

201103011A

別紙3~5

平成 23 年度 厚生労働科学研究費補助金

地球規模保健課題推進研究事業

サハラ以南アフリカにおけるエイズ・結核研究ネットワーク構築に

関する研究

H23-地球規模-一般-001

総括・分担研究報告書

研究代表者 服部俊夫

東北大学

## 目 次

### 1. 総括研究報告

- サハラ以南アフリカにおけるエイズ・結核研究ネットワーク構築に関する研究  
服部俊夫・・・1

### 2. 分担研究報告

- 「サハラ以南アフリカにおけるエイズ・結核研究ネットワークの構築に関する研究」(ザンビアにおける結核菌の分子疫学的解析)  
鈴木定彦・・・6

- ガーナにおける現行抗エイズ治療薬(ART)の評価に関する研究と アフリカ中央部に  
ける HIV 分子疫学の研究  
山岡昇司・・・10

- サハラ以南アフリカにおけるエイズ・結核研究ネットワークの構築に関する研究(ケニア  
におけるエイズ・結核研究ネットワーク構築)  
久保 亨・・・14

- 簡便で安価な薬剤耐性 HIV 検査法の開発  
仲宗根正・・・17

- カポジ肉腫の病理組織学的解析と臓器への放射性物質の蓄積に関する研究  
福本 学・・・19

- ウイルスの薬剤感受性と阻害剤の開発  
児玉栄一・・・23

### 3. 資料：共同研究実施機関の基本情報一覧（2012年3月現在）・・・28

### 4. 研究成果の観光に関する一覧表・・・40

### 5. 研究成果の刊行物・別刷・・・45

平成 23 年度 厚生労働科学研究費補助金

地球規模保健課題推進研究事業

サハラ以南アフリカにおけるエイズ・結核研究ネットワーク構築に関する研究

総括研究報告書

研究代表者 東北大学 服部俊夫

概要 サハラ以南アフリカにおけるエイズと結核は同地の保健衛生上の課題である。社会・経済・政治などにも影響を及ぼしており、国際的な取り組みの必要性が指摘されている。感染症は人やモノの移動に伴って伝播し、国境をまたぐこともある。感染症の予防や治療を含む対策には国際的な連携が重要である。そこで同地におけるエイズ・結核研究ネットワークを構築するために、各地の研究者との連携体制を強化することを目的とした研究課題を開始した。

A. 研究目的

潜在性結核感染症(LTBI)の多い地域に HIV 感染が急激に拡大し、結核発症者に対する適切な感染防御措置がとられていない時にエイズ・結核の感染爆発が生じ、また医療機関での感染拡大も伴うので多剤耐性結核(MDR-TB)が上昇する。この班においてはエイズ・結核の現状と問題点を解析する。さらに、アフリカとの日本との間の研究ネットワークの拡大、アフリカに拠点を持つ各研究機関相互のネットワーク構築、各拠点における研究の推進を目的とする。

課題 1

アフリカとの研究ネットワークの拡大

B. 研究方法

既に研究分担者はアフリカ各地において現地との共同研究を行っている。本年度はこれらの機関を訪問して、共同研究拡大のための調査を行った。

C. 研究結果

今年度はネットワークに関わる 4 施設を訪問した。特に 7 月に訪問した南アにおいて、K-RITH の起工式の間行われたクワツルナタール大学ではそれに付随したシンポジウムに出席し、座長も務めた。ハーバード大学、ロンドン大学からの研究者とともに意見交換をした。その折りに当該大学の結核病棟を仲宗根班員と視察した。そこでは結核病棟がどこから始まるのかが判然とせず、一般の病室に混在しているように見えた。またケニアのブシアに久保班員とともに視察した。換気がよくされているせいか、ある病室の一角が結核患者用に確保されカーテンで仕切ってあった。医療関係者の感染防御についての理解は、一般的に BCG を接種していれば感染を生じないのでマスクは不要であると医療関係者は解釈しているようである。さらにザンビアの Teaching

Hospital には鈴木班員と訪問し、2<sup>nd</sup> Scientific Meeting for “HIV/AIDS, Influenza” and “TB Diagnosis by Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)”に参加し、HIV 感染個体における結核菌に対する免疫応答に関する最新の研究成果を報告した。ガーナでは LTBI に関するセミナーを行い、われわれの進めている結核菌に特異的な抗原を利用した IFN-gamma release assay などの研究を紹介した。

#### D.考察

医療関係者の結核感染防御は、結核菌への潜伏感染を減らすという点から重要である。特に、HIV 感染率の高いサハラ以南のアフリカ各国では、エイズ結核対策が重要である。今回訪問した病院では、医療者の結核感染防御について不十分な例もあった。今年度各地の研究会に参加し、交流を深めたが、この機会を活用し結核の潜伏感染の概念を導入し結核感染防御の正しい知識を学べた。

#### 課題2

アフリカに拠点を持つ日本の研究機関を結ぶネットワークの構築

#### B.研究方法

アフリカ諸国と日本との共同研究は、日本と南アフリカ、日本とザンビアなどのように二国間のものは活発に行われてきた。今年度は、これら既存の共同研究を活用する複数国間の連携の可能性を探るために、研究分担者へのアンケートを行い課題の抽出と整理を行った。

研究分担者を対象にしたアンケートを実施し、全員から回答を得た。調査の概要は以下の通り。

実施時期：平成23年10月

方法：質問項目をメールで送り、回答は自由記述とした。

質問項目：質問は、以下5点とした。

- アフリカでの共同研究実施国
- 研究内容
- 共同研究の可能性あるテーマ
- 他の研究者から入手したいもの
- 班員からの希望

同時に、上原班員が、それぞれの研究拠点の基本的な情報について、年報や機関のwebサイトをもとに一覧表(共同研究実施機関の基本情報一覧)にまとめた。

#### C.研究結果：

共同研究の可能性については、それぞれの拠点ですでにプロジェクトが動いており、そこでのサンプルを提供した共同研究、サハラ以南のアフリカで広く利用可能な診断・モニタリングのためのツールを開発し、これを現地の教育研修に活用するといった回答があった。

他の研究者から入手したいものとして、診断ツール開発、治療効果の解析などに必要な試料が挙げられた。

班員からの希望としては、情報の共有、人の交流の活発化が挙げられた。また、試料の活用の際し、国際的標準ルールの整理の必要性の指摘もあった。

これらの感染症は輸入感染症として蔓延する可能性もあり早急に対応策を確立しておく必要がある。

#### D.考察

それぞれの共同研究をネットワーク化するためには、モノと情報の共有が必要である。しかし、試料の共有は必ずしも容易で

はない現状が明らかとなった。今後の課題として現状の分析と、実態に即した試料共有のあり方の提言を目指す。

### 課題3

#### 各拠点における研究の推進

#### B.研究方法

1) 結核菌・非定型抗酸菌感染者における TBGL 抗体と Interferon gamma release assay (IGRA) を評価した。使用したサンプルはタイ及びフィリピンで採集した。

2) 南アフリカの新種の NTM に関して、南アとの共同研究を実施した。また LTBI を診断するための新たに有用な抗原を同定するために従来から用いられている抗原以外に Ag85A, Ag85B, MDP1, hbaA (Rv0475), ACR (Rv2031c), Rv0679c 由来のペプチド総計 100 種類以上を作成し、結核感染者の反応性を検索している (東北大学倫理委員会 2010-442)。

3) 結核の治療にも使われているキノロン薬の免疫機能活性を、OPN promoter の転写活性の測定により検討した。

#### C.研究結果

1) 以下の論文を発表することができた。  
タイ : Sidiqi et al. Int. J Tuberc Lung Dis PMID 22325001

マニラ : Siddiqi et al. Clin Dev Immunol in press.

また結核の免疫診断の教科書も分担執筆した。その中で Treg により LTBI が偽陰性になる可能性を明らかにした (文献3)。特にマニラの研究においては TBGL 抗体が LTBI のマーカーになることと LTBI の TBGL-IgA 抗体価が  $\gamma$ -IFN 値と相関するこ

とより LTBI に粘膜免疫が関与することを始めて明らかにした。

2) 南アフリカの新種の NTM に関しては 30th WORLD VETERINARY CONGRESS ([www.worldvetcongress2011.com](http://www.worldvetcongress2011.com)) で UNISA の Prudence 教授が発表した (Mycobacterium avium complex isolated from black wildebeest in South Africa 2009- 2010, Prudence Kabongo-Kayoka, 30th WORLD VETERINARY CONGRESS 2011, 2011)。

3) キノロン薬が OPN promoter の転写活性を促進することを明らかにした。Quinolone-induced up-regulation of osteopontin gene promoter activity and its effect on BCG invasion into human lung epithelial cell (A549) cells は Antimicrobial agents and chemotherapy に受理された。この研究により薬剤耐性結核に使用するキノロンの新たな抗菌機構と宿主への影響を明らかにできた。

#### D.考察

アフリカのみならずハルピン、タイ、マニラ、での LTBI の概念の導入を行い、その知識の導入により Health Care Worker の感染防御意識は高まっている。特にサンラザロ病院では結核病棟でのマスク着用励行、スミア陽性者と陰性者の区別、MDR 患者の別棟診療などが行われるようになり、感染者が減少することが期待される。またサンラザロの研究で LTBI の維持に粘膜免疫の関与が示唆でき、今後の研究方針に影響を及ぼす。

#### E.結論

今年度は、班を構成するすべての研究拠

点四ヵ所を訪問し現状の視察を行うとともに、南ア、ザンビア、ガーナにおいては学会・研究会報告を行い、エイズと結核に関する我々の研究成果の紹介を行うとともに、共同研究打ち合わせを実施することができた。ヒトの交流という面では十分な成果である。一方で、試料の共有に関しては、解析の価値のある試料が多数あるにもかかわらず共有がうまく進んでいない現状が示され、国際的な試料利用に関して、実務面からルールの整理を行う必要があることが明らかとなった。

#### F.健康危険情報

ブシア Sub-district hospital の結核病棟では医療従事者はマスクも着けず働いており、検査室でもマスク未着用で喀痰処理用のドラフトチャンバーも壊れている状態である。同地で研究に従事する人間が結核に感染しないような注意が必要と思われる。

#### G.研究発表

##### 1.書籍

1)Beata Shiratori, Hiroki Saitoh, Siddiqi Umme-Ruman, Jingge Zhao, Haorile Chagan-Yasutan, Motoki Usuzawa, Chie Nakajima, Yasuhiko Suzuki & Toshio Hattori. Immunological Diagnosis of Active and Latent TB. in Mycobacterium Tuberculosis/Book1, Intech, 2012. 353-378.

##### 2.論文発表

1)Siddiqi UR, Punpunich W, Chuchottaworn C, Jindakul S, Ashino Y, Saitoh H, Okada M, Chotpittayasunondh T, Hattori T. Elevated anti-tuberculous glycolipid antibody titres in healthy adults and tuberculosis patients in

Thailand. Int J Tuberc Lung Dis. 16(4), 532-538. 2012

2) Umme Ruman Siddiqi, Prisca Susan A. Leano, Haorile Yasutan Chagan, Beata Shiratori, Hiroki Saitoh, Yugo Ashino, Yasuhiko Suzuki, Toshio Hattori and Elizabeth Telan. Frequent detection of anti-tubercular-glycolipid IgG and IgA antibodies in the healthcare workers with latent tuberculosis infection in the Philippines. Clin Dep Immunol, vol. 2012, Article ID 610707, 10 pages, 2012. doi:10.1155/2012/610707, 2012

3) Beata Shiratori, Jing Zhang, Osamu Usami, Haorile Chagan-Yasutan, Yasuhiko Suzuki, Chie Nakajima, Toshimitsu Uede, Toshio Hattori. Quinolone-induced up-regulation of osteopontin gene promoter activity in human lung epithelial cell line A549. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, e-pub 12Mar. 2012.

##### 3.学会発表

1) Toshio Hattori. HIV-infected patients; Tuberculosis in special settings and its management. 3<sup>rd</sup> conference of the union asia-pacific region, 2011 Hong Kong.

2) 服部俊夫 Progress the research on HIV/AIDS and MTB in Japan. 2nd Scientific meeting for HIV/AIDS, INFLUENZA and TB DIAGNOSIS BY LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION 10/4, 2011 ルサカ

3) 服部俊夫. Attempts to diagnosis of letent TB infection. Noguchi Memorial Institute Medical Research 招待講演 10/7, 2011 アクラ

4) Umme Ruman Siddiqi, Prisca Susan A.

leano,Haorile Chagan-Yasutan, Beata  
Shiratori,Hiroki Saitoh, Yugo Ashino,Yasuhiko  
Suzuki,Toshio Hattori and Elizabeth Telan.  
Frequent detection of anti-tubercular-glycolipid  
IgG and IgA antibodies in the health workers  
with latent tuberculosis infection in the  
Philippines. Asian-African Research Forum on  
Emerging and Reemerging Infections1/11 ~  
12,2012 神戸

厚生労働科学研究費補助金（地球規模保健課題推進事業）  
分担研究報告書

「サハラ以南アフリカにおけるエイズ・結核研究ネットワークの構築に関する研究」

研究分担者 鈴木定彦 北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター  
研究協力者 中島千絵 北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター

研究要旨

サハラ以南アフリカ地域における超多剤耐性結核菌の伝播動態を調査し、これらの制圧のための基礎データを蓄積することを目的とする。この地域の国々の結核研究・検査担当者と結核研究ネットワークを構築し、結核菌株収集するとともに、これらの詳細な遺伝子型解析により対象国における多剤および超多剤耐性結核の起因菌株を明らかにして、その包囲網形成により効率的かつ効果的な結核対策へ繋げる。本年度の研究ではその端緒として、超多剤耐性結核菌の基準であるニューキノロン剤耐性獲得のメカニズムを分子レベルで明らかにした。

A. 研究目的

結核は地球規模で蔓延している感染症である。全世界で年間約900万人以上の新規登録患者と約130万人の死亡者を出しているため、マラリア、エイズと並んで最も重要な感染症の一つと考えられている。特にサハラ以南アフリカにおいてはエイズの蔓延に伴った結核が大きな問題となっており、この地域において適切な対策を講じ、結核を減少させる事は重要である。

結核の標準治療は、4種類の一次選択薬の同時服用である。そのうちの特定の2剤以上が無効であるものを多剤耐性結核、これに加えて、7種類ある二次選択薬の特定の2剤以上、合計4剤以上に耐性のものを超多剤耐性結核と呼ぶ。超多剤耐性結核の治療には効果的な薬はなく、患者は社会から完全に隔離され、多くは早期に死亡する。近年多剤耐性結核菌が世界的に蔓延しつつあり、既に東ヨーロッパや西アジア地域で

は結核対策に大きな影を落としている。これに対して、サハラ以南アフリカでは多剤耐性結核は増加傾向にあるが、超多剤耐性結核の報告は多くない。従って、現段階でサハラ以南アフリカにおいて多剤および超多剤耐性結核の蔓延を防止する事は急務である。多剤耐性結核および超多剤耐性結核の蔓延を防止するためには、疫学調査を実施して世界的な流行状況を把握する必要がある。現在、世界的な流行調査がWHO主導で行われ報告されているが、国毎に調査の規模および精度が異なり、包括的な調査がなされているとは言い難いのが現状である。そこで、本研究では、我が国において迅速かつ精度の高い多剤および超多剤耐性結核菌検出法を構築し、これを研究ネットワーク構築の一助とすることを目的としている。

本年度の研究では、DNA ジャイレース B サブユニット上の 540 番目のアミノ酸残基が



グルタミン酸からバリンに置換する変異のキノロン耐性への関与を明らかにする事を目的として研究を進めた。

## B. 研究方法

### 1. 組換え DNA ジャイレースの作出

野生型および変異型 B サブユニットをもつ 2 種類の精製組換え DNA ジャイレースを作出した。結核菌 H37Rv 株 DNA を鋳型として野生型の DNA ジャイレース A サブユニットならびに B サブユニットをコードする遺伝子を増幅させ、これを大腸菌蛋白発現系 (pET システム) に導入して DNA ジャイレース A サブユニットならびに B サブユニットを発現させた。発現蛋白の精製にはヒスチンタグシステムを用いた。変異型 B サブユニット (GyrB-E540V) は野生型 B サブユニットをコードする遺伝子に PCR にて変異を導入し、上記発現系にて発現させ、これを精製した。

### 2. 組換え DNA ジャイレースの活性評価

*In vitro* スーパーコイリング活性により組換え DNA ジャイレースの活性を評価した。フルオロキノロン感受性は様々なフルオロキノロン剤 (Sitafloxacin、Gatifloxacin、Sparfloxacin、Moxifloxacin、Levofloxacin、Ciprofloxacin、Norfloxacin ならびに Enoxacin) 存在下に *In vitro* スーパーコイリング活性ならびに開列活性評価を実施する事により IC<sub>50</sub> ならび CC<sub>25</sub> として算出した。

## C. 研究結果

フルオロキノロンによる DNA ジャイレースの活性の阻害結果の一部を図 1 に示す。また、表 1 には様々なフルオロキノロン剤の野生型および GyrB-E540V 型 DNA ジャイレースに対する阻害効をまとめた。

GyrB-E540V 型 DNA ジャイレースでは Ciprofloxacin による阻害が見られなかった。一方、Sitafloxacin は GyrB-E540V 型 DNA ジャイレースに対しても強い阻害効果を示した。

## D. 考察

Sitafloxacin の E540V 変異型 DNA ジャイレースに対する IC<sub>50</sub> は野生型の 2.5 倍であったのに対して、Moxifloxacin では 3.8 倍、Ciprofloxacin に至っては 35.9 倍であった。この事は、ニューキノロン剤の側鎖の陰性荷電が DNA ジャイレース B サブユニットとの結合に深く関与する事を示すものであった。

## E. 結論

DNA ジャイレース B サブユニット上のアミノ酸置換とフルオロキノロン耐性の関係を明らかにした。ニューキノロン耐性臨床分離結核菌より新たに見出した同分子上の 540 番目のアミノ酸残基がグルタミン酸からバリンに置換する変異がキノロン耐性を付与する事を明らかにした。また、540 番目のアミノ酸残基グルタミン酸がフルオロキノロンの 7 位の置換基と相互作用をしており、バリンへのアミノ酸置換によりこの相互作用が損なわれるため DNA ジャイレースが耐性を獲得する事を示した。得られた成果はサハラ以南アフリカにおけるエイズ・結核研究ネットワークにおいて超多剤耐性結核検出のための遺伝子診断法構築の基礎データとする。

## F. 健康危険情報

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

•Yokoyama K, Kim H, Mukai T, Matsuoka M, Nakajima C, Suzuki Y. (2012) Amino acid substitutions at position 95 in GyrA can add fluoroquinolone resistance to Mycobacterium leprae. Antimicrob. Agents Chemother. 56(2):697-702.

•Kim H, Nakajima C, Kim Y-U, Yokoyama K, Suzuki Y. (2012) Influence of lineage specific amino acid dimorphism in GyrA on the fluoroquinolone resistance of Mycobacterium tuberculosis. Jpn J Infect Dis 65(1):72-74

•Kim H, Nakajima C, Yokoyama K, Rahim Z, Kim Y-U, Oguri H, Suzuki Y. (2011) Impact of the E540V amino acid substitution in GyrB of Mycobacterium tuberculosis on Quinolone Resistance. Antimicrob. Agents Chemother. 55:3661-3667

•Hang'ombe M B, Nakajima C, Ishii A, Fukushima Y, Munyeme M, Matandiko W, Mweene A S, Suzuki Y. (2011) Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis complex in Cattle and Lechwe (Kobus leche kafuensis) at the slaughter house. Vet. Sci. Dev. 1:e5

•Shiratori B, Saitho H, Umme-Ruman S, Zhao J, Chagan-Yasutan H, Usuzawa M, Nakajima C, Suzuki Y, Hattori T. (2012) Immunological diagnosis of active and latent TB. Cardona P-J (eds.), Mycobacterium tuberculosis/Book 1, Intech Open Access Publisher, Rijeka, Croatia, p353-378

学会発表

•Suzuki Y: How the mycobacteriology laboratory contributes to a better management of multidrug-resistant tuberculosis? 3rd Asia-Pacific Region Conference International Union Against Tuberculosis and Lung Diseases,

July 11, 2011, Hong Kong, China

•Nakajima C, Fukushima Y, Suzuki Y. Easy and rapid detection of Mycobacterium tuberculosis by a newly developed isothermal nucleic-acid amplification method targeting tandem repeat sequences. 46th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, US-Japan Cooperative Medical Science Program. Omiya, Japan, Dec, 6-9, 2011.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許

取得

該当無し

出願

•中島 千絵、鈴木 定彦、福島 由華里。核酸増幅方法およびその利用。平成 24 年 3 月 13 日、PCT/JP2012/56381、出願人；国立大学法人北海道大学

•鈴木定彦、中島千絵、鈴木晴香、奥村英正、川瀬三雄、廣田寿一、丹羽孝介。標的ポリヌクレオチドの検出方法及びアレイ。平成 23 年 6 月 28 日、特願 2011-143441、出願人；国立大学法人北海道大学、日本碍子株式会社

##### 2. 実用新案登録

該当無し

##### 3. その他

該当無し

厚生労働科学研究費補助金（地球規模保健課題推進研究事業）  
分担研究報告書

ガーナにおける現行抗エイズ治療薬(ART)の評価に関する研究と  
アフリカ中央部における HIV 分子疫学の研究

研究分担者 山岡昇司 東京医科歯科大学大学院・医歯学総合研究科・教授  
研究協力者 井戸栄治 東京医科歯科大学大学院・医歯学総合研究科・特任教授  
(ガーナ大学野口記念医学研究所)

研究要旨

アフリカを含む大半の発展途上国においてエイズ患者に対して現在処方されている WHO 推奨の抗ウイルス治療法(ART)の有効性について、ガーナの代表的地方病院をフィールドとして選定し、患者の追跡調査を行うことにより評価した。その結果、現行 ART は概ね（約 87%の患者に対して）有効性を保持していることが明らかとなった。しかしながら、残りの 13%はウイルスの制御が効かなくなっており、その一部には NNRTI に対する薬剤耐性変異の出現が認められた。またカメルーン西部における HIV の分子疫学研究を行った結果、多様な遺伝子型のウイルスの存在が確認されると同時に、重感染の頻度が高い(8%)ことが明らかとなった。

A. 研究目的

エイズ患者の抗ウイルス治療(ART)を行うに際して、先進国の場合は開発されて間もないインテグラーゼ阻害薬などの新薬を始めとして種々の選択肢が可能である。しかし、アフリカを含む大半の発展途上国においては、そうした高価な新薬は言うに及ばず、今となってはいささか古くなったプロテアーゼ阻害剤すら入手は困難である。わずかに国際機関からの支援を受けて配給される NRTI 2 剤と NNRTI 1 剤からなる混合薬剤が、ほぼ唯一の選択肢と言ってよい状況である。実際この処方 WHO によって推奨されており、ガーナの場合は 2003 年からその投薬が始まっている。ところが、実

験機器や技術的・経済的制約などからこれらの薬剤が本当に効果を持続しているのかについて、これまで科学的な評価・検討がほとんどされることなく投薬が続けられているのが現状となっている。そのままでは薬剤耐性変異をやみくもに誘発し、次に取るべき治療手段を大幅に狭めてしまう危険性が考えられる。そこで本研究では、現行の ART について実験データに基づいた正しい評価を行うことを目的とするものである。またアフリカ大陸における HIV の遺伝子型プロフィールは常にダイナミックに変動している。特にウイルスの遺伝的多様性が高い中央部アフリカ諸国において、最新の分子疫学動向を調べることも目的とする。

## B. 研究方法

ART 研究のフィールドとしては、ガーナ共和国の首都アクラの北方に位置するイースタン州の州都コフォリデュア市にあるコフォリデュア州立病院を選定した。同病院はガーナ国において最初のエイズ患者が報告された場所であるという事情もあって、ガーナ政府からの援助等により研究機器・設備が他病院に比べ比較的充実しており、また患者の情報管理システムも良好に確立されている。ガーナ大学野口記念医学研究所にある東京医科歯科大学の研究チームは同病院と共同研究の関係にあり、これまでに延べ約 1,100 人分の検体を収集しており、これらの臨床データと血漿や末梢血リンパ球(PBMC)が研究所内に保管されている。平成 23 年度は特にフォローアップ患者に限定して 300 検体を再採血し、それらの CD4 細胞数と血中ウイルス量を測定した。前者は BD 社の FACSCount を用いコフォリデュア州立病院にて、後者は血液検体を野口研究所に持ち帰り、血漿と PBMC に遠心分離後、血漿中のウイルス量を自家製で確立した LTR 領域にプライマーが設定された定量的 RT-PCR 法で測定した。薬剤耐性変異の有無については、ウイルス遺伝子の RT 領域 5'側部分を配列分析することで解析した。またアフリカの分子疫学研究としては、特にカメルーン西部について調査を行った。(倫理面への配慮)

患者からの検体採取に際しては、ヘルシンキ宣言の精神に基づき本人からの同意書を得た上で採血している。また本研究は、ガーナ大学野口記念医学研究所、該当するアフリカ諸国、および東京医科歯科大学の倫理委員会の承認を受けて行われている。

## C. 研究結果

ART 評価に関して、平成 21 年度までに集めた検体とそれ以降に集めた検体について、ペアまたはそれ以上の回数で、血中ウイルス量ならびに CD4 細胞数の増減が比較できるサンプル数は 243 件であった。前回のデータと比べ、その後にウイルス量が抑制され、CD4 細胞数が回復すれば、明らかに治療が Success (S)のケース、逆にウイルス量が増加、CD4 細胞数が減少すれば Failure (F)である。ウイルス量は抑えられているが CD4 細胞数に回復が見られないようなケースは、薬自体を変えなければならない状況ではないので、Moderate Success (M) というカテゴリーとした。243 件に対する評価では、S が 161 (68.8%)、M が 43 (18.4%)、F が 30 (12.8%)であった。つまり、S と M 合わせて約 87%の患者では現行の ART が一応の効果を示しており、残りの約 13%が現在の処方ではウイルスが抑制されていないことになる。これを、直近のデータでウイルス量が検出限界 (in house の定量法で 160 copies/ml) 以上であった 46 ケースだけに絞ると、F が 30 (65.2%)、M が 8 (17.4%)、S が 8 (17.4%) となり、最終のウイルス量測定で、たとえ少量であれ測定限界以上にウイルスゲノムが検出されたなら、それはかなりの確率で ART が失敗していることを示唆していることが明らかとなった。ガーナでは発展途上国の患者向けとして WHO から推奨された AZT、3TC、NVP の 3 剤からなる混合錠剤が処方されている。NVP の代わりに EFV が選択されることもある。そこで検体採集の最終データにおいてウイルスが検出された患者について、ウイルス遺伝

子の RT 領域 5'側を配列分析して NNRTI に対する耐性変異の出現状況を調べることにした。結果は、NVP や EFV に対する耐性変異としてよく知られる変異はほとんど出現していないことが分かった。

アフリカ大陸における HIV の分子疫学に関して、今年度は特にカメルーン北西部から集めた検体について解析を行った。この地域は、ナイジェリアと国境を接し、ガーナを含めた西アフリカ全体の HIV 流行株の分布状況を反映する重要な地点と考えられるからである。結果は解析された 51 検体の内、最も数が多かったのは CRF02\_A/G リコンビナントで 18 (35 %)、他に G、A、C、D、H、CRF37 などが続き、予想通り多様な遺伝子型分布状況であった。注目すべきは、その中の 4 例 (8%) という高頻度で異なった HIV-1 株同士が同一患者に感染している、いわゆる重感染であったことである。

#### D. 考察

ガーナにおける ART の調査結果は、現行の処方開始から数年以上を経ているにも拘わらず、概ねその効果を持続していることを示すものである。ところが、一部の患者ながら Y181C など NVP、EFV 両 NNRTI に対する耐性変異が認められた例もあり、今後予断を許さない兆候であると捉えるべきとも考えられた。引き続き同様の調査を継続する必要性があるであろう。

HIV 分子疫学の研究においては、重感染の頻度が思いのほか高いことが明らかとなった。こうした患者の体内では遺伝子の組み換え (リコンビネーション) などの現象により、それまでとは全く性質の異なる新たな株が生成する可能性が考えられている。

#### E. 結論

WHO が推奨している発展途上国向けの ART 処方、概ね有効性を示していることが明らかとなった。しかし、一方でその限界もわずかながら認められており、今後も同様の調査継続が必要であると考えられた。HIV の分子疫学研究では、カメルーンにおける解析結果から遺伝子型が異なる HIV が同一患者に感染している重感染が決して稀な現象ではないことが明らかとなった。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Ndembu N, Iwamoto S, Ngansop C, Lemey P, Abimiku A, Mbanya D, Kaptue L, Ido E. High frequency of HIV-1 dual infections in Cameroon, West Central Africa. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 57(2), e25-e27, 2011.

##### 2. 学会発表等

1) Barnor J, Brandful J, Ampofo W, Yamamoto N, Bonney K, Bonney M, Alale M, Ntim A, Amoah Y, Fori S, Addo A, Nyarko A, Ido E, Ishikawa K, Yamaoka S. Establishment of in-house quantitative real-time RT-PCR assay for monitoring for HIV-1 viral loads and efficacy evaluation of ART in Ghanaian AIDS patients in an urban setting. 6<sup>th</sup> IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention, July 17-20, Rome, Italy.

- 2) Ido E, Ndembi N, Taty-Taty R, Iwamoto S, Tada T, Brandful J, Karhemere S, MuyembeJJ. High frequency of HIV-1 dual infections in central African countries. XVth International Congress of Virology (IMS 2011), September 11-16, 2011, Sapporo, Japan.
- 3) 井戸栄治, Karhemere S, Taty-Taty R, 多田哲子, 安永みゆき, 岩元静香, 梅原 綾, Parra HJ, Kashongwe Z, Muyembe JJ. コンゴ盆地における HIV の分子疫学-エイズウイルス生成の現場から. 第 52 回日本熱帯医学大会・第 26 回日本国際医療保健学会学術大会・合同大会, 2011 年 11 月 4-6 日, 東京
- 4) 井戸栄治, Nicaise N, 岩元静香, Charlotte N, Philippe L, Alashle A, Mbaya D, Kaptue LK. カメルーン共和国北西部における HIV の分子疫学. 第 24 回日本エイズ学会学術集会, 2011 年 11 月 30 日-12 月 2 日, 東京
- 5) Amoah Y, Ntim A, Barnor J, Brandful J, Ampofo W, Bonney E, Ofori S, Ishikawa K, Nyarko A, Yamaoka S, Ido E. Evaluation of the current first-line ART for AIDS patients in Ghana. Asia-Africa Research Forum on Emerging and Reemerging Diseases, Jan 11-12, 2012, Kobe, Japan.
- 6) Ido E, Ndembi N, Taty-Taty R, Iwamoto S, Tada T, Brandful J, Karhemere S, Yamaoka S, Muyembe JJ. High frequency of HIV-1 dual infections in central African countries. Asia-Africa Research Forum on Emerging and Reemerging Diseases, Jan 11-12, 2012, Kobe, Japan.
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし。

厚生労働科学研究費補助金（地球規模保健課題推進事業）  
分担研究報告書

サハラ以南アフリカにおけるエイズ・結核研究ネットワークの構築に関する研究

研究分担者 久保 亨 長崎大学熱帯医学研究所・助教

## 研究要旨

ケニア共和国は世界で最も結核の蔓延している 22 カ国のうちの一つであり、その背景には HIV 感染症の蔓延があると考えられているが、その感染の実態については不明な部分も少なくない。我々は本研究を通じて、ケニア共和国における HIV・結核の混合感染の現状を把握し、正確な簡易迅速診断系の開発・導入を通じて同国における HIV・結核感染のコントロールに寄与することを目指す。

### A. 研究目的

ケニア共和国は世界で結核の最も蔓延している 22 カ国のうちの一つであり、これら 22 カ国で世界の結核感染の約 80%を占めていると考えられている。ケニアの Ministry of Public Health & Sanitation の統計によれば、同国における結核の case notification rate (CNR) は、1987 年の人口 10 万人当たり 51 から 2009 年には 329 にまで上昇している。この急激な上昇の背景には HIV 感染症の蔓延があると考えられているが、HIV・結核の混合感染の実態に関しては不明な点も少なくなく、特に地方における情報は極めて限られている。

また、ケニアでは 1993 年より結核治療のために DOTS が行われるようになり、現在広く行われてはいるが、DOTS 治療を行う際に重要となる adherence や結核菌の薬剤耐性に関する情報は乏しく、多剤耐性結核に関する調査・研究は現在ケニア国内ではほとんど行われていないのが実情である。

本研究では、ケニア共和国における HIV・

結核の混合感染の現状を把握し、正確な簡易迅速診断系の開発・導入を通じて同国における HIV・結核感染のコントロールに寄与することを目指す。

本研究によって得られる成果・エビデンスはケニア共和国にとってのみでなく、周辺のサブサハラアフリカ諸国にとっても有用なものであり、本研究を通じてサブサハラアフリカ諸国の HIV/TB 研究のネットワークがさらに強化されればその意義は大きい。また、それはわが国の国際保健政策 2011-2015 に定められている戦略とも合致しているものと考えられる。

### B. 研究方法

本年度はケニアの現地を訪れ、現地のカウンターパートとの協議、医療現場の視察を通じてケニア共和国における HIV・結核の混合感染の現状の把握を行うとともに、問題点とその解決のための今後の研究推進についての協議を行った。現地のカウンターパートは、ナイロビと西部ウガンダ国境

の地方都市ブシアにあるケニア国立医学研究所 (KEMRI) の研究者ならびにブシアの district および sub-district hospital の医療従事者である。

(倫理面への配慮)

現時点では特記すべきものなし。

### C. 研究結果

平成23年7月に研究代表者ととともにケニア共和国を訪れ、ナイロビならびに西部ウガンダ国境の地方都市ブシアにおいて、HIV/結核感染の実態と医療体制に関する調査を行った。ブシアにあるケニア国立医学研究所 (KEMRI) の Director である Dr Mwau はこの数年来 dried blood spot 法を用いた新生児の HIV 診断に従事している研究者で、医師でもある Dr Mwau はケニアにおける HIV ならびに結核感染に関する知識も豊富である。さらにブシアにある sub-district hospital の Dr Amukanga (西部ケニアの provincial な結核対策の責任者でもある) とその他の現地医療従事者と協議を行うとともに、KEMRI の研究施設および病院の視察を行い西部ケニアにおける HIV/結核感染対策の現状とその問題点についての情報を得ることが出来た。

協議において HIV・結核の確定診断能力の向上を求める意見が多く、その現地でのニーズを踏まえ、今後 HIV・結核の混合感染の迅速確定診断法の開発と導入、そして簡便迅速な薬剤耐性結核の検出法の開発と導入を目指す予定である。

### D. 考察

ケニア西部地域のような rural area における

HIV/結核の混合感染に関する罹患率、治療成績、薬剤耐性などに関する正確な情報は必ずしも十分なものとは言えず、それは一つには結核の正確な診断の難しさに原因があるものと考えられた。ブシアのような地方都市においても HIV や結核を簡便・迅速かつ正確に診断できる方法が使用できるようになれば、現地の医療機関の得る恩恵は極めて大きいと考えられた。

LAMP 法は日本で開発された簡便で正確な遺伝子増幅検査法であり、結核診断用試薬は既に実用化されているが、この日本発の簡易迅速確定診断法である LAMP 法を、結核ならびに HIV 診断に導入することを目指したいと考えている。また、LAMP 法を用いて結核の薬剤耐性も同時に診断できるような系が作成できればケニアをはじめとする途上国の医療機関の得る恩恵は非常に大きいと考えられ、現在その系の開発を進めているところである。今後ケニア側の研究者と協力しながらこれらのシステムの導入を目指して行きたいと考えている。

### E. 結論

サブサハラの HIV、結核蔓延国の一つであるケニア共和国において、特にその地方都市においては HIV、結核の正確な診断は未だに困難なことが少なくない。ケニア共和国の地方都市でも結核や HIV の診断が、そして結核の薬剤耐性の診断が正確かつ容易に行えるシステムの開発・導入ができれば、その地域における HIV/結核の混合感染のコントロールのために重要な役割を果たすと考えられる。また、そのような系の確立がサブサハラ全体における HIV、結核の混合感染のコントロールに繋がることが期待さ



れる。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表  
該当するものなし。
2. 学会発表  
該当するものなし。

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得  
該当するものなし。
2. 実用新案登録  
該当するものなし。
3. その他  
該当するものなし。

分担研究報告書

簡便で安価な薬剤耐性 HIV 検査法の開発

分担研究者名 仲宗根正 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

途上国においても利用可能な簡便で安価な薬剤耐性 HIV 検査法の開発とその技術移転を目的とし、数珠多クローン解析法(国立感染症研究所職務発明認定：平成 23 年 2 月)は開発中である。これとは別に、米国 CDC と共同開発した酵素学的 HIV 薬剤耐性迅速検査法も含めて、両技術の移転の可能性について、ガーナ、ケニア、ザンビアの共同研究者と、日本国内や南アフリカ共和国で検討した。その結果、いくつかの課題が浮き彫りになった。最大の障壁は、倫理面を含めた研究ルールの確立、特にヒト試料の有効活用のための国際的な標準ルールの確立と考えられた。

A. 研究目的

途上国においても利用可能な簡便で安価な薬剤耐性 HIV 検査法の開発とその技術移転を目的とする。HIV 感染症は多剤併用療法により、先進国においては制御可能な慢性疾患となりつつある。サハラ以南のアフリカの途上国においても国際社会の介入により多剤併用療法が導入され、先進国同様に制御可能な慢性疾患への展望が期待されている。一方で、先進国が抱える薬剤耐性問題についても多剤併用療法の普及と共に顕在化～深刻化することも容易に想像できる。以上の状況下では、簡便で安価な薬剤耐性 HIV 検査法の必要性は言うまでもない。開発中の検査法の特徴のひとつは、HIV の薬剤耐性について、質的量的解析が可能である点である。さらに既存の手法を改良して、遺伝子学的解析と酵素学的解析を行う点も独創的である。

B. 研究方法

上記目的を達成するため、HIV 薬剤耐性の遺伝子学的解析法として数珠多クローン解析法を、酵素学的解析法として酵素学的 HIV 薬剤耐性迅速検査法を選択した。前者は設計が完成し平成 23 年 2 月に国立感染症研究所職務発明認定を受けている。後者は米国 CDC と共同開発したものをを用いる。前者については実用化に向けて開発を継続し、後者については途上国での利用を見越した改良や精度向上を進める。これらの技術について、代表研究者が構築するネットワークを介して情報共有を図り、その技術移転の可能性について検討する。具体的にはガーナ、ケニア、ザンビアの共同研究者と技術移転の可能性について南アフリカ共和国や日本国内で詳細に検討する。

C. 研究結果

まず、遺伝子学的 HIV 薬剤耐性迅速検査法につ

いては実用化の過程においていくつかの問題点が判明しており、その克服に努めた。しかしながら、目的遺伝子配列が含まれる DNA 鎖の増幅がうまくいかず、今年度の完成は達成できなかった。代表研究者が構築するネットワーク内での検討では、次世代シーケンサーが導入されるまでは途上国において本法が導入されれば、HIV 薬剤耐性の監視に貢献する可能性があるため、開発を進めて欲しい、とのコメントがあった。既に完成済みの酵素学的 HIV 薬剤耐性迅速検査法については共同開発者である CDC の了解を得て、その技術移転について具体的な行動計画を作成することになった。

#### D. 考察

今年度の検討の結果、検査法が完成し技術移転が成功したとして次の課題が考えられた。1) ネットワーク各国で検査するのか、検体を集約してある 1 国内で一括検査するのか。2) 倫理面を含めた研究ルールの確立、特にヒト試料の有効活用のための国際的な標準ルールの確立が必要。次年度は、これらの課題克服のための具体案を共同研究者と検討する。並行して数珠多クローム解析法の確立を目指す。

#### E. 結論

簡便で安価な薬剤耐性 HIV 検査法の技術移転の可能性について、ガーナ、ケニア、ザンビアの共同研究者と、日本国内や南アフリカ共和国で検討した。その結果、いくつかの課題が浮き彫りになった。最大の障壁は、倫理面を含めた研究ルールの確立、特にヒト試料の有効活用のための国際的な標準ルールの確立と考えられた。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Zhang W, Tong X, Nakasone T, Yue XT, Yamamoto N, Liu XY, Yang RG. Activity of superior interferon  $\alpha$  against HIV-1 in severe combined immunodeficient mice reconstituted with human peripheral blood leukocytes. Chin Med J (Engl). 2011 Feb;124(3):396-400.
- 2) Takahara Y, Matsuoka S, Kuwano T, Tsukamoto T, Yamamoto H, Ishii H, Nakasone T, Takeda A, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Sakawaki H, Horiike M, Miura T, Igarashi T, Naruse TK, Kimura A, Matano T. Dominant induction of vaccine antigen-specific cytotoxic T lymphocyte responses after simian immunodeficiency virus challenge. Biochem Biophys Res Commun. 2011 May 20;408(4):615-9.
- 3) Hoffmann D, Garcia A, Harrigan R, Johnston I, Nakasone N, Garcia Lerma JG, Heneine W. Measuring Enzymatic HIV-1 Susceptibility to Two Reverse Transcriptase Inhibitors as a Rapid and Simple Approach to HIV-1 Drug-Resistance Testing. PLoS ONE, 2011;6(7):e22019.

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

カポジ肉腫の病理組織学的解析と臓器への放射性物質の蓄積に関する研究

研究分担者 福本 学 東北大学加齢医学研究所 教授

研究要旨

エイズ患者におけるカポジ肉腫の病理組織標本の解析を行い、血管内皮の特徴的な病理組織学的な特徴を発見した。また、土壤に蓄積された放射性物質の健康に及ぼす影響に関して、将来のアフリカにおける土食習慣を持つ人々への人体影響を探るべく、福島第一原発の事故に伴う大量の放射性物質の環境中への飛散によって被災した警戒区域内の家畜について、放射性物質の臓器別体内集積量を計測した。

A. 研究目的

カポジ肉腫はエイズ患者に発症する。血管あるいはリンパ管内皮への HHV8 ウイルス感染が原因とされている。エイズ指標疾患の一つでもあるが、病理学的な観点からの検討は必ずしも十分ではない。南アフリカを中心とした HIV 感染患者の病理組織標本において血管内皮に注目して病理組織学的な特徴を抽出することを目的とした。我が国におけるエイズ患者数は現在のところ多くない。しかし将来爆発的に増加する可能性もある。このような状況を踏まえ、新たな知見を提供し我が国の病理診断医が HIV/エイズ病変を見逃さないようにする。

放射性物質が経口摂取された場合の、健康に及ぼす影響についてはまだよくわかっていない。そこで、福島第1原子力発電所の半径 20km 圏内に放棄されていた牛について、体内臓器への放射性物質の蓄積を明らかにするための調査を行った。

B. 研究方法

カポジ肉腫病理標本の解析)

カポジ肉腫の病理標本は、南アフリカの Walter Sisulu 大学病理学教室 Garcia-Jardon 准教授の許で診断された HIV 感染症例の病理標本において検鏡し討議する。

（倫理面への配慮） Walter Sisulu 大学の倫理委員会の承認を得て匿名化された病理標本の検鏡を行うため、倫理的な問題は生じない。

放射性物質の蓄積状況調査)

昨年3月の震災と津波が原因となって福島第1原子力発電所の水素爆発事故が起こった。この事故によって大量の放射性物質の環境中への飛散が起こった。原発から半径 20 km の範囲が警戒区域に設定され、住民は避難を余儀なくされた。

同区域内には多数の家畜が置き去られ、一部は野生化したため、総理大臣から福島県知事に殺処分指示が出された。これらの家畜を対象に、放射性物質の蓄積状況を明らかにするために、我々は警戒区域内へ入域し、牛約 150 頭について血液、骨格筋ならびに各臓器を摘出し、