

厚生科学研究費補助金  
エイズ対策研究事業  
平成12年度 研究報告書

研究課題：

HIV等のレトロウイルスによる痴呆や神経障害の  
病態と治療に関する研究

平成13年3月

主任研究者 出雲周二  
(鹿児島大学医学部 難治性ウイルス疾患研究センター 教授)

## 厚生科学研究費補助金研究報告書概要

研究費の名称：厚生科学研究費

研究事業名：エイズ対策研究事業

研究課題名：HIV等のレトロウイルスによる痴呆や神経障害の  
病態と治療に関する研究

国庫補助金精算所要額（円）： 38,000,000円

研究期間： 2000年～2002年

研究年度： 2000年度

主任研究者名： 出雲 周二

鹿児島大学医学部 難治性ウイルス疾患研究センター 教授

分担研究者名：	田平 武	国立精神神経センター	部長
	岸田修二	都立駒込病院	内科医長
	馬場昌範	鹿児島大学難治ウイルス研	教授
	納 光弘	鹿児島大学	教授
	宇宿功市郎	鹿児島大学	助教授
	斉藤邦明	岐阜大学	講師
	高宗暢暁	熊本大学	助手
	木戸 博	徳島大学分子酵素研	教授

## 目 次

### 総括研究報告書

HIV等のレトロウイルスによる痴呆や神経障害の病態と治療に関する研究

主任研究者 鹿児島大学医学部難治性ウイルス疾患研究センター 出雲周二 …2

### 分担研究報告書

1. HIV 脳症の神経障害の臨床・病態に関する研究：抗ウイルス療法による髄液 HIV RNA 量の検討  
東京都立駒込病院神経内科医長 岸田修二 …10
2. HIV 感染に伴う中枢神経障害の程度との脳脊髄液中の 14-3-3 蛋白質についての考察  
徳島大学分子酵素学研究センター・酵素分子化学部門 木戸 博、他 …19
3. サルエイズモデルを用いたエイズ脳症の病態機序の解析  
鹿児島大学医学部難治性ウイルス疾患研究センター 出雲周二、他 …25
4. ウイルスの持続感染と神経障害に関する研究  
国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第6部部长 田平 武、他 …30
5. HIV等のレトロウイルスによる痴呆や神経障害の病態と治療に関する研究  
岐阜大学医学部臨床検査医学 斉藤邦明 …33
6. HIV-1 感染による中枢神経障害の治療薬の開発  
鹿児島大学医学部難治性ウイルス疾患研究センター 馬場昌範 …39
7. HIV等のレトロウイルスによる痴呆や神経障害の病態と治療に関する研究  
熊本大学薬学部 高宗暢暁 …45
8. HAM 患者の HTLV-I プロウイルス量と神経症状の検討  
鹿児島大学医学部難治性ウイルス疾患研究センター 出雲周二、他 …50
9. HAM と ATL の発症と関連した HTLV-I *tax* の変異  
鹿児島大学医学部第3内科 納 光弘、他 …54
10. HTLV-I 感染者 PBMC を用いた Tax 発現誘導に伴う感染細胞、HTLV-I 特異的 CTL の表面抗原、サイトカインの動態の解析  
鹿児島大学医学部医療情報管理学 宇宿功市郎、他 …60

# 総括研究報告書

## 厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

### 総括研究報告書

研究課題：HIV等のレトロウイルスによる痴呆や神経障害の病態と治療に関する研究

主任研究者 出雲周二 鹿児島大学 難治性ウイルス疾患研究センター 教授

分担研究者：国立精神神経センター 部長  
田平 武  
都立駒込病院 内科医長  
岸田修二  
鹿児島大学難治ウイルス研 教授  
馬場昌範  
鹿児島大学 教授  
納 光弘  
鹿児島大学 助教授  
宇宿功市郎  
岐阜大学 講師  
斉藤邦明  
熊本大学 助手  
高宗暢暁  
徳島大学分子酵素研 教授  
木戸 博

ンパ球やマクロファージが中枢神経内に侵入し、ウイルス抗原の発現とそれに対する宿主の免疫応答との関連で神経組織が傷害されるという、HTLV-Iが引き起こすHAMと共通する機序も想定される。本研究の目的はHAMとHIV脳症の病態を比較しながら解析することにより、発症病態の共通するもの、それぞれに特異的なものを明らかにし、病態に則した治療法を開発することである。

#### A. 研究目的

HAARTの確立により、HIV感染症は不治の病から長期間コントロールする慢性疾患へと変貌しつつある。しかしリンパ組織病変とは独立して起こっているHIV脳症がHAART療法によりどのように変貌するかは不明であり、今後あらたな問題となることが懸念される。HIV脳症の病態はウイルスが直接神経細胞に感染するのではなく、感染リ

#### B. 研究方法及び成果

##### 1) HIV脳症に関する研究

###### a) HIV脳症の臨床病態に関する研究

岸田らはHIV感染者の長期経過の追跡体制を確立し、抗ウイルス療法がHIV脳症の発症・病態にどのように影響を与えるかについて検討した。抗ウイルス剤投与による血漿と髄液でのウイルス量の変動パターンから、①逆転写酵素阻害剤のみでは髄液ウイルス量は抑制できないこと、②プロテアーゼ阻害剤を含むHAART療法によっても髄液ウイルス量が十分低下しない例があること、③脳血管関門の破綻を起こしている他の神経合併症の治療のみで髄液HIV-RNA量が検出限界以下になった例が存在することを明らか

にした。髄液 HIV には脳血管関門の破綻により血流から移行した short-life span のウイルスと、髄液中で自己増殖している long-lived なウイルスの存在が考えられ、後者の動態が HIV 脳症の発症・病態に重要であることを示唆している。

木戸らは脳の組織傷害に伴って脳脊髄液中に出現する 14-3-3 蛋白質の各アイソマーに対する特異的抗体を作成し、エイズ患者の髄液についてアイソマーパターンを解析した。その結果、①脳の実質傷害が強く疑われた患者でのみ 14-3-3 蛋白質が検出され、②アイソマーパターンは従来クロイツフェルト・ヤコブ病で報告されパターンとは異なるものであった。HIV 脳症における脳の実質傷害を反映するリアルタイムのマーカーとして HIV 脳症の早期診断、治療の程度・有効性の判定に役立つ可能性がある。

#### b) 動物モデルを用いた分子病理学的解析

出雲らはつくば霊長類センター森研究員との共同研究として、サルエイズモデルの脳組織を用いた解析を行い、①SIV 感染サルの一部に明らかなエイズ脳症病変がみられること、②脳症の進展とリンパ節病変の進行とは必ずしも平行していないこと、③脳症の病理組織像として大脳白質の多核巨細胞を伴うグリア結節に加え、皮質のニューロピルの局所的なグリオシスも脳症の指標となることが示唆された。また、④病巣における SIV 感染細胞の同定法として *in situ hybridization* 法を確立し、グリア結節の多核巨細胞、ミクログリアのみならず、一見正常に見える血管周囲のマクロファージにも陽性で、ウイルスの潜在感染部位として血管周囲マクロファージが重要であると思われる。

田平らはネコ免疫不全ウイルス(FIV)における脳症の発症機序を解明するために、生後

1～2日ネコ脳由来一次培養細胞を用いて感染受容体としての CXCR4 の機能を解析し、また、感染ネコの脳で CXCR4 の発現を調べた。その結果、①FIV は CXCR4 を介して *in vitro* ではアストロサイトに感染しうること、②CXCR4 の *in vivo* での発現は主にニューロンに認められ、わずかにアストロサイトやミクログリアにもみられること、③FIV 感染脳ではニューロンの CXCR4 発現は減少し、ウイルスの感染は血管周囲ミクログリア・マクロファージにのみみられることを明らかにした。ニューロンでの CXCR4 down regulation はニューロンの機能障害を示唆していると思われる。

斉藤らはマウスエイズモデルにみられる学習機能障害について行動薬理的解析を行った。①TNF- $\alpha$ ノックアウトマウスでは感染によりエイズの進行が wild type と同様に生じるが、学習障害は起こらないこと、②脳内ミクログリアの活性化は wild type と同様に起こっていることを見だし、TNF- $\alpha$ がこの学習障害に直接あるいは間接的に関与していることが証明された。また、③抗 TNF- $\alpha$ 薬である Propentofylline の投与により肝臓・脾臓で有意に TNF- $\alpha$ の合成が抑制されたが、脳内の TNF- $\alpha$ 抑制効果は認められず、学習障害の改善もみられなかった。投与方法の工夫、脳に選択的な TNF- $\alpha$ 阻害剤の開発などが必要である。

#### c) 中枢神経障害予防・治療の薬剤の開発

馬場らはヒト神経芽細胞腫由来 SK-N-MC 細胞を神経細胞様に分化させ、HIV 脳症の病態に関わる各種サイトカインや HIV-1 由来蛋白質の神経細胞への影響を検討した。また、末梢血より分離、分化させたマクロファージを用いて各種刺激に対するサイトカイン・ケモカインの放出と薬剤による影響を検討した。その結果、①TNF- $\alpha$ や gp120 の刺激で

神経細胞の生細胞率が低下し、この細胞傷害性は抗酸化剤 N-acetylcysteine や抗炎症性アルカロイド cepharanthine の添加により抑制された。②培養マクロファージのリポ多糖刺激による炎症性サイトカイン・ケモカインの産生を cepharanthine は低濃度で抑制した。cepharanthine はその神経保護作用、サイトカイン抑制作用の両面から治療効果が示唆される。

高宗らは HIV 脳症におけるウイルス因子と目される細胞外 Tat 及び HIV-1 エンベロープを介した神経細胞死を Tat 及び CXCR4 を標的とした薬剤で制御することを試みた。①Tat の zinc finger を標的とする thiamine 誘導体(BDT)は Tat と結合し、Tat の転写活性を濃度依存的に抑制した。②CXCR4 アンタゴニストである Zinc dithiocarbamate 誘導体、Z-8 は、HIV-1X4 株により誘導される SK-N-MC 細胞の細胞死を濃度依存的に抑制した。ウイルスの複製に必須の CXCR4 や Tat 分子の制御は HIV 脳症の治療戦略としても期待される。

## 2) HTLV-I 関連脊髄症に関する研究

### a) HAM の臨床病態に関する研究

HAM では末梢血プロウイルス量が高値で、発症病態との関連が示唆されているが、より病態を反映していると考えられる髄液中のプロウイルス量と HAM の病態との関連は不明である。出雲・納らは、①同時採取した末梢血単核球と髄液単核球中のプロウイルス量と病勢とを比較検討し、臨床経過の短い活動期の患者において髄液中で有意に感染率が高いことを見出した。また、②末梢血リンパ球でのプロウイルス量の経時的検討により、一過性にプロウイルスが増加している症例があり、その時期に一致して臨床症状の悪化が認められた。また、③プロウイルスの

変動に連動してウイルス抗原特異的 CTL の変動がみられた。経時的な HAM の病勢に末梢血・髄液中の HTLV-I 感染細胞の増加と、それに対応する CTL の変動が関与していることが推察される。

### b) 発症に関わるウイルス要因の検索

HAM はウイルスキャリアーの一部にのみ発症するため、発症を規定する複数の因子の存在が示唆されている。その一つとして、感染している HTLV-I 側の要因について検索し、①HTLV-I *tax* にいくつかの塩基配列置換がみられ、そのうち 4 塩基置換は連動して起こっており、HTLV-I サブグループを形成していること、②このサブグループは HAM 患者で有意に高率にみられること、③このサブグループの HAM 発症に対するリスクはすでに報告した HLA-A\*02 とは独立していることを明らかにした。一方、ATL 発症と関連するウイルス変異については、④ HTLV-I を発現できないストップコドンや Tax の免疫認識エピトープの変化、*tax* の広範な欠失など、CTL の認識から逃れる変異が認められた。

### c) 発症機序に関する病理組織学的検索

HAM は主として脊髄を傷害するが、脳病変の存在も報告されている。HAM 剖検例における脳の炎症病変の広がり、時間的推移について詳細に検討し、①脳組織でも脊髄病変と同時進行性に炎症細胞浸潤が生じていること、②その分布は大脳深部白質や、皮髄境界部など、脊髄と同様に血流の低速部として知られている部位の血管周囲に強調されていること、③脳の炎症病巣では浸潤細胞は血管周囲に留まっており、周囲神経組織の傷害はほとんどみられないことを明らかにした。

#### d) 発症機序に関する免疫病理学的解析

HTLV-I 感染者 PBMC の短期培養による Tax 発現誘導にともなう感染細胞、非感染細胞における活性化マーカー、サイトカインの動態について解析し、Tax の発現に伴って、①CD25 などの活性化マーカーが感染細胞のみならず、非感染細胞にも誘導されること、②HTLV-I 感染細胞は Th1 type のサイトカインを誘導することを明らかにした。HAM 患者において報告されている免疫動態が Tax の作用によることがこの細胞レベルで証明された。

#### C. 考 察

本研究のスタートとして HIV 脳症はエイズという免疫不全に伴う神経合併症の一つではなく、独立した病態であることを認識の出発点とした。初年度の研究を通して HIV 脳症には二つの異なる病態が存在する？という可能性が指摘できた。一つは「エイズの末期に亜急性に進行する脳症」としての HIV 脳症であり、大脳皮質にみられる散在性のグリオーシス、ニューロンにおける CXCR4 の down regulation、TNF- $\alpha$ ノックアウトマウスではエイズは進行するが学習障害は起こらないなどがこれを示唆している。もう一つは「慢性変性疾患を思わせる緩徐進行性の神経疾患として HIV 脳症」で、エイズ非発症サルにおける大脳白質のグリア結節と多核巨細胞、散在性のリンパ球浸潤、深部白質の瀰漫性グリオーシスと変性などの病理所見がこれに相当すると考えられる。HAART により免疫不全の進行がコントロールされる中で、エイズの末期に亜急性に進行する脳症としての HIV 脳症とは異なる、慢性変性疾患を思わせる緩徐進行性の神経疾患として HIV 脳症をとらえる必要がでてくるものと思われる。そのような緩徐進行性のレトロウ

イルス疾患である HAM と比較研究をすすめることにより、レトロウイルスが引き起こす神経障害機序の全体像を明らかにし、病態に則した治療法の開発をすすめていく。

#### D. 結 論

今年度の研究により HAART 療法下における HIV 脳症の実態、問題点の一部が明らかとなった。また、HAM に関してはウイルス動態、宿主の免疫動態、及び臨床像の相互関連が明らかとなった。

#### E. 研究発表（誌上発表のみ掲載）

1. Furukawa Y, Kubota R, Tara M, Izumo S, Osame M. Existence of escape mutant in HTLV-I tax during the development of adult T-cell leukemia. *Blood* 97:987-993, 2001.
2. Matsuzaki T, Nakagawa M, Nagai M, Nobuhara Y, Usuku K, Higuchi I, Takahashi K, Moritoyo T, Arimura K, Izumo S, Akiba S, Osame M. HTLV-I-associated myelopathy (HAM)/ tropical spastic paraparesis (TSP) with amyotrophic lateral sclerosis-like manifestations. *J Neurovirol.* 6:544-548, 2000.
3. Izumo S, Umehara F, Osame M. HTLV-I-associated myelopathy. *Neuropathology* 20: S65-68, 2000.
4. Furukawa Y, Yamashita M, Usuku K, Izumo S, Osame M. Phylogenetic subtypes of HTLV-I gene and their risk to HTLV-I-associated myelopathy. *J Infect Dis,* 182:1343-1349, 2000.
5. Aye MM, Matsuoka E, Moritoyo T,



- Umehara F, Suehara M, Hokezu Y, Yamanaka H, Isashiki Y, Osame M, Izumo S. Histopathological analysis of four autopsy cases of HTLV-I-associated myelopathy / tropical spastic paraparesis: inflammatory changes occur simultaneously in the entire central nervous system. *Acta Neuropathol (Berl)* 100: 245-252, 2000.
6. Umehara F, Abe M, Koreeda Y, Izumo S, Osame M. Axonal damage revealed by accumulation of beta-amyloid precursor protein in HTLV-I-associated myelopathy. *J Neurol Sci.* 176: 95-101, 2000.
  7. Machigashira N, Yoshida Y, Wang Sy, Osame M. HTLV-I-associated myelopathy / tropical spastic paraparesis with pseudohypoparathyroidism. *Neurology.* 2001 Jan 9;56(1):104-106.
  8. Kubota R, Nagai M, Kawanishi T, Osame M, Jacobson S. Increased HTLV type 1 tax specific CD8+ cells in HTLV type 1-associated Myelopathy/Tropical spastic paraparesis: correlation with HTLV type 1 proviral load. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2000 Nov 1;16(16):1705-9.
  9. Furukawa Y, Bangham CR, Taylor GP, Weber JN, Osame M. Frequent reversible membrane damage in peripheral blood B cells in human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *Clin Exp Immunol.* 120:307-16, 2000.
  10. Matsuyama W, Mizoguchi A, Iwami F, Koreeda Y, Wakimoto J, Kanazawa H, Mori S, Kawabata M, Fukunaga H, Osame M. Clinical investigation of pulmonary *Mycobacterium avium* complex infection in human T lymphotropic virus type I carriers. *Thorax.* 55:388-392, 2000.
  11. Jeffery KJ, Siddiqui AA, Bunce M, Lloyd AL, Vine AM, Witkover AD, Izumo S, Usuku K, Welsh KI, Osame M, Bangham CR. The influence of HLA class I alleles and heterozygosity on the outcome of human T cell lymphotropic virus type I infection. *J Immunol.* 165:7278-7284, 2000.
  12. Hanon E, Hall S, Taylor GP, Saito M, Davis R, Tanaka Y, Usuku K, Osame M, Weber JN, Bangham CR. Abundant tax protein expression in CD4+ T cells infected with human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) is prevented by cytotoxic T lymphocytes. *Blood.* 95:1386-1392, 2000.
  13. Matsuoka E, Usuku K, Jonosono M, Takenouchi N, Izumo S, Osame M. CD44 splice variant involvement in the chronic inflammatory disease of the spinal cord: HAM/TSP. *J Neuroimmunol.* 102: 1-7, 2000.
  14. Nakagaki K, Tabira T, et al. CXCR4 is the primary receptor for feline immunodeficiency virus in astrocytes. (Submitted)
  15. Koirala TR, Tabira T, et al. Downregulation of CXCR4 expression in the brain of feline

- immunodeficiency virus-infected cat.  
(submitted)
16. Koirala TR, Tabira T, et al. Decreased expression of MAP-2 and GAD in the brain of cat infected with feline immunodeficiency virus. (submitted)
  17. 岸田修二, HIV 関連痴呆. 脳神経 52:1071-1079,2000.
  18. 岸田修二, HIV 感染症と神経疾患. 神経合併症に対する HAART 療法の影響. 医学のあゆみ 194:926-927, 2000.
  19. Baba M, Miyake H, Okamoto M, Iizawa Y, Okonogi K. Establishment of a CCR5-expressing T-lymphoblastoid cell line highly susceptible to R5 HIV-1. AIDS Res. Hum. Retrovir. 16:935-941 2000.
  20. Shiraishi M, Aramaki Y, Seto M, Imoto H, Nishikawa Y, Kanzaki N, Okamoto M, Sawada H, Nishimura O, Baba M, Fujino M. Discovery of novel, potent and selective small molecule CCR5 antagonists as anti-HIV-1 agents: synthesis and biological evaluation of anilide derivatives with a quaternary ammonium moiety. J. Med. Chem. 43:2049-2063 2000.
  21. Okamoto H, Cujec TP, Okamoto M, Peterlin BM, Baba M, Okamoto T. Inhibition of the RNA-dependent transactivation and replication of human immunodeficiency virus type 1 by a fluoroquinoline derivative K-37. Virology 272:402-408 2000.
  22. Makino M, Wakamatsu S, Shimokubo S, Arima N, Baba M. Production of functionally deficient dendritic cells from HTLV-I-infected monocytes: implication for the dendritic cell defect in adult T cell leukemia. Virology 274: 140-148, 2000.
  23. Sawada H, Tamada D, Kawase T, Hayakawa Y, Lee K, Kyokane J, Baba M. Synthesis and properties of novel fluoroalkyl end-capped oligomers containing phosphorous segments. J. Appl. Polym. Sci. 79:228-245 2001.
  24. Fujii R, Okamoto M, Aratani S, Oishi T, Ohshima T, Taira K, Baba M, Fukamizu A, Nakajima T. A role of RNA helicase A in TAR-mediated transcriptional regulation of human immunodeficiency virus type 1. J. Biol. Chem. in press.
  25. Okamoto M, Ono M, Baba M. Suppression of cytokine production and neural cell death by the anti-inflammatory alkaloid cepharanthine: a potential agent against HIV-1 encephalopathy. Biochem. Pharmacol. in press.
  26. Wada H, Saito K, Kanda T, Kobayashi I, Fujii H, Fujigaki S, Maekawa N, Takatsu H, Fujiwara H, Sekikawa K, Seishima M. Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF-alpha) Plays a Protective Role in Acute Viral Myocarditis in Mice: A Study Using Mice Lacking TNF-alpha. Circulation. 103:743-749. 2001.
  27. Saito K, Fujigaki S, Heyes MP, Shibata K, Takemura M, Fujii H, Wada H, Noma A, Seishima M. Mechanism of increases in L-kynurenine and quinolinic acid in renal insufficiency. Am J Physiol Renal Physiol. 279:F565-572, 2000.
  28. Iida R, Saito K, Yamada K, Basile AS, Sekikawa K, Takemura M, Fujii H, Wada H, Seishima M, Nabeshima T.

- Suppression of neurocognitive damage in LP-BM5-infected mice with a targeted deletion of the TNF-alpha gene. *FASEB J.* 14:1023-1031, 2000.
29. Yamada K, Iida R, Miyamoto Y, Saito K, Sekikawa K, Seishima M, Nabeshima T. Neurobehavioral alterations in mice with a targeted deletion of the tumor necrosis factor-alpha gene: implications for emotional behavior. *J Neuroimmunol.* 111:131-138, 2000.
30. Morita T, Saito K, Takemura M, Maekawa N, Fujigaki S, Fujii H, Wada H, Takeuchi S, Noma A, Seishima M. 3-hydroxyanthranilic acid, an L-Tryptophan metabolite, induces apoptosis in monocyte-derived cell stimulated by interferon- $\gamma$ . *Ann Clin Biochem*, in press.
31. Takamune N, Misumi S, Shoji S. Cyclic zinc-dithiocarbamate-S, S'-dioxide blocks CXCR4-mediated HIV-1 infection. *Biochem Biophys Res Commun.* 272:351-356, 2000.
32. Mori H, Inoue M, Yano M, Wakabayashi H, Kido H. 14-3-3tau associates with a translational control factor FKBP12-rapamycin-associated protein in T-cells after stimulation by pervanadate. *FEBS Lett.* 467:61-64, 2000.
33. Wakabayashi H, Yano M, Tachikawa M, Oka S, Maeda M, Kido H. Increased levels of 14-3-3 $\epsilon$ ,  $\gamma$  and  $\zeta$  isoforms in cerebrospinal fluid of AIDS patients with neuronal destruction. *Clinica chimica Acta.* In press, 2001.
- F. 知的所有権の出願・取得状況
- 特許取得（平成 12 年度）
1. 納 光弘. 化学発光 in situ ハイブリダイゼーションと免疫組織化学的染色とを組み合わせた二重標識検出法. 特許第 3 1 2 7 2 4 4 号, 平成 1 2 年 1 1 月 1 0 日.
- 特許出願（平成 12 年度）
1. 三宅 洋, 飯澤祐史, 馬場昌範. HIV 産生細胞株およびその用途. 出願人: 武田薬品工業株式会社, 特願 2000-143416, 平成 12 年 5 月 11 日出願.
2. 馬場昌範, 明石 満, 足立正一. エイズワクチン. 出願人: 馬場昌範, 明石 満, 特願 2000-151487, 平成 12 年 5 月 23 日出願.
3. 馬場昌範, 北島 勲. 抗 HIV 薬. 出願人: バイエル・アクチエンゲゼルシャフト, 特願 2000-203681, 平成 12 年 7 月 5 日出願.
4. 一川隆史, 杉原芳博, 神崎直之, 西村 紀, 馬場昌範. ピペリジン化合物, その製造法および用途. 出願人: 武田薬品工業株式会社, 特願 2000-328851, 平成 12 年 4 月 27 日出願.
5. 三宅 洋, 飯澤祐史, 馬場昌範. T 細胞株およびその用途. 出願人: 武田薬品工業株式会社, 特願 2000-350685, 平成 12 年 11 月 17 日出願.

分 担 研 究 報 告 書

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）  
分担研究報告書

HIV 脳症の神経障害の臨床・病態に関する研究：  
抗ウイルス療法による髄液 HIV RNA 量の検討  
（付、AIDS 関連 PML の病巣拡大とウイルス変異）

分担研究者 岸田修二 東京都立駒込病院神経内科医長

研究要旨：① HIV 原発性疾患である HIV 脳症の発症メカニズムは充分解明されていないが、HIV 感染が関与した病態である。中枢神経内の HIV を抑制することで HIV 脳症の発症を防ぐことが出来るかも知れない。この研究では、抗レトロウイルス剤の長期投与および短期投与での血漿と髄液内ウイルスの動態をみたところ髄液内には 2 種の性格を有するウイルスの存在が示唆され、いずれも長期に血漿ウイルスを抑制できている場合には、髄液内で HIV を抑制出来ていることが証された。しかし、髄液内のウイルスが、脳実質内のウイルスの動態を反映しているかどうかは明かではない。今後髄液内のウイルスの由来を検討する必要がある。  
① PML の原因ウイルス JC ウイルスの調節領域の遺伝子変異が病巣拡大に関与している可能性を指摘した。今後多数の剖検例で検証する必要がある。

A. 研究目的

(1) HIV 脳症の発症には HIV (Human immunodeficiency virus) 感染が関連していることは、病理学的、臨床的研究から明かであるが、何よりも抗ウイルス療法により一時的にせよ臨床症状が改善することから明かである。しかし Highly active anti-retroviral therapy (HAART) が開始されても、HIV 関連原発性疾患の発症頻度は日和見感染症ほど減少していないとの報告もある。そこで、抗ウイルス療法は中枢神経内の HIV を抑制できるのかを検討し、同時に、駒込病院での HIV 感染患者の主要神経合併疾患に対する HAART の影響を解析した。

(2) 進行性多巣性白質脳症 (PML) では JC ウイルスの調節領域の構造が JC ウイルスの増殖力、および PML の病態に関与することが示唆されているので、剖検例を用い、ウイルス DNA の構造解析を試みた。

B. 方法・材料

(1) 駒込病院を受診した HIV 感染患者、および AIDS 患者の主要神経合併症 (HIV 脳症、トキソプラズマ症、脳原発悪性リンパ腫、PML、サイトメガロウイルス脳炎、クリプトコッカス症) の推移をみた。

(2) 抗レトロウイルス薬を投与し、髄液検査が施行できた 12 例の AIDS 患者について、髄液中 HIV-RNA を定量し、ほぼ同時期の血漿中 HIV-RNA との関係を検討した。なお、血漿中 HIV-RNA の検出限界は 400 コピー/ml、髄液の多くは 50 コピー/ml の高感度法で測定した。

(3) PML 症例は 33 歳男性。1998 年 2 月 24 日頭痛、発熱にて近医入院、髄膜炎を疑われたが、HIV 抗体陽性と判明し、3 月 4 日当院転入院となった。入院時、髄膜刺激徴候陽性で、脳神経系では右顔面神経麻痺、運動系では左上肢の筋力低下、感覚系では左前腕から手の感覚低下を認め、四肢深部

反射は消失していた。血漿 HIV-RNA は  $2.9 \times 10^7$  コピー/ml であり、CD4(+)リンパ球は  $1$  個/ $\mu$ L と著減していた。髄液検査では細胞数 20/3 (単核:多核=16:4)、蛋白 152mg/dl、糖 36mg/dl、 $\beta$  2MG 3.5mg/dl、サイトメガロウイルス(CMV)DNA(+)(PCR)であった。頭部MRIでは脳室の拡大と、脳室上衣下の造影剤増強効果を認め、神経伝導検査では左右の正中神経F波伝導速度はそれぞれ 46.7m/秒 (出現率 31%)、51.1m/秒 (出現率 31%) と低下していた。神経所見、髄液検査、電気生理学的検査より、CMV 性髄膜・多発神経根炎と診断し、CMV に対しガンシクロビルとフォスカネットの投与を開始するとともに、AZT、3TC、Nerfinavir による抗 HIV 療法を開始した。神経症状は左右上下肢弛緩性麻痺、下部脳神経麻痺の出現など認めたが、4月上旬には改善傾向にあった。しかし、4月中旬から脳MRIで左後頭葉白質に脱髄所見が出現、5月中旬からは痴呆化、右同名半盲が出現、MRIでは両側後頭葉に拡大する脱髄巣を認めた。髄液よりJCウイルスが検出されたため、CMV 感染にPMLを併発したものと診断した。6月中旬から急速に右片麻痺が出現するとともに、視力障害、精神症状の増悪を認めた。MRI検査では両側後頭葉の白質病変は拡大し、左側頭葉から頭頂葉、前頭葉にまでおよんでいた。7月末骨髄抑制が強いため、抗ウイルス剤はすべて中止した。しかし、神経症状はその後ほとんど変化がなく、脳MRIでも萎縮性変化が進むのみであった。全身的には、MRSAなどの菌血症を繰り返し、その都度抗菌剤で対応していたが、1999年11月末、痙攣発作を生じてから、意識レベルおよび全身状態が急速に悪化し、2000年2月死亡した。神経病理学的には、大小の軟化脱髄巣が左右大脳半球の白質を中心に広範囲に認められる。脱髄巣は左側の前頭葉、基底核、頭頂葉、側頭葉、視床、両側の後頭葉に広がり、特に側頭葉、後頭葉の脱髄巣は癒合し、大きくなっ

ている。脱髄巣には、マクロファージ、リンパ球の浸潤、反応性グリオシス、多核巨細胞などの浸潤がみられる。多核巨細胞は脱髄巣のほぼ全域にわたって認められる。好塩基性のJCウイルス封入体は病巣辺縁部に少数認められる。CMVの核内封入体は脳室壁に沿って分布している。以上からHIV脳症、CMV脳炎を合併したPMLと病理学的に診断された。

この剖検脳について、各葉でのJCウイルスの検出と、その構造解析を行ってみた。

### C. 結果

① 駒込病院での HIV 感染患者受診者数は年々増加傾向にある。HAART 療法が本格的に開始された 1997 年以降、死亡率は減少している (図 1)。

② AIDS に合併した主要神経合併症の頻度も HAART の影響を受け、1997 年以降減少傾向にある (図 2)。

③ Protease Inhibitor を加えた長期の多剤併用抗ウイルス療法 (PI-HAART) により、血漿 HIV-RNA が抑制できている症例 (441-9、353-2、577-2、826-2、231-4、439-8) は、髄液 HIV-RNA も検出限界以下に抑制されている (図 3)。

④ 逆転写酵素阻害剤 2 剤 (447-5) では、血漿 HIV-RNA に比べ、髄液中 HIV は抑制できない (図 4)。

⑤ PI-HAART 2 ~ 5 週の短期投与では、血漿 HIV の減衰に平行して髄液 HIV-RNA が減衰する例 (660-7、956-2) と血漿 HIV の減衰に一致せず、徐々に減衰する例 (799-0) がある (図 4)。

⑥ 症例 792-2 は合併した CMV 性神経疾患に対して予めガンシクロビルを投与することのみで、髄液 HIV-RNA が検出限界以下になった (図 3)。

⑦ PML 症例では図 5 に示すように 6 種の異なった再編成型調節領域の JC ウイルスが検出され、その分布 (図 6) と臨床的

な PML の進展方向から、図 5 の F が前駆体であり、後頭葉に発し、再編することで病巣が側頭葉、頭頂葉へと拡大した可能性が示唆された。

#### D. 考察

1. HAART 療法開始後の神経合併症に関して：

1996 年以降プロテアーゼ阻害剤を含む多剤併用療法の登場は、強力な抗 HIV 療法を可能にし、日和見感染症の発症と死亡率の劇的減少をもたらしたとの報告があるが、わが国の多数例での報告はない。今回一施設ではあるが、多数例を扱っている駒込病院でも HIV 感染者数および AIDS 患者数が年々増加しているのに関わらず、死亡者の減少がみられている。また神経合併症に関しても、諸外国同様中枢神経合併症の発症抑制効果がみられ、HAART が神経合併症発症抑制にも有効であることが認められる。

2. 抗 HIV 剤の髄液移行に関して：

HIV 脳症発症の詳細な機序はまだ明かではないが、HIV の直接中枢神経感染が関与しているならば、HIV 脳症の治療には中枢神経内で充分治療効果を発揮できる薬剤濃度が必要である。長期にわたる全身的 HIV 感染抑制には、脳および脊髄液のような解剖学的に隔絶された領域を含めた治療戦略をたてないと、ウイルス複製を抑制出来ないだけでなく、薬剤抵抗性のウイルス変異株を発生させる可能性がある。髄液は脳実質の感染の性格や薬剤到達具合を反映するので、髄液をモニターすることで、薬剤の治療効果を知ることが出来る可能性がある。

今回検討した抗ウイルス剤に対する髄液中のウイルス制御の効果は、長期間にわたった強力な抗ウイルス療法は、治療薬の組み合わせ如何に関わらず、血漿中でウイルスを抑制出来ている場合には、髄液中でも

検出限界以下に抑制出来ていることが判明した。一方、2～5 週間の短期投与では、血漿と髄液の HIV が平衡して減衰する例と、必ずしも一致しない例が存在することが明かとなった。更に合併神経症状を治療するのみで、髄液中のウイルスが減衰することもある。即ち、これまでの指摘のように髄液中のウイルスには 2 種類の性格のウイルスが存在し、HIV の中枢神経内への侵入には脳血管関門の障害も関与していることを示唆している。髄液内で血漿と同様な動態を示す HIV は、恐らく中枢神経内に取り込まれた血液由来細胞、即ちリンパ球から放出された short-life span のウイルスであり、他方血漿に遅れて反応するタイプの longer-lived な性格のウイルスは、恐らく感染単球/マクロファージ由来と考えられる。前者および後者とも流血中の感染細胞由来であれば必ずしも薬剤の血液-髄液関門を考慮することなく、全身的治療で髄液中ウイルスを抑制可能である。しかし後者のウイルスが脳内で自己増殖しているウイルス由来ならば、髄液透過性のよい薬剤を考慮する必要がある。

恐らく、多くの患者では中枢神経内に両者のウイルスが存在し、脳内でのリンパ球指向性ウイルスからマクロファージ指向性ウイルスへのシフトが HIV 脳炎、脳症の展開に関与していると思われる。

今後、髄液内でのウイルス動態が脳実質内の動態を果たして反映しているか、髄液内のウイルスの由来が何処か更に明らかにすることで、HIV 脳症発症への長期的治療戦略が生まれて来るとと思われる。このことは、髄液移行性の悪い薬剤との比較検討や、髄液中での長期にわたるウイルス抑制が果たして HIV 脳症発生を抑制可能かどうか観察することで明らかになるであろう。

3. PML に関して：

PML はオリゴデンドログリアに JC ウィ

ルスが感染するために生じる中枢神経系での脱髄疾患である。病態の進行に伴って、病巣は原発部位から他の部位に拡大する。しかしその拡大がどのようにして起こるかについては明かでない。一方 PML 患者の脳から分離される JC ウイルスは例外なく原型調節領域から欠失と重複によって再編された DNA の調節領域を有している。この JC ウイルスの調節領域の再編が中枢神経系での増殖率に関係があるのではないかと、あるいは感染の拡大にも関係があることが示唆されてきた。

今回提示した剖検脳各部位から得られた JC ウイルスの構造解析とでは、多様な調節領域をもつ JC ウイルスが増殖できることがあらためて明らかになり、さらに各脳葉での各調節領域の検出率と臨床的病態拡大を重ね合わせると、後頭葉に検出された F を鋳型にした JC ウイルスの再編が病巣の拡大に関与した可能性が高ことが示唆される。

#### E. 結論

① HAART 療法は HIV 感染による死亡を減少させたのみならず、主要神経合併症の発症抑制効果がある。

②抗ウイルス剤短期投与による血漿と髄液の HIV 減衰パターンから、髄液中のウイルスには、一過性の short-life span のウイルスと longer-lived な、髄液中で自己増殖をしているウイルスの存在が考えられる。

③両者のウイルスが血液からの持続的流入に由来するものか、自己増殖のウイルスが中枢神経実質内のマクロファージ由来かで、中枢神経系への移行性を考慮した薬剤選択が必要となるので、髄液で検出されるウイルスの性状を明らかにする必要がある。

④剖検所見及び合併神経疾患治療歴による髄液中 HIV-RNA 量の推移から、ウイル

スの侵入には脳血液関門の関与が大きい。

⑤長期の HAART 療法では、血漿 HIV-RNA が検出限界以下に抑制できている場合、髄液中の HIV-RNA 量も同様抑制出来ているが、今後も引き続き中枢神経内ウイルス増殖を抑制可能かどうか、臨床的・病理学的に引き続き観察する必要がある。

⑥ PML では、病巣拡大に遺伝子の変異が関与している可能性がある。これを検証するためには、多数の剖検例を用いた解析が必要である。

謝辞：JC ウイルスの遺伝子解析をしていただいた東京大学医科学研究所ウイルス感染研究部門の余郷嘉明先生に深謝致します。またこの研究は駒込病院感染症科、同放射線科、同病理科の協力を得て行ったものであり、各科の諸先生に深謝致します。

#### F. 参考文献

1) d'Arminio Monforte A et al : Decreasing incidence of CNS AIDS-defining events associated with antiretroviral therapy. *Neurology* 54:1856-1859,2000

2) Price RW, et al : Measuring the "viral load" in cerebrospinal fluid in HIV infection : window into brain infection ? [editorial]. *Ann Neurol* 42:675-678,1997

3) Eggers CC, et al : HIV infection of the central nervous system is characterized by rapid turnover of viral RNA in cerebrospinal fluid. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 20:259-264,1999

4) Staprans S et al : Time course of cerebrospinal fluid responses to antiretroviral therapy : evidence for variable compartmentalization of infection. *AIDS* 13:1051-1061,1999



5) 予郷嘉明：PML の病態と JC ウイルスのゲノム構造. 厚生科学研究費補助金エイズ対策研究推進事業. エイズと日和見感染症に関する臨床研究. 平成7年度研究報告書. p.170-176,1996

6) 余郷嘉明、他：PML 剖検例における JCV 調節領域の構造と組織との関連. *Neuro・Infection* 5:43-44,2000

#### G. 学会発表

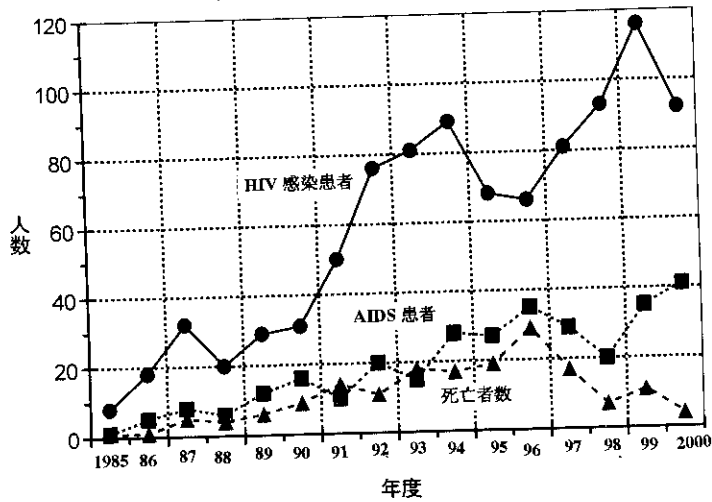
(1) HIV 関連痴呆. 病因と治療. *脳神経* 52 (12) : 1071-1079,2000

(2) HIV 感染症と神経疾患. 神経合併症に対する HAART 療法の影響. *医学のあゆみ*. 194 (12) : 926-927,2000

(3) AIDS に合併したサイトメガロウイルス性末梢神経障害の治療からみた神経学的予後 (抗 CMV 療法と CMV 脳炎との関連). 第5回日本神経感染症研究会 2000.07.14

都立駒込病院におけるHIV感染者数

図1



都立駒込病院における AIDS 患者数と  
主要神経合併症数 (1985 ~ 2000.11)

図2

年	AIDS 患者数	HIV 脳症	Toxoplasma 症	PCNSL	PML	CMV 脳炎	Crypto-coccosis	計 (%)
1985	1							
1986	5							
1987	8	3	1	2	1	1		8 (100)
1988	6							
1989	12		1		1	2	2	6 (50)
1990	16	2		1	1	1		5 (31)
1991	10		3	1	1			5 (50)
1992	20			2		1	1	4 (20)
1993	15	3	2		1			6 (40)
1994	28	5	3	2		2		12 (42)
1995	27	7	4	8	1	4	1	25 (92)
1996	35	8	7	6		6	4	31 (89)
1997	29	3	1	3	1	1	5	14 (48)
1998	20			2	1	2	3	8 (40)
1999	35	2	1			3	2	8 (23)
2000	41	3	2	1		2	1	9 (22)
計	308	36	25	28	8	25	19	125 (41)

図3 長期抗ウイルス療法例

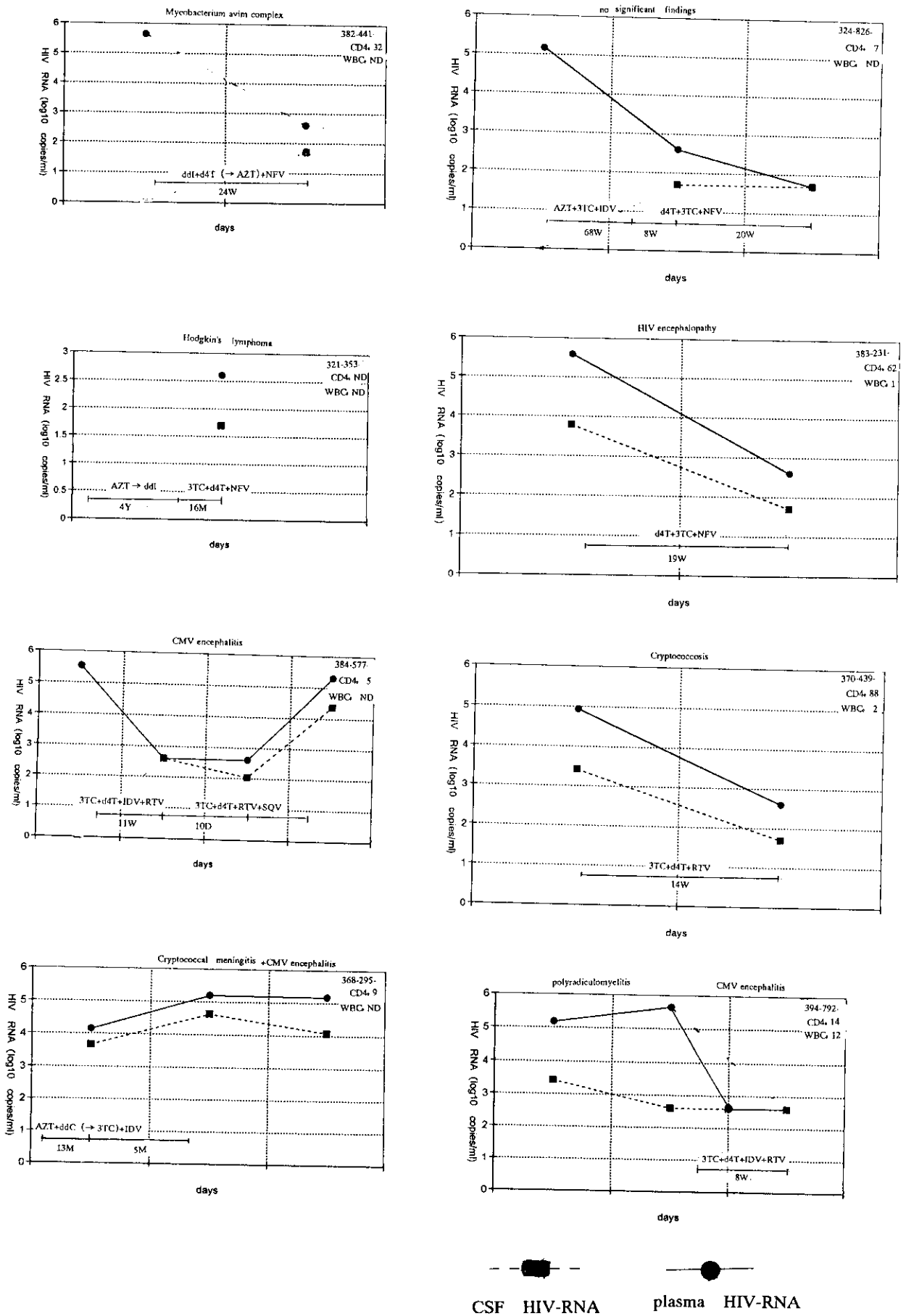
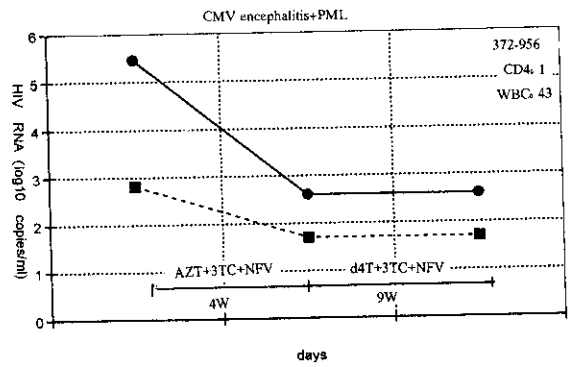
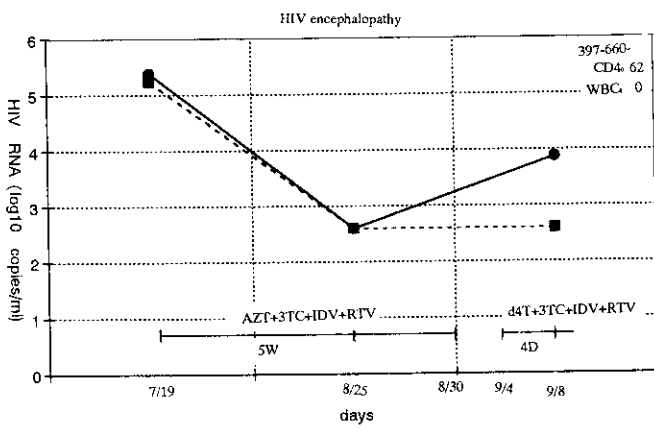
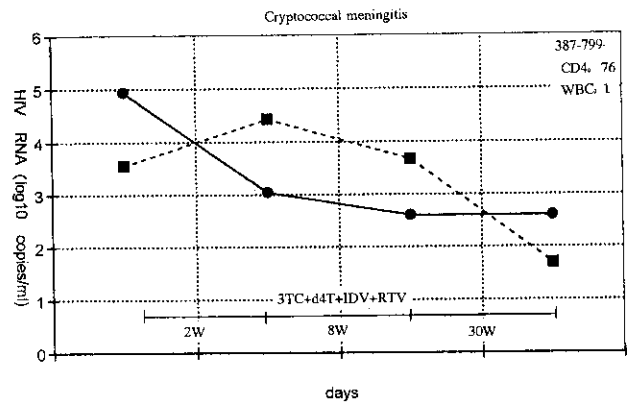
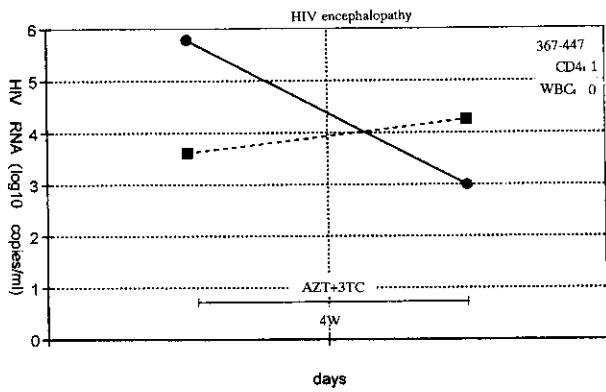


図4 短期抗ウイルス療法例



CSF HIV-RNA       plasma HIV-RNA