

た。それぞれのサブタイプは IIIB 株が B、Y198-031217 株が B、Y191-031111 株が AE、Y185-030403 株が A、Y30-040409 株が C である。これらの分離株の HIV-1 RNA 濃度を終点希釈における RT-nested PCR の結果をポアソン分布で解析する方法（以下、ポアソン法）と Amplicor HIV-1 Monitor Test, version 1.5（以下、Amplicor）によって決定した。

HIV-1 の RNA および DNA の検出に用いた RT-nested PCR は gag 遺伝子 p24 コーディング領域を標的としている（図 1）。1 回目と 2 回目の PCR のプライマー認識部位の各 HIV-1 サブタイプ（A、AE、B、C）におけるコンセンサス塩基配列を図 1 に示す。これらの塩基配列は HIV Databases

(<http://www.hiv.lanl.gov/content/index>)から入手した。4 箇所のプライマー認識部位においてサブタイプ間の塩基の不一致が 1~3 箇所で見られる。そこで、各サブタイプの塩基配列に対応するプライマーを別個合成して実験に使用した。

被験者の HIV-1 サブタイプは末梢血単核球由来 DNA を用いて我々が独自に開発したサブタイプ特異的 PCR 法(Kato et al., 2003, AIDS Res. Hum. Retroviruses. 19, 1057-1063)によって決定した。

（倫理面への配慮）

国内血友病 HIV-1 感染者の感染源は 1980 年初期に米国から輸入された血液製剤であるために、この感染者群の HIV-1 サブタイプは当時米国で流行していた B 株であることが一般的に確かめられている。もし、HIV-1 感染血友病患者のサブタイプが B 以外であることが判明した場合、プライバシーに関する重大な問題が生じる恐れがあるため、本臨床研究に参加した感染者のうち血友病患者に関しては HIV-1 サブタイプの検査を控えることにした。

C. 研究成果

まず、サブタイプ B の標準株である IIIB 株の培養上清の HIV-1 RNA 濃度をポアソ

ン法（サブタイプ B プライマー使用）と Amplicor によって測定したところ、それぞれ 1.28×10^9 copies/ml と 1.42×10^9 copies/ml という非常に近い値が得られた。次に、サブタイプの異なる 4 つの HIV-1 分離株を p24 濃度で 1 pg/ml に希釈した後、HIV-1 RNA 濃度を、サブタイプ B プライマーを用いたポアソン法、サブタイプ特異的プライマーを用いたポアソン法、および Amplicor によって求めた（表 1）。ポアソン法による濃度測定値は 1 コピーのウイルス RNA が RT-nested PCR で検出できるとき真の濃度と一致するという特性がある。非サブタイプ B の HIV-1 株に対しては、サブタイプ特異的プライマーを用いた場合の方が従来のサブタイプ B 特異的プライマーを用いた場合より HIV-1 の濃度が同等かそれ以上で、Amplicor の値に近かった。すなわち、この結果は 1 コピーのウイルス RNA を検出するためには、少なくとも、サブタイプ B プライマーを用いるよりは対象ウイルスのサブタイプに特異的プライマーを用いるべきであることを示している。

以上の結果を受けて、今年度の後半から、被験者の HIV-1 サブタイプを前もって末梢血単核球由来 DNA を用いて決定し、そのサブタイプに合ったプライマーを用いて末梢血単核球 DNA 中のプロウイルスを検出できることを確認してから、洗浄精子ならびに胚移植前の胚培養液の HIV-1 検査を行うように作業過程を変更した。

最後に、本臨床研究における平成 16 年 4 月から平成 17 年 3 月までの当研究室における HIV-1 検査数をまとめる。検査対象者数は 38（夫 24、妻 5、児 5）、検査数は 94（洗浄精子 39、胚培養液 24、血漿 14、単核球 17）であった。また、サブタイプ決定の検査数は 12 で、そのうち 8 検体がサブタイプ B、2 検体が AE、1 検体が AG と判明し、1 検体は不明であった。被験者のうち外国籍は 2 人で、一人はサブタイプ AG、一人は AE であった。

D. 考察

HIV-1 のように遺伝的多様性の高いウイルスを 1 コピーまで検出するには非常に困難な技術的問題を発生する。サブタイプ AE、B、C の分離株に関しては、サブタイプ特異的プライマーを用いたポアソン法による測定値は、RT-nested PCR にポアソン法による HIV-1 RNA 濃度測定値が Amplicor による測定値とほぼ同じであったが、サブタイプ A の分離株に関しては、ポアソン法による測定値が Amplicor による測定値の約 1/5 であった。Amplicor の測定精度は 1/3 から 3 倍とされていることから考えると、この結果は今回用いたサブタイプ A の分離株に関しては 1 コピーまで HIV-1 RNA を検出できなかったことを示唆している。このことはサブタイプ A の HIV-1 株のサブタイプ内多様性が高いことと関係しているのかもしれない。サブタイプ A を 1 コピーまで検出するためにはプライマーを混合物にするなどの工夫が必要であると考えられる。

HIV 不一致夫婦における洗浄精子を用いた生殖医療において、妻および児への感染リスクを限りなく 0 に近づけることが求められている。そのためには、今後も HIV-1 RNA および DNA の検出技術のたゆまない改良が必要であると考えられる。

E. 結論

HIV-1 RNA を 1 コピーまで検出するためには RT-nested PCR に用いるプライマーには、少なくとも、検査対象の HIV-1 のサブタイプに特異的なプライマーを使用する必要があることを明らかにした。この結果を受けて、HIV 不一致夫婦における洗浄精子を用いた生殖医療においては、被験者の HIV-1 サブタイプを前もって末梢血単核球由来 DNA を用いて決定し、そのサブタイプに合ったプライマーを用いて、洗浄精子ならびに胚移植前の胚培養液の HIV-1 検査を行うように作業過程を変更した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Miyake, A., Enose, Y., Ohkura, S., Suzuki, H., Kuwata, T., Shimada, T., Kato, S., Narayan, O., and Hayami, M. The quantity and diversity of infectious viruses in various tissues of SHIV-induced monkeys at the early and AIDS stages. *Arch. Virol.* 149, 943-955, 2004.

2) Takakuwa, K., Kashima, K., Suzuki, M., Fujita, K., Tamura, M., Kaneko, S., Kato, S., Hanabusa, H., and Tanaka, K. Studies on the IVF-ET for discordant couples where the man is HIV positive and the woman is negative using sperm washing technique and highly sensitive PCR method. *International Proceedings of IX International Congress of Reproductive Immunology* 11-15, 2004.

2. 学会発表

1. Shingo Kato, Rie Tanaka. Antiretroviral effects of intracellular protease inhibitors. XV International AIDS Conference, Abstract WePeA5669. July 11-16, 2004, Bangkok, Thailand.

2. 木内英、花房秀次、小島賢一、加藤真吾、田中理恵、築地謙治、太田未緒、和田育子. Tenofovir の効果と副作用. 第 18 回日本エイズ学会学術集会、2004 年 12 月 9-11 日、静岡.

3. 花房秀次、木内英、太田未緒、和田育子、小島賢一、田中理恵、築地謙治、加藤真吾. Atazanavir を含む抗 HIV 療法の評価. 第 18 回日本エイズ学会学術集会、2004 年 12 月 9-11 日、静岡.

4. 築地謙治、根岸昌功、長谷川直樹、木内英、花房秀次、杉浦互、加藤真吾. PI 服用者における毛髪内 PI 定量法の検討. 第 18 回日本エイズ学会学術集会. 2004 年 12 月 9-11 日、静岡.

5. 加藤真吾、田中理恵、杉浦互. LC-MS/MS による AZT の細胞内薬物動態の解析. 第 18 回日本エイズ学会学術集会、2004 年 12 月 9-11 日、静岡.

6. 向出雅一、加藤真吾、田中理恵、近藤真規子、嶋貴子、須藤弘二、武部豊、今井光信. LTR、gag、pol 領域を用いた HIV-1 プロウイルス定量法に関する検討. 第 18 回日本エイズ学会学術集会、2004 年 12 月 9-11 日、静岡.

7. 須藤弘二、嶋貴子、近藤真規子、古谷茂之、瀬尾麻美、加藤真吾、今井光信.

HIV RNA 測定キット COBAS TaqMan HIV-1 Test 「マニュアル」の基礎的検討. 第 18 回日本エイズ学会学術集会、2004 年 12 月 9-11 日、静岡.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

図1. HIV-1サブタイプ間におけるPCRプライマー認識部位の塩基配列の相違

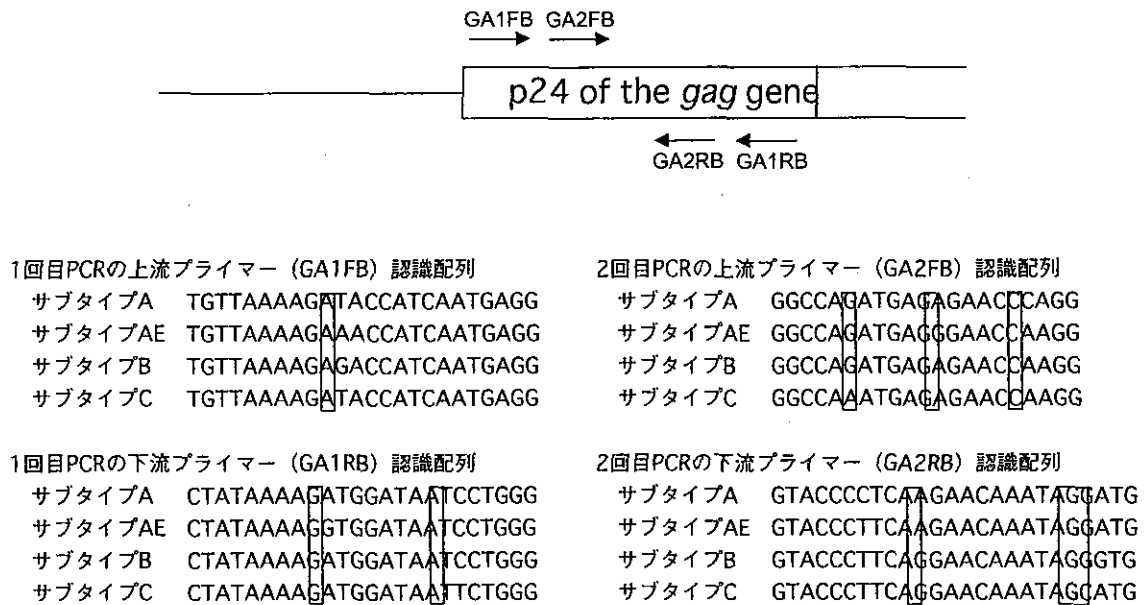


表1. サブタイプBプライマーとサブタイプ特異的プライマーを用いたRT-nested PCRのポアソン分布解析によるHIV-1 RNA濃度測定値の比較

HIV-1株	サブタイプ	HIV-1濃度の測定値 (コピー/ml)		
		サブタイプB プライマー	サブタイプ特異的 プライマー	アンプリコア
Y198-031217	B	-	10,000	9,200
Y191-031111	AE	2,100	3,600	12,000
Y165-020403	A	330	1,200	5,700
Y30-040409	C	39,000	39,000	13,000

平成 16 年度厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

「若年婦人における HIV 感染状況および HIV 感染症と生殖医療との
関連性に関する研究」

HIV 感染者の人工授精・体外受精に関する基礎的・臨床的研究

(4) HIV 陽性男性精液からのウイルス除去、運動精子の選別 DNA 損傷精子観察
法の開発

東京歯科大学市川総合病院産婦人科講師 兼子智

はじめに

われわれは HIV 陽性男性精液からウイルスを除去し、IVF-ET に供する精子の調製法に関して研究を行ってきた。これまでは、精液中のフリーウイルス、感染細胞（リンパ球、とくに単核球）の除去ならびに成熟した運動精子の選別を目標とし、Percoll 密度勾配遠心法および swim up を用いたウイルス除去法を確立した。当初は不連続多層 Percoll を用いたが、本研究で Separable Fine Neck Tube を用いる連続密度勾配法を開発し、精液中の HIV 除去に臨床応用が開始されている。

精子形成過程で生じた精子 DNA 損傷は、修復されずに蓄積する。精子における染色体損傷は、ほとんどが欠失である。ヒト造精過程において DNA 2 重鎖切断（double strand break）を伴う細胞死（アポトーシス）により一部の精細胞が消滅している。消滅を免れて射出に至った精子中にも DNA 損傷精子が混在する。重度精液所見不良症例では、その比率が正常精液に比して増加する。HIV 感染者は抗 HIV 薬を服用している。このうち核酸アナログ系薬剤は DNA 合成阻害活性を有し、精巢はこれらに感受性が高く、精液検査を行った患者には精液所見不良例が高

頻度で見い出される。われわれは HIV 陽性男性の assisted reproduction technology (ART) 施行に際しては、ウイルスの除去とともに積極的に DNA 損傷精子の排除を行う必要があると考えた。このためには、個々の精子の DNA 損傷を多面的に解析する方法を開発する、さらにこれを指標として精液中の精子を分画する方法の確立が不可欠である。

上述したように、本法の臨床応用が予定される HIV 陽性男性は精液所見不良の頻度が高い。現在汎用されている精子の分画手法では極少量の精子を取り扱うことが困難であるので、新たに微小環境精子操作技術の開発が必要となる。このための専用デバイスの設計、製作が不可欠である。

1. HIV 感染精液からの精子調製法の開発

精液には微少な結石、ムチン等が含まれている。さらに射精に際して外尿道口の常在菌で汚染される。亀頭に付着した繊維（おそらく下着に由来する）が精液に混入し、これらの表面には細菌のコロニーが見られる場合が多い。単に精液を Percoll 密度勾配に層積して

遠心分離すると、繊維等の異物は沈澱中に回収される。密度勾配遠心法により精子懸濁液の無菌化、異物除去を図るためには前処理が必要である。

精液中に浮遊する細菌は Percoll 密度勾配遠心法により除去できるが、遠心分離後、パストールピペット等で上清を吸引、除去すると、遠心管内壁に付着した精漿（細菌）が流下して沈澱を再汚染する。

以上の観点から、前処理した精液を Separable Fine Neck Tube を用いる Percoll 連続密度勾配法により分離し、最終的に swim up により運動精子を選択する方法を開発した。本処理法を HIV の除去に応用した。

1-1. 精液前処理法、Separable Fine Neck Tube を用いる Percoll 連続密度勾配法

精液を Hanks 液で 2-3 倍に希釈して孔径 $20\mu\text{m}$ のメッシュフィルターで濾過をする。さらに 10 分間静置してフィルターを通過した微少な結石を自重沈降させた後に密度勾配に層積する。液量が多い場合には、Percoll を 0.1ml 程度管底に導入して、1500-2000rpm で 5 分間程度遠心分離（クッション法）して濃縮しておく（図 1）。

Separable Fine Neck Tube(SFNT) は 1. Percoll 連続密度勾配法において上清で沈澱を再汚染することなく回収する、2. 精液所見不良例を考慮して可及的に精子濃縮率を向上させる（沈澱量を少なくする）、ことを目的として開発した。SFNT はガラス製のチューブであり、従来用いられてきた遠心分離管と比してその底部が細く絞られており（狭部の直径は数 mm である）、その中程にカットラインを有する。図 2 に方法をまとめた。

98%等張化 Percoll 液 5.0 ml を SFNT に注ぎ、さらに Hanks 液 1.0ml を層積

し、簡易密度勾配作成装置にセットし、10 回程度回転して連続密度勾配を形成する。ここに前述した前処理精子スウィングアウトローターを用いて 25-30

分間遠心分離を行う（1600xg - 2400xg、

使用する Percoll 濃度に従い、調整する）。遠心分離後、精子は SENT 底部に沈澱、濃縮される。スピッツを用いる従来法における沈澱量は 0.1 - 0.2ml であったが、本法ではチューブの底部が細く絞られているため、精子は高度に圧縮され、その沈澱量は 0.01-0.02ml 程度となる。通常、精液を培養液等で希釈して遠心分離すると管底に強く圧縮されて生存性を損なうが、本法では高密度の Percoll による浮力が重力（遠心力）を相殺するため、精子運動性を損なうことはない。SFNT ではアンプルカットの要領で、沈澱（精子）の少し上の部分でカットし、さらに残余の Percoll を吸引除去する。この際、Percoll が流れ出るのを防止するため、ゴムキャップにスポイトを取り付け、装着する際に陰圧となるようにする。カットした瞬間、空気が底部から流入して液が流出するのを防止する。本法では、従来困難であった高度乏精子症においても精子濃縮が可能である。

1-2. swim up 法による運動精子の分離

図 3 に swim up の方法をまとめた。図上部に示した原法は精液を希釈、低速で遠心分離する。この操作を 2 回繰り返した後、沈澱を約 0.2ml の培養液に懸濁して丸底チューブに入れて培養液を注ぎ、約 30 度傾けて静置する。単純な希釈遠心法では細菌も同時に沈澱中に濃縮され、精子懸濁液と層積する培養液に比重差がないため層積時に沈澱が舞い上がり、細菌、HIV が混入しやすい。またチューブを傾けても界面

の面積はそれほど大きくなる。改良法では、平底チューブにまず培養液を入れ、その底部に Percoll に懸濁した遠心沈澱をカテラン針等で挿入する。その際、精子懸濁液に浸した針の外周が汚染するので、

厳密には平底チューブにまず培養液を入れた後、内径 2mm 程度のガラスキャピラールを挿入し、その中を通して精子懸濁液を底部に導入する。キャピラール内部は汚染するが、層積した培養液は全く汚染しない。

Swim up の基本原理は細胞拡散であり、精子回収率は極めて低い。極少量の運動精子を対象とする場合は、図 3 に示した macro swim up では精子回収が不可能であり、新たに micro-swim up dish (図 4) を開発した。micro-swim up dish は培養用シャーレの中央部に小さな窪みを有するデバイスであり、凹部とその周りに 50-100 μ l の培養液を導入し、ミネラルオイルで覆う。ここに SFNT を用いて 10 μ l 程度に濃縮した精子懸濁液を導入する。凹部から上昇した精子がシャーレ底面を横に移動 (swim side) していくのが倒立顕微鏡、実体顕微鏡等で観察することが可能である。必要十分な運動精子が顕微鏡下に確認されたら、回収する。

1-3. SFNT、Micro swim up dish を用いた精液所見不良例からの運動精子の回収

原精液濃度 1000 $\times 10^4$ /ml, 運動率 20%以下の重度精子無力症 10 例を対象として、本法を応用した。平均精液量、2.6 \pm 0.87 ml, 593 \pm 250 $\times 10^4$ /ml、運動率 10.4 \pm 5.1%でした。SFNT 沈澱画分は容量が少ない為、精子所見の測定は行わずに、沈澱画分全量を micro-swim up dish 凹部に導入した。検討した全

例において運動精子を確認することができ、約 30 μ リットルの培養液を回収した。CASA を用いて精子所見を観察した結果、平均精子濃度 55.9 \pm 35.8 $\times 10^4$ /ml, 運動率 89.4 \pm 5.1%

であった。従って、回収できた総運動精子数は、4000-38000 匹と推定される。表 1 に結果をまとめた。

2. 個々のヒト精子における DNA 損傷の観察を目的とした Single cell pulse field gel electrophoresis (SCPFGE) の開発

ヒト射出精子には DNA 損傷を有するものが混在し、精液所見不良例ではその比率が増加することが明らかになった。上述したように、HIV 陽性男性では精液所見不良例が高頻度で存在し、本研究で開発した SFNT を用いる密度勾配遠心法、micro swim up dish を用いる微小環境 swim up を行っても、IVF-ET に必要十分な運動精子を回収できない場合が多い。このような症例では、顕微授精 (ICSI) の対象となる。ICSI は顕微鏡下に直接精子を卵に穿刺して授精を図るため、ごく少量の精子で受精卵が得られる。現行の ICSI は全ての精子に DNA 損傷が存在しないことを前提とし、単に顕微鏡下に精子を pick up しているにすぎない。HIV 感染者は抗 HIV 薬を服用している。このうち核酸アナログ系薬剤は DNA 合成阻害活性を有し、精巣はこれらに感受性が高い。上述した非感染精液所見不良症例に比し、感染者ではさらに DNA 損傷の可能性が高い。HIV 感染者に対する ICSI の適応とその鑑別診断には、精子 DNA 損傷を量的、質的に観察する方法の開発、さらにはそれらを指標とした DNA 損傷精子排除法の確立が不可欠であると考えた。

我々は、個々の細胞の DNA 2 重鎖断

片化(以下、DSB)を可視化できる single cell pulse field gel electrophoresis (以下、SCPFGE)を開発した。本法により射精精液中のヒト精子を観察した結果、泳動像は極めて多様であった。

2-1. single cell pulse field gel electrophoresis 装置

本研究の目的は、個々の細胞における染色体 DNA fiber の損傷を可視化することである。従来、主として数千 base 以下の DNA 断片の分離を目的とした電気泳動には、1 次元の電場を用いるサブマリン電気泳動装置が汎用されてきた。本法は染色体レベルの長鎖 DNA の分離には不向きである。そこで染色体レベルの DNA fiber を電気泳動分離するため、single cell pulse field gel electrophoresis 法を開発した。スライドガラス上に薄膜状に形成したアガロースゲル内に播種した細胞を直接融解し、直交する 2 組の電場を数秒間隔で間歇的に通電する (図 5)。細胞は界面活性剤、ウレア存在下にトリプシンにより融解を行うが、不溶物が残存する。個々の細胞に由来する長鎖 DNA fiber はこの不溶物をアンカーとして、原点より伸展した。微視的には DNA はゲル内を鍵状に泳動することになる。DNA 断片はアンカーに補足されることなく、前方に移動した。図 6 に泳動装

置の構成をまとめた。

2-2. SCPFGE による個々の精子の DNA 断片化像の観察

精子 DNA 断片化の割合、断片化様式は精液ごとに大きく変化した。図 7-1、2 に断片化様式を分類し、まとめた。連続したファイバー状 DNA のみを認めるもの、断片化が最も軽度なものでは、原点から伸展する連続したファイバー状 DNA の先に数本の分離した長い DNA ファイバーを認めるもの、ファイバー状 DNA の先に 1 ないし 2 群の粒子状の短鎖 DNA、原点から短鎖 DNA が長く伸びたもの、最も断片化が進行したものでは原点部分が消失し、泳動度が速い断片のみ、などに分類された。

まとめ

本研究において、1. 精液所見不良例から効率よく運動精子を回収することを目的とした精液前処理法、Separable Fine Neck Tube を用いる Percoll 連続密度勾配法、微小環境 swim up 法を開発した。2. 個々のヒト精子の DNA 2 重鎖切断を高精度で観察できる single cell pulse field electrophoresis 法を開発した。本法を指標として、DNA 損傷精子の排除技術の開発を行う。

表 1 重度精子無力症例からの運動精子の回収

原精液			Swim up精子	
精液量 (ml)	精子濃度 ($\times 10^4$ /ml)	運動率 (%)	精子濃度 ($\times 10^4$ /ml)	運動率 (%)
1.9	900	7.40	56	88
2.6	1000	14.0	140	92
3.1	560	9.60	78	95
1.8	440	18.2	52	91
3.3	460	8.50	44	95
2.2	820	13.5	72	90
1.4	450	16.4	29	87
4.4	280	8.80	51	79
2.6	310	4.90	22	84
2.4	710	2.40	15	93
2.6 \pm 0.87	590 \pm 250	10.4 \pm 5.1	56 \pm 36	89 \pm 5.1

図1 フィルター濾過、自重沈降による精液前処理

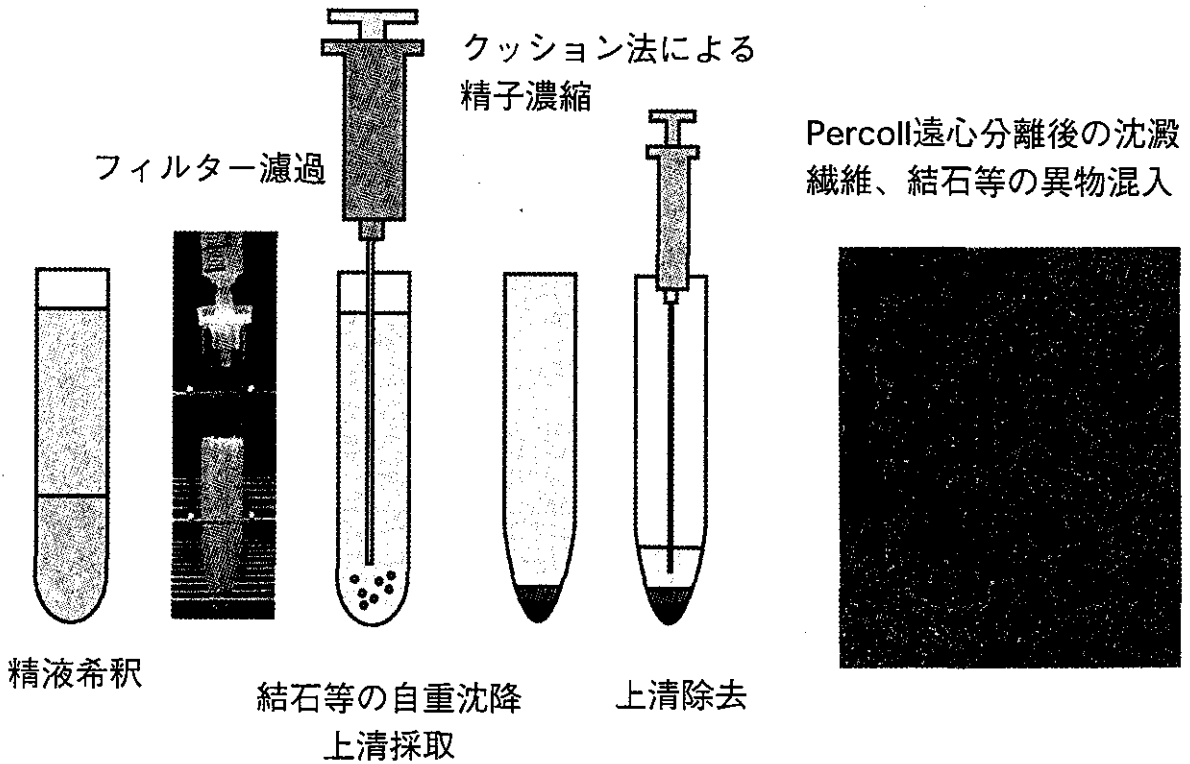


図2 Separable Fine Neck Tubeを用いる精子調製

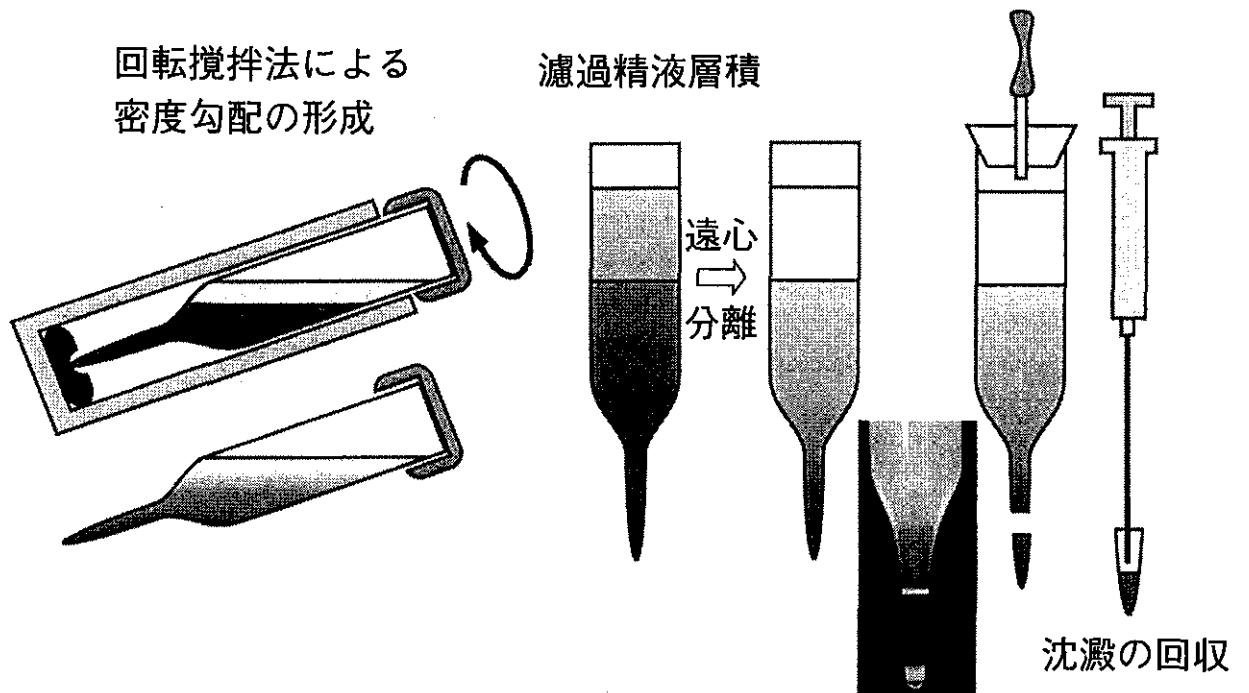


図3 Macro-swim up法

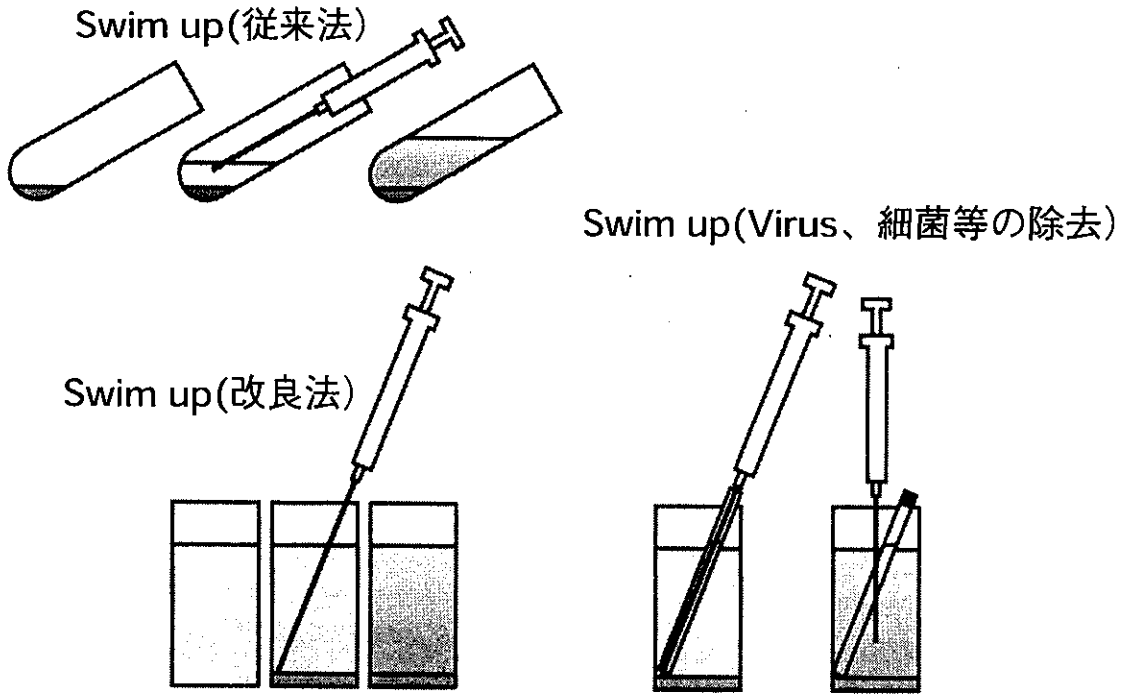


図4 Micro-swim up dishによる極少量運動精子の回収

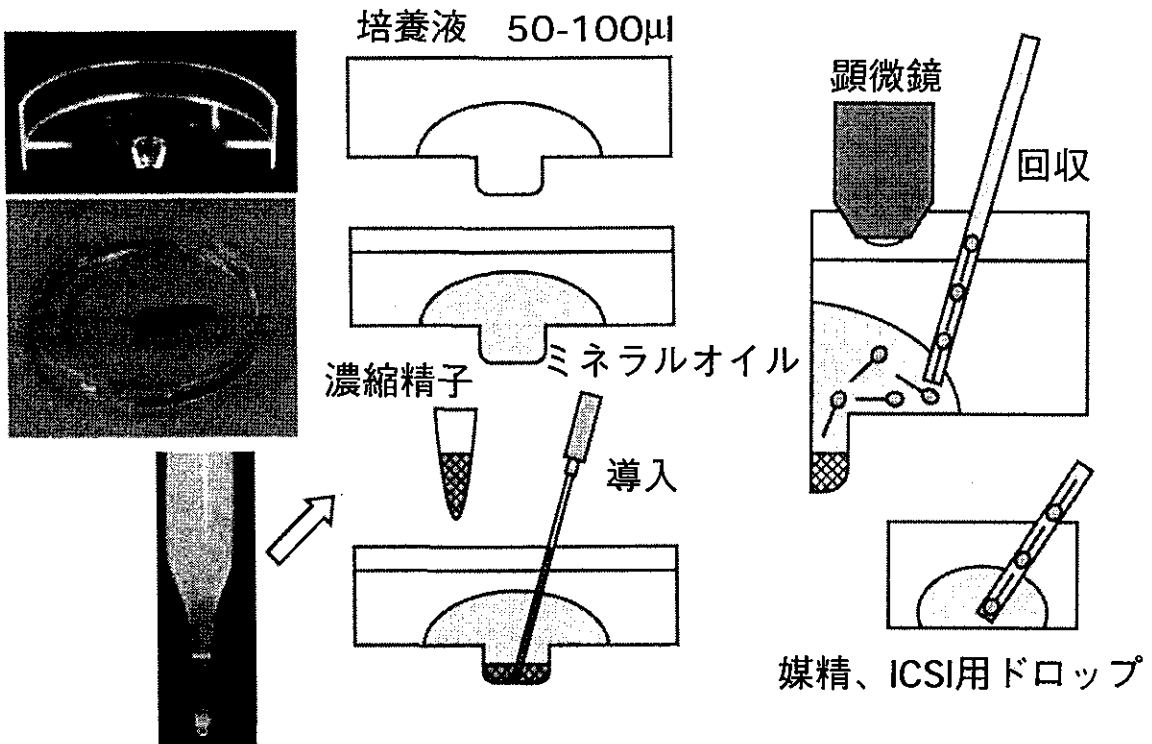
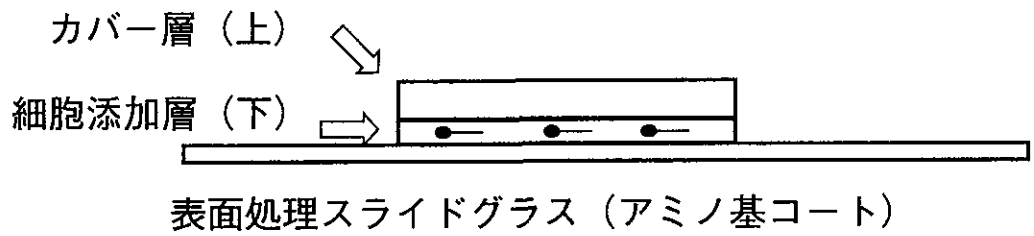


図5 スライドガラス上へのゲル作成



ゲル組成

アガロース (0.7%アガロース、0.7% Syner Gel混合物) 0.8ml
 1.0M 酢酸緩衝液、pH5.0、0.1ml
 精製トリプシン (1.0 mg/ml)、0.1 ml

細胞添加層には、精子を懸濁
 カバー層には無添加

細胞融解

100µg/ml 精製トリプシン
 0.5 M NaCl
 0.2% Triton X-100
 5.0mM EDTA,
 20mM Vitamin C-Na
 10mM DTT
 2.0 M Urea

図6 Single Cell Pulse field Electrophoresis

泳動緩衝液

33mM Tris
 17mM ascorbic acid
 1.3mM EDTA

電位勾配 2.0V/cm
 泳動時間 10分間
 電場切替インターバル 3.0秒
 DNA蛍光染色 SYBR Gold

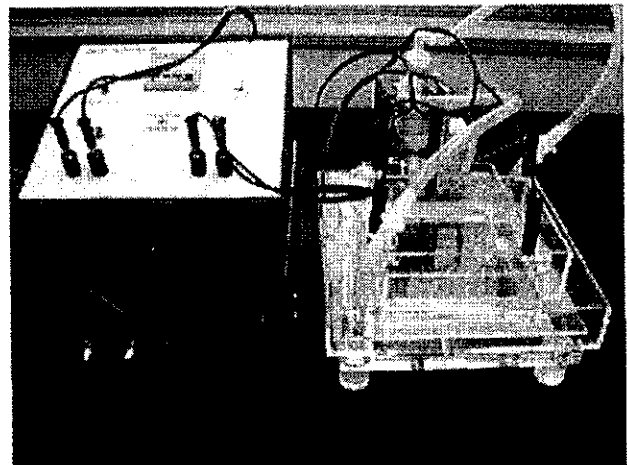
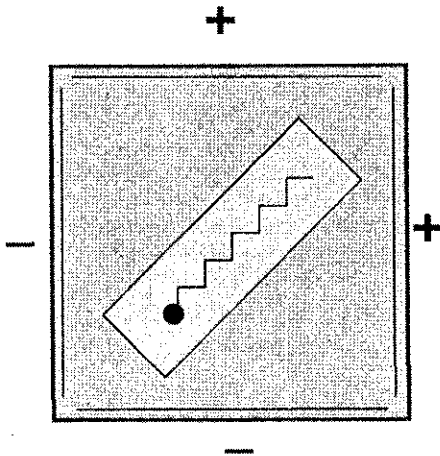
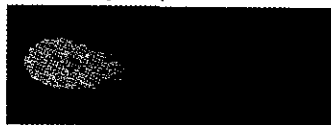


図7-1 DNA断片化像の多様性

正常像 (DNA fiberのみを認める)



数本の分離した長いDNA fiberを認める



長鎖DNA fiberを示す断片化

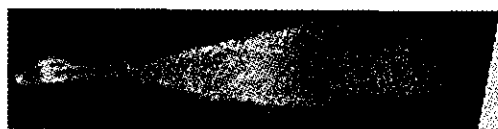
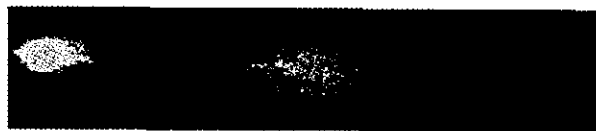
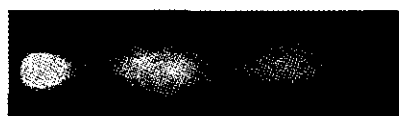
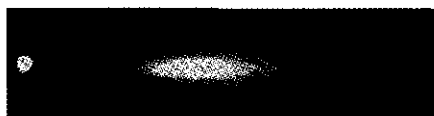


図7-2 DNA断片化像の多様性

短鎖DNA fiberを示す断片化



高度断片化



原点が消失して短鎖断片のみ



論文発表

1. 高桑好一, 田中憲一: 検査値をどう読むか。 -産婦人科診療へのアプローチ II 感染症 4 HIV 産科と婦人科, 71:56-59, 2004
2. K. Takakuwa, K. Kashima, M. Suzuki, K. Fujita, M. Tamura, S. Kaneko, S. Kato, H. Hanabusa, K. Tanaka: Studies on the IVF-ET for discordant couples where the man is HIV positive and the women is negative using sperm washing technique and highly sensitive PCR method. The Proceedings of the IX Congress of the International Society of Reproductive Immunology, 107-111, Medimond, S.r.l., Bologna, Italy, 2004
3. 増田剛太, 木村哲, 岩本愛吉, 岡慎一, 立川夏夫, 巖河いくみ, 照屋勝治, 福武勝幸, 花房秀次, 他: Nevirapine (BIRG 587)国内における臨床試験. 化学療法の領域. 113-128, 2004
4. 木内英, 花房秀次.: 必携今日の生殖医療, 精液中 HIV の完全除去法 産婦人科治療 309-314, 2004 増刊
5. 三間屋純一, 滝正志, 嶋緑倫, 花房秀次, 小野織江.: ぼくにもわかるヘモフィリア. 小児血友病患者さんのためのテキスト. 監修 白幡聡. メディカルレビュー社. 2004
9. 高桑好一, 田中憲一: 女性のための感染症のすべて STD 陽性妊婦と新生児. 産婦人科治療, 掲載予定, 2005.

健康危険情報
なし

知的財産権の出願・登録状況
なし

若年婦人における HIV 感染状況および HIV 感染症と生殖医療の関連性に関する研究班

(主任研究者：田中憲一)

分担研究課題：酸化チタンによる HIV の経母乳感染の防止に関する基礎研究

名取道也 (国立成育医療センター)

研究協力者 山口晃史 (国立成育医療センター)

A 研究目的

現在、母子感染を回避するため人工栄養による保育が選択されている。しかし新生児・乳児における母乳保育の有用性は強く強調されているところであり、さらには世界的にみれば、開発途上国の貧困層においてはコストの問題から人工栄養（粉ミルク）の利用は困難であり、母乳以外には児の栄養源が無いため、母子感染のリスクを承知で母乳保育を選択せざるを得ないのが現状である。

HIV 母子感染において母乳の関与する割合は全体の 30-40%とされており、その重要性が伺われるが感染形態が単一でなく、多くの因子が関与していると考えられているがいまだ不明な点が多い。母体側の因子として、病態と血中のウイルス量の変動、母乳中に産生されるウイルスのフェノタイプの違い、乳腺の炎症の有無などが挙げられ、さらに初乳と成熟乳の組成の違いも関与していると言われている。母乳の組成には抗ウイルス活性を示す免疫グロブリン、サイトカイン、ケモカイン、NK細胞やマクロファージ、CTL、ライソゾームなどが存在するばかりでな

く、児の粘膜面に影響する因子も存在している。一方、HIV 感染母体より産生された母乳中の HIV DNA（感染細胞）検出率は 58%で、ウイルス粒子の検出率は 89%（長期経過中）とされている。

本研究では母乳中の主要成分ならびに抗ウイルス活性を示す因子に影響を与えず、母乳中に含まれる HIV ウイルス粒子や感染細胞を低コストで選択的に破壊もしくは除去する可能な装置を開発して、母乳保育による HIV 母子感染リスクの回避・減少させることを目的とする。

B 研究方法

1) 培養液中のウイルス破壊

HIV-1 IIIB (100 ng/ml) の培養液中での時間経過に伴う感染性の低下は H9 細胞を用いた感染実験で評価した。評価方法は感染した H9 細胞内のプロウイルスを PCR 法で増幅し画像解析処理システムを用いて半定量をおこなった。次に、HIV-1 IIIB を種々の濃度 (w/v) の TiO₂ 粒子 (WAKO 製) と培養液中で混和し UV 照射に誘導される活性化 TiO₂ のウイルス破壊作用を 1) と同様の評価方法

で行った。また UV 照射強度および照射時間と TiO₂ のウイルス破壊作用の関係については、0.25% の TiO₂ 粒子濃度で照射強度、照射時間を変え処理したウイルス培養液を H9 細胞へ感染させ感染後 10 日後に細胞培養液中のウイルス蛋白 p24 を測定しウイルス破壊作用の評価を行い、同時に MAGI 細胞を用いた実験系で抑制効果をみた。

2) ウイルス RNA 量の測定法の確立と母乳・人工乳中のウイルス破壊

人工乳、母乳中に混和した HIV-1 IIIB の検出限界値の評価を行った。次に母乳中の感染性ウイルスを測定するために、予備実験として人工乳中での標的細胞 (H9) の安定性を確認し感染実験系を確立した。また母乳の細胞毒性を標的細胞として H9 (T 細胞系)、M9166 (T 細胞系)、THP-1 (単球細胞系)、PBMC を用い検討した。評価方法は母乳と一定時間混和後 PBS にて洗浄、RPMI 培地で 3 日間培養し細胞数を測定した。次に TiO₂ による人工乳中のウイルス破壊を、UV 未照射、UV 照射、TiO₂+ UV 照射の 3 条件で評価した。照射時間は 1 時間でウイルス量は 10⁸ copies/ml。評価方法は処理後の人工乳中のウイルス RNA 量の測定と H9 細胞への感染実験で行い評価した。

C 研究結果

1) 培養液中のウイルス破壊

HIV-1 IIIB (100 ng/ml) の培養液中での時間経過に伴う感染性の低

下は H9 細胞を用いた感染実験では、ウイルスの感染性は室温放置時間とともに低下している事が確認され、さらに UV 照射 (0.8 mW/m²) を行う事によりその減衰は助長された。また培養液中への TiO₂ 粒子の添加は UV 単独照射よりもウイルス破壊作用が増強された。このとき TiO₂ 粒子に指摘濃度が存在し、培養液中に 0.25% で存在した場合ももっとも強い効果がみられ約 90% 以上の破壊作用を示した。これは低濃度から 0.25% までは濃度依存的に効果がみられ、それ以上の濃度では逆に UV 透過率を下げ効果が減弱したものと考えられた。さらに、この効果を定量化するために同様の実験を、CD4 を発現し LTR-β-gal のレポーター遺伝子を持つ MAGI 細胞を用いて評価した。

結果は H9 細胞を用いた PCR の結果と一致した。次に 0.25% の TiO₂ 粒子濃度で照射強度、照射時間を変え処理したウイルス培養液を H9 細胞へ感染させ感染後 10 日後に細胞培養液中のウイルス蛋白 p24 を測定しウイルス破壊作用の評価を行い、同時に MAGI 細胞を用いた実験系で抑制効果をみた。両者ともに照射時間および照射強度に依存してウイルス破壊作用が増強される事が示唆された。

2) ウイルス RNA 量の測定法の確立と母乳・人工乳中のウイルス破壊

アンプリコア (ロッシュ・ダイア) を用いて PBS、FCS、RPMI、人工乳、母乳中に混和したウイルス (HIV-1

IIIB) の検出限界値の評価を行った結果、RNA 測定では全ての希釈液中でのウイルス測定の限界値は同等であり、有意な測定方法と考えられた。さらに、FCS、母乳で段階希釈を行ったウイルス量の測定を行ったところ希釈倍率に比例したウイルス量の測定が FCS と同等に可能であった。この測定系が感染性ウイルス破壊の評価に有用であれば、すなわち破壊による感染性の低下と RNA 量の低下が一致すれば評価方法が非常に簡潔化されるが、実際は細胞への感染性による評価との比較が必要とされる。

ウイルス希釈液(人工乳、FCS、PBS、RPMI)の違いによるウイルス粒子の感染性の評価を行ったところ、PBS、人工乳、FCS、RPMI の順で感染率が高かった。これらの浮遊液によるウイルス粒子の直接破壊作用はみられないため、標的細胞である H9 細胞へのウイルス吸着に対しそれぞれの浮遊液中の因子が関与したものと考えられる。この実験の結果から人工乳中でのウイルスの存在は FCS 中よりも H9 細胞への感染性が高いことが明らかとなり、母乳中のウイルス破壊の重要性が示唆された。次に母乳を使った実験を、人工乳と同様の感染実験系で行ったが明らかな細胞毒性がみられた(図1)。

母乳の細胞毒性を標的細胞として H9 (T 細胞系)、M9166 (T 細胞系)、THP-1 (単球細胞系)、PBMC を用い検討した結果、H9 細胞と THP-1 細胞は母乳と接触後 10 分以内に急速

に減少、M8166 細胞は比較的保たれ、PBMC が最も安定していた。このことは其々の細胞における増殖速度を考慮すると、毒性は分裂速度に比例している可能性があり、母乳成分の何らかが細胞分裂に直接影響しているか、もしくは分裂時に取り込まれることによって影響している事が示唆された。次に M8166 に対し、接触時間 12 分以下での毒性を評価したところ、5 分以下では比較的毒性が少ない事が示された。従って次に 5 分以下での短時間感染実験を行った。接触から 5 分まで時間に比例して感染率は上昇し 5 分以下でも評価が可能である事が示唆された。しかし、同量のウイルスを PBS で希釈し 60 分感染させた場合の 50% 以下の感染率であり、ウイルス破壊作用の実験系では評価方法として有用であるが、実際の検体はウイルス量が非常に少ないため感染率が下がり評価が困難であると思われる問題も残された。

TiO₂ による人工乳中のウイルス破壊を、UV 未照射、UV 照射、TiO₂+ UV 照射の 3 条件で評価した。照射時間は 1 時間でウイルス量は 10⁸ copies/ml。評価方法は処理後の人工乳中のウイルス RNA 量の測定と H9 細胞への感染実験で行い評価した。人工乳中のウイルス RNA 量および感染性ウイルス量は UV 単独照射の有無に有意差は無いが、TiO₂+ UV 照射では明らかに減少していることが明らかとなった(図2)。

D 考察

TiO₂による人工乳中のウイルス破壊を明らかにしたが、母乳中のウイルスへの影響は、母乳自体の標的細胞にたいする毒性という予想外の影響を排除する実験系作成を解決しつつ検討を開始している。この培養条件は一般の条件と異なるものであり今後さらなる検討が必要であろう。また、現在研究に使用している HIV 非感染者の母乳に HIV を混入する実験（想定濃度より高値）から進んで、平成 17 年 3 月から共同研究を行なうベトナム国よりの HIV 感染母体からの母乳を研究に使用することが可能となり、実用性の研究を開始した。

次年度は酸化チタンを装備する哺乳瓶を開発し、その使用が HIV 感染妊婦の母乳中に含まれるウイルス量をどのように変化させるかについても研究を行なう。

E 結論

TiO₂による人工乳中のウイルス破壊を行なうことに成功し、細胞感染実験で証明した。また人工的に HIV を混入した母乳における感染実験においてもこの方法による評価が可能であることを示したが、細胞への感染の観点で低濃度のウイルス量における実験手法について、さらなる研究が必要である。

発表 論文

- 1) 和田誠司, 左合治彦, 松本隆万, 川口里恵, 杉本公平, 尾見裕子, 林 聡, 小澤伸晃, 藤井絵理子, 塚原優己, 久保隆彦, 北川道弘, 田中忠夫, 名取道也: 妊娠中期胎児超音波スクリーニング検査による胎児異常検出率. 日本周産期・新生児医学会雑誌 2004; 40(1): 24-27 4月
- 2) 名取道也: 双胎間輸血症候群. 日本医師会雑誌 2004; 132(5): 663 9月

図1 母乳の細胞毒性

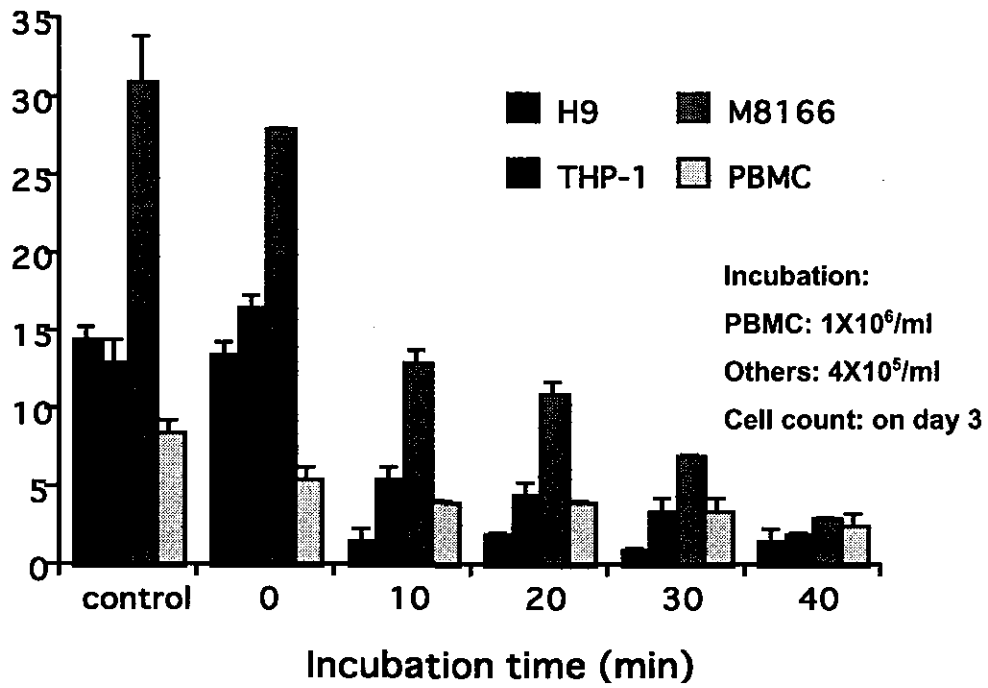
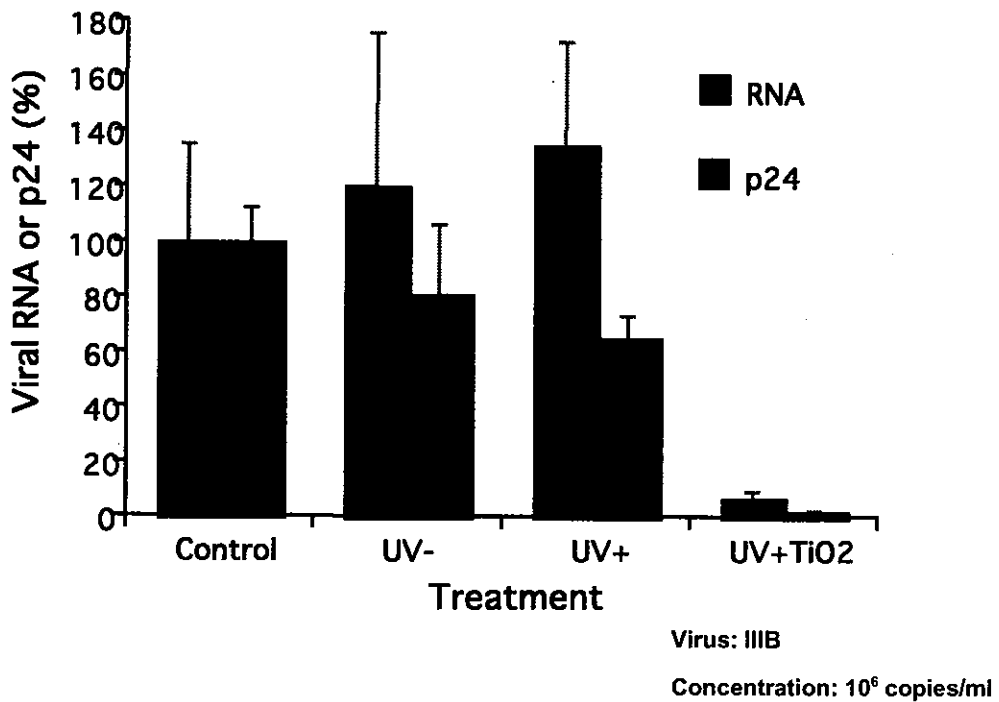


図2 人工乳中のウイルス不活性化



厚生労働科学研究費補助金（H16年度エイズ対策研究事業）
分担研究報告書

若年婦人におけるHIV感染状況およびHIV感染と
生殖医療との関連性に関する研究

妊産婦のHIV感染に関する分子疫学的研究並びに子宮内感染の機序に
関する研究

分担研究者	牛島 廣治	東京大学大学院医学系研究科発達医科学教室
研究協力者	星野 洪郎	群馬大学大学院医学系研究科分子予防医学分野
	朴 杓允	神戸大学大学院自然科学研究科資源生命科学専攻
	沖津 祥子	東京大学大学院医学系研究科発達医科学教室
	柳生 文宏	東京大学大学院医学系研究科発達医科学教室
	宇佐美 雅史	東京大学大学院医学系研究科発達医科学教室

研究要旨

ベトナムでの妊産婦のHIV感染について分子疫学的手法によりサブタイピングを行った。抗体陽性11サンプル中8サンプルがPCRでHIV陽性であった。また陽性サンプルのすべてがサブタイプCRF01_AEであった。

巨細胞形成の電子顕微鏡観察においては混合培養110分後に至るまで細胞膜が融合している場面に遭遇しなかったものの、細胞膜間に30nmの大きさの高電子密度粒子が観察された。

三つの絨毛癌細胞（BeWo, JEG-3, JAR）に発現するGタンパクレセプターは三つの細胞間で発現の強弱に差はあるものの、C5a receptor、CCR7、CCR9/CCR10、RDC1で、どの細胞にも発現していることが確認された。

A. 研究目的

A-1. ベトナムにおける妊産婦の HIV の分子疫学

ベトナムでの妊産婦のHIV感染について分子疫学的手法によりHIVのサブタイプ等の現状を明らかにすることを目的として調査する。

A-2. HeLa/KS386とHeLa/T4の巨細胞形成の電子顕微鏡観察

ウイルスを用いない巨細胞形成試験として、それぞれCD4(HeLa/T4)とHIVgp160

遺伝子(HeLa/KS386)を組み込んだ2種類の細胞による擬似感染モデルがある。このHeLa/KS386とHeLa/T4の巨細胞形成においてレセプターがどのように働いているか調べるために電子顕微鏡で観察した。

A-3. 絨毛癌細胞に発現するGタンパクレセプター

アジアでは特に女性感染者の増加が顕著であり、現在では男女比は同等となるまでに至っている。わが国においてもHIV感染妊婦と母子感染の急増が危惧され、より有