

平成 24 年度厚生労働省科学研究費補助金（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 アフリカを始めとする多く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)がどこまで有効かを明らかにするため、ガーナのある地方病院を定点観測地点として選定し、昨年度に引き続き患者の追跡調査を行うことにした。その結果、現行の ART は概ね有効性を保持しているものの、昨年度に比べると服薬指導等により若干は改善が見られた患者もいるものの、Failure ケースが相対的に増加していることが明らかとなった。まだ多剤耐性株が出現している状況ではないものの、現行の薬剤が有効でなくなる日はそう遠くない前兆が見られたものとして、今後の更なる追跡が肝要である。また分子疫学の研究としてコンゴ民主の中央部に位置する赤道州の調査を行った結果、非常に多様な遺伝子型のウイルス群の存在が確認されると同時に、ここでも重感染症例の存在が次世代型の高速度 DNA シーケンサーによる解析によって明らかとなった。

A. 研究目的

エイズ患者の抗ウイルス治療(ART)に際しては、先進国の場合、インテグラーゼ阻害薬を始めとして新しい逆転写酵素阻害剤やプロテアーゼ阻害剤など様々な新薬の使用が可能である。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勿論、副作用が起こるため今となってはあまり使われ

ないプロテアーゼ阻害剤すら入手は困難である。そこで自ずと国際機関等からの援助によって配給される NRTI2 剤と NNRTI1 剤からなる混合薬剤が、ほぼ唯一の選択肢として使われるわけであるが、この組み合わせの薬剤もガーナに導入されてからほぼ 10 年が経過しており、その有効性がどこまで保持されているのかは明らかではないのが現状である。こうした背景

から、本研究ではガーナで主に採用されている薬剤が実際どのくらいウイルス制御に働いているのかをより正確に評価するために、ある地方病院に登録されている患者集団を毎年追跡調査することにした。また本研究では、もう一つ別なプロジェクトとして、ダイナミックに変動しつつあるアフリカ大陸における HIV の遺伝子型プロフィールを明らかにする研究も行っている。本年度はコンゴ民主共和国のコンゴ盆地の中央に位置する赤道州を調査して、その実態を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

ART 評価のフィールドとしては、昨年度に引き続き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にあるコフォリデュア州立病院で調査を行った。本研究グループが同病院との共同研究を開始した 2009～2010 年には延べ約 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、それ以後同一の患者グループより毎年 300 人分の検体を集めることにした。平成 24 年度は、前年度と同様、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 を使いコフォリデュア州立病院にて測定し、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については、特にコンゴ民主の中央部、赤道州から得られた検体に関して、従来のな

PCR と配列分析の他に次世代型超高速 DNA シーケンサーとして Roche の 454 GS Junior を用いて解析を行った。

(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、東京医科歯科大学、および該当するアフリカ諸国の倫理委員会、またはそれに相当する機関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、昨年度に得られた結果を再度振り返ると、集められた 300 検体中、それまでに集めた検体のデータと照合できるサンプルは 243 検体であった。それ以前のデータと比べ、ウイルス量が抑制され、CD4 細胞数が回復している場合は治療が 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) のケース、またウイルス量は抑えられているが CD4 細胞数の回復が見られないような場合を Moderately Success (M) のケースという 3 つのカテゴリーに分けると、結果は 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いるという結果であった。今年度は、同一の患者集団から再び 300 検体を集め、上記のカテゴリーによってグループ分けを行ったところ、ほぼ同様に S と M と F が分布しており、概ね ART が効いていることが見て取れた。しかしながら、この 300 検体の内、昨年度にもカテゴリー分けがされ、今年度もカテゴリー分けがされた患者が 102 症例あり、その内訳を詳しくみると、おそらくは服薬指導の効

果と思われる F から S への変化は 2 症例に留まったのに対し、S から F への転落が 16 症例もあったことが明らかとなった。S がそのまま S のケースは全体の半分の 51 症例で、M をどのように捉えるかにもよるが、全体的傾向として ART 成功例から失敗例への移行傾向が見える結果であった。ウイルス遺伝子の RT 領域 5' 側の配列分析による NNRTI に対する耐性変異の出現状況も調べたところ、AZT や d4T 単剤に対する変異はかなり広範に見られたものの、NVP や EFV に対する耐性変異としてよく知られる変異は幸いにも出現頻度が少なく、多剤耐性と考えられる株の出現は未だほとんど起こっ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、今年度は特にコンゴ民主の国土の大半を占めるコンゴ盆地の中央部を調べるために、ほぼ赤道直下に位置する赤道州から集めた検体について解析を行った。これまでカメルーンなどの遺伝子型の多様性が高いことはよく知られていたが、この地域に調査が入ったのは我々のグループが初めてである。集められた 61 検体の内、最も主要な株であったのはサブタイプ A で、その後 G、F、C、D など実に多様な株が続き、特に従来一口にサブタイプ A と呼んでいたグループが少なくとも 3 つ以上に分かれるカメルーン以上に多様な遺伝子型分布であったことは注目すべきであった。また今回は、従来の PCR と通常の DNA シーケンサーに加え、次世代型の超高速 DNA シーケンサーによる解析も行ってみた。得られたデータを既存のデータベースと大型コンピューターによって Blast 解析した結果、たちどころに一種類の株に感染している場合は勿論、複数の株に感染しているいわゆる重感染している株も明らかにすることが出来、こうした研究におけ

る次世代型シーケンサーの威力が如実に証明された。

D. 考察

継続する追跡調査の結果、ガーナにおける現行の ART は概ねにおいてその効果を保持していることを確認するものではあったが、同時に薬剤が効かなくなっている症例が現れている兆候を示すものでもあった。さらなる調査の継続によって、この傾向が一段と進んでいるのか、あるいはまだ暫くは現行の処方を守り続けるのか、判断を下すためにも更なる調査の続行をする必要があると考えられた。

HIV 分子疫学の研究においては、コンゴ民主における HIV の遺伝子の多様性が際立って高いことが明らかとなった。これが都市部の首都ではなく、相当辺境な田舎の地域においてそうであったことは、世界に広がった HIV パンデミックがこのコンゴ盆地で始まった可能性があることを強く示唆するものである。また、ここコンゴ民主でも重感染が多くみられることは、この地が新しいリコンビナント株を生成している現場でもある可能性を強く示唆しているものと考えられた。

E. 結論

WHO が推奨している発展途上国向け ART 処方の限界を早く正確に知ることは、極めて重要なグローバルな課題である。その意味でも、本研究のような評価研究は可能な限り続けられなければならない。特に治療失敗である F のケースの場合、その原因が単に服薬アドヒアランスの問題であるのか、あるいは実際に耐性変異の蓄積によるものであるのか、今後の調査はそこに焦点を当てて場合によっては聞き取り調査も視野に入れてみたいと考えている。

HIV の分子疫学研究では、HIV パンデミックのスタート地点としてコンゴ盆地の重要性が益々クローズアップされた結果が得られたものと思われた。これも可能な限り多くの地点を調査し、それらとの比較により、具体的な発生地とその時期の特定を解明したいものである。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表等

- 1) 井戸栄治, 山岡昇司: 東京医科歯科大学がガーナ大学野口記念医学研究所で展開している2つの感染症研究プロジェクト. 第60回日本ウイルス学会学術集会、2012年11月13-15日、大阪.
- 2) 井戸栄治, Karhemere S, Ebengho M, 中村昇太, 中屋隆明, Aziati I, Brandful J, Barnor J, Ampofo W, 生田和良, 山岡昇司, Muyembe JJ: 次世代型高速シーケンサーは HIV 重感染検体の解析に威力を発揮する—コンゴ民主共和国における HIV の分子疫学研究での適用例から. 第60回日本ウイルス学会学術集会、2012年11月13-15日、大阪.
- 3) 井戸栄治, Barnor J, Amoah Y, Aziati I, Ntim NA, Brandful J, Ampofo W, Ofori S, 山本典生, 石川晃一, Nyarko A, 山岡昇司: ガーナ国コ

フォリデュア州立病院における現行 ART の有効性に関する評価研究. 第26回日本エイズ学会学術集会、2012年11月24日-26日、横浜.

- 4) 堀 恭徳, Tung NH, 魚田 慎, 宇都拓洋, 森永 紀, 吉仲由之, 正山征洋, 神奈木真理, 山岡昇司: 植物抽出物による潜伏 HIV-1 プロウイルス再活性化メカニズムの解析. 第26回日本エイズ学会学術集会、2012年11月24日-26日、横浜.
- 5) Barnor J, Brandful J, Ampofo W, Aziati I, Agbosu E, Ofori S, Yamaoka S, Ido E: Evaluation of the Current First-Line ART by a Longitudinal Study in Koforidua Regional Hospital, Ghana. Asia-Africa Research Forum on Emerging and Reemerging Diseases, Jan 23-24, 2013, Tokyo, Japan.
- 6) Ido E, Karhemere S, Ebengho M, Nakamura S, Nakaya T, Brandful J, Barnor J, Ampofo W, Yamaoka S, Muyembe JJ: High-throughput DNA sequencing is a powerful tool to analyze dual and multiple HIV infections — its first application to the study in DRC. 20th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Mar 3-6, 2013, Atlanta, USA.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

平成 24 年度厚生労働省科学研究費補助金（地球規模保健課題推進研究事業）
分担研究報告書

ケニアにおけるエイズ・結核に関する疫学情報の収集

研究分担者

一瀬休生 長崎大学熱帯医学研究所 教授

研究要旨 ケニアにおけるエイズ・結核に関する疫学情報収集及び当該国における検査・治療の特性とその問題点の把握とネットワーク間で種々の菌株の正常解析結果を比較可能な研究協力体制の調査を実施し、プシア KEMRI、大阪市立大などとの共同体制づくりにむけた調査を行った。

A. 研究目的

今年度の研究目的はケニアにおけるエイズ・結核に関する疫学情報収集及び当該国における検査・治療の特性とその問題点の把握に努め、その改善点を追及すると同時に共同研究者からサンプルの譲渡を受け、種々の菌株の性状解析し、ネットワーク間での比較・検討すべく、その道筋を模索することである。

B. 研究方法

ケニアにおけるエイズ・結核に関する疫学情報集はケニア国公衆衛生省の Division of Leprosy, Tuberculosis and Lung Disease (DLTLD), CRDR, CMR (胸部疾患研究センター) JICAケニア事務所(菅本専門家)、KEMRIプシア支所(ムワウ所長)等から入手した。

今後の結核に関する共同研究の調整およびプロポーザルの準備を目下行っているとある。倫理面への配慮は特にない。

C. 研究結果

ケニアは結核の高蔓延国の22か国のうち、その一つに位置付けされ、結核対策は取り組むべき課題である。ケニアにおける2008年の結核患者発生数は約11万人で1990年代のその約10倍に増加している。これに対し、ケニア公衆衛生省は国家公衆衛生改善戦略計画(2008年から2012年まで)で結核対策を重点課題として取り上げている。またWHO, CDC、世界銀行などからの協力を得て、その検査と診断、治療体制の強化、結核対策のモニタリング、結核検査室の整備などの取り組みを推進した結果、患者発見率70%以上、治療成功率85%以上の国際目標を達成している(2009年:患者発見率85%、2008年:治療成功率85%)。

しかし、未だHIV結核の重複感染、多剤耐性結核患の増加、治療困難な症例の増加といった問題が大きな課題である。ケニアの結核の検査体制は技術的にも財政的にも十分に機能しているとは言いがたく、CDCなどのドナーの支援が無くてはならない。J

ICAケニア事務所はLED蛍光顕微鏡を用いた塗抹検査法の導入支援を行ってきている。今後もさらに本法の導入支援事業を推進するべく、専門家派遣事業を継続するとの事である。しかし、結核菌培養および薬剤感受性検査に至っては、CDC、MSFなどのドナーに依存しているのが実情である。以上がケニアにおける結核の現状と検査体制の概要であり、CDC等のドナーがほとんどの主要な地域をカバーしていて、我々が参入可能な残された地域はあまりない。しかし、我々、長崎大学ケニア拠点のP3ラボも結核の培養が可能になり、ブシアKEMRI、大阪市立大学、松本准教授との共同研究に向け、調整と整備を進めている。

D. 考察

本共同研究ではケニアグループの開始が遅れたために、準備に手間取り本格的な開始には至っていないというのが実情であるが、本研究によってサハラ以南アフリカで行われている結核に関する疫学・検査・治療の情報を共有し、またこのネットワークから得られる結核菌の耐性情報はこれからのこの地域の結核治療戦略に大きな意義がある。ケニアにおいても本ネットワークへの情報提供・共有が可能となるようサンプル入手と解析結果の共有化に向けて環境を整備していく予定である。またケニアのビクトリア湖周辺地域のビタ地区のフィールドで実施しているTBIについても結果が出次第、報告する予定である。

E. 結論

ケニアにおけるエイズ結核に関する疫学情報を収集し、解析するために、KEMRI、大

阪市立大学などとの共同研究体制構築を行い、ブシアやビクトリア湖周辺地域での調査体制を整えつつある。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Shingo Inoue, Ernest Wandera, Gabriel Miringu, Martin Bundi, Chika Narita, Salame

Ashur, Allan Kwallah, Amina Galata, Mwajuma Abubakar, Sora Suka, Mohamed Shah, Mohamed Karama, Masahiro Horio, Masaaki Shimada and Yoshio Ichinose. The Nuitm-Kemri P3 Laboratory in Kenya: Establishment, Features, Operation and Maintenance, Tropical Medicine and Health, Vol. 41 No. 1, p1-11, 2013

2) Akihiro Wada, Pooi-Fong Wong,

Hironobu Hojo, Makoto Hasegawa, Akitoyo Ichinose, Rafael Llanes, Yoshinao Kubo, Masachika Senba, Yoshio Ichinose. Alarin but not its alternative-splicing form, GALP

(Galanin-like peptide) has antimicrobial activity. Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 4, 2013

2. 学会発表

1) Yoshio Ichinose and Victor Okoth, A Study on Diarrheal Disease Agents in Mbita Area, Teamwork strengthening workshop of NUITM

- in Mbita, 4th May, 2012, Mbita, Kenya
- 2) 和田昭裕、長谷川慎、一ノ瀬昭豊、千馬正敬、一瀬休生 ケニアで分離された毒素原性大腸菌のバイオフィルム形成に関して 日本熱帯医学会総会
 - 3) 前野芳正、荻野倫子、河本聡、和久田光毅、富田万祐、石川球美子、佐々木潤、守口匡子、谷口孝喜、一瀬休生、ケニアにおけるロタウイルス感染症の分子疫学, 日本熱帯医学会総会
 - 4) 前野芳正、荻野倫子、河本聡志、和久田光毅、富田万祐子、石川球美子、佐々木潤、守口匡子、谷口孝喜、一瀬休生 ケニアにおけるロタウイルス感染症の分子疫学, 日本ウイルス学会
 - 5) Gabriel Miringu, Chika Narita, Martin Bundi, Sora Huka, Amina Galata, Victor Ager, Mwajuma Abubakar, Salame Ashur, Mohamed Karama, Shingo Inoue and Yoshio Ichinose, The 3rd Annual AfBSA Biological Safety Conference, Johannesburg, South Africa, 24-27th June 2012
 - 6) Koki Taniguchi, Wandera Ernest Apondi, Michiko Ogino, James Nyangao, Sora Suka, Martin Bundi, Satoshi Koumoto, Mitsutaka Komoto, Yoshimasa Maeno, Toshiyasu Shimizu, Takao Tsuji, Yoshio Ichinose Study on the distribution of G type and P type of human rotavirus Associated with acute gastroenteritis in Kenya, Asian Pacific Digestive Week 2012: Achieving Excellence in Gastroenterology and Hepatology, Bangkok, Thailand 5 - 8th, December, 2012
 - 7) Satoshi Komoto, Wandera Ernest Apondi, Michiko Ogino, James Nyangao, Sora Suka, Martin Bundi, Mitsutaka Wakuda, Yoshimasa Maeno, Takao Tsuji, Koki Taniguchi, Yoshio Ichinose Study on the distribution of G and P genotypes of human rotaviruses associated with acute gastroenteritis in Kenya. Asian-African research forum on emerging and reemerging infections 2013, Ministry of education, culture, sport, science and technology (MEXT), Japan Initiative for global research network on infectious diseases (J-GRID), January 23-24 2013, Tokyo medical dental University
 - 8) Sachiyo Nagi, Evans Chadeka, Faith Mutungi, Yombo Kalenda Dan Justin, Makoto Ito, Satoshi Kaneko, Yoshio Ichinose, Sohkiichi Mastumoto, Sammy Njenga, Toshihiko Sunahara, Masahiro Hashizume, Masaaki Shimada and Shinjiro Hamano. The morbidity and risk factors related to Schistosoma mansoni infection among primary school children in western Kenya
 - 9) Asian-African research forum on emerging and reemerging infections

2013, Ministry of education, culture, sport, science and technology (MEXT), Japan Initiative for global research network on infectious diseases (J-GRID), January 23-24, 2013, Tokyo medical dental university

10) Bii CC, Mashedi O, Ouko TT, Korir RK, Gatumwa EM, Abdi M, Yaguchi T, Yokoyama K, Ichinose Y,

Kangogo M, Kawamoto S, Matsuzawa T, Gono T Mycotoxin contamination of cereals at various consumer outlets in Kenya

11) KASH conference, KEMRI, Nairobi, Kenya, Feb. 2013

H. 知的財産権の出願・登録状況
特許取得、実用新案登録等特になし

厚生労働省科学研究補助金（地球規模保険課題推進研究事業）

分担研究報告書

ワクチン・薬剤評価系としての SHIV/サル感染 AIDS 発症モデルの開発

分担研究者

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。HIV/AIDS 根絶のために最も重要なワクチンについては開発の目処がたっていない。その原因のひとつとして適切な評価系としての動物モデルが確立されていないことが挙げられる。今回、我々は現時点で最良なモデルのひとつと考えられる SHIV/サル感染 AIDS 発症モデル系を開発した。このモデルはワクチンだけでなく薬剤の評価も可能である。この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。南アフリカ共和国にはサル感染症実験施設があるが、Animal Biosafety Level 2 (ABSL-2) と考えられ、ABSL-3 が要求される我々のモデルの技術移転は困難であると思われた。

A. 研究目的

ワクチン・薬剤評価系としての SHIV/サル感染 AIDS 発症モデル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支援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。近年、さらに積極的な取組みが行われている。高リスク集団への薬剤予防投与 (PrEP: Pre-exposure

Prophylaxis) である。PrEP に用いられる薬剤の前臨床試験はサルエイズモデルが多用されている。サハラ以南のアフリカの途上国、特に南アフリカ共和国では PrEP の臨床試験が積極的に行われている。前臨床試験用のサルエイズモデルの必要性は高い。

B. 研究方法

上記目的を達成するため、まず、我々が開発した SHIV/サル感染 AIDS 発症モデルが PrEP の前臨床試験に適しているかを

検討する。次に、このモデルについて、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、ザンビアそして南アフリカ共和国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

HIV-1 の野生株は CCR-5 好性が主流であり、CXCR-4 好性ウイルスはサハラ以南のアフリカの途上国においても少数の伝播に留まっている。我々が開発した SHIV/サル感染 AIDS 発症モデルでは CXCR-4 好性ウイルスを用いており、この点が最大の問題と考えられた。しかしながら、1) CXCR-4 好性ウイルスは徐々に増えつつあること、2) CCR-5 拮抗薬 (Maraviroc) の使用拡大により、CCR-5 好性ウイルスが駆逐される一方で、CXCR-4 好性ウイルスが優勢になる可能性が高いこと、などから、むしろ CXCR-4 好性ウイルスを用いた前臨床試験は必要であると判断した。次に実績について検討した。我々のモデルは、これまで HIV/AIDS の候補ワクチン、中和抗体、薬剤の評価に用いられてきた実績を有する。特に PrEP の前臨床試験として Tenofovir/Emtricitabine (TDF/FTC) が有効であることを確認済みである (G. 研究発表 1-1))。TDF あるいは TDF/FTC は臨床試験で広く効果が確認されつつある薬剤であり、今後の前臨床試験においては、これらの薬剤が比較対照となる。すなわち、我々は既に比較対照データを実績として有している。以上より、我々が開発

した SHIV/サル感染 AIDS 発症モデルは PrEP の前臨床試験に適していると判断した。

以上について今年度前半の班会議においてガーナ、ケニア、ザンビアそして南アフリカ共和国の共同研究者と情報を共有し、さらに技術移転の可能性について、南アフリカ共和国で検討した。当初、同国にはサル保護リハビリセンター等があり、動物愛護が優先されていることから、サルを用いた実験は困難であるとの見通しがあった。しかし、Kwazulu-Natal 結核エイズ研究所が属する Kwazulu-Natal 大学にはサル感染症実験施設があることが確認できた。一方で、その全容については今回の訪問では把握できなかった。

D. 考察

今年度の検討の結果、次の課題が考えられた。1) 南アフリカ共和国のサル感染症実験施設は Animal Biosafety Level 2 (ABSL-2) と考えられ、ABSL-3 あるいは advanced ABSL-2 (通称 ABSL-2.5) ではない可能性が高い。2) 我々のサルエイズモデルはバイオセーフティ規制上、ABSL-2.5 以上の施設での実験が求められる。サル感染症実験施設は、米国では国立施設で 8 箇所、日本では官民含めて 5 施設がある。いずれの施設でも SHIV を用いた感染実験は ABSL-2.5 以上の施設で行われている。特に日本では ABSL-3 という厳格な規制が適用されている。以上を考慮すると、現時点では、ABSL-3 が要求される我々のモデルの技術移転は困難であると思われる。しかしながら、南アフリカ共和国の規制がどうなっているか確認

する必要がある。米国はカルタヘナ条約を批准していないため SHIV を用いた感染実験は ABSL-2.5 で可能である。規制次第では、南アフリカ共和国においても SHIV 感染実験が可能である。2006 年時点で中国にはサル感染症実験施設が 5 箇所・260 ケージがあり、その後も増設されている。しかし、昨今の政治事情を考慮すると中国でのサル感染症実験施設を利用した共同実験は、今後かなり困難であることが予想される。この分野でのアフリカ地域での共同研究の進展が望ましい。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。

E. 結論

我々は HIV/AIDS のワクチン・薬剤の評価系として、現時点で最良なモデルのひとつと考えられる SHIV/サル感染 AIDS 発症モデル系を開発した。このモデル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。南アフリカ共和国にはサル感染症実験施設があるが、Animal Biosafety Level 2 (ABSL-2) と考えられ、ABSL-3 が要求される我々のモデルの技術移転は困難であると思われた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakasone T, Murakami T, Yamamoto N. Double oral

administrations of emtricitabine/tenofovir prior to virus exposure protects against highly pathogenic SHIV infection in macaques. Japanese Journal of Infectious Diseases, 65:345-349, 2012

- 2) Nakasone T, Kumakura S, Yamamoto M, Murakami T, Yamamoto N. Single oral administration of the novel CXCR4 antagonist, KRH-3955, induces an efficient and long-lasting increase of white blood cell count in normal macaques, and prevents CD4 depletion in SHIV-infected macaques: a preliminary study. Medical Microbiology and Immunology. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22772800, 2012

2. 学会発表

- 1) 仲宗根正. バイオリスク評価・バイオリスク マネージメントについて：国立感染症研究所における HIV 関連曝露事故対策. 第 12 回日本バイオセーフティ学会, 東京, 2012
- 2) 服部俊夫、鈴木定彦、山岡昇司、井戸栄治、一瀬休生、仲宗根正、久保亨、垣本和宏、白澤基紀、福本学、児玉栄一. 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の試み. 第 27 回日本国際保健医療学会大会, 岡山, 2012

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（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
日本赤十字社長崎原爆諫早病院・医師
長崎大学熱帯医学研究所・客員研究員

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、ケニア共和国をはじめとしたサハラ以南アフリカにおける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。現在はLAMP法とリアルタイムPCR法を用いた結核の簡易迅速分子診断・迅速薬剤耐性検査および分子疫学解析システムを開発し、サハラ以南アフリカの臨床検査ラボに導入すべく研究を進めている。

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、ケニア共和国をはじめとしたサハラ以南アフリカ諸国における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・導入を通じて同地域におけるHIV・結核感染のコントロールに寄与することを目指す。現在はLAMP法とリアルタイムPCR法を用いた結核の簡易迅速分子診断・迅速薬剤耐性検査および分子疫学解析システムの開発を行っている。

本研究によって得られる成果・エビデンス

はケニア共和国をはじめとする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

初年度である平成23年度はケニアの現地を訪れ、現地のカウンターパート（ナイロビと西部の地方都市ブシアのケニア国立医学研究所（KEMRI）の研究者およびブシアのdistrictとsub-district hospitalの医療従事者）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。

平成24年度はケニア共和国をはじめとするサハラ以南アフリカ諸国においても導入可能と考えられる結核の新しい遺伝子検査システム系の開発を行っており、従来法よりも迅速で低コストのリアルタイムPCR法とHigh Resolution Melt (HRM) 解析法を用いた結核菌の薬剤耐性変異の迅速スクリーニング検査法と分子疫学解析法の開発と臨床応用についての検討を行っている。分担研究者の勤務する日本赤十字社長崎原爆諫

早病院は結核病床20床を持ち、比較的結核患者数の多い長崎県央部ならびに県南部での結核診療の中心的役割を果たしているが、同院の結核患者の臨床検体（喀痰、気管支洗浄液等）からDNAを抽出し、Rotor-Gene QリアルタイムPCR機を用いてリアルタイムPCR法で*rpoB*、*katG*、*gyrA*などの結核菌の薬剤耐性関連遺伝子領域を増幅し、その後HRM解析法で変異の有無をスクリーニングする。HRM解析法は、温度を徐々に上昇させて二本鎖PCR産物を解離させ、そのパターンを解析することでわずか1塩基ペアの違いまで識別する方法であり、結核菌の薬剤耐性遺伝子変異の有無を約2時間でスクリーニングできると考えられる。また、現在結核菌の疫学解析に用いられているVNTR (Variable Number of Tandem Repeat) 法を、リアルタイムPCR法とMelt解析法によって行う系の開発も行っている。結核菌遺伝子を、VNTR分析法用プライマーを用いてリアルタイムPCR法で増幅しMelt解析を行えば、結核菌の分子疫学解析が可能な情報が得られ、2時間程で結核菌の感染経路を推定することが可能になると考えられる。

(倫理面への配慮)

結核遺伝子検査法開発研究に関しては、日本赤十字社長崎原爆諫早病院の倫理委員会より承認を受けて行っている。患者からの検体の提供に際しては担当医より検査に関する説明を行ってインフォームドコンセントを取った後に同意書を得ている。

C. 研究結果

平成23年度は7月に研究代表者ととも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プシアにおいて、HIV/結核感染の実態と医療体制に関する調査を行った。プシアにあるケニア国立医学研究所 (KEMRI) のDirectorであるDr Mwauや、プシアにあるsub-district hospitalのDr Amukangaや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情報交換した。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、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こととした。

本年度はリアルタイムPCR法とHRM解析法を用いた結核菌の薬剤耐性変異の迅速スクリーニング検査法の開発を行った。*rpoB*、*k*

atG、*gyrA*など計11の結核菌の薬剤耐性関連遺伝子に対するプライマーを作成し、HRM解析法により得られた結果と、ダイレクトシーケンシング法、培養法のより得られた結果を比較しながら系のvalidationを行っている。現在までに2例の薬剤耐性結核患者検体でHRM法とダイレクトシーケンシング法ならびに培養法とで一致する結果が得られている。今後さらに臨床検体数を増やして検討を行っていくことにしている。

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。プ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。

また、特殊な機器を必要とせず、従来法よりも迅速で低コストなリアルタイムPCR法とHRM解析法を用いた結核菌の迅速薬剤耐性検査法と分子疫学解析法は今後結核診療の現場に於いて検査法の主流となって行く可能性があると考えられる。

今後ケニアをはじめとするサハラ以南アフリカ諸国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

サブサハラのアフリカ、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

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。このように、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。

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表
該当するものなし。

2. 学会発表

久保 亨、松竹豊司、江原尚美、福島喜代康、河野 茂:リアルタイムPCR法を用いた結核菌の迅速薬剤耐性検査と分子疫学解析法についての検討. 第61回日本感染症学会東日本地方会学術集会

(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。

ザンビアにおける抗 HIV 治療アドヒアランスに関する研究

研究分担者

垣本和宏 大阪府立大学 教授

研究協力者

佐々木由理 名古屋市立大学

研究要旨 ザンビア共和国ムンブワ郡のヘルスセンターにおいて ART を開始する 15 歳以上の HIV 感染者を対象にアドヒアランスに関する半構造的質問票を用いたインタビュー調査を実施した。アドヒアランスの高い患者は全体の 6 割程度で、助成であること、配偶者の支援があることなどがアドヒアランスの高い要因であることを明らかにした。

A. 研究目的

アフリカにおけるエイズ患者への治療は急速に拡大しており、ザンビアにおいては治療を必要とする HIV 感染者の約 70% が抗 HIV 薬による治療（ART）を受けている。しかしながら、治療を正しく継続することは、エイズ治療の成功や薬物耐性ウイルスの出現の予防にも重要であるが、それは容易ではなくアフリカ諸国において ART のアドヒアランスが課題となっている。これまでのアフリカ諸国でのアドヒアランスに関する研究は比較的都市部で実施されてきたが、近年では地方においても ART が拡大してきており、農村部においての ART のアドヒアランスに関する研究は重要となって

きている。そこで、本研究においては、ザンビアにおいて ART を開始した初期のアドヒアランスを予知する因子を明らかにすることを目的に研究を実施した。

B. 研究方法

ザンビアの首都ルサカより約 150km 東部のムンブワ郡のヘルスセンターにおいて、ART を開始する 15 歳以上の HIV 感染者を対象に対して研究の説明を行った。説明後に同意が得られた対象者に対して、ART 開始時と開始後 6 週間後に半構造的質問票を用いたインタビュー調査を行った。アドヒアランスについては、調査日の前 4 日間において処方された薬を一度も飲み忘れるこ

となく時間通りに服薬した場合をアドヒアランスが高いと定義した。自己スティグマと鬱についての評価は既存の尺度を利用し、スコアの中央値をカットオフとした。また、食糧の充足度についても既存の尺度などを用いて評価した。インタビューに先立ち、インタビューアーに対しては3日間の研修を行った。アドヒアランスが高くなる要因については、 χ^2 乗検定または Fisher の正確確率検定にて p 値が 0.1 未満の変数を多変量ロジスティック回帰分析を用いて分析した。

C. 研究結果

調査期間中に新たに ART を開始し、データの欠損などのない 157 名を対象に分析を行った。年齢の中央値は 35 歳で、94 名 (59.9%) が女性で、105 名 (66.9%) が既婚、77 名 (49.4%) が7年間の初等教育を修了していなかった。また、107 名 (68.2%) の職業が農業で、61 名 (38.9%) が食糧不足を経験していた。ヘルスセンターへのアクセスに関しては、127 名 (80.9%) が交通費を支払う必要がなかったが、80 名 (51%) がヘルスセンターには徒歩で、85 名 (54.8%) が1時間以上かけて通院していた。約半数の 87 名 (56.5%) が自分自身へのスティグマを感じており、92 名 (58.6%) が鬱となっていた。

また、ART 開始後 6 週間では 157 名中 94 名 (59.9%) のアドヒアランスが高い群となった。

アドヒアランスが高いこととの関連は、「女性」および「配偶者に HIV 感染を告げていること」、「過去 30 日の食糧不足の経験」、「農家でないこと」が有意に関連して

いた。また、有意差は見られなかったが、配偶者も ART を受けている患者は ART へのアドヒアランスが高い傾向が見られた。

また、多変量解析を用いたアドヒアランスが高いことへの要因は、「女性であること」[AOR, 3.3; 95% Confidence interval (CI), 1.2 - 8.9]と、「ART を受けている配偶者がいること」(AOR, 4.4; 95% CI, 1.5 - 13.1)、「過去 30 日の食糧不足の経験」(AOR, 5.0; 95% CI, 1.8 - 13.8)となった。

D. 考察

アドヒアランスについて

アドヒアランスが高い患者は 59.9%のみであったが、これは他の研究に比較しても低い。その理由としては、今回の研究のアドヒアランスの定義が他の研究に比べて厳しく設定されていることが原因と考えられる。

アドヒアランスが高い要因について

女性であることがアドヒアランスの高い要因の一つになっているが、これは他の多くの論文でも同様の結果を示している。特に HIV 母子感染予防プログラムを通じて女性はエイズの初期段階から治療を受けていることが多いこと、女性の方が治療への反応が良いことなどが、その理由として挙げられている。しかしながら、女性のエイズ治療へのアクセスには様々なバリアーがあると報告されており、経済力の弱い女性や家庭内暴力など女性が弱い立場にある点は留意が必要である。

また、配偶者が ART を受けていることもアドヒアランスが高い要因となった。ART には通常、飲み忘れがないように治療パートナーを設定することが多いが、その治療

パートナーが ART を受けている配偶者の際には ART を受けていない配偶者より服薬支援に対して理解が深いと考えられた。ART を受けている配偶者による服薬支援がより有益であることから、今後、ART のアドヒアランスを向上させる対策を考慮する際には注目すべき結果と思われる。

今回の結果では食糧不足の経験が高いアドヒアランスの要因に挙げられたが、これは多くの研究結果とは異なる結論になった。しかしながら、同じくザンビアにおいて貧困による食糧不足のために様々な支援を受けている患者は、手厚い支援によりアドヒアランスも向上するとの報告もある。

他の研究で報告されている、自身へのスティグマや鬱については有意な関連は見られなかった。

E. 結論

配偶者や ART 中の患者からの社会的支援はアドヒアランスの向上には重要である、また、アドヒアランスの向上には男性と女性への社会的な影響の差異についてもより留意が必要である。貧困者削減対策についても ART のアドヒアランスの改善に貢献できる可能性も示唆された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Sasaki Y, Kakimoto K, Dube C, Sikazwe I, Moyo C, Syakantu G, Komada K, Miyano S, Ishikawa N, Kita K, Kai I. Adherence to antiretroviral therapy (ART) during the early months of treatment in rural Zambia: influence of demographic characteristics and social surroundings of patients. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2012 Dec 28;11(1):34

2. 学会発表

Yuri Sasaki, Kazuhiro Kakimoto, Christopher Dube, Kenichi Komada, Shinsuke Miyano, Naoko Ishikawa, Kiyoshi Kita, Ichiro Kai. Self-stigma and depressive symptom among patients who initiated antiretroviral therapy in rural Zambia. 第 31 回日本国際保健医療学会西日本地方会、堺市、3 月、2013 年

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

福島原発計画区域内外で採取された家畜サンプルの放射性セシウム集積に関する
調査

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 アフリカにおける土食 (geophagia) は、ミネラル不足を補う効果もあるが、土に含まれる重金属や放射性物質による健康障害が危惧されている。セシウムは胎盤を通して胎仔へ移行し、母体よりも軽度取り込みが大きいことが明らかとなった。放射性セシウムは、半減期が長いために健康障害が危惧されており、本研究結果はその基礎データとなる。

A. 研究目的

中国では新型トリインフルエンザ流行の兆しがみられ、感染症の脅威はなくならないどころか新興感染症の虞が高まっている。特にアフリカにおける土食 (geophagia) は、ミネラル不足を補う効果もあるが、重金属、放射性物質による中毒や細菌感染が危惧されており、現地の医師も警鐘を鳴らしている。特に妊婦の土食は胎児への影響が問題となる。アフリカの医師と連絡をとることが困難なため、わが国の土壌、特に福島原発による放射性物質の計測を行い、サハラ以南の試料が入手可能になった時点計測できる準備を整えることが目的である。

B. 研究方法

福島原発警戒区域内外の殺処分された家畜について臓器別に体内放射性物質の同定と放射能濃度を計測した。環境との関係を明らかにするために土壌採取も行った。(家畜の捕獲方法及び頭数など、方法の詳細は論文7.)

(倫理面への配慮)

動物に関してはすでに殺処分されたものについて解剖、採材するために動物倫理上、問題ない。

C. 研究結果

昨年度は牛において可食部位である骨

格筋に最大の放射性セシウム集積を認めた。今年度はさらに妊娠牛3頭と母・仔牛関係が明らかかな3組について臓器別の放射性物質の同定と放射能濃度を計測した。その結果、放射性銀とテルルは、仔牛、胎児ともに検出されなかった。放射性セシウムは各臓器で親牛と比較したところ、臓器に関わらず、仔牛で1.5倍、胎児で1.2倍放射能濃度が高かった。

D. 考察

本研究から銀やテルルは母親の特定臓器に不溶性の化合物となること、セシウムは胎盤を通して胎仔へ移行し、母体よりも軽度取り込みが大きいことが明らかとなった。放射性セシウムは、半減期が長いために健康障害が危惧されており、本研究結果はその基礎データとなる。

今後、継続的な計測が必要であることはもちろん、対象動物種、計測核種を広げて、放射線内部被ばくの動物臓器アーカイブ構築を目指す。

E. 結論

土食習慣では、感染症ばかりでなく重金

属、さらに global fallout を含めて放射性物質も問題となる。特に妊婦の異味症による土食もあるため、母体から胎児への物質移行は重要な問題である。本研究により、そのような物質の集積と移動に関する基礎的知見を得ることができた。

F. 健康危険情報

本研究に関連するものはない。

G. 研究発表

論文

1. Shimura T, Noma N, Oikawa T, Ochiai Y, Kakuda S, Kuwahara Y, Takai Y, Fukumoto M Activation of the AKT/cyclin D1/Cdk4 survival signaling pathway in radioresistant cancer stem cells *Oncogenesis* 1 e12; doi:10.1038/oncsis 2012
2. Masuda T, Itoh K, Higashitsuji H, Higashitsuji H, Nakazawa N, Sakurai T, Liu Y, Tokuchi H, Fujita T, Zhao Y, Nishiyama H, Tanaka T, Fukumoto M, Ikawa M, Okabe M, Fujita J Cold-inducible RNA-binding protein (Cirp) interacts with Dyrk1b/Mirk and promotes proliferation of immature male germ cells in mice *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(27) 10885-9 2012
3. Fukuda T, Kino Y, Abe, Y, Yamashiro H, Kuwahara Y, Nihei H, Sano Y, Shimada A, Shimura T, Fukumoto M, Shinoda H, Obata Y, Saigusa S, Sekine t, Isogai E, Fukumoto M Distribution of artificial radionuclides in abandoned cattle in the evacuation zone of the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant *PLOS ONE* 8(1) e54312. doi:10.1371/journal.pone.0054312 2013
4. Liu Y, Higashitsuji H, Higashitsuji Hi, Itoh K, Sakurai T, Koike K, Hirota K, Fukumoto M, Fujita J Overexpression of gankyrin in mouse hepatocytes induces hemangioma by suppressing factor inhibiting hypoxia-inducible factor-1 (FIH-1) and activating hypoxia-inducible factor-1 *Biochem Biophys Res Commun* 432(1) 22-7, 2013. doi: 10.1016/j.bbrc 2013.01.093
5. 福本 学, 被災動物放射能評価グループ 福島第一原子力発電所事故に伴う被災家畜の臓器別放射性セシウム濃度 *アイソトープニュース* No.696 10-3 2012
6. 福本 学 放射線影響の病理学 *Bio Clinica* 27(5) 23-8 2012
7. 福本 学 被災動物における放射能と人の関わり 畜産の研究 67(1) 33-40 2013
8. 福本 学, 被災動物線量評価グループ 福島原発警戒区域内の家畜における放射性物質の動態 畜産システム研究会報 36 17-20 2013