

## 目的

*Mycobacterium avium complex* (MAC) 感染症はHIV感染をはじめとする免疫能低下時の日和見感染症として重要である。通常の抗結核剤に対する感受性はよくなく、ニューキノロン剤やclarithromycinが用いられ、複数の薬剤の併用を行うことも多いが、併用効果を*in vitro*で評価して薬剤の組み合わせを決定するには至っていない。そこで臨床分離株を対象にchecker board法を用いて併用効果を検討し、ニューキノロン剤やclarithromycin、azithromycin等を含んだ効果的な併用療法を探ることを目的とした。

## 方法

試験菌株は45患者から分離された*Mycobacterium avium* 45株。試験薬剤はclarithromycin (CAM)、azithromycin (AZM)、ethambutol (EB)、sparfloxacin (SPFX)、amikacin (AMK)で併用薬剤の組み合わせおよび濃度は表1に示す。それぞれの薬剤の組み合わせのcheckerboardをMiddlebrook 7H9 mediumを用いてfrozen plateとして作成した。

Middlebrook 7H9 mediumに菌を接種し35℃ 5% CO<sub>2</sub>培養7日間前培養した後、Middlebrook 7H9 mediumを用いてmcFarland 0.5に調整した。その菌液3mlを滅菌生理食塩水20mlで希釈しMIC2000接種器(ダイナボット)でマイクロプレートに接種した。35℃ 5% CO<sub>2</sub>培養4日間後MIC測定を測定

した。4日後に発育の悪いものは7日後に測定した。fractional inhibitory concentration index (FIC index)を以下の式で計算した。FIC index = 併用時の薬剤AのMIC / 単独使用時の薬剤AのMIC + 併用時の薬剤BのMIC / 単独使用時の薬剤BのMIC。FIC index ≤ 0.5を相乗作用、0.5 < FIC index ≤ 2を相加作用、2 < FIC indexを拮抗作用とした。

## 結果

### 1. 単剤使用時の薬剤感受性

臨床分離株45株について各薬剤のMIC分布および累積MIC分布を図1～5に示す。sensitiveと判断するbreakpointはまだ不明だが、最高血中濃度と比べ、SPFX、AMKが比較的有効と思われた。

### 2. 併用効果の検討

相乗作用を示した株の比率はAZM × EB : 27.3%、CAM × EB: 41.5%、CAM × AMK: 47.7%、CAM × SPFX: 35.6%でありCAMとAMKの併用で最も相乗作用が期待できることが示唆された(図6)。しかしいずれの組み合わせでも25～30%の株が拮抗作用を示した。CAM単独使用時のMIC値と他の薬剤と併用時のFIC indexに相関があるかどうか検討したが、両者に相関を認めなかった。例としてCAM単独使用時のMIC値とCAM、AMK併用時のFIC indexの関係を図7に示す。また、併用薬剤の異なるFIC indexの間にも相関は認めなかった(図8)。

表1 検討した薬剤の組み合わせと濃度

CAM (0.25～16μg/ml) と SPFX(0.03～32μg/ml)
CAM (0.25～16μg/ml) と AMK(0.03～128μg/ml)
CAM (0.25～16μg/ml) と EB(0.12～128μg/ml)
AZM (1～64μg/ml) と EB(0.12～128μg/ml)

CAM: clarithromycin、AZM: azithromycin、  
EB: ethambutol、SPFX: sparfloxacin、  
AMK: amikacin

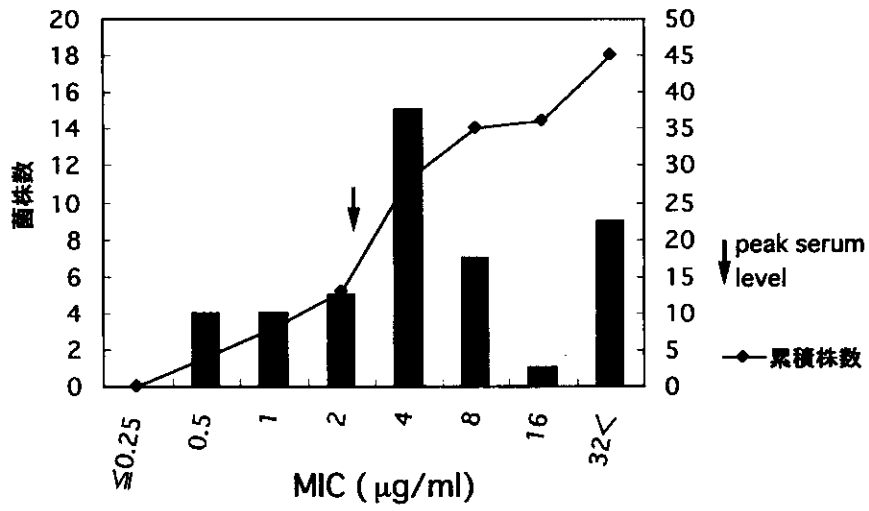


図1 CAMのMIC分布

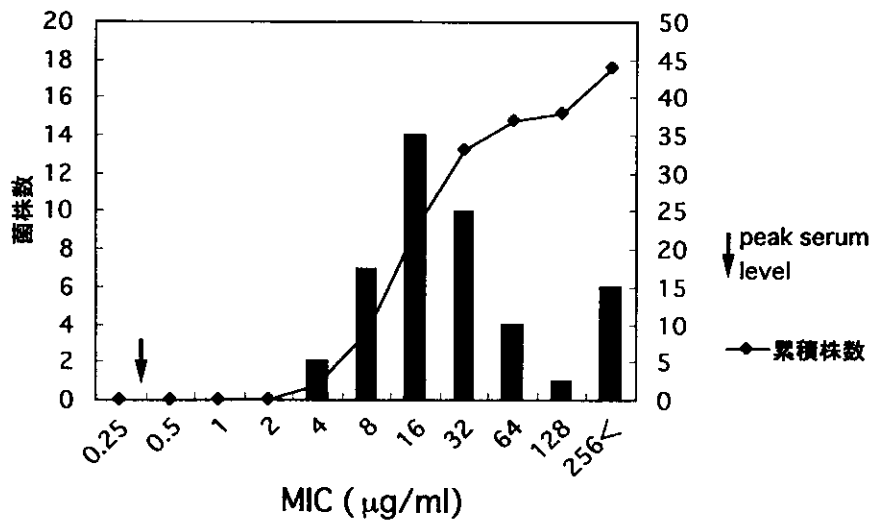


図2 AZMのMIC分布

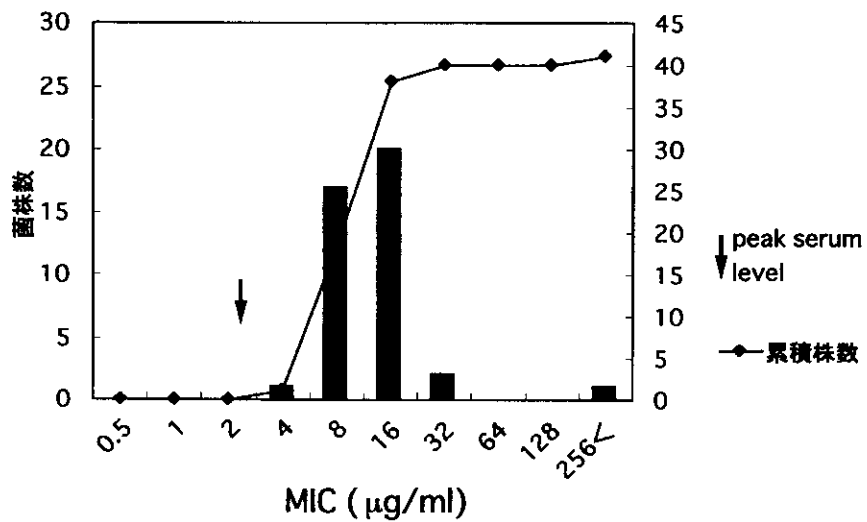


図3 EBのMIC分布

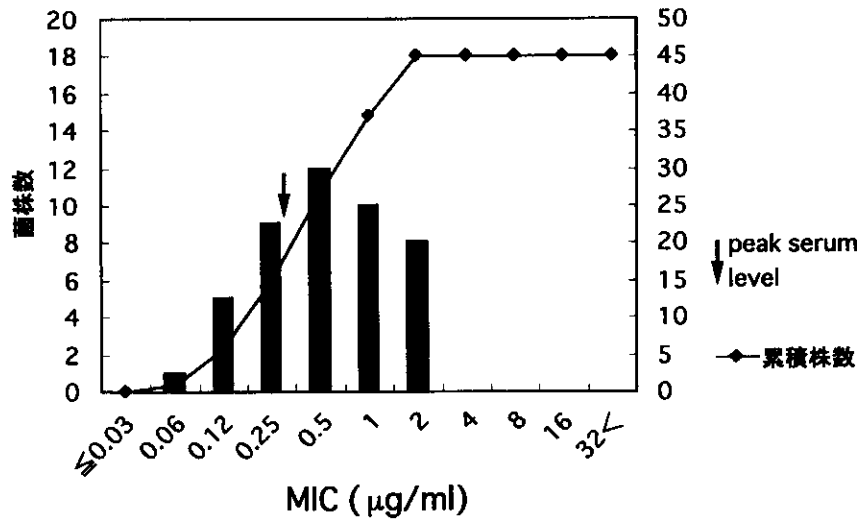


図4 SPFXのMIC分布

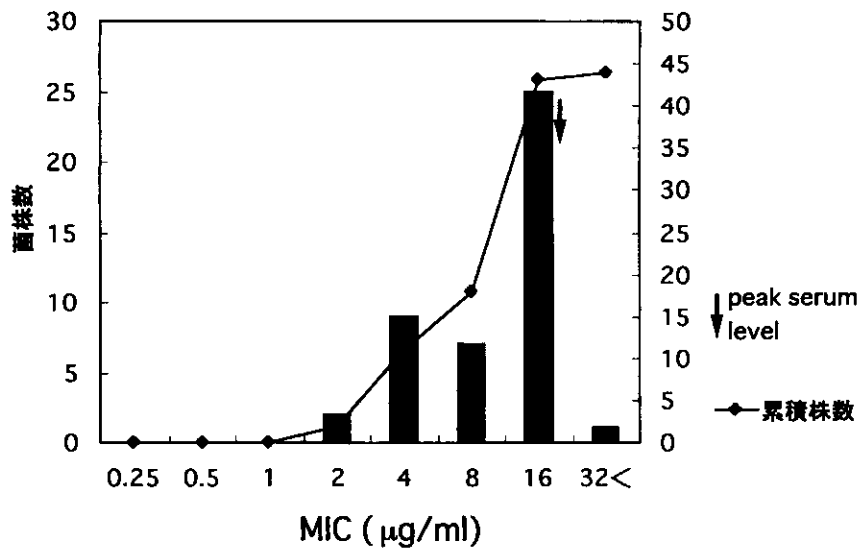


図5 AMKのMIC分布

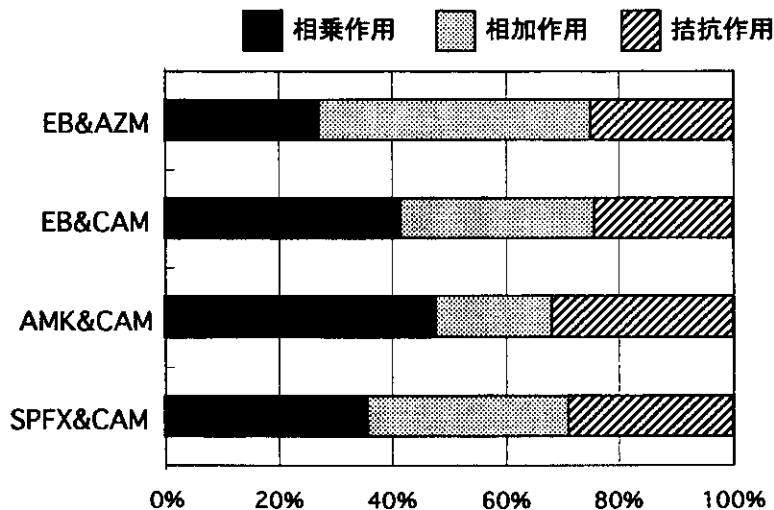


図6 MACに対する抗菌薬の併用効果

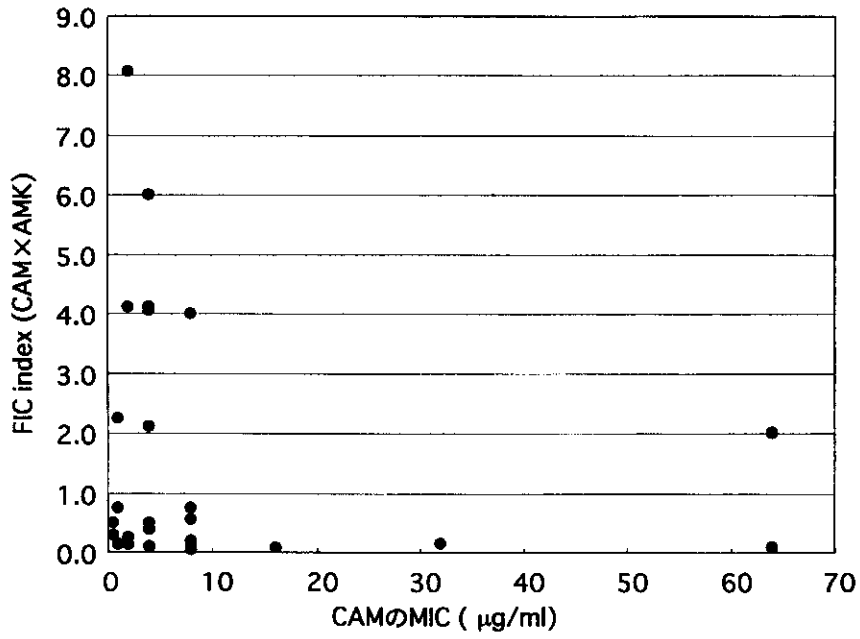


図7 CAMのMIC値とFIC indexの相関

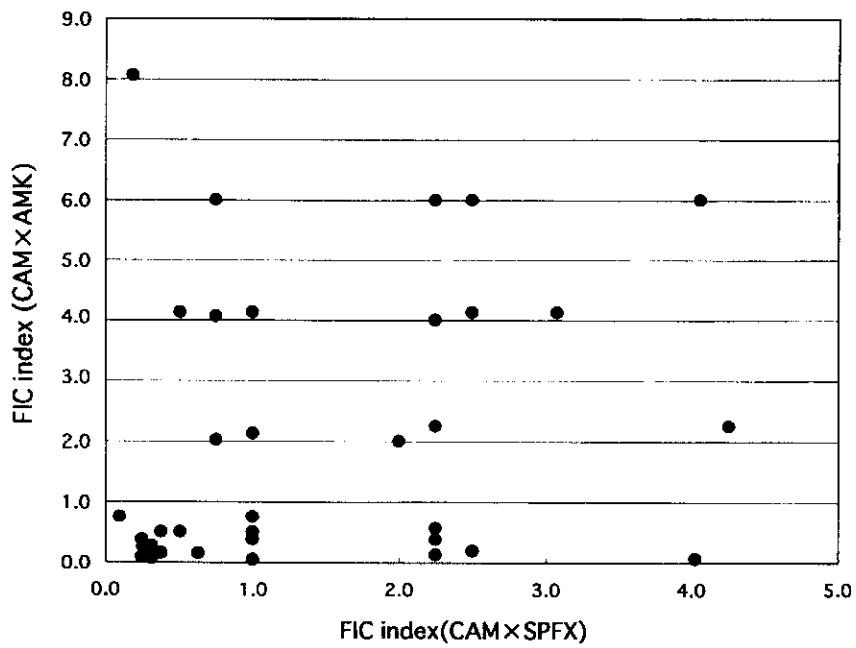


図8 FIC index間の相関

## 考 察

微量液体希釈法によるMACの薬剤感受性試験法に、checkerboard法による薬剤併用効果の評価を取り入れ、臨床分離株を対象にCAMとSPFX、CAMとAMK、CAMとEB、AZMとEBの組み合わせで併用効果を検討した。検討した薬剤について単独使用時のMICを検討すると報告されている最高血中濃度に比べSPFX、AMKが比較的低いMICを示した。CAMは非定型抗酸菌症の治療や予防に用いられる薬剤であるが、16 $\mu$ g/ml以上の高いMICを示す株が1/4近く認められた。どの薬剤についてもMIC値がどの程度であれば臨床的に有効かという breakpoint はまだ知られておらず、今後多くの菌株について測定を行い、臨床効果をあわせて検討されるべきと思われる。併用効果を検討した薬剤の組み合わせのうち、CAMとAMKの組み合わせで相乗作用を示す株の比率が最も高く約半数近くを占めた。一方、拮抗作用を示す株も約3割を占めた。他の3つの組み合わせも25～40%の株で相乗作用が認められた反面、25～30%の株で拮抗作用が示された。またFIC indexと単剤でのMICに相関はなく、異なる薬剤の組み合わせのFIC indexの間にも相関は認めなかった。このようにMACの治療にあたって薬剤を併用する際、今回検討した組み合わせのなかではCAMとAMK次いでCAMとEBが相乗作用が得られる確率が高いが、個々の株についてはどの薬剤の併用で相乗作用が得られるかは予想できず、逆に拮抗作用を示す恐れもあることから、あらかじめ*in vitro*で併用効果の評価してから用いる必要があることが示唆された。

## 結 論

MACの臨床分離株45株についてcheckerboard法を用いて薬剤併用効果を検討した。相乗作用を示した株の比率はCAMとAMKが半数近くで最も高く、CAMとEB、CAMとSPFX、AZMとEBの順であった。いずれの組み合わせでも拮抗作用を示す株も25～30%認められた。MACの薬剤併用療法に際しては、あらかじめ*in vitro*で併用効果の評価してから用いる必要があることが示唆された。

## 健康危険情報

特になし

## 研究発表

なし

## 知的財産権の出願登録状況

なし



## AIDSに合併した *M. Kansasii* の1例

當山 雅樹、健山 正男、玉城佑一郎、比嘉 太、齋藤 厚

琉球大学第一内科

### 研究要旨

AIDSの治療経過中に*M. Kansasii*呼吸器感染症を合併した1例を経験した。本邦におけるAIDSに合併する抗酸菌症は結核と非定型抗酸菌症の比率はほぼ3対1とされており、非定型抗酸菌症の菌種としては*M. avium-intracellulare*が大部分である。本症例はAIDS患者においては比較的希な菌種による感染症であり、画像所見においては、非HIV感染者で本症にみられる薄壁空洞形成はほとんどみられず、本例では淡い浸潤影が主体であった。HIV感染者においては本症は典型的な画像所見を呈さないことがあることを留意するべきであると考えられた。

分担研究者：森 亨

研究協力者：玉城佑一郎、比嘉 太、健山正男、齋藤 厚

### **A Case of *Mycobacterium kansasii* infection with AIDS**

Masaki Tohyama, Masao Tateyama, Yuichiro Tamaki, Futoshi Higa and Atsushi Saito

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

## 目 的

HIV感染者は近年増加傾向にあり、免疫能の低下による様々な日和見感染症の増加が懸念される。HIV感染者に合併する感染症は適切な抗菌薬治療がなされなければ急速な経過をたどり死に至ることがあるため、迅速な診断が要求される。しかし、HIV感染者における呼吸器感染症などにおいては非HIV感染者にみられる典型的な画像所見が認められないことがあり、診断に苦慮することも多い。

*M. kansasii* は明らかな免疫能の低下のない者にも呼吸器感染症を引き起こすことが知られている非定型抗酸菌の一種である。HIV感染者における抗酸菌感染症としては結核や *M. avium-intracellulare* による感染症が多く、*M. kansasii* 感染症は比較的希とされている。本菌による感染症はHIV非感染者においては薄壁空洞を伴うことが多いとされているが、HIV感染者では浸潤影や間質性陰影を呈することがむしろ多いことが報告されている。今回我々はAIDSの治療経過中、本菌の感染症を合併したと考えられた1例を経験したので報告する。

## 症例呈示

症例は41歳の日本人女性。発熱、湿性咳嗽と呼吸困難があり、2000年3月近医を受診。肺炎、外陰部ヘルペス、壊疽性膿皮症の診断で入院加療を受けた。症状軽快し退院したが、同年8月下旬頃から咳嗽と喘鳴出現し、増強してきたため8月26日近医受診。外来で総合感冒薬および機関誌拡張薬処方され経過観察されたが、症状徐々に悪化し、発熱および外陰部のびらんと疼痛も出現。食欲低下もあり、9月2日近医産婦人科受診し、外陰部ヘルペスの診断で加療目的に入院となった。9月3日から労作時呼吸困難感強く低酸素血症および胸部単純X線写真上びまん性スリガラス影の出現、血液検査上リンパ球数の減少などあり、基礎疾患としてHIV感染症が疑われたため9月6日当院紹介入院となった。既往歴としては小児喘息のほか特記すべきことはなかった。

当院入院時、38度台の発熱と低酸素血症が認められ、WBC 6500/mm<sup>3</sup>であったが、ESR 90 mm/hr,

CRP 12.2mg/dl と炎症所見が認められた。CD4 リンパ球数は 2.2個/mm<sup>3</sup>、HIV-RNA 定量で  $4.7 \times 10^4$  copies/ml であった。外陰部ヘルペスに対してはacyclovirの投与を前医から引き続き行った。胸部単純X線写真およびCTから、カリニ肺炎が疑われ、入院当日気管支洗浄検査を施行したところ、洗浄液に多数のカリニストが確認された。カリニ肺炎に対してST合剤とステロイド剤の投与を行ったところ、発熱および低酸素血症はすみやかに改善傾向を示した。しかし、9月下旬より再び発熱を認め、また胸部写真上の陰影が残存しており、血液検査によるサイトメガロウイルス抗原検査が陽性であったことからサイトメガロウイルス肺炎の合併と診断し、gancyclovirの点滴を行った。以降、呼吸器症状および全身状態が比較的安定してきたことから、10月12日より抗HIV薬として、3TC、d4T、RTVおよびSQVの4剤投与を開始した。これらの治療により徐々に胸部写真上の陰影はかなり改善したものの、右上肺野の陰影は残存しており、11月中旬頃から徐々に咳嗽・白色痰の増加が認められるようになり、またそのころから肺門リンパ節の腫脹が認められるようになった。喀痰検査を繰り返し経過を見ていたところ、12月4日の喀痰培養検査ではじめて *M. kansasii* が検出されるようになった(Gaffky陰性)。これまでのところ、Gaffkyはすべて陰性であるが培養で3回の陽性を認めている。また尿・便・血液培養は陰性であり、身体所見についても明らかな全身播種を疑わせる所見はなく、呼吸器感染症のみと考えられる。画像上は右上肺野の淡い浸潤影と肺門リンパ節腫脹が主体であり、明らかな空洞性病変は認めておらず、肺門リンパ節を除き画像上の増悪所見は乏しい。なお、抗HIV薬内服開始から約3ヶ月経過し、CD4リンパ球数は約60~80/mm<sup>3</sup>であり、HIV-RNA量は測定限界以下(400 copies/ml以下)である。

## 考 察

本邦におけるAIDSに合併する抗酸菌症は結核と非定型抗酸菌症の比率はほぼ3対1であり、菌種としては *M. avium-intracellulare* が大部分であり *M. kansasii* はまれである<sup>1)</sup>。*M. kansasii* の画像所見

は、非HIV感染者では薄壁空洞を認めることが多いが、HIV感染者では浸潤影や間質性陰影のみを呈したとする報告も多い<sup>2)</sup>。非定型抗酸菌症はHIV感染者において全身播種型を呈することが多いことが知られているが、*M. kansasii*は全身播種型を呈することは比較的少なく、肺感染症型が多い<sup>3)</sup>。*M. kansasii*肺感染症に関しては化学療法を受けたほとんどの症例は治療反応性は良好で2～3ヶ月内に排菌陰性となり、改善ないし治療している。しかし、無治療例の予後は不良であることが知られている<sup>4)</sup>。

本症例は*M. kansasii*が検出されるようになってからは画像上増悪は認められず、非定型抗酸菌症としては国療NTM共同研究班およびATSの診断基準のいずれも満たしていないが、HIV感染者において、必ずしも診断基準を満たさなくとも経過中、増悪が認められる頻度が高かったことから、*M. kansasii*が検出された時点で化学療法を行うべきであると報告されている<sup>5)</sup>。

治療はisoniazid (INH), rifampicin (RFP), streptomycin あるいは ethambutol (EB) のうちRFPを含む3剤投与が一般的であるが、protease inhibitor (PI) を内服中の患者ではRFPによりPIの代謝が促進されるためリファマイシン系としてはrifabutin (RFB)が、またニューマクロライド剤のclarithromycin (CAM)やazithromycinなどが用いられている。本症例でも抗HIV薬として2種類のPIを内服していることから、薬剤の選択としてはRFBとCAMを主軸とし、INHやEBの併用投与を検討している。なお治療期間は12ヶ月間ないし18ヶ月間を検討している<sup>6)</sup>。

## 結 論

HIV感染者における抗酸菌感染症は、画像所見に特異的なものはないため、希とされる感染症についても常に留意し、原因微生物の検索にあたるべきである。また、治療に際しては、抗HIV薬は種々の薬剤と相互作用を有するため、慎重に抗菌薬を選択すべきである。

## 参考文献

- 1) 森 亨ら：日本におけるHIV感染抗酸菌症の実態,厚生科学研究費補助金エイズ対策研究事業平成10年度研究報告書：117-128
- 2) 坂谷光則ら：肺の*M.kansasii*症を合併したエイズ患者の1例,厚生科学研究費補助金エイズ対策研究事業平成11年度研究報告書：227-229
- 3) Helbert, M., Robinson, D., et al. :Mycobacterial infection in patients infected with the human immunodeficiency virus., Thorax 45: 45-8,1990
- 4) Horsburgh, CR., et al. : The Epidemiology of Disseminated Nontuberculous Mycobacterial Infection in the Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS)., Am. Rev. Respir. Dis. 139:4-7,1989
- 5) van der Meer, JT., Kerssemakers, SP., et al.:Infections with Mycobacterium kansasii in the Academic Medical Center in Amsterdam: the changing clinical spectrum since the start of the HIV epidemic., Ned Tijdschr Geneesk 142:965-9, 1998
- 6) Official Statement of ATS:Diagnosis and Treatment of Disease Caused by Nontuberculous Mycobacteria., Am. J. Respir. Crit. Care. Med. 156: ppS1-25,1997

## 健康危険情報

特になし

## 研究発表

特になし

## 知的財産権の出願・登録状況

特になし





## *P. carinii* の遺伝子多型と薬剤耐性

中村 哲也<sup>1)</sup>、細谷 紀彰<sup>1)</sup>、高橋 孝<sup>1)</sup>、中村 義一<sup>1)</sup>、岩本 愛吉<sup>1)</sup>、  
木村 京子<sup>2)</sup>、大西 健児<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> 東京大学医科学研究所

<sup>2)</sup> 東京都立墨東病院

### 研究要旨

*P. carinii* (以下PCと略す) のrRNA部分(ITS領域)の遺伝子多型を利用して、日本人PC肺炎症例(24例)のPC遺伝子型を決定した。その結果、過去に報告のない遺伝子型を含め30種類のPC遺伝子型が明らかになった。同一の患者から複数(最高8種類)の遺伝子型が検出されることが多く、PC肺炎が複数のPCの増殖により発生することが示唆された。過去に報告されている諸外国での結果と比較すると、日本人症例のPC遺伝子型は欧米諸国のそれと類似し、アフリカ西海岸のそれとは異なっていた。また、PC遺伝子型の解析は、PCの感染経路の推測に有用であった。

分担研究者：中村哲也

研究協力者：細谷紀彰、高橋 孝、中村義一、岩本愛吉、木村京子、大西健児

Tetsuya Nakamura<sup>1)</sup>, Noriaki Hosoya, Takashi Takahashi<sup>1)</sup>, Yoshikazu Nakamura<sup>1)</sup>, Aikichi Iwamoto<sup>1)</sup>, Kyouko Kimura<sup>2)</sup> and Kenji Oonishi<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Institute of Medical Science, The University of Tokyo and <sup>2)</sup> Tokyo Metropolitan Boktoh General Hospital

目的

*P. carinii* (以下PCと略す) のrRNA部分の遺伝子多型を利用して、PCの遺伝子型を決めることが可能である。日本人症例から分離されるPCの遺伝子型を解析し、我が国に特徴的なPC遺伝子型があるか否かを検討する。また、院内感染が疑われたPC肺炎3症例のPC遺伝子型を決定し、遺伝子型がPC肺炎の感染経路を推測する上で有用か否かを検討する。

方法

PC肺炎患者気管支肺胞洗浄液よりDNAを抽出し、PCR法にてPCのrRNAのITS領域を増幅する。得られたDNA断片をシークエンスしてITS領域の遺伝子配列を解析し、過去に報告されているリファランス配列と比較し遺伝子型を決定する。遺伝子型は、2ヶ所のITS領域 (ITS1とITS2) において定義し、ITS1領域の遺伝子型を大文字のアルファベットで、ITS2領域の遺伝子型を小文字のアルファベットで表記した (Leeら、J. Clin. Micro 36: 734, 1998)。

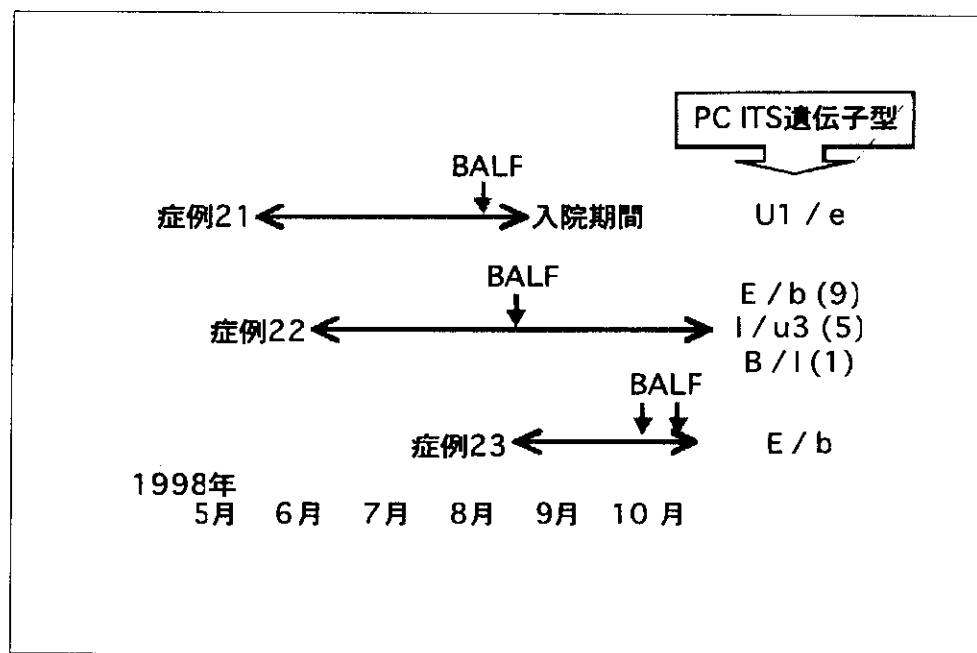
結果

24症例の日本人PC肺炎患者の気管支肺胞洗浄液を解析し、30種類のPC遺伝子型を検出した。これまで報告のない遺伝子型として、ITS1領域:U1、U2、ITS2領域:u3、u4、u5を見いだした。頻度の高かった遺伝子型は、Eb 10例 (ITS1領域がE、ITS2領域がbを意味する)、Eg 8例、Ne 6例、U1e 6例、Bi 4例、Em 4例、Iu 3 4例であった。

同一の患者から複数の遺伝子型が検出されることが多く (最高8種類)、PC肺炎が複数のPCの増殖により発生することが示唆された。今回解析した院内感染が疑われる3症例は下図のような結果となった。各症例のPCの遺伝子型は完全には一致せず、院内感染の可能性は低いものと判断した。

考察

今回の解析で、日本人症例から分離されるPCの遺伝子型が明らかとなった。各症例から分離されるPCは予想以上に多クローンで、このうちのいくつかはこれまで報告されていない遺伝子型であった。過去に報告されている諸外国での結果と比較



院内感染が疑われたPC肺炎症例

すると下表のようになり、日本人症例のPC遺伝子型は欧米諸国のそれと類似し、アフリカ西海岸のそれとは異なっていた。

また、この遺伝子型の解析はPCの感染経路の研究にも有用で、院内感染の可能性が疑われた3症例の解析の結果、これらは独立に発生したもの(恐らく過去に感染していたPCの再活性化)であることが明らかとなった。

**結 論**

- 1) PC肺炎は、複数のクローンにより起こることが多い。
- 2) 日本人から分離されるPCのITS遺伝子型は、欧米人のそれに類似していた。
- 3) ITS遺伝子型解析は、PCの感染経路を推測するのに有用である。

**健康危険情報**

特になし。

**研究発表**

- 1) Hosoya, N., Takahashi, T., Wada, M., Endo, T., Nakamura, T., Sakashita, H., Kimura, K., Ohnishi, K., Nakamura, Y., Mizuochi, T., and Iwamoto, A. Genotyping of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* isolates in Japan based on nucleotide sequence variations in internal transcribed spacer regions of rRNA genes. *Microbiol. Immunol.* 44:591-596, 2000.

**知的財産権の出願・登録情報**

特になし。

PC ITS 遺伝子型	日本 (24例)	デンマーク (45例)	米国 (21例)	アフリカ西海岸 (18例)
Eb	10	15	6	0
Eg	8	38	11	3
Ne	6	26	13	1
U1e	6	0	0	0
Bi	4	6	2	2
Em	4	1	0	0
Iu3	4	0	0	0
その他		Bi=6	Al=5	Me=4



## NKT細胞活性化による日和見真菌感染症の免疫療法に関する基礎的検討

川上 和義、金城 雄樹、屋良さとみ、上江洲香織、高口 善信、斎藤 厚

琉球大学第一内科

### 研究要旨

近年第四のリンパ球として発見されたnatural killer T (NKT)細胞が、極めて迅速にかつ大量のIFN- $\gamma$ やIL-4を産生することで強力な免疫調節作用を有することが報告されている。我々は、この細胞に注目し宿主感染防御における役割について、マウス肺クリプトコッカス(Cn)症モデルを用いて解析した。マウスの気管内にCnを接種し、経時的に肺内に存在するNKT細胞数を調べた。Cn感染4から6日後をピークに肺内でNKT細胞の集積が認められた。さらに、V $\alpha$ 14+NKT細胞を欠損したマウスでは、肺内におけるIFN- $\gamma$ 産生及びTh1細胞の誘導が低下し、Cnの排除が有意に遅延していた。これらの結果から、V $\alpha$ 14+NKT細胞はCn感染防御において重要な役割を担うことが明らかになった。

次に、V $\alpha$ 14+NKT細胞の特異的的刺激剤である $\alpha$ -galactosylceramide ( $\alpha$ -GalCer)を用いてこの細胞を活性化することでCn感染に対して抵抗力を賦与しうるかについて解析を行った。その結果、 $\alpha$ -GalCerを投与することによってIFN- $\gamma$ 産生、Th1細胞が誘導され、真菌の排除が有意に促進された。以上の結果から、難治性日和見感染に対する $\alpha$ -GalCerを用いた免疫療法の可能性が示唆された。

$\alpha$ -GalCerを用いた治療法がエイズ患者の日和見感染症に応用されるためには、エイズ患者においてDCとNKT細胞の機能が保たれている必要がある。そこで、HAART施行前及び後のHIV感染症例からPBMCを採取し、単球をGM-CSF及びIL-4でDCに分化させた細胞をLPSまたはザイモザンで刺激してIL-12、IL-18、TNF- $\alpha$ 産生能を調べ非感染者と比較した。HAART未施行HIV感染患者において、DCのサイトカイン産生能は低下していないことが明らかになった。また、HAARTによる影響も観察されなかった。次に、HAART未施行HIV感染者及び非感染者の末梢血単核球中のNKT細胞、 $\alpha$ -GalCer反応性V $\alpha$ 24+V $\beta$ 11+NKT細胞の比率をフローサイトメーターを用いて解析した。その結果、両群間で有意な差を認めなかった。以上の結果から、エイズ患者におけるDCの機能は正常者と比べて低下していることはなく、 $\alpha$ -GalCer反応性NKT細胞は量的に正常者と明かな差はみられなかった。従って、エイズ患者の難治性クリプトコッカス感染症に $\alpha$ -GalCerを用いた免疫療法が補助的治療法として有用である可能性が考えられた。

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、上江洲香織、高口善信

**A basic study on putative immunotherapy with NKT cell activator against opportunistic fungal infectious diseases**

Kazuyoshi Kawakami, Yuki Kinjo, Satomi Yara, Kaori Uezu, 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* (Cn) に対する感染防御は主として細胞性免疫によって担われている。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<sup>1-3)</sup>。

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<sup>4)</sup>。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 $\alpha$ -galactosylceramide ( $\alpha$ -GalCer) が発見され<sup>5)</sup>、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<sup>6)</sup>。これは樹状細胞 (Dendritic cells: DC) 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、Cn感染防御におけるNKT細胞の役割を解析するために、 $\alpha$ -GalCerに反応性のV $\alpha$ 14+NKT細胞を欠損したマウスを用いてその感染経過及びサイトカイン産生に及ぼす影響を解析した。また、動物感染モデルに $\alpha$ -GalCerを投与しその影響についても検討した<sup>7)</sup>。さらに、HIV感染者におけるDC及びNKT細胞の量的、機能的状態について調べるために、感染者及び非感染者の末梢血単球より得られたDCのサイトカイン産生能、そして末梢血単核球中のNKT細胞の割合を比較検討した。

## 方法

### 1. マウス

7～15週齢雄のC57Bl/6マウス(日本チャールス・リバー、横浜)を用いた。実験によっては、J $\alpha$ 281遺伝子欠損(V $\alpha$ 14+NKT細胞欠損)マウス(千葉大学谷口 克教授より供与)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Cn臨床分離株YC-13(長崎大学第二内科河野 茂教授より供与)を使用した。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Cn感染モデルの作成

肺感染モデルは、Cn( $1 \times 10^6$ CFU)を直接気管内に接種した。静脈感染モデルは、Cn( $1 \times 10^6$ CFU)を眼窩静脈から接種して作成した。これらのモデルでは、感染後から経時的な真菌の排除がみられた。

### 4. $\alpha$ -galactosylceramide

$\alpha$ -galactosylceramide [ $\alpha$ -GalCer: キリンビール株式会社(東京)より供与] 2 $\mu$ 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vehicle (0.02% polysorbate-20) 200 $\mu$ lを同様に投与した。

### 5. 肺及び脾臓内生菌数の測定

Cn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 $\mu$ 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. 脾細胞サイトカイン産生能の解析

Cn感染後経時的に分離精製した脾細胞( $2 \times 10^6$ )

ml)を10%FCS加RPMI1640培地中で種々の濃度のCn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。

### 7. 症例

検討症例は、琉球大学医学部第一内科に入院又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9人(HAART施行前4人、施行後5人)及び健常人5人とした。症例の臨床的特徴は表1にまとめている。

### 8. 末梢血単球由来樹状細胞の調整とサイトカイン産生能の解析

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。得られた単球をIL-4(1000U/ml、Peprotech社、イギリス)及びGM-CSF[(1000U/ml(キリンビール株式会社(東京)より提供)存在下で1日おきに培養液を半換えし、7日間培養後DCに分化させたものを実験に用いた。DCのサイトカイン産生能を調べるために、 $1 \times 10^5$ /mlの濃度でLPS(1 $\mu$ g/ml)又はザイモザン(100 $\mu$ g/ml)とともに48時間培養し、培養上清中のIL-12、IL-18、TNF- $\alpha$ 濃度をELISAにて測定した。

### 9. サイトカイン濃度の測定

マウスIFN- $\gamma$ (Endogen社、米国)、IL-12(BioSource社、米国)、ヒトIL-12(R&D社、米国)、

IL-18(医学生物学研究所、名古屋)及びTNF- $\alpha$ (Endogen社)はELISAキットを用いて測定した。

### 10. 肺内白血球分画の分離

Cn感染後経時的にマウスを屠殺開胸し、右心室から冷生食で肺内血管床を洗浄後摘出した肺をホモジナイズ、DNase I及びコラゲナーゼで1時間処理した後、パーコール比重遠心法にて白血球分画を精製した<sup>8)</sup>。

### 11. 肺内リンパ球の抗原再刺激によるIFN- $\gamma$ 産生能の解析

Cn感染後7及び14日後に肺内白血球分画を分離し、得られた細胞( $2 \times 10^6$ /ml)を種々の濃度のCn生菌とともに48時間培養し、その上清中のIFN- $\gamma$ 濃度をELISAキットを用いて測定した。

### 12. フローサイトメトリー解析

マウス肺内白血球は、FITC標識抗マウスCD3抗体及びPE標識抗マウスNK1.1抗体で染色後、EPICS-XL(Coulter社、米国)を用いて各表面抗原の発現率を解析した。PBMCは、FITC標識抗ヒトCD3、V $\alpha$ 24抗体及びPE標識抗ヒトCD56、V $\beta$ 11抗体(Pharmingen社、米国)を用いて染色した。

### 13. 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を有意とした。

Table 1 Characteristics of HIV-infected patients enrolled in this study

HAART (-)				HAART (+)			
Patients	Viral loads (copies/ml)	CD4+ cell counts (/ $\mu$ l)	Opportunistic infection	Patients	Viral loads (copies/ml)	CD4+ cell counts (/ $\mu$ l)	HAART
1. 50M	2.2x10 <sup>6</sup>	25	PC (Post-Tx)	1. 34M	<500	182	AZT, 3TC, NFV
2. 53M	5x10 <sup>5</sup>	23	PC (Post-Tx)	2. 20M	1x10 <sup>4</sup>	194	d4T, ABC, RTV, SQV
3. 39M	1.3x10 <sup>5</sup>	18	PC (Post-Tx)	3. 34M	3.8x10 <sup>3</sup>	114	d4T, ddI, NVP
4. 41F	4.7x10 <sup>4</sup>	2	PC (Post-Tx)	4. 57M	1.5x10 <sup>3</sup>	87	d4T, 3TC, RTV, SQV
				5. 17F	<500	335	d4T, 3TC, RTV, SQV

## 成果

### 1. Cn感染防御におけるNKT細胞の役割

マウスの気管内にCnを感染させ、経時的に肺から白血球分画を調整、抗マウスCD3、NK1.1抗体で染色後、フローサイトメトリにてNKT (CD3+NK1.1+)、NK (CD3-NK1.1+)、T (CD3+NK1.1-) 細胞の割合を調べた。Cn感染4～6日後をピークに肺内のNKT細胞の増加が認められた(図1)。NK細胞、T細胞も経時的に増加したが、NKT細胞ほどではなかった。

Cn感染防御におけるNKT細胞の役割を解析するために、V $\alpha$ 14+NKT細胞欠損マウス及びコントロールマウスにCnを肺内感染させ、経時的に肺内

の生菌数を調べ両群で比較検討した。その結果、V $\alpha$ 14+NKT細胞欠損マウスにおいて真菌の排除が有意に遅延していた(図2)。また、V $\alpha$ 14+NKT細胞欠損マウスでは、感染1週間後に得られた肺内リンパ球の抗原再刺激によるIFN- $\gamma$ 産生がコントロールに比べて有意に低下していた。

以上の結果から、Cn感染防御及びCn特異的Th1細胞の分化誘導においてNKT細胞が重要な役割を担っていることが明らかになった(図3)。

### 2. NKT細胞活性化による感染防御効果

$\alpha$ -GalCer投与によるCn感染に及ぼす影響について解析した。Cn静脈感染マウスに $\alpha$ -GalCerを腹腔内投与し、7、14日後の肺及び脾臓内の生菌数

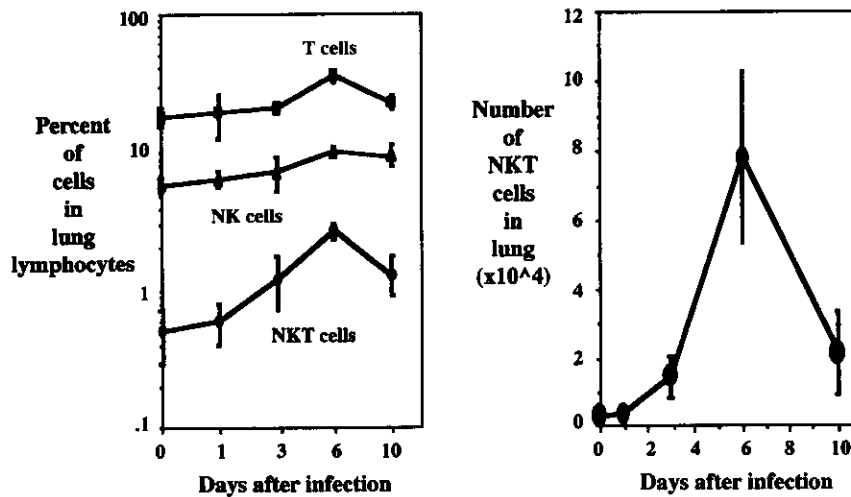


Fig. 1 Accumulation of NKT cells in the lungs after infection with *C. neoformans*

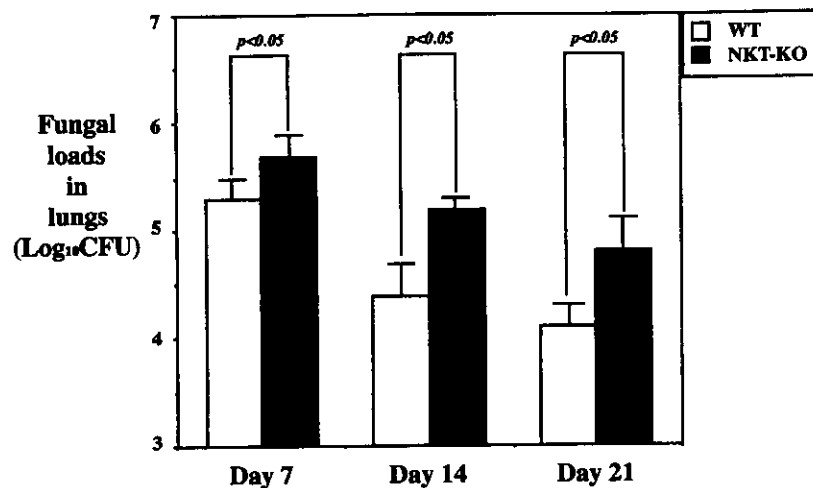


Fig. 2 Important role for V $\alpha$ 14 + NKT cells in the host defense against cryptococcal infection

を調べた。vehicle投与マウスでは経時的な真菌の排除が観察されたが、 $\alpha$ -GalCer投与群では有意に促進していた(図4)。同様の実験で血清中のIFN- $\gamma$ 濃度を測定すると、Cn感染マウスでは $\alpha$ -GalCer投与によってサイトカイン産生が著明に亢進していた。また、同処置によって脾臓内でのCn抗原特異的なTh1細胞の分化誘導も有意に高まっていた。

以上の結果から、 $\alpha$ -GalCerによるNKT細胞の活性化は、Cn感染防御効果を誘導しうることが明らかになった。

### 3. HIV感染者における末梢血DC及びNKT細胞の解析

動物実験の結果から、 $\alpha$ -GalCerがエイズに合併する難治性Cn症の治療に有用である可能性が示唆された。そのためには、少なくともDC及び $\alpha$ -GalCer応答性NKT細胞が量的、機能的に保たれている必要がある。そこで、HIV感染者及び非感染者の末梢血単球から *in vitro* でDCを誘導し、LPS又はザイモザン刺激による各種サイトカイン産生能を調べ両群間で比較検討した。HIV感染者は、HAART施行者と未施行者に分けて検討した。そ

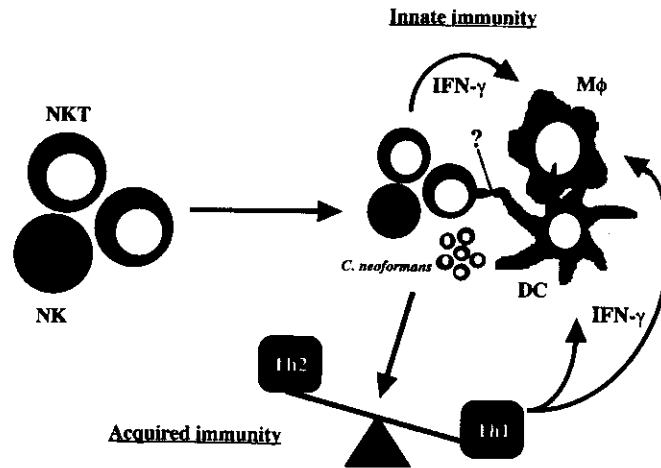


Fig. 3 Possible role for NKT cells in immune response to *C. neoformans*

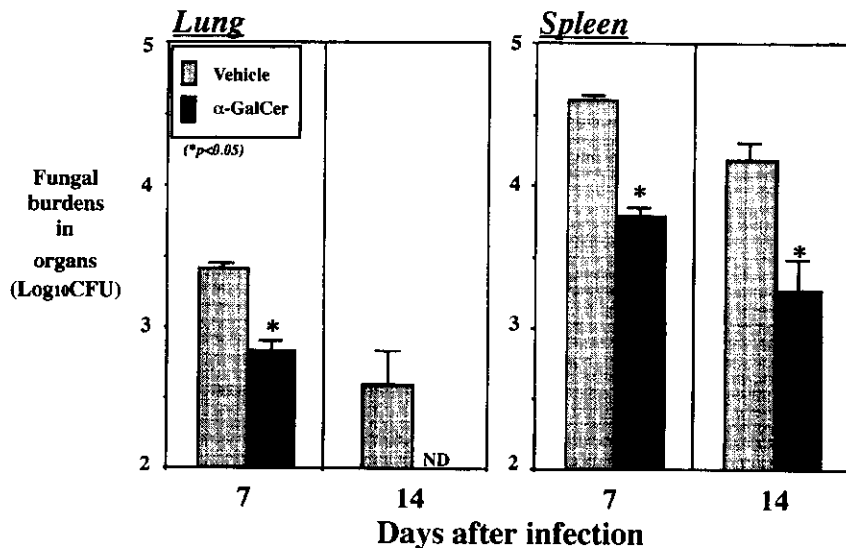


Fig. 4 Protective effect of  $\alpha$ -GalCer in the systemic infection with *C. neoformans*



の結果、HAART未施行及び施行 HIV 感染者ともに IL-12、IL-18、TNF- $\alpha$  産生能の低下は認められなかった。また、HAARTによる影響も観察されなかった (図5)。

ヒト末梢血中に存在する NKT 細胞を検出するために、HIV 感染者又は非感染者から得た PBMC を FITC 標識抗 CD3、V $\alpha$ 24 抗体及び PE 標識抗 CD56、V $\beta$ 11 抗体で染色後フローサイトメトリ解

析した。その結果、NKT (CD3+CD56+) 細胞、 $\alpha$ -GalCer 応答性 NKT (V $\alpha$ 24+V $\beta$ 11+) 細胞ともに両群間で有意差を認めなかった (図6)。

以上の結果から、少なくとも DC のサイトカイン産生能及び PBMC 中の NKT 細胞の割合については HIV 感染者で低下していないことが明らかになった。

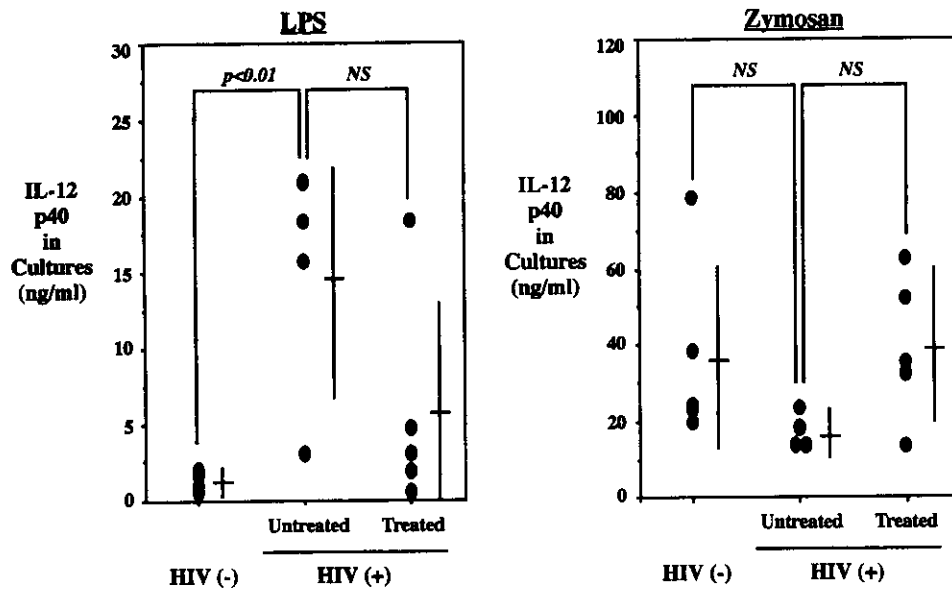


Fig. 5 Comparison of IL-12p40 production by Mo-DCs between HIV(-) and HIV(+) subjects

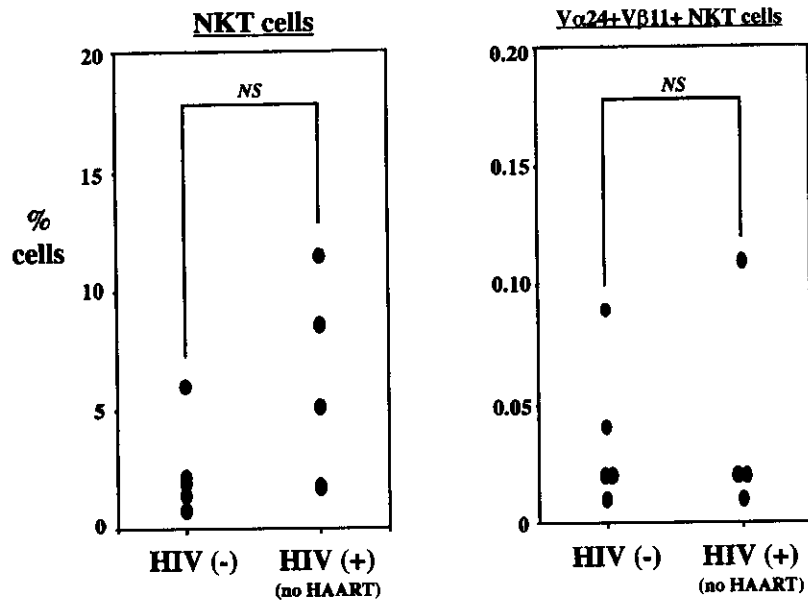


Fig. 6 Comparison of NKT cells in PBMCs between HIV-infected and uninfected patients

## 考察と結論

HIV感染者では、末梢血のCD4+T細胞数の減少に伴って種々の日和見感染症を発症する。特に、CD4+T細胞が200/ $\mu$ l以下になると高頻度に日和見感染症を合併するが、中には50/ $\mu$ l以下になっても明かな日和見感染症を起こさない症例もみられる。その原因については未だ明かではないが、CD4+T細胞以外のリンパ球が低下したヘルパー細胞の機能を代償している可能性が考えられる。その中には、CD8+T細胞、 $\gamma\delta$  T細胞、NK細胞、NKT細胞などが含まれる。CD8+T細胞はCD4+T細胞と同様にIFN- $\gamma$ を産生するTc1細胞とIL-4を主に産生するTc2細胞に分かれることが知られている<sup>9)</sup>。これまでの報告では、CD8+T細胞はHIV感染の後期まではその数が保たれているが、末期になると減少し日和見感染症の頻度が増加する。一方、末梢血の $\gamma\delta$  T細胞についてはむしろ増加<sup>10,11)</sup>、NK細胞はその数及び機能ともに低下する<sup>12,13)</sup>との報告が多くみられる。しかし、HIV感染者におけるNKT細胞の挙動については未だ報告がみられない。

本研究では、T細胞とNK細胞の特長を合わせ持つNKT細胞のCn感染防御機構における役割について、特に $\alpha$ -GalCer応答性のNKT細胞を遺伝的に欠損したマウスを用いて検討した。このマウスではCn感染後のTh1反応及び感染防御能がコントロールに比べ低下していたことから、V $\alpha$ 14+NKT細胞が自然免疫におけるIFN- $\gamma$ の産生、Th1細胞への分化、ひいては感染防御において極めて重要な役割を担っていることが推察された。V $\alpha$ 14+NKT細胞は、これまでの報告から、DC上のCD1d分子に結合したGlycosyl Phosphatidyl Inositol (GPI)、あるいは人工糖脂質である $\alpha$ -GalCerを特異的に認識して活性化され大量のサイトカインを産生することがわかっている<sup>4)</sup>。マラリアやリーシュマニア原虫由来のGPIがNKT細胞を活性化しうることは報告されているが<sup>14)</sup>、Cnについては未だ明かではない。

さらに本研究では、 $\alpha$ -GalCer投与によってNKT細胞を活性化させると、Cn感染マウスにおいてTh1反応が著明に誘導され、感染抵抗性が高められることも明らかになった。この結果から、 $\alpha$ -

GalCerあるいは $\alpha$ -GalCerで処理したDCを用いた新たな免疫療法がエイズに合併した難治性Cn感染症患者において有用である可能性が示唆された。実際、悪性疾患においては、このような治療法が既に臨床治験の段階に入っている。エイズ症例においては、極度にヘルパーT細胞機能が低下している状態であり、同様にDCやNKT細胞の機能に障害があればその実現性が難しくなることが予想される。

そこで、HIV感染者及び非感染者の末梢血単球から*in vitro*でDCを分化誘導し、LPS又はザイモザン刺激による各種サイトカイン産生能を調べ両群間で比較検討した。さらに、PBMC中のNKT細胞、 $\alpha$ -GalCer応答性NKT細胞の割合についても比較検討を行った。その結果、少なくともHIV感染者において、DCのサイトカイン産生能及びPBMC中のNKT細胞の割合は低下しておらず $\alpha$ -GalCerによる治療法の可能性を残すものであった。今後は、HIV感染者のPBMCから*in vitro*で $\alpha$ -GalCer及びDC依存的にV $\alpha$ 24+V $\beta$ 11+NKT細胞を増殖させ、得られた細胞のサイトカイン産生能を調べることで本細胞の機能低下がないか確認する必要がある。

これまで動物実験を重ねる中で、 $\alpha$ -GalCerによる副作用は観察されておらず、IFN- $\gamma$ やIL-12そのものを投与するサイトカイン療法に対して比較的 safely 使用できる可能性が期待される。これまでに報告された多くの免疫療法は、効果の不十分さ、作用機序の不明確さ、あるいは効果は強くてもその副作用のために臨床応用が阻まれてきた。今後、 $\alpha$ -GalCerが難治性感染症の治療に有効に使用されるためには、その投与によって生体内で起こる様々な反応を動物モデルを用いてさらに詳細に解析していくことが重要であると考えられる。

## 参考文献

- 1) Hill, J. O., and A. G. Harmsen. 1991. Intrapulmonary growth and dissemination of an avirulent strain of *Cryptococcus neoformans* in mice depleted of CD4+ or CD8+ T cells. *J. Exp. Med.* 173: 755-758.
- 2) Huffnagle, G. B., J. L. Yates, and M. F. Lipscomb. 1991. Immunity to a pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection requires both CD4+ and CD8+ T cells. *J. Exp. Med.* 173: 793-800.

- 3) Mody, C. H., M. F. Lipscomb, N. E. Street, and G. B. Toews. 1990. Depletion of CD4+ (L3T4+) lymphocytes in vivo impairs murine host defence to *Cryptococcus neoformans*. *J. Immunol.* 144: 1472-1477.
- 4) 河野 鐵, 谷口 克: 第4のリンパ球系列-NKT細胞の機能 最新医学 1999; 54: 2352-2359.
- 5) Kawano, T., J. Cui, Y. Koezuka, et al.: CD1d-restricted and TCR-mediated activation of V $\alpha$ 14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* 278: 1626-1629.
- 6) Taura, I, T. Kawano, Y. Akutsu, et al.: Inhibition of experimental tumor metastasis by dendritic cells pulsed with  $\alpha$ -galactosylceramide. *J. Immunol.* 1999; 163: 2387-2391.
- 7) Kawakami, K., Kinjo, Y., Yara, S., et al.: Activation of V $\alpha$ 14+ natural killer T cells by  $\alpha$ -galactosylceramide results in development of Th1 response and local host resistance in mice infected with *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* 2001; 69: 213-220.
- 8) Kawakami, K., Kohno, S., Morikawa, N., et al.: Activation of macrophages and expansion of specific T lymphocytes in the lungs of mice intratracheally inoculated with *Cryptococcus neoformans*. *Clin. Exp. Immunol.* 1994; 96: 230-237.
- 9) Sad, S., R. Marcotte, and T. R. Mosmann.: Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8+ T cells into cytotoxic CD8+ T cells secreting Th1 or Th2 cytokines. *Immunity* 1995; 2: 271-279.
- 10) DePaoli, P., D. Gennari, P. Martelli, et al.: A subset of gamma delta lymphocytes is increased during HIV-1 infection. *Clin. Exp. Immunol.* 1991; 83: 187-191.
- 11) Boullier, S., G. Dadaglio, A. Lafeuillade, et al.: V delta 1 T cells expanded in the blood throughout HIV infection display a cytotoxic activity and are primed for TNF-alpha and IFN-gamma production but are not selected in lymph nodes. *J. Immunol.* 1997; 159: 3629-3637.
- 12) Ullum, H., P. C. Gotzsche, J. Victor, et al.: Defective natural immunity: an early manifestation of human immunodeficiency virus infection. *J. Exp. Med.* 1995; 182: 789-799.
- 13) Sepulveda, C., J. Puente, C. Weinstein, et al.: Enhancement of natural killer cell activity in HIV-1-infected subjects by a mixture of the calcium ionophore A23187 and the phorbol ester TPA: lack of response to a similar challenge with interleukin-2 or alpha-interferon. *Am. J. Ther.* 1997; 4: 413-421.
- 14) Schofield, L., McConville, M. J., Hansen, D., et al.: CD1d-restricted immunoglobulin G formation to GPI-anchored antigens mediated by NKT cells. *Science* 1999; 283: 225-229.

## 健康危険情報

特になし

## 研究発表

### (1) 論文発表

- 1) Kawakami, K., Kinjo, Y., Yara, S., Koguchi, Y., Uezu, K., Nakayama, T., Taniguchi, M., and Saito, A.: Activation of V $\alpha$ 14+ natural killer T cells by  $\alpha$ -galactosylceramide results in development of Th1 response and local host resistance in mice infected with *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* 2001; 69: 213-220.

### (2) 学会発表参考文献

- 1) Kinjo, Y., Kawakami, K., Yara, S., Koguchi, Y., and Saito, A.: Effect of NKT cell activation on cryptococcal infection. *The FASEB J.* 2000; 14: A953.
- 2) 金城雄樹、川上和義、屋良さとみ、高口善信、上江洲香織、中山俊憲、谷口 克、斎藤厚:  $\alpha$ -galactosylceramideによるV $\alpha$ 14+NKT細胞の活性化とクリプトコッカス感染防御の誘導. 日本免疫学会総会・学術集会記録 2000; 30: 291.
- 3) 川上和義、金城雄樹、屋良さとみ、高口善信、上江洲香織、竹田 潔、審良静男、斎藤厚: クリプトコッカス感染マウスでのNKT細胞活性化によるIFN- $\gamma$ 産生誘導におけるIL-18の役割. 日本免疫学会総会・学術集会記録 2000; 30: 286.
- 4) 高口善信、川上和義、今 重之、上出利光、斎藤 厚: *Penicillium marneffe*刺激によるPBMCからのIL-12p40産生誘導におけるオステオポスチンの役割. 日本免疫学会・学術集会記録 2000; 30: 292.

## 知的財産権の出願・登録状況

特になし



## オステオポンチン(Eta-1)の細胞性免疫誘導における役割と日和見真菌感染症の免疫療法への応用の可能性

高口 善信<sup>1)</sup>、川上 和義<sup>1)</sup>、今 重之<sup>2)</sup>、上出 利光<sup>3)</sup>、斎藤 厚<sup>1)</sup>

1) 琉球大学医学部第一内科

2) 免疫生物研究所

3) 北海道大学遺伝子病制御研究所 病因研究部門 分子免疫

### 研究要旨

真菌はAIDSに最も高頻度に合併する日和見病原微生物である。*Penicillium marneffei*はタイなど東南アジア諸国において、HIV感染症に合併する日和見真菌の主な原因菌である。未治療では致死率が75%と重篤な疾患であり、抗真菌薬による治療で改善を示した症例でも治療を中断すると再発することが多い。これらの現状から既存の抗真菌薬に加え、新たな作用を有した免疫療法の開発が望まれている。

これまで我々はヌードマウスを用いて、本真菌に対する感染防御機構は主に細胞性免疫によって担われていることを明らかにした。さらにこの感染ヌードマウスにIL-12を投与したところ臓器内生菌数の減少と生存期間の延長を認めた。これらのことはエイズ患者のように細胞性免疫が高度に障害された場合においても、IL-12投与によって、いわゆる自然免疫の活性化を介して、合併する*P. marneffei*などの日和見感染症の免疫療法が有用である可能性を示唆している。

オステオポンチン (early T-lymphocyte activation -1 : Eta-1) は分子量約6万前後のリン酸化糖蛋白である。種々の機能を有するが、サイトカインとしてはT細胞から産生されマクロファージに対する遊走活性を示す。近年、結核やサルコイドーシスといった肉芽腫性疾患の肉芽腫に発現していることが病理組織学的に示され、抗酸菌に対する感染防御に働くことが明らかになってきたがその詳細は明らかではなかった。こうした中、最近、オステオポンチン遺伝子欠損マウスを用いた解析により、オステオポンチンがTh1反応を誘導するサイトカインであるIL-12の産生に必須であることが示され、大きな注目を浴びている。本研究はこうした背景から、まだ詳細が明らかでない、ヒトにおけるIL-12の産生誘導におけるオステオポンチンの役割を調べ、AIDSに合併する難治性日和見真菌症の治療への応用の可能性を探る目的で行った。

今回の解析により*P. marneffei*刺激によりヒト末梢血単核球(PBMC)からIL-12およびオステオポンチンが産生されることを明らかにし、さらにIL-12産生をオステオポンチンが増強することを見出した。また、オステオポンチン自体もPBMCからのIL-12産生を直接誘導した。さらに我々は、*P. marneffei*刺激によるPBMCからのオステオポンチン産生誘導にGM-CSFが関与していることを明らかにした。オステオポンチンの産生細胞は主にCD14陽性細胞であり、GM-CSF産生細胞はNK細胞であった。以上のことから、*P. marneffei*刺激によるPBMCからのIL-12産生において、オステオポンチンが重要な働きをしていることが明らかになった。今後は、抗真菌活性におけるオステオポンチンの役割をより詳細に検討する必要があると考えられた。