

CMV 感染などの日和見感染症や、著明な骨髄抑制を認め、HAART の併用が望ましいと考えられたが、両例とも著しい嘔気により化学療法中の HAART の併用は困難であった。

欧米では Burkitt Lymphoma は AIDS 関連の全身性悪性リンパ腫の 20% を占めており、DLBCL は減少傾向にあると報告されている。今後日本においても Burkitt Lymphoma が増加する可能性がある。

③ HIV 合併血液悪性腫瘍に対する造血幹細胞移植療法

都内複数施設へのアンケート調査と当センターでの試み

研究目的

HIV 合併血液悪性腫瘍は予後不良であり有効な治療法の確立が求められている。このような予後不良例に対して、非 HIV 患者においては、積極的な造血幹細胞移植療法が血液悪性腫瘍を治癒に導く治療法とされている。

近年、米国および欧州から HIV 関連悪性リンパ腫に対する造血幹細胞移植療法が報告されている。しかし、日本での報告は少なく、我が国における HIV 関連血液悪性腫瘍に対する造血幹細胞移植の実態は不明である。

今回、我が国における HIV 合併血液悪性腫瘍に対する造血幹細胞移植療法の実態を調査し、HIV 合併血液悪性腫瘍に対する造血幹細胞移植療法の適応について検討する。

研究方法

東京都内の造血幹細胞移植施設 3 箇所に HIV 陽

性患者に対する造血幹細胞移植療法の経験に関する質問紙を送付し、移植症例の患者背景、移植方法、生着率、生存期間、移植に伴う合併症などについて調査した。回答のあった症例について集計と検討を行った。また、当センターでも移植を検討している HIV 合併悪性リンパ腫例がありその症例についても報告する。

研究結果

(1) 都内複数施設の調査結果

質問紙を送付した 3 施設すべてから回答を得た。合計症例数は 4 例、移植例 6 例（再移植 2 例を含む）

内訳は、多発性骨髄腫 1 例、Ph1 陽性 ALL 1 例、成人 T 細胞白血病リンパ腫型 1 例、重症型再生不良性貧血 1 例であった。

幹細胞ソース：血縁同種骨髄移植 2 例（3 回）
自己末梢血幹細胞移植 1 例
臍帯血移植 1 例（2 回）
移植前処置：骨髄破壊的前処置 3 例
骨髄非破壊的前処置 1 例

表 2 に各症例について移植時の年齢、性別、移植方法と前処置、移植中における HAART 併用の有無、移植時の CD4 細胞数、HIV ウイルス量、移植合併症および生存の有無と生存期間についての詳細を述べた。

調査結果要約

東京都内 3 施設への質問調査結果では、4 症例の HIV 陽性患者に対して造血幹細胞移植が施行されていた。造血幹細胞移植療法は、自家移植、同種移植、臍帯血移植など多様な幹細胞ソースが利

表 2. HIV 合併血液疾患に対する移植症例（都内複数施設への調査結果）

Case	疾患/年齢	移植法/移植前処置	移植回数	HAART / CD4 / HIV量	合併症	生存	生存期間(月)
1	MM 41 男	Auto/ L-PAM	1	なし /272 />1.5×10 ⁶	移植後早期 感染症/再発	死亡	19
2	ALL 30 女	CBT/ CY-TBI	1	あり /72 /<50	なし	生存	26
3	ATL 51 男	Allo/ FluMeIT BI /ATG	2	あり /61 /<50	再発	死亡	2
4	AA 47 男	Allo/ CY-TBI	2	あり /630 /<50	Cystitis, CMV, VRE, MRSA	死亡	4

用されていた。

移植対象症例は、Ph1陽性急性リンパ性白血病やATLなど予後不良悪性腫瘍、また重症型再生不良性貧血など通常治療では治癒が極めて困難なものであった。HIV関連リンパ腫に対する造血幹細胞移植例は、今回の調査では見出せなかった

(2) 当センターでの移植予定例について

43歳女性。現病歴：2005年6月に胃部不快感で発症。近医受診し、十二指腸粘膜下腫瘍指摘。生検にてDiffuse large B cell lymphomaと診断され、精査中にHIV陽性を指摘された。診断時のCD4=111/μl、HIV-RNA=1.9×10⁵コピー/ml。

経過：CHOP療法1コース施行後に顔面神経麻痺、意識変調あり、髄液検査にて浸潤をみとめた。以後、MTX大量療法5コース、AraC大量療法1コース後に自己末梢血幹細胞採取。

2006年1月、乳房に再発あり、RICE療法によるサルベージ療法を施行している。抗HIV療法はd4T、3TC、NFVで継続中である。今後、MEAM療法を前処置とする自己末梢血幹細胞移植を実施予定である。

考察

今回の調査では、都内3施設において同種造血幹細胞移植、臍帯血移植、自己末梢血幹細胞移植など様々な方法による造血幹細胞移植療法がHIV陽性患者に対して施行されていた。対象疾患は、急性白血病や成人T細胞性白血病リンパ腫など極めて治癒の困難なものに限られていた。

近年、米国や欧州より難治性再発性HIV関連リンパ腫に対するHAART併用でのAuto-stem cell transplantationの妥当性および有効性が報告されている。国内でも既に、HIV陽性患者に対して同種造血幹細胞移植など高度な幹細胞移植療法が既に実施されていることから、HIV関連リンパ腫に対する自己末梢血幹細胞移植については技術的には十分実施可能と考える。

今回のHIV関連血液疾患に対する造血幹細胞移植療法の実態調査を踏まえ、今後のHIV関連リンパ腫に対する有望な治療戦略として、HIV関連リンパ腫に対する自己末梢血幹細胞移植についての試案を作成した。

対象：難治性再発性HIV関連リンパ腫

除外：HAART不応例、CD4<100/μl、60歳以上。

方法：ESHAP、ICEなどサルベージ療法2-3コース施行後に自己末梢血幹細胞採取。

MEAM(MCNU, VP16, AraC, Melphalan)による移植前処置を施行後にCD34陽性細胞2×10⁶/kg以上の幹細胞を輸注。

移植中は原則としてHAARTを併用する。

この試案を元にプロトコールを作成し、臨床試験を実施予定である。

結論

HIV関連血液腫瘍に対する造血幹細胞移植療法は、国内で既に複数症例で実施されており一部の症例では長期生存が得られている。この結果を踏まえて難治性HIV関連リンパ腫に対するHAART併用造血幹細胞移植療法の試案を作成した。

参考文献

- 1) Gabarre J, Azar N, Autran B, Katlama C, Lblond V. High-dose therapy and autologous haematopoietic stem-cell transplantation for HIV-1-associated lymphoma. *Lancet*. 2000; 355: 1071-1072.
- 2) Krishnan A, Morina A, Zaia J, et al. Durable remissions with autologous stem cell transplantation for high-risk HIV associated lymphomas. *Blood*. 2005; 105: 874-878.
- 3) Re A, Cattaneo C, Michieli M, et al. High-dose therapy and autologous peripheral-blood stem cell transplantation as salvage treatment for HIV associated lymphoma in patients receiving highly active antiretroviral therapy. *J Clin Oncol*. 2003; 21: 4423-4427.
- 4) Diez-Martin JL, Balsalobre P, Carrion R, et al. Long term survival after autologous stem cell transplant(ASCT) in AIDS related lymphoma patients [abstract 868] *Blood*. 2003; 102: 247a.

研究発表

- 1) 上田 晃弘、吉田 邦仁子、田沼 順子、矢崎 博久、鈴木 康弘、本田 美和子、瀧永 博之、照屋 勝治、源河 いくみ、立川 夏夫、菊池 嘉、岡 慎一、木村 哲 当院におけるAIDS関連悪性リンパ腫の検討 第17回エイズ学会総会、神戸、2003年。
- 2) 恩田順子、上田晃弘、原田壮平、阿部泰尚、福島篤仁、横田恭子、田沼順子、矢崎博久、本田美和子、瀧永博之、源河いくみ、照屋勝治、立川夏夫、菊池 嘉、岡 慎一、木村 哲 HIV感染者に合併したBurkitt Lymphoma/Burkitt like lymphomaの2症例 第18回エイズ学会、静岡、2004年。

3. 当科における *Mycobacterium avium* complex (MAC)に関連した免疫再構築症候群症例の検討

研究目的

国立国際医療センター エイズ治療・研究開発センターで経験した MAC に関連した免疫再構築症候群の症例について調査を行い、その臨床的背景、発症病型、発症後の臨床経過について検討を行った。

研究方法

当センターに通院されている患者のうち 2001 年 4 月から 2004 年 3 月までの期間に CD4 陽性リンパ球数 50/μl 未満の状態から HAART を開始し、3 ヶ月以上の経過観察が可能であった患者を対象として診療録を用いて調査を行い、MAC 関連の免疫再構築症候群をきたした患者 12 例を抽出し、MAC 感染症の対象臓器ごとに分類し、臨床的特徴や治療後の経過についての検討を行った。MAC 関連免疫再構築症候群の定義は HAART 開始後 3 ヶ月以内の「新規に発症した MAC 感染症」および「MAC 感染症の治療中であり臨床的な安定が得られていた患者の増悪」とした。

また、同時期に CD4 値 50/μl 未満の状態から HAART を開始し MAC 関連免疫再構築症候群を来たさなかった患者群を対照群とし、これを含めた患者群を用いて「HAART 開始後の CD4 値、HIV-RNA 量の変動」および MAC 一次予防の効果を検討した。

研究結果

(1) 患者背景 (表 3)

対象は 12 例。発症時の平均年齢は 44 歳、性別は男性 10 例、女性 2 例であった。MAC 一次予防を行っていた症例 1 例 (症例 12) と、MAC 症治療中であった 3 例 (症例 3、10、11) が含まれていた。HAART 開始時および HAART 開始 1 ヶ月後の CD4 陽性リンパ球数は 15.6(1-32)/μl、108.6(18-198)/μl であり、HAART 開始時および HAART 開始 1 ヶ月後の HIV-RNA 量は 5.56log copies/ml、3.36log copies/ml であった。発症前の合併 AIDS 指標疾患はニューモシスチス肺炎が 7 例、サイトメガロウイルス感染症 4 例、食道カンジダ症 2 例、播種性 MAC 症が 2 例であった。

HAART に使用した NNRTI、PI は LPV が 8 例、EFV が 3 例、NFV が 1 例であった。なお、同定された菌種は 1 例のみ (症例 8) *Mycobacterium intracellulare* であり他の 11 例は *Mycobacterium avium* であった。

(2) MAC 症の病型

①肺 MAC 症

5 例の症例があり HAART 開始から発症までの期間は平均 56.2 (18-95) 日であった。臨床症状は 1 例で発熱、1 例で喀痰の増加を認めたのみであり、他の症例は胸部画像検査で偶然に発見された。4 例では喀痰あるいは胃液の培養で MAC が検出され、1 例 (症例 3) は肺 MAC 症の治療中に HAART を開始し、その後肺野の浸潤影が増悪し診断された。診断後に抗菌薬投与が開始あるいは継続され、いずれの症例も臨床的に改善が認められ、治療経過は良好であった。

②表在リンパ節 MAC 症

4 例の症例があった。いずれの症例も HAART 開始直後、平均 11 (7-19) 日後より局所リンパ節の腫脹、疼痛を自覚し、その後腫大リンパ節の吸引穿刺や自壊部から得られた検体および生検リンパ節の微生物学的検索により診断に至った。すべての例で検体より MAC が培養された。抗菌薬開始後も高度の病変部の腫脹、疼痛がみられ HAART の中断に至った症例が 3 例あった。HAART 中止後は速やかに病変部の腫脹は改善し全例でその後 HAART を再開し免疫学的およびウイルス学的成功が得られた。

③播種性 MAC 症

HAART 開始前に播種性 MAC 症治療中患者の HAART 開始後の増悪として診断に至った症例が 2 例 (症例 10、11)、HAART 開始直後より発熱し、開始後 6 日目に抗酸菌血液培養が陽性となり診断がなされた例が 1 例 (症例 12) があった。治療中の増悪であった 2 例については抗菌薬の継続に加えてステロイドの使用により対処し、ステロイドは体温を指標に漸減することが可能であった。

(3) 非発症患者との比較検討

症例群 12 例と対照群 49 例を含めた母集団を用いて発症リスク因子の検討を行った。両群について診療録を参照し HAART 開始 1 ヶ月後の CD4

値、HIV-RNA量の変動を比較した。これらに加え、MAC感染症一次予防の有無とMAC関連免疫再構築症候群の発症の関連について検討した。

なお、HAART開始前にMAC感染症の診断がなされ治療開始されていた症例は観察期間中4例ありうち3例が免疫再構築症候群による増悪をきたした(症例3、10、11)。なお、MAC症治療中に免疫再構築症候群をきたさなかった1例は*M.intracellulare* 腸炎の症例であった。

HAART開始後1ヶ月のCD4値の変動は症例群が $93 \pm 68.6/\mu\text{l}$ 対照群が $92.79 \pm 75.27/\mu\text{l}$ 、HAART開始1ヶ月後のHIV-RNA量の変動も症例群が $2.195 \pm 0.36 \log \text{ copies/ml}$ 対照群が $2.547 \pm 0.608 \log \text{ copies/ml}$ でありともに両群間の有意差は認められなかった。

症例群では12例中3例でMAC一次予防を行っており、治療中の症例は3例であった。対照群で

は一次予防がなされていた症例は25例、治療中の症例は1例であった(表4)。

MAC治療中の症例を除いて、「HAART開始後1ヶ月のCD4値、HIV-RNA量の変動」および「MAC一次予防の有無」と「MAC関連免疫再構築症候群の発症の有無」を変数としたロジスティック回帰分析の結果からは「MAC一次予防」の「MAC関連免疫再構築症候群の発症の抑制」に有効であったと考えられた。

考察

当センターで経験したMAC関連免疫再構築症候群の症例はその臨床病型ごとに特徴が見られた。肺MAC感染症の症例は、HAART開始から発症までの期間は平均56.2日と他の病型よりも緩徐に発症しており臨床症状も軽度であった。いずれの症例も抗MAC薬投与のみで治療に成功していた。

表3. 患者背景

症例	対象臓器	CD4 陽性リンパ球数 (/ μl)		HIV-RNA (log copies/ml)		Regimen	AIDS 指標疾患
		ART 前	ART1 ヶ月後	ART 前	ART1 ヶ月後		
1 76M	肺	26	162	5.949	4.114	d4T/3TC/LPVr	PCP 食道カンジダ
2 47M	肺	32	70	4.763	<2.602	d4T/3TC/EFV	PCP 食道カンジダ
3 31M	肺	29	107	6.342	3.505	AZT/ddI/LPVr	なし
4 29M	肺	9	195	5.748	3.519	AZT/ddI/EFV	PCP
5 54F	肺	13	198	5.176	3.322	d4T/3TC/LPVr	PCP
6 49M	リンパ節	14	67	4.400	2.041	AZT/ddI/LPVr	PCP CMV 網膜炎
7 54M	リンパ節	10	33	6.114	2.544	AZT/ddI/LPVr	CMV 網膜炎
8 21F	リンパ節	16	40	4.748	2.732	AZT/ddI/LPVr	なし
9 28M	リンパ節	22	185	5.740	2.519	d4T/3TC/LPVr	PCP
10 58M	播種性	8	18	6.591	5.322	d4T/3TC/LPVr	播種性 MAC CMV 脳炎
11 27M	播種性	1	21	5.322	2.531	d4T/3TC/NFV	播種性 MAC
12 50M	播種性	7	25	5.845	<2.602	d4T/3TC/EFV	PCP CMV 網膜炎

表4. MAC 一次予防の有無

抗MAC薬の使用	MAC再構築あり(n=12)	MAC再構築なし(n=49)
一次予防あり	1	25
治療中	3	1
投与なし	8	23

表在リンパ節 MAC 症は効果的な抗レトロウイルス治療が可能となり播種性 MAC 症の発症が減少した近年では MAC 症の最も一般的な病型といえる。播種性 MAC 症と比較してその生命予後は良好であることが知られているが、当センターの症例は抗 MAC 薬開始後も局所のリンパ節の腫脹とそれに伴う疼痛が制御困難であり、4 例中 3 例で HAART の一時中断に至った。HAART 中断に際しては抗レトロウイルス薬に対する耐性形性や、免疫能の回復が遅延することに伴う他の日和見感染症の発症リスクを勘案する必要があると考えられるが、当センターで経験した 3 例においては HAART 中断後に局所の炎症が軽減し、十分な抗 MAC 薬投与後に他の日和見感染症を発症する前に HAART を再開し、ウイルス学的成功が得られた。

播種性 MAC 症の 3 例のうち 1 例は HAART 開始直後に播種性 MAC 症が発症しており、これは免疫再構築症候群というよりは通常の播種性 MAC 症が HAART 開始直後に発症したと考えるのが妥当であろう。他の 2 例は播種性 MAC 症治療中の患者の HAART 開始後の臨床所見の増悪として診断された。2 例ともに一時的なステロイド投与による炎症のコントロールが有効であった。ステロイド投与による他の感染症の罹患、増悪のリスクがあるので、投与前に他の感染症の十分な除外を行うことが必要であると考えられた。

MAC 感染症の一次予防は免疫不全患者における播種性 MAC 症の予防は可能であるが、免疫再構築症候群に伴う局所性リンパ節炎は十分に予防できないという報告がある。当センターにおいて CD4 陽性リンパ球数 50/μl 未満の状態から HAART を開始した患者群を用いた解析では MAC 一次予防は HAART 開始後の MAC 症の発症予防に有効であることが示唆されたが、予防中の発症例もみられたためにさらなる症例の蓄積による検討を要するものと考えられた。

参考文献

- 1) Salma C et al. Isolated Pulmonary *Mycobacterium avium* Complex Infection in Patients with Human Immunodeficiency Virus Infection: Case Reports and Literature Review. Clin Infect Dis. 2003; 37:e35-e40.
- 2) Philips P et al. Azithromycin Prophylaxis for *Mycobacterium avium* Complex during the Era of

Highly Active Antiretroviral Therapy: Evaluation of a Provincial Program. Clin Infect Dis. 2002;34:371-378.

研究発表

- 1) 原田壮平、恩田順子、阿部泰尚、福島篤仁、横田恭子、上田晃弘、田沼順子、矢崎博久、本田美和子、湯永博之、源河いくみ、照屋勝治、立川夏夫、菊池 嘉、岡 慎一、木村 哲：当科における *Mycobacterium avium* complex (MAC) に関連した免疫再構築症候群症例の検討 第 18 回エイズ学会、静岡、2004 年。

難治性日和見合併症(悪性腫瘍)に関する研究

分担研究者：佐多徹太郎(平成 15 年度 国立感染症研究所感染病理部)

片野 晴隆(平成 16、17 年度 国立感染症研究所感染病理部)

■研究要旨 エイズ患者にはリンパ腫やカポジ肉腫などの悪性腫瘍が合併する。近年の HAART の導入により、エイズの発症が抑えられ、多くの日和見感染症が予防、治療可能となったが、リンパ腫、カポジ肉腫は増加傾向にあり、予後も悪い。本研究ではエイズ合併悪性腫瘍の本邦における実態調査と治療を考慮した基礎的な研究を行った。主な成果は(1) 本邦におけるリンパ腫、カポジ肉腫の臨床病理学的な統計調査を行い、リンパ腫では HAART 導入以降、EBV 陽性率の減少が見られること、組織型が多彩になっていることを示した。(2) HIV が直接リンパ腫発症に関連した症例を示し、EBV 陰性のエイズ関連リンパ腫の新たな発症機構が示唆された。(3) エイズ関連リンパ腫の発現する接着因子を標的とした治療法の基礎的な検討を行った。これらの知見はエイズ関連リンパ腫およびカポジ肉腫の発症機構の解明や治療法につながるものと期待される。

研究目的

HAART の導入により、エイズの発症が抑えられ、多くの日和見感染症が予防、治療可能であるが、エイズ患者に合併する悪性腫瘍(リンパ腫とカポジ肉腫)は HAART 導入以降も発症率が減少せず、予後も悪いことから、リンパ腫、カポジ肉腫の発症機構の解明と治療法の開発は重要な課題の一つである。日本のエイズ関連リンパ腫の特徴は、多くの症例で Epstein-Barr virus または Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV, human herpesvirus 8, HHV-8) の感染が認められることである。EBV や KSHV はそれ自身が癌遺伝子をコードする「癌ウイルス」と考えられており、本邦のエイズ関連リンパ腫はヘルペスウイルスによる日和見腫瘍という性格を持つと考えられていた。しかし、欧米では HAART の導入以降、エイズ関連リンパ腫の病態の変化が報告されており、本邦でも、HAART 導入後、依然としてリンパ腫

の予後は改善しない。本研究では、まず本邦におけるエイズ関連リンパ腫およびカポジ肉腫の臨床病理学的な特徴を把握し、新たな治療法を開発研究することにより、エイズに合併する悪性腫瘍の減少による生命予後の改善と QOL の向上を究極の目標に研究を進めてきた。

個々の研究テーマとして(1) 本邦におけるリンパ腫、カポジ肉腫の臨床病理学的な統計調査を行い、欧米で報告されているような HAART 導入後において、エイズ関連リンパ腫の組織型や発症部位の変化が見られるかどうかを検討する。(2) EBV 陽性リンパ腫が減少してきている現状から、EBV や KSHV 関連リンパ腫以外のリンパ腫発症機構を検討する。(3) 本邦のリンパ腫に EBV 関連リンパ腫が多いことを鑑み、EBV 感染エイズ関連リンパ腫の発現する接着因子を標的とした治療法につき基礎的な検討を行う。以上 3 点を本研究の具体的な目的とした。

研究方法

1. 症例

エイズ拠点病院の病理に提出された生検例あるいは剖検例につき組織型、EBVの結果を集計した。組織型については2000年に発行されたリンパ腫の最新の分類である新WHO分類(WHO classification of Tumours, Pathology and Genetics of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Jaffe ES et al., IARC Press, Lyon, 2001)に従いあらためて分類しなおした。EBVの検査はin situ hybridizationによりEBERを検出することにより行った。

2. 細胞培養

KSHV感染PEL細胞の細胞株は10%牛胎児血清添加RPMI1640(抗生物質添加済)中で37℃、5%CO₂の培養器にて培養を行った。

3. 動物実験

PEL細胞1×10⁷個を重度複合免疫不全マウスの腹腔に移植した。2ヶ月後に腹腔内に液性腫瘍とともに固形腫瘍を認め、これらのそれぞれの成分を採取し、次のマウスに移植した。こうして継代した腫瘍成分をそれぞれ採取し、タンパクを抽出し保存した。

4. タンパク実験

液性、固形それぞれのリンパ腫成分から抽出したタンパクをEttan DIGEシステム(GE社)を用いて二者間で発現の異なるタンパクの同定を行った。それぞれCy2, Cy3で標識し、同量を混合後、二次元電気泳動を行った。泳動後のゲルはイメージアナライザーで蛍光撮影後、画像をコンピューター上で解析した。液性と固形の間に有意な差のあるスポットをゲルから切り出し、トリプシン消化後、MALDI-TOF Massにより質量分析を行った。

5. 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 and 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。

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。動物実験は国立感染症研究所実験動物倫理委員会の承認を得て行われた。

研究結果

1. 本邦におけるエイズ関連リンパ腫、カポジ肉腫の臨床病理学的統計について

東京地区の3つのエイズ拠点病院におけるエイズリンパ腫の組織型およびEBVの陽性率、発症部位について検討した。症例はHAART導入前の1997年までの症例が39例とそれ以降に診断された症例36例の計75例である。データの解析により以下の結論を得た。

- (1) diffuse large B cell lymphoma (DLBCL)がほとんどであった1997年以前に比べると1998年以降の症例ではバーキットリンパ腫など他の組織型のリンパ腫が見られ、組織型が多彩になっている。
- (2) 1997年以前ではほとんどの症例がEBV陽性であったのに対し、1998年以降の症例ではEBVの陽性率が低くなってきている。特にDLBCLにおけるEBVの陽性率が低下していた。
- (3) 1998年以降の症例ではリンパ節病変の頻度が増加し、中枢神経原発リンパ腫の頻度が減少したなど、発症部位の変化が見られる。

KSHV関連リンパ腫(PELおよびKSHV関連固形リンパ腫)は全例中4例のみであり、HAART導入前後にかかわらず、非常にまれなリンパ腫であることが示された。これらの結果は1998年以降の本邦におけるエイズリンパ腫には多彩な病型が含まれていることを示唆するものであり、正確な診断と病型に適した治療の選択が必要であることが示唆される。

また、カポジ肉腫についても調査した。我々の施設にコンサルテーションされた39症例を検討した結果、平均発症年齢は49.6歳、HIV陽性率は89%であった。HIV感染者では全員が男性であり、HIV非感染者では高齢の女性が多かった。皮膚病変の組織学的病期はpatch 11例 plaque 12例 nodular 11例であった。KSHVは免疫組織学的検索では全例が陽性であった。近年ではより早期に

発見されるようになった傾向があり、本邦における KS の認知の広がりや早期診断が可能になったことが窺えた。

2. HIV インテグレーションにより発症した STAT3 関連リンパ腫の発見

EBV 陽性リンパ腫が減少してきている現状から、EBV や KSHV 関連リンパ腫以外の新たなリンパ腫発症機構が存在するものと考え、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、HIV が直接リンパ腫形成に関与していた可能性のある症例を見い出した。

59 歳の男性エイズ患者の肺に多結節性の病変を認め、化学療法を始めるも約 2 週間後に死亡した。剖検では肺の病変は B 細胞性リンパ腫であることが判明した。EBV や KSHV は病理組織切片上では検出されず、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、1 細胞あたり約 1 コピーの高コピー数の HIV が検出され、サザンブロットでも HIV のリンパ腫細胞ゲノムへの組み込みが示唆された。ゲノムウオーキングにより HIV のインテグレーション部位を検索したところ、HIV は染色体 17 番の STAT3 遺伝子の第 1 エクソン上流に組み込まれていることが判明した。プロモーターアッセイでは 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た。免疫組織化学では本リンパ腫では STAT3 の発現が核内に認められた。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。このことから本リンパ腫は 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、腫瘍化した症例と考えられ、EBV 関連リンパ腫以外の新たなエイズ関連リンパ腫の発症機構の存在が示唆された。

3. 悪性リンパ腫における節外性病変発症機構の検討と新たな治療法の検討

エイズに合併する EBV 陽性 DLBCL は節外性病変を形成し、予後不良の一つの要因となっている。通常のリンパ腫と異なりエイズリンパ腫が節外性病変になる理由は接着因子発現の亢進にある。われわれはリンパ腫の中で唯一、接着因子をまった

く発現していない primary effusion lymphoma (PEL) の細胞株を重度免疫不全マウスの腹腔に移植することで、液性リンパ腫から固形リンパ腫が発症する動物実験モデルを作成した。この系を利用して接着因子の発現に関与するタンパク群の同定を行った。

PEL 細胞株 TY-1 を重度免疫不全マウスの腹腔に移植後、2 ヶ月で腹腔内に液性リンパ腫のほか固形リンパ腫の形成を見た。ここで得られた液性・固形リンパ腫はそれぞれを他のマウスに移植することによりその形質を保持したまま継代が可能であった。接着因子のひとつ LFA-1 の発現を免疫染色及びウエスタンブロットにより固形腫瘍と液性腫瘍とを比較したところ液性腫瘍においては LFA-1 の発現は抑制されていたのに対し、固形腫瘍ではその発現が亢進しているのが確認された。数回の継代の後、液性、固形の二つの成分からタンパクを抽出し、GE 社の Ettan DIGE システムと MALDI-TOF Mass を用いて発現に差のあるタンパクを同定した。その結果、液性リンパ腫に高発現するタンパク 8 個と固形リンパ腫に高発現するタンパク 6 個を同定した。現在これらタンパクのうち接着因子発現と関連する分子を検索中である。

考察

1. 本邦におけるエイズ関連リンパ腫、カボジ肉腫の臨床病理学的統計について

本研究の結果から、本邦においても HAART 導入以降、エイズリンパ腫の病型が変わりつつあることが示された。HAART 導入後、EBV の陽性率が減少したことやバーキットリンパ腫など他の組織型のリンパ腫が現れてきたことは日本のエイズリンパ腫も欧米のそれと近づいてきたことを示している。HAART によるエイズリンパ腫における EBV の陽性率の変化を明らかにした報告はなく、このデータは貴重なものといえる。この結果から示唆される最も重要な点は HAART 導入前にはほぼ単一な疾患であった本邦のエイズリンパ腫が、HAART 導入後には多様な病型を含んだリンパ腫に変化しているという点である。現在、エイズリンパ腫はいずれの病型にしても治療困難であるが、個々の症例がどの病型に属するかを明らかにし、病型ごとに治療を検討していくことがエイズリンパ腫の治療法を考える上で重要なことであろう。

2. HIV インテグレーションにより発症した STAT3 関連リンパ腫の発見

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。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。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。

3. 悪性リンパ腫における節外性病変発症機構の検討と新たな治療法の検討

本来リンパ腫 lymphoma のように-oma のつく疾患は固形腫瘍を意味している。それゆえ、液性リンパ腫 effusion lymphoma という概念は本来のリンパ腫の概念からはずれ、臨床的には理解しにくい病変であった。本研究は PEL 細胞株から液性リンパ腫と固形リンパ腫が作成できる動物実験系を用いて、この二つのリンパ腫の差を明らかにしようとするものである。固形になるかどうかは接着因子の発現に関わっていることは間違いない。接着因子の代表的な分子である LFA-1 はさまざまな白血球系の細胞に発現していることが知られており、免疫系やケモタキシスなど、リンパ球の機能にとって重要な役割を担う。このような細胞接着に関わる LFA-1 の機能は細胞表面にすでに発現している LFA-1 の活性化により起こる。しかし、PEL 細胞ではそもそも LFA-1 の発現そのものが見られない。今回の研究で同定した分子は LFA-1 と連動している分子であり、固形リンパ腫に高発現する分子は LFA-1 の発現に連動する因子、液性リンパ腫で高発現する分子は LFA-1 の発現抑制と同時に連

動する分子といえる。個々の分子の機能的な解析は今後の課題であるが、LFA-1 発現との関わりを調べることにより PEL における LFA-1 発現の抑制機構を明らかにし、他のさまざまな種類のリンパ腫に対する治療に応用できるものと期待される。

結論

エイズ合併悪性腫瘍の本邦における実態調査と治療を考慮した基礎的な研究を行い、(1) 本邦におけるリンパ腫、カポジ肉腫の臨床病理学的な統計調査を行ない、HAART 導入以降のリンパ腫の変化を記載した。(2) HIV インテグレーションが直接リンパ腫発症に関連した症例を示し、新たなエイズ関連リンパ腫の発症機構が示唆された。(3) エイズ関連リンパ腫の発現する接着因子を標的とした治療法の基礎的な検討を行った。今後、これらの知見をエイズ関連リンパ腫およびカポジ肉腫の発症機構の解明や治療法につなげる継続的な研究が望まれる。

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無い。

研究発表

論文発表

- 1) Rosales CM, McLaughlin MD, Sata T, Katano H, Veno PA, De Las Casas LE, Miranda RN. AIDS Presenting with Cutaneous Kaposi's Sarcoma and Bacillary Angiomatosis in the Bone Marrow Mimicking Kaposi's Sarcoma. *AIDS Patient Care STDS*. 2002;16:573-577.
- 2) Fukushi M, Higuchi M, Oie M, Tetsuka T, Kasolo F, Ichiyama K, Yamamoto N, Katano H, Sata T, Fujii M. Latency-Associated Nuclear Antigen of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Interacts with Human Myeloid Cell Nuclear Differentiation Antigen Induced by Interferon alpha. *Virus Genes*. 2003;27:237-247.
- 3) Katano H, Sata T. Human herpesvirus 8. In: Yu VL, Weber R, Raoult D, eds. *Antimicrobial Therapy and Vaccines*. Vol. 1. New York: Apple Trees Productions, LLC; 2003:1243-1247.
- 4) Hasegawa H, Katano H, Tanno M, Masuo S, Ae T, Sato Y, Takahashi H, Iwasaki T, Kurata T, Sata T. BCL-6-positive human herpesvirus 8-associated solid lymphoma arising from liver and spleen as multiple nodular lesions. *Leuk Lymphoma*. 2004;45:2169-2172.

- 5) Katano H, Pesnicak L, Cohen JI. Simvastatin induces apoptosis of Epstein-Barr virus (EBV)-transformed lymphoblastoid cell lines and delays development of EBV lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:4960-4965.
- 6) Katano H, Ali MA, Patera AC, Catalfamo M, Jaffe ES, Kimura H, Dale JK, Straus SE, Cohen JI. Chronic active Epstein-Barr virus infection associated with mutations in perforin that impair its maturation. *Blood*. 2004;103:1244-1252.
- 7) Song J, Yoshida A, Yamamoto Y, Katano H, Hagihara K, Oka S, Kimura S, Yoshizaki K. Viral load of human herpesvirus 8 (HHV-8) in the circulatory blood cells correlates with clinical progression in a patient with HHV-8-associated solid lymphoma with aids-associated Kaposi's sarcoma. *Leuk Lymphoma*. 2004;45:2343-2347.
- 8) Katano H, Ito K, Shibuya K, Saji T, Sato Y, Sata T. Lack of human herpesvirus 8 infection in lungs of Japanese patients with primary pulmonary hypertension. *J Infect Dis*. 2005;191:743-745.
- 9) Katano H, Cohen JI. Perforin and lymphohistiocytic proliferative disorders. *Br J Haematol*. 2005;128:739-750.
- 10) Katano H, Hogaboam CM. Herpesvirus-associated pulmonary hypertension? *Am J Resp Crit Care Med*. 2005;172:1485-1486.
- 11) Asahi-Ozaki Y, Sato Y, Kanno T, Sata T, Katano H. Quantitative Analysis of Kaposi Sarcoma-Associated Herpesvirus (KSHV) in KSHV-Associated Diseases. *J Infect Dis*. 2006;193:773-782.
- 12) 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).
- 13) 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).
- 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 International 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、

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

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）

- 14) 片野晴隆、伊藤金次、渋谷和俊、佐地 勉、佐藤由子、佐多徹太郎。原発性肺高血圧症とヒトヘルペスウイルス 8 感染。第 93 回日本病理学会総会（札幌）2004.6.
- 15) Katano H, Pesnicak L and Cohen JI. Simvastatin induces apoptosis of Epstein-Barr virus (EBV)-transformed lymphoblastoid cell lines and delays development of EBV lymphomas. 29th International Herpesvirus Workshop. (Reno, Nevada, U.S.A.) 2004.7.
- 16) 菅野隆行、秋山ひと美、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 52 回日本ウイルス学会総会（横浜）2004.11.

知知的財産権の出願・登録状況

とくになし。

HAART 時代の日和見合併症に関する研究 分担研究報告書

平成 15 年度
免疫再構築症候群の病態解明と回避の手段、発症時の対応

平成 16 年度
CMV 感染症における免疫再構築症候群の臨床的検討

平成 17 年度
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：遠藤 宗臣¹、藤井 毅¹、山田 晴美¹、岩本 愛吉¹、
永田 洋一¹、小田原 隆¹、岡 慎一²、蕪城 俊克³

（¹東京大学医科学研究所、²国立国際医療センター、

³東京大学医学部附属病院）

■研究要旨

本研究においては、一貫して抗 HIV 療法開始後にみられる日和見疾患の増悪、すなわち免疫再構築症候群の研究を行った。免疫再構築症候群の診断に関して、非定型抗酸菌症に対する特異的免疫の大部分は CD4 陽性 T リンパ球分画に由来すること、ニューモシスティス肺炎の診断法として血中 S-adenosylmethionine が測定可能であることを明らかにした。また、サイトメガロウイルス網膜炎の免疫再構築症候群は、もとの網膜病変が大きく HAART 後の CD4 数の上昇が速やかな症例に多くみられることを示した。これらの種々の免疫再構築症候群が抗 HIV 療法開始後にみられる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。

研究目的

抗 HIV 療法による免疫力の回復に伴い、残存微生物に対する免疫応答が増強する病態が免疫再構築症候群と考えられている。免疫再構築症候群を起こす代表的日和見疾患である非定型抗酸菌症、ニューモシスティス肺炎、サイトメガロウイルス（CMV）網膜炎に焦点を絞り、その臨床的・免疫学的特徴について解析を行った。また、免疫再構築症候群が、CD4 陽性 T リンパ球の増加が未だ認められない時期から発生することから、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発症機序に関与している可能性が推測される。そこで免疫再構築症候群の病態の解明のた

めに、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マイクロアレイを用いて比較することとした。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

非定型抗酸菌症に関してはデタミナー TBGL 抗体キット（協和メディックス社）を用いた特異的抗体の測定、結核菌由来 PPD、MAC 由来 PPD、BCG を抗原とした ELISPOT アッセイを行う。ニ

ニューモシステイス肺炎の診断にはHPLCを用いて血中S-adenosylmethionine (SAM)の測定を行う。CMV網膜炎については、1989年から2004年までに東京大学医科学研究所附属病院と国立国際医療センター・エイズ治療研究センターにて診療を行ったAIDSに合併したCMV網膜炎の、HAART投与期間、血液データ(CD4、CD8、CMV antigenemiaなど)、眼科カルテよりCMV網膜炎の程度や治療内容、眼所見などについて情報を収集した。遺伝子発現解析に関しては、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、CD4陽性Tリンパ球、CD8陽性Tリンパ球、NK細胞、単球を解析する。抗HIV療法開始前後での核細胞分画の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。

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. 平成15、16年度：非定型抗酸菌症、ニューモシステイス肺炎、CMV網膜炎の免疫学的・臨床的解析

過去の保存血清を用いて、細菌学的または臨床的にMACと診断したエイズ症例の血清TBGL抗体を41例で測定した。陽性症例は3例(7.3%)とごく少数であった。MAC IRS中の血清を1症例で測定したが、測定感度以下であった。磁気ビーズを用いてPBMCをCD4陽性分画、CD8陽性分画にわけてIFN-gamma産生細胞を計測すると、陽性細胞のほとんどはCD4陽性分画に存在していた(表1)。MACのIRSを発症する症例はCD4数が50未満の症例であるため、IRS患者でELISPOT法によりMAC特異的反応を検出することは困難であった。ニューモシステイス肺炎患者の血漿中SAM濃度測定は、UV検出法によるSAMでは感度が低いと考えられた。そこで、6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl calbamateを用いてSAMを蛍光誘導体化し、蛍光検出器(RF10A XL, Shimadzu)を使用し、0.5 nMまで測定することが

表1. MAC-PPDに対する反応(ELISPOT)

検体番号	細胞分画		
	total	CD8(+)	CD4(+)
健常者			
1	65 (20)	40 (57)	327 (80)
2	337 (327)	410 (563)	97 (40)
3	107 (30)	0 (3)	137 (40)
HIV感染者			
4	10 (10)	10 (0)	5 (20)
5	257 (160)	160 (110)	500 (493)

10⁶PBMC中のIFN- γ 産生細胞数を示す、()は抗原なしのコントロール検体番号4はMAC IRS中の症例(CD4数1~5)検体番号5はMACの既往のある症例(CD4数200前後、VL < 400)

表2. 眼病変の特徴

	例数(%)	発症時CD4数	HAART開始~発症までの期間(平均)
硝子体炎	6例(18.2%)	188 (41-358)	2.3 (1~6)
網膜前線維症	6例(18.2%)	167 (18-477)	16.0 (3-30)
CMV網膜炎の悪化	2例(6.1%)	191	2 (1, 3)
視神経乳頭新生血管	1例(3.0%)	477	16
嚢胞様黄斑浮腫	1例(3.0%)	257	12

可能となった。CMV 網膜炎に関しては 75 症例のレトロスペクティブな解析を行った。この中で HAART を施行し得なかった 42 例では、経過観察中に新たな眼病変の出現を認めなかった。HAART を施行した 33 例において 13 例 (39.4%) で何らかの免疫再構築症候群の出現を認めた。表 2 に示すように、病変の内訳は、硝子体炎が 6 例、網膜前線維症が 6 例、網膜炎の悪化が 2 例、視神経乳頭新生血管が 1 例、嚢胞様黄斑浮腫が 1 例にみられた。発症時期に関しては、硝子体炎と網膜炎の悪化が HAART 開始後 6 ヶ月以内に見られたのに対し、それ以外の病変のほとんどは 6 ヶ月以後にみられた。これらの眼病変の出現頻度と各種臨床パラメーターの関連を解析したところ、HAART 開始後の CD4 数の増加と元の CMV 病変の大きさに相関があることが明らかとなった (表 3)。HAART 開始後 3 か月以内に CD4 が $50/\text{mm}^3$ 以上増加した症例を増加群、50 未満であった症例を不変群として検討してみると、不変群では 21 例中 1 例 (4.8%) にのみ眼病変がみられたが、増加群では 12 例中 5 例 (41.7%) に病変がみられた。また、網膜炎の大きさが 1 象限未満では 21 例中 2 例 (7.4%) にしか眼病変がみられなかったが、1 象限以上では 6 例中 4 例 (66.7%) 例にみられた。

2. 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

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 (10^5 個程度) が得られなかった。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 4)。

考察

3 年間の研究の前半では、免疫再構築症候群を起こす代表的な日和見疾患である非定型抗酸菌症、ニューモシスティス肺炎、CMV 網膜炎などについての免疫学的・臨床的検討を行った。非定型抗酸菌症の免疫学的解析では、CD4 陽性細胞数が極めて低い本疾患では技術的に免疫学的解析が困難

表 3. 眼病変の出現と CMV 網膜炎の大きさ・CD4 数変化の相関

CD4 数 大きさ	不変群	増加群	計
1 象限未満	0/19	2/8	2/21 (7.4%)
1 象限以上	1/2	3/4	4/6 (66.7%)
計	1/21 (4.8%)	5/12 (41.7%)	6/33 (18.2%)

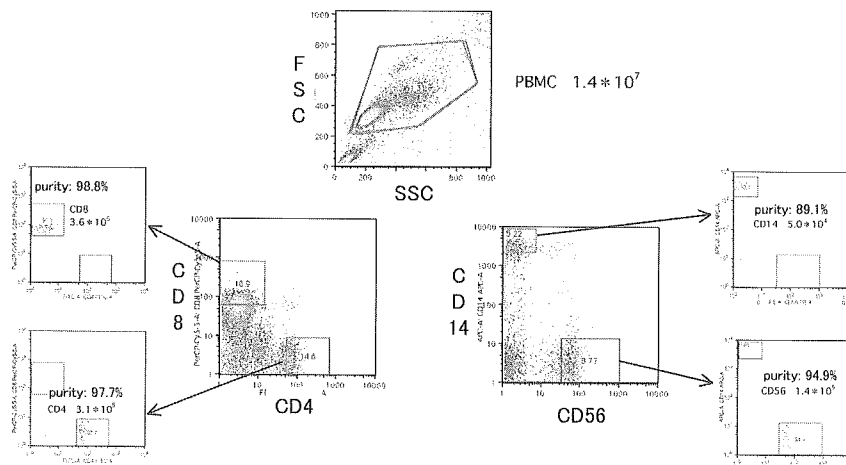


図 1. ソーティングを行った 1 例

表4. 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		1.7×10^6	1.9×10^6	1.6×10^5	4.8×10^5
2	254	start	1.8×10^5	1.0×10^5	ND	3.7×10^5
3	272		2.3×10^5	2.9×10^5	ND	3.7×10^5
4	368		3.1×10^5	3.6×10^5	5.0×10^4	1.4×10^5
5	233		3.6×10^5	5.0×10^5	1.6×10^4	4.6×10^4
6	239	start	3.0×10^5	4.0×10^5	8.0×10^4	1.0×10^5
7	574		8.2×10^5	9.6×10^5	ND	1.0×10^5
8	456		4.3×10^5	4.6×10^5	ND	6.0×10^4

で、免疫再構築症候群を予見・診断することができなかつた。CMV 網膜炎に関しては、その初期病変の臨床的性状から免疫再構築症候群のリスクを予測することが出来ることが明らかとなった。研究期間後半では、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、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。

結論

HAART 時代の日和見感染症における最大の問題の一つである免疫再構築症候群について、基礎的・臨床的解析を行った。非定型抗酸菌症の免疫再構築症候群をその特異免疫の変化から診断することは困難であったが、CMV 網膜炎に関してはその網膜所見から免疫再構築症候群のリスク予測が可能であることを明らかにした。これらの結果をふまえ、より網羅的に免疫再構築症候群の病態を解析するために、患者抹消血中の各種免疫担当細胞の抗 HIV 療法前後での遺伝子変化を DNA マイクロアレイで網羅的に解析する試みを開始した。

健康危険情報

特記すべきことなし。

研究発表

論文発表

- 1) Yamada, T., Watanabe, N., Nakamura, T and

Iwamoto, A. Antibody-dependent cellular cytotoxicity via a humoral immune epitope of Nef protein expressed on the cell surface. *J. Immunology*. 172: 2401-6, 2004.

- 2) Furutsuki T, Hosoya N, Kawana-Tachikawa A, Tomizawa M, Odawara T, Goto M, Kitamura Y, Nakamura T, Kelleher AD, Cooper DA, Iwamoto A. Frequent transmission of cytotoxic-T-lymphocyte escape mutants of human immunodeficiency virus type 1 in the highly HLA-A24-positive Japanese population. *J Virol*. 78: 8437-45, 2004.
- 3) D Zhu, H Taguchi-Nakamura, M Goto, T Odawara, T Nakamura, H Yamada, H Kotaki, W Sugiura, A Iwamoto & Y Kitamura. Influence of single-nucleotide polymorphisms in the multidrug resistance-1 gene on the cellular export of nelfinavir and its clinical implication for highly active antiretroviral therapy. *Antiviral Therapy* 9:929-35, 2004.
- 4) Tomonari A, Takahashi S, Shimohakamada Y, Ooi J, Takasugi K, Ohno N, Konuma T, Uchimaru 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.
- 5) 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¹、井関 基弘²、塩田 恒三³

¹ 京都府立医科大学、² 金沢大学大学院医学研究科、

³ 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、効果的な技術移転法、及び自己点検・評価法の構築のため、平成 15～17 年度に渡って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技術移転パッケージ確立のための検討を行った。平成 15 年度はエイズ診療拠点病院の検査施設長と臨床検査医学会あてに開催案内を出したが、平成 16 年度より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送付先を変更し、また本来の目的である急性期病院へのアクセスを確保すべく、臨床検査医学会のみならず寄生虫学会、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、申込書もダウンロードできるようにした。これらに加え、平成 17 年度は更にエイズ学会にも同様の依頼を行った。講習会の開催回数は、平成 15 年度 2 回、16 年度 3 回、17 年度 3 回の、計 8 回である。平成 15 年度のアンケートに基づき、16 年度より再参加と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。参加者数は、15 年度が 144 名、16 年度が 226 名、17 年度が 227 名であった。開催場所は、毎年第 1 回目は京都府立医大で開催し、15 年度の 2 回目、16、17 年度の 2～3 回目は慶大医学部で開催した。初年度のアンケートの結果、診療拠点病院からの反応が非常に悪く、回答回収率が約 360 ケ所の病院のうちで 88 ケ所と約 25%に過ぎなかった。16 年度からは案内送付の方法を変更したせいもあってか、増加傾向に転じている。すなわち、16 年度は 124 ケ所、最終年度は 140 ケ所に達した。急性期病院を含む拠点病院以外からの応募は 15 年度は確実なところ、1～2 ケ所に過ぎなかった。しかし、2 年次には 3 回の講習会を通して 18 名に達し、最終年度では、2 回めまでに 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、最終年度で明らかになったのは、単独の施設からの参加者の増加であり、第 1 回めでも 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、2～3 年次には、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 3 回の講習会参加者には全て配付した。赤痢アメーバの CD も完成したので、最終年度の 1～2 回目の参加者には郵送した。3 回目の参加者には直接配付する予定である。また、2 年次より、日本寄生虫学会で運営しているネット上でのコンサルテーションシステムの紹介を文献を配布し、詳しく行った。こ

れにより、検査室レベルで判定が難しい場合も専門家にアクセスできる事を説明した。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基弘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、問題を提出し、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。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。

研究目的

これまでのエイズ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当時東京大学、木村哲教授）において、木村教授の要請により、都合6年間の間に、エイズの日和見原虫感染症、及び近縁の微生物感染症に関し、病原体の生物学、疫学、病態、診断、治療に関する講習会を慶大医学部において、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、情報伝達の拡大を計ただけであった。しかし、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。恐らくあっても毎回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関し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情報開示方法の改良の試み、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調査できるシステムの検討等は行った事がなかった。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り、もっと早期に行うべきであったと

考えている。

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それほど多いとは言えないであろうが、公衆衛生上、また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のための人材育成の必要度は現時点でも高い。

本研究は、以上の状況に鑑み、エイズに伴う多く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おり、また臨床検査学の教育システムに起因するものと思われるが、臨床検査に従事する者の知識、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、評価法を確立する事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。

この3年間は、以上のような基本的な方向性に基づき、講習会の情報開示の拡大、講習会の繰り返しでの開催、検査技術の自己点検評価システムの開発、及び繰り返しの学習を可能とする方策の一つとして、講義・実習内容のCD化などを試みた。実習材料をも可能な範囲で確保し、それを実習終了後も検査室にて再度施行できるよう分配するスタイルを構築した。その上で、講習会開催時にアンケート調査を行い、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。

研究方法

(a) 対象及び実施経過

平成 15 年度には、全国約 360 ケ所のエイズ診療拠点病院の中央臨床検査施設長あてに講習会の案内を送付し、合わせて臨床検査医学会のホームページにも同様のものを掲載し、そこから申込書等もダウンロードできるようにした。平成 16 年度には初年度のアンケート調査に基づいて、エイズ拠点病院の案内送付先を中央臨床検査部の技師長あてに変更した。これは初年度の参加者の分布、アンケートへの回答等により、検査施設長に宛て案内を送付しても必ずしも検査の第 1 線の技師に情報が届いていない事が明らかになったためである。更に、初年度での急性期病院からの参加者が予想よりはるかに少なかった事を考慮し、臨床検査医学会に加えて寄生虫学会、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、加えて講習会の開催回数を 3 回に増やした事もあって再参加、単一施設からの複数参加をも推進する事とした。平成 17 年度は 16 年度と同様、講習会の案内を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。同時に上記 4 学会に加えて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、2 年次よりも更に明確に検査診断技術の獲得・維持のため、再参加、単一施設からの複数参加をより一層積極的に推進する事を明示した。

これまでの講習会のアンケート調査で参加希望者がかなり多い事が想定できたので、初年度は西日本地区で 1 回、東日本地区で 1 回開催する事とした。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本事業に参加されたので、初回は京都府立医大で平成 16 年 2 月 14～15 日に、2 回目は慶大医学部にて同年 3 月 13～14 日に実施した。2～3 年次は西日本地区で 1 回、東日本で 2 回開催することとした。幸い有菌直樹教授が研究協力者として継続して本事業に参加されたので、2 年次より第 1 回めは京都府立医科大学（平成 17 年 1 月 22～23 日）、第 2 回、3 回目は慶大医学部（同年 2 月 19～20 日、及び 3 月 19～20 日）にて実施した。最終年度は平成 18 年 1 月 28～29 日に京都府立医科大学にて開催し、第 2

回目は慶大医学部で 2 月 25～26 日に開催した。第 3 回目は平成 18 年 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 3 年間を通してほぼ同様で、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 時間ずつであった。

総論（本講習会の目的、何故以下の 4 病原体の感染を主に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（京都府立医科大学、現ルイ・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）

16 年度より文献を含めて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を紹介した。この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、論文（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。このシステムの詳しい紹介を行

ったのは、これを利用すれば臨床検査の現場から容易に専門家にアクセスでき、少なくとも診断に関するコメントを得る事ができるからである。このようなシステムを上手く使う事によって、診断技術の維持に努める事も必要であると考えられる。

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実施した。この実習内容の詳細は平成15年度の分担研究報告書に記載したので、本総合報告には記載しないが、特長としては以下の点が挙げられる。

具体的には、3年間を通してできるだけ多数の専門家に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、参加者が監督者に接触、質問しやすいようにする事を基本スタイルとして施行した。幸い初年度より、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、毎年京都府立医大では40～50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う事が出来た。初年度の第2回め、及び2～3年次の第2回、第3回の慶大医学部での実習には80～100名の参加者に対して7名が指導者として参加できた。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らない事が確かな場合、例えば赤痢アメーバ栄養型の観察等では、できるだけ生鮮標本を使用して観察に供した。またジアルジア、サイクロスポーラ、イソスポーラ等、エイズには稀に日和見感染症として見られるだけの近縁原虫をも、可能な範囲でデモとして提示した。検出手技そのもの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、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筋炎、ニューモシステイス肺炎の組織像等を観察してもらい、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、抗酸染色用に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、3年間を通して参加者全員に配付し、帰宅後の技術管理、情報伝達が行なえるように計らった。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最終年度中には稼動が見込まれる。

結果

(a) 講習会への参加者の構成、その他の実施経過

今次研究でも上述のように約360ヶ所の全国のエイズ診療の拠点病院に対して、初年度は施設長あて、2年次以降技師長あてに案内を送付した。これは初年度拠点病院からの反応が非常に悪かったため、参加者にアンケート等で尋ねた所、上述のように施設長からは講習会開催に関する情報がなかなか第1線の技術者までに伝わって来ず、技師長宛ての方が情報が伝わりやすいとの事実が明らかにされたためである。また、当初は臨床検査医学会のみに案内掲載を依頼したが、急性期病院等拠点病院以外の反応が殆ど見られなかったので、2年次より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、以上に加えて、2年次のアンケートでの指摘に基づき最終年度はエイズ学会へも依頼し、ホームページに案内を掲載する事が出来た。

以上のようなアプローチをとった結果、拠点病院、それ以外の施設よりの反応は3年間を通して好転していると判断された。案内には不参加の場合も回答を頂きたい旨記載したが、初年度には拠点病院、約360施設のうち88ヶ所、2年次は124ヶ所、3年次は140ヶ所以上より応答があった。参加者の推移は、初年度は144名、2年次、3年次はそれぞれ226、227名であった。拠点病院以外からの参加者は、初年度は確実ではないが、1～2名程度であり、2年次より増加した。すなわち2年次では18名、3年次では2回めまでに既に12施設、18名に達している。このような状況は、2年次より関連学会のホームページに案内を掲載し、周知を計った事と関連しているものと思われる。しかし、ここまで案内の範囲を拡大しても、応答

があったのは拠点病院の1/2に達しておらず、以下に述べる単一施設からの参加者数の拡大から考えると、拠点病院間での反応の差異が依然として大きいと云わざるをえない。

2年次より再参加、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と思われるが、最終年度の第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、昨年よりも増加傾向にある。同様な傾向は、17年度の第2回目、3回目も明瞭に伺えた。このように病院によっては応答の良いところもあるが、これまでの9年間の講習会に一度も応答がない施設も確かにある。このような状況の理由は幾つかあろうが、各病院の臨床検査部の置かれた状況から推測するに、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ため、参加できなかった検査担当者の理由として病院の経費を挙げた例も少数見られ、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、少なくとも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に比較して着実に増加している。2年次、3年次とも数名の民間検査センターからの参加者があったが、この事は少なくとも、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を示しているものと判断できよう。

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作成を試み、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る形を企図した。既にクリプトスポリジウム、ニューモシスティスのCDは2年次に作成を終わり、2～3年次の全参加者に配付した。最終年度は赤痢アメーバのCDが2回めの講習会直後に完成したので、1回め、2回めの参加者には郵送し、3回目の参加者にはクリプトスポリジウム、ニューモシスティスと合わせて配付する予定である。トキソプラズマのCD作成は間に合わず、今後の課題として残念ながら残っ

た。

(b) 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。今次研究においては、2年次よりアンケート内容を少し変更し、技術移転法の作成についての質問を加えた形にして行った(平成16年度分担研究報告書参照)。2～3年次のアンケートを解析すると、以前からの講習会の参加者の場合、自己評価によれば、技術はある程度定着していると判断されるものの、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云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明らかになった。エイズ診療拠点病院と云っても、臨床検査の現場に戻ればこのような原虫性疾患の診断依頼がそう頻繁にあるわけではなく、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云う意見が複数回参加者の中には多く見られ、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判断される。

このため、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。最終年度の1回め、2回目の講習会のアンケートでも、赤痢アメーバなどのCD追加配布はほぼ全員が希望し、金沢大学のネット上での診断技術点検に参加したいと云う希望も多数が示した。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、平成17年度の分担報告にも述べたように、このような情報ネットワークによる自己点検、評価手法が完成しても、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全く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、ひとつひとつ確認しながら診断技術を獲得して行くと云う手法の方が、時間も費用もかかるが、臨床検査担当者の能力開発には最も信頼度が高いと考える。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判