

A. 研究目的

- 研究班で収集された患者・検体・塩基配列情報をデータベース化し、疫学他の解析に容易に利用できるよう、入力・検索のインターフェースを作成する。
- HIV における分子進化学的手法を用いた塩基配列の大量解析の手法を開発する。
- データベースに蓄積した塩基配列データを用いて、わが国における HIV-1 感染の動態を把握する。
- 地域分布・サブタイプ・リスク行動等の因子が、動態とどう関連するかを解析する。

B. 研究方法（倫理面への配慮）

- Web サーバと DB サーバの連携によって、研究班が集める患者／検体情報を情報ネットワークを活用して効率的に収集・集積・検索するシステムを構築する。
- 上記の情報システムに蓄積された Protease-RT 領域の塩基配列データを用いて、距離行列を用いて領域ごとのサブタイプの一斉推定を行うとともに近隣接合法を用いた結果の検証を行う。
- 各サブタイプの塩基配列データを、近隣接合法と内部枝検定、最尤法とブートストラップ検定、Bayesian Markov Chain Monte-Carlo 法（ベイズ MCMC 法）と事後確率の推定の 3 方法でそれぞれ解析し、すべての方法で有意な単系統群をもって、国内の感染クラスタ（微小系統群：MC）または国際的感染クラスタと同定する。
- ベイズ MCMC 法を用いて、最適塩基置換モデル・進化パラメーター・時間系統樹トポロジー・感

染クラスタの tMRCA 推定、スカイラインプロット解析によるウイルス集団サイズの経時的変化の推定を行う。

- 組換え体変異とされたウイルス配列について、ブートスキャン法、PHI テスト、SplitsTree 解析を行い、その構造を解明する。
- それぞれの感染クラスターについて、記述疫学的解析を行う。

C. 研究結果

データベースに格納されている 2002 年度～2011 年度に初診で来院した患者の中で、初診時に検体が採取され、かつ Protease-RT 領域の塩基配列が完全に得られたものは 4393 検体あった。これらの検体配列には、既存のサブタイプや CRF のほか未知の組換え体が存在する可能性がある。4000 検体以上の配列を迅速・一斉な系統樹解析するために、本研究では検体配列とサブタイプリファレンス配列のアライメントにおいて、配列ウインドウ設定し、それをスライドさせることで部分配列アライメントを多数抽出し、これらについて検体とリファレンス間の平均置換塩基率を各々算出して比較する方法を用いた。分類後、それぞれのタイプにある配列は、各々系統樹解析にかけられ、サブタイプ・既知の CRF との関係が再検討された。その結果、95%以上の領域が Subtype B の配列が 3899、CRF_01 の配列は 344、Subtype C の配列は 46、Subtype G の配列は 15、Subtype F の配列は 9、Subtype D の配列は 1 であった（図 1）。残り 79 配列は、2 つ以上のサブタイプ間の組換え体である。これらの配列は、

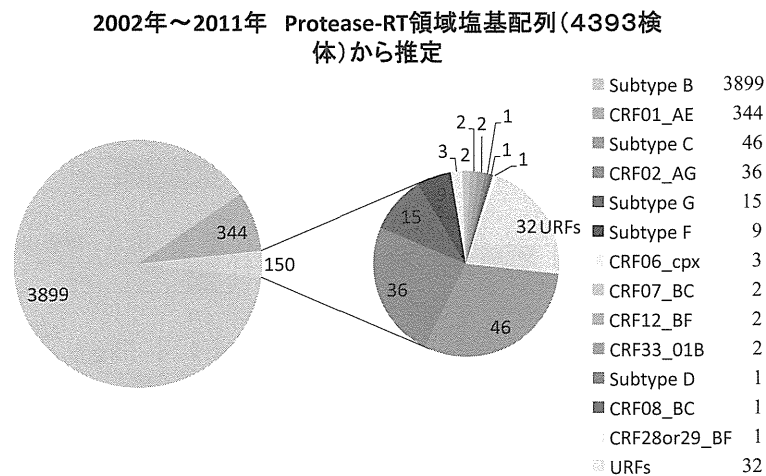


図 1 日本国内の HIV-1 サブタイプ・CRF の検出頻度

改めて CRF を含むサブタイプリファレンス配列と共にアライメントされ、分子系統樹解析にかけられた。その結果、CRF02_AG が 36 配列、CRF06_cpx が 3 配列、CRF07_BC, CRF12_BF, CRF33_01B がそれぞれ 2 配列、CRF08_BC, CRF28 または 29_BF (pol 領域の構造が同じで判別できない) がそれぞれ 1 配列見つかった。残りの 32 配列は、どの CRF ともクラスタリングせず、独特の組換え体 (URF) と考えられた。これらの組換え体は、ブートスキャン法および SplitsTree 法による構造解析の結果、図 2 に示す構造を持つことが推定された。

日本国内で優勢な HIV-1 のサブタイプ (Subtype B, CRF01_AE, CRF02_AG) について、分子系統樹解析を通じて病原体の感染動態を推定した。Subtype B 感染者 については、2002 年～2009 年までの 8 年間に pol 領域の塩基配列が解析できた 1 8 8 2 検体を、CRF01_AE 感染者 については、2002 年～2010 年 3 月までの 8 年 3 ヶ月間に pol 領域の塩基配列が解析できた 2 4 3 検体を、CRF02_AG 感染者 については、2002 年～2012 年 3 月までの 10 年 3 ヶ月間に pol 領域の塩基配列が解析できた 36 検体を以下の解析に entry した。これらのウイルスに感染した患者で優勢だったのは、Subtype B の場合は男性 1797 名 (95.5%)、MSM 1346 名 (71.5%)、日本人 1681 名 (89.3%) (図 3)、CRF01_AE の場合は男性 167 名 (68 %)、heterosexual 163 名 (67 %)、日本人 165 名 (68 %) (図 4)、CRF02_

AG の場合は、女性 23 名 (64%)、日本人 25 名 (69%) であった (図 5)。これらの配列に公開データベースにある国外採集の既知検体を加え、分子系統樹を推定した (Subtype B: 図 6, CRF01_AE: 図 7, CRF02_AG: 図 8)。系統樹のトポロジーおよび Protease - RT 領域の塩基配列から推定された各検体間の塩基置換数は、患者の来院した地域間および申告した感染経路のいずれにおいても、HIV-1 の遺伝的分化を生じていないことを示唆した。Subtype B で同定された MC は 247、MC に属する患者は 756 名、自分以外の日本由来の患者と直接の遺伝的関係を持たないウイルス (孤立ウイルス) に感染している患者は 1126 名であった (図 6)。CRF01_AE で同定された MC は 33、MC に属する患者は 8 1 名、孤立ウイルスに感染している患者は 1 6 2 名であった (図 7)。CRF02_AG で同定された MC は 6 つであった (図 8)。MC 構成員を互いに communication を持つネットワークとみなすと、Subtype B および CRF01_AE ではネットワークの度数分布はべき乗則に従い、スケールフリー性を持っていることが示唆された。また、そのスケールリング指数は Subtype B でより小さく、MSM で優勢なこのウイルスは異性間接触が優勢な CRF01_AE より感染コミュニティを広げやすい性質を持つことが示唆された (図 9)。一方、CRF02_AG の MC は、スケールフリー性を示さなかった。Subtype B では、ペアをのぞく大きな MC は、日本人男性のみで形成されていた。これら

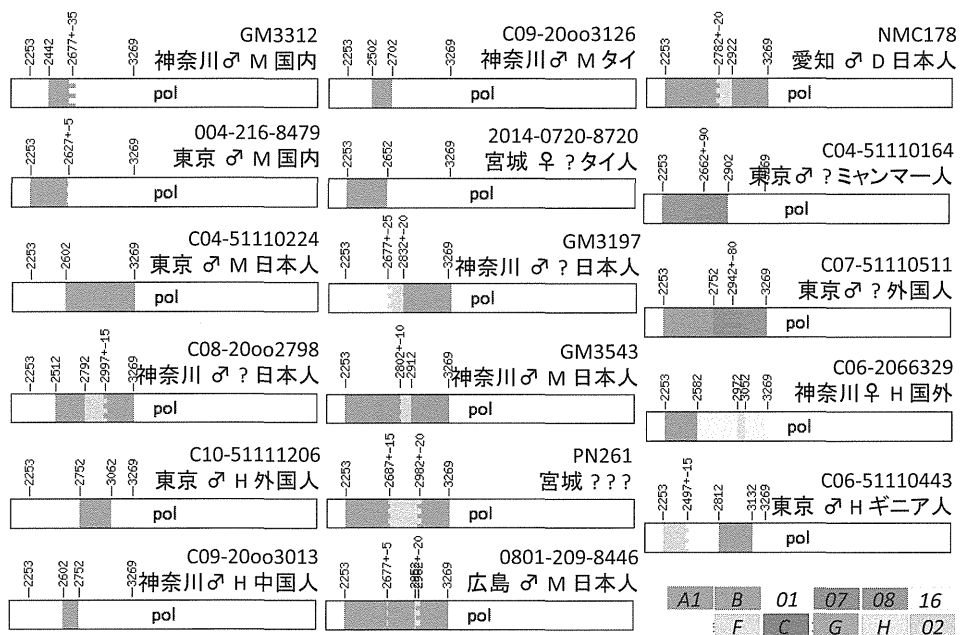


図 2 日本国内に見出された URF の pol 領域の構造

の患者のリスク行動は MSM が多く、異性間接触と宣言した患者も感染したウイルスは他の女性患者の持っているそれと遺伝的関連性が低いことから、ほぼすべてが同性愛者であることが推測された。CRF01_AE では、クラスタのサイズによって異なる疫学的特徴を見出した。3 患者以上が含まれる“大きな” MC は 5 つ見つかり、その構成員はほぼ半数が外国人で、女性比が比較的多く、MSM はほとんど含まれていなかった (図 1 0)。また、9 患者いる IVDU のうち 7 患者が、4 つの大きな MC に集中していた ($p < 0.001$)。一方、小さな MC は、日本人同士が多く、heterosexual couple と MSM 関連がほぼ同数であった (図 1 1)。Bayesian coalescence MCMC 法を用いて時間系統樹の推定と各 MC の起源配列の発生時期 (tMRCA) の推定を行なったところ、MC (国内感染クラスタ) の日本への伝播時期の分布は、Subtype B の場合 1990 年代後半に始まり 2000 年ごろにピークとなっていた。一方、CRF01_AE の場合は、96 年が最も古く、大きなクラスタは 2000 年代初めに、小さなクラスタは 2000 年代後半に集中して輸入されてきていることがわかった (図 1 2)。Subtype B の大きな MC について詳細な分岐構造を調べたところ、複数の地域に分布を広げる場合の様相には特定の傾向が見いだせなかった一方で、いくつかの MC においては、配列の分岐過程と薬剤耐性アミノ酸変異の伝播が明確に関連付けら

れた (図 1 3)。CRF01_AE については、各 MC ごとに東南アジアの特定の国との関連が示唆され、また東南アジアの IDU 集団で分化したウイルスの伝播も確認できた (図 1 4)。その他の希少な CRF に分類された検体は、元来の流行地から来日した外国人、または流行地での感染ケースに由来するものが多かった (図 1 5)。これらは、2000 年代に入ってから報告数が増える傾向にあり、世界における CRF の流行の広がりやを反映していると思われる。一方、CRF に分類できないユニークな組換え体 (URF) は、Subtype A, B, C, F, G, H, CRF02, 03, 07, 08, 40 の組み合わせからなる多様なものが発見された。そのうち 4 種類は、2 検体以上の患者に同一構造のウイルスであった (図 1 6)。Subtype B と CRF01_AE をもとにしたものは 11 種類あった。詳細な構造解析と部分系統樹解析からこれらのいくつかは共通する領域を持っていることがわかり、国内も含めた B-AE の共感染集団の可能性を示した (図 1 7)。B-F をもとにしたものは 4 種類あった (図 1 8)。CRF07, 08 を含んでいるもの、CRF16_A2D を含んでいるものがそれぞれ 1 種類 (図 1 9)、B-C をもとにしたものが 2 種類 (図 2 0) それぞれミャンマー・中国といった元の流行地域で感染した者から見出された。そのほか、海外でもマイナーなサブタイプの断片を含むものが 4 種類見出されたが、その多くはアフリカと関係がある者に感染していた (図 2 0)。

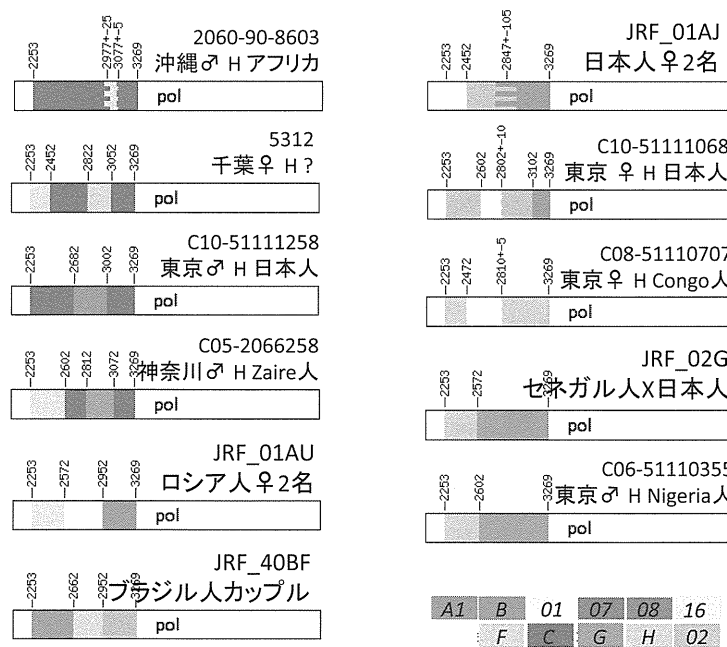


図 2 続き

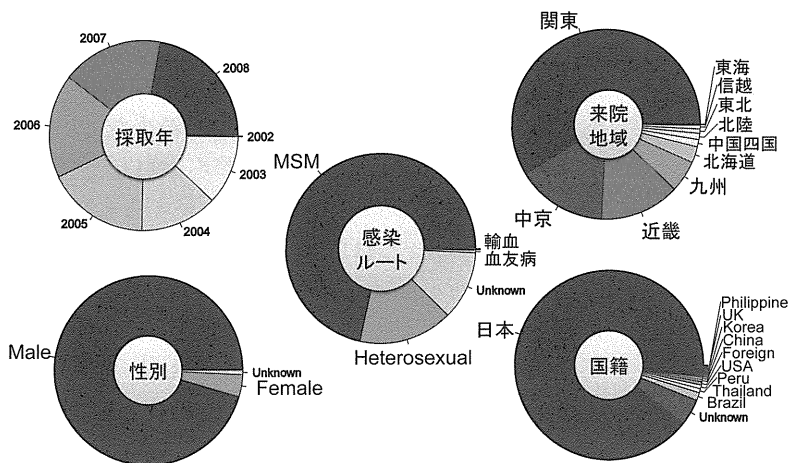


図3 Subtype B 感染者の概要

| | male | | female | | Unknown Total | | N | N | N | N |
|--------------------------------|------|------|--------|------|---------------|-----|------|---|---|---|
| | N | (%) | N | (%) | N | N | | | | |
| Nationality | | | | | | | | | | |
| Japanese | 128 | 52.7 | 36 | 14.8 | 1 | 165 | 67.9 | | | |
| Asian countries | 19 | 7.8 | 31 | 12.8 | 0 | 50 | 20.6 | | | |
| China | 1 | 0.4 | 3 | 1.2 | 0 | 4 | 1.6 | | | |
| Phillipine | 0 | 0.0 | 1 | 0.4 | 0 | 1 | 0.4 | | | |
| Vietnum | 3 | 1.2 | 0 | 0.0 | 0 | 3 | 1.2 | | | |
| Malaysia | 2 | 0.8 | 0 | 0.0 | 0 | 2 | 0.8 | | | |
| Indonesia | 4 | 1.6 | 4 | 1.6 | 0 | 8 | 3.3 | | | |
| Thailand | 5 | 2.1 | 19 | 7.8 | 0 | 24 | 9.9 | | | |
| Laos | 1 | 0.4 | 1 | 0.4 | 0 | 2 | 0.8 | | | |
| Myanmar | 3 | 1.2 | 3 | 1.2 | 0 | 6 | 2.5 | | | |
| South American countries | 1 | 0.4 | 1 | 0.4 | 0 | 2 | 0.8 | | | |
| Brazil | 0 | 0.0 | 1 | 0.4 | 0 | 1 | 0.4 | | | |
| Peru | 1 | 0.4 | 0 | 0.0 | 0 | 1 | 0.4 | | | |
| Unspecified | 4 | 1.6 | 2 | 0.8 | 0 | 6 | 2.5 | | | |
| Unknown | 13 | 5.3 | 4 | 1.6 | 3 | 20 | 8.2 | | | |
| Transmission category | | | | | | | | | | |
| High-risk heterosexual contact | 104 | 42.8 | 62 | 25.5 | | 166 | 68.3 | | | |
| Male-to-male sexual contact | 37 | 15.2 | - | - | | 37 | 15.2 | | | |
| Intravenous drug user | 7 | 2.9 | 2 | 0.8 | | 9 | 3.7 | | | |
| Unidentified | 16 | 6.6 | 10 | 4.1 | 5 | 31 | 12.8 | | | |
| Area of clinics and facilities | | | | | | | | | | |
| Hokkaido | 3 | 1.2 | 3 | 1.2 | 1 | 7 | 2.9 | | | |
| Tohoku | 0 | 0.0 | 0 | 0.0 | 0 | 0 | 0.0 | | | |
| Kanto | 112 | 46.1 | 48 | 19.8 | 3 | 163 | 67.1 | | | |
| Koushinetsu | 4 | 1.6 | 4 | 1.6 | 0 | 8 | 3.3 | | | |
| Toukai | 3 | 1.2 | 1 | 0.4 | 0 | 4 | 1.6 | | | |
| Chukyo | 23 | 9.5 | 13 | 5.3 | 0 | 36 | 14.8 | | | |
| Hokuriku | 1 | 0.4 | 1 | 0.4 | 0 | 2 | 0.8 | | | |
| Kinki | 15 | 6.2 | 2 | 0.8 | 0 | 17 | 7.0 | | | |
| Kyushu | 2 | 0.8 | 1 | 0.4 | 0 | 3 | 1.2 | | | |
| Okinawa | 2 | 0.8 | 1 | 0.4 | 0 | 3 | 1.2 | | | |
| Total | 165 | 67.9 | 74 | 30.5 | 4 | 243 | | | | |

図4 CRF01_AE 感染者の概要

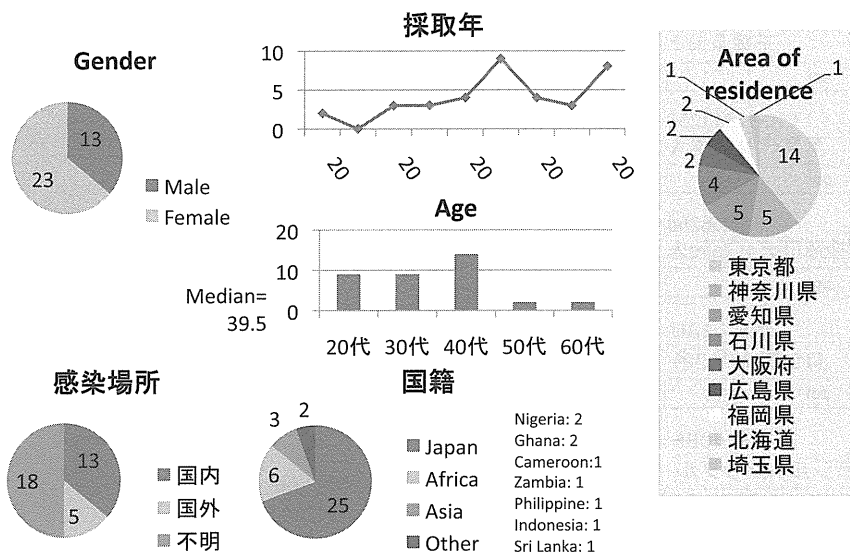


図5 CRF02_AG 感染者の概要

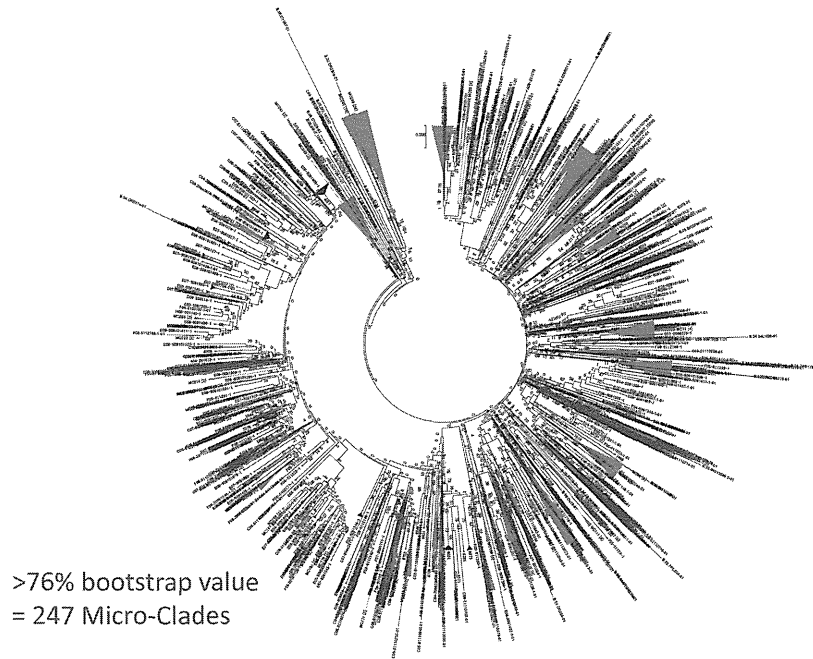


図6 距離行列法と近隣接合法による日本国内の Subtype B の分子系統樹要

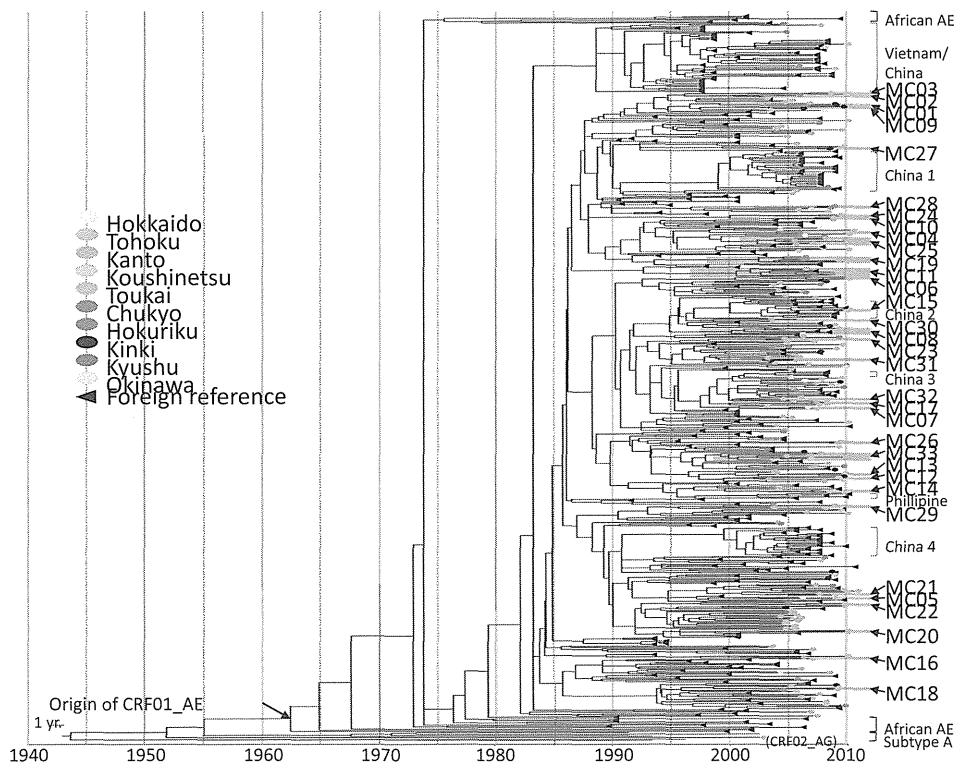


図7 CRF01_AE の BayesianMCMC 法による時間系統樹

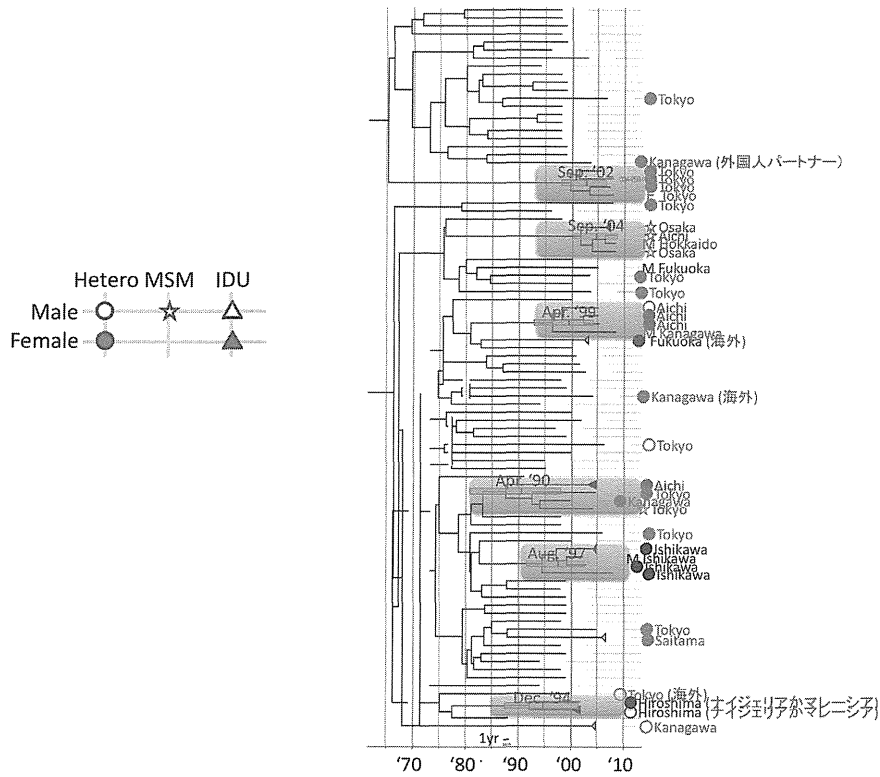


図8 CRF02_AG の BayesianMCMC 法による時間系統樹

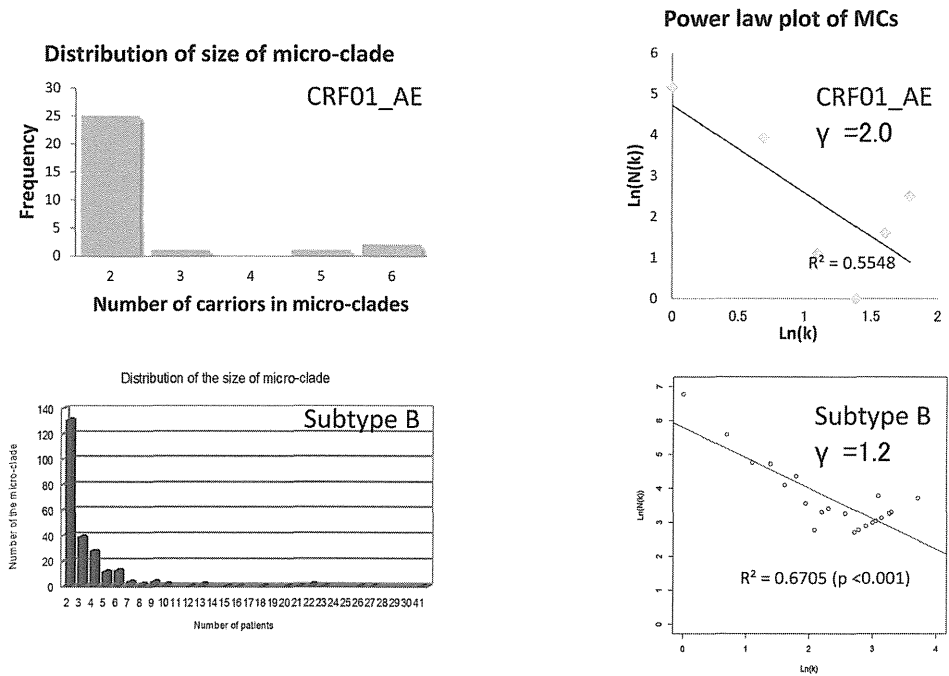


図9 Subtype B と CRF01_AE 感染者集団は、感染クラスタ・ネットワークにスケールフリー性がある

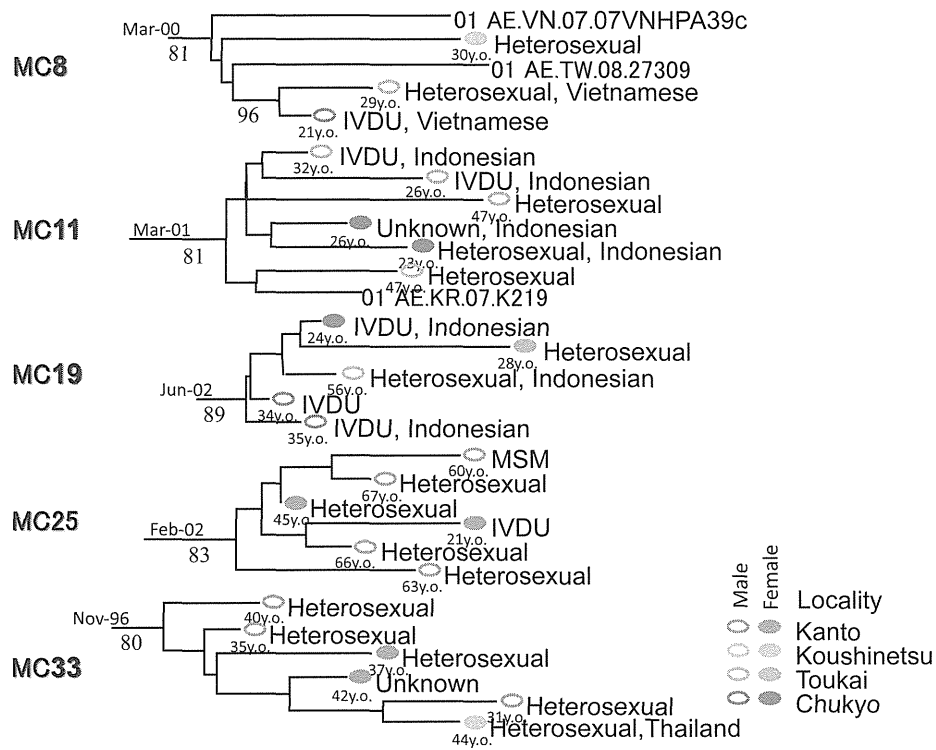


図 10 CRF01_AE の大きな感染クラスター

| ID. | %IBT | MDL | tMRCA | | Characteristics of individuals in the Micro-clades | | | | | |
|------|------|-------|--------|---------------|--|------------|-----|---------|----------|-------------|
| | | | Median | 95% HPD | Locality | Coll. date | Age | Gender | Behavior | Nationality |
| MC01 | 99 | 0.003 | 13-Jan | 24-Mar-30-May | Kinki | 15-Oct | 27M | MSM | Japan | |
| MC02 | 98 | 0.001 | 21-Oct | 20-Nov-9-Jun | Chukyo | 24-Dec | 52M | Hetero | Japan | |
| | | | | | Chukyo | 14-Sep | 65M | Hetero | Japan | |
| MC03 | 99 | 0.008 | 12-Feb | 7-Mar-27-Apr | Kanto | 13-Jun | 46M | MSM | Japan | |
| | | | | | Kanto | 2-Nov | 40M | MSM | Japan | |
| MC04 | 99 | 0.006 | 11-Nov | 5-Jan-30-Dec | Chukyo | 1-Jun | 51F | Hetero | Japan | |
| | | | | | Chukyo | 28-Jul | 58M | Hetero | Japan | |
| MC05 | 99 | 0.024 | 10-Dec | 20-May-19-Mar | Hokkaido | 1-Jun | 32M | MSM | Japan | |
| | | | | | Kanto | 20-Mar | 58M | Hetero | Japan | |
| MC06 | 99 | 0.013 | 19-Sep | 5-Aug-28-Oct | Kanto | 25-Dec | 46M | Hetero | Japan | |
| | | | | | Kanto | 25-Dec | 29F | Hetero | Japan | |
| MC07 | 98 | 0.010 | 24-Apr | 29-Aug-7-Jun | Hokkaido | 12-Jul | 35F | Hetero | Japan | |
| | | | | | Kanto | 15-Apr | 59F | Hetero | Japan | |
| MC09 | 99 | 0.015 | 4-Aug | 18-Jan-27-Jun | Kinki | 27-Feb | 43M | MSM | Japan | |
| | | | | | Kinki | 15-Sep | 56M | MSM | Japan | |
| MC10 | 99 | 0.003 | 5-Apr | 20-Jun-2-Apr | Kanto | 12-May | 35F | Unknown | Unknown | |
| | | | | | Kanto | 2-Jun | 29F | Hetero | Thailand | |
| MC12 | 97 | 0.014 | 22-Nov | 22-Apr-3-Nov | Kanto | 15-Dec | 29M | MSM | Japan | |
| | | | | | Kanto | 11-Nov | 36M | MSM | Japan | |
| MC13 | 99 | 0.006 | 12-Jun | 8-Jun-15-Oct | Kanto | 27-Apr | 47M | Unknown | Unknown | |
| | | | | | Kanto | 22-May | 35M | Unknown | Unknown | |
| MC14 | 99 | 0.000 | 19-Mar | 27-Apr-11-Jun | Kanto | 2-Jun | 45M | Hetero | Japan | |
| | | | | | Chukyo | 13-Jun | 44M | Unknown | Japan | |
| MC15 | 98 | 0.003 | 17-Feb | 16-Oct-14-Oct | Kanto | 10-Mar | 23M | Unknown | Unknown | |
| | | | | | Kanto | 16-Oct | 23M | MSM | Japan | |

図 11 CRF01_AE の小さな感染クラスター

| ID. | %IBT | MDL | tMRCA | | Characteristics of individuals in the Micro-clades | | | | | |
|------|------|-------|--------|---------------|--|------------|------|---------|----------|-------------|
| | | | Median | 95% HPD | Locality | Coll. date | Age | Gender | Behavior | Nationality |
| MC16 | 99 | 0.006 | 4-Aug | 7-Sep-23-Oct | Kanto | 9-Mar | 20sM | Unknown | Unknown | |
| | | | | | Kanto | 6-Dec | 28M | MSM | Japan | |
| MC17 | 99 | 0.003 | 6-Mar | 24-Sep-23-Jan | Kanto | 7-Mar | 44F | Hetero | Japan | |
| | | | | | Kanto | 8-Mar | 34M | IVDU | Foreign | |
| MC18 | 99 | 0.001 | 18-Jul | 16-Apr-26-Jan | Kanto | 30-Jan | 46M | Hetero | Japan | |
| | | | | | Toukai | 26-Feb | 39M | Unknown | Japan | |
| MC20 | 99 | 0.016 | 6-Dec | 30-Nov-8-Mar | Kanto | 13-Nov | 23M | Unknown | Unknown | |
| | | | | | Kanto | 10-Nov | 31F | Hetero | Myanmar | |
| MC21 | 99 | 0.023 | 16-Apr | 15-Oct-13-Dec | Kanto | 14-Dec | 25F | Hetero | Japan | |
| | | | | | Kanto | 2-Sep | 39M | Hetero | Japan | |
| MC22 | 99 | 0.019 | 23-Jan | 20-Oct-29-Jul | Kanto | 17-Aug | 33F | Hetero | Myanmar | |
| | | | | | Kanto | 4-Sep | 40M | Hetero | Myanmar | |
| MC23 | 99 | 0.005 | 12-May | 15-Oct-27-Apr | Toukai | 7-Oct | 50M | Hetero | Unknown | |
| | | | | | Toukai | 13-Oct | 50F | Hetero | Japan | |
| MC24 | 99 | 0.007 | 29-May | 20-Feb-8-Dec | Kanto | 13-Jan | 40sM | Unknown | Unknown | |
| | | | | | Kanto | 13-Aug | 73M | Hetero | Japan | |
| MC26 | 99 | 0.000 | 6-Oct | 9-Oct-7-Jan | Kanto | 9-Jan | 24M | Unknown | Unknown | |
| | | | | | Kanto | 13-Apr | 25M | MSM | Japan | |
| MC27 | 99 | 0.003 | 4-Sep | 22-Dec-18-May | Kanto | 11-Mar | 25M | Hetero | Japan | |
| | | | | | Kinki | 20-May | 26M | MSM | Japan | |
| MC28 | 99 | 0.004 | 22-Apr | 24-Jan-20-Dec | Chukyo | 9-Jan | 65F | Hetero | Japan | |
| | | | | | Chukyo | 14-Jul | 66M | Hetero | Japan | |
| MC29 | 97 | 0.014 | 13-Sep | 22-May-3-Apr | Kanto | 4-Sep | 49M | Hetero | Japan | |
| | | | | | Kanto | 19-Nov | 28M | MSM | Japan | |
| MC30 | 98 | 0.021 | 23-May | 16-Jan-14-May | Kanto | 15-May | 28M | Hetero | Japan | |
| | | | | | Kanto | 15-May | 46M | Hetero | Japan | |
| MC31 | 96 | 0.009 | 6-Feb | 29-Aug-27-Nov | Kanto | 15-Jul | 68M | Hetero | Thailand | |
| | | | | | Kanto | 31-Aug | 62F | Hetero | Japan | |
| MC32 | 98 | 0.024 | 8-Sep | 10-Nov-22-Feb | Kanto | 18-Jun | 41M | Hetero | Japan | |
| | | | | | Kanto | 21-Apr | 52M | Hetero | Japan | |

図 11 続き

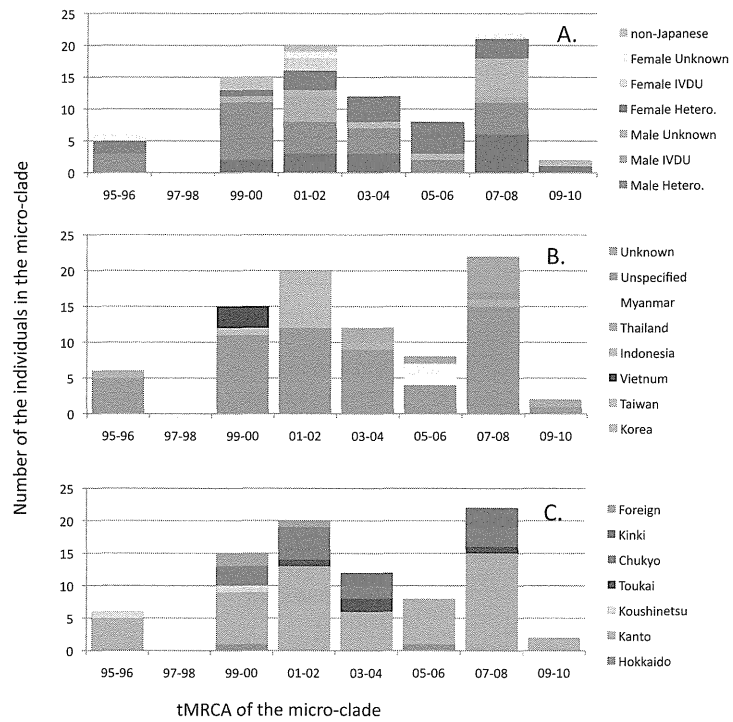


図 12 CRF01_AE の感染クラスタの共通祖先の存在時間分布

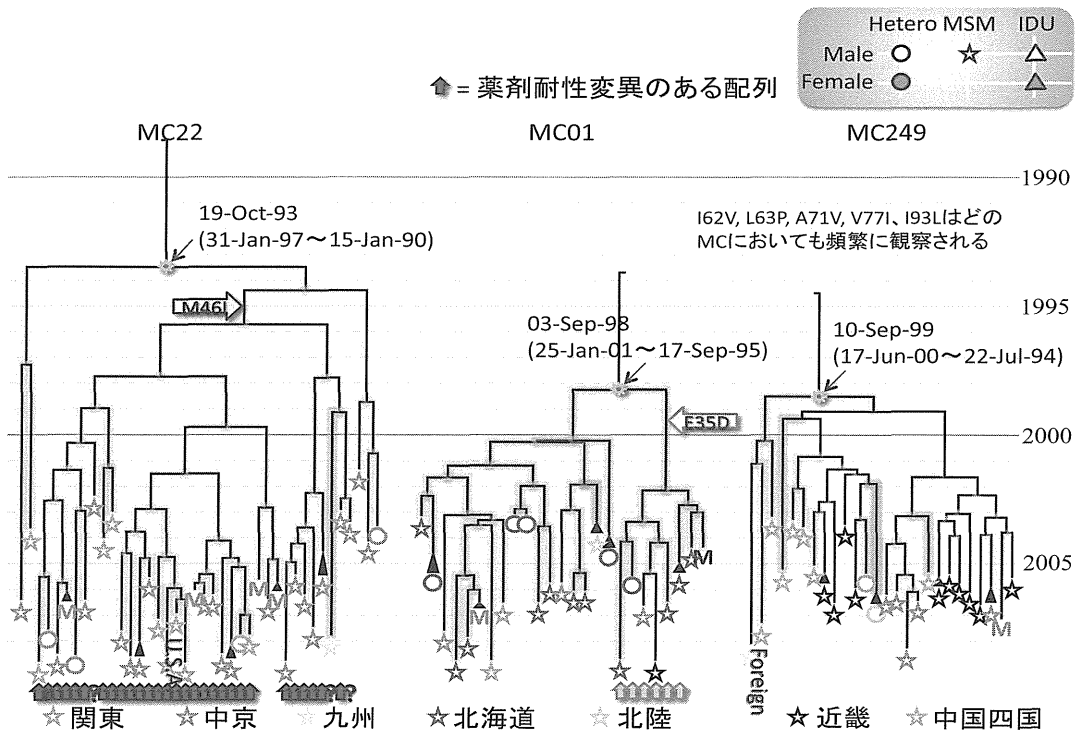


図 13 Maximum clade credibility trees of some large Micro-Clades

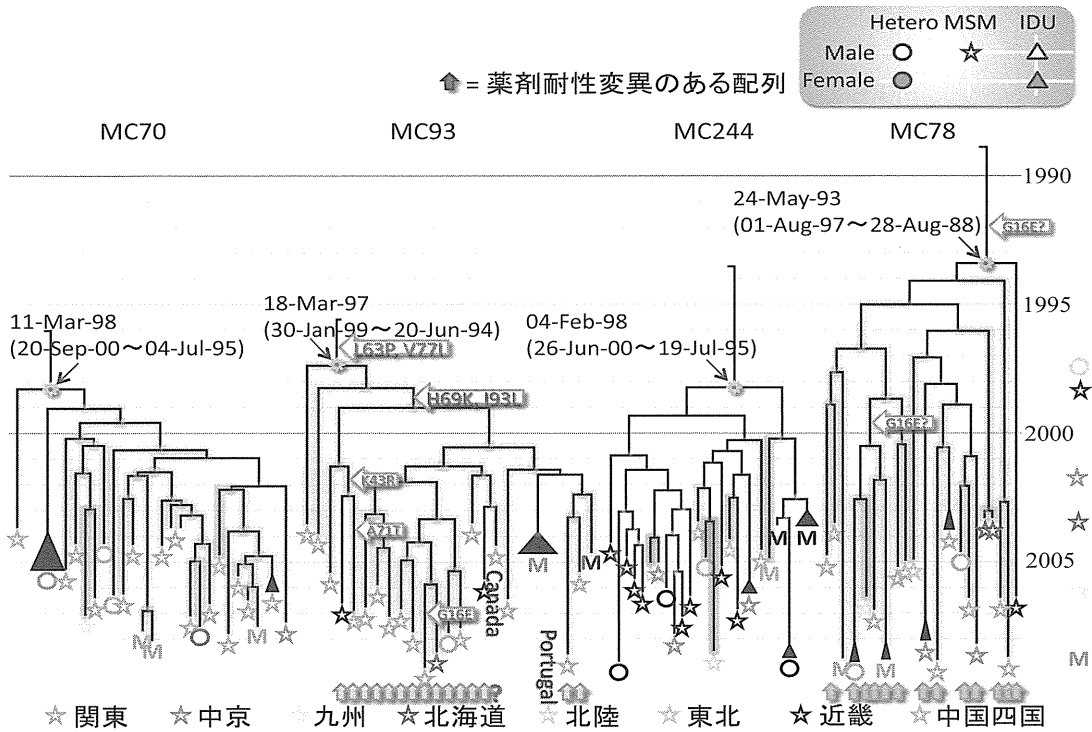


図 13 続き

| Cluster | tMRCA | | | | Locality | Date | Age | Gender | Behavior | Nationality |
|---------------|--------------------------------------|-------|--------------|---------------|------------|---------------------------------------|-----|--------|----------|-----------------------|
| | %BT | MCL | Median | 95% HPD | | | | | | |
| Vietnam/China | 96 | 0.026 | 5-Dec | 5-Mar-23-Mar | Kyushu | 17-Aug | 26 | F | Hetero. | Japan |
| | | | | | Chukyo | 4-Oct | 24 | M | Hetero. | Japan |
| | | | | | Chukyo | 3-Oct | 62 | M | Hetero. | Japan |
| | | | | | Kanto | 27-Jul | 35 | M | MSM | Japan |
| | | | | | Kanto | 7-Aug | 54 | M | Hetero. | Japan |
| | | | | | Toukai | 15-Oct | 43 | M | Unknown | Japan |
| | | | | | Kanto | 25-Nov | 66 | M | Hetero. | Japan |
| | | | | | Vietnam | 35 reference sequences (see Table S1) | | | | |
| | | | | | China | 7 reference sequences (see Table S1) | | | | |
| | | | | | France | 2 reference sequences (see Table S1) | | | | |
| Czech | 2 reference sequences (see Table S1) | | | | | | | | | |
| China1 | 95 | 0.018 | 7-Oct 31-Dec | 25-Dec | Chukyo | 21-Nov | 32 | F | Unknown | China |
| China2 | 96 | 0.022 | 1-Feb 15-Aug | 3-Dec | MC15 | 2 individuals in Japan | | | | |
| Philippine | 99 | 0.018 | 28-Aug | 9-Jun. 20-Feb | Kanto | 13-Sep | 30 | M | MSM | Japan |
| | | | | | Philippine | | | | | 3 reference sequences |

図 14 CRF01_AE のリファレンス配列に見られる感染クラスター

| CRF | 地域 | 年 | 性別 | 年齢 | リスク | 感染場所 | 国籍 | |
|----------|-----|-----|----|----|--------|------------|----------|----------|
| 06_cpx | 北海道 | '08 | M | 42 | ? | 海外 | 外国人 | Cluster |
| | 愛知県 | '09 | M | 36 | Hetero | Nigeria | Nigeria | |
| | 愛知県 | '09 | F | 36 | Hetero | Nigeria 日本 | 日本 | |
| 07_BC | 東京都 | '08 | M | 57 | ? | ? | 日本 | 遺伝的関連はない |
| | 大阪府 | '10 | F | 34 | Hetero | 海外 | 外国人 | |
| 08_BC | 東京都 | '10 | M | 26 | ? | ? | 外国人 | |
| 12_BF | 東京都 | '10 | M | ? | ? | ? | ? | Cluster |
| | 東京都 | '10 | M | 23 | Hetero | ? | Peru | |
| 28 29_BF | 愛知県 | '05 | M | 35 | Hetero | ? | Brazil | |
| 33_01B | 北海道 | '09 | M | 49 | Hetero | ? | 日本 | 遺伝的関連はない |
| | 大阪府 | '03 | M | 34 | MSM | 海外 | Malaysia | |

- 外国人および外国人との接触が多い(9/11)。元来の感染地域からの輸入
- 5年以内の直近の報告が多い(9/11)

図 15 その他の CRF 感染者の概要

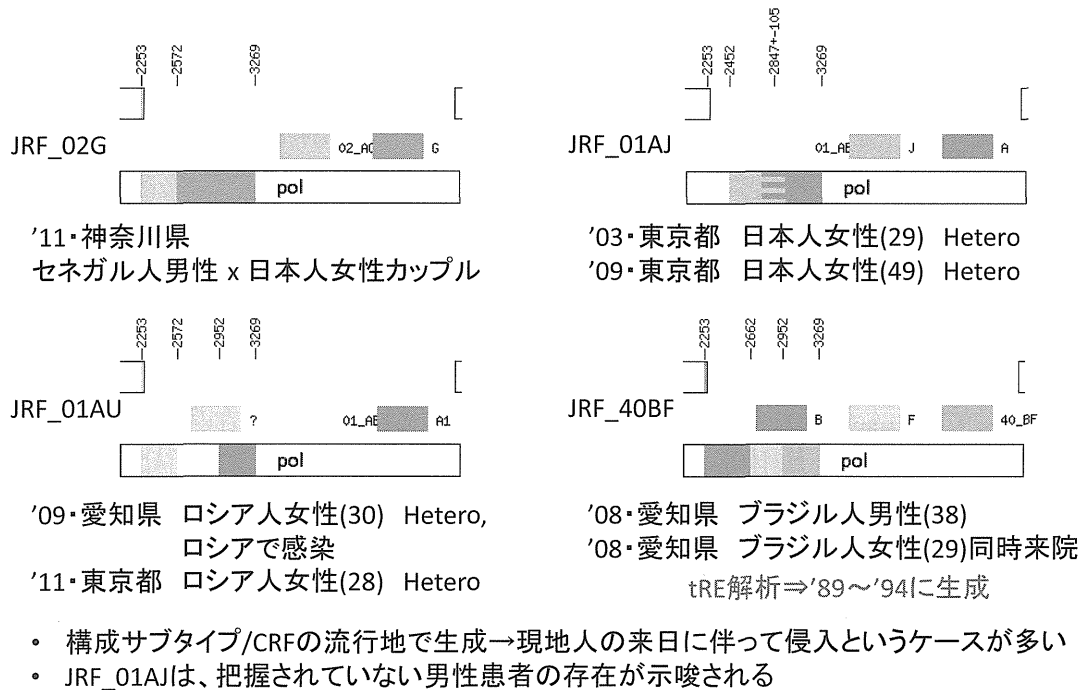


図 16 日本国内で見出された二名以上の感染者に感染していた URF

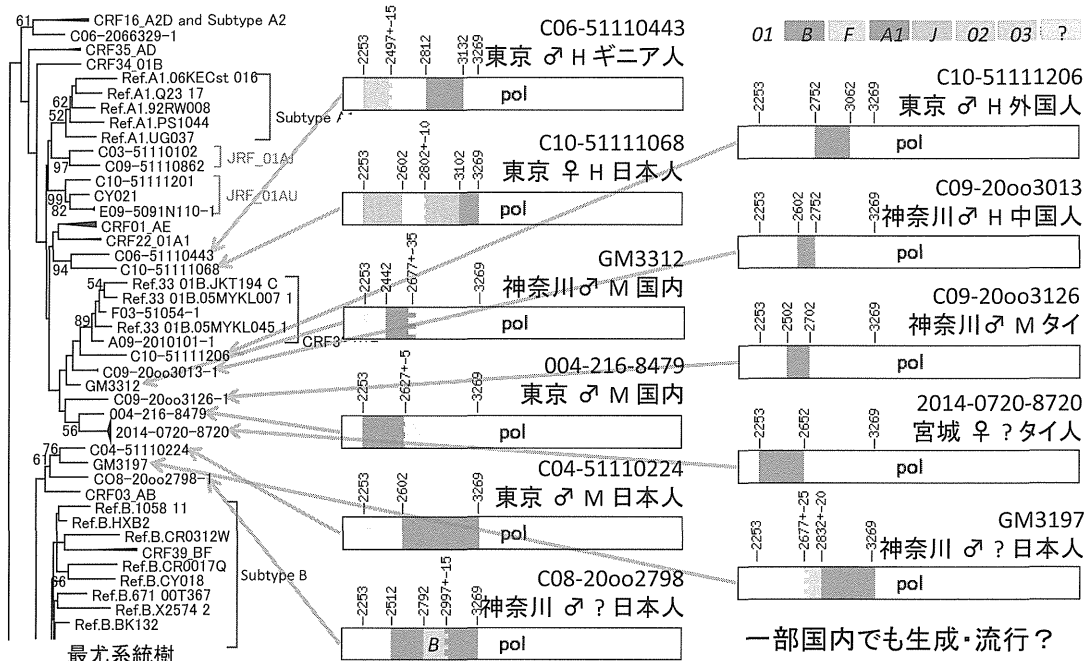


図 17 日本国内で見出された B と AE を主成分とした URF

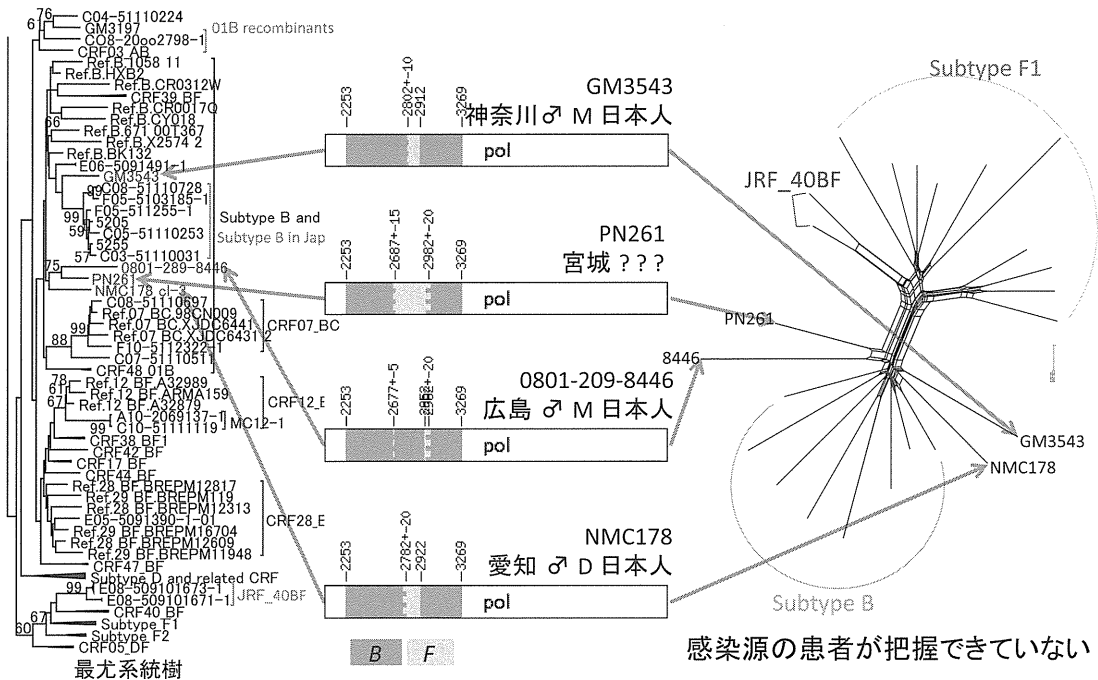


図 18 日本国内で見出された B と F を主成分とした URF

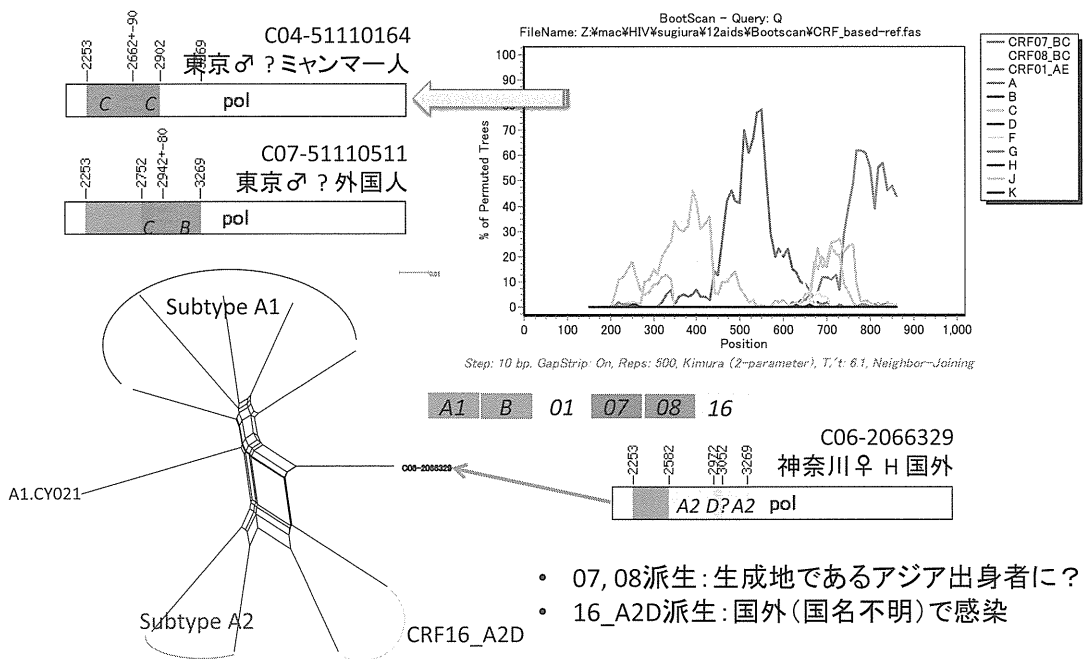
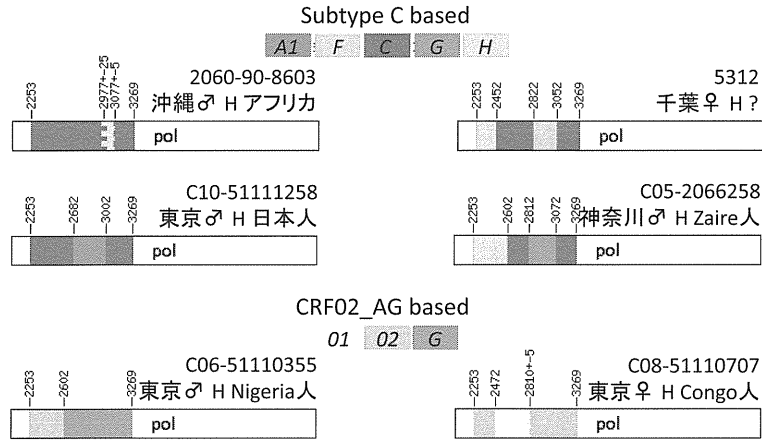


図 19 日本国内で見出された CRF07, 08, 16 を含む URF



- C, AGの流行地である、アフリカ出身またはアフリカでの感染が多い

図 20 日本国内で見出された C と希少サブタイプからなる URF と、CRF02_AG を主成分とした URF

D. 考察

本研究は、phylodynamics と呼ばれる最新の分子疫学的手法を用いて、わが国の HIV-1 感染集団の疫学的な動態を推定した初めてのものである。その解析は、4000 以上の検体情報・塩基配列を対象とした大規模なもので、わが国における HIV-1 の感染状況を知る上で貴重な情報を提供するとともに、大規模データを扱う際に欠かせない自動解析手法の開発にも寄与した。わが国の HIV-1 はサブタイプ毎に異なるリスク集団に感染していることが従来から指摘されていたが、本研究はそれを再確認した。さらに、リスク集団毎に異なる病原体との相互関係のため、その感染動態は極めて異なる様相を呈していることがわかった。

国内の Subtype B 感染は、これまで示唆されていた以上に MSM が感染拡大に関わっていることが明らかとなった。MSM はまた、ほかのリスク因子に比べて、ネットワークの形成規模が大きい。一方で、地域的な伝播については、個々の感染クラスタによってかなり異なる結果が得られている。このことは、国内の MSM の社会的ネットワークが、地域との関わりが多様な多数の分集団からなりたっていることを示している。これらの知見は、我が国で最も感染を拡大している HIV-1 サブタイプである Subtype B の感染防止を考える際に、MSM コミュニティごとのきめ細やかな対策が必要であることを示してい

る。今後の Subtype B 感染対策には、臨床分野のみならず社会学分野とこうした認識を共有することが大切であると思われる。

国内の CRF01_AE の MC 構成員のネットワーク度数がべき乗則に従うことは、我が国の CRF01_AE 感染者の感染に係るネットワークがスケールフリー性を持っていることを示唆している。このことは、CRF01_AE への感染者の大半は他者に感染を広げることはないかあるいは特定のパートナーにしか広げないが、一部のハイリスクなコミュニティにおいて感染が広がる傾向があることを示している。大きな MC (感染ネットワーク) は、外国人と IVDU が独立に関わっていることが明らかのため、ハイリスク・コミュニティのリスク因子はこれら 2 つであると考えられる。これらの知見は、我が国の CRF01_AE 感染対策の標的集団の想定に、有用であると思われる。

その他の組換え体ウイルスの動態は、我が国の主要なサブタイプである Subtype B と CRF01_AE とは異なっていた。組換え体ウイルスは 01_AE, 02_AG などの古くから存在するものを除くと、2000 年代になって急激にその種類を増やしていた。こうしたウイルスは、生成地から直接輸入されていることが推測され、輸入感染症と違って差し支えないと思われる。一方、我が国に流行する 2 つのウイルス型であるサブタイプ B と CRF01_AE の間には、すでに国内産の組換え体が生成している可能性がある。この

ことは、我が国も少ない割合ではあるが新たな HIV-1 変異体の供給元になっていることを示しており、アジア全体の公衆衛生を考える際に考慮すべき問題であろう。CRF02_AG については、特定の感染が広がりやすいコミュニティを通じてわが国に広がりつつあるという結果が得られた。これらのコミュニティは、女性が主要な構成要員である点が従来のサブタイプと大きく異なり、今後の動向調査が望まれる。組換え体ウイルスは数こそ少ないが、サブタイプごとに薬剤耐性変異、免疫への応答性等が異なるとの報告があることを考えると、疾病対策上特異な地位を占める。こうした組換え体ウイルスの動向を把握し診断等に反映することが、今後の HIV 制圧戦略に必要とされるだろう。

E. 結論

- 我が国において、Subtype B は日本人男性同性愛者のコミュニティで 200 を超える多数の感染クラスターを形成して感染を広げているが、感染拡大の様相は個々のコミュニティの特性に依存して様々である。
- 日本国内の CRF01_AE 感染集団は、90 年代初頭から国内で感染を広げている少数のネットワークと、最近になって感染した小さなネットワークに分類され、大きなネットワークには、東南アジアからの来訪者と IVDU の関与が疑われる。
- ネットワーク解析の結果、Subtype B のほうが CRF01_AE より大きな感染コミュニティを構成することがわかった。
- 我が国において、非 B 非 AE 型の HIV-1 は全体の約 3.4% と低頻度だが、疫学的な特徴が異なることから、公衆衛生上無視できない。
- CRF02_AG は、外国人を含む異性接触コミュニティで、特に女性に多く感染する特異性を持っていた。
- その他の CRF と URF は、構成するサブタイプの元の分布地と関連を持ち、海外での発生と日本への感染という新興輸入感染症の様相を呈していたが、B と AE の間の URF は、国内でも発生している可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1) 原著論文

G. 研究発表

1) 原著論文

1. Shiino T. Phylodynamic analysis of a viral infection network. *Front. Microbiol.* 3:278-282, 2012.

2) 口頭発表

海外

1. Shiino T, Sadamasu K, Hattori J, Nagashima M, Iwatani Y, Yokomaku Y, Sugiura W. Molecular phylogenetic analysis of nationwide HIV-1 infection in Japan: Spreading dynamics of the epidemic estimated from surveillance data from 2003 to 6th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention, 2009 17-20 July 2011, Roma, Italy.

国内

1. 椎野禎一郎, 貞升健志, 長島真美, 服部純子, 杉浦 互. 国内感染者集団の大規模塩基配列解析 1: CRF01_AE の動向と微小系統群の同定. 第 24 回日本エイズ学会学術集会総会 (東京), 2010 年 11 月 24~26 日
2. 椎野禎一郎, 服部純子, 瀧永博之, 吉田 繁, 伊藤俊広, 上田敦久, 近藤真規子, 貞升健志, 藤井毅, 横幕能行, 上田幹夫, 田邊嘉也, 渡邊 大, 森治代, 藤井輝久, 南 留美, 健山正男, 杉浦 互. 国内感染者集団の大規模塩基配列解析 2: Subtype B の動向と微小系統群の同定. 第 25 回日本エイズ学会学術集会総会, 2011 年 12 月. 東京
3. 椎野禎一郎, 服部純子, 瀧永博之, 吉田 繁, 伊藤俊広, 上田敦久, 近藤真規子, 貞升健志, 藤井毅, 横幕能行, 上田幹夫, 田邊嘉也, 渡邊 大, 森治代, 藤井輝久, 南 留美, 健山正男, 杉浦 互. 国内感染者集団の大規模塩基配列解析 3: 希少サブタイプとサブタイプ間組換え体の動向. 第 26 回日本エイズ学会学術集会総会, 2012 年 11 月. 横浜

H. 知的所有権の出願・取得状況

該当なし

愛媛県及び近郊における薬剤耐性 HIV の動向調査研究

～四国ブロックにおける薬剤耐性 HIV の動向調査研究～

研究分担者 高田 清式 愛媛大学医学部附属病院総合臨床研修センター・感染症内科教授

研究協力者 村上 雄一 愛媛大学医学部附属病院 感染症内科

井門 敬子 愛媛大学医学部附属病院 薬剤部

研究要旨

四国における新規患感染者の HIV 伝搬の現状を把握する目的で、未治療 HIV 感染者の薬剤関連変異について解析、検討した。平成 23、24 年の解析では、明らかな耐性株はなくプロテアーゼ領域で二次変異を認めるのみであった。また逆転写酵素領域でも明らかな一次変異は認めなかった。なお、インテグラーゼ領域においては平成 24 年の解析では V72I が多くで検出され、薬剤耐性のレベルは低く有効性に影響はないと考えられている E157Q も 1 例で検出された。今後四国全体の HIV 診療の充実を目的に、さらに薬剤関連変異を多くの施設で検討・把握し、HIV に対する治療効果を上げていくことが必要と考える。

A. 研究目的

本邦における薬剤耐性 HIV の動向把握調査において、四国ブロックにおける HIV 感染者の HIV 伝搬の現状を把握する目的で、新規あるいは未治療 HIV 感染者の薬剤関連変異について調査し、解析検討した。さらに、これらの調査研究を行うことにより、四国全体の HIV 診療の充実につながることを期待される。

B. 研究方法

対象は、平成 23 年 1 月から 12 月までに愛媛大学医学部附属病院を受診した HIV 感染者のうち新規あるいは未治療者とし、うち計 18 名を検査した。薬剤耐性検査とサブタイプ解析は、初診時または服薬開始前の検体を用いて行った。検査の同意を得た後、検査は外部の委託機関と検査会社に委託した。

(倫理面への配慮)

患者には担当医から十分な説明を行った後、同意

を得た者に検査を行った。なお、患者および関係者に対する人権の保護に配慮して行い、調査に協力できない場合も不利益にならないようにした。また本研究は、愛媛大学医学部附属病院倫理委員会で承認を受けている。

C. 研究結果

期間中の当院新規患者は、平成 23 年 18 例、平成 24 年 13 名であったがそのうち、すでに平成 23 年の 4 名、平成 24 年の 4 名は前医で治療を受けていた。残り 23 名の患者のうち平成 23 年 11 名、平成 24 年 7 名に対して耐性検査を行った。問診と免疫学的検査結果からは、感染初期と判断される例はなかった。

平成 23 年の耐性検査の結果(表 1)では、プロテアーゼ領域では 11 例中全例で耐性に関する変異が見られたが、いずれも二次変異であった。それらのうち頻度の高い変異としては、I15V が 7 例、

表 1 薬剤耐性変異検査を行った新規未治療 HIV 感染者の解析 (平成 23 年)

| | プロテアーゼ領域変異 | 判定 | 逆転写酵素領域変異 | 判定 | インテグラーゼ領域変異 | 判定 |
|----|----------------|----|-----------|----|-------------|----|
| 1 | I62V、L63P、V77I | S | — | S | — | S |
| 2 | I15V、A71V | S | — | S | — | S |
| 3 | L10V、I15V、G16E | S | — | S | — | S |
| 4 | V77I | S | — | S | — | S |
| 5 | I15V、I62V、A71V | S | — | S | — | S |
| 6 | I15V、I62V、A71V | S | V179D | S | — | S |
| 7 | I15V、A71V | S | — | S | — | S |
| 8 | I15V、A71V | S | — | S | — | S |
| 9 | I15V、A71V | S | — | S | — | S |
| 10 | M36I | S | — | S | — | S |
| 11 | L10I、G16E、L63P | S | — | S | — | S |

表 2 薬剤耐性変異検査を行った新規未治療 HIV 感染者の解析 (平成 24 年)

| | プロテアーゼ領域変異 | 判定 | 逆転写酵素領域変異 | 判定 | インテグラーゼ領域変異 | 判定 |
|---|---------------------|----|-----------|----|-------------|-----|
| 1 | A71T、V77I | S | — | S | V72I | S |
| 2 | I62V、L63P | S | — | S | V72I | S |
| 3 | V77I、I15V、I62V、L63P | S | — | S | V72I | S |
| 4 | L33F、M36I、L63P | S | V179D | S | — | S |
| 5 | L10I、I15V、I62V、A71T | S | — | S | — | S |
| 6 | I15V、G16E | S | V179D | S | — | S |
| 7 | L63P、A71T、V77I | S | A98S | S | E157Q | R*1 |

R*1:RALに耐性

A71Tが6例、I62Vが3例に認められた。また、逆転写酵素領域ではV179Dが1例に認められた。インテグラーゼ領域では、変異は検出されなかった。

平成24年の耐性検査の結果(表2)では、プロテアーゼ領域では7例中全例で耐性に関する変異が見られたが、いずれも二次変異であった。それらのうち頻度の高い変異としては、L63Pが4例、I15V、I62V、A71T、V77Iなどが3例に認められた。また、逆転写酵素領域ではV179Dが2例、A98Sが1例に認められた。インテグラーゼ領域では、V72Iが3例で、薬剤耐性のレ

ベルは低く有効性に影響はないと考えられているE157Qも1例で検出された。なお、サブタイプ解析では、いずれもBであった。

D. 考察

今回、平成23年、24年における新規あるいは未治療HIV感染者の薬剤関連変異について調査し、解析検討した。プロテアーゼ領域では2年とも全例で認められたが、調査研究した範囲内では2年間で大きな傾向の変化はないと考える。逆転写酵素領域では平成23年1例、平成24年3例、インテグラーゼ領域では平成24年のみ4例で薬剤関連変異が認

められたが、二次変異などであり薬剤耐性に高度となるような変異は今回の調査研究では認められなかった。なお、インテグラーゼ領域での E 1 5 7 Q の変異は薬剤耐性のレベルは低く有効性に影響はないと考えられているが、この 2 年間では平成 24 年に初めて四国でも検出された。本症例は T D F / F T C および F P V / R T V にて加療し良好な治療効果を得つつあるが、今後の多くの症例の積重ねにより E 1 5 7 Q などの変異の新たな増加の有無を検討する必要があると考える。

当院では現在累計 120 名以上の HIV 診療経験があり（県内の大半の HIV 診療を担当）、愛媛県の中核拠点病院の立場にある。また四国の他府県の拠点病院とも HIV 診療に関して連携を行いつつある。HIV 感染者・エイズ患者が全国的に増加する傾向にあるが、四国も例外ではなく、愛媛県においても新たに毎年 10 名前後の新規感染者・患者が報告される現状があり、HIV 診療の充実は早急に迫りつつある課題であると考えられる。四国地区においても、この調査研究のような年単位での症例の蓄積は必要であり、今後四国全体の HIV 診療の充実を目的として、さらに薬剤関連変異を他府県とも連携して多くの施設で検討・把握し、HIV に対する治療効果を上げていくことが必要と考える。

E. 結論

平成 23 年、24 年における新規あるいは未治療 HIV 感染者の薬剤関連変異について調査し、解析検討した。今回の調査・研究を行った結果、プロテアーゼ領域では 2 年間とも全例、逆転写酵素領域で平成 23 年 1 例、24 年 3 例、インテグラーゼ領域では平成 24 年 4 例など、薬剤関連変異が多くの例で認められた。四国でも HIV 感染者は増加が著しく、当院とともに薬剤関連変異を多くの施設で検討・把握し、HIV に対する治療効果を上げていくことが必要と考える。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Honda M, Ishisaka M, Ishizuka N, Kimura S, Oka S and Takada K (behalf of Japanese Anti-HIV-1 QD Therapy Study Group). Open-Label Randomized Multicenter Selection Study of Once Daily Antiretroviral Treatment Regimen Comparing Ritonavir-Boosted Atazanavir to Efavirenz with Fixed-Dose Abacavir and

Lamivudine. Intern Med 50: 699-705, 2011.

2. 高田清式、四国における HIV 感染症の動向と現状、医薬の門、52: 272-275、2012

2) 学会発表

- 村上雄一、高田清式、川本祐介、越智俊元、末盛浩一郎、三好一宏、山之内純、東太地、藤原弘、薬師神芳洋、長谷川均、安川正貴、愛媛大学医学部附属病院における HIV 関連悪性腫瘍の検討。第 85 回日本感染症学会総会・学術講演会、東京、2011 年 4 月
- 村上雄一、三好一宏、長谷川均、高田清式、安川正貴、HIV 感染症に合併した悪性梅毒の 1 症例。第 81 回日本感染症学会西日本地方会学術集会、小倉、2011 年 10 月
- 村上雄一、末盛浩一郎、三好一宏、山之内純、東太地、薬師神芳洋、羽藤高明、長谷川均、安川正貴、高田清式、愛媛大学医学部附属病院における HIV 診療の現況。第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2011 年 12 月
- 岡本愛、西宮達也、谷口裕美、高田清式、村上雄一、長谷川均、安川正貴、井門敬子、藤原光子、未治療で HIV-RNA が低値を示した 1 例。第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2011 年 12 月
- 西島健、高野操、石坂美千代、瀧永博之、菊池嘉、遠藤知之、堀場昌英、金田暁、藤井毅、内藤俊夫、吉田正樹、立川夏夫、横幕能行、藤井輝久、高田清式、山本政弘、松下秀三、健山正男、田邊嘉也、満屋裕明、岡慎一、HIV 感染症の初期治療でアタザナビル/リトナビルを固定しエブリコムとツルバダ無作為に割付するオープンラベル多施設臨床試験：ETstudy。第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2011 年 12 月
- 東太地、高田清式、薬師神芳洋、三好一宏、松原悦子、村上雄一、本間義人、安川正貴、当院で経験した高齢者 HIV 感染症 / 後天性免疫不全症候群の 3 例。第 23 回日本老年医学会四国地方会、松山、2012 年 2 月
- 村上雄一、本間義人、末盛浩一郎、三好一宏、山之内純、東太地、薬師神芳洋、長谷川均、高田清式、安川正貴、愛媛大学医学部附属病院における HIV 診療の現況。第 86 回日本感染症学会総会、長崎、2012 年 4 月
- 加藤高英、高田清式、三好一宏、本間義人、村上雄一、末盛浩一郎、安川正貴、総合内科受診を契機に診断された急性 HIV 感染症の 1 例。第 106 回日本内科学会四国地方会、徳島、2012 年 6 月
- 末盛浩一郎、東太地、村上雄一、本間義人、長谷川均、安川正貴、高田清式、食道リンパ増殖性疾患から判明した高齢者 HIV 感染症 / AIDS の 1 例。第 106 回日本内科学会四国地方会、徳島、2012 年 6 月
- 高田清式、村上雄一、三好一宏、末盛浩一郎、東太地、薬師神芳洋、長谷川均、安川正貴、高

次機能障害が ART 治療にて改善した HIV 関連神経認知機能障害患者の 1 例。第 82 回日本感染症学会西日本地方会学術集会、福岡、2012 年 11 月

11. 高田清式、岸田修二、健山正男、仲里愛、田沼順子、飯田敏晴、大金美和、山本政弘、HIV 関連神経認知症 (HAND)、診断の実際と今後の展開。第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会 共催セミナー 3、神奈川、2012 年 11 月
12. 松下修三、村上雄一、森岡悠、HAND (HIV 関連神経認知障害) とは? 第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会 共催セミナー (昼食付き) 3、神奈川、2012 年 11 月
13. 高田清式、村上雄一、辻井智明、西川典子、野元正弘、三好一宏、末盛浩一郎、東太地、薬師神芳洋、長谷川均、安川正貴、井門敬子、木村博史、荒木博陽、藤原光子、中村真理子、若松綾、岡本愛、西宮達也、髄液中の HIV-RNA 量、ネオプテリン量を経時的に測定した HIV 脳症の 1 治療例。第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会、神奈川、2012 年 11 月
14. 井門敬子、木村博史、田中守、荒木博陽、高田清式、6 年生薬学部長期実習における HIV 実習の検討。第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会、神奈川、2012 年 11 月
15. 西島健、高野操、石坂美千代、瀧永博之、菊池嘉、遠藤知之、堀場昌英、金田暁、鯉渕智彦、内藤俊夫、吉田正樹、立川夏夫、横幕能行、藤井輝久、高田清式、山本政弘、松下秀三、健山正男、田邊嘉也、満屋裕明、岡慎一、初期治療でアタザナビル/リトナビルを固定しエプジコムとツルバダ無作為に割付するオープンラベル多施設臨床試験: ETstudy 9 6 週結果。第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会、神奈川、2012 年 11 月

H. 知的所有権の出願・取得状況

なし

薬剤耐性ウイルス感染性分子クローンの整備

～血漿からのウイルス分離と感染性分子クローン樹立標準法～

研究分担者 巽 正志 国立感染症研究所エイズ研究センター

研究協力者 伊部史朗、梅木優子、永井美智、横幕能行、岩谷靖雄、杉浦 互

研究要旨

国内 HIV-2 感染症例 (CRF01_AB: NMC307, NMC716, NMC842; Group A: NMC786) 及び国内多剤耐性 HIV-1 感染症例の保存血漿から MAGIC-5 細胞と磁気ビーズを用いてウイルスを分離し、In-Fusion Cloning Kit と HIV Trapping System により感染性分子クローンを樹立した。本クローン群は国内 HIV-2 感染遺伝子診断における標準株として、および HIV-1 多剤耐性獲得機序の解析に有用と期待される。

A. 研究目的

HIV 感染症の確定診断は主に血清学的あるいは遺伝子学的診断法を用いてなされてきたが、多様性に富む HIV のウイルス学的研究にはウイルス分離が「Golden Standard」であることは論を待たない。これまで末梢血リンパ球の混合培養による分離法が標準とされてきたが、ドナー血球の入手から保存、ドナーによるウイルス感受性の違いなどから、手間暇の掛かる方法で、特にレトロスペクティブに保存血漿などからのウイルス分離は困難なことが多い。今回、我々が樹立した HIV 感染指示細胞 MAGIC-5A 細胞と磁気粒子を用いることにより、長期保存血漿からの効率的なウイルス分離法を確立し、これまで報告した In-Fusion Cloning Kit と HIV Trapping System により迅速に感染性分子クローンを樹立する標準法を確立した。国内 HIV-2 感染 4 症例および国内多剤耐性 HIV-1 感染症例に応用し、国内 HIV-2 感染診断における遺伝学的確定診断の為の国内感染症例からの標準株を整備することと、併せて多剤耐性 HIV-1 感染症例からのウイルス分離と感染性分子クローン樹立を行い薬剤耐性獲得機序解析の為の基盤整備に資することを目的に研究を行った。(倫理面への配慮)

本研究では、血液などヒト臨床材料が使用される

場合には、材料提供者の個人情報が漏出しないよう厳格なプライバシー保護に努めた。このためヒト材料を用いた研究は連結不可能匿名化 (unlinked anonymous) の手法を行って個人情報の漏洩を防ぎ、患者の非特定性を保った。また、研究方法および研究により生じうる研究対象者に対する不利益、危険性の排除について十分な説明を加え、守秘義務を守った。以上を遵守することで倫理面の問題は無いものと判断した。

B. 研究方法

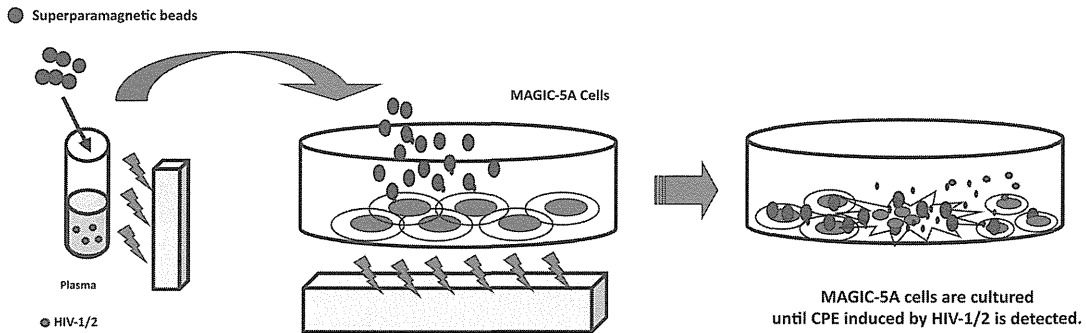
今回ウイルス分離に用いた血漿は、受診時に採取し 4 年から 8 年間凍結保存したものであり、末梢血分離単核球の混合培養法でウイルス分離が出来なかった症例も含んでいる。

磁気ビーズと MAGIC-5 細胞を用いたウイルス分離は以下の様に行った (図 1)。

【ウイルス分離手順】

1. ウイルス分離の前日、あるいは 6 時間前に 10 x 10⁵ / mL MAGIC-5A 細胞を 0.5 mL ずつ 24 穴培養プレートの各穴に播いてプレート底に付着伸展させる。
2. Viro-Adembeads (Ademtech com 商品コード 07010 フナコシ扱い) を 1 検体あたり 10 ~ 25 μ l 減

磁気粒子によるウイルス分離



Superparamagnetic beads: Viro-Adembeads
Reference Site : www.ademtech.com

Virus Isolation : 7 / 84 JRC samples stored at -30 C
rate 8.3% from high viral load samples

? Isolation Rate for Clinical samples

HIV-1

Subtype B : 09JP_NMC127 09JP_851A 11JP_NMC851B 11JP_NMC851C,
08JP_NMC104

HIV-2

Group A : 08JP_NMC786

Group B : UC1

CRF01_AB : 08JP_NMC842, 07JP_NMC716, 04JP_NMC307

図 1

- 1.5 ml Eppendorf Tube に取り、磁気スタンド Adem-Mag SV に掛け磁気ビーズを集め、上澄を捨てる。
3. キットの Binding Buffer で洗浄し、磁気スタンド Adem-Mag SV に掛け磁気ビーズを集め、上澄を捨てる。
4. 検体（血清もしくは血漿）1 mL を加えて、ローターなどで室温 20 分緩やかに混合する。
5. 軽く遠心し、磁気スタンド Adem-Mag SV に掛け磁気ビーズを集め、上澄を別の Tube に移し替える。
6. 血清なしの培養液 1 mL で洗浄し、磁気スタンド Adem-Mag SV に掛け磁気ビーズを集め、上澄を捨てる。
7. 血清なし培養液 0.5 mL で再懸濁し、予め培養してある MAGIC-5A 細胞の各穴に添加し、培養プレートを磁気プレートに密着させて 1 時間以上培養する。
8. 毎日、多核巨細胞などの CPE 出現を検鏡する。
9. 各穴が過剰増殖気味になったら培養液を除去し、PBS で洗浄して Trypsin-EDTA で細胞を剥がし、10 分の 1 程度に Split-Down して培養を継続する。
10. およそ 2 週間 CPE が出現するまで培養を継続する。
11. ウイルスが分離されたら新たな MAGIC-5A 細胞へ感染させウイルスを増殖させる。この場合 MAGIC-5A 細胞が CPE でぼろぼろになるまで培養するとウイルスコピー数は 10^8 copies/mL まであげることが出来る。

分離出来た症例では、培養開始後 2 週間ほどで細

胞変性作用が認められ、MAGIC-5 細胞測定による感染価が 10^7 bfu/mL (Blue Focus Unit / mL) に達した。分離ウイルス液の力価を測定し、新鮮な MAGIC-5A 細胞に M.O.I = 0.05 で感染させ 2 日後に HIV-1/2 proviral genome を含む感染細胞ゲノムを精製し Long PCR 法の鋳型試料とした。

HIV-1/2 ウイルスのクローニングおよび Long PCR と全長ゲノム Plasmid 構築は先に報告した HIV 感染価測定系 Indicator 細胞 MAGIC-5/HeLa4.5 nEGFP 細胞株を用いた HIV ウイルスクローニングと感染性クローンの構築系 (HIV Trapping System ; HIV 捕捉実験系) により行った。まず図 2 に示すようにそれぞれの検体ウイルスの provirus 5' LTR 配列に則した Primer と HIV-1 もしくは HIV-2 で高度に保存されている PBS 領域の配列で 5' LTR を増幅し、Cloning Vector pMT1 に組み込み pMT1/LTR を構築した。Not I 切断した pMT1/LTR を鋳型に、HIV-1/2 PBS 領域と pMT1 Not I 下流の配列と HIV-1/2 poly A 下流の 15 塩基が相同する配列で pMT1/LTR Amplicon を増幅した。一方、HIV-1/2 PBS から Poly A 下流領域までの Near Full-length 9.5 ~ 10.0 Kbp Amplicon を先に精製した感染細胞ゲノムを鋳型に増幅し、アガロースゲル電気泳動後精製し、先の精製した pMT1/LTR と In-Fusion Cloning Kit を用いて全長クローンを得た。得られた全長クローンは HeLa4.5nEGFP 細胞と 293FT 細胞の混合培養に

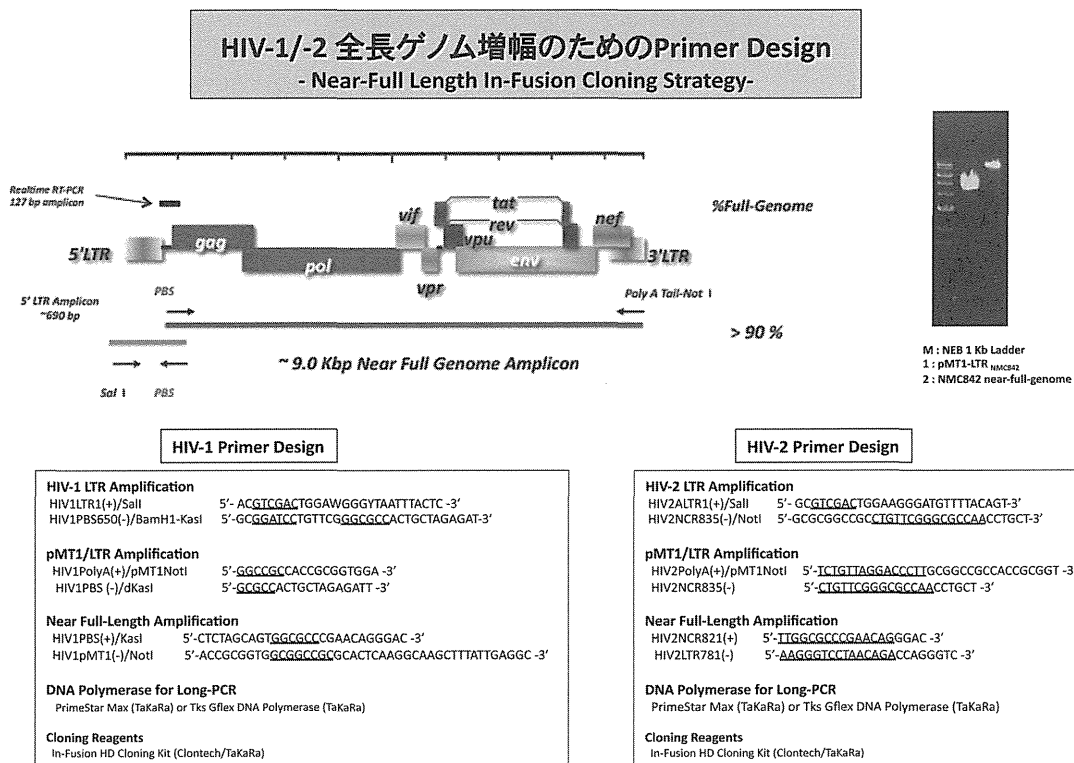


図 2

Transfection し、その 2 日後の培養上澄を MAGIC-5A 細胞に接種し感染性を確認した (図 3)。感染性が確認された 50 以上のクローンから任意に 2 クローンを選択し Transposon を用いた GPS-1 Genome Priming System (NEB) と Primer Walking 法で全長ゲノムの配列を決定した。全ゲノム配列が決定されたクローンについて HIV-1/2 グループの参考クローンとともに全ゲノム配列を対象に系統樹解析を行った。

C. 研究結果

MAGIC-5 細胞と磁気粒子による、感染者保存血漿からのウイルス分離は概ねコピー数が 10^4 /mL 以上の検体からは 2 週以内の培養で分離出来た。ウイルスが分離できた初期の培養では「フクロウの目」のような細胞塊が出現することが多い。磁気ビーズが混在しているので慣れるまで倒立位相差顕微鏡下で CPE 検出に戸惑うが、検体中のウイルス量が多いと 3 日間の培養で分離できることがあった。増殖速度が遅いウイルス株では「フクロウの目」のような細胞塊が出現した培養上澄中のウイルスを再度磁気ビーズで濃縮し、新しい MAGIC-5A 細胞へ感染させるとより短期間で力価の高いウイルス液が得られウイルス分離が可能ながあった。高い力価のウイルス液を感染させて得られた感染細胞ゲノムを鋳型にすれば図 2 のように E xtra Band の少ない Full-

Length に近い HIV-1/-2 ゲノムが増幅可能であった。個々の症例ウイルスの感染性分子クローンの性状については昨年度と本年度の分担報告書を参照して頂きたい。

D. 考察

本研究班で MAGIC-5A 細胞 / 磁気ビーズ法によるウイルス分離を試み、名古屋地域で分離された HIV-2 感染 4 症例 4 血漿検体と多剤耐性 HIV-1 感染 3 症例 5 血漿検体からウイルス分離ができた。 10^4 /mL 以上のウイルス量があり凍結保存状態がよければ分離される可能性が高いことが示された。このことから MAGIC-5A 細胞 / 磁気ビーズ法によるウイルス分離は、末梢血単核球によるリンパ球混合培養法では難しい、レトロスペロタイプに保存血漿などからのウイルス分離が可能であることから薬剤耐性遺伝子検査において判明した興味ある耐性変異を示す凍結保存検体を遡ってウイルス学的に詳細な解析に道を拓く方法論を提供するものと期待される。

ウイルス量が少ない検体では、MAGIC-5 細胞感染による多核巨細胞の検出に、ある程度の慣れが必要となるが、我々が別途樹立した LTR 下流に核仁移行シグナルを付加した EGFP を組み込んだ HIV 感染指示細胞株 HeLa 4, 5 LTR-nEGFP を MAGIC-5 細胞と平行して培養することにより感染初期蛍光の検出は