

の結果からエイズ剖検例では多くの種類のウイルスがさまざまな臓器から検出されること、臓器分布はウイルスごとに異なることが明らかになった。

## 考 察

本研究ではエイズ関連リンパ腫とエイズ剖検例の各臓器におけるウイルスの感染プロファイルを明らかにした。リンパ腫に関してはこれまでEBV、HHV-8、HIVなどを検討した多くの文献があるが、本研究のように多くのウイルスを網羅的に行った研究は見あたらない。本研究の結果からは意外にもリンパ腫組織からは上記以外の複数のウイルスが検出され、中には高コピー数が検出されたウイルスもあった。このうちの多くは周辺組織からのコンタミネーション、または日和見的に感染しているものを検出しているに過ぎないと思われる。しかし、高いコピー数を示したHBV、CMVなどに関しては、これまで、リンパ腫細胞そのものにHBVやCMVのウイルスタンパクが免疫組織化学などで検出された例はないものの、今後、慎重にリンパ腫発症との関連を検索する必要がある。

各臓器におけるウイルスの感染プロファイルは、ヒトのウイルス感染を考える上での基礎データとして、意義のある資料になるものと思われる。これまで、健常者、あるいは免疫不全者において、どのウイルスが各臓器にどの程度存在しているかというデータはほとんど報告がない。健常者においては仮に各臓器にウイルスが潜伏感染していても、ウイルス量は多くなく、検出は難しいことが予想される。本研究では疾患がない臓器からさまざまなウイルスが検出されており、疾患の発症に至らない微量のウイルスを検出することができたものと考えている。こうした免疫不全者におけるデータは健常者の臓器におけるウイルス量を考える上で参考になろう。

近年のエイズ関連リンパ腫におけるEBV陽性率の減少はエイズ患者における免疫が変化してきたことと、それに伴い、リンパ腫の発症機構が大きく変化していることを示唆している。エイズ関連リンパ腫の発症機序とウイルス感染との関連はEBVのみならず、HHV-8、HIVとの関連を示すデータが積み上げられてきており、エイズ関連リンパ腫をこれらのウイルス感染による日和見腫瘍とする考えは広く受け入れられている。しかし、本研究でエイズ関連リンパ腫について、多くのウイ

ルスの検出を試みた結果、多くの症例で病因との有意な関連を示すウイルス感染は存在しない可能性が示唆された。このことは、近年発症しているエイズ関連リンパ腫はウイルスの日和見腫瘍というよりも健常者に起こるリンパ腫と同様に、染色体転座や遺伝子異常など、ウイルス以外の原因で起こるリンパ腫が増加していることを示唆する。HAART導入後はCD4が比較的高い値でリンパ腫が発症していることも、この考えを支持するものである。おそらく、HAARTで回復した免疫において、ウイルスに対する免疫と腫瘍に対する免疫（腫瘍免疫）の回復の程度に差があり、一部の腫瘍免疫が完全に回復しないことがリンパ腫発症の一因ではなからうか。今後はリンパ腫の病因としてウイルス感染のみならず、リンパ腫の一般的な病因である遺伝子異常や染色体転座などの解析により、エイズ関連リンパ腫をさらに詳細に分類していくことが必要となろう。

## 結 論

エイズ関連リンパ腫組織から多くの病原ウイルスの検出を試み、これまでリンパ腫との関連が知られているEBV、HHV-8以外にも多くのウイルスが検出された。リンパ腫発症との関連は今後の検索課題である。

## 健康危険情報

なし。

## 研究発表

### 論文発表

- 1) Ishak Mde, O., Martins, R.N., Machado, P.R., de Souza, L.L., Machado, L.F., Azevedo, V.N., Katano, H., Sata, T., Hasegawa, H., Vallinoto, A.C., and Ishak, R. High diversity of HHV-8 molecular subtypes in the Amazon region of Brazil: Evidence of an ancient human infection. *J. Med. Virol.*, 79: 1537-1544, 2007.
- 2) Katano, H., Sato, Y., Hoshino, S., Tachikawa, N., Oka, S., Morishita, Y., Ishida, T., Watanabe, T., Rom, W., Mori, S., Sata, T., Weiden, M., and Hoshino, Y. Integration of HIV-1 caused STAT3-associated B cell lymphoma in an AIDS patient. *Microbes Infect.* 9: 1581-1589, 2007.
- 3) Kuhara, T., Yoshikawa, T., Ihira, M., Watanabe, D., Tamada, Y., Katano, H., Asano, Y., and Matsumoto, Y. Rapid detection of human herpesvirus 8 DNA using loop-mediated isothermal

amplification. J. Virol. Methods, 144: 79-85, 2007.

- 4) Ueno, T., Mitsuishi, T., Kimura, Y., Kato, T., Hasegawa, H., Katano, H., Sata, T., Kurane, S., and Kawana, S. Immune reconstitution inflammatory syndrome associated with Kaposi's sarcoma: successful treatment with interferon-alpha. Eur. J. Dermatol., 17: 539-540, 2007.

## 学会発表

### 国内

- 1) 片野晴隆、加納基史、菅野隆行、佐多徹太郎。エイズ剖検例の各臓器におけるヒトヘルペスウイルスの定量。第22回ヘルペスウイルス研究会2007年6月、福岡。
- 2) 片野晴隆、加納基史、菅野隆行、佐多徹太郎。エイズ剖検例の各臓器におけるDNAウイルスの感染プロファイル。第55回日本ウイルス学会学術集会2007年10月、札幌。
- 3) 菅野隆行、佐多徹太郎、片野晴隆。サイトカインによるカポジ肉腫関連ヘルペスウイルス(KSHV) 遺伝子の誘導。第55回日本ウイルス学会学術集会2007年10月、札幌。
- 4) 片野晴隆。エイズ関連悪性腫瘍の感染病理に関する研究。第53回日本病理学会秋期特別総会 2007年12月、東京。

## 知的財産権の出願・登録状況

なし



## HIV 合併原虫症新規治療薬の 開発に関する研究

分担研究者：竹内 勤

(慶應義塾大学医学部 熱帯医学・寄生虫学教室)

研究協力者：浅井 隆志<sup>1</sup>、所 正治<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>慶應義塾大学医学部 熱帯医学・寄生虫学教室、

<sup>2</sup>金沢大学大学院医学系研究科・寄生虫感染症制御学教室)

### 研究要旨

HIV 合併原虫症の中からトキソプラズマ症とクリプトスポリジウム症の新規治療薬の開発を昨年に引き続き検討した。トキソプラズマに特異的な酵素 NTPase の結晶化による阻害剤の発見を試みた。またピルビン酸キナーゼ II の存在とクリプトスポリジウム症の治療薬を検討した。

### 研究目的

トキソプラズマ症とクリプトスポリジウム症は HIV 合併原虫症の中でも多発する難治性の原虫感染症である。トキソプラズマは一度感染すると一生慢性的に感染しているため、ヒトへの感染率は非常に高い。現在使用されている治療薬は治癒効果が低く副作用も強いことから、より治癒効果の高い副作用のない薬剤が求められている。またクリプトスポリジウム症は特効的な治療薬が無く、急性発症での新規治療薬の開発が求められている。

宿主には存在せず原虫に特異的な酵素を標的にした薬剤の開発を主眼に我々は研究を継続してきている。トキソプラズマと近縁の原虫であるネオスポーラにのみ特異的に、しかも大量に存在する酵素 (NTPase) の性質を調べ、その特異的活性阻害物質を検索してきた。その結果 15 万種の化合物より特異な阻害剤を見出した。しかし動物実験の結果、既存の治療薬であるピリメサミンに比べて治療効果が低いことが判明した。このことは昨年の報告書にまとめた。そこでより良い酵素の阻害剤を発見するために、酵素の結晶化による構造解析を行った。またトキソプラズマ原虫における糖代謝経路の特異的調節機構に関する研究の過程で、EST の遺伝子情報から、特異なピルビン酸キナーゼを見いだした。このピルビン酸キナーゼは解糖経路の酵素では無く、この原虫に特異的な酵素で

ある。その根拠は、この酵素がミトコンドリアに存在することである。現在までミトコンドリアに存在するピルビン酸キナーゼはどの生物でも知られていない。したがって生理的役割が不明な酵素である。この酵素をピルビン酸キナーゼ II (PyK-II) として記載し、本当にミトコンドリアに存在するかどうか検討した。もし酵素活性の特殊な調節を明らかにすることができれば、そこを標的にした治療薬の開発が可能と考えられる。

クリプトスポリジウムは数値処理可能な定量法が確立されておらず、既存の治療薬は有効性が低い。そこでリアルタイム PCR により原虫の定量方法を開発した。またアデノシン化合物の原虫増殖に与える効果を調べた。その結果、2-フロロアデノシンが原虫増殖を強力に阻害することが判明した。現在薬剤としての可能性を検討中である。

本研究の目的のひとつは、NTPase を標的にしたトキソプラズマ症の新規治療薬の開発を行う事である。またもうひとつの目的はトキソプラズマのピルビン酸キナーゼ II の性質を調べ、この酵素の生理的役割を明らかにすることで、新たな標的としての可能性を見いだすことである。またクリプトスポリジウム症の新規の治療薬を開発することである。

## 研究方法

### a. NTPase の結晶化

ネオスポーラの NTPase (NcNTPase) とトキソプラズマの NTPase-I の結晶化にあたり、サンプルとしては 10 mM Tris-HCl pH 7.4 に溶解した 10 mg/ml の酵素を準備した。これらの酵素はバクテリア内で発現した後、インクルージョンボディから活性のある形態へリホールディングした。その後イオン交換、ゲル濾過、吸着クロマト、疎水性クロマトの方法を組み合わせることで単一に精製した。

### NcNTPase の結晶化

結晶化は、サンプル 0.5 マイクロリットルと下記の結晶化剤溶液 0.5 マイクロリットルを混合して、同じ結晶化剤溶液に対して蒸気平衡させる、シッティングドロップ蒸気拡散法で行った。温度は 20 °C。結晶化剤溶液はそれぞれ 3.0 M Sodium formate 0.1 M Tris-HCl pH 8.4, 2.5 M Potassium acetate 0.1 M カコジル酸緩衝液 pH 6.8, 1.8 M Sodium formate 0.1 M クエン酸緩衝液 pH 8.4, 2.2 M Potassium acetate 0.1 M カコジル酸緩衝液 pH 6.6, 2.5 M Potassium acetate 3% Isopropanol 0.1 M カコジル酸緩衝液 pH 6.6, 2.5 M Potassium acetate 4% propanol 0.1 M カコジル酸緩衝液 pH 6.6, 2.2 M Potassium acetate 0.4 M Ornithine 0.1 M カコジル酸緩衝液 pH 6.8 で行った。

### NTPase-I の結晶化

結晶化は、サンプル 0.5 マイクロリットルと下記の結晶化剤溶液 0.5 マイクロリットルを混合して、同じ結晶化剤溶液に対して蒸気平衡させる、シッティングドロップ蒸気拡散法で行った。温度は 20 °C。結晶化剤溶液は 0.4 M Potassium acetate 0.1 M Tris-HCl pH 7.8, 3.5 M Potassium acetate 0.1 M Tris-HCl pH 7.4, 4 M Sodium formate 0.1 M Tris-HCl pH 7.4。

SPring-8 および筑波の PF にて NcNTPase とトキソプラズマ NTPase-I の結晶の X 線分析を行った。

### b. ビルビン酸キナーゼ II の細胞内分布

ビルビン酸キナーゼ II の遺伝子の N-末端にはビルビン酸キナーゼ II の配列の前に 350 個もの余分なアミノ酸配列が存在する。この配列のデリベーションを作製して、各細胞内小器官への分布がどうか検討を加えた。

### c. クリプトスポリジウム症の薬剤開発

クリプトスポリジウムは HNJ-1 株を用いた。細胞はヒト回盲腺癌由来の HCT-8 を使用した。クリプトスポリジウムのオーシストの感染では、感染前に 50 mM の塩酸で前処理したものを使用した。2 時間かけて脱囊させたオーシストと非脱囊のオーシストを洗浄により分離後、薬剤を加えた RPMI1640 で細胞を培養した。24 時間後にトリプシン処理により培養細胞を集め、3 回凍結融解した後 DNA を精製した。リアルタイム PCR 法は、MAT 遺伝子近傍領域 477bp およびベータアクチン遺伝子領域 107bp をベクターに組み込んだ物を標準とした。反応は SYBR Green I を用いたインターカレタ法で行い、実際の反応条件は、50 度 2 分、95 度 10 分、95 度 15 秒および 60 度 1 分を 40 サイクルであった。データの解析は ABI PRISM 7000 (Applied System) を使用した。

## 研究結果

### a. NTPase の結晶化

2-(1-Naphthalenylthio)-1-H-indole を 15 万種類の化合物から選択したが、既存の薬剤であるピリメサミンを超える効果は得られなかった。このことは昨年の報告書に記載した。そこでより強力な NTPase の阻害物質を探すために NTPase の結晶化を行った。図 1 は蒸気拡散法による結晶化を模式図にしたものである。今回はシッティングドロップ

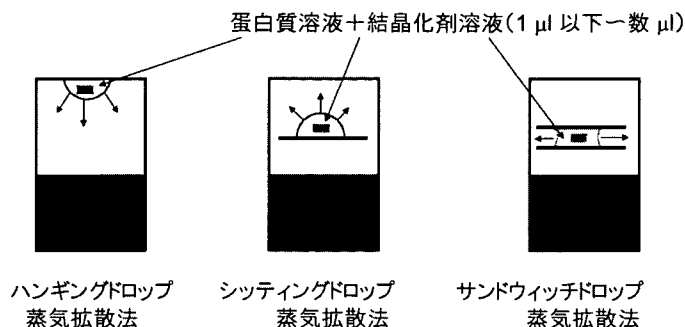


図 1 蛋白質の結晶化方法の概略

蒸気拡散法を用いた。その結果、NcNTPase では色々な条件でとても綺麗な結晶が得られた (図 2 ~ 3)。しかし現在のところ分解能は 3.5 ~ 8 オングストロームと低く構造解析に至っていない。図 3 はまだ分解能を測定していない。トキソプラズマの NTPase においても NcNTPase と同様に綺麗な結晶が得られた (図 4)。分解能は未測定である。

#### b. ピルビン酸キナーゼ II の細胞内分布

昨年は次のような報告をした。ピルビン酸キナーゼ II を蛍光染色すると細胞質は染まらず、細胞内小器官が染色された。この像はミトコンドリアの染色像と符合し、また符合しない部分をアピコプラストの染色像と重ねてみると全く一致することが分かった。このことからピルビン酸キナーゼ

II はミトコンドリアとアピコプラストに存在することが推測された。図 5 にはピルビン酸キナーゼ N-末端のアミノ酸配列が記載されている。ピルビン酸キナーゼの配列の前に 350 個もの長い配列があり、その中に 5 個のメチオニン配列がある。そして前半にシグナル配列、プラスチド移行配列、ミトコンドリア移行配列が推定される。したがって一番長いメチオニンの位置で翻訳がはじまり、各細胞内小器官に移行するものと考えられる。現在この N-末端のデリーションミュータントを作製して移行を確認している。

#### c. クリプトスポリジウム症の薬剤開発

リアルタイム PCR による標準曲線は 10 から 10 万コピーで直線になった (図 6)。この曲線を利用してアデノシアナログの増殖に与える効果を見

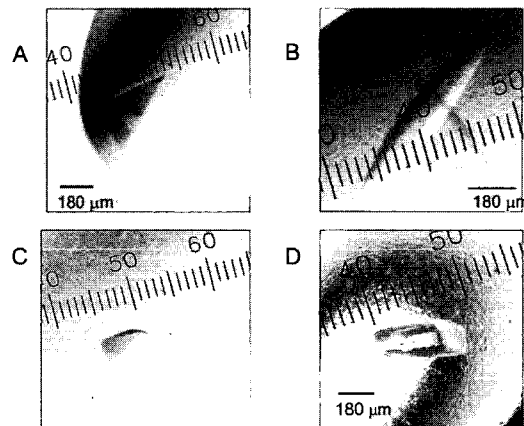


図 2 ネオスポーラ NTPase の結晶

A: 0.1 M Tris-HCl pH 8.4, 3.0 M Sodium formate ; B: 0.1 M クエン酸緩衝液 pH 8.4, 1.8 M Sodium formate; C: 0.1 M カコジル酸緩衝液 pH 6.8, 2.5 M Potassium acetate ; D: 0.1 M カコジル酸緩衝液 pH 6.6, 2.2 M Potassium acetate

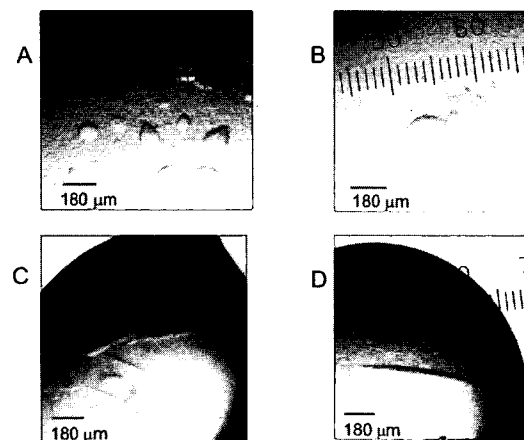


図 3 ネオスポーラ NTPase の結晶

A: 0.1 M カコジル酸緩衝液 pH 6.6, 2.5 M Potassium acetate, 3% Isopropanol; B: 0.1 M カコジル酸緩衝液 pH 6.6, 2.5 M Potassium acetate, 4% Propanol; C: 0.1 M カコジル酸緩衝液 pH 6.8, 2.2 M Potassium acetate, 0.4 M Ornithine; D: 0.1 M カコジル酸緩衝液 pH 6.6, 2.2 M Potassium acetate, 0.4 M Serine

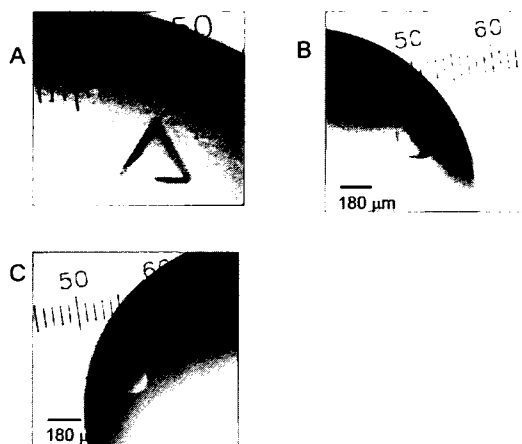


図4 トキソプラズマ NTPase-I の結晶

A: 0.1 M Tris-HCl pH 7.8, 4.0 M Potassium acetate; B: 0.1 M Tris-HCl pH 7.4, 3.5 M Potassium acetate; C: 0.1 M Tris-Cl pH 7.4, 4.0 M Sodium formate

```

1      MDDGGAEFSS SRANGFASMN FPTCGSEKPV RKNSSGFRST RTEAHIDLQN
51     FSRFPGGERG LREHTLSVRV SSRPRLLLRF FFFCFLALLL SAMAPLRPSP
101    ASVCTRVAAV ATGHRRVGLP SMDFFRVFES RALQSRGSOA RKVLFSTGTE
151    KTRVQPDFSA QKAQNLQRQT CDCLADLTQG IPHRPIRHEC PVRFHREASV
201    PPVAPHIGFL SSRLAEGVSS SSFAAPASSR AGKAGQDASL LQTSSSGRRP
251    TETAFFLLTG FPSSPSACSP FAASLSREES GPRAGLETHR GMLSAASPAL
301    ARKSFDFRGS ALRHFSSGG HRGSSDTKIS PGHSDKSGEP LDLPVETSTK
351    QIATIGP
    
```

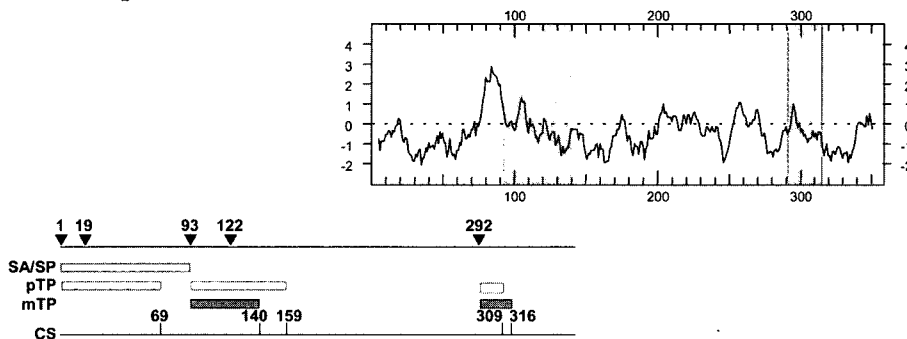


図5 トキソプラズマピルビン酸キナーゼIIのN-末端配列と予想される各種配列および疎水性検索  
SA/SP: シグナルシーケンス; pTP: プラスチド移行配列; mTP: ミトコンドリア移行配列; CS: アミノ酸配列

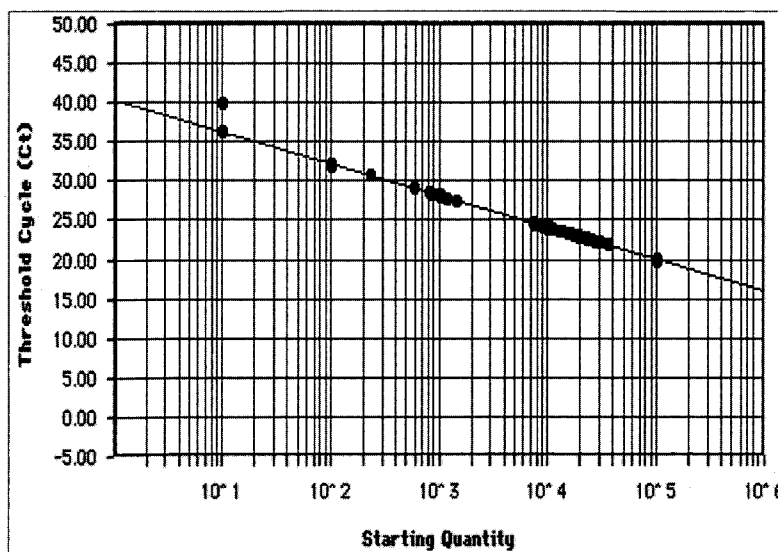


図6 クリプトスポリジウム数定量のための標準曲線

たのが図7である。KAK1からKAK5、KAK7、KAK9、KAK16で多少の増殖抑制が見られ、KAK8で強力な増殖抑制が観察された。その他は何の効果も認められなかった。KAK8は2-フロロアデノシンであり、唯一治療薬の候補になり得ると考えられる。濃度依存性の値を既存の治療薬と比較したものが図8である。これらの薬剤の中で2-フロロアデノシンは最も効果的な薬剤であることがわかる。これら各薬剤のEC50値を今回測定し、過去のデータと比較したものが表1である。2-フロロアデノシンは非常にEC50値が低く（既存薬の50倍以上）で*in vitro*の実験では有効な薬剤であった。

## 考 察

トキソプラズマと近縁の原虫であるネオスポーラにのみNTPaseは見出された酵素であり、トキソプラズマの増殖に必須の酵素であることがわかっている。またこの酵素は細胞内に大量に存在する。したがって、これを標的にした薬剤は有効な抗トキソプラズマ剤になることが期待されている。約15万種の化合物より選び出された化合物である2-(1-Naphthalenylthio)-1-H-indoleは強毒株と弱毒株において、*in vitro*の実験系では、低濃度で殺原虫作用を示す。しかし*in vivo*の実験では、既存の治療薬であるピリメサミン以上の効果が得られなかった。そこでより有効な阻害剤の開発を行うために結晶化を行った。色々な条件下でネオスポーラ

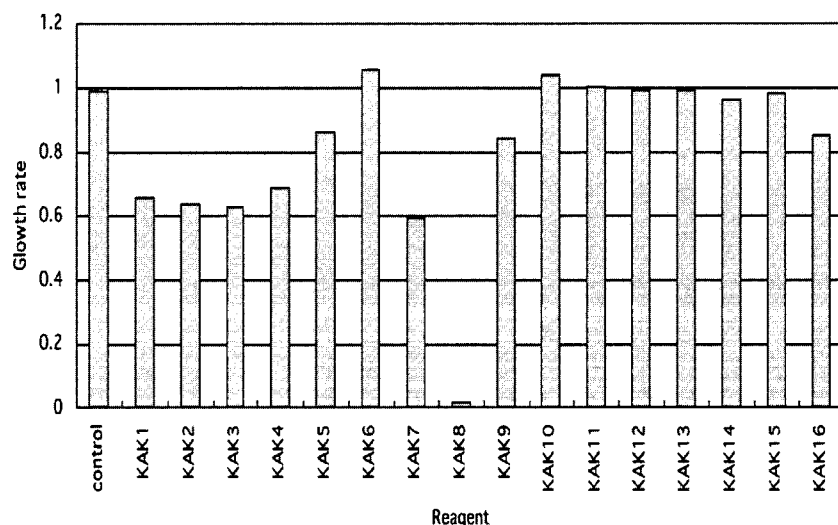


図7 各種アデノシンアナログによるクリプトスポリジウム増殖抑制  
KAK番号は任意のアデノシン化合物

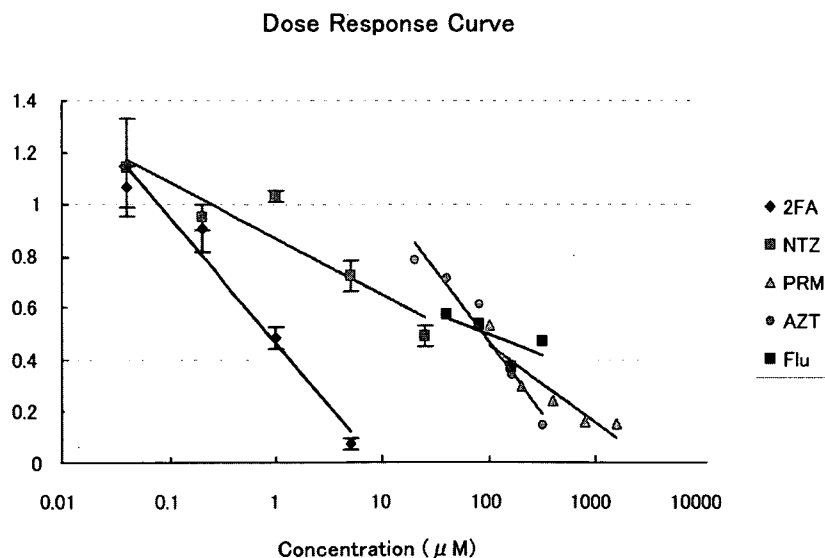


図8 2-Fluoroadenosineと各種クリプトスポリジウム治療薬による増殖阻害曲線  
2FA: 2-Fluoroadenosine; NTZ: Nitazoxanide; PRM: Paromomycin; AZT: Azithromycin; Flu: Fludara

のNcNTPaseとトキソプラズマのNTPase-Iは非常に綺麗な結晶となった。大きさも十分なサイズであるが分解能であるX線の反射が構造を決定するまでの値に至っていない。多分構造の電気的不均一性が関与していると思われるが、現在のところ不明である。

2-(1-Naphthalenylthio)-1-H-indoleの類似化合物を検討することが結晶化と同様に必要な方法であるが、これも2-(1-Naphthalenylthio)-1-H-indole以上に効果のある化合物が見出されていない。現在の結晶の分解能で最も良い値が3.5オングストロームなので、構造解析に使える2オングストロームまでには今ひとつである。結晶も綺麗であることからもう少しの何らかの条件で構造解析が可能であると考えられる。

トキソプラズマのピルビン酸キナーゼIIは基本的な共通配列が保存されているにもかかわらず、今まで知られたピルビン酸キナーゼとのアミノ酸配列相同性は30%以下である。またN-末端に長鎖のアミノ酸配列があり、ミトコンドリアとアピコプラストへの輸送を示唆するシグナル配列が存在する。以前に報告した細胞質に存在する解糖系の酵素であるピルビン酸キナーゼIとはアミノ酸配列の相同性が22%しかなく、共通の抗原認識部位が存在しなかった。このことからピルビン酸キナーゼIIはトキソプラズマに特異的な新規の酵素であることが考えられる。現在ミトコンドリアに存在するピルビン酸キナーゼはどの生物でも報告されていない。N-末端の長鎖のアミノ酸配列は細胞内小器官への分布に重要な役割を演じているこ

とは間違いない。そこで我々は阻害剤の検出以前にミトコンドリアへの存在を確立させる必要性を感じた。やはりどの生物でも報告のない特殊なケースであるので、その特殊性を確立する必要性があった。N-末端のデリーションミュータントを使った細胞内小器官への分布に関しては次回に報告をする予定である。いずれにしろトキソプラズマに特異な酵素であるので、細胞内寄生という特殊な環境に適応した酵素であることが考えられる。治療薬の標的として考慮することが十分考えられる。

クリプトスポリジウム定量に関しては、数値評価できる方法がオーシストの検鏡測定以外に適切な方法が無かった。今回行ったリアルタイムPCR法により、適切な定量法が確立された。このことは実験室での研究効率を飛躍的に向上させたと言える。現在クリプトスポリジウムの培養はオーシストからの脱囊の段階のみで、継代培養は成功していない。

継代培養が可能になれば、リアルタイムPCR法との組み合わせでより効率的な実験が可能になるであろう。今回見出した2-フロロアデノシンは*in vitro*での効果が既存の治療薬に比べて格段に良い結果であった。濃度依存性曲線(図8)とEC50値(表1)の比較から明らかである。このことから2-フロロアデノシンは新規の治療薬として期待される。しかし*in vivo*では毒性が強く治療実験は困難な状態である。今後は毒性の低い類似化合物の検索が重要な役割となる。

表1

	EC <sub>50</sub> (μM)	
	this study	published data
2-fluoroadenosine	<b>0.84</b>	ND *
nitazoxanide NTZ	49	0.976-25.6
paromomycin PRM	71	38.0-1890
azythromycin AZT	87	33.1% reduction at 10.7 μM
fludara	97	ND

\*ND=Not Detected



## 結 論

トキソプラズマとネオスポーラに特異的に存在する NTPase のより効果的な阻害剤を見出すために、結晶化を行った。結晶からの構造解析は現在検討中である。トキソプラズマに特異なピルビン酸キナーゼ II の細胞内小器官（ミトコンドリアとアピコプラスト）への移行を検討した。クリプトスポリジウム症の治療薬候補として 2-フロロアデノシンを見出した。

## 研究発表

- 1) Saito T, Maeda T, Nishi M, Hashimoto H, Wu B, Roos DS, Takeuchi T, Asai T: A Novel GDP-dependent pyruvate kinase isozyme from *Toxoplasma gondii* is targeted to both the mitochondrion and the apicoplast. J. Biol. Chem., 2008 (in press)
- 2) Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T: Differences in protein profiles of the isolates of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* by surface-enhanced laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF MS) ProteinChip assays. Parasitol Res, 2007, 102, 103-110.
- 3) Tachibana H, Cheng XJ, Kobayashi S, Okada Y, Itoh J, Takeuchi T: Primary structure, expression and localization of two intermediate subunit lectin of *Entamoeba dispar* that contain multiple CXXC motifs. Parasitol, 2007, 134, 1989-1999.
- 4) Suzuki J, Kobayashi S, Murata R, Yanagawa Y, Takeuchi T: Profiles of a pathogenic *Entamoeba histolytica*-like variant with variations in the nucleotide sequence of the small subunit ribosomal RNA isolated from a primate (De Brazza's Guenon). J Zoo Wild Life Med, 2007, 38, 471-474.
- 5) Fukao T, Fukuda Y, Kiga K, Sharif J, Hino K, Enomoto Y, Kawamura A, Nakamura K, Takeuchi T, Tanabe M: An evolutionarily conserved mechanism for microRNA-223 expression revealed by microRNA gene profiling. Cell, 2007, 129, 617-631.
- 6) Tasaka S, Hasegawa N, Kobayashi S, Yamada W, Nishimiura T, Takeuchi T, Ishizaka A: Serum indicator for the diagnosis of Pneumocystis pneumonia. Chest, 2007, 131, 1173-1180.



## 免疫再構築症候群の発症に関連する臨床的因子

分担研究者：古西 満<sup>1</sup>、照屋 勝治<sup>2</sup>、  
永井 英明<sup>3</sup>、堀場 昌英<sup>4</sup>

研究協力者：善本英一郎<sup>1</sup>、小田原 隆<sup>5</sup>、今村 顕史<sup>6</sup>、  
藤 純一郎<sup>7</sup>、後藤 哲志<sup>8</sup>、日笠 聡<sup>9</sup>、健山 正男<sup>10</sup>

(<sup>1</sup>奈良県立医科大学 感染症センター

<sup>2</sup>国立国際医療センター エイズ治療研究開発センター

<sup>3</sup>国立病院機構東京病院 呼吸器科

<sup>4</sup>国立病院機構東埼玉病院 呼吸器科

<sup>5</sup>東京大学医科学研究所 感染免疫内科

<sup>6</sup>都立駒込病院 感染症科

<sup>7</sup>東京女子医科大学 感染症科

<sup>8</sup>大阪市立総合医療センター 感染症センター

<sup>9</sup>兵庫医科大学 血液内科

<sup>10</sup>琉球大学 感染病態制御学)

### 研究要旨

免疫再構築症候群 (immune reconstitution inflammatory syndrome:IRIS) の発症に関連した臨床的因子を明らかにするために調査を行なった。抗 HIV 治療経験が多い 10 施設に調査票を送付し、IRIS を発症した症例としなかった症例の臨床データを比較した。集積した症例は、IRIS を発症した症例が 66 名、IRIS を発症しなかった症例が 162 名であった。IRIS の疾患は、非結核性抗酸菌 (NTM) 症が 23 名、結核 (TB) 症が 15 名、ニューモシスチス肺炎 (PCP) が 10 名、サイトメガロウイルス (CMV) 感染症が 15 名、NTM 症 + CMV 感染症が 2 名、PCP + CMV 感染症が 1 名であった。HAART 開始前には診断がついていないことも多かった。IRIS の発症に関連する臨床的因子は、HAART 開始前の CD4<sup>+</sup> 数・ヘモグロビン値の低値で、HIV-RNA 量が高値であること、および HAART 開始 1 ヶ月後の CD4<sup>+</sup> 数、CD8<sup>+</sup> 数の増加率が高く、HIV-RNA 量の減少が大きいことであった。HAART の薬剤組合せは多彩であったが、d4T を含む組合せが有意に IRIS を発症した症例で多かった。IRIS は、日和見感染症の治療中や予防中にも発症していた。また、IRIS を発症した症例で日和見感染症の治療・予防を継続している症例が多い傾向を認めた。

## 研究目的

免疫不全が進行した状態で抗 HIV 治療を開始した後に、日和見感染症などが発症、再発、再増悪することを経験する。これは、抗 HIV 治療によって急速な HIV-RNA 量の減少と免疫能の改善が起こり、体内に存在する病原体に対する免疫応答が誘導されるために生じると考えられている。そのため、この現象は免疫再構築症候群 (immune reconstitution inflammatory syndrome : IRIS) と呼ばれ、臨床医にとっては抗 HIV 治療経過中に起こる悩ましい問題の一つとなっている。

そこで、どのような症例に IRIS が発症しやすいのかを把握することは、IRIS の発症機序の解明や発症予防の確立に重要である。また、臨床医にとっては抗 HIV 治療中の経過管理に有益な情報の一つとなるので、さまざまな解析が行なわれている<sup>1)</sup>。しかし、日常臨床で利用しやすい項目が少なく、IRIS 発症に関連する臨床的因子を見出すことが必要である。このような検討は海外でも散見される<sup>2-5)</sup>程度であり、わが国では皆無である。

そこで、本研究では IRIS を発症した症例と発症しなかった症例の臨床データを比較し、IRIS 発症に関連する臨床的因子を解析する。

## 研究方法

2001 年以降新規に抗 HIV 治療 (HAART : highly active antiretroviral therapy) を開始した HIV 感染者で、HAART 開始後 6 ヶ月以内に IRIS を発症した症例と 6 ヶ月間 IRIS を発症しなかった症例の臨床データを集積し、比較した。IRIS は、非結核性抗酸菌 (NTM) 症、結核 (TB) 症、ニューモシスチス肺炎 (PCP)、サイトメガロウイルス (CMV) 感染症のみとし、IRIS を発症していない症例は他疾患も含めて IRIS を発症していないこと

とした。

調査内容は、HAART 開始時の年齢、性別、HAART 開始時・1 ヶ月後・3 ヶ月後の CD4<sup>+</sup> 数・CD8<sup>+</sup> 数・HIV-RNA 量、HAART 開始前の白血球数・ヘモグロビン値・総蛋白値・アルブミン値、HAART の薬剤、HAART 開始時の前述 4 疾患に対する治療・予防の有無、IRIS の疾患について質問した (図 1)。

調査は、抗 HIV 治療経験が多い 10 施設に調査票を送付し、協力を依頼した。回答者の負担に配慮し、1 施設で 20 ~ 40 症例分の調査票を回収することとした。

## (倫理面への配慮)

症例の匿名化を行ない、個人を特定することが可能な情報は収集しなかった。また、提供された情報の管理には十分注意した。

## 研究結果

集積した症例は、IRIS を発症した症例が 66 名 (男性 58 名・女性 8 名、平均年齢 : 43.0 ± 10.9 歳)、IRIS を発症しなかった症例が 162 名 (男性 153 名・女性 9 名、平均年齢 : 39.6 ± 11.0 歳) であった。IRIS の疾患は、NTM 症が 23 名、TB 症が 15 名、PCP が 10 名、CMV 感染症が 15 名、NTM 症 + CMV 感染症が 2 名、PCP + CMV 感染症が 1 名であった。IRIS の疾患を HAART 開始前に診断していた症例は、NTM 症で 5 名、TB 症で 11 名、PCP で 7 名、CMV 感染症で 7 名であった (表 1)。

HAART 開始前の臨床データを全症例で比較したところ、年齢、AIDS 発症の有無、ヘモグロビン値、CD4<sup>+</sup> 数、CD8<sup>+</sup> 数、CD4/CD8 比、HIV-RNA 量、総蛋白値、アルブミン値、A/G 比に有意

表 1 集積した症例の概要

	症例数	IRIS の疾患	HAART 開始前	
			AIDS	疾患診断
IRIS (+) 症例	66 名	NTM	25 名	5 名
		TB	15 名	11 名
		PCP	11 名	7 名
		CMV	18 名	7 名
* 重複症例あり [58 名 (55 名)]				
IRIS (-) 症例	162 名		76 名	

### 免疫再構築症候群の発症リスクに関する調査

- HAART開始時年齢 ( )歳 性別 男 / 女
- HAART開始時既にAIDSを発症していましたか。
  - ・AIDS発症 (指標疾患名: )
  - ・AIDS未発症
- HAART開始前、1ヵ月後、3ヵ月後のCD4<sup>+</sup>数、CD8<sup>+</sup>数、HIV-RNA量を記載して下さい。

	HAART開始前	HAART1ヵ月後	HAART3ヶ月後
CD4 <sup>+</sup> 数(/ $\mu$ L)			
CD8 <sup>+</sup> 数(/ $\mu$ L)			
HIV-RNA量(コピー/mL)			

- HAART開始前の白血球数、ヘモグロビン値、血清総蛋白値、血清アルブミン値をご記載下さい。
  - ・白血球数 ( )/ $\mu$ L
  - ・ヘモグロビン値 ( )g/dL
  - ・血清総蛋白値 ( )g/dL
  - ・血清アルブミン値 ( )g/dL
- 開始されたHAARTの薬剤組合せをご記載下さい。

[ ]

- 下記の感染症に対する治療および予防の有無について当てはまる箇所に○をつけて下さい。

	非結核性抗酸菌症	結核症	ニューモシスチス肺炎	CMV感染症
治療 なし				
HAART開始時終了				
HAART開始時継続				
予防 なし				
HAART開始時中断				
HAART開始時継続				

- 下記(非結核性抗酸菌症・結核症・ニューモシスチス肺炎・CMV感染症の4病型に限定)の免疫再構築症候群を発症されましたか。発症された場合はその疾患に○をして下さい。

- ・発症した ( 非結核性抗酸菌症 / 結核症 / ニューモシスチス肺炎 / CMV感染症 )
- ・発症しなかった

調査へのご協力ありがとうございます

差を認めた (表 2)。次に、AIDS 発症例のみで臨床データを比較すると、ヘモグロビン値、CD4<sup>+</sup>数、CD8<sup>+</sup>数、HIV-RNA 量、総蛋白値に有意差を認めた (表 3)。さらに、CD4<sup>+</sup>数が 50/μl 以下の症例のみで臨床データを比較すると、ヘモグロビン

値、CD4<sup>+</sup>数、HIV-RNA 量に有意差を認めた (表 4)。したがって、IRIS 発症に関連する臨床データとしてヘモグロビン低値、CD4<sup>+</sup>数の減少、HIV-RNA 量高値が重要であった。

HAART 開始 1 ヶ月後の臨床データを比較した

表 2 HAART 開始前の臨床データの比較

	IRIS(+)	IRIS(-)	検定
性別(男 / 女)	58 / 8	153 / 9	n.s.
年齢	43.0±10.9	39.6±11.0	p<0.05
AIDS発症例	53 (83.3%)	76 (46.9%)	p<0.001
白血球数	3,553.8±1,939.5	4,071.0±1,877.3	n.s.
ヘモグロビン	10.9±2.0	12.8±2.1	p<0.001
CD4 <sup>+</sup> 数	35.3±47.9	128.0±107.4	p<0.001
CD8 <sup>+</sup> 数	382.5±449.5	605.1±382.0	p<0.001
CD4/8	0.11±0.11	0.22±0.17	p<0.001
HIV-RNA (log <sub>10</sub> )	5.2±0.6	4.7±0.7	p<0.001
総蛋白	7.0±0.8	7.5±0.8	p<0.001
アルブミン	3.4±0.6	3.8±0.6	p<0.001
A/G	0.9±0.3	1.1±0.3	p<0.05

表 3 AIDS 症例における HAART 開始前の臨床データの比較

	IRIS(+)	IRIS(-)	検定
性別(男 / 女)	49 / 6	72 / 4	n.s.
年齢	42.9±10.0	41.2±10.2	n.s.
白血球数	3,583.6±2,002.1	3,874.3±1,886.3	n.s.
ヘモグロビン	10.7±2.0	12.0±2.0	p<0.001
CD4 <sup>+</sup> 数	27.3±35.5	63.4±63.3	p<0.001
CD8 <sup>+</sup> 数	299.5±263.6	494.8±375.6	p<0.005
CD4/8	0.11±0.12	0.17±0.18	n.s.
HIV-RNA (log <sub>10</sub> )	5.2±0.6	4.9±0.7	p<0.005
総蛋白	6.9±0.9	7.3±0.9	p<0.05
アルブミン	3.4±0.6	3.5±0.6	n.s.
A/G	0.9±0.3	0.9±0.2	n.s.

表 4 CD4<sup>+</sup>数が 50/μl 以下の症例における HAART 開始前の臨床データの比較

	IRIS(+)	IRIS(-)	検定
性別(男 / 女)	49 / 6	50 / 2	n.s.
年齢	42.4±10.6	39.4±9.4	n.s.
AIDS発症例	48 (87.3%)	45 (86.5%)	n.s.
白血球数	3,426.9±1,950.7	3,279.1±1,403.5	n.s.
ヘモグロビン	10.8±1.9	11.8±2.1	p<0.05
CD4 <sup>+</sup> 数	17.8±12.4	24.9±13.2	p<0.01
CD8 <sup>+</sup> 数	283.2±245.9	366.6±243.5	n.s.
CD4/8	0.09±0.08	0.10±0.08	n.s.
HIV-RNA (log <sub>10</sub> )	5.2±0.6	4.9±0.6	p<0.05
総蛋白	6.9±0.9	7.1±0.9	n.s.
アルブミン	3.4±0.5	3.5±0.6	n.s.
A/G	0.9±0.3	1.0±0.2	n.s.

ところ、IRISを発症した症例ではCD4<sup>+</sup>数、CD8<sup>+</sup>数の増加率が有意に高く、HIV-RNA量の減少が有意に大きかった。しかし、HIV-RNA量が400コピー/ml未満の症例頻度には差を認めなかった(表5)。

HAARTの薬剤組合せは、IRISを発症した症例では24パターン、IRISを発症しなかった症例では31パターンあり、全体では37パターンと多彩であった。主な薬剤組合せは、表6の通りであった。TDF+FTC+EFVはIRISを発症しなかった症例が多く、d4T+3TC+EFV、d4T+3TC+LPV/rはIRISを発症した症例が多かった。キードラッグにプロテアーゼ阻害薬を含む組合せ、LPV/rを含む組合せ、EFVを含む組合せは、両群間に有意差を認めなかった。しかし、d4Tを含む

組合せが有意にIRISを発症した症例が多かった(表7)。

IRISとしてNTM症、TB症、PCP、CMV感染症を発症した症例でのHAART開始時の治療・予防状況は、表8の通りであった。事前に診断されていたNTM症、TB症は、治療中にHAARTが開始されていたが、診断がついていなかった症例では予防を受けている症例は少なかった。事前に診断されていたPCPは、治療が終了してからHAARTが始められており、診断されていなかった症例でも予防を受けていることが多かった。事前に診断されていたCMV感染症は、治療から予防に変更後や治療・予防の中断中にHAARTが開始されていたが、診断されていなかった症例は予防を受けていることはなかった。

表5 HAART開始1ヵ月後の臨床データの比較

	IRIS(+)	IRIS(-)	検定
CD4 <sup>+</sup> 数増加率(%)	818.0±1300.0	330.0±370.0	p<0.001
CD8 <sup>+</sup> 数増加率(%)	216.0±180.0	192.0±316.0	p<0.001
HIV-RNA減少(log <sub>10</sub> )	2.17±0.8	2.04±0.7	p<0.001
HIV-RNA<400c/mL	22 (34.9%)	74 (46.3%)	n.s.

表6 HAARTの比較(1)

抗HIV薬の組合せは37パターン(IRIS(+):24パターン、IRIS(-):31パターン)

抗HIV薬の組合せ	IRIS(+) n=66	IRIS(-) n=162
TDF+FTC+EFV	4名(6.1%)	29名(17.9%)
d4T+3TC+EFV	15名(22.7%)	10名(6.2%)
d4T+3TC+LPV/r	10名(15.2%)	11名(6.8%)
TDF+FTC+ATV+RTV	4名(6.1%)	12名(7.4%)
AZT+3TC+EFV	4名(6.1%)	11名(6.8%)
TDF+3TC+ATV+RTV	3名(4.5%)	7名(4.3%)
ABC+3TC+ATV+RTV	1名(1.5%)	9名(5.9%)
TDF+3TC+EFV	1名(1.5%)	9名(5.9%)
AZT+3TC+LPV/r	0名	10名(6.2%)
ABC+3TC+EFV	2名(3.0%)	7名(4.3%)

表7 HAARTの比較(2)

抗HIV薬の組合せ	IRIS(+) n=66	IRIS(-) n=162	検定
PI(+)	36名(54.5%)	88名(54.3%)	n.s.
LPV/r(+)	16名(24.2%)	35名(21.6%)	n.s.
EFV(+)	30名(45.5%)	69名(42.6%)	n.s.
d4T	33名(50.0%)	28名(17.3%)	p<0.001

IRIS を発症した症例と発症しなかった症例で、HAART 開始時の NTM 症、TB 症、PCP、CMV 感染症に対する治療・予防状況を比較すると、IRIS を発症した症例で治療・予防を継続中の症例が多い傾向を認めた (表 9)。

## 考 察

IRIS の発症頻度は抗 HIV 治療例全体では 15 ~ 25 %<sup>6)</sup>、日和見感染症を起こした症例に限ると 7 ~ 63 % となる<sup>7-13)</sup>ため、IRIS は抗 HIV 治療を継続する上で重要な問題の一つとして認識されている。IRIS を発症すると、患者にとっては苦痛であり、臨床医にとっては治療遂行の妨げとなる。そのため、どのような症例に IRIS が発症しやすいのかを把握できることは、臨床医にとって抗 HIV 治療中の経過管理に有益な情報の一つとなる。また、IRIS の発症機序の解明や発症予防の確立にとっても重要な情報であると考えられる。

IRIS の発症に関連する臨床的因子に関する検討は、海外においても散見される程度であり、それらの報告<sup>2-5)</sup>では、男性、若年齢、HAART 開始時の低 CD4<sup>+</sup> 数・高 CD8<sup>+</sup> 数、高 HIV-RNA 量、低ヘ

モグロビン値、日和見感染症の治療開始から HAART 開始までの期間が短いことなどが臨床的因子として指摘されている。

一方、わが国では未だに IRIS の発症に関連する臨床的因子については検討されていない。そこで、本研究では IRIS を発症した症例と発症しなかった症例の臨床データを比較し、IRIS 発症に関連する臨床的因子を解析した。その結果から、HAART 開始前の臨床データを全症例でみると、年齢、AIDS 発症の有無、ヘモグロビン値、CD4<sup>+</sup> 数、CD8<sup>+</sup> 数、CD4/CD8 比、HIV-RNA 量、総蛋白値、アルブミン値、A/G 比に有意差を認めた。しかし、HAART 開始前の AIDS 発症や CD4<sup>+</sup> 数が強く影響すると考え、AIDS 発症例や CD4<sup>+</sup> 数が 50/μl 以下の症例のみで検討しても、IRIS 発症に関連する臨床データはヘモグロビン低値、CD4<sup>+</sup> 数のより低値、HIV-RNA 量のより高値が重要であった。また、HAART 開始 1 カ月後の臨床データは、IRIS を発症した症例で CD4<sup>+</sup> 数、CD8<sup>+</sup> 数の増加率が有意に高く、HIV-RNA 量の減少が有意に大きかったことから、HAART が短期間でより有効であることが IRIS 発症に関連すると考えられた。

表 8 IRIS (+) 症例における日和見感染症治療・予防状況

IRIS の疾患	HAART 開始前に診断	HAART 開始時の治療・予防状況			
		治療中	予防中	中断	中断 なし
NTM 25名	5名	4名 (4名)	5名 (1名)	0名	16名
TB 15名	11名	10名 (10名)	0名	0名	5名 (1名)
PCP 11名	7名	1名 (1名)	8名 (6名)	1名	1名
CMV 18名	7名	1名 (1名)	3名 (3名)	3名 (3名)	11名

( ) : HAART 開始前に診断した症例

表 9 HAART 開始時の日和見感染症治療・予防状況の比較

	NTM		TB		PCP		CMV	
	IRIS(+) n=66	IRIS(-) n=162	IRIS(+) n=66	IRIS(-) n=162	IRIS(+) n=66	IRIS(-) n=162	IRIS(+) n=66	IRIS(-) n=162
治療終了			1名 (0.6%)		3名 (1.9%)		4名 (6.1%)	
治療継続	6名 (9.1%)	3名 (1.9%)	11名 (16.7%)	11名 (6.8%)	1名 (1.5%)		4名 (6.1%)	1名 (0.6%)
予防なし	41名 (62.1%)	132名 (81.5%)	55名 (83.3%)	150名 (92.6%)	4名 (6.1%)	35名 (21.6%)	48名 (72.6%)	151名 (93.2%)
予防中断					1名 (1.5%)	2名 (1.2%)	4名 (6.1%)	
予防継続	19名 (28.8%)	27名 (16.7%)			60名 (90.9%)	122名 (75.3%)	6名 (9.1%)	10名 (6.2%)

HIVの増殖を強力に抑制するLPV/rのような抗HIV薬が、IRISの発症に関連しているのではないかと推測される。しかし、今回の調査では、IRIS発症群と非発症群でキードラッグがプロテアーゼ阻害薬である頻度やLPV/r、EFVの使用率に差を認めなかった。ところが、d4Tの使用率がIRIS発症群で有意に高く、興味深い結果であった。AZT単独投与例でのIRIS発症も報告されており<sup>14)</sup>、IRIS発症と使用薬剤との関連については、今後の研究課題になると考える。

HAART開始前に体内の病原体抗原量を減らしておくことは、IRISの発症予防につながると想像される。そのため、日和見感染症に対する十分な治療や予防が、IRISを回避するために役立つと考えられている。今回の調査では、IRISの疾患がHAART開始前に診断されていたのが、NTM症で20.0%、TB症で73.3%、PCPで63.6%、CMV感染症で38.9%であり、以前の調査<sup>15)</sup>に比べるとその頻度が低下している傾向にあった。このことは、十分な治療をしてからHAARTを開始していることを反映している可能性も考えられた。しかし、一方で日和見感染症の治療・予防中にIRISを発症している症例も多く、またIRISを発症した症例の方がHAART開始時に日和見感染症の治療・予防中の頻度が高いことから、容易に結論付けることは困難であった。日和見感染症に対する十分な治療や予防が、IRIS予防に有用であることを判断するためには、今後、前向き試験などを実施する必要がある。

## 結 論

IRIS発症と関連する臨床的因子を解析した。HAART開始時のヘモグロビン値・CD4<sup>+</sup>数・CD8<sup>+</sup>数の低値およびHIV-RNA量の高値であることとHAART開始1ヵ月後のCD4<sup>+</sup>数・CD8<sup>+</sup>数の増加率およびHIV-RNA量の減少がより良好なことが重要であった。

## 参考文献

- 1) Stoll M, Schmidt RE. Adverse events of desirable gain in immunocompetence: the immune restoration inflammatory syndromes. *Autoimmun Rev.* 3: 243-249, 2004.
- 2) French MA, Lenzo N, John M, Mallal SA, McKinnon EJ, James IR, Price P, Flexman JP, Tay-Kearney M-L. Immune restoration disease

after the treatment of immunodeficient HIV-infected patients with highly active antiretroviral therapy. *HIV Medicine.* 1: 107-115, 2000.

- 3) Robertson J, Meier M, Wall J, Ying J, Fichtenbaum J. Immune reconstitution syndrome in HIV: Validating a case definition and identifying clinical predictors in persons initiating antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis.* 42: 1639-1646, 2006.
- 4) Shelburne SA, Visnegarwala F, Darcourt J, Graviss EA, Giordano TP, White Jr AC, Hamill RJ. Incidence and risk factors for immune reconstitution inflammatory syndrome during highly active antiretroviral therapy. *AIDS.* 19: 399-406, 2005.
- 5) Ratnam I, Chiu C, Kandala N-B, Easterbrook PJ. Incidence and risk factors for immune reconstitution inflammatory syndrome in an ethnically diverse HIV type 1-infected cohort. *Clin Infect Dis.* 42: 418-427, 2006.
- 6) Shelburne SA, Montes M, Hamill RJ. Immune reconstitution inflammatory syndrome: more answers, more questions. *J Antimicrob Chemother.* 57: 167-170, 2006.
- 7) Murdoch DM, Venter WDF, Van Rie A, Feldman C. Immune reconstitution inflammatory syndrome (IRIS): review of common infectious manifestations and treatment options. *AIDS Res Ther.* 4: 9, 2007.
- 8) Lawn SD, Bekker L-G, Miller RF. Immune reconstitution disease associated with mycobacterial infections in HIV-infected individuals receiving antiretrovirals. *Lancet Infect Dis.* 5: 361-373, 2005.
- 9) 小河原光正、坂谷光則、木村 剛. 日和見疾患合併 HIV 感染症の多剤併用療法に関する研究. 厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業 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 17 年度研究報告書. 69-77, 2006.
- 10) Feller L, Wood NH, Lemmer J. Herpes zoster infection as an immune reconstitution inflammatory syndrome in HIV-seropositive subjects: a review. *Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 104: 455-460, 2007.
- 11) 中村哲也、岡 慎一、永田洋一、蕪城俊克. CMV 感染症における免疫再構築症候群の臨床的検討. 厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業 HAART 時代の日和見合併症に関する研究 平成 16 年度総括・分担研究報告書. 40-42, 2005.
- 12) Sungkanuparph S, Jongwutiwes U, Kiertiburanakul



- S. Timing of cryptococcal immune reconstitution inflammatory syndrome after antiretroviral therapy in patients with AIDS and cryptococcal meningitis. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 45: 595-596, 2007.
- 13) Miralles P, Berenguer J, Lacruz C, Cosina J, López JC, Padilla B, Muñoz L, García-de-Viedma D. Inflammatory reactions in progressive multifocal leukoencephalopathy after highly active antiretroviral therapy. *AIDS*. 15: 1900-1902, 2001.
- 14) French MA, Mallal SA, Dawkins RL. Zidovudine-induced restoration of cell-mediated immunity to mycobacteria in immunodeficient HIV-infected patients. *AIDS*. 6: 1293-1297, 1992.
- 15) 古西 満、源河いくみ、中村哲也、善本英一郎、今村顕史、山元泰之、上平朝子、濱口元洋. 免疫再構築症候群の臨床像に関する調査. 厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業 HAART 時代の日和見合併症に関する研究平成 16 年度総括・分担研究報告書. 84-92, 2005.

## 健康危険情報

特になし

## 研究発表

### 論文

- 1) Shigeki Hoshino, Binlian Sun, Mitsuru Konishi, Mari Shimura, Tatsuya Segawa, Yoshiaki Hagiwara, Yoshio Koyanagi, Aikichi Iwamoto, Jun-ichi Miyama, Hiroshi Terunuma, Shigeyuki Kano, Yukihito Ishizaka: Vpr in plasma of HIV type 1-positive patients is correlated with the HIV type 1 RNA titers. *AIDS Res Hum Retrov*, 23: 391-397, 2007.
- 2) Kenji Uno, Mitsuru Konishi, Eiichiro Yoshimoto, Kei Kasahara, Kei Mori, Koichi Maeda, Eiwa Ishida, Noboru Konishi, Koichi Murakawa, Keiichi Mikasa: Fatal cytomegalovirus-associated adrenal insufficiency in an AIDS patient receiving corticosteroid therapy. *Intern Med*, 46:617-620, 2007.
- 3) Kenji Uno, Mitsuru Konishi, Eiichiro Yoshimoto, Kei Kasahara, Kei Mori, Koichi Maeda, Keiichi Mikasa : A case of gynecomastia associated with efavirenz. *J Nara Med Associ*, 58:141-145, 2007.
- 4) Yoshinari Morimoto, Mitsuru Konishi, Yuichiro Imai, Koutaro Inagake, Satoru Fukutsuji, Tadaaki Kirita: Resistant recurrent aphthous stomatitis in an AIDS patient-Efficacy and problems of long-

term corticosteroid therapy-. *Oral Therapeutics and Pharmacology*, 26:55-60, 2007.

- 5) 澤口博千代、中島宏和、中島重徳、古西 満：間質性肺炎発症から後天性免疫不全症候群と判明した 2 症例. *感染症誌*, 81:67-71, 2007.

### 学会発表

- 1) 古西 満、善本英一郎、宇野健司、笠原 敬、森 啓、前田光一、三笠桂一：HIV 感染症における Th1/Th2 バランスに関する検討. 第 81 回日本感染症学会総会、2007 年 4 月、京都.
- 2) 善本英一郎、古西 満、宇野健司、米川真輔、中川智代、笠原 敬、森 啓、前田光一、三笠桂一：HAART 経過中に急性虫垂炎を合併した HIV 感染者の 1 例. 第 81 回日本感染症学会総会、2007 年 4 月、京都.
- 3) 古西 満：わが国における免疫再構築症候群の現状. 第 21 回日本エイズ学会総会（シンポジウム 01：HAART 時代の日和見感染症一残された課題一）、2007 年 11 月、広島.

### 知的財産権の出願・登録状況

なし



## *Mycobacterium avium* complex による 免疫再構築症候群の原因解明と治療法の開発

分担研究者：山崎 善隆

(信州大学医学部附属病院 内視鏡診療部)

研究協力者：田邊 嘉也<sup>1</sup>、塚田 弘樹<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>新潟大学医学部 第二内科、<sup>2</sup>新潟市民病院 感染症科)

### 研究要旨

強力な抗 HIV 療法である HAART が導入されて以降、CD4 リンパ球が回復する過程で、それまで顕在化していなかった日和見病原体への過剰な反応を呈する免疫再構築症候群 (immune reconstitute syndrome: IRS) が新たに認識されるようになった。*Mycobacterium avium* complex (MAC) は IRS の代表的な起因菌で、HAART 導入後約 10 日程度で肺およびリンパ節に MAC 感染症を生じる。治療はマクロライド系抗菌薬と抗結核薬の併用療法を行うが、その増悪のために副腎皮質ホルモンを併用したり、HAART を休薬しなければならないことがある。我々はヒト気管支上皮培養細胞 (BEAS-2B) に MAC が侵入して細胞内増殖する実験系を作成し、クラリスロマイシンを最小発育阻止濃度 (MIC) に調整した細胞培養液を用いると細胞内殺菌効果を発揮することを明らかにした。さらに、MAC が BEAS-2B 細胞内において増幅する時に発現する遺伝子をマイクロアレイによって解析したところ、IL-6、IL-8、MCP-1 mRNA が有意に発現した。本研究では、MAC が BEAS-2B 細胞内で増幅した細胞上清中の IL-6、IL-8、MCP-1 を ELISA 法により測定したところ有意に上昇した。さらに、MAC に対するクラリスロマイシン最小発育阻止濃度 (MAC) の 1/4 倍、1 倍、4 倍に調整して培養したところ、IL-6、IL-8、MCP-1 濃度はすべて低下した。クラリスロマイシンは MAC の上皮細胞内増幅により惹起される炎症を抑制し、免疫再構築症候群発症を抑制する可能性が示唆された。他方、線維芽細胞培養細胞に対する MAC の影響を調べるために、線維芽細胞に対して MAC を接種して、マイクロアレイ解析を行ったところ、3 倍以上発現する有意な遺伝子は認めなかった。MAC を接種して電子顕微鏡撮影を行ったが、侵入像は認めなかった。線維芽細胞は MAC 感染によって影響を受けないと推定される。MAC による免疫再構築症候群発症に上皮細胞の関与が推定され、その発症をクラリスロマイシンが抑制できる可能性が示された。

## 研究目的

*Mycobacterium avium complex* (MAC) によって発症する免疫再構築症候群 (immune reconstitute syndrome: IRS) は肺感染型、リンパ節炎型、播種型に分類される<sup>1-4)</sup>。肺感染型における実際の局所の MAC の菌量は少ないが<sup>5)</sup>、気道に強力な炎症が惹起されていることが推定される。MAC が気道上皮細胞内で増幅する時に発現される遺伝子をマイクロアレイにより解析したところ、IL-6, IL-8, MCP-1 mRNA などが有意に発現する。また、クラリスロマイシンは細胞内で増幅する MAC に対して殺菌作用や静菌作用を有する<sup>6)</sup>。

そこで本研究では MAC が侵入し増幅した気道上皮培養細胞の培養上清中の IL-6、IL-8、MCP-1 濃度を ELISA 法により測定し、さらにクラリスロマイシンの濃度を MIC の 1/4 倍、1 倍、4 倍と変えて、IL-6、IL-8 および MCP-1 濃度し、抗炎症作用を呈するクラリスロマイシンの濃度を検討する。さらに、MAC が上皮細胞をトランスロケーションした後に、粘膜下の各種炎症細胞に及ぼす影響を解析するため、線維芽培養細胞に MAC を接種してマイクロアレイや電子顕微鏡撮影によって検討を行った。

## 研究方法

### 1) Replication assay

ヒト正常気管支上皮培養細胞 (BEAS-2B) は抗菌薬を含まない bronchial epithelium growth media (BEGM) を用いて培養した。BEAS-2B 細胞は 24 ウェル組織培養プレートを用いて、5% CO<sub>2</sub>, 37 °C の条件で confluent まで培養した (約 4 日間)。MAC 104 strain は Middlebrook 7H11 agar に 10 日間培養した。24 ウェル組織培養プレートで BEAS-2B 細胞を confluent まで培養し、MAC 104 strain を接種 (約  $3 \times 10^6$  CFU/mL)、24 時間後に細胞外に存在する浮遊・接着菌を洗浄、アミカシン (2 時間) で殺菌した後、細胞内侵入した MAC104 strain の菌量を 1、3、5 日目に細胞内の菌量をカウントする。次に、この実験系を用いて、MAC 104 strain (クラリスロマイシン (CAM) に対する MIC 2 µg/ml) が侵入した BEAS-2B 細胞の培養上清中にクラリスロマイシンを添加し、5 日間にわたり細胞内で増菌した MAC 104 strain の菌量をカウントし、細胞内殺菌・静菌作用について検討を行った。

### 2) サイトカイン・ケモカインの測定

上清中の IL-6、IL-8、MCP-1 濃度を ELISA 法を用いて測定した。BEGM は MAC 104 strain を接種して、接種後 24 時間、後に BEGM のクラリスロマイシン濃度を 0、0.5 (1/4 ×)、2 (1 ×)、8 (4 ×) µg/mL に調整して、それぞれ第 5 日目に採取し、-78 °C で凍結保存した。上清中の IL-6、IL-8、MCP-1 濃度は ELISA を用いて測定した。各実験は 3 回繰り返した。

### 3) 線維芽培養細胞を用いた検討

組織培養用 25cm<sup>2</sup> フラスコに線維芽培養細胞 (fetal human lung fibroblast-1: HLF-1) を confluent まで培養し、MAC 104 strain を  $3 \times 10^7$  CFU 接種した。それぞれのフラスコの HLF-1 細胞は 3 時間後に Flask 中の上清を捨て、冷蔵した PBS で 3 回 flask を洗浄し、よく水分を切り、β-Mercaptoethanol (2ME) 入り RLT buffer を加えて、細胞成分を回収し、細胞懸濁液を液体窒素で瞬間凍結した。Biomatrix Laboratory, Co., へ送付し、GeneChip<sup>®</sup> Array (Affymetrix Co.) を用いて解析した。

## 研究結果

### 1) Replication assay

MAC を接種 24 時間で BEAS-2B 細胞内に平均  $3.2 \pm 1.2 \times 10^5$  CFU/well 侵入した。5 日目に BEAS-2B 細胞内の菌量は平均  $5.4 \pm 1.7$  倍に増加した。次に、MAC 104 strain を感染させた BEAS-2B 細胞培養上清中にクラリスロマイシンを添加して培養したところ、5 日目にそれぞれ MIC では  $0.32 \pm 0.04$  倍、 $0.25 \pm 0.04$  倍と殺菌し、また、1/4 MIC では 5 日目に  $1.42 \pm 0.68$  倍と静菌した。

### 2) 培養上清中におけるサイトカイン・ケモカイン産生とクラリスロマイシンによる抑制効果 (Fig 1, 2, 3)

MAC 104 strain が侵入した BEAS-2B 細胞を 5 日目まで培養継続し、第 5 日目に培養上清中の IL-6、IL-8、MCP-1 濃度はコントロールに比し、有意に上昇した。第 5 日目において、クラリスロマイシンが 1 倍 MIC (2 µg/mL) と 4 倍 MIC (8 µg/mL) における IL-6、IL-8、MCP-1 濃度はいずれもクラリスロマイシンを添加しないものに比し、有意に低下した。さらに、1/4 倍 MIC (0.5 µg/mL) における IL-6、IL-8、MCP-1 濃度も同様にクラリスロマイシンを添加しないものに比し、有意に低下した。

### 3) 線維芽培養細胞を用いた検討

MACを接種したHLF-1細胞を用いて解析したところ、コントロールに比し、3倍を超える有意な炎症関連遺伝子の発現を認めなかった。また、走査型電子顕微鏡と透過型電子顕微鏡を用いた観

察ではMACはHLF-1細胞表面に付着しておらず、また、細胞内に侵入像も認めなかった (Fig4)。すなわち、MACはHLF-1細胞に対して親和性が低いことが推定される。

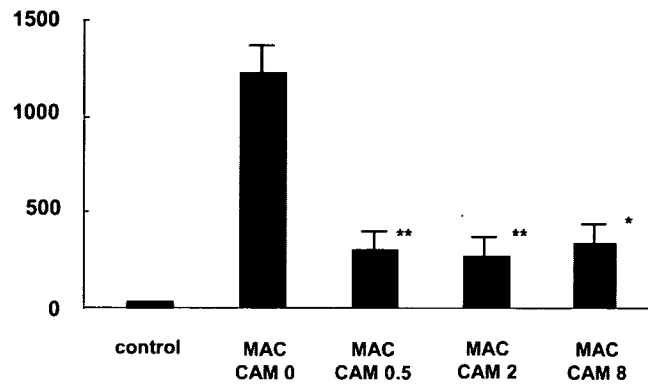


Fig1. 第5日目における上清中のIL-6濃度とクラリスロマイシンによる抑制効果  
クラリスロマイシンをMACに対するMICをそれぞれ1/4倍, 1倍, 4倍に調整したところ、クラリスロマイシンを添加しないものに比し、有意に抑制された。M ± SD、\*p<0.01, \*\*p<0.001

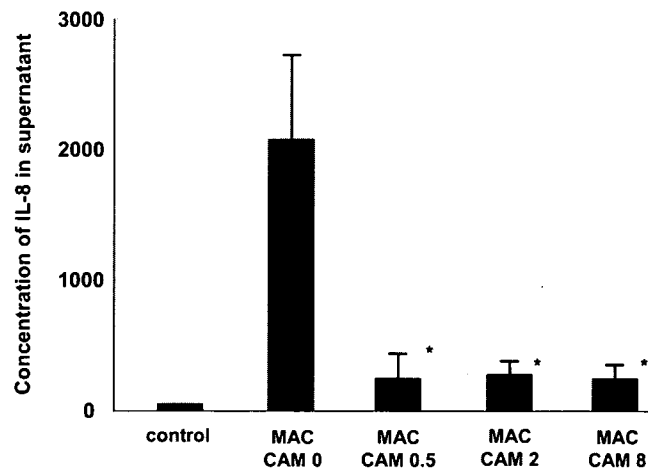


Fig2. 第5日目における上清中のIL-8濃度とクラリスロマイシンによる抑制効果  
クラリスロマイシンをMACに対するMICをそれぞれ1/4倍, 1倍, 4倍に調整したところ、クラリスロマイシンを添加しないものに比し、有意に抑制された。M ± SD、\*p<0.01, \*\*p<0.001

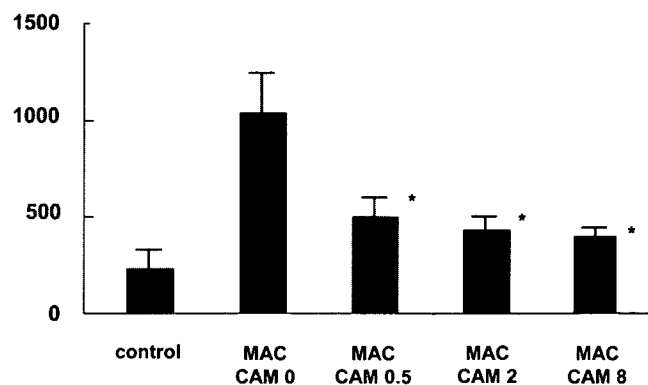


Fig3. 第5日目における上清中のMCP-1濃度とクラリスロマイシンによる抑制効果  
クラリスロマイシンをMACに対するMICをそれぞれ1/4倍, 1倍, 4倍に調整したところ、クラリスロマイシンを添加しないものに比し、有意に抑制された。M ± SD、\*p<0.01, \*\*p<0.001