

## 総説

## 大規模ウイルス遺伝子配列解析からみた本邦の HIV-1 流行動態

—日本薬剤耐性サーベイランスネットワークの活動から—

HIV-1 Transmission Dynamics in Japan Inferred from  
Large-Scale Viral Sequence Data

—A Harvest from Japanese HIV-1 Drug-Resistance Surveillance Network—

椎野禎一郎<sup>1)</sup>, 杉浦 互<sup>2)</sup>Teiichiro SHINO<sup>1)</sup>, Wataru SUGIURA<sup>2)</sup><sup>1)</sup> 国立感染症研究所感染症疫学センター, <sup>2)</sup> 国立病院機構名古屋医療センター臨床研究センター感染・免疫研究部<sup>1)</sup> Infectious Diseases Surveillance Center, National Institute of Infectious Diseases,<sup>2)</sup> Clinical Research Center, Nagoya Medical Center

## はじめに

感染症の流行に対策を講じる時、「どんな病原体」が「いつから」どういった「経路」で感染を広げているのかを解明することが重要となる。新興感染症や院内感染のアウトブレイクの際には、定常的なサーベイランスや現場での調査（実地疫学）から得られた情報を数理的に解析する（分析疫学）ことで、病原体の種類はもとより、感染者の伝播ネットワーク・アウトブレイクの発端事象・種々の疫学的指標等が明らかになり、感染の制圧や再発防止に繋がる。たとえば、2009年の新型インフルエンザの流行の際には、国立感染症研究所・感染症情報センター（当時）による実地疫学調査によって最初のアウトブレイクの感染像が解明され<sup>1)</sup>、アウトブレイクの再感染阻止に貢献した<sup>2)</sup>。HIVの感染予防対策においても Treatment as Prevention が叫ばれる今日、こうした疫学情報は重要度を増している。HIV感染症においては、感染者は必ずしも感染初期に医療機関等を訪れるわけではないため、医療機関等から報告された情報のみでは HIV の潜在的な感染者の推測が難しく、通常のサーベイランスや実地疫学調査で伝播ネットワークを明らかにすることは困難である。これに代わる方法として近年脚光をあびているのが、ウイルス遺伝子配列の分子進化学的解析によってウイルス伝播過程を予測する phylodynamic 解析<sup>3,4)</sup>である。この方法は、多数の患者から感染ウイルスの塩基配列を得る必要があること、解析に

大量の計算が必要なことが難点だった。近年、塩基配列ベースの診断法の普及と電算機の性能の向上によってこれらの難点は克服されつつあり<sup>5)</sup>、採取されたウイルスが過去にたどった進化の道筋を比較的正確に推定することが可能となっている<sup>6,7)</sup>。本稿では、従来のサーベイランスや分子疫学解析で明らかになっている日本国内の HIV 感染の動向を紹介するとともに、日本薬剤耐性サーベイランスネットワーク<sup>8,9)</sup>で行われている phylodynamic 解析の結果を示し、本邦の HIV-1 の流行動態について考察したい。

## 1. サーベイランスによる本邦の HIV-1 流行の動向

## 1-1. エイズ動向委員会年報にみる流行動向

本邦における公的な HIV/AIDS のサーベイランスは、1984年に開始されエイズ予防法（1989～1999年度）・感染症法（1999年度～）に基づき診断医の全数届出によって行われている。その結果は厚生労働省エイズ動向委員会（以下動向委員会）による「エイズ発生動向年報」として公表されている。平成25年の年報<sup>10)</sup>によると、1985～2013年の累積報告数は HIV 感染者 15,812 件・AIDS 患者 7,203 件で、血液凝固因子製剤による HIV 感染者 1,439 件を加えると国の把握している HIV 感染者は 24,454 件である。動向委員会は報告数に占める AIDS 患者の割合が下がらないことに警告を発している。2012年に至っても 30%あまりが AIDS と診断されて初めて HIV 感染が判明したものであり、潜在的感染者数と検査による感染者の間の齟齬を如実に示している。HIV 感染者の大半は日本国籍の男性で、彼らのおよそ 3/4 は男性間性的接触者（MSM）である<sup>10)</sup>。MSM は、男性 HIV 感染者の中では 1999 年から、AIDS 患者の中では 2004 年から大きく数を伸ばしてきており（図 1）、

著者連絡先：杉浦 互（〒460-0001 名古屋市中区三の丸 4-1-1 国立病院機構名古屋医療センター臨床研究センター 感染・免疫研究部）

2014年7月11日受付

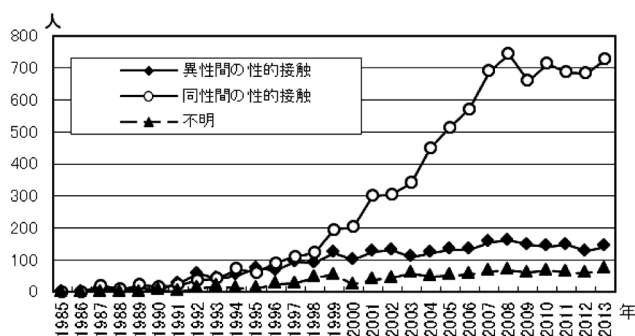


図 1 日本国籍男性の新規 HIV 感染者報告数の感染経路別年次推移

1985～2013 年の統計。●は異性間接触を、○は MSM を、▲は不明症例を示す。平成 25 年エイズ発生動向概要<sup>10)</sup>より引用した。

本邦の HIV 流行動向は 2000 年代とそれ以前では異なる様相を呈していることがわかる。

### 1-2. 薬剤耐性サーベイランスにみる流行動向

日本薬剤耐性サーベイランスネットワーク（以下薬剤耐性ネット）では、国内の 23 の医療・研究機関を結んで 2003 年より薬剤耐性 HIV のサーベイランスを中心に国内で流行する HIV 株の動向を調査している。2012 年の検体捕捉率は、動向委員会報告数の 45% に相当し、定点サーベイランスとして質の高いものとなっている<sup>11)</sup>。最近のサーベイランスの報告<sup>9)</sup>によると、2003～2008 年のウイルス塩基配列が明らかな 2,573 症例については、動向委報告と同様に男性 (93.2%) 日本国籍 (90.1%) が多数を占め、約 74% が MSM をリスク因子としてあげていた。特筆すべきは、ウイルス塩基配列から判明したサブタイプにみられる不均衡である。検体の約 88% を占めるサブタイプ B においては、MSM がきわめて高いリスク因子であり (95.9%)、日本人が主体であったのとは対照的に、非 B 型サブタイプでは異性間接触が多く、また外国人が認められた。この結果は、MSM リスク集団の感染するサブタイプに強い拘束性があることを示している。この拘束性は、世界の MSM 集団の最初のアウトブレイクで導入されたウイルス系統の影響であろう。しかし、記述疫学にサブタイプ情報だけを組み合わせただけの場合、これ以上の情報を得ることは難しい。

## 2. 分子疫学による本邦の HIV-1 流行の動向

本邦の HIV-1 の分子疫学研究は、おもに少数の地域を限定して行われている。90 年代の感染者はサブタイプ B が優勢だったと考えられている<sup>12)</sup>。90 年代には、1998 年から 2000 年の首都圏の新規来院患者 89 名の調査がある<sup>13)</sup>。この調査では、73% がサブタイプ B に、18% が CRF01\_AE に、

残りが A, C, CRF02\_AG に感染していた<sup>13)</sup>。41 名の MSM はすべてサブタイプ B に感染しており、90 年代末にはサブタイプ B はすでに MSM 患者に広がっていたことがわかる<sup>13)</sup>。env V3 近傍領域の配列による分子系統樹解析では、サブタイプ間分岐以外に有意な分岐は示唆されていないが<sup>13)</sup>、サブタイプ B にはいくつかのサブクラスタを観察することができる。2000 年代に入ると、MSM へのサブタイプ B ウイルスの感染は日本全体で増加した<sup>9)</sup>。一方、この現象は大都市圏以外では遅れて生じた。2001 年から 2007 年に茨城県で受診した患者の調査では、日本人の中老年男性に多数の CRF01\_AE 感染例が見出された<sup>14)</sup>。この地域の CRF01\_AE は、2004 年以前に感染が発覚した患者に顕著に多く、2000 年代後半にはこの地域でも MSM によるサブタイプ B 感染が主要なリスクとなっていた<sup>14)</sup>。最近報告された神奈川県と東京都で 2004 年から 2011 年に診断された 477 患者による解析<sup>15)</sup>では、MSM 日本人男性 246 名のうち 239 名がサブタイプ B に感染しており、その系統樹にはおもに 4 つのクラスタが見ついている。これらのクラスタには、中国から報告されている塩基配列に近縁のウイルスが含まれていた。残り 7 名の MSM 患者は、pol 領域および env 領域の両方が CRF01\_AE か B と CRF01\_AE の組換え体であったが、それらのうち 3 検体の CRF01\_AE 部分は、中国で最近流行している CRF01\_AE のアウトブレイク株に近縁であった<sup>15)</sup>。こうしたウイルスは MSM とは確認できない 3 名の男性患者からも発見されているが、これらの 6 症例はいずれも比較的最近 (2010～2011 年) に診断された<sup>15)</sup>。この報告は、中国と日本の MSM 感染ネットワークにつながりがあること、それを通じてサブタイプ B と CRF01\_AE の共感染が起こっていることを示している点で重要だが、症例は首都圏に限られた医療機関の受診者のみに限られている。

## 3. 全国規模のウイルス遺伝子配列サーベイランスによる感染クラスタ解析

薬剤耐性ネットは、抗 HIV 薬の標的分子の遺伝子配列に加えて疫学的な付帯情報を合わせたデータベースを構築している。この収集された HIV の配列データを用いて、われわれは HIV の伝播過程や感染者ネットワークの解明を目指して phylodynamic 解析を進めている。

### 3-1. 感染クラスタの推定法

感染者集団のウイルス分子系統樹解析は古くから行われているが<sup>16-18)</sup>、推定された系統樹は一カ所から分岐する傾向が強く有効なクラスタの同定には至らないことが多い。これは、HIV ゲノムの遺伝子多様性が大きく、精細な検定法によらないかぎり有意なクラスタを見出せないためである<sup>5)</sup>。われわれは、データベースにある数千の配列

を大量の外国由来の参照配列とともに解析し、複数の高精度解析法で得た以下の A~C の基準に合致するものを疫学的に有効な単系統群（微小系統群）とする方法を取った：

- A) 近隣接合法と最尤法で推定した系統樹の両方で単系統となる
- B) 単系統の内部枝検定と Bayesian MCMC 法による事後確率の両方が >95%
- C) 単系統内の配列間の平均塩基多様度が、サブタイプ全体の遺伝距離分布の下位 10% 以内

こうして同定した微小系統群の中で系統樹の根からたどって最初のものを探しだし、国際的感染クラスタとした。さらに下部にたどり、サンプル配列と外国参照配列との分岐にあたる微小系統群を国内感染クラスタとした（図 2）。データベースに登録されている 2002 年以降の初診時に採取された検体情報から、protease-RT 領域の塩基配列が欠落なく揃っている 4,393 配列について、サブタイプ・組換え体構造を同定したのち上記の方法で感染クラスタの推定を行った。薬剤耐性ネットの把握する本邦 HIV-1 のサブタイプ頻度は、サブタイプ B が 88.7%, CRF01\_AE が 7.8%, サブタイプ C が 1.0%, CRF02\_AG が 0.8%, 未知の組換え体が 0.7% であった。また、サブタイプ B に 247 個, CRF01\_AE に 33 個, C に 7 個, CRF02\_AG に 6 個, G で 4 個, F に 2 個の国内感染クラスタが検出された（図 3）。

### 3-2. 感染クラスタ分析から見える感染動向の変化

同定された国内感染クラスタについて、構成メンバーがすべて男性でかつ少なくとも 1 名の MSM を含んでいるものを MSM クラスタとみなすと、MSM クラスタはサブタイプ B に 234 個, CRF01\_AE に 11 個, C, G, CRF02\_AG に各

1 個見つかった（図 3）。サブタイプ B においては、6 名以上の感染者を含む大きなクラスタはすべて MSM 関連であり（表 1）、いくつかの系統のサブタイプ B ウイルスが、日本人の MSM コミュニティごとに大きく広がっていることが分かる。これらのクラスタの共通祖先ウイルスの存在時期（tMRCA）を Bayesian MCMC 法で推定したところ、国内コミュニティへの侵入は 1982 年にはすでに始まっており、90 年代後半から加速的に侵入事例が増えていることが示唆された（図 3）。一方、CRF01\_AE の MSM クラ

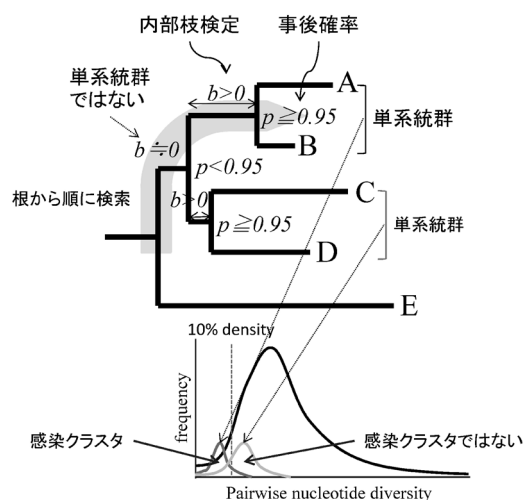


図 2 感染クラスタの同定法

系統樹の根から順に有意な単系統群を探し、平均塩基多様度が配列対の遺伝距離の分布（下のグラフ実線）の 10% 以下におさまるものを感染クラスタとした。

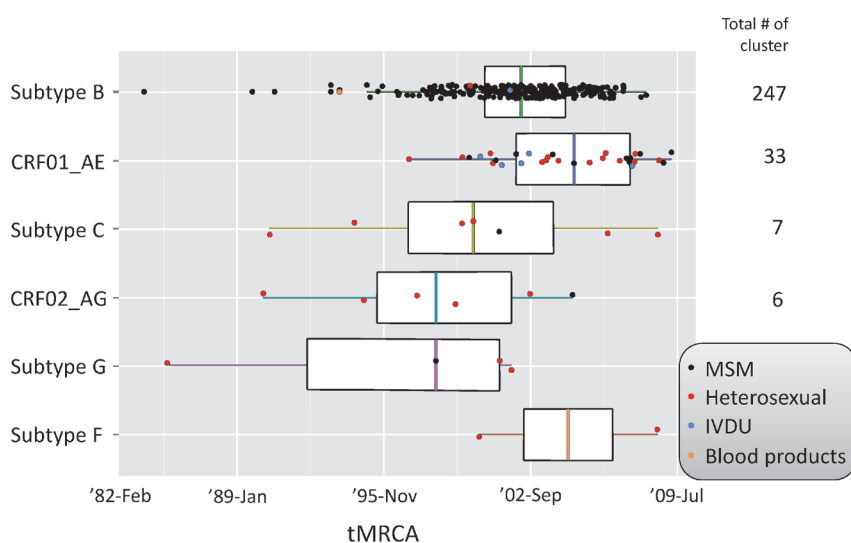


図 3 本邦で検出された国内感染クラスタの tMRCA のサブタイプ毎の分布  
点は同定された感染クラスタを示し、点の色は感染クラスタの主要なリスク因子を示す。

表 1 サブタイプ B の感染クラスタの大きさと、推定される感染リスクの関係

クラスタサイズ	MSM	Hetero	IVDU	Unknown	合計
2	118	6	1	5	130
3-5	77	1	0	0	78
6-10	25	0	0	0	25
11-20	7	0	0	0	7
>21	7	0	0	0	7
合計	234	7	1	5	247

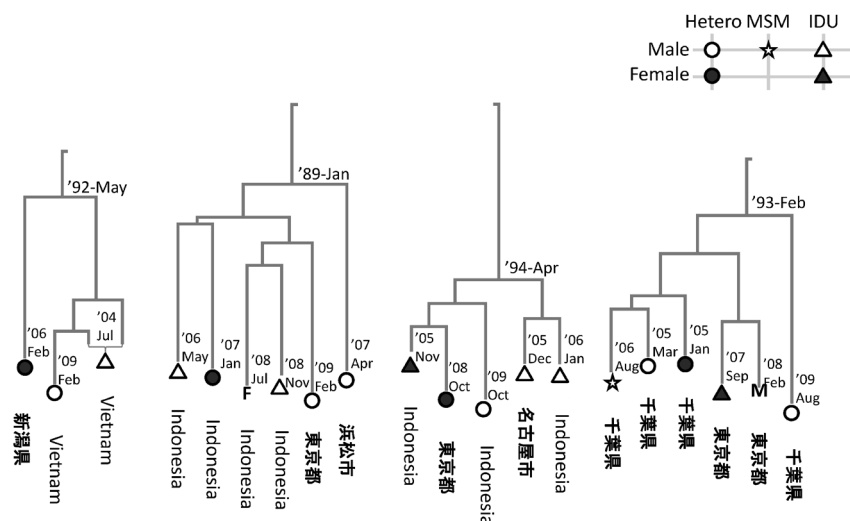


図 4 CRF01\_AE のおもな国内感染クラスタ  
大きな感染クラスタに7名のIVDUが集積していることがわかる。

スタはいずれも起源が新しい小さなもので、2000年代に入ってからコミュニティに浸潤しはじめていることがわかった<sup>19)</sup>。前述の中国由来のウイルス株<sup>15)</sup>は、この研究のMSMクラスタからも見つかっている。すなわち、MSMコミュニティでは、近年中国を含むさまざまな起源からのCRF01\_AEウイルスが感染を広げつつある。

### 3-3. 新たな組換えウイルスの出現

近藤ら<sup>15)</sup>の報告にもあるように、MSMコミュニティにCRF01\_AEが感染を広げているなかで、先に循環を始めていたサブタイプBとの組換え体が多数観察されている。われわれが解析した *pol* 領域の1,000塩基あまりの領域だけを見ても、多彩な構造の組換え体がおもに外国国籍者を中心に見つかっている。とりわけ01\_AE-B間の組換え体(9症例)の流行は2種類のウイルスの共感染が頻繁に生じる環境がそれなりの頻度で存在していることを示唆している。

### 3-4. IVDU 行動の潜在的危惧

本邦のHIV感染動向においてIVDU患者の報告数はそ

れほど多くはない。しかし、薬物はしばしば危険な性行動とともに使われる傾向があるため、感染者ネットワークにIVDUが1例でも観察される場合はネットワーク内での感染拡大に薬物が影響を及ぼしている可能性が危惧される。われわれは、CRF01\_AE感染9例に観察されたIVDUのうち7例が4つの感染クラスタに集積していることを見出した(図4)<sup>19)</sup>。これらはいずれも比較的大きな感染クラスタであり、また多様な国籍とする感染者が含まれていた。そのtMRCAは2000年代初頭に集中しており、CRF01\_AEの国内における感染拡大には異性間性的接触とは別の起源があることを示唆している。

### 3-5. 新たなサブタイプの流入と感染拡大

感染クラスタの同定による動態の把握の特長の一つに、通常のサーベイランスで見落とされてしまった小さなアウトブレイク事例を検出できることがある。われわれは、本邦において限られた外国籍の患者だけが感染していると考えられてきたCRF02\_AGやサブタイプGにおいて、女性主体の感染クラスタが形成されていることを発見した。た

例えば CRF02\_AG では、4つのクラスタの構成員はいずれも多数の女性と一人の男性である。配列データの Bayesian MCMC 解析によって推定された CRF02\_AG およびサブタイプ G 集団の基本再生産数 (R0) は、その他の主要なサブタイプのものより有意に高かった。02\_AG や G ではきわめて高い伝播活性を持つ男性感染者 (hyper-active male spreader) をハブとしたネットワークが形成されており、異性間性的接触か薬物使用を介して感染が広がりつつあると思われる。

## おわりに

わが国の HIV 感染動向の推定では、近年塩基配列データによる分子疫学的解析が成果をあげつつある。われわれの解析は、かなり古い時代から現在に至るまで海外からの輸入例が絶え間なく続いていると同時に、いったん輸入された系統がハイリスクコミュニティ内で大きく広がっている現状を明らかにした。ハイリスクコミュニティには、従来言われていたサブタイプ B だけでなく最近では CRF01\_AE も感染を広げつつあり、いわば多方面からの複合攻撃に晒されている危険な状態といえよう。国内由来の組換え体の生成や国内で醸成された系統の海外への輸出といった本来は HIV 流行地域でのみ起こるような現象も観察される。一方、薬物使用をリスクとするクラスタは、地域集団における感染拡大のリスクが MSM に限らないことを示唆している。こうした動向の把握は、将来的に Treatment as Prevention のターゲット選びや、それでは抑えきれない感染拡大への対策に有効な情報となるだろう。

## 謝辞

薬剤耐性サーベイランスネットワークに参加されている各施設の皆様と検体をご提供いただいた患者の方々に、心より感謝申し上げます。本邦の HIV の分子疫学に関する近年の研究に関して情報を提供していただいた国立感染症研究所の武部豊先生に深謝いたします。

## 文 献

- 1) Shimada T, Gu Y, Kamiya H, Komiya N, Odaira F, Sunagawa T, Takahashi H, Toyokawa T, Tsuchihashi Y, Yasui Y, Tada Y, Okabe N : Epidemiology of influenza A(H1N1)v virus infection in Japan, May-June 2009. *Eurosurveillance* 14 : 19244, 2009.
- 2) Shiino T, Okabe N, Yasui Y, Sunagawa T, Ujike M, Obuchi M, Kishida N, Xu H, Takashita E, Anraku A, Ito R, Doi T, Ejima M, Sugawara H, Horikawa H, Yamazaki S, Kato Y, Oguchi A, Fujita N, Odagiri T, Tashiro M, Watanabe H : Molecular evolutionary analysis of the influenza A(H1N1) pdm, May-September, 2009 : temporal and spatial spreading profile of the viruses in Japan. *PLoS One* 5 : e11057, 2010.
- 3) Grenfell BT, Pybus OG, Gog JR, Wood JL, Daly JM, Mumford JA, Holmes EC : Unifying the epidemiological and evolutionary dynamics of pathogens. *Science* 303 : 327-332, 2004.
- 4) Holmes EC, Grenfell BT : Discovering the phylodynamics of RNA viruses. *PLoS Comput Biol* 5 : e1000505, 2009.
- 5) Shiino T : Phylodynamic analysis of a viral infection network. *Front Microbiol* 3 : 278, 2012.
- 6) Hughes GJ, Fearnhill E, Dunn D, Lycett SJ, Rambaut A, Leigh Brown AJ : Molecular phylodynamics of the heterosexual HIV epidemic in the United Kingdom. *PLoS Pathog* 5 : e1000590, 2009.
- 7) Lewis F, Hughes GJ, Rambaut A, Pozniak A, Leigh Brown AJ : Episodic sexual transmission of HIV revealed by molecular phylodynamics. *PLoS Medicine* 5 : e50, 2008.
- 8) Gatanaga H, Ibe S, Matsuda M, Yoshida S, Asagi T, Kondo M, Sadamasu K, Tsukada H, Masakane A, Mori H, Takata N, Minami R, Tateyama M, Koike T, Itoh T, Imai M, Nagashima M, Gejyo F, Ueda M, Hamaguchi M, Kojima Y, Shirasaka T, Kimura A, Yamamoto M, Fujita J, Oka S, Sugiura W : Drug-resistant HIV-1 prevalence in patients newly diagnosed with HIV/AIDS in Japan. *Antiviral Res* 75 : 75-82, 2007.
- 9) Hattori J, Shiino T, Gatanaga H, Yoshida S, Watanabe D, Minami R, Sadamasu K, Kondo M, Mori H, Ueda M, Tateyama M, Ueda A, Kato S, Ito T, Oie M, Takata N, Hayashida T, Nagashima M, Matsuda M, Ibe S, Ota Y, Sasaki S, Ishigatsubo Y, Tanabe Y, Koga I, Kojima Y, Yamamoto M, Fujita J, Yokomaku Y, Koike T, Shirasaka T, Oka S, Sugiura W : Trends in transmitted drug-resistant HIV-1 and demographic characteristics of newly diagnosed patients : nationwide surveillance from 2003 to 2008 in Japan. *Antiviral Res* 88 : 72-79, 2010.
- 10) エイズ動向委員会 : エイズ動向委員会報告. 2014. <http://api-net.jfap.or.jp/status/2013/13nenpo/h25gaiyo.pdf>
- 11) 杉浦互 : 厚生労働科学研究補助金エイズ対策研究事業平成 22~24 年度総合報告書. 2013. <https://mhlw-grants.niph.go.jp/niph/search/NISR00.do>
- 12) Yamanaka T, Fujimura Y, Ishimoto S, Yoshioka A, Konishi M, Narita N, Mimaya J, Meguro T, Nakasone T, Okamoto Y, Yoshizaki H, Yamada K, Honda M : Correlation of titer of antibody to principal neutralizing domain of HIVMN strain with disease progression in Japanese hemophiliacs seropositive for HIV type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses*

- 13 : 317-326, 1997.
- 13) Kato S, Saito R, Hiraishi Y, Kitamura N, Matsumoto T, Hanabusa H, Kamakura M, Ikeda Y, Negishi M : Differential prevalence of HIV type 1 subtype B and CRF01\_AE among different sexual transmission groups in Tokyo, Japan, as revealed by subtype-specific PCR. *AIDS Res Hum Retroviruses* 19 : 1057-1063, 2003.
  - 14) 長谷彩希, 上西理恵, 廖華南, 草川茂, 高山義浩, 四本美保子, 高橋央, 齋藤博, 人見重美, 武部豊 : 茨城県における HIV-1 感染症の最近の動向. *日本エイズ学会誌* 12 : 104-109, 2010.
  - 15) Kondo M, Lemey P, Sano T, Itoda I, Yoshimura Y, Sagara H, Tachikawa N, Yamanaka K, Iwamuro S, Matano T, Imai M, Kato S, Takebe Y : Emergence in Japan of an HIV-1 variant associated with transmission among men who have sex with men (MSM) in China : first indication of the International Dissemination of the Chinese MSM lineage. *J Virol* 87 : 5351-5361, 2013.
  - 16) Brown AJ, Lobidel D, Wade CM, Rebus S, Phillips AN, Brettle RP, France AJ, Leen CS, McMenamin J, McMillan A, Maw RD, Mulcahy F, Robertson JR, Sankar KN, Scott G, Wyld R, Peutherer JF : The molecular epidemiology of human immunodeficiency virus type 1 in six cities in Britain and Ireland. *Virology* 235 : 166-177, 1997.
  - 17) Salminen M, Nykänen A, Brummer-Korvenkontio H, Kantanen ML, Liitsola K, Leinikki P : Molecular epidemiology of HIV-1 based on phylogenetic analysis of in vivo gag p7/p9 direct sequences. *Virology* 195 : 185-194, 1993.
  - 18) Yirrell DL, Robertson P, Goldberg DJ, McMenamin J, Cameron S, Leigh Brown AJ : Molecular investigation into outbreak of HIV in a Scottish prison. *BMJ* 314 : 1446-1450, 1997.
  - 19) Shiino T, Hattori J, Yokomaku Y, Iwatani Y, Sugiura W : Phylogenetic analysis reveals CRF01\_AE dissemination between Japan and neighboring Asian countries and the role of intravenous drug use in transmission. *PLoS One* 9 : e102633, 2014.