

HIV脳症の年度別推移

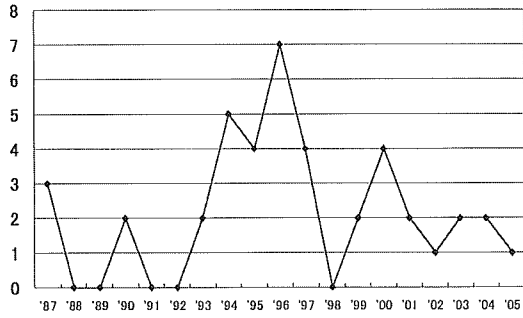


図1. HIV 脳症の年度別推移

年齢分布

中間値:45歳(24~66歳)

HAART導入前 43歳
HAART導入後 42歳

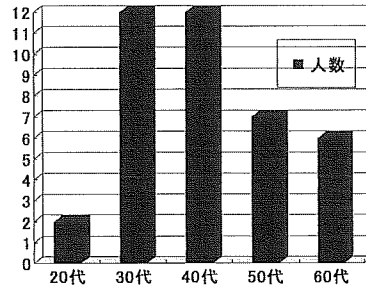


図2. HIV 脳症発症年齢

【HIV痴呆36例の画像所見】

[CT] 萎縮 13例 (N=20) [ECD-SPECT] 血流低下 12例 (N=15)
[MRI] 萎縮 23例 (N=31) 白質異常 12例 (N=31)

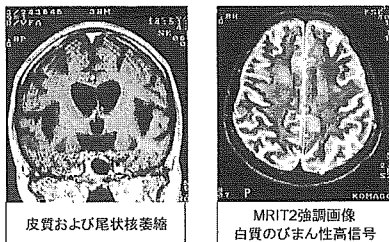


図3. 画像所見

【HIV痴呆39例の神経学的所見】

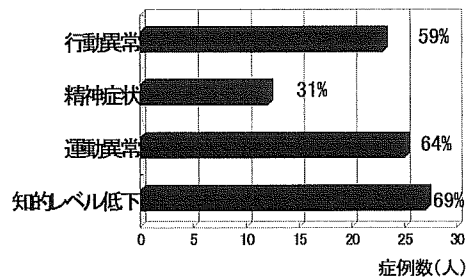


図4. HIV 痴呆の神経学的所見

HIV痴呆の生命予後

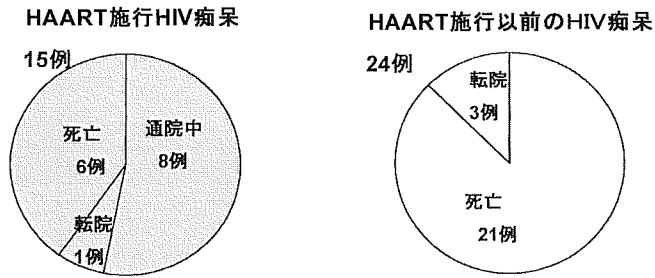


図5. HIV 痴呆の生命予後

生存期間中間値 38ヶ月 (4~99ヶ月) 生存期間中間値 5ヶ月 (0.4~28ヶ月)
 死亡者の生存期間中間値 19.5ヶ月
 (4~78ヶ月)

HAART施行HIV痴呆の死因

肺悪性リンパ腫 咽頭癌 敗血症
 急性腎不全 自殺 突然死

図6. HAART 施行 HIV 痴呆の死因と死亡者と生存者の免疫状態の比較

HAART施行HIV痴呆の死亡者と生存者の免疫状態

	CD4リンパ球数 / μ L	HIV-RNA /ml
死亡者 N=6	Median 103 (5~214)	54,000 190,000 <400 78 <50 <50
生存者 N=8	Median 313.5 (82~506)	全例 <50

死亡者の中でHIV RNA高値はHAART中断者

HIV痴呆の生命予後

	HIV痴呆で発症	他のAIDS指標疾患後に発症
HAART施行あり 生存期間中間値 (範囲)	n=4 27.5ヶ月 (9~64ヶ月) (平均32ヶ月)	n=10 56.5ヶ月 (4~78ヶ月) (平均47.4ヶ月)
HAART施行無し 生存期間中間値 (範囲)	n=6 10ヶ月 (1~28ヶ月) (平均6.5ヶ月)	n=15 2.0ヶ月 (0.4~12ヶ月) (平均3.7ヶ月)

図7. HIV 痴呆の生命予後
 HIV 痴呆で発症者と他の AIDS 指標疾患が先行した場合の比較

厚生労働科学研究費補助金（エイズ研究事業）
分担研究報告書

エイズ脳症の発症病態と治療法に関する研究：

エイズ脳症に関するワークショップ報告

分担研究者 中川 正法 京都府立医科大学 神経内科 教授

研究要旨

【目的】関西地区における NeuroAIDS の臨床疫学を明らかにし、他の地区との比較検討を目的に研究を行った。

【方法】エイズ脳症に関するワークショップを開催し、関西地区、関東地区、東海地区の NeuroAIDS の動向について検討した。

【結果】2006年12月10日、大阪国際交流センターにて「エイズ脳症の発症病態と治療法に関する研究」ワークショップを開催した。その結果、1)先進国ではわが国のみ右肩上がり増加、2)初診時 AIDS の増加（大阪 AIDS 発症が25%、14%が死亡）、3)末梢神経障害の増加、エイズ脳症は10～15%程度、4)人口比では関西地区で HIV 感染者の増加が目立つ、5)エイズ脳症の病態は未解明な点が多い、6)神経内科医の NeuroAIDS への更なる関与が必要である、7)研究班でモジュールを作成し啓発活動を行う必要がある、8)HAART によってエイズ脳症は「treatable dementia」になるのか、9)海外、とくにアジア諸国との交流が必要であるなどの点が指摘された。

【考察】今回のワークショップにより、関西地区、東海地区、関東地区の NeuroAIDS の動向に関して、ある程度比較検討を行うことが出来た。その結果、関東地区よりも関西地区において HIV 感染者がより急増していること、神経合併症の初期からの継続的な対応が困難な状況が明らかとなった。

【結論】今後、神経内科医、感染症科医、臨床心理士、コーディネーター、神経病理医などとの学際的な協力のもと NeuroAIDS 早期発見の観点から HIV 感染者を長期フォローアップする体制を構築する必要がある。

A. 研究目的

わが国における HIV 感染による神経障害の疫学的、臨床的実態に関する疫学調査は、本研究班を中心に全国規模で行われてきた。しかし、関西地区における HIV 感染に伴う神経合併症（NeuroAIDS）の動向に関する調査研究は、他の地区と比較して不十分な面が指摘されていた。今回、関西地区における NeuroAIDS の臨床疫学を明らかにし、他の地区との比較検討を目的に研究を行った。

B. 研究方法

エイズ脳症に関するワークショップを開催し、関西地区、関東地区、東海地区の NeuroAIDS の動向について検討した。以下にワークショッププロ

グラムおよび参加者を示す。また、各分野の専門家にコメンテーターを依頼し、討論を深めた。

<ワークショッププログラム>

班長 あいさつおよびオーバービュー

HIV 感染者の現状と神経合併症の東西比較

座長 中川正法

演題 1 1985 年から今日までの都立駒込病院での HIV 診療状況と神経合併症

演者 東京都立駒込病院 神経内科 岸田修二

演題 2 当院における HIV 感染症患者の中枢神経疾患の現状

演者 国立病院機構大阪医療センター

免疫感染症科 白阪琢磨

演題 3 症例提示

演者 京都大学高次脳機能総合研究センター
福山秀直

HIV 感染症と画像診断 座長 福山秀直

演題 4 HIV 感染症における中枢神経病変の画像
診断について

演者 国立病院機構 大阪医療センター
放射線科 酒井美緒

エイズ脳症の臨床と病理 (CPC) 座長 出雲周二

演題 5 HIV 脳症が疑われ、末期に急速に意識障
害をきたした一例

演者 東京都立駒込病院 病理科 船田信顕、
神経内科 岸田修二

演題 6 HIV 脳症 5 症例の臨床的検討

演者 名古屋医療センター神経内科
橋本里奈、向井栄一郎

演題 7 HIV-1 中枢神経感染症-病変の多様性

演者 京都府立医科大学病理学
伊東恭子、Serge Weis、伏木信次

演題 8 エイズ剖検脳における HIV 脳炎所見と
大脳皮質変性病変との関連：

ウィーン大学剖検例での検討

演者 鹿児島大学大学院 難治ウイルス病態
制御研究センター

出雲周二、能勢裕久、Moe Moe Aye

総合討論 司会 岩崎 祐三

班長のまとめ

<コメンテーター>

岩崎祐三 元国立宮城病院 院長

新宅雅幸 大阪赤十字病院 病理部

福山秀直 京都大学高次脳機能総
合研究センター

三浦義治 京都大学ウイルス研究所
エイズ研究施設感染病態研究領域

長嶋和郎 東徳洲会病院 病理

向井栄一郎 名古屋医療センター 神経内科

佐古田三郎 大阪大学大学院 神経内科学

<参加班員等>

馬場昌範、岡本実佳、木戸 博、矢野仁康、三隅
将吾、能勢裕久、Moe Moe Aye、川西健登、夏能
正幸、徳田隆彦、山口達之、大島洋一。

C. 研究結果

2006 年 12 月 10 日、大阪国際交流センターに
て「エイズ脳症の発症病態と治療法に関する研
究」ワークショップを開催した。前述の27名が参
加し、都立駒込病院、大阪医療センター、名古屋
医療センターより NeuroAIDS の動向について報
告された。また、CPC を行い、諸外国におけるエ
イズ脳症との比較検討も行った。これらの発表を通
じて、

- 1) 先進国ではわが国のみ右肩上がり増加
(図1)
- 2) 初診時 AIDS の増加(大阪 AIDS 発症が2
5%、14%が死亡)
- 3) 末梢神経障害の増加、エイズ脳症は10~1
5%程度
- 4) 人口比では関西地区で HIV 感染者の増加
が目立つ(大阪医療センターの HIV 感染
者数 千人に迫る)(図2, 3)
- 5) エイズ脳症の病態は未解明な点が多い
- 6) 神経内科医の NeuroAIDS への更なる関与が
必要である
- 7) 研究班でモノグラムを作成し啓発活動を行う
必要がある
- 8) HAART によってエイズ脳症は「treatable
dementia」になるのか?
- 9) 海外、とくにアジア諸国との交流が必要であ
る
などの点が指摘された。

今回のワークショップの内容をモノグラムとして
発表することになった。

D. 考察

今回のワークショップにより、関西地区、東海
地区、関東地区の NeuroAIDS の動向に関して、あ
る程度比較検討を行うことが出来た。その結果、
関東地区よりも関西地区において HIV 感染者がよ
り急増していることが明らかになった。
NeuroAIDS への対応に関しても関西地区で HIV 感
染者が最も多く受診している病院に常勤の神経
内科医がおらず、神経合併症の初期からの継続的
な対応が困難な状況が明らかとなった。

多くの先進諸国で AIDS 患者が減少傾向になっ
ている中で、わが国では HIV 感染者および ADIS
患者が急速に増加することが予測されている。
HAART 導入により HIV 感染症が慢性感染症へと変

貌したが、このことはエイズ脳症を含む NeuroAIDS の相対的頻度の増加および臨床病態の変化を予測させるものであり、本研究の継続的かつ積極的な研究が求められる。

今後、神経内科医、感染症科医、臨床心理士、コーディネーター、神経病理医などとの学際的な協力のもと NeuroAIDS 早期発見の観点から HIV 感染者を長期フォローアップする体制を構築する必要があると考える。

E. 結論

わが国では HIV 感染者および ADIS 患者に伴い、エイズ脳症を含む NeuroAIDS の増加が予測されており、本研究の継続的かつ積極的な推進が求められる。

F. 研究発表

なし

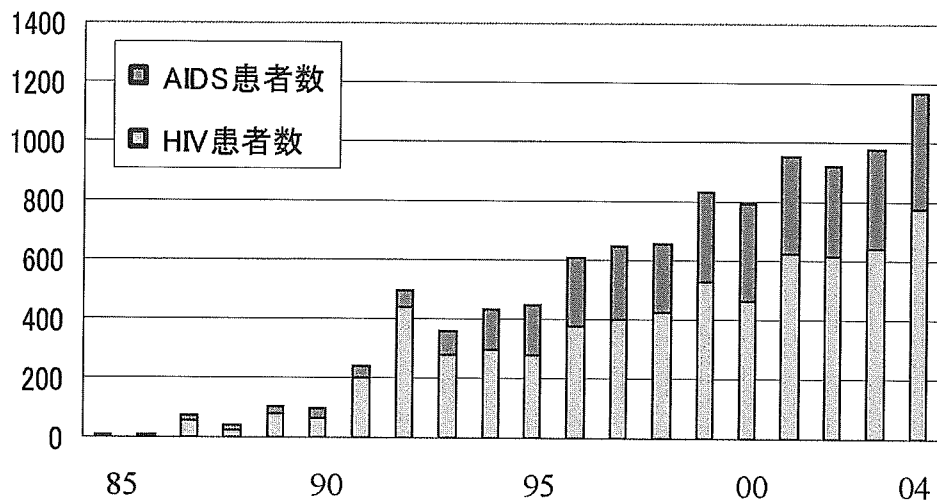


図1. HIV感染者およびAIDS患者数の推移

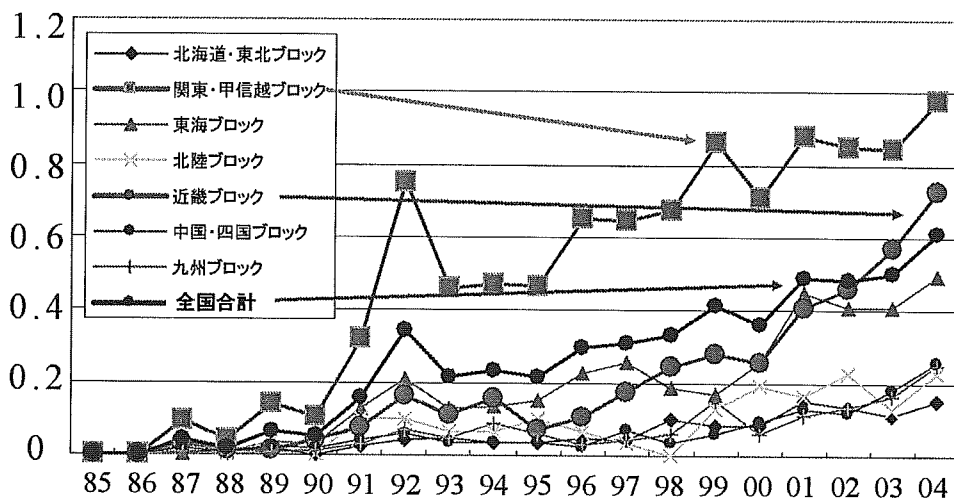


図2. HIV感染者数／人口10万人

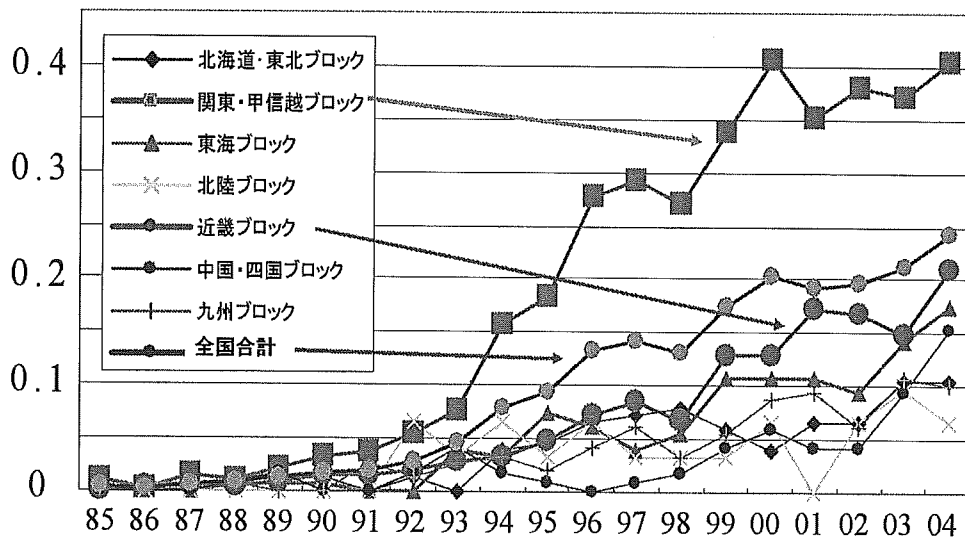


図3. AIDS感染者数／人口10万人

エイズ脳症大脳皮質病変における EAAT-2 の発現低下とミクログリアの活性化
—ヒト剖検例での検討—

主任研究者： 出雲周二 鹿児島大学難治ウイルス病態制御研究センター
研究協力者： 邢 惠琴 鹿児島大学難治ウイルス病態制御研究センター
久保田龍二 鹿児島大学難治ウイルス病態制御研究センター
早川 仁 鹿児島大学難治ウイルス病態制御研究センター、神経内科
笠井武史 鹿児島大学難治ウイルス病態制御研究センター、神経内科
Ellen Gelpi Institute of Neurology, Vienna University
Herbert Budka Institute of Neurology, Vienna University

研究要旨：我々はサルエイズモデルを用いた研究により、エイズ脳症には炎症性病態であるHIV脳炎と変性病態である大脳皮質障害がそれぞれ独立して生じうることを明らかにした。サルモデルでみられた2つの独立した神経障害機構が、実際のヒトエイズ症例においても同様に独立して生じているかを明らかにするために、多数のエイズ剖検例を有するウィーン大学神経学研究所のBudka教授よりHIV感染者剖検脳組織の提供を受けて、病理組織学的解析をすすめ、昨年度までにHIV感染者の中樞神経で多核巨細胞を伴うミクログリア結節というHIV脳炎像と、大脳皮質における変性所見であるEAAT-2低下、ミクログリアの瀰漫性活性化やグリオシスは独立して生じていることを示した。本年度は、HIV脳症の大脳皮質病変形成にミクログリアがどのように関与しているかを明らかにするために、大脳皮質のEAAT-2発現低下と活性化ミクログリアの増勢を定量的に解析し、ミクログリアにおけるproinflammatory cytokineの発現との関連を検索した。その結果、アストロサイトにおけるEAAT-2の発現低下とミクログリアの活性化は有意に相関し、増勢する活性化ミクログリアにIL-1b、TNF-aの発現はみられず、一部のミクログリアはEAAT-2を発現していた。これらの結果より、HIV感染者大脳皮質では、アストロサイトの障害により生じたEAAT-2発現低下を補うためにミクログリアが活性化し、アストロサイトの神経保護作用を代償していることが推察される。

A: 研究目的

エイズ脳症の病理像として、大脳白質の多核巨細胞の出現を伴うミクログリア結節と皮質の変性所見が知られている。

我々はこれまでサルエイズモデルを使い、ウイルスの感染指向性の違いによるリンパ組織病変の進行と脳病変の進展を比較した。その結果、エイズ脳症には神経病理学的に二つの独立した神経障害機構、す

なわち、大脳白質のグリア結節病変として知られ、免疫不全を伴わずに生じうるHIV脳炎と、エイズ末期に免疫不全の進行に伴い生じる大脳皮質神経細胞の障害としての脳症が存在し、この2つの病態はウイルス指向性の違いによって生じている可能性を指摘した(Xing HQ, et al. J Neurovirol. 2003)。さらに、大脳皮質変性病態にはアストロサイトの変性・機能障害が関与しており、ミクログリアはグルタミン酸トランスポー

ターEAAT-2を発現し、神経傷害性の興奮性アミノ酸を神経組織間隙より除去することにより、神経細胞保護作用を発揮していることを明らかにした (Xing HQ, et al. Am J Pathol. Submitted)。また、昨年度は、サルエイズモデルでみられた2つの独立した神経障害機構が、実際のヒトエイズ症例においても同様に独立して生じているかを明らかにするために、多数のエイズ剖検例を有するウィーン大学神経学研究所のBudka 教授より HIV 感染者剖検脳組織の提供を受けて共同研究を推進し、HIV感染者大脳でも HIV 脳炎の有無とは独立して大脳皮質でアストロサイトの変性とミクログリアの瀰漫性増勢が生じていることを明らかにした。

エイズ脳症の発症病態におけるミクログリアの関与については、HIV 脳炎では感染ターゲットとしてのミクログリアの関与が明らかであるが、大脳皮質変性への関与についてはまだ不明の部分が多い。これまでの報告では、活性化ミクログリアによる IL-1 β 、TNF- α などのサイトカインや NO の産生、感染ミクログリアからのウイルス蛋白 gp120 や Tat などを通して、神経障害のエフェクターとなるという報告がある一方、活性化ミクログリアの神経保護作用に注目した報告もみられる。本年度は HIV 脳症のうち、大脳皮質病変形成にミクログリアがどのように関与しているかを明らかにすることを目的とした。

B: 研究方法

検索対象

1983 年以後のウィーン大学神経病学研究所の剖検台帳を閲覧し、HIV 感染が明らかとなっている 429 剖検例を抽出した。さらに日和見感染症や腫瘍、脳血管性病変などが中枢神経の主病変として認められる症例を除外し、HIV 脳炎と病理診断を受けた 11 例 (HIVE 群) と明らかな中枢神経病変を認めない 9 例 (No HIVE 群)、計 20 例を検索対象とした。ALS で死亡した HIV 非感染症例をコントロールとして用いた。

免疫組織化学

前頭葉と橋のパラフィン切片について、アストロサイト (GFAP)、活性化ミクログリア (Iba1)、HIV-1 P24、グ

ルタミン酸トランスポーター (EAAT-2)、IL-1 β 、TNF- α の免疫組織染色、TUNEL 法によるアポトーシスの検出を行なった。

組織定量的解析

上前頭回皮質の第 2 層から 5 層について、200 倍に拡大した顕微鏡視野の重複しない 5 視野の Iba1 陽性ミクログリア数をカウントした。また、EAAT-2 染色標本の対応する部位について、100 倍拡大写真 5 枚をデジタルカメラで撮影、NIHImage 画像解析ソフトを用いて EAAT-2 陽性ニューロピル面積を算定した。両者の相関を Spearman r テストと回帰分析により解析した。

C: 研究結果

HIVE 群の全 11 例では前頭葉、あるいは橋には、典型的なエイズ脳症の病理組織所見である“多核巨細胞を伴うミクログリア結節と血管周囲リンパ球浸潤”が認められ、周囲の反応性グリオシスと髄鞘の変性を伴っていた。4 例では皮質でも少数のミクログリア結節が確認された。No HIVE 群では、ミクログリア結節、多核巨細胞、リンパ球浸潤のいずれもみとめられなかった。

Iba1 免疫染色では、HIVE 群 5 例と No HIVE 群 2 例で、ミクログリア結節の局在部位と関連なく、Iba1 陽性の活性化ミクログリアが橋や前頭葉皮質に瀰漫性に増生していた (Fig. 1)。

GFAP では前頭葉皮質に明らかな瀰慢性グリオシスを HIVE 群 5 例と No HIVE 群 2 例で認め (Fig. 2)、その内 5 例ではミクログリアの瀰慢性活性化を伴っていた。

EAAT-2 はニューロピルで瀰漫性・斑状に染色され、アストロサイトの胞体・突起に発現していると考えられる分布を示した。HIVE 群、No HIVE 群共に明らかに EAAT-2 の発現が斑状、虫食い状に低下していると考えられる例がみられた (Fig. 3)。

EAAT-2 と Iba1 の二重免疫染色で、一部のミクログリアは EAAT-2 を発現していると考えられた (Fig. 4)。

TUNEL 法によるアポトーシス検出では、陽性細胞は 5 例では増加しており、主として大脳皮質 2~3 層の

アストロサイトに陽性で、6例では少数のニューロンでも陽性所見が観察された(Fig. 5)。

HIV-1 P24、IL-1 β 、TNF- α は HIVE 群のミクログリア結節を形成する一部の細胞で発現がみられたが、皮質に瀰漫性の増勢するミクログリアやアストロサイトでの発現は認められなかった(Fig. 6)。

EAAT-2 発現と Iba1 陽性ミクログリアの定量的解析では、コントロール脳では EAAT-2 陽性面積は70%および76%であった。HIVE群6例、No HIVE群4例、計10例では EAAT-2 陽性面積が70%未満で、発現低下と考えられ、これらの発現低下例では、EAAT-2 陽性面積と Iba1 陽性ミクログリア数は有意の逆相関を示した(Fig. 7)。

D: 考 察

アストロサイトに発現する EAAT-2 はシナプス間隙からグルタミン酸を取り除き、神経細胞を保護する役割をしている。今回の検索では、HIV 感染者大脳皮質でアストロサイトの EAAT-2 発現低下が観察され、アストロサイトの傷害による神経保護、すなわちシナプス間隙からのグルタミン酸除去作用の低下が推定された。EAAT-2 発現低下部位で活性化ミクログリアは EAAT-2 を発現しており、アストロサイトの神経保護作用を代償していることが示唆された。アポトーシスは主としてアストロサイトに見られ、アストロサイトが最初に傷害されていると考えられた。神経細胞のアポトーシスも観察された。このような大脳皮質病変局所にはウイルス感染細胞や TNF- α 、IL-1 β 発現細胞はほとんど見られず、HIV 脳炎の有無との関連も認められず、このアストロサイトの機能障害やミクログリアの瀰漫性増生はエイズ末期の全身的な病態に伴い生じていると考えられる。

E: 結 論

1. HIV 感染者の中樞神経では、多核巨細胞を伴うミクログリア結節という HIV 脳炎像と、大脳皮質における変性所見である EAAT-2 低下、ミクログリアの瀰漫性活性化やグリオーシスは独立して生じている。
2. HIV 感染者大脳皮質では、アストロサイトの神経

保護作用の障害を代償するために、ミクログリアは瀰漫性に活性化している。

F. 健康危険情報

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

G. 研究発表

1. Xing HQ, Hayakawa H, Mori K, Gelpi E, Sugimoto C, Ono F, Izumo K, Kuboda R, Budka H, Izumo S. Two independent pathogenetic events take place in retroviral brain damage: SIV/HIV-1 encephalitis mainly involving cerebral white matter and primary astrocytic injury in the cortex. *Am J Pathol.* submitted.
2. Izumo S, Xing HQ, Hayakawa H, Kasai T, Budka H. HIV encephalitis and degeneration of the cerebral cortex occur independently in the brain of AIDS patients. *J Neurol Sci* 2005, 238: S98.
3. Xing HQ, Hayakawa H, Kasai T, Budka H, Izumo S. Reduced expression of excitatory amino acid transporter-2 (EAAT-2) and activation of microglia in the cerebral cortex of AIDS patient. *J Neurol Sci* 2005, 238: S318.
4. Furukawa Y, Tara M, Izumo S, Arimura K, Osame M. HTLV-I viral escape and host genetic changes in the development of adult T cell leukemia. *Int J Cancer.* 2006, 118:381-387.
5. Matsuzaki T, Saito M, Usuku K, Nose H, Izumo S, Arimura K, Osame M. A prospective uncontrolled trial of fermented milk drink containing viable *Lactobacillus casei* strain Shirota in the treatment of HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Neurol Sci.* 2005, 237:75-81.

6. Saito M, Eiraku N, Usuku K, Nobuhara Y, Matsumoto W, Kodama D, Sabouri AH, Izumo S, Arimura K, Osame M. ApaI polymorphism of vitamin D receptor gene is associated with susceptibility to HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in HTLV-1 infected individuals. *J Neurol Sci.* 2005, 232:29-35.
7. Sabouri AH, Saito M, Usuku K, Bajestan SN, Mahmoudi M, Forughipour M, Sabouri Z, Abbaspour Z, Goharjoo ME, Khayami E, Hasani A, Izumo S, Arimura K, Farid R,

Osame M. Differences in viral and host genetic risk factors for development of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-associated myelopathy/ tropical spastic paraparesis between Iranian and Japanese HTLV-1-infected individuals. *J Gen Virol.* 2005, 86(Pt 3):773-781.

H. 知的財産権の出願 登録状況

今年度、本研究に関するものでは、出願および取得特許は無い。

表: HIV 感染者剖検脳の前頭葉病理組織所見

Patient No.	Diagnosis	decrease of EAAT-2	Apoptosis		activation of microglia	cortical gliosis	HIV P24	
			cortex	white matter			cortex	white matter
137-99	HIVE	3	0	0	2	1	0	2
118-91	HIVE	3	1	2	3	0	1	0
82-91	HIVE	2	2	1	3	2	0	1
45-96	HIVE	2	1	1	1	0	0	1
206-86	HIVE	2	2	1	3	3	0	1
32-92	HIVE	2	1	2	2	2	1	3
50-95	HIVE	1	2	1	1	3	2	2
133-00	HIVE	0	2	0-1	1	0	1	1
10-87	HIVE	0	1	3	1	3	0	3
98-02	HIVE	0	3	2	0	0	0	1
61-93	HIVE	0	2	2	0	0	0	1
122-97	NO HIVE	3	0	0	3	0	0	0
147-94	NO HIVE	3	1	0-1	3	2	0	0
39-89	NO HIVE	3	1	0-1	0	0	0	0
73-95	NO HIVE	2	0	0	2	0	0	0
55-97	NO HIVE	1	2	1	0	0	0	0
34-01	NO HIVE	0	0	0	2	0	0	0
85-97	NO HIVE	0	0	0	3	2	0	0
155-95	NO HIVE	0	0	0	3	1	0	0
164-99	NO HIVE	0	0-1	0-1	3	0	0	0

3: marked 2: moderate 1: slight 0: none

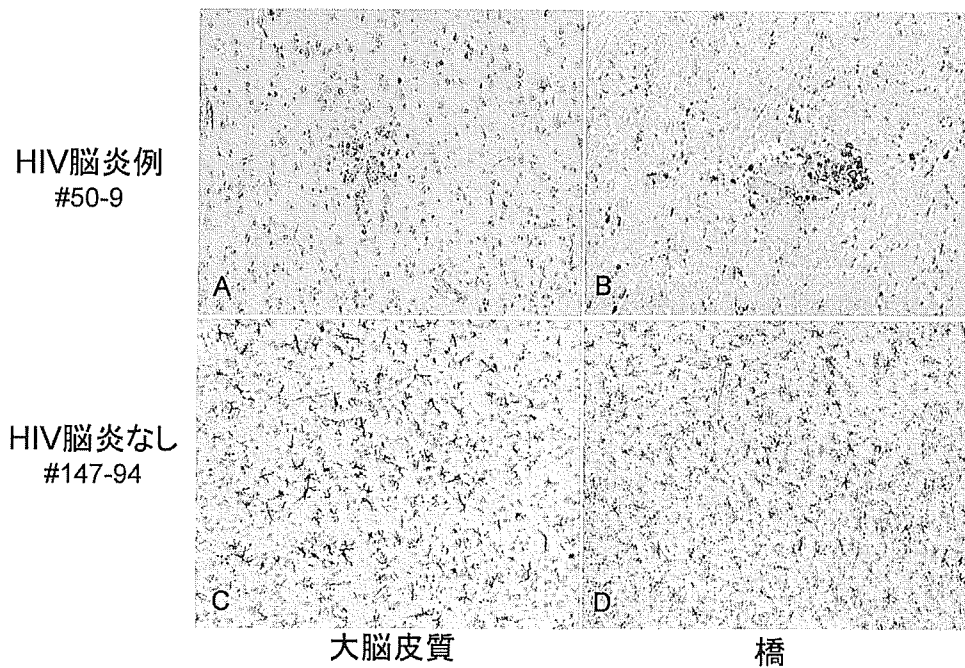


Fig. 1: 大脳皮質、橋におけるIba1陽性ミクログリアの増勢

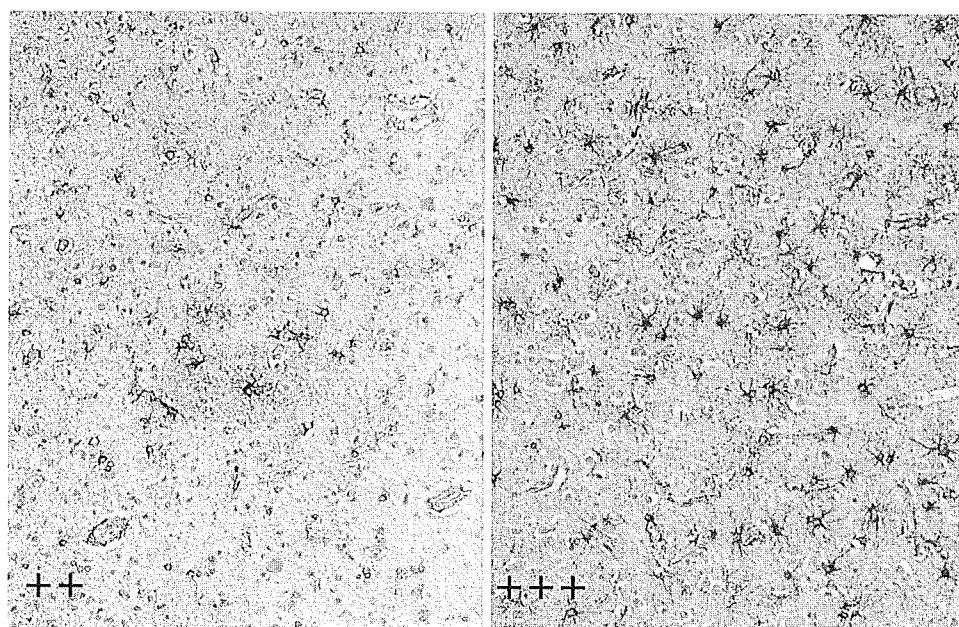


Fig. 2: 大脳皮質におけるGFAP免疫染色。瀰漫性グリオシースが7例(HIVE 5例、No HIVE 2例)でみられた。

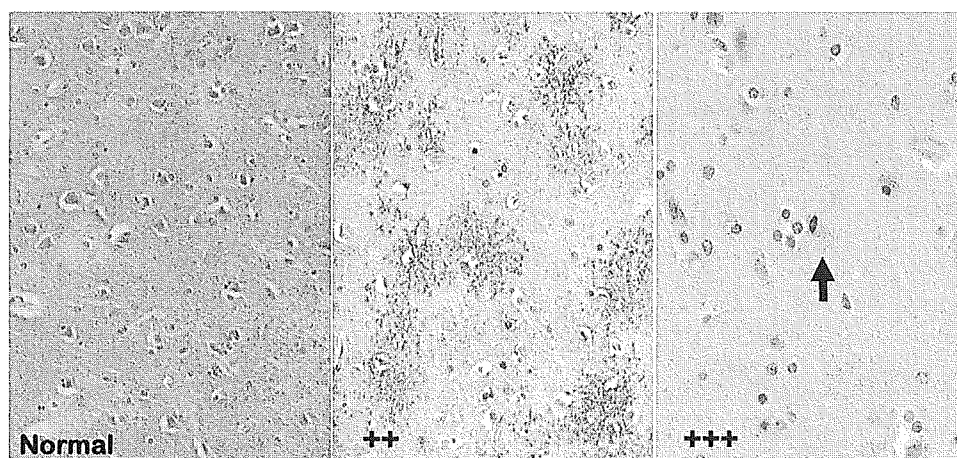


Fig. 3 : 大脳皮質におけるEAAT-2免疫染色。EAAT-2の発現低下が12例(HIVE 7例、No HIVE 5例)でみられた。

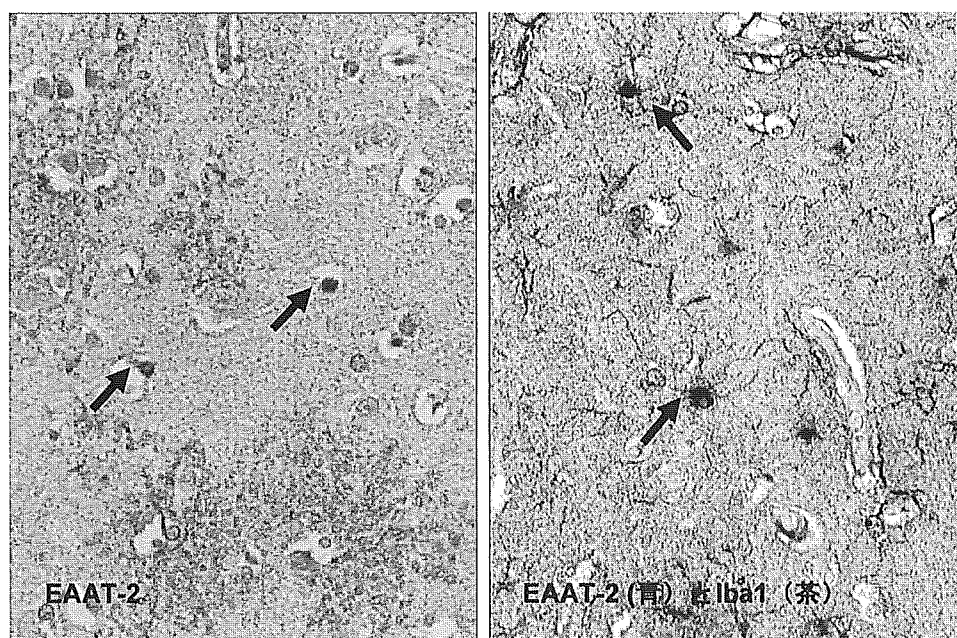


Fig. 4: EAAT-2の発現が低下している部位でIba1陽性ミクログリアの一部はEAAT-2を発現していた。

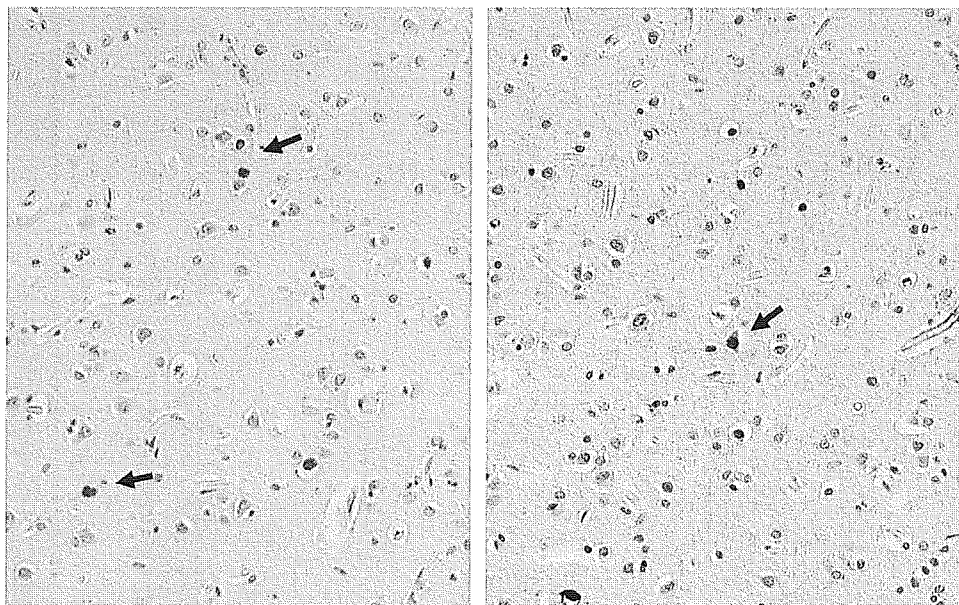


Fig. 5: 大脳皮質におけるApopTaq ISH。Apoptosisは7例（HIVE 6例、No HIVE 1例）で検出された。主にastrocyteで、一部、小型の神経細胞でも陽性であった。

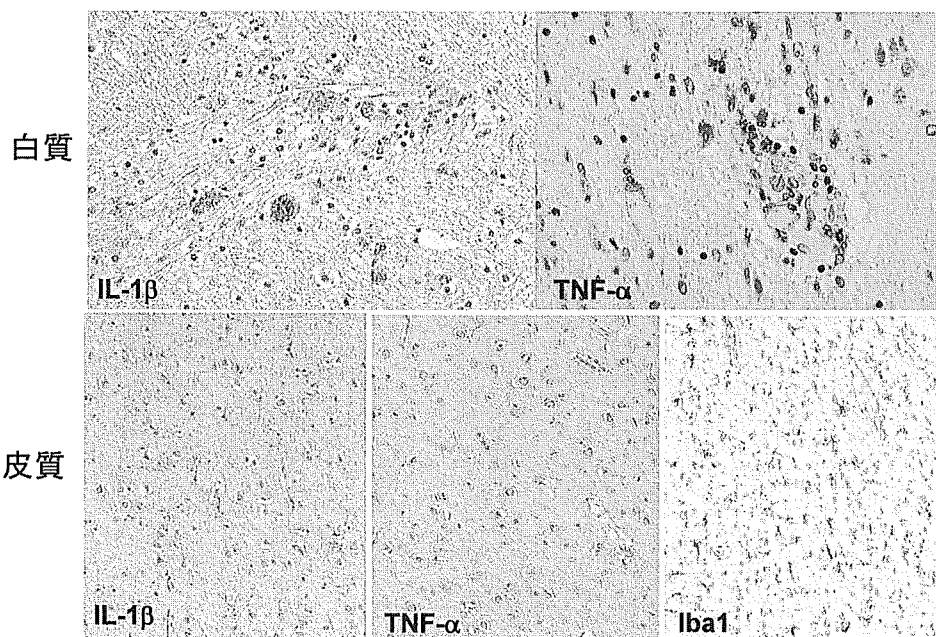


Fig. 6: TNF- α 、IL-1 β の発現とミクログリア活性化との関連。ミクログリアが増生している皮質にはTNF- α 、IL-1 β の発現は見られない。

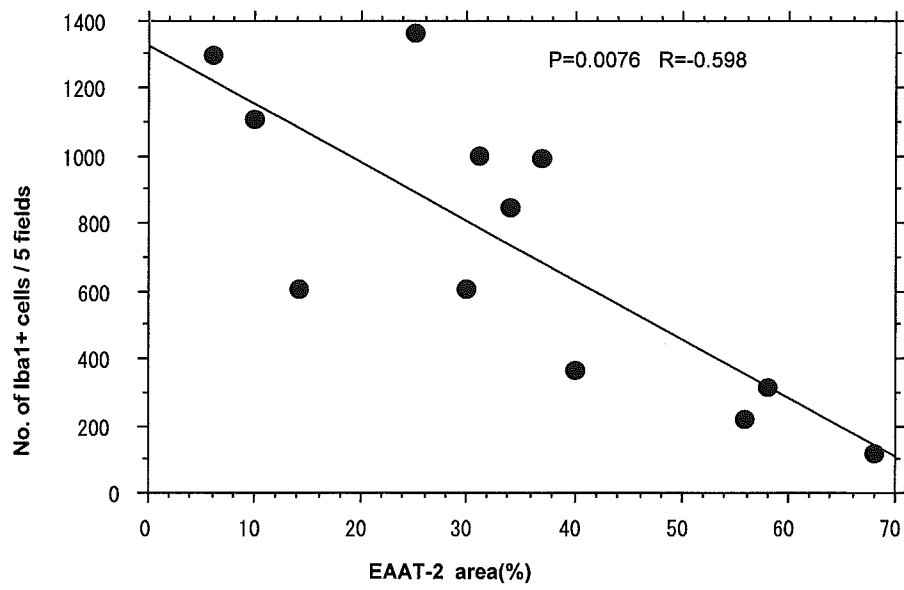


Fig. 7: EAAT-2減少例におけるEAAT-2陽性面積とIba1陽性細胞数

厚生労働省科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
分担研究報告書

HIV-1 感染者中枢神経系における iNOS 発現に関する免疫組織学的検討

研究分担者 船田信頭 東京都立駒込病院病理科部長

研究要旨：HIV 脳症の臨床的重症度は、脳における HIV の量よりも microglia/macrophage の浸潤程度に相関することが報告されており、HIV 以外の因子が神経傷害に関与しているものと考えられる。In vitro の実験では HIV は microglia/macrophage や astrocyte による神経障害作用を示す種々の炎症性作用物質の産生を誘導することが知られている。このような炎症性作用物質のひとつとして nitric oxide (NO) があげられる。NO は抗ウイルス作用を有するとともにその酸化ストレスは Alzheimer 病、筋萎縮性側索硬化症など神経細胞や神経突起の変性・消失がみられる種々の神経変性疾患や脱髄における稀突起膠細胞の傷害にも関与していると考えられている。本研究では、HIV 脳症の発症病態に NO による酸化ストレスが関与している可能性を検証する為に、剖検例を使用して iNOS の発現状態を免疫組織学的に検索した。また、microglia/macrophage の浸潤と iNOS 発現の関連も検討した。対照として HIV 非感染例も同様に検討した。iNOS 陽性細胞は非 HIV 感染例に比較して HIV 脳症例に多数出現していた。HIV 脳症未発症の HIV 感染例では、対照例よりも多くの iNOS 陽性細胞が出現したが、脳症例よりは軽度の例が多かった。また、iNOS 陽性細胞のほとんどは astrocyte であったが、microglia/macrophage にも陽性像が散見された。HIV 脳症例では脳実質に活性化した microglia/macrophage が多数浸潤しており、HIV、活性化 microglia/macrophage の浸潤そして astrocyte における iNOS 発現の間には密な関連があり、NO は抗ウイルス作用とともに一方では神経傷害に関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

HIV 脳症は AIDS の重要な合併症であり、駒込病院における AIDS 剖検例でも約 26% に HIV 脳症の組織学的所見がみられている (1)。1995 年以後の HARRT の出現は脳

症の減少をもたらしたが、生存期間の延長、薬剤耐性の HIV の出現や薬剤そのものによる副作用などにより、HIV 脳症は亜急性疾患からより慢性的で白質障害のめだつ疾患へと変化しているとの指摘があ

り(2)、発症病態の解明は治療に大きく貢献するものである。HIV脳症の臨床的重度は、脳におけるHIVの量よりもmicroglia/macrophageの浸潤程度に相関していることから、HIV以外の因子が神経傷害に関与しているものと考えられる(3)。In vitroの実験ではHIVがmicroglia/macrophageやastrocyteによる神経傷害作用を示す種々の炎症性作用物質の産生が誘導することが知られている。このような炎症性作用物質のひとつとしてnitric oxide (NO)があげられる。NOはnitric oxide synthase (NOS)の活性化で産生が誘導される物質であり、NOSにはneuronal NOS (nNOS)、endothelial NOS (eNOS)、inducible NOS (iNOS)が知られている。正常では、ごく微量のNOは神経伝達物質として作用するが、濃度が高いと神経細胞や乏突起膠細胞に傷害性があり、Alzheimer病、筋萎縮性側索硬化症など神経細胞や神経突起の変性・消失がみられる種々の神経変性疾患や脱髄に関与していると考えられている(4, 5)。そしてアカゲザルによる実験的SIV脳炎でも樹状突起の損傷とiNOS発現増強との関連性が指摘され(6)、また、ヒトでもHIV脳症における認知機能の障害にはシナプスや樹状突起の減少が関連していることから(7)、HIV脳症における灰白質や白質の傷害にNOがかかわっている可能性が考えられる。In vitroでiNOSの発現を検討した研究は多く、intracellular interleukin-1 β (8)、HIV感染単球由来macrophage (9)、HIV-tat(10)、gp120(11)などによりastrocyteのiNOS産生が誘導されるが、ヒト剖検例の脳を使用してiNOS発現を検

討した研究は少ない。また、HIV脳症におけるiNOS発現細胞がmicroglia/macrophageなのかastrocyteなのか、結果も一致していない(12, 13, 14, 15)。本研究では、HIV脳症の発症病態にNOによる酸化ストレスが関与している可能性を検証する為に、剖検例を使用してiNOSの発現状態を免疫組織学的に検索した。また、microglia/macrophageの浸潤とiNOS発現の関連にも検討を加えた。

B. 研究方法

HIV脳症例6例、HIV陽性だが脳症を合併していない症例7例(AIDS発症例4例、AIDS未発症例3例)、対照としてHIV非感染例8例を使用した。剖検例の前頭葉ホルマリン固定、パラフィン包埋材料から4ミクロン切片を作成し、脱パラフィン後1mM EDTA液中で100°C40分間の前処理を実施し、1000倍希釈の抗iNOS/NOS type II抗体(BD Transduction Laboratories)を2時間作用後、elite ABC法で可視化した。症例によってはiNOSとGFAP(DAKO)あるいはIba1(和光純薬)との二重染色を行った。また、microglia/macrophageのマーカーとしてはIba1の他にHLA-DR(DAKO)および中枢神経系の血管周囲に存在し、免疫反応に重要な役割を果たしていると考えられるCD163陽性macrophage(16)に対する抗体(Novocastra Laboratories)も使用した。iNOSの染色結果の判定は白質の陽性細胞で評価した。陽性細胞数および個々の細胞の染色強度を参考に、完全な陰性〜ごく稀に細胞質がわずかに陽性を示すもの

を grade 0、少数の細胞に陽性のものを grade 1、陽性細胞が多く、細胞質が豊富で強く染色されるものを grade 3、grade 1 と 3 の間を grade 2 とした (図 1)。

C. 研究結果

免疫組織学的には、iNOS 陽性細胞は主に白質にび慢性に認められた (図 2)。皮質における陽性細胞は白質よりも弱く反応性も弱いものが主であった (図 3)。特に HIV 脳症例で陽性所見がめだち、5 例を grade 3、1 例を grade 2 と判定した。HIV 陽性であるが脳症の組織像がみられない 7 例では、grade 1 が 2 例 (AIDS 1 例)、grade 2 が 3 例 (AIDS 2 例)、grade 3 が 2 例 (AIDS 1 例) であった (表 1)。非脳症例の grade 3 とした AIDS 1 例では、前頭葉白質には HIV 陽性細胞は認めなかったが、内包に数個の HIV 陽性細胞が確認された。対照群では、grade 0 が 2 例、grade 1 が 4 例、grade 2 が 2 例 (そのうち 1 例は Alzheimer 型痴呆) であった。iNOS 陽性細胞は星形の突起をもっており (図 4)、形態および二重染色により、ほとんどが astrocyte と判断されたが、HIV 脳症では血管周囲の多核および単核細胞にも陽性所見が認められた (図 5)。Microglia/macrophage のマーカーでは、HIV 脳症では全例に HLA-DR、Iba1、CD163 陽性細胞の増加がみとめられ、astrocyte も増生していた (図 6, 7)。少数例では HIV 脳症以外にも Iba1 や HLA-DR 陽性細胞が増生していたが、CD163 陽性 macrophage は対照例を含めて HIV 脳症例以外では、ほとんどの例で血管周囲性に散見される程度であり、白質および皮質の実質内に

CD163 陽性 macrophage が目立つ例はほぼ HIV 脳症に限定していた。

D. 考察

臨床的な脳症の程度は、脳における HIV の量よりも microglia/macrophage の浸潤程度に相関すると報告されており (3)、本研究でも Iba1、HLA-DR、CD163 陽性 microglia/macrophage の浸潤程度は HIV 脳症例でより強く、また、正常では血管周囲性に存在し、抗原の認識、呈示に重要な働きを示していると考えられる CD163 陽性 macrophage (16) が HIV 脳症例で比較的特異的に増加し、白質・皮質の脳実質への浸潤が認められた (17)。免疫染色で確認できる HIV 陽性 microglia/macrophage はこれらの種々の抗体で可視化される microglia/macrophage よりも少ないが、広範な炎症反応が脳に生じていることを示す結果である。In vitro の実験では HIV が microglia/macrophage や astrocyte による種々の炎症性作用物質の産生を誘導されることが報告されている。この炎症性作用物質の一つとして NO があげられる。正常ではごく微量の NO は神経伝達物質として作用するが、NO 濃度に異常があると NO を介した酸化ストレスが組織傷害をもたらす。例えば、Alzheimer 病、筋萎縮性側索硬化症などの神経変性疾患、脱髄など様々な中枢神経系障害に NO が関与することが知られている (4, 5)。また、NO は種々のウイルスに対して抗ウイルス作用も持っている (18)。NO は nitric oxide synthase (NOS) の活性化で合成される物質で、NOS には neuronal NOS (nNOS)、

endothelial NOS (eNOS)、inducible NOS (iNOS)があり、nNOSやeNOSはごく微量のNOの産生を行い、生体の機能維持に重要な役割を果たしている。一方、iNOSは非特異的な生体反応として多量のNOを産生する。本研究では剖検例が検索対象である為、原病、死戦期の状況、剖検までの時間、固定時間など、種々の因子がiNOS免疫染色に影響を及ぼしている可能性を考慮しなければならないが、HIV非感染対照例よりもHIV脳症例においてmicroglia/macrophageの浸潤程度が著しいとともにastrocyteによるiNOS発現がより目立った点は、HIVと活性化されたmicroglia/macrophageそしてastrocyteのiNOS発現との間には密な関連があり、HIV脳症の発症病態にもNOを介した酸化ストレスが重要な役割を果たしていることを示唆するものである。アカゲザルによる実験的SIV脳炎でも樹状突起の損傷とiNOS発現増強との関連性が指摘され(6)、in vivoの実験でも、HIV感染単球由来macrophage、HIV-tatやgp120はastrocyteのiNOSの発現を増強し(9, 10, 11)、また、gp120による神経細胞障害およびastrocyteのiNOS発現は抗酸化剤であるアスコルビン酸で抑制されることが報告されており(11)、本研究結果に矛盾しない。しかし、ヒト剖検例を使用した研究では、HIV脳症におけるiNOS発現細胞はmicroglia/macrophageとする報告(12, 13)とastrocyte(14, 15)とする報告がある。本研究ではHIV脳症では単核および多核macrophageにもiNOS陽性像が確認されたが、Zhaoら(14)およびDugasら(15)の報告と同様に、iNOS陽性

細胞の多くはastrocyteであった。このような研究結果の差異が何によるものであるか不明である。ホルマリン固定の有無、使用した抗体や前処置の違いが関与している可能性も考えられる。Microglia/macrophageが主たる陽性であったRostasyらはパラフィン切片とResearch and Diagnostic社のポリクローナル抗体(12)、Vincentらは凍結切片と本研究と同じTransduction Laboratories社のマウスモノクローナル抗体(13)を使用し、astrocyteが陽性であったZhaoらはパラフィン切片とSanta Cruz Biomedical社のウサギポリクローナル抗体(14)、Dugasらはパラフィン切片とMoncada S博士の作成したウサギポリクローナル抗体(15)を使用しており、染色結果の違いの原因を明確に説明できない。しかし、in vitroでHIV-1 tat proteinがmicrogliaのiNOS発現を増強するという実験報告もあるが(19)、最近のin vitroの実験ではHIV感染macrophage、gp120、tat蛋白はmicrogliaではなくastrocyteのiNOS発現を誘導することを示した報告が多い(9, 10, 11)。本研究結果もiNOSは主にastrocyteに発現しており、その発現程度はHIVの感染したmicroglia/macrophageや活性化されたmicroglia/macrophageの浸潤と密接な関連があることを示唆している。HIV脳症にみられるiNOS発現は神経系に対する傷害とともに抗ウイルス因子として防御的役割を果たしている可能性もある。非HIV感染の場合にもastrocyteが比較的強いiNOS陽性を示す例がみられることは、Zhaoらも記載しており(14)、原病や死戦

期の影響など microglia/macrophage の浸潤とは異なった因子も iNOS 発現には関与していると考えられる。また、HIV 感染者ではあるが脳症未発症例が脳症例と対照例との中間的な結果を示した点は、HIV 感染者では組織学的に脳症の所見が明瞭でなくても少しずつではあるが、持続的に astrocyte の iNOS 発現が upregulate されるような状況が生じている可能性が考えられる。このような iNOS 発現が HIV 感染者にみられる軽微な認知異常と関連しているのか、今回の研究からは臨床的データが不十分であり、不明であった。今後は詳細な神経学的所見を記録し、病理所見と比較検討できる研究環境を構築することが重要な課題である。

E. 結論

iNOS の発現程度は HIV 脳症において強く、HIV 脳症の発症機序に NO を介した神経系障害が関与している可能性が示唆される。HIV 脳症では iNOS 発現細胞は主に astrocyte あり、microglia/macrophage での発現は astrocyte よりも限定的である。

F. 健康危険情報

なし

参考文献

1. 船田信顕、比島恒和、根本哲生、堀口慎一郎、河内洋、岸田修二。東京都立駒込病院における後天性免疫不全症候群 80 剖検例の神経病理学的検討。第 93 回病理学会総会、札幌市、2004 年 6 月 9～11 日
2. Langford TD, Letendre SL, Larrea GJ, Masliah E. Changing patterns in the neuropathogenesis of HIV during the HAART era. *Brain Pathol.* 2003;13:195-210.
3. Glass JD, Fedor H, Wesselingh SL, McArthur JC. Immunocytochemical quantitation of human immunodeficiency virus in the brain: correlations with dementia. *Ann Neurol.* 1995 ;38:755-762.
4. Heneka MT, Wiesinger H, Dumitrescu-Ozimek L, Riederer P, Feinstein DL, Klockgether T. Neuronal and glial coexpression of argininosuccinate synthetase and inducible nitric oxide synthase in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2001;60:906-916.
5. Smith KJ, Kapoor R, Felts PA. Demyelination: the role of reactive oxygen and nitrogen species. *Brain Pathol* 1999;9:69-92.
6. Li Q, Eiden LE, Cavert W, Reinhart TA, Rausch DM, Murray EA, Weihe E, Haase AT. Increased expression of nitric oxide synthase and dendritic injury in simian immunodeficiency virus encephalitis. *J Hum Virol* 1999;2:139-145.
7. Everall IP, Heaton RK, Marcotte TD, Ellis RJ, McCutchan JA, Atkinson JH, Grant I, Mallory M, Masliah E, Group HNRC. Cortical synaptic density is reduced in mild to moderate human

- immunodeficiency virus neurocognitive disorder. *Brain Pathol.* 1999; 9: 209-217.
8. Liu Z, Zhao ML, Brosnan CF, Lee SC. Expression of type II nitric oxide synthase in primary human astrocytes and microglia: role of IL-1 β and IL-1 receptor antagonist. *J Immunol* 1996;157:3569-3576
9. Hori K, Burd PR, Furuke K, Kutza J, Weih KA, Clouse KA. Human immunodeficiency virus-1-infected macrophages induce inducible nitric oxide synthase and nitric oxide (NO) production in astrocytes: astrocytic NO as a possible mediator of neural damage in acquired immunodeficiency syndrome. *Blood* 1999;93:1843-1850.
10. Liu X, Jana M, Dasgupta S, Koka S, He J, Wood C, Pahan K. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) tat induces nitric-oxide synthase in human astroglia. *J Bio Chem.* 2002;277:39312-39319.
11. Walsh KA, Megyesi JF, Wilson JX, Crukley J, Laubach VE, Hammond RR. Antioxidant protection from HIV-1 gp120-induced neuroglial toxicity. *J Neuroinflammation* 2004;1:8.
12. Rostasy K, Monti L, Yiannoutsos C, Kneissl M, Bell J, Kemper TL, Hedreen JC, Navia BA. Human immunodeficiency virus infection, inducible nitric oxide synthase expression, and microglial activation: pathogenetic relationship to the acquired immunodeficiency syndrome dementia complex. *Ann Neurol* 1999;46:207-216.
13. Vincent VA, De Groot CJ, Lucassen PJ, Portegies P, Troost D, Tilders FJ, Van Dam AM. Nitric oxide synthase expression and apoptotic cell death in brains of AIDS and AIDS dementia patients. *AIDS* 1999;13:317-326.
14. Zhao ML, Kim MO, Morgello S, Lee SC. Expression of inducible nitric oxide synthase, interleukin-1 and caspase-1 in HIV-1 encephalitis. *J Neuroimmunol* 2001;115:182-191.
15. Dugas N, Lacroix C, Kilchherr E, Delfraissy JF, Tardieu M. Role of CD23 in astrocytes inflammatory reaction during HIV-1 related encephalitis. *Cytokine* 2001;15:96-107.
16. Fabriek BO, Van Haastert ES, Galea I, Polfliet MM, Dopp ED, Van Den Heuvel MM, Van Den Berg TK, De Groot CJ, Van Der Valk P, Dijkstra CD. CD163-positive perivascular macrophages in the human CNS express molecules for antigen recognition and presentation. *Glia.* 2005;51:297-305.
17. Roberts ES, Masliah E, Fox HS. CD163 identifies a unique population of ramified microglia in HIV encephalitis (HIVE). *J Neuropathol Exp Neurol.* 2004;63:1255-64.
18. Karupiah G, Xie Q-w, Buller RML, Nathan C, Duarte C, MacMicking JD. Inhibition of virus replication by interferon γ -induced nitric oxide synthase. *Science* 1993;261:1445