

の研究でも、この領域の乗換えがある特定の部位でのみ生じているのではという当初の疑問は否定できそうである。CRF や URF に見られる組換えのホットスポットは、上述の系統関係上の関連性によるか、乗換え後のサブタイプ間組換え変異が fitness を落とすことによる負の選択によるものではないだろうか。

#### E. 結論

1. In vivo 症例では、投与薬剤の変更という宿主環境の変化に適応した遺伝子型が、provirus のアーカイブから適宜選択され、必要に応じて組換えが生じることで変異の形成が起こっていた
2. in vitro 競合実験では、極めて大きな組換え価が観察され、薬剤濃度に応じて最適なハプロタイプ構成に速やかに移行した
3. in vitro, in vivo 双方において組換えのホットスポットは観察されなかった
4. in vitro 競合実験では、多様性に関する組換えの寄与は薬剤濃度にかかわらずほぼ一定だったが、in vivo では組換えの寄与が耐性変異が進化した時期には上がり、投与薬剤の変更によりアーカイブにある以前のウイルスが有利になった時に下がった

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

論文発表

学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

HIV-1 の分子疫学的研究  
—神奈川県で検出された CRF01\_AE/B リコンビナント HIV-1 の解析—

分担研究者 近藤真規子 (神奈川県衛生研究所)

研究協力者 宮崎裕美、今井光信 (神奈川県衛生研究所)、相楽裕子 (横浜市市民病院)

**研究要旨**

2003 年から 2006 年に神奈川県内の医療機関に来院した 132 名の HIV-1 遺伝子について、2 カ所の領域 (pol pro-RT、env C2V3) のサブタイプ解析を行い、CRF01\_AE とサブタイプ B のリコンビナントが疑われる症例を 1 例検出した。詳細な解析の結果、この HIV-1 株は gag P24 領域から pol RT の p51 領域 (p51 の約 70%) がサブタイプ B、その他は CRF01\_AE のリコンビナントウイルスであることが確認された。このウイルスはタイ国籍の在日外国人より検出され、感染経路は異性間性行为であった。CRF01\_AE とサブタイプ B リコンビナント HIV-1 はタイやマレーシアで 1990 年後半ごろから報告され始めているが、この株のリコンビナントパターンは現在報告されている CRF01\_AE/B リコンビナント型と異なるユニークなものであった。今後、日本国内においてもこのようなリコンビナントウイルスの動向が注目される。

**A. 研究目的**

世界的に HIV の流行が大きな問題となっており、特にアフリカやアジアでの感染者が著しく増加している。日本においても HIV 感染者は年々増加しており、2003 年末には HIV 感染者と AIDS 患者の報告数が 1 万人を超え、年間の感染者・患者報告数が 1000 人を超えるなど、HIV 感染症の拡大傾向が加速しつつあり、HIV 流行の監視や予防対策がますます重要となってきている。

我々は日本で流行している HIV の特徴を明らかにするため、従来から継続して HIV-1 のサブタイプ解析を行っているが、今回初めて、サブタイプ B と CRF01\_AE のリコンビナントが疑われる症例を経験した。CRF01\_AE/B リコンビナントウイルスは 1990 年後半よりタイやマレーシアで報告されるようになったが、我が国ではまだ報告されていない。

しかしながら、アジアでの流行は日本での流行に大きな影響を及ぼすことから、リコンビナント株の動向について、調査・研究することは重要である。そこで、リコンビナントが疑われた株について詳細な解析を行い、アジアで報告されているリコンビナント株との比較を行った。

**B. 研究方法**

1) 試料

2003 年から 2006 年に神奈川県内の医療機関に来院した HIV 感染者 132 名より得られた末梢血単核球 (PBMC) および血漿。

2) HIV-1 サブタイプの解析

HIV-1 感染者 132 名の検査試料から抽出された HIV-1 遺伝子を用いてサブタイプを解析した。すなわち、HIV-1 の pol 領域 (Pro, RT) および env C2V3 領域を nested PCR (あるいは RT-PCR) 法で増幅し、ダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定後 neighbor-joining 法による系統樹解析により、サブタイプを決定した。

3) full-length sequence 解析

2 つの領域のサブタイプが一致していない症例 Y231 (Pro, RT : B、env C2V3 : E) について全塩基配列を決定し、その遺伝子的特徴を解析した。すなわち、Y231 の PBMC より抽出したプロウイルス HIV-1・DNA を用いて、HIV-1 遺伝子の各領域を nested PCR 法により増幅後、ダイレクトシーケンス法によりほぼ全長の塩基配列を決定した。全領域のサブタイプを neighbor-joining 法による系統樹解析、Los Alamos 研究所プログラム RIP3 を用いた相同性解析 (ホームページ上で公開)、BootScan 解析により決定した。組換えが疑われた領域についてはクローニングを行い、リコンビナント HIV-1 である確認を行った。

(倫理面への配慮)

主治医から患者に研究内容について説明を行い、研究への同意の得られた症例について研究を実施した。患者名はすべて記号化して扱っており、プライバシーの流出防止など患者の人権保護に十分配慮した。尚、本研究は当研究所の倫理委員会で承認されている。

## C. 研究結果

### 1. HIV-1 サブタイプの解析

2003年から2006年に神奈川県内の医療機関に来院した HIV-1 感染者 132 名について、HIV-1 遺伝子の env C2V3 領域のサブタイプ結果を表 1 に示した。

男性同性間性行為による感染では 58 例中そのほとんどがサブタイプ B(97%)であり、CRF01\_AE は 2 例であった。

一方、異性間性的接触による感染では、63 例中サブタイプ B (25 例) と AE (27 例) がほぼ半分ずつ、次いで A が 6 例、C が 3 例、D、F、判定不能が各 1 例ずつであった。日本人感染者においても、サブタイプ B が 18 例、AE が 13 例、A が 3 例、C が 1 例で、サブタイプ B と non-B がほぼ半数ずつであった。異性間性行為による感染において、サブタイプが多様化していることが確認された。

これら 132 例の内、env C2V3 領域と pol 領域 (Pro, RT) でサブタイプの異なる例が 4 例認められ、内 3 例はアフリカ由来株であったが、欧米型サブタイプ B と AE のリコンビナントが疑われる症例が 1 例存在した (表 2)。

### 2. full-length sequence 解析

CRF01\_AE とサブタイプ B のリコンビナント HIV-1 の感染が疑われた症例 Y231 の HIV-1 遺伝子のほぼ全領域について塩基配列を決定した。塩基配列を Los Alamos のホームページ上のプログラム、RIP3 で各サブタイプとの相同性 (similarity) を解析した後、BootScan 解析 (図 1) を行い、また各領域について系統樹解析を行った。

その結果、gag p24 領域から pol RT の p51 領域 (p51 の約 70%を含む領域) はサブタイプ B であったが、gag p17 領域および pol p51 領域の後半から 3'LTR は CM240 株と同一のクラスターを形成しており、CRF01\_AE 由来と考えられた。

ブレイクポイントを含む gag 全領域と pol p51-p31 領域を PCR で増幅後、クローニングを行い、塩基配列を決定した。これら 2 領域のクローン (各領域 16 クローンずつ) の解析結果はダイレクトシーケンスの結果と一致しており、本プロウイルス HIV-1 はリコンビナントウイルスであることが確認された。

## D. 考察

日本で流行している HIV-1 の特徴を明らかにするため、神奈川県内の医療機関に来院した 132 名の HIV-1 遺伝子の 2 カ所の領域 (pol pro-RT, env C2V3) についてサブタイプを解析した。異性間性行為感染で、pol pro-RT 領域と envC2V3 領域のサブタイプが一致しない症例が 4 例検出され、その内 1 症例に

CRF01\_AE とサブタイプ B とのリコンビナント HIV-1 の感染が疑われた。

CRF01\_AE とサブタイプ B のリコンビナントはタイにおける Injecting drug users (IDU) や異性間性行為による感染者において、1990 年後半ごろから検出され始め、現在では 10 種以上のリコンビナントパターンが報告されている。また、マレーシアにおいては IDU の間で CRF01\_AE/B リコンビナントが効率的に検出されることが最近報告されている。本症例 (Y231) のリコンビナントパターンは、タイやマレーシアで報告されているリコンビナントパターンと異なるユニークなパターンであった (図 2)。

Y231 はタイ人女性で 1993 年に来日し、感染時期および感染場所は不明であるが、2004 年に AIDS を発症し入院した。タイでの感染も否定できないが、1993 年以前はタイにおいても CRF01\_AE/B リコンビナントが検出されていないこと、サブタイプ B と同定された pol pro-RT 領域がタイ型 B (B') 株とは同じクラスターを形成せず、むしろ欧米型の株と

近似していたことから、日本での感染の可能性も考えられる。

また、リコンビナント HIV-1 の感染か、サブタイプ B と CRF01\_AE の重複感染後、in vivo で組換えが起こったかについても明らかでないが、今後、このようなリコンビナントウイルスの流行の動向を監視していくことが重要と考えられた。

日本において本年度初めて CRF01\_AE/B リコンビナント HIV-1 の存在が、当研究室以外で 2 例、計 3 例検出されており、これら 3 例の関連性についても当研究班で解析中である。

## E. 結論

日本で流行している HIV-1 のサブタイプは、感染経路により特徴があり、男性同性間性行為感染ではほとんどが欧米型のサブタイプ B であった。一方、異性間性行為感染ではサブタイプ B (39.7%) と CRF01\_AE (42.9%) で大部分を占めるが、少数ながらサブタイプ A、C、D、F やリコンビナントウイルスも検出されており、感染サブタイプが多様化していることが確認された。

異性間性行為感染者 (タイ国籍) から CRF01\_AE とサブタイプ B のリコンビナントウイルスが検出された。この株のリコンビナントパターンはタイやマレーシアで報告されている CRF01\_AE/B リコンビナント型と異なっていた。

## F. 研究発表

## 1. 論文発表

1) 宇宿秀三、野口有三、坂本光男、足立拓也、相楽裕子、須藤弘二、西澤雅子、近藤真規子、栃久保修、今井光信：Analysis of a long term discrepancy in drug-targeted genes in plasma HIV-1 RNA and PBMC HIV-1 DNA in the same patient. Jpn. J.Infect.Dis, 59, 122-125 (2006)

2) 嶋貴子、一色ミユキ、近藤真規子、塚田三夫、潮見重毅、今井光信：保健所におけるHIV即日検査導入の試みとその効果、日本公衆衛生雑誌、53, 167-177 (2006)。

3) 須藤弘二、嶋貴子、近藤真規子、加藤真吾、今井光信：Real-time PCR を用いた HIV-1 RNA 測定キットの基礎的研究、感染症学雑誌、81, 1-5 (2007)。

### 2. 学会発表

1) 近藤真規子、須藤弘二、田中理恵、嶋貴子、相楽裕子、岩室紳也、加藤真吾、今井光信：A quantification of HIV-1 group M proviral DNA using a TaqMan real-time PCR、XVI International AIDS Conference, 13-18 Aug. 2006, Toronto.

2) 嶋貴子、近藤真規子、今井光信ほか：Implementation and Effectiveness of Rapid HIV Testing at Publicly Funded Voluntary HIV Counseling and Testing (VCT) Sites in Japan、XVI International AIDS Conference, 13-18 Aug. 2006, Toronto.

3) 近藤真規子、須藤弘二、嶋貴子、高橋華子、相楽裕子、武部豊、今井光信：日本で検出された CRF01\_AE/B リコンビナント HIV-1 の解析、第 20 回日本エイズ学会学術集会・総会 (2006 年 11 月 30～12 月 2 日、東京)。

4) 嶋貴子、近藤真規子、須藤弘二、相楽裕子、今井光信：新しい HIV 迅速抗体検査キットの検討、第 20 回日本エイズ学会学術集会・総会 (2006 年 11 月 30～12 月 2 日、東京)。

5) 須藤弘二、田中理恵、近藤真規子、今井光信、加藤真吾：HIV 感染者 PBMC 中プロウイルスの multiplex nested PCR による構造解析、第 20 回日本エイズ学会学術集会・総会 (2006 年 11 月 30～12 月 2 日、東京)。

6) 木内英、岩室紳也、近藤真規子、今井光信、花房秀次、加藤真吾：母児感染予防における AZT 血中濃度、第 20 回日本エイズ学会学術集会・総会 (2006 年 11 月 30～12 月 2 日、東京)。

## G. 知的財産権の出願・登録

### 1. 特許出願

1) 発明の名称：「HIV-1 プロウイルス定量法」、発明者：近藤真規子、加藤真吾、出願年月日：平成 18 年 5 月 2 日、出願番号:特願 2006-128565

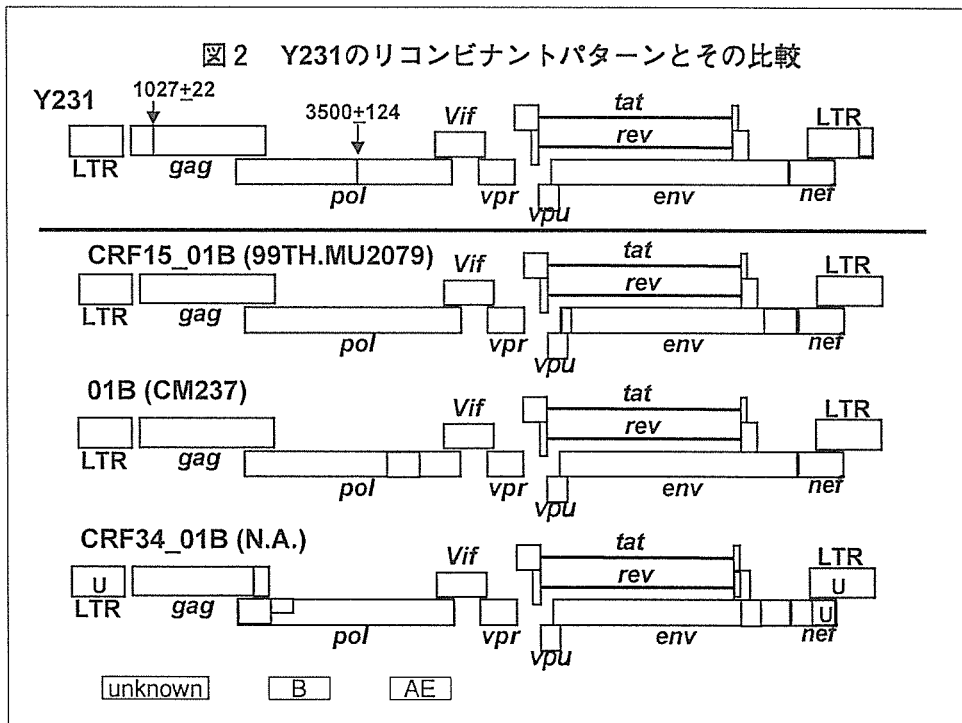
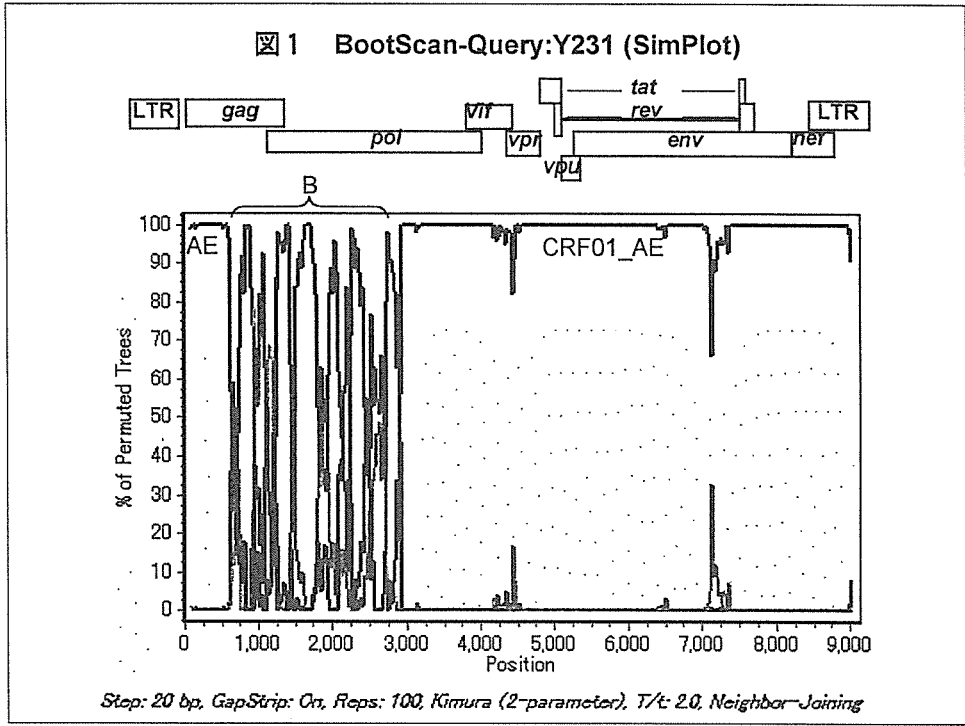
2) 発明の名称：「弱毒型 HIV-1 塩基配列」、発明者：近藤真規子、今井光信、武部豊、公開年月日：平成 18 年 7 月 27 日、公開番号:特開 2006-191891

表1 Distribution of HIV-1 subtype  
(神奈川県衛生研究所：2003～2006)

Risk factor	total	HIV-1 subtype (C2V3)						
		B	AE	A	C	D	F	?
MSM Japanese	54	52	2					
non-Japanese	4	4						
Heterosexuals								
Japanese male	30	18	11	1				
female	5		2	2	1			
non-Japanese male	12	4	5		2			1
female	16	3	9	3			1	
Other, unknown	11	7	3			1		
Total	132	88	32	6	3	1	1	1

表2 Subtypeの不一致症例 (polおよびC2V3領域)

Sample no.	Protease (297base)	RT (840base)	C2V3 (350base)
88	Subtype B	B	B
31	CRF01_AE	AE	AE
1	Subtype B	B	AE
4	Subtype A	A	A
3	Subtype C	C	C
1	Subtype AG	AG	A
1	Subtype C	C	A
1	Subtype K	C	?
1	Subtype D	D	D
1	Subtype F	F	F



HIV-2 核酸検査法に関する研究

分担研究者 加藤 真吾 慶応義塾大学医学部微生物学・免疫学教室助手

研究要旨

近年、HIV-2 の感染例がわが国でも散発的に報告されるようになってきたが、現行の検査法が HIV-2 に対して HIV-1 と同レベルの感度と特異性をもっているとは必ずしも言えない。その原因の一つは HIV-2 の核酸検査法が確立していないことにある。そこで本研究では、HIV-2 サブタイプ A と B の両方に対応する高感度 RT-nested PCR の方法を開発した。検出感度はほぼ 1 コピーであった。HIV-2 サブタイプ A と B にそれぞれ感染した 2 名の感染者の血清からウイルス RNA の存在が確認された。また、段階希釈した試料を用いた実験から、近似的にウイルス濃度を求めることができた。今後、海外の医療機関との連携・協力のもとに検体数を増やしてその検査法としての信頼性を実証し、HIV-2 感染の正確な検査体制の確立のために役立てる予定である。

A. 研究目的

AIDS の原因ウイルスである HIV は分子生物学的性状から HIV-1 と HIV-2 に大別される。HIV-1 は世界的流行を引き起こしているが、HIV-2 の流行は西アフリカ、ポルトガル、フランス、インドなどに限局している。しかし近年、HIV-2 の感染例がわが国でも散発的に報告されるようになってきた。昨年、日本人初の HIV-2 感染例が出たのは記憶に新しいところである。

これらの報告例は現行の HIV 検査によって見つかったものであるが、現在利用可能な検査法が HIV-2 に対して HIV-1 と同レベルの感度と特異性を有しているとは必ずしも言えない。例えば、市販の HIV 抗原抗体同時検査キットは HIV-1 抗原を検出できるが HIV-2 抗原を検査することができない。また、HIV-2 ウェスタンブロットキットは一部の HIV-1 抗体と交差反応を起こすため、HIV-2 の確認検査をウェスタンブロット法だけに頼ることができない。このような場合、HIV-2 の核酸検査が必要となるが、市販キットがないため、一般の検査機関では対応できていない。

HIV-2 の DNA および RNA の検出・定量法に関しては PCR による方法がいくつか報告されている。しかし、これらの方法は検出限界に関する検討がほとんど行われておらず、また PCR プライマーの設計がサブタイプ A の塩基配列を基に行われているという問題があった。そこで本研究では、HIV-2 サブタイプ A と B の両方に対応する RT-nested PCR の方法を開発し、その検出限界をポアソン分布によって正確に検討した。さらに、この方法を用いて、わが国で見つかった HIV-2 感染者の血清検体から HIV-2 RNA の検出を試みた。

B. 研究方法

血液検体から Ficoll-Paque (GE ヘルスケア)によって末梢血単核球と血漿を分離した。末梢血単核球からは QIAamp DNA Mini Kit を用いて DNA を精製した。また、血漿からは QIAamp UltraSens Virus Kit を用いて RNA を精製した。

LTR の中にある、HIV-2 サブタイプ A と B のウイルスの間で最も塩基配列が保存されている領域を標的とし、Primer Express を用いて PCR プライマーを設計した。1 回目の PCR のプライマーは上流が 5'-TTCAGTCGCTCTGCGGAGA-3' (1F)、下流が 5'-AAATTCGTTTCGTTTCGCACCTC-3' (1R)、2 回目の PCR のプライマーは上流が 5'-TGGGAGGTTCTCTCCAGCAC-3' (2F)、下流が 5'-GGTGAGAGTCTAGCAGGGAACAC-3' (2R)。リアルタイム PCR 用 MGB プローブは 5'-AGCAGGTAGAGCCTG-3'。

DNA を検査材料とする nested PCR は、1 回目の PCR を以下のようにして行った。まず、500 ng の DNA を含む 20  $\mu$ l の試料を調製する。次にマスター液を調製する。1 回分あたりの各液量は、10  $\times$  PCR Buffer (Platinum) 5.0  $\mu$ l、50 mM MgCl<sub>2</sub> 3.0  $\mu$ l、25 mM each dNTP 0.4  $\mu$ l、20  $\mu$ M プライマー 1F 1.5  $\mu$ l、20  $\mu$ M プライマー 1R 0.5  $\mu$ l、水 20.4  $\mu$ l、Platinum Taq (Invitrogen) 0.2  $\mu$ l の計 30.0  $\mu$ l。試料液にマスター液を加えて、よく攪拌し、94°C に設定した PCR 装置に並べる。温度サイクルの設定は以下の通り。94°C、2 分；5 サイクル(94°C、5 秒；48°C、10 秒；72°C、15 秒)；25 サイクル(94°C、5 秒；60°C、15 秒)；72°C、1 分；4°C。次に、2 回目の PCR を以下のようにして行った。マスタ

一液の調製は 1 回分あたり、10 × PCR buffer (Platinum) 5.0  $\mu$ l、50 mM MgCl<sub>2</sub> 3.0  $\mu$ l、25 mM each dNTP 0.4  $\mu$ l、20  $\mu$ M プライマー-2F 0.5  $\mu$ l、20  $\mu$ M プライマー-2R 0.5  $\mu$ l、水 39.4  $\mu$ l、Platinum Taq 0.2  $\mu$ l の計 49.0  $\mu$ l。マスター液 49  $\mu$ l に 1 回目の PCR 産物 1  $\mu$ l を加えて、よく攪拌し、94° C に設定した PCR 装置に並べる。温度サイクルの設定は以下の通り。94\_C、2 分；5 サイクル(94\_C、5 秒；48\_C、10 秒；72\_C、15 秒)；20 サイクル(94\_C、5 秒；60\_C、15 秒)；72\_C、1 分；4\_C。PCR 産物 20  $\mu$ l に 4  $\mu$ l の loading buffer を加え、2%アガロースゲルを用いて 160 V で 30 分間電気泳動する。標準的な HIV-2 株ならば 60 bp の DNA 鎖が観察される。

RNA を検査材料とする RT-nested PCR では、先に記した nested PCR のプロトコールのうち、1 回目の PCR のマスター液に RNasin (Promega) 0.1  $\mu$ l と SuperScript III (Invitrogen) 0.1  $\mu$ l を加え、温度サイクルの始めに 50\_C、10 分のステップを挿入する。それ以外はすべて同じように nested PCR を行う。

#### (倫理面への配慮)

本研究を実施にあたっては、研究目的のために血清および DNA クローンを使用することを、各 HIV-2 感染者に研究の概要と意義を説明して同意を得た。

#### C. 研究成果

HIV-2 サブタイプ A の DNA クローンである pGH123 を制限酵素 EcoR I で切断後、アガロースゲル電気泳動によって DNA 分子の濃度を決定する一方、その終点希釈液を今回開発した nested PCR 法にかけてポアソン分布式によって濃度を計算した結果、1 分子あたり 1.87 コピーとなった。また、HIV-2 サブタイプ B の DNA クローンである pOJPKR-IMCJ02\_1 についても同様の計算を行った結果、1 分子あたり 1.94 コピーという値が得られた。これらの結果は、LTR が HIV-2 の DNA クローンに 2 個ずつ存在することと良く一致しており、今回開発した nested PCR 法が分子の HIV-2 DNA をほぼ確実に増幅できる性能があることを示している。1 回目の PCR のアンプリコンの長さは 145 bp である。一般的にこのような短い距離の cDNA 合成はほぼ 100%起こることから、RNA を被検体とする、RT-nested PCR も 1 分子の HIV-2 RNA をほぼ確実に検出できると考えられる。

次に、HIV-2 感染者 2 人(06JPYH001、00JPKR-IMCJ 020)の血漿から HIV-2 RNA の検出を試みた。06JPYH001 の HIV-2 はサブタイプ A であり、00JPKR-IMCJ 020RNA はサブタイプ B であることが既に分かっている。それぞれの血漿 100  $\mu$ l

から抽出した RNA 液の 1/10 量を 2 倍段階希釈し、RT-nested PCR を行った。その結果、06JPYH001 の RNA は 1、1/2、1/8 倍希釈液に明瞭な DNA バンドが検出され、00JPKR-IMCJ020 の RNA は 1/64 倍希釈液までと 1/256 倍希釈液に DNA バンドが検出された。これらの結果から、06JPYH001 の血漿 HIV-2 濃度は約 560 コピー/ml、00JPKR-IMCJ020 の血漿 HIV-2 濃度は約 18,000 コピー/ml と推定された。

#### D. 考察

HIV-2 のサブタイプ A と B の両方に対応できるように設計した(RT-) nested PCR 法を開発した。HIV-2 の DNA クローンをを用いて検討した結果、この方法はほぼ 1 コピーの HIV-2 ゲノムを検出できることが示された。HIV-2 サブタイプ A と B にそれぞれ感染した 2 名の感染者の血清を用いて実験を行ったところ、どちらの検体からもウイルス RNA が検出された。また、段階希釈した試料 RNA を用いた実験から、近似的にウイルス濃度を求めることができた。これらの血清検体は他の研究機関で HIV-2 RNA の存在が確認されなかったものである。

我々の方法は、HIV-2 サブタイプ A と B のウイルスゲノムを高感度で検出できることを目的に開発されたものであるが、実際に実験対象としたのは、今のところ DNA クローン 2 種と感染者血清 2 検体だけである。この方法が当初の目的通りの性能を有し、臨床的に有効なものであることを実証するためには、より多くの HIV-2 感染者由来血清を対象に実験を行う必要がある。しかし、わが国における HIV-2 感染例は非常に限られている。検体数を増すためには、海外の医療機関ならびに HIV-2 感染者の方々の連携・協力が必要不可欠であると考えられる。

わが国における現行の HIV 検査アルゴリズムでは、感染初期における HIV-2 感染、ならびに HIV-1 と HIV-2 の混合感染を見落としてしまう可能性が高い。これらの問題を解決するためには、標準的な HIV-2 核酸検査法を確立し、必要に応じて検査が実施できる体制を整備することが重要である。HIV-2 核酸検査キットの発売予定のない現状においては、公的機関が主導して以上の施策を行う必要がある。本研究で開発した HIV-2 核酸検査法はそのための有効な手段になると考える。

#### E. 結論

HIV-2 サブタイプ A と B のウイルス RNA を、検出限界がほぼ 1 コピーという超高感度で検出できる方法を開発した。この方法を用いて、実際の HIV-2 感染者 2 例の血清から HIV-2 RNA を検出することに成功した。今後、海外の医療機



関との連携・協力のもとにさらに検体数を増やしてその検査法としての信頼性を実証するとともに、HIV-2 感染の正確な検査体制の確立のために役立てる予定である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Kato, S., Hanabusa, H., Kaneko, S., Takakuwa, K., Suzuki, M., Kuji, N., Jinno, M., Tanaka, R., Kojima, K., Iwashita, M., Yoshimura, Y., and Tanaka, K. (2006) Complete removal of HIV-1 RNA and proviral DNA from semen by the swim-up method: Assisted reproduction technique using spermatozoa free from HIV-1. AIDS 20(7):967\_973.

2. 須藤弘二, 嶋貴子, 近藤真規子, 加藤真吾, 今井光信. (2007) Real-time PCR を用いた HIV-1 RNA 測定キットの基礎的検討. 感染症学雑誌 81(1), 1\_5.

3. Hamatake, M., Nishizawa, M., Yamamoto, N., Kato, S., and Sugiura, W. A simple competitive RT-PCR assay for quantitation of HIV-1 subtype B and non-B RNA in plasma. J. Virol. Methods (in press)

### 2. 学会発表

1. Shingo Kato, Rie Tanaka, Hideji Hanabusa, Ei Kinai, Masayoshi Negishi. Quantification of intracellular efavirenz in HIV-1-infected patients by LC-MS/MS. XVI International AIDS Conference. 2006, August 13-18, Toronto, Canada.

2. 浜武牧子, 浦野恵美子, 花房秀次, 加藤真吾, Tee Kok Keng, 武部豊, 山本直樹, 駒野淳「血友病患者におけるエイズ長期未発症例における高力価中和抗体の存在と標的部位の同定」第 20 回日本エイズ学会学術集会 (2006 年 11 月 30 日-12 月 2 日、東京)

3. 木内英, 岩室紳也, 近藤真規子, 今井光信, 花房秀次, 加藤真吾「母子感染予防における AZT 血中濃度」第 20 回日本エイズ学会

学術集会 (2006 年 11 月 30 日-12 月 2 日、東京)

4. 田中理恵, 加藤真吾, 井土美由紀, 林邦彦, 今井光信「HIV-1 RNA 定量キットのコントロールサーベイ」第 20 回日本エイズ学会学術集会 (2006 年 11 月 30 日-12 月 2 日、東京)

5. 須藤弘二, 田中理恵, 近藤真規子, 今井光信, 加藤真吾「HIV 感染者 PBMC 中プロウイルスの multiplex nested PCR による構造解析」第 20 回日本エイズ学会学術集会 (2006 年 11 月 30 日-12 月 2 日、東京)

6. 花房秀次, 木内英, 太田未緒, 和田育子, 小島賢一, 加藤真吾「血友病 HIV/HCV 肝炎の現状と PEG IFN 治療の課題」第 20 回日本エイズ学会学術集会 (2006 年 11 月 30 日-12 月 2 日、東京)

7. 加藤真吾, 田中理恵, 原健, 田上正, 前田憲昭「唾液を用いた抗 HIV 薬の薬物動態の検討」第 20 回日本エイズ学会学術集会 (2006 年 11 月 30 日-12 月 2 日、東京)

8. 西澤雅子, 加藤真吾, 三浦秀佳, 山本直樹, 杉浦互「細胞内における抗 HIV 薬 (プロテアーゼ阻害剤) の薬剤濃度のモニタリング」第 20 回日本エイズ学会学術集会 (2006 年 11 月 30 日-12 月 2 日、東京)

9. 田上正, 北川善政, 連利隆, 池田正一, 加藤真吾, 田中理恵, 前田憲昭「唾液中の HIV DNA の定量」第 20 回日本エイズ学会学術集会 (2006 年 11 月 30 日-12 月 2 日、東京)

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

細胞内薬剤検出法に関する特許出願準備中

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

## 東京都における HIV 遺伝子型モニタリングに関する研究

分担研究者 貞升健志  
研究協力者 長島真美，新開敬行，吉田靖子，山田澄夫  
(東京都健康安全研究センター)

### 研究概要

東京都では1987年より保健所における無料匿名HIV検診を開始し、1993年より夜間の受診機関である東京都南新宿検査・相談室（以下、南新宿）を開設している。2003年4月より、南新宿における土日検査を開始するとともに、抗原抗体同時スクリーニング検査や、即日検査の導入などの施策により、南新宿を中心とした保健所検査におけるHIV検査数、陽性数は増加する傾向にある。都内における新規感染者におけるHIVの疫学的な解析を行う目的で、これら陽性例の血清よりHIV遺伝子を検出し、サブタイプ型別を行った結果、90%がサブタイプB、それ以外はCRF01\_AEであることを明らかにした。

### A. 研究目的

東京都では、エイズ対策事業として1987年から都内保健所における無料・匿名HIV検診事業を、1993年から東京都南新宿検査・相談室（以下：南新宿）におけるHIV検診事業を開始した（図1）。東京都におけるHIV検査数は、1992年をピークに年々減少していたが、2003年4月より、南新宿における土日検査を開始するとともに、抗原抗体同時スクリーニング検査や、即日検査の導入などの施策により、HIV検査数、陽性数が増加する傾向にある（図2）。これらHIV検査陽性例の男女別、年齢別の調査を行うとともに、サブタイプ型別を実施し、東京都内で蔓延しているHIVの解析を行うことを本研究の目的とした。

#### （倫理面の配慮）

なお、本研究の実施前に、東京都健康安全研究センター倫理委員会にて、本研究に倫理的な問題のないことが承認された。

### B. 研究方法

2004年～2006年に都内保健所等でHIV検査を実施し、陽性となった検体104検体（2004年、50件、2005年23件、2006年31件）の血清200 $\mu$ LからウイルスRNAを抽出し、HIV-1 env 遺伝子の増幅を行い、direct-sequencing法により塩基配列を決定後、Mega3にて系統樹解析を行い、サブタイプを決定した。サブタイプ型別が困難な事例については、HIV Sequence Database の HIV-Blast(<http://www.hiv.lanl.gov/content/hiv-db/mainpage.html>)にて、サブタイプングを行った。

### C. 研究結果

#### 1. 陽性例の男女・年齢別解析

東京都内保健所等のHIV検査陽性例の90%以上は男性であり、特に30歳代が多く、次いで20歳代が多い傾向が認められた（図3）。

## 2. サブタイプ型別

陽性血清より HIV RNA を抽出し、HIV-1 env 遺伝子の増幅を行い、direct-sequencing 法により塩基配列を決定後、Mega3 にて系統樹解析を行い、サブタイプを決定した。その結果、2004 年には 92%、2005 年には 95.7%、2006 年には 93.5%がサブタイプ B であり、それ以外は CRF01\_AE に分類された (図 4, 5)。

### D. 考察

東京都における保健所等の HIV 検査で陽性となる症例は、2002 年以降、東京都の感染症発生动向調査で報告される HIV 感染者の 40% 以上を占めている (図 6)。従って、保健所等陽性例由来の HIV の解析を行うことで、都内における新規感染者における実態把握が可能になるものと推察される。

今回の調査では、ウイルスの 90%以上がサブタイプ B であり、それ以外は CRF01\_AE に分類されたことから、新規感染者の多くはサブタイプ B による感染がであることが示唆された。今回の結果では、サブタイプ B および CRF01\_AE 以外のサブタイプまたは CRF の存在は示されなかったが、今後、さらに調査対象数を増やし、遺伝子解析を実施していくことにより、東京都で蔓延している HIV の実態をさらに明らかにしていくことができるものと考えられる。

### E. 結論

東京都における HIV 検査陽性例の血清より HIV 遺伝子を検出し、サブタイプ型別を実施した結果、90%がサブタイプ B であることが明らかになった。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

(1) 東京都における HIV 検査成績 (1999 年-2004 年)

長島真美, 貞升健志, 新開敬行, 秋場哲哉, 吉田 勲, 吉田靖子, 矢野一好, 甲斐明美, 諸角 聖, 東京都健康安全研究センター年報, 56, 41-44, 2005

#### 2. 学会発表

(1) 東京都における HIV 検査の現状

貞升健志, 秋場哲哉, 新開敬行, 長島真美, 吉田 勲, 吉田靖子, 甲斐明美, 諸角 聖  
衛生微生物技術協議会第 26 回研究会, 福井, 2005

(2) 東京都内で検出された HIV-1 の Protease および Reverse Transcriptase 遺伝子の解析

貞升健志, 長島真美, 新開敬行, 秋場哲哉, 甲斐明美, 諸角 聖,  
第 19 回日本エイズ学会学術集会・総会, 熊本, 2005

(3) イムノクロマト法で陰性を示した HIV 検査陽性の 2 症例について

貞升健志, 長島真美, 新開敬行, 甲斐明美, 諸角 聖, 山口 剛  
第 80 回日本感染症学会総会, 東京, 2006

(4) 東京都内で検出された HIV-1 の Protease 遺伝子の解析

貞升健志, 長島真美, 新開敬行, 吉田靖子, 山田澄夫  
第 20 回日本エイズ学会学術集会・総会, 東京, 2006

図1. 東京都内における保健所等（HIV検査受付）の分布

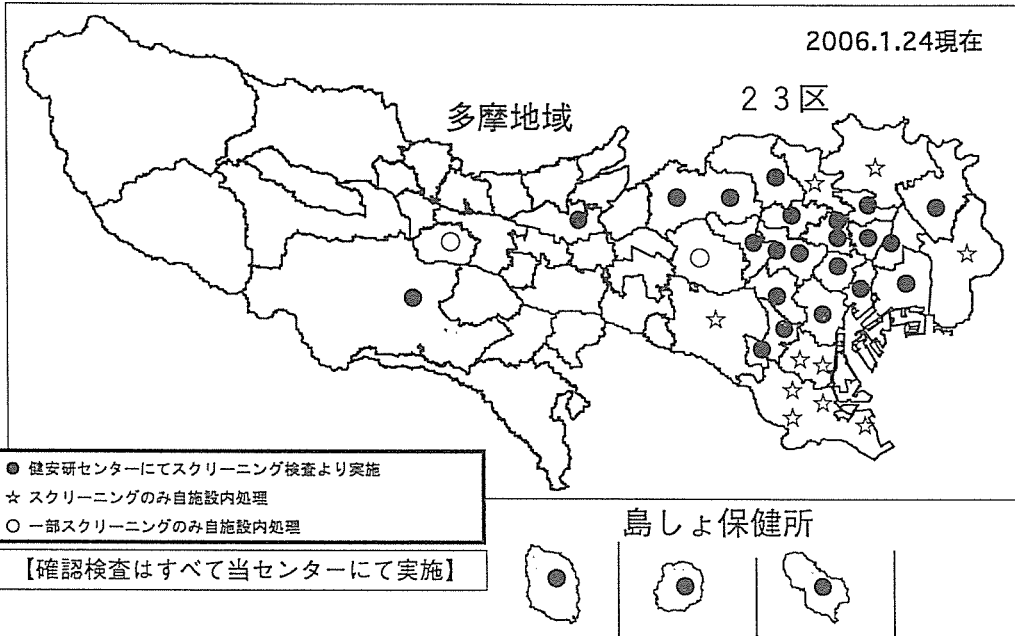


図2. 東京都の保健所等におけるHIV検査陽性数（2003—2006年）

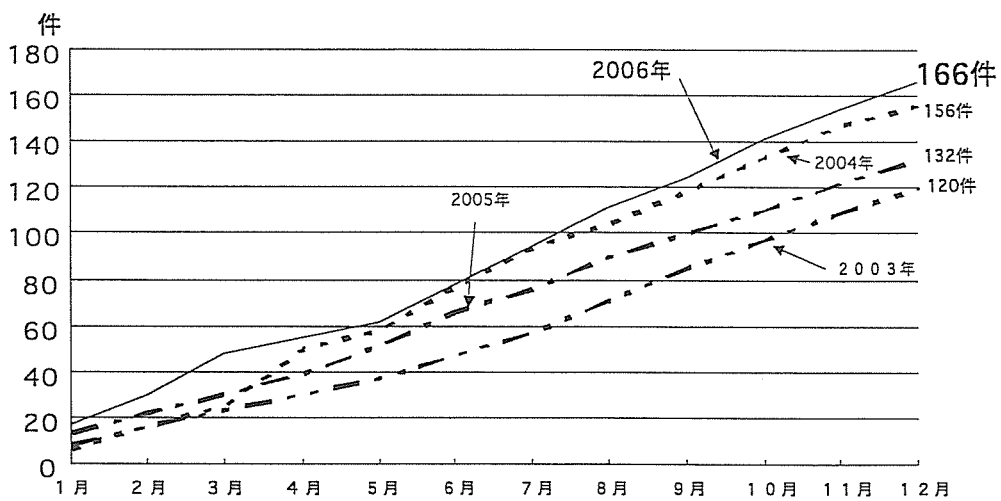


図3. 東京都における保健所等HIV検査陽性例の年齢別解析

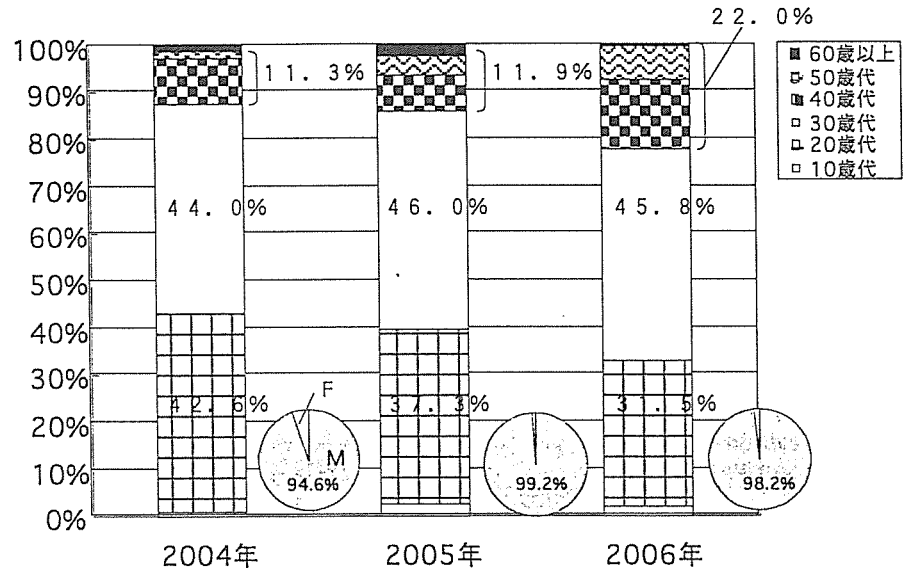


図4. 東京都内保健所等HIV検査陽性例の系統樹解析 (env)

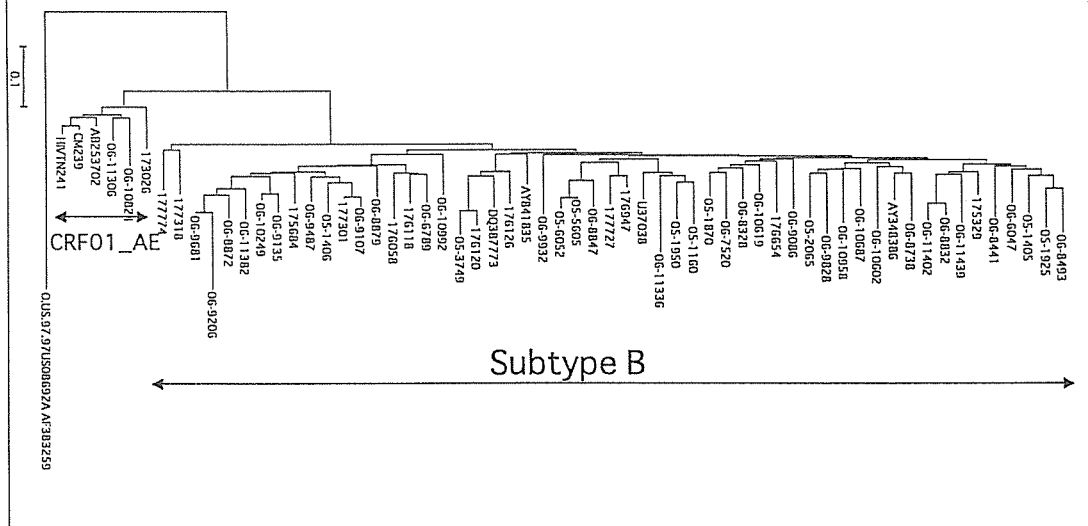


図5. 東京都における保健所等HIV検査陽性例のサブタイプ型別

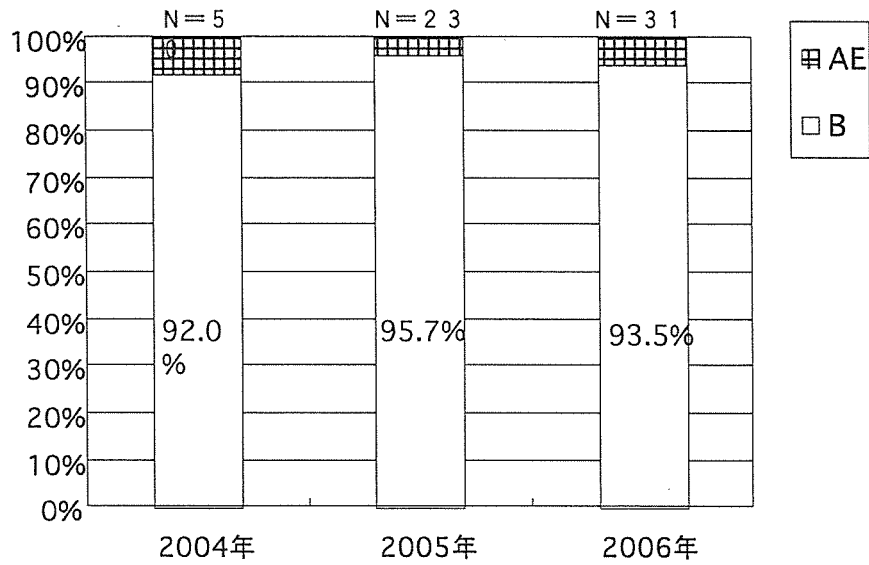
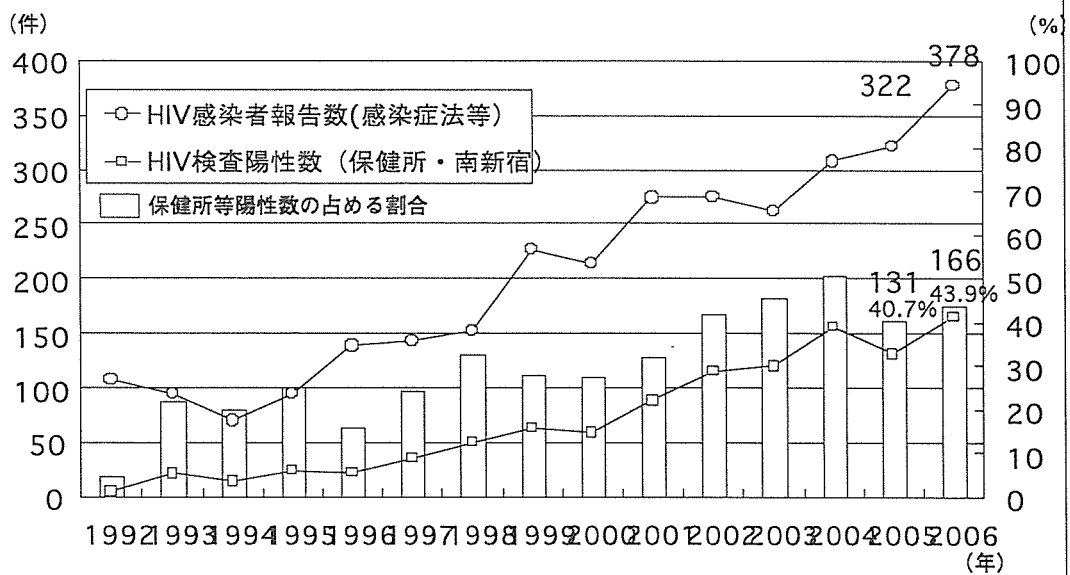


図6. 新規HIV感染者報告数と保健所等におけるHIV検査陽性数の推移 (東京都: 1992 - 2006年)



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

大阪・関西地域における HIV 遺伝子型モニタリングに関する研究  
- ハイリスク疫学調査検体の分子疫学的解析 -

分担研究者 小島洋子（大阪府立公衆衛生研究所ウイルス課）  
研究協力者 川畑拓也、森 治代、大竹 徹（同上）

### 研究概要

1992年-2006年の間にハイリスク疫学調査で HIV 抗体陽性が確認された 120 検体中 87 検体について、分子疫学的手法を用いて *env*-V3 領域の解析を行った。その結果、81 例がサブタイプ B、6 例が CRF01\_AE であった。B の大部分は日本人男性において検出され、系統樹解析の結果、遺伝的距離が近い複数のグループが認められた。また、CRF01\_AE が検出された 6 例のうち 3 例が日本人 MSM であったが、アジア諸国で流行している CRF01\_AE 株とは異なるタイプである可能性が示唆された。

### A. 研究目的

我々は 1992 年より継続して、大阪府内における HIV 感染に対してリスクの高い行動をとっていると思われる者を対象とした HIV-1 抗体調査を行っている。本研究では、調査地域内に侵淫する HIV-1 の広がりを追跡するために、抗体調査で陽性が確認された検体について HIV-1 の分子疫学的解析を行った。

### B. 研究方法

1992 年から 2006 年まで大阪府内の STI 関連クリニック（性病科、泌尿器科、産婦人科など）を定点として、HIV 感染に対してリスクの高い行動をとっていると思われる受診者を対象に抗 HIV-1 抗体調査を実施し、陽性が確認された 120 例のうちの 87 例（日本人男性 83 例、日本人女性 1 例、外国人女性 3 例）について HIV 遺伝子解析を行った（Fig.1）。血清から RNA を抽出し、HIV-1 の *env*-C2V3 領域を RT-PCR により増幅した後、この PCR 産物につい

てダイレクトシーケンスを行い被検ウイルスの塩基配列を決定した。

また、一部の HIV 抗体確認検査陽性検体についても同様の解析を行った。

（倫理面への配慮）

医療機関において、被験者には内容について説明をし、本人の同意を得た上で採血を行っている。確認検査検体については、連結不可能な匿名検査である。また本研究は、大阪府立公衆衛生研究所倫理委員会の承認を受けている。

### C. 研究結果

遺伝子解析を行った 87 株の HIV-1 について *env*-C2V3 領域の塩基配列からサブタイプを同定した結果、日本人男性ではサブタイプ B が 80 株、サブタイプ CRF01\_AE が 3 株、外国人女性は 3 株すべてサブタイプ CRF01\_AE、また 2005 年に 1 例見つかった日本人女性はサブタイプ B であった（Fig.2）。

これらのウイルス株の中でサブタイプ B

株について系統樹解析を行ったところ、2001年以降に検出された株は遺伝的に多様な広がりをもっていることが観察された (Fig.3)。しかしその中でも、遺伝的距離が近いウイルス集団が複数のクラスターを形成しており、個々のクラスター内のウイルス株数も年々増加する傾向が認められた。さらに、遺伝的に非常に近縁で V3 loop 内に同一のユニークな特徴をもつ複数の株が 2 グループ確認された。そのひとつは 2001年に検出された 3 株(01-2,01-3,01-4)であり、V3 loop の 19 番目と 20 番目の間に Ile あるいは Met の挿入、24 番目にアミノ酸の欠失がみられ、アミノ酸レベルでは 90~98% の相同性を示した (Fig.3)。同様の特徴を持つ株が、2006 年の確認検査陽性検体の中にも 2 例認められた (データ示さず)。また別の特徴的配列をもつ 2 株(00-3,01-8) は crown tetrapeptide モチーフ内に Ile の挿入変異がみられ (GIPGR)、V3 領域においてアミノ酸レベルでは 97% の相同性を示した (Fig.3)。

サブタイプ B 株による感染が大部分を占める日本人男性の中で 2001 年に 1 例 (02-1)、2006 年に 2 例 (06-10、06-20) のサブタイプ CRF01\_AE 株が見つかり (Fig.1)、2006 年の 2 例は MSM (Men Sex with Men) であった。2006 年の確認検査検体ではさらに 1 例の日本人 MSM と 1 例の国籍不明バイセクシュアル男性にサブタイプ CRF01\_AE が検出されており、これまで主に異性間性交渉により感染が拡大していたサブタイプ CRF01\_AE が MSM の間でも流行し始めた可能性が示唆された。当所において日本人男性から検出された 11 株のサブタイプ CRF01\_AE にアジア型株を加えて系統樹解析を試みたところ、異性間感染が明らかな 2 例 (02-426、05-1744) を除き日本人男性由来の株はすべてアジア型から遺伝的距離が遠いことが示された

(Fig.4)。レファレンス株の中でタイの薬物常用者由来の 1 株 (TH.02.OUR7371) のみが日本人 MSM 由来株の比較的近くに位置していた (Fig.4)。

#### D. 考察

大阪府内において、HIV 感染に対してリスクの高い性行動をとっていると思われる者を対象に抗体検査を実施し、陽性が確認された検体について HIV 遺伝子解析を行った結果、調査地域に侵淫してきた HIV-1 が、同じサブタイプ B の中でも多様性を増しながら地域で広がりつつあることが示唆された。ここ数年間で大阪地域において HIV 感染者数が急激に増加していることも多様性増加の一因であると考えられる。その中でも、遺伝的に近縁なウイルスが集積した複数のクラスターが観察されているが、聞き取り調査の結果、それぞれのクラスター内に多くの MSM が存在することが明らかになった。このことから、それぞれのゲイコミュニティにおいて、同一系統のウイルスが感染拡大しているものと考えられた。

また近年、日本人 MSM においてしばしばサブタイプ CRF01\_AE が検出されるようになり、サブタイプ CRF01\_AE が MSM の間でも広がりつつあることが示唆された。しかしながら系統樹解析の結果より、MSM 間で流行している CRF01\_AE 株は異性間性交渉により感染拡大しているアジア型とは異なるタイプである可能性が示された。

#### E. 結論

大阪地域では、主に日本人男性の間で HIV 感染が拡大しており、2001 年以降に検出されるウイルスは遺伝的多様性が増大していることが示された。

#### F. 健康危険情報



なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) 川畑拓也、小島洋子、森 治代、大竹 徹、大國 剛、当所にてH I V感染を確認した、2例のイムノクロマトグラフィー法陰性の感染初期例、感染症学雑誌、80:76-77、2007

### 2. 学会発表

1) 小島洋子、川畑拓也、森 治代、大竹 徹、大阪府内において HIV 感染に対してリスクの高い行動をとるグループ内で広がる HIV-1 の疫学調査、第 20 回近畿エイズ研究会学術集会、大阪、2006

2) 川畑拓也、小島洋子、森 治代、大竹 徹、大國 剛、HIV 感染に対して感染リスクの高い行動を取る人々を対象にした疫学調査において見つかった、HIV-1 遺伝子陽性である 3 例の感染初期例、第 20 回近畿エイズ研究会学術集会、大阪、2006

3) 川畑拓也、小島洋子、森 治代、大竹 徹、大國 剛、IC 法において陰性を示した 3 例の HIV 感染初期例、第 20 回日本エイズ学会、東京、2006

4) 川畑拓也、小島洋子、森 治代、大竹 徹、大國 剛、HIV 疫学調査における母集団の性感染症罹患リスクの解析、第 20 回日本エイズ学会、東京、2006

5) 森 治代、小島洋子、川畑拓也、大竹 徹、V108I polymorphism が EFV 耐性の誘導に及ぼす影響、第 20 回日本エイズ学会、東京、2006

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

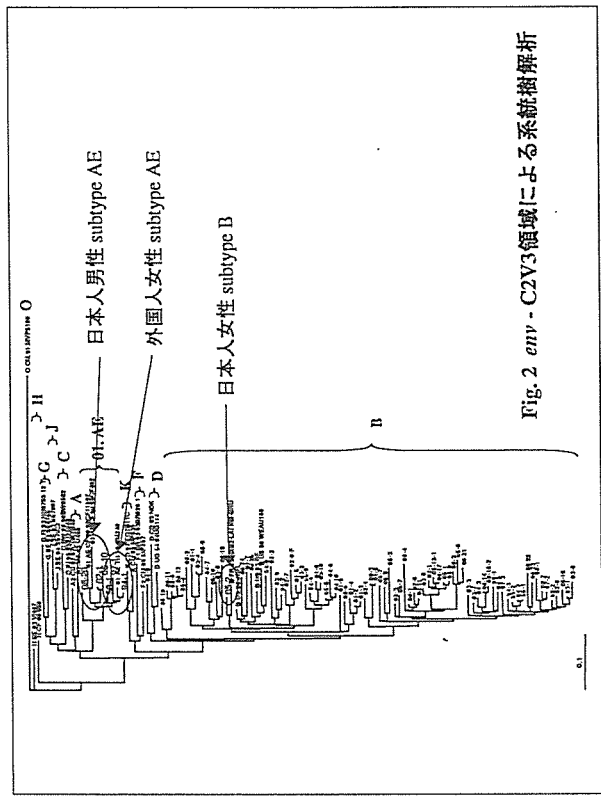
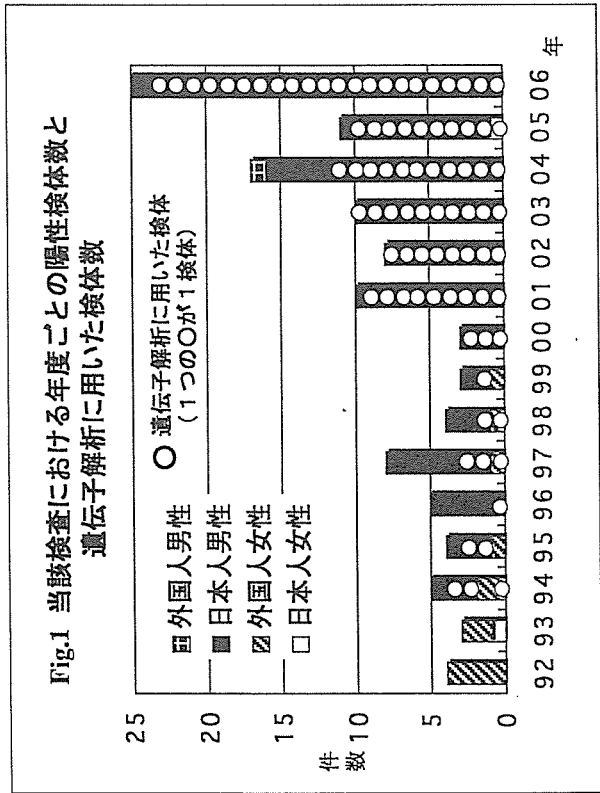


Fig. 3 *env* - C2V3領域による系統樹解析 (subtype B)

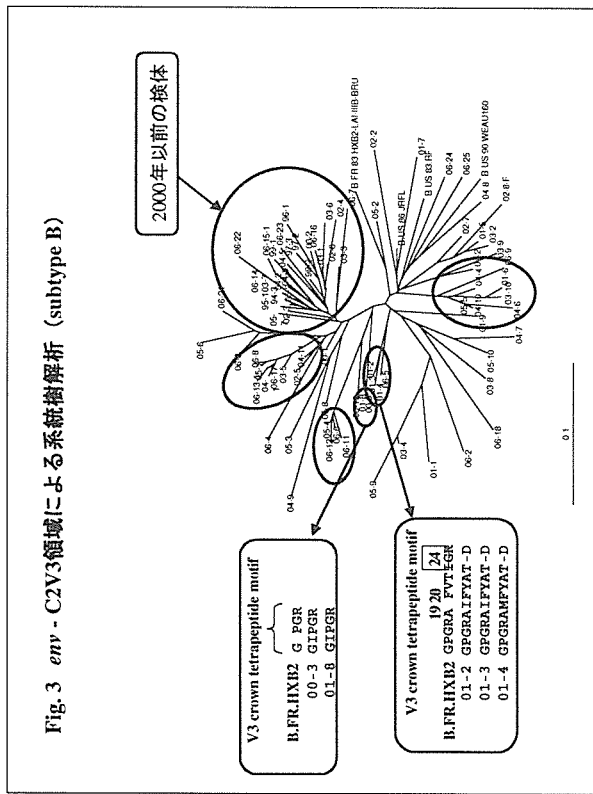
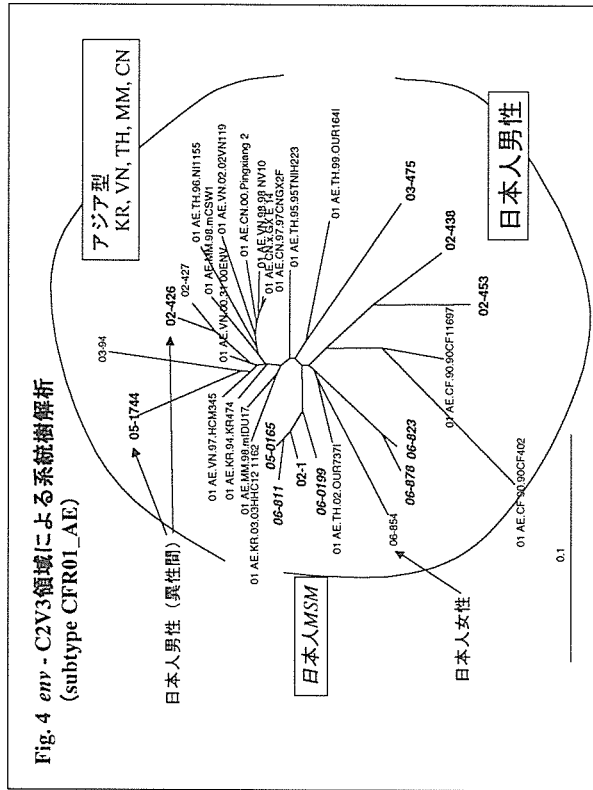


Fig. 4 *env* - C2V3領域による系統樹解析 (subtype CFR01\_AE)



アジア・太平洋地域における HIV・エイズの流行・対策状況と日本への波及に関する研究

福岡県における HIV-1 のサブタイプについて

分担研究者 千々和勝己（福岡県保健環境研究所）  
研究協力者 村田昌之、古庄憲浩、林純（九州大学医学部）  
鍋島茂樹（福岡大学医学部）  
柏木征三郎（福岡県赤十字血液センター）

研究概要

当研究所では 1990 年から現在まで、福岡市内の大学病院を受診した HIV-1 感染者 61 名について、そのウイルスのサブタイプの決定を試みている。これまでに得られたサブタイプの情報を、感染経路別、時期別に解析した結果を報告する。福岡県においては全体的に見ると、1990 年代からサブタイプ B が主流で、特に、血液製剤、男性同性間性的接触による感染者では、サブタイプが決定できた例は全てサブタイプ B であった。日本人では、その他にサブタイプ AE が 2 例、サブタイプ C が 1 例確認された。一方、外国人ではサブタイプ A が 1 例と、リコンビナントウイルスと見られる例が 2 例見られた。

A. 研究目的

AIDS 患者及び HIV 感染者について、その感染ウイルスのサブタイプの解析を行い、福岡県における HIV 感染の実態を把握することを目的とする。また、得られた分子疫学的な知見を基に有効なエイズ予防対策を立案することも目的とする。

B. 研究方法

(1) 対象

研究の対象は、九州大学医学部附属病院総合診療部を受診した AIDS 患者及び HIV 感染者 61 名である。その初診年別の推定感染経路は、表 1 のとおりである。

(2) 分子系統樹解析による HIV-1 のサブタイプの決定

感染者の末梢血リンパ球(PBMC)から抽

出・精製した DNA、または血漿から抽出した RNA をサンプルとし、env 領域については、数種類のプライマーを組み合わせ、nested PCR を行い増幅した<sup>1)</sup>。また、gag 領域についても、nested PCR で増幅した<sup>2)</sup>。これらの PCR 産物について、ダイターミネーター法により直接塩基配列の決定を試みた。そして、env 領域は C2/V3 領域を含む約 320 塩基について、gag 領域については約 410 塩基について、Genebank から得た各サブタイプの既知の塩基配列を加え、neighbor-joining 法により分子系統樹解析を行い、サブタイプを決定した。

C. 結果

(1) サブタイプの決定

env または gag 領域についてサブタイプ