

[中心静脈ライン]

CNS 12件中11件(92%)、S.aureus 5件中2件(40%)、Candida albicans 1件をはじめ、多くの例で中心静脈カテーテル由来の感染を否定できなかった。発症時、菌血症との因果関係は問わず、38件中24件(63%)で中心静脈カテーテルを留置されており、全身状態不良な例で菌血症を合併しやすい傾向が示された。(図4)

[白血球数]

菌血症発症時の白血球数は2000/ μ l未満が38件中5件(13%)、4000/ μ l未満が16件(42%)を占めた。“白血球数の少ない例でグラム陰性菌による菌血症が多い”という傾向は必ずしも見られなかった。(図5)

[抗 HIV 療法の状況]

菌血症発症時に抗HIV療法を行っていたのは38件中9件(24%)に過ぎず、12件(32%)が未施行、17件(44%)が治療中断例であった。(図6)

抗HIV療法が中断されていた理由としては、副作用が17件中9件(53%)と最多で、日和見疾患合併5件(29%)、自己中断2件(12%)、治療失敗1件(6%)と続いた。(図7)

図8に菌血症発症時のCD4陽性リンパ球数と血中HIV-RNA量の関係を示したが、CD4が低くウイルス量が高い左上部に集中していることが分かる。CD4陽性リンパ球数は50/ μ l未満が71%、100/ μ l未満が82%を占め、中央値13/ μ lであった。

菌種別のCD4陽性リンパ球数の分布を図9に示すが、Salmonellaで700/ μ lを超える例が1件みられた。

(4) 菌血症発症患者の子後

菌血症を認めた入院28件のうち11件(39%)で、患者は当該入院中に死亡した(図10)。死因としては11件中7件(64%)が菌血症関連と考えられ、残り4件(36%)は日和見疾患による死亡であった(図11)。菌種別では緑膿菌で4件中2件(50%)が菌血症関連死を来たしており、予後の悪さが窺えた(図12)。菌血症に関連して死亡したと考えられる7件と、それ以外の31件で、CD4陽性リンパ球数を比較したが、それぞれ平均値は18.6 \pm 19.5/ μ lと79.1 \pm 148.1/ μ lで、Welchの検定により有意差を認めた(p<0.05)。(図13)

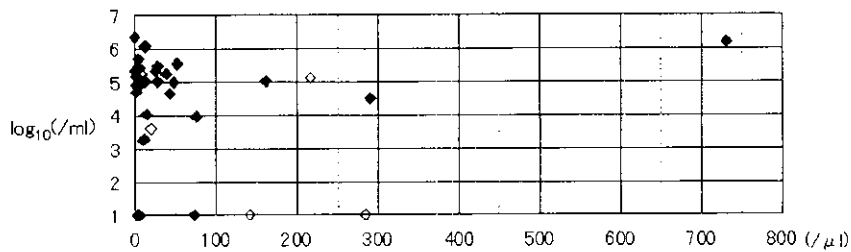


図8 菌血症発症時の“CD4陽性リンパ球数”と“血中HIV-RNA量”

◇ ARTあり ◆ ARTなし

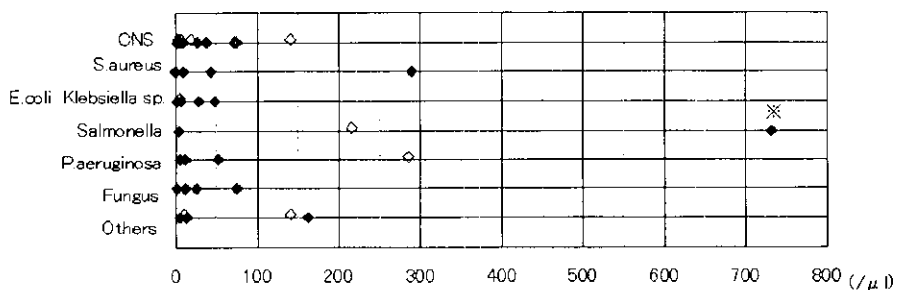


図9 菌種別・CD4陽性リンパ球数

◇ ARTあり ◆ ARTなし

※ CD4 731/ μ l. Salmonella菌血症でAIDS発症となった。

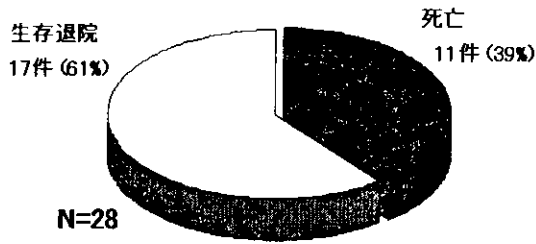


図10 菌血症発症患者の予後

菌血症を認めた入院 28件のうち、11件(39%)が“当該入院中の死亡”に至った。

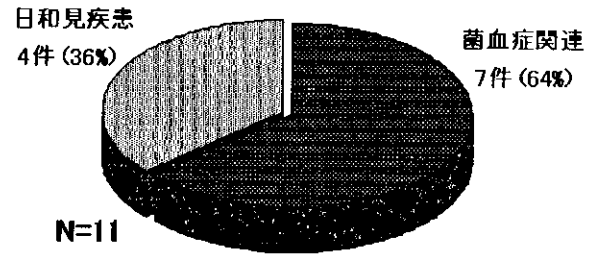


図11 死亡原因

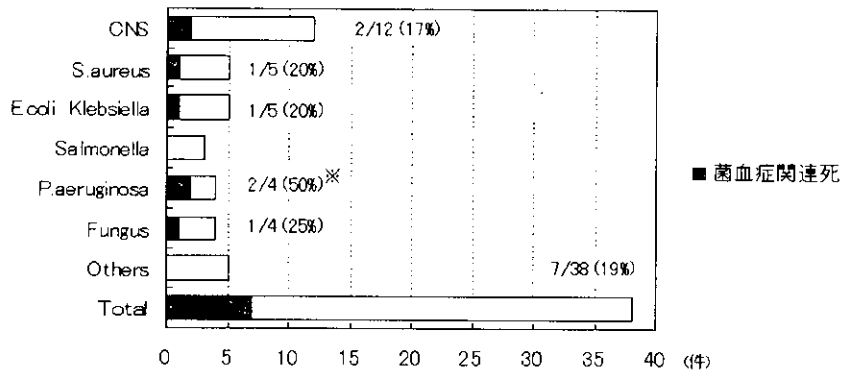


図12 菌種別・菌血症関連死の頻度

* 緑膿菌では4件中2件(50%)が菌血症関連死を来した。

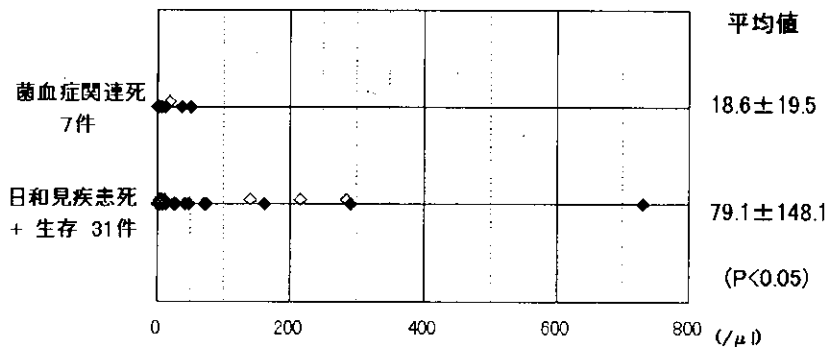


図13 CD4陽性リンパ球数と予後

◇ ARTあり ◆ ARTなし

※ 菌血症関連死を来した7件と、それ以外の31件で、CD4陽性リンパ球数を比較したところ、Welchの検定で平均値に有意差を認めた。

考 察

今回の調査で、HIV感染患者に特徴的な血液培養分離菌として、Nontyphoidal Salmonella(7.9%)とCryptococcus neoformans(2.6%)を認めたが、主な分離菌はコアグラゼ陰性ブドウ球菌(31.6%)と黄色ブドウ球菌(13.2%)であり、中心静脈カテーテルからの感染を疑われる例が多い点は、HIV非感染者と同様であった。

HIV感染者の血液培養分離菌については地域による特性が見られる。欧米の報告では、中心静脈カテーテルの使用や薬物濫用者の蔓延を背景として、コアグラゼ陰性ブドウ球菌と黄色ブドウ球菌の分離頻度が高いが¹⁾²⁾³⁾、アフリカの報告ではサルモネラと肺炎球菌が優位を占め、その大半は市中感染症である⁴⁾⁵⁾⁶⁾。今回の報告では、市中感染と考えられる菌血症は38件中4件(11%)に過ぎず、わが国のHIV感染者にみられる菌血症では院内発症例の比重が高いことが示された。

HIV感染者が菌血症を発症する独立危険因子としては、CD4陽性リンパ球減少(HIV感染症の進行³⁾、好中球減少³⁾⁷⁾⁸⁾、中心静脈カテーテルの使用¹⁾³⁾⁷⁾⁸⁾、薬物濫用⁷⁾、重症度(APACHE score)⁷⁾などを挙げる報告がある。

今回の調査では菌血症発症時に約3/4のケースで抗HIV療法を行っておらず、CD4陽性リンパ球数は中央値 $12/\mu\text{l}$ と極めて低値であった。これは他で報告された値($17 \sim 29/\mu\text{l}$)と同様の結果であった¹⁾⁹⁾¹⁰⁾。

HIV感染者における好中球減少は、HIV感染症自体や投与薬剤の影響により、しばしば見られる現象であるが、Keiser Pらの報告によると、好中球数 $1000/\mu\text{l}$ 未満の患者では菌血症発症の相対危険度が14.9にのぼる⁸⁾。今回の調査でも菌血症発症時の白血球数は $2000/\mu\text{l}$ 未満が13%、 $4000/\mu\text{l}$ 未満が42%を占め、好中球減少がHIV感染者の菌血症発症に深く関与している可能性が示唆された。「HIV感染者の好中球減少例に対してG-CSFを投与することにより菌血症発症リスクが低下し生存期間が延長された」との報告もあり¹¹⁾、HIV感染症の進行例、中心静脈カテーテル留置例、全身状態が重篤な例など、ハイリスク群に対しては、G-

CSFの投与を積極的に検討していく必要があると思われる。

Tumbarello Mらは、HAARTがHIV感染者の菌血症に与えた影響を検討しているが、HAART導入後、菌血症発症危険因子である「好中球減少」例と「中心静脈カテーテル使用」例が有意に減少し、菌血症自体も有意に減少したという⁷⁾。今後わが国でもHAART成功例での菌血症は減少していくものと思われるが、何らかの原因でHAARTを継続できない例が存在すること、重篤な日和見疾患を契機にHIV感染症が判明する例が後をたたないことから、その重要性はますます増していくものと考えられる。

結 論

わが国のHIV感染者においてもNontyphoidal Salmonella、Cryptococcus neoformansなどによる「市中発症」の菌血症を認めたが、大部分は重篤な日和見疾患などで入院した後の合併症として菌血症を発症(「院内発症」)しており、CNS、S.aureus、P.aeruginosaが主な分離菌であった。またHIV感染症の進行(CD4陽性リンパ球数の減少)、投与薬剤やHIV感染症に関連した好中球減少、中心静脈カテーテル留置などが、わが国のHIV感染者において菌血症発症の危険因子となっていることが示唆された。

本研究に当たり、HIV感染者および当院での血液培養分離菌のデータ抽出に御協力いただいた中央検査部細菌室、此崎寿美氏、川畑久氏に深謝いたします

参考文献

- 1) Fichtenbaum CJ et al. Bacteremia in hospitalized patients infected with the human immunodeficiency virus: a case-control study of risk factors and outcome. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirology 1995 Jan 1; 8(1): 51-7
- 2) Bonadio M et al. Bloodstream infections in HIV-positive patients: a review of sixty-eight episodes. J Chemother 1998 Jun; 10(3): 243-7
- 3) Tumbarello M et al. The impact of bacteremia on HIV infection. Nine years experience in a large Ital-

ian university hospital. *J Infect* 1995 Sep; 31(2): 123-31

- 4) Arthur G et al. Trends in bloodstream infections among human immunodeficiency virus-infected adults admitted to a hospital in Nairobi, Kenya, during the last decade. *Clin Infect Dis* 2001 Jul 15; 33(2): 248-56
- 5) Gordon MA et al. Bacteremia and mortality among adult medical admissions in Malawi-predominance of non-typhi salmonellae and *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect* 2001 Jan; 42(1): 44-9
- 6) Ssali FN et al. A prospective study of community-acquired bloodstream infections among febrile adults admitted to Mulago Hospital in Kampala, Uganda. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1998 Dec 15; 19(5): 484-9
- 7) Tumbarello M et al. HIV-associated bacteremia: how it has changed in the highly active antiretroviral therapy (HAART) era. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2000 Feb 1; 23(2): 145-51
- 8) Keiser P et al. Neutropenia is associated with bacteremia in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Am J Med Sci* 1996 Sep; 312(3): 118-22
- 9) Omenaca C et al. Bacteremia in HIV-infected patients: short-term predictors of mortality. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999 Oct 1; 22(2): 155-60
- 10) Hung CC et al. Bacteremia and fungemia in patients with advanced human immunodeficiency virus (HIV) infection in Taiwan. *J Formos Med Assoc* 1998 Oct; 97(10): 690-7
- 11) Keiser P et al. Granulocyte colony-stimulating factor use is associated with decreased bacteremia and increased survival in neutropenic HIV-infected patients. *Am J Med* 1998 Jan; 104(1): 48-55

知的財産権の出願・登録状況

特になし

健康危険情報

特になし

研究発表

1. 学会発表

- 1) 川田真幹、石崎有澄美、中島由紀子、矢崎博久、砂川恵伸、照屋勝治、源河いくみ、立川夏夫、菊池嘉、安岡彰、岡慎一、木村哲：当センターのHIV感染入院患者における血液培養陽性例の臨床的検討。第15回日本エイズ学会学術集会・総会、2001、東京。



エイズ合併結核—その病態と臨床—

中田 光¹⁾、慶長 直人¹⁾、永井 英明²⁾、倉島 篤行²⁾、蛇澤 晶²⁾、藤田 明³⁾、
Yoshihiko Hoshino⁴⁾、Michael Weiden⁴⁾

1) 国立国際医療センター研究所呼吸器疾患研究部

2) 国立療養所東京病院内科

3) 国立療養所東京病院病理検査科

4) 都立府中病院呼吸器内科

5) NYU Medical Center

研究要旨

炎症によりHIV感染細胞からのウイルス産生が亢進する機序として、炎症に伴い誘導される転写促進因子NF- κ B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。剖検及び生検病理標本の検討で、血中CD4細胞数50以下の極度に進行したAIDS合併結核では、HIV産生が逆説的に低下していることを見出した。また、HIV/結核重感染の病巣部を病理学的に検討し、細胞相と上記転写因子の発現の関係について調査した。その結果、HIV結核の結核病巣部は類上皮細胞の形成不全がみられ、類上皮を形成するマクロファージの融合が弱く、類上皮細胞間にCD8T細胞の浸潤が見られるが、CD4細胞浸潤は皆無であった。また、非HIVの結核病巣部に比べ、HIVの類上皮細胞は、NF- κ Bの発現が弱い。この原因は不明であるが、CD4細胞が肉芽腫形成と転写因子の誘導になんらかの形で関与していると思われる。

分担研究者：森 亨

研究協力者：中田 光、永井英明、藤田 明

Immunopathology of tuberculosis coinfecting with HIV

Koh Nakata¹⁾, Naoto Keicho¹⁾, Hideaki Nagai²⁾, Atsuyuki Kurashima²⁾, Akira Hebisawa²⁾, Akira Fujita³⁾, Yoshihiko Hoshino⁴⁾ and Michael Weiden⁴⁾

¹⁾Department of Respiratory Diseases, Research Institute, International Medical Center of Japan, ²⁾Department of Medicine, National Tokyo Chest Hospital, ³⁾Department of Pathology, National Tokyo Chest Hospital, ⁴⁾Department of Medicine, Tokyo Metropolitan Fuchu Hospital and ⁵⁾New York University Medical Center

研究目的

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。

研究方法

パラフィン包埋切片は協力研究者の蛇沢から供与を受けた。切片を脱パラフィン操作後、1mMEDTApH8.0溶液中にて95℃で30分加熱処理した。内因性パーオキシダーゼブロッキング処理、非特異的蛋白結合ブロッキング処理の後、Novocastra社製抗CD4及びCD8抗原モノクローナル抗体、Dako社製抗CD68抗原モノクローナル抗体と一昼夜反応させ、ニチレイ製シンプルステインPO MAXを二次抗体として免疫組織化学染色を行った。発色はDABまたはAECにて行った。

(倫理面への配慮)患者標本はすべて匿名でおこない、プライバシーにわたる事項は取り扱わなかった。

研究結果及び考察

1. AIDS合併リンパ節結核の肉芽腫組織像の特徴

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。このうちの2例と他に、HIV/結核のリンパ節生検2例を用い、非HIVの結核結節をコントロールとして、結核病巣部の細胞相を調べた。コントロールの非HIVの壊死のあるリンパ節では、壊死の周囲に密に融合したマクロファージからなる類上皮層があり、それを取り囲むようにCD4とCD8Tリンパ球の混合した層が形成される(図1-1)。

これより早期と思われる壊死のない結核リンパ節では密に融合したマクロファージの類上皮の周辺にCD4とCD8リンパ球の混合した層が形成される。チールニールセン染色で染まる結核菌は類上皮層になく、壊死層にごくまれに認められる程度である。このように、非HIVの結核リンパ節では、中心部から壊死層、類上皮層、それを取り囲むリンパ球層の境界がはっきりしており、菌はこのラ

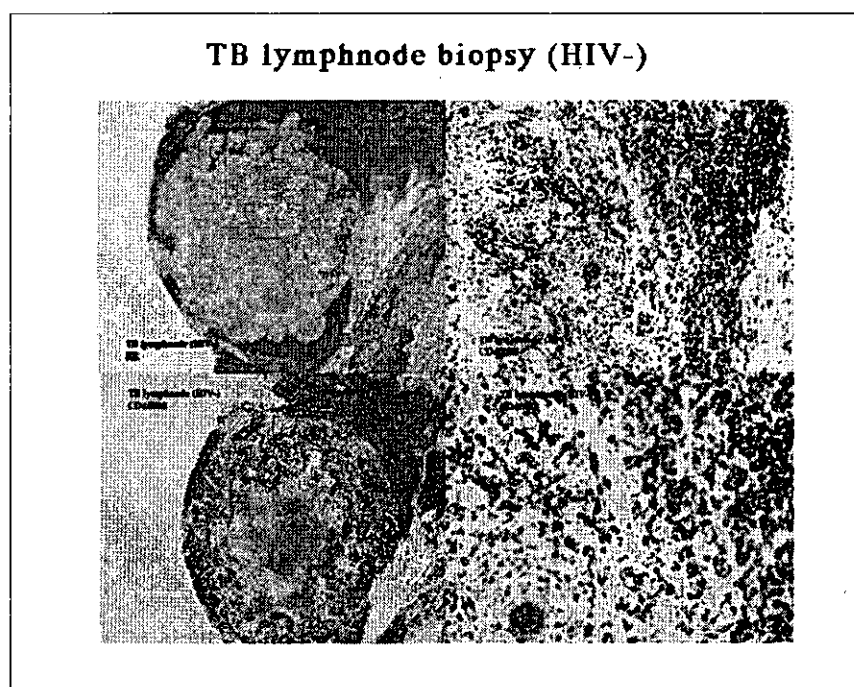


図1-1 非HIV感染リンパ節結核のHE染色(左上、20倍)、免疫担当細胞の三重染色(左下、20倍、マクロファージ・壊死-橙色、CD4リンパ球-濃紺色、CD8リンパ球-茶色)、同右上100倍、右下同200倍

メラ構造によって包囲されていると思われる。

一方、血中CD4が84/mm³のHIV/結核重感染のリンパ節では、壊死層の周辺は融合していないマクロファージと線維芽細胞層からなり、その周囲を類上皮が囲むが融合が疎で間質に主としてCD8からなるリンパ球の浸潤があった(図1-2)。

類上皮層と浸潤リンパ球層の境界が不鮮明で、入り乱れている。CD4リンパ球は極めて少なく、病巣の最外層に集簇が認められた。結核菌は壊死の辺縁部に見られたが、類上皮層には認められな

かった。CD4が41/mm³のリンパ節では類上皮はさらに疎な融合からなり、細胞間隙が目立った。壊死の形成は不完全で壊死中にマクロファージとCD8リンパ球の浸潤が見られた(図1-3)。

類上皮の間隙には多くのCD8リンパ球の浸潤があり、類上皮層と浸潤リンパ球層の境界は判別不可能である。CD4が26と6のリンパ節では、壊死の周辺をマクロファージが取り囲むが、類上皮形成せず、その周囲をさらにCD8リンパ球が包囲していた。CD4リンパ球は皆無であった。以上のこ

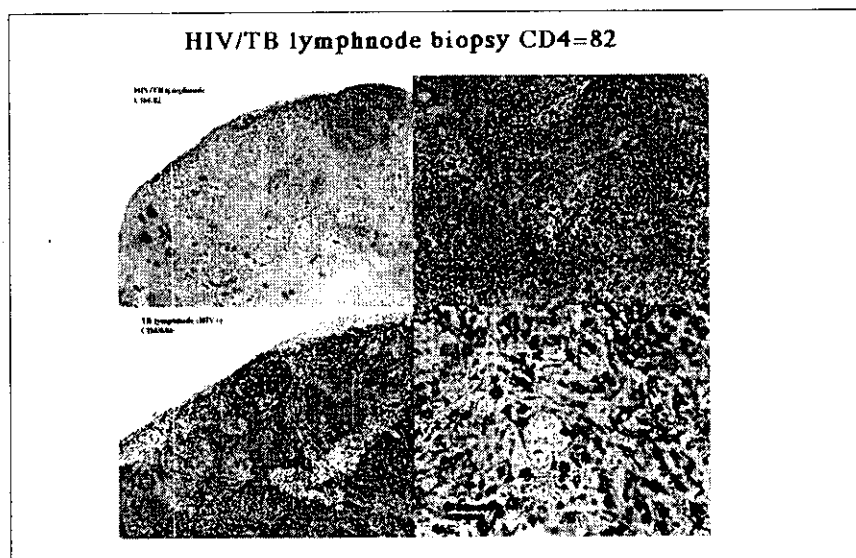


図1-2 血中CD4リンパ球数が82/mm³のエイズ合併リンパ節結核のHE染色(左上20倍)、免疫担当細胞の三重染色(右下、20倍、マクロファージ・壊死-橙色、CD4リンパ球-濃紺色、CD8リンパ球-茶色)、同右上100倍、同右下400倍、CD4リンパ球はほとんどみられない。

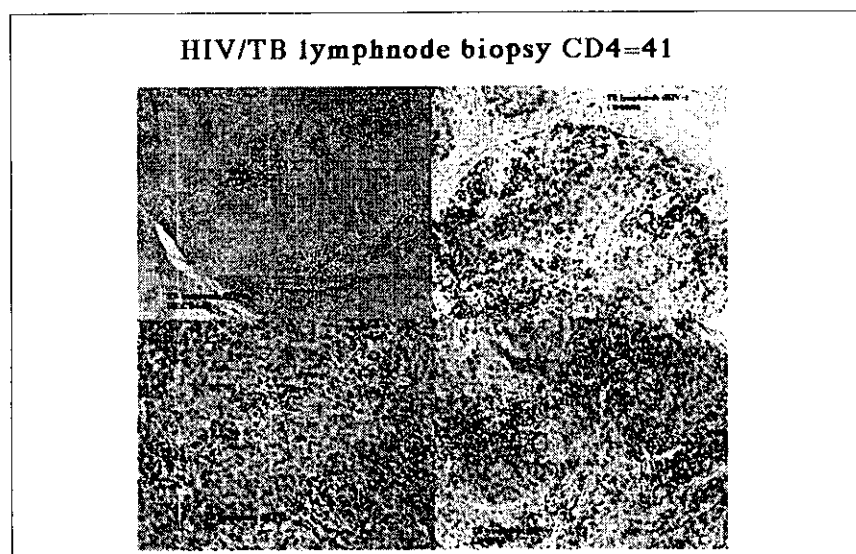


図1-3 血中CD4リンパ球数が41/mm³のエイズ合併リンパ節結核のHE染色(左上20倍、左下100倍)、免疫担当細胞の三重染色(右上100倍、マクロファージ・壊死-橙色、CD4リンパ球-濃紺色、CD8リンパ球-茶色)、同右下200倍、CD4リンパ球は全くみられない。

とから、エイズ合併結核の結核病巣部は、非HIVのそれで通常みられる典型的な乾酪壊死をみることはまれで、壊死のなかにさらにマクロファージやCD8T細胞や線維芽細胞の浸潤をみる類壊死の様相を呈する。また、類上皮形成は不完全で、融合していないマクロファージも多数みられる。その結果、壊死層、類上皮層、リンパ球層の判別が困難である。

2. エイズ合併結核の粟粒結節の特徴

晩期エイズ合併結核のもう一つの特徴である粟粒結核の組織像は非HIVでみられる粟粒結核のそれとは異なる特徴をもつ。非HIVの粟粒結核結節

の経気管支肺生検のHE染色像を図2-1に示す。結節は上記の非HIVリンパ節結核同様に、壊死層、類上皮層、リンパ球層、線維芽細胞層からなり、壊死層の周辺にときにランゲハンス巨細胞をみる。通常の結核結節と比べてリンパ球浸潤の程度が軽く、壊死も小型である。

これに対し、エイズ合併結核の粟粒結節は、ほとんどが壊死～類壊死からなる。図2-2に示すように壊死は通常の結核に見られる特徴的な乾酪壊死ではなく、崩壊したマクロファージの集簇にリンパ球浸潤(CD8+リンパ球)をともなったものである。壊死内に夥しい数の結核菌がみとめられる。さらには、壊死の周辺には融合しないマクロファージが見られる。

表1：剖検・生検組織のP24免疫組織化学染色の結果

	CD4 count(/mm ³)	giant cell	p24 positive cells	stained sites
TBLB				
BS96-2431	452	+	++	epithelioid cells, AM(?)
BS97-2150	250	++	++	epithelioid cells, AM
15213	88	+	++	epithelioid cells
BS95-7094	80	+	+	epithelioid cells
BS96-5267	20	-	negative	
953503	12	-	negative	
BS98-4635	10	-	negative	
lymphnode				
1546-47	391	++	+	macrophage, follicle
1853	83	+	++	epithelioid cells, macrophages
2588	41	-	+	macrophages
4148	26	-	negative	
1508-28	6	-	negative	
lung				
1546-70	391	++	+	macrophages
1651-74	70	+	+	macrophages
1508-82	6	-	negative	
4148-24	26	-	negative	

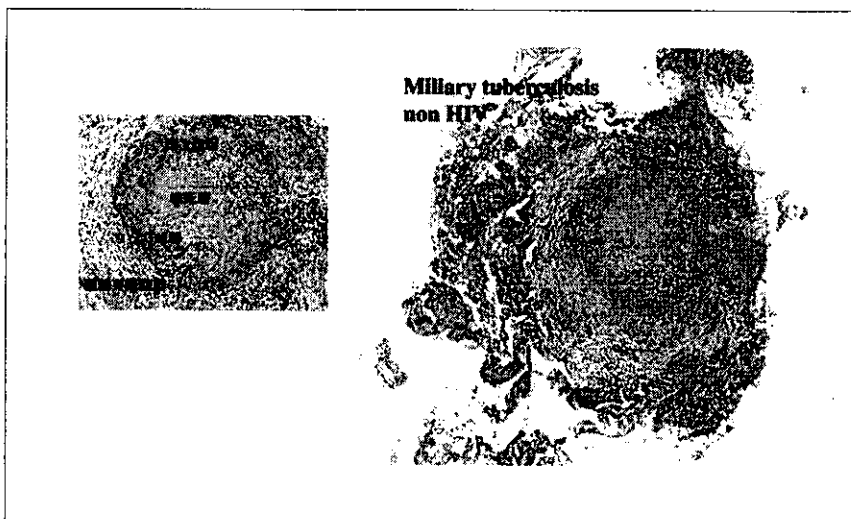


図2-1 非HIV粟粒結核患者の肺病理像：HE染色

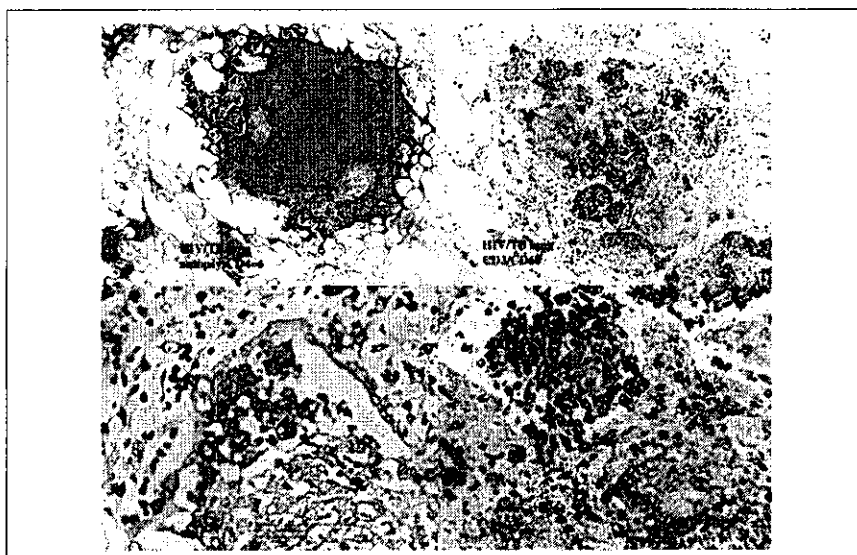


図2-2 エイズ合併粟粒結核剖検肺：HE染色
左上 20倍
左下：400倍、マクロファージ-茶色、抗酸菌-赤の二重染色
右上：50倍、Tリンパ球-濃紺、マクロファージ-赤色の二重

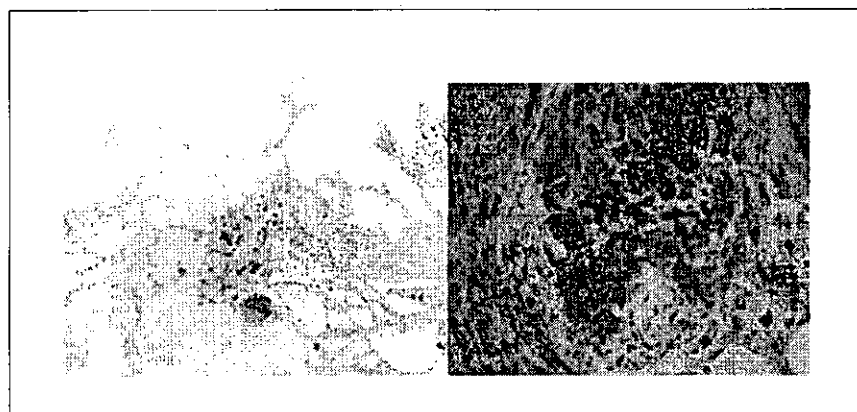


図3-1 血中CD4が88/mm3(左)と250/mm3(右)のHIVp24抗原免疫組織化学染色



図3-2 P24とCD4の二重染色像。p24染色陽性像の周辺にはCD4陽性リンパ球の局在がみられた

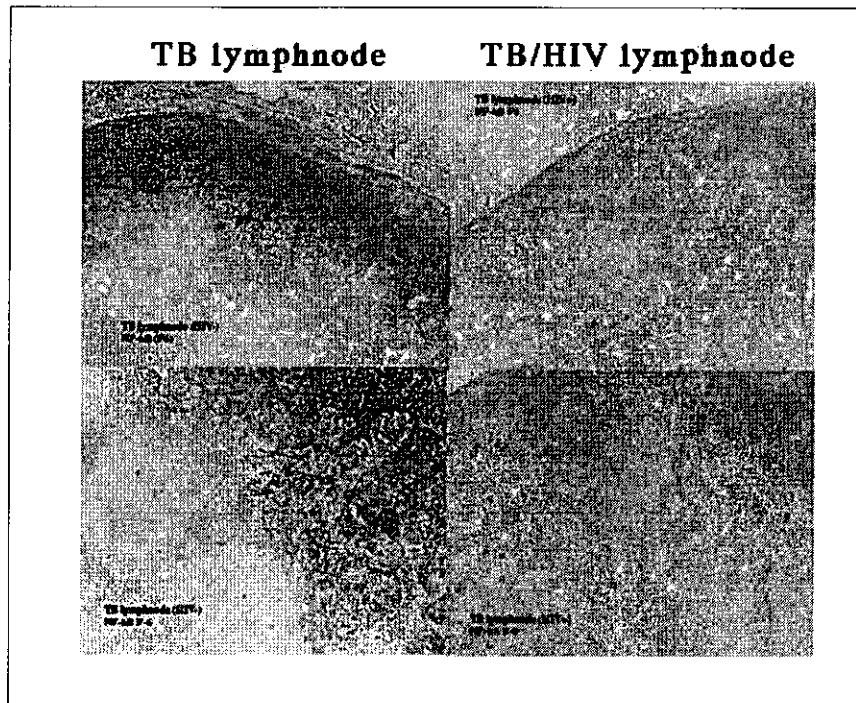


図4：リンパ節結核のNF-κB発現
 左上下：非HIV, 類上皮細胞及びそれを取り巻くリンパ球に強く発現している
 右上下：エイズ合併結核、壊死周囲のマクロファージに弱く発現

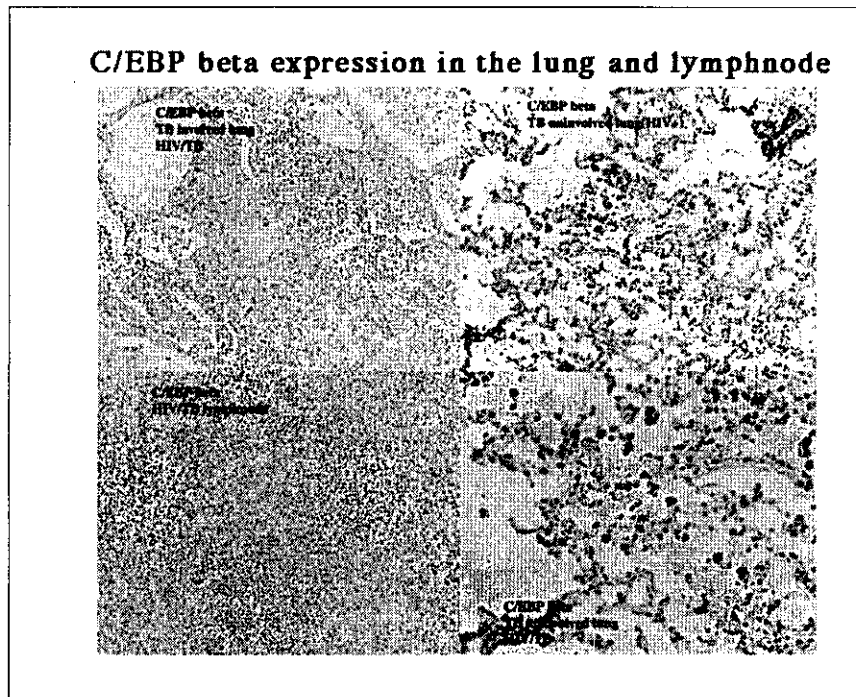


図5：結核病巣部のC/EBPβ発現
 左上：エイズ合併粟粒結核病巣部、発現なし。
 左下：エイズ合併リンパ節結核病巣部、発現なし。
 右上：エイズ合併結核非病巣部(倍率100倍)、マクロファージの核に発現
 右下：同上200倍

3. 剖検及び生検組織中の肉芽腫中のHIVの局在

剖検生検16例のHIV-p24抗原の免疫組織化学染色の結果を表1に示す。興味深いことにHIV産生している組織は主として血中CD4数が100前後以上の患者の組織で、主として類上皮細胞ないしは類上皮には発現していないが、集簇しつつあるマクロファージが産生していた(図3-1, 3-2)。

どちらもTBLB標本で、類上皮細胞に染まっている。

4. 剖検及び生検組織中の肉芽腫中の転写因子の発現

結核菌感染により、局所のマクロファージは活性化し、TNF α やIL-1 β 、IL-6などの炎症性サイトカインとIL-8, MCP-1, MIP-1 α などのケモカインを放出し、炎症の惹起とそれに伴う菌の排除に中心的な役割を担う。マクロファージの活性化には細胞内の転写因子が活性化され、引き続いて核内へ移動することが重要である。そこで、結核肉芽腫局所での転写因子の発現を調べた。転写因子の中でマクロファージの活性化とHIVの産生調節に関わる、もっとも重要なものとして、NF- κ B(nuclear factor kB)とNF-IL6 (nuclear factor IL6, C/EBP β /CCAAT/enhancer binding protein β)を取り上げた。

非HIV結核結節では乾酪壊死周囲の類上皮にNF- κ Bが強く発現し、その周囲をやはりNF- κ B陽性のリンパ球が包囲していた(図4左)。

血中CD4が84/mmのHIV/結核患者のリンパ節ではNF- κ B陽性マクロファージは局限しており、非HIV結核に比べて減弱していた(図4右)。血中CD4が41の生検リンパ節では、さらに類上皮細胞NF- κ Bの発現は弱かった。CD4が24及び6/mm³のリンパ節結核病巣では壊死ないしは類壊死の周辺に薄い融合していないマクロファージ層があり、NF- κ Bを弱く発現していた。上記のリンパ節のマクロファージにはいづれもC/EBP β の発現は見られなかった(図5左)。

HIV合併結核の非病巣部及び健常肺では、C/EBP β は肺胞マクロファージの核に強く発現していた(図5右)。また、エイズ合併粟粒結核の病巣部では、壊死周囲のマクロファージに弱くNF- κ Bが発現し、C/EBP β は発現していなかった。このように非HIVの結核病巣部では特に類上皮層のマク

ロファージに非常につよくNF- κ Bが発現しており、マクロファージの活性化が起こっていると考えられる。これに対して、エイズ合併結核の肉芽腫ではNF- κ Bの発現が弱く、したがってマクロファージの活性化の程度も弱いと考えられる。

一方、C/EBP β は健常部の肺胞マクロファージの核に発現しているが、病巣部の肺胞マクロファージ及び肉芽腫内のマクロファージには発現していなかった。

結 論

以上のエイズ合併結核の病理学的検討から以下のようなことが明らかとなった。

1. 進行した晚期エイズ合併結核の病巣部は典型的な乾酪壊死と類上皮、ラングハンス巨細胞をもつ肉芽腫を形成せず、壊死の中にマクロファージやCD8T細胞の浸潤がみられ、さらにその周囲を融合が弱い類上皮細胞がとりまく。
2. HIVの産生は主として類上皮細胞あるいはマクロファージが行っており、CD4陽性リンパ球がその周辺に見られた。CD4陽性リンパ球のみられない組織にはHIVを産生しているマクロファージないし類上皮細胞は見られなかった。
3. HIV陰性結核の病巣部にはウイルスの宿主側の促進因子であるNF- κ Bの発現が類上皮細胞リンパ球に強く見られるが、進行したエイズ合併結核では類上皮層の発現はよわい。一方、抑制生の転写因子C/EBP β は非病巣部の肺胞マクロファージの核に強く発現しているが、病巣部のマクロファージの発現は弱かった。

健康危険情報

なし

研究発表

1. 論文発表

- 1) Hirota M, Totsu T, Adachi F, Kamikawa K, Watanabe J, Kanegasaki S, and Nakata K: Comparison of antimycobacterial activity of grepafloxacin

- against *Mycobacterium avium* with that of levofloxacin: Accumulation of grepafloxacin in human macrophages *J. Infection and Chemotherapy*, 7,16-21, 2001
- 2) Keicho N, Emi M, Kajita M, Matsushita I, Nakata K, Azuma A, Ohishi N, Kudoh S : Overestimated frequency of a possible emphysema-susceptibility allele when microsomal epoxide hydrolase is genotyped by the conventional polymerase chain reaction-based method. *J. Human Genetics*, 46,96-98,2001
 - 3) Hoshino Y, Nakata K, Hoshino S, Honda Y, Tse D, Shioda T, Rom W, and Micahel Weiden: Maximal HIV-1 replication in alveolar macrophages during tuberculosis requires both lymphocyte contact and cytokines. *J. Experimental Medicine*, 2002, in press.
 - 4) 中田 光、本田芳裕、M. Weiden (分担執筆) : HIVと結核の相互作用の分子機構、結核、編集 光山正雄、大阪、医薬ジャーナル社、2001年、p359-368
 - 5) 慶長直人、土屋朋子、中田 光 : びまん性汎細気管支炎とHLA、血液フロンティア、11 (1)、39-46、2001.
 - 6) 寺川貴裕、中田 光、内田 寛治、慶長直人 : Surfactantの基本構造と病原微生物との結合、マクロファージ貪食、*The Lung perspective*, 9(4), 86-89, 2001
 - 7) 松下育美、中田 光、慶長直人 : 病態解析とSNP-呼吸器疾患 (慢性閉塞性肺疾患)、血液・免疫・腫瘍BIC Forum, 16(4), 56-62, 2001
 - 8) AM__の増殖の研究から肺胞蛋白症の病因解明に至る道のり、*Bio Defence News Letter* 01-1, 2001

2. 学会発表

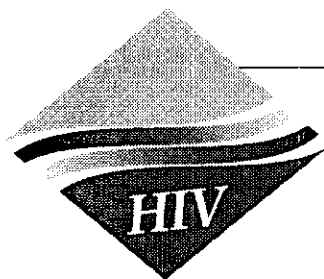
- 1) 中田 光 特発性肺胞蛋白症の病因解明—抗GM-CSF自己抗体の発見に至る道のり、特別講演、岩手びまん性肺疾患研究会、盛岡、2月、2001.
- 2) 中田 光 HIV感染者におけるウイルス動態、呼吸器感染免疫研究会-第10回京都セミナー、シンポジウム講演、京都、8月4日、2001.
- 3) 中田 光 結核・エイズについて、日本細菌学会九州支部・日本ウイルス学会九州支部総会、市民講座、教育講演、北九州、9月7日、2001.
- 4) Koh Nakata: Idiopathic pulmonary alveolar proteinosis as an autoimmune disease with neutralizing autoantibody against GM-CSF., *Ciclo di Seminari* 2001, Institute of Mutagenesis and differentiation,

招請講演、イタリア・ピサ、9月、2001.

- 5) K. Uchida, K. Nakata, T. Kitamura, N. Tanaka, Y. Inoue, M. Sakatani, S. Kudoh, A. Azuma, T. Nukiwa, T. Tsuchiya, I. Matsushita, M. Hashimoto, Goh Tanaka, Naoto Keicho EPI TOPE MAPPING OF AUTOANTIBODY AGAINST GM-CSF ISOLATED FROM SERA OF PATIENTS WITH IDIOPATHIC PULMONARY ALVEOLAR PROTEINOSIS 97th International Conference of American Thoracic society, San Francisco, USA, May 18-23, 2001

知的財産権の出願・登録状況

とくになし。



結核菌および*Mycobacterium avium* complex (MAC)の薬剤耐性の遺伝子診断 についての検討

米山 彰子¹⁾、日暮 芳己²⁾、奥住 捷子²⁾、森屋 恭爾²⁾、中原 一彦¹⁾、木村 哲²⁾

¹⁾ 東京大学医学部附属病院検査部

²⁾ 東京大学医学部感染制御部

研究要旨

抗酸菌の薬剤耐性に関与する遺伝子変異を検出する DNA チップである OligoArray[®] (NISSHINBO)を用いた薬剤感受性試験について検討した。臨床分離結核菌株7株について、通常感受性試験の結果と比較検討すると、RFPおよびKMについては7株とも一致したが、INH について3株、SM について2株、EB について1株が不一致であった。不一致例はいずれも OligoArray[®]では感受性、通常感受性試験で耐性と判定され、この乖離の原因は今後検討が必要と思われた。*Mycobacterium avium* については OligoArray[®]をそのままでは用いることができず、プライマー等を *Mycobacterium avium* 用に変更する必要があると思われた。

分担研究者：米山彰子

研究協力者：日暮芳己、奥住捷子、森屋恭爾、中原一彦、木村哲

Susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* complex(MAC) isolates by DNA chip

Akiko Yoneyama¹⁾, Yoshimi Higurashi²⁾, Katsuko Okuzumi²⁾, Kyoji Moriya²⁾, Kazuhiko Nakahara¹⁾ and Satoshi Kimura²⁾

¹⁾Laboratory Center, University of Tokyo Hospital, ²⁾Department of Infection Control and Prevention, University of Tokyo

研究目的

結核および *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。結核菌については薬剤耐性結核菌が問題になってきており、MACも通常の抗結核薬が効きにくいことから、薬剤感受性試験が大切である。しかし通常の薬剤感受性試験は培養をベースとしており、判定までに時間がかかることが避けられない。これに対し、最近、遺伝子工学的手法を用いた結核菌の耐性遺伝子診断のキットが発売された。今回結核菌の臨床分離株について通常の薬剤感受性試験の結果と比較検討するとともに、この手法のMACへの応用の可能性を探ることを目的とした。

研究方法

試験菌株は、結核菌として臨床分離株7株およびH37Rv株(ATCC27294)、および *Mycobacterium avium* 臨床分離株10株。

結核菌の耐性遺伝子診断にはOligoArray®(NISSHINBO)を用いた。結核菌より、アンブリコアマイコバクテリウム検体前処理試薬セットII(ロシュ)を用いてDNAを抽出、その後の手順はOligoArray®の使用説明書に従った。

OligoArray®は、isoniazid (INH), rifampicin (RFP), streptomycin (SM), kanamycin (KM), ethambutol (EB)の5薬剤について薬剤耐性と関連のある塩基置換、欠失あるいは挿入を検出するためのオリゴヌクレオチドおよび感受性型DNAを検出するオリゴヌクレオチドをひとつのアレイ上に配列したDNA

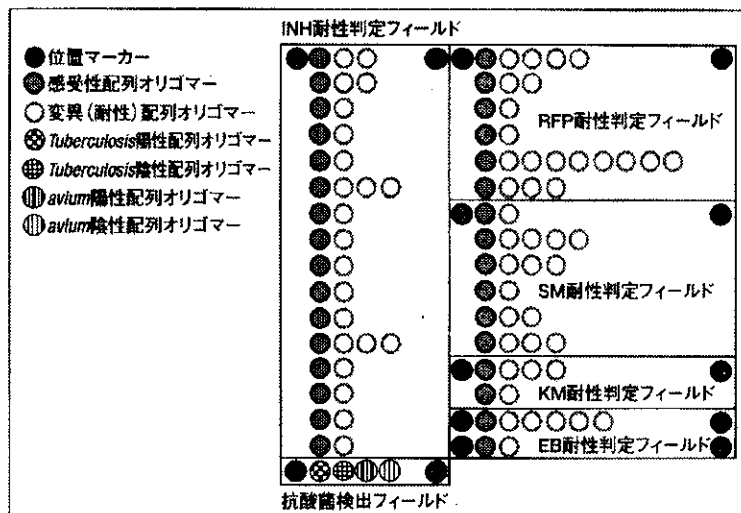


図1 オリゴアレイの配列

表1 薬剤耐性に関与する遺伝子

薬剤	耐性遺伝子	耐性化の作用部位	関与率 (下線の遺伝子)
INH	<u>inhA</u> , <u>katG</u> , <u>ahpC</u>	catalase-peroxidase、ミコール酸合成	80%
RFP	<u>rpoB</u>	RNAポリメラーゼβサブユニット	95%
SM	<u>rfs</u> , <u>rpsL</u>	16sリボソーム蛋白、S12リボソーム蛋白	80%
KM	<u>rfs</u>	16sリボソーム蛋白	70%
EB	<u>embB</u>	arabinosyl transferase	70%
PZM	<u>PncA</u>	pyrazinamidase	
キノロン	<u>gyrA</u> , <u>gyrB</u>	DNA gyrase	

下線：オリゴアレイで検出可能な遺伝子

チップである(図1)。結核菌コロニーから抽出したDNAから耐性に関与する遺伝子領域を増幅し、得られたピオチン化ターゲットをアレイ上で hybridization し発色させて検出する。感受性配列オリゴマーのシグナルの消失と耐性配列オリゴマーのシグナルの出現から耐性診断を行う。同時に結核菌と *Mycobacterium avium* の同定用のオリゴヌクレオチドも配置されている。このキットにより結核菌の薬剤耐性に関与する遺伝子変異のかなりの割合を検出できるとしている(表1)。

結核菌の薬剤感受性試験は、Middle brook 7H9 broth (マイコビーズ[®]; 極東製薬)によって前培養した菌を用い、極東結核菌感受性ピットスペクトル-SR[®](極東製薬)で行った。

Mycobacterium avium については、結核菌と同様の処理を行ってOligoArray[®]による解析を行うとともに、増幅産物をポリアクリルアミド電気泳動にて解析した。

研究結果

1. 結核菌の解析

結核菌のOligoArray[®]による解析結果を図2に示す。臨床分離菌株1,2および7ではOligoArray[®]により判定された耐性薬剤と通常感受性試験による耐性薬剤が一致した。他の4株ではOligoArray[®]により耐性と判定されなかったが通常感受性試験で耐性と判定された薬剤が1~2剤認められた。薬剤ごとにみると、RFP および KM については7株とも一致したが、INH については3株、SM については2株、EB については1株が不一致であった。不一致例はいずれもOligoArray[®]では感受性、通常感受性試験で耐性と判定された。

2. *Mycobacterium avium* の解析

結核菌用に作られたプライマーを用いて *Mycobacterium avium* についても同様に増幅が可能か検討するため、増幅産物をポリアクリルアミド電気泳動にて解析した。図3にその一部を示す。*Mycobacterium avium* 株ではどのプライマーについても結核菌株H37Rvとは異なったパターンを示した。詳しく検討すると、SM、EB、KMに関連する増幅産物の一部が確認できたが、増幅産物の確認

できないもの、増幅産物はあるが電気泳動で分離できないものが多く認められた(表2)。表には3菌株についてのみ示すが他の7株も同様であった。OligoArray[®]にて解析すると、*Mycobacterium avium* 同定のシグナルは検出されるが、SM、EB、KM領域の一部にシグナルが認められたものの感受性型、耐性型いずれのシグナルも検出されない部位が多かった(図4)。

考察

結核菌の臨床分離株7株についてOligoArray[®]と通常感受性試験の結果を比較した。RFPとKMについてはすべての株で結果が一致した(耐性株はそれぞれ5株、1株)。判定の食い違う株はINHについては3株、SMについては2株、EBについては1株で、いずれもOligoArray[®]では感受性、通常感受性試験で耐性と判定された。この乖離の原因としてまずあげられるのは、OligoArray[®]で検出できない遺伝子変異による耐性である可能性である。OligoArray[®]にはINH、RFP、SM、KM、EBにつきそれぞれ16種、6種、6種、2種、2種の遺伝子変異を検出できるがそれ以外のものは検出できない。もう一つは通常感受性試験が耐性気味に判定されやすい可能性である。結核菌の薬剤感受性試験については、結核病学会の提案にしたがって近年方法が変更されており、試験濃度を1濃度とした「比率法」となっている。比率法は菌液濃度を100倍にした場合と比較して生育したコロニー数が1%以下になった場合を感受性と判定するものである。今後この方法とOligoArray[®]、他の感受性試験法(液体培地を用いた微量液体希釈法など)を比較検討してみる必要があると思われる。

Mycobacterium avium についてもOligoArray[®]が利用できないか検討した。増幅産物を電気泳動で検討したところ、結核菌とはパターンが異なり、結核菌とは遺伝子学的に相違があることが示唆された。SM、KMなど増幅産物が確認されたものについては、結核菌と *Mycobacterium avium* で同一の配列を有していると思われる。*Mycobacterium avium* についてはOligoArray[®]をそのままでは用いることができず、プライマー等を *Mycobacterium avium* 用に変更する必要がある。

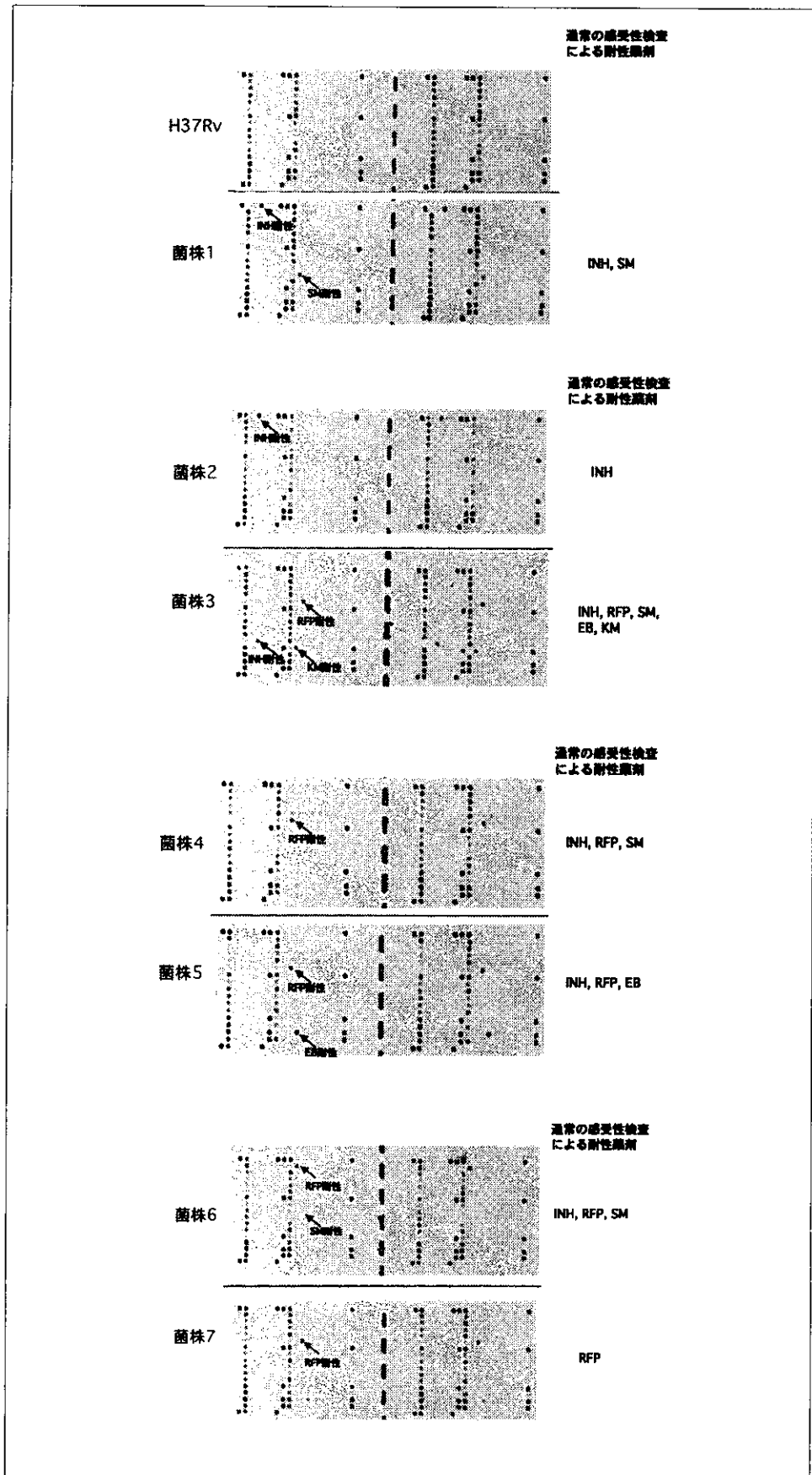


図2 結核菌の解析結果

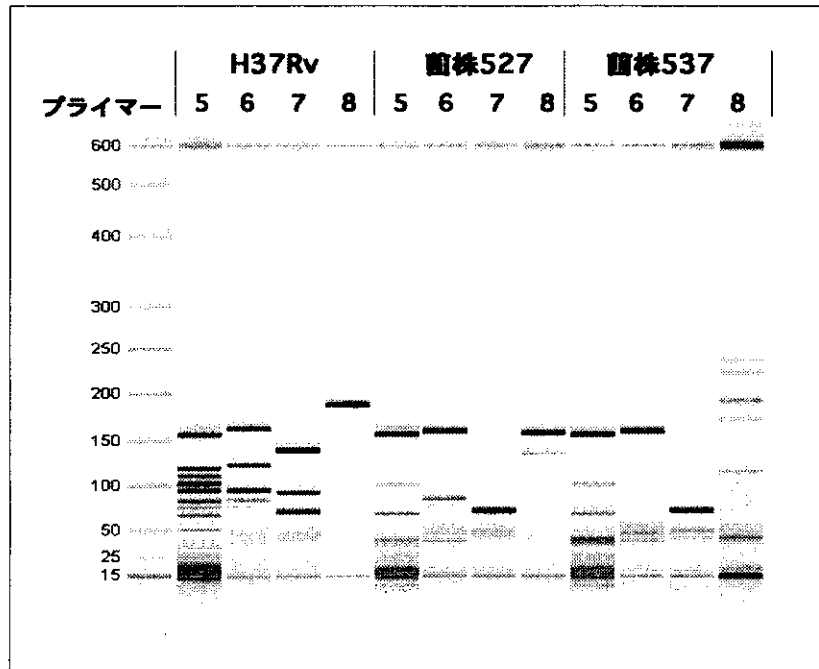


図3 *Mycobacterium avium* の増幅産物の電気泳動

表2 *Mycobacterium avium* の増幅産物の電気泳動の解析

プライマー	サイズ(bp)	薬剤	菌株No		
			521	527	537
5	153	SM	○	○	○
	119	INH	×	×	×
	106	SM	?	?	?
	102	INH	?	?	?
	99	SM	?	?	?
	92	EB	?	?	?
	80	EB	○	○	○
	76	KM	×	×	×
	71	INH	×	×	×
	63	SM	○	○	○
6	50	INH	×	×	×
	158	抗酸菌分類	○	○	○
	124	RFP	×	×	×
7	93	INH	×	×	×
	79	INH	×	×	×
	142	INH	×	×	×
8	87	INH	×	×	×
	65	KM	○	○	○
8	186	INH	×	×	×

○: 増幅産物確認できた
 ×: 増幅産物確認できず
 ?: 増幅産物はあるが電気泳動で分類できず

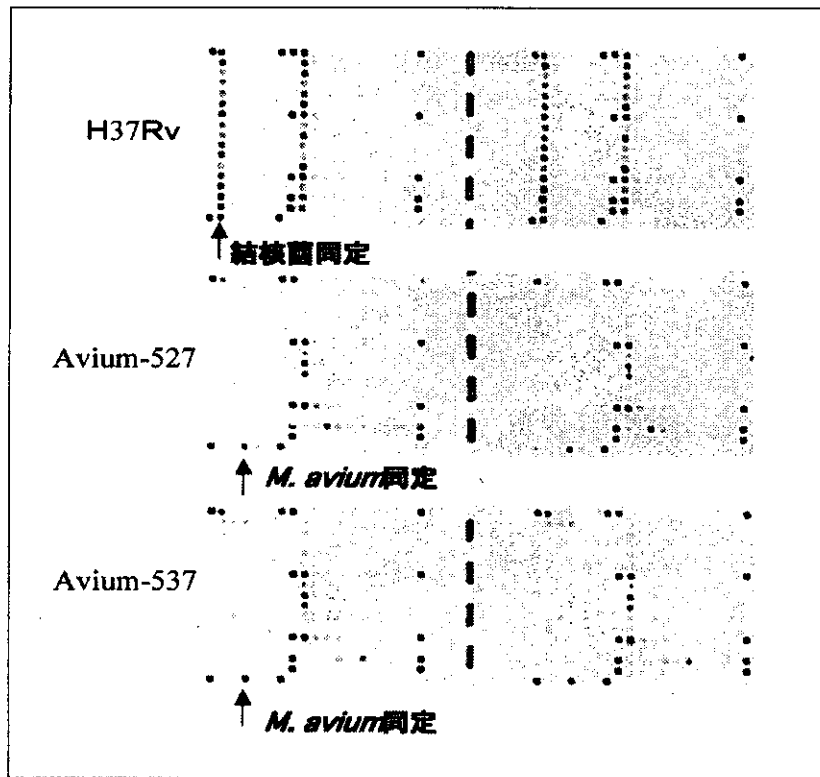


図4 *Mycobacterium avium*のオリゴアレイによる解析

結 論

OligoArray®と通常の薬剤感受性試験の結果を比較すると、一部にOligoArray®では感受性、通常の感受性試験で耐性と判定されるものが見られ、特にINHについて目立っていた。この乖離の原因については今後検討が必要と思われた。*Mycobacterium avium*についてはOligoArray®をそのままでは用いることができず、プライマー等を*Mycobacterium avium*用に変更する必要がある。

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



結核の発症病態におけるオステオポンチンの役割に関する臨床的検討

高口 善信¹⁾、川上 和義¹⁾、大湾 勤子²⁾、仲本 敦²⁾、久場 睦夫²⁾、久手堅憲史¹⁾、
今 重之^{3,4)}、新里 敬¹⁾、比嘉 太¹⁾、健山 正男¹⁾、上出 利光³⁾、斎藤 厚¹⁾

1) 琉球大学医学部第一内科

2) 国立沖縄病院

3) 北海道大学遺伝子病制御研究所 病因研究部門 分子免疫分野

4) 免疫生物研究所

研究要旨

結核はエイズに高頻度に合併する日和見感染症である。エイズに合併した結核は診断に苦慮することが多く、新しい診断のためのマーカーが必要とされている。一方、多剤耐性結核の出現により、従来の化学療法に加え、異なる作用機序による新しい治療法の開発が望まれている。

オステオポンチン(OPN)は種々の生物活性を有するリン酸化糖タンパクである。近年になって、結核性肉芽腫周囲に発現していることから、結核感染防御におけるOPNの役割について注目されている。マウスにおいては、OPN遺伝子欠損(OPN-KO)マウスは抗酸菌に対し感受性であり、インターロイキン12産生が障害され、Th1反応がおこらないことが明らかになっている。しかしながら、ヒト結核感染におけるOPNの詳細な役割は明らかにされていない。そこで、今回我々はこれまで報告されていない結核患者における血漿中OPN濃度を測定し、健常人との比較を行った。その結果、結核患者の血漿中OPN濃度は健常人のそれに比べ有意に高かった。結核患者を塗沫陽性患者と陰性患者に分けて比較すると、陽性患者の方が、血漿中OPN濃度が有意に高かった。更に、NTA分類に従って肺病変の広がりによって患者をminimal, moderately advanced(MA), far advanced(FA)の3群に分けそれぞれを比較すると、minimal群と健常人の間には有意な差はなかったものの、MA, FA群では健常人、minimal群に比べ有意にOPN濃度が高かった。また治療前と治療6ヶ月後のOPN濃度を比較すると、治療前に比べ治療6ヶ月後において有意にOPN濃度が低下していた。

以上のことから、OPNは結核の病態に何らかの関与をしていることが推察された。今後は、エイズ患者に合併した結核症例についても同様の検討を行い、エイズにおける結核の病態を明らかにし、OPNの新しい結核の診断マーカーとしての可能性と、結核に対する免疫療法のターゲットとしての可能性の両面について解析を行っていきたい。

研究目的

世界に目を向けると、結核による死亡者数は年間200万人にもものぼる。近年は特にHIV/AIDS患者の爆発的な増加により事態はより深刻となっている¹⁾。臨床上、エイズ感染者に合併した活動性結核は診断に苦慮することが多く、従来の診断に比べ迅速かつ簡便な補助診断法の開発が必要とされている。一方、多剤耐性結核の出現により、既に確立された化学療法とは異なる機序による新しい治療法が求められている²⁾。このような背景からエイズに合併した結核の病態を把握する研究が必要とされている。

オステオポンチン(OPN)は分子量約6万程度のリン酸化糖タンパクである。細胞の形質転換の際に増加するタンパクとして同定され、その後、非コラーゲン性骨基質タンパクであることが明らか

となり、「オステオ」の名を冠するようになった^{3,4)}。最近の研究によって、結核などの肉芽腫性疾患の肉芽腫周囲にOPNが発現していることが明らかとなった⁵⁻⁸⁾。また遺伝子欠損マウスを用いた検討では抗酸菌に対する感染防御にOPNが重要であることが示されている⁹⁾。しかしながら、現在のところヒト結核感染防御におけるOPNの詳細な役割については明らかにされていない。

我々は昨年来、OPNの感染防御における役割に関して解析を進めてきた。その結果、ヒト末梢血単核球を*Penicillium marneffei*で刺激した際のインターロイキン(IL)12産生に、CD14陽性細胞から産生されたOPNが必要であることを明らかにした¹⁰⁾。このことにより、マウスの研究¹¹⁾から明らかにされたOPNのIL-12産生誘導活性をヒトの場合においても成立することを初めて明らかにした(図1)。

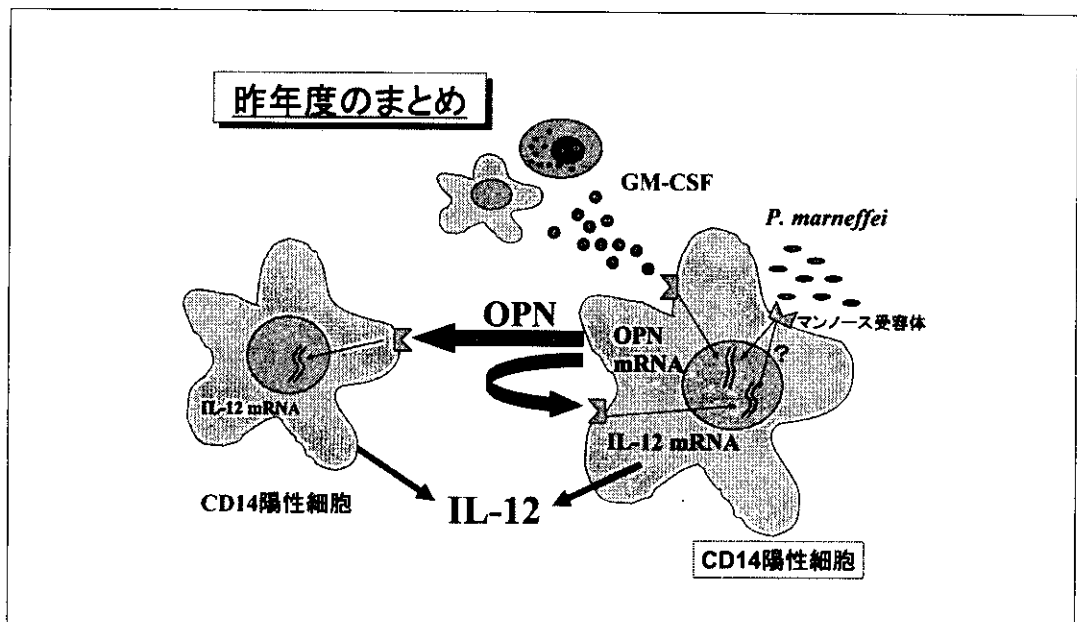


図1 *P. marneffei*刺激によるPBMCからのIL-12産生におけるOPNの役割とGM-CSFの関与

分担研究者：斎藤 厚

研究協力者：川上和義、高口善信、大湾勤子、仲本 敦、久場睦夫、久手堅憲史、今 重之、新里 敬、比嘉太、健山正男、上出利光

Increased plasma levels of osteopontin in pulmonary tuberculosis

Yoshinobu Koguchi¹⁾, Kazuyoshi Kawakami¹⁾, Isoko Owan²⁾, Atsushi Nakamoto²⁾, Mutsuo Kuba²⁾, Norifumi Kudaken¹⁾, Shigeyuki Kon^{3,4)}, Takashi Shinzato¹⁾, Futoshi Higa¹⁾, Masao Tateyama¹⁾, Toshimitsu Uede³⁾ and Atsushi Saito¹⁾

¹⁾First Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, University of the Ryukyus, ²⁾National Okinawa Hospital, ³⁾Division of Molecular Immunology, Research Section of Molecular Pathogenesis, Institute for Genetic Medicine, Hokkaido University and ⁴⁾Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd