

氏名(本籍)	た なか ま り 田 中 真 理 (東 京 都)
学位の種類	博 士 (医 学)
学位記番号	博 甲 第 3224 号
学位授与年月日	平成15年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	細胞内サイトカイン測定法を用いたHIV-1感染者の病態と病態に関連した免疫応答に関する解析
主査	筑波大学教授 薬学博士 永田 恭介
副査	筑波大学助教授 医学博士 渋谷 彰
副査	筑波大学講師 理学博士 三輪 佳宏
副査	筑波大学講師 医学博士 本橋 ほづみ

### 論文の内容の要旨

#### (目的)

ヒト免疫不全ウイルス1型 (human immunodeficiency virus type 1, HIV-1) は、その生存感染者が全世界におよそ4,000万人存在し、アジア・アフリカ地域を中心に新規感染者数も断続的な増加が認められる深刻な感染症の原因ウイルスである。HIV-1による病態は、ヘルパーT (CD4+) 細胞数の減少、体内のHIV-1の増殖、そしてそれらに付随して発生する免疫機能低下により進行する。従って、特異的なヘルパーT (CD4+) 細胞数の増減を検定することは、HIV-1による病期の診断や治療の効果の評価にとって重要である。病態と関連した免疫機能の評価する判断基準として近年注目されている方法に、細胞内サイトカイン測定法がある。細胞内サイトカイン測定法は、細胞をマイトジェンや抗原により刺激し、これにより活性化されてサイトカインを産生する細胞を検出する測定系である。この測定法の最大の特徴は、サイトカインと表面抗原を二重染色することで、フローサイトメトリーを用いてリンパ球サブセット毎のサイトカイン産生細胞の割合を解析することが可能な点である。本研究では、この方法を用いて、HIV-1病期の進行とTH1タイプからTH2タイプへのサイトカインシフトとの関連およびAIDS患者に発症することの多いサイトメガロウイルス (CMV) 網膜炎の発症・再発症とCMV特異的CD4+T細胞数の変化との関連について検討した。また、HIV-1感染により減少したインターロイキン2 (interleukin-2, IL-2) 産生CD4+T細胞の割合の組替え体IL-2 (rIL-2) 投与による回復の可能性についても検討した。

#### (対象と方法)

検体を得る対象者は国立国際医療センターに通院中のHIV-1感染者であり、研究についての十分な説明を行ない、インフォームドコンセントを得た。HIV-1病期の進行とTH1タイプからTH2タイプへのサイトカインシフトとの関連についての解析では、CD4+T細胞数を基準に3群に分類したHIV-1感染者 (n=48) を対象とした。サイトメガロウイルス (CMV) 網膜炎の発症・再発症とCMV特異的CD4+T細胞数の変化との関連についての解析では、CMV網膜炎の既往歴があり維持療法中断後も高活性抗HIV療法 (Highly Active Antiretroviral Therapy, HAART) のみで経過が安定している者 (n=5) とCMV網膜炎発症中の者 (n=4) を対象とした。IL-2投与によるIL-2産生CD4+T細胞の増減に関する検討では、rIL-2投与HIV-1感染者 (n=5) とその対照者 (n=4) を対象とした。得られた末梢血単核球にはマイトジェンのphorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) とionomycinを添

加し、CMV 網膜炎に関連した解析では CMV 特異抗原を添加して、それぞれを培養後、細胞内サイトカイン測定法によるサイトカイン産生細胞の割合を解析した。

#### (結果)

サイトカイン生成能力を強引に引き出す PMA による刺激により、サイトカイン産生 T 細胞の免疫動態と、HIV-1 感染者の病期との関連を検討した。その結果、HIV-1 感染者においては、CD4 + CD8-T 細胞中の IL-2 産生細胞の割合が低下しており、病期が進行すると更に低下することが明かとなった。一方、IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-5 の産生は HIV-1 感染や HIV-1 感染後の病期の影響を受けなかった。しかし、TH1 タイプから TH2 タイプへのシフトと病期の進行には関連が認められなかった。

HIV-1 感染者の IL-2 産生細胞の割合が回復することを期待して、HIV-1 感染者に rIL-2 を投与し、その後の経過を縦断的に解析した。その結果、TH1 および TH2 タイプサイトカイン産生細胞の動態には有意な変動は認められなかったが、CD4 + T 細胞数の増加が認められた。IL-2 産生 CD4 + T 細胞の割合は個人により変化の動態が異なり、割合の上昇を認めたのは 5 名中 1 名で、残り 4 名は対照 (rIL-2 未投与 HIV-1 感染者) 群と同じレベルの反応か、もしくは基準値 (IL-2 投与開始前値) を下回る反応を示した。CD4 + T 細胞が増加するメカニズムとしては、rIL-2 投与中断後も 9 ヶ月にわたり高値が維持される IL-2 レセプター  $\alpha$  (CD25) の発現上昇が関連している可能性が考えられた。

次に、CMV 抗原により誘導される TNF- $\alpha$  産生 CD4 + T 細胞、すなわち CMV 特異的 CD4 + T 細胞数の変化についてを検討した。CMV 網膜炎発症中患者の CMV 特異的 CD4 + T 細胞数は低い値で推移した。一方、CMV 網膜炎の既往があり、抗 CMV 維持療法中断後は HAART のみで経過した AIDS 患者の CMV 特異的 CD4 + T 細胞数は、CD4 + T 細胞総数が多い CMV 網膜炎発症中の患者のそれよりも、48 週間にわたり有意に高い値を推移した。以上より、HAART 開始により CD4 + T 細胞数の上昇を認めた場合でも、CMV 特異 CD4 + T 細胞数の回復無くしては CMV 網膜炎発症 (再発症) の制御が困難である可能性が示唆された。

#### (考察)

以上の結果から、細胞内サイトカインの測定は HIV-1 感染者の免疫機能を評価する上で有用な方法となりうる可能性が示された。また、この手法を用いて対象者の免疫応答を縦断的に追跡することの重要性も認められた。今後は、HIV 抗原により誘導される特異的免疫応答の解析をはじめ、CMV 以外の日和見感染症や HIV-1 併発感染症に関しても細胞内サイトカインの解析が臨床上有効な指標となりうるかを順次検討していく予定である。

### 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、細胞内サイトカイン測定法を用いて HIV-1 感染者における病期と T 細胞の動態との関連を解析し、この測定法が HIV-1 感染者の免疫機能を評価する上で有用な方法となりうる可能性を示しており、価値ある研究と考えられる。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。