

原 著

茨城県における HIV-1 感染症の最近の動向

長谷 彩希¹⁾, 上西 理恵¹⁾, 廖 華 南¹⁾, 草 川 茂¹⁾, 高山 義浩²⁾,
四本美保子²⁾, 高 橋 央²⁾, 斎 藤 博²⁾, 人見 重美³⁾, 武 部 豊¹⁾

¹⁾ 国立感染症研究所エイズ研究センター

²⁾ 長野県エイズ拠点病院ネットワーク (代表: 斎藤博/県立須坂病院)

³⁾ 筑波大学附属病院感染症科

目的: 1990年代はじめに多数の外国人感染者が報告された茨城県に注目し, 日本の非大都市圏における HIV 感染症の動向の一端を明らかにすることを目的とする。

対象および方法: 茨城県の HIV 感染者から同意のもとに検体の提供を得て, 血清から抽出された RNA を鋳型として PCR を行い, Protease-RT と env C2/V5 領域の塩基配列を direct sequence 法で決定し, 標準株との近隣結合法による系統樹解析によって遺伝子型帰属を決定した。

結果: 茨城県の検体における遺伝子型分布 (n=36) は, CRF01_AE 47.2% (n=17); サブタイプ B 50% (n=18); 不一致例 (CRF01_AE と B 間の組換えあるいは重感染) 2.8% (n=1) であった。感染経路別分布は, 異性間性接触 (n=19) では CRF01_AE が全体の 63% (n=12) を占め, 同性間性接触 (n=7) では全てサブタイプ B であった。2004 年以前 (n=18) は CRF01_AE が 67% (n=12) を占めていたが, 2005 年以降 (n=18) はサブタイプ B が 72% (n=13) に増加した。

結論: この地域では, 異性間感染ルートによる東南アジアを起源とする CRF01_AE の感染の広がりが見られ, 同性間感染ルートによるサブタイプ B の感染が圧倒的に優位な大都市圏とは, 異なる特徴をもつ。しかし, 近年, CRF01_AE 優位から大都市圏型のサブタイプ B 優位へ徐々にシフトしつつある傾向が見える。実効性のある予防戦略立案のためには, 継続的モニタリングと疫学的検討が不可欠であり, 流行動態を考慮した地域ごとの戦略が求められるであろう。

キーワード: HIV-1, 分子疫学, CRF01_AE, 茨城県, 地域差

日本エイズ学会誌 12: 104-109, 2010

緒 言

日本において 1980 年代はじめに, 欧米の HIV-1 感染者と接触をした男性同性愛者 (Men who have sex with men, MSM) 及び, ほぼ同時期に北米から輸入された非加熱血液製剤の投与を受けた血友病患者者にサブタイプ B 感染者が発生した¹⁾。サブタイプ B は, 当時日本で観察されたほぼ唯一のウイルス株と考えられる。しかし, 1989 年に入って, タイで CSW (commercial sex worker) を中心として CRF01_AE による爆発的な流行がはじまり, 1990 年代はじめには周辺の東南アジア諸国に急速に拡大した。CRF01_AE 流行はまもなく日本にも波及した。日本の HIV/AIDS 報告件数の年次推移に見られる 1992 年の感染者数 (主に外国人女性) の急増は, 日本における CRF01_AE の侵淫のタイミングを反映するものと考えられる^{2,3)}。現在, 日本の HIV-1 サブタイプ分布はおおよそ, 欧米からのサブタイプ B が 80%, 東南アジアからの CRF01_AE が 18%, その他が 2% 前後であると推定される (<http://www.hiv.lanl.gov/components/>

sequence/HIV/geo/geo.comp)。

本研究は 1990 年代初めに外国人女性の中に多数の HIV-1 感染者が報告された東関東地域に注目して, 分子疫学的解析を行い, 日本の大都市圏における HIV 感染症の分子疫学的特徴と対比しながら, その疫学的・公衆衛生学的意義について考察を進めようとするものである。

対象 (材料) および方法

材料

2001 年 1 月~2007 年 7 月に茨城県で受診した未治療 HIV 感染者 42 人から採取した血清を材料とした。[国立感染症研究所「医学研究倫理審査」委員会において承認済み (平成 18 年 10 月 5 日, 研究課題名「日本における HIV 感染症の最新動向に関する分子疫学研究」)] 血液の供与は本人の自由意志によるものであり研究協力の意思は同意書をもって確認した。

方法

RNA 抽出キット QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) を用い, 感染者の血清からウイルス RNA を抽出後, nested PCR 法を用いて塩基配列領域を増幅した。解析の対象とした遺伝子領域は protease-reverse transcriptase (pro-RT)

著者連絡先: 長谷彩希, 武部 豊 (〒162-8640 東京都新宿区戸山 1-23-1 国立感染症研究所エイズ研究センター)

2009 年 6 月 11 日受付; 2010 年 2 月 18 日受理

(HXB2 : 2148-3372) 及び envelope (*env*) C2/V5 (HXB2 : 6945-7814) の 2 領域である。第 1 段目の RT-PCR は One-step RT-PCR キット (Takara) を用いて行った。プライマーは, pro-RT 領域に関しては 5'-AGA CAG GYT AAT TTT TTA GGG A-3' (forward, F) および 5'-TAC TTC TGT TAG TGC TTT GGT TCC-3' (reverse, R), *env* C2/V5 領域に関しては 5'-ATA CAT TAT TGT ACC CCR GCT GG-3' (F) および 5'-GTC TGG CCT GTA CCG TCA GCG-3' (R) を用いた。RT-PCR の温度条件は 94°C, 1min→{94°C for 30 sec→50°C, 30 sec→72°C, 3 min} 30 サイクル→72°C, 7 min である。2nd PCR には, pro-RT 領域ではプライマー 5'-AGA GCC AAC AGC CCC ACC AG-3' (F), 5'-TAA TCC CTG CAT AAA TCT GAC TTG C-3' (R), *env* C2/V5 領域に関しては, プライマー 5'-AAT GTC AGC ACA GTA CAA TGT ACA C-3' (F) と 5'-GCC CAT AGT GCT TCC TGC TGC TCC-3' (R) を用いた。2nd PCR の温度条件は 94°C, 1 min → {94°C for 30 sec→55°C, 30 sec→72°C, 3 min} 30 サイクル →72°C, 7 min である。PCR 産物を泳動後, QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) で精製し, Direct sequencing 法によって塩基配列を決定した。sequence 用プライマーは 2nd PCR と同一のものを用いた。BigDye® Terminator v1.1 (Applied Biosystems) を用い, ABI PRISM® 3130 Sequencer (Applied Biosystems) によって塩基配列を決定した。Clustal W⁴⁾ で配列のアライメントを行い BioEdit version 7.0.5.3⁵⁾ を利用し手動で修正を加えた後, 近隣結合法 (Tajima Nei⁶⁾, 1000 bootstrap replicates) による系統樹解析を MEGA version 3.1⁷⁾ を用いて行った。樹形の信頼性は Bootstrap 法によって検定した。

結 果

検体の疫学的属性

提供を受けた全 42 検体中 36 検体 (86%) に関して pro-RT 領域と *env* C2/V5 領域の双方, あるいはどちらかの領域の塩基配列を決定することができた。塩基配列が得られた 36 検体の年齢の中央値は 44 歳 (最低 18 歳, 最高 73 歳) で, 10 代 1 人 (3%), 20 代 7 人 (19%), 30 代 8 人 (22%), 40 代 6 人 (17%), 50 代 9 人 (25%), 60 歳以上 5 人 (14%) であった。検体採取期間と同時期 (2001-2007 年) の茨城県全体の感染者の年齢中央値は 42 歳, 日本全体では 36 歳で, 検体は茨城県の傾向を反映しているが, 日本全体と比べ約 8 歳高齢側にシフトしている。性別は男性 29 人 (81%) [うち外国人 2 人 (6%)], 女性 7 人 (19%) [うち外国人 3 人 (8%)] であった (図 1A)。また, 国籍は日本人 31 人 (86%) [うち女性 4 人 (11%)], 外国人 5 人 (14%) [うち女性 3 人 (8%)] であった (図 1B)。感染経路別に見ると, 異性間 19 人 (53%), 同性間 7 人 (19%), 両性間 1

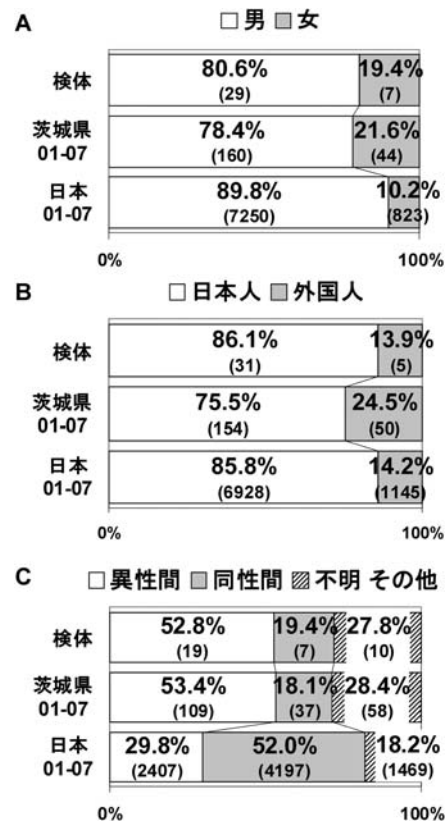


図 1 36 検体の疫学特徴: (A) 性別, (B) 国籍, (C) 感染経路: 茨城県全体, 日本全体 (2001-2007) の資料と比較

人 (3%), 血液製剤 1 人 (3%), 不明 8 人 (22%) であった (図 1C)。日本全体でみると異性間 30%, 同性間 52%, その他 18% [不明を含む (非加熱血液製剤による感染者は含まない)] であるので, 検体は茨城県のプロファイルと近似しているが全国的な傾向とは大きく異なっている。特に異性間性接触による感染者は, 日本全体での値の 2 倍近くの割合 (検体 53%, 全国 30%) であり, 一方同性間性接触が少ない (検体 19%, 全国 52%) ことが注目される。国籍別にみた場合, 検体は, 日本全体での割合 (日本人 86% : 外国人 14%) と差はないが, 茨城県は外国人が 25% と検体は茨城県と比べ低い割合を示した。また, 男女比は, 日本全体では男性 90%, 女性 10% であるが, 今回の検体では女性が約 20% と茨城県と同様に女性の比率が高い (エイズ動向委員会報告書 [http : //api-net.jfap.or.jp/mhw/survey/mhw_survey.htm](http://api-net.jfap.or.jp/mhw/survey/mhw_survey.htm))。

遺伝子型分布

遺伝子型を決定することができた 36 検体の遺伝子型分布は, サブタイプ B 18 人 (50%), CRF01_AE 17 人 (47%), サブタイプ不一致例 (pro-RT がサブタイプ B, *env* が CRF01_

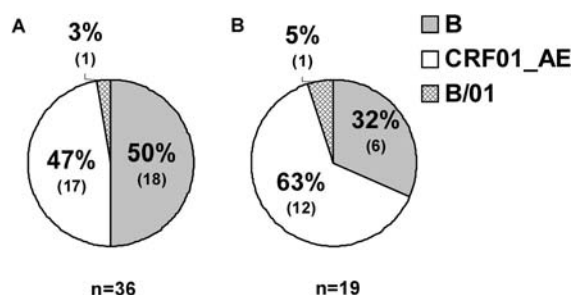


図 2 茨城県採取検体における HIV-1 遺伝子型分布 (A) 全体 (B) 異性間性接触

AE) 1 人 (3%) であり、サブタイプ B と CRF01_AE が約半数ずつと拮抗している (図 2A)。サブタイプ B 検体は全て欧米型の B であり、タイを起源とするとされる B' ではない (図 3)。異性間性接触による感染者 (n=19) の遺伝子型分布では、サブタイプ B 6 人 (32%)、CRF01_AE 12 人 (63%)、サブタイプ不一致例 1 人 (5%) で、CRF01_AE が過半数を占める (図 2B)。なお、サブタイプ不一致例は、異性間性感染の日本人男性から検出されたものである (表 1)。遺伝子型別の年齢の平均値はサブタイプ B 38.8 歳 (SD=15.0)、CRF01_AE 47.8 歳 (SD=14.6) であり、約 9 歳の差が見られた。

Los Alamos HIV データベースによる 2007 年までの日本全体のサブタイプ分布 (<http://www.hiv.lanl.gov/components/sequence/HIV/geo/geo.comp>) と比較すると、CRF01_AE が、日本全体では約 18% であるのに対して、検体では 47% と高い。一方、サブタイプ B が日本全体で約 80% であるのに対し 50% と少ないという特徴が見られる。

サンプリング年代による遺伝子型分布の特徴

HIV 遺伝子型分布の時間的推移を検討するため、検体採取年別に集計してみると、2001 年には CRF01_AE が 100% であるのに対し、2001 年から 2007 年にかけてサブタイプ分布は次第に CRF01_AE 中心からサブタイプ B 中心に移行し、2007 年にはサブタイプ B が 100% となっている (図 4A)。また、感染経路は 2003 年まで異性間性接触による感染が 100% であるが、同・両性間性接触による感染が年々増加し、2007 年には 60% を占めるまでになっている (感染経路不明を除く) (図 4B)。さらに、異性間性接触による感染者に限っても CRF01_AE 中心からサブタイプ B 中心に移行する傾向が観察された (図 4C)。しかし、感染経路の申告の正確性に疑問が残る (後述)。

考 察

茨城県は、長野県と並んで 1990 年代初めに外国人女性の間に多数の HIV-1 感染者が報告された地域である (エイズ

動向委員会報告書 http://api-net.jfap.or.jp/mhw/survey/mhw_survey.htm)。本研究で明らかにされたように、茨城県では異性間感染、また CRF01_AE の割合が全体の半数近くを占め、サブタイプ B、同性間感染が大多数を占める東京・大阪など大都市圏とは全く異なる傾向にある。さらに、この地域では中高年齢層の日本人男性に多数の CRF01_AE 感染が存在するという特徴がある。これらの知見は、この地域で 90 年代初めに外国人女性感染者の報告数が急増した事実と何らかの関連があると考えられるが、実際の感染時期が明確でない為推測の域を出ない。また、今研究では外国人の割合 (14%) が茨城県全体 (25%) に比べ低いことから、外国人に関する結果の議論は難しいと考える。

本研究では異性間感染が主体であるが、男女比が 4 : 1 と女性感染者が低いレベルにある。検体採取期間と同時期 (2001-2007 年) の茨城県の感染者・患者の疫学データ (http://www.hsc-i.jp/06_aids/houkoku.htm) でも、日本人男性 67%、日本人女性 9%、外国人男性 12%、外国人女性 12%、となっている。データでは女性感染者の把握が充分ではなく、隠れた感染者が存在する可能性を否定できない。本研究のデータもサンプリングバイアスが正確な分析の妨げとなっている可能性がある。しかし、本研究での異性間性接触での男性に偏った感染傾向は、1996 年までの日本の異性間性接触による累計エイズ患者の傾向、男性 4 : 女性 1⁸⁾ と近似していることから、日本では異性間性接触による感染の場合に、男性感染者の報告数が多くなる傾向があると考えられる。

また、遺伝子型分布の年次推移をみると、2004 年以前には CRF01_AE が 67% を占めていたのに対し、2005 年以降はサブタイプ B が 72% に増加しており、近接する大都市圏の影響を受け、次第に同性間感染によるサブタイプ B 優位の傾向にシフトしつつある可能性が示唆される。同性間感染者だけでなく異性間感染者によるサブタイプ B 感染の広がり可能性が観察されたことは、感染拡大のルートと傾向を考える上で大変に興味深い。

系統樹解析から、CRF01_AE では、明白な疫学的な関連が推測されるケースを除いて系統樹上に明らかなクラスターが見られないことから (図 3)、1 つあるいは少数の founder strain がこの地域の感染の広がり原因となっているのではなく、外部から個々にまた様々な時期に侵入してきたもの (multiple entry) によるものと示唆される。

ここにみるように、日本における HIV 感染症の広がり・流行動態は刻々と変化しており、地域差も大きい。実効性のある予防戦略立案のためには、継続的モニタリングと疫学的検討が不可欠である。都会と異なる流行動態を示している地域では、若者・MSM を主要な対象とする都会

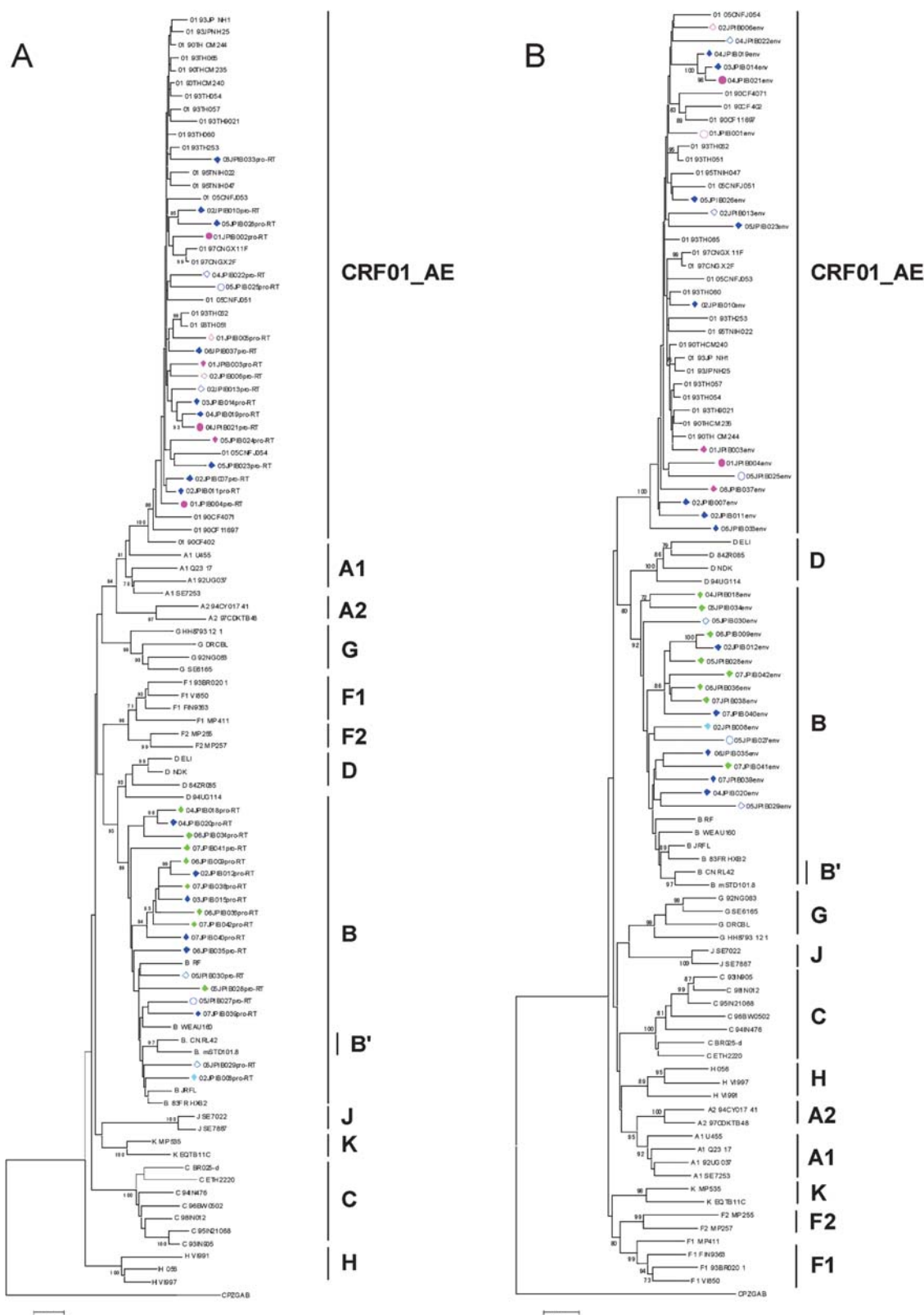


図 3 系統樹解析 (近隣結合法) による遺伝子型決定: 領域 (A) pro-RT (B) env (C2/V5).
 国籍・性別: 日本人女性 (◆), 日本人男性 (◇), 外国人女性 (●), 外国人男性 (○).
 感染経路: 異性間 (性別色分けと共通), MSM (◆), 血液 (◇), 経路不明 (白抜き).

表 1 茨城県採取検体における分子疫学情報のまとめ

国籍	性別 (n)	感染経路	n	遺伝子型		
				CRF01_AE	B	B/01
日本	男性 (27)	異性間性接触	14	7	6	1
		同・両性間性接触	8		8	
		血液製剤	1		1	
		不明	4	2	2	
	女性 (4)	異性間性接触	2	2		
		不明	2	2		
日本国籍合計			31	13	17	1
ブラジル	男性 (1)	不明	1		1	
バングラデシュ	男性 (1)	不明	1	1		
マレーシア	女性 (1)	異性間性接触	1	1		
タイ	女性 (2)	異性間性接触	2	2		
外国国籍合計			5	4	1	
総計			36	17	18	1

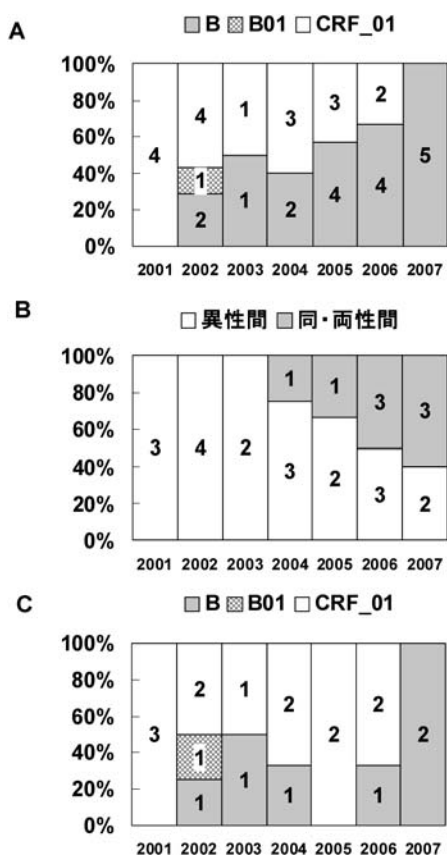


図 4 検体採取年代別 (2001-2007) 疫学構成 (A) HIV-1 遺伝子型 (B) 感染経路 (感性経路不明, 血液製剤を除く。両性間性接触例は, 同性間性接触を含む) (C) 異性間接触感染による遺伝子分布

型キャンペーンをそのまま展開するのではなく、流行動態を考慮した地域ごとにカスタマイズされた戦略が要求されるであろう。本研究において茨城県では中高年層の異性間性感染の一方で都市型の同性間性感染も顕在化してきたことが特筆され、このような状況を考慮した感染対策が必要だと考えられる。

謝辞

本研究にご協力頂いた研究協力者および患者各位に感謝の意を表します。疫学的分析に関して堀成美 (聖路加病院) 氏のご助言を感謝します。本研究は厚生労働省科学研究費補助金, エイズ対策事業 (アジア・太平洋地域における HIV・エイズの流行・対策状況と日本への波及に関する研究) の助成を受けて行われました。長谷彩希はヒューマンサイエンス財団, 上西理恵, 廖華南はエイズ予防財団リサーチレジデントであり, 両財団からの支援を感謝します。

文 献

- 1) Kurimura T, Kawatani T, Hattori N, Tsuchie H : Prevalence and transmission of human immunodeficiency virus in Japan. AIDS Res 2 Suppl 1 : S163-166, 1986.
- 2) Weniger BG, Takebe Y, Ou CY, Yamazaki S : The molecular epidemiology of HIV in Asia. AIDS 8 Suppl 2 : S13-28, 1994.
- 3) Takebe Y, Uenishi R and Li X : Global molecular epidemiology of HIV : Understanding the genesis of AIDS

- pandemic. *Adv Pharmacol* 56 : 1–25, 2008.
- 4) Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ : CLUSTAL W : improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22 : 4673–4680, 1994.
- 5) Hall TA : BioEdit a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acid Symp*, Ser 41 : 95–98, 1999.
- 6) Tajima F, Nei M : Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. *Mol Biol Evol* 1 : 269–285, 1984.
- 7) Kumar S, Tamura K, Nei M : MEGA3 : Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* 5 : 150–163, 2004.
- 8) 梅田珠美, 木原正博, 橋本修二, 市川誠一, 鎌倉光弘, 嶋本喬 : 日本の異性間性的接触によるエイズの特徴 エイズサーベイランスによる英国および米国との比較研究. *日本公衛誌* 48 : 200–208, 2001.

The Recent Trends of HIV-1 Infections in Ibaraki Prefecture

Saiki HASE¹⁾, Rie UENISHI¹⁾, Huanan LIAO¹⁾, Shigeru KUSAGAWA¹⁾, Yoshihiro TAKAYAMA²⁾, Mihoko YOTSUMOTO²⁾, Hiroshi TAKAHASHI²⁾, Hiroshi SAITO²⁾, Shigemi HITOMI³⁾ and Yutaka TAKEBE¹⁾

¹⁾ Laboratory of Molecular Virology and Epidemiology, AIDS Research Center, National Institution of Infectious Diseases

²⁾ Nagano Hospital Network for AIDS care and treatment (Principal Hospital : Prefectural Suzaka Hospital)

³⁾ Department of Infectious Diseases, Tsukuba University Hospital

Objectives : We undertook molecular epidemiological investigation in Ibaraki prefecture, where numbers of non-Japanese HIV infection reported in early 90's, to elucidate the recent trends of HIV infections in the non-metropolitan region in Japan.

Materials and Methods : The nucleotide sequences of protease-reverse transcriptase and envelope C2/V5 regions of plasma HIV-1 RNA from 36 HIV-1-positive consenting patients in Ibaraki were determined by direct sequencing and were subjected to phylogenetic analyses to define the genotypes.

Results : HIV-1 genotype distribution (n=36) was as follows : CRF01_AE (17, 47%) ; B (18, 50%) ; subtype discordance (B in pro-RT/CRF01_AE in *env*) (1, 3%). CRF01_AE predominated in heterosexual transmitted population (12/19, 63%), while MSM were exclusively infected with subtype B. The prevalence of CRF01_AE in heterosexual transmitted population decreased from 100% in 2001–2002 to 40% in 2007. In contrast, the prevalence of subtype B increased from 0% in 2001–2002 to 60% in 2007.

Conclusion : We observed the HIV infection profile in Ibaraki from those in metropolitan areas where MSM and subtype B predominate. CRF01_AE was introduced into this region in early 1990s and spread into male Japanese population through heterosexual contact. The recent increase in the proportion of subtype B infection appears to reflect the increase of MSM cases in recent years. The present study emphasises the importance of continuous monitoring in non-metropolitan areas and the necessity of implementing specific prevention measures customized to the region's social characteristics.

Key words : HIV-1, molecular epidemiology, CRF01_AE, Ibaraki, area study