

## 考 察

*P. carinii* 肺炎の診断に関し、従来から用いられている染色法は操作性や特異度には優れているが感度が低い点が問題となる。新しい検査法として注目されているPCR法は感度、特異度とも極めて高く、優れた検査法である<sup>1,2)</sup>が操作性の煩雑さや制度管理、コストなどの問題もあり一般の検査室にはまだ普及していない。

一方、HIV感染症における代表的な日和見感染症である*P. carinii*肺炎の発症に関しては、ST合剤やペンタミジンなどの予防投与によりその制御がある程度可能となってきた。しかし予防の失敗例や副作用による投与中止例が存在し、またHIV感染がまだ診断されていない段階での*P. carinii*肺炎発症ではその診断に苦慮することも多く<sup>3)</sup>、染色法やPCR法に加え、さらに有効で簡便な診断法について検討する必要がある。

血液検体を用いた検査法は浸襲性が低く比較的容易に施行できしかも繰り返し検査が可能な点で意義がある。*P. carinii*肺炎に関しては血清LDHの上昇や発症初期からの動脈血酸素分圧、肺胞気-動脈血酸素分圧較差の増大などが認められるが、これらはいずれも非特異的な所見である。これらに代わる新しい血清マーカーとして、本研究ではKL-6およびβ-D-グルカン測定による*P. carinii*肺炎診断における有用性について検討した。

血清KL-6抗原は河野ら<sup>4)</sup>により発見されたヒトMUC1ムチンに属する高分子量糖蛋白であり、肺においてはII型肺胞上皮細胞や呼吸細気管支細胞などに発現することが知られている。血清KL-6が間質性肺炎や肺癌の有用な指標となることが注目されており<sup>4,5)</sup>、一般の肺胞性肺炎では上昇しないとされる<sup>4)</sup>。しかし今回の検討において呼吸器感染症の中でも、*P. carinii*肺炎症例の80.0%、レジオネラ肺炎の54.1%の症例で発症初期から血清KL-6が500 U/ml以上を示し陽性となることが明らかとなった。また*P. carinii*肺炎群における発症初期の血清KL-6の平均値はレジオネラ肺炎群よりも有意に高かった。

また*P. carinii*の嚢子の細胞骨格の主成分が真菌類と共通するβ-D-グルカンであることが明らかとなり<sup>6)</sup>、内臓真菌症の有用な指標である血清β-D-

グルカンの*P. carinii*肺炎診断における有用性も示唆される。今回の検討では肺真菌症例は2例と少ないものの全例で血清β-D-グルカンが上昇していたのに加え、*P. carinii*肺炎8例でも全症例でβ-D-グルカン値が20pg/ml以上を示し陽性となっていた。以上の結果より、血清KL-6およびβ-D-グルカンは両者ともそれぞれ単独の測定により、*P. carinii*肺炎診断に関する確定診断法である染色法に比較し特異度はもちろん劣るものの、感度は染色法を上回ることが明らかとなった。また両者の陽性反応的中率は低かったが、両者を同時測定することにより陽性反応的中率が63.6%まで上昇することがわかった。これはKL-6とβ-D-グルカンのそれぞれが陽性となる呼吸器感染症に差があり、両者の測定が相補的に関与しあうためであることがわかった。以上の結果より、*P. carinii*肺炎が疑われる状況にある症例において、KL-6とβ-D-グルカンがともに陽性であれば*P. carinii*肺炎の可能性が極めて高く、治療開始の指標となりえると考えられる。ただしここで注意すべきはKL-6は元来、間質性肺炎や肺癌の指標として検討されているものであり、これらの疾患を基礎疾患として有する場合はその解釈が困難となる。また同様にβ-D-グルカンに関しては真菌症の合併に加え、透析に使用される透析膜や真菌由来の抗癌剤(レンチナン、クレスチンなど)、免疫グロブリンなどの影響で擬陽性となる場合があるといわれ、またβ-D-グルカンの測定キット、測定方法の種類によっては*P. carinii*肺炎の治療に用いられるST合剤自体により擬陽性が出現する場合があるといわれ注意する必要がある。

今回の検討では、HIV感染*P. carinii*肺炎群のKL-6およびβ-D-グルカン値は、非HIV感染群よりも高値をとる傾向にあったが、これは従来いわれているようにHIV感染を基礎疾患とする*P. carinii*肺炎は非HIV感染例に比べ症状の進行が緩徐であり、肺炎発症から受診および診断までの期間がより長くなる傾向にあり、そのあいだに肺内*P. carinii*の増殖にともなうβ-D-グルカンの産生増加や宿主側生体反応としてのKL-6産生増加が進行するためではないかと考えられる。

今回、経時的に血清KL-6、β-D-グルカン値を測定し得た症例を2例のみ提示したが、HIV感染を

基礎とする症例1においては上昇したKL-6、 $\beta$ -D-グルカン値の陰性化に治療開始から約2カ月を要した。一方、症例2では両者とも約3週間で陰性化していた。この理由として症例1では副作用のため *P. carinii* 肺炎に対する十分な治療ができず、ファンシダールの短期間使用とペンタミジン吸入のみの治療であり、*P. carinii* 肺炎の改善が緩徐であったためではないかと思われる。これらの症例におけるKL-6、 $\beta$ -D-グルカン値の推移より、両者の測定はともに *P. carinii* 肺炎の治療反応性を示す有用な指標になり得ることが示唆される。*P. carinii* 肺炎の治療法の選択や治療期間の決定にも有用な情報を与える検査となる可能性があり今後さらに検討を要すると思われる。

## 結 論

血清KL-6、 $\beta$ -D-グルカン値は *P. carinii* 肺炎の発症初期より上昇を認め、また各呼吸器感染症におけるKL-6、 $\beta$ -D-グルカンの陽性率に違いがあり両者が相補的な陽性率分布をとるため、両者の同時測定は *P. carinii* 肺炎の診断、鑑別診断法として有用な検査法である。また両者とも *P. carinii* 肺炎に対する治療反応性に並行して推移することが示唆され、治療法の選択や治療期間の決定にも有用な情報を与える検査となる可能性がある。

## 参考文献

- 1) 斎藤 厚、伊志嶺朝彦、仲本 敦、他：*Pneumocystis carinii*肺炎の早期診断におけるPCR法の有用性と新しい治療法の開発に関する研究、エイズと日和見感染症に関する臨床研究 平成6年度研究報告書：52-61, 1994
- 2) 伊志嶺朝彦、仲本 敦、比嘉 太、他：*Pneumocystis carinii*肺炎の早期診断におけるPolymerase chain reaction (PCR) 法の有用性に関する研究、感染症誌 68:751-758, 1994
- 3) 比嘉 太、伊志嶺朝彦、新垣紀子、他：Nested PCR法による *Pneumocystis carinii* の検出—Pc肺炎症例、その他の入院症例および院内環境における検討—、エイズと日和見感染症に関する臨床研究 平成9年度研究報告書：91-96, 1998
- 4) Kohno, N., Kyoizumi, S., Awaaya, Y., et al: New serum indicator of interstitial pneumonitis activity., *Chest* 96:68-73, 1989
- 5) 北村 諭、日和田邦男、小林 淳、他：ED046による間質性肺炎症例の血清KL-6値の検討、日胸会誌 34(6):639-645, 1996
- 6) 川上亮子、菊池和博、小林 淳、他：間質性肺炎の血清マーカーKL-6が高値であったニューモシスチス・カリニ肺炎の1例、日胸会誌 34(12):1420-1426, 1996
- 7) Hamada, H., Kohno, N., Yokoyama, A., et al: KL-6 as a serologic indicator of *Pneumocystis carinii* pneumonia in immunocompromised hosts., *Internal Medicine* 37:307-311, 1998
- 8) Matsumoto, Y., Yamada, M., Amagai, T.: Yeast glucan of *Pneumocystis carinii* cyst wall: An excellent target for chemotherapy., *J. Protozool.* 38(s): 6-7, 1991



## *Cryptococcus neoformans* の 中枢神経系への播種性感染における 接着分子の役割

川上 和義、高口 善信、Mahboob Hossain Qureshi、屋良さとみ、宮里 明子、  
斎藤 厚

琉球大学医学部 第一内科

### 研究要旨

*Cryptococcus neoformans* (Cn)は経気管的に肺に感染し肉芽腫性あるいは浸潤性病変を形成し、特にエイズ患者のように細胞性免疫が極度に低下した状態では中枢神経系に播種性感染を起こしてしばしば致命的経過をたどる。しかしながら、Cnが肺から中枢神経系に播種する機序についての研究はほとんどなされていないのが現状である。近年、多くの病原微生物が感染に際し宿主側の接着分子を利用しているとする報告が増えつつある。そこで本研究では、Cnの中枢神経系への播種性感染における接着分子の役割を解析するために、マウス肺クリプトコッカス症モデルを用いて抗接着分子抗体がCnの脳播種に与える影響について検討した。Cn強毒株を経気管的に接種すると、マウスの肺内で速やかにCnが増殖し、3週目には明らかな脳への播種性感染を認めた。抗CD11b(Mac-1)抗体を投与した群では血液内および中枢神経系への播種性感染が有意に抑制された。しかし、同じβ2インテグリンファミリーに属するCD11a(LFA-1)、CD11c(CR4)、さらにこれらの共通のβ鎖であるCD18に対する抗体を投与しても脳への播種性感染は抑制されなかった。また、Mac-1のリガンドのひとつであるICAM-1に対する抗体でも影響は認めなかった。抗CD11b抗体の肺内Mac-1陽性細胞に与える影響について調べるために、肺内の白血球分画を分離し抗体で染色後フローサイトメトリを用いて解析したが、Mac-1陽性細胞には影響がみられなかった。また、Cn自身がMac-1分子を発現している可能性についても、同様にフローサイトメトリにて解析したが発現は認めなかった。以上の結果から、Cnが肺から血液内に入る過程でMac-1を利用している可能性が示唆された。

分担研究者：斎藤 厚

研究協力者：川上和義、高口善信、Mahboob Hossain Qureshi、屋良さとみ、宮里明子

### Involvement of adhesion molecules in disseminated infection of *Cryptococcus neoformans* to the central nervous system

Kazuyoshi Kawakami, Yoshinobu Koguchi, Mahboob Hossain Qureshi, Satomi Yara, Akiko Miyazato, and Atsushi Saito

The First Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, University of the Ryukyus

## 目的

クリプトコッカス症はエイズ患者に合併する重要な日和見真菌感染症であり、しばしば中枢神経系への播種性感染を起こして致死的経過をたどる。本感染症の病因真菌である *Cryptococcus neoformans* (Cn) に対する感染防御機構は主として細胞性免疫によって担われることが知られており<sup>1-4)</sup>、エイズのように細胞性免疫が極度に障害された状態では、感染を肺局所に封じ込めておくことができず、血行性に中枢神経系への播種性感染を起こす。本感染症の予後を決定的するのは髄膜脳炎であり、従って肺から中枢神経系への播種性感染機序を解明することは、エイズ患者におけるクリプトコッカス髄膜脳炎の発症予防及びその有効な治療法の確立につながり、このような患者の予後の改善が期待されることから重要な研究課題であると考えられる。

近年、結核菌が接着分子のひとつである Mac-1 (CD11b/CD18) を介してマクロファージに接着すること<sup>5)</sup>、ライノウイルスが ICAM-1 (CD54) 分子を介して宿主細胞に感染すること<sup>6,7)</sup> など、病原微生物の感染成立における接着分子の役割に関する知見が集積されつつある。そこで本研究では、Cn の肺から中枢神経系への播種性感染機序を明らかにするために、マウス肺クリプトコッカス症モデルを用いて、Cn が肺から脳へ播種性感染を起こす課程における接着分子、特にβ<sub>2</sub>インテグリンファミリー [CD11a (LFA-1)、CD11b (Mac-1)、CD11c

(complement receptor type 4:CR4)、CD18 (common β chain)] 及びそのリガンドのひとつである ICAM-1 (図1) の関与について、それぞれに対する抗体投与の影響を調べることによって解析した。

## 方法

### 1. マウス

7～10週齢雌の (Balb/cxDBA/2)F1 マウスを用いた。マウスは全て SPF 環境下で飼育し、感染実験は P2 から P3 レベルで行った。本研究で実施した全ての実験は、予め琉球大学の動物実験委員会の承認を受けている。

### 2. *Cryptococcus neoformans*

実験には血清型 A 臨床分離株 YC-11 (長崎大学第二内科河野 茂教授より供与) を用いた。Cn は PDA 培地上で 2～3 日間培養後生食で 3 回洗浄して用いた。マウス 1 匹当たり 1x10<sup>5</sup> 個の Cn 酵母を経気管的に接種した。

### 3. 抗体

抗マウス CD11a 抗体 (クローン名 M17/5.2; ラット IgG 2b)、抗 CD11b 抗体 (クローン名 M1/70.15.11.5.HL; ラット IgG2b)、抗 CD11c 抗体 (クローン名 N418; ハムスター IgG)、抗 CD18 抗体 (クローン名 M18/2.a.8; ラット IgG2a)、抗 ICAM-1 抗体 (クローン名 YN1/1.7.4; ラット IgG2a) 及びコントロールのラットまたはハムスター IgG 200μg を感染 3

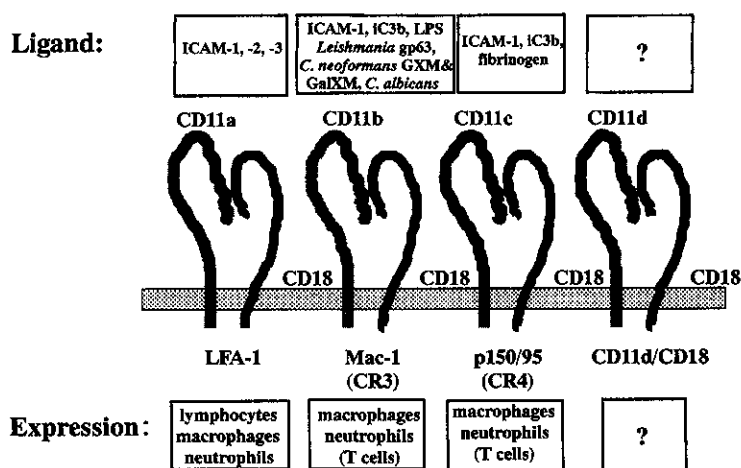


図1 β<sub>2</sub>インテグリンファミリーと ICAM-1

日前、当日、感染後3、7、14日目にマウスの腹腔内に接種した。これらの抗体は、無血清培地(エス・クロンSF-B、三光純薬、東京)にて大量培養し、アンモニウム塩析後、プロテイン A(Amersham Japan社、東京)またはGカラム(KPL社、英国)を用いて精製した。

#### 4. 肺、脳及び血液内真菌数の測定

Cn 感染 21 日目にマウスを屠殺、摘出した肺及び脳をホモジナイズ後、蒸留水にて適当に希釈した組織液から 100 $\mu$ l を PDA 培地に接種し、2 日後にコロニー数を調べた。抗 CD11b 抗体投与マウスに関しては、ヘパリン加で採決した血液内の生菌数についても調べた。

#### 5. 肺内白血球の解析

PBS、ラット IgG または抗 CD11b 抗体を投与したマウスに Cn を経気道的に感染させた後 21 日目に屠殺開胸し、右心室から冷生食により肺内血管床を洗浄後摘出した肺をホモジナイズ、DNaseI 及びコラーゲナーゼで 1 時間処理した後、パーコール比重遠心法にて白血球分画を精製した。得られた細胞は FITC 標識抗 Mac-1 抗体(Caltag Lab 社、米国)で染色した後、フローサイトメトリにて解析した。

#### 6. Cn における Mac-1 様分子発現の有無についての解析

Cn を抗体投与の実験で使ったのと同じ抗 CD11b 抗体とインキュベートし、3 回洗浄後、FITC 標識 F(ab')<sub>2</sub> ヤギ抗ラット IgG 抗体(Tago 社、米国)で染色したものをフローサイトメトリを用いて解析した。陽性コントロールとしてマウスマクロファージ細胞株 J774 (東北大学加齢医学研究所附属癌細胞保存施設から購入)を用いた。

### 結果

#### 1. 播種性クリプトコッカス感染モデルの作製

Cn 強毒株である YC-11 をマウスの気管内に感染させると、肺内で速やかな真菌の増殖が認められ、感染 3 週後には明かな脳への播種性感染を起し、その後 3 週以内に全例が死亡した(図 2A)。感染 3 週後の病理学的解析では、脳に著明な髄膜炎の所見が観察された(図 2B)。このことから、本マウスモデルは Cn の肺から中枢神経系への播種性感染機序を解析する上で極めて有用な材料を提供してくれるものと考えられた。

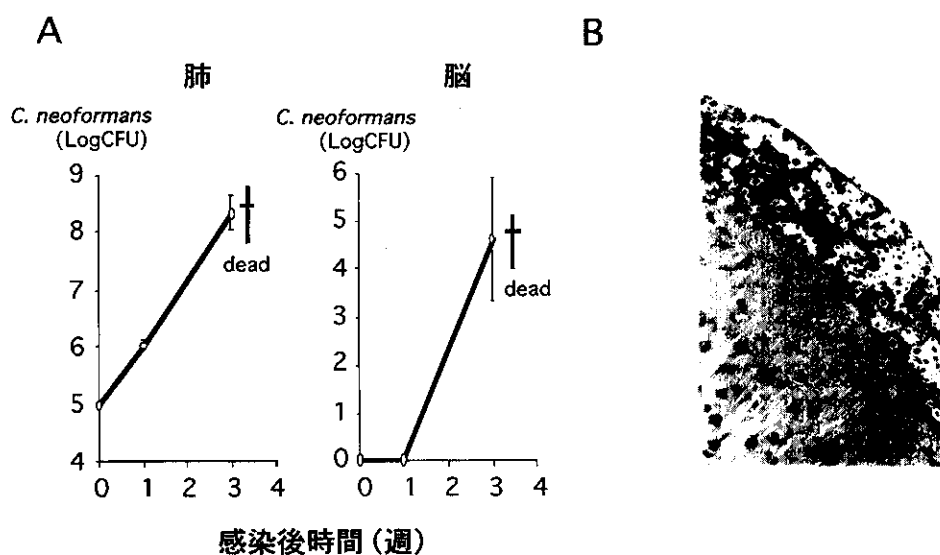


図 2 播種性クリプトコッカス症モデル

## 2. 肺、血液及び脳内における感染真菌数の定量的解析

このCn播種性感染モデルにおいて、肺、血液及び脳内生菌数を調べ、各臓器間の相関関係について検討した。血液と脳内生菌数との間には有意な正の相関関係を認め、Cnが肺から血液内に移行すると比較的容易に脳内に播種しうることが推察された。しかし興味深いことに、肺内生菌数が極端に少ない個体でも大量の真菌が脳内に検出されたり、逆に肺内で大量のCnが検出されたにもかかわらずほとんど脳への播種性感染がみられない個体も存在したことから、必ずしも両者の間に関連が存在しない可能性が推察された。そこで、肺内と血液内生菌数及び肺内と脳内生菌数間の相関関係を調べてみると、いずれにも有意な相関関係認められなかった。このことから、肺から血管内にCnが移行する際に何か特異な機序の存在する可能性が示唆された。

## 3. 抗接着分子抗体のクリプトコッカス脳播種に与える影響

Cnの肺から中枢神経系への播種性感染における接着分子の役割について解析するために、Cn感染マウスに抗接着分子抗体を投与してその影響を検討した。抗CD11b抗体を投与した群では感染21日目の肺内生菌数には明らかな影響はなかったものの、PBS群、コントロールラットIgG群に比べて血液内生菌数および脳内生菌数の有意な抑制が観察された。一方、抗CD11a抗体、抗CD11c抗体、抗CD18抗体、抗ICAM-1抗体を投与したマウスでは、抗体によっては肺内生菌数や脳内生菌数を増加させるものがみられたが、少なくとも脳内生菌数を減少させることはなかった。以上の結果から、今回検討した接着分子の中でCD11b(Mac-1)のみがCnが肺内から血管内へ移行する過程で重要な役割を果たしている可能性が考えられた。

## 4. 抗CD11b抗体投与マウスにおける肺内Mac-1陽性細胞の解析

抗CD11b抗体が肺内のMac-1陽性細胞に与える影響をみるために、PBS、コントロールラットIgGまたは抗CD11b抗体を投与したCn感染マウスから21日目に肺内白血球分画を分離し、抗Mac-1抗

体で染色後フローサイトメトリを用いて陽性細胞について解析した。通常Mac-1はマクロファージ及び好中球に発現しているが、散乱パターンで見ると抗体処理によってこれらの細胞分画の総細胞に占める割合にはほとんど影響がみられなかった。さらに、Mac-1陽性細胞比率においても抗体投与の影響はほとんどみられなかった。この結果から、今回用いた抗CD11b抗体は肺内のMac-1陽性細胞数を減少させることによって作用するのではないことが明らかになった。

## 5. CnにおけるMac-1様分子発現の有無についての解析

別の可能性として、Cnがその表面上に抗CD11b抗体と交差反応性を示すMac-1様分子を発現し、抗CD11b抗体がこの分子と結合することによって作用していることも考えられる。この点について調べるために、Cnを抗体投与実験に用いたのと同じ抗CD11b抗体で染色した後、フローサイトメトリにて解析した。その結果、コントロールのJ774細胞が本抗体によって強く染色されたのに対して、Cnは全く染まらなかった。したがって、Cn上にはCD11b分子あるいは本抗体が交差反応性を示す分子は存在しないことが明らかになった。

## 考察及び結論

本研究では、マウスクリプトコッカス症モデルを用いることによって、Cnの中枢神経系への播種性感染にCD11b分子が関与していることが示唆された。

従来、Cnの中枢神経系への播種性感染の機序については、肺内で肺胞腔を押し広げるほどに増殖した菌体が、その物理的な力で肺胞構造を破壊し毛細血管から血流に侵入して中枢神経系に播種すると考えられてきた。もしこの考え方が正しいければ、肺内菌数と血液内あるいは脳内菌数との間に有意な正の相関が認められるはずである。しかしながら今回の検討では、これらの間には全く相関が認められず、従来の考え方ではこの現象を説明できない。したがって我々は、単に物理的な機序ではなく、何らかの特異的な機序がCnが肺胞腔から血管内に侵入する過程で働いている可能性を考

えている。

近年、多くの病原微生物が宿主細胞に侵入する過程で宿主側の接着分子を利用しているとの知見が明らかにされつつある<sup>5,7)</sup>。其中で、 $\beta$ 2インテグリンファミリーに属する Mac-1 には結核菌、*Bordetella pertussis*、*Leishmania* spp.、*Candida albicans*、*Histoplasma capsulatum*、*Blastomyces dermatitidis*、*Saccharomyces cerevisiae* など多くの病原微生物が接着することが報告されている<sup>5,8-14)</sup>。Cn においても、Murphy らは Cn の莢膜多糖体がヒト好中球上の CD18 分子に結合することを明らかにしている<sup>15)</sup>。これらの知見をもとに、我々は Mac-1 (CD11b) 及び同じファミリーに属している LFA-1 (CD11a)、CR4 (CD11c)、共通の  $\beta$  鎖である CD18、そしてこれらのリガンドのひとつである ICAM-1 に注目してそれぞれに対する抗体の影響について検討した。今回の検討では、抗 CD11b 抗体のみが Cn の肺から脳への播種性感染を抑制しており、その他の抗体にはそのような効果がみられなかった。抗体が結合するエピトープの問題もあるため、それぞれ1種類の抗体のみを用いた今回の検討だけでは CD11b 以外の接着分子が Cn の播種性感染に関係していないと即断することはできないが、少なくとも CD11b は何らかの役割を果たしていると考えられるかもしれない。今後、CD11b 以外の抗体については何種類か異なったエピトープに結合するもの、あるいはポリクローナル抗体を用いた検討も必要になってくる

ものと思われる。

近年の報告では、CD11b の本来のリガンドが結合する I ドメインと呼ばれる領域に数多くの病原微生物が結合しうることが明らかにされつつある<sup>8,16,17)</sup>。また、I ドメインの近傍に存在するレクチン様ドメインにも多糖体を多く含む真菌が結合するとの報告もみられる<sup>14,17)</sup>。Cn に関しては、CD18 に結合しうるとの報告はあるものの、直接 CD11b 分子に結合するとの報告はまだみられていない。今回の我々の検討でも、Cn と CD11b とが直接結合しうるかどうかは明かではない。しかし、これまでの他の病原微生物に関する知見からは、Cn が宿主細胞上の CD11b に結合することにより、それを足がかりにして肺胞腔から血管内へ侵入する可能性は十分に考えられる。今後は、この点についてさらに検討していく必要があるものと思われる。

今回の結果及びこれまでの諸家の報告から考えられる Cn の肺胞腔から血管内への侵入の過程における Mac-1 分子の関与についての我々の仮説を図3にまとめた。一つには、Cn が補体成分である iC3b を介してオプソニン依存性に、あるいは直接 Mac-1 分子に結合してオプソニン非依存性に侵入したマクロファージをキャリアとして血管内に入り中枢神経に播種するという可能性が考えられる。別の可能性としては、Cn が肺胞上皮に発現した Mac-1 様分子に結合することでそれを足がかりに血管内に入り中枢神経に播種するということが考えられる。今後は、肺内における Mac-1 分子の

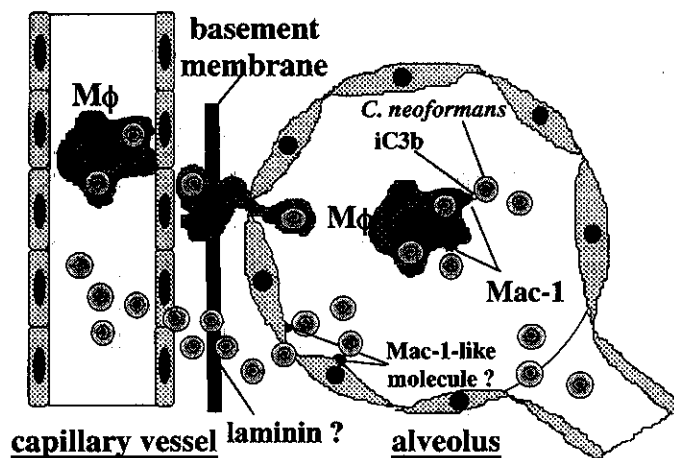


図3 クリプトコッカスの播種性感染機序 (仮説)

発現の詳細な検討、Cnあるいは莢膜多糖体のMac-1(CD11b)分子に対する結合能等さらなる検討が必要になるともと思われる。

本研究において我々は、Cnの肺から脳への播種性感染に接着分子であるMac-1が関与している可能性を示した。エイズ患者に合併するクリプトコッカス症では高率に中枢神経系への播種性感染を起こすと同時に、しばしば難治性であり再発率が高く患者の予後を考える上で大きな問題となっている。したがって、もしこのような患者においてCnの播種性感染を予防することが可能になればその予後を大きく改善できうることは想像に難くない。この意味で今回の結果は、Mac-1分子を標的にした治療法の可能性を示すものとして意義がある。今後は、CD11b遺伝子欠損マウスなどを用いてMac-1分子の役割をさらに確認していくと同時に、図4に示すように抗Mac-1抗体やCnとMac-1の結合モチーフを有した合成ペプチドによる播種性感染の予防法の開発も考えながら研究を進めていきたい。

### 参考文献

- 1) Lim, T. S., and J. W. Murphy. 1980. Transfer of immunity to cryptococcosis by T-enriched splenic lymphocytes from *Cryptococcus neoformans*-sensitized mice. *Infect. Immun.* 30: 5-11.
- 2) Hill, J. O., and A. G. Harmsen. 1991. Intrapulmonary growth and dissemination of an avirulent strain of *Cryptococcus neoformans* in mice depleted of CD4+ or CD8+ T cells. *J. Exp. Med.* 173: 755-758.
- 3) Huffnagle, G. B., J. L. Yates, and M. F. Lipscomb. 1991. Immunity to a pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection requires both CD4+ and CD8+ T cells. *J. Exp. Med.* 173: 793-800.
- 4) Mody, C. H., M. F. Lipscomb, N. E. Street, and G. B. Toews. 1990. Depletion of CD4+ (L3T4+) lymphocytes in vivo impairs murine host defence to *Cryptococcus neoformans*. *J. Immunol.* 144: 1472-1477.
- 5) Cywes, C., L. N. Godenir, H. C. Hoppe, R. R. Scholle, L. M. Stey, R. E. Kirsch, and M. R. W. Ehler. 1996. Nonopsonic binding of *Mycobacterium tuberculosis* to human complement receptor type 3 expressed in Chinese hamster ovary cells. *Infect. Immun.* 64: 5373-5383.
- 6) Greve, J. M., G. Davis, A. M. Meyer, C. P. Forte, S. C. Yost, C. W. Marlor, M. E. Kamarck, and A. McClelland. 1989. The major human rhinovirus receptor is ICAM-1. *Cell.* 56: 839-847.
- 7) Staunton, D. E., V. J. Merluzzi, R. Rothlein, R. Barton, S. D. Marlin, and T. A. Springer. 1989. A cell adhesion molecule, ICAM-1, is the major surface receptor for rhinoviruses. *Cell* 56: 849-853.
- 8) Hoepelman, A. I. M., and E. I. Tuomanen. 1992. Consequences of microbial attachment: directing host cell functions with adhesion molecules CD11/CD18. *Blood* 75: 1037-1050.

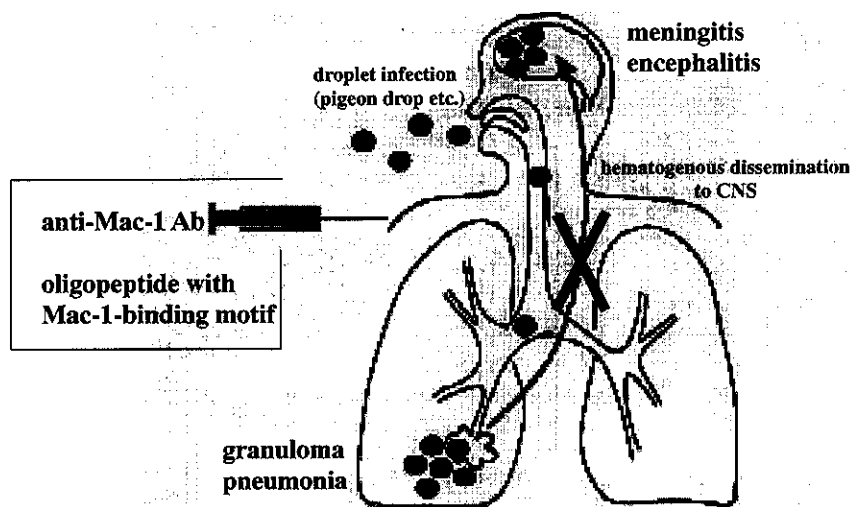


図4 接着分子機能の修飾によるクリプトコッカス播種性感染予防



- 9) Russel, D. G., and S. D. Wright. 1988. Complement receptor type 3 (CR3) binds to an Arg-Gly-Asp-containing region of the major surface glycoprotein, gp63, of *Leishmania promastigotes*. *J. Exp. Med.* 168: 279-292.
- 10) Szabo, I., L. Guan, and T. J. Rogers. 1995. Modulation of macrophage phagocytic activity by cell wall components of *Candida albicans*. *Cell. Immunol.* 164: 182-188.
- 11) Forsyth, C. B., and H. L. Mathews. 1996. Lymphocytes utilize CD11b/CD18 for adhesion to *Candida albicans*. *Cell. Immunol.* 170: 91-100.
- 12) Arnaout, M. A. 1990. Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18. *Blood* 75: 1037-1050.
- 13) Newman, S. L., S. Chaturvedi, and B. S. Klein. 1995. The WI-1 antigen of *Blastomyces dermatitidis* yeasts mediates binding to human macrophage CD11b/CD18 (CR3) and CD14. *J. Immunol.* 154: 753-761.
- 14) Thornton, B. P., V. Vetvicka, M. Pitman, R. C. Goldman, and G. D. Ross. 1996. Analysis of the sugar specificity and molecular location of the  $\beta$ -glucan-binding lectin site of complement receptor type 3. *J. Immunol.* 156: 1235-1246.
- 15) Dong, Z. M., and J. W. Murphy. 1997. Cryptococcal polysaccharides bind to CD18 on human neutrophils. *Infect. Immun.* 65: 557-563.
- 16) Isberg, R. R., and G. Tran Van Nhieu. 1994. Binding and internalization of microorganisms by integrin receptors. *Trends Microbiol.* 2: 10-13.
- 17) Forsyth, C. B., E. F. Plow, and L. Zhang. 1998. Interaction of the fungal pathogen *Candida albicans* with integrin CD11b/CD18: recognition by the I domain is mediated by the lectin-like domain and the CD18 subunit. *J. Immunol.* 161: 6198-6205.



## エイズの免疫不全状態における可溶性CD4分子の役割:膜結合型CD4欠損マウスを用いたクリプトコッカス感染防御能への影響に関する研究

川上 和義<sup>1)</sup>、Mahboob Hossain Qureshi<sup>1)</sup>、高口 善信<sup>1)</sup>、屋良さとみ<sup>1)</sup>、宮里 明子<sup>1)</sup>、  
照屋 勝治<sup>1,2)</sup>、安岡 彰<sup>2)</sup>、岡 慎一<sup>2)</sup>、成内 秀雄<sup>3)</sup>、斎藤 厚<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>琉球大学医学部 第一内科

<sup>2)</sup>国立国際医療センター エイズ治療・研究開発センター

<sup>3)</sup>東京大学医科学研究所 アレルギー研究部

### 研究要旨

HIV感染者では末梢血CD4+T細胞数の減少にともなって感染防御能が低下し種々の日和見感染症に罹患する。CD4にはT細胞膜に結合するタイプと体液中に分泌される可溶性のタイプ(sCD4)が存在する。近年HIV感染者において血清中のsCD4が上昇しているとの報告がみられているため、本研究では種々の程度にCD4+T細胞数が減少したHIV感染者の血清sCD4、そしてさらにIL-12濃度を測定し臨床的な解析を試みた。HIV感染者では、健常人に比べsCD4値が増加しており、特に最もCD4+T細胞数が減少している群において顕著であった。また、血清IL-12濃度はHIV感染者において増加していたが、最もCD4+T細胞数が減少している群では逆に検出限界以下にまで低下していた。興味深いことに、血清sCD4とIL-12は有意な負の相関を示しており、sCD4がIL-12の産生低下を介してCD4+T細胞の減少にともなう免疫不全をさらに助長している可能性が示唆された。

この可能性についてさらに検討するために、膜結合型CD4分子を欠損し体液中のsCD4が著明に増加している変異マウス(CD4Lマウス)を用いて *Cryptococcus neoformans*(Cn)感染防御に及ぼすsCD4の影響について検討した。野生型マウスに比較してCD4Lマウスは、Cnに対する遅延型過敏反応(DTH)が低下しており、Cn感染に対して感受性になっていた。血清中のサイトカインではIL-12、IL-18、IFN- $\gamma$ が低下しており、エイズ患者と類似した所見を呈していた。CD4LマウスにおけるDTH及び感染免疫の低下は抗CD4抗体投与によって改善がみられたことから、CD4+T細胞の欠損のみならずsCD4の存在も重要な役割を担っている可能性が考えられた。

以上の結果から、エイズ患者では体液中のsCD4分子の増加が免疫不全をさらに助長している可能性が推察され、今後はこの点に関するさらなる解析とsCD4をコントロールすることによる新たな治療法の開発の可能性について検討していく必要があるものと考えられた。

## 目 的

クリプトコッカス症はエイズ患者に合併する重要な日和見真菌感染症であり、しばしば中枢神経系への播種性感染を起こして致死的経過をとる。

*Cryptococcus neoformans*(Cn)に対する感染防御は主として細胞性免疫によって担われている<sup>1)</sup>。特にCD4+T細胞が重要であり、末梢血中のCD4+T細胞数が100/ $\mu$ lを下回った場合にその危険性が增加する。動物実験では、抗体を用いてCD4+T細胞を除去することによって肺内生菌数の増加、脳への播種性感染の悪化、生存率の低下が観察されている<sup>2,4)</sup>。私達の研究でも<sup>5)</sup>、マウスの気管内に菌体を接種すると肺内で経時的なCD4+T細胞の増加が認められた。

一方、CD4分子にはT細胞上に発現する膜結合型と細胞膜に結合しないまま分泌される可溶性のもの(soluble CD4: sCD4)の存在することが知られている。Peakmanらは<sup>6)</sup>、HIV感染者では非感染者に比べ血清中にsCD4が増加していることを報告している。彼らは、sCD4とCD4+T細胞数の比をとると病期の進展とよく相関していることを見出し、sCD4/CD4比が $\beta$ 2ミクログロブリンやネオプテリンとともにHIV感染の病期の進行程度を推測するためのよい指標になるのではないかと考察している。

本研究では、sCD4がエイズの病態、特にエイズにともなう感染防御免疫能の低下に及ぼす影響について検討した。そのために、HIV感染者の血清中のsCD4値を測定するとともに末梢血CD4+T細胞数、ウイルス量、インターロイキン12(IL-12)値

との関係について解析した。さらに基礎的検討として、成内ら(東京大学医科学研究所アレルギー研究部)によって見出された膜結合型CD4を欠損するとともに血清中のsCD4が著明に増加している変異マウス<sup>7)</sup>を用いて、Cn感染に対する防御能への影響とその免疫学的特徴について解析を試みた。

## 方 法

### 1. 症例と検体

国立国際医療センターエイズ治療研究開発センターの入院または外来のHIV感染者40症例の血清を用いた。血清は全て抗HIV治療を開始する前に採取されたものである。また、コントロールとして健康人10人(平均年齢34.6 $\pm$ 7.4才)の血清も用いた。症例の詳細は表1に示す。

### 2. マウス

C57BL/6バックグラウンドにした膜結合型CD4分子の欠損マウス(以下CD4Lマウス)を用いた。このマウスは染色体上の第8エクソンと第8イントロン間の14の塩基が1つのthymineに置き換わっており、それが原因で第8エクソンが欠損し、膜結合型のCD4が合成されずに、胸腺内で合成されたCD4分子は細胞外に放出され、従って体液中に大量のsCD4分子が存在する<sup>7)</sup>。コントロールとして野生型のC57BL/6を用いた。実験には、7~10週齢雌のマウスを用いた。マウスは全てSPF環境下で飼育し、感染実験はP2からP3レベルで行った。本研究で実施した全ての動物実験は、予め琉

分担研究者：斎藤 厚

研究協力者：川上和義、Mahboob Hossain Qureshi、高口善信、屋良さとみ、宮里明子、  
照屋勝治、安岡 彰、岡 慎一、成内秀雄

### Significance of soluble CD4 in Immunodeficiency of AIDS patients: host resistance to *Cryptococcus neoformans* infection in mutant mice defective of membrane-bound CD4

Kazuyoshi Kawakami<sup>1)</sup>, Mahboob Hossain Qureshi<sup>1)</sup>, Yoshinobu Koguchi<sup>1)</sup>, Satomi Yara<sup>1)</sup>, Akiko Miyazato<sup>1)</sup>, Katsuji Teruya<sup>1,2)</sup>, Akira Yasuoka<sup>2)</sup>, Sinichi Oka<sup>2)</sup>, Hideo Nariuchi<sup>3)</sup>, and Atsushi Saito<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>The First Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, University of the Ryukyus, <sup>2)</sup>AIDS Clinical Center, International Medical Center of Japan, and <sup>3)</sup>Department of Allergology, Institute of Medical Science, University of Tokyo

球大学の動物実験委員会の承認を受けている。

### 3. *Cryptococcus neoformans*

実験には血清型A臨床分離株YC-13(長崎大学第二内科河野茂教授より供与)を用いた。CnはPDA培地上で2~3日間培養後生食で3回洗浄して用いた。マウス1匹当たり $1 \times 10^6$ 個のCn酵母を経気管的に接種した。

### 4. 肺内真菌数の測定

Cnを経気道的に感染させ、3週後にマウスを屠殺、摘出した肺をホモジナイズ後、蒸留水にて適当に希釈した組織液から100 $\mu$ lをPDA培地に接種し、2日後にコロニー数を調べた。

### 5. 遅延型過敏反応の測定

Cnに対する遅延型過敏反応(DTH)を調べるために、感染7日後にCn生菌 $1 \times 10^7$ CFU及びPBSをそれぞれ左右のフットパッドに接種し、さらに24時間後にその腫脹の程度をノギスで測定し、PBS接種による腫脹分を差し引いたものをDTHの指標とした。

### 6. sCD4及び各種サイトカイン濃度の測定

HIV感染者または健常人の血清中のsCD4濃度はELISAキット(Endogen社、米国)を用いて、IL-12p70濃度は高感度ELISAキット(R&D社、米国)を用いて測定した。マウス血清中のsCD4濃度は2種類の抗体を用いたサンドイッチELISA法で測定した<sup>7)</sup>。各種サイトカイン濃度は、以下のELISAキットを用いて測定した。[IFN- $\gamma$ 、IL-4(Endogen社)、IL-12p40(Genzyme社、米国)、IL-13(R&D社)、IL-18(林原生物化学研究所藤崎研究所 栗本雅司博士より供与)]。

## 結 果

### 1. HIV感染者における血清sCD4及びIL-12濃度の測定

表1に示した40症例のHIV感染者と10人の健常人の血清sCD4濃度を測定した。HIV感染者は末梢血CD4+T細胞数によってA~D群に群別した。その結果、HIV感染群では健常群に比べsCD4値の上昇がみられ、その程度は末梢血CD4+T細胞数の減少に応じて顕著になり、特にD群では健常群に

表1 HIV症例(国立国際医療センター)

群	症例	性別	年齢	CD4+T細胞 (/ $\mu$ l)	群	症例	性別	年齢	CD4+T細胞 (/ $\mu$ l)
A	1	M	42	700	C	21	M	33	156
	2	M	37	738		22	F	27	118
	3	M	29	795		23	M	54	128
	4	F	30	936		24	M	46	167
	5	M	31	811		25	M	48	101
	6	M	50	913		26	M	18	99
	7	M	26	695		27	M		126
	8	M	36	924		28	M	48	87
	9	M	22	699		29	M	27	162
	10	M	15	795		30	M	28	138
				平均 801 $\pm$ 95					平均 128 $\pm$ 28
B	11	M	41	388	D	31	M	46	37
	12	M	59	379		32	M	21	16
	13	M	22	401		33	M	22	13
	14	M	25	367		34	M	45	18
	15	M	34	363		35	M	65	14
	16	M	35	334		36	F	33	37
	17	M	42	340		37	M	40	10
	18	F	32	350		38	M	31	9
	19	M	22	343		39	M	38	31
	20	M	38	380		40	M	25	2
				平均 365 $\pm$ 22					平均 19 $\pm$ 12

比べ有意差が認められた(図1)。末梢血 CD4+T 細胞数と血清 sCD4 値との相関をみてみると統計学的に有意な負の相関が認められ(図2)、血清 sCD4 値の上昇に末梢血 CD4+T 細胞数の減少が関係している可能性が考えられた。

一方、血清IL-12は健常群で全く検出されなかったのに対して、HIV感染群ではD群を除き有意に上昇していた。しかし、最もCD4+T細胞数が減少するD群において健常群と同程度まで血清IL-12値が低下していた(図3)。さらに、sCD4値との相関を調べてみると、統計学的に有意な負の相関が認められ、sCD4の増加がIL-12産生低下と関連している可能性が示唆された(図4)。

## 2. 膜結合型CD4欠損マウスを用いた肺クリプトコッカス感染モデルの作製

CD4Lマウスを用いて肺クリプトコッカス感染モデルを作製した。本マウスは、脾細胞中に全くCD4+T細胞を認められず、かわりに血清中には大量のsCD4が検出された。一方、野生型のマウスでは血清sCD4は全く検出されなかった(図5)。CD4Lマウスの脾細胞をConAあるいは抗CD3抗体で刺激すると、野生型マウス由来の脾細胞に比べ有意に低い増殖反応を示した。また、BCG感作後に脾細胞をBCGで再刺激すると、野生型マウスにくらべ明らかに低いIL-2産生能を示した。

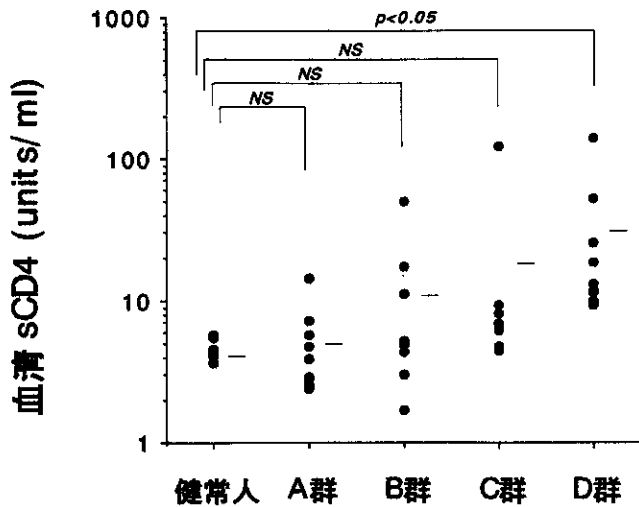


図1 HIV感染者における血清sCD4値

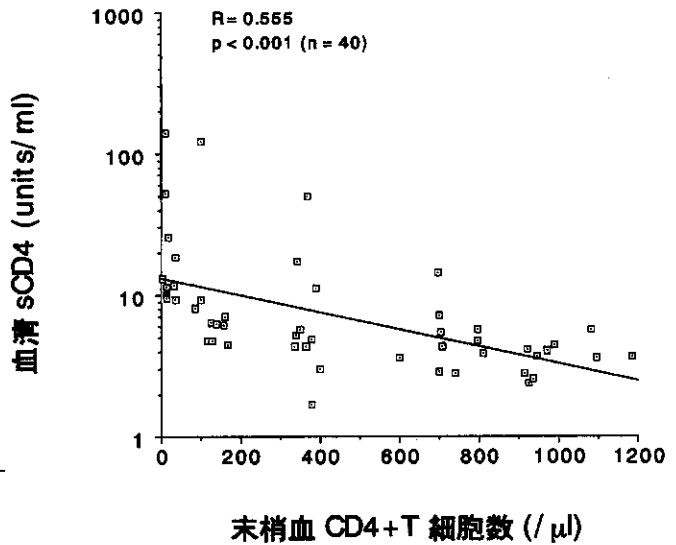


図2 血清sCD4値と末梢血CD4+T細胞数の相関関係

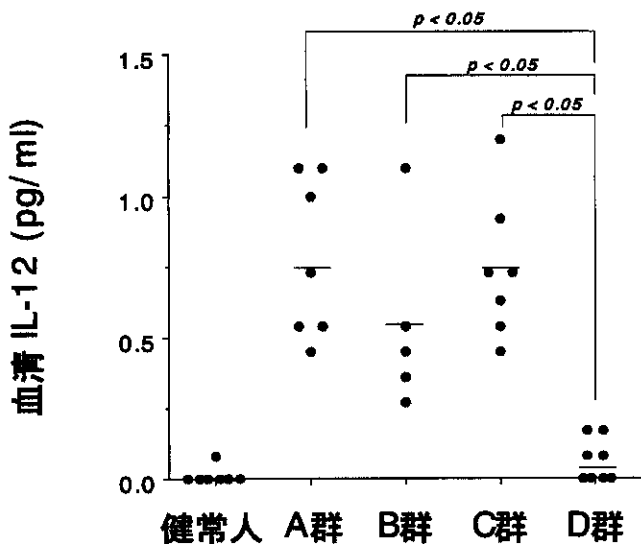


図3 HIV感染者における血清IL-12値

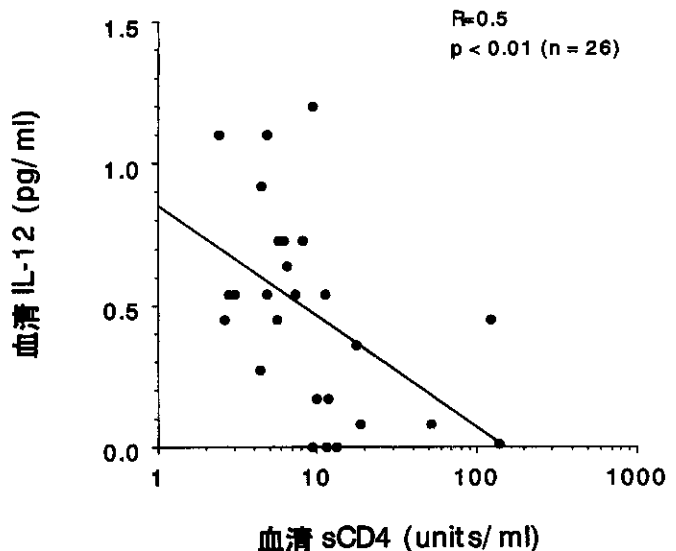


図4 血清sCD4値と血清IL-12値との相関関係

CD4L マウスに経気管的に Cn を感染させると、野生型マウスに比べ感染後3 及び5 週目における肺内真菌の排除が有意に遅延していた。さらに、Cn に対する DTH を検討したところ、変異マウスにおいて明らかに減弱していた。感染3、7、14、21 日後の血清中の各種サイトカイン濃度を調べると、Th1 型のサイトカインである IFN- $\gamma$ 、IL-12、IL-18 は変異マウスにおいて有意に低下していたが、Th2 サイトカインである IL-4 及び IL-13 については両者で差がみられなかった。

### 3. sCD4 のクリプトコッカス感染に及ぼす影響

CD4L マウスにおける Cn 感染抵抗性の低下は単に CD4+T 細胞が欠如しているためである可能性が考えられるため、次に CD4L マウスに抗 CD4 抗体を投与することにより sCD4 を中和しその影響を調べた。もしこの可能性が正しければ抗体の投与によっても何ら影響がみられないはずである。しかし、CD4L マウスに抗 CD4 抗体を投与して Cn を感染させると抗体非投与群に比べ肺内生菌数の有意な減少が観察された。コントロールラット IgG にはこのような作用はみられなかった。同様に、Cn に対する DTH も抗 CD4 抗体投与によって増強することが明らかになった。これらの結果は、変異マウスにおける感染防御能の低下が単に CD4+T 細胞の欠如によるものではなく、体液中に多量存在する sCD4 が関与していることを示している。

### 考察及び結論

Peakman らは、HIV 感染者において血清中の sCD4 が増加していること、末梢血 CD4+T 細胞数との比が病期の進行にともなって増加し、 $\beta$ 2ミクログロブリンやネオプテリンなどとともに有用な指標になりうることを示した<sup>6)</sup>。本研究でも、彼らと同様の結果が得られ、sCD4 は HIV 感染からエイズに進展する過程で何らかの機序によって増加するものと考えられた。現在その機序は明らかではないが、これまでの多くの研究において CD4+T 細胞はウイルス感染そのものによってというよりアポトーシスによって減少していくと考えられている<sup>8-10)</sup>ことから、我々はアポトーシスによって sCD4 が CD4+T 細胞から遊離または分泌されるのではないかと考えた。我々の結果では、血清 sCD4 値は末梢血 CD4+T 細胞数と有意な逆相関を示しており、この仮説に矛盾しない結果であると考えられる。そこで我々は、ヒト CD4+T 細胞株である Molt-3 に抗 Fas 抗体でアポトーシスを誘導しその培養上清中の sCD4 濃度を測定した。その結果、予想通りアポトーシスによる細胞数の減少とともに培養上清中の sCD4 濃度が増加した。現在、sCD4 が増加する直接的な機序は明らかではないが、エイズの進行とともにアポトーシスによって CD4+T 細胞数が減少し、同時に sCD4 が増加してくるものと推察された。

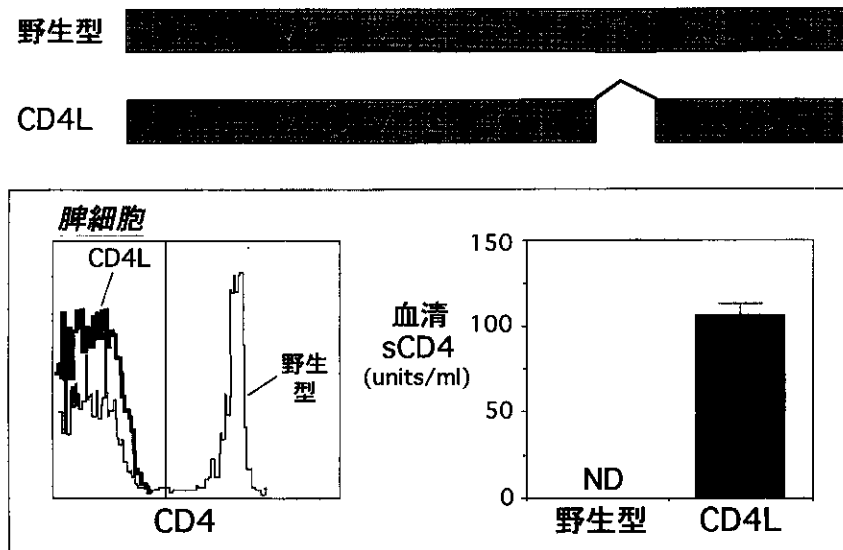


図5 膜結合型 CD4 欠損マウス

今回の検討では、HIV 感染者において末梢血 CD4+T 細胞数が最も減少する時期に血清 sCD4 値が最も増加しており、我々はエイズ末期の免疫不全の病態に sCD4 が何らかの影響を及ぼしているのではないかと考えた。そこで、多くの病原微生物に対する感染防御に重要な細胞性免疫の成立において中心的な役割を有する IL-12 の血清中濃度を高感度 ELISA 法を用いて測定した。その結果、末梢血 CD4+T 細胞が 50/ $\mu$ l 以上の HIV 感染者ではむしろ IL-12 値は健常群に比べ増加していた。しかしながら、50/ $\mu$ l 未満の群ではほとんどの症例で検出限界以下であった。さらに、血清 sCD4 値と IL-12 濃度を比べると統計学的に有意な負の相関が認められ、sCD4 が IL-12 の産生低下、ひいてはエイズ末期の免疫不全を助長している可能性が示唆された。

成内らは、偶然に膜結合型 CD4 を欠損したマウスを発見した。このマウスは、胸腺における CD4+T 細胞の成熟ができないため末梢組織には全く CD4+T 細胞が存在しない。そのかわり胸腺内で盛んに sCD4 が産生され、体液中に大量の sCD4 が存在している<sup>7)</sup>。これらの知見は、CD4L マウスが先に示した末期のエイズ症例と類似した免疫環境を有している可能性があることを示唆している。実際成内らは、このマウスが羊赤血球やメチル化 BSA に対する遅延型過敏反応の低下、抗体産生の低下など種々の免疫不全を示すことを報告している<sup>7)</sup>。我々の結果では、CD4L マウス由来の脾細胞は野生型マウスに比べマイトゲンに対する増殖反応が弱く、さらに BCG 刺激による IL-2 産生能が低下していた。こうして、CD4L マウスはエイズ末期の免疫不全状態について解析するためのよいモデルとなりうる可能性が示唆された。

さらに我々は、エイズ末期の患者に播種性感染症、特に髄膜脳炎を引き起こしてしばしば問題になる Cn を CD4L マウスに感染させ、sCD4 の感染防御に及ぼす影響について検討した。このマウスは、種々の免疫不全状態を示す実験結果から予想されるように Cn に対しても感染抵抗性が減弱していた。同時に、Cn に対する DTH の低下もみられ、細胞性免疫の誘導能において問題のある可能性が示唆された。血清中のサイトカインでは、細胞性免疫の誘導に重要な IL-12、IL-18 そして IFN-

$\gamma$  が野生型マウスに比べ有意に低下しており先の仮説とよく一致する結果であった。しかし、IL-4 や IL-13 のような Th2 サイトカインには差が認められず sCD4 が Th2 細胞の誘導には直接影響していない可能性が考えられた。

CD4L マウスにおける免疫不全の原因として 3 つの可能性が考えられる。第一は CD4+T 細胞が欠如しているためのもの、第二は sCD4 の存在によるもの、そして第三にはその両者である。第二の可能性について検討するために、CD4L マウスに抗 CD4 抗体を投与し Cn に対する感染防御及び DTH 反応への影響を検討した。もし sCD4 が CD4L マウスの免疫不全に全く関与していなければ抗体の影響はみられないはずである。しかし、抗 CD4 抗体を投与することによって感染防御、DTH ともに改善がみられたことから、CD4L マウスの免疫不全に sCD4 が直接関与している可能性が考えられた。これまでの報告から第一の可能性は十分に考えられるため<sup>24)</sup>、現在のところ両者が免疫不全の原因になっているかもしれない。この点に関しては、CD4+T 細胞のみ欠損して sCD4 が存在しない CD4 遺伝子欠損マウスを用いて検討しているところである。

現時点では sCD4 がどのようにして免疫不全を引き起こすのかは明かではない。これまでに CD4 のリガンドとして MHC クラス II 及び IL-16 が知られている<sup>11,13)</sup>。これらはどちらも免疫の調節に重要な役割を担っていることから、sCD4 が結合することで本来の受容体である膜結合型 CD4 分子との結合が阻害され正常な免疫応答ができなくなる可能性が考えられる。この点については今後の研究課題である。

今回の研究によって、エイズの進行期においては体液中に増加した sCD4 が CD4+T 細胞の減少にともなう免疫不全をさらに助長している可能性が示された。これらの知見は、このような状態における日和見感染症の病態を理解する上で重要であり、増加した sCD4 がより有効な治療法を開発していく上での標的分子のひとつに成りうる可能性を示すものである。今後はこの点に関するさらなる解析と sCD4 をコントロールすることによる新たな治療法の開発の可能性について検討していく必要があるものと考えられた。

## 参考文献

- 1) Lim, T. S., and J. W. Murphy. 1980. Transfer of immunity to cryptococcosis by T-enriched splenic lymphocytes from *Cryptococcus neoformans*-sensitized mice. *Infect. Immun.* 30: 5-11.
- 2) Hill, J. O., and A. G. Harmsen. 1991. Intrapulmonary growth and dissemination of an avirulent strain of *Cryptococcus neoformans* in mice depleted of CD4+ or CD8+ T cells. *J. Exp. Med.* 173: 755-758.
- 3) Huffnagle, G. B., J. L. Yates, and M. F. Lipscomb. 1991. Immunity to a pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection requires both CD4+ and CD8+ T cells. *J. Exp. Med.* 173: 793-800.
- 4) Mody, C. H., M. F. Lipscomb, N. E. Street, and G. B. Toews. 1990. Depletion of CD4+ (L3T4+) lymphocytes in vivo impairs murine host defence to *Cryptococcus neoformans*. *J. Immunol.* 144: 1472-1477.
- 5) Kawakami, K., S. Kohno, N. Morikawa, J. Kadota, A. Saito, and K. Hara. 1994. Activation of macrophages and expansion of specific T lymphocytes in the lungs of mice intratracheally inoculated with *Cryptococcus neoformans*. *Clin. Exp. Immunol.* 96: 230-237.
- 6) Peakman, M., G. Senaldi, N. Foote, T. J. McManus, and D. Vergani. 1992. Naturally occurring soluble CD4 in patients with human immunodeficiency virus infection. *J. Infect. Dis.* 165: 799-804.
- 7) Nagase, H., C.-R. Wang, T. Yoshimoto, C. Sugishita, T. Shiroishi, A. Matsuzawa, and H. Nariuchi. 1998. Novel mutant mice secreting soluble CD4 without expression of membrane-bound CD4. *Eur. J. Immunol.* 28: 403-412.
- 8) Terai, C., R. S. Kornbluth, C. D. Pauza, D. D. Richman, and D. A. Carson. 1991. Apoptosis as a mechanism of cell death in cultured T lymphoblasts acutely infected with HIV-1. *J. Clin. Invest.* 87: 1710-1715.
- 9) Laurent-Crawford, A. G., B. Krust, S. Muller, Y. Rivide, M. A. Rey-Cuill, J. M., Bohet, L. Montagnier, and A. G. Hovanessian. 1991. The cytopathic effect of HIV is associated with apoptosis. *Virology*, 185: 829-839.
- 10) Gougeon, M. L., and L. Montagnier. 1993. Apoptosis in AIDS. *Science* 260: 1269-1270.
- 11) Doyle, C., and J. L. Strominger. 1987. Interaction between CD4 and class II MHC molecules mediates cell adhesion. *Nature* 330: 256-259.
- 12) Gay, D., P. Maddon, R. Sekaly, M. A. Talle, M. Godfrey, E. Long, G. Goldstein, J. Kappler, et al. 1987. Functional interaction between human T-cell protein CD4 and the major histocompatibility complex HLA-DR antigen. *Nature* 328: 626-629.
- 13) Center, D. M., H. Kornfeld, and W. W. Cruikshank. 1996. Interleukin 16 and its function as a CD4 ligand. *Immunol. Today* 17: 476-481.





## 血清を用いたPCR法による 侵襲性アスペルギルス症の診断

山上由理子<sup>1)</sup>、時松 一成<sup>1)</sup>、山形 英司<sup>1)</sup>、永井 寛之<sup>1)</sup>、那須 勝<sup>1)</sup>、斎藤 厚<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>大分医科大学医学部 第二内科

<sup>2)</sup>琉球大学医学部 第一内科

### 研究要旨

侵襲性アスペルギルス症は免疫不全宿主における致死的な日和見感染症であり、AIDS症例においても2～12%の割合で認められるといわれている。本症の迅速診断法として血清を検体としたPCR法の有用性について検討した。プライマーは *Aspergillus fumigatus* の18S ribosomal RNA をコードする遺伝子配列から nested PCR が可能な2組を設定した。本法の特異性は *Aspergillus* 属の5菌種においてのみ陽性を示し、*Penicillium* 属を含む他の真菌および一般細菌においては陰性であった。免疫抑制ラットを用いた実験においては、ラテックス凝集反応を用いたガラクトマンナン抗原検出法や(1→3)-β-D-glucan検出法と同等の感度が得られた。さらに、臨床的に侵襲性アスペルギルス症と診断された20症例の血清を用いた検討では、PCR法は70%で陽性でありガラクトマンナン抗原検出法よりも高い感度が得られた。経時的に検討すると、大部分の症例で発症後7日間以内にPCRは陽性化しており、早期診断法としての有用性が示唆されたが、治療開始後は治療効果の如何に関わらず早期に陰性化する傾向が認められ、予防投与例や治療例における検出には問題が残った。

分担研究者：斎藤 厚

研究協力者：山上由理子、時松一成、山形英司、永井寛之、那須 勝

**Diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis by PCR detection of DNA specific for *Aspergillus* species.**

Yuriko Yamakami<sup>1)</sup>, Issei Tokimatsu<sup>1)</sup>, Eiji Yamagata<sup>1)</sup>, Hiroyuki Nagai<sup>1)</sup>, Masaru Nasu<sup>1)</sup>, Atsushi Saito<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Second Department of Internal Medicine, Oita Medical University and <sup>2)</sup>First Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, University of Ryukyus

## 目 的

侵襲性アスペルギルス症は免疫不全宿主における致死的な日和見感染症として知られている。*Aspergillus* 属に対する生体防御は主に好中球が担っており、そのためHIV感染症には合併しにくいと考えられていた。しかしながら、近年、AIDS患者の剖検例においては2～12%の割合で認められるとの報告もあり、AIDSのlate～end stageにおける感染症として重要であると考えられる。

本症の確定診断は真菌学的または病理組織学的になされるが、培養は陽性率、信頼性ともに不十分であること、また重篤な基礎疾患のために生検などの侵襲的なアプローチを行い難い状況にあることなどから診断が困難なことが多く、剖検ではじめて診断されることも少なくない。

この現状をふまえて、最小限の侵襲で繰り返し得ることの可能な血清を検体としたPCR法による侵襲性アスペルギルス症の迅速診断法の有用性についてラット侵襲性肺アスペルギルス症モデルおよび臨床検体を用いて検討を行った。

## 材料と方法

### 1. ラット侵襲性肺アスペルギルス症モデル

サイクロフォスファミドとプレドニゾロンの腹腔内投与により免疫抑制した8週齢のSDラットに $5 \times 10^6$ 個の *Aspergillus fumigatus* IFM 41944の分生子を経気管接種し、侵襲性肺アスペルギルス症モデルを作成した<sup>2)</sup>。菌接種後、1、2、3、4、5日にエーテル麻酔下に sacrifice し、心血採取と病理学

的検討を行った。採取した血液は50 $\mu$ lを血液培養に供し、残りは血清を分離し、PCR、(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucan 検出および galactomannan 抗原検出に用いた。

### 2. PCR法

我々の施設で開発した *Aspergillus* 属に特異的なDNAを検出する nested PCR 法を用いた<sup>3)</sup>。

血清に proteinase K を含む検体処理液を加えて55 $^{\circ}$ C 60分間反応させDNAを抽出し、95 $^{\circ}$ C 10分間の処理にて proteinase K を失活させた後、遠心し、上清をPCRの検体とした。

PCRのプライマーは *Aspergillus fumigatus* の18S ribosomal RNAをコードする遺伝子配列から nested PCRが可能な2組を設定し、外側プライマーとして、Asp. 5: 5'-GATAACGAACGAGACCTCGG-3' および Asp. 8: 5'-TGCCAACTCCCCTGAGCCAG-3' を、内側プライマーとして Asp. 1: 5'-CGGCCCTTAAA TAGCCCGGTC-3' および Asp. 7: 5'-CCTGAGCCAGT CCGAAGGCC-3' を用いた。

PCRの設定条件は、single PCRではDNA変性94 $^{\circ}$ C 1分、アニーリング50 $^{\circ}$ C 1分、伸長反応72 $^{\circ}$ C 3分で30サイクル、nested PCRではアニーリングを65 $^{\circ}$ C 1分として30サイクルの増幅を行った。

本法の特異性を Fig. 1 に示した。感度は nested PCRで *A. fumigatus* 精製DNA量50 fgまで検出可能であった。

### 3. (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucan検出法

(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucan検出法としては、マルハより提供されたM-0198のキットを用いた。検出方法はキットの添付文書に準じて行い、50pg/ml以上を陽性と判定した。

Table 1. Comparative results of the three diagnostic tests in time course of experimental rats invasive pulmonary aspergillosis.

Day after inoculation	1	2	3	4	5
No. of rats	5	5	8	2	2
Pastorex Aspergillus	20%	60%	75%	100%	100%
$\beta$ -D-glucan	20%	60%	75%	100%	100%
Nested PCR	20%	80%	88%	100%	50%

4. galactomannan抗原検出法

galactomannan抗原検出法としては、ラテックス凝集反応である Pastorex *Aspergillus* (Diagnostics Pasteur)を用いた。検出方法はキットの添付文書に準じて行った。

5. 臨床検体

当科および関連病院において臨床的に侵襲性アスペルギルス症と診断された20名の血清を使用した。気管支洗浄液などの気道材料の培養、または

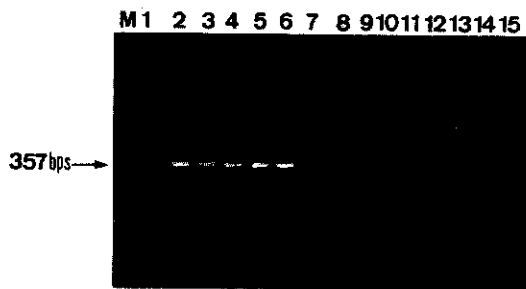


Fig. 1. Specificity of the nested PCR assay with DNA from various pathogenic fungi.  
Lane M: molecular size marker  
1: negative control (distilled water)  
2: *A. fumigatus*  
3: *A. flavus*  
4: *A. nidulans*  
5: *A. niger*  
6: *A. terreus*  
7: *Candida albicans*  
8: *C. glabrata*  
9: *C. parapsilosis*  
10: *C. tropicalis*  
11: *Cryptococcus neoformans*  
12: *Trichosporon asahii*  
13: *Penicillium citreo-viride*  
14: *Penicillium expansum*  
15: *Penicillium crustosum*

病理組織にて *Aspergillus* の感染が証明された症例を proven IA, 臨床像から本症が強く疑われたが確定出来なかった症例を presumptive IA とした<sup>4)</sup>。

結果

1. ラットモデルにおける各種診断法の比較

ラットモデルにおける nested PCR、(1→3)-β-D-glucan検出法および galactomannan 抗原検出法の陽性率を経時的に比較した(Table 1)。各検査法とも菌接種1日後より陽性化する個体が認められ、その後は経時的に陽性率が高くなる傾向が認められた。

さらに病理組織学的所見をグレード分けして、各々の検査法の陽性率を検討したところ、いずれの検査法においても組織所見のグレードが高くなるほど陽性率が高くなる傾向が認められた(Table 2)。なお、血液培養はすべてのラットにおいて陰性であった。

2. 臨床検体における nested PCR 法と抗原検出法の比較

臨床検体を用いておこなった nested PCR と galactomannan 抗原検出法の結果を Table 3 に示した。

nested PCR は14例70%で陽性を示したのに対して、galactomannan 抗原は8例40%で陽性であり、nested PCR は galactomannan 抗原検出法よりも優れた感度を示した。

Table 2. Comparative results of the three diagnostic tests with histological findings of experimental rats invasive pulmonary aspergillosis.

Histopathology <sup>1)</sup>	Pastorex <i>Aspergillus</i>	β-D-glucan	Nested PCR
—	0%	0%	0%
±	25%	25%	25%
+	38%	63%	63%
++	100%	67%	83%
+++	100%	100%	100%

<sup>1)</sup> +, conidia and hyphae were present in the lung but confined to the mucosal surface of the bronchi.  
++, hyphal invasion through bronchial walls and peribronchial inflammation were present.  
+++, hyphal invasion into the local blood vessels and hemorrhage were present.

Table 3. Results of galactomannan antigen assay and nested PCR with sera of patients with invasive aspergillosis.

Case	Age/Sex	Aspergillosis type	Underlying diseases	Galactomannan antigen	Nested PCR
1	42/M	proven IPA	AML	+	+
2	52/F	proven IPA	nephrotic syndrome	+	+
3	37/M	proven IPA	ATL	+	+
4	18/M	proven IPA	CGD	+	+
5	29/M	proven IPA	AML	-	+
6	70/F	proven IPA	pancreatic cancer	-	+
7	44/M	proven IPA	AIDS	-	+
8	65/F	presumptive IPA	AML	-	+
9	48/F	presumptive IPA	ATL	-	-
10	45/M	presumptive IPA	AML	-	+
11	60/M	presumptive IPA	AML	-	+
12	76/M	presumptive IPA	malignant lymphoma	-	+
13	68/F	presumptive IPA	AML	+	+
14	21/M	presumptive IPA	CGD	-	-
15	68/M	presumptive IPA	malignant lymphoma	+	+
16	65/M	presumptive IPA	AML	+	-
17	14/M	presumptive IPA	CGD	-	+
18	3/M	presumptive IPA	CGD	-	-
19	71/M	presumptive IPA	ATL	+	-
20	21/M	presumptive IPA	CGD	-	-

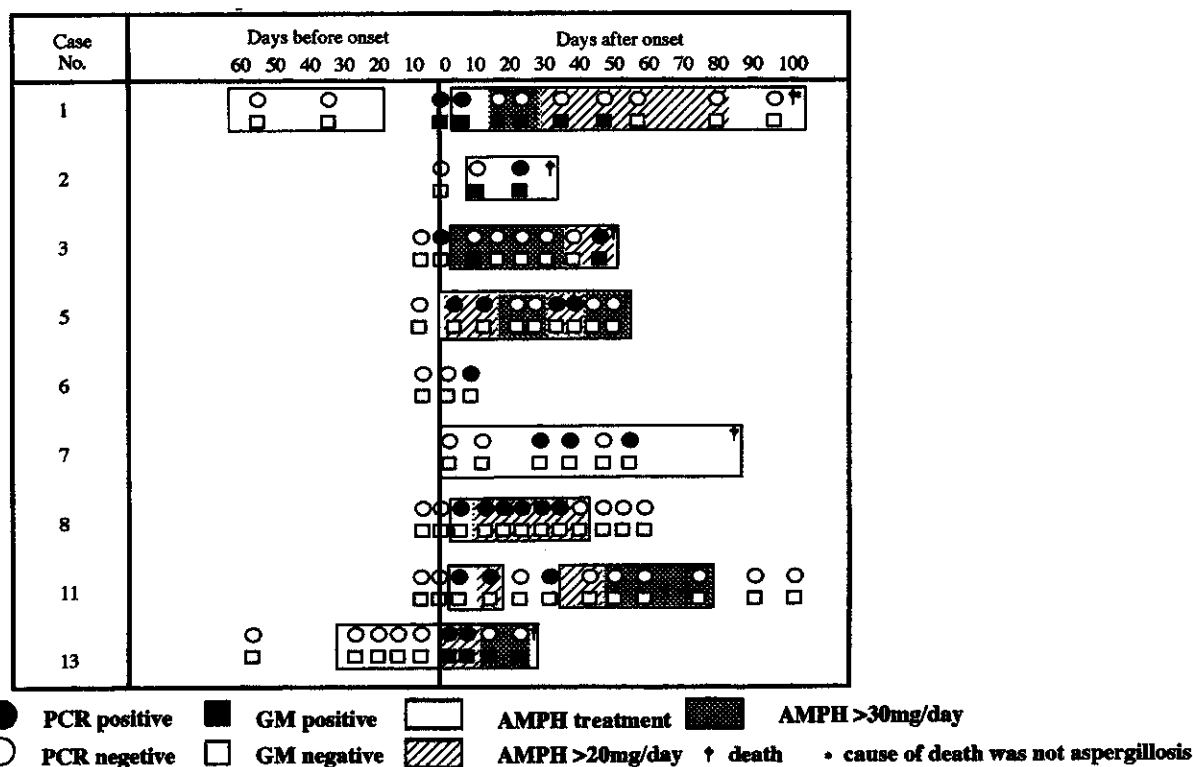


Fig. 2. Serial changes in the results of nested PCR and galactomannan assays in patients with invasive aspergillosis treated with amphotericin B.