

図12: SHIV-NH1sr のトランスフェクションによるウイルス産生と、その CEMx174 に対する感染性

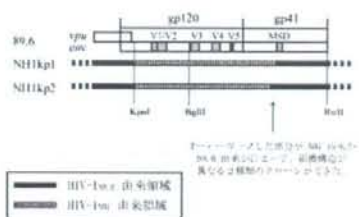


図13: 新たに構築した 93JP-NH1 由来フラグメントを持つ SHIV の構造

表 2: 樹立した感染性分子クローンの一覧

サブタイプ	ウイルス株	ホスト細胞
サブタイプ B'	B106	dua1, CCK5
	B4002	CCK5
CRF01_AE	NH1	dua1
	NH2	CCK5
CRF07_BC	BH043	CCK5
CRF08_BC	BH040	CCK5

研究課題：日本における HIV-1 感染にみる宿主内・宿主間の HIV-1 ゲノム多様性の分子集団
遺伝学的解析

分担研究者：椎野 慎一郎（国立感染症研究所エイズ研究センター・主任研究官）

研究要旨

HIV-1 の流行形成と病理の両方に重要な役割を持つゲノム多様性の維持機構を知るため、感染者間、感染者体内、*in vitro* における塩基配列変異の推移を調べ、分子集団遺伝学的手法を用いて多様性の維持に関わる因子を解析した。感染者体内の変異は、CRF01_AE の国内の家族内感染例 NH3 の逆転写酵素（RT）領域における高度・多剤耐性変異ウイルスの発生と消失過程に注目した。*In vitro* の変異は、NH3 の解析結果を元に RT 領域の耐性変異のもととなったと考えられる M41L, 69Ins, T69I と L210W, T215Y の 2 つのハプロタイプを持つ感染性クローンを作成し、さらに L210W, T215Y については T69 と W210 間の約 400 ヌクレオチドの領域に存在する 20 個の制限酵素サイトに、それぞれアミノ酸配列を変えないよう変異を導入し（NH1-RTDRS_WY）、これらの共感染競合実験を行った。感染者間の変異は、名古屋医療センターにて診療を受けた患者のうち HIV-1 サブタイプ B に感染した 134 名の RT 領域配列、および東京都において実施されている抗体検査の確認検体で 2004 年から 2007 年に採取された 377 検体の *pol* 領域配列を用いた。NH3 より経時的に採取した検体を用いた逆転写酵素領域の分子進化学的解析から、M41L, 69Ins, T69I, L210W, T215Y のハプロタイプを持つ高度多剤耐性形質がフィンガー領域とパーム領域の変異群間の遺伝子組換えによって生まれたことがわかった ($p < 0.01$)。治療失敗に伴う投与薬剤の変更によって、このハプロタイプはその後次第に消失し、かわりに以前 provirus として存在していた variant が組換えを伴って re-circulate した変異体が優勢となった。*In vitro* 競合培養では、培養細胞において交叉点が明確な組換えウイルスを大量に発生させることが可能となった。得られたウイルスのクローン配列を解析したところ、組換え価は 1.8×10^{-4} /bp/day と推定された。各 SNP 間の実際の組換え価を先の理論値と比較したところ、有意な差のある領域が 2 つ発見されたが、両方とも理論値より実測値が低く、ホットスポットではなかった。これらの塩基配列に加えて、NH3 と同一家族感染者の NH1 から採取された env C2V3 領域のクローン配列および名古屋医療センターの検体から明らかになった RT 領域配列を用いて、Coalescent theory の手法を使い、多様性の維持に関わる因子である population mutation parameter (4*N*_{eu})、population recombination parameter (4*N*_{er})、集団有効サイズ (*N*_e) および Tajima の *D* を推定した。*in vitro* 競合感染実験における RT 領域では突然変異と組換えが NRTI の濃度にかかわらず一定の寄与割合であったが、*in vivo* では採取時期によって大きく変動していた。RT で見られた変動は、C2V3

領域では観察されなかったが、患者間の配列では、HARRTを開始している群において組換えの寄与が有意に高かった。有効集団サイズは、すべての解析で $10^2 \sim 10^3$ だった。一方、TajimaのDによる自然選択圧の解析は、in vivoにおける耐性変異が発生した時期およびinter-hostの標本におけるHARRTを開始している群である遺伝子型にかかる選択圧が有意に高いことを示した。東京都の確認検査検体のproteaseおよびRT領域配列は、得られた配列のうち、日本人感染者集団の主体と考えられているSubtype Bのみを抽出し、Bayesian MCMC samplingによる最尤系統樹を作成したのちに、注目すべき分岐点について祖先分岐時間(tMRCA)を推定した。Subtype B集団の各年度の塩基多様度は、proteaseが0.05、RTが0.04で変動はなく、集団の分岐は観察されなかった。これらの集団は、1980年近辺に分岐した3つの主要な系統群で構成されていた。また、同一検体の複数のハプロタイプ間の分岐年代が、10年以上前に遡れるものが5検体見出され、HIV-1の遺伝子組換えに先立つ現象である多重感染が予想以上に頻繁に生じている可能性が示唆された。

A. 研究目的

HIV-1のゲノム多様性は、流行形成と病理の両方に重要な役割を持っている。ゲノム多様性の主な要因は、各アミノ酸遺伝子座に生じる突然変異と、遺伝子座間の組換えによるハプロタイプの変異である。こうして生じた多様性の維持には、閉鎖した集団においては集団の有効サイズと自然選択圧が大きな役割を持つ。HIV-1の多様性は、突然変異率が極めて大きく、ウイルス生産量も大きいこに起因すると考えられている。一方、HIV-1では異なるゲノムを持つウイルスが共感染する際に、ゲノム間の組換えが高頻度で生じることも報告されている。HIV-1の流行サブタイプの中に存在する、サブタイプ間組換え型流行ウイルス(circulating recombinant form: CRF)や、東アジアの流行地域でしばしば発見される unique recombinant form (URF)は、HIV-1の組換えがある条件下ではかなりの頻度で生じることを示している。これらのウイルスのゲノム構造には、組換えの際に交叉が生じるサイトに共通点があることが多いが、これが組換えのホットスポットによるものなのか、組換え現象の不均等と集団構造に

よるものなのかは不明である。宿主内においては、組換えが薬剤治療などの宿主環境の変化へのウイルスの適応に重要な役割を持っているという知見もある。しかし、宿主間・宿主内のHIV-1の集団動態に、突然変異率・集団サイズ・遺伝子組換えがどの程度寄与しているかはあまり明らかになっていない。こうした現象の解明には、ウイルス変異形成過程におけるゲノムレベルの集団遺伝学的解析が有効である。また、遺伝的多様性の集団動態を研究するためには、集団内(感染者間)のウイルス多様性の現状と過去の様相を知ることでもある。これを知るためには大規模な配列データ収集と緻密な解析が不可欠であるが、日本人感染者集団におけるHIV-1の大規模な集団遺伝学的調査は行われていない。本研究は、HIV-1の宿主内、宿主間双方の集団遺伝学的解析を通して、日本人感染者集団におけるウイルスゲノムの集団動態を解明することを目的とした。

B. 研究方法

宿主内、宿主間の様々な状況における集団動態を研究するため、本研究では以下の5種類の検体

を解析に用いた。

1) CRF01AE 感染性クローン 93JP-NH1 と同系統のウイルス株に感染し抗ウイルス剤療法を受けた感染者 (NH3) の4期にわたる血液検体。それぞれ、NH3-1 (1993年採取) が感染初期、NH3-2 (1999年12月採取) が HAART 療法 (AZT+ddI → AZT+3TC+NFV or IDV) の失敗期、NH3-3 (2000年3月採取) が NRTI 耐性変異の形成を受けて薬剤療法を NNRTI(NVP)と PR 阻害剤 (SQV, IDV) に変更した直後、NH3-4 (2003年5月採取) が NH3-3 で選択した治療が継続している時期である (図1)。これらの血液検体を血清と PBMC に分画し、RNA と DNA をそれぞれ抽出、RT 領域 (624bp) を PCR により増幅したのちにクローニングし、各々32配列以上の塩基配列を得た。

2) *in vitro* 競合感染実験の経時サンプルより採取された RT 領域のクローン配列。競合実験は、以下の方法で行った。93JPNH1 をバックボーンにして M41L, 69Ins, T69I と L210W, T215Y のハプロタイプそれぞれを持つ2つの感染性クローンを作成し、さらに L210W, T215Y については T69 と W210 間の約 400ヌクレオチドの領域に存在する 20個の制限酵素サイトすべてのアミノ酸配列を変えないように変異を導入したクローン (NH1-RTDRS_WY) を作成した (図2)。これらを HeLa 細胞に co-transfection して共感染実験用の混合ウイルス株 (LI:WY=60:40) を生成し、1000TCID₅₀ のウイルス濃度で NP2-CD4-CCR5 細胞および NP2-CD4-CXCR4 細胞に感染させ、上清を経時的に採取した。この際、培養液にさまざまな濃度の NRTI を加えた (図3)。制限酵素部位の変異は、約 20bp の解像度で交叉の発生を計測するためのマーカー遺伝子として使われる。NRTI の濃度を変えることで選択し、組換えを起こし薬剤耐性が変化したハプロタイプを持つウイルスを高濃度で回収することができる。上清中のウイル

スの RT 遺伝子領域を高精度 Pfu RT-PCR で増幅したのち、DNA クローニングを行い1実験区あたり 32本以上の塩基配列を決定した。

3) NH3 と同じ家族から提供された、NH1 血液検体より採取された、envC2V3 の 86配列のクローン。これらの配列はすでに V3 領域のアミノ酸配列と coreceptor usage の関係が phenotypic に明らかになっている。

4) 名古屋医療センターを、2001年から2006年までに受診した HIV 感染者のうち、subtype B に感染した 134検体の RT 領域の配列。これらは、名古屋医療センター臨床研究センターにおいて増幅、ダイレクトシーケンスが行われ、同センターの厚意により塩基配列の形で提供を受けた。感染者は、HARRT を受けている群と未治療群に分類されていた。

5) 2004年から2007年にかけて東京都の抗体検査により HIV 感染が確認された症例より 377検体の protease および RT 領域の配列。これらは、東京都健康安全センターにおいて増幅、ダイレクトシーケンス、ハプロタイプの推定が行われ、同センターの厚意により塩基配列の形で提供を受けた。

得られた塩基配列は、ClustalW による多重アライメントを行い人の手で修正した後に、以下の解析に使用した。塩基置換数行列の推定、集団塩基多様度・集団間分岐度の算出、近隣接合法系統樹、組換えウイルスの確認のための subregion tree 解析 (配列の前 200bp と後 200bp を比較) の系統樹は、MEGA(ver3 または ver4)によって Tamura と Nei の方法を用いて推定した。組換えウイルス構造を知るための bootscan 解析は、SimPlot を用いて行った。2つの subregion tree が異なる進化過程を経ていることの検定には、Incongruent length distance (ILD) test を採用し、PAUP4.0 を用いて行った。配列間の組換えの履歴を図示する系統樹解

析法である phylogenetic network 解析は、SplitsTree を用いて行った。東京都の確認検査検体においては、ウイルス集団の経時的進化過程を詳細に解析する目的で、Bayesian MCMC sampling による最尤系統樹を採用した。この解析には、Beast を用いて塩基置換様式として GTR + Gamma distribution モデル、塩基置換速度はほぼ一定、Coalescent model は exponential population growth を設定したデータセットの解を採用し、Tracer を使用して分岐時間の解析を行った。In vitro 競合実験では、RT の 69 座位と 210 座位の間の中立遺伝子マーカーの違いによって生じる組換えハプロタイプを解析し、マーカー間に起こった交叉の数を計測した。各遺伝子セグメントにおける交叉率は、交叉数を Kosambi の公式 ($y=1/2 \tanh 2x$) で補正した後、領域の塩基長と補正後の交叉率の関係を直線回帰することで 1 日あたり 100bp あたりの割合に換算した。すべての実験区の交叉率を用いて、平均値の t 検定を行うことでホットスポット仮説の検証を行った。4 種類の配列データは、coalescent theory の手法を用いた集団動態の解析に提供された。Population mutation parameter ($q=4N\mu$)、population recombination parameter ($r=4Nr$) は LDHat パッケージの pairwise プログラムを用いて解析した。q の 95%信頼区間は、DnaSP プログラムを用いて推定した。r の信頼区間は、LDHat の解析結果である coalescent likelihood の値が、最大値から 2 log 分減少した値の示す範囲をとって示した。集団有効サイズ (N_e) の推定は、 $u=3.0 \times 10^{-5}$ site/generation として、q の値から算出した。Tajima の D と D' の 0 からの偏差の検定は、DnaSP プログラムを用いて行った。(倫理面への配慮)

本研究で用いた検体は、すべて感染者の通院する病院の倫理委員会において研究の承認を得た上で、感染者本人に HIV-1 ゲノム情報の採取と利用

に関するインフォームドコンセントを行った。

C. 研究結果

感染者 NH3 の血清中および PBMC より見出された RT 領域の塩基配列は、各採取時期の血清中のウイルスが別々の lineage を形成していた。一方、PBMC から取られたクローンの塩基配列は、系統樹の根元に位置した。そのうち、NH3-2 に採取された配列は、NH3-1 と同じ cluster に属するもの(野生型)、M41L と 69Ins を持つもの(LI 型)、L210W、T215Y を持つもの(WY 型)、K70R、L210W を持つもの(RW 型)の 4 つの分類群に分かれて分布していた(図 4)。Bootscan および Subregion tree による組換え体解析の結果は、NH3-2 の血清中に見つかる多剤耐性変異株(M41L、D67N、69Ins、K70R、L210W、T215Y)が PBMC に見つかる LI 型と WY 型の lineage のウイルスの組換え体であることを強く示唆した(図 5: $P<0.01$ ILD test)。NH3-3 では多剤耐性変異の lineage は完全に消失し、NRTI 耐性変異を 1 個～5 個持つ新たな lineage の変異体に置き換わっていた。phylogenetic network 解析の結果、NH3-3 の変異は LI 型と RW 型のウイルスの間の組換え体であることが示唆された(図 6)。NH3-4 ではこの lineage も消失し、NRTI 耐性変異を 0 個～2 個持ち挿入変異を失った新たな lineage の変異体に置き換わっていた。この lineage では、すべての配列が Y181C の NNRTI 耐性変異を持ち、そのうち 7 個は K103N の NNRTI 耐性変異も持っていた。

210W・215Y の 2 つの NRTI 耐性変異を持つクローンを元に、挿入変異部位(In79)と 210W の間にある 17 箇所の制限酵素切断部位をすべて欠失させた変異クローン(NH1-RTDRS_WY)を作成した。この制限酵素切断部位欠失クローンと、M41L、D67N、挿入配列、T69I を持つ感染性クローン(NH1-LI)を HeLa 細胞に co-transfection し、

NH1-RTDRS_WY/NH1-LI 混合株を作成した。RT-PCR と制限酵素解析によって、この株内には NH1-RTDRS_WY と NH1-LI のゲノムがおおよそ 4:6 で含まれていることが確認された。共培養語の上清を RT-PCR 後に、増幅断片のクローニングを行うことで増殖ウイルスの遺伝子頻度を知ることが出来るが、この手法では PCR 反応中の組換えが問題となる。その大半は部分的に増幅した断片が次の増幅過程に介在して生じる現象と考え、伸長反応時間を検討したところ、10 分に設定することで組換えが著しく減少することがわかった (図 7)。NP2-CD4-CCR5 または CXCR4 による共感染培養実験の結果、組換えウイルスは 3 日目の検体から低頻度で出現し、10 日目以降は高頻度に観察された。組換え RT の遺伝子型は、培養液中に NRTI が存在しないときには野生型が優勢であり、M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y (LIWY 型) の遺伝子型を持つ RT は NRTI の濃度に依存して選択を受けていた。得られた組換え体の塩基配列解析から、この領域の *in vitro* 系での平均組換え価は 0.018 /bp/day と推定された (図 8)。この値を理論値としてマーカー遺伝子間の交叉率が理論値と異なるかどうかを検定したところ、組換えが有意に少ない領域が 2箇所検出されたが、組換えが生じやすい領域は存在しなかった (図 9)。

感染者 NH3 の宿主内変異については、クローン解析で得られたすべての SNP の間で *coalescent likelihood analysis* を行い、尤度の期待値との *log* 比を観察する方法で、領域ごとの組換えの起こりやすさを推定した。その結果、すべての採取時期で共通して組換えが生じる領域は見出されなかった (図 10)。また、Hudson & Kaplan (1985) の *R_{min}* を計算し比較したが、やはり共通する組換えホットスポットは見出されなかった (図 11)。Coalescent likelihood 解析の手法を用いれば、

population recombination parameter ($r=4Ner$) を推定できる。一方、集団中の点突然変異の分布から、Population mutation parameter ($q=4Nem$) は推定可能である。この 2つの推定値を用いれば、集団の変異形成に関する点突然変異に対する組換えの寄与 (r/m) を知ることができる。このアイデアを用いて、交叉率の直接観察が不可能な宿主内変異と *in vitro* 実験で生じた変異の組換えの寄与を比較したところ、*in vitro* では、薬剤濃度にかかわらず、点突然変異に対する組換えの寄与は一定であったが、宿主内では $q=4Nem$ はほぼ一定であるにもかかわらず r は薬剤治療の失敗期に大きく成功期には少なくなっていた (図 12)。また、名古屋医療センターからの配列データを用いて、RT の宿主間における組換えの寄与を調べたところ、HAART 治療群において組換えの寄与が有意に高かった。Env 領域の配列で、同様の比較を行ってみたが、*coreceptor usage* との関係はなかった (図 13)。

Mansky L.M. and Temin H. M. の HIV-1 の *in vivo* での世代あたりの突然変異率 (u) の推定値 ($u=3.0 \times 10^{-5}$ site/generation : J. Virol. 1995;69:5087-5094) を $q=4Neu$ に代入し、集団有効サイズ (Ne) を推定した。集団有効サイズは、すべての実験で誤差を入れても 10^2 の範囲にあり、ほぼ一定だった。また、NH3 の患者検体と感染実験では、それぞれ血中・上清中ウイルス量が AMPLICOA によって測定されたウイルスコピー数は $10^2 \sim 10^8$ /ml の範囲で上下していたが、集団有効サイズとは関係がなかった (図 14, 15)。

患者内、患者間で生じている自然選択圧の種類と大きさを、Tajima の方法 (1989) で解析した。RT 領域の NH3 の配列データでは、NH3-2 の時期 (高度薬剤耐性変異が優位だった時期) のみで D が有意に 0 より小さかった (図 16)。また、患者間の配列データでは、HARRT を受けている患

者で D が有意に 0 より小さかった (図 17)。これ以外の検体では、D は 0 から有意に離れているとはいえなかった (図 16、17)。D が 0 より有意に小さいことは、解析時の多様性の形成過程で一定の対立遺伝子が選択上有利 (または不利) であったことを示す。薬剤存在下での薬剤耐性変異の増加には、自然選択が強く関わっていることが証明された。

東京都の確認検査検体の Subtype 分布は、Subtype B が大半を占める一方で、12 検体が CRF01_AE であった。また、若干数の Subtype C、Subtype G、CRF08_BC、Subtype 間の組換え体疑い例が検出された (表 1)。Subtype B 集団に限ると、塩基多様度は年度間で変動せず、protease が $d=0.05 (\pm 0.008)$ 、RT が $0.04 (\pm 0.004)$ であった (図 18)。また、標本年度間の net nucleotide divergence (遺伝子の分岐度を示す指標) はすべて 0 であり (表 2)、年度間で集団分岐は見られないことがわかった。一方、最尤系統樹による解析 (図 19) によって、東京地方の Subtype B 集団は 1980 年前後 (図 20) に祖先を持つ 3 つの系統群に分けられることがわかった。同一検体の多型的ハプロタイプとされる複数の配列が、異なる系統群に所属する例が 6 検体観察された。これらについて、さらに詳細な分岐時間の推定をおこなったところ、そのうち 5 検体については対照群 (monophyletic または paraphyletic な個体内変異集団) に対して明らかに異なる分布を示し、Subtype B 内の多重感染例である可能性が示唆された (図 21)。Bayesian MCMC analysis によって推定された塩基置換率は、protease が 1.37×10^{-5} 、RT が 7.85×10^{-6} 、ウイルス集団の平均有効サイズ (Ne) は、protease が 1.37×10^5 、RT が 7.85×10^6 であった。

D. 考察

NH3-2 の多剤耐性変異は、TAM 耐性変異に加えて 69 番サイトに 13 残基の大きな挿入変異がある。このハプロタイプを持ったウイルスは、AZT、ddI に対する強い耐性を持ち、その他の NRTI に対しても耐性を持つことがわかっている。この phenotype の完成には、少なくとも 4 箇所・突然変異とひとつの挿入突然変異が必要であり、突然変異の蓄積に加えて組換えが関与することで速い進化が期待できる。また、こうしたウイルスは一般に野生型に比べて増殖効率が落ちるため、使用薬剤の変更によって速やかな置換が起きることが観察されている。このときの組換えの寄与も興味深い。NH3 の各時期から得られたウイルスクローン配列の分子進化学的解析は、NH3-2 以降の血清中のウイルスが、NH3-1 と NH3-2 期の PBMC にあるウイルスの組換えによって放散したことを示している。NH3-2 期の PBMC のウイルスのうち多剤耐性変異以外の型は、いずれも系統樹の枝が短いことから世代を重ねていないことが示唆される。このような PBMC 中のウイルスは、NH3-1~NH3-2 の間にリザーバー細胞に休止状態で残った「アーカイブ」の一部と考えられる。Bootscan、subregion tree の解析結果は、NH3-2 の多剤耐性変異体が、アーカイブ中の LI 型と WY 型のハプロタイプの組換え体であることを強く示唆した。本研究の結果は、高度耐性変異はアーカイブの変異の遺伝子組換えによって宿主環境に最も適したハプロタイプを持つウイルスが選ばれて血液中に循環した結果であることを示した。実際、in vitro 競合実験では、すでにアーカイブにあるような変異を与えた場合には、薬剤の濃度を上げることで高度耐性変異が組換えによって速やかに発生し、集団中に広まることが証明された。

一方、薬剤の選択圧がない環境での置換については、in vitro 競合実験と感染者体内の動向に大き

な違いが観察された。in vitro では、薬剤のない環境ではやはり組換えを経て野生型のハプロタイプが増えてくることが観察された。それに対して、感染者の体内においてはアーカイブの変異がより多様性に富むため事情は複雑になる。NH3-3, 4では、NH3-2の高度耐性変異を生んだのは別の系統のハプロタイプから、野生型が生じている。また、NH3-4のNNRTI耐性変異は、点突然変異で起こっているように見える。Bootscan, subregion treeの解析結果からも、NH3-3の変異は、アーカイブ中のLI型とRW型の組換え体であることが示唆されたが、NH3-4はやはり組換え体ではなかった。薬剤耐性変異の生成における組換えの重要性についてはすでに多くの報告があるが、リバータントの生成をアーカイブの配列情報とあわせて観察した例は少ない。本研究の結果は、HIV-1のcirculateするウイルスの多様性と未来の進化過程には、過去に蓄積したアーカイブの多様性とその間で生じる組換えが大きな影響を及ぼしていることを明確に示している。

宿主内では、アーカイブ変異の関与により環境によって組換えの寄与率が変動することが予測できた。このことは、coalescent theoryに基づく解析でさらに確認された。組換えの寄与は、in vitro では薬剤にかかわらず有利なハプロタイプの頻度にしたがって増えた。このことは、in vitro の系では、有利な変異が主に組換えによって形成されることを再度示している。一方、in vivo では多剤耐性変異の出現期のみ大きくなっていった。これは、それ以外の時期、とりわけリバータントが出現したNH3-3以降では、アーカイブ中に有用な変異が十分にあり、組換えによる新規の変異よりアーカイブの多様性からの復帰がより迅速な手段であるためであろう。In vitro の系では、アーカイブの多様性を再現できていないため、coalescent theoryで推定された組換えと突然変異の寄与率は

常に一定なのであろう。感染者間を比較した観察では、HARRTを受けた感染者で組換えの寄与が高い。このことは、HAART後の多剤耐性変異の生成機構には、現時点では集団中で垂直伝播している耐性変異ハプロタイプの潜伏感染と顕在化ではなく、新規の突然変異と組換えが関与していることを示している。

一方、RT領域の組換えが起こりやすい領域があるかどうかの問いには、今回の研究からは探し出せないと答えるしかない。検出された組換えウイルスは、複製を何世代も繰り返したものと推測され、祖先ウイルスでの選択や機会的浮動の効果が推定できないためこうしたウイルスの頻度をもって、配列部位による乗換えの起こりやすさを断定はできない。しかし、これまでの研究でも、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あろう。

多様性の形成を考える際、選択的に有利な変異が蓄積したのか、中立な変異が偶然固定したのかを論ずるのは重要である。In vitro 競合感染実験のように、多様性の形成に関わる対立遺伝子が限られ、かつ個々に解析が可能な状況であれば、なにが‘有利’であるかを実験で証明することが可能である。実際、本研究ではこれらの変異の薬剤耐性能は調査しており、競合実験の結果と矛盾しない。しかし、in vivo のquasispeciesは、はるかに多様なハプロタイプで形成されるため、選択圧の強さをウイルス学的に計測することは容易ではない。こうした場合、Tajimaの方法のようなcoalescent theoryに基づく解析法が強力な手段となる。4種類の検体それぞれで計算されたTajimaのD統計量のうち、0より有意に小さい、すなわ

ち特定の遺伝子型に選択圧がかかる状況にあるのはNH3-2の血漿中と感染者間検体のHARRTを受けている者であった。これらは、組換えの寄与の大きな集団でもあり、見掛けの組換え率の上昇に選択圧が関わることを示している。これらの結果から、薬剤耐性の獲得に対する組換えの重要性は高いと考えられる。

$q=4Neu$ に既知の u である 3.0×10^{-5} site/generation を代入し、集団有効サイズ (Ne) が推定したところ、すべての実験で誤差を入れても 10^2 の範囲にあり、血中・上清中ウイルス量が大きく変動したにもかかわらずほぼ一定だった。今回の θ の推定値は、Charpentier らが 2006 年に行った同様の解析の結果とほぼ同じである。誤差はあるものの、HIV-1 は宿主内において 100~1000 個程度のウイルスゲノムでその多様性を維持しているらしい。これは、感染者体内の HIV-1 の産生量 ($0.68 \sim 2.07 \times 10^9$ 個/日) からすると、極めて少数である。宿主間で維持されている有効集団サイズの推定値として、東京地区の確認検査検体中の Subtype B 集団では 10 の 5 乗~6 乗という値が算出されている。HIV の集団構造は宿主内と宿主間 (感染時) の二層にわかれていることを考え宿主内の推定値を当てはめると、ほぼ 1 つのウイルスが感染を成立させたときの宿主の集団サイズは 10 の 4 乗となる。これは、日本国内の Subtype B 感染者の推定値とかけ離れてはいない。このことから、宿主内で変異の維持に関わる有効集団サイズは、ウイルス産生数に比べて極めて小さいといえる。このことは、HIV-1 の多様性を生み出しているのが、ウイルス量の多さではなく突然変異率そのものであることを示唆し、薬剤療法やワクチン開発における宿主内変異への対策という観点から重要な知見となろう。一方、宿主内での集団サイズが小さいことは、自然選択が生じた際に有利な遺伝子型に置換する時間がかかる

ことを意味する。In vitro 競合実験で、耐性変異の頻度が予想されたよりもゆっくり上昇したのは、HIV-1 の遺伝様式 (半二倍体様) のほかにこうした要因もあるかもしれない。

東京地区の Subtype B 集団で行われたハプロタイプ解析の結果、少なくとも 5 検体について Subtype B 内の多重感染例である可能性が示唆された。これは、標本集団の約 3% に当たる。異なる宿主間で進化してきたウイルス系統間での組換えは、CRF などの流行はもちろんだが、適応進化の促進という意味からも疫学的に重要である。今日、わが国における Subtype B の感染者は同性愛者がその大半を占めている。彼らのリスク行動は、比較的多重感染の機会を作りやすいことは容易に想像できるが、機会があれば 3% 程度は感染しうるとすれば、従来言われていた多重感染に対する宿主側の防御機構が、うまく働いていない場合が無視できない確率であることとなり、今後の検討が必要であろう。

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. 感染者体内の HIV-1 の組換えの多様性への寄与は、薬剤耐性変異の生成期に高かった。また、感染者間の解析では、HARRT を受けている感染者において高かった

5. *in vitro* 競合実験では、多様性への組換えの寄与は適応度の高いハプロタイプの増加に伴い上昇した。
6. RT 領域においては、*in vivo*、感染者間の薬剤投与時の選択圧が存在していた。これらの結果から、選択圧がありかつ有利な遺伝子型がアーカイブ中不在の場合、HIV-1 のゲノム進化に組換えが重要な役割をもつことが示された。
7. 宿主内および *in vitro* の有効集団サイズは、すべての解析で 100~1000 の間にあった。一方、感染者集団内でのウイルス集団の有効サイズは $10^5 \sim 10^6$ と大きかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

学会発表

椎野禎一郎、佐藤裕徳、保科佳美、武部 豊：
NRTI 耐性変異を示す複数遺伝子座の遺伝子頻度の経時変化に対する組換えと自然選択の影響
日本エイズ学会第 20 回大会（東京）

T. Kaneda, S. Fujisaki, T. Shiino, K. Shimizu, K. nakamura, J. Hattori, S. Fujisaki, S. Ibe, U. Shigemitsu, M. Hamaguchi, N. Mamiva and Y. Yokomaku:
Identification of unique form of clade B HIV-1 in Nagoya, Japan. 4th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention, Sydney 2008

椎野禎一郎、佐藤裕徳、保科佳美、山本直樹、武部 豊：HIV-1 の RT 領域における遺伝子組換え価と突然変異率の多様性への寄与 日本エイズ学会第 21 回大会（広島）

椎野禎一郎、貞升健志、長島真美、杉浦 互：
HIV-1 薬剤耐性変異の感染者集団における固定/

消失時間の解析 日本エイズ学会第22回大会（大阪）

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金(エイズ対策研究事業)
平成20年度分担研究報告書

研究課題:日本におけるHIV-1感染にみる
宿主内・宿主間のHIV-1ゲノム多様性
の分子集団遺伝学的解析

分担研究者:
推野 禎一郎(国立感染症研究所エイズ
研究センター・主任研究官)

図1: Clinical aspects of NH3

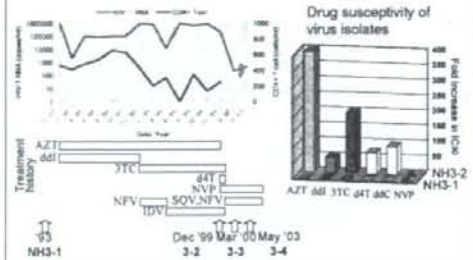


図2: Structure of an infectious clone bearing
the cleavage-siteless RT with two resistant
alleles, pNH1RT-WYΔRS

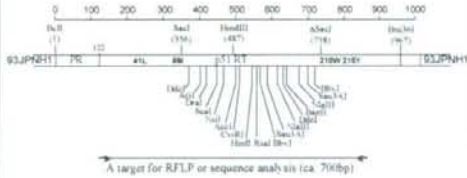
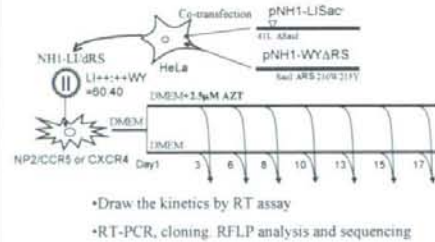


図3: *In vitro* competition culture of the
two intermediate variants in NP2 cell



- Draw the kinetics by RT assay
- RT-PCR, cloning, RFLP analysis and sequencing

図4: Phylogenetic relationship of the
clones

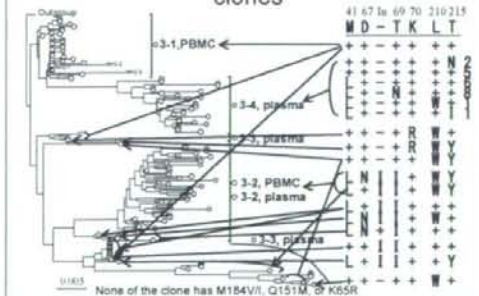
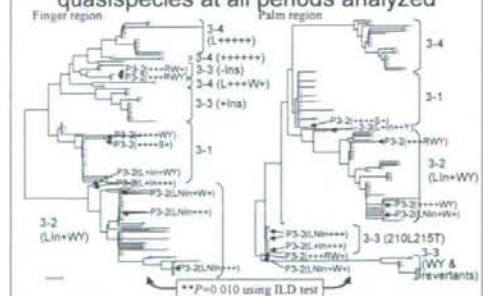


図5: Subregion tree of NH3
quasispecies at all periods analyzed



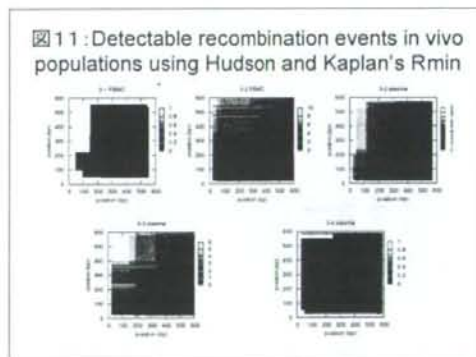
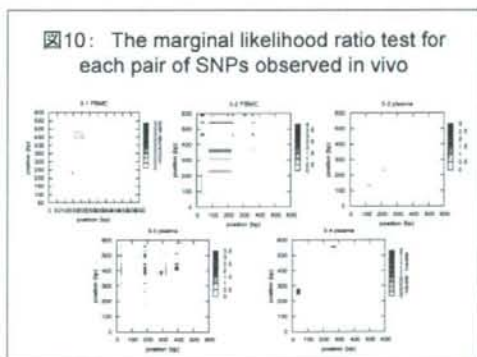
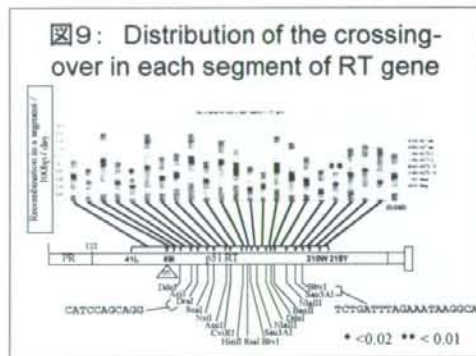
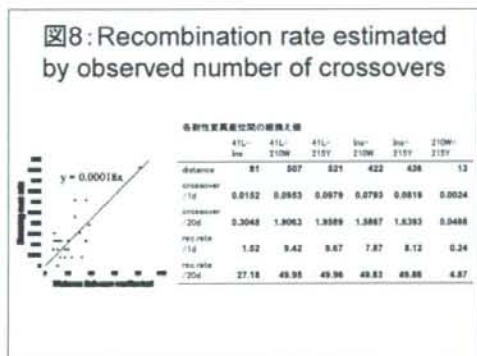
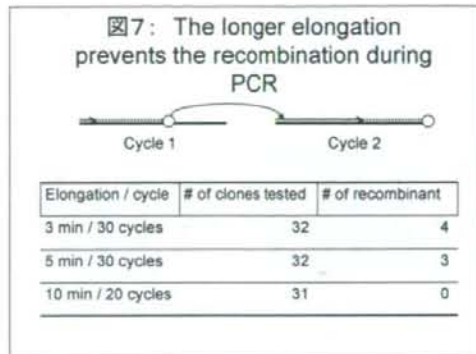
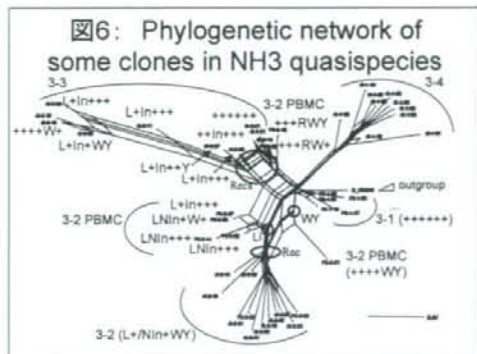


Figure 12: Contribution of mutation and recombination to sequence diversity

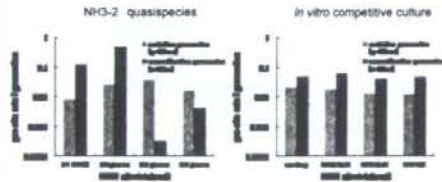


Figure 13: Contribution of mutation and recombination to sequence diversity in *env* or inter-host

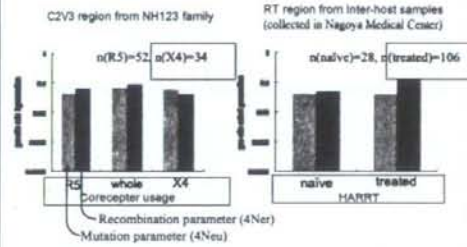


Figure 14: Estimation of the effective population size in vivo

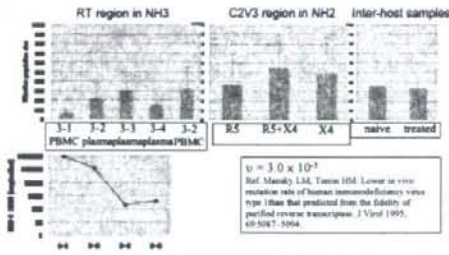


Figure 15: Estimation of the effective population size in vitro

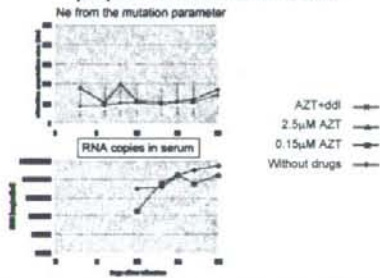


Figure 16: Analysis of natural selection

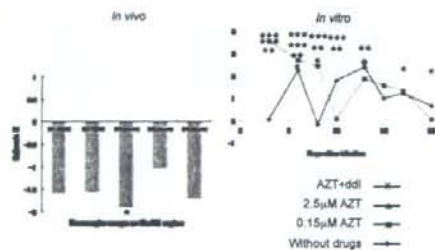


Figure 17: Analysis of natural selection

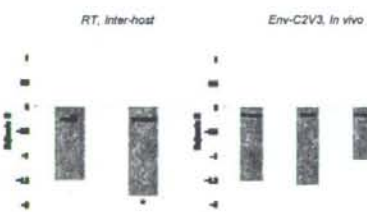


表1: 対象検体から得られた配列数とサブタイプ

Sub-type	Protease					RT			
	'04	'05	'06	'07	Total	'05	'06	'07	Total
B	44	118	47	245 (151)	454 (369)	119	48	226 (151)	393 (318)
C		1		4 (2)	5 (3)	1		1 (1)	2 (2)
G				1 (1)	1 (1)				
01	3	4	1	8 (4)	16 (12)	5	1	8 (4)	14 (10)
08								2 (1)	2 (1)
Un-classified		1		2 (1)	3 (2)				
Total	47	124	48	260 (158)	479 (377)	125	49	237 (157)	411 (331)

'07年の検体は、polymorphicなサイトから複数配列を再現した。解析した検体数はカッコ付きの数字で示した。サブタイプは、MEGA4を用いたNJ法によって行った。以下の解析には、Subtype Bのみを使用した。

図18: Temporal population diversity within each year sample

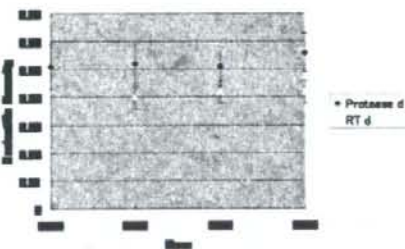


表2: Nucleotide divergences between each year

Protease	Upper-right: standard error		
	0.00	0.00	0.00
	0.00	0.00	0.00
	0.00	0.00	0.00

Lower-left: genetic divergence

RT	Upper-right: standard error	
	0.00	0.00
	0.00	0.00

Lower-left: genetic divergence

図19a: 最尤系統樹(protease)

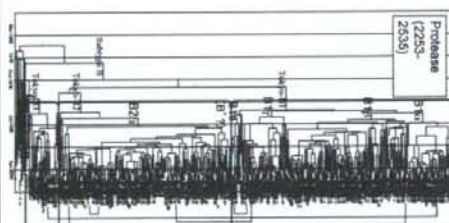


図19b: 最尤系統樹(RT)

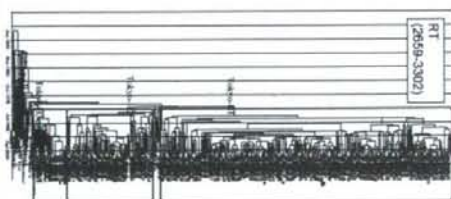


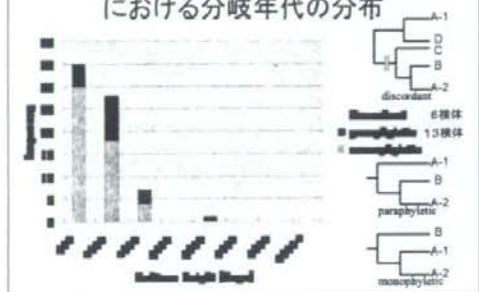
図20a: Subtype B Tokyo sub-populationの共通祖先の分岐年代 (protease)



図20b: Subtype B Tokyo sub-populationの共通祖先の分岐年代 (RT)



図21: 個体内変異のある検体(07年)における分岐年代の分布



首都圏で流行している HIV-1 の分子疫学的研究

分担研究者 近藤真規子 (神奈川県衛生研究所)
研究協力者 倉井華子、相楽裕子、立川夏夫 (横浜市立市民病院)、
岩室紳也 (厚木市立病院)、今井光信 (神奈川県衛生研究所)

研究要旨

日本で流行している HIV の特徴を明らかにするため、1991 年から 2008 年の約 18 年間に主として神奈川県内および首都圏の医療機関に来院した 678 名について HIV-1 遺伝子の特徴を解析した。

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。一方、異性間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% を CRF01_AE が占めた。しかし、2003 年以降男性感染者において再びサブタイプ B が増加し、現時点ではサブタイプ B が 66% を占めている。女性では 2003 年以降もサブタイプ B の感染は少なく、CRF01_AE の他、サブタイプ A や C 等の non B サブタイプや CRF 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。

2004 年から 2006 年に得られた HIV-1 遺伝子の解析により、男性同性間感染で流行している HIV-1 サブタイプ B の中に近縁性の高い集団の存在が確認され、これらはサブタイプ B の約 4 分の 1 を占めていた。

また、サブタイプ B 間での組換えの可能性のある株、異なる 2 系統のサブタイプ B に感染した症例、既知の組換え型とは異なるサブタイプ B と 01_AE との組換え HIV-1 を確認した。サブタイプ B は 1980 年代前半に欧米より日本に浸入した後、既に 20 年以上経過しているが、この間変異や組換えを繰り返しながら、多様性を獲得し、流行に至っているものと考えられた。

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 患者の累積報告数が 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 の特徴を明らかにし、流行の実態を把握するため、性行為による HIV 感染が急増し始めた 1990 年代前半より HIV のサブタイプ解析を継続して行っている。これまでの分子疫学的解析により明らかになった最近の流行および流行株の特徴について報告する。

B. 研究方法

1) 試料

1991 年から 2008 年の 18 年間に主として神奈川県内および首都圏の医療機関に来院した HIV 感染者 653 名より得られた末梢血単核球 (PBMC) および血漿。

2) HIV-1 サブタイプの決定と流行の解析

HIV-1 感染者 678 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 *env* C2V3 領域、あるいは *pol* pro-RT 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、遺伝子学的特徴について解析した。

2004 年から 2006 年の HIV 流行株間の *env* C2V3 領域における進化距離を MEGA3 ソフトを用いて計算し、リファレンス株および 1999 年以前の流行株の進化距離と比較した。

(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

1991 年から 2008 年に神奈川県内および首都圏の医療

機関に来院した HIV-1 感染者 678 名について、HIV-1 遺伝子のサブタイプ結果を表1、図1に示した。

全体ではサブタイプ B が 59% で最も多く、CRF01_AE が 33%、その他サブタイプ A、C 等および CRF が 8% であった。感染経路別では、同性間性行為 (MSM) では、ほとんどがサブタイプ B であったが、異性間性行為による日本人感染者では CRF01_AE が 47% で最も多く、次いでサブタイプ B が 38%、その他、サブタイプ A、C、D、F、G、CRF 等が 15% であった。外国人では CRF01_AE が 77%、サブタイプ B が 13%、その他 10% であった。外国人感染者の出身国の多くは東南アジアで、その他アフリカ、北米、南米であった。

HIV-1 陽性判明年と異性間性行為による日本人感染者のサブタイプの変遷を図2に示した。

男女ともに 1994 年頃から CRF01_AE が増加し始め、2002 年までには男性で 68%、女性で 55% を占めるに至ったが、2003 年以降男性ではサブタイプ B が増加し、2008 年までの総計でサブタイプ B が 66% を占め、CRF01_AE は 26% に減少した。しかし、女性ではサブタイプ B は減少しており、B や CRF01_AE 以外のサブタイプ A、C、D 等が増加した。

2004 年から 2006 年に得られた HIV-1 の *pol* 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) を形成した (bootstrap value: 82%)。Group 1 に含まれている 21 株はすべて日本人感染者であり、18 株 (86%) が MSM 由来で、2 株が異性間性行為感染の男性、1 株は女性であった (図3)。サブタイプ B 89 株の内、54 株が MSM 由来であり、MSM 由来株の 33% が Group 1 に属していた。

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なかった (図4)。

2004 年から 2006 年に HIV 陽性が判明したサブタイプ B、CRF01_AE の *env* C2V3 領域について株間の平均進化距離を求め 1999 年以前の株間の進化距離と比較した (表2)。サブタイプ B、CRF01_AE とともに 2004 年から 2006 年の株間の平均進化距離は 1999 年以前に比べて広がっていることが確認された。

また、*env* C2V3 領域の Group 1 に含まれる株間の平均進化距離 0.125 は 2004 年から 2006 年に陽性が判明した 78 株の平均進化距離 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)。

env C2V3 領域において、ダイレクトシーケンス法

で塩基配列が決定できなかった 3 例 (Y227、GM387、GM1691) について、クローニング後、系統樹解析を行った結果、これら 3 例は個体内での diversity が比較的大きく、内 1 例 (GM1691) は異なる 2 系統のサブタイプ B に感染したと考えられた (図5、表3)。

2004 年、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 1 例検出された。BootScan 解析の結果、本症例は *gag* p24 領域から *pol* RT の p51 領域 (p51 の約 70% を含む領域) は欧米型サブタイプ B であり、*gag* p17 領域および *pol* p51 領域の後半から 3'LTR は CRF01_AE であった (図6)。

D. 考察

1991 年から 2008 年の約 18 年間に主として神奈川県内および首都圏の医療機関に来院した 678 名について HIV-1 遺伝子の特徴を解析した。

HIV-1 サブタイプは感染経路により特徴が見られ、MSM ではほとんどがサブタイプ B である一方、異性間感染による日本人では CRF01_AE が最も多かった (47%)。しかし、2004 年から 2008 年の 5 年間の集計では、異性間の日本人感染者においてサブタイプ B が 60% を占めていた。

我々は以前、異性間性行為感染の日本人感染者について陽性判明年と感染サブタイプについて解析し、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、男性では 2002 年まで約 70% を占めていた CRF01_AE に代わり 2003 年頃からサブタイプ B が再び増加し、現在までのところサブタイプ B が 66% を占めるに至った。女性では 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。

異性間感染の男性にサブタイプ B が増加していること、女性ではサブタイプ B が少ない理由について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 が拡大することも懸念され、感染予防対策が重要となると考えられる。

2004 年から 2006 年に得られた HIV-1 サブタイプ B の RT 領域の系統樹解析で、89 株中 21 株 (24%) が Group 1 のクラスターを形成しており、21 株の内 18 株は MSM 由来であった。これら 21 株は *env* C2V3 領域においても一つのクラスターを形成し、これらのグループ間の平均進化距離は、1999 年以前の株間の平均進化距離に

比よりも小さかった。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、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。

RT 領域の Group 1 には属さないが、env C2V3 領域では Group 1 と同じクラスターに属した株が 4 株存在した。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 間での組換え体である可能性が考えられた。また、異なる 2 系統のウイルスに感染している症例を確認した。サブタイプ B が変異、組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。

2004 年、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 1 例検出された。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 6)。

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 B 型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ることから、日本での感染の可能性も否定できない。

CRF01_AE/B リコンビナント HIV-1 は、2005 年から 2006 年の間に当研究室以外でも 2 例、計 3 例報告されており、今後の動向が注目される。

E. 結論

1991 年から 2008 年の 18 年間に主として神奈川県内および首都圏の医療機関に来院した HIV 感染者 678 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。一方、異性間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 CRF01_AE であった。しかし、2003 年以降男性感染者において再びサブタイプ B が増加し、現時点でサブタイプ B が 66% を占めるに至っている。女性では CRF01_AE の他、サブタイプ A や C 等の non B サブタイプも増加し、感染サブタイプが多様化していることが確認された。

2004 年から 2006 年に得られた HIV-1 遺伝子の解析により、男性同性間感染で流行している HIV-1 サブタイプ B の中に近縁性の高い集団の存在が確認され、これらはサブタイプ B の約 4 分の 1 を占めていた。

異なる 2 系統のサブタイプ B に感染した症例、サブタイプ B 間での組換えの可能性のある株が、また既知の組換え型とは異なるサブタイプ B と CRF01_AE との組換え HIV-1 を 1 例確認した。

サブタイプ B は 1980 年代前半に欧米より日本に浸入した後、既に 20 年以上経過しているが、この間変異や組換えを繰り返しながら、多様性を獲得し、流行に至っているものと考えられた。

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)。

4) Kondo M, Sudo K, Tanaka R, Sano T, Sagara H, Iwamuro S, Takebe Y, Imai M, Kato S : Quantitation of HIV-1 group M proviral DNA using TaqMan MGB real-time PCR, J. V. Meth, in press.

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、岩室伸也、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, MOPE0088, 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)。

7) 近藤真規子、嶋貴子、杉浦互、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)

8) 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、杉浦互、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)。

9) 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)。

10) 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ブスポット法による 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)。

11) 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)。

12) 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)。

13) 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)。

14) Kondo M, Sudo K, Sano T, Sagara H, Iwamura S, Imai M: The genetic diversity of HIV-1 subtype B in Tokyo and Yokohama area, Japan, XVII International AIDS Conference, 3-8 August 2008, CDC0076, Mexico City

15) 近藤真規子、田中理恵、須藤弘二、佐野貴子、岩室紳也、倉井華子、立川夏夫、相楽裕子、加藤真吾、今井光信: 汎用リアルタイム PCR 装置を用いた HIV-1 RNA 定量法の検討、第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会 (2008 年 11 月 26~11 月 28 日、大阪)。

16) 木内英、岩室紳也、相楽裕子、大木茂、元重京子、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の AZT 薬物動態と副作用、第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会 (2008 年 11 月 26~11 月 28 日、大阪)

17) 佐野貴子、山中晃、金子恵、井戸田一朗、平井由児、岩室紳也、須藤弘二、近藤真規子、今井光信: 唾液で検査可能な HIV 迅速検査試薬の検討、第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会 (2008 年 11 月 26~11 月 28 日、大阪)

18) 須藤弘二、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および検査制度の調査、第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会 (2008 年 11 月 26~11 月 28 日、大阪)

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