

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08734

研究課題名(和文) HIV流行阻止・エイズ発症予防のための臨床分離株の増殖能と増殖因子の検討

研究課題名(英文) Replication competence and the factors of clinical isolates for prevention of transmission and disease development to AIDS

研究代表者

景山 誠二 (Kageyama, Seiji)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：60252706

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：2015年・16年のフィリピンにおける薬剤耐性ヒト免疫不全ウイルス(HIV)の流行頻度を9.2%と推定した。この集団において、薬剤未使用者に12ヶ月間治療した後に得た血清・血漿142検体のうち、37株について分離に成功した。この株の増殖能を検討したところ、抹消血液のHIV量と比例したが、試験管内での増殖能が全てについて血漿中より多かった。その増殖能には株による大きな幅があった。このように、内在性のHIVの増殖能は、血漿ウイルス量では判断できない。したがって、内在性ウイルスの増殖能を判定・モニターする意義は大きい。特に耐性ウイルスの出現に伴い薬剤を変更する場合は、この指標に注目する必要がある。

研究成果の概要(英文)：The drug resistance rate was estimated to be 9.2% among the 2,629 referred samples from patients receiving antiretroviral treatment in 2015-2016 in the Philippines. Thirty-seven HIV strains were isolated from 142 HIV-positive serum/plasma samples of patients harboring drug-resistant strains with detectable viral load after a 12-month treatment of drug-naive patients. The replication competence was then assessed by re-inoculation into seronegative peripheral blood mononuclear cells in vitro. The viral yield correlated with the plasma viral load. However, more progeny viruses were produced after the in vitro re-inoculation than the corresponding plasma viral load. Intrinsic replication competence could be assessed by the in vitro re-inoculation system, but not be estimated from in vivo plasma viral load. These results suggest that the replication competence of HIV become an important marker especially when a drug regimen should be altered.

研究分野：ウイルス学、国際保健

キーワード：HIV 薬剤耐性 増殖能 フィリピン

1. 研究開始当初の背景

本格的なエイズ流行に至った要因は、現在まで、いずれの国においても不明・不詳である。過去においては、どの国においても、流行を認識した時には、すでに大規模になっていたのが通例であった。

流行規模の拡大が、ヒト・ヒト間の伝播効率の上昇であるとするれば、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 株の増殖能は流行に大きく関与している可能性が高い。言い換えれば、ウイルス増殖能の高いウイルス集団が優位になれば、流行規模が拡大すると考えられる。重症化要因も同様である。血漿中のウイルス量が、重症化 (エイズ発症) 因子と考えられ、臨床現場でモニターされているが、これもまた、増殖能の高いウイルスがもたらした結果とも解釈できる。増殖能は、一部ヒト・ヒト伝播の事例で、伝播効率を決定する要因として、あるいは、患者血漿中のウイルス量を決定する要素として理解されているが、未だ研究結果は限られている。

流行規模の拡大や、重症化に与える度合いを調べるため、また、流行緩和、重症化阻止に向けて、フィリピンの感染症中央病院 (サンラサロ病院) と共同研究を始めた。この病院の特殊検査・研究部は、日本との政府間共同開発事業で始まったものであり、「研究代表者」は、これを契機にして、2000 年ごろより HIV とエイズの研究を継続していた。その後、2010 年ごろより感染者が急増を始め、その要因についての調査が必要になった。さらに、治療例の増加と共に、重症化 (エイズ発症) 阻止のための適正な治療薬剤の処方検討が必要になった。特に、耐性ウイルス出現の後の対処が焦点になった。

2. 研究の目的

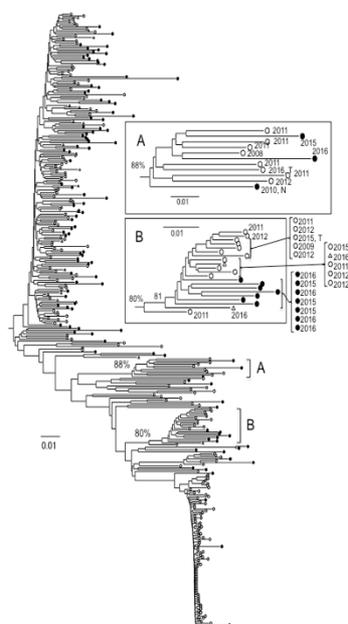
増殖能が流行規模の拡大や、重症化に与える度合いを調べることを上位の目的にした。まず、流行株の増殖能の幅の確認作業を行った。次に、増殖能に与える因子を探索することにした。

3. 研究の方法

流行株を得るために、患者材料を次のように選択した。最も増殖能が問題になる場面として、薬剤耐性ウイルスの出現時と定めた。具体的には、治療薬剤未使用の患者に 12 ヶ月間薬剤を使用した後、一般検査に使用した残りの血清・血漿に注目した。協力患者の皆さんには、現地担当者が研究内容を説明し同意を得た後、匿名化を行い、併せて、研究を通じて得た事実と患者個人とが連結不可能な処理をした。また、研究内容は、フィリピン側、鳥取大学医学部共に、双方の倫理委員会の承認を得た。

耐性ウイルスの決定には、患者血清・血漿中の HIV-RNA を単離し、PCR によって増幅後、pol 遺伝子のアミノ酸配列を決定し、Stanford University の薬剤耐性判定プログラムを使用して判断した。次に、薬剤使用後 12 ヶ月後に血中ウイルス量を検出可能であった ($>1,000$ copies/mL) 患者から HIV 株を分離することにした。検査後、廃棄過程にあった血漿・血清を、新鮮抹消血単核細胞に暴露し、4 週間の培養を経て増殖を促し、その後のウイルス株の性状解析に供した。一定レベルまで増殖できたウイルス株の HIV-RNA 量を揃えて (10^6 copies/ 1.5×10^6 cells)、新鮮な抹消血単核細胞に再感染させその増殖能を 1 週間観察した。特に 5 検体については、分離ウイルスの同じアミノ酸配列領域について、血清・血漿中のウイルスの配列と比較し、分離ウイルスのアミノ酸配列と血清・血漿中のアミノ酸配列に大差のないことを観察した。

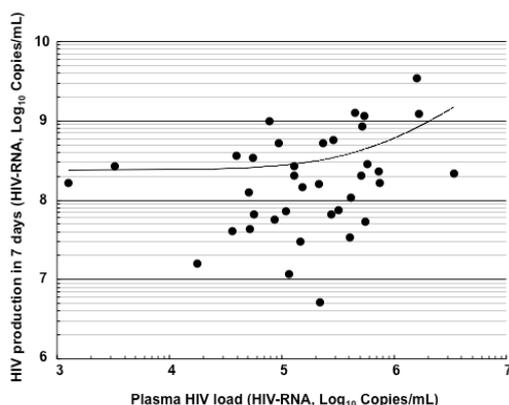
4. 研究成果



まず、被験者集団の性質を定めるため、フィリピンの薬剤耐性の発生状況を検討した。治療未経験者 11,306 人の治療薬 (ジドブジン・ラミブジン・ネビラピン) を投与症例が対象群であった。このうち、2015 年・2016 年に投与後 12 ヶ月に達した患者の血漿 2,628

検体を解析の対象とした。このうち、抹消血液 HIV 濃度が 1,000copies/mL 以上を示したものが 295 検体であり、HIV-pol 遺伝子配列を決定できたのは、127 検体になった。127 検体中 107 検体の HIV-pol 領域に耐性マーカーとなるアミノ酸配列を認めた。以上の結果より、耐性株の割合を 9%程度と推定した。系統樹解析によっても耐性株の広がりが限定的であることが窺われた (図 1)

次に、耐性調査の後残存した血漿 142 検体を、抗 HIV 抗体陰性のボランティアより得た抹消血液由来の単核細胞に暴露し、ウイルス分離を試みた。4 週間の培養により 142 検体中 37 検体より HIV 株を分離することに成功した。



さらに、分離株を 10^6 (copies/mL) に統一して抹消血液由来の単核細胞に再接種し、1 週間後の到達増殖レベルを増殖能判定基準に用いた。増殖能と患者血漿中のウイルス負荷量は相関した。株により増殖能は異なり、その違いの幅は 1,000 倍程度に及び、 5×10^6 (copies/mL) から 3×10^9 (copies/mL) まで開いた (図 2)。

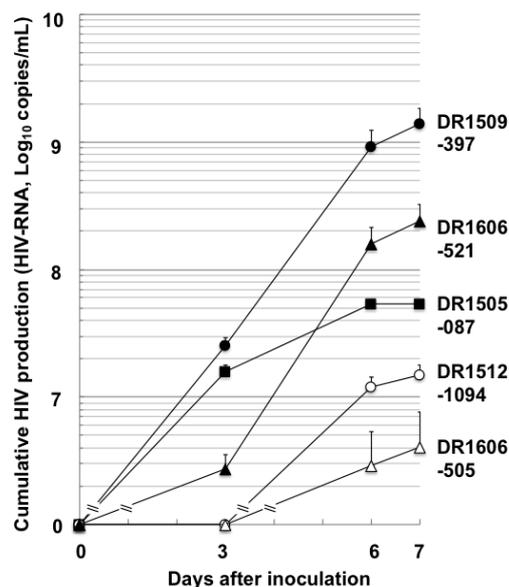
この開きを生じた代表的な 5 株について増殖曲線を図 3 に示す。

これらの事実は、耐性ウイルスの出現後、治療薬を変更すべきタイミングにおいて、耐性ウイルスの増殖能のレベルに注目した薬剤選択が必要であることを示した。さらに、治療薬の変更後は、特に増殖能の高い株を抑制することを優先的に考えるべきであることを示唆した。

一方、このような増殖能の開きは伝播効率にも影響を与えている可能性が大であることを示唆した。ただし、本研究では、その点までは踏み込めなかった。

さらに、これらの大きな増殖能の違いを生

んだ原因として、ウイルスの遺伝子配列が決定要因になっている可能性が強い。本研究では、この証明にまでは至らなかった。この証明には、増殖能という表現型と、ウイルスの遺伝子配列という遺伝子型の対応関係を証明する必要がある。そのためには、純系のウイルスを作出し、相互関係を探る必要がある。遺伝子操作後に産生されたウイルスの操作には、文部科学大臣の承認が必要であり、現在その承認を待っている。承認後は直ちに、部分的遺伝子配列の改変を通じて、増殖能に大きな影響を及ぼす遺伝子配列を決定し、臨床現場で利用可能な診断学へと歩みたい。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

1. Kageyama, S. Viral infections in Asia and Japan: Studies To Maximize Therapeutic Drug and Vaccine Effect. Special Lecture at Sebelas Maret University. Surakarta, Indonesia, September, 2017.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

鳥取大学医学部医学科ウイルス学分野ホームページ

<http://www.med.tottori-u.ac.jp/introduction/medicine/about/3318/3326/23769.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

景山 誠二 (Kageyama Seiji)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：60252706

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

金井 亨輔 (Kanai Kyosuke)

常城 朱乃 (Tsuneki Akeno)