

は精巣・睾丸腫瘍でやや若い傾向が見られた。

腫瘍発生時期(図12)はHIV診断から1年以上経過しての発症が全体の7割を占め、3ヵ月以内(同時発見を含む)が8割である日和見感染症と対照的であった。すなわち、HIVと診断されしばらく経過を見ている間に腫瘍が発生してきている状況が

明らかとなった。

腫瘍患者の転帰(図13)では完全寛解/部分緩解を認めたのは52.2%であった。腫瘍別での死亡率を見ると(図14)、膵癌、白血病などもともと予後不良とされる腫瘍が上位を占めた。

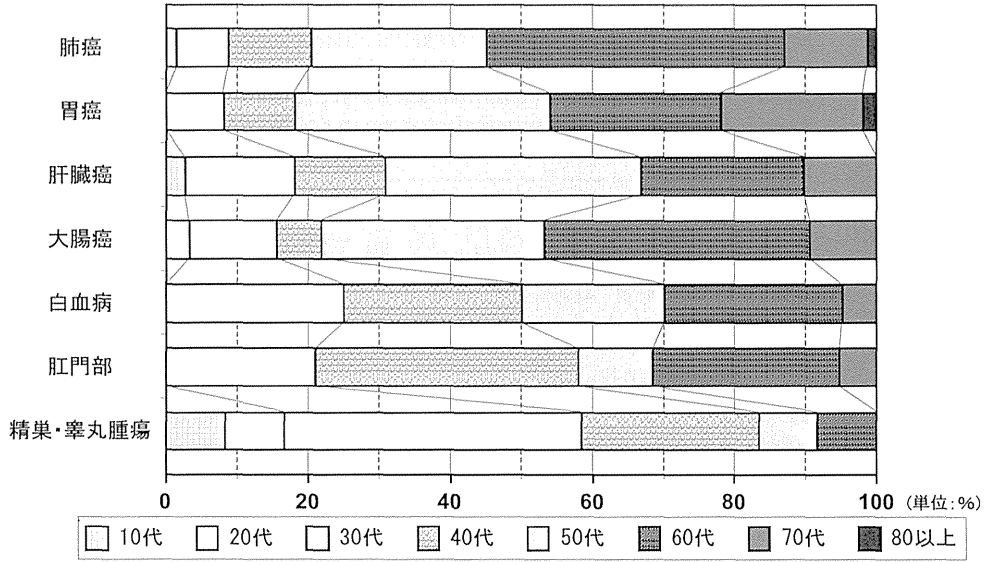


図11 腫瘍別の発症時年齢

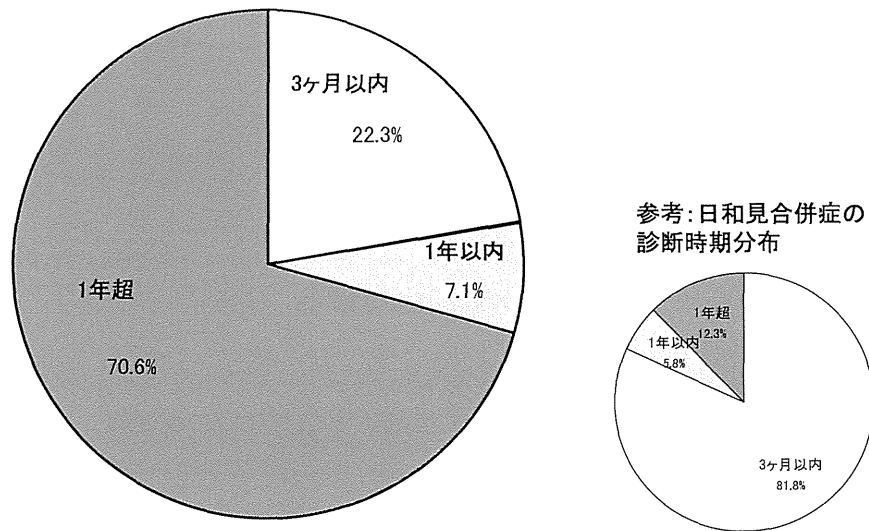


図12 HIV診断から腫瘍発生までの経過期間

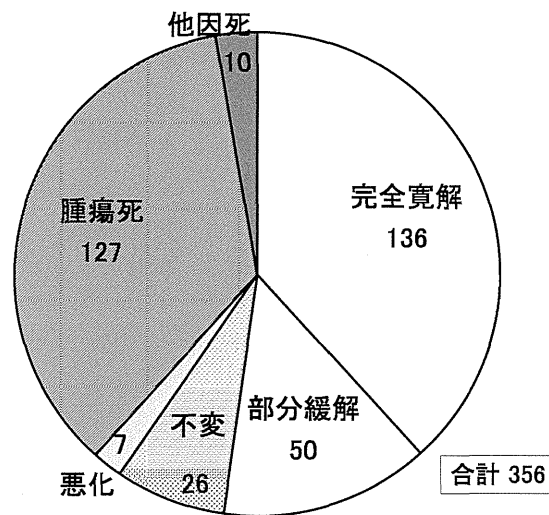


図13 非指標悪性腫瘍の転帰

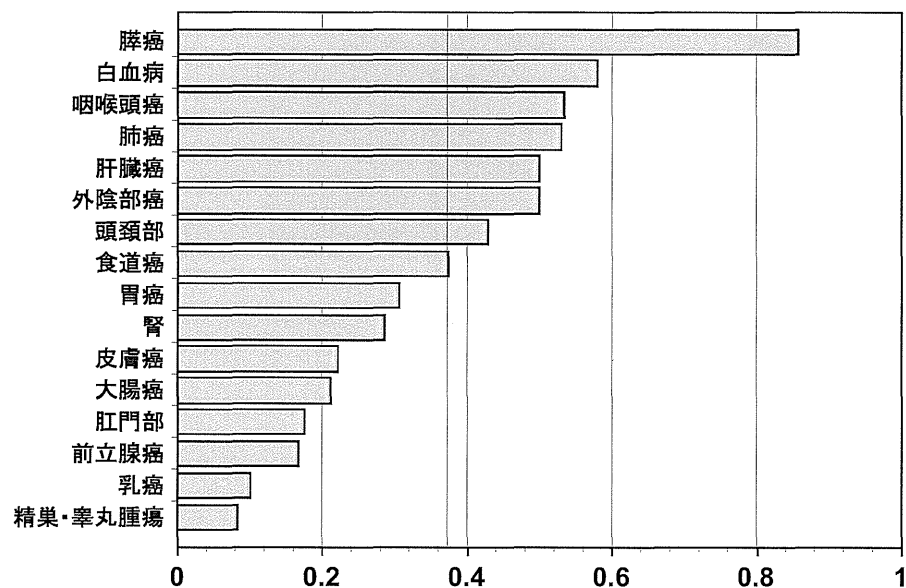


図14 腫瘍別の死亡転帰の割合

D. 考察

ARTの導入によってHIV感染者の予後が長期的に安定するようになり、HIV感染者の悪性腫瘍の発生が問題となり、本研究が開始された。日本においてもHIV感染者での非指標悪性腫瘍は年々増加してきていることが明らかとなった。HIV感染者の腫瘍罹患率は先行研究では日本人癌罹患率と比較すると高い傾向にあったが、年々その倍率は低下してきており、2012-13年の罹患率は昭和60年モデル人口での年齢調整罹患率で比べた場合、日本人の癌罹患率の0.72倍まで低下した。本研究によるデータはエイズ指標疾患に含まれる悪性リンパ腫や子宮頸癌、カポジ肉腫がこの集計では除

外されていることなどもあるが、当初考えられていたほど悪性腫瘍の発生率は高くない可能性も考えられる。ただ、HIV感染による影響はHIVに罹患してからある程度の期間を経て明らかになってくるものであり、長期的な推移を見ていく必要があると考えられる。

発生腫瘍の分布は明らかに日本人の一般的な腫瘍頻度と異なっており、肺癌、肝臓癌、白血病や口腔・咽頭・喉頭腫瘍、肛門部腫瘍、睾丸・精巣腫瘍が特徴的であった。肝臓癌は合併感染するC型肝炎やB型肝炎の影響が、肛門部腫瘍などはヒトパピローマウイルスとの関連が示唆されているが、肺癌や頭頸部腫瘍ではウイルス感染との関

連は明らかになっていない。特に日本では白血病の罹患率が高いことが特徴で、疾患としては骨髄性・リンパ性、急性・慢性のいずれもが認められており、型別での特徴は見られなかった。

主要6疾患の年次別発生数を見ると、この数年で肺癌の急増が目立ってきていた。明確なデータはないが、HIV感染者では喫煙などの肺癌の発生要因が高い可能性があり、今後HIV感染者の禁煙の促進は重要な課題になるものと思われる。一方で血液製剤による感染者のC型肝炎ウイルス共感染によると推定される肝臓癌は、2007年の7例をピークに減少傾向である。ただこの2年間は3例ずつの報告があり、これについても今後の動向を見る必要があると考えられた。

腫瘍発症時のCD4分布を見るとCD4が低いほど頻度は高かったものの、傾斜はなだらかであり、日和見感染症ほどCD4との強い関連は認められなかった。また、年齢を見ると40歳以上の年齢が高い患者での発症が主となっていた。また、悪性腫瘍の発見はHIV患者診療が1年以上経過して発生することが大半であった。HIVの治療によってCD4数が改善しても悪性腫瘍発生のリスクは大幅には低減せず、HIV感染者を長期に診療していくにつれて悪性腫瘍が見られていくことになる。今後のHIV診療では、抗ウイルス療法のコントロールや代謝系合併症などの注意にくわえて、悪性腫瘍の早期発見のための定期的なスクリーニングの実施が、一般中高年者の外来以上に求められていくものと考えられた。

E. 結論

HIVにみられる悪性腫瘍の発生状況を調査し、その特徴を明らかにした。特に肺癌の急増は早急な対応が必要と考えられた。

F. 健康危険情報

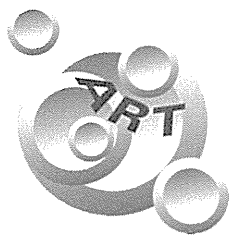
特記事項なし。

G. 参考文献

- 1) 国立がんセンターがん対策情報センター 地域がん登録全国推計によるがん罹患データ(1975年～2011年) : <http://ganjoho.jp/professional/statistics/statistics.html>
- 2) 平成25年エイズ発生動向年報 : http://api-net.jfap.or.jp/status/2013/13nenpo/nenpo_menu.htm

H. 知的財産権の出願・登録(予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし



エイズ関連日和見疾患の最適治療に関する研究

研究分担者：照屋 勝治 独立行政法人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：柳川 泰昭、谷崎隆太郎、柴田 怜
独立行政法人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)

研究要旨

カポジ肉腫(KS)の最適治療法に関する検討を行った。KSに対する Pegylated Liposomal Doxorubicin(PLD)は治療法として確立しているが、112例のKS症例の検討により、予後と関連しているのはPLDの治療の有無ではなく、宿主の免疫状態の改善がより重要であることが示された。

HIV合併梅毒に対する経口ペニシリン製剤による治療効果に関し、287例を対象とした大規模な治療効果に関する検討を行い、治療成功率は95.1%と海外で行われている筋注用ペニシリンによる治療と遜色ない効果が期待できることが示された。

HIV合併ニューモシスチス肺炎では中等症以上の場合、21日間のステロイド併用がガイドラインで推奨されているが、症例毎によっては予後に影響を与えることなく、ステロイド投与期間の短縮が可能であり、かつCMV活性化を抑制することで不要なpreemptive therapyを抑制できる可能性が示された

A. 研究目的

1996年以降、強力な抗HIV療法(ART)が行われるようになってから、日和見疾患の発生率および死亡率は劇的に低下し、HIV感染症の予後は著しく改善した。しかしながら、現在でも感染者の約3割は、AIDSを発症してのちにHIV感染が判明しているいわゆる"いきなりエイズ"であるのが現状である。そのため、ARTが可能な今日においても、難治性日和見疾患により、救命できない症例が後を絶たない。今後、HIV感染症の予後をさらに改善するためには、早期発見、早期治療による"いきなりエイズ"症例を減少させる必要があることはもちろんであるが、ART導入に伴う免疫再構築症候群(IRIS)の対策や、人種により頻度に差のある治療薬物の副作用発現率なども念頭においた、日和見疾患の最適治療法を確立する必要がある。

本研究では、エイズ関連日和見疾患に関する臨床的検討および解析を行い、現時点での最適治療

に関する提言を行うことを目的とする。

B. 研究方法、C. 研究結果、D. 考察

1) ART時代のKaposi肉腫症例の治療成績・予後 (柳川泰昭)

目的

カポジ肉腫(KS)はHIV関連悪性腫瘍の一つである。ARTやPegylated Liposomal Doxorubicin(PLD)などの化学療法の登場によりKSの治療成績は改善しているが、長期的予後や最適治療法に関する検討は現時点でもほとんどなされていないのが現状である。

方法

1999年から2013年までにACCでKSと診断された120症例のうち、ART導入後の経過が観察できた112例を対象に、患者背景、治療内容、予後等に関して臨床録を元にデータを抽出し、予後に関

連する因子の解析を行った。

結果

腫瘍深達度はT0(n=37)、T1(n=75)であり、経過中にそれぞれ5例(14%)、48例(65%)でリボゾーマルドキソルピシン(PLD)による治療が行われていた。観察期間71ヶ月(IQR: 43-115ヶ月)の間に12例が死亡(死因: KS 3例、MCD 1例)し、5年生存率は90.3%であった(図1)。予後と関連する因子の検討では、KSの病期や発症時のCD4数は予後と関連せず(p=0.707)、多変量解析ではKS診断時のOI数 ≥ 3 (aHR 6.392, p=0.004)、ART中のKS発症(aHR 4.467, p=0.014)が予後と関連し、PLDによる治療の有無は予後と関連していなかった(表1)。

考察

KS症例の予後はKSの病期よりもOIのコントロールの方がより重要であり、現在の標準治療と考えられているPLDの一律投与(4-6回)は免疫不全を助長することで、逆に予後を悪化させる可能性を示唆している結果であると考えられた。ART中のKS発症(免疫再構築症候群、IRIS)が有意に予後不良と関連していたという今回の結果は、国外からも報告がなされている。ARTの導入時期やPLDの使用スケジュールがKS-IRIS症例の予後に影響を与えるかどうか、今後の検討が必要と考えられた。

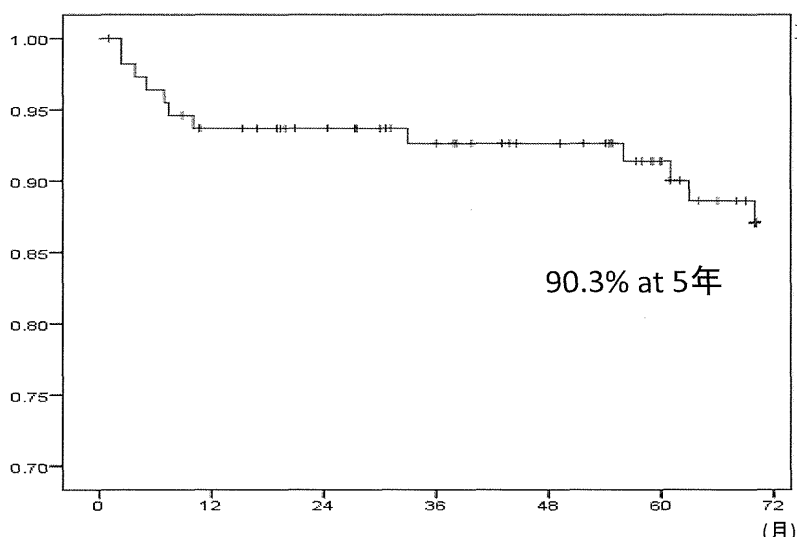


図1 ART開始後のKM生存曲線

表1 KSによる死亡に関する因子解析

	単変量解析		Adjusted by age, nationality and sexuality	
	Hazard ratio, 95% CI	p value	Hazard ratio, 95% CI	p value
年齢(10歳毎)	1.387, 0.832-2.313	0.210		
MSM	20.960, 0-1.09 x 10 ¹⁰	0.766		
日本国籍	0.517, 0.067-4.012	0.528		
KS病期分類				
T1	0.707, 0.188-2.667	0.609		
I1	0.435, 0.056-3.398	0.427		
S1	0.595, 0.129-2.754	0.507		
KS肺病変あり	4.112, 0.912-18.542	0.066		
CD4 T < 50/ μ L (ART開始時)	2.088, 0.610-7.151	0.241		
HIV viral load > 1.0 x 10 ⁵ copies/ml (ART開始時)	1.599, 0.424-6.031	0.488		
プロテアーゼ阻害薬含むART	0.841, 0.223-3.172	0.799		
HHV-8 viral load, by 1 log copies/ml	1.526, 0.960-2.424	0.074		
KS診断時ARTあり	4.835, 1.475-15.848	0.009	4.467, 1.350-14.787	0.014
KS治療でART単独	0.449, 0.119-1.694	0.237		
PLD治療あり*	0.957, 0.292-3.139	0.943		
日和見疾患数 ≥ 3	5.947, 1.814-19.498	0.003	6.392, 1.784-22.901	0.004

2) HIV合併梅毒における経口アモキシシリンの 治療効果 (谷崎隆太郎)

背景

筋注用PCG製剤が使用できない日本では、HIV合併梅毒に対して経口AMPCによる治療が広く行われているのが現状であるが、その治療効果や妥当性に関する検討は見当たらない。

方法

2000年から2014年までにACCでAMPC+プロベネシド(PBD)による梅毒治療を行った症例のうち、治療効果が評価可能であった287例を対象と検討を行った。治療開始後12ヶ月以内にRPRが4倍以上低下した場合を治療成功と定義し、過去起点コホート研究を行った。

結果

287例中273例は治療成功と判定され、成功率は95.1%であった。多変量解析では後期潜伏梅毒(aOR 4.4, p=0.038)、AMPC副作用(aOR 3.7, p=0.041)がそれぞれ治療失敗と有意に関連していた(表2)。AMPCの副作用は全体の10%で見られた。副作用のためAMPCからドキシサイクリンへの変更を要した例は16例あり、うち13例(81.2%)が治療成功した。

考察

経口AMPC+PBDによる治療は、海外で行われているペニシリン筋注治療と比較しても、有効率は遜色ない高さであり、かつ安全な治療法であることが示された。

3) HIV合併PCPにおけるステロイド併用期間 についての検討 (柴田怜)

背景

中等症以上のPCP例における21日間のステロイド併用は、予後改善作用が示されており、治療ガイドラインでも推奨されているが、一方でステロイド投与が免疫不全を助長することで予後悪化の可能性も懸念される。臨床現場では、症例に応じてガイドラインを逸脱する形で、ステロイド投与期間の短縮がなされているが、その妥当性に関する検討は現時点で見当たらない。

方法

2004年から2012年にACCでPCPと診断された179例のうち、米国CDCガイドラインでステロイド投与が推奨される基準を満たす73例を対象に検討した。投与期間が14日以下であった症例(グループ1)と15日以上投与した症例(グループ2)に分けて、臨床的特徴や予後について比較検討した。

結果

43例は14日以下でステロイド投与が終了されていたが全例が生存し、14日以上投与が行われた30例中4例(13.3%)が死亡していた。PCP治療後1年以内の日和見疾患の発症数は、ステロイド投与期間(14日以下 vs 15日以上)で差を認めなかったが、CMVに対するpreemptive therapyを要した症例はそれぞれ、36.6%、74.1%であり、ステロイド投与期間が長くなることでCMVの活性化が認められていた(表3, p=0.00011)。中等症以上のHIV合併PCPの多くはステロイド投与を14日

表2 治療失敗のリスク因子

	単変量		多変量 (年齢で調整)	
	OR (95% CI)	P値 (*p<.05)	Adjusted OR (95% CI)	P値 (*p<.05)
年齢 (1歳増加/毎)	0.9 (0.86 - 1.00)	.059		
ART使用あり	0.6 (0.21 - 1.82)	.380		
梅毒治療歴あり	0.9 (0.30 - 2.66)	.849		
後期潜伏	3.9 (0.99 - 15.1)	.052	4.4 (1.09 - 17.9)	.038*
感染時期不明	1.9 (0.62 - 5.98)	.254	1.8 (0.57 - 5.60)	.318
後期+不明	3.3 (1.10 - 9.74)	.033*	3.2 (1.06 - 9.54)	.039*
CD4数 (1/mm ³ 増加/毎)	1.0 (0.99 - 1.00)	.155		
HIV-1量 (1 log ₁₀ copies増加/毎)	1.5 (1.04 - 2.22)	.029*	1.4 (0.95 - 2.10)	.088
AMPC副作用	4.0 (1.16 - 13.6)	.028*	3.7 (1.06 - 12.9)	.041*

表3 CMV preemptive therapyとステロイド投与期間

	ステロイド14日以下	ステロイド15日以上
抗CMV薬投与あり	11	20
抗CMV薬投与なし	29	7

(p=0.00011)

以下で、予後を悪化させることなく終了可能であった。

考察

中等症以上のPCP症例でも6割以上でステロイド投与期間を14日以下に短縮可能であり、予後は変わらないことが示された。一方で、15日以上ステロイド使用はCMVの内因性活性化をもたらし、preemptive therapyを要する患者が有意に多かったことから、ガイドラインに準じた一律のステロイド長期投与は免疫能を低下させることによる有害事象があることも判明した。今後、患者毎にステロイドの投与スケジュールを検討する指針を確立する必要があると考えられる。

E. 結論

HIV合併KSの予後はKSの病期ともPLDの投与回数とも関連せず、KS診断時のOIの数が予後と有意に相関していた。またART導入後にKSを発症するKS-IRISが独立した予後不良因子であることも判明した。PLDによる盲目的なKS治療は宿主の免疫能を低下させることにより予後を悪化させる可能性があるため、投与回数を症例毎に検討し、投与回数を最小限にすることが望ましいと思われる。また独立した予後不良因子であったKS-IRIS例については悪化要因をさらに詳細に解析することで、今後の適切なマネジメントについてさらに検討する必要があると考えられる。

日本における梅毒治療については、海外での標準的治療法である筋注用ペニシリンが使用できないという背景から、従来、経口AMPCによる治療が広く行われてきたが、根拠となるエビデンスに乏しいものであった。今回の検討で、HIV合併例であっても非常に高い有効性を証明できた事の臨床的意義は大きいと考える。

中等症以上のHIV合併PCPに対するステロイド投与は、その予後改善効果から21日間の長期投与が推奨されている。しかし、ステロイド投与は免疫不全を助長することから、臨床現場では症例毎

にステロイド投与期間の短縮が行われてきたが、根拠となるエビデンスはなかった。今回の検討で、症例を選んだステロイド投与期間の短縮は予後に影響を与えることなく可能であること、さらにCMVの内因性活性化を抑えることで、不要なpreemptive therapyを減少させうる可能性が示された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 原著論文

- 1) Nishijima T, Gatanaga H, Teruya K, Tajima T, Kikuchi Y, Hasuo K, Oka S. Brain magnetic resonance imaging screening is not useful for HIV-1-infected patients without neurological symptoms. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2014 Oct;30(10):970-4
- 2) Katano H, Hishima T, Mochizuki M, Kodama Y, Oyaizu N, Ota Y, Mine S, Igari T, Ajisawa A, Teruya K, Tanuma J, Kikuchi Y, Uehira T, Shirasaka T, Koibuchi T, Iwamoto A, Oka S, Hasegawa H, Okada S, Yasuoka A. The prevalence of opportunistic infections and malignancies in autopsied patients with human immunodeficiency virus infection in Japan. *BMC Infect Dis*. 2014 Apr 29;14:229.
- 3) Kinai E, Nishijima T, Mizushima D, Watanabe K, Aoki T, Honda H, Yazaki H, Genka I, Tanuma J, Teruya K, Tsukada K, Gatanaga H, Kikuchi Y, Oka S. Long-term use of protease inhibitors is associated with bone mineral density loss. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2014 Jun;30(6):553-9.
- 4) Nishijima T, Kawasaki Y, Tanaka N, Mizushima D, Aoki T, Watanabe K, Kinai E, Honda H, Yazaki H, Tanuma J, Tsukada K, Teruya K, Kikuchi Y, Gatanaga H, Oka S. Long-term exposure to tenofovir continuously decrease renal function in HIV-1-infected patients with low body weight: results from 10 years of follow-up. *AIDS*. 2014 Aug 24;28(13):1903-10.
- 5) Mizushima D1, Nishijima T, Yashiro S, Teruya K, Kikuchi Y, Katai N, Oka S, Gatanaga H.

Diagnostic Utility of Quantitative Plasma Cytomegalovirus DNA PCR for Cytomegalovirus End-Organ Diseases in Patients With HIV-1 Infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2015 Feb 1;68(2):140-6.

- 6) Ryutaro Tanizaki, Takeshi Nishijima, Takahiro Aoki, Katsuji Teruya, Yoshimi Kikuchi, Shinichi Oka, Hiroyuki Gatanaga. High-dose Oral Amoxicillin Plus Probenecid Is Highly Effective for Syphilis in Patients with HIV Infection, *Clin Infect Dis*. 2015 Mar 31. pii: civ270. [Epub ahead of print]

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

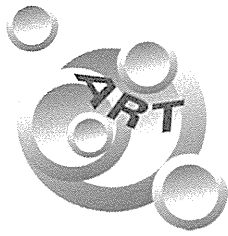
なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



ART導入後のエイズ患者における 日和見感染症の病理学的解析

研究分担者：片野 晴隆 国立感染症研究所感染病理部

研究協力者：福本 瞳、長谷川秀樹 国立感染症研究所

研究要旨

エイズの末期に見られる感染症はウイルス感染のみならず、多くの細菌感染症が発症する。細菌感染症の診断は細菌培養法がスタンダードであるが、剖検例でホルマリン固定パラフィン包埋標本しか残っていない場合は、標本内に存在する細菌を同定することは困難である。そこで、われわれは、real-time PCR法を応用し、70種類以上の細菌を網羅的に検出する系の開発を試みた。ヒトに病原性が認められ、かつ、日和見感染症によく見られる細菌、真菌類を選択し、個々の細菌に特異的なTaqman real-time PCRを設計した。多くの菌種を1プレートで検出できるよう、プローブ、プライマーセットを96ウェルプレートに配し、同一のプレート内に定量曲線用のコントロールを置き、大まかな定量ができるように設計した。陽性コントロールとして、各菌株から抽出したDNAを理研バイオリソースセンター等より分与を受け、感度と特異性の検討を行った。最終的に、エイズの剖検例の肺から抽出されたDNAを用いて検索を行ったところ、非結核性抗酸菌症、膿瘍における緑膿菌などの検出が可能であった。

A. 研究目的

HIV感染者に発症する日和見感染症にはウイルス疾患と並んで、多くの細菌性、真菌性疾患が含まれる。免疫不全状態の患者では宿主の免疫不全に乗じて、さまざまな病原微生物が再活性化、増殖する。本分担研究では昨年、一昨年に、日本におけるHIV感染症の剖検例の検索を行い、ウイルス、細菌、真菌感染症のみならず、悪性腫瘍の頻度を明らかにした。その結果、最も頻度の高い感染症はサイトメガロウイルス感染症の63%であり、続いて、悪性リンパ腫(31%)、ニューモシステイ肺炎(PCP, 29%)、カポジ肉腫(17%)、非結核性抗酸菌症(14%)、カンジダ症(11%)などであった。細菌、真菌、原虫感染症としては上記の他、アスペルギルス症、クリプトコッカス症、トキソプラズマ症、結核などが検出されている。しかし、これらの剖検例における検索はおもにホルマリン固定、パラフィン包埋切片(formalin-fixed paraffin-

embedded sample, FFPE) に対する検索であり、パラフィン切片上で同定可能な細菌、真菌の同定は限られ、十分な解析ができていない。すなわち、クリプトコッカスなどの大型真菌とトキソプラズマ、アメーバなどの原虫類は、その形態的な特徴と特殊染色などから、FFPEでもある程度、病原体の推察が可能である。しかし、ほとんどの細菌や真菌はHE染色や特殊染色を駆使しても、FFPEサンプルから種を同定することは一般には困難である。そこで、われわれはFFPEサンプル上の細菌、真菌種を同定する方法として、real-time PCR法を応用した網羅的な細菌、真菌の検出法の開発を試みた。パラフィン切片ではホルマリン固定により既にDNAは断片化しているが、剖検サンプルでも100bpから200bp程度の長さのDNAは保たれている。多くの対象遺伝子をreal-time PCR法を用いて網羅的に検出する方法は、すでにウイルスの網羅的検出法でわれわれが開発しており(J Med Virol

2011, 83:322-330.)、その技術を、細菌、真菌に特異的な real-time PCR を組み合わせ、FFPE から抽出した DNA を対象に細菌、真菌検出に応用するものである。ART の導入により、日和見感染症の動向が変化していることは剖検の結果からも明らかであるが、real-time PCR のような高感度な方法で病原微生物を検出することで、あらたな微生物の動向が見えてくることが期待される。

B. 研究方法

1. 細菌、真菌遺伝子を網羅的に検出する real-time PCR の系の確立

エイズ指標疾患やエイズ日和見感染症でよく見られる細菌、真菌を対象に約 70 種類の菌種を選定した (表 1)。それぞれの微生物を特異的に検出するプローブプライマーセットを作成した。標的配列とプローブとプライマーの設計は、既に報告されている配列を元に作成した。適当な報告のない細菌に関しては、既報の PCR などのデータを基礎情報として、Primer Express (Applied Biosystems) を用いて新たに設計した。

2. 陽性コントロール

細菌、真菌の核酸の陽性コントロールは理化学研究所バイオリソースバンク遺伝子材料開発室より分与された。また、国立感染症研究所細菌第一部、細菌第二部、獣医科学部など、感染研内の多くの研究者から陽性コントロール DNA の提供していただいた。

3. エイズ剖検例の検索

エイズ患者の剖検時に採取し保存してあった凍結サンプルから抽出した DNA (10 人分) を対象に上記、real-time PCR を応用した細菌、真菌遺伝子の網羅的検索を行った。

(倫理面への配慮)

ヒト検体を用いた研究については国立感染症研究所ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会において承認を得た (承認番号 569)。

表 1 細菌、真菌を網羅的に検出する定量的 PCR 法で検出できる細菌、真菌一覧

(1) グラム陽性菌	(2) グラム陰性菌
黄色ブドウ球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	野兔病菌 <i>Francisella tularensis</i>
炭疽菌 <i>Bacillus anthracis</i>	マールフィア菌 <i>Stenotrophomonas multophila</i>
リステリア <i>Listeria monocytogenes</i>	レジオネラ菌 <i>Legionella pneumophila</i>
レンサ球菌 <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Streptococcus sobrinus</i> , <i>Streptococcus sanguinis</i> , <i>Streptococcus oralis</i> , <i>Streptococcus salivaris</i> ,	エアロモナス菌 <i>Aeromonas hydrophila</i> ,
肺炎球菌 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	インフルエンザ菌 <i>Haemophilus influenzae</i>
腸球菌 <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus faecium</i>	キャンピロバクター <i>Campylobacter jejuni</i>
破傷風菌 <i>Clostridium tetani</i>	ヘリコバクター <i>Helicobacter cinaedi</i>
クロストリジウム・ディフィシル <i>Clostridium difficile</i>	ピロリ菌 <i>Helicobacter pylori</i>
ペプトストレプトコッカス <i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	発疹チフスリケッチア <i>Rickettsia prowazekii</i>
アクチノマイセス <i>Actinomyces</i>	発疹熱リケッチア <i>Rickettsia japonica</i>
アクネ菌 <i>Propionibacterium acnes</i>	つつが虫病リケッチア <i>Orientia tsutsugamushi</i>
ジフテリア菌 <i>Corynebacterium diphtheriae</i>	バルトネラ <i>Bartonella henselae</i> ,
結核菌 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	ブルセラ <i>Brucella</i>
らい菌 <i>Mycobacterium leprae</i>	百日咳菌 <i>Bordetella pertussis</i>
非定型抗酸菌 <i>Mycobacterium chelonae</i> , <i>Mycobacterium kansasii</i> ,	鼻疽菌 <i>Burkholderia mallei</i>
<i>Mycobacterium avium complex</i>	セバシア菌 <i>Burkholderia cepacia</i>
ノカルジア <i>Nocardia asteroides</i>	淋菌 <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
バクテロイデス <i>Bacteroides fragilis</i>	髄膜炎菌 <i>Neisseria meningitidis</i>
エリザベスキングア <i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	カタル球菌 <i>Moraxella catarrhalis</i>
	緑膿菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	アシネトバクター <i>Acinetobacter baumannii</i>
	コレラ菌 <i>Vibrio cholera</i>
	腸炎ビブリオ <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
	ビブリオ・バルニフィカス <i>Vibrio vulnificus</i>
	大腸菌 <i>Escherichia coli</i>
	腸チフス菌 <i>Salmonella enterica</i>
	赤痢菌 <i>Shigella</i>
	肺炎桿菌 <i>Klebsiella pneumoniae</i> ,
	ペスト菌 <i>Yersinia pestis</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> , シトロバクター
	<i>Citrobacter freundii</i>
	プロテウス <i>Proteus mirabilis</i>
	モルガネラ <i>Morganella morganii</i>
	プロビデンシア <i>Providencia</i>
	マイコプラズマ <i>Mycoplasma pneumoniae</i>
	フソバクテリウム <i>Fusobacterium nucleatum</i>
(3) らせん菌	
レプトスピラ <i>Leptospira interrogans</i>	
梅毒 <i>Treponema pallidum</i>	
(4) クラミジア	
オウム病クラミジア <i>Chlamydia psittaci</i>	
トラコーマ・クラミジア <i>Chlamydia trachomatis</i>	
肺炎クラミジア <i>Chlamydia pneumoniae</i>	
真菌類	
アスペルギルス <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus flavus</i>	
クリプトコッカス <i>Cryptococcus</i>	
カンジダ <i>Candida albicans</i>	
ヒストプラズマ <i>Histoplasma</i>	
トリコスポロン <i>Trichosporon</i>	
ムコール <i>Mucor</i>	
コクシジオイデス <i>Coccidioides</i>	

C. 研究結果

1. 細菌、真菌遺伝子を網羅的に検出する real-time PCRの系の確立

パラフィン切片でも検出できるよう、標的遺伝子の長さを60-150bpの範囲に設定していることから、この遺伝子配列に一致するオリゴマーを合

成し、これを鋳型にプライマーを用いて標的遺伝子の全長の核酸を増幅した。増幅した核酸を精製し、濃度を測定した後に、スタンダードコントロールに使用できるように、希釈した。これらのコントロールサンプルを用い、すべてのプローブ、プライマーセットでスタンダードカーブが描出できることを確認した(図1)。つぎに、陽性コントロ

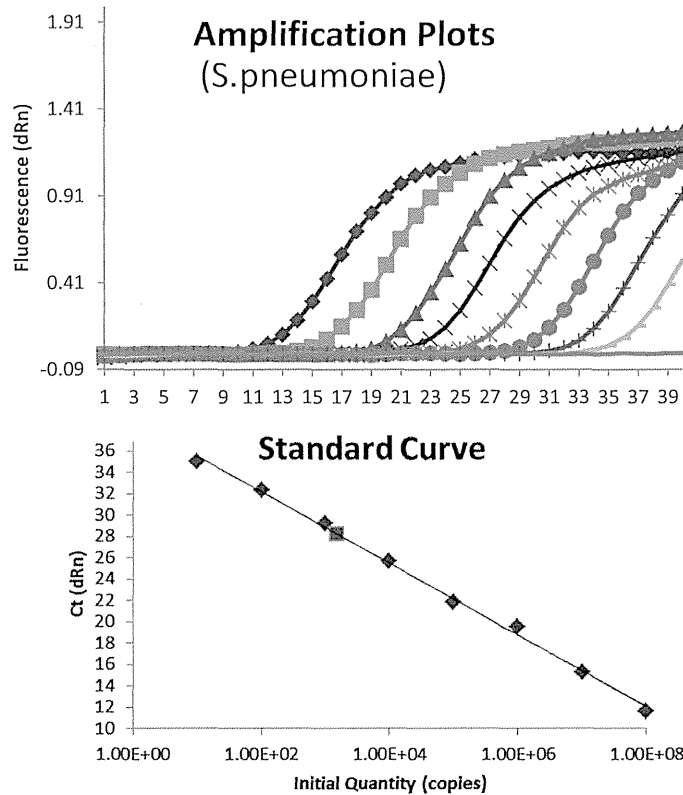


図1

Amplification plotとstandard curveの一例。肺炎球菌を検出する増殖曲線(上)とスタンダードカーブ(下)を示す。

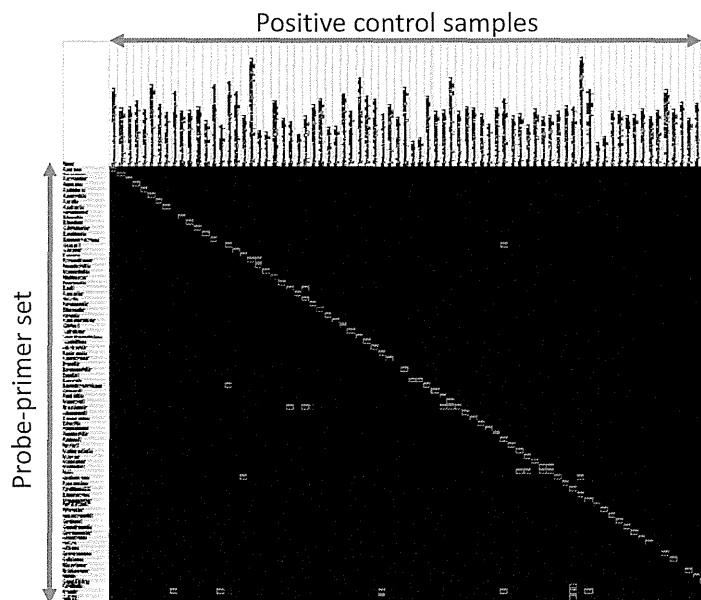


図2

細菌、真菌を網羅的に検出する定量的PCRの陽性コントロールDNAによる検定。縦軸にプローブ、プライマーセット、横軸に各細菌、真菌の陽性コントロールDNAを並べ、コピー数が検出されたところを灰色に表示している。一番下の2つはヒト内因性のコントロールDNAを検出するプローブ、プライマーセット。

ールDNAを用いて、すべてのプローブ、プライマーセットの反応性を確認した。

96ウェルプレートにこれらのプローブ、プライマーセットを配し、1プレートで多種類の細菌、真菌を検出できるように、設計した。同一プレート内にスタンダードカーブをおき、大まかなコピー数も定量できるように設計を行った。

2. 各陽性コントロールを用いた交差反応性、感度の検討

収集した細菌、真菌のコントロールDNAを用いて上記網羅的real-time PCR法を施行し、その交差反応性、及び、感度を検討した。合計、約70種類のDNAを検討した結果、多くのプローブ、プライマーセットでは交差反応性なく、標的微生物のDNAが特異的に検出されたが、いくつかの近縁の細菌種に関しては交差反応性を認めた(図2)。しかし、標的遺伝子を含む微生物は、交差反応性の認められる微生物DNAよりも高いコピー数が得られ、判定は可能と考えられた。

3. エイズ剖検肺DNAにおける検索

本検査系が臨床検体に応用できることを確かめるために、エイズ剖検例の肺から抽出されたDNA10例分を検索した。黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus*、緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa*、エリザベスキングア *Elizabethkingia meningosepticum*、腸球菌 *Enterococcus faecalis*などが比較的、高頻度に検出される菌類であり、臨床経過との関連では、結核菌 *Mycobacterium tuberculosis*、非定型抗酸菌 *Mycobacterium avium complex*、緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa*などが臨床症状とよく関連し、検出された。これらの結果は、臨床経過中の細菌検査の結果とよく一致しており、本検査系の病理標本における有効性が確認された。

D. 考察

エイズに合併する日和見感染症としてはウイルスのみならず、細菌、真菌感染症など、多くの疾患が挙げられるが、これらの原因微生物は、元々体内に潜伏感染して再活性化するものと、外来性の微生物として、体外から体内に侵入し、日和見的に増殖することで疾患を引き起こすものがあると考えられる。免疫不全患者の体内に元々どのような病原微生物がいるか、あるいは、どのような病原微生物が侵入し、増殖しやすい状態にあるの

かを網羅的に検索した研究はこれまでになく、そうした微生物の体内におけるレパートリーを知ることは免疫不全症の病態を考える上で、重要と思われる。われわれは2011年、定量的PCR (Taqman real-time PCR) の系を用いてヒトに病原性のある163種類のウイルスを、96ウェルプレート1枚の上で一度に検出できるウイルスの網羅的検出法(multivirus real-time PCR)を開発した(Katano H et al. J Med Virol 2011)。この系ではPCRの標的遺伝子を100bp以下に設定しているため、ホルマリンでDNAの断片化が進んだ病理組織標本でもウイルス核酸の検出が可能である。これまで200以上の検体を検索し、原因不明脳炎症例の約2割程度でウイルスの同定に成功するなど、原因ウイルスの同定には極めて有力なツールであることが分かった。その一方で、他の感染症や、感染症でない疾患の病変部や臓器からも、低コピー数ながらもいくつかのウイルスが検出されることが分かった。そのほとんどはEBVやHHV-6, TTVなどの常在ウイルスであったが、これらのウイルスが検出される理由として、宿主の免疫状態以外にも、個々の疾患に特異的なウイルス感染パターンの存在や、炎症、腫瘍などの病態がウイルス増殖に何らかの影響を与えていることが推察された。

病原微生物とヒト疾患のかかわり方にはいくつかのパターンがある。

1. 感染症の直接の原因になる場合：

一般的な感染症と考えられる疾患である。

2. 微生物の増殖が疾患の引き金や背景になり、間接的に疾患を引き起こす場合：

例えば、ギランバレー症候群はカンピロバクターのタンパクを抗原として認識する自己免疫疾患である(Nat Rev Neurol. 7:362-3, 2011)。また、川崎病では複数細菌の大量増殖によって血管内皮細胞に誘導されたHSP60が免疫標的となり引き起こされる可能性が示されている。(Immunology 128, 511-520, 2009)

3. 病態の一部を構成する場合：

最近の次世代シーケンサーを用いた細菌ゲノムの網羅的な解析(メタゲノム解析)を行った研究からは、腸内細菌などでは各細菌類の構成比が変化することにより疾患が起こることが示唆されている(N Engl J Med. 365:347-57, 2011)。

4. 疾患の結果として微生物が増える場合：

免疫不全症など。症状を呈さない場合も多い。

さらには微量に存在する微生物が疾患の成立に

どのような影響を与えているか、また、疾患によってどのような微生物が増殖してくるかはよくわかっていない。そこで、ウイルスだけでなく、細菌、真菌を含めた病原微生物の定量、検出を行うことで、病原微生物の構成の変化とエイズによる日和見疾患の成立に何らかの関係が見出せる可能性がある。このような、疾患と微生物の関連を明確に示すためには、個体内における微生物の網羅的な把握が必要である。100を超える多数の微生物を網羅的に検出する方法はmicrobiomeと呼ばれる次世代シーケンサーを用いた方法が一般的だが、ホルマリン固定検体で使用可能な網羅的微生物検出系は、ほとんど報告がない。

今年度の臨床検体の検討はエイズ剖検肺のみであったが、検出される頻度の高い細菌類が同定されたこと、結果が臨床の検査結果と一致していることなどから、有効な検出系が確立できたものと考えられる。一方で、検索した一例では臨床経過中も剖検時での検索でも発見できなかった細菌感染症が新たに発見されたこともあった。本検査系は病理検体のみならず、髄液、血液など多くの検体で応用が可能であり、ウイルスに加えて細菌、真菌が検出できる系が開発されれば、診断上きわめて有用な手法になるものと思われる。また、疾患の新たな病態、病因がわかれば、新しい診断、治療法の開発につながるものが期待される。

E. 結論

Real-time PCR法を応用し、70種類以上の細菌を網羅的に検出する系の開発を行った。さまざまな細菌、真菌の陽性コントロールDNAを用い、特異性と感度を確認した。最終的に、エイズの剖検例の肺から抽出されたDNAを用いて検索を行ったところ、非結核性抗酸菌症、膿瘍における緑膿菌などの検出が可能であった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ota Y, Hishima T, Mochizuki M, Kodama Y, Moritani S, Oyaizu N, Mine S, Ajisawa A, Tanuma J, Uehira T, Hagiwara S, Yajima K, Koizumi Y, Shirasaka T, Kojima Y, Nagai H, Yokomaku Y, Shiozawa Y, Koibuchi T, Iwamoto

A, Oka S, Hasegawa H, Okada S, Katano H: Classification of AIDS-related lymphoma cases between 1987 and 2012 in Japan based on the WHO classification of lymphomas, fourth edition. **Cancer Med** 2014. 3:143-153.

- 2) Katano H, Hishima T, Mochizuki M, Kodama Y, Oyaizu N, Ota Y, Mine S, Igari T, Ajisawa A, Teruya K, Tanuma J, Kikuchi Y, Uehira T, Shirasaka T, Koibuchi T, Iwamoto A, Oka S, Hasegawa H, Okada S, Yasuoka A: The prevalence of opportunistic infections and malignancies in autopsied patients with human immunodeficiency virus infection in Japan. **BMC Infect Dis** 2014. 14:229.
- 3) Yamada M, Katano H, Yotsumoto M, Hashimoto H, Muramatsu T, Shiotsuka M, Fukutake K, Kuroda M: Unique expression pattern of viral proteins in human herpesvirus 8-positive plasmablastic lymphoma: a case report. **Int J Clin Exp Pathol** 2014. 7:6415-6418.

2. 学会発表

- 1) 片野晴隆、比島恒和、望月 眞、児玉良典、小柳津直樹、大田泰徳、峰宗太郎、猪狩 亨、味澤 篤、照屋勝治、田沼順子、菊池 嘉、岡 慎一、上平朝子、白阪琢磨、鯉淵智彦、岩本愛吉、長谷川秀樹、岡田誠治、安岡 彰. HIV感染者の剖検例における日和見感染症と腫瘍の頻度. 第28回 日本エイズ学会学術集会総会 大阪 2014.12.3.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

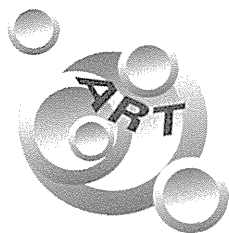
なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



軽微な感染症（STDなど）を端緒とする HIV感染者の早期発見

研究分担者：山本 政弘 国立病院機構九州医療センター
AIDS/HIV総合医療センター 部長

研究協力者：高濱宗一郎 国立病院機構九州医療センター
免疫感染症科 医師

研究要旨

HIV感染者の早期発見に関する研究として、1) STDを端緒とする早期発見、2) HBV/HIV重複感染における、HBV genotypeとHIV subtypeの解析を行った。当院における過去6年間の新規HIV感染者に関してはSTD罹患歴の割合は3～22%であった。STD重複例に関しては過去2年間と比較し2疾患罹患患者数は増加傾向であった。HBV/HIV重複感染における解析に関しては、西日本などの九州において多いとされるgenotype Cよりも慢性化するgenotype Aが増加傾向であることが判明した。またHBV感染時期に関して、HIV感染症判明後の感染においては高確率で急性肝炎を発症しており、それによって抗HIV療法の開始または変更に至る例が見られた。

A. 研究目的

HIV感染症において早期治療が推奨されるようになってきている。早期発見治療によりパートナーへの感染の危険性が減少することが報告されている。日和見感染症および免疫再構築症候群を減らすためにも早期発見は今なお重要な課題である。そこで、本研究においては、HIV感染者の早期発見に役立ち、なおかつHIV感染に合併しやすいSTDなど軽微な感染症の解析やそれらの感染症に伴うスクリーニングとして役立つ検査や臨床所見などの解析を行なうことを目的としている。

B. 研究方法

新規に感染が判明した患者背景の解析を行ない、感染判明の端緒となったHIV感染に合併しやすいSTDの解析を行った。またB型肝炎合併例は以前より問題となっており、HIV/HBV重複感染の有無確認が推奨されている。さらに最近慢性化する可能性が高いgenotype Aの感染例が増加している。

本研究においては下記2点を中心に検討を行った。

STDを端緒とするHIV感染者の早期発見

(1) STDを端緒とする早期発見

当院における新規HIV感染者のうち、感染判明契機としてのSTDを平成21年から平成26年までの過去6年間調査した。

(2) HIV/HBV重複感染者におけるHBV遺伝子型の検討

1998年～2013年4月までに当院を受診したHIV/HBV重複感染患者において、受診時にHBs抗原陽性かつHBV-DNA陽性となった患者の検討を行った。

C. 研究結果

(1) STDを端緒とする早期発見

新規HIV感染者のうちSTDを契機に感染が判明した例数は17%であった。STDの内訳として、非淋菌性尿道炎6例、梅毒および尖圭コンジローマが3例ずつ、赤痢アメーバ症およびB型肝炎が2例

ずつであった。単純ヘルペスは1例であった(図1)。またSTD重複例が過去2年間と比較し増加傾向であった(図2)。

(2) HIV/HBV重複感染者におけるHBV遺伝子型の検討

当院のHIV/HBV重複感染者のHBV遺伝子型は全体の約72%をgenotype Aが占めていた(図3)。HBVの感染時期別では、HIV感染同時判明例で約65%(図4)、HIV感染判明後感染例ではすべてgenotype Aであった(図5)。病態別ではHIV/HBV

同時判明例で無症候性キャリアが最も多く、かつ慢性化しやすいgenotype Aが約67%を占めた(図6)。HIV/HBV同時判明例の初診時平均CD4リンパ球数はどの遺伝子型や病態でも300/ μ L未満であった。HIV感染判明後HBV感染した例では、約83%が急性肝炎を発症した(図7)。HBV genotypeとHIV subtypeの系統樹を比較した結果、subtype Bでは、genotype Aのみのグループと、genotype Cとの混在グループの2グループに分かれた(図8-1,-2)。

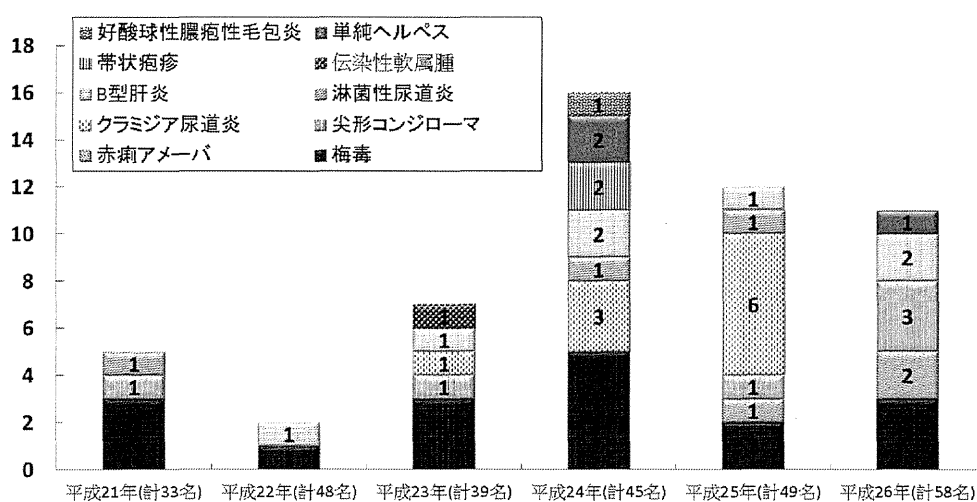


図1 新規HIV感染者における感染判明契機としてのSTDのみの内訳

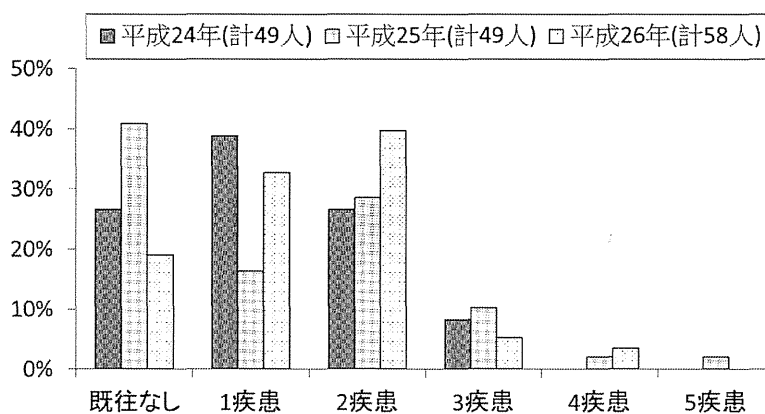


図2 新規HIV感染者における感染判明時のSTD既往数の年次推移

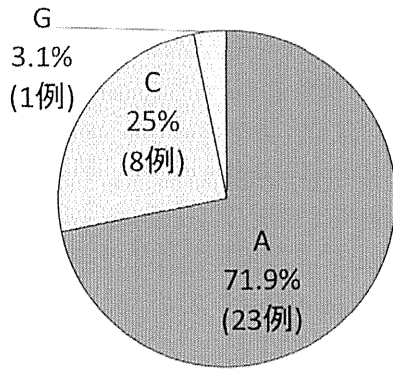


図3 HIV/HBV重複感染者のHBV genotype

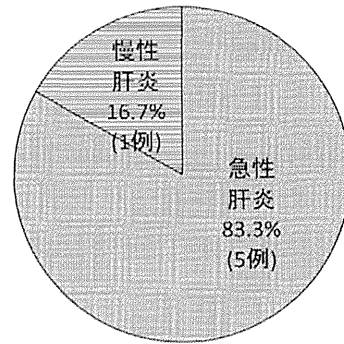


図7 HIV感染判明後HBV感染例における病態別のHBV genotype A

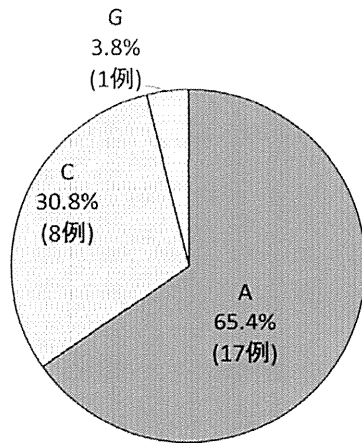


図4 同時判明例のHBV genotype

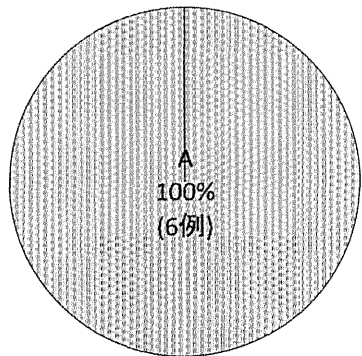


図5 HIV感染判明後HBV感染例のHBV genotype

□無症候性キャリア □急性肝炎
 □慢性肝炎 □免疫再構築症候群による肝炎悪化

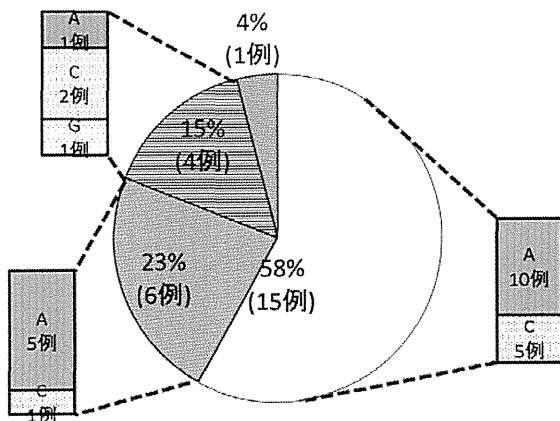


図6 同時判明例における病態別のHBV genotype

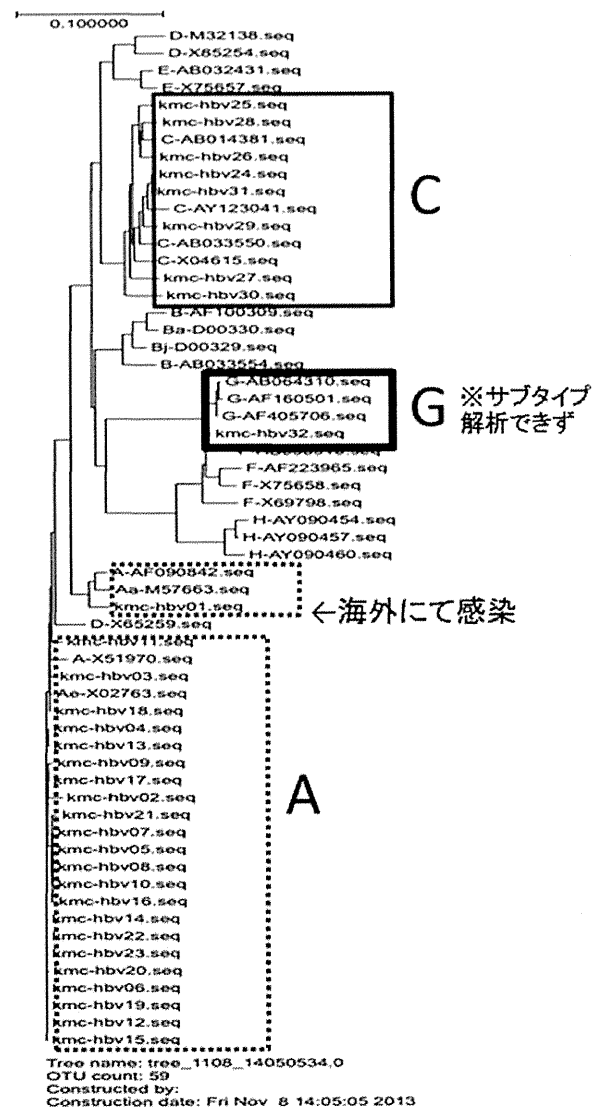


図8-1 HIV/HBV重複感染者におけるHBV genotype

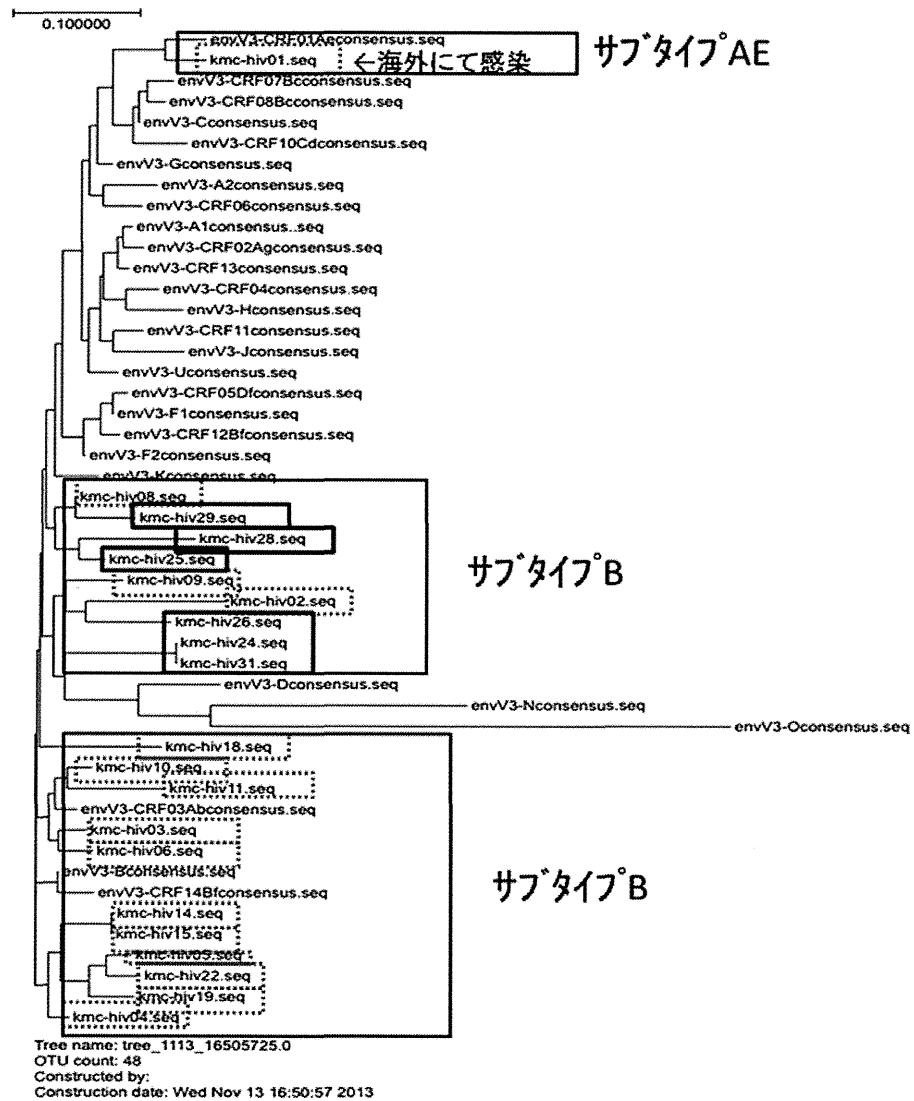


図8-2 HIV/HBV重複感染者におけるHIV-1 subtype

D. 考察

日和見感染症発症を防ぐためにも、HIV感染の早期発見、早期治療が必要となる。しかし無症候期では特徴的な症状を呈することは少なく、早期からの診断は困難である。そこで本研究においては、HIV感染に合併しやすいSTDなど軽微な感染症の解析やそれらの感染症に伴うスクリーニングとして役立つ検査や臨床所見などの解析を行った。新規HIV感染者においてはSTD罹患の割合は高く、STD診療での早期発見が重要となってくる。今回の調査でも、STD罹患歴なしの割合は減少してきており、逆に1~2疾患重複例が増加傾向であった。3疾患以上の罹患例も少ないながらも散見されており、STDが1疾患でも認められた際には、HIVスクリーニング検査を積極的に勧めていく必要があると考えられた。

HIV/HBV重複感染者におけるHBV遺伝子型の検討に関しては、genotype Aが半数以上を占めていた。特にHIV感染症罹患後のHBV感染に関しては高率に急性肝炎を発症することが判明しており、注意深い観察が必要であると考えられた

E. 結論

HIV感染者においては、STDなど軽微な感染症の罹患率が高く、さらに複数のSTD感染例も近年増傾向であった。また、STDの中でもHBV感染に関しては、急性肝炎を呈するgenotype Aが増加しており、今後も引き続き定期通院の際にもSTD感染予防を繰り返し説明していく必要がある。

F. 健康危険情報

なし