感染者のサブタイプの変遷を図1に示した。我々は以前、異性間性行為感染の日本人感染者について解析し、1994年頃から男女ともにそれまで流行の主流であったサブタイプ B に代わり CRF01_AE が増加していることを報告した。しかしその後、女性においてはCRF01_AE の他、サブタイプ A やC 等の non B サブタイプが増加し、感染サブタイプが多様化していることが確認された。

一方、男性においては2002年まで約70%を占めていたCRF01_AE に代わり2003年からサブタイプ B が再び増加し、現在までのところサブタイプ B が約70%を占めるに至っている。異性間性行為感染の日本人男性で再びサブタイプBが増加している理由はまだ明らかになっていないが、今後女性においてもサブタイプBが拡大することが懸念され、その感染予防対策が重要となると考えられる。

2004年から2006年にHIV陽性が確認されたサブタイプB株間の平均進化距離を1999年以前の株間の進化距離を比較した(表2)。2004年から2006年の株間の平均進化距離は 1999 年以前に比べ拡がっていることが確認された。

RT領域の系統樹解析において、サブタイプB 89株中21株(24%)が一つのクラスター (Group 1) を形成していた (bootstrap value:82%)。Group 1に含まれている株はすべて日本人感染者由来であり、21 株の内 18 株 (86%) が男性同性間感染者由来で、2 株が異性間性行為感染の男性由来、1株は女性であった。(図2)。これら21株は *env* C2V3領域においても一つの集団を形成しており、このクラスターに欧米で分離された株は含まれていなかった (図3)。

Group 1 に含まれる株間の平均進化距離 0.125は2004年から2005年に陽性が判明した78株の平均新価距離 0.173 に比べて小さく、またこれは1999年以前の株間の平均進化距離0.144よりも小さかった (表 2)。すなわち、最近流行しているHIV-1 サブタイプ B の中に近縁性の高い集団の存在が明らかになった。サブタイプBは1980年代前半に欧米より日本に浸入し、既に20年以上経過しているが、この間に同性間感染において欧米型サブタイプBの一部から派生した遺伝子型が流行し、日本のサブタイプBの約4分の1を占めるに至ったものと推測された。

env C2V3 領域のGroup 1に属するが、RT領域のGroup 1 に属していない株が4株 (Y243、Y299、GM1415、GM1902) 存在した (図 3、4)。これら 4株は欧米型サブタイプBと日本で派生したサブタイプB間での組み換え体である可能性が考えられた。サブタイプBが変異、組み換えによって多様性を獲得し、流行していることが示唆された。

D. 結論

2004年から2006年の3年間に主として神奈川県内の医療機関に来院した HIV 感染者 137 名のHIV-1 遺伝子の解析により以下の特徴が明らかとなった。

同性間性行為感染ではほとんどがサブタイプ Bであったが、異性間ではサブタイプBとCRF01_AEがほぼ半数ずつ、全体ではサブタイプBが67%、CRF01_AEが23%を占めた。

RT領域において、サブタイプBの24%が1つのクラスターを形成しており、男性同性間感染において近縁性の高いサブタイプBの存在が明らかになった。

HIV 陽性判明年とサブタイプの解析の結果、異性間性行為による日本人感染者では男女ともに1994年以降CRF01_AE が増加し、2002年までは男性感染者の69%、女性感染者の55%が01_AE であった。しかし、2003年以降男性感染者においてサブタイプBが増加し、現時点ではサブタイプBが70%を占めるに至っていることがわかった。

現在のところ、HIV 感染者に占める女性感染者の割合は低いものの、今後は女性においてもサブタイプBの流行の拡大が懸念され、感染予防対策がますます重要となる。

E. 研究発表

1. 学会発表

1) 近藤真規子、嶋貴子、杉浦亙、武部豊、今井光信：日本、特に首都圏において流行しているHIV-1の遺伝子学的特徴、第55回日本ウイルス学会学術集会 (2007年10月21～23日)

2) 近藤真規子、宮崎裕美、須藤弘二、佐野貴子、倉井華子、相楽裕子、岩室紳也、杉浦亙、武部豊、今井光信：日本で流行しているHIV-1サブタイプBのdiversity、第21回日本エイズ学会学術集会・総会 (2007年11月28～11月30日、広島)。

3) 佐野貴子、近藤真規子、須藤弘二、宮崎裕美、倉井華子、相楽裕子、岩室紳也、今井光信：抗HIV抗体とHIV-1p24抗原が同時検出可能なHIV迅速検査試薬の検討、第21回日本エイズ学会学術集会・総会 (2007年11月28～11月30日、広島)。

4) 宮崎裕美、佐野貴子、近藤真規子、須藤弘二、今井光信：ろ紙を用いたドライスポット法によるHIV検査法の検討、第21回日本エイズ学会学術集会・総会 (2007年11月28～11月30日、広島)。

5）須藤弘二、宮崎裕美、佐野貴子、近藤真規子、加藤真吾、今井光信：HIV 郵送検査に関する実態調査と検査精度の調査、第21回日本エイズ学会学術集会・総会（2007年11月28～11月30日、広島）。

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出生児へのHAARTの安全性の検討、第21回日本エイズ学会学術集会・総会（2007年11月28～11月30日、広島）。

7）上西理恵、正兼亜季、近藤真規子、長谷彩希、小野木成美、今井光信、上田幹夫、相楽裕子、花房秀次、加藤真吾、草川茂、武部豊：CRF01とサブタイプBからなる新規組換えウイルス株（URF）の同定とその公衆衛生上の意義、第21回日本エイズ学会学術集会・総会（2007年11月28～11月30日、広島）。

表1 Distribution of HIV-1 subtype
(神奈川県衛生研究所:2004～2006)

Risk factor	total	HIV-1 subtype (*env* C2V3)						
		B	AE	A	C	D	7	
MSM Japanese	56	54	2					
non-Japanese	4	4						
Heterosexuals								
Japanese male	31	18	12	1				
female	8		4	3	1			
non-Japanese male	13	5	5		2		1	
female	13	1	8	4				
Other, unknown	12	10	1			1		
Total	137	92	32	8	3	1	1	

図1 異性間性行為による日本人HIV-1感染者のサブタイプの変遷

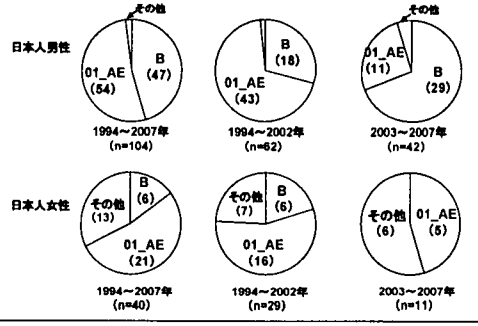
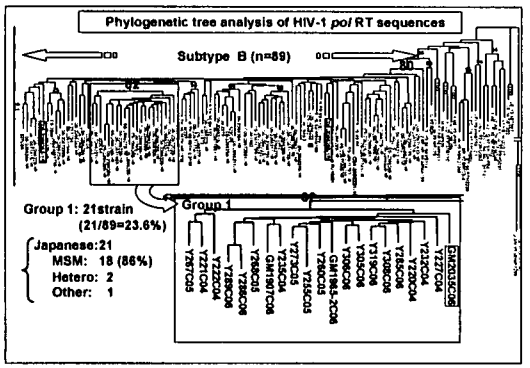
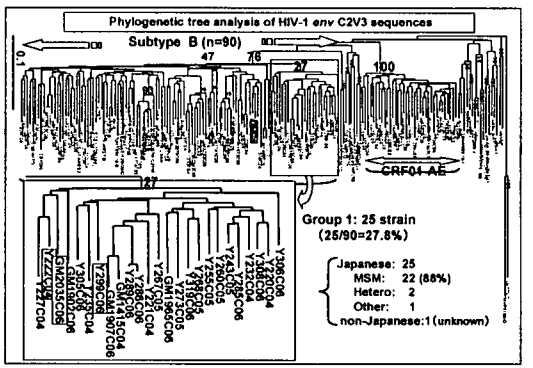


表2 分離株間の進化距離(env C2V3 region)

Subtype B	分離株間 (平均 SD)		Reference株と分離株間(平均 SD)					
			HXB2		US.04.ES2		H93TH067	
2004-2006 (n=78)	0.173	0.037	0.164	0.029	0.146	0.028	0.181	0.026
group 1 (n=25)	0.125	0.028	0.154	0.022	0.148	0.018	0.175	0.016
1999以前 (n=43)	0.144	0.028	0.129	0.018	0.144	0.019	0.152	0.026





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-2 サブタイプ A と B の核酸検出法の開発

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　助教

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 HIV-1/2 検査法が HIV-2 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、昨年度に引き続き、HIV-2 サブタイプ A と B の両方に対応する高感度 RT-nested PCR の方法の開発を行った。この方法は HIV-2 RNA に非常に特異的であり、HIV-1 RNA との間に交叉反応がないことが確かめられた。この方法を用いて、ウエスタンブロットによって HIV-2 が疑われた 3 症例を検査したところ、いずれも HIV-2 RNA が検出されなかった。今後、国内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。

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。一昨年、日本人初の HIV-2 感染症例が見つかっ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-1/2 感染症診断のためのフローチャートに従って見つかったものであるが、現在利用可能な HIV-2 検査法が HIV-1 検査法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 抗原を検査できるが HIV-2 抗原を検査することができない。また、HIV-2 ウエ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 の確認検査をウエスタンブロット法だけに頼ることができない。すなわち、現行の HIV-1/2 検査法では、抗原は陽性であるが抗体はまだ陰性であるような急性期の HIV-2 感染を診断することができず、また HIV-1 と HIV-2 の重複感染は HIV-1 感染として判定されてしまう危険がある。このような問題を解決するための第一歩として HIV-2 の核酸検査法を整備することが必要である。

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 の塩基配列を基にして行われており、世界的流行が確認されているサブタイプ B に適合しているかどうかは不明である。そこで我々は昨年度から、HIV-2 のサブタイプ A と B の両方に対応する RT-nested PCR の方法の開発に取り組んできた。本年度は、この方法の HIV-1 に対する識別能力を検討するとともに、現行の検査法により HIV-2 の感染が疑われた症例に対してこの方法を用いてウイルス RNA の検出を試みた。

B．研究方法

血漿検体から核酸の調製法、HIV-2 RNA の検出法の詳細は昨年度の報告書に記載した。

HIV-1 RNA との交叉反応性を調べるために、HIV-1 IIIB 株培養上清から精製したウイルス RNA を用いた。ウイルス RNA の濃度は PCR の終点希釈における陽性反応の割合をもとにポアソン分布式を用いて求めた。

複数の HIV 診療拠点病院において、HIV-2 ウエスタンブロット法によって HIV-2 の感染が疑われた 3 症例について、担当医の依頼に基づき、血漿検体を用いて HIV-2 RNA を試みた。陽性対照としては HIV-2 サブタイプ B の DNA クローンである pGH123 を用いた。

（倫理面への配慮）

本研究を実施にあたっては、HIV-2 の感染が疑われた症例に対して、担当医から感染の確認のために核酸検査を行うことの意義を説明して同意を得た。

C．研究成果

HIV-2 核酸検査法の HIV-1 RNA に対する交叉反応性を調べるために、10,000 コピーの HIV-1(IIIB

株）RNA を用いて実験を行った（図 1）。10 コピーの HIV-2 DNA からは明瞭な特異的バンドが検出されたが、10,000 コピーの HIV-1 RNA からは特異的バンドがまったく検出されなかった。

ウエスタンブロットによって HIV-2 が疑われた 3 症例について、血漿を 80 μL（症例 1、図 2）あるいは 100 μL（症例 2 と 3、図 3）から調製した RNA を用いて、HIV-2 RNA の検出を試みた。10 コピーの HIV-2 DNA からは明瞭な特異的バンドが検出されたが、いずれの症例の血漿検体の RNA からも特異的バンドはまったく検出されなかった。

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 法の開発を昨年度から継続して行っている。今年度、HIV-1 RNA に対する交叉反応性を調べたところ、10,000 コピーの HIV-1 RNA（血漿ウイルス濃度 100,000 コピー/mL に相当）を用いても特異的なバンドはまったく検出されなかった。この結果からこの結果から HIV-1 RNA によって偽陽性が生じる可能性はないと考えられる。

ウエスタンブロットによって HIV-2 感染が疑われた 3 症例のいずれも HIV-2 RNA 陽性の結果は得られなかった。その後、依頼元の病院から追加検査の依頼がないが、HIV-2 陰性を再確認するための検査は必要であったと思われる。

ウエスタンブロットによって HIV-2 陽性が疑われたにもかかわらず、我々の方法では HIV-2 RNA が検出されなかったは、現在用いられている HIV-2 ウエスタンブロット法は偽陽性が出やすいことを示唆しているのではないかと考えられる。

我々の方法によって新規の検体から HIV-2 RNA の存在を確認した例はまだない。この方法が臨床検査において有効なものであることを実証するためには、多くの HIV-2 感染が疑われる症例を対象に検査を実施する必要がある。そのためには国内外の医療機関と今後一層連携を深めて行く必要がある。

E．結論

HIV-2 サブタイプ A と B のウイルス RNA を超高感度で検出できる方法を開発し、この方法が HIV-1 RNA との間に交叉反応がないことを確かめた。この方法を用いて、ウエスタンブロットによって HIV-2 が疑われた 3 症例を検査したところ、いずれも HIV-2 RNA 陰性であった。今後、国内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．Hamatake, M., Nishizawa, M., Yamamoto, N., Kato, S., and Sugiura, W. (2007) A simple competitive RT-PCR assay for quantitation of HIV-1 subtype B and non-B RNA in plasma. J. Virol. Methods 142:113- 117.

2．Kinai, E., Hanabusa, H., and Kato, S. (2007) Prediction of the efficacy of antiviral therapy for hepatitis C virus infection by an ultrasensitive RT-PCR assay. J. Med. Virol. 79:1113- 1119.

3．Tajima, H., Sueoka, K., Moon, S. Y., Nakabayashi, A., Sakurai, T., Murakoshi, Y., Watanabe, H., Iwata, S., Hashiba, T., Kato, S., Goto, Y, and Yoshimura, Y. (2007) The development of novel quantification assay for mitochondrial DNA heteroplasmy aimed at preimplantation genetic diagnosis of Leigh encephalopathy. J. Assist. Reprod. Genet. 24:227- 232.

4．Nakabayashi, A., Sueoka, K., Tajima, H., Sato, K., Sakamoto, Y., Kato, S., and Yoshimura, Y. (2007) Well-devised quantification analysis for duplication mutation of Duchenne muscular dystrophy aimed at preimplantation genetic diagnosis. J. Assist. Reprod. Genet. 24:233- 240.

5．今井光信，中瀬克己，小島弘敬，加藤真吾，杉浦亙，桒原健，白坂琢磨．(2007) HIV 検査および検査体制―技術の進歩と今後の課題．日本エイズ学会誌 9(3)，202- 208.

5．Tanaka, R., Hanabusa, H., Kinai, E., Hasegawa, N., Negishi, M., and Kato, S., Intracellular efavirenz levels in peripheral blood mononuclear cells from HIV-infected individuals. Antimicrob. Agents Chemother. 52(2):782- 785.

6．Kuji, N., Yoshii, T., Hamatani, T., Hanabusa, H., Yoshimura, Y., and Kato, S. Buoyant density and sedimentation dynamics of HIV-1 in two density-gradient media for semen processing. Fertil. Steril. (in press)

2．学会発表

1．加藤真吾「教育講演：HIV 定量法の進歩とその臨床応用（生殖医療への応用）」第 21 回日本エイズ学術集会（2007 年 11 月 28-30 日、広島）

2．花房秀次、小島賢一、加藤真吾、兼子智、高桑好一、久滋直昭、木内英、加藤克則、吉村泰典、田中憲一「HIV 感染者夫婦の生殖補助医療」第 21 回日本エイズ学術集会（2007 年 11 月 28-30 日、広島）

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出生児へのHAARTの安全性の検討」第21回日本エイズ学術集会（2007年11月28-30日、広島）
4．田中理恵、桒原健、杉浦亙、加藤真吾「HPLCによるダルナビルの血中濃度測定法の開発」第21回日本エイズ学術集会（2007年11月28-30日、広島）
5．須藤弘二、宮崎裕美、佐野貴子、近藤真規子、加藤真吾、今井光信「HIV 郵送検査に関する実態調査と検査精度の調査」第21回日本エイズ学術集会（2007年11月28-30日、広島）
6．加藤真吾、田中理恵、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21回日本エイズ学術集会（2007年11月28-30日、広島）
7．加藤真吾、須藤弘二「LC-MS による薬剤耐性変異の検出」第 21 回日本エイズ学術集会（2007年11月28-30日、広島）
8．上西理恵、正兼亜季、近藤真規子、長谷彩希、廖華南、小野木成美、今井光信、上田幹夫、相良裕子、花房秀次、加藤真吾、草川茂、武部豊「CRF01とサブタイプBからなる新規組換えウイルス株（URF）の同定とその公衆衛生学上の意義」第21回日本エイズ学術集会（2007年11月28-30日、広島）
9．杉浦亙、潟永博之、吉田繁、千葉仁志、小池隆夫、伊藤俊広、原孝、佐藤武幸、石ヶ坪良明、上田敦久、近藤真規子、今井光信、貞升健志、長島真美、福武勝幸、山元泰之、田中理恵、加藤真吾、宮崎菜穂子、岩本愛吉、藤野真之、中曽根正、巽正志、椎野禎一郎、岡慎一、林田庸総、服部純子、伊部史朗、藤崎誠一郎、金田次弘、浜口元洋、上田幹夫、正兼亜季、大家正義、下条文武、田邊嘉也、渡辺香奈子、白坂琢磨、桒原健、森治代、小島洋子、中桐逸博、高田昇、木村昭郎、南留美、山本政弘、松下修三、健山正男、藤田次郎「2003-2006年の新規HIV-1感染者における薬剤耐性頻度の動向」第21回日本エイズ学術集会（2007年11月28-30日、広島）

G．知的所有権の取得状況
1．特許取得
なし
2．実用新案登録
なし
3．その他
なし

図1. HIV-1 RNAとの交叉反応

10,000コピーのHIV-1 LAI RNAを用いて交叉反応が起こるかどうかを調べた。

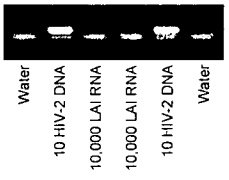


図2. HIV-2感染が疑われた血漿の検査(1)

WB法によってHIV-2の感染が疑われた1症例の血漿それぞれ80 μlを用いてHIV-2の検出を試みた。

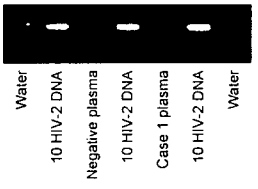
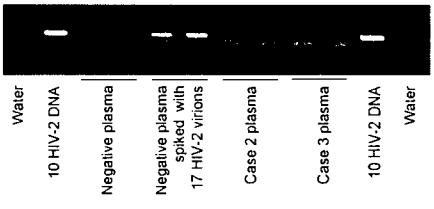


図3. HIV-2感染が疑われた血漿の検査(2)

WB法によってHIV-2の感染が疑われた2症例の血漿それぞれ100 μlを用いてHIV-2の検出を試みた。



厚生労働省科学研究費補助金（エイズ研究事業）
「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班」

分担研究報告書

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（東京都健康安全研究センター）
研究協力者　長島真美，新開敬行，尾形和恵，吉田靖子，矢野一好
上野泰弘（東京都健康安全室感染症対策課）

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．南新宿における土日検査の開始，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，南新宿および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の遺伝子型のモニタリング調査を行う目的で，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，95.0%がサブタイプB，3.1%がCRF01_AEで，その他、C、CRF20_BG、CRF31_BCが各1例(0.6%)検出された。

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．

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，陽性数は増加する傾向にある（図１）．

今回，東京都における HIV の遺伝子型をモニタリングする目的で，保健所・南新宿 HIV 検査陽性例について，HIV サブタイプ型別を実施し，東京都内で蔓延している HIV サブタイプの解析を行うことを本研究の目的とした．

（倫理面の配慮）

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で，本研究に倫理的に問題のないことが承認された．

B. 研究方法

2007 年に都内保健所・南新宿で HIV 検査を受診し，陽性となった 161 検体の血清 400uL からウイルス RNA を抽出し，HIV-1 RT 遺伝子領域の増幅を行い(約 700bp)，direct-sequencing 法により塩基配列を決定後，Mega4 にて系統樹解析を行い，サブタイプを決定した．系統樹解析によりサブタイプ型別が困難な事例については，Sequence Database HIV Blast :http://www.hiv.lanl.gov/content/hiv-db/mainpage.html にて，サブタイプを決定した．

C. 研究結果

1. サブタイプ型別

塩基配列を決定後，Mega4 にて系統樹解析ま

たはHIV Blastによりサブタイプを決定した結果，153例(95.0%)がサブタイプBであり，5例

(3.1%)がCRF01_AEに分類された.さらに，サブタイプC、CRF20_BG、CRF31_BCが各1例(0.6%)検出された（図２，３）.

2.系統樹解析

CRF20_BG、CRF08_BC に分類された２例(TokyoA, TokyoB)について詳細に解析を行った結果，TokyoA株はSierraら(2007)報告のキューバ由来CRF20_BG株Cu103(AY586545)，CB134(DQ020274)，R77(AY586544)と近縁であり，系統樹上でほぼ同位置に位置した。

D．考察

今回の調査では，検出されたウイルスの95.0%がサブタイプBであり，過去の傾向とほぼ同様であったことから，都内の新規感染者の多くは依然としてサブタイプBによる感染が主であることが示唆された.

また，今回の調査で初めて検出されたCRF20_BGおよびCRF08_BCについてはそれぞれ一例のみの検出ではあるが，同性間感染の多い東京都内における今後の動向を注視していく必要がある.

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，95.0%がサブタイプBであることが明らかになった．今回新たに検出されたCRF20_BGおよびCRF08_BCについては，今後の動向を注視していく必要がある.

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)ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）感染症：東京都における検査と解析
貞升健志，長島真美，新開敬行，尾形和恵，吉田靖子，矢野一好，東京都健康安全研究センター年報，58（印刷中）2007

2. 学会発表

(1)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

(2)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

(3)イムノクロマト法における陽性例と偽陽性例の判定ライン出現時間の比較，長島真美，貞升健志，新開敬行，尾形和恵，吉田靖子，矢野一好，第21回日本エイズ学会学術集会・総会，広島，2007

(4)東京都内保健所等のHIV検査陽性例の血清学的，遺伝子学的解析，貞升健志，長島真美，新開敬行，尾形和恵，吉田靖子，矢野一好，第21回日本エイズ学会学術集会・総会，広島，2007

図１．東京都におけるHIV検査陽性累計数（2004-2007.1）
【南新宿検査相談室＋　保健所】

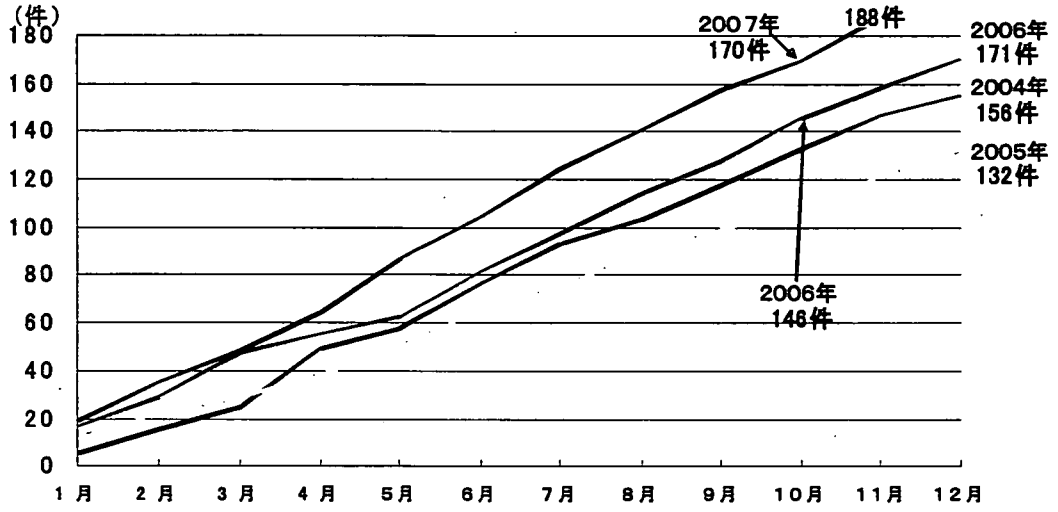


図２．RT領域の系統樹解析

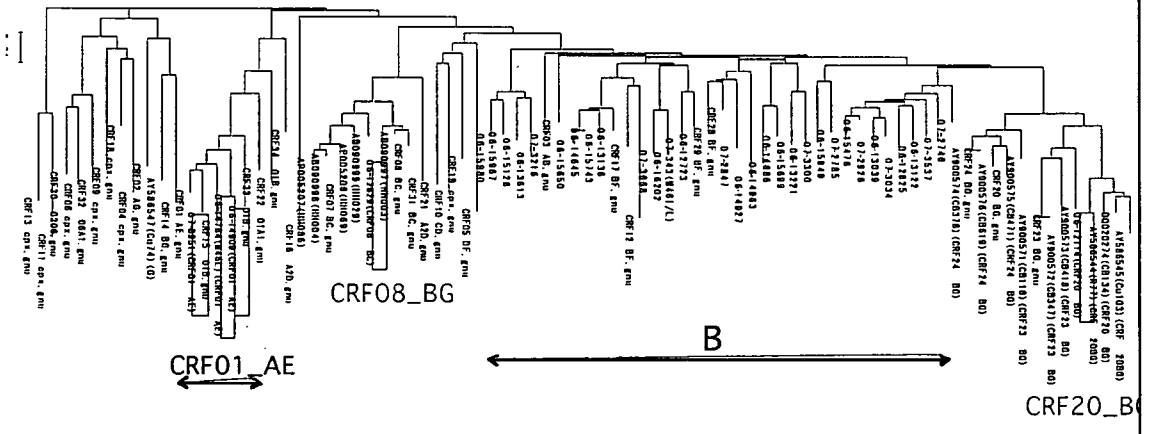


図３． RT領域の系統樹解析

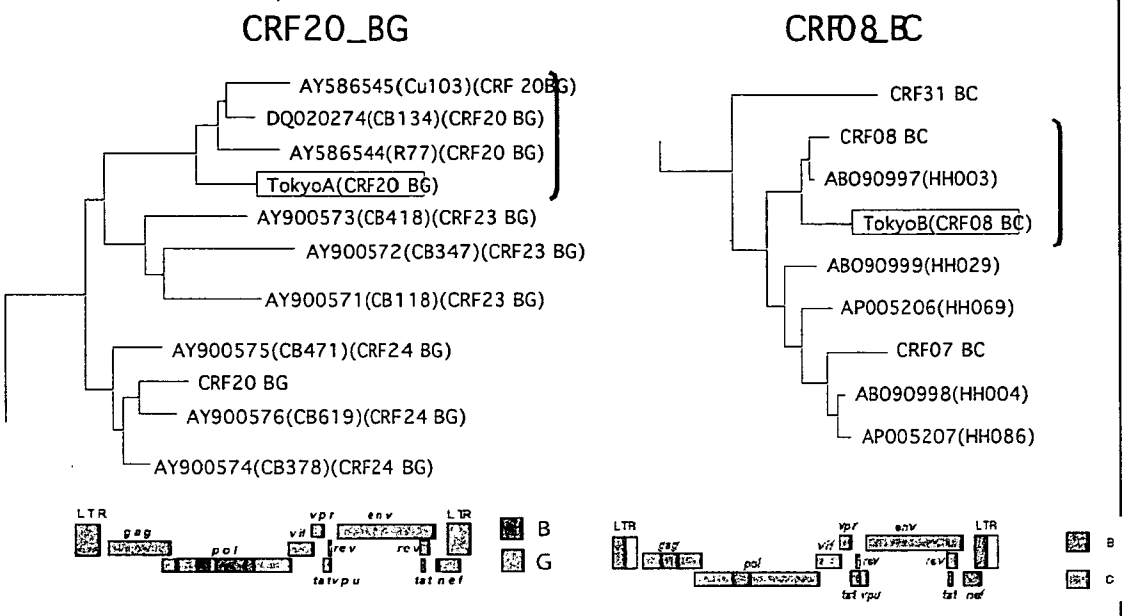
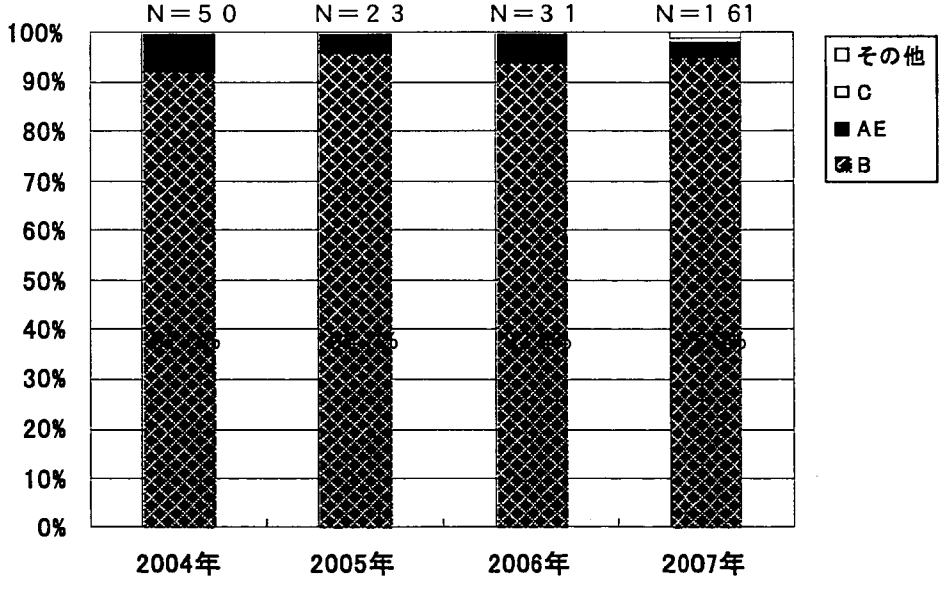


図４．東京都における保健所等HIV検査陽性例のサブタイプ型別



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(2007年) -

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（同上）

研究概要

2007年のハイリスク疫学調査でHIV抗体陽性が確認された23検体中16検体について、分子疫学的手法を用いて *env*-C2V3 領域の解析を行った。その結果、15例がサブタイプB、1例がサブタイプCであった。Bはすべて男性において検出され、Cは日本人女性から検出された。この日本人女性から検出されたウイルスの *pol* 領域を解析すると、C,B,AEが混在していることが確認され、重感染していることが推測された。

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、2007年の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

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抗体調査を実施し、2007年に陽性が確認された23例（日本人男性21例、日本人女性1例、外国人男性1例）についてHIV遺伝子解析を行った。

方法は、血清からRNAを抽出し、HIV-1の *env*-C2V3 領域および *pol* 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クエンスを行い被検ウイルスの塩基配列を決定した。必要に応じてcloningも行った。

（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

2007 年に遺伝子解析を行った 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、現在解析中である 7 例をのぞいた 16 例のうち、日本人男性 14 例と外国人男性 1 例(07-2)はサブタイプ B であった。日本人女性 1 例(07-6)はサブタイプ C であった(表 1、図 1)。

また、*pol* 領域では、現在解析中である 2 例をのぞいた 21 例のうち、日本人男性 19 例と外国人男性 1 例はサブタイプ B であった(表 1)。*env*-C2V3 領域でサブタイプ C と確認された日本人女性(07-6)は、*pol* 領域の解析を行ったところ、サブタイプ C、B、AE が混在していた(表 2)。

1994 年から 2007 年にかけてハイリスク疫学調査陽性検体のサブタイプ（*env*-C2V3 領域）を調べた結果、感染リスクが判明している 54 名のうち、その 89%にあたる 48 名が MSM であり、MSM のうち 98%がサブタイプ B であった（表 3)。

1994 年から 2007 年の陽性検体について *env*-C2V3 領域の系統樹解析を行ったところ、由来が同じであると考えられるウイルスを保有するグループが複数あり、それぞれのリスクグループの間で感染が広がっていることが推測された。またその中には感染初期例も含まれていた(データは示さず)。

D. 考察

2007 年に大阪府内において、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 *env*-C2V3 領域の遺伝子解析を行った結果、日本人男性ではサブタイプ B が多くみつかった。日本人女性（07-6）でサブタイプ C がみつかったが、*pol* 領域の解析ではサブタイプ C、B、AE が混在し、重感染していることが推測された。この日本人女性は 20 歳代で、海外渡航歴が多数あり、海外での性的接触により複数の株に感染したと思われる。

1994 年から 2007 年にかけてハイリスク疫学調査陽性検体のサブタイプ（*env*-C2V3 領域）を調べた結果、大阪･関西地域では日本人 MSM でサブタイプ B のウイルスが広がっていることが確認された。また、今のところ症例数の増加傾向は認めないものの、MSM で散見されているサブタイプ AE についても今後の動向が注目される。

また、検査法の改良に伴って検出感度が上昇し、2005 年頃からは感染初期で陽性がみつかるケースも増えてきた。2007 年のハイリスク疫学調査でも 2 例が感染初期で発見された。由来が同じであると考えられるウイルスが広がっているリスクグループの中に感染初期例も含まれる事より、HIV の感染拡大は歯止めがかかっていないと思われる。

一過性の症状がでて病院を訪れた際に、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には検査を推奨する等、新たな感染拡大を防止する施策が必要であると考えられた。

E. 結論

大阪·関西地域において重感染と考えられる例が発見された。また、感染初期例が複数のリスクグループでみられることより、感染拡大が続いていることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) YOKO KOJIMA、TAKUYA KAWAHATA、HARUYO MORI、ISAO OISHI、TORU OTAKE、Recent Diversity of HIV-1 in Individuals who visited STI-related clinics in Osaka, Japan 、Journal of Infection and Chemotherapy (in press)

2. 学会発表

1) 小島洋子、川畑拓也、森　治代、大竹　徹、大國　剛、大阪府内の STI 関連クリニックにおける HIV 感染初期例、第 21 回近畿エイズ研究会学術集会、大阪、2007

2) 小島洋子、川畑拓也、森　治代、大國　剛、大阪近隣の未治療新規感染者における薬剤耐性 HIV-1 の伝播状況、第 21 回日本エイズ学会学術集会、広島、2007

3) 森　治代、小島洋子、川畑拓也、大國　剛、プライマーにより異なるサブタイプおよび薬剤耐性変異が検出された HIV-1 重感染例、第 21 回日本エイズ学会、広島、2007

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図1.　2007年ハイリスク疫学調査検体（*env*-C2V3領域）

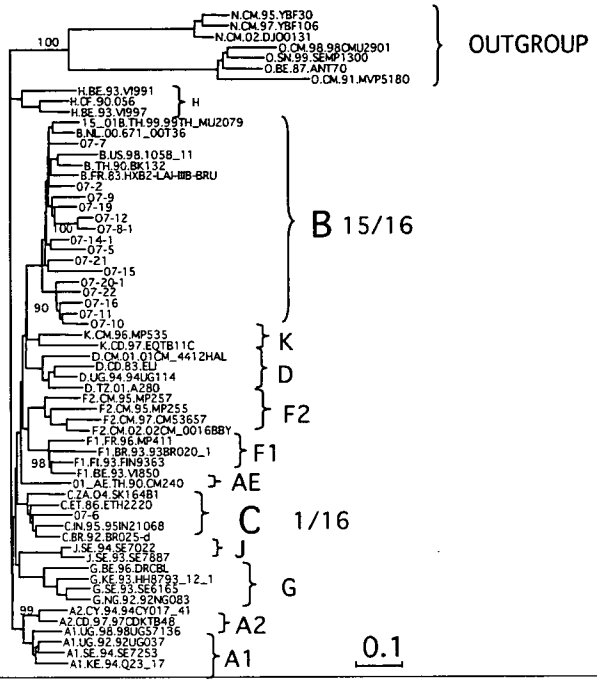


表1.　2007年ハイリスク疫学調査検体一覧

番号	性別	国籍	*env*サブタイプ	*pol*サブタイプ	リスク	備考
07-1	M	日本	解析中	解析中	MSM	
07-2	M	フランス	B	B	MSM	
07-3	M	日本	解析中	B	MSM	
07-4	M	日本	解析中	B	MSM	
07-5	M	日本	B	B	MSM	感染初期
07-6	F	日本	C	C B AE	heterosexual	
07-7	M	日本	B	B	MSM	
07-8	M	日本	B	B	MSM	
07-9	M	日本	B	B	MSM	
07-10	M	日本	B	B	MSM	
07-11	M	日本	B	B	MSM	
07-12	M	日本	B	解析中	MSM	
07-13	M	日本	解析中	B	MSM	
07-14	M	日本	B	B	不明	
07-15	M	日本	B	B	MSM	感染初期
07-16	M	日本	B	B	MSM	
07-17	M	日本	解析中	B	MSM	
07-18	M	日本	解析中	B	MSM	
07-19	M	日本	B	B	MSM	
07-20	M	日本	B	B	MSM	
07-21	M	日本	B	B	MSM	
07-22	M	日本	B	B	不明	
07-23	M	日本	解析中	B	MSM	

表2.　07-6 ; gag、PR、RT各領域のサブタイプ

	gag	PR	RT
plasma virus	C	B, AE mix	C
	C		
PBMC provirus	C	B, AE mix	C
		AE (RT:K65R,K103N,Y181C,M184V,G190A)	

表3.　ハイリスク疫学調査検体のサブタイプ（*env*-C2V3領域）
1994年～２００７年

Risk factor	国籍	性別	Total	HIV-1 subtype (*env*- C2V3)		
				B	AE	C
MSM	日本人	男性	47	46	1	
	外国人	男性	1	1		
Heterosexual	日本人	女性	1			1
	外国人	女性	3		3	
Bisexual	日本人	男性	2	2		
その他、不明	日本人	男性	48	47	1	
	日本人	女性	1	1		
Total			103	97	5	1

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

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

分担研究者　千々和　勝己
福岡県保健環境研究所保健科学部ウイルス課長

研究概要
今年度は、福岡市内の大学病院を受診したHIV-1感染者9名について、そのウイルスのサブタイプの決定を試みた。その結果、7例は、env、gag領域ともサブタイプBに、1例はgag領域のみサブタイプBと判定された。これら8例は全て男性で、7例は同性間性的接触が、1例は異性間性的接触が感染経路と推定される。また、残りの1例はgagのみサブタイプAに決定され、env領域はサブタイプEであることが示唆された。この例は女性で、異性間性的接触が感染経路と推定される。今回得られた情報から、福岡県におけるHIV-1感染は、現在も男性同性間性的接触によるサブタイプBの感染が中心だと思われる。

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

今年度の研究の対象は、2007年に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9名である。その初診年、及び推定感染経路は、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をサンプルとし、env領域については、1stでは573A/004B、2ndでは007A/575B、または574A/521Bのプライマーを用いて、nested PCRを行った。また、gag-pol領域についても、1stでは509A/512Bを、2ndでは513A/530Bのプライマーを用いてnested PCRで増幅した。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388塩基について、gag-pol領域については522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。なお、短い長さの塩基配列しか決定できなかった場合は、その配列について、国立感染症研究所HIV感染症統合データベースを用いて、相同性検索を行った。

C．研究結果

（1）サブタイプの決定

env及びgag-pol領域についてサブタイプを決定できたのは9例中7例であり、全て男性でサブタイプBであった。それらを感

染経路別に見ると、6 例が同性間性的接触、1 例が異性間性的接触であった。その他に、gag-pol 領域だけがサブタイプ A または B と決定したものが各 1 例あった。これらの env 領域の塩基配列は、200 塩基程度しか決定できなかったが、国立感染症研究所 HIV 感染所統合データベースを用いて、相同性検索を行った結果は、それぞれサブタイプ E 及び B であった。サブタイプ AE が示唆される例は、女性で異性間性的接触による感染と見られる例であった。サブタイプ B の例は、男性で同性間性的接触による感染であった。以上の結果を表 1 にまとめる。

過去にサブタイプを調べた例と今回の結果を併せて、感染経路別のサブタイプを表 2 に示す。また、初診年別にサブタイプの分布を表 3 に示す。

D．考察

今回、サブタイプを解析した 9 例では、8 例が B で、1 例が AE であった。サブタイプ AE 感染例はこれまで異性間性的接触による 2 例だけであり、今回が 3 例目となった。関東地区ではサブタイプ AE が同様な経路で増加したが、福岡県においては大きな増加は認められていない。今回得られた情報から、福岡県における HIV-1 感染は、現在も男性同性間性的接触によるサブタイプ B の感染が中心だと思われる。

E．結論

福岡県内では、1990 年代から現在に至るまで、サブタイプ B による感染が主流であり、いわゆるサブタイプ AE の著しい増加は見られていない。今回得られた情報から、福岡県における HIV-1 感染は、現在も男性同性間性的接触におけるサブタイプ B の感染が中心だと思われる。

研究協力者
九州大学病院総合診療部
村田昌之、古庄憲浩、林純

表 1.HIV-1 サブタイプ解析結果(2007 年)

番号	感染経路	性別	初診年	サブタイプ	
				gag-pol	env
FA60	同性間性的接触	男	2007	B	B
FA61	異性間性的接触	女	2007	A	(E)
FA62	同性間性的接触	男	2005	B	B
FA63	同性間性的接触	男	2005	B	B
FA64	同性間性的接触	男	2005	B	B
FA65	同性間性的接触	男	2006	B	(B)
FA66	同性間性的接触	男	2006	B	B
FA67	同性間性的接触	男	2006	B	B
FA68	同性間性的接触	男	2006	B	B

表2. 感染経路別サブタイプ(gag-pol/env)

感染経路	B/B	B/ND*	ND/B	A/E	A/A	C/C	C/A	C/E	合計
血液製剤	11	4	2	0	0	0	0	0	17
男性同性間	21	8	4	0	0	0	0	0	33
異性間	3	1	1	3	1**	1	0	0	10
薬物濫用	1**	0	0	0	0	0	0	0	1
不明	0	0	1	0	0	0	1**	1**	3
合計	36	13	8	3	1	1	1	1	64

* not determined

**foreigner

表3. 初診年別サブタイプ (gag-pol/env)

初診年	B/B	B/ND*	ND/B	A/E	A/A	C/C	C/A	C/E	合計
1990-1994	17	3	1	0	0	0	1	0	22
1995-2000	10	3	3	2	1	0	0	1	20
2001-2007	9	7	4	1	0	1	0	0	22
合計	36	13	8	3	1	1	1	1	64

* not determined

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
「アジア・太平洋地域におけるHIV・エイズの流行・対策状況と日本への波及に関する研究」
分担研究報告書

北海道におけるHIV・エイズの流行状況と遺伝子型モニタリング

分担研究者　澤田　幸治　北海道立衛生研究所長
協力研究者　長野秀樹、地主勝（北海道立衛生研究所微生物部）
工藤伸一（生物科学部）

研究要旨

日本におけるHIV感染者数は数年来、増加傾向が続いている。北海道においても同様であったが、2007年の新規HIV感染者・エイズ患者数は24名で、2006年より4名減少した。このうち、エイズ患者は8名で33%であった。感染経路別では同性間性的接触が16名で67%（16/24）、年齢別ではエイズ患者で20代の増加が顕著で、HIV感染者については昨年同様30代が最も多く67%（12/16）であった。入手可能な材料6例についてHIVの塩基配列によるサブタイプについて調べたところ、サブタイプBが5例、サブタイプCRF01_AEが1例であった。

A. 研究目的

北海道におけるHIV感染者・エイズ患者数は近年、増加傾向が続いている。平成16年4月から、道立保健所のHIV検査において、即日検査を導入した。その結果、年間の受検者数は増加傾向を示したが、感染の拡大を阻止するには至っていない。本研究は、エイズ流行の形成メカニズムおよびそれに関連する諸要因を理解し、それによりエイズ流行の防圧に向けた研究の推進を目的としている。なお本研究は、「北海道立衛生研究所ヒトを対象とする医学研究に関する規定」に基づき北海道立衛生研究所倫理審査委員会の承認を得て実施している。

B. 研究方法

1. 北海道におけるエイズ流行の現状

感染症法に基づく発生届けによるデータをもとに、年齢分布、感染経路などに関して集計解析した。

2. HIVのサブタイプ分析

HIV感染者の血清からウイルスRNAを分離精製し鋳型とした。*env*遺伝子内のC2/V3領域、*pol*遺伝子内のプロテアーゼ領域、逆転写酵素領域についてRT-PCR、Nested PCR法により当該領域を増幅し、塩基配列を決定した。当該領域の塩基配列について、MEGA3の近隣接合法を用い、系統樹を作成し、サブタイプを決定した。系統樹の信頼性評価のためにブートストラップ値を1,000とした。

C. 研究結果