

表 2

「HIV 陽性婦人の STD 感染の実態に関する調査」別紙

貴施設名 _____

症例番号 ()

- (1) 年齢 () 才
- (2) 初診された時期 平成 () 年
- (3) 国籍 ()
- (4) STD 検査の結果について (結果につきましては陽性あるいは陰性に○をつけて下さい)

①クラミジア：実施時期 年 月
陽性 陰性

②淋菌：実施時期 年 月
陽性 陰性

③ヒトパピローマウイルス：実施時期 年 月
陽性 陰性

④その他
項目 ()：実施時期 年 月
陽性 陰性

項目 ()：実施時期 年 月
陽性 陰性

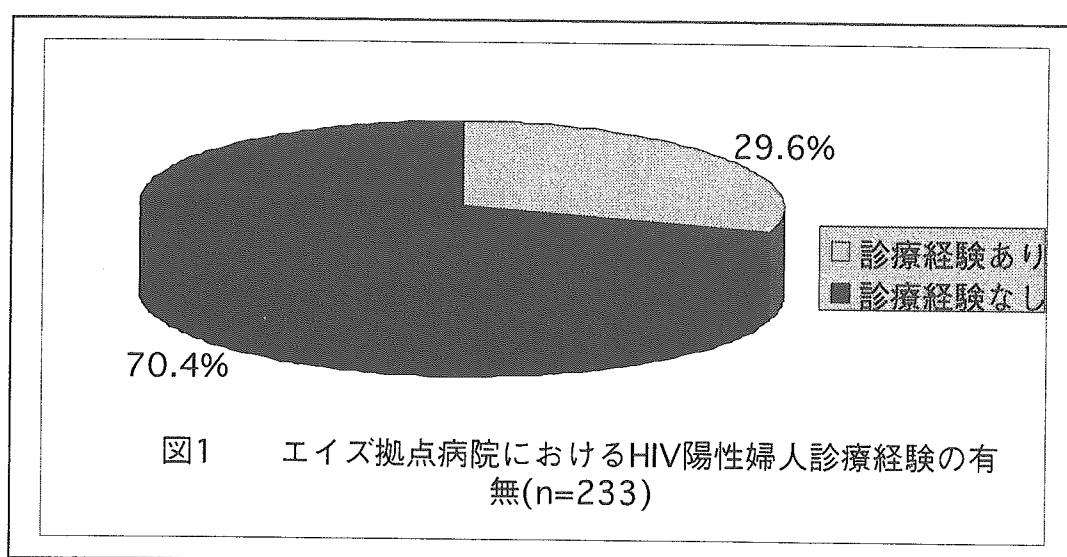
⑤子宮頸部細胞診：実施時期 年 月
結果：クラス ()

C. 研究結果

エイズ拠点病院 363 施設に対して HIV 陽性婦人の診察に関するアンケートを送付した。これら 363 施設中

233 施設 (64.2%) から回答を得た。

これらのうち HIV 患者 (女性) の診療経験を有する施設は 69 施設 (29.6%) であった (図 1)。



これらの施設で HIV 陽性婦人に対し、何らかの STD 検査または子宮頸部スメアテストを実施されている症例が 72 例あった (平成 14 年度にすでに回答されていたものを含む)。これらの症例について回答をいただいた施設は以下のとおりである。

札幌医科大学産科婦人科学教室
弘前大学産科婦人科学教室
秋田大学産科婦人科学教室
国立仙台病院産婦人科
国立栃木病院産婦人科
国立霞ヶ浦病院産婦人科
旭中央病院産婦人科
防衛医科大学校産科婦人科学教室
都立荏原病院産婦人科
信州大学産科婦人科学教室

長野赤十字病院産婦人科
長野県立須坂病院産婦人科
佐久総合病院産婦人科
諏訪赤十字病院産婦人科
県西部浜松医療センター病院産婦人科
国立東静岡病院産婦人科
岐阜大学産科婦人科学教室
金沢医科大学産科婦人科学教室
福井大学産科婦人科学教室
京都市立病院産婦人科
大阪大学産科婦人科学教室
広島大学産科婦人科学教室
広島市立広島市民病院産婦人科
産業医科大学産科婦人科学教室
熊本大学産科婦人科学教室
琉球大学産科婦人科学教室

前方視的に HIV 陽性婦人に対する

検索は以下の施設で実施された。

- 国保旭中央病院産婦人科
- 国立名古屋病院産婦人科
- 国立大阪病院産婦人科
- 三重県立医療センター産婦人科
- 新潟大学産婦人科

これらの施設においては HIV 陽性婦人に対して、十分な説明のもと、同意を得て検索を行った。

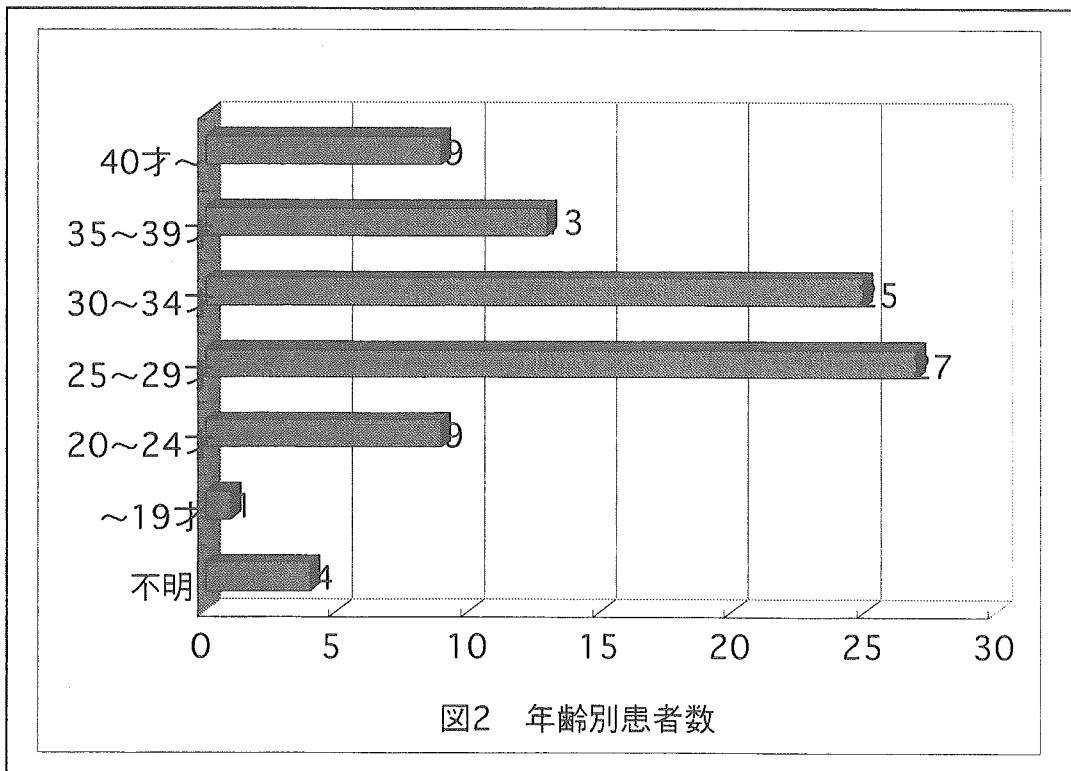
何らかの STD 検査または子宮頸部スメアテストを実施されている 88 症例の国籍別人数を図 2 に示した。88 例中日本人は 37 例であり、タイが 32 例、ブラジルが 8 例であり、その他が 9 例、国籍不明（記載なし）が 2

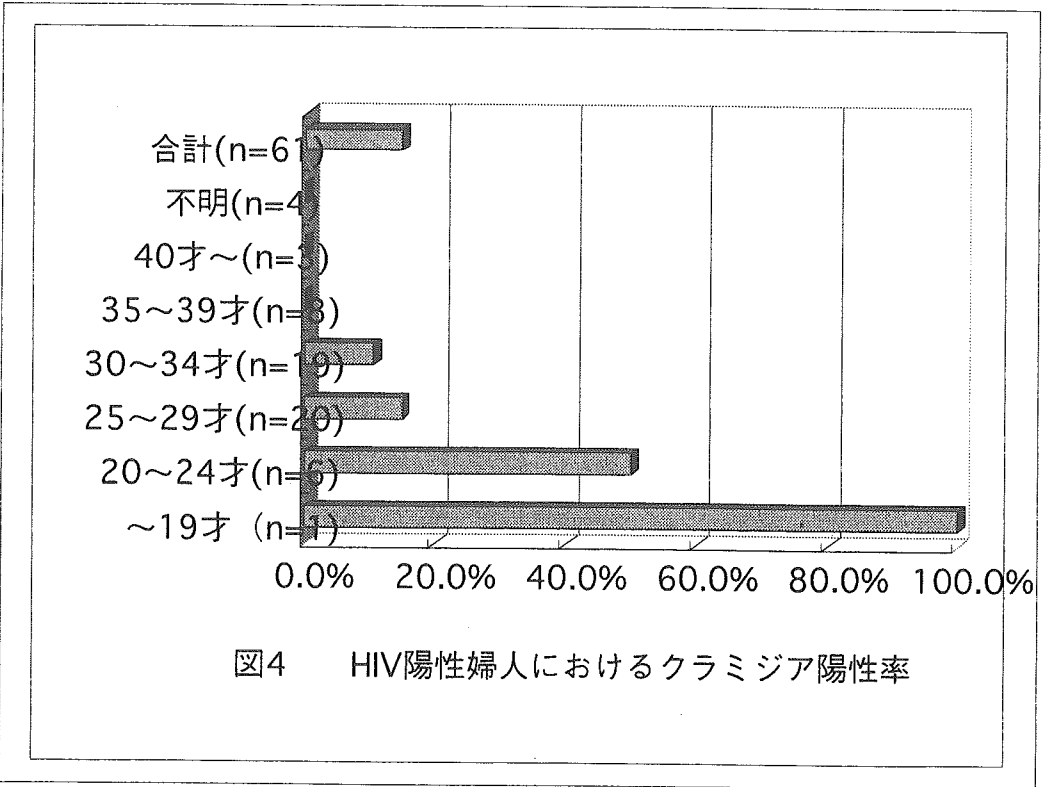
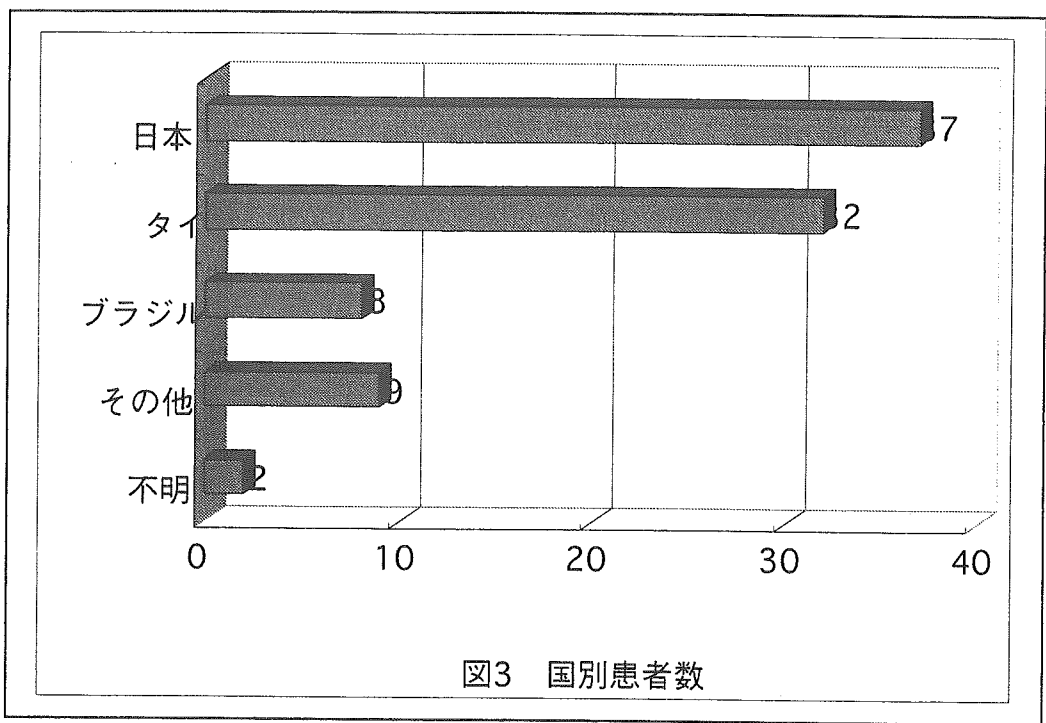
例であった。

年齢階層別の人数を図 3 に示した。20 才未満が 1 例、20-24 才が 9 例、25-29 才が 27 例、30-34 才が 25 例、35-39 才の 13 例、40 才以上が 9 例であった。

クラミジア DNA 検査が実施された症例は 61 症例であり、このうち 9 例（14.8%）が陽性であった。年齢階層別の陽性率を図 4 に示した。

19 才以下で 1 例中 1 例、20-24 才では 6 例中 3 例（50.0%）、25-29 才で 20 例中 3 例（15.0%）で陽性であった。また、30-34 才で 19 例中 2 例（10.5%）で陽性であったが、35 才以降では陽性例は認められなかった。



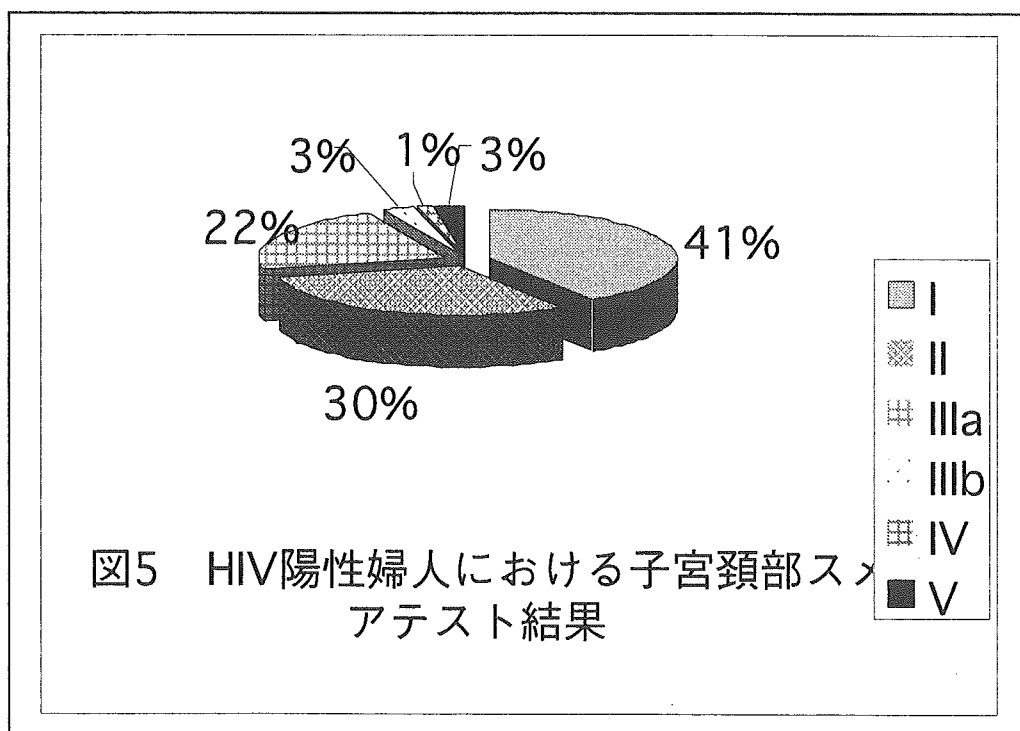


淋菌については 34 例で検査が実施されたが、陽性例は認められなかった。

子宮頸部のスメアテストについては 76 症例で実施されているが、クラス別の例数を図 5 に示した。Class I が 31 例 (40.8%)、Class II が 23 例 (30.3%) であり、正常と判断される症例が 71.1%であった。一方、Class IIIa が 17 例 (22.4%)、Class IIIb が 2 例 (2.6%)、Class IV が 1 例 (1.3%)、Class V が 2 例 (2.6%) であった。Class IIIa 以上の割合は、28.9%であ

り、一般婦人における IIIa 以上の割合に比較し、著しく高率である。年齢階層別の Class IIIa 以上については、20-24 才では 10 例中 3 例 (30.0%)、25-29 才では 28 例中 4 例 (14.3%)、30-34 才では 33 例中 11 例 (33.3%)、35-39 才では 18 例中 3 例 (16.7%) であり、40 才以上では 10 例中 1 例 (10.0%) であった。

また、HPV については、23 例で検査が実施され、14 例 (60.9%) に陽性であった (図 7)。



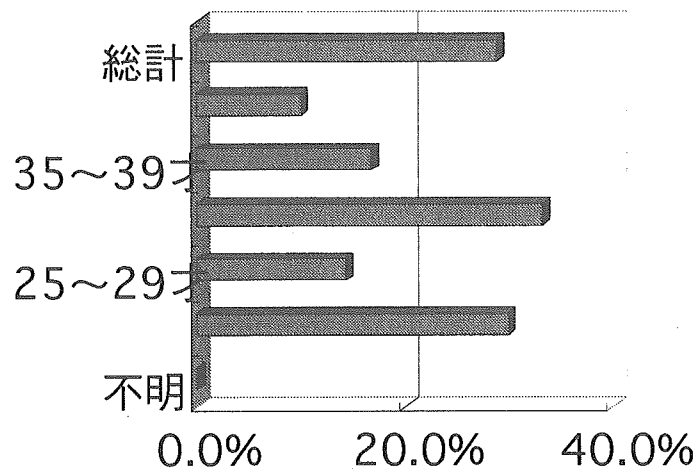


図6 HIV陽性婦人における子宮頸部スメアIIIa以上症例の割合

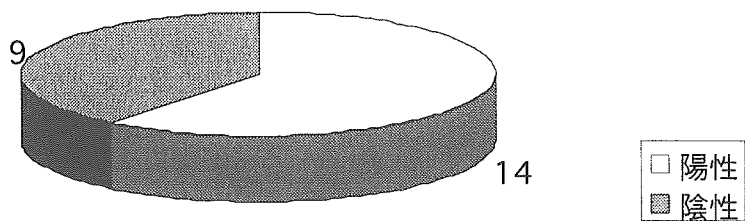


図7 HIV陽性婦人におけるHPV陽性率

2-2) 多施設共同による若年婦人を対象とした HIV 検査の実施

A. 研究目的

すでに述べたように本邦における HIV の感染者および AIDS の患者数は増加傾向にあることが指摘されており、平成 22 年度には、患者数が 5 万人に達すると推計されている。このような HIV も含めた性感染症(STD) の増加は重大な問題であり、その対策は緊急の課題である。

平成 12 年度から平成 14 年度の厚生労働科学研究費補助金「エイズ対策研究事業・妊産婦の STD 及び HIV 陽性率と妊婦 STD 及び HIV の出生児に与える影響に関する研究」において、一般妊娠婦人における子宮頸管クラミジア DNA および淋菌ならびにヒトパピローマウイルス (HPV) の検索を行い、10 才台および 20 才台前半の妊娠婦人において、陽性率が高いことを指摘した。一方、これらの感染の可能性が高い人工妊娠中絶術を施行された婦人において HIV 抗体の検査実施率は極めて低い状況であった。今回の研究では帯下感、出血などの有症状婦人、STD 検査希望、人工妊娠中絶術希望者など HIV 感染に関し、ハイリスクと考えられる婦人特に若年婦人層における感染実態を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

若年婦人における STD および HIV 抗体の陽性率に関する検討については、東京都、神奈川県における開業産婦人科医院 326 施設中、若年婦人の受診が見込める 203 施設を対象に、多施設共同研究参加の意志を確認した。その結果 33 施設が本研究に参加

の意志を示したが、結果的には 26 施設が参加した。参加施設は以下のとおりである (順不同)。

まつしま産婦人科・小児科クリニック (東京都江戸川区)

育良クリニック (東京都目黒区)

宇田川産婦人科 (東京都江戸川区)

永井産婦人科 (東京都立川市)

塩口産婦人科 (東京都太田区)

横田医院 (東京都板橋区)

岡本産婦人科医院 (横浜市金沢区)

関根産婦人科医院 (東京都練馬区)

久保田病院 (東京都練馬区)

銀座医院 (東京都中央区)

高島平クリニック (東京都板橋区)

桜井産婦人科 (横浜市港北区)

小川クリニック (東京都豊島区)

水口病院 (東京都武蔵野市)

斎藤医院 (横浜市港南区)

浅倉クリニック (東京都江戸川区)

大倉山レディースクリニック (横浜市港北区)

池川クリニック (横浜市金沢区)

竹下医院 (東京都新宿区)

仲町台レディースクリニック (横浜市都筑区)

畑中医院 (東京都西東京市)

樋口産婦人科医院 (東京都江東区)

美しが丘ウイメンズクリニック (横浜市青葉区)

米山医院 (東京都足立区)

牧野クリニック (神奈川県平塚市)

本間ウイメンズクリニック (横浜市都筑区)

これらの施設において、30 才未満の帯下感、出血などの有症状婦人、STD 検査を希望する婦人、人工妊娠中絶術希望者などに対し、十分なイ

ンフォームドコンセントを行い、クラミジア DNA、淋菌 DNA、HIV 抗体の各検査を実施した。

C. 研究成果

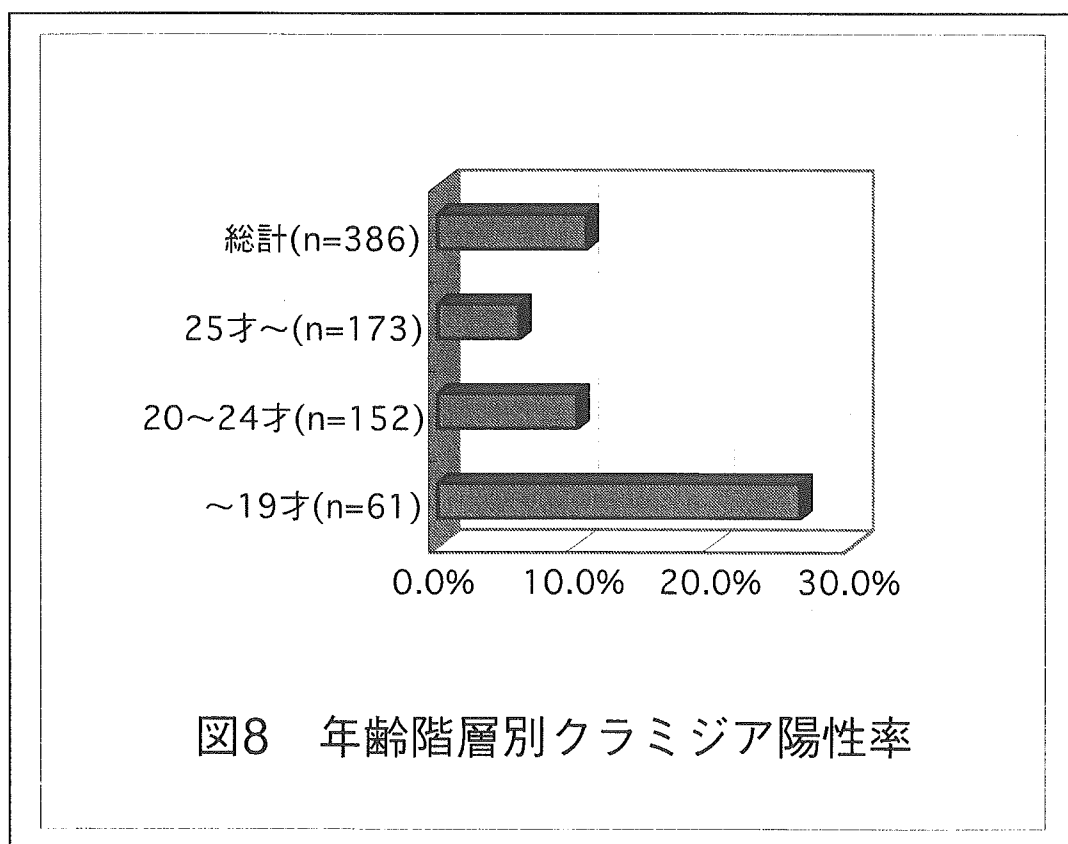
1. HIV 抗体陽性率

若年婦人における HIV 抗体の陽性率については、831 名が HIV 抗体検査を受けいずれも陰性であった。年齢内訳は 19 才以下が 156 名、20-24 才が 327 名、25 才以降が 348 名であった。

クラミジア DNA については 386 例に検査が行われ、41 例 (10.6%) で陽性であった。年齢別陽性率に関

しては、19 才以下では 61 名中 16 名 (26.2%)、20-24 才では 152 例中 15 例(9.9%)に、25 才以降では 173 例中 10 例(5.8%)で陽性であり、19 才以下の階層で有意に高率であった (図 8)。

淋菌 DNA については 379 例に検査が行われ 6 例 (1.6%) で陽性であった。年齢別陽性率に関しては、19 才以下では 61 名中 2 名 (3.3%)、20-24 才では 149 例中 2 例(1.3%)に、25 才以降では 169 例中 2 例(1.2%)で陽性であり、19 才以下の階層で高率であった (図 9)。



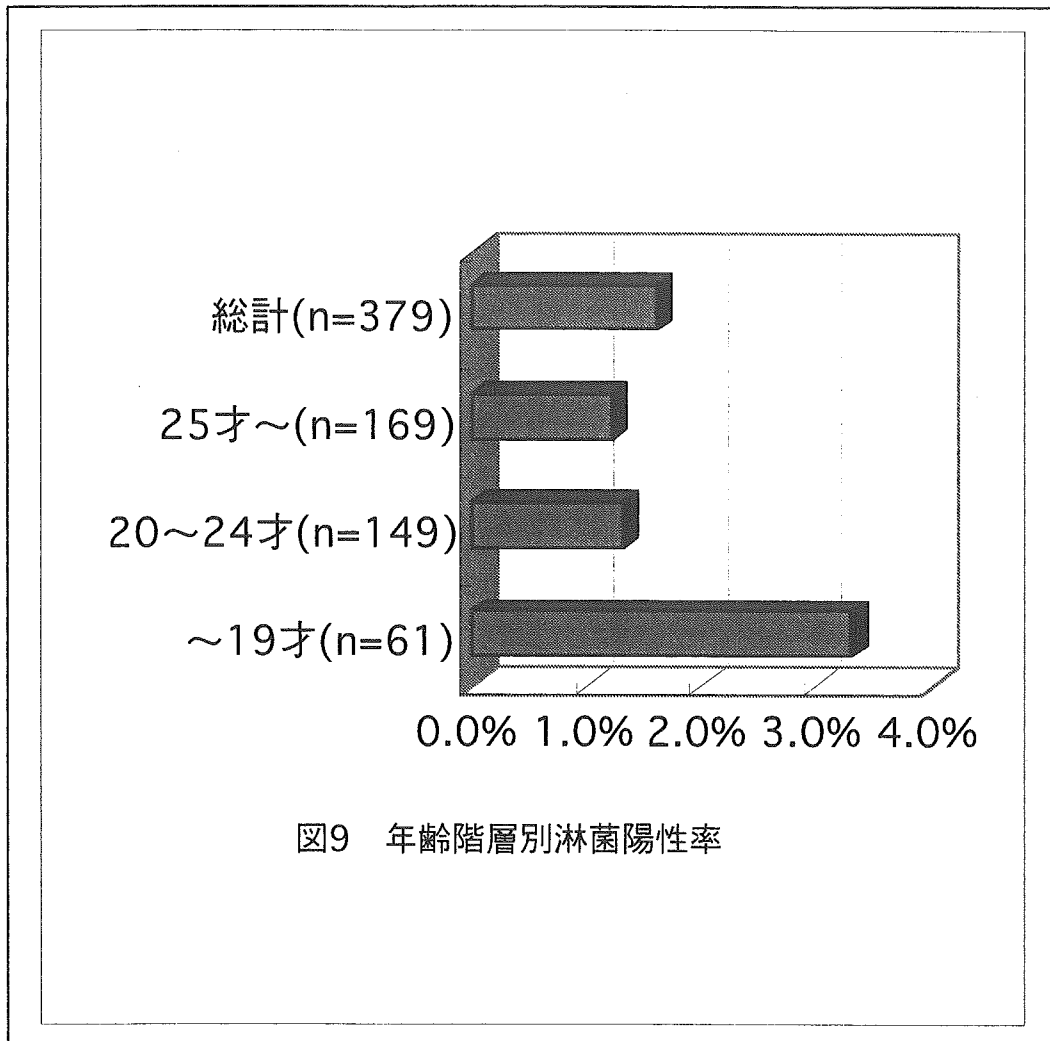


図9 年齢階層別淋菌陽性率

D. 考察

HIV も含めた STD の感染状況については国により大きな差異がある。特に HIV 感染者については欧米，東南アジア諸国，アフリカ諸国などでは高い感染率を示しているが、本邦においては一般人口における HIV 抗体陽性率はいまだ高いものではない

が、徐々に感染が拡大していることが危惧されている状況である。

HIV 陽性婦人では、免疫能の低下から、STD 感染を起こしやすいことが指摘されているが、その実態を明らかにするために、平成 14 年度の厚生労働科学研究費補助金「エイズ対策研究事業・妊産婦の STD 及び HIV 陽性率と妊婦 STD 及び HIV の出生児

に与える影響に関する研究」において、エイズ拠点病院に対するアンケート調査を実施、後方視的な検討を行った。これにより、各種 STD の陽性率が高い傾向が示されたが、今年度の研究においては、これら、すでに検査を実施された症例に関する個票による STD 調査とともに、前方視的に検査を行い、HIV 陽性婦人における STD の実態を明らかにすることを目的とした。全国のエイズ拠点病院 363 施設に対し、アンケート調査用紙を送付し、協力を依頼したが、233 施設 (64.2%) から回答が得られた。これら 233 施設の産婦人科で HIV 陽性婦人を診察した経験のある施設は 69 施設 (29.6%) であり、エイズ拠点病院においても HIV 陽性婦人の診療を行ったことのない、産婦人科医師が相当数いることが示された。

何らかの STD 検査または子宮頸部スメアテストを実施されている 88 症例の国籍別人数では日本人は 37 例であり、タイが 32 例、ブラジルが 8 例であり、その他が 9 例、国籍不明 (記載なし) が 2 例であった。

クラミジア DNA 検査が実施され

た症例は 61 症例であり、このうち 9 例 (14.8%) が陽性であった。年齢階層別の陽性率では、24 才以下の症例で 7 例中 4 例で陽性であり、若年婦人に高率である傾向が認められた。

若年婦人における HIV 抗体に関する陽性率の研究については、東京都および神奈川県の開業産婦人科施設において、30 才未満の帯下感、出血などの有症状婦人、STD 検査を希望する婦人、人工妊娠中絶術希望者などに対し、十分なインフォームドコンセントを行い、クラミジア DNA、淋菌 DNA、HIV 抗体の各検査を実施した。

クラミジア DNA については 386 例に検査が行われ、41 例 (10.6%) で陽性であった。年齢別陽性率に関しては、19 才以下の階層で有意に高率であった。今回の検討では HIV 陽性者は認められなかったが若年婦人における STD の蔓延の状況を考慮すると今後とも検討を行なう必要があるものと判断される。

E. 結論

本研究により若年婦人における HIV 感染はいまだに低率であるものの、各種 STD の感染の状況とくに若年婦人において、広く蔓延している実態が明らかになった。今後さらに、若年層を中心とした検索が重要であると判断された。

一方、今回の結果は HIV 陽性婦人に対する、健康管理の観点から、STD などの検査を積極的に実施することが望ましいことを示すデータであると判断され、今後さらに前方視的に検索を行なうことが重要であると判断された。

厚生労働科学研究費補助金 分担研究報告書

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

分担研究者	牛島廣治	東京大学大学院医学系研究科	教授
	星野洪郎	群馬大学大学院医学系研究科	教授
	朴 杓允	神戸大学大学院自然科学研究科	教授
	沖津祥子	東京大学大学院医学系研究科	研究支援員
	柳生文宏	東京大学大学院医学系研究科	協力研究員

【目的と意義】

(1) いまだ HIV 感染症は世界中で急増傾向にあり、アジア諸国では爆発的に流行している。母子感染と性行為感染がその主な感染経路と考えられているがベトナムにおいては薬物注射使用も多い。またベトナムでの HIV は CRF01_AE が優位であり、数%が薬剤耐性を持っているとされている。しかしながら HIV の母子感染についてはほとんど調査されていない。そこで、母子感染を起こした児についてサブタイプ特異的プライマーを用いた PCR によりサブタイピングを行った。またシーケンスにより薬剤耐性について解析を行った。

(2) 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、薬剤耐性等の現状を明らかにすることを目的として調査する。さらに HIV の母子感染のうちおもに子宮内感染の機序を解明するためにウイルスおよび宿主両面から検索を行う。胎盤内でのウイルスの存在部位を解析し、また母子感染を引き起こすウイルスの要因およびコレセプター等の宿主の因子を検討する。今回は HIV サブタイピングおよび絨毛癌細胞を対象にし HIV のコレセプターの可能性のある G タンパク受容体の発現について調べた。また、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。一方、日本では同性間の性的接触による HIV 感染は増加の一途をたどっている。厚生労働省 HIV 研究班の報告によると、同性間の

性的接触の感染様式全体の中での比率は、平成 16 年の統計で 60.0%となっている。また同様に、平成 15 年は 55.6%、平成 14 年は 53.6%と、年々比率が増加していることが伺える。感染が起こるためには、主要レセプターである CD4、かつコレセプターと呼ばれる主要レセプターに付属するものの 2 つのレセプターが必要である。そして最近、いくつかの共役型 G プロテインレセプターが HIV のコレセプターとなることが発見され注目されている。そこで直腸感染の可能性を *in vitro* のレベルで検討するために、直腸癌細胞である CaCo-2 細胞に、CD4、およびコレセプターとして考えられている 18 種類の共役型 G プロテインレセプターが発現する mRNA の有無を調べた。

(3) 今まで知られているコレセプター活性を有する G-protein-coupled receptor (GPCR) の多くはケモカイン・レセプターでアミノ末端細胞外領域 (NTR) にチロシン残基を持つ。NTR にチロシン残基を有するにもかかわらず、コレセプター活性の報告がない GPCR がいくつか存在する。そこで NP-2/CD4 細胞と様々な HIV-1、HIV-2、及び SIV 株を用いて、フォルミルペプチド・レセプター-FML1、及びケモカイン・レセプター-CCR9B、D6、及び XCR1 のコレセプター活性を解析する。得られた結果を基に、GPCR がコレセプターとして機能するための条件と、HIV-1 の複雑な体内感染動態の解明し、母子感染などの際に重要な役割を果たすコレセプターの同定をめざす。

【材料と方法】

(1) ベトナム・ホーチミン市内の小児病院において抗ウイルス剤を投与されていない HIV 陽性の母親から生まれた児で、HIV 抗体陽性の血液 29 サンプルから DNA を抽出し用いた。v3 領域及び pol 領域を PCR で増幅し、シーケンスを行った。

v3 領域のシーケンスよりサブタイプ、pol 領域のシーケンスよりサブタイプおよび薬剤耐性を決定した。gp41 領域に設定したサブタイプ特異的プライマーを用いた PCR(J Med Virol. 2005;76:16-23)によりサブタイプを決定した。

(2) 三つの絨毛癌細胞 (BeWo, JEG-3, JAR) と CaCo-2 を用い、RNA 抽出キット (RNeasy Mini Kit: QIAGEN) を用いて total RNA の抽出を行った。DNase 処理を行った後、どのような G タンパク受容体が発現しているかを RT-PCR を用いて調べた。RT-PCR に用いた G タンパク受容体のプライマーは、APJ、C5a receptor、CCR1、CCR4、CCR7、CCR9/CCR10、CXCR3、CXCR4、CXCR5/BLR1、DEZ α 、DEZ β 、Duffy antigen、GPR9-6、GPR5、GPR12、GPR15、GPR25、RDC1 の遺伝子をターゲットにしたものを用いた。PCR 法の際に用いられたプライマーは以下の表の通りである (表 1)。

HeLa/KS386 と HeLa/T4 を 1 : 1 の比率で混ぜ合わせ、経時的に融合過程を観察した。プラスチックシートに培養した両細胞を等量添加して、10分、20分、50分、60分、70分、80分、90分、100分、110分後に細胞を固定した。最終濃度 1.5% グルタルアルデヒド (1/15 M リン酸緩衝液, pH 7.4) になるように固定液を加えて前固定を行った。その細胞を 1% 四酸化オスミウムと 0.8% フェロシアン化カリの混合液 (0.1M カコジル酸緩衝液) で 1 時間、後固定した。その後、標本を 1% 没食酸水溶液に室温、30 分浸漬し、1% 酢酸ウランで更に 30 分処理した。その後、アルコール脱水した後に、Quetol 812 樹脂に細胞を培養しているシートを包埋した。シートに載っている細胞から切片を作製し、これらに 4% 酢酸ウランで 20 分、クエン酸鉛で 10 分、電子染色を施した。こ

れら切片は日立電子顕微鏡 (H-7100 型) で観察した。

(3) CD4 導入グリオーマ由来細胞である NP-2/CD4 は、様々な HIV-1、HIV-2、及び SIV 株に対して極めて感染抵抗性である。NP-2/CD4 細胞では、現在までに報告されたコレセプター遺伝子の発現がほとんど検出されない。この細胞に GPCR 遺伝子を導入して発現させ、HIV/SIV 感染感受性を検定することでコレセプター活性を評価できる。コレセプター活性を有する GPCR のほとんどは、細胞外突出アミノ末端領域 (NH₂-terminal region, NTR) に、酸性アミノ酸に隣接したチロシン残基を持つ。CCR5 では、それらの硫酸化がコレセプター活性を増強する。この特徴を指標として、新しいコレセプターの探索と機能解析を行っている。また N4R5/GFP 細胞の GFP 発現の HIV-1 量依存性について調べた。

【結果】

(1) 28 サンプルが v3 領域のシーケンスより CRF01_AE であると決定された。また、26 サンプルはサブタイプ特異的プライマーを用いた PCR でも同じ結果を得た。

1 サンプルは HIV に関する PCR すべてにおいてネガティブであった。

薬剤耐性については逆転写酵素阻害剤耐性、プロテアーゼ阻害剤耐性の major mutation は共に見つからなかった。

(2) CaCo-2 においては 18 種類の G プロテインレセプターのうち、C5a receptor、CCR1、CCR7、CCR9、CXCR3、CXCR4、CXCR5、RDC1 の 8 種類の mRNA が発現されていることが確認された。しかし、その他の G プロテインレセプター、および CD4 の mRNA の発現は確認できなかった。また絨毛癌細胞については C5a receptor、CCR7、CCR9/CCR10、RDC1 は三つの細胞間で発現の強弱に差はあるものの、どの細胞にも発現していることが確認された。そのうち少なくとも CCR9 や RDC1 などは他の論文から HIV のコレセプターとなることが確認されている。

HeLa/KS386 と HeLa/T4 の巨細胞形成の電

子顕微鏡観察について

電顕解析すると、二種の細胞は融合時間が経過するにつれてお互いが接着し、大形の細胞塊を形成した。始めは細胞表面の細胞突起が別の細胞表面に接触し、ついで接触面は広範囲になった。接触面では細胞突起は消失し平滑な細胞膜がお互いに向き合っていた。両者の細胞の細胞膜は完全に密着することなく少しの間隔を開けて向かい合っていて存在し、その間に30nmの大きさの高電子密度の粒子が観察された。この粒子と両者の細胞膜は接触していた。しかし、融合処理110分後に至るまで、両者の細胞膜が融合している場面に遭遇しなかった。

(3) CCR9Bを導入したNP-2/CD4細胞は、用いた全てのHIV-2株及びSIVmndGB-1株に感受性を示したが、その程度はウイルス株依存的であった。D6を導入したNP-2/CD4細胞は、いくつかのHIV-1株、用いた全てのHIV-2株、及びSIVmndGB-1株に感受性を示したが、その程度は株依存的であった。HIV-1では、R5-X4型HIV-1株に高い感受性を示したことが注目される。XCR1を導入したNP-2/CD4細胞は、いくつかのHIV-1株、用いた全てのHIV-2株、及びSIVmndGB-1株に感受性を示したが、その程度はCCR9BやD6に較べて低かった。CCR9B、D6、及びXCR1のケモカイン・レセプターを導入したNP-2/CD4細胞も、HIV-1臨床分離株には、感受性を示さなかった。FML1を導入したNP-2/CD4細胞は、いくつかのHIV-1実験室株及び臨床分離株、全てのHIV-2株、及びSIVmndGB-1株に感受性を示したが、その程度は株依存的であった。ウイルスを10倍希釈してN4R5/GFP細胞に感染させたところGFP発現がHIV-1量に依存性を示した。

【考察】

(1) すべてのPCRでバンドが見られなかった1サンプルはHIV陰性であると思われ、母親の移行抗体によってELISA陽性となった可能性がある。ベトナムではHIVポジティブの成人の数%が薬剤耐性を持っているといわれているが、今回の母子感染を起

こしたケースには見られなかった。

(2) 今までCaCo-2においてC5a receptor、CCR1、CCR7、CCR9、CXCR3、CXCR5、RDC1のmRNA発現は確認されていなかったが、今回の研究において初めて発現を確認した。これらのうちCCR9、CXCR4、RDC1は先行研究から既にHIVのコレセプターとして機能することが確認されている。また、今回発現量を半定量的に調べたところ、RDC1の発現量が高かったことからHIVのエントリーに働く可能性がある。一方、HIVの主要レセプターであるCD4のmRNA発現は確認されなかった。従来 of 先行研究でも、CaCo-2ではCD4のmRNA発現は確認されていない。そのため、直腸感染ではCD4以外の未知の主要レセプターが関与する可能性がある。また、同じ絨毛癌細胞でも、種類が違くと発現しているコレセプターの種類に違いが見られ、発現量も異なっている。実際の胎盤での発現とその量は興味のあるところである。また垂直感染がこのようなコレセプターを介して行われるかは、ウイルスのコレセプターユースの研究と共に今後の研究課題である。

細胞の融合にかかる時間は110分以上である事が分かった。混合培養後110分では多核の細胞塊は完全な合胞体とはならず多数の細胞が密着している像であると判断出来る。また、向かい合った細胞膜に見られた高電子密度の粒子には何か融合に関わる構造的基盤を示している可能性がある。

(3) FML1はHIV-1臨床分離株の効率よいコレセプターとして機能することから、生体内での感染における関与が考えられる。N4R5/GFP細胞のGFP発現のHIV-1量依存性により、ウイルス定量の可能性が示唆された。

【結論】

(1) 本研究でベトナムにおいて母子感染を起こしたHIVはすべてCRF01_AEであった。サブタイプ特異的プライマーの感度は約93%であった。6サンプルにプロテアーゼ阻害剤耐性であるminor mutationが見られた。

(2) CaCo-2において、C5a receptor、CCR1、CCR7、CCR9、CXCR3、CXCR4、CXCR5、RDC1の8種類のmRNAの発現が確認された。また絨毛癌細胞においてはC5a receptor、CCR7、CCR9/CCR10、RDC1は三つの細胞に発現していることが確認された。

HeLa/KS386とHeLa/T4の巨細胞形成の電子顕微鏡観察については、細胞の融合にかかる時間は110分では足りない事が分かった。

(3) CCR9B、D6、及びXCR1は、CD4依存的にHIV-1、HIV-2、あるいはSIVのコレセプターとして機能することが明らかになった。様々な組織や細胞において発現が検出されるD6やFML1については、D6にR5-X4型HIV-1に対する効率よいコレセプター活性がみとめられた。N4R5/GFP細胞のGFP発現のHIV-1量依存性が確認された。

自己評価

1) 達成度について

「ベトナムでの疫学」、「絨毛癌細胞およ

びCaCo-2に発現するGタンパク受容体」、「HeLa/KS386とHeLa/T4の巨細胞形成の電子顕微鏡観察」のすべて項目について予定通りに進み、予定された成果が得られた。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

アジア諸国では成人の新たな感染は減っているものの母子感染の増加が問題の国が増えつつある。またわが国においてもHIV感染妊婦と母子感染の急増が危惧されており、母子感染は重要な社会問題である。免疫学的・ウイルス学的基礎研究により、HIV母子感染のメカニズムを解明し、母子感染予防対策への寄与が期待される。また東京大学大学院医学系研究科発達医科学教室では「タンザニア国ダルエスサラーム州における妊婦のHIV母子感染予防のためのHIV検査の受診に関連する要因の研究」

(appendix)などのHIV母子感染予防の調査的研究も行っている。

[表 1]

Human gene	Product length, bp	Sequence
CD4	589	sense:5'-GGA TAC AGT GGA ACT GAC CTG-3' antisense:5'-TTC AAC TGT AAA GGC GAG TGG-3'
APJ	1143	sense:5'-ATG GAG GAA GGT GGT GAT TTT GAC AAC TAC-3' antisense:5'-CTA GTC AAC CAC AAG GGT CTC CTG GCT GTA G-3'
C5a receptor	1053	sense:5'-ATG AAC TCC TTC AAT TAT ACC ACC CCT GAT-3' antisense:5'-CTA CAC TGC CTG GGT CTT CTG GGC CAT AGT G-3'
CCR1	1068	sense:5'-ATG GAA ACT CAA AAC ACC ACA GAG GAC TAT G-3' antisense:5'-TCA GAA CCC AGC AGA GAG TTC ATG CTC CCC TG-3'
CCR4	1083	sense:5'-ATG AAC CCC ACG GAT ATA GCA GAT ACC ACC-3' antisense:5'-CGT CGC ATT CGC GGC CGC CTA CAG AGC ATC ATG AAG-3'
CCR7	573	sense:5'-CGC GTC CTT CTC ATC AGC AAG CTG TCC TGT G-3' antisense:5'-GTG CCG ACA GGA AGA CCA CTG CCG GAG CTG-3'
CCR9/CCR10	510	sense:5'-ATC CCT GAT ATG GTC TTT GTA CAG ACA CAT G-3' antisense:5'-GCT GGA TAA TGA GGC CTG GGC AGT GCC AGG-3'
CXCR3	555	sense:5'-CGG GGG CCC CCG GCC CGC GTG ACC CTC ACC TG-3' antisense:5'-CTG GAG CCC TCT CTG GTT GGG GCA GCC CAG GC-3'
CXCR4	570	sense:5'-CCA AGG AAG CTG TTG GCT GAA AAG GTG GTC TA-3' antisense:5'-TCC ACC TCG CTT TCC TTT GGA GAG GAT CTT-3'
CXCR5/BLR1	570	sense:5'-GGG ACC ATC TGG CTG GTG GGC TTC CTC CTT G-3' antisense:5'-GAG ACT GCT CCT GCG CCA GCT AGG GAA GAG-3'
DEZ α	1122	sense:5'-ATG AGA ATG GAG GAT GAA GAT TAC AAC ACT TC-3' antisense:5'-TCA AAG CAT GCC GGT CTC CCT CTC ATT CAT AG-3'
DEZ β	1116	sense:5'-ATG GAG GAT GAA GAT TAC AAC ACT TCC ATC-3' antisense:5'-TCA AAG CAT GCC GGT CTC CCT CTC ATT CAT AG-3'
Duffy antigen	1017	sense:5'-ATG GCC TCC TCT GGG TAT GTC CTC CAG GCG GAG-3' antisense:5'-CTA GGA TTT GCT TCC AAG GGT GTC CAG ATG AG-3'
GPR-9-6	1074	sense:5'-ATG GCT GAT GAC TAT GGC TCT GAA TCC ACA TC-3' antisense:5'-TCA GAG GGA GAG TGC TCC TGA GGT TGT CTC C-3'
GPR5	1002	sense:5'-ATG GAG TCC TCA GGC AAC CCA GAG AGC ACC-3' antisense:5'-TCA GTA GAA GGA GGC GCC CTC ATA GGC GAA G-3'
GPR12	1005	sense:5'-ATG AAT GAA GAC CTG AAG GTC AAT TTA AGC GG-3' antisense:5'-CTA CAC ATC ACT GGG CGA GCG CGC TCT CTG GG-3'
GPR15	1083	sense:5'-ATG GAC CCA GAA GAA ACT TCA GTT TAT TTG-3' antisense:5'-TTA GAG TGA CAC AGA CCT CTT CCT CCT GG-3'
GPR25	1083	sense:5'-ATG GCC CCC ACA GAG CCC TGG AGC CCC AGC CC-3' antisense:5'-CTA CCA GGA GGC CGA GGC AGT GTT CGC GGC C-3'
RDC1	281	sense:5'-AAG AAG ATG GTA CGC CGT GTC GTC TGC ATC CTG-3' antisense:5'-CTG CTG TGC TTC TCC TGG TCA CTG GAC GCC GAG-3'

研究発表

学会発表

- 1: 第7回アジア・太平洋地域エイズ国際会議 Molecular Epidemiology of HIV-1 among children in Vietnam and developing subtype CRF01_AE specific primers for PCR. Yagyu F, Trinh DQ, Nguyen AT, Okitsu S, Hoang TK, Tanamoto K, Ushijima H
- 2: 第53回 日本ウイルス学会 ベトナムにおける HIV 感染妊婦から生まれた児の HBV・HCV の検出 F. Yagyu, Q.D. Trinh, T.A. Nguyen, S. Okitsu, H. Ushijima
- 3: 第19回 日本エイズ学会 ベトナムにおける HIV 母子感染の分子疫学 F. Yagyu, Q. D. Trinh, H. Ushijima
- 4: 第17回日本エイズ学会 (神戸) HIV-1 のコレセプターとして機能するケモカイン・レセプターD6、及びフォルミルペプチド・レセプターFML1 の解析 清水宣明、田中淳、大上厚志、星野洪郎
- 5: 第51回日本ウイルス学会 (京都) 既知のコレセプターと近縁な GPCR 遺伝子を導入した CD4 陽性ヒトグリオーマ細胞株 NP-2/CD4 の HIV/SIV 感受性 清水宣明、田中淳、大上厚志、星野洪郎
- 6: 第6回 VIP/PACAP 関連ペプチド国際シンポジウム (箱根) G protein-coupled receptors having DY-sequence in the amino-terminal region act as coreceptors for human and simian immunodeficiency viruses: Identification of the functional domain of the coreceptor activity of GPR1. N. Shimizu, A. Tanaka, A. Oue, K. Kanbe, H. Hoshino
- 7: 第7回日本神経ウイルス研究会 (帯広) 感染性のアッセイが困難なウイルスの VSV pseudotype の作成とその有用性 田中淳、Roy Bibhuti Bhusan、田村一志、Saha Manujendra Narayan、大槻貴博、品川雅彦、大上厚志、清水宣明、星野洪郎
- 8: 第51回日本ウイルス学会 (京都) 硫酸化多糖の HTLV-I 感染に対する多様な影響 田中淳、清水宣明、品川雅彦、大上厚志、星野洪郎
- 9: 第51回日本ウイルス学会 (京都) GFP

- 10: 第51回日本ウイルス学会 (京都) GFP 発現を指標として HIV-1 感染を検出する細胞株の作製 大槻貴博、清水宣明、大上厚志、巽正志、星野洪郎
- 11: 第17回日本エイズ学会 (神戸) GFP 発現を指標として HIV-1 感染を検出する細胞株の作製 大槻貴博、清水宣明、大上厚志、巽正志、星野洪郎
- 12: 第7回日本神経ウイルス研究会 (帯広) ヒト脳微小血管由来内皮細胞と周皮細胞の共存培養系を用いた HIV-1 感染試験 大上厚志、黒崎大、田中淳、清水宣明、星野洪郎
- 13: 第17回日本エイズ学会 (神戸) ヒト脳微小血管由来内皮細胞と周皮細胞の共存培養系を用いた HIV-1 感染試験 大上厚志、黒崎大、田中淳、清水宣明、星野洪郎
- 14: 第35回日本小児感染症学会 (富山) PCR による HIV のサブタイピング 柳生文宏 牛島廣治

論文発表

- 1: Huy TT, Ishikawa K, Ampofo W, Izumi T, Nakajima A, Ansah J, Tetteh JO, Nii-Trebi N, Aidoo S, Ofori-Adjei D, Sata T, Ushijima H, Abe K. Characteristics of hepatitis B virus in Ghana: full length genome sequences indicate the endemicity of genotype E in West Africa. J Med Virol. 2006 Feb;78(2):178-84.
- 2: Khamrin P, Peerakome S, Wongsawasdi L, Tonusin S, Sornchai P, Maneerat V, Khamwan C, Yagyu F,

- Okitsu S, Ushijima H, Maneekarn N. Emergence of human G9 rotavirus with an exceptionally high frequency in children admitted to hospital with diarrhea in Chiang Mai, Thailand. *J Med Virol.* 2006 Feb;78(2):273-80.
- 3: Huy TT, Ushijima H, Sata T, Abe K. Genomic characterization of HBV genotype F in Bolivia: genotype F subgenotypes correlate with geographic distribution and T(1858) variant. *Arch Virol.* 2006 Mar;151(3):589-97.
- 4: Akihara S, Phan TG, Nguyen TA, Yagyu F, Okitsu S, Muller WE, Ushijima H. Identification of sapovirus infection among Japanese infants in a day care center. *J Med Virol.* 2005 Dec;77(4):595-601.
- 5: Yagyu F, Okitsu S, Tanamoto K, Ushijima H. Determination of HIV-1 subtypes (A-D, F, G, CRF01_AE) by PCR in the transmembrane region (gp41) with novel primers. *J Med Virol.* 2005 May;76(1):16-23.
- 6: Phan TG, Nguyen TA, Shimizu H, Yagyu F, Okitsu S, Muller WE, Ushijima H. Related Identification of enteroviral infection among infants and children admitted to hospital with acute gastroenteritis in Ho Chi Minh City, Vietnam. *J Med Virol.* 2005 Oct;77(2):257-64.
- 7: Yoshinaga M, Phan TG, Nguyen TA, Yan H, Yagyu F, Okitsu S, Muller WE, Ushijima H. Changing distribution of group A rotavirus G-types and genetic analysis of G9 circulating in Japan. *Arch Virol.* 2006 Jan:183-192
- 8: Akihara S, Phan TG, Nguyen TA, Hansman G, Okitsu S, Ushijima H. Existence of multiple outbreaks of viral gastroenteritis among infants in a day care center in Japan. *Arch Virol.* 2005 Oct;150(10):2061-75.
- 9: Phan TG, Nguyen TA, Kuroiwa T, Kaneshi K, Ueda Y, Nakaya S, Nishimura S, Nishimura T, Yamamoto A, Okitsu S, Ushijima H. Viral diarrhea in Japanese children: results from a one-year epidemiologic study. *Clin Lab.* 2005;51(3-4):183-91.
- 10: Phan TG, Nguyen TA, Nishimura S, Nishimura T, Yamamoto A, Okitsu S, Ushijima H. Etiologic agents of acute gastroenteritis among Japanese infants and children: virus diversity and genetic analysis of sapovirus. *Arch Virol.* 2005 Jul;150(7):1415-24.
- 11: Li L, Phan TG, Nguyen TA, Kim KS, Seo JK, Shimizu H, Suzuki E, Okitsu S, Ushijima H. Molecular epidemiology of adenovirus infection among pediatric population with diarrhea in Asia. *Microbiol Immunol.* 2005;49(2):121-8.
- 12: Yan H, Abe T, Phan TG, Nguyen TA, Iso T, Ikezawa Y, Ishii K, Okitsu S, Ushijima H. Outbreak of acute gastroenteritis associated with group A rotavirus and genogroup I sapovirus among adults in a mental health care facility in Japan. *J Med Virol.* 2005 Mar;75(3):475-81.
- 13: Phan TG, Nguyen TA, Yan H, Okitsu S, Ushijima H. A novel RT-multiplex PCR for enteroviruses, hepatitis A and E viruses and influenza A virus among infants and children with diarrhea in Vietnam. *Arch Virol.* 2005 Jun;150(6):1175-85.
- 14: Phan TG, Okame M, Nguyen TA, Nishio O, Okitsu S, Ushijima H. Genetic diversity of sapovirus in fecal specimens from infants and children with acute gastroenteritis in Pakistan. *Arch Virol.* 2005 Feb;150(2):371-7.

- 15: Hansman GS, Doan LT, Kgyuen TA, Okitsu S, Katayama K, Ogawa S, Natori K, Takeda N, Kato Y, Nishio O, Noda M, Ushijima H. Detection of norovirus and sapovirus infection among children with gastroenteritis in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Arch Virol.* 2004 Sep;149(9):1673-88.
- 16: Yan H, Nguyen TA, Phan TG, Okitsu S, Li Y, Ushijima H. Development of RT-multiplex PCR assay for detection of adenovirus and group A and C rotaviruses in diarrheal fecal specimens from children in China. *Kansenshogaku Zasshi.* 2004 Aug;78(8):699-709.
- 17: Phan TG, Nishimura S, Okame M, Nguyen TA, Khamrin P, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H. Virus diversity and an outbreak of group C rotavirus among infants and children with diarrhea in Maizuru city, Japan during 2002-2003. *J Med Virol.* 2004 Sep;74(1):173-9.
- 18: Phan TG, Okame M, Nguyen TA, Maneekarn N, Nishio O, Okitsu S, Ushijima H. Human astrovirus, norovirus (GI, GII), and sapovirus infections in Pakistani children with diarrhea. *J Med Virol.* 2004 Jun;73(2):256-61.
- 19: Bai Y, Soda Y, Izawa K, Tanabe T, Kang X, Tojo A, Hoshino H, Miyoshi H, Asano S, Tani K. Effective transduction and stable transgene expression in human blood cells by a third-generation lentiviral vector. *Gene Ther.* 2003, 10, 1446-1457.
- 20: Sakamoto T, Ushijima H, Okitsu S, Suzuki E, Sakai K, Morikawa S, Muller WE. Establishment of an HIV cell-cell fusion assay by using two genetically modified HeLa cell lines and reporter gene. *J Virol Methods.* 2003, 114, 159-66.

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

分担研究者：名取道也 国立成育医療センター副院長

研究要旨：HIV の経母乳感染を防止することを目的とした基礎的実験を行った。その結果をもとに、母乳中の細胞を孔径 $8\mu\text{m}$ のフィルターにより除去し、ひなたの太陽光線量に相当する $3\text{mW}/\text{cm}^2$ の紫外線を約 60 分照射することが可能な特殊搾乳哺乳瓶を設計し試作した。

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した。

B 研究方法

1) 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

市販の HIV-1RNA 定量キットであるアンプリコアを用いて PBS、FCS、RPMI、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。

HIV-1_{IIIB} (H9/ HTLV- IIIB, NIH1983; AIDS Research and Reference Reagent Program) を p24 抗原の濃度換算で 400 ng/ml に調整した母乳 500 μl を準備し、これに標的細胞として選択した M8166 を 5×10^6 cells/ml の濃度で混合した後インキュベートした。対照として、p24 抗原の濃度を 100 ng/ml (約 10^7 copies/ml) に調整した RPMI 500 μl にて M8166 を 1 時間インキュベートしたものを使用した。インキュベーション後 10 ml の PBS で 2 回洗浄後、培地上に 5×10^5 cells/ml の濃度で培養し、RPMI 培地で 3 日間培養後、p24 抗原の産生量を酵素抗体法にて計測した (Lumipulse®I HIV-1 p24

chemiluminescence enzyme immuno-assay, CLEIA; FUJIREBIO Inc. Japan)。

2) 母乳中 HIV の紫外線照射による不活性化

紫外線照射によるウイルスの不活性化は p24 抗原の濃度換算で 400 ng/ml の HIV-1_{III}B を含む母乳にたいし、紫外線を 0、1、3mW/cm² の線量で照射し 15、30、45、60 分の時点でサンプルを抽出して M8166 と 5 分間インキュベートし、RPMI 培地で 3 日間培養後、同様の方法で測定を行なった。また同時に RNA 量の定量を AMPLICOR[®] HIV-1 MONITOR Test (Roche Molecular Systems, RT-PCR)にて行なった。

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 10⁸copies/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。

3) 母乳中の母乳細胞の安定性

母乳中にもともと存在する母乳細胞の母乳中での安定性の検討を行なった。採取された母乳を室温に静置し 0、1、3、5 時間後に一部を取り出し、母乳細胞を遠心分離し、annexin V-FITC 及び 7AAD で染色し、FACScan flow cytometer (Becton Dickinson).で解析した。

4) フィルターによる母乳細胞の除去

母乳中に含まれる細胞をトラップする上で最適なフィルターのサイズを決定するための実験を行った。4 種の細胞 (H9、M8166、THP-1、PBMC) を其々 5x10⁶ cells/ml の濃度で 1ml の PBS に浮遊させ、8、10、11 μm のフィルターを通過させた

後、通過液を遠心し、通過細胞数をトリパンプルー染色ならびに FACS にて測定し、通過阻止率を計算した。

C 研究結果

紫外線照射によるウイルスの不活性化実験及び同時に行なった RT-PCR による RNA 量の測定を行なった結果、p24 抗原産生量は紫外線の量に応じ、また照射時間に応じて減少した。RNA 量はどのサンプルにおいても差を認めなかった。不活性化比率は各測定における p24 抗原の産生量を紫外線非照射群 0 分のサンプルの産生量で割った数値である。

母乳中の母乳細胞は 5 時間後においても対照と比較して生存する細胞数には変化はなかった。

次に母乳中の細胞をトラップするために最適な孔径を検討した結果、8 μm で全ての細胞をトラップすることが可能であった。

D 考察

通常 HIV の感染性の議論においては、cell-free のウイルス粒子や感染細胞の量を RNA や DNA 測定により定量化する手法が道いられる。当然のことながら RNA や DNA が存在しない場合には感染性を否定できる。しかし、RNA や DNA が存在する場合の感染性については、それらの量の計測では感染性を示すことはできない。本研究においては、細胞毒性を有する母乳中に HIV が含まれる場合の感染性を、特殊な感染実験法を確立することより可能とした。この実験系を用い「ひなた」の紫外線量に相当する 3mW/cm²