

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 や多発性キャッスルマン病 (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 関連のパ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 は、宿主細胞内で、潜伏感染 (latent infection) と溶解感染 (lytic infection) の 2 種類の感染様式で存在する。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に分類され、lytic gene は前初期、初期、後期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ビ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と KSHV の複製阻害活性を有する抗 KSHV 化合物の探索と作用機序の解析を行った。具体的には、本年度の研究では、サンギバマイシンと水溶性フラレン誘導体類の PEL 細胞に対する細胞増殖阻害の作用機序解析と抗 KSHV 活性の評価を実施した。

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 RPMI1640 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 RPMI1640 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 個の PBS 懸濁液をスライドガラスに塗布後、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 , 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。培養液 2mL 中の細胞を遠心にて回収し、

SDS-PAGE サンプルバッファーを添加してサンプルを調製した。

B-4. リアルタイム PCR

BC3 細胞に、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 QIAamp DNA blood mini kit (QIAGEN) で精製した。KSHV の ORF50 プライマー (5'-GATGACAAGGTAAAGATCGACCT-3' と 5'-GGTCAAGTACACCGAACACTTAA-3') 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、10¹、・・・10⁶、10⁷

copies/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。

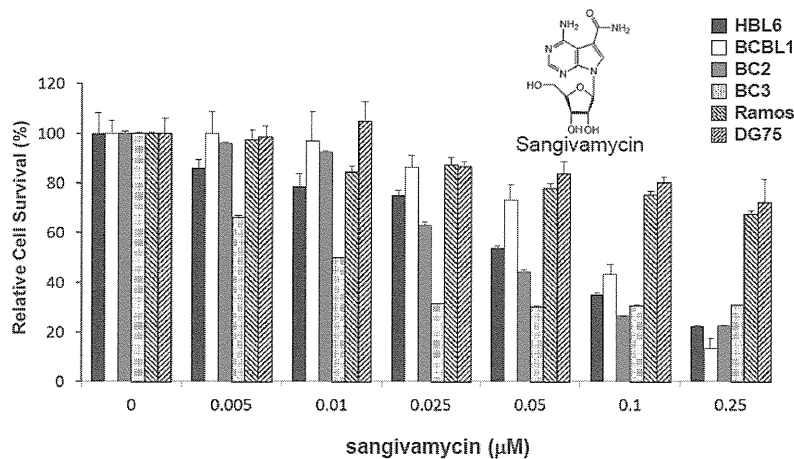


図 1 サンギバマイシンの PEL 細胞株に対する増殖阻害活性

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。

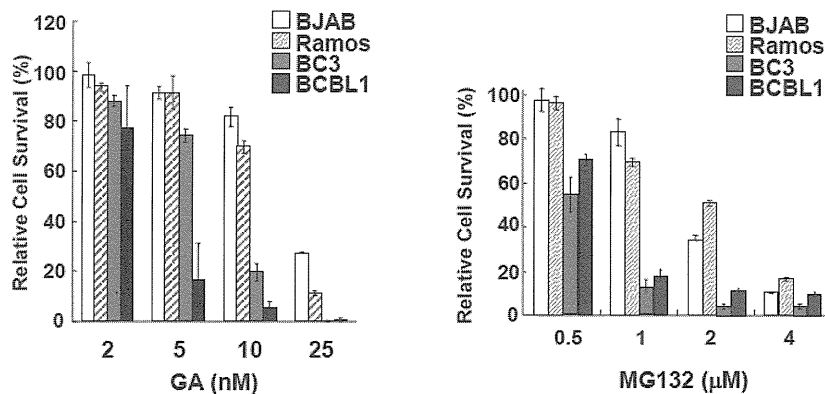


図 2

HSP90 阻害剤 (GA) とプロテアソーム阻害剤 (MG132) の PEL 細胞増殖阻害 PEL 株 (BCBL1, BC3)、および KSHV 非感染株 (BJAB, Ramos) の培養液に各濃度の GA または MG132 を添加し、24 時間後の生細胞数を CCK-8 により測定した。

C. 研究結果

1. サンギバマイシンと他の抗腫瘍化合物の併用による PEL 細胞のアポトーシス誘導

昨年度の研究により我々は、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 細胞にアポトーシスを誘導することを見出した (図 1)。さらに、プロテアソーム阻害剤 (MG132) と HSP90 阻害剤の Geldanamycin (GA) は、PEL 細胞に対して I κ B 安定化を介して、NF- κ B シグナルの抑制とアポトーシスを誘導することを明らかにしている (図 2)。また、抗てんかん薬として用いられるバルプロ酸は HDAC (histone deacetylase) 阻害活性や PEL を含むリンパ腫細胞に対して細胞増殖抑制効果も持つことが報告されている。そこで、サンギバマイシンと GA やバルプロ酸を併用することで、サンギバマイシンの PEL に対する細胞増殖抑制効果の増強を検討した。

PEL 細胞 (BCBL1) に 0.2 μ M MG132、10 nM GA、0.5 mM バルプロ酸、0.025 μ M サンギバマイシンをそれぞれ単独で細胞培養培地に添加したものと、0.2 μ M MG132 + 0.025 μ M サンギバマイシン、10 nM GA + 0.025 μ M サンギバマイシン、または 0.5 mM バルプロ酸 + 0.025 μ M サンギバマイシンの組み合わせでコンビネーション添加後、1、2、3 日ごとの生存細胞数を測定した。なお薬物処理開始時の細胞数は 1.5×10^4 個 /well で始めた。MG132 とサンギバマイシンの併用では、単独処理に比べて

有意な細胞増殖抑制効果を示さなかった (data not shown)。しかし、GA とサンギバマイシンの併用とバルプロ酸とサンギバマイシンを併用した結果、サンギバマイシンのみによる増殖抑制効果と比べ、顕著な細胞増殖抑制効果を示した (図 3a, b)。

次に、サンギバマイシン処理により PEL 細胞に潜伏感染している KSHV の溶解感染移行に影響を与えるか、また、サンギバマイシンは KSHV の複製阻害活性 (抗 KSHV 活性) を有しているか解析を行った。KSHV が潜伏感染している BCBL1 細胞を各種濃度のサンギバマイシンで処理し、培養液中に放出された KSHV 粒子のウイルス DNA をリアルタイム PCR で測定した。その結果、サンギバマイシン処理は PEL 細胞に潜伏感染する KSHV のウイルス産生に影響を与えなかった (図 4a)。そこで、次にサンギバマイシンの KSHV 複製阻害活性 (抗 KSHV 活性) を評価した。KSHV が潜伏感染している BCBL1 細胞を 1.5 mM の n-butyrate を処理することで、KSHV を溶解感染に移行させウイルス産生を惹起させた。n-butyrate の PEL 細胞の培地添加と同時に各濃度のサンギバマイシンを添加し、培養液中に放出された KSHV をリアルタイム PCR で測定することで、サンギバマイシンの KSHV 複製阻害活性を解析した。その結果、サンギバマイシンはウイルス産生抑制効果 (抗 KSHV 活性) を有していないことが明らかになった (図 4b)。

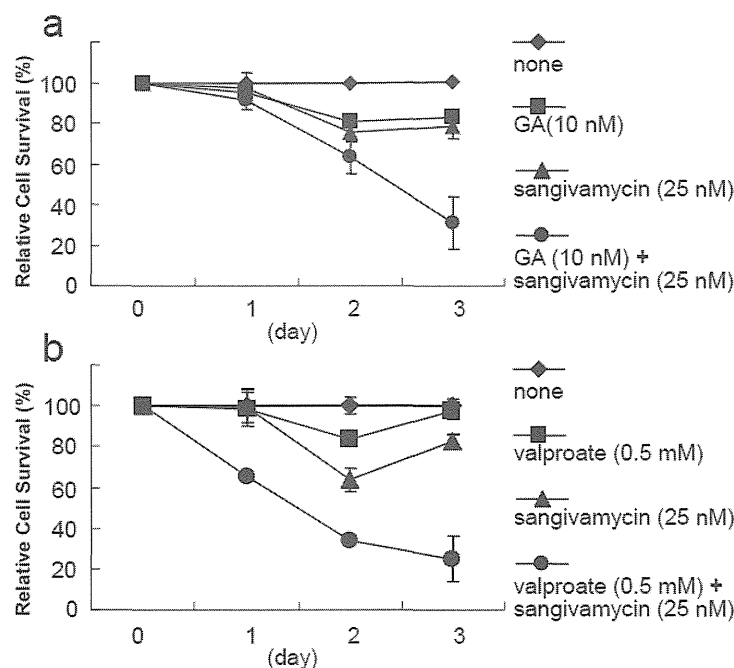


図 3 GA とバルプロ酸によるサンギバマイシン (Sang) の PEL 増殖阻害活性の増強
BCBL1 の培養液に 10nM GA、0.5mM バルプロ酸、25nM Sang、10nM GA + 25nM Sang、0.5mM バルプロ酸 + 25nM Sang を添加後、1、2、3 日の生存細胞数を測定。

2. 水溶性フラーレン誘導体による PEL 細胞の アポトーシス誘導

昨年度の研究で、炭素原子 60 個で構成される C₆₀ フラーレン (fullerene) に各種官能基を導入した水溶性フラーレンの化合物ライブラリーを用い、PEL 細胞に対する殺細胞活性を評価した。その結果、ピロリジニウム型フラーレン誘導体が PEL 細胞株に対して caspase9 および 7 の活性化を介したアポトーシスを誘導することを見出した (図 5)。そこで本年度は、ピロリジニウム型フラーレンの詳細な作用機序について解析を行った。フラーレン誘導体類は慶應大学 薬学部 増野匡彦先生よりご恵与いただいた。その結果、25 μM のピロリジニウム

型フラーレン誘導体 (C₆₀Pyr) を PEL (BC3 細胞) と KSHV 非感染 B 細胞 (DG75) の培養培地に添加し、影響を受ける細胞内シグナル伝達をウエスタンブロットにより解析を行った。その結果、ピロリジニウム型フラーレン (C₆₀Pyr) は BC3 細胞内の Akt の Ser473 のリン酸化 (Akt の活性化を誘導)、Erk1/2 の Tyr202/204 のリン酸化を阻害した (図 6 A, B)。Akt の Ser473 と Erk1/2 の Tyr202/204 のリン酸化はともに Akt と Erk1/2 の活性化を誘導するリン酸化であることから、ピロリジニウム型フラーレン (C₆₀ Pyr) は BC3 細胞の Akt と Erk シグナルを抑制することが明らかとなった。また、ピロリジニウム型フラーレンは、caspase9 の Ser196 のリ

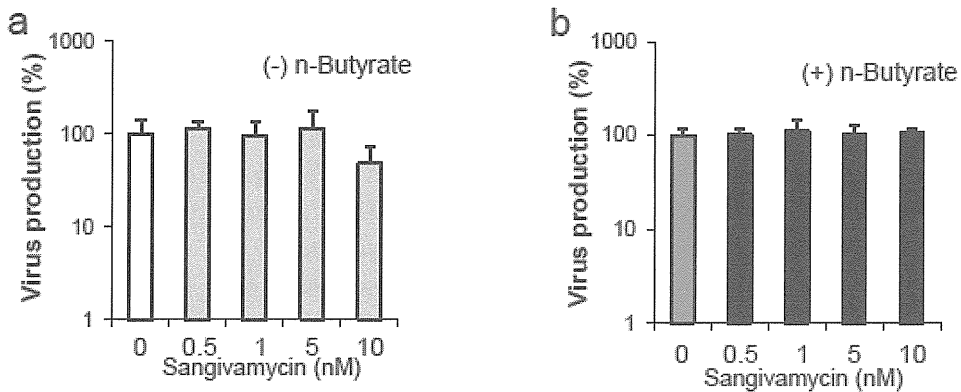


図 4 サンギバマイシンの KSHV 産生誘導と KSHV 産生阻害

(a) BCBL1 の培養液に各濃度のサンギバマイシンを添加し、24 時間後に培養液中に放出された KSHV 粒子のウイルス DNA をリアルタイム PCR で測定した。
(b) BCBL1 細胞を 1.5mM の n-butyrate を処理することで、KSHV を溶解感染に移行させウイルス産生を惹起させた。n-butyrate の PEL 細胞の培地添加と同時に各濃度のサンギバマイシンを添加し、培養液中に放出された KSHV をリアルタイム PCR で測定した。

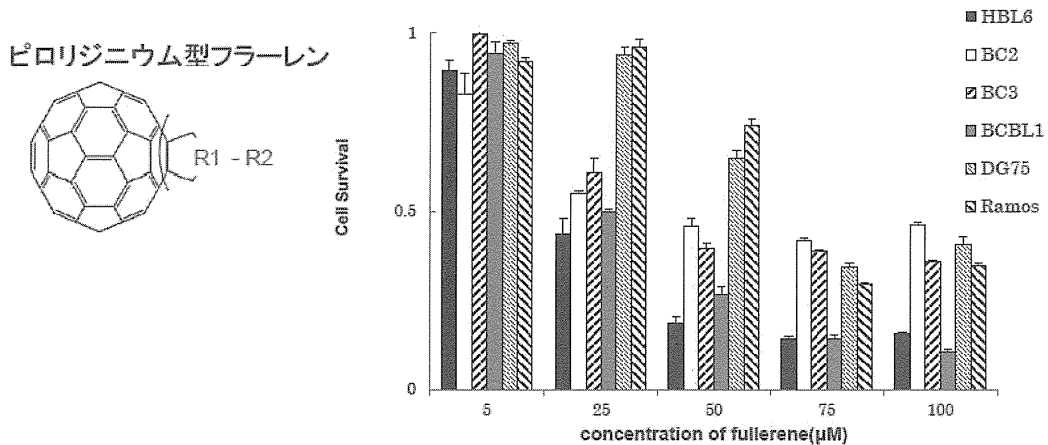


図 5 ピロリジニウム型フラーレン誘導体の PEL 細胞に対する細胞増殖抑制

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ーレン誘導体を添加し 24 時間後の生細胞数を測定した。

ン酸化も阻害した (図 6 C, D)。この caspase9 の Ser196 のリン酸化は、caspase9 の切断 (活性化) を抑制する。また、Ser473 がリン酸化された活性化型 Akt は、caspase9 の Ser196 をリン酸化し、caspase9 の抑制 (切断阻害) を介して、抗アポトーシス作用を発揮することが知られている。これらの知見とデータを考え合わせると、ピロリジニウム型フラレンは、PEL 細胞内の Akt のリン酸化 (活性化) を阻害することで Akt による caspase9 の Ser196 のリン酸化 (caspase9 の不活性化) を抑制して PEL 細胞にアポトーシスを惹起すると考えられる。また、興味深いことに、BC3 細胞にピロリジニウム型フラレン誘導体を処理すると BC3 細胞の凝集が観察された (図 6E)。現在のところ、この凝集効果の意義は不明である。

3. ジアリルトリスルフィド (DAT) による

PEL 細胞のアポトーシス誘導

本年度実施した抗 PEL 化合物スクリーニングにより、ニンニクの新芽由来のフィトケミカルであるジアリルトリスルフィド (Diallyl trisulfide; DAT) が PEL 細胞特異的な細胞増殖抑制効果を有していることも見出した (図 7)。DAT は、ウイルス非感染 B 細胞性リンパ腫株である Ramos 細胞の増殖に

は影響を与えず、PEL 細胞のみ特異的に増殖抑制効果を示した。次に DAT の作用機序を解析した。Western blots 解析による結果、DAT は PEL 細胞内の NF- κ B シグナルの抑制因子である I κ B α を顕著に安定化し、NF- κ B の転写因子 p65 の核移行を阻害した (図 8a, b)。次に、NF- κ B のレポータープラスミドを用いて、DAT 処理による PEL 細胞内の NF- κ B の転写活性に与える影響を解析した結果、DAT は濃度依存的に NF- κ B の転写活性を抑制した (図 8c)。さらに、DAT による I κ B α の安定化は、DAT 処理が I κ B α の分解を誘導するリン酸化を阻害することに起因することを明らかにした (図 8d)。以上の結果より、DAT は I κ B α のリン酸化阻害による I κ B α の安定化、すなわち NF- κ B シグナルの抑制を介して、PEL 細胞にアポトーシスを誘導したと考えられる。

D. 考察

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。本研究により、サンギバマイシンは Raf と Erk のリン酸化を阻害することを見出した。プロテインキナーゼ C

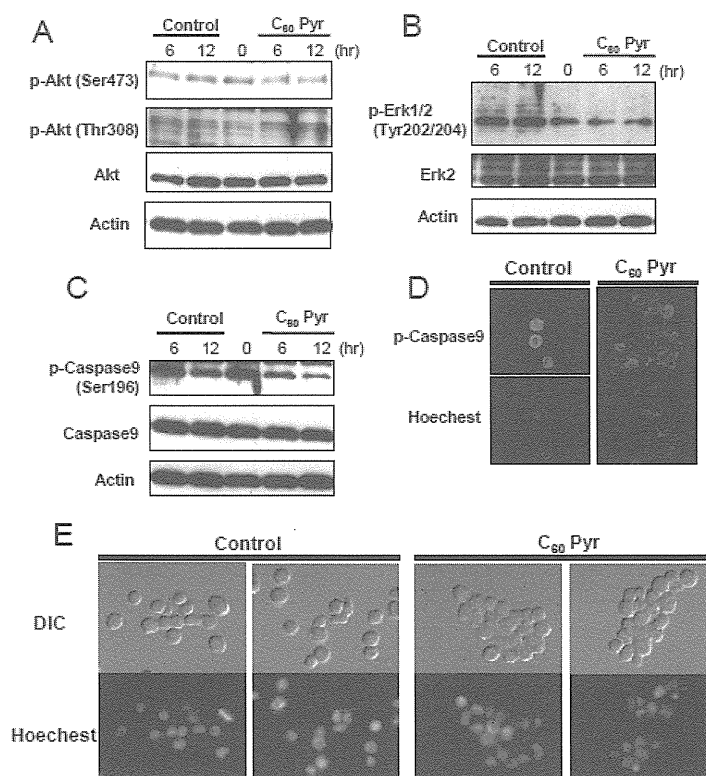


図 6 ピロリジニウム型フラレン (C₆₀Pyr) が PEL 細胞に与える影響

(A, B, C, D) BC3 や DG75 の培養液に 25 μ M のピロリジニウム型フラレン誘導体 (C₆₀Pyr) を添加し、ウエスタンブロットと IFA によりシグナル伝達への影響と caspase9 のリン酸化を解析した。
(E) BC3 細胞に 25 μ M のピロリジニウム型フラレン誘導体 (C₆₀Pyr) を添加後の細胞の凝集。

(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。

リンパ腫に対する抗がん剤療法は、CHOP 療法に代表されるように、抗がん剤の単独投与よりも複合投与が多用される。抗がん剤の単独投与の場合に比べ、複合投与では「低濃度で抗腫瘍効果が得られる」、「低濃度の抗がん剤使用による副作用の軽減」、「複数の分子標的薬を組み合わせることにより強い抗腫瘍効果が得られる」等の様々な利点がある。本研究では、プロテアソーム阻害剤 (MG132) と HSP90 阻害剤の Geldanamycin (GA)

また、抗てんかん薬として用いられ HDAC (histone deacetylase) 阻害活性を持つバルプロ酸に着目した。これら化合物は既に我々や他のグループにより PEL 細胞に対して細胞増殖抑制効果を持つことが報告されている。プロテアソーム阻害活性を持つ MG132 には、サンギバマイシンの PEL 細胞増殖抑制を増強しなかったが、HSP90 阻害剤 (GA) とバルプロ酸は、サンギバマイシンの PEL 細胞増殖抑制を増強した。この結果は、PEL 細胞の生存や増殖に必要なとされる複数の因子が阻害されたことに起因すると推察される。

フラーレンは炭素原子 60 個がサッカーボール状に結合した分子で、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。フラーレンの分子構造は非常に

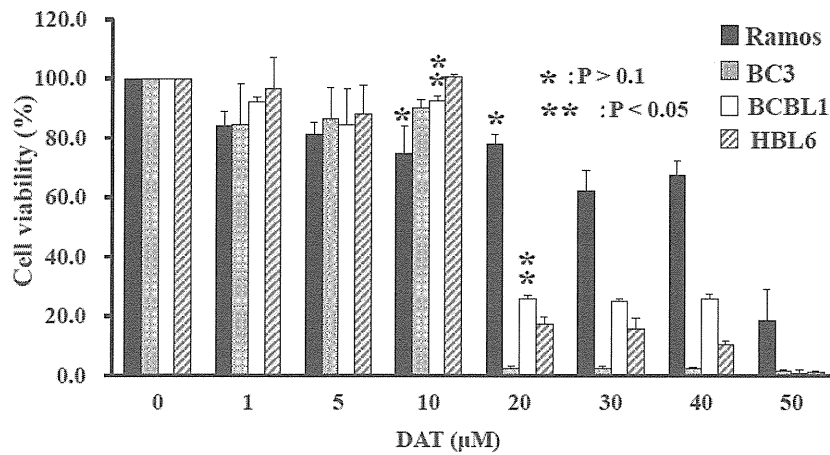


図7 ジアリルトリスルフィド (DAT) の PEL 細胞株に対する増殖阻害活性
PEL 株 (BC3, BCBL1, HBL6)、KSHV 非感染 Ramos の培養液に各濃度の DAT を添加し 24 時間後の生細胞数を CCK-8 により測定した。

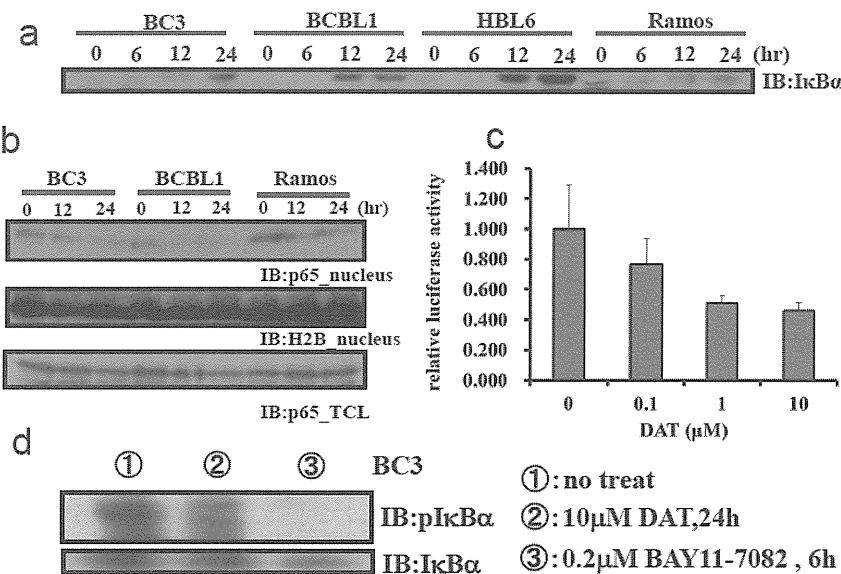


図8 ジアリルトリスルフィド (DAT) が PEL 細胞に与える影響
(a, b) 各 B 細胞株に 10μM DAT 処理を行い、ウエスタンブロットにより IκBα の安定化と NF-κB を解析した。
(c) NF-κB レポーター遺伝子を用いて 10μM DAT 処理による BC3 細胞内の NF-κB の転写活性に与える影響を解析した。
(d) BC3 細胞に 10μM DAT 処理を行い、ウエスタンブロットにより IκBα のリン酸化を解析した。

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。昨年度、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。

ピロリジニウム型フラレン誘導体は PEL 細胞内の Caspase3, 7 の活性化、さらには上流因子である Caspase9 の活性化を誘導した。一方でピロリジニウム型フラレンは、Akt の活性化につながる Ser473-Akt のリン酸化と caspase9 の不活性化を誘導する Ser196-caspase9 のリン酸化を減弱させた。Ser473 がリン酸化された活性型 Akt は、caspase9 の Ser196 をリン酸化して caspase9 を不活性化（切断阻害）し、抗アポトーシス作用を発揮することが知られている。我々は Akt の活性化状態の低下に伴い、リン酸化 Caspase9 が減弱することを見出した。すなわち、ピロリジニウム型フラレン誘導体は Akt を介した Caspase9 抑制を解除することにより、PEL 細胞にアポトーシスをもたらすことが推論できる。

ニンニク新芽の含有成分の一つ diallyl trisulfide (DAT) は、KSHV 非感染 B 細胞性リンパ腫株の増殖には影響を与えず、KSHV が感染した PEL 細胞のみ特異的に増殖抑制効果を示した。DAT は PEL 細胞の I κ B α を安定化し、NF- κ B の転写因子 p65 の核移行と NF- κ B の転写活性を抑制した。また、結果には示さなかったが、DAT 処理により、PEL 細胞内のプロテアソーム活性と I κ B α のポリユビキチン化には影響を与えなかった。これらの結果は、DAT は IKK 複合体による I κ B α のリン酸化阻害による I κ B α の安定化、すなわち NF- κ B シグナルの抑制を介して PEL 細胞にアポトーシスを誘導したと推察することが出来る。今後は、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を展開させる。

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、HSP90 阻害剤 (GA) とバルプロ酸は、サンギバマイシンの PEL 細胞増殖抑制を増強した。また、ピロリジニウム型フラレン誘導体は Akt を介した Caspase9 抑制を解除することにより、PEL 細胞にアポトーシスを誘導する。ニンニク新芽の含有成分である DAT は、I κ B α のリン酸化阻害による I κ B α の安定化、すなわち NF- κ B シグナ

ルの抑制を介して、PEL 細胞にアポトーシスを誘導した。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) Wakao K, Watanabe T, Takadama T, Uia S, Shigemi Z, Kagawa H, Higashi C, Ohga R, Taira T, Fujimuro M: Sangivamycin induces apoptosis by suppressing Erk signaling in primary effusion lymphoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2014, 444:135-140
- 2) Wakabayashi N, Skoko JJ, Chartoumpakis DV, Kimura S, Slocum SL, Noda K, Palliyaguru DL, Fujimuro M, Boley PA, Tanaka Y, Shigemura N, Biswal S, Yamamoto M, Kensler TW: Notch-Nrf2 axis: Regulation of Nrf2 gene expression and cytoprotection by Notch signaling. *Mol. Cell. Biol.* 2014, 34:653-663
- 3) 藤室 雅弘: タンパク質の品質管理と分解 新細胞生物学 (廣川書店), 2013, 3:90-95
- 4) 藤室 雅弘: 細胞分裂と増殖 新細胞生物学 (廣川書店), 2013, 6:151-174

2. 学会発表

- 1) 渡部匡史、中村成夫、増野匡彦、小野智哉、宇井定春、賀川裕貴、藤室雅弘: カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス誘導性リンパ腫を標的とした化学療法の探索. 日本薬学会年会. 横浜 (2013.3)
- 2) 重見善平、賀川裕貴、渡部匡史、藤室雅弘: 小胞体ストレス誘導剤 Diallyl trisulfide のウイルス感染性リンパ腫に対する抗腫瘍活性. 日本生物高分子学会 2013 年度大会. 大阪 (2013.10)
- 3) 渡部匡史、賀川裕貴、藤室雅弘: KSHV 陽性腫瘍細胞における Hsp90 の切断. 日本ウイルス学会年会. 兵庫 (2013.11)

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

カポジ肉腫では、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。そして、pegylated liposomal doxorubicin (PLD) による化学療法によって、その治療方針は大きく変化してきた。

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、結果的に他の日和見疾患の合併する危険性を高めるため、化学療法の適応や終了時期が問題となることが多い。本研究では、実際に経験されたカポジ肉腫を詳細に調査することによって、化学療法の適応や終了時期、難治症例における治療方針など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。喉頭蓋病変を伴う重症例、ART 後に疫再構築症候群として病変が増悪する例、あるいは PLD 無効例など、難治例における治療方針についてもまとめた。

A. 研究目的

カポジ肉腫は AIDS 指標疾患における代表的な悪性腫瘍のひとつである。近年は、抗 HIV 療法 (ART) の進歩や、pegylated liposomal doxorubicin (PLD) による化学療法によって、治療方針が大きく変化してきた。カポジ肉腫は ART によっても改善する傾向がある。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ことから、化学療法の適応や終了時期を決めることがカポジ肉腫治療における重要なポイントとなってくる。また、実際の臨床現場では、喉頭蓋病変を伴う重症例、ART 後に疫再構築症候群として病変が増悪する例、あるいは PLD 無効例など、基本的な治療方針で対応しきれない難治例も存在する。今回、これまでに経験されたカポジ肉腫症例を詳細に調査することによって、カポジ肉腫における化学療法のポイントや、難治例における対策について検討を行った。

B. 研究方法

1990～2010 年末までに当院でカポジ肉腫と診断された 102 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、診療録を用いて後方視的に調査した。

(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

当院における 1990～2010 年末に経験された 102 例のカポジ肉腫の調査では、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。

化学療法を開始する基準としては、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があるかどうかによって判断されていた。

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]

喉頭蓋病変があった 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た。[第27回日本エイズ学会、2013、熊本]

以下に代表的な難治例の報告をまとめる。これらの症例については、本研究班の作成した治療の手引きにも掲載して、治療を行う際の注意点や対策などについて解説した。

《症例1》Pegylated liposomal doxorubicin (PLD) で再燃を繰り返した症例

40歳代 日本人男性。MSM。

20XX年4月に左大腿部の蜂窩織炎を発症。20XX+1年10月より左下腿浮腫と乾性咳嗽が出現。20XX+2年1月より労作時呼吸困難と黒褐色隆起病変が下腹部に出現。

4月より浮腫は増悪、歩行障害を来たしたため近医を受診した。HIV感染症と皮膚組織よりカポジ肉腫(KS)が判明したため、6月に当院紹介入院となった。

CD4数は26/ μL 、HIV-RNA量は 1.0×10^9 copies/mLであった。入院時には下腹部から両側下腿にかけて浮腫を伴う黒褐色隆起病変を認めた。肺、肝臓、胃にもKSを疑う病変が指摘された。

(経過)

KSが多臓器に認められたため、治療として抗HIV療法(ART: Antiretroviral therapy) [スタブジン+ラミブジン+ロピナビル/リトナビル]にリポゾーマルドキソルビシン(PLD) 20mg/ m^2 を併用した。治療開始後、咳嗽、労作時呼吸苦、下腿浮腫は軽快した。PLDを計3コース終了した時点で、肺や肝臓の病変も改善した。PLD投与に伴う重篤な副作用は認めず退院となった。

退院後、外来にてPLDを継続し、計10コース実施した。しかし、PLDを終了すると休薬期間中に下腿浮腫は増悪し、歩行障害が出現。PLDをさらに計14コース実施したが、症状は寛解増悪を繰り返した。

20XX+5年8月頃から症状が再燃し、この時点でCD4数は112/ μL 、HIV-RNA量は検出限界以下であった。また、心機能に異常は認められなかったが、PLDは計24コース(総投与量840mg)行っていた。

同年11月より入院にてパクリタキセル(PTX)による治療を実施した。治療実施にあたり、プロテアーゼ阻害薬とPTXとの薬物相互作用を考慮し、ATV/rをラルテグラビルに変更した。PTXの用量

は100mg/ m^2 とし、好中球減少(Grade 3)と脱毛(Grade 1)を認めた以外は重篤な副作用は認めなかった。PTXは3週間毎に実施し、臨床症状は徐々に改善した。退院後も治療を継続し、計8コースを実施し、徐々に症状は軽快した。

《症例2》喉頭蓋病変により気道狭窄を生じた症例 30歳代 男性。MSM。

肛門周囲膿瘍をきっかけにHIV陽性と診断され入院。CD4数186/ μL 、HIV-RNA量は 2.5×10^9 copies/mLであった。入院時、身体所見では体幹・四肢に暗紫色の結節病変を認めた。上部消化管内視鏡では胃に暗赤色粘膜が確認され、病理学的にカポジ肉腫(KS)と診断された。喉頭ファイバーでは白色プラークと結節が咽頭から喉頭にかけて広がり、喉頭蓋は発赤腫脹しKS病変が疑われた。

(経過)

咽喉頭を含むKS病変に対して抗HIV療法(ART: Antiretroviral therapy) [ラルテグラビル+テノホビル/エムトリシタビン]にpegylated liposomal doxorubicin (PLD) 20mg/ m^2 を併用し治療を開始した。その後、皮膚病変は平坦化、咽喉頭喉頭の発赤腫脹も改善した。ARTとPLDの副作用は認めず、PLDを2コース施行し退院となった。PLDの追加投与に関しては新規KS病変がないことと状態が安定していたことから行わなかった。

しかし、退院1か月後に呼吸困難と咽喉頭違和感を主訴に耳鼻科外来を受診した。喉頭鏡では喉頭蓋の発赤腫脹を認め、当初は急性ウイルス性喉頭蓋炎が疑われたためプレドニゾロン(PSL) 30mgが投与されたが、症状が急速に進行し10日後に再入院となった。身体所見では顔面頸部の浮腫を認め、皮膚の暗紫色病変と結節が再増悪した。CD4数は196/ μL でHIV-RNA量は20 copies/mLであった。カポジ肉腫の免疫再構築による増悪を疑い、ARTは中止、PSLは漸減中止するとともにPLDを速やかに再投与した。気管切開をせずに経過をみたとところ症状と喉頭蓋病変は徐々に改善した。PLD4コース直前にARTを再開し、症状の再燃がないことを確認し退院となった。退院後も治療を継続し、PLDを計10コース実施し病変は完全に消失した。

D. 考察

(症例 1 における診療のポイント)

1) 化学療法の適応

カポジ肉腫は ART による改善も期待できることが、一般的な悪性腫瘍における化学療法の方針とは大きく異なる点である。軽症の場合には ART のみで経過観察することも可能である。しかし、本症例のように多臓器に広がり進行が早い場合、そして肺病変がある場合には化学療法を併用することが必要となる。

2) 化学療法の選択と継続期間

化学療法としては、リポゾーマルドキソルピシン (PLD) が第一選択となっている。化学療法にともなう骨髄抑制は、その一方で ART 後の免疫回復を妨げ、他の合併疾患を発症する危険性も高めてしまう。したがって、カポジ肉腫の増悪がコントロールされたならば、その後は ART による改善を期待して、化学療法の早期終了についても検討される。

しかし、PLD の無効例や再燃を繰り返す例もあり、そのようなケースではパクリタキセル (PTX) への変更も考慮すべきである。PLD と PTX における奏効率に大きな違いはないが、作用機序が異なるため効果が得られる可能性がある。

本症例では、リポゾーマルドキソルピシン (PLD) を計 24 コース行ったが、カポジ肉腫の再増悪を繰り返した。その後、化学療法をパクリタキセル (PTX) へ変更して計 8 コース行ったことで、その後は ART のみで経過観察可能となった。

PTX 投与時には、併用する薬剤との相互作用にも注意が必要となる。本例においても、PLD から PTX へ変更する時点で、プロテアーゼ阻害薬との薬物相互作用を考慮して ATV/r がラルテグラビルに変更された。

(症例 2 における診療のポイント)

1) 喉頭部の病変には注意が必要

カポジ肉腫では、口腔内も好発部位のひとつであり、口蓋部や歯肉に発生することが多い。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くなる。皮膚などにカポジ肉腫を認めている場合には、常に口腔内病変の有無にも注意することが大切である。

2) 喉頭カポジ肉腫の治療

ART は、カポジ肉腫に対する治療としての役割を演じている。しかしその一方で、免疫再構築症候群としてカポジ肉腫を増悪させることもある。

このため、喉頭部に集簇する例や、喉頭浮腫を伴う例では、ART だけではなく、化学療法も同時に開始することがすすめられる。また、喉頭部に集簇する例や、喉頭浮腫をとまなう例においては、治療の中止時期も慎重に検討することが必要となる。

また、カポジ肉腫においては、ステロイド投与後に病変の増悪する例も多く報告されている。したがって、現時点で免疫再構築症候群として増悪した場合のステロイド投与はすすめられていない。

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では「免疫機能 (Immune system: I)」「全身性疾患 (Systemic illness: S)」「腫瘍 (Tumor: T)」によってカポジ肉腫が分類されている。しかし、我々が行った調査では、化学療法の適応は「腫瘍 (Tumor: T)」の状況のみによって決定され、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。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。また ART 開始後に、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。

E. 結論

AIDS に合併するカポジ肉腫の臨床像は多彩であり、従来の病期分類で化学療法の適応を判断することは困難であった。しかし、本研究で多くの症例を調査したことによって、化学療法を開始する基準を示した手引きが作成された。また、難治例や重症例を詳細に検討したことによって、その注意点や治療方針をまとめることができた。

F. 研究発表

学会発表

- 1) 「カポジ肉腫による気道狭窄を生じたエイズ患者3例の検討」第27回日本エイズ学会学術集会・総会

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

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 病棟医長
 研究協力者 柳川泰昭 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
 永田尚義 国立国際医療研究センター 消化器内科

研究要旨

2012 年度に作成した「AIDS に合併するカポジ肉腫等の HHV-8 関連疾患における診断と治療の手引き」において本研究班は「リポゾーマルドキソルピシン (PLD) の使用基準、回数について再考を促す (早期中止を検討)」とする提言を行った。本年度は、本提言の臨床的妥当性を検証する目的で、自施設のカポジ肉腫 (KS) 症例について、死亡を primary outcome とした最適な PLD の投与回数についての臨床的検討を行った。108 例の KS 症例の臨床的検討を行った結果、KS 症例の多くが診断時にはすでに重度の免疫不全状態であり、その後に発症した日和見疾患の数が有意に予後と関連し、PLD 治療と予後との関連は見られなかった。これは、現在の標準治療と考えられている PLD の一律投与 (4-6 回) が免疫不全を助長することで逆に予後を悪化させている可能性を示唆しており、本研究班の提言の妥当性を示すものであると考えられた。HHV-8 関連疾患として最も予後不良かつ稀な疾患である原発性滲出性リンパ腫 (PEL : primary effusion lymphoma) について、自施設の症例についての臨床的解析を行った。4 例の HIV 合併 PEL 中の 3 例で腫瘤形成が見られ、1 例の CR 例が確認された。標準治療の確立していない予後不良の疾患であるため、今後も継続した臨床情報の収集が望まれる。

A. 研究目的

カポジ肉腫 (KS) を始めとする HHV-8 関連疾患は、抗 HIV 療法 (ART) が広く行われるようになった現在でも、临床上の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、ART に加えてリポゾーマルドキソルピシン (PLD) などの化学療法を必要とする KS 例が少なからず存在しており、PLD 治療例においても 111 症例のうち 13.5% が死亡しており決して予後良好な疾患ではないという実態を明らかにした。その病態から KS が死亡原因となることは比較的少ないと考えられていること、また PLD 治療自体はその副作用の骨髄抑制により免疫機能の回復を阻害する可能性があることから、予後不良の原因として PLD の副作用による免疫不全の増悪が多少なりとも関連している可能性が検討された。実際、ほとんどの医療機関では、KS の重症度によらず PLD の 4-6 回投与が標準治療として行われているのが現状であると考えられるが、その妥当性を裏付けるエビデン

スが存在しているわけではない。以上を踏まえ、2012 年度に本研究班で作成した「AIDS に合併するカポジ肉腫等の HHV-8 関連疾患における診断と治療の手引き」においては、各分担研究者の臨床経験例を踏まえた上で、「PLD の使用基準、回数について再考を促す (早期中止を検討)」という趣旨の提言を行っている。

本年度は上記「手引き」内で本研究班が示した「PLD の投与回数に関する提言」の妥当性を検証する目的で、自施設のこれまでの KS 症例について、死亡を primary outcome とした場合の最適な PLD の投与回数について臨床的検討を行う。さらに、HHV-8 関連疾患として最も予後不良かつ稀な疾患である原発性滲出性リンパ腫 (PEL : primary effusion lymphoma) について、自施設の症例についての臨床的解析を行う。臨床現場における参考資料として提示することで、PEL のマネジメントの改善、予後向上に寄与することを目的とする。

B. 研究方法

1. KS 症例の臨床的検討 (研究協力者:柳川泰昭)

1999年から2013年までに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で経験した108例のKS症例を対象に臨床的検討を行った。患者背景、治療内容、予後等に関して診療録を元にデータを抽出し、予後(死亡)に関連する因子の解析を行った。

2. PEL 症例の臨床的検討 (研究協力者:柳川泰昭)

1999年から2013年までに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で経験した4例のPEL症例を対象に臨床的検討を行った。診療録より臨床像、治療内容、治療効果についてデータ抽出を行った。

C. 研究結果

1. KS 症例の臨床的検討

1) 患者背景

年齢の中央値は41歳(35-52歳)、KS診断時のCD4数は63/μL(29-146)であった。中央値で68ヶ月(30-108)の観察が行われていた。

2) KS 診断時の CD4 数 (図 1)

診断時のCD4数は85%の症例がCD4<200/μL、43%がCD4<50/μLであり、KS症例の大多数が発症時点ですでに重度の免疫不全状態であった。

3) KS 診断時の他の AIDS 指標疾患 (図 2)

KS発症時の重度免疫不全を反映して、症例の67%がすでに他のAIDS指標疾患を発症していた。30%の症例は2個以上のAIDS指標疾患の併発が見られていた。

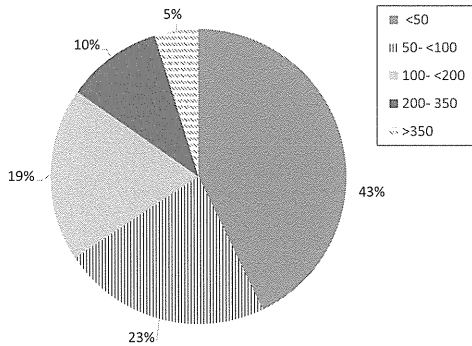


図 1
KS 診断時の CD4 数の分布

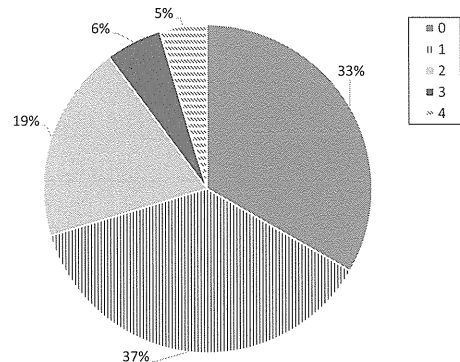


図 2
KS 診断時の他の AIDS 指標疾患数

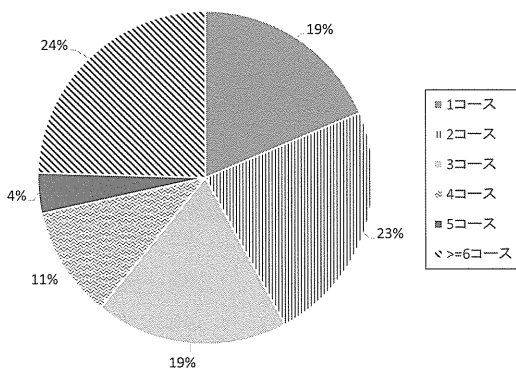


図 3
PLD の投与回数

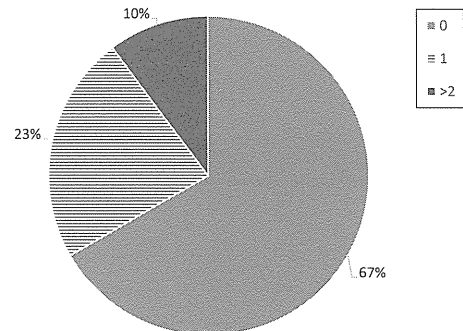


図 4
KS 診断後に新たに発症した日見疾患数

4) PLD の投与回数 (図 3)

PLD による治療は 52 例 (48%) に対して行われた。標準治療である 4 コース以上の PLD が投与されたのは全体の 39% であった。61% は標準治療より回数の少ない 1-3 回の投与にとどまっていた。

5) KS 診断後に新たに発症した日和見疾患 (図 4)

全体の 33% で観察期間中に新たな日和見疾患を発症していた。10% で 2 つ以上の疾患の発症がみられた。

6) 予後に関連する因子の解析 (表 1)

観察期間中に 12 例の死亡が確認された。全例が KS 発症後 1 年以内の死亡であり、このうち KS が死因と判断されたのは 3 例 (2.8%) であった。推定 5 年生存率は 88.9% であった。予後に関連する因子の多変量解析では、「KS 診断後の 2 つ以上の新たな日和見疾患の発症 (HR 5.989, p<0.015)」が、有意に予後と関連していることが判明した。PLD の投与自体は予後とは全く相関していなかった (p=0.933)。

2. PEL 症例の臨床的検討 (表 2)

1) 患者背景

4 例の HIV 感染合併 PEL 症例は全て男性同性愛者であり、PEL 発症時の年齢 (中央値 [範囲]) は 42 歳 [30-75] であった。3 例が ART 未導入下で CD4 数 50/μL 未満であったが、1 例は ART 実施下で CD4 数 350/μL と比較的免疫良好な状態で PEL を発症していた。

2) PEL の病態と予後

1 例は滲出性胸水以外にリンパ腫病変を認めず、典型的な原発性滲出性リンパ腫の像を呈していたが、3 例は表在リンパ節・腹腔内リンパ節・胸壁・大腿・胃粘膜・肝臓・脾臓に腫瘤形成を認めた。2 例で CHOP 療法、2 例で EPOCH 療法が行われたが、初回治療への反応は不良 (PD:progressive disease) であった。3 例は診断後 7-25 週間で死亡が確認された。1 例はサルベージ治療として THP-COP が行われ CR (complete response) となり、診断後 1 年時点で生存が確認されている。

表 1
KS 患者の予後に関連する因子

	Univariate analysis		Multivariate analysis	
	Hazard Ratio (95% CI)	p value	Hazard Ratio (95% CI)	p value
older age (by 10 year)	1.423 (0.906-2.236)	0.125	1.265 (0.788-2.030)	0.330
Japanese nationality	0.273 (0.060-1.248)	0.094	0.231 (0.044-1.204)	0.082
MSM	21.669 (0-2484372)	0.605		
CD4 count <50/ml	2.802 (0.843-9.308)	0.093	1.590 (0.431-5.857)	0.486
HIV-RNA > 5 log copies/mL	0.955 (0.333-3.204)	0.955		
T1 case	0.867 (0.261-2.878)	0.815		
Doxil treatment	1.050 (0.339-3.256)	0.933		
Other OI => 2	8.136 (2.201-30.080)	0.002	5.989 (1.416-25.337)	0.015

表 2
HIV 合併 PEL 症例のまとめ

症例	性	年齢	CD4数	発症時ART	病変部位	血中HHV-8	化学療法	効果	予後
1	男	30	31	無	腸、全身KS内に混在	2000 copies/mL	CHOP	PD	死亡
2	男	43	20	無	リンパ節・筋肉・骨髄	<200 copies/mL	EPOCH	PD	死亡
3	男	42	16	無	胸水、心臓	100000 copies/mL	CHOP	PD	死亡
4	男	75	350	有	胸水	3000 copies/mL	EPOCH→THP-COP	CR	生存

D. 考察

KS に対する PLD は腫瘍の縮小効果に優れ、副作用も少ない。しかしながら、PLD の治療適応や、治療を行う場合の最適投与回数について、予後の観点から検討された報告はほとんどなく、多くの施設で独自の判断基準により KS 病変の CR を目指した 4-6 コースの PLD 投与が行われているのが現状である。今回、108 例の KS 症例の臨床的検討を行った結果、KS 症例の多くが診断時にはすでに重度の免疫不全状態であり、その後に発症した日和見疾患の数が有意に予後と関連し、PLD 治療の予後との関連は見られなかった。これは、現在の標準治療と考えられている PLD の一律投与 (4-6 回) が免疫不全を助長することで、逆に予後を悪化させている可能性を示唆していた。この結果は、本研究班が「手引き」内で示した「PLD の投与回数に関する提言」の妥当性を示すものであると考えられる。

今回、検討された 4 例の HIV 感染合併 PEL のうち、3 例で腫瘍形成がみられたことは興味深い。一般的には本疾患での腫瘍形成は稀であると考えられているため、今後の情報集積が必要であると考えられる。予後は不良であるが、1 例で CR 例が確認された。有効な標準治療の確立のため、これについても、今後の全国の症例情報を集積した治療成績の検討が必要であると考えられた。

E. 結論

今回の検討で、KS 症例は、診断後の KS 以外の日和見疾患の発症が予後と有意に関連しており、ART による免疫再構築が最も重要であることが示唆された。これは本研究班で提言した「PLD の使用基準、回数について再考を促す (早期中止を検討)」の妥当性を示すものであると考えられる。今後の検討により適切な PLD 投与回数を決定する因子の特定が、より適切なマネジメントを考える上で重要であると思われた。

今回の検討で、HIV 合併 PEL では腫瘍形成が稀ならず見られた事、1 例の CR 例があったことを示した。標準治療の確立していない予後不良の疾患であり、今後も継続した臨床情報の収集が望まれる。

F. 研究発表

1. 学会発表

1) 照屋勝治：日和見感染症、診断、治療の実際

日本エイズ学会認定医講習会 第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会 熊本 (2013.11)

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

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 科長
 研究協力者 渡邊 大 国立病院機構大阪医療センター 臨床研究センター
 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、悪性リンパ腫や血球貪食症候群など、HHV-8 関連疾患について調査した。【方法】2005 年 9 月～2013 年 12 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 44 例のうち、血中の HHV-8-DNA を測定した 29 例について調査した。【結果】8 例で HHV-8-DNA が検出され、ウィルス量は 74 ～ 1,400,000 copies/mL であった。このうち 3 例で血球貪食症候群 (VAHS) や悪性リンパ腫を合併していた。【考察】HHV-8 関連疾患を発症した 3 例は血中ウィルス量が高値であり、病勢との関連が示唆された。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推奨される。

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 2009 年と 2012 年における抗 HHV-8 抗体保有率について、縦断的調査を行った。【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 0.76 以上を陽性とした。また、カポジ肉腫の既往がある症例 (KS 群) を陽性コントロール、血液製剤による HIV 感染者 (血液製剤群) を陰性コントロールとした。残りの症例を推定感染経路別に、同性間群と異性間・その他群に分類した。2009 年と 2012 年に抗 HHV-8 抗体を測定し、その変化について検討した。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】KS 群 (15 例) は全例で抗 HHV-8 抗体が 2009 年・2012 年ともに陽性であった。血液製剤群 (7 例) と異性間・その他群 (8 例) は全例で抗 HHV-8 抗体が 2009 年・2012 年ともに陰性であった。同性間群 (50 例) は、10 例 (20%) が 2009 年・2012 年とも陽性、1 例 (2%) が陽性から陰性に变化 (陰転化)、6 例 (12%) が陰性から陽性に变化 (陽転化)、8 例が 2009 年・2012 とも陰性であった。【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縦断的調査を行った。推定感染経路が同性間性的接触であった症例で高い陽転化率を認めた。

3) HIV 感染者におけるヒトヘルペスウィルス 8 型関連疾患の多施設調査

【目的】HHV-8 が関連する悪性リンパ腫や血球貪食症候群は症例数が少ないため、多施設共同研究による症例集積および解析を行う。【方法】大阪医療センター、東京都立駒込病院、国立国際医療研究センターの 3 施設における HHV-8 関連疾患について調査を行った。【結果】原発性滲出性リンパ腫 (PEL) 5 例、HHV-8 関連悪性リンパ腫 (HHV-8ML) 3 例、HHV-8 関連血球貪食症候群 3 例、HHV-8 関連腹水貯留が 1 例の計 11 例であった。PEL および HHV-8ML の 8 例中、5 例が死亡の転帰をとり、悪性リンパ腫の予後指数である age adjusted IPI において、全例 high intermediate risk 以上に分類された。【考察】HHV-8 関連血球貪食症候群、PEL およびその他の HHV-8 関連悪性リンパ腫では、血中 HHV-8-DNA 量が陽性であり、死亡例では特にウィルス量が高い傾向にあった。血中 HHV-8-DNA 定量は病勢の反映のみならず、予後規定因子となる可能性がある。

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、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ウイルス量との関係を検討した。

B. 研究方法

2005年9月～2013年12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44例のうち、血中のHHV-8-DNAを測定した29例について調査した。

(倫理面に対する配慮)

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

2005年9月～2013年12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は44例であった。全例が男性で、年齢の中央値は40歳、発症時のCD4値の平均は92.7/ μ L、転帰は37例が寛解、3例が死亡、その他4例であった(図1)。29例中8例でHHV-8-DNAが検出された。HHV-8のウイルス量は74～1,400,000copies/mLであり、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。この3例のHHV-8のウイルス量は 10^4 copies/mL以上であった。特にウイルス量が 10^6 copies/mL以上と高値であった1例は、血球貪食症候群とHHV-8関連悪性リンパ腫の併発を認めた(図2)。

性別 年齢(発症時)	男性 n=44 26～79歳(中央値)	女性 n=0 40歳、平均 42.5歳)
CD4陽性 リンパ球数	1～406/ μ l <200/ μ l \geq 200/ μ l	平均: 92.7/ μ l n=38 n=6
発症時の HIV-RNA量	40～5,020,000 copies/ml (中央値 193,000 copies/ml)	
合併していた エイズ指標疾患	ニューモシチス肺炎 CMV感染症(肝・脾・リンパ節以外) カンジダ症(食道) 悪性リンパ腫 クリプトコッカス症(肺以外) 結核	10例 6例 4例 2例 2例 1例
転帰	寛解 37例	死亡 3例 その他(治療中・転院など) 4例

(2005年9月～2013年12月まで)

図1

大阪医療センターにおいて生検により診断したカポジ肉腫症例の患者背景

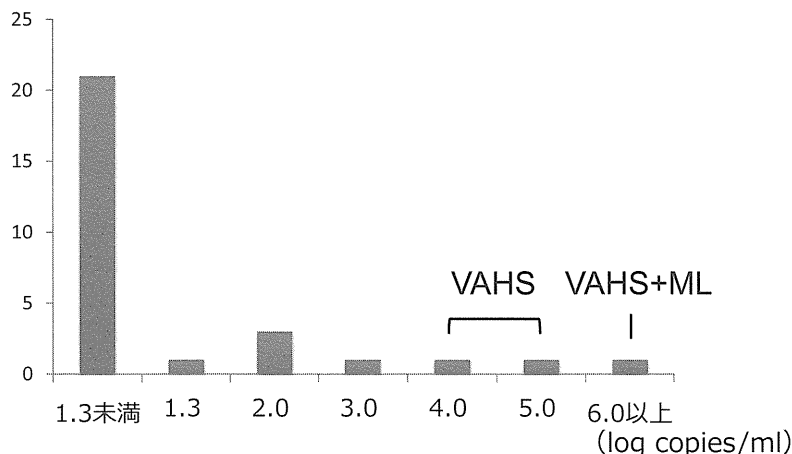


図2

HHV-8 ウイルス量の測定 (診断時, 血中) n=29

D. 考察

HIV 感染者など免疫不全宿主では、HHV-8 の再活性化から血球貪食症候群を発症することがあり、重症度と HHV-8-DNA 量との相関が指摘されている。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。本研究において HHV-8 関連血球貪食症候群を呈した 3 例は血中 HHV-8-DNA を検出し、全例で 10^4 copies/mL 以上の高ウイルス量であった。症例数は少ないが、重症度と HHV-8-DNA 量との相関が示唆される。

本研究で解析した血球貪食症候群を発症した 3 例のうち 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。症例数が少ない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ある。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こうした HHV-8 関連疾患の関与が疑われるため、血中 HHV-8-DNA の定量を行うことが必要である。

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、本症の疾患を疑わなければ、HHV-8 のウイルス量を測定することはないと思われる。従って、適切な診断・治療を行うために、まず本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。

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, *Arch. 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。われわれは昨年度までの研究で、2009 年における大阪医療センターに通院中の HIV 感染者の抗 HHV-8 抗体保有率について検討し、推定感染経路が同性間性的接触である症例で高い抗体保有率を示したことを明らかとした。そこで今年度は 2009 年と 2012 年における比較、すなわち縦断的検討を行った。

B. 研究方法

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 0.76 以上を陽性とした。また、カポジ肉腫の既往がある症例 (KS 群) を陽性コントロール、血液製剤による HIV 感染者 (血液製剤群) を陰性コントロールとした。残りの症例を推定感染経路別に、同性間群と異性間・その他群に分類した。2009 年と 2012 年に抗 HHV-8 抗体を測定し、その変化について検討した。

(倫理面に対する配慮)

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

74 例の HIV 感染者について抗 HHV-8 抗体の測定を行い、縦断的検討を行った。患者背景としては、平均年齢 41 歳 (範囲: 24-77 歳) で 71 例 (96%) が男性、71 例 (96%) が日本人であった。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 (KS 群、9 例) について検討した。KS 群は全例、2009 年と 2012 年の両方で抗 HHV-8 抗体は陽性であった。血液製剤群 (7 例) と異性間・その他群 (8 例) においては 2009 年・2012 年とも陰性であった。一方、同性間群 (50 例) は 2009 年陽性・2012 年陽性が 10 例 (20%)、2009 年陽性・2012 年陰性 (陰転化) が 1 例 (2%)、2009 年陰性・2012 年陽性 (陽転化) が 6 例 (12%)、2009 年陰性・

2012年陰性が33例（66％）であり、高い陽転化率を認めた。同性間群における2009年に抗HHV-8抗体が陰性であった症例（39例）にのみ注目すると、約3年間での陽転化率は15％であった。

D. 考察

昨年度、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が、今年度は縦断的調査を行い、MSM-HIV感染者において高い陽転化も観察された。これはHHV-8の感染が過去のものではなく、現在も感染拡大が進行していることが予想される。また、陽転化した6症例とも抗HIV療法が継続されており、CD4数も1例を除いて350/μL以上であった。このことからHHV-8の流行は、少なくとも免疫不全に伴うものではないと考えられた。

E. 結論

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縦断的調査を行った。MSM-HIV感染者で高い陽転化率が観察された。

3) HIV感染症におけるヒトヘルペス

ウイルス8型関連疾患の多施設調査

A. 研究目的

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は、症例こそ少ないが、不良な転帰をとることがあり、症例の集積による発症・予後因子等の解析が求められる。そこで、症例経験の多い3施設の症例について、発症時の

CD4数やHIV-RNA量、HHV-8-DNA量などにつき、検討を行う。

B. 研究方法

HHV-8関連疾患として、PELとHHV-8関連悪性リンパ腫、血球貪食症候群、その他の病態を対象として、該当する症例経験がある3施設で調査を行った。

調査項目は、HIV関連情報（診断時・発症時のCD4、HIV-RNA量、抗HIV療法の有無、レジメン）、HHV-8感染項目（症状、検査データ、発症した疾患、発症時のHHV-8ウイルス量、カポジ肉腫の有無、治療薬、転帰）である。調査票を郵送し、質問紙による回答を集計、解析した。

（倫理面に対する配慮）

本研究は、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13034）。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

症例数は11例であった。内訳は、PEL5例、HHV-8関連悪性リンパ腫（PEL以外）2例、HHV-8関連血球貪食症候群2例、血球貪食症候群とHHV-8関連悪性リンパ腫合併が1例、HHV-8関連腹水貯留が1例であった（図3）。HHV-8関連疾患全体では生存が5例、死亡が6例であり、特に悪性リンパ腫での死亡率が高かった（62.5％）。

対象施設：国立国際医療研究センター、都立駒込病院、大阪医療センター

症例数：11例

疾患名	症例数	KS合併例
原発性滲出性リンパ腫（PEL）	5	2
HHV-8関連悪性リンパ腫（PEL以外）	2	0
血球貪食症候群（VAHS）	2	2
血球貪食症候群とHHV-8関連悪性リンパ腫	1	1
腹水貯留	1	1
計	11	6

図3

HIV感染者におけるHHV-8関連疾患（MCD以外）の患者背景

また、カポジ肉腫の合併は 6 例 (54.5%) に認め、CD4 数や HIV-RNA 量、発症疾患との関連は認めなかった。

次に、PEL および HHV-8 関連悪性リンパ腫の 8 例について、これを生存群 (3 例) と死亡群 (5 例) にわけ、発症時の CD4 数、HIV-RNA 量、HHV-8-DNA 量等について解析を行った (図 4)。CD4 数は死亡群 (5 例) が平均 77.3/μL、生存群 (3 例) が 259.5/μL であり、死亡群で有意に低い傾向がみられた。また可溶性 IL-2 レセプターについても死亡群の平均は 11,819 U/mL、生存群が 1,113 U/mL と、死亡群が有意に高かった。発症時の HIV-RNA 量、

LDH については、生存群、死亡群間で差は認められなかった (図 5)。HHV-8-DNA 量の平均値は、死亡群で 384,404 copies/mL と高値であったのに対し、生存群では 2 例が検出感度未満であった (1 例はデータなし)。

悪性リンパ腫の国際的な予後指数である age adjusted IPI (International Prognostic Index) で、high intermediate risk 以上に分類された 6 例中 5 例で死亡の転帰をとった。逆に low risk/low intermediate risk に分類された 2 例は生存していた。

症例数	8	
年齢 median(IQR)	42 (39-44)	(歳)
CD4 median(IQR)	110(19-278)	(/mm ³)
VL median(IQR)	4.8(1.6-5.6)	(logcp/ml)

		n (%)
病期分類 (IPI)	Low	1 (12.5)
	Low intermediate	1 (12.5)
	High intermediate	2 (25.0)
	High	4 (50.0)
Performance status (PS)	0-1	4 (50.0)
	≥2	4 (50.0)
発症時の ART	有り	3 (37.5)
	無し	5 (62.5)
予後	生存	3 (37.5)
	死亡	5 (62.5)

図 4
HHV-8 関連リンパ腫の患者背景

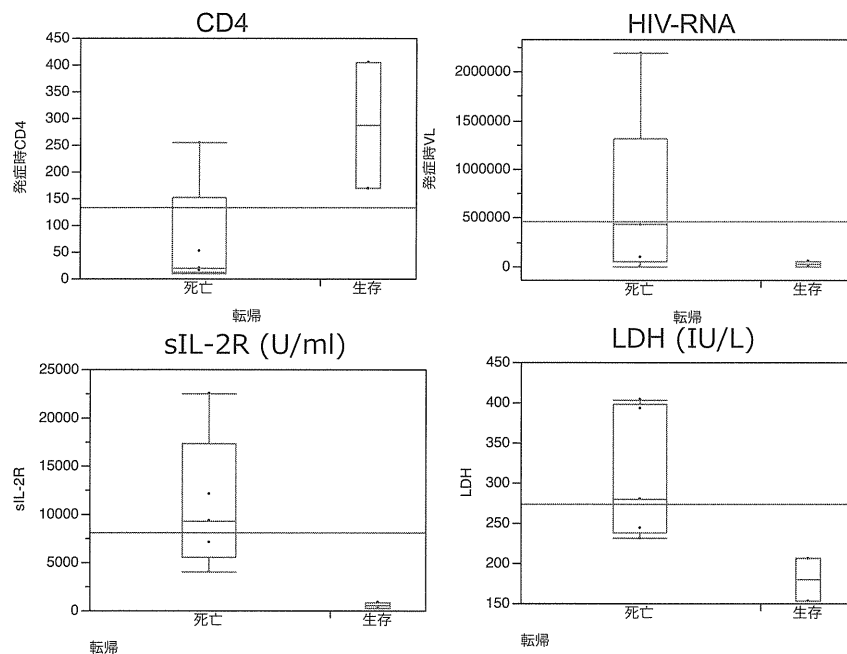


図 5
リンパ腫症例の生存群と死亡群の発症時所見の比較