

目 的

本研究の目的は、単球・顆粒球吸着療法 (Monocyte-granulocytapheresis: M-GCAP)、1種の体外循環治療法^{1,2)}が、HAART治療に十分反応しない HIV 感染患者の HIV ウイルス量を下げ、CD4陽性T細胞数を上昇させる治療効果を持っているかを探ることである。

方 法

1. 対象患者

- 1) 18歳以上のHIV感染患者(ただし、女性の場合は妊娠・授乳をしていないこと)。
- 2) 4ヶ月以上のHAART治療に奏効しなかった(免疫学的かつウイルス学的に改善のない患者)か、部分的にしか奏効しなかった(免疫学的、ウイルス学的どちらか一方に改善の認めない) HIV 感染患者。
- 3) ヘルシンキ宣言に従った新GCPガイドラインに沿って試験内容の説明を受け、試験の参加の同意が得られた患者を対象患者とした。

2. 単球・顆粒球吸着療法(M-GCAP)の治療方法

特殊加工した直径約2mmの酢酸セルロースビーズ220gを充填したアダカラム(直径6cm×長さ20cm)を用い、そのカラムの中をヘパリンで抗凝固化したHIV感染患者の静脈血を流速30ml/分のスピードで1時間体外循環させる。その間にHIV感染患者の白血球、特にHIV感染単球と感染CD4陽性T細胞を含めた白血球を体外に選択的に除去する。本治療を、HIV感染患者に対して施行した。

結 果

本年度の研究結果は、平成12年2月5日の「HIV感染症に関する臨床研究」班、平成11年度班会議において、現在までのアダカラム基礎・臨床研究(他疾患治療)で明らかにされていることと、共同研究を行っているイタリア、ミラノ、サンラファエロ病院のアドリアーノ ラザリン先生(臨床)とマリオ クラリッチ先生(免疫)のプレリミナリーな

HIV臨床試験の結果をまだ治療研究途中ではあるが中間報告した。

- 1) 基礎的研究で、アダカラムとシリコンコートしたガラスビーズとの間で血漿蛋白の吸着率の違いについて検討した。アダカラムは、シリコンコートしたガラスビーズに比べて、C3b、免疫グロブリンの吸着が有意に多く、フィブロネクチン、フィブリノーゲン、ビトロネクチンの吸着は有意に少なかった。
- 2) 慢性関節リウマチ患者に対する同カラムでの治療時のデータ³⁾より、本治療の白血球吸着率は、顆粒球が約45±1%、単球が約32±1.5%、そしてリンパ球が約6±1%であった。
- 3) 慢性関節リウマチ患者に対する同カラムでの治療時のデータ⁴⁾より、アダカラム使用 M-GCAP 治療前、3回後、そして治療終了2週間後に、慢性関節リウマチ患者の末梢血単核球を5mg/mlのLPS刺激下で37℃18時間培養し、その培養上清中のTNF α とIL1- β の濃度を測定した。両サイトカイン産生ともM-GCAP3回治療後に有意に低下し、それらTh1系サイトカイン産生抑制効果は、治療終了2週間後も継続していることが判った。
- 4) HAART治療にアダカラムを用いたM-GCAP治療を併用した群(M-GCAP治療併用群)に重篤な有害事象は認められなかった。
- 5) M-GCAP治療併用群とコントロールとしてHAART単独治療群に分け、HIV陽性患者より得た末梢血単核球を5mg/mlのLPS刺激下で37℃18時間培養し、その培養上清中TNF α の濃度を測定した。M-GCAP治療併用群では、TNF α の産生が有意に低下したが、HAART単独治療群では、TNF α 産生の低下は見られなかった。
- 6) HIV感染患者末梢血単核球中のHIV-DNA量が、M-GCAP治療併用群では5例中4例に低下し、低下した4例中3例は統計的に有意であった。しかし、アダカラムを併用しなかったHAART単独治療群4例では、2例に上昇を認めたものの1例の低下もなかった。
- 7) 治療経過に伴うHIV感染患者の末梢血中CD4⁺Tリンパ球数の変化を見たところ、M-GCAP併用群では治療経過(治療前n=14、8回の治療終了時n=14、治療終了後8週間n=10)に

に伴い、CD4⁺Tリンパ球数が明らかに上昇し、M-GCAPが終了した後約8週間後においてもその傾向は持続していた。しかし、HAART単独治療群(治療前n=11、7週間目n=9)ではこのような変化はなかった。

- 8) 治療に伴う末梢血CD45RA⁺CD4⁺ (Naive) T cells の変化を観察したところ、M-GCAP 治療併用群では、治療を重ねるに連れ(治療前、治療4回前、治療8回前を比較)、観察できた4例全例にCD45RA⁺CD4⁺ T cellsの割合が増えた。この変化はHAART 単独治療群では見られなかった。

考 察

M-GCAP治療併用群でHIV感染患者末梢血単核球中のHIV-DNA量が低下し、かつTNF α 産生が有意に低下したことは、HIVの持続感染で活性化されていたTh1系免疫反応が、HIVそのものの減少で抗原提示が少なり活性が正常化したものと考えられた。また、M-GCAP治療併用群でCD4⁺Tリンパ球数が治療後明らかに上昇し、その効果はM-GCAP8回終了後も比較的長期(約8週)間持続した。このような効果は今までの治療にはないものであり、効率良くHIV感染細胞が体外除去されていることが推測された。

CD4⁺Tリンパ球のなかのCD45RA⁺CD4⁺ T cells%の上昇は、通常HAART治療約1年以上しないと見られない変化であり、M-GCAP治療併用群で治療開始後約1~2ヶ月ですで見られることより、HAART治療にM-GCAPを併用することで、HIV患者の免疫系を再構築させる可能性が示唆された。

結 論

HAART治療にアダカラムを用いたM-GCAPを併用することにより、治療後HIV-DNA量、TNF α 産生が減少し、かつCD4⁺Tリンパ球数の上昇、得にCD45RA⁺CD4⁺ (Naive) T cellsの上昇が見られた。

重篤な有害事象もなくHIV感染患者の治療として有望であると考えられるが、共同研究を行っているイタリアのプレリミナリーHIV臨床試験の最

終結果が今後注目される。また、日本で開発されたアダカラムを用いたM-GCAPのHIV感染患者に対する治療効果の検討は、本国日本でも早急に検討する必要がある。

参考文献

- 1) Sawada K, Malchesky PS, Nosé Y: Available removal system: State of the art. "Therapeutic Hemapheresis in the 1990s." Nydegger UE, ed. Curr Stud Hematol Blood Transfus, Karger, Basel, 1990, 51 - 113
- 2) 澤田康史、大西国夫、江頭明盛、下山 孝：炎症性腸疾患 アフェレシスマニュアル(秀潤社)クリニカルエンジニアリング別冊1999, III-13-T 274-281
- 3) 粕川禮司：顆粒球除去器の慢性関節リウマチに対する臨床的検討「炎症」1997, 17(1): 57-80
- 4) 中村 洋：顆粒球体外吸着法による炎症細胞の制御「炎症」1996, 16(6): 403-411



非核酸系逆転写酵素阻害剤ネビラピンの 治療成績

安岡 彰、立川 夏夫、菊池 嘉、平林 義弘、岡 慎一

国立国際医療センター エイズ治療・研究開発センター

研究要旨

この数年HIVに対する抗ウイルス療法が様変わりし、強力な抗ウイルス療法 (HAART)により日和見感染症の発症率は半減 (96年1.01/年→97年0.51/年)したが、この治療の主力であるプロテアーゼ阻害剤には高頻度 (投与例の79.5%)に副作用が認められることを本研究班で報告してきた。このため最近では幅広い治療選択が考えられるようになってきている。本年度は本邦で最初に導入された非核酸系逆転写酵素阻害剤の有効性を検討した。

対象症例は43症例で治療開始時のCD4は237.9/ μ L、HIV-RNAは 1.17×10^4 /mLであった。治療継続例でのCD4数は16週で+130/ μ L、HIV-RNAは-1.7 logと良好であり、特に治療開始後4週間までの速やかなウイルス減少が特徴的であった。副作用/検査値異常は32例 (72.1%)に認められ、発疹・発熱 (15例)、肝障害 (10例)、白血球減少 (2例)が主なもので、そのほかは軽微な副作用であった。中止は12例 (27.9%)にみられ、上記の3つのいずれかが中止の原因となっており、投与開始後8週間以内に中止となる例がほとんどであった。

ネビラピンは治療開始初期に副作用によって中止となる例が多くみられるが、この時期を越えて服用できた例ではごく軽微な問題しかなく、長期にわたってコンプライアンスよく服用できる薬剤と考えられた。

分担研究者: 安岡 彰、岡 慎一

研究協力者: 立川夏夫、菊池 嘉、平林義弘

Clinical efficacy of nevirapine, the first non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor in JAPAN

Akira Yasuoka, Natsuo Tachikawa, Yoshimi Kikuchi, Yoshihiro Hirabayashi and Shinichi Oka

AIDS Clinical Center, International Medical Center of Japan

目的

HIV感染症の臨床像と予後は本研究班の発足前後で大きく様変わりした。従来HIV感染症は根本的な治療法がなく、次々と生じてくる日和見感染症に対して治療を行い、1日でも予後を改善させるというのが一般的な姿であった。ところが本邦でも1996年から使用可能となったプロテアーゼ阻害剤とそれを含む多剤併用療法 (Highly Active Anti-Retroviral Therapy; HAART)は、ウイルスの強力な増殖抑制と、それに引き続く免疫不全の改善をもたらした。平成9年度(1997年度)の報告では、我々は96年と97年を比較し、HAART導入前後で明らかに日和見感染症の発症率と死亡率が低下していることを報告したり。

しかし、HIV医療にとって革新的であったプロテアーゼ阻害剤も、平成10年度(1998年度)で報告したように高頻度に様々な副作用が見られることが明らかとなり²⁾、さらに長期使用に伴うlipodystrophyや耐糖能異常など重篤な問題点も指摘されるようになってきた。この間に抗HIV療法は非核酸系逆転写酵素阻害剤が登場し、これを用いた併用療法もプロテアーゼ阻害剤に劣らない効果を示すことが知られるようになってきた。本邦でも1998年12月にnevirapineが臨床使用可能となり用いられるようになった。当センターでも本剤を積極的に導入し、その成績についてまとめたので報告する。

方法

1999年10月までに当センターでnevirapineを含む抗HIV療法を開発された患者全例を解析対象とした。方法は臨床病歴記録を用いてretrospectiveに解析し、投与前後での末梢血CD4リンパ球数、HIV-RNA量の変化、服薬中止/継続の状態と時期、経過中にみられた副作用や臨床検査値異常(有害事象)を検討した。有害事象については明らかにnevirapine以外の薬剤が原因と特定されたものを除き、併用療法によって発生したものは本剤との関連があると見なして集計した。

投与を開始されたのは41症例で、うち2床例は3ヶ月以上の中断期間を挟んで2度の投与を開始さ

れていたため、43エピソードととして解析した。臨床効果については投与開始から16週以上を経過していた34例を解析対象とし、副作用/臨床検査値異常は全例を対象とした。

結果

対象患者は20歳から66歳(平均35.4歳)で男性39例、女性2例であった。患者の感染ルートでは凝固因子製剤7例(17.1%)、同性間性交渉27例(65.9%)、異性間性交渉6例(14.6%)、不明1例(2.4%)であった。

治療開始時のCD4細胞数は1~734/μL(平均237.9/μL)であり、HIV-RNAは検出限界以下(<400/mL;統計処理では100として計算)から 7.5×10^5 /mL(平均 $4.06 \log = 1.17 \times 10^4$ /mL)であった。

nevirapineの使用理由では新規導入が27例(65.9%)、前治療無効による変更が6例(14.6%)、前薬の副作用による単独変更5例(12.2%)などであった。併用薬は核酸系逆転写酵素阻害剤2剤が36例(87.8%)であり、プロテアーゼ阻害剤と併用されたのが5例(12.2%)であった。

本剤の治療成績をFig. 1に示した。CD4リンパ球数は投与開始後16週で+130 cells/μLとなり、この後も増加傾向を示した。ウイルス量は投与開始後8週で-1.78 logとなり、その後も-1.7 log前後を推移していた。Fig. 2に全43エピソードでの、治療開始後4週までのHIV-RNA量の変化を示した。ほとんどの症例でこの期間、特に最初の2週間で-1 log以上の急速なウイルスの減少が観察されていた。

本剤を投与された患者のうち、初期の副作用中止がなく、治療開始から52週以上が経過した6症例の末梢血中HIV-RNA量の変化をFig. 3に示した。前治療があった2例では初期のウイルス抑制がみられたものの8~10週でウイルス量は元のレベル近くまで増加してしまい、新たな治療薬組合せへ変更となった。1例は服薬が不規則となった後、来院しなくなり、ドロップアウトした。それ以外の初回治療例3例は86週以上にわたって良好なウイルス抑制が持続していた。これらの症例では薬剤服用に伴う有害事象はほとんどなく、プロテアーゼ阻害剤に見られるようなlipodystrophyな

どの所見も認められなかった。

本剤を含む治療薬投与によって出現した有害事象をFig. 4に示した。全体での何らかの副作用/臨床検査値異常の発現は32例(72.1%)に見られていた。発疹15例(34.9%)及びこれに付随する発熱がもっとも高頻度に認めており、うち10例がこのために治療を中止していた。これ以外の副作用はおおむね軽度であり、中止の原因となったものはな

かった。臨床検査値異常では肝機能障害が10例(24.4%)で認められ、うち4例(重複あり)では中止を余儀なくされていた。また白血球減少が2例で認められており、1例で投薬を中止していた。これらの中止を要する有害事象の発生は投与開始後8週以内に集中しており、副作用による中止率は12例(27.9%)に達していた。

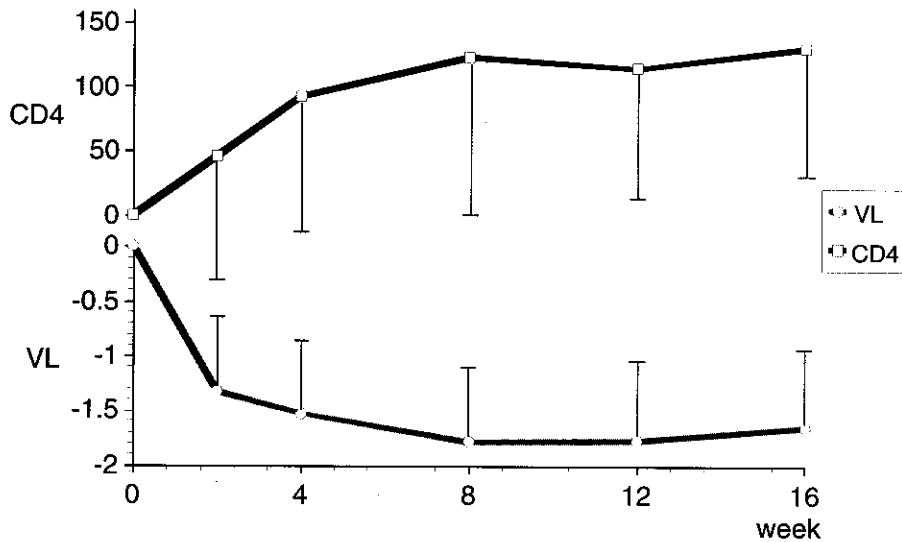


Fig.1 Response of CD4 and HIV-RNA with nevirapine-containing therapy

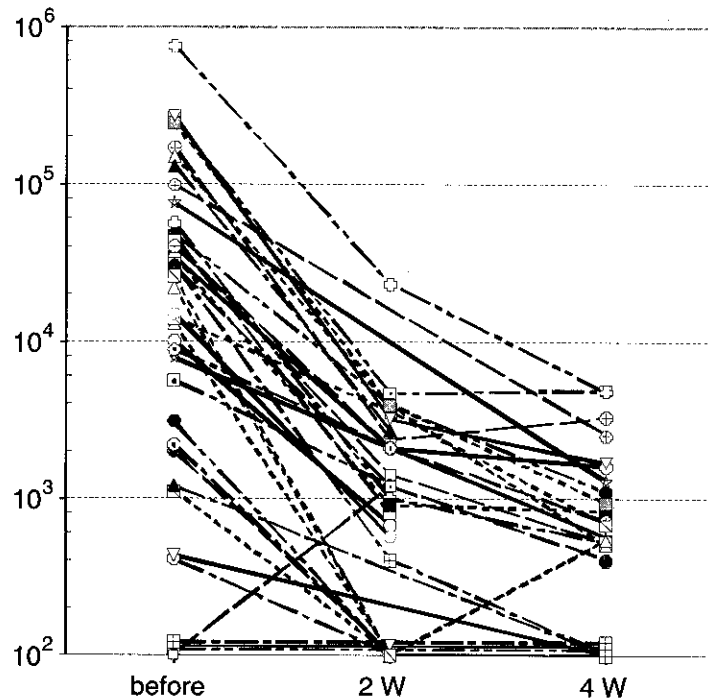


Fig. 2 HIV-RNA change with nevirapine-containing therapy in the first 4 weeks

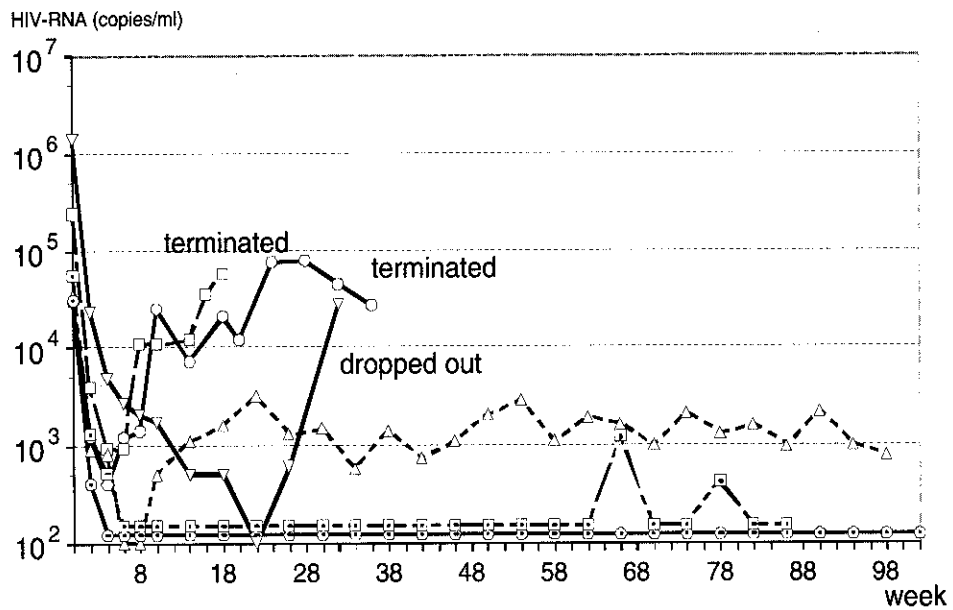


Fig. 3 Long-term efficacy of nevirapine in 6 patients who started the therapy 54 weeks ago or before

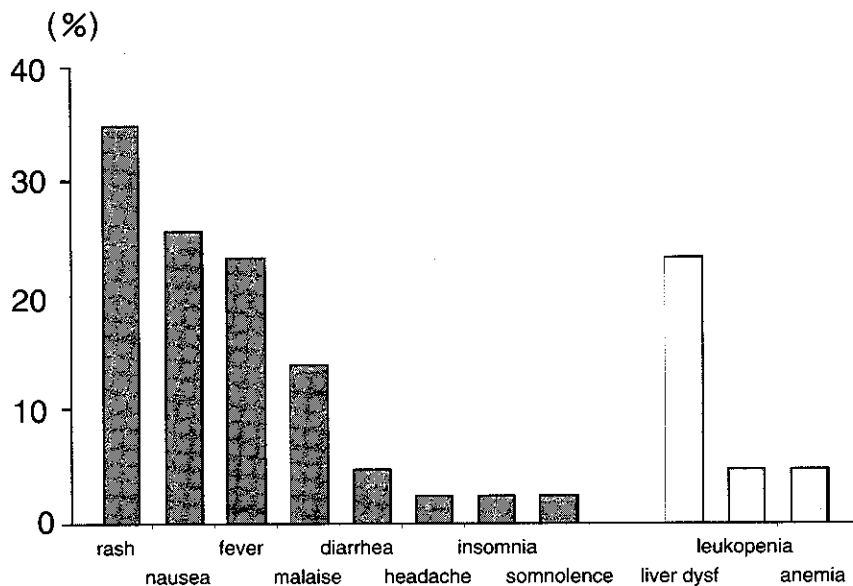


Fig. 4 Adverse events with nevirapine therapy in 43 cases

考 察

HIV 感染症の治療は HAART 導入により、従来の日和見感染症治療を主体としたものから抗ウイルス療法をどう行っていくかに変わりつつある。1997年度報告に示したように、日和見合併疾患は HAART 導入前の 1996 年では 1 人あたりの発症率が 1.01 回であったのに対し、98 年には 0.51 回と半減し、死亡率も減少がみられている。特にサイ

トメガロウイルス感染症 (減少率 84.2%) や播種性非定型抗酸菌症 (減少率 84.8%) のような、高度の免疫不全に伴って発症していた疾患ほど大きな減少が認められている。これに伴って HIV 感染者が入院した場合の死亡率も半減し、この傾向は 98 年にも継続してみられていた (data not shown)。しかし HAART 治療の中心であるプロテアーゼ阻害剤は、その剤型や錠数の多さ、複雑な服用方法とともに、高頻度に見られる副作用が問題となってきた

た。98年報告に示したようにプロテアーゼ阻害剤投与例の79.5%の患者は何らかの副作用を訴えていた²⁾。副作用による中止率は全体で15.7%で、もっとも頻度が高いindinavir (IDV)では21.6%に達していた。また、継続できている症例も、止痢剤を常用しなければならない下痢 (nelfinavir)、繰り返す尿路結石 (IDV)などの特徴的な副作用や、慢性的な嘔気や不快感が続くなど、服用による日常生活の障害は決して無視できるものではないのが現状である。さらにプロテアーゼ阻害剤投与が長期になるにつれて、lipodystrophy や高脂血症、耐糖能異常などの問題点も明らかにされてきた。HIVの治療にはウイルスの抑制が重要であることは論を待たないが、長期予後が期待されるようになってきた今日、体型の変化や心血管系に長期的に有害となるような変化は今後問題となる可能性が大である。

これに対して近年、非核酸系逆転写酵素阻害剤が注目されるようになってきた。日本で使用可能なものは97年12月に発売となったnevirapineと99年10月に発売となったefavirenzである。これらの薬剤は投薬時間の自由さや服薬錠数の少なさなどプロテアーゼ阻害剤にない利点を持っている。

今回の我々の nevirapine の検討は主に初回治療例で、開始時のCD4数が平均237.9 μL 、HIV-RNAが平均 1.17×10^4 /mL と、比較的免疫不全が進行していない症例を対象としているが、CD4数の増加は16週で+130 μL と良好であり、これは当センターにおけるプロテアーゼ阻害剤投与患者のCD4数上昇と比べても、同等かそれ以上であった³⁾。またウイルス量の減少も-1.7 logであり、開始時のウイルス量を考慮すると多くが検出限界またはそれに近いレベルまで低下したことを意味し、十分な効果を示していた。一方副作用/臨床検査値異常は72.1%に見られており、主たるものは発疹・発熱といったアレルギー様症状と肝障害であった。この2大有害事象は投与開始後8週以内に起こり、主な中止理由となっており中止率は27.9%と高値であった。このほかの有害事象はおおむね軽く、初期の中止を免れた症例では長期にわたり安定して服薬が可能で、抗ウイルス効果も持続していることが観察された。

これらの結果から、nevirapine は使用可能かどうかは非常にはっきりした薬剤であるといえる。すなわち投与開始後8週以内にアレルギー様症状や肝障害が出現した場合は速やかに他剤に変更が必要であるが、出現しなかった場合には長期にわたって服用しやすい薬剤であるということができる。本剤の投与開始に当たってはこれらの点を十分説明し、投与初期には慎重な観察が必要であるが、長期の安定した服用、プロテアーゼ阻害剤に見られる副作用を考慮した場合、初回治療では十分に考慮に値する治療選択と考えられる。今後本剤の長期成績と副作用の出現、初期の有害事象発現に対する対策、より免疫不全が強い患者に対する効果についても今後検討する必要があると考えられた。

結 論

nevirapine を43エピソード投与し、治療継続が可能であった症例では16週でのCD4数が+130 μL 、HIV-RNAが-1.7 logの低下を示した。発疹・発熱と肝障害により27.9%で中止となっていた。治療継続例では良好なウイルス抑制が続いていた。nevirapineは初回治療薬として十分考慮しうる薬剤と考えられた。

参考文献

- 1) 安岡 彰、立川夏夫、菊池 嘉ほか：HIVに合併する日和見感染症の動向—HAART導入による影響—HIV感染症に関する臨床研究 平成9年度報告書 p50-53.
- 2) 安岡 彰、立川夏夫、菊池 嘉ほか：プロテアーゼ阻害剤を含む抗HIV療法施工中にみられた副作用 HIV感染症に関する臨床研究 平成10年度報告書 p165-169.
- 3) 相澤佐織、岡 慎一：プロテアーゼ阻害剤開始後の耐性検査の有用性 HIV感染症に関する臨床研究 平成10年度報告書 p160-164.



日本におけるHAARTの治療成績— 全国拠点病院でのレトロスペクティブスタディ

木村 哲^{1,2)}、岡 慎一²⁾

¹⁾ 東京大学大学院医学系研究科 感染制御学、感染症内科

²⁾ 国立国際医療センター エイズ治療・研究開発センター

研究要旨

全国のエイズ拠点病院の協力を得、初めて3剤による強力な抗レトロウイルス療法 (highly active antiretroviral therapy, HAART) を行った症例につき、HAART 開始前後の CD4 陽性リンパ球数、血漿中 HIV-RNA 量などに関し、大規模な調査を行った。全国 363 拠点病院に依頼し、123 病院より 822 例の報告例があり、この内、573 例につき解析が可能であった。最も治療成績が良かったのは前治療がなく初めから3剤のHAARTで治療を開始した群 (A群、296例) で、2年後で CD4 陽性リンパ球数は 200 個/μL 増加、HIV-RNA 量は -2 log まで低下していた。使用歴のない3剤でHAARTを開始しているが他剤での治療歴のある群 (B群、55例) では、CD4 陽性リンパ球数の上昇がゆるやかであり、HIV-RNA は -1.5 log までの低下であった。一方、1剤もしくは2剤による前治療に新たに2剤を加えて3剤のHAARTにした群 (C群、86例) は A 群、B 群より劣り、CD4 陽性リンパ球数の増加は 150 個/μL どまりで、HIV-RNA 量は一旦 -1.2 log まで低下したが、その後 -1 log に戻っていた。また、A 群で3剤の組み合わせ方法による比較も行った。比較できるほどの症例数が得られたのは AZT+3TC+Ind (103例)、AZT+3TC+Nelf (60例)、d4T+3TC+Ind (12例)、d4T+3TC+Nelf (56例) の4群であった。この中で AZT+3TC+Ind と AZT+3TC+Nelf が約2年間にわたり、同程度に有効であった。d4T+3TC+Ind は HIV-RNA 量の抑制作用が前2者より強かったが、1年以上の長期成績はまだ得られていない。d4T+3TC+Nelf では 6 ~ 12 カ月目で効果が減弱する傾向が見られた。

分担研究者：木村 哲、岡 慎一

研究協力者：全国拠点病院担当医

Clinical Outcome of HAART in Japan – A Retrospective Study in AIDS-referral Hospitals

Satoshi Kimura^{1,2)} and Shinichi Oka²⁾

¹⁾ Department of Infection Control and Prevention, Department of Infectious Diseases Graduate School of Medicine, University of Tokyo, ²⁾ AIDS Clinical Center, International Medical Center of Japan

目的

強力な抗レトロウイルス療法 (highly active antiretroviral therapy, HAART) の普及により、HIV 感染症患者の予後が改善してきた。しかし、核酸系逆転写酵素阻害薬が6剤、非核酸系逆転写酵素阻害薬が2剤、HIV プロテアーゼ阻害薬が5剤使用可能な現在、多数考えられる3剤の組み合わせの中で、臨床的にどの組み合わせが最適であるかを比較した試験がない為、どのような治療をすべきかに関して医療現場での戸惑いは大きい。そこで本研究ではレトロスペクティブではあるが、全国のエイズ拠点病院の担当医に依頼し、現在 HAART を行っている患者につき、初めて HAART を開始した時点の前治療と HAART の組み合わせ、HAART 開始前後の CD4 陽性リンパ球数と血漿中 HIV-RNA 量の推移を調査し、至適治療法を見出すことを試みた。

方法

調査時点では非核酸系逆転写酵素阻害薬を使用している症例は少なかったが、核酸系逆転写酵素阻害薬2剤に HIV プロテアーゼ阻害薬もしくは非核酸系逆転写酵素阻害薬を組み合わせ3剤以上併用したものを HAART と定義した。全国の363のエイズ拠点病院に調査票を送り、現在 HAART を行っている患者につき、初めて HAART を開始し

た時の HAART 前の治療歴、HAART の内容 (組み合わせ)、HAART 前と HAART 開始後現在までの CD4 陽性リンパ球数および血漿中 HIV-RNA 量の推移を調査した。2回目、3回目のサルベージ的 HAART では前治療が余りにも多彩であり条件を揃えることが困難であると思われたので、今回は最初の HAART を対象として解析した。HAART 前に全く抗レトロウイルス薬を投与されることがなく、3剤による HAART が初めての治療となる患者群を A 群、それまで1剤または2剤で治療されていたが、新規の3剤による HAART を開始した群を B 群、それまで使っていた1剤 (場合によっては2剤) に新規の2剤を追加して3剤 (場合によっては4剤) の HAART に移行した群を C 群とした。血漿中 HIV-RNA 量において400コピー/mL未滿に低下したものについては中間の200コピー/mLと仮定して計算した。

結果

1. 回答率および解析可能症例数

363病院中123病院より回答があり、回答率は34%であった。回答率は余り高くはなかったが、エイズ拠点病院の約3分の1が HIV 診療の経験が無いことを考え合わせると、実際に HIV 診療を行っている施設の半数以上が回答しているものと推定される。

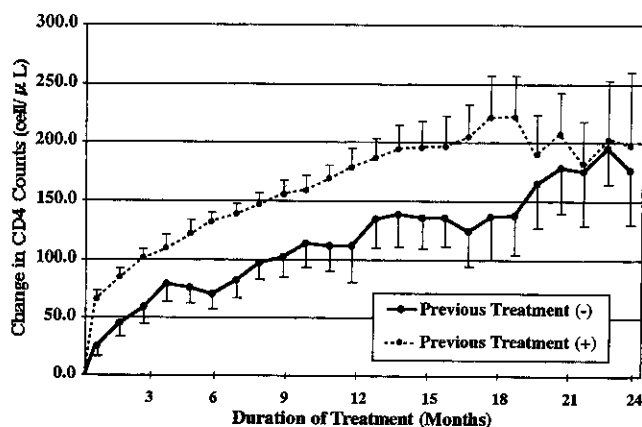


図1 A群、B群における HAART 開始後の CD4 陽性リンパ球数の推移
previous treatment (-); A群、previous treatment (+); B群
成績は mean \pm SEM で表示した。

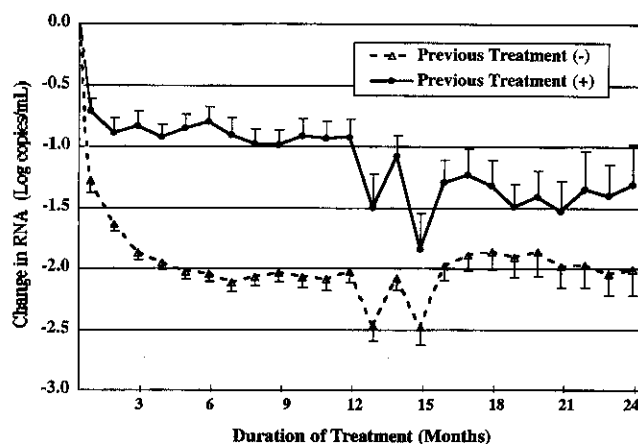


図2 A群、B群における HAART 開始後の血漿中 HIV-RNA 量の推移
previous treatment (-); A群、previous treatment (+); B群
成績は mean \pm SEM で表示した。

この調査では、現在 HAART を実施している症例を対象とし、822 例が報告された。報告された症例の内、249 例は HAART 開始直前の CD4 陽性リンパ球数と HIV-RNA 量の記載がなく、治療効果が判定できないなどの理由により除外され、評価可能対象例は 573 例であった。

2. 初回治療が HAART であった群 (A 群) の治療成績

以前に抗レトロウイルス療法を受けたことがなく、初めから HAART で治療を開始した群 (A 群) は 573 例中 296 例 (52%) であった。この群の治療成績が最も良く、図 1 に示すように CD4 陽性リンパ球数は 1 カ月後には 65.5 個/μL 上昇し、その後も順調に上昇を続け、15 カ月以後は基礎値より 200 個/μL 高い値を維持した。HIV-RNA 量においても図 2 に示すように HAART 開始後順調に低下し、6 カ月以後は -2 log の値を維持した。症例数は表 1 に示したが 12 カ月後で 102 例、24 ヶ月後で 14・15 例と、まだ長期治療例は少ないが、2 年間は効果が維持すると思われる結果であった。

3. 前治療歴はあるが新たに 3 剤で HAART を行った群 (B 群) の治療成績

この群は HAART 開始前に先行治療が行われていた群で、先行治療では使われていなかった 3 剤で HAART を開始したものである。B 群では 55 例が解析可能であった。先行治療の大部分は核酸逆転写酵素阻害薬 1 剤による治療であった。3 剤による HAART が開始された時点で A 群と同じであるが、

既に治療歴がある点が A 群と異なる。

この群の治療成績は図 1 および図 2 に示されている如く、CD4 陽性リンパ球数の増加においても、HIV-RNA の抑制においても A 群に比べてやや劣るものであった。CD4 陽性リンパ球数は 24 カ月後には A 群と同等になっているが、表 2 に示すように、B 群の 24 週はまだ症例数が少ないので慎重に判断すべきと考えている。

いずれにしても過去の治療歴が HAART の成績に影響することが示唆される成績であった。

4. 前治療薬 (1~2 剤) に新たに 2 剤を加えて HAART とした群 (C 群) の治療成績

国際エイズ学会アメリカ部会などのガイドラインによると治療薬を変更するに当たっては、少なくとも 2 剤をそれまで使ったことのないものとするのが推奨されている。この方針に従って 2 剤を新規のものとし、従来から使っていた 1 剤に加え治療された群である。前治療が 2 剤で行われていた場合は多くの例で 1 剤のみを残し新規の 2 剤と合わせて 3 剤としていた。この C 群に属する症例は 86 例であった。

図 3 に示すように CD4 陽性リンパ球数の増加は 150 個/μL で、A 群より劣り、B 群と同等もしくはそれよりやや劣る結果であった。HIV-RNA 量は 12 カ月後に -1.2 log まで下がり、それ以後 -1 log に戻る動きを示した (図 4)。これも A 群より劣り、B 群と同等もしくはやや劣る成績であった。各時点における症例数は表 3 に示した。

表 1 A 群の月別症例数

治療期間 (月)	0	3	6	9	12	15	18	21	24
CD 4 数の推移	296	250	202	142	102	65	47	32	14
HIV-RNA の推移	296	249	199	140	102	71	44	28	15

表 2 B 群の月別症例数

治療期間 (月)	0	3	6	9	12	15	18	21	24
CD 4 数の推移	55	52	48	36	30	19	14	11	8
HIV-RNA の推移	55	52	48	36	30	24	13	11	8

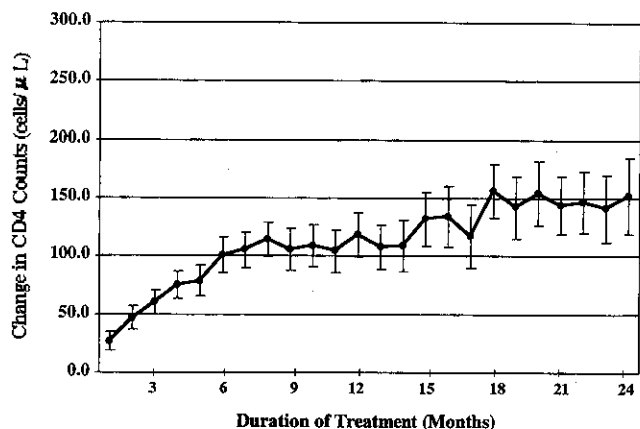


図3 C群におけるHAART開始後のCD4陽性リンパ球数の推移
成績はmean ± SEMで表示した。

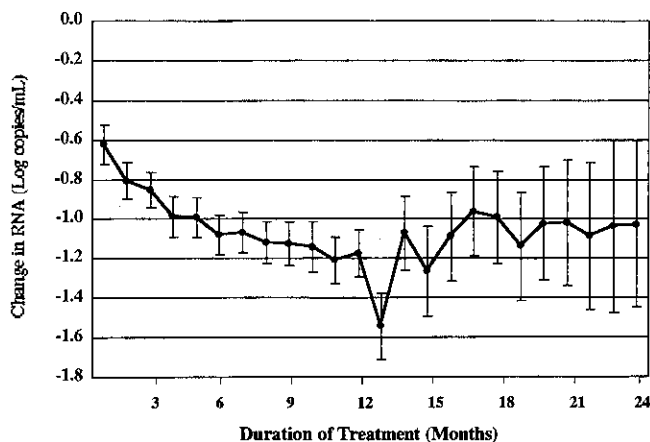


図4 C群におけるHAART開始後の血漿中HIV-RNA量の推移
成績はmean ± SEMで表示した。

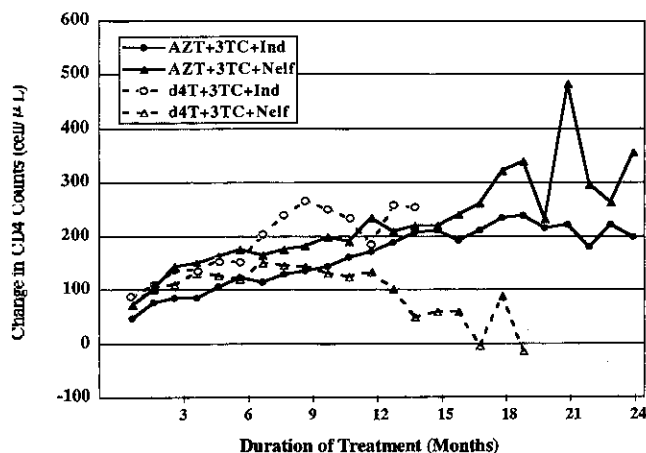


図5 A群の組み合わせ別効果-CD4陽性リンパ球数の推移

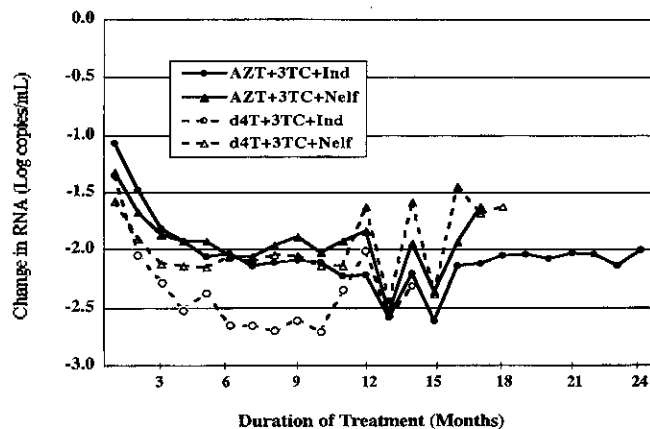


図6 A群の組み合わせ別効果-血漿中HIV-RNA量の推移

表3 C群の月別症例数

治療期間 (月)	0	3	6	9	12	15	18	21	24
CD4数の推移	86	83	69	63	50	44	33	25	19
HIV-RNAの推移	86	81	69	63	49	45	33	25	19

表4 A群の薬剤組合せ別症例数

治療期間 (月)		0	3	6	9	12	15	18	21	24
AZT+3TC+Ind	CD4数の推移	103	92	74	59	47	29	22	17	6
	HIV-RNAの推移	103	92	74	58	47	33	20	15	7
AZT+3TC+Nelf	CD4数の推移	60	49	38	24	15	10	7	2	1
	HIV-RNAの推移	60	49	36	23	15	11	7	2	1
d4T+3TC+Ind	CD4数の推移	12	9	9	8	4	0	0	0	0
	HIV-RNAの推移	12	9	9	8	4	1	0	0	0
d4T+3TC+Nelf	CD4数の推移	56	48	40	19	11	8	6	0	2
	HIV-RNAの推移	56	48	39	21	11	8	5	3	2

5. A群における3剤の組み合わせ間の比較

抗レトロウイルス薬の使用歴がなく、初めから3剤によるHAARTで治療を開始した群(A群)は、既述の如く296例あったが、この中で症例数の多かった組み合わせはAZT+3TC+Ind(103例)、AZT+3TC+Nelf(60例)、d4T+3TC+Ind(12例)、d4T+3TC+Nelf(56例)の4種の組み合わせで、A群全体の78%(231/296)を占めていた。

図5にCD4陽性リンパ球数の推移を、また図6にHIV-RNA量の推移を示した。図には24カ月までの経過を示しているが、表4にあるように10例前後以上の症例が得られているのはAZT+3TC+Indで23カ月まで、AZT+3TC+Nelfで15カ月まで、d4T+3TC+Indで9カ月まで、d4T+3TC+Nelfで12カ月までなので、d4Tを含む組み合わせではグラフの後半は参考値にとどまる。そのような条件付きで比較するとCD4陽性リンパ球数に対する効果に関してはd4T+3TC+Nelfがやや劣る印象があるが、いずれも大差なく、1年後に100個~200個/ μ Lの上昇が見られている。AZT+3TC+IndおよびAZT+3TC+Nelfでは200個/ μ L前後の上昇が2年間維持された点は注目される。

一方、血漿中HIV-RNA量はd4T+3TC+Indが最も良好な効果を示した。この群では10カ月以後HIV-RNA量が前値にもどり始めているが、この部分は症例数が少ないので判断できない。

考 察

海外の成績から初回のHAARTが大切で、初回のHAARTが無効となった場合、その後の治療は初回のものほど有効ではないことが予想されていたが、今回の調査・解析で前治療のないA群の成績が、前治療歴のあるB群、C群のものより優れていることが裏付けられた。レトロスペクティブな検討ではあるが、日本のデータでそのことが確認された事は意義深い。今後、新規に治療を開始する場合、主治医、患者双方に初回治療の重要性および初回治療の効果を維持させるために高いアドヒアランスが重要であることを説明する資料としても貴重である。今回の成績でB群の24カ月後のCD4陽性リンパ球数の増加がA群のそれに追いついているが、血漿中HIV-RNA量では依然開

きがあることから、やはり長期的にもA群が勝っているものと考えられる。今後プロスペクティブな試験で比較できると、この点もより明確にできるであろう。また同じく前治療がある場合でも、3剤とも新規薬で治療した群(B群)と2剤のみが新規薬であった群(C群)とではCD4陽性リンパ球数においても、HIV-RNA量においても、有意ではないが24カ月後の値がB群で優れていたことも示唆に富む成績である。

一方、A群の患者をHAARTの薬剤組み合わせにより層別してみるとAZT+3TC+IndおよびAZT+3TC+Nelfは症例数も多く、1年以上の長期投与例もあったが、d4T+3TC+Indは症例数が少なく、d4T+3TC+Nelfは症例数は多かったが長期投与例が少なく、比較が困難であった。しいて言えばAZT+3TC+IndとAZT+3TC+Nelfは同等で長期的治療薬として期待できること、d4T+3TC+IndはHIV複製の抑制効果が強いと思われること、d4T+3TC+NelfはCD4陽性リンパ球数においてもHIV-RNA量においてもやや劣るのではないかと思われること、などが挙げられる。理論的にはプロスペクスタディが必要であるが、次々と新薬が開発され治療内容が変化している現状では、いくつかの組み合わせに限定して無作為割付けすることが困難で、また、いずれも副作用の多い薬なので割付け通りに服用できない場合が少なくないと予想されることから、新規症例が少ない日本での実施は難しいと思われる。

結 論

HAARTを新たに開始した症例につき検討した結果、前治療歴のない症例では治療歴のある症例に比し、有意に良好な治療成績が得られた。初回治療をできるだけ長期間維持できるようアドヒアランスを高く保つことが重要である。初回治療ではAZT+3TC+IndとAZT+3TC+Nelfが約2年間にわたり同程度に有効であった。d4T+3TC+IndはHIV-RNAの抑制において前2者の組み合わせより強い効果を示したが、1年以上の長期成績はまだ得られていない。d4T+3TC+Nelfは、これらより若干劣る可能性がある。

分担研究報告書

B. HIV 感染症の病態の解析およびモニタリング



CD8陽性T細胞より産生される 可溶性抗HIV活性因子同定の試み

市村 宏¹⁾、阿知原直子¹⁾、武久 盾¹⁾、吉崎 和幸²⁾

¹⁾金沢大学医学部 国際環境保健学講座

²⁾大阪大学健康体育部 健康医学第一部門

研究要旨

CD8陽性T細胞より産生される可溶性の抗HIV活性をもつ因子として、我々は、CCケモカイン (RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β)、IL-16とは異なるSHIF (soluble HIV inhibitory factor)の存在を明らかにし、この因子の同定ならびに遺伝子のクローニングを試みている。SHIF高発現のCD8陽性T細胞クローン(#62)とSHIF無発現クローン(#36)よりmRNAを抽出し、マイクロアレイ法を用いて遺伝子発現の差を検討したところ、クローン#62に高発現している既知ならびに未知の遺伝子が見つかった。今回、これらの「SHIF遺伝子」候補の中で、カテプシンEとWに注目し、病期の異なるHIV感染者において、CD8陽性T細胞におけるこれらの遺伝子発現を定量的PCR法を用いて解析した。病期が進むほどカテプシンEの発現頻度が高まる傾向が見られたが、カテプシンWに関しては特に傾向は認められなかった。

分担研究者：吉崎和幸

研究協力者：市村 宏、阿知原直子、武久 盾

Trial to identify soluble HIV inhibitory factor(s) (SHIF) produced by CD8⁺ T lymphocytes

Hiroshi Ichimura¹⁾, Naoko Achihara¹⁾, Jun Takehisa¹⁾ and Kazuyuki Yoshizaki²⁾

¹⁾ Department of International Health and Medical Virology, Kanazawa University, School of Medicine, ²⁾ Department of Medical Science I, School of Health and Sports Sciences, Osaka University

目的

CD8陽性T細胞が抗HIV活性をもつ可溶性因子を産生しており、この(これらの)因子がHIV感染症の進展阻止(遅延)に重要な役割を果たしていることが示唆されてきた。我々は、CCケモカイン(RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β)、IL-16、CAFとは異なる因子としてSHIF (soluble HIV inhibitory factor)の存在を明らかにし、この因子の同定ならびに遺伝子のクローニングを多角的に試みている。今回、SHIF 遺伝子の同定のために、SHIF 高発現のCD8陽性T細胞クローンと低発現のクローンにおける遺伝子発現の相違をマイクロアレイ法を用いて検討した。さらにHIV感染者のCD8陽性T細胞におけるこれら遺伝子の発現レベルを検討した。

方法

1. CD8陽性T細胞クローン

エイズ長期未発症者であるHIV-1感染者より樹立したクローンの中で、強いSHIF産生能をもつもの(クローン#62)とSHIF産生能がほとんどないもの(クローン#36)を使用した。

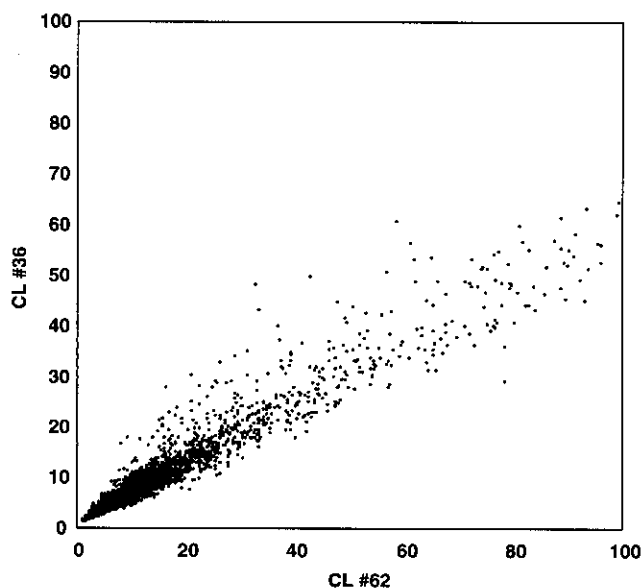


図1 Gene expression Microarrayの結果

2. マイクロアレイを用いた遺伝子発現の検討

CD8陽性T細胞クローン#62と#36よりmRNAを抽出(Quick Prep Micro mRNA Purification Kitを使用)し、Human UniGEM V microarrayを用いて遺伝子発現のレベルを解析した(Incyte Pharmaceuticals, Inc. (Palo Alto, CA)に依頼)。なお、このアレイには4,107の既知の遺伝子と2,968の未知の遺伝子(ESTs)が含まれている。

3. HIV感染者

マハラト・ナコン・ラチャシマ病院(ナコンラチャシマ、タイ国)で経過観察中のHIV感染者78人(男性26人、女性72人;平均年齢30.5 \pm 7.3歳)を対象とした。(現在、抗HIV剤による治療の有無に関して問い合わせ中である。)これらのHIV感染者から採血(EDTA血)し、Dynabeads (M-450 CD8)を用いてCD8陽性T細胞を分離した後、ISOGENを用いてtotal RNAを抽出した。

4. 定量的PCR

ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection Systemを用いて行った。プライマーは異なるエクソン内に、またプローブはジャンクションを挟んで設定した。なお、内源性コントロールとしてGlyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenaseを用いた。

結果

1. CD8陽性T細胞クローンにおける遺伝子発現

クローン#62細胞とクローン#36細胞における各種遺伝子の発現レベルをマイクロアレイ法を用いて検討した。図1に示されているように、クローン#62で強発現している遺伝子群(カテプシンE (CTSE)、カテプシンW (CTSW)など)、逆にクローン#36で強発現している遺伝子群が明らかになった。なお、具体的な遺伝子名に関する記述はここでは省略する。

2. HIV感染者CD8陽性リンパ球におけるCTSE、CTSWの発現

CD8陽性T細胞クローン#62細胞に高発現している遺伝子の中で、HIV env V3を切断しうるアス

パラギン酸プロテアーゼであるCTSE¹⁾と、詳細は不明だが、リンパ球由来のシステインプロテアーゼであるCTSW^{2,3)}について、今回さらに検討を行った。

病期の異なるHIV感染者において、末梢血CD8陽性T細胞におけるこれらの遺伝子の発現を定量的PCR法を用いて解析したところ、HIV感染者の末梢血CD4陽性Tリンパ球数が低い群ほどCTSE

の発現率が高い傾向があること、HIV感染者では未感染者に比べCTSEの発現率が高い傾向があることが明らかとなった(表1、図2)。ただし、血漿HIV RNA量とCTSEの発現量との間に相関は認められなかった(図2)。一方、CTSWの発現は、末梢血CD4陽性Tリンパ球数と血漿HIV RNA量のいずれとも相関は認められなかった(図3)。

表1 HIV感染者ならびに未感染者末梢血CD8陽性リンパ球におけるカテプシンE遺伝子の発現率とCD4陽性リンパ球数

HIV infection	number of peripheral CD4 ⁺ T cells	CTSE positive (%)
(+)	≤100	8/23 (34.8)
	100 - 500	7/26 (26.9)
	> 500	4/24 (16.7)
	total	19/73 (26.0)
(-)		1/10 (10.0)

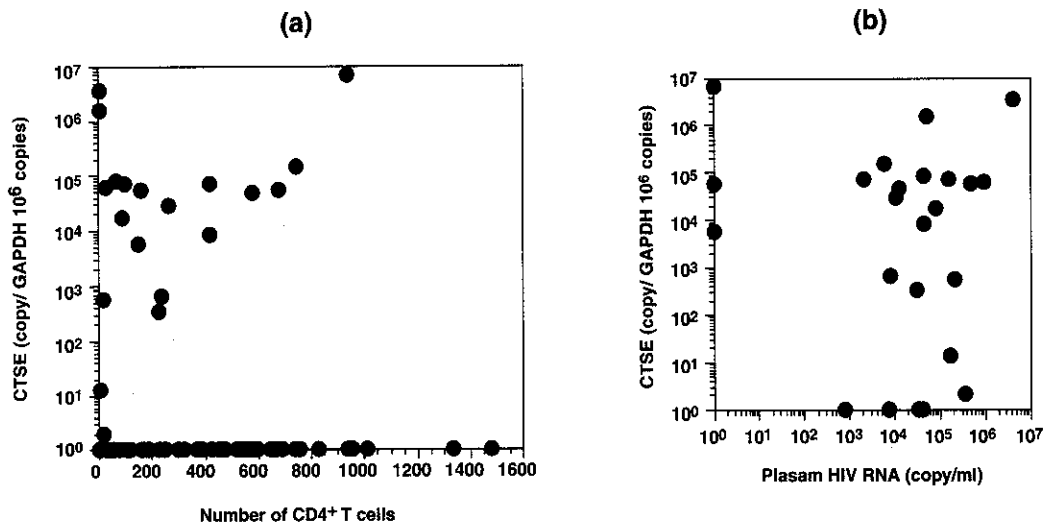


図2 HIV感染者末梢血CD8陽性リンパ球におけるカテプシンEの発見とCD4陽性Tリンパ球数(a)ならびに血漿HIV RNA量(b)との相関

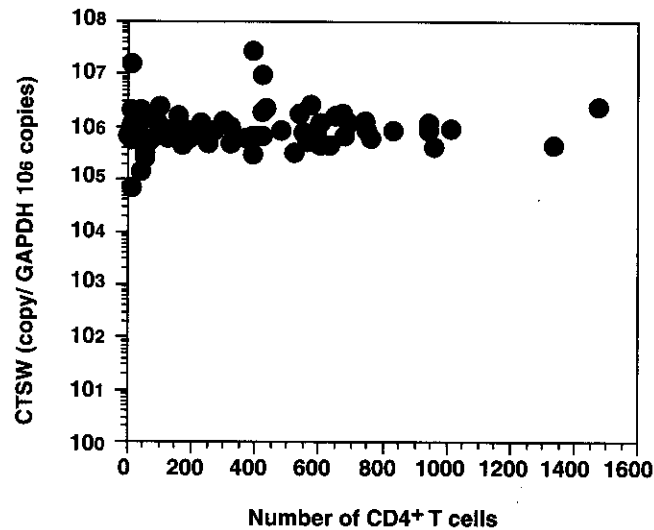


図3 HIV感染者末梢血CD8陽性リンパ球におけるカテプシンWの発現とCD4陽性Tリンパ球数との相関

考 察

昨年までに、可溶性 HIV-1 複製抑制因子(SHIF: soluble HIV inhibitory factor)がエイズ長期未発症者のCD8陽性T細胞から産生されていること、SHIFを高発現しているCD8陽性T細胞クローンにおける発現動態の違いからSHIFがCCケモカイン(RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β)およびIL-16とは異なること、熱安定性の相違からSHIFはCAFとも異なること、そしてSHIFによるHIV-1複製抑制のメカニズムがHIV-LTRの転写抑制によるものであることを報告してきた。

このようにSHIFの性状を明らかにするとともに、この因子の同定ならびに遺伝子クローニングを多角的に試みてきた。本年度の研究では、その試みの一つとして、SHIFを高発現しているCD8陽性T細胞クローンと低発現のクローンにおける各種遺伝子発現の相違をマイクロアレイ法を用いて検討した。これらのクローンで有意な発現量の差が認められた既知ならびに未知の遺伝子群について「SHIF遺伝子」候補になりうるかどうか、今後検討を進めていく予定である。

今回、HIV感染者の末梢血CD8陽性T細胞において、CTSEとCTSW遺伝子の発現を定量的PCR法を用いて解析したところ、HIV感染者の末梢血CD4陽性Tリンパ球数が低い群ほどCTSEの発現

率が高い傾向があること、HIV感染者では未感染者に比べCTSEの発現率が高い傾向があることが明らかとなった。これらの結果は、CTSEとSHIFの何らかの関連を示唆するものであるが、CTSEの*in vitro*における抗HIV作用など今後更なる検討が必要と考えられる。

結 論

現在、CD8陽性T細胞から産生される可溶性HIV複製抑制因子(SHIF)の同定ならびに遺伝子のクローニングを多角的に試みている。本研究では、同一のエイズ長期未発症者のCD8陽性T細胞から樹立されたSHIF高発現クローンと低発現クローンを用いて、その遺伝子発現の相違から「SHIF」遺伝子を同定する試みについて紹介した。

参考文献

- 1) Clements, G.J., Price-Jones, M.J., Stephens, P.E., et al.: The V3 loops of the HIV-1 and HIV-2 surface glycoproteins contain proteolytic cleavage sites: a possible function in viral fusion? *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 7(1): 3-16, 1991.
- 2) Linnevers, C., Smeekens, S.P., Bromme, D.: Human cathepsin W, a putative cysteine protease predominantly expressed in CD8+ T-lymphocytes. *FEBS Lett.* 405(3):253-259, 1997.

- 3) Wex, T., Levy, B., Smmekens, S.P., et. al.: Genomic structure, chromosomal localization, and expression of human cathepsin W. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 248(2): 255-261, 1998.



HIV感染者における末梢血単球由来樹状細胞のサイトカイン産生能の解析

高口 善信、川上 和義、金城 雄樹、屋良さとみ、仲本 敦、新里 敬、
健山 正男、斎藤 厚

琉球大学医学部 第一内科

研究要旨

樹状細胞(DC)は、強力な抗原提示細胞であり、ヘルパーT細胞およびキラーT細胞のいずれのナイーブT細胞をも活性化できることから注目を集めている細胞である。腫瘍免疫の領域では、患者から分離したDCを腫瘍特異抗原で活性化させ生体内にもどすDCワクチンの臨床治験が行われ大きな効果をあげている。その作用機序は主に細胞性免疫を活性化し抗原特異的キラーT細胞(CTL)を誘導することである。このことから細胞性免疫が低下し、感染防御にCTLが重要な役割を果たしている HIV 感染症およびそれに合併する日和見感染症にDCワクチンが有用である可能性が考えられる。そこで今回我々はCD4KOマウスおよびHIV感染者のDCの機能について解析を行った。CD4KOマウスの脾細胞由来DCは野生型マウスのそれと比べLPS刺激においてもSAC刺激においてもIL-12p40産生能の低下が認められた。このことからHIV感染者におけるDCの機能低下が予測された。しかしながら、LPSおよびzymosanで刺激した末梢血単球由来樹状細胞(Mo-DC)のIL-12p40、TNF- α やIL-18産生能はHIV感染者群と健常人群間で有意な差を認めなかった。以上の結果からHIV感染者においてDCのサイトカイン産生能が障害されていないことが示された。しかし、今回対象としたHIV感染者は全例抗HIV療法を受けておりその影響も考えられることから、今後は未治療のHIV感染者を含めDCのサイトカイン産生能および抗原提示能を解析する必要があると考えられた。

分担研究者：斎藤 厚

研究協力者：高口善信、川上和義、金城雄樹、屋良さとみ、仲本 敦、新里 敬、健山正男

Functional studies of monocyte-derived dendritic cells in HIV-infected individuals

Yoshinobu Koguchi, Kazuyoshi Kawakami, Yuki Kinjo, Satomi Yara, Atushi Nakamoto, Takashi Shinzato, Masao Tateyama and Atsushi Saito

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

目的

樹状細胞(以下DC)は、強力な抗原提示細胞であり、ヘルパーT細胞およびキラーT細胞(CTL)のいずれのナイーブT細胞をも活性化し、初期免疫応答を惹起する極めて重要な細胞である。DCは細胞表面に高密度に主要組織適合遺伝子複合体(major histocompatibility complex ; MHC)クラスIおよびクラスIIを発現し、T細胞の活性化に必要なコストミュラトリー分子や接着分子も同様に発現している^{1,2)}。

DCの研究が最も進んでいるのは腫瘍免疫の領域である。すでに、前立腺癌³⁾、メラノーマ⁴⁾や非ホジキンリンパ腫⁵⁾では各腫瘍に対して、患者から分離した樹状細胞に腫瘍特異抗原などを加え活性化させた後、患者に戻すいわゆる「DCワクチン」の臨床治験が始まっている。対象となった患者はいずれも既存の治療に抵抗性で多臓器転移を認めているにもかかわらず、中には著明な腫瘍の退縮を認める症例も数例存在した。

これらのDC投与による抗腫瘍効果発現は末梢血単核球(PBMC)からの抗原特異的なIFN- γ 産生増加³⁾、DTH反応の増強や腫瘍局所へのメモリーCD8陽性T細胞浸潤の著明な増加⁴⁾、といった細胞性免疫の増強とそれによる腫瘍特異的なCTLの効率的な誘導によると報告されている。

以上のことから、HIV特異的なCTLの誘導や日和見感染症に対する感染免疫能を高める手段としてDCワクチンの有効性が期待できる。そのためにはHIV感染者におけるDC機能の状態を良く理解しておく必要がある。そこで我々はまず、エイズ患者と同様にCD4陽性T細胞の機能不全を有するCD4欠損マウスから分離したDCを用いて、細胞性免疫を誘導する上で極めて重要なサイトカインであるIL-12産生能について解析を行った。

また、これまでのHIV感染患者のDCについては真菌に対するサイトカイン産生能に関する報告はなされていない。そこで今回我々は、ヒト単球由来樹状細胞(以下Mo-DC)を用いてLPSや真菌の菌体成分であるzymosanに対するIL-12p40、IL-18およびTNF- α といった感染防御に重要なサイトカインの産生能をHIV感染者と健常人の間での比較を検討した。

方法

1. マウス

8~12週齢雄のC57Bl/6バックグラウンドCD4分子欠損マウス(以下CD4KOマウス)とコントロールとしてC57Bl/6マウスを用いた。これらのマウスはSPFにて飼育した。本研究で行った動物実験はあらかじめ琉球大学動物実験委員会の承認を得ている。また、遺伝子欠損マウスを用いた実験は、あらかじめ琉球大学遺伝子実験委員会の承認を得ている。

2. マウス脾細胞由来DCの調整

CD4KOマウスおよびC57Bl/6マウスから脾細胞を調整しCD11cマグネティックビーズ(Miltenyi Biotec, ドイツ)と反応させた後MACS(Miltenyi Biotec, ドイツ)を用いてCD11c陽性細胞を分離しDCとした。purityはフローサイトメトリーにて確認し、CD11cおよびMHCclassII陽性細胞をDCとした。Purityは約80%であった。

3. マウスDCによるサイトカイン産生能

CD4KOマウスおよびC57Bl/6マウスから調整した脾細胞由来DC(1×10^5 /ml)にLPS(Sigma社、米国)あるいはStaphylococcus aureus Cowan 1株(SAC)(Calbiochem社、米国)を加え刺激し、48時間後に培養上清を採取し、-80℃で保存した。培養上清中のIL-12p40をELISAキット(Endogen社、米国)を用いて測定した。

4. 症例

検討の対象は琉球大学医学部第一内科に入院または外来通院中のインフォームド・コンセントの得られたHIV感染者5症例(Table.1)および健常人5人とした。またこれらの症例は採血の時点で日和見感染症は合併していなかった。

5. Mo-DCの調整

ヘパリン加血液からFicoll-Paque(Pharmacia社、スウェーデン)にて末梢血単核球(PBMC)を分離した。PBMCからグラスディッシュを用いて単球を分離した(Fig.1)。得られた単球をIL-4(1000U/ml, Peprotech社、イギリス)およびGM-CSF(1000U/ml,