

図2 vIL-6によるHIV複製刺激作用

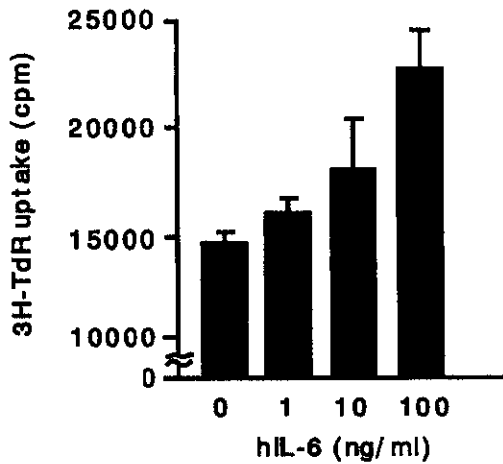


図3 vIL-6によるBCBL-1細胞の刺激作用

### 考 察

HIV 感染に伴い hIL-6 の産生が増加することはすでに知られている。hIL-6は、B細胞から抗体産生を促す因子として発見されたが同時に炎症性サイトカインとして急性ならびに慢性炎症形成に関与することや、神経のアストロサイトやグリア細胞の分化にも関与していることが知られており、AIDS患者に認められる高γグロブリン血症、悪液質、あるいは AIDS 脳症の発症にも関与する可能性がある。また、hIL-6がカポジ肉腫、悪性リンパ腫の増殖因子であることが知られており、AIDS 治療にはウイルスの制圧が根本的ではあるものの、hIL-6のシグナル阻害は、合併症や臨床症状の出現を抑える全く新しい発想に基づく治療法となる可能性がある。すでに我々はヒト IL-6 受容体

(IL-6R)に対する抗体を遺伝子操作によりヒト型化しヒトへの反復投与を可能にしたヒト型化抗 IL-6R 抗体を有しており、さらに多発性骨髄腫や Castleman病、慢性関節リウマチ患者への治療経験<sup>11,12)</sup>をも持っていることから、AIDS病態における hIL-6の関与が明確になれば容易に治療的アプローチが可能となる。

一方、今回我々は hIL-6が HHV-8 感染 Bリンパ腫細胞(BCBL-1)の増殖を促すこと、BCBL-1細胞は常に HHV-8に感染しており、かつ vIL-6を産生し続けること、さらに vIL-6は HIV 感染単球細胞株 U-1細胞において HIV複製を促すことを示した。すなわち HIV と HHV-8 は hIL-6ならびに vIL-6を介してウイルス間で相互作用を有すると考えられ(図4参照)、それにより AIDS病態を悪化させている可能性がある。従ってこの悪循環を断ち切るとは治療として有効であると考えられ、ヒト型化抗 IL-6R 抗体もその一つの手段となる。

HIV複製に関して、hIL-6に比べ vIL-6は非常に強い活性を示した。この原因は未だ明らかではないが、vIL-6と hIL-6の細胞内シグナル伝達経路が異なっている可能性が示唆される。また U-1細胞では HIV複製を刺激したにも関わらず ACH-2では何ら影響を与えなかったことから、ACH-2では vIL-6特異的受容体が欠失している可能性が示唆される。vIL-6受容体は未だ明らかではなく、vIL-6シグナル伝達のメカニズムと合わせ今後の検討課題の一つである。

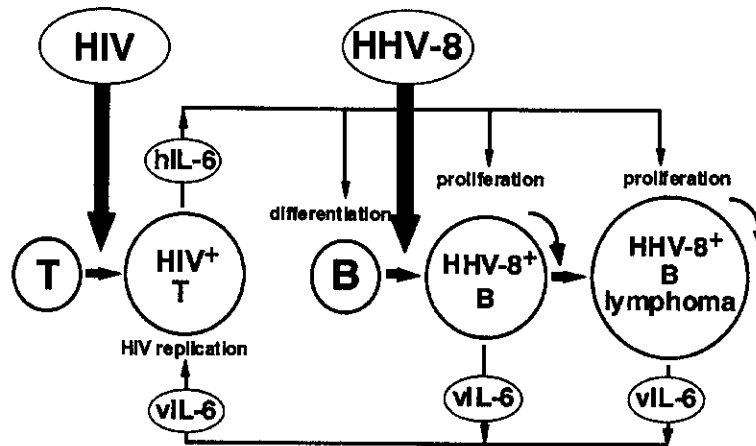


図4 HIVとKSHVのIL-6を介したクロストーク

## 結論

HIVとHHV-8はその感染細胞は異なるが、hIL-6ならびにvIL-6というサイトカインを介してクロストークを行い、AIDS病態を悪化させる。従ってIL-6のシグナル阻害は、AIDS病態に基づいた全く新しい治療的アプローチとなりうる。

## 参考文献

- 1) Nakajima K, Martinez-Maza O, Hirano T, Been EC, Nishahanian PG, Salazar-Gonzalez JF, Fahey JL, Kishimoto T: Induction of IL-6 (B cell stimulatory factor-2/IFN-beta 2) produced by HIV. *J. Immunol.* 142: 531-536, 1989
- 2) Emilie D, Fior R, Jarrousse B, Marfaing-Koka A, Merrien D, Crevon MC, Maillot MC, Galanaud T: Cytokines in HIV infection. *Int. J. Immunopharmacol.* 16: 391-396, 1994
- 3) Miles SA, Rezai AR, Salazar-Gonzales JF, Meyden MV, Stevens RH, Logan DM, Mitusya RT, Taga T, Hirano T, Kishimoto T, and Martinez-Maza O: AIDS Kaposi sarcoma-derived cells produce and respond to interleukin 6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 4068-4072, 1990
- 4) Yee C, Biondi A, Wang XH, Iscove NN, deSousa J, Aarden LA, Wong GG, Clark SC, Messner HA, and Hinden MD: A possible autocrine role for interleukin-6 in two lymphoma cell lines. *Blood*, 74, 798-804, 1989
- 5) Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, Lee F, Culpeper J, Knowles DM, and Moore PS: Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Sciences*, 266, 1865-1869, 1994
- 6) Moore PS, Boshoff C, Weiss RA, and Chang Y: Molecular mimicry of human cytokine and cytokine response pathway genes by KSHV. *Science*, 274, 1739-1744, 1996
- 7) Nicholas J, Ruvolo VR, Burns WH, Sandford G, Wan X, Ciuffo D, Hendrickson SB, Guo HG, Hayward GS, and Reitz MS: Kaposi's sarcoma-associated human herpesvirus-8 encodes homologues of macrophage inflammatory protein-1 and interleukin-6. *Nature Med.*, 3, 287-292, 1997
- 8) Burger R, Neipel F, Fleckenstein B, Savino R, Ciliberto G, Kalden JR, and Gramatzki M: Human herpesvirus type 8 interleukin-6 homologue is functionally active on human myeloma cells. *Blood*, 91, 1858-1863, 1998
- 9) Gessain A, Sudaka A, Briere J, Fouchard N, Rio B, Arborio M, Troussard X, Audouin J, and The G: Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like virus (human herpesvirus type 8) DNA sequences in multicentric Castlemans disease: Is there any relevant association in non-human immunodeficiency virus-infected patients? *Blood*, 87, 414-416, 1996
- 10) Cesarman E, Chang Y, Moore PS, Said JW, and Knowles DM: Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-related body-cavity-based lymphomas. *N. Engl. J. Med.*, 332, 1186-1191, 1995
- 11) Yoshizaki K, Nishimoto N, Mihara M, Kishimoto T: Therapy of RA by blocking IL-6 signal transduction with humanized anti-IL-6 receptor antibody. *Springer Seminars in immunopathology* 20:247-259, 1998
- 12) Nishimoto N, Kishimoto T, and Yoshizaki K: Anti-cytokine therapy in autoimmune diseases. *Internal Med.*, (in press), 1999



# AIDSに合併するカポジ肉腫、キャッスルマン病におけるKSHV感染の意義

## —KSHV由来vIL-6によるhIL-6産生の誘導—

吉崎 和幸<sup>1)</sup>、西本 憲弘<sup>1)</sup>、田合ひろみ<sup>1)</sup>、松本 智成<sup>1)</sup>、大野 美夏<sup>1)</sup>、森 康子<sup>2)</sup>、山西 弘一<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>大阪大学健康体育部 健康医学第一部門

(大阪大学大学院医学系研究科 分子病態医学専攻生理病態学)

<sup>2)</sup>大阪大学大学院医学系研究科 分子病態医学専攻微生物学

### 研究要旨

Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV)は、human herpesvirus-8 (HHV-8)とも呼ばれるガンマヘルペス属のウイルスであるが、カポジ肉腫、multicentric Castleman's disease (MCD)あるいはbody cavity-based lymphomaと疫学的な関連が報告されている。MCDの多彩な症状や検査値の異常はヒトinterleukin-6 (hIL-6)の過剰産生に基づくことを我々は明らかにしたが、HHV-8の感染が発症にどのように関与するかは不明である。興味深いことにこのウイルスゲノムにはhIL-6と相同部位が含まれておりそのコードするタンパク(vIL-6)はhIL-6と同様の作用を有することが示されたが、*in vivo*ではvIL-6の産生はhIL-6に比べ非常に少ない。そこでvIL-6がhIL-6の過剰産生を誘導し、hIL-6を介しカポジ肉腫やMCDの病態を形成するとの仮説を立てた。実際にリコンビナントvIL-6はヒトT細胞株(MT4)、マクロファージ細胞株(U937、THP-1)、B細胞株(Raji、CESS)のみならず、MCD患者リンパ節から樹立した3種類のB細胞株においてもhIL-6産生を誘導した。しかも、vIL-6によるhIL-6の誘導は、抗ヒトIL-6受容体(hIL-6R)抗体(rhPM-1)では阻害できないが、抗gp130抗体にて完全に阻害できたことから、vIL-6はIL-6Rにではなく、そのシグナル伝達分子であるgp130に直接、あるいはhIL-6Rとは別のvIL-6Rを介して結合することが示唆された。以上のことから、HHV-8はそれ自身が産生するvIL-6により、hIL-6産生を誘導することでMCDの病態形成に関与すると考えられる。カポジ肉腫においても同様の病態が存在すると思われる。

分担研究者：吉崎和幸

協力研究者：西本憲弘、田合ひろみ、松本智成、大野美夏、森 康子、山西弘一

**Pathogenic significance of KSHV/HHV8 infection in Kaposi's sarcoma and Castleman's disease associated with AIDS: KSHV/HHV8-encoded interleukin 6 homolog (vIL-6) induces endogenous human IL-6 secretion.**

Kazuyuki Yoshizaki<sup>1)</sup>, Norihiro Nishimoto<sup>1)</sup>, Hiromi Tagoh<sup>1)</sup>, Tomoshige Matsumoto<sup>1)</sup>, Mika Ono<sup>1)</sup>, Yasuko Mori<sup>2)</sup>, Koichi Yamanishi<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Medical Science I, School of Health and Sport Sciences, Osaka University and <sup>2)</sup>Department of Microbiology, Osaka University Medical School

## 目 的

AIDS に合併するカポジ肉腫病変部位から representational difference analysis (RDA) 法にて見出された Kaposi's sarcoma-associated herpes virus (KSHV) は、既知の  $\gamma$  ヘルペスウイルス亜群と相同性を有し、8番目のヒトヘルペスウイルス (human herpesvirus 8, HHV-8) とも呼ばれている<sup>1)</sup>。その後の研究から HHV-8 はカポジ肉腫のみならず、非ホジキンリンパ腫である body cavity-based lymphoma 細胞や Castleman 病の腫大リンパ節からも検出され、特に AIDS に合併したこれらの疾患病態との疫学的関連が示された<sup>2,3,4)</sup>。HHV-8 の興味深い点はそのウイルスゲノムの中にヒト interleukin 6 (hIL-6) 遺伝子と相同性を有する配列を持ち<sup>5,6)</sup>、実際にその遺伝子がコードするタンパク、viral IL-6 (vIL-6) は hIL-6 同様にマウスハイブリドーマ細胞<sup>5,6)</sup> やミエローマ細胞<sup>7)</sup> の増殖を促した。しかもカポジ肉腫や非ホジキンリンパ腫の増殖は hIL-6 に依存し<sup>8,9)</sup>、Castleman 病は hIL-6 の過剰産生で生じる<sup>10)</sup> ことが知られていることから、HHV-8 が病因として注目された。しかし、*in vivo* においては HHV-8 は極少数の細胞に感染が認められているのみで、vIL-6 産生量も少ない。Castleman 病の患者の腫大リンパ節において vIL-6 陽性細胞はリンパ濾胞のマントルゾーンに存在する少数のリンパ球であり、しかもわずかに散見されるのみである<sup>11)</sup>。一方、hIL-6 は胚中心に存在する活性化された B 細胞から大量につくられている<sup>10,11)</sup>。したがって、vIL-6 が Castleman 病の病態を直接形成しているとは考えにくい。そこで vIL-6 が hIL-6 の過剰産生を誘導し、hIL-6 を介して MCD の病態を形成するのではないかと考えた。今回 vIL-6 による hIL-6 の誘導の可能性を検討するとともに、vIL-6 のシグナル伝達が hIL-6 受容体 (hIL-6R) ならびに実際のシグナル伝達分子である gp130 を介して行われるのか否かについて *in vitro* で検討を加えた。

## 方 法

### 1. リコンビナント vIL-6 の作成

vIL-6 cDNA は Dr. Chan and Dr. Moore より供与された。pME18Sf ベクターに順方向ならびに逆方向

に挿入したプラスミドを 293T 細胞 (ヒト胎児由来腎細胞に SV40 の large T 抗原を導入して作成した細胞) にリン酸カルシウム共沈法にて遺伝子導入を行った。2日間培養した 293T 細胞の培養上清を D-MEM メディウムで透析した後、マウスハイブリドーマ細胞 MH60 に対する増殖刺激作用を検討し、hIL-6 相当量として vIL-6 活性を示した。この方法により hIL-6 換算 370pg/ml に相等する vIL-6 を得た。またコントロールには逆方向に遺伝子を組み込んだプラスミド導入株の上清 (reverse vIL-6) ならびに Sham operation を行った培養上清を用いた。

### 2. hIL-6 の定量

hIL-6 は化学発光酵素抗体法 (CLEIA)<sup>12)</sup> を用いて測定した。CLEIA 法では一部の高等なサルを除きヒトの IL-6 以外は測定できない。したがって vIL-6 はハイブリドーマ細胞株 MH60 の増殖支持能を有するが CLEIA では検出できない。また hIL-6 産生誘導能を有する IL-1 $\beta$  ならびに Tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) についても ELISA にて検討した。

### 3. 細胞ならびにサイトカインによる刺激

T 細胞株として HTLV-1、Jurkat、SupT1、B 細胞株として Raji、Ramos、CESS、BCBL-1、単球として THP-1 と U937、さらに HepG2 肝癌細胞を用いた。また、multicentric Castleman's disease (MCD) 患者の腫大リンパ節より当教室で樹立した 3 種類 B 細胞株 (CD1、CD2、CD3) を用いた。それぞれ  $1 \times 10^5$  個の細胞を 96 穴培養プレートを用いて 5% FCS 添加 RPMI にて 78 時間培養し、培養上清中の hIL-6 を測定した。また IL-6 の阻害実験には、ヒト型化抗 IL-6 R 抗体 (rhPM-1) ならびにマウス抗ヒト gp130 抗体 (gpx22) をそれぞれ 25 $\mu$ g/ml 添加した。コントロール抗体にはヒト IgG またはマウスモノクローナル抗体 MOPC21 ( $\gamma$ 1 $\kappa$ ) を用いた。

### 4. luciferase assay

vIL-6 が hIL-6 の転写を促進するか否かを検討するため、IL-6 プロモータ領域を含む luciferase reporter plasmid を構築し MT4 細胞にエレクトロポレーション法を用いて導入した。24 時間後に vIL-6 あるいは reverse vIL-6 を添加し、さらに 24 時間

いは48時間培養後、Luciferase活性をPicaGene assay Kitを用いて測定した。

## 結果

### 1. vIL-6によるhIL-6の産生の誘導

図1に各種細胞株の培養上清中のhIL-6量を示す。リコンビナントvIL-6の添加によりMT4(T細胞)、U937、THP-1(単球/マクロファージ)、CESS(B細胞)においてhIL-6産生の誘導が観察された。U937、THP-1ならびにCESSは、無刺激の状態においても20pg/mlから100pg/ml相当のhIL-6の産生が認められたがvIL-6の添加により、2~4倍に産生が増加した。一方MT4細胞においては、hIL-6産

生量は約20倍に増幅された。このようなhIL-6の産生の誘導はvIL-6cDNAを逆方向にベクターに挿入したプラスミドをトランスフェクションして作成したreverse vIL-6あるいはSham operation controlの293T細胞培養上清では認められなかった。一方Sup T1, Jurkat, Raji, Ramos, BCBL-1, HepG2においては、有意なhIL-6産生の増強は認められなかった。

次にMCD患者の腫大リンパ節より樹立したB細胞株3種(CD1、CD2、CD3)についてもリコンビナントvIL-6によるhIL-6産生誘導能を検討した。これらのCastleman病由来B細胞株は無刺激の状態でも前述の10種類の細胞株に比べ大量のhIL-6(150pg/ml~400pg/ml)を産生していた(図2参

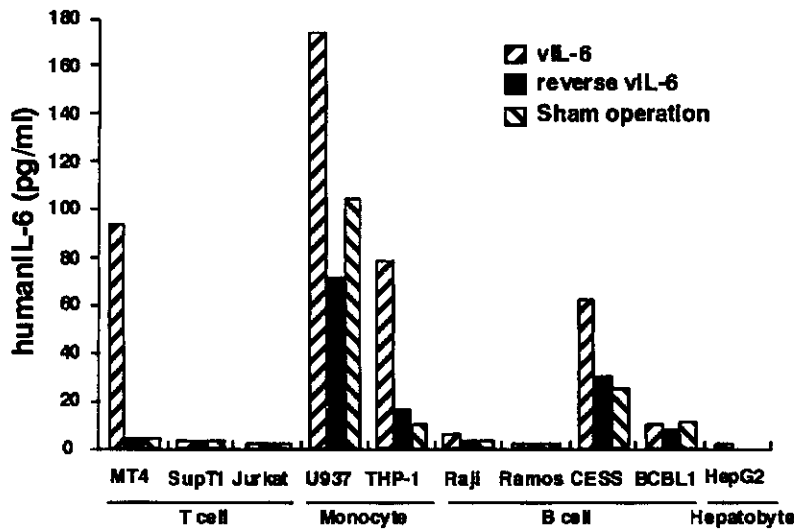


図1 リコンビナントvIL-6による様々な細胞株からのhIL-6産生の誘導

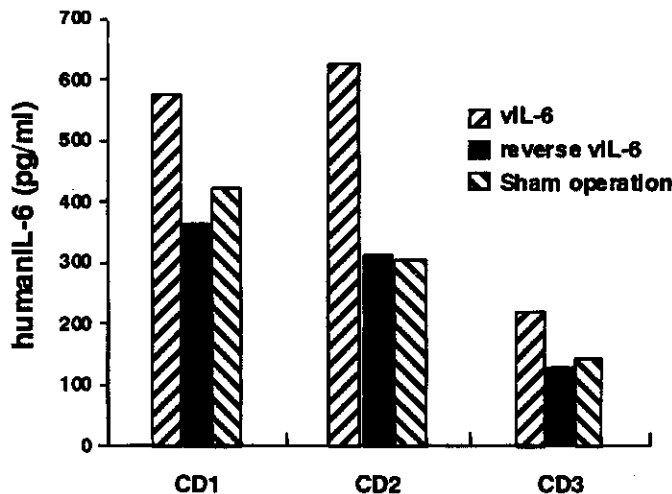


図2 リコンビナントvIL-6によるCastleman病患者リンパ節由来B細胞株からのhIL-6産生の増幅

照)。リコンビナントvIL-6はこれらの細胞からのhIL-6の産生も約2倍に増加させた。

### 2. vIL-6によるIL-1 $\beta$ 、TNF $\alpha$ の産生誘導

vIL-6によるhIL-6産生の誘導が、hIL-6産生誘導能を有するIL-1 $\beta$ あるいはTNF $\alpha$ を介している可能性を検討するためMT4培養上清中のIL-1 $\beta$ 、TNF $\alpha$ を測定した。しかし、IL-1 $\beta$ 、TNF $\alpha$ ともに産生は認められなかった。

### 3. 抗hIL-6R抗体または抗gp130抗体によるシグナルの阻害

vIL-6がhIL-6と同様の生理活性を有することからvIL-6がhIL-6Rならびにそのシグナル伝達分子

であるgp130を利用している可能性がある。そこで抗hIL-6R抗体、抗ヒトgp130抗体によるシグナル阻害を試みた。この実験には実際に治療への応用の可能性を考え、マウスのモノクローナル抗体の相補性決定領域(CDR)の遺伝子をヒト免疫グロブリン遺伝子に移入して作成したヒト型化抗IL-6R抗体、rhPM-1<sup>13)</sup>を用いた。図3に示すようにリコンビナントvIL-6によるhIL-6の産生誘導はヒト型化抗IL-6R抗体、rhPM-1では全く阻害できなかったが、IL-6のシグナル伝達分子であるgp130分子に対するモノクローナル抗体、gp130は完全に阻害した(図3)。このことからvIL-6のシグナル伝達にはhIL-6Rは必ずしも必要ではないが、gp130分子は必要不可欠であることが確認できた。

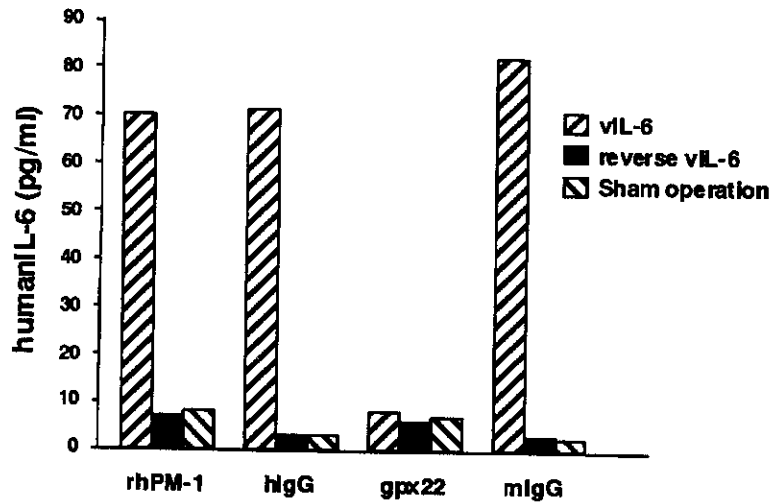


図3 抗hIL-6抗体ならびに抗gp130抗体によるvIL-6シグナル阻害

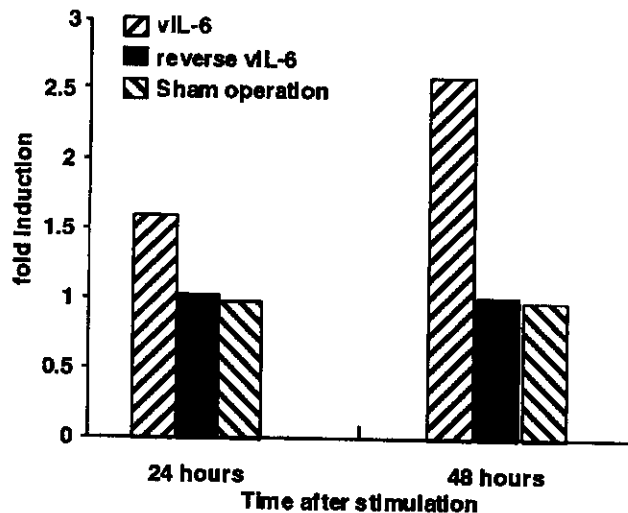


図4 vIL-6によるヒトIL-6遺伝子のプロモーターの活性化

#### 4. vIL-6によるIL-6プロモーターの活性化

vIL-6によるhIL-6産生誘導の機序がhIL-6の転写を促進することにより生じるか否かを検討するために、IL-6プロモーター領域を含むluciferase reporter plasmidを構築し、MT4T細胞株に導入した。リコンビナントvIL-6の添加を24時間ならびに48時間におけるluciferase活性を図4に示す。vIL-6の刺激によりluciferase活性はそれぞれ2.1倍と3.4倍に増加しており、vIL-6はhIL-6の転写を促進することが確認された。

#### 5. ヒト型化抗IL-6R抗体によるMCD患者の治療

MCD患者の病態がhIL-6によって生じることの確認、ならびにhIL-6の阻害によるMCDの治療の可能性を明らかにする目的で、ヒト型化抗IL-6R抗体、rhPM-1による治療を行った。リンパ節生検によりMCDと確定診断された患者のインフォームドコンセントを得たうえで、大阪大学倫理委員会ならびに先進医療審査会の許可の下にrhPM-1を投与した。rhPM-1は点滴静注にて行い1mg、

10mg、50mgと副作用の無いことを確認しながら増量し、以後は50mgを1週間に2回、又は100mgを1週間に1回投与した。図5にその経過を示す。10mgのrhPM-1投与直後よりCRPが低下し始め、50mgのrhPM-1の3回目の投与後CRPは陰性化した。それに伴い、それまで続いていた発熱や全身の倦怠感も消失し、さらにそれにわずかに遅れて血中ヘモグロビン値が改善し始め、2ヶ月後にはほぼ正常値にまで改善した。また血清γグロブリン値は正常化し、低アルブミン血症も改善した。またこのような治療効果は抗体投与を続けている限り持続し、効果の減弱はなかった。このことからヒト型化抗IL-6R抗体によるhIL-6の阻害が、ヒトMCDの新しい治療戦略となることがわかった<sup>14)</sup>。

#### 考 察

近年その存在が明らかとなったHHV-8はカポジ肉腫や、Castleman病、悪性リンパ腫の原因ウイルスとして注目されているが、その発症メカニズム

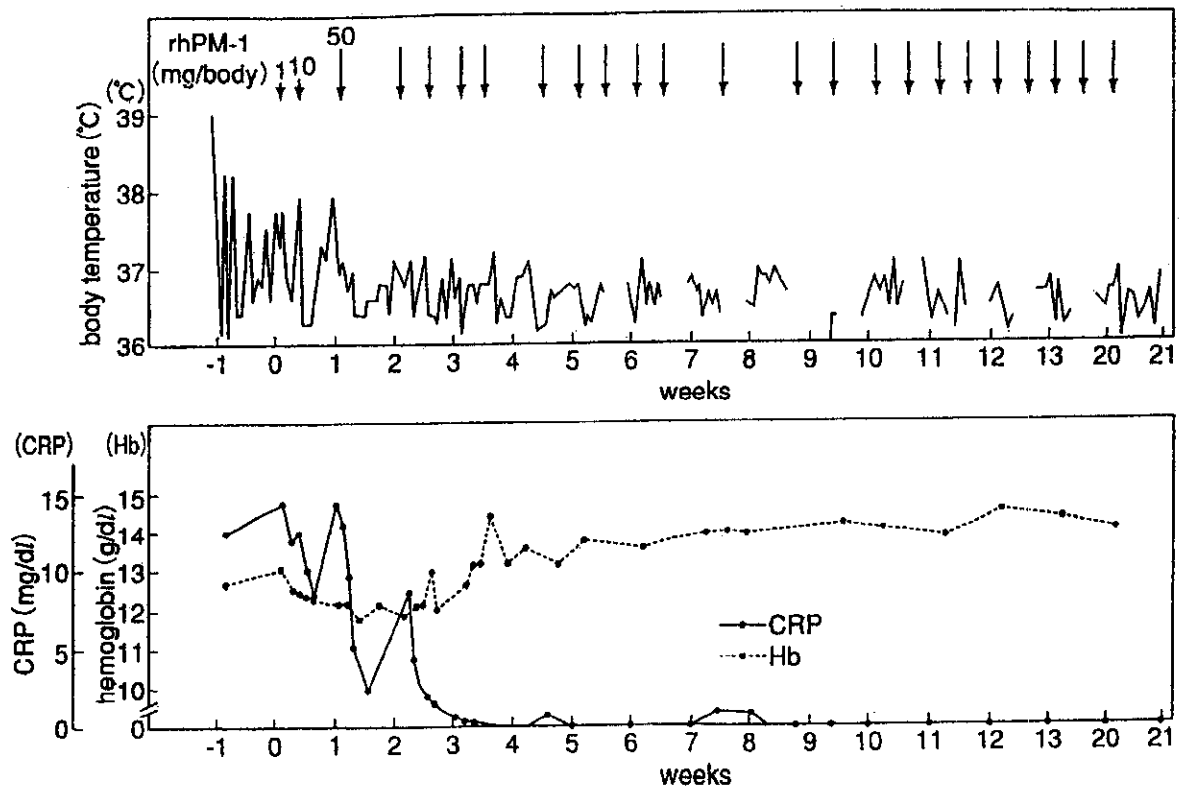


図5 ヒト型化抗IL-6受容体抗体を用いたCastlman病の治療

は未だ明らかではなく病態意義に疑問が残っている。その最も大きな理由は、HHV-8の感染細胞は非常にわずかであること、HHV-8の産生するvIL-6は、これらの疾患の増悪因子になる可能性があるが、実際には*in vivo*での発現が非常に少ないからである。今回我々は、vIL-6がhIL-6の産生を転写レベルで増加させることを明らかにした。しかもヒトのIL-6Rに対する抗体がそのようなvIL-6の作用をブロックできずに抗gp130抗体が完全にブロックしたことから、vIL-6のシグナルはhIL-6Rを必ずしも必要とせず、gp130分子に直接あるいはvIL-6特異的受容体を介してgp130分子に結合することで伝えられると考えられる。但し、現時点でこのようなvIL-6特異的受容体は同定されていない。

以上の結果に加え、vIL-6のシグナルは阻害しないがhIL-6のシグナルは完全に抑えることができる抗hIL-6抗体<sup>15)</sup>の投与により、MCD患者の臨床症状や検査値の異常が完全に消失したことから、vIL-6は直接MCD病態に関与するのではなく、hIL-6産生の誘導を介してMCD病態を形成すると思われる。このことは、vIL-6産生細胞(HHV-8感染細胞と同じ分布を示す)が、リンパ濾胞のマントルゾーンに散見されるにすぎないにも関わらず、hIL-6の産生細胞が胚中心に存在する殆どの活性化B細胞であり、基本的に全く異なる分布を示すことから示唆される。すなわちHHV-8ウイルス感染細胞自身がhIL-6を産生するのではなく、パラクラインメカニズムによりhIL-6産生を誘導すると考えられ、vIL-6がそれを媒介する。したがって、vIL-6の阻害治療もhIL-6阻害と同様に有効である可能性を示唆するが、実際にvIL-6の阻害効果があるか否かは今後の課題であり、それが明らかになれば同時に、vIL-6によるhIL-6産生のパラクラインメカニズムがHHV-8によるMCD発症病態であることの直接証明にもなる。今回はCastleman病における病態を中心に解析したが、おそらくカポジ肉腫や悪性リンパ腫の病態にもあてはまるであろう。

一方、AIDSに伴うこれらの疾患においては高頻度にHHV-8の感染が認められるのはなぜであろうか。免疫不全状態になった結果、HHV-8感染細胞の排除が行えず発症する可能性が考えられる

が、HIV非感染者にも上記疾患は発症する。HIV感染細胞は、T細胞や単球であり、HHV-8が感染しているカポジ肉腫細胞や悪性リンパ腫やCastleman病のB細胞とは基本的に異なるがHIV感染が少なからず影響しているのは疑いない。今のところhIL-6がHHV-8そのものの複製を促すか否かは明らかでないが、HIV感染そのものがhIL-6産生を促すことから、このhIL-6によりカポジ肉腫やBリンパ腫の増殖を促し、HHV-8感染細胞を増加させている可能性が考えられる。またHIVによるhIL-6の増加がvIL-6により誘導されるhIL-6と相加的にCastleman病の病態を悪化させると考えられる。vIL-6は、HIV複製をも促すことからvIL-6、ならびにhIL-6を介し、HIV、HHV-8という2種類のウイルスがクロストークを行いAIDS病態を形成していると思われる。

## 結 論

HHV-8は、自身の遺伝子がコードするvIL-6の分泌を介し、パラクラインメカニズムによりhIL-6産生を誘導し、Castleman病の病態を形成すると思われる。同時にvIL-6とhIL-6はともにHIV複製をも促すことからAIDS病態をも悪化させると考えられる。したがってvIL-6あるいはhIL-6のシグナルを阻害する治療がAIDSの新しい治療戦略となりうる。

## 参考文献

- 1) Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, Lee F, Culpeper J, Knowles DM, and Moore PS: Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Sciences*, 266, 1865-1869, 1994
- 2) Huang YQ, Kaplan JJ, Li MH, Poesz B, Katabira E, Zhang WC, Feiner D and Friedman-Kien AE: Human herpesvirus-like nucleic acid in various forms of Kaposi's sarcoma. *Lancet*, 345, 759-761, 1995
- 3) Cesarman E, Chang Y, Moore PS, Said JW, and Knowles DM: Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-related body-cavity-based lymphomas. *N. Engl. J. Med.*, 332, 1186-1191, 1995
- 4) Gessain A, Sudaka A, Briere J, Fouchard N, Rio B,



- Arborio M, Troussard X, Audouin J, and The G: Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like virus (human herpesvirus type 8) DNA sequences in multicentric Castleman's disease: Is there any relevant association in non-human immunodeficiency virus-infected patients? *Blood*, 87, 414-416, 1996
- 5) Moore PS, Boshoff C, Weiss RA, and Chang Y: Molecular mimicry of human cytokine and cytokine response pathway genes by KSHV. *Science*, 274, 1739-1744, 1996
- 6) Nicholas J, Ruvolo VR, Burns WH, Sandford G, Wan X, Ciuffo D, Hendrickson SB, Guo HG, Hayward GS, and Reitz MS: Kaposi's sarcoma-associated human herpesvirus-8 encodes homologues of macrophage inflammatory protein-1 and interleukin-6. *Nature Med.*, 3, 287-292, 1997
- 7) Burger R, Neipel F, Fleckenstein B, Savino R, Ciliberto G, Kalden JR, and Gramatzki M: Human herpesvirus type 8 interleukin-6 homologue is functionally active on human myeloma cells. *Blood*, 91, 1858-1863, 1998
- 8) Miles SA, Rezai AR, Salazar-Gonzales JF, Meyden MV, Stevens RH, Logan DM, Mitusya RT, Taga T, Hirano T, Kishimoto T, and Martinez-Maza O: AIDS Kaposi sarcoma-derived cells produce and respond to interleukin 6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 4068-4072, 1990
- 9) Yee C, Biondi A, Wang XH, Iscove NN, deSousa J, Aarden LA, Wong GG, Clark SC, Messner HA, and Hinden MD: A possible autocrine role for interleukin-6 in two lymphoma cell lines. *Blood*, 74, 798-804, 1989
- 10) Yoshizaki K, Taeho L, Aozasa K, Nakahata T, Wawai H, Tagoh H, Komori T, Kishimoto S, Hirano T, and Kishimoto T: Pathogenic Significance of interleukin-6 (IL-6/BSF-2) in Castleman's disease. *Blood*, 74, 1360-1367, 1989
- 11) Parravicini C, Corbellino M, Paulli M, Magrini U, Lazzarino M, Moore PS, and Chang Y: Expression of a virus-derived cytokine, KSHV vIL-6, in HIV-seronegative Castleman's disease. *Am. J. Pathol.*, 151, 1517-1522, 1997
- 12) Nishizono I, Iida Suzuki N, Kawada H, Murakami H, Ashihara Y, and Okada M: Rapid and sensitive chemiluminescent enzyme immunoassay for measuring tumor markers. *Clin. Chem.* 37, 1639-1644, 1991
- 13) Sato K, Tsuchiya M, Saldanha J, Koishihara Y, Ohsugi Y, Kishimoto T, and Bendig MM: Reshaping a human antibody to inhibit the interleukin-6-dependent tumor cell growth. *Cancer Res.*, 53, 851-856, 1993
- 14) Nishimoto N, Kishimoto T, and Yoshizaki K: Anti-cytokine therapy in autoimmune diseases. *Internal Med.*, (in press), 1999



## 男性HIV感染者における 配偶者間人工授精に関する研究

五味淵秀人、箕浦 茂樹

国立国際医療センター 病院 産科婦人科

### 研究要旨

男性HIV感染者より同意のもとに採取された精液をswim-up法、密度勾配法、濾過法などの調製法を単独あるいは組み合わせて処理した。この過程においてHIVウイルス量および精子以外の細胞数を測定した。精液を処理することによりウイルス量は明らかに低下した。400copy/mlを感度限界とすれば単独の調製法でも十分ウイルス量は低下した。100copy/ml未満を目標とすると密度勾配+swim-up併用法で55.6%は達成できたが、回収される精子数が少ないため人工授精に不适当的な症例が多かった。しかし、Sil-Select単独にて処理した46.2% (7/13)は陰性で、2法併用に比べて陰性率は減るものの有意差はなかった。よって、ウイルスの測定法が確実であればこの方法は有用なのではないかと考えられた。

分担研究者：箕浦茂樹

研究協力者：五味淵秀人

**Artificial insemination with processed semen of HIV-positive husband**

Hideto Gomibuchi and Shigeki Minoura

*Department of Obstetrics and Gynecology, International Medical Center of Japan*

## 目的

HIV に対する治療法の進歩により AIDS 発症を抑える、もしくは遅らせることが可能となった。それに伴い、拳児を希望する患者もできるようになった。性行為による伝播が重要な経路である本疾患においては、予防と拳児希望を共に満たすことは相反することである。しかし、精液より HIV ウイルスを除去し妊孕性のある健常精子のみを選別して配偶者に人工授精することは問題解決の一法になると考えられる。よって、本研究の目的はウイルスを除去する精子調製法を開発することとした。

## 方法

### 1. 単一処理法における検討

男性 HIV 感染者より同意のもとに採取された精液を室温にて 1 時間静置し十分に液化させた。精液検査(精液量、精子濃度、運動率および運動性)と精子以外の細胞数の算定を行った。この原精液一部よりウイルス量を測定した。

#### a. swim-up 法

5ml の培養液(Gamete Preparation Medium, GPM, Serono)に精液を混和し 400g、10 分の遠心分離を行った。上層の培養液を除去しウイルス測定(表: SW 遠沈上清 1)、試験管底の pellet を再懸濁し同様の操作を行った(SW 遠沈上清 2)。この懸濁液を、試験管に入れた 1.5ml の培養液の管底に注入した。37℃、5% CO<sub>2</sub> in air に設定した培養器内で 60 分静置した。その後、最上層 1.0ml を採取し精液検査、細胞数の算定を測定した。この下方 0.5ml (SW 中層)、および最下層 (SW 下層) についてもウイルス量を測定した。

#### b. 密度勾配法

諸外国ではパーコールによる分離が盛んに用いられているが、日本産科婦人科学会の会告より精子処理に対しパーコールの使用が禁止されているため、同様にシランコーティングされたコロイド状の珪酸分子で内毒素レベルがパーコールに比べて低い、Sil-Select (FertiPro N. V., Belgium) を用いた。

試験管内に濃度 90%、45% に調製された Sil-Select を 2.5ml ずつ 2 層になるよう入れ、この上に

精液を 2.5ml 重層し 400g、30 分の遠心分離を行った。重層した最上層には精漿が残り、90%-45% 境界面に異常精子と血球成分が分離されるため、これらを SS 分離上層、SS 分離中層としてウイルス量を測定した。管底の pellet (SS 分離下層) を 2.5ml の培養液に混和し 400g、8 分の遠心分離を行った。同様の操作を再度行った。上層 1.5ml を除去し (SS 遠沈上層) 下層 1.0ml について精液検査、細胞数の測定と HIV ウイルス量を測定した。

#### c. 濾過法

デキストランビーズ (Sephadex G-15) を濾過材とする Sperm-Prep II (ZBL, Inc. U.S.A.) を用いた。

5ml の培養液 (GPM) に精液を混和し 400g、10 分の遠心分離を行った。上層の培養液を除去し、試験管底の pellet を再懸濁後 Sperm-Prep II のカラムに通し回収液 (4 ~ 5ml) を得た。カラム内上層 (SP1)、下層 (SP2) のウイルス量を測定した。この回収液を 400g、10 分遠心分離し、上層を除去 (SP 遠沈上清) 下層 1.0ml を採取し、精液検査、細胞数の測定とウイルス量を測定した。

### 2. 併用法による検討

Semprini らの報告<sup>1)</sup> に準じ Sil-Select + swim-up 法について検討した。

Sil-Select 2 層に精液を重層し 400g、30 分の遠心分離を行い、洗浄のため培養液に混和し遠心分離を 2 回行った。pellet を 1ml の培養液で再懸濁し試験管に入れた 1.5ml の培養液の管底に注入した。37℃、5% CO<sub>2</sub> in air に設定した培養器内で 60 分静置した。上層 1.0ml を採取し、精液検査、精子以外の細胞数の測定をした。HIV 量の測定は原精液、Sil-Select 処理後 (SS-SW)、最終検体に行った。

### 3. ウイルス測定法

NASBA 法にて HIV-RNA を定量した。定性法は PCR 法によった。測定は、国立感染症研究所エイズ研究センターエイズ検査室室長、吉原みな子博士に依頼した。

## 結果(表)

18 例のボランティアより得られた 26 検体について検討した。平均年齢は 30.2 才、感染経路は血

友病11例、同性愛者6例、異性間交渉1例であった。血友病の1例はすでに子供を持っているが、他の17症例には子供はいない。10例には単剤または多剤併用による抗ウイルス剤の治療を受けた既往があった。未測定の場合を除き、25検体中18例に同時に採取された血液から定量法(検出感度400copy/ml)でウイルスが認められた。定量と共に定性法(100copy/ml)を行った13例では、両測定法ともに陰性4例、ともに陽性6例、定量で42000、1300、990copy/mlの3例は定性では陰性であった。

精液中のウイルスは、測定できた19検体中5検体に定量法で検出された。血液・精液共に定量を行った19例では、ともに感度以下6例、血中のみ8例、共に検出されたもの5例で血中に比し精液中のウイルス量が多かったのは5例中2例であった。精液のみ陽性の例はなかった。定量にて精液中のウイルスが検出されなかった8検体中5検体は定性でも陰性であったが、3検体は陽性であった。しかし、定量で2800、99000copy/mlの2検体は定性では陰性であった。精液検査所見では9検体は精子濃度が不良( $40 \times 10^6$ /ml以下)、7検体は精子運動

率が不良(60%以下)と問題のある症例が多かった。

Swim-up法7検体、Sil-Select8検体、Sperm-Prep II 6検体につき検討した。Sil-Selectにて処理をした1検体に1200copy/mlの残存を認めた以外は400copy/ml未満であった。12検体にはSil-Select+swim-upの併用法を行った。定量を行った6検体は全て400copy/ml未満であった。これを含め定性を9検体に行ったところ4検体が陽性であった。併用法ではSil-Select終了時の検体の一部についても定性を行った。Sil-Selectだけで陰性となっていたものは4検体、Sil-Selectだけでは陽性であったがswim-upを加えた後に陰性となったもの1検体、併用でも陰性にならなかったもの2検体であった。しかし、残りの2検体はSil-Selectで陰性であったがswim-upを加えた後に陽性となった。Sil-Select単独にて処理した13検体中7検体が陽性で、併用では9検体中4検体が陽性であった。処理後の精子運動率は良好で、濃度については、swim-up法で平均 $4.9 \times 10^6$ /mlと不良であったが、他の2法では十分なものであった。Sil-Select+swim-upの併用法では精子濃度は極めて低かった。

	施行年月日	症例番号	年齢(才)	感染ルート	治療薬	血中ウイルス量(copy/ml)	血中定性	CD4値	精液量(ml)	精子濃度(×million/ml)
1	980311	1	32	HemoA	なし	25000	未測定	401	3	140
2	980311	1	32	HemoA	なし	25000	未測定	401	3	140
3	980506	2	44	hetero	AZT/3TC/IDV	500	未測定	407	4.1	180
4	980506	3	23	HemoA	d4T/3TC/IDV	1400000	未測定	79	3.3	35
5	980506	2	44	hetero	AZT/3TC/IDV	500	未測定	407	4.1	180
6	980506	3	23	HemoA	d4T/3TC/IDV	1400000	未測定	79	3.3	35
7	980520	4	28	HemoB	なし	540	未測定	510	4	94
8	980520	1	32	HemoA	なし	98000	+	279	2.5	158
9	980610	5	25	homo	AZT/3TC/IDV	2700	+	622	1.7	70
10	980617	6	30	HemoA	d4T/3TC/RTV/SQV	3000	未測定	172	2	126
11	980617	7	27	homo	AZT/3TC/NFV	990	+	567	3	93
12	980624	8	31	homo	AZT/3TC/NFV	UD	未測定	766	4	19
13	980624	9	30	HemoA	AZT/ddc	UD	未測定	186	6.5	67
14	980624	10	29	HemoA	ddl	960	未測定	573	2.5	30
15	980624	8	31	homo	AZT/3TC/NFV	UD	未測定	766	4	19
16	980624	9	30	HemoA	AZT/ddc	UD	未測定	186	6.5	67
17	980624	10	29	HemoA	ddl	960	未測定	573	2.5	30
18	980722	11	32	homo	なし	58000	+	344	1.7	26
19	980729	12	24	homo	AZT/ddc/NVP	UD	未測定	432	4.2	86
20	980729	13	40	homo	なし	71000	未測定	496	1.3	22
21	980729	12	24	homo	AZT/ddc/NVP	UD	未測定	432	4.2	86
22	981021	14	22	HemoA	なし	UD	-	201	1.6	24
23	981028	6	30	HemoA	d4T/3TC/RTV/SQV	42000	-	243	3.2	92
24	981028	15	30	HemoA	AZT/3TC	UD	-	386	2.2	143
25	981104	4	28	HemoB	なし	1300	-	601	1.3	19
26	981104	16	34	HemoA	AZT/ddc/SQV	UD	-	61	4.1	47
27	981111	13	40	homo	なし	130000	+	445	0.9	18
28	981125	1	32	HemoA	なし	990	-	515	3.2	161
29	981209	2	44	hetero	AZT/3TC/IDV	UD	-	437	4	93
30	990106	11	32	homo	なし	530	+	315	0.9	19
31	990114	3	23	HemoA	d4T/3TC/IDV	140000	未測定	38	1.8	54
32	990120	17	25	HemoA	なし	30000	未測定	0.5	6.2	64
33	990127	18	37	HemoA	なし	未測定	未測定	230	1.6	282

運動率(%)	運動性	精液中ウイルス量(copy/ml)	精液定性	処理法	処理後精子濃度(×million/ml)	処理後運動率(%)	処理後運動性	処理後ウイルス量(copy/ml)
91	2.5	測定できず	未測定	SP2	78	96	未測定	未測定
91	2.5	測定できず	未測定	swim	7	100	未測定	未測定
86	未測定	UD	未測定	SP2	57	63	未測定	UD
63	未測定	770	未測定	SP2	11	73	未測定	UD
86	未測定	UD	未測定	swim	23	74	未測定	UD
63	未測定	770	未測定	swim	0.2	50	未測定	UD
74	2	12000	未測定	SS	23	83	3	UD
68	2	2800	-	SS	74	68	3.5	1200
79	2	UD	-	SS	31	84	4	UD
76	2	UD	未測定	SS	63	90	3.5	UD
37	2	UD	-	SS	29	76	3	UD
68	2	UD	未測定	SP2	2.5	92	2.25	未測定
60	2	UD	未測定	SP2	56	93	3.5	UD
67	2	UD	未測定	SP2	33	97	3.5	未測定
68	2	UD	未測定	swim	0.2	100	1	UD
60	2	UD	未測定	swim	3	33	2	UD
67	2	UD	未測定	swim	1	100	2	UD
77	2	99000	-	SS	29	66	3	UD
81	1.5	UD	未測定	SS	35	54	2	UD
36	1	2100	未測定	SS	9	11	1	UD
81	1.5	UD	未測定	swim	3	100	2	UD
80	2	UD	+	SS-swim	0.4	75	3	UD
48	1	UD	-	SS-swim	2	100	2.5	UD
72	1.5	UD	-	SS-swim	0.3	100	3	UD
42	0.75	UD	+	SS-swim	全視野1	100	2	UD
34	1.5	未測定	-	SS-swim	0.7	71	3	未測定
72	1.5	未測定	+	SS-swim	0	0	0	未測定
78	2	UD	-	SS-swim	7	100	3.5	UD
66	2.5	UD	+	SS-swim	1	100	3	UD
74	2	未測定	-	SS-swim	0	0	0	未測定
62	2	未測定	未測定	SS-swim	1	100	3	未測定
65	0.75	未測定	未測定	SS-swim	0.5	100	1.5	未測定
49	1.5	未測定	未測定	SS-swim	0.2	100	3	未測定

処理後定性	SS分離上層	SS分離中層	SS分離下層	SS選沈上層	SS選沈下層	SW選沈上清1	SW選沈上清2	SW中層	SW下層	SP1	SP2	SP選沈上清
未測定												
未測定												
未測定										UD	UD	UD
未測定										UD	UD	UD
未測定						UD	UD	UD	1200			
未測定						UD	UD	UD	UD			
未測定	24000	UD	UD	UD	UD							
+	1100	UD	450	UD	1200							
+	UD	UD	UD	UD	UD							
未測定	UD	UD	UD	UD	UD							
+	UD	UD	UD	UD	UD							
未測定											UD	UD
未測定											UD	UD
未測定											UD	UD
未測定						UD	UD	UD	UD			
未測定						UD	UD	UD	UD			
未測定						UD	UD	UD	UD			
+	35000	UD	5700	UD	UD							
未測定	UD	UD	UD	UD	UD							
未測定	2300	UD	UD	UD	UD							
未測定						UD	UD	UD	UD			
+												
-												
+												
-												
+												
+												
-												
-												
-												
未測定						未測定						
未測定						未測定						
未測定						未測定						

精液中血球成分(×million/ml)	処理後血球成分(×million/ml)
未測定	未測定
未測定	未測定
未測定	未測定
未測定	未測定
未測定	未測定
未測定	未測定
未測定	未測定
未測定	未測定
未測定	未測定
未測定	未測定
未測定	未測定
未測定	未測定
未測定	未測定
未測定	未測定
未測定	未測定
未測定	未測定
未測定	未測定
未測定	未測定
未測定	未測定
未測定	未測定
未測定	未測定
未測定	未測定
なし	なし
5	なし
13	なし
0.2	なし
0.5	なし
2	なし
0.4	なし
0.5	なし
0.1	なし
0.3	なし
0.2	なし
8	0.1

## 考 察

HIVの感染経路として性行為は重要なものである。伝播の防御として安全な性行為、つまり、コンドームの使用が推奨されていることは周知のことである。しかし、これは避妊行為であり、子供がいる普通の家庭生活を希望するHIV患者夫婦の希望にはそぐわない行為である。挙児を希望すれば、妻がHIVに感染する危険性を承知の上で性行為を持たざるを得ない。Sempriniらはイタリアの大規模なコホート調査の報告をもとに1回の性行為当たり0.07%の感染のリスクをもつと試算した。全く問題のない夫婦において1周期での妊娠率は約30%と言われており、単純に計算すると12ヶ月で99%が妊娠することになる。妊娠成立まで排卵期に1度だけ避妊をしない性行為をすると妻の感

染の危険率は0.23%になる。実際には全く問題のない夫婦ばかりではないため危険率は増し妊娠率は減ることになる。一方、HIVに対する治療法の進歩によりAIDS発症を抑えるか、もしくは、遅らせることが可能となった現在において、妻への感染がなく挙児希望を満たす医療行為に期待が持たれることは当然といえる。この問題について、精液よりHIVウイルスを除去し妊孕性のある健常精子のみを選別して配偶者に人工授精することは問題解決の一法になると考えられる。

男性HIV感染者より同意のもとに採取された精液をswim-up法、密度勾配法、濾過法など不妊治療の日常臨床に用いられる精子調製法を単独あるいは組み合わせて処理した。ただし、これら不妊症治療に用いられている調製法は精液より如何に運動良好精子を回収するかを目的としているもの

で、ウイルスを除去することが主たる目的ではないことを述べておく。swim-up 法は体外受精胚移植において繁用されている精液処理法で、下層の精子懸濁液から運動能の良好な精子は重層した培養液に昇り (swim-up) 自動能のない精子や細胞成分は重力により管底に沈む。よって、精液より運動良好な精子を回収することが可能な調製法である。ただし、回収される精子が少ない欠点がある。密度勾配法としてはパーコールによる方法が体外受精胚移植や人工授精に盛んに用いられている。日本産科婦人科学会の会告よりパーコールの使用が禁止されているため、我々は代替品として販売されている Sil-Select を用いた。濾過法としては、Sephadex G-15 を濾過材とした Sperm-PrepII<sup>2)</sup> を用いた。この方法では細胞成分はデキストランビーズに吸着されるものの液性成分が通過してしまうことが難点で、精漿に含まれるフリーのウイルスが通過する可能性が考えられた。海外においてはパーコールに swim-up 法を併用することにより、HIV 陽性の夫精液を処理し人工授精を行っている<sup>1,3)</sup> ため、この報告に準じ Sil-Select + swim-up 併用法についても検討を加えた。

18 症例より得られた 26 検体について検討した結果、5 症例 (5 検体) の精液から定量法でウイルスが認められた。定量法の感度限界は 400copy/ml であったため、PCR 法にて検出感度をおよそ 100copy/ml (5copy/tube を 1ml に換算) に上げた定性検査で 400copy/ml 未満であった検体を再度検討したところ 3 検体が陽性であった。精液中ウイルス量と血中ウイルス量は必ずしも一致しなかったものの、血中ウイルス量が 400copy/ml 未満であった 6 症例は精液中ウイルス量も 400copy/ml 未満であった。CD4 値と精液中ウイルス量には明らかな関連は見られなかった。

精液中のウイルス量に比べて処理後のウイルス量は明らかに低下しており、3 つの精子の調製はいずれもウイルスの除去にも有効であると考えられた。Sil-Select にて処理した検体中、血中ウイルス量 38000copy/ml、精液中ウイルス量 2800copy/ml であった 1 検体が処理後も 1200copy/ml 残存していた以外、swim-up 法や Sperm-PrepII で処理した検体では 400copy/ml 未満であった。Sil-Select 単独にて処理した 13 検体中 7 検体 (53.8%) が定性で陽性、Sil-

Select + swim-up 併用では 9 検体中 4 検体 (44.4%) が陽性であった。2 法併用により陽性率は減るものの Sil-Select 単独法との間に有意差はなく、併用法を選択すべき理由はない可能性が示唆された。Semprini ら<sup>1)</sup> のグループは 2 法併用の処理後 400copy/ml 未満であれば人工授精を行い、結果として妻への感染はなかったと報告している。ほぼ同じ処理法を行っている Marina ら<sup>3)</sup> は 200copy/ml を指標として人工授精を行っており、やはり感染例はなかったと報告している。『どれぐらいのウイルス量であれば感染の危険性がないのか』というデータはなく、検出感度をどこに設定するのが良いかはわからないうが、臨床実施にあたってウイルスの残存が明らかな検体を人工授精に用いることはできない。精液中ウイルス量と処理後検体中のウイルス量とは関連がなかったことより、ウイルスは精漿に存在するだけでなく精子表面に付着あるいは精子内に侵入していることも考えられた。Baccetti ら<sup>4)</sup> は精子内にウイルス粒子が存在することを認めていることは、この結果と合致するものと考えられた。今後、ウイルスを持つ精子はどれぐらいの割合で存在するのか、また、この精子に受精能はあるのかという点は検討しなければならない。さらに、これらのウイルスに感染力があるのかという問題も検討すべきであろう。

もう一つの問題として原精液の検査所見が不良な症例が多いことである。今回検討した 18 症例中 9 例は WHO の男性不妊の基準 (精子濃度  $20 \times 10^6/ml$  かつ運動率 50% 以下) に該当した。臨床問題がでる可能性は精子濃度  $40 \times 10^6/ml$  かつ運動率 60% 以下と考えられているが、この基準では 14 例が該当した。これは不妊外来における男性不妊の率を大きく上回るものであった。今回の検討では精液中のウイルス量、血中ウイルス量、CD4 値、感染経路、治療法などとは明らかな関連はなかった。Marina ら<sup>3)</sup> は施行前に同様の精子処理を行い  $4 \times 10^6$  以上の精子が回収される症例にのみ人工授精を施行している。単独処理法ではよいが、併用法ではわずかに 1 検体のみが適応になるだけであった。剖検例で睾丸の基底膜の著明な肥厚と間質の線維化を伴った精子形成不全が認められたとの報告<sup>5)</sup> や、抗精子抗体の存在を認めた報告<sup>6)</sup> があり、処理法の検討とともに病態についての検討が

必要であると考えられた。精液所見が不良であった5例について血中抗精子不活化抗体を測定したが、いずれも陰性であった。人工授精に十分な精子数が得られない症例には、精子が少なくても可能な体外受精胚移植や顕微授精が必要になることも考えられた。通常、人工授精では処理後検体を0.5～1.0ml子宮腔に注入するが、体外受精胚移植の場合は卵の入ったdishに添加する処理後検体量は人工授精の約1/10である。受精確認後、卵(胚)の培養液交換を行うので添加液はさらに希釈される。胚移植により子宮腔内に注入される処理後検体量は人工授精の1/10<sup>10</sup>になると試算される。受精卵(胚)の洗浄を追加すれば更に希釈される。当然のことながら受精卵(胚)の中にある精子は1つなので、この点においても子宮腔内に注入されるウイルス量を減らせることは容易に推察される。実際に顕微授精により妊娠した報告<sup>7)</sup>がされている。しかし、体外受精胚移植は人工授精に比べ女性側に与える危険性は高く、費用もおよそ30～40倍かかる。妊娠率も胚移植あたり20%ほど<sup>8)</sup>と決して高いものではない。また、『どれぐらいのウイルス量であれば感染の危険性がないのか』が明らかでない現状では体外受精胚移植が人工授精に比べ絶対安全な方法とは言い切れず、逆に、人工授精でも十分安全なのかもしれない。

今回の検討において、定量法で陽性であったが定性法にて陰性になった検体があった。PCRによる定性法は5copy/tubeの結果を1mlに換算し100copy/mlとして検討しているため多少の誤差は致し方ないと思われる。Sil-Select+swim-up併用でSil-Select終了時には陰性であったが、swim-up終了時の検体で陽性となることはあり得ることと考えられる。高感度で、かつ、再現性のあるHIVウイルスの検出方法の確立が必要であると考えられた。

## 結 論

精液を処理することによりウイルス量は明らかに低下した。処理後検体のウイルス量が400copy/ml未満であればよいとすればどの処理法でも人工授精は可能である。しかし、100copy/ml未満とすると単独の処理法では回収精子数は十分である

が、約6割の検体が陽性となった。Sil-Select+swim-up併用法では約5割の検体が可能ではあるものの、回収される精子数が少なく人工授精により妊娠を成立させるには不十分なことが危惧された。高感度で、かつ、再現性のあるHIVウイルスの検出方法が確立されれば、対象となる患者は限定されるが、単独の処理法で回収精子数確保しウイルス陰性の検体を人工授精できると考える。しかし、今後、以下の課題は加えて検討する必要があると考える。

1. 精液中のウイルス量と処置後検体のウイルス量とは必ずしも一致しないのはなぜか。処理後検体に残存するウイルスはフリーのウイルスなのか、あるいは、精子に付着しているか精子内に侵入したのものなのか。
2. ウイルスがある精子はどれぐらいの割合いで含まれるのか、これらに受精能はあるのか。また、選別する方法はあるのか。
3. 乏精子症あるいは精子無力症の症例が多いが、その原因はなにか。
4. 併用法としてSil-Select+swim-up以外に人工授精に十分な健常精子数を得られる調製法はないか。単独法で行う場合Sil-Selectの濃度はこれでよいか。
5. 精液検査所見が悪く人工授精の適応から外さざるを得ない症例に対して体外受精胚移植(あるいは顕微授精)が必要か、さらに、これは安全なのか。
6. どれぐらいのウイルス量であれば子宮内に入っても感染の危険がないのか。

## 参考文献

- 1) Semprini, S. E., Levi-Setti, P., Bozzo, M., et al.: Insemination of HIV-negative women with processed semen of HIV-positive partners., *Lancet*.340:1317-1319, 1992
- 2) Gomibuchi, H., Matsui, M., Minoura, S., et al.: Semen preparation using the Sperm-PrepII., *J. Fertil. Implant.*14:181-184, 1997
- 3) Marina, S., Marina, F., Alcolea, R. et al.: Human immunodeficiency virus type 1- serodiscordant couples can bear healthy children after undergoing intrauterine insemination., *Fertil Steril.* 70:35-39, 1998



- 4) Baccetti, B., Benedetto, A., Burrini, A. G., et al.: HIV-particle in spermatozoa of patients with AIDS and their transfer into the oocyte., *J. Cell Biol.* 127: 903- 914, 1994
- 5) DePaepe, M. and Waxman, M.: Testicular Atrophy in AIDS: A Study of 57 Autopsy Cases., *Human Pathology.* 20:210-214, 1989
- 6) Naz, R., Ellaurie, M., Phillips, T., et al.: Antisperm antibody in human immunology virus infection: Effects on fertilization and embryonic development., *Biol Reprod.* 42:859-868, 1990
- 7) Marina, S., Marina, F., Alcolea, R. et al.: Pregnancy following intracytoplasmic sperm injection from an HIV-1-seropositive man, *Hum. Reprod.* 13:3247-3249, 1998
- 8) 青野敏博：平成9年度 診療・研究に関する倫理委員会報告(平成8年分の体外受精・胚移植等の臨床実施成績および平成10年3月における登録施設名)、*日産婦誌*50:267-277, 1998



## HIV感染患者における冠動脈バイパス手術の一例：周術期における高度抗レトロウイルス療法の役割

Kazuhiro Imanaka, MD<sup>1)</sup>, Shinichi Takamoto, MD<sup>1)</sup>, Satoshi Kimura, MD<sup>2)</sup>, Yuuji Morisawa, MD<sup>2)</sup>, Toshiya Ohtsuka, MD<sup>1)</sup>, Yoshihiro Suematsu, MD<sup>1)</sup>, Tetsuro Shirai, MD<sup>3)</sup>, Kiyoshi Inoue, MD<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Cardiothoracic Surgery, University of Tokyo Hospital

<sup>2)</sup>Department of Infectious Diseases, University of Tokyo Hospital

<sup>3)</sup>Department of Cardiology, Tokyo Metropolitan Police Hospital,

### 研究要旨

In a patient with severe ischemic heart disease and advanced human immunodeficiency virus (HIV) infection, strenuous perioperative treatment with anti-retroviral agents and coronary artery bypass surgery using cardiopulmonary bypass was successfully performed. This strategy could become the standard for patients with cardiovascular disease and advanced HIV infection. Following aspects that were observed in this case require further investigation; (1) lack of reactive increase in the neutrophil count (2) transient extreme reduction of lymphocytes and (3) relative decrease of CD8+ cell ratio.

分担研究者：木村 哲

研究協力者：Kazuhiro Imanaka, MD, Shinichi Takamoto, MD, Yuuji Morisawa, MD, Toshiya Ohtsuka, MD, Yoshihiro Suematsu, MD, Tetsuro Shirai, MD, Kiyoshi Inoue, MD

### Coronary artery bypass grafting in a patient with human immunodeficiency virus infection - roles of perioperative active anti-retroviral therapy

Kazuhiro Imanaka<sup>1)</sup>, Shinichi Takamoto<sup>1)</sup>, Satoshi Kimura<sup>2)</sup>, Yuuji Morisawa<sup>2)</sup>, Toshiya Ohtsuka<sup>1)</sup>, Yoshihiro Suematsu<sup>1)</sup>, Tetsuro Shirai<sup>3)</sup>, Kiyoshi Inoue<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Cardiothoracic Surgery, University of Tokyo, <sup>2)</sup>Department of Infectious Diseases, University of Tokyo Hospital, Tokyo, Japan, <sup>3)</sup>Department of Cardiology, Tokyo Metropolitan Police Hospital, Tokyo, Japan

## 目的、方法および結果

Coronary angiography in a 61-year-old male who had episodes of effort angina revealed multiple significant stenoses in the coronary system, including 90 % stenosis in the left main trunk. He was therefore admitted to our hospital for coronary artery bypass surgery. A preoperative blood test revealed that he was human immunodeficiency virus (HIV) positive. The HIV-RNA copy was 240000 particles per milliliter and the CD4+ cell count was 213 per microliter ( $\mu$  l). Highly active anti-retroviral therapy (HAART) [1], with a combination of zidovudine (400 mg, daily), lamivudine (300 mg, daily) and zalcitabine (600mg, daily) was started. This treatment was effective. Twelve weeks later, the HIV-RNA copy became undetectable and the CD4+ cell count was increased to 349 / $\mu$  l. He underwent placement of 3 coronary artery bypass grafts including an internal mammary arterial graft under standard cardiopulmonary bypass (CPB) and cardiac arrest. We strictly abided by standard precautions. Everyone wore impermeable gowns, thick gloves and special surgical masks. Surgical instruments were not handed directly from person to person, but were put in a tray and were taken up from there. All needles were cast off into a special box immediately after use. The arterial cannula was placed onto the femoral artery to avoid blood splashes. The operation was carried out steadily. The early postoperative course was satisfactory. HAART was resumed 2 days later. Serial blood tests [Table.1] showed that total lymphocytes and CD4+ cells were severely decreased right after the operation, increased gradually and returned to around the preoperative values 1 week later. The reduction in CD8+ cells was more marked than in CD4+ cells. HIV-RNA copy remained undetectable. Although C-reactive protein increased normally, the white blood cell count did not increase, maybe due to the use of anti-retroviral drugs. Therefore, sufficient antibiotics were administered for a week for prophylaxis. He convalesced uneventfully and is doing well thereafter.

## 考 察

HIV infection is one of the most serious problems in the world today [2]. Patients used to die of HIV sooner or later, but the introduction of HAART has effectively reduced the incidence of acquired immunodeficiency syndrome and death due to HIV infection [3]. As HIV infection becomes more common and does not mean the patient's rapid death, radical therapy may be indicated more often for HIV-positive patients. We should be ready for more cases like this one.

HIV impairs cell-mediated immunity. T-lymphocytes, especially CD4+ cells, decrease in number. Because use of CPB markedly reduces total lymphocytes and CD4+ cells [4,5], cardiovascular surgery for HIV-positive patients would seem to carry a higher risk than usual. Concerns have been expressed about CPB in patients with advanced HIV infection [6]. However, the successful control of HIV infection by HAART and the restoration of lymphocyte and CD4+ cell count within 1-2 weeks in this case are encouraging. HAART seems to reduce the risk of operation using CPB in HIV positive patients. Therefore, the state of HIV infection should be evaluated by HIV-RNA copy and CD4+ cell count. Preoperative treatment for strongly active HIV infection or obvious immune impairment is desirable especially in cases that need CPB. As CPB does not seem to affect the state of HIV infection [7,8], we believe that the combination of cardiovascular operation and perioperative HAART will become a standard strategy for patients with advanced HIV infection. Of course, catheter intervention or off-pump procedures can be good alternatives when indicated.

White blood cell counts did not increase reactively in this case, which could be a side-effect of the anti-retroviral drugs. Antibiotics had better be administered sufficiently in those who have been treated by HAART, although humoral immunity and neutrophil function are usually preserved in HIV-positive patients. All lymphocyte subsets were reduced much more severely than usual right after the operation. And the relative decrease of CD8+ cell ratio differs from previous reports [4,5]. These aspects need to be investigated further.

The major concern for medical staff is contact with the patient's blood. Any methods that contribute to the safety and steadiness of operation should be adopted, although the infectious potential of HIV is not strong. Needle-prick-injury has a risk of transmission of around 0.3 % [9], and risks of other kinds of contact are very low. When a puncture occurs, prompt commencement of HAART can reduce the risk to 0.06 % [9].

## 結 論

Therefore, surgeons do not have to be too afraid. We should simply exercise caution and do our best for HIV positive patients.

## 参考文献

- 1) Centers for disease control and prevention. Report of the NIH Panel to define principles of therapy of HIV infection and guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-infected adults and adolescents. MMWR Mort Morb Wkly Rep 1998; 47(RR-5): 1-82
- 2) Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS), World Health Organization (WHO). Report on the global HIV/AIDS epidemic. June 1998, 1998, pp 1-75
- 3) Centers for disease control and prevention. HIV/AIDS Surveillance report 1997; 9(2): 1-43
- 4) Ide H, Kakiuchi T, Furuta N, Matsumoto H, Sudo K, Furuse A, Asano K. The effect of cardiopulmonary bypass on T cells and their subpopulations. Ann Thorac Surg 1987; 44: 277-82
- 5) DePalma L, Yu M, McIntosh CL, Swain JA, Davey RJ. Changes in lymphocyte subpopulations as a result of cardiopulmonary bypass. J Thorac Cardiovasc Surg 1991; 101: 240-4
- 6) Egan TM, Maitland A, Sinave C, Pollick C, David TE. Myocardial abscess in a patient with AIDS-related complex: pericardial patch repair. Ann Thorac Surg 1990; 49: 481-2
- 7) Lemma M, Vanelli P, Beretta L, Botta M, Antinori A, Santoli C. Cardiac surgery in HIV-positive intravenous drug addicts: Influence of cardiopulmonary bypass on the progression to AIDS. Thorac Cardiovasc Surgeon 1992; 40: 279-82
- 8) Aris A, Pomar JL, Saura E. Cardiopulmonary bypass in HIV-positive patients. Ann Thorac Surg 1993; 55: 1104-8
- 9) Centers for disease control and prevention. Public health service guidelines for the management of health-care worker exposures to HIV and recommendations for postexposure prophylaxis. MMWR Mort Morb Wkly Rep 1998; 47(RR-7): 1-33

なお、本論文はJpn Circulation Researchにin pressである。