

れた。

再活性化阻害薬として新規 NF- $\kappa$ B 阻害剤の効果を解析している過程で、AIDS リンフォーマのモデル系としての EB Blast 細胞株の増殖を抑制する事が明らかとなり、培養3日で明確な細胞死を誘導できる事があきらかとなった。再活性化阻止能の実験については慢性感染細胞株への細胞障害性などの問題もあり、実験系のデザインを変更し検討する必要がある。

#### 4. 考察

*de novo* DNA メチル化酵素の標的配列である CpXpG あるいは CpHpH 配列のシトシンのメチル化が *in vivo* で認められたことから、LTR のメチル化の実際は *de novo* DNA メチル化酵素が担う事が示唆された。

メチル化頻度とウイルスRNA量との相関については、来年度さらに検体数を増やして検討する必要があると思われる。

サル感染モデル系は、組織等の局所の研究素材の提供、感染初期検体の得られやすさなどが本研究における利点である。今後は *in vivo* ヒストン修飾解析系を立ち上げ感染初期におけるエピジェネティック制御機構の解析をすすける必要があるであろう。

新規 NF- $\kappa$ B 阻害剤を用いた再活性化阻止実験の過程から、AIDS リンフォーマ治療への応用が期待できる結果を得た。来年度はさらに詳細を詰め動物実験等を計画したい。同薬剤を用いた再活性化阻止の実験は、細胞株の多くが NF- $\kappa$ B 依存的な生存を示し、再活性化実験に用いる事が難しいことが明らかになった。実験系を HIV 感染患者末梢血もしくはサル感染モデル系に変更し検討する。

#### 5. 自己評価

##### 1) 達成度について

全体を通し、目標は達成されていると考える。しかし、*in vitro* の分子機構の解析については、*in vivo* メチル

化解析の条件検討などによって遅れている。来年度は、リサーチレジデントの数を増加し、*in vitro* の解析にも中心を移したい。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について  
申請者らの研究は論文発表、学会発表を通じて、すでに国内外に認知され評価を受けていると確信している。社会的意義については、研究計画とおり実行すれば必ず高い評価を受けると確信する。

##### 3) 今後の展望について

今年度の解析結果から HIV 感染者において、*de novo* DNA メチル化酵素の潜伏化への寄与が予想される。このことは潜伏感染細胞の制御に関わる分子標的が絞られたことを示す。また、ヒストン修飾系を標的とした戦略も考えられる。今後は治療戦略を見据えた解析を進めていく。新規 NF- $\kappa$ B 阻害剤の再活性化阻止実験や AIDS リンフォーマ治療への応用性が示唆されたことから、その詳細を詰めていく。

#### 6. 結論

潜伏感染細胞を母体とするリザーバープールは、感染初期に形成されると考えられている。申請者らの研究結果から、エピジェネティックな制御機構のうち DNA のメチル化に関わるのは *de novo* DNA メチル化酵素である事が予想される。HIV 潜伏感染細胞の制御の戦略の一つとして *de novo* DNA メチル化酵素を分子標的として考えることができる。新規 NF- $\kappa$ B 阻害剤を用いた再活性化阻害実験の過程から AIDS リンフォーマ治療への応用が期待できる。

#### 7. 知的所有権の出願・取得状況

##### 特許申請

出願番号：特願 2002-217536

出願日：2002年7月26日

発明の名称：リンパ系悪性腫瘍の予防・治療剤

発明者：堀江良一、渡邊俊樹、梅澤一夫

# 臨床醫學研究

課題番号： H-14-エイズ-001

主任研究者名： 秋山昌範（国立国際医療センター情報システム部 部長）

分担研究者： 山本隆一（東京大学情報学環 助教授） 高橋紘士（立教大学コミュニティ福祉学部 教授）

横内清光（文教大学情報学部 教授） 木内貴弘（東京大学医学部 教授）

## 1. 研究目的

本研究は、我が国で初めて導入された診療情報共有システムである HIV 診療支援ネットワークシステム(A-net)の導入により、エイズ拠点病院に指定されている全国の病院において HIV 診療の標準化を行うことを最終目標に、HIV 診療情報の共有化や研究を行えるような方法論確立を目指すものである。A-net 以外に大規模臨床データが蓄積されていないのが現状である。それには、いくつかの問題点があると予想されるが、大きく分けて、技術的側面と患者の心理的側面に分けられると考えられる。アンケート調査等を行い、それから得られる結果とあわせて、患者が不安材料として抱える因子を抽出し、不安化要素の集計から、不安度により研究計画を 3 段階に分類し、「匿名性の確保の程度 VS 不安度」のマトリックス構造で、研究の安全性の指標化を図ることができると予測される。実際にその定量化にあたっては症例数を増やした検討や患者から見た場合の「IT というなじみのない技術を使うことによる躊躇」を克服するための方策も必要であり、集団心理面からの検討も行う。

## 2. 研究方法

1) 情報技術を中心に検討 現在、コンピュータウィルスの侵入や情報漏洩など、内部の人間が関わるトラブルが深刻になると予想されている。A-net においても「端末の完全制御」について技術検討が必要である。また、個人認証技術の発達により、指紋等の生体認証を導入することで、利便性とセキュリティの両立を図ることが可能である。来るべきユビキタス時代を念頭に、医療の情報化に普遍的に寄与できるインターネット上でセキュリティを保持した情報基盤技術を確立し、ソフトの試作もを行い、各病院内における電子カルテ端末における A-net の相互利用を目指す。

2) データの二次利用におけるセキュリティ 無名性確保のための方法と運用ガイドラインの検討患者情報の収集や参照を行うためのネットワークとは別に、集積されたデータを臨床研究等に活用する際に、患者のプライバシー保護を行うためのセキュリティ要件を検討する。また、米国における個人情報法の指針である HIPPA を参考にしながら、我が国における個人情報保護を踏まえた上で、情報ネットワークシステムを利用した臨床研究における情報学的・社会学的指針を制定できると考えられる。

## 3) プライバシー保護に関する社会学的、心理学的要因

の検討 A-net は、実働しているネットワーク型電子カルテとして希有な存在である。しかしながら一方で、IT というなじみのない技術を使うことによる躊躇も見られる。本研究ではマーケティングの専門家に加わっていただき、新技術への適応に関し、集団心理面からの検討を行う。

（倫理面での配慮）

本研究は、A-net システム部会等を通じ、原告団や弁護団と情報交換を行いながら行う。また、インフォームドコンセントを取って行う予定であり、実験にあたり、個人が判別できるようなデータが一般の目に触れるようなことは原則としてない予定である。各施設内での倫理委員会においても、承認をいただくこととしている。

## 3. 研究結果

1) Virtual Private Network (VPN: 仮想専用線網)の技術を用いて、インターネットを介した安全な情報基盤の技術は既に確立され、大学病院内の情報システムを含めたブロック拠点病院や主要な拠点病院間での単一のネットワーク接続機種間での運用を行った。その結果、国立国際医療センターにおいて、院内の電子カルテシステム端末で A-net のアプリケーションを操作できる環境を提供できるようになった。従来は、診療時に A-net 端末と電子カルテ端末の 2 台を操作する必要があったが、ソフトを新規開発し、同一端末で利用可能になり、利便性が向上した。

2) 第一点は、無名性の定義を定め、大学病院情報システムに蓄えられている診療情報項目を用い、無名性の定量化を試みた。第二点は、個人情報保護法案に基づいて、医療分野での個人情報保護ガイドラインを試作した。臨床利用でも研究等の二次利用でもプライバシー保護が重要な課題であるが、二次利用においては本質的にプライバシー情報を扱う必要さえない。そこで、二次利用における無名性確保の方法と有効性について検討を行ってきた。今年度は、現在までに行った調査の問題点の検討と運用面を検討し、HIV 診療における EBM 研究のための方法論を検討した。また、現在までに集積されたデータを解析して新規診断法や治療法の開発への応用が期待され、国際医療センターにおいて A-net のデータを用いた解析法の検討を行った

3) A-net の受容には何が必要か、また A-net の受容を阻害する要因がどこにあるか、マーケティング理論を用い

て検討を進めた。具体的には、スイスのソシュールが唱えた記号論を検討し、情報を本質機能であるデノテーション（内包的機能）とその付加価値であるコノテーション（外延的機能）に分解してアプローチする手法が有効性であると判明した。そこで、目標を「A-netの周知」から、「A-net『技術情報』の周知」と限定させ、その上で各ステークホルダー（利害関係者）の認知度や好感度等を調査する必要があると考えている。また記号論によると、「A-net」という名称も、わかりやすく親近感のあるものへ変更する必要性が示唆されている。

#### 4. 考察

HIV診療情報の共有化を図るために、A-netが構築され、平成16年12月末現在、129箇所のエイズ拠点病院で利用され、499例が患者登録され継続的に使用されており、そのデータを有効利用させる必要がある。そこで、利活用に対する問題点抽出のための現状調査として、各施設のユーザへアンケート調査を行い分析した。一方、本年4月の個人情報保護法施行を控えて、その対応を検討する必要が生じた。特に、データの二次利用におけるプライバシー確保のため、国民が求めるセキュリティ要件も明らかにしたが、今後も検討が必要と思われる。プライバシーを保護に関して、患者側の同意という側面では、当初より同意書の中に研究に関する同意事項も盛り込まれているために、研究利用も問題ないと考えられていたが、研究目的が必ずしも明確でない場合もあり、研究目的の明確化、具体化が必要と考えられる。一方、同意書が利用拡大の最大の阻害要因になっていることも調査研究で明らかになっており、現在の運用指針ではA-net利用者以外の研究利用を禁止していることから、疫学者や臨床工学者等は研究利用ができない。そこで、研究の利用者拡大を可能にする方法を検討した。具体的には、広報学的アプローチを用いソシュールの記号論を検討し、情報をデノテーション（内包的）、コノテーション（外延的）に分解してアプローチする手法の有効性が示唆された。また、端末の認証レベルの向上を図るための新規ソフトウェアも開発した。これらの技術を応用することで、A-net利用者以外の研究利用という二次利用拡大を図りたい。

#### 5. 自己評価

##### 1) 達成度について

A-netは、ネットワーク型電子カルテとして既に実働している希少な存在である。本研究を通して、セキュリティやインターネットとの親和性が確認され、VPNを用いた運用形態を普遍的なものにした。また集約されたデータを元に、データマイニング手法をもって、EBMを導く可能性を示唆することが出来た。また無名性の確保については、指標として最小特定人数を用い、病院情報システムのデータベースで最小特定人数が利用可能なことを示した。プライバシー保護に関する社会的、心理学的要因の検討及び

A-netの啓発については、引き続き調査を進め、阻害要因の特定とその克服のための手法を確立する必要があると考えている。

##### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

医療情報学の分野において、医療情報ネットワークや電子カルテ等の研究が行われているが、実際に運用している例は少ない。さらに、複数施設間でカルテを一元管理するのは国際的にも初めての試みである。本研究開始時点ではVPNの研究報告も医療分野においては、まだ始まったばかりであった。同等の技術を用いて、他疾患の医療ネットワーク（肝ネット、腎ネット等）も既に稼働している。データマイニングによりEBMを導く可能性が示唆され、同手法によって肝ネットでは国際特許も申請済みである。

##### 3) 今後の展望について

A-netは、ネットワーク型電子カルテとして成功しており、来るべきユビキタス社会に向け、セキュアでより利便性の高いシステムとして発展することが望まれる。また、臨床疫学的観点からは、引き続き無名性の科学的な検証や患者側の要因の検討が必要である。さらに、患者のみならず、各ステークホルダーから信頼されるための広報学的アプローチについて、今後も個人情報保護法施行を踏まえた観点で取り組む必要がある。

#### 6. 結論

A-netは、医療情報学の分野において、我が国で初めて運用された広域ネットワーク版電子カルテシステムとして、技術的に高い評価を受けた。さらに、国際的にもHIV感染症としては、すでに世界最大規模の臨床情報データベースであり、HIV感染症のみならず標準的な電子カルテの開発へと発展しつつある。さらに、診療データの研究への二次利用に関する検討では初めての研究であり、遺伝子情報データベースの研究応用などへの応用も期待される。平成16年12月末現在、全国129のエイズ拠点病院で317名の医療従事者登録を達成し、患者登録数も499例であった。A-net導入後も緩やかながら常に右肩上がり登録数が伸びていたが、本年度に入ってから伸びが落ちている。今回の研究を通して、無名性の検討や患者側の要因に関する検討の研究デザインが決めることができ、今後は、個人情報保護法を踏まえた臨床研究における指針の分野別・具体的な検討を行うことで、EBMへとつなげていくことを可能としたい。

#### 7. 知的所有権の出願・取得状況

本研究をベースとし、「知識発見型大規模診療情報自動解析(データマイニング)システムの開発と各政策医療ネットワークへの応用に関する研究」と共同研究により、特願2003-118496 疾病予後モデルの作成方法、このモデルを用いた疾患予後予測方法、このモデルによる予後予測装置、ならびにプログラム、記憶媒体。出願済み。

# 研究課題名：免疫賦活を応用した HIV 感染症の治療開発に関する研究

課題番号：H15-エイズ-001

主任研究者：岡 慎一（国立国際医療センターエイズ治療・研究開発センター 部長）

分担研究者：滝口雅文（熊本大学エイズ学研究所センターウイルス制御分野 教授）、松下修三（熊本大学エイズ学研究所センター病態制御分野 教授）、満屋裕明（熊本大学第二内科 教授）、森内浩幸（長崎大学小児科 教授）、江川滉二（㈱メディネット 取締役）、白阪琢磨（国立病院機構大阪医療センターHIV/AIDS先端医療開発センター）、立川夏夫（国立国際医療センターエイズ治療・研究開発センター 室長）

## 1. 研究目的

HAARTにより多くの患者の予後が改善された。しかし、治療が長期にわたるといふ点からいくつかの課題は残されている。本研究は、これら課題克服を目的に以下の4つの柱で遂行した。

- 柱1：HIVに合併する悪性リンパ腫の治療法の開発、
- 柱2：免疫再構築症候群に対する対処法の開発、
- 柱3：現状の治療薬に対する耐性ウイルスの克服、
- 柱4：免疫賦活を応用した現状の治療の進展

## 2. 研究方法

### 柱1：HIVに合併する悪性リンパ腫の治療法の開発

昨年の1例目に続き、2例目の一卵性双生児の悪性リンパ腫HIV患者に対して、化学療法に免疫療法を併用した（立川）。免疫療法は、以下の3つの方法を順次試みた。①LAK、②ペプチド刺激 CTL+DC、③ペプチド刺激 CTL+DC（成熟型：IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$ 、PEG2を使用）であり、特に③はDCの分化・成熟に関して②より優れた方法を採用した。効果判定の補助として、テラマを用いたEBV特異的CD8T細胞の検出と（滝口）、ELISPOT解析を行った（江川）。

### 柱2：免疫再構築症候群に対する対処法の開発

カリニ肺炎（PCP）と確定した5例の患者血清中のサイトカインパターンをPCP初発症時早期、HAART開始時、及びIRS発症症例ではIRS治療前後の血漿中 $\gamma$ -IFN濃度を当院保存血漿を用いELISA法により測定した（白阪）。

### 柱3：耐性ウイルスの克服

AK602（CCR5アンタゴニスト：spirodiketopiperazine 誘導体）の作用機序の解析を目的としてCCR5阻害剤の<sup>3</sup>Hラベル体作製およびCCR5の各ドメインに変異を加えた変異CCR5発現細胞株を作製、更に<sup>125</sup>Iラベル化されたケモカイン（RANTES、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ ）を用いて野生株・変異CCR5との結合能やCCR5阻害剤とケモカインとの相互作用の検討を行なった。また、分子構造解析機器（SYBYL）を用いた構造モデリングの手法によりCCR5の構造学的解析を行った。更に変異CCR5とケモカイン・CCR5阻害剤との結合能の変化のデータを元に、これらとCCR5との結合様式の解析を進めた（満屋）。一方CCR5

ligandsが潜伏したHIVの再活性化に及ぼす影響を検討するため、HARRTによりウイルスが検出限界以下となった患者のPBMC（CD8-depleted、CD8+CD14-depleted）培養においてRANTES（CCR5 agonist）+少量の抗CD3抗体の刺激がウイルス発現を促すかどうかを評価した（森内）。

### 柱4：免疫賦活を応用した現状の治療の進展

急性感染者に対するSTI療法は、26例全例が観察期間に入っている（岡）。これらの例において、実際にCTLが誘導されているかどうかを経時的にテラマを用いて解析した（滝口）。長期HAART療法にてウイルス抑制が持続できている症例において、自己の分離株に対する中和抗体活性を経時的に検討した。HIV特異的T細胞反応は、末梢血単核球をHIV抗原で刺激後の細胞内サイトカイン産生をFACS解析した。制御性T細胞のマーカーであるFoxp3はリアルタイムPCRで測定した（松下）。将来的な免疫療法への基礎検討として、長期未発症者であるHLAB51保有者について、CTLを解析した（滝口）。

### （倫理面への配慮）

本研究に関する臨床研究はすべて倫理委員会/受託審査委員会の承認を得た。また、対象となる患者より文書同意を得ている。

## 3. 研究結果

### 柱1：HIVに合併する悪性リンパ腫の治療法の開発

2例目（Diffuse Large B-cell Lymphoma）の治療は、03年12月26日よりEPOCH療法で開始し、05年1月現在CR（完全寛解）と判断されている。免疫療法は、ほぼ2週間隔にて04年1月末より①LAK（4回）、②ペプチド刺激 CTL+DC（8回）、③ペプチド刺激 CTL+DC（成熟型）（10回）が投与された。初期には $\gamma$ -IFN産生細胞は100未満/100万PBMCであったが、③の投与2週間後には2479個/100万PBMCまで増加し、高値が持続している（立川、江川）。

### 柱2：免疫再構築症候群に対する対処法の開発

IRS発症した1例では未発症例に比べ、PCP初発時の血中 $\gamma$ -IFN濃度は低値であった。しかし、他の症例については全例に一致した傾向を見いだせなかった（白阪）。

### 柱3：耐性ウイルスの克服

AK602 は試験管内 (IC50:0.2nM) および動物モデル (huPBL-NOD-SCID マウス) の系でも強力な抗 HIV 活性を示した。また、AK602 は強力な CCR5 に対する結合親和性 ( $K_D$  値: ~3 nM) を持ちながら、ケモカイン (RANTES) が CCR5 を介してもたらず生理的作用は完全には阻害しなかった。AK602 の CCR5 との結合は、既存の CCR5 阻害剤の結合部位とは異なり extracellular loop 2 とその直下の上部膜貫通ドメインに重要なアミノ酸のクラスターが形成されることがわかった (満屋)。この薬剤は、米国で臨床第2相試験の段階まで来た。CCR5 ligands が HIV 感染に与える影響の研究では、HAART により潜伏状態にある HIV の CD8-depleted PBMC からの発現は刺激なしでは起こらず、少量の抗 CD3 抗体の刺激だけでは多くの場合不十分であった。しかし RANTES (CCR5 agonist) + 少量の抗 CD3 抗体の刺激は、抑制されていたウイルスの再増殖を促すことがある。しかしこれらの効果は CD8+CD14-depleted PBMC ではみられなかったことから、monocytes/macrophages への作用がこれらの効果に不可欠であると考えられた (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、2005年1月現在、15例が治療を完遂、中断・脱落例11例である。完遂例では、3ヶ月ごとの平均 HIV-RNA は、STI 終了後2年以上にわたり 10,000 copies/ml 未満に抑えられていた (岡)。成功例では、CTL も誘導できていることが確認された (滝口)。慢性期患者で HAART により自己の HIV に対する中和活性の増加を認めた症例では、HIV 抗原に反応して IL2 や  $\gamma$ -IFN を産生する CD4 陽性 T 細胞の頻度が増加していた。HIV 感染症例では Foxp3 が非感染者に比較して高く、HIV 抗原に対する制御性 T 細胞活性に相関した (松下)。HLA-B\*5101 拘束性 CTL のうち 2 つの Pol エピトープ特異的 CTL は、強い HIV-1 増殖抑制能と強い HIV-1 感染 CD4 T 細胞に対する細胞傷害活性を示した。このエピトープは、3 人の LTNP で検出できたが、4 人の slow progressor では 1 つしか検出できなかった (滝口)。

### 4. 考察

柱1：抗原提示能の強い成熟樹状細胞を皮内投与することで、EBV 抗原に特異的に反応する  $\gamma$ -IFN 産生細胞が体内で確認された。この治療により EBV の体内での増殖を阻止し、B 細胞リンパ腫の進行を抑制する事が期待される。柱2：防御免疫において  $\gamma$ -IFN 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が、はっきりとした結

果を得られなかった。柱3：本研究の意義として臨床試験段階にある AK602 のより詳細な基礎的データの蓄積がなされたことに加えて、生体への影響の少ない新たな薬剤開発のための新たな知見が得られたことが挙げられる。柱4：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。有効な HAART の継続により、自己由来 HIV に対する液性免疫応答が回復する症例では、ヘルパー T 細胞反応の再構築も認められる場合が多い。一方、HIV に対するヘルパー T 細胞は制御性 T 細胞の反応で抑制されている例が認められた。

### 5. 自己評価

#### 1) 達成度について

柱1では、有効な CTL を誘導できる細胞療法の見いだせたとされる。柱2は、2年目で予定していたレベルに検討症例数、検討内容とも到達できていない。柱3は、免疫系に影響しない侵入阻害薬が開発でき、米国で第2相試験まで進んだことの意味は大きい。柱4は、ほぼ最終段階に来ている。

#### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

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ユニークな研究である。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もきわめてユニークである。初感染期の患者に対する 5 回の計画的な治療中断療法は、世界でも初めての試みでありその結果が注目される。

#### 3) 今後の展望について

柱1、柱3、柱4の研究は、すべて新しい治療法を模索する研究であるがほぼ予定通り進行しており、今後の治療法の発展に寄与することが期待できる。柱2については、もう一度綿密な計画の立て直しが必要であると考えられる。

### 6. 結論

今回の研究が進行することにより、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)

- 1) 特願 2000-137975 整理番号 YP2000-007 (平成 12 年) 4'-C-エチニルピリミジンヌクレオシド化合物
- 2) 特願 2001-079611 整理番号 ONP3741 (平成 13 年) トリアザスピロ [5, 5] ウンデカン誘導体を有効成分とする HIV 感染の予防および/または治療

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 に類似したサルウイルス(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定されていた。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、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。本研究第2年度は、1) pol の RT と INT 領域及び env を HIV-1 由来にした SHIV(SHIV-rti/3rn)のサル感染実験においてサル細胞への adaptation にともなって生じた変異の解析、2) SHIV の持続感染に与える IL-15 の治療効果の検討、3) 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—その後の follow up、の3点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) pol の RT と INT 領域及び env を HIV-1 由来にした SHIV(SHIV-rti/3rn)のサル感染実験においてサル細胞への adaptation にともなって生じた変異の解析

SHIV-rti/3rn は、SIVmac239 株のゲノムに、HIV-1 NL432 株の逆転写酵素とインテグラーゼ遺伝子およびエンベロープ遺伝子を組み込んだキメラウイルスである。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、感染性のウイルスが産生される。しかしこのウイルスは、ヒト由来の細胞株ではよく増殖するもののサル由来の細胞株(HSC-F)では増殖が極めて弱かった。そこで、サル細胞への adaptation をねらって HSC-F で 26 週間継代を続けることにした。その結果、HSC-F ならびにアカゲザル PBMC において明らかな増殖能の向上が見られたので、この継代ウイルスを3頭のアカゲザルに iv 接種したところ、いずれのサルにおいても接種後1週目に血中ウイルス量が  $10^6 \sim 10^6$  copies/ml のピークに到達し、2週目からは抗体応答も認められた。ウイルス分離、PCR の成績からも感染の成立は明らかであった。当初このウイルスはサル細胞での増殖がよくなかったため、継代中に何らかの変異が起こり、それによりサル細胞への適応ができたと考えられた。どの段階で変異が生じ、またその増殖性能はどう変化したのかを検討することが、今後の SHIV 作成の指針を得る観点からも急務と考えられた。その結果、継代前と後のウイルスではゲノム全体に渡って全部で 11ヶ所(Gag の MA と CA、Pol の INT、gp120 に4ヶ所、gp41 に3ヶ所、他に PBS に1ヶ所)の変異(PBSを除いてアミノ酸の置換を伴う変異)が認められたが、この内 Gag の CA (p27) 領域と gp41 領域の内の一つ、都合2ヶ所の変異が最もサル細胞における増殖能向上に寄与していることが判明した。

2) SHIV の持続感染に与える IL-15 の治療効果の検討

エイズ治療においてウイルスの持つ各酵素阻害剤の目覚ましい成果については言うまでもない。しかし、治療効果が保証されない新たな薬剤や物質となるとヒトへの試用の前にどうしても動物レベルでの評価が必須と考えられる。そうした物質の一つとして免疫系の特に innate の免疫系を活性化することで注目されているサイトカインの一つ、IL-15 のエイズウイルスに対する影響を調べた。ヒト精製 IL-15 は、in vitro でヒト並びにアカゲザル PBMC の培養液中に添加(25ng/ml)すると、24時間以内に K562 細胞を標的とした NK 活性を顕著に上昇することが明らかとなった。この NK 活性の昂進は in vitro では4日程度持続することも分かった。そこで SHIV89.6p が持続感染しているアカゲザル2頭に、IL-15 を1回当

たり 5 $\mu$ g、隔日で4回血中に投与したところ、2頭共に一過的なNK活性の上昇が見られ、内1頭では血中ウイルス量が one order 減少することを観察した。

3) 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—その後

10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub> のSHIV-prをアカゲザルに静脈内接種すると、血中ウイルス量は接種後2週目で10<sup>6</sup> copies/ml程度にまで上がり、その後10<sup>3</sup>~10<sup>4</sup>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10<sup>5</sup> 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/リトナビル) 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頭いずれも血中ウイルス量が検出限界(10<sup>3</sup> copies/ml)あるいはそれ以下に減少した。薬剤投与を停止すると、血中ウイルス量は直ちに元のレベルあるいはそれ以上に戻り、ウイルス分離もできた。

#### 4. 考察

SHIV-rti/3rnのサル細胞へのadaptationにおいてcriticalな変異が同定され、その分子クローンが得られたことは、同ウイルスが現在世界で最もHIV-1の領域を広く持つSHIVであることから意義が大きいと思われる。またその変異の一つがHIV-1に代えたRTやINT領域ではなくCA領域であったことは、HIV-1の種特異性がサル細胞内でのPIC (pre-integration complex) 形成の段階にあることを思えば、CAの変異がPIC全体の整合性を保つ上で必須の変化とも考えられ、興味深い発見と考えられた。HIV-1領域のさらなる拡大には、こうした一見意外な領域での変異が必須なのかも知れない。

IL-15によるNK活性の増強効果はサルでは初めて示されたものである。IL-15の血中投与により、1頭ではあったがウイルス量を下げることがあったことは、今後こうした治療法の可能性が示唆されたものと思われた。ただし、今回の成績では、まだ実用的に不十分であり、より大きな効果を求めて投与量や投与方法のさらなる検討が必要であると考えている。

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、本研究で作成した一連のSHIVとサルを用いて、PRを初めとする種々の抗ウイルス薬剤のin vivo評価が現実的に可能であることを示している。実際、SHIV89.6pに対してカレトラ剤の効果が見られなかったことは、HIV-1遺伝子を導入した効果が如実に現れたものと考えられよう。現時点ではEnv遺伝子もHIV-1由来にすると、サル個体において持続感染の成立を見ることが困難であるので、今後SIVを骨格にpolのPR遺伝子以外の領域がHIV-1遺伝子に代えられたSHIVを用いた同様の感染実験と阻害実験が早急になされるべきであろう。RT阻害剤は水溶性も高く、経口投与もPR阻害剤よりは容易に行なえるものと考えられる。

#### 5. 自己評価

##### 1) 達成度について

HIV-1由来の領域が最も広いSHIVの分子クローンが得られた意義は大きいと思われる。また新しいエイズ治療薬剤としてNK活性を促進するIL-15の可能性が浮かびあがったことも一つの成果と考えられる。本研究では、HIV-1由来の領域を拡大した新たなSHIVを作成するという方向性の研究と、それらとサルの実験系を用いて新たな治療法を探索するという方向の研究を同時に追い求

めている。これらはどちらも大きな課題で、限られた人力と予算の中で、幾分か焦点が絞り切れていないとの印象は否めない。事実、作成したSHIVの中には未だサル感染実験が行われていないものもあり、この辺り改善が必要と考えている。

##### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

現在各国の研究者らが使用しているSHIVの遺伝子構成は、当グループが10年以前に発表した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。我々は今日もHIV-1領域の拡張に成功しており、新たなSHIVの作成という点では、世界に先駆けた仕事をしているのではないかと自負している。

##### 3) 今後の展望について

本研究計画の最終年度に向けて、特にサルを使ってしかできない以下の3点に絞って研究を遂行したいと考えている。

##### 1) HAART 中断後に再び活発なウイルス産生をする臓器の解明

副作用や変異ウイルス出現などの理由により、HAARTは時に中断を余儀無くされることが多い。こうした時、実はどの臓器がウイルスの産生を行っているのかは明らかとなっていない。そこで、SHIV-prを用い、PR阻害剤投与を停止後再び現れて来るウイルスは、どのようなウイルスであるのか(薬剤耐性ウイルスか否か)、その産生臓器はどこであるのかを定量的PCRや感染性ウイルスの定量できるplaque法で明らかにする予定である。得られる知見は、治療のtargetをどこに絞るべきかを知る上で極めて有用と考えられる。

##### 2) SHIV-rtiのサル感染実験

SHIV-rti (HIV-1のRTとINT遺伝子も持つ)は、in vitroでサル細胞に感染増殖することが我々の研究で明らかとなっているが、まだサル感染実験は行われていない。先ずこのウイルスのサル感染実験を行い、HIV-1用に開発されたRT阻害剤の効果調べる予定である。この実験でも1)と同じく、HAART中断後の諸問題が同様に研究できるものと思われる。

##### 3) HAARTを補完する新たな治療法の開発

HAARTは、止めれば再びウイルスの産生が見られることが大きな問題であることは上述の通りである。このHAART期間中にもう一つ別の処置を加えることで、HAART終了後もウイルス増殖を継続的に抑える療法の可能性が追求されるべきであろう。そうした処理として中和抗体もしくはDNAワクチン(この場合は予防ではなく発症阻止ワクチンとして使用)を試みたいと考えている。

#### 6. 結論

当初期待していた研究成果は徐々に出つつある。たとえば最もHIV-1の領域が広いSHIVが得られたことは、その成果の一つであろう。少なくとも従来他に例を見ない新しいサルを用いた動物モデル系が開拓された意義は大きいものと考えられる。しかし一方、HIV-1領域を拡大することには限界も見えてきており、現在使用できるもので治療法の探索を行うべきとも考えているところである。より効果的な治療法の提案に向けてより一層の努力をしたい。

#### 7. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

なし。

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（（独）国立病院機構名古屋医療センター血液免疫研究部 部長）、岡田 秀親（福祉村病院長寿医学研究所 所長）

## 1. 研究目的

HIV 感染細胞に反応するヒト IgM 抗体 (9F11 など) を作成することができた。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 感染患者の血液中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 (CF8 など) 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ておきたい。

## 2. 研究方法

9F11 で抗体スクリーニングでクローニングした cDNA は 70 kD の蛋白質をコードするもので 30 kDa のものではなかった。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する。そこからリンカーを切断し、抗原分子の同定を試みた。抗原分子の同定には、二次元電気泳動法も活用した。精製分離した抗原やの断片のアミノ酸配列を解析して抗原分子の特定を試みた。

HIV 感染患者末梢血 CD4 陽性細胞での 9F11 抗原の分布と発現の有無を蛍光抗体染色法で解析した。HIV 感染患者の末梢血リンパ球（必要に応じ

CD8 陽性細胞は除去しておく）の初代培養に 9F11 等のヒト IgM モノクローナル抗体と新鮮ヒト血清を補体源として添加することにより HIV プロウイルスを保有した感染リンパ球を排除できる条件について検討を試みた。感染細胞の抑制は P24 の ELISA 定量や、HIV 遺伝子のリアルタイム PCR 法で解析した。HAART などの化学療法を受けている患者や未治療の患者の末梢血リンパ球についての比較解析も試みた。

Nef に対するヒト IgM モノクローナル抗体 CF8 を用いて、潜伏感染細胞の検出と排除を試みた。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役組織染色法等も用いて解析した。

IgM 抗体を大量に作製すると共に、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た。また、過剰な補体反応による副作用に対処するため、C5a 阻害ペプチドを開発し、その活用法についての検討も行った。

（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、（独）国立病院機構名古屋医療センター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した。その際、得られた個人情報を守られるよう慎重に配慮している。

## 2. 研究結果

9F11 を精製し、N 末 10 個のアミノ酸配列を解析した。その配列はデータベースにはみつからず、

新規なタンパク質と考えられた。

HIV 感染患者末梢血に 9F11 抗原陽性細胞が認められた。HIV 感染患者血液から分離したリンパ球分画にヒト IgM 抗体 9F11 を新鮮ヒト血清補体と共に加えて初代培養を行い上清中の P24 を定量する解析で、HIV 感染細胞をほぼ完全に排除できた症例が多かったが、抵抗性の症例も認めた。HIV 感染患者 CD4 陽性細胞における 9F11 抗原陽性率は 4～29% (平均 12%) の分布を示した。9F11 抗原陽性率は CD4 リンパ球数との逆相関を認めた。

SHIV や SIV を感染させたサル末梢血にも 9F11 抗原陽性細胞が出現することが分かった。そこで、SIV 感染サルに 9F11 を投与する予備的実験を開始した。最初のサルでは 9F11 をゆっくると静脈内に投与したためか、免疫複合体形成によると考えられる症状は全く認められなかったが、2頭めでは短時間で投与したためか、ショック症状を呈して死亡した。3頭めは軽度のショック症状が認められた。

ショック症状を制御するために、C5a アナフィラトキシンを強力に制御できるペプチド剤 (AcPepA) を開発した。サルに LPS 投与でショックを起こさせ血圧が測定不能状況になってから AcPepA を 2mg/kg 投与すると速やかに回復することが分かった。

### 3. 考察

9F11 抗原を精製し、その N 末 10 個のアミノ酸配列を決定したがデータベースには見つからない配列であった。再度精製を行い、配列の確認を行ったうえで、その配列を基にプライマーを設計して PCR 法での遺伝子クローニングが必要である。

患者末梢血の感染細胞を 9F11 と補体血清の処理で多くの場合感染細胞を激減できたので治療への応用が期待できる。また、HIV 感染患者 CD4 細胞において 9F11 抗原の発現が誘導増幅されると考えられる。

生体内で起こりうる過剰補体反応を避けるためには静脈内投与よりも皮下投与や腹腔内投与を検討する必要がある。C5a 阻害ペプチド剤などを 9F11 と混合して投与することも検討したい。

### 4. 自己評価

#### 1) 達成度について

感染患者の末梢血リンパ球初代培養に対する有効性が認められたことは心強い。

#### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

IgM 抗体治療の有用性高まり、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

トランスレーショナルリサーチも視野に入れて研究を展開したい。

### 5. 結論

IgM 抗体が有用である可能性が高まった。

### 6. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

・特許第 3463143 号「糖鎖認識抗体及び HIV 感染症資料剤」(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

・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

・国際出願番号 PCT/JP03/08305 (2003 年 6 月 30 日) 同上

・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

・国際出願番号 PCT/JP03/08306 (2003 年 6 月 30 日) 同上

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（鹿児島大学大学院難治ウイルス研 教授・センター長）

分担研究者：

馬場 昌範（鹿児島大学大学院難治ウイルス研 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 信頭（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す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) *In vitro* の系を用いた中枢神経障害の病態機序の解析、5)予防・治療の薬剤の開発、6)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。

## 3. 研究結果

### HIV 脳症の臨床病態：

前回の全国疫学調査の結果をふまえ、対象に全国のエイズ拠点病院 368 施設を対象に 2002 年、2003 年の実態について第 2 次疫学調査を実施し、現在までに回答が寄せられた 192 施設 (52%) のデータについて解析した。AIDS 患者数 987 名で、神経合併症は 97 名 9.8%にみられ、その比率は以前の調査結果よりも低下していた。しかし、その低下は他の HIV 関連疾患の低下傾向よりも緩やかで、相対的な神経合併症の頻度は増加していた。78.3%は神経症状が AIDS の初発であった。HIV 脳症は 14 名で、いずれも HAART 未治療群で発症していたが、HAART 治療群ではトキソプラズマ、クリプトコッカス脳炎、サイトメガロウイルス脳炎、PML、脳原発悪性リンパ腫が発症しており、特に、後 3 者は HAART 治療下で CD4 が保たれた低ウイルス量の段階で発症しており、HAART 治療下の神経合併症対策上注目すべき疾患であることが明らかとなった。薬剤による末梢神経障害や長期生存に伴う高齢化の影響と思われる脳血管障害の合併なども確認されており、この点も HAART 治療の継続における問題点として重要である。

### 病理解剖例での神経病理学的解析：

ウィーン大学 Budka 教授より標本の提供を受け、1987 年以降の 2 万件を超える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、中から脳に日和見疾患のないエイズ剖検大脳 20 例を抽出し、前頭葉皮質におけるミクログリアの活性化、astrocyte のグルタミントランスポータ EAAT-2 の発現、astrocyte の増生程度、HIV 陽性細胞との関連性を検討した。HIV 脳炎の病理所見とは独立して、大脳皮質にミクログリアの活性化と EAAT-2 の発現低下が生じていること、astrocyte の変性が先行していることを見出した。サルエイズの検索で示唆された「独立した二つの神経傷害機構」がヒトでも存在することを示す所見である。一方、駒込病院剖検脳でも同様の検索を行い、一部の症例で astrocyte の EAAT-2 発現低下を認め、臨床像、ウイルス動態との関連を検索している。

### 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学的解析を行った。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検索し、免疫不全に伴ってミクログリアの活性化と astrocyte のアポトーシス、EAAT-2 発現低下が生じており、これらの病変局所にはウイルス感染細胞の浸潤は伴っていないことを、免疫染色、レーザーマイクロダイセクションによる抽出 DNA の PCR 法によりを明らかにした。ヒト剖検例と一致する結果である。炎症性病態については脳に存在するマクロファージ系細胞での感染が病態の指標となるため、細胞指向性、病原性が異なる 3 種のウイルスをアカゲザルに感染し、細胞指向性、病原性、組織での感染細胞について初期感染期（感染後 1、2 週）での消化管、主要リンパ組織での感染細胞の局在を検討した。ウイルスにより感染細胞は異なるが *in vitro* の細胞指向性とは一致しない結果が得られている。さらに、感染早期脳への感染成立の有無と局在、抗原に対する生体の免疫動態の検索を開始した。

2) マウスエイズモデルを用いた解析では、TNF- $\alpha$ などのサイトカインによって誘導され、エイズ脳症発症の 1 つの原因物質と考えられているキノリン酸合成の律速酵素である indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) とエイズ脳症について、IDO の阻害剤をマウス脳症モデルに投与し、その効果について検討した。脳症が発症することが確認されている感染後 10 週後の肺および脳の IDO 活性は著明に増加し、その代謝産物であるキノリン酸合成は著しく増加した。IDO の阻害剤 1 メチルトリプトファン の投与により、その上昇が有意に抑制された。サイトカインにより誘導された IDO およびリコンビナントタンパクによる解析結果から、IDO は peroxynitrite によりニトロ化による修飾を受け、酵素活性が阻害されることが明らかとなった。さらに 2 次元 LC/MS/MS システムにより解析した結果、IDO タンパク中の 3 カ所のチロシン残基でニトロ化が確認され、1 番目のチロシン残基のニトロ化が IDO 酵素活性の低下に影響することが明らかとなった。IDO はエイズ脳症の指標、治療の標的分子として注目される。

### *In vitro* の系を用いた中枢神経障害の病態機序の解析

エイズ脳症の病態におけるアストロサイトの役割を明らか

にする目的で、ヒトアストロサイト初代培養細胞と HIV-1 非感染および感染ヒトマクロファージの培養上清を用い、上清がアストロサイトの増殖と遺伝子発現などに与える影響について検討した。その結果、1) HIV-1 感染・非感染マクロファージの培養上清は、in vitroにおいてヒトアストロサイトの有意な増殖の活性化を引き起こし、その作用は HIV-1 感染マクロファージにおいてより顕著であった。2) HIV-1 感染・非感染マクロファージの培養上清は、ヒトアストロサイトにおいて、SDF-1 $\alpha$  産生、MMP および TIMP 発現の有意な増加を引き起こした。3) HIV-1 感染・非感染マクロファージの培養上清によるヒトアストロサイトの増殖活性化は抗 SDF-1 $\alpha$  中和抗体および MMP 阻害剤により抑制された。以上の結果から、HIV-1 感染および非感染マクロファージより分泌された因子は、SDF-1 $\alpha$  および MMP 発現の活性化を介して、強力にアストロサイトの増殖活性化を引き起こすと考えられ、このことは HIV-1 脳症の発症機序に関与すると思われる。

14-3-3 蛋白質がエイズ脳症患者の脳脊髄液中に特異的に検出されることから、ADC の脳内病変の進行状況を的確に把握できるマーカーとして提唱してきた。この際、まず 14-3-3 蛋白質は HIV 感染に伴い神経細胞内でその発現が反応性に増強し、炎症の進行に伴い神経細胞が破壊されると髄液中への逸脱が認められることから HIV 感染による神経細胞死での 14-3-3 蛋白質の役割に着目してきた。HIV-1 による細胞死に関与する gp120 の primary target と考えられている CXCR4 を発現し、gp120 によって実際に細胞死が誘導されるヒト由来の初代血管内皮細胞培養 (HUVEC) をモデル細胞として、14-3-3 蛋白質の gp120 による細胞死に果たす役割を検討した。14-3-3 蛋白質は gp120 による細胞死カスケードの internal pathway (ミトコンドリア経路)において、Bad と結合して細胞死に抑制的に働く重要な制御因子である事、通常 Bad は細胞質内で 14-3-3 $\tau$  と特異的に結合する事で不活化されているが、gp120 による細胞死では、14-3-3 $\tau$  が gp120 より Bad (serinell12) の脱リン酸化を防ぐ事で Bad のミトコンドリア移行を抑制し細胞死を制御している事が判明した。一方、HIV 感染による免疫不全症候群の主たる原因となる細胞死は、一般的に HIV-1 にアタックされた CD4+ T 細胞表面に発現した Fas 等のデスリガンドによる external pathway が重要である事がわかっている。今回、この古典的細胞死誘導経路での 14-3-3 蛋白質の役割をヒト脳由来の初代血管内皮細胞で解析した所、gp120 は Bid の活性化を引き起こし特定の 14-3-3 ファミリーがその過程に関与している事を新たに見出した。これらの結果は、14-3-3 蛋白質が HIV 感染(gp120 依存的)による細胞死においてより包括的にその制御を担っている事を示唆すると共に、HIV 脳症発症の機序解明の手掛りを与える事が期待される。

#### 予防・治療の薬剤の開発：

多くの細胞性タンパク質およびウイルス性タンパク質に存在するタンパク質の N-ミリスチル化は、それらタンパク質の活性発現に重要であり、N-myristoyltransferase (NMT) はその触媒酵素として知られている。N-ミリスチル化阻害剤によって Pr55gag の N-ミリスチル化が阻害された結果、HIV-1 複製が抑制されることは周知の事実である。N-ミリスチル化阻害剤は疎水性の高い誘導体が多いことから、脳組織への移行が比較的容易であると予想され、脳内における HIV-1 複製阻害効果が期待される。しかしながら、宿主性タンパク質の N-ミリスチル化もまた同時に阻害されるため、細胞毒性が N-ミリスチル化阻害剤の問題点であった。近年、human NMT (hNMT) には 2 つの遺伝子 (hNMT1 および hNMT2) が存在し、細胞内で複数の isozymes で存在することが明らかとなった。そこで本研究では、hNMT isozyme 特異的な機能抑制が低毒性の HIV-1 複製阻害を可能にするかを検討した。hNMT isozyme

特異的な siRNA を用いた結果、hNMT1 の特異的な抑制による HIV-1 複製阻害が観察された。また各 isozyme シングルノックダウンによる細胞増殖抑制効果は各 isozyme ダブルノックダウンによるそれよりも低い結果となった。以上の結果から、hNMT isozyme 特異的な機能抑制は低毒性の HIV-1 複製阻害が達成できると期待される。このことから、各 hNMT isozyme 特異的な阻害剤の開発が必要である。

#### 発症に関わる内的・外的因子の検索：

HAART 導入以後 HIV 脳症の疫学的背景の変化は著しく、HIV 脳症の発症機序が変化してきていることを伺わせる。HAART 導入以前は HIV の複製に伴う炎症の側面が強く考えられていたが、導入後は中枢神経系内の炎症がなく、HIV RNA 量が低いにもかかわらず HIV 脳症が増し HIV 複製に伴う炎症以外に免疫機構の関与が予測され、また HIV 脳症は HIV 感染者全てに発症するわけではなく一部に発症するため、発症要因として宿主因子の解析が必須となってきている。我々はレトロウイルス持続感染により起こる HAM 発症宿主因子の解析を行って来ているが、今回はこの要因と HIV 脳症発症要因の関連を検討した。両疾患で発症危険度を増していたのは TNF-alpha -863A allele であったが、SDF-3' +801 AA genotype と IL-10 -592A allele は HAM で危険度を減じ、HIV 脳症では危険度が増していた。MCP-1 promoter -2578A/G 多型は HAM では発症危険度には関連がなかったが、HIV 脳症の危険度を増していた。他の因子に拡大して調べると共に、全国疫学調査により得られていた感染者をコホートとした我が国独自の調査を開始したい。

#### 4. 考察・自己評価

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、第 2 次全国疫学調査を実施し、HAART 治療下で HIV 関連疾患が減少する中、神経合併症の相対的頻度が増している実態が明らかとなった。HIV 脳症自体は減少しているが、緩徐進行性潜在性の病態をとることを予想しており、神経内科医、精神科医によるより詳細な観察が必要である。一方で、HAART 治療下で免疫不全の進行を伴わずにサイトメガロウイルス脳炎、PML、脳原発悪性リンパ腫が発症しており、今後注意深い観察と対策が必要である。調査の回答率をさらにあげて、我が国のエイズ神経合併症の全体像を明らかにし、将来の神経系病態の予測と発症予防法の開発に寄与していく。剖検例についてはウィーン大学症例、駒込病院剖検例の解析がすすみ、ヒトにおいても HIV 脳炎と大脳皮質の変性病態は独立して生じていることが示唆される所見を得ることが出来た。さらに症例を増やして検討していく。また、大脳皮質の変性病態にはアストロサイトの傷害が重要であることを示す所見が、剖検例の解析、in vitro の解析から得られており、発症病態の解明へつながることを期待している。また、これまでの本研究班の研究により、病態に関与し、治療の標的分子の候補として Tat の亜鉛結合 cysteine-rich domain、14-3-3 蛋白質、インドールアミン 2,3 ジオキシゲナーゼ、N-ミリスチル転移酵素、TNF- $\alpha$  がリストアップされており、治療薬の開発につなげたい。

#### 5. 結論

- HAART 治療下で神経合併症の相対的頻度が増している。
- ヒトにおいても HIV 脳炎と大脳皮質の変性病態は独立して生じている。
- 大脳皮質の変性病態にはアストロサイトの傷害が重要である。

#### 6. 知的所有権の出願・取得状況

なし

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)、片野晴隆(国立感染症研究所 室長)、中村哲也(東京大学医学研究所 助教授)、竹内 勤(慶應義塾大学医学部 教授)、川上和義(琉球大学医学部 助教授)、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 講師)

## 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、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。さらに、本年度は視点を改めてこれまでのデータの解析を行った。(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 などを用いて検討し、病変発生にいたる遺伝子変異について解析した。またハイリスク患者の血液を用いて早期発見が可能かどうかについて検討した。(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診断時にはしばしば重症化し治療抵抗性である。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。また、クリプトコックスの病原因子について変異株を用いて検討した。また、高度免疫不全状態で問題となる薬剤耐性カンジダの治療法について検討した。(川上、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

高度免疫不全状態に陥った HIV 感染者に HAART を開

始した際にみられる日和見感染症の発症/悪化は免疫改善に伴うものとして免疫再構築症候群(IRS)と呼ばれ、HAART 時代の新たな問題点である。本症の発生頻度と疾患分布を調査し、併せて検討症例の集積を行いデータベースを作成した。また、特に IRS としての非結核性抗酸菌症およびサイトメガロウイルス(CMV)網膜炎について retrospective に解析した。(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

日和見合併症を発症して来院した病院においてはじめて HIV と診断される割合は HIV の診断理由の大きな部分を占めているが、発見の端緒となる病院は必ずしも HIV/AIDS に精通した施設ではなく、治療成績が危惧される。HIV 感染症を疑うための指針や、診断のための技術、治療指針の策定や開発は重要な課題である。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、本年度は米国 CDC ではじめて公開された日和見感染症の治療ガイドラインを解析・日本語化を行った。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。(源河、竹内、安岡、中村、古西)

(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。個々の疾患比率では i)ニューモシスチス肺炎 38.2%、ii)サイトメガロウイルス感染症 16.3%、iii)カンジダ症(主に食道) 10.8%の頻度が高かった。また、ニューモシスチス肺炎、悪性リンパ腫、カポジ肉腫の増加傾向が特徴的であった。昨年も報告したように抗 HIV 療法を受けていない例(2003 年；82.5%)、HIV 診断後 3 ヶ月以内の例(2003 年；80.6%)が増加している点が上げられた。HAART 導入例では導入後 6 ヶ月以内の症例が約 3 割を占め、最近では免疫再構築症候群による発症の割合が高いことが示唆された。日和見合併症を発症した患者の転

婦は 17.8%(2003 年)が死亡であり、現在でも日和見合併症が患者予後に大きな影響を与えている実態が明らかとなった。

## 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

HIV 合併リンパ腫の病理診断から見た頻度は欧米では HAART 導入後に変化が見られていると報告されているが、日本の主要 3 病院の病理部における調査ではこれまでの diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) がほとんどを占めるものから、それ以外の病型の増加が見られてきており、特に Burkitt lymphoma が目立つようになってきていた。また、DLBCL でもこれまで日本では EB ウイルス抗原陽性例がほとんどであったものが、その割合の低下が見られていた。

Burkitt lymphoma 2 例の治療経過では CODOX-IVAC 療法が有効であったが、HAART の導入は副作用の増強のため困難を強いられた。

HIV に見られる DLBCL ではほとんどが節外性発生であるがこの理由は明らかでなかった。DLBCL では 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、節外性発生の要因としてもこの LFA-1 が重要であることを明らかにした。

カポジ肉腫についても HAART+ribosomal doxorubicin による化学療法について、および病理診断の技術提供として研究を継続中である。

### b) 進行性多巣性白質脳症

本年度も進行性多巣性白質脳症 (PML) の診断依頼が 45 件あり、このうち 6 例で陽性であった。PML 例での JC ウイルス遺伝変異としてこれまで報告してきた調節領域変異とともにコード領域 (VPI ループ) でも変異が認められることを明らかにした。PML を発症していない免疫不全状態の患者 14 例の血液からは PML 遺伝子は検出されなかった。

### c) 難治性・耐性真菌症

免疫不全状態での *C.neoformans* 治療を強化の手段として CpG-DNA による免疫賦活の効果を検討した。実験的感染マウスでは CpG-DNA を加えることによって生存率の改善が確認され、また HIV で見られる CD4 機能低下状態で行ってもこの効果が認められ、HIV 感染症でも有効である可能性が示唆された。*C.neoformans* の病原因子欠損株の特徴を検討したところ、37 °Cでの発育性が低下していた。

アゾール耐性カンジダの薬剤感受性がラクトフェリンを併用することにより改善することを明らかにした。この作用は血清添加で誘導されるが、HIV 感染者の血清では誘導が低下することが明らかとなり、この原因蛋白の検索を行っている。

## 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、このうち帯状疱疹、非結核抗酸菌症、CMV 感染症、ニューモシスチス肺炎、結核症について詳細を調査した。IRS は CMV 感染症、ニ

ューモシスチス肺炎、結核症では罹患疾患の再発・再燃として起こることが多いのに対し、帯状疱疹、非結核抗酸菌症は先行感染症が明らかでないことが多かった。このほか各疾患で IRS の起こり方に特徴があり、治療と予防を考える上では疾患別に対策を講じる必要があると考えられた。発症に特徴的な HAART はなくどのような組合せでも生じていた。

非結核抗酸菌症ではリンパ節炎型の頻度が高く、HAART の中止を必要とする割合が高かった。

CMV 網膜炎では定型的な網膜炎とともにブドウ膜炎を起こす頻度が高く、発症時点での網膜病変の広がりとその後の再発や眼機能予後に関連していた。

## 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、その効果的な習得・技能維持のための対策を検討した。また CD-ROM の作成しており、近日中に配布予定である。米国 CDC ではじめて日和見合併症の治療のガイドラインが公表されたため、この日本語要約版を作成した。

## 4. 考察

本年度の検討で、HAART が一般化した後に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% にも達しており、本症の重要性が明らかとなった。免疫再構築症候群は疾患により病態や特徴が異なることが明らかとなり、今後は個別の疾患として検討していく予定である。本年度は CMV や非結核抗酸菌症について検討することができた。悪性リンパ腫やクリプトコックス、耐性カンジダ症、PML の診断や治療にも新しい知見が得られた。今後これらの成果をさらに進めつつ、診断や治療の指針を総合的に構築していく予定である。

## 5. 自己評価

### 1) 達成度について

本年度は病態の調査解明、新しい治療法の端緒についての新知見を得るなどおおむね予定を達成したと考えている。また講習会やセミナーの開催などそのフィードバックについても開始することができた。

### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

日本の HIV 感染症に伴う日和見合併症の動向や、問題点について全国集計、アンケートによってデータを集積しており、国内では他では得られない貴重なデータが集積されている。また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 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（東京大学医学部 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

多剤併用抗レトロウイルス療法 HAARTの登場以降、HIV感染者の予後は著しく改善してきている。このことによって、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。1997年から2000年までの複数の統計によると、HIV感染患者の死亡のうち、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関連死が約半数となっている。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必要である。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。HIV感染者に合併する慢性HCV感染症の現状を把握し、治療法の開発を目指すことが急務といえる。

### 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。その結果、我が国の HIV 感染症例の約20%がHCVに重複感染していることが判明した。この結果を受けて、エイズ拠点病院である当班員の施設において HIV・HCV 重複感染症例の肝疾患進展度の実態調査を行なった。各施設の倫理委員会の進行状況等で現在調査は進行中であるが、HIV・HCV 重複感染症例のうち約90%の症例でHCV量が高値（ $\geq 100$  KIU/ml）であることが判明した（対照のHCV単独感染では72%）。さらに、総ビリルビンが

3.0 mg/dl を越える進行肝硬変で、肝移植の対象となる症例が少なからず存在することも明らかになった。

- 2) HIV 感染症合併慢性 C 型肝炎に対して、リバビリン併用ペグ・インターフェロン療法を実施している。終了例も増加してきているが、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。血小板値の低い例が多いため、部分脾塞栓(PSE)を施行後にペグ・インターフェロン治療を行なう試みも行なわれている。
- 3) HIV 感染症への B 型肝炎重複感染予防のため、HB ワクチン投与等の予防法を実施中である。
- 4) HIV・HCV 重複感染症に対する生体肝移植を施行し、更に安全なドナー肝手術法の開発を図っている。H16年度は HIV・HCV 重複感染症の 3 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行なった。北大で 7 例、大阪で 14 例、福岡で 10 例の HIV・HCV 重複感染例に対して抗 HCV 療法が行なわれてきている。また、広島では、進行肝硬変に対して生体肝移植が施行された。

#### 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極めて重要と思われる。

HIV 感染症に合併する C 型肝炎に対するリバビリン併用 (ペグ)・インターフェロン・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 HCV 単独感染症に比してやや低めである。通常の慢性 C 型肝炎患者に比して HCV 量が約 1 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、リバビリン併用ペグ・インターフェロン 48 週後に更にペグ・インターフェロンのみの追加投与を行なうスケジュールで治療を開始している。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。特に、HAART 施行中は副作用の発生が多い。HAART の regimen について慎重な検討が必要である。

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。H16年度は 4 例に移植が施行された。うち 1 例では、残念ながら不幸な転帰をとった。CD4 リンパ球数を移植適応の目安と考えてきているが、「手術直前の CD4 数の減少速度」を考慮する必要がある。

#### 5. 自己評価

##### 1) 達成度について

当初設定した 4 つの目的について、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。抗 HCV 治療については更に治療効果を高める工夫が必要である。

##### 2) 研究成果の学術・国際・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、特に切実な問題となっていており、その意義は大きい。

##### 3) 今後の展望について

抗 HCV 療法に関しては、現時点ではより長期の治療がオプションとして考えられる。生体肝移植に関しては適応基準が次第に明らかになってきているが、より明確な指針の作成を目指す必要がある。

#### 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押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臨床的・疫学的研究

課題番号：H15 - エイズ -007

主任研究者：稲葉 憲之（獨協医科大学 大学病院長）

分担研究者：戸谷 良造（医療法人和合会和合病院 医師）、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（国立病院機構仙台医療センター 医長）、塚原 優己（国立成育医療センター 医師）

## 1. 研究目的

わが国における HIV 感染は近年急増傾向にあり、この傾向は先進国の中では唯一の例外である。隣国の中国ではエイズ患者の急増にその対策が追いつかず、「棄民政策」さえ台頭しつつある（中日育児シンポジウム、2004 年 9 月、西安）。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 HIV 母子感染ゼロを目指して、①周産期における HIV 感染対策の現状把握、②日本の国情に合致した最も有効な母子感染防止対策の確立と標準化、③HIV 母子感染及びその対策に関する医療関係者のみならず一般国民に対する啓発教育・広報活動の推進、を行う。

## 2. 研究方法

### (1) 周産期における HIV 感染対策の現状把握

以下の項目について後方視的または前方視的に実施する。

①妊婦 HIV スクリーニングの実施状況の一次、二次アンケート調査研究（産科施設 1570、小児科施設 3142）（和田担当）、②HIV 感染妊婦並びにその出生児の後方視的調査研究（喜多、外川担当）、③HIV 母子感染予防対策未施行例の社会疫学的解析と予防対策に関する研究（戸谷分担）、④HIV 母子感染における  $\alpha$ -defensin の役割に関する臨床的検討（稲葉分担）

### (2) 日本の国情に合致した最も有効な母子感染防止対策の確立と標準化

以下の 6 項目について検討した。

①妊婦 HIV スクリーニングの実施率向上（和田担当）、②経膈分娩を可能にする妊婦血中ウイルス量の同定（喜多担当）、③HIV 母子感染予防対策未施行例対策の確立（戸谷担当）、④わが国における HIV 感染妊娠発生数の将来予測（塚原担当）、⑤妊婦 HIV スクリーニング検査における偽陽性率の検討と陽性例への対応（塚原担当）、⑥感染女性の性行動と妊娠にかかわる問題の整理と妊娠前支援体制の強化（塚原担当）

### (3) 啓発教育・広報活動の推進

以下の項目につき啓発教育・広報活動を行った。

①「HIV 母子感染予防対策マニュアル」の改訂・配布（塚原担当）、②患者向け小冊子作成・配布（塚原担当）、③研究

成果発表会（エイズ予防財団主催）（和田担当）、④学会活動、マスコミを通じた報道・広報活動（稲葉担当）

（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、必要があれば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

### (1) 周産期における HIV 感染対策の現状把握

①HIV 検査実施率は平均 91.1% で前年度の病院調査結果を 1.4% 上回り、調査を開始した平成 11 年度に比べて実施率は 17.9% 上昇した。②県別の検査実施率では最高 100% から最低 53.9% と相変わらず地域較差がみられたが、60% 未満の県は前年度の 7 県から今年度は 1 県と較差は縮小する傾向にあった。③AZT 単剤投与＋選択的帝王切開（帝切）による母子感染予防策をおこなうと、わが国における妊婦 1 万人対 HIV 陽性妊婦 1 人の発生状況で全例スクリーニングは経済性からみて妥当であるとの結果を得た。④エイズ拠点病院では HIV 陽性例の経験、説明パンフレットの準備、帝切シミュレーションの有無など全ての項目で 50% に満たなかった。⑤HIV 感染妊婦の 2004 年度追加症例は 46 例で、昨年比して 15 例の増加が見られた。⑥小児科調査では新たに 27 例の新規報告児があり、その内 5 例が感染例であった。⑦HIV 母子感染確立症例は 35 例で、33 例（94%）は HIV 母子感染対策未施行例で、21 例（60%）が母乳哺育であった。

### (2) 日本の国情に合致した最も有効な母子感染防止対策の確立と標準化

①HIV 母子感染児の 94% が妊婦 HIV スクリーニング未施行であり、同スクリーニングの重要性が再認識された。②産婦人科 2 次調査のデータに基づいた 2007 年までの HIV 感染妊婦数の予測推計では 10 万分娩当たりの感染妊婦数は増加傾向にあり、2007 年までに 34～92 人程度まで達する見込みである。③妊婦スクリーニング検査偽陽性率及び陽性的中率はそれぞれ 0.34%、3.8%～10.3% で、受検妊婦の心理的重圧は少なくないことが示唆された。④拠点病院の看護師・助産師

269名中83名(31%)が女性感染者の感染予防、避妊、妊娠に関する相談・指導経験を有していた。また、妊娠と同時にHIV感染が判明するケースが多く、若年者に対する啓発教育の必要性が示唆された。

### (3) 啓発教育・広報活動

①妊婦HIV偽陽性率がきわめて高い事実が明らかとなったことから、マニュアルの中から「II. 妊婦HIVスクリーニング検査施行に際しての説明と同意」の項に改訂を加えた。②妊婦HIV検査のIC取得の一助となるような、A4三つ折の妊婦配布小冊子を作成し、スクリーニング実施率の低い九州地方の産科施設を中心に40,000部を配布した。③研究成果発表会をエイズ予防財団主催のもと、3回開催した(10月2日:大分市、10月17日:東京都、11月7日:山形市)。④以下の学会・広報活動を行った。学会活動:第56回日本産婦人科学会(5)、第107回日本小児科学会(2)、第22回日本産婦人科感染症研究会(5)、第45回日本臨床ウイルス学会(1)、第18回近畿エイズ研究会(1)、第40回日本周産期・新生児医学会(3)、第17回日本性感染症学会(3)、第18回日本エイズ学会(シンポジウム:10)、(一般演題:4)、11th ICID(1)、第15回国際エイズ会議(1)、第9回国際生殖免疫学会シンポジウム(2)、広報活動:TV報道(2004/10/2;NHK「News645」,「News855」)、新聞報道(2003/2/20;読売新聞、2003/11/24;盛岡タイムス、2003/11/25;読売新聞、2004/7/14;読売新聞、2004/10/3;大分新聞、2004/10/17;毎日新聞、2004/10/18;毎日新聞) HCV

### 4. 考察

妊婦HIV抗体検査実施率は年々改善が見られ、特に病院施設ではHCV抗体検査実施率(94.4%)に迫ってきた。地域較差の改善は更に著明で、60%未満の県は前年度の7県から今年度は1県にまで縮小し、当班研究始め種々の努力の効果が示唆された。一方、一時見られた感染妊婦の減少傾向は「再増加」に転じ、益々HIV母子感染対策の重要性が明らかとなった。更に、小児科班では新たに27名の出生児が見出され、その内5名(19%)が感染児であった。感染児35名の詳細な追跡調査により妊婦HIVスクリーニングの不可欠さは明瞭となった。更に全妊婦スクリーニングの「医療経済性」シミュレーションでは近未来・中長期予測共に「増加傾向」が予測され、母子感染対策事業は国家的規模で遂行されるべきとの示唆を得た。

HIV母子感染予防対策に関する啓発教育・広報活動は絶え

間なく、日常的に実施するべきである。エイズ患者が増え続け、「棄民」に近い施策に迫り込まれている中国の状況を「他山の石」とすべきである。研究成果発表会(エイズ予防財団主催)、HIV母子感染予防対策マニュアル(偽陽性等の問題は毎年補充改訂)、患者向け小冊子、学会・マスコミ広報活動を益々充実させ、活発にすべきである。

### 5. 自己評価

#### 1) 達成度について

本研究は①周産期におけるHIV感染対策の現状把握、②日本の国情に合致した最も有効な母子感染防止対策の確立と標準化、③啓発教育・広報活動の全てに亘って具体的な成果を挙げた。特に評価すべきは、感染小児の解析と医療経済学的な試算により「全妊婦スクリーニングの不可欠性」を明らかにしたことである。提出計画の85%近くが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

前述の如く、国内外で多数の発表を行い、学術的、国際的に貢献をしたと考える。また、前項で述べたように、当班の研究成果は全国3箇所で開催され、テレビや新聞等のマスコミに繰り返し取り上げられ、HIV母子感染予防対策の面から社会的にも十分な貢献を果たしたと考える。

#### 3) 今後の展望について

わが国の新規エイズ患者・HIV感染者は昨年始めて年間1000人の大台を超えた(1114人:厚生労働省集計速報値、日本経済新聞1月27日、2005年)。また、当班の成績をもとにした妊婦感染者数の予測でも2007年までは確実に増加し続けるとの推測がなされ、昨年より再増加に転じた今年度の捕捉感染妊婦数を反映する予測結果であった。

このような現状を踏まえると、当班が営々と持続してきた①周産期におけるHIV感染対策の現状把握、②わが国独自の母子感染防止対策の確立と標準化、③啓発教育・広報活動の推進の3骨子は今後も更に発展し、学術的には言うまでもなく社会的にも優れて貢献するものと確信致す。

### 6. 結論

HIV母子感染予防対策のすべては全妊婦スクリーニングから始まり、次いでわが国に合致した予防対策の立案とその改訂、啓発教育活動に尽きる。この事実が当班の研究成果より明らかになった。

#### 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 : 牛島 廣治 (東京大学医学部 教授)

名取 道也 (国立成育医療センター 周産期科部長)

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(IVF-ET)に関する基礎的、臨床的研究であり、妻の二次感染をほぼ0とし、妊娠しようとする臨床応用を進めている。その有用性および安全性を明らかにするとともに、より簡便である人工授精、実施のための研究を進めている。第2の研究は、ベトナムでの妊産婦のHIV感染について分子疫学的手法によりHIVのサブタイプ、薬剤耐性等の現状を明らかにすることを目的として調査する。さらにHIVの母子感染のうちおもに子宮内感染の機序を解明するためにウイルスおよび宿主両面から検索を行う。第3の研究は母乳中に含まれるHIVを低コストで減少・除去可能な装置を開発して、母乳保育によるHIV母子感染リスクを回避・減少させることを目的とする。

## 2. 研究方法

HIV 感染男性非感染女性夫婦に対する IVF-ET の臨床応用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味を確認した。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。媒精後に培養液につき再度 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抗 HIV 抗体, HIV-RNA 検査を 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も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 法を組み合わせて HIV を除去してきたが, ヨード剤を用いた HIV 分離法を検討した。また, IVF-ET より簡便で患者の負担の少ない人工授精実施のための基礎的検討として, 洗浄した精子浮遊液を静置した場合の精子の運動率などの変化について検討した。HIV 感染者に対する治療が精子にどのような影響を与えるかを検討するため, 電子顕微鏡や特殊染色による検討を行った。

第 2 の研究については以下のとおりである。(1) ベトナム、ホーチミン市第一小児病院において HIV 陽性産婦から生まれた児の末梢血のサンプルを採取し、昨年度開発したサブタイプ鑑別用プライマーを用いた PCR によるサブタイプピングを行った。(2) 三つの絨毛癌細胞 (BeWo, JEG-3, JAR) にどのような G タンパク受容体が発現しているかを RT-PCR を用いて調べた。(3) HeLa/KS386 と HeLa/T4 を 1:1 の比率で混ぜ合わせ、経時的に融合過程を観察した。プラスチックシートに培養した両細胞を等量添加して、経時的に細胞を固定した。その細胞を 1% 四酸化オスミウムと 0.8% フェロシアン化カリの混合液 (0.1M カコジル酸緩衝液) で 1 時間、後固定した。その後、電子顕微鏡で観察した。

第 3 の研究については以下のとおりである。(1) 培養液中のウイルス破壊: HIV-1 III<sub>B</sub> (100 ng/ml) の培養液中での時間経過に伴う感染性の低下は H9 細胞を用いた感染実験

で評価した。評価方法は感染した H9 細胞内のプロウイルスを PCR 法で増幅し画像解析処理システムを用いて半定量をおこなった。次に、HIV-1 III<sub>B</sub> を種々の濃度 (w/v) の TiO<sub>2</sub> 粒子と培養液中で混和し UV 照射に誘導される活性化 TiO<sub>2</sub> のウイルス破壊作用を(1)と同様の評価方法で行った。(2) ウイルス RNA 量の測定法の確立と母乳・人工乳中のウイルス破壊: 市販の HIV-1 RNA 定量キット(アンプリコア)を用いて PBS, FCS, RPMI, 人工乳, 母乳中に混和した HIV-1 III<sub>B</sub> の検出限界値の評価を行った。次に母乳中の感染性ウイルスを測定するために、予備実験として人工乳中での標的細胞 (H9) の安定性を確認し感染実験系を確立した。また母乳の細胞毒性を標的細胞として H9 (T 細胞系), M9166 (T 細胞系), THP-1 (単球細胞系), PBMC を用い検討した。(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。HIV 感染男性, HIV 非感染女性夫婦に対する IVF-ET の応用については、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している。

## 3. 研究結果

第 1 の研究については以下のとおりである。HIV 感染男性, 非感染女性夫婦に対する IVF-ET の実施については、これまで 34 症例に実施し, 21 例で妊娠が成立, 18 例が分娩するに至っている。また, 母児ともに二次感染は認めない。基礎的研究としては, HIV 感染者の精子について電子顕微鏡や特殊染色を用いて検討し, HIV/C 型肝炎の治療として IFN+ribavirin 治療を行うと精子の核酸代謝障害をもたらし, necrosis を効率に合併することが判明した。一方, 人工授精実施のための基礎的検討として行っている洗浄精子の静置実験では, 37℃における静置で 7 時間後でも運動率, 良好精子精子獲得率が低下しないことが観察された。

第2の研究結果については以下のとおりである。(1)ベトナムでの疫学について:平成16年10月より11月までベトナム、ホーチミン市、ツズー病院および第一小児病院を訪れたHIV陽性妊婦より生まれた児より11サンプルの血液を採取した。すべてHIV抗体テスト陽性であった。PBMCよりDNAを抽出しPCRをしたところ、8サンプルがHIV陽性ですべてサブタイプCRF01\_AEであった。(2)絨毛癌細胞に発現するGタンパク受容体について:C5a receptor,CCR7,CCR9/CCR10,RDC1は三つの細胞間で発現の強弱に差はあるものの、どの細胞にも発現していることが確認された。そのうち少なくともCCR9やRDC1などは他の論文からHIVのコレセプターとなることが確認されている。(3)HeLa/KS386とHeLa/T4の巨細胞形成の電子顕微鏡観察について:電顕解析すると、二種の細胞は融合時間が経過す

るにつれてお互いが接着し、大形の細胞塊を形成した。始めは細胞表面の細胞突起が別の細胞表面に接触し、ついで接触面は広範囲になった。接触面では細胞突起は消失し平滑な細胞膜がお互いに向き合っていた。両者の細胞の細胞膜は完全に密着することなく少しの間隔を開けて向かい合って存在し、その間に30nmの大きさの高電子密度の粒子が観察された。

第3の研究については以下のとおりである。(1) 培養液中のウイルス破壊: HIV-1 IIB (100 ng/ml) の培養液中での時間経過に伴う感染性の低下を H9 細胞を用いた感染実験では、ウイルスの感染性は室温放置時間とともに低下している事が確認され、さらに UV 照射 (0.8 mW/m<sup>2</sup>) を行う事によりその減衰は助長された。また培養液中への TiO<sub>2</sub> 粒子の添加は UV 単独照射よりもウイルス破壊作用が増強された。(2) ウイルス RNA 量の測定法の確立と母乳・人工乳中のウイルス破壊: アンプリコアを用いて PBS, FCS, RPMI, 人工乳, 母乳中に混和したウイルス (HIV-1 IIB) の検出限界値の評価を行った結果、RNA 測定では全ての希釈液中でのウイルス測定の限界値は同等であり、有意な測定方法と考えられた。母乳の細胞毒性を標的細胞として H9 (T 細胞系), M9166 (T 細胞系), THP-1 (単球細胞系), PBMC を用い検討した結果、H9 細胞と THP-1 細胞は母乳と接触後 10 分以内に急速に減少、M8166 細胞は比較的保たれ、PBMC が最も安定していた。

#### 4. 考察

近年 HIV 感染男性、非感染女性夫婦で挙児希望を持つ夫婦が増加しているが、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 IVF-ET を実施し、妻が二次感染することなく生児を出産した症例がさらに増加した。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する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。

先行研究にあるようにベトナムではサブタイプ CRF01\_AE が優位で、今回のサンプルもすべて CRF01\_AE であった。また PCR で陰性だった 3 サンプルは月齢 2ヶ月が 2、9ヶ月が 1 サンプルで、いまだに母親からの移行抗体により HIV 抗体陽性になった可能性が高い。同じ絨毛癌細胞でも、種類が違えば発現しているコレセプターの種類に違いが見られ、また発現量も異なっている。実際の胎盤での発現とその量は興味のあるところである。また垂直感染がこのようなコレセプターを介して行われるかは、ウイルスのコレセプターユースの研究と共に今後の研究課題である。細胞の融合にかかる時間は 110 分以上である事が分かった。混合培養後 110 分では多核の細胞塊は完全な合体体とはならず多数の細胞が密着している像であると判断出来る。また、向かい合った細胞膜に見られた高電子密度の粒子には何か融合に関わる構造的基盤を示している可能性がある。

TiO<sub>2</sub> による人工乳中のウイルス破壊を明らかにしたが、母乳中のウイルスへの影響は、母乳自体の標的細胞にたいする毒性という予想外の影響を排除する実験系作成を解決してから開始された。この培養条件は一般の条件と異なるものであり今後さらなる検討が必要であろう。また、現在

研究に使用している HIV 非感染者の母乳に HIV を混入する実験 (想定濃度より高値) から進んで、平成 17 年 1 月から共同研究を行なうベトナム国よりの HIV 感染母体からの母乳を研究に使用することが可能となり、実用性の研究が開始される。しかし空輸にともなう条件の変化、低濃度ウイルス条件下における母乳の細胞毒性など、実験を困難にする要因も予想される。

#### 5. 自己評価

##### 1) 達成度

第 1 および第 2 の研究については当初の目的をほぼ、達成しているものと判断している。第 3 の研究は若干遅れているが、この理由はベトナム国との共同研究契約が同国政府より認可されるのが大幅に遅れたためである。しかしこの間、HIV 非感染者の母乳に HIV を混入する実験から、母乳自体の標的細胞にたいする毒性という予想外の影響が明らかにされ、実験条件の整備が進んだ。これにより平成 17 年 1 月以降の実験がスムーズに進むと考えている。

##### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

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している。第 2 の研究については免疫学的・ウイルス学的基礎研究により、HIV 母子感染のメカニズムを解明し、母子感染予防対策への寄与が期待される。第 3 の研究については、母乳中に含まれる HIV を減少・除去し、次に計画される必要があるフィールドワークにおいて母乳保育による HIV 母子感染リスクを回避・減少させることが証明されれば、本装置の維持にかかるコストが低いことから、国際的・社会的意義は非常に大きい。

##### 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。ベトナムでのサンプル採取を更に続けサブタイピングを行うと共に、ウイルスのコレセプターユースや宿主のコレセプターの発現、ミューテーション等を調べる。また HeLa/KS386 と HeLa/T4 の巨細胞形成では 110 分以降の経過を観察する。その結果、母子感染を引き起こすコレセプター発現などの宿主およびウイルスの要因を解析し子宮内感染の機序を明らかにし、母子感染のより有効な予防対策の確立に役立てる。第 3 の研究については平成 17 年度末までに、本装置の有用性を細胞感染レベルで証明する。ヒトへの真の有用性の検証は、フィールドワークにおいて母乳保育による HIV 母子感染リスクを回避・減少させることが証明される必要があるが、これを推進する段階に至ることに十分な期待を持っている。

#### 6. 結論

HIV 感染は確実に増加しており、本研究グループでなされている各研究の継続は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。