

計畫編號：DOH93-DC-1020

行政院衛生署九十三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（三年計畫-總成果報告）

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：91年1月1日至93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	3-6
肆、本文	
前言	7-11
研究目的	11-13
材料與方法	13-15
結果	15-19
討論	20-28
結論與建議	29-32

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 (三年計畫-總成果報告)

計畫編號: DOH93-DC-1020 (91-93)

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:

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)。由於近年來器官移植與 AIDS 等免疫不全病患急速增加常導致嚴重併發症如肺炎、腸炎,腦炎、視網膜炎等。臨床上愛滋病患罹患巨細胞病毒視網膜炎(HCMV Retinitis),約佔 20-45%,如果不接治療大約半年內造成患者失明。在臨床的觀察中發現,巨細胞病毒視網膜炎是一種極具侵犯性及破壞性的眼部疾病,部份病患早期不會有明顯視力變化,但如果不能及時診斷並給予治療,或是中斷治療,最後皆往往造成患者失明。然而目前醫學研究對於 HCMV 病毒在巨細胞病毒視網膜炎的感染發展成因及 HCMV 病毒是如何在視網膜和眼睛內形成病毒複製循環,以及 HCMV 病毒又如何視網膜傳遞 (cell to cell),這些造成愛滋病患嚴重視力喪失-- HCMV Retinitis 之疾病重要致病機轉,至今仍不得而知。

(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 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。

(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。

(III) 在臨床的觀察中發現，其中高達 20% 至 45% 愛滋病患者會罹患巨細胞病毒視網膜炎 CMV Retinitis。CMV retinitis 是一種極具侵犯性及破壞性的眼部疾病，部份病患早期不會有明顯視力變化，但如果不能及時診斷並給予治療，或是中斷治療，最後皆往往造成患者失明。本研究計畫將針對因 CMV 病毒活化 FasL 所引發視網膜細胞 Apoptosis 之致病路徑，希望利用 Anti-Apoptosis 基因(如 NF-KB 之 p65、IAP (the inhibition of apoptosis)、與 Bcl-2 等)之特色傳送入已受 CMV 感染之視網膜或 HRPE 細胞中，進而減少 CMV 病毒本身引發的免疫反應，並予以阻斷 CMV 病毒所引發視網膜 Apoptosis，最終達成免疫基因治療之目的。實驗結果支持 NF-KB 基因載體轉染 RPE 細胞可大幅減少因 CMV 造成的 RPE 細胞 Apoptosis 現象。將 NF-KB 之 p65、IAP、與 Bcl-2 等 cDNA 載體傳送入已受 CMV 感染之 HRPE 細胞中(*In Vitro* CMVR model)，同時配合加入(或不加入) Ganciclovir，以觀察因 CMV 造成的 RPE 細胞 Apoptosis 現象及 NF-KB、IAP、與 Bcl-2 之 Anti-Apoptosis 作用。

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 (Final report - Three Year)

Project Number: DOH93-DC-1020

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.

Part III: HCMV infection usually develops asymptomatic lifelong infection in healthy individuals, but can cause severe clinical complications such as HCMV retinitis when reactivated in AIDS patients. 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. In this study, we focused on blocking the pathway of CMV-induced apoptosis by using activated anti-apoptosis genes (like NF- κ B, IAP, Bcl-2) or transducing these genes into *in vitro* CMV/HRPE infection models. Our preliminary result showed that the c-FLIP (anti-apoptosis gene) will be activated after transduced the plasmid of NF- κ B cDNA, and the activity of caspase-8 will be simultaneously declined.

Keyword: AIDS, human cytomegalovirus retinitis, HIV viral load

本 文

前 言

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)。由於近年來器官移植與 AIDS 等免疫不全病患急速增加常導致嚴重併發症如肺炎、腸炎，腦炎、視網膜炎等。臨床上愛滋病患罹患巨細胞病毒視網膜炎(HCMV Retinitis)，約佔 20-45%，如果不接治療大約半年內造成患者失明。在臨床的觀察中發現，巨細胞病毒視網膜炎是一種極具侵犯性及破壞性的眼部疾病，部份病患早期不會有明顯視力變化，但如果不能及時診斷並給予治療，或是中斷治療，最後皆往往造成患者失明。然而目前醫學研究對於 HCMV 病毒在巨細胞病毒視網膜炎的感染發展成因及 HCMV 病毒是如何在視網膜和眼睛內形成病毒複製循環，以及 HCMV 病毒又如何能在視網膜傳遞 (cell to cell)，這些造成愛滋病患嚴重視力喪失-- HCMV Retinitis 之疾病重要致病機轉，至今仍不得而知。

(1) 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，造成临床上防治的困難。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護，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，進而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, Amersham, 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% H₂O₂) 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% H₂O₂ 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，pH 7.6) 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)之造成免疫破壞與免疫治療之可能性

在臨床的觀察中發現，其中高達 20%至 45%愛滋病患者會罹患巨細胞病毒視網膜炎 CMV Retinitis。CMV retinitis 是一種極具侵犯性及破壞性的眼部疾病，部份病患早期不會有明顯視力變化，但如果不能及時診斷並給予治療，或是中斷治療，最後皆往往造成患者失明。先前實驗我們利用 *in situ* hybridization 技術來偵測 Fas ligand (FasL) mRNA，檢測人類視網膜組織時發現 FasL 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、外核層，以及人類視網膜色素上皮細胞。但對於檢測感染 CMV Retinitis 的愛滋病患眼睛病灶區內之 FasL mRNA 表現時，我們發現在 CMV 感染視網膜之病灶區中 FasL 訊號明顯增加。同時利用 TUNEL staining 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，此外我們已將 CMV 病毒感染視網膜色素上皮(HRPE)細胞，模擬 CMV 在眼內視網膜之致病機轉及免疫反應改變。實驗證明 CMV immediate early gene 2 (IE2)可以活化 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。實驗結果支持 CMV 病毒可利用活化 FasL 表達而演化出特定病毒免疫規避效應，CMV 病毒感染視網膜不但能躲避宿主免疫系統偵測甚至攻擊之，並做出對本身病毒有利之生長環境(Chiou & Hsu et al. *J Immunology* 2001 167:4098-4103; *Ophthalmol Res* 2002;34;77-82)。而其視網膜因局部及全身性免疫自我之防護也破壞殆盡，病人終究也喪失寶貴視覺功能。因此我們所做的研究顯示, CMV 病毒對 retina 所造成的破壞, 部份直接的原因來自 CMV 病毒產物對周邊細胞所造成之 apoptosis; 抑制細胞 apoptosis (anti- apoptosis pathway) 並配合現有之臨床藥物(如 Ganciclovir)施用，是增進病人癒後的一條可行之途徑。目前研究顯示，已知 NFKB 在 Anti-apoptosis pathway 之訊號傳遞(Signal Transduction)中扮演重要之角色，特別是 p65(為 NFKB 之 Subunit)扮調控樞紐。而期其他重要 anti-apoptosis 基因為 Bcl-2 與 IAP 皆已有文獻報告明確指出可阻止 apoptosis pathway 中 Caspase 8 及 Caspase 3 之活化。進而達成抗細胞凋亡(anti-apoptosis)與減緩 cell Death 之功能。

本研究計畫將針對因 CMV 病毒活化 FasL 所引發視網膜細胞 Apoptosis 之致病路徑，希望利用 Anti-Apoptosis 基因(如 NF-KB 之 p65、IAP (the inhibition of apoptosis)、與 Bcl-2 等)之特色傳送入已受 CMV 感染之視網膜或 HRPE 細胞中，進而減少 CMV 病毒本身引發的免疫反應，並予以阻斷 CMV 病毒所引發視網膜 Apoptosis，最終達成免疫基因治療之目的。我們已將 NF-KB 之 p65、IAP、與 Bcl-2 等 cDNA 載體傳送入已受 CMV 感染之 HRPE 細胞中(*In Vitro* CMVR model)，同時配合加入(或不加入) Ganciclovir，以觀察因 CMV 造成的 RPE 細胞 Apoptosis 現象及 NF-KB、IAP、與 Bcl-2 之 Anti-Apoptosis 作用。實驗結果支持 NF-KB 基因載體轉染 RPE 細胞可大幅減少因 CMV 造成的 RPE 細胞 Apoptosis 現象。

其次，由於人類巨細胞病毒(Human cytomegalovirus)並不會感染其他種類動物(如

兔子、Rat、mice、pig)，因此目前尚未有人類巨細胞病毒感染之動物模型。本研究希望利用 SCID mice 不會對於人類 retina 或 HRPE 產生排斥作用之特性，希望將已受 CMV 感染之 HRPE 細胞移殖 SCID mice 眼球內，以建立 SCID-hu /CMV retinitis mice model。同時測試 NF-KB 之 p65、IAP、與 Bcl-2 等 Anti-Apoptosis 基因合併使用 Anti-CMV drug (Ganciclovir) 在 *in vivo* SCID-hu mice model 之治療效果，以期作為為來臨床治療之改進。

(二) 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 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。

(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 \pm 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 \pm 10.4 mM, n=7, pc0.05)。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 \pm 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。

(三) 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

後天免疫缺乏症候群自1981年在美國公佈迄今，已屆滿19年[1-4]。根據世界衛生組織估計，公元兩千年時，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[1-4]。國內自民國73年首例愛滋病發佈至今已有二千一百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[1-4]。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[1-4]。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%的愛滋病患會感染巨細胞病毒視網膜炎(Cytomegalovirus retinitis; CMV Retinitis) [1-4]。巨細胞病毒視網膜炎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[1-4]。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[1-4]，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。然而，愛滋病患者年齡多20-50歲之壯年期，如果因罹患巨細胞病毒視網膜炎而喪失視力，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[1-4]。故此，本研究目的在於早期診斷，早期治療，並且預防患眼再復發。如能確實發揮功能，將不僅能造福愛滋病患者，更將大幅減低對於愛滋病患者所需付出的社會照顧與醫療成本。

CMV Retinitis 之臨床病程與眼底表徵

愛滋病患者併發巨細胞病毒視網膜炎時，免疫淋巴球(CD4)總數常低於50/ul,且會先有明顯全身性病徵[1-4],例如不明原因長期發燒,體重減輕,或是以理學檢查上有淋巴腺腫大,白血球明顯下降,及合併其他機緣性感染等[1-4]。一般而言,通常在愛滋病臨床診斷後10至15個月,才會感染巨細胞病毒視網膜炎[1-4]。巨細胞病毒視網膜炎為一極具侵犯性之眼疾,如果不接受治療。病灶將會不斷地破壞正常視網膜組織,且常造成兩眼同時感染[1-4]。如果按照病灶在眼底出現的位置和外型來分。大致可分

(一) 出血性(hemorrhagic type): 典型眼底變化為大量視網膜出血、水腫、壞死、大量血管滲出物浸潤,視神經盤水腫等病變,眼底病灶外型類似”pizza pie”或是”crumbled cheese and ketchup”[1-4]—大量的出血散在廣泛性視網膜壞死區域上。(如病例一所示)。由於病灶造成嚴重的視網膜水腫及出血現象,涵蓋面積甚大,位置發生於眼球後極部(post. pole),且多已侵犯視網膜黃斑部和視神經盤,所以一旦發生,視力就已明顯減退[1-4]。

(二) 顆粒狀病灶(Granular lesion): 位於周邊視網膜,為一局部視網膜組織壞死變性之黃白色病灶,周圍常可見到具活動性的衛星狀病變,較少造成出血[1-4]。病灶所在的視網膜變乾萎縮,退化變薄,血管變細甚至產生血管白鞘化,及色素上皮細胞的退化,有時在這些變薄的視網膜會產生小的多孔破洞,而造成裂孔性視網膜剝離[1-4]。通常病人初期只有輕微的飛蚊症或是甚至沒有任何主訴,也不會感到疼痛視力和眼睛外觀

上皆無明顯變化。但是如果不治療,此局部病灶將會逐漸侵犯其它正常視網膜組織,大約半年的時間,病灶將漫延至黃斑部和視神經盤,而導致失明[1-4]。在臨床上不經由散大瞳孔和間接眼底鏡檢查(indirect ophthalmoscope),常會遺漏此顆粒狀病灶的存在。因此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。然而目前對於巨細胞病毒視網膜炎之確定臨床診斷,仍是以眼底檢查及其特殊的眼底表徵為依據 [1-4]。

巨細胞病毒總負荷量 (CMV virus load)

目前已有測定血液中巨細胞病毒總負荷量 (CMV virus load; quantitative-competitive PCR assay) 之檢查方式[1-4],用來當做監測CMV Retinitis之臨床感染標準(Maker)。我們將已罹患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,比較病患整個治療過程及預後之間變化,進而了解巨細胞病毒臨床病程與巨細胞病毒視網膜炎之間的相關性。同時希望經由長期追

蹤多位愛滋病患血液中CMV病毒總量之變化結果進一步作為預測愛滋病患罹患巨細胞病毒視網膜炎時之CMV病毒量閾值(Predicting Threshold Value),以便於篩檢出CMV Retinitis高危險群病患並給予預防性治療,故此將能大幅減低AIDS病患感染CMV Retinitis之罹患率,以避免因感染所造成患者失明之不幸。

巨細胞病毒視網膜炎之臨床治療

巨細胞病毒視網膜炎之治療藥物有ganciclovir和foscarnet和仍在評估當中的新藥5-HPMPC (cidofovir),由於衛生署尚未引進foscarnet等藥物,目前台灣地區對於CMV retinitis的治療仍以ganciclovir藥物為主。Ganciclovir是一含guanine結構之合成化合物,在細胞內轉換成三磷化合物才具抗CMV功能,有直接抑制DNA polymerase之作用,或為DNA polymerase之錯誤受質,對Herpes simplex virus、Epstein-Barr virus Varicella-zoster virus皆有抑制作用。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,並且不可停用,一直使用至死亡。由於Ganciclovir全身性給藥會造成抑制骨髓成長,白血球及淋巴球下降之副作用,故局部眼球內玻璃體注射(intravitreal injection),則為另一給藥方式,其初始劑量期給藥為每週兩次眼球內注射,每次劑量為400ug/0.1c.c,為期一個月,之後維持劑量為每週一次,每次劑量為400 ug/0.1c.c。本院目前則採初始劑量以靜脈注射型式,維持劑量則改為每週一次

400ug/0.1c.c的眼球內玻璃体注射。口服型式Ganciclovir主要適應症為對於不能從靜脈給藥之病患(如引起靜脈炎併發等),每天口服3000mg的Ganciclovir可用於維持劑量治療。雖然文獻報告Ganciclovir口服與靜脈注射型式治療之效果相當,但本院使用之結果,似乎口服Ganciclovir較不能有效控制病灶。Ganciclovir近99%之投予劑量以原型排除於尿中,故當腎功能不全時,必須依creatinine之清除率來調整投予劑量,當CLcr: 50-69ml/mim,原來劑量減半,當CLcr: 25-49ml/mim,每日劑量再減半,當CLcr: <25 ml/mim,則每天投予1.25mg/kg,而維持劑量之調整,皆同於上述。本院ganciclovir之使用甚為頻繁,無論在愛滋病患、器官移植病患或一般病患CMV感染之治療及預防,皆以ganciclovir為主,為避免過與不及之臨床療效及毒性反應,徹底了解國人使用ganciclovir之藥物動態學,做為給藥方式之依據,確有其實際應用之必要,在此先以感染CMV之愛滋病患為研究對象進行探討分析。

研究巨細胞病毒抗藥性病毒株之基因表現型與愛滋病患者 HIV 病毒反昇之相關性

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 Ganciclovir, 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 (JBC. 1992., J.V. 1994)。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 (New England Journal of Medicine 1995)。有鑑於此,本計劃希望能藉由追蹤 AIDS 病患使用 HAART 之前後,追蹤 HIV 病毒量變化與 CD4 之同時,能夠監測 CMV 病毒總量之變化,配合眼底視網膜之追蹤檢查,以評估何者為高危險群並建立資料庫,分析出罹患 CMV Retinitis 之危險臨界閥值(HIV & CMV viral load count 及 CD4 count)。同時我們將針對這些高危險群與罹患 CMV Retinitis 之 AIDS 病人血液中 CMV 之 Genotyping 之分析,以了解是否有新的抗藥病毒株產生?而對於 CMV Genotype 之分析,我們則針對臨床上較易變異之基因區域-CMV UL97, UL54, 以 CMV AD169 strain 作為比對基礎(我們已先前建立 CMV AD169 於 HEL 細胞株中之 cDNA gene bank)。

眼睛—免疫優勢區: Fas/Fas Ligand 系統在眼睛免疫優勢中的重要性

Baker 與 Billingham 於 1977 年提出正常中樞神經系統維持一種特有免疫屏障,而將全身性免疫系統隔絕於外,其目的為避免因一般非特異性發炎反應及細胞免疫浸潤效應而造成神經組織之正常功能喪失(bystander damage)。此種免疫優勢(Immune Privilege)之特性近年來也發現在眼睛(尤其在視網膜)同樣具有此種功能。在以往對於眼睛維持此種特殊環境的主因有:(1) 血管眼部屏障(Blood-ocular barrier),為組織解剖上之特殊結構,類似血腦屏障(Blood-Brain barrier)。(2) 特殊之過濾器官,如眼睛前房(Trabecular

Meshwork)來過濾調節排出眼內液體。(3) 眼前房液及玻璃體中含有 immun-suppressive cytokine, 如 TGF- β 、Neuropeptide 等。(4) 在虹膜、睫狀體、是網膜中有特化之 Bone marrow-derived dendritic cell and macrophage。(5)與脾臟相關之 eye-derived antigenic signals。(6)特殊之 MHC class I and II 之抗原表達及抗原呈現系統。(7)近年來才為人知的 Fas/Fas Ligand 系統 (1995, Science)。當人體對於面臨外來病原入侵時, 常以引發細胞免疫力及發炎反應, 來減低入侵者所可能造成的破壞。但這一連串因抵禦外來病原及清除入侵者所產生之自體反應的同時, 也常引發部份非特異免疫反應而使宿主自體器官受到損傷。而這些自體免疫 (Autoimmunity) 所造成的傷害, 多半能為宿主本體所能包容 (Tolerance), 因而不會造成組織永久性破壞。而在人體某些重要器官, 如眼睛、神經中樞、睪丸、卵巢等, 為了維持正常生理功能, 因此不同於人體大部分器官能包容及修復這些因自體免疫之發炎反應所導致的生理性傷害, 因為這些免疫反應所遺留下來的併發病變, 對於眼睛或神經中樞等器官會造成不可挽救的功能性喪失, 其後果及影響之廣泛是可想而知的。所幸在人類百萬年演化過程當中, 這些特殊的器官 (如眼睛、神經中樞睪丸、卵巢等) 為了因應上述之自體免疫損害併發症, 而發展具有免疫優勢 (Immune Privilege) 的特質。

Ferguson & Griffith (Science 1995; Immunity 1996) 等人實驗發現維持眼內免疫優勢區 (Immune Privilege site) 的主要原因為眼睛具備 Fas/Fas ligand (CD95 Ligand) 系統的存在。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 (Cell programmed death or Apoptosis) 的反應, 如 thymic deletion activity 等重要自體免疫調節功能。Fas Ligand 為一種 Type II membrane protein, 屬於 tumor necrosis factor (TNF)/ Nerve growth factor (NGF) family。而眼睛內滿佈 Fas Ligand, 包括在角膜、視網膜、虹膜、睫狀體、視網膜、及視網膜色素上皮細胞。而當眼外來物進入眼內時, 如發炎細胞, lymphocyte CD4/CD8、T cell、B cell 等...。因這些細胞表面皆帶有 Fas (type I membrane protein of TNF/NGF receptor family) 會為眼內原來具備之 Fas Ligand 所辨認並結合。此時眼內 Fas Ligand 會活化外來細胞膜上 Fas 所屬的 Death Domain, 而造成帶有 Fas 的外來發炎細胞引發細胞 Apoptosis。此一精巧的免疫設計使得眼睛能避免發炎反應所造成的攻擊及組織損傷, 而能繼續維持正常器官功能及生理完整性。

建立巨細胞病毒視網膜炎之體外模型

由於眼睛本身具有免疫優勢 (Immune privilege) 之器官, 如角膜、虹彩色素細胞、視網膜神經細胞及上皮細胞皆具有免疫功能, 及組織結構上具有視網膜血管阻隔 (Retinal blood vessel barrier), 加上視網膜是患者身上唯一內眼可見血管及神經組織之病變等特徵, 所以對於研究 CMV 之感染, 及 CMV Retinitis 其致病機轉則更顯重要。然而對於 CMV 病毒在巨細胞病毒視網膜炎的感染發展成因及 CMV 病毒是如何在視網膜 (Retina) 和眼睛內形成病毒複製循環, 以及 CMV 病毒又如何能在視網膜傳遞 (Cell to cell), 這些造成愛滋病患嚴重視力喪失 -- CMV Retinitis 之疾病重要致病機轉, 至今仍不得而知。

我們成功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，同時本身還具有免疫保護，及 Cytokine 分泌等重要抵禦外來者入侵 (如 CMV) 之重要功能。可想而知，HRPE cell 自然是病毒感染時之重要攻擊目標，及在病毒複製和病毒傳遞中扮演舉足輕重之角色。目前我們已將 CMV AD169 病毒成功感染 HRPE 細胞 (Permissive infection)，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。

然而我們在研究過程中發現，CMV 雖可感染 HRPE 細胞，但在 HRPE 細胞之 CMV 病毒形成複製與一般 Human Fibroblast 之 CMV 感染，有截然不同之表現：

(1) Human Fibroblast cell 在 CMV multiplicities of infection (MOI)=1 的狀況下感染，一般而言 CMV IE protein 會在 8-12 小時出現，而 CMV Late protein 在 72 小時左右可出現。

(2) 而反觀 HRPE 細胞，同樣 CMV MOI=1 時感染，我們發現 CMV IE protein 在 10 天左右出現 (Prolonged period)，而 CMV early protein 及 Late protein 則在 10-16 天出現，且 CMV IE protein 表現量較低，此與一般 CMV 病毒在 Fibroblast (CMV IE protein 量極高：大於 90% CPE 皆表現) 完全不同。

(3) 為何同樣皆可感染 CMV，HRPE 細胞卻明顯將 Infection time course 延長 (1-7 天內看不見任何 CMV IE, E, L protein 表現; MOI=1)，且使 CMV IE protein 在 HRPE 細胞中維持較低表現量。

這樣十分又趣的發現，不得不讓我們與愛滋病患病毒視網膜炎臨床表徵有一聯想與推論：在臨床報告指出 CMV 在血液中感染複製造成 CMV Viremia，其時間長短與病毒量高低時常和 CMV Retinitis 之發生時間不相關 (Dissociation)，使得 CMV Retinitis 之早期偵測與早期預防往往不可而得或高不可測。而根據此感染模型之結果，我們的發現或許可解釋為何在臨床上：CMV 在血液中感染複製之感染病程與 CMV Retinitis 之臨床發生時間不相符合一致的主要原因，可能就與 CMV 在視網膜 HRPE 細胞感染複製時間延長 (prolonged replication periods) 有關。

而造成 CMV 在 HRPE 細胞感染形式與其它種 fibroblast 不同的原因，且使 CMV IE protein 在 HRPE 細胞中維持較低表現量，我們推測至少有下列二種原因：

(1) 受制於細胞內因子 (Cellular factor)，如 NFkB 等影響，而使 CMV 活化複製時，major IE promoter (MIEP)，IE 及 IE2 之表現改變或受阻，延長 CMV 複製時間。此外已有報告指出 CMV MIEP 往往決定了 CMV 感染時 nonpermissive 及 permissive 之重要因子。

(2) 而造成 CMV IE protein 之低表現量的另一種可能，即是 CMV 在 HRPE 細胞感染中，其活化路徑可能不像在 Fibroblast 中所表現的基因一致，也就是說在 HRPE 細胞可能有其他取代性路徑 (Alternative pathway)，如 CMV US (Unite short) pathway 之 gene 表現有關，故我們在感染 1-7 天內完成測不到傳統主要路徑 (Classic pathway) 中的 CMV IE, E, L protein 表現，而在往後即使有 CMV IE 的表現 (10-29 天中)，但 IE

protein 依舊較低，是不是在早期即有其他 Alternative pathway CMV US 中的 gene 表現的存在，是值得再深入研究的問題。

病毒免疫規避效應

病毒為了長期潛伏於人體宿主細胞中，並且能躲避宿主免疫系統之偵測與攻擊，而演化出特定之病毒免疫規避 (Virus Evasion) 效應，而一般常見到的策略有 (1) 阻止病毒抗原體被宿主細胞呈現 (presentation) 給全身性免疫細胞，如 block MHC class I & II 之抗原呈現路徑 (antigen presentation)。(2) 利用蛋白質酵解 (Proteolysis) 作用如干擾並控制利用宿主細胞質中之蛋白質路徑。(3) 直接摧毀 MHC class I & II 系統。(4) 干擾並利用病毒進入宿主細胞內吞路徑 (Endocytic Pathway)。(5) 病毒演化出攜帶 (Encode) 特殊細胞激素 (Cytokine) 用以干擾和躲避免疫系統偵測與攻擊。(6) 病毒利用進入控制宿主細胞複製週期中 (Cell replication cell)，並調節宿主細胞生長及抑制計劃性死亡 (Apoptosis)，以宿主調控細胞週期及存活而做出對本身病毒有利之生長環境。而在人體內免疫優勢區中，特別是眼睛是眼睛視網膜內，巨細胞病毒之複製感染與局部及全身性免疫細胞之互動為何？而局部及全身性免疫系統對 CMV 病毒之清除為何？而 CMV 在眼免疫優勢區中是否有特殊免疫反應或發現出新的規避路徑？我們希望經由深入對於 CMV Retinitis 之致病機轉之了解和 CMV 病毒感染視網膜之特殊免疫發炎反應和規避路徑之研究。能在未來的臨床治療上配合現在已有之抗 CMV 病毒之治療藥物 (Ganciclovir、Foscarnet 等)，並運用已知 CMV 病毒致病機制及免疫規避效應之了解以及分子生物技術及基因體研究，所發展出的針對病毒免疫效應之藥物和基因療法。來家成治療患者眼部感染。對愛滋病患合併 CMV Retinitis。

在臨床治療上之主要難題，在於 CMV 病毒本身之再復發性及視網膜壞死 (Retinal necrotizing) 造成快速擴散這兩者皆與 CMV 病毒本身基因體之特性如長潛伏週期其特有之免疫規避路徑有關。故此，如果要在臨床治療上有所突破，就必需在抗 CMV 病毒藥物外有新的發展，因為目前之抗 CMV 病毒藥物如 Ganciclovir、Foscarnet、Ciclofovir 都只是抑制 CMV 病毒快速繁殖、複製，而皆無法清除 CMV 病毒殘存之病毒 DNA，而這些在視網膜神經細胞內的 CMV DNA 則將是造成日後 CMV retinitis 之禍首。如何能有效清除 CMV 病毒？或是使 CMV 病毒無法潛伏再活化復發？抑或是增強免疫系統對 CMV 病毒體之偵測及攻擊？其根本解決則在於對於 CMV retinitis 之致病機轉之了解及 CMV 病毒可能所利用之免疫規避路徑有所發現，才能達到臨床治療效果，保存並挽救患者視力健康。

本計劃不僅希望愛滋病病患在抗 CMV 病毒之臨床上有所突破，而減少機緣性感染，更希望因 CMV retinitis 能受到有效治療而大大提升患者生活品質。我們最終目的 -- 希望藉由此 CMV Retinitis model 之建立，發現決定 CMV 感染眼部視網膜之途徑與決定活化因子，及 CMV gene 如何表現，並利用此發現結果應用於愛滋病患身上，希望能配合經由血液中 CMV gene 的表現，和比較病理活體切片結果之相一性，即 CMV - Hematopoietic cell - HRPE cell 之互動模式，用以推測 CMV Retinitis 發生之可能性，

而建立一快速，正確安全的早期檢測系統，在對於 CMV Retinitis 尚未或即將要形成之前，即能偵測診斷並有效治療。

(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. 本研究計畫將針對因 CMV 病毒活化 FasL 所引發視網膜細胞 Apoptosis 之致病路

徑，希望利用 Anti-Apoptosis 基因(如 NF-KB 之 p65、IAP (the inhibition of apoptosis)、與 Bcl-2 等)之特色傳送入已受 CMV 感染之視網膜或 HRPE 細胞中，進而減少 CMV 病毒本身引發的免疫反應，並予以阻斷 CMV 病毒所引發視網膜 Apoptosis，最終達成免疫基因治療之目的。我們已將 NF-KB 之 p65、IAP、與 Bcl-2 等 cDNA 載體傳送入已受 CMV 感染之 HRPE 細胞中(*In Vitro* CMVR model)，同時配合加入(或不加入) Ganciclovir，以觀察因 CMV 造成的 RPE 細胞 Apoptosis 現象及 NF-KB、IAP、與 Bcl-2 之 Anti-Apoptosis 作用。實驗結果支持 NF-KB 基因載體轉染 RPE 細胞可大幅減少因 CMV 造成的 RPE 細胞 Apoptosis 現象。

2. 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Ganciclovir, 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。
3. 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. 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。
5. 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。

6. 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. Mills JM: Serious cytomegalovirus disease in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Ann Intern Med* 1988, 108: 585-594.
7. Breton G, Cremieux AC: Treatment of cytomegalovirus infections in HIV infection. *Presse Med* 1996, 25:1967-1973.
8. Jacobson MA, Zegans M, Pavan PR, et al: Cytomegalovirus retinitis after initiation of highly active antiviral therapy. *Lancet* 1997, 349: 1443-1445.
9. Drew WL, Ives D, Lalezari J, et al: Oral ganciclovir as maintenance treatment for cytomegalovirus retinitis in patients with AIDS. *N Engl J Med* 1995, 333: 615-20.
10. Jabs DA, Green WR, Fox R, Polk BF, Bartlett JG: Ocular manifestations of acquired immune deficiency syndrome. *Ophthalmology* 1989, 96: 1092-1099.
11. Hansen KK, Ricksten A, Hofmann B, Norrild B, Olofsson S, Mathiesen L: Detection of cytomegalovirus DNA in serum correlates with clinical cytomegalovirus retinitis in AIDS. *J Infect Dis* 1994, 170:1271-1274.
12. Shibata D, Martin WJ, Appleman MD, Causey DM, Leedom JM, Arnheim N: Detection of cytomegalovirus DNA in peripheral blood of patients infected with human immunodeficiency virus. *J Infect*

Dis 1988, 158: 1185-1192.

13. Mitchell SM, Fox JD, Tedder RS, Gazzard BG, Lightman S: Vitreous fluid sampling and viral genome detection for the diagnosis of viral retinitis in patients with AIDS. *J Med Virol* 1994, 43: 336-340.
14. Gonzalez CR, Wiley CA, Arevalo JF, et al: Polymerase chain reaction detection of cytomegalovirus and human immunodeficiency virus-1 in the retina of patients with acquired immune deficiency syndrome with and without cotton-wool spots. *Retina* 1996, 16: 305-311.
15. Faber DW, Wiley CA, Lynn GB, Gross J, Freeman WR. Role of HIV and CMV in the pathogenesis of retinitis and retinal vasculopathy in AIDS patients. *Inves Ophthal Visual Science*. 1992,33(8): 2345-53.
16. Glasgow BJ, Weisberger AK. A quantitative and cartographic study of retinal microvasculopathy in AIDS. *Am J Ophthal* 1994;118:46-56.
17. Glasgow BJ. Evidence for breaches of the retinal vasculature in AIDS angiopathy. *Ophthalmology* 1997,104(5):753-60.
18. Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR, Ferguson TA. Fas Ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* 1995;1189-92.
19. Ferguson TA, Griffith TS. Cell death and the immune response: a lesson from the privileged. *J of Clinical Immunology* 1997;17(1):1-10.
20. Ferguson TA, Griffith TS. A vision of cell death: insight into immune privilege. *Immunological reviews* 1997;156:167-84.
21. Reyburn HT, et al. The class I MHC homologue of human cytomegalovirus inhibits attack by nature killer cell. *Nature* 1997 386:514-7.
22. Farrel HE, et al. Inhibition of natural killer cells by a cytomegalovirus MHC class I homologue in vivo. *Nature* 386:510-4.
23. Jones TR, et al. Human cytomegalovirus US2 destabilizes major histocompatibility complex class I heavy chains. *J Virol*. 1997;71:2970-9.
24. Steimle VCA, et al. Regulation of MHC class II expression by interferon- γ mediated by the transactivator gene CIITA. *Science* 1994;265:106-9.
25. Bodaghi B. Role of IFN- γ -induced indoleamine 2,3 dioxygenase and inducible nitric oxide synthase in the replication of human cytomegalovirus in retinal pigment epithelial cells. *J Immunol* 1999;162:957-963.
26. Chinnaiyan AM, Dixit VM. The cell-death mechanism. *Curr Biol* 1996;6:555-558.
27. Alnemri ES. Mammalian cell death proteases - a family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases. *J Cell Biochem* 1995;64:33-39.
28. Vaux DL, Korsmeyer SJ. Cell death in development. *Cell* 1996;96:245-249.
29. Chan CC, Matteson DM, Li Q, Whitcup SM. Apoptosis in patients with posterior uveitis. *Arch Ophthalmol* 1997;115:1559-1563.
30. Zhang HG. Antigen presenting cells expressing Fas ligand down-medulate chronic inflammatory disease in Fas ligand-deficient mice. *J Clin Invest* 2000;105:813-821.
31. Martin F. Apoptosis mediated by fas but not tumor necrosis factor receptor 1 prevents chronic disease in mice infected with murine cytomegalovirus. *J Clin Invest* 1998;102:1431-1436.

32. Takehiko M, Kiyoshi A, Kazuo T, Yasuo I, Yasuhiro K. Fas-mediated apoptosis of the hematopoietic progenitor cells in mice infected with murine cytomegalovirus. *Blood* 1997;89:3565-3570.
33. Service RF. Microchip arrays put DNA on the spot. *Science* 282, 396-399, 1998.
34. Ermolaeva O, Rastogi M, Pruitt KD, *et al.* (Data management and analysis for gene expression arrays. *Nature Genet.* 20, 19-23, 1998.
35. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, *et al.* Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nature Med.* 4, 844-847, 1998.
36. Heller RA, Schena M, Chai A, *et al.* Discovery and analysis of inflammatory disease-related genes using cDNA microarrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 2150-2155 1997.
37. Silzel JW, Cercek B, Dodson C, *et al.* Mass-sensing, multianalyte microarray immunoassay with imaging detection. *Clinical Chem.* 44, 2036-2043, 1998.
38. Bertucci, K. Bernard, B. Loroid, YC. Sensitivity issues in DNA array-based expression measurements and performance of nylon microarrays for small samples. *Human Mol. Genetics* 8: 1715-1722, 1999.
39. Xu XN *et al.* Virus infection: Escape, Resistance, and Counterattack. *Immunity* 15;867-70, 2001.
40. Zhang M, Atherton S. Apoptosis in the retina during MCNV retinitis in immunosuppressed BALB/c mice. *J Clin Virol* 25;137, 2002.
41. Mocarsji ES. Immunomodulation by cytomegalovirus: manipulative strategies beyond evasion. *Trends Microbiol* 10(7):332-1, 2002.
42. Browne EP, *et al.* Altered cellular mRNA levels in human cytomegalovirus-infected fibroblasts: viral block to the accumulation of antiviral mRNAs. *J Virology* 75(24); 12319-12330, 2001.
43. 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.
44. 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.
45. Skaletskaya A, Laura MB, Chittenden T, McCormick AL, Morcarski ES, Goldmacher VS. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98:7829-7834.
46. 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.
47. 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.
48. 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，**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：0968068497 / 28263485

傳真：(02)28748647

E-mail：shchiou@vghtpe.gov.tw

九十三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：DOH93-DC-1020

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. Ophthalmologica 2003;217: 298-301 .	期刊	✓
3	Wen-Ming Hsu, et al. The HIV RNA Levels of Plasma and Ocular Fluids in AIDS Patients with Ophthalmic Infections. Ophthalmologica 2004;218:328-332.	期刊	✓
4	Wen-Ming Hsu, et al. Detection of HIV RNA levels in intraocular and cerebrospinal fluids in patients with AIDS-related cryptococcosis.. Ophthalmologica (in press)	期刊	✓
5			
6			
7			
8			
9			
10			

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

九十三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(第三年)

主持人：許紋銘 計畫編號：DOH93-DC-1020

1. 計畫之新發現或新發明

(1) 在臨床的觀察中發現，其中高達 20% 至 45% 愛滋病患者會罹患巨細胞病毒視網膜炎 CMV Retinitis。CMV retinitis 是一種極具侵犯性及破壞性的眼部疾病，部份病患早期不會有明顯視力變化，但如果不能及時診斷並給予治療，或是中斷治療，最後皆往往造成患者失明。先前實驗我們利用 *in situ* hybridization 技術來偵測 Fas ligand (FasL) mRNA，檢測人類視網膜組織時發現 FasL 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、外核層，以及人類視網膜色素上皮細胞。但對於檢測感染 CMV Retinitis 的愛滋病患眼睛病灶區內之 FasL mRNA 表現時，我們發現在 CMV 感染視網膜之病灶區中 FasL 訊號明顯增加。同時利用 TUNEL staining 結果發現在視網膜病灶區中有大量細胞計畫性死亡(apoptosis)之現象，此外我們已將 CMV 病毒感染視網膜色素上皮(HRPE)細胞，模擬 CMV 在眼內視網膜之致病機轉及免疫反應改變。實驗證明 CMV immediate early gene 2 (IE2) 可以活化 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。實驗結果支持 CMV 病毒可利用活化 FasL 表達而演化出特定病毒免疫規避效應，CMV 病毒感染視網膜不但能躲避宿主免疫系統偵測甚至攻擊之，並做出對本身病毒有利之生長環境(Chiou & Hsu et al. *J Immunology* 2001 167:4098-4103; *Ophthalmol Res* 2002;34:77-82)。而其視網膜因局部及全身性免疫自我之防護也破壞殆盡，病人終究也喪失寶貴視覺功能。因此我們所做的研究顯示，CMV 病毒對 retina 所造成的破壞，部份直接的原因來自 CMV 病毒產物對周邊細胞所造成之 apoptosis; 抑制細胞 apoptosis (anti-apoptosis pathway) 並配合現有之臨床藥物(如 Ganciclovir)施用，是增進病人癒後的一條可行之途徑。目前研究顯示，已知 NFkB 在 Anti-apoptosis pathway 之訊號傳遞(Signal Transduction)中扮演重要之角色，特別是 p65(為 NFkB 之 Subunit)扮調控樞紐。而期其他重要 anti-apoptosis 基因為 Bcl-2 與 IAP 皆已有文獻報告明確指出可阻止 apoptosis pathway 中 Caspase 8 及 Caspase 3 之活化。進而達成抗細胞凋亡(anti-apoptosis)與減緩 cell Death 之功能。

(2) 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。

(3) 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, pc0.05)。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。

3. 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。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。

九十三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(第三年)

主持人：許紋銘 計畫編號：DOH93-DC-1020

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	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。

參與九十三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(第三年)

主持人：許紋銘 計畫編號：DOH93-DC-1020

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。