

本稿ではこれらについて述べる。

1. ヘルペス属ウイルス治療薬

ヘルペス属ウイルスの呼吸器疾患としては、高度免疫不全状態でのサイトメガロウイルス(CMV)が挙げられるが、このほか単純ヘルペスウイルスや水痘・帯状疱疹ウイルスによる肺病変も知られている。これらの治療薬としてaciclovirおよびそのプロドラッグであるvalaciclovir, ganciclovir, foscarnet, cidofovir(本邦未発売), vidarabineがある。

1) 生体の遺伝子多型

生体の遺伝子多型によるこれらの薬剤の吸収・代謝・排泄に関する大きな影響については報告されていない。

2) 病原体の遺伝子多型

Ganciclovirは病原体のphosphotransferaseおよび細胞の酵素により活性化型の3リン酸型となり、抗ウイルス作用を発揮する。最初のリン酸を付与するウイルス由来のphosphotransferaseをコードするUL97遺伝子に変異が生じると、CMVはganciclovir耐性となる¹⁾。また、ganciclovir, foscarnet, cidofovirの作用点であるDNA polymeraseをコードするUL54の変異では多剤耐性を獲得する。これらの薬剤耐性CMVはまだ頻度が少ないが、臓器移植や抗HIV薬が無効となったHIV患者に対する長期間のganciclovir投与例では薬剤耐性が問題となることがある。耐性化のハイリスクグループでは耐性遺伝子の有無につい

での検査が取り入れられようとしている。

2. インフルエンザウイルス治療薬

インフルエンザウイルスにはA, B, Cの3型があるが、ヒトの呼吸器感染を惹起するのはAとBである。いずれも遺伝子変異を起こしやすいため一度罹患しても翌年には再感染が起こる。特にインフルエンザAでは他の種に感染するウイルスとの間で遺伝子再構成を起こすことが知られており、これが起こると従来と遺伝型の大きく異なったウイルスを生じ、重篤で大規模な感染が起こることが危惧されている。

インフルエンザウイルスの治療薬として、インフルエンザAにのみ有効なamantadineと、A, Bともに有効なoseltamivir, zanamivirがある。これらの治療薬は抗原性が変化した新型ウイルスにも効果が期待されているが、一方薬剤の頻用による耐性ウイルスの出現が危惧されている。

1) 生体の遺伝子多型

生体の遺伝子多型によるこれらの薬剤の吸収・代謝・排泄に関する大きな影響については報告されていない。

2) 病原体の遺伝子多型

Amantadineに曝露されたインフルエンザAウイルスは急速に耐性を獲得し治療例では1/3で耐性ウイルスを排出するとされている。2003年12月から2004年3月にかけてみられたH5型の高病原性鳥インフルエンザAウイルスは発見時からamantadineに耐性で

あったことが報告されている。この変化はamantadineの標的部であるM2蛋白のアミノ酸変異が起こることによって生じる。特に4カ所(S31, V27, A30, L26)が耐性変異部位として明らかにされており、PCR-RFLPなどによって解析する方法が提案されている²⁾。

ノイラミニダーゼ阻害薬であるoseltamivir, zanamivirではこれまでの検討では薬剤耐性変化は起こりにくいことが知られている。しかし、臨床分離株のサーベイランスでは、作用点であるノイラミニダーゼのアミノ酸変異(N2のD151, T225, E375;いずれもインフルエンザAの場合)によって耐性化したウイルスが報告されている³⁾。薬剤の多用による耐性ウイルスの出現には十分注意が必要で、今後もこれらの出現頻度についてモニターしていくことが重要である。

3. ヒト免疫不全ウイルス(HIV)治療薬

HIVは、感染細胞内でのRNAから相補的DNAへの逆転写過程で、多くの遺伝子変異が起こる。このため免疫による制御を逃れて持続感染し、また薬剤耐性も容易に生じることが知られている。抗HIV薬には核酸系逆転写酵素阻害薬(NRTI)として7種類、非核酸系逆転写酵素阻害薬(NNRTI)として3種類、ウイルスプロテアーゼ阻害薬(PI)として7種類、侵入阻害薬として1種類(本邦未発売)が臨床応用され、これらの多剤併用療法(highly

active anti-retroviral therapy ; HAART)により, 免疫不全発生の阻止が可能となった。

1) 生体の遺伝子多型

NRTIの1つであるabacavir(ABC)は白人では5%ほどの患者で重篤な過敏症反応を起こすことが知られているが, この反応とHLAとの関連が報告されている⁴⁾。ABCを投与され過敏反応を起こした個体の94.4%でHLA-B*5701が認められ, 過敏反応を起こさなかった患者での陽性率1.7%と比べて強い相関を認めた。日本人ではHLA-B*5701は少ない(したがってABC過敏反応も少ない)が, 発症すると重篤で致死的転帰も報告されているため, 今後何らかの方法で簡易的にこの遺伝子を知る方法が望まれる。

また, PIやNNRTIのうち特にefavirenz(EFV)は肝の薬剤代謝酵素であるチトクロームP450(CYP)で代謝されるため, この活性や結合により有効濃度に変化する可能性がある。

4種類のCYP遺伝子多型と, バリア上皮や造血幹細胞に分布して薬剤の侵入をコントロールするP-glycoproteinをコードするmultidrug-resistance transporter gene(MDR1)の多型と, 抗HIV薬nelfinavir, efavirenzの血中濃度, 抗ウイルス効果をみた報告ではCYP2D6の野生型/変異型(wt/wt, wt/mut, mut/mut)によって薬剤血中濃度が異なっていることが報告されている⁵⁾。本報告ではMDR1の多型(TT, CT, CC)でも血中濃度

に差が出ることを示されている。興味深いことにMDR1では血中濃度が低いgenotype(TT)をもつ方が抗ウイルス効果が高い傾向があることが示されており, 薬物代謝に関わる遺伝子多型は単純に血中濃度だけでは評価できない可能性があり, さらに研究の進展が期待される。

2) 病原体の遺伝子多型

前述のように遺伝子変化による薬剤耐性が容易に起こることが知られており, それぞれの薬剤によって鍵となる標的部位が特定されており, 薬剤選択の重要な情報として臨床的にも応用されている。薬剤に対する正確な耐性の度合いはウイルスを薬剤とともに培養して行うphenotype検査で明らかとなるが, 細菌の検査と比べて時間とコスト・技術を要するため, 遺伝子変化で耐性をみるgenotype検査が広く用いられている。Genotypeと薬剤による耐性部位はNRTIで18カ所, NNRTIで10カ所, PIでは21カ所がリストされており, これらの組み合わせにより耐性が異なる⁶⁾。この解釈はきわめて複雑であり, コンピュータシミュレーションによる判定などの試みがなされている。またウイルスの薬剤耐性変化の遺伝部位のみを増幅してウイルスベクターに組み込みphenotypeをみようとする検査方法も開発されている。

文 献

1) Limaye AP : Ganciclovir-resistant cytomegalovirus in organ transplant recipients. Clin Infect Dis 5 :

866-872, 2003

- 2) Suzuki H, Saito R, Masuda H, et al : Emergence of amantadine-resistant influenza A viruses : epidemiological study. J Infect Chemother 9 : 195-200, 2003
- 3) McKimm-Breschkin J, Trivedi T, Hampson A, et al : Neuraminidase sequence analysis and susceptibilities of influenza virus clinical isolates to zanamivir and oseltamivir. Antimicrob Agents Chemother 47 : 2264-2272, 2003
- 4) Martin AM, Nolan D, Gaudieri S, et al : Predisposition to abacavir hypersensitivity conferred by HLA-B*5701 and a haplotypic Hsp 70-Hom variant. Proc Natl Acad Sci U S A 101 : 4180-4185, 2004
- 5) Fellay J, Marzolini C, Meaden ER, et al : Response to antiretroviral treatment in HIV-1-infected individuals with allelic variants of the multidrug resistance transporter 1 : a pharmacogenetics study. Lancet 359 : 30-36, 2002
- 6) Johnson VA, Brun-Vezinet F, Clotet B, et al : Drug resistance mutations in HIV-1. Top HIV Med 11 : 215-221, 2003

安岡 彰

昭和59年 長崎大学医学部卒業

現在, 富山医科薬科大学感染予防医学・感染症治療部助教授

専門分野: 感染症, 呼吸器, HIV感染症, 病院感染対策

E-mail : yasuoka-kkr@umin.ac.jp

《深在性真菌症の診断と治療》 ニューモシスチス肺炎の診断と治療

安岡 彰*

基礎知識●

ニューモシスチス肺炎は現在では真菌に近い病原体とされる *Pneumocystis jiroveci* による感染症である。これまで本病原体は *Pneumocystis carinii* と呼ばれ、ヒト以外にもラット、マウス、ウサギをはじめ多くのほ乳類に感染することが知られていた。これらの *P. carinii* が同一であるかどうかは長いあいだ不明であったが、最近になって動物種特異性がかなり高いことが明らかになり、遺伝子レベルでの比較でそれぞれの動物に感染する *P. carinii* は別種であることがわかってきた。このため *P. carinii* という名称は最初に同定されたラット由来のものに与えられ、人のものは *P. jiroveci* と命名された。通称としてはこれからも「カリニ肺炎」と呼ばれるものと思われるが、本稿では新しい分類名に矛盾しないよう「ニューモシスチス肺炎」と呼ぶことにする。なお、*PneumoCystis Pneumonia* として PCP という略称は今後も使用することが提唱されている。

P. jiroveci は嚢子と栄養体の2形態をとることが知られている。生活環は吉田らによって Fig. 1 のように提唱されている。有性生殖型がみられるのかどうかなどについてはまだ知られていない。嚢子壁には真菌に特徴的とされる β グルカンが多く含有している。*P. jiroveci* は肺胞 I 型上皮との親和性が高く、これと結合した状態で増殖が起こる。すなわち病原性としては肺特異的である。

本菌の感染形態はまだ完全に解明されたわけで

はないが、従来いわれていた肺内での長期潜伏感染ではなく、日常的に再感染が起こっているという考え方が有力になっている。乳幼児のあいだでは *P. jiroveci* による感冒様の気道感染がまれではなく起こっているとする報告がある。

診 断●

1. 発症背景

PCP はほとんどの場合、細胞性免疫不全を背景に発症する。代表的疾患に HIV 感染症、成人 T 細胞白血病 (adult T-cell leukemia: ATL) やリンパ系悪性腫瘍、副腎皮質ステロイドホルモンの中量以上を1ヵ月以上全身投与されている例、免疫抑制薬使用例などがあげられる。また最近では抗癌薬使用で高度の白血球減少をきたす例や悪性腫瘍の末期感染としてみられることも報告されている。

最近では、一見、基礎疾患がみられないような成人で PCP を発症し、HIV 感染症と診断される例が増加しており注意が必要である。一見、基礎疾患がない患者に PCP の特徴を有する肺炎をみた場合には、症状が数週間前からみられていないか、発症に先立って体重減少や慢性的な下痢・発熱などの症状がみられていなかったかについての病歴聴取が重要となる。

2. 臨床症状

PCP では発熱、乾性咳嗽、呼吸困難が比較的特徴的とされる。*P. jiroveci* は滲出性の炎症機転が生じにくいいため、細菌感染の合併がない限り PCP では喀痰はほとんどみられないことが特徴である。また胸部 X 線所見の印象より病変は広範であ

* A. Yasuoka: 富山医科薬科大学感染予防医学/感染症治療部。

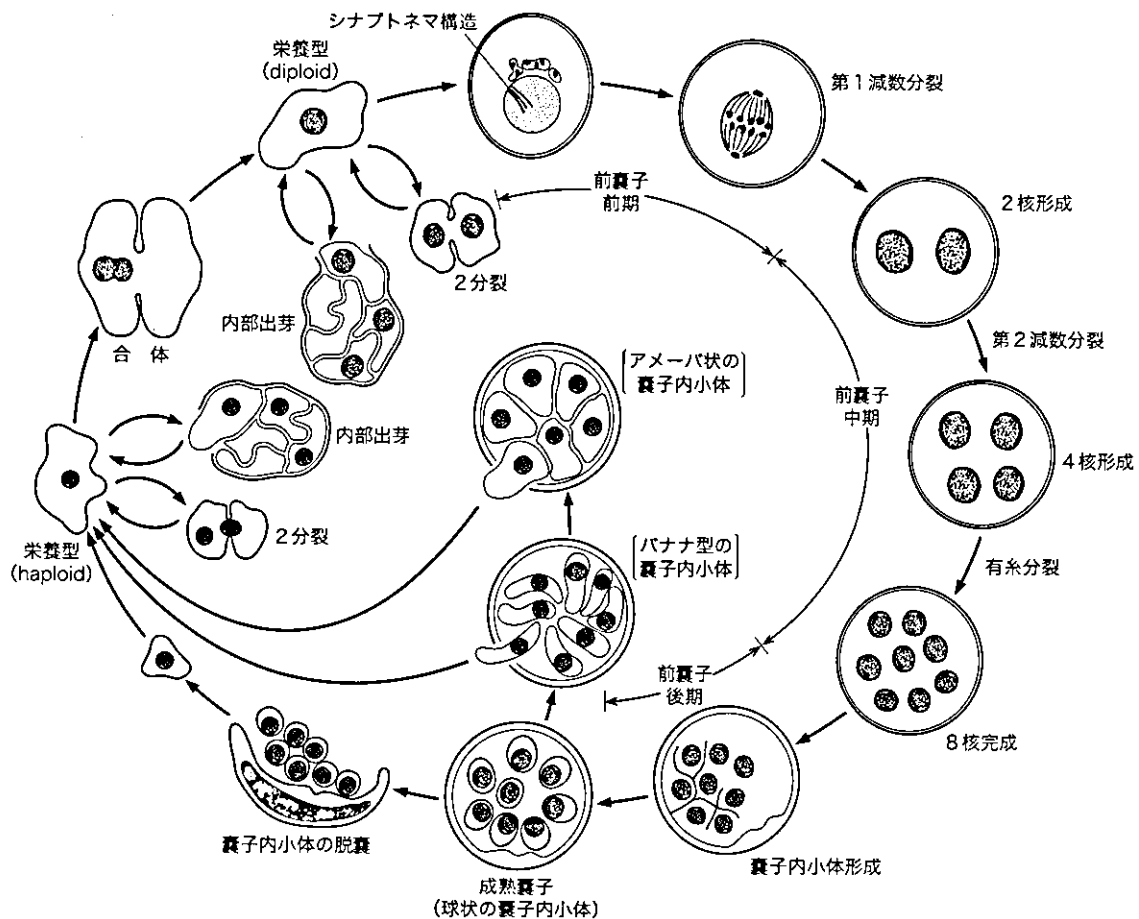


Fig. 1. *P. jirovecii* の生活史

[文献1]より引用]

り、呼吸困難・低酸素血症が強い。

3. 画像所見

胸部単純X線では両側びまん性の淡い「スリガラス状」と表現される陰影が特徴である。これは病原体が肺胞内を充満する(実質性病変)でありながら、滲出機転を伴わないため濃厚な浸潤影とはならず、微細な点が集合したような陰影となるためである。病変が進行して陰影の重なりが濃厚となると浸潤影との区別は困難となる。病変は基本的に両側びまん性であるが、肺小葉単位での進行度の差があるため場所により濃淡差がみられることが多い。

CTでは肺小葉単位で均一な濃度上昇がみられ

るが、隣り合った肺小葉間では濃度差がみられ「地図状」のまだらな肺胞濃度の上昇が観察される。また、胸膜直下に正常肺胞濃度の部分が残ることも特徴的所見である。また嚢胞を形成しやすく、気胸や縦隔気腫の頻度が高い。PCPはさまざまな非典型陰影を呈することが多いことも知られており、網状・線状影が目立つ例、一肺葉に限局する例、浸潤影や結節影の報告もみられている。

ガリウムシンチグラム(Gaシンチ)では、早期より肺野全体のびまん性取り込みがみられ、早期診断や他のびまん性肺疾患との鑑別に有用である。

4. 検査所見

日常的な検査所見としては中等度の炎症所見が認められる。CRP はおおむね一桁台の上昇で、白血球増多や左方移動も著明ではない。肺での炎症を反映してLDHの上昇が認められ、これは重症度を反映する。肺の線維化マーカーであるKL-6が上昇することも報告されている。

血液検査でもっともPCPを疑う根拠となるのが(1→3)- β -Dグルカン(β グルカン)の上昇である。 β グルカンは深在性真菌症の補助診断マーカーとして日本ではよく用いられているが、PCPではこれが数百から数千pg/mlと著明に上昇することが多い。*P. jiroveci*以外の肺真菌症でこのような高値となることはまずないため、上記の画像所見と β グルカンの著しい高値をみた場合、PCPを強く疑うことができる。PCPの場合、 β グルカン値は治療開始初期に一時的に上昇することがあり、また発症後数ヶ月と長期に陽性を維持するので治療終了のマーカーとはならないが、次第に低下してくれば治療成功の指標とはなりうる。

5. 病原体の検出

*P. jiroveci*は臨床検査として増菌・培養することができないため、病原体の検出方法は検体の直接塗抹鏡検によるか、遺伝子の検出によって行われる。

塗抹標本としては肺胞から直接採取されたものほど適しており、肺組織、肺胞洗浄液、大量の高張食塩水吸入による誘発痰が用いられる。染色方法としては、嚢子が染まるグロコット染色(GMS染色)やトルイジンブルー-O染色と、栄養体が染まるギムザ染色(簡易染色法としてDiff-Quikが頻用される)がある。前者は識別は容易であるが染色にやや時間がかかる。一方、Diff-Quik染色は短時間に容易に染色できるが、*P. jiroveci*の同定にはある程度の経験を要する。熟練者が行った場合、肺胞内での量が多い栄養体染色法が感度が高い傾向にある。

HIV感染者の場合は肺胞中の菌体が多く、肺胞洗浄液が検体であればほぼ塗抹で確認できるが、非HIV患者の場合は検体中の量が少なく、塗抹

陰性でもPCPを否定することができない。

感度が高いのは遺伝子の検出法であり、研究施設や検査会社が独自のPCRを提供している。PCRの設定によるため一概にはいえないが、塗抹鏡検が陰性の非HIV例でも肺胞洗浄液や誘発略痰で陽性の結果が得られる。感度は落ちるが、略痰や咳嗽を繰り返したのちの咽頭拭い液でも陽性となることがあり、侵襲性の高い検体が得にくい場合は検討する価値がある。

HIV感染者の場合は明らかなPCPでない場合でもPCRが陽性となることが知られており、これは顕性の肺炎を起こしていなくても*P. jiroveci*が増殖していることがあるためとされている。したがって、とくにHIV例ではPCR陽性結果の解釈は十分臨床所見との整合性を考える必要がある。

治 療●

1. 治療薬 (Table 1)

HIV患者の多い米国などではPCPの治療薬もいくつかの選択肢があるが、わが国においては実質的にはST合剤とpentamidineの2つを用いることになる。

1) ST合剤: ST合剤はsulfamethoxazoleとtrimethoprimの2つの葉酸合成阻害薬の合剤である。英語での表記の順は逆で、T/Sとかco-trimazoleと記されることが多い。*P. jiroveci*以外にもグラム陽性球菌から陰性桿菌まで広い抗菌スペクトラムを有する抗菌薬で、一部の原虫にも効果がある。PCP治療薬としては有効性・効果発現までの時間などから第一選択薬と考えられている。細菌治療(4g/day)の2~3倍の投与量が必要で、trimethoprimとして15mg/kgが標準量である。これは体重60kgの場合12錠(顆粒12g)に相当する。静注製剤もあるが、溶解度が低く1A(錠剤の1錠に相当する)あたり標準で125ml、最低でも75mlの輸液を必要とする。ST合剤は腸管からの吸収が良好であるので、経口摂取が困難でない限り、経口剤の治療が適している。

投与量が多いこともあり、副作用の発現は高頻

Table 1. PCP の治療薬

薬 剤	投与量	投与方法	副作用
ST 合剤(錠, 顆粒) 1 錠(1 g)中 trimethoprim 80 mg sulfamethoxazole 400 mg	trimethoprim で 15 mg/kg	分 3~4	ショック, 皮疹・発熱などの アレルギー, 貧血, 汎血球減 少症, 肝障害, 腎障害
ST 合剤(注射)(バクトラミン) 1 アンプル中 trimethoprim 80 mg sulfamethoxazole 400 mg	trimethoprim で 15 mg/kg	1 アンプルあたり 125~75 ml のブドウ糖液に溶解 分 3~4	ショック, 皮疹・発熱などの アレルギー, 貧血, 汎血球減 少症, 肝障害, 腎障害
pentamidine(注射)(ペナンボックス) 1 バイアル中 300 mg	3~4 mg/kg	ブドウ糖 200~300 ml に 溶解し 1~2 時間かけて 1 日 1 回点滴	低血圧, 腎障害, 不整脈, 低 血糖, 高血糖, 肺炎, 白血球 減少, 血小板減少, 電解質異 常, 味覚異常,
pentamidine(吸入)(ペナンボックス) 1 バイアル中 300 mg	300~600 mg	300 mg あたり 3~5 ml の注射用水に溶解し, 30 分 かけて 1 日 1 回吸入	気管支痙攣, 喘息発作, 咳嗽, 味覚異常
atovaquone(内服液) 150 mg/ml, 210 ml/bottle	1,500 mg	分 2	発疹, 嘔気, 下痢

度である。薬剤過敏症(発熱・発疹)は HIV 感染者では半数近くで発生する。また、骨髓機能抑制、低 K 血症などの電解質異常、腎障害が多く認められる。

2) **pentamidine** : pentamidine はトリパノソーマ治療薬として長い歴史をもつが、日本では 1989 年に PCP 治療薬として認可されている。作用機序は明確ではないが複数の作用点をもつとされている。ST 合剤と作用点異なることから相補的に用いられる。点滴投与、筋肉内投与、吸入投与が可能であるが、筋注すると局所の無菌性壊死を起こしやすいことから通常は用いない。点滴投与は 4 mg/kg を 5%ブドウ糖液(生理食塩水には溶解しない)に溶解し、1~2 時間以上かけて投与する。後述するように副作用が高頻度であるので、われわれは 3 mg/kg で使用しているが、効果はほぼ同等で副作用の発現が遅れる傾向がある。吸入は薬剤到達の確実性に欠けることから副作用などで前投与薬を中断した場合の治療継続手段や後述する発症予防投与として用いるのが主である。300~600 mg を蒸留水に溶解し、30 分程度の吸入時間になるよう量を調整する。ジェットネブライザーが推奨されている。

pentamidine は腎障害、膀胱障害(急性膀胱炎および低血糖、高血糖)、骨髓機能抑制など重篤な副作用

の頻度が高い。とくに前 2 者は不可逆性変化となる可能性があり注意が必要である。また投与速度が速すぎるとショックや血管炎を起こしやすい。数日以上投与では金属のような味覚がしたり味覚低下が起こりやすい。われわれは薬剤性肺臓炎も経験している。吸入では咳嗽・呼吸困難や喘息が誘発されることもある。本剤は有害薬であり治療者以外が吸入しないよう換気のよい部屋で吸入し、その間スタッフは室外に出るなどの注意が必要とされている。

3) **その他の治療薬** : atovaquone は軽症から中等症の PCP の代替治療薬として用いられる。日本では HIV 感染者の PCP 治療のために厚生労働省エイズ治療薬研究班(班長: 東京医科大学 福武勝幸 教授)から入手可能である。経口剤(シロップ)で、1,500 mg 分 2 で用いる。

このほかハンセン病治療薬である diaphenyl-sulfone(dapsone; レクチゾール)およびマラリア治療薬の primaquine も他剤と併用して用いられることがある。

2. 実際の治療法と補助療法 (Table 2)

上述のように PCP の治療薬は副作用をある程度覚悟して使用する必要がある。また効果発現には 5~7 日を要する。多少侵襲がある検査ではあるが、治療を開始する前に気管支肺胞洗浄や誘発痰

Table 2. PCP 診療の要点

1. PCP を想起する。明らかでない免疫不全(HIV 感染症など)がある可能性を考慮する
2. 胸部 X 線の両側性スリガラス状陰影、画像所見の割に低酸素血症が強いのが特徴である
3. 血液検査で LDH 上昇、 β グルカン高値は PCP の可能性を考慮する
4. 確定診断の努力。有効な方法は BAL と PCR である
5. 治療は経口 ST 合剤が第一選択。不必要な併用はしない
6. 積極的な副腎皮質ステロイドホルモン投与を行う
7. 合併症として気胸やサイトメガロウイルス肺炎に注意する

BAL : bronchoalveolar lavage, 気管支肺胞洗浄

などを行って確定診断を得ることが本症の治療成績を向上させる。

治療の第一選択は ST 合剤で、食事摂取が可能であれば経口薬を投与する。ST 合剤と pentamidine 点滴投与の併用は治療成績の向上につながるというデータはなく、副作用は確実に相乗するので使用しない。治療期間は 21 日間(3 週間)である。2 週間治療と 3 週間治療では 3 週間のほうが治療成績がよいというデータがある。それ以上の治療継続を支持する成績はなく、胸部 X 線での陰影残存があっても 3~4 週間で治療は終了とする。

PCP 治療でもっとも重要なことは、副腎皮質ステロイドホルモン(以下ステロイド)の併用である。治療開始に伴う急激な菌体の崩壊が各種サイトカインを誘導し、高度の肺炎症を惹起して肺の線維化が進行するので、これを抑えることによって PCP の治療成績は大きく改善した。治療開始初期に十分な量のステロイドを使用することにより PCP の治療成績を改善してきた。診断時の PaO₂ が 70 mmHg 以下、あるいは AaDo₂ が 35 mmHg 以上であれば prednisolone 60~80 mg 相当のステロイドを治療開始 72 時間以内(可能な限り同時)に開始する。重症例、PCP の原因がステロイド投与による場合は methylprednisolone によるパルス療法(500~1,000 mg×3 日)で開始する

のが効果的である。ステロイドは初期の 5~7 日間は十分量を投与するが、その後はすみやかに減量することが免疫不全による合併感染を少なくする。PCP の治療終了時点ではステロイドも終了できるような減量計画を立てる。

合併症●

PCP では気胸の頻度が高く両側気胸が起こることもある。人工呼吸管理が必要な場合はとくに注意が必要である。

ステロイドの大量を長期に用いるとサイトメガロウイルスによる肺炎が合併することがある。PCP 治療時にはサイトメガロウイルスの抗原血症検査を定期的に行うことが推奨される。

発症予防●

PCP は重篤な肺炎であり、発症のリスクがある程度特定できるため、ハイリスクグループでは発症の予防投薬が推奨される。中等度以上のステロイドを 1 ヶ月以上投与する場合、高度の免疫不全が持続する治療を行う場合、末梢血 CD4 リンパ球数が持続して 200/ μ l 未満である HIV 感染者などが対象となる(1 次予防)。また PCP の治療が終了し、上記免疫不全が持続する場合も予防投与を行う(2 次予防)。ST 合剤を 1 錠連日、2 錠週 3 回、または 2 錠連日(HIV 感染者でトキソプラズマなど他の合併感染も予防する場合)で投与する。他の方法として pentamidine 300 mg の吸入を月 1~2 回、diaphenylsulfone 100 mg 連日、atovaquone 1,500 mg 連日などの方法が有効である。

文献●

- 1) 吉田幸雄(編著)：ニューモシスチス・カリニ。図説人体寄生虫学、第 6 版、南山堂、東京、p 72-81、2001
- 2) Thomas Jr CF, Limper AH : Pneumocystis pneumonia. N Engl J Med 350 : 2487, 2004
- 3) 安岡 彰：ニューモシスチスカリニ肺炎。Medical Practice 臨時増刊、実践抗生物質・抗菌薬療法ガイド、文光堂、東京、p 249-251、2003

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
狩野繁之、源河いくみ、 岡慎一、他	我が国の HIV/AIDS 患者に 合併する寄生虫症	日本臨床寄生虫 学会誌	15(1)	95-98	2004

わが国の HIV/AIDS 患者に合併する寄生虫症

国立国際医療センター 研究所

狩野繁之

同 エイズ治療・研究開発センター

源河いくみ・吉田邦仁子・岡 慎一

独立行政法人国立病院機構 仙台医療センター

伊藤俊広・佐藤 功・片倉道夫

同 名古屋医療センター

間宮均人

同 大阪医療センター

渡邊清司・上平朝子・白阪琢磨

同 九州医療センター

山本政弘・宮村知也

Key Words : エイズ, HIV 感染症, 寄生虫症

はじめに

わが国では、エイズおよび HIV 感染症に合併する寄生虫症は、その数が余り多くないために、患者

の医療における重要性の認識が低く、適切な診断・治療の体制整備が遅れている。エイズ指標疾患に入る寄生虫症は、トキソプラズマ脳症、クリプトスポリジウム症、イソスポラ症の 3 疾患で、患者の免疫

Parasitic Diseases Complicated with HIV/AIDS Patients in Japan

Shigeyuki Kano*

Ikumi Genka**

Kuniko Yoshida**

Shinichi Oka**

Toshihiro Ito***

Isao Sato***

Michio Katakura***

Naoto Mamiya****

Kiyoshi Watanabe*****

Tomoko Uehira*****

Takuma Shirasaka*****

Masahiro Yamamoto*****

Tomoya Miyamura*****

**Research Institute, International Medical Center of Japan*

***AIDS Clinical Center, International Medical Center of Japan*

****National Hospital Organization, Sendai Medical Center*

*****National Hospital Organization, Nagoya Medical Center*

******National Hospital Organization, Osaka National Hospital*

******National Hospital Organization, Kyushu Medical Center*

論文請求先：狩野繁之 〒162-8655 新宿区戸山1-21-1 国立国際医療センター 研究所

Clinical Parasitology Vol. 15 No. 1 2004

力が低下してきた際の日和見原虫感染症である。さらにエイズおよび HIV 感染症に高率に合併する寄生虫症としては、赤痢アメーバ症、ランブル鞭毛虫症、糞線虫症などが知られている¹⁾。全国 360 余のエイズ拠点病院にアンケート用紙を配布し、エイズ/HIV 感染症患者に合併した上記寄生虫症の調査を行うなど、わが国における同合併症の疫学特性を把握するための研究を展開したので報告する。

赤痢アメーバ症

全国のエイズ拠点病院 (368 施設) にアンケート用紙を配布し、平成 15 年度に HIV 感染症患者に合併した赤痢アメーバ症の患者背景について調査を行った。

回収率は 223 施設 (61%) で、175 施設は HIV 感染症患者の診療経験があり (175/223 = 78%)、赤痢アメーバ症の診療経験のある施設は 28 施設 (28/223 = 13%)、症例数は 38 例であった。すべて男性症例で、平均年齢 37 歳、33 例は MSM (Men who have sex with men) による STD (Sexually transmitted disease) 感染と考えられた。CD4 数の平均は 306/ μ l、HIV ウイルス量の平均は 2.2×10^4 コピー/ml であった。

赤痢アメーバ症の病型は、腸炎 18 例 (18/33 = 55%)、肝膿瘍 13 例 (39%)、腸炎と肝膿瘍の合併 3 例、その他の部位の膿瘍 2 例であった。

すべての症例でメトロニダゾールが治療薬として用いられ、抗糞子薬フロ酸ジロキサニド (フラミド[®]) が 16 例 (42%) で使用されていた。転帰としては完治 12 例、改善 24 例、不変 1 例、死亡 1 例 (アメーバ症によるものではなく原疾患である悪性リンパ腫によるもの) であった。

わが国のエイズ/HIV 感染症に合併する赤痢アメーバ症は、CD4 数の平均値から考えて患者の免疫状態は比較的良好であり²⁾、また海外旅行歴が少ないのに対し、梅毒や B 型肝炎などの合併が多かった。すなわち感染は、流行地における食事等を介した糞口感染としてではなく³⁾、また日和見感染としてでもなく⁴⁾、MSM に STD として感染していると考察できた。

トキソプラズマ症

全国のエイズ拠点病院 362 施設にアンケート調査を行った。回収率は 235 施設 (65%) で、169 施設は HIV 診療経験があり (169/235 = 72%)、トキソプラズマ症の診療経験のある施設は 29 (29/235 = 12%)、症例数は 55 例であった。これは全 5,147 例の HIV の 1.07% にあたる。男性 48 例、女性 6 例、不明 1 例。全症例の平均年齢は 41.2 歳 (2 例は年齢記載なし)。CD4 数の平均値は 44.3/ μ l であった。HIV ウイルス量は測定限界以下から最高では 8.8×10^5 /ml まで幅広く分布した。すなわち、ウイルス量 $< 10^3$ /ml : 6 例、同 $< 10^4$ /ml : 4 例、同 $< 10^5$ /ml : 13 例、同 $< 10^6$ /ml : 8 例。感染経路の検討では、非加熱血液製剤による HIV 感染者は 7 例 (12.7%)、同性間性交渉による者は 10 例 (18.2%)、異性間性交渉による者は 31 例 (56.4%)、その他 7 例 (12.7%) であった。

本調査結果は、対象施設をエイズ拠点病院と限定はしているものの、その症例数から信頼度は高いものと考えられた。また、調査期間を限定せず過去から現在までのすべての症例について回答を得たが、トキソプラズマ症合併例の HIV 感染経路の大半は性感染によるもの (74.6%) であることや、58% の症例で抗 HIV 療法が施行されていることを考慮すると、集められた症例のほとんどは最近 10 年程度に経験されたものが多いものと思われた。合併率は 1.07% であったが、一般には 2% 程度といわれていることから低い数値と思われるが、アンケート報告された 5000 例を超える HIV 症例が最近 10 年くらいの症例へのかたよりのあると過程すると、ST 合剤を用いたカリニ肺炎の予防がトキソプラズマ症の発症の予防につながっている可能性があると考えられた。それと同時に、抗 HIV 療法は 55 症例中の半数強に施行されているのみであることから、感染予防をさらに充実させればトキソプラズマ症の合併頻度をさらに低下させることができる可能性があると考えられた。

ジアルジア症

愛知県内の大型 10 病院 (500 床以上) にアンケー

ト調査を行ったが、ジアルジア症の報告はなかった。ジアルジア症は、やはり MSM に STD として感染することが想定される。名古屋医療センターでは、従来一般患者（HIV 陰性患者）からのジアルジア症の検出が続いていたが、最近報告がなくなっていることも考慮に値する。

国立国際医療センターでは、海外渡航歴の無い下痢を主訴とした患者に、HIV 感染を認めた 2 例を最近経験したが、ジアルジア症の重症化がエイズで起こることが疑われた。

一般的にエイズでの合併の報告がわが国で少ないことは、検査法の非徹底ならびに技術の低下による見逃しが予想される。近年直接蛍光抗体法による検出キットが市販の状況にあるが、その導入も今後は検討する必要がある。しかしながら、従来のギムザ染色等の検査法でも、体制の整った検査室では診断が可能であるので、同検査技術の熟練の必要性を強く認める。

イソスポラ症・クリプトスポリジウム症

全国で発症した AIDS 報告症例の集計（1985～2002）を行い、大阪医療センターの症例に関しては、過去約 7 年（1997.4.1～2003.12.3）の実態を調査した。

全国集計の結果は、AIDS 患者 2,556 名（日本国籍 1,906 名、外国籍 650 名）の内、イソスポラ症の合併報告はなく、クリプトスポリジウム症の合併は計 9 件（内外国籍 8）であった。

大阪医療センターでは、HIV 感染者 524 例のうち、イソスポラの合併は認められず、クリプトスポリジウム症の合併は 3 例であった。3 例とも激しい下痢、体重の減少、CD4 数の顕著な減少があり、AIDS の病態として重篤であった。すべての症例で、クリプトスポリジウムの特異的な治療は行わず、抗 HIV 療法による免疫力回復で治癒した。2 例は、それぞれ赤痢アメーバおよびキャンピロバクターとの重複感染例であり、下痢の病態が特定しなかった。感染経路については、他の下痢起因微生物の感染経路を鑑みて、性的接触によるクリプトスポリジウム症の感染の可能性が考えられた。

イソスポラ症およびクリプトスポリジウム症は

AIDS 指標疾患に入る寄生虫症であり、免疫力の低下による日和見感染が起こりうる⁵⁾。しかしながら、わが国の合併症例はきわめて少なく、症例の蓄積が困難である。大阪医療センターにおけるクリプトスポリジウム症 3 例の報告はきわめて貴重であり、真に有効な治療薬が無いクリプトスポリジウム症に対して、補液による脱水と電解質バランスの補正や、適切な抗 HIV 療法による免疫力の回復を図る治療法の有効性が強く認識された。

糞線虫症

本症との合併に関するアンケート調査を、全国のエイズ拠点病院 364 施設に行った。回収率は 201 施設（55%）で、糞線虫症との合併例は 6 例〔日本人 2 例、外国人 3 例（アフリカ人、タイ人、ブラジル人）、国籍不明 1 例〕（男 5 例、女 1 例）で、合併時の平均年齢は 41 歳であった。地域としては、沖縄が 1 例、その他は東京、大阪などの大都市であった。HIV 感染経路は、同性間性交渉 2 例、異性間 2 例、両性間 2 例、不明 1 例であった。

糞線虫症合併時の CD4 は 3～793（平均 206）/ μ l で、かなりの幅が見られた。本 6 例のうち、播種性糞線虫症が認められたのは 1 例のみであった。

糞線虫症は、熱帯・亜熱帯に広く分布する線虫類の寄生虫症で、本邦では、沖縄や南西諸島に未だに多くの感染者が認められる。特に消耗性疾患、栄養不良、悪性リンパ腫や成人 T 細胞性白血病、ステロイド投与など免疫力が低下すると感染が進行することが知られており、エイズ患者における糞線虫症の合併の危険性が考えられている。しかしながら今回の調査研究では、本邦における症例では重症化の傾向は見られなかった。HIV 感染者における糞線虫症合併頻度はおよそ 0.1% 以下であろうと考えられ、なかなか特異的な症例の蓄積ができないのが現状である。

おわりに

わが国におけるエイズ・HIV 感染症との寄生虫症の合併頻度やその重篤性は、諸外国の報告とはかなり異なり⁶⁾、診断・治療法の選択も、諸外国の例をそのまま適用できないことが分かった。また、合併

例に対する適切な治療薬の配備もわが国には十分でない。たとえば、アメーバ赤痢におけるフロ酸ジロキサニドや、糞線虫症におけるイベルメクチンの使用は制限された状況にある。

それぞれの合併寄生虫症には、その疫学および臨床的特徴があることから、今後わが国における有効な治療法の確立のために、個別の症例研究をかさねてゆく必要があるものと考えられた。

追記：本報告は、「平成 15 年度エイズ医療共同研究（15 公-6）」の成果による。

文 献

- 1) Mehlhorn, H. (2001) : Opportunistic Agents, Man, In : Encyclopedic reference of parasitology, Springer, Berlin, pp461-462.
- 2) 源河いくみ, 他 (2003) : 免疫不全者の寄生虫易感染性について, 病院・施設における寄生虫感染症とその対策, 狩野繁之編, フリープレス, 東京, pp53-59.
- 3) Hung, C. C. (1999) : Invasive amebiasis : an emerging parasitic disease in patients with HIV in an area endemic for amoebic infection, AIDS, 13, 2421-2428.
- 4) William, A. (1999) : Diagnosis and management of amebiasis, CID, 29, 1117-1125.
- 5) 山本徳栄 (1999) : クリプトスポリジウム症, 感染症とその治療, 竹田美文編, 最新医学社, 大阪, pp231-241.
- 6) Piot, P. (1996) : Opportunistic infections and tumours, HIV/AIDS-with an emphasis on Africa, In : Manson's Tropical Diseases, Cook GC ed. Saunders, London, pp 313-315.

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Katano H, Cohen JI	Perforin and lymphohistiocytic proliferative disorders.	Br J Haematol	128	739-750	2005
Katano H, Ito K, Shibuya K, Saji T, Sato Y, Sata T.	Lack of Human Herpesvirus 8 Infection in Lungs of Japanese Patients with Primary Pulmonary Hypertension.	J Infect Dis	191	743-745	2005
Song J, Yoshida A, Yamamoto Y, Katano H, Hagihara K, Oka S, Kimura S, Yoshizaki K.	Viral Load of Human Herpesvirus 8 (HHV-8) in the Circulatory Blood Cells Correlates with Clinical Progression in a Patient with HHV-8-associated Solid Lymphoma with AIDS-associated Kaposi's Sarcoma.	Leuk Lymphoma.	45	2343-2347	2004
Katano H, Pesnicak L, Cohen JI.	Simvastatin induces apoptosis of Epstein-Barr virus (EBV)-transformed lymphoblastoid cell lines and delays development of EBV lymphomas.	Proc Natl Acad Sci USA.	101	4960-4965	2004
Katano H, Ali MA, Patera AC, Catalfamo M, Jaffe ES, Kimura H, Dale JK, Straus SE, Cohen JI.	Chronic active Epstein-Barr virus infection associated with mutations in perforin that impair its maturation.	Blood	103	1244-1252	2004
Hasegawa H, Katano H, Tanno M, Masuo S, Ae T, Sato Y, Takahashi H, Iwasaki T, Kurata T, Sata T.	BCL-6-positive Human Herpesvirus 8-associated Solid Lymphoma arising from Liver and Spleen as Multiple Nodular Lesions.	Leuk Lymphoma.	45	2169-2172	2004

Perforin and lymphohistiocytic proliferative disorders

Harutaka Katano¹ and Jeffrey I. Cohen²

¹Department of Pathology, National Institute of Infectious Diseases, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan, and ²Medical Virology Section, Laboratory of Clinical Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA

Summary

Perforin is critical for cytotoxicity mediated by granules present in natural killer (NK) cells and cytotoxic T lymphocytes (CTLs). Perforin-deficient mice have impaired cytotoxicity by NK cells and CTLs, resulting in failure to control infections with certain viruses or bacteria. Infection of perforin-deficient mice with lymphocytic choriomeningitis virus results in haemophagocytic lymphohistiocytosis and elevated levels of pro-inflammatory cytokines. Mutations throughout the perforin gene have been identified in patients with familial haemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL) type 2. These patients present with fever, hepatosplenomegaly, pancytopenia, have marked elevations of T-helper type 1 and type 2 cytokines, and have impaired NK cell and CTL cytotoxicity. A number of infectious pathogens have been implicated as triggering the onset of disease. Identification of mutations in perforin as the cause of FHL should allow prenatal diagnosis of the disorder. While stem cell transplantation is curative, gene therapy might be effective in the future.

Keywords: perforin, familial haemophagocytic lymphohistiocytosis, haemophagocytosis, histiocytosis, Epstein-Barr virus.

Molecular basis of killing by CTLs and NK cells: the role of perforin

Cytotoxic T lymphocytes (CTLs) and natural killer (NK) cells are critical for host defence against pathogenic microorganisms and malignant cells (Russell & Ley, 2002). When CTLs recognize target cells, the T-cell receptor (TCR) on the cell surface of CTLs engages with major histocompatibility complex (MHC) class I molecules. Signals from the TCR activate both the perforin and Fas pathways in CTLs (Henkart, 2000). Perforin is present in granules of CTLs and NK cells. Cytotoxic granules gather at the site of contact between the CTL and the target cell, known as the immunological synapse.

The granule membrane fuses with the cell membrane and releases the contents of the granules in a process referred to as exocytosis. This results in rapid death of the target cell.

Perforin released from CTLs binds to the phospholipid bilayer and forms small (15 nm diameter) pores in the membrane of target cells (Lowin *et al.*, 1995). Some investigators have postulated that granzymes, released from cytotoxic granules with perforin, go through the pores, enter the cytoplasm of target cells and induce apoptosis in the target cells (Lieberman, 2003). Granzyme B induces cleavage of caspases, including caspase-3 (Darmon *et al.*, 1995). In addition, granzyme B can induce cell death in the presence of caspase inhibitors, suggesting that granzyme B also activates caspase-independent apoptosis (Henkart *et al.*, 1997). Granzyme B cleaves BH3-interacting domain death agonist (BID), and the cleaved form of BID induces apoptosis through the mitochondrial pathway (Barry *et al.*, 2000). Granzyme A damages DNA by inducing single-stranded nicks with resultant apoptosis of the cells (Shi *et al.*, 1992). The activity of granzymes is dependent on the activity of perforin. Transfection of cells that do not have endogenous perforin or granzymes with granzyme A or B cDNA does not induce death of target cells, while transfection of the same cells with perforin cDNA induces death (Shiver *et al.*, 1992; Nakajima *et al.*, 1995). This suggests that granzymes enter target cells through perforin membrane pores. Other studies, however, suggest that perforin cannot form pores large enough for entry of granzymes (Froelich *et al.*, 1996). As a pore size of >50 nm in diameter may be required for entry of granzymes, the usual perforin pore (15 nm in diameter) is too small. A new hypothesis states that perforin is required for the release of granzymes from the endocytic compartment into the cytosol and for tracking to the nucleus (Browne *et al.*, 1999).

The perforin gene consists of three exons (Fig 1). The coding sequence is located in exons 2 and 3. Perforin is a 555 amino acid protein that has a 21 amino terminal signal sequence, an approximately 300 amino region that shares homology to the C9 complement protein, a 36 amino acid epidermal growth factor-like domain, and a 132 amino acid domain homologous to the C2 domain of protein kinase C (Lichtenheld *et al.*, 1988; Uellner *et al.*, 1997). The protein contains two N-linked glycosylation sites. Perforin is synthesized as an inactive precursor, which must be cleaved at its

Correspondence: Jeffrey I. Cohen, Laboratory of Clinical Infectious Diseases, Bldg. 10, Room 11N228, National Institutes of Health, 10 Center Drive, Bethesda, MD 20892, USA.
E-mail: jcohen@niaid.nih.gov

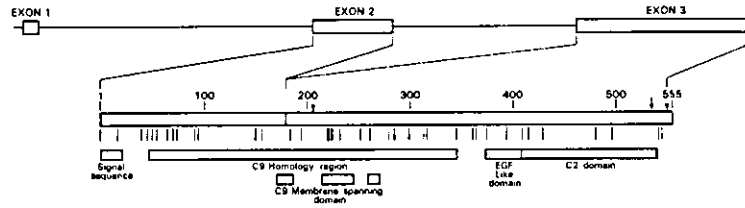


Fig 1. Structure of perforin gene, perforin protein, sites of mutations, and structural domains of the protein. The vertical lines below the perforin protein are the sites of amino acid mutations reported in patients with familial haemophagocytic lymphohistiocytosis. The arrow indicates the carboxy terminal cleavage site and the two lollipops indicate N-linked glycosylation sites.

carboxy terminus, releasing the approximately 20 carboxy terminal amino acids, to yield the active form of the protein (Uellner *et al*, 1997). The C2 domain of perforin is important for its binding to the phospholipid bilayer of cytoplasmic membranes (Fig 2). The C2 domain in the uncleaved form of perforin cannot bind to the membrane, because of the presence of a bulky N-linked glycan on the carboxy terminal domain of the protein. Proteolytic cleavage of the carboxy terminal domain allows the C2 domain to bind to the membrane.

Perforin is harmful to cell membranes; however, the granule membrane encompassing the protein is not destroyed by perforin. The pH inside granules is very acidic (pH <6.0) and this probably keeps perforin in an inactive state. When exocytosis occurs and perforin is released from the granule, the pH becomes neutral and perforin becomes active. In addition, proteoglycans (serglycin and calreticulin) usually cover and inactivate perforin in the granule (Masson *et al*, 1990; Metkar *et al*, 2002). When the granule is released from the cell, perforin is separated from proteoglycans and binds to cell membranes of target cells. Cathepsin B, a lysosomal protease, usually localizes in granules; however, cathepsin B moves to the surface of CTLs during granule exocytosis (Balaji *et al*, 2002). As cathepsin B can cleave perforin, a membrane-bound form of cathepsin B is thought to destroy perforin on the surface of CTLs, preventing the formation of perforin membrane pores and protecting the cell membrane from attack by perforin. Protection of CTLs by cathepsin B is impaired by addition of an inhibitor to the enzyme.

The other mechanism used by CTLs to kill target cells is the Fas pathway. Signalling through the TCR promotes transcription of Fas ligand in CTLs (Henkart, 2000). Fas ligand binds to Fas on the surface of target cells and initiates caspase-mediated killing of the cells. Some proteins function in both the perforin and Fas pathways to mediate cytotoxicity. For example, granzyme B cleaves caspase-3 in both pathways (Darmon *et al*, 1995).

The role of perforin in animal models

Perforin is important for control of pathogens, malignancies and graft-versus-host disease

Perforin-deficient mice were generated by inserting a neomycin cassette into the second or third exons of the perforin gene (Kagi *et al*, 1994a; Kojima *et al*, 1994; Walsh *et al*, 1994). Homozygous mice failed to express perforin protein. Cells from these mice were impaired for lysis of certain virus-infected cells or NK cell targets *in vitro*.

Intravenous or intraperitoneal inoculation of homozygous perforin-deficient mice with lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) resulted in persistent infection of tissues, ultimately resulting in death, while wild-type and heterozygous animals cleared the virus (Kagi *et al*, 1994a; Walsh *et al*, 1994). Perforin-deficient mice are also impaired for control of herpes simplex virus infection (Ghiasi *et al*, 1999) and ectromelia (mousepox) virus (Mullbacher *et al*, 1999). Rossi *et al* (1998)

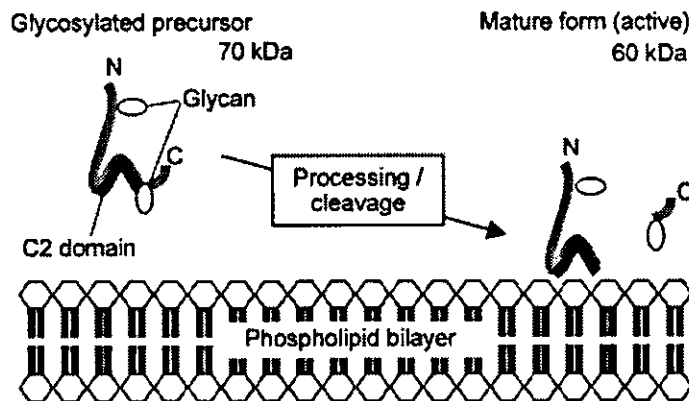


Fig 2. Processing of the perforin protein to its mature form. Perforin is synthesized as a 70 kDa inactive, glycosylated precursor, which is cleaved at its C-terminus to yield a 60 kDa active, mature protein. Only the mature form of the protein can bind to the phospholipid bilayer of cells at the C2 domain of perforin.

showed that perforin-deficient mice infected with Theiler's virus developed encephalomyelitis and inflammatory infiltrates in the spinal cord with high levels of viral RNA in the central nervous system, while control mice remained healthy. Perforin-deficient mice are not impaired for clearance of other viruses, including vaccinia virus, vesicular stomatitis virus, murine cytomegalovirus, Semliki Forest virus (Kagi *et al*, 1995), cowpox virus (Mullbacher *et al*, 1999), rotavirus (Franco *et al*, 1997), coxsackie B virus (Gebhard *et al*, 1998), or murine herpesvirus-68 (Usherwood *et al*, 1997), a mouse homologue of Epstein-Barr virus (EBV).

While perforin-deficient mice are able to ultimately clear infection with the intracellular bacteria *Listeria monocytogenes*, there is delayed clearance from the spleen (Kagi *et al*, 1994b). Perforin-deficient mice showed increased mortality during chronic infection with *Toxoplasma gondii* (Denkers *et al*, 1997) or *Histoplasma capsulatum* (Zhou *et al*, 2001). In contrast, perforin-deficient mice show no delay in clearance of *Chlamydia trachomatis* (Perry *et al*, 1999) or *Chlamydia pneumonia* (Rottenberg *et al*, 1999).

Inoculation of syngeneic fibrosarcoma cells into perforin-deficient mice results in failure to reject the tumour cells, while wild-type animals reject the cells (Kagi *et al*, 1994a). Perforin is important for control of tumour initiation, growth and metastases (Street *et al*, 2001). Perforin-deficient mice are more prone to spontaneous T, B and NK cell tumours (Smyth *et al*, 2000). Growth of implanted tumour cells in mice is controlled by NK cell cytotoxicity, which is dependent on perforin (van den Broek *et al*, 1995).

Perforin also plays an important role for class I-restricted graft-versus-host disease (GvHD) in mice. CD8⁺ T cells from perforin-deficient mice result in less susceptibility to fatal GvHD after infusion into lethally irradiated animals compared with cells from wild-type or granzyme B-deficient animals (Graubert *et al*, 1997; Jiang *et al*, 2001). In contrast, Fas ligand, but not perforin is important for class II-restricted (CD4⁺ T cell) GvHD in mice. CD8⁺ T cells can also prevent rejection of allogeneic bone marrow grafts; perforin-deficient CD8⁺ T cells are impaired in their ability to prevent rejection in mice (Martin *et al*, 1998).

Absence of perforin results in uncontrolled lymphocyte proliferation and haemophagocytosis

Perforin deficiency increases immunopathology in some, but not all, animal models. Perforin-deficient mice have normal levels of NK and CD8⁺ T cells and remain healthy in the absence of infection (Kagi *et al*, 1994a). However, infection of these animals with different viruses or bacteria can initiate an uncontrolled immune response resulting in death of the animal, usually because of the inflammatory response rather than directly because of destruction of cells by the pathogen. Infection of perforin-deficient mice with LCMV results in fatal pancytopenia with elevated levels of tumour necrosis factor α (TNF- α) and interferon γ (IFN- γ) and increases in activated

virus-specific CD8 T cells (Binder *et al*, 1998; Matloubian *et al*, 1999). These animals develop haemophagocytic lymphohistiocytosis with fever, splenomegaly, haemophagocytosis, hypertriglyceridaemia and hypofibrinogenaemia (Jordan *et al*, 2004). Lymph nodes and spleen from these animals show the depletion of follicles with activated lymphocytes. Periportal infiltrates are present in the liver, the bone marrow shows hypoplasia, and a mononuclear pleocytosis is present in the cerebrospinal fluid. Multiple cytokines, including interleukin (IL)-6, IL-10, IL-18, macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), IFN- α , IFN- γ , and TNF- α , are elevated. Antibody to IFN- γ , but not other cytokines, prolongs survival and prevents development of histiocytic infiltrates and cytopenia. Depletion of CD8⁺ T cells, but not NK or CD4⁺ T cells, prolongs survival. The CD8⁺ T cells secrete IFN- γ and depletion of these cells lowers the level of the cytokine. The elevated IFN- γ is thought to be the result of the increased antigen stimulation of CD8⁺ T cells; neutralizing antibody to LCMV lowers IFN- γ levels and prolongs survival.

Perforin-deficient mice also have an abnormal response after vaccination with an LCMV antigen (Badovinac *et al*, 2003). Vaccinated perforin-deficient mice have higher rates of death after challenge with LCMV compared with control mice. Perforin-deficient mice have marked expansions of antigen-specific CD8⁺ T cells and elevated levels of IFN- γ and TNF- α . Depletion of CD8⁺ T cells, or injection with antibodies to IFN- γ and TNF- α , reduced the rate of mortality after challenge with LCMV.

Injection of perforin-deficient mice with *Staphylococcus enterotoxin B*, a superantigen, results in expansion and persistence of CD8⁺ T cells (Kagi *et al*, 1999). Perforin is critical for control of CD8⁺ T-cell expansion in response to *L. monocytogenes* (Badovinac *et al*, 2000). Inoculation of perforin-deficient mice with *L. monocytogenes* results in three to fourfold increases in antigen-specific CD8⁺ T cells compared with control mice. In addition, perforin-deficient mice injected with dendritic cells coated with a *L. monocytogenes* epitope have a threefold increase in antigen-specific CD8⁺ T cells when compared with control mice. Taken together, these results indicate that perforin is critical for controlling the CD8⁺ T-cell response to both infectious organisms and their antigens.

Jordan *et al* (2004) proposed a model for the pathophysiology of haemophagocytic lymphohistiocytosis in perforin-deficient mice. T cells stimulated by antigen-presenting cells (APCs) produce a variety of cytokines that can activate macrophages, including APCs. When APCs recognize foreign antigens, the cells promote presentation of the antigens, resulting in stimulation of CD8⁺ T cells. Stimulated CD8⁺ T cells produce cytokines, including IFN- γ , and begin to kill infected cells, including macrophages and APCs, by the perforin pathway. However, the pathway is impaired in perforin-deficient mice. The persistence of pathogen-infected cells results in sustained antigenic stimulation, T-cell and macrophage proliferation, and elevation of proinflammatory cytokines (Arnaout, 2000; Moretta *et al*, 2000). The

impairment in cytotoxicity of CD8⁺ T cells allows the APCs to continue to present antigens, which in turn increases the proliferation of these T cells. This results in uncontrolled production of IFN- γ as well as other cytokines, and leads to the characteristic histologic and clinical features of haemophagocytic lymphohistiocytosis, including haemophagocytosis.

In the absence of challenge with an infectious pathogen or its antigens, abnormal immune responses can be seen in animals with both perforin deficiency and an additional genetic disease. When perforin-deficient mice are bred on the background of lupus-prone mice, they are more prone to autoimmune disease, and develop autoantibodies and immune complex formation in various organs (Peng *et al*, 1998). Perforin-deficient severe combined immunodeficiency (SCID) mice have more expansion of CD8⁺ T cells than control mice in a GvHD model (Spaner *et al*, 1999). Perforin is important for preventing autoimmunity by the elimination of autoreactive B cells and antigen-specific T cells (Shustov *et al*, 2000). Perforin-deficient mice are more susceptible to autoimmune encephalitis than control mice (Malipiero *et al*, 1997). Perforin-deficient mice that also lack Fas ligand develop severe pancreatitis with macrophage proliferation when compared with mice that lack Fas ligand alone (Spielman *et al*, 1998).

The role of perforin in humans

Perforin in normal adults and children

Perforin expression is confined to NK, CD8⁺ T, CD56⁺ T, γ - δ T, and activated CD4⁺ T cells (Kogawa *et al*, 2002). Perforin expression in NK, CD56⁺ T, and CD8⁺ T cells is age-dependent, with higher levels of perforin in adults compared with children. Healthy infants have very low levels (0–3%) of CD8⁺ T cells that express perforin, compared with adults (8–28%). In contrast, infants have frequencies of NK cells (91–97%) and CD56⁺ T cells (4–30%) expressing perforin that are more similar to the frequencies of NK cells (86–98%) and CD56⁺ T cells (30–77%) expressing perforin in adults.

Perforin in human infections

Perforin is important for the control of viral diseases in humans. Lysis of human immunodeficiency virus (HIV)-infected cells by CTLs requires granule exocytosis and perforin (Shankar *et al*, 1999). Perforin is important for the control of HIV in patients. Long-term non-progressors (who maintain very low levels of HIV replication for years) have high frequencies of HIV-specific CD8 T cells that express perforin, and the level of expression of perforin within these cells is high. In contrast, the vast majority of patients chronically infected with HIV have progressive disease with high levels of HIV replication, and HIV-specific T cells that express little or no perforin (Migueles *et al*, 2002; Zhang *et al*, 2003). However, these patients have large numbers of CD8 T cells that do express perforin, but are not specific for HIV (Appay *et al*, 2000).

Virus-specific CD8 T cells from healthy patients chronically infected with other persistent viruses, including EBV and cytomegalovirus, express very low levels of perforin and are impaired for cytotoxicity against autologous cells incubated with viral peptides (Zhang *et al*, 2003). In contrast, cell lines expressing higher levels of perforin are cytotoxic for target cells pulsed with these peptides. Furthermore, the levels of perforin in CD8⁺ T cells from lymphoid tissue of HIV-infected persons early in their infection are significantly higher than during the chronic phase of infection (Andersson *et al*, 1999). Taken together these results suggest that perforin is important for controlling the early phase of these infections, but once a chronic infection is established, the numbers of perforin positive virus-specific T cells, and their level of perforin expression, declines and limits the chance of eradicating the virus.

Perforin is important for cytotoxicity of EBV-specific CD8⁺ T cells in patients with EBV lymphoproliferative disease (Yoshimi *et al*, 2002). Cytotoxic T cell activity from a patient with EBV-lymphoproliferative disease was blocked with concanamycin A, which inhibits perforin, but not Fas-mediated killing (Yoshimi *et al*, 2002). The perforin pathway is the major mechanism used by CD4⁺ T cells to lyse EBV-infected B cells (Sun *et al*, 1999; Khanolkar *et al*, 2001).

Familial haemophagocytic lymphohistiocytosis: a disease caused by perforin deficiency

Clinical features

Familial haemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL) is an autosomal recessive trait in which infants and young children who are usually healthy at birth, present with dysregulated cellular immune responses. Most patients present with symptoms during the first year of life (Arico *et al*, 1996), but some present as late as the third decade of life (Clementi *et al*, 2002). Signs and symptoms include fever, splenomegaly, hepatomegaly, anaemia, thrombocytopenia, neutropenia, hypertriglyceridaemia, hypofibrinogenaemia, and cerebrospinal fluid pleocytosis in over 50% of patients (Henter *et al*, 1998). Lymphadenopathy, rash, neurological abnormalities, leucopenia, elevated liver function tests, elevated ferritin, and hyponatraemia may also be present. Neurological abnormalities range from irritability and hypotonia to seizures, cranial nerve deficits and ataxia. The inciting event is thought to be initiated by infection. Bone marrow biopsy late in the disease usually shows hypoplasia or aplasia. Patients who are not treated, or who do not respond to therapy, usually die within a few months of the onset of symptoms. Most deaths are the result of infection, disseminated intravascular coagulopathy with uncontrolled bleeding, or central nervous system disease.

Haemophagocytosis is a prominent feature of the disease. Haemophagocytosis occurs when activated macrophages (histiocytes) ingest erythrocytes and sometimes platelets and leucocytes (Fig 3). The bone marrow is the most common site of haemophagocytosis, although the spleen, liver and

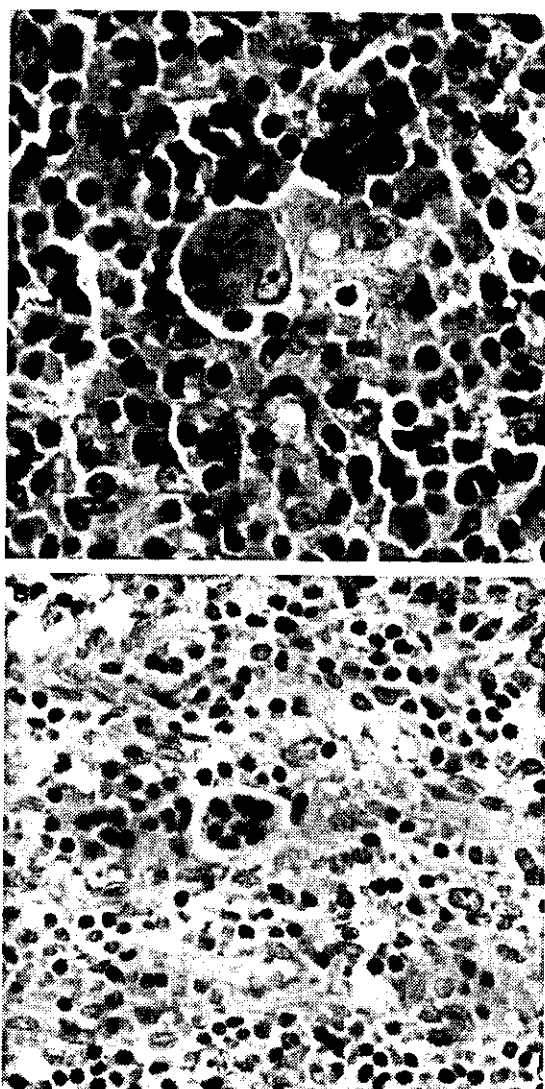


Fig 3. Histiocytosis with erythrophagocytosis (A) and phagocytosis of leucocytes (B) in the spleen of a patient with perforin mutations. Original magnification $\times 400$. Photomicrograph courtesy of Dr Elaine Jaff.

lymph nodes are also frequently affected. In the early stage of the disease, histiocytes are present in focal areas of the bone marrow; in later stages of the disease they are distributed diffusely throughout the bone marrow. When haemophagocytosis is prominent in the bone marrow, there are decreased numbers of normal precursors, which is associated with pancytopenia. In the lymph nodes, histiocytes are increased in the sinuses and T-cell areas, and lymphocyte depletion is often observed. In the spleen, histiocytes are distributed diffusely and erythrophagocytosis is frequently present.

NK cell and CTL cytotoxicity are severely impaired. Uncontrolled immune responses result in infiltration and

destruction of tissues by activated macrophages ($CD68^+$), $CD8^+$ T cells (MHC class I positive). Activated macrophages and T cells are often present in the bone marrow, spleen, lymph nodes, liver and central nervous system; other organs including the lungs, heart, intestine, thymus, kidney and pancreas may also be infiltrated with these cells. Uncontrolled activated macrophages and T cells release pro-inflammatory cytokines, which result in elevated serum levels of $IFN-\gamma$, $TNF-\alpha$, IL-1 receptor antagonist, soluble IL-2 receptor, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, IP-10, monokine induced by $IFN-\gamma$ (MIG) and M-CSF (Komp *et al*, 1989; Henter *et al*, 1991a; Akashi *et al*, 1994; Osugi *et al*, 1997; Takada *et al*, 1999, 2003). High levels of these T-helper type 1 and type 2 cytokines contribute to haemophagocytosis, cellular infiltration and organ damage. Lipoprotein lipase deficiency is associated with elevated serum triglycerides (Henter *et al*, 1991b). The level of spontaneously activated caspases in IL-2-stimulated lymphocytes from patients with FHL is reduced, which may contribute to the large numbers of activated T cells (Fadeel *et al*, 1999).

The diagnosis of FHL generally requires (i) a positive family history of the disease, (ii) fever, (iii) splenomegaly, (iv) cytopenia (affecting two of three cell lineages), (v) hypertriglyceridaemia and/or hypofibrinogenaemia, and (vi) haemophagocytosis in the spleen, bone marrow, or lymph nodes without underlying malignancy (Henter *et al*, 1991c). Some cases may not fit all the criteria.

The differential diagnosis of FHL includes both inherited and acquired disorders. Haemophagocytic syndrome is associated with certain infections, malignancies (including T and B-cell lymphomas, acute non-lymphocytic leukaemia and multiple myeloma), and rheumatic disease (including systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis) (Reiner & Spivak, 1988; Janka *et al*, 1998).

Infection-associated haemophagocytic syndrome has been most frequently associated with EBV. EBV-encoded RNA and DNA are present in the infiltrating T or, less commonly, in NK cells (Kawaguchi *et al*, 1993; Imashuku, 2002). Most cases occur in otherwise immunocompetent children and adolescents. Patients with EBV-associated haemophagocytic syndrome have increased numbers of $CD8^+$ T cells expressing perforin (Kogawa *et al*, 2002). Perforin is detectable and perforin mutations are absent in patients with EBV-associated haemophagocytic syndrome (Ma *et al*, 2001; Ueda *et al*, 2003).

Haemophagocytic syndrome is also seen in patients with EBV-associated peripheral T or nasal T/NK cell lymphoma, EBV-associated NK cell leukaemia, and chronic active EBV disease (CAEBV). CAEBV infection is a rare disease in the US, but relatively common in Asian countries. Patients present with prolonged fever, lymphadenopathy, hepatosplenomegaly with liver dysfunction, and occasionally with haemophagocytic syndrome (Schooley *et al*, 1986; Straus, 1988; Kimura *et al*, 2001). Patients may have lymphadenitis, meningoencephalitis, pneumonitis, uveitis or persistent hepatitis. Biopsies show EBV

DNA, RNA or proteins in the affected tissues. Patients with CAEBV often develop progressive cellular and humoral immunodeficiency with pancytopenia and hypogammaglobulinaemia that renders them susceptible to opportunistic infections or B or T-cell lymphoproliferative disease (Okano, 2002). One patient with CAEBV was found to have mutations in both alleles of the perforin gene resulting in an inability to express the mature (60 kDa) form of the protein (Katano *et al*, 2004). The amount of the native form of perforin in the patient's peripheral blood mononuclear cells was extremely low and these cells were impaired for Fas-independent cytotoxicity. The patient had no family history of FHL, and he developed T-cell lymphoproliferative disease with haemophagocytic lymphohistiocytosis and died at 18 years of age, 10 years after the onset of CAEBV.

Infection with other viruses including cytomegalovirus, human herpesvirus 6, parvovirus, adenovirus and HIV has also been associated with haemophagocytic syndrome (Reiner & Spivak, 1988; Hoang *et al*, 1998). Infection with bacteria (especially enteric Gram-negative rods and brucella), fungi (including histoplasma and candida), and protozoa (e.g. leishmania) have also been reported to be associated with haemophagocytic syndrome.

At least three genetic diseases other than FHL have been associated with haemophagocytic syndrome. Patients with X-linked lymphoproliferative disease have mutations in SLAM (signalling lymphocytic activation molecule)-associated protein (SAP, also referred to as SH2D1A and DSHP) (Coffey *et al*, 1998; Nichols *et al*, 1998; Sayos *et al*, 1998). SAP is important for the down-regulation of IFN- γ production by T cells (Latour *et al*, 2001) and for NK cell cytotoxicity (Nakajima *et al*, 2000). When patients with the X-linked lymphoproliferative disease are infected with EBV they usually develop fulminant infectious mononucleosis with haemophagocytosis. A patient with X-linked lymphoproliferative disease was reported to have increased numbers of CD8⁺ T cells expressing perforin (Kogawa *et al*, 2002). SAP-deficient mice show no overt phenotype and have normal lymphocyte development, however, infection with LCMV or *T. gondii* results in increased numbers of IFN- γ -producing T cells (Czar *et al*, 2001; Wu *et al*, 2001). SAP-deficient mice also have impaired long-term humoral immunity (Crotty *et al*, 2003).

Patients with Chediak-Higashi disease have mutations in *CHS1* and have large intracellular granules in their CTLs, NK cells, neutrophils and other lysosome-containing cells (Barbosa *et al*, 1996; Nagle *et al*, 1996). These patients have partial albinism and are predisposed to bacterial infections. Their cells have impaired chemotaxis, impaired phagocytosis, and their NK cells and neutrophils show reduced cytotoxicity. Some patients develop fatal haemophagocytic syndrome. A patient with Chediak-Higashi disease was reported to have normal levels of perforin in his NK cells (Kogawa *et al*, 2002). Human *CHS1*, known as the lysosomal trafficking regulator (*LYST*) is important for the packaging and sorting of lysosomal proteins, including perforin and granzymes, in the cell (Baetz *et al*, 1995;

Barbosa *et al*, 1996; Nagle *et al*, 1996). Beige mice with a mutation on the beige (*Lyst*) gene, which corresponds to the *CHS1/LYST* gene in humans, have severe immunodeficiency and reduced function of T cells and NK cells because of impairment of granule exocytosis (Biron *et al*, 1987).

Patients with Griscelli syndrome type II have mutations in *Rab27a* and may also present with haemophagocytosis (Menasche *et al*, 2000). *Rab27a* regulates the trafficking of vesicles, and mutations in the protein impair granule exocytosis and cause disease in mice (Haddad *et al*, 2001). These patients have partial albinism, large clumps of pigment in their hair shafts, and frequent bacterial infections associated with neutropenia. Ashen mice with mutations in *Rab27a* are considered an animal model for Griscelli syndrome. *Rab27a* plays an important role in transporting melanosomes, and ashen mice have a light coat colour because of an abnormal perinuclear distribution of pigment granules in melanosomes (Wilson *et al*, 2000). T cells in ashen mice have a defect in granule exocytosis, resulting in impairment of the perforin pathway (Haddad *et al*, 2001).

Treatment of FHL (reviewed in Janka & Schneider, 2004) includes an inductive regimen of etoposide and corticosteroids followed by ciclosporin maintenance therapy with alternating pulses of etoposide and corticosteroids until stem transplantation can be performed. A new protocol is being tested in which ciclosporin will be given as part of the initial therapy. Stem cell transplantation is the only curative treatment for patients with FHL at present.

Genetics

Linkage analysis studies showed that FHL is linked to three loci: 9q21-22 [FHL1 (Ohadi *et al*, 1999)], 10q21 (FHL2), and at least a third unidentified locus. Estimates suggest that 20–40% of cases are linked to chromosome 10, 10% to chromosome 9, while most cases are to other mutations (Goransdotter Ericson *et al*, 2001). While the gene responsible for FHL1 is unknown, perforin mutations are responsible for FHL2 (Stapp *et al*, 1999), and Munc 13-4 mutations result in FHL3 (Feldmann *et al*, 2003). Munc 13-4 is located on chromosome 17q25 and is important for fusion of the granule membrane with the cell membrane. Patients with Munc 13-4 mutations present with typical symptoms of FHL and their cells have defective CTL activity.

Stapp *et al* (1999) first showed that the perforin gene, located in 10q21, is responsible for FHL in several patients. These patients have homozygous mutations in both alleles, or heterozygous mutations in different alleles of perforin that result in expression of very little or no perforin in their cytotoxic cells and impaired cytotoxicity in a Fas-independent killing assay. In contrast, levels of granzyme B, another protein in cytotoxic cells, are normal.

Parents of patients with perforin mutations, who are asymptomatic carriers and heterozygous for the mutation, have reduced levels of perforin in NK, CD8⁺, or CD56⁺ T cells

Table I. Mutations reported in the perforin gene in patients with familial haemophagocytic lymphohistiocytosis.

Mutation		
Nucleotide	Amino acid	Reference
A1G	M1V	Ueda <i>et al</i> (2003)
G3A	M1I	Feldmann <i>et al</i> (2002); Molleran Lee <i>et al</i> (2004)
T50del	L17frameshift	Stepp <i>et al</i> (1999); Clementi <i>et al</i> (2001); Feldmann <i>et al</i> (2002); Kogawa <i>et al</i> (2002); Molleran Lee <i>et al</i> (2004)
C116A	P39H	Kogawa <i>et al</i> (2002); Molleran Lee <i>et al</i> (2004)
G133A	G45R	Kogawa <i>et al</i> (2002); Molleran Lee <i>et al</i> (2004)
G134A	G45E	Molleran Lee <i>et al</i> (2004)
G148A	V50M	Goransdotter Ericson <i>et al</i> (2001); Molleran Lee <i>et al</i> (2004)
C160T	R54C	Kogawa <i>et al</i> (2002); Molleran Lee <i>et al</i> (2004)
C190T	Q64stop	Stepp <i>et al</i> (1999); Feldmann <i>et al</i> (2002)
C207del	P69frameshift	Suga <i>et al</i> (2002); Ueda <i>et al</i> (2003)
G208T	D70Y	Molleran Lee <i>et al</i> (2004)
T217C	C73R	Molleran Lee <i>et al</i> (2004)
C272T†	A91V	Clementi <i>et al</i> (2002); Busiello <i>et al</i> (2004)
T283C	W94R	Clementi <i>et al</i> (2001)
G445A	G149S	Kogawa <i>et al</i> (2002); Molleran Lee <i>et al</i> (2004)
C449A	S150stop	Molleran Lee <i>et al</i> (2004)
T469G	F157V	Molleran Lee <i>et al</i> (2004)
T548G	V183G	Stepp <i>et al</i> (1999); Feldmann <i>et al</i> (2002)
T577C*	F193L	Katano <i>et al</i> (2004)
C657A	Y219stop	Clementi <i>et al</i> (2001); Goransdotter Ericson <i>et al</i> (2001)
G658A	G220S	Clementi <i>et al</i> (2001); Feldmann <i>et al</i> (2002)
C662T	T221I	Clementi <i>et al</i> (2001)
A665G	H222R	Molleran Lee <i>et al</i> (2004)
C666A	H222Q	Molleran Lee <i>et al</i> (2004)
T671A	I224D	Goransdotter Ericson <i>et al</i> (2001)
C673T	R225W	Stepp <i>et al</i> (1999); Clementi <i>et al</i> (2001); Feldmann <i>et al</i> (2002); Molleran Lee <i>et al</i> (2004)
C694T	R232C	Clementi <i>et al</i> (2001)
G695A	R232H	Feldmann <i>et al</i> (2002); Busiello <i>et al</i> (2004)
A755G†	N252S	Stepp <i>et al</i> (1999); Feldmann <i>et al</i> (2002)
G781A	E261K	Feldmann <i>et al</i> (2002)
G836A	C279Y	Stepp <i>et al</i> (1999); Feldmann <i>et al</i> (2002)
AAG853-855del	K285del	Goransdotter Ericson <i>et al</i> (2001)
C895T	R299C	Molleran Lee <i>et al</i> (2004)
A938T	D313V	Molleran Lee <i>et al</i> (2004)
G949A	G317R	Ueda <i>et al</i> (2003)
C1034T	P345L	Stepp <i>et al</i> (1999); Feldmann <i>et al</i> (2002)
A1081T	R361W	Molleran Lee <i>et al</i> (2004)
G1083del	R361frameshift	Suga <i>et al</i> (2002); Ueda <i>et al</i> (2003)
CT1090-1091del	L364frameshift	Suga <i>et al</i> (2002); Ueda <i>et al</i> (2003)
G1122A	W374stop	Stepp <i>et al</i> (1999); Clementi <i>et al</i> (2001, 2002); Goransdotter Ericson <i>et al</i> (2001); Feldmann <i>et al</i> (2002); Suga <i>et al</i> (2002); Ueda <i>et al</i> (2003)
1182Tinsert	G394frameshift	Clementi <i>et al</i> (2001)
G1229C*	R410P	Katano <i>et al</i> (2004)
C1246T	Q416stop	Ueda <i>et al</i> (2003)
G1286A	G429E	Stepp <i>et al</i> (1999); Feldmann <i>et al</i> (2002)
A1442C	Q481P	Molleran Lee <i>et al</i> (2004)
T1491A	C497stop	Suga <i>et al</i> (2002); Ueda <i>et al</i> (2003)
I628Tinsert	L542frameshift	Molleran Lee <i>et al</i> (2004)
C1636 del	E545frameshift	Molleran Lee <i>et al</i> (2004)

*This patient (with mutations at nucleotides 577 and 1229) had chronic active EBV with many of the features of FHL, but no family history.

†Changes at these nucleotides have been reported to be polymorphisms rather than mutations (Molleran Lee *et al*, 2004). See text for details.