

皮疹などがみられ2例がHAARTを中断している(表2)。

HAARTの治療効果は、HAARTを継続できた6例では非常に良好であり、CD4陽性Tリンパ球数は平均122/ μ lから393/ μ lに増加し、血漿中HIV RNA量は4例が検出限界50/ μ l未満となった(表3)。結核の予後については7例が治癒し、2例は現在も治療中であるが経過良好である。2例が結核は治癒したが、肺癌、くも膜下出血で死亡した。

考 察

結核発病を契機にHIV感染症と診断された症例はAIDS発症であり、当然HAARTを開始すべきである。特に、粟粒結核などで発病した場合、CD4陽性Tリンパ球数が50/ μ l以下の著しく免疫能が低下した症例が多いので、他の日和見感染症の合併率も高い。病状の改善のためにも免疫能の早期回復が望まれ、HAARTをできるだけ早期に開始することが患者にとって必要と考えられる。しかしながら、以下のような点から直ちに開始するのは困難な症例が多い。

結核の重症例では、栄養状態が不良で体力の低下が著しく、抗結核薬の内服も十分できない症例が多い。この場合、抗結核薬と抗HIV薬と同時に内服するのは不可能である。致死感染である結核の治療を優先しなければならない。

HIV感染者では抗結核薬による副反応がしばしば起こる。サンフランシスコでは結核治療を中断しなければならない副反応が125例の患者のうち18%に起こった³⁾。13例に皮疹、6例に肝炎を認めた。これらは主にRFPとpyrazinamideによるものであった。同様に、ザンビアでは、thiacetazoneを含まない治療を受けた65例のHIV感染小児のうち7例(11%)に8週以内に皮疹が認められた⁴⁾。致死的なStevens-Johnson症候群を2例に認めた。この傾向は抗結核薬に特有のものではなく、一般にHIV感染者では薬剤の副反応が起こりやすい。ボストンの684例のHIV感染者では抗結核薬以外の薬剤による皮疹を125例(18.3%)に認めた⁵⁾。これらの副反応はHIV感染症が進行するほど高率に出現する。

皮膚に見られる副反応に加え、最近のフロリダ

からの報告では、HIV感染症では抗結核薬による肝炎を生じやすくなるという⁶⁾。この報告によるとHIV感染症では肝酵素の変動が4倍生じやすくなり、C型肝炎では5倍、HIVとC型肝炎ウイルスの合併では14倍に高まる。

このように薬剤による副反応を生じやすいHIV感染者が、抗結核薬と抗HIV薬を同時に内服するのは非常に負担が大きい。他の日和見感染症を合併していればさらに治療薬を投与しなければならず、薬剤の副反応が生じる可能性は高まる。一度副反応が起こると、多数の薬剤を内服しているため、どの薬剤によるものかの判断が困難となり、すべての治療薬を中止せざるを得ない状況にもなる。

抗HIV薬であるPIと非核酸系逆転写酵素阻害薬は、RFPとの併用は禁忌とされていた。RFPは肝臓のP-450 cytochrome oxidasesを強力に誘導し薬剤の代謝を亢進させ、その血中濃度を著しく低下させるからである。結核の治療中に上記2系統の薬剤を開始する場合は、RFPを同じリファマイシン誘導体であるrifabutin〔本邦では承認されておらず、エイズ治療薬研究班(東京医大臨床病理科)より譲り受ける〕に変更する⁷⁾。RifabutinはRFPに比較し、P-450の誘導が弱いからである。この場合用いることができるPIはIDVとNFVのいずれかであり、非核酸系逆転写酵素阻害薬はnevirapine、EFVである。RFPをrifabutinに変更して2週間のwash out期間をおいてから開始する。核酸系逆転写酵素阻害薬はリファマイシン系薬剤との相互作用はほとんどないのでRFPと併用してよい。Rifabutinの取り寄せには手続きが必要であり、治療を継続した場合毎月取り寄せなければならず、この点もHAARTの早期開始に影響があったと考えられる。

しかし、2000年3月、CDCはRFPとritonavir、ritonavir + saquinavir、EFVとの併用を可能としたため選択肢が増えた⁸⁾。そこで、最近ではPIを用いずEFVを用いたHAARTで治療を開始している。しかしながら、抗HIV薬の血中濃度の測定は必要と思われる。

最近HIV感染症合併結核に対してPIを含む強力な抗HIV療法を行った場合、約2週間後に一過性に発熱や胸部X線写真の悪化を認めるという報告がある²⁾。これは抗HIV薬の投与によりCD4陽性

Tリンパ球の機能が回復し、一時的に結核菌に対する生体側の反応が高まるためといわれている。

以上のような理由、すなわち、結核患者は全身状態不良であることが多い、抗結核薬の副反応が起こりやすい、RFPとPIとの併用困難、paradoxical worseningの存在などから、抗結核薬と抗HIV薬を同時に開始するのはすすめられていない。

当院の9症例においても、重症の粟粒結核が多い、全身状態が不良である、抗結核薬の副反応が多い、合併症が多いという理由から、早期のHAARTの開始は困難な状況であった。とくに、抗結核薬の副反応を高頻度に認めた。HAART開始後は、HAARTによる副反応を5例に認め2例はHAARTが中断され、抗結核薬と抗HIV薬の併用は患者には大きな負担であると考えられた。HAARTの治療効果は、HAARTを継続できた6例では非常に良好であり、CD4陽性Tリンパ球数の増加、ウイルス量の低下を認め、HAARTは病状の安定に寄与したと考えられた。paradoxical worseningが認められなかったのは、HAARTの開始時期が結核の治療開始4カ月後と結核の治療がある程度進んだ時期であったためと思われる。結核治療中のHAARTの開始時期は、結核の治療が落ち着いた3～4カ月以後が適当と思われる。

結核の治療中ではHAART開始後の副反応も高率であるので、可能であれば結核の治療終了後にHAARTを開始した方がよいとも思われた。しかし、HAART開始時期は症例毎に判断すべきであり、さらに症例の積み重ねが必要であると考えられた。

文 献

- 1) Department of Health and Human Services: Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-infected adults and adolescents. Feb.5.2001
- 2) Narita M, Ashkin D, Hollender ES, et al: Paradoxical worsening of tuberculosis following antiretroviral therapy in patients with AIDS. *Am J Respir Crit Care Med* 158:157-161,1998
- 3) Small PM, Schechter GF, Goodman PC, Sande MA, Chaisson RE, Hopewell PC. Treatment of tuberculosis in patients with advanced human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 324:289-294, 1991
- 4) Luo C, Chintu C, Bhat G, et al: Human immunodeficiency virus type-1 infection in Zambian children with tuberculosis: changing seroprevalance and evaluation of a thiacetazone-free regimen. *Tuberc Lung Dis* 75:110-115, 1994
- 5) Coopman SA, Johnson RA, Platt R, Steven RS. Cutaneous disease and drug reactions in HIV infection. *N Engl J Med* 328:1670-1674, 1993
- 6) Ungo JR, Jones D, Ashkin D, et al: Antituberculosis drug-induced hepatotoxicity. The role of hepatitis C virus and the human immunodeficiency virus. *Am J Respir Crit Care Med* 157:1871-1876, 1998
- 7) Centers for Disease Control and Prevention: Prevention and treatment of tuberculosis among patients infected with human immunodeficiency virus: Principles of therapy and revised recommendations. *MMWR* 47(RR-20):1-51,1998
- 8) Centers for Disease Control and Prevention: Updated guidelines for the use of rifabutin or rifampin for the treatment and prevention of tuberculosis among HIV-infected patients taking protease inhibitors or nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors. *MMWR* 49:185-189,2000



HIV/結核重感染の病巣部におけるウイルス 産生制御

中田 光¹⁾、本田 芳裕²⁾、橋本みちえ¹⁾、M. Weiden³⁾、永井 英明⁴⁾、
蛇澤 晶⁴⁾、倉島 篤行⁴⁾、藤田 明⁵⁾、慶長 直人¹⁾、森 亨⁶⁾

- 1) 国際医療センター研究所呼吸器疾患研究部
- 2) 仙台厚生病院内科
- 3) ニューヨーク大学医学部呼吸器内科
- 4) 国療東京病院
- 5) 都立府中病院
- 6) 結核予防会結核研究所

研究要旨

後天性免疫不全症候群(AIDS)に合併する結核はアジア、アフリカを中心に増加傾向にあり、現在、患者数は140万人(全結核の14%)と推定されている。HIV感染者における日和見感染症の合併はエイズの発症を惹起し、その予後を著しく不良にすることが知られている。これは、炎症によりHIV感染細胞からのウイルス産生が亢進することが一因と考えられている。さらに、その機序として、炎症に伴い誘導される転写促進因子がHIV-LTRに結合し、プロウイルスの転写が促進する機構が知られている。HIV陽性結核患者の肺病巣部から回収された肺胞洗浄液中では、非病巣部に比べてウイルス量が著しく増加している。*in vitro*においてもマクロファージ腫瘍細胞株(未熟な細胞株)にHIVを感染させ、結核菌で刺激するとHIV産生の増強がみられる。この機序としてNF- κ Bを介したHIV-LTRの up-regulation が主であり、一部NF-IL6(C/EBP β)である。C/EBP β は、単一の mRNA から DNA activating domain を持つものと、DNA activating domain を欠く short form が導かれる。我々は成熟マクロファージに結核菌を感染させることにより、16Kdの dominant negative form が誘導されることを見出し、HIV-LTRの negative regulatory element(NRE) に特異的に結合し、転写が抑制されることを確認した。さらに、HIV感染者の肺洗浄液を用いた検討で健常肺中の細胞と組織ではC/EBP β が発現しているが、結核病巣では発現がみられず、HIV産生が亢進していることを確認した。以上のことから通常、肺のマクロファージに発現しているC/EBP β short form (16 kDa) がHIV-LTRの negative regulatory element (NRE) に結合し、HIV-1の転写を抑制しているが、結核による炎症によりこの抑制が解除される結果、HIV-1産生が亢進するという機序が想定される。

目 的

HIV/結核重感染の病巣部におけるウイルス産生調節機構を明らかにすることにより、結核合併した患者の AIDS の進行を制御する方法を提案することが本研究の目的である。

方 法

単球由来マクロファージ：健常者ヒト単球はヘパリン血 50ml より Ficoll Hypaque 比重遠心法により単核球を分離し、プラスチックプレート付着法により分離後、 $1 \times 10^5 / \text{ml}$ の密度で 24 穴プレートまたは 96 穴プレートに撒いた。単球は M-CSF1000 U/ml の存在下で RPMI / 10% FCS 中で 7 日間培養し、HIV-BaL (macrophage tropic virus) を 1 ng/ml 2 時間感染させた後、培地を交換し、さらに 7 日間培養した後、H37Rv を MOI 0.1-1.0 で感染させた。Stable LTR Reporter Construct: HIV-LTR が安定的に integrate されている THP-1 細胞である BF24 及び pHIV-CAT-LTR reporter construct は AIDS Reference Reagent Program から入手した。CAT 活性は ELISA 法により luciferase 活性は Boehringer 社のキットを用いて測定した。

細胞と核の抽出：細胞の抽出は PBS / 1% NP40 / 0.5% deoxycholate / 30 $\mu\text{l/ml}$ aprotinin / 1 mM Na orthovanadate に 30 分暴露し、21 ゲージの注射針を通すことにより行った。核は NP40 により分離し、高塩濃度で核内物質を抽出した。

Immunoblotting：100 μg の蛋白を 10-20% のグラデーションアクリルアミドゲルで電気泳動した後、蛋白はナイロン膜に転写し、ウサギポリクローナル抗 C/EBP β 抗体 (Santa Cruz Biotechnology

社) と HPR 抗ウサギ抗体を用いてイムノプロットした。

Electromobility gel shift assay (EMSA): DNA プロブは Klenow DNA polymerase を用いて [$\alpha^{32}\text{P}$ dCTP] で以下の ISRE に対応する oligonucleotide をラベルした。

5'CTCGGGAAAGGGAAACCGAAACTGAAGCC3', nonspecific な competitor として以下のプロブも合成した。5'CTCTCTGCAAGGGTCATCAGTAC3', 10^5 cpm のラベルされた DNA を 10 μg の蛋白抽出液、poly dI/dC 2.5 μg gel mobility shift buffer に加え、1 μg の抗体を反応させた。DNA / 蛋白複合体は 6% ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、オートラジオグラフィにて解析した。一部は densitometer でバンドの強度を測定した。

免疫組織化学染色：以下の抗体を用いた。anti NF- κB monoclonal antibody (Santa Cruz, F-6, 12H11), anti C/EBP β polyclonal antibody (Santa Cruz, Sc-150)。検体は HIV/結核剖検例 2 例の肺及びリンパ節、2 例の生検リンパ節を用い、2 次抗体としてシンプルステイン PO Max (ニチレイ製) を用いた。

結 果

1. 抗酸菌の重感染によるマクロファージからの HIV-1 産生の変化

これまでの研究から抗酸菌感染の炎症部において HIV-1 を産生している細胞は主としてマクロファージであることが確認されている。そこで、我々は、マクロファージの *in vitro* における HIV-1 と結核の重感染がウイルス産生に及ぼす影響を培養マクロファージを用いて検討した。

分担研究者：森 亨

研究協力者：中田 光、本田芳裕、橋本みちえ、M. Weiden、永井英明、蛇澤 晶、倉島篤行、藤田 明、慶長直人

TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF HIV-1 IN MACROPHAGES CO-INFECTED WITH *M. TUBERCULOSIS*

Koh Nakata¹⁾, Yoshihiro Honda²⁾, Michie Hashimoto¹⁾, Michael Weiden³⁾, Hideaki Nagai⁴⁾, Akira Hebisawa⁴⁾, Akira Fujita⁵⁾, Naoto Keicho¹⁾ and Tohru Mori⁶⁾

¹⁾ Department of Respiratory Diseases, Research Institute, International Medical Center of Japan, ²⁾ Department of Medicine, Sendai Kosei Hospital, ³⁾ Division of Pulmonary & Critical Care Medicine and Bellevue Chest Service, NYU Medical Center, ⁴⁾ Department of Pulmonary Diseases, National Tokyo Hospital, ⁵⁾ Department of Pulmonary Diseases, Metropolitan Fuchu Hospital and ⁶⁾ Research Institute of Tuberculosis, JATA

マクロファージ腫瘍細胞株であるTHP-1にHIV-1と *M. tuberculosis* H37Ra を重感染させると、菌量依存的にウイルスの産生亢進がおこる。このことは、HIV-1のプロモーター遺伝子LTRの下流に chloramphenicol acetyltransferase (CAT) reporter gene 結合させたプラスミドを transfect したTHP-1細胞においても確認された。

一方、THP-1にマクロファージの分化を誘導する作用が知られている化合物 phorbol myristate acetate (PMA) を添加し、付着性のマクロファージに分化させた後に重感染させると逆に菌量依存的にHIV-1産生を抑制することがわかった。次に単球由来マクロファージに重感染させると、PMA刺激THP-1と同様に菌量依存的にウイルス産生を抑制した(図1)。この傾向は感染後、4日-10日の間で変わりなく、また結核菌 H37Rv 株, BCG, *M. smegmatis* においても同程度に抑制されたが、H37Raの死菌では効果が弱く、結核菌の膜成分である Lipoarabinomannan では全く効果がなかった。前述の HIV-1 LTR CAT THP-1 を PMA で刺激して分化させた場合でも、MOI 1.0で33%の MOI 10では66%のCAT活性の抑制が見られた。

2. C/EBP 結合部位と転写抑制の関係

HIV-1 LTRのNegative regulatory element (NRE) が転写抑制に関与していることが知られている。

HIV-1 LTR にはC/EBP β 結合部位が3カ所あるが、それぞれに変異を加えた HIV-1 LTR luciferase construct と wild type の construct を transfect したTHP-1細胞を用いてPMAと結核菌による刺激実験を行った。wild type のTHP-1ではreporterの発現が24時間後に刺激前の14倍になり、その後抑制されて48時間後にピークの50%となった。一方、C/EBP変異のTHP-1では刺激後の活性が弱いが48時間後の抑制が見られなかった。つまり、PMAで分化したマクロファージの重感染によるHIV産生抑制にはC/EBP β が関与していることが示唆された。

3. 単球由来マクロファージ、分化したTHP-1細胞、肺泡マクロファージに発現している16kDaのC/EBP β isoform

C/EBP β はC/EBP family に属する転写因子であり、多くのサイトカインのプロモーター結合し炎症反応の発現に重要な役割を果たしている。inhibitory 及び stimulatory form のC/EBP β は単一のmRNAより作られており、stimulatory formは37Kdと33Kdからなっている。ribosome translation を最初あるいは2番目のAUGから開始することによって stimulatory forms が作られ、これらはDNA binding domain, dimerization domain および transcriptional activating domain をもつ。16Kdの

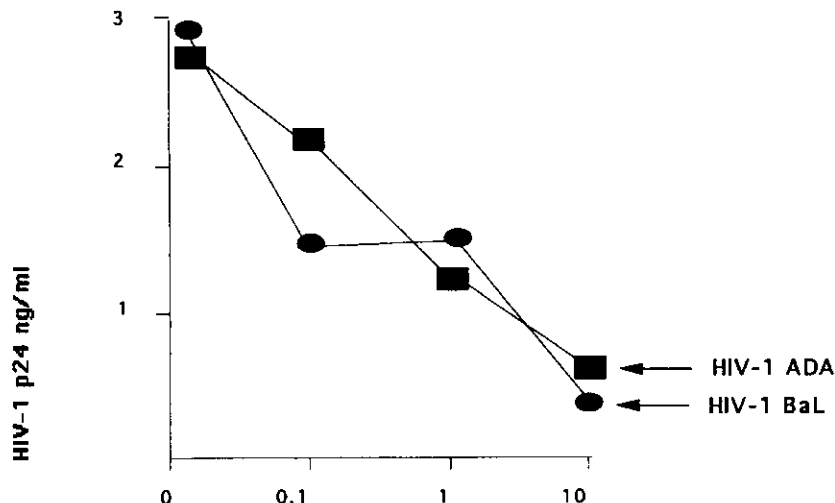


図1 THP-1由来マクロファージ(マクロファージの分化を誘導するPMAを添加し、付着性のマクロファージに分化させたもの)にHIV-1と結核菌を重感染させると菌量依存的にHIV-1産生を抑制することがわかった。

inhibitory form は ribosome が3番目の AUG より translation を開始することによってもたらされ、DNA binding domain と dimerization domain のみを持ち、dominant negative transcription factor として作用する。

C/EBP β はマクロファージに発現しており、HIV-1 LTR を亢進と抑制の両方の作用があることが知られているが、この転写因子が結核菌の刺激下でどのような働きを持つか明らかにするために、抗 C/EBP β 抗体を用いた細胞抽出液の immunoblot を行なった。単球を M-CSF の存在下で培養すると、16kDa の C/EBP β isoform が発現するが、結核菌で刺激するとこの発現はさらに増強される。また、THP-1細胞を PMA で刺激すると 16kDa の C/EBP β isoform が細胞核に発現してくるのに12日間もかかるが、この系に結核菌の刺激をさらに

加えると、早くも48時間後に16kDaの isoform が発現してくる。これに対して結核菌だけの刺激では16kDaの isoform は発現してこない。健常者の肺胞マクロファージに発現しているのは結核菌と PMA で刺激した THP-1 の C/EBP β isoform pattern に非常によく似ており、16kDa の C/EBP β isoform が発現している (図2)。胸部 X 線上結核非感染肺からの気管支肺胞洗浄液細胞に発現している isoform も全く同様なパターンである。ところが、結核感染肺からの細胞では全ての C/EBP β isoform の発現が非常に弱くなっている (図3)。このことは、HIV 合併結核でも非合併結核でも傾向は変わらなかった。また、気管支肺胞洗浄液細胞を付着性と非付着性細胞に分けて発現を観ると、付着性細胞にほとんどの発現があったことから、C/EBP β は肺胞マクロファージ由来と考えられた。

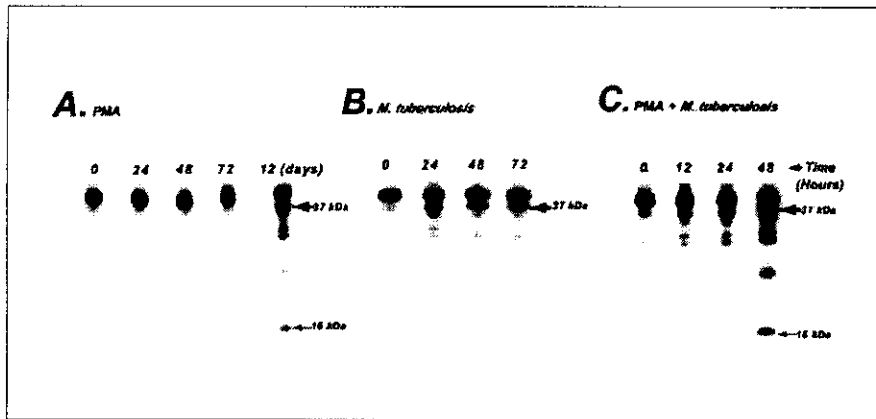


図2 また、THP-1細胞をPMAで刺激すると16kDaのC/EBP β isoformが細胞核に発現してくるのに12日間もかかるが、*M.tuberculosis*の刺激をさらに加えると、早くも48時間後に16kDaの isoform が発現してくる。これに対して *M.tuberculosis* だけの刺激では16kDaの isoform は発現してこない

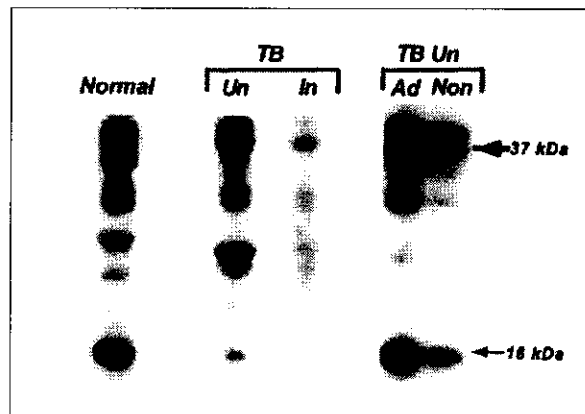


図3 肺胞マクロファージに発現している C/EBP β isoform pattern。健常者と胸部 X 線上結核非感染肺 (UN) からの肺胞マクロファージには16kDaの C/EBP β isoform が発現している。ところが、結核感染肺 (IN) からの細胞では全ての C/EBP β isoform の発現が非常に弱くなっている。

以上のことから、結核非病巣部のBAL細胞に発現しているC/EBPβ short form (16 kDa)がHIV-LTRのnegative regulatory element (NRE)に結合し、HIV-1の転写を抑制するという機序が想定されるが、このことを証明するために、結核病巣部と非病巣部の細胞から蛋白を抽出し、NRE特異的なoligonucleotideプローブを用いてElectromobility shift assay (EMSA)をおこなった。結核病巣部の細胞では、NREと蛋白の明らかな複合体の形成は認められなかったが、結核非病巣部の細胞では、明らかな複合体の形成を示すバンドを認め、このバンドはC/EBPβ特異的な抗体の添加でsuper shiftしたことから、NREと複合体を形成している蛋白は確かにC/EBPβであることが証明された(図4)。以

上のことから、結核病巣部では、C/EBPβによる抑制が何らかの機序により解除されており、そのためにHIV産生が亢進していることが予測された。

4. 剖検及び生検組織中の転写因子の発現

剖検肺及びリンパ節の結核病巣は、本邦で行われた7例中5例が粟粒結核型で、かつ全例に縦膈リンパ節結核があった。粟粒結核結節の転写因子発現は、NF-κBが減弱し、C/EBPβは発現していなかった。これに対し、HIV陰性の結核病巣部ではNF-κBが非常に強く発現し、C/EBPβが発現していなかった。健常肺およびHIV合併結核の非病巣部ではNF-κBが弱く発現し、C/EBPβは肺泡マクロファージの核に強く発現していた(図5)。

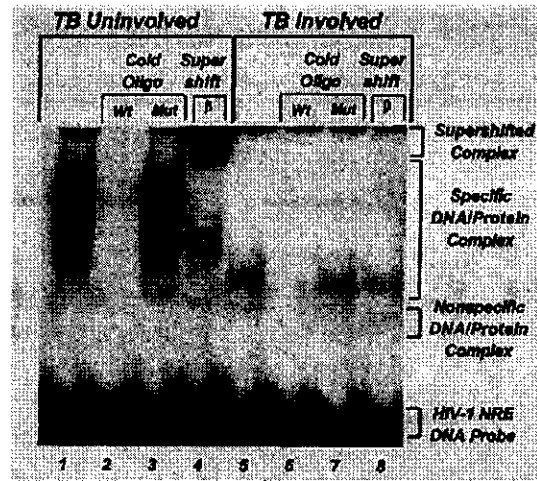


図4 結核病巣部と非病巣部の細胞から蛋白を抽出し、NRE特異的なoligonucleotideプローブを用いたElectromobility shift assay (EMSA)。結核病巣部の細胞では、NREと蛋白の明らかな複合体の形成は認められなかったが、結核非病巣部の細胞では、明らかな複合体の形成を示すバンドを認め、このバンドはC/EBPβ特異的な抗体の添加でsuper shiftしたことから、NREと複合体を形成している蛋白は確かにC/EBPβであることが証明された。

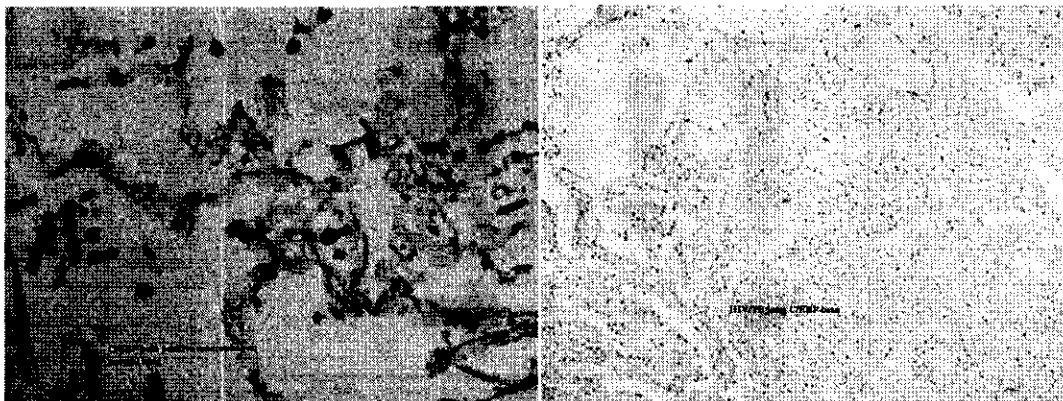


図5 左：健常肺のC/EBPβの発現。肺泡マクロファージの核に発現。
右：HIV/結核の粟粒結節には発現が見られない。

考 察

HIV-1感染したマクロファージのウイルス産生を促進する因子としてこれまでの報告では、NF- κ Bが最も重要であると考えられている。マクロファージ細胞株であるTHP-1の結核菌とHIV-1の重感染においてもNF- κ BがHIV-LTRに優位に働く転写因子であることが、明らかにされている。しかし、この促進はマクロファージの分化状態に左右され、THP-1細胞がPMAの刺激により付着性の細胞になると、逆に結核菌重感染により転写が抑制されることが今回の研究により明らかとなった。

また、マクロファージのHIV-1産生を抑制するウイルス側の因子としてLTR上のNRE、対応する細胞側の因子としてC/EBP β が知られていたが、今回結核菌による*in vitro*でのウイルス産生抑制の機序として両者が働いていることが支持された。C/EBP β はマクロファージに特異的に発現されるが、このことは、マクロファージに感染したHIVが潜伏感染となりやすく、それゆえHIVのreservoirとしての役割を持つと考えられていることにも合致する。

重感染について、最も大きな問題点は、*vivo*と*in vitro*の乖離であろう。すなわち、すでに我々は重感染の結核病巣部から得た気管支肺胞洗浄液中のウイルス量は非病巣部に比べて非常に多いことを報告しているが、*in vitro*で単球由来マクロファージの系では反対に結核菌はHIV産生を抑制する。この矛盾は、マクロファージの分化状態が病巣部と非病巣部で異なること、病巣部ではマクロファージ以外の細胞がHIVを主として産生していることなどで説明できるかもしれない。しかしながら、後者はHIV合併MAC症などの病巣部で主としてHIVを産生しているのがマクロファージであることがわかっていることから可能性が低い。今回、気管支肺胞洗浄液を用いた我々の検討では、結核病巣部のマクロファージではHIV-LTRの転写抑制をするC/EBP β の16Kd isoformが発現されていないことを確認した。したがって、結核病巣部のHIV産生増強は前者の機序によるものと思われる。病巣部では何故「たが」が外された状態になるのか、今後の最も重要な研究テーマと思われる。

結 論

HIV結核の病巣部におけるウイルス産生調節機構としてこれまでNF- κ Bが重要であると言われてきたが、それに加えてC/EBP β によるウイルス産生抑制の解除という機構が重要であると思われる。

健康危険情報

HIV及び結核は全てP3施設内で取り扱い、実験者に危険のないよう配慮した。また、HIV/結核合併患者の肺洗浄は、ニューヨーク大学で行い、予め学内の倫理委員会です承を得、患者の承諾書を取って施行した。

研究発表

(1) 論文発表

- 1) Mycobacterium tuberculosis enhances HIV-1 replication by transcriptional activation at the long terminal repeat. *J. Clin. Invest.* 95:2324-2331, 1995 Zhang Y, Nakata K, Weiden M, and Rom WN.
- 2) Limited variability and copy number of proviral DNA in alveolar macrophages from HIV-1 infected patients: *J. Mol. Med.*, 1995, Molecular Medicine, 1, 744757, Koh Nakata, Michael Weiden, Timothy Harkin, David Ho, and William N. Rom.
- 3) The Effect of Thalidomide on the Pathogenesis of HIV-1 and M. tuberculosis Infection. *AIDS Research and Human Retroviruses* 1996, 11:247-257 Klausner JD, Makonkawkeyoon S, Nakata K, and Kaplan G.
- 4) M. tuberculosis enhances human immunodeficiency virus-1 replication in the lung. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 155:996. 1997 Nakata K, Rom WN, Honda Y, Condos R, Kanegasaki S, Cao Y, and Weiden M.
- 5) Type I interferon induces inhibitory 16 kDa C/EBP β repressing the HIV-1 LTR in Macrophages: pulmonary tuberculosis alters C/EBP expression enhancing HIV-1 replication. *J. Exp. Med.* 188:1255. 1998. Honda Y, Rogers L, Nakata K, Zhao BY, Pine R, Rom WN, and Weiden M.
- 6) Differentiation of monocytes to macrophages switches the Mycobacterium tuberculosis effect on HIV-1 replication from stimulation to inhibition: modulation of interferon response and CCAAT/enhancer binding protein b expression, *Journal of Immunology*, 2000, 165:2028-2039, Mi Weiden M, Tanaka N, Qiao Y, Honda Y, Nakata K, Rom WN, and Pine R
- 7) Comparison of antimycobacterial activity of grepa-

floxacin against *Mycobacterium avium* with that of levofloxacin: Accumulation of grepafloxacin in human macrophages *J. Infection and Chemotherapy, in press*, Hirota M, Totsu T, Adachi F, Kamikawa K, Watanabe J, Kanegasaki S, and Nakata K

知的財産権の出願・登録状況

特になし



CMV感染症の診断・経過観察・発症予知 における血中DNA定量の有用性

吉田 敦¹⁾、森澤 雄司¹⁾、岡 慎一²⁾、木村 哲¹⁾

¹⁾ 東京大学医学部附属病院感染制御部

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

HIV感染者の全血、血漿中における、サイトメガロウイルス(CMV)のDNA量をreal-time PCR法を用いて定量した。CMV感染症の有無と、血中のDNA量との相関をみると、全血中のDNA量が 3×10^3 コピー/mL、血漿中のDNA量が 1×10^3 コピー/mLより多い例で、CMV感染症が多く観察された(それぞれ感度94%, 87%, 特異度87%, 88%)。CMV感染症に対する治療開始後には、血中DNA量は臨床所見に合致して低下した。さらにCMV感染症を発症していないHIV感染者33例の血中DNA量を追跡したところ、全血中DNA量が 1×10^4 コピー/mLかつ血漿中DNA量が 2×10^3 コピー/mLを超えた11例中8例において、発症がみられた。これらのDNA量をbreakpointとして設定した場合、感度は100%、特異度は88%であり、DNA量がbreakpointを上回った場合、以後の発症のリスクが高いといえた。

本研究の結果より、real-time PCR法を用いた血中のCMV DNA定量は、CMV感染症の診断・経過観察・発症予知に有用な手段であると考えられた。本法が抗ウイルス剤の予防投与の是非を判断する上で有用であるかどうか、今後検討が必要であろう。

分担研究者：木村 哲、岡 慎一

研究協力者：吉田 敦、森澤雄司

Diagnosis, Monitoring and Prediction of Cytomegalovirus Disease in HIV-Infected Patients Using a Real-Time PCR Assay

Atsushi Yoshida¹⁾, Yuji Morisawa¹⁾, Shinichi Oka²⁾ and Satoshi Kimura¹⁾

¹⁾ Department of Infection Control and Prevention, University of Tokyo Hospital and ²⁾ AIDS Clinical Center, International Medical Center of Japan

目的

CMVはHIV感染者において重篤な感染症を発症するが、その診断、治療効果の判定、発症の予知にはしばしば困難を伴う。real-time PCR法を用いた血中CMV DNAの定量が、CMV感染症の診断、治療効果の判定、発症の予知に有用であるかどうか検討する。

方法と結果

全体が3研究からなるため、それぞれについて個別に述べる。

研究I. CMV感染症の診断と、血中CMV DNA量との相関

(方法)

CMV-IgGが陽性であるHIV感染者83例から血液を採取した。但し、既にCMV感染症の治療中で、良好な経過を示している者は含まれていない。CMV感染症の診断はLjungmanらによる基準りに従った。同時に、血液採取1ヶ月以内のCD4+リンパ球数も記録した。コントロールとして健常人ボランティア28名からも血液を採取した。

Qiagen社のQIAamp® DNA Mini Kitを用いて、全血、血漿それぞれ400μLからDNAを抽出し、抽

出されたDNAについて、CMVゲノムのopen reading frame US17をターゲットとして、PCR反応を行った(PCR primers;5'-GCG TGC TTT TTA GCC TCT GCA-3' および5'-AAA AGT TTG TGC CCC AAC GGT A-3'、並びにfluorogenic probe;5'-[FAM] TGA TCG GCG TTA TCG CGT TCT TGA TC [TAMRA]-3')。PCRの反応条件は50℃2分、95℃10分、95℃15秒と61℃1分を50サイクル、である。Perkin-Elmer Applied Biosystems社のABI PRISM™ 7700 Systemを用い、PCR増幅産物中の蛍光色素FAMからの光量を測定することにより、CMV DNAコピー数を算出した。この際、サブクローニングしたCMVゲノム断片の希釈系列を作成し、定量の際のスタンダードとして用いたが、200コピー/mL以下は再現性が低くなることから、200コピー/mLを定量限界として設定した。このようにして測定されたDNA量と、CD4+リンパ球数およびCMV感染症の有無との関係を検討した。

(結果)

HIV感染者83例のうち16例でCMV感染症が認められた。その内訳は、網膜炎11例、網膜炎と食道炎の合併例1例、食道炎1例、肺炎1例、肺炎・膀胱炎の合併例1例、肺炎・腸炎・副腎炎の合併例1例、である。83例のCD4+リンパ球数は0.15-929 [median: 41]個/μLであったが、発症例では0.6-49 [median: 16]個/μLで、全例50個/μL未満であった。

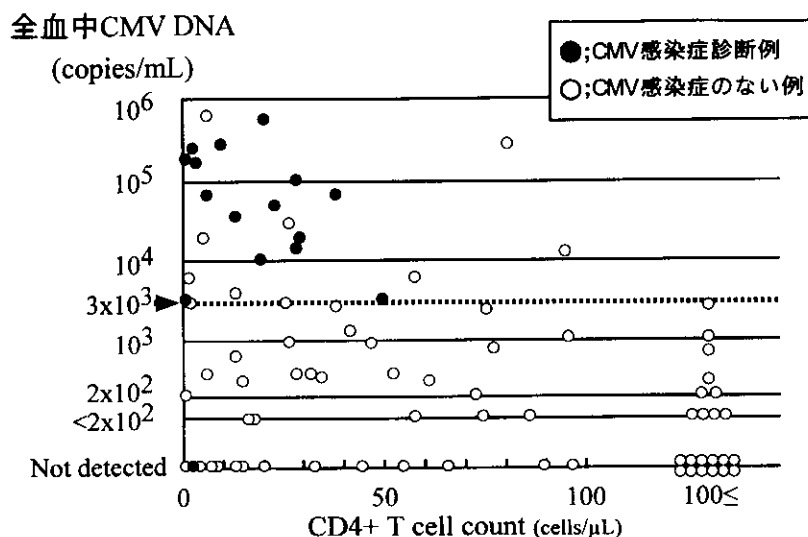


図1 全血中CMV DNA量とCD4+リンパ球数との関係

全血中 DNA は 83 例中 57 例で検出され、特に CMV 感染症診断例では、1 例を除いて全例で $> 3 \times 10^3$ コピー/mL であった。DNA 量を縦軸に、CD4+ リンパ球数を横軸にとり、個々の症例での値をプロットすると、CD4+ リンパ球数が少なくなると DNA 量が多くなるという左上がりの分布が認められ、診断例は CD4+ リンパ球数 < 50 個/ μ L かつ DNA 量 $> 3 \times 10^3$ コピー/mL という範囲に集中して認められた (図1)。一方、健常人については全員が 200 コピー/mL 以下ないし undetectable であった。

血漿中 DNA 量は 83 例中 75 例で測定できた。発症例 16 例では 15 例で測定できたが、うち 2 例を除いて $> 1 \times 10^3$ コピー/mL であった。血漿中の DNA 量と CD4+ リンパ球数との相関関係をみると、全血の場合と同様に左上がりの分布が認められ、診断例は CD4+ リンパ球数 < 50 個/ μ L かつ DNA 量 $> 1 \times 10^3$ コピー/mL の範囲に集中して認められた (図2)。

CMV 感染症の有無について、上記の全血中 DNA 量 3×10^3 、血漿中 DNA 量 1×10^3 コピー/mL を cut-off line として採用すると、それぞれ感度は 94% と 87%、特異度は 87% と 88%、positive predictive value (PPV) は 63% と 65%、negative predictive value (NPV) は 98% と 96% であった。

一般的に HIV 感染者において CMV 感染症が発症しやすいとされるのは、CD4+ リンパ球数が 50 個/ μ L 以下の場合であるので、CD4+ リンパ球数 50 個/ μ L 以下の例に限って上記の cut-off line を適用すると、それぞれ感度は 94% と 87%、特異度は 79% と 83%、PPV は 71% と 72%、NPV は 96% と 92% となった。

研究II. CMV感染症の臨床経過と、血中CMV DNA量との相関

(方法)

研究 I において CMV 感染症と診断された HIV/AIDS 患者について、引き続き血中の DNA 量を経時的に測定した。CD4+ リンパ球数は研究 I と同様の基準で記録した。血液サンプルの採取方法、DNA の抽出方法、PCR 反応の過程、および定量方法はすべて研究 I と同一であった。

(結果)

CMV 感染症に対する治療が行われ、DNA 量の追跡ができた例は 11 例であった。内訳は網膜炎 8 例、網膜炎と食道炎の合併例 1 例、食道炎 1 例、肺炎 1 例である。10 例において、CMV に対する治療が奏功し、臨床症状が改善するのに伴って、(全血、血漿共に) DNA 量は低下し、最終的に 200 コピー/mL 以下まで低下した。残りの 1 例は

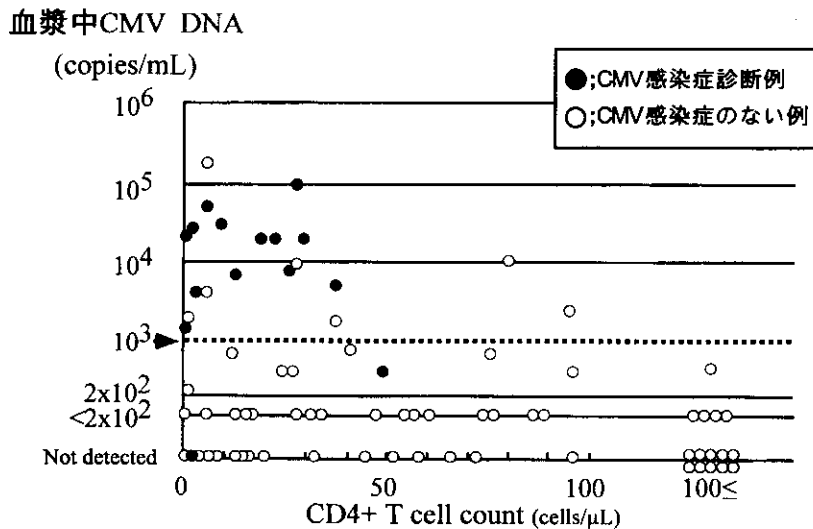


図2の legend 血漿中 CMV DNA 量と CD4+ リンパ球数との関係

ganciclovir (GCV)とfoscarnet (FCN)の投与中にもかかわらず網膜炎の悪化を来した例であり、GCVとFCNの投与続行で網膜炎の改善がみられたが、DNA量は全血、血漿共に追跡開始時から undetectable のままであった。

図3に24歳男性の臨床経過を示す。CMV網膜炎を発症し、GCVのimplantationを行われたが、網膜炎の悪化がみられた。DNA量は全血で 1×10^5 、血漿で 1×10^5 コピー/mLであった。FCNの投与開始後、網膜炎は改善し、全血、血漿中のDNA量は200コピー/mL以下となった。FCNから経口GCVへの変更後、DNA量は一時増加したが、HAARTによるCD4+リンパ球数の増加と相まって、再び減少に転じ、最終的には検出されなくなった。

研究III. CMV感染症の発症予知における、血中CMV DNA定量

(方法)

CMV-IgGが陽性であるが、臨床的にCMV感染症を認めないHIV感染者33例を対象とした。CD4+リンパ球数、全血・血漿中CMV DNA量をprospectiveに測定し、追跡した。追跡期間は7日以上とし、追跡中にCMV感染症が発症した場合、発症までを追跡期間として記録した。CD4+リンパ

球数は研究I、IIと同様の基準で記録した。血液サンプルの採取方法、DNAの抽出方法、PCR反応の過程、および定量方法もすべて研究I、IIと同一であった。

(結果)

33例の追跡期間は7-665 [median: 57]日であった。追跡開始時のCD4+リンパ球数は0.2-175 [median: 26] 個/ μ Lであり、全血中DNA量はmedian 770 copies/mL、血漿中DNA量はmedian < 200 copies/mLであった。既にHAARTが開始されていた例は1例のみ(CD4+リンパ球数96個/ μ L)であった。

33例中8例が7-264[median: 66]日でCMV感染症を発症した(網膜炎単独5例、食道炎と網膜炎の合併例1例、肺炎1例、肺炎と腸炎と副腎炎の合併例1例)。発症時のCD4リンパ球数は0.6-38[median: 16]個/ μ Lであり、全例で50個/ μ L未満であった。発症例におけるDNA量の変化をみると、8例全例において、全血中で 1×10^4 コピー/mL、かつ、血漿中で 2×10^3 コピー/mLを超えてから発症に至っていた。一方、未発症例では、25例中22例において、経過中DNA量はこのレベルに達しなかった。このDNA量を発症予知に対するbreakpointとして設定すると、breakpointの感度は100%、特異度は

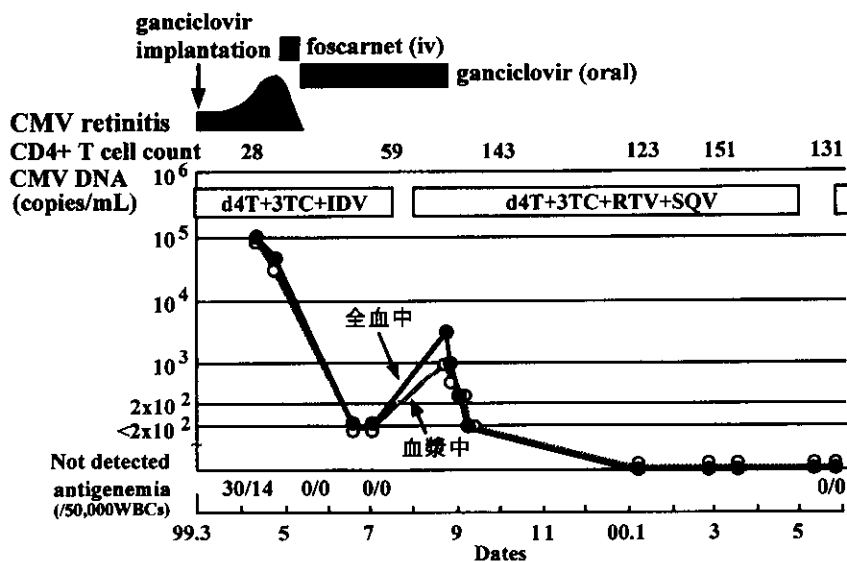


図3の legend 24歳男性 (CMV網膜炎) の臨床経過

88%、PPVは73%、NPVは100%であった。

さらに発症例における、CMV DNA量増加の時期と、発症時期の関係をみると、(i) DNA量(全血、血漿共)の増加のピークとほぼ一致して発症(6例)、(ii) DNA量(全血、血漿共)が増加し、ピークを過ぎて下降に転じてから発症(2例)、の2つのパターンがみられた。以下に症例を示す。

図4左は28歳男性(CD4+リンパ球数:7個/ μ L)の臨床経過である。Pneumocystis carinii肺炎(PCP)で入院したが、入院時のCMV DNA量は全血中で 1×10^3 、血漿中で <200 コピー/mLであった。PCPの治療としてprednisolone (PSL)が開始された後、DNA量の増加がみられ(全血中 1×10^4 、血漿中 7×10^3 コピー/mL。特に血漿中DNA量の増加が著しかった)、間もなくCMV網膜炎が発症した。GCVの投与開始後、両側の網膜炎は軽快し、DNA量も低下したが、GCVによる腎機能障害が進行した。GCVの投与中止後、DNA量は増加したが、先行して開始したHAARTによるCD4+リンパ球の増加後には、再び減少に転じ、最終的には検出されなくなった。

図4右は50歳男性(CD4リンパ球数:0.6個/ μ L)の臨床経過を示している。Cryptococcus neoformans髄膜炎、および潰瘍性大腸炎にて入院となった。

入院前より多量のPSLが投与されており、DNA量は入院時で全血中 5×10^4 、血漿中 2×10^3 コピー/mLと高値であった。PSLを漸減したところ、DNA量は減少したが、入院後70日でCMV網膜炎が発症した。社会的な事情から、網膜炎に対する治療は行われなかった。

考 察

CMVは、特にCD4+リンパ球数が極度に低下したHIV感染者において、重篤な感染症を発症する。従来よりCMV感染症の診断、治療効果の判定、予知に有用な指標が求められてきた。PCR法による血中のCMV DNA検出もその一つだが、単に検出だけでは必ずしもCMV感染症の活動性を反映せず、定量的な測定法が求められ、検討されてきた²³⁾。しかし従来の定量的PCR法は煩雑であり、臨床応用に限界があった⁴⁾。さらに血液検体において、全血、血漿、白血球のうちどれを用いるのが最も適当であるかについても、議論があった⁵⁾。一方、近年開発されたreal-time PCR法は、蛍光プローブから発する光の量から客観的に定量できること、PCR反応後に検体を扱う手間が要らないことから、従来の定量的PCR法に比べ簡便性、迅速性、

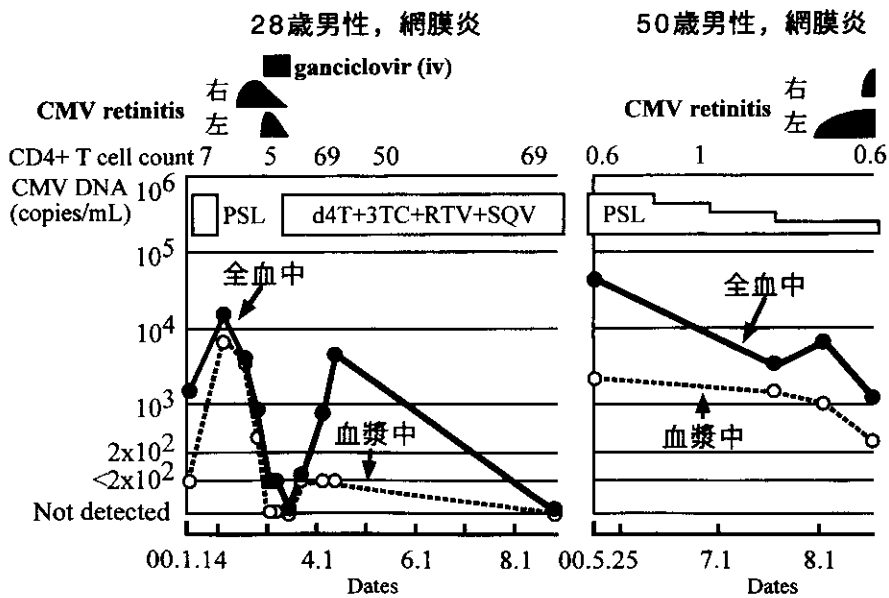


図4 追跡中にCMV感染症を発症した2例の臨床経過(PSL; prednisolone)

再現性に優れている特徴があった⁶⁾。このため本研究では、real-time PCR法を用い、全血と血漿それぞれにおけるCMV DNA genomeを定量し、その有用性を評価した。

まずCMV感染症の有無とCMV DNA量との相関(研究I)では、全血・血漿中のDNA量が高値であると、CMV感染症が多くなることが示された。特に、全血中DNA量 $>3 \times 10^3$ コピー/mL、血漿中DNA量 $>1 \times 10^3$ コピー/mLである場合、CMV感染症は感度94%・87%、特異度87%・88%で診断されており、CMV感染症の診断にこれらのDNA量が一つの目安となる可能性が示された。

さらに治療効果の判定、経過観察における検討(研究II)では、治療の奏功と臨床的改善とともにDNA量が減少し、最終的に定量限界ないしそれ以下になることが示された。この場合、血漿中DNAが全血中DNAに先んじてundetectableになり、後に共にundetectableとなる例があったが、これらの結果から、全血中DNA量が検出されなくなればCMV感染症の急性期の治療が成功したとみなせるのではないかと推論した。

これら2研究を踏まえ、研究IIIではCMV感染症の発症予知における本法の有用性を検討した。発症予知に対するDNA量のbreakpointを、全血で 1×10^4 、かつ血漿で 2×10^3 コピー/mLと設定すると、breakpointの感度は100%、特異度は88%、PPVは73%、NPVは100%であった。この結果は、DNA量がbreakpoint以上に達すると、以後の発症のリスクが大きくなることを意味しており、発症のリスクの判定にこのbreakpointが一つの目安になると考えられた。

さらにCMV DNA量増加の時期と、発症時期の相関から、DNA量が一旦breakpoint以上に増加してしまえば、ピークを過ぎて減少に転じても発症はおこりうるということが明らかになった(例:図4右)。この事実はShinkaiらの報告例⁷⁾と合致するが、DNA量が増加している時間が長いこと、すなわちCMVにさらされている時間が長いことが発症に関与する可能性を示していた。DNA量が増加してからどのくらいの時間が経過すると以後の発症がより高率になるかについては、今後検討が必要である。

また、経過中の全血中DNA量と、血漿中のDNA

量の変化を比較すると、全血中DNA量が先行して増加した後に、血漿中のDNA量が増加して、発症に至るという傾向が認められた(例:図4左)。一方未発症例では、全血中のDNA量が増加しても、血漿中のDNA量が増加せず、発症に至らない例があった。全血中DNA量は早期に鋭敏に増加してくる特徴がある一方、血漿中DNA量はより発症のリスクと関連した動きを示す特徴があると考えられた。全血中DNAと血漿中DNAの同時測定から得られたこれらの特徴は、発症予知を行う上で一つの手がかりとなりうると推測された。

現在HIV感染者のCMV感染症に対する、抗ウイルス剤の予防投与(primary prophylaxis)の是非については、意見の分かれるところである。抗ウイルス剤の副作用、費用、薬剤耐性といった問題から、リスクの高い症例に限った投与方法(pre-emptive therapy)が好まれるが、その際の基準はまだ定まっていない^{8,9)}。本研究で得られたbreakpointその他の所見が、pre-emptive therapyの是非の判断に役立つかどうか、さらにはpre-emptive therapy対象者の絞り込みの一助になるかどうかについては、今後検討が必要である。

結 論

real-time PCR法により測定した全血、血漿中のCMV DNA量は、CMV感染症の診断、経過観察、発症予知に有用である。特に全血中DNA量 1×10^4 コピー/mL、かつ、血漿中で 2×10^3 コピー/mL以上に増加した例では、その後の発症のリスクが高いと推測できる。さらに全血中DNA、血漿中DNAそれぞれの変化を比較することにより、発症前のより詳細な情報を得ることができる。抗ウイルス剤の予防投与の是非の判断に、本法が役立つかどうかは、今後の検討課題である。

参考文献

- 1) Ljungman P, Plotkin SA. Workshop on CMV Disease: definitions, clinical severity scores, and new syndromes. Scand J Infect Dis 1995; 99 (Suppl): 87-89.
- 2) Fischer SH, Masur H. Laboratory monitoring of cytomegalovirus disease - Is polymerase chain reac-

- tion the answer? Clin Infect Dis 1997; 24: 841-842.
- 3) Boeckh M, Boivin G. Quantitation of cytomegalovirus: Methodologic aspects and clinical applications. Clin Microbiol Rev 1998; 11: 533-554.
 - 4) Boivin G, Handfield J, Murray G, et al. Quantitation of cytomegalovirus (CMV) DNA in leukocytes of human immunodeficiency virus-infected subjects with and without CMV disease by using PCR and the SHARP Signal Detection System. J Clin Microbiol 1997; 35: 525-526.
 - 5) Boivin G, Handfield J, Toma E, et al. Comparative evaluation of the cytomegalovirus DNA load in polymorphonuclear leukocytes and plasma of human immunodeficiency virus-infected subjects. J Infect Dis 1998; 177: 355-360.
 - 6) Heid CA, Stevens J, Livak KJ, et al. Real time quantitative PCR. Genome Research 1996; 6: 986-994.
 - 7) Shinkai M, Bozzette SA, Powderly W, et al. Utility of urine and leukocyte cultures and plasma DNA polymerase chain reaction for identification of AIDS patients at risk for developing human cytomegalovirus disease. J Infect Dis 1997; 175: 302-308.
 - 8) Rasmussen L, Zipeto D, Wolitz RA, et al. Risk for retinitis in patients with AIDS can be assessed by quantitation of threshold levels of cytomegalovirus DNA burden in blood. J Infect Dis 1997; 176: 1146-55.
 - 9) Bowen EF, Sabin CA, Wilson P, et al. Cytomegalovirus (CMV) viraemia detected by polymerase chain reaction identifies a group of HIV-positive patients at high risk of CMV disease. AIDS 1997; 11: 889-893.

研究発表 (学会発表)

吉田 敦、遠藤博久、森澤雄司、人見重美、岡慎一、木村 哲：CMV感染症におけるreal-time PCR法による血中CMV DNA定量の有用性。第14回日本エイズ学会学術集会・総会，2000，京都。



リアルタイムPCRを用いたKSHV/HHV-8複製の検出とサイトカインによる調節

宋 健¹⁾、吉崎 和幸^{1,2)}、西本 憲弘^{1,2)}

¹⁾大阪大学健康体育部健康医学第一部門

²⁾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

研究要旨

Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus-8 (KSHV/HHV-8)は、AIDSに合併するカポジ肉腫、悪性リンパ腫あるいはCastleman病と関連を有す。KSHV/HHV-8はAIDS患者での感染率が高く、AIDSに伴う日和見感染と考えられる。

KSHV/HHV-8は感染が成立すると通常では潜伏状態になり、ウイルスの遺伝子発現は制限される。ウイルスの増殖期には様々なlytic geneが活性化され、宿主細胞が破壊され感染が拡大する。したがってlytic geneの検出はウイルスの増殖期を把握し、ひいてはAIDSに伴うKSHV/HHV-8日和見感染症の早期発見と増悪の予見に有用である。また、ウイルスの増殖の制御は感染の拡大を抑制するのみならず、KSHV/HHV-8の感染により生じる上記の疾患の発症を予防することにつながる。今回、KSHV/HHV-8のlytic gene特異的なプライマーを用いたリアルタイムRT-PCRを用いたウイルスの定量的解析法を確立した。この方法を用い、IL-6をはじめとするサイトカインによるKSHV/HHV-8複製の解析を行った。lytic geneの1つであるORF26 mRNAはIFN γ 、IL-6、IL-6+IL-6Rによりそれぞれ2.30倍、2.41倍、3.16倍に増加した。よって、HIV感染により産生されるヒトIL-6がKSHV/HHV-8の増殖を促すことが示唆された。また、患者血清中のKSHV/HHV-8抗体価の測定に加え、末梢血より抽出したDNAからのPCRによるウイルス検出を試みた。2例のカポジ肉腫合併HIV陽性患者の末梢血単核球よりKSHV/HHV-8特異的ORF26ならびにLANAが検出された。一方HIV陰性のCastleman病では検出されなかった。BCBL-1細胞を用いた間接蛍光抗体法でも同様の結果を得たが、ORF26に対するPCRは特異的であるばかりでなくウイルス量の推定に役立つと考えられた。

リアルタイムPCRを用いたHIV患者末梢血からのKSHV/HHV-8検出により、カポジ肉腫やCastleman病、BCBLの発症の可能性をスクリーニングすることが可能である。HIV感染に伴い増加するIL-6はKSHV/HHV-8の増殖を促し、KSHV/HHV-8の産生するvIL-6はHIVの複製を促すことから、両ウイルス間にIL-6を介したクロストークの存在が確認された。したがって、IL-6の阻害はHIVのみならずKSHV/HHV-8により生ずる合併症の治療にも役立つ新しい治療的アプローチとなる。

分担研究者：吉崎和幸

研究協力者：宋 健、西本憲弘

Cytokine-induced HHV-8 replication and detection of HHV-8 infection in MCD/KS patients by real-time PCR

Jian Song¹⁾, Kazuyuki Yoshizaki^{1, 2)}, and Norihiro Nishimoto^{1, 2)}

¹⁾Department of Medical Science I, School of Health and Sport Sciences, Osaka University and ²⁾Department of Clinical Immunology, Graduate School of Medicine, Osaka University

目的

AIDSに合併したカポジ肉腫の病変部位から見出されたKaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV)は、 γ ヘルペスウイルス亜群に分類され human herpesvirus-8 (HHV-8)とも呼ばれる。KSHV/HHV-8はAIDSに合併するカポジ肉腫、悪性リンパ腫の1つであるbody cavity-based lymphoma (BCBL)、あるいはCastleman病と疫学的な関連を有することが報告されている。これらの疾患はIL-6が増殖因子あるいは病態形成因子として関与することが知られ、また、KSHV/HHV-8がヒトIL-6 (hIL-6)と同様の機能を持つウイルスIL-6 (vIL-6)を産生することから、KSHV/HHV-8がAIDSに合併する上記疾患の原因ウイルスとして注目された。しかもKSHV/HHV-8はAIDS患者での感染率が高いことから、カポジ肉腫、BCBL、あるいはCastleman病は、AIDSの免疫不全状態に伴うKSHV/HHV-8日和見感染症と考えることができる。

KSHV/HHV-8は感染が成立すると通常では潜伏状態になり、ウイルスの遺伝子発現は制限される。一方、ウイルスの増殖期には様々なlytic geneが活性化され、ウイルス複製の増加により宿主細胞が破壊され、さらに感染が拡大する。したがって、ウイルスの増殖の制御はウイルス感染の拡大を抑制するのみならず、KSHV/HHV-8の感染により生じる上記の疾患の発症を予防することにつな

がる。また、lytic geneの検出はウイルスの増殖期を把握し、ひいてはAIDSに伴うKSHV/HHV-8日和見感染症の早期発見と増悪の予見に有用である。今回我々は、KSHV/HHV-8のlytic gene特異的なプライマーを用いリアルタイムRT-PCRによるウイルスの定量的解析法を確立した。この方法を用い、IL-6をはじめとするサイトカインによるKSHV/HHV-8複製の調節機構の解析を行い、従来我々が掲げているAIDS病態におけるHIVとKSHV/HHV-8のクロストーク仮説を立証する。また、患者血清中のKSHV/HHV-8抗体価の測定に加え、患者末梢血より抽出したDNAからのPCRによるウイルス検出の可能性を検討した。

研究方法

1. KSHV/HHV-8の増殖試験

ウイルス増殖の検討にはKSHV/HHV-8が潜伏感染するBCBL-1細胞株を用いた。5×10⁴個の細胞をIFN γ (1000 unit/ml)、OSM (100 ng/ml)、IL-6 (100 ng/ml)、IL-6+可溶性IL-6受容体(sIL-6R)(各100 ng/ml)の存在下で7日間培養しRNAを抽出した。lytic geneとしてORF26ならびにLANAに対する特異的プライマーを作製し、TaqmanプローブとPE Biosystem 5700を用いて定量的RT-PCRを行った。スタンダードはプラスミドにくみこんだcDNAを用いた。

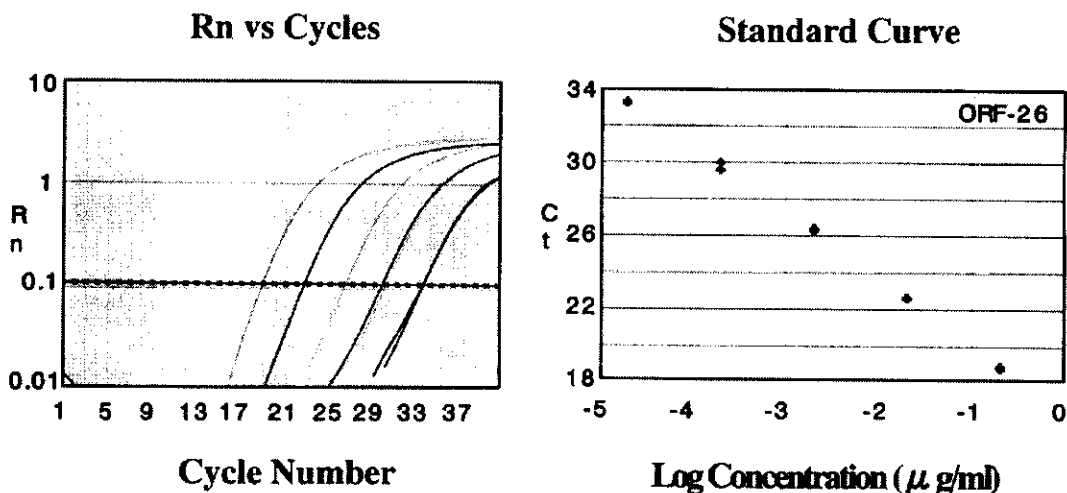


図1 リアルタイムPCR法を用いたHHV-8 ORF-26の定量的解析

2. 患者検体

患者検体は、カポジ肉腫を発症したHIV陽性患者2例ならびにHIV陰性のCastleman病3例の末梢血単核球からDNAを抽出し、ORF26ならびにLANA遺伝子の含有を、リアルタイムPCRを用いて定量的に解析した。大阪大学附属病院で加療中のCastleman病患者よりインフォームドコンセントを得た後に採血を行った。3例中2例では生検リンパ節から抽出したDNAについても検討を行った。カポジ肉腫の患者末梢血単核球のDNAは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講座・上田啓次先生より供与いただいた。また、血清中のKSHV/HHV-8抗体価はTPAで刺激を行ったBCBL-1細胞をスライドグラス上に冷アセトンにて固定し、段階希釈を行った血清を反応させ、間接蛍光抗体法にて検討した。

研究結果

1. リアルタイムPCRシステム

一定の蛍光閾値に到達したPCRのサイクル数(Ct値)はPCRに加えたORF26 cDNA量の対数値と約 10^{-5} から 10^{-1} $\mu\text{g/ml}$ の範囲で直線的に相関した(図1参照)。段階希釈を行ったORF26 cDNAを用いて作製した標準曲線からサンプル中のKSHV/

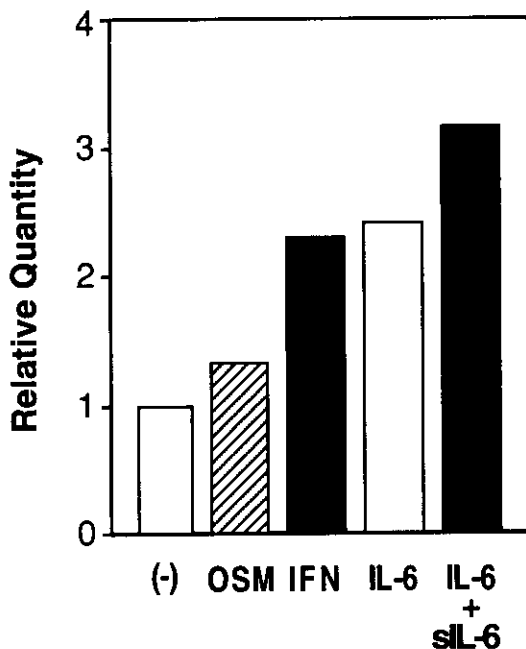


図2 サイトカインによるHHV-8の複製
IL-6はBCBL-1細胞におけるHHV-8の複製を刺激した。

HHV-8 mRNAとDNA濃度を決定した。LANAに関しても同様に検討した。

2. サイトカインによるKSHV/HHV-8の複製

BCBL-1細胞においてORF26 mRNAはIFN γ 、IL-6、IL-6+sIL-6R刺激によりそれぞれ無刺激の細胞に比べ2.30倍、2.41倍、3.16倍に増加した(図2参照)。

3. 患者検体からのKSHV/HHV-8の検出

患者末梢血を用いたKSHV/HHV-8 DNAの検出では、2例のカポジ肉腫を発症したHIV陽性患者の末梢血単核球よりKSHV/HHV-8特異的ORF26ならびにLANAが検出された。一方HIV陰性のCastleman病(日本では同疾患でHIVならびにKSHV/HHV-8陽性者は少ないと考えられる)では検出されなかった(図3)。BCBL-1細胞を用いた間接蛍光抗体法でも同様の結果を得た。

考 察

昨年までの研究で我々はKSHV/HHV-8が産生するvIL-6がHIV感染UI細胞株でのHIVの複製を促進すること、vIL-6が様々な細胞からのhIL-6産生を促進すること、hIL-6がKSHV/HHV-8感染BCBL-1細胞の増殖を刺激することを報告してきた。HIV感染患者では血中IL-6値が増加することがすでに知られており、今回hIL-6がKSHV/HHV-8の複製を刺激したことから、HIV感染に伴う高hIL-6血症がKSHV/HHV-8感染の拡大と発症に関わっていることが示唆された。すなわち、HIVは免疫不全状態をつくりKSHV/HHV-8の日和見感染を引き起こす以外に、hIL-6産生を介してより積極的にKSHV/HHV-8の悪化に関わっていると考えられる。このことは従来我々が提唱してきた、HIVとKSHV/HHV-8がIL-6を介し相互に病態を悪化させるというクロストーク仮説を支持するものである。同時にIL-6のシグナル阻害がHIVならびにKSHV/HHV-8感染症の治療に有用であることを示唆する。

KSHV/HHV-8感染細胞を用いた患者血清中のKSHV/HHV-8抗体価の検索では、患者が高率に有

するEBウイルスに対する抗体がKSHV/HHV-8に交叉反応し、擬陽性を呈することがある。従来はLANA抗原の染まり方で鑑別していたが、今回のORF26に対するPCRはKSHV/HHV-8特異的であるばかりでなくウイルス量の推定に役立つと考えられた。しかもHIV患者の末梢血単核球からKSHV/HHV-8を検出することが可能であり、カポジ肉腫やCastleman病、BCBLの発症の可能性を末梢血でスクリーニングすることができる。また、リアルタイムPCRの定量性を利用してウイルス量をモニターし上記の合併症の悪化を予見することも不可能ではない。今回は、HIV感染カポジ肉腫の患者で検出可能であるか否かを検討したが、今後、我が国のカポジ肉腫合併患者におけるKSHV/HHV-8検出率を検討するとともに、カポジ肉腫未発症HIV感染者でのスクリーニング検査を行い、プロスペクティブに発症の早期発見に有用か否かを検討したい。

結 論

HIV感染に伴い増加するhIL-6はKSHV/HHV-8の増殖を促し、KSHV/HHV-8感染症を悪化させる。またKSHV/HHV-8の産生するvIL-6はHIVの

複製を促すことから、IL-6のシグナルの遮断によりこれらの悪循環を断ち切り、HIVのみならずKSHV/HHV-8により生ずる合併症の治療にも役立つ新しい治療的アプローチとなる可能性が示唆された。

リアルタイムPCRシステムはKSHV/HHV-8のウイルスmRNAとDNAの定量に有用であり、患者末梢血をモニターすることでKSHV/HHV-8感染症の発症の可能性と悪化を予見可能である。

健康危険情報

特記すべきこと無し

研究発表

(1) 論文発表

- 1) Nishimoto N, Sasai M, Shima Y, Nakagawa M, Matsumoto T, Shirai T, Kishimoto T and Yoshizaki K: Improvement in Castleman's disease by humanized anti-interleukin-6 receptor antibody therapy. Blood 95:56-61, 2000.
- 2) Mori Y, Nishimoto N, Ohno M, Inagi R, Dhepakson P, Amou K, Hirano T, Yoshizaki K and Yamanishi K: Human Herpesvirus 8-encoded interleukin-6 homologue (viral IL-6) induces endogenous

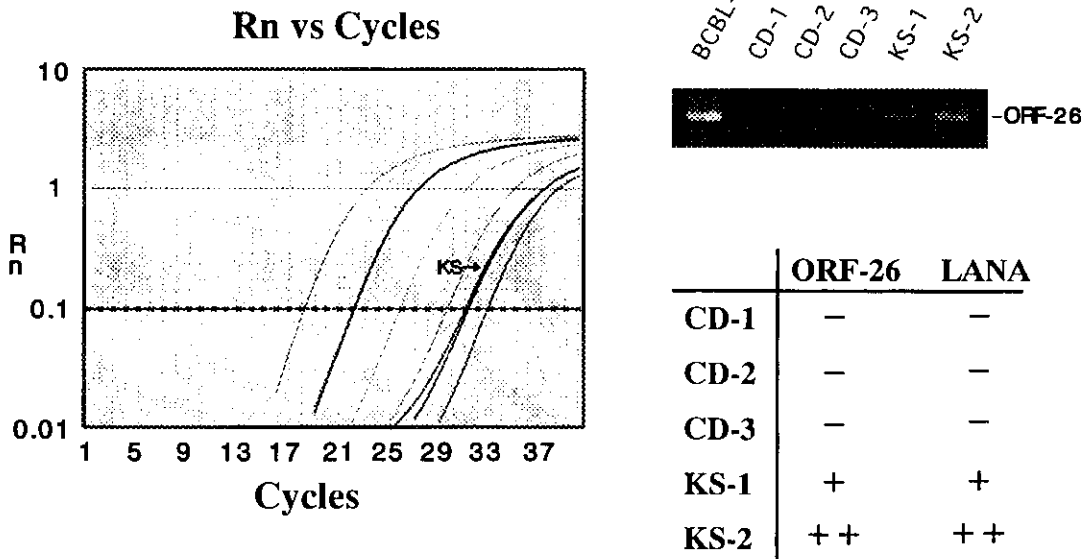


図3 AIDS-KSならびにHIV陰性Castleman病患者末梢血からのHHV-8の検出