

were eligible for this study. The exclusion criteria were HCV infection, active hepatitis, and treatment for antihypertherpes therapy at the time of sampling. Nine HIV-1-positive individuals were analyzed longitudinally before and after the initiation of antiretroviral therapy (ART). For controls, 12 HIV-1-seronegative patients with autoimmune thrombocytopenia and 17 HIV-1-seronegative healthy volunteers were sampled for baseline comparisons. Informed consent for blood sampling was obtained from all participants. The study was conducted according to the ethical guidelines of the hospital and was approved by an authorized representative of the hospital. EDTA-treated blood was taken from the subjects, and leukocytes were collected after removing red blood cells with hemolysis buffer (155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0.1 mM EDTA). Cell pellets were stored at -20°C until use.

Real-time quantitative PCR

DNA was extracted from the cell pellets using a QIAamp Blood Mini kit (QIAGEN Inc., Tokyo, Japan). Real-time PCR was conducted with the LineGene33 (BioFlux, Tokyo, Japan) using Premix Ex Taq (TAKARA, Shiga, Japan). As an internal control measurement, to normalize for input DNA, copy numbers of β_2 -microglobulin (β_2 M) were determined in every sample tested. The primers used for amplification were as follows: HHV-8 forward, 5'-CCTCTGGTCCCCATTCATTG-3', and reverse, 5'-CGTTTCCGTCGTGGATGAG-3', and probe 5'-FAM-CCGGCGTCAGACATTCTCACAAACC-TAMRA-3';¹¹ Epstein-Barr virus (EBV) forward, 5'-CGGAAGCCCTCTGGA CTTC-3', and reverse, 5'-CCCTGTTTATCCGATGGAATG-3', and probe 5'-FAM-TGTACACGCACGAGAAATGCGCC-TAMRA-3';¹² β_2 M forward, 5'-CAGCAAGGACTGGTCTTT CTATCTCT-3', and reverse, 5'-ACCCCACTTAACATCTT GG-3', and probe 5'-FAM-CACTGAAAAAGATGAGTATG CCTGCCGTGT-TAMRA-3'.¹³ Standards were obtained by amplification of a control sample in a polymerase chain reaction (PCR) reaction using the same primers. The data were normalized as copies/10⁶ cells by measuring copy numbers of the β_2 M gene, since two β_2 M copy numbers correspond to one cell. The lower limit of detection was defined as 1 copy/10⁶ cells.

Statistical analyses

Frequency analysis was performed using Fisher's exact test for 2x2 tables. The viral DNA copy numbers of HHV-8, EBV, and HIV-1 were log₁₀ transformed and compared between different groups by means of the Mann-Whitney *U* test. The associations between them were determined using an analysis of covariance (ANCOVA), with EBV-DNA and HIV-RNA as covariates, where HHV-8 DNA was adjusted on the bases of

EBV-DNA and HIV-RNA. Spearman's rank correlation coefficient was used to compare changes in platelet counts and changes in HHV-8 DNA loads. A partial correlation was used to assess this relationship, while controlling for any changes in HIV-RNA and EBV-DNA.

Results

Subjects characteristics

A total of 125 patients fulfilled the inclusion criteria. Demographic and clinical characteristics of the subjects included in this study are shown in Table 1. There were 8 women and 117 men, 112 of whom were men who have sex with men; the others were heterosexual. These patients were ranged from 20 to 69 years of age (mean age, 37.8 years). Of these, 58 received ART and 67 remained untreated. The duration of ART was 3 months to 9.5 years (mean 3.25 years). Nine HIV-1-positive individuals were analyzed longitudinally before and after the initiation of ART. Among 125 HIV-1-positive subjects included in our study, we evaluated 97 subjects for the prevalence of splenomegaly by means of an abdominal ultrasound examination; 23 subjects were thus found to have splenomegaly.

HHV-8 qualitative and quantitative DNA analysis

The presence and load of HHV-8 DNA were investigated in 125 HIV-1-positive subjects and 17 HIV-1-negative healthy controls (Fig. 1). HHV-8 DNA was detected in 37 of 125 (29.6%) leukocyte samples from HIV-1-positive subjects, with values ranging from 2 to 91,171 copies/10⁶ leukocytes. HHV-8 DNA was not detected in any healthy controls.

Relationship between HHV-8 DNA and KS

HHV-8 DNA was detected in three of five (60%) HIV-infected subjects with KS, whereas they were found in 34 of 120 (28.3%) subjects without KS (*p* = 0.15). Figure 2 shows that the HHV-8 DNA load of subjects with KS to be higher than that of the subjects without KS, but not significantly so.

The correlation between HHV-8 DNA and HIV-1-related immunovirological parameters

The HIV-RNA load in the serum of HHV-8 DNA-positive subjects was significantly higher than that of HHV-8 DNA-negative subjects (Fig. 3a). In addition, the correlation between HHV-8 DNA and hypergammaglobulinemia (the percentage of gammaglobulin is more than normal range) was examined, which is often observed in HIV-1-positive subjects. The HHV-8 DNA load in leukocytes in subjects with

TABLE 1. DEMOGRAPHIC AND CLINICAL CHARACTERISTICS OF 125 HIV-POSITIVE SUBJECTS^a

	Total	Pretreatment of ART	Treatment of ART	P
N (male/female)	125 (117/8)	67 (63/4)	58 (54/4)	
Age (years)	37.8 ± 10.4	34.3 ± 8.2	42.1 ± 11.2	<0.001
CD4 (cells/ml)	396 ± 218	387 ± 226	407 ± 211	0.616
Viral load (copies/ml) (log ₁₀)		4.36 ± 0.86	Under detection limit	
Duration of ART (years)		0	3.25 ± 2.68	

^aThe mean values ± SE are shown. Pretreatment of ART versus treatment of ART.

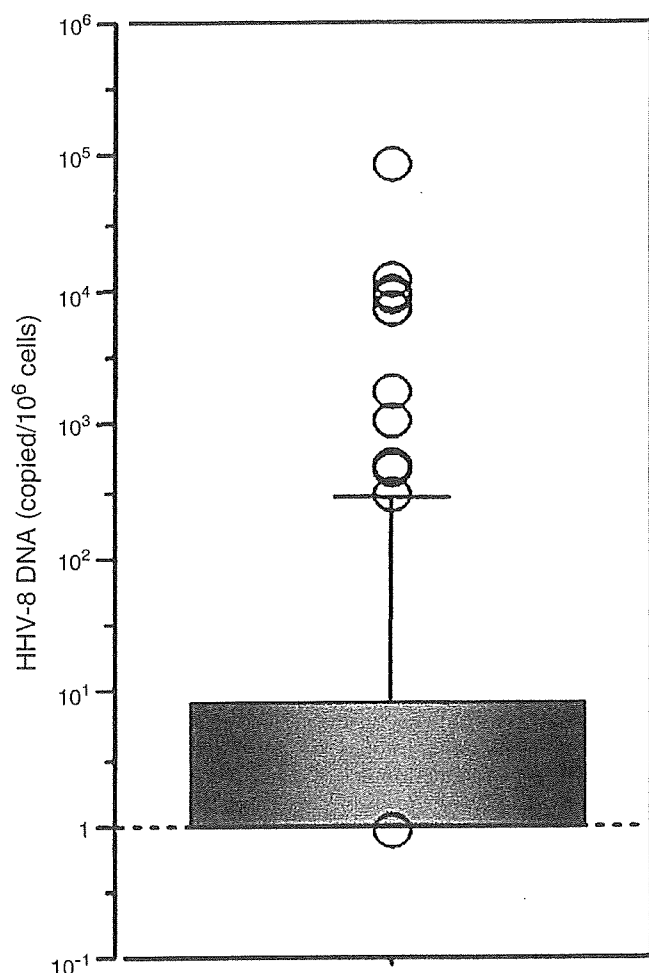


FIG. 1. Quantification of HHV-8 DNA by real-time PCR. Log₁₀-transformed HHV-8 copy numbers per 10⁶ leukocytes are shown. The bar shows the mean and standard deviations. The dotted line shows the detection limit of the assay.

hypergammaglobulinemia was significantly higher than in subjects without hypergammaglobulinemia (Fig. 3b). HHV-8 DNA was detected in 24 of 44 (54.5%) HIV-infected subjects with hypergammaglobulinemia, whereas it was found in 13 of 81 (16.0%) subjects without hypergammaglobulinemia ($p < 0.0001$). We could not find any significant correlation between HHV-8 DNA loads and CD4-positive T cell counts.

The effect of ART on HHV-8 DNA

HHV-8 DNA load in leukocytes in subjects with ART was significantly lower than in subjects without ART (Fig. 4a). HHV-8 DNA was detected in 12 of 58 (20.7%) HIV-infected subjects with ART, whereas it was found in 25 of 67 (37.3%) subjects without ART ($p = 0.042$). There was no difference in the duration of ART between HHV-8 DNA-negative and HHV-8 DNA-positive subjects with ART (3.161 ± 2.764 vs. 3.575 ± 2.439 years, $p = 0.624$). HHV-8 DNA loads (log₁₀) per 10⁶ leukocytes in subjects with a short duration of ART (<6 months) were higher than in subjects with a long duration of ART (≥ 6 months), but the difference was not statistically significant (0.758 ± 0.447 vs. 0.323 ± 0.111 , $p = 0.309$).

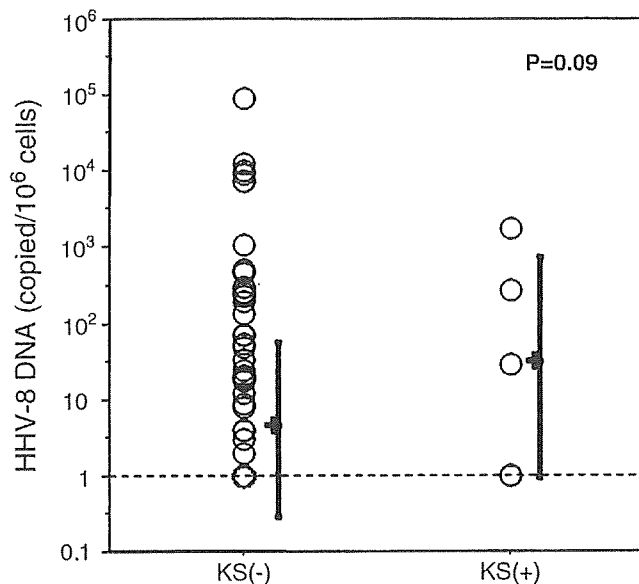


FIG. 2. HHV-8 DNA loads among the HIV-1-positive subjects with or without KS. Log₁₀-transformed HHV-8 copy numbers per 10⁶ leukocytes are shown. The bar shows the mean and standard deviations. p -values were estimated by the Mann-Whitney U test. The dotted line shows the detection limit of the assay.

Longitudinal analysis of HHV-8 DNA loads after initiation of ART

The longitudinal profiles of HHV-8 DNA loads were examined in nine subjects after initiation of ART (Fig. 4b). Within 1 month after starting ART, HHV-8 DNA transiently increased in three patients (Fig. 4b, black straight lines); in two of the three patients, KS had progressed transiently. These findings show the reactivation of HHV-8 by initiation of ART. Three months after the initiation of ART, all nine patients had achieved and maintained the decreased levels of HHV-8 DNA.

The influence of EBV on HHV-8 infection

Like HHV-8, EBV is lymphotropic and is a member of the gammaherpesvirinae; it is reactivated by HIV-1 infection. Therefore, the influence of EBV on HHV-8 infection was investigated. EBV-DNA loads (log₁₀) per 10⁶ leukocytes were significantly higher in HHV-8 DNA-positive subjects (0.69 ± 0.11 vs. 1.46 ± 0.21 , $p = 0.0007$) and EBV DNA was detected in 32 of 88 (36.4%) HHV-8-negative subjects, whereas they were found in 25 of 37 (67.5%) HHV-8-positive subjects ($p = 0.002$).

Relationship between HHV-8 DNA and thrombocytopenia

Figure 5 shows a case of Castleman's disease in which the platelet counts changed in inverse association with HHV-8 DNA in the leukocytes. Therefore, the association between platelet counts and HHV-8 DNA in leukocytes was examined. First, the changes in platelet counts and HHV-8 DNA were analyzed in the nine subjects before and after the initiation of ART (Fig. 6). Both the decrease in HHV-8 DNA and the

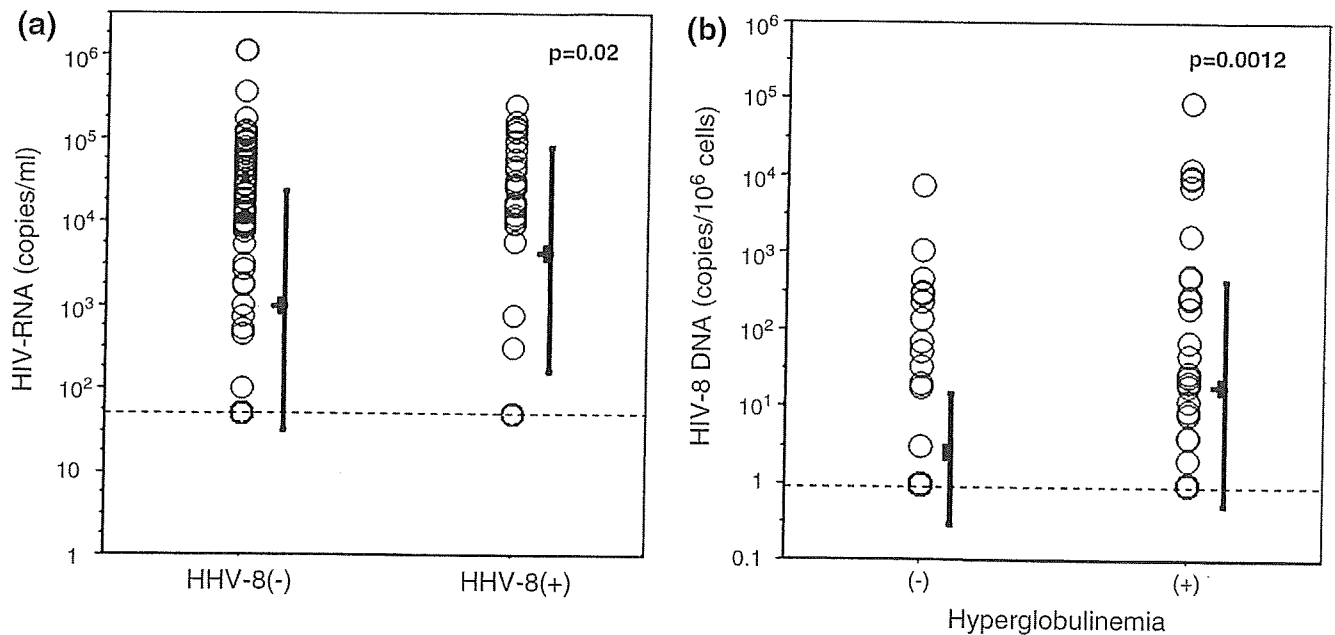


FIG. 3. The correlation between HHV-8 DNA and HIV-1-related immunovirological parameters. (a) HIV-RNA loads among the HIV-1-positive subjects with or without HHV-8 DNA. Log₁₀-transformed HIV-1 copy numbers/ml of serum are shown. The bar shows the mean and standard deviation. *p*-values were estimated by the Mann-Whitney *U* test. (b) HHV-8 DNA loads among the HIV-1-positive subjects with or without hypergammaglobulinemia. HHV-8 copy numbers per 10⁶ leukocytes are shown. The bar shows the mean and standard deviations. *p*-values were estimated by the Mann-Whitney *U* test. The dotted line shows the detection limit of the assay.

increase in platelet counts were significant. Furthermore, the correlation between changes in platelet counts and changes in HHV-8 DNA was obtained (Spearman; $r = -0.783$, $p = 0.0267$). Patients with HIV infection sometimes develop thrombocytopenia, and EBV is also reported to cause mild thrombocytopenia. Therefore, partial correlations were also used to

assess this relationship while controlling for EBV-DNA and HIV-RNA, and the correlation between the change in HHV-8 DNA and platelet counts was obtained (partial correlation coefficient; $r = -0.733$, $p = 0.0219$).

Next, all 125 subjects with HIV infection were analyzed. There was no significant difference between the group with

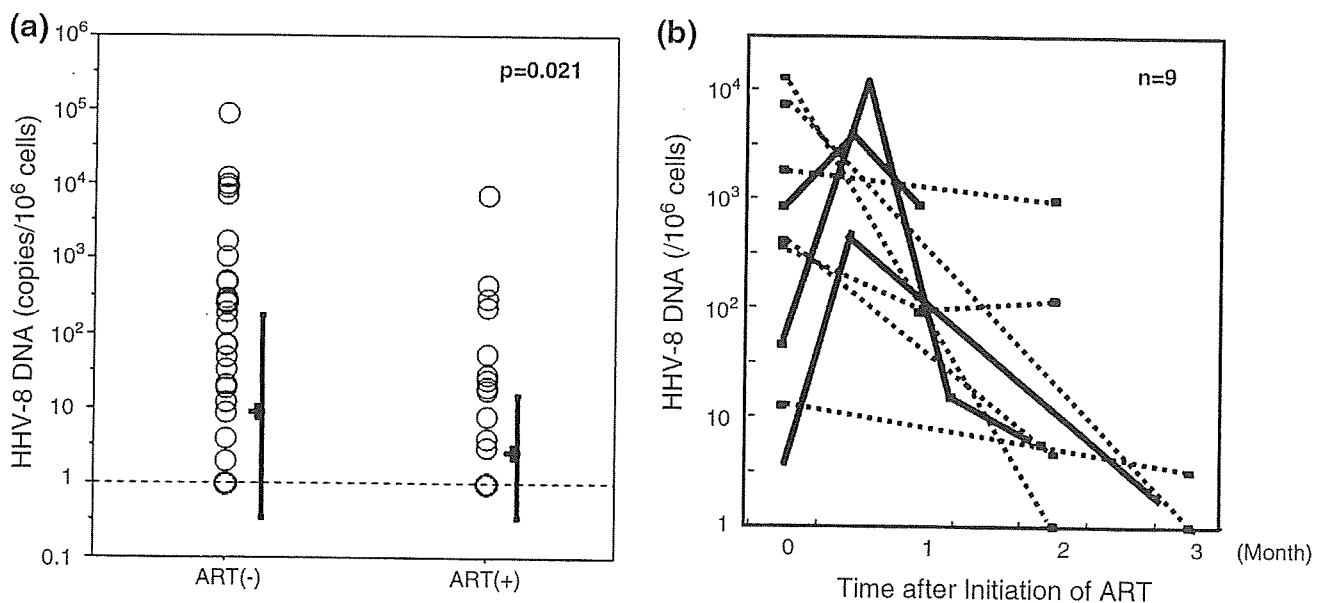


FIG. 4. The effect of ART on HHV-8 DNA. (a) HHV-8 DNA load in PBMCs in subjects with or without ART. HHV-8 copy numbers per 10⁶ leukocytes are shown. The bar shows the mean and standard deviation. *p*-values were estimated by the Mann-Whitney *U* test. (b) HHV-8 DNA load after initiation of ART. HHV-8 DNA loads of the nine subjects were measured at the indicated time points. The dotted line shows the detection limit of the assay.

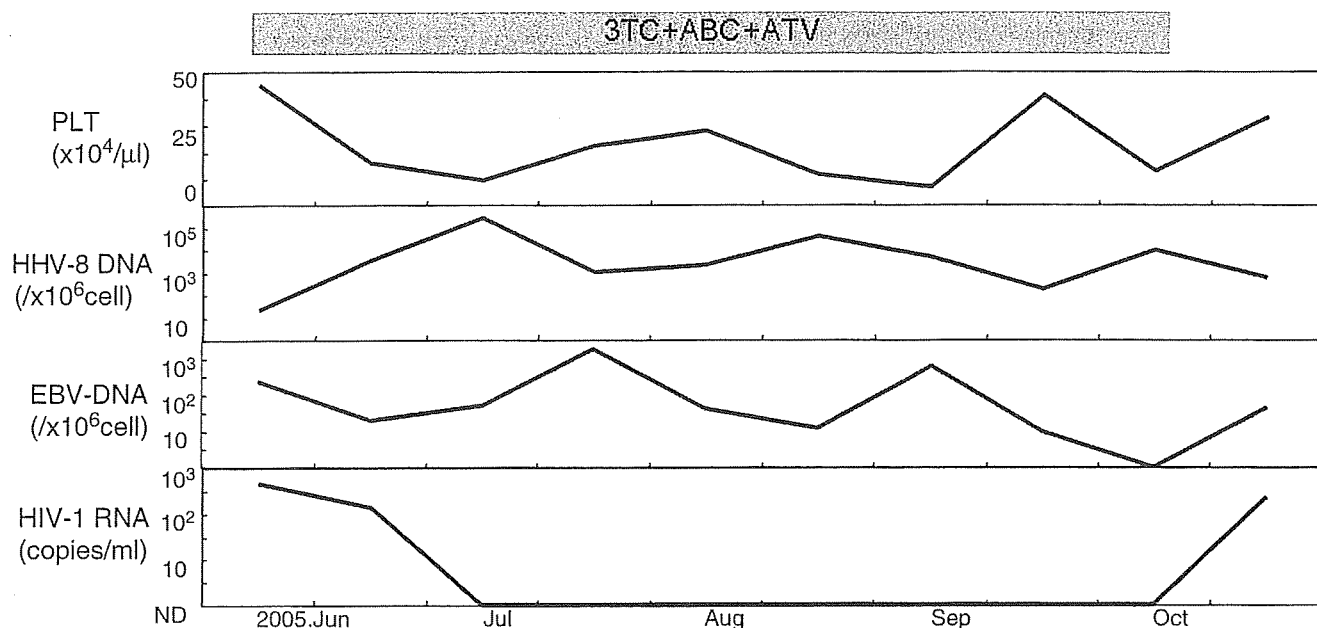


FIG. 5. Time course of the case of Castleman's disease with HIV-1 infection. Platelet counts, \log_{10} -transformed HHV-8 and EBV copy numbers per 10^6 leukocytes, and \log_{10} -transformed HIV-1 copy numbers/ml of serum are shown. The data were excerpted from Minami and Yamamoto.¹⁰ PLT, platelet; HHV-8, human herpes virus 8; EBV, Epstein-Barr virus; 3TC, lamivudine; ABC, abacavir; ATV, atazanavir.

thrombocytopenia and the group without thrombocytopenia in terms of the number of subjects with ART, the duration of ART, and the prevalence of subjects with splenomegaly (with thrombocytopenia vs. without thrombocytopenia; 30.8% vs. 22.6%, $p = 0.520$). Similarly, no significant difference was observed between the group with HHV-8-DNA and the group without HHV-8-DNA in terms of the duration of ART and the prevalence of subjects with splenomegaly (with HHV-8 vs. without HHV-8; 26.7% vs. 22.4%, $p = 0.647$). The effects of

HHV-8 DNA in leukocytes on platelet counts were examined using ANCOVA, with EBV-DNA as a covariate. ANCOVA revealed a significant interaction between EBV-DNA and HHV-8 DNA but no significant interaction between thrombocytopenia and EBV-DNA. Post hoc tests revealed that HHV-8 DNA was significantly higher in subjects with platelet counts $<150,000$ platelets/ μl than in subjects with platelet counts $\geq 150,000$ platelets/ μl (Fig. 7a). HHV-8 DNA was detected in 11 of 14 (78.6%) subjects with low platelet counts,

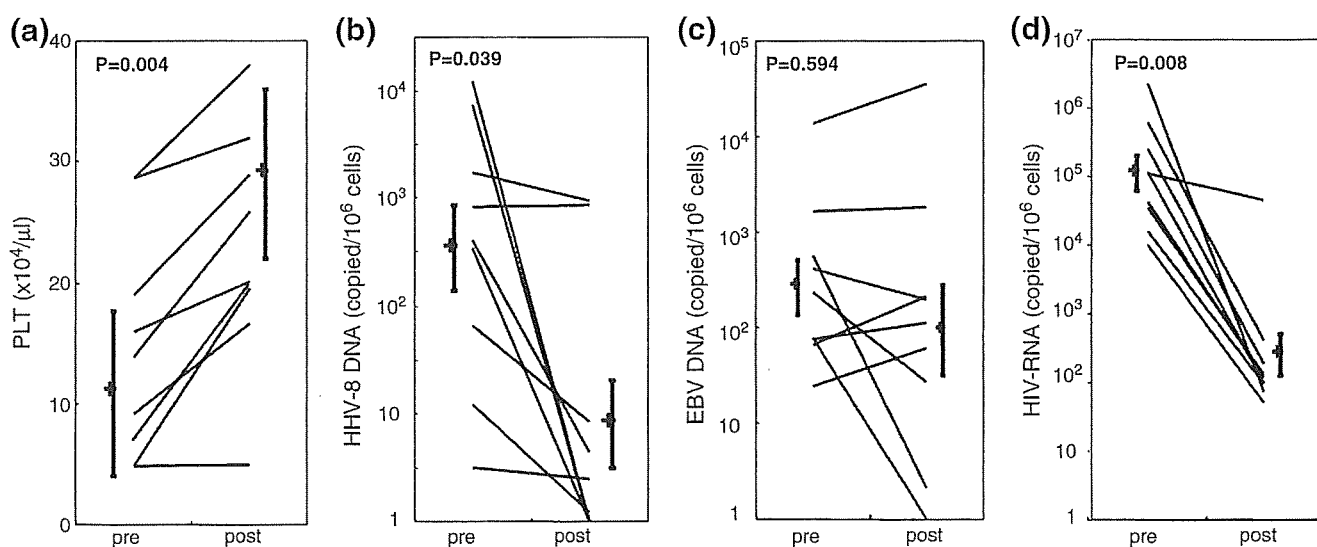


FIG. 6. Changes in the platelet counts, HHV-8 DNA loads, EBV-DNA loads, and HIV-RNA of pre- and post-ART. Platelet counts (a), HHV-8-DNA (b), EBV-DNA (c), and HIV-RNA (d) of the nine subjects were analyzed before (pre) and after 2 or 3 months of initiation of ART (post). The viral loads were \log_{10} transformed. Bar shows the mean and standard deviation. p -values for the difference between the two time points were estimated by the Wilcoxon signed rank test.

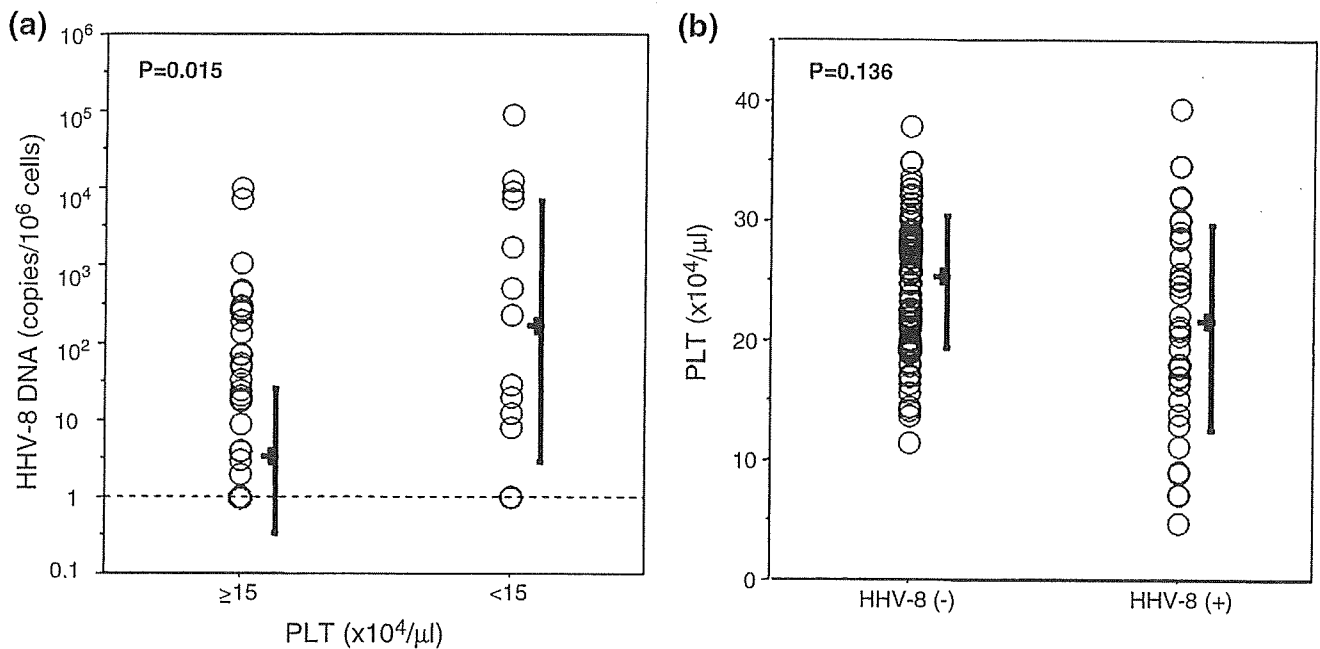


FIG. 7. Relationship between HHV-8 DNA and mild thrombocytopenia. (a) HHV-8 DNA load in leukocytes in subjects with platelet counts of $<150,000$ platelets/ mm^3 or with platelet counts of $\geq 150,000$ platelets/ mm^3 . HHV-8 copy numbers per 10^6 leukocytes are shown. The bar shows the mean and standard deviation. The p -values were estimated by a post hoc test after ANCOVA with EBV-DNA as a covariate. (b) Platelet counts among the HIV-1-positive subjects with or without HHV-8 DNA. The bar shows the mean and standard deviation. The p -values were estimated by a post hoc test after ANCOVA with EBV-DNA as a covariate. The dotted line shows the detection limit of the assay.

whereas it was found in 26 of 111 (23.4%) of subjects with normal platelet counts ($p=0.0059$; estimated by post hoc test after ANCOVA with the prevalence of EBV-DNA as a covariate). The platelet counts were lower in HHV-8 DNA-positive subjects than in HHV-8 DNA-negative subjects, but not significantly (Fig. 7b). In subjects without ART, HIV-RNA might be a confounding factor, and thus ANCOVA was conducted with HIV-RNA and EBV-DNA as covariates.

In subjects without ART, HHV-8 DNA was also significantly higher in subjects with mild thrombocytopenia with an adjustment for EBV-DNA and HIV-RNA ($p=0.013$, data not shown). HHV-8 DNA was not detected in the 12 subjects with autoimmune thrombocytopenia. We also examined the correlation between HHV-8 DNA loads and platelet counts in subjects without KS, because the subject with KS might have occult Castleman's disease, which can cause thrombocytopenia. HHV-8 DNA was significantly higher in subjects with platelet counts of $<150,000$ platelets/ μl than in subjects with platelet counts of $\geq 150,000$ platelets/ μl [\log_{10} (HHV-8) = 2.103 ± 1.797 vs. 0.438 ± 0.924 ; $p=0.0285$]. HHV-8 DNA was detected in 9 of 12 (75.0%) subjects with low platelet counts, whereas it was found in 25 of 108 (23.1%) subjects with normal platelet counts ($p=0.0002$). The platelet counts were significantly lower in HHV-8 DNA-positive subjects than in HHV-8 DNA-negative subjects ($21.5 \pm 8.61/\mu\text{l}$ vs. $25.0 \pm 5.56/\mu\text{l}$; $p=0.1319$).

Discussion

Some previous studies have examined the prevalence of HHV-8 infection in HIV-1-infected subjects. A unique aspect of this study is that the effect of HHV-8 DNA in the peripheral

blood leukocytes on HIV-1 infection was examined; a significant association between HHV-8 DNA and the clinical appearance of HIV-1 infection, especially thrombocytopenia complicated with HIV-1, was found.

Some reports have shown that the presence of KS was associated with the prevalence of HHV-8 DNA in leukocytes¹⁴ and the severity was associated with HHV-8 DNA loads in leukocytes.¹⁵ The current data also showed a certain association with the presence of KS and HHV-8 DNA load, but in this study there were only five subjects with KS, because the prevalence of KS in HIV-1-infected patients in Japan is low. As a result, it was impossible to determine whether the HHV-8 DNA load predicted the onset and severity of KS. To draw any conclusions concerning the clinical and prognostic utility on KS, more subjects with KS need to be analyzed.

HHV-8 encodes homologues of cytokine and cytokine response genes, such as viral interleukin-6 (vIL-6)¹⁶ and viral interferon regulatory factor (vIRF). vIL-6 can bind the gp130 receptor to activate IL-6 response genes and promote B cell activation, which is the mechanism of hypergammaglobulinemia induced by HHV-8 infection. It was also found that HHV-8 plays an important role in hypergammaglobulinemia, which is often found in subjects with HIV-1 infection.

The current data showed that HIV-RNA load in the serum of HHV-8 DNA-positive subjects was significantly higher than that found in the serum of HHV-8 DNA-negative subjects. HHV-8 replication is activated by HIV-Tat,¹⁷ and it has been reported that HHV-8 reactivation is associated with HIV-1 acute infection.¹⁸ Furthermore, an open reading frame (ORF), the major transactivator of the HHV-8 lytic cycle, can also induce increased levels of HIV replication. In conclusion, these findings show that HHV-8 coinfection is associated with

HHV-8 AND THROMBOCYTOPENIA IN HIV-1 INFECTION

immunological characteristics and disease severity of HIV infection.

ART reduced HHV-8 DNA loads as well as HIV-RNA (Fig. 4). The inhibition of HIV-1 replication with ART probably leads to the reconstitution of the immune system and generates effective immune responses against HHV-8. Moreover, protease inhibitors block the production of inflammatory cytokines,¹⁹ which in turn may result in the downregulation of HHV-8 replication. In this longitudinal study during ART, HHV-8 DNA loads transiently increased in three subjects soon after the initiation of ART. This might be due to the disorder of cytokine balance, which occurs transiently in the process of the reconstitution of the immune system, and this might be one of the explanations for the immune reconstitution syndrome of KS. Some inflammatory cytokines are induced in immune reconstitution syndromes. It has recently been reported that some cytokines, which are associated with the development of KS, were elevated in other reconstitution syndromes.²⁰ It is possible that reactivation of HHV-8 by ART might activate the inflammation of the other reconstitution syndromes by the increase in vIL-6 or other cytokines.

The difference between HHV-8 DNA in the subjects with platelet counts of <150,000 platelets/ μ l and in the subjects with platelet counts of \geq 150,000 platelets/ μ l was significant, but the difference between the platelet counts in the HHV-8 DNA-positive subjects and the platelet counts in the HHV-8 DNA-negative subjects was not significant. This is because HHV-8 DNA correlates with "mild" thrombocytopenia.

This is the first report that analyzed the association between HHV-8 DNA and thrombocytopenia in HIV-1-infected subjects, though there are a few studies that showed the relationship between HHV-8 infection and hematological disorders²¹ or posttransplantation bone marrow failure in HIV-1-negative subjects.²² Some case reports have described thrombocytopenia complicated with HHV-8-induced Castleman's disease, hemophagocytic syndrome, or other inflammatory syndromes. The HIV-1-positive subjects sometimes develop thrombocytopenia, which has been thought to be caused by an autoimmune mechanism. Recently, antibody cross-reactivity between a known epitope region of HIV-1 proteins and platelet GPIIb/IIIa49-66 has been reported to be responsible for HIV-1-associated thrombocytopenia.²³ However, the present study showed that HHV-8 also contributes independently to the thrombocytopenia complicated in HIV-1 infection.

The molecular mechanism of thrombocytopenia induced by HHV-8 remains to be established, but it is possible that some cytokines or chemokines induced by HHV-8 might be involved in thrombocytopenia. For example, interleukin-8 (IL-8), which is induced by HHV-8 infection,²⁴ binds the receptors on megakaryocytes and platelets and inhibits megakaryocytopoiesis.²⁵ Furthermore, HHV-8 is reported to infect CD34-positive hematopoietic progenitor cells^{26,27}; HHV-8 harboring CD34-positive cells might also contribute to hematological disorders including thrombocytopenia.²⁸ Another possible explanation for thrombocytopenia is an autoimmune mechanism such as immune thrombocytopenia (ITP). Chronic stimulation of the B cell clones induced by HHV-8 could favor the production of autoantibodies, some of which might react against platelet. In fact, Evan's syndrome complicating multicentric Castleman's disease²⁹ and ITP complicating KS have been reported.³⁰

In Italy, the area of subendemicity of HHV-8, the presence of HHV-8 DNA in HIV-1-negative elderly people has been reported to be associated with mild thrombocytopenia.³¹ In Japan, HHV-8 infection in HIV-1-negative subjects is rare; as a result, when the 12 subjects with autoimmune thrombocytopenia were examined, the association between HHV-8 and autoimmune thrombocytopenia in HIV-1-negative subjects was not distinct. However, the fact that HHV-8 DNA was not detected in the HIV-1-negative subjects with autoimmune thrombocytopenia suggests that HHV-8 is not a main causative agent of autoimmune thrombocytopenia.

In conclusion, a significant association was observed between HHV-8 infection and the clinical appearance of HIV-1 infection, especially in regard to mild thrombocytopenia, hypergammaglobulinemia, and disease severity. It is possible that some of these effects of HHV-8 infection are related to other independent etiological cofactor or some other viruses. However, it may be useful to monitor HHV-8 DNA in leukocytes of HIV-1-positive subjects to assess and predict disease severity and to select the optimal treatment modalities.

Acknowledgments

We are grateful to Ms. Asuka Horita and Ms. Mariko Takahashi for their valuable technical support. This study was partly supported by Health Science Research Grants on HIV/AIDS from the Ministry of Health, Labor, and Welfare of the Japanese Government. The sponsor had no role in the study design, data collection, data analysis, and data interpretation, or in the writing of this report.

Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

1. Ablashi DV, Chatlynne LG, Whitman JE Jr, and Cesarman E: Spectrum of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, or human herpesvirus 8, diseases. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15:439-464.
2. Miller CS, Berger JR, Mootoor Y, Avdiushko SA, Zhu H, and Kryscio RJ: High prevalence of multiple human herpesviruses in saliva from human immunodeficiency virus-infected persons in the era of highly active antiretroviral therapy. *J Clin Microbiol* 2006;44:2409-2415.
3. Challine D, Roudot-Thoraval F, Sarah T, *et al.*: Seroprevalence of human herpes virus 8 antibody in populations at high or low risk of transfusion, graft, or sexual transmission of viruses. *Transfusion* 2001;41:1120-1125.
4. Stein L, Carrara H, Norman R, Alagiozoglou L, Morris L, and Sitas F: Antibodies against human herpesvirus 8 in South African renal transplant recipients and blood donors. *Transpl Infect Dis* 2004;6:69-73.
5. Fujii T, Taguchi H, Katano H, *et al.*: Seroprevalence of human herpesvirus 8 in human immunodeficiency virus 1-positive and human immunodeficiency virus 1-negative populations in Japan. *J Med Virol* 1999;57:159-162.
6. Katano H, Iwasaki T, Baba N, *et al.*: Identification of antigenic proteins encoded by human herpesvirus 8 and seroprevalence in the general population and among patients with and without Kaposi's sarcoma. *J Virol* 2000;74:3478-3485.

7. Mesri EA, Cesarman E, Arvanitakis L, *et al.*: Human herpesvirus-8/Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is a new transmissible virus that infects B cells. *J Exp Med* 1996;183:2385-2390.
8. Sirianni MC, Vincenzi L, Topino S, *et al.*: Human herpesvirus 8 DNA sequences in CD8 + T cells. *J Infect Dis* 1997;176:541.
9. Sirianni MC, Uccini S, Angeloni A, Faggioni A, Cottori F, and Ensoli B: Circulating spindle cells: Correlation with human herpesvirus-8 (HHV-8) infection and Kaposi's sarcoma. *Lancet* 1997;349:255.
10. Minami R and Yamamoto M: A case of HIV-1 and HHV-8-associated Castleman disease with a relapsing high fever and lymphadenopathy. *Kansenshogaku Zasshi* 2006;80:423-427.
11. Polstra AM, Van Den Burg R, Goudsmit J, and Cornelissen M: Human herpesvirus 8 load in matched serum and plasma samples of patients with AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *J Clin Microbiol* 2003;41:5488-5491.
12. Kimura H, Morita M, Yabuta Y, *et al.*: Quantitative analysis of Epstein-Barr virus load by using a real-time PCR assay. *J Clin Microbiol* 1999;37:132-136.
13. Nagai H, Wada K, Morishita T, Utsumi M, Nishiyama Y, and Kaneda T: New estimation method for highly sensitive quantitation of human immunodeficiency virus type 1 DNA and its application. *J Virol Methods* 2005;124:157-166.
14. Boivin G, Gaudreau A, Toma E, *et al.*: Human herpesvirus 8 DNA load in leukocytes of human immunodeficiency virus-infected subjects: Correlation with the presence of Kaposi's sarcoma and response to anticytomegalovirus therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:377-380.
15. Laney AS, Cannon MJ, Jaffe HW, *et al.*: Human herpesvirus 8 presence and viral load are associated with the progression of AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *AIDS* 2007;21:1541-1545.
16. Aoki Y, Jones KD, and Tosato G: Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded interleukin-6. *J Hematother Stem Cell Res* 2000;9:137-145.
17. Harrington W Jr, Sieczkowski L, Sosa C, *et al.*: Activation of HHV-8 by HIV-1 tat. *Lancet* 1997;349:774-775.
18. Lennette ET, Busch MP, Hecht FM, and Levy JA: Potential herpesvirus interaction during HIV type 1 primary infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2005;21:869-875.
19. Wasmuth JC, Nischalke HD, Jütte A, *et al.*: Chemokine mRNA levels in mononucleated cells of HIV-infected patients before and after initiation of PI- versus NNRTI-containing HAART. *Antiviral Res* 2004;61:207-212.
20. Tamburini J, Grimaldi D, Chiche JD, Bricaire F, and Bossi P: Cytokine pattern in Kaposi's sarcoma associated with immune restoration disease in HIV and tuberculosis co-infected patients. *AIDS* 2007;21:1980-1983.
21. Tsai WH, Lee YM, Ing-Tiau Kuo B, *et al.*: Increased seroprevalence of human herpesvirus 8 in patients with hematological disorders. *Acta Haematol* 2005;114:95-98.
22. Cuzzola M, Irrera G, Iacopino O, *et al.*: Bone marrow failure associated with herpesvirus 8 infection in a patient undergoing autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Clin Infect Dis* 2003;37:102-106.
23. Li Z, Nardi MA, and Karpatkin S: Role of molecular mimicry to HIV-1 peptides in HIV-1-related immunologic thrombocytopenia. *Blood* 2005;106:572-576.
24. Sun Q, Matta H, Lu G, and Chaudhary PM: Induction of IL-8 expression by human herpesvirus 8 encoded vFLIP K13 via NF-kappaB activation. *Oncogene* 2006;25:2717-2726.
25. Kowalska MA, Ratajczak J, Hoxie J, Brass LF, Gewirtz A, Poncz M, and Ratajczak MZ: Megakaryocyte precursors, megakaryocytes and platelets express the HIV co-receptor CXCR4 on their surface: Determination of response to stromal-derived factor-1 by megakaryocytes and platelets. *Br J Haematol* 1999;104:220-229.
26. Henry M, Uthman A, Geusau A, *et al.*: Infection of circulating CD34+ cells by HHV-8 in patients with Kaposi's sarcoma. *J Invest Dermatol* 1999;113:613-616.
27. Wu W, Vieira J, Fiore N, *et al.*: KSHV/HHV-8 infection of human hematopoietic progenitor (CD34+) cells: Persistence of infection during hematopoiesis *in vitro* and *in vivo*. *Blood* 2006;108:141-151.
28. Quinn JP, Gilligan OM, and Horgan M: Evan's syndrome complicating multicentric Castleman's disease—dramatic response to rituximab. *Eur J Haematol* 2004;73:384-385.
29. Brown EE, Whitby D, Vitale F, *et al.*: Correlates of human herpesvirus-8 DNA detection among adults in Italy without Kaposi sarcoma. *Int J Epidemiol* 2005;34:1110-1117.
30. Muela Molinero A, Ballesteros del Rio B, Sandoval Guerra V, and Llor Banos J: Evans syndrome as presentation of multicentric Castleman disease. *Rev Clin Esp* 2003;203:616-617.
31. Toyohama T, Nagasaki A, Miyagi J, *et al.*: Kaposi's sarcoma in a human immunodeficiency virus-negative patient treated with corticosteroid for idiopathic thrombocytopenic purpura. *Intern Med* 2003;42:448-449.

Address reprint requests to:

Rumi Minami
 Internal Medicine, Clinical Research Institute
 National Hospital Organization
 Kyushu Medical Center
 1-8-1 Jigyohama, Chuo-ku
 Fukuoka 810-8563, Japan

E-mail: rrrhh@kyumed.jp

症 例

治療後ウエスタンブロット法にて抗 HIV 抗体が陰性化し
持続している HIV-1 感染症の 1 例

独立行政法人国立病院機構九州医療センター内科・臨床研究センター

南 留美 高濱宗一郎 安藤 仁 山本 政弘

(平成 20 年 10 月 28 日受付)

(平成 21 年 2 月 10 日受理)

Key words: human immunodeficiency virus (HIV)-1, Western blot

序 言

ウエスタンブロット法 (WB 法) は, HIV 感染の確認検査として広く用いられており, 種々の HIV 構成タンパクに対する特異抗体を検出する方法である。これらの抗体は, 感染早期には産生量は少なく, 抗原に対する親和性も低い, 時間の経過とともに抗原の暴露を受けることにより産生量が増加し, 親和性も高くなるといわれている。そのため, WB 法では通常, 感染から時間が経過するに従い, 検出される抗体の種類が増えていく。

今回, 初診時の WB 法にて 2 種類の抗体が検出されたにも係わらず, その後の経過中に抗体が消失した症例を経験した。抗体消失の機序を解明するため, 本症例での HIV 特異的抗原への反応性を評価し, 他の HIV 陽性患者との比較検討を行った。

症 例

症例: 41 歳, 男性。

主訴: 微熱。

既往歴, 家族歴: 特記事項なし。

現病歴: 2004 年 12 月頃より体重減少出現, 2005 年 3 月より微熱が認められるようになった。保健所にて抗 HIV 抗体 (PA 法, ELISA 法) 陽性を指摘され当院受診, CD4 陽性リンパ球数 (CD4) 37/μL, HIV-RNA 3.4×10^5 コピー/mL であり, 胸部 CT にてすりガラス陰影を認めたため, 精査加療目的にて入院。なお, 5 年前の HIV スクリーニング検査は陰性であった。数カ月以内に HIV-1 感染のリスクはあったが, それ以前にも感染のリスクはあり, 正確な感染時期は不明であった。

入院時現症: 身長 175cm, 体重 65kg, 体温 37.5°C, 口腔内白苔は認めない, 表在リンパ節触知せず, 胸腹部所見異常なし, 神経学的異常所見は認めない。

検査所見 (Table 1): 末梢血白血球 5,000/μL (リンパ球 10.3%), CRP 5.9g/dL, CD4 陽性 T 細胞数 37/μL, CD4/CD8 0.2, HIV-RNA 3.4×10^5 コピー/mL, サブタイプ B, 抗 HIV-1 抗体 (ELISA 法) 陽性, Western blot (WB) 法 gp160, p18 にバンドあり。IgG, IgA, IgM, IgG サブクラス異常なし。β-D-グルカン 42.6pg/mL, 喀痰 PCR *Pneumocystis jiroveci* 陽性, 抗酸菌陰性。胸部 CT にてすりガラス陰影を認める。

臨床経過 (Fig. 1): 入院後, PCP の治療を行ったが, 治療薬であるアトパコンに対しアナフィラキシー反応を示したため 28 病日に Hydrocortisone 100mg を使用した。その後, 喀痰より結核菌が検出されたため 58 病日より抗結核剤の内服を開始。76 病日から抗 HIV 薬の内服を開始した。93 病日より発熱を認め, 薬剤アレルギーおよび免疫再構築症候群の可能性を考え prednisolone を使用した (20mg/日 × 7 日間, 10mg/日 × 7 日間)。その後, 発熱は改善, 喀痰からの結核菌は消失, 胸部 CT の所見も改善したため退院となった。抗 HIV 薬開始後, HIV-RNA 量は徐々に低下し, 6 カ月後には感度 (50 コピー/mL) 以下となった。以後, ウイルス量は感度以下で経過している。HIV-DNA も同様に徐々に減少し 2006 年 4 月には検出感度以下となった。CD4 陽性細胞数は徐々に増加し 6 カ月後に 123/μL, 現在 300~400/μL にて経過している。HIV 抗体に関しては, WB 法 (ラブプロット 1; 富士レビオ社) にて初診時 gp160, p18 にバンドが認められていたが, 2005 年 12 月以降, バンドは消失し, 2 年以上経過した現在でもその状態が持続している。PA 法による HIV-1 Ab (ジェネディア HIV-1/2 ミックス

別刷請求先: (〒810-8563) 福岡市中央区地行浜 1-8-1

独立行政法人国立病院機構九州医療センター内科・臨床研究センター 南 留美

平成 21 年 5 月 20 日

Table 1 Laboratory data on admission

CBC		Virology	
WBC	5,000 / μ L	Hbs Ag	(-)
Neut	76.5 %	HCV Ab	(-)
Ly	10.3 %	CMV IgG (EIA)	68.3
Mono	7.6 %	CMV IgM	0.43
Eos	5.6 %	CMV/C7HRP	(-)
RBC	5,230,000 / μ L	VZV IgG (EIA)	31.6
Hb	15.3 g/dL	HSV IgG (FA)	$\times 24.4$
Ht	46.8 %	HHV-6 IgG (FA)	$\times 160$
PLT	143,000 / μ L	EB EA-DR IgG (FA)	< 10
		EB VCA IgG (FA)	$\times 160$
		measles (EIA)	35.3
Serology/Immunology		Infection	
CRP	5.99 g/dL	β -D glucan	42.6 pg/mL
IgG	1,389 mg/dL	< PCR analysis of sputum >	
IgA	454 mg/dL	TB	(-)
IgM	98 mg/dL	MAC	(-)
		PCP	(+)
CD4	37 / μ L	HIV-RNA (subtype B)	340,000 copies/mL
CD4%	8 %		
CD8	264 / μ L		
CD8%	61 %		
CD4/8	0.2		

EIA: Enzyme Immunoassay, FA: fluorescence antibody technique

TB: tuberculosis, MAC; Mycobacterium Avium complex, PCP: Pneumocystis Pneumonia

PA; 富士レビオ社), ELISA 法による HIV-1 Ag/Ab (2005 年 3 月, 4 月, 12 月はジェンスクリーン HIV Ag-Ab; 富士レビオ, 2007 年 5 月はアーキテクト HIV Ag/AB コンボアッセイ; アポットジャパンにて測定) においても titer が徐々に低下し, 2005 年 12 月以降は陰性化した. なお, PA 法に関しては他の測定キット (セロディア HIV (Type 1): 富士レビオ) にて測定を行い, 128 倍 (2005 年 12 月) であった.

方 法

本症例の HIV-1 抗原に対する反応性を評価し, 他の HIV-1 感染者との比較を行った. 対象は本症例および当院通院中の HIV-1 陽性者 10 名 (ステロイド使用歴あり 4 名, ステロイド未使用かつ抗 HIV 薬投与中 3 名, ステロイド未使用かつ抗 HIV 薬投与中 3 名) (Table 2). 末梢血単核球を分離し Phytohemagglutinin-P (PHA) (2 μ M), および HIV-1 Gag p24 (1 μ M; コスモバイオ), HIV-1 Gag p17 (0.2 μ M; コスモバイオ), HIV gp41 (0.2 μ M; Fitzgerald Industries Internal Inc) で刺激, 72 時間後に, ①リンパ球増殖試験 (CellTiter 96 AQueous One Solution Cell proliferation Assay: Promega), ② IFN- γ mRNA の定量 (real-time RT-PCR 法), ③培養上清の IFN- γ の濃度の測定 (human IFN- γ ELISA high sensitivity; Bender MedSystems) を行った. 測定は, 各々の症例につき 2 回ずつ行った. 有意差は student t-test にて検定し $p < 0.05$ を有意差ありとした.

結 果 (Fig. 2)

本症例の末梢血から分離した単核球は, PHA に対しては, リンパ球刺激試験, IFN γ mRNA 発現量, IFN γ 産生量, いずれにおいても反応を示した. 一方, HIV 特異抗原に対する反応は, 上記のいずれにおいても HIV 非感染者と同様, 反応は認められなかった. 他の HIV 感染者においては HIV 特異抗原に対し反応を示した. p24 や p17 に対する反応は, ステロイド投与群や抗 HIV 薬投与群では, 未治療者群に比べ低下していた. gp41 に対する反応においても, ステロイド投与群や抗 HIV 薬投与群では, 未治療者群に比べ反応が低下する傾向があった.

考 察

HIV 感染症の診断は, 血清中の抗 HIV 抗体や HIV 抗原, HIV 遺伝子の検出にて行う. まず, 粒子凝集反応 (PA 法), ELISA 法などの高感度スクリーニング検査で HIV 抗体, および HIV 抗原/抗体を検出する. スクリーニング検査には偽陽性が約 0.3% 認められるため, 陽性の場合には WB 法や HIV-RNA 量の確認検査を行い診断する. WB 法は HIV-1 のコア蛋白 (p17, p24, p55), ポリメラーゼ (p31, p51, p66), エンベロープ (gp41, gp120, gp160) に対する抗体を検出し gp120/160 と gp41 もしくは p24 に対する抗体が認められる場合に陽性とする. 抗 HIV 抗体が偽陰性になる確率¹⁾は, 0~2% と調査地域の HIV 感染率や検査対象によっても異なる. Farzadegan H らの薬物使用者 (intravenous drug users; IVDUs) を対

Fig. 1 Clinical course.

Peripheral blood HIV-1 RNA load (HIV-RNA), CD4 positive T lymphocyte counts (CD4), HIV-1 Ag/Ab ELISA (ELISA), patterns of Western blot results are shown.

PCP; Pneumocystis pneumonia, TB; Tuberculosis, ART; antiretroviral therapy, ELISA; enzyme-linked immunosorbent assay.

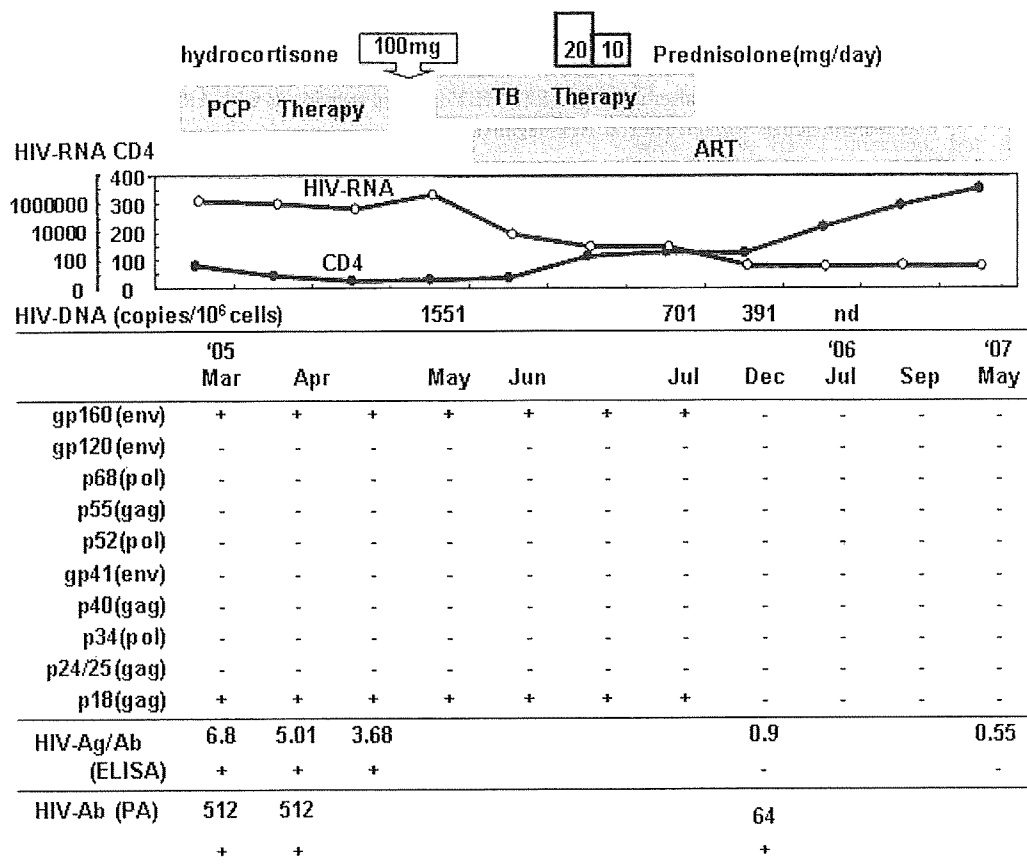


Table 2 Patient profiles

	Age	CD4 (present)	HIV-RNA (present)	ARV Duration (years)	CD4 (min) (μ L)	Steroid use	Steroid dose (max)
Case	41	345	< 50	2.4	7	before ART after ART	Hydrocortisone 100mg PSL 20mg
1	36	809	< 50	2	148	before ART	mPSL 500mg
2	35	874	< 50	1	236	before ART	mPSL 500mg
3	37	231	< 50	2	15	after ART	PSL 20mg
4	49	514	< 50	3.6	4	after ART	PSL 30mg
5	47	595	< 50	3.5	111	—	0
6	50	551	< 50	1	262	—	0
7	30	513	< 50	1.8	243	—	0
8	39	455	13,000	0	455	—	0
9	29	498	4,300	0	245	—	0
10	30	325	8,400	0	224	—	0

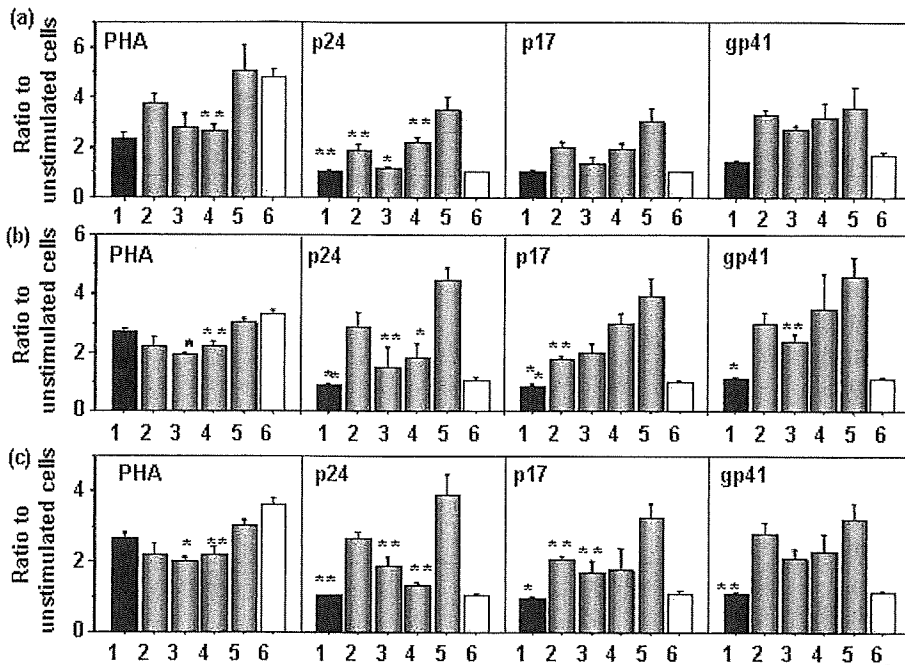
CD4 (min): minimum CD4 T lymphocyte counts during clinical course,

Steroid dose (max): maximum steroid dose use during clinical course,

象とした研究では 0.3%²⁾, Gibbons J らの血友病を対象とした研究では 1.8% と報告されている³⁾. 偽陰性の原因としては, (1) ウインドウ期, (2) 抗体の消失: 進行した免疫不全状態や, 急性期に抗 HIV 剤を

開始した場合など, (3) 無 γ グロブリン血症, (4) HIV-2 感染, (5) ウイルス側の要因, (6) 検査技術の問題, (7) 原因不明, などが挙げられる. 本症例の場合, 感染が判明してから 2 年以上が経過しており, (1) のウ

Fig. 2 Response of the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) to HIV-specific protein. 5×10^4 PBMCs were incubated in triplicate with PHA ($2 \mu\text{M}$), Gag p24 ($1 \mu\text{M}$), Gag p17 ($0.2 \mu\text{M}$), gp41 ($0.2 \mu\text{M}$) for 3 days. (a) Proliferation assays were performed with a Cell proliferation Assay kit. (b) IFN γ mRNA expression of PBMC was evaluated by quantitative RT-PCR. (c) Secretion of IFN γ to the culture medium was assayed using an ELISA. Results are expressed as the ratio of data of PBMC with antigens to data of PBMC without antigens. * $p < 0.01$, ** $p < 0.05$ vs. patients without antiretroviral therapy (Student *t*-test). 1. case, 2. HIV-infected individuals with steroid use before starting ART, 3. HIV-infected individuals with steroid use after starting ART, 4. HIV-infected individuals with ART, 5. HIV-infected individuals without ART, 6. HIV-negative controls.



インドウ期とは考えにくい。また IgG は正常範囲であり、麻疹やヘルペスウイルス属に対する抗体は検出されているため、(3) の無 γ グロブリン血症も否定的である。HIV-1 の RNA は PCR で検出されており、HIV-2 に対する抗体は WB 法にて陰性であった。検査は再検にて確認されており、また PA 法や ELISA 法による HIV 抗体は、他の測定キットでも同様の結果であったため、技術的な問題も考えにくい。ウイルス側の要因としては、HIV-1 の HLA-I もしくは HLA-II 拘束性のエピトープが変異することにより HIV が T 細胞からの認識を妨げている場合があるという報告がある⁴⁾。本症例の場合、*in vitro* にてリコンビナントの p24, p17, gp41 に対する反応がいずれも低下しており、ウイルス側の要因ではなく、宿主側の要因が主体であると考えられる。以上より、本症例では、何らかの要因により HIV に対する抗体が消失したと考えられる。実際、初診時に認められた gp160, p18 に対する抗体は、6 カ月後には、消失している。Fig. 2 に示すように、本症例は p24, p17, gp41 に対する反応が消失していた。他の症例は、いずれも HIV 抗原に対する反応性は保たれていたが、ステロイド投与群、

抗 HIV 剤投与群では、未治療者に比べ、反応性が低下していた。ステロイドの使用により HIV 特異的 CTL が抑制され HIV-1 タンパクに対する反応性が低下したという報告がある⁹⁾。また抗 HIV 薬の影響については、抗 HIV 薬そのものが、免疫系に影響を与えるという報告⁶⁾、および抗 HIV 薬にて抗原刺激 (体内の HIV) が減少するために HIV 特異的 CTL や HIV に対する抗体の産生が抑制されるという報告がある⁷⁾。後者に関連して、急性感染時期の抗 HIV 薬導入により、抗体の陽転化が遅延したという報告⁸⁾⁹⁾や、垂直感染時の早期の抗 HIV 薬導入により HIV 特異的 CTL が消失した症例の報告がある¹⁰⁾¹¹⁾。本症例では、感染時期の同定は出来ないが、HIV-1 への反応が不十分な時期にステロイドの使用および抗 HIV 薬の導入を行い、抗原刺激の減少 (HIV-RNA, HIV-DNA の減少) とともに、HIV-1 に反応するリンパ球のクローンが消失した可能性がある。

今回、我々は抗 HIV 抗体が WB 法による判定で長期間陰性で、HIV 抗原に対する *in vitro* の反応も消失している HIV-1 感染症の症例を経験した。今回の症例は HIV に対する免疫機構を考える上で興味深い症

例と考えられる。また、本症例は、末梢血中の HIV-1 RNA が検出感度以下であり、抗 HIV-1 抗体も検出されないことから、標準的な検査では、HIV-1 感染陰性と判定され得るため注意が必要である。

謝辞：抗 HIV 抗体測定にご協力いただきました富士レビオ社に深謝いたします。また、「HIV-1 抗原に対する反応性」の実験にご協力いただきました高橋真梨子氏に深謝いたします。

文 献

- 1) Van de Perre P, Simonon A, Msellati P, Hitimana DG, Vaira D, Bazubagira A, *et al.* : Postnatal transmission of human immunodeficiency virus type 1 from mother to infant. A prospective cohort study in Kigali, Rwanda. *N Engl J Med* 1991 ; 325 : 593—8.
- 2) Farzadegan H, Vlahov D, Solomon L, Muñoz A, Astemborski J, Taylor E, *et al.* : Detection of human immunodeficiency virus type 1 infection by polymerase chain reaction in a cohort of seronegative intravenous drug users. *J Infect Dis* 1993 ; 168 : 327—31.
- 3) Gibbons J, Cory JM, Hewlett IK, Epstein JS, Eyster ME : Silent infections with human immunodeficiency virus type 1 are highly unlikely in multitransfused seronegative hemophiliacs. *Blood* 1990 ; 76 : 1924—6.
- 4) Harcourt GC, Garrard S, Davenport MP, Edwards A, Phillips RE : HIV-1 variation diminishes CD4 T lymphocyte recognition. *J Exp Med* 1998 ; 188 : 1785—93.
- 5) Harrer T, Bäuerle M, Bergmann S, Eismann K, Harrer EG : Inhibition of HIV-1-specific T-cells and increase of viral load during immunosuppressive treatment in an HIV-1 infected patient with Chlamydia trachomatis induced arthritis. *J Clin Virol* 2005 ; 34 : 224—30.
- 6) Angel JB, Parato KG, Kumar A, Kravcik S, Badley AD, Fex C, *et al.* : Progressive human immunodeficiency virus-specific immune recovery with prolonged viral suppression. *J Infect Dis* 2001 ; 183 : 546—54.
- 7) Pitcher CJ, Quittner C, Peterson DM, Connors M, Koup RA, Maino VC, *et al.* : HIV-1-specific CD4+ T cells are detectable in most individuals with active HIV-1 infection, but decline with prolonged viral suppression. *Nat Med* 1999 ; 5 : 518—25.
- 8) Sellaeri M, Orchi N, Zaniratti MS, Bellagamba R, Corpolongo A, Angeletti C, *et al.* : Effective highly active antiretroviral therapy in patients with primary HIV-1 infection prevents the evolution of the avidity of HIV-1-specific antibodies. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007 ; 46 : 145—50.
- 9) Rosenberg ES, Altfeld M, Poon SH, Phillips MN, Wilkes BM, Eldridge R, *et al.* : Immune control of HIV-1 after early treatment of acute infection. *Nature* 2000 ; 407 : 523—6.
- 10) Luzuriaga K, McManus M, Catalina M, Mayack S, Sharkey M, Stevenson M, *et al.* : Early therapy of vertical human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection: control of viral replication and absence of persistent HIV-1-specific immune responses. *J Virol* 2000 ; 74 : 6984—91.
- 11) Desai N, Mathur M, Abu-Lawi K : HIV-1 seronegativity in a child with proved perinatal HIV infection on HAART. *Sex Transm Infect* 2005 ; 81 : 377—9.

A Case of HIV-1 Infection that Showed Western Blot Analysis for HIV-1 Negative After Antiretroviral Therapy

Rumi MINAMI, Soichiro TAKAHAMA, Hitoshi ANDO & Masahiro YAMAMOTO

Internal Medicine, Clinical Research Institute, National Hospital Organization, Kyushu Medical Center

Western blot (WB) is the most widely accepted confirmatory assay for detecting antibodies to the human immunodeficiency virus 1 (HIV-1). We report the case of an HIV-1 patient whose WB was negative for over two years.

A 41-year-old Japanese man with Pneumocystis pneumonia (PCP) and pulmonary tuberculosis referred in March 2005 was found to have positive HIV-1 ELISA and HIV RNA PCR, but HIV-1 WB with only two bands, at gp160 and p18, and no WB HIV-2 band. The CD4 count was 37/μL, and total immunoglobulin, IgG, IgM, and IgG subclasses were normal. The man was treated for PCP and pulmonary tuberculosis, then underwent antiretroviral therapy. He had taken short-term steroids to treat a drug allergy and immune reconstitution syndrome. Six months later, his serological ELISA tests for HIV-1 and HIV DNA PCR were negative and WB showed no positive band. The CD4 count recovered gradually, and exceeded 350/μL two years later, but WB remained negative. Lymphoproliferative assays and interferon γ expression against HIV-p17, p24, and p41 were studied and compared to those of other HIV-1 infected patients. Our patient showed no response to p17 or p24 and only a weak response to p41. Other patients showed a response to HIV-antigens, but patients with antiretroviral therapy or with histories of steroid use responded more weakly than those with neither. These findings show that HIV-specific lymphocytes decline with antiretroviral therapy and steroid treatment within early HIV infection. It is therefore important to interpret negative serological tests carefully in patients such as ours.

(J.J.A. Inf. D. 83 : 251—255, 2009)

研究成果の刊行に関する一覧表

平成 21 年度 奈良県立医科大学附属病院 感染症センター 古西 満

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
善本英一郎、古西満、宇野健司、米川真輔、中川智代、笠原敬、前田光一、三笠桂一、若月幸平、中島祥介	HAART開始後短期間に急性虫垂炎を発症したHIV感染者の1例	総合臨床	58	531-534	2009
古西満、善本英一郎、宇野健司、小川拓、忽那賢志、中川智代、米川真輔、笠原敬、前田光一、三笠桂一	HAART時代におけるHIV感染者のTh1/Th2バランス	総合臨床	58	1474-1477	2009
古西満、宇野健司	HIV感染症の最新知見 ⑦ 抗HIV療法後にみられる免疫再構築症候群	BIO Clinica	24	49-53	2010
古西満、菊池嘉、小田原陸、富成伸次郎、永井英明、今村顕史、田沼順子、善本英一郎	シンポジウム「抗HIV療法をいつ、どの薬剤で始めるかー症例経験から考えるー」	日本エイズ学会誌		75-80	2010

症例

HAART 開始後短期間に急性虫垂炎を
発症した HIV 感染者の 1 例*Acute appendicitis developed in short term after commencing HAART in a patient with HIV infection*

善本英一郎	YOSHIMOTO Eiichiro	奈良県立医科大学感染症センター 講師
古西 満	KONISHI Mitsuru	奈良県立医科大学感染症センター 准教授
宇野 健司	UNO Kenji	奈良県立医科大学感染症センター
米川 真輔	YONEKAWA Shinsuke	奈良県立医科大学感染症センター
中川 智代	NAKAGAWA Chiyo	奈良県立医科大学感染症センター
笠原 敬	KASAHARA Kei	奈良県立医科大学感染症センター
前田 光一	MAEDA Koichi	奈良県立医科大学感染症センター 講師
三笠 桂一	MIKASA Keiichi	奈良県立医科大学感染症センター 教授
若月 幸平	WAKATSUKI Kouhei	奈良県立医科大学消化器・一般外科, 小児外科
中島 祥介	NAKAJIMA Yoshiyuki	奈良県立医科大学消化器・一般外科, 小児外科 教授

はじめに

抗 HIV (human immunodeficiency virus) 治療の進歩に伴い, HAART (highly active antiretroviral therapy) 導入後の HIV 感染者の予後は著明に改善している. その一方で, HAART による副反応は多彩であり, 免疫再構築症候群 (Immune reconstitution inflammatory syndrome: IRIS) もその一つである.

今回われわれは, HAART 開始後短期間に急性虫垂炎を発症した 1 例を経験し, IRIS との関連について若干の考察を行ったので報告する.

症 例

患 者 27歳, 男性.

主 訴 乾性咳嗽・動悸・労作時呼吸困難感.

既往歴: 26歳時, アトピー性皮膚炎.

家族歴 とくになし.

生活歴 喫煙歴 20本/日, 飲酒せず, 同性間性的接触歴あり.

現病歴 2006年5月頃に乾性咳嗽と時々動悸を感じるようになった. その後徐々に症状が増悪し, 労作時呼吸困難感も伴うため, 7月7日に近医を受診した. 胸部レントゲン写真でびまん性スリガラス影を認めたため緊急入院となった. 入院後の喀痰 Grocott 染色標本で *Pneumocystis jirovecii* の cyst を認め, ニューモシスチス肺炎と診断された. その際に HIV 感染が判明したため, 7月12日に加療目的で当科に転院となった.

Key words HAART 免疫再構築症候群 虫垂炎

入院時現症 身長164cm, 体重58kg, 体温36.7°C, 血圧106/74mmHg, 脈拍94/分・整, 呼吸数14/分・胸腹式, 結膜に貧血あり・黄疸なし, 口腔内では咽頭や舌に白苔を認めた. 表在リンパ節は触知せず. 心音は清で雑音はなかった. 肺音は両側肺底部で fine crackles を聴取した. 腹部は平坦・軟, 圧痛もなかった. 四肢・神経系には異常所見を認めなかった. 皮膚は顔面・前胸部・腹部に落屑を伴う紅斑を認めた.

入院時検査所見(表1) 末梢血検査では, 白血球数は $9,300/\mu\text{l}$ だがリンパ球が著明に減少し, 赤沈が亢進していた. 生化学検査では軽度肝機能障害と LDH の上昇, 血清学検査では CRP は 5.6mg/dl と上昇していた. CD4陽性リンパ球数が $39/\mu\text{l}$ と低下, HIV-RNA 量は 2.3×10^5 コピー/ml であった. 血清 β -D グルカン値, KL-6値は上昇していた. 酸素 4 L/分吸入下で動脈血酸素分圧は 64.9Torr であった.

入院後経過(図1) ニューモシスチス肺炎に対する

表1 入院時検査所見

末梢血		生化学		免疫血清	
RBC	458万/ μ l	TP	7.6g/dl	CRP	5.6mg/dl
Hb	13.6g/dl	Alb	3.2g/dl	CD4数	39/ μ l
Ht	38.4%	GOT	55IU/l	CD8数	925/ μ l
WBC	9,300/ μ l	GPT	52IU/l	HIV-RNA量	
stab	6%	LDH	746IU/l		2.3×10^5 コピー/ml
seg	80%	γ -GTP	62IU/l	β -D グルカン	88.9pg/ml
eos	1%	BUN	15mg/dl	KL-6	1386.0U/ml
bas	0%	CRE	0.5mg/dl	動脈血液ガス分析	
lym	8%	Na	138mEq/l	pH	7.43
mon	5%	K	4.5mEq/l	PaO ₂	64.9Torr
Plt	35.2万/ μ l	Cl	103mEq/l	PaCO ₂	37.6Torr
ESR	112mm/hr	GLU	98mg/dl	(O ₂ 4l/min 経鼻)	

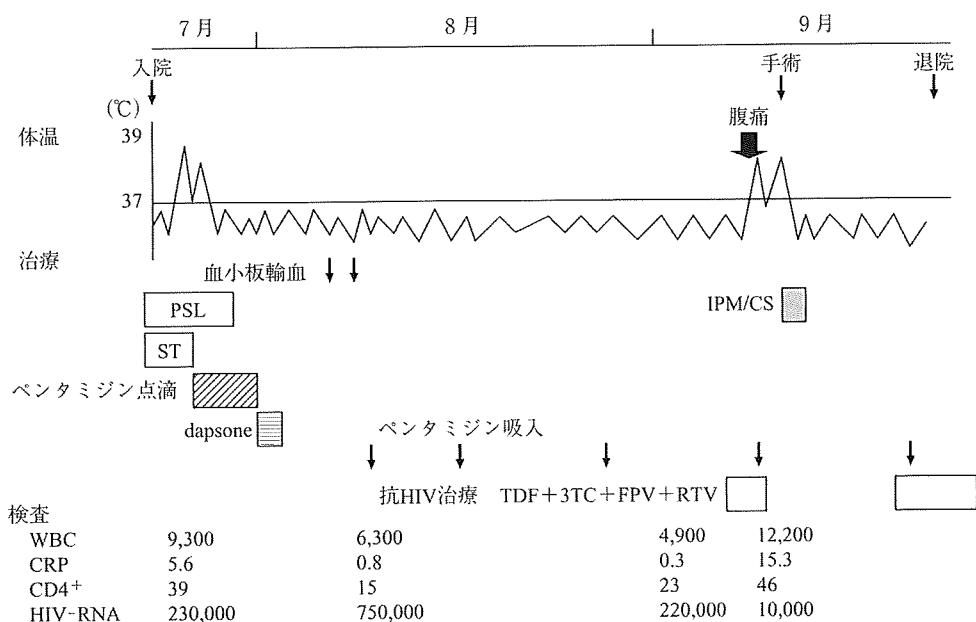


図1 治療経過

治療を終了した後、9月6日からHAART[tenofovir (TDF) + lamivudine (3TC) + fosamprenavir (FPV) + ritonavir (RTV)]を開始した。HAART開始前のCD4陽性リンパ球数が23/ μ l、HIV-RNA量が 2.2×10^5 コピー/mlであった。投与6日後から下痢・嘔吐が出現し心窩部痛を伴うようになった。翌日には腹痛が増強したので、腹部CTを施行し、急性虫垂炎の診断で虫垂切除術を受けた。急性虫垂炎発症時の白血球数は17,100/ μ l、CD4陽性リンパ球数は46/ μ l、HIV-RNA量は 1.0×10^4 コピー/mlと短期間であったが治療によく反応していた。その後HAARTを再開し、速やかに

HIV-RNA量は検出限界以下となっている。

切除した虫垂とその病理像(図2) 腫大した虫垂には糞石を認め、その病理像は好中球を主体とした全層の炎症像を示していた。

● 考 察

急性虫垂炎は日常診療においてよく遭遇する疾患である。三原ら¹⁾によると、HIV感染患者に発症する急性虫垂炎は患者数の増加とともに手術件数が増えており、その予後は非HIV感染患者と比較しても差を認

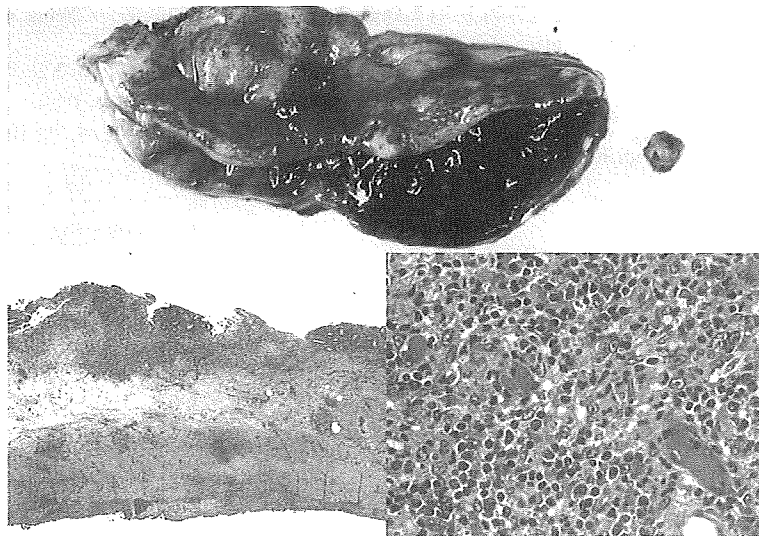


図2 切除した虫垂とその病理組織像

めないと報告している。

最近、HAART によって免疫不全が進行した状態から急速に免疫が回復することで過度の炎症が惹起される IRIS が、さまざまな病態で報告されている。本症例は CD4 陽性リンパ球数が $23/\mu\text{l}$ と進行した免疫不全状態にあり、HAART の効果は良好で短期間に CD4 陽性リンパ球数の増加と HIV-RNA 量の低下を認めたことから、IRIS が起こりやすい状況であることが推察された。しかしわれわれが行った調査²⁾において、1997～2003年に発症した IRIS 症例は、帯状疱疹・非結核性抗酸菌症・サイトメガロウイルス感染症・ニューモシチス肺炎・結核症の順に多く、虫垂炎は一例もなかった。またわれわれが検索した限りでは、海外において IRIS の関与を示唆した虫垂炎症例が報告されている³⁾が、本邦報告例はなかった。急性虫垂炎の起炎菌はグラム陰性桿菌や腸球菌が多くを占める。一方、海外において HIV 感染患者の虫垂炎の原因には、免

疫状態によりサイトメガロウイルス⁴⁾・クリプトスポリジウム⁵⁾・*Mycobacterium kansasii*⁶⁾・*Mycobacterium avium complex*⁷⁾・*Mycobacterium tuberculosis*⁸⁾・カポジ肉腫⁹⁾などの報告が散見され、IRIS が起こりやすい微生物と重なり興味深いと考える。

本症例では日和見微生物の関与は認められなかったが、糞石による不顕性の炎症が存在し、HAART によって免疫が再構築される過程で炎症が顕在化した虫垂炎を発症したと考えると、本症例が IRIS である可能性も考えることができる。HAART は進化し、抗 HIV 作用が強くなるうえでさまざまな副反応が明らかになっている。IRIS は HAART 開始時の克服しなければならない重要な副反応の一つと考えられ、本症例は HIV 診療を行ううえで示唆に富むと考え報告した。

なお、本論文要旨は、第71回日本感染症学会総会(2007年4月、京都)にて発表した。

文 献

- 1) 三原史規, 枝元良広, 清水利夫ほか: HIV 陽性患者の急性虫垂炎手術例の検討. 日外感染症会誌 4: 1-5, 2007.
- 2) 安岡 彰, 古西 満, 中村哲也ほか: 免疫再構築症候群 診療のポイント. 厚生労働省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 2006年1月発行.
- 3) Aldeen T, Horgan M, Macallan DC, et al: Is acute appendicitis another inflammatory condition associated with highly active antiretroviral therapy (HAART)? HIV Med 1: 252-255, 2000.
- 4) Tarng YW, Shih DF, Liu SI, et al: Cytomegalovirus appendicitis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. Zhonghua Yi Xue Za Zhi 60: 48-51, 1997.
- 5) Buch K, Nguyen S, Divino CM, et al: Cryptosporidiosis presenting as acute appendicitis. Am Surg 71: 537-538, 2005.
- 6) Enani MA, Frayha HH, Halim MA, et al: An appendiceal abscess due to *Mycobacterium kansasii* in a child with AIDS. Clin Infect Dis 27: 891-892, 1998.

534 綜合臨牀 2009.3/Vol.58/No.3

- 7) Domingo P, Ris J, Lopez-Contreras J, et al : Appendicitis due to Mycobacterium avium complex in a patient with AIDS. Arch Intern Med 27 : 1114, 1996.
- 8) Pintor E, Velasco M, Piret MV, et al : Tuberculous abscess simulating complicated acute appendicitis in a patient with HIV infection. Enferm Infect Microbiol Clin 15 : 497-498, 1997.
- 9) Meyer-Rochow GY, Lee KM, Smeeton IW, et al : Primary Kaposi's sarcoma of the appendix : a rare cause of appendicitis. ANZ J Surg 77 : 402-403, 2007.

臨床

HAART 時代における HIV 感染者の Th1/Th2 バランス

Th1/Th2 balance in HIV-infected patients in the HAART era

古西 満	KONISHI Mitsuru	奈良県立医科大学感染症センター 准教授
善本英一郎	YOSHIMOTO Eiichiro	奈良厚生会病院感染制御室 副院長
宇野 健司	UNO Kenji	奈良県立医科大学感染症センター
小川 拓	OGAWA Taku	奈良県立医科大学感染症センター
忽那 賢志	KUTSUNA Satoshi	奈良県立医科大学感染症センター
中川 智代	NAKAGAWA Chiyo	奈良県立医科大学感染症センター
米川 真輔	YONEKAWA Shinsuke	奈良県立医科大学感染症センター
笠原 敬	KASAHARA Kei	奈良県立医科大学感染症センター
前田 光一	MAEDA Koichi	奈良県立医科大学感染症センター 講師
三笠 桂一	MIKASA Keiichi	奈良県立医科大学感染症センター 教授

はじめに

ヘルパー T(Th)細胞(CD4陽性細胞)は、サイトカインの産生様式に基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細胞とのバランスがさまざまな疾患の病態に関連することが知られており、HIV(human immunodeficiency virus)感染症においても注目されている。

そこで、われわれは HIV 感染者において末梢血 CD4陽性細胞内サイトカインをフローサイトメトリーで測定する方法を用い、HAART(highly active antiretroviral therapy)時代における HIV 感染者の Th1/Th2 バランスの臨床的意義について検討したので、報告する。

対象と方法

対象は、本研究への参加同意を得ることができ、6ヵ月以上病状が安定していた HIV 感染者27名とした。平均年齢は41.4歳(25~66歳)、性別は男性24名、女性3名、HIV 感染経路は血液製剤が9名、異性間性的接触が14名、同性間性的接触が4名であった。HIV 感染症の病態は無症候性キャリア(AC: asymptomatic carrier)が19名、AIDS(acquired immunodeficiency syndrome)が8名であり、平均 CD4陽性細胞数は389/ μ l(11~772/ μ l)、HIV-RNA 量が50コピー/ml未満の症例は9名、10,000コピー/ml以上の症例は7名であった。19名が抗 HIV 治療を受けていた。

Th1/Th2バランスの評価には、末梢血中の CD4陽

性細胞を phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA)と ionomycin で刺激した後に産生された細胞内 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陽性細胞を Th1細胞、IL-4陽性 CD4陽性細胞を Th2細胞とし、その比を Th1/Th2バランスとした。

Th1/Th2比と HIV 感染症の臨床病態、抗 HIV 治療効果および末梢血好酸球数・血清 IgE 値との関連について検討した。抗 HIV 治療を行っている症例(19名)で、末梢血 CD4陽性細胞数が200/ μ l以上かつ HIV-RNA 量が400コピー/ml未満を3ヵ月以上継続している場合を治療効果良好症例、そうでない場合を治療効果不良症例とした。

統計学的解析には、Student's t-検定および回帰分析を用いた。

Key words HIV 感染症 抗 HIV 治療 ヘルパー T 細胞 Th1/Th2 バランス

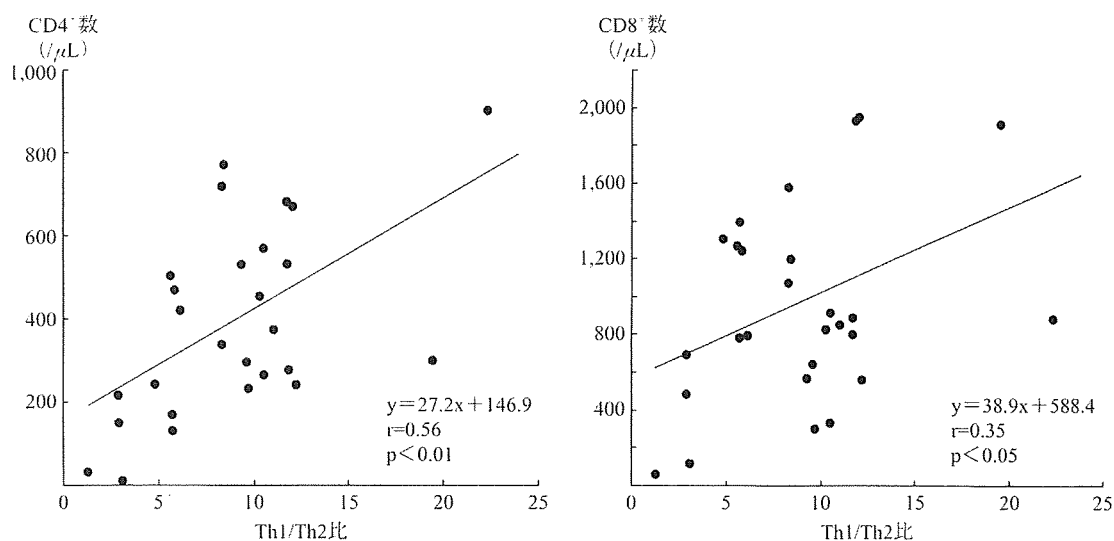


図1 CD4 陽性細胞数、CD8 陽性細胞数と Th1/Th2 比との関係

■ 結 果

Th1/Th2比の平均値は AC 症例が9.3, AIDS 症例が8.0であり, 有意差はなかった。

Th1/Th2比と末梢血 CD4陽性細胞数とは有意な正の相関 ($p < 0.01$) を認めた。また, 末梢血 CD8陽性細胞数とは有意な弱い正の相関 ($p < 0.05$) があつた(図1)。

Th1/Th2比の平均値は抗 HIV 治療効果良好症例で11.5, 不良症例で5.4であり, 有意差 ($p < 0.01$) を認めた(図2)。

Th1/Th2比と末梢血好酸球数との間には相関はなかった。Th1/Th2比と血清 IgE 値とは有意な負の相関 ($p < 0.05$) を認めた(図3)。

■ 考 察

Th 細胞は免疫系の特異的応答を司り, サイトカイン産生細胞としてきわめて重要な細胞である。Mosmann⁴⁾は, 産生するサイトカインの種類で Th 細胞には二つの亜集団, すなわち, 主に細胞性免疫機構を活性化する IL-2や IFN- γ を産生する Th1細胞と, 主に液性免疫機構を活性化する IL-4, IL-5, IL-10を産生する Th2細胞が存在することを報告している。その後の研究から, Th1細胞と Th2細胞のバランスが感染症, 自己免疫疾患, アレルギーなどの発症や病態形成に関与すると考えられている²⁾。

HIV 感染症は IFN- γ を産生する Th 細胞が減少し, 細胞性免疫障害を生じる疾患である。また, 1990年代

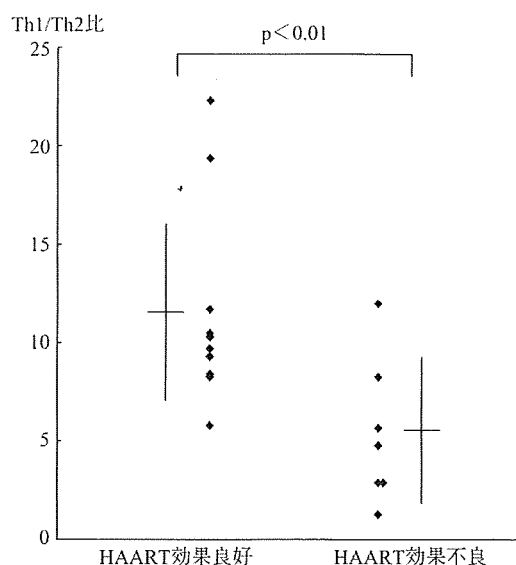


図2 HAART の臨床的効果と Th1/Th2 比との関係

初めには, Th 細胞が Th1細胞から Th2細胞にスイッチすることが HIV 増幅をもたらし, HIV 感染症の病状を進行させる³⁾という仮説が出されている。しかし, この理論には反論も多く, いまだに結論は得られていない。Imami ら⁴⁾は, 長期非進行性 HIV 感染者では Th2細胞の活性化も強く, Th1細胞と Th2細胞間の適正な調節が HIV 増幅抑制に重要であると推察している。

一方, 1990年代後半から HAART が導入され, その有用性については数多くの報告がなされている^{5,6)}。

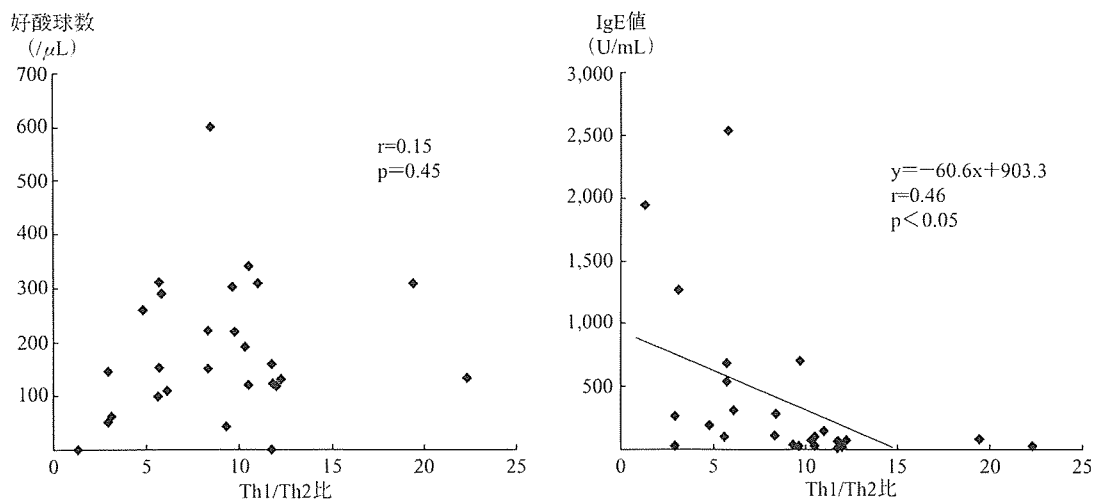


図3 末梢血好酸球数, 血清 IgE 値と Th1/Th2 比との関係

ところが, HAART 時代における HIV 感染者の Th1/Th2 バランスに関する臨床的な検討は少ない。そこで, われわれは少数例ではあるがその解析を行い, 病状の安定した HIV 感染者では AIDS 発症の有無は Th1/Th2 比と関連はないが, 現時点の末梢血 CD4 陽性細胞数や治療効果が良好な症例では Th1/Th2 比が高くなっていることが見い出せた。Reuben ら⁷⁾は, 小児例ではあるが, HAART によって IFN- γ 産生能が回復することを報告しているが, 同時に HAART によって IL-10 産生能も高くなっていることを指摘している。したがって, HAART によって Th1 細胞, Th2 細胞とも回復するが, 病態の良好な症例では Th1 細胞の回復がより勝っている可能性があると考えられる。

今回の検討では, Th1/Th2 比と血清 IgE 値とは有意な負の相関を認めたことから, 血清 IgE 値が簡易な Th1/Th2 比の臨床的指標となる可能性が示唆される。HIV 感染者で高 IgE 血症を呈する症例があることは古くから指摘され, 血清 IgE 値と臨床病態に関連が

ある⁸⁾ことが報告されている。また, HIV 感染者において血清 IgE 値と IL-4 や IL-10 には正の相関あることや, IFN- γ や IL-12P70 には負の相関を認める⁹⁾¹⁰⁾ことも報告されている。さらに, HIV-1 の gp120 がアレルゲンとして働き, IL-4 産生を誘導して IgE 合成をもたらす¹¹⁾ことも指摘されており, HAART によるウイルス量減少が Th1/Th2 比に影響する機序の一つである可能性が考えられる。

したがって, HAART 時代においても HIV 感染者の Th1/Th2 バランスを評価することは意義があり, 血清 IgE 値がその指標の一つとなる可能性があると考ええる。

謝 辞

本研究の要旨は, 第21回近畿エイズ研究会(2007年6月, 会長奥野良信先生)で発表し, 近畿エイズ研究会学術賞(理事長生田和良教授)を賜りましたことに心から感謝申し上げます。

文 献

- 1) Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, et al: Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136: 2348-2357, 1986.
- 2) Kidd P: Th1/Th2 balance: The hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev* 8: 223-246, 2003.
- 3) Cleric M, Shearer GM: A Th1 \rightarrow Th2 switch is a critical step in etiology of HIV infection. *Immunol Today* 14: 107-111, 1993.
- 4) Imami N, Pires A, Hardy G, et al: A balanced type1/type2 response is associated with long-term nonprogressive human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 76: 9011-9023, 2002.
- 5) Lohse N, Hansen AB, Pedersen G, et al: Survival of persons with and without HIV infection in Denmark, 1995-2005. *Ann Intern Med* 146: 87-95, 2007.
- 6) Robert WB, Darrell HST: Prolongation and quality of life for HIV-infected adults treated with