

エイズ患者剖検脳における大脳皮質変性病変と HIV 脳炎病変との関連
—ウィーン大学剖検例での解析—

主任研究者 出雲周二 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 難治ウイルス研 分子病理
研究協力者 邢 惠琴 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 難治ウイルス研 分子病理
早川 仁 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 神経内科老年病学
笠井武史 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 神経内科老年病学
Herbert Budka ウィーン大学神経病学研究所

研究要旨:HIV 感染者の脳剖検組織を用いて、大脳皮質の変性病変の形成にミクログリアがどのように関与しているかを検討した。対象はウィーン大学剖検例の HIV 感染者23例で、HIV 脳炎 (HIVE+)の所見は12例で認められ、内、3例は中枢神経の日和見感染症 (PML; 1例、真菌感染症; 1例、細菌感染症; 1例)を合併していた。HIV 脳炎像なし(HIVE-)は11例であった。合併症のないHIVE+ 9例と、HIVE- 11例について前頭葉皮質病変を解析した。大脳皮質では Iba1 陽性ミクログリアの増生を認めた12例内、HIVE+ 5例、HIVE- 7例で HIVEの有無とは関連なく Iba1 陽性活性化ミクログリアが増加していた。グルタミン酸をシナプス間隙から除去し神経保護作用をしている EAAT-2の発現はニューロピルで瀰漫性・斑状にみられ、サテライト細胞の一部も強く発現していた。9例では EAAT-2 の発現低下がみられ、低下している部位では Iba1 陽性の活性化ミクログリア増加し、EAAT-2 を発現していた。アポトーシスは主としてアストロサイトに観察され、一部の例ではニューロンとアストロサイトの両方で観察された。このことよりアストロサイトの傷害による神経保護作用の低下を活性化ミクログリアが代償していることが示唆された。また、ニューロンにもアポトーシスが生じていることより、エイズ晩期にはミクログリアによる神経保護作用も低下していることが示唆された。病変局所にウイルス感染細胞は見られず、エイズ末期の全身的な病態に伴う間接的な機序により、アストロサイトとニューロンの傷害が生じていると考えられる。

A. 研究目的

HIV 感染は欧米では減少に転じているが日本では増加の傾向が続いており、さらにアジアにおいては爆発的な感染の広がりが懸念されている。一方、HAART 導入により感染者のエイズ発症は効果的に抑えられ、その臨床像は早期に死に至る不治の病から長期慢性に経過する慢性疾患へと変貌している。しかし、近年の報告ではエイズ脳症は剖

検検索ではむしろ増加していると報告され、エイズ脳症の病態解明と治療法の開発は HIV 感染症対策の緊急の課題となっている。

エイズ脳症の病理像として、大脳白質の多核巨細胞の出現を伴う HIV 脳炎と皮質の変性所見が知られている。これらの病態においてミクログリアの活性化の関与が報告されている。HIV 脳炎では感染ターゲットとしてのミクログリアの関与が明らかであるが、

大脳皮質変性への関与は不明である。活性化ミクログリアは IL-1 β などのサイトカインや NOなどを介して神経障害のエフェクターとなっているという報告が多い。一方、近年は活性化ミクログリアの神経保護作用に注目した報告もみられる。

これまで我々は、サルエイズモデルを用いて、ウイルスの感染ターゲットの違いによるリンパ組織病変の進行と脳病変の進展を比較し、HIV 脳症には多核巨細胞を伴うミクログリア結節を特徴とする HIV 脳炎と、エイズの末期に免疫不全の進行に伴い大脳皮質の神経細胞・ニューロピルの障害を起こす亜急性の脳症という、独立した2つの病態が存在することを示した。さらに、後者の大脳皮質ニューロピルの変性病態にはアストロサイトの変性・機能障害が関与しており、ミクログリアの活性化によるグルタミン酸トランスポーターEAAT-2の発現が生じていることを報告した。今回、実際のヒト症例においても大脳皮質の変性病態の形成にミクログリアがどのように関与しているかを、ウィーン大学剖検の HIV 感染者脳組織を用いて検討した。

B. 研究方法

1987年以後のウィーン大学神経病学研究所剖検台帳閲覧により HIV に感染しエイズを発症して死亡した429剖検例を抽出し、さらに日和見感染症や腫瘍、脳血管性病変が中枢神経の主病変として認められる症例を除外した23剖検例を検索対象とした。大脳前頭葉、及び橋のパラフィン包埋標本作製、通常のHE、KB染色にくわえ、ENVISION法による免疫染色を行い、HIV-P24抗体を用いて HIV 感染細胞の有無を、カルシウム結合タンパク Iba1 に対する抗体を用いて活性化ミクログリアを検出した。また前頭葉切片の免疫組織化学染色により、大脳皮質のGFAPの発現、グルタミン酸トランスポーターEAAT-2の発現を検索すると共に、TUNEL法によりアポトーシスの検

出を行った。

C. 研究結果

通常の神経病理組織学的検索により、23例中12例で血管周囲の小円形細胞浸潤とミクログリア結節、多核巨細胞の出現を伴う、典型的な HIV 脳炎 (HIVE) の所見が認められた。12例のうち、中枢神経の日和見感染症の合併が3例で認められた (PML; 1例、真菌感染症; 1例、細菌感染症; 1例)。HIV 脳炎の所見が見られない例は11例であった。

合併症のない HIVE 9例 (HIVE+群) と HIVE の見られない 11例 (HIVE-群) について前頭葉皮質の病理組織所見を解析した (表1)。Iba1 免疫染色では陽性ミクログリアが前頭葉皮質に瀰漫性に増生している例が12例あり、内、HIVE+ 5例、HIVE- 7例で、HIVEの有無と瀰漫性ミクログリア活性化との関連は見られなかった。EAAT-2はニューロピルで瀰漫性・斑状に染色され、アストロサイトの胞体・突起に発現していると考えられる分布を示した。9例ではEAAT-2の発現低下がみられ、低下している部位ではIba1陽性の活性化ミクログリアが増加し、一部のミクログリアはその胞体が陽性で、EAAT-2を発現していると考えられた。EAAT-2の発現低下とミクログリアの瀰漫性活性化、HIVEの有無との関連は見られなかった。

アポトーシスは主として大脳皮質2~3層のアストロサイトにみられた。一部の例ではグリア細胞とニューロンの両方で陽性所見が観察された。HIV-1 P24抗原陽性細胞は大脳皮質には極少数みられる例があったが、活性化ミクログリア増加との関連は認められなかった。

D. 考察

アストロサイトに発現するEAAT-2はシナプス間隙からグルタミン酸を取り除き、神経細胞を保護する役割を担っている。Grayらはエイズ脳で活性化ミクログリアがEAAT-2を発現し、神経保護作用をしていると

報告している。我々は昨年度サルエイズモデルを用いた検索により、エイズの発症に伴う大脳皮質ニューロピルの変性病態にはアストロサイトの変性・機能障害が関与しており、ミクログリアの活性化によるグルタミン酸トランスポーターEAAT-2 の発現が生じていることを報告した。今回のヒト剖検例を用いた検索では、HIV 感染者大脳皮質でアストロサイトの EAAT-2 発現低下が観察され、アストロサイトの傷害による神経保護、すなわちグルタミン酸の神経間隙からの除去作用の低下が推定された。EAAT-2 発現低下部位では活性化ミクログリアが EAAT-2 を発現していることが観察され、低下したアストロサイトの神経保護作用を代償していることが示唆された。これまでエイズ脳症では大脳皮質神経細胞の変性脱落、アポトーシスなどが報告されているが、今回の TUNEL 法によるアポトーシスの観察では、陽性細胞は主としてアストロサイトに見られ、神経細胞のアポトーシスは少数で観察されるのみであった。さらにこれらの大脳皮質病変局所にはウイルス感染細胞はほとんど見られず、HIVE の有無との関連も認められず、このアストロサイトの機能障害はエイズ末期の全身的な病態に伴い生じていると考えられる。

E. 結論

エイズ患者の大脳皮質では、HIVE の有無とは関係なく EAAT-2 の低下と活性化ミクログリアの増加が生じている。

F. 健康危険情報

本研究によって得られた成果の中で、健康危険情報に該当する事項は特に含まれていない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Sabouri AH, Saito M, Usuku K, Bajestan SN, Mahmoudi M, Forughipour M, Sabouri Z, Abbaspour Z, Goharjoo ME, Khayami E,

Hasani A, Izumo S, Arimura K, Farid R, Osame M. Differences in viral and host genetic risk factors for development of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis between Iranian and Japanese HTLV-1-infected individuals. *J Gen Virol.* 2005 Mar;86:773-81.

- (2) 出雲周二. HIV 感染症, AIDS. 痴呆症学 (2). 日本臨床 62 巻 増刊号1:p.219-223, 2004.
- (3) Furukawa Y, Usuku K, Izumo S, Osame M. Human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) p12I is dispensable for HTLV-I transmission and maintenance of infection in vivo. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2004 20:1092-9.
- (4) Kodama D, Saito M, Matsumoto W, Sabouri AH, Izumo S, Arimura K, Usuku K, Bangham CR, Osame M. Longer dinucleotide repeat polymorphism in matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) gene promoter which correlates with higher HTLV-I Tax mediated transcriptional activity influences the risk of HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *J Neuroimmunol.* 2004 156:188-94.
- (5) Sabouri AH, Saito M, Lloyd AL, Vine AM, Witkover AW, Furukawa Y, Izumo S, Arimura K, Marshall SE, Usuku K, Bangham CR, Osame M. Polymorphism in the interleukin-10 promoter affects both provirus load and the risk of human T lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Infect Dis.* 2004 190:1279-85.
- (6) Saito M, Usuku K, Nobuhara Y, Matsumoto W, Kodama D, Sabouri AH, Izumo S, Arimura K, Osame M. Serum concentration and genetic polymorphism in the 5'-untranslated region of VEGF is not associated with susceptibility to HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) in HTLV-I infected individuals. *J Neurol Sci.* 2004

219 :157-61.

- (7) Saito M, Nakagawa M, Kaseda S, Matsuzaki T, Jonosono M, Eiraku N, Kubota R, Takenouchi N, Nagai M, Furukawa Y, Usuku K, Izumo S, Osame M. Decreased human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) provirus load and alteration in T cell phenotype after

interferon-alpha therapy for HTLV-I-associated Myelopathy / tropical spastic paraparesis. *J Infect Dis.* 2004 189:29-40.

G. 知的所有権の出願・取得状況

無し

Case No.	病理診断	Iba1	GFAP	HIVP 24	EAAT-2 低下
155-95-1	HIVE -	+++	+	-	-
34-01-1	HIVE -	++	-	-	-
73-95-1	HIVE -	++	-	-	++
85-97-1	HIVE -	+++	++	-	-
147-94-1	HIVE -	+++	++	-	++
164-99-1	HIVE -	+++	-	-	-
122-97-1	HIVE -	+++	-	-	+++
133-00-4	HIVE -	-	-	+	-
137-99-1	HIVE -	-	+	-	-
55-97-1	HIVE -	-	-	-	-
39-89-1	HIVE -	-	-	-	++
206-86-5	HIVE +	+++	+++	-	++
82-91-1	HIVE +	+++	++	-	+
32-92-1	HIVE +	++	++	+	+
118-91-1	HIVE +	++	-	-	+++
50-95-1	HIVE +	++	+++	++	+
45-96-6	HIVE +	-	++	-	-
61-93-1	HIVE +	-	-	-	-
98-02-4	HIVE +	-	+	-	-
10-87-1	HIVE +	-	+++	-	-

表 1: エイズ剖検例前頭葉皮質の病理組織所見

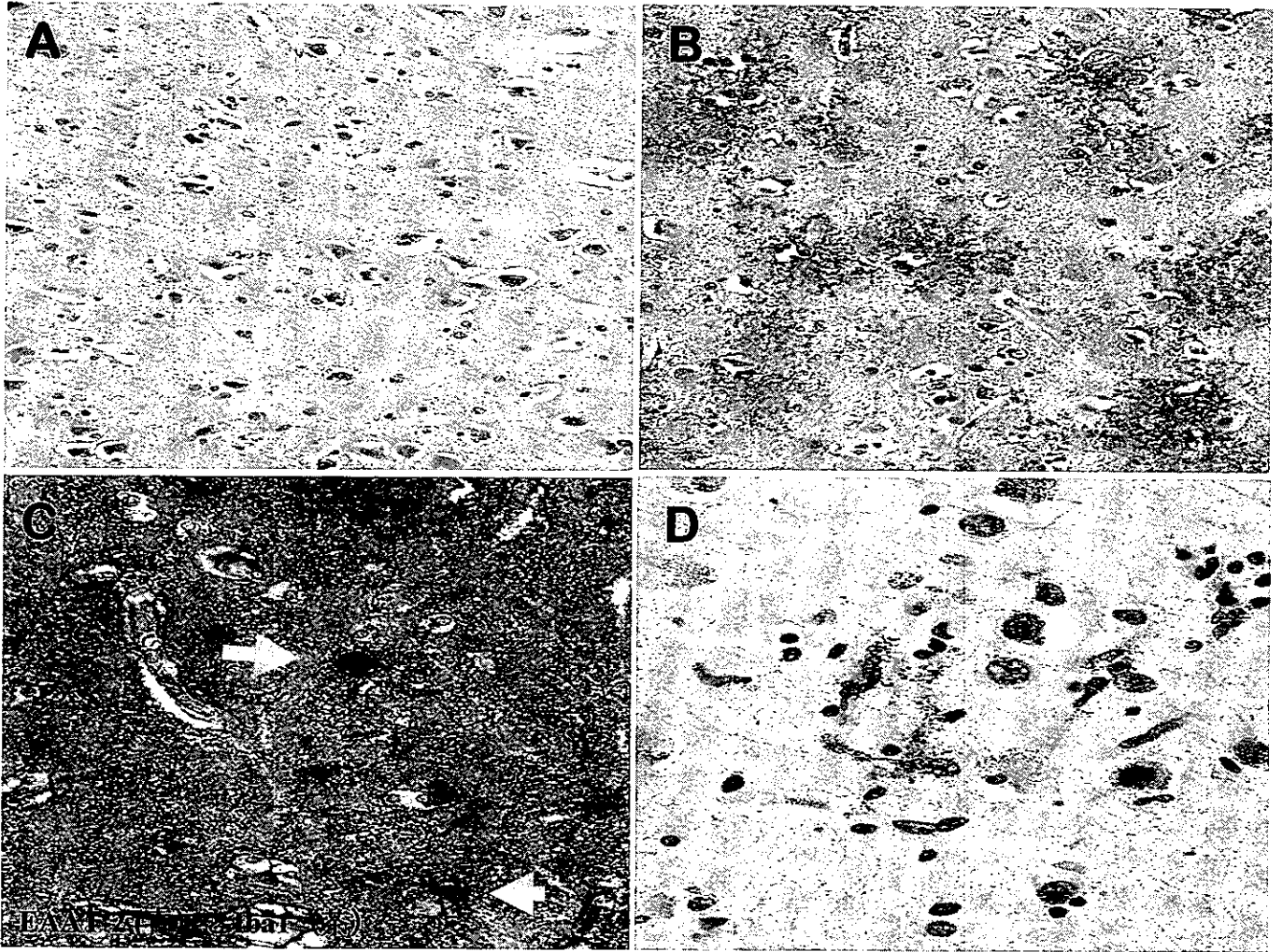


図1. 大脳皮質にはEAAT-2の発現。ニューロピルで瀰漫性ないし斑状に認められ、アストロサイトに発現している (A)。B: EAAT-2の発現低下。C:低下している部位ではIba1とEAAT-2の二重免疫染色で活性化ミクログリア/マクロファージがEAAT-2を発現していた。D:HIVp24免疫染色。

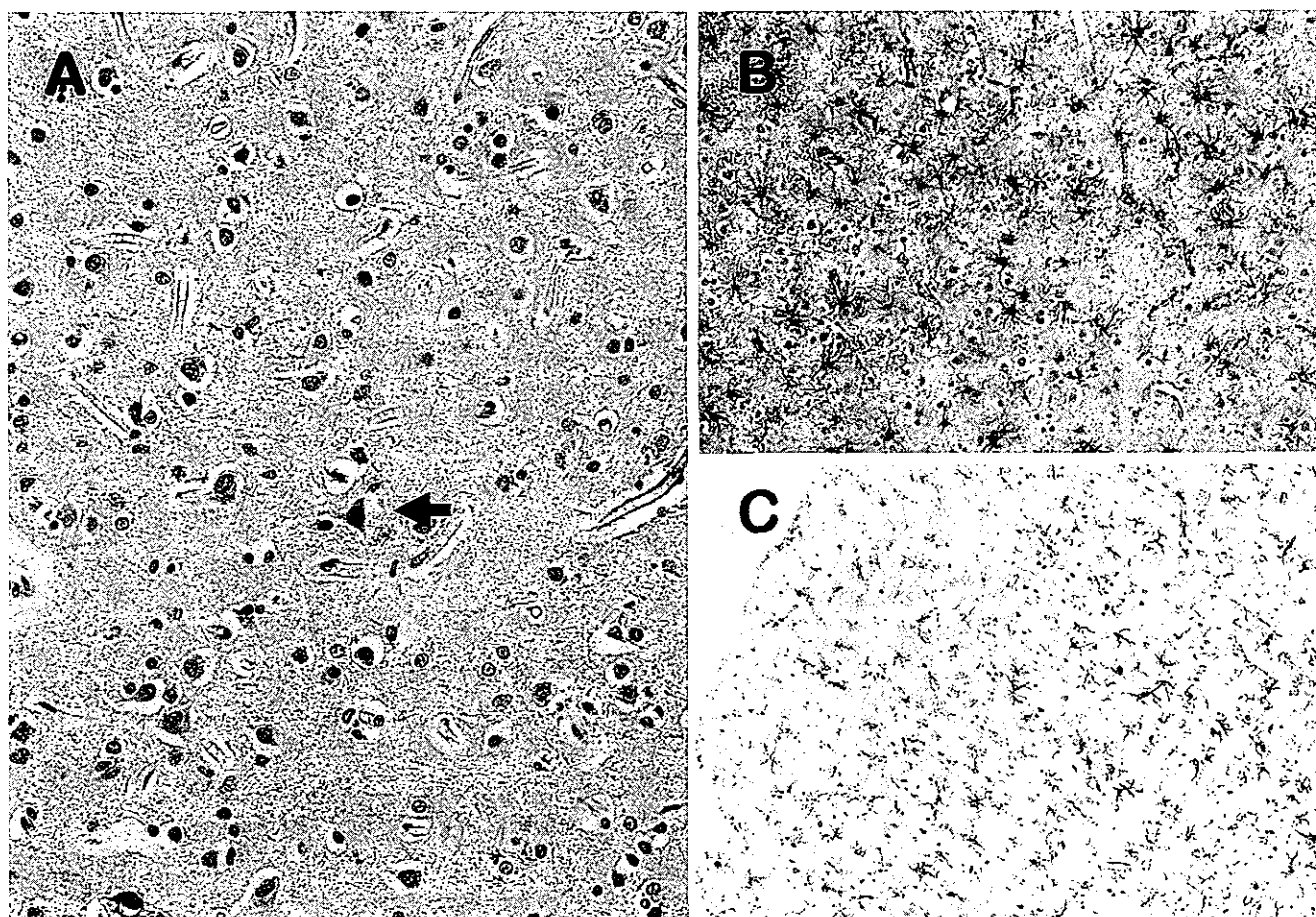


図2. 前頭葉皮質に見られるアストロサイトとニューロンのアポトーシス (A),
びまん性グリオシス (B), Iba1陽性の活性化ミクログリアのびまん性増生
(C)。

HIV感染者の脳におけるグルタミントランスポーターEAAT2発現とミクログリア活性化に関する免疫組織学的研究

研究分担者 船田信頭

東京都立駒込病院病理科部長

研究要旨：HIV 脳症の発生機序は多数の因子が複雑に関連している。そのうちの一つに神経細胞に対する興奮毒性を示すグルタミン酸による神経細胞傷害があげられる。Astrocyte に存在するグルタミン酸トランスポーターは細胞外グルタミン酸の濃度を低く保つことでグルタミン酸の興奮毒性から神経細胞を保護している。In vitro の実験では HIV 構成蛋白や cytokine などが astrocyte によるグルタミン酸処理能力の低下させることから、astrocyte の機能異常が脳症の発生に重要な役割を果たしているという推測がなされている。しかし、人体材料での検討は行われていない為に生体でも実際に起きている現象なのか不明である。本研究では、剖検例を用いて HIV 感染者の脳皮質における HLA-DR 陽性の活性化 microglia および GFAP 陽性 astrocyte の増生程度、HIV 陽性細胞浸潤、astrocyte の EAAT2 の発現を免疫組織学的に評価し、HIV 脳症における EAAT2 発現低下の意義とこれらの因子との関連性を検討した。対照として非 HIV 例の脳も同様に検討した。中枢神経症状のない非 HIV 対照群の脳皮質には、HLA-DR 陽性の活性化 microglia および GFAP 陽性 astrocyte は少なく、EAAT2 は neuropile にびまん性に陽性となる症例が多かった。しかし、EAAT2 陽性反応の強弱は症例により差異があり、また、びまん性陽性の近傍で斑状に陽性となるなど、同一切片でも部位により染色パターンに差異が認められた例もあった。脳症未発症の HIV 例では、活性化 microglia、GFAP 陽性 astrocyte とも増生は軽度で、EAAT2 も対象例と類似した染色性を示す傾向がみられた。さらに、脳症例でも HIV 陽性 microglia/macrophage の浸潤が白質および基底核に主座があり、皮質にはほとんど認められない例では対照と同様な皮質変化を示す傾向があったが、皮質にも HIV 陽性細胞が浸潤し、活性化 microglia、GFAP 陽性 astrocyte が増生するような症例では EAAT2 発現の減弱した neuropile に核周囲のみが弱い EAAT2 陽性を示す astrocyte や少数の細長い陽性突起をもつ astrocyte が認められた。しかし、活性化 microglia が増生していても EAAT2 の発現低下が明らかでない部位もあった。Alzheimer 病の 1 例では、活性化 microglia、astrocyte の増生とともに、EAAT2 陽性 astrocyte に HIV 脳症と同様の変化がみられた。以上の免疫染色の結果から、脳皮質における EAAT2 の発現低下は HIV 陽性 microglia/macrophage の浸潤、microglia の活性化、astrocyte の増生とある程度関連しており、脳症発症に関与するものと考えられた。

A. 研究目的

HIV 脳症の発生機序は多数の因子が複雑に関連している。そのような神経細胞

傷害因子の一つに神経細胞に対する興奮毒性を示すグルタミン酸があげられている(1,2,3)。Astrocyte に存在するグルタミ

ン酸トランスポーターは細胞外グルタミン酸の濃度を調節する重要なタンパクであり、細胞外グルタミン酸の濃度を低く保つことでグルタミン酸の興奮毒性から神経細胞を保護している。従って、astrocyteの機能障害は細胞外グルタミン酸濃度の異常につながる可能性が高い。実際、in vitroの実験結では、tumor necrosis factor α や gp120 により astrocyteによるグルタミン酸処理能力が低下しているという報告がある(4,5,6)。しかしながら、人体材料での検討は行われていない為に、生体でもこのような現象が認められるのか不明である。本研究では、HIV感染者の剖検大脳を用いて、皮質における EAAT2 の発現を免疫組織学的に評価し、HLA-DR 陽性の活性化 microglila や GFAP 陽性 astrocyte の増生程度、HIV 陽性 microglia/macrophage の浸潤との関連性を検討した。

B. 研究方法

HIV感染群としてAIDS未発症例1例、AIDSを発症しているがHIV脳症を合併していない症例4例、HIV脳症例7例、対照群として非HIV感染症例6例、変性疾患としてAlzheimer型老人性痴呆1例を選び、大脳皮質および基底核をhematoxylin-eosinなどの通常染色に加えて、抗HLA-DR抗体(DAKO)、抗GFAP抗体(DAKO)、抗HIV抗体(DAKO)、抗EAAT2抗体(Chemicon)による免疫染色を行い検討した。抗EAAT2抗体はrat glial glutamate transporter GLT-1のC-末端部の合成ペプチドでモルモットを免役して作成された抗体である。EAAT2の

免疫染色はElite ABC法で行った。最初にパラフィン切片をpH6のクエン酸緩衝液中で20分間microwaveによる処置を行い、その後に3,000倍希釈の抗体を2時間反応させた。

C. 結果

変性疾患のない対照群の全例がほぼ同様の染色結果を呈した。すなわち、HLA-DR陽性の活性化microgliaが軽度に増生する例が1例あったが、その他の例ではHLA-DR陽性microgliaは少数であり、GFAPで陽性となるastrocyteも少数しかみられなかった(図1)。EAAT2は大脳皮質のneuropileがびまん性に陽性となる傾向にあるが(図2、3)、部分的な斑状陽性(図4、5)や斑状陽性がより広い症例(図6、7)など症例間で差異があった。また、同一切片内でも部位により染色パターンに差異が認められた例の他に、前頭葉皮質は斑状の陽性を示すが島皮質がびまん性に陽性になる例もあった。染色強度は皮質深層および脳溝部に強い傾向があった(図2、6)。強拡大では、EAAT2はneuropileに微細な網目状に陽性となっており(図3)、皮質深部ではastrocyteの太い細胞質突起が多数四方に伸展している像が明瞭であった(図5)。斑状に陽性像がみられる部でもごく薄い染色性を背景にastrocyteのEAAT2陽性突起は四方に広く伸び、微細な網目状パターンを示していた(図7)。

Alzheimer型老人性痴呆の1例では、前頭葉皮質にHLA-DR陽性のmicroglilaが集簇して出現しており、GFAP陽性astrocyteの増生が認められた(図8)。

EAAT2 は反応性の減弱した部位が広く、その中に斑状陽性像がみられた (図 9)。斑状陽性部では網目状パターンの消失した中に EAAT2 陽性突起の減少した astrocyte が散見された (図 10)。島皮質では、HLA-DR 陽性 microglia および GFAP 陽性 astrocyte の増生は前頭葉と同程度であったが、EAAT2 はびまん性に陽性で、前頭葉に較べると EAAT2 の発現の変化は軽微であった (図 11)。しかし、わずかながら繊細な網目状パターンの断裂があり、その中に細い EAAT2 陽性突起をもつ astrocyte が認められた (図 12)。

HIV 陽性であるが AIDS 未発症例では、HLA-DR 陽性 microglia/macrophage は少数で、GFAP 陽性 astrocyte の増生もみられなかった (図 13)。EAAT2 はびまん性に陽性を示す部と斑状に陽性を示す部があり (図 14)、前者では neuropile に繊細な網目状の陽性所見が認められ (図 15)、後者ではごく薄い染色性を背景に astrocyte が EAAT2 陽性の太い突起を多数、四方に伸展しており、変性疾患のない対照群と同様の発現であった (図 16)。

AIDS を発症しているが、HIV 脳症を発症していない例には、対照群と同様に活性化 microglia や GFAP 陽性 astrocyte の乏しい例と軽度の増生がみられる例があった (図 17)。EAAT2 は斑状陽性部をまじえた染色を示し、繊細な網目状パターン部が主であり、microglia と考えられる桿状核の細胞にも少数ながら陽性像がみられた (図 18、19、20)。また、急激な全身性カンヂダ症で発症した症例では HLA-DR 陽性 microglia および GFAP 陽性 astrocyte の軽度～中程度増生があり

(図 21)、EAAT2 は染色性の低下した部が多く、その中に斑状陽性巢が散在していた (図 22)。強拡大では繊細な網目パターンは消失し、その中に核周囲のみ陽性の astrocyte や数の減少した細長い陽性突起をもつ astrocyte が認められた (図 23)。本例では HIV 脳症の組織像はなく、HIV 染色も陰性であった。

HIV 脳症発症例では、HIV 陽性 microglia/macrophage は主に白質、基底核に出現しており、大脳皮質には HIV 陽性細胞がほとんどない例と散在性あるいは集簇してみられる例があった。大脳皮質に HIV がほとんどみられない例では、皮質の HLA-DR 陽性細胞および GFAP 陽性 astrocyte の増生も軽度の傾向があった (図 24、25)。そのような症例では EAAT2 は変性疾患のない対照群とほぼ同様な染色性を示していた (図 26、27)。しかし、大脳皮質に HIV 陽性細胞が浸潤し、HLA-DR 陽性の活性化 microglia と GFAP 陽性 astrocyte の増生がみられる例では、EAAT2 は斑状にむらになって染色される部の割合が増え、EAAT2 陽性の繊細な網目状パターンは減少し、突起が短く核周囲のみが陽性となる astrocyte がみられるところがあった (図 28、29、30)。しかし、皮質の活性化 microglia の増生程度には同一例でも分布に heterogeneity があり、活性化 microglia、GFAP 陽性 astrocyte が少なく、EAAT2 がびまん性に染色され、ほぼ対照例と同じ染色性を示す部 (図 31、32) の近傍に HIV 陽性 microglia/macrophage の浸潤、活性化 microglia、GFAP 陽性 astrocyte の増生があり、EAAT2 の発現が減弱するような

例も認められた(図 33、34)。Microglia 結節部では EAAT2 の発現が巣状に消失する像もあった。しかし、活性化 microglia が増加していても EAAT2 がびまん性に陽性となる部もあり、EAAT2 の染色パターンと活性化 microglia の増生程度は必ずしも一致はしなかった(図 35、36)。

D. 考察

本研究でも従来の報告と同様に HIV 脳症における HIV 陽性 microglia/macrophage の好発出現部位は大脳白質と基底核であった。しかし、神経症状の程度は HIV 陽性 microglia/macrophage 数よりも活性化 microglia/macrophage 数と相関が強いなど、神経細胞傷害には HIV による直接的な傷害以外に多数の因子が複雑に関与していると考えられている。その一つに、神経細胞に対する興奮毒性を示すグルタミン酸による神経細胞傷害があげられる(1,2,3)。Astrocyte に存在するグルタミン酸トランスポーターは細胞外グルタミン酸の濃度を調節する重要なタンパクであり、細胞外グルタミン酸の濃度を低く保つことでグルタミン酸の興奮毒性から神経細胞を保護している。従って、astrocyte の機能障害は細胞外グルタミン酸濃度の異常につながり、神経細胞傷害をきたす可能性が高い。HIV 脳症以外にもグルタミン酸トランスポーターはアルツハイマー型老人痴呆、梗塞など多数の中樞神経障害において重要な役割を果たしていることが注目されている(7)。In vitro の研究では、gp120 や HIV 感染によって

astrocyte の EAAT2 の発現が低下すること(4,5)や tumor necrosis factor α などによって astrocyte によるグルタミン酸の uptake が阻害されることが報告されている(5,6)。In vitro で HIV あるいは gp120 を作用させると特に EAAT2 の RNA および蛋白レベルの低下があり、EAAT1 の RNA および蛋白レベルの低下はそれに較べると軽度であるが、TNF α を作用させると astrocyte の EAAT1 および EAAT2 の両方とも発現が低下する(4)。これらの in vitro の研究結果からは、HIV 脳症における神経細胞傷害には HIV や cytokine によって astrocyte の EAAT2 発現が低下することが重要な役割を果たしている可能性が高い。しかし、人体でもグルタミン酸の uptake 異常が実際に認められるものか、ほとんど検討は行われておらず、明らかではない。本研究に使用した抗 EAAT2 抗体による免疫染色では、変性疾患のない対照群で neuropile に繊細な網目状構造を示す陽性反応があり、また、astrocyte からのびる細胞質突起が陽性を示す像が確認できた。このような染色パターンは対照群の全例で認められたことから、使用した抗体が astrocyte の EAAT2 を特異的に染色しており、このような染色パターンが中樞神経系に異常のない例における基本と考えられる。また、HLA-DR 陽性の活性化 microglia および GFAP 陽性 astrocyte が少ない点も対照群のほぼ全例に共通していた。しかし、びまん性に染色される部と斑状に強く染まる部が隣接し、あるいは離れた皮質に認められる理由は現在のところ不明である。死戦期の変化、死亡

時に至るまでの症例ごとの違い、剖検までの死後時間、ホルマリン固定時間など様々な因子が作用している可能性があげられる。

非 HIV 感染者における痴呆症の重要な疾患としてアルツハイマー型老人性痴呆があり、神経傷害の一因子として EAAT2 の関与が指摘されている(7)。本研究でも一例のみの検討ではあるが、特に前頭葉において microglia 活性化と astrocyte の増生とともに astrocyte の EAAT2 発現低下が認められ、この仮説を裏付けるものであった。しかし、同程度に活性化 microglia および astrocyte の増生する島皮質では EAAT2 の発現現象は軽度であった点は症例を増やし、さらに検討する必要がある。

HIV 感染者で AIDS を未発症例では、HLA-DR 陽性 microglia は乏しく、EAAT2 の染色パターンも対照群と同様であった。また、AIDS 発症者で HIV 脳症の所見のない例では、活性化 microglia と GFAP 陽性 astrocyte の増生は軽度から中程度であり、EAAT2 の発現も細胞質突起の発達した astrocyte からなる斑状陽性であり、対照群に類似したパターンであった。時に microglia と考えられる杆状核をもつ EAAT2 陽性細胞があったが、非常に少なかった。HIV 脳症の初期には、活性化した microglia が EAAT1 を発現し、細胞外のグルタミン酸を除去することで神経細胞を保護する機序が作用していることも推測されているが(8)、EAAT2 の発現からみると、microglia による神経細胞の保護は有効ではないと考える。HIV 脳症の組織学的所見はないが、microglia の

軽度増生と GFAP 陽性 astrocyte の中程度増生のみられる全身性カンジダ症で EAAT2 発現が減弱していた点は HIV に関連した蛋白のみならず microglia や他の炎症性細胞から分泌される tumor necrosis factor α 、IL-1 β 、arachidon 酸など種々の cytokine が astrocyte のグルタミン酸の uptake が阻害しているという報告とも合致している (2,5,6)。

HIV 脳症例では、HIV 陽性細胞の出現は白質と基底核に主座を置いており、皮質には HIV 陽性細胞がほとんどない症例と陽性細胞の浸潤がみられる症例があった。前者では活性化 microglia、GFAP 陽性 astrocyte、EAAT とも対照群と類似した染色パターンであり、後者では活性化 microglia、GFAP 陽性 astrocyte の増加と EAAT2 陽性突起が乏しい astrocyte からなる EAAT2 発現低下巣が認められた。これらの所見は HIV 構成蛋白や活性化 microglia から放出される各種の cytokine が astrocyte の EAAT2 発現あるいはグルタミン酸の uptake を低下させるという in vitro の報告に合致するものである。しかし、活性化 microglia、astrocyte の増生と EAAT2 の染色性低下は完全に一致するものではなく、両者の間にはさらに複雑な因子が関与しているものと考えられ、これからの研究課題である。中枢神経症状のある HIV 陽性例では、laser-capture microdissection によって大脳皮質および基底核の astrocyte の 1%に HIV-1 の DNA が見出されるという報告があるが(5)、免疫染色による本研究では、HIV 陽性細胞は microglia/macrophage に限局しており、

astrocyte の感染は確認できなかった。この点についてもより鋭敏な手法を用いた検討が必要である。

E. 結論

症例間のみではなく、同一の切片でも部位によって EAAT2 の発現パターンや強弱に差異が認められた点は、死亡前の状況やホルマリン固定時間など、剖検例における多数の二次的因子が免疫染色の結果に影響している可能性や astrocyte の変化は神経細胞傷害の結果という可能性を考慮しなければならないが、大脳皮質への HIV 陽性 microglia/macrophage の浸潤、microglia の活性化、GFAP 陽性 astrocyte の増加、astrocyte における EAAT2 発現の低下との間にはある程度の関連性が認められたことから、グルタミン酸による神経細胞傷害が HIV 脳症の発生に関与していると推測された。

F. 健康危険情報 なし

参考文献

1. Gras G, Chretien F, Vallat Decouvelaere AV, Le Pavec G, Porcheray F, Bossuet C, Leone C, Mialocq P, Dereuddre Bosquet N, Clayette P, Le Grand R, Creminon C, Dormont D, Rimaniol AC, Gray F. Regulated expression of sodium-dependent glutamate transporters and synthetase: a neuroprotective role for activated microglia and macrophages in HIV infection? *Brain Pathol* 2003; 13: 211-222
2. Bell JE. An update on the neuropathology of HIV in the HAART era. *Histopathology* 2004; 45: 549-559
3. Kaul M, Garden GA, Lipton SA. Pathways to neuronal injury and apoptosis in HIV-associated dementia. *Nature* 2001;410:988-994
4. Wang Z, Pekarskaya O, Bencheikh M, Chao W, Gelbard HA, Ghorpade A, Rothstein JD, Volsky DJ. Reduced expression of glutamate transporter EAAT2 and impaired glutamate transport in human primary astrocytes exposed to HIV-1 or gp120. *Virology* 2003;312:60-73.
5. Wang Z, Trillo Pazos G, Kim SY, Canki M, Morgello S, Sharer LR, Gelbard HA, Su ZZ, Kang DC, Brooks AI, Fisher PB, Volsky DJ. Effects of human immunodeficiency virus type 1 on astrocyte gene expression and function: potential role in neuropathogenesis. *J Neurovirol* 10 Suppl 2004:1:25-32
6. Fine SM, Angel RA, Perry SW, Epstein LG, Rothstein JD, Dewhurst S, Gelbard HA. Tumor necrosis factor α inhibits glutamate uptake by primary human astrocyte. Implications for pathogenesis of HIV-1 dementia. *J Biol Chem* 1996; 271:15303-15306
7. Su ZZ, Leszczyniecka M, Kang DC, Sarkar D, Chao W, Volsky DJ,

Fisher PB. Insights into glutamate transport regulation in human astrocytes: cloning of the promoter for excitatory amino acid transporter 2 (EAAT2). Proc Natl Acad Sci U S A 2003;100:1955-1960

8. Vallat Decouvelaere AV, Chretien F,

Gras G, Le Pavec G, Dormont D, Gray F. Expression of excitatory amino acid transporter-1 in brain macrophages and microglia of HIV-infected patients. A neuroprotective role for activated microglia? J Neuropathol Exp Neurol 2003;62:475-485.

G. 研究発表

学会発表

東京都立駒込病院における後天性免疫不全症候群 80 剖検例の神経病理学的検討

船田信顕、比島恒和、根本哲生、堀口慎一郎、河内洋、岸田修二. 第 93 回病理学会総会、札幌市、2004 年 6 月 9～11 日

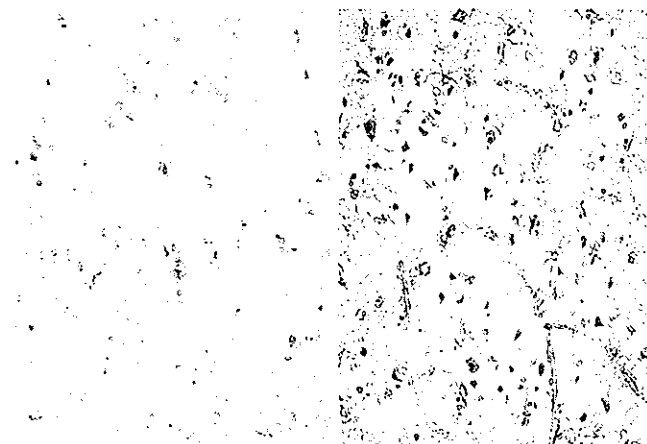


図1 対照例；HLA-DR陽性microglia、GFAP陽性astrocyteは少数。

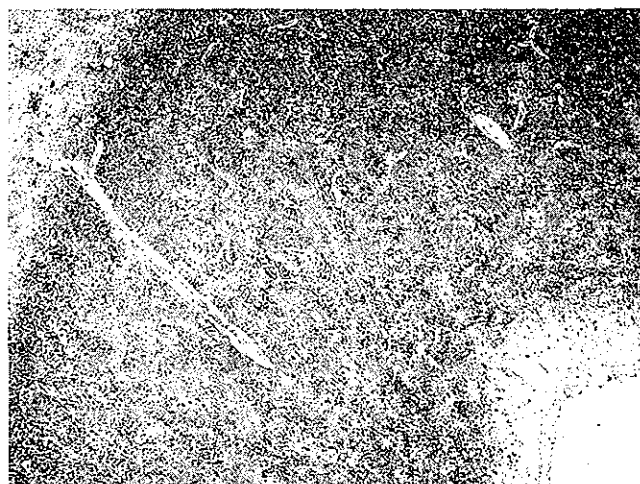


図2 対照例；EAAT2はびまん性に皮質に陽性。皮質深部がより強く陽性となる傾向。

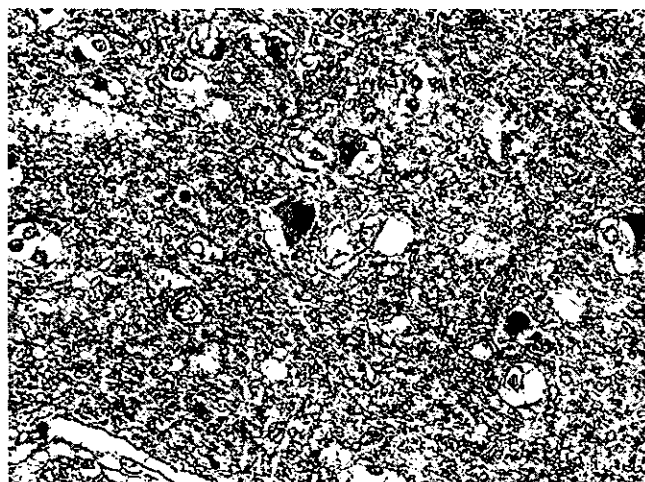


図3 対照例；EAAT2陽性のastrocyteの突起がneuropilに細かい網目状を呈している。

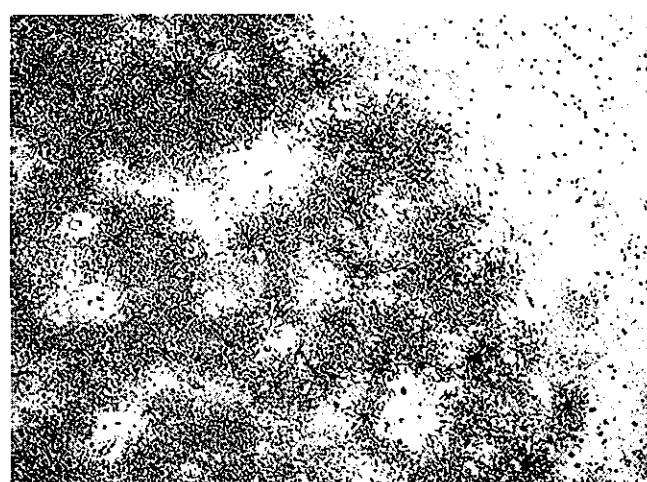


図4 対照例；部分的に斑状に陽性となる症例もある。

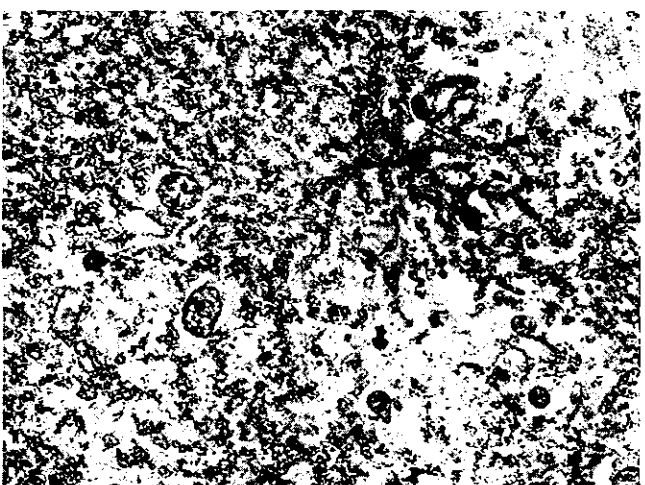


図5 対照例；皮質深部の斑状陽性部にはよく発達した四方に伸びる突起がみられる。

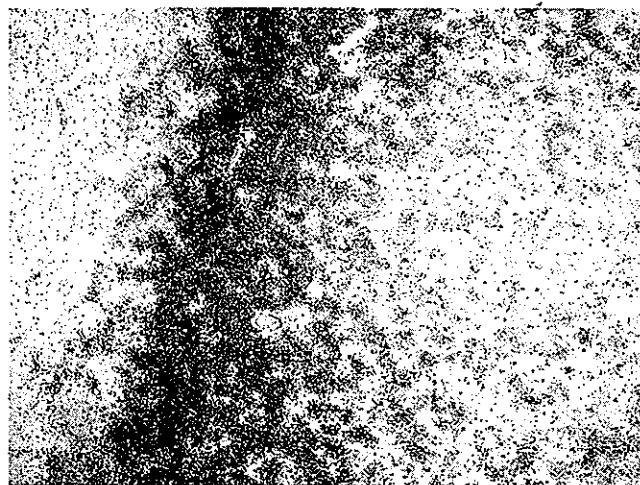


図6 対照例；斑状陽性部がより広い症例。皮質深部により強い陽性像を示す傾向がある。

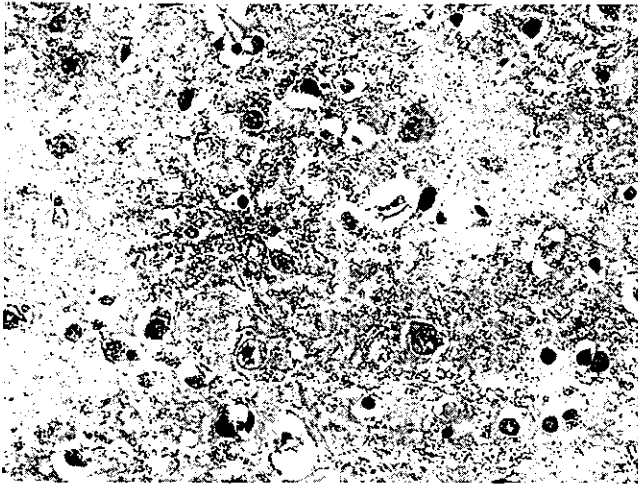


図7 対照例；斑状陽性でもEAAT2陽性細胞突起は広く伸び、網目状のパターンを示す。

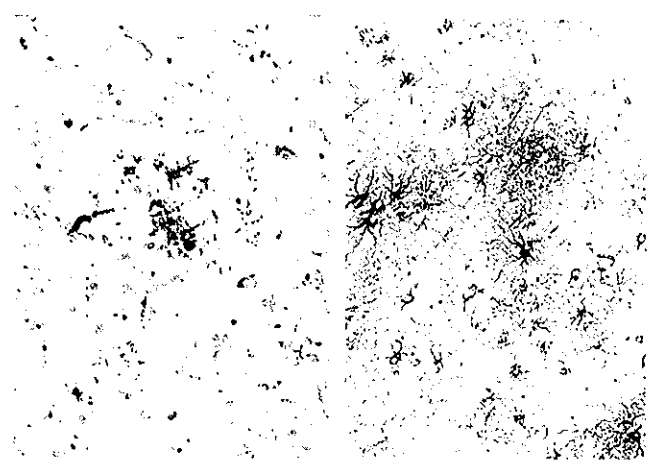


図8 Alzheimer病；前頭葉皮質のHLA-DR陽性microglia（左）、GFAP陽性astrocyte（右）の増生

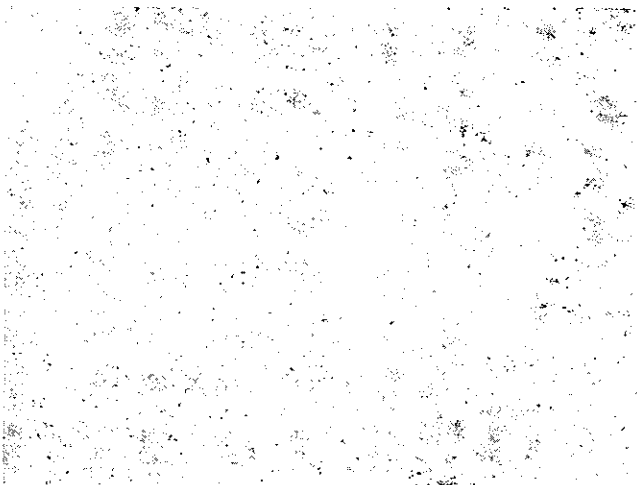


図11 Alzheimer病；前頭葉皮質のEAAT2の反応性は低下し、斑状の陽性巣が散在。

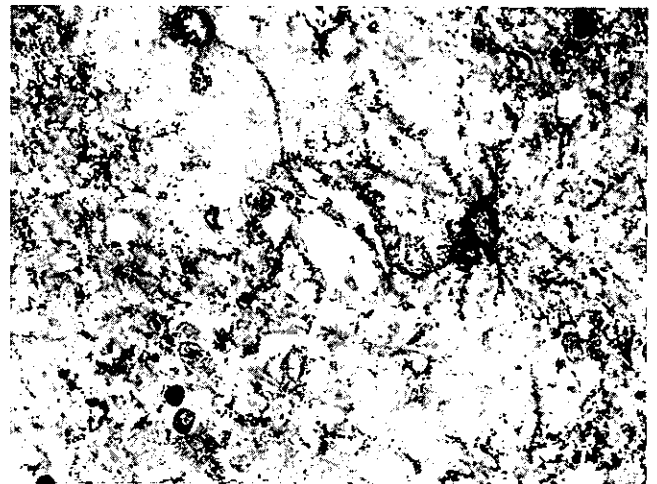


図10 Alzheimer病；EAAT2の網目状のパターンは消失し、細い突起のみが陽性。

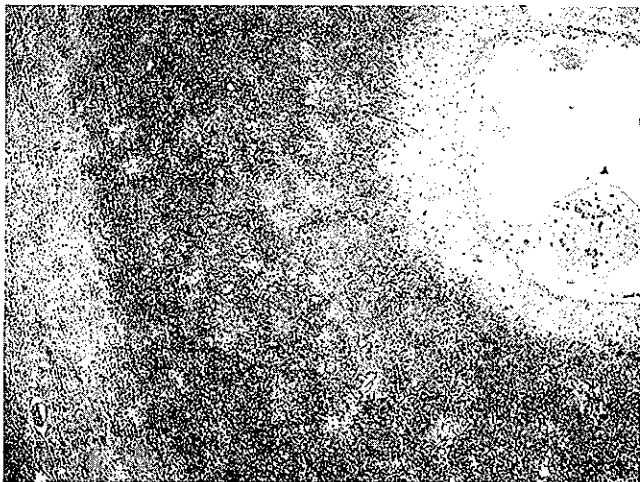


図11 Alzheimer病；島皮質のEAAT2。前頭葉に較べてびまん性の陽性を示す。

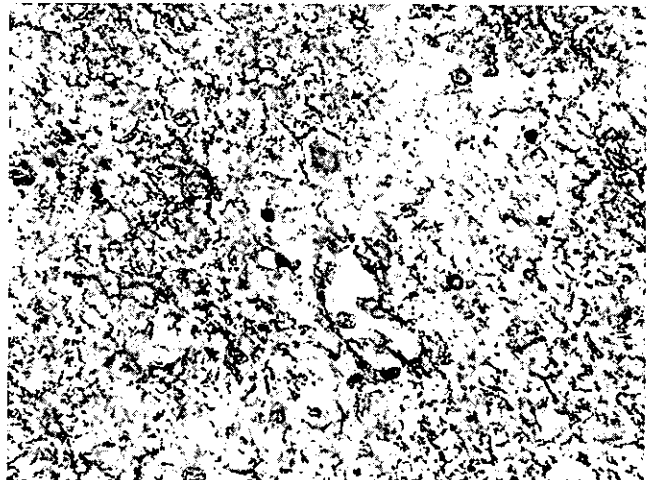


図12 Alzheimer病；島皮質のEAAT2。細かい網目状パターンは軽度ながら不均一。

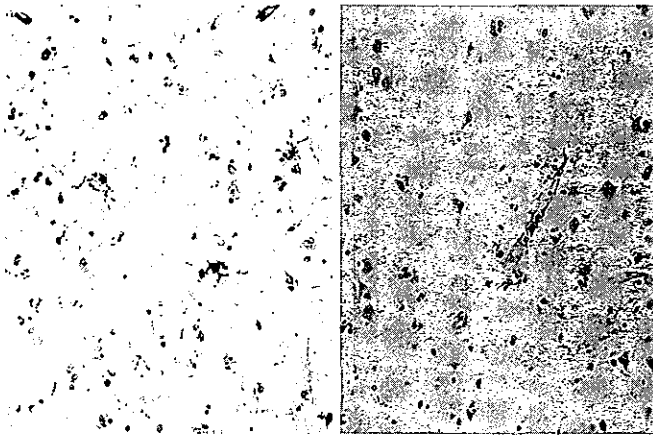


図13 AIDS未発症のHIV感染例；大脳皮質のHLA-DR陽性microglia（左）、GFAP陽性astrocyte（右）とも対象例と同程度に少ない。

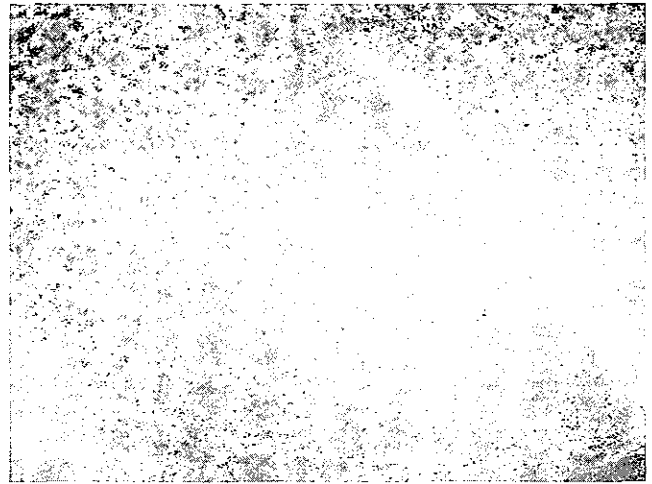


図14 AIDS未発症のHIV感染例；前頭葉皮質のEAAT2。やや斑状の陽性を示す。

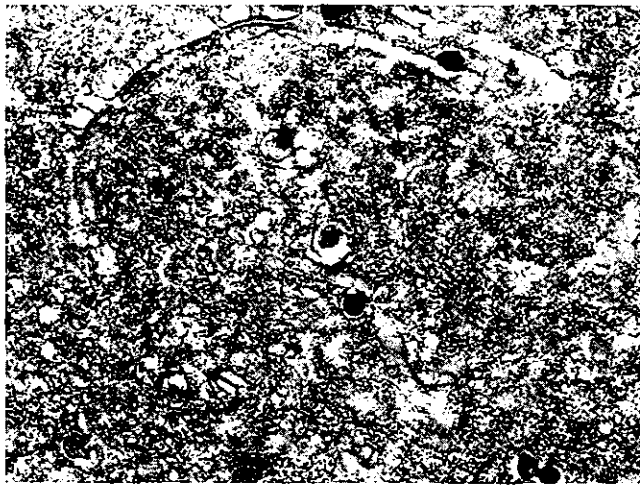


図15 AIDS未発症のHIV感染例；前頭葉皮質のEAAT2。均一な網目状パターンを示す。

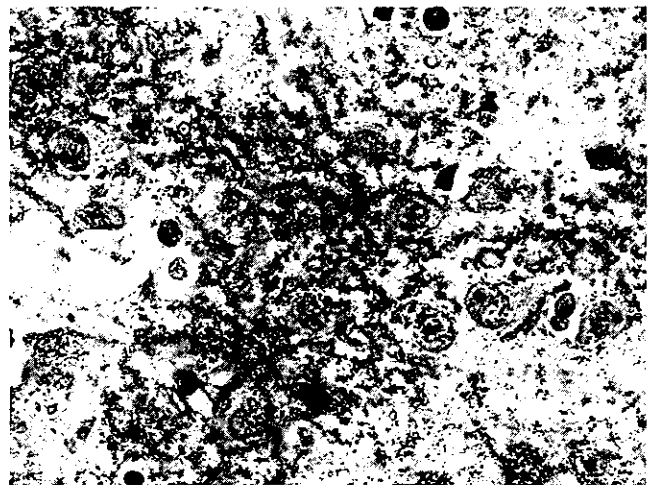


図16 AIDS未発症のHIV感染例；斑状陽性部にはよく発達した四方に伸びる突起がみられる。



図17 脳症のないAIDS例；大脳皮質のHLA-DR陽性microglia（左）、GFAP陽性astrocyte（右）が軽度増生。

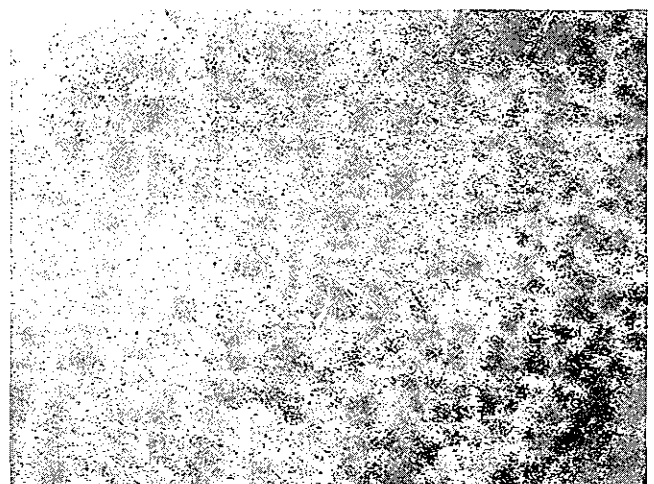


図18 脳症のないAIDS例；図17と同一例。前頭葉皮質のEAAT2。深部で斑状の陽性を示す。

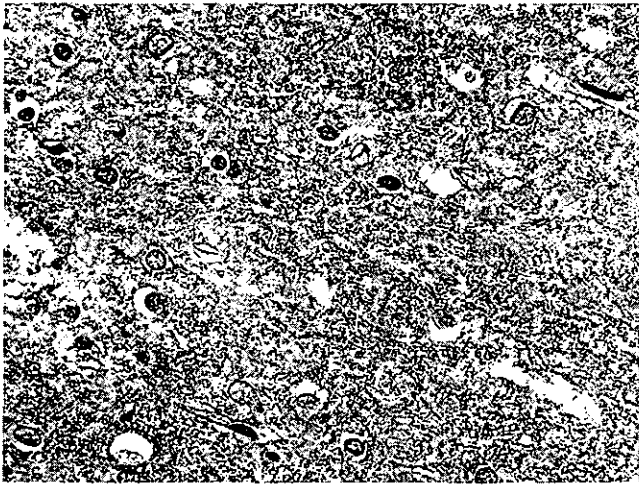


図19 脳症のないAIDS例；図18の拡大。EAAT2は繊細な網目状パターンを示す。

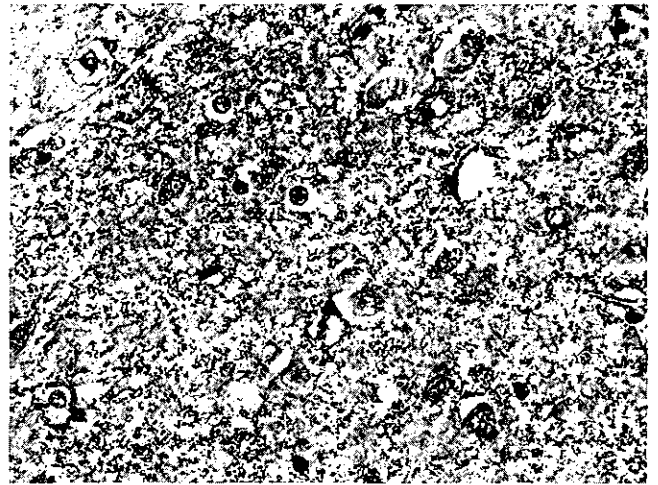


図20 脳症のないAIDS例；EAAT2はびまん性陽性で、繊細な網目状パターンもほぼ保たれる。Microgliaと考えられる細胞にも陽性。

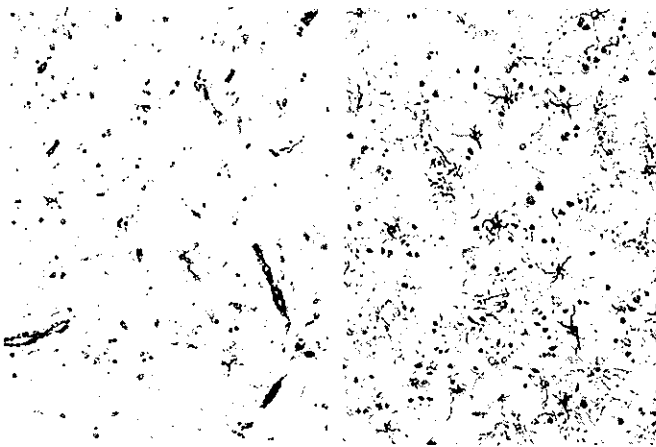


図21 脳症のないAIDS例；全身性Candida症。HLA-DR陽性microglia（左）の増加は軽度だが、GFAP陽性astrocyte（右）の中程度増生。

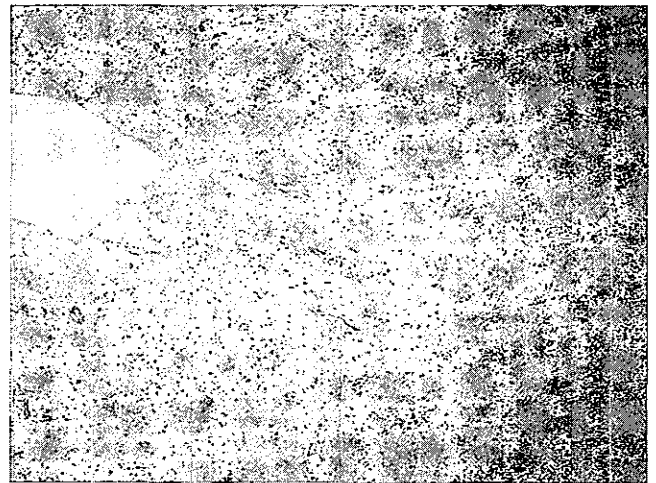


図22 脳症のないAIDS例；全身性Candida症。EAAT2染色性の減弱した部分の広い斑状陽性パターンが主となる。



図23 脳症のないAIDS例；全身性Candida症。EAAT2陽性の網目状パターンの消失や核周囲のみ陽性のastrocyteが出現。

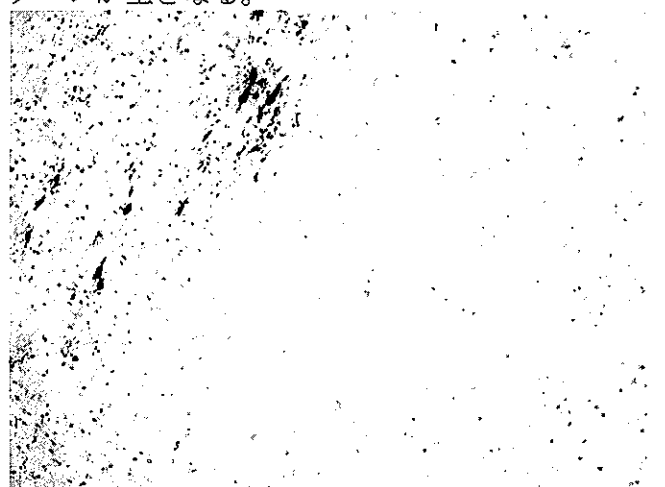


図24 脳症を伴うAIDS例；HIV陽性細胞は白質に多いが、皮質には乏しい例（HIV免疫染色）。

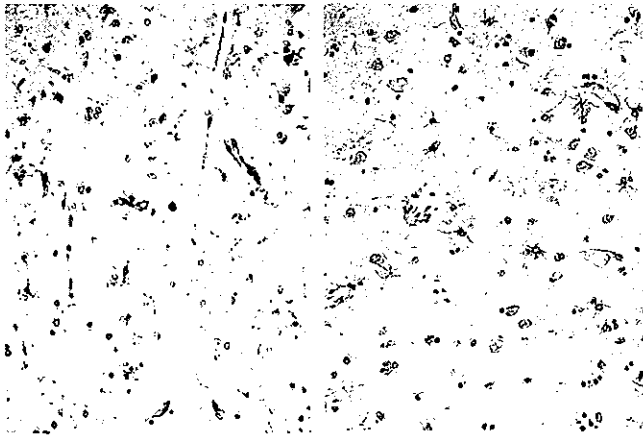


図25 脳症を伴うAIDS例；図24と同一例。
HLA-DR陽性microglia（左）、GFAP陽性astrocyte
（右）は少なく、対照例とほぼ同程度。

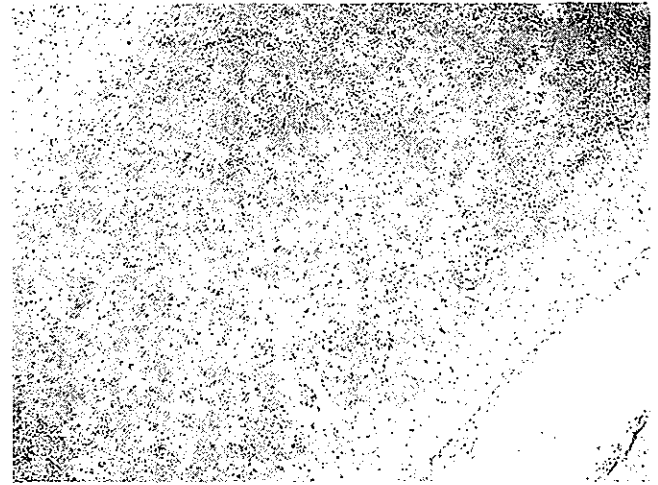


図26 脳症を伴うAIDS例；図24と同一例。
EAAT2は対象例と同様にびまん性に陽性。



図27 脳症を伴うAIDS例；図26の拡大。EAAT2
は細かい網目状パターンを示す。

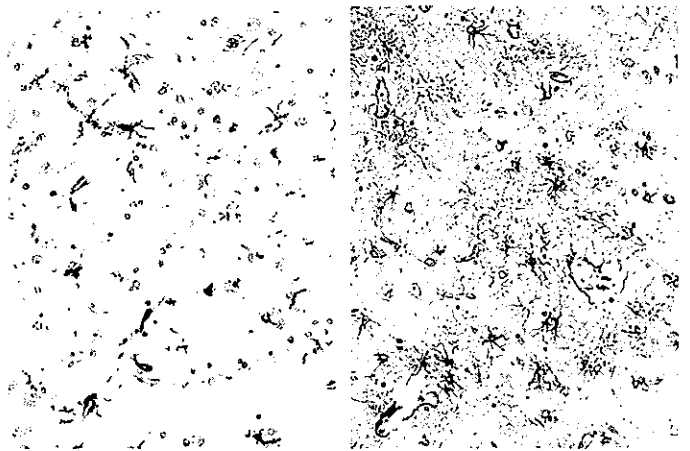


図28 脳症を伴うAIDS例；本例ではHLA-DR陽性
microglia（左）、GFAP陽性astrocyte（右）の増
生があり、皮質にHIV陽性細胞がみられる。

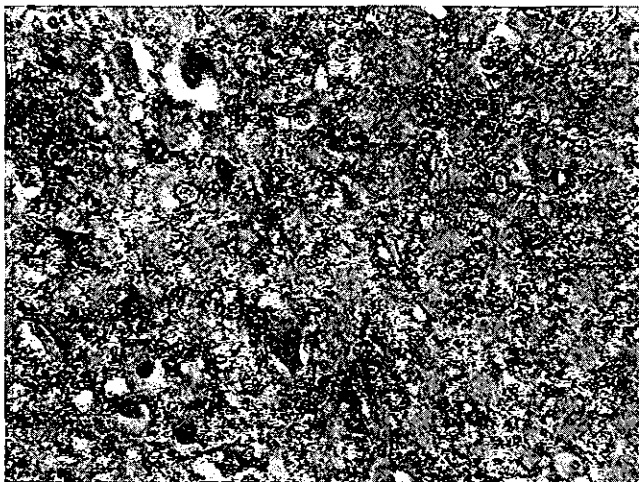


図29 脳症を伴うAIDS例；EAAT2は斑状に陽性
となり、発現の減弱した部に核周囲のみが陽性
で、突起が短く少ないastrocyteが認められる。

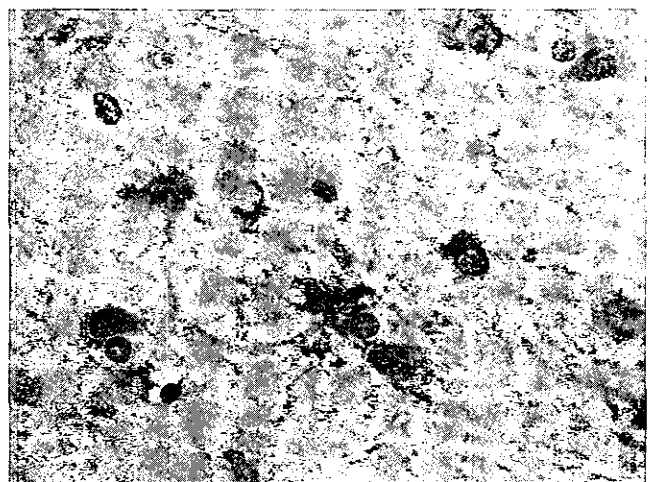


図30 脳症を伴うAIDS例；EAAT2の発現の弱い
部では核周囲のみが陽性で突起の乏しいastrocyte
が認められ、繊細な網目状パターンは消失。

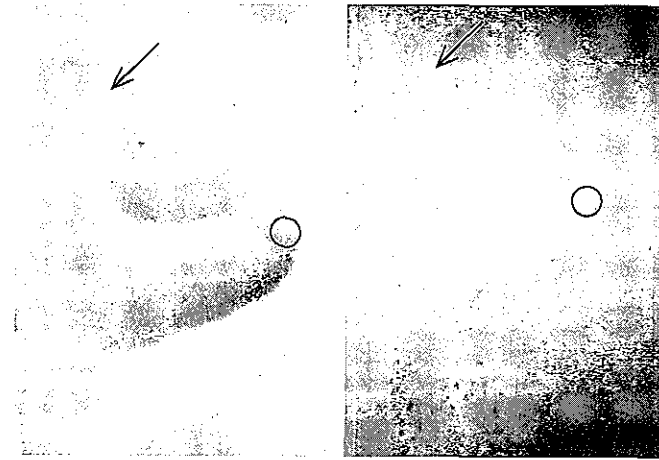


図31 脳症を伴うAIDS例；左EAAT2、右HLA-DR。丸印部皮質にはHLA-DR陽性細胞は少なく、矢印部皮質には多い。

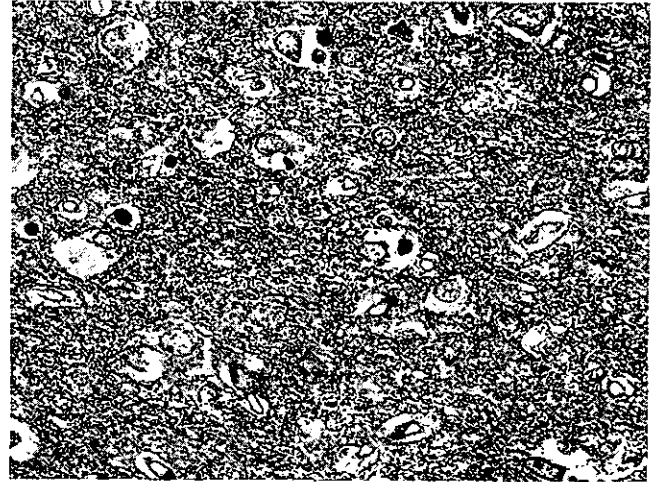


図32 脳症を伴うAIDS例；図31と同一例。丸印部では活性化microglia少なくEAAT2は対照と同様にびまん性に繊細な網目状パターンを示す。

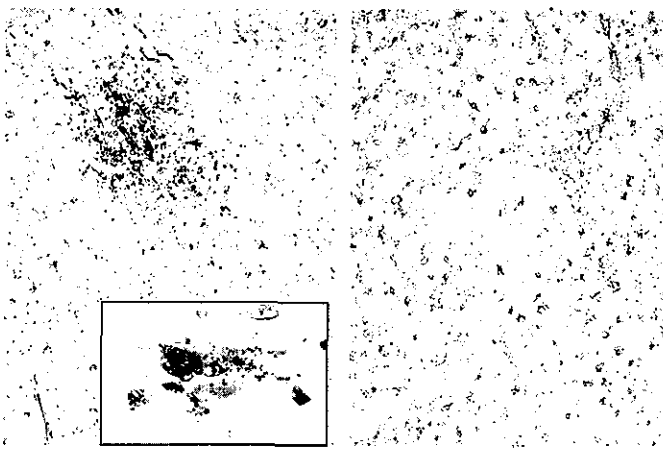


図33 脳症を伴うAIDS例；図31と同一例。矢印部ではHLA-DR陽性細胞は結節を形成（左）。挿入図はHIV。GFAP陽性astrocyteは増生（右）。

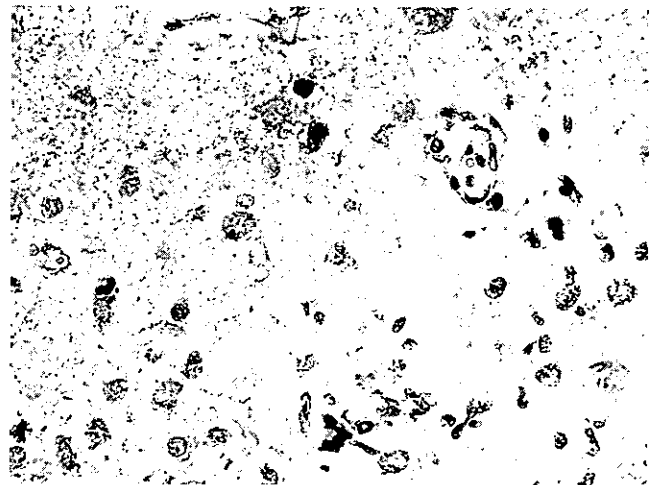


図34 脳症を伴うAIDS例；図31と同一例。矢印部にあるミクログリア結節部ではEAAT2は陰性となり、周囲の染色性も薄い。

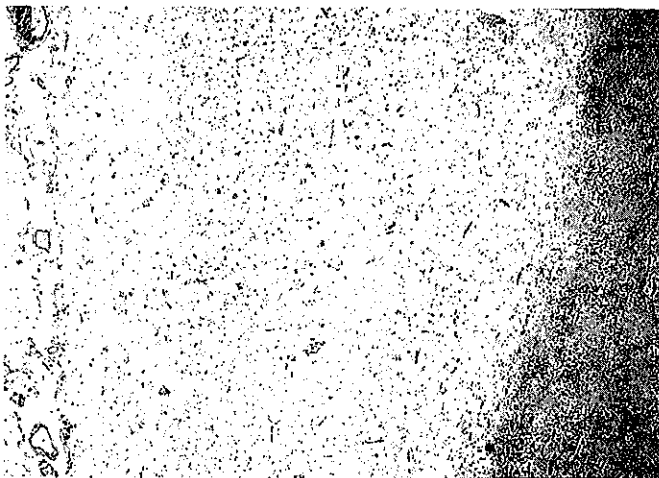


図35 脳症を伴うAIDS例；本例ではHLA-DR陽性細胞は増生するが、皮質にHIV陽性細胞はほとんどない。

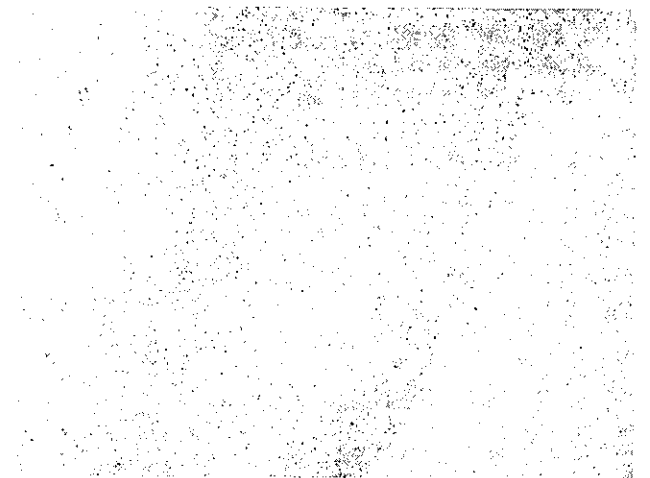


図36 脳症を伴うAIDS例；図35と同一例。EAAT2の染色性は対照と同様である。

SIVのマクロファージ指向性と宿主における感染

分担研究者： 森 一泰 国立感染症研究所 エイズ研究センター

研究協力者： 杉本智恵 国立感染症研究所 筑波霊長類センター

研究要旨：エイズウイルスの細胞指向性がエイズ発症、脳症や脳炎の発症などの感染後の病態に与える意義について検討をすることを目的に細胞指向性の異なる SIV の *in vitro* での性質を調べ、サルでの初期感染における感染細胞の解析を行った。*In vitro* では T 細胞指向性を示し、マクロファージではほとんど増殖しなかった SIVmac239 と *in vitro* マクロファージで非常によく増殖した MERT はサル感染初期の腸管、腸管膜リンパ節において T 細胞だけでなく、マクロファージにも感染していた。しかし、糖鎖欠失変異を持ち、わずかにマクロファージ指向性を示した $\Delta 5G$ は感染初期の腸管、腸管膜リンパ節では T 細胞が主要な感染細胞であった。SIVmac239、MERT 感染サルはエイズを発症するが、 $\Delta 5G$ は初期感染のみで感染が制御されることから、初期の感染標的細胞の違いはその後の病態を反映していると考えられた。

A. 研究目的

サル/SIV 感染モデルはヒトにおける HIV の感染病態と多くの共通点があるので、エイズの予防法や治療法を開発する上での評価系として、またエイズ病態を解明する動物モデル系として有用である。

SIVmac239 はサルにエイズを発症させる分子クローンである。SIVmac239 は培養細胞系では T 細胞でよく増殖するが、マクロファージではほとんど増殖しない。しかし、SIVmac239 感染後エイズを発症したサルでは高頻度に脳炎や巨細胞性肺炎のようなマクロファージ感染と関連する傷害が認められた。このような感染マクロファージから

分離された SIV は培養細胞系でもマクロファージで非常に良く増殖することが明らかになり、ウイルスの分子生物学的解析の結果、マクロファージでの増殖性の獲得には、*env* のアミノ酸変異が重要であることが明らかになった。

これまでに出雲らが報告しているように、マクロファージ指向性と最も強く関連する 4 つのアミノ酸変異を *env* に持つ MERT 感染後エイズを発症したサルでは大脳白質において炎症性病態が見られ、SIV 感染マイクログリア/マクロファージが存在することが明らかになった。また SIVmac239 感染後エイズを発症したサルでは大脳皮質の変性病態が認められているが、SIV 感染細胞は