

Table 1. *Candida glabrata* strains used in this study

Strain	Genotype or description	Reference or source
CBS138	Wild type	Dujon <i>et al.</i> (2004)
2001T	$\Delta trp1$	Kitada <i>et al.</i> (1995)
2001HT	$\Delta his3, \Delta trp1$	Kitada <i>et al.</i> (1995)
2001TU	$\Delta trp1, \Delta ura3$	Kitada <i>et al.</i> (1995)
TG11	2001T containing pCgACT-P	Miyazaki <i>et al.</i> (2010a)
TG151	$\Delta slt2::HIS3, \Delta trp1$ (made from 2001HT)	Miyazaki <i>et al.</i> (2010a)
TG152	TG151 containing pCgACT-P	Miyazaki <i>et al.</i> (2010a)
TG153	TG151 containing pCgACT-PS2	Miyazaki <i>et al.</i> (2010a)
TG161	$\Delta cnb1::HIS3, \Delta trp1$ (made from 2001HT)	Miyazaki <i>et al.</i> (2010b)
TG162	TG161 containing pCgACT-P	Miyazaki <i>et al.</i> (2010b)
TG163	TG161 containing pCgACT-PNB	Miyazaki <i>et al.</i> (2010b)
TG164	TG161 containing pCgACT-PY1	This study
TG171	$\Delta crz1::HIS3, \Delta trp1$ (made from 2001HT)	Miyazaki <i>et al.</i> (2010b)
TG172	TG171 containing pCgACT-P	Miyazaki <i>et al.</i> (2010b)
TG173	TG171 containing pCgACT-PRZ	Miyazaki <i>et al.</i> (2010b)
TG174	$\Delta crz1::HIS3, \Delta trp1, \Delta ura3$	This study
TG181	$\Delta rlm1::HIS3, \Delta trp1$ (made from 2001HT)	Miyazaki <i>et al.</i> (2010a)
TG182	TG181 containing pCgACT-P	Miyazaki <i>et al.</i> (2010a)
TG191	$\Delta yps1::HIS3, \Delta trp1$ (made from 2001HT)	This study
TG192	TG191 containing pCgACT-P	This study
TG193	TG191 containing pCgACT-PY1	This study
TU-EM14	2001TU containing pEM14	This study
TU-Y1	2001TU containing pPYPS1	This study
TU-YD1	2001TU containing pPYPS1-D1	This study
TU-YD2	2001TU containing pPYPS1-D2	This study
TU-YD3	2001TU containing pPYPS1-D3	This study
TU-YD4	2001TU containing pPYPS1-D4	This study
TU-YD42	2001TU containing pPYPS1-D42	This study
TU-YD5	2001TU containing pPYPS1-D5	This study
TU-YD5-4	2001TU containing pPYPS1-D5-4	This study
TU-YD52	2001TU containing pPYPS1-D52	This study
TU-YD6	2001TU containing pPYPS1-D6	This study
TG174-Y1	TG174 containing pPYPS1	This study

Deletion and complementation of *YPS1* in *C. glabrata*

Sequence information of *C. glabrata* genes was obtained from the *C. glabrata* genome database Genolevures (<http://www.genolevures.org/>). The primers and plasmids used in this study are listed in Tables 2 and 3, respectively. The plasmids constructed using PCR products were verified by sequencing before use. Transformation of *C. glabrata* was performed using a lithium acetate protocol, as described previously (Cormack & Falkow, 1999).

A *C. glabrata* *YPS1* deletion strain was generated using a one-step PCR-based technique, as described previously (Miyazaki *et al.*, 2010a). Briefly, a deletion construct was amplified from pBSK-HIS (Miyazaki *et al.*, 2010a) with

the primer pair CgYPS1 100-F and CgYPS1 100-R. *Candida glabrata* strain 2001HT ($\Delta his3, \Delta trp1$) (Kitada *et al.*, 1995) was then transformed with the deletion construct, and the resulting transformants were selected by histidine prototrophy. Both PCR and Southern blotting were performed to verify that the desired homologous recombination occurred at the target locus without ectopic integration of the deletion construct. One successful deletion strain ($\Delta yps1$) was selected and designated as TG191.

To generate a complementation plasmid, a 1836-bp DNA fragment containing the *C. glabrata* *YPS1* gene was amplified from the genomic DNA of the *C. glabrata* wild-type strain CBS138 (Dujon *et al.*, 2004) with the primer pair CgYPS1-Xba-F and CgYPS1-Xba-R. The PCR product was digested with XbaI and inserted into the XbaI site of pCgACT-P to generate pCgACT-PY1. Strain TG191 was then transformed with pCgACT-P and pCgACT-PY1 to generate strains TG192 and TG193, respectively.

Spot dilution test

To examine sensitivity to high temperature, a spot dilution test was performed as described previously (Miyazaki *et al.*, 2010a). Briefly, logarithmic-phase cells grown in SC-trp broth were harvested and adjusted to 2×10^7 cells mL⁻¹. Serial 10-fold dilutions were then prepared, and 5 μ L of each dilution was spotted onto SC-trp agar plates in the presence and absence of 1 M sorbitol. Plates were incubated for 48 h at 30 or 41 °C. The spot dilution test was repeated twice on independent occasions.

Quantitative real-time reverse transcription (RT)-PCR

To examine the expression levels of the *YPS* genes, logarithmic-phase cells grown in SC-trp broth at 30 °C were adjusted to 1×10^7 cells mL⁻¹ and then further incubated at 41 °C with agitation. Total RNA was extracted using a FastRNA Red Kit (Qbiogene, Carlsbad, CA). Quantitative real-time RT-PCR was performed as described previously (Saijo *et al.*, 2010). Briefly, first-strand cDNA was synthesized using a QuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen, Valencia, CA) from 1 μ g of total RNA in a final volume of 20 μ L, and 3 μ L of resulting cDNA was then used as a template for individual PCR with gene-specific primers (Table 2), using a QuantiTect SYBR Green PCR kit (Qiagen). Quantitative real-time RT-PCR was performed in triplicate in a 96-well plate format, using a 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA). The mRNA abundance of the *YPS* genes was normalized to *ACT1* transcript levels. The real-time RT-PCR assays were repeated twice on independent occasions.

Table 2. Primers used in this study

Primer*	Sequence (5'–3')†
For strain and plasmid construction	
CgYPS1 100-F	<i>CACGCTAATGGCTTGGGGGGGAAGGGCAAGGGCATTAACTGCTGATGGGG</i> <i>CTCCCCTGCAAGGCTTGGATCTTG</i>
CgYPS1 100-R	<i>ATAATTGCCATATATATAGCTTGTATAAATACGACTCACTATAGGGC</i> <i>GCATTTAAAGAACTCCAGCTTTGCTTAATATCAAATGAACAAAGA</i> <i>AATCCTCACCAGGAGCACCGGTTGATG</i> <i>CTATCCAGGGTGAGAGCCATCTCAGCGCTCTAGAACTAGTGGATCC</i>
CgYPS1-Xba-F	<u>GCTCTAGA</u> ATGAAGTTTAGTTCGCTATGTATGC
CgYPS1-Xba-R	GCTCTAGAGGGTGAGAGCCATCTTCAGAATG
CgYPS1-355Bam-F	<u>CGGGATCCTGAAGCCC</u> GAGAGAAATCCC
CgYPS1-38Kpn-R	<u>AAGGTACC</u> GCAACAGACGCCAGCATACTAG
YPS1prm-F1	TTGCGCATCTTGAAAAAACA
YPS1prm-F2	CCCTGCAAGGCTTGGATCT
YPS1prm-F3	CTTGAAAATGTGATTCCTGAATACC
YPS1prm-F4	TTCTTTTTCACGCTAATGGC
YPS1prm-F5	TGGGGGGGAAGGGCAAGG
YPS1prm-F6	TGGATCTTGATAATTGCCA
YPS1prm-R1	GTGCTTTGCTTCTTTGCTTC
YPS1prm-R2	ATCAGCAGTTAATGCCCTTGC
YPS1prm-R3	GGCAATTATCAAGATCCAAGC
YPS1prm-R4	GCTTTAATTTGAATTTTCTTC
YPS1prm-R5	TTTTCAAGCCCTTTTCAAGCCCTTT
For real-time PCR	
CgYPS1-F1281	CGGATCCACATCAACGCTC
CgYPS1-R1436	TCGTAGTTTTCCAGGTCGTAGACG
CgYPS2-F1518	CACTGAGTTCATCTTCTTATGCC
CgYPS2-R1647	CGTGTGTTGTTCTGCTTGTC
CgYPS3-F944	ACGCACCAAAGCAAGTCGTC
CgYPS3-R1079	GCACCAGCAAAGTTGAAGATAAGC
CgYPS4-F490	AATGGCGTGAAGTTGATAACG
CgYPS4-R603	GGCAGCAAGTTGATTTGTTGTCTC
CgYPS5-F312	TGATGGATTCCCACCTTCGC
CgYPS5-R461	GCAAATGTCTCGTCACCGTAGC
CgYPS6-F305	CTGGCTTTCCAAACCCCTG
CgYPS6-R495	CAATCCACCCAACTAACCACATC
CgYPS7-F438	CAGCGGTGTGAGTTTCAGGAAC
CgYPS7-R602	AGGAAGAAGAACGAGTGGTTGATG
CgYPS8-F510	TGTGAACTTTGCCTTGGGGAG
CgYPS8-R632	GAATCGCTGATGTTTTCTGC
CgYPS9-F70	AAGACCCCAGGCAGTGATTTG
CgYPS9-R198	TTGTAGCAAGACCTTCTGAGGAGG
CgYPS10-F310	GCACAGGTTCCAAATCGTTG
CgYPS10-R439	CAGCGTAGGATGAGTCCAAGTAGC
CgYPS11-F1269	TGACACTTTGCCAGAAGACATCG
CgYPS11-R1414	TTGTGCTGCCGTTTGGAGGAG
CgACT1-F163	GGTATGGGTCAAAGGACTCTTACG
CgACT1-R305	TCGTTGTAGAAAGTGTGATGCCAG

*'F' and 'R' indicate forward and reverse primers, respectively.

†Sequences homologous to flanking regions of the *YPS1* ORF are shown in italics. Sequences shown in bold are present in pBSK-HIS. Restriction sites are underlined.

Construction of lacZ-reporter plasmids

A 0.4-kb fragment containing the 355-bp upstream region and the first 12 codons of *C. glabrata YPS1* was amplified from the genomic DNA of *C. glabrata* CBS138 with the

primers CgYPS1-355Bam-F and CgYPS1-38Kpn-R. The resulting PCR product was digested with BamHI and KpnI and inserted into the corresponding sites of pEM14 (El Barkani *et al.*, 2000) to yield pPYPS1. Various deletions were introduced into the *YPS1* promoter sequence in pPYPS1

Table 3. Plasmids used in this study*

Plasmid	Description	Reference or source
pBSK-HIS	A 1-kb XhoI fragment containing <i>C. glabrata HIS3</i> was inserted into the XhoI site of pBluescript II SK+(Stratagene).	Miyazaki <i>et al.</i> (2010a)
pCgACT-P	A 1-kb SacI-KpnI fragment containing the <i>S. cerevisiae PGK1</i> promoter, polylinker and <i>C. glabrata HIS3</i> 3'UTR was excised from pGRB2.2 and inserted into the SacI-KpnI site of pCgACT.	Miyazaki <i>et al.</i> (2010a) Frieman <i>et al.</i> (2002) Kitada <i>et al.</i> (1996)
pCgACT-PS2	A 1625-bp fragment containing <i>C. glabrata SLT2</i> was inserted into the Sall site of pCgACT-P	Miyazaki <i>et al.</i> (2010a)
pCgACT-PNB	A 580-bp fragment containing <i>C. glabrata CNB1</i> was inserted into the SmaI site of pCgACT-P	Miyazaki <i>et al.</i> (2010b)
pCgACT-PRZ	A 1938-bp fragment containing <i>C. glabrata CRZ1</i> was inserted into the EcoRI site of pCgACT-P	Miyazaki <i>et al.</i> (2010b)
pCgACT-PY1	A 1836-bp fragment containing <i>C. glabrata YPS1</i> was inserted into the XbaI site of pCgACT-P	This study
pEM14	<i>C. glabrata</i> centromere and autonomously replicating sequence-based plasmid containing <i>S. cerevisiae URA3</i> and <i>E. coli lacZ</i>	El Barkani <i>et al.</i> (2000)
pPYPS1	A 0.4-kb fragment containing the 355-bp promoter region and the first 12 codons of <i>C. glabrata YPS1</i> was inserted into the BamHI-KpnI site of pEM14.	This study

*The series of lacZ-reporter plasmids constructed from pPYPS1 are summarized in Fig. 3b.

using the KOD-Plus-Mutagenesis Kit (Toyobo, Osaka, Japan) and mutagenic primers (Table 2). Plasmid pPYPS1-D2 was used as a template to generate plasmids pPYPS1-D42 and pPYPS1-D52. All plasmids generated by site-directed deletion mutagenesis were verified by DNA sequencing.

β -Galactosidase assay

Candida glabrata strain 2001TU ($\Delta trp1$, $\Delta ura3$) (Kitada *et al.*, 1995) was transformed with the series of constructed *YPS1* promoter-*lacZ* reporter plasmids. Strain TG174 ($\Delta crz1$, $\Delta trp1$, $\Delta ura3$), which was obtained by plating strain TG171 ($\Delta crz1$, $\Delta trp1$) (Miyazaki *et al.*, 2010b) on 5-fluoro-orotic acid-containing media as described previously (Boeke *et al.*, 1984), was transformed with pPYPS1. Transformants were selected by uracil prototrophy and verified by PCR using plasmid-specific primers. Logarithmic-phase cells grown in SC-ura broth were adjusted to 1×10^7 cells mL⁻¹ and subjected to a temperature shift from

30 to 41 °C. After 3 h of incubation at 41 °C, the cell cultures were harvested and washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline. Cells (100 μ L) were resuspended in 300 μ L Reporter Lysis Buffer (Promega, Madison, WI) containing 5 μ L Protease Inhibitor Cocktail (Sigma, St. Louis, MO). Cell extracts were prepared using acid-washed glass beads (Sigma) and cleared by centrifugation at 14 000 *g* for 30 min at 4 °C. Protein concentrations were determined by the Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, Richmond, CA) using bovine serum albumin as a standard. β -Galactosidase activity was measured using the β -Galactosidase Enzyme Assay System (Promega) according to the manufacturer's instructions. All assays were performed in triplicate on separate days. β -Galactosidase activities of each reporter construct were calculated in Miller units (nmol min⁻¹ mg⁻¹ protein) at 37 °C (Miller, 1972). The activity of each mutated promoter is expressed relative to the value obtained with the intact promoter.

Results and discussion

Candida glabrata requires *Yps1* for cell growth at elevated temperatures

Several phenotypic differences in the $\Delta yps1$ strains of *S. cerevisiae* and *C. glabrata* have been reported. For example, while the loss of *Yps1* results in decreased tolerance to Congo red and caspofungin in *S. cerevisiae* (Krysan *et al.*, 2005), a similar sensitivity is not displayed by *C. glabrata* (Kaur *et al.*, 2007). As the effect of *YPS1* deletion on temperature sensitivity has not been reported in *C. glabrata*, we examined the growth of the *C. glabrata* $\Delta yps1$ strain at 30 and 41 °C using a spot dilution assay (Fig. 1). The growth of the mutant was similar to that of the wild-type strain at 30 °C, but it was drastically impaired at 41 °C. However, either reintroduction of the wild-type *YPS1* gene or the addition of 1 M sorbitol, an osmotic stabilizer, to the medium could effectively restore the growth of the mutant. These results suggest that *C. glabrata* *Yps1* plays a role in maintaining cell wall integrity to prevent cell lysis at elevated temperatures.

Heat-induced expression of *YPS1* is predominantly regulated by the calcineurin-Crz1 pathway in *C. glabrata*

To examine whether the transcription of *C. glabrata* *YPS1* is upregulated in response to heat stress, we monitored the expression levels of *YPS1* mRNA using real-time RT-PCR. Because the signaling pathways controlling *YPS1* expression in *C. glabrata* are unclear, we also examined *YPS1* expression levels in mutants lacking a key component of two cell wall-associated signaling pathways, including the last member of the PKC1-MAPK cascade (Slt2), the regulatory B subunit of the serine-threonine-specific protein phosphatase

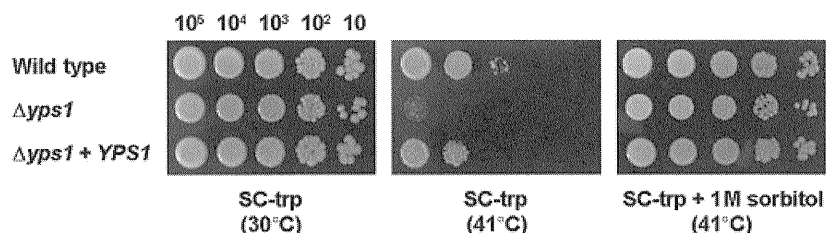


Fig. 1. *Yps1* is required for cell growth at an elevated temperature in *Candida glabrata*. After logarithmic-phase cells were adjusted to 2×10^7 cells mL⁻¹, 5 μ L of serial 10-fold dilutions were spotted onto an SC-trp agar plate in the presence and absence of 1 M sorbitol. Plates were photographed after 48 h of incubation at the indicated temperatures. Representative results of two independent experiments are shown. *Candida glabrata* strains: wild type, 2001T containing an empty vector (strain TG11); $\Delta yps1$, a $\Delta yps1$ strain containing an empty vector (strain TG192); and $\Delta yps1 + YPS1$, a $\Delta yps1$ strain containing pGACT-PY1 (strain TG193).

calcineurin (Cnb1), and the calcineurin-regulated transcription factor Crz1. The expression level of *C. glabrata* *YPS1* increased in the wild-type strain 1 h after a temperature shift from 30 to 41 °C, and this upregulation was sustained for the duration of the 4-h experiment (Fig. 2a), which is consistent with the kinetics of most genes involved in cell wall remodeling (Garcia *et al.*, 2004). Notably, the transcriptional upregulation of *YPS1* was not observed in the $\Delta cnb1$ or $\Delta crz1$ mutants (Fig. 2a). In *S. cerevisiae*, the treatment of wild-type cells with sodium dodecyl sulfate or calcofluor white leads to increased expression of *YPS1*, but has no effect in a strain lacking *MPK1/SLT2* (Krysan *et al.*, 2005; Gagnon-Arsenault *et al.*, 2006). Here, we observed that the deletion of *SLT2* in *C. glabrata* impaired the heat-induced expression of *YPS1* compared with the wild-type strain; however, expression was not completely abolished (Fig. 2a). Rlm1 is a transcription factor downstream of Slt2 and responsible for most of the transcriptional activation of genes required for cell wall integrity in *S. cerevisiae* (Garcia *et al.*, 2004). However, the *YPS1* expression levels in a *C. glabrata* $\Delta rlm1$ mutant (Miyazaki *et al.*, 2010a) were similar to those in the wild-type strain after 3 h of incubation at 41 °C (data not shown), indicating that Slt2 regulated *YPS1* expression independent of Rlm1 in *C. glabrata*. The results were consistent with previous findings in *S. cerevisiae* that induction of *YPS1* expression after exposure to calcofluor white requires Slt2, but not Rlm1 (Krysan *et al.*, 2005). Further studies investigating how Slt2 regulates *YPS1* expression in these fungi are warranted.

We also compared the heat-induced expression levels of *YPS1* in the *CNB1*-, *CRZ1*-, and *SLT2*-overexpressing strains with that of the wild-type *C. glabrata* strain (Fig. 2b). Although the expression levels of *YPS1* in the *CNB1*- and *SLT2*-overexpressing strains were comparable to that of the wild type, the expression of *YPS1* in the *CRZ1*-overexpressing strain increased approximately fivefold even in the absence of heat stress and increased > 20-fold at 41 °C (Fig. 2b). Taken together, these results suggest that stimulated expression of *YPS1* in *C. glabrata* in response to elevated growth tempera-

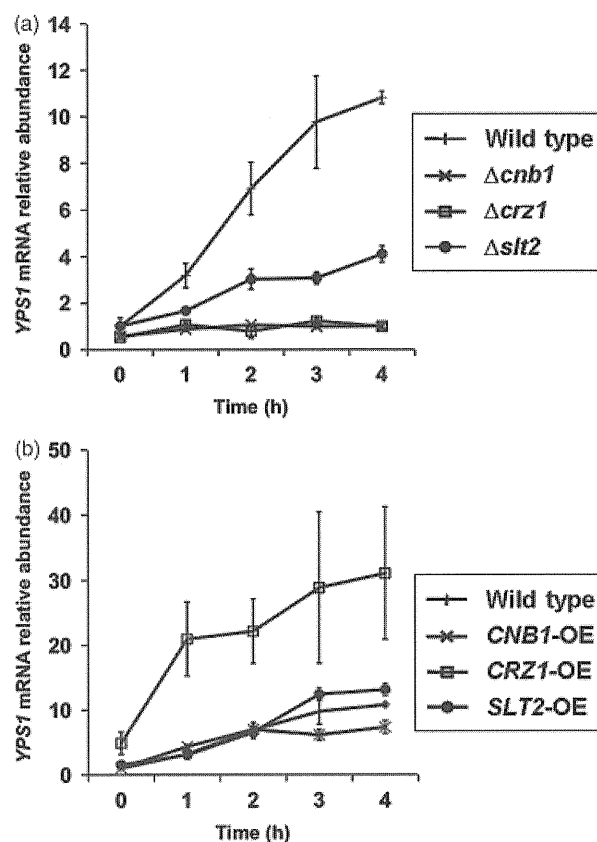


Fig. 2. Time-course analysis of *YPS1* expression in mutant (a) and overexpressing (b) strains of *CNB1*, *CRZ1*, and *SLT2* at an elevated growth temperature. Logarithmic-phase cells grown at 30 °C were adjusted to 1×10^7 cells mL⁻¹ and then further incubated at 41 °C. Total RNA was extracted at the indicated time points, and *YPS1* mRNA was measured in triplicate by quantitative real-time RT-PCR. Results represent the average of two independent experiments. Error bars are SDs. *Candida glabrata* strains: wild type, strain TG11; $\Delta cnb1$, strain TG162; $\Delta crz1$, strain TG172; $\Delta slt2$, strain TG152; *CNB1*-OE, a *CNB1*-overexpressing strain (TG163); *CRZ1*-OE, a *CRZ1*-overexpressing strain (TG173); and *SLT2*-OE, an *SLT2*-overexpressing strain (TG153).

ture is regulated by both the Slt2 MAPK pathway and calcineurin signaling via the Crz1 transcription factor, with the latter representing the dominant mechanism.

Dissection of the *C. glabrata* *YPS1* promoter

To further validate the speculation that Crz1 regulates the transcription of *YPS1* in *C. glabrata*, the *YPS1* promoter

(a)

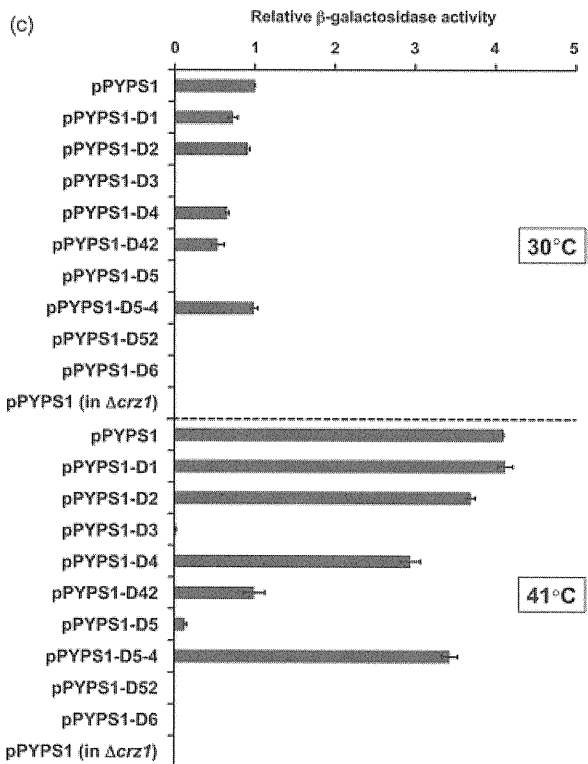
```

(-360)                                     (-301)
CCCCGAGAGAAATCCCGCACAAGAGAAAGCAAAGAAGCAAAGCACAATGACG
(-360)                                     (-251)
TAATTTGCGCATCTTGAATAAAACAAATTTGAAGAAAATTCAAATTAAGC
(-250)                                     (-201)
TGAAAAGGGCTTGAAGAAGGGCTTGAAGAAGTTCTTTTCACGCTAATGGC
(-200)                                     (-151)
TTGGGGGGGAAGGGCAAGGGCATTAACTGCTGATGGGGCTCCCTGCAAG
(-150)                                     (-101)
GGTTGGATCTTGATAATTGCCATATAIATAGCTTGTAAAATGTGATTCT
(-100)                                     (-51)
GAATACCTTTACTCTAGTACCAGAACTAGAACTAGAACTAGAACCAAGAAC
(-50)                                       (+1)
TACAAGTAAAAGTAGAACTAGAACTACAAGTACAAGACACACATACAGAAAT

```

(b)

Plasmid name	Mutagenic Primer	Deleted region
pPYPS1	N/A	N/A
pPYPS1-D1	YPS1prm-F1 & YPS1prm-R1	-307 to -297
pPYPS1-D2	YPS1prm-F2 & YPS1prm-R2	-166 to -160
pPYPS1-D3	YPS1prm-F3 & YPS1prm-R3	-129 to -120
pPYPS1-D4	YPS1prm-F4 & YPS1prm-R4	-250 to -222
pPYPS1-D42	YPS1prm-F4 & YPS1prm-R4	-250 to -222, -166 to -160
pPYPS1-D5	YPS1prm-F5 & YPS1prm-R4	-250 to -200
pPYPS1-D52	YPS1prm-F5 & YPS1prm-R5	-222 to -200
pPYPS1-D52	YPS1prm-F5 & YPS1prm-R4	-250 to -200, -166 to -160
pPYPS1-D6	YPS1prm-F6 & YPS1prm-R4	-250 to -145



elements were dissected using a *lacZ* reporter system. The 355-bp sequence immediately upstream of the *YPS1* ORF and the putative transcription factor-binding sites in this region are shown in Fig. 3a. The intact 355-bp promoter region and the first 12 codons of *YPS1* were fused to *lacZ* in pEM14 to generate the pPYPS1 reporter construct. Site-directed deletion mutagenesis was then used to sequentially introduce mutations into the promoter region to construct the reporter plasmids illustrated in Fig. 3b. The β -galactosidase activities of these reporter constructs in strains 2001TU and TG174 were then compared after 3 h of incubation at 41 °C (Fig. 3c). Interestingly, we identified a sequence, 5'-ATGACGTAAT-3', in the upstream region (-306 to -297) of *C. glabrata* *YPS1* matching the consensus sequence of the *S. cerevisiae* Sko1-binding site, 5'-ATKACGMTAT-3' (Proft *et al.*, 2005) (Fig. 3a). The transcription factor Sko1 has been characterized as a downstream target of the Hog1 signaling pathway in *S. cerevisiae* (Proft *et al.*, 2001; Proft & Struhl, 2002). However, Sko1-mediated transcriptional regulation of *YPS1* was not evident, because the deletion of this sequence did not affect promoter activity, as evidenced by the high-level induction of β -galactosidase activity in the strain containing pPYPS1-D1 (Fig. 3c).

We also identified the sequence 5'-GGGGCTCC-3', which was similar to the consensus Crz1-binding site 5'-GNGGC(G/T)CA-3' (Yoshimoto *et al.*, 2002), in the upstream region (-166 to -159) of *C. glabrata* *YPS1* (Fig. 3a). The deletion of this sequence resulted in only a slight decrease of promoter activity, displaying 90% activity of the intact promoter at 41 °C (pPYPS1-D2 in Fig. 3c). A genome-wide analysis in *S. cerevisiae* previously revealed that the promoters of most calcineurin-dependent genes contain one to six copies of the Crz1-binding sequence 5'-GNGGC(G/

Fig. 3. Dissection of putative promoter elements in the upstream region of *Candida glabrata* *YPS1*. (a) The 355-bp sequence upstream of *C. glabrata* *YPS1*. Nucleotide sequence numbers relative to the transcription start site (A of ATG) are indicated. A putative Sko1-binding site, 5'-ATGACGTAAT-3', is underlined (-306 to -297), while a putative Crz1-binding site, 5'-GGGGCTCC-3', is shown in a gray box (-166 to -159). Five copies of the core Crz1-binding sequence 'GGCT' are italicized and underlined. A putative TATA box, 5'-TATATAT-3', is shown in bold and underlined (-128 to -122). (b) A summary of the deletions introduced into the *YPS1* promoter sequences. Symbols: open box, putative Sko1-binding site; shaded circle, core Crz1-binding sequence; shaded box, putative TATA box. (c) β -Galactosidase assay. *Candida glabrata* wild-type strain (2001TU) containing a single copy of the reporter constructs was incubated at 41 °C for 3 h. The $\Delta crz1$ mutant containing pPYPS1 was also included as a control. β -Galactosidase activities were calculated in Miller units ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein) at 37 °C. The activity of each reporter construct is expressed relative to that of pPYPS1 in the wild-type strain at 30 °C. Three independent transformants for each reporter construct were assayed in triplicate. Error bars represent SDs from the means of three independent experiments.

T)-3', with any base substitution in the core 'GGCT' sequence resulting in the elimination of Crz1p binding, except the T to G change (Yoshimoto *et al.*, 2002). Similarly, five copies of the core Crz1-binding sequence 'GGCT' were present within the 355-bp upstream region of *C. glabrata* *YPS1* ('GGCG' was not found), as shown in Fig. 3a. Therefore, we extended the originally deleted regions in the *YPS1* promoter to sequentially remove the core Crz1-binding sequences, as summarized in Fig. 3b. The pPYPS1-D4 construct, in which the first and the second 'GGCT' sites were deleted, showed 72% activity of the intact promoter at 41 °C (Fig. 3c). The induction of promoter activity of pPYPS1-D42, which contained the additional deletion of the putative Crz1-binding sequence, 5'-GGGGCTCC-3', was significantly impaired compared with the results with pPYPS1-D4 and pPYPS1-D2, suggesting that both regions contribute to the full activity of the *YPS1* promoter. Compared with the activity levels of pPYPS1, pPYPS1-D42 displayed 54% activity at 30 °C, but only 24% activity at 41 °C. The induction ratios of pPYPS1 and pPYPS1-D42 were 4.10 and 1.86, respectively. The results suggested that the deletions in pPYPS1-D42 did not drastically affect the basal activity of the *YPS1* promoter, but impaired the induction of promoter activity at an elevated temperature. On the other hand, the absence of the putative TATA box, 5'-TATATAT-3', or the first three 'GGCT' sites impaired not only the induction but also the basal activity of the *YPS1* promoter (pPYPS1-D3 and pPYPS1-D5, respectively). To examine whether the drastically decreased promoter activity of pPYPS1-D5 was solely due to the loss of the -221 to -200 region containing the third 'GGCT', we constructed pPYPS1-D5-4, in which only the -221 to -200 region was deleted. The pPYPS1-D5-4 construct displayed 83% activity of the intact promoter at 41 °C, suggesting that multiple sites were involved in the induction of the *YPS1* promoter activity. As expected, the promoter activity was completely lost by the simultaneous deletion of the putative Crz1-binding sequence and the first three or four 'GGCT' sites (pPYPS1-D52 and pPYPS1-D6, respectively). The results from these promoter assays suggest that *C. glabrata* Crz1 regulates *YPS1* transcription via multiple binding sites in the promoter region of this gene. Consistent with the results of the real-time RT-PCR assay, no β -galactosidase activity was detected in the Δ *crz1* mutant containing pPYPS1.

Transcription of yapsin genes other than *YPS1* is not regulated by the calcineurin-Crz1 or the Slt2 pathway in *C. glabrata*

In addition to *YPS1*, the expression levels of the other 10 *YPS* genes in *C. glabrata* were also examined by quantitative real-time RT-PCR in the wild-type, Δ *cnb1*, Δ *crz1*, and Δ *slt2* strains

after a 2-h incubation at 41 °C (Fig. 4). Although *YPS3* and *YPS5* were not transcriptionally induced in response to elevated growth temperature, the expression levels of the remaining eight *YPS* genes (*YPS2*, *YPS4* and *YPS6-11*) were increased at 41 °C in all the strains tested in this study compared with the respective control data obtained at 30 °C. The results suggested that the upregulated *YPS* genes might be involved in cellular adaptation to high temperature independent of the calcineurin-Crz1 and Slt2 pathways. In agreement with the results of the gene expression assay, a putative Crz1p-binding motif could not be found in the 1-kb upstream regions of the *YPS* genes other than *YPS1*.

Although the induced expression levels of *YPS4* and *YPS10* in the Δ *cnb1* mutant were higher than those in the wild-type strain, this phenomenon was not observed in the Δ *crz1* mutant. In addition, none of the *YPS* genes were compensatory upregulated in the Δ *yps1* mutant and over-expression of *YPS1* in the Δ *cnb1* mutant did not affect the expression levels of *YPS4* and *YPS10* (data not shown).

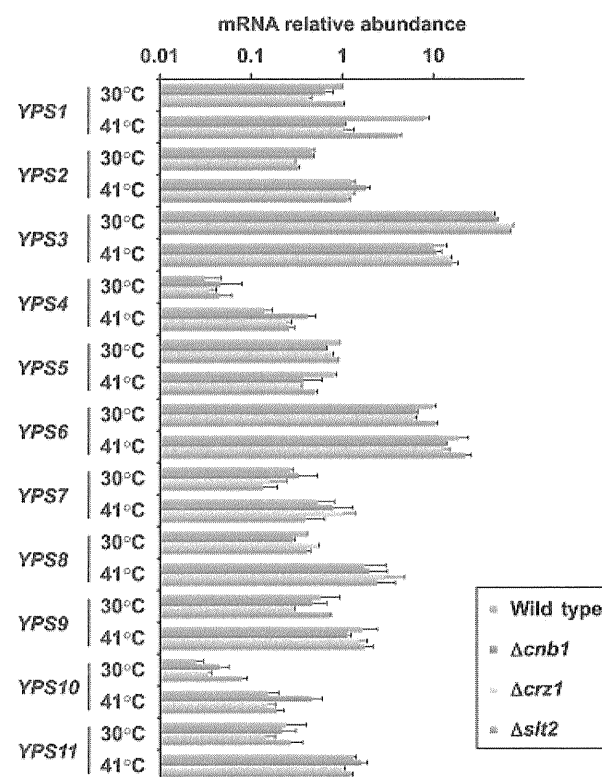


Fig. 4. Relative mRNA abundance of *YPS* genes in response to elevated growth temperature. Logarithmic-phase cells grown in SC-trp broth at 30 °C were further incubated at 41 °C for 2 h, and total RNA was then extracted. The relative mRNA abundance was measured by quantitative real-time RT-PCR. Results are expressed as the mean \pm SD. The quantitative real-time RT-PCR was performed in triplicate and representative data of two independent experiments are shown. *Candida glabrata* strains: wild-type, strain TG11; Δ *cnb1*, strain TG162; Δ *crz1*, strain TG172; and Δ *slt2*, strain TG152.

These results suggested that *YPS4* and *YPS10* were upregulated as a general response to loss of calcineurin independent of *YPS1* expression levels.

Concluding remarks

Although a previous genome-wide analysis in *S. cerevisiae* revealed that the expression of > 160 genes is regulated in a calcineurin-Crz1-dependent manner (Yoshimoto et al., 2002), none of the orthologous genes have been studied in a *C. glabrata* Δ crz1 mutant. Our present study has provided evidence that Yps1 is required for the growth of *C. glabrata* at high temperatures and that the heat-induced expression of the *YPS1* gene is dependent on the calcineurin-Crz1 pathway. The results of the β -galactosidase assays performed using mutated *YPS1* promoters suggest that *C. glabrata* Crz1 may bind to multiple sites in the *YPS1* promoter region to induce the transcription of this gene. The *YPS1* promoter-lacZ reporter system established in this study will be a useful tool for monitoring the activation of the calcineurin-Crz1 signaling pathway in *C. glabrata*.

Acknowledgements

We thank Drs Fritz Muhlschlegel, Hironobu Nakayama, and Brendan Cormack for providing pEM14, pCgACT, and pGRB2.2, respectively. This research was partially supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research (no. 19790324 to T.M., no. 20591212 to Y.M., and no. 21390305 to S.K.) from the Japanese Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, a grant from the Global Centers of Excellence Program, Nagasaki University, and by grants from the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan (H20-nanchi-ippan-035, H20-shinko-ippan-012, H20-shinko-ippan-015, and H22-shinko-ippan-008 to Y.M.).

References

- Boeke JD, LaCrute F & Fink GR (1984) A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. *Mol Gen Genet* **197**: 345–346.
- Cormack BP & Falkow S (1999) Efficient homologous and illegitimate recombination in the opportunistic yeast pathogen *Candida glabrata*. *Genetics* **151**: 979–987.
- Dujon B, Sherman D, Fischer G et al. (2004) Genome evolution in yeasts. *Nature* **430**: 35–44.
- El Barkani A, Haynes K, Mosch H, Frosch M & Muhlschlegel FA (2000) *Candida glabrata* shuttle vectors suitable for translational fusions to lacZ and use of beta-galactosidase as a reporter of gene expression. *Gene* **246**: 151–155.
- Frieman MB, McCaffery JM & Cormack BP (2002) Modular domain structure in the *Candida glabrata* adhesin Epa1p, a beta1,6 glucan-cross-linked cell wall protein. *Mol Microbiol* **46**: 479–492.
- Gagnon-Arsenault I, Tremblay J & Bourbonnais Y (2006) Fungal yapsins and cell wall: a unique family of aspartic peptidases for a distinctive cellular function. *FEMS Yeast Res* **6**: 966–978.
- Garcia R, Bermejo C, Grau C et al. (2004) The global transcriptional response to transient cell wall damage in *Saccharomyces cerevisiae* and its regulation by the cell integrity signaling pathway. *J Biol Chem* **279**: 15183–15195.
- Kaiser C, Michaelis S & Mitchell A (1994) *Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Kaur R, Ma B & Cormack BP (2007) A family of glycosylphosphatidylinositol-linked aspartyl proteases is required for virulence of *Candida glabrata*. *P Natl Acad Sci USA* **104**: 7628–7633.
- Kitada K, Yamaguchi E & Arisawa M (1995) Cloning of the *Candida glabrata* TRP1 and HIS3 genes, and construction of their disruptant strains by sequential integrative transformation. *Gene* **165**: 203–206.
- Kitada K, Yamaguchi E & Arisawa M (1996) Isolation of a *Candida glabrata* centromere and its use in construction of plasmid vectors. *Gene* **175**: 105–108.
- Krysan DJ, Ting EL, Abeijon C, Kroos L & Fuller RS (2005) Yapsins are a family of aspartyl proteases required for cell wall integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **4**: 1364–1374.
- Miller JH (1972) *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Miyazaki T, Inamine T, Yamauchi S et al. (2010a) Role of the Slt2 mitogen-activated protein kinase pathway in cell wall integrity and virulence in *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Res* **10**: 343–352.
- Miyazaki T, Yamauchi S, Inamine T et al. (2010b) Roles of calcineurin and Crz1 in antifungal susceptibility and virulence of *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Ch* **54**: 1639–1643.
- Proft M & Struhl K (2002) Hog1 kinase converts the Sko1-Cyc8-Tup1 repressor complex into an activator that recruits SAGA and SWI/SNF in response to osmotic stress. *Mol Cell* **9**: 1307–1317.
- Proft M, Pascual-Ahuir A, de Nadal E, Arino J, Serrano R & Posas F (2001) Regulation of the Sko1 transcriptional repressor by the Hog1 MAP kinase in response to osmotic stress. *EMBO J* **20**: 1123–1133.
- Proft M, Gibbons FD, Copeland M, Roth FP & Struhl K (2005) Genomewide identification of Sko1 target promoters reveals a regulatory network that operates in response to osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **4**: 1343–1352.
- Saijo T, Miyazaki T, Izumikawa K et al. (2010) Skn7p is involved in oxidative stress response and virulence of *Candida glabrata*. *Mycopathologia* **169**: 81–90.
- Yoshimoto H, Salzman K, Gasch AP et al. (2002) Genome-wide analysis of gene expression regulated by the calcineurin/Crz1p signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **277**: 31079–31088.

特集 HIV 感染症と呼吸器疾患

HIV 感染症と呼吸器ウイルス感染

照屋勝治*

Summary

HIV 感染症では、各種のウイルスが重篤な下気道感染へと進展し、致死的な肺炎を発症し得る。重篤な免疫不全を反映して、ウイルス性肺炎も単独で発症することはまれであり、しばしば他疾患と合併して発症するため、診断は容易でないことが多い。ウイルス性肺炎の場合は画像上、両側性のすりガラス様陰影を呈し得るが、これは PCP の画像所見と類似している。今後、H1N1pdm の流行拡大によりインフルエンザ肺炎症例が増加する可能性があり、PCP との鑑別も含めて注意が必要であると考えられる。

Key words サイトメガロウイルス肺炎、水痘肺炎、アデノウイルス肺炎、麻疹肺炎、インフルエンザ肺炎／
cytomegalovirus pneumonia, varicella zoster virus pneumonia, adenovirus pneumonia, measles pneumonia,
influenza virus pneumonia

はじめに

ウイルス性肺炎は小児で見られ、成人では比較的まれな病態である。そのため、ウイルス性肺炎の原因ウイルスや頻度に関する知見は、現在においてもそれほど多くない。ウイルス性肺炎では診断が困難なことが多いこと、また細菌性肺炎の合併がしばしば起こるため、ウイルス性肺炎単独の病態評価が難しいことも、おそらくはその一因となっている。しかしながら、HIV 感染症をはじめ今後さまざまなタイプの免疫不全宿主が増加するにつれ、鑑別疾患としてのウイルス性肺炎の重要

性が高まってくると考えられる。

ウイルス性肺炎の疫学

一般的に小児では RS ウイルス (respiratory syncytial virus : RSV) やパラインフルエンザウイルスが最も頻度の高い病原体であり、成人ではインフルエンザウイルスが主な原因であるとされる。インフルエンザウイルス、RSV、パラインフルエンザウイルス、アデノウイルスなどは免疫不全患者で重症の下気道病変を引き起こし、致命的になり得ることが知られているが、このような呼吸器感染症の HIV 患者における病原性や疫学につい

Respiratory Viral Infections in Persons with HIV Infection

Katsuji TERUYA*

* National Center for Global Health and Medicine, AIDS Clinical Center, Tokyo

* 独立行政法人国立国際医療研究センター病院, エイズ治療・研究開発センター (〒162-8655 東京都新宿区戸山 1-21-1)

ては、現在までまとまった知見が存在しないのが実情である。

Roux らの、免疫健常者におけるウイルス性肺炎の病原体別の頻度の検討は、これを考えるうえでの参考になるだろう¹⁾。市中肺炎症例 1,356 例からペア血清による検討が可能であった 338 例について検討し、61 例のウイルス性肺炎を抽出したところ、原因としては 27 例がインフルエンザ A、10 例がインフルエンザ B であり、インフルエンザウイルスが合計 37 例 (61%) と最も多かった。次いでパラインフルエンザが 11 例 (18%)、RSV が 5 例 (8%)、アデノウイルスが 5 例 (8%)、複数のウイルスの混合感染が 3 例 (5%) であった。HIV 患者においては、これらに加えて内因性再燃として発症し得るサイトメガロウイルス (cytomegalo virus : CMV) 肺炎や、水痘帯状疱疹ウイルス (varicella zoster virus : VZV) 肺炎の可能性を念頭に置くべきであると考えられる。

CMV 肺炎

CMV 肺炎は高度の細胞性免疫不全を背景として発症する典型的な日和見感染症である。多くの成人では CMV は潜伏感染状態にあり、免疫が正常である場合にはなんら問題はないが、HIV 感染の進行により細胞性免疫が高度に障害される状況に陥ると、CMV が内因性に再活性化することで CMV 肺炎を発症し得る。

HIV 患者における CMV 肺炎の診断の難しさは、気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid : BALF) から CMV が検出されても、必ずしも臨床的 CMV 肺炎の発症を意味

しない点にある。HIV 患者では CD4 数が 50/ μ l 未満となると CMV 網膜炎や腸炎の発症リスクが高くなるが、臨床的 CMV 肺炎の発症はまれである。仮に BALF から CMV が検出され、肺局所での CMV 再活性化が証明される場合でも、多くは特に治療を必要とせず自然軽快する²⁾。これは HIV 以外の細胞性免疫不全宿主、例えば臓器移植に伴う免疫不全状態においては、臨床的 CMV 肺炎の頻度が高く、発症した場合には治療にかかわらず予後不良であるという点と大きな対照をなしているといえる。

71 例の HIV 患者 (無症候性キャリア 19 例、CMV 網膜炎 6 例、急性呼吸器症状 46 例) に対し、気管支肺胞洗浄 (bronchoalveolar lavage : BAL) を施行し、その後 3 カ月の経過観察を行った検討では、無症候性キャリアの 47%、網膜炎の全例、肺症状の 72% で CMV が検出された。呼吸器症状のあった 1 例が CMV 肺炎を発症し死亡したが、無症候性キャリアや網膜炎の症例からは CMV 肺炎の発症は認められなかった。著者らは HIV 患者においては呼吸器症状の有無にかかわらず BAL から CMV は高頻度に分離され、それは少なくとも 3 カ月以内の CMV 肺炎の発症とは関連していないと報告している³⁾。

このように HIV 患者では肺内での CMV 活性化が CMV 肺炎発症を意味しないことが多く、文献上は極めてまれと扱われていることすらある。ところが実際の症例では、ニューモシスチス肺炎 (Pneumocystis pneumonia : PCP) の治療のみではなかなか改善が見られない状況で、抗 CMV 薬を併用すると臨床症状の改善が得られる場合があり、CMV 肺炎の併発が疑われた症例に少なからず遭遇す

る。HIV 患者では PCP の頻度が高いため、PCP に CMV 肺炎が併発した場合にはその診断の難しさから、CMV 肺炎の臨床的意義が過小評価されている可能性が否定できない。

176 例の PCP の予後に関する多変量解析⁴⁾では、BALF での CMV 培養陽性が独立した予後因子となっていた、という事実もその可能性を示唆していると著者は考えている。

Yoshida ら⁵⁾は、HIV 患者 70 例〔15 例の CMV 感染症含む（網膜炎 11 例、肺炎 1 例、食道炎 1 例、網膜炎と食道炎 1 例、結腸炎と肺炎 1 例、副腎炎 1 例）〕について、全血と血漿を用いた CMV の real time PCR を行い、全血で 3,000 copies/ml、血漿で 1,000 copies/ml が CMV 疾患の存在と相関していたと報告した（感度 93%、86%、特異度 89%、85%、陽性予測率 70%、63%、陰性予測率 98%、95%）。CD4 が 50/ μ l 以下に限定すると陽性予測率はそれぞれ 78%、71%へと上昇した。

著者らの施設ではこの結果を踏まえ、PCP 治療中は CMV-DMA のモニタリングを行い、全血で 3,000 copies/ml 以上となった場合には 5 mg/kg/day の ganciclovir の投与を、10,000 copies/ml となった場合には 5 mg/kg \times 2/day の ganciclovir の投与を行い、pre-emptive に CMV の治療を併用している。

これまで述べてきたように、HIV 患者における臨床的 CMV 肺炎はまれであり、また発症が疑われる例でも多くは PCP などの他疾患の合併があることから、CMV 肺炎のみの画像所見を検討した報告はほとんどない。1994 年に CMV 以外にはほかの病原体が検出できず、CMV 肺炎と診断された HIV 患者 21 例の画像所見について報告がなされてい

表 1 CMV 肺炎における画像所見 (n=21)

	症例数	頻度
#1 Ground-Glass Attenuation	9	42.8%
#2 Dense consolidation	7	33.3%
#3 Masses (>3 cm)	12	57.1%
#4 Interstitial Reticulation	6	28.6%
#5 Adenopathy	5	23.8%
#3 or #4	13	61.9%
#3 without #1	7	33.3%
#1 without #3	4	19%

(McGuinness G, Scholes JV, Garay SM, et al. Cytomegalovirus pneumonitis: spectrum of parenchymal CT findings with pathologic correlation in 21 AIDS patients. Radiology 1994; 192: 451-9 より改変引用)

る⁶⁾。本検討のまとめを表 1 に示した。すりガラス様陰影、浸潤影、気管支壁肥厚など多彩な所見を呈するが、PCP などほかの合併疾患と大きく異なり CMV 肺炎に特徴的と思われたのは、mass shadow（腫瘤影）の存在であった。従来、すりガラス様陰影は特徴的所見といわれ、本検討でも 42.8%で認められているが、mass shadow を認めたものを除くと（表 1 で #1 without #3）、わずかに 19%で見られるのみであった。一方で 1/3 の症例は mass shadow のみが所見であった。

HIV 患者の多くは成人であるため、CMV の初感染の頻度は高くないが、免疫不全状態で CMV の初感染を起こした場合は CMV 肺炎を発症することがある。図 1 は当科で経験した CMV 肺炎の 1 例である。CMV 初感染による伝染性単核球症を契機に HIV 感染が判明し、発症時の CD4 数は 110/ μ l であった。胸部 X 線で両側性陰影を認めたため PCP が疑われたが、BALF で *P. jirovecii* (-) であった。血中 CMV は 2,000 copies/ml であり、抗 CMV 治療のみで陰影の改善が得られた。



図1 HIV患者で見られたCMV初感染によるCMV肺炎

VZV肺炎

水痘は2~8歳の小児に好発し通常は良好な経過をたどるが、成人に罹患した場合には重篤化しやすく、肺炎を含めた重篤な合併症を来す確率が高いことが知られている。罹患年齢により肺炎合併率は大きく異なっており、小児では水痘肺炎の合併はまれであるが、成人水痘では健常人でも20%の頻度で肺炎を合併すると報告されている⁷⁾。ただしその多くは一般細菌による2次感染が主体であり、ウイルス自体による原発性肺炎の頻度は0.8%と低い。米国のデータでは400件に2.3件という報告があり、米国の陸軍兵が訓練中に発生した114例の検討では18例(16.3%)でX線上間質影あるいは結節影の混在した

肺炎像が認められた⁷⁾。免疫不全宿主や慢性肺疾患をもった患者も肺炎合併の頻度が高いといわれている。南アフリカのHIV患者での報告では、12例の患者のうち7例が肺炎を発症し、入院後12時間以内に抗ウイルス薬を投与したにもかかわらず3例が死亡したとしている⁸⁾。

一般的に肺炎の合併は、皮疹出現後1~6日目に起こることが多く、皮疹が見られない症例に肺炎が発症することはまれである。胸部X線検査では、肺門より広がる両側びまん性の、気管支周囲を中心とした多発小結節影(直径5mm以下)が認められ、この疾患に特徴的な所見とされている。胸部CT検査でもほぼ同様の多発小結節影が背側を中心に認められる。また胸水や肺門リンパ節腫脹が認められることもある。回復期以降は肺内のびまん性の小石灰化結節影を残すことがある。気管支鏡検査では時に気管支粘膜に水疱や潰瘍を認めることがある。図2は当科で経験したHIV合併水痘症例で出現した肺野病変である。両側肺野に結節影を認めた。呼吸器症状はなく臨床的肺炎症例ではなかった。発症時のCD4数は300台で抗HIV治療は未導入であった。

VZVによる肺炎は通常、初感染(水痘)に続発して起こることが多いが、播種性帯状疱疹の合併症としても起こり得る。HIV患者において、VZVの内因性再燃による肺炎を繰り返した症例の報告がある⁹⁾。本報告ではBALFからのウイルス分離は成功せず、BALFからのPCRでのVZV検出が診断の根拠となっており、著者らはVZV肺炎が疑われる場合には、感度の点から積極的にPCRを用いるべきであるとしている。

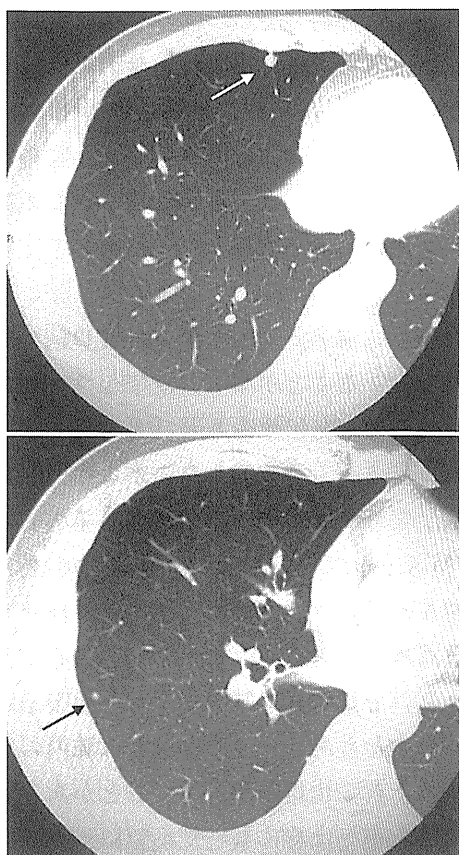


図 2 HIV 患者の水痘感染における両肺野の結節性陰影

アデノウイルス肺炎

アデノウイルス感染は決して頻度は高くないが、HIV 感染者では致死的な肺炎を来し得る重要な鑑別疾患である。AIDS 患者を対象とした前向き検討では、HIV 感染によりアデノウイルス感染のリスクが上昇することが分かっているが、病型のほとんどが胃腸炎であった¹⁰⁾。その他、AIDS 患者で発症し得るまれな病型としては、肝壊死¹¹⁾、脳炎¹²⁾、そして間質性肺炎¹³⁾などが報告されている。これまでの case report のほとんどが他疾患と



図 3 PCP と合併したアデノウイルス肺炎

- a. CT 所見。
b. 同症例の剖検病理所見。核内封入体陽性細胞 (smudge cell) を認める。

の併発であることから、診断がしばしば困難であり、かなりの症例が見逃されている可能性もある。

27 歳の HIV 感染者が PCP を発症し、治療にもかかわらず呼吸不全で死亡したが、剖検の結果、アデノウイルス肺炎を併発していたことが判明した報告がなされている¹⁴⁾。当科でも気管支内視鏡検査を行い、PCP の確定診断のもと治療を行ったにもかかわらず (図 3a)、臨床症状の改善が見られず永眠され、その後の剖検の結果、肺胞内の *Pneumocystis jirovecii* とともに、壊死性気管支炎・細気管支炎と核内封入体陽性細胞 (smudge cell) を認め (図 3b)、免疫染色によりアデノウイルスが検出された症例を経験している。

呼吸器検体の細胞診では、アデノウイルス感染に特徴的な封入体 (sumdage cell) が、し

ばしば CMV 感染に伴う封入体 (owl's eye) と間違えられることがあり、注意が必要である¹⁵⁾。

先述のように、ほぼすべての患者はアデノウイルス肺炎に加えてほかの疾患を合併しているため、診断は極めて困難である。ただし、アデノウイルスの一病型としての胃腸炎を反映してか、肺炎の case report の多くで下痢症状を認めており、診断のヒントになり得るかもしれない¹⁶⁾。

麻疹肺炎

麻疹は伝染性の強いウイルス感染症である。先進国ではワクチン接種により患者が激減したが、病院内を含む集団感染はいまだに起こっており、先進国の中では例外的に麻疹患者が多数報告されている本邦においては、十分な注意が必要であると思われる。

麻疹肺炎は麻疹の重篤な合併症であり、麻疹関連死亡のほとんどは肺炎によるとされている。麻疹ウイルスによる肺炎では細菌による 2 次感染が高率で 30~50% に見られる。肺炎合併の頻度は年齢によって異なっており、米国の 1987~2000 年までの 67,000 例以上の症例の検討では、肺炎合併率は 5.9% で、5 歳未満で 8.6%、5~19 歳で 2.2%、20~29 歳で 6.1%、30 歳以上で 9.3% と、5~19 歳で合併頻度が少ないが、5 歳未満の小児と 30 歳以上の成人で高率である¹⁷⁾。

HIV 患者など細胞性免疫の低下した症例では、致死的な巨細胞性肺炎を生ずる。免疫不全宿主では麻疹に特有の皮疹が出現せず、発熱と肺炎像のみで発症することもあるとされ、この場合には診断は極めて困難である。

麻疹肺炎の自然経過に関しては、少数例の報告例は散見されるが大規模な検討は見あたらない。おおむね免疫健全人の肺炎では多くは経過観察のみで自然軽快するようであり、免疫不全宿主例などでは重症化し致命的となる場合があるようである。Goetz らは、10 例の麻疹肺炎の臨床経過について報告している¹⁸⁾。患者は全例リバビリンを含む抗ウイルス薬などの特異的治療を受けず、supportive に管理された。5 例は ICU で管理され、6 例は人工呼吸器管理を要した。人工呼吸器管理を要した 6 人のうち 2 例が死亡したが、1 例が AIDS 発症患者であった。回復した残り 4 例は平均 6.75 日で離脱し軽快していた。

麻疹肺炎を疑ううえで最も注意すべき点は、しばしば麻疹に特徴的な皮疹を呈さない症例があるということである。発症時に気づかれず、死亡後に麻疹感染が判明したというケースレポートがある¹⁹⁾²⁰⁾。当科においても、原因不明の脳炎による死亡後、剖検により特徴的な細胞内封入体の存在から、亜急性麻疹脳炎と診断された症例を経験している。本症例では、おそらくは麻疹感染を起こしたと思われる時期に一致して、胸部 X 線で肺炎像を認めていたが自然軽快していた。経過中、麻疹を疑うような皮疹はまったく認められなかった。流行状況、麻疹患者との接触歴などから、積極的に麻疹肺炎を疑い、麻疹 IgM 抗体などの血清検査を繰り返すことが診断の鍵であろうと思われる。

生ワクチンである MMR ワクチンは、重度免疫不全に接種した場合にはワクチン株による発症リスクがある。重度免疫不全の HIV 感染小児にワクチン株の麻疹による肺炎を発症した症例報告がある²¹⁾²²⁾。

表 2 インフルエンザシーズンにおける超過死亡 (人口 1 万人あたり)

	1991~92 年	1992~93 年	1993~94 年
HIV 患者 (13 歳以上)	12.56	14.65	9.37
一般人口			
13 歳以上	1.21	1.19	1.1
25~54 歳	0.1	0.09	0.09
65 歳以上	7.03	6.82	6.35

(Lin JC, Nichol KL. Excess mortality due to pneumonia or influenza during influenza seasons among persons with acquired immunodeficiency syndrome. Arch Intern Med 2001; 161: 441-6 より改変引用)

インフルエンザ肺炎

インフルエンザ肺炎と呼ぶ場合、インフルエンザに関連して起こる肺炎の総称であることが多く、純粋にインフルエンザウイルスが肺炎の原因となる純ウイルス性肺炎、ウイルス性肺炎と細菌性肺炎の混合感染型、そして 2 次性の細菌性肺炎を含んでいる。後二者は発病後 3~4 日を過ぎてから発症することが多く、純ウイルス性肺炎は発症とほぼ同時に肺炎像が出現し、急速進行して、呼吸不全から死亡にいたる電撃的な経過をたどる。従来の季節性インフルエンザによる純ウイルス性肺炎はかなりまれな病態であり、HIV 患者のような免疫不全状態であってもまれであると考えられ、当科における経験例もない。ただし、抗 HIV 治療が導入される以前のインフルエンザによる死亡率の検討では、HIV 患者においてインフルエンザシーズンにおける超過死亡が著しく高いことが示されており、HIV 患者ではインフルエンザが重篤化するリスクが高いことが知られていた²³⁾(表 2)。

さて、2009 年にいわゆる新型インフルエンザ (H1N1pdm) が出現したが、これは従来のインフルエンザとはまったく異なり、中年層

を中心に死亡例が多く、基礎疾患のない免疫正常の成人でもウイルス性肺炎による多くの死者を出している。重症化の病態に関して、現時点でも十分なエビデンスが得られているとは言い難く、また今後起こり得る変異によって、病原性がどう変化するかの予測も難しい状況である。

臓器移植患者²⁴⁾や妊婦²⁵⁾では、H1N1pdm 罹患による ICU 入室または死亡に関するリスクが高いことが報告されており、免疫不全宿主では病態が悪化する可能性が示唆されている。メキシコにおける検討²⁶⁾では、呼吸器症状で来院した 126 例の HIV 患者のうち、30 例 (23.8%) が RT-PCR 法による H1N1pdm 感染例であった。これらのうち 16 例 (53.3%) は入院管理となり、12 例 (40%) は活動性日和見疾患を併発しており、6 例 (20%) が死亡した。96 例の H1N1 非感染例では 54 例 (56.2%) が入院となり、12 例 (12.5%) が死亡した。入院例全例の解析では、抗 HIV 治療 (highly active anti-retroviral therapy: HAART) を行っていることと、HIV ウイルス量が検出限界以下になっていることが高い生存率と関係していた ($p=0.019$)。H1N1pdm の感染は HAART 導入の有無で補正しても高い死亡率と関連していた ($p=0.043$)。H1N1pdm 感染

例では、日和見疾患の合併がある場合に重症化する傾向があり、入院期間の延長 ($p=0.0013$)、入院率 ($p<0.0001$)、人工呼吸器管理 ($p=0.0086$)、死亡 ($p=0.026$) と関連していた。オセルタミビルの投与が遅れると、入院患者の死亡は有意に増加した ($p=0.0022$)。死亡例のオセルタミビル投与までの期間は発症から 11 日目であったが、生存例では 1 日未満であった。以上のデータより著者らは HIV 感染者においては、HAART が導入されていない場合、H1N1pdm 感染が重症化すると結論づけている。

一方で、HIV 感染者の H1N1pdm 感染での臨床経過は、non-HIV 患者のそれと同じであるという報告もいくつかなされている^{27)~29)}。逆に肺炎などの重症例は、非 HIV 例と比べても少なかったとする報告もある³⁰⁾。

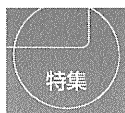
H1N1pdm に対するワクチンの反応性に関する検討では、反応性が不良であり接種後の免疫獲得は 6 割にすぎなかった³¹⁾。対象者の CD4 の中央値は $502/\mu\text{l}$ であり、92% の症例は HAART により、血中 HIV ウイルス量は検出限界以下であった。ワクチン接種後に 40 倍以上の防御レベルに達したのは 61% であり、ワクチン接種時に血中 HIV ウイルス量が検出限界以下でなかった 9 例では、4 例 (44%) でしか防御レベルの反応が得られなかった。

重要なのは H1N1pdm が致死的となり得るのは重症のウイルス性肺炎で、初期には HRCT で両側性のすりガラス様陰影を呈する例がある³²⁾ ことであり、画像上、common disease である PCP と鑑別することが難しい点である。CD4 値が低い症例では肺内に *P. jirovecii* が colonize することがわかってお

り、BALF で *P. jirovecii* が証明されても、PCP と確定診断することは難しい場合がある。今後、H1N1pdm の病原性が沈静化し、完全に従来の季節性インフルエンザと同等となるまでは、PCP と疑われる症例でも治療中の臨床経過が典型的ではない場合には H1N1pdm の可能性も考慮して、エンピリックな抗インフルエンザ薬の投与も念頭に置くべきであると考えられる。

文献

- 1) de Roux A, Marcos MA, Garcia E, et al. Viral community-acquired pneumonia in nonimmunocompromised adults. *Chest* 2004 ; 125 : 1343-51.
- 2) Millar AB, Patou G, Miller RF, et al. Cytomegalovirus in the lungs of patients with AIDS. Respiratory pathogen or passenger? *Am Rev Respir Dis* 1990 ; 141 : 1474-7.
- 3) Mann M, Shelhamer JH, Masur H, et al. Lack of clinical utility of bronchoalveolar lavage cultures for cytomegalovirus in HIV infection. *Am J Respir Crit Care Med* 1997 ; 155 : 1723-8.
- 4) Benfield TL, Helweg-Larsen J, Bang D, et al. Prognostic markers of short-term mortality in AIDS-associated *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Chest* 2001 ; 119 : 844-51.
- 5) Yoshida A, Hitomi S, Fukui T, et al. Diagnosis and monitoring of human cytomegalovirus diseases in patients with human immunodeficiency virus infection by use of a real-time PCR assay. *Clin Infect Dis* 2001 ; 33 : 1756-61.
- 6) McGuinness G, Scholes JV, Garay SM, et al. Cytomegalovirus pneumonitis : spectrum of parenchymal CT findings with pathologic correlation in 21 AIDS patients. *Radiology* 1994 ; 192 : 451-9.
- 7) Weber DM, Pellicchia JA. Varicella pneumonia : study of prevalence in adult men. *JAMA* 1965 ; 192 : 572-3.
- 8) Popara M, Pendle S, Sacks L, et al. Varicella pneumonia in patients with HIV/AIDS. *Int J Infect Dis* 2002 ; 6 : 6-8.
- 9) Fraisse P, Faller M, Rey D, et al. Recurrent vari-



- cella pneumonia complicating an endogenous reactivation of chickenpox in an HIV-infected adult patient. *Eur Respir J* 1998 ; 11 : 776-8.
- 10) Khoo SH, Bailey AS, de Jong JC, et al. Adenovirus infections in human immunodeficiency virus-positive patients : clinical features and molecular epidemiology. *J Infect Dis* 1995 ; 172 : 629-37.
 - 11) Krilov LR, Rubin LG, Frogel M, et al. Disseminated adenovirus infection with hepatic necrosis in patients with human immunodeficiency virus infection and other immunodeficiency states. *Rev Infect Dis* 1990 ; 12 : 303-7.
 - 12) Anders KH, Park CS, Cornford ME, et al. Adenovirus encephalitis and widespread ependymitis in a child with AIDS. *Pediatr Neurosurg* 1990-1991 ; 16 : 316-20.
 - 13) Ostermann A, Klueppelberg U, Wassermann K, et al. Non-specific interstitial pneumonia (NIP) : immunohistologic screening of etiologic agents. *In Vivo* 1994 ; 8 : 613-9.
 - 14) Koopmann J, Dombrowski F, Rockstroh JK, et al. Fatal pneumonia in an AIDS patient coinfecting with adenovirus and *Pneumocystis carinii*. *Infection* 2000 ; 28 : 323-5.
 - 15) Soldatou A, Davies EG. Respiratory virus infections in the immunocompromised host. *Paediatr Respir Rev* 2003 ; 4 : 193-204.
 - 16) Hierholzer JC. Adenoviruses in the immunocompromised host. *Clin Microbiol Rev* 1992 ; 5 : 262-74.
 - 17) Perry RT, Halsey NA. The clinical significance of measles : a review. *J Infect Dis* 2004 ; 189 : S4-16.
 - 18) Goetz MB, Mathisen GE. Clinical course and treatment of adults with severe measles pneumonitis. *Clin Infect Dis* 1995 ; 21 : 443.
 - 19) Enders JF, McCarthy K, Mitus A, et al. Isolation of measles virus at autopsy in cases of giant-cell pneumonia without rash. *N Engl J Med* 1959 ; 261 : 875-81.
 - 20) Markowitz LE, Chandler FW, Roldan EO, et al. Fatal measles pneumonia without rash in a child with AIDS. *J Infect Dis* 1988 ; 158 : 480-3.
 - 21) Measles immunization in HIV-infected children. American Academy of Pediatrics. Committee on Infectious Diseases and Committee on Pediatric AIDS. *Pediatrics* 1999 ; 103 : 1057-60.
 - 22) Goon P, Cohen B, Jin L, et al. MMR vaccine in HIV-infected children : potential hazards? *Vaccine* 2001 ; 19 : 3816-9.
 - 23) Lin JC, Nichol KL. Excess mortality due to pneumonia or influenza during influenza seasons among persons with acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Intern Med* 2001 ; 161 : 441-6.
 - 24) Smud A, Nagel CB, Madsen E, et al. Pandemic influenza A/H1N1 virus infection in solid organ transplant recipients : a multicenter study. *Transplantation* 2010 ; 90 : 1458-62.
 - 25) Louie JK, Acosta M, Jamieson DJ, et al. Severe 2009 H1N1 influenza in pregnant and postpartum women in California. *N Engl J Med* 2010 ; 362 : 27-35.
 - 26) Ormsby CE, Rosa-Zamboni DD, Vázquez-Pérez J, et al. Severe 2009 pandemic influenza A (H1N1) infection and increased mortality in patients with late and advanced HIV disease. *AIDS* 2010 ; 25 : 435-9.
 - 27) Perez CM, Dominguez MI, Ceballos ME, et al. Pandemic influenza A (H1N1) in HIV-1-infected patients. *AIDS* 2010 ; 24 : 2867-9.
 - 28) Isais F, Lye D, Llorin R, et al. Pandemic (H1N1) 2009 influenza in HIV-infected adults : clinical features, severity, and outcome. *J Infect* 2010 ; 61 : 437-40.
 - 29) Riera M, Payeras A, Marcos MA, et al. Clinical presentation and prognosis of the 2009 H1N1 influenza A infection in HIV-1-infected patients : a Spanish multicenter study. *AIDS* 2010 ; 24 : 2461-7.
 - 30) Martinez E, et al. 2009 H1N1 virus infection in HIV+ adults. Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections 2010. Abstract 802LB.
 - 31) Tebas P, Frank I, Lewis M, et al. Poor immunogenicity of the H1N1 2009 vaccine in well controlled HIV-infected individuals. *AIDS* 2010 ; 24 : 2187-92.
 - 32) Marchiori E, Zanetti G, Hochhegger B, et al. High-resolution computed tomography findings in an HIV-positive patient with swine-origin influenza A (H1N1) virus-associated pneumonia. *Br J Radiol* 2010 ; 83 : 179.



結核

Tuberculosis

独立行政法人国立国際医療研究センター病院エイズ治療・研究開発センター病棟医長

照屋 勝治
Katsuji Teruya

Summary

HIV患者の急増に伴い、結核の中蔓延国である日本でもHIV合併結核の増加が懸念されている。HIV合併結核では薬剤耐性結核のリスクが高く、また結核の診断や治療の点でも、非HIV例とは異なったいくつかの問題点が存在している。従来、免疫再構築症候群(IRIS)のリスクや薬物有害事象の懸念から、まず結核治療のみを先行させ、抗HIV治療はある程度遅らせることが推奨されてきたが、2011年の抗HIV治療ガイドラインの改訂により、生存率改善の観点から結核発病早期からの抗HIV治療導入が推奨されるようになってきている。

Key words

- HIV合併結核
- RFP単独耐性
- インターフェロン γ 応答アッセイ (IGRAs)
- 免疫再構築症候群

はじめに

HIV感染症の病態は、「HIVが感染宿主のCD4細胞を破壊することにより体内のCD4細胞数を進行性に枯渇させ、細胞性免疫を破綻させるもの」と表現できる。細胞性免疫は、結核菌に対する感染防御機構において最も重要な役割を果たしているため、HIV患者では免疫不全の進行に伴い結核感染および発病のリスクがきわめて高い。HIV患者が最も多いアフリカにおいては、結核患者の30%以上がHIV患者であり、剖検による検討ではHIV患者の50%が活動性の結核を有している¹⁾。HIV合併結核患者のほとんどは途上国に存在しており、2000年現在の1,150万人のHIV合併結核患者のうち、7割がサハラ以南アフリカ、2割が東南アジアに存在する。一方、先進国においてはHIV合併結核の患者数は少ないが、1980年以降のHIVの蔓延によって多くの国で結核患者数の減少にブレーキをかける要因になっている。米国では、結核発症患者の3分の1がHIVにも感染していると報告している²⁾。日本は、先進国のなかでは例外的に結核の有病率が高く、結核の「中蔓延国」に位置付けられているため、今後のHIV患者の増加に伴い、重複感染例の増加が懸念される状況であるといえる。

本稿では、HIV合併結核の診断と治療に関する最近のTopicsについて概説する。

HIV患者における耐性結核のリスクと高い死亡率

イソニアジド(INH)、リファンピシン(RFP)の2

剤に耐性をもつ多剤耐性結核(multi-drug resistant tuberculosis: MDR-TB)や、INH, RFP, フルオロキノロンの3剤に加え、さらにアミカシン, カナマイシン, またはカプレオマイシン(発売中止)の少なくとも1剤に耐性をもつ超多剤耐性結核(extensively drug-resistant tuberculosis: XDR-TB)の世界的増加が報告されており、治療上の大きな問題となってきた。

HIV合併結核では薬剤耐性結核の頻度が高く、しかも非HIV例と比べて死亡率が高い。米国におけるMDR-TBの頻度は、1980年代は0.4%であったのが1991年には3.5%と増加しており、多くはニューヨークにおける発生であった。米国疾病管理予防センター(CDC)は8件のMDR-TBのアウトブレイクを解析し、患者の90%がHIV患者であったと報告している。多変量解析では、HIV感染自体がMDR-TBの独立したリスク因子であった³⁾。同じく、米国における1993年～2007年の83例のXDR-TBの報告例では31例(37.3%)がHIV患者であり、死亡率も非HIV患者の9.6%(5/52)に比べ、HIV患者では67.7%(21/31)と高かった⁴⁾。エストニアの検討からも、HIV感染(OR 3.12)は結核の治療歴(OR 10.54)やアルコール依存(OR 1.98)と並んでXDR-TBのリスク因子となっている⁵⁾。南アフリカにおいて、2005年～2007年に診断された272例のMDR-TBと382例のXDR-TBの検討では、HIV感染の合併率はそれぞれ90%, 98%, 1年後の死亡率はそれぞれ71%, 83%であり、MDR-TBの40%, XDR-TBの51%は診断後30日以内に死亡していた⁶⁾。

Dhedaらは、南アフリカの4つの地域の指定治療施設において2002年8月～2008年2月に診断されたXDR-TB 195例について、予後に関するリスク因子の解析を行った。21例は治療開始前に死亡し、174例が結核治療を受けたが(HIV患者は82例)、62例(36%)は経過観察期間中に死亡した。HIV患者の死亡率は41%(34/82)であり、非HIV患者の30%(28/92)と比べて高かったが有意差はなかった($p=0.13$)。モキシフロキサシン(MFLX)の使用は死亡率を89%減少させ($p=0.03$)、使用薬剤数が多い場合には死亡率が低かった($p<0.0001$)。多剤併用療法(HAART)の有無による解析では、ハザード比0.38($p=0.01$)でHAART実施群の死亡率が低かった⁷⁾。

明確な機序は不明であるが、HIV感染自体がRFPに対する単独耐性獲得のリスク因子であるという報告

も少なくない。Sandmanらの検討では、RFP単独耐性の21例と48例の対照患者とを比較し、RFP単独耐性患者ではHIV患者が多く(81% vs 46%, $p=0.03$)、また播種性病変(48% vs 19%, $p<0.001$)の症例も多かった⁸⁾。HIV患者では結核治療中の耐性獲得率も高く、その多くはRFPの単独耐性であるという報告もある⁹⁾。HIV患者でリファマイシン系薬剤の血中濃度が低いとする報告もなされており、RFP単独耐性獲得の機序として薬剤吸収不良が関連している可能性も示唆される¹⁰⁾。

以上より、HIV合併結核では耐性菌感染のリスクが高いことを念頭に置いたうえで、治療前に菌の検出および薬剤感受性試験を行うことがきわめて重要であり、治療反応性が不良の場合には薬剤感受性試験を繰り返す必要がある。特に、HIV合併結核では炎症が乏しいことから呼吸器由来検体の採取が容易でない場合があり、診断自体がしばしば困難である。そのため、喀痰塗抹検査を含め各種検査でも結核感染が証明できず、エンピリック治療が必要となることも少なくないが、その場合でも治療前に最低3回以上の培養検体(胃液採取含む)を採取しておくべきであろう。

当科の経験例で薬剤耐性検査が実施可能であった102例の検討¹¹⁾では、INH耐性が4.9%, RFP耐性が2.9%, 多剤耐性(RFP+INH)が2.0%, 1つ以上の薬剤に耐性を有する症例は11.2%であった。

インターフェロン γ 応答アッセイ(IGRAs)の結核診断における意義

HIV患者におけるツベルクリン反応(ツ反)は、CD4数 ≤ 200 cells/ μ Lの免疫不全例では活動性結核患者の30%程度しか陽性にならず、CD4数 >200 cells/ μ Lでも50%程度しか陽性にならない¹²⁾ことや、BCGが接種される日本においては結核診断における特異度に大きな問題があるため、結核診断における本検査の臨床的意義は乏しい。一方、インターフェロン γ 応答アッセイ(interferon- γ release assays: IGRAs)(クオンティフェロン, T-SPOT)は、結核の潜伏感染(latent tuberculosis infection: LTBI)の診断や活動性結核の補助的診断法として非HIV患者における有用性の知見が集積され、すでにツ反に代わる検査法となっており、HIV患者においてもその有用性が期待されている。

結核菌由来の特異抗原(ESAT-6, CFP-10, TB7.7)

でリンパ球を刺激してインターフェロン γ 産生能を測定するクオンティフェロン-3G(QFT-3G)では、ツ反で用いられるPPD抗原とは違って結核菌に対する特異度が高い。あらかじめ刺激抗原が塗布された3組の専用採血管(陰性コントロール・結核菌抗原・陽性コントロール)で採血を行い、十分攪拌した後に37℃の保温器に入れることにより直ちに刺激培養が開始できる仕組みになっている。現時点では、HIV患者における本検査法の有用性について、いまだ十分な検討がなされていない。インターフェロン γ 産生能で評価するため、細胞性免疫能が低下しているHIV合併結核例では感度が低下する可能性があるが、本検査法は特異度が高いため、陽性結果の場合の臨床的意義は高いと考えられる。なお、結果の解釈にあたっては、本検査法で用いられる結核菌特異抗原が例外的に*M. marinum*と*M. kansasii*由来の抗原に交差反応する点について念頭に置いておく必要がある。

590例のHIV患者を対象としてQFT-3Gの有用性を検討した報告¹³⁾では、27例の陽性者が検出されLTBIが示唆された。マイトジェンであるPHAに対する反応性はCD4数が低い場合に有意に低下しており($p < 0.001$)、結果判定が不能となるPHA non-responderはCD4数 < 100 cells/ μ Lの場合は23.5%で認められた。また、CD4数が低いほど“intermediate(判定保留)”の判定となる傾向があった。理論的には、結核罹患率はCD4数にかかわらず同等か、もしくはCD4数が低いほど罹患率が高くなると予想される(抵抗性減弱により曝露後の感染率が高いため)が、論文中のデータをもとに筆者が作成した表1では、CD4数の低下に伴い陽性率が低下していた。以上より、①CD4数 < 300 cells/ μ Lの時点ですでに感度の低下があること、また②CD4数 < 100 cells/ μ Lの場合には感度が著しく低下しており本法の有用性はほとんどない可能性があること、などが示

唆される。

他の免疫不全例と比較した場合でも、HIV患者ではIGRAsの感度が低い可能性がある。ツ反、QFT-3G、T-SPOTの陽性率に関し、肝移植患者120例、HIV患者116例、血液悪性腫瘍患者95例を対象に行った検討では、陽性率が他の2法と比べてツ反で10.9%と低く、QFT-3Gが15.1% ($p = 0.033$)、T-SPOTが18.4% ($p < 0.001$)であった。いずれかの検査が陽性であった割合はHIV患者が9.5%と有意に低く、肝移植患者35.8% ($p < 0.001$)、血液悪性腫瘍患者29.5% ($p < 0.001$)であった。陽性コントロールの反応不良で判定不能となった割合は、QFT-3Gで有意に高かった(QFT-3G 7.2% vs T-SPOT 0.6%, $p < 0.001$)¹⁴⁾。

一方、新しい診断法として尿中の結核菌由来抗原(lipoarabinomannan : LAM)を直接検出する方法も検討されている。この検査法では、感度がHIV患者のほうが非HIV患者よりも高く($p = 0.001$)、またHIV患者でもCD4数 < 200 cells/ μ Lの重度免疫不全例のほうが、CD4数 > 200 cells/ μ Lの場合よりも有意に感度が高い($p = 0.003$)。CD4数 < 200 cells/ μ Lの塗抹陰性、培養陽性症例の25%で本検査が陽性であったと報告されている¹⁵⁾。結核菌抗原に対するインターフェロン γ 産生をみるIGRAs検査では、結核感染の有無を判定することはできるが、潜伏感染なのか、あるいは活動性結核なのかを判定することは原理上不可能であり、陽性結果が活動性結核を意味する本検査とは本質的に異なっている。また、結核菌に対する免疫応答をみているIGRAsは、宿主の免疫不全が進むほどその感度が低下しうが、抗原検出検査では感度が宿主の免疫状態に左右されず、場合によっては免疫不全宿主ほど高い感度が期待できる。今後は、両検査の併用による診断への応用が期待できるかもしれない。

表1. HIV患者を対象としたQFT-3Gの有用性の検討

CD4数	患者数*	陽性	陰性	判定不能	陽性率	判定不能率
<100	17	0	13	4	0%	23.5%
100~199	37	1	35	1	2.7%	2.7%
200~299	63	2	55	5	3.2%	7.9%
≥ 300	473	24	440	10	5.1%	2.1%
合計	590	27	543	20	4.6%	3.4%

* : 患者数は(陽性)+(陰性)+(判定不能)と一致するべきであるが、数が一致しない箇所がある。

(文献13)より筆者作成)

結核の治療について

現在のところ、抗結核薬の効果はHIV患者であっても非HIV患者と同等であるという考え方が主流である。すなわち、非HIV患者の結核と同様、6ヵ月短期治療で十分であるとする考え方が多いが、短期治療と9～12ヵ月の延長治療を比較すると前者で再燃率が高かったとする報告がいくつかある¹⁶⁾。HIV合併結核患者を対象として、週3回の間歇治療における6ヵ月治療(n=167, 2HREZ/4HR)と9ヵ月治療(n=160, 2HREZ/7HR)に無作為割り付けした検討では、治療成功率(83% vs 76%)および3年時点での死亡率(36% vs 35%)で両群に差を認めなかったが、治療後の再発率が6ヵ月治療群で有意に高いという結果であった(15% vs 7%, $p<0.05$)¹⁷⁾。米国胸部疾患学会(ATC)のガイドラインでは、HIV患者においても基本的に非HIV患者と同じ治療でよいとしているが、他方でINHとrifapentine(本邦未承認)の週1回投与による治療はHIV患者で再発率が高いとして禁忌としており、治療による効果がHIV患者と非HIV患者で全く同一ではないことを認めている。標準治療法で治療を行っても、非HIV患者と比べ再発が多く死亡率が高いという報告もある¹⁸⁾。

HIV患者では肺外結核の頻度も高いが、結核性髄膜炎や心外膜炎など非HIV患者ではステロイドが併用される病態では、臨床的な判断が求められる。ジンバブエのスタディでは、6週間のステロイド投与によりHIV患者の心外膜炎における著明な生存率の改善がみられたと報告している¹⁹⁾。一方で、胸膜炎の患者を対象にしたプレドニゾン投与に関する大規模な無作為比較試験(RCT)では、生存率における効果はみられなかった²⁰⁾。髄膜炎を対象とした検討でも、ステロイド併用による死亡および機能障害の点のベネフィットは証明されなかった²¹⁾。

抗結核薬と抗HIV薬の相互作用について

抗HIV治療を導入する場合には、RFPが抗HIV薬である非核酸逆転写酵素阻害薬(NNRTI)とプロテアーゼ阻害薬(PI)の代謝に大きな影響を与える点が問題となる。RFPは、薬物代謝酵素であるCYP3A4を誘

導することでPIの血中濃度を大幅(75～95%)に低下させるため、基本的にRFPとPIは併用できない。PIを少量のリトナビル(RTV)と併用するboosted PIが行われるようになり、この場合にはRFPとPIを併用できる可能性があるが現時点ではデータが限られており、基本的には推奨されない。よって、結核の治療と抗HIV治療(HAART)を併用する場合には、RFPをリファブチン(RFB)に変更するのが一般的に推奨されている方法である。

RFBの抗結核効果については十分なエビデンスがあるとは言いがたいが、HIV患者50例を対象に行ったウガンダの検討では、培養陰性化までの期間はRFPとRFBで差がなかったと報告されている²²⁾。非HIV患者の検討でも、RFPとRFBの6ヵ月治療におけるrandomized trialで両者の有効性に差異はみられていない。

RFPによる酵素誘導は導入から2週間で最高に達し、投与を中止した場合でも2週間は誘導された酵素の影響が残るとされるため、HAARTを開始する場合には、まずRFPをRFBへ変更し、変更後2週間程度経過して誘導された酵素がベースラインまで戻るのを待ってからHAARTを導入するほうが安全である。

抗HIV薬の種類は多数であり新規薬剤が次々として出てきているため、薬物相互作用についての最新の情報を入手しておくことが重要である。米国CDCのサイト²³⁾が参考になる。主要な相互作用と推奨投与量について表2, 3にまとめた。

上述のように、RFBは抗結核治療とHAARTを同時に行う際に使用されるが、HIV患者においてはRFBの薬物動態が非HIV患者と異なっている可能性を示す報告が出ている。HIV合併結核患者10例を対象としたRFBの薬物動態に関する検討では、非HIV患者の場合はRFBの C_{max} は通常 $0.3\sim 0.9\mu\text{g/mL}$ に分布するが、HIV患者で通常量の300mg週3回を内服した場合は10例中5例で、ロピナビル(LPV)/rと併用してRFB 150mg週3回内服した場合には10例中9例でRFBの C_{max} は $0.3\mu\text{g/mL}$ 未満の低値となっており、治療に十分な血中濃度に達していなかった。耐性獲得阻止のためには、 AUC_{0-24} が $3.2\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ 以上となる必要があるが、HIV患者で中央値は2.71(RFB単独内服)、2.97(LPV/rと併用)であった。10例中1例では結核の再発がみられ、RFBに対する耐性を獲得していた²⁴⁾。