

200500710 A

厚生労働科学研究費補助金
エイズ対策研究事業

開発途上国における薬剤耐性予防など Antiretroviral 治療の
質的向上と推進に関わる研究

平成 17 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 若杉 なおみ

平成 18(2006)年 4 月

目 次

I.	総括研究報告		
	開発途上国における薬剤耐性予防など Antiretroviral 治療の質的向上 と推進に関わる研究	_____	1
	若杉なおみ		
II.	分担研究報告		
	1. HIV/結核重感染患者への Antiretroviral 治療に関する研究		
	石川信克	_____	4
	2. 途上国における薬剤耐性および副作用を回避するための HIV 治療法の研究		
	岡 慎一	_____	7
	3. HIV-1Vpr による白血球減少及び染色体異常に対する ARV 治療の影響		
	志村まり	_____	8
	4. 開発途上国における母子感染の予防と治療に関する研究		
	若杉なおみ	_____	10
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	_____	13

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
総括研究報告書

開発途上国における薬剤耐性予防など Antiretroviral 治療の質的向上と推進に関わる研究

主任研究者	若杉なおみ	国立国際医療センター研究所 疫学統計研究部長
分担研究者	石川信克	結核予防会結核研究所 副所長
	岡 慎一	国立国際医療センターエイズ治療研究開発センター 臨床研究開発部長
	志村まり	国立国際医療センター研究所難治性疾患研究部 室長

1. 研究目的

HAART (Highly Active Antiretroviral Therapy) が先進国の感染者に生存の延長、QOL の回復という目に見える効果を示して以降、エイズ発症者・死亡者が蓄積増加するアジア、アフリカなどの開発途上国においても感染者へのケア・治療が客観的必要性となってきた。日本政府が呼びかけた沖縄感染症対策イニシヤチブなどを起点として、WHO は開発途上国におけるエイズ治療のためのガイドラインを作ると共に、2005 年までに世界で 300 万人の HIV 感染者を ARV 治療に入れようという「3 by 5」イニシヤチブを開始した。しかし当然のことながら危惧される ARV (Antiretroviral) 治療による毒性、副作用、薬剤耐性の発現に対して、資源の乏しい開発途上国でそれを極力予防しながら ARV 治療を成功させる方法に関する研究が求められている。本研究は、開発途上国における ARV 治療の質的向上を目的として、1) ARV 治療による毒性の機序と実態、治療効果および薬剤耐性に関連するウイルス学的研究。や 2) 結核との重感染者、妊婦・小児など特殊対応を必要とするグループの ARV 治療に関連する課題の解明を行う。

2. 研究方法

全分担研究者が、アフリカのザンビア国現地の HIV 感染者における臨床的・疫学的研究 (①～③)、あるいは感染者の検体を用いたウイルス学的研究 (④、⑤) を実施するか、計画と準備開始を行なった。

① ARV 治療の第一選択薬である

EFV (Efavirenz) 濃度を通常の 3 倍高くする代謝酵素の遺伝子変異の発見をもとに、アフリカのザンビアのエイズ患者におけるその遺伝子型変異の頻度と EFV 副作用発現の実態と関連を把握し、治療費軽減にもつながる EFV 投与量減量を射程においた研究 (岡)。

② HIV 陽性妊婦から胎児への子宮内母子感染における胎盤の炎症 (絨毛膜羊膜炎) の影響とその検出法、予防的治療の効果 (若杉)。

③ 結核・HIV 二重感染者の、ザンビア国ルサカの貧困地域におけるコミュニティボランティアによる結核 DOTS (直接監視下短期療法) + ARV 治療の試みにおける、抗結核薬耐性頻度とその影響 (石川・御手洗) をみる研究。

④ HIV 感染における白血球減少および染色体異常の責任分子の同定とその測定法の確立と ARV 治療効果研究 (志村)。

⑤ 薬剤耐性、治療効果をみるためのザンビア感染者から分離した HIV-1 サブタイプ C の感染性クローンの研究 (研究協力者 山本)。

①と②は計画準備のための現地調査を行ったのち、ザンビア (および国内) の倫理委員会にプロトコールを承認され、現地での患者リクルートを開始した。③は現地予備調査を行い、計画を策定した。④⑤は国内における実験室研究を遂行した。

(倫理面への配慮)

ザンビア国および国内の倫理委員会の承認を受け、インフォームドコンセントのもとに患者本人の同意を得た上で検体採取、質問表調査を行なっている。

3. 研究結果

① ザンビアの EFV 治療開始あるいは予定のエイズ患者で、CYP2B6*6/*6 の頻度をみる Small pilot study が開始され、その頻度が日本国内患者の 3% よりも明らかに高頻度であるという preliminary な感触を得た。また患者リクルートと EFV 治療の副作用(めまい、不眠、精神症状など)に関する調査が進行中である。今後の EFV 減量治療の効果に関する大規模臨床研究の準備も行なわれた。

② ザンビアの HIV 陽性妊婦における、絨毛膜羊膜炎のマーカーである子宮頸部顆粒球エラストラーゼおよび出生児の HIV 感染を PCR で測定することにより、胎盤の炎症が HIV の子宮内母子感染と最もよく関連することが明らかになり、抗生物質による予防的治療に活用できる可能性が示された。

③ 当該研究フィールドの結核患者の 95% が HIV 検査 (VCT) を受け入れ 80% に HIV の二重感染があることが判明した。同時に喀痰塗抹陰性・培養陽性が多く、コミュニティボランティアによる治療支援と結核迅速診断(培養・感受性)が、結核・HIV 感染者の治療効果に与える影響をみる研究計画を策定した。

④ HIV-1 の Vpr は総リンパ球数と逆相関し染色体異常 (premature sister chromatid separation; PCS) の原因分子であることが明らかとなった。また Vpr に対するモノクローナル抗体が作成でき血漿中 Vpr の ELISA による測定がほぼ確立できた。今後ザンビア患者血清の測定を試みる。

⑤ 8名のザンビアエイズ患者から合計 29 の感染性クローンを得た。その系統樹解析から解析した 9つのクローンは全長にわたりすべてピュアなアフリカ型サブタイプ C であることが判明した。また感染実験の結果、R5HIV-1 であることがわかった。

4. 考察

エイズ発症者・HIV 感染率が世界でも最も高い南部アフリカ地域にあるザンビア国のエイズ患者の ARV 治療の現場で、感染者の治療に関連する本研究班の諸研究が着手され、preliminary な興味ある成果が得られ始めた。

今後アフリカでも使用が膨大に増えるであろう EFV の副作用に関連する CYP2B6*6/*6 の頻度がアフリカで高いことはそれだけで重要な結果であり、副作用と治療脱落をできるだけ防ぎ、薬剤耐性を減らし、さらに資金の乏しいアフリカでの投薬量の減量の可能性を示す端緒となる。

また HIV 感染妊婦の胎盤炎症と母子感染の関連も ARV よりも安価な抗生物質治療による HIV 母子感染の減少の可能性を示唆し、さらに ARV による HIV 母子感染予防の効果を向上させることにつながる。

結核との二重感染者は増加の一途をたどりその治療は困難を極めているが、ザンビアで結核 DOTS の方式で行なっている治療実践の基礎的データを明らかにし、より正確な結核診断、抗結核薬耐性保持者の確認、ARV 治療への影響を研究することの意義は大きい。

HIV-1Vpr によるリンパ球減少は、WHO が開発途上国における ARV 治療開始基準およびフォローマーカーとして、高価な CD4 測定の代りに総リンパ球数を提示していることの学術的基盤を提供する。また世界的な ARV 治療の拡大による HIV 感染者の延命に付随する悪性腫瘍高発の問題と関わる。

逆転写酵素阻害剤やプロテアーゼ阻害剤など、現行の薬剤に対する感受性が HIV-1 のサブタイプにより異なるとの報告があり、ザンビアのエイズ患者からの HIV-1 サブタイプ C の感染性クローンの分離は薬剤耐性、ARV 治療効果、新薬開発の研究に重要な基盤を提供する。

5. 自己評価

1) 達成度について

各分担研究者、研究協力者(御手洗、山本、平岡)の本年度の達成度は非常に高く、ザンビア現地在住のエイズ予防財団リサーチレジデント平岡重矢医師の日常的な研究協力も得て、一般にアフリカ諸国では困難である現地フィールドでの研究体制セットアップと推進が順調に進んでいる。また日本国内におけるベンチ研究も開発途上国のエイズ状況に specific でその克服に重要なテーマで行ない、次年度はザ

ンビアの感染者の検体で研究する方向性が出てきた。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

EFV の血中濃度と副作用に深く関連している特定の遺伝子型の頻度が、感染者の多いアフリカにおいて初めて明らかになり、より耐性ウイルス出現を押さえ副作用の少ない治療法の開発に結びつくことが予想される（岡）。

HIV 母子感染予防は周産期の予防処置は実施に移されているが、その後に残る妊娠中の子宮内感染についてリスク因子が明らかになり、これまで世界では試みられていないエラストアーゼによる予防的検出と対策を具体化できる可能性がある（若杉）。

増加する HIV/結核二重感染者の臨床的実態を明らかにし、より正確な診断・治療を試みることにより、耐性 HIV の出現を防止し開発途上国のエイズ治療の成功に寄与することができる（石川・御手洗）。

Vpr と AIDS 病態との関連の研究は総リンパ球数減少の原因を明らかにすると共に、今後 ARV 治療の拡大、HIV-1 感染の長期化により、感染後期で高発すると予想される悪性腫瘍との関連についても解明が進む可能性がある（志村）。

開発途上国に特に患者の多いサブタイプ C の感染性クローンを世界に先駆けて分離した（山本）。

3) 今後の展望について

18年度は、ザンビア現地では岡による FFV 血中濃度や減量治療を含む大規模研究に進む予定である。また若杉は抗生物質による絨毛膜羊膜炎の治療の HIV 母子感染減少効果を見る研究を計画する。石川は現地セットアップを進め、HIV/結核感染者のコミュニティ DOTS による治療効果と抗結核薬耐性との関連の研究を本格化する。志村は血漿中 HIV-1Vpr の ELISA 測定、染色体異常分析をザンビア患者検体で試みる。

6. 結論

各分担研究者、研究協力者の本年度の研究目標は達成され、ザンビア現地における研究セットアップが完了あるいは着手され、予備調査や患者リクルートが開始され、18年度の継続によって世界に報告するに値すると考えられる研究成果が得られた。これらはすべて資源の乏しい開発途上国で開始されたエイズ治療の質的向上に貢献するものと考えられる。日本におけるベンチ研究もその成果をもとにザンビア検体への応用により、より開発途上国のエイズの実態に即した結果が期待される。

7. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

なし

厚生労働科学研究費補助金(エイズ対策研究事業)

分担研究報告書

HIV/結核重感染患者への Antiretroviral 治療に関する研究

分担研究者 石川信克 結核予防会結核研究所副所長

研究協力者 御手洗聡 結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンスセンター細菌検査科

1. 研究目的

発展途上国において、結核は HIV 感染患者の主要な合併症である。また、結核患者の多くが HIV に重感染していることが多数報告されている。途上国における結核の検査室診断は、主に喀痰の塗抹鏡検に依存しているが、HIV/AIDS 患者では炎症反応が十分に起こらないことにより間質性に拡散して塗抹陰性となることが多く、正確な診断を得るため迅速・高感度な検査法(培養・薬剤感受性検査)の導入が検討されつつある。

一般に途上国での抗結核化学療法は標準治療方式による empiric therapy であり、耐性結核菌が蔓延した状態では Anti-Retroviral Therapy (ART)の導入によっても効果的な治療効果の改善が得られない可能性がある。実際に New York での AIDS 患者における多剤耐性肺結核の蔓延に際しては、早期の診断と耐性に対する適切な治療および治療コンプライアンスの改善が予後に影響していることが示されている。

現在 Global Fund 等により途上国でも ART が拡大しつつある。ART を含まない結核治療経過における耐性結核と免疫不全の影響を評価した報告はあるものの、発展途上国で ART を実施する過程において結核の予後に対する耐性の影響を評価した報告はない。

今回 HIV による免疫不全を基礎に持つ結核患者の診断および治療において ARV 治療を効果的に実施することに関連して、診断効率および耐性結核菌感染の影響を評価することを目的とする。

2. 研究方法

ザンビア共和国はサハラ砂漠以南に位置する内陸国であり、およそ 10 万人対 500 の割合で結核患者が発生している。また、HIV 高蔓延地域として結核患者のおよそ 70% が HIV 陽性である。研究実施サイトとしてザンビア共和国首都ルサカの一地域を設定した。

対象患者

約 500 名の結核疑い患者をスクリーニングし、100

名程度の結核・HIV 感染患者を対象とすることを目標とする。患者の診断・治療・経過観察は Zambia Tuberculosis and Leprosy Trust (ZATULET)クリニックで実施する。対象に関して問診、理学的検査を実施し、結核が疑われる者に対して抗酸菌(結核菌)検出のための検査を実施する。結核と診断された患者は同施設内にて Voluntary Counseling Testing (VCT)を受けるよう勧奨し、VCT 結果の判明した(HIV 陽性・陰性)となった結核患者を対象として経過を観察する。結核患者については基本的に ZATULET のボランティアによる対面内服療法 (Directly Observed Treatment: DOT)を行い、追跡期間は治療終了までの 8 ヶ月間として、2 ヶ月目、5 ヶ月目、8 ヶ月目に治療経過を判定する。

抗酸菌検査

結核疑い患者から少なくとも 2 検体の喀痰を採取する。採取した喀痰はザンビア大学教育病院結核検査室にて塗抹鏡検、培養、同定、感受性試験を実施する。培養については、NALC-NaOH による雑菌処理、遠心集菌を行い、鶏卵固型培地 (Lewenstein-Jensen: L-J) および液体培地 (BACTEC MGIT 960: MGIT) を用いる。培養陽性検体については薄層免疫クロマトグラフィー同定試験(キャピリア TB: 日本ベクトンディッキンソン)を実施し、さらに L-J 培地および MGIT による薬剤感受性試験を Isoniazid (INH)、Rifampicin (RIF)、Ethambutol (EMB)、および Streptomycin (STR)の主要抗結核薬 4 剤について実施する。非結核性抗酸菌感染については対象から除外する。

Anti-Retroviral Therapy (ART)

結核および HIV の重感染が証明された症例については、基本的に VCT の基準に従って ART を勧奨する。ART の開始時期及び治療内容についてはザンビア国の治療ガイドラインに従う。

データ解析

患者の診断に関して、培養法の寄与に関する検討をおこなう。また、薬剤感受性試験の結果が得られる

までの時間と、患者への利益に関する検討を行う。さらに DOT による結核・HIV 重感染患者の治療経過に対する影響を判断する。

(倫理面への配慮)

研究プロトコルを作製し、ザンビア側と倫理的問題について検討しており、通常の患者ケアの範囲内として倫理的な問題はないものと考えられる。また、結核・HIV 感染症ともに診断・治療に関しては全てザンビア国内の医療ガイドラインに従う。

3. 研究結果

研究協力者・御手洗の予備調査では、当該国の結核患者発生率は 499/100,000 (WHO 2005) である。HIV 感染を合併しているのが約 70% であり、その約 1/3 が CD4 200/μl 以下である。結核菌の薬剤感受性試験に関する調査では、22% の患者に何らかの薬剤耐性が見られ、多剤耐性菌も 4.4% あることが報告されている (2002)。これらの患者における臨床経過では、新規患者での脱落率が 32.7% と高く、8 ヶ月治療終了時点で喀痰陰性を確認した患者は 48.6% しか認められていない。一方既治療 (再治療) 患者では脱落は少ないものの、死亡が 41.2% も認められ、半数以上の患者が INH/RIF/EMB/STR/Pyrazinamide (PZA) の 5 剤併用で治療されているにも関わらず予後不良であることが示されている。この調査が行われた時点ではザンビアは国として DOT を実施しておらず、ART も一般には導入されていなかった。

現在までにザンビア側との研究体制を確立し、研究プロトコルの作成を行い、患者のスクリーニングを開始している。

4. 考察

HIV 感染患者の結核については、その非典型的臨床所見から診断に苦慮するケースが多く、塗抹鏡検による検査室診断も、陽性率が低く効果的でないことが知られている。これに対処するため WHO は主に迅速培養・感受性検査システムの導入を進めようとしているが、このシステムがどの程度結核・HIV 患者の診断を含む予後の改善に有用であるかは証明されていないのが現状である。今回の研究は HIV 感染者の結核診断の効率について、迅速診断システムの有用性を検討する上で重要と考えられる。

治療については、現時点で ART・DOT が結核・

HIV 重感染の予後にどのように影響するかは明確でなく、これに耐性結核の影響がどれだけあるかもはっきりしていない。予備的な結果は DOT/ART 導入以前のものであり、DOT の導入によるコンプライアンスの改善が治療経過に影響すれば、特に再治療患者での死亡数の減少に寄与する可能性がある。しかし、既治療患者では耐性獲得率が高いことが予想され、これによる影響がどの程度あるか、また、免疫不全そのものによる死亡の実態が明確になるものと考えられる。

分担研究者である石川は、ザンビア共和国で実施されている国際協力機構 (JICA) のエイズ・結核コントロールプロジェクトの国内委員であり、このプロジェクトの活動の一環として、ルサカ市内の居住区 (コンパウンド) を拠点として結核の DOT を導入口とした ART・DOT 治療に関する operational research を 2004 年度から推進している。このフィールド研究では結核患者に HIV 陽性者が多いことから、結核治療に現在標準的に用いられる DOT を、ART にもそのまま導入し、その効果を検討している。人的資源を含めてあらゆる資源に乏しい途上国においても、結核の DOT は広く普及しており、治療コンプライアンスの向上に寄与して治療成功率を押し上げている。この方法がそのまま ART に応用可能かを検討しているが、現時点では結核患者の 95% が VCT を受け入れており、ART への入口としての価値は高いと思われる。また、結核の診断についても多くの塗抹陰性・培養陽性が認められており、これが迅速に行われれば診断・治療的価値は高いことが期待される。(personal communication)

5. 自己評価

1) 達成度について

平成 17 年 12 月時点で、予備調査及び研究に関するザンビア側の同意とセッティングをほぼ終了し、患者のスクリーニングを開始した。薬剤感受性試験に関して外部精度保証が必要なことなどあり、達成度は 85% 程度と考える。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

考察にも述べた通り、ART の入口として結核は重要な疾患である。ART の主な問題はコンプライアンス

であるが、結核 DOT が適応可能であり、機能することが証明されれば HIV 感染者の予後改善に寄与することは明白であろうと思われる。また、コンプライアンスを改善・適正化することにより、耐性 HIV の出現を防止することにも有用と思われる。

3) 今後の展望について

抗酸菌迅速培養・感受性システムが患者の予後改善に有用と言うことが証明されれば、世界的な導入の方向性を支持することになる。また、DOT の拡大により結核、HIV とともに治療成功率が向上し、診断率が上昇することが期待される。HIV については感染予防措置との緊密な連携が必要になるものの、DOT は教育活動でもあるので、副次的に疾患の内容について啓蒙され、将来的には患者の数的な減少が見込まれる。

6. 結論

平成 17 年度 12 月までに、HIV/TB 重感染患者への ARV 治療に関する研究として、ザンビアでの予備的な調査分析、研究プロトコールの作成、現地スタッフとの討議等を実施し、研究体制を確立した。結核 DOT の重要性が示されるとともに、ART 導入への入口としても有用であることが示された。これらを基礎として、来年度は ART における DOT の実践性、また HIV 患者の診断・治療における検査室機能の有用性の評価を実施する。

7. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

なし。

途上国における薬剤耐性および副作用を回避するためのH I V治療法の研究

分担研究者 岡 慎一 国立国際医療センターエイズ治療研究開発センター部長

1. 研究目的

途上国においても Global Fund の援助を受けいよいよH A A R T療法が始まった。しかし、投与薬剤の組み合わせは限られており、治療失敗後の選択薬も少ない。したがって、途上国でこそ薬剤耐性や副作用を回避するための対策が必要である。このためには、どのような方策が可能であるかを検討することを目的として本研究を行った。

2. 研究方法

われわれは、H I V治療の第一選択薬であるE F V濃度を通常の3倍高くするE F Vの代謝酵素の遺伝子変異を発見した。現在E F Vは、アフリカでの使用は限定的であるが、今後使用量の増加が予想される。そこで今回、途上国であるザンビアにおいても遺伝子型により薬剤投与量を減量するいわゆるテーラーメイド治療が可能かどうかを検討するためのfeasibility studyを行った。まず、プロトコールに則った臨床試験が可能かどうかを見るための小規模パイロット試験を計画し、両国の倫理委員会に提出した。

(倫理面への配慮)

国立国際医療センターおよびザンビア大学の倫理委員会の承認を得た。

- ・国立国際医療センター(承認番号H17-87)
2005年10月3日
- ・ザンビア大学(承認番号FWA00000338)
2005年9月5日

3. 研究結果

お互いの臨床現場の状況を尊重しつつ、倫理的に問題のない形で臨床試験を考案し、両国より倫理委員会の承認を得て臨床試験の実施を行うところまで到達できた。今後この臨床試験を第一歩として、大規模試験へと移行していきたい。今回の臨床試験のタイトルは、[Exploration of clinical surrogate markers for CYP2B6*6/*6 in Zambian HIV-1-infected patients treated with

efavirenz]であり、small pilot studyである。

4. 考察

アフリカの研究者と綿密な打ち合わせを行い、臨床試験の計画を立て実施にこぎつけることは、地理的に離れていることから容易ではない。しかし、現在のアフリカのエイズの状況は悲惨であり、アフリカのために役に立つ臨床試験をアフリカで行うことの意義は大きい。本臨床試験自体は、小規模であるが、臨床試験の基盤整備が進み、より大きな検証試験が可能となれば、アフリカの国によるアフリカのためのエビデンスが作成されることになろう。

5. 自己評価

1) 達成度について

途上国においても臨床試験が可能であることを示すことができた点で今年度の目標は達成できた。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

今回の臨床試験により、E F Vの血中濃度と深く関連していることが明らかになっている特定の遺伝子型の頻度が明らかになる。このことにより、より耐性ウイルス出現を押しえ副作用の少ない治療法の開発に結びつくことが予想される。この結果の国際的・社会的意義は大きい。

3) 今後の展望について

今回の臨床試験は、小規模なものであるが、この臨床試験を契機としてより貢献度の高い臨床試験を遂行していきたい。

6. 結論

ザンビアにおける臨床試験実施の条件を整えることができた。

7. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)なし

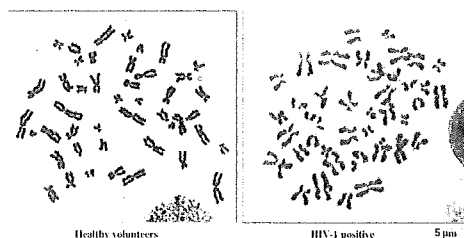
厚生科学研究費補助金(エイズ対策研究事業)
分担研究報告書

HIV-1Vpr による白血球減少及び染色体異常に対する ARV 治療の影響

分担研究者 志村まり 国立国際医療センター研究所難治性疾患研究部難治性疾患研究室 室長

1. 研究目的

HIV-1 感染により誘導される HIV 感染者白血球細胞の染色体異常 (premature sister chromatid separation; PCS、下図) について、これまで報告してきた。PCS (下図 1 右) が、健康人 (平均±標準誤差; $1.22 \pm 0.48\%$) (下図左) より高率 ($5.36 \pm 2.92\%$) に認められた。PCS 頻度は、HIV-1 RNA copy 数に依存して増大し、総白血球数の減少に相関していた。



本研究では、染色体異常をもたらす原因分子を明らかにした後、原因分子によるモニターシステムを確立し、ARV 治療効果を含めた AIDS 病態との関連を探索することを目標とする。

2. 研究方法

1. Pseudotype virus pNL-Luc-E-R+において、アクセサリ遺伝子の欠失変異型を作成し、健康人由来末梢単核球細胞を用いた感染実験より得られた染色体像を解析し、原因分子を明らかにする。

2. 原因分子による ELISA システムの確立。

- モノクローナル抗体の作成。
- 患者血漿中の原因分子の検出。
(Immunoprecipitation 法、ELISA 法)

<倫理面での配慮>

HIV-1 感染者由来血液細胞について、奈良県立医科大学感染症センターおよび国立千葉医療センター内科施設において、インフォームドコンセントを行い、研究内容について理解同意を得られた患者より供給されたものである。また、本研究施行は、上記 2 医療施設及び国立国際医療センター倫理委員会において、承認されたものである。

3. 研究結果

1. 健康人末梢単核球細胞を用いた HIV-1 感染で、PCS 頻度は $7.00 \pm 1.59\%$ に増大したが、Vpr 欠損型ウイルスでは、健康人と同様の頻度を示した。これにより、PCS の主要原因は Vpr であることが示唆された。

2. ELISA に用いる抗 Vpr モノクローナル抗体の作成に成功し、これにより HIV-1 感染者由来血漿中の Immunoprecipitation 法による Vpr の検出が可能となった。Vpr 検出があった感染検体は、HIV-1 RNA コピー数の高い傾向を示した。一方、健康人血漿中では検出されなかった。

4. 考察

HIV 感染者において認められた PCS は、健康人末梢単核球細胞への感染実験でも PCS が増大したことから、免疫不全等の 2 次的要因ではなく、HIV 感染に起因していることが示唆される。さらに、Vpr 欠損型ウイルスでは、その頻度が著しく減少したことから、PCS は Vpr に依存した現象であることが示唆される。

これまで、PCS は多様な疾患で報告されている。興味深いことは、すべての疾患で aneuploidy を伴っていることから、PCS はゲノム不安定性のマーカーとして認識されている。HIV-1 感染後期においては、免疫不全を伴った AIDS-defined tumor の頻度が増大する。加えて、免疫不全を伴わない、non-AIDS-defined tumors の頻度も増大して

いることが近年明らかになっている。現時点で明確な腫瘍化との関連は見出せないが、本研究の HIV 感染による PCS は、腫瘍化因子となる可能性は否定できない。さらに、本研究から、PCS の主要原因分子は Vpr であること、HIV-1 感染患者血漿中に Vpr が検出されたことより、今後、ELISA による血漿中 Vpr 濃度や PCS 頻度をモニターし、悪性腫瘍を含めた AIDS 病態との関連が明確にできる可能性が提示された。今後の HIV-1 患者検体による解析が期待される。

5. 自己評価

- 1) 達成度について：患者検体への試行はまだであるが、染色体異常の原因分子が明確となり、また検出法の確立が目前であることで、本研究のおおよそ半分の目的は達成できたと考える。
- 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について：HIV-1 感染による悪性腫瘍が高発であることは周知のことであるが、その原因については不明な点も多い。ARV により、HIV-1 感染予後は改善されたが、ARV を中断すると、ARV 治療前と同様のウイルス価を示すことから、現状は HIV-1 を完全に駆逐することは難しいと報告されている。今後、HIV-1 感染の長期化により、感染後期で頻発する悪

性腫瘍が明るみになると考える。本研究で提唱する Vpr と AIDS 病態との関連を明らかにすることは、学術的にも、社会的意義も高いと推測する。

- 3) 今後の展望について：患者検体を用いて、ELISA、染色体解析と AIDS 病態との関連を解明し、さらに ARV 治療の有効性を検討する。

6. 結論

本研究により、HIV-1、Vpr より PCS が誘導されることが示唆された。また、患者血漿中にも Vpr が検出されたことより、今後、HIV-1 感染検体での Vpr に着目し、悪性腫瘍との関連および分子機序を明らかにすることが肝要と考える。

7. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得

出願番号	特願 2001-205800
発明者	石坂幸人、志村まり
発明の名称	レセプター型チロンシンキナーゼ RET に結合するペプチド系化合物
出願人	日本化薬株式会社
出願年月日	2001年7月6日

開発途上国における母子感染の予防と治療に関する研究

分担研究者 若杉なおみ 国立国際医療センター研究所 疫学統計研究部長

1. 目的

世界の HIV 感染者中の女性比率は 10 年間で 25% から 50% へと倍増しており、「エイズの女性化」傾向が進んでいる。そのため母子感染予防対策が進められながらも子どものエイズも増加傾向にあり、新しく HIV に感染した子どもの数は 年の 60 万人から 年には 80 万人へと増加した。さらに開発途上国での HIV 母子感染率（陽性母から出生児に垂直感染する率）は 25.42% と、先進国の 14.25% に対し基礎感染率が高いのが特徴である。また ARV（Antiretroviral）による母子感染予防効果は部分的であり、更に感染率を下げる為に残された課題は、妊娠中の子宮内感染および産後の母乳感染である。

本研究は、子宮内 HIV 母子感染を予測し予防介入する方法を探るために、危険因子と言われている絨毛膜羊膜炎(CAM)のマーカーである子宮頸管顆粒球エラスターゼを測定し、子宮内 HIV 母子感染率との関連を明らかにすることを目的とした。

2. 方法

ザンビア大学教育病院産婦人科を受診し、陣痛開始後・破水前で出血を認めない妊婦を対象とした。本人と出生児への HIV 検査を含めた本調査への同意を文書で取り、助産師による計測(母児体重身長、胎盤の色、サイズ、重量など)、問診(妊娠週数その他) および採血、膣スミア、子宮頸部スワブ採取を行なった。HIV 検査は迅速キット (ABBOT) を使い、出生児への子宮内感染は出生後 24 時間以内の児の末梢血の HIV DNA-PCR にて行なった。子宮頸部エラスター

ゼは頸管粘液スワブを用い好中球エラスターゼ測定キット (帝国臓器: 1.6ug/ml 以上を陽性と検出) で測定した。膣スミアは pH 試験紙による pH 測定後、Gram 染色標本を鏡陰にて細菌性膣症スコア診断(Nugent の方法)を行なった。統計解析には SPSS (version10) を使い、単変量、多変量解析を行なった。

3. 結果

対象妊婦は 264 名で、そのうち 260 名が HIV 検査に同意、263 名にエラスターゼ測定を行なった。母の HIV 感染率は 27.7%(72/260)、子宮内 HIV 母子感染率(陽性母 72 名からの出生児 PCR の結果)は 15.3%(11/72)、母のエラスターゼ陽性率は 25.1%(66/263)であった。基本データ(年齢、BMI(Body Mass Index),出生児体重)は全妊婦(264 人)、HIV 陽性母(72 人)、HIV 陰性母(187 人)で有意の差は無く、エラスターゼ陽性もそれぞれ 25.1%、29.2%、23.5%と、有意の差はなかった。胎盤のサイズと出生児体重あたりの胎盤サイズは、エラスターゼ陽性母で有意に陰性母よりも高かった($p < 0.05$, t test)。

表 1 は、72 人の陽性母からの子宮内感染のリスク因子を多変量ロジスティック回帰解析によって検討した結果である。リスク因子の解析モデルとして、母の BMI、分娩時間、出生児の体重、胎盤のサイズと重量、細菌性膣症スコア、エラスターゼを検討したところ、エラスターゼのみが子宮内 HIV 感染と有意に関連した。エラスターゼ陽性母の子宮内 HIV 母子感染率は 33.3%(7/21)と、陰性の 7.8%(4/51)より有意に高く ($p < 0.01$)、エラスターゼ陽性すなわち胎盤の絨毛膜羊膜炎は、子宮内 HIV 母子感染のリスクを 8.65 倍(95%CI, 1.73-43.3)高めていた。

HIV陽性母(n=72)からの子宮内母子感染に対するリスク因子

若杉

調査項目	N	子宮内母子感染率	OR (95%CI)	P-value	AOR (95%CI)*	P-value
陽性母全体	72	15.3				
母のBMI						
<25.6	34	17.6	1.0		1.0	
>=25.6	35	14.3	0.78 (0.21-2.84)	0.70	0.42(0.08-2.26)	0.31
分娩時間, min						
<610	34	17.6	1.0		1.0	
>=610	34	14.7	0.81 (0.22-2.94)	0.74	0.53 (0.11-2.56)	0.43
胎盤長径 cm						
<18.0	34	8.8	1.0		1.0	
>=18.0	36	22.2	3.00(0.71-12.2)	0.14	5.00 (0.58-42.7)	0.14
胎盤重量 g						
<700	34	11.8	1.0		1.0	
>=700	36	19.4	1.81 (0.48-6.85)	0.38	0.51 (0.07-3.91)	0.52
エラスターゼ						
陰性	51	7.8	1.0		1.0	
陽性	21	33.3	5.88 (1.50-23.0)	0.01	8.65 (1.75-43.3)	<0.01
細菌性膣症スコア						
0-3 (normal)	32	12.5	1.0		1.0	
4-6 (borderline BV)	24	12.5	1.00 (0.20-5.00)	1.00	1.07 (0.17-6.84)	0.94
7-10 (BV)	16	25.0	2.33 (0.50-10.9)	0.28	3.29 (0.54-20.0)	0.22

*N=69, adjusted for each variable listed above

4. 考察

HIV 陽性女性からの妊娠中の子宮内 HIV 母子感染のリスクとして妊娠中の胎盤の炎症（絨毛膜羊膜炎）が強く示唆される。それをエラスターゼ簡易測定キットで妊娠中に予測検知し、抗生物質による安価な予防的治療を行うことにより、子宮内 HIV 母子感染を減少させる対策に利用できる可能性がある。妊娠中の母の ARV 治療ができないような開発途上国の場合、あるいはできる先進国のような場合でも ARV による母の血中ウイルス量の減少と同時に、胎盤の炎症の治療には、子宮内 HIV 母子感染減少効果が期待される。

5. まとめ

開発途上国における HIV 感染者への ARV 治療の質的向上という目的の中で、女性と子どものエイズの予防と治療はその特殊性に対応した研究と対策が必要である。ARV を用いた HIV 母子感染予防対策の中で、残された課題であると言われる妊娠中の子宮内感染の

リスク因子を探索し、開発途上国でも応用可能な簡便な方法によるリスクの予測的検知に関する研究を報告した。本報告は以下の論文として発表された。

C.Kaseba-Sata, F.Kasolo, K.Ichijama, S.Mitarai, A.Nishiyama, N. Kanayama and N.Wakasugi. Increased risk of intrauterine transmission of HIV-1 associated with granulocyte elastase in the endocervical mucous. *Journal of AIDS* 2006 Feb 1;41(2):249-251

6. 文献

1. Wabwire-Mangen F, Gray RH, Mmiro FA, *et al.* Placental membrane inflammation and risks of maternal-to-child transmission of HIV-1 in Uganda. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 1999;22(4):379-385.
2. Stringer JSA, Goldenberg RL. Subclinical Chorioamnionitis as a targetable risk factor for vertical transmission of HIV-1. *Ann NY Acad Sci.* 2000; 918: 77-83

主任研究者

若杉なおみ

- 1) Christine Kaseba-Sata, Francis Kasolo, Koji Ichiyama, Satoshi Mitarai, Ayako Nishiyama, Naohiro Kanayama and Naomi Wakasugi. Increased risk of intrauterine transmission of HIV-1 associated with granulocyte elastase in the endocervical mucous. *Journal of AIDS*. 2006; 41: 249-251
- 2) Chiipepo Kankasa,, Margaret Siwale,, Francis Kasolo,, Ayako Nishiyama,, Hiroshi Terunuma, and Naomi Wakasugi Socioeconomic and reproductive factors associated with condom use within and outside of marriage among urban pregnant women in Zambia. *African Journal of Reproductive Health*. 2005; 9(3):127-132
- 3) 若杉なおみ HIV-母子感染の現状と今後の方向 小児科臨床別冊「子どものための国際保健医療協力-各論-」 2005; 58:1361-1369
- 4) 若杉なおみ 「エイズ」国際保健医療学 改訂版 (国際保健医療学会編・杏林書院) 2005; 201-206
- 5) 若杉なおみ 女性と子どものエイズリスクの回避と脆弱性の減少に何が必要か? アフリカ研究 2005; 67 : 107-120

分担研究者

石川信克

- 1) 石川信克:公衆衛生の及びにくい人々の結核対策——都市結核研究班からの発信:公衆衛生 2006; 70:96-100.
- 2) Ohkado A., Williams G, Ishikawa N., Shimouchi A., Simon C.: The management for tuberculosis control in Greater London in comparison with that in Osaka City: lessons for improvement of TB control management in Osaka City urban setting: *Health Policy* 2005; 73: 104-123.
- 3) 石川信克:世界の結核問題にいかに関わるべきか——国際協力の課題と実践:結核 2005; 80:89-94.
- 4) 中村安秀, 石川信克, 佐藤寛, 坂本真理子, 大石和代:戦後の日本の経験を国際協力に活用する:公衆衛生 2005; 69: 561-568.

岡 慎一

- 1) Bi X, Gatanaga H, Tanaka M, Honda M, Ida S, Kimura S, and Oka S. Modified Dynabeads method for enumerating CD4+ T cell count for widespread use in resource-limited situations. *JAIDS* 2005; 38: 1-4.
- 2) Tomiyama H, Fujiwara M, Oka S and Takiguchi M. Epitope-dependent effect of Nef-mediated HLA class I down-regulation on ability of HIV-1-specific CTL to suppress HIV-1 replication. *J Immunol (Cutting Edge)* 2005; 174: 36-40.
- 3) Satoh M, Takamiya Y, Oka S, Tokunaga K, and Takiguchi M. Identification and characterization of HIV-1-specific CD8+T cell epitopes presented by HLA-A*2601. *Vaccine* 2005; 23: 3783-3790.
- 4) Yamanaka H, Teruya K, Kikuchi Y, Takahashi T, Kimura S, Oka S, and the HIV/Influenza Vaccine Study Team. Efficacy and immunologic responses to influenza vaccine in HIV-1-infected persons. *JAIDS* 2005; 39: 167-173.
- 5) Matsushita S, Yoshimura K, Kimura T, Kamihira A, Takano M, Eto K, Shirasaka T, Mitsuya H, and Oka S. Spontaneous recovery of hemoglobin and neutrophil levels in Japanese patients on a long-term Combivir containing regimen. *J Clin Virol* 2005; 33: 188-193.
- 6) Fujiwara M, Takata H, Oka S, Tomiyama H, and Takiguchi M. Patterns of cytokine production in HIV-1-specific human CD8+ T cells after stimulation with HIV-1-infected CD4+T cells. *J Virol* 2005; 79: 12536-12543.
- 7) Borghan MA, Oka S, and Takiguchi M. Identification of HLA-A*3101-restricted cytotoxic T lymphocyte response to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in patients with chronic HIV-1 infection. *Tissue Antigens* 2005; 66: 305-313.
- 8) Munkanta M, Terunuma H, Takahashi M, Hanabusa H, Miura T, Ikeda S, Sakai M, Fujii T, Takahashi Y, Oka S, Mastuda J, Ishikawa M, Taki M, Tatsunami S, Takashima Y, Mimaya J, Ito M, Kimura A, and Yasunami M. HLA-B polymorphism in Japanese HIV-1 infected long-term surviving hemophiliacs. *Viral Immunol* 2005; 18: 500-505.
- 9) Otsuka Y, Fujino T, Mori N, Sekiguchi J, Toyota E, Saruta K, Kikuchi Y, Sakaki Y, Ajisawa A, Ohtsuka Y, Nagai H, Takahara M, Saka H, Shirasaka T, Yamashita Y, Kiyosuke M, Koga H, Oka S, Kimura S, Mori T, Kuratsuji T,

and Kirikae T. Survey of human immunodeficiency virus (HIV)-seropositive patients with Mycobacterial infection in Japan. *J Infect* 2005 (in press)

- 10) Hirabayashi Y, Tsuchiya K, Kimura S, Oka S. Simultaneous determination of six HIV protease inhibitors (amprenavir, indinavir, lopinavir, nelfinavir, ritonavir, and saquinavir), the active metabolite of nelfinavir (M8) and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (efavirenz) in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Biomed Chromatogr* 2005 (in the press)
- 11) Gatanaga H, Hachiya A, Kimura S, and Oka S. Other mutations than 103N in HIV-1 reverse transcriptase (RT) emerged from K103R polymorphism under non-nucleoside RT inhibitor pressure. *Virology* 2005 (in press)
- 12) Kawashima Y, Satoh M, Oka S and Takiguchi M. Identification and characterization of HIV-1 epitopes presented by HLA-A*2603: Comparison between HIV-1 epitopes presented by A*2601 and A*2603. *Human Immunol* 2005 (in press)
- 13) Gatanaga H, Tachikawa N, Kikuchi Y, Teruya K, Genka I, Honda M, Tanuma J, Yazaki H, Ueda A, Kimura S, and Oka S. Urinary β_2 -microglobulin as a sensitive marker for renal injury by tenofovir disoproxil fumarate. *AIDS Res Hum Retrovirus* 2005 (in press)

志村まり

- 1) Tachiwana H, Shimura M., Nakai-Murakami C., Tokunaga K., Takizawa Y., Sata T., Kurumizaka H. and Ishizaka Y. HIV-1 Vpr induces DNA double-strand breaks. *Cancer Res.* in press.
- 2) Mizoguchi I., Ooe Y., Hoshino S., Shimura M., Kasahara T., Kano S., Ohta T., Takaku F., Nakayama Y. and Ishizaka Y. Improved gene expression in resting macrophage using an oligopeptide derived from Vpr from human immunodeficiency virus type-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338, 1499-1506, 2005.
- 3) Shimura, M., Tokunaga, K., Konishi M., Sato Y., Kobayashi, C., Sata, T. and Ishizaka, Y. .Premature sister chromatid separation in HIV-1infected peripheral blood lymphocytes. *AIDS.* 19, 1434-1423, 2005.
- 4) Shimura,M., Saito, A., Matsuyama, S., Sakuma,T., Terui, Y., Ueno, K., Yumoto, H., Yamauchi, K., Yamamura, K., Mimura, H., Sano, Y., Yabashi, M., Tamasaku, K., Nishio K., Nishino, Y., Endo,K. Hatake,K., Mori,Y., Ishizaka,Y. and Ishikawa,T. Element array by scanning X-ray fluorescence microscopy after cis-diamminedichloro-platinum (II) treatment. *Cancer Res.* 65, 4998-5002, 2005.