

図1 ELISPOTの原理

培養するとプレート上で細胞の周囲に分泌されたサイトカインや抗体がキャプチャーされる。

一定時間後、細胞を洗い流し、プレートにビオチン標識二次抗体を加え、アルカリホスファターゼ結合ストレプトアビジンでDABなどの基質を発色させる。個々の細胞の産生したサイトカインを1つのスポットとして検出できるので、サイトカイン産生数のみならずスポットの大きさから産生量を定量できる。

## 準備

- PBS (-) (pH 7.2) (和光純薬 162-19321) ※<sup>1</sup>
- 0.5% BSA (Sigma) -PBS
- Tris 緩衝液 A (pH 9.5) (0.1 M Tris, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>) ※<sup>2</sup>
- NBT 溶液 ※<sup>3</sup>
- 溶液 a [NBT (Biorad 170-6532) 30 mg を上記 NBT 溶液 1 ml に溶解]
- 溶液 b [BCIP (Biorad 170-6539) 15 mg を上記 NBT 溶液 1 ml に溶解]
- BCIP/NBT 溶液 (冷暗所保存) (溶液 a + 溶液 b + Tris 緩衝液 A 98 ml)
- 0.5% FCS (Gibco) -PBS
- 96穴ニトロセルロース膜 (Multiscreen 96well filtration plate) [Multiscreen HA (MAHAS4510)], あるいは PVDF (polyvinylidene difluoride) 膜 ※<sup>4</sup> [Multiscreen IP (MAIPS4510)] (Millipore)

※<sup>1</sup> 溶解後に0.045 μmのミリポアフィルターで濾過する。

※ <sup>2</sup> Tris	12.1 g
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.12 g
dH <sub>2</sub> O	800 ml 蒸留水

HClにてpH 9.5に調整し、蒸留水で1,000 mlにメスアップ。

※ <sup>3</sup> NN,ジメチルホルムアミド	0.7 ml
蒸留水	0.3 ml

※<sup>4</sup> PVDF膜の場合は使用前に70%エタノールでプレウエットが必要。

## プロトコール

### ■ 第1日

#### A) プレートの準備

96穴膜プレートに一次抗体 (15 μg/ml) を100 μl/well加えて4℃でオーバーナイトインキュベーション。抗原ペプチドも同様。

#### B) 細胞の準備

PHA, サイトカイン刺激の場合, MACS (磁気ビーズ法) など分画した10<sup>5</sup>個<sup>※1</sup>程度の末梢血リンパ球, あるいは粘膜リンパ球を10 ml円底チューブで刺激。

※<sup>1</sup> 抗原刺激の場合は細胞濃度により10<sup>7-8</sup>/個が必要。

抗原やマイトジェンを ELISPOT プレートに加えて刺激することも可能であるが、あらかじめ培養してから分注する方が安定した結果が得られる。

## ② 第2日

- ① プレートの洗浄。PBSで6回洗う。
- ② 0.5% BSA-PBSでブロッキング。室温2時間。
- ③ 培養細胞を100  $\mu$ lづつ播く。マイトジェンやサイトカイン刺激の場合は $10^3\sim 4$ 個、ペプチド刺激の場合は $10^6\sim 7$ 個が適当であるが、何回か予備実験をして至適濃度を決定する。
- ④ 2～6時間培養。
- ⑤ PBSで6回洗浄<sup>\*2</sup>。
- ⑥ ビオチン標識二次抗体を0.5% FCS-PBSで1,000倍希釈し、室温2時間反応させる。
- ⑦ PBSで6回洗浄<sup>\*2</sup>。アルカリホスファターゼ結合ストレプトアビジンを加え、室温2時間。
- ⑧ PBSで6回洗浄（この段階で0.5% FCS-PBSを加えて4℃オーバーナイト保存も可能）。
- ⑨ 発色。BCIP/NBT溶液100  $\mu$ lを加えて室温で1～2時間静置。
- ⑩ PBSで6回洗浄<sup>\*2</sup>。
- ⑪ 乾燥後、粘着テープに転写（図2）<sup>\*3</sup>。

※2 毎回ペーパータオル上でたたきつけるようにして水を切る。

※3 粘着フィルムに転写したメンブレンは半永久的に室温保存可能。

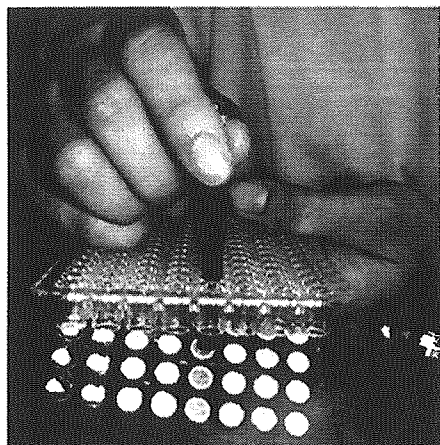


図2 粘着フィルムへのメンブレンの転写

- ⑫ スポットをカウントする。

## 自動解析装置

各ウェルのスポットが数十個以内であれば、数枚のプレートを顕微鏡下にカウントすることはそれほど困難はないが、各ウェルのスポットが100を超える場合や測定すべきプレートが多い場合は、大変な時間と

手間がかかり測定の客観性に問題を生じる可能性がある。近年、ELISPOTプレートを計測する自動解析装置が数社から発売されている。原理的には、①ELISAリーダーを応用したもの、②落射照明顕微鏡（あるいは実体顕微鏡）下にスポットをカウントするもの、に

大別できる。前者は安価であるがバックグラウンドの影響を受けやすく、また個々のスポットのデータが得られない。後者は高価であるが、

- ①バックグラウンドの影響を受けにくい
- ②スポットの数のみならず大きさや濃度が定量できる
- ③スポットとノイズの判別が容易である（あるいはユーザーが定義できる）

といった利点がある。測定結果はExcelなどの汎用ソフトに転送して統計的解析にもっていくことができる。ちなみに筆者はCarl Zeiss社のKS ELISPOT-system（図3）を使用し良好な成績を得ているが、多数の検体を継続的に処理する施設では、客観性の確保や手間の節約など自動解析装置導入の利益はきわめて大きい。

## 実験例

われわれはヒト脱落膜CD56陽性LGLがIL-12刺激によってIFN- $\gamma$ を産生するが、胎盤絨毛が産生するG-CSFがこれを強く抑制することを明らかにした<sup>7)</sup>（図4）。またカニクイザルにおいて、国立感染症研究所で現在開発中のHIVワクチンによって誘導される細胞傷害性T細胞を定量できることを明らかにした（投稿中）。この場合、ウイルス感染によって誘導されるT細胞とワクチン接種によって誘導されるT細胞をエピトープレベルで分けることができるので、今後の臨床応用が期待される。

## おわりに

従来実験技術として開発されたELISPOT法であるが、近年臨床的にも自己免疫疾患や腫瘍免疫、感染免疫における応用が報告され、病態解析や臨床検査の有用なツールとなっている。IFN- $\gamma$ を指標としたT細胞

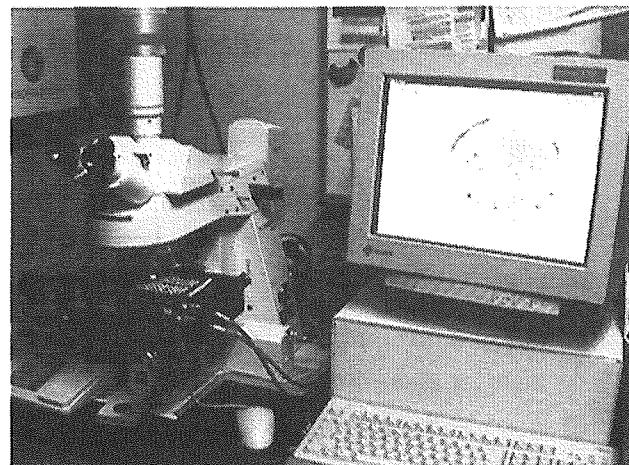


図3 ELISPOT自動検出システム（KS ELISPOT system）

胞の検討では、腫瘍細胞に由来するHLA四量体<sup>8)</sup>を認識するT細胞や、HSP110-HER-2/neu<sup>9)</sup>やMuc-1<sup>10)</sup>ワクチンにより誘導されるT細胞を検出するという報告がある。自己免疫疾患では、I型糖尿病患者の末梢血に $\beta$ 細胞のGAD65を認識するT細胞が<sup>11)</sup>、潰瘍性大腸炎患者末梢血に腸管上皮tropomyosin isoform 5を認識するT細胞<sup>12)</sup>がおの存在することがELISPOTにより報告されている。B細胞レベルでは、シェーグレン症候群患者の末梢血B細胞がRo/SS-A抗体やLa/SS-B抗体産生すること<sup>13)</sup>、ITP（特発性血小板減少性紫斑病）患者の脾B細胞が抗gp II b-III a抗体を産生すること<sup>14)</sup>が報告されている。

今後、抗体、サイトカイン、ケモカイン以外にも細胞が分泌する微量の物質を定量できる可能性がある。

## 文献

- 1) Tarkowski, A. et al. : J. Immunol. Methods, 72 : 451-459, 1984
- 2) Ekerfelt, C. et al. : J. Immunol. Methods, 260 : 55-67, 2002

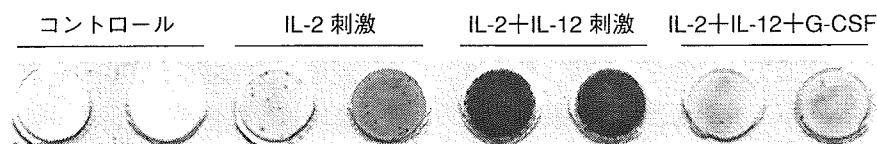


図4 IL-2、IL-12刺激によるヒト脱落膜CD56細胞のIFN- $\gamma$ 産生とG-CSFによる抑制

- 3) Stott, D. I. : J. Immunoassay, 21 : 273-296, 2000  
 4) Bienvenu, J. A. D. et al. : Clin. Chem. Lab. Med., 38 : 267-285, 2000  
 5) Prussin, C. : J. Clin. Immunol., 17 : 195-204, 1997  
 6) Tobery, T. W. et al. : J. Immunol. Methods, 254 : 59-66, 2001  
 7) Sugita, K. et al. : Am. J. Reprod. Immunol., in press (2002)  
 8) Schultze, J. L. et al. : Trends Immunol., 22 : 516-523, 2001  
 9) Manjili, M. H. et al. : Cancer Res., 62 : 1737-1742, 2002  
 10) Musselli, C. et al. : Int. J. Cancer, 97 : 660-667, 2002  
 11) Kotani, R. et al. : Diabetes Care, 25 : 1390-1397, 2002  
 12) Taniguchi, M. et al. : Clin. Immunol., 101 : 289-295, 2001  
 13) Halse, A. et al. : Clin. Exp. Immunol., 115 : 208-213, 1999  
 14) Kuwana, M. et al. : J. Immunol., 168 : 3675-3682, 2002

**試薬機器メーカーへの問い合わせ先一覧**

和光純薬工業 (株)

シグマ アルドリッチ ジャパン (株)

日本バイオラッドラボラトリーズ (株)

インビトロジェン (株) (GIBCO 社製品)

日本ミリポア (株)

カール ツァイスジャパン(株)

TEL : 0120-052-099 / FAX : 0120-052-806

TEL : 03-5821-3111 / FAX : 03-5821-3170

TEL : 03-5811-6270 / FAX : 03-5811-6272

TEL : 03-3663-8143 / FAX : 03-3663-8242

TEL : 03-5442-9719 / FAX : 03-5442-9736

TEL : 03-3355-0332 / FAX : 03-3358-7554

## 粘膜における免疫応答とアレルギーの分子機構 —マスト細胞を中心に—

羅 智 靖\* 早川 智\*\*

生物は皮膚と粘膜によって外界からの独立性を保っている。粘膜は皮膚の20倍以上の面積があり、粘膜や皮膚に局在するリンパ組織は第一線にあって感染性微生物や毒素に対する防衛機構を担っている。粘膜にける免疫応答の異常のひとつがアレルギー反応であり、マスト細胞がその中心的役割を果たしている。マスト細胞は高親和性IgEレセプターを介して活性化し種々のケミカルメディエーターを放出するほか、それ自体がサイトカインの産生を介して遅発相の誘導にも関与する。IgE-FcεRIの構造と発現調節機構、IgE-FcεRIを介したシグナル伝達機構が明らかとなり、この方面からアレルギー疾患の新たな治療戦略が開ける可能性がある。粘膜に局在するマスト細胞はTLR 2, 4を介して活性化し種々のサイトカインを産生あるいは脱顆粒する。アレルギーを起こす悪玉細胞としての側面以外にマスト細胞の粘膜における自然免疫細胞としての機能が注目される。

### I. 粘膜における免疫応答

生物の身体は外界に対してその独立性を維持するバリア機構が存在する。体表面を被覆する皮膚に対し、消化管、気道、生殖器など一見体内のように見える管腔臓器内面は広く粘膜に覆われる。粘膜は皮膚と同様、外界と接するため共通した粘膜免疫システムが存在する。ヒトにおいて全身の粘膜表面には、リンパ組織全体の50%以上が集まっているが、粘膜免疫では胸腺外分化T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞、NKT細胞など未

梢血ではマイナーな細胞が主体となり、いわゆるinnate immunityを担う<sup>1)2)3)</sup>。液性免疫では粘膜にあるリンパ組織からの分泌されるIgAが管腔内における有害微生物や毒素の中和抗体として作用する。近年、消化管を中心に粘膜における特異な免疫応答が明らかにされてきた<sup>4)</sup>。実際 消化管では日々異物である食物の中から有用な栄養成分を選択的に取り込みながら、これに異常な反応を来す事なく、かつまた物理的損傷や常在菌あるいは病原細菌の産生する有害毒素の侵入から個体を守っている。特異免疫系は脊椎動物に固有のシステムであるが、吸血によって栄養をとる円口類やプランクトンを餌とする海馬類(タツノオトシゴ)では未発達である一方、他の魚や甲殻類を補食する魚ではよく発達していることからMatsunagaは古生代に有顎魚が進化した時に腸管の損傷を防

\*Chisei RA

日本大学大学院医学研究科 先進医学総合研究センター 分子細胞免疫・アレルギー学講座

\*\*Satoshi HAYAKAWA

日本大学医学部産婦人科

〒173-8610 東京都板橋区大谷口上町30-1

ぐシステムとして特異免疫系が進化したという仮説を提唱した<sup>5)6)</sup>。浮袋から進化した肺、気管はいずれも内胚葉臓器であり腸管に類似した組織構造を有するが、卵管、子宮などミューラー管システムは中胚葉臓器であり、腔や口腔は外胚葉が発生に関与する。これらが共通した粘膜免疫システムを使用していることは興味深い。

## II. 粘膜免疫の破綻とアレルギー

この粘膜における免疫応答の破綻の一つがアレルギー疾患であると捉えることもできる。アレルギー疾患の有病率は近年著しく上昇しており、日本や欧米の先進工業国では総人口の50%を越えると報告される。有病率が50%を越える疾患は、もはや従来の疾病と同じパラダイムで捉えることはできず、*Homo sapiens* という種の存亡の危機と言い換えても過言ではない。現代文明は生活を快適にするために様々な発明をなし、また衛生環境の劇的な改善はわれわれを多くの感染症から守るようになったが、一方では文化的・精神的な環境も含めて人工的な環境自体が新たなストレスの要因となるという二面性を有している。ヒトは進化の過程でそれまで出会うこともない物質に対しても可塑的に対応する能力を獲得してきたが、現代における環境の急激な変化にはもはやその可塑性が対応しきれない可能性がある。本来の自然環境では発症しないで済んでいた人達が、その人それぞれの耐え得る“閾値”を越えた刺激を受けた場合、刺激を排除しようとしてアレルギーを発症したという面がある。それではこの“閾値”は何によって規定されているのだろうか。抗原提示細胞による抗原の取り込みプロセッシング過程と抗原提示、T細胞活性化、B細胞による免疫グロブリン産生、抗原・IgEによるマスト細胞の活性化に至るアレルギー反応に向かう免疫反応のほとんど全ての段階で、複雑な遺伝的背景が臓器あるいは個体レベルでの応答性に関与する。当然ながら個体の栄養状態や常

在菌、ストレスによる自律神経応答の変化や内分泌攪乱物質（いわゆる環境ホルモン）の関与も想定しなければならない。この複雑な問題を一つ一つ解決してゆく事によりアレルギー疾患治療法の開発という直近の利益と同時に複雑な免疫システムの理解が可能となるであろう。以下われわれが明らかにした知見の一部を紹介したい。

### 1. IgE-Fc $\epsilon$ RI-マスト細胞パラダイム

抗原（アレルゲン）・IgE抗体複合体が高親和性IgEレセプター（IgE-Fc  $\epsilon$  RI）を介してマスト細胞に結合し、この複合体によって2分子以上のFc  $\epsilon$  RIが架橋されるとマスト細胞が活性化され即時型（I型）アレルギー反応が惹起される。活性化マスト細胞は種々のケミカルメディエーターを放出する事によってアレルギー反応の即時相の実効細胞として働くのみならず、自身の産生するサイトカインを介して遅発相の誘導にも係る。この遅発相の反応が慢性アレルギー炎症の病態を反映していると考えられる。マスト細胞はほとんど凡ゆる臓器に分布するが、特に外界に接触し、アレルギーの標的臓器でもある皮膚、気道粘膜、消化管粘膜などの血管周囲に多数定着している。顆粒球を始めとする炎症細胞は、このマスト細胞の産生、放出するケモカインや化学伝達物質を媒介にして、流血中からアレルギー炎症の局所へ遊走する（図1）。一方でマスト細胞はIgE産生そのものを増強する<sup>9)</sup>という、まさにアレルギー増悪サイクルの中心的役割を果たしている（図2）。Fc  $\epsilon$  RIは当初マスト細胞と好塩基球に選択的に発現するものと考えられていたが、その後ランゲルハンス細胞、単球/マクロファージ、活性化好酸球や好中球、血小板にも発現しており、しかもFc  $\epsilon$  RIを介してこれらの細胞の活性化が誘導されることが判明し、IgEとFc  $\epsilon$  RIの結合阻害によりこれら広範な炎症細胞の活性化を制御できる可能性が出てきた。

### 2. Fc $\epsilon$ RIの構造と機能

Fc  $\epsilon$  RIは $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ の3種類のサブユニットより形成される。即ち $\alpha$ 鎖1個、 $\beta$ 鎖1個

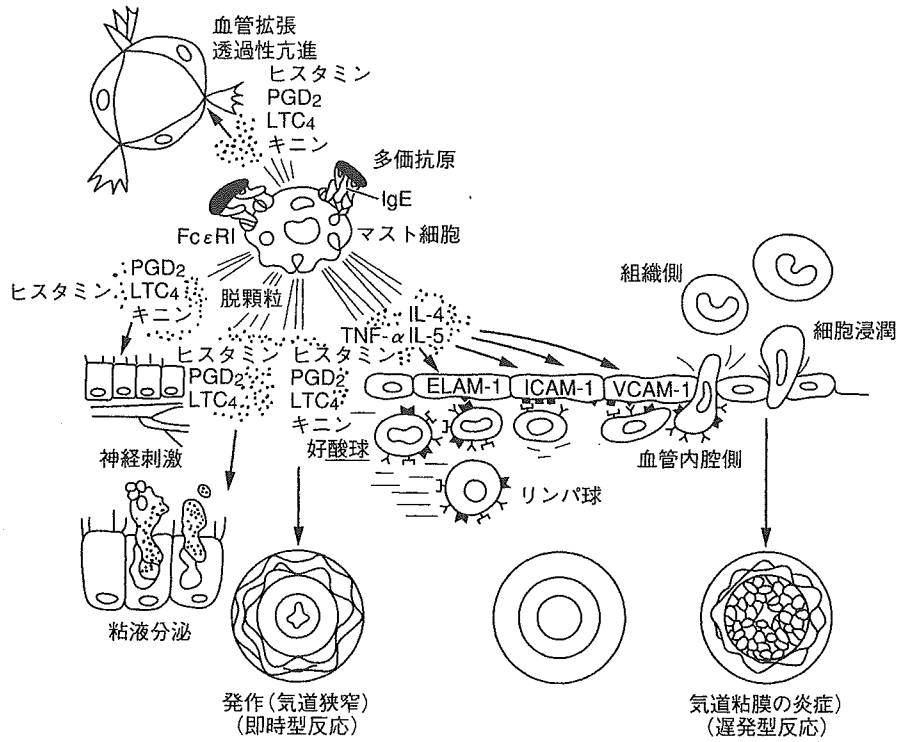


図 1 喘息の即時型反応と遅発型反応

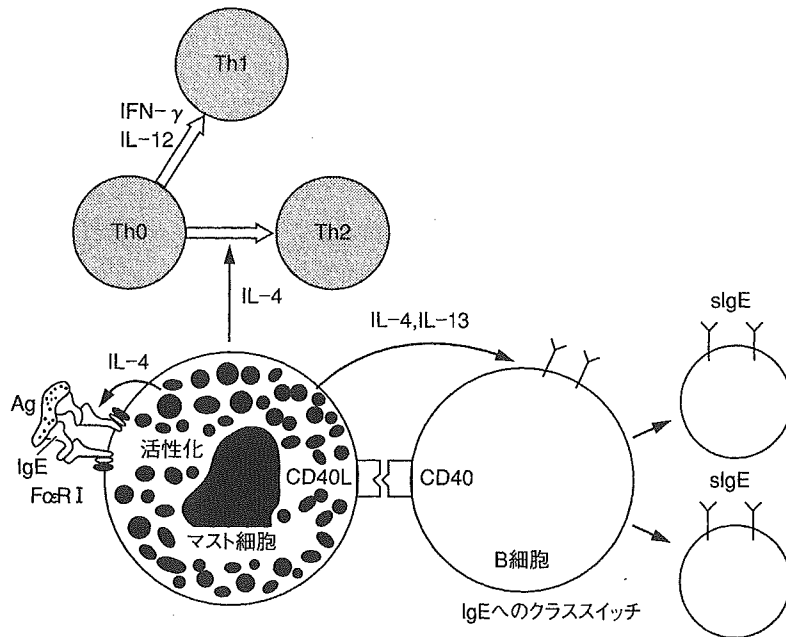


図 2 IgE 産生におけるマスト細胞と  $\beta$  細胞の相互作用

がジスルフィド結合によりホモダイマーを形成した2個の $\gamma$ 鎖が、非共有結合により $\alpha\beta\gamma 2$ の4量体を構成する<sup>78)</sup>。但しヒトでは $\beta$ 鎖を会合しない $\alpha\gamma 2$ タイプも存在する。 $\alpha$ 鎖はFc $\epsilon$ 鎖を直接高親和性結合 ( $K_A=10^{10}/M$ ) す

る細胞外ドメインを主体とする分子で、免疫グロブリンスーパーファミリーに属している。最近ヒト $\alpha$ 鎖の細胞外ドメインが結晶化され、X線回折やNMRによる解析でその立体構造が明らかにされた。その結果2つの免疫グロブ

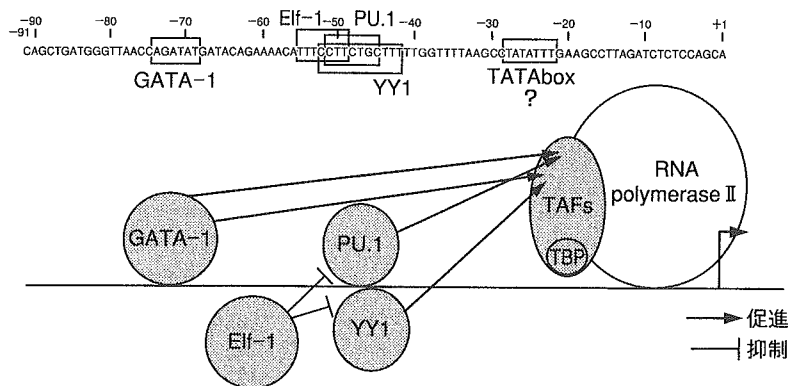


図3 FcεRIα鎖遺伝子の発現制御機構

リン相同ドメイン (D1, D2) が、鋭角をなして外向きに折れ曲って顕著な突起を構成し、IgE 結合部位を外側に向けた構造をしていることが判明した<sup>9)</sup>。一方、抗体のエピトープ解析や変異体を用いた解析から、これらのドメインのうちカルボキシル基 (C) 末端側の D2 が、Fcε鎖と直接結合する可能性が示唆されている。D2 には分子表面に4個のトリプトファン残基が互いに近傍に位置し、疎水性領域が重なって露出した構造をとっており、この領域がIgE との高親和性に重要だと考えられている。現在各国の研究者によりこの構造に関するデータを利用した結合阻害剤の分子設計の試みが始まっている。β鎖は4回細胞膜を貫通する疎水性の高い分子で、N末端、C末端ともに細胞内に存在する。C末端側の細胞内領域にITAM (Immuno-receptor tyrosine-based activation motif) と呼ばれるシグナル伝達モチーフを持ち、チロシンキナーゼを介してシグナル伝達に関与する<sup>10)</sup>。γ鎖はFcεRI以外にFcγR, FcαR, TCRのシグナル伝達分子としても働き<sup>11)12)</sup>、さらにコラーゲンレセプター<sup>13)</sup>、NKレセプター<sup>14)</sup>にも会合しえる。

### 3. 免疫アレルギー疾患の感受性遺伝子の探索

免疫・アレルギー疾患は多数の因子によりその疾患感受性が影響される多因子疾患であるが、われわれはFcR遺伝子の遺伝子多型の側面からの検討を行った。FcεRIβ鎖遺伝子はいわゆる「アトピー遺伝子」の候補として、1993年にオックスフォード大学のグループか

ら最初に報告された遺伝子である<sup>15)</sup>。現在までに、intron 2, intron 5などの非翻訳領域の多型と、エキソン6 (Ile 181 Leu, Val 183 Leu), エキソン7 (Glu 237 Gly) のアミノ酸置換を伴う多型について報告されているが<sup>16)</sup>、われわれは日本人においてはGlu 237 Glyの多型頻度が、気管支喘息などのアレルギー疾患患者において有意に高いことを報告した。さらにこの多型がマスト細胞の機能に及ぼす影響を調べるため、FcεRIβ鎖遺伝子欠損マウスを作製<sup>17)</sup>し、そのマスト細胞にそれぞれのβ鎖変異体を遺伝子導入した。しかしながら予想に反してこれらの変異β鎖を発現するマウスマスト細胞は、FcεRIを介した脱顆粒、ロイコトリエン産生、サイトカイン産生のいずれにおいても、野生型と同等の反応を示した<sup>18)</sup>。この結果はβ鎖遺伝子多型が蛋白質の機能としてではなく、遺伝子発現調節の段階で異なる機能を示す可能性を示唆するものであった。そこで野生型と変異型の転写調節機能の相異を検討すると、野生型がプロモーター活性を抑制しているのに対して、コドン181と183の変異型は活性化を増強している傾向にあること、さらにコドン237の野生型はβ鎖遺伝子のプロモーター活性を著しく抑制するが、変異型ではその効果の小さいことが判明した。さらに多型部位へ結合する核蛋白の検討では、野生型で検出される核蛋白の一つが181/183の変異型ではいずれも消失していた。またコドン237の多型では変異型に特異的に結合する核蛋白が検出されてお



り、今後これらの蛋白の同定と機能の解析によって、 $\beta$ 鎖遺伝子多型の意味の一部が明かされて行く可能性がある。一方Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ 鎖遺伝子の多型解析ではプロモーター領域に新しい $\alpha$ 鎖の多型を発見し、 $\alpha$ 鎖転写開始点直上に位置するGATA, Ets motifがプロモーター活性の発現に必須であること<sup>19)</sup>、第1イントロン中のE-boxに結合するUSF 1/2複合体による制御などを解明した<sup>20)21)</sup>。さらに最近このプロモーター領域内-66番にTとCの塩基置換を見出し、Fc $\gamma$ RI $\alpha$ 鎖発現細胞株を用いたレポーターアッセイによりそれぞれの転写活性を測定すると、CアリルではTアリルに比してプロモーター活性の低下が認められた。興味深い事にこの変異はGATA-1の結合親和性に影響することが示唆されたので、GATA-1を用いた共発現の系で検証を試みたところ、Cアリルにおいては、GATA-1を加えた場合にプロモーター活性が2倍に上昇するのに対して、Tアリルの場合は4倍に上昇することが判明した。

現在までの解析では非アレルギー例においてT/Cのヘテロが検出されているが、前述のように、TアリルがCアリルより強くGATA-1によってプロモーター活性が上昇することを考えると、Fc $\gamma$ RI $\alpha$ 鎖の発現強度の点から、Cアリル保有者ではマスト細胞のFc $\epsilon$ RIの発現という意味で感受性の低くアレルギーになりにくい可能性がある。

#### 4. ヒトFc $\epsilon$ RIの遺伝子発現制御機構

先に述べたように高親和性IgEレセプター(Fc $\epsilon$ RI)は、IgEを介したアレルギー反応において鍵を握る受容体である。従ってFc $\epsilon$ RIの細胞特異的発現制御機構、発現誘導機構を解明することは、アレルギー反応の制御につながる重要な研究であると考えられる。Fc $\epsilon$ RIの構造は進化の上で保存され、 $\alpha$ 鎖ノックアウトマウスの解析からIgEを介したアレルギー反応において必須の分子であることが確認されている。Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ 鎖遺伝子の転写制御を解析するため、われわれは、ヒト $\alpha$ 鎖遺伝子の5'

フランキング領域の主要プロモーター近傍における転写調節領域の特定を試み、転写開始点直上のnt-74/-69およびnt-55/-47の2カ所が、マスト細胞などFc $\epsilon$ RI発現細胞に特異的なエンハンサー活性に必須であることを証明し、それぞれの領域が転写因子のGATA-1およびElf-1によって認識されることを報告した<sup>19)</sup>。その後の解析により、Elf-1認識部位に一部重なり合って、YY-1, PU.1が結合すること。すなわち、GATA-1, YY-1, PU.1の過剰発現によりプロモーター活性は上昇するが、GATA-1とPU.1, GATA-1とYY-1の共発現によりさらに著しく活性が上昇することが判明し、これらの転写調節因子が協調的にプロモーターを活性化することを明らかにした<sup>21)22)</sup>(図3)。

次にイントロンに存在する転写活性化領域を解析するため $\alpha$ 鎖遺伝子全域にわたってシスエレメントの探索を行った結果、第1イントロンに存在する配列がプロモーター活性化能をもつことが明らかになった。第1イントロン中のE-boxと呼ばれるモチーフの配列がエンハンサーとして作用すること、この配列にUSF 1, USF 2のヘテロ二量体の結合することを示し、さらにUSF 2のアンチセンスオリゴマーの導入により、ヒトマスト細胞株KU 812において濃度依存的に $\alpha$ 鎖mRNA量の減少が観察され、USFが実際に $\alpha$ 鎖遺伝子の転写活性化に機能していることを明らかにし、上述の $\alpha$ 鎖発現細胞特異的な転写因子GATA-1, Elf-1, PU.1と相互作用をすることによって、USF 1/USF 2も機能している可能性が高いことを示した<sup>20)21)22)</sup>。Fc $\epsilon$ RI $\beta$ 鎖の発現によりFc $\epsilon$ RIを介するシグナル強度が著しく増強し、マスト細胞のIgE・抗原に対する感受性が大きく上昇するので、 $\beta$ 鎖発現の制御過程の解析が重要であることはいうまでもない。われわれはヒト $\beta$ 鎖のプロモーター領域(約1.2 kb)をクローニングし、+54/+83の領域がプロモーター活性発現に重要であることを明らかにした。この領域はPOUファミリー

と Ets ファミリーの結合領域を含んでおり、Oct-1 が結合することを明らかにした。Oct-1 の導入により  $\beta$  鎖遺伝子の転写が制御されることも判明している。以上のように、Fc  $\epsilon$  RI の遺伝子発現制御機構の詳細が徐々に明らかになってきており、近い将来アレルギー治療のターゲットになるものと期待される。

#### 5. マスト細胞のシグナル伝達と Fc $\epsilon$ RI $\beta$ 鎖

$\beta$  鎖は、4 回細胞膜を貫通する分子で N 末端および C 末端とも細胞内にあり、C 末端側の細胞内領域に、 $\gamma$  鎖と同じくチロシン残基を含む Immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) と呼ばれるよく保存されたシグナル伝達モチーフを有する。この ITAM を介して細胞内にシグナルを伝達する<sup>10)</sup>。われわれは  $\beta$  鎖欠損マウスを作製し個体のレベルで  $\beta$  鎖がシグナル伝達を増幅させる機能を有することを証明した。その一方で、 $\beta$  鎖の ITAM には抑制性のシグナルを伝達する SHIP, SHP-2 などが会合するとの報告もある。そこで、われわれはマスト細胞における  $\beta$  鎖の機能解析をさらに進めるため、 $\beta$  鎖 ITAM 内のチロシン残基数に着目し、シグナル伝達における機能解析のため中央および両端のチロシン残基をフェニルアラニンに置換した  $\beta$  鎖変異体 (Y-Y-Y, Y-F-Y, F-F-F, F-Y-F) を作製して  $\beta$  鎖欠損マウスの骨髄由来マスト細胞 (BMMC) へ、レトロウイルスベクターによるウイルス感染によって導入した。 $\beta$  鎖遺伝子を導入した BMMC を IgE で感作した後に抗原で架橋し、 $\beta$ -hexosaminidase の放出と IL-6 産生を指標としてマスト細胞活性化におよぼす影響を解析した。その結果は、予期に反するものであった。われわれは  $\beta$  鎖の役割はシグナルの増幅であると考えてきたためチロシン残基をフェニルアラニン置換したことで  $\beta$  鎖の機能が減弱し、脱顆粒、サイトカイン産生能ともに抑制されることが予測したが、脱顆粒への影響は抑制効果が認められたものの、サイトカイン産生に関しては逆に促進させていることが明らかになった。以上の結果より

野性型  $\beta$  鎖 (Y-Y-Y) は活性化 Lyn を介して脱顆粒、サイトカイン産生を誘導するが、同時に強力なサイトカイン産生抑制シグナルも伝達することが初めて明らかになった。

### III. 女性ホルモン、生殖器粘膜とマスト細胞

粘膜免疫とアレルギーに関与する研究は消化管粘膜と気道粘膜を中心に検討が進められてきているが生殖器粘膜における局所免疫機構とアレルギーに関する研究は少ない。しかしながら正常子宮内膜、脱落膜には少数ながらマスト細胞が存在する事から、これらが何らかの生理的もしくは病的役割を果たしている可能性がある。Marx らは流産患者では正常妊婦に比較して脱落膜におけるマスト細胞数が 10 倍以上に増加していると報告<sup>25)</sup>しているが、われわれの検討では一部にマスト細胞浸潤を認める症例はあるものの、必ずしも彼等と同等の結果は得られなかった。流産の原因は染色体異常や感染など胎児側因子と自己免疫疾患など母体側疾患さらに同種拒絶反応など多岐にわたり、その一部にアレルギー反応が関与する可能性はあるが本質的な病態であるや否は不明な点が多い。

一方、妊娠時には血中のエストロゲンレベルは非妊時の数倍から数十倍に増加しこれが局所あるいは全身の免疫応答を調節する事が知られている。Zhao らは上気道ではマスト細胞がエストロゲン、プロゲステロン両レセプターを発現していること<sup>26)</sup>、また Kim らはヒトマスト細胞がエストロゲン受容体を発現しエストロゲンがマイトジェンによる IL-6 や TNF- $\alpha$  産生を抑制すること<sup>27)</sup>、Lesclous らはラットの卵巣摘出によって骨髄マスト細胞が著しく増加することを報告している<sup>28)</sup>。一方で Yamaguchi らはヒトマスト細胞はデキサメサゾンによって Fc  $\epsilon$  RI 発現が抑制されるが性ホルモンは Fc  $\epsilon$  RI 発現と情報伝達に全く影響しないとしている<sup>29)</sup>。マスト細胞を遊走させるケモカインについても、実験系によって女性ホルモンが産生

を誘導する場合と抑制する場合のあることが知られている。さらに低濃度のエストロゲンは IFN- $\gamma$  産生を促進するが高濃度では逆にこれを強く抑制するという<sup>30)</sup>。アレルギー疾患の感受性に年齢の影響が見られる事から性ホルモンが何らかの関与をしている可能性があるが、どのレベルでの関与か今後の検討すべき課題である。

## 1. 内分泌攪乱物質（環境ホルモン）と脱落膜免疫

われわれは脱落膜 CD 56 陽性顆粒リンパ球が Ah レセプターを発現し、極めて低濃度のダイオキシン（内分泌攪乱物質）に反応して RANTES や MCP 1, MIP-1  $\alpha$  などのケモカインの産生を起こすこと、またエストラジオールや DES, ビスフェノール A が CD 56 陽性顆粒リンパ球に一連のケモカインレセプター発現を増強することを明らかにした<sup>31)</sup>。近年内分泌攪乱物質のヒト胎児に対する直接毒性はそれほど強いものではないという見解があるが、ケモカインとそのレセプターを介した炎症細胞の遊走、集積やマスト細胞活性化が間接的な生殖毒性の鍵となる可能性がある。さらに、CCR 5, CXCR 4 は HIV のコレセプターであり、内分泌攪乱物質が HIV の感受性に関与する可能性がある。抗原の粘膜局所からの吸収も性ホルモンによって影響を受けるが、マウスでは蛋白質抗原の生殖器粘膜透過性が血清中の性ホルモンレベルによって著しく変化する。すなわち発情期に取り込みが低く発情間期では高いという<sup>32)</sup>。ヒト女性生殖器における可溶性または微粒子抗原の取り込み機構と性ホルモンの影響についての研究は、現在のところほとんどみられないが、今後の HIV など経粘膜感染を来す疾患のコントロールやワクチン開発の上で考慮すべき問題である。

## 2. 感染防御の フロントラインとしてのマスト細胞

マスト細胞は下等動物から高等動物にわたり胎生期の初期から全身に分布しており、単にアレルギーに関与するだけの細胞とは考え難い。

マスト細胞を欠損する W/W<sup>v</sup> マウスでは寄生虫を排除できないことや、腸内細菌による腹膜炎で死亡することなどから、マスト細胞が病原微生物や寄生虫排除に重要な役割を果たす細胞であると考えられているが、その詳細は不明であった。われわれは、マスト細胞が Toll-like receptors TLRs を発現しており、まさにこのレセプターがマスト細胞による感染防御の主役を演じていることを明らかにした<sup>41)</sup>。マスト細胞は TLR は 2, 4 を発現するが、TLR 2 は主としてグラム陽性菌の細胞壁成分であるペプチドグリカンやリポプロテイン、マイコプラズマ、マイコバクテリウム、スピロヘータや酵母由来の zymosan を認識することが判明している。TLR 4 はグラム陰性菌の LPS, RS ウイルスの F 蛋白や HSP 60 などを認識し、TLR 9 はバクテリア由来の CpG DNA を認識する。われわれは、TLR 4 の細胞内ドメインに変異をもつ C3H/HeJ マウスや TLR 4 ノックアウトマウス (TLR 4<sup>-/-</sup>)、TLR 2 ノックアウトマウス (TLR 2<sup>-/-</sup>) を用いて、マスト細胞の TLRs を介した感染防御機能を世界で初めて明らかにした<sup>33)</sup>。しかも、TLR 4 を介したシグナルが NF- $\kappa$ B を介して伝達され、サイトカイン産生を惹起するが、脱顆粒は誘導しないことが判明した。腹腔のマスト細胞は *E. coli* などのグラム陰性菌により TLR 4 を介して活性化され、TNF- $\alpha$  を産生放出して好中球を動員し、グラム陰性菌感染に対してフロントラインの防御を担っていることが証明されたことになる<sup>33)</sup><sup>34)</sup>。脱顆粒を伴わないマスト細胞の活性化こそ、おそらく本来の生理的な機能であろう。一方、TLR 2 を介するマスト細胞の活性化は同様に NF- $\kappa$ B を介してサイトカイン産生を誘導するが、さらに Ca<sup>2+</sup> 流入を促し脱顆粒をも惹起する。またそのサイトカイン産生パターンも、TLR 4 を介したものと相異して、TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-13, IL-4, IL-5 であった。以上のように同じ TLRs であっても、TLR 2 と TLR 4 の刺激に対する反応は、脱顆粒やサイトカイン産生において明らかに相

異があり、FcR を介するシグナル伝達との相異も含めて、生理的なアウトプットとアレルギー反応に向かうアウトプットに至るシグナル伝達経路の分岐点に興味をもたれるところである。

---

### おわりに

マスト細胞は体のいたるところに存在し、感染防御のフロントラインを担うことが示されたが、それぞれ異なる臓器に定着するマスト細胞が実際どのような表現型をとっており、如何なる異なった生理的機能を果しているのかについては、漸くその研究の緒についたばかりである。マスト細胞の個体発生や、系統発生そして生理的機能の研究は、生体のアレルギーへの逸脱の機序についても新たな示唆を与えることが予想され、今後の研究の発展が益々期待される分野である。

---

### 文 献

- 1) Pearay L. Ogra et al Ed. Mucosal immunology 2nd Ed. Academic Press, NY 1999.
- 2) Hayakawa S, Saito S, et al. Expression of recombinase-activating genes (RAG-1 and 2) in human decidual mononuclear cells. *J Immunol*, **153**(11) : 4934-4939, 1994.
- 3) Tsuda H, Sakai M, Michimata T, et al. Characterization of NKT cells in human peripheral blood and decidual lymphocytes. *Am J Reprod Immunol*, **45**(5) : 295-302, 2001.
- 4) Kiyono H, Kweon MN, Hiroi T, et al. The mucosal immune system: from specialized immune defense to inflammation and allergy. *Acta Odontol Scand*, **59**(3) : 145-153, 2001.
- 5) Matsunaga T. Did the first adaptive immunity evolve in the gut of ancient jawed fish? *Cytogenet Cell Genet*, **80**(1-4) : 138-141, 1998.
- 6) Matsunaga T, Rahman A. What brought the adaptive immune system to vertebrates?—The jaw hypothesis and the seahorse. *Immunol Rev*, **166** : 177-186, 1998.
- 7) Ra C, Jouvin MH, and Kinet JP. Complete structure of the mouse mast cell receptor for IgE (Fc  $\epsilon$  RI) and surface expression of chimeric receptors (rat-mouse-human) on transfected cells. *J Biol Chem*, **264** : 15323-15327, 1989.
- 8) Blank U, Ra C, Miller L, et al. Complete structure and expression in transfected cells of high affinity IgE receptor. *Nature*, **337** : 187-189, 1989
- 9) Garman SC, Kinet JP, and Jardetzky TS. Crystal structure of the human high-affinity IgE receptor. *Cell*, **95** : 951-961, 1998.
- 10) Kinet JP, Blank U, Ra C, et al. Isolation and characterization of cDNAs coding for the b subunit of the high-affinity receptor for immunoglobulin E. *Proc Natl Acad Sci USA*, **85** : 6483-6487, 1988.
- 11) Ra C, Jouvin MH, Blank U, et al. A macrophage Fc $\gamma$  receptor and the mast cell receptor for IgE share an identical subunit. *Nature*, **341** : 752-754, 1989.
- 12) Orloff D, Ra C, Frank S, et al. Family of disulphide-linked dimers containing the z and h chains of the T-cell receptor and the g chain of Fc receptors. *Nature*, **347** : 189-191, 1990.
- 13) Konishi H, Katoh Y, Takaya N, et al. Platelets activated by collagen through immunoreceptor tyrosine-based activation motif play pivotal role in initiation and generation of neointimal hyperplasia after vascular injury. *Circulation*, **105** : 912-916, 2002.
- 14) Arase N, Arase H, Park SY, et al. Association with FcR $\gamma$  is essential for activation signal through NKR-P1 (CD161) in NK cells and NK1.1<sup>+</sup> T cells. *J Exp Med*, **186** : 1957-1963, 1997.
- 15) Sandford AJ, Shirakawa T, Moffatt MF, et al. Localisation of the gene for atopy and the  $\beta$  subunit of Fc  $\epsilon$  RI on chromosome 11q. *Lancet*, **341** : 332-334, 1993.
- 16) Shirakawa T, Li A, Duvowitz M, et al.

- Association between atopy and variants of the  $\beta$  subunit of the high affinity immunoglobulin E receptor. *Nature Genetics*, **7** : 125-130, 1994.
- 17) Hiraoka S, Furumoto Y, Koseki H, et al. The Fc receptor  $\beta$  subunit is required for full activation of mast cells through Fc receptor engagement. *Int Immunol*, **11** : 199-207, 1999.
  - 18) Furumoto Y, Hiraoka S, Kawamoto K, et al. Polymorphisms in Fc  $\epsilon$  RI $\beta$  Chain Do Not Affect IgE-Mediated Mast Cell Activation. *Biochem Biophys Res Commun*, **273-2** : 765-771, 2000.
  - 19) Nishiyama C, Yokota T, Okumura K, et al. The transcription factors Elf-1 and GATA-1 bind to cell specific-enhancer elements of human Fc epsilon alpha chain gene. *J Immunol*, **163** : 623-630, 1999.
  - 20) Takahashi K, Nishiyama C, Okumura K, et al. A complex composed of USF1 and USF2 activates the human Fc  $\epsilon$ RI  $\alpha$  chain expression via CAGCTG element in the first intron. *Eur J Immunol*, **31** : 590-599, 2001.
  - 21) Takahashi K, Nishiyama C, and Ra C. Transcriptional regulation of the human high affinity IgE receptor alpha-chain gene. *Mol Immunol*, **38** : 1193-1199, 2002.
  - 22) Nishiyama C, Hasegawa M, Nishiyama M, et al. Regulation of human Fc epsilon RI alpha-chain gene expression by multiple transcription factors. *J Immunol*, **168** : 4546-4552, 2002.
  - 23) Nishiyama C, Hasegawa M, Ra C. Cloning of full-length genomic DNA encoding human Fc  $\epsilon$  RI $\alpha$ -chain and its transcriptional regulation. *Biochem Biophys Res Commun*, **284** : 1056, 2001.
  - 24) Lin S, Cicala C, Scharenberg AM, et al. The Fc(epsilon) RI beta subunit functions as an amplifier of Fc(epsilon) RI gamma-mediated cell activation signals. *Cell*, **85** : 985-995, 1996.
  - 25) Marx L, Arck P, Kieslich C, et al. Decidual mast cells might be involved in the onset of human first-trimester abortion. *Am J Reprod Immunol*, **41**(1) : 34-40, 1999.
  - 26) Kim MS, Chae HJ, Shin TY, et al. Estrogen regulates cytokine release in human mast cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, **23**(4) : 495-504, 2001.
  - 27) Zhao XJ, McKerr G, Dong Z, et al. Expression of oestrogen and progesterone receptors by mast cells alone, but not lymphocytes, macrophages or other immune cells in human upper airways. *Thorax*, **56**(3) : 205-211, 2001.
  - 28) Lesclous P, Saffar JL. Mast cells accumulate in rat bone marrow after ovariectomy. *Cells Tissues Organs*, **164**(1) : 23-29, 1999.
  - 29) Yamaguchi M, Hirai K, Komiya A, et al. Regulation of mouse mast cell surface Fc epsilon RI expression by dexamethasone. *Int Immunol*, **13**(7) : 843-851, 2001.
  - 30) Gilmore W, Weiner LP, Correale J. Effect of estradiol on cytokine secretion by proteolipid protein-specific T cell clones isolated from multiple sclerosis patients and normal control subjects. *J Immunol*, **158**(1) : 446-451, 1997.
  - 31) Chishima F et al. 投稿中
  - 32) Forrest BD. Women, HIV, and mucosal immunity. *Lancet*, **337**(8745) : 835-836, 1991.
  - 33) Supajatura V, Ushio H, Nakao A, et al. Protective roles of mast cells against enterobacterial infection are mediated by toll-like receptor 4. *J Immunol*, **167** : 2250-2256, 2001.
  - 34) Supajatura V, Ushio H, Nakao A, et al. Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity. *J Clin Invest*, **109** : 1351-1359, 2002.
  - 35) 羅 智靖. 免疫アレルギー疾患発症機構の分子医学的解明とその治療法の開発 日大医誌, **62** : 18-30, 2003.

\* \* \* \*

## HIV 感染妊婦の管理

西成田 進\*<sup>1</sup> 早川 智\*<sup>2</sup> 山本 樹生\*<sup>2</sup>

全 HIV 患者に占めるの母児感染の割合は日本ではあまり多いものではない。しかし世界的にみれば、とくにサハラ砂漠以南のアフリカ諸国では国全体の平均寿命に影響を及ぼしかねない大きな問題となっている。母児感染予防の原則は妊娠 14 週以降の zidovudine 単独療法である。しかし、より完全な感染予防を求めて、あるいは zidovudine 単独療法にともなう耐性 HIV の出現のリスク、さらには妊娠前の HAART 療法を中止することによる HIV 感染症の増悪のリスクなどから、妊娠に対する HAART 療法を試みる頻度が徐々に高まってきているのが現状である。しかし、長期的にみた HAART 療法の児への影響については未解決である。

## はじめに

Human Immunodeficiency Virus (HIV) は CD4 T リンパ球に感染して、これを死滅させることにより免疫不全状態をひき起こす。長期にわたる免疫不全は、やがて種々の重篤な日和見感染をひき起こすとともに、ときに二次性悪性腫瘍の発生をまねき、患者は死の転帰をとることになる。有効な抗 HIV 薬が開発される以前、HIV 感染症は明らかに予後不良の“悪性疾患”であった。

本稿ではまず HIV 感染に関する最近の疫学、病態と治療のトピックスについて概説し、次いで世界的にみるならば HIV 感染予防の最大の問題点である母児間感染の予防について述

べる。

## I. HIV 感染の現況—日本と世界—

HIV の感染経路は第 1 に血液、第 2 に性交渉、第 3 に母児間感染である。本邦において、かつて血友病患者への非加熱血友病製剤を介する感染が血液感染の大多数を占めていたが、その後新規の血液製剤を介する感染者は激減し、全患者に占める血液製剤による感染者の割合は 25%程度まで低下している。かわって性行為による感染が徐々にではあるが、しかし確実に増加してきている。日本における累積 HIV 感染者総数は 2002 (平成 14) 年 11 月現在 7,470 名、その約 1/3 は東京都に集中、とくに同性間性交渉による頻度が相対的に高いことが特徴である<sup>1)</sup>。世界に目を向けると 2001 年末で約 4,000 万人の HIV 感染者がいると推定され、うち 70%がサハラ砂漠以南のアフリカに集中している<sup>2)</sup>。この地区の子供の HIV 感染の 90%以上が母児感染によっている<sup>3)</sup>。経済上の理由から母親の HIV 感染を十分に治療できないこと、

\*<sup>1</sup>Susumu NISHINARITA

公立阿伎留病院内科

\*<sup>2</sup>Satoshi HAYAKAWA, Tatu YAMAMOTO

日本大学産婦人科学教室

〒173-0834 東京都あきる野市引田 78(公立阿伎留病院)

代替人工栄養の不足から新生児への母乳の禁止ができていないことなどから、この地区における5歳未満児の死亡は1986年以降むしろ増加に転じている<sup>4)</sup>。

## II. HIV 感染病態の解明—最近の知見—

HIVはCD4 T細胞、マクロファージを主な標的細胞とする。HIVのこれらの細胞への感染はHIVのenv gp120分子が標的細胞表面のCD4分子への結合でスタートする。最近この結合にもうひとつのレセプター (co-receptor) の関与が必須であること、このco-receptorの本態がケモカインレセプターであることが明らかにされた。HIV感染に関与するケモカインレセプターは主にCCR5とCXCR4であり<sup>5)6)</sup>、これらのレセプターの細胞表面への発現の差がHIV感染初期のマクロファージ指向性、感染晩期のT細胞指向性を決定していると考えられている。ケモカインレセプター遺伝子内に変異を有する感染者では、ときに感染後も長期未発症者の臨床経過をとること<sup>7)</sup>、変異CCR5をホモ接合体でもつ人ではHIV感染に対しほぼ完全に抵抗性を示すこと、ヘテロ接合体でもつ人は病像の進行が緩やかであることが知られている<sup>8)9)</sup>。変異CCR2のみはCXCR4と二量体を形成することができ、このCCR2はCXCR4を介するHIVの細胞内侵入を抑制する<sup>10)</sup>。

HIV感染では急性の時期(初感染)を過ぎると、いわゆる潜伏期に移行する。この時期、血漿ウイルス量(HIV RNA量:viral load)はその患者に固有の安定した量を示すようになる(set point)。set pointにおけるviral loadは潜伏期間の長さに逆相関する。一見無症状にみえるこの時期の病態が明らかにされてきた。この時期、HIVは1日、 $10^7$ - $10^{10}$ 個のウイルスをCD4細胞内で複製し、RNA分子として1mlの血漿中に $10^4$ - $10^7$ 個存在、その結果1日あたり $10^9$ 個のCD4 T細胞を破壊している<sup>11)</sup>。血中に放出されたHIVの半減期は0.3

日(8時間)、感染CD4 T細胞の平均生存期間は1.6日<sup>12)</sup>。すなわち、膨大な数のHIV増殖と、これにともなう膨大な数のCD4 T細胞の破壊と再生産の動的な平衡状態が“潜伏期間”の実態であることが明らかにされた。このことは、感染者の免疫器官によるCD4 T細胞の再生産が可能うちに治療を開始すべきであるという考えに根拠を与えることになった。

## III. HIV 感染症の治療

抗HIV薬はその作用機序から逆転写酵素阻害薬と蛋白分解酵素阻害薬とに大別される。治療の原則は逆転写酵素阻害薬2剤と蛋白分解酵素阻害薬1剤を組み合わせた多剤療法(highly active anti-retroviral therapy:HAART)である。無症候性HIV感染者であってもCD4 T細胞が350個未満、あるいは血漿HIV RNA量が55,000コピー以上では治療を開始すべきであるとされている。HIV感染に対する臨床的なマネージメントについては要約された日本語ガイドライン<sup>13)</sup>、あるいは最新米国ガイドラインを参照されたい<sup>14)</sup>。HAARTによるHIV感染に対する効果は目ざましく、日和見感染に対する治療方針の確立と相まって、数年の経過でみるならばHIV感染はたんなる“慢性疾患のひとつ”に過ぎないという極論さえでている。

## IV. HIV 感染女性の管理

妊娠中の女性に対してはzidovudine (AZT)の単独療法が推奨されている(表1)。妊娠14週以降経口AZTを開始、陣痛、分娩中のAZT静注、新生児への6週間のAZTの投与で母児感染は約2/3まで、あるいはそれ以上に減少する<sup>15)16)</sup>。治療の開始は胎児の器官形成期が終了する12週までは待つべきであると考えられている。非妊娠女性の場合と異なり、治療開始はHIV-RNAレベルが1,000コピー以上であれば開始されるべきであると考えられてい

表 1 zidovudine による母児感染予防

分娩前: 14 週以降 A または B を継続する。 A: zidovudine 100 mg を 1 日 5 回 B: zidovudine 200 mg を 1 日 3 回または 300 mg を 1 日 2 回
分娩中: zidovudine 2 mg/kg, 1 時間で点滴。 その後分娩まで 1 mg/kg で維持。
分娩後: 生後 12 時間以内に zidovudine syrup を 2 mg/kg/児, 経口で 6 時間ごと, 6 週間継続。

(文献 15 から要約)

る<sup>14)</sup>。HIV-RNA レベルが 1,000 コピー以下であっても, AZT の投与は母児感染を非投与者の 9.8% から 1% まで減少させる<sup>17)</sup>。AZT 単独療法は妊娠末期に限定して投与しても母児感染を低下させることも明らかになっている<sup>18)</sup>。

母体の HIV ウイルス量のコントロールが母児感染予防のもっとも大きな要因であること<sup>14)19)</sup>, 1 log の血漿ウイルス量の減少は母児感染を 1/2.5 に減少させること<sup>20)</sup>, 血漿ウイルス量の減少は産道感染の原因である産道分泌物中の HIV 量と相関すること<sup>21)</sup>を考えると AZT 単独よりも強力な HIV の抑制が母児感染防止に重要であることは間違いない。実際, AZT と lamivudine の併用による母児感染予防効果は double-blind study で明らかであり<sup>22)</sup>, 32 週以降の AZT と lamivudine の併用で母児感染は 1.6% まで低下すること<sup>23)</sup>, さらに蛋白分解酵素阻害薬を加えた HAART ではより強い母児感染予防効果を示し, その感染頻度は 1.2% まで低下することが報告<sup>24)</sup>されている。さらに小規模の study ではあるが, 蛋白分解酵素阻害薬を含む HAART で, 母児感染は完全に防止できかつ安全であるとする報告もある<sup>25)</sup>。

他方, AZT 以外の抗 HIV 薬の妊婦への安全性についての明確なデータはない。もし標準療法としての HAART を施行中の女性の妊娠が判明した場合, その時点で HAART は原則として一時中止されるべきである。しかし HAART 中止による HIV-RNA レベルの再上昇の可能性は否定できず, 14 週以降の治療が AZT 単独でよいのかどうかは今後の問題であ

る。実際問題として米国の現状では妊婦であっても従来の AZT 単独療法から HAART を受ける妊婦の頻度が多くなってきている<sup>26)27)</sup>。AZT 単独療法と逆転写酵素阻害薬の多剤療法とでは未熟産の頻度に差はないものの, 多剤療法に蛋白分解酵素がふくまれると未熟産, 低体重出生の比率が増加すること<sup>28)</sup>, 多剤併用療法で早産が増加する可能性<sup>29)</sup>, とくに蛋白分解酵素阻害薬をふくむ多剤療法では致命的な乳酸アシドーシスの頻度が増加する可能性<sup>29)</sup>などが指摘されており, HAART を含む多剤療法が, その効果とリスクの面から臨床の現場で実際に施行されるためには十分なインフォームドコンセントが必要である。長期使用にともなう児への影響が未確定のまま妊婦への HAART の使用頻度が高まっていることに鑑み, 参考にすべき抗 HIV 薬の基礎的, 臨床的データのリストが報告<sup>14)</sup>されている (表 2)。

帝王切開は破水を経過した自然分娩にくらべて母児感染を 50% 以上低下させる<sup>30)31)</sup>。破水時間の長さも母児感染に影響する<sup>32)</sup>。これらのことから HIV 感染妊婦の分娩には, 原則として帝王切開が推奨される。

母乳もまた母児感染の要因である。母乳の禁止により母児感染は半減する<sup>33)34)</sup>。HIV 感染者が爆発的に増加している多くの発展途上国においては, その経済的な状況から母乳を禁止できず母児感染の増加を許している。

## V. 症例提示 (表 3)

夫婦ともに HIV 感染者であったが, 当初は



表 2 妊婦に対する抗 HIV 薬の基礎的、臨床的データ

抗 HIV 薬	FDA category*	胎盤通過性 (児/母 ratio)	発癌性 (動物実験)	催奇形作用 (動物)
Zidovudine	C	yes (0.85)	positive	positive
Zalcitavine	C	yes (0.3~0.5)	positive	positive
Didanosine	B	yes (0.5)	negative	negative
Stavudine	C	yes (0.76)	未決定	negative
Lamivudine	C	yes (-1.0)	negative	negative
Abacavir	C	yes	未決定	positive
Tenofovir	B	yes	未決定	negative
Nevirapine	C	yes (-1.0)	未決定	negative
Delavirdine	C	yes (0.15)	positive	positive
Efavirenz	C	yes (-1.0)	未決定	positive
Indinavir	C	yes	未決定	negative
Ritonavir	B	yes (0.15~0.64)	positive	negative
Saquinavir	B or C	不明	未決定	negative/positive
Nelfinavir	B	不明	未決定	negative
Amprenavir	C	不明	未決定	negative
Lopinavir/ ritnavir	C	yes/Lop (0.08)	未決定/Lop	negative

\* FDA pregnancy category

- A: 危険なし, B: 動物実験レベルで危険なし, ヒトでは未確認,
- C: ヒトでの安全性は未確認, 効果とリスクを勘案して使用すべき,
- D: 胎児への影響大

(文献 14 から改編, 要約)

表 3 症例提示

1997(H 9) 2月: 妊娠 16 週時, 夫婦ともに HIV 感染者であることが判明, 人工妊娠中絶。CD4T 細胞数 663 個, HIV-RNA copy 数 1,000。以後, 夫婦ともに無治療で経過観察。
1999(H11) 9月: Indinavir, AZT, 3TC による HAART 開始。CD4T 細胞数 243 個, HIV-RNA copy 数 1,500。
2000(H12) 3月: HAART 続行。CD4T 細胞数 549 個, HIV-RNA copy undetectable (50 未満)
2001(H13) 3月: 妊娠確認。HAART 中止。CD4T 細胞数 712 個, HIV-RNA copy 数 50 未満。 5月: 14 週。AZT 単独投与開始。 6月: AZT 単独療法続行。CD4T 細胞数 344 個, 8月: CD4T 細胞数 189 個, HIV-RNA copy 数 1,000 9月: indinavir, AZT, 3TC の HAART へもどす。 10月: CD4T 細胞数 281 個, HIV-RNA copy 数 50 以下。帝王切開分娩 (35 週と 6 日, 2,625 g), 児への感染なし。
2002(H14) 2月: CD4T 細胞数 430 個, HIV-RNA copy 数 50 以下。

AZT 単独, 妊娠晚期には HAART 療法を行い母児感染なく健児を得た例を報告する。症例は妊娠 16 週の検診で HIV 感染が判明した。同時期, 夫も HIV 感染者であることが判明し

た。この時は夫婦の希望で人工妊娠中絶施行し, その後, 無治療で経過を観察していたが, 徐々に CD4 T 細胞数の減少傾向があり HAART 療法を開始した。ほぼ同時期に御主

人の治療も同内容の HAART で開始した。夫婦ともに感染者の場合、お互いの耐性 HIV 株が交差しないよう同じ薬剤による HAART が選択されるべきである。両者の CD4 T 細胞数が安定、ウイルス量も検出限界以下で安定している時期に妊娠、帝王切開で健児を得た。夫婦ともに感染者からの垂直感染なしの出産例は本邦ではめずらしい。

---

### おわりに

---

妊婦への抗 HIV 薬の投与は母児感染予防の立場から、非妊婦の場合よりも CD4 T 細胞数、HIV-RNA 量のうえでより早期に開始されるべきである。現時点で zidovudine 単独療法がすすめられるが、viral load の最大の抑制を狙って、妊婦に対してもより強力な HAART 療法を施行しようとする傾向にある。しかしその場合、長期にわたる児への影響についてはまだ結論を得てはいないことを銘記すべきである。

---

### 文 献

---

- 1) AIDS News Letter (no. 93). 東京都, 2002 年 11 月.
- 2) AIDS Epidemic update December 2001. UNAIDS 2002.
- 3) Peckham C, Gibb D: Current concepts: Mother-to-child transmission of the human immunodeficiency virus. *N Engl J Med*, **333**: 298-302, 1995.
- 4) Percent of infant deaths due to AIDS, projections for the year 2010. The progress of nations. UNICEF, 1997.
- 5) Dragic T, Litwin V, Allaway GP, et al: HIV-1 entry into CD4<sup>+</sup> cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature*, **381**: 667-673, 1996.
- 6) Endres MJ, Clapham PR, Marsh M, et al: CD4-independent infection by HIV-2 is mediated by fusin/CXCR4. *Cell*, **87**: 745-756, 1996.
- 7) Liu R, Paxton WA, Choe S, et al: Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiple exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell*, **86**: 367-377, 1996.
- 8) Michael NL, Nelson JAL, Kewalramani VN, et al: Exclusive and persistent use of the entry coreceptor CXCR4 by human immunodeficiency virus type 1 from a subject homozygous for CCR5  $\Delta$ 32. *J Virol*, **72**: 6040-6047, 1998.
- 9) Dean M, Carrington M, Winckler C, et al: Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. *Science*, **273**: 1856-1862, 1996.
- 10) Mellado M, Rodriguez-Frade JM, Vila-Colo AJ, et al: Chemokine control of HIV-1 infection. *Nature*, **400**: 723-724, 1999.
- 11) Ho D, Neumann D, Perelson AU, et al: Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature*, **373**: 123-126, 1995.
- 12) Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, et al: HIV-1 dynamics *in vitro*: Virion clearance rate, infected cells life-span, and viral generation time. *Science*, **271**: 1582-1586, 1996.
- 13) 抗 HIV 治療ガイドライン:平成 13 年度厚生労働省科学研究費補助金エイズ対策研究事業「HIV 感染症の治療に関する研究」班 (2003 年 3 月).
- 14) Dybul M, Fauci AS, Bartlet JG, et al: Guidelines for using antiretroviral agents among HIV-infected adults and adolescents: The panel on clinical practice for HIV. *Ann Intern Med*, **137**: 381-434, 2002.
- 15) Sperling RS, Shapiro DE, Coombs RW, et al: Maternal viral load, zidovudine treatment, and the risk of transmission of human immunodeficiency virus type 1 from mother to infant. Pediatric AIDS Clinical Trial Group Protocol 076 Study Group. *N Engl J Med*, **335**: 1621-1629, 1996.
- 16) 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*, **331**: 1173-1180, 1994.
- 17) Ioannidis JP, Abrams EJ, Ammann A, et al: Perinatal transmission of human immunodeficiency virus type 1 by pregnant women with RNA virus load < 1000 copies/ml. *J Infect Dis*, **183**: 539-545, 2001.
- 18) Lallemand M, Jourdain G, Coeur SL, et al: A trial of shortened zidovudine regimens to prevent mother-to-child transmission of HIV-1. *N Engl J Med*, **343**: 982-991, 2001.
- 19) Kourtis AP, Bulterry SM, Nesheim SR, et al: Understanding the timing of HIV transmission from mother to infant. *JAMA*, **285**: 709-712, 2001.
- 20) Quinn TC, Wawer MJ, Sewankambo N, et al: Viral load and Heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. Rakai Project Study Group. *N Engl J Med*, **342**: 921-929, 2000.
- 21) Hart CE, Lennox JL, Pratt-Pulmore M, et al: Correlation of human immunodeficiency virus type 1 RNA levels in blood and the female genital tract. *J Infect Dis*, **179**: 871-882, 1999.
- 22) Mandelbrot L, Landreau-Mascaro A, Reck-acewics C, et al: Lamivudine-zidovudine combination for the prevention of maternal-infant transmission of HIV-1. *JAMA*, **285**: 2083-2093, 2001.
- 23) The Petra Study Team: Efficacy of three short-course regimens of zidovudine and lamivudine in preventing early and late transmission of HIV-1 from mother to child in Tanzania, South Africa, and Uganda (Petra Study): a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*, **359**: 1178-1186, 2002.
- 24) Cooper ER, Charurat M, Mofenson L, et al: Combination antiretroviral strategies for the treatment of pregnant HIV-1-infected women and prevention of perinatal HIV-1 transmission. *J Acquir Immune Defic Syndr*, **29**: 489-494, 2002.
- 25) Morris AB, Cu-Uvin S, Harwell JI, et al: Multicenter review of protease inhibitors in 89 pregnancies. *J Acquir Immune Defic Syndr*, **4**: 306-311, 2000.
- 26) Turner BJ, Zhang D, Laine C, et al: Association of provider and patients characteristics with HIV-infected women's antiretroviral therapy regimen. *J Acquir Immune Defic Syndr*, **27**: 20-29, 2001.
- 27) Minnkoff H, Ahdieh L, Watts H, et al: The relationship of pregnancy to the use of highly active antiretroviral therapy. *Am J Obstet Gynecol*, **184**: 1221-1227, 2001.
- 28) Tuomala RE, Shapiro D, Mofenson LM, et al: Antiretroviral therapy during pregnancy and the risk of an adverse outcome. *N Engl J Med*, **346**: 1863-1870, 2002.
- 29) European Collaborative Study, Swiss Mother and Child HIV Cohort Study: Combination antiretroviral therapy and duration of pregnancy. *AIDS* **14**: 2913-20, 2000.
- 30) International Perinatal HIV Group: Mode of delivery and vertical transmission of HIV-1: a meta-analysis from fifteen prospective cohort studies. *N Engl J Med*, **344**: 977-987, 1999.
- 31) European Mode of Delivery Collaboration: Elective caesarean section versus vaginal delivery in preventing vertical HIV-1 transmission: a randomized clinical trial. *Lancet*, **353**: 1035-1059, 1999.
- 32) Rutstein RM: Prevention of perinatal HIV infection. *Curr Opin Pediatr*, **13**: 408-416, 2001.
- 33) Nduati R, John G, Mbori-Ngacha D, et al: Effect of breastfeeding and formula feeding on transmission of HIV-1: randomized clinical trial. *JAMA*, **282**: 1167-1174, 2000.
- 34) Newell M-L: Prevention of mother-to-child transmission of HIV: challenge for the current decade. *Bulletin of the World Health Organization*, **79**: 1138-1144, 2001.

\* \* \* \*

## 感染症

母子感染の現況と治療的戦略  
HIV 感染妊婦の管理とその問題点早川 智<sup>\*1\*3</sup> 西成田 進<sup>\*2</sup>  
山本 樹生<sup>\*1</sup> 本多 三男<sup>\*3</sup>

1990年代以降、わが国でも HIV 感染妊婦が増加している。しかしながら、妊婦検診時の HIV 抗体検査と陽性者に対する薬物療法と選択的帝王切開、授乳の禁止により 1%以下という世界的にみても最低の垂直感染率を達成している。一方、感染者が非常に少ない地域におけるスクリーニング検査の費用/効果効率や感染が判明したときの医療機関の受け入れの問題、さらに長期間の AZT 単剤投与による耐性の誘導や HAART による重篤な副作用など新たな問題が生じている。発展途上国では先進国なみの管理は不可能でありワクチンの開発が待たれる。垂直感染機構や胎盤関門についてはまだ不明な点が多いが脱落膜免疫細胞の機能が注目されている。

## はじめに

エイズはレトロウイルスのひとつである 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。わ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<sup>1)~3)</sup>。わが国では 1990 年代後半より HIV 陽性妊婦が増加し、

2002 年現在で筆者らが把握した範囲では年間 30 例前後の分娩があるが、後述のように抗ウイルス剤の投与と選択的帝王切開によって垂直感染はほとんど完全に予防されている (図 1)。一方、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、とく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 15~40% が HIV に感染し、その多くが 10 歳以前に死亡するため第三世界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 2002 年現在、毎年 80 万人の新生児が HIV に垂直感染するという<sup>4)</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

\*1Satoshi HAYAKAWA, Tatsuo YAMAMOTO  
日本大学医学部産婦人科

\*2Susumu NISHINARITA  
公立あきる病院内科

\*3Mitsuo HONDA  
国立感染症研究所エイズ研究センター第一グループ  
〒173-8610 東京都板橋区大谷口上町 30-1