

確定診断のためのカリニ肺炎診断法の実際

京都府立医科大学医動物学教室 塩田恒三

1. 検査材料の採取

検査材料中にカリニが多数存在し、夾雑物が少なければ、検査法の如何に関わらずカリニの検出は容易で高い検出率が得られる。ゆえに検査材料の採取方法およびその処理は重要である。

1) 気管支肺胞洗浄 (BAL)

気管支鏡を用いたBALは、リスクの高い患者にも比較的安全に行え、しかもカリニの検出率は80~100%と高く、同時にカリニ以外の肺炎起因病原体等の検査にも供せるため、現在最も広く用いられている。液量としては、小児を除き5ml以上あることがのぞましい。

2) 誘発喀痰

超音波あるいはジェットネブライザー等を用いて3%食塩水を吸入させて得られる誘発喀痰は、患者に与える侵襲がほとんどなく、カリニの検出率もBALの69~94%と比較的高いため、米国等ではAIDS患者のみならず、AIDS以外の患者や小児科においても第1次選択として用いられている。

3) 気道吸引物

挿管下にある患者の気道吸引物あるいは吸引に使用したチューブ内に留まった粘液はよい材料である。3日間の経日的検査を行う。

4) 喀痰

カリニ肺炎の臨床症状の特徴の一つとして、空咳で喀痰が出にくいことが挙げられている。しかし、発病初期の軽度感染例では抗カリニ剤投与後は喀痰が出やすく、また喀痰中にカリニを検出しやすいと考えられる。この理由は、I型肺胞上皮に接着寄生しているカリニが抗カリニ剤の作用で肺胞腔内へ脱落・遊離した後、肺サーファクタントと気管支内面を覆う線毛上皮の線毛運動等による肺クリアランス作用により、上部気道へ運ばれて喀痰に混じって検出されるためと考えられる。しかし、初期治療が行われず本肺炎が進行した例では、肺胞腔は増殖したカリニ、脱落した上皮、変性した遊走細胞およびフィブリン等が器質化した大きな集塊をなしており、このような例では上記肺クリアランス作用のみではこれらの集塊の上部気道への運搬は困難と考えられ、次に述べる気管支肺胞洗浄液や誘発喀痰が適している。

喀痰の採取に当たっては、清浄な広口瓶を患者のベッドサイドに置き、努めて咳をさせて喀出痰を集める。一日以上蓄痰する場合は、採取瓶に抗生剤・抗真菌剤を適量入れておく。3日間の経日的検査を行う。

2. 検査材料の処理

採取した検査材料は喀痰液化剤 dithiothreitol (DTT) (SPUTASOL, OXIOD社等) で37C, 30分処理(液化)し, 3000rpm, 10分遠沈した後, 沈さを3枚の清拭したスライドガラスに塗抹, 風乾, メタノール固定を5分行う. 喀痰液化剤処理塗抹標本の cellufluor 蛍光色素やメテナミン銀 (GMS) の染色結果は, 塗抹が均一の厚さとなるため染色性のばらつきはなく, カリニの集塊もよく保存されているためカリニを検出しやすい. また, 集シスト効果があるため標本枚数が少数ですみ, 染色に要する時間と鏡検時間が短縮される. 挿管下にある患者の気道吸引物採取に使用したチュウブ内に留まった粘液もよい材料である. チュウブは約1cmに細切して喀痰液化剤を入れた容器内で37C, 30分処理する. 時々振盪するとチュウブ内に付着した粘液は剥離・液化しやすい.

3. 染色法

(A) cellufluor (calcofluor white) 蛍光色素染色 (Fungi-Fluor kit; Polysciences, Inc.等)

本蛍光色素はカリニの嚢子壁に含まれる多糖に結合し, 紫外線下で淡青色の蛍光を発する. 真菌類の細胞壁の多糖も同様に蛍光を発する. カリニ嚢子と真菌類の鑑別は, カリニ嚢子に特異的に存在し, 本法では強い蛍光を発する明瞭な”括弧状構造物”により行う. 検査材料中に含まれる種々の細胞は本色素では染まらないのでカリニ嚢子は検出しやすい.

(1) 前記メタノール固定塗抹標本の塗抹部をcellufluor 溶液(A)約6滴で覆い, 1分静置染色. 塗抹材料が含水して粘液状になり, スライドガラスから剥がれ落ちやすくなる

(2) 染色液を捨てないで標本を水平に近い角度でピンセットで保持し, スライドガラスの高い方から蒸留水を滴下し続けてスライドガラス全面を覆い, 静かにスライドガラスを傾けて染色液を同低い方から洗い落とす. 本法での最も注意すべき点である.

(3) スライドガラスを数分立てかけて, 余分な水を自然に落とすと同時に含水した粘液状の材料を半乾燥させて容量を減少させる. 非塗抹部の面が乾く位がよい. この減量により鏡検時, 検査材料の焦点深度の幅が浅くなり, 見落としを防止して鏡検による検出率を上昇させるとともに, 検査時間を短縮させる.

(4) 半乾燥の状態のカバーガラスをかける. 乾燥しきるとよくない.

(5) 蛍光顕微鏡 (U励起; 例Zeiss UG-1)で観察. 40倍対物レンズ使用, 写真撮影.

参考資料

(6) カリニ嚢子は淡青色の蛍光色に見える。嚢子は円形（実際は球形）で、直径約5（4～6） μm 。嚢子壁は真菌の細胞壁よりも薄く染まる。嚢子内にあるように見える”括弧状構造物”が強く染まって観察される。この構造物はあたかも双球菌のごとく常にペアをなしている。なお、この構造物は肺内に認められる真菌類（カンジダ、アスペルギルス、クリプトコッカス等）には認めないので、カリニの確定診断に用いる。この構造物が円形の嚢子壁内面にくっついて見える場合（側面像）は桿状に見える。カリニの栄養型は染まらない。

(B) ゴモリのメテナミン銀染色 Gomori's methenamine silver nitrate (GMS) stain, Grocott's variation (グロコット染色)

GMS染色はcellufluor染色と同じく、カリニの嚢子壁および真菌類の細胞壁を染める。これらに含まれる多糖類をクロム酸で酸化すると遊離アルデヒド基ができる。これにメテナミン銀を反応させると銀粒子の沈着（鍍銀）を生じ、括弧状構造物を含むカリニの嚢子壁や真菌類は同等に黄褐色～黒褐色に染まる。カリニの嚢子は円形（球状）あるいはカップ状（例えば、軟式テニスボールの空気を抜いた状態）で、直径は約5（4～7） μm である。嚢子壁に皺を有する嚢子を時に認めるが、皺は真菌類には認めないので鑑別の参考になる。

注意点：メテナミン反応時間が長すぎると、嚢子は過染して真っ黒に染まり、括弧状構造物や皺が判別できなくなり、同じ大きさの真菌の胞子との鑑別が困難となることがある。過染しないように時々染色容器より取り出してカバーガラスをかけウェットの状態で鏡検する。この時に真菌類が染まっていればカリニ嚢子も同等に染まるので指標になる。顆粒球の顆粒もカリニ嚢子と同等に染まる。これらが黄褐色に染まってきた時点で反応を止める。もしカリニの嚢子が含まれていれば、括弧状構造物を含め嚢子壁は黄褐色に染まり、この時点で診断がつく。この場合は簡略法として、以下の染色段階を中止して、軽く水洗、風乾、包埋して永久標本としてもよい。

ニューモシスチス・カリニ染色標本の観察（顕微鏡実習資料）

- 1) カリニ肺炎患者の気管支肺胞洗浄液（BALF）、GMS染色標本
- 2) カリニ肺炎で死亡した患者の剖検肺、パラフィン包埋切片、GMS染色標本 DEMO
- 1) カリニ肺炎で死亡した患者の剖検肺、パラフィン包埋切片、cellufluor蛍光色素染色標本
- 2) その他

分担研究報告書

F. 日和見合併症の治療法の開発



トキソプラズマ特異酵素(NTPase)の 基質結合部位の解析 (抗トキソプラズマ剤開発のための基礎研究)

三浦 恵¹⁾、浅井 隆志²⁾、竹内 勤²⁾

¹⁾横浜市立大学医学部 ラジオアイソトープ研究センター

²⁾慶應義塾大学医学部 熱帯医学・寄生虫学教室

研究要旨

エイズ患者に多発する急性トキソプラズマ症の治療薬の開発の目的で、トキソプラズマに特異的に存在する酵素(ジチオスレイトールにより活性化されるヌクレオシド三リン酸加水分解酵素;NTPase)に着目した。過去の研究結果より、NTPaseの特異的阻害剤はトキソプラズマの増殖を阻害することから、治療薬の絶好のターゲットとなると考えられる。しかしトキソプラズマのNTPaseには二つのアイソザイム(NTPase-I及びNTPase-II)が存在する。またトキソプラズマの株間で両アイソザイムの存在様式が異なる。そこで両アイソザイムの反応様式を分子レベルで解析するために、両アイソザイムのキメラ蛋白を作製した。そしてこれを大腸菌で大量発現した。

分担研究者：竹内 勤

研究協力者：三浦 恵、浅井隆志

Analysis of substrate binding position on *Toxoplasma gondii* specific enzyme (NTPase); basic research for development of anti-*T. gondii* drug

Satoshi Miura¹⁾, Takashi Asai²⁾ and Tsutomu Takeuchi²⁾

¹⁾Radioisotope Research Center, School of Medicine, Yokohama City University, ²⁾Department of Tropical Medicine and parasitology, School of Medicine, Keio University

目的

トキソプラズマ症はエイズ患者及び臓器移植患者に多発する難治性の原虫感染症である。一度感染すると一生慢性的に感染しているためヒトへの感染率は非常に高い。現在使用されている治療薬は治療効果が低く副作用も強いことから、より治療効果の高い副作用のない薬剤が求められている。

我々は従来の研究によって他の生物には見られないトキソプラズマ及び近縁の原虫であるネオスポーラに特異的に存在する酵素を発見し、その性質からNTPaseと命名している^{1,2)}。トキソプラズマのNTPaseには二つのアイソザイム(NTPase-I及びNTPase-II)が存在する。NTPase-IIはトキソプラズマのすべての株に共通して存在するが、NTPase-Iは強毒株にのみ存在する。過去の研究結果³⁾より、NTPaseの特異的阻害剤はトキソプラズマの増殖を阻害することから、治療薬の絶好のターゲットとなると考えられる。

本研究の目的は、このNTPaseを標的にしたトキソプラズマ症の新規治療薬の開発を行う原資とするために、基質結合部位の分子解析をすることである。

方法

1. 原虫の培養

トキソプラズマRH株及びBeveley株の急増虫体をヒト線維芽細胞(HHF)を宿主として*in vitro*培養した。培地にはダルベッコのMEMに10%FBS、2mMグルタミン、20 μ g/ml ゲンタミシンを加えた。増殖した急増虫体は3 μ m径のフィルター(Nucleopore)で分離する記載の方法⁴⁾で集め、使用時まで-80 $^{\circ}$ Cで保存した。

2. 酵素の精製及び酵素活性の測定

凍結保存してあるトキソプラズマRH株の急増虫体(2g)を10mlの20mM HEPES-KOH, pH7.5/0.9% NaCl液に懸濁後、20kHzで10秒間超音波処理し、10000rpmで10分間遠心した。上清に20%になるようにグリセリンを加え、これを酵素液とした。NTPaseの精製、酵素反応液の組成、活性の測定は

記載の方法¹⁾で行った。分解されたヌクレオチドはHPLCで記載の方法⁵⁾で行った。

3. 遺伝子のクローニングと塩基配列の決定

トキソプラズマの急増虫体のmRNAを抽出し、これを用いてUni-ZAPラムダcDNAライブラリーを作製した。抗トキソプラズマNTPaseとIgG抗体を用いてライブラリーをスクリーニングし、NTPaseのcDNAクローンを得た。詳細は記載の方法¹⁾による。

4. 遺伝子組換え体酵素の作製

NTPaseには二種類のアイソザイム(NTPase-IおよびNTPase-II)が存在するが、open reading frameは共通のプライマー(forward oligo 5'-TACCATATGACAGACTCATCGTCACTCCG-3'; reverse oligo 5'-TCGCTCGAGTCACAGATTGTGAGAATATCC-3')でpolymerase chain reaction (PCR)法により増幅可能である。最初の変性を94 $^{\circ}$ C 5分とし、変性に94 $^{\circ}$ C 30秒、アニーリングに65 $^{\circ}$ C 1分、伸長反応に72 $^{\circ}$ C 2分のサイクルを40回行い、最後の伸長反応を72 $^{\circ}$ C 5分とした。native Pfu DNA Polymerase (Stratagene, USA)を用いそれぞれのアイソザイムは対応する遺伝子¹⁾を組み込まれたpBluescript-II (SK+) (Stratagene)を鋳型にして遺伝子を増幅した。PCR産物を1.2%アガロースゲルで電気泳動し、該当するバンドを切り出して発現ベクターであるpET22(b)⁺ (Novagen, USA)のNdeI/XhoIサイトに組み込んだ。これをElectro cell manipulator (BTX, USA)を用いて大腸菌BL21に導入した。NTPaseの発現は、37 $^{\circ}$ Cで50 μ g/mlのアmpiシリンを加えたLB brothで2~2.5時間培養後、0.2mM isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG)を加え、さらに37 $^{\circ}$ Cで2~2.5時間培養して行った⁶⁾。

NTPase-Iの封入体を6Mのグアニジン塩酸で溶解した後、50mM トリス塩酸、pH 7.5で6倍にうすめ一晩4 $^{\circ}$ Cで放置した。これを過剰量(~3000倍)の50mM トリス塩酸、pH 7.5に対して一晩4 $^{\circ}$ Cで透析することで活性を復元した。活性のあるNTPase-Iは20mM トリス塩酸、pH 8.5の存在下でDEAE-Toyopeal 650S カラム(30 \times 1.6cm)を用いたイオン交換クロマトグラフィー(塩化カリウム濃度勾配0-0.5M)により部分精製した。さらに0.2M塩

化カリウムを加えた50mM トリス塩酸, pH7.5を溶媒にして、Toyopeal HW55S カラム(東ソー、60×1.6cm)より溶出するゲルろ過法により単一に精製した。

5. 遺伝子組換えキメラ酵素の作製

二種類のアイソザイム(NTPase-IおよびNTPase-II)のアミノ酸残基177番目の位置にHindIII, 481番目にSacIの制限酵素サイトを作製し、この部分でお互いのアイソザイムを結合した。作製にはPCR法を用い、反応の諸条件は上述と同様である。HindIIIのサイト作製にはプライマー (forward oligo 5'-CAGGTCAAAGCTTTGGGCATTCCAGTAATG-3'; reverse oligo 5'-GCCCAAAGCTTTGACCTGGACC TTTTGT-3')を用いた。

このプライマーは両アイソザイムに共通であるが、SacIサイトの作製にはforward側のプライマーは別々のシーケンスが必要であるので、プライマー(forward oligo NTPase-I 5'-GTTTGCGAGC TCGACAGCGCCGATGAT-3', NTPase-II 5'-GTTTGCGAGCTCGACAGCACCC AATGTT; reverse oligo 5'-GCTGTGCGAGCTCGCAAACCTGAAGA CTTGG)を用いた。

結果

1. NTPaseアイソザイムの諸性質の違い

精製したNTPase アイソザイムの基質特異性が表1に示されている。

NTPase-IIはどのヌクレオシド三リン酸も同じように加水分解するが、ヌクレオシド二リン酸はほとんど加水分解しない。またNTPase-Iはテトラポリリン酸をわずかに加水分解する。一方NTPase-IIはヌクレオシドの三リン酸、二リン酸ともに同じように加水分解する。ただし両アイソザイムとも

にピリミジンヌクレオチドに対する反応性が若干弱い。NTPase-IIはトリポリリン酸及びテトラポリリン酸を多少加水分解する。両アイソザイムの決定的な違いはヌクレオシド二リン酸の加水分解の強弱である。

NTPase アイソザイムのMgATPとMgADPの分解に対する反応速度定数が表2に示されている。NTPase-IではMgATPとMgADPに対するKm値は10倍ほど異なるが、NTPase-IIでは同一のKm値である。また同じように、NTPase-IのMgATPとMgADPの加水分解におけるVmax値は約70倍の違いがあるが、NTPase-IIではほぼ同一である。MgATPの加水分解におけるNTPase-IとNTPase-IIのVmax値には約四倍の違いがある。遺伝子組換え体のNTPase-Iの諸性質はnativeなものと同であった。

表1 NTPase アイソザイムの基質特異性の比較

Compound	NTPase-I		NTPase-II	
	%			
ATP	100*		100	
GTP	103		99	
ITP	105		97	
UTP	101		92	
CTP	91		100	
TTP	90		87	
dATP	103		101	
dGTP	106		108	
dUTP	91		90	
dCTP	87		101	
ADP	0.7		98	
GDP	0.8		98	
UDP	0.9		68	
CDP	0.7		77	
Pyrophosphate	ND ^b		ND	
Triphosphate	ND		0.2	
Tetraphosphate	0.3		1.9	

*ATPの加水分解活性を100%とした。

^b活性検出できず。

表2 NTPase アイソザイムのATP, ADP加水分解における反応速度定数の比較

Substrate	Km		Vmax	
	NTPase-I	NTPase-II	NTPase-I	NTPase-II
MgATP	0.11 ± 0.02	0.50 ± 0.05*	1630 ± 76	446 ± 32
MgADP	1.20 ± 0.20	0.50 ± 0.06	22 ± 5	415 ± 41

*Mean ± SE (N=6)。

2. キメラ酵素の作製

NTPaseアイソザイムのアミノ酸配列の違いが図1に示されている。ここにはNTPase-I及びNTPase-IIの他にBeverley株のアミノ酸配列も同時に示されている。Beverley株にはNTPase-IIタイプの酵素しか存在しない。

これは弱毒株に共通している。RH株のNTPase-IIとは3個のアミノ酸しか違いがなく、しかもその内の一個は成熟酵素には存在しないシグナルシーケンス内にある。NTPase-IとNTPase-IIはともに628個のアミノ酸残基により構成されている。そのうちN-末端から25残基はシグナルシーケ

スで成熟酵素には存在しない¹⁾。NTPase-IとNTPase-IIは97%のアミノ酸配列が相同で16個のアミノ酸しか異ならない。これらの違いはアミノ酸残基104～110と488～499に集中している。この二つの集中部分を切り放すために、アミノ酸残基177番目の位置にHindIII、481番目にSacIの制限酵素サイトを作製し、別々の集中部分を持つキメラ酵素を作製した。その模式図が図2である。これら4種類のキメラ酵素を大腸菌で発現させたものが図3に示されている。どのキメラ酵素も非常に良く発現されている。

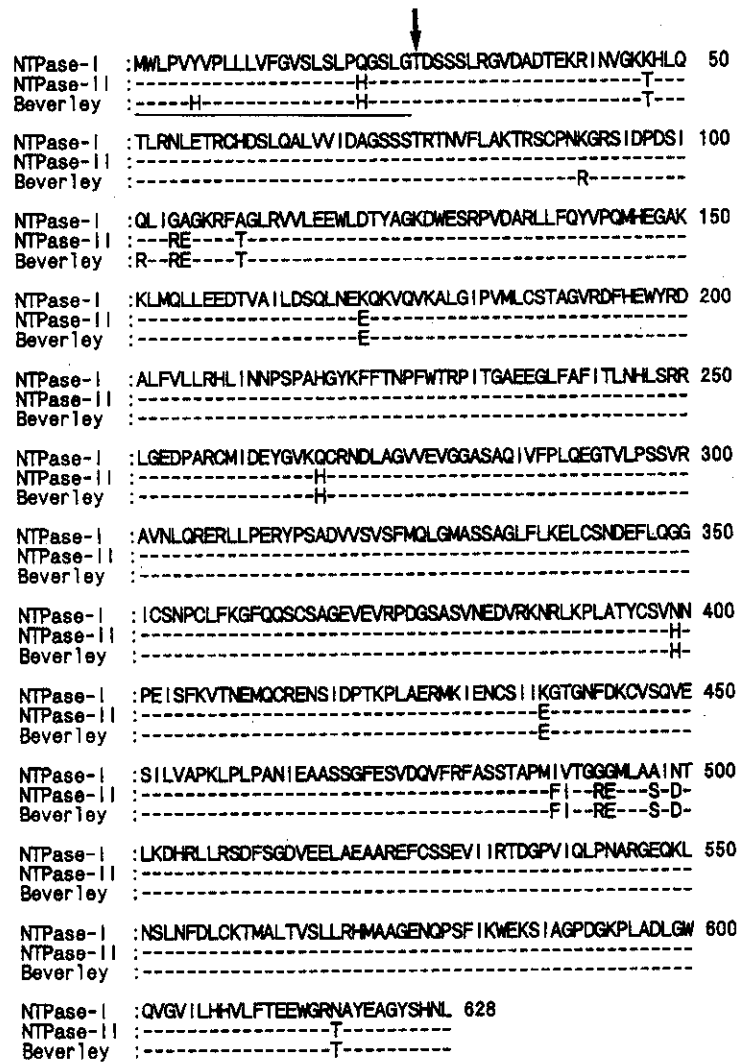


図1 NTPaseアイソザイムのアミノ酸配列の比較

Dashesは同一アミノ酸を表す。矢印はN-末端を示す。下線部はシグナルシーケンス配列を示す。右側の数字はアミノ酸残基数を示す。

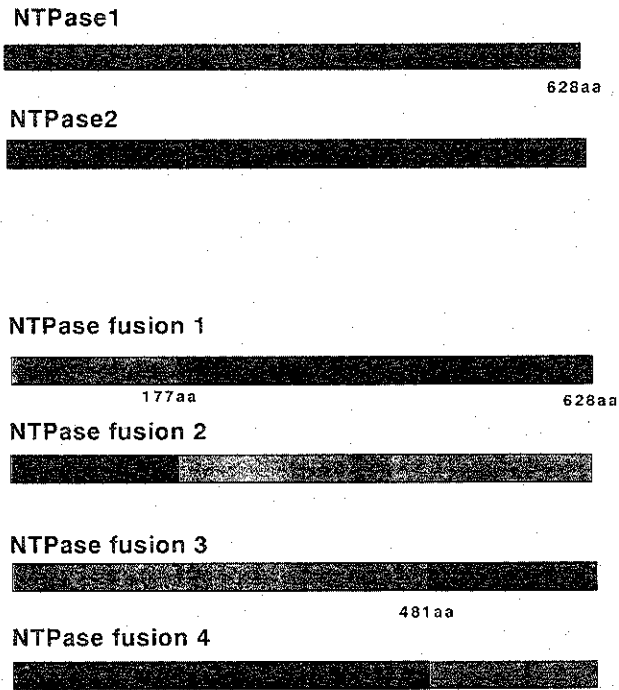


図3 大腸菌に発現させた NTPase キメラ酵素の SDS-電気泳動像

左の数字は分子量を示す。上部には NTPase-II 及び各キメラ酵素の遺伝子を挿入したプラスミドを持った大腸菌に対して、左のレーンが IPTG 非添加、右のレーンが IPTG で誘導した結果を示す。右の矢印は 69kDa に蛋白が発現していることを示す。

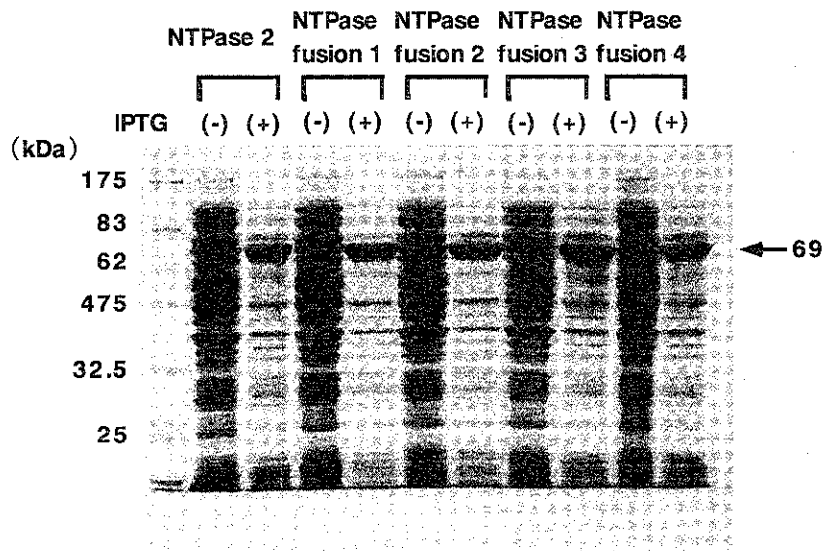


図2 四種の NTPase キメラ酵素の模式図

薄い部分が NTPase-I, 濃い部分が NTPase-II。アミノ酸残基 177 番目と 481 番目で結合されている。

考 察

我々は既に NTPase の阻害剤がトキソプラズマの増殖を阻害することを報告している³⁾。その研究で浮かび上がってきた問題点は阻害剤がふたつあるどちらのアイソザイム (NTPase-I 及び NTPase-II) に特異的であるかということである。ふたつあるアイソザイムのうち NTPase-I は大腸菌に発現させた遺伝子組換え体を活性のある酵素に還元することが容易であるが、NTPase-II の活性還元は成功していない。現在まで約10万種類の化合物を阻害剤としてテストしているが全て NTPase-I について行われている。所が NTPase-II は強毒株にのみ存在する。一方 NTPase-II は全ての株に共通して存在する。株間で多少のアミノ酸配列に違いがあると考えられるが、今回調べた RH 株と Beverley 株の違い(図1)程度と思われる。事実反応速度定数などには株間で違いは見られない⁵⁾。ふたつのアイソザイムのアミノ酸配列では97%の相同性がある(図1)ことから、上述のようなことを懸念する必要がないようであるが、基質特異性及び反応速度定数(表1、2)がかなり異なる事実から十分検討が必要であろう。

図1の両アイソザイムのアミノ酸配列の比較から、アミノ酸残基104～110と488～499に違いが集中していることがわかる。予想されるATPの結合部位はアミノ酸残基101～108である²⁾。この部分は前半のアミノ酸残基の違いの集中部分とほぼ一致している。後半の集中部分はヌクレオチドの結合部位との関係は不明であるが、表1、2に示された反応様式の違いが前半の集中部分だけで決定されているとは考えにくい。後半部分は重要な役割を担っているのは間違いない。今回、前後のアミノ酸残基の違いの集中部分を切り放すために、アミノ酸残基177と481で切断し、別々の部分を結合させた四種類のキメラ酵素(図2)を作製し、大腸菌に大量発現させた(図3)。現在活性の還元を検討中である。

NTPaseの生理的役割及びなぜトキソプラズマとネオスポラに特異的であるかは未だ不明である。しかし酵素の特異的な阻害剤が虫体の増殖を阻害することから、この酵素が虫体の増殖に必要な不可欠な重要な物であることは間違いない。寄生原虫

にはプリン体の新生合成経路が存在せず、核酸合成その他に使われるプリンヌクレオチドはサルベージ経路により供給される。NTPaseの生理的役割として、宿主のヌクレオチドの加水分解を行いサルベージ経路の初段を担う可能性が考えられる。この経路の意義としてはヌクレオチド二リン酸を加水分解するNTPase-IIの存在が重要である。すなわち、ヌクレオチド三リン酸からヌクレオチド一リン酸にならなければ経路が成り立たない。その他の生理的機能、たとえば parasitophorous vacuole膜の物質輸送、parasitophorous vacuole内を構成する蛋白質群の多次構造の組立など、エネルギーを必要とする反応に関与するものと考えられる。これらの研究を並行させて行くことが特異的治療薬の開発に重要であろう。

結 論

トキソプラズマに特異的に存在する NTPase のアイソザイム、NTPase-I 及び NTPase-II のキメラ酵素の作製に成功した。これらのキメラ酵素の諸性質を分子レベルで解析することにより、全てのトキソプラズマ株に増殖阻害効果のある治療薬の開発が期待される。

参考文献

- 1) Asai T, Miura S, Sibley LD, Okabayashi H, Takeuchi T: Biochemical and molecular characterization of nucleoside triphosphate hydrolase isozymes from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. J Biol Chem 270: 11391-11397, 1995
- 2) Asai T, Howe DK, Nakajima K, Nozaki T, Takeuchi T: *Neospora caninum*: Tachyzoites express a potent type-I nucleoside triphosphate hydrolase, but lack nucleoside diphosphate hydrolase activity. Exp Parasitol 90: 277-285, 1998
- 3) 竹内 勤、浅井隆志、佐貫潤一：特異酵素 (NTPase) を標的にした抗トキソプラズマ剤の開発研究、エイズと日和見感染症に関する臨床研究平成8年度報告書 p85-90
- 4) Sibley LD, Niesman IR, Asai T, Takeuchi T: *Toxoplasma gondii*: Secretion of a potent nucleoside triphosphate hydrolase into parasitophorous vacuole. Exp Parasitol 79: 301-311, 1994
- 5) Asai T, Suzuki Y: Remarkable activities of nu-

cleoside triphosphatehydrolase in the tachyzoites of both virulent and avirulent strains of *Toxoplasma gondii*. FEMS microbiology letters 72: 89-92, 1990

- 6) Nakajima-Nakano K, Makioka A, Yamashita N, Matsuo N, Asai T: Evaluation of serodiagnosis of toxoplasmosis by using the recombinant nucleoside triphosphate hydrolase isoforms expressed in *Escherichia coli*. Parasitol Int 48:215-222, 2000



Kaposi 肉腫に対する Liposomal doxorubicin の効果

菊池 嘉、立川 夏夫、安岡 彰、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

HIV 抗体陽性患者に併発する Kaposi 肉腫 (以下 KS) の頻度は欧米の報告によると、HAART (Highly Active Anti-retroviral Therapy) が導入されてからの前後でその発症頻度の減少を認めている [文献1,2]。KS の発症頻度は2つの報告によると、1990年代初頭の2.56から3.5 case/100 person-years から1996から1997年にかけて0.75から0.0 case/100 person-years に減少していると報告されている [文献1,2]。HAARTに反応するKSも少なくないことから、KS自体に対する治療を待機的にする場合が多くなっている。また、局所のみ出現したKSに対しては、外科的切除、レーザー療法、液体窒素による冷凍療法及び放射線照射が良い適応となる [文献3]。しかしながら、発育の早い場合、疼痛などの症状を伴う場合、肺、消化管などに発生した場合には免疫能の状態を考慮に入れて全身抗癌剤治療が必要となる。現在の本邦においてはKSの治療として保険適応となっている薬剤は無く、血管肉腫などの悪性腫瘍として doxorubicin (A)、bleomycin (B)、vincristine (V) からなる、いわゆるABV療法などの抗癌剤による治療が行われているのが現状である。従来の治療法の中でABV療法では治療効果は大であるが、顆粒球減少、貧血、血小板減少などの骨髄抑制や心毒性、間質性肺炎や発疹、神経麻痺やイレウスなどの副作用の発生が問題となる。副作用出現時には、Bの単剤、Vもしくはvinblastinの単剤あるいはBとV/vinblastinの併用(BV)などが施行されることが多い。これら従来の治療法に対して liposomal doxorubicin は第II相及びIII相試験において優れた治療効果と副作用発現率が低く [文献4]、また cost effectiveness の点からも欧米では全身投与剤の第一選択剤となっている [文献5]。HIV感染KS併発した日本人症例に対する同剤の治療効果と副作用出現について報告する。

研究分担者：安岡 彰、岡 慎一

研究協力者：菊池 嘉、立川夏夫

Clinical effect of liposomal doxorubicin for HIV-related Kaposi's sarcoma

Yoshimi Kikuchi¹⁾, Natsuo Tachikawa¹⁾, Akira Yasuoka¹⁾ and Shinichi Oka¹⁾

¹⁾ AIDS Clinical Center, International Medical Center of Japan

目的

HIV感染者に合併したKaposi肉腫に対する、リポソマールドキシソルピシン (liposomal doxorubicin, doxorubicin HCl liposome injection、商品名 Caelyx または Doxil) の臨床効果の判定と毒性の検討。Caelyxは主に米国や南北米大陸で使用されており、Doxilは欧州と豪州で使用されているが、商品名が異なるのみで同一製剤と考えて良い。以下の症例1の1998年中には、Doxilを用いており、99年に入ってから各症例でCaelyxを使用している。

試験薬剤の効能・性状

リポソマールドキシソルピシン (liposomal doxorubicin, doxorubicin HCl liposome injection, 商品名 Caelyx または Doxil) は、doxorubicin hydrochloride を STEALTH liposome で包んだ静脈投与製剤である。

同剤は1ml溶剤中に2mgのdoxorubicin HClが含まれている。同剤は最も内側にdoxorubicin HClが水和された形で内包されており、その外側をliposomalの二重層が取り囲んでいる。このSTEALTH liposomalは、さらにその外側にMPEG-DSPE (N-(carbonylmethoxypolyethylene glycol 2000)-1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine sodium salt) が取り囲んでいる。その他、HSPC (fully hydrogenated soy phosphatidylcholin)、コレステロール、ヒスチジン、緩衝剤などを含有しており、薬剤の90%以上がliposomalに内包されている。

同剤の作用機序は、doxorubicin HClがDNAに結合して核酸合成を阻害することに基づいている。doxorubicin HClは速やかに細胞内に取り込まれ、核周囲のクロマチンに結合し、減数分裂と核酸合成を阻害し、mutagenesisと遺伝子の変化をもたらすことが、細胞構造の検討から示唆されている。

水和されたdoxorubicin HClを内包するSTEALTH liposomeは、外側にMPEGを突き出しており、この中の一部はpegylationに関係すると見なされているが、liposomeが単核球の食作用から逃れ、血中に保たれる時間を長くしている。

STEALTH liposomeの血中半減期は約55時間である。血中で安定であり、薬剤の90%以上が血中

でliposomeに包まれたまま存在している。

同剤の平均的な直径は100 nmと小さくまた血中で長く存在しうるので、pegylationを受けた同剤は、変性し抑制された腫瘍の血管に貫通できると考えられている。この仮説はコロイド化された金粉を含んだSTEALTH liposomeの検討などから裏付けられている。STEALTH liposomeが一旦組織内に取り込まれるとdoxorubicin HClが活性化され効果を現す。

1. Pharmacokinetics [文献6]

同剤は投与後2層性の薬効動態を示し、半減期はλI層は5時間、λII層55時間であり、AUCは590 ± 58.7 μg/ml・hである。

組織内での分布では、11名のKS症例で20 mg/m²の投与後48時間での検討では、正常組織中とKS病変中での濃度は、中央値で19倍 (range: 3-53倍) 高濃度であった。

2. 投与量

HIV感染合併KSに対する投与量は、内含されるdoxorubicin量で、20 mg/m²を30分以上かけて静脈投与する。以後2から3週間隔で十分な効果が得られ、耐用できる限り投与を継続する。静脈投与に関しては、確実な血液逆流が認められ、疼痛などの自覚症状を欠く場合でも、血管外漏出の危険性がある。投与に当たっては細心の注意を払い、漏出徴候が認められた場合は別の静脈ルートに変更し、漏出部位は30分氷嚢で冷却することで、症状が軽減される。静脈投与以外は禁忌である。

3. 副作用 [文献7,8,9]

a. 心毒性

心毒性に関して高用量の使用経験が無いために蓄積毒性に関しての確立した報告はまだ無いので、従来のliposomal化されていないdoxorubicinに準ずるものと見なしている。総投与量が550 mg/m²を越えた場合は、治療に反応しない非可逆的な心筋毒性を来す場合がある。報告されているものは、左心不全(うっ血性心不全)と心筋炎がある。これらは、薬剤中止後にも出現する可能性がある。doxorubicin以外のanthracycline系薬剤やanthracenedione系薬剤の使用経験がある症例には、

doxorubicinの総投与量の検討が必要である。過去に心血管系の既往歴のある患者では、使用による利益が、不利益を上回ると考えられた場合のみ使用する。また、縦隔内への放射線治療歴のある患者では総投与量の限界を400 mg/m²とすべきである。

全体の9.6%に心臓関連の副作用が見られた。その約半数がliposomal doxorubicinによるもの、もしくはその関連性が疑われるものであり、全体の1%に心筋炎か心不全のいずれかか両方が見られ、投与が中断されている。

b. 骨髄抑制

HIV感染に合併したKS症例では、治療前のbase lineでも様々な理由で骨髄抑制を持っている場合が多く、骨髄抑制によりやむなく投与中止となることもある。同剤の臨床試験に参加した705名の患者の中で好中球減少(1000/μl未満)を来したものは49%で、1度以上500未満を記録したものは13%に上った。試験中、敗血症は5%の患者に認められているが、このうち確実にliposomal doxorubicinによるものとその可能性があるものを含めて0.7%であった。全体の1.6%が骨髄抑制のために投与中止となっている。貧血は19.4%に血小板減少症は9.2%に見られている。このように、重篤な骨髄抑制が起こる可能性があり注意が必要である。liposomal doxorubicinの投与前及び投与中には定期的な血算の施行が必須である。

c. 静脈投与に関する問題

静注に関する問題としては、全体の6.8%に、紅潮、呼吸困難、顔面浮腫、頭痛、悪寒、背部痛、胸部または咽頭部圧迫感、血圧低下などが見られた。これらのエピソードは初回投与時に見られることが多く、2回目以降に初めて見られることは稀であった。投与中止後数時間から半日程度で症状の消失が認められ、静注速度を減ずるのみで症状軽快を認める場合もあった。これらの症状は従来型のdoxorubicinでは報告が無く、liposomal doxorubicinの何らかのコンポーネントに対する反応であろうと考えられる。6例が静注での問題で投与中止となったが、多くの症例ではその後何の処置もなく投与が続けられた。

4. Palmar-Plantar Erythrodysesthesia [文献10,11]

手掌及び足底に腫張と疼痛を伴う紅斑もしくは表皮剥離を伴うPalmar-Plantar Erythrodysesthesiaと言われる皮疹が3.4%に見られた。多くは治療後6週以降で見られたが、中にはより早期から出現するものもあった。標準量より投与量が多い場合や投与間隔が短い場合に起きる傾向があったが、1ないし2週後には消退する。Palmar-Plantar Erythrodysesthesiaのために治療中止となった例は、全体の0.4%であった。

a. 妊婦への投与

動物実験では、liposomal doxorubicinは胎児死亡を通常の投与量よりも低用量で起こしており、危険性よりも有効性が期待される場合のみ投与されるべきである。また、投与中には避妊が望ましい。

b. 毒性の増強

従来のliposomal化されていないdoxorubicinは、Cyclophosphamideとの併用で出血性膀胱炎の頻度が増したり、6MPの肝毒性を増すことが報告されており、liposomal doxorubicinでも毒性を増強する可能性があり、注意を要する。放射線治療との併用でも心毒性、皮膚粘膜、肝毒性の増悪の可能性があり注意が必要である。

c. 静注部位での局所反応

確実に静注されている(血液の逆流が認められる)場合でも、疼痛の有無によらず、血管外への漏出の可能性があり、静脈投与に際して細心の注意が必要である。血管外漏出の可能性がある場合は直ちに別の静脈ルートに差し替える。万が一血管外に漏出した場合は30分間氷嚢で冷やすことにより局所反応が軽減される。

d. 肝機能障害

肝機能障害のある患者に対する投与の安全性は検討がなされていないが、liposomal doxorubicinの大部分が肝代謝されるので、投与前のルーチンの肝機能検査は必須で、肝機能障害のある患者では減量すべきである。liposomal化されていないdoxorubicinでは、総ビリルビンが1.2~3.0 mg/dlでは半量に減量し、3 mg/dl以上では4分の1に減量するので、liposomal doxorubicinでもこれに準ずる。

e. 消化器症状

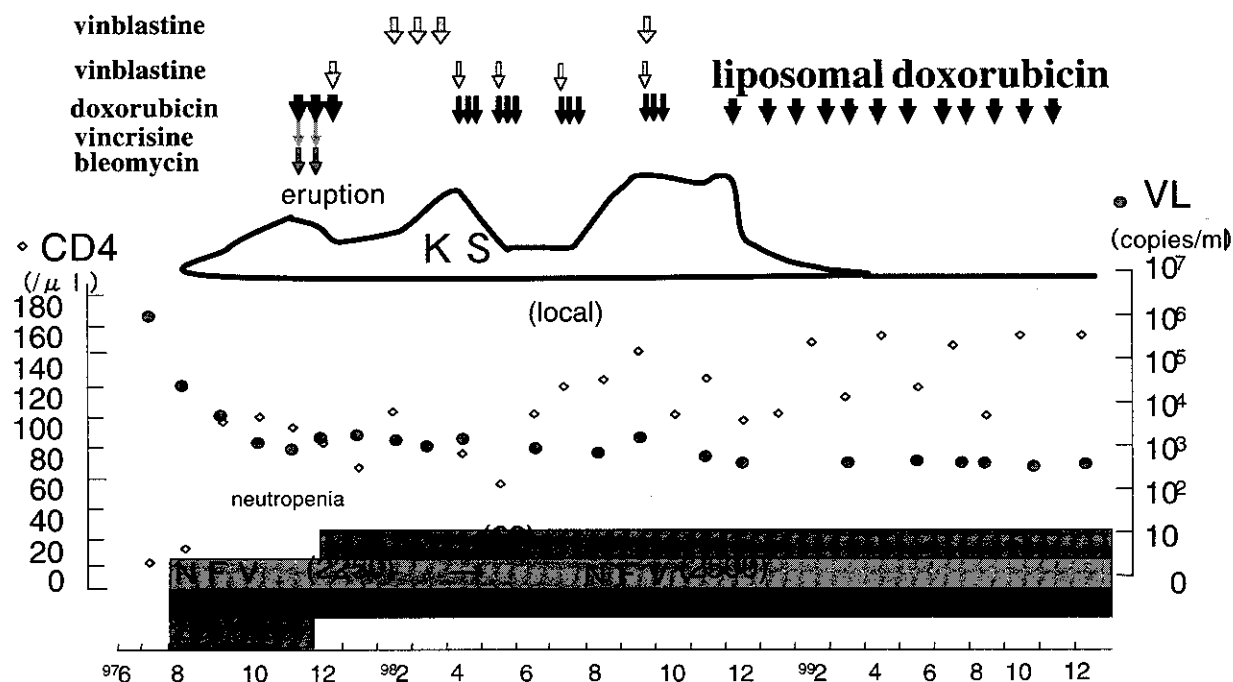
嘔気が17%、嘔吐が7.8%、下痢が7.8%、口内炎6.8%、口内カンジダ症5.5%報告されている。

症 例

1. 症例 1) (経過図1)

40歳男性。1996年10月の穿孔性虫垂炎術後の創傷治癒不全が続き、HIV抗体陽性が判明し1997年5月下旬、当センター紹介となった。受診時より舌表面にKSを認めた。その後カリニ肺炎、アメーバ赤痢に罹患。同年8月からAZT/3TC/NFVによるHAARTを開始。免疫能の回復によるKSの消退を期待したが、KSは徐々に増大し、同年9月下旬には顔面の帯状疱疹も併発。同年10月より、doxorubicin、bleomycin、vincrinsineからなるABV療法を開始。2クール目を終了後2週間後に、全身の紅斑と激しい掻痒感を伴う皮疹が出現。その後、2次感染も来すようになった。このため、bleomycin、vincrinsineの2剤を中止し、doxorubicinとvinblastinによる治療に変更した。口腔内KSの

消退と胃内のKSも消退傾向を認めたため、同年末に退院した。この間化学療法と、AZTによると思われる、貧血、白血球減少を認めたため、AZTを中止しd4Tに変更した。その後約1ヶ月間はKSの増大無く経過したが、1998年2月に入り舌の病変の増大傾向が著明となり、嚥下構音にも不都合が生じたため、vinblastinの局所注射を施行した(98年2月及び3月)。舌のKSは局所投与に反応し、消退傾向を認めたが、消化管内のKSの増悪がみられ、doxorubicinとvinblastineによる全身投与を4週間強の間隔(98年3,4,7,9月)で施行し、局所のvinblastine投与も併用(98年9月)したが、全身のKSが増大傾向と、新たに皮膚、眼球結膜にもKS病変が出現した。2年越しで輸入のための手続きをしていた、liposomal doxorubicinが98年10月に入手出来、十分な説明を行いインフォームドコンセントを文章にてとり、20mg/m²の投与を開始した。開始当初は入院にて施行したが、心配された白血球減少や貧血などは認められず、投与後10日目から2週間にかけて掻痒感を伴う皮疹が認められるだけであり、徐々に外来投与に移行した。CD4+細胞数は160/μl前後に止まっているが、ウ



ウイルス量はほぼ検出限界以下に保たれており、消化管及び舌のKS病変も癒痕を残すのみで増大傾向を認めないため、1999年8月を最後にliposomal doxorubicinの投与を中止し経過を観察している。doxorubicinとしての総投与量はliposomal doxorubicinとして投与した240 mg/m²を含んで、418 mg/m²に及んだが今のところ心毒性の出現を見ていない。

2. 症例 2)

51歳男性。98年1月に食道カンジダ症、CMV網膜炎を発症後、たびたびHAART療法を試みるが、嘔気などの消化器症状でいずれも継続できなかった。1998年11月からは抗ウイルス療法を中断していた。1999年7月にCD4が0.6/μlまで低下し、ウイルス量も1.2×10⁵まで上昇。入院管理の後、abacavir/efavirenz/RTV/IDVからなるHAART療法開始。その後右下肺に閉塞性肺炎像を伴った異常影が認められ、TBLBよりKSと診断され、9月初旬よりliposomal doxorubicin 20 mg/m²の投与を開始した。投与開始後8日目より白血球減少(WBC 1500, 顆粒球1000)が認められた。その後食道カンジダ症の悪化などもあり、継続投与が困難であったが、ほぼ4週間おきに同量を投与続けたがいずれも投与開始後10日から2週間前後に830～1230までの顆粒球減少症と高度の嘔気嘔吐が認められた。現在は投与間隔を狭め、顆粒球減少(最小で832/μl)に対してはG-CSF製剤を使用し、6クールを終了し画像上は肺のKS病変の縮小を認めている。

3. 症例 3)

1999年1月下旬に呼吸困難を主訴に当センター呼吸器科を受診し、HIV抗体陽性が判明したために紹介入院となった。入院時はカリニ肺炎が認められ、ST合剤、ペンタミジンで加療したが、その後サイトメガロ食道炎、MAC敗血症を併発した。これらの合併症コントロールをしている間に、同年6月下旬より左足底部及び下腿に有痛性の紅色の皮疹が出現した。足底の皮疹の増大傾向が著明で歩行時および安静時の疼痛も増悪したため、生検を行い、組織診でKSと確定診断した。KS確定

診断時CD455/μl, HIVウイルス量9.5×10⁵コピー/mlであった。同年7月よりliposomal doxorubicinを20 mg/m²を3ないし4週間隔で3クール施行した。また同年8月中旬よりd4T/3TC/NFVによるHAARTも開始し、その後KSの増大傾向無くliposomal doxorubicinの追加投与は行わず経過観察中である。副作用に関しては投与後の全身倦怠感を訴えたのみで耐用性は良好であり顆粒球減少などはなかった。

4. 症例 4)

1999年10月下旬カリニ肺炎で入院。入院時CD471/μl, HIVウイルス量1.8×10⁵コピー/mlであった。入院後より軽度の嘔気が続いていたため、上部消化管内視鏡を施行したところ、体中部に紅色の隆起性病変を認め組織学的にKSと確定診断した。その後頸部を中心にした腫張が急激に出現し、以前から上腕にあった皮疹の増大と、顔面、下肢に新たなKS様病変を認めた。頸部の腫張を鑑別のため、生検したところ紡錘形のKSに典型的な組織像がえられ、皮膚生検とも合致したため、KSの全身発症と診断した。同年11月下旬にliposomal doxorubicinを20 mg/m²で開始し、その後d4T/ddI/RTV/SQVからなるHAARTも開始した。4週ごとに同量のliposomal doxorubicinを計3クール投与した。頸部の腫張は急速に消退し、3クール終了後には消失している。この症例では、liposomal doxorubicin投与約1週間後から、常時ある嘔気が増悪し2週間目頃まで継続する訴えがあり、また2週後に顆粒球が760/μlまで減少したが、それ以外には大きな副作用は認めなかった。

考 察

1. liposomal doxorubicinの臨床効果

HIVに合併したKS病変に対してliposomal doxorubicin 20 mg/m²を用いたところ全例で腫瘍サイズの減少と症状の改善を認めた。特に最初の症例は既にABV療法や局所療法を行っており従来法では反応性が無くなっていた後の症例であり、従来法に難治性となった症例でも治療効果が期待できた。

2. liposomal doxorubicinの副作用

4例中2例で顆粒球1000/ μ l以下の顆粒球減少症を認め、両症例ともG-CSF製剤の投与を要した。2例に高度の嘔気嘔吐を認めたが、両症例とも元々嘔気などの消化器症状が強く見られており、liposomal doxorubicin投与を終了したあとも症例4では嘔気が継続している。その他の報告されている副作用はこれら4症例には認められず、心毒性に関してもanthracycline系抗癌剤としての総投与量が400 mg/m²を越えている症例1でも投与終了後6ヶ月近く経過しているが心毒性の発現を見ない。そのほか肝機能障害などもこれらの4症例では認められなかった。

結 論

HIV感染に合併したKSに対して、従来法(ABV)による治療に難治であった1症例を含む計4症例において、liposomal doxorubicinは腫瘍サイズの減少と自覚症状の著明な改善をもたらした。4例中2例に治療経過中、顆粒球1000/ μ l未満の顆粒球減少を認めたが、いずれもG-CSF製剤の使用により改善し、このために次回治療の遅延には至らなかった。総じて副作用も軽微であり、従来法に比して効果は絶大であり、今後本邦においても同剤の早期保険収載が望まれる。

参考文献

- Jacobson LP, Yamashita TE, Detels R, Margolick JB, Chmiel JS, Kingsley LA, Melnick S, Munoz A. Impact of potent antiretroviral therapy on the incidence of Kaposi's sarcoma and non-Hodgkin's lymphomas among HIV-1-infected individuals. Multicenter AIDS Cohort Study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999 Aug 1; 21 Suppl 1:S34-41
- Buchbinder SP, Holmberg SD, Scheer S, Colfax G, O'Malley P, Vittinghoff E. Combination antiretroviral therapy and incidence of AIDS-related malignancies. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999 Aug 1; 21 Suppl 1:S23-6
- Nasti G, Errante D, Santarossa S, Vaccher E, Tirelli U. A risk and benefit assessment of treatment for AIDS-related Kaposi's sarcoma. *Drug Saf* 1999 May; 20(5):403-25
- Goebel FD, Jablonowski H. Therapy of special HIV-associated diseases: HCV-HIV-co-infection and AIDS-related Kaposi's sarcoma-official satellite to the 7th European Conference on Clinical Aspects and Treatment of HIV-infection, October 23, 1999 in Lisbon, Portugal. *Eur J Med Res* 1999 Dec 16; 4(12):507-13
- Hjortsberg C, Persson U, Lidbrink E, Bennett C. Cost-effectiveness analysis of pegylated-liposomal doxorubicin and liposomal daunorubicin treatments in patients with Kaposi's sarcoma. *Acta Oncol* 1999; 38(8):1063-7
- Rahman A, Carmichael D, Harris M, Roh JK. Comparative pharmacokinetics of free doxorubicin and doxorubicin entrapped in cardiolipin liposomes. *Cancer Res* 1986 May; 46(5):2295-9
- Presant CA, Scolaro M, Kennedy P, Blayney DW, Flanagan B, Lisak J, Presant J. Liposomal daunorubicin treatment of HIV-associated Kaposi's sarcoma. *Lancet* 1993 May 15; 341(8855):1242-3
- Simpson JK, Miller RF, Spittle MF. Liposomal doxorubicin for treatment of AIDS-related Kaposi's sarcoma. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 1993; 5(6):372-4
- Newell M, Milliken S, Goldstein D, Lewis C, Boyle M, Dolan G, Ryan S, Cooper DA. A phase II study of liposomal doxorubicin in the treatment of HIV-related Kaposi's sarcoma. *Aust N Z J Med* 1998 Dec; 28(6):777-83
- Uziely B, Jeffers S, Isacson R, Kutsch K, Wei-Tsao D, Yehoshua Z, Libson E, Muggia FM, Gabizon A. Liposomal doxorubicin: antitumor activity and unique toxicities during two complementary phase I studies. *J Clin Oncol* 1995 Jul; 13(7):1777-85
- Coukell AJ, Spencer CM. Polyethylene glycol-liposomal doxorubicin. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy in the management of AIDS-related Kaposi's sarcoma. *Drugs* 1997 Mar; 53(3):520-38



クリプトコッカス症に対する NKT細胞活性化による免疫療法の可能性

川上 和義、金城 雄樹、屋良さとみ、高口 信、斎藤 厚

琉球大学医学部 第一内科

研究要旨

近年、NK細胞とT細胞の両方の特長を合わせ持つNKT細胞が第4のリンパ球として注目を集めている。その機能については、腫瘍免疫の領域で解析が進められているものの未だ不明な部分が多い。最近その認識抗原として糖脂質である α -galactosyl ceramide (α -GalCer)が発見され、実験的メラノーマ担癌モデルに投与することで顕著な治療効果を有することが報告されている。これは樹状細胞依存的にNKT細胞を活性化することによることが明らかにされている。本研究では、NKT細胞の活性化剤である α -GalCerのクリプトコッカス感染における治療効果の有無について検討し、全身感染動物モデルにおいて明かな防御効果のあることを明らかにした。この効果はCD4KOマウスでも認められ、CD4陽性T細胞を欠いた状態でも有効であった。以上の結果より、エイズに合併する日和見感染症に対する新たな免疫療法として α -GalCerが有用であ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、金城雄樹、屋良さとみ、高口善信

A putative immunotherapy with NKT cells against intractable cryptococcosis

Kazuyoshi Kawakami, Yuki Kinjo, Satomi Yara, Yoshinobu Koguchi and Atsushi Saito

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

目 的

真菌はエイズ患者に最も高頻度に合併する日和見病原微生物とされている。その中でクリプトコッカス症は、高頻度に中枢神経系など全身に播種性感染を起こし、また抗真菌剤による化学療法に抵抗性を示ししばしば治療に難渋することからエイズ患者においては重要な合併真菌感染症のひとつである。

Cryptococcus neoformans 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。特に CD4 陽性 T 細胞が重要であり、エイズ患者に合併しやすいことから容易に想像できる。動物実験では、抗体を用いて CD4 陽性 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¹⁻³⁾。

近年、T 細胞受容体と NK 細胞受容体の両方を合わせ持つ NKT 細胞が T 細胞、B 細胞、NK 細胞に次ぐ第 4 のリンパ球として注目を集めている⁴⁾。その機能については、腫瘍免疫の領域で解析が進められているものの未だ不明な部分が多い。最近その認識抗原として糖脂質である α -galactosyl ceramide (α -GalCer) が発見され⁵⁾、実験的メラノーママウスモデルに投与することで顕著な治療効果を有することが報告されている⁶⁾。これは樹状細胞依存的に NKT 細胞を活性化することによることも明らかにされている。

本研究では、クリプトコッカス感染防御における NKT 細胞の役割を解析するために、動物感染モデルに α -GalCer を投与しその感染経過及びサイトカイン産生能を含めた宿主反応に及ぼす影響について検討した。また、CD4 陽性 T 細胞数が極度に低下するエイズの特異性を考慮して、CD4 遺伝子を欠損し CD4 陽性 T 細胞を欠除している CD4KO マウスにおいても検討を行った。

方 法

1. マウス

7~15 週齢雄の C57Bl/6 マウス (SLC Japan、浜松) を用いた。実験によっては、CD4 遺伝子欠損 (CD4KO) マウス (Jackson Laboratory、米国より入手) も用いた。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. *C. neoformans*:

長崎大学第二内科で樹立された *C. neoformans* 臨床分離株 YC-13 (河野 茂教授より供与) を使用した。YC-13 は肺感染後速やかに排除され、中枢神経系への播種性感染はほとんど認められない。

3. マウスクリプトコッカス感染モデルの作成

眼窩静脈よりクリプトコッカス (1×10^6 CFU) を接種しマウスクリプトコッカス感染モデルを作成した。このモデルでは、感染後から経時的な真菌の排除がみられた。

4. α -galactosylceramide

α -galactosylceramide [α -GalCer: キリンビール株式会社 (東京) より供与] 2 μ g を感染直後、3 日、7 日、14 日後に腹腔内に投与した。コントロールとして 0.02% polysorbate-20 200 μ l を同様に投与した。

5. 肺及び脾臓内生菌数の測定

クリプトコッカス感染後経時的に肺及び脾臓を摘出、ホモジナイズの後蒸留水で適当に希釈してその 100 μ l を PDA 培地に接種し 2~3 日後コロニー数を調べ希釈倍率を乗じて各臓器内の生菌数とした。

6. 血清サイトカイン濃度の測定:

血清中の IFN- γ (Endogen 社、米国)、IL-12p40 (Genzyme 社、米国)、TNF- α 、IL-4 (Endogen 社) 及び IL-13 (R&D 社、米国) は ELISA キットを用いて測定した。

7. 脾細胞サイトカイン産生能の解析:

クリプトコッカス感染後経時的に分離精製した脾細胞 (2×10^6 /ml) を 10% FCS 加 RPMI1640 培地中で種々の濃度のクリプトコッカスと 48 時間共培養した後その上清を採取し、各種 ELISA キットを用いてサイトカイン濃度を測定した。

8. フローサイトメトリー解析:

脾細胞をFITC標識抗マウスCD3、CD4、I-A^b抗体及びPE標識抗マウスB220、CD8、NK1.1、CD11c抗体(Pharmingen社、米国)で染色後、EPICS-XL(Coulter社、米国)を用いて各表面抗原の発現率を解析した。また、各細胞集団の実数については全脾細胞数にそれぞれの割合を乗じて算出した。ヒトNKT細胞を検出するために、末梢血単核球(PBMC)をFITC標識抗ヒトCD3抗体及びPE標識Vβ11又はCD56抗体にて染色後同様に解析した。

9. 統計学的解析:

統計学的解析はStatview II softwareを用いて行った。群間の比較にはFischer PLSD testを用いp<0.05を有意差ありとした。

成 果

1. ヒト末梢血におけるNKT細胞の検出

ヒト末梢血中に存在するNKT細胞を検出するために、健常人から得たPBMCをFITC標識抗CD3抗体及びPE標識抗Vβ11又はCD56抗体で標識後フローサイトメトリー解析した(図1)。健常人3人(男性2人、女性1人:年齢29.0±4.4歳)から得た

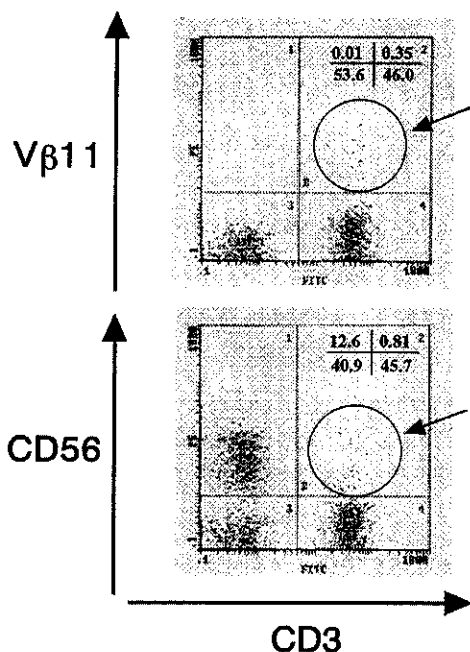


図1 ヒト末梢血NKT細胞

PBMCでは、CD3+CD56+細胞3.0±2.7%、CD3+Vβ11+細胞0.27±0.12%であった。

2. クリプトコッカス感染へのα-GalCerの影響

クリプトコッカス感染マウスにα-GalCer又はvehicleを投与し7日、14日後の肺及び脾臓内生菌数を調べた。図2に示すように、α-GalCer投与群ではコントロール群に比べて両臓器において有意な真菌数の減少が観察された。

3. 血清サイトカインの解析:

α-GalCer投与による宿主免疫反応への影響を調べるために、クリプトコッカス感染後の血清サイトカイン濃度を経時的に測定した。vehicleを投与した感染マウスでは7日後に一過性の少量のIFN-γ産生が検出されたが、3日及び14日後では全く検出されなかった。一方、感染マウスにα-GalCerを投与すると3日後から明かなIFN-γの産生がみられ、7日後にピークに達した後、14日後にはほとんど検出されなくなった(図3)。また、感染後7日目での検討では、α-GalCerの効果はクリプトコッカス感染マウスのみ認められ、非感染マウスではα-GalCerを投与しても血清中のIFN-γ産生は全く検出されなかった。

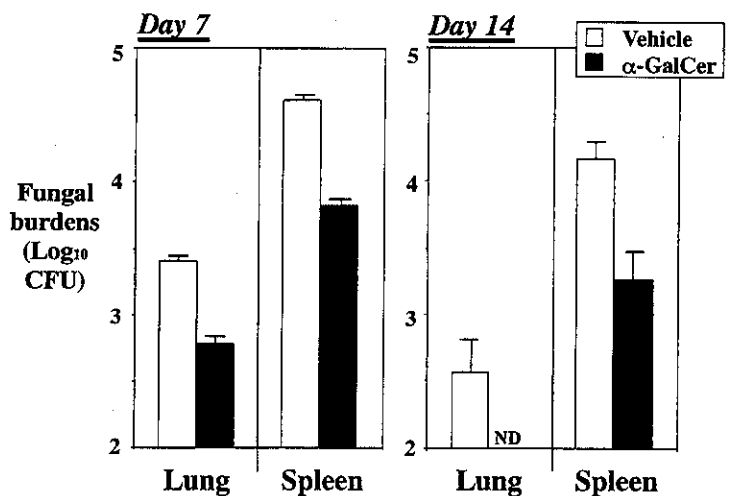


図2 α-GalCerの感染防御効果