

HIV-2 サブタイプ A と B の核酸検出・定量法の開発

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 専任講師

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。しかし、現行の HIV 検査法における HIV-2 感染の診断が HIV 感染の診断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。その原因の一つは HIV-2 の核酸検査法が国内において確立していないため、HIV 検査法にそれが導入され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。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まったく認められなかった。さらに、この方法を基にしてリアルタイム PCR による HIV-2 RNA の定量法を開発し、500 コピー/mL 以上の血清中 HIV-2 RNA 濃度の可能とした。ウエスタンブロットによって HIV-2 が疑われたいくつかの症例の血液検体に対してこれらの方法を試験的に適用し、予想通りの HIV-2 RNA の検査結果が得られた。今後、HIV-2 感染のより正確な検査方法の確立のために利用して行く予定である。

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、ボルトガル、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ている。その多くは国外で感染した外国人であるが、日本人の感染例や国内での感染例も見つかっている。

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感度が低く、また一部の HIV-1 抗体と交叉反応を起こすため、HIV-2 の確認検査をウエスタンブロット法だけで行うことができない。そのため、スクリーニング検査陽性検体の HIV-2 ウエスタンブロットの結果が陰性であっても、HIV-2 感染を否定するためには 2 週間後の再検査が必要となる。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。また、2 週間後の HIV-2 再検査は受検者（特に妊婦）に対して感染不安等による大きな精神的負担を与えることになる。このような問題を解決するための一つの方法は HIV-2 の核酸検査法を確立し、HIV 検査に組み込むことである。

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、HIV-2 のサブタイプ A と B の両方に対応する RT-nested PCR に

よる HIV-2 RNA と DNA の検出法を開発した。さらに、この方法を基にしてリアルタイム PCR による HIV-2 RNA の定量法も開発した。そして、ウエスタンブロットによって HIV-2 が疑われたいくつかの症例の血液検体に対してこれらの方法を試験的に適用し、その有用性を検討した。

B. 研究方法

血液検体から Ficoll-Paque (GE ヘルスクア) 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'-AAATTCGTTTCGTTCCGACCTC-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'-GGTGAGAGCTTAGCAGGGAACAC-3' (2R)。

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 μ L の試料を調製した。次にマスター液を調製した。1 回分あたりの各液量は、10 \times PCR Buffer (Platinum) 5.0 μ L、50 mM MgCl₂ 3.0 μ L、25 mM each dNTP 0.4 μ L、20 μ M プライマー 1F 0.5 μ L、20 μ M プライマー 1R 0.5 μ L、水 20.4 μ L、Platinum Taq (Invitrogen) 0.2 μ L の計 30.0 μ L。試料液にマスター液を加えて、よく攪拌し、94 $^{\circ}$ C に設定した PCR 装置に並べた。温度サイクルの設定は以下の通り。94 $^{\circ}$ C、2 分；5 サイクル(94 $^{\circ}$ C、5 秒；48 $^{\circ}$ C、10 秒；72 $^{\circ}$ C、15 秒)；25 サイクル(94 $^{\circ}$ C、5 秒；60 $^{\circ}$ C、15 秒)；72 $^{\circ}$ C、1 分；4 $^{\circ}$ C。次に、2 回目の PCR を以下のようにして行った。マスター液の調製は 1 回分あたり、10 \times PCR buffer (Platinum) 5.0 μ L、50 mM MgCl₂ 3.0 μ L、25 mM each dNTP 0.4 μ L、20 μ M プライマー 2F 0.5 μ L、20 μ M プライマー 2R 0.5 μ L、水 39.4 μ L、

Platinum Taq 0.2 μ L の計 49.0 μ L。マスター液 49 μ L に 1 回目の PCR 産物 1 μ L を加えて、よく攪拌し、94°C に設定した PCR 装置に並べた。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 μ L に 4 μ L の loading buffer を加え、2% アガロースゲルを用いて 160 V で 30 分間電気泳動した。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 μ L と SuperScript III (Invitrogen) 0.1 μ 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した。それ以外はすべて同じようにして nested PCR を行った。

HIV-1 RNA との交叉反応性を調べるために、HIV-1 III B 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 の検出を試みた。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。

リアルタイム PCR は以下のようにして行った。まず、血清検体 200 μ L を 18,000 rpm、4°C で遠心し、上清を除去し、さらに残りの液を 18,000 rpm、室温で 5 分遠心し、なるべく多くの上清を除去した。この沈殿から UltraSens RNA Purification Kit (キアゲン) を用いて RNA を溶出させた。キットは前もって 4 回分ずつ分注し使い捨てとした。この RNA 溶出液から RNA をエタノール沈殿し、リアルタイム PCR のマスター試薬に溶解させることにより RNA をすべて次の反応に使用した。リアルタイム装置には StepOnePlus (アプライドバイオシステムズ)、プライマーには上流が 5' -TTCAGTCGCTCTGCGGAGA-3' (1F)、下流が 5' -GGTGAGAGTCTAGCAGGGAACAC-3' (2R)、プローブには MGB プローブ 5' -AGCAGGTAGAGCCTG-3'、反応試薬には Express 定量 RT-PCR キット (インビトロジェン) を使用した。温度サイクルの設定は、50°C、10 分; 95°C、2 分; 95°C、15 秒; 45 サイクル (95°C、15 秒; 60°C、1 分) とした。

リアルタイム PCR で用いたコントロール検体は以下の通りである。標準物質には HIV-2 ROD 株感染 U937 細胞培養上清 (国立感染研究所の仲宗根先生から供与) を用いた。ポアソン分布法による測定した濃度は 2.4×10^{11} コピー/mL であった。検量線用検体には標準ウイルス液を市販ブランク血清で 0、200、1,000、5,000、20,000、100,000、500,000 コピー/mL に段階希釈したものを用いた。QC 検体として High QC (500,000 コピー/mL)、Middle QC (10,000 コピー/mL)、及び Low QC (100 コピー/mL) 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 サブタイプ A の DNA クローンである pGH123 を制限酵素 EcoRI 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。その結果、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 p0JPKR-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 020 RNA はサブタイプ B であることが既に分かっている。それぞれ血漿 100 μ L から抽出した RNA 液の 1/10 量を 2 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。

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 (III B 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 μ L (症例 1、図 2) あるいは 100 μ L (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。

リアルタイム PCR における血清 HIV-2 RNA 濃度と CT の関係を図 4 に示す。きれいな直線関係が認められた。次に、High と Middle QC 検体の同時再現性を表 1 に示す。真度、精度ともに 40% 以内の値が得られた。しかし、Low QC 検体を用いた場合、5 回の測定のうち 3 回で蛍光シグナルの増加が観察されなかった。臨床検体を用いた場合のリアルタイム RT-PCR 法による定量値をポアソン法による定量値と比較すると (図 5)、リアルタイム PCR による定量値の方が数倍低かった。

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。

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HIV-1 RNA との交叉反応により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ので、HIV-2陰性と判定されたと思われるが、HIV-2陰性を確認するために再度核酸検査を行うべきであったかもしれない。

リアルタイムPCRを利用してHIV-2 RNAを定量する方法も開発した。現在の結果では、100 コピー/mLのLow QCの検出率が2/5 (40%)であることから、検出限界はおそらく500 コピー/mL程度ではないかと考えられる。感度が低い原因としてRNAの回収率の悪さ、プライマーとHIV-2 ROD株RNAとのミスマッチ等が考えられる。今後もこの技術の完成のため努力を続けたいと考えている。

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の重複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、公的研究組織の主導により、国内外の医療機関の協力を得ながら以上の施策を行う必要がある。本研究で開発したnested PCRによるHIV-2核酸検査法はそのための有効な手段になると考えられる。

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が疑われた症例を検査したところ、いずれもHIV-2 RNA陰性の結果が得られた。また、リアルタイムPCRによるHIV-2 RNA定量法も開発した。これらの方法はHIV-2感染のより正確な診断法の確立のために役立つことが期待される。

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. (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.

4. 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.

5. 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.

6. 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.

7. 今井光信, 中瀬克己, 小島弘敏, 加藤真吾, 杉浦互, 栗原健, 白坂琢磨. (2007) HIV検査および検査体制一技術の進歩と今後の課題. *日本エイズ学会誌* 9(3), 202- 208.

8. 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.

9. 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)

10. Kondo, M., Sudo, K., Tanaka, R., Sano, T., Sagara, H., Iwamuro, S., Takebe Y., Imai, M., and Kato, S. Quantification of HIV-1 group M proviral DNA using TaqMan MGB real-time PCR. *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、太田末緒、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、栗原健、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)
10. 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 回日本エイズ学会学術集会 (2007 年 11 月 28-30 日、広島)
11. 花房秀次、小島賢一、加藤真吾、兼子智、高桑好一、久慈直昭、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 回日本エイズ学会学術集会 (2007 年 11 月 28-30 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 回日本エイズ学会学術集会 (2007 年 11 月 28-30 日、広島)
13. 田中理恵、栗原健、杉浦互、加藤真吾「HPLC によるダルナピルの血中濃度測定法の開発」第 21 回日本エイズ学会学術集会 (2007 年 11 月 28-30 日、広島)
14. 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 (2007 年 11 月 28-30 日、広島)
15. 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 回日本エイズ学会学術集会 (2007 年 11 月 28-30 日、広島)
16. 加藤真吾、須藤弘二「LC-MS による薬剤耐性変異の検出」第 21 回日本エイズ学会学術集会 (2007 年 11 月 28-30 日、広島)
17. 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 回日本エイズ学会学術集会 (2007 年 11 月 28-30 日、広島)
18. 杉浦互、湯永博之、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、上田敏久、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、中曾根正、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、大塚正義、下条文武、田邊嘉也、渡辺香奈子、白坂琢磨、栗原健、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 回日本エイズ学会学術集会 (2007 年 11 月 28-30 日、広島)
19. S. Kato, K. Sudo, R. Tanaka. Novel assay using PCR and mass spectrometry for quantification of minor populations of HIV-1 carrying drug-resistant mutations. XVII International AIDS Conference. 3-8 August, 2008, Mexico city, Mexico.
20. Shingo Kato, Mitsuhiro Kamakura. Quantification of minor populations of drug-resistant HIV-1 variants by PCR and mass spectrometry. United States-Japan Cooperative Medical Science Program, 21st Joint Meeting of the AIDS Panels. 2008, September 10-12, Awaji Island and Tokyo, Japan.
21. 加藤真吾「サテライト公演: HIV 感染症診断のガイドライン 保健所等における HIV 検査のガイドライン-妊婦検診を含めて」第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会 (2008 年 11 月 26 日-28 日、大阪)
22. 植田知幸、加藤真吾「休止期 CD4+T 細胞における HIV-1 感染防御機構の解析」第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会 (2008 年 11 月 26 日-28 日、大阪)
23. 花房秀次、小島賢一、加藤真吾、兼子智、高桑好一、久慈直明、木内英、加藤克則、吉村泰典、田中憲一、和田裕一「HIV 感染夫婦の生殖補助医療の実績と安全性: HIV 陽性同士の生殖補助医療プロトコール」第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会 (2008 年 11 月 26 日-28 日、大阪)
24. 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 日-28 日、大阪)
25. 田中理恵、古谷茂之、林邦彦、今井光信、加藤真吾「HIV-1 RNA 定量キットのコントロールサーベイ」第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会 (2008 年 11 月 26 日-28 日、大阪)
26. 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 日-28 日、

大阪)

27. 須藤弘二、加藤真吾「PCR と LC-MS を組み合わせた薬剤耐性変異定量法の検討」第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会 (2008 年 11 月 26 日-28 日、大阪)

28. 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精度の調査」第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会 (2008 年 11 月 26 日-28 日、大阪)

29. 池野 良、高木律男、児玉泰光、田邊嘉也、手塚貴文、佐藤みさ子、加藤真吾「リアルタイム PCR 法 (TaqMan 法) を用いた唾液中 HIV-1 RNA/DNA 量と血清中 HIV-1 RNA 量の比較検討」第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会 (2008 年 11 月 26 日-28 日、大阪)

30. 加藤真吾、榎本 茜、田中理恵「正しい血中ウイルス量を求める方法の検討」第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会 (2008 年 11 月 26 日-28 日、大阪)

31. 杉浦 互、湯永博之、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、藤井 毅、岩本愛吉、藤野真之、仲宗根正、巽 正志、椎野禎一朗、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、大家正義、田邊嘉也、渡辺香奈子、渡邊 大、白阪琢磨、栗原 健、森 治代、小島洋子、高田 昇、木村昭郎、南 留美、山元政弘、松下修三、健山正男、藤田次郎「2003-2007 年の新規 HIV-1 感染者における薬剤耐性頻度の動向」第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会 (2008 年 11 月 26 日-28 日、大阪)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

1. 発明の名称: 遺伝子変異検出システム及び遺伝子変異検出方法. 発明者: 加藤真吾、須藤弘二. 発願年月日: 2008 年 05 月 19 日. 出願番号: 特願 2008-131243 号. (申請中)

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。



図4. 血清HIV-1 RNA濃度とC_Tの関係

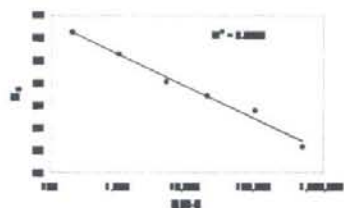
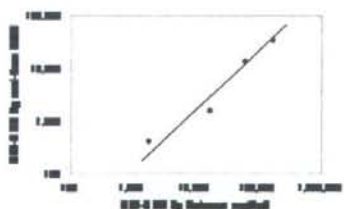


表1. QC検体の同時再現性

(n = 5)

Sample	Nominal conc.	Mean value	S.D	Accuracy	Precision
High QC	500,000	409,000	77,000	-18%	19%
Middle QC	10,000	68,000	29,000	-32%	43%

図5. 臨床検体におけるリアルタイムRT-PCR法とポアソン法による定量値の比較



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

2005-2008 年の東京都における 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，仲真晶子，矢野一好
（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。南新宿における土日検査の開始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、2005-2008年のHIV検査陽性例504例の血清よりHIV遺伝子を検出し、RT領域の遺伝子解析を行った結果、481例（95.4%）がサブタイプB、18例（3.6%）がCRF01_AEで、3例（0.6%）がサブタイプC、その他のタイプが2例（0.4%）に分類された。

ないと決定された。

A. 研究目的

東京都では、エイズ対策事業として1987年から図1に示す都内保健所等における無料・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検診事業を開始している。年により差は認められるものの、1年間に170例前後の新たなHIV検査陽性例が認められている（図2）。

今回、東京都内で検出されるHIVの遺伝子型をモニタリングする目的で、これら公的検査機関のHIV検査陽性例から検出されたHIVについて遺伝子解析を行い、東京都内で蔓延しているHIVのサブタイプ解析を行うことを本研究の目的とした。

（倫理面の配慮）

本研究はヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針等の倫理規定に準拠して実施した。本研究は個人が特定できるようなデータ

を含まない、連結不可能匿名化されている検体から抽出したHIV遺伝子の解析を目的とした調査研究であり、東京都健康安全研究センター研究調整委員会において倫理審査委員会への付議に当たら

B. 研究方法

2005-2008年に都内保健所・南新宿でHIV検査を受診し、陽性となった504例の血清200 μ L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>を参考に、サブタイプを決定した。

C. 研究結果

1. サブタイプ型別

2005-2008年の年次別の推移を見たところ、94.5-97.7%はサブタイプBであり（図3）、年ごとの傾向に差は認められなかった。4年間の平均ではサブタイプBが95.4%を占め（図4）、CRF01_AEは3.6%、サブタイプCは0.6%、その他のタイプ（0.4%）としてはCRF08_BCおよびCRF20_BGが認められた（図5）。

2. サブタイプ B, non-B の年次別の男女比

サブタイプ B および non-B の男女における検出率を比較したところ、サブタイプ B のほとんどが男性で検出されているのに対し、non-B については女性から検出される傾向があり、N 数は少ないながらもその比率は年々高くなってきている (図 6)。

non-B についてさらに詳しくみてみると、CRF01_AE では 18 例中 5 例が女性から検出されているのに対し、N 数は少ないながら、C およびその他のサブタイプでは半数以上が女性から検出されている (図 7)。

3. サブタイプ B, non-B の年代別検出率

年齢区分を 20 歳代以下、30 歳代、40 歳代、50 歳代、60 歳代以上に分け、non-B が検出される比率を検討した。その結果、年齢が高くなる程 non-B の検出される割合が高くなる傾向が認められた (図 8)。

D. 考察

今回の調査により検出された HIV の 95.4% がサブタイプ B であり、non-B については全体の 4.6% と少数であり、この傾向は少なくとも 4 年間は続いていることが判明した。

一方、年代別、年齢区分別に解析してみると、HIV 検査陽性女性から non-B が検出される割合が高くなっていること、年齢が上昇するにつれて non-B が検出される割合が高くなる傾向があることが示唆され、東京都に多いといわれる同性間感染とは違う感染経路がこれらの層については存在する可能性が示唆された。東京都における HIV 感染症の疫学解析を実施していく上で、今後も継続して東京都内におけるサブタイプ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、95.4% がサブタイプ B であることが明らかになった。

【学会発表】

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) 貞升健志, 長島真美, 新開敬行, 尾形和恵, 仲真晶子, 矢野一好: 東京都における 2007 年 HIV 検査陽性例の遺伝子学的, 血清学的解析, 日本エイズ学会誌 (投稿中)

(2) 貞升健志, 長島真美, 新開敬行, 尾形和恵, 吉田靖子, 矢野一好: 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, 東京都健康安全研究センター年報, 58, 27-36, 2007

(3) 貞升健志: HIV ジェノタイプ薬剤耐性検査, 医学書院, 臨床検査データブック 2007-2008, 547-549, 2007

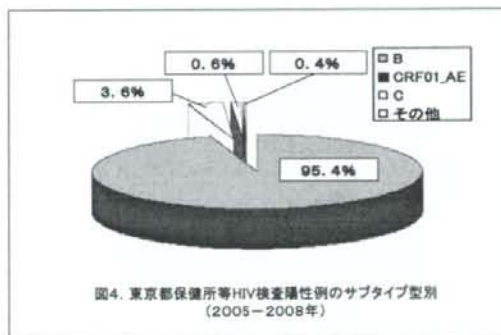
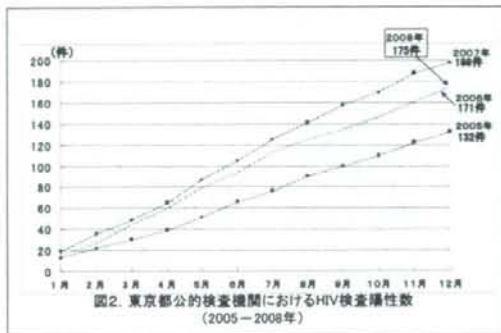
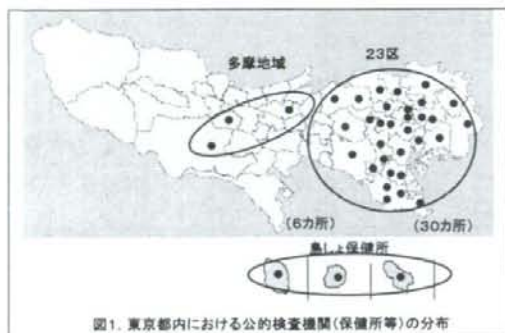
2. 学会発表

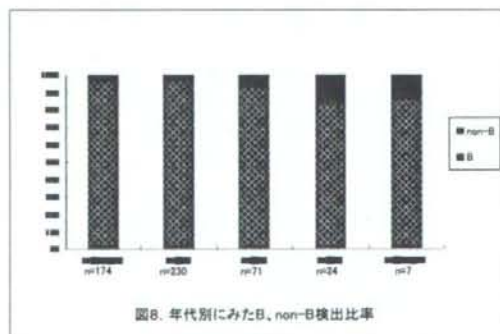
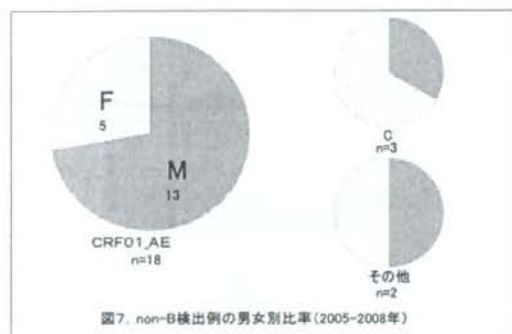
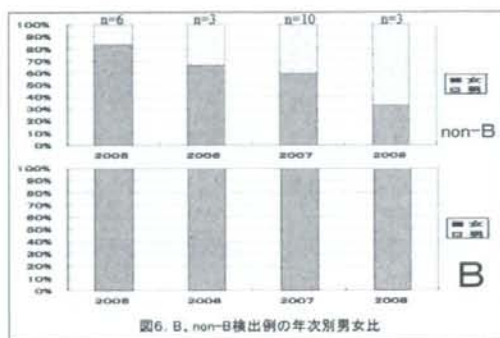
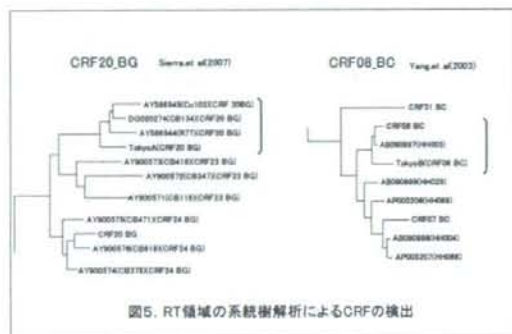
(1) 貞升健志, 長島真美, 新開敬行, 尾形和恵, 原田幸子, 仲真晶子, 矢野一好: 2005-2008 年の東京都内保健所等 HIV 検査陽性例の薬剤耐性変異の解析, 第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会, 大阪(2008.11)

(2) 長島真美, 新開敬行, 尾形和恵, 原田幸子, 貞升健志, 仲真晶子, 矢野一好: BED assay を使用した東京都内保健所等における HIV 検査陽性例の血清学的解析, 第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会, 大阪(2008.11)

(3) 貞升健志, 長島真美, 新開敬行, 尾形和恵, 吉田靖子, 矢野一好: 東京都内保健所等の HIV 検査陽性例の血清学的, 遺伝子学的解析, 第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会, 広島(2007.11)

(4) 長島真美, 貞升健志, 新開敬行, 尾形和恵, 吉田靖子, 矢野一好: 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, 第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会, 広島(2007.11)





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-2008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170検体中129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、122例がサブタイプB、6例がCRF01_AE、1例がサブタイプC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例が日本人男性であり、3例は外国人女性であった。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（自らHIV検査を希望する者も含む）を対象としたHIV検査を行っている。

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、本研究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2008年まで大阪府内のSTI関連診療所（性病科、泌尿器科、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およびHIV検査希望者を対象にHIV調査を実施し、陽性が確認された170例のうちの129例（日本人男性123例、日本人女性2例、外国人女性3例、外国人男性1

例）についてHIV遺伝子解析を行った（図1）。

方法は、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。必要に応じてcloningも行った。

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129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120株、CRF01_AEが3株であった。日本人女性はサブタイプBが1株、サブタイプCが1株であった。外国人男性はサブタイプBが1株であり、外国人女性は3株すべてCRF01_AEであった（表1）。

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(図2)。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。またその中には、感染初期例(確認検査のWB法で判定保留、NAT(核酸増幅検査)で陽性あるいはNATのみ陽性と定義)が13例含まれていた(図2)。

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。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3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。

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2002年に1例(02-1)、2006年に1例(06-20)、2008年に1例(08-5)のCRF01_AE株が見つかり、2006年と2008年の2例はMSM(Men who have Sex with Men)であった(図3)。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CRF01_AEがMSMの間でも散見されたが、大きな流行には至っていない(図3)。

2007年に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)。

D. 考察

1992年から2008年まで大阪府内において、

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受診者およびHIV検査希望者を対象にHIV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。

近年、日本人MSMにおいてCRF01_AEが見られるようになった。系統樹解析の結果より、日本人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。2008年に日本人MSMで見つかった株(08-5)は今まで日本人男性で見つかったのとは異なるタイプであった。

日本人女性(07-6)でサブタイプCが見つかったが、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。

検査法の改良に伴って検出感度が上昇した事もその一因であると考えられるが、2005年頃からは感染初期で陽性が見つかるケースが増えてきた。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ると思われる。

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

大阪地域では、主に日本人男性の間でサブタイプ B の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。また、日本人 MSM において CRF01_AE が散見されるようになってきたが、今のところ大きな流行には至っていない。また、感染初期例が複数のリスクグループで見られることより、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) 川畑拓也、小島洋子、森 治代、大竹 徹、大國 剛. 当所にて HIV 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) 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、14:51-55、2008

3) 森 治代、小島洋子、川畑拓也、後藤哲志. 未治療 HIV-1 感染者に検出された V108I 変異が efavirenz 耐性誘導に及ぼす影響、日本エイズ学会誌、10:184-190、2008

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

6) 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

7) 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

8) 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

9) 小島洋子、川畑拓也、森 治代、大國 剛、大阪府内の性病科・泌尿器科・婦人科を定点とした HIV-1 の疫学調査、第 22 回近畿エイズ研究会学術集会、奈良、2008

10) 森 治代、小島洋子、川畑拓也、大國 剛、Mismatched primers detected covert drug-resistant mutations in a patient of HIV-1 dual infection

(HIV-1 重感染の患者においてミスマッチのプライマーが隠れた薬剤耐性変異を検出した)、XVII INTERNATIONAL AIDS CONFERENCE、3-8 August 2008、Mexico City (第 17 回国際エイズ会議、2008 年 8 月 3-8 日、メキシコシティ)

11) 森 治代、小島洋子、川畑拓也、大國 剛、Mismatched primers detected covert drug-resistant mutations in a patient of HIV-1 dual infection

(HIV-1 重感染の患者においてミスマッチのプライマーが隠れた薬剤耐性変異を検出した)、3rd International Workshop on HIV Transmission、2008、Mexico City (第3回国際 HIV 伝播ワークショップ、メキシコシティ)

12)小島洋子、川畑拓也、森 治代、大阪府の HIV/HBV 重感染例における HBV 遺伝子型別、小島洋子、川畑拓也、森 治代、第 22 回 日本エイズ学会学術集会、大阪、2008

13)川畑拓也、小島洋子、森 治代、大國 剛、古林敬一、早川謙一、木村博子、岩佐 厚、谷口幸一、谷口 恭、大阪府内の診療所を定点とした HIV 疫学調査、第 24 回地研全国協議会近畿支部疫学情報部会定期研究会、京都、2008

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

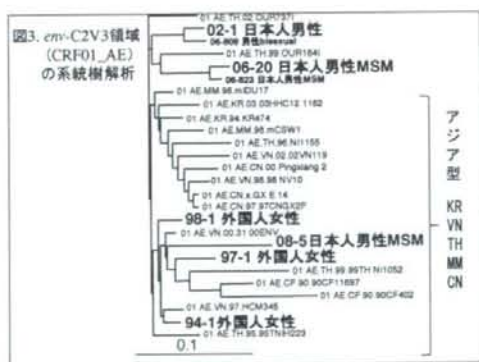


表1 ハイリスク疫学調査検体のサブタイプ (env-C2V3領域) 1994年～2008年

Risk factor	国籍	性別	Total	HIV-1 subtype (env-C2V3)			
				B	AE	C	
Homosexual	日本人	男性	79	77		2	
	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	3	3			
	日本人	女性	2	2			
その他、不明	日本人	男性	39	38			1
	日本人	女性	1	1			
Total			129	122	6	1	

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 (RTXGSRK103N.Y181C.M184V.G190A)	

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

福岡県における HIV-1 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保健科学部長
研究協力者	村田昌之、古庄憲浩、林純	九州大学病院総合診療部
	鷺山和幸	さぎやま泌尿器科クリニック
	中山志幸、石橋哲也、世良暢之	福岡県保健環境研究所

研究概要

当研究所では、1990年から2004年にかけて、福岡市内の大学病院を受診した HIV-1 感染者 59 名について、そのウイルスのサブタイプの決定を試みた。さらに、本研究の開始とともに、2006年から2009年にかけて、17名の感染者から検体を採取し、サブタイプの決定を試みた。その結果、福岡県における HIV-1 感染は、血液製剤によるもの以外では、1990年代から現在まで、同性間性的接触によるサブタイプ B の感染が主だと思われる。

A. 研究目的

AIDS 患者及び HIV-1 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-1 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

この研究期間における対象は、2006年から2009年に九州大学病院総合診療部を受診した HIV-1 感染者 15 名と、福岡市内のさぎやま泌尿器科クリニックを受診し、HIV-1 検査で陽性となった 2 名である。また、1990年から2004年にかけて九州大学病院総合診療部を受診した HIV-1 感染者 59 名については、当時サブタイプの解析を試みて得られた結果を、本研究に使用した。それらの

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

感染者の血漿から抽出したウイルス RNA、または末梢血リンパ球(PBMC)から抽出したプロウイルス DNA から、*env* 遺伝子については C2-V5 領域の 825bp、また *pol* 遺伝子については 1179bp を nested PCR で増幅した。方法については、参考資料 1 に、プライマーは参考資料 2 に示す。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を決定した後、Genebank から得た各サブタイプの既知の塩基配列を加え、MEGA4 を用い分子系統樹解析を行い、サブタイプを決定した。なお、2006、2007年に採取した検体の一部と、1990年から2004年に解析したものは、*env* 遺伝子では 320 塩基、*pol* 遺伝子では 410

塩基について分子系統樹解析を行い、サブタイプを決定した。また、一部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い、サブタイプを推定した。

(倫理面への配慮)

医療機関において、対象者には解析内容を説明し、本人の同意を得て、採血を行っている。

C. 研究結果

(1) 福岡県における HIV-1 感染の状況

福岡県が発表した、平成 19 年までの福岡県 HIV 感染者等情報に基づく、年次別の AIDS 患者・HIV 感染者報告数の推移を図 1 に示す(血液製剤による感染者は含まない)。平成 16 年から 18 年にかけて、急激な報告数の増加が見られたが、平成 19 年には大きな増加は見られなかった。平成 19 年までの報告数は累計で 232 名であるが、男女別に見ると、男性が 209 名、女性が 23 名と圧倒的に男性が多い。この傾向は現在も継続している。また、図 2 に患者・感染者の感染経路別の割合を示す。AIDS 患者では異性間性的接触による感染が 43%と最も多く、HIV 感染者では同性間性的接触の感染が 53%と最も多くなっている。このことは、福岡県における最近の HIV 感染では、同性間性的接触の感染が主になってきていることを示唆している。

(2) サブタイプの決定

2007-2009 年に採取された 17 例について、*pol* 領域については全てサブタイプを決定できたが、*env* 領域では 12 例がサブタイプを決定でき、2 例はサブタイプの推定にとどまり、3 例は解析不能であった。個別の結果を表 2 に示す。

pol 領域に関しては、FA61 がサブタイプ A であった以外は、全てサブタイプ B であった。1179bp が解析可能であったものにつ

いては、図 3 に分子系統樹を示す。なお、FA61 は 410 塩基の解析でサブタイプ A と決定した。

次に、*env* 領域に関しては、サブタイプを決定できた 12 例と推定した 1 例は、サブタイプ B であり、FA61 はサブタイプ E と推定された。従って、FA61 は、CRF01_AE(サブタイプ AE)の可能性が強いと考えられる。852bp が解析可能であったものについては、図 4 に分子系統樹を示す。

env 領域の解析が出来なかったものを *pol* 領域の解析結果で代表させ、以上の結果を感染経路別に見ると、同性間性的接触と推定される 16 例は全てサブタイプ B であり、異性間性的接触の 1 例のみが、サブタイプ AE と推定された。

過去(1990~2004 年)にサブタイプの決定を試みた 59 例のうち、解析できたのは 55 例であった。それらの解析結果と、今回解析した結果を併せて、感染経路別のサブタイプを表 3 に示す。血液製剤によるもの、及び同性間性的接触が原因と考えられるものは、全てサブタイプ B と考えられる。一方、異性間性的接触によるものは、サブタイプ B が 6 例、サブタイプ AE が 3 例、サブタイプ A と C が各 1 例であった。次に、初診年別にサブタイプの分布を表 4 に示す。どの期間も、サブタイプ B が主で、サブタイプ AE や、その他のサブタイプは散発的に検出され、特に増加している傾向は見られなかった。

D. 考察

今回の研究期間中にサブタイプを解析した 17 例では、16 例がサブタイプ B で、1 例がサブタイプ AE と考えられた。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、今回も同じ感染経路で、通算 3 例目となった。関東地区では一時サブタイプ AE が同じ感染経路で増加したが、福岡県においては大きな増加は認

められていない。ただし、今回の検体 17 例中 16 例が同性間性的接触による感染であったことから、福岡県において報告される HIV 感染者の 32% を占める、異性間の感染に関しては、実態を十分に解明することが出来なかったと考えられる。今回得られた情報からは、福岡県における HIV-1 感染は、現在も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。今後のエイズ予防対策は、同性間性的接触を行うグループを、主な対象として展開する必要があると考えられる。

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。