

第108回日本小児科学会学術集会
教育講演

わが国における HIV/AIDS 医療の現状と課題

静岡県立こども病院血液腫瘍科

三間屋 純 一

キーワード：HIV/AIDS, HAART, 感染爆発, エイズ拠点病院, 国際貢献

はじめに

厚生労働省エイズ動向委員会 2005 年 4 月の報告によると、2004 年のわが国の新規 HIV/AIDS 患者数は過去最高を記録し、前年度の 2 割増となっている。先進国の中で唯一日本のみが右肩上がりの増加となっている。しかも日本の献血者の HIV 抗体陽性率は世界で第一位となっている。わが国での HIV/AIDS 医療は薬害エイズ問題即ち輸入血液凝固因子製剤により HIV 感染した血友病患者に端を発している¹⁾。その感染時期は 1979 年から 1985 年の長期間にわたったと考えられる。この点が諸外国と大きく異なり、その後のわが国における HIV/AIDS 医療におおきな影響を及ぼしてきた。しかし、現在では、新規感染者報告の 80% 以上が性交渉による感染と大きく様変わりしている。本稿では静岡県立こども病院にて 1982 年より HIV/AIDS 診療に携わってきた筆者の経験を紹介しながら²⁾、わが国のエイズ医療の流れ、現状および問題点につき触れることとする。

当院における HIV 感染者/AIDS 医療の推移と現状

当院では 1983 年に血友病患者での細胞性免疫能を OKT4/8 比でみたところ、非加熱凝固因子製剤を使用していた血友病患者群では正常コントロール群に比し明らかに低下していることがわかった (図 1)³⁾。1984 年末にこれら患者群につき、米国より入手した ELISA キットを用い HTLV-III/LAV 抗体 (HIV-1 抗体) を測定したところ当院の血友病患者の 31% に陽性即ち HIV 感染が判明した (図 2)。保存血清につきレトロスベクテブに検索したところ最初の感染例は 1981 年 9 月 (図 3) で、感染時期のピークは 1982 年であった^{4)~11)}。当院における HIV 感染者・AIDS 患者 45 例の内訳 (表 1) は、33 例が血友病患者で、その感染時期は 1981 年から 1985 年にまたがっており、感染時年齢は 16 歳以下の小児期が 20 例、残り 13 例は 16 歳から 25 歳となっている。血友病患者でのエイズ死亡例は 3 例のみで、その他の死亡原因は HCV に起因する肝がん、肝硬変によるものとなっている。12 例は既に感染

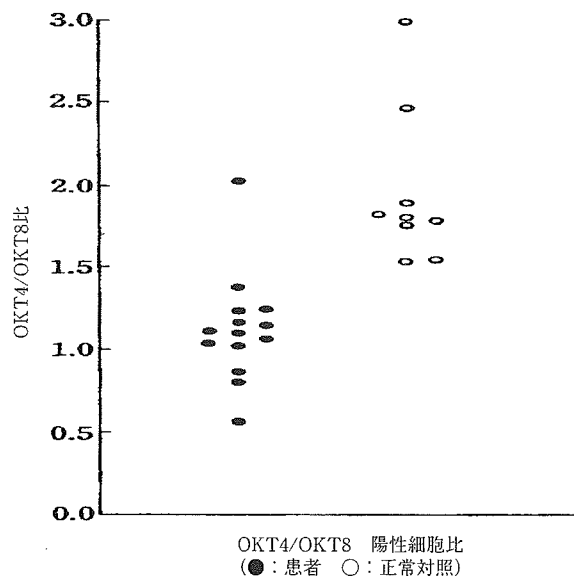


図 1 血友病と免疫異常—静岡県立こども病院—
小児内科 25(1) : 177—180, 1984

から 23 年を経過しているが、1997 年 HAART (Highly Active Antiretroviral Therapy) の導入により、現在もエイズ発症はみられていない。内 3 例は 23 年間無治療のいわゆる長期未発症例^{12)~14)}である。一方、非血友病患者 12 例の感染経路は同性間性的接触 4 例、異性間性的接触 8 例でいずれも感染時年齢は 25 歳以上である。これらの患者はいずれも血液センターならびに保健所のエイズ検査で陽性となり、当院へ確認検査、カウンセリングおよびエイズ発症予防治療目的での紹介である。現在は県内エイズ拠点病院と連携しながらフォローしている。

わが国の HIV 感染者・AIDS 患者発生動向

わが国では非加熱凝固因子製剤を使用した血友病患者の約半数が HIV に感染し、最初の感染例は 1979 年で、感染のピークは 1982 年から 1983 年であることが、筆者が委員長をつとめた 1991 年厚生省 HIV 感染者発症・予防に関する研究班 NH 委員会調査で報告されている^{15)~19)} (図 4)。血友病の感染者総数は 1,428 名で、

2004 月末時点で 851 名が生存し, 577 名が既に死亡している²⁰⁾(表 2)。

これら非加熱凝固因子製剤による血友病患者などの感染例をのぞくと, 日本国内での HIV/AIDS は年々増加傾向(図 5)をしめし, 累計で 2004 年末の HIV 感染者 6,527 名, エイズ患者数は 3,250 名となっている。

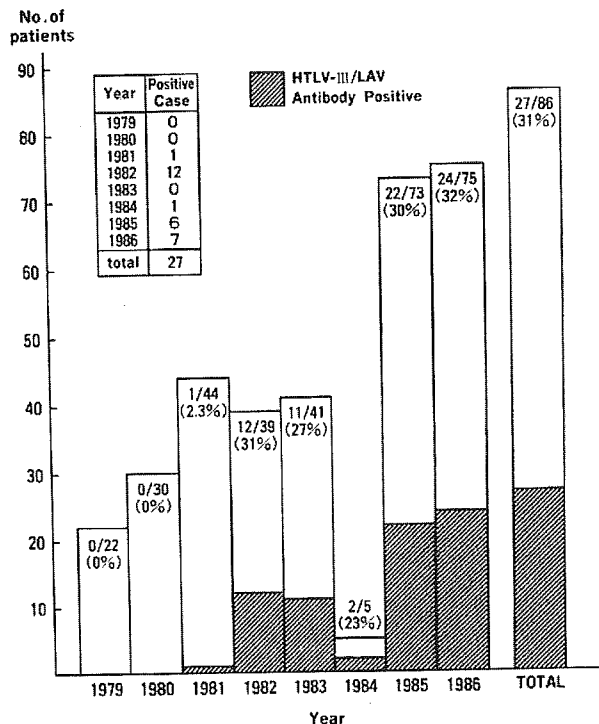


図 2 Percentage by year of HTLV-III/LAV Antibody Positive Hemophiliacs (1979~1986) — Shizuoka Children's Hospital —

2004 年のエイズ発生動向年報²¹⁾をみると, 1996 年以降増加が続き, 2004 年の 1 年間だけで新規 HIV/AIDS は過去最高の 1,165 名である。感染経路は性的接触によるものが 86% をしめている。日本国籍の異性間性的

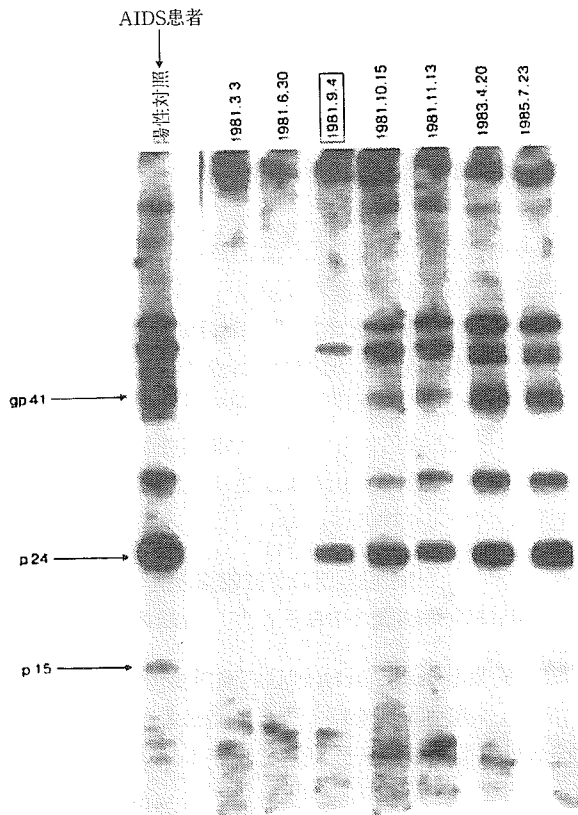


図 3 Western Blotting (Strip radiommuoassay) 血友病 A (20 歳) 男性

表 1 当院における HIV 感染者・AIDS 患者 45 例の内訳

1) 感染経路	
凝固因子感染 (血友病)	33 例
同性間性的接触	4 例
異性間性的接触	8 例 (含む女性 3 名)
2) 感染期間	
1981 ~ 1985 年	33 例 (血友病)
不明	12 例
3) 感染時年齢	
16 歳以下	20 例 (現在全例 20 歳以上)
16 歳 ~ 25 歳	13 例
25 歳以上	12 例 (性的接触)
4) HIV 臨床ステージ	
AC	18 例
ARC	15 例 (死亡 6 例)
AIDS	8 例 (死亡 6 例)
不明	4 例
5) 経過観察期間	
1 年 ~ 24 年 (2005 年 3 月末現在)	

—静岡県立こども病院—

接触による HIV 感染者の特徴をみると、15 歳～24 歳では他の年齢層とは対照的に女性の感染者が過半数を占めている。地域別にみると東京都、関東甲信越が多く、2004 年の報告では全国の 6 割をしめているが、他の地域からの報告も増加している。厚生労働省エイズ動向委員会では、同性間および異性間の性感染防止や、早期発見、早期治療に向けた積極的な対策をこうじなければならないとの見解を出しているにもかかわらず、行政のエイズ関連予算は年々削られており、このままでは増加傾向に歯止めを掛ける事は困難であろう。

国連合同エイズ計画 (UNAIDS) は 2005 年 7 月 1 日、日本の HIV 感染者が 1 万 2 千人に達したと報じている。日本では一般人のエイズに関する関心が低く、エイズ知識が不足し、感染者が社会から阻害されていること等から「急速な全国的な蔓延は十分に起こり得るだろう」と指摘している。その結果、緊急にエイズ対策を抗じないと、2010 年には 5 万に達するであろうと警告している。

**HIV 感染症の早期診断法
(HIV 抗体検査と PCR 法^{22)~24)} の流れと現状**

HIV 感染の早期診断は HIV 抗体検査を受けることである。各医療機関で行うことは出来るが、基本的には全国の保健所で無料、匿名で受けるシステムとなっ

ている。ただし抗体検査で陽性反応が出るまでには 3 週から 6 カ月かかる。即ち感染してから抗体陽性になるまでの期間を「ウインドウ・ペリオド」と呼び、こ

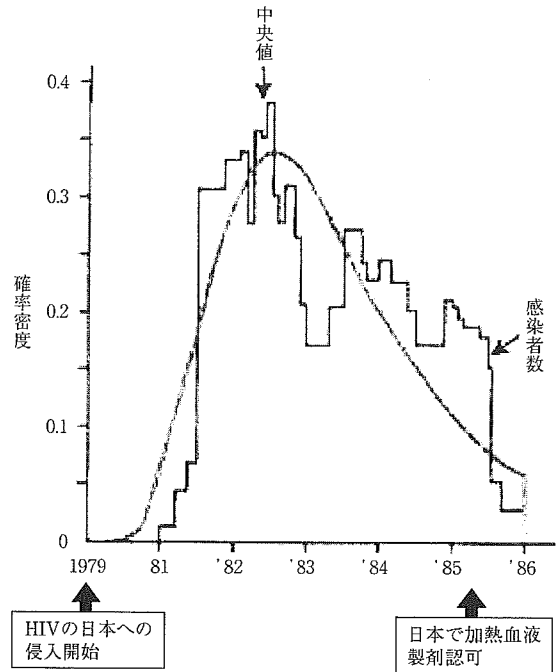


図 4 1991 年厚生省 HIV 感染者発症・予防に関する研究班 NH 委員会報告 (三間屋) 日本の血友病における HIV 感染の時期 (年次別)

表 2 日本全国における血液凝固異常症総数

(厚生労働省委託事業：血液凝固異常症全国調査)

	血友病 A	血友病 B	vWD	類縁疾患	小計
HIV 非感染生存	3,294	677	757	350	5,078
(男性)	3,274	672	347	191	4,484
(女性)	20	5	410	159	594
HIV 感染生存	644	195	7	5	851
(男性)	644	195	2	2	843
(女性)	0	0	5	3	8
HIV 非感染・感染生存合計	3,938	872	764	355	5,929
(男性)	3,918	867	349	193	5,327
(女性)	20	5	415	162	602
AIDS 発症 (生存)	123	40	2	0	165
(男性)	123	40	0	0	163
(女性)	0	0	2	0	2
HIV 感染死亡 (累積)	441	128	1	7	577
(男性)	439	126	1	5	571
(女性)	2	2	0	2	6
HIV 感染総数 (生存および累積死亡)	1,085	323	8	12	1,428
(男性)	1,083	321	3	7	1,414
(女性)	2	2	5	5	14

vWD : von Willebrand 病

AIDS 発症：治療により症状が消失したり、検査所見が改善したものも含む

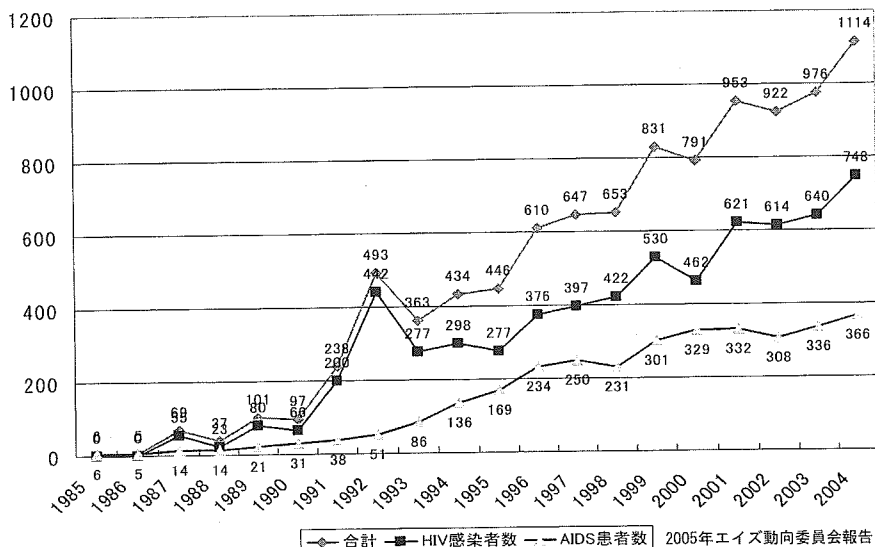


図5 日本の HIV 感染者数, AIDS 患者数

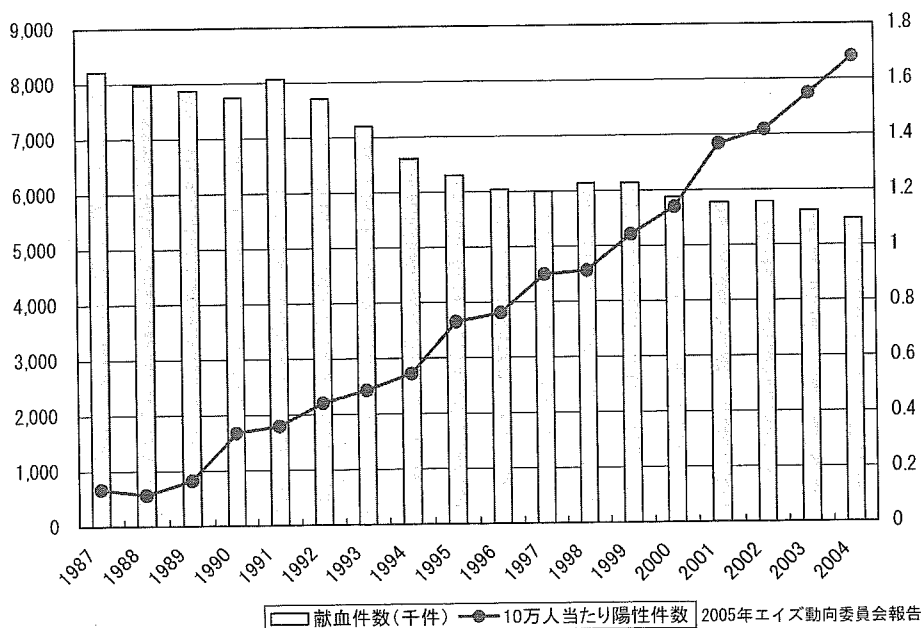


図6 献血件数及び HIV 抗体・核酸増幅検査陽性件数

の時期には例え感染していても抗体検査のみでは陽性反応は出ない。このウインドウ・ピリオドでの感染リスクをなるべく少なくする為、日本赤十字血液センターでは献血ドナーの HIV スクリーニングとして PCR (核酸増幅検査) を 1999 年より導入している。ちなみに 2004 年には 10 万件当りの抗体陽性件数は 1.681 とこれまた過去最高 (図 6) で、その陽性率は世界で第一位と深刻な状況にある。1993 年に当院の HIV 血友病患者での PCR による HIV-RNA の経時的検討では抗体陽性になる前に PCR で陽性になる例 (表 3:

YM) が存在する事を報告している⁽⁶⁾⁽⁷⁾⁽¹¹⁾⁽²⁵⁾⁽²⁶⁾。本年 1995 年 7 月 1 日より全国の一部保健所では迅速検査即ち検査当日に結果が判明するクロマト法：ダイナスクリーン HIV-1/2 が導入されている。陽性例には追加検査として PA 法を行い、更にウエスタンブロットにて確認検査を行う (図 7)。これらの検査体制に伴ない保健所での対応、即ち検査前、検査後のカウンセリング体制の見なおしと、医療期間との連携が更に重要な課題となる。

表3 プロウイルス DNA および血清 RNA の検出結果

—Seroconversion 前後における RT-PCR 検討症例—

症例	病期	検査日	DNA-PCR			RT-PCR gag	HIV Ab	CD4 (μ l)	CD4/CD8 (比)	p24 Ab (%)	p24 Ag (C.I.)
			gag	env	pol						
1	AC ARC	79年 5月				-	-				
		79年 12月				-	-				
		81年 12月				-	-				
		82年 7月				+	+				
		89年 12月	(+)	+	-		+	373	0.6		
		90年 3月	(+)	+	-		+	316	0.47	99	0.43
		90年 6月	(+)	+	-	+	+	261	0.40	100	0.36
90年 7月					+						
2	AC	79年 2月				-	-				
		82年 5月				-	-				
		82年 11月				-	-				
		85年 1月				-	+	233	0.36		
		85年 5月				-	+	261	0.31		
		86年 4月				+	+	318	0.32		
		89年 11月	+	+	+		+	479	0.37	102	0.39
		90年 3月	+	+	+		+	408	0.46		
90年 7月	+	+	+	+	+	321	0.46	102	0.31		
3	AC	81年 3月				-	-				
		81年 10月				-	-				
		82年 2月				-	+			101	0.46
		89年 12月	+	+	-		+	423	0.49		
		90年 6月	+	+	+	+	+	759	0.32		
4	AC	81年 3月				-	-				
		81年 9月				-	+				
		81年 10月				+	+				
		86年 6月				-	+	252	0.51		
		89年 12月	+	+	+	(+)	+	266	0.41	65	0.92
		90年 6月	+	+	+	+	+	208	0.31	101	1.12
※ 5	AC	80年 1月				-	-				
		82年 1月				(+)	-				
		82年 6月				(+)	+				
		89年 12月	+	-	-		+	337	0.40		
		90年 2月	+	-	-		+	269	0.49		
		90年 7月	+	-	-	(+)	+	332	0.40	101	0.43

(+) は Two-step PCR を行い検出されたことを示す。

—静岡県立こども病院—

※ウィンドウ・ペリオド：抗体陰性時期に PCR で陽性となった例。

HIV/AIDS 治療 HAART の進歩と問題点

HIV 感染症・AIDS の治療は 1996 年 Highly Active Antiretroviral Therapy の導入により AIDS 発症を阻止し、AIDS による死亡を激減させた。実際 HAART を開始すると HIV-RNA 数は 50 コピー以下に抑制され、細胞性免疫能の指標である CD4 数の上昇をみとめるようになる。当院での経験でも 1997 年 HIV/AIDS 9 例に AZT+ddc+PI を使用したところ有効性がみられた²⁷⁾ (図 8)。現在では HAART の開始時期は以前の基準より緩やかとなっている (図 9, 表 4)。即ち無症

状の症例の場合には HIV-RNA 量 50,000 コピー以上又は CD4 細胞数 350 以下となっている。この変更の理由としては早期治療により逆に患者の QOL が様々な短期、長期の薬剤副作用により低下し、その為アドヒアランス不良となり薬剤耐性を引き起こす例が増加したためである。現在わが国で使用可能な抗エイズ薬は 1987 年 AZT が開発されて以来 23 種類をかぞえているが (表 5)、初回治療として数種類の組み合わせが推奨されている²⁸⁾²⁹⁾ (表 6)。最近では抗ウイルス効果のみでなく、患者の社会生活を視野に置いた服薬率の改善³⁰⁾ならびにリポジストロフィー³¹⁾など長期有害事象

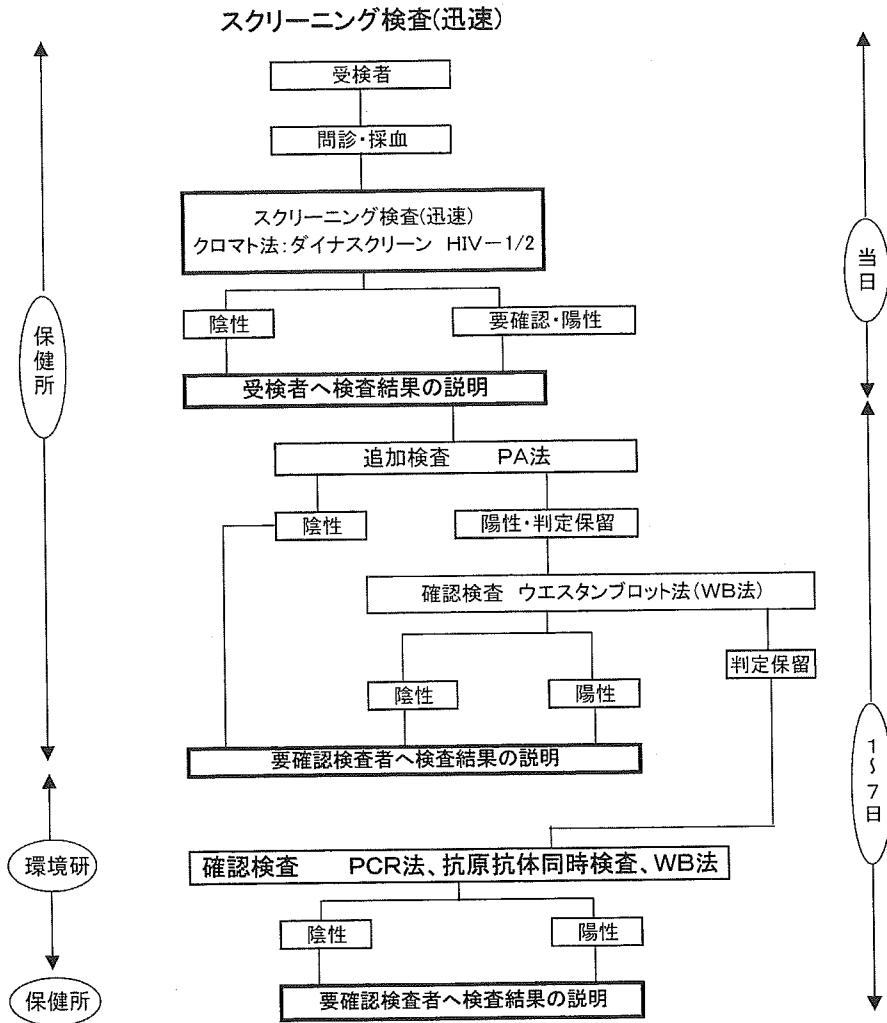
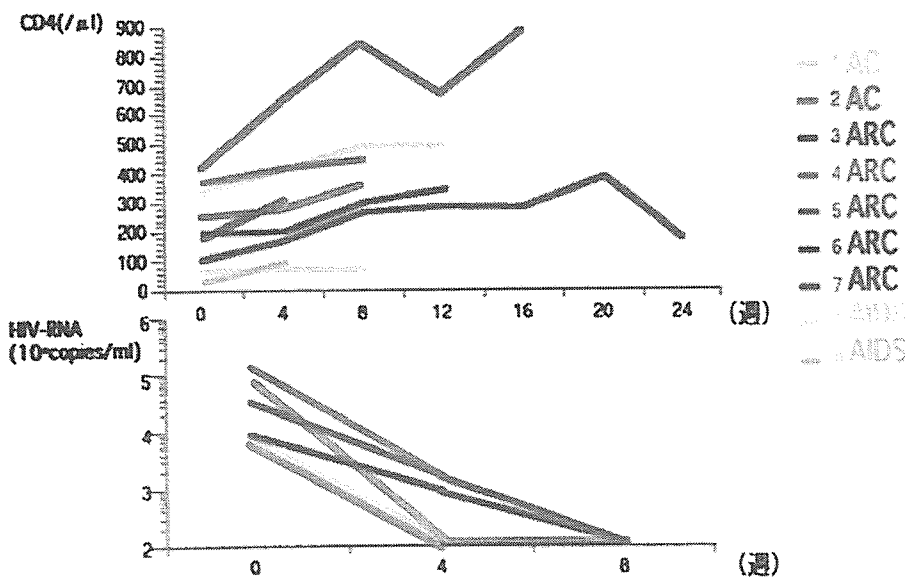


図7 HIV抗体検査におけるフローチャート(静岡県)



—静岡県立こども病院—

図8 当院における HIV 患者・感染症 9 例における AZT + ddC + Protease Inhibitor カクテル療法 (1997 年)

の軽減を目的とした1日1回の服用ですむ薬剤の選択が増えつつある。

わが国における HIV 母子感染の現状と予防対策

わが国での小児 HIV/AIDS 即ち母子感染例の報告はわずか47名であるが、世界的にはその生存者数は220万人にのぼり、1994年の新規小児 HIV・AIDSは64万人でその殆どは感染妊婦からの垂直感染によるものである。その感染経路は子宮内、産道、母乳によるものでありこれらに対する経路を断つことが母子感染の予防ということになる²⁸⁾³²⁾。子宮内感染に対しては妊婦に対する AZT や NVP などの抗 HIV 薬の投与、分娩中の AZT の点滴、産道感染予防は計画的帝王切開、乳児に対しては出産後の AZT 予防内服および母乳禁止等の方法を、妊婦の HIV-RNA 量を考慮しながら選択する³³⁾。これにより母子感染はほぼ防止する

事が出来る(表7)。1994年母子感染に関する厚生労働省研究班：分担研究「HIV 感染妊婦より出生した児の実態調査とその解析班」班長である大阪市立総合医療センターの外川の調査結果内容を見ると、全国1,706施設からの回答では、感染妊婦からの出生は248例で、感染児は40例、非感染児174例、未確定・不明が34例となっている。その内、予定帝王切開と抗エイズ薬を併用した群では母子感染率は1%以下に抑えられている(図10)。こうした事実からも妊婦の HIV 抗体スクリーニング検査は極めて重要となる。地域により妊婦の HIV 抗体検査受診率に大きな隔りがあることは大きな問題であろう。ただし、HIV 抗体検査を行うにあたっては患者自身の承諾をうることが法的に定められている。

HIV/AIDS カウンセリングのノウハウ
—当院における告知の経験から

HIV/AIDS 診療におけるカウンセリングは臨床現場において患者感染者へのインフォームド・コンセント同様欠くことの出来ないものである。筆者は1982年米国滞在中に血友病患者でのエイズ患者の存在をはじめて知った。その後1984年に当院の患者で感染者の存在がわかり、患者家族にどの様に伝えるか悩んだ。1985年当時、実際に筆者が告知をした HIV 感染血友病患者・家族が様々な悩みを持つ事を知った(表8)。その悩みの内容を参考に「HIV 感染を患者家族へ告知する上での留意点」と題して静岡県立こども病院血友病相談センター指針(表9)を提示した。本指針はこれからの新規感染者にも適応されるものと考えている。

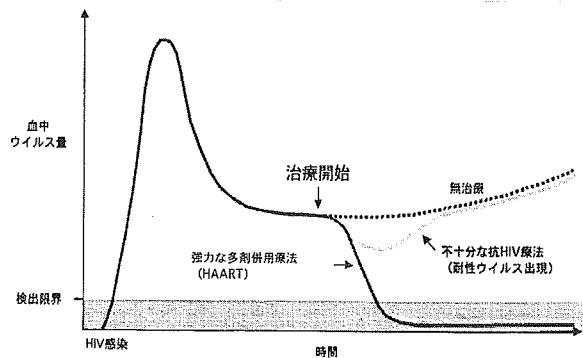


図9 Highly Active Antiretroviral Therapy による Viral load の推移

表4 未治療成人患者に対する抗 HIV 療法の開始基準 (推奨) (『治療の手引き<第8版>』)

臨床症状*がある場合		
治療開始に際し考慮すべき項目		推奨
CD4 陽性リンパ球数・血中ウイルス量の数値にかかわらず		治療開始
臨床症状*がない場合		
CD4 陽性リンパ球数 (/mm ³)	治療開始に際し考慮すべき項目	推奨
< 200		治療開始
200 ~ 350	CD4 陽性リンパ球数の減少速度が速い場合** 血中ウイルス量が高い場合** 上記以外の場合	積極的に治療開始を考慮*** 治療開始を考慮****
> 350		経過観察*****

* : AIDS および AIDS に関連する重篤な症状
 ** : CD4 陽性リンパ球数の減少速度 : > 100/mm³/年の場合を速いとする
 血中ウイルス量 : 10 万コピー/mL 以下を低い、それ以上を高いと考える
 *** : 患者の状態、服薬アドヒアランスへの意識理解度、副作用および薬物相互作用なども考慮する
 **** : 血中ウイルス量 (10 万コピー/mL 以下を低い、それ以上を高いと考える) が低ければ 3~4 カ月に 1 回程度の検査で経過観察を行い、血中ウイルス量が高ければ頻回 (1~2 カ月に 1 回程度) 検査を行う

表5 日本で承認されている抗 HIV 薬 (2005年3月時点)

分類	一般名	略号	商品名	承認年月	食事の影響	重要な副作用
NRTI	ジドブジン	AZT (ZDV)	レトロビル	1987年9月	なし	食欲不振, 貧血, 骨髄抑制
	ジダノシン	ddI	ヴァイデックス	1992年6月	食間	嘔気・嘔吐, 倦怠感, 頭痛
			ヴァイデックス EC	2001年3月	食間	嘔気・嘔吐, 倦怠感, 頭痛
	ザルシタピン	ddC	ハイビット	1996年4月	なし	末梢神経障害, 膵炎, 口内炎
	ラミブジン	3TC	エビビル	1997年2月	なし	食欲不振
	サニルブジン	d4T	ゼリット	1997年7月	なし	末梢神経障害, 膵炎
	ジドブジン・ ラミブジン配合剤	AZT/ 3TC	コンビビル	1999年6月	なし	食欲不振, 貧血, 骨髄抑制
	アバカビル	ABC	ザイアジェン	1999年9月	なし	過敏症
	テノホビル	TDF	ビリアド	2004年4月	なし	消化器系症状
	アバカビル・ ラミブジン配合剤	ABC/ 3TC	エプジコム	2004年12月	なし	過敏症
エムトリシタピン	FTC	エムトリバ	2005年4月	なし	下痢, 浮動性めまい, 悪心	
エムトリシタピン/ テノホビル	FTC/ TDF	ツルバダ	2005年4月	なし	下痢, 浮動性めまい, 悪心	
NNRTI	ネビラピン	NVP	ビラミューン	1998年11月	なし	発疹, 中毒性表皮壊死症, 皮膚粘膜眼症候群
	エファビレンツ	EFV	ストックリン	1999年9月	なし	発疹, 眩暈, 集中力障害
	デラビルジン	DLV	レスクリプター	2000年2月	なし	発疹, 頭痛, 肝機能障害
PI	インジナビル	IDV	クリキシバン	1997年3月	空腹時	腎石症, 嘔気・嘔吐, 腎不全
	サキナビル	SQV- HGC SQV- SGC	インビラーゼ	1997年9月	食後2時間以内	消化管障害, 頭痛, 肝機能障害
			フォートベイス	2000年4月	食事中または 食後2時間以内	消化管障害, 頭痛, 肝機能障害
	リトナビル	RTV	ノービア (リキッド)	1998年9月	食後	嘔気・嘔吐, 下痢, 食欲不振
			ノービア (ソフトカプセル)	1999年8月	食後	嘔気・嘔吐, 下痢, 食欲不振
	ネルフィナビル アンプレナビル	NFV APV	ピラセプト	1998年3月	食後	下痢, 発疹, 脱力感
			プローゼ	1999年9月	なし	悪心, 下痢・軟便, 発疹
	ロピナビル・ リトナビル配合剤	LPV/ RTV	カレトラ	2000年12月	食後	下痢, 嘔気・嘔吐, 肝機能障害
	アタザナビル	ATV	レイアタツ	2003年12月	食事中または 食直後	間接ビリルビン血症, PR 間隔延長
ホスアンプレナビル	FPV	レクシヴァ	2004年12月	なし	皮疹, 下痢, 嘔気・ 嘔吐	

「各分類の複数の抗 HIV 薬に見られる副作用」乳酸アシドーシス・脂肪肝・ギラン・バレー症候群様症状 (NRTI), 肝機能障害, 高血糖・糖尿病 (PI), リポジストロフィー/体脂肪分布異常・高脂血症, 出血傾向 (PI), 骨壊死・骨減少症・骨粗鬆症, 発疹

エイズ拠点病院の役割と現状

現在わが国には国立国際医療センターエイズ治療・研究センターを核としてブロック拠点病院が8施設 (図11)あり, その他地域エイズ拠点病院が358施設あるが, 東京, 大阪, 名古屋などの一部の拠点病院に患者が集中している反面, 患者感染者の経験のない拠点病院が多数あり, 明らかな2極化がすすんでいる³¹⁾.

都市圏には地方からの患者感染者もきており, 地域の拠点としての役割を担っていない状況にあり, 拠点病院の見なおしが迫られている. 以前, 筆者は日本エイズ学会で拠点病院の診療担当医師の役割につき院内の受け入れ体制, カウンセリングの必要性, 地域との連携につき提言してきた (表10). その他, 医療面では1998年4月1日より施行された免疫機能障害における身体障害者手帳の申請を行い, 厚生医療制度により

表6 初回療法として推奨される多剤併用療法 (『治療の手引き<第8版>』)
 好ましい組合せ…臨床試験によって有効性と効果の持続性、忍容性、使いやすさなどが示された治療法 (Preferred)
 代替の組合せ…臨床試験によって有効性が示されているものの、抗ウイルス効果の強さや持続性、忍容性、使いやすさなどの点で次善の治療法 (Alternative)

推奨度		NNRTI, PI または NRTI	NRTI				
NNRTI + NRTI 併用療法 NNRTI 1剤 + NRTI 2剤	好ましい組合せ	EFV (妊娠や妊娠の可能性のある女性を除く)	+	3TC または FT	+	AZT または TD	
	代替の組合せ	EFV (妊娠や妊娠の可能性のある女性を除く) NVP	+	3TC または FT	+	ABC または ddi または d4T AZT または ABC または d4T または ddi または TDF	
PI + NRTI 併用療法 PI 1剤または 2剤* + NRTI 2剤 * PI 1剤 + 低用量 RTV	好ましい組合せ	LPV/RTV	+	3TC または FT	+	AZT	
	代替の組合せ	ATV				AZT または ABC または d4T または ddi TDF	
		ATV + RTV					
		FPV FPV + RTV IDV + RTV NFV SQV_SGC または SQV_HGC + RTV LPV/RTV	+	3TC または FT	+	AZT または ABC または TDF または d4T または ddi	
NRTI 3剤 併用療法 NRTI 併用, PI 併用療法の 代替療法として 治療開始前の血中ウイルス量 < 100,000 コピー/ml の 患者で開始してはならない	代替の組合せ	ABC	+	3TC	+	AZT	

NRTI: 核酸系逆転写酵素阻害薬, NNRTI: 非核酸系逆転写酵素阻害薬, PI: プロテアーゼ阻害薬

表7 母子感染予防・治療の目標と指針

- 1) 血中ウイルス量が低い場合は、AZT 単独療法を考慮する。
- 2) 妊娠 14 週から分娩まで妊産婦に AZT を経口投与し、36～37 週前後（陣痛発来前、破水前）に選択的帝王切開を施行する。なお、帝王切開 3 時間前から AZT を静注するべきと考えている専門医もいる。
- 3) 新生児には出生後なるべく早期（生後 6 時間）より AZT シロップ 2 mg/kg を 6 時間毎、6 週間投与する。
- 4) AZT を投与しても血中ウイルス量が高値を維持する例や上昇する例には併用療法を行う。
- 5) 併用薬を選択する場合には、特に母子に対する影響、胎盤の移行性や、薬物相互作用などについても考慮する。
- 6) 血中ウイルス量が高値を示す例では、AZT 単独療法に替え最初から多剤併用療法を行うことを考慮する。
- 7) 母乳には、ウイルスやウイルス感染細胞が含まれている可能性があるため、新生児には母乳を与えず、人工栄養とする。

抗 HIV 治療ガイドライン（平成 16 年度）
HIV 感染症の医療体制の整備に関する研究班

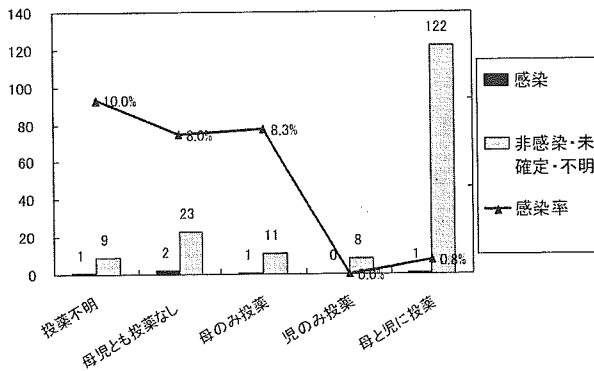


図 10 予定 C/S-ART 別感染率
外川正生：第 12 回静岡エイズシンポジウム/2005, 3, 26

医療費が免除されることも患者に情報提供しなければならない。今後わが国における患者感染者の増加に伴わない地域拠点病院の役割はさらに大きくなるであろう。改めて筆者の提言の趣旨を理解し、院内での診療体制の確立、HAART などの治療技術の習得をして戴ければ幸いである。

世界における ARV の供給状況とワクチン開発の意義

HAART の導入により HIV 感染症は慢性のウイルス感染症へ変貌した。世界的に見ると、開発途上国における抗レトロウイルス薬（ARV）へのアクセスは大幅に増えている。世界保健機関（WHO）と UNAIDS の最新報告によると、この 18 カ月間で倍以上に増え、ARV にアクセスできている人の数は 40 万から 100 万

表 8 告知を受けた HIV 感染血友病患者・家族の悩み
—1985 年—

- 1) 発症の恐怖—死の恐怖
単なる風邪症状をも全て発症と結びつけ、心が休まらない。
 - 2) 社会からの隔離—孤独感
恋人を作れない。結婚ができないのでは。どうしても自分で身を引いてしまう。
性生活の悩み、キス程度ならいいのか。
同僚ならびに親戚に知られ、家族に迷惑をかけてしまうのでは。
 - 3) 子どもの将来への絶望感（感染者の両親の場合）
 - 4) 加熱血液凝固因子製剤への不安を拭えない。
 - 5) 性交渉をもった女性への対応に悩む。—検査を受けさせるべきか否か。
- （静岡県立子ども病院血友病相談センター）

表 9 HIV 感染を患者・家族へ告知する上での留意点
—1985 年—

- 1) 患者または家族が強く希望し、主治医との信頼関係が保たれている。
希望しない時の対応は？—その中身についてよく考えることが先決。
 - 2) エイズに対する正しい知識をもっていること、および理解力があること。
抗体陽性の意味を詳しく説明する。
感染経路、感染力および消毒法について、
発症のリスクについて（すべて発症するわけではないことも）。
発症予防および治療について現在行われていることと将来展望について。
 - 3) 告知後の支援体制がととのっていること。
主治医、看護婦、カウンセラー、HIV 感染者、友人（および家族）。
患者に相談者の選択の自由と機会をあたえる。
 - 4) プレカウンセリングの必要性あり。
エイズに対する正しい知識や告知の必要性を説明する。
 - 5) 抗体検査の告知とエイズ発症の告知とは異なる。
- （静岡県立子ども病院血友病相談センター指針）

人になっている。WHO および UNAIDS が掲げた、2005 年末までに 300 万人の治療へのアクセスを保障するという目標、すなわち「3×5（スリー・バイ・ファイブ）目標」を達成するのは困難とされている。世界で ARV を必要としている人々のうち 6 人に 1 人にしか ARV が行き届いていない現状すなわち 500 万人への対応がせまられている。実際 ARV 治療を受けられない人々は、世界で 20 カ国に集中しており、インドでは全体の 10% しか ARV が供給されておらず、そのため 70 万の人が治療を受けることなく死亡する可能性があるといわれている。この点から、エイズを根絶す

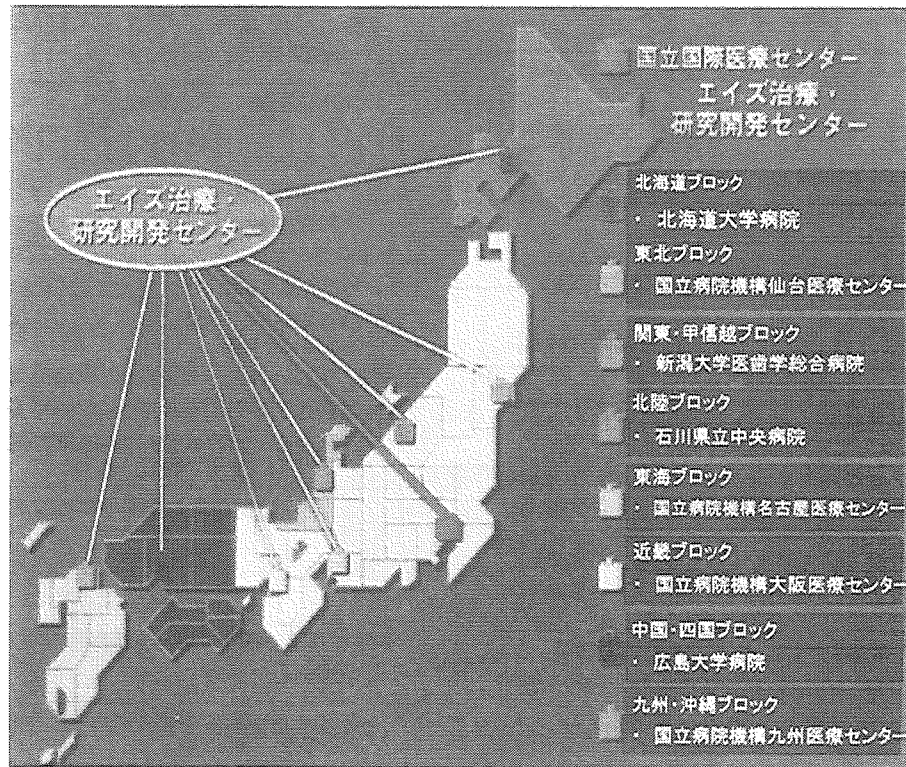


図 11 エイズ医療体制診療ネットワーク

表 10 地域エイズ拠点病院への提言 (三間屋純一)

- 1) 常日頃より院内において医療従事者の HIV およびエイズに対する正しい知識の教育と患者・感染者に対してソフト面での受け入れ体制を整備しておく
特に拠点病院においては必須である
- 2) 告知前カウンセリング
患者・感染者の HIV およびエイズに対する認識度の把握を行う
- 3) 病名告知
患者・感染者の立場を理解した慎重なものでなければならない
告知後のフォローを円滑に進める為にも、出来ればナースやカウンセラーに同席してもらう
- 4) 患者・感染者に対し HIV およびエイズに対する正しい医学知識と最新情報の提供を行う
- 5) 患者・感染者に本人の現在の病状を詳しく説明し、今後の治療方針を提示する
- 6) 告知後の診療面および心理面での支援体制の確立
院内各診療科へ出向き患者背景を説明し診療の協力を要請する
co-medical へ精神面での援助とプライバシーの保護を依頼する
患者・感染者の希望があれば近医療機関や他の患者およびボランティア団体を紹介する

るためにはワクチンの開発が急務となる。現在世界では4千万人以上の人々が HIV とともに生活し、毎日1万4千人の人が新たに感染しているといわれている。現行の予防対策と治療プログラムを拡充することは当然であるが、同時に、新たな予防技術の開発を迫られている。その意味でも、予防ワクチンの開発こそが、エイズ流行とそれに付随する莫大な被害を食い止め

る、もっとも有効な長期的対策である。現在、30以上のワクチン候補が臨床試験に進んでいる。国際エイズワクチン推進構想 (IAVI) は1996年に設立された国際的な非営利・非政府組織で、HIVの感染とエイズ発症を予防するワクチンの開発促進を目指して活動している。エイズワクチン開発には途上国との連携が重要で、IAVIはアフリカやアジアの研究者とともに、ウイル

表 11 共同研究者

◆静岡県立こども病院
血液腫瘍科
殿内力, 豊田恭徳, 堀越泰雄, 高嶋能文, 西尾信博, 奈良妙美
臨床病理科
杉山武喜子, 山崎あけみ, 藪田明弘, 塚本道子, 高原勝行
指導相談室
紅林洋子, 大久保俊夫
薬剤部
鈴木宗代, 坂本達一郎, 鈴木貴也
看護部
黒木久美子, 河野芳子, 平野友子, 加藤富久子, 土居泰子, 高橋定子, 富永智栄子
歯科
加藤光剛, 松浦芳子
◆静岡県立大学 薬学部
川端寛樹, 内藤博敬, 森田全
◆熊本大学医学部 第二内科
服部俊夫, 高月清
◆東京医科大学 臨床病理科
池松正次郎, 羽田雅夫, 福武勝幸
◆聖マリアンナ医科大学 小児科
山田兼雄, 目黒嵩, 立浪忍, 瀧正志
◆国立感染症研究所エイズ研究センター
中永和枝, 吉原なみ子
◆山梨医科大学 微生物学
照沼裕, とう学文

(所属は研究当時)

スの異なるサブタイプの見られる途上国向けに, 安全, 効果的で安価に製造できるワクチン開発に向け研究を重ねている。日本の研究者もアフリカやタイの研究者と協力し, ワクチンの臨床試験を行っているところである。

おわりに—日本の役割

本年7月神戸で開かれた第7回アジア・太平洋地域エイズ会議²⁴⁾²⁵⁾の場で, 国際社会より, このまま日本は沈黙をまもり, 本国における HIV 感染拡大の防止の必要性の事実をひたすら覆い隠し, 近い将来くるであろう感染爆発を見守るのか? と危惧されている。この指摘に対し, これまで以上に積極的予防対策を講じ, 国民ひとり, ひとりがこのエイズ問題を自分自身の問題として真剣に考える時期にきているのではないだろうか。また, 本会議で UNAIDS の事務局長 Peter Piot 氏は日本の AIDS 対策として, 先ず国内のエイズ予防策を強化し, 教育を徹底し, エイズ問題をオープンに話せる環境造りが最も大切であると提言している。また同時にアジアで唯一の G8 の一員である日本はエイズ問題においても世界的なリーダーシップ, 特に財政支援の面での役割を担うことを期待しているとのコメントがなされている。この点に関しては, 本年6月に

東京で開催された世界エイズ・結核・マラリア対策基金のシンポジウムにおいて小泉首相は, 基金に対して従来の 3.27 億米ドルに加え, 新たに 5 億米ドルの追加資金の拠出を誓約している。このような資金面での国際貢献は非常に大切なことであるが, 世界は一つの共同体であることを認識し, エイズが人間の尊厳に関わる問題であり, 社会の根源に関わる重大な問題であり, さらに世界各地での流行拡大が日本にも影響を及ぼすという認識を持ち, 先ず第1に自分たち日本人自身の足元を固める事を最優先しなければならない。その為には行政, 医療機関, マスコミ, NGO などの民間団体がタッグを組んで再度対策を見なおすべきであろう。

文 献

- 1) 三間屋純一, 福武勝幸, 西田恭治, 他. HIV 感染症と血友病—回顧と展望—. 日本エイズ学会誌 2005; 7: 61—76.
- 2) 三間屋純一. 会長講演「1982年より臨床現場においてエイズ診療と研究を通して感じたこと」. 日本エイズ学会誌 2004; 6: 75—77.
- 3) 殿内 力, 小島勢二, 三間屋純一, 他. 血友病と免疫異常. 小児科 1984; 25: 177—180.
- 4) 三間屋純一, 殿内 力, 豊田恭徳, 他. 静岡県下における血友病患者の HTLV-III 汚染時期に関する検討. 医学のあゆみ 1985; 135: 573—574.

- 5) Mimaya J, et al. Retrospective study of seropositivity of HIV and immunity of Japanese Hemophiliacs. Pro 5th Int Symp 1986 ; 265—274.
- 6) 堀越泰雄, 市川正孝, 殿内 力, 他. HIV 感染血友病患者における DNA-PCR および RT-PCR 法によるプロウイルスおよびゲノム RNA の検出. 臨床血液 1993 ; 34 : 620—627.
- 7) Morita T, Kawabata K, Mimaya J, et al. Time-course detection of HIV-1 proviral DNA and genomic RNA by polymerase chain reaction in sera from seropositive and seronegative hemophiliacs treated with clotting factor concentrates. Int J Hemat 1993 ; 8 : 225—232.
- 8) 三間屋純一, 他. AIDS および関連疾患—感染から発症までの臨床経過. 病理と臨床 1993 ; 11 : 331—342.
- 9) 三間屋純一. HIV 感染症の病態と臨床—臨床経過と追跡マーカー—. 臨床血液 1995 ; 36 : 424—434.
- 10) 三間屋純一. 血友病と HIV 感染の現状. 医学のあゆみ 1996 ; 176 : 7—11.
- 11) Naito H, Mimaya J, Horikoshi Y, et al. Quantitative Defection of HIV-1 RNA by PCR and Use as a Prognostic Marker and for Evaluating Antiretroviral Therapy. Biol Pharm Bull 1997 ; 20 : 1317—1320.
- 12) 三間屋純一. AIDS の治療—長期未発症例. 臨床科学 1997 ; 33 : 43—48.
- 13) 三間屋純一. HIV 感染における Long-term non-progressor. 血液・免疫・腫瘍 1998 ; 3 : 41—48.
- 14) 三間屋純一, 目黒 嵩, 根岸昌功, 他. National History 委員会報告—長期未発症例の実態調査結果と CD4 200cells/ μ l 以下の症例の予後を中心に—厚生省平成 7 年度 HIV 感染者発症予防・治療に関する研究班報告書. 1995.
- 15) 三間屋純一, 目黒 嵩, 立浪 忍, 他. HIV 感染者の長期予後に関するコホート研究. 厚生省 HIV 感染者発症予防・治療に関する研究班. 平成元年年度研究報告書. 1989 : 13—23.
- 16) 三間屋純一, 目黒 嵩, 立浪 忍, 他. Natural History 委員会研究報告. 厚生省 HIV 感染者発症予防・治療に関する研究班. 平成 2 年度研究報告書. 1990 : 9—16.
- 17) 三間屋純一, 目黒 嵩, 立浪 忍, 他. Natural History 委員会研究報告. 厚生省 HIV 感染者発症予防・治療に関する研究班. 平成 3 年度研究報告書. 1991 : 9—16.
- 18) 三間屋純一, 目黒 嵩, 立浪 忍, 他. Natural History 委員会研究報告. 厚生省 HIV 感染者発症予防・治療に関する研究班. 平成 4 年度研究報告書. 1992 : 9—16.
- 19) 三間屋純一, 目黒 嵩, 立浪 忍, 他. Natural History 委員会研究報告. 厚生省 HIV 感染者発症予防・治療に関する研究班. 平成 5 年度研究報告書. 1994 : 37—45.
- 20) 血液凝固異常症全国調査運営委員会 (瀧 正志, 立浪 忍, 白幡 聡, 三間屋純一, 他). 血液凝固異常症全国調査. 平成 16 年度報告書. 1995 年 4 月.
- 21) 2004 年 (平成 16 年) エイズ発生動向年報. 厚生労働省エイズ動向委員会. 平成 17 年 4 月 25 日.
- 22) 三間屋純一, 他. HIV-1 感染血友病患者における HIV-1 抗原 (p24) と HIV-1 抗体 (gp41, p24) の経時的観察. 臨床血液 1988 ; 29 : 795—801.
- 23) 三間屋純一, 他. 感染から発症までの臨床経過. 病理と臨床—臨時増刊号 1993 ; 11 : 331—342.
- 24) 三間屋純一, 他. HIV 感染症・AIDS. 血中 P24 抗原検出法. 日本臨床 1993 ; 51 : 211—224.
- 25) 森田 全, 他. HIV 感染症・AIDS. 血中 HIV-RNA 検出法. 日本臨床 1993 ; 51 : 284—289.
- 26) 堀越泰雄, 三間屋純一, 他. HIV 感染症・AIDS. 感染細胞におけるプロウイルス DNA の検出法. 日本臨床 1993 ; 51 : 290—298.
- 27) 高嶋能文, 三間屋純一, 他. HIV 患者・感染者に対するプロテアーゼ阻害剤を含む抗 HIV 剤多剤併用療法の効果—長期投与例も含めて—. 臨床とウイルス 1998 ; 26 : 24—31.
- 28) HIV 感染症治療研究会 (木村 哲, 満屋裕明). HIV 感染症『治療の手引き』第 8 版, 2004 年 12 月. <http://www.hivjp.org/>
- 29) 中村哲也, 他. 抗 HIV 治療ガイドライン 平成 16 年度研究報告書—厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業省. HIV 感染症の医療体制に関する研究班. 2005 年 3 月.
- 30) 白坂琢磨, 他. 多剤併用療法服薬の精神的, 身体的負担軽減のための研究班. 平成 16 年度研究報告書—厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業. 2005 年 3 月.
- 31) 高嶋能文, 三間屋純一, 他. d4T, 3TC, 内服中に buffalo hump を認めた HIV 感染血友病の一例. 日本エイズ学会誌 2000 ; 2 : 8—14.
- 32) 三間屋純一. 総説—小児の HIV 感染症. 日小血会誌 1997 ; 9 : 135—146.
- 33) Working Group on Antiretroviral Therapy. National Pediatric HIV Resource Center. Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in Pediatric HIV Infection ; March 24, 2005.
- 34) 木村 哲, 他. HIV 感染症の医療体制の整備に関する研究. 平成 16 年度研究報告書—厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業. 2005 年 3 月.
- 35) 7th ICAAP News : Friday 1 ~ Monday 4, July 2005. Kobe.



CD24 is expressed specifically in the nucleus pulposus of intervertebral discs

Nobuyuki Fujita^{a,b,1}, Takeshi Miyamoto^{a,b,*,1}, Jun-ichi Imai^c, Naobumi Hosogane^{a,b}, Toru Suzuki^{a,b}, Mitsuru Yagi^{a,b}, Kozo Morita^{a,b}, Ken Ninomiya^{a,b}, Kana Miyamoto^{a,d}, Hironari Takaishi^b, Morio Matsumoto^b, Hideo Morioka^b, Hiroo Yabe^b, Kazuhiro Chiba^b, Shinya Watanabe^c, Yoshiaki Toyama^b, Toshio Suda^{a,*}

^a Department of Cell Differentiation, The Sakaguchi Laboratory, Japan

^b Department of Orthopedic Surgery, Keio University School of Medicine, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan

^c Department of Clinical Informatics, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8519, Japan

^d Department of Medicine and Biosystemic Science, Graduate School of Medicine, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Fukuoka 812-8582, Japan

Received 8 October 2005

Available online 10 November 2005

Abstract

Intervertebral disc (IVD) consists of a soft gelatinous material in its center, the nucleus pulposus (NP), bounded peripherally by fibrocartilage, annulus fibrosus (AF). Despite the number of patients with IVD degeneration, gene expression analysis has not been undertaken in NP and therefore little is known about the molecular markers expressed in NP. Here, we undertook a microarray screen in NP with the other nine tissues to identify the specific cell surface markers for NP. Five membrane associating molecules out of 10,490 genes were identified as highly expressing genes in NP compared with the other tissues. Among them, we identified CD24, a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor protein as a cell surface marker for NP. CD24 expression was also detected in the herniated NP and chordoma, a malignant primary tumor derived from notochordal cells, while it was absent in chondrosarcoma. Therefore, CD24 is a molecular marker for NP as well as the diseases of IVD.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Intervertebral disc; Nucleus pulposus; CD24

Intervertebral disc (IVD) degeneration and concomitant herniation are the distinguishing anatomical features associated with lumbar disc disease (LDD). The molecular mechanisms leading to the onset of IVD degeneration are not well understood. Recent genetic studies in humans and mice indicate that genetic factors play an important role in the etiology and pathogenesis associated with LDD [1–3].

The IVD is composed of two discrete components termed the nucleus pulposus (NP) and the annulus fibrosus

(AF). The interior structure, NP, is a soft gelatinous avascular cartilage-like tissue, derived from notochord, containing extracellular matrix proteins (ECM) rich in large proteoglycans such as aggrecan and collagens. ECM proteins play a central role in chondrocyte metabolism through regulation of growth factors and appear to be crucial for maintaining IVD homeostasis and integrity [4,5]. A recent genetic study demonstrated the role of cartilage intermediate layer protein (CILP), an ECM that acts as a modulator of LDD susceptibility through deregulation of TGFβ signaling [3].

The AF, a fibrous cartilage composed of an inner and outer coaxial lamella, is bound to the periphery of the NP. The onset of degenerative disc disease is marked by mechanical stress-induced apoptosis in the AF resulting

* Corresponding authors. Fax: +81 3 5363 3475.

E-mail addresses: miyamoto@sc.itc.keio.ac.jp (T. Miyamoto), sudato@sc.itc.keio.ac.jp (T. Suda).

¹ These authors contributed equally to this work.

in degeneration and disruption of the outer disc tissue leading to herniation of the NP [6]. This sequelae of events is consistent with the susceptibility to LDD associated with aggrecan and collagen mutations that compromise the response of IVD cells to injury [1,2].

To further delineate the mechanism of NP function in IVD degeneration, we performed a microarray screening and cluster analysis to identify cell factors that were expressed specifically in NP tissue. Based on previous findings about the properties and function of NP cells, we screened several different tissues for comparison in our microarray analysis. These tissues include: avascular tissues such as AF and tendon, mesenchymal tissues such as skeletal muscle, skin, bone, AF, and tendon; and neurogenic tissues including spinal cord and brain. We found that expression of a heat-stable antigen termed CD24, a glycosylphosphatidylinositol-anchored cell surface protein, was upregulated in NP cells in a tissue specific manner.

CD24 is expressed in neurons, preB cells, T cells, and several cancer cells [7–10]. It also functions in differentiation and activation of granulocytes and B lymphocytes [11]. CD24 deficient mice show no gross physical or behavioral abnormalities, however the homeostatic proliferation of CD24 deficient T cells is reduced indicating that CD24 may be involved in cell proliferation [12].

In this study, we found that CD24 was high in NP and was detected in herniated NP tissue. We also determined CD24 expression was upregulated in chordoma, a malignant primary tumor derived from notochord cells. In contrast, we were unable to detect CD24 expression in chondrosarcoma, malignant tumors derived from mesenchymal cells.

Materials and methods

Microarray analysis. Total RNA was extracted and pooled from 10 different tissues including NP, AF, tendon, skeletal muscle, spinal cord, brain, skin, bone, bone marrow, and peripheral blood of 8-week-old male Wistar rats using TRIzol Reagent (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). To ensure a sufficient amount of Poly(A)⁺ RNA for screening, we pooled NP, AF, and tendon tissue from 50 rats. For the remaining tissues, we pooled tissue from 10 rats. Synthetic polynucleotides (80-mers) representing 11,464 rat transcripts derived from 10,490 independent genes (MicroDiagnostic, Tokyo, Japan) were arrayed with a custom-made arrayer. Two micrograms of poly(A)⁺ RNA was labeled with cyanine 5-dUTP or cyanine 3-dUTP. Hybridization and subsequent washes of arrays were performed with a Labeling & Hybridization Kit (MicroDiagnostic). Hybridization signals were measured with a GenePix 4000A scanner (Axon Instruments, Union City, CA) and then processed into primary expression ratios (ratios of cyanine 5-intensity obtained from each sample to cyanine 3-intensity obtained from the rat common reference RNA), which are indicated as 'median of ratios' by the GenePix Pro 3.0 software (Axon Instruments). Normalization was performed for the median of ratios by multiplying normalization factors calculated for each feature on a microarray by the GenePix Pro 3.0 software. The expression ratios were converted into log₂ values as final expression ratios.

Animals. All animals were purchased from Japan Crea (Tokyo, Japan) or born and kept under pathogen-free conditions, and cared for in accordance with the guidelines of Keio University School of Medicine.

Rat hernia model. Posterior herniations were created between the 5th and 10th tail IVD of 8-week-old male Wistar rats. After a posterior

incision above the IVD was made, the soft tissues such as posterior tendons and ligaments were separated. Then, a small incision was made in AF with subsequent compression between an upper and lower vertebral body to prepare a posterior herniation. Seven days after surgery, rats were sacrificed and the herniated discs with vertebral bodies were removed. For preparation of an IVD section, freshly isolated IVDs were embedded in rat minced liver and frozen using 2-methylbutane (Wako, Osaka, Japan) and liquid nitrogen. Frozen sections of IVD, that had not been decalcified, were obtained using a cryostat (MICROME, model HM505) equipped with a tungsten carbide knife.

Human samples. For the experimental use of the surgical samples, informed consents were obtained from the patients according to the Hospital Ethical Guideline (Keio Hospital #15-52). Specimens of seven chordomas and seven chondrosarcomas diagnosed according to conventional criteria, and three IVD tissues dissected from scoliosis patients as normal IVD were fixed in 4% paraformaldehyde/PBS, embedded in paraffin, and 4 μm sections were cut.

Cell harvest and flow cytometric analysis. NP and AF cells were macroscopically dissected from the cervical, thoracic, and lumbar IVD of 8-week-old male Wistar rats. NP tissue was digested with pronase E (0.04%) (SERVA, Heidelberg, Germany) for 1 h at 37 °C and then collagenase P (0.025%) (Roche Diagnosis), for 1 h at 37 °C. To isolate AF cells, AF tissue was treated with pronase E (0.4%) for 1 h at 37 °C, followed by collagenase P (0.025%) for 4 h at 37 °C. Cells were then washed with DMEM/F12 medium (Invitrogen, Carlsbad, CA) containing fetal bovine serum (5%) (Equitech-Bio, Kerrville, TX).

Cells were stained with anti-rat CD24 (clone HIS50, BD Pharmingen, San Diego, CA) followed by FITC-conjugated anti-mouse IgG (Biosource, Camarillo, CA). Flow cytometry and cell sorting was performed using FACS Vantage or FACS Calibur (Becton–Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA). NP and AF cells were also stained with May–Gruenwald–Giemsa.

Immunohistochemical analysis. Rat IVD were dissected from 8-week-old Wistar rats, fixed in formalin (10%), embedded in paraffin, and cut into 4 μm sections. Deparaffinized sections of paraffin embedded samples or cryosections of rat herniated IVD were stained with anti-rat CD24 (HIS50, BD Pharmingen, San Diego, CA, diluted 100-fold) followed by FITC-conjugated anti-mouse IgG (Biosource, Camarillo, CA, diluted 200-fold) and TOTO3 (Invitrogen, diluted 750-fold) for nuclear staining. Antigen retrieval was achieved on chordomas and chondrosarcoma sections by pressure-cooking in citrate buffer (pH 6.0) for 20 min. Samples were then stained with anti-human CD24 (Ab-2, clone 24C02, Neomarkers, Fremont, CA diluted 100-fold) followed by Alexa Fluor488-conjugated anti-mouse IgG (Molecular Probes, Oregon, USA, diluted 100-fold). Immunoreactivity was detected by fluorescence microscopy (Olympus, Tokyo, Japan).

Real-time RT-PCR assay. Total RNA was extracted from NP, AF, patella tendon, peripheral blood, tibia bone, bone marrow, brain, lens, musculus quadriceps femoris, back skins, spinal cord, white adipose tissue, articular cartilage of femur head, and medial collateral ligaments from the knees of 8-week-old male rats (RNeasy mini kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) or Trizol (Invitrogen)). First strand cDNA was prepared using the first strand synthesis kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instruction, and cDNAs were amplified using a Light Cycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche diagnostics) in a Light Cycler Quick System (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Relative mRNA expression levels are shown by comparison with β-actin mRNA expression. The primers used are shown below:

5'-rat β-actin 5'-TCCTAGCACCATGAAGATC-3',
 3'-rat β-actin 5'-AAACGCAGCTCAGTAACAG-3'
 5'-rat CD24 5'-TGCTTCTGGCACTGCTCCTAC-3'
 3'-rat CD24 5'-GGTGGTAGCATTAGTTGGATTGG-3'
 5'-human β-actin 5'-CGTGACATTAAGGAGAAGC-3'
 3'-human β-actin 5'-GGAGTTGAAGGTAGTTTCG-3'
 5'-human CD24 5'-GCACTGCTCCTACCCACGCAGATTT-3'
 3'-human CD24 5'-GCCTTGGTGGTGGCATTAGTTGGAT-3'

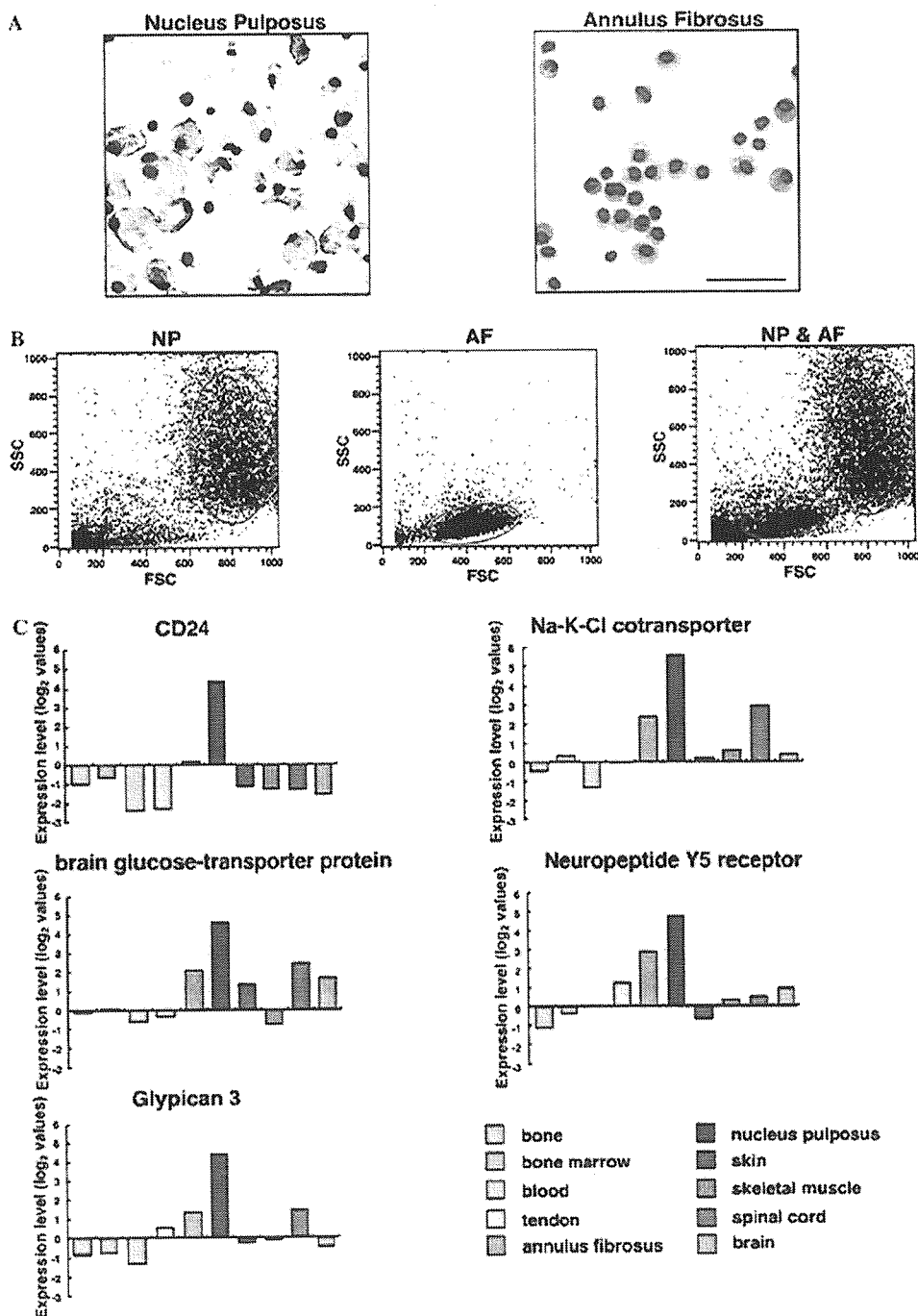


Fig. 1. Identification of NP specific cell surface molecules. Nucleus pulposus (NP) and annulus fibrosus (AF) were isolated from 8-week-old male rat IVD, and their morphology was examined by May-Grunwald-Giemsa staining (A) and flow cytometric analysis (B). Bar = 100 μ m. Red and blue circles represent the NP and AF population, respectively. (C) Ten different tissues, including NP and AF, were dissected from 8-week-old male rats, and DNA array hybridization and cluster analysis were performed. Five genes were identified that were expressed highly in NP cells when compared with the other nine tissues.

Results

Identification of NP specific cell factors

To identify cell factors expressed specifically in NP cells, we performed a comparative microarray analysis of 10,490

genes in NP and AF cells, and in cells isolated from tendon, skeletal muscle, spinal cord, brain, skin, bone, bone marrow, and peripheral blood of 8-week-old male Wistar rats. We isolated NP and AF tissues from lumbar, thoracic, and cervical IVD from more than 50 rats, and pooled tissue samples prior to isolation of poly(A)⁺ RNA. Fig. 1 shows May-Grunwald-Giemsa staining (Fig. 1A), and flow cyto-

metric analysis (Fig. 1B) of cells isolated from NP and AF tissues. As expected, NP cells had a larger cytoplasm (FSC) and a more complex structure (SSC) when compared to AF cells. We isolated the eight other tissues including tendon, skeletal muscle, spinal cord, brain, skin, bone, bone marrow and peripheral blood from 10 rats, and pooled samples from each tissue. Poly(A)⁺ RNA was isolated under protease-free conditions to prevent degradation and ensure that we screened a representative pool of poly(A)⁺ RNA that accurately reflected the levels of expression in cells.

In this report, we focused our efforts on identifying an NP specific cell surface marker that could be utilized to further characterize NP cells. To that end, we chose five cell surface proteins that were specifically expressed at a high level in NP but not in AF cells, or the eight cell types we analyzed (Table 1 and Fig. 1C). These cell factors included: CD24 antigen (NM_012752), Na–K–Cl co-transporter (AF051561), brain glucose-transporter protein (M13979), neuropeptide Y5 receptor (NM_012869), and Glypican 3 (NM_012774). We selected one of the five candidate genes, CD24, for further study since, of the five genes identified, it had the highest level of specific expression in NP cells.

CD24 expression is elevated in NP cells in a tissue specific manner

To determine the relative level of expression of these genes in NP tissue, we used a semi-quantitative real-time PCR assay to determine mRNA expression in NP and AF cells, and the various cell types used in our screen (Fig. 2A). In this experiment we also examined the expression level of CD24 in three additional mesenchymal tissues: white adipose tissue (WAT), articular cartilage, and liga-

ment cells. Our results confirmed that CD24 is specifically expressed in NP cells and that the level of expression was elevated by approximately 4-fold when compared to AF cells. We detected a very low level of CD24 expression in skin and tendon cells, and virtually no expression in the rest of the tissues we examined. We also used a commercially available CD24 antibody to confirm tissue specific expression of CD24 in NP cells using flow cytometry (Fig. 2B), and immunohistochemistry (Fig. 2C). Our results demonstrate that, based on the tissues we examined, CD24 is expressed specifically in NP cells. In addition, CD24 is a useful cell surface marker for identifying NP cells. We have also detected CD24 expression in human NP cells by RT-PCR and immunohistochemical analysis (data not shown).

CD24 is expressed in herniated NP tissue

To further investigate the role of CD24 in IVD disease, we analyzed CD24 expression in a rat model that recapitulates the pathological conditions associated with IVD disease in vivo. Posterior lumbar herniations were created between the 5th and 10th tail IVD. We were able to distinguish herniated protrusions (H) and intact NP (N) (see upper panels Fig. 3). CD24 expression was detected in the herniated protrusion as well as in the remaining NP tissue (lower panels Fig. 3). This result suggests that CD24 may also function in herniated NP tissue.

CD24 is expressed in chordoma cells

Chordoma, a primary malignant tumor of the skeleton, is considered to develop from a remnant of notochordal cells. Chordoma develops mostly in the sacrum region in

Table 1
Microarray identification of highly expressed genes in NP

Accession No.	Tissue									
	Bone	Bone marrow	Blood	Tendon	AF	NP	Skin	Muscle	Spinal cord	Tendon
NM_053518	0.2714	-0.1943	1.4249	0.5499	2.6595	6.3545	-0.2362	-0.6552	0.5039	0.9848
D45920	2.0607	4.421	0	1.6991	1.4552	6.1639	0	0.2857	4.0969	3.1089
AB020019	0.3696	0.2314	1.4082	0.5281	1.8984	5.8966	-0.4461	-0.1219	0.2485	0.585
M13518	0.5917	-0.3147	0.1648	1.542	5.5938	5.8456	-0.1047	-0.484	-0.394	-0.5564
AF051561	-0.454	0.308	-1.3364	-0.0484	2.3934	5.5614	0.2029	0.5763	2.9445	0.3896
NM_031140	1.3829	-0.456	-0.3808	2.6318	1.9309	5.3232	1.0545	-0.255	1.4942	-1.462
XM_217890	0.546	0.9298	0.514	-0.1345	1.301	5.1885	0.5772	0.519	0.4823	0.6012
X62952	1.107	0.5685	-0.8651	2.0374	1.6327	5.0932	0.8891	-0.7298	1.111	-2.0233
AA684960	-0.5951	-0.8135	-0.1959	4.0923	3.3176	4.8973	1.9355	-0.0816	-0.7346	-0.9214
AA686870	-1.9546	-3.2934	-2.7959	4.0689	3.2575	4.886	1.782	-1.2447	-1.7859	-2.0116
AA685376	-0.9828	-1.3808	-0.873	4.1059	2.9635	4.8324	1.9419	-0.0425	-1.152	-1.0262
NM_012869	-1.1392	-0.3696	0.037	1.2284	2.8584	4.7459	-0.6873	0.3208	0.4772	0.9161
AA684929	-0.8034	-0.8288	-0.0499	4.1048	3.2363	4.6141	1.9942	0.0468	-0.9828	-1.0954
M13979	-0.1187	0.0676	-0.606	-0.3364	2.0895	4.5972	1.3437	-0.7984	2.4354	1.6713
NM_012880	2.3417	-4.2379	-4.6439	0.1519	3.4848	4.4875	-3.8783	-4.7959	1.9452	-3.5395
NM_012774	-0.8494	-0.7735	-1.3004	0.514	1.3374	4.4059	-0.2934	-0.1584	1.4626	-0.482
NM_054008	1.9249	0.8237	-0.9296	1.058	0.4823	4.3906	-1.114	-0.7202	0.3161	0.1878
NM_080698	-2.4344	-2.699	-1.1779	4.5453	4.1006	4.3845	-2.9885	0.0014	-2.2042	-1.6943
NM_012752	-0.9799	-0.6804	-2.3884	-2.3004	0.1725	4.3827	-1.1297	-1.2758	-1.3147	-1.5606
AI007530	-0.035	-0.2176	0.704	3.1437	2.5969	4.3677	1.595	-0.2092	-0.3997	-0.3292

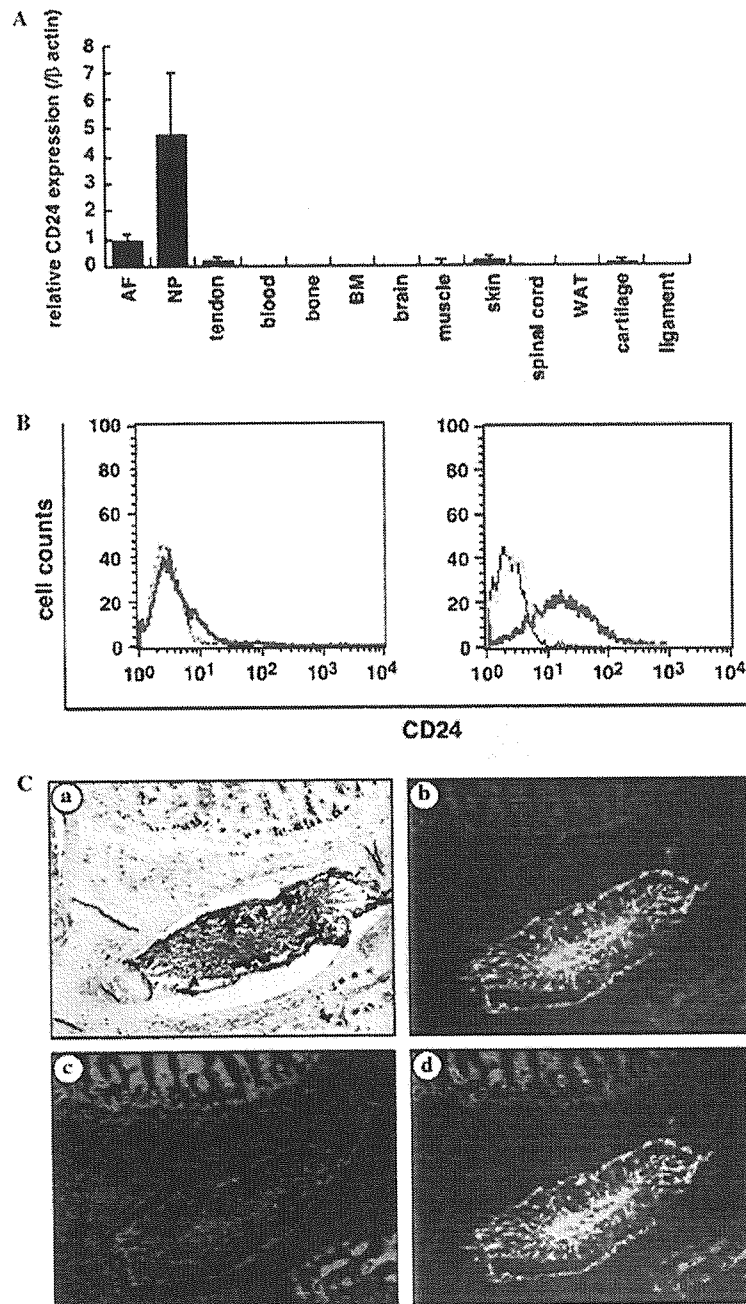


Fig. 2. Confirmation of CD24 expression in NP. (A) CD24 expression was analyzed in 13 different tissues, 10 of which were analyzed in microarray assay, by semi-quantitative real-time PCR. CD24 expression was elevated specifically in NP cells. (B) CD24 expression was analyzed in NP and AF cells using flow cytometry. CD24 expression was detected in NP but not in AF. (C) IVDs were dissected from 8-week-old male rats and stained by rabbit anti-rat CD24 antibody followed by FITC-conjugated anti-rabbit IgG. TOTO3 was used as a counter stain for nuclei. Sections were then stained and examined using phase contrast microscopy (a) and fluorescence microscopy (b–d). (b) CD24, (c) TOTO3, and (d) merged image of CD24 and TOTO3. AF, annulus fibrosis; NP, nucleus pulposus; BM, bone marrow; WAT, white adipose tissue.

elderly patients and local recurrences are frequently observed. Although chordoma cells are considered to derive from the notochord, a comparative evaluation of a tissue specific marker has not been possible. Our identification of CD24 as an NP specific cell marker allowed us to evaluate and compare CD24 expression in notochord,

chordoma, and chondrosarcoma, malignant tumors that are derived from mesenchymal cells. Specimens of chordoma and chondrosarcoma were analyzed for CD24 expression (Fig. 4). CD24 expression was detected in six out of the seven chordomas, but not in the seven different chondrosarcomas we analyzed. This result suggests that chordo-

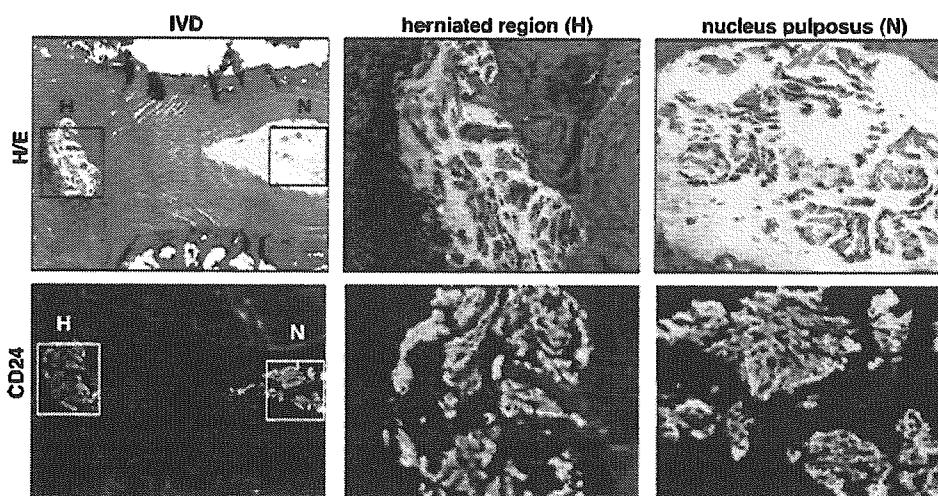


Fig. 3. CD24 expression is detected in herniated protrusion. IVD hernia model was created in 8-week-old rat tail IVDs. Seven days later, IVDs were dissected and stained by H/E (upper panel) or anti-CD24 antibody followed by FITC-conjugated anti-mouse IgG (lower panel), and observed under a fluorescence microscope.

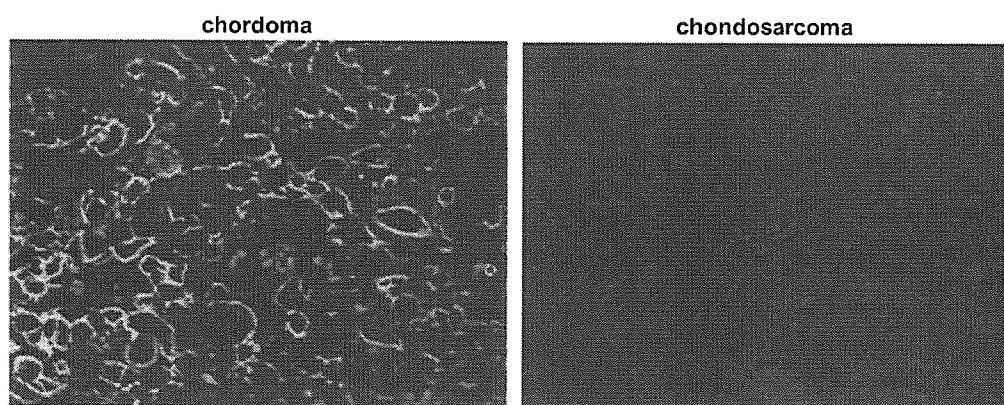


Fig. 4. CD24 expression is detected in chordoma but not in chondrosarcoma. Specimens of chordomas (left panel) and chondrosarcomas (right panel) were stained by anti-human CD24 followed by Alexa Fluor488-conjugated anti-mouse IgG. Immunoreactivity was detected by fluorescence microscopy.

mas are derived from notochordal cells in NP tissue, and that chordoma cells can be distinguished from chondrosarcoma cells by analysis of CD24 expression.

Discussion

We found that expression of CD24 is high in NP cells in a tissue specific manner. To further characterize the function of CD24 in NP tissue, we determined that CD24 is expressed in herniated NP tissue. We also determined that CD24 expression is elevated in chordoma, one of the most common malignant primary neoplasms of the skeleton, which are thought to be a remnant of notochordal cells. The similar pattern of gene expression observed between chordoma and NP supports the hypothesis that chordoma originates from notochordal cells. Interestingly, three out of the five membrane associated factors we identified in this study including: CD24, brain glucose-transporter protein,

and the Na–K–Cl co-transporter are also expressed in chordoma (data not shown). Since both NP and chordoma tissues express chondrogenic extracellular matrix protein and aggrecan at high levels, they cannot be used to distinguish chordoma from other chondrogenic malignant tumors [13]. We did not detect CD24 expression in chondrosarcomas, which are malignant tumors derived from mesenchymal cells.

IVD, especially NP is rich in large chondroitin sulfate proteoglycans, which have the ability to retain water in tissues. A large proteoglycan, aggrecan, forms huge aggregates by binding to hyaluronate and links proteins to maintain tissue homeostasis. In contrast, collagens, such as collagen type 2 form a fibrous structure in cartilage. Previous reports indicate that aggrecan and collagen type 9 are involved in IVD maintenance, and more recently, signaling through TGF β -1 was shown to be important for the expression of both collagen type 2 and aggrecan [1–3]. It

appears that loss of TGF β -1 signaling in asporin or cartilage intermediate layer protein mutants reduces collagen type 2 and aggrecan expression, and leads to development of osteoarthritis and LDD, respectively [14].

The IVD is an avascular tissue like articular cartilage, tendon, and lens. It remains to be clarified how these avascular tissues are maintained in the absence of oxygenation. One potential explanation is that the fluid surrounding functions in maintaining these tissues under hypoxic conditions. Like NP tissue, the lens is an avascular tissue, and as seen with IVD, degeneration of lens tissue correlates with age. Interestingly, CD24 is also highly expressed in lens (data not shown), indicating CD24 may function to maintain such avascular tissues.

Identification of CD24 as an NP specific marker provides a valuable tool for future studies to ascertain the function of CD24 in the maintenance of NP homeostasis and development of chordomas.

Acknowledgments

We thank the affected individuals for participating in this study: M. Mukai for preparation of specimens of chordoma and chondrosarcoma; Y. Sato and A. Kumakubo for technical support; E.S. Withers-Ward for manuscript preparation.

References

- [1] H. Watanabe, K. Nakata, K. Kimata, I. Nakanishi, Y. Yamada, Dwarfism and age-associated spinal degeneration of heterozygote cmd mice defective in aggrecan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 6943–6947.
- [2] S. Annunen, P. Paassilta, J. Lohiniva, M. Perala, T. Pihlajamaa, J. Karppinen, O. Tervonen, H. Kroger, S. Lahde, H. Vanharanta, L. Ryhanen, H.H. Goring, J. Ott, D.J. Prockop, L. Ala-Kokko, An allele of COL9A2 associated with intervertebral disc disease, *Science* 285 (1999) 409–412.
- [3] S. Seki, Y. Kawaguchi, K. Chiba, Y. Mikami, H. Kizawa, T. Oya, F. Mio, M. Mori, Y. Miyamoto, I. Masuda, T. Tsunoda, M. Kamata, T. Kubo, Y. Toyama, T. Kimura, Y. Nakamura, S. Ikegawa, A functional SNP in CILP, encoding cartilage intermediate layer protein, is associated with susceptibility to lumbar disc disease, *Nat. Genet.* 37 (2005) 607–612.
- [4] R.V. Iozzo, A.D. Murdoch, Proteoglycans of the extra cellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function, *FASEB J.* 10 (1996) 598–614.
- [5] R.V. Iozzo, The biology of the small leucine-rich proteoglycans. Functional network of interactive proteins, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 18843–18846.
- [6] F. Rannou, T.S. Lee, R.H. Zhou, J. Chin, J.C. Lotz, M.A. Mayoux-Benhamou, J.P. Barbet, A. Chevrot, J.Y. Shyy, Intervertebral disc degeneration: the role of the mitochondrial pathway in annulus fibrosis cell apoptosis induced by overload, *Am. J. Pathol.* 164 (2004) 915–924.
- [7] J. Bruce, F.W. Symington, T.J. McKearn, J. Sprent, A monoclonal antibody discriminating between subsets of T and B cells, *J. Immunol.* 127 (1981) 2496–2501.
- [8] F.W. Symington, S. Hakomori, Hematopoietic subpopulations express cross-reactive, lineage-specific molecules detected by monoclonal antibody, *Mol. Immunol.* 21 (1984) 507–514.
- [9] D.M. Allman, S.E. Ferguson, M.P. Cancro, Peripheral B cell maturation. I. Immature peripheral B cells in adults are heat-stable antigenhi and exhibit unique signaling characteristics, *J. Immunol.* 149 (1992) 2533–2540.
- [10] G. Kristiansen, M. Sammar, P. Altevogt, Tumour biological aspects of CD24, a mucin-like adhesion molecule, *J. Mol. Histol.* 35 (2004) 255–262.
- [11] P.J. Nielsen, B. Lorenz, A.M. Muller, R.H. Wenger, F. Brombacher, M. Simon, T. von der Weid, W.J. Langhorne, H. Mossmann, G. Kohler, Altered erythrocytes and a leaky block in B-cell development in CD24/HSA-deficient mice, *Blood* 89 (1997) 1058–1067.
- [12] O. Li, P. Zheng, Y. Liu, CD24 expression on T cells is required for optimal T cell proliferation in lymphopenic host, *J. Exp. Med.* 200 (2004) 1083–1089.
- [13] D. Gottschalk, M. Fehn, S. Patt, W. Saeger, T. Kirchner, T. Aigner, Matrix gene expression analysis and cellular phenotyping in chordoma reveals focal differentiation pattern of neoplastic cells mimicking nucleus pulposus development, *Am. J. Pathol.* 158 (2001) 1571–1578.
- [14] H. Kizawa, I. Kou, A. Iida, A. Sudo, Y. Miyamoto, A. Fukuda, A. Mabuchi, A. Kotani, A. Kawakami, S. Yamamoto, A. Uchida, K. Nakamura, K. Notoya, Y. Nakamura, S. Ikegawa, An aspartic acid repeat polymorphism in asporin inhibits chondrogenesis and increases susceptibility to osteoarthritis, *Nat. Genet.* 37 (2005) 138–144.