

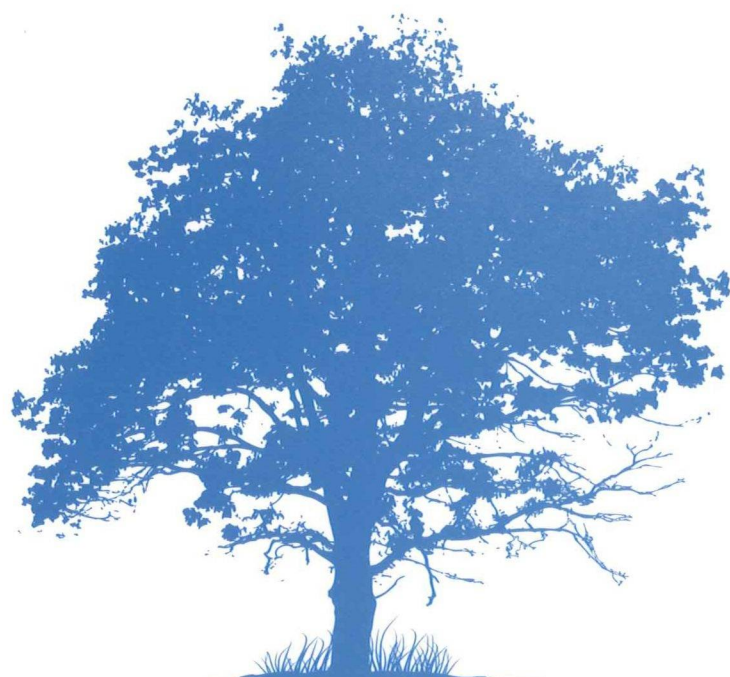
200932044X

平成21年度
**厚生労働科学研究費補助金
エイズ対策研究事業**

標準的治療法の確立を目指した
急性HIV感染症の病態解析

独立行政法人国立病院機構
大阪医療センター

渡邊 大



厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業
標準的治療法の確立を目指した急性 HIV 感染症の病態解析
平成 21 年度 研究報告書

独立行政法人国立病院機構 大阪医療センター

渡邊 大

目 次

■ 総括研究報告

- 1 標準的治療法の確立を目指した急性 HIV 感染症の病態解析…………… 7

研究代表者：渡邊 大（国立病院機構大阪医療センター エイズ先端医療研究部 HIV 感染制御研究室）

■ 分担研究報告

- 2 残存プロウイルス量測定と急性期での抗 HIV 療法の導入の意義…………… 1 3

研究分担者：渡邊 大（国立病院機構大阪医療センター エイズ先端医療研究部 HIV 感染制御研究室）

- 3 急性感染例の血清サイトカイン値の測定による HIV 感染症の病態解析…………… 1 7

研究分担者：渡邊 大（国立病院機構大阪医療センター エイズ先端医療研究部 HIV 感染制御研究室）

- 4 急性 HIV 感染症の入院例の分析（多施設共同調査）…………… 2 3

研究分担者：上平 朝子（国立病院機構大阪医療センター 感染症内科）

- 5 急性 HIV 感染症の実態調査に関する多施設共同研究…………… 2 9

研究分担者：南 留美（国立病院機構九州医療センター 医師）

- 6 2009 年名古屋医療センターにおける急性感染症例の臨床像と治療経過…………… 3 3

研究分担者：横幕 能行（国立病院機構名古屋医療センター）

総括研究報告

1

標準的治療法の確立を目指した急性HIV感染症の病態解析

研究代表者：渡邊 大（国立病院機構大阪医療センター エイズ先端医療研究部 HIV 感染制御研究室）

研究分担者：上平 朝子（国立病院機構大阪医療センター 感染症内科）

横幕 能行（国立病院機構名古屋医療センター 感染症科・臨床研究センター）

南 留美（国立病院機構九州医療センター 免疫感染症科・遺伝子検査室）

研究要旨

【目的】HIV 感染症の新規治療法の開発のために、標準的な治療指法が確立されていない急性感染に注目した。

【方法】急性 HIV 感染症の実態調査のために、3 ブロック拠点病院から急性 HIV 感染症と診断された症例を収集し、その解析を行った。急性 HIV 感染症と診断された症例を対象に、血清サイトカイン値の測定を行った。急性期治療例の残存プロウイルス量が低レベルに抑えられており、半数以上の症例で測定感度未満であったため、測定系の改良を行った。【結果】急性 HIV 感染症の入院 37 症例について検討を行い、約 1/3 が急性期入院中に治療が開始されていた。無症候性キャリアとなった症例の約半数が 2009 年 12 月の時点で治療が導入されており、入院から治療までの期間の中央値は 318 日であった。血清 IL-18 と急性感染後の CD4 数の上昇との間に、血清 sICAM-1・IP-10 と血中ウイルス量の間に相関関係を認めた。残存プロウイルス量に関しては、プライマーの設定変更等で、昨年度測定感度未満であった症例も測定可能となった。【考察】急性 HIV 感染症は多彩な症状・病態を呈しており、さらなる解析が必要であった。急性期に関わるサイトカインを明らかとしたが、その意義については症例数の増やすことによって明確にしたい。残存プロウイルス量の高感度法により、急性期に治療を導入した症例を中心に測定を行い、慢性期の症例と比較して、どのレベルまで抑えられているかを明らかとする。

研究目的

抗HIV薬の多剤併用療法（HAART）の開発により HIV感染症は不治の病からコントロール可能な慢性疾患に移行した。しかし、寿命が長い潜伏感染細胞を駆逐するのに平均73.4年要する（Nat. Med. 9, p727, 2003）との報告からも、身体的・精神的・経済的負担の大きい抗HIV薬の内服を長期間継続することが必要とされる。さらには計画的に治療を中断（STI）する臨床試験も行われたが、治療継続の方が好ましいとの結果であった（N. Engl. J. Med. 355:2283-6, 2006）。従って抗HIV薬の長期内服の負担を軽減する方法としては新規治療薬の開発や合併症対策などが一般的に考慮されるが、我々は急性感染に注目した。急性感染期から病態に介入することにより、免疫学

的修飾による無症候期の延長や早期の抗HIV療法導入による潜伏感染細胞の減少などが得られる可能性もある。そのようなメリットが得られた場合は治療ストラテジーにも大きな変更が加えられることになる。HIV感染症の新規治療法の開発のためにも、まず標準的治療法が確立されていない急性HIV感染症の病態を、免疫学およびウイルス学的な視点から解析を行い、具体的には（1）臨床データの解析、（2）血清サイトカイン値の解析、（3）急性期治療例における残存プロウイルス量の解析の3つに焦点を置くことにした。

臨床データの解析に関しては、昨年度の大阪医療センターと名古屋医療センターの入院症例の解析から、急性期の抗HIV療法に加え、急性期および無症候性キャリア期におけるCD4数の低下や、

症状や発症した症候群、併発した感染症などに注目して、多施設共同の実態調査を行うことにした。

血清サイトカイン値の解析は昨年度、Interferon (IFN) - γ と Interleukin (IL) -18 が急性期に関わるサイトカインとして同定され、血清 IFN- γ と IL-18 に逆相関の関係を認めた。本年度は症例数を増やすとともに、これらの関係をより明確とすることを目的とした。また、他のケモカインや接着分子に関しても測定を行った。

急性期治療例における残存プロウイルス量の解析に関しては、昨年度に慢性期治療例と比較して統計学的有意に低レベルに抑えられていることを明らかにした。しかし、急性期治療例では半数以上の症例で測定感度未満であった。そこで本年度はそれらの症例の残存プロウイルス量の測定のために、高感度法の改良を行った。

研究方法

(1) 臨床データの解析：独立行政法人国立病院機構大阪医療センター・名古屋医療センター・九州医療センターに受診した HIV 感染者のうち、急性 HIV 感染症と診断された入院例について症例票の回収を行った。

(2) 血清サイトカイン値の解析：20 歳以上の HIV-1 感染患者のうち同意が得られたものを対象とした。同意取得の後、血清を採取し、IFN- γ 、IL-6、IL-10、IL-18 の 4 種のサイトカインに加え、TNF- α 、sICAM-1、IP-10、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-12、IL-17、IL-23 について ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) 法で測定した。それらの結果と臨床情報について関連性を検討した。

(3) 残存プロウイルス量の解析：抗 HIV 療法が導入され血中 HIV-RNA 量が感度未満で維持されている症例を対象とし、informed consentのもとに採血を行った。末梢血単核球 (PBMC) もしくは CD4 陽性 T リンパ球を分離し、DNA を抽出した。精

製した DNA を鋳型として、Lightcycler DX400 を用いて TaqMan PCR 法を用いてコピー数を決定した。HIV-DNA 量は 1 μ g に含まれるコピー数として算出した。

(倫理面への配慮)

研究の実施にあたっては、疫学研究に関する倫理指針を遵守した。研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除に留意し、実施に当たっては患者への分かりやすい説明を行いながら十分な理解を得た。検体採取にあたっては、各施設の倫理委員会の承認を得た後に実施し、個人情報の管理は厳重に行うこととした。

研究結果

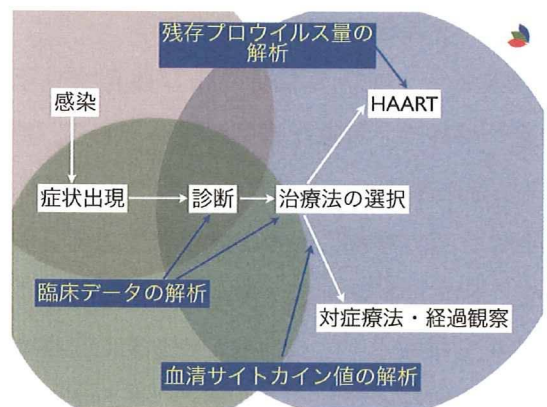
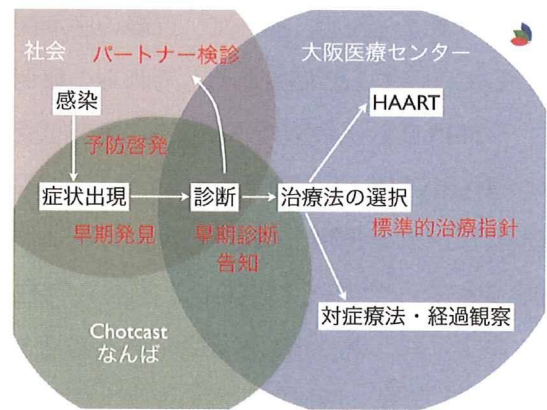
今年度の主な結果を次に記す。(1) 臨床データの解析：各研究施設に急性 HIV 感染症で入院した症例は 37 症例であり、2007 年以降から増加していることが明らかとなった。臨床試験に組み込まれた 3 例を除外して 34 例のうち、11 例で抗 HIV 療法が急性期入院中に行われていた。急性期に治療が導入されず、無症候性キャリアとなった 23 例の経過は、2009 年 12 月の時点で 11 例で抗 HIV 療法が導入されていた。入院日から治療導入までの期間は 318 日と、一般的に知られている無症候期 (5~10 年) と比較して短い期間であった。消化器症状を呈した症例も多く、他の急性ウイルス感染症を併発した症例も認められた。

(2) 血清サイトカイン値の解析：血清サイトカイン値の測定は 16 症例から同意を取得して測定を行った。無症候期における IFN- γ が陽性の症例と陰性の症例に分類することができ、無症候期の IFN- γ が陰性の症例で、IL-18・IL-10・IL-6 が高い傾向を示した。また、IL-18 と急性期から無症候期での CD4 数の上昇との間に、sICAM-1・IP-10 と血中ウイルス量との間に統計学的有意な相関関係を認めた。

(3) 残存プロウイルス量の解析：昨年度の研究で使用されたプライマーペアで、PCRの効率が低下していることが明らかとなった。その近傍にデザインしたプライマー・プローブを用いて、TaqMan PCR法による測定系を確率した。昨年度の研究で急性期に治療が導入され、複数回の測定で測定感度未満であった症例も測定可能となった。末梢血単核球由来のDNAを用いた場合、慢性期に治療を開始した7例では116～221copies/ μ gDNAであったが、急性期治療の1例は41copies/ μ gDNAであった。

考察

本研究は3つの柱で研究を遂行している。まず、臨床データの解析であるが、これはHIV感染症の捕捉率の高い3ブロック拠点病院での症例票の回収を行った。単施設の検討においても、全施設の検討においても急性HIV感染者数は増加傾向であった。特に今年度は各地でHIV感染者の新規報告数の減少が報告されているが、急性HIV感染症に関しては逆に増加傾向であった。新規HIV感染者数の減少は、感染者数が減ったのではなく、新型インフルエンザに伴う検査回数の減少によるものと分析している専門家も多い。急性HIV感染症患者が増加していることから、感染拡大はなお続いていると思われる。また、臨床データの解析で困難であったことは、急性HIV感染症の定義であった。HIVに感染後、高レベルのウイルス血症の際にさまざまな症状・症候群を呈する。その中に口腔内カンジダ症が含まれることから、超急性期には免疫不全に陥っていることは明白である。この超急性期に他の感染症を合併することは理解しやすい。その一方で、急性期の症状は軽くおさまリ、その回復過程においてアメーバ肝膿瘍やニューモシスティス肺炎といった様々な病態を発症していた症例も認めた。また、急性期からそのままAIDS発症期になったと考えられる症例も



ある。さらには、急性HIV感染症も二峰性の発熱を来することがあり、前半の発熱に血球減少（白血球減少・血小板減少）、後半の発熱に肝機能障害を伴っていることも経験される。このように、急性HIV感染症は今回報告した以上にさまざまな病態を取り、単純に急性期・無症候期と分類することはできない。本研究においても、急性期と慢性期の鑑別に苦慮する症例もあった。その点については来年度の課題にしたい。

急性HIV感染症の問題点としては、種々の問題が残されている。本研究では標準的治療に主眼をおいているが、それ以外にも早期発見・早期診断・告知・パートナー検診が挙げられる。発熱などの急性期症状が出現した場合、患者が最初に行う行為は近隣の医療機関の受診になる。それは、自分がHIV感染症のハイリスク群であることを理解していても、そうせざるを得ない。その理由としては、保健所等の無料匿名検査場では、感染のリスクがあつて3ヶ月経ってから検査をうけて下さいと考えている所も多いこと、発熱のみであればエイズ治療の拠点病院に直接赴く訳にはいか

ないことが挙げられる。従って、近隣の医療機関を受診して入院する症例もある。それらの症例のうち、一部は自らの希望によってHIV検査を受けており急性HIV感染症と診断されている。しかし、診断されないまま退院となって、3ヶ月後に無料匿名検査を受けて診断されている症例も存在する。このように、急性HIV感染症の早期発見・早期診断に関しては、医療機関内の連携も含め、今後解決すべき課題になると思われる。

血清サイトカインの解析および残存プロウイルス量の解析は、明確な結果が出つつある。特にIL-18と急性感染後のCD4数の上昇に相関関係を認めたことは、非常に興味ある現象であると考えている。次年度も症例数を増やすとともに、これらの解析を継続とし、急性HIV感染症の治療の選択に関わる情報になりうるか否か、そして急性期治療をすすめるエビデンスになりうるか否かを明らかにしていきたい。

結論

急性HIV感染症については3施設の症入院症例についてレビューを行った。血清サイトカイン値に関しては、IFN- γ とIL-18の相反する関係、急性感染後のCD4数の上昇とIL-18との相関、sICAM-1・IP-10と血中ウイルス量の相関を明らかとした。残存プロウイルス量は測定法を改良し、先行研究では測定感度未満であった症例も測定可能となった。

健康危険情報

該当なし

研究発表

該当なし

知的財産権の出現・登録状況

該当なし

分担研究報告

2

残存プロウイルス量測定と急性期での抗HIV 療法の導入の意義

研究分担者：渡邊 大（国立病院機構大阪医療センター エイズ先端医療研究部 HIV 感染制御研究室）

研究協力者：白阪 琢磨（国立病院機構大阪医療センター エイズ先端医療研究部）

上平 朝子（国立病院機構大阪医療センター 感染症内科）

研究要旨

急性期での抗 HIV 療法（ART）の意義を明らかにするために、急性期での治療を行った 8 例について末梢 CD4 陽性 T リンパ球中の残存プロウイルス（HIV-DNA）量を測定した。対象は慢性期で ART を導入した 63 例とした。急性期に ART を導入した 8 症例中 5 症例は HIV-DNA 量が感度未満であり、慢性期で導入した 63 症例と比較し統計学的有意に残存プロウイルス量が低下していた。そこで、本年度は急性期に ART を導入した症例が、どのレベルまで残存プロウイルス量が抑えられているかを明らかとするために、高感度法の開発に取り組んだ。先行研究で行った 2 種の条件（プライマーペアとプローベ）に加え、5 種類の PCR の条件について検討を行った。先行研究で用いたプライマーで PCR の効率が落ちていることが判明した。そこで、新規のプライマーペアを用いたところ、先行研究では CD4 陽性 T リンパ球中の HIV-DNA 量が感度未満であった症例の PBMC 中の HIV-DNA 量も測定可能となった。次年度は本手法を用いて急性期での ART 導入例を中心に残存プロウイルス量を測定する予定である。

研究目的

HIVに感染して2から4週間後に発熱、咽頭炎、下痢、皮疹などの症状や、白血球減少・血小板減少・高LDH血症などの検査異常が出現する。これら一連の病態を急性HIV感染症という。この急性期は無治療の場合は2週間程度持続して軽快し、いわゆる無症候性キャリア期に入る。急性感染期の治療は一般に対症療法とされている。症状が遷延化した場合や、髄膜炎・血球貪食症候群などを発症し重症化する場合も知られており、そのような症例においては抗HIV療法（ART）が著効する。しかし、その開始基準は定まっておらず、現状では個々の症例で判断せざるを得ないのが実情である。また、治療を開始してもいつ中断すべきか、それとも中断することなく継続すべきかについてもエビデンスが存在しない。急性期でARTを開始するデメリットとしては、抗HIV薬服薬の必要性和その副作用出現の可能性や薬剤耐性変異株の出現の可能性が考えられ、メリットとしては症

状の改善および免疫系の破壊の少ないうちに治療が開始されることが挙げられる。

一方、慢性期においてはCD4陽性リンパ球数がどこまで低下すれば開始すべきかの課題は残されているものの、ARTの開発によってHIV感染者の血漿中ウイルス量（VL）は検出感度を下回るまで抑制されるようになった。数十年の抗HIV薬服薬による毒性の蓄積や、薬剤耐性変異株の出現などが問題視されるほど、HIV感染症はコントロール可能な慢性疾患になったといえる。HIV感染細胞の半減期に関する研究から、感染細胞をすべて駆逐するには平均73.4年の内服期間が必要とされ、生涯の抗HIV薬の服用の根拠とされている。しかし、それらの研究でも半減期には幅があり、個々の患者の感染細胞数の違いもあるため、感染細胞の存続期間も一律でよいのかは十分な議論がされていないのが実状である。すなわち潜伏感染として感染している細胞数が少ない症例などは73.4年を待たずに治癒が可能と考えられる。HIV

図1 急性期にARTを導入した症例のプロウイルス量

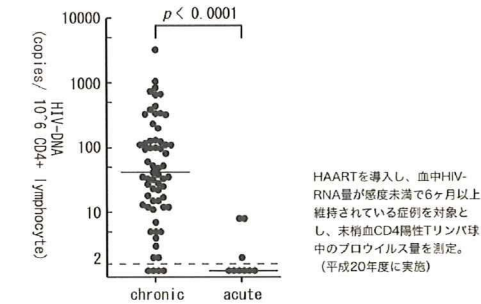


図2 残存プロウイルス量測定に用いたprimer sets

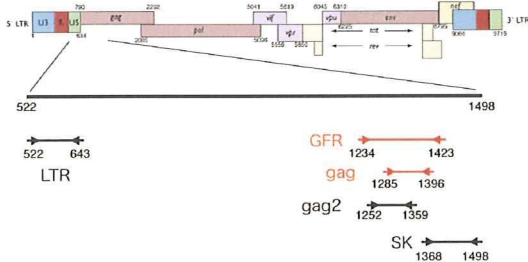


図3 Primer-ProbetセットのCp値の比較

	pt1	pt2	pt3
GFR	36.9	36.2	39.0
gag	-	37.9	-
gag2	39.2	37.7	40.5
LTR	37.7	37.0	39.0
SK	36.5	36.2	38.1

pt1-3 : subtype B症例のPBMC由来DNA 300ng

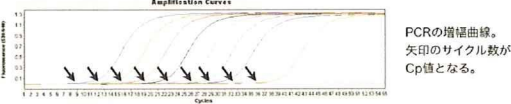
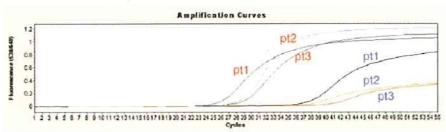


図4 gag vs gag2



pt1-3 : subtype B症例のPBMC由来DNA
↓
GFRのprimer pairで1st PCR (20 cycles)
↓
gag及びgag2のprimer pairでTaqman PCR

感染症の自然歴のうち、この潜伏感染細胞がいつ樹立するかは明らかではない。感染早期から樹立すると考えられる一方、無症候期においても残存プロウイルス量が検出されない症例も存在している。従って急性期に治療を開始した場合は残存プロウイルス量が低いことが予想され、実際低レベルに抑えられていた (図1)。しかし、急性期治療例では半数以上の症例で測定感度未満となったため、どのレベルまで残存プロウイルス量を抑えられるかは現時点では明らかでない。本年度は、それらの点を明らかにするため、残存プロウイルス量測定の高感度法の開発に取り組んだ。

研究方法

抗HIV療法が導入され血中HIV-RNA量が感度未満で維持されている症例を対象とし、informed consentのもとに採血を行った。末梢血単核球 (PBMC) もしくはCD4陽性Tリンパ球を分離し、DNAを抽出した。精製したDNAを鋳型として、Lightcycler DX400を用いてTaqMan PCR法によりコピー数を決定した。HIV-DNA量は1 μ gに含まれ

るコピー数として算出した。

(倫理面への配慮)

残存プロウイルス量の測定に関しては疫学研究に相当し、院内の倫理委員会に相当する受託研究審査委員会に研究課題「HAART著効例における末梢CD4陽性Tリンパ球中の残存プロウイルス量とその転写活性能の把握」を提出し承認を取得した。この審査委員会で審査・受理された方法で研究を遂行し、具体的には文書での同意の取得や、検体処理やデータ管理の際の匿名化などを行った。

研究結果

まず、先行研究で用いられた2種のPCRの条件に加え、5種についてPCRの効率を検討した。1つはLTRとgag遺伝子の境界領域に位置し、残りはgag遺伝子内とし、本研究では仮に図2のように命名した。サブタイプB症例のPBMC由来のDNA300ngを鋳型としてリアルタイムPCRを行い、まずPCRの増幅曲線が立ち上がるCp値での比較を行った (図3)。

先行研究で用いたgagでは、pt1およびpt2において増幅を認めなかった。他の組み合わせにおいては多少前後があるものの、Cp値は36～40サイクルであった。gagとgag2はGFRのアンプリコン内に設計されているため（図2）、nested PCRが可能である。そこで、図2で用いたDNAをまずGFRのプライマーペアで20サイクル増幅し、その後gagおよびgag2の組み合わせでリアルタイムPCRを施行した（図4）。gag2では24～27サイクルで増幅曲線の立ち上がりが見られたが、gagでは36サイクル前後であった。以上のことから臨床検体を用いた場合、gagではPCRの効率が落ちていることが明らかとなった。そこで、gag2を用いてコピー数の算定を行った。まず、抗HIV療法を行い、血中HIVRNA量が測定感度未満の症例よりPBMCを採取し、300ngのDNAを鋳型として、1 μ gDNAあたりのコピー数として算出した。慢性期にARTを導入した7症例では、116～1221copies/ μ gDNAとなった。一方、急性期に抗HIV療法を導入し先行研究では複数の測定で感度未満であった1例においては、41cp/ μ

gDNAと測定可能となった。本手法のCV値は図6に示されるように、50copiesの場合でintra-assayで35%、inter-assayで20%であった。また、少数の症例であるがARTが導入され血中HIV-RNA量が感度未満の4症例に対してCD4陽性Tリンパ球を分離してHIV-DNA量を測定した（図7）。530～4600copies/ μ gDNAに分布していた。また、鋳型となるDNAを希釈して測定したところ、いずれの4症例もそのコピー数は25%に近い結果となった。

考察

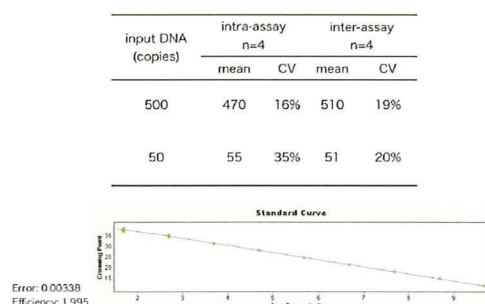
昨年度、急性期にARTが導入された末梢血残存プロウイルス量の測定を行った。うち2症例は複数回の測定によっても感度未満が持続していた。慢性期のほうが治療期間の長い症例が占めている割合が多いにも関わらず、急性群で残存プロウイルス量が統計学的有意差をもって低値であった。この説明の一つとして、2つのメカニズムが想定される。一つは、潜伏感染細胞が樹立される前にARTが開始されることである。このような潜伏感染細胞がいつどのように樹立されるかは明らかではないが、治療開始前のCD4陽性リンパ球数と今回測定した残存プロウイルス量が逆相関することから、病期の進展に伴い徐々に増加すると考えられる。もう一つのメカニズムとしては、ARTによりHIVの逃避変異の進展と免疫系の破壊を防ぐことがあげられる。ARTにより新規のウイルス粒子の形成や、ウイルスゲノムの組み込みが抑えられる事によって、潜伏感染細胞が保有するHIVは逃避変異のないHIVに限定することになる。従い、ARTにてHIVの増殖が抑えられ免疫力が回復した場合、免疫細胞による潜伏感染細胞の監視により有効になる可能性がある。この仮説に従うと、急性期でARTが導入された症例と慢性期でARTを導入した症例では、残存プロウイルス量の低下速度が異なることを意味している。先行研究では、観察期間が短かったことや急性期にARTを導入し

図5 PBMC中のHIV-DNA量

patients	cp/ μ gDNA
chronic	1 307
	2 1221
	3 116
	4 660
	5 525
	6 885
	7 261
acute 1	41

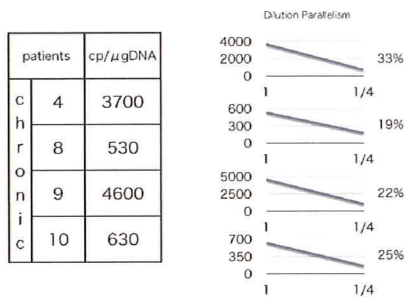
抗HIV療法を行い、血中HIV-RNA量が感度未満の症例よりPBMCを採取し、300ngのDNAをテンプレートとした。

図6 CV値



研究発表
該当なし

図7 CD4陽性Tリンパ球中のHIV-DNA量



た症例の大多数で測定感度未満であったことから、個々の症例の低下速度までは算出不可能であった。先行研究での残存プロウイルス量の推定半減期は約4年（1400日）であったことから、10年近くの観察が必要とされる。

潜伏感染細胞の解析からARTによって体内のHIVが駆逐されるには50年以上必要と報告されている。その報告と本研究の方法は異なるが、急性期で治療を開始した症例の潜伏感染細胞が少なくなれば、当然50年を待たずして体内から駆逐される可能性があり、完治の恩恵に預かれるHIV感染者も出現するかもしれない。もしそのような可能性が強く提示されれば、急性期の治療方針は原則経過観察から、速やかに治療開始に変更されることになる。今回開発を行った高感度法を用いて、治療の終焉についても検討していきたい。

結論

急性感染期でARTを導入した症例は、慢性期でARTを導入した症例と比較し残存プロウイルス量は低値であった。急性感染期での治療例の多くは測定感度未満であったため、さらなる高感度法の開発を行った。次年度は本手法を用いて測定を行い、急性期に治療導入をした場合、どのレベルまで残存プロウイルス量が抑えられるかを明らかにしたい。

健康危険情報
該当なし

3

急性感染例の血清サイトカイン値の測定によるHIV感染症の病態解析

研究分担者：渡邊 大（国立病院機構大阪医療センター エイズ先端医療研究部 HIV 感染制御研究室）

研究協力者：白阪 琢磨（国立病院機構大阪医療センター エイズ先端医療研究部）

上平 朝子（国立病院機構大阪医療センター 感染症内科）

研究要旨

急性 HIV 感染症の病態形成に関与するサイトカインを明らかにするために、急性 HIV 感染症と診断された 16 症例を対象に、急性期症状の緩和後に検体を採取して、各種血中サイトカイン・ケモカイン・接着分子について解析を行った。急性期では慢性期の症例と比較して IL-18 が特に高い傾向を示した。無症候期における IFN- γ によって、IFN- γ 陽性群と IFN- γ 陰性群に分類が可能であり、それぞれの急性期のサイトカインの発現パターンが異なっていた。IFN- γ 陰性群において IL-6・IL-10・IL-18 が高値を示した。臨床データとの相関については、IL-18 と CD4 数の上昇との間に、sICAM-1 および IP-10 と血中ウイルス量との間に統計学的有意な相関関係を認めた。

研究目的

HIV 感染症は HIV が CD4 陽性細胞に感染することによって引き起こされる感染症である。持続的なウイルス産生により CD4 陽性 T リンパ球が破壊され機能不全におちいり、後天性免疫不全症候群、いわゆる AIDS を発症することになる。HIV 感染症は単一のウイルスによる感染症であるが、その臨床経過は同一のものではなく、様々な経過をたどることが知られている。急性期から治療導入後までの期間にそれらの例は数多く挙げることができる。具体的には急性期症状が強い症例と全く出現のない症例、急性感染後にウイルスの増殖のコントロールが良好であり長期未発症者となる症

例とセットポイントのウイルス量が高く感染後 1-2 年で治療が必要となる症例、CD4 陽性リンパ球数が 200/ μ L 以上あるにもかかわらず AIDS を発症する症例と CD4 陽性リンパ球数が極度に低下しているにもかかわらず日和見感染症を認めない症例、抗 HIV 療法にてすぐに免疫能が回復する症例と CD4 陽性リンパ球数の上がり幅が少ない症例などである。

このようなウイルス学的、免疫学的な個体差がある原因として、宿主側、ウイルス側、それぞれ多くの要因が推定されているが、未だに明らかにされていない。本研究では、そのような免疫学的効果の差異の宿主側要因を明らかにするために血中のサイトカインに加え、ケモカインや接着分子にも着目した。サイトカインにはインターロイキン、インターフェロンなどがあり、いずれも免疫応答において重要な細胞間伝達物質である。サイトカインはそれぞれに特異的な細胞表面受容体に結合して細胞内にシグナルを伝え、遺伝子発現に変化をもたらす。1つのサイトカイン産生が他のサイトカイン産生や応答にも影響を及ぼ

図1 血清サイトカイン値の測定(1)

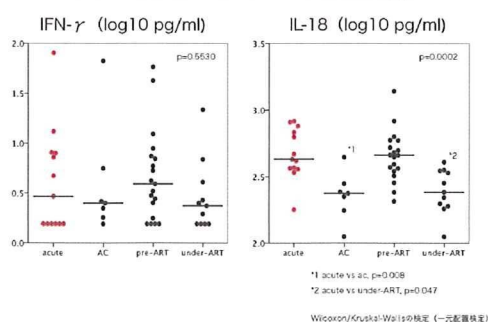
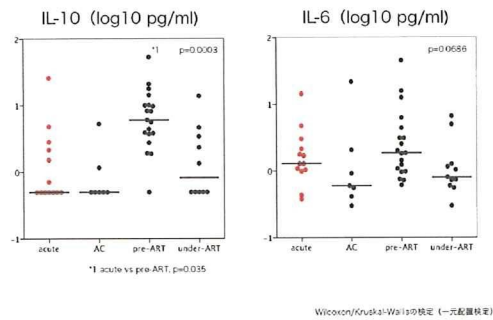


図2 血清サイトカイン値の測定(2)



す事も知られており、サイトカイン産生は免疫の複雑なネットワークを形成し、巧みに免疫応答制御に関与しているとされている。ケモカインや接着分子も同様なメカニズムを擁している。昨年度はInterferon (IFN) - γ 、Interleukin (IL) -6、IL-10、IL-18に注目し、急性期ではIL-18が高値をとること、IFN- γ とIL-18が相反関係にあることを示した。本年度は新たに症例をエントリーするとともに、他のサイトカインやケモカイン・接着分子の測定も行い、それらの解析を行った。

研究方法

20歳以上のHIV-1感染患者のうち同意が得られたものを対象とした。同意取得の後、血清を採取し、IFN- γ 、IL-6、IL-10、IL-18の4種のサイトカインに加え、TNF- α 、sICAM-1、IP-10、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-12、IL-17、IL-23についてELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) 法で測定した。患者を感染早期群 (early)、無症候群 (AC)、免疫低下群 (pre-ART)、治療継続群 (under-ART) の4群にわけ、血清サイトカイン値を比較した。感染早期群は「急性HIV感染症と診断されてから1から3ヶ月以内」の症例、無症候群は「CD4陽性リンパ球数が300/ μ l以上に保たれており、症状を有さず、抗HIV療法も未実施」の症例とした。免疫低下群とは「CD4陽性リンパ球数が300/ μ l未満であるが、活動性の日和見感染症は有しておらず、HAART導入が適応となった」症例、治療継続群とは「1年間以上HAARTが継続されており、かつ血中

HIV-RNA量が50copies/ml未満を継続している」症例とした。それぞれの群間比較についてWilcoxon検定を用い、有意水準を5%とした。サイトカイン値と血中CD4陽性リンパ球数、血中HIV-RNA量との相関に関しては、Spearman's rank検定を用い、有意水準を5%とした。

(倫理面への配慮)

本研究は国立病院機構大阪医療センターの倫理委員会に相当する受託研究審査委員会で審査・承認を受けた。具体的には文書でもって同意を得ること、資料は匿名化の処理を行うこと、個人情報管理は厳重に行うこととした。

研究結果

急性HIV感染症と診断された16例から検体を採取した。IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-12、IL-17、IL-23については、測定を行った大多数の検体で測定感度未満であったため解析から除外した。急性期でのサイトカインの発現パターンを明らかにする

図3 血清サイトカイン値の測定(3)

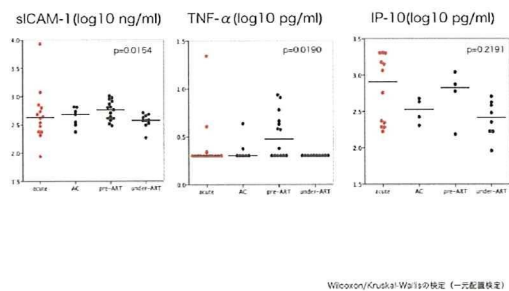
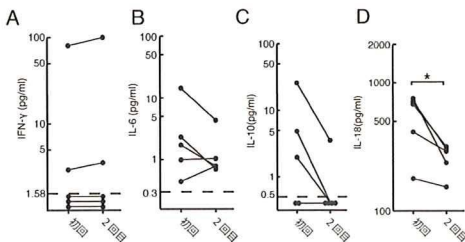
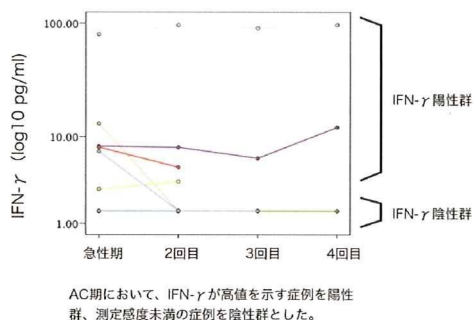
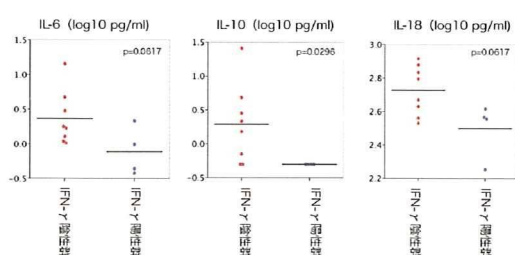


図4 血清サイトカイン値の推移



*: p<0.05
**: p<0.01

ために、慢性期症例の測定結果との比較を行った。それぞれの群を感染早期群 (acute)、無症候群 (AC)、免疫低下群 (pre-ART)、治療継続群 (under-ART) と分類した。感染早期群に関しては、急性期症状がある程度終息し、無症候期への移行時に測定を行った。IFN- γ (図1左) はいずれの群においても、高値をとる症例が存在し、統計学的有意差は認められなかった。IL-18 (図1右) は感染早期群と免疫低下群において有意に上昇していた (acute vs ac; $p=0.008$, acute vs under-ART; $p=0.047$)。IL-10 (図2左) と IL-6 (図2右) は免疫低下群において有意に上昇を示した。感染早期群においては無症候群や治療継続群よりも高値で免疫低下群より低値である傾向を認めたものの有意差は認められなかった。sICAM-1 (図3左) と TNF- α (図3中) も IL-10 と同様な傾向を示した。IP-10 (図3右) は感染早期群で高い傾向を示したが、統計学的有意差は認めなかった。以上のことから、今回測定したサイトカインの中では IL-18 が急性期に高値となることが明らかとなった。

図5 IFN- γ の推移図6 Interferon- γ とIL-6・10・18の関連

Wilcoxonの検定

次に IFN- γ ・IL-6・IL-10・IL-18 の4つの時間の推移について検討を行った。2回目は無症候性キャリア期で検体を採取した。IL-6、IL-10、IL-18 は無症候性キャリア期で低下していた (図4B-D) が、IFN- γ は変化を認めない症例が存在した (図4A)。IFN- γ についてさらに検討を行ったところ、急性期には IFN- γ が高くそれが無症候性キャリア期まで持続する症例と、急性期は高いがその後低下する症例、急性期から IFN- γ が低い症例が存在していた (図5)。そこで、無症候性キャリア期での IFN- γ 値によって、IFN- γ 陽性群と IFN- γ 陰性群に分類した。この2群に分けて、急性期の IL-6・IL-10・IL-18 の比較を行った (図6)。いずれも IFN- γ 陰性群で高値となる傾向が認められた。以上のことから、無症候期の IFN- γ 値によって、急性期のサイトカイン産生のパターンが異なることが明らかとなった。

次に サイトカン値と CD4 陽性リンパ球数 (急性期および無症候性キャリア期) との比較を行った (図7)。無症候性キャリア期になる前に治療を開始した症例は解析から除外した。急性期の CD4 数との間に相関を認めなかったが、CD4 数の上昇と IL-18 との間に有意な相関関係を認めた ($p=0.044$)。散布図および回帰分析の結果を図8に示した。IL-18 が低値となる IFN- γ 陽性群を赤点で示しているが、CD4 数の上昇が少ないところに集中していた。最後に サイトカイン値と血中ウイルス量 (VL) との相関について検討した (図9)。無症候性キャリア期になる前に治療を開始した症例は上述と同様に解析から除外した。sICAM-1 や IP-10 が急性期および無症候性キャリア期の VL と相関を示していた。回帰分析においても同様な結果が得られた。以上のことから IL-18 および IFN- γ が CD4 数の上昇と、sICAM-1 および IP-10 が VL と関連を示していた。

考察

本研究によってHIV感染症において急性期特有のサイトカインの発現異常がある事を明らかにした。慢性期においてはサイトカインの変動の理解は容易であり、無症候性キャリアの症例においては図1-3に示した通り多くのサイトカイン・ケモカインで血清中の値は低く、病期の進行とともに上昇し、抗HIV療法の施行によって低下していた。唯一、このパターンに当てはまらないものがIFN- γ である。たしかにIFN- γ も病期の進行によって高値をとるが、無症候性群や治療継続群も多い。しかし、このような症例に対して抗HIV療法を導入しても、一部の症例でIFN- γ の低下を認めない。以上のことから、IFN- γ は病期や治療に関係なく血清中の濃度上昇を示す症例が存在し、HIVの感染そのものによって上昇している可能性を示している。

無症候性キャリア期におけるIFN- γ により2群に分け、この2群でサイトカインの発現パターンが異なっていたことも上記の仮説とは矛盾していない。IFN- γ が上昇していることはTh1サイトカインが優位であることを意味し、これはTh2サ

図9 血清サイトカイン値とVLの相関

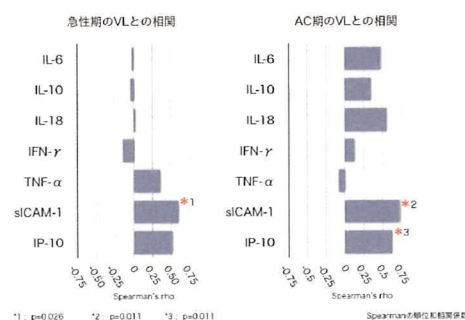
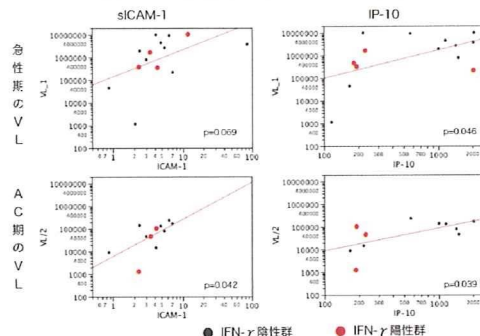


図10 VLとsICAM-1, IP-10の相関



イトカンであるIL-6およびIL-10が低値となることと合致する。IL-18に関しても、クローニングの際にはTh1サイトカインとして同定されたが、実際は周りの環境によってTh1サイトカインとしてもTh2サイトカインとしても両面の機能を発揮することができるかと報告されている。IL-18が生体内でHIVの急性感染においてどのような作用を有しているか明らかでないが、今回の解析結果を検討するとTh2サイトカインとして機能していることが示唆された。

VLはsICAM-1およびIP-10と関連し、CD4数はIL-18との関連を示していた。確かに、IL-18が高い症例ほど、急性期のCD4数が高く、無症候性キャリア期でのCD4数の高い傾向を認めた。これに合致しなかったのが、IFN- γ 陽性群の1症例である(図8の赤点のうち一番左の症例)。この症例はIFN- γ が異常高値(90~100pg/ml)で推移し、VLも無症候性キャリア期においては1000copies/mlで推移している。慢性感染の症例でIFN- γ の異常高値の1症例(図1)のVLも同様に推移していることを踏まえると、IL-18だけではなくIFN- γ も、

図7 血清サイトカイン値とCD4数の相関

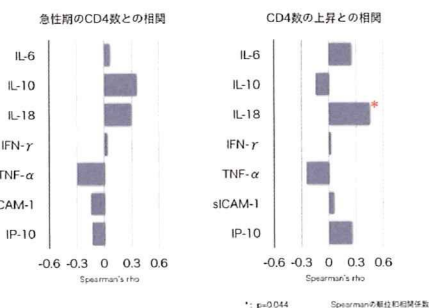


図8 CD4数の上昇とIL-18との相関

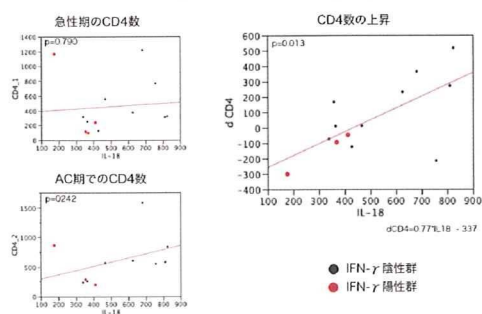
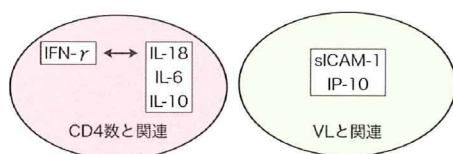


図11 血清サイトカイン値の解析 まとめ



知的財産権の出現・登録状況

該当なし

極端な高値になった場合にHIVに感染してもCD4数が低下しない症例になることが考えられる。いずれにしてもIFN- γ の異常高値の症例は10%前後のため、IFN- γ とCD4数との関連性を明らかにするには、より多くの症例の解析が必要となる。

今回の検体は、超急性期の検体ではなく、急性期の症状が収束した時の検体を用いて解析を行った。急性期の解析も重要であるが、多くのサイトカイン値が異常高値をとることや、症例数が少ないために解析が困難であった。今年度の研究にてIL-18とIFN- γ の2つが特に重要であることが示唆されたが、来年度は急性期に対しても症例の蓄積とともに他のサイトカインの解析やその意義に関する分析を進めていきたい。

結論

本研究にてHIV感染症におけるサイトカインの発現異常を明らかにした。無症候性キャリア期のIFN- γ によって2群に分類でき、IFN- γ 陰性群で急性期のIL-18・IL-6・IL-10が高値になることを示した。IL-18とCD4数の上昇との間に、sICAM-1・IP-10とVLとの間に相関関係を認めた。

健康危険情報

該当なし

研究発表

該当なし

4

急性HIV感染症の入院例の分析（多施設共同調査）

研究分担者：上平 朝子（国立病院機構大阪医療センター 感染症内科）

研究要旨

急性 HIV 感染症は、慢性期と診断方法が異なることもあり、診断がつかないまま無症候性キャリア期に移行している例も多いと考えられる。そのため確定診断に至る症例数も少なく、いまだ標準的な治療法は確立されていない。急性 HIV 感染症の病態を明らかにするために、捕捉率の高いブロック拠点病院の入院症例について症例票を回収し、特に抗 HIV 療法について中心に解析を行った。2000 年から 2009 年までに 37 例の入院症例があった。臨床試験に組み込まれた 3 例を除外すると、34 症例中 11 症例が急性期入院中に抗 HIV 療法が導入されていた。髄膜炎、血球貪食症候群、急性肝炎、急性リンパ節炎のほか、潰瘍性大腸炎様の急性腸炎を呈した症例も認めた。急性期の CD4 陽性リンパ球数が低い症例ほど、早期に抗 HIV 療法が導入される傾向にあった。急性 HIV 感染症の病態は多種多様であり、治療の適応も含め、症例の蓄積は必要であると考えられた。

研究目的

急性 HIV 感染症は診断方法が慢性期と異なることもあり、その多くが見過ごされていると考えられている。従い、国内において HIV 感染者数が増加しているにもかかわらず、急性期で診断される症例数が少ないがために、標準的治療法も存在しないのが実情である。通常は無治療で改善するが、症状が遷延化、重症化した場合は抗 HIV 療法が有効である。しかし、実際の開始基準は個々の症例で判断せざるをえない。また、急性期で入院加療が必要であった HIV 感染者は感染後 1-2 年で抗 HIV 療法が適応となることも多い。加えて、高レベルのウイルス血症のために感染力も高くスーパープレッダーとなる可能性も報告されている。そのため急性期での確実な診断が求められる。そこで HIV 感染症の捕捉率の高い 3 ブロック拠点病院（大阪医療センター・名古屋医療センター・九州医療センター）に入院した急性 HIV 感染症の症例を対象とし、その実態調査を行った。

研究方法

独立行政法人国立病院機構大阪医療センター・名古屋医療センター・九州医療センターに受

診した HIV 感染者のうち、急性 HIV 感染症と診断された入院例について症例票の回収を行った。なお、発熱や倦怠感といった急性期症状が出現後 1 ヶ月以内に PCR 法陽性・Western blot 法陰性もしくは判定保留で診断された症例を対象とした。

（倫理面への配慮）

各々の施設の倫理審査後に症例票の回収を行った。個人が特定されないように、氏名・住所・生年月日・カルテ番号といった項目は調査項目から外し、年齢は 30 代等で記載した。臨床情報の取り扱いには注意を行った。また、本研究に関する情報をホームページ上 (<http://www.onh.go.jp/khac/center/koukaibunsho.html>) で公開した。

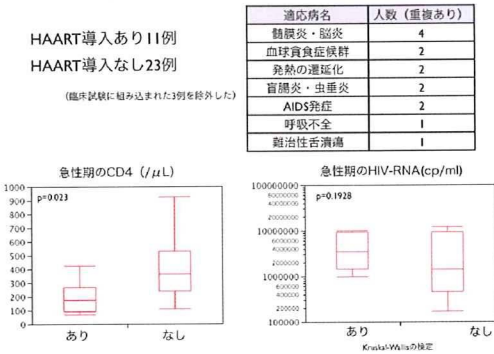
研究結果

各施設で急性 HIV 感染症と診断された入院症例数は、表 1 に示した通りで、2000 年から 2009 年までは 37 名の入院があった。患者背景は図 1 に示した。年齢は 30 代が最も多かったが、40 代以上は 3 名と慢性感染の初診患者と比較して若い傾向を認めた。全員男性であり、推定感染経路も多くは同性間性的接触であった。初診年に関しては、感

図1 急性HIV感染症の患者背景

年齢		初診年	
10代	3名 (8%)	2000年	1名 (3%)
20代	13名 (35%)	2004年	5名 (14%)
30代	18名 (49%)	2005年	3名 (8%)
40代	2名 (5%)	2006年	2名 (5%)
50代	0名 (0%)	2007年	9名 (24%)
60代	1名 (0%)	2008年	6名 (16%)
性別		2009年	11名 (30%)
男性	37名 (100%)		
女性	0名 (0%)		
推定感染経路			
同性間	35名 (95%)		
異性間	2名 (5%)		

図2 急性期入院中のHAART導入症例 (1)



染早期の症例を対象にして臨床試験が行われた2004年に5名とやや多かったが、その年を除くと、2007年以降から増加していることが明らかとなった。37症例中、臨床試験に組み込まれた3例を除外して34例のうち、11例でHAARTが急性期入院中に行われていた (図2)。施行された対象疾患は、髄膜炎・脳炎の4例が最も多かった。HAARTが導入された11例と導入の23例の急性期のCD4数と血中ウイルス量を比較すると、HAART導入があった11例で有意にCD4数が低く (中央値180/ μ l、最低68/ μ l、最高424/ μ l)、血中ウイルス量も有意差を認めないものの、大多数の症例で10の6乗コピー/ml以上であった。急性期入院中のHAART導入時期は入院日から換算して1週間前後、症状が出現してから3週間前後の症例が多かった (図3)。HAARTのメニューはtenofovir/emtricitabine配合剤とlopinavir/ritonavir配合剤が半数以上の6例で選択されていた。一方、急性期入院中にHAARTが導入されず、無症候性キャリアとなった23例についての経過についても解析を行った (図4)。2009年12月の段階で約半数の11例においてHAARTが導

入されており、入院日からHAART導入までの期間は中央値で318日であった。急性期と3ヶ月後のCD4数を図4右に示した。2009年12月の時点でHAARTが導入された症例を赤線で示したが、3ヶ月後のCD4数が500/ μ l以下の症例の大多数で治療が導入されていた。入院37症例の症状および診断名を図5に示した。髄膜炎・脳炎や血球貪食症候群、肝機能障害はよく知られているものであるが、下痢といった消化器症状も認めた。具体的には大腸ファイバーで潰瘍性大腸炎と診断可能であった腸炎、急性盲腸炎、急性虫垂炎、多発性直腸潰瘍の症例も認めた。また、AIDS発症も2例認めた。ニューモシスチス肺炎の1例は、入院時にはニューモシスチス肺炎の所見を認めなかったものの、経過中に呼吸不全・ β Dグルカンの上昇・典型的な胸部CT所見で診断された。他のウイルス感染症の併発 (図6) に関しては、急性B型肝炎と急性HIV感染症の重複感染を3症例認めた。また、IgM抗体のみでは評価は困難であるが、サイトメガロ (CMV) -IgM抗体陽性 (高力価) 例を3例、ムンプスウイルスIgM抗体陽性を1例、水痘・帯状疱疹ウ

図3 急性期入院中のHAART導入症例 (2)

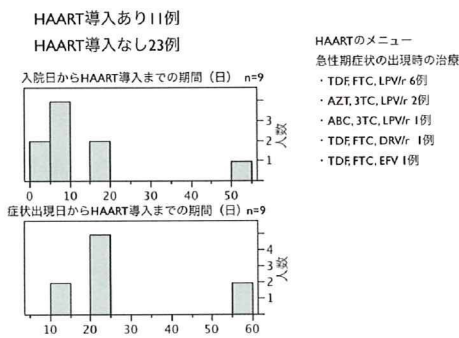


図4 急性期にHAARTが導入されず無症候性キャリアとなった23例の経過

