

厚生労働科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

# アジア・太平洋沿岸地域における HIV 感染症の疫学に関する研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者

武 部 豊

平成17（2005）年3月

# 厚生労働科学研究費補助金研究報告書目次

## I. 総括研究報告書

- 武部 豊 -1-  
「アジア及び太平洋沿岸地域における HIV 感染症の疫学に  
関する研究」

## II. 分担研究報告書

- 武部 豊 -7-  
「ミャンマーおよび中国における流行形成メカニズムに関する  
分子疫学的解析」

- 有吉 紅也 -12-  
「北タイにおける HIV 感染者および配偶者コホートの維持と  
基礎医学研究への応用」

- 草川 茂 -19-  
「HIV-1 サブタイプ B' 感染性分子クローンの樹立とその  
性状の解析」

- 椎野禎一郎 -23-  
「タイ型 HIV-1 ヴァリアント CRF01\_AE の高度薬剤耐性変異に  
関する分子進化学的解析とそれを用いたレトロウイルス  
組換え解析系の開発の試み」

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -27-

## IV. 研究成果の刊行物・別刷り -29-

# 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）  
H16 総括報告書

研究課題：アジア及び大太平洋沿岸地域におけるHIV感染症の疫学に関する研究

課題番号： H15-エイズ-019

主任研究者：所属施設 国立感染症研究所エイズ研究センター 武部 豊

分担研究者：所属施設 国立感染症研究所エイズ研究センター 有吉 紅也

草川 茂・椎野禎一郎

(同エイズ研究センター 主任研究官)

#### 研究要旨

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

#### (I) 「アジアにおける HIV 流行の分子疫学」

①これまでの研究によって、ミャンマーおよび隣接する雲南省西部に、多様な組換えウイルスが新生する世界的にも類例のないユニークなホットスポットが存在することを見出したが、今年度、数十におよぶ組換えウイルス株候補から、CRF01\_AE と中国に由来する CRF07\_BC の間の新型組換えウイルスを疫学的に関連性のないミャンマーの3個体から発見した。この知見は中国・ミャンマー両地域の流行が密接不可分の関係があることを示す新たな証拠となるだけでなく、我が国の研究機関が同定・発信する最初の CRF となる可能性が期待される。

②我が国における感染者・患者報告数が昨年度はじめて 1000 名の大台を越えるなど、感染者の増加傾向がさらに加速している。このような動向を反映して、国内症例でははじめて、異なる系統の HIV-1 株間の共感染例や新型組み換えウイルスを見出した。これらの知見は、我が国における HIV 感染症が公衆衛生上予断を許さないフェーズに入りつつある事を暗示するものと考えられる。

#### (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」

2000 年 7 月に始まったランパン県病院エイズ専門外来受診患者およびその配偶者を対象としたコホートは 2004 年 9 月までに参加総人数は 1,540 名に至った。内訳は、HIV 感染者 1,385 人、HIV 感染者を配偶者にもつ抗 HIV 抗体陰性配偶者 155 名であった。この中に 185 組の双方が HIV に感染した夫婦および 116 組の片方のみが HIV に感染した夫婦 (discordance case) が含まれている。これまで感染者で死亡が確認されたのは 310 名、追跡中に抗 HIV 抗体が陽転化した配偶者は 6 名であった。このコホートに基づいて

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ことを確認した。

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を見出した。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 が見出すなどの成果を得た。

#### (III) 「アジア型 HIV-1 ヴァリアントに関するウイルス学的研究」

アジア型ウイルスの解析試薬として重要な意義をもつ感染性分子クローンの完全なセットの樹立を目指しているが、本年度あらたに、中国における流行に極めて重要な役割を果たしていることが明らかになり、その重要性が再認識されている HIV-1 subtype B' の感染性分子クローン樹立に成功した。また HIV-1 の in vitro 組み換えメカニズムの解析のための実験系の開発が進行した。

これらの成果は、アジアと日本における HIV 感染症の将来動向の把握に加え、アジアの流行の成立、流行拡大の背景にある宿主側・ウイルス側の要因の解明に重要な意義があると考えられる。

## A. 研究目的とその背景

これまでタイ、インドを中心とする南・東南アジア地域が主体であったアジアにおけるエイズ流行は現在重要な転換期を迎えつつある。特に中国ではUNAIDSが「Titanic Peril—迫り来る巨大危機」と形容される極めて憂慮すべきエイズ流行が進行しつつあるなど、アジアにおいてさらに深刻なエイズ危機の到来が危惧される。

このような状況を背景として、本研究班は、アジアにおける流行形成のメカニズムに関する分子疫学的研究とタイにおけるコホート研究、アジア型 HIV-1 ヴァリアントに関するウイルス学的研究を主要な柱として研究を推進し、我が国およびアジアでの流行動向・将来動向を探ると共に、アジアにおける流行制圧と予防に向けた研究の「科学的基盤」の構築を目指すものである(図2)。

### (柱 I)「アジアにおけるエイズ流行の分子疫学」

(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・遺伝学的研究を進める。

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

アジアの流行の中で、重要性が急速に増しつつある中国型 HIV-1 variants の感染性分子クローンの分離などアジアに特徴的な HIV 流行株に関するウイルス学的解析を進め、将来のワクチン開発の基盤整備を進める(草川班員)。また HIV のゲノム多様性拡大の重要な動因である組換え機構の解析のための *in vitro* 評価系の開発を目指す(椎野班員)。

## B. 研究方法

### (柱 I)「分子疫学研究」(武部班員)

① アジア各地域(中国雲南省、ミャンマー、タイなど)および我が国の感染者血液から、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。

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。

### (柱 II)「コホート研究」(有吉班員)

①ランパン県病院 HIV 専門外来にて、同外来受診者全員を対象にリクルートし、特に HIV 感染した夫婦は、3ヶ月毎追跡、6ヶ月毎に血液検体分離・保存、患者情報のコンピューター二重入力、検証を行った。②コホート検体を用いて HIV 伝播・エイズ病態に関連する遺伝子領域における SNIP を PCR-RFLP により、また、HLA Class I アリールを PCR-MPH (Microtiter plate hybridization) 法により解析、患者データと比較検討した。

### (柱 III)「ウイルス学的研究」(草川・椎野班員)

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

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* 系の構築を行った。

### (倫理面への配慮)

研究はすべて *unlinked anonymous* の手法によって行われる。またアジア各国エイズ研究機関との共同研究に関しては各国政府所轄機関の指示する倫理規程に従って遂行された。本研究計画に関して国立感染症研究所倫理委員会からの承認を受けている。なお、タイ国におけるコホート研究は、1999年12月にタイ政府保健省医学研究倫理委員会にて協議され、2000年1月に承認済であり、すべてのコホート参加者から、サイン入り同意書が得られている。

## C. 研究結果

### (柱 I)「分子疫学研究」(武部班員)

① 中国とミャンマー流行の直接の相互関係を示す新しいタイプの組み換えウイルスの同定：

ミャンマーの首都ヤンゴンの STD 感染者40名の中から、塩基配列が決定された全長のウイルスゲノムの 5'領域が中国に起源をもつ CRF07\_BC、3'領域がタイに起源をもつ CRF01\_AE の間の新しいタイプの組換えウイルス 3 株を同定した。

この新種の組換えウイルスは、CRF 間の第2世代の組換えウイルス (Inter-CRF recombinant, ICR) としては、先に我々が中国雲南省東南部の IDU から分離した CRF07\_BC と CRF08\_BC の間の組換えウイルス (ICR\_0708) に次ぐ第2の例となった。

② 我が国における HIV-1 感染症の分子疫学の新動向：

1999-2003年に収集された我が国の HIV 感染者に関して遺伝子型分析を行った結果、日本人 (n=27) では、CRF01\_AE (12, 45%); subtype B (9, 34%); subtype B' (2, 7%); subtype C (2, 7%); サブタイプ不一致例 (2, 7%) であった。一方我が国在住の外国人 (n=25) では、CRF01\_AE (17, 68%); subtype B (3, 12%); subtype C (2, 8%); CRF02\_AG (1, 4%); サブタイプ不一致例 (2, 8%) であった。

サブタイプ不一致例 4 例はいずれもサブタイプ B と CRF01\_AE の間のもので、少なくともそのうち2例は塩基配列が決定された連続した領域内に組み換え点が同定され、新しいタイプの組み換えウイルスであることが証明された。これらは、我が国において新しいタイプの組み換えウイルスが同定された最初の例と考えられる。

### (柱 II)「コホート研究」(有吉班員)

#### ①ランパン県病院 HIV コホートの維持

2000年7月より2004年9月までに参加した総人数は1,374名に至った。内訳は、HIV 感染者1,219人、HIV 感染者を配偶者にもつ抗 HIV 抗体陰性配偶者155名であった。この中に185組の双方が HIV に感染した夫婦および114組の片方のみが HIV に感染した夫婦が含まれている。

## ②宿主遺伝子多型研究

本年は、昨年引き続き宿主遺伝子多型の感染者生命予後に関する解析が進んだ。その結果、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、宿主遺伝子多型と死亡をエンドポイントとする自然経過との間の相関がより鮮明に現れることが判明した。本年度は、昨年報告した 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 値ならびに生存率との関連が判明した。

抗 HIV 抗体陰性配偶者と相関のある宿主遺伝子の中で DC-SIGN の関連遺伝子である DC-SIGNR (dendritic cell specific ICAM-grabbing non-integrin related, CD209L) は、DC-SIGN 同様に gp120 糖タンパクに親和性があり、HIV の T リンパ細胞感染を促進するトランスレセプターとして働くことがわかっているが、DC-SIGNR の宿主遺伝子多型である exon5 の SNP (IMS-JST 025121) が "A", exon 4 に見られる 69 塩基の VNTR(variable number of tandem repeat)が "5", あるいは "homozygous" である抗 HIV 抗体陰性女性配偶者が、HIV に感染した女性配偶者に比べ統計的に有意に多いことが判明した。(それぞれ  $p=0.034, 0.027, 0.0116$ )。

### (柱 III) 「ウイルス学的研究」 (草川・椎野班員)

① 先に確立した両側の LTR を含むベクターを用いた高効率の感染性 HIV-1 分子クローンの構築技術を用い、本年度あらたに中国の経血液ルートでの流行の重要な動因となっている HIV-1 subtype B' (subtype B のタイ型ヴァリエント) に関して非常に良好な複製能力を示す感染性分子クローンの作出に成功した。このクローンは CCR5 と CXCR4 の両者をコレセプターとして用いる X4R5 型であることを確認した。

② HIV-1 間の遺伝子組換えを検出するために、逆転写酵素遺伝子のフィンガーとパームドメイン間の約 400 ヌクレオチドの領域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導入した CRF01\_AE をベースとする遺伝子組換え評価系が完成した。この系では逆転写酵素遺伝子内の上記の 2 ドメイン間の組み換えによって高度の薬剤耐性が発現するよう工夫されている。

## D. 考察

### (柱 I) 「分子疫学研究」 (武部班員)

① ミャンマーで発見された新規組み換えウイルス (ICR\_0701) に関して：組換えウイルスの検出された 3 人の感染者は相互に直接的な疫学的関連性のない (Epidemiologically-unlinked) と考えられる症例である。また独立の 3 株のウイルスゲノムの全塩基配列が決定されていることから、新たな組換え型流行株 (circulating recombinant form, CRF) としての資格を備えており、我が国の研究機関から報告される最初の CRF となることが期待される。

② 我が国における重感染例・新規組み換えウイルス感染例に関して：国内症例 58 例の中から同定されたサブタイプ不一致例 (discordant subtype) 4 例のうち少なくとも 2 例は CRF01 と欧米型のサブタイプ B 間の組換えウイルス株の感染者であることが確認されたが、一方、近年東南アジア地域で見出されているものは、CRF01 と東南アジア特有のサブタイプ B' との組み合わせである。このことは、今回同定された組み換えウイルスが国内で生まれたものである可能性を強く示唆するものである。さらにまた、このことは様々なタイプのウイルスに感染する危険性のある (性) 行動をしている集団の存在を推測させる事実であると言えよう。

### (柱 II) 「コホート研究」 (有吉班員)

① ランパン病院コホートは順調に進行し維持されてきたが、

2004 年中頃までに CD4 値 200/ul 以下の患者にはほぼ全員、抗 HIV 薬剤治療が開始された。この結果、予想通りコホート患者の生命予後は劇的に改善され、本コホート研究から HIV 感染の自然経過を追跡するという当初の目的は遂行できなくなった。逆に言えば、2000 年から抗 HIV 薬剤治療が普及した 2003 年までが、自然経過を観察する最後の機会であったと言える。一方、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 2 年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ことも事実である。

② ランパンコホートは、タイ政府系病院 HIV 外来へ受診する感染者およびその配偶者全員を対象にした標本抽出方法が明確なコホートである。また地方病院で実施されたことから大都会の病院コホートに比べ、個々の患者の属するコミュニティに近く、患者追跡率が非常に高く維持されている。さらに、コホート参加者の社会的背景、性行動、薬剤服用行動、臨床像に関する包括的な情報が収集されているのに加え、すべての参加者から検体が採取・保存されており、これらの患者の背景情報と基礎医学研究から得られた宿主遺伝子多型、免疫反応、ウイルス等に関する様々なデータを連携した解析を可能にした。本年度も順調に基礎医学研究と連携させた研究成果につながった。特に、HIV 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、長期生存者に見つかった特徴的組換えウイルスは、興味深い。

### (柱 III) 「ウイルス学的研究」 (草川・椎野班員)

タイやミャンマーで注射薬物乱用者の間に発見されたものであるが、最近中国における注射薬物乱用者の間の爆発的流行にだけでなく中国内陸部の供血者の間に起った悲劇的アウトブレイクの原因ウイルスとして重要性が再認識されている HIV-1 サブタイプ B' ヴァリエントの感染性分子クローンは確立されたことは、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基盤的研究ツールを開発する上で重要な一歩となると期待される。また、HIV-1 組換え現象を現実のフィールド株をベースにして解析するシステムの構築のために重要な役割を果たす可能性が期待される。

## E. 結論

① これまでの継続的な研究の effort によって、東南・東アジア地域の形成のメカニズムに関して解明が進んだ。今年度は特にミャンマーにおいて中国での流行の直接的な関連性を示す第 2 世代の組み換えウイルス (ICR\_0701) を発見し、両地域の流行が密接不可分の関係にあることを示した。

② 感染者・患者報告数が急ピッチで増加しはじめている我が国の HIV 感染症を探るため分子疫学的解析を進めた。その結果、国内ではじめて重感染 (あるいはスーパー感染) 例および新しいタイプの組換えウイルス感染例を見出した。これらの知見は我が国における HIV 感染症が公衆衛生上予断を許さない危険なフェーズに入りつつあることを徴候の一つと考えられる。

③ アジア型 HIV-1 ヴァリエ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。

④ 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、さらに現地のタイ人研究者の育成に貢献した。

## F. 健康危険情報

本年度、当班よりの報告はありません。

## G 研究発表

### 論文発表

(欧文)

主任研究者 (武部 豊)

1. Takamura, S., Niikura, M., Li, T.-C., Takeda, N., Kusagawa, S., Takebe, Y., Miyamura, T., and Yasutomi, Y. (2004). DNA vaccine-encapsulated virus-like particles derived from an orally transmissible virus stimulates mucosal and systemic immune responses by oral administration. *Gene Ther.* 11: 628-635.
2. Takebe, Y., Kusagawa, S., and Motomura, K. (2004). Molecular epidemiology of HIV: Tracking AIDS Pandemic. *Pediatrics International* 46: 236-244.
3. Takebe, Y., Kusagawa, S., Yokota, Y., Ma, Y., Yang, C., Li, X., Hoshina, Y., Wang, Q., Li, X., Imamura, Y., Uehara, R., Motomura, K., Yang, R., Shiino, T., Xia, X., Ben, K., Thwe, M., Aung, T., Aye, K. T., Oo, K. Y., and Lwin, H. H. (2004). Geographical hotspots of extensive intersubtype recombination in Asia: "Melting pot" that generates diverse forms of HIV-1 unique recombinants. *Proceeding of XV International AIDS Conference (Bangkok, Thailand)*. pp. 35-38. Medimond. Italy.
4. Kusagawa, S., Yang, R., and Takebe, Y. (2004). Isolation and biological characterization of an infectious molecular clone of HIV-1 CRF08\_BC from China. *Proceeding of XV International AIDS Conference (Bangkok, Thailand)*. pp. 39-42. Medimond. Italy.
5. Hidaka, C., Norose, Y., Nakagawa, Y., Shimizu, M., Takahashi, M., Ohwaki, A., Nohtomi, K., Toda, M., Kusagawa, S., Sakaguchi, M., Kudo, S., Takebe, Y., and Takahashi, H. (2004). Dermal dendritic cells sensitized with plasmid DNA encoding immunostimulatory sequence by gene gun efficiently prime murine HIV-1 -specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *Biomedical Research* 25 (2): 83-91.
6. Kondo, M., Shima, T., Sudo, K., Nishizawa, M., Iwamuro, S., Okabe, T., Takebe, Y., Imai, M. (2005). Identification of attenuated HIV-1 CRF01\_AE variant associated with slow disease progression due to gross genetic alterations in the nef-LTR sequences. *J. Infl Dis.* (in press).

有吉班員

1. N Wichukchinda, T. Shiino, J. Srisawat, A. Rojanawiwat, P. Pathipvanich, P. Sawanpanyalert, K. Ariyoshi, W. Auwanit. Heterosexual Transmission of Novel CRF01\_AE and Subtype B Recombinant Forms of HIV-1 in Northern Thailand. *AIDS Research and Human Retroviruses* (in press).
2. A. Rojanawiwat, T. Miura, H. Thaisri, P. Pathipvanich, S. Umnajsirisuk, T. Koibuchi, S. Vongsheree, A. Iwamoto, K. Ariyoshi, P. Sawanpanyalert. Frequent Detection of Epstein-Barr Virus and Cytomegalovirus but not JC Virus DNA in Cerebrospinal Fluid from HIV-infected Patients in Northern Thailand. *Journal of Clinical Microbiology* (in press).
3. R. Kantor, D.A. Katzenstein, B. Efrom, A.P. Carvalho, B. Wynhoven, P. Cane, J. Clarke, S. Sirivichayakul, M.A. Soares, J. Snoeck, C. Pillay, H. Rudich, R. Rodrigues, A. Holguin, K. Ariyoshi, P. Weidle, M.B. Bouzas, P. Cahn, W. Sugiura, V. Soriano, L.F. Brigido, Z. Grossman, L. Morris, A.-M. Vandamme, A. Tanuri, P. Phanuphak, J. Weber, D. Pillay, P.R. Harrigan, R. Camacho, J.M. Schapiro, R.W. Shafer. Impact

of HIV-1 Subtype and antiretroviral therapy on protease and reverse transcriptase genotype: results of a global collaboration. *PLOS-Medicine* (in press).

4. Pathipvanich P, Rojanawiwat A, Ariyoshi K, Miura T, Pumpradit W, Wongchoosie S, Yingseree P, Warachit P, Sawanpanyalert P. Mortality analysis of HIV-1 infected patients for prioritizing antiretroviral drug therapy. *J Med Assoc Thai.* 87: 951-4, 2004
5. Alabi AS, Jaffar S, Ariyoshi K, Blanchard T, Schim van der Loeff M, Awasana AA, Corrah T, Sabally S, Sarge-Njie R, Cham-Jallow F, Jaye A, Berry N, Whittle H. Plasma viral load, Saeng-Aroon S, Wichukchinda N, Myint L, Pathipvanich P, Ariyoshi K, Rojanawiwat A, Matsuda M, Sawanpanyalert P, Sugiura W, Auwanit W. Study of Antiretroviral Drug-Resistant HIV-1 Genotypes in Northern Thailand: Role of Mutagenically Separated Polymerase Chain Reaction as a Tool for monitoring Zidovudine-Resistant HIV-1 in Resource-Limited Settings. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 36:1051-56, 2004.

草川班員

1. Takamura, S., Niikura, M., Li, T.-C., Takeda, N., Kusagawa, S., Takebe, Y., Miyamura, T., and Yasutomi, Y. (2004). DNA vaccine-encapsulated virus-like particles derived from an orally transmissible virus stimulates mucosal and systemic immune responses by oral administration. *Gene Ther.* 11: 628-635.
2. Takebe, Y., Kusagawa, S., and Motomura, K. (2004). Molecular epidemiology of HIV: Tracking AIDS Pandemic. *Pediatrics International* 46: 236-244.
3. Takebe, Y., Kusagawa, S., Yokota, Y., Ma, Y., Yang, C., Li, X., Hoshina, Y., Wang, Q., Li, X., Imamura, Y., Uehara, R., Motomura, K., Yang, R., Shiino, T., Xia, X., Ben, K., Thwe, M., Aung, T., Aye, K. T., Oo, K. Y., and Lwin, H. H. (2004). Geographical hotspots of extensive intersubtype recombination in Asia: "Melting pot" that generates diverse forms of HIV-1 unique recombinants. *Proceeding of XV International AIDS Conference (Bangkok, Thailand)*. pp. 35-38. Medimond. Italy.
4. Kusagawa, S., Yang, R., and Takebe, Y. (2004). Isolation and biological characterization of an infectious molecular clone of HIV-1 CRF08\_BC from China. *Proceeding of XV International AIDS Conference (Bangkok, Thailand)*. pp. 39-42. Medimond. Italy.
5. Hidaka, C., Norose, Y., Nakagawa, Y., Shimizu, M., Takahashi, M., Ohwaki, A., Nohtomi, K., Toda, M., Kusagawa, S., Sakaguchi, M., Kudo, S., Takebe, Y., and Takahashi, H. (2004). Dermal dendritic cells sensitized with plasmid DNA encoding immunostimulatory sequence by gene gun efficiently prime murine HIV-1 -specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *Biomedical Research* 25 (2): 83-91.

(和文論文・総説)

武部班員 (主任研究者)

1. 武部 豊 (2004). アジアの HIV・エイズ最前線 Vol. 1 ① 中国 (インタビュー記事). *AIDS Report* 63: pp. 6. (厚生労働省エイズストップ作戦本部監修, エイズ予防財団編集) 中央法規出版. 東京.
2. 武部 豊 (2004). トピックス「HIV サブタイプの最新分類とその世界分布」. 病原微生物検出情報 *Infectious Agents Surveillance Report (IASR)* [<http://idsc.nih.gov/jp/iasr/index-j.html>].
3. 武部 豊 (2004). 「第 11 回国際レトロウイルス・日和見感染症会議—Oversea congress report」 「Confronting

- HIV 2004」 26: McCann Healthcare Publishing (2004).
4. 武部 豊 (2004). (分担執筆) ヒト後天性免疫不全症候群(エイズ)「感染症の事典」朝倉書店. 東京. (in press).
  5. 武部 豊. 「HIV の特徴」特集「子どもの HIV 感染症の諸問題」小児内科 37 (3): 東京医学社. 東京 (2004). (in press).
  6. 武部 豊. (分担訳) 「ハリソン内科 第二版」HIV 感染症: エイズと関連疾患 (Anthony S. Fauci & H. Clifford Lane). メディカル・サイエンス・インターナショナル. 東京. (2004). (in press).
  7. 武部 豊 (2004). 「アジアにおける HIV 流行の分子疫学: 流行はいかにして形成されたか」 「Confronting HIV 2004」 26: McCann Healthcare Publishing (2004). (in press).

#### 有吉班員

- 1) 有吉紅也 「発展途上国における HIV・エイズ対策の現状と未来」科学 74: 949-953, 2004

#### 学会発表

##### 武部班員 (主任研究者)

1. Takebe, Y., Yokota, Y., Kusagawa, S., Imamura, Y., Uehara, R., Thwe, M. and Lwin, H. H. Precise mapping of recombination breakpoints of HIV-1 unique recombinant forms emerging in Myanmar: in vivo sequence preference for recombination. 11th International Workshop on HIV Dynamics & Evolution (April 29-May 2, 2004, Stockholm, Sweden).
2. Takebe, Y., Yang, R., Motomura, K., Hlat Htut Lwin, Min Thwe, Myint Zaw, Zhang, C., Xia, X., Ben, K., and Kusagawa, S. Molecular epidemiology of HIV in Yunnan-Myanmar border: Geographical hotspots that generate diverse forms of HIV-1 unique recombinant forms. (Oral presentation). 5th Japan-China International Congress of Virology (June 10, 2004, Osaka, Japan).
3. Kusagawa, S., Yang, R., and Takebe, Y. Isolation and Biological Characterization of a Replication-Competent Molecular Clone of Human immunodeficiency Virus Type 1 Circulating Recombinant Form 08\_BC. XIth International AIDS Conference (Oral presentation) (July 13, 2004, Bangkok, Thailand).
4. Shimizu, N., Tanaka, A., Que, A., Takebe, Y. and Hoshino, H. (2004). G protein-coupled receptors, CCR9B, D6, FML1 and XCR1, have capacity to mediate the CD4-dependent infection of HIV-1, HIV-2, and SIV as coreceptors. XIth International AIDS Conference (Poster presentation) (July 13, 2004, Bangkok, Thailand).
5. Takebe, Y., Yang, R., Motomura, K., Lwin, H. H., Thwe, M., Zaw, M., Zhang, C., Xia, X., Ben, K., and Kusagawa, S. Geographical hotspots of extensive intersubtype recombination in Asia: "Melting pot" that generate diverse types of HIV-1 unique recombinant forms. XIth International AIDS Conference (Oral presentation) (July 15, 2004, Bangkok, Thailand).

#### 草川班員

1. Takebe, Y., Yokota, Y., Kusagawa, S., Imamura, Y., Uehara, R., Thwe, M. and Lwin, H. H. Precise mapping of recombination breakpoints of HIV-1 unique recombinant forms emerging in Myanmar: in vivo sequence preference for recombination. 11th International Workshop on HIV Dynamics & Evolution (April 29-May 2, 2004, Stockholm, Sweden).
2. Takebe, Y., Yang, R., Motomura, K., Hlat Htut Lwin, Min Thwe, Myint Zaw, Zhang, C., Xia, X., Ben, K., and Kusagawa, S. Molecular epidemiology of HIV in Yunnan-Myanmar border: Geographical hotspots that generate diverse forms of HIV-1 unique recombinant forms. (Oral presentation). 5th Japan-China International Congress of Virology (June 10, 2004, Osaka, Japan).
3. Kusagawa, S., Yang, R., and Takebe, Y. Isolation and Biological Characterization of a Replication-Competent Molecular Clone of Human immunodeficiency Virus Type 1 Circulating Recombinant Form 08\_BC. XIth International AIDS Conference (Oral presentation) (July 13, 2004, Bangkok, Thailand).
4. Takebe, Y., Yang, R., Motomura, K., Lwin, H. H., Thwe, M., Zaw, M., Zhang, C., Xia, X., Ben, K., and Kusagawa, S. Geographical hotspots of extensive intersubtype recombination in Asia: "Melting pot" that generate diverse types of HIV-1 unique recombinant forms. XIth International AIDS Conference (Oral presentation) (July 15, 2004, Bangkok, Thailand).

#### H 知的財産権の出願・登録状況

(主任研究者 武部 豊)

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抗 HIV-1 オリゴヌクレオチド塩基配列」 (特願 2005-55064, 2/28/05 出願; 東京大学理学部と共同出願)



# 分担研究報告書

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）  
平成 16 年度分担研究報告書

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

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

研究要旨 ①これまでの研究によって、ミャンマーおよび隣接する雲南省西部に、多様な組換えウイルスが新生する世界的にも類例のないユニークなホットスポットが存在することを見出したが、今年度、数十におよぶ組換えウイルス株候補から、CRF01\_AE と中国に由来する CRF07\_BC の間の新型組換えウイルスを疫学的に関連性のないミャンマーの3個体から発見した。この知見は中国・ミャンマー両地域の流行が密接不可分の関係があることを示す新たな証拠となるだけでなく、我が国の研究機関が同定・発信する最初の CRF となる可能性が期待される。

我が国における感染者・患者報告数が昨年度はじめて 1000 名の大台を越えるなど、感染者の増加傾向がさらに加速している。このような動向を反映して、国内症例でははじめて、異なる系統の HIV-1 株間の共感染例や新型組み換えウイルスを見出した。これらの知見は、我が国における HIV 感染症が公衆衛生上予断を許さないフェーズに入りつつある事を暗示する徴候の一つと考えられる。

#### A 研究の背景とその目的

これまでタイ、インドを中心とする南・東南アジア地域が主体であったアジアにおけるエイズ流行は現在重要な転換期を迎えつつある。特に中国では UNAIDS が「Titanic Peril—迫り来る巨大危機」と形容される極めて憂慮すべきエイズ流行が進行しつつあるなど、アジアにおいてさらに深刻なエイズ危機の到来が危惧される。

また我が国においても新規感染者・患者報告数が過去最高であった昨年度（2003 年）を 15% も上回るという急増傾向が示されている。

そこでわれわれはこのような流行動向の最近の変化の背景を解明するため分子疫学的解析を継続したいと考える。

#### B 研究方法

① 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った。

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。

（倫理面への配慮）

研究はすべて unlinked anonymous の手法によって行われた。研究方法による研究対象者に対する

不利益について充分の説明を加え、起こりえる危険性の排除に可能なかぎりの方策をとった。またアジア各国エイズ研究機関との共同研究に関しては各国政府所轄機関の指示する倫理規程に従って遂行されている。なお本研究計画は国立感染症研究所の医学研究に関する倫理委員会の承認を得ている。

#### C 研究結果

① 中国とミャンマー流行の直接の相互関係を示す新しいタイプの組み換えウイルスの同定：

ミャンマーの首都ヤンゴンの STD 感染者由来の 40 検体に関して、2.6-kb gag-RT 領域と env (C2/V3) 領域のサブタイプ帰属を決定した。その中に、gag-RT 領域が CRF07\_BC、env (C2/V3) 領域が CRF01\_AE に帰属される検体が 3 検体見いだされた。

HIV-1 全ゲノム配列を決定した結果、3 株いずれも pol 遺伝子 3'-末端部分に組換え点をもつ CRF07\_BC と CRF01\_AE 間の組換えウイルスであることが判明した。またこの 3 つのウイルス株は全く同一の組み換え構造をもつことが明らかになった（図 1）。

検体が同一の感染個体から由来するものでないことは、検体中のミトコンドリア DNA の D-ループ領域の塩基配列の検討によって検証された。

② 我が国における HIV-1 感染症の分子疫学解析：

1999-2003 年に収集された国内の HIV 感染者（n=68）に関して遺伝子型分析を行った結果、日本人（n=27）では、CRF01\_AE, (12, 45%); subtype B

(9, 34%); subtype B' (2, 7%); subtype C (2, 7%); サブタイプ不一致例 (2, 7%) であった。一方我が国在住の外国人 (n=25) では、CRF01\_AE (17, 68%); subtype B (3, 12%); subtype C (2, 8%); CRF02\_AG (1, 4%); サブタイプ不一致例 (2, 8%) であった (図 3)。

サブタイプ不一致例 4 例はいずれもサブタイプ B と CRF01\_AE の間のもので、少なくともそのうち 2 例は塩基配列が決定された連続した領域内に組み換え点と同定され、新しいタイプの組み換えウイルスであることが証明された (図 4)。

#### D 考察

① ミャンマーで発見された新規組み換えウイルス (ICR\_0708) に関して:

3 人の感染者から同定された組換えウイルス株の構造は全く同一で、また相互に直接的な疫学的関連性のない (Epidemiologically-unlinked) と考えられることから、新規の組換え型流行株 (circulating recombinant form, CRF) としての資格を備えている。従って、新たな CRF として認知された場合、我が国の研究機関から報告される最初の CRF となることが期待される。

また、CRF 間の第 2 世代の組換えウイルス (Inter-CRF recombinant, ICR) としては、先に我々が中国雲南省東南部の IDU から分離した CRF07\_BC と CRF08\_BC の間の組換えウイルス (ICR\_0708) に次ぐ第 2 の例となった (図 2)。

新たな組換えウイルス (ICR\_0701) の発見は、ミャンマーの流行と中国の流行の密接な関連性を実証する新たな証拠と考えられる。

② 我が国における HIV-1 重感染・新規組換えウイルス感染例に関して:

国内症例 58 例の中から同定されたサブタイプ不一致例 (discordant subtype) 4 例のうち少なくとも 2 例は CRF01 と欧米型のサブタイプ B 間の組換えウイルス株の感染者であることが確認された。

しかし一方、東南アジア地域で近年発見されている CRF01/B 間の組換えウイルスは、CRF01 と (欧米型のサブタイプ B ではなく) 東南アジア特有のサブタイプ B' との組み合わせによるものである。このことは、現時点では speculation に域をでないが、今回同定された組み換えウイルスが国内で生まれたものである可能性を強く示唆するものである。さらにまた、このことは、様々なタイプのウイルスに感染する危険性のあるハイリスクの (性) 行動をしている集団の存在を推測させる事実であると言えよう。

#### E 結論

新たな組換えウイルス (ICR\_0701) の発見は、ミャンマーの流行と中国の流行の密接な関連性を証明する新たな証拠となった。我が国の研究機関が同定・発信する最初の CRF となる可能性が期待される。

また我が国における患者・感染者報告数の急増傾向など様々な指標に現れつつある HIV 感染

症の新動向を反映し、国内症例でははじめて、異なる系統の HIV-1 株間の共感染例や新型組換えウイルスを見出した。これらの知見は、我が国における HIV 感染症が公衆衛生上予断を許さないフェーズに入りつつある徴候として危惧される。

#### F 健康危険情報

本年度は当班よりの報告はありません。

#### G 研究発表

##### 論文発表

(欧文)

1. Takamura, S., Niikura, M., Li, T.-C., Takeda, N., Kusagawa, S., Takebe, Y., Miyamura, T., and Yasutomi, Y. (2004). DNA vaccine-encapsulated virus-like particles derived from an orally transmissible virus stimulates mucosal and systemic immune responses by oral administration. *Gene Ther.* **11**: 628-635.
2. Takebe, Y., Kusagawa, S., and Motomura, K. (2004). Molecular epidemiology of HIV: Tracking AIDS Pandemic. *Pediatrics International* **46**: 236-244.
3. Takebe, Y., Kusagawa, S., Yokota, Y., Ma, Y., Yang, C., Li, X., Hoshina, Y., Wang, Q., Li, X., Imamura, Y., Uehara, R., Motomura, K., Yang, R., Shiino, T., Xia, X., Ben, K., Thwe, M., Aung, T., Aye, K. T., Oo, K. Y., and Lwin, H. H. (2004). Geographical hotspots of extensive intersubtype recombination in Asia: "Melting pot" that generates diverse forms of HIV-1 unique recombinants. Proceeding of XV International AIDS Conference (Bangkok, Thailand). pp. 35-38. *Medimond, Italy*.
4. Kusagawa, S., Yang, R., and Takebe, Y. (2004). Isolation and biological characterization of an infectious molecular clone of HIV-1 CRF08\_BC from China. Proceeding of XV International AIDS Conference (Bangkok, Thailand). pp. 39-42. *Medimond, Italy*.
5. Hidaka, C., Norose, Y., Nakagawa, Y., Shimizu, M., Takahashi, M., Ohwaki, A., Nohtomi, K., Toda, M., Kusagawa, S., Sakaguchi, M., Kudo, S., Takebe, Y., and Takahashi, H. (2004). Dermal dendritic cells sensitized with plasmid DNA encoding immunostimulatory sequence by gene gun efficiently prime murine HIV-1 -specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *Biomedical Research* **25** (2): 83-91.
6. Kondo, M., Shima, T., Sudo, K., Nishizawa, M., Iwamuro, S., Okabe, T., Takebe, Y., Imai, M. (2005). Identification of attenuated HIV-1 CRF01\_AE variant associated with slow disease progression due to gross genetic alterations in the *nef*-LTR sequences. *J. Infl Dis.* (in press).

(和文論文・総説)

1. 武部 豊 (2004). アジアの HIV・エイズ最前

- 線 Vol. 1 ① 中国 (インタビュー記事). AIDS Report 63: pp. 6. (厚生労働省エイズストップ作戦本部監修, エイズ予防財団編集) 中央法規出版. 東京.
2. 武部 豊(2004). トピックス「HIV サブタイプの最新分類とその世界分布」. 病原微生物検出情報 Infectious Agents Surveillance Report (IASR) [http://idsc.nih.go.jp/iasr/index-j.html].
  3. 武部 豊 (2004). 「第 11 回国際レトロウイルス・日和見感染症会議—Oversea congress report」 「Confronting HIV 2004」 26: McCann Healthcare Publishing (2004).
  4. 武部 豊 (2004). (分担執筆) ヒト後天性免疫不全症候群 (エイズ) 「感染症の事典」 朝倉書店. 東京. (in press).
  5. 武部 豊. 「HIV の特徴」 特集「子どもの HIV 感染症の諸問題」 小児内科 37 (3): 東京医学社. 東京 (2004). (in press).
  6. 武部 豊. (分担訳) 「ハリソン内科 第二版」 HIV 感染症: エイズと関連疾患 (Anthony S. Fauci & H. Clifford Lane). メディカル・サイエンス・インターナショナル. 東京. (2004). (in press).
  7. 武部 豊 (2004). 「アジアにおける HIV 流行の分子疫学: 流行はいかにして形成されたか」 「Confronting HIV 2004」 26: McCann Healthcare Publishing (2004). (in press).

#### 学会発表

1. Takebe, Y., Yokota, Y., Kusagawa, S., Imamura, Y., Uehara, R., Thwe, M. and Lwin, H. H. Precise mapping of recombination breakpoints of HIV-1 unique recombinant forms emerging in Myanmar: *in vivo* sequence preference for recombination. 11th International Workshop on HIV Dynamics & Evolution (April 29-May 2, 2004, Stockholm, Sweden).
2. Takebe, Y., Yang, R., Motomura, K., Hlat Htut Lwin, Min Thwe, Myint Zaw, Zhang, C., Xia, X., Ben, K., and Kusagawa, S. Molecular epidemiology of HIV in Yunnan-Myanmar border: Geographical hotspots that generate diverse forms of HIV-1 unique recombinant forms. (Oral presentation). 5th Japan-China International

Congress of Virology (June 10, 2004, Osaka, Japan).

3. Kusagawa, S., Yang, R., and Takebe, Y. Isolation and Biological Characterization of a Replication-Competent Molecular Clone of Human immunodeficiency Virus Type 1 Circulating Recombinant Form 08\_BC. XIth International AIDS Conference (Oral presentation) (July 13, 2004, Bangkok, Thailand).
4. Shimizu, N., Tanaka, A., Que, A., and Takebe, Y. and Hoshino, H. (2004). G protein-coupled receptors, CCR9B, D6, FML1 and XCR1, have capacity to mediate the CD4-dependent infection of HIV-1, HIV-2, and SIV as coreceptors. XIth International AIDS Conference (Poster presentation) (July 13, 2004, Bangkok, Thailand).
5. Takebe, Y., Yang, R., Motomura, K., Lwin, H. H., Thwe, M., Zaw, M., Zhang, C., Xia, X., Ben, K., and Kusagawa, S. Geographical hotspots of extensive intersubtype recombination in Asia: "Melting pot" that generate diverse types of HIV-1 unique recombinant forms. XIth International AIDS Conference (Oral presentation) (July 15, 2004, Bangkok, Thailand).
6. Takebe, Y. (2004). Geographical hotspots of extensive intersubtype recombination in Asia: "Melting pot" that generate diverse types of HIV-1 unique recombinant forms. Invited lecture in China Medical University. (October 15, 2004, Shenyang, China).
7. 武部 豊 (2004). アジアにおける HIV 流行の分子疫学: 流行はいかにして形成されたか? シンポジウム「アジアのウイルス性感染症の分子疫学」. 第 36 回日本小児感染症学会総会 (2004.11.13, 東京).

#### H 知的財産権の出願・登録状況

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抗 HIV-1 オリゴヌクレオチド塩基配列」 (東京大学 西郷薫、内藤雄樹と共同出願準備中)

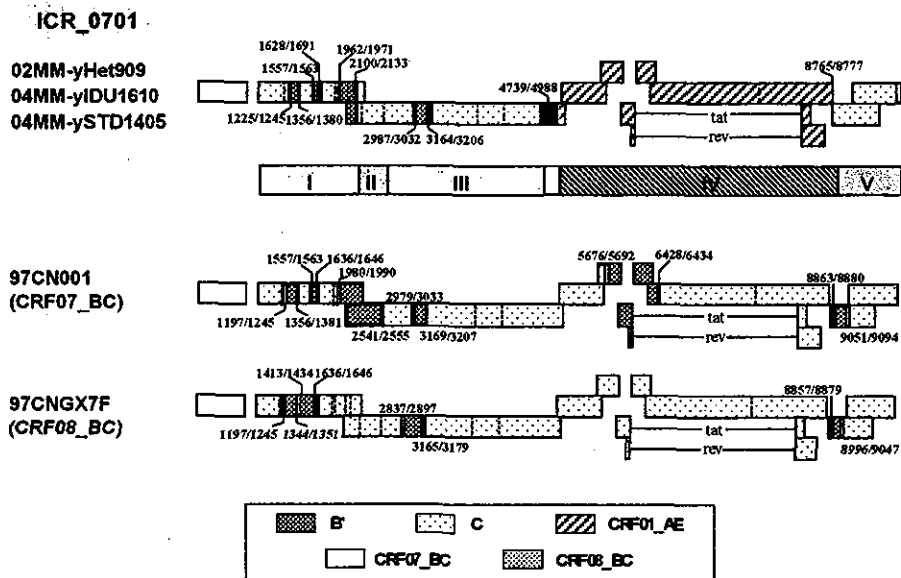


図1. CRF07\_BCとCRF01\_AEの間の第2世代の組換えウイルス(ICR\_0701)の同定 (Yangon, Myanmar)

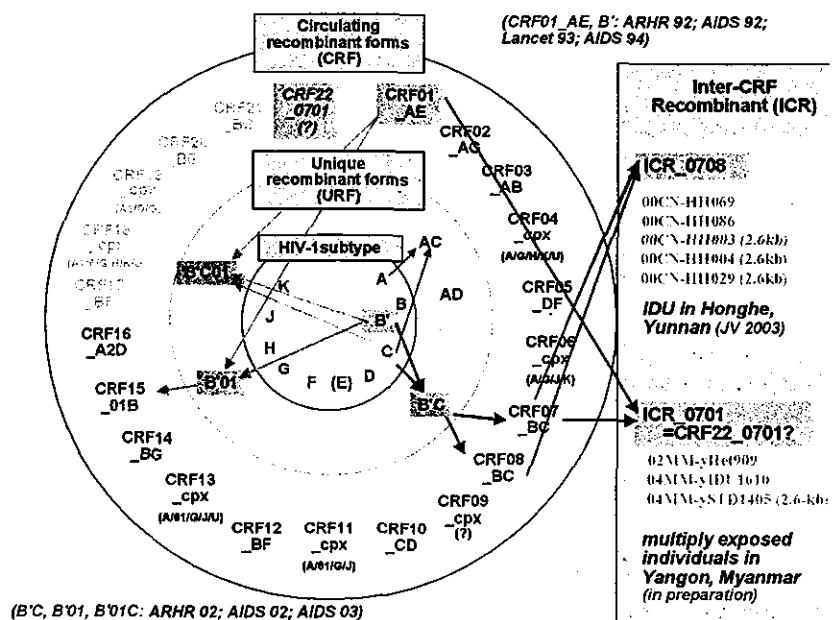


図2. Inter-CRF Recombinant (ICR) の生成機序 (模式図)

(首都圏・東関東)

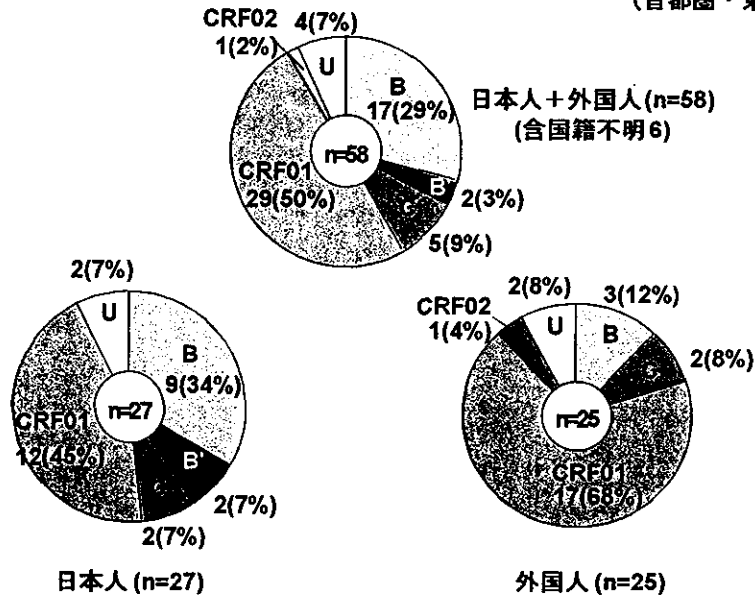


図3. 我が国におけるHIV-1サブタイプ分布

検体番号	国籍	年齢	性別	採取年度	採取地域	PR	RT	
							5'	3'
620	日本	不明	男性	1997	茨城	CRF01	CRF01	B
848	外国	不明	女性	2003	東京	B	n/a	CRF01
861	日本	0	男性	2004	茨城	CRF01	B	n/a
869	外国	34	不明	2004	千葉	B	CRF01	CRF01

n/a: not amplified

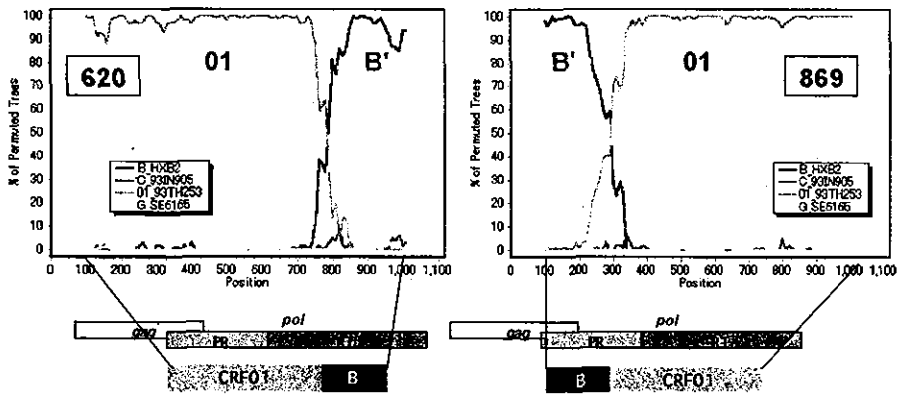


図4. 国内症例 最初の組み換えウイルス感染例の検出

平成 16 年度厚生科学研究費補助金 (エイズ対策研究事業)  
分担研究総合報告書

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

分担研究者：有吉紅也 国立感染症研究所エイズ研究センター主任研究官

協力研究者： Pathom Sanwanwalert (タイ国立衛生研究所所長)、Panita Pathipvanich  
(ランパン県病院院長補佐)

研究要旨

HIV 感染者の自然経過や抗 HIV 抗体陰性配偶者の HIV 非伝播機序について多角的に調べるため、北タイランパン病院における HIV 感染者およびその配偶者を対象にしたコホート研究を維持し、臨床から基礎医学研究へ活用した。2000 年 7 月より 2004 年 9 月までに本コホートに参加した総人数は 1,374 名 (うち 155 名は抗 HIV 抗体陰性) に至った。2004 年 10 月 15 日時点での生存調査を実施した結果、93% の追跡率が得られ、362 名が死亡していることが判明した。観察期間の前半に 30 / 100 PYO 前後であった死亡率が、抗 HIV ジェネリック薬 “GPOvir” が急速に普及した 2003 年以降、10 / 100PYO 以下へと顕著に低下したことが観察された。本コホート患者における GPOvir 治療成功率は 82%、薬剤治療歴や特に治療開始直後のアドヘレンスが治療成否に影響を及ぼす主要な因子であることが示された。GPOvir 薬剤耐性変異では、M184V/I が最も頻度が高く、同変異を検出する MS-PCR をベースにした簡便検査法が開発された。日和見感染症では、タイエイズ患者に中枢神経悪性リンパ腫や CMV 脳炎が極稀であるにもかかわらず、中枢神経系における EBV および CMV ウイルス感染頻度が高いことが判明した。CTL 研究では、さらに新たな Gag epitope が見つかり、宿主遺伝子研究では、DC-SIGNR 遺伝子多型と HIV 非伝播との有意な相関関係が示された。分子疫学では、新しい CRF01\_AE と Subtype B の組み換えウイルスが夫婦間伝播することが見つかり、エイズ進行遅延との関連が示唆されるデータが得られた。北タイランパン病院 HIV コホートは順調に維持・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、さらに現地のタイ人研究者の育成に大変有意義である。

1. 研究目的：

HIV 感染者の自然経過や抗 HIV 抗体陰性配偶者の HIV 非伝播機序について多角的に調べるため、2000 年 7 月より開始された北タイランパン病院における HIV 感染者およびその配偶者を対象にしたコホート研究を維持し追跡情報を集積すること、コホートから得られた患者検体を各種基礎医学研究へ活用することを目的とした。本年度は、2003 年度よりタイ国内生産のジェネリック抗 HIV 薬が急速に普及したことを受け、コホート患者の自然経過への影響についての解析を研究目的に加えた。

2. 研究方法：

A) ランパン病院 HIV コホートの維持  
昨年度に引き続き、ランパン病院 HIV 専門外来を受診するすべての感染者にアプローチし、感染者およびその配偶者へ研究目的を説明し、文書にて同意を得られたものから患者情報および血液検体を採取した。患者データはすべてコード化し、コンピュータへの 2 重入力を行なった。血液検体は同

病院検査部にて血漿ならびにパuffyコートに分離し凍結保存した。同外来通院患者のうち、抗 HIV 薬未治療で CD4 値 200/ul 以上の患者、および、HIV 感染した配偶者と同居を続けている抗 HIV 抗体陰性配偶者については、6ヶ月毎に患者情報および血液検体を採取した。

B) ジェネリック抗 HIV 薬 “GPOvir のインパクト評価

タイ国内生産が始まったジェネリック抗 HIV 薬 “GPOvir” (d4T/3TC/nevirapine 合剤) が、2002 年 4 月より徐々にランパン病院 HIV 外来でも普及した。本年度は、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詳しく収集すると共に、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新たな情報を得た。同時に、血液採取・ウイルス量測定を行ない、12ヶ月以内の失敗例におけるリスク因子解析を行なった。

C) ランパン病院 HIV コホート患者における中枢神経系ウイルス感染症に関する研究  
2001年3月より2003年6月までの間、ランパン病院 HIV 外来およびランパン病院エイズ病棟にて、クリプトコッカス髄膜炎疑いで髄液検査を受けた患者140名から採取された163髄液サンプルから残った検体を用いて、エイズ日和見感染症として問題となる中枢神経系ウイルス感染症（EBV感染、CMV感染、JCV感染）の頻度を、東大医科研岩本愛吉教授グループの協力を得て、PCRにて検討した。

#### D) ランパン病院 HIV コホートの基礎医学研究への活用

これまでにコホート参加者より採集保存した患者検体ならびに患者新鮮血検体を活用し、宿主遺伝子多型評価実験・細胞性免疫実験・液性免疫実験・薬剤耐性検査を阪大塩田達雄教授、東大医科研北村助教、感染研佐藤裕徳博士、感染研杉浦互グループ長、感染研椎野貞一郎博士らの協力を得て行われた。それらの結果とコホートワールド活動によって収集された患者臨床情報ならびに生存追跡データとを連携した解析が進められた。

#### （倫理面への配慮）

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である。2004年9月までにリクルートされたすべてのコホート参加者から署名入り同意書が得られている。本コホートの継続については、2004年9月にランパン HIV コホート時期5年研究計画書を同委員会へ提出し、11月10日に審議が行なわれた。現在同委員会からの質問項目に返答し、その結果を待っている段階にある。

### 3. 研究結果：

#### A) ランパン病院 HIV コホートの維持

2000年7月より2004年9月までに参加した総人数は1,374名に至った。内訳は、HIV感染者1,219人、HIV感染者を配偶者にもつ抗 HIV 抗体陰性配偶者155名であった。この中に185組の双方が HIV に感染した夫婦および114組の片方のみが HIV に感染した夫婦が含まれていた。

HIV感染者1,219名について、2004年10月15日時点での生存調査を実施したところ、1,135名（93%）について追跡が可能であり、773名が生存、362名が死亡していることが判明した。残り74名のうち、10

名について死亡が確認されたが、死亡年月日が不明であった。この結果合計2,081.4PYO(person-year-observation)の観察がされ、観察期間の死亡率は17.4 / 100 PYOであった。前述したGPOvirの普及に伴い死亡率の低下が認められた。そこで、コホート開始時より四半期（3ヶ月）毎の死亡率を計算し、GPOvirを開始した患者の累積数と同じグラフにプロットしたところ、GPOvirの普及によって同クリニックを受診した感染者の死亡率が急激に減少している様子が明確になった（図1）。

抗 HIV 抗体陰性配偶者のうち71名が、コホート参加時にその HIV 感染配偶者が生存し、同居していた。このうち追跡抗体検査が可能だったのは63名、追跡期間の合計は140.8PYOに達した。追跡期間に抗 HIV 抗体が陽転化した配偶者は4名であったので、抗体陽転率は2.84 / 100 PYOであった。陽転化した配偶者のうち3名は男性で、抗体陽転率も男性4.42 / 100PYO、女性1.37 / 100PYOと、男性が抗 HIV 抗体陰性配偶者であるカップルの方が、女性が抗 HIV 抗体陰性配偶者のカップルよりも約3倍高かった。また、追跡中の抗 HIV 抗体陽転化した配偶者の夫婦間性的接触回数は、中央値[25%ile, 75%ile]で月7回[4,12]で、そうでない配偶者の3.25 [1, 8]に比べ性的に活発であった。一方コンドームの使用頻度は、前者の62.5% [25, 87.5]に比べ、後者は100%[50, 100]と頻度が高かった。

#### B) ジェネリック抗 HIV 薬 “GPOvir” のインパクト評価

2002年4月10日に最初の HIV 感染者が GPO 薬剤治療を開始した。2004年1月31日までにランパン病院 HIV 外来にて治療を開始した患者の累積数は438名であった。内357名について、治療開始後4ヶ月～17ヶ月の間にウイルス量検査が実施され、コピー数が400/ml以上になった感染者（薬剤治療失敗例）は、薬剤治療経験者96名のうち35名（36.5%）、未治療者261名のうち29名（11.1%）であり、薬剤治療歴と強い相関があることが判明した（ $p < 0.0001$ ）。治療開始前のウイルス量・CD4値・臨床症状と治療失敗症例との相関はなかった。しかし、男性と、年齢が35歳未満のものとの薬剤治療失敗との間に有意な関係が認められた（それぞれ  $p = 0.043$ ,  $p = 0.004$  ; Mantel-Haenzel 法により薬剤治療歴有無、年齢、性別を補正）。薬剤服用



行動アドヘレンスを評価するために様々な質問方法を同時に試したところ、薬剤治療失敗例と有意な相関が見られたのはアドヘレンスに関する自己判定を聞いた3者選択{good, fair, bad}の問いに対し「Good」もしくは「Fair」と答えたもの、また、服用忘れの頻度を聞いた3者選択{Increasing, not change, decreasing}の問いに対し「Decreasing」と答えたものと薬剤治療失敗との間に有意な相関が認められた(それぞれ  $p=0.006$ ,  $p=0.007$ )。その他、過去1ヶ月間に服用を忘れた回数についても聞いたが、有意な関係は認められなかった。さらに、患者を取り巻く社会環境、特に服用行動に影響を与えると考えられた家族・職場社会・地域社会と個々の感染者との関係について、また、医療従事者や別の患者とのコンタクトの回数に関する情報を集め、治療失敗との関連を調べたが、有意な関係は見られなかった。

C) ランパン病院 HIV コホート患者における中枢神経系ウイルス感染症に関する研究  
リクルートされた140名のうち、98名(70%)がクリプトコッカス髄膜炎と診断された。このうち31(22.1%)、16(11.4%)および1(0.1%)名の感染者において、髄液中にそれぞれEBV, CMV, JCVがPCRにて検出されたが、クリプトコッカス髄膜炎と相関はなかった。その他の臨床症状について、これらのウイルスが検出された感染者群とそうでない感染者群の間に有意な差は認められなかった。また、観察期間中、いずれの感染者にも臨床的に頭蓋内悪性リンパ腫やCMV脳炎は見られなかったが、一症例において臨床的に進行性多巣性白質脳症と診断された。

D) ランパン病院 HIV コホートの基礎医学研究への活用

#### 1) 宿主遺伝子多型研究

本年は、昨年に引き続き宿主遺伝子多型の感染者生命予後に関する解析が進んだ。その結果、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、宿主遺伝子多型と死亡をエンドポイントとする自然経過との間の相関がより鮮明に現れることが判明した。本年度は、昨年報告したIL4-589Tアリアルと低ウイルス量・高CD4値との相関に加え、RANTES-28Gアリアルにおいても、低ウイルス量・高CD4値ならびに生存率との関連が判明した。

抗HIV抗体陰性配偶者と相関のある宿主遺

伝子についても実験・解析が進んだ。特に、東大医科研北村助教授の協力を得て解析したDC-SIGNの関連遺伝子であるDC-SIGNR (dendritic cell specific ICAM-grabbing non-integrin related, CD209L)は、DC-SIGN同様にgp120糖タンパクに親和性があり、HIVのTリンパ細胞感染を促進するトランスレセプターとして働くことがわかっているが、DC-SIGNRの宿主遺伝子多型であるexon5のSNP (IMS-JST 025121)が“A”, exon4に見られる69塩基のVNTR(variable number of tandem repeat)が“5”,あるいは、“homozygous”である抗HIV抗体陰性女性配偶者が、HIVに感染した女性配偶者に比べ統計的に有意に多いことが判明した。(それぞれ  $p=0.034$ ,  $0.027$ ,  $0.0116$ )さらに、ARLEQUINプログラムを用いハプロタイプ解析を行なったところ、上記SNPとVNTRにハプロタイプ形成が認められ、有意に抗HIV抗体陰性女性配偶者に偏ってA5,A9ハプロタイプが見られた( $p=0.004$  and  $0.0001$ , respectively)。今回の対象となった74名の女性が結婚してから夫のHIV感染を知るまでの期間は、中央値[IQR]で5[3,8]年、夫のHIV感染を知るまでの夫婦間性的接触回数は月5[3,8]回、64名(87.7%)はそれまで夫婦間で一度もコンドームを使用した経験がないと答えており、常にコンドームを使用していたと答えたのは4名のみであった。

2) 細胞障害性T細胞性(CTL)免疫研究  
本研究の中心的テーマは、CTLエピトプを同定し、各エピトプ認識の臨床的意義を調べることにある。エピトプ同定には2つのアプローチを用いた。ひとつは、サブタイプBで報告されたエピトプ領域からCRF01\_AEエピトプを推定したものである。これまでCD4値が高く、抗HIV薬剤投与されていないコホート感染者65名をELISPOT法によってスクリーニングし、これら推定エピトプ合成ペプチドを認識した28名のうち18名から34のCTLラインを樹立し、Cr51放出アッセイにてCTL活性の証明を試みた。その結果、10のCRF01\_AEエピトプを特定した。このうち4エピトプについては、過去に報告例がない。

もう一つのアプローチは、コホート患者のGagアミノ酸配列を元にオーバーラッピングエピトプ98本を合成しエピトプを特定する方法である。昨年度は同ペプチドをプールしてマトリックス法により個々のペ

プチド反応を推定する方法を用いたが、多くの感染者が複数のペプチドを認識した為、ペプチド同定に至らない感染者が大半を占めた。本年度は、ペプチドプールに反応した感染者を再度採血し、マトリックス法によって推定された個々のペプチドに対する認識を調べている。

### 3) 抗 HIV 薬剤耐性変異に関する研究

上記、研究結果 B)で判明した 64 名の早期薬物治療失敗例のうち、薬剤治療未経験者について RT 領域のシーケンスが行なわれ、うち 27 名について何らかの薬剤耐性変異が見られた。耐性変異のうち最も頻度が高いのが、M184V/I (21 症例)、次に Y181C/V (17 症例)、D67N(10 症例)、K103N/R (9 症例)であった。本ジェネリック薬に対する耐性 CRF01\_AE ウイルスのモニターをより簡便かつ低コストで行なう為、本年度は、M184V 又は M184I 変異を検出できる MS-PCR の開発を行なった。シーケンスが判明している 141 サンプルについて新しく開発された MS-PCR を行ない、94.3% (133/141) の割合でシーケンス結果と MS-PCR 結果が一致した。184 における変異は最も頻度が高く、この変異を検出するだけで、同ジェネリック薬による耐性ウイルスの約 8 割は検出できることが判明した。

### 4) 分子疫学的研究

本コホート患者 114 名の薬剤耐性変異を調べる過程で得られたプロテアーゼ領域と逆転写領域のシーケンスを別々に系統樹解析したところ、2 名の感染者においてサブタイプに齟齬があった。そこで、この 2 名とその配偶者の有する HIV 全ゲノムをダイレクトシーケンス解析した結果、2 種類の過去に報告のないサブタイプ間の組換えウイルスが発見され、うちひとつについては、夫婦間でブレイクポイントが合致していることから、同組換えウイルスは異性間伝播することが判明した。興味あることに、この組換えウイルスに感染した双方の配偶はどちらもウイルス量および CD4 値から長期生存者である可能性が高いことがわかった。また、この組換えウイルスの特徴として、p24 領域に複数のブレイクポイントが認められた。

### 4. 考察

ランバン病院コホートは順調に進行し維持されてきたが、2004 年中頃までに CD4 値 200/uI 以下の患者にはほぼ全員、抗 HIV 薬剤治療が開始された。この結果、予想通り

コホート患者の生命予後は劇的に改善され、本コホート研究から HIV 感染の自然経過を追跡するという当初の目的は遂行できなくなった。逆に言えば、2000 年から抗 HIV 薬剤治療が普及した 2003 年までが、自然経過を観察する最後の機会であったと言える。一方、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 2 年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ことも事実である。

本年度のデータ解析により、本コホートに参加した抗 HIV 抗体陰性配偶者の抗 HIV 抗体陽転率が計算された。本コホート参加者のほとんどは、コホート参加時までに病院でのカウンセリングを受けており、同 HIV 外来でもコンドームの無料配布を受けていたにもかかわらず、平均して年 2%以上の高い感染率であった。特に男性に限ると 4%以上であり、タイの売春婦の感染率に匹敵する。我々のコホートによって男性抗体陰性配偶者は女性抗体陰性配偶者に比べ配偶者との性的接触回数が多くコンドーム使用頻度は低いことが明らかになってきた。男性抗体陰性者は、前夫に死なれた女性感染者と結婚する例が多く、結婚前から妻の HIV 感染を承知している。一方、女性抗体陰性者は夫の不貞による HIV 感染を結婚後に知らされる場合が多く、この違いが夫婦間の性行動に影響しているものと思われる。

今回、感染者の薬剤服用行動と薬剤治療成否との関連について検討され、特に、インタビューを受けた時点から過去 1 ヶ月のアドヘレンスに関する回答では、治療失敗例との相関を見出すことはできなかったが、アドヘレンスが治療開始後に比べインタビュー時に「向上した」と答えた感染者に治療失敗例が多かったことは興味深い。これらは治療開始直後のアドヘレンスを維持することの重要性を改めて強調する結果となった。発展途上国ではウイルス量検査によって治療効果をモニターできない。これらの情報は、発展途上国にてコストをかけずに治療効果を向上させるのに役立つことが期待される。

本年度は、さらに北タイエイズ患者における中枢神経系のウイルス感染症に関するデ

ータがまとめられた。これまで中枢神経系の悪性リンパ腫がタイ国内のエイズ患者に非常に稀であることが知られている。ランパン病院を含む政府系のレファランス病院では CT スキャン設備を有しており、中枢神経系の悪性リンパ腫の低頻度が診断手段の不足によるとは考え難い。にもかかわらず、EBV の中枢神経系感染頻度が予想以上に高かったのは重要な発見である。髄液の PCR 診断は、先進国においては悪性リンパ腫の補助診断として普及しているが、タイでは臨床的意義は低い可能性がある。もしくは、抗 HIV 薬が普及し、患者生命予後が飛躍的に改善するとタイにおいても悪性リンパ腫が増える可能性があることを警告する結果となった。

ランパンコホートは、タイ政府系病院 HIV 外来へ受診する感染者およびその配偶者全員を対象にした標本抽出方法が明確なコホートである。また地方病院で実施されたことから大都會の病院コホートに比べ、個々の患者の属するコミュニティーに近く、患者追跡率が非常に高く維持されている。さらに、コホート参加者の社会的背景、性行動、薬剤服用行動、臨床像に関する包括的な情報が収集されているのに加え、すべての参加者から検体が採取・保存されており、これらの患者の背景情報と基礎医学研究から得られた宿主遺伝子多型、免疫反応、ウイルス等に関する様々なデータを連携した解析を可能にした。本年度も順調に基礎医学研究と連携させた研究成果につながった。特に、HIV 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、長期生存者に見つかった特徴的組換えウイルスは、興味深い。抗 HIV 抗体陰性配偶者と HIV 感染配偶者との結婚歴や性行動に関する細かな情報が収集されていたことは、DC-SIGNR と HIV 非伝播との関連を証明する上で核となった。また、薬剤耐性ウイルスの出現についても、薬剤耐性変異が検出されない治療失敗症例は決まってアドヘレンスが悪いことがわかっており、これらの服用行動に関するデータは実験データの解析に不可欠であった。

## 5. 自己評価

### 1) 達成度について

コホート維持・検体・データ集積は順調に進行しているが、研究成果の論文発表が遅れている。

### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

本コホートはアジア人を対象にしている点、CRF01\_AE サブタイプ感染者が大多数である点、抗 HIV 抗体陰性配偶者を含めた夫婦を対象にしている点で、特色があり、今後も様々なラボラトリー実験データと臨床現場の情報を連携させることにより、さらに学術的に新しい発見がある可能性が高い。

本コホートは、「可能な限りタイ国内において、タイ人の手によって遂行されるべきである」という原則に乗っ取って行なわれている。本研究によって訓練・技術指導を受けたタイ人医療スタッフ・タイ人研究者は多い。本コホート研究をベースに博士過程に進んだ、あるいは進む予定のタイ人研究者は現在 4 名である。

HIV 感染への抵抗と関連する新しい遺伝子・免疫抗原が発見されれば、新薬あるいはワクチンの開発につながる。

### 3) 今後の展望について

抗 HIV 薬治療が普及した現在、今後の展望として考えられる点は以下のとおりである。

- A) 自然経過観察に関するエンドポイントを「死亡」から、「CD 4 値の勾配」へと改める。
- B) 本コホートで特にユニークで興味深い研究対象である HIV 感染長期生存者および HIV 感染配偶者をもつ抗 HIV 抗体陰性配偶者の参加者数を増加させる。
- C) 薬剤治療に関連した研究分野を発展させる。例えば、CRF01\_AE に特徴的な薬剤耐性変異の研究、抗 HIV 薬治療に伴う副作用に関連した宿主遺伝子因子の研究、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。

B) のコホート対象者を飛躍的に増やす為に、隣県パヤオ県にあるレファランス病院のエイズ外来担当医および担当看護師とミーティングを持ち今後共同研究を行うという合意に至った。次期 5 年研究計画では、隣県病院との共同研究活動を盛り込んだ。

## 6. 結論

1) 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、さらに現地のタイ人研究者の育成に大変有意義である。

2) GPOvir の普及は、タイ政府系病院の HIV 外来通院患者の死亡率を劇的に減らした。

3) HIV 感染配偶者をもつ抗 HIV 抗体陰性配偶者における抗 HIV 抗体陽転率は、カウンセリングを受けた後も高かった。特に男性抗 HIV 抗体陰性配偶者の抗 HIV 抗体陽転率が高い。

4) GPOvir の服用行動と治療成功率との間に有意な相関が見られた。

5) タイエイズ患者における中枢神経系悪性リンパ腫や CMV 脳炎は稀であるにもかかわらず、タイ HIV 感染者の中枢神経系 EBV および CMV 感染率は高いことが判明した。

6) DC-SIGNR 遺伝子多型と HIV 非伝播との間に有意な相関があることが判明した。

7) GPOvir の薬剤耐性変異として最も頻度の高い M184V/I を検出する簡易薬剤耐性変異検出方法が開発された。

8) 新しい CRF01\_AE とサブタイプ B との組み換えウイルスが夫婦間で伝播したことが示された。このウイルスは、p24 領域に複数のブレークポイントがある点特徴があり、また、臨床経過（エイズ進行遅延）との関連も示唆された。

7. 知的所有権の出願・取得状況  
特記すべき事項なし。

#### 8. 研究発表

欧文

N Wichukchinda, T. Shiino, J. Srisawat, A. Rojanawiwat, P. Pathipvanich, P. Sawanpanyalert, K. Ariyoshi, W. Auwanit. Heterosexual Transmission of Novel CRF01\_AE and Subtype B Recombinant Forms of HIV-1 in Northern Thailand. **AIDS Research and Human Retroviruses** (in press).

A. Rojanawiwat, T. Miura, H. Thaisri, P. Pathipvanich, S. Umnajsirisuk, T. Koibuchi, S.

Vongsheree, A. Iwamoto, K. Ariyoshi, P. Sawanpanyalert. Frequent Detection of Epstein-Barr Virus and Cytomegalovirus but not JC Virus DNA in Cerebrospinal Fluid from HIV-infected Patients in Northern Thailand. **Journal of Clinical Microbiology** (in press).

R. Kantor, D.A. Katzenstein, B. Efrom, A.P. Carvalho, B. Wynhoven, P. Cane, J. Clarke, S. Sirivichayakul, M.A. Soares, J. Snoeck, C. Pillay, H. Rudich, R. Rodrigues, A. Holguin, K. Ariyoshi, P. Weidle, M.B. Bouzas, P. Cahn, W. Sugiura, V. Soriano, L.F. Brigido, Z. Grossman, L. Morris, A-M. Vandamme, A. Tanuri, P. Phanuphak., J. Weber, D. Pillay, P.R. Harrigan, R. Camacho, J.M. Schapiro, R.W. Shafer. Impact of HIV-1 Subtype and antiretroviral therapy on protease and reverse transcriptase genotype: results of a global collaboration. **PLOS-Medicine** (in press).

Pathipvanich P, Rojanawiwat A, Ariyoshi K, Miura T, Pumpradit W, Wongchoosie S, Yingseree P, Warachit P, Sawanpanyalert P. Mortality analysis of HIV-1 infected patients for prioritizing antiretroviral drug therapy. **J Med Assoc Thai.** 87: 951-4, 2004

Saeng-Aroon S, Wichukchinda N, Myint L, Pathipvanich P, Ariyoshi K, Rojanawiwat A, Matsuda M, Sawanpanyalert P, Sugiura W, Auwanit W. Study of Antiretroviral Drug-Resistant HIV-1 Genotypes in Northern Thailand: Role of Mutagenically Separated Polymerase Chain Reaction as a Tool for monitoring Zidovudine-Resistant HIV-1 in Resource-Limited Settings. **J Acquir Immune Defic Syndr.** 36:1051-56, 2004

和文  
有吉紅也 「発展途上国における HIV・エイズ対策の現状と未来」**科学** 74: 949-953, 2004