

イズ関連リンパ腫の変化はEBV陽性率だけでなく、組織型にも現れている。1997年以前ではほとんどのエイズ関連リンパ腫がびまん性大細胞型B細胞性リンパ腫であったのに対し、1998年以降ではバーキットリンパ腫やホジキン病などの他の組織型も増加している。すなわち、1997年以前の本邦におけるエイズ関連リンパ腫はEBVによって形質転換した細胞が免疫不全により日和見的に増殖したEBV関連日和見リンパ腫という、いわば単一な疾患であったのに対し、近年のHAART導入以降のリンパ腫は、様々な病型のリンパ腫が加わってきているといえる。そこで、われわれはエイズ関連リンパ腫の新たな発症機構を調べるために、EBV陰性のエイズ関連リンパ腫症例を一例ずつ、丁寧に解析し、その病因を解明することにつとめた。その中で、非常に奇妙な形態を持つ、これまでの分類では分類不能な症例に遭遇した。この症例を解析していくうちに、リンパ腫細胞中にHIVが高濃度に濃縮されていることが分かった。これまで、HIVは患者の体内においてT細胞を破壊し、免疫不全を誘導することにより、EBVやKSHVなどのヘルペスウイルスに感染したリンパ球が日和見的に増えていくのを助長し、リンパ腫形成に間接的に関与すると考えられてきた。しかし、この症例においてはリンパ腫細胞内にEBVやKSHVは低コピー数しか検出されず、EBVやKSHVが直接リンパ腫形成に関与している可能性は少ない。そこで、HIVが直接リンパ腫形成に関与していた可能性を考え、新たなエイズ関連リンパ腫の発症機構を検討することが本研究の目的である。

## 研究方法

### 1. 症例

59歳の男性エイズ患者でCD4は6/mm<sup>3</sup>であった。発熱とともに、皮膚にカポジ肉腫を認めた。CT像で肺に多結節性の病変を認めたため、カポジ肉腫あるいはリンパ腫の疑いで化学療法を始めるも約2週間後に死亡した。

### 2. DNA

剖検で得られた組織からフェノールクロロホルム法によりDNAを抽出した。

### 3. ゲノムウオーキング

HIVのインテグレーション部位はGene Walker Kit (BD Clontech, Palo Alto, CA)を用いて決定した。4つの異なる制限酵素 (DraI, EcoRV, PvuII 及び SspI) を用いて、DNAを消化した後にリンカーをライゲーションし、リンカーとHIV LTRの配列を持ったプライマーでPCRを行った。PCR産物を鋳型にnested PCRを行い、得られたバンドをTAクローニングし、DNA遺伝子配列を決定した。配列はENSEMBLE (<http://www.ensembl.org>) により、ヒト染色体上の位置を決定した。

### 4. レポータージーンアッセイ

PCRにて、HIV-1 3' LTR、STAT3のイントロン領域、STAT3のプロモーター領域を増幅し、pGL3ベクターに組み込んだ。これらのレポータープラスミドはLipofectamine Plus (Invitrogen, Carlsbad, CA)を用いてHeLa細胞に遺伝子導入された。レポーターであるルシフェラーゼ活性はdual luciferase assay system (Promega)を用いて計測した。

### 5. 免疫組織学的検出法

生検および剖検病理組織を10%緩衝ホルマリンで固定し、パラフィンに包埋した。薄切した切片をシランコートガラススライドに貼付した。脱パラフィン後、クエン酸処理にて抗原賦活化処理を行い、リン酸バッファーで洗浄後、一次抗体を反応させた。洗浄後、ビオチン標識二次抗体を、三次抗体にはペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを順次反応させた。抗体の種類により、Catalyzed Signal Amplification kit (DAKO) によりシグナルを増強させた。ジアミノベンチジンで発色後、アルコール脱水、キシレン透徹、封入後、検鏡した。

### 6. EBV-encoded small RNA (EBER)の

#### *in situ* hybridization

パラフィン切片に対し脱パラフィン、プロテナーゼ処理後、ビオチン標識されたEBERに対するanti-sense probeを42℃のハイブリダイゼーションバッファー中で90分間反応させた。洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを反応させジアミノベンチジンを用いて発色後、ヘマトキシリンで核染、脱水透徹後、封入した。

## 倫理面への配慮

剖検組織の検討は剖検承諾書を得、種々の検討は診断の過程で行われた。

## 研究結果

肺に見られた多結節性の病変は組織学的検索からリンパ腫が疑われた(図1)。免疫組織化学の結果ではこれらの細胞はリンパ球マーカーであるCD45が陽性であり、リンパ腫であることが判明したが、T細胞、B細胞のマーカーがいずれも陰性であった。そこで、イムノグロブリン遺伝子をサザンブロットにより検索したところ、遺伝子再構成バンドが検出され、本病変はB細胞性リンパ腫であることが判明した。患者にはカポジ肉腫の合併が見られたことから、EBVとKSHVの検索を試みた。PCRでは本病変部から抽出したDNA中に、これら2つのウイルスが検出されたが、そのコピー数は少なく、さらに、EBERやLANAといった、これらのウイルスの潜伏感染時に通常、発現が見られる遺伝子、タンパクの発現は見られなかった。したがって、これらのヘルペスウイルスの病因への関与は薄いことが分かった。同時に、HIVのウイルスコピー数を調べたところ、高コピー数のHIVが検出され、半定量PCRの結果では、このリンパ腫のDNAはHIVのDNAを1細胞あたり約1コピー保持していることが判明した。さらに、HIVの断片をプローブとし、各種制限酵素で

切断したDNAを用いてサザンブロットを行ったところ、HIVの全長である9kbp以上のところにバンドが認められ、HIVのリンパ腫細胞ゲノムへの組み込みが示唆された。

HIVのインテグレーション部位をゲノムウォーキングにより決定した。その結果、HIVは染色体17番のSTAT3遺伝子中に組み込まれていることが判明した。HIVはSTAT3遺伝子のnon-coding exonと第一エクソンの間にインテグレーションしており、さらに、HIVは5'LTRのほとんどの領域を欠いた欠損ウイルスであることが分かった。

HIVのLTRは一般的に強いプロモーター活性があることが知られている。HIV 3'LTRがSTAT3遺伝子の第一エクソンの上流約1kbpに位置していることから、HIV 3'LTRがSTAT3の発現を促進している可能性が示唆された。そこでわれわれはこのリンパ腫のDNAからHIV 3'LTRをPCRでクローニングし、プロモーターアッセイを試みた。その結果、HIV 3'LTRはSTAT3の本来のプロモーターと比べ、より強いプロモーター活性を持っていることが分かった。すなわち、STAT3上流にHIV 3'LTRが組み込まれたことにより、リンパ腫細胞でのSTAT3の発現が誘導されたと考えられる。

最後に、このリンパ腫でのSTAT3の発現を免疫組織化学で確認した。HIVがインテグレーションした本リンパ腫ではSTAT3の発現が核内に認め

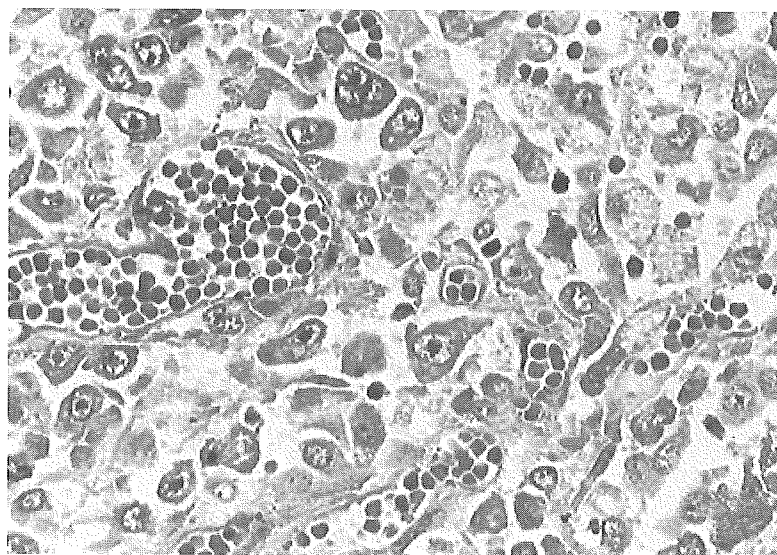


図1. HIV インテグレーションが見られたリンパ腫の組織像(ヘマトキシリン・エオジン染色)。エイズ患者の剖検時に肺に見られた結節性病変。核小体が明瞭で広い細胞質を持つ、大型で異型の強い細胞の浸潤が認められる。免疫組織化学ではCD45が陽性であるが、CD3, CD20などのT細胞、B細胞のマーカーは陰性であった。

られた。他のエイズ関連リンパ腫 10 例では STAT3 の発現はおもに細胞質に認められ、核内に発現のあるものは本症例以外にはなかった。また、非エイズ患者に発症したリンパ腫や正常のリンパ節などでは、STAT3 自体が検出されることがまれであった。このことから本リンパ腫では HIV が STAT3 の上流にインテグレーションしたことにより STAT3 が高発現し、腫瘍化したリンパ腫症例と考えられる。

## 考察

STAT3 はインターロイキン 6 等のサイトカインの下流でそのシグナル伝達に関わり、B 細胞の分化等に関わる重要な役割をする分子である。サイトカイン等の刺激により、STAT3 はリン酸化され、STAT1 などとともに核内に移行し、転写活性化因子として働く。それとは別に、STAT3 には発癌作用もあることが知られている。活性型（リン酸化）STAT3 の発現は様々な癌の動物実験モデルに認められ、また、STAT3 を遺伝子導入して、哺乳類細胞に高発現させると、導入された細胞は形質転換を起こし、ヌードマウスに移植した際の造腫瘍性を獲得する。また、近年の研究ではこれらの腫瘍化に STAT3 の活性化は必要なく、多くの腫瘍では非活性型（リン酸化されていない）STAT3 の貯留が認められることが報告されている。本症例においてはリンパ腫細胞の核内に STAT3 の発現が認められ、リンパ腫の形成と STAT3 の核内貯留が何らかの関連があることが示唆された。これまで HIV-1 がリンパ腫のゲノムにインテグレートした症例として 3 例が報告されている。いずれも *c-fes/fps* の上流にインテグレーションしていることが示されているものの、機能的な解析は全くされていないことから、本症例は HIV のインテグレーションがリンパ腫形成に直接関わったことが示された唯一の症例といえる。

本症例は B 細胞性のリンパ腫であったが、HIV が B 細胞に感染した機構についてはいまだに不明な点が多い。KSHV の前初期タンパクである ORF50 は KSHV 感染 B 細胞において CD4 やケモカインレセプターの発現を誘導することが知られていることから、HIV が感染した過程には KSHV の関与が考えられる。今回、我々は KSHV 非感染 B 細胞に ORF50 を発現させ、HIV を感染させた実験を試みたが、この系では HIV の感染は成立しなかった。この結果は ORF50 以外の KSHV タンパ

クが HIV の感染には必要であることを示唆するものであり、今後、HIV 感染に関与する KSHV タンパクの同定が必要となろう。

HIV のインテグレーション部位は活動性のある遺伝子部位に多いといわれるが、基本的にはアトランダムにインテグレーションすると考えられている。どの部位に入れば癌化するかということは、近傍の遺伝子を詳しく調べる必要があり、明確には分かっていない。したがって、アトランダムに入る可能性がある以上は、本症例のように癌化を誘導する部位に入る可能性も考えなければならない。現在では本邦のエイズ関連リンパ腫の約 4 割は EBV 陰性であり、HIV がインテグレーションしたリンパ腫が含まれる可能性も今後検討していく必要がある。

## 結論

HIV が宿主ゲノムの STAT3 遺伝子の第 1 エクソン上流にインテグレートしているエイズ関連リンパ腫症例を発見した。HIV 3' LTR には強いプロモーター活性があり、リンパ腫細胞では核内に STAT3 の発現が認められたことから、STAT3 の高発現により発症したリンパ腫と考えられた。本例は HIV が直接リンパ腫形成に関わったことが証明された最初の症例であり、エイズ関連リンパ腫の新たな発症機構を示唆する症例と考えられる。

## 健康危険情報

本研究で得られた成果に関して健康危険情報として報告しなければならない情報はない。

## 研究発表

### 論文発表

- 1) Satoh M, Kaneko A, Kokaze A, Katano H, Sata T: Seroprevalence of Human Herpesvirus 8 on Vanuatu islands in eastern Melanesia. *Jpn J Infect Dis* 2006:(in press).
- 2) Asahi-Ozaki Y, Sato Y, Kanno T, Sata T, Katano H: Quantitative analysis of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) in KSHV-associated diseases. *J Infect Dis* 2006:(in press).
- 3) Hishima T, Oyaizu N, Fujii T, Tachikawa N, Ajisawa A, Negishi M, Nakamura T, Iwamoto A, Hayashi Y, Matsubara D, Sasao Y, Kimura S, Kikuchi Y, Teruya K, Yasuoka A, Oka S, Saito K, Mori S, Funata N, Sata T, Katano H: Decrease of Epstein-Barr virus-positive AIDS-related lymphoma in the era of highly active antiretroviral

therapy. *Microbes Infect* 2006:(in press).

- 4) Katano H, Hogaboam CM: Herpes virus-associated pulmonary hypertension. *Am J Resp Crit Care Med* 2005, 172:1485-1486.

#### 学会発表

- 1) 片野晴隆、柳澤夕佳、渡辺慎哉、菅野隆行、佐藤由子、佐多徹太郎 Primary effusion lymphoma(PEL)の発症機構に関する研究。第94回日本病理学会総会（横浜）2005.4.
- 2) 菅野隆行、佐藤由子、樋口好美、佐多徹太郎、片野晴隆。ヒトヘルペスウイルス8 (HHV-8)がコードする Interferon regulatory factor (IRF)のホモログ K10, K11の発現様式とその意義。第94回日本病理学会総会（横浜）2005.4.
- 3) 菅野隆行、佐藤由子、佐多徹太郎、片野晴隆。HHV-8のコードする Interferon Regulatory Factor(IRF)ホモログ K10の細胞内局在と結合蛋白の同定。第20回ヘルペスウイルス研究会（名古屋）2005.6.
- 4) 尾崎泰子、佐藤由子、菅野隆行、佐多徹太郎、片野晴隆。HHV-8関連疾患におけるウイルス量と感染細胞数。第20回ヘルペスウイルス研究会（名古屋）2005.6.
- 5) 片野晴隆、佐藤由子、菅野隆行、加納基史、佐多徹太郎。エイズ患者肺における慢性炎症を基盤としたカポジ肉腫発症機構。第20回ヘルペスウイルス研究会（名古屋）2005.6.
- 6) Katano H, Sato Y, Kanno T, Kano M, Sata T. Inflammation increases susceptibility of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in the lung of patients with HIV-1 infection. 30th International Herpesvirus Workshop. (Turku, Finland) 2005.7.
- 7) Kanno T, Sato Y, Sata T, Katano H. Expression of HHV-8 (KSHV)-encoded K10 and K11 proteins, homologues of interferon regulatory factors. 30th International Herpesvirus Workshop. (Turku, Finland) 2005.7.
- 8) Katano H, Sato Y, Hoshino S, Mori S, Sata T, Weiden MD, Hoshino Y. Integration of HIV-1 caused STAT3-associated B cell lymphoma in an AIDS patient. 2005 Internatioal meeting of the Institute of Human Virology. (Baltimore, MD, USA) 2005.8.
- 9) 加納基史、菅野隆行、佐多徹太郎、片野晴隆。vIL-6欠損KSHV感染リンパ腫細胞株の解析。第53回日本ウイルス学会学術集会（横浜）2005.11.
- 10) 片野晴隆、佐藤由子、星野聡美、立川夏夫、岡 慎一、森下保幸、William N Rom、森 茂郎、佐多徹太郎、Micheal D Weiden、星野仁彦。HIVのインテグレーションにより発症し

たSTAT3関連リンパ腫の一例。第53回日本ウイルス学会学術集会（横浜）2005.11.

- 11) 菅野隆行、佐藤由子、佐多徹太郎、片野晴隆 KSHV(HHV-8)のコードする Interferon Regulatory Factor (IRF)ホモログ K10の細胞内局在と結合蛋白の同定。第53回日本ウイルス学会学術集会（横浜）2005.11.
- 12) 尾崎泰子、佐藤由子、菅野隆行、佐多徹太郎、片野晴隆。KSHV (HHV-8)関連疾患におけるウイルス量と感染細胞数。第53回日本ウイルス学会学術集会（横浜）2005.11.
- 13) 片野晴隆、佐藤由子、星野聡美、立川夏夫、岡 慎一、森下保幸、William N Rom、森 茂郎、佐多徹太郎、Micheal D Weiden、星野仁彦。HIVインテグレーションにより発症したSTAT3関連リンパ腫。第53回日本ウイルス学会学術集会（横浜）。

#### 知知的財産権の出願・登録状況

とくになし。

## 抗 HIV 療法開始前後における リンパ球遺伝子発現の変化の解析

分担研究者：中村 哲也（東京大学医科学研究所附属病院）

研究協力者：小田原 隆（東京大学医科学研究所附属病院）

**■研究要旨** 抗 HIV 療法開始後にみられる日和見疾患に対する免疫再構築症候群の機序を解明するために、抗 HIV 療法開始前後での CD4 陽性 T リンパ球、CD8 陽性 T リンパ球、NK 細胞、単球の遺伝子発現変化の解析を試みた。HIV 感染者の生細胞をフローサイトメーターで安全にソートできることを確認し、抗 HIV 療法開始予定の 8 症例から各細胞分画を採取し total RNA を得た。今後、DNA アレイを用いて遺伝子発現変化を解析する予定である。

### 研究目的

日和見疾患を合併したエイズ患者では、抗 HIV 療法を開始し免疫能が回復すると共に日和見疾患の増悪ないしは顕性化が見られることがあり、この病態を免疫再構築症候群と呼ぶ。多くの日和見疾患でこの病態が見られることが知られているが、頻度として高いのは非定型抗酸菌症と結核である。これらに対する免疫再構築症候群は、抗 HIV 療法開始後 1～4 週の比較的早期に見られる。その機序としては、抗 HIV 療法により回復してくる免疫機構が、患者体内に残存している日和見微生物に対して免疫応答をおこすためと考えられている。しかしながら、この時期には、血中 HIV RNA 量の減少は顕著にみられるものの、CD4 陽性 T リンパ球の増加は未だ認められない時期である。したがって、免疫担当細胞の数的な回復というよりは、それらの機能的な回復が免疫再構築症候群の発症機序に関与している可能性が推測される。そこで本研究では、抗 HIV 療法を開始する症例で治療開始前後の末梢血単核球を分離し、その遺伝子発現

の変化を DNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析することとした。これにより、各種免疫担当細胞の機能的変化について網羅的知見を得ることが可能となる。その結果をもとに、免疫再構築症候群の発症機序を解明することを目的とする。

### 研究方法

東京大学医科学研究所附属病院において抗 HIV 療法を行う HIV 感染者を対象として、治療開始前、開始後 1 ヶ月および 3 ヶ月に末梢血を採取し、末梢血単核球を分離する。total RNA を抽出するためには生細胞をフローサイトメーターでソートする必要があり、International Society for Analytical Cytology が推奨する Biosafety guidelines for sorting of unfixed cells (Cytology 28: 99, 1997) にもとづき、T4 bacteriophage を用いる系で実験者の安全性の確認する。その後、抗 CD4 抗体、抗 CD8 抗体、抗 CD56 抗体、抗 CD14 抗体により HIV 感染者単核球を免疫染色し、FACSaria にて陽性分画をソートし、それぞれ CD4 陽性 T リンパ球、CD8 陽性 T

リンパ球、NK細胞、単球を採取する。total RNAを抽出し、イルミナ社のSentrix BeadChipを用いてRNA発現解析を行う。本システムは、50～100 ngのtotal RNAで約46,000遺伝子のプロファイリングが可能である。3～4名の患者検体で検討を行い、抗HIV療法開始前後で発現の変化が見られる遺伝子を見出し、それらについてさらに検討を加えたい。

#### 倫理面への配慮

結果の公表に際しては、患者個人が特定し得ないよう配慮を行う。

### 研究結果

#### 1. 生細胞をソートするための安全性の確認

本研究では、細胞からRNAを回収するために生細胞をフローサイトメーターでソートする必要がある。ソート時に発生するエアゾルはHIV感染細胞を含んでおり、フローサイトメーター操作者がそれを吸引しHIV感染する危険性を排除するために、フローサイトメーターを設置したP3実験室

の安全確認を行った。

具体的には、テストソート用のビーズを浮遊させたサンプル液にT4 bacteriophageを加え( $3.4 \times 10^8$  PFU/ml, through put  $9.2 \times 10^7$  PFU/min)、標準的な条件(Nozzle tip 70 mm、Drop frequency 90 kHz、Sort rate 1,000 decision/s)でFACSariaを用いたソートを行った。その際に、装置周囲にフタをはずした大腸菌プレートに静置し落下するエアゾルを、またエアサンプラーで室内空気を吸引し大腸菌プレートに吹き付け浮遊するエアゾルの検出を行った。大腸菌プレートは37℃ o/n培養しプラーク数をカウントすることで、エアゾルの有無を測定した。静置大腸菌プレートを用いた落下エアゾルは、FACSariaのソーティングチャンバードアを開けなければ測定した全箇所(ソーティングチャンバー内の右、ソーティングチャンバー内の左、ソーティングチャンバー外〔チャンバー上〕の右、ソーティングチャンバー外〔チャンバー上〕の左、機械の上、オペレーターデスク上)において検出されなかった(表1)。ドアを開けた状態ではエアゾルの落下が認められたことから、チャン

表1. 静置大腸菌プレートのプラーク数

ソートの条件	プレートの場所					
	1	2	3	4	5	6
good mode (通常sortingの状態、2時間)	0	0	0	0	0	0
bad mode (streamをずらし、25分間)	0	0	0	0	0	0
bad modeでドアを開ける (25分間)	183	5	0	ND	2	0

- 1: ソーティングチャンバー内の右、2: ソーティングチャンバー内の左、  
3: ソーティングチャンバー外(チャンバー上)の右、  
4: ソーティングチャンバー外(チャンバー上)の左、5: 機械の上、  
6: オペレーターデスク上

表2. エアサンプラーで回収(10分間)したエアロゾル由来のプラーク数

	操作者の位置	操作者から1m離れた位置
ファージをRunする前	0	0
good modeの最後の10分間	0	0
bad modeの最後の10分間	0	0
bad modeでかつドアを開けた状態	0	0

バードアを開ける際にはソーティングを中断してから行う必要がある。エアゾル中からは、ソーティングチャンバードアを開けた状態も含めてファージが検出されないこと明らかになった。以上の結果を、施設内安全管理委員会に報告し、以下の実験を行った。

2. HIV 感染者末梢血からの生細胞のソーティング

末梢血から単核球を分離し CD4、CD8、CD56、CD14 に対する抗体で染色し、それぞれ CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、NK 細胞、単球のソー

ティングを行った (図 1)。当初、過去に抗 HIV 療法を開始した症例の末梢血数 ml より分離・凍結しておいた末梢血単核球をソートし上記 4 分画の細胞を得ようと試みたが、単球に関して 50 ~ 100ng の total RNA を得るために十分な細胞数 (10<sup>5</sup> 個程度) が得られなかった。ソーティングの際の流速を調整し単球の回収率を改善させることを試みたが、図 2 に示すように回収率の悪い症例では流速を遅くしても回収率が 10 % 前後で変わらなかった。そのため、新規に抗 HIV 療法を開始する症例から 10-15ml 程度の末梢血を採取し、分離した単

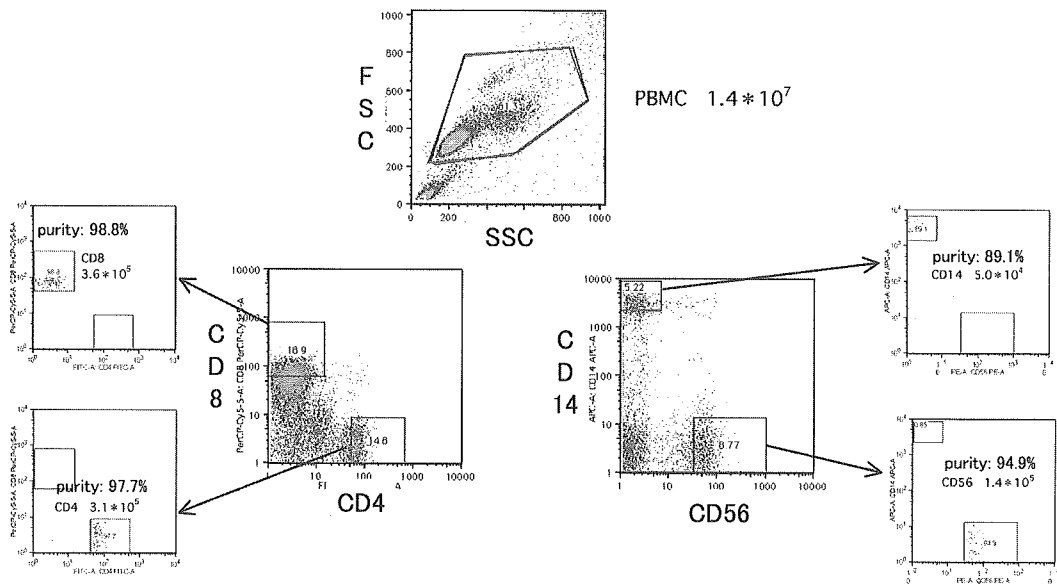


図 1. ソーティングの 1 例

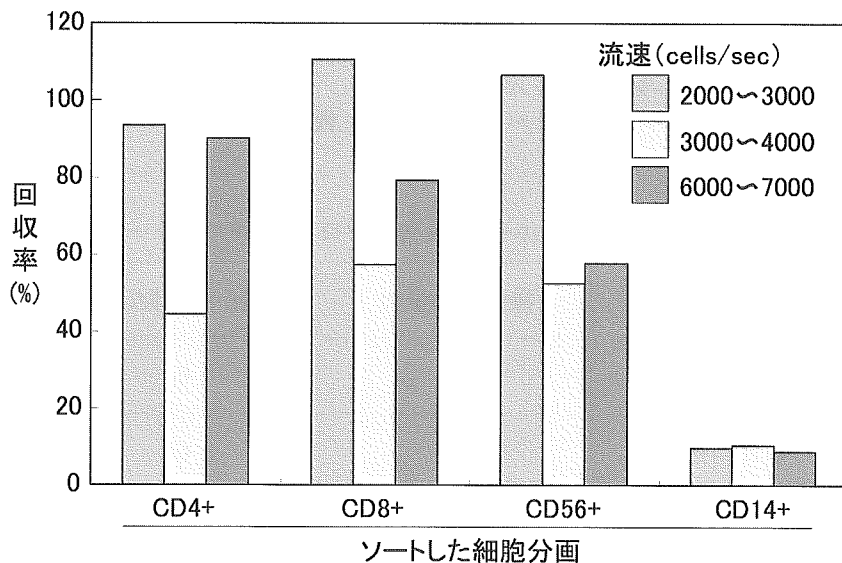


図 2. ソーティングの流速と回収率

表3. これまでソートした各分画の細胞数

症例	CD4数	抗HIV療法	CD4	CD8	CD14	CD56
			細胞数	細胞数	細胞数	細胞数
1	346		$1.7 \times 10^6$	$1.9 \times 10^6$	$1.6 \times 10^5$	$4.8 \times 10^5$
2	254	start	$1.8 \times 10^5$	$1.0 \times 10^5$	ND	$3.7 \times 10^5$
3	272		$2.3 \times 10^5$	$2.9 \times 10^5$	ND	$3.7 \times 10^5$
4	368		$3.1 \times 10^5$	$3.6 \times 10^5$	$5.0 \times 10^4$	$1.4 \times 10^5$
5	233		$3.6 \times 10^5$	$5.0 \times 10^5$	$1.6 \times 10^4$	$4.6 \times 10^4$
6	239	start	$3.0 \times 10^5$	$4.0 \times 10^5$	$8.0 \times 10^4$	$1.0 \times 10^5$
7	574		$8.2 \times 10^5$	$9.6 \times 10^5$	ND	$1.0 \times 10^5$
8	456		$4.3 \times 10^5$	$4.6 \times 10^5$	ND	$6.0 \times 10^4$

核球を凍結せずに免疫染色・ソートし、total RNAを抽出することに変更した。現在までに、8症例の抗HIV療法開始予定者よりソーティングを行いRNA抽出を終えた(表3)。症例2と6は既に抗HIV療法が開始され、抗HIV療法開始後の末梢血が採取され次第ソーティングを行いRNAを抽出し、遺伝子発現解析に供する予定である。

## 考察

HIV感染者では、HIVの標的細胞であるCD4陽性Tリンパ球の減少により細胞性免疫の障害をきたすが、それ以外にもNK細胞や単球の数的・質的異常が知られている。免疫再構築症候群ではこれらの異常が回復する過程で発生することから、その病態を理解するためには本研究のように各種免疫担当細胞の抗HIV療法前後での変化を網羅的に解析することが重要であると考えられる。そのためには、患者末梢血を材料として純度の高い生細胞をソーティングにより安全に採取し、DNAマイクロアレイで解析するに十分な量のRNAを得る必要があった。平成17年度に開始した本研究では、これらの条件設定を終了し抗HIV療法開始前の8症例のソーティングとRNA抽出までを終了した。残念ながら研究年度中に遺伝子発現の解析までなし得なかったが、今後これらの症例の治療が開始され次第、検体を採取しマイクロアレイ解析を行っていきたい。

## 結論

フローサイトメーターでHIV感染者の生細胞をソートする際の安全性を確認した。8症例において、抗HIV療法開始前のCD4陽性Tリンパ球、

CD8陽性Tリンパ球、NK細胞、単球分画を採取しtotal RNAを得た。今後、抗HIV療法後の各細胞分画のRNAを抽出し、DNAアレイを用いた遺伝子発現変化を解析する予定である。

## 健康危険情報

特記すべきことなし。

## 研究発表

### 論文発表

- 1) Tomonari A, Takahashi S, Shimohakamada Y, Ooi J, Takasugi K, Ohno N, Konuma T, Uchimaruk K, Tojo A, Odawara T, Nakamura T, Iwamoto A, Asano S. Unrelated cord blood transplantation for a human immunodeficiency virus-1-seropositive patient with acute lymphoblastic leukemia. Bone Marrow Transplant. 36:261-2, 2005.
- 2) T. Maeda, T. Fujii, T. Matsumura, T. Endo, T. Odawara, D. Itoh, Y. Inoue, T. Okubo, A. Iwamoto, T. Nakamura. AIDS-related cerebral toxoplasmosis with hypertense foci on T1-weighted MR images: A case report. J. Infect. in press.

### 学会発表

本研究と関連したものはない。

### 知的財産権の出願・登録状況

特に予定をしていない。



## 急性期病院の第 1 線医師、検査技師等に対する 啓蒙・診断技術移転法の解析

分担研究者：竹内 勤（慶應義塾大学医学部）

研究協力者：有蘭 直樹<sup>1</sup>、井関 基弘<sup>2</sup>、塩田 恒三<sup>3</sup>

（<sup>1</sup>京都市立医科大学、<sup>2</sup>金沢大学大学院医学研究科、

<sup>3</sup>ルイ・パスツール医学研究センター）

■研究要旨 わが国におけるエイズの増加に対処するため、診療の中心となるエイズ診療拠点病院のみならず、むしろ拠点に組み入れられていない急性期疾患を扱う病院の中央臨床検査施設におけるエイズに伴う日和見原虫感染症の診断技術向上、更には技術レベル維持を目的とした自己点検・評価システムの構築のため、日和見原虫感染症の講習会を開催し、それを通して他の疾患にも適用できる効率的な情報伝達、技術移転の方法確立のための検討を行った。昨年より更に講習会の情報周知の徹底を計るべく、拠点病院の臨床検査部の技師長に案内を送付し、また臨床検査医学会、寄生虫学会、熱帯医学会、感染症学会に案内を送りホームページに掲載を依頼したが、今年度は更にエイズ学会にも同様の依頼を行い、申込書もホームページよりダウンロードできるようにした。更に技術の確実な定着を促進するため、講習会を昨年同様 3 回企画し、再参加や単一の施設からの複数参加を積極的に受け入れる事を案内に明示した。第 1 回目の講習会は平成 18 年 1 月に京都市立医大で開催した。参加者は 40 名であった。2 回目、3 回目はそれぞれ 2 月、3 月に慶大医学部で開催予定である。参加者は本稿執筆時、2 回目が 67 名、3 回目は 55 名の予定である。一昨年のアンケートに基づいて情報伝達法を昨年に変更したためと思われるが、拠点病院約 360 ケ所のうち 115 施設から参加、不参加の回答があり、初年度の 88 件に比べ改善傾向が見られた。昨年度は 124 施設から反応があったが、今年度はまだ第 1 回目を終了した直後であり、更に増加するものと思われる。急性期病院を含む拠点病院以外からの応募も既に 12 施設、18 名に達しており、次第に増加傾向を示すようになって来ている。また、今年度非常に著明となったのは、単独の施設からの参加者の増加であり、5 名以上の参加者があったのが 3 施設、4 名参加が 3 施設となっている。また、昨年に引き続き、技術レベルの維持、自己点検・評価のため講習会の内容（クリプトスポリジウムとニューモシスティス・カリニ）の CD を第 1 回目の参加者には配付した。現在赤痢アメーバの CD が完成に近付いており、第 2 回目より直接配付できる。以前の参加者にも追加配布を行うべく準備している。また、今回は寄生虫学会で運営しているコンサルテーションシステムの紹介を文献を含め、詳細に行った。コンピューターネットワーク上での自己点検システムは研究協力者である金沢大学大学院医学研究科の井関教授の研究室のホームページを利用して開設した。これを利用して、問題の提出し、参加者がアクセスできるようにしておき、自身で評価ができるように設計した。第 2 回目から使用方法についても情報を伝達して行きたい。最後に、3 年間計 8 回の講習会の経験を通して各病院の臨床検査レベルの向上のための情報伝達に関する留意点を纏め、提言とした。

従来の HIV/AIDS の日和見感染症に関する研究班（平成9～11年度：HIV感染症に関する臨床研究、平成12～14年度：日和見感染症の治療に関する研究、何れも主任研究者は東京大学、木村哲教授）において、都合6年間の間に日和見原虫感染症の病原体の生物学、感染症学、病態、診断、治療に関する講習会を慶大医学部の施設を利用して、エイズ診療拠点病院の中央臨床検査施設の医師、検査技師を対象として、合計9回開催した。参加者数は毎回80～100名に達していたので、かなり多数の対象者について講習を実施したこととなる。しかしながら、この一連の講習会の対象は上述のようにエイズ診療の拠点病院のみであって、一般の急性期病院に関しては、全くアプローチはされておらず、辛うじて情報のより広範な周知の必要性が参加者からアンケートにより指摘されたため、最後の1～2回臨床検査医学会の事務局を通して学会ホームページに案内を出し、周知を計ただけであった。この臨床検査医学会のホームページを通して、何名が参加したのかについては、アンケートに当該項目がなかったせいもあって明らかではないが、あっても毎回1～2名ではなかったかと推測している。また、この講習会では、毎回参加者に対してアンケート調査を行ったが、講習会開催の時期、方法、場所あるいは実習の内容などについての希望を聞いたのみで、今次研究班の研究テーマにあるような参加者の技術のレベルの調査、あるいは自己再学習の必要性の有無、技術の定着度など、技術移転が確実に行われたのかどうか自己点検できるシステムの必要性の調査、あるいは情報伝達開示の改善の試みは行なった事がなかった。この点は、講習会を担当した本分担研究者らにとって大きく反省すべき点である。

一方、最近わが国においてはエイズは減少傾向を示さず、むしろ増加傾向を示している。感染者あるいは患者の絶対数はまだ少ないものの、公衆衛生上、あるいは臨床上大きな問題となりつつあり、効果的な対策立案、臨床的に確実な対応等は現時点で必要度は高い。

本研究は、以上の状況に鑑み、エイズの日和見感染症のなかで、従来の講習会のアンケートによっても明らかに臨床検査分野で診断技術等の普及が遅れている、あるいは臨床検査学の教育システムに起因するものであろうが、知識、経験が十分ではないと考えられた原虫疾患ならびに近縁の疾

患に関して、全国約360ヶ所のエイズ診療拠点病院だけでなく急性期病院の医師、臨床医検査技師を対象として講習会を開催し、診断技術の移転を計り、その成果を評価して、より効果的な技術移転法の確立を行う事、及び診断技術の維持に関する自己点検法、評価法の確立を通して他にも応用できるように一般化する事、すなわちこれらを通し類似の技術移転を計る際にどのような点に留意すべきかを可能であればパッケージとして示す事を目的としている。

今年度は、去年のアンケートに基づき、ホームページ掲載範囲の拡大、再学習を可能とするような方策の一つとして、講義・実習内容のCD化の継続などを試みた。その上で、前年度と同様のアンケートを行い、コンピューターネットワークによる点検システムの構築等に対する意見の聴取、及び今後この種の講習会の存続に関する見解を取得をも試みた。

## 対象及び実施経過

### 1. 講習会の準備、内容

平成17年10月にこれまでと同様、下記の内容の講習会の案内を全国約360ヶ所のエイズ診療拠点病院の中央臨床検査施設の技師長あてに送付した。同時に臨床検査医学会、寄生虫学会、熱帯医学会、感染症学会、及びエイズ学会の各事務局の了解を得て、各学会のホームページに全く同じ案内を掲載し、同時に申込書もダウンロードできるようにした。この際に、昨年よりも更に明確に検査診断技術の維持のため、再参加、単一施設からの複数参加を積極的に推進する旨を掲示した。

初年度のアンケートの結果、参加希望者がかなり多い事が想定できたので、今年度も昨年度と同様に西日本地区で1回、東日本で2回開催することとした。幸い京都府立医科大学医動物学教室、有菌直樹教授が研究協力者として今年度も本事業に参加してくれることとなったので、平成18年1月28日(土曜日)、29日(日曜日)に京都府立医科大学の施設を使って講習会を開催した。第2回目は慶大医学部で2月25～26日に、第3回目は3月18～19日に慶大医学部にて開催する予定である。

講習会の内容は基本的には昨年度同様で、以下の通りである。

第1日目 日和見感染を起こす原虫(従来原虫と

されていたが、近年真菌に再分類されたニューモシステイスとミクロスポリジウム等を含む)の生物学、感染経路、疫学、病態、診断、治療に関する講義を以下の担当者が行った。基本的には総論15分程度、赤痢アメーバ以下、各1時間ずつである。

総論(本講習会の目的、何故以下の4病原体の感染を取り上げるかについて説明、更に寄生虫学会のコンサルテーションシステム等の説明を含む)：

竹内 勤(慶大医学部)

赤痢アメーバ：竹内 勤

トキソプラズマ：浅井 隆志(慶大医学部)

ニューモシステイス：塩田 恒三(ルイ・パスツール医学研究センター)

クリプトスポリジウム、イソスポーラ、ミクロスポリジウム、サイクロスポーラ：井関 基弘(金沢大学大学院医学研究科)

寄生虫学会で運営しているコンサルテーションシステムは同学会の情報処理委員会が管理しているもので、寄生虫学会公式ウェブサイト(<http://jsp.tm.nagasaki-u.ac.jp/welcome-2.html>)を介した医療関係者のみに限定した診断コンサルテーションシステムである。このシステムを通して寄生虫学会情報処理委員会にアクセスすると、情報処理委員会でコンサルテーションの内容を検討し、個人情報のカバー等を行った後に、寄生虫学会員のクローズドなメーリングリストに質問の内容が公開される。この質問に対して、適当な専門家が回答すると、その回答は直接、又はメーリングリストを介して質問者に送られる。画像や動画等、情報量の多いものは学会員だけがアクセスできるウェブページ上に掲載され、意見が求められている。以上の内容を、嶋田雅暁、竹内 勤 他、治療、86、2653-2658、2004を使用して説明した。更に、同論文に含まれているCDCやWHOのWeb Site、各種のメーリングリストなどの紹介も行った(表1参照)。

第2日目 午前9時より赤痢アメーバ、トキソプラズマ、ニューモシステイス、クリプトスポリジウムに関する実習を行った。この実習内容の詳細は初年度の報告書に記載したので、本稿には記載しないが、特長としては以下の点が挙げられる。

具体的には、できるだけ多数の研究者の参加を得て、監督者として実習に参加してもらい、参加者各自に1台ずつ顕微鏡を与えて、参加者が監督

者にコンタクトしやすいようにして実施した。幸い京都府立医科大学のスタッフの全面的協力が得られたので、今年度も約40名の参加者に対して、8名の指導者の関与のもとで実習を行った。第2回目、第3回日の慶大医学部での実習には7名が指導者として参加する予定である。実習に際しては、検出した対象が正しい病原体であるかどうか、組織病理でも正確な病変部を観察しているかどうか、いちいち確認を取るよう指示した。実習内容としては、まず事故による感染が起こらない事が確かな場合は、できるだけ生鮮標本を使用して観察に供した。第1回目にはジアルジア、サイクロスポーラ、イソスポーラ等、HIV/AIDSに稀に日和見感染症として見られる近縁原虫をもデモとして提示した。また、検出手技に関する実習もニューモシステイスとクリプトスポリジウムについて実施した。すなわち、前者ではニューモシステイスの検出、特にカッコ状構造物の検出にも有用なセルフロール蛍光染色、後者ではシヨ糖遠沈浮遊法、簡易シヨ糖浮遊法、抗酸染色の実技を実施した。また病原体の形態的な観察だけでなく、アメーバ症の腸管組織、トキソプラズマリンパ節炎、ニューモシステイス肺炎の組織像等を供覧し、病態の理解をも深める事を計った。更に、多くの参加者が所属施設に帰った後に、講習内容の伝達を行う必要性が以前より参加者の一部より指摘されていたため、クリプトスポリジウムのオーシストを多量に含むマウスのホルマリン固定試料、抗酸染色用のクリプトスポリジウムを塗布したスライドグラス、セルフロール染色用にニューモシステイスの未染色感染肺切片を載せたスライドグラス等を昨年度と同様参加者全員に配付し、帰室後の技術管理、情報伝達が行なえるように計らった。また、寄生虫学会で運営しているコンサルテーションシステムの紹介を初日の総論に引き続き再度行い、また金沢大学大学院医学研究科の研究協力者(井関博士)の研究室のホームページを利用した自己点検システムの紹介も行った。このシステムの具体的な開始は今年度中には見込まれるが、上記の寄生虫学会のシステムと合わせて、これからも周知を計って行くべきであろうと考える。

## 2. 講習会への参加者の構成、その他の実施経過

今年度も上述のように約360ヶ所の全国のエイズ診療の拠点病院に対してまず案内を送付し、臨

床検査医学会に加え、関連する寄生虫学会、熱帯医学会、感染症学会のホームページにも案内を掲載した。また、昨年度の指摘に基づきエイズ学会へもアプローチし、ホームページに案内を掲載する事が出来た。各都道府県の臨床検査技師会を対象に加えるべきという以前のアンケートがあったが、今回も種々の理由で見送った。今年度は1~3月に涉って3回開催するため、それぞれ締め切りの期日を変えてあるが、昨年同様参加者がいない場合も返事を送付するように依頼した。その結果、参加者は第1回目に40名であり、2回目が67名、3回目は55名がこれまでに申し込みをしており(平成18年2月1日現在)、拠点病院約360ヶ所については不参加の返事も含めて128ヶ所より反応があった。これは初年度の88施設、昨年度の124施設に比べ、今後も増加する事が予想されるので、全体としては好転していると判断できよう。しかし、これでも全体の1/2に達しておらず、これまでの本講習会の経過を考えると、病院間での反応の差異が依然として大きい。また、再参加、あるいは単一の施設からの複数参加も積極的に推進したせいかと思われるが、今年度の第1回目も2回以上の再参加が6名、また単一施設からの複数申し込みは第1回目で国立大阪病院5名、徳島大学病院4名、神戸大学病院3名と増加傾向にある。同様な傾向は、第2回目、3回目も明瞭に伺える。このように病院によっては非常にレスポンスの良いところもあるが、これまでの15回の講習会に一度もレスポンスがない施設もある事は、わが国のエイズ診療体制がこのままで良好に推移して行くか、懸念を持たざるを得ない面もある。一方、本研究分担者の所に電話で参加、不参加について相談された施設も今年度は幾つかあるが、臨床検査部の置かれた状況から見ると、dutyが余りにも多すぎるため、土曜日、日曜日と云え出張が不可能と云う状況と思われる面もあり、また本講習会は、基本的には旅費、宿泊費は参加者が負担する事によって成り立っているので、参加できなかった検査担当者の理由として出張旅費が工面できないというのも少数見られ、参加者の熱意を眼前にした時、病院側あるいは行政側の何らかの対応が今後この種の講習会には求められると考える。

本来の目的である急性期病院からの参加者を見ると、アンケートで自分の病院のカテゴリーに混乱した例も少数あったが、少なくともエイズ診療

拠点病院の中央臨床検査施設以外からの参加者は初年度、前年度に比較して着実に増加している。第1回目も数名の民間検査センターからの参加者があったが、2月1日の時点で3回を通して12施設が拠点病院以外の施設に該当しており、第2回目以降も民間検査施設からの参加が見られる。この事は主催者にとっては歓迎すべき事で、少なくとも、この講習会の存在が次第に広く知られるようになってきている事は間違いのないものと思われる。

本研究の課題の一つは如何にして自己点検、再学習の方法を確立するかである。そのため赤痢アメーバ、トキソプラズマ、ニューモシスティス、クリプトスポリジウムと4種類のCDを作成し、講義内容、診断方法手技、病原体の形態的所見、組織病理所見などを含めた形にした。既にクリプトスポリジウム、ニューモシスティスのCDは昨年度に作成を終わり、同様に第1回目の参加者には全員配付した。近々赤痢アメーバ、他も完成予定であり、今年度第1回目の参加者及び昨年参加者にも合わせて配付する予定である。

今年度はまだ第1回を終了しただけであるが、上記のように40名中6名が2回以上の参加者であった。この事は、第2回目、3回目も想定できる事であり、案内にも再参加を積極的に推奨したせいであろうと思われるが、本講習会が上述のように広く知られてきただけでなく、必要性も認識されて来ている事を示すものかも知れない。確かに1回程度の講習では確実な診断技術の定着が危ぶまれると云う事態も考えられ、今後の対応の際に考慮を払うべき問題と思われる。この意味で、金沢大学のホームページを利用した評価システムや、寄生虫学会のコンサルテーションシステムの積極的な活用の推進を計って行く必要があると考える。

### 3. アンケートの内容と解析

効果的な診断技術移転法の確立について、参加者の意見を聞くことは極めて重要であることは明らかである。今年度第1回目の講習会も昨年のアンケートと同じものを使用し、傾向を比較検討できるようにした。回収率は、第1回目の参加40名中37名であった。今回のアンケートでは、再参加を積極的に推進した事もあって、以前の講習会の参加者に対しては、技術の定着度について自己評価を尋ねたが、2回以上これまで参加した者では

ある程度定着しているが、やはり繰り返して参加し、検査手法、形態的特徴等に慣れることが有用であると言う意見は複数回参加者のほぼ全員がかなり強く持っている事が前年度のアンケートと同様に明らかになった。検査の現場に戻ればこのような原虫性疾患の診断の機会がそうあるわけではなく、自信をもって診断に当たる事は、1回の参加で得た経験ではまず不可能であると言う意見に基づくもので、繰り返して講習会やその他の自己点検、評価のシステムにアクセスする事がどうしても必要であると言う見解に一致する。この種の意見は、実はこの講習会を開催した平成9年度より最も強く見られたものである。

前年度よりCDによって再学習を可能としたり、コンピューターネットワーク上で診断技術の点検ができたり、学会のホームページを通して、専門家に依頼するルートなど、いわば補助的な診断手法移転法は次第に確立されてきたものと考えられる。今回のアンケートにおいてもCD配布はほぼ全員が希望し、やはり9割近くが金沢大学のネット上で診断技術点検に参加したいと言う希望を示した。寄生虫学会のサイトにアクセスした経験を有している参加者も1~2存在した。

しかしながら、前年度にも述べたように、恐らくこのような情報ネットワーク関連手段を講じて、エイズの日和見原虫感染症に対応すべき人材育成という面から考えると、Face to Faceで行う講習会の必要性は診断技術移転についてみればそれほど変わらないのではないかと考えている。むしろ、この種の多数の指導者のもとで討論しながら技術を獲得して行くと言うスタイルの方が、回り道のような情報手法の導入によって、診断可能なリソースそのものへのアクセスルートは多様化されてゆくであろう。しかし、繰り返しになるが本講習会のように、できるだけ多数の実習担当者を起用し、ひとつひとつ疑問に対する答えを講師から得ながら、時間をかけて技術を自分の中で定着させて行くのがcost effectiveとは言えないであろうが、最も信頼度の高い理想的な方法であろう。恐らくCDやネットワーク上の点検は、上述のようにその補助的な役割を担うに過ぎないものと思われる。しかし、重要な事は繰り返し接する事であり、その意味では講習会と情報技術を用いた補助手段を併用する事が技術移転には最も良好な方

法である。この意味で、今年度再参加を積極的に推進した事は良い影響を与えたものと言えよう。今後もこの方向を堅持すべきであろう。

## まとめ

今次研究班における本研究分担者の研究目的は、エイズに伴う日和見原虫感染症の講習会開催を行うと同時に、それを通して、効率的な情報・技術移転方法を確立し、自己点検・評価法も検討して、一般化され得るスキームを作成する事である。当然このスキームは他の診断技術の講習会に際しても適用されることが期待される。また、今回と従来の講習会の大きな差異この点を今後の検討で確認し、最終的に効果的な診断技術移転策を確立するべく検討を行って来た。その結果、今年度第1回までの成果に基づいて、この種の技術移転に際しての留意点を以下のように提言したい。これによって行政、学会サイドからの一層活発な働きかけを期待したい。

- (1) 少なくともこの種の講習会は2日程度で関東、関西でそれぞれ1回ずつ行う必要がある。
- (2) 情報の開示は極めて重要で、文書による案内のみならず、できるだけ多数の関連学会の協力を得て、ホームページに掲載する等、周知を計るべきである。
- (3) 実施に際しては繰り返してのFace to Faceの学習が必要であるため、再参加、同一の施設よりの複数参加なども推進する必要がある。
- (4) 実習を主体とするべきで、監督指導できる人材をできるだけ多数配置し、参加者と討議しつつすすめる必要がある。これにより診断能力の向上がより一層期待できる。
- (5) 各参加者は施設の代表として送られてくる場合もあるので、実習材料の配布、講義／実習内容を含んだCD等の情報媒体の提供等を行う。これによりある程度の補助的な自己点検、自己評価が行なえるものと思われる。
- (6) 情報ネットワーク等を通じた技術点検評価システムも補助的な手法として有用と思われる。適切な学会のコンサルテーションシステムの導入等、積極的に取り入れられるべきである。
- (7) 最も重要なのは、この種の技術移転のための講習は継続性が担保される必要がある事である。そのための財政的措置、人的な措置は行政、学会

サイドが協調して対応し、講習会が長期間継続して行えるようにすべきである。臨床検査技師レベルでのこのタイプの講習会はニーズが高い。事実、アンケートによれば自身が行った検査結果について十二分に自信を持っている検査技師はそう多くはない。多くの場合、専門家にその都度確認を依頼したり、専門書に頼ったりしている。また、このようなルートも確保できない病院がある事にも留意すべきである。

今期はエイズ診療拠点病院だけでなく、急性期疾患を扱う病院をも対象としているが、このようなアプローチが上記のような留意点にのっとりうまく機能すれば、わが国で増加しつつあるHIV感染症のみならず、他の感染症の診断技術移転などにも応用可能となるものと期待される。最後に現在まで本研究分担者がこの事業に従事して感じた問題点を挙げて稿を終りたい。

- (1) エイズ診療拠点病院は明らかに多極分化している。病院により本講習会のような企画にレスポンスが全く異なっている事、あるいは少数の単一病院が多数の参加者を送り込んでくる事等、勘案すればエイズ診療の強化のために拠点病院の再整備が必要ではないか。
- (2) 今回の9年にわたる講習会では、地方自治体の保健所は全く対象とならなかった。保健所のCapacity Buildingは国立感染症研究所等の役割であろうが、拠点病院の制度と効率的な連繋が必要ではないのであろうか。恐らく現在のエイズ検査、診療での保健所の役割の故か、全く9年間保健所からのアプローチはなかったのが講習会の対象とならなかった主な理由である。

## 謝辞

今年度第1回目の講習会開催に際しては、京都府立医科大学の御厚意で講義施設、顕微鏡を含む実習施設を使用させて頂いた。また実習の監督者としても、研究協力者の有菌教授以外にも同大学医動物学教室のスタッフ、及びやはり研究協力者である金沢大学、井関教授の教室の方々の全面的な協力が得られた。記載して、謝意を表したい。

## 論文

- 1) Khalifa SAM, Imai E, Kobayashi S, Haghghi A, Hayakawa E, Takeuchi T

Growth-promoting effect of iron-sulfur proteins on axenic cultures of *Entamoeba dispar*. *Parasite*, 13, 2006 (in press).

- 2) Kobayashi S, Imai E, Haghghi A, Khalifa SAM, Tachibana H, Takeuchi T  
Axenic cultivation of *Entamoeba dispar* in newly designed yeast extract-iron-gluconic acid-dihydroxyacetone-serum medium. *J Parasitol*, 91, 1-4, 2005.
- 3) 小林正規、前田卓哉、竹内 勤  
赤痢アメーバの抗原検出法。シンポジウム「寄生虫疾患診断に用いる検査キットの諸問題」、*Clin Parasitol*, 16, 2006 (印刷中)
- 4) Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T  
*Entamoeba invadens*: cysteine protease inhibitors block excystation and metacystic development. *Exp Parasitol*, 109, 27-32, 2005
- 5) Makioka A, Kumagai M, Takeuchi T, Nozaki T  
Characterization of protein geranylgeranyltransferase I from the enteric protist *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol*, 2006 (in press).
- 6) Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T  
Effect of artificial gastrointestinal fluid on excystation and metacystic development of *Entamoeba invadens*. *Parasitol Res*, 2006 (in press).

## 学会発表

- 1) 竹内 勤、有菌直樹、井関基弘、塩田恒三  
「エイズに伴う日和見原虫感染症の診断に関する講習会」実施経過と問題点について。第46回日本熱帯医学会大会、京都

## 1. 主要なWWWサイト

日本寄生虫学会：学会の公式ウェブページ <http://jsp.tm.nagasaki-u.ac.jp/welcome-2.html>  
 コンサルテーションとして医療従事者むけの寄生虫に関する相談窓口を設けているページであり、国内外の主要な寄生虫関連サイトはここからリンクされている。

熱帯病に対するオーファンドラッグ開発研究班 <http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/daidai/orphan/index.html>  
 ヒューマンサイエンス総合研究事業によって運営されている研究班のサイトである。国内で発生する輸入熱帯病や寄生虫疾患の治療に必要な稀用薬を輸入、保管、供給している。治療の指針、薬剤保管者等に関する冊子「寄生虫病薬物治療の手引き」が上記研究班より出版されている。

Asian Center of International Parasite Control (ACIPAC) <http://www.tmd.ac.jp/med/mzoo/acipac/>  
 我が国の国際寄生虫対策（橋本イニシアティブ）による人材育成、その他、東南アジアにおける寄生虫疾患制圧のためのセンターのサイトである。第1期の5年の計画は終了したが、近々わが国より再度アドバイザーが赴任する事となっている。東南アジアにおける状況を知るのに有用である。

American Society of Parasitologists <http://asp.unl.edu/>  
 米国寄生虫学会のサイトであり、ヒトの疾病のみならず、植物、魚類等幅広い対象の寄生虫疾患を扱っている。

CDC DPD Home Page <http://www.cdc.gov/ncidod/dpd/>  
 米国感染症対策疾病センター(Center for Disease Control and Prevention, National Center for Infectious Diseases)の寄生虫部門であるDivision of Parasitic Diseasesのホームページ。寄生虫疾患診断サポート(DPDx)で寄生虫疾患の解説、診断法、検査材料のCDCへの送付法まで記載されている。優れたサイトである。

World Health Organization <http://www.who.int/ten/>  
 WHO（世界保健機関）の公式サイトである。Weekly Epidemiology Recordも毎週公開されている。

厚生労働省検疫所「海外渡航者のための感染症情報」 <http://www.forth.go.jp/>

## 2. 主要なメーリングリスト

ProMED(PROgram for Monitoring Emerging Diseases)  
 世界におけるEmerging diseasesの発生をいち早く通知し、対策、サーベイランスの方法等について意見交換できる。申し込みは、<http://www.promedmail.org/>にアクセスし、subscribeのページから行う。

EID (Emerging Infectious Diseases)=a CDC monthly list <http://www.cdc.gov/ncidod/subscribe.htm>  
 これに加入するとCD発行の雑誌、Emerging Infectious Diseasesが発行される度に、目次を知らせてくれる。

MMWR (Morbidity and Mortality Weekly Report)- a CDC list <http://www.cdc.gov/mmwr/>  
 上記にアクセスし、free subscriptionにより申し込む。

(以上のデータは、嶋田雅暁、赤尾信明、石渡堅治、奥祐三郎、奥沢英一、竹内 勤、名和行文、西山利正、原 樹、濱田篤郎、堀尾政博 日常診療で役に立つ寄生虫情報システム。治療、86, 2653-2658, 2004より一部改変して引用し、論文は本講習会において参加者に配付した)

## 難治性クリプトコッカス症に対する免疫療法の開発と免疫再構築症候群の病態解明に関する研究

分担研究者：川上 和義

(東北大学医学部保健学科基礎検査学講座 病原検査学分野)

研究協力者：金城 武士、宮城 一也

(琉球大学大学院医学研究科感染病態制御学講座 分子病態感染症学分野)

■研究要旨 HIV 感染者におけるクリプトコッカス症の合併頻度はそれほど高くはないものの、HAART 時代においてもなお重要な日和見感染症のひとつである。ひとたび末期エイズ患者にクリプトコッカス髄膜脳炎が発症すると重篤化して致死的になることも稀ではなく、たとえ治療に成功しても長期にわたる抗真菌薬の投与を余儀なくされることも多い。したがって、難治性クリプトコッカス症では、HAART 時代においても、強力な抗真菌化学療法とともに、免疫防御能の賦活化を介した治療戦略の開発が期待される。また一方では、HAART によって低下していた免疫能が回復するにつれて、クリプトコッカス由来の抗原に対する過剰な免疫反応にともなう免疫再構築症候群 (IRIS) が問題になっている。これまでに我々は、マウスを用いた致死性クリプトコッカス感染モデルにおいて合成 CpG-オリゴ DNA (ODN) が Th1 免疫応答の誘導を介して肺及び脳内における感染を制御しうること、そしてクリプトコッカス由来のマンノプロテイン (MP) が樹状細胞を介して CpG-ODN の治療効果に関与することを明らかにしてきた。本年度は、CpG-ODN の感染防御効果と MP 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実施し、以下のような知見が得られた。1) CpG-ODN はフルコナゾールによる致死性マウスクリプトコッカス症の治療効果をさらに増強した、2) CpG-ODN はヒト末梢血単球由来樹状細胞に対して IL-12 産生誘導活性を示した、3) CpG-ODN は MP 刺激によるヒト樹状細胞からの IL-12 産生を増強した。以上の研究成果から、CpG-ODN が難治性クリプトコッカス症に対して抗真菌化学療法のアジュバントとして使用できる可能性が示唆された。



## 研究目的

免疫系は細菌やウイルスなど原核生物由来のDNAを認識するシステムを保有しており、Toll-like receptor (TLR) 9がその認識に深く関与している。1990年代半ばにKriegらは、これらのDNAの本体が非メチル化CpGモチーフ(5'-Pu-Pu-CpG-Pyr-Pyr-3')であることを明らかにした。合成したCpGモチーフを含むオリゴDNA(ODN)は、マクロファージ、樹状細胞、NK細胞などの自然免疫細胞を活性化し、Th1関連サイトカインを産生誘導、さらにその機能成熟を促す作用を有している<sup>1,2)</sup>。一方、CpG-ODNがTLR9に作用すると、アダプター分子であるMyD88を介して一連の活性化シグナルが伝達され、各種サイトカインや細胞表面分子の発現が誘導されることが明らかにされた<sup>3)</sup>。

エイズの重要な日和見病原真菌であるクリプトコッカスは、細胞性免疫の低下した宿主に感染、発症し、高率に難治性の髄膜脳炎を発症させることが知られている。その感染に対する防御の主体は細胞性免疫であり、Th1サイトカインが重要な役割を担っている<sup>5-10)</sup>。昨年度までの研究では、致死性クリプトコッカス肺感染マウスモデルを用いて感染防御免疫応答に対するCpG-ODNの影響について検討を行った。CpG-ODNは肺からの真菌の排除を促進するのみならず、中枢神経系への播種性感染を予防する効果のあること、そして感染局所においてTh1サイトカイン産生を誘導すること、樹状細胞による真菌抗原のT細胞への提示及びTh1細胞への分化を促進することなどを明らかにしてきた<sup>11)</sup>。

そこで本研究では、エイズに合併する難治性クリプトコッカス症に対するCpG-ODNを用いた免疫療法の可能性について検討する目的で、抗真菌薬とCpG-ODNによる併用投与の効果、そしてヒトの末梢血単球由来樹状細胞に対する反応性について解析を行った。

## 研究方法

### 1. マウス

7~9週齢雌のCDF-1マウスを使用した。実験によっては、C57Bl/6マウスも用いた。すべてのマウスは、琉球大学医学部附属実験動物センター、東北大学大学院医学系研究科附属動物実験施設においてSPF環境下で飼育された。また、実験のプ

ロトコールドは琉球大学及び東北大学の動物実験倫理委員会の承認を得ている。

### 2. *C. neoformans*

長崎大学医学部第二内科で樹立された*Cryptococcus neoformans*(Cn)臨床分離株YC-11(河野茂教授より供与)、莢膜欠損変異株Cap67(ボストン大学Stuart M. Levitz教授より分与)を使用した。真菌はポテトデキストロース寒天培地にて培養、2~3日後に生理食塩水で $2 \times 10^6$ /mlに調整し、25ゲージのサーフロー針の外筒を用いて50 $\mu$ lを直接気管内に接種した。YC-11をマウスに経気道的に感染させると、感染は肺にとどまらず脳播種を起こして3~6週でほぼ全例が死亡する<sup>7)</sup>。実験によっては、これらの真菌をYeast nitrogen液体培地で5日間培養後、得られた培養液中のマンノプロテイン(MP)をConAカラムにて精製した。

### 3. CpGオリゴデオキシヌクレオチド(CpG-ODN)

マウス型CpG-ODN1826(TCCATGACGTTTCCTGACGTT)とヒト型CpG-ODN2006(TCGTCGTTTGTGCGTTTTGTCGTT)を使用した。また、コントロール(CNT)-ODNとして、それぞれ下線部のCGをGCに置換したものを合成し用いた。合成DNAはすべてS化し、HPLCにて精製した。また、リムルステストにて有意なエンドトキシンの混入も認められなかった。

### 4. CpG-ODN及び抗真菌薬の投与

マウスに、CpG-ODN1826またはコントロールODN 20  $\mu$ g/マウスを感染1日、3日、7日後、そして以後は1週間に1回腹腔内に投与した。また、抗真菌剤であるフルコナゾール(FLCZ)10mg/kgは感染後4週間連日腹腔内に投与した。

### 5. 気管支肺胞洗浄

CpG-ODNまたはCNT-ODNを感染マウスに投与し、感染7、14日後に25ゲージのサーフロー針の外筒を用いて生理食塩水1mlにて気管支肺胞洗浄(BAL)を行い、得られたBAL液中のサイトカイン濃度をELISAキットにて測定した。

## 6. 樹状細胞の作製

C57Bl/6 マウスから得られた骨髄細胞を GM-CSF と 9～10 日間培養することで骨髄細胞由来樹状細胞 (BM-DC) を作製した。また、ヒト末梢血単核球にマイクロビーズ結合抗マウス CD14 抗体を反応させ、磁気細胞分離装置 (MACS) にて CD14 陽性単球を分離し、さらに GM-CSF 及び IL-4 とともに 7～8 日間培養することでヒト単球由来樹状細胞 (Mo-DC) を作製した。得られた DC は、CpG-ODN の存在下または非存在下でクリプトコッカス由来 MP と培養し、48 時間後に培養上清中の IL-12p40 濃度を ELISA にて測定した。

## 研究結果

### 1. CpG-ODN と FLCZ 併用による致死性クリプトコッカス症に対する治療効果

CpG-ODN のような免疫賦活薬の臨床応用を考えると、単独投与よりも抗真菌薬との併用投与が

現実的である。そこで本研究では、抗真菌薬である FLCZ と CpG-ODN との併用効果について検討を行った。両薬剤の投与は図 1 のようなスケジュールに従って実施した。図 2A に示すように、CNT-ODN 投与 (無治療) マウスでは感染 5 週以内に全例が死亡したのに対して、CpG-ODN または FLCZ 単独投与では明らかな生存期間の延長効果が認められた。さらには、CpG-ODN と FLCZ をともに投与したマウスでは、各薬剤の単独投与に比較して有意な生存期間の延長が認められた。

感染 3 週後における肺及び脳内生菌数の検討でも、FLCZ 単独投与に比較して、CpG-ODN 併用投与では有意な臓器内菌数の減少が認められた (図 2B)。一方、感染 7 日または 14 日後の肺内における IL-12、IFN- $\gamma$  産生では FLCZ 単独群に比較して CpG-ODN 併用群で有意な増加がみとめられ、逆に IL-4 産生では明らかな減少が観察された。

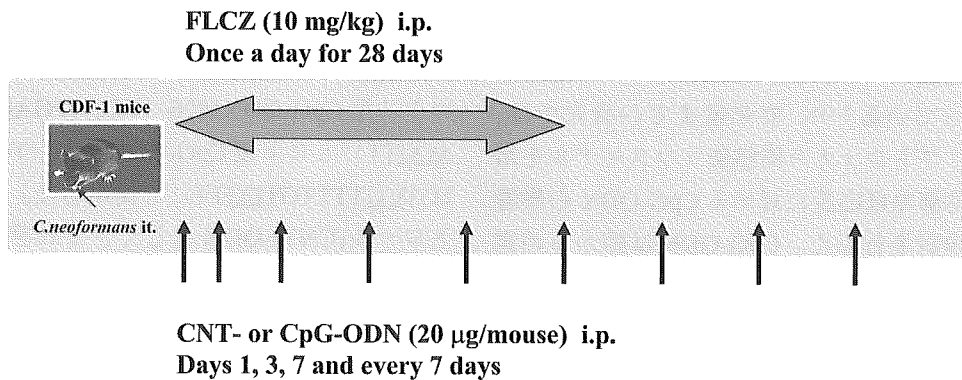


図 1. 致死性クリプトコッカス症における FLCZ と CpG-ODN の投与スケジュール

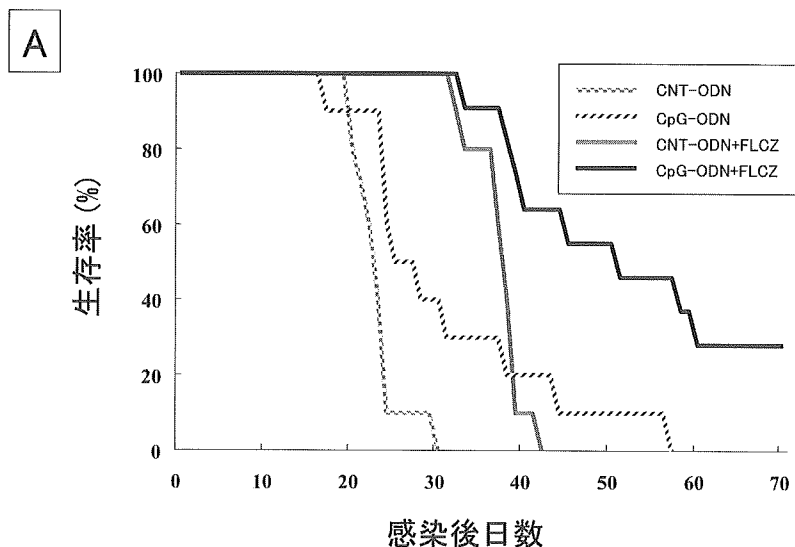


図 2A. CpG-ODN と抗真菌薬による併用療法

## 2. CpG-ODNによる樹状細胞からのIL-12産生誘導効果

*in vivo*におけるCpG-ODNの感染防御機構においては、樹状細胞からのIL-12産生、そしてそれにとともなうTh1免疫応答の誘導が重要である。そこで、マウス骨髄細胞をGM-CSFとともに培養することによって作製したBM-DCをマウス型CpG-ODN1826で*in vitro*刺激したところ、著明なIL-12産生が観察された。さらに、ヒトにおいても同様な活性がみられるのかを検討するために、末梢血単球をGM-CSFおよびIL-4とともに培養することで得られたMo-DCをヒト型CpG-ODN2006で刺激すると、マウスほどではないもののわずかにIL-12産生が誘導された。

## 3. CpG-ODNによるクリプトコッカスMP刺激樹状細胞からのIL-12産生増強効果

昨年度の研究で、クリプトコッカスの主要なT細胞抗原であるMPをパルスしたBM-DCは、あらかじめ真菌で感作されたマウスから得られたリンパ節細胞の増殖反応及びIFN- $\gamma$ 産生を増強すること、そしてMPでBM-DCをパルスする際にCpG-ODN1826を添加するとこれらの反応が有意に増強されることを示した。そこで、ヒト単球由来樹状細胞Mo-DCをMPで刺激する際にCpG-ODNを添加しその影響について検討したところ、Mo-DCはMP単独でも明らかなIL-12産生を誘導し、さらにCpG-ODN2006を添加するとこの反応が有意に増強された(図3)。

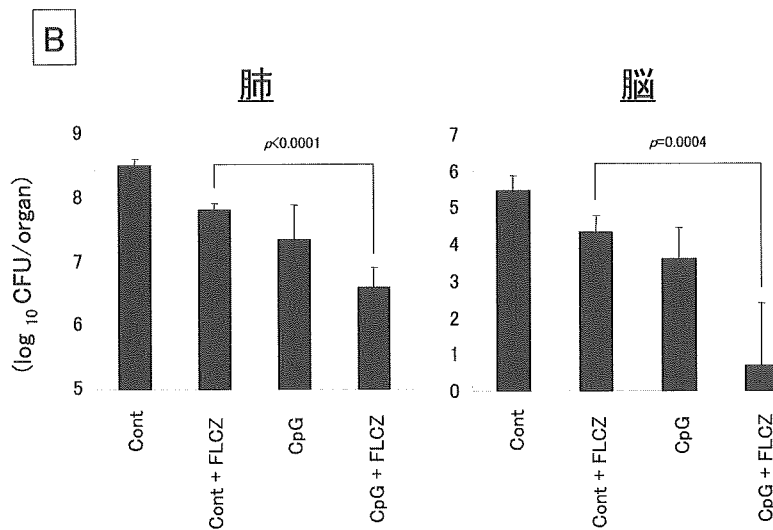


図2B. CpG-ODNと抗真菌薬による併用療法

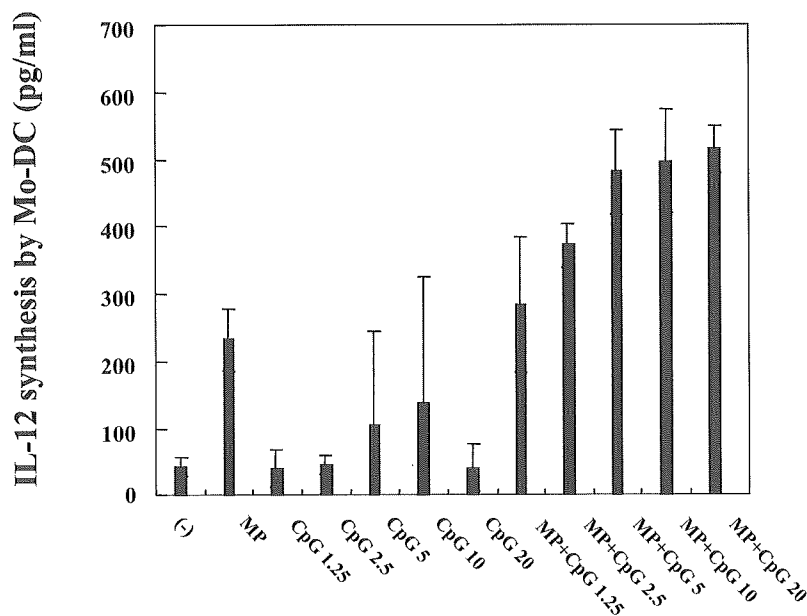


図3. CpG-ODNによるクリプトコッカス・マンノプロテイン刺激ヒト末梢血樹状細胞からのIL-12産生増強効果

## 考察

クリプトコッカス症は HIV 感染の末期に合併する日和見真菌感染症であり、初感染臓器である肺から中枢神経系に血行性播種を起こして致死的な髄膜脳炎を引き起こす。2000 年に米国感染症学会から発表されたガイドライン<sup>12)</sup>では、HIV 合併クリプトコッカス症の治療は、最初の 2 週間のアンホテリシン B とフルシトシンによる導入療法に引き続き、フルコナゾール静注による 10 週間の地固め療法、そして生涯にわたるフルコナゾール内服による維持療法が必要とされている。また、このような標準的治療を行っても、2 週後に 12%、10 週後に 26% が死亡すると報告されており、HAART 時代の現在においてもなお予後の悪い疾患である<sup>13)</sup>。

これまでに我々は、CpG-ODN のクリプトコッカス感染防御における治療効果について致死性マウスクリプトコッカス感染モデルを用いて検討を行ってきた<sup>11)</sup>。このモデルでは、CpG-ODN を投与すると、CNT-ODN と比べて Th1 反応および感染防御能が増強した。このことから、CpG-ODN がクリプトコッカス感染後において IFN- $\gamma$  の産生を誘導して感染防御に働くことが明らかとなった。しかしながら、臨床的には免疫賦活薬が単独で感染症治療に用いられることは考えにくく、抗真菌

薬による化学療法との併用治療を考慮することが現実的である。そこで本研究では、抗真菌薬である FLCZ と CpG-ODN との併用効果について検討を行い、FLCZ の単独投与よりも CpG-ODN を併用した方が有意に治療効果が高まることを明らかにした。この結果は、CpG-ODN が抗真菌薬による化学療法のアジュバント薬として臨床的にも有用である可能性を示唆するものである。

昨年度までの研究では、致死性マウスクリプトコッカス感染モデルに CpG-ODN を投与することで、感染局所における IL-12 産生を増加させ、Th1 免疫応答を著明に誘導することを示してきた。これらの知見に一致して、今年度の解析では、CpG-ODN 及びクリプトコッカス由来の菌体成分である MP がマウスのみならずヒトにおいても樹状細胞からの IL-12 産生を誘導すること、そして両者を併用すると IL-12 産生が一層増強することが明らかになった。また、1 症例のみでの検討ではあるが、肺クリプトコッカス症症例から得られた末梢血単核球は、*in vitro* において MP に CpG-ODN を同時に添加することで単独刺激よりもより高い IL-12、IFN- $\gamma$  産生が認められた（データ未発表）。これらの結果から、マウスで得られた知見がヒトにおいても同様に認められる可能性のあることが推察された。

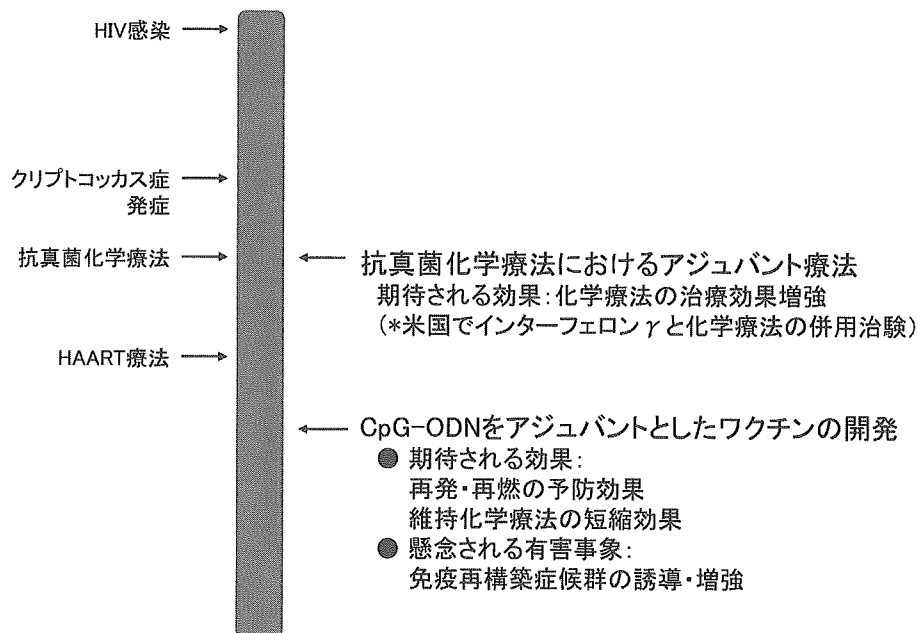


図 4. 難治性クリプトコッカス症に対する CpG-ODN の臨床応用の可能性