

PEPCKであると推定された。また、N末端に約100アミノ酸の他種のPEPCKと相同性の低い配列が見られた。

考 察

アライメントの結果よりトキソプラズマのPEPCKのN-末端には他の生物には見られないユニークな配列が存在した。それが酵素活性とどのような関連があるかは、遺伝子組み換え酵素を作製して詳細に酵素学的検討を行わねばならないだろう。今後、このクローニングしたPEPCK遺伝子を大腸菌などに導入し、組み換えタンパク質を作らせ、産生された酵素の活性を *in vitro* で測定し、同時にその酵素のインヒビターとなる物質の検索を行う予定である。このような酵素の活性・インヒビターの働きが *in vivo* において同様であるかは今後の研究結果を待たねばならないが、そのインヒビターとなる物質の中で、ホストのPEPCKの活性影響を与えない、トキソプラズマのPEPCKに特異的なインヒビターであれば、あるいはそのようなインヒビターを開発することができれば、その物質が抗トキソプラズマ剤として有効であろうと考えられる。

また、ホストのPEPCKはGTP依存性であり、トキソプラズマのPEPCKはATP依存性であるところに注目し、それぞれのPEPCKの立体構造を解析し、その結合部位の構造の違いを検索することが可能であろう。そして、そこをターゲットとし、トキソプラズマのPEPCKのアデニン結合部位を特異的に阻害する薬剤を開発することができれば、抗トキソプラズマ剤として有効であろうと期待される。

結 論

トキソプラズマのホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (PEPCK) 遺伝子のクローニングを行った。N-末端にユニークなアミノ酸配列が存在することが判明した。今後トキソプラズマのエネルギー代謝をになうこの酵素の性質を調べることにより、有効性の高い治療薬の開発が期待される。

健康危険情報

なし。

研究発表

1. 論文発表

- 1) Saito T., Maeda T., Nakazawa M., Takeuchi T., Nozaki T., Asai T.; Characterization of hexokinase from *Toxoplasma gondii* tachyzoite. International Journal for Parasitology (in press).

2. 学会発表

- 1) Asai T., Miura S., Nakazawa M., Saito T., Maeda T., Takeuchi T., Sibley L.D.; Analysis of substrate specificities of *Toxoplasma gondii* nucleoside triphosphate hydrolase isoforms. 6th International Congress on Toxoplasmosis, 21-25 May, 2001
- 2) Maeda T., Saito T., Nakazawa M., Takeuchi T., Ajio-ka J.W., Asai T.; Characterization of the gene encoding pyruvate kinase, glycolytic enzyme from *Toxoplasma gondii*. 6th International Congress on Toxoplasmosis, 21-25 May, 2001
- 3) Saito T., Maeda T., Nakazawa M., Takeuchi T., Ajio-ka J.W., Asai T.; Molecular cloning and characterization of hexokinase from *Toxoplasma gondii* tachyzoite. 6th International Congress on Toxoplasmosis, 21-25 May, 2001

参考文献

- 1) Denton, H., S. M. Brown, et al. (1996). Comparison of the phosphofructokinase and pyruvate kinase activities of *Cryptosporidium parvum*, *Eimeria tenella* and *Toxoplasma gondii*. Mol Biochem Parasitol 76 (1-2): 23-9.
- 2) Tomavo, S. (2001). The differential expression of multiple isoenzyme forms during stage conversion of *Toxoplasma gondii*: an adaptive developmental strategy. Int. J. Parasitol. 31(10): 1023-31.
- 3) Matte, A., L. W. Tari, et al. (1997). Structure and mechanism of phosphoenolpyruvate carboxykinase. J Biol Chem 272(13): 8105-8.

知的財産権の出願・登録状況

なし。



コクシジウム類原虫を病原体とする腸管感染症

増田 剛太¹⁾、味澤 篤²⁾、今村 顕史²⁾、根岸 昌功²⁾

¹⁾ 東京都立清瀬小児病院院長

²⁾ 東京都立駒込病院感染症科

研究要旨

腸管寄生性コクシジウム(クリプトスポリジウム(Cp)、サイクロスポーラ(Cc)、イソスポーラ(Ib))感染症についての疫学的・臨床的検討を行なった。Cpについては1990-2001年に東京都立駒込病院臨床検査科に提出された下痢患者の糞便に関するプロスペクティブスタディーを行ない、26/1,449検体(1.8%)からこの原虫を検出した。患者背景としては海外渡航者(3.4%)とHIV/AIDS(2.4%)での感染率が高かった。AIDS症例での下痢は重症、難治性であり、1996年以前の3症例は死亡したが、わが国で強力抗AIDS薬療法(HAART)が開始された1997年以降の2症例は免疫機能の回復とともにCpによる下痢もよくコントロールされるようになった。Ccの検出は1996-2001年の糞便について行ない、4/1,071検体(0.4%)の検出率であり、陽性4症例とも海外渡航例であったが、このうち1例はHIV感染者であった。Ibは2症例から検出された。いずれもAIDS発症者であり、激しい下痢を主症状としたが、ST合剤投与によく反応し、その後にHAARTが開始された。

分担研究者：味澤 篤

研究協力者：増田剛太、今村顕史、根岸昌功

Clinical manifestation of gut infections by coccidian parasites as the causative agent

Gohta Masuda¹⁾, Atsushi Ajisawa²⁾, Akifumi Imamura²⁾ and Masayoshi Negishi²⁾

¹⁾President, Tokyo Metropolitan Kiyose Children's Hospital and ²⁾Department of Infectious Diseases, Tokyo Metropolitan Komagome Hospital

研究目的

コクシジウム類(クリプトスポリジウム、サイクロスポーラ、イソスポーラ、トキソプラズマ、サルコシスチス)は飲食物に混じて消化管内に侵入し、腸管粘膜上皮から生体内に侵入して細胞内寄生を行なう一群の原虫類を呼称する。これら原虫のうちヒト腸管に寄生し、下痢を初めとする腸炎症状を示すものを腸管寄生性コクシジウムと呼ぶ。これらの原虫は正常宿主にも病原性を示すが、AIDSを初めとする免疫不全生体では、より重症で難治性の下痢症の原因微生物となる。さらに、これらの原虫は赤痢アメーバなどで行なわれる糞便の直接塗抹法では検出が困難であり、臨床症例は診断未確定かあるいはほかの疾患と誤診されることが多い。

クリプトスポリジウム(Cp)は1976年に初めてヒト感染例が報告され、その後この原虫はAIDS宿主に発症する難治性、再発性、致死性下痢症の病原体として注目を浴びたが、さらに1990年代に至り、正常宿主に一過性の非血性下痢症を惹起する原虫として、とくに汚染水道水による集団発生の病原体として知られるようになった。わが国ではAIDS症例での本症の報告例は少なく、さらに正常宿主でのCp感染症の実体もほとんど知られていない。

サイクロスポーラ(Cc)とイソスポーラ(Ib)に関してもCpと同様にその疫学、臨床像、診断法の問題が残されている。今回の研究では東京都立駒込病院の臨床症例からこれら腸管寄生性コクシジウム類に属する3原虫種感染症についての成績を集積し、検討を加える。

研究方法

1. Cp、Cc感染症の発生頻度に関する研究

1990-2001年の12年間に東京都立駒込病院で診療した下痢症患者の糞便について蔗糖浮遊法による集オーシストを用いてCpの有無を検討した。顕微鏡下にCpと同定した原虫は*Cryptosporidium pa.*を用いた免疫染色、あるいはPCRを用い本原虫であることを確認した。

Ccについても駒込病院での下痢症症例の糞便について蔗糖浮遊法を用い同様の検討を行なった。また、塗抹した糞便をUV励起により蛍光顕微鏡下に特有の自家蛍光を証明し、Cc同定の一助とした。

2. CpとCc感染症の臨床症状の検討

駒込病院で1985-2001年に診療した症例を診療録に基づき検討した。

研究成果

1. 東京都立駒込病院の下痢症患者検体から見たCp感染症の発生頻度(表1)

駒込病院は癌と感染症を主要医療課題とする800床規模の総合病院である。表には同病院の下痢症患者から細菌検査を主目的として臨床検査科に提出された1990-2001年の12年間の糞便検体について、経年的にCpの検出状況を示した。患者の推定感染地・生活背景については海外感染、国内感染(外来症例、入院症例)、HIV/AIDS症例に分類した。この間に検討した検体総数は1449件である。なお、Cp陽性検体数は()内に実数として示した。

Cp感染症例数を経年的にみると、とくに1997年以降に増加していることが明らかである。すなわち、1996年までの7年間には検体総数464中陽性4(0.9%)であったが、1997-2001年の5年間では検体総数985のうち陽性22(2.2%)と増加していた。患者背景を見ると海外旅行者例が多く、12年間を通算すれば陽性症例数は19/566(3.4%)であり、推定感染地としてはインド・ネパール・パキスタンでの感染が9/136(6.6%)と最も高率だった。HIV/AIDS症例間でのCp感染は4/168例(2.4%)と海外旅行者例に次いで高い感染率を示した。国内感染症例では1990-2000年の期間にCp感染例は証明されなかったが、2001年に3例の国内感染陽性者が確認された。この国内症例のうち一例は30歳代、男性同性愛者でHIV陰性、CD4+細胞数683/μlであり、悪心、嘔吐、水様下痢便20回/日を主症状として外来を受診した。他の2例の国内感染例の感染経路は特定出来なかった。

2. AIDS症例のCp症 (表2)

この表には5例の症例が示されているが、うち4例(症例2-5)は表1中に示した症例の再掲であり、症例1はサーベイランスを開始する以前の1987年症例である。いずれの症例にあっても高度の免疫不全(CD4+細胞数7-48/μl)に加え長期間持

続する下痢を伴っていた。強力抗AIDS薬療法(HAART)が開始される以前の1996年以前の症例(症例1-3)は3例とも死亡したが、HAART以後の2症例(症例4-5)はいずれも投薬開始による免疫機能の回復とともにCp症が治癒し、糞便からもCpが検出されなくなった。

表1 下痢便からのクリプトスピリジウム検出: 症例数1,449例での検討(都立駒込病院、1990～2001年)

推定感染地・背景	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	Total (%)
インド・ネパール・パキスタン	6	7	3	3(1)	11	6(1)	11	13(1)	16	28(2)	23(3)	11(1)	136(9) [6.8]
タイ	6	9	3	1		9	10	11(1)	8	12(1)	11	9	89(2) [2.2]
インドネシア	3	6	6	4	2	3	3	12(1)	10(1)	12	7	8	76(2) [2.6]
フィリピン		4	2	1	2	3	2	5	6	3	2	7	37
"アジア" (上記以外・特定出来ない)	8	8	10	1	5	6	7	15(1)	17(1)	19(1)	22	18	136(3) [2.2]
アフリカ	4	1	1			1	7	5	6(1)	11	10	4	50(1) [2.0]
その他	2	2	4	1	1	1	3	4	4	6(1)	13(1)	1	42(2) [4.8]
国外来症例	23	29	7	4	8	1	17	37	51	32	49	50(3)	308(3) [1.0]
国内入院症例	31	40	30	13	7	5	17	36	30	38	100	56	403
HIV/AIDS症例	3	7	3(1)	1	1	5	9(1)	17	17(1)	27	50(1)	28	168(4) [2.4]
不明		1	3										4(0) [0]
Total	86	114	72(1)	29(1)	37	40(1)	86(1)	155(4)	165(4)	186(5)	287(5)	192(4)	1,449(26) [1.8]

() 内は陽性検体数

表2 AIDS生体のクリプトスピリジウム症(都立駒込病院)

症例番号	国籍	年齢	性	危険因子	発症時 CD4+T リン/μl	下痢性状・ 回数/日	発症年月	下痢持続 期間	治療	転帰	他の腸管系 病原体
1	日本	49	M	同性愛	21	水様・ ≥12回	1987.2月 (再発)	1か月	メトロニダゾール 1.0g/日	死亡 (クリプトスピリジウム 腸炎)	なし
2	外国	45	M	異性愛	7	水様・ 8~15回	1992.4月 (?)	17か月	アセチルスピラマイ シン 1.2g/日	死亡 (除外死亡・ 詳細不明)	なし
3	日本	44	M	同性愛	36	水様・ 2-9回	1996.1月	11か月	パロモマイシン 2.0g/日	死亡 (HIV脳症)	なし
4	タイ	27	F	異性愛	38	水様・ 8回	1998.12月	約1か月	なし	HAART (d4T・ 3TC・NFV) 投与で健快	なし
5	日本	34	M	同性愛	48	水様・ 2~14回	不明	不明	なし	HAART (d4T・ 3TC・IDV・RTV) 投与で健快	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>

表3 サイクロスポーラ感染症 (都立駒込病院)

症例番号	診断年月	年齢(歳)	性	国籍	糞便性状・回数/日	下痢持続期間	投与薬剤	転帰	推定感染地	備考*
1	1996.3月	22	男	日本	水様・10回	≥13日	SPFX	不明	カンボジア・タイ	フォローアップせず。
2	1997.9月	50	男	日本	水様・4回	26日	ST	治癒	東南アジア (ミャンマー・シンガポール・タイ・カンボジア)	ST投与4日目から有形便化。
3	1998.4月	46	男	日本	“下痢”・1回	6日	他国から“抗生物質” 内容不明	治癒	インドネシア	フォローアップせず。
4	2000.8月	36	男	日本	水様・18回	>2か月	ST	治癒	タイ・カンボジア	HIV(+), CD4+141/μl. 抗HIV薬+ST 177日を 開始後他病院に転院。

症例1~3では初診時糞便からサイクロスポーラ以外の下痢惹起性病原体(細菌、水虫)は検出されなかった。症例4からは Giardia lamblia を検出した。

3. Cc感染症例

Ccの検出は1996-2001年の糞便について行ない、4/1,071検体(0.4%)の検出率であり、陽性4症例とも海外渡航例であったが、このうち1例はHIV感染者であった。これら4例(表3)のいずれも東南アジアへの旅行で感染したことが推定された。症例1-3での下痢の持続期間は≥13日、26日、6日であり、転帰は治癒2例、不明1例であった。治療薬として症例2にSTが用いられ、有効であった。症例4はHIV感染者であり、CD4+細胞数141/μlと免疫機能の低下が証明された。症状の持続期間は>2か月と長期であったが、原虫証明により行なわれたST投与により速やかに下痢は改善した。

Ib感染症例は2例経験された(成績は示さない)。2例ともに外国人のHIV感染症例であり、CD4+細胞数は29/μl(AIDS例)、216/μl(ARC例)であり、いずれの症例にあっても長期間の激しい非血性水様便を伴ったが、ST合剤の使用により、速やかな改善が得られた。

考 察

腸管寄生性コクシジウム類に属するCp、Cc、Ibは正常宿主、HIV感染者のいずれに対しても非血性下痢症を惹起させる。これらの原虫はその存在がわが国の臨床でまだ十分に認識されていないため、原因不明の腸炎として治療されたり、他の疾

患と誤診されて投薬を受けていることが少なくない。免疫機能正常者でのCpやIbを原因とする症例の下痢は症状が激しいものの、数日から2、3週間程度で自然に治癒する。しかし、免疫不全生体にあつての下痢は重症、難治性、致死性であり、病原診断を根拠とした的確な治療が必要である。これら日和見感染症の治療に加え、HAARTによる免疫機能の回復がこれら原虫症の治療をもたらす。

Ccは正常宿主に増悪・寛解・再発を繰り返す長期間持続する下痢症の原因になる。これらの症例では糞便中から原虫を検出することが正しい診断の前提になり、STが有効薬剤である。また、この原虫は、HIV/AIDS宿主にも下痢症を発症させるが、致死的な症例の報告は少なく、死亡例に関してもCcの関与が明らかではない。この原虫は宿主条件の如何に拘らず慢性、再発性下痢症の原因となり、治療薬としてSTが有効であるため、病原体検出による正確な診断が強く求められることになる。

腸管寄生性コクシジウムによる腸炎は臨床現場での慢性、難治性、再発性下痢症の診療での鑑別診断で上位に位置する感染症である。逆に、これらの原虫が検出された症例では免疫不全生体である可能性を考えて以後の診療を進める必要があり、それによるHIV感染症の診断、早期治療の開始へと展開する可能性がある。

原因不明、慢性下痢症の診療にあつてのクロシジウム類原虫検索の重要性を強調したい。

結 論

都立駒込病院の集計成績から腸管寄生性クロシジウム類(Cp、Cc、Ib)のうち、Cpが海外渡航者とHIV/AIDS症例間に多く見られること、免疫不全宿主での感染例は重症、致命的であること、Cc症例はHIV感染者、正常宿主ともに見られ、いずれも慢性下痢症の原因になりSTが有効であること、HIV/AIDSでのIb感染症では激しい下痢が主症状となり、STが有効であることを示した。すなわち、原因不明の慢性下痢症ではこれら原虫の可能性を念頭に置いた診療が重要であることが証明された。

健康危険情報

本文中に記載。

研究発表

- 1) 増田剛太：クリプトスポリジウム症－臨床症状と疫学－. 化学療法の領域14:29-33, 1998
- 2) 増田剛太：赤痢アメーバ性大腸炎・クリプトスポリジウム症. 臨床と微生物25:309-312, 1998
- 3) 増田剛太、味澤 篤、根岸昌功、今村顕史、井関基弘、遠藤卓郎：下痢便からのクリプトスポリジウムの検出：駒込病院での成績. *Clinical Parasitology* 10:72-74, 1999
- 4) 増田剛太：クリプトスポリジウム症とサイクロスポーラ症. *Current Therapy*17:105-108, 1999
- 5) 遠藤卓郎、八木田健司、増田剛太、黒木俊郎：クリプトスポリジウム症を中心とした原虫性下痢症の診断マニュアル. 国立感染症研究所寄生動物部、2000

知的財産権の出願・登録状況

なし。



NKT細胞活性化による感染制御に関する基礎的検討

川上 和義、金城 雄樹、高口 善信、上江洲香織、宮城 一也、齋藤 厚

琉球大学第一内科

研究要旨

Natural killer T (NKT) 細胞はT細胞受容体とNK細胞マーカーを併せ持つ極めてユニークな細胞である。抗原受容体はレパトリーが乏しく限られた抗原を認識することが予想されていたが、近年糖脂質である glycosyl phosphatidyl inositol (GPI) や α -galactosyl ceramide (α -GalCer) が特異的なリガンドの一つであることが明らかにされた。NKT細胞の主要なサブセットである $V\alpha 14+$ 細胞 (マウス)、 $V\alpha 24+V\beta 11+$ 細胞 (ヒト) は樹状細胞上の CD1d に結合した α -GalCer によって活性化を受けると極めて迅速に大量の IFN- γ や IL-4 を産生することで強力な免疫調節作用を有する。

我々は昨年度の研究で、マウス肺クリプトコッカス (Cn) 症モデルを用いて、感染防御における $V\alpha 14+$ NKT 細胞の役割を明らかにした。すなわち、Cn 感染後肺内において増加した $V\alpha 14+$ NKT 細胞は、Th1 細胞の分化誘導ならびに感染局所からの真菌の排除に重要な役割を担っている。逆に、 α -GalCer をマウスに投与することで $V\alpha 14+$ NKT 細胞を活性化すると IFN- γ 産生誘導を介して Cn 感染に対する抵抗性を賦与できる。これらの結果から、 α -GalCer によって NKT 細胞を活性化することで難治性感染症を治療できる可能性が期待される。

本研究では、ヒトにおいてもマウスと同様感染症の病態に NKT 細胞が関与しているかどうか調べるために、治療前の肺結核患者の末梢血中の $V\alpha 24+V\beta 11+$ NKT 細胞の比率を検討した。コントロールに比較して結核患者群では有意に α -GalCer 反応性 NKT 細胞の増加が観察された。これらの結果は、ヒトにおいても NKT 細胞が感染症の発症病態に何らかの役割を担っている可能性を示唆するものである。

次に、HIV 感染症における NKT 細胞の動態を調べるために、HIV 感染者と非感染者とで末梢血中の $V\alpha 24+V\beta 11+$ NKT 細胞の比率を調べたところ両群間で明らかな差は認められなかった。また、 α -GalCer をパルスした単球由来樹状細胞によって末梢血単核球中の $V\alpha 24+V\beta 11+$ NKT 細胞を増殖させるよう試みたところ、症例数が少ないものの一部の HIV 感染者においては数倍の増加が観察された。

今後は症例数を増やしながら HIV 感染症の病態における NKT 細胞の役割を解析し、 α -GalCer による $V\alpha 24+V\beta 11+$ NKT 細胞の活性化が HIV 感染ならびに合併する日和見感染症に及ぼす影響について検討していきたい。

研究の目的

病原微生物が侵入すると自然免疫が発動され好中球やマクロファージによる殺菌が試みられるが、その感染防御能が十分でないことから、従来は獲得免疫が誘導されるまでの「つなぎ役」として捉えられていた。しかしながら近年の研究の進展にともない、自然免疫は単なる「つなぎ役」とどまらず、それ以後の獲得免疫の「質」を規定する重要なプロセスとして考えられるようになってきた¹⁾。

自然免疫の担当細胞として、好中球やマクロファージの他にNK細胞、NKT細胞、 $\gamma\delta$ T細胞、BI細胞がある。その中でNKT細胞は、腫瘍免疫や自己免疫疾患との関連において近年非常に注目されつつある²⁾。この細胞はT細胞受容体とともにNK細胞マーカーを発現しており、その抗原受容体は発現量が通常のT細胞より少なく限られたレパートアしか持たない^{3,4)}。したがって、認識する抗原は限定されており、現時点ではglycosyl phosphatidyl inositol や α -galactosylceramide (α -GalCer) のような糖脂質が想定されている^{5,6)}。

NKT細胞の生理的意義については、腫瘍免疫や自己免疫疾患において精力的に解析され多くの知見が蓄積されつつある²⁾。しかしながら、感染防御免疫における役割については未だ十分には理解されていない¹⁾。これまでに我々は、エイズの重要な日和見病原真菌であるクリプトコッカス感染防御におけるNKT細胞の役割についてマウスモデルを用いて解析し、昨年度の研究成果として報告した。その概略を図1にまとめて示す。すなわち、クリプトコッカス肺感染後、感染局所において monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) の産生が起り、NKT細胞の主要なサブセットであるV α 14+NKT細胞がMCP-1依存的に経時的な増加を示す。V α 14+NKT細胞欠損マウスを用いた解析から、感染後肺内に集積するNKT細胞は真菌特異的なTh1細胞の分化誘導に関与し、さらにはIFN- γ 産生を介してクリプトコッカス感染制御に重要な役割を担っている⁷⁾。逆に、V α 14+NKT細胞の特異的活性化物質である α -GalCerを投与することで、クリプトコッカス感染マウスの自然免疫およびTh1性獲得免疫を著明に誘導し、産生されたIFN- γ によって真菌の排除が有意に促進される^{8,9)}。同様の報告が

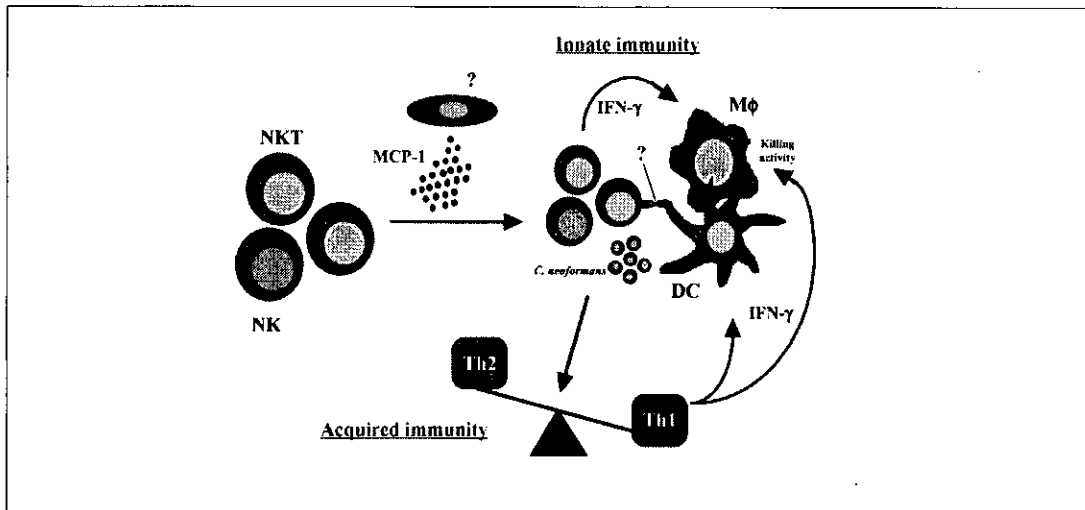


図1 クリプトコッカス感染免疫とNKT細胞

分担研究者：齋藤 厚

研究協力者：川上和義、金城雄樹、上江洲香織、宮城一也、高口善信

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

Kazuyoshi Kawakami, Yuki Kinjo, Kaori Uezu, Kazuya Miyagi, Yoshinobu Koguchi, Atsushi Saito

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

マウスマラリアの系でもなされており¹⁰⁾、難治性感染症への免疫療法への応用が期待される場所である。

一方、ヒトにおいてもマウスのV α 14+NKT細胞に相当する α -GalCer反応性サブセットが存在する。V α 24+V β 11+NKT細胞がそれである²⁾。本サブセットは末梢血単核細胞(PBMC)の中で0.02~0.03%程度しか存在せず極めて稀な細胞である。本研究では、ヒトにおいてもNKT細胞が感染症の病態に何らかの関与をしているのかを調べるために、結核患者においてPBMC中のNKT細胞及びV α 24+V β 11+NKT細胞の割合を検討するとともに、エイズ患者において α -GalCer結合樹状細胞によってPBMCから同細胞を増殖させることが可能か否かについても検討した。

研究方法

1. 症例

検討症例は琉球大学第一内科及び国立療養所沖縄病院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治療前の結核患者25人、コントロールとして年齢、性を合わせた健常者または感染症、炎症性疾患、悪性疾患、そして免疫能に影響を及ぼすことが予想される疾患を有さない患者17人とした。また、琉球大学第一内科に入院又は外来通院中のHIV感染者でインフォームドコンセントの得られた6人及び健常者7人についても検討した。

2. 末梢血単核球中のNKT細胞の解析

ヘパリン加採血した末梢血からFicoll-Paque (Pharmacia社、スウェーデン)にて単核球(PBMC)を分離した。PBMCをFITC標識抗ヒトCD3、V α 24抗体及びPE標識抗ヒトCD56、V β 11抗体(Pharmingen社、米国)を用いて染色し、EPICS-XL (ベックマンコールター社、米国)を用いてフローサイトメトリー解析した。

3. 末梢血単核球からのV α 24+V β 11+NKT細胞の増殖誘導

PBMC (1×10^7) に対し20 μ lのCD14マイクロビーズ(Miltenyi Biotec、ドイツ)を6 $^{\circ}$ C 15分反応させ、MS分離カラム(Miltenyi Biotec)を用いてSuperMACS (Miltenyi Biotec)下にCD14陽性細胞を単離した。得られた単球をヒトリコンビナントIL-4(1000U/ml、Peprotech社、イギリス)及びヒトリコンビナントGM-CSF(1000U/ml、Peprotech社)存在下で1日おきに培養液を半換えし7日間培養して樹状細胞(DC)に分化させた。得られたDCはさらにヒトリコンビナントTNF- α (50ng/ml、Peprotech社)、 α -GalCer [100ng/ml、キリンビール株式会社(東京)より供与] またはVehicleとともに3日間培養の後、3回洗浄して α -GalCer-DC及びVehicle-DCとした。PBMC中のV α 24+V β 11+NKT細胞を増殖させるために、PBMCと α -GalCer-DC又はVehicle-DCとともに7日間培養の後、各種抗体で染色してフローサイトメトリー解析を行った。

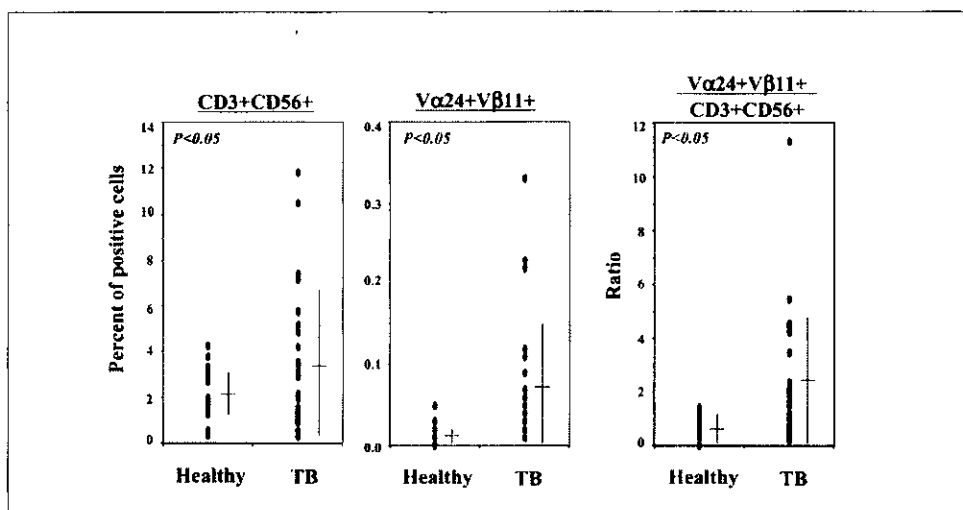


図2 結核患者末梢血中のNKT細胞

4. サイトカイン濃度の測定

ヒト IFN- γ 、IL-4 濃度は ELISA キット (Endogen 社、米国) を用いて測定した。

5. 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。

研究成果

1. 結核患者における末梢血 NKT 細胞の解析

治療開始前の肺結核患者及びコントロール群から採取した PBMC を各種抗体で染色しフローサイトメトリー解析した。図2のように、CD3+CD56+ 細胞として同定される NKT 細胞の比率は結核患者群において有意に高値を示した。また、 α -GalCer に反応性の V α 24+V β 11+NKT 細胞ならびに CD3+

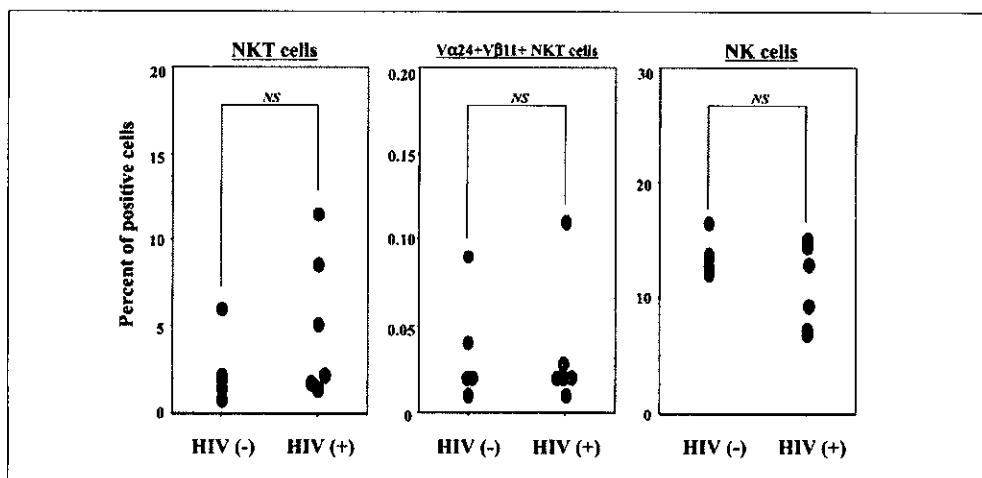


図3 HIV感染者末梢血中のNKT細胞

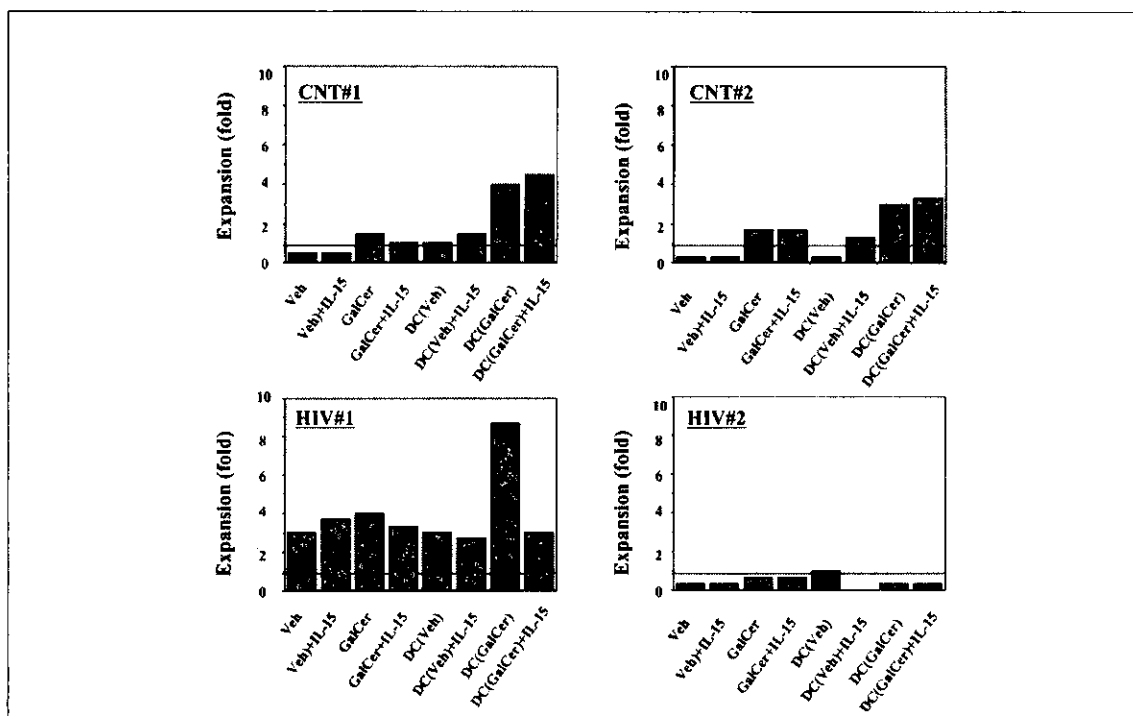


図4 α -Galcerによる末梢血 V α 24+V β 11+NKT 細胞の増加

CD56+NKT細胞に対するV α 24+V β 11+NKT細胞の比率もコントロール群に比べて結核患者群において有意に高かった。

以上の結果から、結核患者において末梢血中の α -GalCer反応性NKT細胞が増加していることが明らかになった。

2. HIV感染者における末梢血NKT細胞の解析

一方、HIV感染者においては、非感染者と比べ、CD3+CD56+NKT細胞、V α 24+V β 11+NKT細胞、そしてV α 24+V β 11+NKT細胞/CD3+CD56+NKT細胞比率のいずれも明らかな違いは見られなかった(図3)。これらの結果から、少なくとも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推察された。

3. 末梢血V α 24+V β 11+NKT細胞の α -GalCer結合樹状細胞による増殖の試み

PBMC中に0.02~0.03%と極くわずかしき存在しない α -GalCer反応性V α 24+V β 11+NKT細胞を*in vitro*で増加させるために、 α -GalCer又はVehicleをパルスしたDCとPBMCを7日間培養した。この時、NK細胞及びNKT細胞の増殖因子であるIL-15を添加してその影響を調べた。図4に示すように、健常者2名からのPBMCでは、 α -GalCer-DC+IL-15とともに培養することによって、V α 24+V β 11+NKT細胞の比率は前値の3~5倍程度に増加していた。一方、HIV感染者2名のうち1名は全く増加しなかったものの、残り1名は9倍程度の増加を示した。こうして、今回の検討では症例数が少ないものの、HIV感染者でも α -GalCerによって末梢血中のV α 24+V β 11+NKT細胞を増加させる可能性が推察された。

また、 α -GalCer-DCとの培養によって上清中に産生されるIFN- γ 、IL-4を測定したところ、健常人、HIV感染者ともにIFN- γ は検出できず、IL-4は健常人でのみ検出された。

考察と結論

昨年度の研究では、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 α -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マウスに比べ低下していたことから、V α 14+NKT細胞が自然免疫におけるIFN- γ 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を明らかにした⁷⁾。さらには、 α -GalCer投与によってV α 14+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した^{8,9)}。

本年度の研究では、治療前の肺結核患者においてコントロール群と比較して末梢血中のNKT細胞、特に α -GalCer反応性V α 24+V β 11+NKT細胞が有意に増加していることを明らかにした。このことは、ヒトにおいてもNKT細胞が感染症の発症病態に何らかの関与をしている可能性を示唆するものである。しかしながら、これまでの他研究者からの報告ならびに最近の我々の研究では、マウスの実験系で抗酸菌感染防御にNKT細胞はそれほど重要な役割を担っていないとする結果が示されている¹¹⁻¹³⁾。一方では、結核菌由来の糖脂質抗原による肉芽腫形成にV α 14+NKT細胞が必須であるとの報告もある¹⁴⁾。したがって、抗酸菌感染症においては、特にヒトにおいてさらに詳細な解析が必要であると考えられる。

これまでの結果から、 α -GalCerあるいは α -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、特に固形癌においては、このような治療法がヨーロッパで臨床治験(Phase I)の段階に入っている。それによると、当初懸念されていた α -GalCer投与による肝障害はそれほど問題にならないことが報告されている^{15,16)}。

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。しかしながら、DC機能については、これまでにLPSまたはザイモザン刺激によるサイトカイン産生能を指標に、HIV感染者と非感染者の間で差がないことを示してきた。今回は、PBMC中のNKT細胞、V α 24+V β 11+NKT細胞の割合について比較検討を行った。その結

果、少なくともHIV感染者において、PBMC中の α -GalCer応答性NKT細胞の割合は低下しておらず、 α -GalCerによる治療法の可能性を残すものであった。しかしながら、ごく最近の研究では、HIV感染者において末梢血中のV α 24+V β 11+NKT細胞が有意に減少しており、病期の進行とともに減少の程度が明確になると報告している¹⁷⁾。今回の我々の結果と異なる理由については不明であるが、本研究ではまだ症例数が少ないため、今後症例数を蓄積することでさらに詳細に検討する必要があると考えられる。また、彼らの結果では非感染者のV α 24+V β 11+NKT細胞の比率が比較的高く人種的な相違などを含めた解析も必要かも知れない。

ヒト末梢血中のV α 24+V β 11+NKT細胞の機能については、量的にかなり少ないために十分には解析されていない。最近Viletらは、PBMCから分化させたDCに α -GalCerをパルスさせた後、IL-7またはIL-15の存在、非存在下でPBMCとともに培養することでV α 24+V β 11+NKT細胞を数10倍に増加させることを報告した¹⁸⁾。我々は、彼らの方法に倣って、HIV感染者のPBMC中のV α 24+V β 11+NKT細胞を増加させるかどうかについて検討を行った。今回は、健常人2名、HIV感染者2名と症例数が少なかったが、HIV感染者2名のうち1名において健常人と同程度の増加が観察された。しかし、彼らの報告と異なり数倍程度の増加に留まっていたため、今後は方法の工夫などさらに検討していく必要があると考えられた。

NKT細胞の活性化によってHIV感染者の日和見感染に対する抵抗性を増強させることを考えた場合、HIV感染自体におけるNKT細胞の役割を知ることは極めて重要である。これまでに、このような検討がなされたことはほとんどなく、HIV感染者末梢血中のV α 24+V β 11+NKT細胞の比率に関する報告がなされているのみである¹⁷⁾。したがって、HIV感染者由来のNKT細胞の機能に関する研究は重要な意義を有する。今後はこの点について詳細な解析を行い、 α -GalCerの臨床応用の可能性についてさらに検討していきたい。

参考文献

- 1) 川上和義: クリプトコッカス感染防御とNKT細胞-自然免疫から獲得免疫へ. 日本医真菌学雑誌 in press, 2002.
- 2) 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 54: 2352-2359, 1999.
- 3) Taniguchi M, Nakayama T: Recognition and function of V α 14NKT cells. *Semin Immunol* 12: 543-550, 2000.
- 4) Godfrey DI, Hammond KJL, Poulton LD, Smyth MJ, Baxter AG: NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol Today* 21: 573-583, 2000.
- 5) Joyce S, Woods AS, Yewdell JW, Bennink JR, de Silva AD, Boesteanu A, Balk SP, Cotter RJ, Bratkiewicz RR: Natural ligand of mouse CD1d: cellular glycosylphosphatidyl-inositol. *Science* 279: 1541-1544, 1998.
- 6) Kawano T, Cui J, Koezuka Y, Toura I, Kaneko Y, Motoki K, Ueno H, Nakagawa R, Sato H, Kondo E, Koseki H, Taniguchi M: CD1d-restricted and TCR-mediated activation of V α 14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* 278: 1626-1629.
- 7) Kawakami K, Kinjo Y, Uezu K, Yara S, Miyagi K, Koguchi Y, Nakayama T, Taniguchi M, Saito A: Monocyte chemoattractant protein-1-dependent increase of V α 14NKT cells in lungs and their roles in Th1 response and host defense in cryptococcal infection. *J Immunol* 167: 6525-6532, 2001.
- 8) Kawakami K, Kinjo Y, Yara S, Koguchi Y, Uezu K, Nakayama T, Taniguchi M, Saito A: Activation of V α 14+ natural killer T cells by α -galactosylceramide results in development of Th1 response and local host resistance in mice infected with *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immunol* 69: 213-220, 2001.
- 9) Kawakami K, Kinjo Y, Yara S, Uezu K, Koguchi Y, Tohyama M, Azuma M, Takeda K, Akira S, Saito A: Enhanced gamma interferon production through activation of V α 14+ natural killer T cells by α -galactosylceramide in interleukin-18-deficient mice with systemic cryptococcosis. *Infect Immun* 69: 6643-6650, 2001.
- 10) Gonzalez-Aseguinolaza G, de Oliveila C, Tomaska M, Hong S, Bruna-Romero O, Nakayama T, Taniguchi M, Bendelac A, van Kaer L, Koezuka Y, Tsuji M: α -galactosylceramide-activated V α 14 natural killer T cells mediate protection against murine malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97: 8461-8466, 2000.
- 11) Behar SM, Dascher CC, Grusby MJ, Wang CR, Brenner MB: Susceptibility of mice deficient in

CD1D or TAP1 to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med* 189: 1973-1980, 1999.

- 12) Szalay G, Zugel U, Ladel CH, Kaufmann SHE: Participation of group 2 CD1 molecules in the control of murine tuberculosis. *Microb Infect* 1: 1153-1157, 1999.
- 13) Kawakami K, Kinjo Y, Uezu K, Yara S, Miyagi K, Koguchi Y, Nakayama T, Taniguchi M, Saito A: Minimal contribution of V α 14 natural killer T cells to Th1 response and host resistance against mycobacterial infection in mice. *Microbiol Immunol* 46: 207-210, 2002.
- 14) Apostolou I, Takahama Y, Bermant C, Kawano T, Huerre M, Marchal G, Cui J, Taniguchi M, Nakachi H, Fournie JJ, Kourilsky P, Gachelin G: Murine natural killer cells contribute to the granulomatous reaction caused by mycobacterial cell walls. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 5141-5146, 1999.
- 15) Osman Y, Kawamura T, Naito T, Takeda K, van Kaer L, Okumura K, Abo T: Activation of hepatic NKT cells and subsequent liver injury following administration of α -galactosyl ceramide. *Eur J Immunol* 30: 1919-1928, 2000.
- 16) von Blumberg BME, Giaccone G, van der Vilet HJJ, van den Ertwegh AJM, Punt CJ, Ando Y, Nishi N, Peters M, Scheper RJ, Beijnen JH, Pinedo HM: Phase I study on the NKT cell ligand α -galactosylceramide (KRN7000) in patients with solid tumors. *Scand J Immunol* 54S1: 85.
- 17) van der Vilet HJJ, von Blumberg BME, Hanzenberg MD, Nishi N, Otto SA, van Benthem BH, Prins M, Claessen FA, van den Ertwegh AJM, Giaccone G, Miedema F, Scheper RJ, Pinedo HM: Selective decrease in circulating V α 24+V β 11+NKT cells during HIV type 1 infection. *J Immunol* 168: 1490-1495, 2002.
- 18) van der Vilet HJJ, Nishi N, Koezuka Y, von Blumberg BME, van den Ertwegh AJM, Porcelli SA, Pinedo HM, Scheper RJ, Giaccone G: Potent expansion of human natural killer T cells using α -galactosylceramide (KRN7000)-loaded monocyte-derived dendritic cells, cultured in the presence of IL-7 and IL-15. *J Immunol Methods* 247: 61-72, 2001.

健康危険情報

特になし

研究発表

1. 論文発表

- 1) Kawakami K, Kinjo Y, Uezu K, Yara S, Miyagi K, Koguchi Y, Nakayama T, Taniguchi M, Saito A: Monocyte chemoattractant protein-1-dependent increase of V α 14NKT cells in lungs and their roles in Th1 response and host defense in cryptococcal infection. *J Immunol* 167: 6525-6532, 2001.
- 2) Kawakami K, Kinjo Y, Yara S, Uezu K, Koguchi Y, Tohyama M, Azuma M, Takeda K, Akira S, Saito A: Enhanced gamma interferon production through activation of V α 14+ natural killer T cells by α -galactosylceramide in interleukin-18-deficient mice with systemic cryptococcosis. *Infect Immun* 69: 6643-6650, 2001.
- 3) Koguchi Y, Kawakami K, Kon S, Segawa T, Macda M, Uede T, Saito A: *Penicillium marneffei* causes osteopontin-mediated production of interleukin-12 by peripheral blood mononuclear cells. *Infect Immun* 70: 1042-1048, 2002.
- 4) Kawakami K, Kinjo Y, Uezu K, Yara S, Miyagi K, Koguchi Y, Nakayama T, Taniguchi M, Saito A: Minimal contribution of V α 14 natural killer T cells to Th1 response and host resistance against mycobacterial infection in mice. *Microbiol Immunol* 46: 207-210, 2002.
- 5) Kawakami K, Koguchi Y, Qureshi MH, Zhang T, Kinjo Y, Yara S, Uezu K, Shibuya K, Naoe S, Saito A: Anti-CD11b monoclonal antibody suppresses brain dissemination of *Cryptococcus neoformans* in mice. *Microbiol Immunol* 46: 181-186, 2002.
- 6) Kawakami K: Interleukin-18 and host defense against infectious pathogens. *J Immunother* in press, 2002.
- 7) 川上和義: クリプトコッカス感染防御とNKT細胞-自然免疫から獲得免疫へ。日本医真菌学雑誌 in press, 2002.

2. 学会発表

- 1) Kinjo Y, Kawakami K, Yara S, Uezu K, Koguchi Y, Nakayama T, Taniguchi M, Saito A: V α 14+NKT cells play an important role in the host defense to *Cryptococcus neoformans* infection through inducing Th1 response. *Scand J Immunol* 54S1: 83, 2001.
- 2) Tohyama M, Kawakami K, Kinjo Y, Yara S, Uezu K, Koguchi Y, Takeda K, Akira S, Saito A: IL-4-mediated increase in Th1 response through activation of V α 14+ NKT cells in IL-18-deficient mice with a systemic cryptococcal infection. *Scand J Im-*

munol 54S1: 91, 2001.

- 3) 川上和義, 金城雄樹, 上江洲香織, 屋良さとみ, 宮城一也, 高口善信, 中山俊憲, 谷口 克, 斎藤厚: クリプトコッカス感染によるV α 14+NKT細胞の肺内集積と感染防御における役割. 第31回日本免疫学会総会・学術集会記録 31: 134, 2001.
- 4) 宮城一也, 川上和義, 金城雄樹, 上江洲香織, 屋良さとみ, 高口善信, 中山俊憲, 谷口 克, 斎藤厚: クリプトコッカス感染によるV α 14+NKT細胞の肺内集積におけるMCP-1の役割. 第31回日本免疫学会総会・学術集会記録 31: 134, 2001.
- 5) 金城雄樹, 川上和義, 屋良さとみ, 上江洲香織, 高口善信, 宮城一也, 中山俊憲, 竹田 潔, 審良静男, 岩倉洋一郎, 斎藤 厚: IFN- γ 誘導性サイトカイン欠損マウスにおける結核感染防御機構の解析. 第31回日本免疫学会総会・学術集会記録 31: 139, 2001.
- 6) 上江洲香織, 川上和義, 金城雄樹, 屋良さとみ, 高口善信, 宮城一也, 星野友昭, 岡元昌樹, 川瀬裕介, 吉野公一郎, 竹田 潔, 審良静男, 斎藤厚: 結核感染防御におけるIL-18の役割. 第31回日本免疫学会総会・学術集会記録 31: 139, 2001.
- 7) 高口善信, 川上和義, 今 重之, 前田雅弘, 成見正作, 上出利光, 斎藤厚: ヒト結核感染防御におけるオステオポンチン、IL-10の役割: 血漿中濃度と病態との関連性について. 第31回日本免疫学会総会・学術集会記録 31: 138, 2001.

知的財産権の出願・登録状況

特になし



CD4障害下におけるヒトクリプトコックス肉芽種に関する病理組織学的検討

渋谷 和俊¹⁾、長谷川千花子²⁾、川上 和義³⁾、直江 史郎¹⁾、斎藤 厚³⁾

¹⁾東邦大学大橋病院病理学講座

²⁾東邦大学大森病院病理学研究室

³⁾琉球大学第一内科

研究要旨

後天性免疫不全症候群(AIDS)における重篤な日和見感染症である深在性真菌症について病理組織学的に検討した。

AIDSにおける全身性深在性真菌症の中ではクリプトコックス症の頻度が圧倒的に高かった。肺は本菌の侵入門戸であるが、組織学的には、多くの症例で広範な胞隔毛細血管内への菌の侵入を認めるものの、肺胞内の菌の増殖と組織球の反応の程度は異なっていた。しかし、多核巨細胞の形成を伴う緻密な組織球の集簇を特徴とした肉芽腫性病変はみられなかった。一方、HAARTが施行された最近の症例では、組織球や線維芽細胞による菌の増殖巣の被包化が観察され、本症におけるCD4+細胞の賦活化による特徴的な所見と推定された。

分担研究者：斎藤 厚

研究協力者：渋谷和俊、長谷川千花子、川上和義、直江史郎

Histopathological investigation on systemic mycosis in patient with acquired immunodeficiency syndrome with focusing on pulmonary lesions of cryptococcosis

Kazutoshi Shibuya¹⁾, Chikako Hasegawa²⁾, Kazuyoshi Kawakami³⁾, Shiro Naoe¹⁾, Atsushi Saito³⁾

¹⁾Department of Pathology, Toho University Ohashi Hospital, ²⁾Department of Pathology, Toho University Omori Hospital and ³⁾The first department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, University of Ryukyus

研究目的

AIDSにおける日和見感染症の発症は重篤なものが多く、中でも真菌感染症は非定型好酸菌症やカリニ肺炎などとともにAIDSにおける代表的な日和見感染症として注目されている^{1,2)}。本研究の目的は、ロサンゼルス市内の2施設で行われたAIDS剖検例を用いて深在性真菌症の発生頻度やその病理組織学的特徴を明確にすることである。またHighly Active Anti-retroviral Therapy (HAART)が施行された1例についてより詳細な検討を行い、いわゆる炎症再燃による病変の修飾像についても検討した。

研究方法

本研究の材料として以下を用いた。(1) 系統的病理解剖が行われたHIV抗体陽性例162例。その内訳は、1983年から1993年2月までのUniversity of California, Los Angeles (UCLA), Medical Centerでの剖検例123例と1985年6月から1991年4月までのWest Los Angeles Veterans Affairs (VA) Medical Centerでの剖検例39例。(2) 1998年にUCLAにて剖検されたHAART施行全身性クリプトコックス症例1例。

検索対象とした剖検例は、ほぼすべての臓器の標本が作成されており、これらを光学顕微鏡下で観察した。さらに代表的な病変部の切片については、酵素抗体間接法を施し、免疫組織学的検索も行った。また、1993年までの剖検例における深在性真菌症を、原因菌種別に単独の臓器に感染巣がみられた限局性真菌症と血行性播種による全身性真菌症とに分けて、それらの頻度ならびに組織像について検討した。ここでは、全身性真菌症が真菌血症の結果であることをより明確にするために、肺・腎・肝などの実質臓器2臓器以上に菌の増殖を認めた症例を全身性真菌症例とした。またこのとき、同一患者に合併した食道や口腔などの粘膜に認められた真菌感染巣は、全身性真菌症の侵襲臓器からは除外した。

研究結果

検索対象例から抽出された全身性真菌症の中では、クリプトコックス症が18例(11.1%)と最も頻度が高く、ついでヒストプラズマ症3例(1.85%)、コクシジオイデス症2例(1.23%)、カンジダ症2例(1.23%)の順であった。

全身性真菌症の中で最も頻度の高かったクリプトコックス症剖検例では、肺、脾、リンパ節、中枢神経、肝、腎の順で感染病巣が観察された。組織学的には、網内系臓器である脾・リンパ節や脳などでは、臓器の基本構造を破壊する高度の菌増殖と極めて軽微な組織球反応を認めた。また、肺でも菌の増殖は顕著であるが、症例ごとに組織球反応の程度は異なっていた。肺での菌増殖巣は、主に巣状の分布を示す。しかし、この増殖巣が少数の場合、これを取り囲む組織球の集簇巣が形成される(Fig.1)。一方、多数の菌の増殖巣が癒合性に形成された場合には、大半の肺胞が菌と組織球によって満たされており、組織球の集簇は明らかではなかった。また、いずれの症例でもリンパ球浸潤は軽微で、免疫組織学的には少数のB細胞の集簇を認めるものの、CD4+細胞はほとんどみられず、末梢血中のCD4/CD8比ならびにCD4+細胞数の極端な低値を組織学的にも証明する結果であった。

HAART施行例でのクリプトコックスによる侵襲臓器は肺と中枢神経であった。肺では、結節状の菌の増殖巣が散見され、この辺縁は組織球ならびに線維芽細胞により被包され、この周囲にCD4+細胞が観察された。この結節部以外の胞隔内毛細血管に菌は認められず、HAART未施行例との大きな相違点であった(Fig.2)。

一方、クリプトコックス症と同様に健常人に発症し、肺に肉芽腫を形成する代表的な深在性真菌症であるコクシジオイデス症では、比較的良好な異物型巨細胞や組織球の反応をみ、多くの菌は巨細胞の細胞質内に取り込まれていた。原発性コクシジオイデス症と比較して、AIDS患者に日和見感染として発症した病変では、病変の境界が不鮮明なことと壊死巣が目立つことの2点が、組織学的な相違であった(Fig.3)。

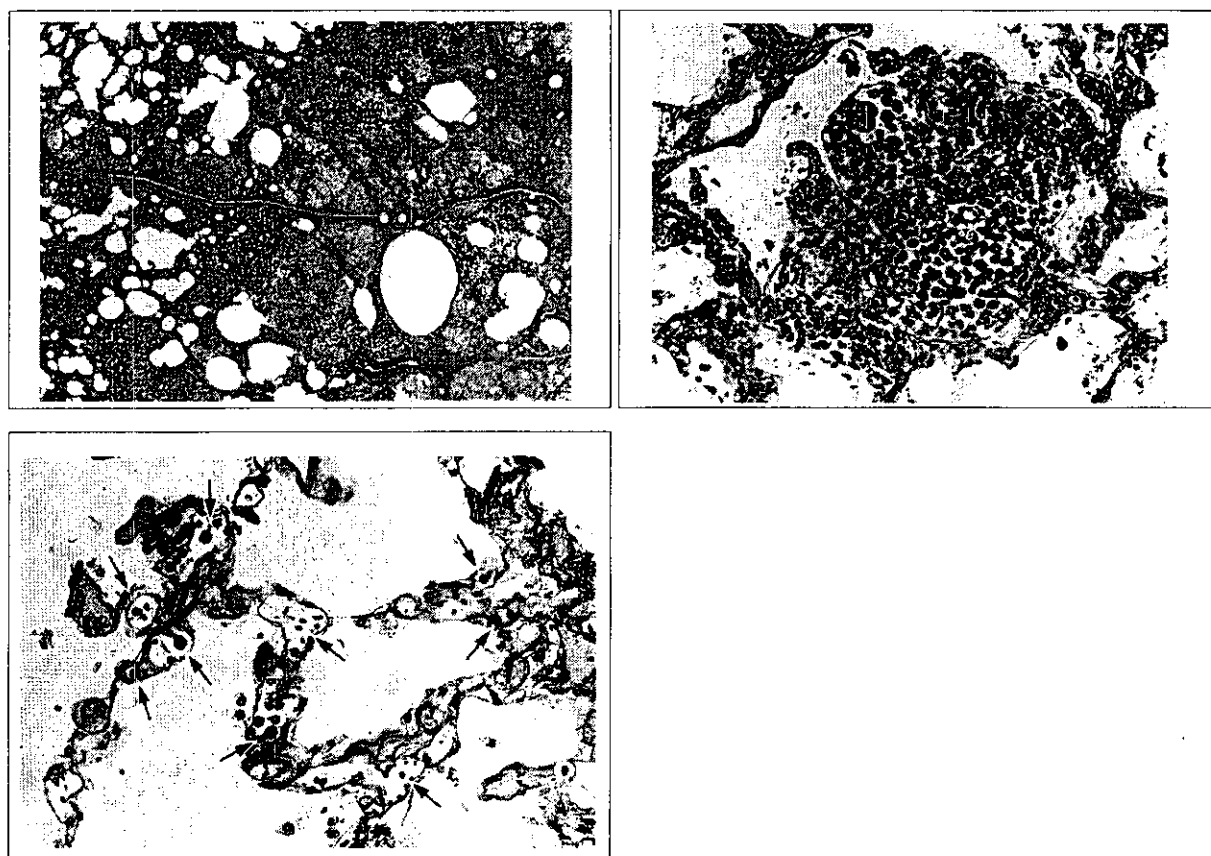


fig. 1 Pulmonary lesions of generalized cryptococcosis in patient with AIDS without treatment of HAART. A: Lung shows widely spread and fused intra-alveolar lesion consisting of loosely aggregated histiocytes. No necrotic foci are visible in the lung (H&E stain, x20). B: One of typical intra-alveolar lesion is characterized by loose aggregate of histiocytes containing yeasts in their cytoplasm and lack of both lymphocytes and necrosis (PAS-elastica stain, x260). C: A large part of the lungs in patients without treatment of HAART shows massive intra-capillary involvement without any types of inflammatory response. Yeasts are visible in dilated capillary lumen of septa as black and round dots with budding form in the picture (arrows). The feature was observed as the commonest alteration in this patient group (PAS-elastica stain, x400).

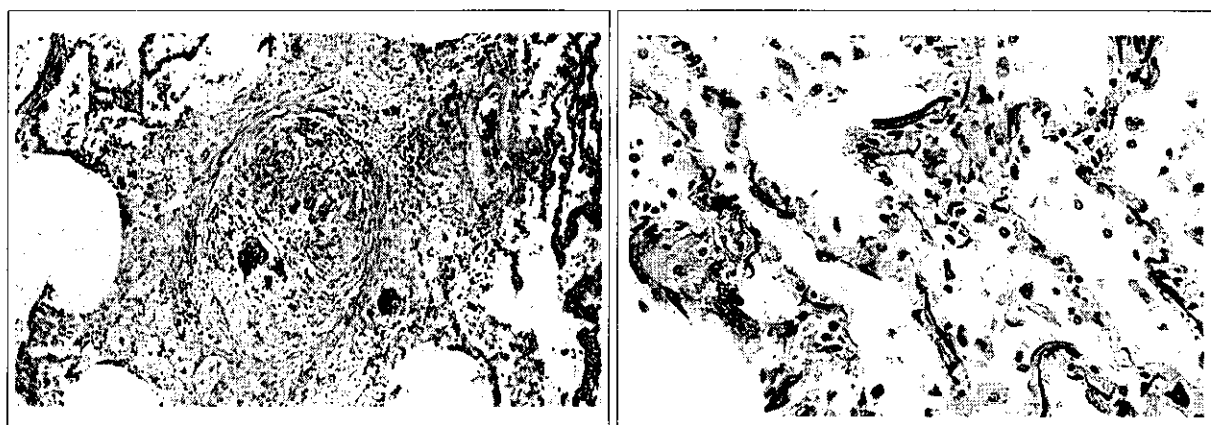


fig. 2 Pulmonary lesions of generalized cryptococcosis in a patient with AIDS with a treatment of HAART. A: One of nodular lesions scattered in the lung, consisting of cryptococcal proliferation with reacting histiocytes and multinucleated giant cells of foreign body type, is encompassed with fibrous tissue (H&E stain, x200). B: No yeast cells are found in septal capillary where is not involved by foci cryptococcal proliferation. This indicates a significant difference from that demonstrated in patients without HAART (PAS-elastic, x400).

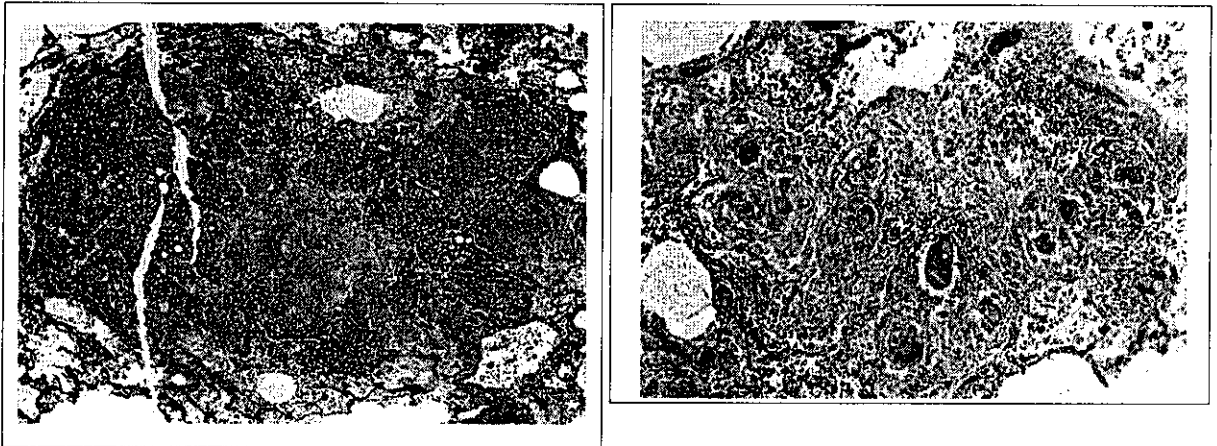


fig. 3 Pulmonary lesion of generalized coccidioid mycosis in patient with AIDS without treatment of HAART. A: Nodular focus in lung consisting of a fusion of granulomatous lesions contains necrosis in the center (H&E stain, x20). B: Small granulomatous lesion shows loose aggregate of spindle-shaped histiocytes and multinucleated giant cells of foreign body type containing spherules in their cytoplasm (H&E stain, x200).

考 案

AIDSにおける深在性真菌症の特徴として、限局性真菌症としては食道および口腔内のカンジダ症の、また全身性真菌症としてはクリプトコックス症の頻度がそれぞれ著しく高いことが上げられよう。また、粘膜のカンジダ症が高頻度に合併するにもかかわらず、全身性カンジダ症が162例中わずか2例と際だって少ないことも一つの特徴といえよう。この結果は、AIDS患者でもカンジダに対する粘膜から血中への移行を阻止する機能が良好に保たれていることを示している。すなわちカンジダに対する感染防御の主たる働きを有している好中球の機能がHIV感染患者でも良好に残されており、菌が全身に散布され難い状態であることが推定される³⁾。

一方、深在性全身性真菌症としては、クリプトコックス症の頻度が極めて高いことが特徴的であり、これは白血病とはじめとする代表的な深在性真菌症の基礎疾患群における発症頻度と著しい相違を示している⁴⁾。この点は、本症の感染防御が、真菌症の中でも特に主要組織適合複合体クラスII分子(MHC class-II molecule)に拘束された細胞間相互作用に依存していることの密接な関係を示唆するものと理解できよう⁵⁾。さらに、組織学的に菌の高度の増殖とこれに伴う組織球反応をみることは、従来の続発性クリプトコックス症でみられる

組織球反応の欠如した嚢胞病変とは異なった組織像であり、AIDS症例に特徴的な所見と考えたい。また、北米でのAIDS患者におけるクリプトコックス症の発症頻度は、臨床的な報告よりも今回の剖検例の検索結果の方が若干高く^{1,2,6)}、その理由の一つとして、臨床診断が困難な症例の存在が推定された。

ところで、今回の検索の中でHAARTが施行されなかった症例の大きな組織学的特徴として、著明な胞隔毛細血管内への菌の侵入を適したい。また、これらの症例では、肺胞内の細胞反応が微弱な症例も多く、この特徴的なクリプトコックス症の組織像は、クリプトコックス症が進行しているにもかかわらず胸部レントゲン撮影で、異常所見が認められないことが多いとする報告を指示する変化として捉えたい⁷⁾。さらにHAART施行例では、増殖巣の組織球を主とした被包化による明確な組織内菌増殖の抑制が観察された。これは本症におけるCD4+細胞の賦活化による特徴的な所見の一つと推定された。

謝 辞

本研究遂行に際し貴重な症例の検索をお許しいただいたUCLA病理、Walter Coulson教授ならびにJoan Mao博士に心より感謝の意を表します。

引用文献

- 1) Dupont B, Graybill J R, Armstrong D, Laroche R, Touze J E, Wheat LJ: Fungal infections in AIDS patients. *J Med Vet Mycol* 30 suppl.1 : 19-28, 1992
- 2) Steven L, Chuck M D, Merle A, Sande M D: Infections with *Cryptococcus neoformans* in the acquired immunodeficiency syndrome. *New Engl J Med* 321 : 794-799, 1989
- 3) Oliver A J, Reade P C ; Morphotypes of oral *Candida albicans* from patients infected with the human immunodeficiency virus. *J Med Vet Mycol* 31 : 289-297, 1993
- 4) 渋谷和俊、若山恵、直江史郎：Compromized host に発症する深在性真菌症に関する病理学的研究. *日本医真菌学会雑誌* 34: 253-263, 1993
- 5) 渋谷和俊、若山恵、直江史郎、内田勝久、山口英世：病原酵母を用いた実験的肺肉芽腫に関する免疫組織学的研究. *日本炎症学会誌* 10: 361-366, 1990
- 6) Robert H K, Eliahou B, Sharon M S, Rajendra K: Cryptococcal infection in patients with acquired immune deficiency syndrome. *Am J Med* 81: 19-23, 1986
- 7) Chechani V, Kamholz S L: Pulmonary manifestations of disseminated cryptococcosis in patients with AIDS. *Chest* 98: 1060-6, 1990

結 論

後天性免疫不全症候群に発症したクリプトコックス症について病理組織学的検討を加え以下の結果を得た。

- 1) HAART未施行例では、いずれの症例でも高度の菌の増殖と肺胞隔壁内の広範な菌の侵襲を認めるも組織球の反応は総じて微弱であり、肉芽種と称すべき病変は組織学的には認められなかった。
- 2) HAARTが施行され、組織学的にもCD4+細胞が証明された症例では、組織球反応を伴う限局性病変が肺に多発性に認められ、毛細血管への侵襲は軽微であった。
- 3) HAART 施行の有無に関わらずCD4+細胞の浸潤と成熟した巨細胞の反応を伴う緻密な組織球の集簇を特徴とする肉芽腫の形成は認められなかった。

健康危険情報

特になし

研究発表

1. 論文発表

- 1) Shibuya K, Coulson WF, Wollman JS, Wakayama M, Ando T, Oharaseki T, Takahashi K, Naoe S: Histopathology of cryptococcosis and other fungal infections in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Int J Infec Dis* 5:78-85, 2001
- 2) 甘利雅雄、田口勝二、岩原 実、渋谷和俊、直江史郎：ラットの胸壁組織培養を用いた胸膜中皮細胞の修復機序に関する超微形態ならびに免疫組織化学的研究一. *J. Clin. Electron Microsc.* 33(2):75-88, 2001
- 3) K. Shibuya: Chest radiographs closely mirror pulmonary aspergillosis; Recognizing image patterns can improve estimate of prognosis. *Mycology Observer*, 10(4):6-7, 2001
- 4) 渋谷和俊：後天性免疫不全症候群（AIDS）における真菌症に関する病理学的研究. 厚生科学研究費 新興・再興感染症研究事業「輸入真菌症等真菌症の診断・治療法の開発と発生動向調査に関する研究」平成12年度研究報告書、81-87、2001

2. 学会発表

- 1) 安藤常浩、渋谷和俊、若山 恵、高橋 啓、折津 愈、武村民子、直江史郎：侵襲型肺アスペルギルス症の画像所見の解析—病理所見との対比をもとに一。第22回関東医真菌懇話会、東京、2001.6
- 2) 安藤常浩、渋谷和俊、大原関利章、若山 恵、高橋 啓、折津 愈、武村民子、直江史郎：侵襲性肺アスペルギルス症の画像所見の推移と病理組織像との相関. 第45回日本医真菌学会総会、東京、2001.9
- 3) 安藤常弘、渋谷和俊、大原席利章、若山 恵、高橋 啓、直江史郎、折津 愈：肺真菌症における血中(1→3)- β -D-グルカンの臨床的検討. 真菌症フォーラム第3回学術集会、東京、2002.2
- 4) 村山宋明、花澤 良、渋谷和俊、内田勝久、直江史郎、斧 康雄、山口英世：TSA-ISH法による臨床組織標本からの*Aspergillus* 属の検出. 第45回日本医真菌学会総会、東京、2001.9

- 5) 三野 健、山岸 亨、亀村裕貴、畑中延介、保阪公夫、栗原照幸、渋谷和俊、直江史郎：先行性肺病変がなく短期間で菌球を形成した肺アスペルギルス症の一例。第45回日本医真菌学会総会、東京、2001.9
- 6) 村山宋明、渋谷和俊、直江史郎、花澤 良、池田達夫、丹生 茂、三ツ矢正安、末柄信夫、斧 康雄、山口英世：同一患者でAspergillus属2菌種の感染をISH法により証明した一例。真菌症フォーラム第3回学術集会、東京、2002.2
- 7) 村山宋明、渋谷和俊、直江史郎、花澤 良、池田達夫、丹生 茂、三ツ矢正安、末柄信夫、斧 康雄、山口英世：同一患者でAspergillus属2菌種の感染をISH法により証明した一例。第75回日本細菌学会総会、真菌症フォーラム第2回学術集会、東京、2002.3
- 8) 渋谷和俊、高橋成好、内田勝久、安藤常弘、若山 恵、大原関利章、高橋 啓、山口英世、直江史郎：Gene disrupted mutantを用いたアスペルギルス病原因子に関する実験病理学的研究。第90回日本病理学会総会、東京、2001.4
- 9) 渋谷和俊：肺クリプトコックス症の病理。第12回東北感染症治療フォーラム、八幡平、2001.5
- 10) 渋谷和俊、直江史郎：剖検例の分析による深在性真菌症の推移。第22回関東医真菌懇話会、東京、2001.6
- 11) 渋谷和俊、Coulson WF：ヒト・クリプトコックス症における組織反応。第45回日本医真菌学会総会、東京、2001.9
- 12) 渋谷和俊：侵襲性肺アスペルギルス症の病理。第17回肺真菌症研究会、東京、2001.12
- 13) 渋谷和俊、安藤常弘、若山 恵、大原関利章、高橋 啓、Coulson WF、直江史郎：クリプトコックス肉芽腫に出現する多核巨細胞に関する組織学的研究。第91回日本病理学会総会、横浜、2002.3
- 14) 槇村浩一、渋谷和俊、加納 壘、杉田 隆、岩口伸一、前崎繁文、望月 隆：オンライン病原真菌データベース：PFDB2001。第45回日本医真菌学会総会、東京、2001.9
- 15) 若山 恵、渋谷和俊、安藤常浩、大原関利章、高橋 啓、直江史郎：全身性カンジダ症例における腎病変の変遷に関する病理組織学的検討。第90回日本病理学会総会、東京、2001.4
- 16) 若山 恵、渋谷和俊、安藤常浩、大原関利章、高橋 啓、直江史郎：全身性カンジダ症例にみられたカンジダ腎病変の変遷に関する病理学的検討。第22回関東医真菌懇話会、東京、2001.6
- 17) 若山 恵、藤田正志、寺田武史：固形臓器移植例に生じたアスペルギルス症の成立と進展に関する臨床病理学的検討。第119回東邦医学会例会、東京、2002.2
- 18) 若山 恵、渋谷和俊、安藤常浩、大原関利章、高橋 啓、直江史郎：腎カンジダ症の組織像と抗真菌剤投与の影響に関する検討。真菌症フォーラム第3回学術集会、東京、2002.2
- 19) 若山 恵、渋谷和俊、安藤常浩、大原関利章、高橋 啓、直江史郎：カンジダ腎病変の病理組織学的検討—抗真菌剤投与の影響に関する一考察—。第91回日本病理学会総会、横浜、2002.3
- 20) 田口勝二、渋谷和俊、高橋 啓、若山 恵、大原関利章、直江史郎：細胞診でみられるCandida albicans菌糸形形態について—膣スミア・尿細胞診を中心に—。第45回日本医真菌学会総会、東京、2001.9
- 21) 田口勝二、岩原 実、藤田正志、村石佳重、渋谷和俊、高橋 啓、若山 恵、大原関利章、直江史郎：膣スミアおよび尿細胞診標本にみられるCandida albicans菌糸形形態の比較。第42回日本臨床細胞学会総会、宇都宮、2001.6
- 22) Shibuya K, Ando T, Wakayama M, Oharaseki T, Takahashi K, Oritsu M, Takemura T, Naoe S: Histopathological Study with Radiological Implications of Invasive Pulmonary Aspergillosis. The 5th Japan-China International Congress of Mycology, The 2nd Congress of the Asia Pacific Society for Medical Mycology, Kunming, China, 2001.8
- 23) Kazutoshi Shibuya, Joan Mao, Scott Nelson*, Megumi Wakayama, Toshiaki Oharaseki, Kei Takahashi, Shiro Naoe, Walter Coulson; Histopathological study on granuloma formation against cryptococci in patients with acquired immunodeficiency syndrome with and without treatment of active antiretroviral Focus on Fungal Infections 12, Phoenix, Arizona, USA, 2002.3
- 24) Wakayama M, Shibuya K, Ando T, Oharaseki T, Takahashi K, Naoe S: Histopathological Examination of Renal Candidiasis-As a part of Systemic Candidiasis. The 5th Japan-China International Congress of Mycology, The 2nd Congress of the Asia Pacific Society for Medical Mycology, Kunming, China, 2001.8