

- Multicentric Castleman's Disease; Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus-Encoded vMIP-I and vMIP-II. *Virology* 425:95-102, 2012. doi.org/10.1016/j.virol.2012.01.008
- 5) Noma, S., Ohya-Shimada, W., Kanai, M., Ueda, K., Nakamura, T., Funakoshi, H: Overexpression of HGF attenuates the degeneration of Purkinje cells and Bergmann glia in a knockin mouse model of spinocerebellar ataxia type 7. *Neuroscience Res.* 73(2):115-21. 10.1016/j.neures.2012.03.001.
 - 6) Ueda, K: For the future studies of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. An Editorial.*Frontiers in Virology* 3: 1-2, 2012. doi: 10.3389/fmicb.2012.00237.
 - 7) Ueda, K: Kaposi's Sarcoma-associated Herpesvirus Induced Tumorigenesis; how viral oncogenic insults are evaded. *J.Blood and Lymph*2:3, 2012. doi.org/10.4172/2165-7831.1000e109.
 - 8) Ueda, K., Ohsaki, E., and Omori, H: Successful Generation of Hepatitis B virus (HBV) Pseudotype; a versatile tool for Identification of the HBV Receptor and Investigation of HBV infectivity. *Biophys. Res. Comm.* under revision.
 - 9) 上田啓次：HHV-8「病原細菌・ウイルス図鑑」新居志郎ら編、北海道大学出版会（編集中）
 - 10) 上田啓次：B型肝炎のウイルス学. 化学療法の領域 48:125-133, 2012.
 - 11) 上田啓次：遺伝子挿入HBVを用いた感染リセプターの探索. 肝胆膵 65：601-609, 2012.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当無し

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

該当無し

新規治療薬の開発

研究分担者 藤室 雅弘

京都薬科大学 細胞生物学 教授

研究要旨

カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV) は健常者に感染すると深刻な疾患を起こさずに潜伏感染する。しかし、感染者のエイズや免疫抑制剤投薬などの免疫不全時に、KSHV はカポジ肉腫 (KS) や原発性体腔液性リンパ腫 (Primary effusion lymphoma: PEL) を起こすと考えられている。日本においては、HIV 感染者数や臓器移植件数の増加にともない KSHV 感染症は深刻な問題になりつつある。今年度、我々は PEL を標的とした抗腫瘍化合物の探索を実施した。その結果、核酸誘導体のサンギバマイシンが PEL 細胞内の Erk シグナル伝達を阻害し、PEL にアポトーシスを誘導することを見いだした。また、各種官能基を導入した水溶性フラレン誘導体の PEL 細胞株に対する抗腫瘍効果を解析した結果、一部のフラレン誘導体は、KSHV 感染 PEL 細胞株群特異的に Caspase9 依存的な細胞増殖抑制効果を示した。平成 23 年から実施された本研究により、プロテアソーム阻害剤、HSP90 阻害剤、サンギバマイシン、フラレン誘導体が PEL に対する抗腫瘍効果を有していることを明らかにした。

A. 研究目的

Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) は、1994 年に Chang らのグループによりカポジ肉腫より同定され、8 番目に発見されたヒトヘルペスウイルスであることからヒトヘルペスウイルス 8 型 (HHV-8) とも呼ばれる。

ヒト体内において、KSHV は B 細胞と血管内皮細胞に潜伏感染することが明らかにされている。KSHV のトロピズム (細胞指向性) を決定する細胞のウイルスレセプターは明確ではないが、KSHV は他のヘルペスウイルス同様、細胞膜のヘパラン硫酸に親和性を有し、細胞のインテグリン $\alpha 3\beta 1$ や xCT とも結合する。KSHV の潜伏感染者の割合は、アフリカでは 50% 以上、EU や北米では 10% 程度、日本では 2% 以下と報告されている。KSHV の伝播経路は、唾液や粘膜分泌液を介した経口感染、性交渉等による接触感染、または母子感染が多い。

KSHV は健常者に感染すると重篤な疾患を伴わないで潜伏感染する。KSHV は標的細胞に吸着・侵入後、脱核して 2 本鎖 DNA として感染細胞核内で維持される。KSHV 潜伏感染時、KSHV 遺伝子は両側のターミナルリピートが繋がった環状 2 本鎖 DNA (エピゾーム) として存在し、ウイルスの再活性化により溶解感染 (lytic infection) に移行し、ウイルスの複製を開始する。なお、KSHV のエピ

ゾーム維持にはウイルス蛋白質 LANA (ORF73) が、KSHV の再活性化には転写因子である RTA (ORF50) が必須である。

KSHV の潜伏感染は、エイズ関連型の PEL や多発性キャスルマン病 (multicentric Castleman's disease: MCD) において、極めて高い確率で検出され、それらの発症に深く関与していると考えられている。また、KSHV はエイズ関連、非関連のどちらの KS でも、ほぼ 100% の確率で潜伏感染している。エイズ関連非ホジキンリンパ腫の一つである PEL と、EBV 関連のバーキットリンパ腫や他のエイズ関連非ホジキンリンパ腫とでは、発現する遺伝子パターンが異なる。一方、カポジ肉腫や PEL と比べ、MCD での KSHV 陽性率は低いが、エイズ関連型 MCD 発症者では、KSHV が高頻度に検出される。KSHV の DNA 配列は、発がんウイルスの EBV や herpesvirus saimiri (HVS) と相同性を持ち、EBV や HSV と同亜科の $\gamma 2$ ヘルペスウイルス亜科 (rhadinovirus 属) に分類される。KSHV ゲノムは、約 170kbp の遺伝子配列をもち、両側を繰り返し配列 (terminal repeat) に挟まれた約 90 個の ORF (open reading frame) を有している。KSHV の ORF は、HVS の ORF との相同性に対応させて ORF4-75 と分類され、また、KSHV に特徴的な ORF は K1-K15 と名付けられている。

KSHV は潜伏感染 (latent infection) と溶解感染 (lytic infection) の2種類の感染様式を有している。KSHV がコードする遺伝子は、latent 期と lytic 期の発現時期で区別され、潜伏感染期遺伝子 (latent gene) と溶解感染期遺伝子 (lytic gene) に分類され、lytic gene は前初期 (immediate early:IE)、初期 (early)、後期 (late) 遺伝子に分類される。また、KSHV ゲノムがコードする遺伝子産物には、細胞増殖亢進、抗アポトーシス、トランスフォーム、免疫回避に関連するものが多数含まれている。また、KSHV は、宿主のシグナル伝達を巧みに利用しウイルスと細胞ゲノムの転写制御を行ない、感染維持や発がん、ウイルス複製を行なう。

KSHV 関連疾患における化学療法に関しては、KS に対してはドキシソルピシンのリポソーム封入剤 (ドキシル) が用いられ、PEL に対しては CHOP 療法 (アドリアマイシン+シクロホスファミド+ビンクリスチン+プレドニゾロン)、または、CHOP + 抗ヒト CD20 抗体のリツキシマブ (Rituximab) による化学療法が用いられる。現在における KSHV 関連腫瘍に対する化学療法の問題点として、その副作用や抗がん剤排出ポンプを発現した多剤耐性がん細胞が指摘されている。

これらの現状をふまえ、本研究では KSHV 感染 PEL 細胞に対する抗腫瘍化合物の探索と作用機序の解析を行った。その結果、サンギバマイシンが PEL 細胞内の Erk シグナル伝達を阻害し、アポトーシスを誘導することを見いだした。また、マロン酸型、ピロリジニウム型、プロリン型、アミノ酸型などの水溶性フラレン誘導体を用いて、KSHV 感染 PEL (および非感染) 細胞に対する細胞増殖阻害効果を解析した。そのなかで、ピロリジニウム型フラレン誘導体は、PEL 細胞株に Caspase9 依存的な細胞増殖抑制効果を示した。

B. 研究方法

B-1. 細胞培養と生細胞の測定

実験に用いた PEL 細胞株と KSHV 非感染 B 細胞株

BC3 : KSHV (+) /EBV(-)

BCBL1 : KSHV (+) /EBV(-)

HBL6 : KSHV (+) /EBV(+)

BC2 : KSHV (+) /EBV(+)

Raji : KSHV (-) /EBV(+)

DG75 : KSHV (-) /EBV(-)

Ramos: KSHV (-) /EBV(-)

上記の細胞は、10% FBS を含む RPMI-1640 で培養した。細胞増殖アッセイには、96-well plate に細

胞数 5×10^4 cells/well となるよう細胞を加え、さらに各種化合物をフェノールレッド非含有の RPMI 1640 で希釈し、細胞培養液 100 μ l/well で 24 時間培養を行った。培養後、生存細胞数を測定するため、CCK-8 を添加し呈色反応後に 450 nm における吸光度を測定した。なお、薬物無添加の細胞数を 100% として各濃度の薬物添加 24 時間後の生存腫瘍細胞数の割合を算出した。

B-2. 間接蛍光抗体染色 (IFA)

薬物処理した PEL 細胞 (または、非感染細胞) 25000 個を PBS で wash し、スライドガラスに細胞懸濁液を塗布後、メタノールで固定した。1% BSA 溶液でブロッキングし、1 次抗体と 2 次抗体の各 1 時間の反応後、マウンティング溶液 (ProLong Gold antifade reagent) を滴下してカバーガラスを被せ固定した。検体は蛍光顕微鏡 U-RFL-T OLYMPUS にて観察し、画像解析ソフト DP2-BSW を用いてデータを得た。

B-3. ウェスタンブロッティング

本研究のウェスタンブロッティングおよび IFA で用いた抗体は下記のとおりである。

- ・ Anti-p21, p27, active-PARP, p-Raf(ser259), p-I κ B α , p-p53 (Ser19), phospho-Erk1/2 (pT202/pY204), p-p38 (pT180/pY182), p-Akt(Ser473) antibody (BD Biosciences)
- ・ Anti-active caspase-3, caspase-9, caspase-7 antibody (Cell Signaling)
- ・ Anti-caspase-8, HHV-8-K-bZIP antibody (SANTA CRUZ)
- ・ Anti-actin antibody (SIGMA)

15 ml 遠心管に BC3 細胞培養液 (4×10^5 cells/ml) を 2 ml 加え、約 2 時間培養後、各種薬物を添加した。細胞培養液 2ml を回収し、1200 rpm で 5 分間遠心して細胞を PBS で洗浄した。PBS で洗浄し遠心により得られた細胞に SDS-PAGE サンプルバッファ 0.5 ml を加えて細胞サンプルを調製した。SDS-PAGE は Laemmli 法に従って行った。ゲル内のタンパク質をニトロセルロース膜へ転写後、Can Get Signal 中で各種 1 次抗体と 2 次抗体とを反応させた。シグナルの検出は、ECL プライムを用いてルミノ・イメージアナライザー ImageQuant LAS4000 を用いて発光を検出した。

B-4. リアルタイム PCR

BC3 細胞の培養液に、TPA を終濃度 20 ng/ml で添加した。培養上清を DNase I 処理し、培養液に

含まれるウイルス粒子からウイルス DNA を精製した。KSHV の ORF50 プライマー (Y015、Y016) を用いてリアルタイム PCR を行い、培養液に含まれる KSHV ゲノムのコピー数を算出した。ゲノムのコピー数算出のため、KSHV の ORF21 遺伝子を pCIneo に組み込んだプラスミドを 1、10⁴、・・・10⁶、10⁷ コピー/μl に希釈したものをスタンダードサンプルとして同時に PCR を行い、得られた検量線から KSHV ゲノムのコピー数を算出した。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換え等の実験に関しては当該研究施設の遺伝子組換え実験倫理委員会の承認を得た上で実験を行った。

C. 研究標的結果

C-1. PEL を標的とした抗腫瘍化合物の探索

本研究では、葉酸代謝拮抗剤のメトトレキサート、ドキソルビシンの立体異性体であるエピルビシン、HDAC 阻害活性を有し抗てんかん薬のバルプロ酸、ATP 誘導体で PKC 阻害剤のサンギバマイシンについて着目し、これらの PEL に対する抗腫瘍効果について解析を行った。アッセイを行った化合物の構造は図 1 に示す。

KSHV 非感染 B リンパ腫株と PEL 細胞株の細胞培養液に各種濃度のエピルビシン、メトトレキサ

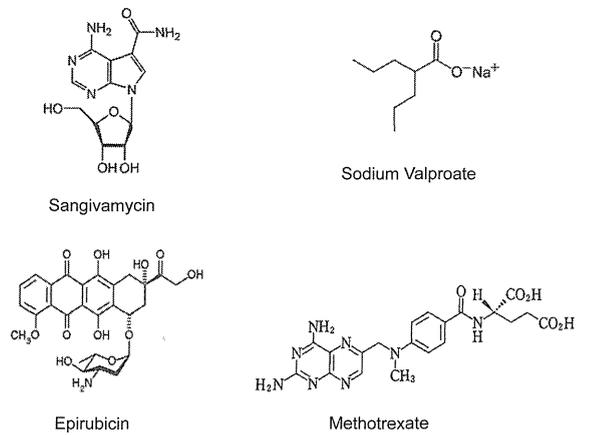


図 1 評価した化合物の構造

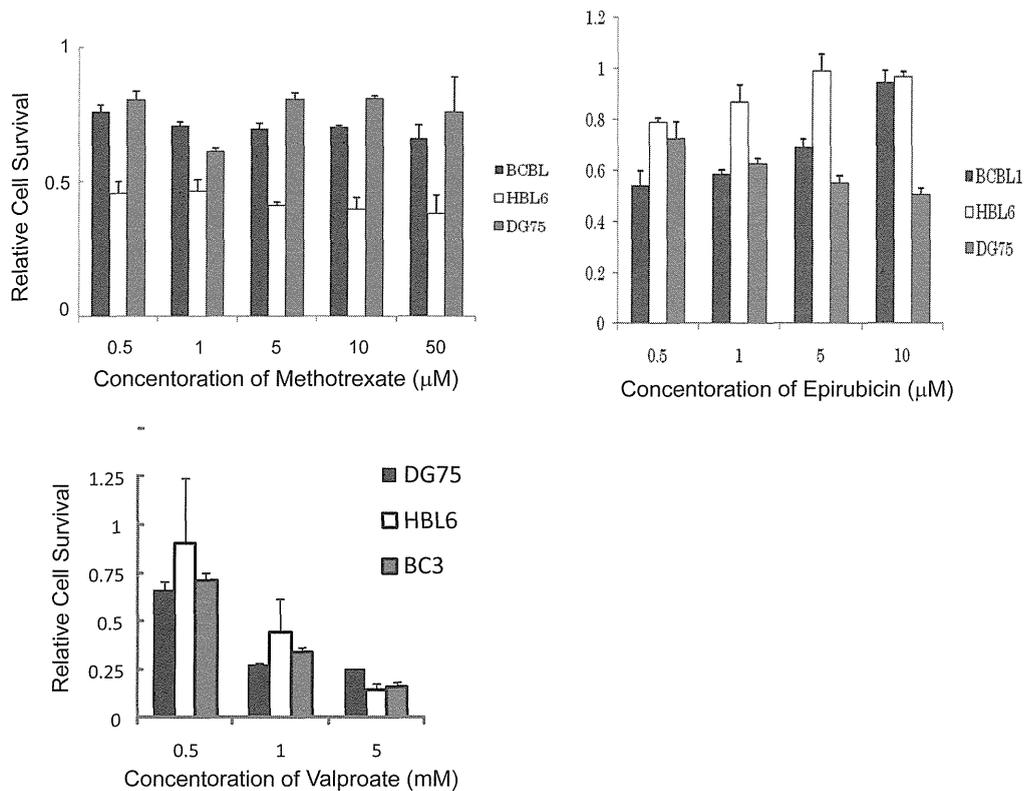


図 2 エピルビシン、メトトレキサート、バルプロ酸の PEL に対する増殖阻害活性

各細胞株 (KSHV 感染 PEL: BCBL1, HBL6, BC3、非感染: DG75) の培養液に各種濃度の薬剤を添加し 24 時間後の生細胞数を CCK-8 で測定した

ート、バルプロ酸、サンギバマイシンを添加し 24 時間後の生細胞数を測定した (図 2)。メトトレキサートは、一部の (HBL6) の PEL 細胞株には 0.5 μ M という低濃度で殺細胞活性を有していた。エピルピシンは低濃度で腫瘍細胞の増殖を阻害したが、その効果は KSHV 感染・非感染に無関係であった。バルプロ酸は濃度依存的に KSHV 感染・非感染の両タイプの細胞株の増殖を阻害した。サンギバマイシンは、0.05 μ M という低濃度で PEL 細胞の増殖を強く阻害した (図 3)。

次に、サンギバマイシン添加による PEL 細胞の生存率低下の原因を明らかにするためイムノブロットと蛍光抗体染色により解析した。サンギバマイシン処理した PEL 細胞抽出液を用い、ウエスタ

ンブロット解析を行った結果、サンギバマイシンは PEL 細胞内の caspase-8 には影響を与えなかったが、caspase-9 と caspase-7 の活性化、さらに PARP の切断を誘導した。したがって、サンギバマイシン処理により PEL 細胞のアポトーシスが誘導されることが確認された。

次に、アポトーシスや細胞生存に関連するシグナル伝達のサンギバマイシン処理による影響を解析した結果、サンギバマイシンは PEL 細胞内の Akt のリン酸化 (活性化) の阻害、さらに、Raf の 473 番目 Ser のリン酸化 (活性化) と Erk の 202Thr と 204Tyr のリン酸化 (活性化) を阻害した。これらの結果より、サンギバマイシン処理は PEL 細胞の Akt 経路と MAP キナーゼ経路を阻害し、さらに

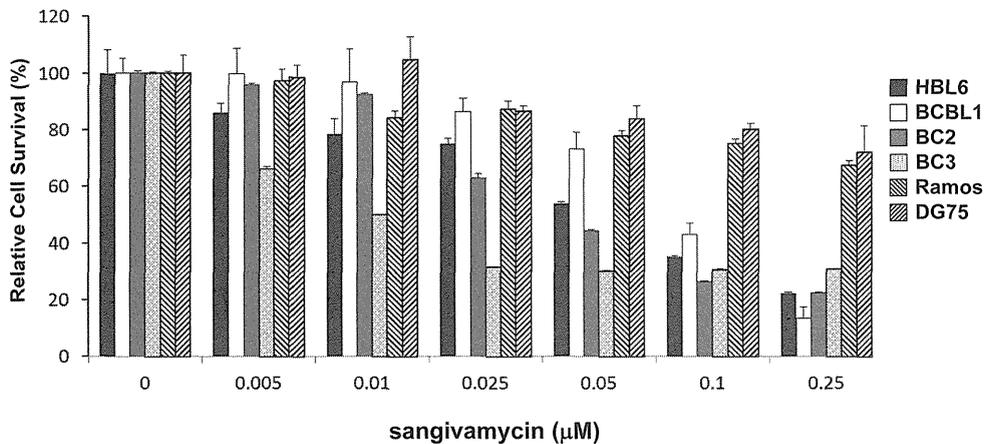


図 3 サンギバマイシンの PEL 細胞株に対する増殖阻害活性

各細胞株 (PEL: BCBL1, HBL6, BC3, BC2, KSHV 非感染: DG75, Ramos) の培養液に各濃度のサンギバマイシンを添加し 24 時間後の生細胞数を CCK-8 により測定した

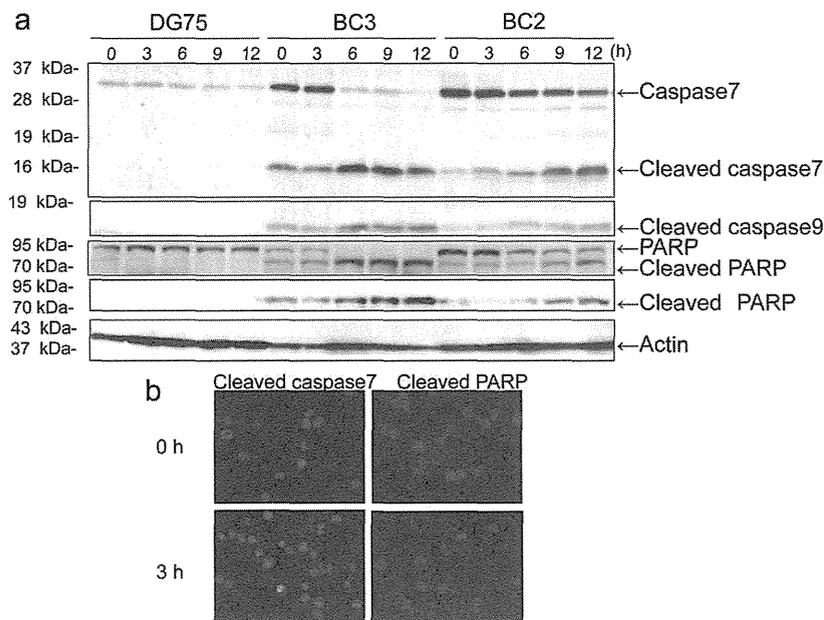


図 4 サンギバマイシンはカスパーゼ 9 を活性化する

(a) 細胞培養液に 0.1 μ M のサンギバマイシンを添加し経時的にサンプリングし、各種カスパーゼ抗体を用いてウエスタンブロット (b) BC3 の培養液にサンギバマイシン (終濃度 0.1 μ M) を添加し 3 時間後のカスパーゼ 7 の活性化を蛍光抗体染色にて観察した

アポトーシスを誘導することが明らかになった。なお、サンギバマイシンは PEL 細胞に潜伏感染している KSHV の溶解感染移行や PEL 細胞内で恒常的に活性化されている NF- κ B 経路には影響を与えなかった。

次に、サンギバマイシンの KSHV 複製に対する影響を解析した。PEL 細胞 (BC3 細胞) の培養液に、

TPA を添加し、培地中に放出されたウイルス粒子由来の KSHV ゲノムをリアルタイム PCR にて測定した。その結果、サンギバマイシンは KSHV 複製に対して影響を与えなかったことより、KSHV に対する抗ウイルス活性は有していなかった。

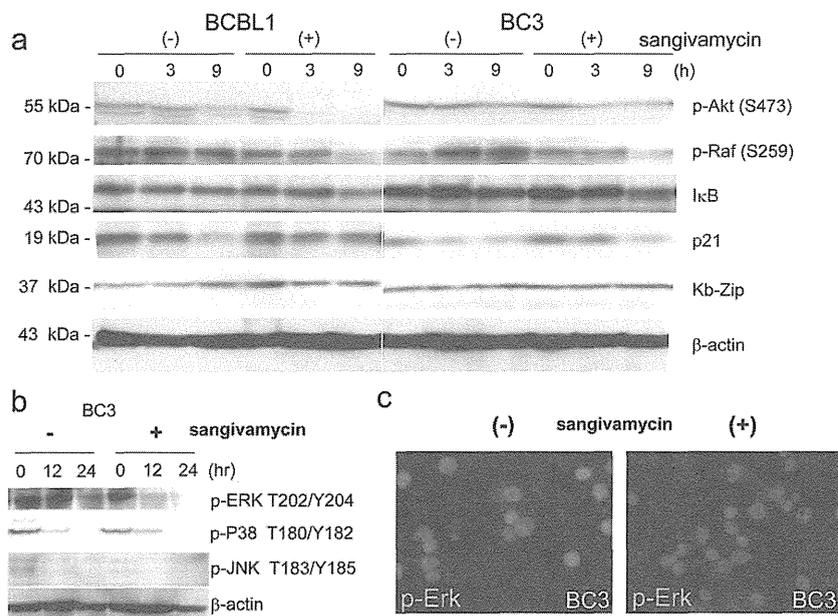


図 5 サンギバマイシンは PEL 細胞の Raf-Erk 経路を阻害する

(a, b) PEL 細胞 (BCBL1, BC3) の培養液にサンギバマイシン (終濃度 0.1 μ M) を添加し経時的にサンプリングし、各種抗体を用いてウエスタンブロットを行った。(c) BC3 の培養液にサンギバマイシン (終濃度 0.1 μ M) を添加し 1.5 時間後の Erk のリン酸化を蛍光抗体染色にて観察した

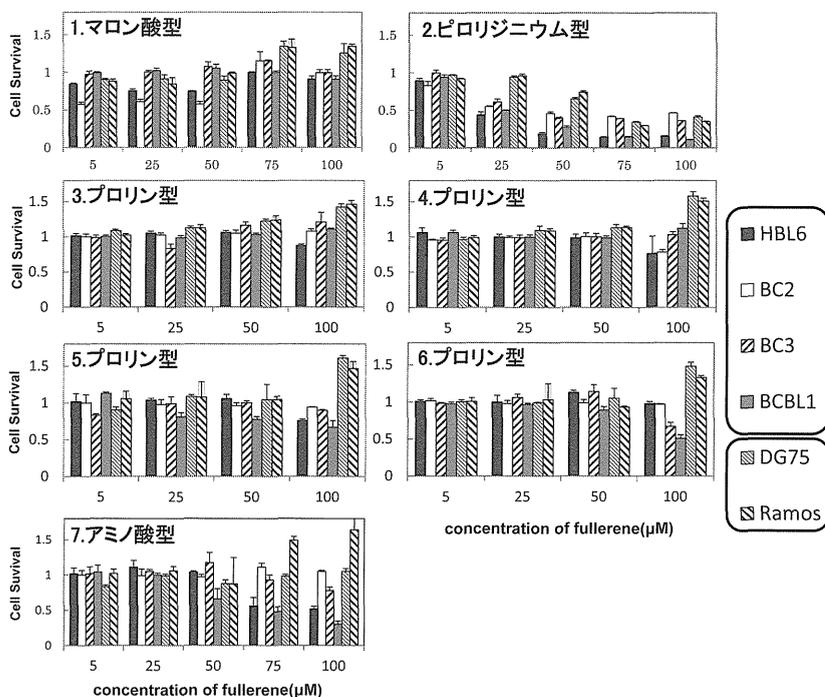


図 6 フラーレン誘導体の PEL 細胞に対する細胞増殖抑制効果

各種細胞株 (PEL: BCBL1, HBL6, BC3, BC2, KSHV 非感染: DG75, Ramos) の培養液に各濃度のフラーレン誘導体を添加し 24 時間後の生細胞数を CCK-8 により測定した

C-2. 水溶性フラレーン誘導体による PEL 細胞のアポトーシス誘導

マロン酸型、ピロリジニウム型、プロリン型、アミノ酸型フラレーン誘導体を用いて、KSHV 感染 PEL 細胞株と非感染 B リンフォーマ株に対する細胞増殖阻害効果を解析した (図 6)。なお、これらの誘導体類は慶應大学 薬学部 増野匡彦先生より恵与いただいた。細胞培養液に各フラレーン誘導体を添加し、24 時間後に生細胞数を測定した。その結果、アミノ酸型フラレーンは、KSHV 感染と非感染の両方の種類のリンフォーマの細胞数を減少させた。また、ピロリジニウム型フラレーンは、非感染と比較して KSHV 感染 PEL 細胞株に対して 0.05 μ M という低濃度で有意に生細胞数を減少させた (図 7)。

次に、ピロリジニウム型フラレーン添加による PEL 細胞のアポトーシス誘発に起因するの否かを明らかにするため、caspase の活性化について解析した。その結果、ピロリジニウム型フラレーンは PEL 細胞内の caspase-3 と caspase-9 の切断 (活性化) と PARP の分解を生じさせることで、PEL にアポトーシスを引き起こしていた。また、ピロリジニウム型フラレーンは PEL 細胞内の p53 の発現や安定化に影響は与えなかったが、p21 の発現を亢進させていた。なお、ピロリジニウム型フラレーンは PEL 細胞内の NF- κ B、MAPK、Wnt、PI3-Akt シグナルなどの細胞の生存とアポトーシスに関わるシグナル伝達に影響を及ぼさなかった。引き続き、ピロリジニウム型フラレーンによる PEL 内のアポトーシス誘導の機構解析を行うとともに、

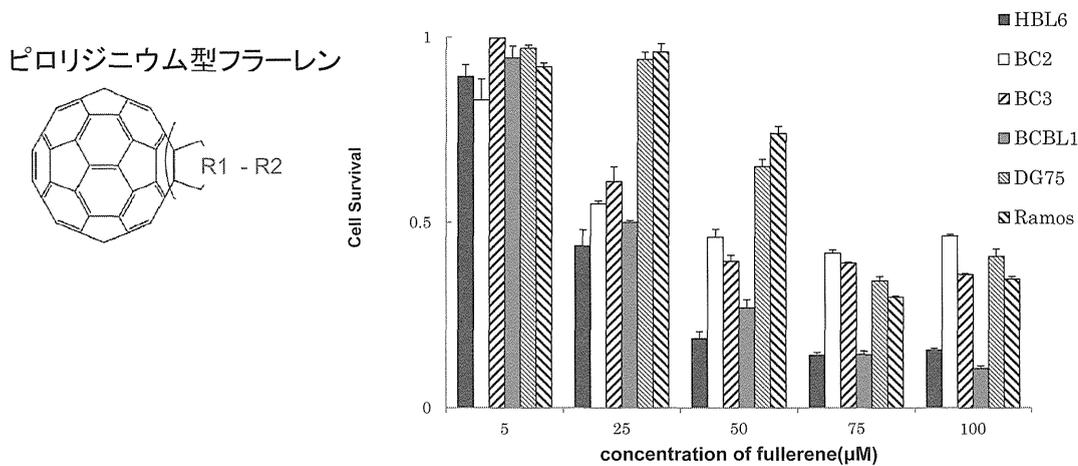


図 7 ピロリジニウム型フラレーン誘導体の PEL 細胞に対する細胞増殖抑制

各種細胞株 (PEL: BCBL1, HBL6, BC3, BC2, KSHV 非感染: DG75, Ramos) の培養液に各濃度のピロリジニウム型フラレーン誘導体を添加し 24 時間後の生細胞数を測定した

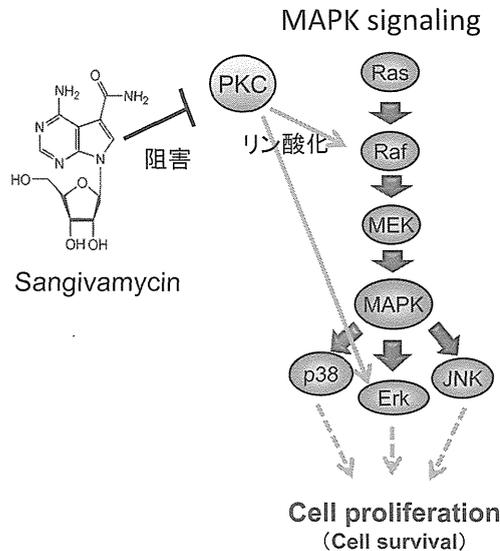


図 8 サンギバマイシンによる Raf-Erk 経路の阻害

プロテインキナーゼ C (PKC) は Raf と Erk のリン酸化し MAPK 経路を正に制御している。サンギバマイシンは PEL 細胞内の PKC を阻害して Erk の活性化を抑制すると考えられる

ピロリジニウム型フラレンの KSHV に対する抗ウイルス活性の測定を実施する。

D. 考察

今回 PEL に対する殺細胞活性を評価したエピルビシンはアントラサイクリン系の抗腫瘍剤アドリマイシン(ドキシソルビシン)の立体異性体であり、ドキシソルビシンと同様の抗腫瘍性を示すが、毒性が少ない薬剤である。メトトレキサートは葉酸代謝拮抗剤であり、肉腫や急性白血病に対する抗腫瘍薬として、また抗リウマチ薬として臨床使用されている薬剤である。バルプロ酸は HDAC 阻害活性や抗腫瘍活性を有し、抗てんかん薬、抗躁薬として臨床で用いられているが、その作用機序は明らかでない。また、EBV 関連リンパ腫細胞に対して強い殺細胞活性を持つ。プリンヌクレオチド誘導体であるサンギバマイシンは、ATP 誘導体として機能することで細胞のプロテインキナーゼ C を阻害し様々なシグナル伝達に影響を及ぼす。また、サンギバマイシンはヒトサイトメガロウイルスに対して DNA 複製阻害による抗ウイルス活性を示す。今回実施した薬物評価により、サンギバマイシンは強い抗 PEL 活性を有することを明らかにしたが、抗 KSHV 活性 (KSHV 複製阻害活性) を有している化合物は同定できなかった。プロテインキナーゼ C (PKC) は、MAPK 経路の最上流分子の Raf と Erk のリン酸化を行い、MAPK-Erk 経路を正に制御していると考えられている。つまり、サンギバマイシンは PEL 細胞のプロテインキナーゼ C を阻害することで、Raf と Erk のリン酸化 (活性化) を抑制することが考えられる (図 8)。

フラレンは炭素原子 60 個がサッカーボール状に結合した分子で (図 9)、国内で工業生産が開始されて以来、化粧品やナノチューブ素材などへの応用が進められている。フラレンの分子構造は非常に安定で、水や有機溶媒に溶けにくい。そのため親水性官能基を付加した水溶性フラレンも

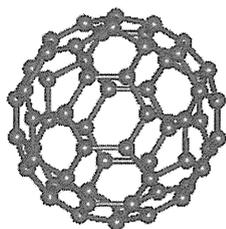


図 9 フラレン (C60) の分子構造

多数開発され、それらはユニークな薬理活性を持つことから新しい薬物候補として期待されている。今回は、慶応大学薬学部の増野教授らにより開発された水溶性フラレン誘導体について検討を行った。なお、彼らの開発したマロン酸型フラレン誘導体は NF- κ B 経路を阻害し、ピロリジニウム型は活性酸素増産活性を有する。プロリン型フラレン誘導体は HIV 逆転写酵素阻害活性を有している。アミノ酸型は HIV 逆転写酵素阻害活性を有することが明らかにされている。本研究により、ピロリジニウム型フラレンは PEL 細胞内のカスパーゼ 9 活性化を惹起することでアポトーシスを誘導することを見出したが、その分子機構は不明のままである。ピロリジニウム型フラレンは細胞内で活性酸素を増産するが、それが PEL 細胞のカスパーゼ活性化に関連している可能性も考えられる。様々な官能基で修飾可能な水溶性フラレンは多数の薬理活性を付与することができる次世代の新規骨格を有していると言える。今後は、ピロリジニウム型フラレンはどのような機構で細胞死を惹起するのか、その仕組みを明らかにする。

平成 23 年度から開始した本研究により、プロテアソーム阻害剤、HSP90 阻害剤、サンギバマイシン、ピロリジニウム型フラレンが PEL に対する抗腫瘍薬のリード化合物となりうることを見出してきた。また、プロテアソーム阻害剤と HSP90 阻害剤は KSHV 複製阻害も有しており抗ウイルス化合物となりうることも明らかにした。来年度は、これら化合物を免疫不全マウスへの PEL 細胞移植モデルによる薬効評価も展開したい。

E. 結論

PEL を標的とした抗腫瘍化合物の探索を実施した結果、サンギバマイシンが PEL 細胞内の Erk シグナル伝達を阻害し、PEL にアポトーシスを誘導することを明らかにした。また、ピロリジニウム型フラレンは PEL 細胞特異的に Caspase9 依存的な細胞増殖抑制効果を示した。今後はさらに詳細な作用機序解析と動物実験を行い、PEL に対する新規治療法開発のためのリード化合物の開発を目指す。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Higashi C, Saji C, Yamada K, Kagawa H, Ohga R, Taira T, Fujimuro M. The effects of heat shock protein 90 inhibitors on apoptosis and viral

- replication in primary effusion lymphoma cells. **Biol. Pharm. Bull.**, 35, 725-730, 2012
- 2) Ashizawa A, Higashi C, Masuda K, Ohga R, Taira T and Fujimuro M, The ubiquitin system and Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. **Front Microbiol.** 3, 66, 2012
 - 3) Nakazawa T, Ohmae T, Fujimuro M, Ito M, Nishinaga T, Iyoda M, Syntheses, molecular structures, and antiviral activities of 1- and 2-(20-deoxy -D- ribofuranosyl) cyclohepta [d][1, 2, 3] triazol-6 (1H) -ones and 1-(20-deoxy-D-ribofuranosyl) cyclohepta [b]pyrrol- 8(1H)-one. **Tetrahedron**, 68, 5368-5374, 2012
 - 4) Yamanokuchi R, Imada K, Miyazaki M, Kato H, Watanabe T, Fujimuro M, Saeki Y, Yoshinaga S, Terasawa H, Iwasaki N, Rotinsulu H, Losung F, Mangindaan E. P. R, Namikoshi M, Voogd J de Nicole, Yokosawa H, Tsukamoto S. Hyrtioreticulins A-E, indole alkaloids inhibiting the ubiquitin-activating enzyme from the marine sponge Hyrtios reticulatus. **Bioorg. Med. Chem.**, 20, 4437-4442, 2012

2. 学会発表

- 1) Masahiro Fujimuro, Tadashi Watanabe, Hiroki Kagawa, S. Diane Hayward : Dysregulation of post-translational processing of p32/HABP1/gC1qR by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. Joint Meeting of The 45th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists & The 64th Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology 神戸 (2012.5)
- 2) Akira Ashizawa, Tadashi Watanabe, Masahiro Fujimuro: Sumoylation of RanGAP1 in HSV infection. Joint Meeting of The 45th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists & The 64th Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology 神戸 (2012.5)
- 3) 東知寿香、渡部匡史、賀川裕貴、藤室雅弘 : KSHV 感染を標的とした新規治療法の探索 第 27 回 ヘルペスウイルス研究会 愛知 (2012.6)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

HIV 関連カポジ肉腫の臨床像と治療方針に関する検討

研究分担者 今村 顕史 がん・感染症センター都立駒込病院 感染症科 医長

研究協力者 加藤 博史 がん・感染症センター都立駒込病院 感染症科

研究要旨

カポジ肉腫においては、他の悪性腫瘍とは異なり、抗 HIV 療法（ART）による病変の改善も期待できる。また、長期の化学療法は ART による免疫回復に悪影響をもたらすことから、化学療法の適応が問題となることが多い。我々の調査では、カポジ肉腫に対する化学療法の適応は、ACTG による病期分類の「免疫機能（Immune system: I）」や「全身性疾患（Systemic illness: S）」とは関係なく、「腫瘍（Tumor: T）」のみによって決定されていた。そして、その T1 に分類される症例の中にも、化学療法を必要としないものが多く含まれることが示された。そこで当研究班では、カポジ肉腫による多彩な病変をさらに詳しく調査することで、化学療法の適応についての検討を行った。その結果、顔面や四肢に浮腫を伴う集簇した皮膚病変、肺病変や気道病変、広範囲で進行が急速な消化器病変、鼠径部の集簇したリンパ節病変、そして喉頭部の病変などにおいて、化学療法の開始が必要となることがわかった。そして、T1 に含まれる病変であっても、このような重症度の高い状況でなければ、ART のみで経過観察できる例も多いということが示唆された。しかし、ART のみで治療を行っている経過中に、免疫再構築症候群として病変が増悪する例もあり、このような場合には化学療法の追加も考慮する必要があると考えられた。

A. 研究目的

エイズ合併カポジ肉腫では、pegylated liposomal doxorubicin (PLD) などによる化学療法だけでなく、ART そのものによっても腫瘍を改善させる効果のあることがわかっている。また、化学療法による骨髄抑制は ART 後の免疫回復にも悪影響をもたらす可能性があるため、どの症例に化学療法を行うべきかという判断が重要となってくる。そこで我々は、これまで利用されていた ATCG による病期分類を見直し、さらに多くの症例における臨床所見を検討することで、化学療法の適応についての指針を作成することとした。

B. 研究方法

これまでに経験されたカポジ肉腫症例について、その病変部位、検査所見、治療方針や経過などを調査した。さらに ACTG による病期分類の問題点を考慮し、各症例の臨床所見を詳細に検討することで、治療方針を決定するためのガイドラインを作成した。

(倫理面に対する配慮)

承認前の PLD については、エイズ治療薬研究班からの供給薬によって治療を行っている。この際には、同研究班の規定によるインフォームドコンセントを行い、同意書を取得後に治療を開始した。

C. 研究結果

当院において 1990～2010 年末に経験された 102 例のカポジ肉腫の調査では、主な病変部位は、皮膚 83 例 (81.4%)、口腔内 42 例 (41.2%)、消化管 44 例 (43.1%)、肺 13 例 (12.7%)、肝臓 6 例 (5.9%) などであった。そして、ART を導入した 61 例のうち、ART のみで治療を行ったのは 44 例 (72.1%) で、重症例と判断された 17 例 (27.9%) については pegylated liposomal doxorubicin (PLD) による化学療法も開始されていた。また、PLD を投与した 1 例においては、PLD の継続にても寛解増悪を繰り返したため paclitaxel (PTX) へと変更し治療されていた。[2011 年度研究報告、第 25 回日本エイズ学会, 2011, 東京]

現在、エイズ合併のカポジ肉腫には、AIDS 臨床試験研究グループ (AIDS Clinical Trials Group: ACTG) 腫瘍学委員会による病期分類がある (表 1)。我々の調査では、カポジ肉腫に対する化学療法の適応は「免疫機能 (Immune system: I)」や「全身性疾患 (Systemic illness: S)」とは関係なく、「腫瘍 (Tumor: T)」のみによって決定されていた。また、カポジ肉腫は一般的な悪性腫瘍と異なり、ART によっても改善することが期待できることから、T1 病変の中にも化学療法を必要としない例が多く含まれていることがわかった。

皮膚病変では、急速に進行し顔面や四肢に浮腫を伴うタイプの病変が重症例となっていた。肺病変には浸潤影や結節影を呈する例があり、特に前者において進行の早い重症例がみられた。消化管病変の多くは腹痛や出血なども伴わず無症状であることがほとんどであった。また、皮膚病変を伴わない例もあり、他疾患の精査目的で行った内視鏡検査で偶然に発見されることもあった。

口腔内も好発部位のひとつであり、とくに口蓋部や歯肉に発生することが多かった。喉頭部に発症した場合には、進行にともない浮腫をとまなうことで気道狭窄を起し致命的となる危険性が高かった。我々の経験した喉頭蓋病変 3 例のうち、2 例においては緊急の気道切開が必要となっていた。また、喉頭蓋病変が、免疫再構築症候群と喉頭蓋浮腫に対するステロイド投与によって増悪したと考えられた例も経験されている。

T1 に含まれる病変であっても、このような重症度の高い状況でなければ、ART のみで経過観察できる例も多いということが示唆された。しかし、

ART のみで治療を行っている経過中に、免疫再構築症候群として病変が増悪する例もあり、このような場合には化学療法の追加も考慮する必要があると考えられた。

D. 考察

AIDS に合併したカポジ肉腫においては、ART による改善も期待できることがわかっている。重症例においては化学療法が必要となり、現在は第一選択として pegylated liposomal doxorubicin (PLD) の投与が行われている。PLD が無効の難治例に対しての第二選択としては、パクリタキセル (paclitaxel: PTX) による化学療法が行われることが多い。このように、カポジ肉腫の治療は、ART の進歩と抗腫瘍薬の開発によって大きく変化してきた。化学療法による骨髄抑制は ART 後の免疫回復にも悪影響をもたらす可能性があるため、どの症例に化学療法を行うべきかという判断が重要となってくる。しかし、現時点において化学療法の適応について明確に示すガイドラインは存在しない。このため臨床現場では、しばしば化学療法を開始するかどうかの問題となっていた。

エイズに合併したカポジ肉腫の病期分類としてこれまで利用されてきた ACTG 分類では、腫瘍の広がりや浮腫の有無を「腫瘍 (Tumor: T)」、CD4 陽性リンパ球数を「免疫機能 (Immune system: I)」、日和見感染症の有無や全身状態「全身性疾患 (Systemic illness: S)」としてカポジ肉腫を評価している。今回の我々の調査では、カポジ肉腫に対する化学療法は「免疫機能 (Immune system: I)」や「全

表 1 カポジ肉腫の病期分類 (ACTG)

	リスク良好 (以下のすべて)	リスク不良 (以下のいずれか)
腫瘍 (T)	【T0】 皮膚やリンパ節に限局 軽度の口腔内病変	【T1】 腫瘍が原因の浮腫 広範な口腔内病変 リンパ節以外の内臓病変 (肺、消化管、肝臓など)
免疫機能 (I)	【I0】 CD4 数 > 200/μl	【I1】 CD4 数 < 200/μl
全身性疾 (S)	【S0】 日和見疾患既往 (-) カンジダ既往 (-) B 症状 (-) PS < 70%	【S1】 日和見疾患既往 (+) カンジダ既往 (+) B 症状 (+) PS < 70% 他の HIV 関連疾患

身性疾患 (Systemic illness: S)」とは関係なく、「腫瘍 (Tumor: T)」のみによって決定されていた。また、カポジ肉腫は一般的な悪性腫瘍と異なり、ART によっても改善することが期待できることから、T1 病変の中にも化学療法を必要としない例が多く含まれていることがわかった。このように、ACTG による病期分類は、カポジ肉腫の病勢をある程度は示しているものの、治療方針を決定するのに利用するのは困難であることが示唆された。

そこで当研究班では、化学療法の適応を決定するためには T1 分類に属する病態をさらに検討する必要があると考え、カポジ肉腫による多彩な病変

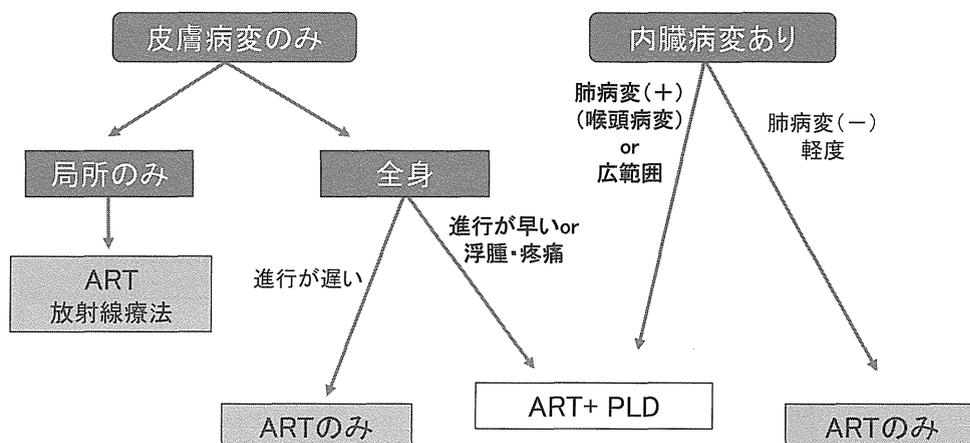
についての詳細な調査を行った。その結果、皮膚病変においては、顔面や四肢に浮腫を伴う場合や、広範囲に存在し急速に増加・増大する例においては、化学療法の開始を検討すべきであると判断した。また、内臓病変では、隆起性で広範囲な口腔内病変、咽頭・喉頭部の病変、肺病変、消化器病変でも広範囲にわたる場合、そして鼠径部に集簇したりリンパ節病変において化学療法の開始がすすめられることがわかった (表 2) (表 3) (図 1)。特に喉頭部の病変では、浮腫を伴うことで気道閉塞をきたす危険性が高いため迅速な治療決定が求められる。また、喉頭浮腫に対して一般的に投与

表 2 皮膚病変における化学療法の適応

- ・ 顔面や四肢に浮腫を伴う場合
- ・ 広範囲に存在し急速に増加・増大
- ・ 顔面病変で美容的な問題あり

表 3 内臓病変における化学療法の適応

- ・ 口腔内病変で以下の場合
咽頭・喉頭部の病変
隆起性で広範囲
- ・ 肺病変・気道病変
- ・ 消化器病変で以下の場合
広範囲で進行が急速
- ・ 鼠径部の集簇したリンパ節病変



治療方針についての考え方をフローチャートにまとめた (PLD: pegylated liposomal doxorubicin)

図 1 カポジ肉腫の治療方針

されるステロイドは、カポジ肉腫病変に対しては増悪因子となる可能性も示唆された。

ARTのみで経過観察可能と判断された症例においても、その経過中に免疫再構築症候群として病変が増悪する可能性があるため注意観察が必要である。そして、カポジ肉腫の増悪状況によっては、化学療法の追加も考慮すべきであろう。

E. 結論

今回の調査によって、エイズ合併カポジ肉腫における化学療法の適応が、ACTGにおけるT分類、とくにT1の内容によって決定されていることが判明した。そして多くの症例の検討によって、T1病変の中でも特に化学療法がすすめられる病態を集積することができた。

カポジ肉腫における化学療法の適応を決めるためには、腫瘍の状態を適切に判断することが重要なポイントとなる。しかし、カポジ肉腫は他の疾患ではほとんど見ることがない合併疾患であり、我が国においてはHIV診療を行っている医師でも、多くの症例を経験することは難しいというのが現状である。そこで、今回作成した治療ガイドラインに関する冊子には、化学療法の適応をまとめるとともに、診療経験の少ない医師にも参考となるような画像所見を多く掲載した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

HHV-8 感染症の病態と治療

研究分担者 照屋 勝治 国立国際医療研究センター エイズ治療・研究開発センター (ACC)
研究協力者 永田 尚義 国立国際医療研究センター 消化器科

研究要旨

KS の深部臓器病変として最も頻度の高い消化管 KS に関して臨床的解析を行い、消化管 KS の 8割で消化器症状がなく、3分の1で皮膚 KS を認めないことを明らかにした。この結果に基づき、消化管内視鏡検査の適応の判断は、CD4 数や感染経路に基づいて行うべきであることを提言した。予後不良の MCD の診断治療については、現在までの知見を踏まえた上で、リツキシマブを主体とした治療を提言した。

A. 研究目的

カポジ肉腫 (KS) を始めとする HHV-8 関連疾患は、ART が広く行われるようになった現在でも、臨床上的大きな問題であり続けている。2011 年度に本分担研究において HIV 拠点病院を対象に行った全国実態調査では、リポゾーマルドキソルピシンなどの化学療法を必要とする予後不良の KS 例が少なからず存在していること、消化管 KS (35.4%) や肺 KS (14.8%) などの深部臓器病変の合併が高頻度であること、さらにキャッスルマン病 (MCD) 症例が 4 施設で 8 例報告され、治療法が全く確立していない実態と、高い死亡率 (37.5%) という現状が明らかになった。

上記の結果を踏まえ、本研究では主に診断および不良な予後が問題となりうる消化管 KS および MCD について臨床例の解析を行うとともに、それを元に「診療手引き」を作成、提言を行うことで、日本における HHV-8 関連疾患のマネジメントの改善、向上を図ることを目的とする。

B. 研究方法

1) 消化管 KS 病変に関連する因子の検討 (永田尚義)

ACC に通院中の HIV 患者で消化管内視鏡検査を実施した 1027 例を対象に、診療録を元にした後ろ向き検討を行った。感染経路、CD4 数、HIV-RNA 数、消化器症状の有無が、消化管 KS 病変の有無と程度に関連するかどうかについて解析を行った。

2) 消化管 KS の内視鏡生検病理診断による偽陰性率とそれに関連する因子の検討 (永田尚義)

KS は粘膜下病変であるため、内視鏡下での生検診断では理論的に偽陰性となるリスクがある。ACC に通院中の HIV 患者で最終的に消化管 KS であると診断された病変のうち、生検病理を行った 116 病変を対象に、偽陰性率および偽陰性に関連する因子について、診療録を元にした後ろ向き検討を行った。

3) 診療手引きの作成 (照屋勝治、永田尚義)

診断が時に困難である消化管 KS の診断について一項目を割り、診断の鍵である消化管内視鏡検査の適応と、多彩な KS 病変の画像を多用することで診断の一助となることをめざす。

MCD については、診断および治療に関する現在までの知見を網羅的に要約した臨床現場で役立つような手引きを作成する。特に治療については、臨床的に有効であった具体的治療例を提示する。

C. 研究結果

1) 消化管 KS 病変に関連する因子の検討

- 対象患者 1027 例のうち、46 例で皮膚 KS、33 例で消化管 KS を認めた。消化管 KS を認めた 33 例のうち 26 例 (78.8%) は消化器症状を全く認めず、8 例 (33.3%) は皮膚 KS を伴っていなかった。
- 皮膚 KS を認めない場合に、消化管 KS の存在と関連していた因子は、CD4 数 $<100/\mu\text{l}$ (OR 9.55, $p<0.05$) であり、男性同性愛 (OR 5.18,

p<0.1) でリスクが高い傾向があった。

- CD4 数 <100/μl と HIV-RNA 量 ≥ 100,000 copies/ml は、潰瘍形成や腫瘍形成などの重症消化管 KS と関連していた。

2) 消化管 KS の内視鏡生検病理診断による偽陰性率とそれに関連する因子の検討

- 生検を行った 116 病変の病理診断では、41 例 (35.3%) が偽陰性の結果だった。
- 多変量解析で、食道病変は偽陰性率が高い傾向があり (4 例全例が偽陰性、OR 7.26, p=0.08)、pathy な病変では有意に偽陰性率が高かった (40 例中 22 例、OR 3.30, p<0.01)。

3) 診療手引きの作成

- 消化管 KS の診断については、1) , 2) の臨床的検討結果を踏まえた記載を行った。便潜血や消化器症状の有無は消化管 KS の診断に全く有用性がないこと、リスク因子として CD4<100/μl, HIV-RNA ≥ 100,000copies/ml をあげた。多彩な内視鏡所見を呈し、経験の浅い臨床医にはしばしば診断が困難であるため、臨床症例の内視鏡画像を 8 点掲載し診断の一助となるよう心がけた。確定診断の根拠となる免疫染色などの病理像も 3 点掲載した。
- MCD については、標準治療としてはまだ確立

していないが、エビデンスとして集積しつつあるリツキシマブによる治療を推奨する記載とした。診断における HHV-8 DNA の検出と CRP 値の有用性、また高頻度に合併する悪性リンパ腫の評価に Ga シンチが有用である可能性についても言及した。治療法が確立していない状況を踏まえ、ACC での治療奏功例の具体的経過について記載することで、治療方針決定の指針となることを目指した (図 1)。

D. 考察

消化管 KS は本研究における 2011 年の全国調査で 35.4% の KS 症例で見られており、深部臓器病変としては頻度が最も高かった。消化管 KS は時に腫瘍からの出血、消化管穿孔、腫瘍増大による消化管閉塞を来たしうるが、重篤化するまで消化器症状はほとんどなく、皮膚 KS 病変を認めない症例も少なからず存在することが知られており、どのような状況で消化管 KS の診断を目的とした内視鏡検査を実施すべきか、そして内視鏡生検の診断率がどの程度なのかというデータも国内外で知見がほとんどない。今回の大規模な臨床データの解析により、消化管 KS を認めた症例の 8 割で消化器症状を認めず、3 分の 1 で皮膚 KS を認めなかったことから、これらを指標とした消化管内視

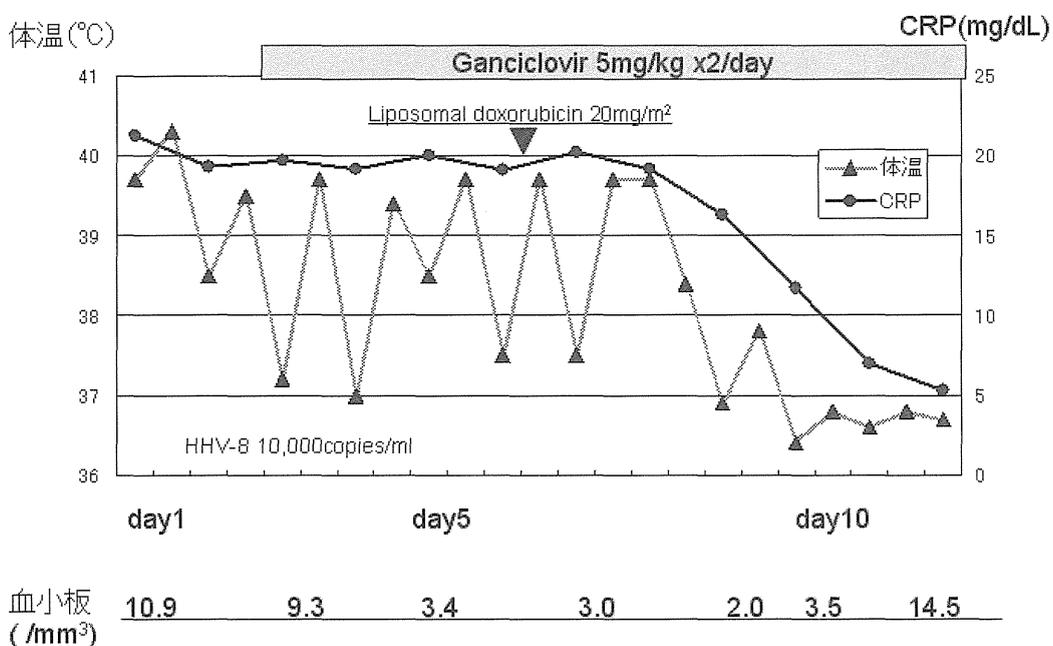


図 1 MCD 発症時における導入治療を行った例

鏡の適応に関する適切な判断は不可能であることが示された。一方で、皮膚KSを認めず、消化器症状が全くない場合でも、男性同性愛者であり、CD4数<100/μlの場合には消化管KSのリスクが高く、また後者は予後と関連しうる重症KS病変とも関連していた。以上の結果も踏まえた上で、消化管KSの診断に関する診療手引きでは、CD4低値(<100/μl)、HIV-RNA高値(≥100,000 copies/ml)、抗HIV治療が行われていない、男性同性愛者をリスク因子としてあげ、消化管内視鏡検査の適応とした。さらに、消化管KSの病理診断における偽陰性率が驚くほど高く、特に食道病変でその頻度が高いことを見いだした。内視鏡生検病理の結果を解釈する上での重大な注意点であると考えられた。

確立した診断法がなく、予後不良であるMCDについては、最新の国内外の文献検索を行い、現在までの知見を網羅的に要約し、その上で、実際の治療奏功例の臨床経過を提示した診療手引きを作成した。これが診療経験の乏しい医療機関のMCD治療のヒントになるとともに、今後、同じ治療法での臨床例を蓄積していくことで、今後の国内におけるエビデンス構築への足がかりとなりうることを期待している。

E. 結論

頻度の高い消化管KSの内視鏡検査の適応、および偽陰性の問題点について、大規模な臨床データをもとに解析を行った。MCDについては現在までの知見を網羅的にまとめた。以上の結果に基づいて診療手引きを作成し、エビデンスの乏しいこれらの領域の診療に関する提言を行った。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

原著論文

- 1) Nagata N, Sekine K, Igari T, Hamada Y, Yazaki H, Ohmagari N, Akiyama J, Shimbo T, Teruya K, Oka S, and Uemura N. False-Negative Results of Endoscopic Biopsy in the Diagnosis of Gastrointestinal Kaposi's Sarcoma in HIV-Infected Patients. *Pathol Res Int* 2012 (2012), Article ID 854146

- 2) Nagata N, Shimbo T, Yazaki H, Asayama N, Akiyama J, Teruya K, Igari T, Ohmagari N, Oka S, Uemura N. Predictive Clinical Factors in the Diagnosis of Gastrointestinal Kaposi's Sarcoma and Its Endoscopic Severity. *PLoS ONE* 2012 7(11): e46967.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

カポジ肉腫の現状把握および HHV-8 の抗体保有率の検討

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
 矢嶋敬史郎 国立病院機構大阪医療センター 感染症内科

研究要旨

1) カポジ肉腫の現状把握

【目的】カポジ肉腫の診療ガイドラインの作成にあたり、HHV-8 が関連する悪性リンパ腫や血球貪食症候群について調査した。

【方法】2005 年 9 月～2012 年 5 月までに、大阪医療センターで生検により診断したカポジ肉腫症例 37 例のうち、血中の HHV-8-DNA を測定した 23 例について調査した。

【結果と考察】7 例で HHV-8-DNA が検出され、ウイルス量は 74 ～ 1,400,000cp/ml であった。このうち 3 例で血球貪食症候群や悪性リンパ腫を合併していた。3 例はウイルス量が高値であり、血球貪食症候群や悪性リンパ腫の発症と関連性が認められた。カポジ肉腫症例で高度の血球減少を呈する場合は、血中の HHV-8-DNA の定量を行うことがすすめられる。

2) HIV 感染者における抗 HHV-8 抗体の保有率についての研究

【目的】HIV 感染者における抗 HHV-8 抗体の保有率については、限られた報告しかない。そこで、大阪医療センターに通院中の HIV 感染者を対象に抗 HHV-8 抗体保有率について検討した。

【方法】Advanced Biotechnologies Inc の whole virus lysate を用いた ELISA kit で HIV 感染者の抗 HHV-8 抗体を測定した。測定にあたっては、ELISA の説明文書通りに行い、S/CO が 3 以上を陽性とした。また、カポジ肉腫の既往がある症例を陽性コントロール、血液製剤による HIV 感染者を陰性コントロールとした。本研究は倫理審査をうけ、文書を用いて患者同意を得た。

【結果】カポジ肉腫の既往がある症例（20 例）は全例で抗 HHV-8 抗体陽性であった。血液製剤による HIV 感染者（11 例）は全例で抗 HHV-8 抗体陰性であった。残りの 69 例の HIV 感染者のうち 18 例（26%）が抗 HHV-8 抗体陽性であり、推定感染経路別で見ると同性間が 53 例中 17 例（32%）で、異性間・その他が 16 例中 1 例（6%）と、同性間による HIV 感染者において高い抗体保有率を認めた。

【考察】大阪医療センターに通院中の HIV 感染者における抗 HHV-8 抗体保有率について検討した。カポジ肉腫の既往のある症例では 100%、血液製剤による感染者では 0%、MSM-HIV 感染者では 32%であった。MSM-HIV 感染者で高い抗体保有率が観察された。

1) カポジ肉腫の現状把握

A. 研究目的

カポジ肉腫は、エイズ関連悪性腫瘍の中でも最も頻度の高い悪性腫瘍であり、診療ガイドラインの作成が必要である。そこで我々は、ガイドラインの作成にあたり、HHV-8 が関連する悪性リンパ腫や血球貪食症候群といった難治性病態と HHV-8 のウイルス量を調査した。

B. 研究方法

2005年9月～2012年5月までに、生検により診断したカポジ肉腫症例 37 例のうち、末梢血白血球中の HHV-8-DNA 量を測定した 23 例のウイルス量と臨床経過を調査した。

(倫理面への配慮)

個人が特定されないように、氏名・生年月日・カルテ番号といった項目は調査項目から除外した。臨床情報の取り扱いについては注意を行った。

C. 研究結果

血中の HHV-8-DNA を測定した 23 例のうち 7 例で HHV-8-DNA が検出された。ウイルス量は、 $74 \sim 1.4 \times 10^6$ copies/ml であった (図 1)。ウイルス量が検出感度未満でもカポジ肉腫は非常に難治性を示した症例もあった。

7 例中 3 例でカポジ肉腫以外の HHV-8 関連疾患を合併していた。血球貪食症候群が 2 例 (case ①, case ②) で、1 例 (case ②) は HHV-8 関連の悪性リンパ腫を発症していた。残る 1 例 (case ③) は血小板数の低下を認めていた。ウイルス量は、case ① (2.7×10^5)、case ② (1.4×10^6)、case ③ (3.4×10^4) といずれも高値であった。治療は、case ①と case

③は、Liposomal doxorubicin によりカポジ肉腫も血球減少も改善した。case ②は、前年度にも報告したが、liposomal doxorubicin による 6 回の全身化学療法を施行後、病変が短期間に全身に転移し、血球貪食症候群を併発、骨や皮下に腫瘤を形成するに至り、HHV-8 関連の悪性リンパ腫を発症し、予後不良の転帰をたどった。いずれも、HHV-8 のウイルス量と病勢かが大きく関連しており、HHV-8 が関連した難治性病態であったと考えられた。

D. 考察

HIV 感染者など免疫不全宿主では、HHV-8 の再活性化が起こり、血球貪食症候群を発症することがあり、HHV-8 のウイルス量が関連している。特に高ウイルス量を呈する症例では、致死的な血球貪食症候群を発症することが知られており、ウイルス量が 1.0×10^6 copies/ml 以上の場合では重篤化する可能性がある。

今回、当院で測定した症例のうち、血球貪食症候群を発症した 3 例は、いずれもウイルス量が高値であった。2 例では、ウイルス量を測定することで、適切な診断と治療につながり、病状は改善した。少数症例のため評価は難しいが、HHV-8 による血球貪食症候群は、早期に診断できれば、予後の改善につながる可能性が示唆された。急速に進行するカポジ肉腫や高度の血球減少を呈する症例では血中の HHV-8-DNA の定量検査を行うことが必要であると考ええる。

血球貪食症候群による血球減少や発熱などは、非特異的な症状であり、HHV-8 の関与を疑わなければ、ウイルス量を測定することはないと考えられる。従って、適切な治療を行うためには、まず病態の存在を知ることが重要であり、診療ガイドラインへの記載を行った。

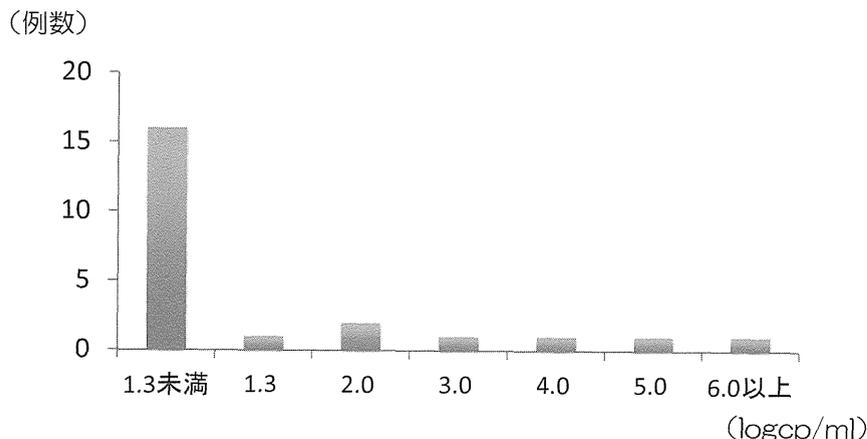


図 1 カポジ肉腫診断時の血中 HHV-8 ウイルス量 (n=37)

他のエイズ診療拠点病院でもこのような HHV-8 による血球貪食症候群と考えられる症例が散見されることから、次年度は他施設への実態調査を行う予定である。

E. 結論

カポジ肉腫に、血球貪食症候群や血球減少、悪性リンパ腫を合併する症例がある。このような症例では、血中の HHV-8-DNA を測定すべきである。

2) HIV 感染者における抗 HHV-8 抗体の保有率についての研究

A. 研究目的

国内における抗 HHV-8 抗体の保有率は限られた報告しかない。一般人口においては 0.2 ~ 1.4 % (Fujii ら、J. Med. Virol. 1999、Katano ら、J. Virol., 2000) とされ、那覇や南大東島ではそれぞれ 1.4 % と 3.2 % との報告 (Satoh ら、Jpn. J. Infect. Dis., 2001) があり、いずれにしても抗体保有率は低い。国内の HIV 感染者の抗 HHV-8 抗体の保有率は 12 % と 64 % という報告 (Fujii ら、J. Med. Virol. 1999、Katano ら、J. Virol., 2000) があり、一般人口より高いと思われる。一方、血液製剤による HIV 感染者では抗体保有者を認めなかったという報告も存在する (Shimizu ら、Arck. Dermatol. Res., 2001)。いずれも 10 年以上前の研究であり、HIV 感染者が増加した近年の国内における抗体保有率の報告は存在しないのが実情である。そこで、大阪医療センターにおける抗 HHV-8 抗体の保有率について検討を行った。

B. 研究方法

大阪医療センター通院中の HIV 感染者を対象とした。Advanced Biotechnologies Inc の whole virus lysate を用いた ELISA kit で HIV 感染者の抗 HHV-8 抗体を測定した。測定にあたっては、ELISA の説明文書通りに行い、S/CO が 3 以上を陽性とした。また、カポジ肉腫の既往がある症例の血漿を陽性コントロール、血液製剤による HIV 感染者の血漿を陰性コントロールとした。

(倫理面への配慮)

抗 HHV-8 抗体の測定について、院内の倫理委員会に相当する受託研究審査委員会で倫理審査を行い、承認を取得した (承認番号 11061)。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。

C. 研究結果

100 例の HIV 感染者について抗 HHV-8 抗体の測定を行った。表 1 に患者背景を示した。まず、陽性コントロールとして測定したカポジ肉腫の既往のある症例について検討した (図 2)。初診時にカポジ肉腫を認めた症例は 18 例中 17 例で陽性であった。1 例は抗 HHV-8 抗体は陰性であった。この症例は CD4 数 $1/\mu\text{L}$ と極度の免疫低下を示しており、ART 導入後に再検すると陽性となった。初診時にカポジ肉腫を認めない 2 例については、抗 HHV-8 抗体も陰性であった。カポジ肉腫発症後に再検するといずれ症例も抗 HHV-8 抗体が陽転化していた。以上よりカポジ肉腫の既往のある症例は 20 例すべてで、抗 HHV-8 抗体は陽性となった。次に、血液製剤による感染者 11 例について検討したが、いずれも陰性であった (表 2)。最後に、残りの 69 例の HIV 感染者について検討した。69 例のうち 18 例 (26%) が抗 HHV-8 抗体陽性であった。推定感染経路別でみると同性間が 53 例中 17 例 (32%) で、異性間・その他が 16 例中 1 例 (6%) と、同性間による HIV 感染者において高い抗体保有率を認めた。

D. 考察

本研究において、大阪医療センター通院中の HIV 感染者においても高い抗 HHV-8 抗体保有率が観察された。特に推定感染経路が同性間による HIV 感染者に高い抗 HHV-8 抗体保有率を認めた。

抗 HHV-8 抗体の測定はいくつかの方法がある。本研究で用いた ELISA 法に加え、IFA 法も用いられることが多い。今回は商業ベースで入手可能な ELISA キットを用いた。このキットは whole virus lysate を抗原としているため、LANA に対する抗体のみを保有する症例については見落としがある。また、IFA・ELISA のいずれの方法についても感度や特異度に問題があり、golden standard となる測定方法はないと考えられている。このような背景からも、本研究での抗 HHV-8 抗体保有率はあくまでも抗体を保有しているかどうかであり、感染したかどうかの判定は低く見積もってしまう危険性がある。つまり、個々の症例において HHV-8 に感染しているかどうか、暴露されたかどうかの判定には使用できない。