

験症例数が少ない施設があるのは当然であるが、これらの施設においても患者／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(500名～1,000名)を診ている3施設との2極化が見られる。患者数の最も多いACCでは1999年以後今年度初めて新患者の減少(約15%減)が見られ、これは出張研修の効果ではないかと推定している。それでも200名以上の新患者があり、60日処方、90日処方の比率も増えているなど、患者増に対する工夫が進められている。

f) 首都圏問題および医療機関間の連携に関する具体策

平成15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、平成16年度には首都圏の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い、平成17年度は同じ施設で2回ずつ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った。強化病院のレベルアップが達成されれば、患者が利便性に応じ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。平成17年度、ACCの新患者が数年来、初めて減少するなど、効果が見られた。

g) 長期入院患者の受け入れ体制の整備に向けて

HAARTの普及に伴う延命効果の結果、長期入院患者が増加してきた。ところが全国の拠点病院の殆どが急性期病院であり、長期入院は極度に忌避されている。一方、HIV感染症はいまだに医療機関での特別視が根強く残っており、長期療養型医療機関との医療連携が困難であることから、長期入院が予想される患者の受け入れが滞っている。この点を改善するために厚生労働省に提言を行った。

2) 治療ガイドラインと拠点病院診療案内などの作成

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した。全国拠点病院診療案内、診療ハンドブックの改訂版、合併症予防ガイドラインなどを作成した。薬剤耐性検査ガイドラインを作成した。

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。このための拠点病院啓発を行った。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、昨年度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した。今年度の日本エイズ学会で、これにより感染者が発見できたとする発表がみられた。

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

コーディネーターが中心となり、都内のある医師会とHIV診療における病診連携の可能性について協議を重ね、今後の病診連携に向けて医師会と勉強会を行った。これに関連し「医療連携パス」を作成・配布した。コーディネー

ターナースの資格化に向け申請を行った。

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。ソーシャルワークの領域では、エイズ患者の長期入院の問題が表面化してきたことから、解決に向け厚生省に提言を行った。

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。日本歯科医師会の協力を得て、感染防止対策の実態調査を行い、不良の点について改善を求めた。HIV感染症の歯科治療ガイドラインを作成し、全国約7万人の歯科医に配布した。

4. 考察

各ブロックで地道な活動が続けられ、数年前に比べると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、それが維持されていることが示された。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。治療ガイドライン、拠点病院診療案内、合併症予防法ガイドライン、歯科診療ガイドライン、診療ハンドブック改訂版など有益な出版物が数多く作成でき、診療レベルの向上に貢献できたと思われる。

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90%まで達成でき活用できた。歯科の感染対策も部分的ながら改善できた。全体的達成度80%。

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、また、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、国際的意義もある。

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、HIV診療の均てん化につながるものである。

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い、各種ガイドライン、マニュアルを作成・配布した。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活用した。長期入院病診連携、カウンセリングについて検討した。歯科治療ガイドラインを完成させた。

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）



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大阪医療センター 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大阪医療センター 総合内科医長）、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

種々の精神的、身体的負担によって服薬アドヒアランスが不十分になる事による治療失敗や薬剤耐性 HIV 出現の報告がある。本研究目的は HAART が必要な患者が適切で完壁な服薬を長期間遂行できるために 1) 服薬の継続の阻害要因を患者側（身体的、心理的負担など）と医療者側から明らかにし、それらを軽減するための支援方法を確立し、服薬支援ツールも開発する事である。これらの研究成果から、外来におけるチーム医療マニュアルを作成する。

2. 研究方法

本研究では 1) 患者側要因として①ケア支援、②副作用調査、③心理支援、④精神介入、2) 医療者側要因として⑤HAART 調査、⑥服薬指導調査、⑦合併例 HAART、⑧耐性検査、3) 服薬支援ツール開発⑨ホームページ (HP) 開発、⑩ツール開発の 10 研究を実施した。①ケア支援では「修正 DOT のアセスメントシート」を改訂し「初診で直接入院症例の転帰」につき調査した。②副作用調査では受診患者に副作用につきブロック拠点病院と国立国際医療センターにアンケート調査を実施した。③心理支援では服薬の維持要因あるいは阻害要因を明らかにする目的で患者に対して個別面接調査を実施した。④精神介入では患者（HAART 実施患者 105 名、未実施患者 73 名）を対象に、さまざまな社会的背景、心理状態をアンケート、心理検査を用いて明らかにし、患者の病態の情報を加えた相互関係を分析した。⑤HAART 調査では全国エイズ拠点病院に対し抗 HIV 薬の組み合わせ、採用・在庫、院外処方箋発行状況につきアンケート調査を行った。⑥服薬指導調査では拠点病院薬剤部へ服薬支援連携に付きアンケート調査を実施した。⑦合併例での HAART につき検討を行った。⑧服薬に伴う薬剤耐性検査の時期や意義の検討を行った。⑨HP 開発

については利用者にやさしいユニバーサルデザイン化を検討し新たな薬剤情報を追加した。出来事および患者向け服薬アンケートシステムを開発した。⑩既に開発した携帯電話を用いた服薬支援ツールを試行し、問題点と課題の検討を行った。研究成果を基に外来における服薬等のチーム医療マニュアルを作成した。

（倫理面への配慮）研究の実施にあたっては、疫学研究に関する倫理指針を遵守し、研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除に留意し、患者への分かりやすい説明を行いながら十分な理解（インフォームドコンセント）を得る事とした。研究によって施設の倫理委員会の承認を得た。

3. 研究結果

①ケア支援では修正 DOT 導入の適応が治療失敗後や初回治療例で認められた。感染の発見遅延から症状コントロール不良、さらには服薬の自己管理移行も困難となった症例があった。初診時直接入院症例では AC 期より AIDS 期で初診時 CD4 値が少なく、症状出現から受診までの日数と入院日数が長い傾向があった。発症者の約 2 割が死亡した。②副作用調査ではブロック拠点病院 4 施設と国立国際医療センターでアンケート調査を実施した。③心理支援では服薬良好維持群 (20-40 代の仕事を有する者 12 名) では、服薬が自分自身の生命や生活の重要な基盤であると明確に意識し、試行錯誤による有効な方法の発見・定着によって、服薬行動を食事と同様の日常行為にまで生活の一部化していた。医療者は服薬情報を提供する情動的サポートとして機能していた。④精神介入では、感染者の不安は、定期的に受診することへの職場の理解がある人、法的配偶者がある人、本人の感じる社会的困窮がない人のほうが有意に少なく ($p < 0.01$)、仕事を持つ人のほうが不安が少な

った ($p < 0.05$)。医療関係者以外に HIV 感染を気軽に相談できる人がいる人の方が状態不安尺度が低く ($p < 0.05$)、社会的適応、医療関係者以外の相談相手の存在が、感染者の不安を和らげる可能性を示した。一方、同居家族や性的パートナーの有無、学歴、物質依存と不安の程度には有意差がなかった。抑うつ程度も不安と同じ傾向を示した。認知能力低下は感染年数や過去最低の CD4 値などの病勢が関係しており、不安よりも抑うつ程度と関係が深かった。⑤HAART 調査ではアンケート結果を得た 260 施設 (回収率 70.3%) で在庫金額は増加し、患者数増による負担が重くなっていることが示唆された。院外処方発行状況は昨年と同様であり、プライバシーや在庫問題が院外処方の支障となっていた。処方の組み合わせは症例数 30 例未満の施設では昨年同様の傾向が見られたが、30 例以上の施設では 1 日 1 回処方が増加していた。⑥服薬指導調査では近畿地方の多くの拠点病院は HAART 処方症例数が 10 名以下であり専任の薬剤師の配置はなく、外来での服薬指導はされていなかった。10 名以上の病院では専任薬剤師を配置し、服薬指導を行っていた。後者の病院でも研修会、HP の設置、メールによる服薬相談などを強く希望した。⑦結核合併例などでの服用上の注意点を整理した。⑧耐性検査では治療開始前、治療失敗時の実施が必要と考えた。⑨HP 開発ではユニバーサルデザイン化を図り検索性が向上し google では「haart」検索で 11,100 件中実質 7 番目にリストされた。⑩支援ツールを開発し、2 施設で試行した。登録は 7 名であったが、服薬支援サービスを有効に利用している事が確認された。外来でのチーム医療マニュアルを作成した。

4. 考察

本研究から患者の服薬行動についての精神的、身体的阻害因子や促進因子がある事と医療を提供する施設側にも要因があることが明らかになった。心理テスト分析から患者の精神心理的背景が明らかになった。ただ、今回の調査対象者は服薬への理解度が高く、怠薬患者が少なかったため怠薬の増悪に繋がる社会的背景を明らかに出来なかつ

た。罹患年数の長さ、CD4 値の低下が怠薬の増加と関係が示され、病状に応じて、服薬指導を強化する必要性がある。抗 HIV 薬の在庫リスクは依然として高く、病院経営に及ぼす影響を考慮すると薬剤採用に影響する可能性を否定できない。多くの拠点病院の薬剤師が自らの服薬指導がまだ不十分であると自覚しており、服薬連携支援システムの確立が急務と考えた。服薬支援ツールでは”服薬時間お知らせメール”の配信後、遅延応答でも服薬したと扱われたため、時間内服薬の正確さの把握に欠けるなどの問題点があった。機能改修したシステムの開発によって、より正確な利用状況を把握でき患者の服薬の自己管理を支援できると期待できる。服薬に関連した機能を有する HP を開発でき、今後の活用が重要と考えた。本研究成果から外来におけるチーム医療マニュアルを作成したが、今後、現場で使用し評価の後、改訂を行う必要があるかと考える。

4. 自己評価

1) 達成度について

初期の計画目標を多くの研究で達成できた。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

本研究成果は服薬継続の向上と維持に有益であると考ええる。一部の成果は 7th ICAAP で報告した。

3) 今後の展望について

2 年の研究で服薬継続の向上・維持のための問題点と課題が明らかになった。今後、継続困難例等を詳細に研究し、対策と支援ツールの具体的な活用につき検討を深める必要性があると考えた。

5. 結論

服薬の長期継続維持のために服薬アドヒアランスの阻害要因 (身体的、心理的負担など) を患者側と医療者側から明らかにし、それらを軽減するための支援モデルを作成し、併せて服薬支援ツールを開発した。これらの研究結果から外来におけるチーム医療マニュアルを作成した。今後研究を深め、全国の拠点病院等での服薬支援の実践に役立て、患者の服薬アドヒアランスの向上、維持につなげたい。

7. 知的所有権の出願・取得状況

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）

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）、柴原 健（独立行政法人国立病院機構大阪医療センター 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大阪医療センター 総合内科医長）、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

種々の精神的、身体的負担によって服薬アドヒアランスが不良となり治療が失敗し、さらに薬剤耐性 HIV が出現したとの報告がある。本研究の目的は HAART が必要な患者が適切で完璧な服薬を長期間遂行できるように、服薬継続の阻害要因を患者側（身体的、心理的負担など）と医療者側から明らかにし、それらを軽減するための支援方法を確立し、服薬支援ツールも開発する事である。これらの研究成果から、外来におけるチーム医療マニュアルを作成する。

2. 研究方法

本研究では 1) 患者側要因として①ケア支援、②副作用調査、③心理支援、④精神介入、2) 医療者側要因として⑤HAART 調査、⑥服薬指導調査、⑦合併例 HAART、⑧耐性検査、3) 服薬支援ツール開発⑨ホームページ (HP) 開発、⑩ツール開発を実施し、マニュアルを作成した。①ケア支援 初回治療導入例の治療効果および服薬状況等の調査や「修正 DOT のアセスメントシート」改訂等を行った。②副作用調査 受診患者に副作用につきブロック拠点病院と国立国際医療センターにアンケート調査を実施した。③心理支援 服薬の維持要因あるいは阻害要因を明らかにする目的でカウンセラー (Co)、続いて患者に対して個別面接調査を実施し質的に分析した。④精神介入 患者 (HAART 実施患者 105 名、未実施患者 73 名) を対象に、さまざまな社会的背景、心理状態をアンケート、心理検査 (STAI, SDS, JHDS) を用いて明らかにし、患者の病態の情報を加えた相互関係を分析した。⑤HAART 調査 全国エイズ拠点病院に対し抗 HIV 薬の組み合わせ、採用・在庫、院外処方箋発行状況につきアンケート調査を行った。⑥服薬指導調査 拠点病院薬剤部へ服薬支援連携に付きアンケート調査を実施した。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 につき検討を行った。⑧薬剤耐性 服薬

に伴う薬剤耐性検査の時期や意義の検討を行った。⑨HP 開発 利用者にやさしいユニバーサルデザイン化を検討し新たな薬剤情報を追加した。出来事および患者向け服薬アンケートシステムを開発した。⑩ツール開発 携帯電話を用いた服薬支援ツールを開発・試行し、問題点と課題の検討を行った。

（倫理面への配慮）疫学研究に関する倫理指針を遵守し、研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除に留意し、患者へ説明を行い十分な理解（インフォームドコンセント）を得た。研究によって施設の倫理委員会の承認を得た。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 施設 A の初回治療導入者 109 名（帰国者・転院者を除く）でウイルス量再上昇例が 24 名 (22.0%) であった。施設 B の初回治療導入者 79 名（帰国・転院等 11 名を除く）でウイルス量再上昇例が 19 名 (24.1%) であった。ウイルス量再上昇例の多く（特に服薬率低下例）は、支援体制強化によって経過良好となったが、自己中断例では改善が困難であった。修正 DOT 導入の適応が治療失敗後や初回治療例で認められた。②副作用調査 ブロック拠点病院 4 施設と国立国際医療センターでアンケート調査を実施した。③心理支援 服薬継続時に抽出された問題点に対して Co が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。中断例では生きる意欲のなさが密接に結びついていると推測され、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。服薬良好維持群（20～40 代の仕事を有する者 12 名）では、服薬が自分自身の生命や生活の重要な基盤であると明確に意識し、試行錯誤による有効な方法の発見・定着によって、服薬行動を食事と同様の日常行為にまで生活の一部化していた。医療者は服薬情報を提供する

情的サポートとして機能していた。④精神介入では、感染者の不安は、定期的に受診することへの職場の理解がある人、法的配偶者がある人、本人の感じる社会的困窮がない人のほうが有意に少なく($p < 0.01$)、仕事を持つ人のほうが不安が少なかった($p < 0.05$)。医療関係者以外に HIV 感染を気軽に相談できる人がある人の方が状態不安尺度が低く($p < 0.05$)、社会的適応、医療関係者以外の相談相手の存在が、感染者の不安を和らげる可能性を示した。一方、同居家族や性的パートナーの有無、学歴、物質依存と不安の程度には有意差がなかった。抑うつ程度も不安と同じ傾向を示した。認知能力低下は感染年数や過去最低の CD4 値などの病勢が関係しており、不安よりも抑うつ程度と関係が深かった。⑤HAART 調査 初年度 233 施設(63.0%)、今年度 260 施設(回収率 70.3%)の回答を比較した。1 施設あたりの在庫金額は¥977,366(H16)から¥1,211,463(H17)と増加し、患者数増による負担が重くなってきていることが示唆された。院外処方発行状況は昨年と同様であり、プライバシーや在庫問題が院外処方の支障となっていた。2 年目の処方組み合わせは症例数 30 例未満の施設では昨年同様の傾向が見られたが、30 例以上の施設では 1 日 1 回処方が増加していた。⑥服薬指導調査 近畿地方の多くの拠点病院は HAART 処方症例数が 9 名以下であり専任の薬剤師の配置はなく、外来での服薬指導はされていなかった。10 名以上の病院では専任薬剤師を配置し、服薬指導を行っていた。後者の病院でも研修会、HP の設置、メールによる服薬相談などを強く希望した。専門薬剤師派遣による外来服薬指導は患者からも高く評価された一方で、院内薬剤部から「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」などの問題が指摘された。⑦結核合併例などでの服用上の注意点を整理した。⑧耐性検査 治療開始前、治療失敗時の実施が必要と考えた。⑨HP 開発 ユニバーサルデザイン化を図った。その結果、検索性も向上し google では「haart」検索で 11,100 件中実質 7 番目にリストされた。⑩支援ツールを開発し、2 施設で試行した。服薬支援サービスを有効に利用している事が確認された。本研究を基に外来でのチーム医療マニュアルを作成した。

4. 考察

本研究から患者の服薬行動についての精神的、身体的阻

害因子や促進因子がある事と医療を提供する施設側にも要因があることが明らかになった。心理テスト分析から患者の精神心理的背景が明らかになった。ただ、今回の調査対象者は服薬への理解度が高く、怠薬患者が少なかったため怠薬の増悪に繋がる社会的背景を明らかに出来なかった。罹患年数の長さ、CD4 値の低下が怠薬の増加と関係が示され、病状に応じて、服薬指導を強化する必要がある。抗 HIV 薬の在庫リスクは依然として高く、病院経営に及ぼす影響を考慮すると薬剤採用に影響する可能性を否定できない。多くの拠点病院の薬剤師が自らの服薬指導がまだ不十分であると自覚しており、服薬連携支援システムの確立が急務と考えた。服薬支援ツールでは“服薬時間お知らせメール”の配信後、遅延応答でも服薬したと扱われたため、時間内服薬の正確さの把握に欠けるなどの問題点があった。機能改修したシステムの開発によって、より正確な利用状況を把握でき、患者の服薬の自己管理を支援できると期待できる。服薬に関連した機能を有する HP を開発できたが、今後の活用が重要と考えた。本研究成果から外来におけるチーム医療マニュアルを作成した。今後、本冊子を現場で使用し評価の後、改訂を行う必要があるかと考える。

5. 自己評価

1) 達成度について

当初の計画目標を多くの研究で達成できた。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

本研究成果は服薬継続の向上と維持に有益であると考えられる。一部の成果は 7th ICAAP で報告した。

3) 今後の展望について

2 年の研究で服薬継続の向上・維持のための問題点と課題が明らかになった。今後、継続困難例等を詳細に研究し、対策と支援ツールの具体的な活用につき検討を深める必要があると考えた。

6. 結論

服薬の長期継続維持のために服薬アドヒアランスの阻害要因(身体的、心理的負担など)を患者側と医療者側から明らかにし、それらを軽減するための支援モデルを作成し、併せて服薬支援ツールを開発した。これらの研究結果から外来におけるチーム医療マニュアルを作成した。今後研究を深め、全国の拠点病院等での服薬支援の実践に役立て、患者の服薬アドヒアランスの向上、維持につなげたい。

7. 知的所有権の出願・取得状況

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・グループ長)

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(独立行政法人大阪医療センター 副薬剤科長)、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(熊本大学エイズ学研究センター・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)、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)、上田幹夫(石川県立中央病院血液病治療部・部長)、下条文武(新潟大学医学部総合病院・第二内科・教授)、白阪琢磨(独立行政法人大阪医療センター・センター長)、木村昭郎(広島大学血液内科・教授)、山本政弘(独立行政法人九州医療センター・医長)、健山正男(琉球大学大学院医学研究科感染病態制御学講座・講師)、貞升健志(東京都健康安全センター微生物部・主任研究官)、近藤真規子(神奈川県衛生研究所・主任研究員)、森 治代(大阪府立公衆衛生研究所・主任研究官)

1. 研究目的

新規 HIV-1 感染者における薬剤耐性 HIV-1 の発生・伝播動向を把握する全国規模の調査体制の確立と、薬剤耐性 HIV-1 症例の増加を抑制する有効な技術および協力体制の構築を目指す。

2. 研究方法

目的を達成するために下記3つのサブグループに分かれて研究を進めていく。

疫学調査研究: 本邦の新規 HIV/AIDS 感染・診断症例における薬剤耐性 HIV-1 の流行状況を把握するために、新規 HIV/AIDS 感染・診断症例を捕捉し薬剤耐性遺伝子検査を実施する。調査と併行して我が国における薬剤耐性検査体制の整備と確立も進めていく。調査により集積した HIV-1 遺伝子情報を元に新規 HIV-1 感染者における薬剤耐性 HIV-1 の頻度と動向を把握し、薬剤耐性 HIV-1 が拡散する背景と因子を推測する。その上で薬剤耐性 HIV-1 の拡散を抑制するための対策を検討する。

治療最適化研究: 既治療 HIV/AIDS 症例における薬剤耐性の頻度を低下させることは新規 HIV/AIDS 症例への薬剤耐性の感染伝播を直接的に抑制すると考えられる。既治療症例における薬剤耐性の誘導を抑えるためには適切な処方と服用による薬剤の血中濃度の維持が肝心である。このことから、研究班では抗 HIV-1 治療薬剤の血中濃度測定・モニタリングを臨床現場に提供し、適切な治療のサポートに取り組んでいる。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実施している。また、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統合した高度医療を実施し、今後の至適治療のあり方についての検討を行っていく。

薬剤耐性基礎研究: 薬剤耐性 HIV-1 症例の増加を抑制し、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重要である。このグループ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、核酸系逆転写酵素阻害剤 d4T の耐性機序の解析とそこから見えるあらたな治療薬開発の可能性、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などに取り組み臨床現場に成果を還元していく。さらに、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していく。

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う。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) 薬剤耐性 HIV-1 検査バリデーションの実施と評価

新規 HIV-1 感染者の調査は多施設で実施されるため、施設間の検査精度が同等のレベルであることが必要である。このことから研究班では薬剤耐性検査の施設間差を評価する

バリデーションを計画し、これを実施した。平成 16 年度は準備として、各施設で実施している薬剤耐性検査法と調査への参加意思をアンケートにより調査した。本年度はこれに基づき患者由来のプロテアーゼと逆転写酵素領域を組み込んだ HIV-1 クローンを参加希望 15 施設に配布し、遺伝子検査を実施してもらい、その結果の収集を行った。最終的に参加 15 施設全てより結果を回答してもらった。解析の結果、8 施設の結果に若干の問題が認められ、技術的な改善が必要であることが判明したため個別に指導を実施した。

(2) 新規 HIV/AIDS 症例における薬剤耐性 HIV-1 の動向調査

平成 16 年度に設立したワーキンググループで作成したプロトコルに従い、2003 年および 2004 年の新規 HIV/AIDS 症例の調査を実施した。参加施設全てよりデータの登録があり、2003 年 1 月から 2004 年 12 月までの 2 年間に感染が確認された 575 症例(2003 年: 267 例、2004 年: 308 例)の捕捉に成功した。これらの症例全てに対して薬剤耐性遺伝子検査を実施した。調査期間にエイズ動向委員会に登録された症例数が 1375 名であることから、およそ 3 割の新規症例を捕捉したことになる。性別、年齢分布、感染経路等による検定の結果、研究班で捉えた集団は動向委員会に登録された集団を代表することが確認された。薬剤耐性検査の結果 31 症例(5.4%)に何らかの薬剤耐性変異が認められた。薬剤クラス別に見ると NRTI: 20 例(3.5%)、NNRTI: 7 例(1.2%)、PI: 5 例(0.9%)であった。今回の調査では薬剤耐性 HIV-1 の頻度だけでなく、合わせて肝炎合併の有無についても調査を行った。その結果 HBs 抗原陽性率 8.8%、HCV 抗体陽性率 4.3% であることが明らかになった。

(3) 平成 17 年 6 月 24 日: 第 1 回班会議および系統樹解析法の講習会を実施。

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、検査の受付そして抗 HIV-1 薬の薬物動態に関する情報を提供しており、アクセス件数 3220 件、パスワード取得者 116 名となった(平成 17 年 11 月時点)。また平成 17 年 4 月～11 月に測定した件数は 779 件、利用施設は 26 施設となった。(栗原)。

(2) LC-MS/MS を用いて細胞内 efavirenz の定量を試みた。その結果 efavirenz は細胞外に比して 40 倍以上に濃縮されていることが明らかになった。また細胞への流入は早くいずとも 5 分以内に完了することを明らかにした。(加藤)

(3) プロテアーゼ阻害剤の細胞内濃度と動態について細胞種間の相違について解析を行った。その結果 HeLa 細胞では SQV と LPV の細胞内濃度が T 細胞系の HPB-M(a) と CEM に比べて約 3 倍程度高い事が示された。NFV と RTV では大きな差は認められなかった。また HeLa 細胞と T 細胞系細胞株では NFV の細胞内への取り込みのパターンに差が認められ細胞によりメカニズムが異なる可能性が示唆された(杉浦)。

(4) 服薬アドヒアランスを客観的に評価する方法として毛髪からの検出技術を開発した。非侵襲で血中濃度をモニタリングする方法として唾液からの薬剤検出を試み、核酸系逆転写酵素阻害剤の検出に成功した。(加藤)。

(5) 長期間にわたり良好な治療効果が得られている 7 症例について HIV-1 インテグレーション部位の同定を試み、168 の部位を同定した。その結果 97% がイントロンに蓄積している

ことが明らかになった。さらに restingCD4 T 細胞についてインテグレーションしている遺伝子が発現できるか解析を行った結果、全てにおいて発現が可能であることが明らかになった。(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)核糖酸 4 位にエチニル基を有する新規核酸系阻害剤を見いだし、既知の核酸阻害剤耐性HIVに対して有効であることを見い出した。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)プロテアーゼ阻害剤耐性HIV-1 による感染症例について薬剤耐性変異の推移について追跡を行った結果、薬剤非存在下においても耐性変異が長期間にわたり維持されることが明らかになった。同 1 例について増殖能の解析を行ったところ、野性株と同等の増殖能を呈することが明らかになった(金田)。

(3)Tenofovir の腎障害について解析を行い、血清 creatinine と尿中 β 2-microglobulin について解析した結果尿中 β 2-microglobulin が早期腎障害マーカーとして有用である可能性を見い出した(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)薬剤耐性症例より合計 391 個の感染性クローンを樹立し、100 個以上のクローンの全長遺伝子配列解析を終了した(巽、杉浦)。

(6)超高感度 RT 活性測定法 Real-time Amp-RT Assay: RTA2 による 3TC 耐性、AZT 耐性検出系を確立した。d4T 耐性は現在の測定系での判定は困難であり、さらに条件の検討が必要であると考えられた。臨床検体についてRTA2 による 3TC耐性の有無を判定した結果、高い精度での検出に成功した。(仲宗根)。

(7)Nelfinavir 耐性変異 D30N と L90M は排他的変異として知られているが、その原因について構造学的に解析をした。その結果二つの変異が入った D30N-L90M 変異体が二量体としての安定性が低いということが明らかになった(山口)。

4.考察

多剤併用療法の導入から 10 年が経過した今日、HIV/AIDS 感染症の治療環境は大きく様変わりをした。HIV/AIDS 感染者の予後が改善され死亡例が減少するその一方で薬剤耐性 HIV-1 による難治症例の出現と増加が大きな問題となっている。また薬剤耐性 HIV/AIDS 症例の増加にともない、薬剤耐性 HIV-1 による新規感染例が見いだされるようになり、その対策が新たな課題となっている。欧米諸国における薬剤耐性 HIV-1 による新規感染例の頻度は調査により幅があるが、低いもので数%、高いものでは 26%に達している。我が国では、2003 年にクロスセクショナルな 2 つの調査報告がなされ、各々数%、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 つの報告でも欧米同様に耐性出現頻度が大きく隔たっているが、これは我が国においても薬剤耐性HIVの広がり調査集団に大きく左右されることを示唆しており、定点観測による調査では実態を捉えることが難しいことを示している。

このことから本研究班では全国に調査の網を広げ、できるだけ多くの新規感染・診断症例を解析することにより集団の偏りの無い正確な動向を捉えることを目指した。現時点で 2003 年と 2004 年の 2 年間で我が国における新規感染症例の 3 割に相当する575症例の捕捉と解析を完了した。その結果、新規感染・診断症例における薬剤耐性症例の頻度は 5.4%であることが明らかにされた。この頻度は日本とほぼ同じ治療環境の欧米諸国の報告と比較するとかなり低い水準である。その理由は現時点では明確では無く、今後有効な対策を立てていくためにも、薬剤耐性 HIV-1 の伝播に影響を及ぼしている因子(ウイルス学的、疫学的、社会学的)についての検討が必要である。

今回明らかにされた 5.4%は欧米水準と比較すると低いとは

いうものの、20 人に 1 人は最初から薬剤耐性ウイルスを保有しているということであり、米国DHHSが新規感染・診断症例に対してルーチンで薬剤耐性を実施すべきであるとしている値には到達している。

治療最適化研究ではHPでの情報提供により薬剤血中濃度のモニタリングが治療を進める際の指標の一つとして活用されるようになっていく。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

調査研究では 2003 年と 2004 年の 2 年間について、エイズ動向委員会に報告された新規症例のおよそ 3 割を捉えて解析し、我が国における薬剤耐性 HIV-1 による感染例が 5.4%であることを明らかにした。調査研究では我が国における HIV/AIDS 感染症例と HBV あるいは HCV の合併率についてもはじめて明らかにした。さらに、我が国における薬剤耐性検査の基盤整備のための精度管理を実施した。このように平成 17 年度の時点で本研究班の大きな目標の一つを達成した。治療最適化研究の血中濃度モニタリングは研究班で運営しているホームページが臨床現場で活用されており、これについても目標を達成したと考えている。血中濃度を測定・評価する新たな技術に関しては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

本研究グループでは新規感染診断症例をおよそ 3 割捕捉することに成功したが、これほどの高い捕捉率を達成し、調査を行った報告は国際的にみても例は無く、貴重なデータである。また今後薬剤耐性 HIV-1 の感染予防策を考える上で意義ある情報である。

3)今後の展望について

疫学調査研究:引き続き 2005 年と 2006 年についての調査を継続し、薬剤耐性 HIV-1 の動向についても観察していく。現在、新規感染・診断症例の調査は感染者が受診した医療機関を観測点として実施しているが、今後は保健所にも観測点を置き、抗体検査陽性検体についても調査の網を拡大していくことを検討している。これにより既治療患者集団、新規感染・診断症例集団、そして抗体陽性集団という 3 つの異なる集団における薬剤耐性の動向を比較することが可能となり各集団間の関連を明らかにし、HIV-1 感染拡大モデルの構築することが可能となる。

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。さらに研究班で提案されたアドヒアランスを客観的に評価する毛髪検査、唾液による血中濃度の推定などの新たなモニタリング手法の実用性と有効性についての評価を行っていく。

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 2003 年-2004 年の新規感染・診断症例における薬剤耐性の頻度が 5.4%であることを明らかにした。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その普及に大きく貢献した。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

特許: 4'-C-置換-2-ハロアデノシン誘導体 特願 2004-263409

特許:細胞内低分子化合物の抽出法 出願中

研究課題：新作用機序の抗 HIV 薬剤の開発に関する研究

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 教授）

分担研究者：鈴 伸也（熊本大学エイズ学研究センター 講師）

1. 研究目的

HIV-1 Nef 蛋白質はエイズ発症を助長する病原因子である。特に、Nef と宿主因子 Hck との会合がその機能を担う事が予想されており、Nef-Hck の会合を分子標的とした化合物が新規作用機序の抗 HIV 薬となり、薬剤耐性ウィルスの克服につながると期待される。しかし、これまでに有望な抗 Nef 物質は見出されていない。その理由は Nef-Hck 会合が宿主細胞にもたらす機能変化の分子基盤が未解明であり、それに基づいたスクリーニング系が出来ないためである。本研究では、これまでに見出した Nef-Hck 会合がサイトカイン系に及ぼす攪乱作用を明らかにし、それを基にしたスクリーニング系を確立し、抗 Nef 機能阻害低分子化合物を同定する事を最初の目的とする。一方、これら候補物質はウィルスに直接作用するのではなく、Nef によって異常を起こす宿主蛋白質の機能回復を目指すものであり、その効果判定の為にはエイズ発症モデル動物系の確立が不可欠である。そこで本研究の第 2 の目的は、重度免疫不全マウスにヒト造血幹細胞や単核球を移植する事でマウス個体内でのヒト T 細胞やマクロファージ等の免疫系細胞の効率良い構築系を確立し、エイズ発症モデルマウスの基礎とする事である。

1. 研究方法

Nef がサイトカイン系、特に M-CSF、GM-CSF、IL-4 に及ぼす影響について解析した。その為に、これらサイトカインに依存性に増殖する 2 種のヒト白血病細胞株（TF-1-fms は M-CSF に、TF-1 は GM-CSF と IL-4 に依存）を用いた。これら細胞株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株を樹立した。合成エストロゲン 4-HT で Nef 活性化を誘導する事で Nef のサイトカイン系に及ぼす影響を細胞増殖能の変化で解析した。尚、Nef の活性化は CD4 の発現低下が誘導される事で確認した。また、これら in vitro 培養系を用いて低分子化合物ランダムライブラリー（国立感染症研究所より供与）をスクリーニングした。具体的には、Nef 活性化により抑制される M-CSF/IL-4 依存性細胞増殖および増強される GM-CSF 依存性細胞増殖に影響するかを MTT 法により検討した。

ヒト免疫系、特に T 細胞が長期間構築するマウス作製

のために、新たに NOD/Scid/Jak3 欠損マウスを樹立した。

免疫不全度が高い事は NK 活性の測定により確認した。

これらマウスの新生児期に肝臓内にヒト臍帯血由来純化造血幹細胞を移植したところ、生後 8 週以降にヒトの T 細胞の構築をみた。更に、移植マウスに HIV-1 JRFL 株を接種し、ゲノム PCR 法によりウィルス感染を確認した。経時的に末梢血や種々の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。また、NOD/Scid/ β 2micro 欠損マウスに臍帯血単核球を移植することにより、HIV-1 感染の新たなモデル系を作製した。

（倫理面への配慮）

ヒト由来試料（臍帯血・末梢血等）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承認を受け、規則に従い実施した。また、免疫不全マウスの作製および移植実験等の動物実験は、同大本荘地区動物実験委員会の承認を得た上で同大実験動物指針に従い実施した。

1. 研究結果

以前、Nef が M-CSF 依存性の細胞増殖を抑制する事を報告した。今回、IL-4 依存性の細胞増殖も抑制する事、しかし GM-CSF 依存性の細胞増殖はむしろ増強する事を明らかにした。以上の結果から Nef は選択的にサイトカイン系に選択的に攪乱を誘導する事が示された。更に、SH3 領域特異的低分子化合物がこれら Nef の作用を解除する傾向を示した。以前に、Nef による M-CSF 受容体経路の阻害は Hck との会合による事を明らかにしており、Nef による IL-4 および GM-CSF 活性の制御も、Nef と Hck の SH3 領域との会合に因る可能性が示唆された。これまで一次スクリーニング系（Nef による M-CSF 活性に抑制系）にて約 1500 種の低分子化合物をスクリーニングした結果 7 つの陽性物質が得られ、今後 IL-4 および GM-CSF 系で特異性を確認していく予定である。

従来、用いてきたマウス（NOD/Scid/ β 2m 欠損マウス）と比較して、NOD/Scid/Jak3 欠損マウスでは移植後 8 週において既にヒト T 細胞の構築が容易に確認出来た。また、T 細胞以外にも B 細胞、骨髄系細胞、樹状細胞等の免疫担当細胞の構築を確認した。また、JRFL 接種後のマウス脾臓細胞にウィルスゲノムを認めており、HIV-1 感染可能なマウスである事を確認した。また、NOD/Scid/ β 2m 欠

損マウスにヒト臍帯血単核球を移植し HIV-1 を感染させることにより、メモリーCD4 陽性T細胞に HIV-1 が感染する新たな HIV-1 感染モデルを樹立した。

1. 考察

Nef がサイトカイン系に対して抑制的に働くだけでなく (M-CSF や IL-4)、促進的に働く場合がある (GM-CSF) 事を示した。この事は病原性因子 Nef の分子基盤を解明する上で重要な手掛かりである。具体的には、「Nef は宿主細胞のサイトカイン反応性を修飾する事でその機能を攪乱する」という新しい仮説が考えられる。同時に、今回の研究で結果的に、Nef の機能阻害物質の為のスクリーニング系が複数、得られた事は今後の薬剤開発に大きく貢献すると期待される。また、重度免疫不全マウスの樹立と移植ルートの改善により、効率よくヒト T 細胞を含む免疫担当細胞をマウス個体内で構築出来る事を明らかにした。そしてこれらのマウス系で HIV-1 の感染を確認した事は今後の研究の展開に有用である。しかし、エイズ様症状を呈するマウスの作製には更なる改善が必要であり、今後の重要な課題と考えている。

1. 自己評価

1) 達成度について

Nef の機能を反映し、且つ異なるアウトプットの 3 種類の培養系 (増殖抑制と増強) が得られた事は、今後の抗 Nef 薬剤同定にとって、特に特異性を判断していく上で極めて重要である。いずれも簡便で多検体を処理出来る点に於いて現実的であり、今後の精力的なスクリーニングを可能に出来た点に於いて、当初の目的を十分達成出来たものと考えられる。また、免疫不全マウスにヒト臍帯血由来の造血幹細胞または単核球を移植することにより、長期・短期に渡るヒトの免疫系を構築したマウスが作製でき、これらのマウスに HIV-1 が感染可能であったことは、大きな進歩である。以上より、今年度の研究計画は充分達成できたと考えられる。

1) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

Nef が一定の選択性でサイトカイン系に対して影響を及ぼす事を明らかにした事は、未だ明らかとなっていない Nef の病原性発現機構を知る重要な手掛かりである。他方で、サイトカイン受容体カスケードの解明にウイルス由来蛋白質が有用なツールとなる例を示した点に於いて学術的意義は大きい。今後、抗 Nef 物質の同定を通して社会的貢献を果たす事が出来ると考えられる。また、ヒト免疫系構築マウスの作製は HIV-1 研究だけでなく幅広い分野 (免疫やがん研究) にとって有用なツールであ

る事は疑いが無い。今回、生理的な分化段階に近いヒト T 細胞をマウス個体内で構築出来た事は、新たなヒト化マウスを提供する点で重要と考えられる。

3) 今後の展望について

17 年度に複数の抗 Nef スクリーニング系を確立した事で、Nef の機能に極めて特異的な阻害物質を同定する事が可能となった。現在、入手済みの低分子化合物のランダムライブラリーのスクリーニングを中心に、SH3 領域阻害化合物の誘導体化や Nef-Hck 選択的ドラッグデザインを行い、18 年度中に候補物質の同定を成功させたいと考えている。また、エイズ発症マウスモデルはこれまでに確立したマウス系の更なる改善を考えている。具体的には、サイトカイン投与 (in vitro でウイルス産生を促進する事が明らかとなっている IL-7 や M-CSF) および長期 T 細胞構築の為に、胸腺内に T 細胞の産生促進因子を過剰発現する NOD/Scid/Jak3 欠損マウスの樹立を行う。これらのマウスを用いて、同定した候補物質の in vivo における効果判定を行いたい。

1. 結論

今年度の研究により、Nef が M-CSF と IL-4 の生物活性を抑制する一方で GM-CSF の活性は増強する事を明らかにした。即ち、Nef が宿主細胞のサイトカイン反応性を修飾し得る可能性を示し、Nef の病原性発現の分子基盤解明の新たな糸口を見出した。同時に結果として、Nef を標的とした薬剤スクリーニング系が確立出来た。この 3 つの系は簡便で多検体処理を出来、その併用で、単一のスクリーニングによるものより Nef 特異的化合物が得られる可能性が大きい。18 年度は精力的にスクリーニングを行い、候補物質を同定する予定である。また、NOD/Scid/Jak3 欠損マウスの新生児肝臓内へのヒト造血幹細胞の移植により、生理的な分化段階に近いヒト T 細胞をマウス個体内で構築する事が可能となり、HIV-1 感染を確認する事が出来た。今後、サイトカイン投与実験および T 細胞産生促進因子を過剰発現する NOD/Scid/Jak3 欠損マウス等を用いた移植・感染実験を行い、エイズ発症のマウスモデルの確立を目指す予定である。

1. 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：RNAi 耐性ウイルス株の出現に対処する第二世代の RNAi 医薬品の開発

課題番号：H17-エイズ-002

主任研究者：高久 洋（千葉工業大学工学部 教授）

分担研究者：橋本 香保子（千葉工業大学工学部 講師）、黒崎 直子（千葉工業大学工学部 講師）、

山本 典生（東京医科歯科大学医学部 助手）

1. 研究目的

本研究は第二世代 RNAi ベクターの薬剤耐性 HIV-1 に対する抗ウイルス効果の評価を行うと共にその発現メカニズムを詳細に解析することを目的とする。現在使われている抗 HIV 剤は逆転写酵素阻害剤やプロテアーゼ阻害剤が中心であるが、それぞれ薬剤耐性株の出現という問題を抱えている。この問題を解決するひとつの方法は、これらの薬剤とは異なる作用点を持ち薬剤耐性株に対しても有効なアプローチを含めた新規治療法を開発することであり、RNAi を用いた遺伝子治療は有力なアプローチと考えられる。そこで、vif に対する shRNA とデコイ TAR RNA を Dicer が認識できるリンカーにより結合した共発現ベクターと RNaseP/tRNaseZ 誘導型 EGS 発現レンチウイルスベクターを作製し、これらが薬剤耐性株に対して有効かどうかの評価を行うこととした。さらに、第二世代 RNAi ベクターが、ウイルスライフサイクル上のどの点に作用することで抗ウイルス効果を発揮するのか明らかにするため、特異性の高い新規 real-time nested PCR 法を開発した。

2. 研究方法

第二世代 RNAi ベクターは、HIV-1 vif を標的とした shRNA(CS-vif)とデコイ TAR(CS-TAR)を共発現するレンチウイルスベクター(CS-vif-TAR)を作製し、PBMC、H9 細胞、Jurkat 細胞に導入した。この細胞へ HIV-1_{NL4.3} を感染させた後、経時的に HIV-1 増殖抑制能について評価をした。また、ウイルス RNA の shRNA 標的部位の配列を解析し、shRNA 耐性株の出現についてもあわせて検討した。

また、HIV-1 tat RNA および vif RNA を標的とした RNaseP 誘導型 EGS(EGS-tat)と tRNaseZ 誘導型 EGS(EGS-vif)も同様にレンチウイルスベクターへ組込んだベクターを作製した。これらを SupT1 細胞へ導入した後、HIV-1_{NL4.3} を感染させた後、経時的に HIV-1 増殖抑制能について評価をした。

つぎに Jurkat 細胞に CS-TAR, CS-vif, CS-vif-TAR を M.O.I.=20 で導入し、数日培養した後野生株 HIV-1 (HXB2), 薬剤耐性 HIV-1(HXB2/K65R)をそれぞれ感染させ、p24 量を測定した。

さらに、新しくデザインされたプライマー・プローブ

を使用して real-time nested PCR を行い、その特異性を様々なコントロール実験によって評価した。測定には ABI7700 sequence detector system を用いた。

（倫理面への配慮）

HIV-1 の感染実験は P3 で行い、環境中への拡散が起こらないよう配慮した。

3. 研究結果

shRNA やデコイ TAR を単独で発現するベクターを細胞に導入して HIV-1 を感染させると、約 2～3 週間でウイルスの出現が見られたのに対し、shRNA とデコイ TAR を共発現する CS-vif-TAR は約 9 週間の長期間に渡り HIV-1 転写阻害効果が見られた。また、shRNA やデコイ TAR を単独発現させたのものより、共発現する CS-vif-TAR の方が、ウイルス変異の出現が遅れただけでなく、その頻度も少なかった。

RNaseP 誘導型 EGS(EGS-tat)と tRNaseZ 誘導型 EGS(EGS-vif)も同様にそれぞれを単独導入した細胞より共発現のベクターを導入した細胞の方が、強い抗ウイルス活性を示し、後者では 90%以上も HIV-1 産生阻害効果を示した。

また、CS-vif-TAR は野生株 HIV-1 と同様、薬剤耐性 HIV-1 についてもウイルスの増殖を最も強く抑制した。抑制の程度は HIV-1 を M.O.I. = 1 で感染させた場合でも 90%という高い抑制活性を維持していた。CS-vif や CS-TAR でも抑制活性はあったが、CS-vif-TAR ほどではなかった（CS-vif では 60%程度の抑制、CS-TAR では 50%程度の抑制）。以上の結果からデコイ TAR と vif shRNA を結合させた small RNA は薬剤耐性株に対しても非常に有効であることが分かった。

さらに、第二世代 RNAi ベクターが、ウイルスライフサイクル上のどの点に作用することで抗ウイルス効果を発揮するのか明らかにするため、特異性の高い新規 real-time nested PCR 法を開発した。HIV-1 は逆転写の後にウイルス DNA を宿主細胞のゲノム中にインテグレーションさせるが、インテグレーションされた DNA を正確に定量することは従来の nested PCR 法では難しかった。それはインテグレーションされていないウイルス DNA が nested PCR の過程で増幅されてしまうからであるが、プ

ライマー配列にタグをつける等の工夫を加えることで、非特異的増幅を大幅に減少させることに成功した。次はこの方法を用いて実際にウイルスライフサイクル中の標的段階を同定したい。

4. 考察

shRNA とデコイ RNA を組み合わせることで、shRNA によるウイルス変異株が出現してもデコイ RNA の抑制効果により、長期的にウイルス産生抑制効果を持続させることが可能であることが明らかとなった。

RNaseP 誘導型と tRNaseZ 誘導型 EGS も同様にそれぞれを単独ではなく、連続して発現するように設計することによりさらに高い抗 HIV-1 効果が得られることが示唆された。

また、CS-vif-TAR は薬剤耐性 HIV-1 の増殖を強く抑制することが明らかとなった。このことは、従来の HAART と本研究で用いている第二世代 RNAi ベクターを組み合わせることで、より効果の高い治療法が開発可能であることを意味している。このような新しい治療法の開発は極めて重要である。

5. 自己評価

1) 達成度について

野生株の HIV-1 だけでなく、薬剤耐性 HIV-1 に対しても第二世代 RNAi ベクターが有効であることを示せたことで、一応の水準はクリアしたと考えている。約 9 週間の長期に渡りウイルスの発現を抑制することができたことは、これまでの抗ウイルス剤では達成し得なかった結果であり、今後の臨床応用への期待が高まる。しかし薬剤耐性株は多数報告されているので、他の薬剤耐性株についても同様の検討をしていきたいと考えている。

また新規 real-time nested PCR 法の開発については、論文や特許という形にも結実したことから一応の成果は出せたと考えている。次はこの方法を用いて感染制御メカニズムを明らかにしていきたい。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

エイズは現在でも非常に多数の患者が世界中におり、HIV-1 感染症は人類が解決すべき大きな問題である。HIV-1 は非常に変異を起こす率が高いことが知られており、それが薬剤耐性を獲得しやすいことにつながっている。薬剤耐性株の問題を解決するには、作用点が異なる治療ストラテジーを含んだ新たな併用療法を開発することが有効であるが、本研究で用いた第二世代 RNAi ベクターはその候補として重要な位置を占めるのではないかと

と我々は考える。エイズが国際的・社会的に大きな問題であることを考えれば、本研究の国際的・社会的意義の大きさは明らかである。

3) 今後の展望について

今後は薬剤耐性株の数を増やして抗ウイルス活性の検討を行っていく。また、定量 PCR 法によるウイルス制御メカニズムの検討も行っていく。さらに、RNAi 法で問題となっている dsRNA による IFN 誘導等のターゲットオフ効果を伴わない shRNA の開発も進んでいる。これらの検討によって第二世代 RNAi ベクターの有用性がさらに明確になっていくものと考ええる。さらに進んだ遺伝子治療ベクターの開発も今後なされていくであろう。

また、本研究では最終年度に HIV-1 感染マウスを用いた第二世代 RNAi ベクターの抗 HIV-1 活性、ならびに生体への影響を検討し、将来臨床応用への足掛かりとする。

6. 結論

vif shRNA とデコイ TAR を組み合わせた CS-vif-TAR は長期間野生型 HIV-1 の発現を抑制することや耐性ウイルスの発現遅延や発現頻度を減少することが明らかとなった。同時に CS-vif-TAR は薬剤耐性 HIV-1 の増殖を強く抑制することが明らかとなった。また、RNaseP 誘導型と tRNaseZ 誘導型 EGS も同様に高い抗ウイルス活性を持つことが明らかとなった。以上のことから、本研究によって作製された第二世代 RNAi ベクターは野生株の HIV-1 だけでなく、薬剤耐性株にも有効であることが示された。このことは第二世代 RNAi ベクターと従来の HAART を組み合わせることで、より効果の高い新規治療法が開発が可能であることを意味する。

また、最近 shRNA の直接の標的部位以外にも変異が発生していることが明らかとなった。そこで本研究では、作用機序の異なる decoy-RNA や EGS と shRNA のコンビネーションによる変異株に対処する方法を確立した。HIV-1 感染症の世界的な広がりや薬剤耐性株出現という問題を考えると、このような新しい治療法の開発は国際的にも社会的にも極めて大きな意義を持つ。

7. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

- (1) 特願 2005-021960、副作用のない RNAi 医薬、2005.1.28.
- (2) 特願 2005-151602、RNAi 耐性ウイルス株を克服する新手法、2005.2.25.
- (3) 特願 2005-333406、核酸増幅方法、2005.11.17.
- (4) 特願 2005-145625、核酸増幅方法、2005.5.18.

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 病原体ゲノム解析研究センター 室長）

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 主任研究官）、櫻木淳一（大阪大微生物病研究所ウイルス感染制御分野 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（熊本大大学院医学薬学研究部感染防御分野 教授）、服部俊夫（東北大大学院医学系研究科感染病態学分野 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（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科免疫治療学 助教授）、間陽子（理化学研分子ウイルス学研究ユニット エントリゲーター）、岡本尚（名古屋市大大学院医学研究科細胞分子生物学 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（医薬基盤研究所霊長類医学研究センター リーダー）、足立昭夫（徳島大大学院ヘルスケア・サイエンス研究部ウイルス病原学 教授）、増田道明（獨協医科大微生物学 教授）、三隅将吾（熊本大大学院医学薬学研究部薬学生化学 助教授）

1. 研究目的

世界の HIV 感染者は 4,000 万人を超え、日本への感染拡大が危惧される。このような状況下で国民の公衆衛生上の安全を確保するには、抗 HIV 薬とワクチンを必要とする。しかし未だ決定的なものは無く、開発に必要な国内の HIV 増殖研究基盤も欧米諸国と比べると脆弱である。さらに HIV は自然界で容易に変異するため、一旦確立した予防治療法においてもその効果を維持することは難しい。そこで本研究班では、HIV の増殖と変異に関する基礎研究を系統的に行う体制を国内に確保し、新たな HIV 感染予防治療法の開発と有効性の維持に繋がる科学情報を収集する。

2. 研究方法

本研究では、HIV の増殖と変異の 2 つの研究の柱を設定し、構造生物学的手法を取り入れて基礎研究を行う。得られた成果から新たな予防治療法の開発ならびにそれらの有効性の確保に繋がる科学情報を整理収集する。

柱 1. HIV 増殖研究：HIV の増殖に必要な調節因子を特定し、その働きを選択的に制御すれば特異性の高い抗 HIV 薬ができる。決定的な因子を特定できれば、学術と臨床に大きなインパクトを与える。世界で競合する研究分野だが、国内で系統的に研究する体制が無い。そこで平成 16 年度に国内の複製研究者 18 名と連携して当該研究班を立ち上げた。柱 1 では、HIV の複製を (i) 吸着・侵入、(ii) 脱殻・ゲノム RNA 逆転写・プロウイルス核内輸送と染色体組み込み、(iii) プロウイルス転写、(iv) Gag 細胞質輸送・ゲノム二量体化・集合・出芽に分け、分担して調節因子と調節機構を明らかにする。

柱 2. HIV 変異研究：HIV 変異の調節因子を特定し、その働きを選択的に制御すれば、変化能や複製能が破綻し弱毒化すると推察される。ウイルスの変異は学術と臨床双方に重要な課題でありながら、世界の基礎研究は少なく科学的に議論できる基盤は脆弱である。そこでまず国内の研究基盤を確保することを目指し、柱 1 でゲノム変異と組換えに関連する研究者を中心に柱 2 を立ち上げた。柱 2 では、(i) 逆転写酵素と (ii) ゲノム RNA の機能調節因子と調節機構を明らかにする。

立体構造研究：柱 1、2 で特定した細胞因子やウイルス分子の立体構造がわかれば、作用機構の理解に役立ち、特異性の高い抗 HIV 薬ができる。そこで国内の HIV 研究に (i) 計算科学解析と (ii) X 線結晶構造解析を適用するための基盤づくりに取り組む。

（倫理面への配慮）

ヒト由来材料（血液）を使う場合は、所属機関倫理審査会の審議を受け、提供者の承諾とプライバシーの保護に万全を期した。動物実験は行っていない。

3. 研究結果

昨年に引き続き、HIV 増殖と変異に関わる調節因子の探索と生理的意義の検証を行った。分担研究の主な進捗状況は以下のとおりである。

柱 1. HIV 増殖研究

- ① HIV の細胞侵入に、感染受容体と細胞骨格のリンカー蛋白質エズリンとモエシン（久保）および細胞膜と HIV エンベロープ蛋白質の流動性（原田）が関わること、コレステロール様構造を持つグリチルリジンが抗ウイルス活性を示すこと（原田）、CCR5 を介する感染を特異的に抑制すること（服部）がわかった。
- ② HIV の逆転写反応の進行に、インテグラーゼと相互作用する細胞因子 Gemin2 が関与することがわかった。（増田貴）。Gag マトリックス蛋白質と結合し、逆転写反応の進行に関与する可能性のある細胞因子 tRNA シンセターゼを同定した（村上）。Nef が脱殻に関わる可能性を示唆した（小島）。
- ③ HIV のマクロファージ感染に重要な Vpr-importin α 相互作用を阻止する低分子化合物を同定した（間）。
- ④ HIV-1 転写を阻害する細胞因子 RNF125 を同定した（生田）。IKK 阻害剤が NF- κ B を介する転写と HIV 増殖を抑制することがわかった（岡本）。
- ⑤ 酵母で Gag 細胞質輸送と集合・出芽に関わる細胞因子として同定された Syntaxin が、ヒト細胞（HeLa と 293T）でも同様の機能をもつことがわかった（森川）。
- ⑥ Vpr は Wee1 機能昂進を介して G2 arrest を誘導すること（増田道）、Vif と Gag の一部が HIV-1 の種特異性の決定に重要である事（足立）、Vif の N 末端領域が Gag 成熟抑制効果をもつこと（明里）、などがわかった。
- ⑦ 粒子内に 5 種類の p24 isoform があること、R5 と X4 ウイルス特異的細胞因子があることがわかった（三隅）。
- ⑧ siRNA ライブラリーを用いて HIV-1 産生の昂進と抑制に働く細胞遺伝子 11 種を同定した（生田）。

柱 2. HIV 変異研究

- ① トポイソメラーゼ I が組換えを抑制し完全長 cDNA の合成を促進すること、組換えの前段階である粒子成熟にも関わることをわかった。（高橋）。
- ② ゲノム二量体化は複製初期過程の進行に影響を与えること、二量体化シグナル内ステムループ 1 が組換え効率の決定因子であること（櫻木）がわかった。
- ③ 計算機解析と実験を組み合わせ、逆転写酵素のアロステリック調節因子 ATP の競合阻害剤候補を同定した（佐藤）。
- ④ 新たな RNaseH 活性測定系をつくり、逆転写酵素の

薬剤耐性変異は RNaseH 活性の変化をもたらすことを示した(駒野)。

- ⑤ 自然界で R5 ウイルスが優勢となるための選択優位性をもたらす HIV-1 core element を同定した(佐藤：研究協力者 長縄聡＝日本大学医学部先端医療科学)。

立体構造研究

- ① 計算科学：実験と同程度の精度の分子モデルを構築する計算環境をつくり、治療薬と薬剤耐性変異が HIV 変異率の変化を誘起するしくみ、Env Gp41 変異が膜融合活性を調節するしくみ、HIV-1 亜株がプロテアーゼ阻害剤の一部に低感受性となるしくみ、などを説明した。(佐藤：研究協力者 横山勝＝国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター)。
- ② 結晶構造解析：HIV-1CRF01_AE プロテアーゼホモダイマー(西澤／Massachusetts Univ.)、Vif-APOBEC3G 複合体(足立／理化学研究所)、Vpr-Importin α 複合体(間／理化学研究所)、CRF01_AE 逆転写酵素ヘテロダイマー(佐藤)の結晶化を試みている。

4. 考察

主な分担研究成果の学術的意義および新たな HIV 制御法開発との関連は以下のとおりである。

- ① HIV-1 の細胞侵入には、感染受容体とエンベロープ蛋白質が脂質二重層で局所集合・多重結合し、一定サイズの fusion pore が形成されることが必要と推察される(久保、原田)。局所集合におけるリンカー蛋白質の関与を明確にすれば世界初の成果であり、細胞侵入メカニズムの理解が大きく進むとともに新たな薬剤標的分子候補が提供される。
- ② 感染細胞における逆転写反応の進行は、多彩な分子で cis と trans に制御されていると推察される(増田貴、高橋、櫻木、村上、佐藤)。増田貴らの研究は、インテグラーゼの新たな作用点を特定し、関与する細胞因子の HIV 複製における意義を明らかにした点で学術的水準の高い成果と言える。感染細胞における HIV ゲノム逆転写の調節機構の理解と薬剤開発に繋がるインテグラーゼ/Gemin2 複合体構造の解明を期待する。
- ③ HIV-1 転写抑制因子として同定された RNF125 はアミノ酸配列の相同性からユビキチン化を進める E3 ligase と推定される(生田)。通常は翻訳産物の分解に関わるユビキチン化と HIV 転写抑制は単純には結びかず、未知の転写制御機構の存在を示唆する。メカニズムの解明は学術的に重要で、HIV 転写制御治療薬の開発にも結びつく可能性がある。
- ④ HIV-1 出芽に後期エンドゾームの class E Vps 蛋白質(TSG101 など)の関与が示唆されている。しかし、これらのみでは出芽は説明できず、未知の細胞因子群の関与が推察される。実際に森川らの結果は初期～後期エンドゾーム因子の関与を示す。森川らの酵母出芽系は世界に類例はなく、Gag 輸送・集合・出芽に関わる調節因子群とその制御機構の全容を解明する有力な手法といえる。研究の発展は、当然、HIV 複製後期を標的とする新規阻害薬開発に結びつく。
- ⑤ HIV-1 アクセサリー蛋白質群は生体におけるウイルス増殖と免疫逃避への関与が示唆されている。持続感染と病態進行に重要な関わりをもつと推察されるが、蛋白質機能の調節は不明な点が多い。本研究班でのアクセサリー蛋白質群への多角的な取り組み(間、足立、増田道、明里)は、調節機構解明と新薬開発の基礎と

なる。特に生体環境下での HIV 増殖の理解に結びつく成果を期待する。

- ⑥ 近年、細胞因子群の網羅的解析が可能となってきた。siRNA ライブラリーを用いた増殖関連遺伝子の検索(生田)、精製 HIV 粒子のプロテオーム解析(三隅)により、HIV 増殖に関わる新たな細胞因子の特定とその調節機構解明に結びつく成果を期待する。
- ⑦ HIV は、容易に変異して抗ウイルス薬やワクチンの効果を無力化する。一方、この変異性が破綻するとウイルスの複製能や変化能が破綻し、弱毒化する可能性が高い。逆転写酵素とゲノム RNA の調節機構研究(佐藤、高橋、櫻木、駒野)は、ウイルスの変異性(変異と組換え)に介入する方法を開発し、治療薬やワクチンの有効性を確保するための基礎を提供する。世界の研究は少なく科学的に議論できる基盤はまだ脆弱であるため、基礎情報の蓄積を目指す。
- ⑧ 計算機を用いて高精度分子モデルを構築する手法の適用(佐藤)は、分子の働きを理解するためと創薬に有用である。岡本らもその重要性に着目し、同様の環境設置を試みている。X 線結晶構造解析の共同研究(間、足立、西澤、佐藤)も同様の意義をもち、より正確な構造情報が期待される。計算機と実験による関連蛋白質の構造機能研究の基盤を研究班の中につくることで、本研究班で特定する調節因子の理解が深まり、特異的阻害剤を開発する環境が整うと期待する。

5. 自己評価

1) 達成度について

柱 1、2 ともに設定した分担項目で複数の調節因子候補を特定し、その生理的意義の検証に進んでいる。立体構造解析の基盤づくりも進んだ。計算科学を適用した研究の成果がウイルス学の学術誌に共著で採択され、結晶構造解析についても国内最高水準にある理化学研究所との共同研究が始まった。以上から、本年度計画をおおむね達成したといえる。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

考察に示すように、分担研究の学術的水準は高い。海外論文成果が示すように、学術成果の国際的な認知度も高い。考察に示すように、研究成果は新たな抗 HIV 感染制御法を開発するための科学的基盤を提供する。これは公衆衛生上の安全確保に繋がり、社会的意義も高い。

3) 今後の展望について

引き続き、HIV 増殖と変異に関わる調節因子の探索と生理的意義の検証を行う。構造生物学的手法の適用範囲を広げる。3 年間の研究で得られた成果から、新たな予防治療法の開発とその有効性の確保に繋がる主要な科学情報を整理収集する。

6. 結論

本研究は、計画に従い、おおむね順調に進展している。考察に示すとおり、国内の HIV 複製研究者が独自性を保ちつつ関連を深める体制、および HIV 研究に構造生物学的手法を適用する基盤が整ってきた。今後は、学術的発展を目指すとともに、HIV 感染制御に繋がる科学情報の整理収集に努めることが重要となる。

7. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

服部(HIV-1 分離株 SDA-1: AY902478)、生田(HIV 転写制御因子: 特願 2005-083826)、岡本(NF- κ B 活性化抑制因子: 特願 2005-22759)、間(HIV-1 感染阻害物質: 予定)、三隅(HIV 粒子蛋白質: 予定)。

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)
 石川晃一 (国立感染症研究所エイズ研究センター 主任研究官)
 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 (独立行政法人国立病院機構名古屋医療センター第1内科 (臨床研究部))
 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BCGワクチンと組換えDIsワクチンについてサルを用いて、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)。DNAプライム・Gag発現SeV(SeV-Gag)ブーストワクチン接種サルモデルで、ワクチン誘導CTLによるSIV複製制御の可能性を調べた (俣野)。種々の組換えSHIVを用い、サルにおける病原性およびワクチン効果を検討した (三浦)。Envのprime-boostワクチンと最も効果的な防御免疫を誘導する弱毒ウイルスワクチンd-5Gとnef遺伝子欠損SIVについて宿主免疫応答を比較解析した (森)。Cyclic dodecapeptide-multiple-antigen peptide conjugate(cDDR5-MAP)抗原を免疫原として免疫応答とウイルス抑制を検討した (庄司)。粘膜免疫アジュバントをマウスで検討し、またカニクイサル6頭を用い、HIVのDNAワクチン候補としてHVJ envベクターとHIV-1env発現プラスミッドを経鼻投与し、SHIVの攻撃接種によりワクチン効果を検討した (石川)。

2) ワクチン免疫による防御機構の解明: 抗酸菌の分泌抗原 Ag85B 遺伝子を用いて DNA ワクチンに対する新規アジュバントの可能性を検討し、さらに酵母菌でのリコンビナント α 抗原蛋白の作成を試み、アジュバント効果を比較した (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

および免疫不全の解析を行った (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 *tal*, *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。感染性のないものが多かったのもので、感染性をもつ新規ベクターを構築した (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 の改良型を構築した。またこの HGV クローンが有する 5'UTR の IRES 活性を比較検討した。ヒトリンパ球を用いた HGV/HIV-1 の共感染実験および HGV ウイルス産生の検討を行った (佐多)。サル胎児脳から分離培養した神経幹細胞に細胞指向性の異なる 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。さらにミクログリア培養系を樹立した (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-typeHIV-1 に対する感受性等を追跡した。感染拡大の鍵を握る NKT 細胞へ抗原を提示する CD1d 分子の種族的な特性を解明した (高橋)。

(倫理面への配慮)

健常人の末梢血単核球、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: 組換えBCGワクチンとDIsワクチンのプライムブーストワクチンの基礎的なコンセプトを確立することができ、安全性の確認、そして著明なブースター効果が認められた (本多)。DNA プライム・Gag 発現SeV(SeV-Gag)ブーストワクチンで、SIV 複製制御に複数のエピトープ特異的 CTL が関与していること、SIV チャレンジ後のセットポイント期の血漿中ウイルス量を制御できる可能性が判明した (俣野)、nef 欠失弱毒SHIV 接種では防御効果が誘導されていること、また

nef 欠失部位へのインターフェロン γ 遺伝子組込により攻撃接種ウイルスの増殖抑制に働く面と増幅に働く面があることを明らかにし、強毒及び弱毒 SHIV 分子クローン間の差異が env gp41 の配列の違いによること、幼若な T 細胞に対する障害性が病原性に重要であることが判明した (三浦)。Env の prime-boost ワクチンは初期感染を抑制したが、その後の感染抑制に d-5G Env ワクチンの効果は見られなかった。Gag 特異的細胞性免疫が感染制御と関連し、また Env のワクチン抗原としての重要性が見いだされた。エイズウイルス感染を低レベルに抑制する宿主応答と感染防御免疫との関連性が示唆された (森)。マウスで誘導された抗体は細胞表面の native な human CCR5 を特異的に認識し、HIV-1R5 ウイルスの感染防止効果を示した。またサルでも抗体が誘導され、clade に関わらず HIV-1 R5 ウイルス対しても感染防止効果を示した。免疫から 1 1 週目に SHIV162p3K 株 10TCID50 を静注 Challenge した結果、3 頭とも血中 Viral loads が $2\log\sim 3\log$ 低下した (庄司)。経鼻免疫では低分子のキトサンおよび HVJ env ベクターがマウスで高い抗体価を示した。HIV の DNA ワクチン候補のサルでの効果はいまだみられていない (石川)。

2) ワクチン免疫による防御機構の解明：リコンビナント α 抗原蛋白は HIVenv gp120 蛋白に対し非常に強い抗体の誘導と Th1 タイプのサイトカインの産生が認められた。リコンビナント Ag85B 蛋白の新たな精製法を確立した (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。Nef 発現が NK とマクロファージ活性化を抑制する予期せぬ所見を得た (神奈木)。HIV-1 gp120 存在下で、非結核性抗酸菌を樹状細胞に感染させたが、免疫不全は誘導されなかった (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、抗原特異的な T 細胞活性化診断系を確立しつつある (横田)。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 を構築した。新しい CTL epitope を gag 上に同定した。また感染性をもつ新しいベクターを構築した (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：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一過性に検出した。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 複製抑制は再現されなかった (佐多)。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。サル胎児脳由来ミクログリアを SIV 感染 BPC 由来ニューロン・グリア培養系に添加することで、ニューロン or/and グリア細胞に感染していた SIV

がミクログリアに感染し、増幅産出されることがわかった (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。また CD1 分子群が種属内では非常に高い保存性を有していた (高橋)。

4. 考察

組換え BCG および DIs ワクチンが治療用ワクチンとしての可能性を示唆した (本多)。CTL 誘導型ワクチンにおいて長期の SIV 複製制御維持につながる可能性が示唆出来た (俣野)。腸管免疫組織防御を介した性器免疫機構の防御のためには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 3 年間の研究計画は、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：組換え BCG と DIs を用いたプライムブーストワクチンの基本的概念を確立し、前臨床レベルでのメドをつけることができた。CTL 誘導型エイズワクチンによる HIV 複製制御の可能性を世界で初めて示し、CTL 誘導型エイズワクチン開発の合理性および複数のエピトープ選択の重要性を示すことができた。自己抗体誘導型ワクチンの有効性を示すことができた。

3) 今後の展望について：ワクチンの実用化のためには臨床医学的、及び社会学的な検討に基づく共同研究が必須である。長期のウイルス複製制御維持に必要な機序を解析しウイルス多様性に対する効果を検討する。基礎的な感染制御機構の解明が進み、またアジュバントの検討により、ワクチン開発の基盤が形成されつつある。自己抗体型ワクチンとして経口粘膜免疫ワクチンの開発をめざす。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

組換え BCG と DIs を用いたプライムブーストワクチンの基本的概念を確立した。SIV 複製制御において複数のエピトープ特異的 CTL の関与、SIV チャレンジ後のセットポイント期の血漿中ウイルス量を制御により長期複製維持が可能であることが示唆された。組換え SHIV のワクチン効果および病原性に関わる知見を明らかにした。自己抗体誘導型ワクチンの感染抑制能を示すことができた。新しいアジュバントの効果が確認できた。感染制御の機序の解明として基礎的データが集積された。

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：HIV 感染予防に関する研究（平成 17 年度のみの成果概要）

課題番号：H15・エイズ・010

主任研究者：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：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）、石川晃一（国立感染症研究所エイズ研究センター 主任研究官）、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（独立行政法人国立病院機構名古屋医療センター第 1 内科（臨床研究部））、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 BCG ワクチンと組換え DIs ワクチンについて至適化を行いサルを用いて検討し、さらにワクチン抗原の製造や評価に関する基準を検討した（本多）。DNA プライム・SeV ブーストワクチン接種サルに SIVmac239 チャレンジ後、血漿中ウイルス量、ウイルスゲノム塩基配列、ウイルス特異的 CTL レベル等を測定した。検出限界以下のサンプルについては、血漿を濃縮しウイルス定量を行った（俣野）。種々の組換え SHIV を用い、サルにおける病原性、感染制御に重要な免疫機構およびワクチン効果を検討した（三浦）。d-5G 感染ザル、nef 遺伝子欠損 SIV 感染ザル、SIV239 感染を長期に抑制したサル、SHIV-RT 感染後早期治療ザルに SIVmac239 をチャレンジ感染し、血中ウイルス RNA 量、env 遺伝子の塩基配列を調べ感染防御効果を検討した（森）。Cyclic dodecapeptide-multiple-antigen peptide conjugate (cDDR5-MAP) 抗原を免疫原として免疫応答とウイルス抑制を検討した（庄司）。粘膜免疫アジュバントをマウスで検討し、またカニクイサル 6 頭を用い、HIV の DNA ワクチン候補として HVJ env ベクターと HIV-1env 発現プラスミッドを経鼻投与し、SHIV の攻撃接種によりワクチン効果を検討した（石川）。

2) ワクチン免疫による防御機構の解明：抗酸菌の分泌抗原 Ag85B 遺伝子を大腸菌でのリコンビナント蛋白の作成を試み、アジュバント効果を比較した（保富）。CD28 ファミリー分子を介する HIV-1

複製抑制効果について詳しく解析した（神奈木）。M. avium の菌体糖脂質 GPL の合成系を解析し、また M. smegmatis を用い GPL 合成系に關与する代謝酵素のノックアウト株を作製し M. avium の相同酵素遺伝子を導入しその性状を解析した（牧野）。レンチウイルスベクターシステムを構築し Jurkat 細胞あるいは末梢血単核細胞 (PBMC) に感染させ感染効率と IFN promoter 活性を測定した（横田）。gag(-pro)領域を移動可能な新規 HIV-1 vector 作成し、新規 CTL epitope 同定法を検討した（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 の改良型を構築した（佐多）。サル胎児脳由来ミクログリアと BPC 由来ニューロン・グリア培養系における SIV の感染性を比較しミクログリアを添加した影響を調べた（中島）。初乳細胞表面の CD4 分子及びケモカイン・レセプターおよび DC-SIGN の発現動態を検討し、R5 ウイルスを感染させ、感染伝播力を追跡した。粘膜組織由来の CD8α 陽性 CD4 陽性 double positive 細胞株を不死化させた。また、NKT 細胞へ抗原を提示する CD1d 分子の種族的な特性を遺伝的に追跡した（高橋）。

（倫理面への配慮）

健常人の末梢血単核球、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：組換え BCG ワクチンのコドン至適化と DIs ワクチンのブーストワクチンの基礎的なコンセプトを確立することができた（本多）、チャレンジ後のセットポイント期以降、血漿中ウイルス量が検出下限以下となったサルが 5 頭いた。うち 2 頭では約 1 年でウイルス血症の再出現がみられたが、残り 3 頭ではウイルス複製抑制が維持されていた。セットポイント期以降 1 年までの濃縮血漿を用いた解析では、ウイルスは検出されなかった（俣野）、強毒及び弱毒 SHIV の感染初期における腸管と深

部リンパ系組織におけるウイルス動態と CD4 陽性 T 細胞に対する障害性の違いについて明らかにし、幼若な T 細胞に対する障害性が病原性に重要であることが判明した。半生 DNA ワクチンの投与方法として坐薬を用いたところ細胞性免疫が誘導された(三浦)。チャレンジ前のサルでは血中ウイルス量が検出限界前後 (100 copy/ml) で感染は制御されていた。SIVmac239 を静脈内接種後血漿ウイルス量の増加は観察されなかった。増加した 1 頭では SIV 抗体価が非常に低かった。d-5G 感染ザルにおける d-5Genv 遺伝子の変異は低く、新たな変異は検出されなかった(森)。cDDR5-MAP 抗原をカンクイサルに免疫し、一回目免疫から 11 週目に SHIV162p3K 株を経静脈的に播種した結果、3 頭とも血中の Viral load が $2\log-3\log$ 低下する感染防御効果が認められた(庄司)。経鼻免疫では低分子のキトサンおよび HVJ env ベクターがマウスで高い抗体価を示した。HIV の DNA ワクチン候補のサルでの効果は検討中である(石川)。

2) ワクチン免疫による防御機構の解明：リコンビナント α 抗原蛋白は HIVenv gp120 蛋白に対し非常に強い抗体の誘導と Th1 タイプのサイトカインの産生が認められた(保富)。可溶性 CTLA-4 に量依存的な HIV-1 複製抑制が認められ、マクロファージを介した細胞増殖抑制を伴う HIV-1 抑制であった。他の実験系で Nef 発現が NK とマクロファージ活性化を抑制した(神奈木)。M. avium 代謝遺伝子を各ノックアウト株に導入したところ、合成初期は M. smegmatis と共通の経路を用い、後期は M. avium 特異的経路が働き、病原性に関与する GPL が形成されることが明らかになった(牧野)。Jurkat 細胞でプロモーターの活性を検出できた(横田)。InFusion システムを用いて gag, pro 等遺伝子を簡易に移動できる construct の作成に成功した(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 複製中間体であるマイナス鎖 RNA を細胞内および上清中で一過性に検出した(佐多)。ミクログリアを SIV 感染 BPC 由来ニューロン・グリア培養系に添加すると培養上清中の SIV gag 蛋白量が増大した。またミクログリアには β ケモカインが誘導された(中島)。乳汁中の HIV 感受性を有する CD4 陽性細胞の大半は DC-SIGN を有した樹状細胞群であった。粘膜内に棲息する CD8 $\alpha\alpha$ 陽性 CD4 陽性の T 細胞群の方がウイルスの複製能が高かった。また CD1d 分子の種族的な特性を解明した(高橋)。

4. 考察

組換え BCG および DIs ワクチンの臨床試行の可能性について検討できる段階にきた。チャレンジ

後のセットポイント期の血漿中ウイルス量を、血漿濃縮による感度の高い方法によっても検出されない程度に抑制することができれば、長期の SIV 複製制御維持・エイズ発症阻止につながることを示唆された。SHIV 感染による CD4 陽性 T 細胞の増殖分化障害発生機序を追究することにより、エイズの病原性解明に向けて極めて重要な知見が得られると考えられた。自己抗体型ワクチンとして粘膜免疫ワクチン開発が必要である。

5. 自己評価

1) 達成度について：各分担研究者の研究計画は、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：組換え BCG と DIs を用いたプライムブーストワクチンの基本的概念を確立し、前臨床レベルでのメドをつけることができた。CTL 誘導型エイズワクチンによりセットポイント期のウイルス量を低下させることがエイズ発症阻止の結びつくことを実証することができた。自己抗体誘導型ワクチンの有効性を示すことができた。

3) 今後の展望について：ワクチンの実用化のためには臨床医学的、及び社会学的な検討に基づく共同研究が必須である。長期のウイルス複製制御維持に必要な機序を解析しウイルス多様性に対する効果を検討する。基礎的な感染制御機構の解明が進み、またアジュバントの検討により、ワクチン開発の基盤が形成されつつある。自己抗体型ワクチンとして経口粘膜免疫ワクチンの開発をめざす。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

組換え BCG ワクチンと DIs ワクチンのプライムブーストワクチンの基礎的なコンセプトを確立し、実用化への道を開くことができた。ワクチン接種により血漿中ウイルス量を極めて低い値に低下させることがエイズ発症阻止に結びつくことを示した。腸管や深部リンパ系組織における詳細なウイルス感染動態と免疫細胞動態の実験解析基盤を確立できた。cDDR5-MAP 抗原による自己抗体誘導による HIV-1 感染防止戦略は有望である

7. 知的所有権の出願・取得状況(平成 17 年度および予定)

出願番号：2005-317905 出願日：2005.11.01、腸管免疫賦活剤、発明者：庄司省三、三隅将吾、中山大介、出願人：国立大学法人熊本大学

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・助教授）、宮澤正顕（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ず、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った。

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-Meier 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）。マウス・フレンド白血病ウイルス (Fv) 感染時の中和抗体産生を制御する宿主遺伝子をバッククロス実験等により同定した。イタリアの HIV 暴露非感染を含むコホート研究と共同し、ヒトの相同位置にある遺伝子座の連鎖不平衡から HIV 感染抵抗性遺伝子を同定した（宮澤）。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）。

（倫理面への配慮）

文部科学省、厚生労働省、経済産業省合同の『ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針』および文部科学省、厚生労働省合同の『疫学研究に関する倫理指針』に該当する研究においてはこれらを遵守する。本研究の成果をヒトに臨床応用する場合には研究担当者の所属する機関の承認を得、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得た上で、安全に細心の注意を払う。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。

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

IL4-589T のホモ接合体あるいは RANTES -28G を持つ HIV 感染者はそれぞれの対照群より死亡率が低い。一方、RANTES -403A を持つ HIV 感染者は対照群より優位に死亡率が高い（塩田）。HIV に感染してほぼ 20 年経過している日本人血友病者のコホートを再編成し、長期未発症者 (LTNP) を含め、平成 15 年度には 117 検体を収集した（三間屋）。感染時期がおおよそ特定できる HIV 感染血友病 (LTP 5 例を含む) の総計 111 の培養末梢血由来リンパ球から遺伝子発現プロファイリングを行ったが、LTNP に特異的な発現を示す遺伝子の特定にはいたらなかった（渡辺）。Fv 抵抗性遺伝子をマウス第 15 染色体上 D15Mit71 近傍にマップした。抗体産生能に関係ありそうな候補遺伝子をレンチウイルスベクターでマウス受精卵に導入し、その機能同定を行っている。マウス第 15 染色体上 D15Mit71 近傍と相同的なヒト D22S272 近傍の解析をイタリアの HIV 暴露非感染コホートで行い、暴露非感染者で頻度が高い新規 SNP を発見した（宮澤）。

(2) HIV 特異的細胞性及び液性免疫

日本人の約 70%が発現する HLA-A24 によって提示される HIV 上の CTL エピトープ 4 箇所、7 ペプチドを患者末梢血から分離誘導した自身の樹状細胞 (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 例に対して実施した。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。4 名中 2 名で Nef138 エピトープに特異的に反応する CD8 陽性細胞の増加が見られた（岩本）。HLA-B*3501 陽性患者の HIV 遺伝子配列解析から CTL による選択圧の結果と思われる特異変異を見出した（滝口）。HIV 感染後 10 年以上未治療・未発症の HIV 感染血友病者では HLA-B*1507 の頻度が高く、HLA-B*5401 の頻度が低い。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）。HIV の中和エスケープに関して env 遺伝子可変部位のみならず C3 領域の配列の変異も重要であることを明らかにした（松下）。

(3) HIV の病態に関わる宿主側及びウイルス側の因子

HIV 感染抵抗性宿主因子 TRIM5α の B30.2 領域がウイルス

特異性を決定していることを見出した（塩田）。HIV 感染に重要な宿主因子として Nup98 及び CD63（+その変異体 CD63dN）を同定した。核膜孔複合体の構成蛋白質である Nup98 はウイルス cDNA の核内移行に必須である。CD63 の N 末端欠損変異体は CXCR4 の細胞表面発現を完全に抑制し、HIV 感染抵抗性に働く。野生型の CD63 も HIV 感染粒子の形成を 100 分の 1 以下に抑制する（小柳）。OVA 特異的 T 細胞レセプターとアデノウイルスレセプターを共発現するトランスジェニックマウスを作製し、*nef* 遺伝子組換えアデノウイルスベクターにより成熟 T 細胞に Nef を発現させた。Nef 発現により T 細胞の表現型がヘルパー型から抑制型に変化する可能性が示されたが確証にいたらなかった。Nef 発現 T 細胞はヘルパー活性が低下し、*nef* による CD4 発現抑制が原因と考えられた（竹森）。Vpr の発現によって高頻度に染色体分離異常が認められ、染色体 DNA の二重鎖切断（Double strand breaks:DSB）が誘導されることを見出した。患者血清中の 100pg~1ng/ml 程度の Vpr を検出できる測定系を開発した（石坂）。Hu-PBL-SCID マウスの実験系を用いてケモカインレセプター阻害薬の効果や耐性ウイルスの出現を検討できる系を作製した。IL4 または IL4+GM-CSF 存在下で抗 CCR5 及び抗 CXCR4 単クローン抗体を用いて単球を架橋すると樹状細胞（DC）に分化した。この DC を不活化 HIV 粒子で感作すると R5 HIV 抑制因子を産生する CD4 陽性細胞を誘導した。ここにさらに CXCR4 阻害薬を投与すると R5 ウイルスと X4 ウイルスの重感染に抵抗性となった（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
タイ国では HIV 感染のうねりが男性から女性へと大きく変化した。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、女性においてのみ有意差の見られた SNP もあった（塩田）。平成 15 年度に LTNP に特徴的な発現を示すと考えられた 21 遺伝子は LTNP が 3 例しか含まれていなかったためのノイズであると考えられた。LTNP が臨床的分類である以上、病態進行症例も避けられないことが解析を難しくしている。（渡辺）。HIV 暴露非感染者と感染パートナーとで対立遺伝子頻度の異なるマイクロサテライトマーカーと SNP 遺伝子座を発見した（宮澤）。

(2) HIV 特異的細胞性及び液性免疫

“治療ワクチン”によって特異免疫を誘導できなかった 2 症例は HAART 開始前の最低 CD4 数が低く（50 及び $2/\mu\text{L}$ ）、いったん免疫が荒廃した感染者ではワクチン効果がより不良である可能性が示唆された（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にした（滝口）。発症促進の可能性が認められた HLA-B*5401 は、欧米人には少ないが日本人や中国人では

頻度の高いアレルである（三間屋）。高い交差中和抗体活性を持つ LTNP から新規の中和抗体を樹立しその中和メカニズムを研究する必要がある（松下）。

(3) HIV の病態に関わる宿主側及びウイルス側の因子

Nup98 及び CD63 とその変異体の 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）。血清中の Vpr が測定できるようになったことで、HIV 感染病態と Vpr の関係が新たな側面から解析できる。Vpr によるクロマチンリモデリングが静止期の細胞への HIV の感染能力やエイズにおける悪性腫瘍の多発に関連している可能性がある（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。単球上のケモカインレセプターを架橋することにより Th1 誘導性 DC を培養誘導できることを発見した。これらの実験系を使って未知の R5 HIV 抑制性 CD4 ファクターを発見できた（田中）。

5. 自己評価

タイ国ランパン県の HIV 感染者コホートの臨床追跡調査のデータが膨大で多大な時間がかかったが、IL 4 および RANTES のプロモーターにおける遺伝子多型と病態進行の関係に民族差が存在するか否か、という当初の目的は達成できた（塩田）。培養を加えず少量の血液で遺伝子発現解析が可能な系を改めて確立する必要がある（渡辺）。LTNP は主治医と強い信頼関係にある。主治医をつなぐコホートを維持し、情報の共有と研究を進めていくことは極めて重要であり、その基盤が形成できた（三間屋）。マウス受精卵にレンチウイルスベクターで遺伝子導入できる系が開発できた。HIV 感染抵抗性遺伝子の一つを同定できた可能性が高く、国際的に評価される独自の成果である（宮澤）。アジュバンドなど HIV 感染者におけるワクチンの免疫誘導効果の上昇を高める方法の開発が重要である（岩本）。HIV 感染に重要な新規の宿主因子を 2 つ同定できた。CD63 の HIV 抑制機構の解析は進んでいるが、Nup98 の役割は解明できていない（小柳）。Th1 誘導性 DC を培養誘導する系の確立と新たな CD4 ファクターの発見は極めて評価できる（田中）。

6. 結論

HIV 抵抗性遺伝子や SNPs の同定、治療ワクチンの臨床応用研究等で成果を挙げたが、今後メンバーの組換え等により新たな視点や共同研究を盛り込み、エイズ発症阻止に向けたさらなる研究が必要である。

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)。