

&lt; 4 &gt;

**18. 非ホジキンリンパ腫**

L S G分類により

- 1) 大細胞型
- 2) 免疫芽球型
- 3) Burkitt 型

④④④確定診断

組織による病理診断

**19. 浸潤性子宮頸癌**

④④④確定診断

組織による病理診断

[その他]

**20. 反復性肺炎**

④④④ 1年以内に二回以上の急性肺炎が臨床又はX線写真上認められた場合

**21. リンパ性間質性肺炎／肺リンパ過形成：LIP/PLH complex (13歳未満)**

④④④確定診断

組織による病理診断

④②②臨床的診断

胸部X線で、両側性の網状小結節様の間質性肺陰影が2か月以上認められ、病原体が検出されず、抗生物質療法が無効な場合。

**22. HIV脳症(痴呆又は亜急性脳炎)**

④④④ 下記のいずれかの状態があり、①脳脊髄液検査、②脳のCT、MRIなどの画像診断、③病理解剖のいずれかによっても、HIV感染以外にこれを説明できる疾病や状況がない場合。

< a > 就業もしくは日常生活活動に支障をきたす認識もしくは運動障害が臨床的に認められる場合

< b > 子供の行動上の発達障害が数週から数か月にわたって進行

これらは確定的な診断法ではないがサーベイランスの目的のためには十分である。

**23. HIV消耗性症候群(全身衰弱又はスリム病)**

④④④ 以下のすべてに該当するもの

- ① 通常体重の10%を超える不自然な体重減少
- ② 慢性の下痢(1日2回以上、30日以上継続)又は慢性的な衰弱を伴う明らかな発熱(30日以上にわたる持続的もしくは間歇性発熱)
- ③ HIV感染以外にこれらの症状を説明できる病気や状況(癌、結核、クリプトスポリジウム症や他の特異的な腸炎など)がない

※ 11 活動性結核のうち肺結核及び19 浸潤性子宮頸癌については、HIVによる免疫不全を示唆する症状または所見がみられる場合に限る。

## HAART 時代の日和見合併症に関する研究 分担研究報告書

# 当センターで経験した悪性リンパ腫と カポジ肉腫症例の検討

分担研究者：源河いくみ（国立国際医療センターエイズ治療・研究開発センター）

研究協力者：上田 晃弘（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 代表的な AIDS 関連悪性腫瘍である悪性リンパ腫とカポジ肉腫（KS）について、組織型、進行度、治療内容、成績などについて検討を行った。

悪性リンパ腫 12 例の診断時 CD4 の中央値は  $69.5/\mu\text{l}$ 、HAART 施行例が 3 例、HAART 未施行例は 9 例であった。組織型は 9 例が diffuse large B cell type、1 例が diffuse large immunoblastic type、2 例が anaplastic large type であった。治療は化学療法単独 3 例、放射線療法単独 1 例、化学療法＋放射線療法 3 例、外科的手術＋化学療法 2 例、外科的手術＋放射線療法＋rituximub 1 例、化学療法＋放射線療法＋rituximub 1 例、化学療法＋rituximub 1 例であった。初回化学療法は CHOP5 例、EPOCH4 例、mBACOD 1 例であった。6 例に HAART を併用した。治療成績は 8 例が死亡、1 例が PR、1 例が CR、2 例は治療継続中であった。多剤併用化学療法をはじめとする集学的治療にもかかわらず、本疾患の予後はきわめて不良であり、さらなる治療法の検討が必要である。

KS については 25 症例の検討を行った。CD4 の中央値は  $77/\mu\text{l}$ 、AIDS-related KS staging system の poor risk group に入る症例が多くを占めたが、HAART とリポゾーマルドキソルピシンなどの治療により治療成績は良好であった。HAART の投与により KS が悪化する症例があり免疫再構築による悪化が疑われた。リポゾーマルドキソルピシンを HAART に先行して投与した症例では、KS の悪化がみられなかった。今後は、HAART、ルドキソルピシンの適切な投与方法について検討する必要がある。

## 研究目的

国立国際医療センターで経験した悪性リンパ腫と KS について調査を行い、その臨床的背景、治療方法、治療成績を明らかにし、有効な治療法について検討する。

## 研究方法

診療録を用いて、悪性リンパ腫、12 例、KS、25 例について診療録を用いて、患者背景、組織型、臨床病期、治療内容、成績などについて調査を行った。

## 研究結果

### 1. 悪性リンパ腫

対象は 12 例で、男性 11 例、女性 1 例で、平均年齢は 44.3 歳であった。

#### (1) CD4 と HAART の有無（表 1）

診断時 CD4 の中央値は  $69.5/\mu\text{l}$  であった。HAART は 3 例で施行、9 例は未施行であった。なお、診断時 CD4 は HAART 施行群 3 例で 106、252、 $414/\mu\text{l}$  であり、HAART 未施行群 9 例ではいずれも  $\text{CD4} < 100/\mu\text{l}$  以下であった。

## (2) 組織型 (表 2)

diffuse large B cell が 9 例、diffuse large immunoblastic が 1 例、anaplastic large cell (ALCL) が 2 例で、ALCL のうち一例は、KS を合併した一例であった。

## (3) EB ウイルスの関与

12 症例中 11 症例について、診断時血中 EB ウイルスを評価した。11 例のうち、8 例で EB ウイル

スが陽性であり、3 例が陰性であった。

## (4) 治療内容と成績 (表 3)

治療は化学療法単独 3 例、放射線療法単独 1 例、化学療法+放射線療法 3 例、外科的手術+化学療法 2 例、外科的手術+放射線療法+ rituximab 1 例、化学療法+放射線療法+ rituximab 1 例、化学療法+ rituximab 1 例であった。初回化学療法は CHOP5

表 1. CD4 と HAART の有無

症例	発症時 CD4	発症時 VL	HAART の有無
1 33M	0	130000	—
2 30M	52	430000	—
3 39F	106	49000	AZT/ddI/NFV
4 36M	252	< 400	ABC/EFV/APV/RTV
5 37M	23	67000	—
6 44M	75	370000	—
7 64M	21	260000	—
8 51M	68	670000	—
9 55M	414	< 50	ABC/EFV/APV/RTV
10 58M	45	1400000	—
11 32M	71	42000	—
12 53M	89	50000	—

表 2. 組織型

Diffuse large B cell	9 例
Diffuse large immunoblastic	1 例
Anaplastic large cell	2 例

表 3. 治療内容と成績

	IPI	治療	化学療法	治療効果
33M DLBCL	3	化学療法	mBACOD	PR (157 日)
30M ALCL	4	化学療法	CHOP	PD (31 日)
39F DLBCL	2	化+放+抗 CD20	CHOP/DHAP	PD (806 日)
36M DLBCL	1	外+化	CHOP	CR (1145 日)
37M DLBCL	2	放+化	CHOP	PD (148 日)
44M DLBCL	2	化+放	EPOCH/DHAP	PD (110 日)
64M DLBCL	1	外+放+抗 CD20	—	RD (436 日)
51M DLBCL	1	放+化	EPOCH/DHAP	PD (115 日)
55M DLBCL	2	化学療法	EPOCH/ESHAP	PD (183 日)
58M DLBCL	4	放射線療法	—	PD (57 日)
32M ALCL	2	外+化+LAK	CHOP/ESHAP	治療中 (182 日)
53M DLBCL	2	化+抗 CD20	EPOCH	治療中 (79 日)

CR : 完全寛解、PR : 部分寛解、PD : 進行、RD : 再発

例、EPOCH4例、mBACOD1例であった。

治療成績は8例が死亡、1例がPR、1例がCR、2例は治療継続中であった。

### (5) 考察

当センター経験した悪性リンパ腫症例は化学療法を中心とした集学的治療にもかかわらず、予後はきわめて不良であった。悪性リンパ腫の治療について海外の報告によると、Ratnerらは、HAARTを併用したdose modified CHOPでは30%がCR、30%がPRを達成したと報告している。自験例では、CHOP施行群では計4症例のうち、CRが1例のみであり、PRが1例、PDが2例となっており、のぞまれた治療効果見られなかった。その後、LittleらによりHAARTを併用しないEPOCH療法が報告され、その内容は39例中、74%がCR、13%がPRを達成するという優れた治療成績であったが、自験例ではEPOCH療法群では3症例のうちCR、PRを達成した症例はなく、何れもPDであり、治療効果に乏しいものであった。

欧米と本邦とにおけるいくつかの病型の違いが指摘されている。

- (1) 病理組織型：欧米では半数がsmall non-cleaved typeで、diffuse large B cell typeは30%前後であるが、本邦では約90%がdiffuse large B cell typeである。
- (2) EBV関連の有無：欧米では約50%の症例にEBVが検出されるのに対し、本邦では約90%にEBVが検出されるとの報告がある。
- (3) 発症時CD4数：欧米では200前後であるが、本邦では100以下と低値での発症である。

欧米と本邦とにおけるいくつかの病型の違いが、欧米からの報告と本邦での治療成績の乖離に關与している可能性があり、病型に応じた治療方法の選択が必要であると考えられる。このため、当院では現在HAARTを併用したEPOCH療法、抗CD20抗体の併用、いわゆるLAKなどの免疫療法の併用を行っている。今後のよりすぐれた治療法の開発が強く望まれる。

## 2. カポジ肉腫

対象は25症例ですべて男性、平均年齢は39.6歳であった。

### (1) 患者背景

HIVの感染経路はすべてMSM(Men who have sex with men)であった。CD4数の中央値は77/ $\mu$ lで、HAARTの投与を受けていた例は5例、未施行が20例であった。

### (2) AIDS-related KS staging systemによる分類

AIDS-related KS staging systemによるステージ分類(表4)ではT1I1S1:16例(64%)、T1I0S0:3例(12%)、T0I0S1:2例(8%)、T0I1S1:2例(8%)、T0I1S0:1例(4%)、T0I0S0:1例(4%)とPoor risk例が多くをしめていた(図1)。

### (3) KSHVの検出

血液のKSHV-PCRは8例が陽性、17例が陰性であった。

### (4) 治療内容

HAART単独、HAARTとリポゾーマルドキソルピシンの投与、ピンクリスチンなどの局所投与、放射線、手術療法の併用などが行われていた。各ステージ症例の治療内容については図2に示す。

リポゾーマルドキソルピシンは、11例に投与が行われた。20mg/m<sup>2</sup>を2~3週毎に投与が行われ、総投与量の平均は120mg/m<sup>2</sup>であった。副作用は嘔気、下痢などで、白血球、1000/ $\mu$ l未満の症例はなく骨髄抑制は軽度であった。HAARTに先行してリポゾーマルドキソルピシンを投与した7例にKSの悪化はなかった。

### (5) 治療成績

腫瘍の消失：11例、縮小：11例、不変：1例、死亡2例であり、大部分の症例で治療成績良好であった。死亡例は、悪性リンパ腫の合併症例と種々の日和見感染症を合併し多臓器不全で死亡した症例であった。各ステージ症例の治療成績を図3に示す。

KSの治療のためのHAART投与後にKSが悪化した2症例あり、その1例は、HAART投与前のCD4が122/ $\mu$ l、投与後が186/ $\mu$ l、stagingがT1I1S1で、d4T、3TC、RTV、SQVが使用され悪化まで期間は14日でHAARTを継続し改善した。もう1例は、HAART投与前のCD4が55/ $\mu$ l、投与後が84/ $\mu$ l、stagingがT1I1S1で、d4T、3TC、EFVが使

表4. ACTG for AIDS-KS staging system

	Good risk : 0 (以下のすべて)	Poor risk : 1 (以下のいずれか)
Tumor, T	限局した皮膚やリンパ節病変 口腔内病変が軽度	腫瘍による浮腫、潰瘍 広範な口腔内病変 消化管や他臓器病変
Immune system, I	CD4>200	CD4<200
Systemic illness, S	OIや口腔内カンジダの既往(-) B症状(-) Karnofsky performance status>70%	OIや口腔内カンジダの既往(+) B症状(+) Karnofsky performance status<70%

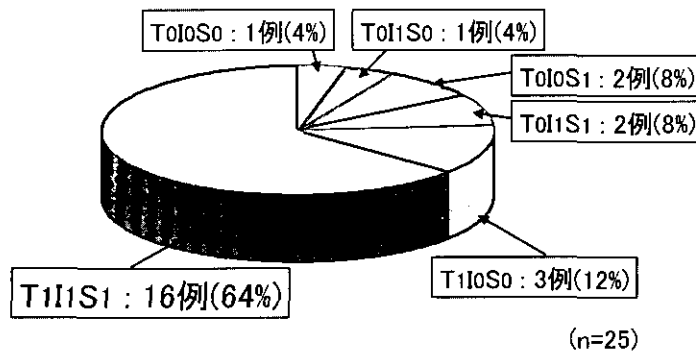


図1. ACTG AIDS-KS staging

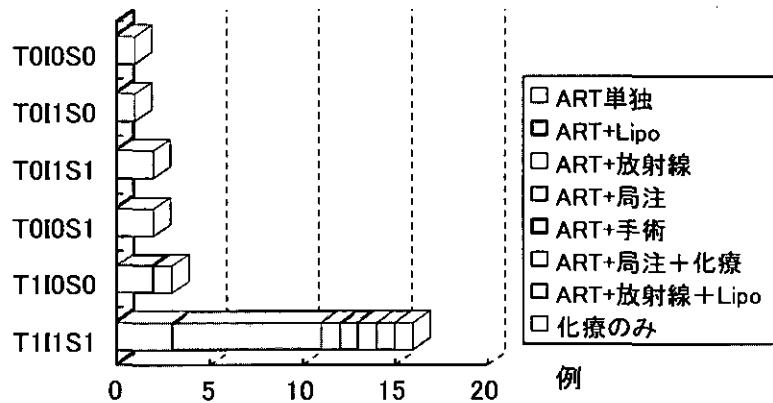


図2. 各ステージ症例に対する治療内容

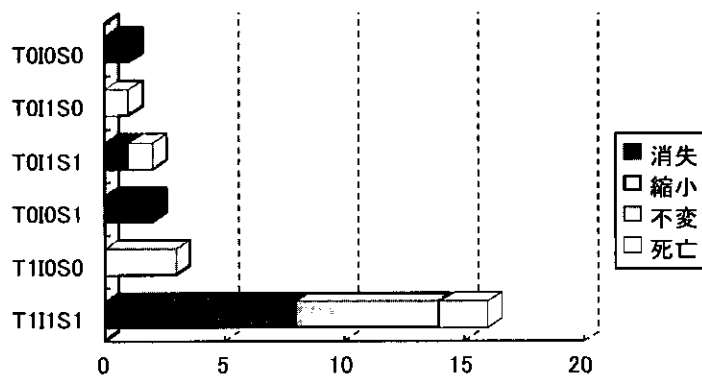


図3. 各ステージ症例の治療成績

用され、悪化まで期間は14日でリポゾーマルドキソルピシンを併用し改善した。両症例は免疫再構築症候群による悪化が疑われた。

## (6) 考察

KS診断時にPoor riskの症例が多くをしめたが、HAART単独、またはリポゾーマルドキソルピシンの投与により治療成績は良好であった。

HAARTを開始した後悪化した症例があり免疫再構築による悪化が疑われた。リポゾーマルドキソルピシンの副作用は軽く、HAARTに先行して投与した症例にKSの悪化はなかった。

## 結論

悪性リンパ腫症例は化学療法を中心とした集学的治療にもかかわらず、予後はきわめて不良である。当院では現在HAARTを併用したEPOCH療法、抗CD20抗体の併用、いわゆるLAKなどの免疫療法の併用を行っているが、今後のよりすぐれた治療法の開発が強く望まれる。

カポジ肉腫については、診断時にpoor riskの症例が多くをしめたが、HAART単独、またはリポゾーマルドキソルピシンの投与により治療成績は良好であった。HAARTの投与によりKSが悪化する症例があり免疫再構築による悪化が疑われた。リポゾーマルドキソルピシンをHAARTに先行して投与した症例では、KSの悪化がみられなかった。今後は、HAART、リポゾーマルドキソルピシンの適切な投与方法について検討する必要がある。

## 参考文献

- 1) Ratner L et.al. Chemotherapy for human immunodeficiency virus-associated non-Hodgkin's lymphoma in combination with highly active antiretroviral therapy. J Clin Oncol. 2001;19(8):2171-8
- 2) Little RF et.al. Highly effective treatment of acquired immunodeficiency syndrome-related lymphoma with dose-adjusted EPOCH: impact of antiretroviral therapy suspension and tumor biology. Blood. 2003;101(12):4653-9
- 3) Krown, SE, Testa, MA, Huang, J. AIDS-related KS: Prospective validation of the AIDS Clinical Trials Group Staging Classification. J Clin Oncol 1997; 15:3085-92
- 4) Northfelt, DW, Dezube, BJ, Thommes, JA, et al. Pegylated-liposomal doxorubicin versus doxorubicin, bleomycin, and vincristine in the treatment of AIDS-related Kaposi's sarcoma: Results of a randomized Phase III clinical trial. J Clin Oncol 1998; 16:2445-51

bicin, bleomycin, and vincristine in the treatment of AIDS-related Kaposi's sarcoma: Results of a randomized Phase III clinical trial. J Clin Oncol 1998; 16:2445-51

- 5) Stewart, S, Jablonowski, H, Goebel, FD, et al. Randomized comparative trial of pegylated liposomal doxorubicin versus bleomycin and vincristine in the treatment of AIDS-related KS. International Pegylated Liposomal Doxorubicin Study Group. J Clin Oncol 1998; 16:683-91

## 健康危険情報

特記すべきことなし。

## 研究発表

### 学会発表

- 1) 上田 晃弘、吉田 邦仁子、田沼 順子、矢崎 博久、鈴木 康弘、本田 美和子、湯永 博之、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 当院におけるAIDS関連悪性リンパ腫の検討 第17回エイズ学会総会、神戸、2003年
- 2) 源河 いくみ、上田 晃弘、吉田 邦仁子、鈴木 康弘、田沼 順子、矢崎 博久、本田 美和子、湯永 博之、照屋 勝治、立川 夏夫、安岡 彰、菊池 嘉、岡 慎一、木村 哲 第17回エイズ学会総会、神戸、2003年

## 知的財産権の出願、登録状況

なし



## 難治性日和見合併症(悪性腫瘍)に関する研究

分担研究者：佐多徹太郎（国立感染症研究所感染病理部）

研究協力者：片野 晴隆<sup>1</sup>、佐藤 由子<sup>1</sup>、尾崎 泰子<sup>1</sup>、Jeffrey I Cohen<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>国立感染症研究所感染病理部、<sup>2</sup>米国国立衛生研究所)

■研究要旨 本邦におけるエイズに合併するカポジ肉腫につき、病理学的、ウイルス学的解析を行った。1995年から2003年までに日本全国からコンサルテーションとして当部に寄せられた39例のカポジ肉腫のパラフィン切片を検索した。ほぼ全例にヒトヘルペスウイルス8の潜伏感染タンパクLANAを免疫組織化学染色で検出した。また、血管腫、血管肉腫など組織学的にカポジ肉腫に類似する病変には一例もLANA陽性細胞を認めなかった。これらの結果はLANAの免疫染色がカポジ肉腫の診断にきわめて有用であることを示している。また、エイズ合併悪性リンパ腫のモデルであるEBVにより形質転換したB細胞の増殖を高コレステロール血症治療薬スタチンの一部が抑えることを見いだした。スタチンはEBV陽性のエイズ合併リンパ腫の新たな治療薬になる可能性がある。

### 研究目的

HAARTの導入により近年のエイズ患者における合併症に大きな変化が現れている。多くの日和見感染症は減少傾向にあるが、カポジ肉腫と悪性リンパ腫は発症率としては減少傾向にあるものの治療は困難であり、特に悪性リンパ腫はいまだ死亡原因として重要なものの一つである。CDCによるエイズの診断指標ではカポジ肉腫、悪性リンパ腫、子宮頸部癌の3つの悪性腫瘍がエイズの診断基準に含まれている。これらはいずれもウイルスがその発症に関与しており、免疫不全状態において日和見的に増殖、活性化されたウイルスが起こした病態と考えられている。したがって、これらエイズ患者に発症する悪性腫瘍は日和見腫瘍ともいわれ、その病態は宿主の免疫状態と深く関係する。

カポジ肉腫はもともと地中海沿岸の老人に見られる血管系の腫瘍として報告された疾患で、同性愛のエイズ男性患者に多く認められる疾患である。米国ではエイズ剖検例の約30%にカポジ肉腫の合

併が見られ、悪性リンパ腫よりも頻度が高い。日本ではエイズ剖検例の約5%程度に見られ、米国ほど高頻度ではないが、エイズに合併する悪性腫瘍としては悪性リンパ腫に次ぐ。カポジ肉腫の原因ウイルスはヒトヘルペスウイルス8 (human herpesvirus 8, HHV-8) と呼ばれるヒトヘルペス属ウイルスの一種である。このウイルスは1994年にエイズに合併したカポジ肉腫から発見され、カポジ肉腫のすべての病型から検出されることがわかっている。日本人の健常者には1%程度の抗体陽性者が見られるが、アフリカや地中海沿岸では高い感染率が報告されている。HHV-8は他のヘルペスウイルスと同様、その感染細胞内で増殖感染と潜伏感染の二つの感染様式が存在する。カポジ肉腫ではほとんどの細胞がHHV-8の潜伏感染状態にあり、HHV-8のコードする潜伏感染タンパク Latency-associated nuclear protein (LANA) を発現している。カポジ肉腫の診断は通常、病理組織からヘマトキシリン・エオジン染色を行い、その病理組織学的形態から確定診断を行う。しかし、カポ



ジ肉腫の組織像は血管肉腫や血管腫、出血を伴う他の紡錘形細胞腫（線維腫、平滑筋腫など）や瘢痕などと類似するケースがあり、診断が困難な場合がある。さらに、カポジ肉腫の初期病変では血管の軽い拡張や浮腫、血管周囲における少量の紡錘形の細胞の増殖などにとどまることが多く、エイズ合併例でもその診断に苦慮する。そうした場合、HHV-8のLANAを検出する免疫組織化学染色はカポジ肉腫の確定診断に有用なツールとなると考えられる。LANAに対する抗体はすでに我々が1999年に開発し、報告済みであるが、本研究ではこの方法のカポジ肉腫とその類似疾患における有用性を確かめ、さらに診断に資するにはどのような方法をとればよいかを探ることを目標の一つとする。

本研究で研究対象としたもう一つのエイズ合併悪性腫瘍は悪性リンパ腫である。日本ではエイズ剖検例の約3割に悪性リンパ腫がみられ、多くはエプスタイン・バーウイルス(Epstein-Barr virus, EBV)の感染が認められる。EBVもやはりヒトヘルペスウイルスの一種であり、B細胞に感染するウイルスである。HHV-8と異なりほぼすべての人が感染している常在ウイルスである。試験管内でEBVをヒトのB細胞に感染させるとB細胞は不死化する。健常者ではこのようにEBVが感染し、不死化したB細胞はEBVの抗原を発現することにより、細胞障害性T細胞に認識され、異物として排除される。しかし、エイズなどの免疫不全患者ではこのようなEBV感染B細胞は排除されず、そのままクローナルな増殖を続け腫瘍として認識される。これがEBV関連日和見リンパ腫の発症機序と考えられている。エイズ合併日和見リンパ腫は欧米と日本で組織型の構成が大きく異なるものと考えられる。欧米のエイズ合併日和見リンパ腫にはバーキットリンパ腫やホジキンリンパ腫、形質芽細胞性リンパ腫に免疫芽細胞性リンパ腫など多彩な組織型があるが、日本の症例ではそのほとんどは免疫芽細胞性リンパ腫である。EBVの感染も欧米と日本では大きく異なり、欧米では半分以下であるのに対し、日本のエイズ合併日和見リンパ腫では7割以上がEBV陽性である。このように、欧米とはその病態が大きく異なるため、欧米で報告される治療法の成績と日本で実施された同一の治療法の成績が大きく異なることもしばしばである。日本のエイズリンパ腫の実態を把握し、

日本人エイズ合併リンパ腫に適した治療法を模索していくことも本研究の目的の一つである。

## 研究方法

### 1. 免疫組織学的検出法

#### (1) HHV-8の潜伏感染タンパクLANA特異抗体の作成

HHV-8のopen reading frame 73 (ORF73)のN末端である257アミノ酸(35から291)をグルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)融合タンパク法でリコンビナントタンパクとして作成した。これらのタンパクをアジュバントとともにウサギに免疫し、2-3ヶ月後に血清を採取した。血清は硫酸沈殿後、アフィニティーカラムを用い抗体成分を精製した。抗体の特異性はHHV-8感染細胞株TY-1の蛍光免疫染色、およびウエスタンブロットにより確認した。

#### (2) 免疫組織学的検出法

生検および剖検病理組織は10%緩衝ホルマリンで固定し、パラフィンに包埋した。4 $\mu$ m厚の切片を作製し、シランコートガラススライドに貼付した。脱パラフィン後、クエン酸処理にて抗原賦活化処理を行い、リン酸バッファーで洗浄後、上記ウサギポリクローナル抗体を一次抗体として反応させた。洗浄後、ビオチン標識抗ウサギイムノグロブリン抗体を二次抗体として、三次抗体にはペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを順次反応させた。抗体の種類により、Catalyzed Signal Amplification kit (DAKO)によりシグナルを増強させた。ジアミノベンチジンで発色後、アルコール脱水、キシレン透徹、封入後、検鏡した。また、免疫染色とは別に各標本はヘマトキシリン・エオジン(HE)染色で全体の形態変化を観察した。

#### (3) 血清学的検査

HHV-8がコードする4つのタンパクK8.1, ORF59, ORF65, ORF73をグルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)融合タンパク法を使い大腸菌内で人工的に合成、精製後、これを抗原タンパクとしてELISAプレートを作成した。すべての血清は55 $^{\circ}$ C 30分で非働化したのち、希釈溶液にて規定濃度に希釈した。希釈血清をプレートと反応させた後、酵素抗体法にて発色後、発色強度を吸光度

計にて測定した。陽性、陰性の判定は蛍光抗体法などの他の方法で確認された明らかな陰性症例 50 例の吸光度の平均に標準偏差値の 5 倍を加えた数値をカットオフ値とし、この値を超えるものを陽性とした。また、陽性例、および、陽性を疑う症例（平均+標準偏差の 3 倍を越えるもの）については HHV-8 感染細胞を用いた蛍光免疫染色法にて確認した。

#### (4) 細胞培養

EBV 感染ヒト B 細胞の細胞株は 10% 牛胎児血清添加 RPMI1640（抗生物質添加済）中で 37℃、5%CO<sub>2</sub> の培養器にて培養を行った。細胞の生存率はトリパンブルー染色をおこない顕微鏡下で細胞数を計測、あるいは、細胞をプロピジンイオダイドで染色し、その蛍光強度をフローサイトメトリーで計測した。

### 研究結果

#### 1. カポジ肉腫および類似疾患における HHV-8 潜伏感染タンパク LANA の発現

HHV-8 の潜伏感染タンパク LANA がカポジ肉腫に特異的に発現していることはすでに報告があるが、カポジ肉腫の様々な病期、組織型、類縁疾患で LANA の発現がどのように変化するかについて詳細な報告はない。そこでわれわれはエイズ合併カポジ肉腫を含む 39 例のカポジ肉腫の生検標本あるいは剖検標本について HHV-8 の潜伏感染タンパク LANA の発現を LANA に対するウサギポリクローナル抗体を用いて検索した。検索した症例

は HIV 陽性者 34 例と HIV 陰性者 5 例、様々な発症部位（皮膚、消化管、肺、リンパ節など）、3 例の女性例、複数の外国人症例を含む。これらの症例を検索した結果、一部に固定不良などの標本作製時の問題がある症例では染色性の不確かなものもあるが、潜伏感染関連タンパク LANA はほとんど全てのカポジ肉腫紡錘型腫瘍細胞の核内に点状に発現していることがほぼ全例において確認された（図 1）。発症部位、病期（stage）、HIV 感染の有無、年齢、人種、性別に関わらず、カポジ肉腫のすべての症例で LANA の発現が認められた。血管腫などと鑑別の難しい、patch stage と呼ばれるカポジ肉腫の初期の病変部でも、異常血管の血管内皮、および異常血管の周囲の紡錘形の細胞の核内に明らかなシグナルを認めた。一方でカポジ肉腫と病理組織形態学的に類似する疾患に対して、本抗体を用いて同様の染色を行った。検索した検体は海綿状血管腫、血管肉腫、多形性紅斑、平滑筋腫、平滑筋肉腫、lymphomatoid papulosis、癬痕、肉芽組織などの疾患のほか、正常皮膚やリンパ節、形質細胞腫、癌の組織等、様々な疾患である。結果はこれらのカポジ肉腫に形態的に類似する疾患や正常な皮膚組織、他の癌組織などには特異的なシグナルは認められなかった（図 1）。さらに、ヘマトキシリン・エオジン染色で染色した標本の病理組織学的検索のみからはカポジ肉腫か血管肉腫か、あるいは他の血管系の腫瘍カポジ肉腫、判別できなかったものに関しても、LANA はこれらの標本を明瞭に染め分けた。このうち一部の症例では患者血清中の抗 HHV-8 抗体の血清検査が可

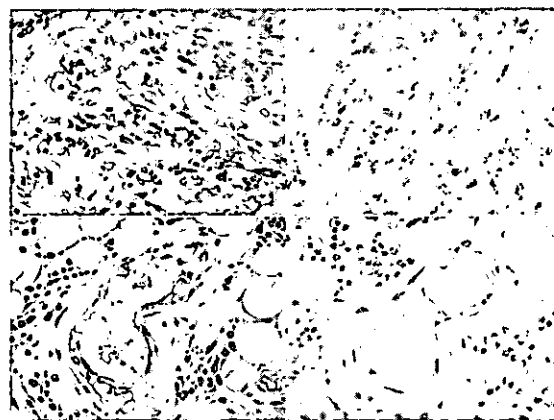


図 1 抗 HHV-8 LANA 抗体を用いたカポジ肉腫と血管肉腫の免疫染色

（左上）カポジ肉腫の組織像。（ヘマトキシリン・エオジン染色）紡錘形の腫瘍細胞が赤血球を容れた血管隙を作りながら増殖している。（右上）カポジ肉腫における LANA の染色像。多くの点状の陽性シグナルが紡錘形細胞の核内に認められる。（左下）血管肉腫。異型のある血管内皮細胞が脂肪組織内に異常血管を作り浸潤している。周囲には炎症性細胞浸潤を認める。（右下）血管肉腫における LANA の染色像。陽性シグナルは全く認められない。

能であり、その結果、LANA 陽性の症例は血清抗体陽性であり、また、抗LANA抗体で染色されなかった症例については血清学的にもHHV-8の感染が見られなかった。これらのことから、ここで用いた抗LANA抗体がレトロスペクティブにカポジ肉腫のみに染色されることがわかった。この結果は本抗体がカポジ肉腫の紡錘型腫瘍細胞を特異的に検出する抗体であり、他の形態的に類似する疾患との鑑別に非常に有用であることを示唆している。

## 2. エイズ合併悪性リンパ腫に関する研究

日本人エイズ患者に発症する悪性リンパ腫には7割以上がそのリンパ腫細胞内にEBVのコードするRNA (EBV-encoded small RNA, EBER)が検出される。これらのEBV陽性のリンパ腫細胞はEBVがコードする多くのオンコプロテインを発現しており、そのうちのlatent membrane protein-1(LMP-1)は日和見EBVリンパ腫では発癌の中心的な役割を果たすことがわかっている。LMP-1はEBV感染細胞の中でLFA-1をはじめとした様々な接着因子の発現を誘導し、リンパ腫細胞が節外性病変を形成することに貢献する。

われわれは、EBV関連リンパ腫が発現する接着因子をブロックする目的で最近LFA-1の作用をブロックすることが明らかになったスタチンをEBVにより形質転換したヒトB細胞(EBV-transformed lymphoblastoid cell line, LCL)の培養上清に添加し、その増殖の変化を観察した。スタチンはもともと高コレステロール血症の治療薬として用いられている合成化合物で、近年、LFA-1のICAM-1との結合部位近傍に結合しLFA-1がICAM-1に結合するのを阻止し、LFA-1の機能を抑える働きがあることがわかっている。2 $\mu$ MのスタチンをLCLに加えたところ、1週間後には多くの細胞が細胞死に陥ることが明らかになった。LCL以外のEBV陽性パーキットリンパ腫の細胞株や他のEBV陰性のBリンパ腫細胞株、Tリンパ腫細胞株では細胞死は見られず、スタチンの効果はEBV陽性のLCLに特異的と思われた。細胞死の性格はDNAの断片化やカスパーズの活性化が見られたことからアポトーシスが起った結果と考えられる。

## 考察

カポジ肉腫やリンパ腫といったエイズに合併する悪性腫瘍は他の日和見感染症と比べ、明らかに致死率が高く、危険であるといえる。HAART導入後、患者の血中HIVのレベルはある程度まで抑えることが可能になり、それに伴い、日和見感染症が見られる頻度はかつてほどではない。また、発症したところで、HAARTにより比較的高い免疫能が保たれているケースでは抗生物質などの治療薬に反応し、回復も早い。しかし、カポジ肉腫やリンパ腫は発症すると抗癌剤の投与を余儀なくされ、予後も悪い。こうした悪性腫瘍を早期に発見し、早めに治療を開始することが予後を左右する大きな鍵となる。

カポジ肉腫は皮膚や消化管粘膜、口腔などに発症するケースが多く、肺やリンパ節などの内臓病変を形成するのはエイズの末期の患者であるケースが多い。皮膚などの比較的可見な病変部では発見も診断も早期に可能であるが、消化管などでは内視鏡検査を経なければ確定診断はできない。病理のサイドでの問題は消化管病変では内視鏡により採取された小さなサンプルから診断を確定しなければならない点である。皮膚病変でもパンチバイオプシーのサンプルで十分な量がとれない場合があり、判断が困難なケースも少なくない。さらに、これまで、カポジ肉腫に特異的なマーカーは存在せず、カポジ肉腫は血管内皮、あるいはリンパ管内皮がその起源といわれるが、血管内皮のマーカーであるFactor VIII-associated factorなどが常に陽性になるとは限らない。そうした中、この研究で明らかになったとおり、HHV-8のLANAに対する抗体はカポジ肉腫にきわめて特異的であり、他の形態的に類似した疾患には全く陽性シグナルを認めない。このような特異的なマーカーの存在はこれまで困難であったカポジ肉腫の症例に対しても確定診断の有力なツールであることは間違いない。多くの施設で活用されるべきものと思われるが、本抗体が市販されていないことや症例がある程度集中する施設で使用されることが望ましい点を考え、現在ではエイズ拠点病院でカポジ肉腫の症例数が多く、病理部において高度な免疫染色が可能な施設にこの抗体を配布し、使用していただき、他の施設においては当研究所にパラフィン切片を送付していただき、我々のスタッフで免疫染色を行い、結果を依頼施設の担当医

師に報告するという形式をとっている。当研究所ではHHV-8の血清抗体を測定することも可能であり、この血清検査を加えることにより、さらに正確な診断が可能である。全国をカバーできているかどうかはわからないが、診断の難しいケースでは大いに活用していただきたいシステムであると考えている。

エイズ合併悪性リンパ腫は欧米との組織型や病態の違いから日本では独自の病態の把握や治療法の検討が必要と思われる。日本ではほとんどのエイズ合併悪性リンパ腫は組織学的にびまん性大細胞型B細胞リンパ腫(diffuse large B cell lymphoma, DLBL)に分類されており、他の組織型はまれである。近年のDNAアレイを用いて遺伝子発現のプロファイルを調べた研究によるとDLBLは様々な病態を含んでおり、単一な疾患ではない。その遺伝子発現プロファイルからDLBLはおおまかに胚中心B細胞様DLBLと活性型B細胞様DLBLに分類されるが、そのなかでもEBV陽性のものと陰性のもの、HHV-8陽性のものと陰性のもの、典型的な遺伝子発現プロファイルを示さないもの、など、多彩な亜型が含まれると考えられる。そのそれぞれの亜型について予後も病態も異なることが予想され、当然、治療法も亜型ごとに検討しなければならない。これまでの病理学的解析から日本人のエイズ患者にはEBV陽性のDLBLが多いと考えられ、多くの症例でEBERやLMP-1の発現が認められている。本研究で用いたEBVで形質転換したB細胞であるLCLはまさに日本人におおいEBV陽性の日和見リンパ腫としてのDLBLの試験管内モデルといえるもので、本研究でLCLに特異的に抗腫瘍作用を認めたスタチンはエイズ合併EBVリンパ腫の治療薬として応用が可能かも知れない。動物実験やメカニズムの解明をさらに進めることにより、安全性とその効果を確認し臨床への応用を考えたい。

## 結論

カポジ肉腫の診断系としてHHV-8の潜伏感染タンパクLANAに対する免疫染色がもっとも信頼度が高く、血管腫、血管肉腫など組織学的にカポジ肉腫に類似する病変とも明確に区別が付く診断法であることが明らかになった。血清抗体の検査と組み合わせることにより確実な診断が可能であ

り、カポジ肉腫の診断に普及されるべきものである。スタチンがEBV感染LCLの増殖を抑制し、細胞死を誘導することがわかった。エイズ合併リンパ腫は本邦ではEBV関連DLBLが多いことからスタチンはエイズ合併リンパ腫の新たな治療薬としてさらに効果や安全性を確認していきたい。

## 倫理面への配慮

実験に用いたすべての生検組織については詳細な診断目的と治療への関与について十分に説明し、患者の同意を得て、採取されたものである。また、血液サンプルについても同様にインフォームドコンセントを得て採取されている。また、遺伝子組換え実験は当該施設(国立感染症研究所)の承認の後、遺伝子組換え実験ガイドラインに沿って行われた。剖検組織の検討は事前の剖検承諾書を得、種々の検討は診断の過程で行われた。

## 健康危険情報

本研究で得られた成果に関して健康危険情報として報告しなければならない情報は無い。

## 研究発表

### 論文発表

- 1) Fukushi M, Higuchi M, Oie M, Kasolo F, Ichiyama K, Yamamoto N, Katano H, Sata T, Fujii M: Latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus interacts with myeloid cell nuclear differentiation antigen induced by interferon  $\alpha$ . *Virus Gene* 2003, 27: 237-47.
- 2) Katano H, Sata T: Human herpesvirus 8 (HHV-8). *Antimicrobial Therapy and Vaccine*. 2nd Ed. By Yu VL, Weber R, Raoult D. 2002, pages 1243-1247, Apple Trees Productions, LLC.
- 3) Rosales CM, McLaughlin MD, Sata T, Katano H, Veno PA, De Las Casas LE, Miranda RN.: AIDS presenting with cutaneous Kaposi's sarcoma and bacillary angiomatosis in the bone marrow mimicking Kaposi's sarcoma. *AIDS Patient Care and STDs* 2002, 19: 573-577.



## 急性期病院の第 1 線医師、検査技師等に対する 啓蒙・診断技術移転法の解析

分担研究者：竹内 勤（慶應義塾大学医学部）

研究協力者：有蘭 直樹<sup>1</sup>、井関 基弘<sup>2</sup>

（<sup>1</sup>京都府立医科大学、<sup>2</sup>金沢大学医学部）

■研究要旨 わが国におけるエイズの増加に対処するため、エイズ診療拠点病院のみならず、むしろ急性期疾患を扱う病院のエイズに伴う日和見原虫感染症の診断技術向上、更には技術レベル維持を目的とした自己点検・評価システムの構築のため、日和見原虫感染症の講習会を開催し、それを通して効率的な情報伝達、技術移転の方法の検索を行った。第 1 回目の講習会は平成 16 年 2 月に京都府立医大で実施した。3 月には第 2 回目を慶大医学部にて開催予定である。参加者は京都府立医大では 41 名であった。2 回目には 103 名が予定されている。今回の企画では、案内をエイズ拠点病院の中央臨床検査部責任者と臨床検査医学会に送付し、拠点病院のみならず急性期病院の参加の途も開いたが、前期研究班で 9 回も開催していたのに、拠点病院約 360 ケ所から参加、不参加を問わず、何らかの意思表示があったのは 88 件と 1/4 程度に過ぎず、講習会の情報の流通について更に詳しく検討、改善する必要があるものと思われた。急性期病院からの応募は 1 名のみであった。この点も参加者からは、臨床検査学会だけでなく、技師会のホームページへの記載などが提案されているので、情報提供の手法に関して再検討する必要がある。また、第 1 回目の参加者のアンケートからは技術レベルの維持、自己点検・評価のためには講習会の内容の CD 化、参加者とのネットワーク化を行い、それを通じた質疑を行う、等の希望が出された。第 2 回目の同様のアンケート結果を見て、どのような方策を作用するかを決める予定であるが、講義、実習内容の CD によるマニュアル化、実習材料の確保などには既に着手しているので、今後順次実施に移す予定である。

## はじめに

従来の HIV/AIDS の日和見感染症に関する研究班（平成9～11年度：HIV感染症に関する臨床研究、平成12～14年度：日和見感染症の治療に関する研究、何れも主任研究者は東京大学、木村哲教授）において、都合6年間の間に日和見原虫感染症の病原体の生物学、感染症学、病態、診断、治療に関する講習会を慶大医学部において、エイズ診療拠点病院の中央臨床検査施設の医師、検査技師を対象として、合計9回開催した。参加者数は毎回60～100名に達していたので、かなり多数の対象者について講習を実施したこととなる。しかしながら、この一連の講習会の対象は上述のようにエイズ診療の拠点病院のみであって、一般の急性期病院に関しては、辛うじて最後の1～2回臨床検査医学会の事務局を通して参加依頼をただただけであった。このチャンネルを通して、何名が参加したのかについては残念ながら検討していない。また、この講習会では、毎回実習終了後に参加者に対してアンケート調査を行ったが、講習会開催の時期、方法、場所などに関しての希望を聞いたのみで、参加者の技術のレベルの調査、あるいは自己再学習の必要性の有無、技術の定着度、その他、技術移転が確実に行われたのかどうかの調査は行った事がなかった。この点は、講習会を担当した筆者らにとって大きく反省すべき点である。

一方、最近わが国においてはエイズは減少傾向を示さず、絶対数はまだ少ないものの、公衆衛生上、あるいは臨床上大きな問題となりつつある。本研究は、以上の状況に鑑み、エイズの日和見感染症のなかで、検査技術等の普及が遅れている、あるいは検査した経験に乏しいと思われた原虫疾患ならびに近縁の疾患に関して、エイズ診療拠点病院だけでなく急性期病院の医師、臨床医検査技師を対象として講習会を開催し、診断技術の移転を計り、その成果を評価することによって、より効果的な技術移転法の確立を行う事、及び診断技術の維持に関する自己点検法、評価法の確立を目的としている。すなわち、これまでのエイズ診療拠点病院のみならず、一般の急性期病院に焦点をあて、上記講習会を開催すると同時に、どの程度まで診断技術が移転、定着しているか、また今後どのようにすれば、より一層効果的な技術移転のノウハウが形成できるかを検討の目的としている。

今年度は、初年度と云うことも有り、前回の研究班の際の講習会で、最も希望が多かった西日本地区での開催を試み、またアンケートの内容も変更し、参加者の意識、技術のレベルなどを調査し、今後どのようにすれば効率的な自己点検、再評価が行なえ、他の講習会の開催に際して基準として応用可能となるかを検索した。

## 対象及び実施経過

### 1. 講習会の準備、内容

平成15年秋にこれまでと同様、下記の内容の講習会の案内を全国約360ヶ所のエイズ診療拠点病院の中央臨床検査施設長あてに送付し、合わせて臨床検査医学会に全国の会員への周知を依頼した。

今年度は前期までの講習会で最も希望が多かったため、西日本地区で1回開催することとした。幸い京都府立医科大学医動物学教室、有菌直樹教授が研究協力者として本調査事業に参加してくれることとなったので、平成16年2月14日、15日には京都府立医科大学の施設を使って講習会を開催した。第2回目は当初の予定通り、慶大医学部で3月13、14日に開催予定である。講習会の内容は以下の通りである。

#### 第1日目

日和見感染を起こす原虫(*Pneumocystis carinii* と *Microsporidium* を含む)の生物学、感染経路、疫学、病態、診断、治療に関する講義を以下の担当者が行う。

総論：竹内 勤（慶大医学部）

赤痢アメーバ：竹内 勤

トキソプラズマ：浅井 隆志（慶大医学部）

ニューモシステイス：塩田 恒三（京都府立医大）

クリプトスポリジウム、他：井関 基弘（金沢大学医学部）

#### 第2日目

赤痢アメーバ、トキソプラズマ、ニューモシステイス、クリプトスポリジウムに関する実習。この実習内容の詳細に関しては、本報告の末尾に纏めて示したので参照されたい（資料1）。

具体的には、できるだけ多数の研究者の協力を得て、監督者として実習に参加してもらい、参加者各自に1台ずつ顕微鏡を与えて、参加者ができるだけ監督者にコンタクトしやすいようにして実施した。幸い京都府立医科大学のスタッフの全面

的協力が得られたので、約 40 名の参加者に対して、10 名の指導者の関与のもとで実習を行った。実習には蛍光顕微鏡を使用した解析も含まれるが、これも京都府立医科大学の御厚意で使用可能となった。3 月中旬に予定されている慶大医学部における実習では、やはり 10 名程度の実習指導者を予定している。

## 2. 講習会への参加者の構成、その他の実施経過

今年度も上述のように約 360 ケ所の全国のエイズ診療の拠点病院に対してまず案内を送付し、臨床検査学会を通して案内を送付した。平成 16 年 1 月中旬に申し込みを締め切った。今年度は従来の講習会の時と異なり、講習会の定着度を調べる一環として、参加者がいない場合も返事を送付するように依頼した。その結果、参加者は第 1 回目に 41 名、2 回目が 103 名で、これまでの講習会と基本的にはそれほど変わらないレベルであったが、依頼に対して返事があった施設は拠点病院約 360 ケ所から 88 ケ所と約 25%に過ぎなかった。臨床検査学会を通して参加があったのは 1 名であった。従来の研究班で実施した際には、何ヶ所の拠点病院から応答があったかを調べたことはなく、今回の調査が初めてのものであるが、これまで 9 回実施した割には反応が極めて悪いと判断せざるを得ない。この理由としては様々なものが考えられようが、第 1 回目の参加者の何人かに尋ねてみると、案内が中央臨床検査施設の責任者宛てになっていたことが原因の一つと考えられた。後述するアンケートでも明らかであるが、参加者の理解では、このような原虫疾患に対する診断技術は、なかなか他で教えてもらうことがなく、ニーズは高いものと判断されたので、恐らく当方からの案内が検査担当者の手許に届いていない可能性があり、次回より案内送付に関して何らかの工夫が必要であることが明らかになった。しかし、一方検査施設の責任者から講習会の案内を渡されて、参加するように言われたとのアンケート結果（下記）もあり、一概に断定する訳にも行かない。今後は班会議で指摘されたごとく、各病院の庶務課の責任者、あるいはエイズ診療の看護部門の責任者に送付するなど、異なる方法をも検討したい。また、今回の研究の目的である急性期病院へのアプローチも、残念ながら今年度は達成されなかった。臨床検査医学会だけでなく、技師会など、他の窓口を含め、

対応策を検討する必要がある。下記のアンケートでは技師会のホームページに年度の早期から情報を掲載すべきであるという意見があった。また、第 1 回目と 2 回目では参加者の数が大幅に異なることも、今後京都府立医科大学での開催を念頭に置いているだけに、何らかの対応を迫られるものとする。恐らく、交通の利便性の問題であろうというのが京都府立医大の意見であったが、2 年度より対応を考えたい。

## 3. アンケートの内容と解析

効果的な診断技術移転について、参加者の意見を聞くことは極めて重要であることは明らかである。今回からは以前のアンケートと内容を替え、資料 2 に示した無記名アンケートとした。回収率は、当日参加 40 名中 33 名であった。この内、従来の講習会に参加したことが有るとの回答は 3 名よりあり、2 名が 1 回、1 名が 3 回であった。1 回参加の内の 1 名は、自己評価で講習会は役に立っていなかった、と回答している。その理由は同定の際に自信をもってできなかった、と言うもので、一方 3 回と解答した 1 名は役立ったと回答している。これらより速断するのは避けたいが、従来より 1 回のみでの参加は殆ど役立たず、自己再学習などの途を開く必要が有ることは認識されていた所である。また今回の第 1 回目の講習会への参加理由を尋ねたところ、エイズ拠点病院であって、業務上必要であるため、と言う回答が最も多かった。これと合わせ、実物を見る機会が殆どないため、と言う回答も同程度見られた。関西地区で開催されたため、あるいはアメーバ感染を伴ったエイズ症例を経験したので、更に技術を、と言う答えも少数あった。また、講習会開催の必要性を調べるため、原虫感染症診断の妥当性に対して自己評価を行う場合、講習会参加後は参加前より異なってくるかと言う質問を行ったが、異なってくるという回答が殆ど全員から得られた。このアンケートは実習終了直前に回収されたので、この答えはある程度当然とは思われるが、この技術がどのようにすれば今後も維持されるのかが、大きな問題となる。このため、繰り返して自己点検・評価を行うのにどのような方法を希望されるかを尋ねた所、CD 化したマニュアルの配布を 28 名が、コンピューターネットワークでの質問受付を 23 名が、実習に用いた原虫標本の配布を 15 名



が、随時1日程度であれば講習を慶大、京都府立医大、金沢大で受けられると言う項目を10名が希望した。また、その他として注目すべきであろうと思われたのは、日本医師会、あるいは日本臨床検査医学会等の技術レベルサーベイランスにこのような病原体を入れる、またブラインドでのテストを講習会とは別に行き、自己点検に応用すべきと言う意見である。講習会には繰り返し参加したいと言う意見も数名あった。このような意見に基づいて、現在講習会の内容のCDによるマニュアル化、実習材料の確保・配布、ネットワーク化は開始している。技術レベルの維持のための客観試験はネットワーク完成以後に検討するつもりであるが、関係団体とは接触を持ちたいと考えている。

## まとめ

今次研究班における本研究分担者の研究目的は、日和見原虫感染症の講習会開催を行うと同時に、それを通して、効率的な情報・技術移転方法を確立し、自己点検・評価法も検討して、一連のスキームを作成する事である。当然このスキームは他の診断技術の講習会に際しても適用されることが期待される。また、今回と従来の講習会の大きな差異はエイズ診療拠点病院だけでなく、急性期疾患を扱う病院をも今回は対象としていることで、このようなアプローチがうまく機能すれば、わが国で増加しつつあるHIV感染症のみならず、他の感染症の診断技術移転などにも応用可能となるものと期待される。

また、これまで、以前の9回にわたる研修コース参加者の技術レベル維持に関するフォローアップを全く行って来なかったが、参加者の多い拠点病院の協力をあおいで、参加者のフォローアップ調査を行い、自己点検評価システム、トレーニングコース評価システムを確立したい。このシステムを更にマニュアルに取り入れ、完成したものとすべく準備を整えている。これは今回の講習の参加者の中に既に何回か参加した人がおり、講習を受けたものの実際に鑑別する段になると迷ってしまうと言う意見が述べられたためである。加えて日本医師会や日本臨床検査医学会主催の診断技術サーベイランスに参加するというオプションもあることが明らかになったこともあり、本研究班

独自に今年度あるいは従来の講習会の参加者の診断技術の維持のため、サーベイランス、フォローアップを実施すると言う選択肢も有るが、参加する病院の拡大を念頭に置けば、考慮するのに値する方策と思われた。二年次の課題として、早期から検討する予定である。

また、アンケートの結果では、このような講習会そのものの意義は十分に認識されているようで、アンケートの設問には今後繰り返しての参加を希望するかどうか、に関しては設問を設けなかったが、33名中11名が今後も繰り返しての講習会参加の意志を表明していた。二年次以降、このようないわゆるリピーターの受け入れは積極的に枠を作って行いたいと考えている。

## 謝辞

今年度第1回目の講習会開催に際しては、京都府立医科大学の御厚意で講義施設、顕微鏡を含む実習施設を使用させて頂いた。また実習の監督者としても、研究協力者の有菌教授以外にも講義担当者である塩田助教授ほか、同大学医動物学教室のスタッフ、及びやはり研究協力者である金沢大学、井関教授の教室の方々の全面的な協力が得られた。記載して、謝意を表したい。

## 参考文献

- 1) 竹内 勤、田辺将信、浅井隆志、小林正規、三浦左千夫、井関基弘、塩田恒三、山浦 常、木村 哲；平成11年度エイズに伴う日和見原虫感染症に関する講習会開催について。厚生科学研究費補助金エイズ対策研究事業、HIV感染症に関する臨床研究、平成12年3月、pp177-190.
- 2) 竹内 勤、田辺将信、浅井隆志、小林正規、三浦左千夫、井関基弘、塩田恒三、山浦 常、木村 哲；日和見原虫感染症の治療に関する研究—平成12年度「エイズに伴う日和見原虫感染症」に関する講習会開催について。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3月、pp157-159.

資料1-1 講習会の実習用のテキスト（赤痢アメーバ、トキソプラズマ、クリプトスポリジウム、ニューモシスティス）

「HAART時代の日和見合併症に関する研究班」 主催日和見原虫感染症の講習会  
実習資料

赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*)、大腸アメーバ (*Entamoeba coli*)

1. *Entamoeba histolytica* (赤痢アメーバ) 栄養型

ロビンソン培地の管底から一滴スライドグラスにとり、カバーグラスをかぶせて検鏡する。はじめ弱拡大で大きさ(12~30 $\mu$ m)、光沢をよく記憶する。強拡大では外肉、内肉、運動の状況をよくみる。培地には米粉が加えられており、顕微鏡下に多数観察される。アメーバはこれを活発に食食しており、取り込まれた米粉とアメーバ内オルガネラとを間違えない様よく注意して観察する。

2. *Entamoeba histolytica* (赤痢アメーバ) 嚢子

材料はアメーバ症患者の糞便中に排出された赤痢アメーバ嚢子をホルマリン固定したものである。これをスライドグラスに一滴とり、カバーグラスを載せて検鏡する。嚢子は青白い光沢を持った屈折性の球形の物体(10x 15 $\mu$ m)として観察される。まず弱拡大で検鏡し、みつかったら強拡大になおして観察する。類染色質体が存在するものもある。嚢子の大きさと光沢の具合をよく観察する。ついでヨード・ヨードカリ液(ヨード1.0g、ヨードカリ2.0g、水50cc)を1滴滴下し染色する。この標本で核をはっきり見ることができる。また、核分裂のすすんでいない嚢子ではグリコーゲン胞をみることがある。

3. *Entamoeba coli* (大腸アメーバ) 嚢子

赤痢アメーバ嚢子と全く同様にして観察。赤痢アメーバより一般に大きな嚢子(15 x 30 $\mu$ m)がみられる。核内のカリオソーム及び核膜下クロマチン顆粒の状態、嚢子の大きさ、核の数等について大腸アメーバと赤痢アメーバとを比較し両者の区別を行う。

4. アメーバ性大腸潰瘍の組織切片標本 (モルモット)

初期の病変は粘膜下組織にアメーバの増殖がみられ、粘膜表面の欠損部は狭く flask-shaped ulcer と呼ばれる潰瘍が特徴である。進行した病変では粘膜表面の欠損が拡大し灰白色の滲出液が表面を覆う。隣接した潰瘍と癒合しないこと、粘膜下病変との間に基部が存在することが特徴である。組織内に見られるのは栄養型のみで、周辺にハローが認められる。宿主側の反応としては、細胞浸潤が軽度であることがアメーバ症の特徴の1つである。

## トキソプラズマ (*Toxoplasma gondii*)

### 1. *Toxoplasma gondii* (tachyzoite)

- a) 生鮮標本：マウスを用いて継代維持している RH 株で、腹腔内を生理食塩水で洗ったものを観察する。Tachyzoite は三日月型で  $6-8 \times 2-3 \mu\text{m}$  のサイズで、運動性があり体をひねったりして少しずつ動くのが見られる。腹腔細胞（マクロファージ、リンパ球等）と大きさを比較する。
- b) Giemsa 染色標本：a) の sample を Giemsa 染色したもので、核や細胞内顆粒、さらには apical complex が観察される。

### 2. *Toxoplasma gondii* (cyst & bradyzoite)

- a) 生鮮標本：トキソプラズマ (Beverley 株) 感染マウスの脳の懸濁液をカバーガラスで圧平し観察する。シストは径  $20-50 \mu\text{m}$  の球形で中に bradyzoite がつまっている。
- b) Giemsa 染色標本：a) の標本を Giemsa 染色したものである。cyst 及び bradyzoite は紫色に染まって見える。

### 3. *Toxoplasma gondii* (oocyst)

ネコ糞便中の oocyst を観察する。径  $12-14 \mu\text{m}$  の楕円形で、immatur のものは sporoblast、mature のものは 2 個の sporocyst がみえ、中に各々 4 個の sporozoite を含む。

### 4. 急性トキソプラズマ感染ヒトリンパ節切片 (H E 染色)

急性トキソプラズマ感染によるリンパ節症を示す患者のリンパ節標本である。肉眼的にはリンパ節腫大がみられる。組織学的にはリンパ小節周辺部及び髄索にエオジン好性の大きな細胞質を持つ類上皮細胞 (RES 系細胞) の増生を示す細胞集塊が多数認められる。

講習会「エイズに伴う原虫感染症」

クリプトスポリジウム症の検査（実習）

金沢大学大学院医学系研究科  
寄生虫感染症制御学  
井関基弘

クリプトスポリジウム症は激しい水様下痢を主徴とする。免疫機能が正常な患者では1～2週間で自然治癒するが、HIV感染者やエイズ患者のように免疫機能が低下している場合は下痢は年余にわたって持続し、感染部位も腸管にとどまらず、胆管、胆嚢、膵管、呼吸器にまで拡がり重症になる。現在、本原虫症に有効な治療薬はない。エイズの感染症として重要である。

診断には糞便検査でオーシストを検出すればよい。今回の実習では下記の4方法のうち1～3を実施する。

1. 簡易迅速蔗糖浮遊法
2. 蔗糖遠心浮遊法
3. 抗酸染色法
4. 直接蛍光抗体法

試薬の調製や手技、鏡検時の注意点などについては、出版社の許可をえて、次頁以下に示した。