

学 位 論 文 題 名

Epidemiological Studies of Human
Immunodeficiency Virus Type 1
Subtype E in Heterosexually Infected
Individuals in Thailand

(タイにおいて異性間接触感染者に蔓延している
ヒト免疫不全ウイルス1型-サブタイプEの疫学的研究)

学位論文内容の要旨

[背景と目的]

1980年代初期、北米、西ヨーロッパおよびアフリカで後天性免疫不全症候群(acquired immunodeficiency syndrome, AIDS)の流行が拡大しているころ、タイではヒト免疫不全ウイルス1型 (human immunodeficiency virus type 1, HIV-1)の感染およびAIDSのケースは稀であった。しかし、バンコクの薬物濫用者(injecting drug users, IDUs)の間では、'87年に検出されなかった抗体保有率が、'88年には43%と爆発的な上昇が見られ突然の流行が始まった。

HIV-1は、エンベロープ(env)の遺伝子配列の多型性から、AからJのサブタイプに分類される。タイで流行しているHIV-1のサブタイプはE型とB型であるが、タイのE型はA型と未同定のE型親株のキメラ構造であり、タイのB型は、北米やヨーロッパのB型とは系統樹解析上で異なるクラスターを形成するB'型として知られている。このように、HIV-1は容易に遺伝子変異がおきるため、地域的、経時的にウイルスの特徴および疾病の発症経過に違いが認められる。遺伝子変異の動向やハイリスク集団内のウイルスの特徴の把握は、拡大予防やワクチン開発に重要な意義を持つ。

本研究では、'91年から6年間にわたるタイの各県のハイリスクグループにおける血清疫学、分子疫学調査を行ない、E型のenv領域のV3ループの相同性の検討、スローウイルスとして潜伏状態にあると考えられ、精神疾患と関連性が示唆されているボルナ病ウイルス(BDV)のHIV-1感染者における抗体保有率の検討、またE型2株のプロウイルスの全塩基配列を決め、その遺伝子解析からタイE型HIVの特徴を検討した。

[材料と方法]

1) 血液検体とそのスクリーニング法: '91年から'97年にタイ13県における、性感染症(sexually transmitted diseases, STD)患者、IDUs、売春婦(prostitutes, PROs)、妊婦(pregnant women, PREs)、献血者、無症候性キャリア(asymptomatic carriers, ACs)、AIDS患者の各集団の延べ72,0359名より採取した血液もしくは血漿を用いた。抗HIV-1抗体のスクリーニングは、ELISA法もしくはゲル粒子凝集反応法を用いた。陽性検体はウエスタンブロット法もしくは蛍光抗体法により確認した。

2) ELISAによるHIV-1血清型判定: E、B'、B各型のgp120領域の主要中和ドメインの合

成ペプチドを抗原とした ELISA を用いた。

3) HIV-1 遺伝子型の同定と解析: 感染者末梢血単核球 DNA から、*env* 遺伝子内の V3 領域をポリメラーゼチェーンリアクション(Polymerase Chain Reaction, PCR)法により増幅後、塩基配列を決定し、系統樹解析と相同性の検討を行なった。

4) 抗 BDV-p24 抗体検索: BDV p24-GST 融合蛋白を抗原とした ELISA を用いた。

5) プロウイルス DNA の全塩基配列の決定と解析: STD の ACs から分離された E 型 2 株(95TNIH22, 95TNIH47)の感染末梢血単核球 DNA から Long-PCR 法により全プロウイルス遺伝子を増幅し、クローニング後、塩基配列を決定した。解析は Genetyx7.0 および PHYLIP3.572 パッケージのソフトウェアを用いた。

[結 果]

1) '91 年から '93 年のタイにおける HIV-1 抗体保有率および遺伝子型: タイの 4 県におけるハイリスク集団 5,041 検体および献血者 66,778 検体の HIV-1 抗体保有率は STD 患者; 14.8%、PROs ; 38.6%、IDUs ; 35.2%、献血者集団 ; 2.1% であった。そのうち 63 検体の V3 領域の塩基配列の解析から、E 型と B 型の 2 型に分類され、その系統樹解析より、タイ E 型はアフリカ E 型と同じクラスター内であるが、独自の集団を形成することが判明した。29 名の STD 患者の 86% は E 型、4% は B 型であった。29 名の IDUs では、24% が E 型、76% が B 型であった。E 型は性的接触感染者に、B 型は IDUs 感染者に多く見られた。

2) タイ HIV-1 感染者における BDV 抗体保有率: ACs 60 名の抗 BDV-p24 抗体保有率は 15%、AIDS 患者 67 名では 17.9% であった。リスク集団内では、STD 患者 21 名で 38% と高率であった。PROs 12 名では 8.3%、しかし、PREs 17 名、IDUs 10 名では抗体保有者は認められなかった。Mann-Whitney U 検定から STD 集団は、PROs および IDUs 集団に比べ有意に高い BDV 抗体保有率であった。BDV-p24 抗体保有者の HIV-1 の血清型は、STD 患者では 95.2%、PROs で 83.3%、PREs で 88.2% が E 型であった。

3) '95 年から '97 年の HIV-1 遺伝子型とその相同性: STD 患者 79 名、IDUs 14 名の V3 領域の塩基配列の相同性検索、系統樹解析を行なった。STD 集団の E 型は、株間の差異が高度であるのに対し、IDUs の集団では比較的小さなものであった。

4) タイ HIV-1 分離 2 株の全塩基配列解析: V3 領域のアミノ酸配列は、'91 年のタイ E 株と大きな差異がみられ、特に、この 2 株の tetrameric tip の GPAR、GPGK はこれまでの報告にないものであった。プロウイルス全遺伝子配列解析から、*gag*、*pol* 領域は A 型に近縁であるが、*LTR*、*env* 領域は E 型独自のクラスターを形成した。*LTR* 領域は、NF- κ B サイトが B 型に比べ 1 ケ所と少なく、TATAA モチーフも TAAAA と不完全な配列であり、HIV-1 の転写に重要な Tar 配列も 1 塩基欠落のため不安定な構造をとることが予想された。

[考 察]

本研究より、E 型は性的接触感染者に多く、B 型は IDUs に多い特徴が見いだされた。これは E 型が性的接触によって伝播し易いウイルス学的特性を示唆し、粘膜免疫誘導の重要性が考えられる。全塩基配列の結果からも、*LTR* の転写効率に重要な領域が B 型と異なることは、E 型に特徴的な臨床経過が推測され、E 型は B 型より AIDS の進行が速いとされる報告との関連が興味深い。同様に E 型感染は、より強い免疫抑制を宿主に誘導し潜伏状態 BDV の再活性化を促すことで抗 BDV 抗体の上昇の結果がみられた。

V3 領域は中和抗体誘導部位として知られ、ワクチン開発では大きく注目されている。'95 年から '97 年の結果から E 型の V3 領域の差異の拡大度は、B 型のそれより大きく、tetrameric tip は報告のない配列が出現していた。このことは、現時点も差異の幅が拡大している可能性を示唆し、今後、幅広いワクチンの設計と継続的な蔓延株の解析が必要と考えられる。

[結 語]

これまでの研究により明らかにされたB型とは異なるタイのHIV感染状況であった。

タイE型感染は性的接触感染者に多かった。STD患者のHIV感染者は、PROsおよびIDUs集団に比べBDV抗体保有率は有意に高かった。'95年から'97年のHIV E型のV3領域の変異度は高度であった。タイE型の*LTR*領域は、B型と異なっていた。これらの結果は、感染拡大予防やワクチン開発に向けて的確な指針になるものと考ええる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 生 田 和 良
副 査 教 授 今 村 雅 寛
副 査 教 授 上 出 利 光

学 位 論 文 題 名

Epidemiological Studies of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype E in Heterosexually Infected Individuals in Thailand

(タイにおいて異性間接触感染者に蔓延している
ヒト免疫不全ウイルス1型-サブタイプEの疫学的研究)

1980年代初期、北米、西ヨーロッパおよびアフリカでAIDSの流行が拡大しているころ、タイではヒト免疫不全ウイルス1型(HIV-1)の感染およびAIDSのケースは稀であった。しかし、バンコクの薬物濫用者(IDUs)の間では、'87年に検出されなかった抗体保有率が、'88年には43%と爆発的な上昇が見られ、突然の流行が始まった。

HIV-1は、エンベロープ(*env*)の遺伝子配列の多型性から、AからJのサブタイプに分類される。タイで流行しているHIV-1のサブタイプはE型とB型であるが、タイのE型はA型と未同定のE型親株のキメラ構造であり、タイのB型は、北米やヨーロッパのB型とは系統樹解析上で異なるクラスターを形成するB'型として知られている。このように、HIV-1は容易に遺伝子変異が起きるため、地域的、経時的にウイルスの特徴および疾病の発症経過に違いが認められる。

本研究では、'91年から6年間にわたるタイの各県のハイリスクグループにおける血清疫学、分子疫学調査を行ない、E型の*env*領域のV3ループの相同性の検討、スローウイルスとして潜伏状態にあると考えられ、精神疾患と関連性が示唆されているボルナ病ウイルス(BDV)のHIV-1感染者における抗体保有率の検討、またE型2株のプロウイルスの全塩基配列を決め、その遺伝子解析からタイE型HIVの特徴を検討した。

'91-'93年のタイにおけるHIV-1抗体保有率および遺伝子型の検討よりタイの4県におけるハイリスク集団5,041検体および献血者66,778検体のHIV-1抗体保有率は性感染症(STD)患者; 14.8%、売春婦(PROs); 38.6%、IDUs; 35.2%、献血者集団; 2.1%であった。そのうち63検体のV3領域の塩基配列の解析から、STD患者ではE型、IDUsではB'型が

主であった。

タイ HIV-1 感染者における BDV-p24 抗体保有率は、無症候性キャリアー(ACs)60 名では 15%、AIDS 患者 67 名では 17.9%であった。リスク集団内では、STD 患者 21 名に 38%で PROs および IDUs 集団に比べ有意に高い抗体保有率であり、抗体保有者の HIV-1 の血清型は、E 型が主であった。

'95 年から '97 年の STD 患者 79 名、IDUs 14 名の HIV-1 V3 領域の塩基配列の相同性解析では、STD 集団では株間の差異が高度だが、IDUs の集団内では比較的小さなものであった。

'95 年分離のタイ HIV-1 分離 2 株のプロウイルス全塩基配列解析から V3 領域のアミノ酸配列は、'91 年のタイ E 株と大きな差異がみられ、*gag*、*pol* 領域は A 型に近縁であるが、*LTR*、*env* 領域は E 型独自の配列であった。また、*LTR* 領域の転写調節領域は B 型と異なることが明らかになった。

本研究より、E 型は性的接触感染者に多く、B'型は IDUs に多い特徴が見いだされた。これは E 型が性的接触によって伝播し易いウイルス学的特性を示唆し、粘膜免疫誘導の重要性が考えられる。全塩基配列の結果からも、*LTR* の転写効率に重要な領域が B 型と異なることは、E 型は B 型より AIDS の進行が速いとされる報告との関連が興味深い。同様に E 型感染は、より強い免疫抑制を宿主に誘導し潜伏状態 BDV の再活性化を促すことで抗 BDV 抗体の上昇を促すと考えられる。'95 年から '97 年の E 型の中和抗体誘導部位として知られる V3 領域の差異の拡大度は、B'型のそれより大きいことが明らかになった。このことは、現時点も差異の幅が拡大している可能性を示唆し、今後、幅広いワクチンの設計と継続的な蔓延株の解析が必要と考えられる。

公開発表にあたり、副査の今井教授から中央アフリカの E 型とタイの E 型の違いを質問され、タイ E 型間の相同性は 3~5%であるのに対し、中央アフリカとタイの E 型間では 6~7%の相同性であり、より離れていると解答した。E 型遺伝子上にみつかると特徴はウイルスの感染性や複製にどのように影響するのか質問され、*in vitro* での報告はないが、E 型は AIDS 発症に 3~4 年に対し B 型は 7~10 年と遅いことから、*in vivo* で型特異的ウイルス動向の存在の可能性を示した。E 型に対し抗ウイルス剤治療は B 型と異なるのか質問され、昨年タイの結果から効果的であることを解答した。

次いで、副査の上出教授から 1980 年代後半のタイでの HIV 感染者数の著しい増加の理由を質問され、売春婦の社会行動、特に高い *sexual activity* があることを解答した。また、E 型と B'型がタイに多い理由を質問され、ビルマ等周辺諸国には E 型は少ないことをあげ、伝播経路の特徴と社会的交流状況によることを推察した。E 型の抗体保有率が男性売春夫より女性売春婦に高い理由を質問され、男性売春夫は避妊具を使用するなど行動の違いによると解答した。最後に E 型が B'型に比べ速い進化をおこす理由を質問され、感染者の社会行動と HLA が一つの *force factor* になっていることを解答した。

さらに、これらの結果を用いることにより、HIV の感染拡大予防やワクチン開発に向けて的確な指針になるものと期待される。

審査員一同は、これらの血清学的、分子生物学的疫学の成果を高く評価し、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。