

繁に行うことが重要である。また、どの施設の微生物検査担当者でも実施できるように、操作法のマニュアルを整備するも必要である。HIV-1 をほぼ 1 個まで検出できる検査法はあまりにも感度が高すぎて、一般の検査会社では引き受けてもらえない。こ

E 結論

Percoll 法および Swim up 法組み合わせた方法により調整された精子浮遊液を用い、超高感度 PCR 法により HIV ウイルスがほぼ除去されていることを、2 段階にわたって検索するという体外受精・胚移植に関する今回のプロトコールにより、HIV 陽性男性、陰性夫婦に対し、ほぼ 100%安全に（妻が二次感染することなく）妊娠、出産を行うことが可能であると判断される。ただし、より確実な結論を得るためには、引き続き、臨床応用を実施していくことが重要であると考えられる。また、HIV 陽性男性、陰性夫婦に対する人工授精の臨床応用については、今回の基礎的検討結果の結果を踏まえつつ、検討していくことが重要であると判断している。一方、最近男性、女性ともに HIV 陽性である夫婦に関して、妊娠を試みた場合、妻が superinfection を起こすということが問題となっている。このような点から、男性、女性ともに HIV 陽性である夫婦に対する生殖補助医療の応用の可能性についても検討する意義があるものと考えられる。

F 健康危険情報

なし。

G 研究発表

1. 論文発表

- (1) Kato, S., Hanabusa, H., Kaneko, S., Takakuwa, K., Suzuki, M., Kuji, N., Jinno, M., Tanaka, R., Kojima, K., Iwashita, M., Yoshimura, Y., and Tanaka, K. (2006) Complete removal of HIV-1 RNA and proviral DNA from semen by the swim-up method: Assisted reproduction technique using spermatozoa free from HIV-1. AIDS 20(7):967- 973.
- (2) Takakuwa, K., Mitsui, T., Iwashita, M., Kobayashi, I., Suzuki, A., Oda, T., Torii, Y., Matsumoto, M., Yahata, G.,

の方法が HIV-1 除去精子を用いた生殖医療の安全性を保障する上で重要な役割を果たしていることを考えると、今後も信頼性と利便性の向上のために改良を重ねていく必要がある。

Tanaka, K.: Studies on the prevalence of human papilloma virus in pregnant women. J. Perinat. Med., 34: 77-79, 2006.

(3) 須藤弘二, 嶋貴子, 近藤真規子, 加藤真吾, 今井光信. (2007) Real-time PCR を用いた HIV-1 RNA 測定キットの基礎的検討. 感染症学雑誌 81(1), 1- 5.

(4) Hamatake, M., Nishizawa, M., Yamamoto, N., Kato, S., and Sugiura, W. A simple competitive RT-PCR assay for quantitation of HIV-1 subtype B and non-B RNA in plasma. J. Virol. Methods (in press)

2. 学会発表

- (1) Mina Suzuki, Kenichi Tanaka: Studies on the IVF-ET using the improved swim-up technique for HIV-discordant couple. 9th International Symposium of German-Japanese Society of Obstetrics and Gynecology, Satellite Symposium in Niigata, 2006, April, 26th, Niigata City.
- (2) 鈴木美奈、竹山智、加嶋克則、藤田和之、高桑好一、田中憲一、花房秀次、兼子智、加藤真吾: HIV 感染男性-非感染女性における swim-up 変法を用いた体外受精の臨床成績について。第 24 回日本受精着床学会、2006 年 9 月 21 日-22 日、軽井沢町、長野県。

(3) Shingo Kato, Rie Tanaka, Hideji Hanabusa, Ei Kinai, Masayoshi Negishi. Quantification of intracellular efavirenz in HIV-1-infected patients by LC-MS/MS. XVI International AIDS Conference. 2006, August 13-18, Toronto, Canada.

- (4) 浜武牧子、浦野恵美子、花房秀次、加藤真吾、Tee Kok Keng、武部豊、山本直樹、駒野淳「血友病患者におけるエイズ長期未発症例における高力価中和抗体の存在と標的部位の同定」第 20 回日本エイズ学会学術集会 (2006 年 11 月 30 日-12 月 2 日、東京)
- (5) 木内英、岩室紳也、近藤真規子、今井

光信、花房秀次、加藤真吾「母子感染予防における AZT 血中濃度」第 20 回日本エイズ学会学術集会（2006 年 11 月 30 日-12 月 2 日、東京）

(6) 田中理恵、加藤真吾、井土美由紀、林邦彦、今井光信「HIV-1 RNA 定量キットのコントロールサーベイ」第 20 回日本エイズ学会学術集会（2006 年 11 月 30 日-12 月 2 日、東京）

(7) 須藤弘二、田中理恵、近藤真規子、今井光信、加藤真吾「HIV 感染者 PBMC 中プロウイルスの multiplex nested PCR による構造解析」第 20 回日本エイズ学会学術集会（2006 年 11 月 30 日-12 月 2 日、東京）

(8) 花房秀次、木内英、太田未緒、和田育子、小島賢一、加藤真吾「血友病 HIV/HCV 肝炎の現状と PEG IFN 治療の課題」第 20 回日本エイズ学会学術集会（2006 年 11 月 30 日-12 月 2 日、東京）

(9) 加藤真吾、田中理恵、栞原健、田上正、前田憲昭「唾液を用いた抗 HIV 薬の薬物動態の検討」第 20 回日本エイズ学会学術集会

（2006 年 11 月 30 日-12 月 2 日、東京）

(10) 西澤雅子、加藤真吾、三浦秀佳、山本直樹、杉浦互「細胞内における抗 HIV 薬（プロテアーゼ阻害剤）の薬剤濃度のモニタリング」第 20 回日本エイズ学会学術集会（2006 年 11 月 30 日-12 月 2 日、東京）

(11) 田上正、北川善政、連利隆、池田正一、加藤真吾、田中理恵、前田憲昭「唾液中の HIV DNA の定量」第 20 回日本エイズ学会学術集会（2006 年 11 月 30 日-12 月 2 日、東京）

H 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

細胞内薬剤検出法に関する特許出願準備中(加藤真吾)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

荻窪病院血液科で治療につき説明，治療の希望が強く，患者男性の病状，精子の状態に問題がない場合新潟大学医歯学総合病院産婦人科を受診



説明書に基づき，
臨床応用の実際
本治療に伴うリスク
万が一二次感染が発生した場合の夫婦の負担
治療開始後中止することになっても問題ないこと
などにつき詳細に説明



妻の検査(HIV他各種感染症，ホルモン検査，基礎体温の確認など)を実施



カウンセラーにより，夫婦個別の意思を確認



患者夫婦の治療に対する意思が強い場合，夫婦個別に，再度治療について詳細に説明
最終的な意思の確認を行い，夫婦別々の同意書に夫婦および担当医師が署名，捺印
臨床実施へ

図1 HIV 陽性男性、陰性女性夫婦に対する体外受精・胚移植の実施までの対応

表 1 Swim-up によって洗浄した精子調製液中の HIV-1 を高感度で検出するための方法

洗浄した精子液(全量の半分)

↓

①高速遠心(15,000 rpm、1時間)
(精子とHIV-1が沈殿する)

↓

②RNA精製(QIAGEN RNeasy Mini Kit)
(精子とHIV-1のRNAが得られる)

↓

③逆転写反応
(HIV-1のRNAがcDNAに変換される)

↓

④1回目のPCR
(HIV-1のDNAが約100万倍に増幅される)

↓

⑤2回目のPCR
(HIV-1のDNAがさらに約10万倍増幅される)

↓

アガロースゲル電気泳動
(増幅されたHIV-1 DNAを検出する)

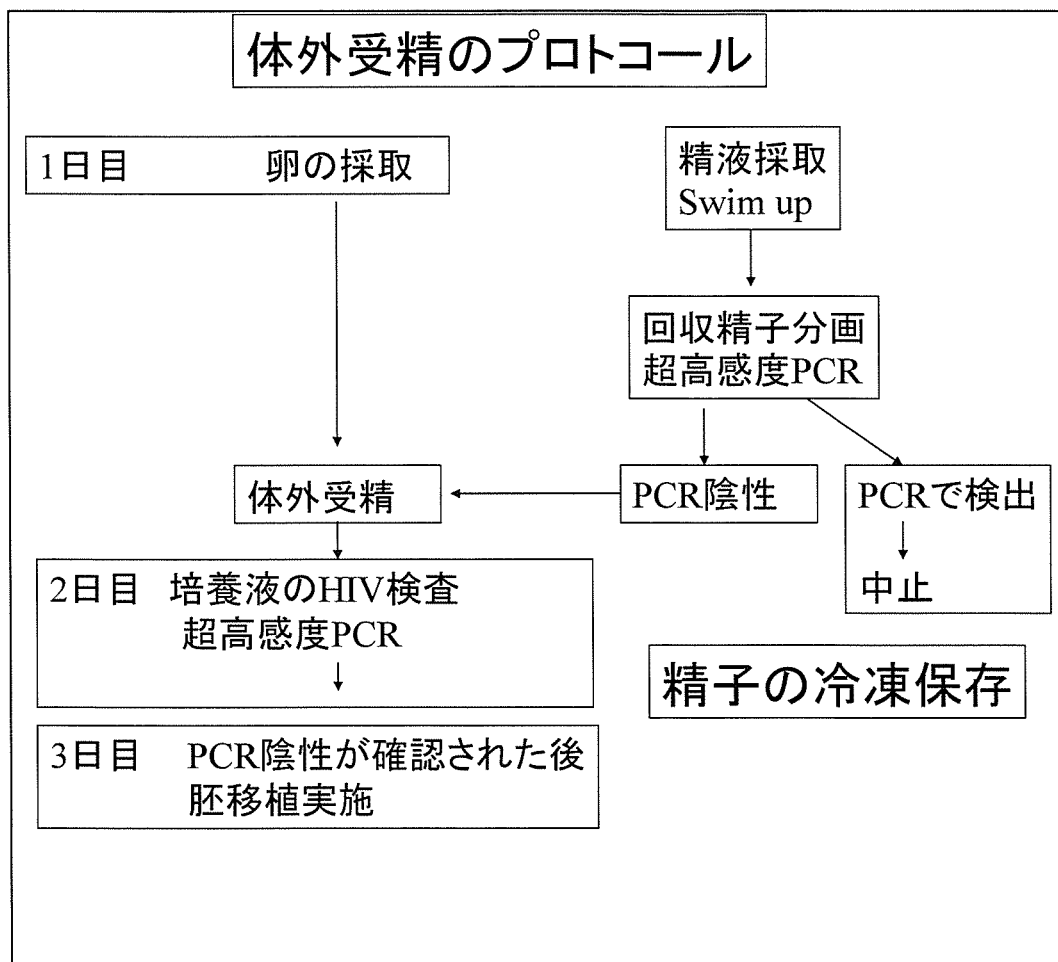


図2 体外受精・胚移植のプロトコール

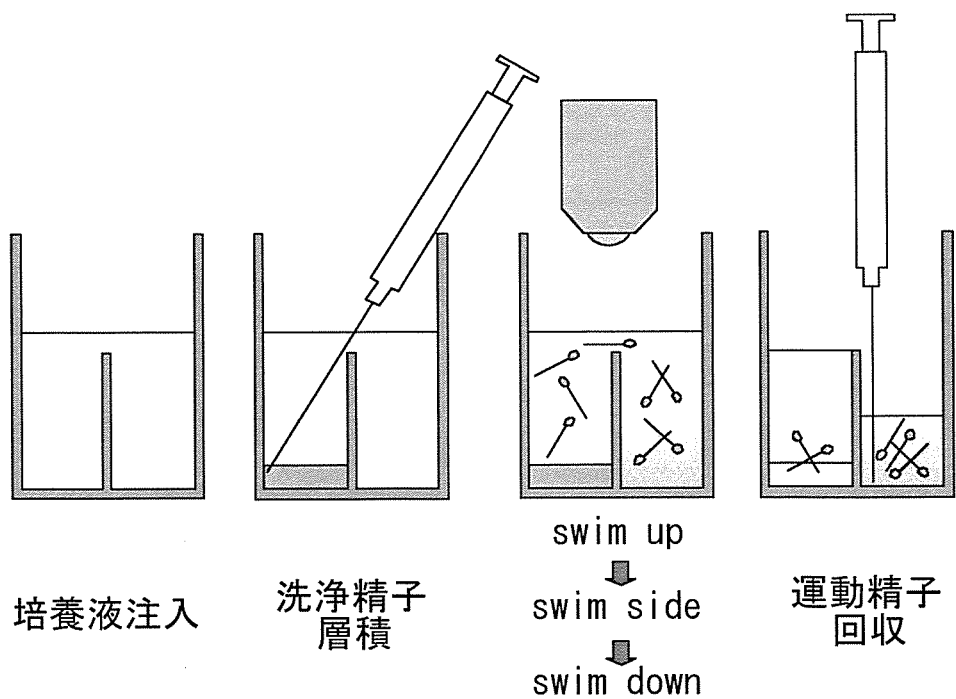
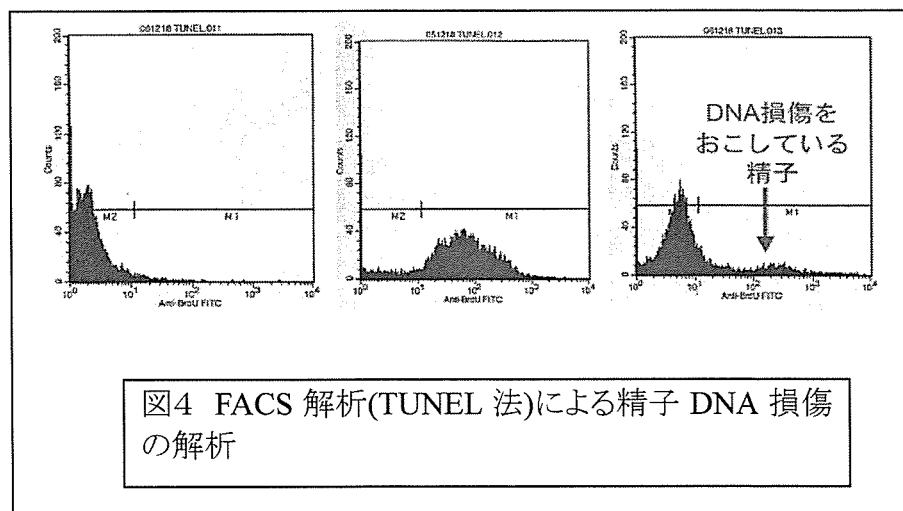


図3 Swim side array 法の操作手順



HIV 感染女性の性行動とパートナーへの感染回避可能な妊娠に関する検討

分担研究者： 五味淵秀人 国立国際医療センター産科医長
研究協力者： 大金美和 国立国際医療センターエイズ治療・研究開発センター
ケア支援室 看護師
松岡 恵 東京医科歯科大学大学院保健衛生学研究科
リプロダクティブヘルス看護学教授

研究要旨

わが国でも、生殖年齢にある女性感染者が増加しており、HIV 感染症が治療の進歩により慢性疾患の様相を呈してきた昨今、HIV 陽性女性におけるリプロダクティブヘルスの向上は重要な課題である。妊娠・出産を望む声も聞かれており、パートナーへの感染を回避しながら、安全で健康な妊娠・出産を可能とする手段の提供を行う必要性が生じている。今回、不妊治療で行われている人工授精に着眼し、パートナーへの感染回避を目的とした夫精液を用いた人工授精施行について HIV 拠点病院 330 施設の産婦人科医に調査を依頼し 235 施設からの回答を得た。本法施行の賛否については「是非やるべき」22 施設(9.4%)、「やってもいい」126 施設(53.8%)と賛成意見は 63.2%であった。「やらないほうがいい」25 施設(10.7%)、「やるべきでない」6 施設(2.6%)と反対意見は 13.3%であったことより、本法施行は容認されるものと考えられた。挙児希望者が「いる」と回答した施設は 12 施設（希望者総数 16 名）であった。人工授精は 4 施設で計 4 例に行われていた。21 施設は本法施行に前向きであり、「わからない」と回答した 104 施設においても状況によって施行が期待できる施設もあると思われた。施行に当たっての条件や方法などに未だ検討すべき課題があり、今後は標準化と指針作成、さらに広報が必要であると考えられた。

A. 研究目的

HIV 感染症が治療法の進歩により慢性疾患の様相を呈してきた昨今、わが国でも生殖年齢にある HIV 陽性女性が増加している現実がある。このような女性の quality of life を考えた場合、パートナーへの感染を回避しながら、安全かつ健康な妊娠・出産を可能にする臨床的手法の必要性が生じている。今回、パートナーへの感染を回避する方法として、不妊治療で行われている人工授精に着眼し、夫精液を用いた人工授精施行について HIV 陽性女性の診療に

あたっている産婦人科医に挙児希望者の有無、本法への意見、問題点等の調査を行った。

B. 研究方法

HIV 感染症の医療体制の整備に関する研究班編の「拠点病院診療案内」にある病院のうちで診療科として産婦人科が標榜されている 330 施設にアンケート調査票（図）を郵送し、その結果を解析した。

C. 研究結果

アンケート調査票を郵送した 330 施設のうち 3 施設は現在産婦人科の診療が行われていない旨の返事があった。結果として 235 施設から回答（回答率：71.9%）があった。

1-1 経験症例数

なし 147 施設 (62.6%)、1～2 例 49 施設 (20.9%)、3～4 例 20 施設 (8.5%)、5～9 例 8 施設 (3.4%)、10～29 例 9 施設 (3.8%)、30 例以上 2 施設 (0.9%) であった。

1-2 受診理由（複数回答可）

妊娠関連 75 施設 (63.0%)、婦人科疾患 27 施設 (22.7%)、癌検診などの定期チェック 14 施設 (11.8%)。その他は 3 例 (2.5%) あり、いずれも挙児希望の相談であった。

1-3 分娩症例の経験数

なし 174 施設 (74.0%)、1～2 例 41 施設 (17.4%)、3～4 例 10 施設 (4.3%)、5～9 例 6 施設 (2.6%)、10 例以上 4 施設 (1.7%) であった。

1-4 婦人科手術症例の経験数

なし 212 施設 (85.1%)、1～2 例 19 施設 (8.1%)、3～4 例 3 施設 (1.3%)、5～9 例 1 施設 (0.4%)、10 例以上 経験している施設はなかった。

2-1 挙児を希望する女性患者の有無

「いる」と回答した施設は 13 あった。ただし、経験症例が「なし」と回答した施設であるにもかかわらず「いる」と回答した施設が 1 施設あった。149 施設は「いない」と回答し、「わからない」が 23 施設であった。

2-2 「いる」場合、その数

1 名が 8 施設、2 名が 4 施設あった（未記入 1 施設）。3 名以上いる施設はなかった。

3-1 妻 HIV 陽性・夫陰性夫婦に対する人工授精の賛否

「是非やるべき」は 22 施設 (9.4%)、「やってもいい」126 施設 (53.8%) と賛成意見は 63.2% であった。「どちらでもいい」は 50 施設 (21.4%) であった。「やらないほうがいい」25 施設 (10.7%)、「やるべきでない」6 施設 (2.6%) で反対意見は 13.3% であった。選択肢にはなかったが「わからない」という記入が 5 (2.1%)、「記入なし」が 1 施設あった。

3-2 3-1 の理由

賛成理由としては「夫婦間感染が防げる」が最も多かった。夫婦間の問題であり、医療者は危険性の説明とともにより安全な手技を提供するべきである、という意見も多かった。一方、反対理由としては児への感染を危惧するものが最も多く 16 施設からあった。児の福祉の問題が 5 施設からあった。

3-3 人工授精の施行経験

妻 HIV 陽性・夫陰性夫婦に対する人工授精の施行経験のある施設は 4 施設あった。いずれも 1 症例ずつであった。「なし」は 220 施設、未記入 11 施設であった。

3-4 施行の意向

「あり」は 18 施設、「なし」88 施設、「わからない」104 施設であった。その他として、「希望者があれば」が 3 施設あった。

3-5 実施する場合、行っておくべき事項(複数可)

「夫婦個別の挙児希望確認と同意書」は 195 施設(88.6%)、「症例毎の感染症科、産科、小児科の合意と許可」149 施設(67.7%)、「倫理委員会での承認」128 施設(58.2%)、「不妊スクリーニング検査」76 施設(34.5%)、「戸籍謄本による夫婦の確認」72 施設(32.7%)、「不妊カウンセリング」61 施設(27.7%)であった。未回答は 15 施設あった。

3-6 人工授精実施する場合の施設条件

「HIV 妊娠分娩例を十分経験している施設に限定」が 119 施設(48.4%)、「経験が少なくても、他科と連携の取れる分娩取り扱い施設」52 施設(21.1%)、「連携が取れていれば人工授精、妊娠分娩の管理が同一施設でなくともよい」49 施設(19.9%)、「限定すべきでなく、希望があればどこでもよい」7 施設(2.8%)であった。その他は 8 施設あり、このうち「HIV 経験のある施設」としたものが 1 施設あった。未記入は 11 施設、重複選択は 11 施設あった。

3-7 夫婦共に陽性の場合の人工授精

「是非やるべき」は 3 施設(1.3%)、「やってもいい」55 施設(24.7%)、「どちらでもいい」72 施設(32.3%)であった。しかし、「やらないほうがいい」56 施設(25.1%)、「やるべきでない」26 施設(11.7%)と反対意見が賛成意見を上回った。また、選択肢にはなかったが、「やる理由がわからない」との記入が 2 施設、「わからない」が 9 施設あった。未記入 15 施設、重複選択 1 施設であった。」

D. 考察

人工授精は排卵にあわせて夫精液(あるいは精子)を妻の子宮内腔に注入する方法である。わが国で行われるようになって既に半世紀以上になり多くの施設で容易に行えるために、不妊治療として確立された手技となっている。日本不妊学会(現日本生殖医学会)のガイドラインでは、1)精子・精液の量的・質的異常、2)射精障害・性交障害、3)精子-頸管粘液不適合、4)機能性不妊、を医学的適応としており、感染症の伝搬を回避することが目的である人工授精は想定範囲外であった。感染症がある場合にはその治療後に人工授精を行うことになるが、治療法の進歩により慢性感染症のひとつといえるにまで至ったとはいえ HIV 感染については容易に解決できない種々の問題がある。とくに、血友病患者男性の挙児希望に対して大きな問題であった。そこで、平成 15 年 1 月に日本産科婦人科学会からは「現状では精漿より HIV を完全に除去する方法が確立されていないことに鑑み、HIV に罹患した夫から採取した精液を用いた人工授精を行う場合は、当該夫婦から感染の可能性を含めた十分なインフォームド・コンセントを得るとともに、実施にあたっては 1 例ごとに施設内倫理委員会で審査を受けることが望ましい」との通達が出された。近年増加している HIV 陽性女性の quality of life を考えた場合、パートナーへの感染を回避しながら、安全にかつ健康に妊娠し出産を可能にする臨床指針の作成の必要性がでてきたが、検討はほとんど行われていなかった。そこで今回 HIV 拠点病院の産婦人科 330 施設に妻 HIV 陽性・夫陰性夫婦に対する人工授精の可否を主目的としたアンケート調査を行った。

235 施設から回答があり、その回答率は 71.9%であった。HIV 陽性者の取り扱い経験のある施設は 88 施設 (37.4%) で 3 例以上の経験を有する施設は 39 施設 (16.5%) であった。受診理由で最も多かったものは妊娠関連であったが、分娩例の経験を有する施設は 61 施設 (37.0%)、3 例以上の経験では 20 施設 (8.6%) にすぎなかった。婦人科手術症例の経験数はさらに少なかった。

挙児を希望する HIV 陽性女性が「いる」と回答した施設では 8 施設で 1 名、4 施設で 2 名と、回答があった 235 施設で 16 名は明確に挙児の意思を表していた。「いない」と回答した 149 施設でも「わからない」と回答した 23 施設でも調査をすれば更に希望者はいるものと考えられる。これらのなかで人工授精の施行経験のある施設は 4 施設で、いずれも 1 症例ずつであった。現状では HIV 陽性女性のニーズはありながらも応じられていないことが推察される。しかし、人工授精施行の意向がないと回答した施設は 88 施設 (41.3%) であり、今後施行が期待できる施設は少なからずあると思われた。

妻 HIV 陽性・夫陰性夫婦に対する人工授精の賛否については「是非やるべき」は 22 施設 (9.4%)、「やってもいい」126 施設 (53.8%) と賛成意見は 6 割を超えた。「やらないほうがいい」25 施設 (10.7%)、「やるべきでない」6 施設 (2.6%) という反対意見は 1 割強であったことより、本法施行は容認されるものと考えられた。HIV 陽性女性の取り扱い経験症例数から検討すると、経験症例 0-2 例の施設における賛成は 116、反対 30 であったが、3 例以上の経験を有する施設では賛成 31、反対 2 であった。症例を重ねるに従って HIV 感染についての知

識や現実的対応を考慮しなければならなくなっていることが推察される。

反対理由としては、児への感染を危惧するものが 16 施設からあり最も多かった。本法はあくまで水平感染を防ぐものであり、垂直感染を予防するものではないことは当然である。しかし、挙児希望のある夫婦は感染の危険を顧みず夫婦生活を行うことを余儀なくされているのが現状である。当然、担当医は安全な夫婦生活、すなわち、コンドームの使用を薦めることが一般的であろう。担当医に相談をしないままに妊娠を試みることになれば、病状からみて許可できない状態での妊娠があり得るであろうし、催奇形性があるとされる薬剤を投与されているままに妊娠することもあるだろう。結果、望まざる方向へ行かざるを得ない可能性も高くなっていくと考えられる。また、コンドームを使わない夫婦生活をむやみに繰り返せば、夫への感染の確率が高くなることは当然危惧される場所である。しっかりとした指針に則った人工授精は結果的に母子感染の予防に繋がると言えるのではなかろうか。

他方、夫婦共に陽性の場合の人工授精については賛成 26.0%、反対 36.8% と反対意見が賛成意見を上回った。わからない、あるいは、未記入が 24 施設、さらには「やる理由がわからない」との記入が 2 施設あったことから、今後十分に議論されなければならない課題であろう。

今回の検討では、国立国際医療センターを除いているが、国立国際医療センターでは HIV 陽性女性の診療経験数は有に 100 例を超えており、分娩、婦人科手術も多くこなしている。また、院内倫理委員会の承認を得て本法を既に 7 例に施行し 6 例が妊娠 (2 例は体外受精胚移

植による)、うち4例は分娩を終了し児への感染は認められておらず、また、2例は妊娠継続中である。人工授精の実施にあつては今回の質問条項の全てを行っている。「夫婦個別の挙児希望確認と同意書」、「症例毎の関連各診療科の合意と許可」、「倫理委員会での承認」は過半数を超える賛成があつたが、「不妊スクリーニング検査」は34.5%に留まつた。しかし、人工授精を行うにあつては医学的要約も満たしていなければならない。著者らも既に報告しているように HIV 陽性女性には混合感染の可能性も低からずあり、卵管障害などによる妊孕性の低下があれば人工授精の実施期間をいたずらに延長させ本来の疾病の病状に影響を及ぼす可能性もあるため、省くことのできない項目と考へている。

施設の基準については、「HIV 妊娠分娩例を十分経験している施設に限定」が119施設(48.4%)、「経験が少なくても、他科と連携の取れる分娩取り扱い施設」52施設(21.1%)であり、HIV 合併妊娠の周産期管理の可能な施設で人工授精を行い、一貫した管理が求められていた。

E. 結論

HIV 拠点病院の産婦人科担当者に対するアンケート調査から、1) 挙児を希望する HIV 陽性女性が各地にいること、2) パートナーへの感染を回避し安全な妊娠を可能にする手段としての人工授精の施行は容認されること、3) 施行に当たつての条件などに検討すべき課題があること、が明らかになった。今後、挙児希望のあるすべての HIV 陽性女性がより良い医療を受けられるよう指針を作成し広報していく必要があると考へられた。

HIV 感染妊婦の早期診断と治療および母子感染予防に関する基礎的・臨床的研究

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 教授
研究協力者 沖津祥子 東京大学大学院医学系研究科発達医科学教室 助手
柳生文宏 東京大学大学院医学系研究科発達医科学教室 助手

研究要旨

(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が投与されていない HIV 陽性の母親から生まれた児より、HIV 抗体陽性の血液 29 サンプルを採取した。母子感染による HIV/HBV の重感染は見られず、HCV については 5 サンプルが抗体陽性であった。

(2) HIV 母子感染の可能性として、胎盤におけるレセプターの存在を調べたところ CD4 の mRNA は僅かに認めることもあったが、コレセプターである C5a receptor、CCR1、CCR7、CCR9、CXCR4、CXCR5、GPR5、GPR12、RDC1 の 9 種類の mRNA の発現が見られた。一方、母乳中の細胞ではリンパ球、マクロファージなどの存在のため C5a receptor、CCR1、CCR5、CCR7、CCR9、CXCR3、CXCR4、CXCR5、DEZ α 、GPR5、GPR12、GPR25、RDC1 の 13 種類の mRNA の発現が確認された。

A. 研究目的

(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。さらに血液や体液を介する感染や母子感染等、同様のルートで感染する HBV や HCV との重感染も見られるようになってきた。またこれらの重感染は病態の進行が早いなど重要な問題となっている。そこで、HIV 母子感染を起こした児の血液サンプルから HBV および HCV の検出を行った。

(2) HIV 母子感染とは、HIV に感染した母親から、胎盤を介して、もしくは分娩時に血液を介して、さらには分娩後母乳を介してウイルスが子どもへ感染することをいう。その中で経胎盤感染については、胎盤におけるレセプターの存在など具体的なメカニズムが未だに解明されていない。HIV 感染のコレセプターとなる可能性がある G プロテインレセプター、および主要レセプターである CD4 がヒトの胎盤の栄養膜細胞において発現しているかどうかを調べた。また、母乳の細胞においてもどのような G プロテインレセプターが発現しているかを調べた研究がないため、母乳も研究の対象に入れた。この研究結果は、胎盤、もしくは母乳を介する HIV 感染のメカニズムを解明し、母子垂直感染の予防を推進することにつながると思われる。

B. 研究方法

(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が投与されていない HIV 陽性の母親から生まれた児より、HIV 抗体陽性の血液 29 サンプルを採取した。血漿をサンプルとし、HBs 抗原をダイナスクリーン HBsAgII により、また HCV 抗体を HCV・PHA 「アボット」を用いて検出した。血液サンプルから DNA を抽出し、v3 領域を PCR で増幅した後、シークエンスを行い HIV 感染を確認した。また HBV について PCR を行った。さらに HCV 抗体陽性血漿より viral RNA を抽出し、HCV について RT-PCR を行った。

(2) 胎盤のサンプルについては 7~9 週の初期胎盤を使用した。パーコール分離、CD9 ビーズ法を用い、血球、間質細胞などを取り除き栄養膜細胞のみを精製した。母乳については遠心分離を行うことによって、脂肪などを取り除き、リンパ球、マクロファージなどを含んだ細胞のみを採取した。次に、RNA 抽出キット (RNeasy Mini Kit: QIAGEN) を用いてこれらの細胞から total RNA の抽出を行った。さらに、抽出された total RNA に紛れ込んでいる DNA を取り除くため、DNase I (Deoxyribonuclease I ; SIGMA) を用いて DNase 処理を行った。そして、逆転写反応により cDNA を作製し、PCR 法により、目的とする遺伝子の増幅反応を行った。増幅されたかどうかは電気泳動法により確認した。さらに、mRNA の発現が確認されたものについては定量も行った。具体的な方法として、発現されていることが確認された遺伝子において、各 12、

15、18、21、24、27、30、33、36、39 サイクルで増幅した PCR プロダクトを作製し、画像解析ソフト NIH image を用いてバンドの濃さを測定した。それに基づき、PCR の増幅過程を表す検量線を作成し、元の cDNA 量を比較した。

(倫理面への配慮)

この研究は東京大学医学系研究科の研究倫理委員会およびベトナム・ホーチミン市の医学倫理委員会の承認のもとで行われた。

C. 研究結果

(1) HBV についてはダイナスクリーン

HbsAgII、PCR ともにすべてのサンプルで陰性であった。HCV については 5 サンプルが PHA で+であったが、PCR では-であった。

(2) 19 種類の G プロテインレセプターのうち、胎盤栄養膜細胞においては C5a receptor、CCR1、CCR7、CCR9、CXCR4、CXCR5、GPR5、GPR12、RDC1 の 9 種類の mRNA の発現が、母乳細胞においては C5a receptor、CCR1、CCR5、CCR7、CCR9、CXCR3、CXCR4、CXCR5、DEZ α 、GPR5、GPR12、GPR25、RDC1 の 13 種類の mRNA の発現が確認された。その他の G プロテインレセプターについては発現を確認することはできなかった。また CD 4 については、母乳細胞においては発現を確認することができ、胎盤栄養膜細胞においては胎盤 3 サンプルのうち 1 サンプルにおいて発現を確認することができたが、再現性を確認することはできなかった(表 1)。また、バンドが確認されたものについては定量も行い、 β -actin を 100 とした時の数値結果を以下に示した(胎盤栄養膜細胞のみ)(表 2)。

D. 考察

(1) ホーチミン市の健常人の HBV、HCV の prevalence はそれぞれ 10%、2% であり(Tran HT Hepatol Res. 2003 Aug;26(4):275-280)、HIV 母子感染を起こした児の HBV の prevalence はそれより低くなっている

(2) C5a receptor、CCR1、CCR7、CCR9、CXCR5、GPR12、RDC1 の mRNA については胎盤栄養膜細胞における発現は確かめられていなかったが、今回の研究において初めて発現を確認することができた。また C5a receptor、CCR1、CCR7、CCR9、CXCR3、CXCR5、DEZ α 、GPR12、RDC1 の mRNA については母乳細胞における発現は確かめられていなかったが、今回の研究において初めて発現を確認すること

ができた。CCR9、CXCR4、RDC1 は先行研究から HIV のコレセプターと機能することが確認されていることから、胎盤において特に定量的結果から相対的に強く発現していた CCR9 は HIV が細胞にエンタリーする際に機能している可能性がある。

CD4 については胎盤栄養膜細胞、母乳ともに発現を確認することができたが、母乳においてはリンパ球が混じっているため発現を確認することができることは納得ができる。しかしながら一方、胎盤栄養膜細胞においては CD4 の mRNA は発現していないという説が有力である。CD4 陽性の原因として、実験操作の段階においてリンパ球や胎盤のマクロファージである Hofbauer 細胞が微量ながら混ざってしまったのではないかと考えられ、今後の課題としてあげられる。また、タンパクレベルでの実験、ウイルスを用いた感染実験といった、今後のさらなる研究に発展させることができるであろう。

E. 結論

(1) 母子感染による HIV/HBV の重感染は見られず、HCV については 5 サンプルが抗体陽性であった。

(2) 胎盤栄養膜細胞において、C5a receptor、CCR1、CCR7、CCR9、CXCR4、CXCR5、GPR5、GPR12、RDC1 の 9 種類の mRNA の発現が、母乳細胞においては C5a receptor、CCR1、CCR5、CCR7、CCR9、CXCR3、CXCR4、CXCR5、DEZ α 、GPR5、GPR12、GPR25、RDC1 の 13 種類の mRNA の発現が確認された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Phan TG, Kuroiwa T, Kaneshi K, Ueda Y, Nakaya S, Nishimura S, Yamamoto A, Sugita K, Nishimura T, Yagyu F, Okitsu S, Müller WEG, Maneekarn N, Ushijima H. Changing Distribution of Norovirus Genotypes and Genetic Characterization of Recombinant GIIB among Infants and Children with Diarrhea in Japan. J Med Virol. 78(7): 971-978, 2006.
- 2) Phan TG, Yagyu F, Kozlov V, Kozlov A, Okitsu S, Müller WEG, Ushijima H. Viral gastroenteritis and Genetic Characterization of Recombinant Norovirus among Infants and Children with Diarrhea in Eastern

- Russia. Clin Lab 52 (5-6): 247-253, 2006.
- 3) Phan TG, Yan H, Li Y, Okitsu S, Müller WEG, Ushijima H. Novel Recombinant Norovirus in China. Emerg Infect Dis. 12(5): 857-858, 2006.
 - 4) Phan TG, Okitsu S, Müller WEG, Kohno H, Ushijima H. Identification of Novel Recombinant Sapovirus in Japan. Emerg Infect Dis. 12(5): 865-867, 2006.
 - 5) Khamrin P, Maneekern N, Peerakome S, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Molecular characterization of a rare G3P[3] human rotavirus reassortant strain reveals an evidence for human-animals multiple interspecies transmissions. J Med Virol 78(7):986-994, 2006.
 - 6) Phan TG, Trinh OD, Yagyu F, Sugita K, Okitsu S, Muller WEG, Ushijima H. Outbreak of sapovirus infection among infants and children with acute gastroenteritis in Osaka City, Japan during during 2004-2005. J Med Virol 78(6):839-846, 2006.
 - 7) Okame M, Akihara S, Hansman G, hainan Y, Thien Tuan Tran H, Phan TG, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Existence of multiple genotypes associated with acute gastroenteritis during 6-year survey of norovirus infection in Japan. J Med Virol 78(10):1318-1324, 2006.
 - 8) Phan TG, Shimizu H, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H. Human adenovirus type 1 related to feline adenovirus: evidence of interspecies transmission. Clin Lab 52 (9-10): 515-518, 2006.
 - 9) Phan TG, Takanashi S, Kaneshi K, Ueda Y, Nakaya S, Nishimura S, Sugita K, Nishimura T, Yamamoto A, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Detection and genetic characterization of norovirus strains circulating among infants and children with acute gastroenteritis in Japan during 2004-2005. Clin Lab 52 (9-10): 519-525, 2006.
 - 10) Phan TG, Yan H, Khamrin P, Quang T, Dey SK, Yagyu F, Okitsu S, Mueller WEG, Ushijima H. Novel intragenotype recombination in sapovirus. Clin Lab 52(7-8):363-366, 2006.
 - 11) Okitsu-Negishi S, Okame M, Shimizu Y, Phan TG, Tomaru T, Kamiyo S, Sato T, Yagyu F, Mueller WEG, Ushijima H. Detection of norovirus antigens from recombinant virus-like particles and stool samples by a commercial norovirus enzyme-linked immunosorbent assay. J Clin Microbiol 44(10):3784-3786, 2006.
 - 12) Phan TG, Khamrin P, Quang TD, Dey SK, Yagyu F, Okitsu S, Nishio O, Ushijima H. Genetic characterization of group A rotavirus strains circulating among children with acute gastroenteritis in Japan in 2004-2005. Infection, Genetics and Evolution 7: 347-253, 2007.
 - 13) Phan TG, Trinh QD, Kaneshi K, Ueda Y, Nakaya S, Nishimura S, Sugita K, Nishimura T, Yamamoto A, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Emergence of new variant rotavirus G3 among infants and children with acute gastroenteritis in Japan during 2003-2004. Clin Lab, in Press.
 - 14) Maneekarn N, Khamrin P, Chan-it W, Peerakome S, Sukchai S, Pringprao K, Ushijima H. Detection of rare G3P[19] porcine rotavirus strains in Chiang Mai, Thailand provides evidence for the origin of VP4 genes of Mc323 and Mc345 human rotaviruses. J Clin Microbiol 44:4113-4119, 2006.
 - 15) Terao Y, Takagi H, Phan TG, Okitsu S, Ushijima H. Identification of IgA against coronavirus in breast milk. Clin Lab, in press.
 - 16) Shimizu H, Phan TG, Nishimura S, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H. An outbreak of adenovirus serotype

- 41 infection in infants and children with acute gastroenteritis in Maizuru city, Japan. *Infect, Genet and Evol* 7:247-253, 2007
- 17) Phan TG, Trinh QD, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Emergence of rare sapovirus genotype among infants and children with acute gastroenteritis in Japan. *European J Clin Microbiol & Infect Diseases* 26(1): 21-27, 2007.
- 18) Zhou Y, Ushijima H, Frey TK. Genomic analyses of diverse rubell virus genotypes. *J Gen Virol* 88:932-941, 2007.
- 19) Khamrin P, Maneekarn N, Peerakome S, Chan-It W, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Norvel porcine rotavirus of the genotype P[27] shares new phylogenetic lineage with G2 porcine rotavirus strain. *Virology* 2007 (E-pub).
- 20) Makita K, Hayakawa Y, Okame M, Homma K, Phan TG, Okitsu S, Ushijima H. First detection of IgA against Norovirus in breast milk. (short communication) *Clin. Lab.*, in press.
- 21) Dieng H, Boosts M, Tamori N, Satho T, Higashihara J, Okada T, Kato K, Komalamisra N, Ushijima H, Takasaki T, Kurane I, Eshita Y. Effect of food, embryo density and conspecific immatures on hatchability in the dengue vector *Aedes albopictus* House and household insect pest, in press.
- 22) Dieng H, Boots M, Higashihara J, Satho T, Kato K, Okada T, Komalamisra N, Ushijima H, Takahashi T, Kurane I, Eshita Y. Two dimensional gel analysis of midgut proteins of the dengue vector *Aedes albopictus* (Diptera Culicidae) with reference to sex and Bbody size. *Jpn J Environ Entomol Zool*, in press.
- 23) Nguyen TA, Yagyu F, Okame M, Phan TG, Yan H, Hoang PL, Cao Anh TH, Hoang KT, Okitsu S, Ushijima H. Diversity of viruses associated with acute gastroenteritis in children hospitalized with diarrhea in Ho Chi Minh city, Vietnam. *J Med Virol*, in press.
- 24) Quang DT, Nguyen TA, Phan TG, Khamrin P, Yan H, Hoang PL, Maneekarn N, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Amino acid substitution in VP7 sequences of human rotavirus G1 isolated in Japan, China, Thailand, and Vietnam in 2002-2003. *J Med Virol*, in press.
- 25) Wang XT, Liu PY, Tang JB, Mizutani H, Xin KQ, Ozawa K, Ushijima H. Tendon healing in vitro: Adeno-associated virus-2 effectively transduces intrasynovial tenocytes with persistent expression, but other serotypes do not. *Hand/Peripheral Nerve Plastic and reconstructive surgery*. 119(1):227-234, 2007
- 26) Ushijima H. Foreword. Mother and child health in Asia and Africa. *Pediatrics International*, in press.
- 27) Li Y, Hotta M, Shi A, Li Z, Yin J, Guo G, Kawata K, Ushijima H. Malnutrition Improvement for Infants and Young Children under 18 months old of Dai Minority in Luxi, China. *Pediatrics International*, in press.
- 28) Kominami M, Kawata K, Ali M, Meena H, Ushijima H. Factors determining prenatal HIV testing for PMTCT in Dar Es Salaam, Tanzania. *Pediatrics International*, in press.
- 29) Nguyen TH, Ushijima H. Nutritional status of low birth weight ethnic minority infants in Backan province, Vietnam. *Pediatrics International*, in press.
- 30) Hotta M, Ali M, Ushijima H, Lee S, Nakamura Y, Shigeta M, Kobayashi N. Situational analysis of maternal and child health services for foreign residents in Japan. *Pediatrics International*, in press.
- 31) Li L, Li K, Ushijima H. Moderate-to-vigorous physical activity and body fatness in Chinese urban school

- children. *Pediatrics International*, in press.
- 32) Manilay P, Ali M, Yagyu F, Soulivanh P, Kuroiwa C, Ushijima H. Risk factors for protein-energy malnutrition of children under 5 years: A study from Luangprabang province, Lao PDR. *Pediatrics International*, in press.
- 33) Dey SK, Phan TG, Nguyen TA, Nishio O, Salim AFM, Yagyu F, Ushijima H. Prevalence of sapovirus infection among infants and children with acute gastroenteritis in Dhaka City, Bangladesh during 2004-2005. *J Med Virol*, in press.
- 34) Khamrin P, Maneekarn N, Peerakome S, Tonusin S, Phan TG, Okitsu S, Ushijima H. Molecular characterization of rare G3P[9] rotavirus strains isolated from children hospitalized with acute gastroenteritis. *J Med Virol*. in press.
- 35) Phan TG, Khamrin P, Quang TD, Dey SK, Takanashi S, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H. Detection and genetic characterization of group A rotavirus strains circulating among children with acute gastroenteritis in Japan. *J Virol*, in press.
- 36) Phan TG, Khamrin P, Trinh DQ, Dey SK, Takanashi S, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H. Emergence of Intragenotype Recombinant Sapovirus in Japan. *Infection, Genetics and Evolution*, in press.

2. 学会発表

- 1) 柳生文宏、沖津祥子、牛島廣治 絨毛癌細胞および直腸癌細胞におけるGプロテインレセプターの発現 日本ウイルス学会 第54回学術集会 2006. 11. 29-21.

G. 知的財産の出願・登録状況

特になし。

[表 1] 胎盤栄養膜細胞および母乳細胞における mRNA 発現

Gene	Annealing temperature(°C)	Trophoblasts	Breast milk
CD4	50	±	+
APJ	60	-	-
C5a receptor	58	++	+
CCR1	60	+	+
CCR4	60	-	-
CCR5	65	-	+
CCR7	60	+	+
CCR9/CCR10	60	++	+
CXCR3	65	-	+
CXCR4	65	+	++
CXCR5/BLR1	65	+	+
DEZ α	58	-	±
DEZ β	58	-	-
Duffy antigen	60	-	-
GPR-9-6	60	-	-
GPR5	60	+	+
GPR12	60	+	±
GPR15	58	-	-
GPR25	60	-	+
RDC1	60	+	++

±,faint ; +,weak ; ++,strong ; -,not detected

[表 2] 胎盤栄養膜細胞における G-プロテインレセプターの発現の定量結果

G protein receptor	Relative intensity*
C5a receptor	0.102
CCR7	0.026
CCR9	1.112
CXCR4	0.086
CXCR5	0.013
GPR5	0.074
GPR12	0.014
RDC1	0.002

*: β -actin を 100 とする発現量

子宮頸管粘液中 HIV コピー数、 α -defensins (1-3)、Secretory Leukocyte Protease Inhibitor (SLPI) 測定による経膈分娩選択の可能性

分担研究者	大島 教子	獨協医科大学産科婦人科学講師
研究協力者	戸谷 良造	和合病院 副院長
	渡辺 博	獨協医科大学産科婦人科学教授
	深澤 一雄	同上
	有坂 治	獨協医科大学小児科学教授
	太田 順子	獨協医科大学産科婦人科学助教授
	吉田 敦	獨協医科大学臨床検査医学講座講師
	西川 正能	獨協医科大学産科婦人科学助手
	岡崎 隆行	同上
	林田 綾子	同上
	庄田 亜紀子	同上
	根岸 正実	獨協医科大学産科婦人科学大学院
	林田 志峯	同上
	吉田 穂波	ウィミンズ・ウェルネス銀座クリニック
	熊 曙康	大連市婦産医院助教授
	Deshratn Asthana	University of Miami Miller School of Medicine, Assistant Professor
	Mugerwa Kidza Yvonne	Makerere Medical School

研究要旨

先進国において HIV 母子感染予防対策の一環としての選択的帝王切開術は標準的であるが、母体低 HIV ウイルス量の場合における帝王切開分娩の意義は未だ controversial である。本研究では、子宮頸管粘液中の HIV ウイルス量と生体感染防御マーカーである α -defensins (1-3) および SLPI を測定し、その相関より α -defensins (1-3) と SLPI の経膈分娩選択における有用性を検討する。

A. 研究の目的

現在、先進諸国における HIV-1 母子感染率は約 1.5% と、適切な医療介入を受けた HIV-1 感染妊婦の児への垂直感染率は低率である。

しかしサハラ以南のアフリカ諸国や近年 HIV-1 感染者の増加が著しいアジアにおいて、依然 HIV-1 母子感染は主要な HIV-1 感染経路の 1 つである。一方、先進諸国において標準