

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：84407

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590573

研究課題名（和文） HIV-1 SUPERINFECTION の簡便な検出法の開発

研究課題名（英文） Detection of HIV-1 superinfection by using cluster-specific PCR primers

研究代表者

森 治代 (MORI HARUYO)

大阪府立公衆衛生研究所・感染症部・主任研究員

研究者番号：20250300

研究成果の概要（和文）：大阪府内で流行が拡大し、分子疫学的に大きなクラスターを形成する HIV-1 株に着目し、それらを特異的に増幅する PCR プライマーを用いることにより HIV-1 の superinfection（初感染とは異なる HIV-1 株に再感染すること）もしくは重複感染を簡便に検出する方法を開発した。3 種類の特異プライマーを作製し、HIV-1 感染者 63 名から得られたプロウイルス DNA について検討した結果、2 症例においてサブタイプ B 株の重複感染が認められた。

研究成果の概要（英文）：In order to detect HIV-1 superinfection (or dual-infection), we constructed three sets of primers that were designed to specifically amplify HIV-1 strains forming large clusters in Osaka. Proviral DNA samples obtained from 63 HIV-1-infected patients were analysed by nested PCR using the cluster-specific primers, and two cases were found to be dually infected with two distinct HIV-1 subtype B.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：HIV-1・superinfection・重複感染・特異プライマー

1. 研究開始当初の背景

これまで、HIV-1 は一度感染すると免疫防御機構が働くため異なる株に再感染 (superinfection) することはほとんどないと考えられてきた。しかしながら近年、HIV-1 感染にハイリスクなグループを対象とした詳細な研究により、superinfection がこれまで考えられていたよりも実際には高頻度で起こっている可能性が指摘され始めている。異なる HIV-1 株に再感染すると病態の進行が

早まることが報告されており、薬剤耐性ウイルスによる superinfection の症例もいくつか報告が見られるなど、superinfection が感染者の病態管理や治療に及ぼす影響は大きく、その実状把握は重要な課題である。また、superinfection は新たなリコンビナントウイルス発生の主要な原因であり、ワクチン戦略の重要なポイントともなることから、その解明に関心が集まっている。

我々は、1988 年以来 HIV 感染者の治療支援

を目的として、大阪府内および近隣府県の医療機関と連携し、ウイルス分離、薬剤耐性検査等による感染者のフォローアップを行っており、20年以上に渡って収集した多数の臨床検体および分離 HIV-1 株を保存している。また、1992年より大阪府内の性感染症関連診療所との協同で HIV 感染にハイリスクな行動を取っていると思われる人々を対象とした HIV 感染疫学調査を実施しており、これまでに多くの陽性を確認している。近年、それら陽性例の中で、海外でのハイリスクな性行動により感染したと考えられる 1 例について、複数のプライマーペアを用いた薬剤耐性遺伝子検査を実施したところ、異なるサブタイプおよび薬剤耐性変異が検出され、重複感染である可能性が強く示唆された。さらに、当所で実施している HIV 確認検査の陽性例 1 例において著しい塩基配列の混在が認められたため、クローニングにより詳細に調べたところ、同一領域にサブタイプ B と CRF01\_AE のクローンが検出され、重複感染であることが証明された。これらは HIV 検査のため採血された血清検体で、遡り調査が不可能であるため、superinfection（再感染）か coinfection（同時感染）かの判別は困難であるが、いずれにしても異なる HIV 株の重複感染と考えられるケースが我々の検体においても確認されており、さらなる詳細な調査が必要と思われた。

## 2. 研究の目的

これまでに国内外で報告されている superinfection（あるいは重複感染）のケースは、異なるサブタイプの HIV-1 に感染する、いわゆる inter-subtype であることが多く、その場合には株間の塩基配列の違いが明らかであるため、比較的検出が容易であると考えられる。一方、大阪府内の HIV-1 感染者は、その大部分が MSM (Men who have Sex with Men) であり、複数の HIV-1 株に感染するリスクは高いと推測されるものの、MSM の間で流行している株のほとんどが subtype B であるため superinfection も同じサブタイプ間、すなわち intra-subtype である可能性が高く、検出が困難であることが予想される。

そこで本研究では、地域で広く感染が流行している HIV-1 株が superinfection を起こす可能性が高いと仮定し、流行株に特異的な配列の PCR プライマーを用いることにより intra-subtype の superinfection（あるいは重複感染）を簡便にスクリーニングする方法を開発し、調査地域内（大阪府とその近郊）の HIV-1 感染者における superinfection の実状を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 大阪府内で流行している HIV-1 株の検索

当所において実施している HIV 確認検査および性感染症関連診療所との協同で実施している HIV 疫学調査で陽性が確認された検体について、*pol* および *env* 領域のシーケンスを行なった。得られた塩基配列について系統樹解析を行ない、大きなクラスターを形成するグループをピックアップし、大阪府における流行 HIV-1 株とすることとした。

### (2) プライマーの構築と PCR の条件設定

各流行株グループについて *pol* および *env* 領域の塩基配列を比較し、それぞれのクラスターに属する HIV-1 株を特異的に増幅できるプライマーを構築した。

各グループに属する検体から代表例を選択し、リアルタイム PCR 法により末梢血単核球 (PBMC) 中のプロウイルス DNA コピー数を測定した。そのコピー数をもとに、各グループの HIV-1 株とグループに属さない対照 HIV-1 株を組み合わせて 1:1、1:10、1:100 の割合で混合し、重複感染を模したサンプルを作製した。作製した混合検体を用いて特異プライマーの選別、PCR の最適条件及び検出感度を検討した。

### (3) HIV-1 重複感染のスクリーニング

superinfection であることを証明するためには、2 回以上の経時的なサンプリングが必要である。しかしながら、今回対象とする検体の中には 1 回のみの採取で遡り調査が不可能なものも多い。そこで、まずはクラスター特異プライマーにより重複感染例をスクリーニングし、重複感染が検出された検体について過去の保存検体がある場合には遡って詳細に検討を行うこととした。

HIV 感染にハイリスクな行動を取っていると思われる人々を対象とした疫学調査の陽性検体について、重複感染の検出を行った。血清サンプルからウイルス RNA を抽出し、通常プライマー及びクラスター特異プライマーを用いて、HIV-1 遺伝子を増幅した。得られた増幅産物についてシーケンスおよび系統樹解析を行ない、クラスター特異プライマーを用いた場合と従来のプライマーを用いた場合とで、塩基配列が異なる位置にクラスターリングされる検体を重複感染可能性例とした。

さらに、HIV 診療医療機関との協同で行なっている感染者フォローアップの症例については、血漿中のウイルス RNA と PBMC 中のプロウイルス DNA の両方を用いてスクリーニングを行なった。

### (倫理面への配慮)

本研究に用いる HIV-1 感染者血液試料は、医療機関において主治医が感染者本人の同意を得た上で採血し、匿名化された ID 番号を付けて当所に搬入される。また、HIV 抗体

確認検査検体は依頼元で採血の際に連結不可能に匿名化されるため、同意を得ることが出来ないため、当所の Web サイト上に研究内容を広報し、社会に周知する。

なお、本研究は大阪府立公衆衛生研究所の倫理審査委員会の承認を得ている（申請番号 0703-06）。

#### 4. 研究成果

##### (1) クラスタ特異プライマーの構築

2007-2009 年に当所で実施された HIV 確認検査の陽性検体について *pol* および *env* 領域のシーケンスを行ない、系統樹解析により大きなクラスタを形成する 2 つのグループ (a, b) を選択した (どちらもサブタイプ B)。グループ a, b 間の塩基配列を比較したところ、*pol* 領域は塩基配列の相同性が比較的高く特異プライマーの構築が困難であったため、より多様性が高い *env* 領域内に、それぞれのクラスタに属する HIV-1 株を特異的に増幅できるプライマーを設定した。各クラスタ特異プライマーの配列は以下の通りである。

##### 1<sup>st</sup> PCR:

envC1FoutA

5' -GTTACCTTAAATTGCACTGATGC-3'

envC1FoutB

5' -GTTACTTTAAATTGCACTGACTA-3'

envRoutAB (クラスタ a, b 共通)

5' -CATATCTCCTCCTCCAGGTCC-3'

##### nested PCR:

envV1FinA

5' -GTACAAATAAATGATGATGAGG-3'

envV1FinB

5' -CCACAAGCATAAAAGATAAGGT-3'

envRinA

5' -TGGGTCCCTCCTGCAGAC-3'

envRinB-S

5' -CTCCTGAGGAGCGATTA-3'

また近年、これまで主に異性間の性交渉により感染が広がっていた CRF01\_AE 株が、日本人 MSM においてもしばしば検出されるようになったことから、サブタイプ B と CRF01\_AE の重複感染が頻発している可能性を考え、CRF01\_AE を検出するための特異プライマーを *gag* 領域に構築した。AE 特異プライマーの配列は以下の通りである。

##### 1<sup>st</sup> PCR:

gagAE-Fout

5' -GAACAGTTACAGTCAACTCTCA-3'

gagAE-Rout

5' -CTCTTCCCCATCCCCAGT-3'

##### nested PCR:

gagAE-FinM

5' -AATTACCCTATAGTGCAAAATGCA-3'

gagAE-RinM

5' -CATCATTAYWTTTACMTGTTGTG-3'

##### (2) クラスタ特異プライマーの検出感度

グループ a, b および CRF01\_AE に属する検体とそれら以外の HIV-1 株を混合して重複感染を模したサンプルを作製し、PCR の最適条件及び検出感度を検討したところ、a, b および CRF01\_AE の特異プライマーは各々 1-2 コピーの混在まで検出できることが確認された。また、これらは 3 種混合プライマーとしても、同等の検出感度を示した。

##### (3) クラスタ特異プライマーを用いた重複感染の検出

確認検査検体およびフォローアップ患者検体のウイルス RNA サンプル 59 例について、クラスタ特異プライマーを用いて重複感染の検出を試みた結果、通常プライマーでグループ a (2 例) あるいは b (4 例) にクラスタリングされることが明らかなサンプルは、それぞれの特異プライマーでも同じ塩基配列が増幅されたが、それ以外は全例ともグループ a および b の重複感染は認められなかった。

次に、フォローアップ患者検体のプロウイルス DNA サンプル 63 例を用いて、クラスタ特異プライマーによる重複感染の検出を行った。その結果、通常プライマーでは塩基の混在が著しくダイレクトシーケンスでは解読が困難であった 1 例 (31-4) において、グループ a にクラスタリングされる遺伝子が増幅された。本症例について、通常プライマーによる増幅産物をクローニングし、グループ a に属する HIV 株と a クラスタから少し離れたところに位置する株の重複感染であることを確認した。その他のサンプルについては、通常プライマーでグループ a (2 例) あるいは b (4 例) にクラスタリングされることが明らかなサンプル以外は特異プライマーによる遺伝子の増幅は認められなかった。

重複感染の検出に用いるサンプルとしては、fitness の優れたウイルスがメジャーとなる血漿中のウイルス RNA よりも過去の感染履歴が残っているプロウイルス DNA の方が適当であると考えられる。しかし、検体のプロウイルス量を測定し、1 回の PCR にかかるコピー数を計算したところ、比較プロウイルス量が多いと考えられる未治療患者でも 10-30 コピー、治療経過が良好な患者ではせいぜい数コピー程度しか検討していないことがわかり、重複感染を検出するには 1 検体あたり 1 回の PCR では不十分であることが示唆

された。

そこで、フォローアップ患者のプロウイルス 63 検体の中から、より重複感染のリスクが高いと思われる、他の性感染症（B 型肝炎や梅毒など）の既往歴がある症例を中心に 30 検体を選択し、1 検体あたり少なくともプロウイルス 100 コピー以上を検討できるよう複数回の PCR を実施した。

その結果、1 例（31-19）においてクラスター特異プライマーにより HIV 遺伝子の増幅が認められた。しかしながら、シーケンスを解析したところ、それは通常プライマーで検出される 31-19 の塩基配列とは異なるものの、予想に反してグループ a にも b にも属さない HIV 株（サブタイプは B）であった。このことから、今回構築した特異プライマーは、グループ a、b 以外にも検出可能な HIV 株があることが示唆された（図）。

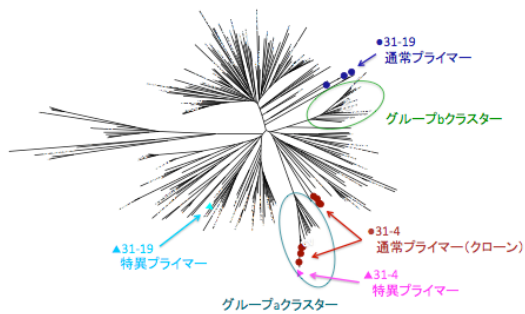


図 グループ特異プライマーにより検出された HIV-1 サブタイプ B の重複感染例

なお、今回重複感染が検出された 2 例（31-4 および 31-19）は、共に過去の保存検体がないため superinfection か coinfection かの判別はできなかった。

最近の研究の中には、superinfection は初感染と同じ頻度でおこる、との報告もあり、本研究における重複感染の検出率（2/63 例、3.2%）は、日本人 MSM における HIV 感染率が 4%程度と推定されていることから考えると、妥当な数値であるかもしれない。

また、今回特異プライマーを用いて検討した中にサブタイプ B と CRF01\_AE の重複感染は認められなかったが、近年東南アジアを中心に CRF01\_AE と B の新たなリコンビナントタイプの HIV-1 が相次いで報告されており、また日本人 MSM のコミュニティに中国からの CRF01\_AE が流入してきているという報告もあることから、今後も日本の MSM コミュニティにおける CRF01\_AE の動向に注意が必要であろう。

## 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 7 件）

- ① Kojima Y, Kawahata T, Mori H, Furubayashi K, Taniguchi Y, Iwasa A, Taniguchi K, Kimura H, Komano J. Prevalence and epidemiological traits of HIV infections in populations with high-risk behaviours as revealed by genetic analysis of HBV. *Epidemiology and Infection*, 査読有, 25:1-8, 2013 DOI:<http://dx.doi.org/10.1017/S0950268812003123>
- ② Nakamura K., Ohtsuki T., Mori H., 他 10 名, Novel anti-HIV-1 activity produced by conjugating unsulfated dextran with polyL-lysine. *Antiviral Research.*, 査読有, 94, 89-97, 2012 <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.02.011>
- ③ 志牟田健、飛田収一、伊東三喜雄、藤原光文、上田朋宏、亀岡 博、古林敬一、川畑拓也、大西 真、京都府と大阪府における 2010-2011 年に分離された淋菌株の性状解析、*日本性感染症学会誌*、査読有、23: 83-89、2012 [jglobal.jst.go.jp/public/20090422/201202255173726797](http://jglobal.jst.go.jp/public/20090422/201202255173726797)
- ④ 森 治代、注目されるウイルス感染症と制御対策 8 エイズ (AIDS)、防菌防黴、査読無、39:433-442、2011 [http://saaaj.jp/legacy/magazine/abstract/magazine\\_3907abstract04.html](http://saaaj.jp/legacy/magazine/abstract/magazine_3907abstract04.html)
- ⑤ 中瀬克己、中谷友樹、堀成美、神谷信行、灘岡陽子、尾本由美子、高橋裕明、山内昭則、福田美和、松村義晴、大熊和行、川畑拓也、白井千香、兒玉とも江、山岸拓也、中島一敏、大西真、性感染症サーベイランス結果の地方自治体による活用の評価と支援、*日本性感染症学会誌*、査読有、22 : 49-55、2011 <http://hdl.handle.net/10285/9544>
- ⑥ 川畑拓也、小島洋子、森 治代、HIV/AIDS 感染者・患者の多い地域における公衆衛生専門機関の現状と課題、*公衆衛生*、査読無、74 : 914-917、2010、<http://www.bitway.ne.jp/ejournal/sonet/1401101943.html>
- ⑦ Hattori J, Shiino T, Gatanaga H, Yoshida S, 他 29 名 (Mori H:9 番目, Kojima Y:26 番目), Trends in transmitted drug-resistant HIV-1 and demographic characteristics of newly diagnose patients : nationwide surveillance from 2003 to 2008 in Japan. *Antiviral*

Research, 査読有, 88:72-79, 2010  
DOI:http://dx.doi.org/10.1016/j.anti  
viral.2010.07.008

[学会発表] (計 5 件)

- ① 森 治代、小島洋子、川畑拓也、血漿中 HIV-1 と PBMC 由来分離 HIV-1 のコレセプター指向性不一致例、第 26 回日本エイズ学会学術集会、2012 年 11 月 25 日、横浜市
- ② 小島洋子、川畑拓也、森 治代、駒野 淳、谷口 恭、井戸田一朗、HIV 感染者における新規 Ae/G リコンビナント HBV の解析、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012 年 11 月 14 日、大阪
- ③ 川畑拓也、森 治代、小島洋子、大阪府内の HIV 感染症の流行状況と対策について、第 53 回日本社会医学会総会、2012 年 7 月 15 日、高槻市
- ④ 森 治代、小島洋子、川畑拓也、長期治療成功例の残存プロウイルスに検出される薬剤耐性変異の動態、第 25 回日本エイズ学会学術集会、2011 年 11 月 30 日、東京都
- ⑤ 森 治代、小島洋子、川畑拓也、HIV-1 重複感染例の検出、日本エイズ学会、2010 年 11 月 24 日、東京都

[その他]

ホームページ等

<http://www.iph.pref.osaka.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

森 治代 (MORI HARUYO)

大阪府立公衆衛生研究所・感染症部・主任  
研究員

研究者番号：20250300

### (2) 研究分担者

川畑 拓也 (KAWAHATA TAKUYA)

大阪府立公衆衛生研究所・感染症部・主任  
研究員

研究者番号：80270768

小島 洋子 (KOJIMA YOKO)

大阪府立公衆衛生研究所・感染症部・主任  
研究員

研究者番号：70291218

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：