

計畫編號：DOH92-DC-1031

行政院衛生署九十二年度科技研究發展計畫

愛滋病患合併巨細胞病毒視網膜炎之致病機轉與免疫
基因療法發展之研究(第二年)

計畫名稱

研究報告

執行機構：台北榮民總醫院

計畫主持人：許紋銘

研究人員：許紋銘 邱士華

執行期間：92年1月1日至92年12月31日

本研究報告僅供參考，不代表本署意見

目 錄

壹、封面	1
貳、目錄	2
參、摘要	3-5
肆、本文	
前言	6-8
研究目的	9-12
材料與方法	13-15
結果	16-17
討論	18-19
結論與建議	20-21

附表

行政院衛生署科技研究發展計畫原始數據資料庫
資料讀我檔案

計畫名稱：愛滋病患合併巨細胞病毒視網膜炎之致病機轉與免疫基因

療法發展之研究 (第二年)

計畫編號：DOH92-DC-1031

執行機構：台北榮總

計畫主持人：許紋銘

計畫主持人服務單位：台北榮總眼科部

計畫主持人職稱：部主任

研究報告中文摘要：

(I) 而我們近五年來之追蹤調查結果，發現在 127 位 AIDS 病患中，有 42 年 (33.07%) 患者出現 HIV-related retinopathy (Retinal hemorrhage, cotton wool spots, 以及 micro-angiopathy 等) 之非感染性病變。而其中有 24 位確定罹患過 CMV Retinitis, 而有 3 位 (2.36%) 罹患過 Toxoplasmosis Retinopathy (弓漿蟲視網膜炎), 以及一位 (0.78%) 罹患過 Cryptococcus chorioretinopathy (新型隱球菌脈絡膜視網膜炎)。

我們也針對 AIDS 患者眼內有病變患者，如 HIV-related retinopathy (non-infections lesions : retinal hemorrhage, cotton wool spots), CMV Retinitis, toxoplasmosis retinitis, cryptococcus chorioretinitis 等患者血中及眼內液之 HIV RNA-Copied level, 做一分析比較，研究結果發現在 (1)HIV-related retinopathy 患者 plasma 中 HIV RNA-copied 數目 (110.237 ± 12.137 copies/ml, n=17), 前房液中 HIV RNA-copied 數目為 (3.612 ± 1.205

copies/ml, n=6), 而 CD4 count 為 51 ± 6.7 cells/ μ l, 而經過三合一療法 (highly active anti-retroviral therapy; HAART) 治療四個月後, 血漿 plasma 中 HIV RNA-copied 數為 8.321 ± 4.312 copies/ml, n=17, 而前房液中則測不出任何 HIV RNA-copied, 而此時 CD4 count 以回升到 189 ± 6.8 cells/ μ l。而在 (2) CMV Retinitis 病患 (未經過 HAART 治療者) 血中 plasma HIV 病毒量為 361.831 ± 25.783 copies/ml, 而眼內前房液中 HIV 病毒量為 22.307 ± 25.783 copies/ml, n=5, 而 CD4 count 為 7 ± 2.1 cells/ μ l, 而經過 HAART 治療後血中 plasma HIV 病毒量則降至 31.321 ± 10.537 copies/ml, 而前房液中 HIV 病毒量則降至 2.701 ± 1.801 copies/ml, 而 CD4 count 則升至 81 ± 7.8 cells/ μ l。

(3) 對於罹患 Toxoplasmosis Retinitis (n=3) 病患血中 HIV 病毒量為 531.308 ± 87.121 copies/ml, 而 CD4 為 12 ± 3.5 cells/ μ l, 經過 4 個月 HAART 治療後, 其血中 plasma 之 HIV 病毒量則降至 39.157 ± 21.031 copies/ml, 而眼內病毒量則降至 1.431 ± 807 copies, 而 CD4 count 則升至 46 ± 22.1 cells/ μ l。(4) 而對於罹患 Cryptococcus Chorioretinitis 病患 (n=1), 其血中 HIV 病毒量為 267.089 copies/ml, CD4 count 為 0 cells/ μ l, 經過 4 個月 HAART 治療後, 血中 HIV 病毒量則降至 21.053 copies/ml, CD4 count 則升高至 21 cells/ μ l。

(II) 我們利用 *in situ* hybridization 技術來偵測 Fas ligand mRNA 之表現, 檢測人類視網膜組織時發現 Fas Ligand 在正常視網膜組織中呈現一種同質性表現分佈, 主要表現在視網膜內核層 (inner nuclear layer), 外核層 (outer

nuclear layer) ，以及人類視網膜色素上皮細胞 (human retinal pigment epithelium) 。但是對於感染 CMV Retinitis 的愛滋病患眼睛病灶區內之 Fas ligand mRNA 表現作一檢測時，我們發現在 CMV 感染視網膜之病灶區中 Fas ligand 訊號明顯增加。同時利用 terminal transferase-mediated nick end labeling assay (TUNEL stain) 來分析結果發現在視網膜病灶區中有大量細胞計劃性死亡 (apoptosis) 之現象。我們已將 HCMV AD169 病毒成功感染視網膜色素上皮細胞，以模擬 HCMV 病毒在眼內視網膜之致病機轉及免疫反應改變等變化。我們發現並證明 HCMV immediate early gene 2 (IE2) 可以活化 Fas ligand (FasL) promotor 而造成帶有 Fas receptor 之免疫細胞如 T cell，因與 FasL 結合而導致 apoptosis。我們實驗結果支持 CMV 病毒利用活化 Fas ligand 表達而演化出特定之病毒免疫規避 (virus evasion) 效應，並且能躲避宿主免疫系統之偵測與攻擊，以調控視網膜宿主細胞存活而做出對本身病毒有利之生長環境。其結果則導致 HCMV 感染越演越烈，視網膜因局部及全身性免疫自我防護之破壞，與免疫救援系統不能發揮而破壞殆盡，病人終究也喪失寶貴視覺功能。

中文關鍵詞(至少三個)：愛滋病患 病毒量 人類巨細胞病毒視網膜炎

Research Data Archive, Department of Health, The Executive Yuan, R.O.C.

Readme file

Project Title: To Investigate the Pathogenesis of Cytomegalovirus Retinitis in AIDS Patients & Development Immunotherapy and Gene Therapy for CMV

Retinitis (Second Year)

Project Number:DOH92-DC-1031

Executing Institute: Taipei Veterans General Hospital

Principal Investigator (P.I.): Wen-Ming Hsu

P.I. Position Chief of Department of Ophthalmology

P.I. Institute: Department of Ophthalmology, Taipei Veterans General Hospital

Abstract:

Part I: The aim of the present study was to evaluate the impact of highly active antiretroviral therapy (HAART) in HIV viral load of plasma and intraocular fluids in AIDS patients with ophthalmic opportunistic infections. We further compared the treatment effect of HAART on these patients. From June 1997 to July 2003, we examined and followed up the ophthalmic conditions of 49 patients receiving HAART were confirmed with ophthalmic diseases during this period. The method of reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect and monitor HIV load in plasma and/or aqueous humor of AIDS patients. Before HAART, HIV levels in the plasma and aqueous humor in 8 AIDS with ophthalmic opportunistic infections were significantly higher than those in 6 patients with HIV-related retinopathy ($p < 0.05$). Compared to the eye findings and clinical improvement, HIV loads of aqueous humor in ten of 14 AIDS patients (six with HIV-related retinopathy, five with CMV retinitis, two with toxoplasmic retinitis, and one cryptococcal chorioretinitis) were declined to undetectable level (< 400 copies/ml) after 4 to 8 months HAART. HIV virus levels in plasma of AIDS patients were significantly decreased and the CD4 counts of these patients were significantly increased (Wilcoxon test) after initiation of HAART.

Part II Human cytomegalovirus (HCMV) infection usually develops asymptomatic lifelong infection in healthy individuals, but can cause severe clinical complications such as HCMV retinitis when reactivated in immunocompromised patients. Although the detailed mechanisms of HCMV latency and reactivation are not yet well understood, accumulating evidences suggest that the virus can use a panel of viral proteins to escape from cellular immune control and thus, successfully survive and replicate in host cells. Cellular immune reactions and the associated inflammatory responses can be harmful to nearby tissues. Since minor inflammation can result in impaired vision or even blindness, the eye is naturally designed as an immune privileged site where infections usually do not lead to destructive immune reactions.

The question as to how HCMV infection causes retinal pathogenesis and visual destruction in AIDS patients remains unresolved. To answer the question, by using terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick end labeling (TUNEL) assay, we detected the significant signals of apoptotic cells at the same sites in the HCMV-infected retina of AIDS patients as compared to AIDS patients without HCMV retinitis. To support this idea, we observed augmented soluble FasL (sFasL) levels in vitreous from AIDS patients with HCMV retinitis as compared to that from AIDS patients without HCMV infection. In addition, by *in situ* hybridization and immunohistochemistry, we detected enhanced signals of FasL, the existence of viral IE antigens and apoptotic cells at the same sites in the lesion of HCMV-infected retina. These results strongly suggest that IE2 induction of FasL expression in human retina might be an important event that takes place in the early stage of infection and finally leads to visual loss in individuals affiliated with HCMV retinitis.

eyword: AIDS, human cytomegalovirus retinitis, HIV viral load

本 文

(1)前言：包括研究問題之背景與現況、研究目的等。

人類巨細胞病毒(human cytomegalovirus; HCMV)為皰疹病毒(herpes virus)之一種，病毒本身約具二百個基因（約 200kb）為一相當龐大之病毒。巨細胞病毒病毒感染人類後可造成長期甚至到達終身潛伏之狀態。根據統計，在台灣地區一成年人口中，約有 85%~90%曾受巨細胞病毒感染，而巨細胞病毒感染及病毒基因活化，常造成人體器官病變，如目前已知可能與冠狀動脈血管硬化之病理機制有關，以及一些細胞癌化過程中扮演重要之角色，如迅早期基因(intermediate early gene)與 p53 基因作用之調控等。雖然正常人感染此病毒之比例相當高，通常不造成臨床症狀，但由於近年來器官移植與愛滋病(AIDS)等免疫不全病患急速增加，使得巨細胞病毒成已為一常見且致命之機緣性感染原。

雖目前研究指出巨細胞病毒可能潛伏於人體血液中具有樹突狀細胞特性之巨大吞噬性細胞。但由於對此病毒復發機轉仍缺乏完整了解，造成臨床上防治的困難。巨細胞病毒為 AIDS 常見的機緣性感染病毒之一，根據國外文獻統計約有 60%至 80%的愛滋病患者合併感染巨細胞病毒血症 (HCMV viremia)，同時造成腸炎、肺炎、視網膜炎等器官感染。其中高達 20%至 45%愛滋病患者會罹患巨細胞病毒視網膜炎(cytomegalovirus retinitis; CMV Retinitis)，且後果最為嚴重。後天免疫缺乏症候群自 1981 年在美國公佈迄今，已屆滿 20 年。根據世界衛生組織估計，公元兩千年全世界感染人類免疫缺乏病毒與後天免疫缺乏症候群病患，將達三千五百萬人以上。國內自民國 73 年首例愛滋病發佈至今已有一千餘名患者感染人類免疫缺乏病毒 (human immunodeficiency virus-1, HIV-1)，而且增加的速度仍未趨緩，證明國內疫情仍未有效控制。伴隨台灣地區罹患愛滋病之病患不斷增加，使得愛滋病患眼

部常見之機緣性感染及其併發症，也逐漸受到醫界的重視。在愛滋病之臨床病程當中，約有 70-90% 比例的愛滋病患者會發生與其相關的眼部病變及機緣性感染，20-45% 的愛滋病患會感染 CMV Retinitis。CMV Retinitis 為一漸進性破壞之病症，部份病患早期不會有明顯的症狀，如果不接受治療或不能早期診斷，最後將會導致失明。Culberston 就曾指出愛滋病患者自殺最重要的原因為失明或懼怕喪失視力，因此對於維持愛滋病患者的生活品質與具有獨立生活的能力，眼科醫師佔有極具重要的地位。同時這些患者年齡多 20-50 歲之壯年期，如果因罹患 CMV Retinitis 而喪失視力，勢必國家將要付出更大的社會及經濟成本來照顧這類患者。故此，本研究目的在於探討巨細胞病毒視網膜炎之致病機轉，以期達到早期診斷、早期治療，並且預防患眼再復發之效。

研究目的

(一) 臨床巨細胞病毒視網膜炎之病毒量研究

對於患者之臨床服藥及血液病毒量 (HIV 及 CMV) 之變化予以監控，以區分出危險因子以及 CMV Retinitis 發病之臨界值 (如 CD4 count <10 cell/ μ l; HIV RNA copies $>300,000$ copies/ml，以及 CMV viral load 之變化及閾值等)，以作為日後早期治療 (即已達危險閾值但尚未患病者) 給與先前給藥預防，

(1) 我們先以 HIV 病毒量作為患者罹患 CMV Retinitis 之危險因子，我們已初步歸納出，如果 HIV viral load 大於 30 萬 copies/ml，以及近四個月病毒量增加 (Rebound) 2.5 倍者，皆可能為將罹患 CMV Retinitis 之前兆，對於這些患者一則應積極治療 (如更換 HAART 之 formula)，一則應積極追蹤眼底視網膜之病變。

(2) 同時，在未來之研究，我們計劃加入追蹤 CMV 病毒量，作為評估

及監控 CMV Retinitis 之發生及早期治療之臨床標的 (Marker)。再者對於已罹患 CMV Retinitis 病患 HIV 及 CMV 病毒予以分析 (如 Genotyping)，以了解是否因 HIV 產生 drug-resistance strain 而造成 viral load rebounding，同時刺激 CMV 病毒活化而導致感染視網膜。

此研究目的及預測目標以 (1)研究並了解 CMV 在臨床上 CMV 致病機制之所代表意義，(2)臨床治療失敗與病情感染惡化之是否與 Resistant-strain CMV 產生有關，及其可能代表之臨床意義，並作為新型抗 CMV 病毒藥物開發之基礎。

(二) 巨細胞病毒視網膜炎之致病機轉之研究

本研究目的希望藉由對於 HCMV Retinitis 之病理標本之研究，配合建立 HCMV Retinitis 體外模型 (HCMV / human retinal pigment epithelium cell; HRPE)；以進一步了解 HCMV 病毒在人體視網膜之感染進入路徑及病毒複製週。同時經由基礎分子生物研究，探討 HCMV 病毒在眼內免疫優勢區 (immune privilege) 中免疫變化及相互作用，以了解病毒如何規避全身免疫系統之攻擊，以及 HCMV 如何利用眼內特別免疫功能，而達到 HCMV 病毒持續感染複製及潛伏，再活化感染之 HCMV Retinitis 致病機制。

此外，讓我們感興趣的是 CMV 病毒除了使受感染視網膜細胞壞死分解外，是不是還可經由 CM 病毒基因調控 (如使 Fas Ligand 大量表現等)，而此種病理機轉也使得正常視網膜細胞以及外來救緩，也因與 FasL 結合造成細胞 apoptosis，此推論結果與巨細胞病毒視網膜炎之臨床表徵及嚴重度相合。為進一步驗證以上之假說，我們已培養出在維持視網膜正常生理之重要細胞 --人類視網膜色素上皮 (Human retinal pigment epithelium ; HRPE) 細胞，HRPE 細胞不僅能維持視網膜感光細胞及神經細胞之營養供給及光視覺反應，且具有免疫保護及 Cytokine 分泌等抵禦外來者入侵 (如 CMV) 之重要功能；同時我們已將 CMV

AD169 病毒成功感染視網膜色素上皮細胞，以模擬 CMV 病毒在眼內視網膜之致病機轉及免疫反應改變等變化。此巨細胞病毒視網膜炎體外實驗模型之建立，將能提供更多的資訊來研究模擬 CMV infection 及 CMV Retinitis 之致病機轉及感染途徑。

(2)材料與方法。

本研究採前瞻性世代表性(prospective cohort)觀察每位愛滋病患者臨床病程與定期監測眼底視網膜變化之相關性。對於每一位 AIDS 病患，每 2 個月散瞳檢查眼底視網膜一次，對為 HIV 帶原者則每 4 個月檢查眼底一次。對於已經罹患巨細胞病毒視網膜炎病患。應每 2 至 4 週做一次眼底檢查。受檢病人先必須充分散大瞳孔(約 30 至 40 分鐘)。檢查時以間接眼底鏡 檢查。每次病人接受眼底檢查，同時檢測病患血液中 CD4 淋巴球量。追蹤臨床感染已罹患巨細胞病毒視網膜炎愛滋病患者對於 ganciclovir 治療效果及預後之評估。

在按照病灶出現在眼底視網膜之位置來區分:

- (1)Zone 1: 位在視神經盤, 和後極部的區域
- (2)Zone 2: 介於赤道區(Equator)和 Zone 1之間的區域
- (3)Zone 3: 介於視網膜之前緣Ora serrata 與赤道區之間的區域

Ganciclovir 給藥方式，一般可分為靜脈注射、眼球內注射及口服等型式。靜脈注射臨床給藥療程，先以初始劑量 (initial induction course)每 12 小時每公斤 5mg 為期 14-21 天，之後維持劑量 (maintenance course)為每週注射 5 天，每天注射一次，每次劑量以每公斤 5mg 計算，

將已罹患 CMV Retinitis 的病患定期抽血追蹤檢查，利用多生鏈聚合酶病毒定量法以測定病患血液中巨細胞病毒總負荷量 (CMV virus load) 及 HIV virus load，比較病患整個治療過程(ant-CMV and anti-HIV protocol)及預後之間變化，進以了解巨

細胞病毒臨床病程與愛滋病患罹患巨細胞病毒視網膜炎之間的相關性。

細胞培養與人類巨細胞病毒感染(Cell Culture and HCMV infection)

人類視網膜色素上皮細胞(human retinal pigment epithelium cell; HRPE cell)之 ARPE-19 細胞株與人類巨細胞病毒(human cytomegalovirus; HCMV) 之 AD169 病毒株皆取自於美國細胞株中心(American Type Culture Collection, Manassas, VA)。HRPE 細胞培養於含有 10% FCS 的一比一比例的 DMEM 與 Ham's F-12 培養液內。HEL-299 細胞培養於含有 10% FCS 的 DMEM 培養液內。Jurkat 細胞培養於含有 10% FCS 的 RPMI 1640 培養液內。所有的細胞皆培養在含有 5% 二氧化碳的 37°C 培養箱。人類巨細胞病毒病毒儲存液則來自於受 HCMV AD 169 感染的 HEL-299 細胞 [45]。感染的前一天將尚未全滿的 HRPE 細胞換置成不含血清的培養液，AD 169 以 5 PFU/cell 的 multiplicity of infection (M.O.I.) 感染 HRPE 細胞，在 37°C 巨細胞病毒病毒感染 2 小時後，以 PBS 清洗細胞兩次，換置新鮮的培養液，培養於含有 5% 二氧化碳的 37°C 培養箱。

西方墨點方法(Western Blot Assay)

受 AD169 病毒感染的 HRPE 細胞在感染的第 1, 2, 3, 5 及 7 天收下，細胞萃取液的準備如先前所述，15 μ l 的細胞萃取液以 95°C 煮 5 分鐘，以 10% SDS - polyacrylamide gel 做蛋白質電泳分離，蛋白再以 wet - transfer system 轉印至 Hybond - ECL nitrocellulose paper (Amersham, Arlington Heights, IL)，所使用的單株抗體有 anti-FasL mAb (F37720/lot 3; BD Transduction Laboratories, Lexington, KY)，anti-Fas monoclonal antibody (mAb) (F22120; Transduction Laboratories)，anti-CMV IE mAb (Mab810; Chemicon International, Temecula,

CA)，與 anti β -actin mAb (Mab81501; Chemicon international)，在轉印紙上所形成的抗原。抗體複合體再利用化學冷光蛋白質偵測系統 (Chemiluminescence (ECL) protein detection system, Amersham International plc, Arnersham, UK)做進一步的顯影分析確定。

過氧化酶染色法(Peroxidase Anti -Peroxidase Staining, PAP staining)

臘塊切片先以連續酒精以及碘溶液脫臘後，以 solution L (0.1% sodium azide with 3% H_2O_2) 在室溫下反應以去活化內生性過氧化酶(endogenous peroxidase)，以二次水沖洗三次後以山羊血清反應5分鐘以阻擋非特異性的結合處。加入抗體 (如 anti-CMV IE, anti-Fas, anti-Fas Ligand) 和標本在室溫下作用一小時。同時用一不相關的免疫球蛋白 IgG 1 抗體作為對照組。之後以二次水沖洗三次後加入山羊對抗小鼠免疫球蛋白的抗體在室溫下10分鐘後加入小鼠過氧化酶複合體的抗體於室溫下約10分鐘。最後加入剛配好的臨解物 (substrate) (0.05% 3,3 - diaminobenzidine tetrahydro - chloride 和 0.03% H_2O_2 於 50ml Tris 緩衝液，pH 7.6) 直至呈色為止。Methyl green 染核後以光學顯微鏡判讀之。

TUNEL 方法(Terminal deoxynucleotidyl transferase deoxy-UTP nick end labeling)偵測細胞凋亡 (Apoptosis)

脫臘後之切片沖洗後，以濃度 20 μ g/ml proteinase k 在室溫下作用 30 分鐘。短暫加上平衡緩衝液(equilibration buffer)後加入作用溶液(含 dUTP-fluorescein 之 TdT 酵素) 於 37°C 下作用 60 分鐘。對照組分成正對照組 (positive control) 以及負對照組 (negative control)。正對照組於加入作用溶液前先以濃度 1 μ g/ml DNase I 作用 10 分鐘，負對照組則是以標示溶液(label solution) 取代作用溶液。之後以 PBS 沖洗三次以停止反應。抗 fluorescein 過氧化酶加入後於 37°C 下反應 30 分鐘。最後加入剛配好的酶解物 (substrate) (0.05% 3,3'- diaminobenzidine

tetrahydrochloride 和 0.03% 於 H₂O₂ 50mM Tris 緩衝液，pH7.6) 直至呈色。以 methyl green 染核後於光學顯微鏡下觀察。

(3) 結果。

(一) 巨細胞病毒視網膜炎(CMV Retinitis)之臨床病程與病毒量相關性

而我們近五年來之追蹤調查結果，發現在 127 位 AIDS 病患中，有 42 年 (33.07%) 患者出現 HIV-related retinopathy (Retinal hemorrhage, cotton wool spots, 以及 micro-angiopathy 等) 之非感染性病變。而其中有 24 位確定罹患過 CMV Retinitis, 而有 3 位 (2.36%) 罹患過 Toxoplasmosis Retinopathy (弓漿蟲視網膜炎), 以及一位 (0.78%) 罹患過 Cryptococcus chorioretinopathy (新型隱球菌脈絡膜視網膜炎)。

我們也針對 AIDS 患者眼內有病變患者, 如 HIV-related retinopathy (non-infections lesions: retinal hemorrhage, cotton wool spots), CMV Retinitis, toxoplasmosis retinitis, cryptococcus chorioretinitis 等患者血中及眼內液之 HIV RNA-Copied level, 做一分析比較, 研究結果發現在:

(1) HIV-related retinopathy 患者 plasma 中 HIV RNA-copied 數目 (110.237 ± 12.137 copies/ml, n=17), 前房液中 HIV RNA-copied 數目為 (3.612 ± 1.205 copies/ml, n=6), 而 CD4 count 為 51 ± 6.7 cells/ μ l, 而經過三合一療法 (highly active anti-retroviral therapy; HAART) 治療四個月後, 血漿 plasma 中 HIV RNA-copied 數為 8.321 ± 4.312 copies/ml, n=17, 而前房液中則測不出任何 HIV RNA-copied, 而此時 CD4 count 以回升到 189 ± 6.8 cells/ μ l。而在

(2) CMV Retinitis 病患 (未經過 HAART 治療者) 血中 plasma HIV 病毒量為 361.831 ± 25.783 copies/ml, 而眼內前房液中 HIV 病毒量為 22.307 ± 25.783 copies/ml, n=5,

而 CD4 count 為 7 ± 2.1 cells/ μ l，而經過 HARRT 治療後血中 plasma HIV 病毒量則降至 31.321 ± 10.537 copies/ml，而前房液中 HIV 病毒量則降至 2.701 ± 1.801 copies/ml，而 CD4 count 則升至 81 ± 7.8 cells/ μ l。

(3) 對於罹患 Toxoplasmosis Retinitis (n=3) 病患血中 HIV 病毒量為 531.308 ± 87.121 copies/ml，而 CD4 為 12 ± 3.5 cells/ μ l，經過 4 個月 HAART 治療後，其血中 plasma 之 HIV 病毒量則降至 39.157 ± 21.031 copies/ml，而眼內病毒量則降至 1.431 ± 807 copies，而 CD4 count 則升至 46 ± 22.1 cells/ μ l。

(4) 而對於罹患 Cryptococcus Chorioretinitis 病患 (n=1)，其血中 HIV 病毒量為 267.089 copies/ml，CD4 count 為 0 cells/ μ l，經過 4 個月 HAART 治療後，血中 HIV 病毒量則降至 21.053 copies/ml，CD4 count 則升高至 21 cells/ μ l。

(5) 對於愛滋病患罹患 CMV Retinitis 之病理機轉研究，我們首先針對於對 CMV Retinitis 感染所產生一氧化氮在眼內的濃度高低是否對視網膜有何影響或造成破壞？做一追蹤整理，發現在愛滋病患罹患 CMV Retinitis 之患者前房液中 NO 濃度 (NO level: 104.3 ± 27.1 mM, n=12)，遠高於愛滋病患眼內無任何感染者之前房液 NO 濃度 (NO level: 36.1 ± 10.4 mM, n=7, p<0.05)。同時針對五名愛滋病患已罹患 CMV Retinitis 之患者，進行為期二個月之 Ganciclovir 全身靜脈內注射，伴隨著眼內病灶消失好轉，其五名患者玻璃體中之 NO 濃度也明顯下降至 53.4 ± 11.8 mM。

我們進一步利用組織免疫染色法發現在 AIDS 合併 CMV Retinitis 患者眼內病灶區中，發現有大量帶有 CMV IE (早期基因) 抗原之巨大吞噬細胞 (Macrophage)，而這些 Macrophage 都表現出大量高濃度 NO，而出現高病毒濃度具組織毒性 NO 之產出，可能主要是針對毒殺 CMV 病毒傳染複製，但是此高濃度 NO 產生之同時，也極有可能造成周圍正常視網膜之破壞，而導致 CMV Retinitis 患者之視網膜受損更加嚴重。

(二) 巨細胞病毒視網膜炎之致病機轉之研究

我們利用 *in situ* hybridization 技術來偵測 Fas ligand mRNA 之表現，檢測人類視網膜組織時發現 Fas Ligand 在正常視網膜組織中呈現一種同質性表現分佈，主要表現在視網膜內核層(inner nuclear layer), 外核層(outer nuclear layer), 以及人類視網膜色素上皮細胞 (human retinal pigment epithelium) 。但是對於感染 CMV Retinitis 的愛滋病患眼睛病灶區內之 Fas ligand mRNA 表現作一檢測時，我們發現在 CMV 感染視網膜之病灶區中 Fas ligand 訊號明顯增加。同時利用 terminal transferase-mediated nick end labeling assay (TUNEL stain) 來分析結果發現在視網膜病灶區中有大量細胞計劃性死亡 (apoptosis) 之現象。根據以上免疫病理之發現，我們推測在愛滋病患感染 HCMV Retinitis 的致病機轉中 HCMV 病毒除了使受感染視網膜細胞壞死分解外，是不是還可經由 HCMV 病毒基因調控 (如使 Fas ligand 大量表現等)，而此種病理機轉也使得正常視網膜細胞以及導致來自全身性徵召 (recruitment) 之血液免疫細胞因 apoptosis 而不能發揮其救援功能？

再利用 immunohistochemistry double stain 技術，來雙重標的 Fas ligand 和 HCMV IE 蛋白之表達以及所處位置，可以清楚看出 CMV IE 蛋白與 FasL 出現在同一受感染之視網膜細胞中。根據以上免疫病理之發現，我們推測在愛滋病患感染 HCMV Retinitis 的致病機轉中，HCMV 病毒除了使受感染視網膜細胞壞死分解外，也可經由感染眼睛視網膜改變及調控視網膜原有正常生理的免疫表現，使得眼睛局部免疫力 (local immunity) 失控進而造成病理性免疫反應 (pathologic immune reaction) 。例如可經由 HCMV 病毒基因調控 FasL 之表現，而此病理機轉將造成正常視網膜細胞細胞計劃性死亡，以及來自全身性徵召 (recruitment) 之血液免疫細胞因 Apoptosis 而導致不能發揮其救援功能，此推論結果與巨細胞病毒視網膜炎之臨床表徵及嚴重度相合。

(4) 討論。

(1) 根據國外報告指出，約有百分之六十以上的愛滋病患會出現與 HIV 感染之眼底病變。然而在台灣目前尚未有關於愛滋病患眼底病變之臨床統計報告。自 1999 年 3 月至 2002 年 12 月，我們已評估並追蹤 89 位感染愛滋病毒之病患並做詳細之眼底檢查。在其中 67 位愛滋病患，22 位 (32.8%) 眼底視網膜罹患有白色棉絮狀斑 (cotton wool spot)，此為台灣愛滋病患者最常見之眼底視網膜病變。巨細胞視網膜炎為台灣愛滋病患者最常見之眼部機緣性感染(14 位病患共佔 18.1%)。在此，我們建議愛滋病患者應定期 2 至 4 個月接受眼底散瞳檢查，以達早期診斷，確保視力健康。同時對於愛滋病患眼部感染之檢查及治療，應建立於內科醫生與眼科醫生合作之上，才能充分發揮預防視力喪失及維持愛滋病患生活品質之功效。

(2) 眼內 Fas/Fas ligand system 為一種自我免疫辨識及自體免疫調節功能之防禦系統，主要功能是對於外來發炎細胞執行細胞計劃性死亡 (apoptosis) 的反應。但是在當病人本身免疫系統受抑制 (immune suppression) 或受到嚴重破壞時，如愛滋病患者感染巨細胞病毒視網膜炎其眼睛視網膜內 FasL 是否也會受到 CMV 病毒感染之影響而改變？ 因此我們為了進一步了解探討與證實 CMV Retinitis 對 Fas / FasL 影響和所造成免疫病理反應，以及病毒感染造成視網膜之破壞及視網膜細胞 apoptosis 之形成原因。

我們在已感染 CMV Retinitis 病灶區及體外 HRPE 感染 CMV 病毒細胞模型的實驗結合，皆支持 CMV 病毒在感染人類視網膜組織及視網膜色素上皮細胞後，可經由 CMV IE2 病毒基因來調控活化 FasL promotor，而造成 FasL 產物大量表達，同時對於因免疫徵召來的免疫細胞 (如 T cell 、macrophage) 進行攻

擊，其機制為利用病灶區及部份游離的 FasL 與 T cell 細胞膜上的 Fas receptor 結合而促進細胞進行 Apoptosis 最後達成逃脫免疫監測而避免病毒被清除之效應。

然而，正常視網膜組織及 HRPE 細胞皆帶有 Fas receptor，而對於因為 CMV 病毒活化產生之 FasL（細胞模型及游離型）是不是也有可能造成這些細胞也進行 Apoptosis？其次，對於已遭受或正遭受 CMV 感染的視網膜組織及 HRPE 細胞，是不是也有可能在 FasL 大量表達而造成已感染細胞也進行 Apoptosis？

Bigger 等人在 2000 年 IOVS 雜誌中，即在 MCMV Retinitis 病灶周圍未受 MCMV 感染之正常視網膜以及對側無注射 MCMV 之正常眼視網膜和脈絡膜中皆有細胞 Apoptosis 之現象，同時我們在人類 CMV Retinitis 之病灶區與 HRPE 感染細胞模型中，也皆發現在周圍未受感染的正常區域也皆呈現細胞 Apoptosis 之現象。因此，經由 CMV 病毒感染視網膜組織及 HRPE 細胞產生大量 FasL 很可能導致帶有 Fas receptor 正常視網膜組織及 HRPE 細胞因 Fas/FasL 路徑活化而進行 Apoptosis。

(5)結論與建議:

1. 在臨床上CMV病毒常造成AIDS與免疫不全患者之機緣性感染，嚴重時會造成患者失明(如CMV Retinitis)甚至致命，故對於CMV之臨床治療則格外顯得重要。但由於CMV病毒常因長期使用抗CMV病毒藥物(如Gancidovir, Foscarnet等)而產生新的抗藥性(drug-resistance)病毒株。研究已指出長期使用Ganciclovir半年，則30%患者服用後會產生抗藥性及新CMV病毒株。特別在HIV感染之患者中，則此種現象則更為明顯。先前實驗結果已證實HIV之Tat基因會活化CMV MIE promoter兒而增強複製與及感染能力，而CMV IE基因

也可作用在HIV之LTR而導致 HIV病毒活化。此種HIV與CMV病毒之相互影響作用之結果，即可能解釋臨床上當AIDS患者合併CMV感染時，常造成患者器官(如眼睛視網膜)嚴重感染及存活預後明顯降低。

2. 愛滋病患者即使沒有症狀，而CD4小於50 cell/ul時，應每一至二個月檢查眼底一次，對於已經罹患巨細胞病毒視網膜炎病患，應每兩周來找眼科醫師做一次眼底檢查，以確保病人視力的不再惡化。

3. 根據國外報告指出，約有百分之六十以上的愛滋病患會出現與HIV感染之眼底病變。然而在台灣目前尚未有關於愛滋病患眼底病變之臨床統計報告。自1999年3月至2002年12月，我們已評估並追蹤89位感染愛滋病毒之病患並做詳細之眼底檢查。在其中67位愛滋病患，22位（32.8%）眼底視網膜罹患有白色棉絮狀斑 (cotton wool spot)，此為台灣愛滋病患者最常見之眼底視網膜病變。巨細胞視網膜炎為台灣愛滋病患者最常見之眼部機緣性感染（14位病患共佔18.1 %）。在此，我們建議愛滋病患者應定期2至4個月接受眼底散瞳檢查，以達早期診斷，確保視力健康。同時對於愛滋病患眼部感染之檢查及治療，應建立於內科醫生與眼科醫生合作之上，才能充分發揮預防視力喪失及維持愛滋病患生活品質之功效。

4. 我們實驗結果支持CMV病毒利用活化 Fas ligand表達而演化出特定之病毒免疫規避（virus evasion）效應，並且能躲避宿主免疫系統之偵測與攻擊，以調控視網膜宿主細胞存活而做出對本身病毒有利之生長環境。其結果則導致HCMV感染越演越烈，視網膜因局部及全身性免疫自我防護之破壞，與免疫救援系統不能發揮而破壞殆盡，病人終究也喪失寶貴視覺功能。

5. 其次 我們推測CMV病毒在早期感染宿主細胞，同時經由一些迅早期基因作用而調節宿主細胞週期，並保護宿主細胞在病毒複製週期中，不易受到外來刺激而進行Apoptosis，其最終目的就是確保CMV病毒本身能有效完成複製週期。然而當CMV病毒大量複製完成，即對宿主細胞進行CMV lytic cycle，造成宿主細胞崩裂，而導致細胞Necrosis現象產生。

(6)參考文獻。

1. Chee M S, Bankier AT, Beck S, Bohni R, Brown CM, Cerny R, Horsnell T, Hutchison CA, Kouzarides T, Martignetti JA. Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr Top Microbiol Immunol* 1990; 154:125-131.
2. Mocarski ES, Abenes GB, Manning WC, Sambucetti LC, Cherrington JM. Molecular genetic analysis of cytomegalovirus gene regulation in growth, persistence and latency. *Curr Top Microbiol Immunol* 1990; 154:147-153.
3. Soderberg-Naucler C, Fish KN, Nelson JA. Reactivation of latent human cytomegalovirus by allogeneic stimulation of blood cells from healthy donors. *Cell* 1997; 91:119-126.
4. Tomazin R, Boname J, Hegde NR, Lewinsohn DM, Altschuler Y, Jones TR, Cresswell P, Nelson JA, Riddell SR, Johnson DC. Cytomegalovirus US2 destroys two components of the MHC class II pathway, preventing recognition by CD4 T cells. *Nature Med* 1995; 5:1039-1046.
5. Tsai HL, Kou GH, Chen SC, Wu CW, Lin YS. Human cytomegalovirus immediate-early protein IE2 tethers a transcriptional repression domain to p53. *J Biol Chem* 1996;

271:3534-3561.

6. Johnson DC, Hill AB. Herpesvirus evasion of the immune system. *Curr Top Microbiol Immunol* 1998; 232:149-153.
7. Tomazin, R., Boname J, Hegde NR, Lewinsohn DM, Altschuler Y, Jones TR, Cresswell P, Nelson JA, Riddell SR, Johnson DC. Cytomegalovirus US2 destroys two components of the MHC class II pathway, preventing recognition by CD4 T cells. *Nature Med* 1999; 5:1039-1042.
8. Yuo CY, Wu G, Huang ES, Wu FYH, Wu CW. Stable expression of functional human cytomegalovirus immediate-early protein IE1 and IE2 in Hela cells. *Intervirolgy* 1992; 34:94-98.
9. Zhu H, Yuqiao S, Thomas S. Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins block apoptosis. *J Virol* 1995; 69:7960-7965.
10. Yurochko AD, Huang ES. Human cytomegalovirus binding to human monocytes induces immunoregulation gene expression *J Immunol* 1999; 162:4806-4812.
11. Wilcox CM, Forsmark CE, Darragh TM. Cytomegalovirus peritonitis in a patient with the acquired immunodeficiency syndrome. *Digest Dis and Sci* 1992; 37:1288-1293.
12. Conboy TJ, Pass RF, Stagno S. Early clinical manifestations and intellectual outcome in children with symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr* 1987; 11:343-349.
13. Mills JM. Serious cytomegalovirus disease in the acquired immuno-deficiency syndrome (AIDS). *Ann Intern Med* 1988; 108:585-589.
14. Budka H. Human immunodeficiency virus (HIV) –induced disease of the central nervous system: Pathology and implications for pathogenesis. *Acta Neuropathol* 1989; 77:225-230.
15. Jabs DA, Green W, Fox R, Polk FB, Bartlett JG. Ocular manifestations of acquired immune deficiency syndrome. *Ophthalmology* 1989; 96:1092-1097.
16. Gross J.G, Bozzette SA, Mathews WC. Longitudinal study of cytomegalovirus retinitis

- in acquired immune deficiency syndrome. *Ophthalmology* 1990; 97:681-686.
17. Green WR, Fox R. Ocular Manifestations of acquired immune deficiency syndrome. *Ophthalmology* 1989; 96:1092-1097.
 18. Mertens TE, Stoneburner SL. Global estimates of HIV infections and AIDS: further heterogeneity in spread and impact. *AIDS* 9 (suppl 1): 1995; S251-256.
 19. Piot P, Laga M, Ryder R. The global epidemiology of HIV infection: continuity, heterogeneity, and change. *J AIDS* 1990; 3:403-408.
 20. World Health Organization, Global Programme on AIDS. The HIV/AIDS pandemic: 1993 overview. 1994 Geneva: World Health Organization.
 21. Chiou SH, Wong WW, Hsu WM, Chung YM, Liu CY, Liu W., Chen SH, Liu JH. Natural progression of cytomegalovirus retinitis in AIDS. *Chinese Med J (Taipei)* 1999; 62:316-321.
 22. Ferguson TA, Griffith TS. A vision of cell death: insight into immune privilege. *Immunol Reviews* 1997; 156:167-178.
 23. Lukac DM, Alwine JC. Effects of human cytomegalovirus major immediate-early proteins in controlling the cell cycle and inhibiting apoptosis: studies with ts13 cells. *J Virol* 1999; 73:2825-2830.
 24. Glodmacher VS, Bartle LM, Skaletskaya A, Cheryl AD, Kedersha NL, Vater CA, Han JW, Lutz RJ, Watanabe S, McFarland EDC, Kieff ED, Mocarski ES, Chittenden T. A cytomegalovirus-encoded mitochondria-localized inhibitor of apoptosis structurally unrelated to Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:12536-12541.
 25. Skaletskaya A, Laura MB, Chittenden T, McCormick AL, Morcarski ES, Goldmacher VS. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98:7829-7834.
 26. Tomazin R, Boname J, Hegde NR, Lewinsohn DM, Altschuler Y, Jones TR, Cresswell P, Nelson JA, Riddell SR, Johnson DC. Cytomegalovirus US2 destroys two components of the MHC class II pathway, preventing recognition by CD4 T cells. *Nature Med* 1999; 5:1039-1044.

27. Cinatal JJ, Blaheta R, Bittoova M, Scholz M, Margraf S, Vogel JU, Cinatl J, Doerr HW. Decreased neutrophil adhesion to human cytomegalovirus-infected retinal pigment epithelium cells is mediated by virus-induced up-regulation of Fas ligand independent of neutrophil apoptosis. *J Immunol* 2000; 165:4405-2211.
28. Geleziunas R, Xu W, Takeda K, Ichijo H, Greene WC. HIV-1 Nef inhibits ASK-dependent death signaling providing a potential mechanism for protecting the infected host cell. *Nature* 2001; 410:834-838.

※磁片檔案說明

檔案性質	磁片別	檔案名稱	檔案說明	檔案大小 (bytes)	修改日期
資料讀我檔案		readme.doc	readme.doc	0.8MB	
空白問卷檔案		ques.doc			
訪員手冊檔案		manual.doc			
譯碼簿檔案		codebook.doc			
原始資料數據檔案		data.dbf	data.dbf	0.4MB	
		data.txt			
成果報告檔案		report.doc	report.doc	0.6MB	

注意事項：

1. 為方便作業，檔案名稱須依上表規定命名，而若遇兩種以上的調查工具，請再附加標示 1、2、3…(如範例所示 ques1.doc、ques2.doc)，以利區分。
2. 為方便使用者的不同需求，原始資料數據檔案請各交付 dbf 及 txt 檔。
3. 若單一檔案已超過 1.44Mb (相當於一片 3.5" 磁片) 時，請改用 CD-R 光碟片儲存，將所有檔案燒錄至 CD-R 光碟片後交出(但請不要利用 MO 交付)；若遇燒錄有困難時，亦可將檔案壓縮後交付出，**並請於磁片標籤上標示「壓縮檔」**。

※連絡方式

計畫執行單位：台北榮總

計畫連絡人：邱士華

地址：台北市北投區石牌路二段 201 號 台北榮總眼科部

連絡電話：0958068682 / 28201999-7211 傳真：(02)28748647

E-mail：shchiou@vghtpe.gov.tw

九十二年度計畫著作一覽表

計畫名稱：愛滋病患合併巨細胞病毒視網膜炎之致病機轉與免疫基因療法發展之研究

主持人：許紋銘 計畫編號：DOH92-DC-1031

序號	計畫產出名稱	產出形式	SCI*
1	Apoptosis of human retina and retinal pigment cells induced by human cytomegalovirus infection. Chiou SH, Liu JH, Chen Steve SL, Liu WT, Lin JC, Wong WW, Tseng WS, Chou CK, Liu CY, Ho Larry LT, Hsu WM.. Ophthalmic Research 2002;34:77-82.	期刊	✓
2	Wen-Ming Hsu , Steve S.-L. Chen, Chi-Hsien Peng, Chieh-Fu Chen, Yu-Chieh Ko, Der-Chong Tsai, Ching-Kuang Chou, Larry L-T. Ho, Shih-Hwa Chiou. Elevated Nitric Oxide (NO) Level in Aqueous Humor of AIDS Patients with Cytomegalovirus Retinitis. <i>Ophthalmologica 2003;217:298-301.</i>	期刊	✓
3	<u>Wen-Ming Hsu</u> , et al. The HIV RNA Levels of Plasma and Ocular Fluids in AIDS Patients with Ophthalmic Infections. <i>Ophthalmologica (In press)</i>	期刊	✓
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			

*SCI: Science Citation Index，若發表之期刊為SCI所包含者，請打「✓」。

九十二年度計畫重要研究成果

計畫名稱：愛滋病患合併巨細胞病毒視網膜炎之致病機轉與免疫基因療法發展之研究(第二年)

主持人：許紋銘 計畫編號：DOH92-DC-1031

1.計畫之新發現或新發明

(1) 調查台灣地區愛滋病患罹患巨細胞病毒視網膜炎之盛行率發現，在 127 位 AIDS 病患中，有 42 位(33.07%)患者出現 HIV-related retinopathy(Retinal hemorrhage, cotton wool spots，以及 micro- angiopathy 等) 之非感染性病變。而其中有 24 位確定罹患過 CMV Retinitis，而有 3 位(2.36%) 罹患過 Toxoplasmosis Retinopathy (弓漿蟲視網膜炎)，以及一位(0.78%) 罹患過 Cryptococcus chorioretinopathy。

(2) 對於愛滋病患罹患 CMV Retinitis 之病理機轉研究，我們首先針對於對 CMV Retinitis 感染所產生一氧化氮在眼內的濃度高低是否對視網膜有何影響或造成破壞？做一追蹤整理，發現在愛滋病患罹患 CMV Retinitis 之患者前房液中 NO 濃度 (NO level: 104.3 ± 27.1 mM, n=12)，遠高於愛滋病患眼內無任何感染者之前房液 NO 濃度 (NO level: 36.1 ± 10.4 mM, n=7, $p < 0.05$)。同時針對五名愛滋病患已罹患 CMV Retinitis 之患者，進行為期二個月之 Ganciclovir 全身靜脈內注射，伴隨著眼內病灶消失好轉，其五名患者玻璃體中之 NO 濃度也明顯下降至 53.4 ± 11.8 mM。

我們進一步利用組織免疫染色法發現在 AIDS 合併 CMV Retinitis 患者眼內病灶區中，發現有大量帶有 CMV IE (早期基因) 抗原之巨大吞噬細胞 (Macrophage)，而這些 Macrophage 都表現出大量高濃度 NO，而出現高病毒濃度具組織毒性 NO 之產出，可能主要是針對毒殺 CMV 病毒傳染複製，但是此高濃度 NO 產生之同時，也極有可能造成周圍正常視網膜之破壞，而導致 CMV Retinitis 患者之視網膜受損更加嚴重。

2.計畫對民眾具教育宣導之成果

在愛滋病之臨床病程當中，約有 70-90% 比例的愛滋病患者會發生與其相關的

眼部病變及機緣性感染，20-45%的愛滋病患會感染 CMV Retinitis。CMV Retinitis 為一漸進性破壞之病症，部份病患早期不會有明顯的症狀，如果不接受治療或不能早期診斷，最後將會導致失明。Dr. Culberston 就曾指出愛滋病患者自殺最重要的原因為失明或懼怕喪失視力，在此，我們建議愛滋病患者即使沒有症狀，而 CD4 小於 50 cell/ul 時，應每一至二個月檢查眼底一次，對於已經罹患巨細胞病毒視網膜炎病患，應每兩周來找眼科醫師做一次眼底檢查，以確保病人視力的不再惡化。

4. 計畫對醫藥衛生政策之具體建議

巨細胞病毒為 AIDS 常見的機緣性感染病毒之一，根據國外文獻統計約有 60%至 80%的愛滋病患者合併感染巨細胞病毒血症 (HCMV viremia)，同時造成腸炎、肺炎、視網膜炎等器官感染。其中高達 20%至 45%愛滋病患者會罹患巨細胞病毒視網膜炎(cytomegalovirus retinitis; CMV Retinitis)，且後果最為嚴重。後天免疫缺乏症候群自 1981 年在美国公佈迄今，已屆滿 20 年。根據世界衛生組織估計，公元兩千年全世界感染人類免疫缺乏病毒與後天免疫缺乏症候群病患，將達三千五百萬人以上。國內自民國 73 年首例愛滋病發佈至今已有三千餘名患者感染人類免疫缺乏病毒 (human immunodeficiency virus-1, HIV-1)，而且增加的速度仍未趨緩，證明國內疫情仍未有效控制。同時這些患者年齡多 20-50 歲之壯年期，如果因罹患 CMV Retinitis 而喪失視力，勢必國家將要付出更大的社會及經濟成本來照顧這類患者。

故此，我們建議衛生署應制訂愛滋病醫藥衛生政策時 應建議醫師及患者應定期 2 至 4 個月接受眼底散瞳檢查，以達早期診斷，確保視力健康。同時對於愛滋病患眼部感染之檢查及治療，應建立於內科醫生與眼科醫生合作之上，才能充分發揮預防視力喪失及維持愛滋病患生活品質之功效。

九十二年科技計畫重要研究成果產出統計表

計畫名稱：愛滋病患合併巨細胞病毒視網膜炎之致病機轉與免疫基因療法發展之研究(第二年)

主 持 人：許 紋 銘 計畫編號：DOH92-DC-1031

科技論文篇數			技術移轉			技術報告		
發表地點 類 型	國 內	國 外	類 型	經 費	項 數	篇		
						技術創新		
期 刊 論 文	篇	3 篇	技 術 輸 入	千 元	項	項		
						技術服務		
研 討 會 論 文	篇	3 篇	技 術 輸 出	千 元	項	專 利 權 (核 准)	國 內	項
							國 外	項
專 著	篇	篇	技 術 擴 散	千 元	項	著 作 權 (核 准)	國 內	項
							國 外	項

[註]：

期刊論文：指在學術性期刊上刊登之文章，其本文部分一般包括引言、方法、結果及討論，並且一定有參考文獻部分，未在學術性期刊上刊登之文章（研究報告等）與博士或碩士論文，則不包括在內。

研討會論文：指參加學術性會議所發表之論文，且尚未在學術性期刊上發表者。

專著：為對某項學術進行專門性探討之純學術性作品。

技術報告：指因從事某項技術之創新、設計及製程等研究發展活動所獲致的技術性報告並未公開發表者。

技術移轉：指技術由某個單位被另一個單位所擁有的過程。我國目前之技術移轉包括下列三類：一、技術輸入。二、技術輸出。三、技術擴散。

技術輸入：藉僑外投資、與外國技術合作、投資國外高科技事業等方式取得先進之技術引進國內者。

技術輸出：指直接供應國外買主具生產能力的應用技術、設計、顧問服務及專利等。我國技術輸出方式包括整廠輸出、對外投資、對外技術合作及顧問服務等四種。

技術擴散：指政府引導式的技術移轉方式，即由財團法人、國營事業或政府研究機構將其開發之技術擴散至民間企業之一種單向移轉（政府移轉民間）。

技術創新：指研究執行中產生的技術，且有詳實技術資料文件者。

參與九十二年度計畫研究人力之職級與學歷分析表

計畫名稱：愛滋病患合併巨細胞病毒視網膜炎之致病機轉與免疫基
因療法發展之研究(第二年)

主持人：許紋銘 計畫編號：DOH92-DC-1031

學歷別 職級	博士	碩士	學士	專科	博士 研究生	碩士 研究生	其他	合計
第一級			2					2
第二級	1	1	1					3
第三級			2					2
第四級			2					2
第五級								
第六級								
合計								9

〔註〕

- 第一級：研究員、教授、主治醫師、簡任技正，若非以上職稱則相當於博士滿三年、碩士滿六年、或學士滿九年之研究經驗者。
- 第二級：副研究員、副教授、助研究員、助教授、總醫師、薦任技正，若非以上職稱則相當於博士、碩士滿三年、學士滿六年以上之研究經驗者。
- 第三級：助理研究員、講師、住院醫師、技士，若非以上職稱則相當於碩士或學士滿三年以上之研究經驗者。
- 第四級：研究助理、助教、實習醫師，若非以上職稱則相當於學士或專科畢業目前從式研究發展，經驗未滿三年者。
- 第五級：指目前在研究人員之監督下從事與研究發展有關之技術性工作，且具備下列資格之一者屬之：具初（國）中、高中（職）、大專以上畢業者或專科畢業目前從式研究發展，經驗未滿三年者。
- 第六級：指在研究發展執行部門參與研究發展有關之事務性及雜項工作者，如人事、會計、秘書、事務人員及維修、電機人員等。