

研究課題：血友病の治療とその合併症の克服に関する研究

課題番号：H15-エイズ-009

主任研究者：坂田 洋一（自治医科大学分子病態研究部 教授）

分担研究者：小澤 敬也（自治医科大学遺伝子治療研究部 教授）、吉岡 章（奈良県立医科大学小児科学教室 教授）、

長谷川 護（ディナベック株式会社 代表取締役社長）、新井 盛夫（東京医科大学臨床検査医学講座 助教授）、天野 景裕（東京医科大学臨床検査医学講座 助手）、小林 英司（自治医科大学臓器置換研究部 教授）、北村 義浩（東京大学医科学研究所先端医療研究センター 助教授）

1. 研究目的

血友病は、現在は出血時に因子製剤を補充する care 中心の治療が行われている。欠乏する凝固 VIII 因子（血友病 A）、或いは凝固 IX 因子（血友病 B）の血中レベルを正常の数%に維持できれば、製剤投与では不可避の不慮の出血を予防できる。この目的に血友病遺伝子治療が大きな期待を寄せられている。本年度は血友病 B では、サルを対象にアデノ随伴ウイルスベクター（AAV）の AAV4 を利用して筋肉細胞へ、また AAV8 を用いて肝臓へサル型 FIX 遺伝子を導入し、その長期発現法の検討と、安全性のデータの蓄積を図る。さらに、マウスを用いて至適な AAV 血清型の検討も続行する。血友病 A では、血友病 A マウスを用いて、日本オジナルのサル免疫不全ウイルス（SIVagm1Y0-1 株）ベクター（SIV）と AAV を用いた遺伝子治療法の開発をさらに推進する。細胞療法との併用を指向した遺伝子導入 CD34 陽性細胞の移植と、成熟肝細胞の異所性移植法による第 VIII 因子導入法の基礎的検討を行う。さらに、遺伝子治療の成否にも関わるインヒビタ対策を血友病マウスへの免疫寛容誘導という観点から検討する。

2. 研究方法

血友病 A：搭載可能遺伝子サイズが 5 kb であるが、これまでの検討で安全性が確認されている AAV の利用を検討した：167b の β actin minimum promoter 及び肝臓特異的 $\alpha 1$ antitrypsin promoter を利用して B 領域除去第 VIII 因子 cDNA (BDD FVIII cDNA) を搭載した AAV4 と AAV8 を作製してマウス骨格筋と肝臓へ投与し、長期因子発現と安全性を検討した。SIV では、研究班において、当研究のための promoter (PM) などの改変許可と量を確保するための作製許可の契約を結んだ。そして、骨髄巨核球、肝臓、血管内皮細胞、脂肪細胞により特異的な PM を検討した。治療遺伝子を搭載した SIV を作製し PM 毎に内皮細胞や脂肪細胞での発現を期待して血友病 A マウスへ投与するとともに、CD34 陽性細胞へ *ex vivo* で transfection し、これをマウスへ移植して骨髄巨核球での発現、及び肝細胞との fusion をの基礎的検討を図った。解析は血中 FVIII の活性測定と、別途 GFP 遺伝子搭載ベクターの利用と免疫学的手法を用いた。異所性移植に関しては、正常マウス成熟肝細胞を血友病 A マウスの腎皮膜下に EHS マトリックスゲルとともに移植して、血中 FVIII レベルの検討と、安全性を観察した。**血友病 B：**ヒト第 IX 因子 (FIX) 遺伝子を導入したサルのヒト FIX の動態を解析した。さらに、インヒビタ産生を抑制することを目的に免疫原性の低いと思われるサル型 FIX 遺伝子を作製し、その利用を図った。まず、サル血中に治療遺伝子により発現したサル型 FIX を同定するために、変異サル型第 IX 因子遺伝子を作製し、モノクロナル抗体を用いた EIA と免疫組織化学法の確立を試みた。次に、変異遺伝子を AAV4 を利用して筋肉に、また AAV8 を利用して肝臓に投与して、発現持続性と、肝機能の推移を含めた安全性データを集積した。また、基礎実験としてマウスの脂肪細胞、

血管内皮細胞特異的 PM である PAI-1PM を用いて、脂肪細胞、内皮細胞へのマーカー遺伝子、及び FIX の発現誘導を試みた。

遺伝子治療基礎的技術検討：因子の臓器特異的発現はインヒビタ産生のみならず、germinal transmission の検討などの点でも極めて重要である。マウスを用いて種々の血清型の AAV にルシフェラーゼ遺伝子を搭載し、ベクターの投与経路、標的臓器などでどのようにベクターの分布と発現が変化していくかを観察する方法を検討した。異所性移植においては、*ex vivo* で成熟肝細胞への遺伝子導入効率改善の検討と、aFGF を徐放するマイクロスフェアズを留置し、予め血管を誘導した後に肝細胞を皮下へ移植する方法の検討も始めた。SIV の安全性の向上とエンベロブ改変による標的臓器特異性も検討した。

インヒビタ対策：新生児免疫寛容誘導法と遺伝子治療とのカップリングのための最適条件の検討と、胸腺細胞へ直接 FVIII 提示をする方法で成熟マウスでの免疫寛容誘導の可能性を検討した。細胞性免疫寛容も視野に、ヘルペスウイルス k3 遺伝子による MHC-I 制御も検討を始めた。

遺伝子解析：遺伝子治療に向けて、倫理指針に則り、血友病 B 患者の遺伝子解析を施行した。

〔倫理面への配慮〕

本研究は、非病原性のベクターの応用を目指したものであり、周辺環境及び実験従事者の安全性に関して、倫理的問題が生ずることは基本的にないと考えている。マウス、イヌを用いた動物実験は、動物倫理面（動物愛護上の配慮など）を含めて奈良県立医大、自治医大の動物実験指針規定に沿って行う。筑波霊長類センターとの共同研究として厚生労働省霊長類共同利用施設で実施する予定のサルの実験では、国立感染症研究所「動物実験ガイドライン」及び筑波霊長類センター「サル類での実験遂行方針」を遵守して行う。遺伝子解析に関しては、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 文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号）を遵守して、国の倫理指針（平成 15 年 7 月 30 日に施行された厚生労働省告示第 255 号）に準拠し、人権を保障しながら適正に実施する。

3. 研究結果

血友病 A：AAV4 によりベクター量依存性に FVIII を血友病 A マウス骨格筋で発現させることが出来た。活性は 4 週間持続したが、使用した免疫抑制剤では中和抗体の産生を抑制できず、6 週以降漸減した。AAV8 を用いて肝臓で発現させた場合も、ベクター量依存性の発現が確認され、活性は 100-700%にも達した。12 週以上インヒビタ産生も見られず活性上昇が持続した。AAV4 での筋肉細胞、AAV8 での肝細胞とも、導入 FVIII の転写産物が RT-PCR 法にて、また FVIII が免疫蛍光法で検出された。正常マウス肝細胞を血友病 A マウス腎皮膜下に移植したところ、移植後 5 週目までは片側腎では 5%のそして両側腎移植モデルでは FVIII 活性が 10%を示し、Tail-cut 止血時間も短縮した。

血友病 B: マウス骨格筋へ AAVIV-PAI-1promoter・FIX を投与したときは、ヒト FIX は骨格筋周囲の血管内皮細胞に認められ、骨格筋細胞には同定できなかった。血中ヒト FIX は 10%以上の血中レベルが 20 週持続した。PM を CMV に変えると 5%しか得られなかった。さらに PAI-1PM マウスでは TGF β 1 により FIX の発現増強が見られた。ヒト型 FIX 遺伝子を筋肉に投与したサルで、数週間治療レベルの FIX が確認されその後低下したが、サルの組織では FIX の転写産物が十分量検出された。サル型 FIX 遺伝子にタグを付加したものは、細胞からの分泌が不十分で、また凝固活性の比活性も低値であった。そこで、ヒト型 FIX をサル型と区別出来るモノクロナル抗体のエピトープ相当部位 262Thr をヒト型の Ala に変異させた変異サル型 FIX を作製し、モノクロナル抗体を利用した ELISA 系で発現 FIX を定量した。測定感度として 0.1%まで測定できることが確認されたため、現在サルに投与し発現経過を観察中である。

技術的検討: *in vivo* imaging により、ベクターの血清型違いやベクターの投与経路、さらにマウスの週齢やマウスの性差による発現部位と量の違いを同一個体で経時的に簡便に追跡することが可能となった。*ex vivo* で成熟肝細胞へ遺伝子を導入するには、分離後、短時間のうちに suspension 状態で行うことが良いことが明らかとなった。また皮下へ予め血管を誘導する二段法で肝細胞を移植すると皮下に 100 日以上長期生着が得られることが確認された。**インヒビタ対策:** 胸腺内に FVIII 投与する場合の安全な FVIII 量が推定された。N 数は少ないが寛容誘導に一定の効果は確認できた。外科的処置による出血の影響を抑えるためのエコー下投与を現在検討中である。

4. 考察

血友病 A の治療にも安全な AAVV を用いて長期発現を得ることが可能であることが示唆されたことは、ヒト臨床研究への実用化に向けての意義は大きい。特に、AAV8V の利用により FVIII の肝臓での長期高発現が得られたことは注目に値する。しかし、患者に HCV(+)が多いことを考えると、肝臓への遺伝子導入が肝臓へ与える影響については十分な検討が必要と考える。また AAVV では染色体に治療遺伝子は殆ど組み込まれない。従って、論理的には標的臓器は終末細胞よりなる筋肉や、脂肪組織などが長期発現に有利である。これらの臓器でさらに長期安定発現を得られるかが AAVV 利用を実用化できるか否かの鍵と思われる。この AAVV 応用の論理は血友病 B の遺伝子治療でも同様である。長期発現という点では日本版 SiVW は有利ではあるが、遺伝子が組み込まれるために、一般のコンセンサスを得るには、まず、自殺遺伝子の組み込みや insulator の搭載など安全性を高めるための基礎検討を進めることが実用化には重要である。CD34 陽性細胞や、成熟肝細胞を利用した異所性移植による血友病遺伝子治療はブレークスルーの可能性を秘めている。これらに一定の成果が見られた意味は大きい。我々の確立した新生児免疫寛容誘導法は応用段階に入っており、遺伝子治療との coupling が現在進行形である。さらに、HLA 修飾や、胸腺細胞への抗原直接提示などの方法を試みているが、特異性の高い免疫寛容誘導法を確立するにはまだ先が長い印象である。

5. 自己評価

1) 達成度について: 10 年間のブランクのあとに 0 から

出発した研究であるが、技術的には差のないレベルに達している。また基礎検討についても、パテントの問題など制約は多いが欧米と競争できるレベルには達していると考えられる。欧米とは桁の違う予算の中で班員の創意工夫による努力と、繰り返しミーティングを行うなどの相互の密接な協力により、臨床応用に向けて研究は着実に進んでいる。しかし、実用化には安全性のよりいっそうの保証、パテントの問題、社会問題など、乗り越えなければならない壁はまだ高い。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について: retrovirus vector による SCID 遺伝子治療は T cell leukemia 発症の問題が起きたが、まれな偶然の重なった結果であるという報告が出て再開されている。血友病の遺伝子治療も患者にとっても社会にとっても benefit は大きい。しかし、血友病は代換え care 治療が存在し、SCID と異なり、より大きな安全性が要求される。我々も適当にインパクトだけを考えて見切り発車するのではなく、安全性の確保には十分な基礎検討が必要であることを再確認している。我々の開発した新生児免疫寛容療法は、欧米における遺伝子治療研究に利用され始めたのみならず、ヨーロッパで新生児を対象にした免疫寛容療法についての議論を惹起している。また、世界で最初に我々が遺伝子導入標的細胞に選んだ脂肪細胞は、切除可能な終末細胞で、しかも活発な代謝を営んでおり、興味深い標的細胞として注目を浴びつつある。異所性移植と遺伝子治療の仕事も独創性の高い試みとして今後の展開が期待されている。

3) 今後の展望について: 臨床研究前夜にある血友病 B 遺伝子治療は長期発現の維持と、肝機能に与える影響など十分な安全性のデータの集積が必要である。遺伝子導入には virus vector の利用が現実的である。AAVV では終末細胞の利用を図っていく必要があるが、長期発現を考慮すると SSV の応用が必要になる。いかにこのレンチウイルスの安全性を高め、利用について社会のコンセンサスを得ていくかは、社会的な対応も含めて十分検討する必要があると考えている。細胞治療を併用した遺伝子治療など、何かのブレークスルーが遺伝子治療を一步進めるために必要であり、それがこの研究班から生まれるように最大限の努力をする所存である。

6. 結論

これまでの基礎研究により短期間の治療レベル因子発現の技術は獲得した。また多くの新知見も得て、遺伝子治療に向けた基礎研究は整いつつある。これらの一部は報告、或いは報告中である。臨床応用に向けて、免疫反応対策など長期発現の工夫と安全性のさらなる向上に向けて今後検討していく必要がある。

7. 知的所有権の出願・取得状況

「VSV-G シュードタイプ化サル免疫不全ウイルスベクターを用いた霊長類胚性幹細胞への遺伝子導入」(D3-A0103)
出願番号: 特願 2003-503807 (2001/6/8)

状態: 審査請求済み

「シアル酸結合活性を有する膜蛋白質をエンベロープに含むウイルスベクターをグラム陰性菌由来ノイラミニダーゼを用いて製造する方法」(D3-A0204)

出願番号: 特願 2002-258576 (2002/9/4)

状態: 出願公開中

研究課題： 計算機を活用したHIVの薬剤耐性評価

課題番号： H15-エイズ-023

主任研究者：星野忠次（千葉大学大学院薬学研究部 助教授）

分担研究者：畑 晶之（千葉大学大学院薬学研究部 助手）、佐藤武幸（千葉大学医学部附属病院 感染症管理治療部長、助教授）、杉浦 互（国立感染症研究所、エイズ研究センター 第2研究グループ長）

協力研究者：横幕能行（千葉大学医学部附属病院 助手）、布施 晃（国立感染症研究所、血液・安全性研究部長）

1. 研究目的

抗HIV薬は長期にわたる投与を余儀なくされるため、ウイルスが薬剤抵抗性を獲得し、耐性ウイルスが発生してしまうことが、HIV感染症治療では深刻な問題となっている。そこでHIV感染患者に薬を投与する前に、予め薬剤耐性検査を行うことが、抗HIV療法をより充実させるために重要である。これに対応して、HIVのジェノタイプとフェノタイプを迅速に決める検査技術が開発され、抗HIV療法の一環として、耐性検査を行うことが現実のものとなっている。

本研究では、ジェノタイプ検査やフェノタイプ検査に並ぶ新しい薬剤耐性検査法として、「コンピュータシヨナル検査」を提案している。この技術の実現に向け、計算手法の開拓を中心に開発を推進している。本研究の目標は、計算機を駆使した理論化学的方法により、国内で認可されている抗HIV薬のうち、個々の患者にとって最も適した薬剤を選択できる技術を確立することである。

2. 研究方法

患者ごとに異なる酵素の構造変異を計算機内で再現し、抗エイズ薬への抵抗性を算出するシステムを構築するために、方法論の開拓ならびに実験的知見との整合性確認という2つの観点より、以下に示す項目に分けて研究を進めた。特に本研究では、計算機で評価された検査結果に、高い信頼性があるか、十分に新規の医療技術として臨床に応用できるものかを確認することが、最大のポイントである。そこで、従来のジェノタイプ検査やフェノタイプ検査と照らし合わせて、計算機で算出した値が、実験的方法と整合性があるかを詳細に調べている。

ソフトウェア開発（方法論の開拓）

- ・ 計算評価法改良と計算機プログラムの作成
- ・ 計算の迅速化に向けた取り組み

既存データとの比較（整合性確認）

- ・ フェノタイプ検査が既知のデータを照合例として使用
- ・ 変異情報から、検体固有の酵素を計算機内で仮想的に作成し、薬剤-変異酵素結合構造を構築
- ・ 薬剤と酵素の結合力の算出と薬剤抵抗性の評価
- ・ 計算機算出値と実験データとの比較

臨床データとの比較（整合性確認）

- ・ 患者からのサンプル採取とウイルス量の測定
- ・ 国立感染症研究所エイズ研究センターでのサンプルのジェノタイプ検査

・ ジェノタイプ検査、治療経過および計算評価結果を比較（倫理面への配慮）

患者からの試料採取は、千葉大学大学院医学研究院倫理審査委員会での審議を経て行い、提供者に菌株が実験に利用される旨の説明をして同意を得る。分担研究者(佐藤)以外は、個人識別情報は全く参照できない。コンピュータシヨナル検査の実施においては、主任研究者らは患者とは全く接点が無い。

3. 研究結果

ソフトウェア開発

薬剤耐性の予測法として、薬と標的酵素の結合エネルギーから評価する方法と接合面のゆらぎ具合から推定する方法を試みた。エネルギー評価法では、薬剤と酵素の間の静電力的力と分子間力を算出し、疎水部分の接触面積から疎水相互作用の効果を、芳香族環から π - π 相互作用の効果を算出し、全てを加え合せて評価するプログラムを作成した。

ゆらぎ評価法では、計算中における薬剤と酵素の間の接合面の変動の周期（良く結合している場合は接合面の揺らぎがゆったりとしているが、結合が緩いと細かく変動する）から、親和性を評価するプログラムを作成した。

当初、一つの薬剤のシミュレーションには3週間程必要であったが、計算方法を工夫することで、計算精度を落とさずに、最大で計算時間を従来の半分程度に抑えることができた。但し、現在の最新の計算機では、さらにその半分程度まで計算時間を短縮することができる。

既存データとの比較

分担研究者(杉浦)の蓄積している解析データの中より、検査会社(Virco)によりフェノタイプ検査の行われた36検体について、主任研究者(星野)は分担研究者(畑)と共に計算機解析を始めた。計算が実行しやすいことならびにジェノタイプ検査だけの結果のみでは十分に耐性度が推定できず、本研究で開発するシステムの有用性が高いことから、本研究ではプロテアーゼ阻害剤に絞って研究を進めた。臨床検体からの一つのHIV-1プロテアーゼにつき、現在国内で認可されている7つのプロテアーゼ阻害剤との結合親和性を順次に求め、10検体について計算を実施することができた。その結果、エネルギー評価法では、リトナビルとインジナビル以外では、臨床検体のフェノタイプの耐性検査と計算予測値との整合性が、ある程度は取れるようにな

った。

ゆらぎ評価法では、変異が1,2箇所だけの実験室株に対しては、計算値は実験的薬剤感受性と良い相関が見られる。この評価法を抗原-抗体結合に適用した結果も良い推測値を与えることができるようになった。ところがHIVの臨床株に対しては満足の行く結果は得られていない。

臨床データとの比較

実際の患者2例について、評価を試みた。但し、計算機による薬剤耐性評価が確立していないので、この結果は参考程度であり、実用面では目立った進展がなかった。但し、患者の薬剤投与履歴とウィルス量変化やウィルス変異の経過を追跡する必要があるので、分担研究者(佐藤)は、幾つかのサンプルについて、国立感染症研究所に検査を依頼して、後の評価検討のための準備を進めている。

4. 考察

本研究で開発してきたエネルギー評価法ならびにゆらぎ評価法は、従来、創薬や生物学の分野で標準的に利用されてきた自由エネルギー計算手法(MMGBSA法やMMPBSA法)よりは、信頼性の高い結果を与えている。但し薬物候補のスクリーニングでの利用とは異なり、臨床における薬剤選択に利用されるには、相当に計算精度を上げる必要がある。HIV-1プロテアーゼの薬剤に対する感受性変化が2~3倍変化するのに対し、1kcal/mol程度のエネルギー変化しかないとされており、従来の方では対処しきれない。本研究で開発してきたエネルギー評価ならびにゆらぎ評価のいずれの方法も、十分に長く計算シミュレーションを行うと精度が向上する。但し、実用に耐える計算時間(1週間以内)で良い結果を出すために、まだ改良すべき点が多く残っている。

実験室株である程度予測が可能なのに対して、臨床株では信頼性の高い結果が得にくいこと理由は、臨床株は変異の数が多いためと考えている。変異体プロテアーゼは、野生株の構造を出発点にして、これにアミノ酸変異を入れた形でモデル作成を行う。計算実行後、出発構造から徐々に構造変化してはいるが、なお未だ十分に構造が緩和し、エネルギーが下がりきった状態が得られていないために評価に誤差を生じる。もちろん計算時間を延ばせば、緩和状態に近づくが、実用には向かなくなる。これに対処するため、なるべく短い計算時間で所望の構造に達する計算プログラム上の工夫をしている。

臨床検体ウィルスの遺伝子配列解析では、A,T,G,Cに分類できないコドン(例えばRはAまたはGに対応)も存在する。これは臨床検体には複数の遺伝型を持つウィルスが混在しているためであると考えられる。検体によっては、確定のできないコドンが複数個あるために、HIV-1プロテアーゼ遺伝子の全長に対して千通り以上の組み合わせが生じる場合も多々ある。計算ではどれか一つに確定しないとモデルが作成できないので、一旦、全てのアミノ酸配

列の組み合わせを作成し、それを比較して一つの配列に絞り込むことを行った。具体的には、重要な変異の有無、電荷の変化、かさ高さの変化などに順位付けを行い、変異が入ったときに野生株から最も大きな影響を及ぼす可能性のあるものが選択されるようにした。これはフェノタイプ検査との不整合の一因となってしまいが、重大なアミノ酸変異を見逃すことの無いようにとの判断である。

5. 自己評価

1) 達成度について

当初計画していたよりも薬剤耐性評価が難しく、未だ臨床応用できるシステムとして開発できていない点で、達成度としては不十分である。但し、2つの有望な評価法の開発、幾つかの計算上の工夫を具体化するソフトウェア群の作成、問題点の明確化により達成目標に近づいたことには満足している。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

ゆらぎ評価法は、親和性評価方法として試みられたことがほとんど無く、HIVなどの良く規定されている系で、実験結果との整合性が確認されたことは、数数学的見地からは学術的貢献はあると考えている。国際的あるいは社会的意義については、本研究で提案する検査システムが実用になった段階で評価されるので、この点での貢献は今後の課題となっている。

3) 今後の展望について

計算機による薬剤耐性評価を実用技術として確立するには、今後、以下の2点が研究の成否に直結すると予想している。(1)臨床株のように野生株から大きく構造がずれているプロテアーゼを、できるだけ速く適切な構造にコンピュータ内で変化させること、(2)検査コストに見合うだけ短時間で評価ができることである。今後、この部分の開発が進めば、大きな研究の進展が見込まれる。今後も、研究を推進し、実用に足るものを提供する。

6. 結論

薬剤抵抗性評価に用いるソフトウェアの開発には、一定の成果があった。実験室株ならびにリトナビルとインジナビルを除くプロテアーゼ阻害剤については、ある程度の整合性が、計算機による親和性の算出値と実験による測定値の間にみられるようになった。今後、評価法をさらに改良し、全種プロテアーゼ阻害剤について、短時間で変異株についての十分な予測ができるようにする必要がある。

7. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

特許出願等の実績はなし。

疫 学 研 究

研究課題：HIV感染症の動向と予防モデルの開発・普及に関する社会疫学的研究

課題番号:H15-I47-018

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

和田 清（国立精神・神経センター精神保健研究所 部長）、小野寺昭一（東京慈恵会医科大学医学部泌尿器科 教授）、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

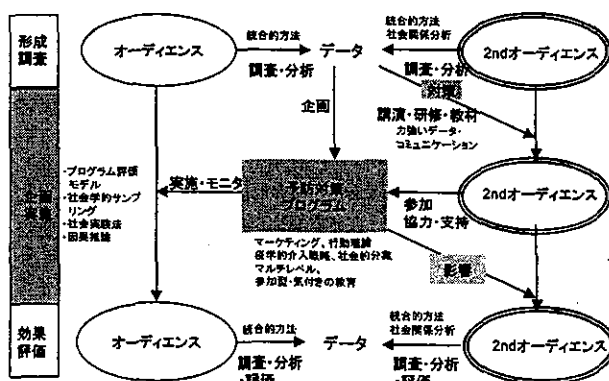
社会疫学的手法に基づいて、わが国の社会文化に適し、かつ行政施策にふさわしい予防介入モデルを開発し、その全国的普及を図ると共に、高リスク層の流行監視を通して、適時適切な行政施策の発展に資する。

2.研究方法と3.研究結果

A. 予防介入モデルの開発に関する研究

(1)若者の予防介入研究(木原雅)

社会疫学的手法（質・量手法の併用、マーケティング、行動理論、社会実験法等。右図）を用いて開発した若者予防介入モデル（WYSH モデル）は、わが国の新しい予防モデルとして高い知名度を獲得し、多くの学校、自治体、団体から研究参加の依頼が寄せられている。そうした環境を背景に、多様なモデルの開発と全国展開を図るため、本年度は以下の研究を実施した。いずれの研究も現在、データ集計中である。1) 観察的研究：①全国高校生性意識・行動調査：(社)全国高等学校 PTA 連合と共同でわが国最初の高校生のエイズ関連知識・意識・行動に関する全国調査を実施した。全国9ブロックから各5校を選び、計9,567名が参加。②G県全域の高校生性意識・行動調査：次年度の予防介入への基礎調査として、G県下で実施。公立の76%(57/75)及び一部の私立校が参加。参加者数23,612人。2) 予防介入研究：①中学生・高校生への予防介入研究:WYSHモデルの全国普及の最初の試みとして、(財)エイズ予防財団による青少年エイズ予防対策事業と連動し、全国中高生予防介入の研修と効果評価を実施した。希望校の中から、17府県の中学45校(12,615人)と高校29校(6,422人)を選び、事前調査(7月)後、研修を行い(8月)、介入期間(9-12月)の後、事後調査(12月)を行なった。介入には、独自に開発したパワーポイント、ビデオ、地域版のパネルポスターを使用し、学校の実情に即した改変を認めた。学校への質問票調査によって、実際の予防介入のパターンを分析・分類し、パター別の効果比較を実施する(比較群付き前後比較試験)。②親子コミュニケーション促進のための介入研究:保護者と生徒でペアとなる独自のパンフレットをマーケティング手法により開発し、保健所による保護者講演会を利用して、ペアパンフレットの親子コミュニケーション促進効果や保護者の意識の変化などを評価している(現在までに約400名の保護



注：オーディエンス = 直接の対象者、2ndオーディエンス = 対象者に関わる人々（若者の場合、学校や保護者、保健所等）、統合的方法 = 質的方法と量的方法の併用

者参加)。

(2)滞日外国人の予防介入研究(木原正)：平成13年以來のプロジェクト。昨年度まで、全国メディア(テレビ・新聞)を用いた予防介入やコンタクトのソーシャルマーケティングを実施したが、行動変容が認められなかったため、本年度から地域集中型の予防対策に転換し、その初年度の基礎調査を行った。①4つの在日ブラジル人集住地区(浜松、小牧、大泉、名古屋)でvenue-basedの質問票調査(HIV/STD関連知識・態度・性行動)を行い、580名から回答を得た(回収率85%)。なお集計中だが、STDに関する知識が特に低調であることが判明した。②在日ブラジル人学校の生徒合計37人の生徒に対してフォーカスグループインタビューを実施、現在質的分析中だが、HIV/STD情報の不足、妊娠出産の多さ、安心して相談できる場のニーズの高さなどが判明してきた。③在日スペイン語系の若者に対して個人面接を実施(現時点で6人)。質的内容分析により、「完全適応型」「不完全適応型」「不適応型」に分かれること、知識面、行動面で脆弱性が非常に高いことが示された。

(3)HIV感染者の予防研究(木原正)：わが国初の、HIV感染者を対象とする介入研究。前年度までの感染者、医療従事者に対する質的研究や共分散構造分析の結果を踏まえ、感染者の自他へのHIV/STI感染予防のための準実験的予防介入を計画実施している。介入は、患者、医療従事者双方にデザインし、内容としては、患者向けパンフ、医療従事者向けパンフ、問診票を用い、本年3月をめどに拠点病院への普及を行う。患者の事前調査を終え、現在

医療従事者の事前調査を実施中。リソース開発として、がん患者のセクシュアリティに取り組むチームとの連携を進めている。

(4) アリソン・ケスマネジメント(PCM)法の開発に関する研究
(木原正):米国で開発された個別契約式の予防介入法であるPCM法の文化的な咀嚼と、人材開発を終え、5名のMSMクライアント(全てHIV感染者)と1名の女性を対象に予防介入パイロット研究が進行中である。これら具体例の経験から、スキルアップに重要な進歩が得られた。

B.ハイリスク層の行動・感染監視に関する研究

(1)薬物乱用・依存者(和田):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(現在までに249名分。最終的には約450名の予定)のデータが得られ、1名HIV陽性(33歳女性)。また、薬物乱用・依存者の自助グループとの共同で、非入院IDUでも同様の調査を実施し、初めて自助グループから1名の感染者を確認した(女性)。

(2)STD患者(小野寺):全国12のSTD診療施設において、希望者についてHIV感染率、性行動、検査行動を調査した。1633名(男性290名、女性615名、セックスワーカー718名)が調査に応じ、クラミジア感染率は、それぞれ14.2%、10.4%、9.8%で、HIV陽性者は、男2名であった。

(倫理面での配慮)

疫学研究に関する倫理指針に則り、研究実施にあたっては、個別施策層当事者の参加を求め、プライバシーの保護、差別・偏見の問題について十分な配慮を行う。

4.考察

予防に関わるエイズ研究は近未来にアジア大流行を迎えるという限られた時間枠の中で成果を上げるよう求められている。我々は、1999年以来、行動研究から予防介入研究への展開を急ぎ、まず一地域で集中的に社会疫学的アプローチによる有効なモデルを開発し、それを全国普及させるという戦略で進めてきた。幸い、若者研究の成果は、WYSHモデルとして現在全国に知られ、多数の自治体や個々の学校(中高)、PTAから研究参加希望が寄せられるに至った。そして、それにより予防研究の機会が拡大し、予防モデルの精緻化と多様化が可能となり、それがさらに研究参加希望の増加につながるという相乗効果が生まれている。外来モデルの単純輸入ではなく、社会疫学的手法を用いて、日本・地域の文化や状況に応じたevidence-basedのモデルを創出してきたことが効を奏したと思われる。わが国初となるHIV感染者の予防介入についても、本年度は最初のエビデンスを得るという重要な進展が見られた。HIV感染者の予防介入は、感染の直接抑制につながる重要な意義があるが、患者・医療従事者の共同で生まれたモデルの有効性が確認されれば、全国的展開への道が開けることが期待される。滞日外国人の研究は、昨年までのマスター・プラン集中キャンペーン式予防介入に行動変容効果がなかったという結果を踏まえ、地域集中型

に転換してその基礎調査を行い、STDの知識や若者の現状などに、予防対策の設計につながる重要な知見が得られた。STD患者は、前年度より大きくサブグループ数を増し、性行動についても調査を開始したが、安定したサベージンズ体制とするにはさらに拡大が必要である。薬物静注者については、昨年台湾で流行が勃発したことから、わが国でもモニター強化が求められる。

5.自己評価

1)達成度について

予定を達成し、①全国規模の高校生調査、②WYSHモデルによる全国規模の中高校生エイズ予防介入の効果評価、③G県レベルの性行動調査、④親子コミュニケーション促進の介入研究などを実現した。HIV感染者を対象とした予防研究、滞日外国人研究、PCM研究、STD患者、薬物静注者における研究については、計画通りの研究成績を得るとともに、次年度の基礎を固めた。

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、社会疫学という新しい学問的アプローチを応用した学術的に重要な試みであると共に、現実に施策として展開可能という意味での社会的意義は大きい。成果はすでに多くのメディアを通じて全国に知られ、また、若者研究については、中国、インドネシア、モンゴルなど、国際的にも関心を集めつつある。

3)今後の展望について

予定どおりに社会疫学的手法による研究を実施する。若者研究は、中高生について青少年エイズ対策事業と連動してさらに大きな全国展開を行なって、授業モデルの多様化を図り、自治体レベルでの総合的取り組みも某自治体で実現し、理想的な自治体モデルの確立を目指す。また、大学生と職域についても、来年度より予防モデル作り着手する。滞日外国人研究では、来年度中に新たな予防介入をデザインし効果評価を行なう。HIV感染者の予防介入については、評価結果を踏まえ、より有効なモデルへの改善を行なうとともに、拠点病院を対象としたマニュアルや研修体制作りを行なう。PCMについては、事例を増やし、対応モデルの多様化を迫る。STD診療施設受診者については、さらにネットワークを拡大するとともに、検査行動を促進する方策についての研究を開始する。薬物静注者については、従来通りモニタリングを継続する。

6.結論

わが国の若者の性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。本研究は、その目的に沿って順調に遂行され、特に若者についてはここ数年で全国的普及が可能な段階に到達した。

7.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

i) アジアにおける流行形成のメカニズムの解明、ii) 流行の背景にある宿主側要因の解析と iii) 基礎研究およびワクチン開発への応用を目指したアジア型 HIV-1 流行株の基盤的研究資源の開発整備を目的として、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)

我が国を含むアジア各地域における HIV 流行の分子疫学解析によって、この地域における爆発的な流行の全容解明を目指す。

(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)

HIV 感染者の自然経過や抗体陰性配偶者の HIV 非伝播機序について調べるために、北タイランバン病院における HIV 感染者および配偶者を対象にしたコホート研究を維持し追跡情報を集積し、コホートから得られた患者検体を基礎医学研究へ活用させることを目的とする

(柱 III)「アジア型 HIV ヴァリエントに関する基盤的研究資源の開発・整備」(草川・椎野班員)

アジア型 HIV-1 variants に関する基盤的研究資源(感染性分子クローン、SHIV、HIV 遺伝子発現系など)の開発を行い、アジアにおける流行を標的とする将来のワクチン開発研究の基盤整備を進める(草川)。またアジアにおける HIV ゲノムの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* 評価系の開発を目的とする(椎野)。

2. 研究方法

(柱 I)「分子疫学研究」

① 本年度は、特に中国 [これまでの研究に継続して南西部(雲南省)と東北部(遼寧省)] に力点を置いて、流行ウイルス株の分離とその遺伝子構造の解析を進めた。また国内症例にかんする予備的な解析を開始した。

(柱 II)「コホート研究」

① GPOvir 治療による影響を調べるために、GPOvir 治療を受けたコホート患者の治療開始時点の臨床情報を新たに収集すると共に、治療開始 6 ヶ月～12 ヶ月後に患者インタビューを行ない GPOvir 薬のコンプライアンスならびに患者の社会的背景について調査した。② これまでに蓄積した患者検体・患者情報ならびに生存追跡データを活用し、宿主遺伝子多型評価実験・細胞性免疫実験・液性免疫実験・薬剤耐性検査と連携した解析を進めた

(柱 III)「ウイルス学的研究」

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。そのウイルス学的性状を検討した。

① overlap extension 法によってサブタイプ B', C, CRF01_AE の感染性分子クローンの *nef* 遺伝子直上流に GFP, YFP, CFP の3種の異なる蛍光タンパク質遺伝子を挿入。YFP と CFP の間の組換えによって GFP の性質をもつ遺伝子が生成するという性質を用いて、*in vitro* でアッセイする系の構築を行った。また逆転写酵素のフィンガー・パーム領域の2群の変異が共同して高度多剤耐性をもたらす系を利用した組換え評価システムの構築を進めた。

(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。

本コホート研究は、2000年1月にタイ政府保健省医学研究倫理委員会にて承認済み。

3. 研究結果

(柱 I)「分子疫学研究」

① 中国流行の成立ちに関する総括的分析：中国におけるエイズ流行のエピセンターと考えられる雲南省西部地域に分布するウイルス株の解析の結果に基づき、分子疫学的視座からみた、中国流行のシークエンスに関する作業仮説を提出した。「90年代初頭までに存在したと類推されるサブタイプ B, B', C の3種のウイルス株のうち、サブタイプ B の流行は abort し、一方サブタイプ C は B' との間の新しい組換えウイルスを生み出した。しかし母体となった純粋なサブタイプ C はほとんどすべて中国から失われ、現在残るのは、ほとんどサブタイプ B' と BC 組換え体となっている。またサブタイプ B' は IDU の他、中国内陸部におけるプラズマ供血者におけるアウトブレイクの極めて強力なファウンダー株となっている」ことを明らかにした。

① 中国遼寧省における解析：中国におけるエイズ非(あるいは低)流行地の代表として遼寧省(東北部)に流布する HIV-1 株の解析を行い、この地域に流布するウイルス株が、雲南省などとは全く異なり、感染経路毎に異なるファウンダー株が流行を形作っていることを明らかにした。性感染ルートでは CRF01_AE とサブタイプ B' ; 注射薬物乱用者 (IDU) では CRF07_BC および CRF08_BC ; プラズマ供血者ではサブタイプ B' が強いファウンダー効果をもっているという際立った特徴をもつことが判明した。

① HIV-1 組換えにおけるサブタイプ C LTR の生物学的優位性の発見：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、LTR 領域はほとんど総べての例でサブタイプ C であるにもかかわらず、組換えの最初期過程に関与する2量体形成開始配列(Dimerization inducing sequence)は、サブタイプ B' と C の両者が使われていることから、組換えウイルスが淘汰・選択される過程で、サブタイプ C LTR を獲得したウイルスが他のものに対して何らかの生物学的優位性をもっていたことを示す最初の直接的な証拠を見出した。

① CRF07_BC と CRF01_AE 間の新しいタイプの第2世代組換えウイルス(inter-CRF recombinant)の同定：全塩基配列を決定した結果、ミャンマー-URF の中に、中国に起源をもつ CRF07_BC とタイに起源をもつ CRF01_AE 間の新規組換えウイルスを疫学的関連性のないミャンマー(首都ヤンゴン)の3名の STD 患者から同定した。これは我が国研究機関から発信される最初の CRF 発見例となる可能性がある。

(柱 II)「コホート研究」

① ジェネリック抗 HIV 薬「GPOvir」のインパクト評価：

2001 年上半期から 2002 年下半期まで、7～9% (Death/100Person-Years) あった死亡率が 2003 年上半期から 2004 年上半期にかけて、4.8%→3.3%→1.3%と GPO 薬治療開始した累積患者数に反比例して、死亡率が急激に減少している

② 宿主遺伝子多型研究：

HIV の感染初期群をより多く含む女性群に絞って解析した場合、宿主遺伝子多型と自然経過がより鮮明に現れることが判明した。IL4-589T アリールと低ウイルス量・高 CD4 値との相関に加え、RANTES-28G アリールにおいても、低ウイルス量・高 CD4 値ならびにより良好な生存率との関連が判明した。また HIV 非伝播関連遺伝子の候補として DC-SIGNR が見つかった。

(注 III)「アジア型 HIV ヴァリアントに関する基盤的研究資源の整備・開発」

①アジア株に中国における重要な流行株である CRF07_BC およびサブタイプ B の感染性分子クローンの分離はじめて成功した。

①アジア型 HIV-1 ヴァリアント間の組換えの *in vitro* アッセイのために薬剤耐性マーカーあるいはカラー・タグを導入した HIV-1 感染性分子クローンの構築が進んだ。

4. 考察

(注 I)「分子疫学研究」

① HIV-1 の遺伝子組換えには塩基配列上の要因と組換えによって生成したウイルスのもつ *viral fitness*, 免疫学的応答など *disadvantage* をもつ組換え体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。サブタイプ C LTR の優位性の発見は、組換えウイルスにかかっている生物学的な選択圧の内容を具体的に示す重要な研究成果と考えられる。

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。

①またこのようにして生まれた URF の中から現在の中国流行の担い手である CRF07 と CRF08_BC の共通祖先が生まれたと推定される。

①CRF07_BC と CRF01_AE 間の新型組換えウイルス (ICR0701) の発見は、ミャンマーと中国の流行の密接な相互関係を証拠づける新たな知見である。

①我が国において重感染例や組換えウイルス感染例を比較的高頻度(4/58)で見出したことは、我が国における HIV 感染症の新しい動向を示すものと考えられる。

(注 II)「コホート研究」

①本コホートは、抗 HIV 薬剤治療が開始される以前から継続的に患者死亡率を追跡していた故に、コホート開始後より徐々に普及した抗 HIV 薬剤治療が、北タイにおける市中病院 HIV 外来を受診するエイズ患者の生存にどのようなインパクトがあったのか、克明に記録する機会となった。

③HIV 非伝播関連遺伝子の候補として DC-SIGNR が見つかった点、ジェネリック薬剤耐性ウイルス簡便検出方法として M184V/IMS-PCR が開発された点が興味深い。

(注 III)「ウイルス学的研究」

アジアにおける爆発的流行の原因となっている CRF07_BC およびサブタイプ B の2種の感染性分子クローンが1昨年樹立された CRF07_BC について確立されたことは、今後のとりわけ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。またこれらの感染性クローンが我が国独自の *in vitro* の組換え評価系の開発の基盤的素材として役立っている。

5. 自己評価

1) 達成度について

①CRF07 と CRF01 間の新規組み換えウイルスは、先にわれわれが同定した CRF07 と CRF08 間の第2世代組み換えウイルスについて、世界で第2番目のもので、と同時に我が国の研究機関が報告する最初の CRF となる可能性があること。また、このタイプのウイルスの同定によって示されるように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証明、アジアの流行を担う重要なウイルス株の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したい。

②コホート維持・検体・データ集積は順調に進行している。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する。

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を究明する取組みは、アジアまた我が国を含む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・国際的意義は極めて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、我が国における 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。

③また、基礎研究面ではとりわけ、組換えの際のサブタイプ C 型 LTR の生物学的優位性の発見は、今後の基礎研究の展開の糸口になる重要な知見でありその学術的意義は大きいと考えられる。

④本研究班の研究活動は、アジアをフィールドとし、またアジアにおける流行株を研究の軸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と考えられる。継続している研究サイトに加え、アジアにおいて新たな感染爆発が懸念されている地域(特にインドネシア、マレーシアなど)への研究の拡大を計画したいと考える。また本年度の予備的解析結果を手掛かりとして、我が国における HIV 感染症の分子疫学的解析を本格化したいと考える。

①また中国、ミャンマーは新規組換えウイルスの宝庫であり、遺伝子組換えの AIDS pathogenesis に果たす意義を解明する上で、独自性の高い研究を展開できる可能性があり、継続的な解析が必要と考える。

①アジア型 HIV-1 株の塩基配列情報の蓄積また感染性分子クローンの樹立は、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考える。

①コホートに関しては、薬剤治療に関連した研究分野を発展させる予定である。例えば、CRF01_AE に特徴的な薬剤耐性変異の研究、抗 HIV 薬剤治療に伴う副作用に関連したホスト遺伝子因子の研究、B 型および C 型肝炎ウイルス感染など HIV との重複感染の問題、などである。

6. 結論

①これまでの継続的な研究の effort によって、東南・東アジア地域、とりわけ巨大流行の危機にある中国の流行の形成のメカニズムに関して解明が進んだ。また我が国の HIV 感染症の最新動向に関する解析の準備が整いつつある。

②アジア型 HIV-1 ヴァリアントに関する基礎研究・ワクチン開発などに資する基盤的研究資源の開発整備が進んだ。

③北タイランパン病院 HIV コホートは、成功裏に維持・発展しており、同コホートから得られた臨床情報・検体は、臨床的研究のみならず、宿主遺伝子研究・免疫研究・ウイルス研究など基礎医学の発展に大変有意義と考える。

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の重要な礎となるものと期待される。

7. 知的所有権の出願・取得状況 (2004-2005) (準備中を含む)

(主任研究者: 武部)

1. 「高度のゲノム多様性をもつ病原性微生物に対する機能性オリゴヌクレオチドの設計アルゴリズムと高い有効性と汎用性をもつ HIV-1 オリゴヌクレオチド塩基配列」(共同出願準備中)

2. 「世界流行フィールド株増殖可能 HIV ゲノム」(出願準備中)

3. 「弱毒型 HIV-1 塩基配列」(特願 2005-08741、平成 17 年 1 月 17 日出願) (神奈川衛研 今井・近藤博士と共同出願)

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（愛知県食品衛生センター 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 などの非 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、世界でも最も HIV の流行が懸念されているアジア・アフリカの途上国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 対策に重要な基礎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、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、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。さらに耐性に関与していると思われる変異について、recombinant virus を作成し、これら変異部位が実際に耐性を獲得しているのか、また、獲得しているとしたらどの薬剤に耐性をもっているのかを解析する。

（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「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針（平成13年3月文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）」、疫学研究に関する倫理指針（平成14年文部科学省・厚生労働省告示第2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、個人情報等は全て現地側共同研究者の管理とする。可能な場合は、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

本研究事業による初年度の成果として、治療に対し抵抗性を示したインドのサブタイプ C の症例において、逆転写酵素領域で従来のサブタイプ B にはみられない T69N, L74L, V106M, H208Y および K219E/Q の変異がみられたことを報告した。

今回、Pol 領域が解析できた156例の感染者のなかで、新たに、逆転写酵素領域において、Y69S/P/L がサブタイ

ブAとDに3例、V106IがサブタイプAEに2例、Y115GとY181DがサブタイプAに、K103S、V118C、L210SがサブタイプCにみられた(サブタイプBではそれぞれ、T69D、V106A/M、Y115F、Y181C/L、K103N、V118I、L210W)。また、プロテアーゼ領域において、V82IがサブタイプCとDに3例みられた(サブタイプBではV82A/F/T/S/L)。さらに、ケニアにおいて収集された治療経過中のHIV感染者17例について現在解析中である。

3. 考察

治療に対し抵抗性を示したインドのサブタイプCの症例においてみられた逆転写酵素領域の変異のうち、V106MはBrennerらによって、サブタイプCにおいて、NNRTIに対して交叉耐性を示すという報告がみられており(AIDS, 17(1):F1-5, 2003 Jan 3)、他の種々の変異についても、それぞれのサブタイプに特徴的な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B以外の症例を重ねるとともに、これらの変異が非サブタイプBにみられる特徴的な耐性関連変異であるか、最終年度である次年度において、recombinant virusを用いてphenotypeを詳細に検討したい。

5. 自己評価

1) 達成度について

アジア、アフリカの途上国において抗エイズ薬による積極的な治療は開始されてまだ日も浅く、さらにそれらを行なっている施設も症例も限られている中で、初年度は金沢大学の市村宏博士とコロンビア大学の稲田頼太郎博士の協力でケニアの検体を多く得る事が出来た。現在なお解析中のものがあり、さらにインドにおいても症例を重ねているが、初年度にも増して、従来報告されているサブタイプBにはみられない薬剤耐性に関連していると思われる変異が種々多くみられており、今後もアジア、アフリカの途上国の研究所、医療機関との協力体制を維持しつつ、調査、解析を進めていきたい。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

今回の本研究事業による解析の結果、従来のサブタイプBにはみられない薬剤耐性に関連していると思われる変異が種々多くみられており、しかも途上国において年々急増の傾向にあることがわかった。地球上で広く流行している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エイズ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のデーター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、これらの国々において積極的に抗エイズ治療を行なっていく上で極めて有益な事と思われる。

3) 今後の展望について

従来のサブタイプBにはみられない薬剤耐性に関連していると思われる変異も含めると、ケニアにおいては2002年においては耐性変異は63例中わずか2例(3%)であったものが、2003年には5/59(8%)、2004年には5/34(15%)と年々急増している。これらの変異も非サブタイプBにみられる耐性関連変異であるかを確認する事が極めて重要であり、次年度の優先課題としたい。また、政府の経済的支援の下で抗エイズ薬による積極的な治療が始まった中国においても、江蘇省南京市のCDC(Center of Disease and Control)と共同研究を行なう事となり、さらに広くデーターの収集と解析が可能となった。

6. 結論

初年度報告したサブタイプBにはみられない耐性に関連していると思われる変異に加えて、今回、Pol領域が解析できた156例のうち、新たに、逆転写酵素領域において、Y69S/P/LがサブタイプAとDに3例、V106IがサブタイプAEに2例、Y115GとY181DがサブタイプAに、K103S、V118C、L210SがサブタイプCにみられた。また、プロテアーゼ領域において、V82IがサブタイプCとDに3例みられ、これらの変異が年々急増している事実が判明した。

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前室長）、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 研究部部长）、小野崎郁史（ちば県民健康予防財団 部長）

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 問題の実態把握を通じ、一時的な緊急政策ではなく、人間の安全保障を目的とした長期的な国家戦略としての「危機管理」論を基盤にし、国際人口移動と HIV/結核対策に関する政策提言を追求している。

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：わが国における来日外国人の HIV/AIDS 発生動向に関する理論的理解を提供する目的で、東南アジア地域 6 カ国を選定し以下の要領で数理生態学的研究を実施した。1.1 来日外国人の時点滞在者数推定：法務省による出入国管理統計資料を用いて、年次別の時点滞在者数を出身国別に時系列で推定した。1.2 出身国の時系列 AIDS 患者数（報告数）から逆計算法を利用して東南アジア各国の HIV 有病率を推定した。1.3 厚生労働省エイズ発生動向調査委員会に基づく外国人 HIV 感染者数を年次別に得た。1.4 1.1 および 1.2 において得られた推定から入国年次別の感染割合が静的であるという想定の下、来日外国人中の HIV 有病率を推定し、それと 1.3 の間における生態学的相関関係を分析した。それを通じて、考え得る流行抑止策、倫理的問題、統計学的・技術的欠陥の除去に関する方法論的問題を検討した。1.5 日本における結核問題とリンクしたエイズ対策について検討するため、首都圏の結核患者に対する HIV 抗体検査の現状把握を行った。

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地域での、エイズと結核コホートを活用した治療脱落率・薬剤耐性頻度の国籍比較を行った。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 感染率調査と分子疫学分析により国境地域の問題を分析している。2.3 中国に関して、人口移動と HIV 感染の関係を検討している。2.4 旧島尾班の成果であるジェンダー分析の応用をした。2.5 近隣 HIV 蔓延国への日本人渡航者の HIV 感染リスクの検討をしている。

3. 政策分析と提言：3.1 重症急性呼吸器症候群 (SARS) に対する「危機管理政策」との比較を行った。3.2 他地域（西ヨーロッパなど）の移民におけるエイズ等感染症に対する政策の分析を行った。3.3 日本の現状を踏まえた、HIV 等感染症の国際人口移動に関連した危機管理としての政策提言を試みる。

（倫理面への配慮）

研究は現地政府と倫理委員会の許可の下で行われ、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。

3. 研究結果（平成 16 年度まで）

1.1-1.4 によって、対象とする東南アジア 6 カ国について、HIV 感染新規登録数と推定滞在者数および推定感染者数について時系列レベルの相関関係が示された。わが国での対象者中の HIV 感染症報告数に対して、東南アジア対象国出身者のうちの時点滞在者数 ($R^2 = 0.28$)、およびそれらの間における推定された HIV 感染者数 ($R^2 = 0.60$) の両方に関して単変量回帰分析から生態学的相関関係を認めた。また、東南アジア諸国を出身とする外国人の出入国の動向、およびそれと同時に背景因子としての各国における HIV 感染症流行状況が、わが国での来日外国人中における HIV 感染症報告数に影響を与える主要因として同定された。1.5 に関しては、検査前後の説明は HIV 抗体陰性の場合には日本人、外国人を問わず十分とはいえず、担当する医師の負担も大きいことが判明した。

2.1 では、近隣諸国より国境を越えてタイ国の病院に結核治療に来る患者が HIV 感染陽性結核（感染率はタイ人と同等）も含めて増加しているが、53.9%(193/358) と高い治療脱落率が示された。同地域のタイ人では、抗結核薬主要 2 剤に対する薬剤耐性頻度は低下して 2% 台であるが、この群では 6.4%(13/202) と高かった。

2.2 では、2002 年では 2,270 症例で 2,240 (97.8%) の患者より血清が採取され、HIV 陽性率は 11.8% であったが、同様に 2005 年 1 月のカンボジア全国の新規登録結核患者を現在、登録して血漿を収集中である。

3 では、HIV に対しては SARS 対策とは異なる長期的な「危機管理対策」が必要であることが示唆された。

また、西ヨーロッパの政策分析より、HIV に対しては地域的な取り組み（Euro-HIV という共同のサーベイランスや人口移動問題にも対応した共同政策）が効果的であり、またそれを可能にしているのは EU を基盤とした組織構造と、コミュニティとしての協力認識があるためと考えられた。また、この地域政策はオランダを拠点にしている AIDS & Mobility という専門家のネットワークの効率的な関与によって方向性と一貫性が維持されていることが観察された。

4. 考察

1.1-1.4 にて、これまでに人口移動を考察したわが国の来日外国人中における HIV/AIDS 発生動向に関する決定要因は記述的考察などによる検討が多くを占めており定量的検討が充分でなかった。本研究は数理生態学的な考察を施すことによって、少なくとも来日外国人中における HIV/AIDS の発生動向と人口移動の関係の第 1 過程を提示することができた。不報告等の問題を含めて解釈を慎重にする為、来日外国人の HIV 及び結核に対する脆弱性も認められたので、タイ人コミュニティにおける事例研究を現場の協力を得ながら進めている。

2 では、「結核を入り口」にして「移動人口」と HIV 感染症という課題にチャレンジしている。国境地域の定点等は現時点では疫学的観測に使っているが、国籍や人種等の人口移動等の情報をより深く分析し、移動人口に対してエイズ対策を講じた場合の評価指標として用いる。タイ国チェンライ県の国境の病院、カンボジア TB/HIV サーベイランスで採取した HIV 陽性結核患者の血漿は凍結保存をしているので、他の研究班との連携により、HIV 初回薬剤耐性頻度推定や HIV 分子疫学に発展させられる。

3. では、ヨーロッパの経験がいかに関日本や多種多様の文化や歴史を抱えるアジアにおいて応用性があるのかという課題が浮き彫りにされたが、国際間人口移動と HIV 伝播の問題に取り組むアジアの専門家ネットワークの構築からその可能性を検討している。

5. 自己評価

1) 達成度について

一昨年度までの島尾班の研究基盤を活用し進めている。昨年までの成果は、バンコクで行われた第 15 回国際エイズ会議にて、本研究班より各テーマを網羅する 13 演題を発表すると共に、WHO の TB/HIV Working Group と共同でシンポジウムを開催した。これまでに学会発表をしてきた研究について論文投稿がなされている。

研究方法に記載した 3 年間全体の計画項目の研究は順次進行しており、最終年度にはこれまでの研究で得られた疫学的根拠を活用した政策提言に力を入れたい。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

本研究は、結核対策の経験を生かして国際人口移動に対応した HIV 感染症対策に貢献する。移動人口は、HIV 感染症流行に寄与しているとされながらも調査が難しい集団であり、人口移動に関する定量的調査を行った点で、学術的に意義があると言えよう。研究成果は、国内・国際会議にて積極的に発表を行っている。また、国際的意義としては、研究成果をアジア諸国の HIV 政策に還元できること、研究協力機関での人材育成にも貢献できること等があげられる。社会的には、今後の政策提言の実践（“3）今後の展望について”にて後述）を通じて、日本およびアジアの HIV 感染症対策に貢献できることを期待している。

3) 今後の展望について

研究班 3 年目の計画としては、在日タイ人コミュニティでの調査研究を、医療支援者との協力のもとで進める。また、現行のアジア諸国での国境問題に関しての疫学調査結果の分析・考察を進め、アジアおよび日本の HIV 感染症政策に還元することを目指す。

研究計画の 2.5 に述べた日本人旅行者の HIV 感染リスクの問題については、調査を進め、本研究班での研究の蓄積したアジアでのエイズ状況の把握も活用し、アジアにいる日本人や日本企業に向けて、10 年前にエイズ予防財団から配られたエイズ対策のガイドラインの改訂を検討している。

日本を含むアジアの文化は多様であり、地域協力の枠組みでいかにアジアにおける国際人口移動と HIV 伝播に取り組むかは難しい問題であるが、今年の神戸での第 7 回アジア太平洋エイズ会議やアジア地域エイズ国際研修を活用して、アジアに根付いた HIV 感染対策専門家のネットワークの形成に貢献したい。

6. 結論

HIV や結核等の感染症の蔓延には、国際人口移動の関与が深く、その状況を出来るだけ正しく把握することが有効な危機管理につながると考えられるが、本研究はそのためのいくつかの貴重な資料を提供し、最終年度に行う政策提言への足がかりを作った。

7. 知的所有権の出願・所得状況（予定を含む）

特になし