



日和見感染症の早期発見と治療（悪性リンパ腫）

研究分担者：片野晴隆（国立感染症研究所感染病理部）

研究協力者：中村智之、佐多徹太郎（国立感染症研究所感染病理部）
比島恒和（東京都立駒込病院病理科）

研究要旨

エイズ関連リンパ腫の発症に関連する新たな因子を検索する目的で、エイズ関連リンパ腫20例におけるウイルスの網羅的検索を行った。EBV, TTV, HIVなど10種類のウイルスが検出された。EBVに関しては高コピー数の症例が12例、低コピー数、または陰性の症例が8例あり、病態への関与の違いが示唆されることから、EBVコピー数によりEBV関連リンパ腫の分類が可能と考えられた。高コピー数のHIVが検出された症例ではHIVがX染色体q28にインテグレーションされていることが確認された。HIVインテグレーションが関連するリンパ腫はまれではあるものの、ある程度の頻度で存在する可能性がある。

A. 研究目的

エイズ関連リンパ腫は近年増加傾向にあり、HAART時代に入り、Epstein-Barr virus (EBV)陰性リンパ腫の増加、脳原発リンパ腫の減少など、その病態に変化が見られる。本分担研究ではこうした近年の変化をふまえ、発症機構ごとにエイズ関連リンパ腫を再分類することを目的とする。EBV陰性のエイズ関連リンパ腫はその病因が明らかでないものがほとんどである。組織学的にはdiffuse large B cell lymphomaがほとんどであるが、この組織型はさまざまな病態で起こり、組織学的分類は単一の病因を示すものではない。一般的にリンパ腫の原因は染色体転座や遺伝子異常といった細胞内要因に加え、ウイルス、薬剤、放射線などの外部要因が加わり、単純ではない。HAART導入前のエイズ関連リンパ腫のほとんどはEBV関連日和見リンパ腫であり、比較的単一の疾患概念であった。しかし、今日のEBV陰性エイズ関連リンパ腫は健常者に起こるリンパ腫にその特徴が近似してきており、その発症過程も複雑であることが予想される。リンパ腫発症と関連するウイルスはこれまでEBVのほかにヒトヘルペスウイルス8(HHV-8)、HTLV-1などがよく知られている。しかし、HHV-8やHTLV-1はエイズ関連リンパ腫での

検出は多くない。そこで、まずわれわれはエイズ関連リンパ腫にEBV以外にどのようなウイルスが関与するかを明らかにするために多種類ウイルスの網羅的検索をおこなった。また、HIVはこれまで、エイズ関連リンパ腫の発症とは直接関連せず、免疫能を低下させることでリンパ腫発症に間接的に関連すると考えられてきた。しかし、以前、本研究班で報告したとおり、HIVが宿主ゲノムにインテグレーションし、インテグレーション部位によってはリンパ腫発症に関連する場合が存在する(Katano H, et al. Microb Infect 9: 1581-1589, 2007)。そこで本年度はリンパ腫中のHIV量に注目し、HIVインテグレーションとリンパ腫発症を示唆する新たな症例の発見に努めることで、エイズ関連リンパ腫発症とウイルス感染の新たな関連を検索した。

B. 研究方法

1. 検体

診断用に採取され、国立感染症研究所感染病理部に冷凍保存してある20症例のエイズ関連リンパ腫組織を用いた。組織型はすべてdiffuse large B cell lymphomaであり、生検、または剖検時に採取し、凍結保存後、DNAおよびRNA抽出を行った。

また、他のエイズ患者20例の剖検時に各臓器から生の状態で標本を採取し、直ちに凍結した。凍結後はリンパ腫サンプルと同様に保存し、核酸の抽出に用いた。

2. 核酸の抽出

凍結組織を2分し、一つをRNA用に、他の一つをDNA用とした。RNA用サンプルをISOGEN (ニッポンジーン社)中に浸漬し、ポリトロン (キネマティカ社)を用いてホモジナイズ後、添付のプロトコールに沿ってRNAを抽出した。また、DNA用サンプルからは通法のフェノールクロロホルム法にてDNAを抽出した。DNA, RNAともに吸光度計にて濃度、OD比を確認した。

3. 定量的PCR法によるウイルスの検出

ヒトに病原性を持つと考えられる163種類のウイルスを96穴プレート上で一度に検出できるreal-time (RT-)PCRシステムを本研究室で独自に開発し、これによりRNAおよびDNAサンプルからウイルスの検出を試みた。詳細は19年度報告書を参照されたい。定量的PCRはMX3005P (ストラタジーン社)、またはABI Prism 7900HT (アプライド・バイオシステムズ社)を用いて行った。

4. ゲノムウォーキング

HIVのインテグレーション部位を同定するためにゲノムウォーキングを行った。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)

サンプルはすべて匿名化された状態で使用され、研究計画は国立感染症研究所ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会による承認を受けた(承認番号156, 157)。

C. 研究結果

1. エイズ関連リンパ腫における多種類ウイルスの網羅的検出

エイズ関連リンパ腫の生検例、および剖検例のサンプル20例につき、定量的PCR法で各種ウイルスの検出を行った(図1A)。検出ウイルスはEBV, TTV, HIV, HBVなどの10種類であった。EBVは20例中18例に検出され、2例はPCRでも陰性であった。またTTVは17例で検出され、いずれも高いコピー数であったが、健常組織などからも検出されており特異性はないものと思われる。Parvovirus

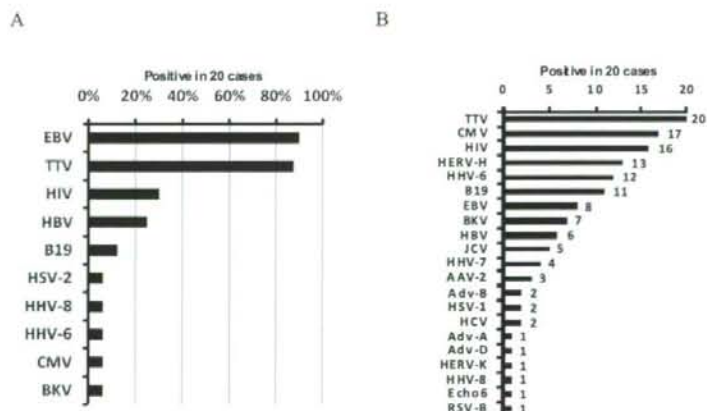


図1 エイズ関連リンパ腫およびエイズ剖検例の各臓器におけるウイルスの網羅的検索の結果 (A) エイズ関連リンパ腫20例で検出されたウイルスを検出頻度順に並べた。(B) エイズ剖検例20例で検出されたウイルス。いずれかの臓器で検出されたものを陽性とした。A, Bともに横軸は検出率(%)。

B19, HBVなどはいずれもコピー数は低く、病態との関連は薄いものと想像された。RNAウイルスではHIVが検出されたのみであり、他のウイルスは検出されていない。DNA, RNAサンプルともに内因性のコントロールは増幅されている。この結果を昨年度報告したエイズ剖検例から検出されるウイルス群と比較するとエイズ剖検例ではCMV, HHV-6, parvovirus B19などが高率に検出されており、明らかな違いがあった(図1B)。EBV, HIVが検出されたリンパ腫についてウイルス量の比較を行った(図2)。EBVは1細胞あたり1コピー以上の高いウイルス量が検出された症例が12例であり、残りの8例は陰性か低コピー数であり、2群間ではEBVのリンパ腫発症への関与の違いがあることが示唆された。HIVはほとんどの症例で1細胞あたり0.01コピー以下という低いコピー数であったが、1例のみ1細胞あたり約3コピーが検出された例が存在した。同時にHHV-8も定量を行ったが、陽性例はなかった。

2. HIVインテグレーション例の解析

ヒトゲノムはアレルが2本あるため、HIVがインテグレーションされた場合、理論的にHIVは1細胞あたり2コピー存在する。HIVが検出された

例は1細胞あたり約3コピーという高コピー数であり、十分にHIVインテグレーションが起こっているものと考えられる。そこでHIVが高コピー数検出された例につき、ゲノムウォーキング法によりHIVインテグレーションの検索を行った。制限酵素処理後のDNAにアダプターをライゲーションし、それを鋳型にHIV-LTRを標的とするgene specific primer、および、アダプターに一致したprimerを用いてPCRをおこなったところ、数本のPCR産物が得られた。これらをTAクローニングした結果、そのうちの1本がHIV LTRに連続して、ヒトX染色体q28の配列を含んでいることが分かった(図3)。HIV-LTRに続く配列はポリA配列を含んでおり、何らかの遺伝子がここまでにコードされていることが示唆されるが、ENSEMBLEでの検索の結果では周辺には既知の遺伝子は登録されておらず、未登録遺伝子のopen reading frameが近傍にあり、その3'末端にインテグレーションしている可能性が示唆された。

D. 考察

本研究ではエイズ関連リンパ腫20例の検索において、10種類のウイルスが検出された。これまでリンパ腫で一度に100種類を超える多種類のウイ

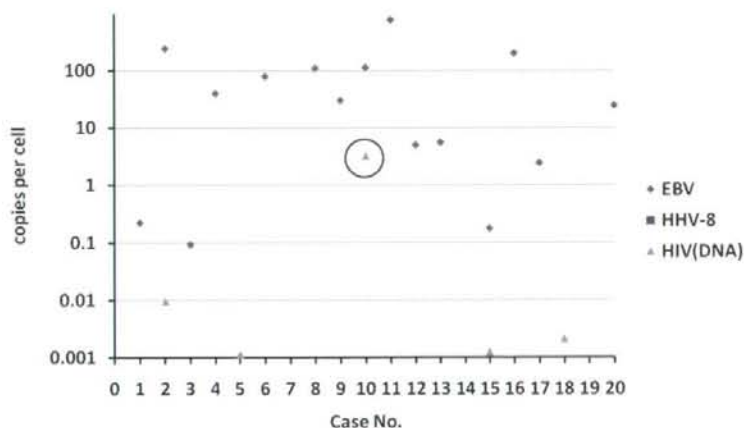


図2 エイズ関連リンパ腫20例におけるEBV, HIV, HHV-8のウイルス量
横軸に各症例を縦軸の数字は1細胞当たりのコピー数。HHV-8は全て陰性。○はHIVが高コピー数検出された症例。

ルスを検出した報告はなく、これは免疫不全状態で起こるリンパ腫の発症機構を考える上で基礎データとなる情報と思われる。エイズ関連リンパ腫で検出されたウイルスの種類と頻度は、エイズ剖検例の各臓器から検出されるウイルスのそれとは明らかに異なる。とくにEBVはこれまで知られているようにエイズ関連リンパ腫には高頻度に検出され、剖検各臓器とも比較して高コピー数である。EBVが関連して起こる日和見リンパ腫がエイズ関連リンパ腫の中でも多くの割合を占めることを示唆したものであるが、一方で、定量的PCRの結果からはEBV陰性のリンパ腫、あるいはEBVのコピー数が低い(1細胞当たり0.1コピー以下)のリンパ腫も20例中8例存在することが明らかになった。病理組織におけるEBVの検索には *in situ* hybridizationが一般的であるが、今回使用した例にはEBER陽性例が何例か含まれており、こうした例はEBV-PCRでは陽性であるが、定量的PCRでは低コピー数のEBVが検出されるにとどまっている。つまり、このようなEBVが低コピー数しか検出されないリンパ腫においてはEBVがリンパ腫発症に直接関連している可能性は低く、循環していたEBV陽性のリンパ球を捉えたものに過ぎないと予想される。そうしたことを勘案すると、定量

的PCRで1細胞当たり1コピー以上のEBVが検出された12例がEBV関連日和見リンパ腫と考えるのが妥当で、他の8例におけるEBVの関与は疑問である。EBVの1細胞当たりのコピー数によりEBVの関与を推定し、リンパ腫を分類することも可能と考えられた。

HHV-8は定量的PCRでは一例が陽性となっているが、これはconventional PCRに比べ、定量的PCRの感度が高いためであると考えられる。EBV、HHV-8以外はリンパ腫発症と直接関連するウイルスはなさそうであるが、TTVは非常に高いコピー数が検出されている。TTVはもともと肝炎ウイルスとして発見されたウイルスであるが、現在では多くの正常組織からも検出され、疾患との関連は否定されつつある。エイズ剖検例の各臓器における検索でもTTVはあらゆる臓器で高いコピー数が検出されており、リンパ腫発症との関連は否定的である。他のHBV、Parvovirus B19、他のヘルペスウイルスに関してもコピー数は低く、リンパ腫発症との関連は否定できる。

今回の研究ではHIVがインテグレーションした例が1例、新たに発見された。インテグレーション部位のXq28はこれまで報告されているHIVのインテグレーション部位に含まれており、比較的、

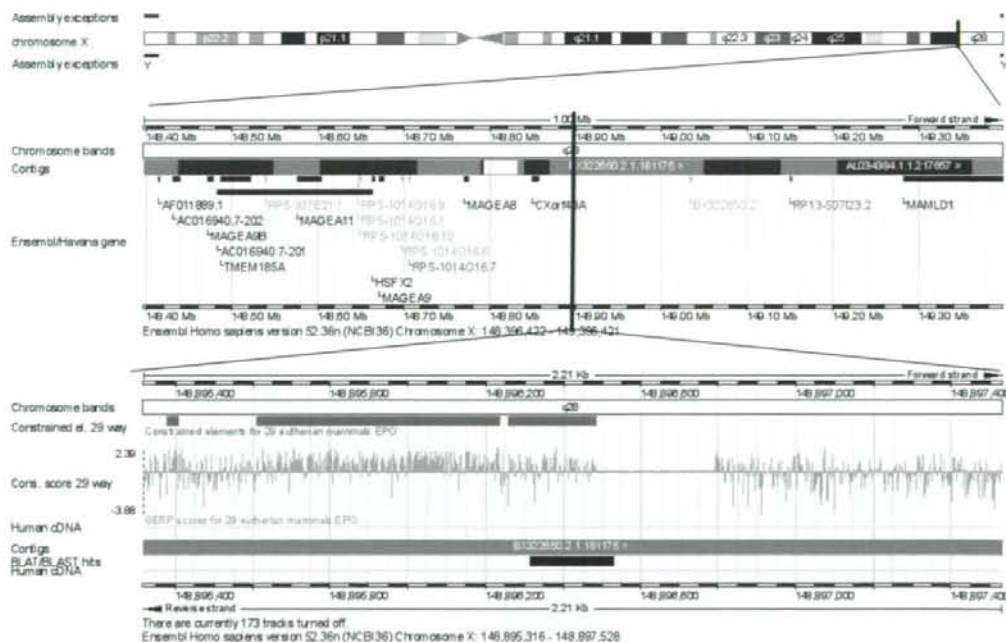


図3 エイズ関連リンパ腫1例におけるHIVインテグレーション部位 ENSEMBLEでの結果を示す。インテグレーション部位には既知の遺伝子は存在しない。

よくある場所であるようである (Schroder AR, et al. Cell 110: 521-529, 2002)。HIVのインテグレーション部位は基本的には全くアトランダムであるが、活性化された遺伝子にインテグレーションしやすいと考えられている。今回同定されたインテグレーション部位には既知の遺伝子は存在しないが、切断部位のすぐ後にPoly A配列があることや、少し離れた近傍にはmiRNAのクラスターがあり、テロメアにも近い。近傍の遺伝子の探索や、5'-LTRの性状、HIVがintactな状態でインテグレーションしているか、などのHIVインテグレーションの形態は今後、検討すべき課題であるが、コピー数が高いことから、リンパ腫本体にHIVがインテグレーションしていたことはほぼ間違いない。我々が経験した前例ではstat3の1st exonの上流にHIVがインテグレーションしており、stat3の過剰発現によりリンパ腫の発症につながったと考えられる。今回の症例ではその分子機序までは明らかではないが、HIVがリンパ腫細胞そのものにインテグレーションしている症例が、少ないながらも存在していることは、限定された症例でHIVインテグレーションがリンパ腫発症と何らかの関連があることが示唆され、エイズ関連リンパ腫の新たな発症機構を考える上で大変興味深い。

E. 結論

エイズ関連リンパ腫20例におけるウイルスの網羅的検索を行ない、EBV, TTV, HIVなど10種類のウイルスを検出した。EBVのコピー数には差があり、1細胞当たり1コピー以上のEBVが存在する症例は12例にすぎない。HIVも6例から検出され、高コピー数のHIVが検出される症例ではHIVのインテグレーション部位を同定した。HIVインテグレーションが関連するリンパ腫はまれではあるものの、ある程度の頻度で存在する可能性がある。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Dewan, MZ, Takamatsu, N, Hidaka, T, Hatakeyama, K, Nakahata, S, Fujisawa, J, Katano, H, Yamamoto, N, Morishita, K. Critical role for TSLC1 expression in the growth and organ infil-

tration of adult T-cell leukemia cells *in vivo*. J Virol. 82:11958-11963, 2008.

- 2) Dewan, MZ, Tomita, M, Katano, H, Yamamoto, N, Ahmed, S, Yamamoto, M, Sata, T, Mori, N, Yamamoto, N. An HIV protease inhibitor, ritonavir targets the nuclear factor-kappaB and inhibits the tumor growth and infiltration of EBV-positive lymphoblastoid B cells. Int J Cancer. 124: 622-629, 2009.

2. 学会発表

(国内学会)

- 1) 片野晴隆, 菅野隆行, 佐多徹太郎. 定量的PCRによる網羅的ウイルス検出法の開発とエイズ剖検例の各臓器におけるウイルス感染プロファイル 第97回日本病理学会総会 2008.4 金沢
- 2) 菅野隆行, 佐多徹太郎, 片野晴隆. RTA発現レベルの異なるKSHV感染細胞におけるウイルス感染維持 第56回日本ウイルス学会学術集会2008年11月、岡山.
- 3) 片野晴隆, 加納基史, 中村智之, 菅野隆行, 浅沼秀樹, 佐多徹太郎. 定量的PCRによる網羅的ウイルス検出法の開発とエイズ剖検例の各臓器におけるウイルス感染プロファイルの解析. 第56回日本ウイルス学会学術集会2008年11月、岡山.
- 4) 片野晴隆, 中村智之, 菅野隆行, 佐藤由子, 佐多徹太郎. KSHV感染におけるKSHV全遺伝子発現プロファイルの解析. 第56回日本ウイルス学会学術集会2008年11月、岡山.
- 5) 片野晴隆, 佐多徹太郎. エイズ関連リンパ腫およびエイズ剖検例の各臓器における多種類ウイルスの定量. 第22回日本エイズ学会学術集会2008年12月、大阪.

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。



HIV合併原虫症の診断と新規治療薬の開発に関する研究

研究分担者：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（慶應義塾大学医学部熱帯医学・寄生虫学教室）

所 正治（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

日和見原虫感染症のうち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診断法の開発と新規治療薬の開発を検討した。トキソプラズマに特異的な酵素NTPaseとその他の酵素の結晶化による阻害剤の発見を試みた。クリプトスポリジウム症においては診断法の開発と既存治療薬のコンビネーション治療の方法を検討した。

A. 研究目的

日和見原虫感染症のうち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。

薬剤開発の標的となるトキソプラズマの酵素として、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）、その他の酵素としてビルビン酸キナーゼ-IおよびII型、ホスホグルコムターゼ-IおよびII型を標的とした。ビルビン酸キナーゼ-Iはグルコース6-リン酸をアロステリックエフェクターとする特異な性質があり他の生物の酵素とは根本的に異なっている。この酵素はトキソプラズマの解糖系における最も重要な酵素であると考えられている。ビルビン酸キナーゼ-IIはその存在がトキソプラズマやマラリア原虫などに限られ、トキソプラズマではミトコンドリアにも存在する。ミトコンドリアに存在するビルビン酸キナーゼは今までどの生物にも知られていない。我々が報告した

この酵素は今後名称の変更も考えられる。

我々はNTPase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ビリメサミンに比べて治療効果が低いことが判明した。このことは今まで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、NTPaseとその他の酵素の結晶化による構造解析の検討を行うことにした。

クリプトスポリジウム症における数値処理可能な原虫の定量法を確立し、診断法の開発と既存の治療薬の有効性について検討を加えた。リアルタイムPCRによる原虫の定量方法を応用し、実際の患者サンプルからの検出を試みた。また既存の治療薬の原虫増殖に与える効果を調べた。その結果、既存薬の組み合わせによる原虫増殖の抑制方法が判明した。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およびその他のトキソプラズマ特異酵素を標的にしたトキソプラズマ症の新規治療薬の開発と診断法の確立を行う事である。またもうひとつの目的はクリプトスポリジウム症の診断法の確立と新規の治療薬を開発することである。

B. 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 pH7.4 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、ゲル濾過等の方法を組み合わせて単一に精製した。

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℃。現在見つかっているNcNTPaseに対する最適の結晶化剤溶液は0.1 M カコジル酸緩衝液 pH 6.8, 2.5 M Potassium acetate, 4% propanolである。NTPase-Iの最適結晶化剤溶液は0.1 M Tris-HCl pH 7.8, 4.0 M Potassium acetateである。

b. ビルビン酸キナーゼIの結晶化

ビルビン酸キナーゼ-Iの結晶化の方法もNTPaseと同様に行なった。最適の結晶化剤溶液は0.1 M リン酸緩衝液 pH 7.0, 7% PEG8000, 0.2 M Li₂SO₄, 0.1 M Prolineである。

c. その他の酵素の結晶化

Clear Strategy IおよびIIなどの結晶化スクリーニングキットを用いて最適の結晶化剤溶液の検討を行った。

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

d. クリプトスポリジウム症の診断と薬剤開発

使用した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ータ法で行い、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。

C. 研究結果

a. NTPaseの結晶化

15万種類の化合物から選択した薬剤は*in vitro*での効果は非常に良いのであるが、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。このことはすでに報告書に記載した。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は今まで行ってきた精製方法と今回改良を加えた方法の違いを示したものである。Refoldを行う前に徹底的に封入体を洗浄することが後の精製に影響を与えることが判明した。図2は得られたサンプルの単一性を見たもので、refold後わずか三つのカラム操作で単一になっていることが分かる。図3はNcNTPaseの結晶写真と結晶化条件を示したもので、分解能の最大は3.5オングストロームであった。この結晶からは結晶学的パラメータである空間群と格子定数の決定を行うことができた。また分解能の異方性が検出され、その時のCCDイメージが図4に示されている。図5はトキソプラズマのNTPase-Iの結晶写真と結晶化条件を示したものである。分解能は4オングストロームと飛躍的な向上が観察されたが、構造解析には至っていない。

b. ビルビン酸キナーゼ-Iの結晶化

ビルビン酸キナーゼ-Iの結晶写真と測定された各種のパラメータを示したものが図6である。最大の分解能は3.1オングストロームであった。これらの測定値を用いて構造を図にしたものが図7である。

c. その他の酵素の結晶化

その他の酵素に関してはまだ最適な結晶化条件が見出されていない。ビルビン酸キナーゼ-IIとホスホグルコムターゼについては結晶が得られているがまだ未測定である。



図1 NTPaseの精製方法の概略

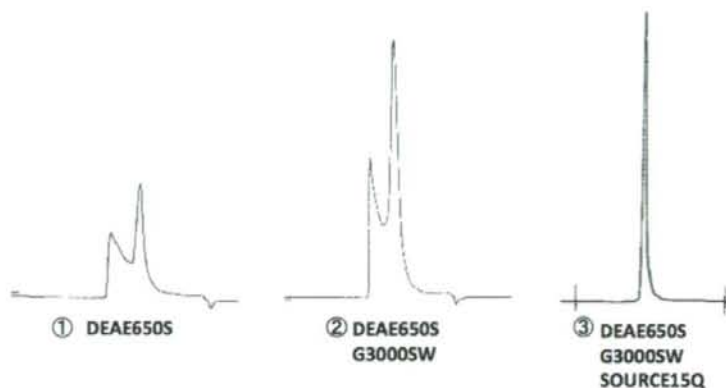


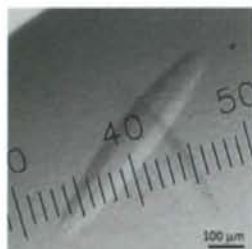
図2 NTPaseの単一性の検討

①DEAE650S溶出 ②DEAE650S,G3000SW溶出 ③DEAE650S,G3000SW,SOURCE15Q溶出

NcNTPase

新しい結晶化条件を発見し、さらに条件の最適化。

0.1 M カコジル酸バッファー pH 6.2~6.8, 2.2~2.5 M 酢酸カリウム



シットイングドロップ蒸気拡散法、20℃

NcNTPase 10 mg / ml

0.1 M カコジル酸バッファー pH 6.8

2.5 M 酢酸カリウム

分解能: 3.5~6.0 Å

- ・X線回折能が、向上。
 - ・結晶学的パラメータの決定に成功。
- 空間群: $P2_12_12$
格子定数: $a=166 \text{ \AA}$, $b=252 \text{ \AA}$, $c=251 \text{ \AA}$

図3 ネオスポーラNTPaseの結晶

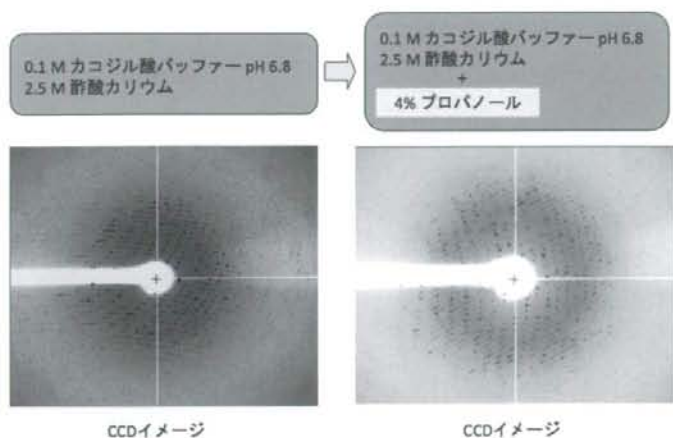
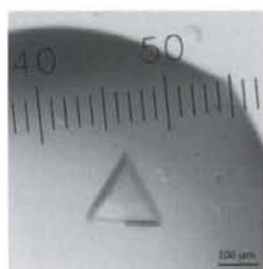


図4 分解能の異方性の検出

TgNTPase 1

新しい結晶化条件を発見。

↓
 0.1 M トリスバッファー pH 7.4~8.2, 4.0 M 酢酸カリウム
 0.1 M カコジル酸バッファー pH 6.2~7.0, 4.0 M 酢酸カリウム



シットイングドロップ蒸気拡散法、20 °C

TgNTPase 10 mg / ml

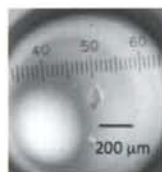
0.1 M トリスバッファー pH 7.8

4.0 M 酢酸カリウム

分解能 : 4.0 Å

⇒ X線回折能が、飛躍的に向上。8.5 → 4.0 Å

図5 トキソプラズマNTPase-Iの結晶

**Protein solution:**

10 mg/ml pyruvate kinase 1
 10 mM Tris-Cl pH 7.0
 200 mM KCl
 1 mM EDTA

Reservoir solution:

7% PEG8000
 0.1 M Phosphate Na/K buffer
 0.2 M Li_2SO_4
 0.1 M Proline

Space group	$P4_12_12$
Cell dimensions	
a (Å)	112.64
b (Å)	112.64
c (Å)	184.26
V_m (Å ³ /dalton)	2.5 (2 molecules/asymm.)
Solvent (%)	52
X-ray source	BL41XU (SPring-8)
Wavelength (Å)	1.00
Resolution (Å)	50.0-3.10 (3.21-3.10)
R_{merge} (%)	7.2 (38.3)
$I/\sigma(I)$	17.9 (9.9)
Completeness (%)	99.6 (100.0)
Redundancy	14.6 (13.7)
No. unique reflections	22311

図6 ビルビン酸キナーゼ-Iの結晶と構造に関する測定結果

d. クリプトスポリジウム症の診断と薬剤開発

図8はリアルタイムPCRにより検出された腸管外のクリプトスポリジウム症例の結果である。喀痰よりPCRで確認され、剖検時に蛍光抗体法と微分干渉により確認された。腸管外クリプトスポリジウム症の検出は世界で80症例ほど報告があり、今回の結果もその一例である。このことから今回開発したPCR法は極微量の感染体の存在も検出可能な方法であることが分かる。

新規の治療薬として期待された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が、*in vivo* の実験では非常に毒性が強いことが判明した。そこでより現実的な既存薬の組み合わせによる治療法について検討した。図9はデフェロキサミンメシル酸塩の類似化合物のクリプトスポリジウム

増殖に与える効果を見たものである。結果的にはAOT1とAOT2が最も効果的であった。この薬剤の用量効果解析を図10に示している。AOT2が使用薬剤として適していることが分かる。従来薬とのコンビネーションによる有効利用の可能性（特願2008-175517）を調べたものが図11である。どの薬剤においても効果を増強していることが判明した。既存薬の組み合わせの効果が期待される。

D. 考察

NTPaseは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。またこの酵素は病気を引き起こすタキゾイト型虫体内に大量に存在する。虫体の全蛋白質の約7%にもおよぶ。したがって、これを標的にし

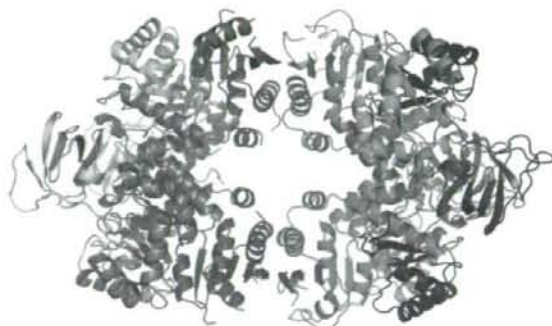


図7 ビルビン酸キナーゼの構造図（四量体）

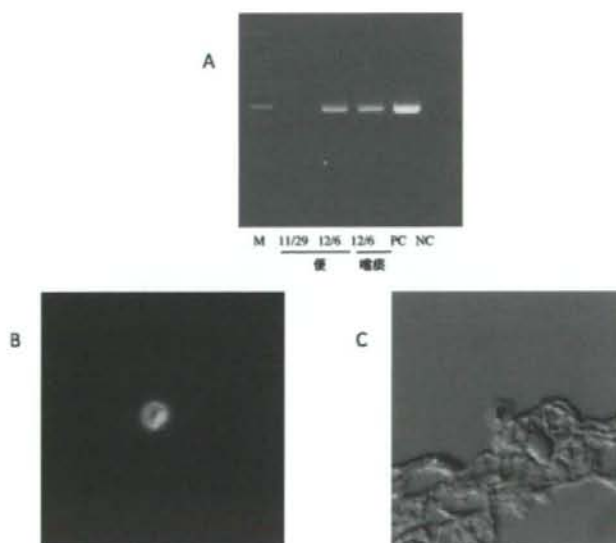


図8 クリプトスポリジウムの低レベル感染の検出
A: PCRによる検出 B: 直接蛍光抗体法 C: 微分干渉像

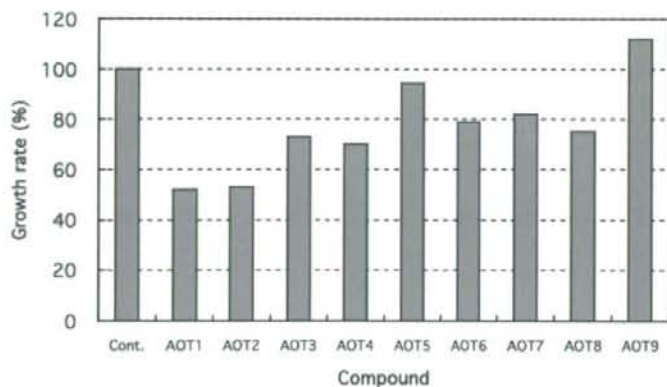


図9 鉄代謝関連基質等をターゲットとした既存薬による抗クリプトスポリジウム作用評価

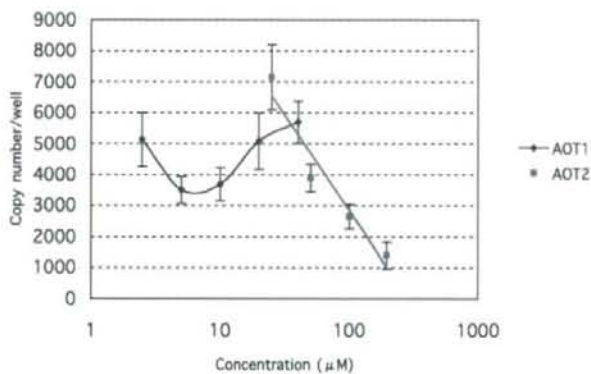


図10 AOT1とAOT2の用量効果解析

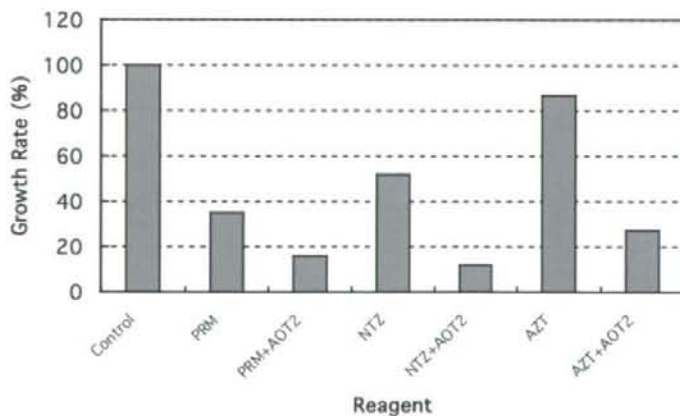


図11 従来薬とのコンビネーションによる有効利用の可能性 (特願2008-175517)
NTZ: Nitazoxanide; PRM: Paromomycin; AZT: Azythromycin

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。現在初歩的なパラメータの決定に至っているが、それ以上の構造決定ができていない。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、現在のところいまだ不明である。見出した化合物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、構造解析に使えるまでには今ひとつである。現在精製法の飛躍的改良がなされ、結晶も綺麗であることから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-Iはグルコース6-リン酸をアロステリック活性化因子とすることが特徴的である。糖代謝の最も重要な代謝調節因子であると考えられる。現在構造が判明しているため、今後はグルコース6-リン酸とどのように結合するのか解析が必要であろう。この解析により何らかの活性阻害化合物が判明すること考えられる。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。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。マラリア原虫における類似の酵素の存在が明らかとなったが、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らしい。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、治療薬の標的として十分考えられる。ホスホグルコムターゼは糖新生の最も重要な酵素であると考えられることから、今後の構造解析の結果が期待される。

クリプトスポリジウム症の診断法としては、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。前回リアルタイムPCR法により適切な定量法について報告した。今回腸管外クリプトスポリジウム症の一例について報告することができた。このことはクリプトスポリジウム症の診断が非常に効率良く可能になったことを示している。前回見出した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が、*in vivo*では毒性が強く治療実験は困難な状態であった。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が、短期的には既存の治療薬の組み合わせによる治療法の確立が急がれる。今回示した鉄キレート剤との組み合わせは既存薬の効果を強める働きがあり、今後免疫不全症下のクリプトスポリジウム症治療への応用が期待される。

E. 結論

NTPase、ピルビン酸キナーゼ-IおよびII型、ホスホグルコムターゼ-IおよびII型結晶化を行った。結晶からの構造解析と阻害剤の解析は現在検討中であるが、ピルビン酸キナーゼ-I型は構造の解明が可能であった。クリプトスポリジウム症の診断法が飛躍的に向上した。既存薬の組み合わせが治療効果に有益である可能性が考えられた。

F. 研究発表

- 1) Saito T, Maeda T, Nishi M, Lim MI, Wu B, Maeda T, Hashimoto H, Takeuchi T, Roos DS, Asai T, A Novel GDP-dependent pyruvate kinase isozyme from *Toxoplasma gondii* localized to both the apicoplast and the mitochondrion. *J. Biol. Chem.*, 2008, 283, 14041-14052
- 2) Maeda T, Saito T, Harb OS, Roos DS, Takeo S, Suzuki H, Tsuboi T, Takeuchi T, Asai T, Pyruvate kinase type-II isozyme in *Plasmodium falciparum* localizes to the apicoplast. *Parasitol Int.* 2009, 58, 101-105
- 3) Ohtani M, Nagai S, Kondo S, Mizuno S, Nakamura K, Tanabe M, Takeuchi T, Matsuda S Mammalian target of rapamycin and glycogen synthase kinase 3 differentially regulate lipopolysaccharide-induced interleukin-12 production in dendritic cells. *Immunology*, 2008, 112, 635-643
- 4) Suzue K, Kobayashi S, Takeuchi T, Suzumi M, Koyasu S, Critical role of dendritic cells in determining the Th1/Th2 balance upon *Leishmania major* infection. *Int. Immunol.*, 2008, 20, 337-343

- 5) Suzuki J, Kobayashi S, Murata R, Tajima H, Hashizaki F, Yanagawa Y, Takeuchi T, A survey of amoebic infections and differentiation of an *Entamoeba histolytica*-like variant (JSK2004) in nonhuman primates by a multiplex polymerase chain reaction. *J. Zoo. Wildl. Med.*, 2008, 39, 370-379
- 6) Suzuki J, Kobayashi S, Iku I, Murata R, Yanagawa Y, Takeuchi T, Seroprevalence of *Entamoeba histolytica* infection in female outpatients at a sexually transmitted disease sentinel clinic in Tokyo, Japan. *Jpn. J. Infect Dis.*, 2008, 61, 175-178



免疫再構築症候群に関する調査および情報提供

研究分担者：古西 満¹、照屋勝治²、永井英明³、
堀場昌英⁴、山崎善隆⁵

¹奈良県立医科大学感染症センター

²国立国際医療センター戸山病院エイズ治療・研究開発センター

³国立病院機構東京病院呼吸器科

⁴国立病院機構東埼玉病院呼吸器科

⁵信州大学医学部附属病院内視鏡診療部

研究協力者：善本英一郎⁶、小田原 隆⁷、今村顕史⁸、藤 純一郎⁹、
後藤哲志¹⁰、日笠 聡¹¹、原永修作¹²、健山正男¹²
矢嶋敬史郎¹³、上平朝子¹³

⁶奈良厚生会病院感染制御室

⁷東京大学医科学研究所先端医療研究センター感染症分野

⁸都立駒込病院感染症科

⁹東京女子医科大学感染症科

¹⁰大阪市立総合医療センター感染症センター

¹¹兵庫医科大学血液内科

¹²琉球大学医学部感染病態制御学

¹³国立病院機構大阪医療センター免疫感染症科

研究要旨

- 1) 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、IRISを発症した症例66名としなかった症例162名の臨床データを比較した。ロジスティック解析を用いると、IRIS発症に関連する臨床的因子はHAART開始前のCD4⁺数が低値、HIV-RNA量が高値、およびHAART開始1ヵ月後にHIV-RNA量の減少が大きいことであった。HAART開始前のCD4⁺数が50/ μ L未満ではオッズ比が5.780、HIV-RNA量が 1.0×10^5 コピー/mL以上ではオッズ比が3.096であった。
- 2) IRISの発症機序を解明するために、HAARTがTh1/Th2バランスに与える影響について評価した。新規にHAARTを開始したHIV感染者10名の末梢血を用いて、CD4⁺細胞内のIFN- γ とIL-4をフローサイトメトリーで測定した。Th1/Th2比は、HAART開始前(19.4 \pm 17.3)に比べ1ヵ月後(11.8 \pm 9.9)で有意な低下を認めた(p<0.05)。今回Th1/Th2比を測定した症例ではIRISを発症しなかった。
- 3) 本研究班での成果や国内外の情報をまとめ、冊子「免疫再構築症候群 診療のポイント Ver.2」を作成した。冊子は全国エイズ拠点病院の診療医へ配布するとともに、冊子をPDFで奈良県立医科大学感染症センターホームページ上に掲載した。

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) と呼ばれている。

しかし、IRISに関するエビデンスは十分でなく、解明すべき課題が残っている。一つにIRIS発症リスクを知ることがIRISに対処していく上で極めて重要であるにもかかわらず、未だデータが少ない状況にある。次に、IRIS発症は抗HIV治療がもたらす免疫系の再構築に起因するが、抗HIV治療とTh1/Th2バランスに関する検討はない。そこで我々は、1) IRIS発症に関連する臨床的因子の把握と2) 抗HIV治療がTh1/Th2バランスに与える影響を明らかにするために本研究を進めている。

また、現時点ではIRISに関する情報は不足しており、臨床医に情報提供することは意義がある。そこで、本研究ではIRISに関する情報提供の方法を模索し、実践することを目的の一つとする。

研究方法

1) IRIS発症に関連する臨床的因子の把握

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ヵ月以内にIRISを発症した症例と6ヵ月間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、AIDS発症の有無、HAART開始時・1ヵ月後のCD4⁺数・CD8⁺数・HIV-RNA量、HAART開始前の白血球数・ヘモグロビン値について質問した。

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症例分の調査票回収に止めることとした。

2) 抗HIV治療がTh1/Th2バランスに与える影響

新規にHAARTを開始したHIV感染者10名を対象として、HAART開始前と1ヵ月後のTh1/Th2バランスを比較した。Th1/Th2バランスの評価には、

表1 IRIS発症に関連する臨床的因子を解析するために集積した症例の概要

	症例数	IRISの疾患	HAART開始前 AIDS発症症例
IRIS(+)症例	66名	NTM*	25名
		TB	15名
		PCP*	11名
		CMV*	18名
		*重複症例あり	
IRIS(-)症例	162名		76名

表2 IRIS発症に関連する臨床的因子の解析法1 (単変量解析)

	IRIS(+)	IRIS(-)	検定
n	66	162	
年齢	43.0±10.9*	39.6±11.0*	p<0.05#
性別(男/女)	58/8	153/9	ns###
ADIS(有/無)	55/11	76/86	p<0.001###
CD4 ⁺	18 (1-227)**	102 (3-639)**	p<0.001##
CD8 ⁺	249 (227-2,933)**	536 (38-2,499)**	p<0.001##
HIV-RNA	1.5×10 ⁵ (1.0×10 ⁴ ~4.1×10 ⁵)**	5.7×10 ⁴ (1.9×10 ² ~1.3×10 ⁵)**	p<0.001##
WBC	3,354±1,940*	4,071±1,877*	ns#
Hb	10.9±2.0*	12.8±2.1*	p<0.001#
CD4 ⁺ △%	810±1290*	330±370*	p<0.001#
CD8 ⁺ △%	220±180*	109±310*	ns#
logRNA△	2.2±0.8*	2.0±0.7*	ns#
HIV-RNA<400	22 (34.9%)	74 (46.3%)	ns#

*mean±SD, **中央値(最小~最大)

Unpaired t-test, ## Unpaired t-test (対数変換), ### Chi square test

全血を phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) と ionomycin で刺激した後に産生された CD4⁺細胞内の interferon(IFN)- γ と interleukin(IL)-4 をフローサイトメトリーで測定する方法を用いた。IFN- γ 陽性 CD4⁺細胞を Th1細胞、IL-4陽性 CD4⁺細胞を Th2細胞とし、その比を Th1/Th2 バランスとした。

3) IRISに関する情報提供

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」班(主任研究者:安岡 彰)で平成17年度に作成した「免疫再構築症候群 診療のポイント」を参考に、情報提供の方法等について検討した。

研究結果

1) IRIS発症に関連する臨床的因子の把握

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 \pm 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 \pm 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)。

解析法1では、年齢、性別、AIDS発症の有無、HAART開始前のCD4⁺数・CD8⁺数・HIV-RNA量・白血球数・ヘモグロビン値、HAART1ヵ月後のCD4⁺数・CD8⁺数の増加率・HIV-RNA量の減少量・HIV-RNA量が400コピー/mL未満を解析項目として、IRISを発症した群と発症しなかった群の間で単変量解析および多変量解析(ロジスティック解析)を行った。単変量解析では、年齢、AIDS発症の有無、HAART開始前のCD4⁺数・CD8⁺数・HIV-RNA量・ヘモグロビン値、HAART1ヵ月後のCD4⁺数の増加率に有意差を認めなかった(表2)。しかし多変量解析では、HAART開始前のCD4⁺数が低いこと、HIV-RNA量が高いことおよびHAART1ヵ月後のHIV-RNA量の減少量が大きいことに有意差を認めた(表3)。

解析法2では、HAART開始前のCD4⁺数を50/ μ L未満、HIV-RNA量を1.0 \times 10⁵コピー/mL以上、ヘモグロビン値を11.0g/dL未満と数値設定を行った上で解析した。単変量解析では、年齢、AIDS発症の有無、HAART開始前のCD4⁺数・HIV-RNA量・ヘモグロビン値、HAART1ヵ月後のCD4⁺数の増加率に有意差を認めた(表4)。しかし多変量

表3 IRIS発症に関連する臨床的因子の解析法1(多変量解析)

	p 値	Odds 比 (95%CI)
年齢	ns	1.259 (0.889~1.782)
性別	ns	0.471 (0.1246~1.784)
AIDS	ns	1.408 (0.537~3.691)
LogCD4 ⁺	p<0.001	8.197 (2.915~22.727)
LogRNA	p<0.001	5.510 (2.309~13.148)
Hb	ns (p=0.06)	0.390 (0.146~1.044)
CD4 ⁺ Δ	ns	0.987 (0.932~1.046)
LogRNA Δ	p<0.05	1.992 (1.014~3.906)
RNA<400	ns (p=0.09)	2.365 (0.8872~6.303)

表4 IRIS発症に関連する臨床的因子の解析法2(単変量解析)

	IRIS(+)	IRIS(-)	検定
n	66	162	
年齢	43.0 \pm 10.9*	39.6 \pm 11.0*	p<0.05#
性別(男/女)	58/8	153/9	ns###
AIDS(有無)	55/11	76/86	p<0.001###
CD4 ⁺ <50	54(81.8%)	51(31.5%)	p<0.001###
RNA \geq 1.0 \times 10 ⁵	45(68.2%)	61(37.7%)	p<0.001###
Hb < 11.0	33(50.0%)	34(21.0%)	p<0.001###
CD4 ⁺ Δ %	810 \pm 1290*	330 \pm 370*	p<0.001#
logRNA Δ	2.2 \pm 0.8*	2.0 \pm 0.7*	ns#

*:mean \pm SD, **:中央値(最小~最大)

#: Unpaired t-test, ##: Unpaired t-test(対数変換), ###: Chi square test

解析では、HAART開始前のCD4+数が50/μL未満であること、HIV-RNA量が 1.0×10^5 コピー/mL以上であることのみに有意差を認めた(表5)。

2) 抗HIV治療がTh1/Th2バランスに与える影響

解析症例の平均年齢は41.5歳(28~63歳)で、男性6例・女性4例であった。既にAIDSを発症している症例は2例で、HIV感染リスクは異性間性的接触が6例・同性間性的接触が4例であった。HAART開始前の平均CD4+数は138.0/μL(2~252/μL)、平均HIV-RNA量は 8.04×10^4 コピー/mL($8.2 \times 10^3 \sim 1.6 \times 10^5$ コピー/mL)であった。HAARTの薬剤は表の通りであった(表6)。

HAART1ヵ月後のCD4+数は有意に増加し、HIV-RNA量は有意に低下しており、有効なHAARTが実施されていた。Th1/Th2比は有意に低下していた(図1)。

3) IRISに関する情報提供

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」班(主任研究者:安岡 彰)で平成17年度に作成した「免疫再構築症候群 診療のポイント」を改訂す

る形で、「免疫再構築症候群 診療のポイント Ver.2(改訂版)」を作成した(図2-7)。内容は、IRISの発症機序、診断、発症率、発症時期、発症リスク、各疾患の臨床像・診断、対応、経過、症例の実際、参考文献から構成した(図3)。見開きページで左側に解説、右側に図表を配置した。海外の報告などを参考にして作成している内容(図4)と研究班で得られた結果(図5)を織り交ぜて作成した。IRISの症例経験が少ない施設もあり、症例の実際を13症例呈示した(図6)。また、参考文献を明記した(図7)。

作成した冊子は、全国のエイズ診療拠点病院担当医宛で送付した。また、Web版として奈良県立医科大学感染症センターのホームページ上にPDFで掲示した。現在、本Web版にリンクしてくれるHIV感染症関連サイトを確保した。

考察

IRISの発症頻度は抗HIV治療例全体では15~25%¹⁾、日和見感染症を起こした症例に限ると7~63%となる²⁾⁸⁾と報告されている。IRISは患者にとって苦痛であり、臨床医にとって治療遂行の妨げとなり、抗HIV治療を行なう上で重要な問題の

表5 IRIS発症に関連する臨床的因子の解析法2(多変量解析)

	p 値	Odds 比 (95%CI)
年齢	ns	1.316 (0.949~1.826)
性別	ns	0.439 (0.126~1.523)
AIDS	ns	1.878 (0.764~4.617)
CD4+ < 50	p<0.001	5.780 (2.381~14.085)
RNA ≥ 10 ⁵	p<0.01	3.096 (1.383~6.929)
Hb < 11.0	ns	1.745 (0.840~3.623)
CD4+ Δ	ns	1.032 (0.972~1.095)
LogRNA Δ	ns	1.434 (0.820~2.513)

表6 抗HIV治療のTh1/Th2バランスへの影響を検討した症例の概要

症例	年齢	性別	病期	感染リスク	CD4	HIV-RNA	HAART
1	34	女性	AC	異性間	2	1.5×10^5	d4T+3TC+LPV/rit
2	35	女性	AIDS	異性間	8	8.2×10^3	d4T+3TC+LPV/rit
3	49	男性	AC	異性間	127	5.0×10^4	d4T+3TC+LPV/rit
4	39	男性	AC	同性間	218	1.6×10^5	TDF/FTC+ATV+RTV
5	28	男性	AIDS	同性間	59	9.5×10^4	TDF/FTC+FPV+RTV
6	48	男性	AC	同性間	214	9.9×10^4	ABC/3TC+ATV+RTV
7	28	男性	AC	同性間	252	3.4×10^4	TDF/FTC+EFV
8	61	女性	AC	異性間	156	7.1×10^4	ABC/3TC+ATV
9	63	女性	AC	異性間	175	2.7×10^4	TDF/FTC+ATV+RTV
10	30	男性	AC	異性間	169	1.1×10^5	TDF/FTC+FPV+RTV
平均	41.5				138.0	8.04×10^4	

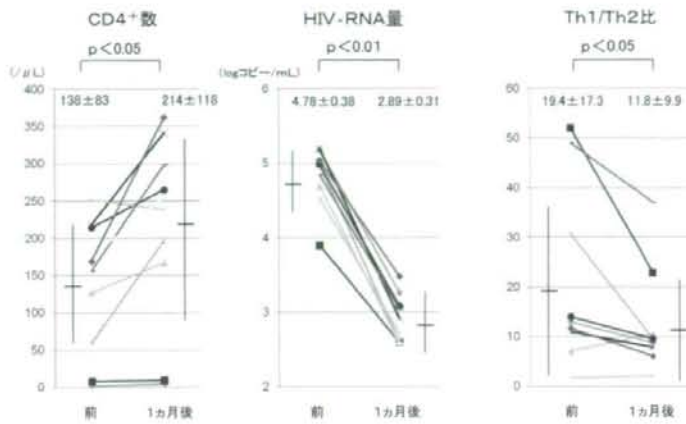


図1 抗HIV治療前後のCD4+数、HIV-RNA量、Th1/Th2バランスの変化

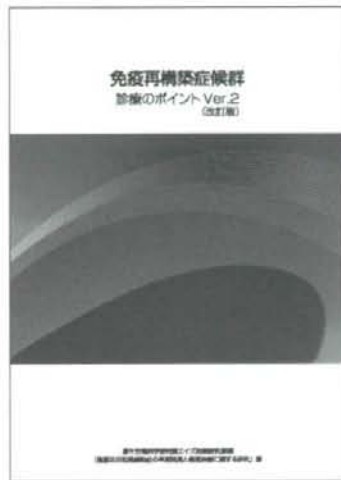


図2 作成した冊子の表紙



図3 作成した冊子の目次



図4 作成した冊子の本文 (1)

一つである。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^{9)~12)}では、男性、若年齢、HAART開始時の低CD4⁺数・高CD8⁺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。今回の多変量解析（ロジスティック解析）を用いた検討では、HAART開始前のCD4⁺数が低いこと、HIV-RNA量が高いことおよびHAART1ヵ月後のHIV-RNA量の減少量が大きいことが重要であった。特に、HAART開始前のCD4⁺数が50/μL未満（オッズ比：5.780）とHIV-RNA量が 1.0×10^5 コピー/mL以上（オッズ比：3.096）がIRIS発症と有意な関連があり、該当する症例に抗HIV治療を開始する前にはIRISを意識した対応が求められる。

ヘルパーT（Th）細胞（CD4⁺細胞）は、サイトカインの産生様式にもとづいて機能的に異なるTh1細胞とTh2細胞とに分類することができる。このTh1細胞とTh2細胞とのバランス（Th1/Th2バランス）が様々な疾患の病態に関連することが知られており、IRISの発症との関連についても注目されている。今回の検討は少数例ではあるが、有効な抗HIV治療後1ヵ月目にはTh1/Th2比は有意な低下を示している。この結果から、抗HIV治療によってCD4⁺細胞は増加しているが、Th2細胞が優位に増えるために日和見感染症を引き起こしやすくなるという推察ができる。しかし、検討症例の中にはIRISを発症した症例がないことから、一般的には抗HIV治療によりTh1/Th2比が低下するにもかかわらず、Th1/Th2比が上がる症例でIRISを発症すると考えることもできる。Reubenら¹³⁾は、小児例ではあるが、抗HIV治療によってIFN- γ 産生能が回復することと同時にIL-10産生能も高くなっている事実を指摘している。したがって、IRIS発症におけるTh1/Th2バランスの意義については、検討症例数を増やし、IRIS発症例を含めた解析を進めていく必要がある。

HIV感染症診療に関わる情報は、日進月歩であり、抗HIV治療のガイドラインは毎年のように改

訂されている。一方、IRISに関するエビデンスの蓄積はまだ乏しく、有力な情報源が確立されていない状況である。そこで、3年前に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」班（主任研究者：安岡 彰）では「免疫再構築症候群診療のポイント」という冊子を作成し、全国のエイズ診療拠点病院へ配布した。今回は冊子の改訂を行ない、全国のエイズ診療拠点病院へ配布するとともに、奈良県立医科大学感染症センターホームページ上に冊子内容のPDFを掲示した。3年前も同様にWeb版をアップしたが、そのことを知る機会が少なく、アクセスすることができなかったというご意見を頂いた。その点を改善するために、HIV感染症関連の有力なサイトで本Web版へのリンクして頂くことができ、情報提供に役立つことを期待している。

結論

- 1) IRIS発症と関連する臨床的因子では、HAART開始時のCD4⁺数が50/μL未満およびHIV-RNA量が 1.0×10^5 コピー/mL以上であることが重要である。
- 2) IRIS発症におけるTh1/Th2バランスの役割を明らかにするためには、IRIS発症例を含む解析症例数の多い検討が必要であると考えられる。
- 3) IRISに関連した情報はまだ不足しており、今後も研究班などで情報提供を行なうことは意義がある。

参考文献

- 1) Shelburne SA, Montes M, Hamill RJ. Immune reconstitution inflammatory syndrome: more answers, more questions. *J Antimicrob Chemother.* 57: 167-170, 2006.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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