

201029037A

平成22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 22 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 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…………… 13

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 急性感染期での抗 HIV 療法の導入の意義…………… 17

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）…………… 21

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…………… 25

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…………… 29

研究分担者：横幕 能行（国立病院機構名古屋医療センター、エイズ・感染症診療医長）

# 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・エイズ治療開発センター）

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（大阪・名古屋・九州）と2中核拠点病院（東京・大阪）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。昨年度に改良を行った測定系を用いて、感染早期に抗HIV療法を導入した症例の残存プロウイルス量を測定した。【結果】急性HIV感染症の入院99症例について検討を行い、約1/4が急性期入院中に治療が開始されていた。他のウイルスに対するIgM抗体が1/3の症例で上昇し、B型急性肝炎の合併を5例に認めた。IFN- $\gamma$  高値持続群と陰性群に分けられ、陰性群においては血清IL-18とCD4数との間に、血清IL-6・sICAM-1・ケモカインと血中ウイルス量と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、感染早期に治療を開始した7症例は慢性期に治療を開始した25症例と比較して有意に残存プロウイルス量の低下を認めたが、中央値から推定すると数倍の低下であった。【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として、IFN- $\gamma$  とIL-18、CD4数の関連を明らかとした。感染早期に治療が開始された症例の残存プロウイルス量は低レベルに抑えられていた。

## 研究目的

急性HIV感染症は、正しく診断されずに見逃されているケースが多い疾患である。これは診断が難しいことに加え、その病態が十分認知されていないためである。症例数が確保できないがために、国内においてはほとんど研究が行われていない。しかし、急性HIV感染症は単なる感染初期に出現する症状ではなく、多彩な病態をとり入院症例も増加している。このようなことから、急性HIV感染症の免疫学およびウイルス学的な視点からの解析と、国内における急性HIV感染症の実態調査から治療に関連した病態解析を行うことを目的とした。

我々は先行研究と、HIV感染症の慢性期における血清のサイトカインの推移について検討した(Watanabe et al., *Viral Immunol.* 2010)。多くのサイトカインは免疫低下時に上昇し、無症候期や抗HIV療法(ART)導入後の安定期においては低下している。しかし、Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) はエイズ発症期のみではなく無症候期においても異常高値を呈し、ARTを導入し

てHIV-RNA量(VL)が感度未満となっても低下することなく高値で維持される症例が約2割存在している。これは検索しえたサイトカインの中でIFN- $\gamma$  特有の現象である。このような先行研究のデータを基に、免疫応答の初めの段階である急性期に注目して、血清サイトカイン値の解析を行った。

金田らによって開発されたnested PCRを用いる残存プロウイルス量の高感度測定法(Kaneda et al. *J. Virol. Methods.* 2005)を用いて、平成20年度にARTを長期間継続し血中のVLが測定感度未満で維持されている症例を対象に残存プロウイルス量の測定を行った。感染早期にARTが導入された症例においては、残存プロウイルス量が低レベルに押さえられており、6症例中3症例において測定感度未満であった。これは慢性期に治療を開始した63症例(中央値34、最小2未満、最大3224コピー/10<sup>6</sup> CD4陽性Tリンパ球)と比較して有意に低下していた(Watanabe et al. submitted)。しかし、半数が測定感度未満であったため、どの程度まで抑えられているかは不明であった。

そこで、平成21年度はTaqMan PCR法によるさらなる高感度法の開発を行い、本年度はその方法による残存プロウイルス量の測定を行い、感染早期のART導入の効果について検討を行った。

昨年度はHIV感染症の捕捉率の高い3ブロック拠点病院にて急性HIV感染症の実態調査を行った。37例の入院例について検討し、約1/3が入院中に、約1/3が発症後1年以内にARTが導入されていた。その解析の中で、他の急性ウイルス感染を併発したと考えられる症例を認めた。そこで今年度は症例数を増やすとともに、抗ウイルスIgM抗体価を中心に実態調査を行った。

## 研究方法

3ブロック拠点病院（大阪・名古屋・九州）・2中核拠点病院（東京・大阪）で急性HIV感染症と診断された入院症例について、臨床情報を診療録から回収し、後ろ向きに解析を行った。20歳以上の急性HIV感染症患者より血清を採取し、サイトカイン（IFN- $\gamma$ 、Interleukin(IL)-6、IL-18など）、接着因子（ICAM-1）、ケモカイン（CCL2/MCP-1、CCL3/MIP-1 $\alpha$ など）についてELISA法による測定を行い、CD4数やART導入との関連性について検討した。ART導入HIV感染症患者より血液を採取し、残存プロウイルス量の測定を行った。

（倫理面への配慮）

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承認が得られた方法を用いて研究を行った（承認番号0614・0973・0912）。検体採取にあたっては、文書同意を得た。臨床情報のみを扱う研究はホームページ上で研究に関する文書を公開した。

## 研究結果

血清サイトカイン値の測定は21症例（本年度は6症例が新規にエントリー）から同意を取得し、発熱といった急性期症状が緩和された後に測定を行った。IFN- $\gamma$ の高値が持続する群（4症例）とIFN- $\gamma$ が陰性の群（14症例）に分類し、まずサイトカイン値の比較を行った。IFN陰性群においてIL-18とIL-10が有意に上昇していた（それぞれWilcoxon test:  $p = 0.0495$ 、 $p = 0.0471$ ）。IFN- $\gamma$ 陰性群においてセットポイントのCD4

数とIL-18に統計学的有意な相関を認めた

（Spearman's rank test:  $p = 0.0413$ , regression analysis:  $p = 0.0209$ ）。次にVLとの関連について検討した。急性期のVLとCCL19（Spearman's rank test:  $p = 0.021$ ）・ICAM-1（ $p = 0.0258$ ）、セットポイントのVLとIL-6（ $p = 0.0136$ ）、CXCL10（ $p = 0.0426$ ）、ICAM-1（ $p = 0.0112$ ）との間に相関関係を認めた。以上のことから、IFN- $\gamma$ とIL-18がCD4数に関係し、IL-6・ICAM-1・ケモカインがVLに関係していることが示された。

残存プロウイルス量の測定に関しては、ARTを継続し、VLが測定感度未満で維持されている症例を対象とした。TaqMan PCR法で測定したCD4陽性Tリンパ球中の残存プロウイルス量（32例）は中央値で290 copies/10<sup>6</sup> CD4陽性Tリンパ球であった。一方CD14陽性単球中の残存プロウイルス量は5例全例で測定感度未満であった。次にTaqMan PCR法とポワソン分布法との相関について検討した（13例）ところ、良好な相関性が認められた（回帰分析:  $\log y = 0.135 + 0.949 \log x$ ,  $p < 0.0001$ ）。感染早期にARTが導入された7症例（中央値140 copies/10<sup>6</sup> CD4陽性Tリンパ球）と慢性期に導入された25症例（中央値440 copies/10<sup>6</sup> CD4陽性Tリンパ球）の比較を行ったところ、感染早期群にて残存プロウイルス量の低下を認めた（Wilcoxon検体、 $p = 0.0058$ ）。その低下は中央値から推定した場合、数分の1と考えられた。

各研究施設に急性HIV感染症（発熱などの急性期症状を伴いwestern blot法が陰性もしくは判定保留で診断された症例）で入院した99例の症例票を回収した。急性期のCD4陽性Tリンパ球数の中央値は295/ $\mu$ lであり、28例が入院中に抗HIV療法を導入された。HIV以外の抗ウイルスIgM抗体は54症例に対して測定されており、いずれかの検査で陽性もしくはボーダーラインとなったのは18例（33%）であった。他の急性ウイルス感染症との併発と臨床的に診断されたのは10例（10%）であり、B型急性肝炎との合併の5例（5%）が最多であった。最後に大阪医療センターにおけるHIV感染者のB型急性肝炎31症例について検討した。11例がHIV感染症で当院初診時に急性肝炎を呈しており、約半数の16例が初診90日以内の急性肝炎の発症であった。

## 考察

血清サイトカインの解析は、今年度6症例を新規にエントリーし、測定項目を増やしたが、昨年度とほぼ同様の結果となった。特にセットポイントにおけるCD4数とIL-18との間に有意な関連性を認めた。IL-18が上昇していた症例では、早期にARTを導入する必要がなく経過観察が可能であった。また、慢性期の症例の解析で認められたIFN- $\gamma$ が高値の症例は、急性期においても存在していた。IFN- $\gamma$ の発現の有無によって、IL-18やIL-10の発現が異なっていたことから、IFN- $\gamma$ の誘導は免疫破壊によるものではなく、ウイルスに対する免疫反応の差異であることが示唆された。

残存プロウイルス量の測定に関しては、従来法よりも高い感度の測定系で行い、感染早期での治療例では数分の1に抑えられていたことが明らかとなった。ARTによってVLが感度未満で維持されている症例における残存プロウイルス量が、臨床士上のような位置づけとなるかは、治療中断の指標等を含め、明らかとされていない。そのため、数分の1に減少していることの臨床的な意義は、10年程度の長期間測定を継続して検討を加える必要がある。

急性HIV感染症と他の急性ウイルス感染症の併発を10例に認めた。また、IgM抗体が約1/4の症例で陽性となったが、これは他のウイルスによる初感染との誤った診断につながる。ウイルス感染症を疑う場合は、CMVやEBウイルスの抗体価だけではなく、HIV検査も早期に行う必要があると考えられた。また、HIVとB型肝炎が比較的短期間の中で感染している症例の存在を認めた。これは感染の伝搬を考えるうえで重要な事項であり、両者の流行の起源の共通性を意味していると思われる。

なお、本研究にあたり、がん・感染症センター都立駒込病院感染症科味澤篤先生・スタッフ一同、大阪市立総合医療センター感染症センター白野倫徳先生・スタッフ一同にご協力をいただき深謝いたします。

## 結論

急性HIV感染症の入院例についてレビューを行い、他のウイルス感染症の併発やIgM抗体価に注意する必

要があると考えられた。急性期におけるIL-18とCD4数との間に関連性が示唆された。感染早期での治療例における残存プロウイルス量は慢性期治療例よりも有意に低く、数分の1に抑えられていた。

## 健康危険情報

該当なし

## 研究発表

原著論文による発表

欧文

- 1) Watanabe D, Uehira T, Yonemoto H, Bando H, Ogawa Y, Yajima K, Taniguchi T, Kasai D, Nishida Y and Shirasaka T. Sustained high levels of interferon-gamma during HIV-1 infection: Specific trend different from other cytokines. *Viral immunology*. 2010;23(6):619-25
- 2) Watanabe D, Taniguchi T, Otani N, Tominari S, Nishida N, Uehira T, Shirasaka T. Immune reconstitution to parvovirus B19 and resolution of anemia in a patient treated with highly active antiretroviral therapy: A case report. *J Infect Chemother*. in press.
- 3) Taniguchi T, Ogawa Y, Kasai D, Watanabe D, Yoshikawa K, Bando H, Yajima K, Tominari S, Shiiki S, Nishida Y, Uehira T and Shirasaka T. Three cases of fungemia in HIV-infected patients diagnosed through the use of mycobacterial blood culture bottles. *Intern Med*. 2010;49(19):2179-83.
- 4) Hattori J, Shiino T, Gatanaga H, Yoshida S, Watanabe D, Minami R, Sadamasu K, Kondo M, Mori H, Ueda M, Tateyama M, Ueda A, Kato S, Ito T, Oie M, Takata N, Hayashida T, Nagashima M, Matsuda M, Ibe S, Ota Y, Sasaki S, Ishigatsubo Y, Tanabe Y, Koga I, Kojima Y, Yamamoto M, Fujita J, Yokomaku Y, Koike T, Shirasaka T, Oka S, Sugiura W. Trends in transmitted drug-resistant HIV-1

and demographic characteristics of newly diagnosed patients: Nationwide surveillance from 2003 to 2008 in Japan. *Antiviral Res.* 2010 Oct;88(1):72-9.

#### 知的財産権の出現・登録状況

該当なし

#### 和文

- 1) 小川吉彦、渡邊大、佐子肇、坂東裕基、矢嶋敬史郎、谷口智宏、富成伸次郎、笠井大介、西田恭治、上平朝子、白阪琢磨。旅行者感染症として播種性ペニシリウム症を発症し治療が奏功した邦人HIV感染者の1症例。感染症学雑誌84(6):740-743, 2010。

#### 口頭発表

#### 国内

- 1) 渡邊大、伊部史朗、近藤恭子、上平朝子、南留美、笹川淳、矢嶋敬史郎、米本仁史、坂東裕基、小川吉彦、谷口智宏、笠井大介、西田恭治、山本政弘、金田次弘、白阪琢磨：残存プロウイルス量測定の臨床的意義について。第24回日本エイズ学会総会・学術集会、2010年11月、東京
- 2) 渡邊大、上平朝子、白阪琢磨、横幕能行、濱口元洋、南留美：急性HIV感染症の入院37症例の検討。第24回日本エイズ学会総会・学術集会、2010年11月、東京
- 3) 大北全俊、渡邊大、白阪琢磨：急性感染者の早期発見の促進に関する倫理的な課題について。第24回日本エイズ学会総会・学術集会、2010年11月、東京
- 4) 渡邊大、米本仁史、坂東裕基、小川吉彦、矢嶋敬史郎、谷口智宏、笠井大介、西田恭治、上平朝子、白阪琢磨：血漿HIV-RNA量が測定感度未満に到達するまで長期の日数を必要とした初回抗HIV療法導入例の解析。第24回近畿エイズ研究会学術集会、2010年6月、大阪
- 5) 白阪琢磨、富成伸次郎、小川吉彦、渡邊大、矢嶋敬史郎、米本仁史、坂東裕基、谷口智宏、笠井大介、西田恭治、上平朝子：Integrase領域の変異の出現を認めたRaltegravirによる治療失敗の2例。第24回日本エイズ学会総会・学術集会、2010年11月、東京



# 分担研究報告

## 2

## 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)

蘆田 美紗 (国立病院機構大阪医療センター エイズ先端医療研究部)

岡本瑛里子 (国立病院機構大阪医療センター エイズ先端医療研究部)

鈴木佐知子 (国立病院機構大阪医療センター エイズ先端医療研究部)

## 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21症例を対象に、急性期症状の緩和後と無症候期に検体を採取して、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。無症候期での測定値は急性期のものと比較して低下傾向であったが、Interferon (IFN)- $\gamma$ に関しては両者に大きな変化を認めなかった。急性期のサイトカイン値とCD4数・血漿中HIV-RNA量 (VL) について相関を検討したところ、急性期のHIV-RNA量 (VL) とsICAM-1、CCL19との間に、また、セットポイントのVLとInterleukin (IL)-6・sICAM-1・IP-10との間に相関関係を認めた。次に無症候期におけるIFN- $\gamma$ によって、IFN- $\gamma$ 高値持続群 (4例) とIFN- $\gamma$ 陰性群 (14例) に分類した。接着分子・ケモカインに関しては変化を認めなかったが、IL-6・IL-10・IL-18がIFN- $\gamma$ 高値持続群で低下傾向であった。最後にIFN- $\gamma$ 陰性群においてCD4数との相関について検討した。急性期およびセットポイントにおけるCD4数とIL-18に統計学的有意な相関を認めた。以上のことより、無症候期におけるIFN- $\gamma$ によって2群に分けられ、それぞれの群でサイトカインの発現パターンが異なること、IFN- $\gamma$ 陰性群においてはCD4数とIL-18に相関関係があること、IL-6・sICAM-1・ケモカインとVLに相関関係があることが明らかとなった。

## 研究目的

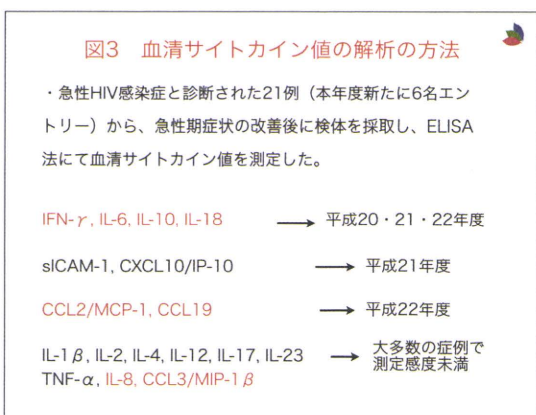
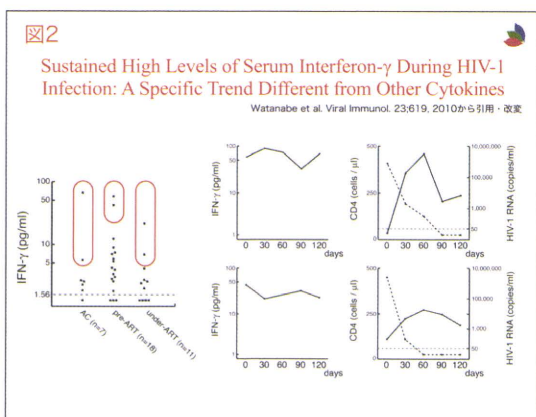
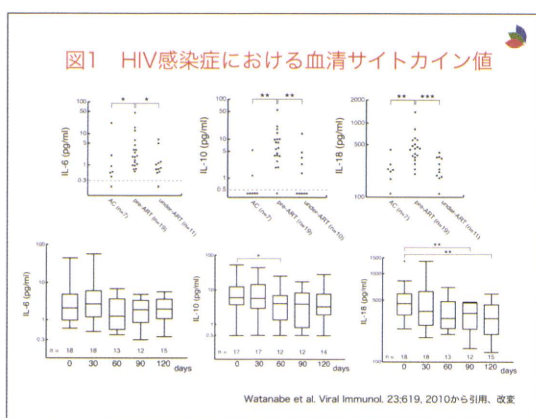
HIV感染症は単一のウイルス感染による疾患であるが、その経過は様々である。通常は、感染初期に発熱等の急性期症状を伴う高レベルのウイルス血症を生じる。その後、HIVに対する強力な液性免疫・細胞性免疫が誘導され、無症候キャリア期となる。急性期では多くの症例において症状が発現するが、症状のない急性HIV感染症患者も存在する。また、無症候性キャリア期においても血中のウイルス量が高い症例と、低い症例が存在し、ウイルス量と免疫不全の進行に相関があることが知られている。

このような経過の相違の原因として、宿主側およびウイルス側のさまざまな要因が推定されている。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・接着分子に着目した。サイトカインにはインターロイキン (Interleukin; IL)、インターフェロン (Interferon; IFN) 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おり、ケモカインや接着分子も同様のメカニズムを擁している。

我々は先行研究においてHIV感染症の慢性期における血清サイトカイン値の変動について解析を行った (Watanabe et al. *Viral Immunol.* 2010)。通常のサイトカインは、免疫が低下するとともに血清中のサ

イトカインが増加し、治療とともに低下する(図1)。しかし、このパターンに一致しないのがIFN- $\gamma$ である(図2)。すなわち、治療の有無に関係なく、抗HIV療法を数年行っても血清中のIFN- $\gamma$ が高値で持続する症例を2割存在することを報告した。このような先行研究の結果をもとに、IFN- $\gamma$ が急性期においてどのような関与をしているかを明らかにするために、本研究を開始した。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(図3)。



## 研究方法

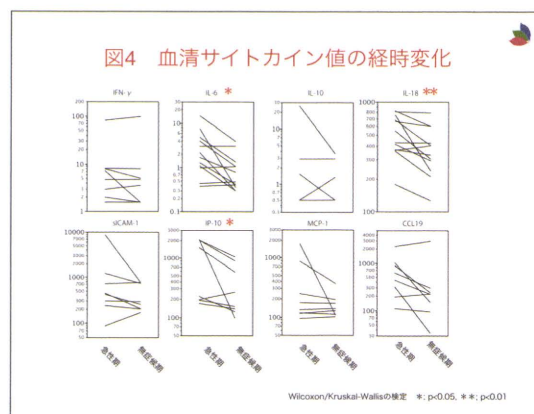
20歳以上のHIV-1感染患者のうち同意が得られたものを対象とした。同意取得の後、血清を採取し、IFN- $\gamma$ 、IL-6、IL-10、IL-18の4種のサイトカインに加え、sICAM-1、CXCL10/IP-10、IL-8、CCL3/MIP-1 $\beta$ 、CCL2/MCP-1、CCL19についてELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) 法で測定した。検体採取は急性期症状の緩和後と無症候期に行った。それぞれの群間比較についてWilcoxon検定を用い、有意水準を5%とした。サイトカイン値と血中CD4陽性リンパ球数、VLとの相関に関しては、Spearman's rank検定を用い、有意水準を5%とした。

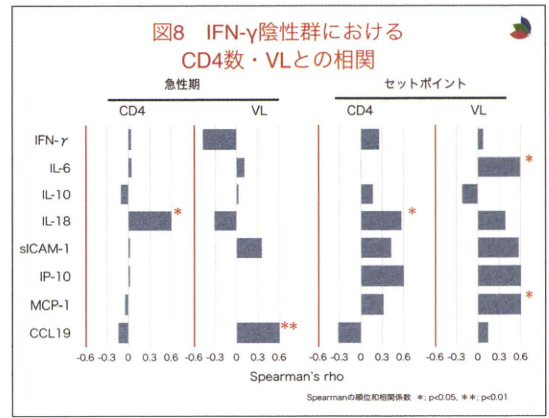
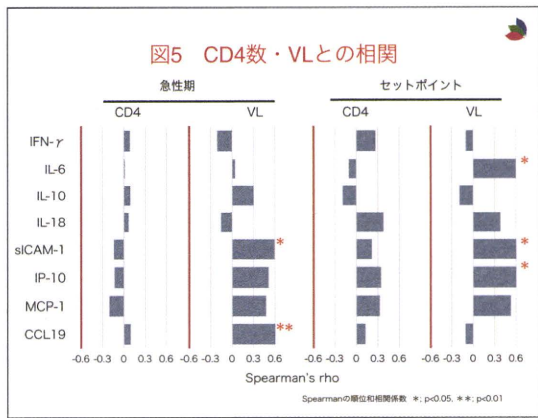
(倫理面への配慮)

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、個人情報の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21例から検体を採取した。IL-8、CCL3/MIP-1 $\beta$ については、測定を行った大多数の検体で測定感度未滿であったため解析から除外した。まず、急性期と無症候期においては血清サイトカイン値の比較を行った(図4)。多くのサイトカインが無症候期で低下傾向となり、IL-6・IL-18・IP-10において統計学的有意な低下を認めた。一方、IFN- $\gamma$ には大きな変化を認めなかった。次に急性期およびセットポイントにおけるCD4数・VLとの相関について検討した(図5)。急性期のVLとsICAM-1・CCL19との



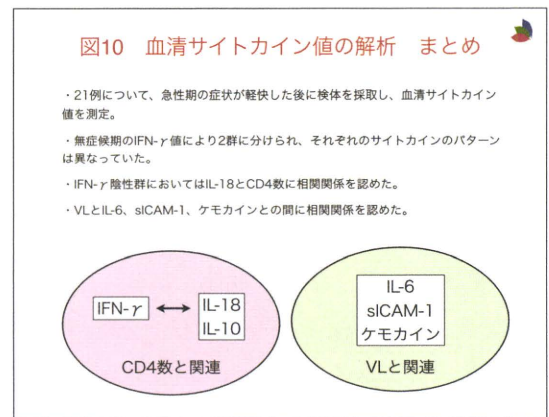
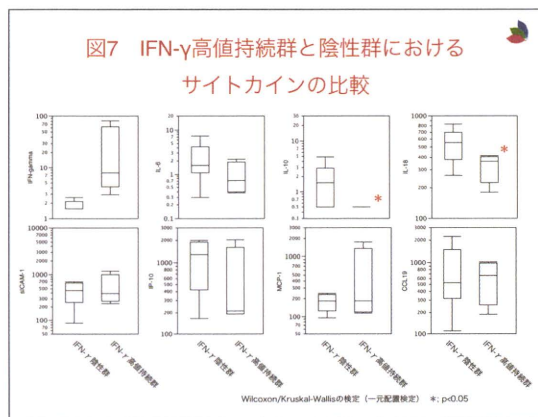
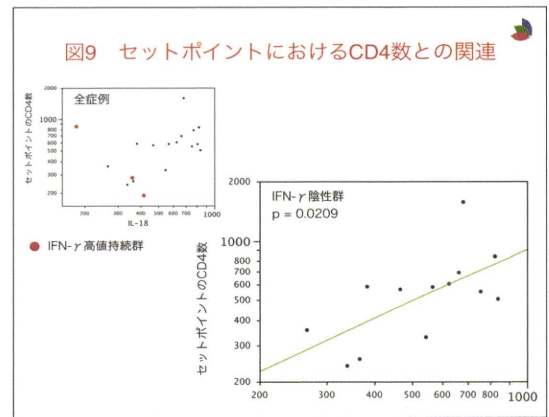
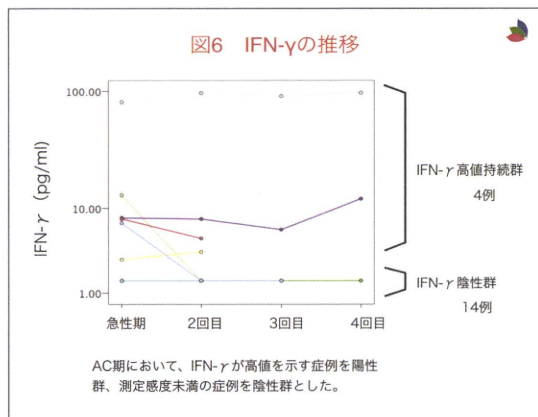


間に相関関係を認め、セットポイントのVLとIL-6・sICAM-1・IP-10の間に相関関係を認めた。一方、急性期およびセットポイントとの相関を示したサイトカインは認めなかった。先行研究からは、病期の進行や治療の有無に関わり無くIFN- $\gamma$ が上昇する症例の存在が明らかとなった。従い、21症例のうち無症候期での検体採取が可能であった18例についてIFN- $\gamma$ 高値持続群とIFN- $\gamma$ 陰性群に分類した(図6)。両群における急性期での血清サイトカイン値について検討したところ、IFN- $\gamma$ 高値持続群においてIL-10とIL-18の低下を認めた(図7)。IFN- $\gamma$ 高値群は4例しか存在しなかったため、IFN- $\gamma$ 陰性群における急性期およびセットポイントでのCD4数とVLとの相関について検討

した(図8)。VLについては全症例(図5)と同様の結果となったが、IL-18と急性期・セットポイントのCD4数との間に統計学的有意な相関を認め、回帰分析においても、両者を対数変換することにより良好な直線性が得られた(図9)。

**考察**

本研究によってHIV感染症において急性期から無症候期にかけてのサイトカインの発現異常について明らかとした。無症候性キャリアの症例においては多くのサイトカイン・ケモカインの血清中の値は低く、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する。唯一、このパターンに当てはまらないもの



がIFN- $\gamma$ であった (Watanabe et al. *Viral Immunol.* 2010)。IFN- $\gamma$ も免疫不全の進行によって上昇している症例は存在するが、無症候性キャリアや抗HIV療法を継続している症例においても高値を持続している症例を認める。以上のことから、IFN- $\gamma$ 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。無症候期におけるIFN- $\gamma$ の上昇を認めた症例においては、急性期のIFN- $\gamma$ も高く、この現象は感染後比較的速やかに誘導されると考えられた。

無症候性キャリア期におけるIFN- $\gamma$ 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- $\gamma$ 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サイトカインであるIL-10およびIL-18が低値となることと合致する。IL-18は、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IL-6・sICAM-1・IP-10・CCL19と関連し、CD4数はIL-18との関連を示していた。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- $\gamma$ 陽性群の1症例である(図9の全症例を示した散布図の赤点のうち一番左の症例)。この症例はIFN- $\gamma$ 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1000cp/mlで推移している。IL-18だけではなくIFN- $\gamma$ も、極端に高値となった場合にHIVに感染後のCD4数が維持される可能性が考えられる。いずれにしてもIFN- $\gamma$ の異常高値の症例は20%前後のため、IFN- $\gamma$ とCD4数との関連性を明らかにするには、症例を増やして解析を行う必要がある。

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- $\gamma$ の2つが特に重要であることが示唆された。

## 結論

本研究にて感染早期の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- $\gamma$ によって2群に分類でき、IFN- $\gamma$ 高値持続群で急性期のIL-18・IL-10が低値になることを示した。IL-18とCD4数との間に、IL-6・sICAM-1・ケモカインと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

原著論文による発表

欧文

- 1) Watanabe D, Uehira T, Yonemoto H, Bando H, Ogawa Y, Yajima K, Taniguchi T, Kasai D, Nishida Y and Shirasaka T. Sustained high levels of interferon-gamma during HIV-1 infection: Specific trend different from other cytokines. *Viral immunology.* 2010;23(6):619-25

## 知的財産権の出現・登録状況

該当なし

## 3

## 急性感染期での抗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）

蘆田 美紗（国立病院機構大阪医療センター エイズ先端医療研究部）

岡本瑛里子（国立病院機構大阪医療センター エイズ先端医療研究部）

鈴木佐知子（国立病院機構大阪医療センター エイズ先端医療研究部）

## 研究要旨

感染早期での抗HIV療法の導入により、残存プロウイルス量は低レベルに抑えられることが平成20年度の研究で明らかとなった。そこで平成21年度に高感度法の開発を行った。今年度はその手法による測定精度の確認を行ったのち、慢性期で抗HIV療法を導入された25例と、急性期に治療を導入された7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。まず、8E5由来のDNAを用いて希釈再現性について検討した。測定に用いたDNA量を1200 ngから75 ngまで段階希釈を行いgagとβ2MGについてコピー数の比を算出したところ、2.5から2.7と再現性は良好であった。次に、臨床検体を用いて希釈再現性について検討した。4検体について4倍希釈し検討したが、同様に良好な再現性が得られた。ポワソン分布法との相違については、測定感度以上となった13検体において良好な一致性を認めた。急性期治療例7例（中央値140コピー/10<sup>6</sup>CD4陽性Tリンパ球）においては慢性期治療例25例（中央値440コピー/10<sup>6</sup>CD4陽性Tリンパ球）と比較して、統計学的有意に残存プロウイルス量が低下していたが（Wilcoxonの検定、 $p = 0.0058$ ）、その低下は中央値から推定すると数倍程度と推定された。

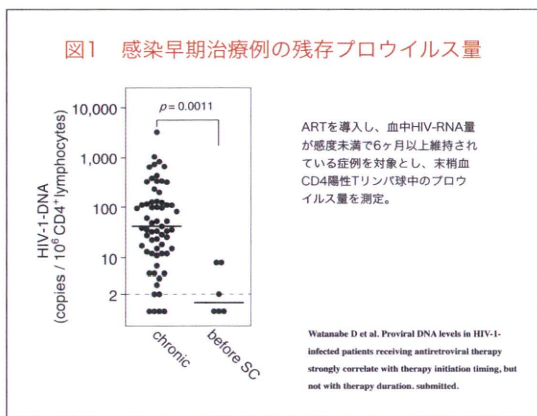
## 研究目的

HIVに感染して2から4週間後に多くの症例において発熱等の症状が出現するが、通常対症療法のみで軽快する。しかし、一部の症例で症状が重症化・遷延化し、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、その開始基準に定まったものはなく、現状では個々の症例で判断せざるをえないのが実情である。一方、急性期でARTを開始するデメリットとしては、抗HIV薬服薬の継続性と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る。

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。HIVの潜伏感染細胞の半減期に関する研究からは感染細胞をすべて駆逐するには平均73.4年の内服期

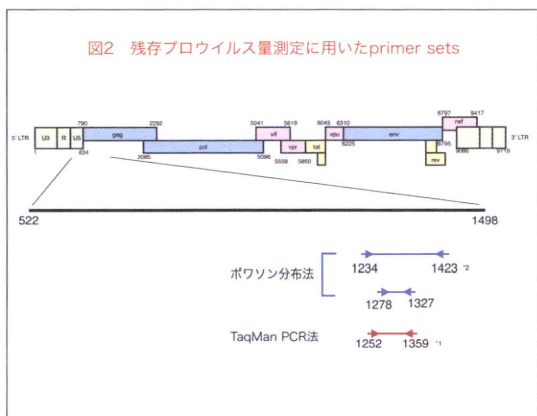
間が必要とされ、生涯の抗HIV薬の服用の根拠とされている。しかし、それらの研究でも半減期には幅があり、個々の患者の潜伏感染細胞数の違いもあるため、感染細胞の存続期間も一律でよいかは十分な議論がされていないのが実状である。すなわち潜伏感染細胞数が少ない症例などは73.4年を待たずに治癒されるはずである。この潜伏感染細胞はHIVに感染早期に樹立すると考えられている。実際、平成20年度に行った研究により、感染早期に治療を開始した症例においては残存プロウイルス量が低レベルに抑えられることを明らかとした（図1）。しかし、感染早期治療例では半数以上の症例で測定感度未満となったため、どのレベルまで残存プロウイルス量を抑えられるかは明らかでなかった。平成21年度に測定感度の改善が得られたため、今年度はその手法を用いて感染早期治療例における残存プロウイルス量の測定を行った。





**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。Positive selectionによりCD4陽性Tリンパ球もしくはCD14陽性単球を分離し、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。Internal controlとしてβ2MGのコピー数を測定し、残存プロウイルス量はCD4陽性Tリンパ球100万個あたりのコピー数として算出した。TaqMan PCR法に用いたプライマー・プローベの設計およびCV値を図2・図3に示した。また、ポワソン分布法に用いたプライマーの位置を図2に示した。



**図3 TaqMan PCR法のCV値**

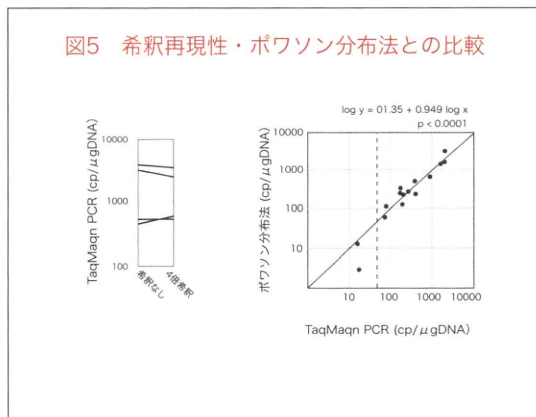
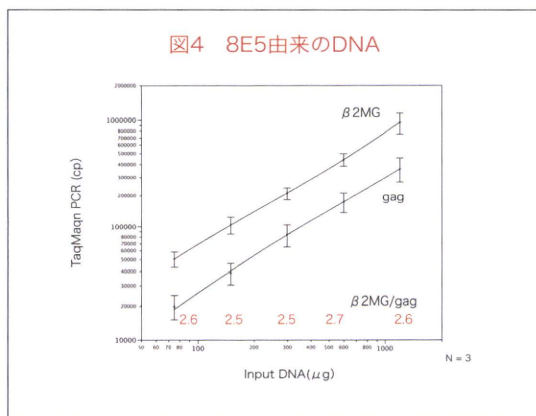
	input DNA (copies)	intra-assay n=4		inter-assay n=4	
		mean	CV	mean	CV
Gag	500	470	16%	510	19%
	50	55	35%	51	20%
β2MG	500	479	11%	501	7%
	50	52	17%	51	30%

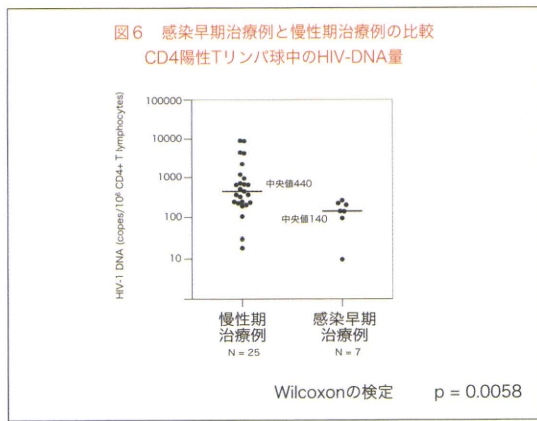
(倫理面への配慮)

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の研究承認を取得した。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**

昨年度に開発した系についてまず8E5細胞を用いて検討した。8E5細胞はゲノムに1コピーのHIV-1が組み込まれている細胞である。従って、β2MGとHIV-1のコピー数の比をとると、理想的には2となる。そこで、鋳型として用いるDNA量を1200 ngから75 ngまで2倍ずつ段階希釈してβ2MGとgagのコピー数を測定し、その比率を算出した(図4)。いずれの比率も2.5から2.7の狭い範囲に収まった。β2MGとgagのPCRの効率が異なった場合は希釈によって比率が異なってくることが予想されるが、本研究で用いた方法では希釈によっても再現性は良好であった。次に臨床検体を用いて測定を行った。ARTを継続してVLが測定感度未満で維持されている32症例のCD4陽性Tリンパ球中の残存プ





ロウイルス量の中央値は290コピー/10<sup>6</sup>CD4陽性Tリンパ球であった。CD14陽性単球中の残存プロウイルス量は測定を行った5例全例で測定感度未満であったため、以後はCD4陽性Tリンパ球中の残存プロウイルス量のみ解析を行った。鋳型となるDNA量を4分の1とし測定結果を4倍にする方法で希釈再現性を検討したが、確認した4検体すべてにおいて良好な再現性が得られた(図5左)。図5右にTaqMan PCR法とポワソン分布法との比較について示した。ポワソン分布法に用いたプライマーはTaqMan PCR法に用いたプライマーの近傍に位置するが別個の配列のものを採用した。TaqMan PCR法が測定感度以上となった検体(13例)については、両者について良好な一致性(すなわちY = Xの直線に近い)を認めた。最後に感染早期にARTが導入された7症例(中央値140コピー/10<sup>6</sup>CD4陽性Tリンパ球)と慢性期に導入された25症例(中央値440コピー/10<sup>6</sup>CD4陽性Tリンパ球)の比較を行ったところ、感染早期群にて残存プロウイルス量の低下を認めた(Wilcoxon検体、p = 0.0058)。その低下は中央値から推定した場合、数倍程度と推定された。

## 考察

HIVの感染早期に治療を開始した症例の残存プロウイルス量の測定は現在までフランスからの報告を含め、2つ報告されている。特にフランスのグループからの報告は詳細に検討されており、慢性期治療開始例と比較して約10分の1程度低く推移し、しかも速い速度で低下していた。それらの観察期間は1年と短いものであったが、我々の先行研究(治療期間の中央値は約6年)から、その効果は長期間持続することを明らかとした。本年度の結果においては、低下はしているもののその程度は数倍程度であった。本研究では母集

団が小さい、横断的といった限界があるのは確かである。早期治療開始により、どこまで残存プロウイルス量を低下させることが可能かは、縦断的観察をふくめ、より長期の研究が必要であると考えられた。

今回測定に用いた方法は細胞内のすべてのHIV-DNA量を測定する方法である。HIVは細胞に感染後、逆転写酵素によってゲノムRNAからDNAが合成される。このDNAからプレインテグレーション複合体が作られ、核内へ移行し、インテグラーゼによって宿主のゲノムの中に組み込まれる。組み込まれなかったDNAは環状化され、2-LTRや1-LTRとなる。従って、すべてのHIV-DNA量を測定した場合、これら全てのDNAが検出されることになる。しかしARTを継続しVLが測定感度未満で長期間維持されている症例については、HIV-DNA量の測定値が宿主のゲノムに組み込まれたDNA量とほぼ同一であることが報告されるようになった。本来なら残存プロウイルス量の測定には、ゲノムの組み込まれたDNA量の測定が必要であり、Alu-PCRといったやや感度の落ちる手法が必要であった。残存プロウイルス量を臨床指数、特に治癒や治療終焉のための判定に使用するには感度が高いものが要求され、上記の報告からも、細胞内すべてのHIV-DNA量の測定で代用すべきであると考えられた。

## 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て残存プロウイルス量は低値であった。その低下は中央値から推定した場合、数倍程度と推定された。

## 健康危険情報

該当なし

## 研究発表

口頭発表

国内

- 1) 渡邊大、伊部史朗、近藤恭子、上平朝子、南留美、笹川淳、矢嶋敬史郎、米本仁史、坂東裕基、小川吉彦、谷口智宏、笠井大介、西田恭治、山本政弘、金田次弘、白阪琢磨：残存プロウイルス量測定の臨



床的意義について。第24回日本エイズ学会総会・学術集会、2010年11月、東京

- 2) 渡邊大、米本仁史、坂東裕基、小川吉彦、矢嶋敬史郎、谷口智宏、笠井大介、西田恭治、上平朝子、白阪琢磨：血漿 HIV-RNA量が測定感度未満に到達するまで長期の日数を必要とした初回抗HIV療法導入例の解析。第24回近畿エイズ研究会学術集会、2010年6月、大阪

**知的財産権の出現・登録状況**

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）

研究協力者：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）

横幕 能行（国立病院機構名古屋医療センター 感染症科・エイズ治療開発センター）

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）

蘆田 美紗（国立病院機構大阪医療センター エイズ先端医療研究部）

岡本瑛里子（国立病院機構大阪医療センター エイズ先端医療研究部）

鈴木佐知子（国立病院機構大阪医療センター エイズ先端医療研究部）

## 研究要旨

急性HIV感染症は診断が困難であり、医療機関を受診しても見逃される症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、国内において研究も十分行われていない。このような急性HIV感染症の実態を明らかにするために、3ブロック拠点病院（大阪・名古屋・九州）と2中核拠点病院（東京・大阪）の入院症例について症例票を回収し、解析を行った。1997年から2010年までに99例の入院症例があった。25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、肝機能障害のほか、AIDS発症を7例認めた。急性期においてはCD4数が $200/\mu\text{L}$ 以上であってもAIDSを発症していた。他のウイルス感染症についてIgM抗体で検討を行ったところ、1/3の症例で陽性もしくはボーダーラインの結果であった。また、B型急性肝炎と急性HIV感染症の併発を5例に認めた。急性HIV感染症の病態は多種多様であり、急性HIV感染症の情報についての発信や全国調査の必要性が考えられた。

## 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、病態が一般内科医に認知されていないことによって、その多くが見過ごされていると考えられている。従って、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、重症化することもある。その場合は抗HIV療法（HAART）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ス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。昨年度はHIV感染症の捕捉率の高い3ブロック拠点病院（大阪・名古屋・九州）に入院した急性HIV感染症の症例を対象とした実態調査を行い、約1/3

の症例で入院中にHAARTが導入されていたことが明らかとなった。また、他の急性ウイルス感染症の合併も認められた。今年度は2中核拠点病院（東京・大阪）からの症例も集積し、99例の入院症例について検討を行った。

## 研究方法

3ブロック拠点病院と2中核拠点病院（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、がん・感染症センター都立駒込病院、大阪市立総合医療センター）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。本研究の対象症例の基準は、発熱や倦怠感といった急性期症状が出現し、PCR法陽性・Western blot法陰性もしくは判定保留で診断された入院症例とした。

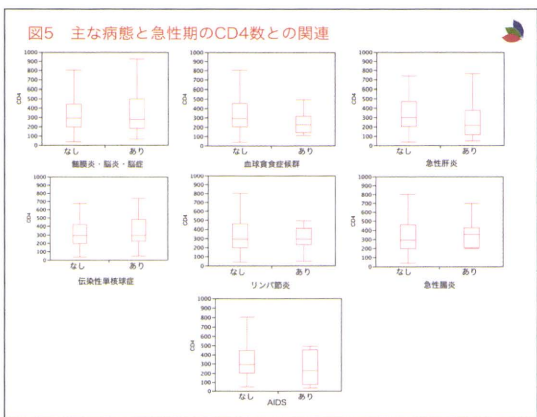
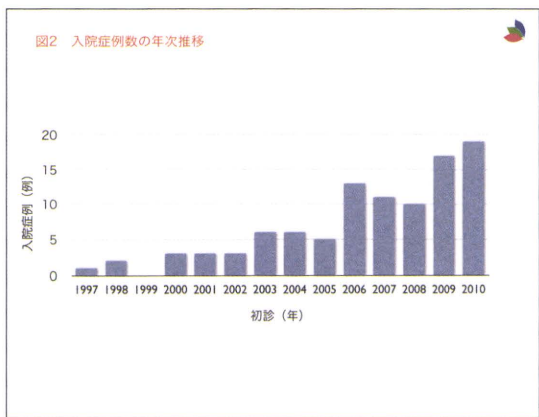
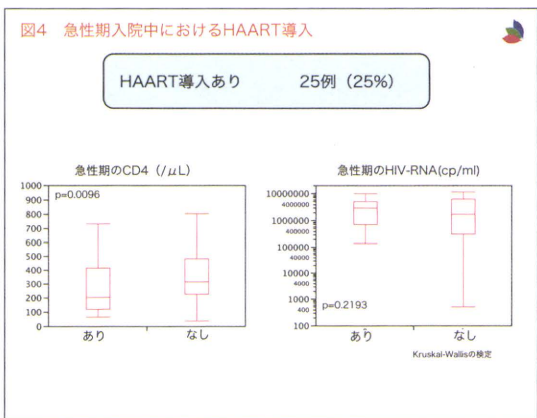
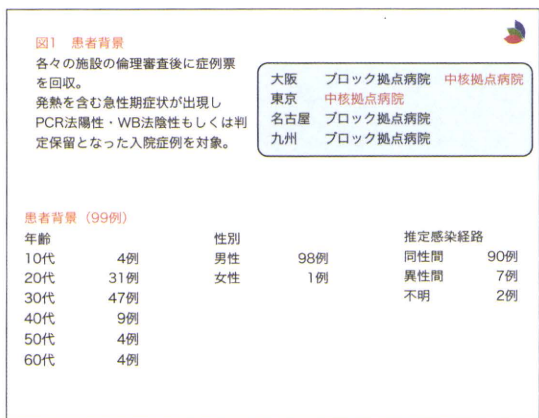
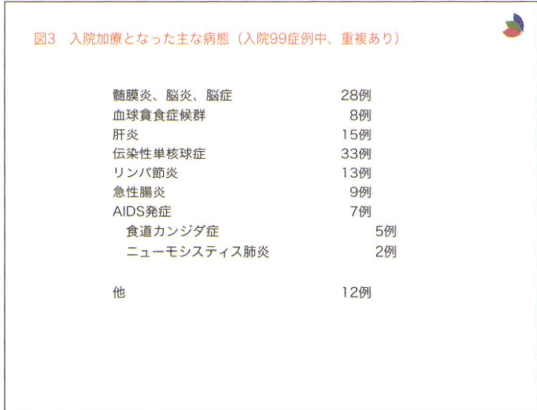
(倫理面への配慮)

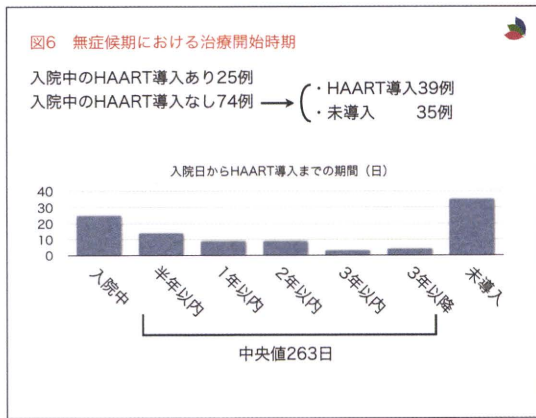
各々の施設の倫理審査後に症例票の回収を行った。個人が特定されないように、氏名・住所・生年月日・カルテ番号といった項目は調査項目から外し、年齢は30代等で記載した。臨床情報の取り扱いには注意を行った。また、本研究に関する情報をホームページ上 (<http://www.onh.go.jp/khac/center/koukaibunsho.html>) で公開した。

### 研究結果

各施設で急性HIV感染症と診断された入院症例は99例について解析を行った。患者背景を図1に示した。20-40歳代で87例 (88%) を占めたが、60歳代でも4例 (4%) の入院症例が存在した。対象症例の多くは男性 (98例、99%) で同性間性的接触 (90例、91%) による感染が推測された。図2に入院症例数の年次推移を示した。ここ数年入院症例数が増加していた。入院となった主な病態は伝染性単核球症 (33例) や髄膜炎・脳炎・脳症 (28例) を多く認めしたが、発熱のみの症例や口腔潰瘍、直腸潰瘍 (他の12例) での入院もあった (図3)。AIDSを発症していたのは7例であり、その内訳は食道カンジダ症が5例、ニューモシスティス肺炎が2

例であった。急性期入院中にHAARTが導入された症例は25例 (25%) であった (図4)。治療導入が必要であった症例のCD4数は、導入が行われなかった症例のCD4数と比較して低下していた (Kruskal-Wallisの検定、 $p = 0.0096$ ) が、CD4数が高くてもHAART導入を必要とした症例も認めた。次に病態別でCD4数の比較を行ったが、いずれの病態においてもCD4数の大きな相違は認めなかった (図5)。AIDSを発症した症例の半数以上がCD4数が200以上であった。次に、入院中に治療が導入されなかった74例について検討した。HAART導入が確認されたのは39例であり、その症例の治療導入時期は入院日から換算して中央値で263日と比較的短期間で導入されていた (図6)。他のウイルス感染症の併発に関しては、HIV以外の抗ウイルスIgM抗体にて検

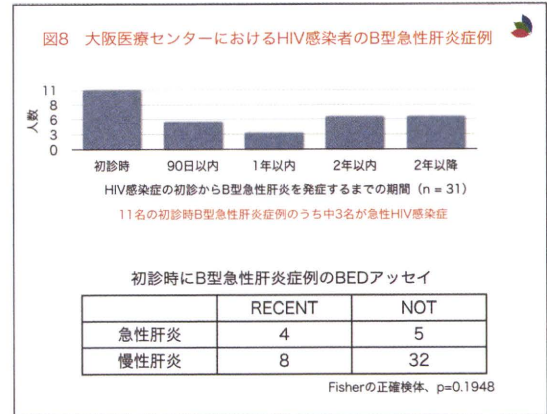
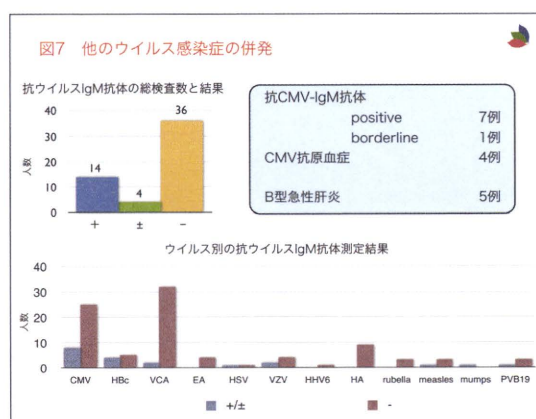




討した。検査が行われたのは54症例あり、18例が陽性もしくはボーダーラインとの結果であった。これはもしHIV検査が行われなければ検査が陽性になったウイルスによる感染症と診断され、HIV感染症が見逃される可能性が危惧される。陽性もしくはボーダーラインとなったものはサイトメガロウイルス (CMV) 感染症が8例と最も多く、CMV抗原血症を併発した症例も存在した。また、急性HIV感染症とB型急性肝炎の合併を5例に認めた。最後に、大阪医療センターにおけるHIV感染者のB型急性肝炎について検討した(図8)。急性肝炎の発症時期は、HIVの初診時が多く、半数が初診90日以内である。B型急性肝炎の診断を契機にHIV感染症が判明したケースもあれば、HIV感染症が判明した直後にB型急性肝炎を発症した症例も認めた。HIV感染症で当院初診時にB型急性肝炎を合併していた症例に対してBEDアッセイを行ったところ、9例中の4例でRECENTと判定された。

## 考察

HIV感染者およびエイズ患者の報告数は年々増加していることがエイズ動向委員会によって報告されていた。しかし、2009年はHIV感染者およびエイズ患者の報告総数は減少を示していた。これは感染拡大が収



まってきたのではなく、新型インフルエンザ等の影響をうけ全国的にHIV検査件数が減少したことが理由として挙げられている。症状を有するエイズ患者数が2008年と2009年が同数であったことや、施設数が少ないものの各施設での急性HIV感染症の入院症例数が増えていることも、そういった理由の裏付けになると考えられた。

どのような症例を急性HIV感染症とするかは、さまざまな定義がある。本研究では急性HIV感染者の定義を、発熱等の急性期症状が出現し、PCR法陽性・Western blot法陰性もしくは判定保留で診断されたものと定義した。しかし、急性感染の後に3ヶ月程度の経過でWestern blot法が陽転化することなくAIDSを発症する症例や、免疫不全の進行のためWestern blot法のバンドが減弱していくAIDS症例などもあり、HIVを専門に診療している医師にとっても急性期か否かの判断が難しい症例は存在している。また、急性HIV感染症という疾患概念自体が急性の熱性疾患を診療する医師に周知されておらず、AIDS発症と診断されたり、HIV感染症が見逃され他のウイルス感染症 (CMV初感染による伝染性単核球症様症候群、麻疹、ヘルペス髄膜炎、非特異的なウイルス感染症など) と診断される症例も少なくない。特に1/3の症例で他のウイルスのIgM型の抗体上昇を認めたため、そのような検査所見があればその時点で確定診断が下されることになる。伝染性単核症 (様症候群) やウイルス感染症を疑う場合は、HIV検査は最後に残すのではなく早めに検査を進めるべきである。急性期はHIVを見つける最初のチャンスとなるため、急性HIV感染症という病態を広く情報発信する必要があると思われた。

急性期入院中のHAARTは今回のコホートでは25例の症例で導入された。それらの約1/4の症例の急性期の