

激により、マクロファージ、線維芽細胞、血管内皮細胞、癌細胞などに誘導され、炎症のみならず細胞増殖とアポトーシス、血管新生、骨吸収などに関与する。1990年代後半以降、COX阻害剤である非ステロイド消炎鎮痛剤(NSAIDs)の一つアスピリンを常用している患者に大腸癌が有意に減少すること、また既に大腸癌に罹った患者でもNSAIDs服用が単に癌性疼痛を緩和するのみならず癌自体の増殖や転移を抑制することが報告された<sup>1)</sup>。

さらに1990年代後半には大腸癌のみならず、胃癌<sup>2)</sup>や乳癌、肺癌<sup>3)</sup>、悪性黒色腫<sup>4)</sup>、頭頸部癌など多くのヒト悪性腫瘍においてCOX-2発現が亢進していることが報告された。卵巣癌でも2002年にDenkertらはCOX-2発現が独立した予後因子であるという報告をしており<sup>5)</sup>、さらに複数の施設よりCOX-2高発現症例は陰性あるいは低発現症例に比較してp53の突然変異が多く予後が不良であること<sup>6,7)</sup>が報告されている。

卵巣癌に限らずCOX-2を発現する腫瘍の悪性度が高い理由として、血管新生の誘導やアポトーシスの抑制、細胞増殖分画の増加などが関与すると推定されている。また、COX-2によって誘導されるprostanoids、特にPGE<sub>2</sub>は強い細胞性免疫抑制物質である。非ウイルス性のヒトの自然発生腫瘍が免疫原性を有するや否は長年論議されてきた問題であるが、近年強弱はあるにせよいずれの腫瘍も何らかの腫瘍関連抗原を有すると考えられている。卵巣癌においては複数の腫瘍関連抗原を認識する細胞傷害性T細胞が存在し、予後と相関することが報告され<sup>8)</sup>、2003年、Zhangらは<sup>9)</sup>卵巣癌腫瘍内に浸潤するリンパ球(TIL)の程度が独立した予後因子であることを報告した。一方この報告には反論があり<sup>10)</sup>未だに明確な結論は出ていない。その理由として上皮性卵巣腫瘍でも粘液性腫瘍と漿液性腫瘍、淡明細胞癌でおのおの生物学的性状が異なること、進行期や化学療法感受性によるバイアスを受けることが想定される。

本研究ではCOX-2発現の生物学的意義を解析するため、比較的均一な集団である未治療の卵巣原発漿液性腺癌においてCOX-2と免疫組織学的マーカー発現ならびに局所における免疫応答の指標としてTILの程度を比較検討した。

## I. 対象ならびに方法

### 1. 卵巣腫瘍患者

1990年から2002年までに日本大学医学部板橋病院において手術を受けた卵巣腫瘍患者44例を対象とした。すなわち病理組織学的に漿液性腺癌と診断された30例(FIGO分類I期9例、II期1例、III期14例、IV期6例)ならびに、対照として漿液性腺腫14例を免疫組織学的検討に供した。腹膜や大網など卵巣以外の原発病巣が疑われる患者、術前にアスピリンやインドメサシンなどのNSAIDsを継続的に内服していないことをカルテ上で確

認した。すべての患者からは免疫染色による病理組織標本の解析と臨床的な予後を解析する研究について同意を得た。

### 2. 免疫組織化学

ホルマリン固定、パラフィン包埋した材料から切片(3-4 $\mu$ m)を作成し、免疫染色はavidin-biotin peroxidase complex(ABC)法で行った。ただし、Apoptosis染色はTUNEL法(TAKARA In situ Apoptosis Detection Kit, MK500, 宝酒造 東京)を用いた。使用した抗体は抗COX-2(H-62)抗体(SC-7951,1:100 Santa Cruz Biochemistry Inc. Santa Cruz, CA)、抗8-OHdG抗体(1:20, 日研ザイル株式会社日本老化制御研究所, 静岡)、抗Ki-67抗体(N-1633, 1:10, ダコ・ジャパン, 東京)である。標本は脱パラフィンした後、0.3%過酸化水素にて内因性ペルオキシダーゼを不活性化した。一次抗体として上記の抗COX-2抗体、抗8-OHdG抗体、抗Ki-67抗体を室温にて1時間反応させた。二次抗体はABC KIT Elite(フナコシ)付属のビオチン標識抗マウス免疫グロブリン-ヤギ抗体および、ビオチン標識抗ウサギ免疫グロブリン-ヤギ抗体を使用した(室温30分)。三次染色はElite(フナコシ)キットを用いて室温30分反応させ、DAB(和光純薬, 東京)で発色した。抗原賦活法として、抗COX-2抗体については、10mmolクエン酸バッファー(pH6.0)にて5分間のマイクロウェーブ処理の後0.5%プロテアーゼ処理(37°C15分)を行った。Ki-67の検出においては、10mmolクエン酸バッファー(pH6.0)にて温浴処理を行った(98°C20分)。抗8-OHdG抗体に関しては、0.5%プロテアーゼ処理(37°C15分)のみを行った。非特異的反応に対するブロッキングのため、市販のブロッキングバッファー(フナコシ)処理もしくは5%スキムミルク中に室温15分処理した。核染のため、抗COX-2抗体、抗Ki-67抗体では、ヘマトキシリン染色を行った。

### 3. 染色所見の評価と統計処理

TUNEL染色あるいはKi-67に対する免疫染色により核が明瞭に染色された細胞を各々apoptosis細胞、Ki-67陽性細胞(増殖細胞)とし、異なった100倍4視野における染色核/染色核+非染色核をパーセントで表記した(Fig. 1, 2)。

COX-2, 8-OHdG染色性はErkinhaimoらの報告<sup>11)</sup>に準じて染色直後に所見を2名以上で評価し、以下のように階級づけた。卵巣癌、腺腫ともに各標本の腫瘍部分において殆どすべての細胞が濃厚に染色されているものを3(strong)とし、半数以上の細胞が染色されているものを2(medium)、半数以下の細胞が染色されているものを1(weak)、全くもしくは殆ど染色細胞が見られないものを0(negative)と階級付けした(Fig. 3, 4)。TILの程度についてはZhangらの論文に準じて、高倍率で1視野に19個以上のリンパ球をみるものを3(strong)とし、6-19

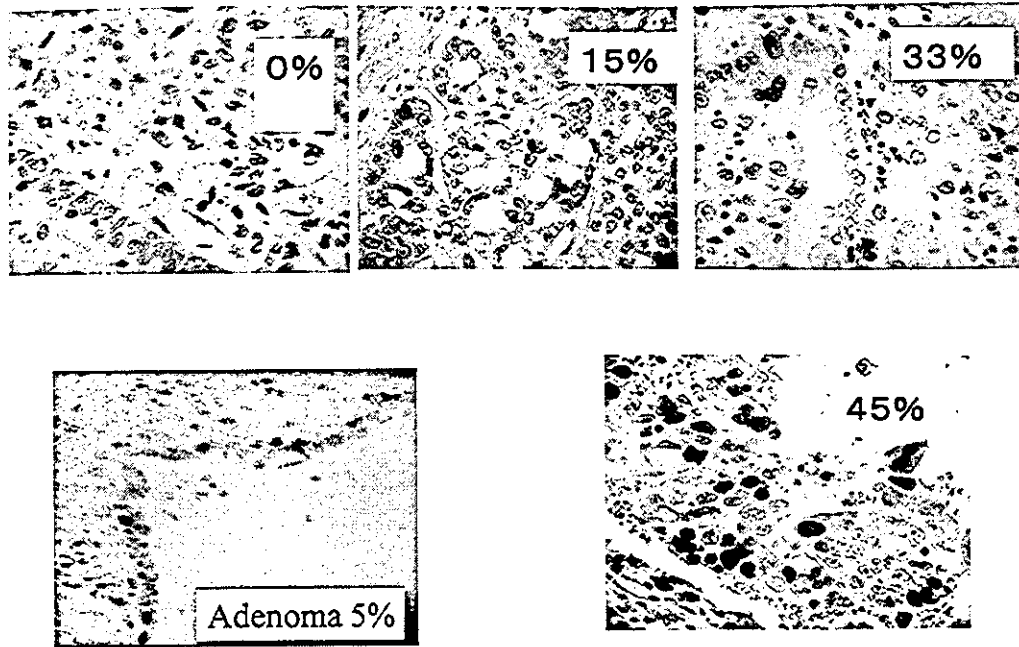


Fig. 1 Expression of Ki-67 protein in ovarian carcinomas as well as a case of adenoma investigated by immunohistochemistry ( $\times 200$ ). Ki-67 was stained exclusively in nuclei. Figures show no (0%), scanty (15%) and frequent (33% and 45%) staining. Of interest, several cells in adenoma showed positive staining (5%).

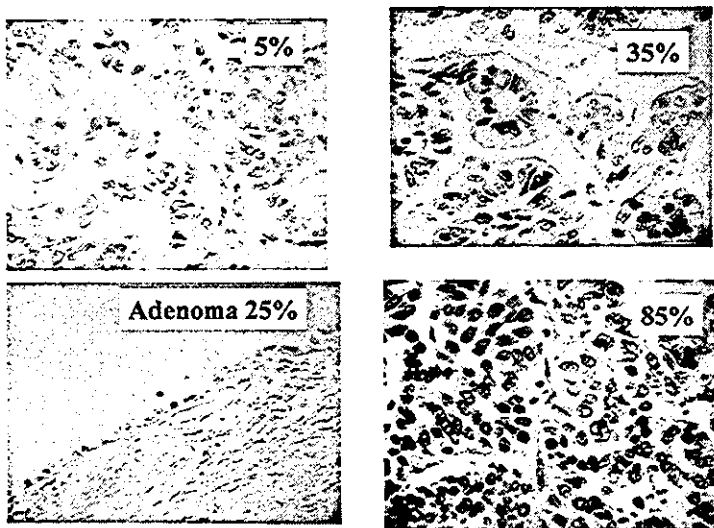


Fig. 2 Apoptotic cells in ovarian carcinomas and a case of adenoma detected with TUNEL stain ( $\times 200$ ). Cellular DNA with extensive strand breaks was labeled with biotin-dUTP and terminal transferase. Representative cases of ovarian carcinomas with scanty (less than 5%), moderate (35%) and frequent (85%) staining and a case of adenoma (20%).

個のリンパ球をみるものを 2 (medium), 5 個以下を 1 (weak), 全くもしくは殆どリンパ球浸潤が見られないものを 0 (negative) と階級づけした (Fig. 5).

## II. 統計処理

Apoptosis 細胞率, Ki-67 陽性の増殖細胞率などの実測値は平均値  $\pm$  標準偏差 (SD) で表した。COX-2 染色性, 8-OHdG 染色性, TIL の程度は上記の基準に従って 0~3 に階級づけた。染色所見の比較は Wilcoxon 法を用い,  $p < 0.05$  を有意差ありと判定した。

## III. 結果

### 1. 免疫組織化学的所見

#### 1) COX-2

腺腫において, COX-2 は 14 例中 8 例に陽性所見を認め (陽性 1 例, 弱陽性 7 例), 漿液性腺癌においては強陽性 7 例, 陽性 12 例, 弱陽性 8 例, 陰性 3 例であり FIGO 分類による進行期との相関は認めなかった。しかし, Kaplan Meier 法による予後解析では COX-2 染色が陰性の患者は陽性の患者に対して予後が良好であった (Fig. 6)。

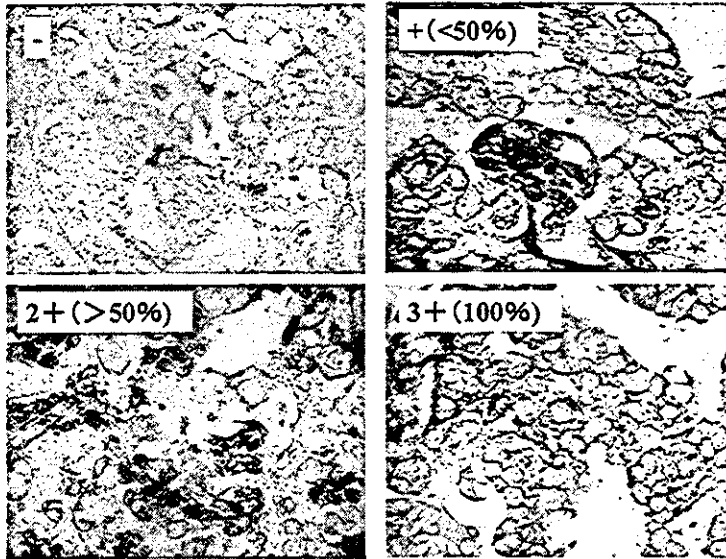


Fig. 3 Expression of COX-2 protein in ovarian carcinomas investigated by immunohistochemistry ( $\times 200$ ). COX-2 protein was stained exclusively in cytoplasm. Tumours without remarkable staining, tumours with less than 50% staining, tumours with 50% or more staining and tumours with all cells stained are designated as 0, 1+, 2+ and 3+ respectively.

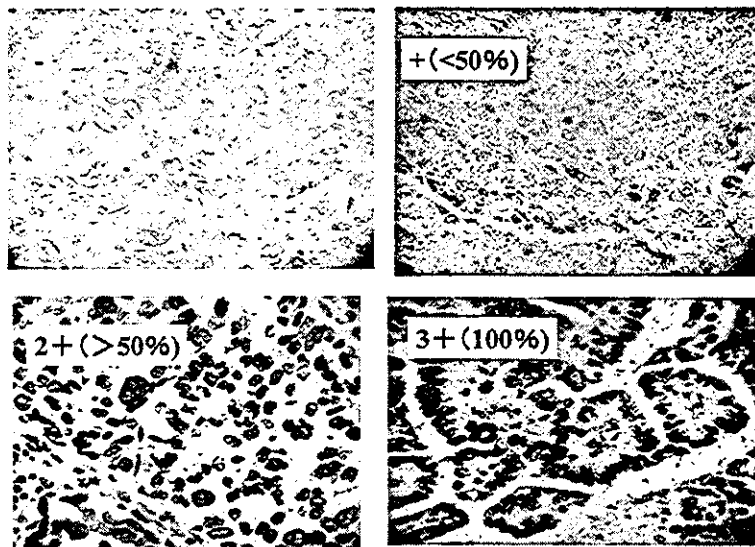


Fig. 4 Expression of 8-OHdG protein in ovarian carcinomas investigated by immunohistochemistry ( $\times 200$ ). 8-OHdG protein was stained exclusively in nuclei. Tumours without remarkable staining, tumours with less than 50% staining, tumours with 50% or more staining and tumours with all cells stained are designated as 0, 1+, 2+ and 3+ respectively.

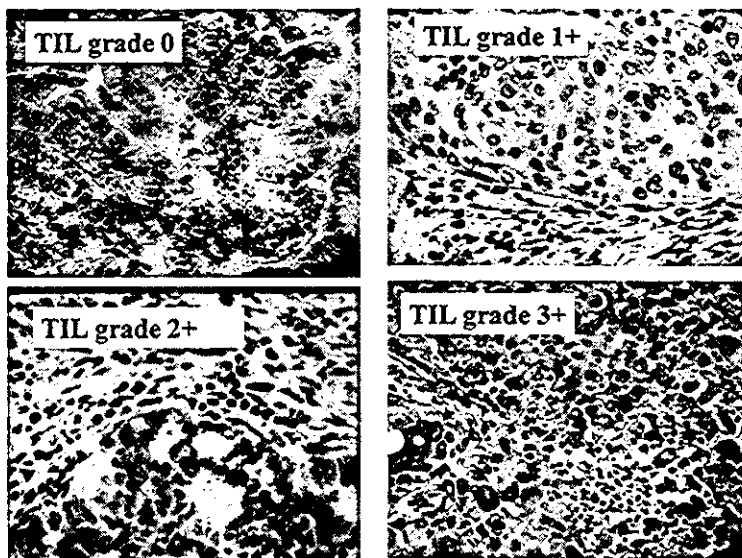


Fig. 5 Hematoxylin-eosin (HE) staining of ovarian carcinoma tissue samples with no, scanty (less than 5 in high power field), moderate (6–19), frequent (more than 20) intratumoral lymphocyte infiltration.

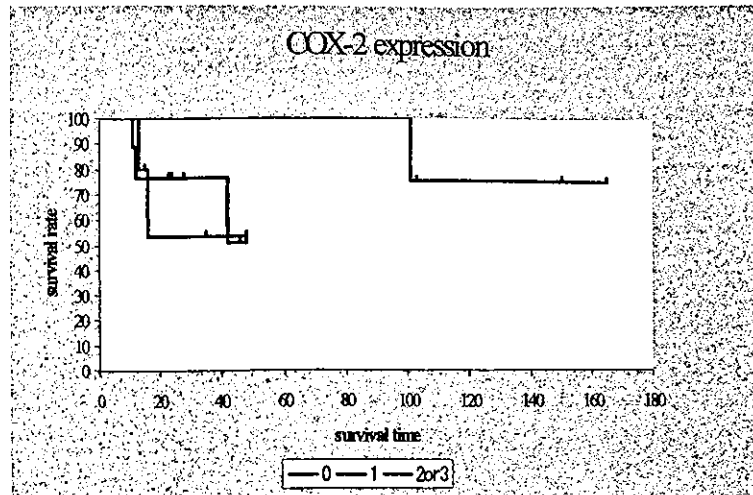


Fig. 6 Kaplan-Meier analysis of carcinoma patients. Primary surgical specimens with negative or low COX-2 immunostaining (red line) showed longer survival compared with medium (blue line) and strong (green line) staining.

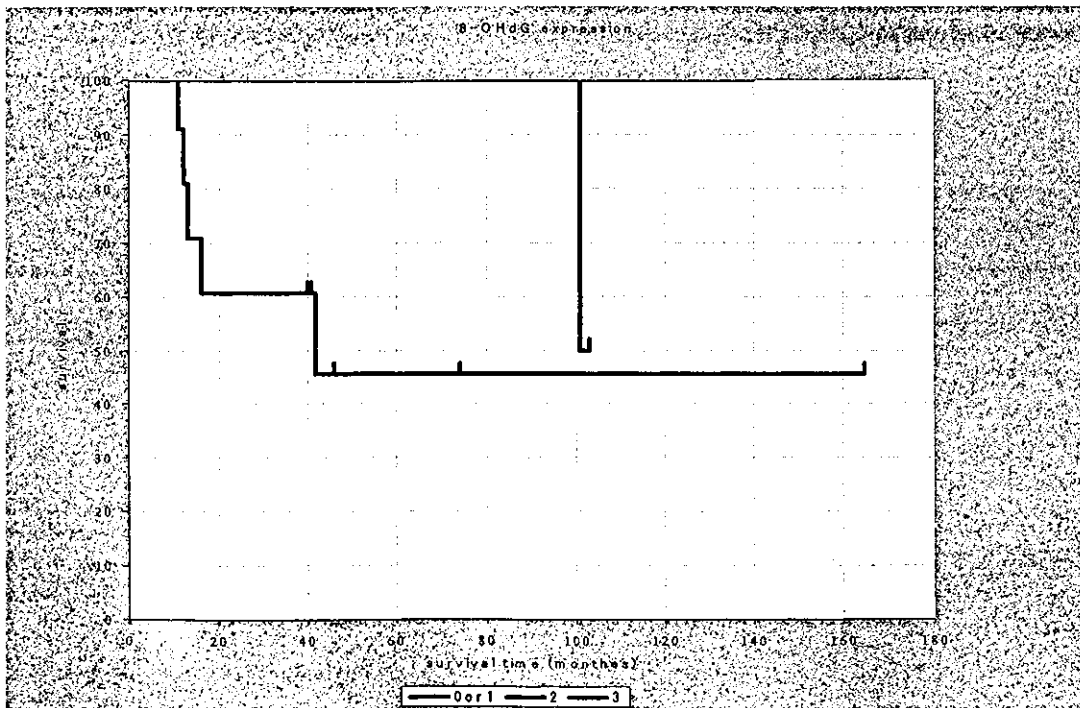


Fig. 7 Kaplan-Meier survival analysis of carcinoma patients. No remarkable correlation between 8-OHdG immunostaining and prognosis of the patients with ovarian serous adenocarcinoma.

## 2) 8-OHdG

腺腫において、8-OHdGは14例中2例に陽性所見を認め、漿液性腺癌においては30例中27例に陽性所見を認めた。内訳は強陽性7例、陽性9例、弱陽性11例でありやはりFIGO分類による進行期との相関は認めなかった。また、Kaplan Meier法による予後解析で8-OHdG陽性度と予後の相関は明らかではなかった (Fig. 7)。

## 3) Ki-67

腺腫において、Ki-67陽性細胞は $2.4 \pm 2.2\%$ 、漿液性腺癌において $16.3 \pm 13.9\%$ であった。FIGO分類による進行期との相関は認めず、予後との相関も認められなかった (Fig. 8)。

## 4) apoptosis

腺腫において、TUNEL染色陽性細胞は $6.4 \pm 4.8\%$ 、漿液性腺癌において $16.6 \pm 15.6\%$ であった。FIGO分類による進行期との相関は認めず、Kaplan Meier法による

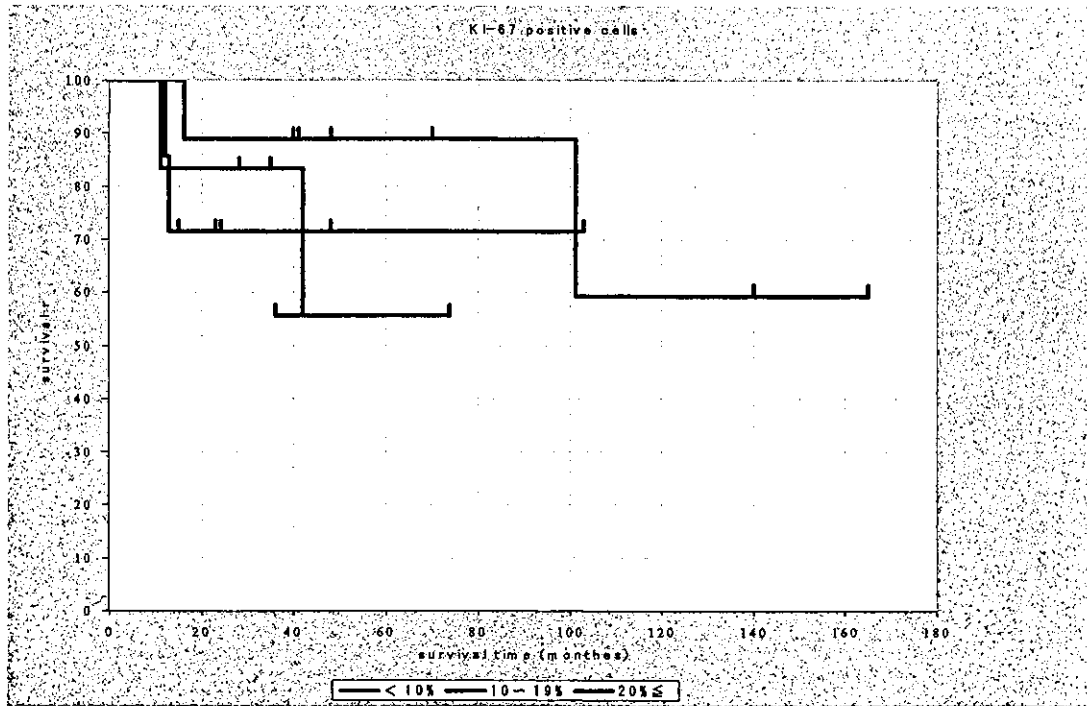


Fig. 8 Kaplan-Meier survival analysis of carcinoma patients. No remarkable relationships between Ki-67 immunostaining and survival rates.

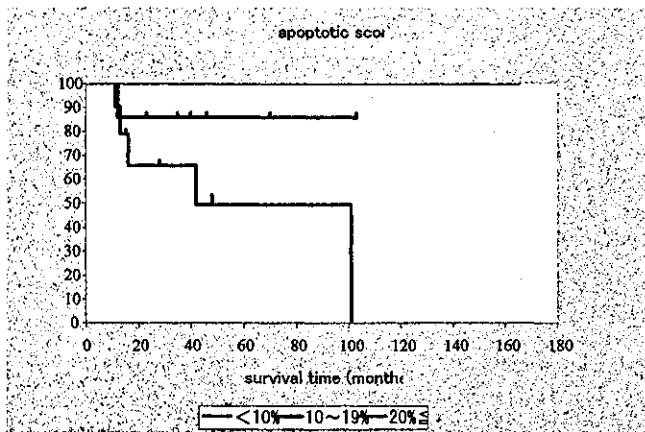


Fig. 9 Kaplan-Meier survival analysis of carcinoma patients. Primary surgical specimens with frequent apoptosis ( $\geq 20\%$ , green line) showed better survival compared with medium ( $10 \sim 19\%$ , blue line) and scanty ( $< 10\%$ , red line) cases.

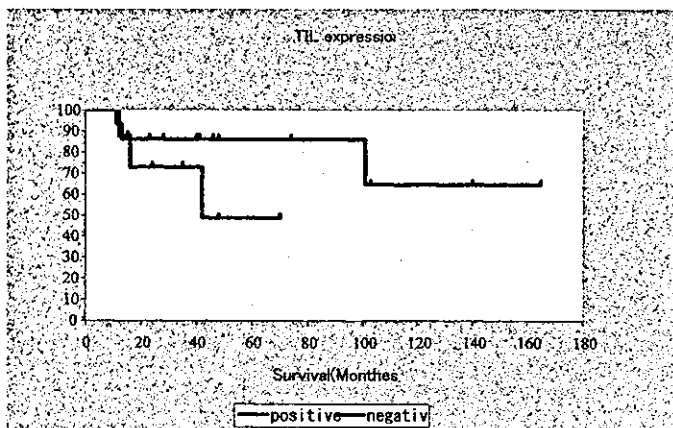


Fig. 10 Kaplan-Meier survival analysis. Primary surgical specimens with positive tumour infiltrating lymphocytes (TIL) showed better survival compared with negative cases.

解析で apoptotic score が 20%以上の症例は予後が良好であった (Fig. 9).

## 2. 他の組織学的所見

卵巣癌において TIL の程度と予後を検討した。進行期と TIL の程度に差を認めなかったが、TIL が全く見られないものと TIL が見られるもののあいだで予後との相関を認めた (Fig. 10)。しかし TIL を認めるもののなかでその程度と予後には明らかな差を見なかった。

## 3. 複数の組織所見間の相関

上記の腫瘍生物学的マーカーの染色所見相互、TIL の程度との相関を検討した。その結果、COX-2 と TIL の間に中等度の逆相関 ( $r = -0.56$ )、COX-2 と 8-OHdG の染色性に弱い相関 ( $r = 0.33$ )、COX-2 と Ki-67 の間に弱い相関 ( $r = 0.38$ ) を認めた。COX-2 と apoptosis score に弱い逆相関傾向 ( $r = -0.19$ ) を認めた。他の所見相互には相関が見られなかった。

## IV. 考 察

卵巣癌は、近年、世界的に増加傾向にある。しかしながら腹水や腫瘤を自覚しない初期段階では症状に乏しいため早期発見が困難であり、子宮頸部癌のようながん検診の有効性も確立していない。従って婦人科悪性腫瘍の中で罹患数当たりの死亡率がもっとも高い。卵巣癌の予後因子としては FIGO 分類による進行期が最も重要と考えられているが、組織学的な Grade に加えて p53 突然変異、EGFR や c-myc など癌遺伝子関連抗原の発現など生物学的マーカーが注目されている<sup>12)</sup>。これらの所見から腫瘍の増殖速度や転移能、化学療法に対する感受性がある程度予測できると考えられるからである。これらの中でも COX-2 は多くの悪性腫瘍に共通する生物学的マーカーの一つと考えられている。本研究においても卵巣癌の 63.4% が COX-2 を中等度以上に発現し、一方腺腫では 57% が陽性であるが多くは弱陽性であった。また、予後との相関を認めたことから漿液性卵巣癌という均一な疾患群においても従来の報告を裏付けるものである。しかしながら、卵巣癌すべてが COX-2 を発現するわけではなく、動物モデルでも COX-2 ノックアウトマウスにおいて悪性腫瘍が wild type と同程度に発生することから COX-2 が癌化それ自体に必須の遺伝子とは考えられない。実際卵巣において Klump らは悪性腫瘍のみならず中間群や良性腫瘍でも COX-2 を発現する症例があり、必ずしも癌化に特異的な現象ではないとしている<sup>13)</sup>。筆者らも先に子宮内膜症病巣において COX-2 発現が亢進していることを報告した<sup>14)</sup>。一般に炎症性腸疾患<sup>15)</sup> や慢性膵炎<sup>16)</sup>、*Helicobacter pylori* 胃炎<sup>17)</sup> など慢性炎症を背景とする発癌には COX-2 発現が見られるとする報告が多い<sup>18)</sup>。おそらく、癌化あるいは癌細胞の progression の過程で COX-2 を発現する細胞がそうでない細胞に比較して何らかの優位性があると考えられる。腫瘍化や慢性

炎症に伴う COX-2 の発現調節機構については不明な点が多いが、Erkinheimo らは卵巣癌において COX-2 発現と、mRNA の安定性を規定する ARE 結合蛋白 Hu-R 発現亢進が相関していることを報告している<sup>19)</sup>。おそらくその背景にあるのは悪性腫瘍における遺伝的不安定性であろう。

癌化に伴い組織は強い酸化ストレスにさらされる。DNA の酸化指標である 8-OHdG は炎症や悪性腫瘍において染色性が亢進し過酸化のマーカーとなることが知られている。Kondo らは大腸癌と腺腫における染色性を比較し、前者では進行期に無関係に染色されたの対して後者では全く染色性を見なかったとしている<sup>20)</sup>。漿液性卵巣腫瘍における我々の検討でもほぼ同様の所見を認め、進行期や予後との相関は認められなかった。従って酸化ストレスの増大は癌化の初期過程に関与し、これを悪性度の判定や予後指標とすることは難しいと考えられた。しかしながら、酸化ストレスは COX-2 発現を誘導する事実が報告されている。胃癌や<sup>21)</sup> 肝癌<sup>22)</sup>、膀胱癌<sup>23)</sup> においては 8-OHdG 発現と COX-2 発現がほぼ並行することが報告されており、逆に慢性炎症に伴う COX-2 発現が細胞内の酸化ストレスと DNA の傷害を誘発している可能性がある。我々の検討においても COX-2 と 8-OHdG の染色性には弱い相関があり、これら二つの生物学的指標の発現に何らかの因果関係が存在する可能性は否定できない。

悪性腫瘍の本質はコントロールされない細胞の増殖である。これは形態的には分裂像の増加や Ki-67 などの発現で推定することができる。Ki-67 抗原は細胞周期の G1/S/G2/M 期に発現しており、G0 期には発現しない。従って Ki-67 陽性細胞率は組織中における増殖分画を示すものと考えられる。Li らは胃粘膜リンパ腫 (MALTOMA) において COX-2 発現と Ki-67 陽性細胞率が正の相関を示すことを報告した<sup>24)</sup>。我々の検討でも COX-2 発現強度と Ki-67 陽性率の間に弱い相関を認めた。

TIL は乳癌や大腸癌においてその程度が予後と相関することが報告されてきたが、上皮性卵巣腫瘍においても Zhang らは独立した予後因子となることを報告している。本研究における検討も彼らの結果を裏付けるものであったが、独立した予後因子ではなく COX-2 発現に逆相関する従属的因子であった。近年、卵巣癌に対して細胞傷害性 T 細胞 (CTL) を誘導するワクチン療法が試みられている。しかし、元来抗原性の低い卵巣癌に対して腫瘍特異性の高い CTL を多量に誘導するには困難が多く、強力な抗原提示細胞である樹状細胞の利用によりやっと一定の効果が見られるようになった。興味深いことに樹状細胞自体も COX-1, 2 を発現し prostanooids を産生するが自らの産生する PG の影響は受けず周囲の細胞が産生する PG によりその機能が強く抑制されるという<sup>25, 26)</sup>。

従って COX-2 陽性の卵巣癌は樹状細胞を介する抗原提示が行われず末梢血からの CD8 陽性細胞の recruitment が誘導できない可能性がある。さらに、ごく最近になって卵巣癌では制御性 T 細胞を局所に誘導し、免疫学的拒絶を免れる機構が報告された<sup>27)</sup>。筆者らもマウス B-16 メラノーマにおいて腫瘍内に浸潤するリンパ球は Th3 あるいは Tr1 の表現型を有しており腫瘍の拒絶に働かないこと<sup>28,29)</sup> ヒトにおいても HPV 誘発腫瘍である子宮頸部癌において腫瘍内リンパ球浸潤と予後に全く相関がなく、その理由は TIL が少数の T 細胞レセプターを使用して腫瘍関連抗原を認識しながら type 2 のサイトカインのみを産生することを報告している<sup>30)</sup>。Prostanoids を含めた免疫抑制因子が担癌患者において局所あるいは全身の免疫応答を規定しているかは今後の興味ある課題である。

大腸癌では先に述べたようにアスピリン内服による発症率の減少が報告されている。乳癌、前立腺癌、膵臓、卵巣癌など消化管以外の癌に対しても予防効果があるとする報告もあるが必ずしもコンセンサスを得られていない<sup>31)</sup>。Lacay らは 6 万人以上を対象とする 25 年間の prospective study で NSAIDs は卵巣癌の頻度を増加も減少もさせないとしている<sup>32)</sup>。さらに in vitro の実験ではあるが COX-2 阻害剤がバクリタキセルによる卵巣癌細胞の apoptosis を抑制するという報告があり<sup>33)</sup>、担癌患者に対する投与は注意を要する。本研究では COX-2 発現と TUNEL 陽性細胞よりなる apoptotic score に弱い逆相関傾向を認めたが、COX-2 の apoptosis に及ぼす影響についてはこれを促進するという報告と抑制するという相反する報告がなされており解釈が難しい。

本論文における我々の解析では、従来の報告同様に COX-2 が卵巣癌の予後因子となりえること、しかし、その発現は単独の指標ではなく 8-OHdG 染色性にみられる組織の酸化ストレスや Ki-67 染色性にみられる増殖細胞分画、apoptosis, TIL の程度に代表される局所の免疫応答と相関あるいは逆相関することが示唆された。COX-2 の発現亢進の分子機構ならびに卵巣癌腫瘍内に浸潤したリンパ球の性状と認識抗原の解析が今後の課題であろう。

謝辞 本研究におきまして、免疫組織染色をご指導いただきましたシイク・アリームザマン博士(日本大学医学部病理学教室)、免疫染色において多大なご協力を賜りました鈴木(唐崎)美喜さん(日本大学医学部産婦人科学教室)、渡辺望生さん(日本大学医学部先端医学講座)、標本の貸し出しを快諾いただきました日本大学板場病院病理科部長 根本則道教授、杉谷雅彦助教授ならびに病理検査室の方々に厚く御礼申し上げます。

## 文 献

1) Sinicrope FA, Gill S. Role of cyclooxygenase-2 in colorectal

- cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2004; **23**: 63-75.
- 2) Uefuji K, Ichikura T, Mochizuki H. Cyclooxygenase-2 expression is related to prostaglandin biosynthesis and angiogenesis in human gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2000; **6**: 135-138.
- 3) Soslow RA, Dannenberg AJ, Rush D, et al. COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors. *Cancer* 2000; **89**: 2637-2645.
- 4) Denkert C, Kobel M, Berger S, et al. Expression of cyclooxygenase 2 in human malignant melanoma. *Cancer Res* 2001; **1**: 303-308.
- 5) Denkert C, Kobel M, Pest S, et al. Expression of cyclooxygenase 2 is an independent prognostic factor in human ovarian carcinoma. *Am J Pathol* 2002; **160**: 893-903.
- 6) Khalifeh I, Munkarah AR, Lonardo F, et al. Expression of Cox-2, CD34, Bcl-2, and p53 and survival in patients with primary peritoneal serous carcinoma and primary ovarian serous carcinoma. *Int J Gynecol Pathol* 2004; **23**: 162-169.
- 7) Shigemasa K, Tian X, Gu L, et al. Expression of cyclooxygenase-2 and its relationship to p53 accumulation in ovarian adenocarcinomas. *Int J Oncol* 2003; **22**: 99-105.
- 8) Knutson KL, Curiel TJ, Salazar L, et al. Immunologic principles and immunotherapeutic approaches in ovarian cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 2003; **17**: 1051-1073.
- 9) Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, et al. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 2003; **348**: 203-213.
- 10) Frassetto F, Scollo P, Pelosi G. T cells in ovarian cancer. *N Engl J Med* 2003; **348**: 1814.
- 11) Erkinheimo TL, Lassus H, Finne P, et al. Elevated cyclooxygenase-2 expression is associated with altered expression of p53 and SMAD4, amplification of HER-2/neu, and poor outcome in serous ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; **10**: 538-545.
- 12) Skirnisdottir I, Seidal T, Sorbe B. A new prognostic model comprising p53, EGFR, and tumor grade in early stage epithelial ovarian carcinoma and avoiding the problem of inaccurate surgical staging. *Int J Gynecol Cancer* 2004; **14**: 259-270.
- 13) Klimp AH, Hollema H, Kempinga C, et al. Expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in human ovarian tumors and tumor-associated macrophages. *Cancer Res* 2001; **61**: 7305-7309.
- 14) Chishima F, Hayakawa S, Sugita K, et al. Increased expression of cyclooxygenase-2 in local lesions of endometriosis patients. *Am J Reprod Immunol* 2002; **48**: 50-56.
- 15) Nasir A, Fernandez PM, Chughtai OR, et al. COX-2, NSAIDs and human neoplasia. Part I: Colorectal neoplasms. *In Vivo* 2002; **16**: 501-509.
- 16) Kasper HU, Wolf H, Drebber U, Wolf HK, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in pancreatic adenocarcinoma: correlation with microvessel density. *World J Gastroenterol* 2004; **10**: 1918-1922.
- 17) Kim KM, Oh YL, Ko JS, Choe YH, et al. Histopathology and expression of Ki-67 and cyclooxygenase-2 in childhood *Helicobacter pylori* gastritis. *J Gastroenterol* 2004; **39**: 231-237.
- 18) Baldassarre G, Nicoloso MS, Schiappacassi M, et al. Linking inflammation to cell cycle progression. *Curr Pharm Des* 2004; **10**: 1653-1666.
- 19) Erkinheimo TL, Lassus H, Sivula A, et al. Cytoplasmic HuR expression correlates with poor outcome and with cyclooxygenase 2 expression in serous ovarian carcinoma. *Cancer Res* 2003; **63**: 7591-7594.

- 20) Kondo S, Toyokuni S, Tanaka T, et al. Overexpression of the hOGG1 gene and high 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) lyase activity in human colorectal carcinoma: regulation mechanism of the 8-OHdG level in DNA. *Clin Cancer Res* 2000; **6**: 1394–1400.
- 21) Farrow B, Evers BM. Inflammation and the development of pancreatic cancer. *Surg Oncol* 2002; **10**: 153–169.
- 22) Fukuhara K, Osugi H, Takada N, et al. Effect of *H. pylori* on COX-2 expression in gastric remnant after distal gastrectomy. *Hepatogastroenterology* 2004; **51**: 1515–1518.
- 23) Romanenko A, Morimura K, Wanibuchi H, et al. Increased oxidative stress with gene alteration in urinary bladder urothelium after the Chernobyl accident. *Int J Cancer* 2000; **86**: 790–798.
- 24) Li HL, Sun BZ, Ma FC. Expression of COX-2, iNOS, p53 and Ki-67 in gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *World J Gastroenterol* 2004; **10**: 1862–1866.
- 25) Jozefowski S, Bobek M, Marcinkiewicz J. Exogenous but not endogenous prostanoids regulate cytokine secretion from murine bone marrow dendritic cells: EP2, DP, and IP but not EP1, EP3, and FP prostanoid receptors are involved. *Int Immunopharmacol* 2003; **3**: 865–867.
- 26) Harizi H, Grosset C, Gualde N. Prostaglandin E2 modulates dendritic cell function via EP2 and EP4 receptor subtypes. *J Leukoc Biol* 2003; **73**: 756–763.
- 27) Curiel TJ, Coukos G, Zou L, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 2004; **10**: 942–949.
- 28) Seo N, Hayakawa S, Takigawa M, et al. Interleukin-10 expressed at early tumour sites induces subsequent generation of CD4 (+) T-regulatory cells and systemic collapse of antitumour immunity. *Immunology* 2001; **103**: 449–457.
- 29) Seo N, Hayakawa S, Tokura Y. Mechanisms of immune privilege for tumor cells by regulatory cytokines produced by innate and acquired immune cells. *Semin Cancer Biol* 2002; **12**: 291–300.
- 30) Kanaeda T, Hayakawa S, Yamamoto T. Tumour infiltrating lymphocytes of uterine cervical carcinoma use skewed TCR V $\beta$  gene segments but possess low prognostic values. *Nihon Univ J Med* 2000; **42**: 327–337.
- 31) Baron JA. Epidemiology of non-steroidal anti-inflammatory drugs and cancer. *Prog Exp Tumor Res* 2003; **37**: 1–24.
- 32) Lacey JV Jr, Sherman ME, Hartge P, et al. Medication use and risk of ovarian carcinoma: a prospective study. *Int J Cancer* 2004; **108**: 281–286.
- 33) Munkarah AR, Genhai Z, Morris R, et al. Inhibition of paclitaxel-induced apoptosis by the specific COX-2 inhibitor, NS398, in epithelial ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol* 2003; **88**: 429–433.



## 総説

## 特集：ウイルス感染症の制御をめざして

## 妊婦におけるウイルス垂直感染の制御

早川 智

日本大学医学部先端医学講座感染制御科学部門

## Control of Vertical Viral Infection in Utero

Satoshi HAYAKAWA

Department of Infectious Disease Control, Nihon University School of Medicine

Impaired cellular immune function during pregnancy often deteriorates to viral infections. Some viruses such as rubella virus, herpes simplex virus (HSV), human parvovirus (B19), and cytomegalovirus (CMV) injure fetuses directly; others affect pregnancy outcome through systemic inflammatory responses and subsequent placental dysfunction and/or uterine contraction. However, there are numerous reports suggesting possible placental barriers that protect the fetus from most viral infections including those from human immunodeficiency viruses and human T cell leukemia viruses (HTLV). Basic scientists and clinicians should investigate the anti viral local immune response in decidual tissue that allows fetal survival as a successful allograft and which protects maternal tissue from excessive trophoblast invasion.

**Key words:** vertical viral infection, maternal immune response, placental barrier  
ウイルス感染, 母体免疫系, 妊娠合併症, 胎盤関門

E-mail: satoshih@med.nihon-u.ac.jp

(J. Nihon Univ. Med. Ass., 2004; 63 (7, 8): 326-334)

**要旨** 妊婦においては細胞性免疫能が低下するためウイルス感染に対する抵抗性が減弱する。母体のウイルス感染は胎児に直接的あるいは間接的な影響を与える。すなわち、経胎盤感染を起こすウイルスは胎児組織を直接的にあるいは間接的に傷害し、流産、奇形、子宮内胎児発育遅延、さらに死産の原因となることがある。一方、脱落膜・胎盤には不完全ながら免疫学的バリアが存在し、母体のウイルス感染症がすべて胎児に感染するわけではない。抗ウイルス剤には胎盤を通過するものや強い胎児毒性を有するものがありその使用には十分な知識が必要である。脱落膜・胎盤における局所防御機構については現時点では不明な点が多く、ウイルスによる胎児胎盤の直接傷害性に加えて、感染に対して産生される炎症性サイトカインやケモカイン、下垂体-副腎皮質ホルモン、プロスタノイドによる胎児胎盤障害の解析と制御が今後の課題である。

妊婦における生体防御系の変化と  
感染感受性の変化

妊婦では免疫学的異物である胎児が子宮内に共生するため局所のみならず、全身的にも免疫能が変化する。特

にTh1型の免疫応答が抑制されるため、細胞傷害性T細胞やNK細胞によるウイルス感染細胞の除去が遅延することが多い。また循環血漿量の増加と粘膜の充血により感染への物理的抵抗力が減弱することから妊婦のウイルス感染は重症化しやすく合併症による死亡率も非妊婦に比較して高いとされる。さらにHSV、CMVなど潜伏するウイルスの活性化をきたすことがある<sup>1-3)</sup>。近年古典的な母子感染症である梅毒やTORCH症候群(トキソプラズマ、風疹、サイトメガロウイルス、単純ヘルペス)は減少しているが、HEVによる激症肝炎やHIV母子感染など新たな感染症が問題となっている。

## ウイルス感染の妊娠に及ぼす影響

母体のウイルス感染は胎児に直接的あるいは間接的な影響を与える。すなわち、経胎盤感染を起こすウイルスは胎児組織を直接的に傷害し、流産、奇形、子宮内胎児発育遅延、さらに死産の原因となることがある。また胎児あるいは新生児は免疫能が未発達であるため持続感染を来すことがある。

一方、ウイルスが胎盤や胎児に感染しなくても間接作用として母体全身状態の悪化が早産、死産を招くことが

知られている。すなわちウイルス感染は母体の生体防御反応として種々のサイトカインを誘導するが Type 1 のサイトカインに分類される IL-2, IL-12, IL-18, IFN- $\gamma$  には胎児胎盤傷害性があり<sup>4)</sup> IL-1, IL-6, IL-8 などの炎症性サイトカインには COX-2 誘導活性があるため PG を介した子宮収縮を誘導する可能性がある。また HIV 感染者において流産が多いとする報告<sup>5,6)</sup>が見られるが胎児胎盤に対する直接傷害性に加えて免疫能の荒廃による母体の日和見感染が大きな問題となる。

### 垂直感染を来す経路

狭義の垂直感染とは経胎盤感染のことであるが広義には産道感染や母乳感染を含め、臨床的には母子感染としてこれらを全て含めて取り扱う。産道感染を来すことの多い HSV や HIV は選択的帝王切開により、母乳による感染を来す HTLV-1 は人工栄養によって予防が可能であるが、経胎盤感染を生じる CMV, 風疹, B19 (パルボウイルス) は現時点では確実な予防が困難である。但し、胎盤には不完全ながら胎盤関門が存在することが知られており絨毛細胞や Hofbauer 細胞、母体側の脱落膜免疫細胞 (CD 56<sup>bright</sup> NK 細胞, 胸腺外 T 細胞, NKT 細胞など)<sup>7,8)</sup> がサイトカインやケモカインを介してウイルスの胎児への侵入を防御すると考えられる。

### 垂直感染の症状と診断

ウイルスが胎児に垂直感染を来すと新生児に特徴的な症状が見られることが多い。すなわち肝脾腫、紫斑、脳脊髄膜炎、白内障、心奇形、難聴(風疹)脳内石灰化、小頭症 (CMV) などであるが、必ずしも特異的な所見ではないので染色体異常や他の先天異常症との鑑別が必要である。ちなみにウイルス感染自体が染色体異常を引き起こすことはない。垂直感染の診断には臍帯血、新生児血の IgM 抗体が最も有用である。IgM は胎盤通過性がないので胎児新生児が病原体に感染した事実を証明する指標となるからである。しかし、妊娠 20 週以前の感染では胎児が病原微生物に免疫応答を起こしえないため IgM 抗体を証明できない。この場合はウイルス自体の分離培養やウイルス抗原の証明、ウイルス特異的 DNA/RNA の証明が必要である。近年極めて感度の高い PCR が臨床検査に導入されウイルス遺伝子の検出が迅速かつ簡便になったが、高感度故に偽陽性や誤った解釈を生じる可能性もあるので複数の検査法を組み合わせる必要がある。以下母子感染を来す主なウイルス感染症の特徴と臨床的問題について簡単に述べる

### 風 疹

風疹ウイルスは Togaviridae に属する 1 本鎖 RNA ウイルスである。1941 年オーストラリアの眼科医 Gregg が風疹に罹患した妊婦から、白内障児の出生を報告した。

その後世界中からさらに難聴、心奇形を合併した児の出生が報告され先天性風疹症候群の疾患概念が確立した。一般に 6~8 週の器官形成期から妊娠 12 週までの時期に風疹ウイルスが胎児に感染すると先天異常をみることが多いが、妊娠年齢前に風疹ワクチン接種が行われるようになってから激減している<sup>9)</sup>。妊娠中でも不顕性感染の場合心奇形発生率は顕性感染の 1/10 程度とされ、またワクチン接種後や感染既往のある妊婦の場合も速やかな二次応答によりウイルスが排除されるため催奇形性の心配はない。さらに、ワクチン接種直後の妊娠もワクチン自体が弱毒化されており危険は少ないが、原則として接種後 3 カ月は避妊を勧める。

### HSV, CMV, EBV, VZV

これらのヘルペスウイルス群は 2 本鎖 DNA ウイルスであり類似した構造を有するが臨床的には異なった病像を示す。単純疱疹ウイルス HSV は初感染後、神経を上行して神経節に潜伏し免疫能の低下するストレスや他の感染症により再発する。子宮内感染は極めて稀であり産道感染により生じる新生児ヘルペス症候群は皮疹、眼症状に加えて発熱や呼吸障害、無呼吸発作、哺乳力低下、中枢神経障害を来とし、しばしば重篤な経過をたどる。従って予防のためには分娩時に性器にヘルペス疹があれば破水前に帝王切開が必須である。また無症状の患者でも腔分泌物中に HSV を認めることがあるため、PCR によって HSV genome の有無を確認しもし認めた場合には帝王切開を推奨する意見もある<sup>10)</sup>。本邦ではサイトメガロウイルス (CMV) は妊娠年齢の 90% 以上が抗体陽性であり (欧米では 30~40%) 妊娠中の初感染による先天性巨細胞封入体症は欧米に比較して極めて稀である。特に教科書的な肝脾腫、黄疸、出血斑、小頭症、脈絡膜炎、脳内石灰化などを見ることは少ないが乳児期から小児期にみられる難聴など軽度の神経学的後遺症に CMV の先天感染の関与を示唆する報告があり今後の検討を要する<sup>11)</sup>。水痘帯状疱疹ウイルス (VZV) の胎内感染は稀であり皮膚の瘰癧形成などに留まって致命的な症状は少ないが白内障、脈絡膜炎、小眼症などによる視力障害が報告されている。極めて稀ではあるが、分娩直前に母体が VZV に感染し場合には十分な中和抗体が誘導されないため経胎盤感染した児が新生児水痘によって致命的な予後をたどる事があるので、この場合は早期に VZIG やアシクロピルの投与が必要である<sup>12)</sup>。Epstein-Barr ウイルス (EBV) は初感染によって伝染性単核症を来すが軽症の場合は感冒と区別がつかず見過ごされることが多い。先天感染は極めて稀であるが子宮内胎児死亡、IUGR、肝脾腫、神経学的後遺症などの報告がある<sup>13)</sup>。

近年、EBV, CMV, 2 型 HSV 抗体陰性患者が妊娠中にこれらのウイルスに感染することが妊娠中毒症発病のリスクファクターになるという報告がなされた<sup>14)</sup>。ウイ

ルス自体が中毒症を誘発するよりはマラリア同様<sup>15)</sup>に Th1 型の免疫応答を誘導して胎児を傷害する可能性が考えやすいが、どの程度一般化できるか今後の検討を有する問題である。

### パルポウイルス

ヒトパルポウイルス (HPV/B19) (ヒトパピローマウイルス HPV と紛らわしいので通常 B19 と略す) は 1 本鎖 DNA ウイルスで伝染性紅斑 (リンゴ病) の原因ウイルスである。成人では関節炎や赤芽球系細胞に感染して溶血性貧血を来すことがある。子宮内感染では 1984 年の Brown の報告以来、胎児の溶血性貧血とこれに続発する胎児水腫の発生が大きな問題となっている。妊娠中に B19 に感染した妊婦では約 5~10% が経胎盤感染しその約 20% に胎児水腫が発生するという。しかしその多くは妊娠 10~24 週の感染に集中し 25 週以降は危険が少ない。γグロブリンや抗ウイルス剤の有効性は報告されていないので、母体の IgM 抗体で感染を確認した場合には超音波で嚴重なフォローアップを行い、必要に応じて洗浄赤血球の胎児輸血や帝王切開による娩出を図る<sup>16)</sup>。

### ウイルス肝炎

肝炎ウイルス中唯一の DNA ウイルスである B 型肝炎ウイルスは周産期感染により児が将来無症候性キャリアとなる可能性がある。多くの場合分娩時に産道で胎児が血液に接触することにより感染するため分娩後速やかに臍帯血中の HBsAg の検索 (胎内感染の否定) を行い陰性の場合には出生後 24 時間以内に HBIG の投与を行う。C 型肝炎ウイルスは経胎盤感染や母乳を介した感染の報告はあるがその頻度はきわめて低く臨床的問題となることは少ない。しかし、医療者側の感染防御と母親本人に対する今後の治療の必要性を判定するために肝機能検査と、血中の HCV RNA の定量を行う。流行性肝炎では A 型肝炎ウイルスや TT ウイルスとも母子感染はないと考えられている。

一方 E 型肝炎ウイルスは妊婦において劇症肝炎を来すことが多いとされている<sup>17)</sup>。従来、日本での発症は著しく稀であり、妊婦が東南アジアや南米、アフリカなど本ウイルスの流行地域に旅行する時に魚や肉の生食を避けるよう指導するのみで十分と考えられてきた。しかし、昨年日本における土着の E 型肝炎の報告があり、さらに人畜共通感染症としても注目されている。近年、海外からの帰省分娩も増加しており海外旅行歴や海外出張既往のある妊婦の肝炎では本疾患を鑑別に入れる必要がある。あるいは旅行歴がなくても B 型、C 型肝炎を否定できる場合には鑑別項目として検査する必要がある。G 型肝炎ウイルスは高い母子感染率が報告されているが病原性は低い。

### インフルエンザ

インフルエンザウイルスは 100~250 nm の 1 本鎖 RNA ウイルスである。A 型および B 型インフルエンザウイルスは宿主細胞膜由来の脂質二重膜よりなる外被に囲まれ細胞表面のシアル酸がレセプターとなる HA 糖蛋白、NA (ノイラミニダーゼ) 糖蛋白が存在する。通常の感冒に比べて強い感染力を有し、妊婦ではしばしば重篤化する。母体の罹患により流産や子宮内胎児発育遅延をきたしえる他、妊娠中期にインフルエンザに感染した母親から生まれた児が統合失調症に罹患するリスクが有意に高いという報告がある<sup>18,19)</sup>。Shi らは妊娠マウスにインフルエンザウイルスを接種することにより仔マウスに高頻度に行動異常が見られることを報告している<sup>20)</sup>。彼らは仔マウス脳にインフルエンザ RNA を検出できないこと、必ずしも神経向性のウイルスでなくても行動異常が見られることから、ウイルスの直接毒性よりもインフルエンザ感染による母体の IFN-γ など Type 1 サイトカイン産生亢進や ACTH 産生亢進が関与するのではないかと推測している。近年、内科、小児科領域で有効性が報告されるノイラミニダーゼ阻害剤は、妊婦においては安全性が確立しておらず、投与には十分な注意が必要である<sup>21)</sup>。したがって臨床的にはインフルエンザ流行時には妊娠中といえどもワクチン接種を勧める報告が多い<sup>22)</sup>。

### HTLV 感染症

成人型 T 細胞型白血病ウイルス (HTLV-1) 感染症で多くの場合は全く無症状であるが感染者の約 0.1% が 50~60 代に成人型 T 細胞白血病 (ATL) を発症する<sup>23)</sup>。九州沖縄地方に多くキャリアは人口の 5% 程度であるが日本全体では 1% 以下と推定されている。輸血や性交渉でも感染するが ATL の発症には感染後長期間を要するため、臨床的な意味は母子感染に限られる。子宮内感染や産道感染も報告されているが極めて稀であり、多くの場合は母乳によって感染する。従って人工栄養によってほぼ完全に予防が可能である。また後に述べる HIV と異なってウイルス粒子のみでは感染が成立し難いので -20°C 12 hr 凍結あるいは 56°C 30 min 加熱といった母乳の除感染操作でも予防が可能であるという。

興味深いことに、HTLV 陽性者の頻度は東アジアでも台湾の一部 (高砂族) やポリネシアに多く中国 (漢民族) や朝鮮半島、モンゴルには少ない。沖縄や南九州、高知、和歌山南部、北海道 (アイヌ民族) には共通した人類学的特徴があり縄文時代の日本人の直系の子孫であろう。弥生時代から古墳時代に大陸から渡来した人々と混血したのが現在の我々日本人と考えられている。海や山の幸が豊富なポリネシア、東南アジアに住んだ縄文人の先祖たちの社会では母親の授乳期間が長く HTLV の感染機会も増加したと考えられる。一方厳しい大陸の環境では女性

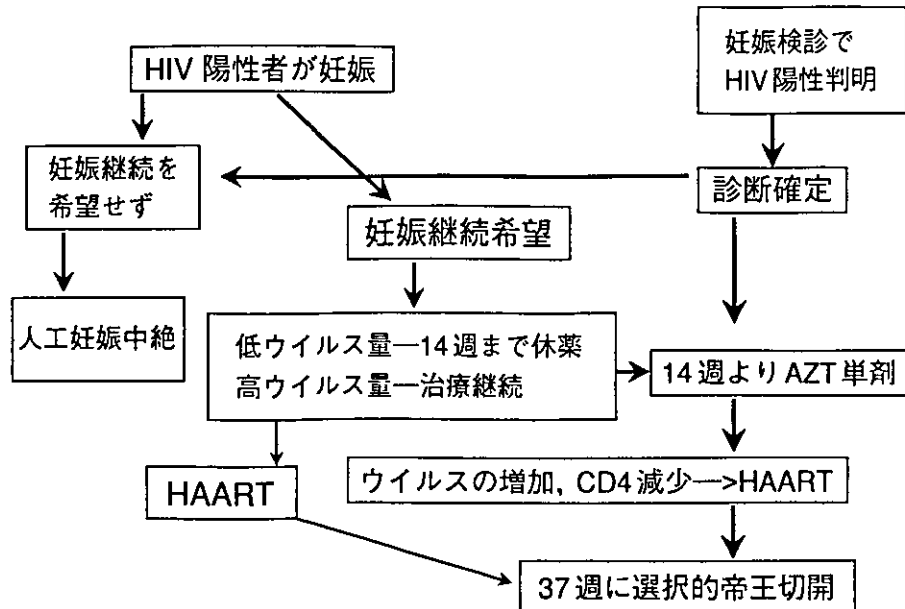


Fig. 1 Clinical principles for management of HIV positive mothers. Antiretroviral therapy during pregnancy with AZT administration (ACTG076) or HAART, Scheduled caesarean section before onset of labour or rupture of membrane, Administration of AZT to neonates and Avoid breast-feeding reduce vertical transmission rate of HIV to less than 1%.

も農耕や牧畜に参加したほうが経済効率がよく、また家畜の乳も容易に入手できるため HTLV の感染機会は減ったと考えられる<sup>24)</sup>。

### HIV 母子感染

エイズはレトロウイルスの一つである HIV の感染により生体防御系の荒廃と日和見感染から死にいたる疾患である。我が国では幸いなことに全人口中の HIV 感染者が少数であることから、HIV の母子感染が一般臨床の場で問題になることは少ない。しかし、アフリカ諸国では全妊婦の 10~20%が HIV 陽性であり、日本の近隣、特に東南アジア諸国でも近年著しい増加傾向にある。母親が HIV 陽性で無治療の場合、新生児の 15~30%が HIV に感染しその多くが 10 歳以前に死亡するため途上国では深刻な問題となっている。実際 UNAIDS (国連エイズプログラム) によると 2000 年現在、毎年 60 万人の新生児が HIV に垂直感染するという<sup>25)</sup>。HIV の母子感染は妊娠中 (経胎盤感染) 分娩時 (産道感染) 産褥 (乳汁感染) いずれからも成立することが知られている。感染の成立には母体血中のウイルス量や HIV に対する中和抗体の有無、CD4 リンパ球数など複数の要因が関与することが知られているが<sup>26)</sup>、妊婦血中のウイルス量を減らすことが最重要と考えられている。Abrams らは母体のコントロールが不良の場合垂直感染の頻度が高く児の予後も不良であるとしている<sup>27)</sup>。妊娠中後期の抗レトロウイルス薬の投与による血中ウイルス量の減量と帝王切開による娩出、授乳の禁止が現時点では先進国における HIV 感染妊婦に対する診療のスタンダードとなっている (Fig. 1)。

### 妊娠の HIV 感染におよぼす影響

一般に妊娠は免疫抑制状態となるので HIV 感染者において AIDS 発症のリスク因子であると考えられていた<sup>28)</sup>。しかしながら、確かに妊娠中は胎児胎盤を拒絶する細胞性免疫が抑制される Th2 優位の免疫環境にあるが、Innate Immunity や液性免疫応答は逆に亢進しておりこれを単純な免疫抑制と理解するには問題がある。適切な抗ウイルス剤による治療が行われるようになって以来、妊娠は無症候性の HIV 感染者の発症要因とはならないという考え方が支配的である<sup>29~33)</sup>。

### HIV 陽性妊婦に対する抗ウイルス剤の適応

従来 HIV 陽性者に対する抗ウイルス剤の投与は早ければ早いほどよいと考えられてきたが、2001 年の CDC ガイドラインでは無症状感染者に対する治療の開始は CD4 350/ $\mu$ l 以下あるいは血中 HIV-RNA 55000 copies/ml 以上の患者に限定すべきであるとしている<sup>34)</sup>。しかしながら HIV 陽性者が妊娠した場合には垂直感染を予防するため速やかに抗ウイルス療法を開始すべきである<sup>35)</sup>。抗ウイルス剤によって胎児に対する危険度は大きく異なるが、一般には器官形成期を過ぎた 14 週を投与の開始時期とする。

妊娠前から治療を受けている患者には休薬期間を置くことなくそのまま継続するとする意見もある。それまで投与されていた薬剤の中断によってウイルス量のリバウンドが生じかえって胎内感染のリスクが増す可能性があるからである。しかし、hydroxyurea や efavirenz など

催奇形性が高い薬剤を投与している場合には AZT や lamibudin など毒性の低い薬剤に変更する必要がある。米国では 2002 年 11 月に FDA によって認可された迅速テスト法により、陣発後の産婦に HIV-1 抗体検査を行い、陽性の場合この時点で抗 HIV 剤の投与を母児を行うという臨床試験が開始され一定の効果を挙げているという<sup>36)</sup>。

### AZT 単剤投与とその問題点

HIV 垂直感染の予防法としては 1994 年に発表された妊婦に対する抗ウイルス剤の投与プロトコル ACTG (AIDS Clinical Trial Group) 076 が名高い。本法により垂直感染率が 25.5% から 8.3% まで減少することが報告され、周産期研究者、臨床家に劇的なインパクトを与えた<sup>37)</sup>。垂直感染の経路としては分娩時の産道感染が最も多いことから、この投与プロトコルを行った上でさらに陣痛発来前の選択的帝王切開を施行することによって垂直感染率を 1% 以下まで低下できる<sup>38)</sup>。AZT は胎児に対する明らかな副作用がなく、現在のところ first choice となっているが、AZT 単剤投与では耐性ウイルスの発現が多いことから、胎児に対する感染が予防できても出産後の母親の予後に悪影響を与えるおそれがある。現在、非妊娠時の HIV 陽性患者に対する薬物療法は、血中ウイルス量を減らす上での有効性と耐性予防の観点から少なくとも 2 剤以上の併用療法が主流となっている。妊婦でも積極的な併用療法を推奨する報告が多い<sup>40)</sup>。しかしながら、併用療法では高率に新生児の造血障害と肝障害、IUGR の発症が報告されており投与時期や適応などは今後の検討を要する課題である。

### 妊娠中毒症と HIV 感染妊婦

妊娠中毒症が HIV 感染妊婦において垂直感染のリスクファクターになっているとする報告がある。その機序は中毒症妊婦胎盤における多発性の梗塞や炎症性変化が脱落膜胎盤関門を破綻し母児間の血液の相互移行が増えることによると考えられる。一方、疫学的には Wimalasundera は HIV 感染妊婦ではコントロールに比較して有意に妊娠中毒症の発症頻度が低く、HAART による治療を行ったグループでは差がなくなる事から HIV 感染妊婦における細胞性免疫の低下が関与しているのではないかとこの仮説を提唱している<sup>40)</sup>。これに対して Mawson は HIV 陽性妊婦に対して投与される抗ウイルス剤、特に核酸逆転写酵素阻害剤のミトコンドリア障害が妊娠中毒症の誘因となっているのではないかと反論している<sup>41)</sup>。確かに妊娠中毒症の一部に免疫が関与することは間違いがないが、抗ウイルス剤治療を受けている HIV 陽性妊婦において臨床的に問題となるレベルまで CD4 が減少し細胞性免疫が低下することは稀であり、彼らの仮説は妥当性を欠くと考えられる。

一方、HIV 感染者では血栓性血小板減少性紫斑病がしばしばみられることが報告されている。本疾患は日本人には比較的稀であるが、血小板減少、末梢血管障害と溶血性貧血、神経症状、発熱、腎障害などの症状をきたし、妊婦では HELLP 症候群や妊娠中毒症との鑑別に困難を来すことがある<sup>42)</sup>。

### 結核と HIV 感染

エイズに合併する結核はアジア、アフリカを中心に増加傾向にあり、現在、患者数は 140 万人 (全結核の 14%) と推定されている。HIV 感染者における日和見感染症の合併はエイズの発症を惹起し、その予後を著しく不良にすることが知られているが、これは、炎症に伴い誘導される転写促進因子が HIV-LTR に結合し、プロウイルスの転写が促進し HIV 感染細胞からのウイルス産生を亢進することや NF- $\kappa$ B を介した HIV-LTR の up-regulation が原因と考えられている。また、HIV の gp120 と結核菌体の MN-LAM は共に樹状細胞の特異的レセプターである DC-SIGN に結合すると有効な抗原提示を行えず、TGF- $\beta$  や IL-10 など抑制性のサイトカインを誘導する<sup>43)</sup>。産婦人科臨床では南アフリカやタイでは結核と HIV 感染の合併が周産期死亡の大きな原因となっている<sup>44)</sup>。米国でも Schulte は移民の多いマイアミの Jackson Memorial Hospital で年間取り扱われる 6000 分娩のうち 2.4% が HIV 陽性であり、さらにその中の 21% がツベルクリン反応陽性、1% は活動性の結核患者であることから、HIV 陽性妊婦ではルーチン検査として結核皮内反応を行うべきであるとしている<sup>45)</sup>。

### HIV 感染妊婦と子宮頸部悪性腫瘍

HIV 感染者では高率に HPV 感染や子宮頸部の上皮内腫瘍が多いという報告がある<sup>46,47)</sup>。HIV と HPV がともに STD であり、multiple partner や CSW など感染に至る behavior が共通しているが、それ以外にも HIV による細胞性免疫の低下が HPV の増殖や子宮頸部上皮の癌化を促進している可能性がある。従って適切な治療によって CIN の進行を阻止できると考えられている。妊婦においても HIV 感染は CIN のリスクファクターであり、積極的に細胞診を行う必要がある<sup>48,49)</sup>。欧米では HPV に対する予防ワクチンが実用化段階に入っており、HIV 陽性者を含むハイリスクグループには妊娠前から接種を勧める意見もある。

### HIV 感染と流産

先に述べたように HIV 感染者では流産率が高いとする報告があるが<sup>5,6)</sup>、流産胎児胎盤において必ずしも高率に HIV の取り込みを見るわけではないのでその機序は不明な点が多い。しかしながら HAART などによる免疫能の改善により予後の著しい改善をみるとする報告がある<sup>50)</sup>。

## Local factors affecting vertical HIV transmission

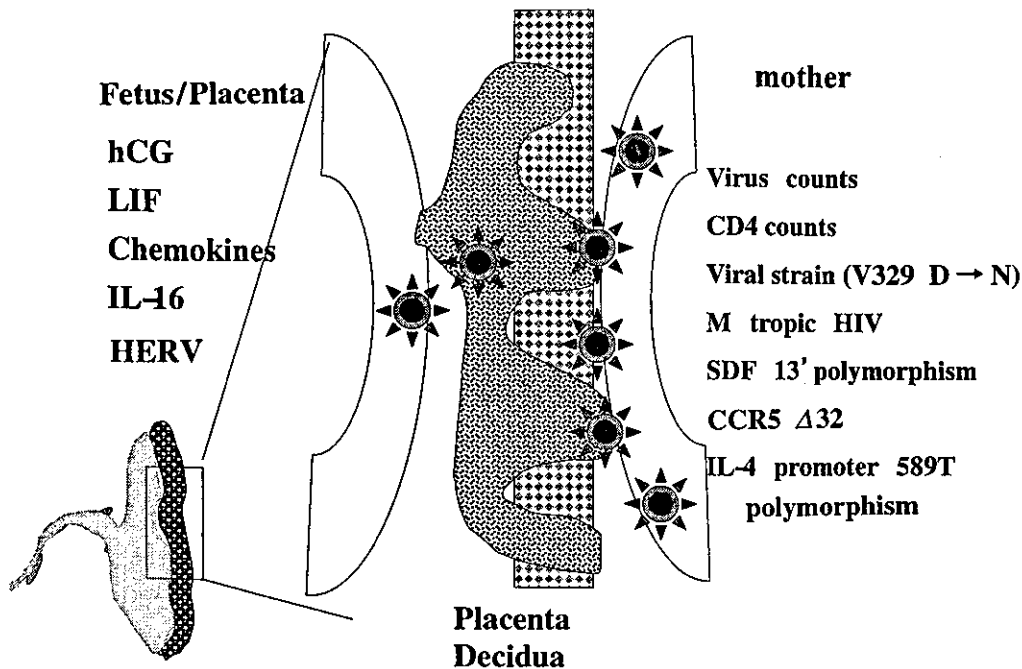


Fig. 2 Systemic and local factors affecting vertical HIV transmission. Maternal viral load and presence or absence of neutralizing antibodies and effective cytotoxic T cell response are considered to be the most important factors. Genetic background of fetuses and mothers, and viral strains are considered to be also important. In placental tissue, possible barrier may exist while its molecular mechanism is unknown.

## HIV 感染における胎盤関門の役割

妊娠中に成立する経胎盤感染は血中のウイルス量を下げることによって予防できる可能性があるが確実な手段はない。HIV の primary receptor である CD4 を発現しない胎盤絨毛への HIV の感染については否定的見解もあるが、*in vitro* で CD4 非依存的に絨毛細胞や間質細胞に感染するという報告がある。Arias らは胎盤への感染は CD4 と CCR5, CXCR4 を介さず、LFA-1 を介した母体リンパ球と胎盤絨毛細胞との接触が極めて重要であるとしている<sup>51)</sup>。CD4 非依存性の感染においては DC-SIGN が重要であるという報告もある<sup>52)</sup>。しかし、大部分の症例で胎児に移行しないメカニズムとして、胎盤自体に何らかの局所防御機構 (placental barrier) が存在するとする考えられる<sup>53)</sup>。Zachar らは胎盤/脱落膜において発現するサイトカインの HIV 増殖に及ぼす影響を検討し IFN- $\gamma$  は増殖を抑制するが FGF, GM-CSF, IL-1 $\beta$  は逆に促進的に働くとしている<sup>54)</sup>。他にも TNF- $\alpha$  や LIF, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES の関与<sup>55-58)</sup> が報告されている。しかし、胎盤を通過する HIV のごく一部が子宮内感染を引き起こすことから他の感染防御因子の存在やウイルス側の問題も検討する必要がある。Wolinsky らは垂直感染を来たすウイルスはごく母体内に多数存在する HIV サブクローンの中でも極めて限られた変異株に過ぎないという報告をして

いるが<sup>59)</sup>、我が国においても HIV 垂直感染の成立した 8 例のうち 6 例は V3 ループの 29D が N に置換していた<sup>60)</sup>。さらに 66 例の HIV 垂直感染症例を検討したところ、母体内 HIV の集団は様々なサブタイプ (A, B, B', D, E) が混在するが新生児においては B, D のみが存在していた。さらに個々の症例内でも母親血中には多数のウイルスクローンが存在するのに対して感染した児の HIV-1 はほぼ単独もしくは極めて少数クローンであることから母体に感染した HIV は変異を繰り返してそのごく一部が胎児・新生児に感染する<sup>61)</sup>。この現象がウイルスの性状に相違によるものかそれとも単に感染効率が極めて低い事実の反映かは現在検討中であるが、脱落膜リンパ球など他の感染防御因子やウイルス側の問題を検討する必要がある (Fig. 2)。

## 絨毛における内在性レトロウイルス

ヒトの遺伝子には太古の昔に感染したレトロウイルスが逆転写され、プロウイルスとして存在している。その大部分は生物学的な活性を喪失し、いわゆるジャンク DNA となっているが悪性腫瘍や自己免疫疾患ではこれら内在性レトロウイルス (human endogenous retrovirus HERV) 遺伝子の発現やウイルス粒子の形成が報告され病態への関与が推測されている<sup>62)</sup>。胎盤は生理的にこれらのウイルスを発現する数少ない臓器の一つである。ウ

ウイルス粒子を形成しうる HERV には数種類が知られているが、胎盤に発現する HERV-W の envelope 遺伝子由来産物 syncytin は栄養膜細胞から合体細胞の形成に必須であることが報告された。

内在性レトロウイルスは HIV をはじめとする外来レトロウイルスの複製に干渉し、細胞内防御機構の一つとなっている可能性が報告されている<sup>62)</sup>。筆者らは HIV を感染させた絨毛細胞において HERV-W との間で複製能を欠失した chimeric virus が形成されることを明らかにした(投稿中)。これが、胎児側に流入するあるいは胎盤内の樹状細胞で処理されることにより、この後述の胎児における特異的免疫の誘導を説明できるかもしれない。

### 胎児における感染抵抗性

近年 PCR を使った研究により、母体と胎児の循環はかつて考えられていたほど完全には分離しておらず、少量の血球細胞が行き来していること (microchimerism) が明らかになってきた。興味深いことに、HIV 陽性妊婦より生まれた新生児では児本人が HIV に感染していないにも関わらず、HIV に対する細胞性免疫応答が誘導されていることが多い<sup>64, 65)</sup>。さらに Bryson らは HIV 陽性(無治療)の母親から 36 週で経膈分娩した男児が新生児期に HIV-1 抗体陽性、PCR 陽性より子宮内感染を確認されたにもかかわらず、無治療で月齢 12 (満 1 歳) にウイルスが消失した症例を報告している。この場合には HIV に対する非常に強い CTL 活性が誘導されていたという<sup>66)</sup>。

おそらく、胎児は 280 日の妊娠経過中に何度も少量のウイルス粒子やウイルス感染細胞の侵入を受けているに違いないが、これを防御する機構が存在すると考えられる。当初、臍帯血リンパ球は HIV 感染に対して抵抗性があるのではないかと考えられてきた。しかし、出生時に採取した臍帯血 T リンパ球に HIV をチャレンジすると、臍帯血清、成人血清、ウシ胎児血清いずれの存在下においても成人末梢血と変わらない複製効率がみられる。一方では HIV 陽性母より生まれた新生児の T 細胞は抗 CD3 刺激で増殖せずアポトーシスに陥る<sup>67)</sup>、CD4/8 の低下、CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 減少と CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> の増加、血中 IL-7 の上昇<sup>68)</sup>、Th2 優位のサイトカイン産生など免疫機能の低下を示唆する報告もあり、その解釈は困難である。臍帯血では抗原刺激に対し IL-2 のみを産生する CD45RA 陽性のナイーブ T 細胞が殆どであり IL-4, 5, IFN- $\gamma$  を産生する CD45RO 陽性細胞が少ない、IL-2 レセプター  $\gamma$  鎖 (IL-2R $\gamma$ ) の発現レベルが成人の 1/3 程度であるなど胎児免疫系の未熟を示す所見が知られている<sup>69)</sup>。しかし、その未熟性あるいは可塑性故に、高度に完成された特異免疫系をターゲットとする HIV 感染に対する抵抗性があるのかもしれない。それはあたかもコンピューターシステムが発達した先進社会がコンピューターウイルスなどサイバーテロに極めて脆弱であるのに対し、アナログ情報社

会ではそのダメージが少ないことにも例えられよう。

筆者らは先にヒト脱落膜の大顆粒リンパ球が胸腺外分化する T 細胞であり<sup>7)</sup>、その一部が NKT 細胞<sup>8)</sup> あるいは  $\gamma\delta$ T 細胞<sup>70)</sup> に分化すること、これが妊娠の維持あるいは炎症性サイトカインの存在下では絨毛細胞を障害することを報告した<sup>71, 72)</sup>。しかし脱落膜胸腺外 T 細胞は活性化により容易にアポトーシスに陥るため、実験が困難である。そこで極めて類似した表現型を有する大顆粒リンパ球細胞株 KHYG-1, MOTN-1 を用い、これらに HIV が CD4 非依存性に感染しウイルスの逆転写と抗原性の変化は生じてウイルス粒子の複製が生じないこと、しかも非感染細胞は IL-2 存在下で不死であるのに対し HIV に感染した細胞は 40 日前後で死滅することを明らかにした(投稿中)。おそらくこのような細胞が生体内で natural vaccine として働いていると考えられる。

### おわりに

母児間の免疫学的接点にある脱落膜免疫細胞は、異物である胎児の母体内生着を許すため拒絶を抑制すると同時に妊娠母体に対する胎盤絨毛細胞の過剰な侵入を抑制し、また母児双方を感染性微生物から守るという生体防御系本来の機能を維持している。280 日という長いヒトの妊娠期間中には感冒や急性胃腸炎など minor complication として見過ごされたり、あるいは不顕性感染に終わって臨床的に問題とならないウイルス感染が少なくない。一過性にウイルス血症を来しても大部分のウイルスが脱落膜胎盤関門で侵入を阻止されることは驚くべきことである。また乳汁中に含まれるラクトフェリンには強い抗ウイルス活性が知られている。種としてのヒトを保存するために進化したこれらの妊娠母体における innate immunity や非特異的防御機構の研究から個体の健康を守るという新たなアプローチが期待できる。

### 文 献

- 1) Remington JS, Klein JO, Ed. Infectious diseases of the fetus and newborn infant. 5th ed. WB Saunders Philadelphia 2001.
- 2) Creasy RK, Resnik R, Ed. Maternal-Fetal Medicine. 4th Ed WB Saunders Philadelphia 1999.
- 3) 川名 尚. 妊娠とウイルス感染. 社団法人日本母性保護医協会研修ノート 47, 1994.
- 4) Hayakawa S, Fujikawa T, Fukuoka H, et al. Murine fetal resorption and experimental pre-eclampsia are induced by both excessive Th1 and Th2 activation. *J Reprod Immunol* 2000; 47: 121-138.
- 5) Ticconi C, Mapfumo M, Dorrucchi M, et al. Effect of maternal HIV and malaria infection on pregnancy and perinatal outcome in Zimbabwe. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003; 34: 289-294.
- 6) Brocklehurst P, French R. The association between maternal HIV infection and perinatal outcome: a systematic review of the literature and meta-analysis. *Br J Obstet Gynaecol* 1998; 105: 836-848.
- 7) Hayakawa S, Saito S, Nemoto N, et al. Expression of

- recombinase-activating genes (RAG-1 and 2) in human decidual mononuclear cells. *J Immunol* 1994; **153**: 4934–4939.
- 8) Tsuda H, Sakai M, Michimata T, Tanebe K, Hayakawa S, Saito S. Characterization of NKT cells in human peripheral blood and decidual lymphocytes. *American Journal of Reproductive Immunology* 2001; **45**: 295–302.
  - 9) Lee JY, Bowden DS. Rubella virus replication and links to teratogenicity. *Clin Microbiol Rev* 2000; **13**: 571–587.
  - 10) Cone RW, Hobson AC, Brown Z, et al. Frequent detection of genital herpes simplex virus DNA by polymerase chain reaction among pregnant women. *JAMA* 1994; **272**: 792–796.
  - 11) Lagasse N, Dhooge I, Govaert P. Congenital CMV-infection and hearing loss. *Acta Otorhinolaryngol Belg* 2000; **54**: 431–436.
  - 12) Fox GN, Strangarity JW. Varicella-zoster virus infections in pregnancy. *Am Fam Physician* 1989; **39**: 89–98.
  - 13) Pedneault L, Lapointe N, Alfieri C, et al. Natural history of Epstein-Barr virus infection in a prospective pediatric cohort born to human immunodeficiency virus-infected mothers. *J Infect Dis* 1998; **177**: 1087–1090.
  - 14) Trogstad LI, Eskild A, Bruu AL, et al. Is preeclampsia an infectious disease? *Acta Obstet Gynecol Scand* 2001; **80**: 1036–1038.
  - 15) Fried M, Muga RO, Misore AO, et al. Malaria elicits type 1 cytokines in the human placenta: IFN-gamma and TNF-alpha associated with pregnancy outcomes. *J Immunol* 1998; **160**: 2523–2530.
  - 16) von Kaisenberg CS, Jonat W. Fetal parvovirus B19 infection. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2001; **18**: 280–288.
  - 17) Kumar A, Beniwal M, Kar P, et al. Hepatitis E in pregnancy. *Int J Gynaecol Obstet* 2004; **85**: 240–244.
  - 18) Brown AS, Schaefer CA, Wyatt RJ, et al. Maternal exposure to respiratory infections and adult schizophrenia spectrum disorders: a prospective birth cohort study. *Schizophr Bull* 2000; **26**: 287–295.
  - 19) Stefan MD, Murray RM. Schizophrenia: developmental disturbance of brain and mind? *Acta Paediatr Suppl* 1997; **422**: 112–6.
  - 20) Shi L, Fatemi SH, Sidwell RW et al. Maternal influenza infection causes marked behavioral and pharmacological changes in the offspring. *J Neurosci* 2003; **23**: 297–302.
  - 21) Lim WS, Macfarlane JT, Colthorpe CL. Treatment of community-acquired lower respiratory tract infections during pregnancy. *Am J Respir Med* 2003; **2**: 221–233.
  - 22) Englund JA. Maternal immunization with inactivated influenza vaccine: rationale and experience. *Vaccine* 2003; **21**: 3460–3464.
  - 23) Mahieux R, Gessain A. HTLV-1 and associated adult T-cell leukemia/lymphoma. *Rev Clin Exp Hematol* 2003; **7**: 336–361.
  - 24) 早川 智, 佐藤和雄. 生殖免疫の話 7 日本人の起源. 産科と婦人科, 1996; **63**: 944–945.
  - 25) Casper C, Fenyo EM. Mother-to-child transmission of HIV-1: the role of HIV-1 variability and the placental barrier. *Acta Microbiol Immunol Hung* 2001; **48**: 545–573.
  - 26) Dictor M, Lindgren S, Bont J, et al. HIV-1 in placentas of untreated HIV-1-infected women in relation to viral transmission, infectious HIV-1 and RNA load in plasma. *Scand J Infect Dis* 2001; **33**: 27–32.
  - 27) Abrams EJ, Wiener J, Carter R, et al. Perinatal AIDS Collaborative Transmission Study (PACTS) Group. Maternal health factors and early pediatric antiretroviral therapy influence the rate of perinatal HIV-1 disease progression in children. *AIDS* 2003; **17**: 867–877.
  - 28) Gloeb DJ, Lai S, Efantis J, O'Sullivan MJ. Survival and disease progression in human immunodeficiency virus-infected women after an index delivery. *Am J Obstet Gynecol* 1992; **167**: 152–157.
  - 29) Kumar RM, Uduman SA, Khurana AK. Impact of pregnancy on maternal AIDS. *J Reprod Med* 1997; **42**: 429–434.
  - 30) Hocke C, Morlat P, Chene G, et al. Prospective cohort study of the effect of pregnancy on the progression of human immunodeficiency virus infection. The Groupe d'Epi-demiologie Clinique Du SIDA en Aquitaine. *Obstet Gynecol* 1995; **86**: 886–891.
  - 31) Johnstone FD, Willox L, Brettle RP. Survival time after AIDS in pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1992; **99**: 633–636.
  - 32) Bessinger R, Clark R, Kissinger P, et al. Pregnancy is not associated with the progression of HIV disease in women attending an HIV outpatient program. *Am J Epidemiol* 1998; **147**: 434–440.
  - 33) Minkoff H, Hershov R, Watts DH, et al. The relationship of pregnancy to human immunodeficiency virus disease progression. *Am J Obstet Gynecol* 2003; **189**: 552–559.
  - 34) Report of the NIH panel to define principle of the therapy of HIV infection and guideline for the use of antiretroviral agents in HIV infected adults and adolescence. *MMWR Morb. Mortal Wkly Rep* 1998; **47** (RR-5): 1–82 (August 2001 update; available at <http://www.hivatis.org>.)
  - 35) Watts DH. Management of human immunodeficiency virus infection in pregnancy. *N Engl J Med* 2002; **346**: 1879–1891.
  - 36) Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Rapid point-of-care testing for HIV-1 during labor and delivery—Chicago, Illinois, 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2003; **52**: 866–868.
  - 37) Connor EM, Sperling RS, Gelber R, et al. Reduction of maternal-infant transmission of human immunodeficiency virus type 1 with zidovudine treatment. *N Engl J med* 1994; **331**: 1173–1180.
  - 38) Kind C, et al. Prevention of vertical HIV transmission: additive protective effect of elective Cesarean section and zidovudine prophylaxis. Swiss Neonatal HIV Study Group. *AIDS* 1998; **12**: 205–210.
  - 39) Lyall EG, Blott M, de Ruiter A, et al. Guidelines for the management of HIV infection in pregnant women and the prevention of mother-to-child transmission. *HIV Med* 2001; **2**: 314–334.
  - 40) Wimalasundera RC, Larbalestier N, Smith JH, et al. Pre-eclampsia, antiretroviral therapy, and immune reconstitution. *Lancet* 2002; **360** (9340): 1152–1154.
  - 41) Mawson AR. Effects of antiretroviral therapy on occurrence of pre-eclampsia. *Lancet* 2003; **361** (9354): 347–348.
  - 42) Ranzini AC, Chavez MR, Ghigliottly B, et al. Thrombotic thrombocytopenic purpura and human immunodeficiency virus complicating pregnancy. *Obstet Gynecol* 2002; **100** (5 Pt 2): 1133–1136.
  - 43) Tailleux L, Schwartz O, Herrmann JL, et al. DC-SIGN is the major Mycobacterium tuberculosis receptor on human dendritic cells. *Exp Med* 2003; **197**: 121–127.
  - 44) Khan M, Pillay T, Moodley JM, et al. Maternal mortality associated with tuberculosis-HIV-1 co-infection in Durban, South Africa. *AIDS* 2001; **15**: 1857–1863.
  - 45) Schulte JM, Bryan P, Dodds S, et al. Tuberculosis skin testing among HIV-infected pregnant women in Miami, 1995 to 1996. *J Perinatol* 2002; **22**: 159–162.



- 46) Bongain A, Rampil A, Durant J, et al. Cervical intra-epithelial neoplasia in women infected with human immunodeficiency virus. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1996; **65**: 195-199.
- 47) Sun XW, Ellerbrock TV, Lungu O, et al. Human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus-seropositive women. *Obstet Gynecol* 1995; **85**: 680-686.
- 48) Coppolillo EF, Peluffo M. HIV-seropositive pregnant women: a high-risk group for cervical SIL. *Acta Cytol* 1998; **42**: 1058-1059.
- 49) Spinillo A, Tenti P, Baltaro F, et al. Cervical intraepithelial neoplasia in pregnant intravenous drug users infected with human immunodeficiency virus type 1. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1996; **68**: 175-178.
- 50) Massad LS, Springer G, Jacobson L, et al. Pregnancy rates and predictors of conception, miscarriage and abortion in US women with HIV. *AIDS* 2004; **18**: 281-826.
- 51) Galloway DA. Papillomavirus vaccine in clinical trials. *Lancet Infect Dis* 2003; **3**: 469-475.
- 52) Arias RA, Munoz LD, Munoz-Fernandez MA. Transmission of HIV-1 infection between trophoblast placental cells and T-cells take place via an LFA-1-mediated cell to cell contact. *Virology* 2003; **307**: 266-277.
- 51) Soilleux EJ, Morris LS, Lee B, et al. Placental expression of DC-SIGN may mediate intrauterine vertical transmission of HIV. *J Pathol* 2001; **195**: 586-592.
- 52) Anderson VM. The placental barrier to maternal HIV infection. *Obstet. Gynecol Clin North Am* 1997; **24**: 797-820.
- 53) Zachar V, Fink T, Koppelhus U, et al. Role of placental cytokines in transcriptional modulation of HIV type 1 in the isolated villous trophoblast. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002; **18**: 839-847.
- 54) Patterson BK, Tjernlund A, Andersson J. Endogenous inhibitors of HIV: potent anti-HIV activity of leukemia inhibitory factor. *Curr Mol Med* 2002; **2**: 713-722.
- 55) Melendez J, Garcia V, Sanchez E, et al. Is decreased HIV-1 infectivity of placental macrophages caused by high levels of beta-chemokines? *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2001; **47** Online Pub: OL 51-59.
- 56) Bacsi A, Csoma E, Beck Z, et al. Induction of HIV-1 replication in latently infected syncytiotrophoblast cells by contact with placental macrophages: role of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha. *J Interferon Cytokine Res*. 2001; **21**: 1079-1088.
- 57) Ishii M, Hayakawa S, Yoshino N, et al. Expression of functional chemokine receptors in human placental cells and choriocarcinoma cell lines. *Am J Reprod Immunol* 2000; **44**: 365-373.
- 58) Wolinsky SM, et al. Selective transmission of human immunodeficiency virus type-variants from mothers to infants. *Science* 1992; **255**: 1134-1137.
- 59) Yoshino N, Naganawa S, Nakasone T, et al. Vertical transmission of human immunodeficiency virus type 1 in Japan: Presence of two subtype B and E with subtype E predominance. *Acta Paediatr. Japonica* 1998; **40**: 503-509.
- 60) Hara T, Yoshino N, Takayama N, et al. Presence of multiple HIV type 1 subtypes among mothers and children in Japan. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2001; **17**: 569-575.
- 61) Mallet F, Bouton O, Prudhomme S, et al. The endogenous retroviral locus ERVWE1 is a bona fide gene involved in hominoid placental physiology. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 1731-1736.
- 62) Ponferrada VG, Mauck BS, Wooley DP. The envelope glycoprotein of human endogenous retrovirus HERV-W induces cellular resistance to spleen necrosis virus. *Arch Virol* 2003; **148**: 659-675.
- 63) Cheynier R, Langlade-Demoyen P, Marescot MR, et al. Cytotoxic T lymphocyte responses in the peripheral blood of children born to human immunodeficiency virus-1-infected mothers. *Eur J Immunol* 1992; **22**: 2211-2217.
- 64) Rowland-Jones SL, Nixon DF, Aldhous MC, et al. HIV-specific cytotoxic T-cell activity in an HIV-exposed but uninfected infant. *Lancet* 1993; 1427-1435.
- 65) Kuhn L, Coutoudis A, Moodley D, et al. T-helper cell responses to HIV envelope peptides in cord blood: Protection against intrapartum and breast. Feeding transmission. *AIDS* 2001; **15**: 1-9.
- 66) Brynson Y, Pang S, Wei LS, et al. Clearance of HIV infection in a perinatally infected infant. *New Engl J Med* 1995; **332**: 833-838.
- 67) Economides A, Schmid I, Anisman-Posner DJ, et al. Apoptosis in cord blood T lymphocytes from infants of human immunodeficiency virus-infected mothers. *Clin Diag Lab Immunol* 1998; **5**: 230-234.
- 68) Clerici M, Saresella M, Colombo F, et al. T-lymphocyte maturation abnormalities in uninfected newborns and children with vertical exposure to HIV. *Blood* 2000; **96**: 3866-3871.
- 69) 早川 智, 山本 樹生. 胎児・新生児の免疫能. 産科と婦人科 7 特別号. 産婦人科感染症のすべて, 2000; 1384-1389.
- 70) Hayakawa S, Saito S, Shiraishi H and Satoh K. Human decidua as a site of extrathymic V $\gamma$ 1 T cells. *American Journal of Reproductive Immunology* 1996; **35**: 233-238.
- 71) Hayakawa S, Nagai N, Kanaeda T, et al. Interleukin-12 augments cytolytic activity of peripheral and decidual lymphocytes against choriocarcinoma cell lines and primary culture human placental trophoblasts. *American Journal of Reproductive Immunology* 1999; **41**: 320-329.
- 72) Sugita K, Hayakawa S, Karasaki-Suzuki M, et al. Granulocyte colony stimulation factor (G-CSF) suppresses Interleukin (IL)-12 and/or IL-2 induced Interferon (IFN)- $\gamma$  production and cytotoxicity of decidual mononuclear cells. *American Journal of Reproductive Immunology* 2003; **50**: 83-89.

Original

## Increased Prevalence of High Risk HPV in Patients with Sexually Transmitted Diseases

Chiho KOGANEI-MURABAYASHI<sup>1)</sup>, Satoshi HAYAKAWA<sup>1,2)</sup>, Kazufumi SHIMIZU<sup>2)</sup>,  
Tatsuo YAMAMOTO<sup>1)</sup>, Aleemuzzaman SHEIKH<sup>3)</sup> and Norimichi NEMOTO<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Obstetrics and Gynaecology, Nihon University School of Medicine

<sup>2)</sup>Department of Infectious Disease Control, Nihon University Advanced Medical Research Center

<sup>3)</sup>Department of Pathology, Nihon University School of Medicine

The acquisition of human papillomavirus (HPV), the most important etiological agent of cervical cancer, does not cause clinical complaints. Although HPV spreads together with other pathogens causing sexually transmitted diseases (STD) with complaints forcing the patient to seek medical advices for STD, STD have not yet been evaluated as a predictors of cervical cancer themselves. The present study aimed to determine the relationship between STD and HPV in order to evaluate the possible role of STD as a risk factor of cervical cancer. Three groups of patients were studied: (i) 56 women with STD (ii) 51 control women (iii) 25 patients with cervical neoplasms. The presence of HPV and other STD in cervical smears was detected with liquid phase hybridization and polymerase-chain reaction. HPV prevalence was 30% in patients with STD, and 12% in the group of women without pelvic inflammatory diseases (PID) ( $p < 0.05$ ), 76% in the patients with cervical neoplasms ( $p < 0.001$ ). On the contrary to our expectation, morphological abnormalities with PAP smear class III or more were detected only 7.5% of the STD patients with HPV infection. Our results suggests that patients suffering from STD apparently have high risk of cervical cancer but scarcely detectable with morphological methods. Thus patients with STD require managements with both virological and cytological procedures.

**Key words:** HPV, STD, carcinoma of uterine cervix, CIN

(J. Nihon Univ. Med. Ass., 2003; 63 (9): 413-417)

### Introduction

Carcinoma of uterine cervix is the most common gynecological malignancy in Japan and other countries. The etiology of cervical carcinoma has been intimately linked with human papilloma virus (HPV) infection<sup>1,2)</sup>. Epidemiological studies and laboratory examinations suggested a strong association between cervical neoplasias and HPV infection. Recent advances in molecular investigation revealed presence of HPV DNA sequences virtually in all cervical cancer tissues as well as precancerous lesions<sup>3)</sup>. Continuous expression of HPV E6 and E7 genes is considered to be indispensable for the maintenance of transformed phenotype, through inactivation of tumour suppressor genes including retinoblastoma protein and p53<sup>4)</sup>. Since genital HPV infection is transmitted through sexual contacts, it can be suspected that infection with any sexually transmitted diseases (STD) is a risk for concomitant HPV infection and subsequent development of cervical neoplasms. HPV is a group of more

than 70 different types of virus. They are given numbers to distinguish them. Some of the HPV viruses which cause benign genital warts such as HPV 6 and HPV 11 are categorized as low risk HPV while others which are linked to cervical intraepithelial neoplasias (CIN) and invasive cervical carcinoma such as type 16, 18 and 33 are defined as high risk HPV. As both groups evoke similar morphological changes such as koilocytosis in squamous epithelia, it is requested to distinguish which group of HPV is present at cervical lesions by molecular methods.

In this study, we examined the frequency of high risk HPV infection in STD patients and compared the results with some other diseases parameters indicating morphologically detectable abnormalities.

### Patients and Methods

From January 2002 to October 2003, we examined 53 female patients (age; 29.4  $\pm$  12.3 years) with STD (3 cases with genital syphilis, 5 cases with Neisseria gonorrhoea infection, 8 cases with herpes genitalia, 2

cases with HIV infection, 17 cases with cervicitis or pelvic inflammatory diseases (PID) related to Chlamydia trachomatis (CT) infection, 9 cases with CT-antigen negative PID and 9 cases with condyloma acuminatum). These patients visited Nihon University Itabashi Hospital with symptoms suggesting of STD infection such as, lower abdominal pain, genital bleeding and genital warts and vaginal discharge. We also examined 51 age-matched negative controls (age; 32.1  $\pm$  9.4 years) selected from healthy subjects undertaking routine gynecological check-up, pregnancy test or non-STD patients with benign gynecological diseases such as uterine leiomyoma and menstrual disorders. Positive controls were taken from 14 invasive cervical cancer and 7 CIN patients. Specimens for PAP smear and HPV DNA examination were taken with cotton swabs during routine pelvic examination. High risk HPV DNA was detected using commercially available liquid phase hybridization kit (Hybrid Capture<sup>®</sup> II, Gaithersburg, MD, USA) as reported previously<sup>5)</sup>. Positive signal for one or more of the HPV strains 16, 18, 31, 35, 45, 51 and 56 were designated as high risk HPV positive. Furthermore, in order to verify the specificity and sensitivity of Hybrid Capture method, a total of 20 cytological samples were collected again from high risk HPV positive and negative patients. Cells were collected from the cervix using a cotton swab rinsed in 0.9% saline. Cells were pelleted at 2000  $\times$  g for 15 minutes before resuspending in 200  $\mu$ l Tris EDTA buffer (pH 7.2). DNA extraction was then performed directly using the Qiagen DNA mini kit, according to the manufacturer's protocol, resulting in 400  $\mu$ l of extracted sample. Three primer pairs were employed in our study: the consensus primer pair, together with HPV-16 and HPV-18 specific primer pairs (Table 1). Primer sequences were taken from published articles<sup>6-8)</sup>. For the detection of HPV, sample DNA was amplified in the presence of consensus primers or type specific primers (20 nM), 2.5 mM of dNTPs (Takara, Tokyo Japan) and 2 U of Taq polymerase (Takara) in a thermal cycler (Takara PCR cycler SP). The consensus primers amplify 110 bp fragment, while type 16 and type 18 specific primers amplify 153 bp and 248 bp fragments respectively. For standardizing the PCR protocol we used, as positive controls, suspensions of HeLa and SiHa cells naturally infected with HPV-18 and HPV-16, respectively. Thirty cycles of amplification enabled us to detect HPV derived fragments on 2% agarose gel electrophoresis. For cases with PAP smears cytologically graded as class III or higher, we made histopathological diagnosis from biopsy samples taken under a pair of colposcopes (Carl Zeiss Japan, Tokyo). Data were analyzed statistically with StatView V 5.0 software on a Macintosh G3 computer.

**Table 1** Sequences of PCR primers to detect HPV infection

HPV-16	Sense	AAT GCT AGT GCT TAT GCA GC
	Antisense	ATT TAC TGC AAC ATT GGG TAC
HPV-18	Sense	TGG TGT ATA GAG ACA GTA TAC CCC A
	Antisense	GCC TCT ATA GTG CCC AGC TAT GT
HPV consensus	Sense	TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC
	Antisense	CAA CCT TCA TCC ACG TTC ACC

**Table 2** Frequencies of active HPV infection among patients with STD, cervical neoplasms, benign gynecological disorders and control subjects**A. STD**

Clinical diagnosis	high risk HPV positive patients
genital syphilis	0/3 (0%)
Neisseria gonorrhoea infection	1/5 (20%)
Herpes simplex	2/8 (25%)
HIV carrier	1/2 (50%)
Condyloma acuminatum	2/9 (22%)
Chlamydia cervicitis, PID	7/17 (41%)
CT negative PID	3/9 (33%)
Overall frequency	16/53 (30%)

**B. Control subject**

Clinical diagnosis	high risk HPV positive patients
pregnancy	1/11 (9%)
medical check-up	3/21 (14%)
Benign gynecological disorders	
uterine myoma	1/8 (13%)
menstrual irregularities	1/7 (14%)
functional dysmenorrhea	0/4 (0%)
Overall frequency	6/51 (12%)

**C. Cervical neoplasms**

Clinical diagnosis	high risk HPV positive patients
Invasive cervical carcinoma	13/14 (93%)
CIN	6/8 (75%)
Adenoma malignum	0/3 (0%)
Overall frequency	19/25 (76%)

**Results***Prevalence of high risk HPV infection in STD patients, based on liquid phase hybridization*

Table 2A shows prevalence of HPV infection in the STD patients of our study. As has been reported previ-

ously, we observed increased prevalence of high risk HPV infection in patients infected with HIV 1/2 (50%), Herpes simplex 2/8 (25%) condyloma acuminatum 2/9 (23%), chlamydial cervicitis and/or chlamydia induced PID 7/17 (41%) and CT negative PID 3/9 (33.3%). The prevalence in subjects who wish routine gynecological check-up and pregnancy test or non-STD patients with benign gynecological diseases were 4/36 (11%) and 2/19 (10.5%) respectively (Table 2B). We observed an increased frequency of HPV infection though in patients with gonococcal infection (1/5 (20%)), the difference was not statistically significant. Contrary to our assumption, we observed no HPV carrier in the patients with syphilis.

#### *Prevalence of abnormal cytological findings in STD patients*

For 51 patients with STD, we examined routine PAP smear and observed abnormal cytological finding (class III or more) only in 4 patients (1 with HIV infection, 1 with herpes genitalia and 2 with CT infection) (Table 4). All patients were confirmed to be positive for high risk HPV. On histopathological examination of biopsy specimens taken under colposcopy, 1 patient (CT infection) showed moderate dysplasia, 2 patients (HIV infection) showed mild dysplasia while others showed chronic cervicitis with or without minor dysplastic changes.

#### *Social and gynecological backgrounds of the STD patients with /without HPV infection*

It has been reported that STD patients have high risk to be infected with multiple diseases because of sexual activities often with multiple partners. We collected patients' information about their social and gynecological backgrounds. However, due to the conservative nature of the society, it was difficult to ask the patients about their sexual history, such as the first age of sexual contact, sexual habits and number of partners. Table 3 shows relevant clinical information of STD patients and controls. No statistical difference was observed between the two groups, except for smoking habit.

#### *Prevalence of high-risk HPV infection in cervical neoplastic changes*

In the 29 positive control cases, we observed presence of HPV in 6/8 (75%) CIN patients and 13/14 (93%) patients with invasive cervical carcinoma (Table 2C). Of interest, no patient with adenoma malignum showed high risk HPV infection. While HPV infection is recently reported in cervical adenocarcinomas, our initial finding distinguishes adenoma malignum for its pathogenesis other than HPV infection.

**Table 3** Sociobiological features of the STD patients with/without HPV

	HPV (+) n = 16	HPV (-) n = 37
age	28.5 ± 7.21	27.1 ± 10.45
gravida	1.44 ± 0.56	1.32 ± 0.76
para	0.29 ± 0.76	0.33 ± 0.64
married	7 (43%)	17 (46%)
divorced	2 (13%)	3 (8%)
smoking	10 (59%)	13 (35%)*

\*  $p = 0.022$

**Table 4** Prevalence of PAP smear class III or more in the patients with STD

Diagnosis	prevalence of class III or more
genital syphilis	0/3 (0%)
Neisseria gonorrhoea infection	0/5 (0%)
Herpes simplex	0/8 (25%)
HIV carrier	1/2 (50%)*
Condyloma acuminatum	1/9 (11%)**
Chlamydia cervicitis, PID	2/17 (12%***)
CT negative PID	0/9 (0%)
Overall frequency	4/53 (7.5%)

\*.\*\*\*high risk HPV positive

\*mild dysplasia

\*\*chronic cervicitis

\*\*\*One mild dysplasia and 1 moderate dysplasia

#### *Comparative sensitivity of liquid phase hybridization and PCR*

For 10 high risk HPV positive STD patients and 10 patients with negative results, we verified the hybridization results through PCR analysis using the same clinical samples. Obtained results showed good consistency between the two methods, since all samples positive with liquid phase hybridization showed positive results with HPV consensus primers. However in the 10 STD patients without evidence of high risk HPV infection, two cases showed positive results with consensus HPV primers and HPV-16 specific primers.

#### *Overall frequencies by dot blot hybridization and statistical analysis*

In the present study, three groups were studied (i) 53 women with STD (ii) 32 women for medical checkup or pregnancy test and 19 benign gynecological disorders, (iii) 25 women with CIN or invasive cervical neoplasms. High risk HPV prevalences detected with liquid phase hybridization assay were 30 in the patients with STD, 12% in control groups ( $\chi^2 p < 0.05$ ) and 76% in the patients with cervical neoplasms. ( $\chi^2 p < 0.001$ )