

平成 21 年 6 月 3 日現在

研究種目：基盤研究（A）
 研究期間：2005～2008
 課題番号：17256004
 研究課題名（和文）中央アフリカにおける HIV の分子疫学 - エイズウイルス生成の源流と未来を探る
 研究課題名（英文）Molecular epidemiology of HIV in central Africa - Searching for the origin of AIDS virus and its future
 研究代表者
 井戸 栄治（IDO EIJI）
 京都大学・ウイルス研究所・特別教育研究准教授
 研究者番号：70183176

研究成果の概要：エイズウイルスの起源と未来の姿を求めて、今日最も多様な遺伝子型の HIV が混在して流行している中央アフリカの 3 ヶ国（カメルーン、コンゴ、コンゴ民主）において、HIV に関する最新の分子疫学動向を調査した。今回、コンゴ民主東部地域を世界に先駆けて調査することに成功したが、ここでも西方諸国と同じく多様な遺伝子型が存在することが明らかとなった。またサルのウイルスに関しては、ブラックマンガベイが新種の SIV を保有することを発見した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
2006 年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2007 年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2008 年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
年度			
総計	25,800,000	7,740,000	33,540,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：ウイルス、進化、エイズ、HIV、分子疫学

1. 研究開始当初の背景

(1) エイズウイルスの起源

当研究室を含む内外の研究グループによるこれまでの調査により、世界中に感染が拡大した HIV（エイズの病原ウイルス）を遺伝子配列から分類すると、大きく 1 型と 2 型の 2 グループに分かれ、前者に関しては A から J まで少なくとも 10 以上のサブタイプから成ること、同様に後者は 6 以上のサブタイプから成ることが明らかとなった。一方、アフリ

カに生息するサル・類人猿の多くは HIV に類似のウイルス（SIV と呼ぶ）を保有することも分かって来た。

霊長類レンチウイルスという大きなファミリーの中で HIV と SIV の関係は何なのか、言い換えれば HIV-1 がいつ、どのように人間社会に現れたのかという起源の問題は極めて重要である。ある欧米のグループ（B. Hahn 博士ら）はそれについて、一部のチンパンジーが保有する SIVcpz がその祖先となったウ

ウイルスに違いないと主張している。しかし、両者の遺伝的距離は十分に近いとは言い難く、何よりもチンパンジーの間でウイルス保有率が低いこと(1-2%程度)がその説を完全に承認するのを難しくしている。HIV-1 は異なった種類の SIV がリコンビネーションによって出来たという説や、未発見の SIV が存在し、それが本当の祖先となっていた可能性も否定できない。こうした状況から、更なるウイルス探索調査が必要と考えられた。そうした調査を行なう場合、遺伝的多様性が最も高い中央アフリカ地域が調査対象となることは明白である。多様性が大きいということは、それだけ長い時間が経過したこと、即ち起源地がその近くにあることを示唆しているからである。

(2) 激しく変異する HIV の未来

HIV は変異を激しく繰り返すことが知られているが、このウイルスが将来どのような形に変貌するのかという疑問は、治療薬開発やエイズワクチン開発にとっても重要な問いかけである。近年、発展途上の国々では予め多剤が混合製剤されている抗エイズ治療薬のフリー・デリバリーなどが始まっている。しかし、貧しい国々では末端の患者らにまでこのサービスが行き渡っているとは言い難く、また辺境地域にあっては定期的に医療機関に通うこと自体が難しい。このような場合、薬のアドヒアランスが低下し、結果多剤耐性株出現の可能性が高くなるであろうと懸念されている。多剤耐性株の早期発見は感染拡大を阻止する上で極めて重要である。

2. 研究の目的

(1) HIV の起源

本研究第一の目的は、最も多様な遺伝子型の HIV が混在して流行し、それ故にエイズウイルス発祥の地と目される中央部アフリカ(カメルーン、コンゴ、コンゴ民主の3ヶ国)をフィールドとして、HIV の起源を探るべく分子疫学調査を行なうことである。各国における最新の分子疫学動向を明らかにすることは、そのままエイズ治療薬・予防法開発のために基礎情報を提供することでもある。

(2) HIV 変異を追跡調査できる研究拠点

また研究第二の目的は、激しい変異や感染個体内で相当な長さのゲノム同士を組み換

えるレコンビネーションにより、今日の複雑多様な HIV ワールドを形成して来たウイルス変異の歴史の中で、どのような原則が存在し、また未来の HIV の姿はどうなるのかを予測する手掛かりを得ることである。このためには観測拠点を定め、同一患者内のウイルスの遺伝子動態を長期に渡って追跡調査が出来る環境を確保することが必須である。そのような問題と一緒に取り組める共同研究者を見つけることが当初の大きな課題であった。

3. 研究の方法

上記の目的を達成するため、各国を1年当たり1回ずつ訪問し、該当国の研究機関の協力を得て、エイズ患者に十分な説明の後、本人の同意を得た上、検体(血液)を採集した。保有率の調査のためには、エイズ患者ばかりでなく、地域の病院・診療所に入・通院する一般患者、あるいは健康人ボランティアからも採血した。

得られた検体は、先ず全血を遠心により血漿とバッフィーコートに分け、次に血漿を用いて HIV の血清学的スクリーニング検査(PA法)を行なった。陽性だった場合には、バッフィーコートから DNA を抽出し、ウイルス特異的プライマーを用いた PCR(通常は nested PCR)を行ない、増幅産物の DNA 配列分析から、最終的に分子系統解析を行なった。

同地ではサル類をペットとして飼育することがよく行なわれている。こうした機会に遭遇した場合には、サル類からも採血し、ヒトの場合とほぼ同様に解析を進めた。以下に、各年度別に訪問した国と渡航期間、並びに調査対象地域と収集検体数をまとめた。

[平成 17 年度]

平成 17 年 10 月 26 日～11 月 18 日

コンゴ民主共和国

キンシャサ市

エイズ患者 28 検体

サル類 26 検体

カメルーン共和国

西部州

エイズ患者 300 検体

コンゴ共和国

ポイント・ノアール診療所

エイズ患者 59 検体

ブラザヴィル市
エイズ患者 5 検体

[平成 18 年度]

平成 18 年 9 月 4 日～9 月 14 日

コンゴ民主共和国

オリエンタル州キサマンガニ市
エイズ患者 10 検体
キンシャサ市
エイズ患者 37 検体
サル類 12 検体

平成 19 年 2 月 4 日～2 月 14 日

コンゴ共和国

ポイント・ノアール診療所
エイズ患者 82 検体

[平成 19 年度]

平成 19 年 7 月 16 日～7 月 30 日

コンゴ民主共和国

南キヴ州ブカヴ市
エイズ患者 80 検体
キンシャサ市
エイズ患者 31 検体

平成 20 年 1 月 30 日～2 月 17 日

ケニア共和国

ILLI 研究所視察・ここでは検体収集なし

コンゴ共和国

キュヴェット州オワンドウ町
一般診療患者 44 検体
エイズ患者 17 検体
ポイント・ノアール診療所
エイズ患者 29 検体

[平成 20 年度]

平成 20 年 6 月 23 日～7 月 10 日

コンゴ民主共和国

オリエンタル州キサマンガニ市
エイズ患者 94 検体

平成 21 年 1 月 11 日～1 月 28 日

コンゴ共和国

ウエスト・キュヴェット州エヴォ町
一般診療患者 49 検体
一般健常人 57 検体
ポイント・ノアール診療所
エイズ患者 42 検体

また本研究補助金を利用して、国立生物医学研究所所長 Prof. Jean-Jacques Muyembe

氏を平成 18 年 10 月 10 日から 10 月 24 日まで日本へ招聘したことを付記して置く。氏が滞在中、研究結果や今後の共同研究の枠組みなどについて詳細に協議することが出来た。

4. 研究成果

以下に研究成果を国別に述べる。

(1) カメルーン共和国

当グループによるこの国の調査は、1994 年以来かれこれ 10 年以上も続いており、これまでに多数の研究論文が本補助金受領以前の段階で報告されている。平成 17 年度には、未だ一度も調査がされたことがない同国西部州のナイジェリアとの国境付近より、エイズ患者検体が多数集められた。これまでに解析が終了した検体に関して言えば、CRF02 (IBNG 株) と呼ばれる A/G リコンビナント型の株が 32 (66.7%) と圧倒的に多数で、これに続いてサブタイプ A、B、C、G、H がそれぞれ 5、4、3、2、1 となり、他に既知の型に分類されない U1、U2 がそれぞれ 4、1 とあった。CRF02 型の株が多かったことは隣国ナイジェリアのそれを十分反映させるものであった。他に重感染が 4 例 (A+G、A+C、G+H、H+U1) もあり、こうした場所で絶えず新たなリコンビナント株が生まれるのであろうことを実感させてくれる結果であった。

(2) コンゴ共和国

ここでは主に 2 つの視点から検体が収集された。一つは HIV の起源ウイルス探索の観点から、なるだけジャングル奥地の村々から一般病院患者並びに一般健常人ボランティアより採血し、HIV の保有率を調べたものである。平成 19 年度には赤道直下のキュヴェット州オワンドウ町、平成 20 年度には同じ赤道直下であるがガボンとの国境に近く相当劣悪な陸路でしかアクセスすることの出来ないウエスト・キュヴェット州エヴォ町という辺境の町である。エヴォ町の結果は次の通り。PA 検査では、49 検体中 4 検体 (8.2%) が強い HIV 陽性を、他に 1 検体が ± の反応を示した。これらを WB 法によって鑑別診断した結果、前者 4 検体はいずれも典型的な HIV-1 と判明、後者の検体は p24、p55 や p68 に弱く反応したものの gp120 とは反応せず、現時点では判定不能例とされた。前者の 4 検体から PCR 産物が得られ、遺伝子解析の結果、サ

ブタイプ D と H が各 1、他 2 例はそれぞれ A と D、D と G の重感染であった。このような辺境な地域でも HIV の侵入が激しいことが明らかになったが、これらの株は特に古い株とは言い難く、むしろ最近になっておそらくは都市部から持ち込まれたものと思われた。ある程度エイズ診療が進んでいるオワンドウ町については、一般診療患者 44 人中、陽性者が 1 人と少なかった。もっともエイズ診療所では 17 人の患者がおり、その大半は典型的な HIV-1 であったが、その中の 1 検体は Westernblot で 1 型、2 型の両方に反応しながら、共通抗原であるはずの p24/p26 とほとんど反応しない極めてユニークな株であることが判明した。

コンゴでは、もう一つの研究観点、即ち HIV の変異を同一患者の中で追跡できる拠点作りを主な狙いとして進めていた。この視点に関しては、大西洋岸に近いポイント・ノアール（推定人口 5 万人）市にある診療所の所長 Dr. Taty-Taty 氏との共同研究の過程において、個人管理のフォロー体制がしっかりしていることを知ることが出来た。この診療所では同一患者から一定インターバルで再採血することが可能となり、平成 18 年度から 3 年間連続して採血された患者も得られた。発展途上国、特にアフリカでは、こうした追跡調査が出来ることは極めて稀である。

肝心の実験結果であるが、平成17年に同地で集められた59検体について調べたところ、PA検査で59検体全てが強いHIV陽性(PA抗体値 \geq 16384)であった。その内、43検体から envC2V3領域のPCR産物が得られ、分子系統解析の結果、サブタイプAが17(28.8%)、以下Gが7(11.9%)、Hが6(10.2%)、Dが4(6.8%)、

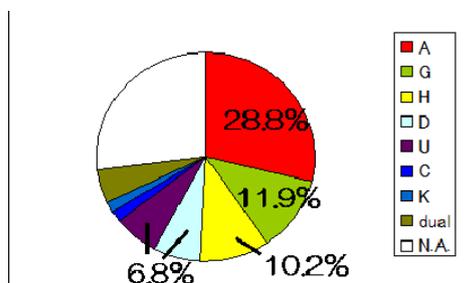


図 1. ポイント・ノアールの診療所で得られたエイズ患者 59 検体の envC2V3 領域におけるサブタイプ分布

Unclassified が 4(6.8%)、C と K が各 1(1.7%)であった(図 1)。PCR 増幅が出来なかったケース(図中白で示した N.A.)が 16 例(27.1%)もあり、重感染が 3 例も見つかったことから、この町では如何に HIV の遺伝型の多様化が進んでいるかが如実である。

また耐性変異に関して、平成 19 年度までに採集した検体の配列を見る限り、幸いに多剤耐性と見られる変異は見つからなかった。

当初目標の一つとして掲げた個体内進化・変異の原則を見つけ、将来予測の手掛かりを得ようとした点であるが、これについてはもう少し時間をかけて取り組む必要があると思われた。本報告書作成時点では、観測拠点を定めることが出来た点が最大の成果であると言って良いであろう。

(3) コンゴ民主共和国

この国は、絶えず政治的不安定を経験しているため検体を収集することすら難しく、最も古い HIV-1 の一つとして知られる ELI 株が相当以前に報告されているにも拘らず、その後首都他若干の都市を除いてほとんど分子疫学調査が為されていない空白地帯であった。特に東部地域の諸州は、未だに小競り合いが散発的ながら起こっているため、欧米を含めて全く調査されたことが無かった。本代表者は、平成18年度から20年度にかけて東部のキサマンガニ市とブカヴ市から諸外国に先駆けて検体を収集することに成功した。

ブカヴから集められた検体の結果は次の通り。80検体の内、PA検査では79検体がHIV陽性。この内、78検体からPCR産物が得られた。系統解析の結果は、サブタイプAが44(56%)、Cが15(19%)、これにF、G、D、Hがそれぞれ4、4、2、1と続いた。この他に11検体が既知のサブタイプに分類されない unclassified であり、そうしたグループが2つ存在することが判った(U1が7、U2が4)。なお重感染が3例あり、AとFが2例、もう1例はAとU1であった。南キヴ州の東側に位置するブルンディには圧倒的にCが多く、東北側に位置するルワンダは圧倒的にAが多いことが報告されている。今回明らかにされた遺伝子型分布は、ルワンダ紛争以後、3国間を人が激しく移動した結果を反映していると解釈することが出来る。Uが11例とかんがりの割合(14%)を占めたことは、遺伝子型の多様化が益々進行している徴候と考えられ、

こうした新しい株が今後周辺に拡散することを警戒する必要があると思われた。何よりも重要な知見は、この広大なコンゴ民主の東側でも多様な遺伝子型が存在することが分かったことで、HIV-1生成の場所としてこの国の調査を今後本格的に進めなければならないことを示唆しているものと考えられた。

最後に、サル類のウイルスについて結果を簡単に述べる。検体は首都キンシャサ市内でペットとして飼育されていたものから得られた。この中でブラックマンガベイと呼ばれるサルから新種のSIVを分離することに成功した(図2. Takemura, et al., J. Gen. Virol., 2005より)。このSIVblkの系統樹上の位置は、既報告のどの株とも独立しており、HIV/SIVの世界が未だ更に拡大する可能性を示す貴重な発見であった。なお、これとは別にドブラザマンキーが高い率でSIV陽性(11頭中4頭)であることも見出している。

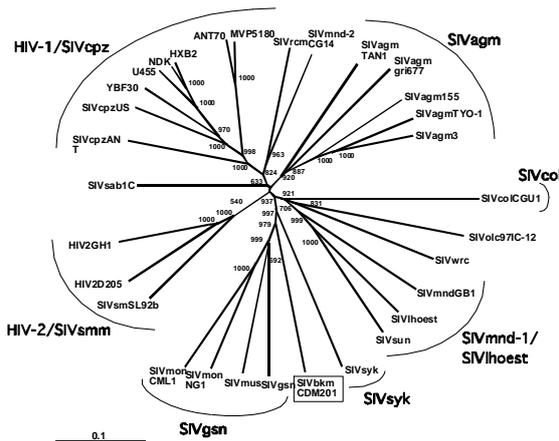


図2. ブラックマンガベイ (*Lophocebus aterrimus*) から分離されたSIVblkのpol領域遺伝子配列に基づく分子系統樹

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6件)

① Yamaguchi-Kabata, Y., Shimada, M. K., Hayakawa, Y., Minoshima, S., et al. (計7名): Distribution and effects of nonsense polymorphisms in human genes. Plos ONE, 3:1-8, 2008. (査読有)

② Yamaguchi-Kabata, Y., Nakazono, K., Takahashi, A., Saito, S., et al. (計8名): Japanese population structure, based on SNP genotypes from 7003 individuals compared to other ethnic groups: effects on population-based association studies. Amer. J. Human Genetics, 83:445-456, 2008. (査読有)

③ 三浦智行: エイズウイルスの起源と進化、Virus Report, 5:82-89, 2008. (査読有)

④ Ndemi, N., Ido, E., Mbanaya, D., Kaptue, L.: Exposure to SIVmnd-2 in southern Cameroon: Public health implications, HIV & AIDS Review, 8(3):16-19, 2007. (査読有)

⑤ Takemura, T., Ekwilanga, M., Bikandou, B., Ido, E., Yamaguchi-Kabata, Y., Ohkura, S., Harada, H., Takehisa, J., Ichimura, H., Parra, H. J., Nende, M., Mubwo, E., Sepole, M., Hayami, M., Miura, T.: A novel SIV from black mangabey (*Lophocebus aterrimus*) in Democratic Republic of Congo. J. Gen. Virol., 86:1967-1971, 2005. (査読有)

⑥ Kurbanov, F., Tanaka, Y., Fujiwara, K., Sugauchi, F., Mbanaya, D., Zekeng, L., Ndemi, N., Ngansop, C., Miura, T., Ido, E., Hayami, M., Ichimura, H., Kaptue, L., Mizokami, M.: A new subtype (subgenotype) Ac(A3) of hepatitis B virus and recombination between genotypes A and E in Cameroon. J. Gen. Virol., 86:2047-2056, 2005. (査読有)

[学会発表] (計5件)

① 井戸栄治, Jean-Raoul Chocolat, Fabien Niama, Jean-Vivien Mombouli, 多田哲子, 梅原綾, 岩元静香, Henri-Joseph Parra: コンゴ共和国辺境地域にある地方病院におけるHIVの血清学的調査、第27回日本国際保健医療学会西日本地方会、2009年2月28日、大阪

② 井戸栄治, Raphael Taty-Taty, 安永みゆき, 田坂暁子, Fabien Niyama, 多田哲子, 多田秀子, 石松美沙, Henri-Joseph Parra: コンゴ共和国西部の町ポイント・ノアールの診療所におけるHIVの遺伝子解析、第23回日本国際保健医療学会学術大会、2008年10月25日、東京

③ 井戸栄治, 多田哲子, Stormy Karhemere, Masimango Imani, 田坂暁子, 多田秀子, Steve Ahuka, Zaccharie Kashongwe, Jean-Jacues

Muyembe: コンゴ民主共和国東部地域におけるHIVの分子疫学、第23回日本国際保健医療学会学術大会、2008年10月25日、東京

④ Ido, E., Taty-Taty, R., Yasunaga, M., Ishimatsu, M., Niama, F., Parra, H-J.: Genetic diversity of HIV-1 has dramatically increased in Republic of Congo during the last decades. 15th East Asia Joint Symposium on Biomedical Research, Seoul, Korea, Jul 22, 2008.

⑤ 安永みゆき、Raphael Taty-Taty、Fabien Niyama、Blaise Bikandou、石松美沙、関口永子、米田幸子、Henri-Joseph Parra、井戸栄治：コンゴ共和国の海岸部都市に流行するHIV遺伝子多様性の解析、第21回日本エイズ学会学術集会・総会、2007年11月30日、広島

[その他]

ホームページ

<http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/Lab/fuku/seikiban.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井戸 栄治 (IDO EIJI)

京都大学・ウイルス研究所・特別教育研究
准教授

研究者番号：70183176

(2) 研究分担者

山口 由美 (YAMAGUCHI YUMI)

理化学研究所・ゲノム医科学研究セン
ター・研究員

研究者番号：10358236

速水 正憲 (HAYAMI MASANORI)

京都大学・ウイルス研究所・教授

研究者番号：40072946

[2005年度のみ]

三浦 智行 (MIURA TOMOYUKI)

京都大学・ウイルス研究所・准教授

研究者番号：40202337

[2005年度～2007年度]

伊吹 謙太郎 (IBUKI KENTARO)

京都大学・ウイルス研究所・助教

研究者番号：00273524

[2005年度～2007年度]

(3) 連携研究者

三浦 智行 (MIURA TOMOYUKI)

京都大学・ウイルス研究所・准教授

研究者番号：40202337

[2008年度]

伊吹 謙太郎 (IBUKI KENTARO)

京都大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：00273524

[2008年度]

(4) 研究協力者 (海外)

Jean-Jacques Muyembe

National Institute of Biomedical
Research, Director, Kinshasa,
Democratic Republic of Congo

Henri-Joseph Parra

National Laboratory of Public Health,
Director, Brazzaville, Republic of
Congo

Raphael Taty-Taty

Centre de Pathologie Infectieuse,
Director, Pointe-Noire, Republic of
Congo

Nicaise Ndembi

University of Yaounde,
Lecturer, Yaounde, Cameroon

Dora Mbanya

Central Hospital, University of
Yaounde, Professor, Yaounde, Cameroon