のサイトカインシグナルに及ぼす影響を、特に、単球・マクロファージの増殖・分化・活性化を司る最も主要なサイトカインである M-CSF に着目して解析を行った。細胞株として TF-1-*fms* を用いた。TF-1-*fms* はヒト単球系の細胞であり、M-CSF に依存して増殖し、M-CSF とホルボールエステル TPA の共存在下でマクロファージへ分化する特徴を持つ。この TF-1-*fms* にエストロゲン受容体と融合させた Nef 蛋白質を発現させ、安定細胞株 (TF-1-*fms*-Nef-ER) を樹立した。この細胞株を用いて、合成エストロゲン 4-HT で Nef 活性化を誘導する事で Nef の M-CSF/M-CSF 受容体系に及ぼす影響を解析した。具体的には、M-CSF 反応性の TF-1-*fms* 細胞の増殖能を flow cytometry 法等を用いて解析した。同時に、M-CSF/TPA によるマクロファージ分化に及ぼす Nef の影響を解析した。更に、M-CSF によるシグナル経路の活性化に及ぼす影響を種々のシグナル分子に対する抗体を用いた免疫沈降・Western Blot 法により解析した。

ヒト造血系・免疫系を構築するマウスを作製する為に、NOD/Scid/ β_2 microglobulin^{-/-}マウスへヒト造血幹細胞移植または、臍帯血単核球移植を行った。純化したヒト臍帯血中 CD34 陽性細胞を 2.5 Gy 放射線照射したマウスへ移植し、経時的に末梢血や種々のマウス臓器中におけるヒト血液細胞の出現を flow cytometry 法により解析した。
(倫理面への配慮)

ヒト由来試料（末梢血・臍帯血等）を用いた研究は、熊本大学大学院医学薬学研究部等倫理委員会の規則に従い実施している（承認済）。また、HIV-1 ウイルスの作製およびマウスへの感染実験は、熊本大学エイズ学研究センター内の P3 実験施設内にて、同センターおよび熊本大学動物実験委員会の規則に従い実施している（承認済）。

3. 研究結果

Nef 活性化で TF-1-*fms*-Nef-ER 細胞の M-CSF 依存性増殖が著しく抑制された。この増殖抑制は早期アポトーシスを伴っていた。更に、細胞形態の観察と付着細胞の出現率の測定から M-CSF/TPA によるマクロファージへの分化も大きく障害される事が明らかであった。更に、Nef が、M-CSF によって引き起こされる最も早期の細胞内変化である M-CSF 受容体の活性化（自己チロシンリン酸化）を強く障害する事が明らかとなった。この為、M-CSF 受容体活性化に引き続き起こる、受容体との種々のシグナル分子との会合も障害されていた。更に重要な事に、Nef によって活性化された Hck が恒常的に M-CSF 受容体と会合していた。Hck は通常 M-CSF によって活性化された M-CSF 受容体とのみ会合する分子である。従って以上の結果は、Nef が Hck を活性化し Hck と M-CSF 受容体の非生理的な会合をもたらす事で、M-CSF 受容体の活性化を障害し、その結果、M-CSF の生物活性を抑制したと考えられた。

臍帯血単核球を移植した NOD/Scid/ β_2 microglobulin^{-/-}マウスでは、移植後 2-6 週に渡りヒト T 細胞の構築が認められ、HIV-1 感染実験においても感染が認められた。一方、臍帯血由来 CD34 陽性ヒト造血幹細胞を移植した NOD/Scid/ β_2 microglobulin^{-/-}マウスでは、移植後 20 週に渡りヒト由来の細胞による造血系の構築が確認された。マウス骨髄と脾臓において、ヒト由来の B 細胞と CD14 陽性の単球系細胞の安定的な生着が確認された。以上の結果より、長期に渡りヒト単球系の細胞を構築するマウ

スの作製が可能となった。

4. 考察

今回、Nef-Hck の会合が Hck-M-CSF 受容体の恒常的会合という非生理的な変化をもたらす事で、M-CSF 受容体の活性化を障害し、結果として Nef が M-CSF の生物活性を抑制するという全く新しい事実を明らかにした。最近他のグループにより、単球・マクロファージに作用する、もう一つの主要なサイトカインである GM-CSF 受容体系には Nef-Hck は障害を与えない事が報告されている。これらの結果は、Nef-Hck 会合がサイトカイン系を異常制御する事で、単球・マクロファージに機能的な偏りを生じさせ、その事がエイズ発症に繋がる一因である可能性を示唆する。今後、その機能的偏りを規定する分子群の同定がエイズ発症の新たな機構を明らかにすると予想される。また、Nef-Hck 会合が M-CSF 系のみを阻害するという特異性は、本研究計画で目指す、高い選択性の新規作用機序の抗 HIV-1 薬開発が可能とするものである。

また、ヒトの造血・免疫系を構築したマウスは、上記研究で得られた研究成果を *in vivo* の系で確認するのみでなく、今後薬剤開発と HIV-1 の病態解明に非常に有用なツールとなりうると考えられる。

5. 自己評価

1) 達成度について

平成 16 年度の研究計画の一つは「Nef による単球の増殖抑制・マクロファージへの分化抑制の細胞内分子機構の解明」であり、Nef-Hck の会合が Hck-M-CSF 受容体の恒常的会合という非生理的な変化をもたらす事で、M-CSF 受容体の活性化を障害する事実を明らかにした(Blood, *in press*)。この異常分子機構は M-CSF 系に特異的であり、今後の選択的薬剤スクリーニングの良い分子標的となり得る事も明らかとなっている。もう一つの計画は「免疫不全マウスにおいて長期にヒト造血系・免疫系を構築する系の確立」であり、NOD/Scid/ β_2 microglobulin^{-/-}マウスへのヒト造血幹細胞移植により、ヒト単球の長期に渡る出現を再現性良く認めた。これらの成果を基に、Nef をターゲットとした簡便な薬剤スクリーニング法を開発し、現在特許申請中である。以上より、今年度の研究計画は十分に達成されたと考えられる。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

Nef が Hck との結合・活性化を通して、単球・マクロファージ特異的サイトカイン M-CSF とその受容体の経路に障害を与えるという事実はこれ迄に全く報告がない。本研究の一部は既に英文専門誌に掲載が決まっております(Blood, *in press*)、十分な評価は得られている。最近、他

のグループから、もう一つの主要なサイトカインである GM-CSF 受容体系への Nef の作用検討の報告が相次いでなされている。興味深い事に、Nef-Hck 会合により GM-CSF 受容体経路は障害を受けず、むしろ活性化が増強されると報告されている。一連の結果は、病原性因子としての Nef の巧妙な作用を示していると同時に、Nef-Hck 会合が抗 HIV-1 開発の良い分子標的作用点である事を更に明らかにする研究の大きな契機である。

3) 今後の展望について

本年度の研究で新規作用機序の抗 HIV-1 薬剤スクリーニングの為の、極めて簡便で且つ多検体をスクリーニング出来る *in vitro* 培養系は十分に確立されている。現在、熊本大学薬学部等の協力で様々な骨格の低分子化合物の入手が出来ており、今後これら化合物の中からリード化合物の同定を行っていく。又、継続して、Nef-Hck 会合がサイトカイン受容体経路に及ぼす影響を更に詳細に明らかにしていく。同時に、既に確立した NOD/Scid/ β_2 microglobulin^{-/-}マウスを用いた系に加えて、効率よくヒトの造血・免疫系を構築したマウスを開発し、*in vivo* における薬剤のスクリーニングシステムを確立する。

6. 結論

今年度の研究により、新規作用機序の抗 HIV-1 薬剤をスクリーニングする為の *in vitro* 培養系を確立し、当初の計画通り進める事が出来た。我々が見出した、Nef によるサイトカインシグナル伝達の攪乱作用 (Nef が Hck との結合・活性化を通して、単球・マクロファージ特異的サイトカイン M-CSF とその受容体の経路に障害を与える) は新しい知見であり、薬剤開発に最も適した分子標的のひとつであると考えられた。今後、より詳細な作用機構の解明を進めると同時に、薬剤のスクリーニングを行う。一方、*in vivo* 評価系の確立を目指したヒト造血幹細胞の移植による免疫不全マウスでのヒト単球系細胞の構築は、既に NOD/Scid/ β_2 microglobulin^{-/-}マウスで研究基盤を確立する事ができた。これらの *in vitro*、*in vivo* の系を有機的に駆使して、Nef をターゲットとした新規薬剤の開発とその評価系の確立を目指す。

7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

特許出願 2004-319531

発明者：岡田誠治、鈴 伸也

抗 HIV-1 薬剤のスクリーニング系及びスクリーニング方法

研究課題： HIV の増殖・変異の制御に関する研究

課題番号： H16-エイズ-004

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： 高橋秀宗（国立感染症研究所感染病理部 室長）、村上努（国立感染症研究所エイズ研究センター 主任研究官）、駒野淳（国立感染症研究所エイズ研究センター 研究官）、櫻木淳一（大阪大微生物病研究所ウイルス感染分野 助手）、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）、西澤 雅子（国立感染症研究所エイズ研究センター 研究官）、原田信志（熊本大医学部 教授）、服部俊夫（東北大大学院医学系 教授）、小島朝人（国立感染症研究所感染病理部 室長）、増田貴夫（東京医科歯科大免疫治療学 助教授）、間陽子（理化学研分子ウイルス学 ユニットリーダー）、岡本尚（名古屋大医学部 教授）、生田和良（大阪大微生物病研究所ウイルス免疫分野 教授）、森川裕子（北里大生命科学研究所 教授）、明里宏文（国立感染症研究所霊長類センター 主任研究官）、足立昭夫（徳島大医学部 教授）、増田道明（獨協医科大微生物学 教授）、三隅将吾（熊本大薬学部 助教授）

1. 研究目的

ゲノム易変異性に富む HIV の制御には、絶えず新たな作用点をもつ抗 HIV 薬を開発していくと共に、易変異性の制御が重要と考える。本研究は、HIV の増殖・変異に関する未知の調節過程を分子レベルで明らかにし、HIV の理解と新規抗 HIV 薬（複製阻害薬と変異制御薬）の開発に役立てることを目的とする。学術成果（生命科学の進展につながる基礎科学知見の情報発信）、および社会的成果（新たなエイズ制御薬開発につながる基礎科学知見の情報発信と特許取得）が期待される。

2. 研究方法

分担研究により違いはあるが、概ね以下の戦略で HIV の理解を薬剤開発につなげる。

(1) HIV 変異と複製の調節因子の同定

A. 結合因子の同定

- * pulse-chase 免疫沈降法
- * pull-down 法
- * 酵母 two-hybrid 法
- * phage display 法
- * 親和性クロマトグラフィー、など

B. 相互作用の意義検証

- * 変異導入解析
- * 代謝阻害剤
- * siRNA
- * dominant negative 変異体
- * 反応速度解析、など

(2) 立体構造情報の入手

立体構造・分子認識解析の専門家との連携を強化。調節因子とウイルス因子の接触面の構造情報を得る。以下の手法については、研究班独自に解析を試みる。

- A. 計算科学解析
- B. X線結晶構造解析

(3) 阻害候補分子の検索

- A. in silico screening → 化学合成 → 評価
- B. 粗抽出液からの精製

*本年度は3年計画の初年度。複製・変異の2本の研究の柱を設定。以下の分担課題を3年計画で遂行。

(柱1. HIV 変異制御研究)

①転写酵素の基質選択性制御の研究（佐藤）：基質選択の調節因子の同定と in silico screening による薬剤耐性発現・ウイルス変異性制御分子の探索。②逆転写酵素機能制御の研究（駒野）：細胞由来の逆転写酵素阻害因子の同定と精製。③脱殻制御の研究（村上）：HIV 脱殻・逆転写調節因子の同定。④変異率制御の研究（久保）：細胞内環境での HIV 逆転写酵素の変異導入頻度の測定系樹立。①②③で同定された細胞因子が変異頻度に及ぼす影響の検討。⑤ゲノム二量体化制御の研究（櫻木）：HIV ゲノム

二量体化と逆転写・組み替え効率に影響する RNA 構造要因と蛋白質因子の同定。⑥ゲノム安定性制御の研究（高橋）：ゲノム安定性の調節因子の同定。①②③⑤で同定された因子が組み換え頻度に及ぼす影響の検討。⑦プロテアーゼ変異制御の研究（西澤）：薬剤耐性プロテアーゼの X線結晶構造解析。

(柱2. HIV 複製制御研究)

①侵入制御の研究（原田、服部、久保、小島）：HIV の細胞侵入効率に影響する因子（膜裏打ち蛋白質、脂質など）の同定。侵入過程を再現する無細胞系と細胞系の樹立と、阻害剤探索。②複製初期過程制御の研究（増田貴、間）：インテグラーゼ、Vpr 結合因子の同定と機能的意義の検証。複合体構造解析。③転写制御の研究（岡本、生田）：Tat/結合因子の複合体の構造解析と in silico screening による HIV 複製阻害分子の探索。④複製後期過程制御の研究（森川）：Gag 細胞内輸送の責任因子の同定。⑤Vif 機能制御の研究（足立、明里）：Vif およびその結合因子の構造機能解析。Vif 新機能の同定。⑥細胞周期/HIV 増殖制御の研究（増田道）：Vpr の G2/M arrest 誘導の責任因子の同定。⑦ウイルス粒子のプロテオーム解析（三隅）：HIV 準種の粒子成分の生化学的性質決定。

*平成17年度新企画：siRNAを用いた宿主因子検索（駒野と佐藤が中心、希望者全員が参加）

(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. 研究結果

(柱1. HIV 変異制御研究)

①逆転写酵素の基質選択性制御の研究：ATP に逆転写酵素の耐性発現と基質選択に関わる “allosteric effector” 機能があることをはじめて見だし、計算科学的手法により ATP 結合部位の構造情報を得た。この結果と反応速度解析をもとに、耐性発現と基質選択を説明するモデルを作った（佐藤）。②逆転写酵素機能制御の研究：HeLa 細胞、非霊長類ほ乳類細胞、酵母と大腸菌の抽出液中に、逆転写酵素の抑制活性を見いだした（分子量50kD 以上、熱感受性、非プロテアーゼ/スクレアーゼ）（駒野）。③脱殻制御の研究：プロテオーム解析の予備検討として、種々のヒト細胞と Gag マトリックス変異ウイルスを用いて感染実験を行い、脱殻・逆転写調節因子の同定に用いるウイルス株と細胞株を絞った（村上）。④変異率制御の研究：細胞内環境での HIV 逆転写酵素の変異導入頻度を測定する系の樹立を目的として、TK-neo、および GFP-Zeo をコードする HIV-1 ベクターを構築した（久保）。⑤ゲノム二量体化制御の研究：ゲノムの約半量が単量体化する変異ウイルスでは、粒子形成阻害は認められ

ないものの、感染時の逆転写反応が劇的に低下することを発見した(櫻木)。

⑥ ゲノム安定性制御の研究: AU 結合宿主因子で mRNA の崩壊に關する tristetrarprolin(TTP)の発現によって HIV-1 ゲノム RNA の安定性とウイルス産生が著明に低下することを見いだした。(高橋)

⑦ プロテアーゼ変異制御の研究: 薬剤耐性変異導入 HIV-1 プロテアーゼの精製方法を確立した(西澤)。

(柱2. HIV 複製制御研究)

① 侵入制御の研究: 電子スピン共鳴法により、HIV 吸着時の温度、脂質、キシロカイン処理に伴う膜流動性変化が HIV 感染性の変化をもたらすことを見いだした(原田)。円二色性分光法(CD)により、V3 ループは水溶液中で不規則構造をとり、疎水性環境下では α -ヘリックス含量が 25-40%程度存在することを見いだした(服部)。エズリンの dominant negative 変異体(EZ-Nter)発現により、膜裏打ち蛋白質機能の抑制が HIV-1 感染性の低下につながることを見いだした(久保)。 β ラクターゼをパッケージした HIV-1 粒子を用いた細胞侵入の解析系を樹立した(小島)。

② 複製初期過程制御の研究: 変異導入解析により、HIV-1 インテグラーゼの新規機能(プロウイルス核内輸送)をはじめ証明した。また、two-hybrid 法により複製に必須の新規インテグラーゼ結合因子を同定した(増田貴)。変異導入解析により、HIV-1 Vpr/Importin α 複合体形成がウイルスのマクロファージ増殖に必要であることを証明した。また、大腸菌を用いて発現・精製した Vpr と Importin α が安定に複合体を形成する条件を決め、結晶化の目処をたてた(間)。

③ 転写制御の研究: HIV-1 Tat の機能発現に必要な Tat/TAR/ Cyclin T1 複合体形成に着目し、計算科学的手法によりそれぞれの分子の接触面の構造情報を得ることにはじめて成功した。酵母 two-hybrid により NF- κ B の p65 subunit と相互作用し転写を活性化する因子として RNA helicase A (RHA)を新たに同定した。(岡本)。

CD4+T 細胞 CD38+及び CD38-サブセット間で HIV-1 感受性の差を生み出す転写調節関連因子の候補として、19種の宿主遺伝子を同定し、RNF125 による HIV-1 LTR 転写阻害効果を見いだした(生田)。

④ 複製後期過程制御の研究: 酵母変異株を用いた Gag 粒子産生系の解析により Gag 細胞内輸送の責任因子候補 Syntaxin を同定した。また、非ミリスチル化 Gag に、粒子形成出芽阻害効果があることを見いだした(森川)。Vif N末欠損変異体は、ウイルス粒子に過剰に取り込まれ、ドミナントネガティブに感染性低下をもたらすことを見いだした(明里)。

⑤ Vif 機能制御の研究: Vif 構造機能解析のために、新たに Vif 点変異体 26 種を作製し、プロテアソーム分解の責任残基を同定した(足立)。

⑥ Vpr 依存細胞周期制御の研究: Vpr 依存 G2/M arrest 責任因子として 14-3-3 β を見いだした。FIV Orf-A に、Vpr と同様の G2/M arrest 誘導活性があることを見いだした(増田道)。

⑦ ウイルス粒子のプロテオーム解析: ウイルス粒子のプロテオーム解析により R5 および X4 virus の Gag p24 がともにホルミル化を受けていること、粒子に取り込まれる Cyclophilin A に最低4種の isoform が存在する事を見いだした(三隅)。

4. 考察

活発な分担研究が行われ、各自の計画はおおむね達成された。一部の分担研究に、学術的なインパクト

が高く、かつ新規抗 HIV 薬の開発につながる興味深い進展が見られた。特に、

(1) インテグラーゼ研究(インテグラーゼ新機能の証明、並びに複製に必須のインテグラーゼ結合因子の同定[増田貴])

(2) Tat 研究(Tat/TAR/ Cyclin T1 複合体モデル作製と評価[岡本])

(3) Vpr 研究(Vpr/Importin α 複合体形成の重要性を示唆[間])

(4) Gag 研究(Gag 細胞内輸送の責任因子の網羅的解析と候補因子の同定[森川])

(5) RT 研究(RT 耐性発現と基質選択に関わる因子の発見と結合部位の予測[佐藤])

は、特筆に値する。(2)、(5)は、in silico screening による阻害剤候補化合物の同定と実験的検証を試みる時期に来たと考える。(1)、(3)は、立体構造解析により、調節因子とウイルス因子の接触面の構造を明らかにすれば、薬剤開発につながる。(4)は、ヒト細胞での意義を検証し、真の責任因子を明らかにすれば、複製後期過程は謎が多いため学術価値が高い。

5. 自己評価

(1) 達成度について:

初年度研究計画はおおむね達成された。

(2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について: 得られた成果は国際学術誌と学会にコンスタントに多数発信しており、また特許取得に活用されていることから、本研究の学術的・国際的・社会的意義は高い。

(3) 今後の展望について:

次年度は、①先行する分担研究について、阻害剤候補化合物のスクリーニングに着手する、②分担研究における立体構造解析の適用度を高める、③“意味のある構造解析・薬剤開発”のために、また“作用点の異なる2の矢、3の矢の薬剤標的分子発見”のために、引き続き各自の分担研究により HIV 複製と変異の理解を深める、の3点に重点を置く。その延長上に、エイズ制御と生命科学のブレークスルーにつながる成果を得ることを3年計画の最終目標としたい。

6. 結論

3年計画の1年目として活発な分担研究が行われ、各自の計画はおおむね達成された。一部の分担研究に、学術的なインパクトが高く、かつ新規抗 HIV 薬の開発につながる興味深い進展が見られた。ただし、薬剤開発を現実的なものとするには研究面と財政面の双方に課題がある。関係者とともに対応策を考えてさらなる研究の進展につなげたい。

7. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

(1) 駒野淳: A Method of Identifying Inhibitors of EBNA-1(William M. Sugden, A. Jun Komano, Gregory D. Kennedy, US patent #6,811,983)。

(2) 間陽子: HIV-1 感染を阻害する変異 Vpr タンパク質及びそれを含む医薬組成物(間陽子、飯島沙幸、笠原優子、木全清典、特願 2004-226462)。

(3) 間陽子: アポトーシス誘導物質を含む医薬組成物(間陽子、渡来仁、三浦智行、特願 2004-298288 号)。

(4) 間陽子: リポソーム(間陽子、渡来仁、河野健司、特願 2004 298238)。

(5) 生田和良: HIV 等のウイルス感染の有無、又はプリオン感染の有無を近赤外線分光法により検査・判定する方法、及び同方法に使用する装置(作道章一、ツェンコバ・ルミアナ、生田和良、小野寺節、特願 2004-329249)。

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)
向井鎌三郎 (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微生物免疫学 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: 組換え MVA ワクチンと組換え DiS ワクチンについて抗原発現、培養細胞のホストレンジ、免疫原性、安全性を比較検討した (本多)。H16年度の DNA プライム・Gag 発現 SeV (SeV-Gag) プーストワクチン接種後の SIVmac239 チャレンジ実験にて、感染初期の SIV 複製制御が認められたサルを対象として、感染慢性期の解析を行なった (俣野)。強毒及び弱毒 SHIV 分子クローンについて塩基配列の違いと病原性との関係を調べた (三浦)。Env ワクチン接種 SIV 感染サルへの SIVmac239 のチャレンジ感染の解析と Δ5G と関連の変異ウイルスと SIVmac239 の細胞指向性、co-receptor usage、中和抗体感受性について調べた (森)。環状ペプチドをサル 3 頭の腹腔内に 2 回免疫し、血清中の HIV-1 効果を調べた (庄司)。実験に使用されるサルの SRV/D 感染を調べた (向井)。

2) ワクチン免疫による防御機構の解明: 酵母菌でのリコンビナント α 抗原蛋白の作成を試みた (保富)。CD28 ファミリー分子 (CD28 と ICOS) を介する HIV-1 複製抑制効果についてさらに詳しく解析した (神奈木)。各種抗酸菌の GFP 発現菌株を作成し、DC-SIGN 安定発現細胞株および非発現親株に感染させ、菌体の細胞内移行性、細胞内増殖性の解析を行った (牧野)。ウイルス抗原を提示する樹状細胞と T 細胞の共培養の系において抗原特異的な T 細胞反応の経過を増殖と IFN-γ 産生を指標に解析した (横田)。gag-pol 迅速クローニングシステムを使用し、gag の塩基配列を解析した。env 発現系の開発を目的として Gateway system を改変して *tat*, *rev*, *env*, *vpu* を含む領域を簡便にクローニング可能なシステム構築した (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: 全長 HGV DNA の改良型を構築し、HGV のウイルス産生の増強を試みた。またこの HGV クローンが有する 5'UTR の

IRES 活性を、今回新たに樹立した dual luc reporter IRES assay を用いて比較検討した。ヒトリンパ球を用いた HGV/HIV-1 の共感染実験も行った (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)。出産後 6-10 日の初乳を入手し、その中に含有される細胞群を解析し、母乳感染の主体である R5-type HIV-1 に対する感受性等を追跡した (高橋)。

(倫理面への配慮)

健康人の末梢血単核球、初乳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努めた。

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: MVA は RK13 細胞以外の細胞株で増殖し SIV の発現が認められたが、組換え DiS ワクチンでは鶏の線維芽細胞のみで増殖し、また増殖を示さないほ乳類細胞の中で強い SIV 抗原を発現した。マウスにおける免疫誘導能では同程度であったが、有意なプースター効果が認められた (本多)、感染初期の SIV 複製制御が認められたサル 5 頭のうち 3 頭では、ほぼ 2 年間にわたる観察期間中、複製制御は維持された。一方、残りの 2 頭では約 60 週目の時点でウイルス血症が再度認められた。この 2 頭は MHC ハプロタイプ 90120-a を共有する 3 頭のうちの 2 頭であった。慢性期におけるこの 3 頭のウイルスゲノム gag 領域の塩基配列解析では、複製制御を維持した 1 頭には感染初期に選択された CTL エスケープ変異 L216S のみしか認められなかったが、複製制御を維持できなかった 2 頭には少なくとも 2 つ以上のさらなる CTL エスケープ変異の追加が認められた (俣野)。強毒 SHIV-KS661 と弱毒 SHIV-cl 64 のゲノム上の塩基配列の違いは 16 ケ所であったが、このうち感染サル個体における病原性に関わることが示唆されたのは計 4 ケ所であり、中でもウイルスの感染力を数十倍高める env gp41 の 1 ケ所の変異が最も重要と考えられた (三浦)、SIVmac239 長期非発症サル、DNA ワクチンによる感染制御サルの解析から、生ワクチンによる強い防御免疫は感染制御との関連性が見いだされ、また Δ5G のどの糖鎖欠失変異がウイルスの細胞指向性、中和抗体感受性に变化を与えることを明らかにした (森)、免疫後 4~6 週目から抗体価の上昇が認められ、11 週目にウイルスを challenge した結

果、免疫サルの viral load はコントロールに較べて 2log-3log の感染防御効果が認められた(庄司)、組織病理学的に異常が認められたサルはいずれも抗 EB ウイルス抗体陽性で且つ SRV/D の活性化がみられた(向井)。

2) ワクチン免疫による防御機構の解明: 酵母菌でのリコンビナント α 抗原蛋白の作成はコドン改変を行うことで成功し、この蛋白は Th1 タイプの免疫反応を誘導するアジュバント活性を持っていた(保富)。ICOS を介する HIV-1 抑制は抗体添加でも可溶性ナチュラルリガンド (B7h-Fc) 添加でも再現することができた。抑制ステップはウイルス複製初期であるが、HIV-1 レセプター発現変化によるものではない。また、ICOS 下流の HIV-1 抑制につながるシグナルは少なくとも NF κ B 経路を介することが分かった(神奈木)、各種の GFP 標識細菌株により、DC-SIGN を使用しないとされていた *M. avium* も DC-SIGN を介し細胞内へ感染していることが示されたが、非病原性抗酸菌は利用していなかった(牧野)。樹状細胞と T 細胞の共培養系において抗原特異的な反応を幅広く解析できる IFN- γ 活性検出レンチウイルスベクターを構築し、その実用化の可能性を示した(横田)。92 クローンで gag のほぼ全長の解析が終了し、P24 中に CTL に認識される 15 mer の peptide が複数確認された。1 ステップで env 発現ベクターにクローニング可能なプラスミド pFG01 を構築し、組み換えた HIV-1 は感染性と増殖性を共にもっていた。新しい CTL epitope を gag 上に同定した(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 5' UTR (ゲノタイプ 3 型) の IRES 活性は HCV 5' UTR に比べて 100 倍程度低いことが判明した。また HGV 複製中間体であるマイナス鎖 RNA を細胞内及び上清中で検出することに成功した。更にヒトリンパ球での HIV-1 感染実験において HGV による HIV-1 複製抑制が観察された。(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 Δ 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)。初乳中の細胞の主体は CD4+CD14+ のマクロファージ型細胞であり、同時に DC-SIGN を発現し、その発現は IL-4 の添加により増強した。そしてこの DC-SIGN 発現細胞は DC-SIGN を介して R5-type HIV-1 を捕捉・保持することにより感染伝播の主役を演ずることを見出した(高橋)。

4. 考察

組換え DIs ワクチンはほ乳類細胞株でも複製能を示さないことから極めて安全なワクチンと考えられた。組換え BCG については昨年度に米国の研究グループによって BCG 東京株が HIV 感染新生児においても他の株と異なり病原性を示さないことが明らかとなりヒト投与量での組換え BCG の安全性が確認された(本多)。SIV 複製制御を維持できなかった 2 頭では、CTL エスケープ変異の蓄積により複製制御が失われたことが示唆された。この結果は今回の実験で観察された SIV 複製制御に複数の CTL が関与していることを意味している(俣野)。自己抗体型ワクチンとして経口粘膜免疫ワクチン開発が必要である(庄司)。

5. 自己評価

1) 達成度について

各分担研究者の 2 年度研究計画は、程度は異なるものの、全体として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

国際共同研究として MVA との比較が行われ、組換え BCG および DIs ワクチンにおいてデータが集積した。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ことはエイズワクチン開発における意義は大きい。

3) 今後の展望について

最終年度に向け、それぞれの目標が達成されよう。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。感染制御機構の解明が進み、よりよいワクチン開発の基盤が形成されつつある。またサルを用いた有効性ととも、安全性や安定性についても検討していく。

6. 結論

MVA との比較において DIs の安全性が有意に優れていることが明らかにされ、さらに BCG 東京株を用いた組換え BCG ワクチンの安全性も明らかとなった。SIV 複製制御において複数のエピトープ特異的 CTL の関与が示され、エイズワクチン開発研究において、複数のエピトープ特異的 CTL を誘導することの重要性が示された。強毒/弱毒 SHIV の比較ゲノム・病態解析は感染個体レベルでの病原性分子機構の解明がワクチン開発に役に立つ。感染制御の機序の解明が生ワクチン以外のワクチン開発には必須である。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。

7. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

プライムブーストワクチン法(2004年11月25日)出願中

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。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。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。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、2003 年 10 月までの追跡調査を行い、Kaplan-Myer 解析をおこなった (塩田)。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研究を行った (三間屋・渡辺)。臨床試験名「ヒト免疫不全ウイルス感染症に対する特異的免疫療法と計画的抗ウイルス薬の中断 (第 I 相試験)」を東京大学医科学研究所附属病院内で実施した。参加症例は MHC Class I の遺伝子型が A*2402 の HIV 感染者で、抗 HIV 療法により過去 6 ヶ月間の血中 HIV RNA 量が 400 コピー/ml 未満の者 4 例 (岩本)。

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 595 名の HIV-1 感染者の IL4 と RANTES の遺伝子多型と、それぞれの感染者の 2003 年 10 月までの追跡調査の結果を解析したところ、女性においてのみ、エイズ発症遅延と関連する RANTES プロモーターの多型 RANTES-28G を持つ感染者が全観察期間を通じて有意に高い生存率を示した (塩田)。HIV-1 感染病態の進行や血漿 HIV-1 量と関連して NK 細胞数が減少し、その減少は主に CD56dim の NK 細胞サブセットに認められた (三間屋)。長期未発症者 (LTNP) 6 例と対照群 110 例のトランスクリプトーム解析では、LTNP に特徴的な mRNA プロファイルが得られなかった (渡辺)。マイクロアレイ解析により、マウスレトロウイルス (Fv) に対する中和抗体産生遺伝子の候補が見つかった。HIV-1 曝露非感染者と HIV-1 感染者の PBMC についてマイクロアレイ解析を行ったところ、HIV 抗原刺激後 6 時間で大きな差異を認めた (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 4 箇所、7 ペプチドを患者末梢血から分離誘導した自己の樹状細胞 (DC) 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、第 1 相臨床試験を 4 例に対して行った。DC は安全に接種できたが、全員で血漿中ウイルスのリバウンドが見られ、1 例では急性 HIV 感染症様の発熱が認められた (岩本)。HLA-B*3501 陽性患者の HIV 遺伝子配列解析から、Pol 遺伝子内の CTL エピトープでは N 末端が Ile から Val に変異していた。Pol 特異的 CD8 T 細胞の TCR レパートリーを調べたところ、新たに出現した T 細胞の相対頻度が経時的に増大していた。HIV 感染細胞に対する傷害活性を測定したところ、後から出現した T 細胞は変異エピトープにのみ弱い傷害活性を示した (滝口)。複数の症例について、env 遺伝子 V3 領域の配列は保存されているにもかかわらず、抗 V3 抗体に対する中和感受性に有意な差が見られ、C3 領域の配列の変化が重要であることが確認された (松下)。

(3) HIV の病態に関わる宿主側及びウイルス側の因子

カニクザル TRIM5 α が HIV-1 のみを阻害したのに対し、アフリカミドリザル TRIM5 α は HIV-1、SIVmac の両者の感染を阻害した。カニクイザルとアフリカミドリザル TRIM5

α のキメラを作成したところ、アフリカミドリザルの TRIM5 α の B30. 2 領域内の 37 アミノ酸からなる領域が SIVmac を阻害する能力を担っていることが明らかになった (塩田)。4 回膜貫通ドメインを有する tetraspanin 分子群のひとつである CD63 の変異体が HIV 抑制活性を有することを見出した。CD63 遺伝子を導入した細胞は、増殖にはまったく影響を受けないが、ウイルスコレセプター分子である CXCR4 の細胞表面発現が非常に低下し、HIV 感染抵抗性となった。その機能は N 末端の細胞外ドメインを欠損した変異体では明らかに増強される。さらに、CD63 とその変異体は HIV の放出も特異的に阻害していた (小柳)。マウス T 細胞に Nef を発現させることにより抗原刺激に対する反応とケモカインに対する遊走能が低下し、さらに生体内における抗原刺激への応答性とダイナミクスの異常が誘導された。Nef 発現により T 細胞の表現型が抑制型に変化することが示された (竹森)。Vpr の存在によって G2 期だけでなく、細胞分裂 (M) 期の細胞周期異常も認められることがわかった。海洋エキス約 6000 個のスクリーニングの結果、抗 Vpr 因子の候補が同定された (石坂)。抗 CCR5 N-terminus 抗体である T-312 を固相化したプレートにより、効率よく PBMC からマクロファージへの分化を誘導できた。T-312 刺激単球に IL-4 を加えて培養することにより機能的な DC が誘導され、さらに不活化 HIV-1 で hu-PBL-SCID マウスを免疫することによって、R5 ウイルス抵抗性を付与できた。このマウスに CXCR4 アンタゴニスト (KRH-1636 を 10mg/kg) を毎日投与することにより、X4 ウイルスに対する抵抗性も付与することができた (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
タイ国ランパンのコホートにおいては、男性感染者の多くが登録された時点ですでにエイズを発症しており、RANTES-28G の効果が男性では認められなかったものと思われる (塩田)。HIV 感染病態進行者では細胞傷害活性をもつ CD56dim の NK 細胞が減少しており、血中 HIV-1 量をコントロールすることで NK による自然免疫能が改善し、エイズ発症予防につながる可能性が示唆された (三間屋)。LTNP の解析数を増やすことが必須であるが、臨床的分類である以上、病態進行症例がでることも避けられず、解析が困難である。PBMC 由来の培養細胞ではなく、何らかの刺激に対する反応性の mRNA プロファイリングが必要かもしれない (渡辺)。マイクロアレイによる発現解析がマウス及びヒトの HIV 抵抗性の解析に有用であることが示された (宮澤)。

(2) HIV 特異的細胞性及び液性免疫

STI 後のウイルスなどにつき、さらに解析が必要である。

HIV 特異的免疫の誘導には更なる改良が必要であると思われる (岩本)。HIV の抗原変異に対するヒトの T 細胞免疫系の応答様式とその機能を明らかとした (滝口)。抗体の反応エピトープ以外のアミノ酸の変化が中和抵抗性に関係している。中和抵抗性のウイルスでも感染細胞表面では、エンベロープに対する抗体の結合活性が保たれており、そのメカニズムの解明がさらに必要である (松下)。

(3) HIV の病態に関わる宿主側及びウイルス側の因子

サル細胞の HIV 抵抗性は、TRIM5 α だけでは説明できない可能性がある (塩田)。CD63 の HIV 増殖調節機序が明らかになることより、新たな HIV 抑制法が開発されることが期待される (小柳)。Nef を発現した T 細胞の存在によって生体内における相対的な免疫状態がどのように変化するか、解析する必要がある (竹森)。Vpr の新しい機能的側面が明らかとなった (石坂)。効率的な DC 誘導法と R5 ウイルス及び X4 ウイルス双方に対し抵抗性を付与する実験系が確立できた (田中)。

5. 自己評価

(1) 達成度

コホート研究は共同研究の形で順調に進んでいる。先進的技術のトランスクリプトームを HIV 病態解析へ応用しているが、T 細胞の単純な培養系では有意な差が認められないことがわかってきた。刺激を入れた系で今後の研究の進展が期待できる。HIV 特異的免疫に関するこの班の研究成果が臨床応用にまで進み、自己の樹状細胞とペプチドの組み合わせは安全であるが、免疫刺激として極めて弱いことがわかった。HIV の増殖制御を行う宿主因子の研究で大きな成果があった。アクセサリ遺伝子に関する研究は、全く新規なもので今後の発展も期待できる

(2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義

タイ、イタリア、日本と国際的な HIV 感染者コホートと協働間関係を結んで国際的に研究が展開されている。HIV 特異的免疫の研究は、研究班の成果が臨床応用に進み、わが国の HIV 研究では初めてのことだと思われる。宿主因子 CD63 とその変異体に HIV 抵抗性があるという全く新規な発見があり、今後大きな発展が期待できる。

6. 結論

研究は順調に成果を挙げており、3 年目の班研究に期待が持てる。

7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

宮澤正顕: Resistance Genes: Supplementary Patent Application to PCT/GB2003/004493 (Filed December 23, 2004)。

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（東京大学大学院新領域創成科学研究科 教授）

分担研究者：石田 尚臣（東京大学大学院新領域創成科学研究科 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、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。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の3点について検討する。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して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

本年度は HIV 感染者を中心に、昨年度から引き続き *in vivo* におけるメチル化解析をおこなった。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。 10^2 copy/μg DNA 以上のプロウイルスロードを持つ検体に対し、LTR のメチル化解析を試みた。18検体においてメチル化解析が可能であった。

シドニーコホート検体を用い、HIV 感染患者の *in vivo* の解析から明らかになった事は以下のとおりである。①*in vivo* において LTR のメチル化が認められる。② LTR のメチル化は典型的 CpG 配列のメチル化は少なく、むしろ CpXpG や CpHpH (H は G 以外) のシトシンのメチル化が中心であった。③サル検体では LTR 中1ないし2カ所のシトシンメチル化が認められるに過ぎなかったが HIV 感染者の場合、1LTR 中3カ所以上のシトシンがメチル化されるケースが多く認められた。

昨年度より引き続き、サル感染モデル系の *in vivo* メチル化解析を進め、京都大学ウイルス研究所速水教授の研究グループより提供された検体についての解析が終了した。経過報告した通り、*in vivo* においても LTR のメチル化が認められ、HIV 感染患者末梢血と同様、*de novo* DNA メチル化酵素が重要である事が示唆さ