

考 察

昨年、我々は、HHV-8が潜伏感染状態にあるBCBL-1細胞を使い、リアルタイムRT-PCRを用いて、IL-6がHHV-8の潜伏感染状態からスィノチ遺伝子(ORF50)の発現誘導を介してHHV-8を増殖複製する可能性を示唆した。HIV/HHV-8が感染した患者血清中でIL-6のほかにIL-1 β やTNF α も増加し、疾患の発症に関わっていることが報告されている。今回のリアルタイム定量的PCRを使った解析では、IL-1 β もORF50の発現誘導を引き起こし、IL-1R antagonistか、その誘導をほぼ完全に抑制するという結果が得られた。したがって、ORF50の発現によるHHV-8の増殖複製には、複数のサイトカインが関与していることが分かった。ところで、HHV-8のORF50のpromoter領域にはAp-1, NF- κ BとNF-IL-6の結合配列を存在することが知られている。IL-1 β 、TNF α いずれもNF- κ Bを活性化することから、NF-IL-6とNF- κ Bを介して、IL-6+IL-1 β あるいはIL-6+TNF α の組み合わせで相乗効果が得られると予測されたが、今回我々の結果では否定的であった、むしろIL-6単独刺激に比へ減少傾向を示した。そのメカニズムを明らかにするには、転写因子レベルでの更なる解析が必要である。今後、我々はORF50かとの様な転写制御機構により発現するのか、またどのような分子が関与するかを検討する。

結 論

IL-1 β はIL-6と同様にHHV-8の増殖において早期増殖期遺伝子ORF50を誘導することを明らかにした。TNF α はORF50の発現を誘導することが示されなかった。ORF50の発現においてIL-6+IL-1 β 、IL-6+TNF α とIL-1 β +TNF α の組み合わせで相乗効果を認めなかった。ORF50の発現調節機構を解明するには更なる転写因子レベルでの解析が必要である。

健康危険情報

特記すべきこと無し

研究発表

1 論文発表

- 1) 西本憲弘, 王鞍孝子, 宋健, 吉崎和幸, 稲城玲子, 森康子, 山西弘一 HIV感染病態におけるIL-6を介したKSHVとHIVのウイルス間クロストーク。日本臨床免疫雑誌(2000), 26(6) 586-590
- 2) 吉崎和幸, 西本憲弘, 宋健, 松本智成, 山西弘一 カポノ肉腫やcastlemans病合併AIDS患者におけるKSHV/HHV-8感染の病態解析。厚生科学研究費補助金エイズ対策研究事業、HIV感染症に関する研究。平成11年度研究報告書、113-118, 2000
- 3) 宋健, 吉崎和幸, 西本憲弘 リアルタイムPCRを用いたKSHV/HHV-8複製の検出とサイトカインによる調節。厚生科学研究費補助金エイズ対策研究事業、日和見感染症の治療に関する研究。平成12年度研究報告書、50-54, 2001
- 4) 宋健, 杉本正道, 吉崎和幸, 西本憲弘 IL-6阻害によるHHV-8増殖抑制—Real-time PCRを用いたHHV-8の早期増殖期遺伝子発現解析と抗IL-6R抗体による抑制効果—。厚生科学研究費補助金エイズ対策研究事業、日和見感染症の治療に関する研究。平成13年度研究報告書、146-150, 2002
- 5) Jian Song (宋健), Takako Ohkura, Masamichi Sugimoto, Yasuko Mori, Reiko Inagi, Koichi Yamashita, Kazuyuki Yoshizaki, Norihiro Nishimoto Human interleukin-6 induces human herpesvirus-8 replication in a body-cavity-based lymphoma cell line Journal of Medical Virology (2002, 68 404-411)

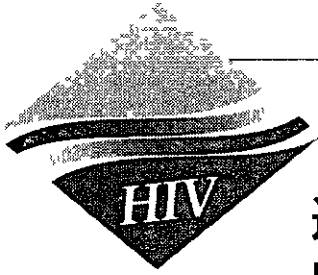
2 学会発表

- 1) 宋健, 王鞍孝子, 稲城玲子, 森康子, 山西弘一, 吉崎和幸, 西本憲弘 Mutual regulation of HIV and HHV-8 replication via human and viral interleukin-6 in AIDS 2001年9月、第2回能本エイズセミナー(能本)
- 2) 宋健, 王鞍孝子, 稲城玲子, 森康子, 山西弘一, 吉崎和幸, 西本憲弘 Inter-regulation of HIV and HHV-8 replication by interleukin-6 in AIDS 2001年11月、第10回日本エイズ学会総会(東京)
- 3) 宋健, 王鞍孝子, 稲城玲子, 森康子, 山西弘一, 吉崎和幸, 西本憲弘 huIL-6 may stimulate not only the growth of HHV-8 positive B-lymphoma cells but also the replication of HHV-8 in AIDS 43rd Annual Meeting of American Society of Hematology

- gy Orland, USA Dec 7-11, 2001
- 4) 宋 健, 杉本正道、吉崎和幸, 西本憲弘 リアルタイムPCRを用いたHIV感染者末梢血からのKSHV/HHV-8の検出 2002年6月, 第16回近畿エイズ研究会学術集会 (大阪)

知的財産権の出願・登録状況

なし



進行性多巣性白質脳症(PML)の PCR診断とPMLの病態解析

余郷 嘉明¹⁾、高坂 友和¹⁾、鄭 懷穎^{1 2)}、北村 唯一²⁾、須磨崎 亮³⁾、大久保 光⁴⁾、
三森 明夫⁴⁾、保田由喜治⁵⁾

¹⁾ 東京大学医科学研究所感染免疫大部門 ウイルス感染分野

²⁾ 東京大学医学部 泌尿器科

³⁾ 筑波大学臨床医学系 小児科

⁴⁾ 国立国際医療センター 膠原病科

⁵⁾ 東海大学医学部 小児科

研究要旨

進行性多巣性白質脳症(PML)はエイズにおける重要な日和見感染症の一つである。我々は既にPMLの簡便で確実な診断法として、患者の脳脊髄液(CSF)からPCRによりJCウイルス(JCV)DNAを増幅する系を樹立した。この系はJCVの調節領域をターゲットとするので増幅断片をシークエンシングすることにより、コンタミによる偽陽性を排除できさらにJCVがPML型かどうかの確認が出来る。本研究の目的の一つはPMLの診断サービスを全国の病院、医療施設に対して行うと同時に、診断法の改善を図ることである。もう一つの目的は、PMLの診断サービスを通して収集されるPML症例を解析し、PMLの発症機構を解明することである。本年度において以下の成績が得られた。

- 1) PMLが示唆された患者31名のCSFからJCV調節領域の検出を試み、6名のCSFからJCV調節領域を検出した。検出された調節領域はいずれもユニークなPML型調節領域であった。JCV DNAが検出された患者の基礎疾患はエイズ(n=3) 成人T細胞白血病(n=1)、慢性骨髄性白血病(n=1)、全身性エリテマトーデス(n=1)であった。
- 2) 1年前に死亡した患者(8歳の男児、基礎疾患はWiscott-Aldrich症候群)の剖検脳組織から原型調節領域が検出された。脳MRI所見と剖検脳の病理所見はPMLとは必ずしも合致せず、PMLは否定的であった。
- 3) CSFからJCV調節領域が検出された1名の患者(38歳の女性、基礎疾患は全身性エリテマトーデス)を6ヶ月間フォローアップした。脳での病巣は拡大し続けたが発症後4ヶ月でCSFからJCV DNAはほとんど検出されなくなった。
- 4) 生前にPMLと診断された14歳の男児(基礎疾患、Wiscott-Aldrich症候群)の剖検脳(大脳後頭葉、小脳、脳幹)に存在するJCV DNAが詳しく解析した。その結果、同一の原型JCVから再編成が独立に起きて3種類のPML型JCVが形成されたこと、原型からPML型への転換の過程でも脳において病巣が拡大する過程でも蛋白コート領域にはほとんど変異が起きないことが示めされた。

研究目的

PMLのPCR診断においては、一般にJCV DNAの蛋白コード領域が増幅される。それに対して、我々の系では、遺伝子発現を調節する非コード領域(調節領域と略す)が増幅される。その理由は以下の通りである。PML患者の脳病変部で検出されるJCV (PML型JCV)の調節領域は、原型調節領域(腎や尿で検出されるJCVが持つ調節領域)から塩基配列の再構成(欠失と重複)により作られる。調節領域をターゲットとする我々の系は、検出されたJCVかPML型かどうか判断できるので、PMLを診断する上で有効である。また、PML型調節領域は各患者にユニークであるから、増幅された調節領域の塩基配列を決定することにより、偽陽性の可能性を排除できる。本研究の第一の目的は、分担課題の一つとしてPMLの診断サービスを全国の病院、医療施設に対して行うと同時に、診断法の改善を図ることである。

PMLの発症や病態進行に関してMajorらは「免疫が低下すると、リンパ球あるいはリンパ組織に潜伏感染しているJCVが活性化され、中枢神経系に侵入し、PMLを発症させる」という説を提唱した。しかし、この説を支持する証拠は十分あるとはいえない。PMLは中枢神経系での脱髄疾患であり、ミエリンを形成する細胞(オリゴデンドロサイト)がJCVに感染するために脱髄が起きる。病態の進行に伴って、病巣は原発部位から他の部位へ拡大する。病巣の拡大がどのように起きるかは明らかになっていない。上述のように、PML患者の脳病変部で検出されるJCVの調節領域は原型調

節領域から塩基配列の再構成(欠失と重複)により作られる。この塩基配列の再構成とPMLの発症との関係は未だ解明されていない。PMLは免疫不全を伴う疾患を有する患者や免疫抑制剤が投与されている移植患者などに主として発生する。免疫低下とJCV調節領域の再構成がどう関わるかも明らかになっていない。本研究は、以上列挙した諸問題を解明する糸口を得るために、PML患者におけるJCV DNAの動態を解析することを第二の目的とする。

研究方法

1. 組織からのDNA抽出

CSFからはスマイテストEX-R&D(ゲノムサイエンス研究所)を用いてDNAを抽出した。脳組織からはプロテイナーースK消化、フェノール処理、クロロフォルム処理によりDNAを抽出した。

2 nested PCR

outer プライマーとしてA1とA3を、inner プライマーとしてB1とB3を用いた。A3以外のプライマーの配列とゲノム上の位置は文献(Sugimoto et al, 1998)に述べた。A3(5' CATTACTTACCTATGTAGCTTTTGGTTCAGGC 3')は以前用いたA2を改変したプライマーである。また、Taq DNA polymeraseに代わって、HotStar Taq DNA polymerase(QIAGEN社)を用いた。増幅反応の前に95度C、15分の処理によりHotStar Taq DNA polymeraseを活性化した。その後続けて、通常の増幅サイクル(Sugimoto et al, 1998)を行った。ファースト サイクルは40回、セカンド サイクルは30回行った。

分担研究者 余郷嘉明

研究協力者 高坂友和、鄭 懷穎、北村唯一、須磨崎亮、大久保光、三森明夫、保田由喜治

PCR diagnosis of progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) and analysis of the development of PML

Yoshiaki Yogo¹⁾, Tomokazu Takasaka¹⁾, Huar-Ying Zheng^{1 2)}, Tadaichi Kitamura²⁾, Ryo Sumazaki³⁾, Hikaru Okubo⁴⁾, Akio Mimori⁴⁾ and Yukiharu Yasuda⁵⁾

¹⁾Laboratory of Viral Infection, Department of Microbiology and Immunology, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, ²⁾Department of Urology, Faculty of Medicine The University of Tokyo, ³⁾Department of Pediatrics, Institute of Clinical Medicine, University of Tsukuba, ⁴⁾Department of Rheumatology, International Medical Center of Japan and ⁵⁾Department of Pediatrics, Tokai University School of Medicine

3 標準PCR

プライマーはB1とB3を、耐熱DNA合成酵素はHotStar Taq DNA polymerase (QIAGEN社)を用いた。増幅反応の前に95度C、15分の処理によりHotStar Taq DNA polymeraseを活性化した。その後、通常増幅サイクル(Sugimoto et al, 1998)を50回行った。

4 増幅断片のクローニング

増幅断片をHindIIIとPstIで消化し、調節領域を切り出した。切り出された調節領域をpBluescript II SK(+)を用いてクローニングした。

5 全長JCV DNAクローニング

既報の方法(Yogo et al 1990)で、全長JCV DNAをpUC19のBamHI切断部位に挿入し、クローニングした。得られたクローンをQIAGEN Plasmid Midi kit (QIAGEN社)を用いて精製した。

6 制限酵素解析

増幅断片を含むクローンをHindIII、PstI、SstIにより消化した。消化液を3%のNuSieveアガロースゲルで電気泳動した。得られた切断パターンからクローンをグループに分けた。各グループの代表

クローン2または3個をQIAprep 8 Turbo Miniprep kit (QIAGEN社)を用いて精製した。

7 CY型とMY型の識別

原型調節領域を含むクローンをHindIII、PstI、PvuIIで三重消化を行った。消化液を3% NuSieveアガロースゲルで電気泳動した。260 bp、160 bp、156 bp、124 bp断片が検出された場合CY型と判定し、280 bp、260 bp、160 bp断片が検出された場合、MY型と判定した。

8 塩基配列の決定

蛍光式自動シーケンサー(ABI 373S)を用いてシーケンシングした。

研究結果

1 PMLのPCR診断の実績

今回CSFを初めて検査した患者は31名で、そのうち、6名のCSFからJCV DNAが検出された。表1に、CSFよりJCV DNAが検出され6名の患者を示した。陽性患者の基礎疾患はエイズ(3名)、成人T細胞白血病(1名)、慢性骨髄性白血病(1名)、全身性エリテマトーデス(1名)であった。エイズ

表1 JCV DNAが検出された患者

患者	性別/年齢	基礎疾患	JCV DNAが検出された検体
J30	男/10	Wiscott-Aldrich 症候群	脳
J31	女/38	全身性エリテマトーデス	CSF PBL
J32	男/56	成人T細胞白血病	CSF
J33	女/65	エイズ ¹⁾	CSF
J34	男/68	エイズ ²⁾	CSF
J35	女/75	慢性骨髄性白血病	CSF
J36	男/27	エイズ ²⁾	CSF

¹⁾HAART治療中 ²⁾HAART治療前。

患者1名はHAART治療6ヶ月でPMLを発症した。また1名の剖検脳組織から原型調節領域が検出された。

図1に、CSFより検出されJCV調節領域の構造を示した。5例(J31~J35)で検出された調節領域は、原型調節領域と比べて欠失と重複を有していた。1例(J36)で検出された調節領域は原型調節領域と比べて短い欠失と一個の点変異を有していた。患者J32では関連した2種の調節領域(J32a、J32b)が検出された。今回検出された調節領域と同一構造の調節領域は過去に検出されていなかった。

2. 症例J30からの原型JCV DNAの検出

今回初めて原型調節領域が検出されたJ30について少し説明する。この患者は10年前に亡くなった男児で、基礎疾患はWiskott-Aldrich症候群であった。脳MRIでは、当初、灰白質に多発性のT1、T2高信号域が見られ、これが経過と共に白質に広がっていったため、PMLとは合わないと考えられた。剖検脳の病理学的な検討結果からもPMLの可能性は低いと見なされた。

今回この患者の剖検脳組織から標準PCRによってJCV DNAの調節領域が増幅された。増幅された調節領域をクローニングし、得られた3クローンをシーケンシングした。3クローンはいずれも原型であった。

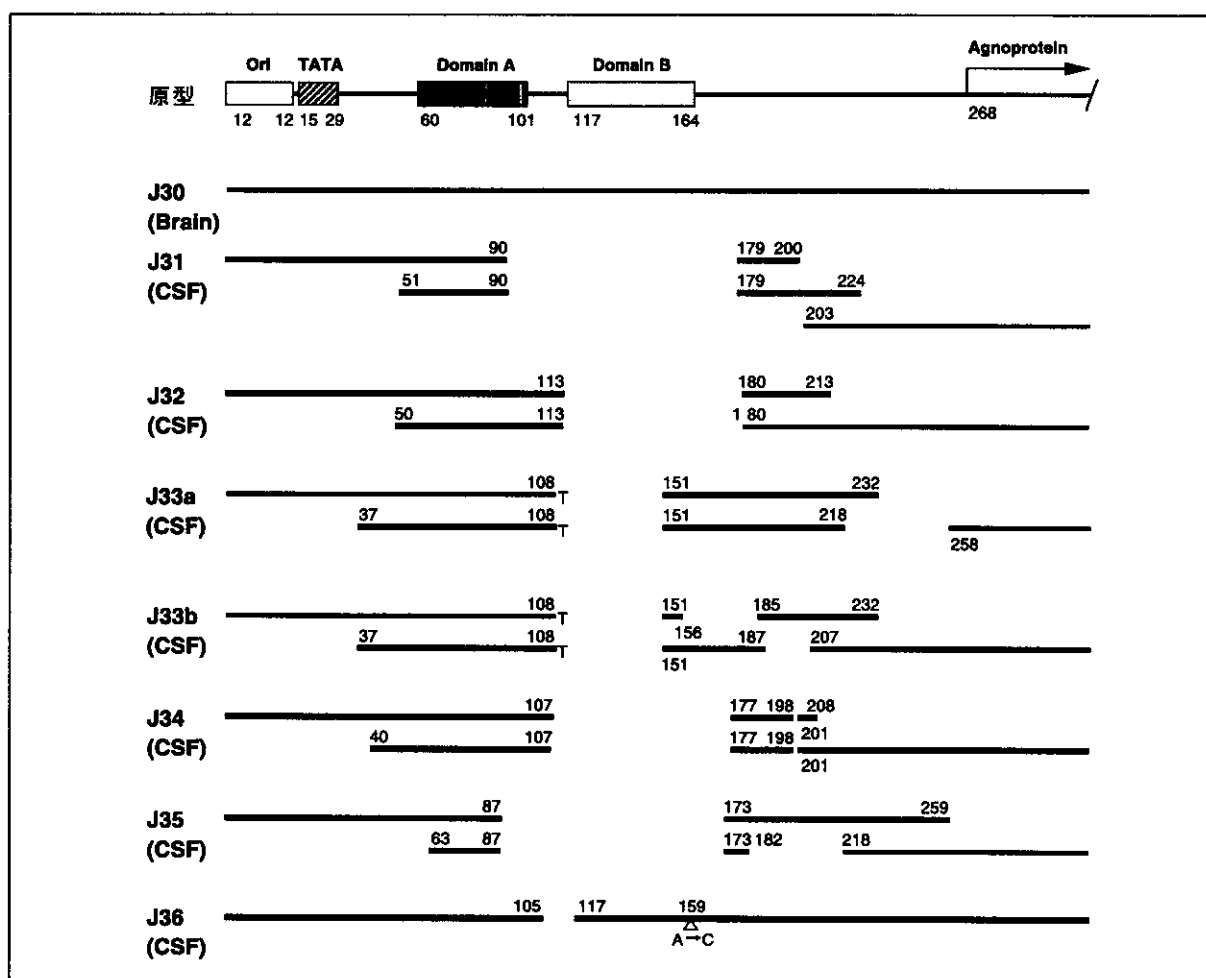


図1 患者CSFと剖検脳組織から検出されたJCV調節領域の構造

最上部に原型調節領域を示す。OriはDNA複製の開始点 TATAはTATA配列を表す。また agnoproteinの翻訳開始部位を示す。domain Aは多くのPML型調節領域で重複し domain Bは欠失している。数字はヌクレオチド番号を示す。原型調節領域の下に、平成14年度にCSFから検出された調節領域の構造を示す。図の表し方は以下の通りである。原型調節領域と同じ配列なら、左から右へ線を引き 欠失に出会ったら空白にし 重複に遭遇したら 一段下の、重複配列が開始する位置へ戻り、再び右へ線を引く。

日本に分布する原型JCVは進化学的には2系統(CYとMY)に分かれる。CYとMYはゲノム全域に分布する塩基置換によって区別されるか、調節領域内では3つの塩基置換によって区別される。これらのうち1箇所における塩基置換は制限酵素(*PvuII*)切断多型を示す。この*PvuII*切断多型を用いて、J30の脳組織から得た多数のクローンを解析した結果、25クローン(81%)がMYに属し、6クローン(19%)がCYに属した。

3 JCV DNAの検出のフォローアップ

平成11年にCSFからJCV DNAが検出された患者(J17)と今年度にCSFからJCV DNAが検出された患者(J31)をフォローアップした。

患者J17 全身性エリテマトーデス発症の30歳の女性。平成11年11月にCSFから初めてJCV DNAが検出された。その後、2ヶ月間は続けて陽性であった。その後、神経症状の悪化は止まり、平成11年末と平成13年5月に採取されたCSFからはJCV DNAは検出されなかった。さらに平成14年5月と7月に採取されたCSFからもJCV DNAは検出されなかった。

患者J31 患者は全身性エリテマトーデス発症の38歳の女性。平成14年6月に採取されたCSFから初めてJCV DNAが検出された。これより1週間前に神経症状が出現し、MRIにて右大脳白質広範囲な白質病変が観察された。その後MRIの観察とCSFからのJCV DNAの検出が定期的に試みられた。7月には脱髄病変が右脳で拡大し、8月には左脳へと拡大し、11月には小脳、脳幹にも病変が出現した。一方、CSFからのJCV DNA検出は10月まで高率に検出され続けた。この間検出されたJCV DNA(調節領域)の構造は同一であった。しかし、11月14日に採取されたCSFからは検出されず、2週間後のCSFからは低い率(1/6)でのみ検出された。シトフォビル投与が合計4クール行われたか、投与期間中も白質病変は拡大し続け、またCSFからJCV DNAが高率に検出され続けた。

5 剖検脳組織中のJCV DNAの解析

患者(J12)は14歳の男性。生後2ヶ月でWiskott-Aldrich症候群と診断された。平成10年4月、同種骨髄移植を行った。平成10年11月、左半身の麻痺、意識障害など神経症状が出現した。PCRによりCSFからJCV DNAが検出され、PMLと診断された。平成10年12月、死亡。剖検が行われ、脳組織(小脳、大脳後頭葉、脳幹)が採取された。小脳、後頭葉、脳幹各部位から抽出したDNAから全長JCV DNAをクローニングした。組織あたり6~7個のJCV全長クローンが得られた。これらのJCV DNAクローンの全長配列を決定した。クローン間の調節領域とコート領域の解析を行った。

脳から5つの調節領域I~Vが検出された(図2)。IIは欠失のみを有した。II~Vは欠失と重複を有していた。IIとIIIは2つの同じ欠失(nt 37-60とnt 201-247の欠失)を有していた。IVとVも同じ欠失(nt 63-85の欠失)を持っていた。

各脳組織のける各調節領域の検出数を表3に示した。調節領域Iは小脳、後頭葉、脳幹で検出され、調節領域IIは小脳と後頭葉で検出された。一方、調節領域III、IV、Vはそれぞれ後頭葉、脳幹、小脳でのみ検出された。

脳幹から検出された3クローン(いずれも調節領域IVを持つ)を除いて、すべてのクローンのコート領域の塩基配列は一致した(Seq 1)(表4)。脳幹からの3クローン(調節領域Iを持つ)は他のクローンと比べて、コート領域(VP2)に一塩基置換があった(Seq 2)。

調節領域Iを持つJCVのコート領域は3組織(小脳、大脳後頭葉、脳幹)から検出されたか、それらはいずれも一致した(表3)。また、調節領域IIを持つJCVのコート領域は2組織(小脳、大脳後頭葉)から検出されたか、それらはいずれも一致した(表4)。

考察

1 PMLのPCR診断

今年度において、(6症例のCSFから)JCV調節領域が検出され、それらはいずれも、原型から再編成により作られたPML型調節領域であった(図1)。検出された調節領域と同じPML型調節領域は過去に検出されていない(即ち、コンタミネーションの可能性は除去された)。以上により、CSFからJCV DNAが検出された6症例はいずれもPMLと確定診断された。

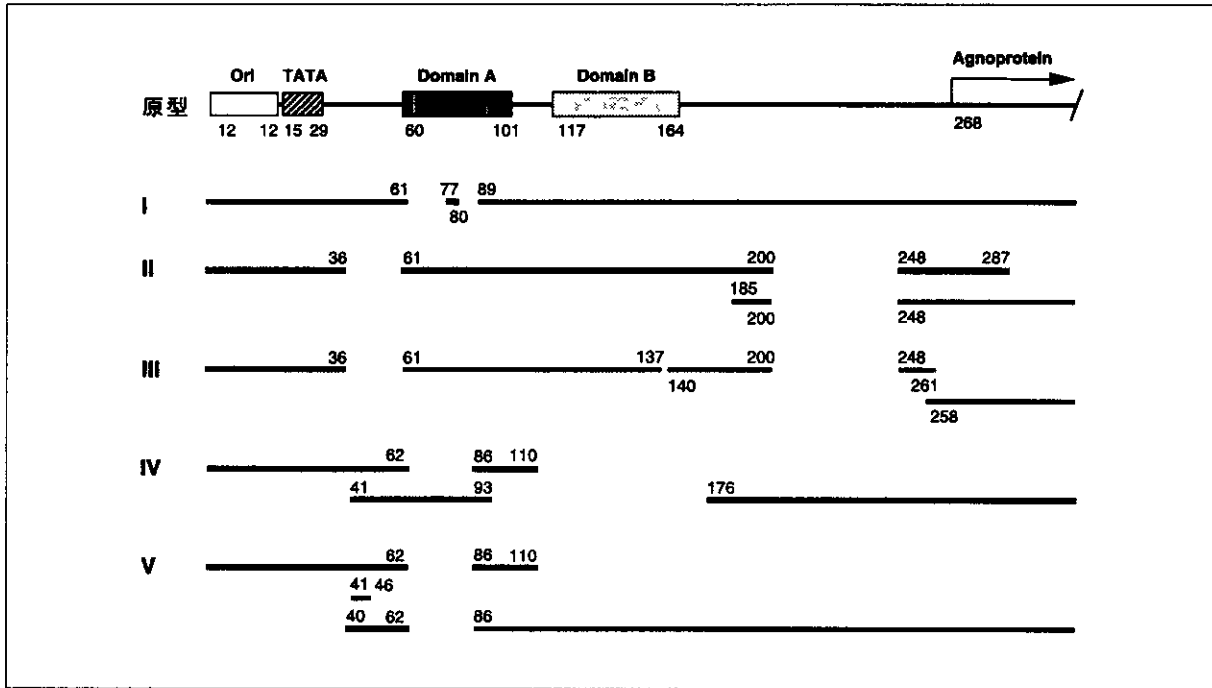


図2 症例J12の剖検脳組織から検出されたJCV調節領域の構造

最上部に原型調節領域を示す。原型調節領域の下に 症例J12の剖検脳組織から検出された調節領域(I~V)を示す。図の表し方は図1と同じ。

表2 CSFからのJCVD NA検出—患者J31のフォローアップ

CSF 採取日	MRIによる病巣の分布	JCV DNA の検出率*	備考
6 21	右大脳白質広範囲と左頭頂葉の一部	6/6	
7 16	同領域でさらに拡大	6/6	シドフォヒル、 2クール終了
8 12	両側大脳白質広範囲に拡大	6/6	シドフォヒル、 4クール終了
10 7	両側大脳白質広範囲に拡大 右側大脳脚 ～橋上部に拡大 びまん性脳萎縮が出現	6/6	
11 14	大脳半球白質全域 脳幹 小脳に拡大、 びまん性脳萎縮の進行	0/6	
11 28		1/6	

*陽性回数/検査回数。

表3 患者J12の各脳組織から検出されたJCV調節領域

脳の領域	得られた全 クローン数	調節領域				
		I	II	II	IV	V
小脳	6	4	1	0	0	1
大脳後頭葉	7	2	3	2	0	0
脳幹	7	4	0	0	3	0

表4 患者J12の各脳組織から検出されたJCV DNAのコート領域の塩基配列

脳組織	各調節領域を持つJCV DNAのコード領域の塩基配列 ¹⁾				
	I	II	III	IV	V
小脳	Seq 1 (4)	Seq 1 (1)	- ²⁾		Seq 1 (1)
大脳後頭葉	Seq 1 (2)	Seq 1 (3)	Seq 1 (2)		
脳幹	Seq 1 (4)	-	-	Seq 2 (3)	

¹⁾Seq 1 と Seq 2 は 1 塩基のみ異なった。括弧内の数字はクローン数を示す。

²⁾検出されず。

エイズに合併したPMLに対してHAART療法を行うとエイズのみならずPMLの病態も改善または安定化し、患者は長期生存し、CSF中のJCV DNAは検出されなくなると報いられている。しかし、本研究で、HAART治療中のエイズ患者1名のCSFからJCV DNAが検出された。今後、HAART治療中の患者におけるPML発症に対して警戒する必要がある。

2 剖検脳組織からの原型調節領域の検出

1年前に死亡した患者J30(8歳の男児、基礎疾患はWiscott-Aldrich症候群)の剖検脳組織から原型調節領域が検出された。脳MRI所見と剖検脳の病理所見はPMLとは合致しなかった。我々は今まで、脳またはCSFからPML型調節領域が検出されることをPML診断の基準としてきたか、PMLと一致しない患者の脳からの原型調節領域の検出はこの基準と矛盾しないと思われた。

しかし、非PML患者の脳組織からなぜJCV DNAが検出されたのか。JCV感染以外の原因で起きた主たる脳病変に加えて、原型JCVによって起きた目立たない病変が進行していたかもしれない。実際、患者J30脳組織中のJCV DNAの量は多くはなかった(データ示さず)。しかし、今後、原型JCVのPML発症への関与の可能性を検討する必要があると考えられた。

また、患者J30の脳組織から2種類の原型JCV(MY型とCY型)が検出されたが、このことは、この患者ではJCVの重複感染が起きたことを示唆している。一般にJCVの重複感染はまれであるか、この患者は幼少から免疫が低下していたため、JCVの重複感染を許したと考えることかてきる。

3 CSFからのJCV DNAの消失

エイズ患者においてHAART療法に伴いCSF中のJCV DNAが消失することか知られている。症

例 J17 の例が示すように、エイズ以外の基礎疾患を有する PML 患者においても、CSF 中の JCV DNA の消失と患者の長期生存と関連があることがわかった（本研究および厚生省科学研究費補助金エイズ対策研究事業、HIV 感染症に関する臨床研究、平成 11 年度報告書）。

本研究において、病態進行と CSF 中の JCV DNA の消長に関してさらなる知見が得られた。すなわち、症例 J31 では、MRI による病巣の観察と CSF 中の JCV DNA の検索が約 6 ヶ月行われ、現在も継続されている。脳での病巣は拡大し続けたが、発症後 4 ヶ月で CSF から JCV DNA はほとんど検出されなくなった。このように、今回、中枢神経系での病態進行と CSF 中での JCV DNA の消長との不一致が観察された。

中枢神経系での病巣が拡大の停止に先立って、CSF からの JCV DNA の消失は何を意味しているのか。平成 13 年度において、中枢神経系での病巣の拡大と末梢血リンパ球中での JCV DNA の消長との不一致を観察した。このことに関して、以下のような考察をした。

「この知見は、末梢血で JCV 感染に対して抑制的に働く因子が末梢血内に誘導される可能性を示唆している。末梢血中の JCV 抑制因子の実体は何であるか。最近 Koralink らは PML 患者において cytotoxic T lymphocytes (CTL) が存在するのを見いだした。Koralink らによると、長期生存の PML 患者で高率 (5/7) に peripheral blood mononuclear cells (PBMC) から JCV 特異的 CTL が検出され、短期生存の PML 患者 6 名の PBMC から JCV 特異的 CTL が検出されなかった。我々が仮定した JCV 抑制因子は JCV 特異的な CTL である可能性が考えられる。」

この考察は、中枢神経系での病巣の拡大停止に先行する CSF からの JCV DNA の消失に対しても当てはまる。

4. PML 型 JCV DNA コード領域の安定性

今までに、調節領域が原型から PML 型へ変化する過程で、JCV ゲノムの蛋白コード領域に変異が起きるかどうかを調べられたことはほとんどない。そこで本研究では、JCV が原型から PML 型への変化する過程や PML 型 JCV が中枢神経系で感

染を拡大する過程における突然変異の出現率を調査した。この調査で、異なる PML 型調節領域が検出された症例が用いられた。調査の結果、調節領域に違いがあっても、一部の例外を除いて、コード領域は全く同じであった。原型から PML 型へ変化する過程で、コード領域に共通の変異は起きないことはわかっているため、上記の本研究結果から、原型から PML 型へ JCV が変化する過程で、コード領域には変異はほとんど起きないと結論される。この症例では、小脳だけでなく、大脳後頭葉と脳幹も採取されたため、脳の領域間の比較も可能であった。脳の領域が違っても、コード領域の配列に変化は起きないという結果も得られた。

結 論

- 1 「日見感染症の治療に関する研究班」の分担課題の一つとして PML の診断サービスを全国の病院に対して行い、平成 14 年には 6 患者の CSF からユニークな PML 型 JCV 調節領域を検出し、PML の診断に貢献した。
- 2 脳 MRI 所見と剖検脳の病理所見は PML とは合致しなかった患者 (10 年前に死亡した 8 歳の男児、基礎疾患は Wiscott-Aldrich 症候群) の剖検脳組織から原型調節領域が検出された。我々は今まで、脳または CSF から PML 型調節領域が検出されることを PML 診断の基準としてきたか、PML と一致しない患者の脳からの原型調節領域の検出はこの基準と矛盾しないと思われた。しかし、今後、原型 JCV の PML 発症への関与の可能性を検討する必要があると考えられた。
- 3 症例 J31 では、MRI による病巣の観察と CSF 中の JCV DNA の検索が約 6 ヶ月行われ、現在も継続されている。脳での病巣は拡大し続けたが、発症後 4 ヶ月で CSF から JCV DNA はほとんど検出されなくなった。このように、中枢神経系での病態進行と CSF 中での JCV DNA の消長との不一致が観察された。この知見は、平成 13 年度の報告書で仮定した「JCV 感染に対して抑制的に働く因子の誘導」によって説明できる。

- 4) 剖検脳組織を用いて、JCVが原型からPML型への変化する過程やPML型JCVが中枢神経系で感染を拡大する過程における突然変異の出現率を調査した。得られた結果から、原型からPML型へJCVが変化する過程でも、JCV感染が周辺の領域へ拡大する過程でも、コート領域には変異はほとんど起きないこという結果が得られた。

研究発表

1 論文発表

- 1) Sugimoto C, Hasegawa, M, Kato, A, Zheng, H-Y, Ebihara, H, Taguchi, F, Kitamura, T, and Yogo, Y Evolution of human polyomavirus JC implications for the population history of humans *J Mol Evol* 54 285-297, 2002
- 2) Suzuki, M, Zheng, H-Y, Takasaka, T, Sugimoto, C, Kitamura, T, Beutler, E, and Yogo, Y Asian genotypes of JC virus in Japanese-Americans suggest familial transmission *J Virol* 76 10074-10078, 2002
- 3) 余郷嘉明 特集1 [Overviewセミナー] 23 パポーウイルス—ウイルスの分子進化と感染個体内変異— *ウイルス* 52 147-150 2002
- 4) 余郷嘉明 新世紀の感染症学 第2部ケノム時代の感染症学 JCウイルス 編者 岩本夏吉 (日本臨牀社)印刷中

2 学会発表

- 1) 鄭 懐穎、北村 唯一、高坂 友和、余郷嘉明 JCウイルスの宿主個体内変異と伝播様式 第50回日本ウイルス学会学術集会 札幌 2002

参考文献

- 1) Agostini, H T, Ryschkewitsch, C F, Singer, E J et al JC virus regulatory region rearrangements and genotypes in progressive multifocal leukoencephalopathy two independent aspects of virus variation *J Gen Virol* 78 659-664, 1997
- 2) Iida, T, Kitamura, T, Guo, J, et al Origin of JC virus variants associated with progressive multifocal leukoencephalopathy *Proc Natl Acad Sci USA* 90 5062-5065, 1993
- 3) Kato A, Sugimoto, C, Zheng, H-Y et al Lack of disease-specific amino acid changes in the viral proteins of JC virus isolates from the brain with progressive multifocal leukoencephalopathy *Arch Vi-*

- rol 145 2173-2182, 2000
- 4) Koralmik, I J, Du Pasquier, R A, Kuroda, M J, et al Association of prolonged survival in HLA-A2+ progressive multifocal leukoencephalopathy patients with a CTL response specific for a commonly recognized JC virus epitope *J Immunol* 168 499-504, 2002
- 5) Koralmik, I J, Du Pasquier R A, Letvin, N L JC virus-specific cytotoxic T lymphocytes in individuals with progressive multifocal leukoencephalopathy *J Virol* 75 3483-3487, 2001
- 6) Major, E O, Amemiya, K, Tornatore, C S, et al Pathogenesis and molecular biology of progressive multifocal leukoencephalopathy, the JC virus-induced demyelinating disease of the human brain *Clin Microbiol Rev* 5 49-73, 1992
- 7) Miralles, P, Berenguer, J, Garcia de Viedma, et al Treatment of AIDS-associated progressive multifocal leukoencephalopathy with highly active antiretroviral therapy *AIDS* 12 2467-2472, 1998
- 8) Sugimoto, C, Itoh, D, Tanaka, K et al Amplification of JC virus regulatory DNA sequences from cerebrospinal fluid diagnostic value for progressive multifocal leukoencephalopathy *Arch Virol* 143 249-262, 1998
- 9) Yogo, Y, Kitamura, T, Sugimoto, C, et al Isolation of a possible archetypal JC virus DNA sequence from nonimmunocompromised individuals *J Virol* 64 3139-3143 1990
- 10) Yogo, Y and Sugimoto, C The archetype concept and regulatory region rearrangement In *Human polyomaviruses molecular and clinical perspectives* edited by Khalili, K and Stoner, G L (John Wiley & Sons, New York) pp127-148, 2001



HIV共感染慢性C型肝炎患者の治療

小池 和彦¹⁾、新谷 良澄¹⁾、木村 哲¹⁾、菊池 嘉²⁾、岡 慎^{—2)}

¹⁾ 東京大学医学部感染症内科

²⁾ 国立国際医療センターエイズ治療研究開発センター

研究要旨

HIV 共感染慢性C型肝炎患者の治療法の確立を目指して検討を行った。

- 1) HIV共感染慢性C型肝炎の治療のため、リバビリン併用ヘグ インターフェロン(Peg-IFN)による治療を行なっている。
- 2) HIV共感染C型肝炎硬変における肝不全の治療としての生体肝移植を確立するために検討を続けている。これまでに3例の肝移植が施行された。

分担研究者 小池和彦

研究協力者 幕内雅敏、菅原寧彦

Guidelines of therapy for chronic hepatitis C patients co-infected with human immunodeficiency virus

Kazuhiko Koike¹⁾, Yoshizumi Shintani¹⁾, Satoshi Kimura¹⁾, Yoshi Kikuchi²⁾ and Shimichi Oka²⁾

¹⁾ Department of Infectious Diseases Internal Medicine, Graduate School of Medicine, University of Tokyo and ²⁾ AIDS Clinical Center, International Medical Center

研究目的

HAARTの登場以来、HIV感染者の予後は著明に改善し、長期生存が可能になった。しかるに、重複感染していることの多いC型肝炎によって、慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌の経過を辿る例が、我が国においても次第に増加してきている。C型肝炎かHIV感染者の死亡原因となる例が多数となり、その治療法を開発することが急務となっている。HIV共感染慢性C型肝炎患者の治療法として、抗ウイルス療法と肝移植の二つの方法を検討した。

研究方法

- 1) 抗ウイルス療法 現在、インターフェロン(IFN) + リバビリジン療法が保険認可され行なわれている。これを更に有効とし、かつ投与中の患者のQOLをあげるため、十分なインフォームト コンセントを得た後、PegIFN + リバビリジン療法を行う。
- 2) 肝不全状態に陥ったHIV共感染慢性C型肝炎 肝硬変患者治療の選択肢として、生体肝移植の可能性を検討している。

研究結果

1 HIV共感染慢性C型肝炎の抗ウイルス治療

Peg-IFNについては週1回筋注を計1年間にわたり投与する。投与終了後6ヶ月の時点で、GOT、GPT値、HCV-RNA値を測定し、生化学的及びウイルス学的効果を判定する。十分なインフォームト コンセントを得た後、各10例ずつに投与し、これまでのIFN + リバビリジンによる治療者と効果を比較検討する。

a Peg-IFN α -2a (Pegasys[®]) + リバビリジン

これまでに7例で投与を行なっている。CD4数 > 200 μ l の症例で、HCV-RNA量は140-850KIU/mlであった。1例は乳酸アノトーシスで、1例で精神症状で、また1例は24週目でHCV-RNAが陰性化しないことで投与中止となった。現在また効果判定に至っていないが、先の1例を除いてはHCV-RNA量の著明な減少を認めている。副作用の中で

は、顆粒球の減少が目立っている。IFNの減量の必要な例もある。

b Peg-IFN α -2b (PegIntron[®]) + リバビリジン

これまでに5例で投与を開始している。やはり、CD4数 > 200 μ l の症例を対象としている。副作用の中では、やはり、顆粒球の減少が目立っている。

2 生体肝移植

HIV共感染慢性C型肝炎 肝硬変患者治療法としての生体肝移植の確立を目指して、東大感染症内科、エイズ治療研究開発センター(ACC)、東大人工臓器移植外科が中心となり、後天性免疫不全 肝移植研究会を行い検討を続けている。

十分なインフォームト コンセントを得た後、これまでに3例のHIV共感染慢性C型肝炎 肝硬変(肝不全)患者に対して生体肝移植を施行した。年齢30 - 40歳前半で、いずれも血友病合併症例である。

第1例目では、移植後のIFN α + リバビリジン投与にてHCVの排除に成功し、C型肝炎の治療に成功している。HIV感染症のコントロールも現在のところ良好である。血友病は臨床的に治癒した。

第2例目、第3例目は最近施行された。血友病の術中 術後管理には問題なかった。C型肝炎の再発、合併症等の問題もあり、現在継続治療中である。今後の症例への生体肝移植に際しては、これまでの経験を生かして、適応基準の見直し、より完全な術前 術中 術後管理を目指す必要がある。

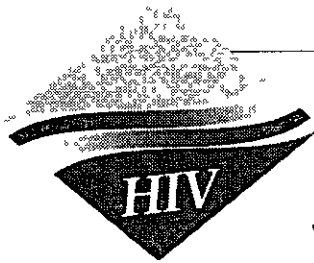
結 論

- 1) HIV共感染慢性C型肝炎のPeg-IFN + リバビリジンによる抗ウイルス治療が開始され、良好な経過をみている。副作用への慎重な対応は必要であるか、HIV共感染慢性C型肝炎患者への治療の新たな選択肢のひとつとして期待される。
- 2) HIV共感染C型肝炎肝硬変患者への生体肝移植が施行された。今後のHIV共感染C型肝炎肝硬変患者に対する治療の新しい選択肢を広げたものと考えられる。

研究発表

H 12-14年度

- 1) Shuntani Y, Yotsuyanagi H, Moriya K, Fujie H, Tsutsumi T, Takayama T, Makuuchi M, Kimura S, Koike K Significance of hepatitis B virus DNA detected in hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C *Cancer* 88 2478-2486, 2000
- 2) Yotsuyanagi H, Shuntani Y, Moriya K, Fujie H, Tsutsumi T, Kato T, Nishioka K, Takayama T, Makuuchi M, Ino S, Kimura S, Koike K Virological analysis of non-B, non-C hepatocellular carcinoma in Japan frequent involvement of hepatitis B virus *J Infect Dis* 181 1920-1928, 2000
- 3) Maruyama T, Mitsui H, Maekawa H, Yamada H, Hirayama M, Ino S, Yasuda K, Koike K, Kimura S, Mich DR Emergence of the precore mutant late in chronic hepatitis B infection correlates with the severity of liver injury and mutations in the core region *Am J Gastroenterol* 95 2894-2904, 2000
- 4) Moriya K, Todoroki T, Tsutsumi T, Fujie H, Shintani Y, Miyoshi H, Ishibashi K, Takayama T, Makuuchi M, Watanabe K, Miyamura T, Kimura S, Koike K Increase in the concentration of carbon 18 monounsaturated fatty acids in the liver with hepatitis C analysis in transgenic mice and humans *Biophys Biochem Res Commun* 281 1207-1212, 2001
- 5) Fujie H, Moriya K, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Ino S, Kimura S, Koike K Hepatitis B virus Genotypes and hepatocellular carcinoma in Japan *Gastroenterology* 120 1564-1565, 2001
- 6) Koike K Hepatitis viruses update *Internal Medicine* 40 173-175, 2001
- 7) Koike K The role of hepatitis viruses in multistep hepatocarcinogenesis *Digestive and Liver Diseases* 33 2-6, 2001
- 8) Fujie H, Moriya K, Shintani Y, Tsutsumi T, Takayama T, Makuuchi M, Kimura S, Koike K Frequent β -catenin aberration in human hepatocellular carcinoma *Hepatol Res* 20 39-51, 2001
- 9) Moriya K, Nakagawa K, Santa T, Shuntani Y, Fujie H, Miyoshi H, Tsutsumi T, Miyazawa T, Ishibashi K, Horie T, Imai K, Miyamura T, Kimura S, Koike K Oxidative stress in the absence of inflammation in a mouse model for hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinogenesis *Cancer Res* 61 4365-4370, 2001
- 10) Yotsuyanagi H, Yasuda K, Shintani Y, Moriya K, Fujie H, Tsutsumi T, Nojiri N, Juji T, Hoshino H, Shimoda K, Hino K, Ino S, Koike K Frequent presence of hepatitis B virus in the sera from HBs antigen-negative, anti-HBc-positive blood donors *Transfusion* 9 1093-1099, 2001
- 11) Hirayama M, Maruyama T, Mitsui H, Maekawa H, Yamada H, Hashimoto N, Koike K, Kimura S, Yasuda K, Ino S, Green J IgG1 anti-P2 as a marker of response to interferon in patients with chronic hepatitis C *Clin Exp Immunology* 126 92-100, 2001
- 12) Koike K, Tsutsumi T, Fujie H, Shuntani Y, Moriya K Role of hepatitis viruses in hepatocarcinogenesis *Oncology* 62 29-37, 2002
- 13) Perlemuter G, Sabile A, Letteron P, Topilco, Samson-Bouna M-E, Chretien Y, Pessayre D, Koike K, Chapman J, Barba G, Brechot C Hepatitis C virus core protein inhibits microsomal triglyceride transfer protein activity and very low density lipoprotein secretion a model of viral-related steatosis *FASEB J* 16 185-194, 2002
- 14) Tsutsumi T, Suzuki T, Shimoike T, Moriya K, Yotsuyanagi H, Matsuura Y, Koike K, Miyamura T Interaction of Hepatitis C Virus Core Protein with Retinoid X Receptor- α Modulates its Transcriptional Activity *Hepatology* 35 937-946, 2002
- 15) Koike K Hepatitis C virus and hepatocarcinogenesis *J Gastroenterol* 37 55-64, 2002
- 16) Koike K, Moriya K, Kimura S Role of hepatitis C virus in the development of hepatocellular carcinoma Transgenic approach to viral hepatocarcinogenesis *J Gastroenterol Hepatol* 17 394-400, 2002
- 17) Koike K Remission of breakthrough hepatitis in chronic hepatitis B patients on lamivudine *J Gastroenterol* 37 988-990, 2002
- 18) Tsutsumi T, Suzuki T, Moriya K, Yotsuyanagi H, Shintani Y, Fujie H, Matsuura Y, Kimura S, Koike K, Miyamura T Intrahepatic cytokine expression and AP-1 activation in mice transgenic for hepatitis C virus core protein *Virology* 304 415-424, 2002
- 19) Yotsuyanagi H, Yasuda K, Ino S, Moriya K, Shintani Y, Fujie H, Tsutsumi T, Kimura S, Koike K, Nojiri N, Juji T, Hoshino H, Hino K HBV DNA in serum of HBsAg-negative, anti-HBc-positive blood donors *Transfusion* 42 1616-1617, 2002
- 20) Moriya K, Shintani Y, Fujie H, Miyoshi H, Tsutsumi T, Yotsuyanagi H, Yasuda K, Ino S, Kimura S, Koike K Serum Lipid Profile of Patients with Genotype 1b Hepatitis C *Viral Infection in Japan Hepatol Res* 2003 in press



血友病HIV感染者に合併したC型肝炎の Pegylated Interferon α 2aと ribavirinの治療成績

菊池 嘉¹⁾、矢崎 博久¹⁾、本田美和子¹⁾、内水 博之¹⁾、源河いくみ¹⁾、立川夏夫¹⁾、
岡 慎一¹⁾、安岡 彰²⁾、小池 和彦³⁾、木村 哲^{1 3)}

¹⁾ 国立国際医療センター エイズ治療 研究開発センター

²⁾ 富山医科薬科大学 感染予防医学 感染症治療部

³⁾ 東京大学医学部付属病院感染症内科

研究要旨

平成8年以降プロテアーゼ阻害剤、非核酸型逆転写酵素阻害剤の相次ぐ導入によりHIV感染症の治療は多剤併用療法(HAART)が主流となった。このため日和見感染症の発症率が低下し、また日和見感染症自体の治療法も確立されたため、総じてHIV感染者の予後が大きく改善された。その一方でHAARTが実施できない場合の予後は基本的にはHAART導入以前のものと同じく変わっておらず、病期の進行は免れない。またHIVに慢性C型肝炎を合併した血友病患者の場合、むしろHCVにより生命を脅かされる危険性が高まりつつあるといえる。欧米においては、インターフェロン(IFN)単剤治療からRibavirin(RBV)との併用療法が主流となり、併用投与群における効果が報告されている。一昨年(平成12年度)より当研究班で、IFNとRBVの併用療法を導入し、その効果と安全性に関する検討を開始した。昨年(平成13年度)には合計12名にIFNとRBVの併用療法を行い、その内の5名で有効な結果を得ている当時の現状について報告した。

さらに、最終年度である平成14年度はPEG-IFNとリハビリンの併用を導入し6名に投与中である。まもなく、最初に導入した症例が48週の予定投与期間を全うするか、4症例でHCV-RNAが検出限界未満を維持しており効果が期待される。顆粒球減少、血小板減少、貧血などの血液系の副作用は強いが、経過を厳密に追うことによって安全に継続することかできている。最終的な効果判定は、PEG-IFNとRBVの投与終了後6ヶ月目以降でも、HCV-RNAが検出限界未満を維持し続けることであるか、この結果は追って報告する予定である。

分担研究者 安岡 彰、小池和彦、木村 哲
研究協力者 菊池 嘉

Combination therapy with Pegylated Interferon alfa 2a plus Ribavirin for chronic hepatitis C in hemophilic HIV infected patients

Yoshimi Kikuchi¹⁾ Hirohisa Yazaki¹⁾ Miwako Honda¹⁾ Hiroyuki Gatanaga¹⁾ Ikumi Genka¹⁾ Natsuo Tachikawa¹⁾ Shinichi Oka¹⁾ Akira Yasuoka²⁾ Kazuhiko Korke³⁾ Satoshi Kimura^{1 3)}

¹⁾AIDS Clinical Center, International Medical Center of Japan and ²⁾Department of Infectious Diseases Faculty of Medicine University of Tokyo

研究目的

HIV と HCV はいずれも血液や体液を介して感染するため重複感染が起こりうる。HIV 感染経路別の HCV 感染の重複感染率は男性間性交渉で 4～8% であるのに対し、静脈注射乱用者では 52～90% 血液製剤使用者では 60～80% となっている。

本邦では、非加熱製剤を使用した血友病患者のうち 9 割が HCV に感染し、4 割が HIV にも感染しているという。2000 年 9 月の段階で当センターに受診した血友病患者の 97.7% が HCV 抗体陽性であった。

重複感染により慢性 C 型肝炎の進行が早くなり、感染後数年で肝硬変または肝癌の発症症例も報告されている。非重複感染例と比較して HCV ウイルス量が多く、抗 HIV 療法による肝障害の助長、C 型肝炎関連疾患での死亡も増えつつある。

一昨年度の IFN 単独療法、昨年度の IFN+RBV 併用療法の効果を引き継ぎ、本年度は、海外の治療例に基づき、PEG-IFN α 2a と RBV の併用療法を導入し、その有効性及び安全性を HIV、HCV 重複感染血友病症例で検証する。

研究方法

1 実施条件

本研究の実施にあたっては、被験者(もしくは被験者の保護者)に対し、研究目的 研究の背景 研究の方法 人権の保護に関する事項などを文書で説明し、被験者の署名による同意を得る。本研究の実施に要する経費は、原則として国立国際医療センター エイズ治療 研究開発センターの研究費をあてる。

2. 被験者の同意

本研究の実施にあたり、担当医師は被験者に対して下記事項に関して、文書および口頭で十分に説明する。被験者は、十分に時間をかけて実施事項に関して理解した後、自由意思により同意書に署名し担当医師に提出する。

同意書(被験者への説明文)に記されるべきこと

- ① 研究の目的
- ② 研究の背景

- ③ 研究の方法

- ④ 予想される結果

- ⑤ 予想される副作用とそれに対する処置

- ⑥ 同意しない場合にも、その後の診療にあたりいかなる不利益も受けないこと

- ⑦ 同意した後も、被験者もしくは保護者の自由意思でいつでも同意を撤回できること

- ⑧ 被験者の人権保護に関する事項

3 被験対象者

以下の選択基準のすべてを満たし、且つ除外基準のいずれにも該当しない者を、当研究の被検対象とする。

選択基準

- ① 当科通院中の HIV / HCV 重複感染者である血友病もしくは凝固因子異常のある患者(過去のインターフェロン治療歴の有無は問わない)
- ② 肝炎治療の意義を理解できる患者
- ③ HIV に関して安定期にある
- ④ CD4 200/ μ l 以上
- ⑤ 導入時入院に応じられる患者
- ⑥ 過去の IFN 治療歴は問わない

除外基準

- ① 年齢 20 歳未満の者
- ② 本人あるいは配偶者が妊娠中 授乳中の者
- ③ 本人あるいは配偶者が本研究期間中の妊娠を希望している者
- ④ インターフェロン製剤およびウン由来物質に対する過敏症の既往を有する者
- ⑤ 小柴胡湯を投与されている者
- ⑥ 自己免疫性肝炎 原発性胆汁性肝硬変を有する者
- ⑦ 非代償性肝硬変を呈している者
- ⑧ 肝臓癌を有する者
- ⑨ アルコール多飲者
- ⑩ AZT を内服中で同剤を他剤に変更することが不可能な者
- ⑪ 高度の貧血(開始前の Hemoglobin が 8.5mg/dl 未満)を呈する者
ただし AZT 内服中の者に関しては同剤を他剤に変更しても改善しない者
- ⑫ 高度の白血球減少(開始前の白血球数が 1500/ μ l

未満)を呈する者

ただしAZT内服中の者に関しては同剤を他剤に変更しても改善しない者

⑬ 高度の血小板減少(開始前の血小板数が25,000/ μ l未満)を呈する者

ただしHIV関連血小板減少症と診断されている者は除く

⑭ 溶血性貧血を有する者

⑮ 明らかな自己免疫疾患を有するもの

⑯ 顕性の甲状腺機能障害を有する者

⑰ 活動性の日和見感染症を有する者

⑱ 活動性の網膜出血を有する者

⑲ 虚血性心疾患(既往を含む)を有する者

⑳ 不安定な不整脈を有する者

㉑ 高度の腎機能障害(Ccr 30ml/min未満)を有する者

㉒ 精神疾患(既往も含む)を有する者

4 被験者の登録

担当医師は本研究の開始前に、被験者のフライハノーを考慮した症例登録票を作成し、被験者の登録を行う。

5 目標症例数及び予定研究期間

目標症例数 10例

予定研究期間 目標症例数に達するまで

6 研究実施方法

① 研究開始時点でのHCV-RNA定量測定を含む一般状態の評価

投与開始前に全身状態の評価としての診察および血液検査(血算 血液生化学 凝固能 HIV-RNA定量 CD4陽性細胞数測定)、心電図検査、胸部X線検査を行う。眼底出血除外のため眼科医師による眼底検査を行う。ST変化 異常Q波 不整脈等の心電図異常があれば循環器科医師による評価を行う。妊娠可能な女性では妊娠検査を行う。

C型肝炎の評価および肝細胞癌除外のため腹部超音波検査を行う。必要ならば肝臓造影CT検査を追加する。原則として肝生検を行うこととするが、血友病症例については出血の危険性を考慮し症例ごとに判断する。

除外基準の検索のため抗核抗体 抗ミトコントリア抗体 抗平滑筋抗体 甲状腺機能(TSH / free T3

/ free T4)を検査する。

血小板数が持続的に100,000/ μ l未満である例では、HIV関連血小板減少症の診断のため抗血小板抗体(PA-IgG)を検査する。この場合原則として骨髄穿刺を行うこととするか、血友病症例については出血の危険性を考慮し症例ごとに判断する。

② PEG-IFN α 2aおよびRBVの投与量および投与期間

PEG-IFN α 2a180 μ gの皮下注射を週1回行う。RBV800mgを2回に分け連日内服する。Hemoglobinの低下、G-CSF併用下でも白血球減少が見られる場合、血小板減少がみられる場合にはPEG-IFN α 2a、RBVの双方もしくは一方の減量かできることとする。PEG-IFN α 2aの減量は、初回投与量の180 μ gから30 μ gずつ減量可能とし、RBVは200mgずつ減量可能とする。24週間の投与を基本とする。開始後24週時点を臨床的あるいは検査所見上効果か認められない例では併用投与を中止する。臨床的、検査所見上効果が見られる場合は、最大48週間継続投与できることとする。副作用による対症的な補助治療を行っても、改善かなければRBVの投与中止を検討し、PEG-IFN α 2aの単独投与も可能とする。

③ 効果判定

投与開始直前にHCV-RNA定量検査、HCV genotype検査を行う。投与開始後2週間、投与開始後4週間、以後投与終了まで1~2ヶ月に1回の割合でHCV-RNA定性検査を行う。定性陽性の場合には定量検査を適宜追加する。治療終了後6ヶ月を経てもHCV-RNA定性陰性を維持している、いわゆるsuspended viral responder(SVR)を有効例と定義する。

④ 副作用の評価

投与開始当初は発熱および溶血性貧血の副作用が高率に認められるため 体温測定を頻繁に行う。投与開始後貧血の進行がおさまるまでの期間は少なくとも週1回の血液検査(血算 血液生化学)を行う。投与開始は可能ならば短期間(約1ヶ月以内)の入院のうえ行う。状態が落ち着けば検査の間隔は適宜延長するか、少なくとも月1回の血液検査を行うこととする。異常所見があれば適切な検査を追加する。

投与期間中は自己免疫性疾患その他の疾患を発症する可能性があり、外来受診時に詳細な問診お

よび診察を行う。症状 異常所見があれば適切な検査を追加する。

自殺企図その他の精神症状が現れる場合があり、慎重に経過観察する。

⑤ 副作用出現時の対応

PEG-IFN α 2a 投与に伴う発熱 全身倦怠感等の症状が見られた際には、被験者の希望があれば対症療法(解熱剤投与等)を行う。自覚症状は通常徐々に改善するため慎重に経過観察するが、改善がみられない場合には投与を一時的あるいは永久に中止する。

投与に伴う貧血 白血球減少 血小板減少がみられた場合には慎重に経過観察し、上記②の投与量の仕方に基づいて、投与量の減量を行う。貧血や白血球減少が高度(Hemoglobin 8.5g/dl未満 白血球数 1500/ μ l 未満)であれば適宜抗HIV剤の変更およびエリスロポエチン製剤やG-CSF製剤の投与を行い、改善がなければRBVの投与中止を検討し、PEG-IFN α 2aの単独投与も可能とする。

不眠 いらいら等の軽度の精神症状が出現した場合には、対症療法を行うとともに投与量の減量を考慮する。自殺企図 譫妄など高度の精神症状が出現した場合には速やかに投与を中止する。

⑥ 併用薬剤

(1) 投与中の抗HIV剤は継続投与して差し支えなく、またウイルス量 CD4陽性リンパ球細胞数の変化などに基づき投与薬剤の変更も可能とする。

(2) 好中球減少が高度となった場合はG-CSF製剤の投与を可能とする。

(3) 貧血が高度となった場合はエリスロポエチン製剤の投与を可能とする。

(4) カリニ肺炎その他の日和見感染症に対する予防投与も継続可能とする。

(5) その他の薬剤に関しては個別に検討する。

⑦ データの収集および解析

各症例のデータはすみやかに収集し、統計学的手法を用いてデータの解析を行う。

⑧ 研究の継続中止の決定

(1) 本研究の継続が被験者にとって明白な不利益を与えられと考えられる場合は、担当医は本研究を中止し、その旨を被験者に口頭または文書で詳細に説明するとともに、研究代表者に

連絡する。

(2) 被験者が本研究継続中に本研究への参加を撤回する意思表示をした際は、担当医は速やかに本研究を中止する。

7 予想される結果

2002年に発表されたアメリカでの臨床試験によれば、HIVとHCVの重複感染者で、過去にHCVに対する治療歴のない20人のうち10人(50%)に有効であり、もう一方ではIFN単剤では効果不十分または再発した21人中6人(28.6%)に有効であった。この2つの臨床試験に準拠して行う今回の治療でも同等の効果が期待できると考えられる。

8 記録の保管

本研究に登録した症例の診療録、検査データ、症例記録 調査票、症例登録票、研究説明同意書、その他本研究にかかわる記録は、すべて適切に保管される。

9 研究結果の発表

本研究で得られたデータは、本研究に関与した医療 研究スタッフ全員の共有とし、その同意のもとに对外発表する。ただし、被験者の文書による同意かなければ個人を特定できる形での对外発表は行わない。

研究結果

7名の患者さんから同意を得たのち、PEG-IFN α 2a及びRBVを開始した。

7名の開始時のデータは表1に示すように、genotype 1bが4例、1a、2a、3aがそれぞれ1例であった。4名が3剤以上の抗ウイルス剤を用いたHAART施行中で、1名が2剤投与で、2名が抗ウイルス剤未治療であった。全例でCD4は200/ μ l以上であり、HCVのウイルス量は140KIUの1例以外は高値であった。

PEG-IFN α 2a及びRBV投与開始後のHCVウイルス量の推移を、genotype 1b型の4例を図1に、1b型以外の3例を図2に示した。

1b型4例のうち2例、Case1は16週目より、Case5は20週目よりHCV-RNAが定性で陰性となり、以

後定性陰性を維持している。Case 2は投与期間中最低でHCV-RNAが440KIUまでしか抑制されず、本人と協議の上24週終了時点でその後の投与を行わないことを決定した。Case 3は4回目の投与終了後に、下痢が高度になったため中断した。振り返ってみると投与期間中はイライラ感が強かったと後日本人が回顧している。

非1b型の成績は、Case 4が14週目にHCV-RNAが定性で陰性となったが、顆粒球減少及び貧血が続いたため、24週終了後よりRBVを中止し、PRG-IFN α 2aのみの継続投与とした。以後も定性で陰性を維持している。Case 6は投与開始後より、倦怠感 脱力感 イライラ感の訴えがあり、12週目で投与を中断した。ハンファローハンフの形成も見られ、乳酸値27mg/dlと高乳酸血症も認めた。投与終了後9週目にHCV-RNAが定性で陽性となったが、終了後20週目からは再びHCV-RNAが定性で陰性となっている。Case 7は従来のIFN α の投与歴のある患者さんで 開始前の血小板が6 3万/ μ lであり、開始後4万まで減少したため、PEG-IFN α 2aを150 μ gに減少し、その後顆粒球減少も続いたためRBVも600mgに減量し現在12週間投与中でHCV-RNAは1 1KIUまで抑制されている。

自覚的な有害事象に関しては、PEG-IFN α 2a初

回及び投与開始後数回まで37~38 5℃の発熱が見られる例があったか、その後は投与後の発熱は軽微となる傾向が観察された。易疲労感、倦怠感もほぼ必発であったか、投与回数を重ねる毎になれてくる症例が多く見られた。投与中断に至ったCase 3及び6では他に比へ、倦怠感の訴えが強かった。中止後振り返ってみると、投与中はイライラ感が強かったと患者は回顧している。

貧血に関しては、Hb量で開始前値に比し2 5g/dl以上の低下を来したものが5例あった(図3)。特にCase 2と4では、4g以上の減少がみられた。T Bilの上昇などより、溶血性貧血と考えられ、投与開始2から3週目にかけて顕著に見られ、その後は徐々に回復してくる経験された。

血小板減少は全例に見られ、前値から最低値を引いた値を前値で除した値を減少率とすると、3割から5割の減少率となった(図4)。

顆粒球の減少は7例中6例で1000未満となり、5例が750未満となり経過中G-CSFを要することがあった(図5)。Case 1は投与開始以来、顆粒球が1000を下回っていたか、28週目に細菌性肺炎を合併した。

CD4数は実数では減少したか、CD4の比率は著変無かった。HIVウイルス量にも影響はなかった。

表1 開始データ

	HCV genotype	HCV-VL(KIU)	抗ウイルス療法	HIV-VL	CD4
Case 1	1b	840	No therapy	7200	307
Case 2	1b	>850	AZT/3TC	91	260
Case 3	1b	710	d4T/3TC/NFV	<50	500
Case 4	1a	140	d4T/3TC/EFV	<50	282
Case 5	1b	>850	AZT/3TC/EFV	<50	418
Case 6	3a	790	ddl-zc/ABC/EFV	<50	557
Case 7	2b	780	No therapy	38,000	384

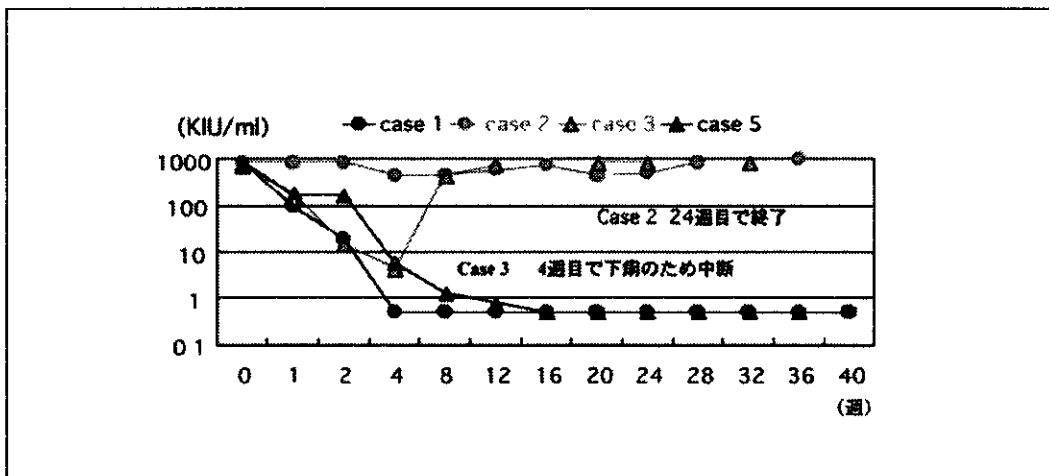


図1 HCV-VL of Genotype 1b
Treated with PEG-IFN α 2a+RBV

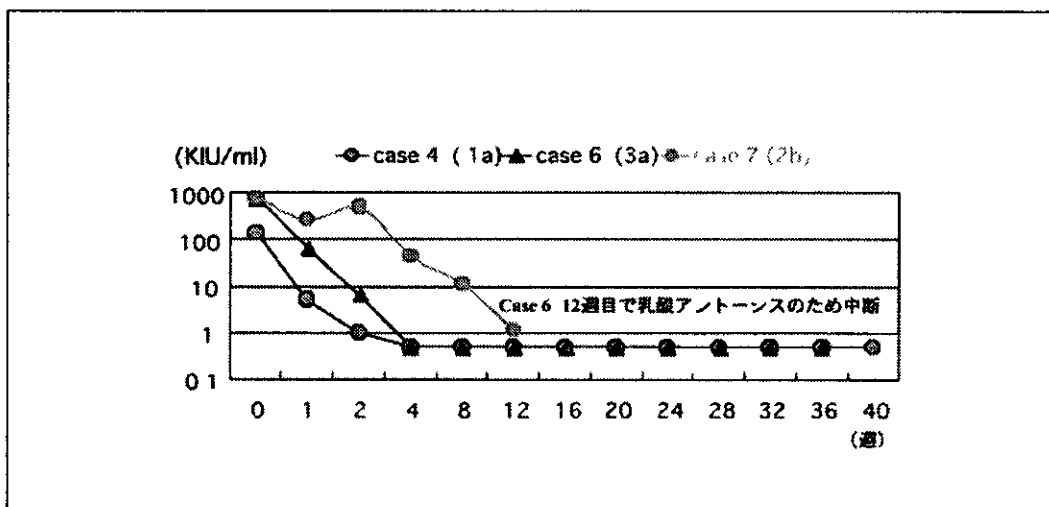


図2 HCV-VL of none-Genotype 1b
Treated with PEG-IFN α 2a+RBV

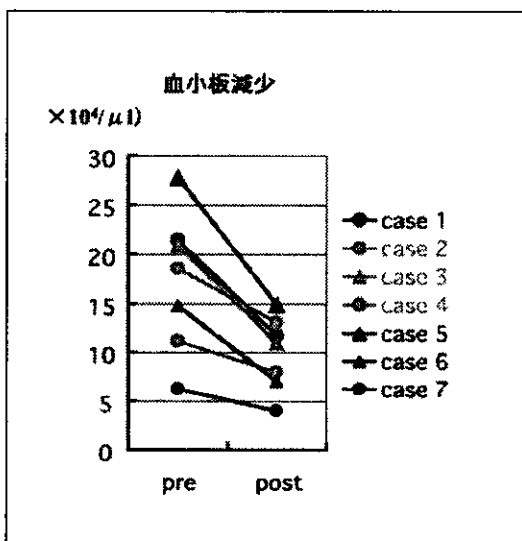


図3

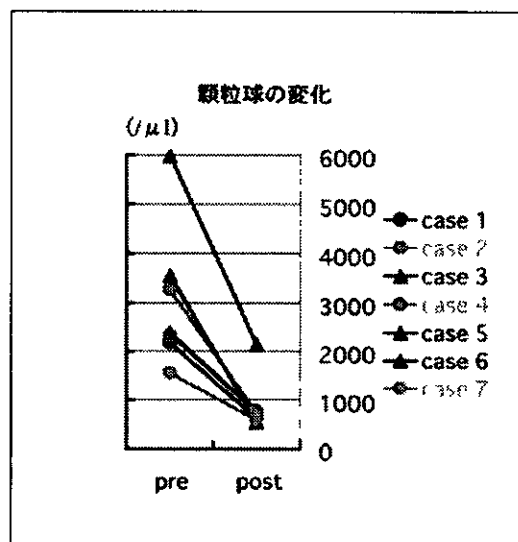


図4