

柱3：耐性ウイルスの克服

AK602は試験管内で強力な活性を示し(IC50:0.2nM)、既存の抗HIV剤(RTI, PI)との交差耐性を認めず、動物モデル(thuPBL-NOD-SCIDマウス)の系でも強力な抗HIV活性を示した。AK602は非常に強力なCCR5に対する結合親和性(K_d値: ~3 nM)を持ちながら、CCR5への結合にはわずかしかな影響を与えず、RANTESがCCR5を介してもたらす生理的作用(chemotaxisやCCR5のinternalization)についても完全には阻害しないことが分かった。構造学的解析からAK602が既存のCCR5阻害剤の結合部位と異なる部位に結合、その中でもextracellular loop 2の両端に位置するアミノ酸(G163とK191)が結合に重要であることを示した(満屋)。CCR5プロモーターをDBP(日内変動の影響を受ける転写因子)が活性化さ、CCR5の発現も概日リズムを取る。また、RANTES(CCR5 agonist) + 少量の抗CD3抗体の刺激は、HAARTでウイルスが検出限界以下となった患者の末梢血単核細胞からのウイルス発現を促した。しかし、これらの影響はAK602では軽微であることも示唆された(森内)。

柱4：免疫賦活を応用した現状の治療の進展

STIに関しては、2004年1月現在、14例が治療を完遂、中断・脱落例10例、2例が治療進行中である。17例中4例は、治療終了後6~12ヶ月後の平均HIV-RNAが10,000copies/ml未満と比較的低く抑えられていた(岡)。ウイルス抑制の見られた成功例では、CTLも誘導できていることが確認された(滝口)。IL-2免疫賦活療法も順調に経過している(岡)。HAARTによる免疫再構築は、観察期間を延長することにより、自己由来HIVに対する液性免疫応答が回復する症例が増加した。またこのような症例では、ヘルパーT細胞反応の再構築も起こることを示した(松下)。

4. 考察

柱1に関しては、本研究で初めて行ったエイズ悪性リンパ腫に対する免疫賦活療法の結果として、症例血液中のEBVに対するCTL数が健常者レベルまで回復していること、症例血漿中EBVDNA量が低値に抑えられていること、などLAK/免疫療法の寄与を示唆する所見も得られている。さらに臨床評価を綿密に行い、2例目以降にも期待したい。

柱2に関しては、防御免疫においてIFN- γ を含むTh1サイトカインの重要性が報告されている。我々は血中サイトカインは測定がIRS発症の簡便で迅速な予知検査となる可能性を検討し

た。さらに症例を増やし検討を続けたい。

柱3に関しては、CCR5の構造学的解析を更に発展させることでCCR5のどの部位がHIV感染に特に重要であるか、さらにはどのような特徴(構造)を有する化合物がHIV特異的なCCR5阻害を来す可能性があるかといった具体的な知見を得ることが可能と考えられる。

柱4に関しては、STIの成功例では、免疫学的にも裏付けられる結果が出ており、確かに一部には有効例のあることがわかった。今後その差につながる因子の解析が重要となろう。HAARTの問題点が明らかになり、何らかの免疫療法の開発が期待されている。有効なHAARTの継続により、細胞性・液性の免疫応答が回復する症例があることを示した。

5. 自己評価

1) 達成度について

一部、前回のHIV治療班からの継続研究と、今回からの新規のものが含まれる。継続研究については、ほぼ予定通りの速度での研究の進展が行っている。新規分については、今後の進展が期待される。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義

LAK/免疫療法はAIDSリンパ腫のもつ感染症的側面に注目した非常にユニークな研究であり、その評価方法も含め世界的にも初の試みと考えられる。CCR5標的療法がHAARTに組み込まれる時代が到来しつつあり、この発現や機能に関わる知見の拡大は大きな意義を有する。長期間HAARTが有効な症例に関するHIV特異的ヘルパーT細胞の再構築に関する報告はきわめてユニークなものである。

3) 今後の展望について

すべて新しい治療法を模索する研究であり、今後の治療法の発展に寄与することが期待できる。

6. 結論

これらの4つの課題が克服されることにより、現状のガイドラインベースでの治療の一步先を行く新しい治療法開発が期待できる。

7. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

なし

研究課題名: HIV-1遺伝子を広域に持つ新規SHIVとサルを用いたエイズ治療薬開発の研究

課題番号: H15-エイズ-002

主任研究者: 井戸 栄治 (京都大学ウイルス研究所 助手)

分担研究者: 伊吹 謙太郎 (京都大学ウイルス研究所 助手)

1. 研究目的

エイズ治療については、この数年の間に HAART 療法などが開発され、光明が見えたかに思えた。しかし、この療法では確かに延命はできるものの、高価な薬剤を大量に摂取し続けねばならず、副作用の問題や投薬を止めれば新たにウイルスが再増殖し始め、しかも通常の薬剤では抑えることができないという多剤耐性株の出現の問題、さらには治療中の免疫系再構築の間に既存の日和見感染症が悪化するいわゆる免疫再構築症候群などの問題が指摘されている。治療薬自体の開発が押し進められるべきであることは言うまでもないが、種々の治療薬の最適な組み合わせの探索を始めとして、他の抗ウイルス活性物質あるいは免疫システム自体を活性化する薬剤との併用など、従来試みられていない実験的療法の開拓が強く要望されている。しかしながら、人を対象としてそのような治療効果が保証されない、場合によっては症状増悪のリスクが否定できない実験的治療を安易に試みることは倫理的に許されない。そこで本研究では、先ず、前臨床の基礎研究として、人に近い動物であるサルを用いてエイズ治療法を実験的に開拓する系を確立することを目的とする。次にその系を用いて、種々の薬剤や新たな治療法の効果判定を行い、人のためのより良い治療法を提示することを最終目標とする。

2. 研究方法

人への治療法として提示するためには、薬剤の標的がエイズの病原ウイルス HIV-1 そのものであることが望ましい。ところが HIV-1 は、ヒト以外にはチンパンジーなど一部の例外を除いて、通常の医学実験用のサルには感染しない。そこで我々は、HIV に類似のサルウイルス(SIV)と HIV-1 とのキメラウイルス(SHIV)を作成し、これとサルを用いてエイズの病態を研究してきた。しかし、従来サル感染実験に用いられた SHIV は、主に env 遺伝子とその周辺付属遺伝子のみが HIV-1 由来で、その他は SIV 由来であるものに限られていた。これでは人への治療薬の効果判定に適してはいない。なぜなら、市販されているウイルス複製阻害剤の中には、AZT のようにレトロウイルス全般に効く薬剤もあるが、NNRTI のように HIV-1 の pol 遺伝子産物を特異的に標的としているものも多いからである。そこで我々は、pol 遺伝子が HIV-1 由来である新規の SHIV を作成することにした。研究開始初年度は、1) HIV-1 の protease (PR) を持つ SHIV(SHIV-pr)のアカゲザル感染実験と PR 阻害剤の効果判定、2) pol の RT と INT 領域及び env を HIV-1 由来にした SHIV(SHIV-rti/3rn)の作成とサル感染実験に重点を置いて研究を行った。

(倫理面への配慮)

本研究では、治療薬開発にサルを用いている。従って差し当たって人権上の問題は該当しない。実験動物としてサルを使用する点については、動物愛護の配慮を怠ることなく主任研究者の所属する京都大学ウイルス研究所のサルの飼育と使用に関する委員会(通称「霊長類委員会」)に定める規定・指針に則して研究を行っている。

3. 研究結果

1) HIV-1のprotease (PR) を持つSHIV(SHIV-pr)のアカゲザル感染実験とPR阻害剤の効果判定

SHIV-prは、クローン化されたSIVmac239株のゲノムに、HIV-1 NL432株のPR遺伝子を組み込んだウイルスである。このプロウイルスプラスミドを培養細胞にトランスフェクションすると、Gag蛋白質は親株と同じように切断され感染性のウイルスを産生することが分かった。10⁵ TCID₅₀ のSHIV-prをアカゲザルに静脈内接種したところ、血中ウイルス量は接種後2週目で10⁵ copies/ml程度にまで上がり、その後10³~10⁴ copies/mlと低いながら半年以上の長期に渡りウイルスを産生し続けることが明らかとなった。さらにこのサルからウイルスを含む血漿を新たなサルに継代したところ、ウイルス量も安定して10⁵ copies/ml程度の持続感染状態になることが判った。次にこれらのサルにPR阻害薬カレトラ(ロピナビルとリトナビルの混合カプセル)の中身を水に懸濁して4週間毎日経口投与(1カプセル分/日/頭)したところ、試みた3頭いずれも10³ copies/mlあるいはそれ以下に血中ウイルス量が減少した。対照的にSHIV89.6pが感染しているサルの場合、薬剤投与の効果は全く見られなかった。

2) pol の RT と INT 領域及び env 全体を HIV-1 由来にした SHIV-rti/3rn の作成とサル感染実験

これまでに RT と env 全体を HIV-1 由来にした SHIV-rt/3rn がサルに感染することは、我々がすでに報告している(J Gen Virol, 2003)。今回はより HIV-1 由来の領域を拡大することを目指して、それに加えて pol のインテグラーゼ (INT) の領域も HIV-1 由来にした SHIV (SHIV-rti/3rn) を作成した。しかし、このウイルスは cell line では増殖するものの、アカゲザル PBMC での増殖が微弱で検出限界に近かった。そこでサルの cell line である HSC-F 細胞で約半年間パッセージを繰り返して、再度感染増殖能を調べた結果、アカゲザル PBMC での増殖が良くなっていることが判明した。このサル細胞馴化ウイルスをアカゲザルに接種したところ、ピークのウイルス量は 10⁴~10⁶ copies/ml となり、抗体応答、PCR の成績からサルに感染することが明らかとなった。

4. 考察

SHIV-pr感染サルのカレトラ投与実験において、ウイルス量が顕著に下がったことは、本SHIVとサルを用いて、PR薬剤の *in vivo* 評価が現実可能であることを示している。一方、SHIV89.6pに対して同薬剤の効果が現れなかったことは、それに含まれているPR阻害剤がHIV-1用に開発されていることから不思議はない。ただし、PR阻害剤は *in vitro* の実験に関する限り、HIV-2やSIVなどの2型のウイルスにもある程度は効くと言われている。SIVのプロテアーゼを持っているSHIV89.6pが何故多少とも反応しなかったのかは不明である。酵素レベルでは阻害されても、ウイルスになると薬剤に対して反応しにくくなるという特質が現れた可能性も考えられる。

なおサルに薬剤を投与する実験は、動物が相手であり、味が苦い、においがするなどの理由により、サルが受けつけないことがあることを学んだ。なるだけ人に近い条件下で薬剤評価を行うために、注射によらず経口投与に限りたいたいと考えているが、今後薬剤によっては投与方法の改良も必要と考えられた。

SHIV-rti/3mのサル感染実験でHIV-1由来の領域を一段と拡大できた。馴化の際にどのような変異が起こったのかを解析してみたところ、ゲノム全体で9ヶ所核酸配列が変わっていた。いずれもアミノ酸置換を伴う変異で、その大半(7ヶ所)はenvに生じていた。予測していたintegrase部分には変異はなく、サル細胞種特異性を獲得したというよりは、感染吸着侵入レベルでウイルスの性能がアップしたものと考えられた。

いずれにせよ HIV-1 由来の遺伝子領域を拡大した新規 SHIV が、サル個体内で感染増殖することが分かった点は大きな前進である。現時点では未だ増殖力が弱いものも、今後 *in vivo* 継代などにより、さらに強いものに改良できるであろう。何よりも、現在世界で使用されているどの SHIV よりも HIV-1 に近いウイルスとサルによる新しい動物モデル系ができたことに意義があると考えている。

5. 自己評価

1) 達成度について

当初計画の研究プランはほぼ予定通り進行しており、結果も期待したものが得られているので、まずまずではないかと思っている。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

現在世界中の研究者らに使用されている SHIV の遺伝子構成は、当グループが 10 年程前に発表した SHIV のそれと基本的に同じもので、env 遺伝子とその周辺のみが HIV-1 由来である。唯一ドイツの Ubela 博士のグループが、RT 遺伝子を HIV-1 由来にした SHIV を報告しているが、これより領域を拡大したというニュースは聞いていない。こうした中、我々は一段と HIV-1 の領域を拡張することに成功しており、当面世界の先端を走る仕事ができるのではないかと自負している。

3) 今後の展望について

HAART 療法では PR と RT の阻害剤が同時に複数使われている。これまでのサル感染実験では、PR と RT が共に HIV-1 由来の SHIV を接種していないので、それを行う予定である。HAART で最も望ましい薬剤の組み合わせは何かという実験的探索や耐性変異の入り方の詳細な解析など、ヒトに先行する研究をしたいと考えている。またウイルス増殖阻害剤の単剤としての効果判定も重要であるが、中和抗体を含めて抗ウイルス活性のある他の物質や免疫系自体を活性化する薬剤との併用による新しい治療法の効果判定をやってみたいと考えている。今後そうした効果が期待できる物質・薬剤等の *in vitro* レベルの選定も平行して進めていく予定である。

また、これまで我々の研究室で使用してきた SHIV は、新規 SHIV を含めて HIV-1 部分に NL432 株の遺伝子を使用しており、こうして作成した SHIV は、サルに感染・増殖するものの病原性が極めて弱いことが分かってきた。エイズ治療薬の開発には発症する系の方が望ましいので、当初計画に追加して強毒性 SHIV の分子クローン(たとえば SHIV-C2/1)との組み合わせも試みる予定である。

6. 結論

まだ研究の第一段階であり、結論を出すのは早すぎると思われる。しかし、少なくとも当初計画の実験は比較的順調に進行しており、SHIV-pr がサルに感染することが明らかとなり、薬剤に反応したウイルス動態を見せたことは、本 SHIV とサルの系が開発中の PR 薬剤の評価に有用であることを示している。また INT が HIV-1 由来である SHIV-rti/3rn が同じくサルに感染することが明らかとなったことは、現在開発が進められているインテグラーゼ阻害剤の評価にも使えると同時に、より HIV-1 に近いウイルスとサルによる新しい動物モデル系が完成する道が開けたものと考えられる。

7. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

中島俊洋、中丸健治、長谷川 護、速水正憲、井戸栄治

「2つの外来遺伝子を発現させるためのベクター」
現在申請中 (特願平 11-175646、日本; D3-008PCT-CA、カナダ)

研究課題：HIV 感染症の治療開発に関する研究

課題番号：H15・エイズ・003

主任研究者：岡田 則子（名古屋市立大学大学院医学研究科 助教授）

分担研究者：金田 次弘（国立名古屋病院血液免疫研究部 室長）、岡田 秀親（福祉村病院長寿研 所長）

1. 研究目的

HIV 感染細胞に反応するヒト IgM 抗体(9F11 等)を作成した。これらのヒト抗体は HIV が感染した株化培養細胞に補体と共に働いて細胞障害を起こすことができる。そこで、これらのヒト抗体が HIV 感染患者の血液に含まれる感染細胞や潜伏感染細胞を障害除去できる可能性を検証する。また、Nef が慢性感染細胞の細胞膜上に発現していることを示す知見も得たので、Nef に対するヒト IgM 抗体も同時に作用させたときの相乗効果も検討する。患者リンパ球から潜伏感染細胞を除去できれば、抗 CD3 抗体と IL-2 で刺激増殖させた LAK-T リンパ球を治療に応用する為の基礎的知見も集積する。補体反応に起因する過剰炎症副作用の制御も想定して炎症抑制ペプチド剤の応用も検討したい。

2. 研究方法

9F11が反応する抗原分子を特定する。HIV感染細胞から作製したcDNAライブラリーを発現ベクターに組み込み、大腸菌等に導入発現させ、9F11抗原のcDNAを9F11抗体でスクリーニングする。また9F11抗体を感染細胞に反応させたあと、抗体と抗原をリンカーで化学結合させて抗原抗体複合物を抽出精製し、二次元電気泳動法で解析する。HIV感染患者の末梢血リンパ球（必要に応じてCD8陽性細胞は除去しておく）の初代培養に9F11等と新鮮ヒト血清補体を添加することによる感染リンパ球の排除を検討する。Nefに対するヒトIgMモノクローナル抗体の活用も試みる。また、患者末梢血やリンパ節等の潜伏感染細胞等でのNefの発現をフローサイトメトリー法や免疫組織染色

法等も用いて解析する。IgM抗体等で感染細胞を排除する上記の試験管内実験においてAZTなどの化学療法剤の添加による乗効果も検討したい。HIV感染患者の末梢血リンパ球をCD3に対する抗体で刺激したあとIL-2で増殖させてLymphokine Activated Killer T cellsを作成するとき、9F11等の抗体を活用して慢性感染細胞を完全に排除する条件を探究する。IgM抗体を大量に作製する為、抗体遺伝子をCHO細胞などに導入し、遺伝子組換え抗体の作製も試みる。また、過剰な補体反応による副作用の可能性に対処するため、C5a阻害ペプチド等の活用法も検討する。

（倫理面への配慮）

HIV 感染患者の末梢血を用いての解析に際しては、倫理委員会の承認のもとに、実験目的などを明確に説明して、書面による同意を得た上で実験を実施する。その際、得られた個人情報が守られるよう慎重に配慮する。

3. 研究結果

9F11と反応するタンパク質をコードする遺伝子を同定した。70 k Da の細胞内シグナル伝達に関わる分子として報告されていた分子であるが、細胞膜表面上に現れることは知られていなかったため、新たな発見である(分子名は P70 と仮称)。しかし、感染細胞抽出液の Western ブロットでは 70 k Da のほかに 30 k Da に強いバンドが認められ、30 k Da の分子の同定が必要である。9F11 は HIV 感染細胞以外に、HTLV-I 感染細胞である MT2 や MT4 細胞株にも強い反応性を示し、補体存在下でそれらの細胞も溶解した。HTLV-I 感染細胞にも上記

30 k Da タンパク質の強いシグナルが検出された。HIV 感染患者末梢血リンパ球についての解析は、倫理委員会の認可に手間取ったことと、初代培養リンパ球からの HIV-RNA の安定した検出定量法の確立が容易でなかったため、9F11 による抑制効果を確認できるには至っていない。12月の国際研究会議において、5週間培養すると HIV-RNA の産生が立ち上がってくるとの報告があったので、その方法を活用した解析を開始した。Nef に対する IgM 抗体 CF8 のハイブリドーマをクローニングして感染細胞に反応性の高い産生株を得た。過剰補体反応で起こりうる副作用の制御には C5a 阻害ペプチドが有用と考えられる知見を得た。

4. 考察

9F11 抗原は、HIV 感染により発現誘導されて細胞膜上に現れる分子であることがわかった。これは HTLV-I でも同様な現象起こることだったので、レトロウイルス感染に共通する現象の可能性もある。9F11 と反応する抗原分子は 70 k Da のシグナル伝達に関わる分子であるが、9F11 が反応する細胞には、30 k Da の抗原分子が検出され、その点に関する解析が急務と考えている。HIV 感染患者末梢血リンパ球に対する解析は容易でなかったため、来年度への継続課題として残った。また、HTLV-I 感染細胞に 9F11 が反応して細胞溶解を起こすので、ATL に対する治療抗体としての活用も期待できる。一方、9F11 などのヒト IgM 抗体を大量に産生するには、遺伝子組換え法による大量産生法の確立が必要と考え検討を開始した。

5. 自己評価

1) 達成度について

9F11 抗原の遺伝子を同定できたことは、今後の展開に大きく貢献できる。また、HTLV-I 感染細胞にも 9F11 が反応することがわかったことも大き

な成果と考えている。しかし、感染患者の末梢血リンパ球初代培養に対する有効性の解析は次年度に残された。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

9F11 抗原の cDNA を同定できたことは学術的・国際的に大きな成果である。また、9F11 が HIV だけでなく HTLV-I 感染症患者への治療抗体として活用できる可能性があることは社会的意義も大きい成果と考えている。

3) 今後の展望について

9F11 抗体が、HIV や HTLV-I 感染患者の治療に有用であることを明らかにするため、トランスレーショナルリサーチに向けて準備をするめたい。

6. 結論

9F11 などのヒト IgM 抗体が HIV や HTLV-I 感染患者の治療に有用である可能性が高まった。

7. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

① 特許第 3463143 号「糖鎖認識抗体及び HIV 感染症治療剤」（平成 15 年 8 月 22 日）特許権者：岡田秀親；発明者：岡田秀親、岡田則子

② 特願 2003-74316（平成 15 年 3 月 25 日提出）「HIV 感染細胞にアポトーシスを誘導するヒト IgM 抗体及び HIV 感染症治療剤」出願人：岡田秀親、岡田則子；発明者：岡田秀親、岡田則子；国際公開番号 WO2004/003021（2004 年 1 月 8 日）

③ 特願 2003-74312（平成 15 年 3 月 25 日提出）「活性化リンパ球を同種補体を介して溶解させるヒト IgM 抗体」出願人：岡田秀親、岡田則子；発明者：岡田秀親、岡田則子；国際公開番号 WO2004/003196（2004 年 1 月 8 日）

④ 9F11 抗原に関する特許出願を準備中。

研究課題：エイズ脳症の発症病態と治療法に関する研究

課題番号：H15・エイズ・004

主任研究者：出雲 周二（鹿児島大学医学部難治ウイルス研 教授・センター長）

分担研究者：

馬場 昌範（鹿児島大学医学部難治ウイルス研 教授）

森 一泰（国立感染症研究所主任研究員）

岸田 修二（都立駒込病院神経内科 医長）

船田 信顕（都立駒込病院病理科 部長）

宇宿功市郎（鹿児島大学大学院 助教授）

木戸 博（徳島大学分子酵素研究センター 教授）

清島 満（岐阜大学医学部 教授）

高宗暢暁（熊本大学大学院 助手）

1. 研究目的

HAART の導入により、リンパ組織崩壊の病態はコントロール可能となり、HIV 感染症は長期間コントロールしうる慢性疾患へと変貌している。しかし現在の3剤併用療法では脳症の治療としては不十分で、さらに本邦では新規感染者は増加の傾向が続いており、HAART による感染者の長期生存と合わせて、HIV 脳症への対応はエイズ対策の中での緊急の課題の一つとなっている。本研究組織は、HIV 脳症の病態の解明と治療法の開発をめざして昨年度まで3カ年の研究をすすめ、①HIV 脳症にはエイズの末期に亜急性に進行する脳症と、HAM と類似の病態による緩徐進行性の神経疾患としての HIV 脳症の独立した二つの神経傷害機構が存在すること、②全国疫学調査と HAART 導入前後の剖検例の比較検討により、HAART 導入によりエイズ脳症の病態が「エイズ末期の亜急性致死性脳症」から免疫不全を伴わずに発症する「緩徐進行性神経疾患」へ推移する可能性があること明らかにした。本研究では、この成果をふまえ、「HIV 脳症には独立した二つの神経傷害機構が存在する」という視点で、①我国での HAART 導入後の HIV 脳症及び他の神経合併症の詳細な実態を明らかにする、②それぞれの病態の発症機序を明らかにし、病態に則した診断法・治療法の開発を目指す、③増加が予想される HIV 感染者の将来の神経系病態を予測し、HIV 脳症発症予防の方策を探る、ことを目的としている。

2. 研究方法

本研究組織の柱として、1)エイズ脳症の臨床病態、特に本邦 HIV 脳症を含む神経合併症の動向、2)剖検例を用いた神経合併症の解析、3)エイズ動物モデルの開発とそれを用いた発症病態の解明、4)中枢神経障害予防治療薬の開発、5)HIV 脳症発症に関連する内的・外的要因の解析、の研究テーマを設定し、分担研究を行った。

HIV 脳症の臨床病態：

前回の全国疫学調査をもとに、抗ウイルス療法が HIV 脳症の発症・病態にどのように影響を与えるかについて検討した。特に独立した二つの病態それぞれの脳症の早期診断、治療の程度・有効性の判定に役立つ臨床的指標探索した。エイズ未発症者の神経症状・所見に重点をおいた第2次全国疫学調査を行い、HAART 治療下の HIV 脳症の臨床的特徴を解析することにより、我が国における HIV 脳症の全体像を明らかにする。

病理解剖例での神経病理学的解析：

日本における HIV 感染者の神経病理の基礎的資料を作成することを目的に、駒込病院で行われた HIV-1 陽性剖検例について HAART 導入前後での神経病理像の変化について検討した。また、ウィーン大学の多数の剖検例について Budka 教授より剖検標本の提供を受け、我国の症例と比較することにより、HIV 感染症における神経合併症の我が国の実態と今後の動向を明らかにする。その結果と臨床病態とを総合して、今後の HAART 治療下の HIV 脳症の動向をさぐる。

動物モデルを用いた HIV 脳症の発症機序に関する研究：

1)サルエイズモデルで、大脳白質の炎症性病態と大脳皮質の変性病態を区別して病理組織解析を行った。大脳皮質の変性病態については T 細胞指向性ウイルス感染サルを用いて、免疫不全の程度、ミクログリアの動態、ウイルス感染細胞の同定とウイルス蛋白の発現の有無、細胞死のマーカーの発現動態を検索した。炎症性病態についてはウイルス抗原に対する免疫動態を知るために、病変中のウイルス感染細胞の局在と量、病巣での免疫担当細胞の動態、サイトカインや接着因子の発現、免疫応答の標的となっているウイルス分子の同定など、生体の応答をみるために、マクロファージ指向性ウイルスの早期感染動態の解析を計画した。

2)マウスエイズモデルで、行動薬理学的手法により記憶障害の程度を、さらに行動薬理試験終了後に脳症発症に関係する脳内キノリン酸、グルタミン酸、PAF など脳内生理活性物質について測定し、記憶障害との関連について検討した。

中枢神経障害予防・治療の薬剤の開発：

HIV 脳症では慢性感染しているミクログリア/マクロファージから産生される GP120 や Tat などのウイルス抗原やサイトカインなどが、中枢神経細胞に障害に関与していると考えられている。そこで、慢性感染マクロファージからのウイルス抗原の産生抑制をパラメーターとして、各種薬剤の抗 HIV-1 効果について検討した。また、細胞外 Tat 活性抑制を目指して、Tat 分子内に存在する特徴的な構造で、Tat の転写活性に必須で高度に保存されている cysteine-rich 領域に着目し、細胞外 Tat 活性制御のための分子内標的部位として本領域の有用性を検討した。

発症に関わる内的・外的因子の検索：

我々がこれまでの研究で得た HAM 発症に関連するウイルス因子、種々の宿主因子の機能と病態への作用機構のデータを HTLV-I 感染者、HIV 感染者間で比較し、2つのヒトレトロウイルス感染の神経病態への関与について、類似点・相違点検討した。具体的には HAM 発症に関連している HTLV-I プロウイルス量と HLA-A*02 に着目し、Tax の塩基配列の解析により感染ウイルスの祖先配列を求め、その祖先配列からの非同義置換 (dN) と同義置換 (dS) の置換距離を計算し、dN/dS ratio から、プロウイルス量および発症抑制宿主因子 (HLA-A*02) の HAM 発症に対する影響を考察した。さらに、HTLV-I プロウイルスの塩基置換パターンをデータベース上の HIV の塩基配列データと比較し、HIV 脳症発症機構解明への基礎データの収集を試みた。

3. 研究結果

HIV 脳症の臨床病態に関する研究：

前研究班の全国疫学調査の結果をふまえ、都立駒込病院の多数例を対象に、独立した二つの病態のそれぞれを臨床的に区別しうる指標を検索した。CD4 低下の以前での脳症発症や、脳症を発症して初めて HIV 感染者であることが判明した例の存在が確認され、その結果をもとに第2次全国疫学調査の調査票を作成中である。

剖検例を用いた神経病理学的解析：

1985年から2002年に駒込病院で行われた HIV-1 陽性剖検例は 97 例で、80 例が中枢神経系を含めた全身検索が可能であった。HIV 脳症は、HAART 導入前の 1985-1996 年 60 例の 28.3%、導入後の 1997-2002 年 20 例の 20.0%で、全体では 26.3%にみられた。HAART 以前の欧米からの報告と大差はなかった。進行性多巣性白質脳症あるいはリンパ腫が合併し、その病巣部に多数の HIV 陽性マクロファージが浸潤する例も認められた。日和見感染症では CMV 脳炎の頻度がもっとも高く、また、HIV 脳炎の約半数は CMV と合併しており、CMV 脳炎も中枢神経系障害には重要であった。

ウィーン大学剖検例の解析では 1987 年以降の剖検台帳の閲覧より、429 例の HIV 感染者の剖検例をピックアップし、その殆どで HIV 脳炎の所見が確認された。また、大脳白質よりも脳幹、特に橋で多核巨細胞を伴うミクログリア結節が高頻度に確認できた。多くの例で種々の合併脳病変が見られたが、純粋の HIV 脳炎症例 20 例を抽出し、脳病変の乏しいエイズ症例 5 例をコントロールとしてパラフィン包埋標本の提供を受けることができた。HIV 脳炎の程度と大脳皮質病変の程度とを比較検討し、HIV 脳症の 2 つの病態の存在を検証する。

動物モデルを用いた分子病理学的解析：

1) T 細胞指向性ウイルス SIVmac239 感染サルの大脳皮質変性病変の解析をすすめ、活性化ミクログリアが増加し、神経細胞周囲に接しているサテライトーシスの所見が高頻度に認められた。一部は Ki67 陽性で局所での分裂増殖を示し、グルタミントランスポーター EAAT-2 の発現が見られ、神経保護作用を示していると考えられた。TUNEL 法によるアポトーシス所見は神経細胞には見られず、周囲のグリア、特にアストロサイトが陽性であった。神経細胞の変性よりも前にアストロサイトの障害が生じている可能性を示唆する所見と考えられ、新しい視点での解析が必要である。

2) LP-BM5 ウイルス感染によりマウス脳内での TNF- α の合成はコントロールに比べ著明な増加が見られた。その際の Y-maze 等行動薬理学的指標の結果は、ウイルス感染群で明らかなマウスの記憶障害を示した。また、脳内キノリン酸、グルタミン酸、PAF 濃度は、非感染群に比べ有意に上昇していた。それに対し、TNF- α 遺伝子欠損マウスでは、LP-BM5 ウイルス感染により脳内キノリン酸濃度は有意な上昇が見られたが、グルタミン酸濃度、PAF 濃度は、非感染群に比べ有意な上昇は認められなかった。

エイズ脳症治療薬の開発：

HIV-1 潜伏感染単球系細胞株 OM-10.1 細胞をもちいての薬剤スクリーニングの結果、ナフタレン誘導体 JTK-101 に非常に強い抗 HIV-1 活性を見出した。慢性持続感染 T 細胞株 MOLT-4/IIIB 細胞においても非常に強い抗 HIV-1 効果を示し、PBMC などの HIV-1 急性感染細胞においては極めて強い抗 HIV-1 活性しか示さなかった。すなわち JTK-101 は HIV-1 慢性感染細胞において、非常に強力かつ選択的な抗 HIV-1 効果を有していた。HIV-1 mRNA 発現に対する JTK-101 の影響をリアルタイム PCR 法により調べ、JTK-101 は 1 nM の濃度において、HIV-1 mRNA 発現を薬剤非存在下のそれと比較して、50% 以上抑制した。以上の結果から、JTK-101 は感染細胞（特に慢性感染細胞）における HIV-1 遺伝子発現を制御している何らかの宿主細胞因子に作用していることが示唆された。その作用機序をさらに明らかにし、エイズ脳症治療薬としての可能性を探るため、DNA アレイを用いて各種遺伝子発現に対する影響を検討中である。

Tat の cysteine-rich domain である 20 から 41 残基に亜鉛 2 原子を配位させたペプチド Zn-Tat20-41 を特異的に認識する単クローン抗体 MAb 5A4 を作製し、LTR 転写活性、Jurkat 細胞のアポトーシス誘導活性を指標に、MAb 5A4 の全長 Tat に対する阻害効果を調べた。その結果、作出した単クローン抗

体 MAb 5A4 は Zn-Tat20-41-Multi-Pin-Block に特異的に結合し、そのエピトープに亜鉛が必要であることが示唆された。MAb 5A4 は培地中に添加した全長 Tat の示す LTR-/b-gal の転写活性を濃度依存的に阻害し、また Jurkat 細胞のアポトーシス誘導を阻害した。Tat の亜鉛結合 cysteine-rich domain が細胞外 Tat 活性発現のために重要で、細胞外 Tat 制御のための標的部位として有用であることが明らかとなった。

発症に関わる内的・外的因子の検索：

HAM 患者は HC に比べて dN/dS ratio が低く、生体内でのウイルスの複製が HC と比較して抑制されていることが示唆された。一方、発症に抑制的な HLA-A02 の有無については、HLA-A02 陽性 HAM 患者の dN/dS ratio が陰性者より低く、HLA-A02 陽性 HAM 患者においてウイルスの複製がもっとも抑制されていること、HLA-A02 陽性 HC の dN/dS ratio が陰性 HC より高く、HLA-A02 陽性 HC においてウイルスの複製がもっとも活発に行なわれていることが示唆された。HTLV-I プロウイルスの変異パターンはほとんどが転位 (transition) であったが、HIV-1 gag 領域においては、G→C の転換 (transversion) 変異も一定の割合で認められた。

HIV 脳症は、HIV ウイルス量の高い群、更には脳内でのウイルス抑制が低い群での発症が示唆されており、HIV と HTLV-I で変異ウイルスの塩基置換パターン之差が認められたことは、各々のウイルスの神経病態への作用機構の差を考える上で極めて興味深い。

4. 考察・自己評価

新たな組織でスタートしたが、ヒト症例を対象にした臨床的・神経病理学的解析に関して現在必ずしも順調に進んでいるとは言えない。ヒト症例の解析には種々の複雑な要素が関連してすっきりした結果が得られにくく、多数例の解析を必要とするが、前回の全国調査をふまえて基本的なデータは得られており、的を絞って解析をすすめる必要がある。剖検例についてウィーン大学症例の閲覧を通して比較的純粋な症例 25 例の標本の提供を受けることができたことは、HIV 脳症の発症病態解明、本邦例との比較などにきわめて有用で、精力的に解析をすすめたい。一方、動物モデルを用いた病態解析、治療薬の開発については順調な伸展が見られ、両者を融合した in vivo での解析へ発展させたい。

5. 結論

- エイズ脳症ではアストロサイトの障害が神経細胞の傷害に先行して生じている。
- エイズ脳症の発症に重要な慢性持続感染系で選択的に抗ウイルス活性を持つ JTK-101 を見出した。
- Tat の亜鉛結合 cysteine-rich domain は細胞外 Tat 活性発現に重要で、細胞外 Tat 制御の標的部位として有用である。

6. 知的所有権の出願・取得状況

出雲周二

蓮井和久、村田長芳、出雲周二。免疫組織化学染色による抗原の検出方法。出願人：鹿児島大学長 特願 2003-366044, 2003 年 10 月 27 日

馬場昌範

白石 充、馬場昌範、瀬戸雅樹、荒牧慶夫、神崎直之、宮本直樹、飯澤祐史。ベンゾアゼピン誘導体、その製造法および用途。出願人：武田薬品工業株式会社。特願 2002-229553, 2002 年 8 月 7 日出願。特開 2003-119191, 2003 年 4 月 23 日公開。

Imamura S, Hashiguchi S, Hattori T, Nishimura O, Kanzaki N, Baba M, Sugihara Y. Cyclic amine compounds as CCR5 antagonists. Assignee: Takeda Chemical Industries, Ltd. US 6,562,978 B1, May 13, 2003.

研究課題：HAART 時代の日和見合併症に関する研究

課題番号：H15-エイズ-005

主任研究者：安岡 彰(富山医科薬科大学医学部 助教授)

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 厚生技官(医師)、佐多徹太郎(国立感染症研究所 部長)、中村哲也(東京大学医科学研究所 助教授)、竹内 勤(慶應義塾大学医学部 教授)、斎藤 厚(琉球大学医学部 教授)、河野 茂(長崎大学大学院 教授)、北村唯一(東京大学医学部 教授)、古西 満(奈良県立医科大学医学部 助手)、池田和子(国立国際医療センター・エイズ治療研究開発センター, 調整官)

1. 研究目的

強力な抗 HIV 療法(HAART)により HIV 感染症の様相が変化したが、日和見感染症は再び増加の傾向にある。この背景には HIV と診断されないまま高度の免疫不全に至り日和見感染症を発症する患者が急増していること、HAART 失敗例の存在、さらに高度の免疫不全状態から抗 HIV 療法を開始した場合数ヶ月以内に日和見感染症を起こす免疫再構築症候群と呼ばれる病態が少なからずみられることがあげられる。このように日和見合併症のコントロールが現在でも重要な研究課題であることから、HAART 時代の今日的な日和見合併症への対処を検討することを目的とした。

2. 研究方法

本研究では、HAART 時代の日和見感染症として特に問題となっている点に絞って検討を行った。

1) 日和見感染症の動向と頻度の調査

「日和見感染症の治療に関する研究」研究班(主任研究者：木村 哲、平成 12～14 年)で行ってきた日和見感染症の動向調査を引き続き全国 HIV 拠点病院を対象に質問紙送付によるアンケート調査を行った。また日本の HIV 感染者の 10%弱を診療するエイズ治療・研究開発センター(ACC)において診療録を用いた retrospective な解析をおこなった。(安岡、源河)

2) 難治性日和見感染症の病態解明、治療方針の確立

a) 悪性リンパ腫、カポジ肉腫

悪性リンパ腫及びカポジ肉腫は HIV に合併する悪性腫瘍の代表疾患で、HAART 時代にも発生頻度が高く適切な治療方法が確立していない。ACC での治療成績を解析すると共に、日本に見られる悪性リンパ腫の特徴を解析し治療の方向性を検討した。(佐多、源河)

b) 進行性多巣性白質脳症

進行性多巣性白質脳症(PML)は JC ウイルスによる脳変性疾患であり、現在の所有効な治療法は確立していない。疑い例の診断を PCR などを用いて検討すると共に、ハイリスク患者の血液を用いて早期発見を行う試みを開始した。(北村(余郷))

c) 難治性・耐性真菌症

HIV に好発するクリプトコックス症は発症初期には非特異的所見しかみられず、診断時にはしばしば重症化し治療抵抗性である。同一由来 *C.neoformans* 株で病原性が増した菌から増加した要素を調べることによって病原因子を検討した。またクリプトコックス症での免疫応答を解析し、重症時における免疫療法の可能性について CpG-DNA を用いて検討した。(斎藤、河野)

3) 免疫再構築症候群の病態解明と回避の手段、発症時の対処

高度の免疫不全状態に陥った HIV 感染者に HAART を

導入すると、免疫の回復にもかかわらず開始後数日～数ヶ月以内に日和見感染症が発症/悪化することが知られるようになった。この発生頻度と疾患分布を調査し、併せて検出症例の集積を行いデータベースを作成した。また、臨床例の免疫応答を細胞レベルで検出疾患の定義と診断基準につながる要素を検討した。(中村、古西)

4) 頻度が高い AIDS 合併疾患についての診断・治療の標準化・診断技術移転法の解析

AIDS を発症した患者が HIV 専門ではない急性期型病院へ受診する頻度が増しているが、HIV に伴う日和見感染症の診断や治療に関する技術は、HIV 診療経験が浅い施設と専門施設との格差が大きい。治療についての症例の収集と専門医による討議を経て、最終的には標準治療集の作成を目標とし、初年度は症例の収集を開始した。また、特殊な診断技術として原虫感染症の診断技術向上のため規模を拡大した講習会を開催すると共に技術移転の方法について検討した。また HIV によく認められる疾患の診断方法がどの程度必要かについての調査を開始した。(源河、竹内、安岡、中村、古西)

5) 日和見感染症発症予防のための服薬指導

服薬が困難となり日和見感染症が発症する患者を減少させるためには薬剤の特徴を理解した服薬指導が重要である。抗 HIV 薬や日和見感染症予防薬の服薬について薬剤の特色やその副作用と服薬率との関連などの基礎的データの収集を行うと共に、効果的な指導方法を検討した。(池田)

(倫理面への配慮)

HIV 感染症は疾患の特殊性から患者のプライバシー保護には特段の注意が必要である。従って症例のデータ収集を行う際にはプライバシー保護に最大限の努力を行い、個人が識別できる可能性がある情報を完全に除去した上での取り扱いを徹底した。臨床研究や臨床検体の採取と利用、患者個人へのアンケートなどを行う際には各施設で倫理委員会に諮って承認を得た上、患者へ文書及び口頭で十分説明を行い任意の参加を得るよう徹底した。(PML の早期診断では参加施設の倫理委員会へ申請して行った。)

3. 研究結果

1) 日和見感染症の動向と頻度の調査

同一病院からの報告数で比較すると日和見合併症は HAART 導入の 1997 年以降、総数で微増傾向が認められた。個々の疾患比率でみると、特に大きな変動は見られないものの、悪性リンパ腫はこの数年増加していた。最近の日和見合併症発症患者の特徴として抗 HIV 療法を受けていない例(2002 年; 87.4%)、HIV 診断後 3 ヶ月以内の例(2002 年; 79.6%)が増加している点が上げられた。HAART 導入例では導入後 6 ヶ月以内の症例が 3 割を占

め、免疫再構築症候群による発症の割合が予想より高い可能性が示唆された。HAART 導入が日和見感染症増加の一因と推定され、今後より重視する必要があると思われる。ACC の症例で検討すると、発生数のみならず発症頻度も増加してきていることが明らかとなった(2002年 48.8 エピソード/100 人年)。

2) 難治性日和見感染症の病態解明、治療方針の確立

a) 悪性リンパ腫、カポジ肉腫

カポジ肉腫症例 25 例の検討では進行例の頻度が高く(腫瘍、免疫状態、全身状態いずれも進行と判断されるのが全体の 64%)、このうち 2 例は致死性の転帰をとっていた。2 例では HAART 導入後に後に増悪が見られ、カポジ肉腫でも免疫再構築症候群が発生していた。治療は非進行例では HAART 導入のみで改善していたが、進行例では HAART+ribosomal doxorubicin による化学療法が有効であった。また、HAART のまえに化学療法を先行させた例では免疫再構築様の悪化を認めず、治療の順序についてもさらに検討する必要が考えられた。

悪性リンパ腫は 14 例が認められ、このうち脳原発を除く 12 例を解析した。化学療法抵抗性例が多く、完全寛解となったのは手術と化学療法を併用した 1 例のみで、化学療法単独では一旦改善しても全例再燃していた。悪性リンパ腫の標準療法である CHOP から HIV 合併リンパ腫に有効と報告された EPOCH 療法を検討したが、欧米の報告とは異なり、治療抵抗性であった。

日本で見られる悪性リンパ腫は B 細胞性 diffuse large タイプがほとんどを占め、欧米の症例と病型が大きく異なることが明らかになってきた。EB ウイルス抗原陽性で LFA-1(leukocyte function-associated antigen-1)を高頻度に発現していることを明らかにした。LFA-1 は高脂血症治療薬の statin が結合することが報告されていたため、マウスでの実験を行ったところリンパ腫の apoptosis を誘導することが明らかとなった。治療応用が有望であり今後臨床試験も含めた検討を行う予定である。

b) 進行性多巣性白質脳症

進行性多巣性白質脳症(PML)の診断依頼が 47 件あり、このうち 4 検体で陽性であった。PML が進行して死亡した剖検検体を用いた検討では、調節領域の欠失と重複の程度により病変の進行が推測できた。PML の予後判定因子として血液を用いた事前診断が有用ではないかと考え、全国の共同施設とともに検討を開始した。

c) 難治性・耐性真菌症

免疫不全状態での *C.neoformans* 治療を考える上で免疫療法の可能性を検討した。免疫賦活刺激として CpG-DNA を検討し、実験的感染マウスで生存率の改善が確認された。しかし免疫抑制状態が高度の HIV 感染者では CD4 による活性化が不足した場合に有効であるかどうか今後検討が必要と思われる。また、*C.neoformans* を動物にパッセージすると病原性が増強するが、この現象を利用して病原因子を RNA サブトラクション法を用いて解析し、いくつかの因子を分離した。

3) 免疫再構築症候群の病態解明と回避の手段、発症時の対処

免疫再構築症候群の発症頻度調査を行い日和見合併症の 4 ~ 15%が関連しているとのデータが得られた。7 施設

で 171 例の IRS 疑い例が認められ、現在これらの症例を詳細に検討して IRS の特徴や診断基準作成を進めている。また IRS により非結核性抗酸菌症を発症した患者の液性及び細胞性免疫能の計測を試みたが、これまでには有意な変化は見られなかった。

4) 頻度が高い AIDS 合併疾患についての診断・治療の標準化・診断技術移転法の解析

原虫疾患診断のための講習会を開催すると共に、復習可能な教材として CD-ROM の作成や Web 上でのトレーニングシステム構築を進めている。そのほかの疾患についても症例の集積を進めている。

5) 日和見感染症発症予防のための服薬指導

治療成功のために服薬率の検討を行い、日和見感染症治療薬としては ST 合剤でアレルギー発症が、抗結核薬では HAART 薬との相互作用が問題となっていた。HAART 失敗例では modified DOT(Directly Observed Therapy)を検討し、自己服薬ではコントロール困難な 11 例中 9 例で順調なコントロールが得られた。うち 2 例では DOT を終了後も良好な服薬習慣獲得が可能となった。

4. 考察

本年度の検討で、HAART が一般化した後も日和見感染症や悪性腫瘍が重要な合併症として HIV 感染者の治療や予後に大きな影響を与えていることが改めて明らかとなった。特に免疫再構築症候群が施設によっては合併疾患の 15%にも達するということは本症候群のコントロールが従来考えられていた以上に重要であることを明らかにした。本研究では悪性リンパ腫やカポジ肉腫の治療に一定の方向性を見いだしつつあり、またクリプトコックス症にも新しい治療方向を示すものとなっている。今後これらの成果をさらに進めつつ、HIV 診療では一般的だが一般病院ではまれな疾患を適切に診断治療する方策についてより具体的な検討を進めていく予定である。

5. 自己評価

1) 達成度について

初年度であり基礎的準備に時間を要したが、当初予定していた研究項目について着手し一部ではすでに有用なデータが出てきており、おおむね達成したと考えている。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

未だ最終成果には至っていないが、悪性リンパ腫やカポジ肉腫、免疫再構築症候群の病態とその診断基準作成の基礎データとなるものとして意義のあるデータが収集されつつある。特に悪性リンパ腫は日本で見られるものは世界の動向とは異なっており国際的にも意義の大きいデータと思われる。普遍的疾患の診断技術移転や標準治療指針の策定は日本の HIV 医療レベル向上に役立つものとなると考えている。

3) 今後の展望について

上記の点をより推し進め、実効あるデータとしていきたい。

6. 結論

HAART 時代の日和見合併症の問題点と特徴を明らかとし、今後の治療指針の策定を検討した。

7. 知的所有権の出願・取得状況

現時点では特記事項なし。

研究課題：HIV 感染症に合併する肝疾患に関する研究

課題番号：H15-エイズ-006

主任研究者：小池和彦（東京大学医学部 助教授）

分担研究者：高松 純樹（名古屋大学医学部 教授）、菅原寧彦（東京大学医学部 助教授）、四柳 宏（聖マリアンナ医大 講師）、森屋恭爾（東京大学医学部 講師）、西田恭治（東京医科大学病院 助手）、菊池 嘉（国立国際医療センター・エイズ治療研究開発センター 医長）、茶山一彰（広島大学医歯薬学総合研究科 教授）、髭 修平（北海道大学医学部 講師）、正木尚彦（国立国際医療センター 医長）、加藤道夫（国立病院大阪医療センター 医長）、酒井浩徳（国立病院九州医療センター 医長）

1. 研究目的

1995年の多剤併用抗レトロウイルス療法 HAART (highly active anti-retroviral therapy)の登場以降、HIV 感染者の予後は著しく改善してきている。このことによつて、HIV感染者の死因も従来に比べて大きく変化してきている。たとえば、米国のCHORUS (Collaborations in HIV Outcomes Research-United States) databaseによると、1997年8月から2000年12月までに135人のHIV(+)患者が死亡したが、AIDS関連死（たとえば 非定型抗酸菌症、カリニ肺炎、サイトメガロウイルス感染症などの日和見感染症による死亡）は約半数にとどまり、非AIDS関連死が約半数であった。そして、非AIDS関連死の90%が肝疾患関連であり、多くは慢性C型肝炎ウイルス（HCV）感染症による死と報告されている。我が国においても全く同様な傾向が見られ、肝疾患、特にC型慢性肝炎とその合併症による死亡が増加し、HIV感染者の死因の約半数を占めるようになってきている。したがって、HIV感染者に合併した慢性HCV感染症をいかに治療するかは、最大の懸案事項であり、治療法を確立することが急務といえる。また、HIV感染者に合併したB型肝炎もHAARTの遂行上大きな問題となっている。私達は、これまで厚生科学研究費補助金エイズ対策事業「日和見感染症の治療に関する研究」班の分担研究者として、HIV感染者に合併する慢性HCV感染症の治療法の開発を目指してきた。これを更に発展させ、治療法の改良を図ることを目的とする。

2. 研究方法

- 1) 我が国における HIV 感染症に合併するウイルス肝炎の実態を把握するためのデータベースを作成する。
- 2) HIV 感染症に合併するC型肝炎に対する（ペグ）インターフェロン・リバビリン併用療法を中心とした抗ウイルス療法をデザインし実施する。
- 3) HIV 感染症に合併するB型肝炎に対する予防法・管理法・治療法を検討する。
- 4) HIV・HCV 重複感染症に対する生体肝移植を念頭において、肝移植ドナー選択のための評価法の開発、より安全なドナー肝手術法の開発を図る。
- 5) HIV 感染症患者の多数存在する全国の施設における HIV 感染症診療医と肝臓病専門医との連携強化を強化し、HIV 感染症に合併する肝疾患の診療の向上を図る。

3. 研究結果

- 1) HIV 感染症に合併するウイルス肝炎の実態を把握するため、全国拠点病院に対して HIV・HCV 重複感染症に関するアンケート調査を行った。現在、回収されたデータを解析中である。
- 2) HIV 感染症に合併する慢性C型肝炎に対して、インターフェロン・リバビリン併用療法およ

びペグインターフェロン・リバビリン併用療法を実施している。長期成績については、まだ数が揃わず解析できていないが、中間評価では HCV 単独感染症の場合に比して治療効果はやや低い傾向がある。

3) HIV 感染症に合併する B 型肝炎に対して、HB ワクチン投与等の予防法を検討中である。また、性感染症としての急性 B 型肝炎に関して、最近の我が国における HBV genotype の趨勢について検討中である。

4) HIV・HCV 重複感染症に対する生体肝移植ドナー選択・適応決定のための評価法の開発、より安全なドナー肝手術法の開発を図っている。H15 年度は HIV・HCV 重複感染症の 2 例が移植を検討されたが、うち 1 例で肝移植が施行された。

5) HIV 感染症患者の多数存在する全国の施設における肝臓病専門医と HIV 感染症診療医との連携強化を図るため、新たに 5 名の肝臓診療医に班員として加わっていただき、診療および班としての対策に加わっていただいた。

4. 考察

HIV 感染者は全国拠点病院のうち首都圏、大都市の一部病院に集中する傾向が顕著である。HIV・HCV 重複感染症についても同様であり、これらの病院における HIV 感染症診療医と肝臓疾患診療医との連携を強めて行くことが重要と思われる。この目的のため、全国の HIV 感染例受診の多い 5 施設から肝臓疾患診療医に当班に班員として加わっていただき、HIV・HCV 重複感染症の診療体制の強化を図った。

HIV 感染症に合併する C 型肝炎に対する（ペグ）インターフェロン・リバビリン併用療法については、継続して治療を行なっているが、その治療成績の中間評価は概して良好とはいえない。その原因は明らかではないが、やはり通常の慢性 C 型肝炎患者に比して HCV 量が 0.5-

1.0 オーダー高いことが原因のひとつと考えられる。より長期間の投与等の工夫が必要と思われる。また、副作用は通常と同等かそれ以上に強いと考えられた。

HIV・HCV 重複感染症に合併する末期肝硬変・肝がん症例に対する生体肝移植の適応を、症例ごとに評価を行ない実施してきている。H15 年度は 2 例について検討が行なわれ、うち 1 例で実際に移植が施行された。残りの 1 例は肝予備能に比較的余裕があることもあり、当面移植は延期された。やはり、生体肝移植においてはドナー選択が最大の問題となっている。

5. 自己評価

1) 達成度について

当初設定した 3 本の目的に加え、肝臓病専門医と HIV 感染症診療医との連携強化という目的を年度途中から追加した。班研究の 1 年目として、ほぼ各項目について、目標通りに検討・診療・組織編成が実行されてきており、今後の成果が期待できると考える。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

肝疾患を合併する HIV 感染者の診療において、社会的な意義は大きいと考えられる。特に、末期肝疾患例に対する肝移植は、最近特に切実な問題となってきており、その意義は大きいと考えられる。

3) 今後の展望について

抗 HCV 療法に関しては、より効果的な方法の模索が必要かと思われる。生体肝移植に関しては、末期肝疾患例について、具体的な適応基準の設定を行なう必要がある。

6. 結論

HIV 感染症に合併する肝疾患について、特に C 型肝炎に重点をおいて診療体制の組織強化、抗ウイルス療法の実行、生体肝移植治療実施、等を行なった。なお、これらの方策を改良しつつ更におし進める必要がある。

7. 知的所有権の出願・取得状況 なし

研究課題:HIV 感染妊婦の早期診断と治療および母子感染予防に関する基礎的・臨床的研究

課題番号:H15 - エイズ -007

主任研究者:稲葉 憲之(獨協医科大学 教授)

分担研究者:戸谷 良造(国立名古屋病院 医長)、喜多 恒和(防衛医科大学校病院 講師)、外川正生(大阪市立総合医療センター 副部長)、和田 裕一(国立仙台病院 医長)、塚原 優己(国立成育医療センター 医師)、牛島 廣治(東京大学医学部 大学院 教授)、名取 道也(国立成育医療センター 部長)、北村 勝彦(横浜市立大学医学部 助教授)

1. 研究目的

HIV 感染は近年急増傾向にあり、その流行は既にアジア諸国、特に隣国の中国にも波及している。わが国では女性感染者の増加が顕著であり、感染妊婦と母子感染の急増が危惧される。本研究はより有効な母子感染予防対策の確立を目的として、① 妊婦 HIV 感染状況、母子感染と予防対策の実状、感染児の予後調査などの「実態調査」を主テーマとし、併せて②医療従事者や一般国民に対する啓発・教育活動の推進、③母子感染のメカニズムや予防に関する基礎研究、母乳哺育の実現化や感染妊婦・児の予後推定などに関する基礎的研究、を行う。

2. 研究方法

【臨床研究】

(1)HIV 母子感染の全国アンケート調査(産婦人科病院 1611、診療所 6269、小児科施設 3000)①HIV 抗体検査実施(和田分担)②HIV 感染妊婦の実態調査とその解析(喜多分担)③HIV 感染妊婦より出生した児の実態調査とその解析(外川分担)④抗 HIV 薬投与と母体の CD4 値やウイルス量の推移及び母児の予後に関する臨床データ解析(喜多・外川・北村分担)

(2)啓発・教育活動①HIV 抗体検査実施率向上の為の効果的な介入法の検討(和田分担)②全国自治体における公費負担に関するアンケート調査(和田分担)③公開講座による啓発・教育活動(和田分担)④わが国独自の HIV 母子感染予防対策マニュアルの作成・改訂及び患者向け HIV 母子感染予防対策小冊子作成(塚原分担)

【基礎研究】

(1)HIV 感染妊娠の治療に伴う免疫学的・ウイルス学的変化:①主要中和領域に対する血清抗体価の変動解析(北村分担)②PCR 法による HIV のサブタイプと HDMA によるサブタイプ内変異の検出(牛島分担)③新しいコレセプターの検出(牛島分担)④胎盤・臍粘膜における局所免疫と母子感染との関連検討(北村担当)(2)母乳からの HIV 除去における酸化チタン添加+UV 照射の有効性検討(名取分担)(3)妊婦における ELISA、FACS による α -defensin の発現検討(稲葉分担)

(倫理面への配慮)

臨床研究においては、文部科学省・厚生労働省「疫学研究の倫理指針」を遵守し、動物実験に関しては、研究施設の倫理委員会の承認を得ることとした。

3. 研究結果

【臨床研究】

①妊婦 HIV 抗体検査実施率は病院・診療所施設ではそれぞれ 89.6、80.7%であった。②各地域における抗体検査実施率は 42-100%に分布した。③妊婦 HIV 抗体スクリーニング検査の公費負担をしている自治体は5県、4政令都市、1特別区に増加した。④HIV 感染妊婦症例の報告数は、平成 14 年 10 月以降の新規症例が 27 例、それ以前の未報告例が 19 例だった。⑤エイズ予防財団主催のもと医療従事者や一般国民を対象とした研究成果発表会を3ヵ所(福岡、盛岡、名古屋)で開催した。⑥「HIV 母子感染予防対策マニュアル」は、全国約 3,500 の産婦人科施設、小児科施設に向けて 3 月に発送される予定である。

【基礎研究】

①HIV サブタイプは E が主流を占め、抗 HIV 抗体価は妊娠中期より徐々に減少し分娩後上昇。②PCR 法による簡便・低コストのサブタイプ検査法の開発。③新たなコレセプター (GPR1、RDC1)の検出。④脱落膜リンパ球の HIV の局所感染防御への関与。④SIV/HIV キメラウイルスと妊娠サルを用いた子宮内感染動物モデルの作製。⑤母乳中 HIV-1 の酸化チタン添加及び UV 照射による破壊。⑥ α -defensin 1-3 は妊娠後期の好中球で増加するも末梢刺激リンパ球では発現せず、などの結果を得た。

4. 考察

妊婦 HIV 抗体検査実施率は年々改善が見られ(病院施設: 89.6%、診療所施設:80.7%)、HCV 抗体検査実施率(94.4%)に比肩可能となってきた。さらに、地域較差にも改善が見られ(最低でも 42%)、公費負担を始めた沖縄県や、県を挙げての啓発活動に取り組んだ佐賀県で著しい上昇が認められた。公費負担をしている自治体は5県(4政令都市、1特別区)に増加したが、

公費負担の必要性は理解していても財政面の問題で導入は困難と考えている自治体も多かった。感染妊婦症例の報告数は平成14年10月以降の新規症例が27例、それ以前の未報告例が19例であり、詳細については2次調査の結果を待ちたい。エイズ予防財団主催のもと医療従事者や一般国民を対象とした研究成果発表会を3カ所(福岡、盛岡、名古屋)で既に開催し、改訂「HIV 母子感染予防対策マニュアル」は全国約3,500の産婦人科施設、小児科施設に向けて3月に発送予定である。さらにホームページの作成など、より効率的な啓発活動が現在動きつつある。

基礎研究では、SIV/HIV キメラウイルスと妊娠サルを用いた世界で初めての経静脈経路によるSHIVの子宮内感染動物モデルの作製と母乳中のHIV-1が酸化チタンを添加しUVを照射することで高率に破壊されるとの報告を評価したい。

5. 自己評価

1) 達成度について

本研究はHIV 母子感染の①わが国における実態調査(産婦人科・小児科施設)、②啓発・教育活動、③基礎的研究の3骨子よりなるが、全て具体的な成果を挙げつつある。唯一、妊婦HIV抗体検査の医療経済学的な検証が積み残しとなっているが、残された期間内に検討される予定である。当初の計画の概略90%は達成出来たのではと考える。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

我々は、1997年以來一貫してわが国の妊婦HIV感染状況と母子感染の実態調査を産婦人科・小児科両領域より行ってきた。また、妊婦HIV検査の重要性について啓発・教育活動を実行してきた。今後急増が危惧されるHIV感染妊娠例に対して、現在全国で行われている母子感染予防対策とその効果の現状を把握・検証することにより他の国々とは異なったわが国の医療体制・医療事情に合致した最も効率的かつ標準的な母子感染予防対策を構築し得るものである。

3) 今後の展望について

本研究の中心はわが国におけるHIV感染妊婦の早期診断と母子感染予防にあり、その実現のためにも営々として持続されてきた①わが国における実態調査(産婦人科・小児科施設)は将来にわたって維持継続されるべきと考える。②啓発・教育活動も徐々にその効果を発揮しつつあり、また、③基礎的研究でも妊娠サルを用いたSHIV子宮内感染動物モデルなど興味ある成果が得られつつあり、今後も精力的に研究を進めたい。

6. 結論

「はじめに検査ありき」という極めてシンプルな結論が得られた。妊婦がHIV検査を受けて始めて母子感染のみならず配偶者への性感染や医療従事者への院内感染も減少させることが可能となる。妊婦抗体検査実施率は年々改善が見られつつあるが、HCV抗体検査実施率に比較すると若干見劣りがすることも事実である。また、地域較差にも著明な改善が認められるが、まだまだHIV検査実施率が半数に満たない地域が少なからず存在する。興味深いことは、公費負担を始めた沖縄県や、県を挙げての啓発活動に取り組んだ佐賀県で著しい上昇が認められた事実である。妊婦のHIV感染状況や母子感染の実態調査に加えて啓発・教育活動の重要性が示唆される結果である。米国では妊婦HIV検査推奨のポスターを掲示したバスが走っている。米国の熱心な対HIV政策の象徴の一つと考えるが、いずれのエンドミックエリアにおいても日本と同じような低感染状況の時代があった筈である。日本を新しいエンドミックエリアにしないために臨床と基礎が手を結んだ本研究の遂行は重要と考える。

7. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

現在、予定を含めて特にありません。

研究課題名 : 若年婦人における HIV 感染状況および HIV 感染と生殖医療との関連性に関する研究

課題番号 : H15 エイズ 008

主任研究者名 : 田中 憲一 (新潟大学大学院医歯学総合研究科 教授)

分担研究者名 : 岩下光利 (杏林大学医学部 教授)

花房 秀次 (荻窪病院 血液科部長)

高桑 好一 (新潟大学大学院医歯学総合研究科 助教授)

1. 研究目的

第1の研究は、HIV感染男性非感染女性夫婦に対する体外受精-胚移植に関する基礎的、臨床的研究である。従来より HIV 感染男性、非感染女性夫婦の妊娠については、妻の二次感染の危険性があることから妊娠しないよう指導されることが通例であった。これに対し、夫精液から HIV ウイルスを除去する方法を用い精子浮遊液を作成し、これを体外受精・胚移植に使用することにより、妻の二次感染をほぼ0とし、妊娠しうような臨床応用を進めているが、その有用性および安全性を明らかにすることを目的としている。また、体外受精-胚移植に比較して簡便である人工授精を実施するためには、精子回収率の高率化が必要である。そこで、基礎的研究として、抗 HIV 薬服用による精子の損傷に関する解析および DNA 損傷精子除去のための基礎的検討を行っている。第2の研究は、HIV 感染と STD との関連性に関する研究であり、若年婦人における STD および HIV 抗体の陽性率を把握すること、HIV 陽性婦人における STD 感染の実態を明らかにすることを目的としている。

2. 研究方法

HIV 感染男性非感染女性夫婦に対する体外受精-胚移植の臨床応用に関する検討については以下のとおりである。本治療の実施に先立ち、夫の HIV 感染の病状および精子の状態をチェックした。また、夫婦に対し医師および専門のカウンセラーによる十分なカウンセリングを行い、本治療を受けることの意志を確認し、その後実際の治療を行った。妻に対しては通常の体外受精-胚移植で行われる排卵誘発を行った。夫から得られた精液を Percoll 法、Swim up 法により調整、超高感度 PCR 法により、HIV が 1 コピー/ml 以下であることを確認、この精子浮遊液を用いて受精卵を得た。媒精 1-2 日後に受精卵の培養液につき再度 PCR を実施し、HIV の陰性を確認し妻に胚移植を行った。胚移植実施後は妻について、1 か月ごとに抗 HIV 抗体および HIV-RNA 検査を行い、これを 3 か月間実施し、二次感染のないことを確認した。また、出生した児については、臍帯血および生後 3-6 か月の間に同様の検査を行い、二次感染のないことを確認した。

現状では、密度勾配遠心分離法と swim up 法を組み合わせ HIV を除去しており、また抗ウイルス薬等の投与により造精機能抑制により精液所見の低下が多く見られ、顕微授精 (ICSI) の適用が必要な例も多い。しかし、抗ウイルス薬は精子 DNA 損傷の可能性を考慮した場合通常媒精による体外受精-胚移植がより望ましい。また子宮腔内人工受精実施のためには精子を高い回収率で得ることが必要である。そのための方策として、遠心分離法

の組み合わせによる運動精子の選別-濃縮、ウイルス (浮遊ウイルス、感染リンパ球)、細菌の排除、DNA 損傷精子の排除を試みた。ヒト精子 DNA 損傷は double strand break (DSB), single strand break (SSB) の解析とともに電顕像による観察も合わせて行った。

若年婦人における STD および HIV 抗体の陽性率に関する検討については、東京都、神奈川県における開業産婦人科医院 326 施設中、若年婦人の受診が見込める 203 施設を対象に、他施設共同研究参加の意志を確認した。その結果 33 施設が本研究に参加することとなった。帯下感、出血などの有症状婦人、STD 検査希望、人工妊娠中絶術希望者などに対し、十分なインフォームドコンセントを行い、クラミジア DNA、淋菌 DNA、HIV 抗体の各検査を実施した。HIV 陽性婦人の各種 STD 検査の陽性率の検討については、全国のエイズ拠点病院 363 施設に対し、アンケート調査を行い HIV 陽性婦人診察の有無、有りの場合 HIV 陽性婦人に対する STD 検査の実施の有無、HIV 陽性婦人に対する今後の STD 検査の可否につき調査した。得られたアンケート調査をもとに、HIV 陽性婦人における STD 陽性率について検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は HIV に関する調査研究であり、倫理面への配慮が重要であることを強く認識している。検査にあたっては対象各個人から書面による同意書を得ることとした。検査の結果については各分担研究者、研究協力者から各個人には知らせるが、検査結果の統計処理に当たっては個人が特定されないような方法により集計することにより、各個人のプライバシーが守られるよう配慮することとしている。HIV 感染男性、HIV 非感染女性夫婦に対する妊娠補助技術の応用については、実施に先立ち、担当医師による説明、カウンセラーによる患者の意思確認を行い、インフォームドコンセントを得ることを徹底することとしている。

3. 研究結果

HIV 感染男性、非感染女性夫婦に対する体外受精-胚移植の実施については、新たに 8 例で実施し、7 例で妊娠が成立、7 例とも妊娠が継続している。これまでの施設別の対胚移植回数に対する妊娠成立率は新潟大学 100% (10 例実施し 10 例とも妊娠成立、継続)、慶応大学 50.0% (10 例実施し 5 例妊娠、4 例継続)、杏林大学 50.0% (8 例実施し、4 例妊娠、3 例継続) であった。また、母児ともに二次感染は認めていない。基礎的研究としては、これまでの予備的検討により、コロイドシリカゲル密度勾配を用いた沈降速度差遠心法、高比重水溶性造影剤を用いた沈降平衡法の組み合わせが適していることが明らかになり、本法で調製した精子

分画は運動率が80%以上、DNA損傷率は1%以下となる。HIVに関して、浮遊ウィルスは細胞との粒子径差を利用した沈降速度差遠心、感染リンパ球と成熟精子の密度差を利用した沈降平衡法の組み合わせが有用であり、最適化を検討している。両法の組み合わせにより、赤血球、白血球（細分画については不明）スメアレベルでは陰性になることが示された。

若年婦人におけるSTDおよびHIV抗体の陽性率については、本年1月10日現在、424名がHIV抗体検査を受けいずれも陰性であった。年齢内訳は19才以下が98名、20-24才が157名、25才以降が169名であった。クラミジアDNAについては121名に検査が行われ13名(10.7%)で陽性であった。特に19才以下では20名中5名(25.0%)に陽性である。淋菌DNAについては陽性例はない。HIV陽性婦人のSTDについての検討については以下のとおりである。全国のエイズ拠点病院363施設にアンケート調査を行い233施設(64.2%)から回答があった。このうちHIV陽性婦人の診察経験のある施設は69施設(29.6%)であった。STD検査を実施した施設41施設に対し、個票によりSTDの結果を確認したところ、クラミジアは48例中9例(18.8%)で陽性であった。淋菌は21例中陽性例はなかった。ヒトパピローマウイルス(HPV)は10例中4例(40.0%)に陽性であり、子宮頸部スメアテストでは68例中19例(27.9%)でIIIa以上であった。

4. 考察

近年HIV感染男性、非感染女性夫婦で育児希望を持つ夫婦が増加しているが、従来は、医療機関に相談しても二次感染の危険性を告げられるだけであった。これに対し、HIV感染者の精液中からHIVを除去した精子浮遊液を得、これを用いた体外受精-胚移植を実施し、妻が二次感染することなく、妊娠に至り、生児を出産した症例がさらに増加した。この治療により、妊娠を希望する女性の二次感染を阻止することができ、また、子供を安全に持てることが可能となりつつある。この治療が広まることは、HIV感染者のQOLを向上させるだけでなく、社会参加による心理的負担の解消と治療費の抑制、社会の労働力増加など多大な利益につながる。現在までのところ、治療を受けた妻および出生した児に二次感染は認められていないが、さらに安全性を担保することは極めて重大な問題であり、この点を重点的に研究を進める。また、今回の基礎的研究により、HIVを除去しつつより効率的に正常精子を回収しうるということが可能となりつつある。これにより、人工授精の応用が期待できる。本邦におけるHIV患者の割合は諸外国に比べいまだ高いものではないが、今後の増加が懸念されている。これまでの研究では、開業産婦人科施設におけるHIV抗体検査実施に関しては、人工妊娠中絶術を実施する際にもほとんど実施されていない現状であった。若年層を対象としたSTD検査希望あるいは人工妊娠中絶術希望する婦人におけるHIV、STDの感染状況の検討を大都市部の開業産婦人科施設で多施設共同研究として開始した。10才

代におけるクラミジア感染が高率であり、この結果は今後若年婦人におけるHIV感染の蔓延を推察させる結果であり、対策が必要であると判断された。また、HIV患者においては免疫能の低下などからSTDあるいは子宮頸癌の高率な発症が危惧されており、今回その点についてアンケートによる後方視的検討を行った。その結果、クラミジア感染が約2割に認められ、子宮頸部スメアテストでIIIa以上が高率に認められるなど一般健常人に比べ高率な感染状況であることを推察させる結果が得られた。HIV患者の健康管理の観点から、定期的な検索が重要であるものと判断された。

5. 自己評価

1) 達成度

いずれの研究についても当初の目的を達成しているものと判断している。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

HIV感染男性、非感染女性夫婦に対する体外受精-胚移植の応用については、社会的にも強い要請があるものと判断され、また、国際的にも先駆的な取り組みであるものと理解している。治療を希望する夫婦は経年的に増加しており、今後さらに治療対象の増加が考慮される。若年婦人におけるHIV、STDの感染状況に関する検討については、現状では、本来HIV抗体検査を実施すべき若年婦人特に人工妊娠中絶術、STDを危惧する症例などでのHIV抗体検査があまり行われていない状況である。その意味でHIV抗体、STDのスクリーニング検査についての、大都市部の開業産婦人科施設による多施設共同研究は重要であると判断される。HIV感染婦人のSTD、子宮頸部スメアの検討結果についても一般に考慮されている危険性を明らかにした点で貴重なデータであり、患者さんのQOLを考慮する上で、有用なデータである。

3) 今後の展望について

HIV感染男性、非感染女性夫婦に対する体外受精-胚移植の応用については、治療を継続し、その有効性、安全性を確認するとともに、基礎的研究をもとにした人工授精の応用も考慮していく予定である。HIV感染とSTDとの関連性に関する研究については、初年度で構築された共同研究組織により、さらに対象症例数を増加させ、感染実態の解明を進めていく予定である。

6. 結論

HIV感染は確実に増加しており、妊娠婦人を含めた婦人における感染実態の把握がますます重要性を増すものと判断される。また、HIVに感染している患者さんのQOLの確保は重要である。これらのことから、本研究の継続が意義あるものと判断される。

7. 知的所有権の出願・取得状況

現在のところ予定なし。

研究課題：血友病の治療とその合併症の克服に関する研究

課題番号：H15-エイズ-009

主任研究者：坂田 洋一（自治医科大学分子病態研究部 教授）

分担研究者：小澤 敬也（自治医科大学遺伝子治療研究部 教授）、吉岡 章（奈良県立医科大学小児科学教室 教授）、

長谷川 護（株式会社ディナベック研究所 取締役研究所長）、新井 盛夫（東京医科大学臨床検査医学講座 助教授）、

小林 英司（自治医科大学臓器置換研究部 教授）、北村 義浩（東京大学医科学研究所先端医療研究センター 助教授）

1. 研究目的

欠乏している凝固 VIII 因子（血友病 A）、あるいは凝固 IX 因子（血友病 B）のレベルを数%に維持できれば、血友病で不慮の出血を来すことは殆どない。現在施行されている因子製剤輸注による care を中心とした治療から、cure をもたらす治療として血友病遺伝子治療が大きな期待を寄せられている。本年度は血友病 A については、動物を対象にレンチウイルスベクターとアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いた安全で効率の良い遺伝子治療法の開発に向けた基礎的検討を進める。また肝細胞の異所性移植法による VIII 因子遺伝子の導入の可能性も検討する。血友病 B については、サルを用いて AAV ベクターを用いた高効率長期発現法の検討と、安全性の検討を昨年に引き続き更に展開する。遺伝子治療においてますます重要視されつつあるインヒビタ対策としては、血友病 A マウスを利用して、免疫寛容誘導のメカニズムを明らかにする。

2. 研究方法

血友病 A、a. 搭載遺伝子サイズに 5kb という制限はあるが、より安全の保証されたベクターとして AAV ベクターを旨く利用できないかを 2 つの方法で検討した：1) 搭載可能な短いプロモータ “short actin promoter” を利用して B 鎖を除く第 VIII 因子 cDNA を搭載した AAV ベクター-1、及び 5 型を作製し、マウス骨格筋あるいは肝臓に注入した。2) 第 VIII 因子の重鎖、及び軽鎖をコードする cDNA を別々の AAV ベクターに搭載し、発現後プロセッシングを期待して動物に注入した。b. 標的細胞：本年度は除去可能な脂肪細胞と骨格筋細胞に対して、後述する第 IX 因子搭載も含めて、導入効率の改善と、発現の特異性を詳細に検討した。病原性のみられないサル免疫不全ウイルス [SIVagnTY0-1 株] ベクター [SIV]、あるいは AAV-1 ベクターに脂肪細胞と血管内皮細胞で特異的に発現する PAI-1 プロモータを搭載し、それぞれ第 VIII 因子あるいは第 IX 因子の cDNA を搭載して、界面活性剤の使用など投与条件をいろいろと工夫し、マウスの脂肪細胞での発現を観察した。解析は別途 GFP 遺伝子搭載ベクターを利用して、さらに、免疫学的手法による組織発現レベルと血中因子レベルを測定することで行った。c. 導入効率の検討：第三世代ヒトレンチウイルスベクターを利用して、遺伝子の導入発現効率に肝細胞の再生機転が関与するか否かを検討した。

血友病 B: ヒト第 IX 因子発現 AAV-1 ベクターをサル骨格筋

に種々の免疫抑制剤投与下に注入した。また長期発現観察のために免疫学的に有利なサル第 IX 因子を搭載した AAV-1 ベクター [後に AAV-8 ベクター] の作製を試みた。マウスを用いて、種々の AAV ベクターを利用し、新生児期第 IX 遺伝子導入の効果を検討した。さらに、第 IX 因子 cDNA が比較的短いことを利用して、低インヒビタ産生臓器発現を念頭に臓器特異的プロモータの再検討も始めた。遺伝子治療基礎的技術検討: レンチウイルスベクターの安全性を高める検討と発現効率に関わる cPPT 配列などの基礎的検討を行った。また臓器浸透効率をたかめるためにセンダイウイルスの膜タンパク質 F, HN を用いた新型シュードタイプの作製を検討した。更に、危険が生じたときに臓器の切除レスキューを目的とした肝臓区域内ベクター投与法の検討もすすめた。インヒビタ対策: 第 VIII 因子 KO マウスにヒト第 VIII 因子投与により免疫寛容を誘導し、因子に対する寛容を抗原刺激による脾リンパ球の増殖とサイトカイン産生レベルを観察することで解析した。遺伝子治療への応用を目指して、寛容誘導に至適な抗原量の検討も行った。

〔倫理面への配慮〕

本研究は、非病原性のベクターの応用を目指したものであり、周辺環境及び実験従事者の安全性に関して、倫理的問題が生ずることは基本的にないと考えている。マウス、イヌを用いた動物実験は、動物倫理面（動物愛護上の配慮など）を含めて奈良県立医大、自治医大の動物実験指針規定に沿って行う。筑波霊長類センターとの共同研究として厚生労働省霊長類共同利用施設で実施する予定のサルの実験では、国立感染症研究所「動物実験ガイドライン」及び筑波霊長類センター「サル類での実験遂行方針」を遵守して行う。

3. 研究結果

血友病 A: 短いβアクチンプロモータを用いる、或いは、第 VIII 因子重鎖・軽鎖を別々に搭載して AAV ベクターの利用を図り、短期間 1-3%の因子発現がえられた。インヒビタ産生により血中レベルの維持は困難であったが、方法的に AAV ベクター利用の可能性が示唆された。脂肪細胞への導入に関しては、生体に無害なブルロニック系界面活性剤の併用により顕著な発現増強効果が得られた。また PAI-1 プロモータの使用により脂肪細胞での発現増強と、骨格筋組織でも血管を中心とした特異性の高い発現が観察された。血中レベルも長期間、治療域が維持され、また投

与部除去により完全にレスキューされて、安全面も確認された。血友病 B：サル骨格筋にヒト第 IX 因子を搭載した AAV-1 ベクターを筋注投与した結果、正常の 9%の血中濃度が得られた。種々の免疫抑制剤を一定量併用したが、ヒト型第 IX 因子に対する抗体が遺伝子導入後 4-6 週で生起しており、これによる FIX の血中濃度の低下が観察された。サルに安全面で問題となる変化は確認できなかった。新生仔マウスにヒト第 IX 因子遺伝子導入を試みた例では、腹腔内投与で、強いインヒビタの産生もみられず、5-10%の血中レベルが長期間観察された。遺伝子治療技術：分離肝細胞を腎被膜下にラミニンと IV 型コラーゲンに富む BMM-Gel と共移植したところ、肝細胞は 100 日を超えて安定して生存し、更に肝切除など肝再生刺激により増殖がみられた。SIV ベクターの第三世代化とセンダイウイルスの膜タンパク質を利用した新型シュードタイプの SIV ベクターの作製に成功した。またラット、ブタに血管カテーテルを用いて肝選択的に遺伝子を発現誘導する技術がほぼ確立した。インヒビタ：新生マウスへの第 VIII 因子製剤を用いた免疫寛容はヒト第 VIII 因子特異的であり、*in vivo* での脾臓リンパ球に対する抗原刺激実験より IL-2 産生はあるものの、IL4、-10、IFN γ の産生がなく、増殖能を有さなかった。また、IL12 の添加により増殖能、サイトカイン産生の回復がみられた。IFN γ 依存性の T 細胞アネルギーに免疫寛容が基づくことが推察された。

4. 考察

第 VIII 遺伝子を AAV ベクターに搭載可能であることが示唆されたことは、例えば AAV-8 などのように高効率のものが発見報告されていることを鑑みれば、今後の方針に与える示唆は大きい。脂肪細胞は終末細胞の一つである。投与方法による発現効率の改善と特異性増強に改善がみられたことと、外科的除去でレスキューされることが実際に確認されたことにより標的細胞としての魅力はより一層強くなったと思われる。サルを用いた血友病 B の遺伝子治療実験はヒトへの前臨床として極めて重要である。尿中排泄などを含め、安全性の確認がされたことと、骨格筋細胞投与でも十分な治療量の因子の発現がみられたことの意味は大きい。しかしながら、ヒト因子と相同性が高いサルを用いたにもかかわらず、インヒビタが産生されたことは、インヒビタ予防が遺伝子治療の鍵を握ることを強く示唆するものといえる。その意味で、今回検討した新生仔マウスの遺伝子治療の予想を上回る結果と、製剤を用いたアネルギー誘導のメカニズムの解析は、今後の遺伝子治療研究に与える影響は大きい。正常肝臓移植により、血友病が cure されることはヒト肝移植や我々の前年度施行した血友病イヌを用

いた実験より明らかである。血友病遺伝子を導入した肝細胞を用いた auto の異所性肝細胞移植治療に向けた方法の一部が確立された意味ははかりしれない。

5. 自己評価

1) 達成度について：10 年後発でスタートした研究であるが、送付論文が不公平な扱いを受けるようになり、ようやく欧米と競争できるレベルに近づいたといえる。多くの新知見が明らかにされており、成果の学術的意義は高い。これには、班員の密接な協力によるところが大きい。しかし臨床応用を現実化するにはベクターの特許の問題などまだまだ、乗り越えなければならない壁は高い。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について：遺伝子治療全体についてレトロウイルスベクターを用いた random integration による問題が現実化し、使用するベクターの選択がより重要になっている。血友病遺伝子治療で先頭を切っていたグループが様々な困難に直面しており、我々との間にそれほど大きな差はないように思われる。臨床応用に進むには解決すべき問題点は多いが、彼方に見えた明かりが確かなものになりつつあるというのが現状である。社会的には血友病遺伝子治療に寄せる期待は極めて大きい。

3) 今後の展望について：臨床直前にある血友病 B についてはサル型の遺伝子を導入し、長期発現の維持とさらなる安全性を検討する必要がある。血友病 A に関しては、新しい AAV ベクターの可能性の検討と、免疫反応も考慮した発現臓器の検討など、世界的な足踏み状態を回避するために、今一度プロモータの選択を含めた“急がば回れ”の基礎的検討が必要と考える。また、本年度より開始した細胞移植と遺伝子治療を併用する方法で血友病治療におけるブレイクスルーを試みたいと考えている。さらに、血友病 A、B ともインヒビタの問題は最後まで残る可能性が高い。回避する手段開発にも主眼をおいて取り組み、血友病遺伝子治療の実現を図りたい。

6. 結論

これまでの研究により、多くの新知見を得るとともに、技術的にも SIV ベクター及び AAV ベクターを用いた血友病遺伝子治療に向けた一定レベルの成果が得られた。またいくつかの問題点も明らかとなった。今後は、臨床応用に向けて大動物を対象に安全性の確認、長期発現の工夫、免疫反応対策などを検討していく必要がある。

7. 知的所有権の出願・取得状況

特になし。

研究課題： 計算機を活用したHIVの薬剤耐性評価

課題番号： H15-エイズ-023

主任研究者：星野忠次（千葉大学大学院薬学研究部 助教授）

分担研究者：畑 晶之（千葉大学大学院薬学研究部 助手）、佐藤武幸（千葉大学医学部附属病院 感染症管理治療部長、助教授）、杉浦 互（国立感染症研究所、エイズ研究センター 第2研究グループ長）

協力研究者：横幕能行（千葉大学医学部附属病院 助手）、布施 晃（国立感染症研究所、血液・安全性研究部長）

1. 研究目的

抗HIV薬は長期にわたる投与を余儀なくされるため、ウイルスが薬剤抵抗性を獲得し、耐性ウイルスが発生してしまうことが、深刻な問題となっている。そこでHIV感染患者に薬を投与する前に、予め薬剤耐性検査を行うことが、抗HIV療法をより充実させるために重要となってきている。これに対応して、HIVのジェノタイプとフェノタイプを迅速に決める検査技術が開発され、抗HIV療法の一環として、耐性検査を行うことが現実のものとなっている。

本研究では、ジェノタイプ検査やフェノタイプ検査に並ぶ新しい薬剤耐性検査法として、「コンピュータショナル検査」を提案している。この技術の実現に向け、計算手法の開拓を中心に開発を推進している。本研究の目標は、計算機を駆使した理論化学的方法により、国内で認可されている全ての抗HIV薬のうち、個々の患者にとって最も適した薬剤を選択できる技術を確立することである。

2. 研究方法

患者ごとに異なる酵素の構造変異を計算機内で再現し、抗エイズ薬への抵抗性を算出する技術の達成するために、方法論の開拓ならびに実験的知見との整合性確認という2つの観点より、以下に示す項目に分けて研究が進められた。特に本研究では、計算機で評価された検査結果に、高い信頼性があるか、十分に新規の医療技術として臨床に応用できるものかを確認することが、最大のポイントである。そこで、従来のジェノタイプ検査やフェノタイプ検査と照らし合わせて、計算機で算出した値が、それら従来の方法と整合性があるかを詳細に調べている。

ソフトウェア開発（方法論の開拓）

- ・計算評価法改良と計算機プログラムの作成
- ・計算の迅速化に向けた取り組み

既存データとの比較（整合性確認）

- ・ジェノタイプあるいはフェノタイプ検査が既知のデータを照合例として選出
- ・選出されたデータの変異情報から、この検体例の固有の酵素を計算機内で仮想的に作成し、薬剤-変異酵素結合構造を構築
- ・薬剤と酵素の結合力算出と薬剤抵抗性の評価
- ・計算機算出値と実験データとの比較
- ・臨床データとの比較（整合性確認）
- ・患者からのサンプル採取とウイルス量の測定

- ・国立感染症研究所エイズ研究センターでのサンプルのジェノタイプとフェノタイプ検査
- ・変異情報から患者固有の酵素を構築し、薬剤-変異酵素結合体構造を作成して、薬剤と酵素との結合親和性から薬剤抵抗性を評価
- ・HIV感染者への治療の中での、ジェノタイプおよびフェノタイプ検査ならびに計算評価結果の情報を比較検討（倫理面への配慮）

患者からの試料採取は、千葉大学大学院医学研究院倫理審査委員会での審議を経て行い、提供者に菌株が実験に利用される旨の説明をして同意を得る。分担研究者(佐藤)以外は、個人識別情報は全く参照できない。コンピュータショナル検査の実施においては、主任研究者らは全く患者とは接点が無い。

3. 研究結果

ソフトウェア開発

薬剤と酵素の間のクーロン力(電気的力)とファンデルワールスカ(分子間力)を抽出し、これを計算中、常にモニターして薬剤と酵素が馴染んだ状態にあるか否かの判断に利用できるようにした。また、この値を結合親和性評価において親水性相互作用エネルギーとして採用した。

薬剤側の電荷を持たない官能基と酵素側の中性残基から構成される疎水部との接触面積を算出し、これに経験値(定数)を掛けて、疎水相互作用の効果をエネルギー的に評価するプログラムを作成した。

当初、一つの薬剤のシミュレーションには3週間程必要であったが、一つの薬剤の計算結果を他の薬剤での計算に再利用する方法を開発し、計算精度を落とさずに計算時間を従来の3分の1程度に抑えることができた。

既存データとの比較

分担研究者(杉浦)は、プロテアーゼ阻害剤(Nelfinavir)耐性を持つ変異体を系統的に解析している。これに対応して、臨床で頻繁に見られ実験的解析の進んでいる変異体(D30N,L90M,N88D,N88S,D30N/N88D,D30N/N88D/L90M,D30N/L90M)7種とWildタイプ(cladeB NL4-3)について、阻害剤としてNelfinavirが結合した構造を作成し、計算的解析を行った。Wildタイプでは薬剤が活性残基のD25,D25'ならびにD30,I50とバランス良く水素結合をとっている。一方、D30Nでは、30番目のアミノ酸残基と薬剤間の水素結合が消失するため、薬剤の方位がずれて、

反対側に位置する D29' と薬剤が水分子を介して水素結合を形成した。L90M では、D30N と薬剤の結合は保たれるものの、フラップ領域が活性残基側に近づき、反応ポケットが扁平になる。ところが D30N/N88D/L90M では、逆にバランスがとれて Wild タイプと類似の水素結合系が回復するなどの知見が得られた。幾つかの方法でエネルギー評価を試みたが、独自の開発プログラムの一つでは、変異体は Wild タイプに比べ全て結合エネルギーが低下した。各種変異体間のエネルギー低下度の比は、実験的に測定された (EC_{50}) 薬剤感受性の比と一致した。数値の絶対値に意味があるかどうかは検討の余地があるが、序列の上では、実験結果との整合性が確認できた。

分担研究者(杉浦)の蓄積している解析データの中より、検査会社(Virco)によりフェノタイプ検査の行われた 36 検体について、主任研究者(星野)は分担研究者(畑)と共に計算機解析を始めた。最初の 4 検体について、実験データとの整合性調査を行ったが、十分に満足な結果は得られなかった。例えば、実験データでは、全ての薬剤に感受性の低下があり、特に Ritonavir には強い抵抗性を示す変異体が存在するが、この変異体に関する計算では、Ritonavir に加えて Indinavir も強い抵抗性を持つと算出された。整合性が得られなかった原因は、多量の薬剤計算機評価を遂行するために機械的に一律の計算を実行したのみで、薬剤と酵素の馴染み具合を十分にモニターしていないこと、エネルギー評価の方法論の信頼性が十分でないことにあると考えている。現在、一連の手続きを見直して、再度、計算を遂行している。

臨床データとの比較

計算機による薬剤耐性評価が確立していないので、この項については目立った進展がない。但し、患者の薬剤投与履歴とウィルス量変化やウィルス変異の経過を追跡する必要があるので、分担研究者(佐藤)は、幾つかのサンプルについて、国立感染症研究所に検査を依頼して、後の評価検討のための準備を進めている。

4. 考察

これまで創薬の分野において、計算機シミュレーションは標的タンパク質(酵素)に対する薬物候補のスクリーニング等に利用されてきた。薬物と酵素の親和性を評価する指標として、自由エネルギー計算が行われ、MMGBSA (Molecular Mechanical Generalized Born Surface Area) 法や MMPBSA (MM Poisson Boltzmann SA) 法が良く利用されている。ところが HIV プロテアーゼの薬剤に対する感受性変化が 2~3 倍変化するのに対し、1kcal/mol 程度のエネルギー変化しかないとされており、従来の方では対処しきれないことが判明した。そこでエネルギー計算精度の向上を目的としたプログラム開発を継続的に行い、またシミュレーション結果より有意な情報を抽出するための手段探索を試みている。

5. 自己評価

1) 達成度について

当初計画していたよりも薬剤耐性評価が難しいことが判明し、多くの検体例を解析することが出来なかった点で、達成度としては不十分である。但し、その問題解決に向けた取り組みは不断に実行しており、幾つかの工夫により開発技術の達成の可能性が出てきたことには満足している。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

計算機による耐性評価の実現に向けて、欧米でも研究が進められている。ところが現状では、実験データとの検証例が少なかったり、評価結果に十分な信頼性が得られないなど課題も多い。本研究では一部実験結果との整合性が確認され始めており、今後、再現性良く評価できる手法を見つけ出せれば学術的貢献は期待できる。また特定の変異が入ると耐性の獲得が起こる理由については、各アミノ酸残基を構成する原子の動きより、ある程度は説明することが出来るようになり、プロテアーゼ作用の理解を深めることに役立っている。

3) 今後の展望について

Nelfinavir 耐性を持つ変異体に関する計算解析では、シミュレーション中の各アミノ酸残基の揺らぎ具合を数値化して調べた。計算で構造揺らぎの小さい場所に位置する残基は、臨床上では変異の入り難いと認識される場所であることが判明してきた。このように定性的にはシミュレーションが確かに現実の系の一端を捉えていることが確認できた。従って、薬剤抵抗性に関わる有用な値を、計算結果より如何に引き出すことができるかが、本研究の成否に直結すると予想している。従って、今後、この部分が達成できれば大きな研究の進展が見込まれる。

6. 結論

薬剤抵抗性評価に用いるソフトウェアの開発には、一定の成果があった。ところが計算機による全種の薬剤とプロテアーゼとの結合エネルギー算出値は、実験による測定値を十分に再現できない状況にある。計算評価の方法論の改良を続けた結果、1つの薬剤(Nelfinavir)については、その薬剤耐性獲得した変異株に関する計算予測と実験値との整合性が取れるようになってきた。今後、評価法をさらに改良し、各種プロテアーゼ阻害剤について、変異株についての十分な予測ができるようにする必要がある。

7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

特許出願等の実績はない。但し、一部の独自開発ソフトウェアに対し商品化あるいは公開化に関する問合せが 2 件あった (企業 1 件、大学 1 件)。

基礎醫學研究