

リンパ球分画の30%から70%がEBV特異的 tetramer 陽性細胞となった。一卵性双生児の兄弟のDC誘導でも、HIV感染の有無にかかわらずHLA-DR, CD80, CD83, CD86, CCR7の発現の程度が類似していた。

柱2：現状の治療薬に対する耐性ウイルスの克服

AVCは多剤耐性株を含むR5-HIV-1を試験管内および動物モデルでも強力な抗ウイルス活性を発揮した。AVCは多くの薬剤との強い相乗効果を認めCCR5阻害剤が多剤併用療法で有効な効果を示す事が示された。AVCの構造学的解析から、AVCはCCR5の細胞外ドメインと上部膜貫通ドメインで形成される疎水性ポケットに結合していた。このポケットがケモカイン作用およびHIV感染に与える影響に関する検討の結果、ポケットの一部(第4-5膜貫通ドメイン近傍)にHIV感染に重要でありながらケモカイン作用へはほとんど影響しない領域があることを明らかにした。これにより低分子化合物をデザインすることでケモカインレセプターの生理的作用を阻害しない抗HIV薬のモデリングが可能である事示した。

CCR5の発現とその制御機序の解析では、①AFPはCCR5の発現を減少させHIV感染を抑制した。②乳清成分のうちsialyl lactoseとlactoperoxidaseは感染初期過程でHIV感染を抑制したが、CCR5の発現への直接的影響はなかった。③急性ストレスに関わるcatecholaminesはHIV感染を抑制したが、CCR5の発現への影響はなかった。CCR5 ligandsがHIV感染に与える影響の解析では、RANTES+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り、系統樹解析では抗CD3抗体単独の刺激で出現するウイルスと少し異なるquasispeciesに属することが示唆された。

柱3：免疫賦活を応用した現状の治療の進展

STIによる免疫賦活療法では、一定期間CTLを誘導の後CTLは低下した。これは、CTLからのescape mutantであることが証明された。CTLもepitopeの数が少ないと薬剤同様耐性化することがわかった。IL-2療法による集中的な免疫賦活によりCD4の持続的な上昇を認めた。

In vitroで強いHIV-1増殖抑制を示した2つのPol特異的CTLが無治療血友病患者でどの程度誘導されているか調べるために、このテトラマーを用いて、患者末梢血でのそれぞれに特異的なCD8T細胞の検出をおこなった。その結果、3人のLTNPでは、2つのPolに対する特異的CD8T細胞が検出できた。しかし、4人の発症遅延者では、ウイルス量が最も低い一人は、Pol283とPol743に対して特異的CD8T細胞が検出できたが、他の3人はPol743に対しては検出がまったくできなかった。以上のことから、この2つのPol特異的CD8T細胞が、患者体内でHIV-1の増殖抑制に強く関与していると考えられた。

KD-247による逃避ウイルス誘導の結果、抗体濃度を600 μ g/ml(6-passage)まで上げたところで、JR-FL株のgp120-V3のtip部位のGPGRがGPERに変異したウイルスが認められ、1mg/ml(8-passage)まで抗体濃度を上げると、8割以上のウイルスがGPGRからGPERに置き換わっていた。8-passageの上清中のウイルスを用いて、KD-247に対する感受性をMTT assayで測定すると、野生株のJR-FLのIC₅₀が6.3 μ g/mlであったのが、8-passageウイルスは、>100 μ g/mlであり、耐性となっていた。

4. 考察

本研究班は、3つの柱ではあるが、実質的には免疫賦活療法と新薬開発にまとめられる。この3年間で、免疫賦活療法では、1) HIV患者であってもDCワクチンによりCTLを誘導できること、2) DCの活性は、一定期間維持できること、

3) LTNPの解析より有効なエピトープが発見できたこと、4) エピトープが少ないと、CTLでも中和抗体でもescape mutantが出現し耐性となること、などがわかった。これらこのことを組み合わせると、今回の結果は、今後HIVそのものに対する免疫賦活療法への布石となったといってもよい。今後より強力なCTLエピトープを複数発見することにより、より有効な免疫賦活療法を実施したい。

一方、新薬開発では、CCR5阻害薬の開発の過程で、繊細な構造解析を行うことができた。今回開発したAVC自体は、臨床試験の過程で副作用により開発中止となったが、この班で行った構造解析により、今後のこのクラスの薬剤モデリングを行う上で、生体への影響の少ない新規薬剤の計画的デザインの可能性を示唆するものである。

5. 自己評価

1) 達成度について：

免疫賦活療法を目的とする研究では、DCワクチンの方法論の確立と、LTNPにおいてHIV-1の増殖抑制に関与するCTLを同定することができ、目標を達成できた。CCR5阻害薬の研究では、上記の通り非常に詳細なCCR5の構造学的モデリングと抗HIV特異的化合物の標的となり得る有望な部位(構造)の同定に成功しており目的の達成度は極めて高いと評価できる。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について：

HLA-B51を持った患者で、HIV-1の増殖抑制に関与しているCTLを明らかにしたことは、評価されている。AVCは米国での臨床試験(第2/3相試験)でAIDS患者に対し強力な抗HIV活性を示したが肝障害の為に現在臨床試験への新しい患者のenrollmentは中止されている。しかし、詳細な構造モデルから抗HIV作用に特化した化合物のデザインを図る系は今のところ世界的に見ても非常に独自性に富むものと思われる。

3) 今後の展望について：

本研究結果から、今後B51のPolのエピトープを用いた新たな治療法が期待できる。科学的データに基づいた新規化合物のデザインが有望な薬剤の開発に繋がる可能性はきわめて高いと期待できる。

6. 結論

免疫賦活に関する研究では、HIVそのものに対する免疫賦活療法の基礎となるデータが得られた。次のステップとしては是非実現したい。新薬開発では、構造学的データから、より特異的・選択的な薬剤のデザインを図るという最近の分子標的のアプローチに即した研究といえる。今後は既に構築された構造モデルを用いて抗HIV活性に特化した新規のケモカインレセプター(CCR5)阻害剤の開発を進める。CCR5の発現や機能を解析する事は、HIV感染の病態生理の理解を深めるだけでなく、これをターゲットとする治療の効果を高め、副反応を軽減するためにも不可欠である。

7. 知的所有権の出願・取得状況

- 1) 「乳清由来lactoperoxidaseおよびsialyl lactoseのHIV感染抑制効果」特許申請中。
- 2) 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
- 3) 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：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・研究開発センター臨床研究開発部 部長）

分担研究者：滝口 雅文（熊本大学エイズ学研究センター・ウイルス制御分野 教授）、松下 修三（熊本大学エイズ学研究センター・病態制御分野 教授）、森内 浩幸（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 教授）、満屋 裕明（熊本大学医学部免疫病態学内科学第二 教授）、江川 滉二（㈱メディネット 取締役）、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 情報室長）

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。本研究班は、これら課題克服を目的に以下の3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

EBウイルス (EBV) によるリンパ腫が、HIV患者の予後に重大な影響を及ぼす。そこで、EBV特異的CD8T細胞を誘導する免疫療法をおこない、患者体内でのEBV特異的CD8T細胞の誘導を解析し、その効果を検討した。

柱2：現状の治療薬に対する耐性ウイルスの克服

*in vitro/in vivo*で強力な活性を有するAK602/Aplaviroc (AVC) と一連の誘導体を用いてHIV感染を阻害する具体的なメカニズム、CCR5阻害剤・ケモカインとCCR5の相互作用などの基礎的研究を進め、ケモカインを介した各種の生理作用に影響を与えないCCR5阻害剤の開発を進めた。ケモカイン・レセプターをターゲットとした新たな治療法が有効かつ安全に行えるために、ケモカイン・レセプターの発現と制御、そしてそれを介するシグナルが及ぼす影響を理解する。

柱3：免疫賦活を応用した現状の治療の進展

免疫療法として行っている2つの臨床試験（急性期感染者に対するSTI療法、IL-2を用いた免疫賦活療法）の経過を観察した。さらに新たなHIV-1に対する免疫療法の基盤を確立するために、長期未発症者（LTNP）に高頻度に見られるHLA-B*5101が提示する4つのHIV-1特異的細胞傷害性T細胞（CTL）の誘導を、20年間以上無治療で経過した血友病患者で検討した。新規に開発した*in vitro*における中和抗体の耐性誘導システムを用いて、これまでCell Lineでは困難であったR5ウイルスの*in vitro*での中和抗体逃避ウイルスを比較的簡便に誘導し、*in vivo*での耐性ウイルスの予測を行った。

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

過去2年間で、実際の免疫細胞療法を1卵生双生児であった2例に行った。DCワクチンを行った2例目では、EBVに対するCTLが誘導でき1年以上維持できているが、このレベルと他のHIV患者のEBVに対するCTLのレベルを比較した。さらに、今回は、この技術のHIV免疫療法への進展をにらみ、DCワクチン療法の基礎検討をおこなった。HIV患者および非感染者のPBMCをIL-2(20 IU/ml)存在下、抗HIV薬(AZT, 3TC, NFV) 1 μMの存在/非存在下で培養し、形態、HIVの増殖の有無、細胞数を調べた。また新たにHIV患者2名と今まで対象とした一卵性双生児兄弟計4名の末梢血から抗HIV薬の存在下で誘導したmature DCをFACS解析により比較した。次にPBLとEBVのpeptide(A*2402 EBNA3B TYSAGIVQI)をパルスしたこのDCを用いて(5対1)、抗HIV薬とIL-2存在下でCTLを誘導し、MHC tetramer法とElispot法でpeptide特異的T細胞を解析した。一卵性双生児兄弟ではそれぞれ由来のDCとPBLを4通りに組み合わせてCTLを誘導した。

柱2：現状の治療薬に対する耐性ウイルスの克服

- 1) 抗HIV化合物の活性評価には試験管内での評価に加え、SCID-huマウスAIDSモデルを用いた評価系を用いた。
- 2) CCR5阻害剤の³Hラベル体作成および複数の変異CCR5発現細胞株を作成、更に¹²⁵Iラベル化されたケモカイン(RANTES, MIP-1α, MIP-1β)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。
- 3) ウシロドプシン結晶構造を基にCCR5の構造学的解析を行なった。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得てCCR5との結合様式の解析を進めた。
- 4) 宿主因子がCCR5の発現とHIVの感染性に及ぼす影響：健康成人またはHIV感染者のPBMCを①臍帯血由来のalpha-fetoprotein (AFP)、②乳清由来の諸成分、または③ストレス関連因子の添加・無添加で培養し、CCR5の発現を調べ(flow cytometry)、HIVの*in vitro*感染実験を行った。
- 5) CCR5 ligandsが潜伏したHIVの再活性化に及ぼす影響：HIV感染者のPBMC (CD8&CD14-depleted) 培養においてRANTES (CCR5 agonist)+少量の抗CD3抗体の刺激によるウイルス発現の有無を評価した。

柱3：免疫賦活を応用した現状の治療の進展

STI療法では、誘導されたCTLのエピトープのsequenceを行い、escape機序の解析を行った。LTNPにおける4つのHLA-B*5101拘束性CTLを検出するために、これらのエピトープを結合させたHLA-B*5101テトラマーを作製し、7名の血友病患者での特異的CD8T細胞の数をフローサイトメトリーで解析した。KD-247単クローン抗体存在下に、CCR5高発現T細胞株であるPM1/CCR5細胞を用い*in vitro* R5ウイルス(JR-FL)の逃避ウイルス誘導を行い、得られた逃避ウイルスの責任部位を導入したpseudotypeウイルスを作製した。

(倫理面への配慮)

本研究班の臨床試験は、「ヘルシンキ宣言」に基づいた厚生労働省の「臨床研究に係る倫理指針」に基づきプロトコルを作成し、国立国際医療センターの倫理委員会での承認「IL-2国際臨床試験(H11-J-95)、急性期患者に対するSTI臨床試験(H13-10)、エイズに伴う悪性リンパ腫に対するLAK療法(H15-162)」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(1卵生双生児)は、DC治療開始後、EBV特異的なCTLの誘導が確認されDC投与終了後現在まで10ヶ月このCTLが維持されている。このCTLのレベルは、HIV患者43例(非悪性リンパ腫)において末梢血PBMC10⁶個あたりのCTL130個であったのに対し、この例においては2160個であった。今後の免疫療法に向けて、HIV患者のPBMCを用いてmature DCを誘導した結果、4名とも抗HIV薬の存在下でもDC誘導が可能であった。また4名ともこのDC刺激でCTL誘導も可能で、リンパ球分画の30%から70%がEBV特異的tetramer陽性細胞となった。一卵性双生児の兄弟のDC誘導でも、HIV感染の有無にかかわらずHLA-DR, CD80, CD83, CD86, CCR7の発現の程度が類似していた。

柱2：現状の治療薬に対する耐性ウイルスの克服

AVCは多剤耐性株を含むR5-HIV-1を試験管内および動物モデルでも強力な抗ウイルス活性を発揮した。AVCは多くの薬剤との強い相乗効果を認めCCR5阻害剤が多剤併用療法で有効な効果を示す事が示された。AVCの構造学的解析から、AVCはCCR5の細胞外ドメインと上部膜貫通ドメインで形成される疎水性ポケットに結合していた。このポケットがケモカイン作用およびHIV感染に与える影響に関する検討の結果、ポケットの一部(第4-5膜貫通ドメイン近傍)にHIV感染に重要でありながらケモカイン作用へはほとんど影響しない領域があることを明らかにした。これにより低分子化合物をデザインすることでケモカインレセプターの生理的作用を阻害しない抗HIV薬のモデリングが可能である事示した。

CCR5の発現とその制御機序の解析では、①AFPはCCR5の発現を減少させHIV感染を抑制した。②乳清成分のうちsialyl lactoseとlactoperoxidaseは感染初期過程でHIV感染を抑制したが、CCR5の発現への直接的影響はなかった。③急性ストレスに関わるcatecholaminesはHIV感染を抑制したが、CCR5の発現への影響はなかった。CCR5 ligandsがHIV感染に与える影響の解析では、RANTES+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り、系統樹解析では抗CD3抗体単独の刺激で出現するウイルスと少し異なるquasispeciesに属することが示唆された。

柱3：免疫賦活を応用した現状の治療の進展

STIによる免疫賦活療法では、一定期間CTLを誘導の後CTLは低下した。これは、CTLからのescape mutantであることが証明された。CTLもepitopeの数が少ないと薬剤同様耐性化することがわかった。IL-2療法による集中的な免疫賦活によりCD4の持続的な上昇を認めた。

In vitroで強いHIV-1増殖抑制を示した2つのPol特異的CTLが無治療血友病患者でどの程度誘導されているか調べるために、このテトラマーを用いて、患者末梢血でのそれぞれに特異的なCD8T細胞の検出をおこなった。その結果、3人のLTNPでは、2つのPolに対する特異的CD8T細胞が検出できた。しかし、4人の発症遅延者では、ウイルス量が最も低い一人は、Pol283とPol743に対して特異的CD8T細胞が検出できたが、他の3人はPol743に対しては検出がまったくできなかった。以上のことから、この2つのPol特異的CD8T細胞が、患者体内でHIV-1の増殖抑制に強く関与していると考えられた。

KD-247による逃避ウイルス誘導の結果、抗体濃度を600 μ g/ml(6-passage)まで上げたところで、JR-FL株のgp120-V3のtip部位のGPGRがGPERに変異したウイルスが認められ、1mg/ml(8-passage)まで抗体濃度を上げると、8割以上のウイルスがGPGRからGPERに置き換わっていた。8-passageの上清中のウイルスを用いて、KD-247に対する感受性をMTT assayで測定すると、野生株のJR-FLのIC₅₀が6.3 μ g/mlであったのが、8-passageウイルスは、>100 μ g/mlであり、耐性となっていた。

4. 考察

本研究班は、3つの柱ではあるが、実質的には免疫賦活療法と新薬開発にまとめられる。免疫賦活療法では、1) HIV患者であってもDCワクチンによりCTLを誘導できること、2) DCの活性は、一定期間維持できること、3) LTNPの解析より有効なエピトープが発見できたこと、4) エピトープが少ないと、CTLでも中和抗体でもescape mutantが出現し耐性

となること、などがわかった。これらのことを組み合わせると、今回の結果は、今後HIVそのものに対する免疫賦活療法への布石となったといってもよい。今後より強力なCTLエピトープを複数発見することにより、より有効な免疫賦活療法を実施したい。

一方、新薬開発では、CCR5阻害薬の開発の過程で、繊細な構造解析を行うことができた。今回開発したAVC自体は、臨床試験の過程で副作用により開発中止となったが、この班で行った構造解析により、今後のこのクラスの薬剤モデリングを行う上で、生体への影響の少ない新規薬剤の計画的デザインの可能性を示唆するものである。

5. 自己評価

1) 達成度について：

免疫賦活療法を目的とする研究では、DCワクチンの方法論の確立と、LTNPにおいてHIV-1の増殖抑制に関与するCTLを同定することができ、目標を達成できた。CCR5阻害薬の研究では、上記の通り非常に詳細なCCR5の構造学的モデリングと抗HIV特異的化合物の標的となり得る有望な部位(構造)の同定に成功しており目的の達成度は極めて高いと評価できる。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について：

HLA-B51を持った患者で、HIV-1の増殖抑制に関与しているCTLを明らかにしたことは、評価されている。AVCは米国での臨床試験(第2/3相試験)でAIDS患者に対し強力な抗HIV活性を示したが肝障害の為に現在臨床試験への新しい患者のenrollmentは中止されている。しかし、詳細な構造モデルから抗HIV作用に特化した化合物のデザインを図る系は今のところ世界的に見ても非常に独自性に富むものと思われる。

3) 今後の展望について：

本研究成果から、今後B51のPolのエピトープを用いた新たな治療法が期待できる。科学的データに基づいた新規化合物のデザインが有望な薬剤の開発に繋がる可能性はきわめて高いと期待できる。

6. 結論

免疫賦活に関する研究では、HIVそのものに対する免疫賦活療法の基礎となるデータが得られた。次のステップとして是非実現したい。新薬開発では、構造学的データから、より特異的・選択的な薬剤のデザインを図るという最近の分子標的のアプローチに即した研究といえる。今後は既に構築された構造モデルを用いて抗HIV活性に特化した新規のケモカインレセプター(CCR5)阻害剤の開発を進める。CCR5の発現や機能を解析する事は、HIV感染の病態生理の理解を深めるだけではなく、これをターゲットとする治療の効果を高め、副反応を軽減するためにも不可欠である。

7. 知的所有権の出願・取得状況

- 1) 「乳清由来lactoperoxidaseおよびsialyl lactoseのHIV感染抑制効果」特許申請中。
- 2) 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
- 3) 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：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(東京大学医科学研究所 助教授)、竹内 勤(慶應義塾大学医学部 教授)、川上和義(東北大学医学部 教授)、河野 茂(長崎大学大学院 教授)、北村唯一(東京大学医学部 教授)、古西 満(奈良県立医科大学医学部 講師)

1.研究目的

強力な抗 HIV 療法(HAART)導入後においても日本では日和見感染症は増加傾向である。これは 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、高度の免疫不全状態から抗 HIV 療法を開始した場合に免疫再構築症候群と呼ばれる日和見感染症発症が高頻度に見られることなどの複合要因による。HIV 感染者の予後改善のためにはこれらの解決が必要であることから、研究班を組織し研究を行った。

2.研究方法

本研究では、現在の日和見感染症の様相の特徴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継続した。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 2002 年から 2004 年分についてそれぞれ翌年に行った。集計結果は 1995 年分から集積されているデータと合わせて、経時変化と、全期間を通じての傾向について解析を行った。(安岡)

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。(片野、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。

高度免疫不全状態で問題となる薬剤耐性カンジダの耐性機構及び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

疾患分布を主要な HIV 診療病院で調査して現状を明らかにするとともに、これらのデータを元に治療の手引きを作成した。また、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 発見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。米国 CDC ではじめて公開された HIV に見られる日和見感染症の治療ガイドラインを解析し、これを元に診療の手引きを作成した。また、特殊な診断技術として原虫感染症の診断技術向上のため規模を拡大した講習会を開催すると共に技術移転の方法について検討した。(竹内、安岡、源河、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。研究にあたっては「臨床研究に関する倫理指針」「疫学研究に関する倫理指針」に従い、必要なものについては該当施設の倫理委員会の承認を得た。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取り扱った。臨床研究では、倫理委員会での承認事項を遵守し、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。

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 31.1%、ii)サイトメガロウイルス感染症 14.6%、iii)カンジダ症(主に食道) 14.3%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。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帰は 17.6%(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

日本の主要 3 病院の病理部において悪性リンパ腫の動向を調査した。これまでは diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) がほとんどを占めていたが、最近では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。

悪性リンパ腫の治療成績は不良であり、初期の m-BACOD から CHOP、EPOCH へと変更し、さらに HAART を追加して行うように治療方針を変更してきている。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接着因子である 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。接着因子阻害として高脂血症治療薬である statin が有効である可能性も示唆された。

カポジ肉腫は ribosomal doxorubicin や早期の HAART 導入が有効であることが明らかとなった。また、LANA 抗体など病理診断の方法を確立し、診断技術を提供中である。

b) 進行性多巣性白質脳症 (PML)

PML 診断の方法として原因ウイルスである JC ウイルス検出の系を確立し、全国からの検査依頼に対応した。PML 発症機序の一つとして JC ウイルスの遺伝子変異があり、調節領域およびコード領域 (VP1 ループ) で変異が認められることを明らかにした。早期診断法として 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 JC ウイルス遺伝子検出を試みた。

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℃での発育性などが低下していた。

食道カンジダ症の難治化要因であるアゾール耐性カンジダの耐性化機序とその対策を検討した。エルゴステロール生成の酵素遺伝子 *ERG3* の欠損株を作成し、アゾール系抗真菌薬に対して高度耐性化することを報告した。*ERG3* 欠損により、① *in vivo* では組織侵襲性が低下して病原性が低下すること、② *in vitro* での耐性化がみられるが抗菌ペプチド等が治療に有効で、実際に高用量のフルコナゾールで治療可能であること、鉄の過剰でこの効果が消失することなどを明らかにした。

3) 免疫再構築症候群 (IRS) 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。

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、発生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。

IRS への対処について、日本の専門医の意見を集約し、治療の手引きを作成した。

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。これらの効果的な移転のため診断の手引き CD-ROM の作成し配布した。

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、個別の対処方針が必要なことが明らかとなった。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。現在、これらを臨床施設へフィードバックするための手引きなどを作成・改訂中である。

5. 自己評価

1) 達成度について

日和見感染症は個別の施設での経験数が限られ、施設横断的な検討が重要となってきている。本研究では主要研究施設や全国診療拠点病院の協力により、HAART 時代に問題となっている日和見合併症の実態や治療についてデータの集積及び新たな知見が得られ、ほぼ所定の目標を達成しつつあると考えている。現在これらをフィードバックするための手引きを作成・改訂中であり、研究の終了時点までには主な診療施設へ配布ができる予定である。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

欧米諸国とは異なる、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たと考えている。

3) 今後の展望について

本研究の疫学データ収集などは今後も継続する必要がある。また、治療指針についても継続したアップデートが望まれる。

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

特記事項なし。

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(東京大学医科学研究所 助教授)、竹内 勤(慶應義塾大学医学部 教授)、川上和義(東北大学医学部 教授)、河野 茂(長崎大学大学院 教授)、北村唯一(東京大学医学部 教授)、古西 満(奈良県立医科大学医学部 講師)

1.研究目的

強力な抗 HIV 療法(HAART)導入後においても日本では日和見感染症は増加傾向である。これは 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、高度の免疫不全状態から抗 HIV 療法を開始した場合に免疫再構築症候群と呼ばれる日和見感染症発症が高頻度に見られることなどの複合要因による。HIV 感染者の予後改善のためにはこれらの解決が必要であることから、研究班を組織した。平成 17 年度はこれまでの成果を発展させるとともに提言をまとめるべく研究を行った。

2.研究方法

1) 日和見感染症の動向と頻度の調査

1995 年分からの日和見感染症の動向調査を継続し、2004 年分について全国 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。集計結果は 1995 年分から集積されているデータと合わせて、経時変化と、全期間を通じての傾向について解析を行った。(安岡)

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

本年度は特に対処法が定まっていない悪性リンパ腫を中心に行った。これまでの ACC での化学療法の成果をまとめるとともに、移植併用療法についての検討を行った。また、日本に見られる悪性リンパ腫およびカポジ肉腫の特徴を解析し治療の方向性を検討した。さらに HIV のインテグレーションがリンパ腫の直接原因となった例についての解析を行った。(片野、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。本年度は、CpG-ODN のクリプトコックス症における感染防御効果とマンノプロテインに対する樹状細胞の応答性についてさらに詳細な解析を行った。また、クリプトコックスの病原因子について検討を継続した。

高度免疫不全状態で問題となる薬剤耐性カンジダのうち、エルゴステロール合成酵素 ERG3 の欠損株における耐性機序を検討した。(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。昨年までに行ったアンケート調査をさらに解析するとともに、これらのデータを元に治療の手引きを作成した。また、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 発見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。米国 CDC ではじめて公開された HIV に見られる日和見感染症の治療ガイドラインを解析し、これを元に診療の手引きを作成した。また、特殊な診断技術として原虫感染症の診断技術向上のため規模を拡大した講習会を開催すると共に技術移転の方法について検討した。(竹内、安岡、源河、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。研究にあたっては「臨床研究に関する倫理指針」「疫学研究に関する倫理指針」に従い、日和見感染症の全国疫学調査、PML の予見の臨床研究は該当施設の倫理委員会の承認を得た。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取り扱った。臨床研究では、倫理委員会での承認事項を遵守し、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。

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)ニューモシス肺炎 31.1%、ii)サイトメガロウイルス感染症 14.6%、iii)カンジダ症(主に食道) 14.3%の頻度が高かった。また、ニューモシス肺炎、悪性リンパ腫、カポジ肉腫の増加傾向が特徴的であった。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帰は 17.6%(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。(2004 年分はアンケートの回収を終え、現在解析中)

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

日本の主要 3 病院の病理部において悪性リンパ腫およびカポジ肉腫の動向を調査した。リンパ腫では従来

diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) がほとんどを占めていたが、最近はその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。カボジ肉腫では以前より早期例が増え、免疫組織学的検索では全例で KSHV が陽性であった。

今回、われわれは HIV インテグレーションが直接、リンパ腫の発症に関連したと考えられる症例を発見した。症例は 59 歳男性エイズ患者で、剖検時に採取した病変部 DNA を解析した結果、HIV が STAT3 遺伝子の 1st exon 上流にインテグレートしており、STAT3 の高発現により発症したリンパ腫と考えられた。

悪性リンパ腫の治療成績は不良であり、初期の m-BACOD から CHOP、EPOCH へと変更し、さらに HAART を追加して行うように治療方針を変更してきた。しかし成績は不良であり、現在造血幹細胞移植併用での治療を試みている。

b) 進行性多巣性白質脳症 (PML)

PML 診断の方法として原因ウイルスである JC ウイルス検出の系を確立し、全国からの検査依頼に対応した。PML 発症機序の一つとして JC ウイルスの遺伝子変異があり、調節領域およびコード領域 (VP1 ループ) で変異が認められることを明らかにした。早期診断法として 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 JC ウイルス遺伝子検出を試みた。

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-ODN 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-ODN を加えることによって生存率の改善が確認され、フルコナゾール治療効果を増強することも明らかとなった。また CpG-ODN はサイトカイン産生も増強することが確認された。

C. neoformans の病原因子欠損株の特徴を検討したところ、37℃での発育性などが低下していたが、これは気道感染での病原性低下と関連していた。

食道カンジダ症の難治化要因であるアゾール耐性カンジダの耐性化機序とその対策を検討した。エルゴステロール生成の酵素遺伝子 *ERG3* の欠損株を作成し、アゾール系抗真菌薬に対して高度耐性化することを報告した。*ERG3* 欠損により、① *in vivo* では組織侵襲性が低下して病原性が低下すること、② *in vitro* での耐性化がみられるが抗菌ペプチド等が治療に有効で、実際に高用量のフルコナゾールで治療可能であること、鉄の過剰でこの効果が消失することなどを明らかにした。

3) 免疫再構築症候群 (IRS) 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。

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、発生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。

IRS への対処について、日本の専門医の意見を集約し、治療の手引きを作成した。

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。これらの効果的な移転のため診断の手引き CD-ROM の作成し配布した。

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、個別の対処方針が必要と考えられた。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。現在、これらを臨床施設へフィードバックするための手引きなどを作成・改訂中である。

5. 自己評価

1) 達成度について

日和見感染症は個別の施設での経験数が限られ、施設横断的な検討が重要となってきている。本研究では主要研究施設や全国診療拠点病院の協力により、HAART 時代に問題となっている日和見合併症の実態や治療についてデータを集積することができ、これらを元に新たな知見が得られ、ほぼ所定の目標を達成しつつあると考えている。現在これらをフィードバックするための手引きを作成・改訂中であり、研究の終了時点までには主な診療施設へ配布ができる予定である。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

欧米諸国とは異なる、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、その他の検討によってデータを集積しており、国内では他で得られない貴重なデータが集積されたと考えている。

3) 今後の展望について

本研究の疫学データ収集などは今後も継続する必要がある。また、治療指針についても継続したアップデートが望まれる。

6. 結 論

HAART 時代の日和見合併症のについて、日本における動向、現在問題となっている免疫再構築症候群や、難治性疾患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

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。これによって、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。最近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関連死の多くが慢性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型肝炎に対するリバビリン併用（ペグ）インターフェロン(IFN)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

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なった。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 7 施設において HIV・HCV 重複感染症 322 例の肝疾患進展度の実態調査を行なった。その結果、HIV・HCV 重複感染例のうちの約 90%の症例で HCV 量が高値(≥ 100 KIU/ml)であることが判明した HCV 単独感染では 72%)。さらに、総ビリルビンが 2.0 mg/dl を越える進行肝硬変が 26 例、3.0 mg/dl を越える例で肝移植の対象となる症例が 10 例以上存在することも明らかになった。また、平均 8.5 年間の観察期間で、アルブミン値は平均 0.17 ± 0.52 g/dl 低下、ビリルビン値は平均 0.16 ± 0.7 mg/dl 上昇し、慢性肝炎（肝硬変）の進展を示したが、血小板数は平均 $2.6 \pm 6.4 \times 10^4 / \mu\text{l}$ 上昇していた。HCV 単独感染症の場合とは異なり、血小板数は慢性肝炎の進行の目安としては使用できないことが明ら

かになった。

また、非観血的な慢性肝炎進行度の指標として超音波にて肝の硬度を測定する Fibroscan®を用いてパイロットスタディーを行なった。血液凝固異常の合併が多く、肝生検が施行し難い例の多い HIV・HCV 重複感染症例における慢性肝炎進展度の推定に極めて有用と思われる。

- 2) HIV 感染症合併慢性 C 型肝炎に対して、リバピリン併用 PegIFN 療法を実施している。Sustained virological response が得られた例は、42 例中 15 例 (36%) であり、HCV 単独感染症の場合に比して治療効果は低い傾向がある。血小板値の低い例が多いため、部分脾塞栓(PSE)を施行後に PegIFN 治療を行なう試みも行なわれている。
- 3) HIV・HCV 重複感染時の診療ガイドライン 2005 年版を作成、出版した。Web 上もエイズ予防情報ネット <http://api-net.jfap.or.jp/>等で閲覧可能である。
- 4) HIV 感染例への B 型肝炎重複感染予防のため、HB 及び HA ワクチンの投与を施行中である。
- 5) 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。これまでに、班員の施設において HIV・HCV 重複感染症の 7 例で肝移植が施行された。また、班員以外の施設で 2 例の生体肝移植が施行された。
- 6) 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・HCV 重複感染例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ピリン併用 PegIFN 療法の治療成績は 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。投与時のウイルス動態は HCV 単独例と大差が無いとされ、より長期間の投与が必要と思われる。リバピリン併用 48 週間治療後に更に PegIFN のみの追加投与を 48 週間行なうスケジュールで治療を開始している。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。

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。これまでに 7 例に移植が施行された。うち 3 例では、残念ながら不幸な転帰をとった。CD4 リンパ球数が移植適応の目安であると考えられるが、「手術直前の CD4 数の減少速度」を考慮に入れる必要がある。

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たと考える。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、より長期にわたる治療期間が必要であると考えられる。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 感染症に合併する肝疾患に関する研究（H17 単年度報告用）

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。これによって、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。最近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関連死の多くが慢性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型肝炎に対するリバビリン併用（ペグ）インターフェロン(IFN)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

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の全国拠点病院アンケート調査を受けて、エイズ拠点病院である当班員の7施設において HIV・HCV 重複感染症 322 例の肝疾患進展度の実態調査を行なった。その結果、HIV・HCV 重複感染例のうちの約 90%の症例で HCV 量が高値(≥ 100 KIU/ml)であることが判明した(HCV 単独感染では 72%)。さらに、総ビリルビンが 2.0 mg/dl を越える進行肝硬変が 26 例、3.0 mg/dl を越える例で肝移植の対象となる症例が 10 例以上存在することも明らかになった。また、平均 8.5 年間の観察期間で、アルブミン値は平均 0.17 ± 0.52 g/dl 低下、ビリルビン値は平均 0.16 ± 0.7 mg/dl 上昇し、慢性肝炎（肝硬変）の進展を示したが、血小板数は平均 $2.6 \pm 6.4 \times 10^4 / \mu\text{l}$ 上昇していた。HCV 単独感染症の場合とは異なり、血小板数は慢性肝炎の進行の目安としては使用できないことが明らかになった。

また、非観血的な慢性肝炎進行度の指標として超音波にて肝の硬度を測定する Fibroscan®を用いてパ

イロットスタディーを行なった。血液凝固異常の合併が多く、肝生検が施行し難い例の多い HIV・HCV 重複感染症例における慢性肝炎進展度の推定に極めて有用であり、その結果は英文原著として出版される予定である。

- 2) HIV 感染症合併慢性 C 型肝炎に対して、リバビリン併用 PegIFN 療法を続行している。Sustained virological response が得られた例は、42 例中 15 例 (36%) であり、HCV 単独感染症の場合に比して治療効果は低い傾向がある。血小板値の低い例が多いため、部分脾塞栓(PSE)を施行後に PegIFN 治療を行なう試みも行なわれている。
- 3) HIV・HCV 重複感染時の診療ガイドライン 2005 年版を作成、出版した。Web 上もエイズ予防情報ネット <http://api-net.jfap.or.jp/> 等で閲覧可能である。
- 4) HIV 感染例への B 型肝炎重複感染予防のため、HB 及び HA ワクチンの投与を施行中である。
- 5) 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。本年度は、班員の施設において HIV・HCV 重複感染症の 1 例で肝移植が施行された。また、班員以外の施設で 2 例の生体肝移植が施行された。
- 6) 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。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・HCV 重複感染例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 PegIFN 療法の治療成績は 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。投

与時のウイルス動態は HCV 単独例と大差が無いとされ、より長期間の投与が必要と思われる。リバビリン併用 48 週間治療後に更に PegIFN のみの追加投与を 48 週間行なうスケジュールで治療を開始している。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。

非観血的な慢性肝炎進行度の指標として Fibroscan® の使用は極めて有用であった。パイロットスタディーの結果を踏まえて、全国的に検討を拡大し、血液凝固異常の合併が多く、肝生検が施行し難い例の多い HIV・HCV 重複感染症例における慢性肝炎進展度の推定と治療方針の決定に役立てて行きたい。

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。CD4 リンパ球数が移植適応の目安であると考えられるが、「手術直前の CD4 数の減少速度」を考慮に入れる必要がある。

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たと考える。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きており、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、より長期にわたる治療期間が必要であると考えられる。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。

7. 知的所有権の出願・取得状況 なし

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 副院長)

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: 1) HIV 感染男性, 非感染女性夫婦において子供を持ちたいと願う夫婦が年々増加しているが通常の性行為による妊娠を試みた場合、二次感染の危険性が極めて大きい。そこでこのような夫婦に対しより安全な妊娠補助技術を応用することが重要であり、このための基礎的、臨床的研究を継続、発展させることを目的とした。2) HIV 陽性婦人における各種 STD の陽性率を検討した (H15 年度のみ実施した)。第 2 の研究: 1) いまだ HIV 感染症は世界中で急増傾向にあり、アジア諸国では爆発的に流行している。母子感染と性感染がその主な感染経路と考えられているがベトナムにおいては薬物注射使用も多い。またベトナムでの HIV は CRF01_AE が優位であり、数%が薬剤耐性を持っているとされている。しかしながら HIV の母子感染についてはほとんど調査されていない。そこで、母子感染を起した児についてサブタイプ特異的プライマーを用いた PCR によりサブタイプピングを行った。またシークエンスにより薬剤耐性について解析を行った。2) 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った。一方、日本では同性間の性的接触による HIV 感染は増加の一途をたどっている。厚生労働省 HIV 研究班の報告によると、同性間の性的接触の感染様式全体の中での比率は、平成 16 年の統計で 60.0%となっている。また同様に、平成 15 年は 55.6%、平成 14 年は 53.6%と、年々比率が増加していることが伺える。感染が起こるためには、主要レセプターである CD4、かつコレセプターと呼ばれる主要レセプターに付属するものの 2 つのレセプターが必要である。そして最近、いくつかの共役型 G プロテインレセプターが HIV のコレセプターとなることが発見され注目されている。そこで直腸感染の可能性を *in vitro* のレベルで検討するために、直腸癌細胞である CaCo-2 細胞に、CD4、およびコレセプターとして考えられている 18 種類の共役型 G プロテインレセプターの mRNA の発現の有無を調べた。第 3 の研究: 酸化チタン (TiO₂) による母乳中の HIV ウイルス破壊に関する検討を行った。また、母乳中の HIV は母乳に含まれる細胞内に存在 (感染細胞) するものと、細胞外に存在する (free-HIV) ものの二通りがある。我々は、① free-HIV は母乳中では感染能力を失う②母乳中の細胞が HIV 母子感染に主要な役割を果たすと考え、この感染細胞の除去により母子感染を防止可能であると仮説を立てた。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した。

2. 研究方法

第 1 の研究: 1) 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志を確認した。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。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。さらに

基礎的検討として HIV-1 サブタイプに依存しないで HIV 核酸を以前と同様の感度で検出できる新しいプライマー対の検討を行った。2) HIV 陽性婦人の各種 STD 陽性率の検討についてはアンケートによる調査および協力施設における検査を実施した。第 2 の研究: 1) 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。2) ベトナム・ホーチミン市内の小児病院において抗ウイルス剤を投与されていない HIV 陽性の母親から生まれた児で、HIV 抗体陽性の血液 29 サンプルから DNA を抽出し用いた。v3 領域及び pol 領域を PCR で増幅し、シークエンスを行った。v3 領域のシークエンスよりサブタイプ、pol 領域のシークエンスよりサブタイプおよび薬剤耐性を決定した。gp41 領域に設定したサブタイプ特異的プライマーを用いた PCR (J Med Virol. 2005;76:16-23) によりサブタイプを決定した。3) CaCo-2 から、RNA 抽出キット (RNeasy Mini Kit; QIAGEN) を用いて total RNA の抽出を行った。DNase 処理を行った後、RT-PCR により、目的とする遺伝子の増幅反応を行った。第 3 の研究: 1) 培養液中のウイルス破壊: HIV-1 IIIB (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 IIIB を種々の濃度 (w/v) の TiO₂ 粒子と培養液中で混合し UV 照射に誘導される活性化 TiO₂ のウイルス破壊作用を (1) と同様の評価方法で行った。2) 母乳中 free-HIV は感染能力を失うことを証明するための細胞感染実験; 母乳には細胞毒性があるため、最初に至適条件及び至適細胞を決定した。提供された母乳に HIV_{IIIB} を 100ng/ml p24antigen の濃度で混入し、M8166 細胞 (濃度; 5 × 10⁴/ml) と共に 5 分間 incubate した。洗浄後細胞を 3 日間 incubate し培養液上清中の p24antigen 量 (ウイルス量) を計測した。3) 母乳中の細胞が HIV 母子感染に主要な役割を果たすためには、母乳中での生存時間が必要であり、これを明らかにした。元々母乳中に含まれる細胞の経時的 viability の変化を FACS で確認した。(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、研究を遂行した。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。とくに HIV 感染男性, 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。また、日本産科婦人科学会に対し「ヒト精子・卵子・受精卵を取り扱う研究に関する登録申請」を行い、許可を得ている。

3. 研究結果

第 1 の研究: 1) HIV 感染男性・非感染女性夫婦に対する体外受精-胚移植については平成 17 年 10 月現在で、55 症例に対し本治療を実施している。このうち 23 例で妊娠が成立し、18 例が分娩するに至っている。これらの症例において妻および出生児に二次感染は認められていない。IVF-ET に比べより簡便な人工授精 (AIH) の実施に際しては二次感染の可能性を極力回避するため、洗浄精子について時間をおいて複数回の HIV の検査を行うこ

とが望ましい。この実施のための基礎的検討として、洗浄精子を孵置することによる精子の運動率、良好精子獲得率を検討した。その結果、常温(26°C)、37°Cにおける静置で10時間後でも運動率が60%以上に保たれることが観察された。HIV-1サブタイプに依存しないでHIV核酸を以前と同様の感度で検出できる新しいプライマー対の検討については、HIV-1サブタイプA、B、C、F、G、AEについて作成が可能であった。2)88名のHIV陽性婦人について各種STD検査の結果を解析し、クラミジアが61名中9名(14.8%)、HPVについては23名中14名(60.9%)に陽性であり、子宮頸部スメアテストについては76名中28.9%がIIIa以上であった。第2の研究: 1)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。2)28サンプルがv3領域のシークエンスよりCRF01_AEであると決定された。また、26サンプルはサブタイプ特異的プライマーを用いたPCRでも同じ結果を得た。1サンプルはHIVに関するPCRすべてにおいてネガティブであった。薬剤耐性については逆転写酵素阻害剤耐性、プロテアーゼ阻害剤耐性のmajor mutationは共に見つからなかった。3)18種類のGプロテインレセプターのうち、C5a receptor、CCR1、CCR7、CCR9、CXCR3、CXCR4、CXCR5、RDC1の8種類のmRNAがCaCo-2において発現されていることが確認された。また、その他のGプロテインレセプター、およびCD4のmRNAの発現は確認できなかった。第3の研究: 1)培養液中のウイルス破壊: HIV-1 IIIB (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/m²)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TiO₂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)母乳中に混入したHIV_{III}の感染性は、母乳との接触時間が長いほど低下した。3)元々母乳に含まれる細胞は経時的にviabilityは低下しない。

4. 考察

近年 HIV 感染男性、非感染女性夫婦で挙児を希望する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しうる事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。また、HIV-1 サブタイプに依存しないで HIV 核酸を以前と同様の感度で検出できる新しいプライマー対の開発により、サブタイプを問わない体外受精・胚移植の実施が可能となると考えられる。HIV 陽性婦人において各種 STD が高率に認められた。単年で研究は終了したが、今後の検討も重要であると判断された。第2の研究については以下のとおりである。1)すべての PCR でバンドが見られたかった1サンプルは

HIV 陰性であると思われる、母親の移行抗体によって ELISA 陽性となった可能性がある。2)今まで CaCo-2 において C5a receptor、CCR1、CCR7、CCR9、CXCR3、CXCR5、RDC1 の mRNA 発現は確認されていなかったが、今回の研究において初めて発現を確認した。これらのうち CCR9、CXCR4、RDC1 は先行研究から既に HIV のコレセプターとして機能することが確認されている。また、今回発現量を半定量的に調べたところ、RDC1 の発現量が高かったことから HIV のエントリーに働く可能性がある。一方、HIV の主要レセプターである CD4 の mRNA 発現は確認されなかった。従来の先行研究でも、CaCo-2 では CD4 の mRNA 発現は確認されていない。そのため、直腸感染では CD4 以外の未知の主要レセプターが関与する可能性がある。第3の研究については以下のとおりである。TiO₂による人工乳中のウイルス破壊を明らかにし、HIV 陽性母の母乳使用の可能性を指摘した。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。今回の結果より、母乳中に元々含まれる細胞を除去すれば、free-HIV は時間とともに感染能力を失い、そのような条件下でこどもに母乳を授与することにより母乳を介する HIV 母子感染を予防することが可能と考えた。

5. 自己評価

1) 達成度

第1の研究に関して体外受精・胚移植については初期の目的を達成したと考えているが、人工授精の臨床実施に至ることができなかった点が問題と考えている。第2および第3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。

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 母子感染あるいは性的接触による感染のメカニズムを解明し、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、母乳保育による HIV 母子感染リスクを回避・減少させることの可能性を指摘しており、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、HIV サブタイプのプライマーの開発など、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。第3の研究についてはヒトへの真の有用性の検証として、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、これを推進していく。

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

予定なし。

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 副院長)

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 : HIV 感染は漸増しているが、新しい抗 HIV 薬の開発により治療可能な慢性感染症となりつつある。そのような状況の中で、HIV 感染男性、非感染女性夫婦において子供を持ちたいと願う夫婦が年々増加しているが通常の性行為による妊娠を試みた場合、二次感染の危険性が極めて大きい。そこでこのような夫婦に対しより安全に、すなわち妻の二次感染の可能性を限り無く 0 に近付ける治療法が重要であり、このための基礎的、臨床的研究を継続、発展させることを目的としている。第 2 の研究 : 1) いまだ HIV 感染症は世界中で急増傾向にあり、アジア諸国では爆発的に流行している。母子感染と性感染がその主な感染経路と考えられているがベトナムにおいては薬物注射使用も多い。またベトナムでの HIV は CRF01_AE が優位であり、数%が薬剤耐性を持っているとされている。しかしながら HIV の母子感染についてはほとんど調査されていない。そこで、母子感染を起こした児についてサブタイプ特異的プライマーを用いた PCR によりサブタイピングを行った。またシークエンスにより薬剤耐性について解析を行った。2) 一方、日本では同性間の性的接触による HIV 感染は増加の一途をたどっている。厚生労働省 HIV 研究班の報告によると、同性間の性的接触の感染様式全体の中での比率は、平成 16 年の統計で 60.0%となっている。また同様に、平成 15 年は 55.6%、平成 14 年は 53.6%と、年々比率が増加していることが伺える。感染が起こるためには、主要レセプターである CD4、かつコレセプターと呼ばれる主要レセプターに付属するものの 2 つのレセプターが必要である。そして最近、いくつかの共役型 G プロテインレセプターが HIV のコレセプターとなることが発見され注目されている。そこで直腸感染の可能性を *in vitro* のレベルで検討するために、直腸癌細胞である CaCo-2 細胞に、CD4、およびコレセプターとして考えられている 18 種類の共役型 G プロテインレセプターの mRNA の発現の有無を調べた。第 3 の研究 : 母乳中の HIV は母乳に含まれる細胞内に存在 (感染細胞) するものと、細胞外に存在する (free-HIV) ものの二通りがある。我々は、① free-HIV は母乳中では感染能力を失う② 母乳中の細胞が HIV 母子感染に主要な役割を果たすと考え、この感染細胞の除去により母子感染を防止可能であるとの仮説を立てた。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した。

2. 研究方法

第 1 の研究 : 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志を確認した。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。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。さらに基礎的検討として HIV-1 サブタイプに依存しないで HIV 核酸を以前と同様の感度で検出できる新しいプライマー対の検討を行った。第 2 の研究 : 1) ベトナム・ホーチミン市内の小児病院において抗ウイルス剤を投与されていない HIV 陽性の母親から生まれた児で、HIV 抗体陽性の血液 29 サンプルから DNA を抽出し用いた。v3 領域及び pol 領域を PCR で増幅し、シークエンスを行った。v3 領域のシークエンスよりサブタイプ、pol 領域のシークエンスよりサブタイプおよび薬剤耐性を決定した。gp41 領域に設定したサブタイプ特異的プライマーを用いた PCR (J Med Virol. 2005;76:16-23) によりサブタイプを決定した。2) CaCo-2 から、RNA 抽出キット (RNeasy Mini Kit: QIAGEN) を用いて total RNA の抽出を行った。DNase 処理を行った後、RT-PCR により、目的とする遺伝子の増幅反応を行った。第 3 の研究 : 1) 母乳中 free-HIV は感染能力を失うことを証明するための細胞感染実験 ; 母乳には細胞毒性があるため、最初に至適条件及び至適細胞を決定した。提供された母乳に HIV_{BB} を 100ng/ml p24 antigen の濃度で混入し、M8166 細胞 (濃度 ; 5×10^4 /ml) と共に 5 分間 incubate した。洗浄後細胞を 3 日間 incubate し培養液上清中の p24 antigen 量 (ウイルス量) を計測した。2) 母乳中の細胞が HIV 母子感染に主要な役割を果たすためには、母乳中での生存時間が必要であり、これを明らかにした。元々母乳中に含まれる細胞の経時的 viability の変化を FACS で確認した。

(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、研究を遂行した。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。とくに HIV 感染男性、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。また、日本産科婦人科学会に対し「ヒト精子・卵子・受精卵を取り扱う研究に関する登録申請」を行い、許可を得ている。

3. 研究結果

第 1 の研究 : HIV 感染男性・非感染女性夫婦に対する体外受精-胚移植については平成 17 年 10 月現在で、55 症例に対し本治療を実施している。このうち 23 例で妊娠が成立し、18 例が分娩するに至っている。これらの症例において妻および出生児に二次感染は認められていない。IVF-ET に比べより簡便な人工授精(AIH)の実施に際しては二次感染の可能性を極力回避するため、洗浄

精子について時間をかけて複数回の HIV の検査を行うことが望ましい。この実施のための基礎的検討として、洗浄精子を孵置することによる精子の運動率、良好精子獲得率を検討した。その結果、常温 (26°C)、37°C における静置で 10 時間後でも運動率が 60% 以上に保たれることが観察された。HIV-1 サブタイプに依存しないで HIV 核酸を以前と同様の感度で検出できる新しいプライマー対の検討については、HIV-1 サブタイプ A(3 株)、B(8 株)、C(1 株)、F(2 株)、G(1 株)、及び AE(5 株)の計 20 株を感染させた培養 PBMC から精製した DNA の中の HIV-1 DNA 濃度を、リアルタイム PCR とポアソン分布法で測定した。両者の値は 1 µg DNA あたり 20_2,500,000 コピーの範囲でサブタイプによらず非常に良く一致していた。第 2 の研究:1)28 サンプルが v3 領域のシーケンスより CRF01_AE であると決定された。また、26 サンプルはサブタイプ特異的プライマーを用いた PCR でも同じ結果を得た。1 サンプルは HIV に関する PCR すべてにおいてネガティブであった。薬剤耐性については逆転写酵素阻害剤耐性、プロテアーゼ阻害剤耐性の major mutation は共に見つからなかった。2)18 種類の G プロテインレセプターのうち、C5a receptor、CCR1、CCR7、CCR9、CXCR3、CXCR4、CXCR5、RDC1 の 8 種類の mRNA が CaCo-2 において発現されていることが確認された。また、その他の G プロテインレセプター、および CD4 の mRNA の発現は確認できなかった。第 3 の研究:1) 母乳中に混入した HIV_{HB} の感染性は、母乳との接触時間が長いほど低下した。2) 元々母乳中に含まれる細胞は経時的に viability は低下しない。

4. 考察

近年 HIV 感染男性、非感染女性夫婦で挙児を希望する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しう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。また、HIV-1 サブタイプに依存しないで HIV 核酸を以前と同様の感度で検出できる新しいプライマー対の開発により、サブタイプを問わない体外受精・胚移植の実施が可能となると考えられる。第 2 の研究については以下のとおりである。1) すべての PCR でバンドが見られたかった 1 サンプルは HIV 陰性であると思われ、母親の移行抗体によって ELISA 陽性となった可能性がある。2) 今まで CaCo-2 において C5a receptor、CCR1、CCR7、CCR9、CXCR3、CXCR5、RDC1 の mRNA 発現は確認されていなかったが、今回の研究において初めて発現を確認した。これらのうち CCR9、CXCR4、RDC1 は先行研究から既に HIV のコレセプターとして機能することが確認されている。また、今回発現量を

半定量的に調べたところ、RDC1 の発現量が高かったことから HIV のエントリーに働く可能性がある。一方、HIV の主要レセプターである CD4 の mRNA 発現は確認されなかった。従来の先行研究でも、CaCo-2 では CD4 の mRNA 発現は確認されていない。そのため、直腸感染では CD4 以外の未知の主要レセプターが関与する可能性がある。第 3 の研究については以下のとおりである。先に、TiO₂ 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。今回の結果より、母乳中に元々含まれる細胞を除去すれば、free-HIV は時間とともに感染能力を失い、そのような条件下でこどもに母乳を授与することにより母乳を介する HIV 母子感染を予防することが可能と考えた。

5. 自己評価

1) 達成度

第 1 の研究に関して体外受精・胚移植については初期の目的を達成したと考えているが、人工授精の臨床実施に至ることができなかった点が問題と考えている。第 2 および第 3 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。

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 母子感染あるいは性的接触による感染のメカニズムを解明し、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、母乳保育による HIV 母子感染リスクを回避・減少させることの可能性を指摘しており、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、HIV サブタイプのプライマーの開発など、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。第 3 の研究についてはヒトへの真の有用性の検証として、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、これを推進していく。

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。

研究課題：開発途上国における薬剤耐性予防など ARV 治療の質的向上と推進に関わる研究

課題番号：H17-エイズ-003

主任研究者：若杉なおみ（早稲田大学大学院政治学研究科 教授）

分担研究者：石川信克（結核予防会結核研究所 副所長）、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臨床研究開発部長）、志村まり（国立国際医療センター研究所難治性疾患研究部 室長）

1) 研究目的

HAART (Highly Active Antiretroviral Therapy) が先進国の感染者に生存の延長、QOL の回復という目に見える効果を示して以降、エイズ発症者・死亡者が蓄積増加するアジア、アフリカなどの開発途上国においても感染者へのケア・治療が客観的必要性となってきた。日本政府が呼びかけた沖縄感染症対策イニシャチブなどを起点として、WHO は開発途上国におけるエイズ治療のためのガイドラインを作ると共に、2005 年までに世界で 300 万人の HIV 感染者を ARV 治療に入れようという「3 by 5」イニシャチブを開始した。しかし当然のことながら危惧される ARV (Antiretroviral) 治療による毒性、副作用、薬剤耐性の発現に対して、資源の乏しい開発途上国でそれを極力予防しながら ARV 治療を成功させる方法に関する研究が求められている。本研究は、開発途上国における ARV 治療の質的向上を目的として、1) ARV 治療による毒性の機序と実態、治療効果および薬剤耐性に関連するウイルス学的研究。や 2) 結核との重感染者、妊婦・小児など特殊対応を必要とするグループの ARV 治療に関連する課題の解明を行う。

2) 研究方法

全分担研究者が、アフリカのザンビア国現地の HIV 感染者における臨床的・疫学的研究 (①~③)、あるいは感染者の検体を用いたウイルス学的研究 (④、⑤) を実施するか、計画と準備開始を行なった。

① ARV 治療の第一選択薬である EFV (Efavirenz) 濃度を通常の 3 倍高くする代謝酵素の遺伝子変異の発見をもとに、アフリカのザンビアのエイズ患者におけるその遺伝子型変異の頻度と EFV 副作用発現の実態と関連を把握し、治療費軽減にもつながる EFV 投与量減量を射程においた研究 (岡)。

② HIV 陽性妊婦から胎児への子宮内母子感染における胎盤の炎症 (絨毛膜羊膜炎) の影響とその検出法、予防的治療の効果 (若杉)。

③ 結核・HIV 二重感染者の、ザンビア国ルサカの貧困地域におけるコミュニティボランティアによる結核 DOTS (直接監視下短期療法) + ARV 治療の試みにおける、抗結核薬耐性頻度とその影響 (石川・御手洗) をみる研究。

④ HIV 感染における白血球減少および染色体異常の責任分子の同定とその測定法

の確立と ARV 治療効果研究 (志村)。

⑤ 薬剤耐性、治療効果をみるためのザンビア感染者から分離した HIV-1 サブタイプ C の感染性クローンの研究 (山本)。

①と②は計画準備のための現地調査を行ったのち、ザンビア (および国内) の倫理委員会にプロトコルを承認され、現地での患者リクルートを開始した。③は現地予備調査を行い、計画を策定した。④⑤は国内における実験室研究を遂行した。

(倫理面への配慮)

ザンビア国および国内の倫理委員会の承認を受け、インフォームド Consent のもとに患者本人の同意を得た上で検体採取、質問表調査を行なっている。

3) 研究結果

① ザンビアの EFV 治療開始あるいは予定のエイズ患者で、CYP2B6*6/*6 の頻度をみる Small pilot study が開始され、その頻度が日本国内患者の 3% よりも明らかに高頻度であるという preliminary な感触を得た。また患者リクルートと EFV 治療の副作用 (めまい、不眠、精神症状など) に関する調査が進行中である。今後の EFV 減量治療の効果に関する大規模臨床研究の準備も行なわれた。

② ザンビアの HIV 陽性妊婦における、絨毛膜羊膜炎のマーカーである子宮頸部顆粒球エラスターゼおよび出生児の HIV 感染を PCR で測定することにより、胎盤の炎症が HIV の子宮内母子感染と最もよく関連することが明らかになり、抗生物質による予防的治療に活用できる可能性が示された。

③ 当該研究フィールドの結核患者の 95% が HIV 検査 (VCT) を受け入れ 80% に HIV の二重感染があることが判明した。同時に喀痰塗抹陰性・培養陽性が多く、コミュニティボランティアによる治療支援と結核迅速診断 (培養・感受性) が、結核・HIV 感染者の治療効果に与える影響をみる研究計画を策定した。

④ HIV-1 の Vpr は総リンパ球数と逆相関し染色体異常 (premature sister chromatid separation; PCS) の原因分子であることが明らかとなった。また Vpr に対するモノクローナル抗体が作成でき血漿中 Vpr の ELISA による測定がほぼ確立できた。今後ザンビア患者血清の測定を試みる。

⑤ 8名のザンビアエイズ患者から合計29の感染性クローンを得た。その系統樹解析から解析した9つのクローンは全長にわたりすべてピュアなアフリカ型サブタイプCであることが判明した。また感染実験の結果、R5HIV-1であることがわかった。

4) 考察

エイズ発症者・HIV感染率が世界でも最も高い南部アフリカ地域にあるザンビア国のエイズ患者のARV治療の現場で、感染者の治療に関連する本研究班の諸研究が着手され、preliminaryな興味ある成果が得られ始めている。

今後アフリカでも使用が膨大に増えるであろうEFVの副作用に関連するCYP2B6*6/*6の頻度がアフリカで高いことはそれだけで重要な結果であり、副作用と治療脱落をできるだけ防ぎ、薬剤耐性を減らし、さらに資金の乏しいアフリカでの投薬量の減量の可能性を示す端緒となる。

またHIV感染妊婦の胎盤炎症と母子感染の関連もARVよりも安価な抗生物質治療によるHIV母子感染の減少の可能性を示唆し、さらにARVによるHIV母子感染予防の効果を向上させることにつながる。

結核との二重感染者は増加の一途をたどりその治療は困難を極めているが、ザンビアで結核DOTSの方式で行なっている治療実践の基礎的データを明らかにし、より正確な結核診断、抗結核薬耐性保持者の確認、ARV治療への影響を研究することの意義は大きい。

HIV-1Vprによるリンパ球減少は、WHOが開発途上国におけるARV治療開始基準およびフォローマーカーとして、高価なCD4測定の代わりに総リンパ球数を提示していることの学術的基盤を提供する。また世界的なARV治療の拡大によるHIV感染者の延命に付随する悪性腫瘍高発の問題と関わる。

逆転写酵素阻害剤やプロテアーゼ阻害剤など、現行の薬剤に対する感受性がHIV-1のサブタイプにより異なるとの報告があり、ザンビアのエイズ患者からのHIV-1サブタイプCの感染性クローンの分離は薬剤耐性、ARV治療効果、新薬開発の研究に重要な基盤を提供する。

5) 自己評価

1) 達成度について

各分担研究者、研究協力者（御手洗、山本、平岡）の本年度の達成度は非常に高く、ザンビア現地在住のエイズ予防財団リサーチレジデント平岡亜矢医師の日常的な研究協力も得て、一般にアフリカ諸国では困難である現地フィールドでの研究体制セットアップと推進が順調に進んでいる。また日本国内におけるベンチ研究も開発途上国のエ

イズ状況にspecificでその克服に重要なテーマで行ない、次年度はザンビアの感染者の検体で研究する方向性が出てきた。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

EFVの血中濃度と副作用に深く関連している特定の遺伝子型の頻度が、感染者の多いアフリカにおいて初めて明らかになり、より耐性ウイルス出現を押さえ副作用の少ない治療法の開発に結びつくことが予想される（岡）。

HIV母子感染予防は周産期の予防処置は実施に移されているが、その後に残る妊娠中の子宮内感染についてリスク因子が明らかになり、これまで世界では試みられていないエラストアーゼによる予防的検出と対策を具体化できる可能性がある（若杉）。増加するHIV/結核二重感染者の臨床的実態を明らかにし、より正確な診断・治療を試みることにより、耐性HIVの出現を防止し開発途上国のエイズ治療の成功に寄与することができる（石川・御手洗）。VprとAIDS病態との関連の研究は総リンパ球数減少の原因を明らかにすると共に、今後ARV治療の拡大、HIV-1感染の長期化により、感染後期で高発すると予想される悪性腫瘍との関連についても解明が進む可能性がある（志村）。開発途上国に特に患者の多いサブタイプCの感染性クローンを世界に先駆けて分離した（山本）。

3) 今後の展望について

18年度は、ザンビア現地では岡によるEFV血中濃度や減量治療を含む大規模研究に進む予定である。また若杉は抗生物質による絨毛膜羊膜炎の治療のHIV母子感染減少効果を見る研究を計画する。石川は現地セットアップを進め、HIV/結核感染者のコミュニティDOTSによる治療効果と抗結核薬耐性との関連の研究を本格化する。志村は血漿中HIV-1VprのELISA測定、染色体異常分析をザンビア患者検体で試みる。

6) 結論

各分担研究者、研究協力者の本年度の研究目標は達成され、ザンビア現地における研究セットアップが完了あるいは着手され、予備調査や患者リクルートが開始され、18年度の継続によって世界に報告するに値すると考えられる研究成果が得られた。これらはすべて資源の乏しい開発途上国で開始されたエイズ治療の質的向上に貢献するものと考えられる。日本におけるベンチ研究もその成果をもとにザンビア検体への応用により、より開発途上国のエイズの実態に即した結果が期待される。

7) 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

特になし。

研究課題：血友病の治療とその合併症の克服に関する研究

課題番号：H15-エイズ-009

主任研究者：坂田 洋一（自治医科大学分子病態研究部 教授）

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

長谷川 護（ディナバック株式会社 代表取締役社長）、新井 盛夫（東京医科大学臨床検査医学講座 助教授）、

天野 景裕（東京医科大学臨床検査医学講座 助手）、小林 英司（自治医科大学臓器置換研究部 教授）、

北村 義浩（東京大学医科学研究所先端医療研究センター 助教授）

1. 研究目的

血友病はX染色体上に存在する血液凝固第VIII、(FVIII) 或いはIX因子(FIX) 遺伝子の異常に起因する先天性出血性疾患である。現在の治療は出血時に因子製剤を投与するcare 中心で、致命的な頭蓋内出血等の予防は不可能である。血中因子レベルを正常の数値に維持できれば不慮の出血を予防できることから患者に cure をもたらず遺伝子治療が大きな期待を寄せられている。成功すれば因子製剤使用量も減らすことが出来、経済的にも社会に資すること大である。本研究では、患者のQOLを高めるために、血友病の遺伝子治療の基礎的技術的検討と、遺伝子治療だけでなくcare 治療でも問題となるインヒビタ対策を目的に研究を展開した。

2. 研究方法

A. 遺伝子治療:効率を考慮するとウイルスベクターの使用が現実的である。ウイルスベクターとしては、染色体への組み込みが殆ど起こらず、非分裂細胞にも導入可能なアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターと、非分裂細胞に導入可能でサルやヒトに病原性の報告のないアフリカミドリザル由来レンチウイルスの一種であるSIVベクターを選択した。安全性を前提に、(I) 体内標的臓器に直接遺伝子導入を図る場合はAAVベクター、そして、(II) 体外で成熟肝細胞、或いは幹細胞に遺伝子を導入し、体内に再移植する場合にはSIVベクターを用いた。I. 種々の血清型のAAVの臓器特異性と切除可能な臓器を標的細胞として検討するとともに、体内直接投与の安全性の検証として、ベクターの体内分布を、ルシフェラーゼ遺伝子搭載 AAV を用いて経時的に *in vivo imaging* 装置により発現分布を検討した。AAVベクターには搭載遺伝子 5kb の制限があり、FVIII 遺伝子は最小で 4.5kb ある。技術的には困難であるがこの場合も臓器特異性を高めるために種々の promoter (PM) を検討した。サルの実験ではヒト FIX 及び発現 FIX の定量的同定を目的に一部をヒト型に改変したサル型 FIX 遺伝子を作製し検討した。II. 成熟肝細胞を単離し、細胞外マトリックスと機能的血管ネットワーク構築法により、腎皮膜下、及び皮下に移植する方法を検討した。また、実用化に向けて、albumin enhancer PM を持つウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベータを肝特異的に発現するトランスジェニックマウスと SCID マウスを交配して得られるマウス (uPA/SCID) の肝臓をマウス及びイヌの移植肝細胞の選択的増殖装置として利用を試みた。一方、血小板特異的に FVIII を発現させるための PM を検討し、血友病マウス由来幹細胞に体外で FVIII 遺伝子を SIV ベクターを利用して導入し、血友病マウスに再移植し、血小板への選択的発現とインヒビタ存在下、非存在下における止血効果などを検討した。SIV ベクターの安全性向上とエンベロプ改変による標的臓器特異性の検討、及び染色体組み込み部位の解析を linear amplification-mediated PCR (LAM-PCR) 法とヒトゲノムデータベースを利用して検討した。挿入部位に選択圧がかか

らない実験条件を選択した。

B. インヒビタ対策：生下時にヒト FVIII 因子を FVIIIKO マウスに投与して免疫寛容誘導しうる（我々の開発）方法の、メカニズムを解析した。さらに成熟マウスへの免疫寛容誘導可能性を超高解像度エコーガイド下に胸腺組織へヒト FVIII, 或いは新生児免疫寛容誘導したマウスの脾臓細胞を注入し検討した。

C. 臨床研究に向けて血友病患者のコンセンートを得て遺伝子解析を進めた。

（倫理面への配慮）

遺伝子治療については、非病原性改変ウイルスベクターを利用した遺伝子導入法の開発と応用を目指したものであり、周辺環境及び実験従事者の安全性に関して倫理的問題が生ずることはないと考えている。研究は遺伝子治療臨床研究に関する文部科学省・厚生労働省告示の倫理指針を遵守して施行する。動物実験は、各大学の動物実験指針規定に従い、独立行政法人・医薬基盤研究所 霊長類医学研究センターで実施するサルの実験では、センターと国立感染症研究所の方針を遵守して行う。臨床研究は、厚生省の倫理指針に従い被験者の人権に十分配慮するとともに、インフォームドコンセントをとる。特に遺伝子解析に関しては、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守する。

3. 研究結果

A. (I) マウスにおいては、AAV1 ベクターを用いて、筋肉、脂肪細胞、或いは血管内皮細胞へ、そして AAV8 ベクターで肝臓へ血友病遺伝子を導入し、年余にわたる発現維持が可能になった。経時的発現分布をルシフェラーゼ発現で観察すると、肝特異性の高いと言われる AAV-8 ベクターでも、多臓器分布が明らかとなった。そこで、PM を利用して臓器特異性を高める工夫を進めた。FVIII に関しては、 α Ianti-trypsin の PM の最短長を利用したところ肝臓特異的に発現が見られ 800%にも及ぶ FVIII の血中レベルが得られた。肝機能に異常は見られず、1年以上発現は持続している。血友病 B については、PAI-1 PM を利用して、血管内皮細胞、脂肪細胞に局所発現を試みた。血管内皮細胞では 20 週以上約 10%の発現が持続し、TGF- β 投与で PM 活性の制御も可能であった。AAV1 ベクターを筋肉に投与したサルで血中に 3-5%の FIX を得たが、ヒト FIX に対する抗体が産生され 4 週間以上の持続が見られなかった。ヒト FIX の Ala262 位アミノ酸はサルでは Thr である。この部に対しては抗体産生が見られなかったため、ヒト型 Ala に変えて、この部をエピトープにもつモノクロナル抗体で発現改変 FIX を測定出来るように工夫した。AAV8 ベクターを利用して予めマウスで 1000%以上の発現を確認した上でサルに門脈から投与した。長期発現は見られたが、サルに既存する AAV8 に対する少量の抗体のため、血中に期待レベルの FIX は得られなかった。(II) 成熟肝細胞に遺伝子を導入し、腎皮膜下に移植し、治療レベルの血友病因子を発現させる

技術を確立した。分離肝細胞を uPA/SCID マウスに移植した結果、移植肝細胞のみの選択的増殖が確認され、増殖細胞を用いた腎皮下移植で安定着生が確認できた。イヌ肝細胞も同様に SCID マウス肝で選択的増殖し、85%がイヌ由来の肝細胞に置換された。GPI b PM が血小板特異性が最も高いことが明らかになった。血液幹細胞へ GPIPM を利用して FVIII を導入し (MOI, 30)、血友病マウスに移植したところ、高率に着生し、巨核球、血小板に殆どの発現が見られた。インヒビタ存在下でも、移植マウスでは尾部切断による出血が制御された。SIV ベクターの第三世代化とセンダイウイルスの膜蛋白質を利用した新型シュードタイプの作製に成功した。組み込み部位の解析では、反応条件とデータ検索方法を中心に検討し、幾つか有用な示唆が得られた。又解析数 69 クロノンのうち 43 クロノンがデータベースで同定でき、挿入部位の約 50%はイントロン部であることが確認された。

B. インヒビタ:免疫寛容誘導マウスの脾臓リンパ球に対する抗原刺激実験により、寛容はインタフェロン γ 依存性の T 細胞エネルギーに基づくことが明らかとなった。抗マウスリンパ球抗体等も利用したが、FVIII 抗原の胸腺直接投与では寛容は誘導されなかった。しかし、新生児寛容誘導マウス脾細胞の注入では 60%に寛容誘導が確認された。

C. 血友病患者の遺伝子解析は進行中であり、新規異常例も確認された、

4. 考察

A. (I) AAV ベクターを用いて、標的臓器に血友病因子を長期発現させる技術は、マウスではほぼ確立した。ヒト応用には、サルでの長期安全性の検討が必要と考えらえる。しかし、AAV ベクターがサル由来であるために AAV 利用は容易ではない。選択的カテーテルとパルーンを用いて、血液との接触を最小限にしてサル肝臓にベクターを投与するなどの投与方法検討が必要であろう。解決すべき問題点の枠はさらに狭まった。(II) 異所性肝細胞移植の技術はほぼ確立した。効率改善のために成熟肝細胞を uPA/SCID マウスで選択的に増殖させたが、ヒト細胞でも可能なことから、細胞移植治療の有力な武器になることが期待される。骨髄巨核球に FVIII を発現させ、血小板に出血部位へ運搬させる方法は、理に適っており、又半減期も延長 (血小板寿命 7 日間) し、インヒビタが存在しても止血部位で放出され止血能を有するためにインヒビタ対策としても極めて独創的な方法と考えている。実用化には SIV ベクターの安全性確立と、自殺遺伝子の同時組み込みなどが必要である。

B. インヒビタ対策:独創的な仕事ではあるが、成人のインヒビタ治療には胸腺に投与した脾細胞のどの細胞が免疫寛容を誘導したかなど、これから解決すべき課題は多い。

5. 自己評価

1) 達成度について

10 年遅れの研究開始であり、技術中心で、しかも対外的には異様な競争が存在して、極めて論文にしにくいプロジェクトではある。この 3 年間で、基礎的技術的には欧米と同じレベルに達しており、一部では凌駕していると考えている。マウスを用いた遺伝子治療基礎技術に関しては、世界の最先端グループの一つである。抗体レベルの低いサルの入手が困難などの研究以前の問題はあるが、サル実験でも解決すべき問題点が絞り込まれたので、技術的には克

服可能と考える。成熟肝細胞移植、及び幹細胞を用いた血小板系への FVIII 発現に関しては期待以上の成果が得られた。臨床研究開始にはまだ安全性確認の研究が不十分であるが、極めて近いところに来ていると確信している。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義

サルを用いた前臨床試験や、マウスでは脂肪細胞への遺伝子導入 (世界初)、成熟肝細胞異所性移植と移植細胞のための生体工場の確立、血小板系への FVIII 発現による有効止血の工夫とインヒビタからの防御などに関しては、いずれも国際的に評価されており、学術的価値も高い。遺伝子治療に関しては、臨床応用が可能になった段階で、患者の cure、キャリアの精神的解放、製剤の使用量の減少など社会的意義ははかりしれない。インヒビタ対策については、新生児 FVIII 免疫寛容誘導法 (JTH, 2004) が、欧米の様々な研究施設で種々の形で応用されている。又、担当した教室の窓岩が日本人で初めて Bayer の Special Project Hemophilia Award を獲得し、表彰された。

3) 今後の展望について

サルの実験は AAV ベクターに対する既存抗体対策が鍵となる。既に幾つか解決法を考案しており、展望はあるものと思われる。又、滞っていた血友病イヌのメーティングが進みコロニー化が進みつつあり、前臨床試験の一つとしての利用も考えられる。生体内ベクター投与方法で切除可能な臓器を中心にさらに基礎検討を続けて行きたいと考えている。長期発現と安全性の問題を常にバランスにかけながら、直接生体内ベクター投与方法が良いか、体外遺伝子導入細胞移植法がよいかを決定し臨床研究を開始したいと考えている。開始における臨床ドクターの役割分担などの人的システムは大学内に構築済みである。ベクターの特許問題、ヒトに投与可能なベクター作製のためのカンパニーの協力などについては、厚労省他の協力が不可欠であると考えている。

6. 結論

遺伝子治療技術は、直接ベクターを生体内に投与する方法、及び体外で遺伝子を導入した細胞を移植する方法のいずれも効率面ではマウスレベルでは確立出来た。しかし、長期安全性確保のための十分な基礎的実験はなお必要である。サルを用いた前臨床試験は AAV に対して抗体を持つサルが多いために現時点でめざましい結果が得られていないが、克服は時間の問題と考える。インヒビタに対する免疫寛容誘導法に関しては新生児では一定の成果が得られたが、成人に対する有効な治療法の確立が今後の課題である。

7. 知的所有権の出願・取得状況

「血液凝固異常の治療方法」(D4-A0506)

状態:出願中 (未公開) (2005/10/28)

「RNA ウイルスのスパイクタンパク質でシュードタイプ化したレンチウイルスベクターを用いた気道上皮幹細胞への遺伝子導入」(D4-A0510)

状態:出願中 (未公開) (2005/10/28)

研究課題：血友病の治療とその合併症の克服に関する研究

課題番号：H15-エイズ-009

主任研究者：坂田 洋一（自治医科大学分子病態研究部 教授）

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

長谷川 護（ディナベック株式会社 代表取締役社長）、天野 景裕（東京医科大学臨床検査医学講座 助手）、

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

1. 研究目的

血友病は X 染色体上に存在する血液凝固第 VIII、(FVIII) 或いは IX 因子 (FIX) 遺伝子の異常に起因する先天性出血性疾患である。現在の治療は出血時に因子製剤を投与する care 中心で、致死的な頭蓋内出血の予防は不可能である。患者のみならず、女性キャリアの精神的負担も極めて大きい。患者の QOL を高めるために、血友病に cure をもたらし遺伝子治療と、care 治療でも問題となるインヒビタ対策を目的に研究を展開した。本年度は、遺伝子治療に関してはこれまでの基礎研究をベースに、臨床研究開始のために必要な技術の確立と、安全性の確認に焦点を絞って検討した。インヒビタ対策は有効な免疫寛容誘導法開発とインヒビタを回避する遺伝子治療の基礎的検討を行った。

2. 研究方法

A 遺伝子治療：効率を考慮するとウイルスベクターの使用が現実的である。ウイルスベクターとしては、これまでの基礎実験の結果から染色体への組み込みが殆ど起こらず、非分裂細胞にも導入可能なアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターと、非分裂細胞に導入可能でサルやヒトに病原性の報告のないアフリカミドリザルから単離したレンチウイルスの一種である SIV ベクターを選択した。安全性を前提に、

(I) 体内標的臓器に直接遺伝子導入を図る場合は AAV ベクター、そして、(II) 体外で肝細胞、或いは幹細胞に遺伝子を導入し、体内に再移植する場合には SIV ベクターを用いた。I. 体内直接投与の場合の安全性の検証として、投与ベクターの体内分布を、種々の血清型の AAV にルシフェラーゼ遺伝子を搭載し、経時的に *in vivo* imaging 装置により発現分布を検討した。AAV ベクターには搭載遺伝子 5kb の制限があるが、発現効率向上と臓器特異性を高めるために 4.5kb の FVIII 遺伝子においても種々の promoter (PM) を検討した。サルの実験ではヒト FIX に対して、抗体産生が見られたために、サル型 FIX 遺伝子を作製し、発現 FIX の定量的同定を目的の一部をヒト型に改変した遺伝子を作製し検討した。II. 成熟肝細胞を単離し、細胞外マトリックスと機能的血管ネットワーク構築法により、腎皮膜下、及び皮下に移植する方法を実用化に向けて改良した。具体的には体外で細胞を増殖させるために、albumin enhancer PM を持つウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベータを肝特異的に発現するトランスジェニックマウスと SCID マウスを交配して得られるマウス (uPA/SCID) の肝臓をマウス及びイヌの移植肝細胞の選択的増殖装置として利用を試みた。一方、血友病マウス由来幹細胞に体外で GPIb PM を有する FVIII 遺伝子を SIV ベクターを利用して導入し、血友病マウスに再移植し、血小板への選択的発現とインヒビタ存在下、非存在下における止血効果などを検討した。SIV ベクターの染色体組み込み部位の解析を linear amplification-mediated PCR (LAM-PCR) 法とヒトゲノムデータベースを利用して検討した。今回はモデル遺伝子として EGFP を用い、挿入部位に選択圧がかからない実験条件を選択した。

B インヒビタ対策：上記血小板への FVIII 発現の試み以外

に、超高解像度エコーガイド下に成熟血友病 A マウスの胸腺組織へヒト FVIII、或いは新生児免疫寛容誘導したマウスの脾臓細胞を注入し、免疫寛容誘導の可能性を検討した。（倫理面への配慮）

遺伝子治療については、非病原性改変ウイルスベクターを利用した遺伝子導入法の開発と応用を目指したものであり、周辺環境及び実験従事者の安全性に関して倫理的問題が生ずることはないと考えている。研究は遺伝子治療臨床研究に関する文部科学省・厚生労働省告示の倫理指針を遵守して施行する。動物実験は、各大学の動物実験指針規定に従い、独立行政法人・医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センターで実施するサルの実験では、センターと国立感染症研究所の方針を遵守して行う。臨床研究は、厚生労働省の倫理指針に従い被験者の人権に十分配慮するとともに、インフォームドコンセントをとる。特に遺伝子解析に関しては、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守する。

3. 研究結果

A (I) ルシフェラーゼ発現により経時的発現分布を観察すると、肝臓特異性の高いと言われる AAV-8 ベクターにおいても、多臓器に分布することが明らかとなった。そこで、PM を利用して臓器特異性を高める工夫を進めた。FVIII に関しては、 α lanti-trypsin の PM の最短長を利用したところ肝臓特異的に発現が見られ 800%にも及ぶ FVIII の血中レベルが得られた。肝機能に異常は見られず、300 日以上発現は持続している。血友病 B については、PAI-1 PM を利用して、血管内皮細胞、脂肪細胞に発現を試みた。血管内皮細胞では 20 週以上約 10%の発現が持続し、TGF- β 投与で PM 活性の制御も可能であった。サルについては、前年度、AAV1 ベクターを筋肉に投与したサルで血中には 3-5%の因子発現が見られたが、ヒト FIX に対する抗体が産生され 4 週間以上の持続が見られなかった。ヒト FIX の Ala262 位アミノ酸はサルでは Thr である。この部位に対しては抗体産生が見られなかったため、ヒト型 Ala に変えて、この部をエピトープにもつモノクロナル抗体で発現改変 FIX を測定出来るように工夫した。AAV8 ベクターを利用して予めマウスで 1000%以上の発現を確認した上でサルに門脈から投与した。残念ながら、サルに既存する AAV8 に対する少量の抗体のため、血中に期待レベルの FIX の長期発現は得られなかった。(II) 分離肝細胞を uPA/SCID マウスに移植した結果、移植肝細胞のみの選択的増殖が確認され、ドナーと同系マウスの腎皮膜下に移植したところ 100 日を超えて安定生着し、小肝組織を形成し得た。イヌ肝細胞も同様に SCID マウス肝で選択的増殖し、抗イヌアルブミンを用いた免疫染色、及びイヌ FIX レベルから 85%がイヌ由来の肝細胞に置換されたことが確認された。血液幹細胞へ GPIb PM を利用して FVIII を導入した (MOI, 30) 細胞を血友病マウスに移植したところ、高率に生着し、巨核球、血小板に殆どの発現が見られた。インヒビタ存在下でも、移植マウスでは尾部切断による出血が制御された。SIV ベクターの組み込み