

Table 1. エッセンシャルオイルおよびチンキ剤の細胞毒性効果と HIV 感染阻害効果

	CT <sub>50</sub> ppm	ID <sub>50</sub> ppm
1 イランイラン	100	>100
2 オレンジ	10	>1
3 カモミール	128	>100
4 クラリセージ	4.2	>1
5 グレープフルーツ	30.8	>10
6 コバイバ	32.8	>10
7 サイプレス	32.8	>10
8 サンドルウッド	30.1	>10
9 ジュニパー	23.3	>10
10 ゼラニウム	25	>10
11 ティートリー	>100	>100
12 ニアウリ	2.6	>1
13 ネロリ	23	>10
14 ブチグレン	192	>100
15 フランキセン	0.478	>0.1
16 ペパーミント	23.6	>1
17 ベルガモット	3.12	<0.01
18 マージョラム	31.6	>10
19 マンダリン	79.8	>10
20 ミルラ	0.344	<0.01
21 メリッサ	292	>10
22 ユーカリ	>100	>100
23 ラベンダー	>100	>100
24 レモン	363	<0.01
25 レモングラス	87.6	<0.01
26 ローズオットー	25.8	<0.01
27 ローズマリー	2.54	>0.1
28 モミ	>100	>100
31 ゲットウ	>100	>100
32 キャットクロー	2343	100
33 ミルクシスル	2328	<0.1
34 エキナセア	>10000	>10000
35 セントジョンズワート	260	>1000

HIV 感染阻害効果 (ID<sub>50</sub>) が認められた数値を斜体で示した。

面の細胞数を定量し、コントロールを 100% としたとき、50% 培養基底面に細胞が残る濃度を CT<sub>50</sub> (ppm) とし、細胞毒性効果を算出した。

### 3. 結果

#### 3.1 エッセンシャルオイルおよびチンキ剤の HIV に対する感染阻害効果

HIV 阻害効果が見られたものはベルガモット (#17), ミルラ (#20), レモン (#24), レモングラス (#25), ローズオットー (#26), キャットクロー (#32) およびミルクシスル (#33) であった (Table 1)。また、CT<sub>50</sub> と比較してかなりの低濃度で HIV 阻害効果が確認でき、この阻害効果が細胞毒性によるものでないことが伺えた。

本研究で検討した濃度範囲は、エッセンシャルオイル (Table 1, #1~#31) で 1000~0.01 ppm, チンキ剤 (#32~#35) で 10000~0.1 ppm としたが、上記の 7 サンプルのうち、キャットクローを除く、いずれにお

いても最低濃度でも阻害効果が 50% 以上認められ、50% の阻害効果が認められる濃度である ID<sub>50</sub> は算出できなかった。

#### 3.2 感染阻害効果の濃度依存性

前述のサンプルに関し、ロットを変更して再現性の検討を行った。このうちキャットクロー (ID<sub>50</sub> が 100 ppm) は、代表的な抗 HIV 剤である AZT (ID<sub>50</sub> が 0.006~0.001 ppm) と比較した場合、HIV 感染阻害効果が認められるのは著しく高濃度であることから、薬剤として開発するには不適当であると判断し、低濃度で活性が見られた、ベルガモット (#17), ミルラ (#20), レモン (#24), レモングラス (#25), ローズオットー (#26), およびミルクシスル (#33) で別ロットのサンプルを用いて、それぞれについてさらに 2 回、同一の検討を行った。

それぞれのサンプルの濃度と HIV 感染阻害効果 (%) については Fig. 1 に示す。ベルガモット (#17), ミルラ (#20), レモン (#24) およびレモングラス (#25) で AZT に近い HIV 感染阻害効果が観察された。ローズオットー (#26), およびミルクシスル (#33) では ID<sub>50</sub> を算出できなかったが、特定の濃度では、HIV 感染阻害効果が 50% に近い値として認められた。また、いずれのサンプルにおいても特定の濃度で HIV 感染阻害効果が最大となり、高濃度では阻害効果が低くなる傾向が見られた。

### 4. 考察

これまでに抗 HIV 活性をもつ天然物のスクリーニングが広く行われてきた。実際、*in vitro* では、抗 HIV 活性のある生薬やその抽出物が多数見つかったいるが<sup>5)~7)</sup>、製剤化には至っていない。その理由として、有効濃度と毒性濃度が近いこと、生薬抽出物のみでは完全な HIV の複製抑制が得られない点にある。

本研究でも、サンプルの濃度を上げて、100% 抑制を達成するエッセンシャルオイルやチンキ剤はなく、これらが従来の抗 HIV 剤に代わるものとは考えられない。しかし、6 サンプルのいずれのエッセンシャルオイルやチンキ剤でも細胞毒性量の 1/100 以下で HIV 複製抑制を認めたことから、HIV 感染者および AIDS 患者に安全に使用できるものと考えられる。また、濃度を上昇させると活性が逆に低下する原因として、エッセンシャルオイルやチンキ剤中に抗 HIV 作用を阻害する物質が混在している可能性がある。すなわち、通常、HIV の感染を阻害する物質の阻害効果は、濃度が低下すると低下する。しかし、天然物から

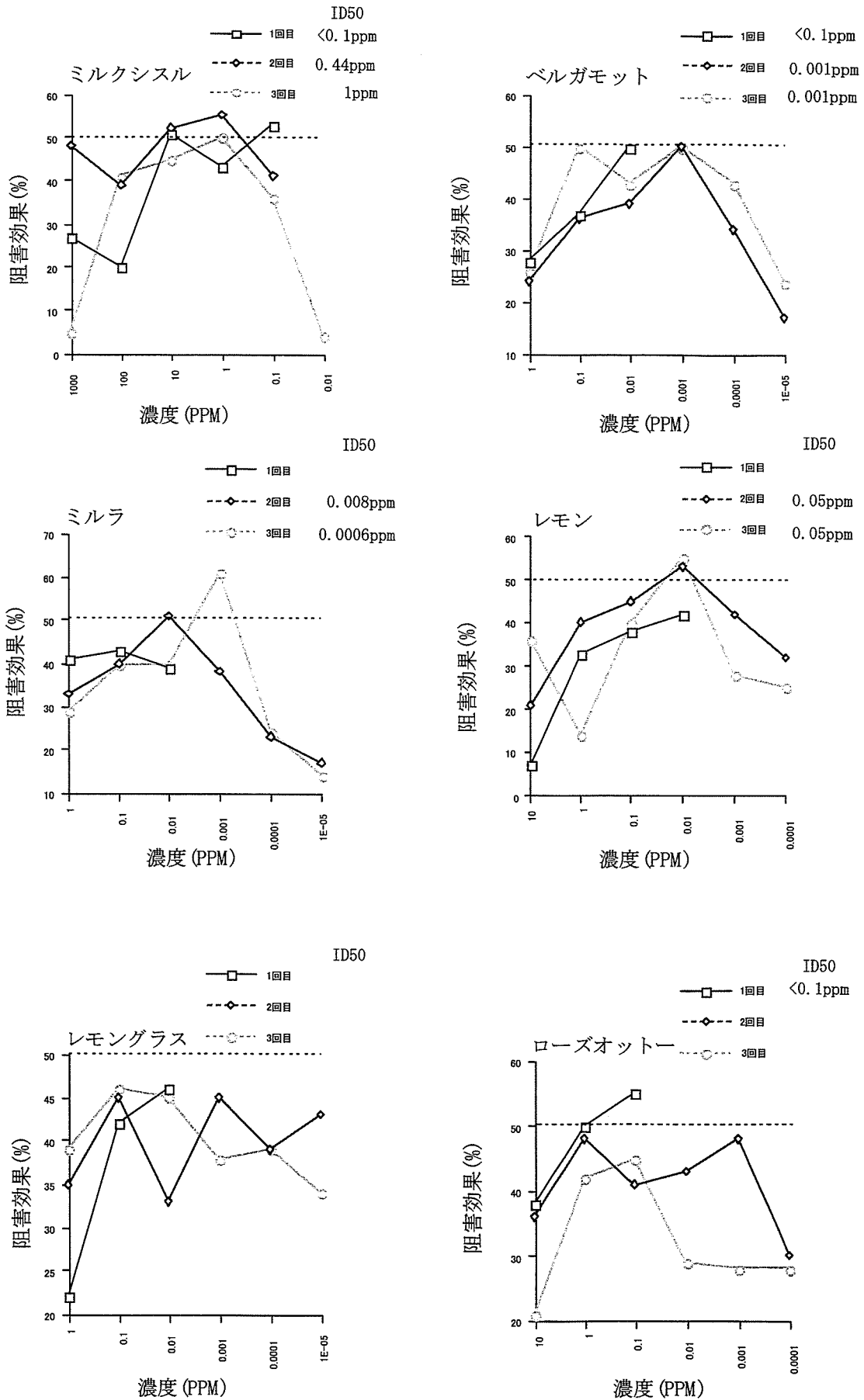


Fig. 1. ベルガモット, ミルラ, レモン, レモングラス, ローズオットーおよびミルクシスルの濃度依存性 HIV 感染阻害効果

の純化しない粗抽出物中には HIV 複製を阻害する物質と拮抗する物質が共存していることを想定した場合、サンプルが高濃度であると、感染を阻害する効果も高いが、その効果を阻害する物質の濃度も濃くなる。濃度が低下するとともに、先に拮抗物質の効果が低下し、阻害効果の方が高いため、見かけ上、感染阻害効果が強く観察される。さらに濃度が低下すると、阻害効果も低下する。この考え方から、将来的にはハーブエキスの中から活性成分のみを分離し、さらに活性成分の構造から推定してより活性の高い有効な薬剤を創出していくというアプローチが期待できる。また、ロットや保存方法によって、阻害効果はかなり変動しているが、これらサンプルが揮発性物質を含むため、感染阻害物質やその拮抗物質の含有量が変動している可能性がある。

本研究の中で最も比活性の高かったベルガモットは、地中海地方に広く分布する蜜柑様の果物で、生食よりは紅茶の着香(アールグレイ)に用いられ、抗不安作用や消化促進作用、駆虫作用などが知られている<sup>8)</sup>。葉には4種の flavonoid (rutin, hyperoside, quercitrin, luteolin, quercetin) が知られ、これらの中に有効成分が存在する可能性がある。実際、flavonoid には抗 HIV 活性を有するものが報告されており<sup>9), 10)</sup>、創薬の可能性はある。

また、同じ柑橘類であるレモンには、抗酸化作用、発癌抑制作用<sup>11)</sup>や殺菌作用<sup>12)</sup>が報告されており、アフリカでは、避妊の目的で陰部をレモンで洗浄する種族で HIV 感染のリスクが低下しているという報告もある<sup>13), 14)</sup>。柑橘類からの抽出物には、抗インフルエンザウイルス活性<sup>15)</sup>や EBV など<sup>16)</sup>他のウイルスの複製を阻害する作用<sup>17)</sup>が知られている。

レモングラスは、植物学的にはレモンとは類縁関係の低いイネ科の植物であるが、Citral を含有することで柑橘類と共通している。レモングラス由来の Citral には抗真菌作用が報告されている<sup>18)</sup>。しかし、Citral には Caspase-3 の誘導効果が報告され<sup>19)</sup>、HIV による中枢神経細胞や免疫細胞の apoptosis を促進する可能性がある。さらに、柑橘類の芳香に長期間暴露すると NK 細胞の活性をはじめとする細胞性免疫能が低下するという<sup>20)</sup>。また、類縁のグレープフルーツジュースは、抗 HIV 薬の一つである saquinavir<sup>21)</sup> を肝臓で分解する酵素チトクローム P456 3A4 の活性を阻害することから、その有効性を高めうる可能性があるが、酵素の活性そのものや吸収に個人差があることから予期しない副作用を起こす可能性があり、saquinavir の製造元ロシュ社はグレープフルーツを

含む柑橘類と併用しないよう警告している。

ミルクシスル (Milk thistle) は、ヨーロッパに自生するキク科の2年草マリアアザミの種子から抽出され、毒キノコの解毒剤や健康増進作用があるとして中欧で古くから広く使用されてきた。近年、肝機能障害に対する治療効果<sup>22)</sup>や紫外線による皮膚の発癌予防<sup>23)</sup>、あるいはシスプラチンによる腎障害の予防効果が報告されている<sup>24), 25)</sup>。しかしこれまでに HIV に対する効果や、AIDS 治療に関する報告がないので筆者らの報告が最初のものと考えられる。生薬の中には、セント・ジョンズワルトのように、抗レトロウイルス剤との相互作用を有するものがあり、HAART との併用は禁忌であるが、ミルクシスルは相互作用がないと報告されており、通常の抗ウイルス療法に併用できる可能性がある。マウス脾細胞に対する mitogen 活性<sup>26)</sup>やヒト末梢血リンパ球の ConA による細胞増殖反応の増強やリンパ球混合培養によるサイトカイン産生の増強 (Th1 および Th2 細胞が共に増強する)<sup>27)</sup>、など免疫系の機能を調節活性する作用も報告されており、臨床的応用の可能性がうかがわれる。

ローズオットー (Rosse otto) はブルガリア原産のダマスカスバラの花の抽出物であり、香水の主要成分の一つであり、鎮静作用が知られているが、免疫機能の調節や抗微生物作用についての報告はない。

ミルラは別名没薬ともいわれ、アラビア半島、エチオピア、ソマリアにかけて生産されている生薬である。主成分はコミフォリックス酸、コミフォリニクス酸などで、血流改善作用のほか、強い殺菌作用があり、「没薬チンキ」として口腔炎、歯根炎に使用されることがある。古代エジプトではミイラ作りに用いられたという。エジプトでは現在でもマンソン住血吸虫の治療に用いられ、その作用機序は寄生虫に対する免疫応答の是正であるという<sup>28)</sup>。

現在、HIV 感染者に対し、既存の漢方薬の投与や代替療法が広く行われている。臨床的検討では、Weber ら<sup>29)</sup>は HIV キャリア 68 名について、漢方薬投与群とコントロールの間にウイルスの検出量、症状、ことに QOL に有意差は見られず、臨床検査でも異常も見られなかったが、漢方薬を服用している患者の方がプラセボ投与を受けている患者よりも有意に多く胃腸症状を訴えた (79% vs. 38%;  $p=0.003$ ) としており、Zhou ら<sup>30)</sup>は、鍼治療で AIDS 患者の不定愁訴が緩和されたと述べているが、Power らは多数の報告を検討して代替医療は AIDS 患者の治療に有用ともそうでないともいえないとしている<sup>31)</sup>。

多くの報告では患者の症状や体質を全く無視してお

り、個々の患者に合わせた処方により、より優れた臨床効果が得られる可能性があるという。しかし、HIV感染者や AIDS 患者では致命的経過をたどる疾患であり、また現在、HAART で大幅な延命が可能であることから、代替医療を主体とする治療は倫理的に許されないであろう。しかし、HAART には副作用や耐性の問題があり、漢方薬やアロマセラピーなど代替医療を併用することによる副作用の軽減や、ワクチンとの併用によるアジュバンド効果を目指すことは十分可能であると考えられる。

本研究により、いくつかのエッセンシャルオイルやチンキ剤において、HIV の感染に対する阻害効果が確認できた。しかし、これらの効果は、あくまでウイルス複製に対する直接効果を検討したものであり、皮膚、鼻粘膜や気道の粘膜における免疫系、さらに芳香により活性化された中枢神経を介した免疫系ならびに内分泌系に及ぼす効果については完全に除外している。本研究で効果なしと判定したエッセンシャルオイルやチンキ剤の中には他の経路を介して作用するものがあるとも考えられるので、他の実験系を介した検討も今後考慮に入れる必要があるであろう。

## 謝 辞

本研究は一部日本アロマセラピー協会・(現: (社) 日本アロマ環境協会) 学術調査研究委員会研究助成金制度による助成を受けて行われた。エッセンシャル標品をご提供いただきました(株)グリーンフラスコの林 眞一郎氏に厚く御礼申し上げます。

## ●引用文献

- 1) Styles J. L.: The use of aromatherapy in hospitalized children with HIV disease, *Complement Ther. Nurs. Midwifery*, **3**, 16-20 (1997).
- 2) Buckle J.: Clinical aromatherapy and AIDS, *J. Assoc. Nurses AIDS Care*, **13**(3): 81-99 (2002).
- 3) Hachiya A., Aizawa-Matsuoka S., Tanaka M., Takahashi Y., Ida S., Gatanaga H., Hirabayashi Y., Kojima A., Tatsumi M., Oka S.: Rapid and simple phenotypic assay for drug susceptibility of human immunodeficiency virus type 1 using CCR5-expressing HeLa/CD4(+) cell clone 1-10 (MAGIC-5), *Antimicrob. Agents Chemother.*, **45**, 495-501 (2001).
- 4) Kimpton J., Emerson M.: Detection of replication-competent and pseudotyped human immunodeficiency virus with a sensitive cell line on the basis of activation of an integrated beta-galactosidase gene, *J. Virol.*, **66**, 2232-2239 (1992).
- 5) Piras G., Makino M., Baba M.: Sho-saiko-to, a traditional Kampo medicine, enhances the anti-HIV-1 activity of lamivudine (3TC) *in vitro*, *Microbiol. Immunol.*, **41**, 835-839 (1997).

- 6) Zhao J., Ben L. H., Wu Y. L., Hu W., Ling K., Xin S. M., Nie H. L., Ma L., Pei G.: Anti-HIV agent trichosanthin enhances the capabilities of chemokines to stimulate chemotaxis and G protein activation, and this is mediated through interaction of trichosanthin and chemokine receptors, *J. Exp. Med.*, **190**, 101-111 (1999).
- 7) Kitamura K., Honda M., Yoshizaki H., Yamamoto S., Nakane H., Fukushima M., Ono K., Tokunaga T.: Baicalin, an inhibitor of HIV-1 production *in vitro*, *Antiviral Res.*, **37**, 131-40 (1998).
- 8) Savickiene N., Dagilyte A., Barsteigiene Z., Kazlauskas S., Vaiciuniene J.: Analysis of flavonoids in the flowers and leaves of *Monarda didyma* L., *Medicina (Kaunas)*, **38**, 1119-1122 (2002).
- 9) Liu S., Lu H., Zhao Q., He Y., Niu J., Debnath A. K., Wu S., Jiang S.: Theaflavin derivatives in black tea and catechin derivatives in green tea inhibit HIV-1 entry by targeting gp41, *Biochim. Biophys. Acta*, **1723**(1-3): 270-281 (2005).
- 10) Asres K., Seyoum A., Veeresham C., Bucar F., Gibbons S.: Naturally derived anti-HIV agents, *Phytother. Res.*, **19**, 557-581 (2005).
- 11) Miyake Y., Murakami A., Sugiyama Y., Isobe M., Koshimizu K., Ohigashi H.: Identification of coumarins from lemon fruit (*Citrus limon*) as inhibitors of *in vitro* tumor promotion and superoxide and nitric oxide generation, *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 3151-3157 (1999).
- 12) Samy R. P.: Antimicrobial activity of some medicinal plants from India, *Fitoterapia*, **76**, 697-699 (2005).
- 13) Short R. V.: The HIV/AIDS pandemic: new ways of preventing infection in men, *Reprod. Fertil. Dev.*, **16**, 555-559 (2004).
- 14) Potts M., Short R. V.: Using microbicides to fight the spread of HIV, *Science*, **300**, 431 (2003).
- 15) Nikolaeva O. V., Karasev A. V., Powell C. A., Garnsey S. M., Lee R. F.: Modulation of the antigenic reactivity of the citrus tristeza virus coat protein, *J. Immunol. Methods*, **206**(1-2): 97-105 (1997).
- 16) Iwase Y., Takemura Y., Ju-ichi M., Kawaii S., Yano M., Okuda Y., Mukainaka T., Tsuruta A., Okuda M., Takayasu J., Tokuda H., Nishino H.: Inhibitory effect of Epstein-Barr virus activation by Citrus fruits, a cancer chemopreventor, *Cancer Lett.*, **139**, 227-236 (1999).
- 17) Li S., Yu H., Ho C. T.: Nobiletin: efficient and large quantity isolation from orange peel extract, *Bio-med. Chromatogr.*, **20**, 133-138 (2005).
- 18) Abe S., Sato Y., Inoue S., Ishibashi H., Maruyama N., Takizawa T., Oshima H., Yamaguchi H.: Anti-*Candida albicans* activity of essential oils including Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil and its component, citral, *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi*, **44**, 285-291 (2003).
- 19) Dudai N., Weinstein Y., Krup M., Rabinski T., Ofir R.: Citral is a new inducer of caspase-3 in tumor cell lines, *Planta Med.*, **71**, 484-488 (2005).
- 20) Delaney B., Phillips K., Buswell D., Mowry B., Nickels D., Cox D., Wang H. B., Manthey J.: Immunotoxicity of a standardized citrus polymethoxylated flavone extract, *Food Chem. Toxicol.*, **39**, 1087-1094 (2001).

- 21) James J. S.: Grapefruit juice and saquinavir AIDS, *Treat News. Nov. 17*, 235, 5-6 (1995).
- 22) Hoofnagle J. H.: Milk thistle and chronic liver disease, *Hepatology*, 42, 4 (2005).
- 23) Singh R. P., Agarwal R.: Mechanisms and preclinical efficacy of silibinin in preventing skin cancer, *Eur. J. Cancer*, 41, 1969-1979 (2005).
- 24) Karimi G., Ramezani M., Tahoonian Z.: Cisplatin nephrotoxicity and protection by milk thistle extract in rats, *Evid. Based Complement Alternat. Med.*, 2, 383-386 (2005).
- 25) Rainone F.: Milk thistle, *Am. Fam. Physician*, 72, 1285-1288 (2005).
- 26) Wilasrusmee C., Kittur S., Siddiqui J., Bruch D.: Wilasrusmee *in vitro* immunomodulatory effects of ten commonly used herbs on murine lymphocytes, *J. Altern. Complement Med.*, 8, 467-475 (2002).
- 27) Wilasrusmee C., Kittur S., Shah G., Siddiqui J., Bruch D., Wilasrusmee S., Kittur D. S.: Immunostimulatory effect of *Silybum Marianum* (milk thistle) extract, *Med. Sci. Monit.*, 8, BR439-443 (2002).
- 28) Soliman O. E., El-Arman M., Abdul-Samie E. R., El-Nemr H. I., Massoud A.: Evaluation of myrrh (Mirazid) therapy in fascioliasis and intestinal schistosomiasis in children: immunological and parasitological study, *J. Egypt Soc. Parasitol.*, 34, 941-966 (2004).
- 29) Weber R., Christen L., Loy M., Schaller S., Christen S., Joyce C., Ledermann, U., Ledergerber B., Cone R., Luthy R., Cohen M.: Randomized, placebo-controlled trial of chinese herb therapy for HIV-1-infected individuals, *J. Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 22, 56-64 (1999).
- 30) Zhou W., Sun Y., Wu Z.: Acupuncture ameliorates AIDS symptoms in 36 cases, *J. Tradit. Chin Med.*, 220, 119-121 (2000).
- 31) Power R., Gore-Felton C., Vosvick M., Israelski D. M., Spiegel D.: HIV: effectiveness of complementary and alternative medicine, *Prim. Care*, 29: 361-378 (2002).

### 【要 旨】

AIDS は新興感染症の中でも致命率の高い疾患であり、現時点では、HIV 感染や AIDS 発症を確実に予防する方法がない。近年 HAART の導入により、予後は改善しているが、長期服用による副作用や耐性の問題がある。そうしたなか、代替医療には AIDS 発症を遅らせたり、日和見感染を予防したり、食欲を増進させるなど全身状態の改善効果が報告されている。我々は、アロマセラピーに用いられている芳香物質が HIV 感染にどのように効果があるか *in vitro* で検討した。

方法として 35 種類のエッセンシャルオイルおよびチンキ剤を MAGIC-5 アッセイ法によって検討した。

その結果、使用した 35 サンプル中 7 サンプルに細胞毒性濃度と比較して 10~100 倍希釈した低濃度で HIV 感染阻害効果を確認することができ、この阻害効果が細胞毒性によるものではないことが判明した。その中でもベルガモット、ミルラ、レモン、ローズオットーおよびレモングラスでは特に高い阻害効果が見られた。興味深いことに、感染阻害作用には単純な濃度依存性がなく、特定の濃度で最大限の感染抑制が見られた。

結論としてアロマセラピーに用いられるエッセンシャルオイルやチンキ剤の一部に HIV の感染を抑制する作用が認められ、従来から知られている抗 HIV 剤とは異なる作用機序による可能性や複数の感染抑制活性物質や拮抗物質が共存するのではないかという可能性が示唆された。

キーワード: HIV, AIDS, アロマセラピー, MAGIC-5

連絡先: 早川 智

日本大学医学部先端医学講座感染制御科学部門

〒173-8610 東京都板橋区大谷口上町 30-1

TEL: 03-3972-8111 (内線 2611)

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

## 原 著

NK, NKT 細胞株に対する  $\beta$ -endorphin の機能調節太田 郁子<sup>1)</sup> 早川 智<sup>1,2)</sup> 鈴木 (唐崎) 美喜<sup>1)</sup> 山本 樹生<sup>1)</sup><sup>1)</sup>日本大学医学部産婦人科学講座<sup>2)</sup>日本大学医学部先端医学講座感染制御科学部門 **$\beta$ -endorphin Regulates Immune Functions of NK, NKT Lymphocyte Cell Lines Via Opioid Receptor Dependent/independent Pathways**Ikuko Ota<sup>1)</sup>, Satoshi Hayakawa<sup>1,2)</sup>, Miki Suzuki<sup>1)</sup> and Tatsuo Yamamoto<sup>1)</sup><sup>1)</sup>Department of Obstetrics and Gynaecology, Nihon University School of Medicine<sup>2)</sup>Division of Infectious Disease Control, Nihon University Advanced Medical Research Center

**PROBLEM:** Recently, opioid-induced regulation of immune functions in the mucosal immune system has been reported both in mice and in humans. Large granular lymphocytes constitute a major population of leukocytes in the secretory endometrium and pregnancy decidua and are considered to be involved in reproductive immunity and in maintaining the pregnancy. In the present study, we examined the effects of  $\beta$ -endorphin on two large granular lymphocyte cell lines, MOTN-1 and KHYG-1, to investigate the regulatory roles of placenta-derived  $\beta$ -endorphin on the local immune system.

**MATERIALS AND METHODS:** The large granular lymphocyte cell lines KHYG-1 (NK) and MOTN-1 (NKT) were maintained in RPMI1640 supplemented with 10% FCS. IFN- $\gamma$  production was evaluated by ELISPOT assay under stimulation with IL-2 100 IU/ml and/or IL-12 10 IU/ml. Various concentrations of  $\beta$ -endorphin were added into the culture media with/without the opioid antagonist naloxone. Expression of opioid receptor  $\kappa$ ,  $\delta$ ,  $\mu$  mRNA was evaluated by RT-PCR.

**RESULTS:** MOTN-1 expressed opioid receptor  $\kappa$  mRNA and constitutively produced IFN- $\gamma$ . Production was up-regulated by IL-2 and/or IL-12.  $\beta$ -endorphin suppressed constitutive and IL-2-induced IFN- $\gamma$  production while it showed no effect on IL-12-induced IFN- $\gamma$  production. The suppression was completely abrogated by simultaneous naloxone treatment. KHYG-1 expressed none of the three opioid receptors and showed non-constitutive IFN- $\gamma$  secretion.  $\beta$ -endorphin up-regulated the production in low concentrations, while it down-regulated the production in high concentrations. This regulation was not affected by naloxone treatment.

**CONCLUSION:**  $\beta$ -endorphin suppress IL-2/STAT5-induced signaling of the large granular NKT lymphocyte cell line MOTN-1, and it affects the large granular NK lymphocyte cell line KHYG-1 via opioid receptor-independent pathways.

**Key words:**  $\beta$ -endorphin, NK lymphocytes, NKT lymphocytes, interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), opioid receptor  
 $\beta$ エンドルフィン, NK 細胞, NKT 細胞, インターフェロン $\gamma$ , オピオイドレセプター

(J. Nihon Univ. Med. Ass., 2005; 65 (1): 17-24)

**要旨** 近年, opioid を介するシグナルが中枢神経のみならず, 免疫担当細胞の機能を調節することが報告される。胎盤は中枢神経や副腎髄質など外胚葉組織以外に大量の  $\beta$ -endorphin を産生する臓器の一つであるが, その生理的機能は明らかではない。そこで脱落膜免疫細胞の主体をなす CD56 陽性大顆粒リンパ球 (CD56 + LGL) を模倣する細胞株 MOTN-1 (NKT) ならびに KHYG-1 (NK)

に対する  $\beta$ -endorphin の作用を検討した。

MOTN-1 は構成的に opioid receptor  $\kappa$  を発現し, 少量の IFN- $\gamma$  を産生した。IL-2, IL-12,  $\beta$ -endorphin は構成的な IFN- $\gamma$  産生ならびに IL-2 による IFN- $\gamma$  産生を濃度依存性に抑制し, naloxone により reverse されたが IL-12 による誘導は抑制を受けなかった。一方, KHYG-1 は培養の条件では opioid receptor  $\kappa$ ,  $\delta$ ,  $\mu$  いずれをも発現せ

本論文の要旨の一部は, 第 25 回国生殖免疫学会<sup>1)</sup> で発表し, また第 13 回日本胎盤学会<sup>2)</sup>, 第 20 回日本生殖免疫学会<sup>3)</sup> で発表予定である。

会期: 1) 平成 17 年 6 月 16 日, 2) 平成 17 年 10 月 27 日, 3) 平成 17 年 12 月 1 日

会場: 1) Providence, RI, USA, 2) 富山県富山市, 3) 大阪府高槻市

受付: 2005 年 9 月 22 日, 受理: 2005 年 11 月 4 日

ず、IFN- $\gamma$  産生もみられなかったが、IL-2 刺激により IFN- $\gamma$  産生が誘導され、低濃度の  $\beta$ -endorphin により産生が増強された。しかし、高濃度では産生が抑制された。この産生調節は、naloxone による調節を受けなかった。以上の結果より  $\beta$ -endorphin は opioid receptor  $\kappa$  を介し、NKT 細胞株 MOTN-1 の IL-2 により活性化される STAT5 を介する IFN- $\gamma$  誘導を抑制するが IL-12 により誘導される STAT4 を介したシグナルは抑制しないこと、一方 NK 細胞株 KHYG-1 では IL-2 により活性化される IFN- $\gamma$  産生を opioid receptor を介さないで、 $\beta$ -endorphin 濃度により二相性に調節することが明らかになった。

## はじめに

Endorphin は、主として中枢神経組織において作用する内因性オピオイドペプチドの一つである。Endorphin には  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、の三種が知られており、最も生物活性が高いとされている  $\beta$ -endorphin はアミノ酸 31 個からなる分子量 3500 の直鎖ペプチドである。 $\beta$ -endorphin は様々なストレスにより主に下垂体前葉から分泌され、標的細胞のオピオイドリセプタを介し、疼痛抑制作用や快楽作用をもたらすことが報告されている<sup>1)</sup>。近年、オピオイドリセプタを介するシグナルが中枢神経細胞のみならず、ケラチノサイトや免疫担当細胞の機能を調節することが報告された。興味深いことに、モルヒネ常用者やモルヒネ、あるいは  $\beta$ -endorphin 投与動物では免疫能が低下するという報告があるが、*in vitro* で免疫細胞をオピオイド処理した場合、機能が亢進<sup>23)</sup>あるいは低下する<sup>45)</sup>という相反する報告がある。筆者らはその機序として、細胞集団によりオピオイドリセプタ発現の多様性や細胞内シグナル伝達に相違があるのではないかという仮説の下に本研究をおこなった。すなわち哺乳類のオピオイドリセプタには  $\mu$ 、 $\kappa$ 、 $\delta$  の三種が知られ、さらに、オピオイドリセプタを介さない、いわゆる opioid receptor independent な応答が報告されている<sup>67)</sup>。

しかしながら、免疫細胞におけるオピオイドリセプタの発現パターンと機能修飾については必ずしも諸家の報告の一致をみない<sup>8)</sup>。

胎盤は中枢神経や副腎髄質など外胚葉組織以外に大量の  $\beta$ -endorphin を産生する臓器の一つである<sup>9)</sup>。その生理機能は不明であるが妊娠維持に関与する可能性がある<sup>10)</sup>。胎盤と直接接する脱落膜には未熟な NK 細胞<sup>11)</sup> や NKT 細胞<sup>12)</sup>、胸腺外 T 細胞<sup>13,14)</sup> よりなる大量の大顆粒リンパ球が存在し、母子間の接点において重要な役割を果たしていると考えられる<sup>15,16)</sup>。本研究では、これら脱落膜大顆粒リンパ球におけるオピオイドシステムの生理的役割を検討するため、NK 細胞、NKT 細胞樹立細胞株を用いてオピオイドリセプタ発現と外因性  $\beta$ -endorphin の IFN- $\gamma$  産生に及ぼす影響の解析を行った。

## I. 対象ならびに方法

### 1. 細胞増殖能の検討

MOTN-1, KHYG-1 細胞株の増殖に対する  $\beta$ -endorphin の作用を AlamarBlue™ Assay で検討した。96 穴マイクロプレートに細胞を播き、IL-2, IL-12, IL-2 + IL-12, PHA を添加して培養した。この系に、 $\beta$ -endorphin を 10, 30, 100 ng/ml 添加し、37°C で 20 時間培養した。Alamar Blue™ (Alamar Biosciences, Inc., Sacramento, Ca, USA) を 10  $\mu$ l/well 添加し、4 時間後にマイクロプレートリーダー (BIO RAD Model 680) を使用し、測定波長を 570 nm で吸光度を比色測定した。同様に 48 時間、72 時間に吸光度を測定した。

### 2. NK, NKT 細胞の培養

NK 細胞, NKT 細胞株として各々 MOTN-1<sup>17)</sup>, KHYG-1<sup>18)</sup> を使用した。前者は Matsuo らにより T cell large granular lymphocyte leukemia (T-CLL or T-LGL) の樹立された細胞株で、表面マーカー解析では CD2+, CD3-, CD4+, CD5-, CD6-, CD8-, CD13-, CD19-, CD56+, TCR  $\alpha/\beta$ , TCR  $\gamma/\delta$  である。後者は Yagita らにより aggressive NK cell leukemia より樹立された細胞株で、FCM による表面マーカー解析では CD2+, surface CD3-, cytoplasmic CD3  $\epsilon$ +, CD7+, CD8  $\alpha$ +, CD16+, CD56+, CD57+, HLA-DR+ である。ともに形態学的にはアズル顆粒陽性の大顆粒リンパ球の形態をとるが、TCR rearrangement の有無より、前者を NK 細胞、後者を NKT 細胞のモデルとして実験に供した。両細胞株はともに interleukin-2 (IL-2) 依存性であるため、IL-2 (日本ベクトン・ディッキンソン, 東京) 100 U/ml, 10% 牛胎児血清 (GIBCO BRL, New York, N.Y.) 加 RPMI1640 (ICN Biomedicals Inc Aurora, OH) 中で、37 度の CO<sub>2</sub> インキュベーターにおいて培養した。

### 3. サイトカイン刺激と endorphin の添加

NKT, NK 細胞共通の刺激因子として IL-12 (Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd, Tokyo, Japan) を使用した。この系における IFN- $\gamma$  産生を ELISPOT 法 (後述) で定量し、種々の濃度の  $\beta$ -endorphin (SIGMA, Steinheim, Germany) を同時に添加してその影響を検討した。さらにオピオイドリセプタによるシグナル伝達たるや否を検討するため、オピオイドリセプタ共通のアンタゴニストである naloxane 0.1 mM (naloxone methiodide FW 469.3 SIGMA Steinheim, Germany) を添加してその作用を検討した。

### 4. オピオイドリセプタの Reverse transcription coupled to polymerase chain reaction (RT-PCR) による mRNA 発現の検討

哺乳類のオピオイドリセプタには  $\mu$ 、 $\kappa$ 、 $\delta$  の三種が知られているが、免疫細胞における発現は一様でなく、その差異が細胞ごとの感受性を決定する可能性がある。mRNA レベルで本研究に用いた細胞株におけるオピオ

イドリセプタ発現パターンを RT-PCR で検討した。

#### RNA 抽出と逆転写

KHYG-1, あるいは MOTN-1 細胞 ( $1 \times 10^5$  個) に RNA-Bee (ISO-TEX Diagnostics, Friendswood, TX) 200  $\mu$ l とクロロホルム 20  $\mu$ l を添加し, 5 分間氷冷したのち, 4°C, 15000 rpm で 15 分間遠心分離した。その上清を分離し, 2-Propanol (和光純薬工業株式会社, 東京) 500  $\mu$ l 加えた。その後室温に 15 分静置し, 4°C, 15000 rpm で 15 分間遠心した後, 上清を分離し 75% ethanol で RNA を沈殿した。RNA は沈殿した状態で -80°C で保存した。

使用時に RNA ペレットを Distilled Water, Deionzed, Sterile (和光純薬工業株式会社) に溶解して, 1  $\mu$ g/ $\mu$ l に調整した。これを 65°C, 10 分で三次構造を denature し, 10 分間氷冷したものを template とした。逆転写は Amersham 社の MMT (murine mammary tumor) 逆転写酵素によりおこなった。すなわち Amersham Bulk first-stand cDNA reaction mixes 5  $\mu$ l, DTT solution 1  $\mu$ l, pd (N6) primer 1  $\mu$ l (Amersham Biosciences, UK) に RNA sample を 8  $\mu$ l 加えて, 37°C で反応させた。

#### RT-PCR

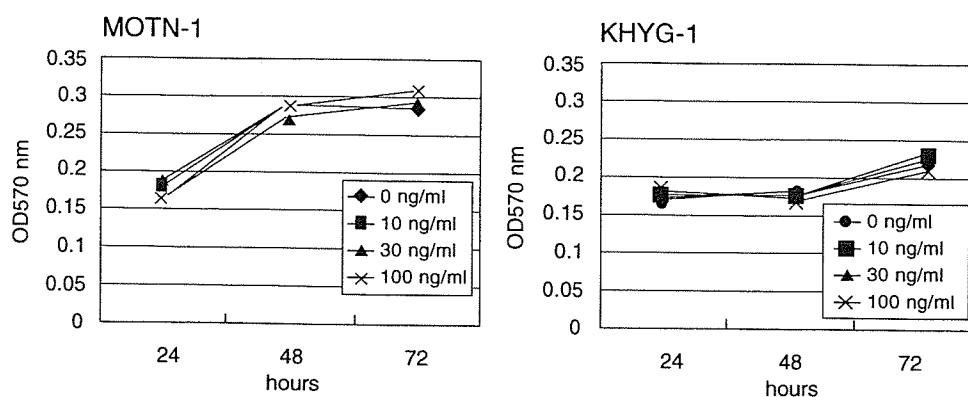
Taq PCR Master Mix (QIAGEN, キアゲン, 東京) 13  $\mu$ l (MgCl<sub>2</sub> 25 mM), RNase free water 11  $\mu$ l を cDNA 1  $\mu$ l に添加し, 94°C 3 分間, 60°C 3 分間で, Hot start した。

Primer は過去に報告された sequence をもとに  $\mu$ -opioid receptor (MOR) の primer は sense を 5'-GCT TCC AAT CTT ATA TTC TTT CAC GG-3', antisense を 5'-CGG TGC TCC TGG CTA CCT CGC A-3' (441bp) とした<sup>19)</sup>。 $\delta$ -opioid receptor (DOR) は sense を 5'-GCC AAG CTG ATC AAC ATC TG-3', antisense を 5'-AAG CAG CGC TTG AAG TC TC-3' (388bp) とした。<sup>20</sup>  $\kappa$ -opioid receptor (KOR) は sense を 5'-AAA GCT AGG GAA GAC GTC GAT GTC-3', antisense を 5'-GAA TGG GAT TCA GGC

TAC TGT TGG-3' (350 bp) とした。<sup>21</sup> PCR は MOR と DOR は, 94°C 60 sec, 64°C 60 sec, 72°C 60 sec を 30 cycle 後, 72°C 10 分間, KOR は 94°C 60 sec, 58°C 60 sec を 35 cycle 後, 72°C 10 分間でいった。PCR 産物は 2% アガロースゲル (岩井化学薬品株式会社) を用い, TAE buffer 中で電気泳動を行い, 予測される長さのフラグメントの増幅を確認し, さらに direct sequence. で確認した。

#### 5. ELISPOT 法による IFN- $\gamma$ 産生の検討

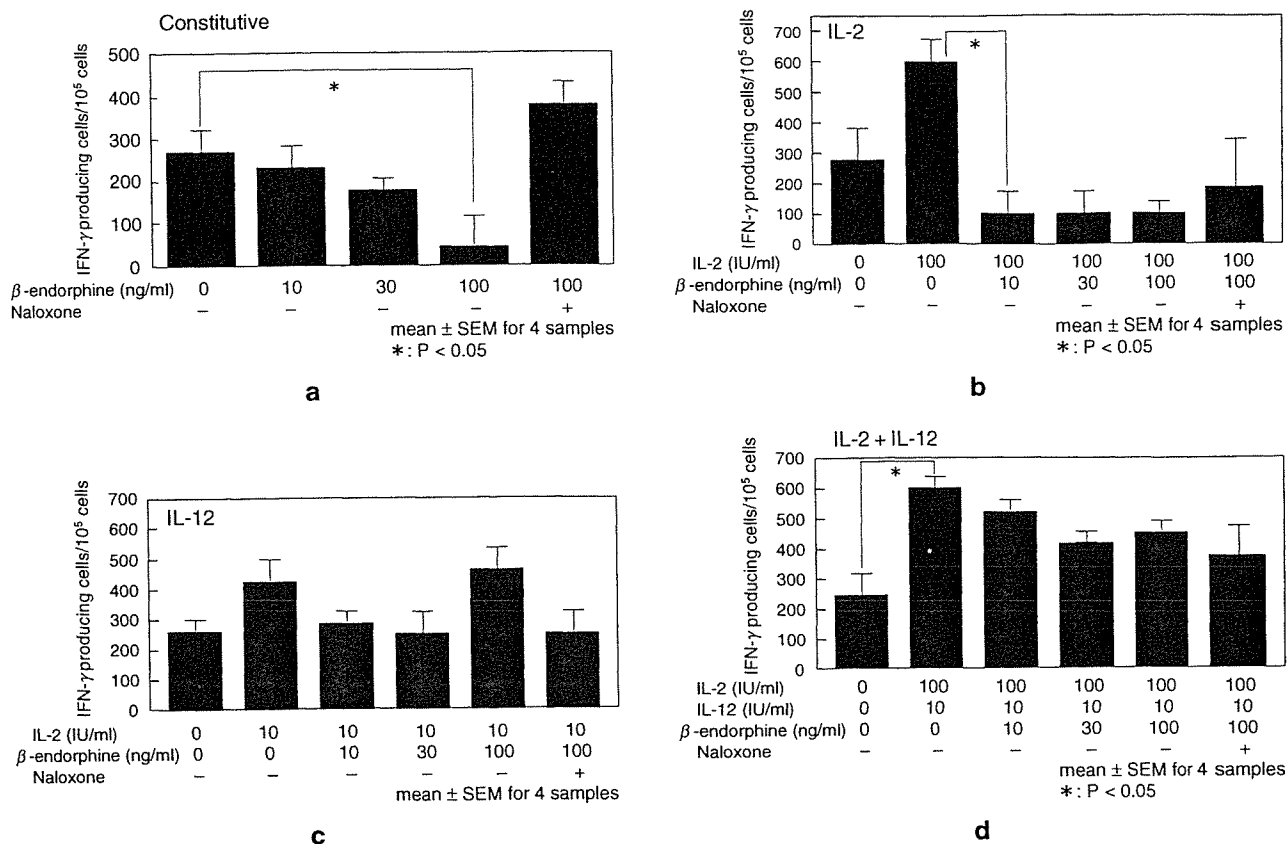
サイトカインを測定する上で, 個々の細胞レベルでの産生を検討する ELISPOT 法は最も感度と定量性に優れた方法と考えられている<sup>22,23)</sup>。本研究では IFN- $\gamma$  産生を NK, あるいは NKT 細胞活性化の指標として, ELISPOT 法で検討した。ELISPOT は市販の human IFN- $\gamma$  ELISPOT kit (Mabtech, Nacka Strand, SWEDEN) を貼付の説明書に従って使用した。pH 7.4 PBS で希釈した IFN- $\gamma$  の一次抗体 (1-D 1K, 15  $\mu$ g/ml) を 100  $\mu$ l/well 添加し, 4°C でオーバーナイトインキュベーションした (0.45  $\mu$ m Surfactant-free Mixed cellulose Ester Membrane, MILLIPORE)。翌日マイクロプレートを PBS で 6 回洗浄し, 0.5% BSA-PBS でブロッキングを行い, 室温に 2 時間静置した。その後, 細胞を  $1 \times 10^4$ /well ずつ 96 well に培養条件各 4 検体ずつ播き, 2 時間培養したのち, PBS で 6 回洗浄した。ビオチン標識二次抗体 (39C3-biotin) を 0.5% FCS-PBS で 1000 倍希釈し, 室温で 2 時間反応させ, PBS で 6 回洗浄した。アルカリフォスファターゼ結合ストレプトアビジン (Mabtech, Nacka Strand, SWEDEN) を加え, 室温に再び 2 時間放置し, PBS で 6 回洗浄したのちに, 発色剤 BCIP/NBT 溶液 (BIO RAD AP conjugate substrate Kit) を加えて, 室温に 1~2 時間静置し, 最後に PBS で 6 回洗浄して, 乾燥後, 粘着テープに転写して, これを ELISPOT 自動検出システム (KS



**Fig. 1** Proliferation of KHYG-1 and MOTN-1 cell lines in various concentrations of  $\beta$ -endorphin. Proliferation of NK and NKT cell lines was estimated by a dye-based lymphocyte proliferation assay. Five thousand cells were cultured with Alamar Blue 10  $\mu$ l/well in the presence or absence of  $\beta$ -endorphin for 72 hours.

$\beta$ -endorphin showed no remarkable influence on MOTN-1 and KHYG-1 proliferation in 10-100 ng/ml. The cytotoxicity was not observed in the highest concentration of  $\beta$ -endorphin.





**Fig. 2** Regulatory effects of  $\beta$ -endorphin on constitutive (Fig. 2A) and cytokine induced (Fig. 2B, C, D) INF- $\gamma$  production by MOTN-1.

$5 \times 10^5$  cells were plated into 96 well plates and cultured for 24 hours in a 37°C humid 5% CO<sub>2</sub> incubator. INF- $\gamma$  production was estimated by enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay. Unstimulated MOTN-1 cells constitutively produced INF- $\gamma$ .  $\beta$ -endorphin suppressed INF- $\gamma$  production in a dose dependent manner. The suppressive effects was statistically significant over 30 ng/ml while the effects were completely reversed by simultaneous naloxon (0.1 mM) treatment. (Fig. 2A)

IL-2 (100 IU/ml) stimulation up-regulated INF- $\gamma$  production.  $\beta$ -endorphin completely suppressed INF- $\gamma$  production even at the minimum concentration (10ng/ml). ( $P < 0.05$ ) The suppressive effect of  $\beta$ -endorphin on IL-2 stimulated MOTN-1 was partially reversed by simultaneous naloxon (0.1 mM) treatment. (Fig. 2B)

IL-12 (10IU/ml) also stimulation up-regulated INF- $\gamma$  production, while  $\beta$ -endorphin showed no suppressive effects on INF- $\gamma$  production even at the highest concentration (100 ng/ml). Naloxon treatment showed no effect in the presence or absence of  $\beta$ -endorphin. (Fig. 2C)

Simultaneous treatment of MOTN-1by IL-12 (100 IU/ml) and IL-12 (10 IU/ml) up-regulated INF- $\gamma$  production.  $\beta$ -endorphin showed partial inhibition over 30 ng/ml. The suppressive effect was partially reversed by naloxon. (Fig. 2D)

ELISPOT system, Carl Zeiss Japan, Tokyo) を使用して計測した。同一の実験を4回繰り返し平均を求めた。

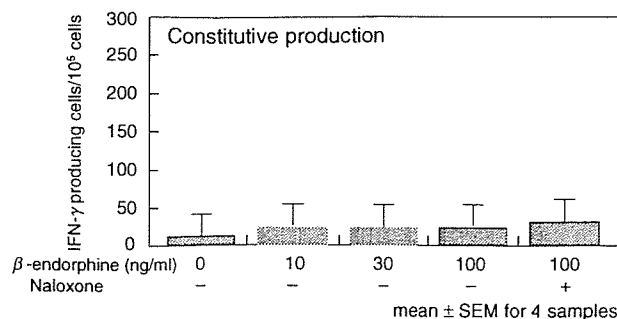
## II. 統計処理

ELISPOT 法にて定量した結果を対応がない二つの条件の中央値を比較するノンパラメトリック検定の Mann-Whitney test にて統計解析を行い、 $p < 0.05$  を有意とした。この統計法により、Fig. 2A では MOTN-1 の  $\beta$ -endorphin 無添加の結果と  $\beta$ -endorphin 100 ng/ml の結果を、Fig. 2B では MOTN-1 の IL-2 100 IU/ml 添加下における  $\beta$ -endorphin 無添加の結果と MOTN-1 の  $\beta$ -endorphin 10 ng/ml の結果を、Fig. 2D では MOTN-1 の IL-2 100 IU/ml + IL-12 10 IU/ml の結果と IL-2 100 IU/ml + IL-12 10 IU/ml

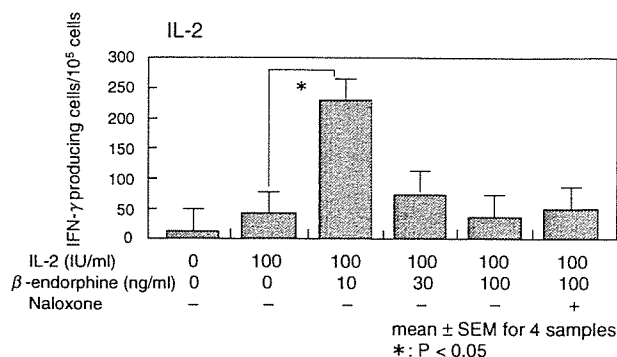
の結果を、Fig. 3B では KHYG-1 の IL-2 100 IU/ml 添加下における  $\beta$ -endorphin 無添加の結果と MOTN-1 の  $\beta$ -endorphin 10 ng/ml の結果をそれぞれ2群間で比較した。

## III. 結果

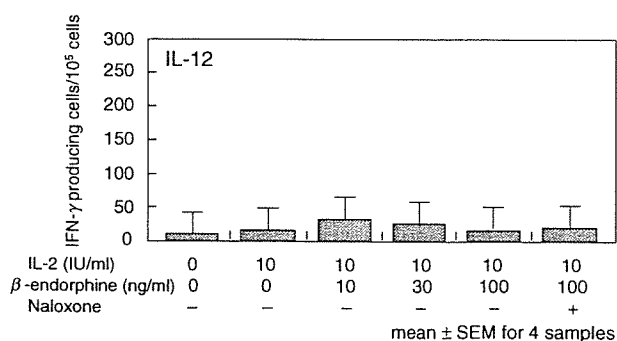
1.  $\beta$ -endorphin の NK, NKT 細胞株増殖に及ぼす影響  
 $\beta$ -endorphin は本実験において検討した 10-100 ng/ml の範囲において、単独では MOTN-1, KHYG-1 の増殖に影響を与えなかった (Fig. 1).
2.  $\beta$ -endorphin の MOTN-1 における INF- $\gamma$  産生に対する影響 (24 時間培養)
  - i) MOTN-1 細胞は IL-2 の存在しない、10% FCS 加 RPMI において構成的に INF- $\gamma$  を産生した。  $\beta$ -endorphin



a



b



c

**Fig. 3** Regulatory effects of  $\beta$ -endorphin on constitutive (Fig. 3A) and cytokine induced (Fig. 3B, C) IFN- $\gamma$  production by KHYG-1.

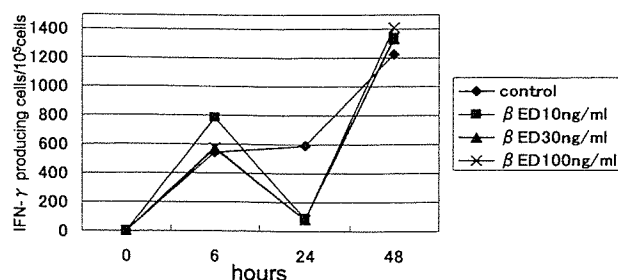
$5 \times 10^5$  cells were plated into 96 well plates and cultured for 24 hours in a 37°C humid 5% CO<sub>2</sub> incubator. IFN- $\gamma$  production was estimated by ELISPOT assay.

Unstimulated KHYG-1 cells did not produce IFN- $\gamma$  in the conditions of this experiment.  $\beta$ -endorphin did not induce IFN- $\gamma$  production even at the highest concentration (Fig. 3A).

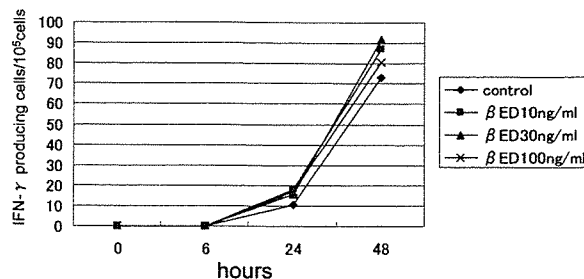
IL-2 (100 IU/ml) stimulation induced IFN- $\gamma$  production by KHYG-1 cells.  $\beta$ -endorphin up-regulated IL-2 induced IFN- $\gamma$  production at a lower concentration (10 ng/ml) while  $\beta$ -endorphin down-regulated IFN- $\gamma$  production at higher concentrations (over 30 ng/ml). The suppression was not affected by simultaneous naloxone treatment (0.1 mM).

IL-12 (10 IU/ml) showed no stimulatory effects on IFN- $\gamma$  production.  $\beta$ -endorphin did not induce IFN- $\gamma$  production even at the highest concentration in the presence of IL-12 (Fig. 3C).

## MOTN-1



## KHYG-1



**Fig. 4** Time courses of IFN- $\gamma$  production by MOTN-1 and KHYG-1 cell lines stimulated with IL-2.

IFN- $\gamma$  producing cells were estimated at 6, 24 and 48 hours of culture.

MOTN-1 cells rapidly respond to IL-2 stimulus from 6 hours of culture, reached their peak levels after 24 hours.  $\beta$ -endorphin transiently suppressed IFN- $\gamma$  production at 24 hours of culture. Then the suppression was not remarkable at 48 hours of culture. KHYG-1 produced  $\beta$ -endorphin in the presence of IL-2 after 24 hours of culture.  $\beta$ -endorphin up-regulated IFN- $\gamma$  production at 24 and 48 hours of culture. Bi-phasic action of  $\beta$ -endorphin on IFN- $\gamma$  production by MOTN-1 was not observed in KHYG-1 cells.

は非刺激時の IFN- $\gamma$  産生を濃度依存性に抑制傾向を認め、100 ng/ml で明らかな抑制を認めた。この作用は naloxone により阻害された (Fig. 2A)。

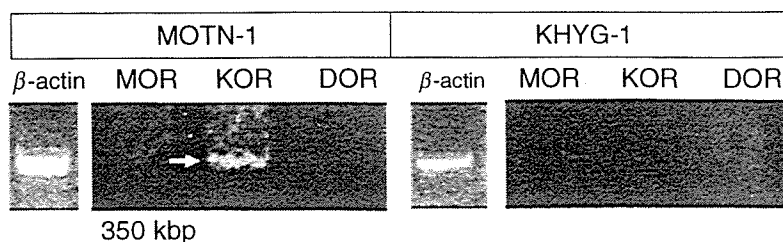
ii) MOTN-1 細胞の IFN- $\gamma$  産生は IL-2 刺激により著しく増強されたが  $\beta$ -endorphin は 10 ng/ml の低濃度でも著明な抑制を認め ( $p < 0.05$ )、この作用は naloxone により阻害される傾向を認めた (Fig. 2B)。

iii) MOTN-1 細胞の IFN- $\gamma$  産生は IL-12 刺激により同様に増強されたが  $\beta$ -endorphin はこの作用を抑制せず naloxone は何の影響も与えなかった (Fig. 2C)。IL-2+IL-12 同時刺激時の IFN- $\gamma$  産生は  $\beta$ -endorphin により部分的に抑制されたが著明な差をみとめなかった (Fig. 2D)。

### 3. $\beta$ -endorphin の KHYG-1 における IFN- $\gamma$ 産生に対する影響 (24 時間培養)

i) KHYG-1 細胞は IL-2 の存在しない、10% FCS 加 RPMI において殆ど IFN- $\gamma$  を産生せず、 $\beta$ -endorphin は 10–100 ng/ml の範囲で影響を与えなかった (Fig. 3A)。

ii) KHYG-1 細胞の IFN- $\gamma$  産生は IL-2 刺激により誘導され、低濃度 (10 ng/ml) の  $\beta$ -endorphin で増強されたが、高濃度 (30 ng/ml 以上) では促進効果が見られなかった (Fig. 3B)。



**Fig. 5** Agarose gel electrophoresis of RT-PCR amplification products of the human lymphocyte  $\kappa$ ,  $\delta$ ,  $\mu$  opioid receptor chains, (KOR, DOR, MOR respectively), and  $\beta$ -actin. One microgram each of total RNA was reverse transcribed into cDNA and amplified for 35 cycles.  $\Phi$ X174 Hae III was used to determine product sizes. In addition to the correct size, PCR products were sequenced to confirm their identity. MOTN-1 expressed MOR in the present condition, while KHYG-1 expressed none of three receptors. Different primer pairs were employed to confirm these observations (Data not shown).

iii) KHYG-1 細胞の IFN- $\gamma$  産生は IL-12 刺激による誘導を受けず,  $\beta$ -endorphin は 10–100 ng/ml の範囲で影響を与えなかった (Fig. 3C).

#### 4. $\beta$ -endorphin の IL-2 刺激 MOTN, KHYG-1 細胞の IFN- $\gamma$ 産生の時間経過

MOTN-1 では IL-2 刺激後 6 時間より IFN- $\gamma$  産生が誘導され 24 時間でピークに達し 48 時間まで漸増した. IL-2 存在下で,  $\beta$ -endorphin は 24 時間培養時の IFN- $\gamma$  産生を抑制したが 48 時間では差が見られなかった. 一方, KHYG-1 では刺激後 6 時間では産生誘導は見られず, 24 時間より産生がみられ, 48 時間でピークに達した (Fig. 4).

#### 5. MOTN-1, KHYG-1 細胞におけるオピオイドリセプタ mRNA 発現

両細胞株における  $\beta$ -endorphin 感受性と IFN- $\gamma$  産生の相違を解明するために, opioid receptor の mRNA 発現を RT-PCR で検討した. MOTN-1 では, KOR のみが発現し, KHYG-1 では MOR, DOR, KOR いずれの発現もみられなかった (Fig. 5). MOTN-1 における作用は  $\beta$ -endorphin の作用は KOR を介した反応が主体である可能性が示唆された. 一方, KHYG-1 における IFN- $\gamma$  スポット数は MOTN-1 の約 1/10–1/4 であり,  $\beta$ -endorphin 処理後 IFN- $\gamma$  産生により長時間を要すること, さらに naloxone により影響を受けないことから既知の  $\mu$ -,  $\kappa$ -,  $\delta$ -オピオイドリセプタを介する反応ではない可能性が示唆された.

### IV. 考 察

$\beta$ -endorphin は  $\mu$ -,  $\kappa$ -,  $\delta$ -の 3 種類のオピオイドリセプタを介して作用を発現する<sup>24,25)</sup>. 末梢血リンパ球において, McCain らは  $\mu$  型リセプタ (MOR) 特異的な morphine の作用が naloxone で阻害されることから MOR が発現するとしている<sup>26)</sup> が, Madden らは蛋白あるいは mRNA レベルで MOR 発現は認められないとしている<sup>27)</sup>. また Cadet らは ヒト末梢血リンパ球 (COS-1) は MOR 関連遺

伝子である  $\mu 3$  のみを発現するとしている<sup>28)</sup>. 一方, Gomez らは DOR が T 細胞, B 細胞, マクロファージ, NK 細胞に発現するとしている<sup>29)</sup>. KOR 発現に関する報告は少ないが, Alicea らは KOR の選択的 agonists (U50, 488H) がマウスマクロファージ細胞株 (EL-4, CTLL-2) において LPS に誘導される炎症性サイトカイン産生を抑制するとしている<sup>30)</sup>. また, House らはヒト末梢血 NK 細胞の  $\beta$ -endorphin による IFN- $\gamma$  産生抑制作用は  $\delta$ -オピオイドリセプタを特異的に介するとしている<sup>31)</sup>.

近年, 興味深いことに, NK 細胞や NKT 細胞など自然免疫に関与する細胞が複数の細胞集団より構成され, 種々のサイトカイン, ケモカイン, ホルモン感受性に大きな相違があること<sup>32)</sup>, 構成細胞の変化が妊娠維持の破綻や妊娠高血圧の発症に関与すること<sup>33)</sup>が報告されている. しかしながら, 末梢血や組織由来の NK 細胞を用いてオピオイドの感受性を検討する場合には, 対象が混合細胞集団より構成されるため精密な解析は困難である.

本研究ではその問題を解決するため NKT, NK 細胞を模倣する樹立細胞株である MOTN-1, KHYG-1 を用いて検討した. NKT 細胞株 MOTN-1 は構成的に IFN- $\gamma$  を産生し, IL-2 刺激により著しく増強されたが,  $\beta$ -endorphin はこれ抑制し naloxone で阻害された. しかし, IL-12 による刺激は抑制を受けなかった. IL-2 と IL-12 はともにサイトカイン細胞内シグナル伝達系 Signal transducer and activator of transcription (STAT) を活性化して IFN- $\gamma$  の転写因子を発現させるが, 前者は STAT5, 後者は STAT4 を介することが知られている<sup>34)</sup>. すなわち, IL-2 のみによって制御される IFN- $\gamma$  産生機構として, IFN- $\gamma$  遺伝子の 5'-flanking region の 3.5–4kb 上流にあって, IL-2 によって活性化されるプロモーターの転写が重要と考えられている<sup>35)</sup>. 本研究では MOTN-1 の IL-2 刺激特異的に IFN- $\gamma$  の産生の抑制がみられたことから,  $\beta$ -endorphin が KOR を介して STAT5 のシグナリングを制御している可能性が示唆された.

一方, NK 細胞株 KHYG-1 は無刺激では IFN- $\gamma$  を産

生せず、 $\beta$ -endorphin も単独では IFN- $\gamma$  誘導活性が見られなかった。しかし、IL-2 の存在下では低濃度の  $\beta$ -endorphin は IFN- $\gamma$  産生を著しく増強し、naloxone による阻害を受けなかった。KHYG-1 では MOR, DOR, KOR いずれの発現もみられず、naloxone により影響を受けないこと、 $\beta$ -endorphin 処理後による IFN- $\gamma$  産生効率が低いことから、既知のオピオイドリセプタを介さない反応であると考えられた。

$\beta$ -endorphin の免疫細胞増殖に対する作用は前述のように、亢進するという報告と抑制するという報告がある。従来の報告ではこの差異は、被験対象の状態や日内リズム、実験時間や投与量によるものではないかと推定されている。しかしながら、本研究で形態的に極めて類似した二つの細胞株において全く異なった感受性が見られたことから、NK 細胞と NKT 細胞あるいはさらにその中の亜集団によって異なったオピオイド調節が機能している可能性がある。

近年、中枢神経や末梢組織において既知のオピオイドリセプタのほか、いわゆる orphan opioid receptor (OOR) の存在が報告され<sup>7)</sup>、その機能が注目される。NK 細胞株 KHYG-1 における IFN- $\gamma$  産生調節はこの経路を介する可能性があり、ストレスと自然免疫系を解析する上で今後の重要な研究課題であろう。

IL-2 存在下における MOTN-1 細胞の IFN- $\gamma$  産生が、 $\beta$ -endorphin により二相性に調節を受けること (Fig. 4) も 24 時間における一過性の抑制は KOR 依存性であり、48 時間において再び産生が誘導されるのは OOR を介する可能性があり、現在レセプター特異的な複数のアンタゴニストにより更に解析を進めている。また、CD56 陽性の NK 細胞自体が pro-opio-melanocortin (POMC) とそのレセプターを発現するという報告や<sup>36)</sup>、 $\beta$ -endorphin を産生するという報告がある<sup>37)</sup>。胎盤絨毛細胞が産生する  $\beta$ -endorphin は生物活性の弱い N-acetyl 型が主体であることから、脱落膜免疫細胞相互においてオピオイドシステムが autocrine もしくは paracrine に機能している可能性がある。

謝辞 本研究の遂行に起きまして、ELISPOT 測定 of the 技術面で多大なご協力をいただきました 右高 宙氏 (Carl Zeiss Japan) ならびに岡田 篤氏 (ミネルヴァテック株式会社) に厚く御礼申し上げます。また、統計解析におきましては、懇切なご指導を賜りました日本大学医学部衛生学教室助教授 平柳 要先生に厚く御礼申し上げます。

#### 文 献

- 1) Chamandari E, Tsigos C, Chrousos G. Endocrinology of the stress response. *Annu Rev Physiol* 2005; **67**: 259–284.
- 2) Kusnecov AW, Husband AJ, King MG, et al. In vivo effects of beta-endorphin on lymphocyte proliferation and interleukin 2

- production. *Brain Behav Immun* 1987; **1**: 88–97.
- 3) Van den Bergh, P Rozing J, Nagelkerken L, et al. Two opposing modes of action of beta-endorphin on lymphocyte function. *Immunology* 1991; **72**: 537–543.
- 4) Puppo F, Corsini G, Mangini P, et al. Influence of beta-endorphin on phytohemagglutinin-induced lymphocyte proliferation and on the expression of mononuclear cell surface antigens in vitro. *Immunopharmacology* 1985; **10**: 119–125.
- 5) Panerai AE, Manfredi B, Granucci F, et al. The  $\beta$ -endorphin inhibition of mitogen-induced splenocytes proliferation is mediated by central and peripheral paracrine/autocrine effects of the opioid. *J Neuroimmunol* 1995; **58**: 71–76.
- 6) Stefano GB, Burrill JD, Labur S, et al. Regulation of various genes in human leukocytes acutely exposed to morphine: expression microarray analysis. *Med Sci Monit* 2005; **11**: MS35–42. Epub
- 7) Liang-Suo J, Gomez-Flores R, Weber RJ. Immunosuppression induced by central action of morphine is not blocked by mifepristone (RU 486). *Life Sci* 2002; **71**: 595–602.
- 8) Halford WP, Gebhardt BM, Carr DJ. Functional role and sequence analysis of a lymphocyte orphan opioid receptor. *J Neuroimmunol* 1995; **59**: 91–101.
- 9) Ng ML, Healy DL, Rajna A, et al. Presence of pro-opiomelanocortin peptides and corticotropin-releasing factor in human placenta Malays. *J Pathol* 1996; **18**: 59–63.
- 10) Grigorakis SI, Anastasiou E, Dai K, et al. Three mRNA transcripts of the proopiomelanocortin gene in human placenta at term. *Eur J Endocrinol* 2000; **142**: 533–536.
- 11) van den Heuvel MJ, Chantakru S, Xuemei X, et al. Trafficking of circulating pro-NK cells to the decidualizing uterus: regulatory mechanisms in the mouse and human. *Immunol Invest* 2005; **34**: 273–293.
- 12) Tsuda H, Sakai M, Michimata T, et al. Characterization of NKT cells in human peripheral blood and decidual lymphocytes. *Am J Reprod Immunol* 2001; **45**: 295–302.
- 13) Hayakawa S, Saito S, Nemoto N, et al. Expression of recombinase-activating genes (RAG-1 and 2) in human decidual mononuclear cells. *J Immunol* 1994; **153**: 4934–4939.
- 14) Mincheva-Nilsson L. Reprod Pregnancy and gamma/delta T cells: taking on the hard questions. *Biol Endocrinol* 2003; **1**: 120.
- 15) Vince GS, Johnson PM. Leucocyte populations and cytokine regulation in human uteroplacental tissues. *Biochem Soc Trans* 2000; **28**: 191–195.
- 16) Vince GS, Johnson PM. Biochem Soc Trans. Leucocyte populations and cytokine regulation in human uteroplacental tissues. 2000; **28**: 191–195.
- 17) Matsuo Y, Drexler HG, Takeuchi M, et al. Leuk Res. Establishment of the T-cell large granular lymphocyte leukemia cell line MOTN-1 carrying natural killer-cell antigens. 2002; **26**: 873–879.
- 18) Yagita M, Huang CL, Umehara H, et al. A novel natural killer cell line (KHYG-1) from a patient with aggressive natural killer cell leukemia carrying a p53 point mutation. *Leukemia* 2000; **14**: 922–930.
- 19) Mayer P, Tischmeyer H, Jayasinghe M, et al. A delta opioid receptor lacking the third cytoplasmic loop is generated by atypical mRNA processing in human malignomas. *FEBS Lett* 2000; **480**: 156–160.
- 20) Shunji Suzuki, Linda F. Chuang, Roy H. Doi, et al. Kappa-opioid receptors on lymphocytes of a human lymphocytic cell line: morphine-induced up-regulation as evidenced by com-

- petitive RT-PCR and indirect immunofluorescence. *International Immunopharmacology* 2001; **1**: 1733–1742.
- 21) Hsueh CM, Chen SF, Huang HJ, et al. Activation of mu-opioid receptors are required for the conditioned enhancement of NK cell activity. *Brain Res* 1996; **737**: 263–268.
  - 22) Kalyuzhny AE. Chemistry and biology of the ELISPOT assay. *Methods Mol Biol* 2005; **302**: 15–31.
  - 23) Matijevic M, Urban RG Use of interferon-gamma ELISPOT in monitoring immune responses in humans. *Methods Mol Biol* 2005; **302**: 237–252.
  - 24) Taylor JW, Kaiser ET. Opioid receptor selectivity of peptide models of beta-endorphin. *Int J Pept Protein Res* 1989; **34**: 75–80.
  - 25) Gonsky R, Deem RL, Bream J, et al Enhancer role of STAT5 in CD2 activation of IFN-gamma gene expression. *J Immunol* 2004; **173**: 6241–6247.
  - 26) McCain HW, Lamster IB, Bozzone JM, et al. Beta-endorphin modulates human immune activity via non-opiate receptor mechanisms. *Life Sci* 1982; **31**: 1619–1624.
  - 27) Madden JJ, Whaley WL, Ketelsen D, et al. The morphine-binding site on human activated T-cells is not related to the mu opioid receptor. *Drug Alcohol Depend* 2001; **62**: 131–139.
  - 28) Cadet P, Mantione KJ, Stefano GB. Molecular identification and functional expression of mu 3, a novel alternatively spliced variant of the human mu opiate receptor gene. *J Immunol* 2003; **170**: 5118–5123.
  - 29) Sharp BM, Li MdD, Matta Sg, et al. Expression of delta opioid receptors and transcripts by splenic T cells. *Ann NY Acad Sci* 2000; **917**: 764–770.
  - 30) Alicea C, Belkowski S, Eisenstein TK, et al. Inhibition of primary murine macrophage cytokine production in vitro following treatment with the kappa-opioid agonist U50, 488H. *J Neuroimmunol* 1996; **64**: 83–90.
  - 31) House RV, Thomas PT, Bhargava HN. Neuropeptides. In vitro exposure to peptidic delta opioid receptor antagonists results in limited immunosuppression 1997; **31**: 89–93.
  - 32) Chan WL, Pejnovic N, Liew TV. NKT cell subsets in infection and inflammation. *Immunol Lett* 2003; **85**: 159–163.
  - 33) Borzychowski AM, Croy BA, Chan WL, et al. Changes in systemic type 1 and type 2 immunity in normal pregnancy and pre-eclampsia may be mediated by natural killer cells. *Eur J Immunol* 2005; **30**:
  - 34) Gollob JA, Veenstra KG, Jyonouchi H, et al. Impairment of STAT activation by IL-12 in a patient with atypical mycobacterial and staphylococcal infections. *J Immunol* 2000; **165**: 4120–4126.
  - 35) Kathy S Wang, David A Frank, Jerome Ritz. Interleukin-2 enhances the response of natural killer cells to interleukin-12 through up-regulation of the interleukin-12 receptor and STAT4. *Blood* 2000; **10**: 3183–3190.
  - 36) Andersen GN, Hagglund M, Nagaeva O, et al. Quantitative measurement of the levels of melanocortin receptor subtype 1, 2, 3 and 5 and pro-opio-melanocortin peptide gene expression in subsets of human peripheral blood leucocytes. *Scand J Immunol* 2005; **61**: 279–284.
  - 37) Ebina T, Ogama N, Shimanuki H, et al. Effector mechanism and clinical response of BAK (BRM-activated killer) immunocell therapy for maintaining satisfactory QOL of advanced cancer patients utilizing CD56-positive NIE (neuro-immune-endocrine) cells. *Microbiol Immunol* 2001; **45**: 403–411.

## HIV 垂直感染と胎盤関門

相澤(小峯)志保子\* 早川 智\* 長縄 聰\*

永石(石井)真木\*\* 本多三男† 砂川恵伸†† 根本則道††

HIV 感染妊婦における胎児、新生児に対する垂直感染の予防は人類保健上重要な課題の1つである。国際連合エイズ委員会の推定では、2004年1年間だけでも全世界で60万人の小児がエイズに感染し、その大部分は垂直感染によるとされている。無治療の場合、小児エイズの予後は不良であることから、早急な対策が必要である。先進国においては、HIV 陽性妊婦は妊娠中の抗ウイルス薬の投与と選択的帝王切開により垂直感染率を1%以下にまで下げることが可能となっている。しかしながら、南アジアやアフリカにおける無治療妊婦でも垂直感染の程度は25~35%程度であり、不完全ながら胎盤関門が存在すると考えられている。また、脱落膜・胎盤における局所の免疫機構が子宮内感染の成立を左右するうえで重要な役割を果たしている。

## はじめに

HIV 感染による AIDS は 20 世紀における新興感染症のなかで、最も感染者が多く、また致命率の高い疾患のひとつである。CCR 5Δ32 などきわめてまれな遺伝的背景を有する場合や、さらにまれな特異的免疫が成立する場合を除き、無治療で放置すれば、数年から十年程度で免疫機能の荒廃か

ら日和見感染をきたして死に至る。わが国における HIV 感染者は諸外国に比較して少数であるが、先進国のなかで唯一、依然として増加傾向にあり、今後生殖年齢に達する HIV 感染女性の数も増加することが予想される。したがって HIV 垂直感染機構の解析は生殖免疫学のみならず臨床的にも非常に重要である。

## 1. HIV 垂直感染の管理

臨床的には、妊娠中の抗 HIV 薬の内服、陣痛発来前の選択的帝王切開術、断乳(人工栄養)により HIV の垂直感染率は1%以下に抑えることが可能である<sup>1)</sup>。厚生労働省研究班の作成した管理方針は、抗 HIV 薬の選択などは米国疾病予防管理センター(CDC)の基準に準拠しながら、わが国の実情を加味したものである(図1)。詳細はインターネットからダウンロード可能であるが<sup>2)</sup>、わが国においては、妊婦検診における HIV 抗体スクリーニングのほぼ全数検査(2005年の検査実施率94.7%)と、感染が疑われた場合の二次施設へ

## 〔キーワード〕

HIV  
AIDS  
胎盤関門  
垂直感染  
局所免疫

\* AIZAWA (KOMINE) Shihoko, HAYAKAWA Satoshi, NAGANAWA Satoshi/日本大学医学部先端医学講座・感染制御科学部門

\*\* NAGAISHI (ISHII) Maki/日本大学医学部産婦人科学教室

† HONDA Mitsuo/Vaccine Research Center/NIAID/NIH

†† SUNAGAWA Keishin, NEMOTO Norimichi/日本大学医学部病理学教室

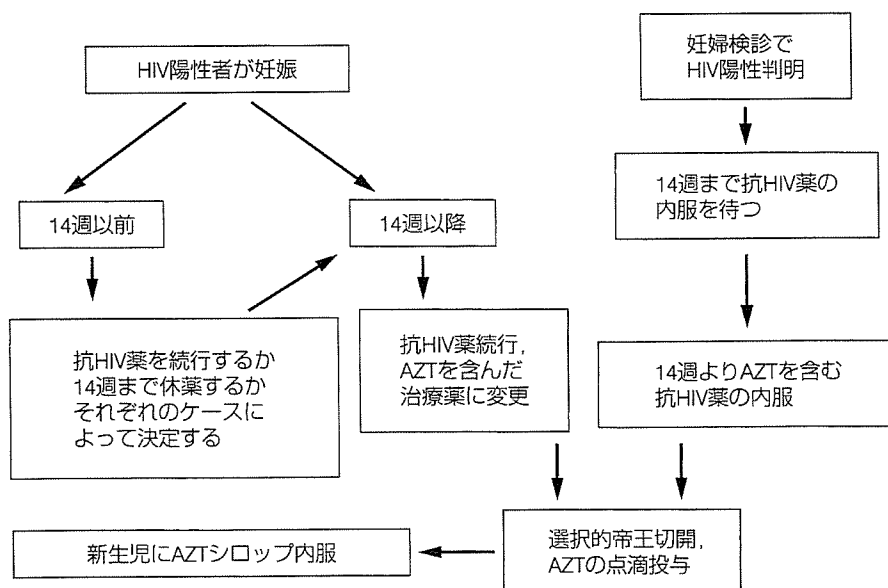


図 1. HIV 陽性妊婦の管理方針

の転送と妊娠・分娩管理により、世界で最高の予防率を達成しているといっても過言ではない。しかし、いかに厳重な産科管理をおこなっても子宮内感染を完全に防御することは困難である。臨床的には、患者の末梢血 CD4 値の低下や HIV ウイルス量の増加に加えて、絨毛羊膜炎や切迫流早産、妊娠高血圧症候群、マラリア感染<sup>3)</sup>(日本ではまずみられないが)などがあると子宮内感染率が高まるといふ。

HIV の治療薬は大なり小なり、胎児に対する副作用を有する。アジドチミジン(AZT)は小児の就学期までの安全性が確認されている唯一の抗 HIV 薬であり、数年前までは妊婦に対しては AZT の単独療法が推奨されていた。しかし、現在では耐性ウイルス出現の危険性も高く、また多剤併用療法(HAART)と比較して母体のウイルス量を十分に下げることが困難であるため、母体に対する治療として推奨されるとはいえない。一方、HAART に使用する抗 HIV 薬は、妊娠中の投与による児の安全性が確認されていないものが多い。催奇形性のあるエファビレンツや乳酸アシドシスをおこしやすいサニルブジン(d 4 T) + ジダノシン(ddI)といった組み合わせは避けるこ

とが望ましい。また、HAART によって早産が増加する危険性や、胎児死亡、骨髄抑制などの重篤な副作用の報告もある。しかし、最近の統計では、HAART の児に対する影響は少なく、一時的な休薬は再開後の母体治療を困難なものとする可能性が指摘されているので、当該妊娠のみならず母体の長期予後を勘案し、十分なインフォームド・コンセントを得たうえで治療薬の選択をおこなう。

Camus らは、HIV 感染者の胎盤では multi-drug resistance 1(MDR-1)mRNA 発現が非感染者に比較して 3~4 倍となることを報告している。胎盤の MDR-1 のコードする P-glycoprotein は HIV 患者に投与されるヌクレオシド系逆転写酵素阻害薬やプロテアーゼ阻害薬の結合蛋白であり、これにより胎盤局所で大部分の抗レトロウイルス薬は不活化されると考えられる<sup>4)</sup>。臨床的に、垂直感染の生じる機会の最も多いのは分娩時の母体血への曝露であり、母体血中のウイルス量を低下させることが最も重要であるという<sup>5)</sup>。これは、経膈分娩を前提とした途上国の多くで投与される、分娩前数週間の short course program の臨床的意義を裏付けるものであろう。

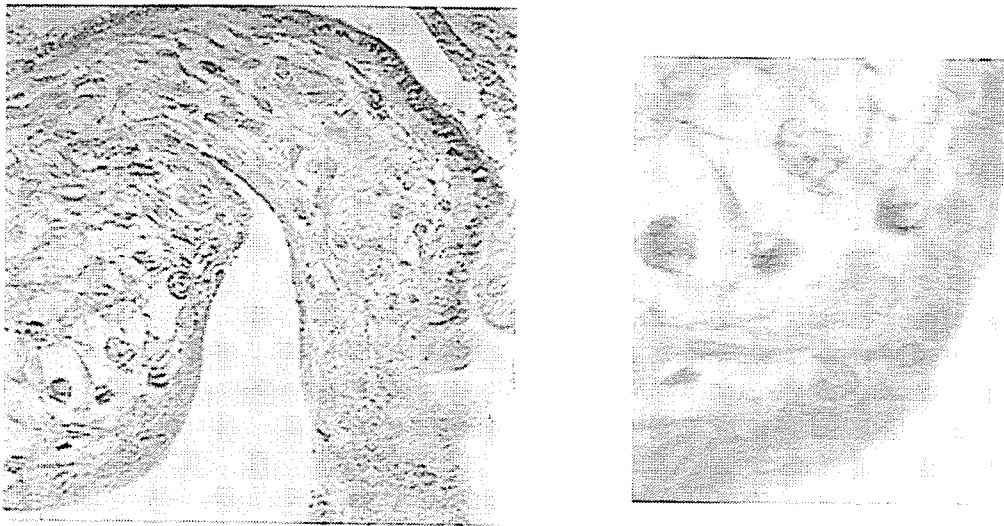


図 2. HIV 陽性妊婦(37 週)の胎盤  
酵素抗体法により, HIVp 24 が染色される(右強拡大).

## 2. 胎盤関門の本態

胎盤には, 胎児循環と母体循環を分別する物理的関門のみならず, Fc $\gamma$  レセプターを介した母体血中の IgG 抗体の胎児側への選択的取り込みや, 母体血中の薬物やホルモンの選択的な取り込み, あるいは局所における分解などをおこなう機能的関門が存在する. HIV 感染者の胎盤を病理組織学的に検討すると, 脱落膜免疫細胞や胎盤の絨毛細胞, Hofbauer 細胞(胎児由来のマクローファージ)に HIV 関連抗原が染色される(図 2). 無治療, あるいは治療が不十分で血中ウイルス量が多い患者では, 十分なコントロールを受けた患者に比較して, より強い染色性がみられる. CD 4 を発現しない絨毛細胞に HIV が感染する機構として, 白血球機能関連抗原(LFA-1)を介したリンパ球と絨毛細胞の直接接触<sup>9)</sup>やトランスサイトーシスが関与するらしい.

われわれ<sup>7)</sup>は, 胎盤絨毛が発生の初期から種々のケモカインレセプターを発現し, ケモカインによってヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)分泌や細胞の増殖といった基本的な機能の調節を受けていることを明らかにした. 同様の所見は Dolcini ら<sup>8)</sup>

や, Maldonado-Estrada ら<sup>9)</sup>により追試証明された. CCR 5 や CXCR 4 はおのおの R 5 ウイルス, X 4 ウイルス感染のコレセプターとして必須のものであり, *in vitro* でも絨毛細胞は CD 4 非依存性に HIV に感染しうること<sup>10)</sup>から, CD 4 非依存性の感染モデルとなると考えられる. しかし, Parry らは初代培養した trophoblast を TNF- $\alpha$  処理すると HIV の侵入が著しく増強するが, これは CD 4 のみならず CCR 5 にも CXCR 4 にも依存しないという知見を発表しており<sup>11)</sup>, 更なる検討が必要である. 絨毛組織内の Hofbauer 細胞は CD 4, CCR 5, CXCR 4 すべて陽性であり古典的経路による感染を説明しやすいが, HIV が母体血中から二重の栄養芽細胞層を乗り越えていきなり Hofbauer 細胞に到達するとは考えがたい.

HIV 陽性妊婦の胎盤では, Moussa らが MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES, IL-6 の発現がコントロールに比較して著しく低下していることを報告している<sup>12)</sup>が, すべての患者が AZT など抗ウイルス薬の投与を受けており, 治療の影響を否定できない. 局所の炎症性サイトカインが栄養膜細胞への感染成立に必須であるとする報告もある<sup>13)</sup>. これら炎症性サイトカインは絨毛羊膜炎で上昇す



ることから、サイトカイン自体の作用というよりも、HIV 垂直感染のリスク因子である絨毛羊膜炎の存在を示唆するものかもしれない。しかし、分娩前に抗生物質で絨毛羊膜炎を治療しても、脱落膜の炎症細胞浸潤の程度や、垂直感染率は変化がみられなかったとする報告もある<sup>14)</sup>。

### 3. 内在性レトロウイルスの意義

ヒトのゲノムには、進化の過程でレトロウイルスが生殖細胞系列の遺伝子内に組み込まれ宿主のゲノムの一部になったいわゆる内在性レトロウイルス (HERVs) が全ゲノムの 10~15% 含まれる。これらの多くは不活性であるが、胎盤や生殖巣では生理的な発現がみられ、胎盤形成や減数分裂に係る未知の生理的意義が示唆される。ヒト胎盤では、syncytiotrophoblast (合胞体栄養細胞層) の形成を担う蛋白 syncytin は HERV-W に由来する<sup>15)</sup> ため、合胞体形成に必須である。

近年、いくつかの実験系において内在性レトロウイルスが外部から侵入するウイルス感染に対して防御因子として作用するのではないかという仮説が提唱されているが<sup>16)</sup>、ヒトにおける実証はほとんどなされていない。最近、Nagy ら<sup>17)</sup> はヒト末梢血に発現する新たな内在性レトロウイルス産物 HRES-1/Rab 4 が HIV-1 Tat の遺伝子導入や HIV 感染によって up-regulation されること、これが HIV gag 24 の転写を抑制し、また CD 4 発現を調節することで HIV の感受性を抑制することを明らかにした。胎盤では HERV-W 以外にも複数の内在性レトロウイルスを発現しており、これが局所の感染制御に作用している可能性がある。

### 4. 胎児・新生児の HIV 感受性と HIV 陽性母から生まれた非感染児の免疫応答

先に述べたように、HIV 陽性母においても子宮内で胎児に感染することは少ない。むしろ、HIV 陽性妊婦より生まれた新生児では本人が HIV に感染していないにもかかわらず、HIV に対する細

胞性免疫応答が誘導されていることが多い<sup>18)~20)</sup>。かつては、胎児の免疫系は未熟で子宮内で曝露された抗原に対しては寛容になると信じられていたが、これは二卵性双胎やウシの free-martin など特殊な場合であり、子宮内でのウイルス感染に対しても CD 8 細胞を主体とする免疫応答が生じることが明らかとなった<sup>21)</sup>。

近年 PCR を使った研究により、母体と胎児の循環はかつて考えられていたほど完全には分離しておらず、少量の血球細胞が行き来していること (microchimerism) が明らかになってきた。実際、HIV 陽性 (無治療) の母親から 36 週で経膈分娩した男児が新生児期に子宮内感染を確認されたにもかかわらず、HIV に対する非常に強い CTL 活性が誘導され無治療で月齢 12 ヶ月にはウイルスが消失した症例が報告されている<sup>22)</sup>。おそらく、胎児は 280 日の妊娠経過中に何度も少量の HIV ウイルス粒子や HIV 感染細胞の侵入を受けているに違いないが、これを防御する機構が存在すると考えられる。われわれは当初、臍帯血リンパ球は HIV 感染に対して抵抗性があるのではないかと考え *in vitro* でウイルスをチャレンジしたが、成人と差がみられなかった。臍帯血清と臍帯単核球、成人血清と成人末梢血リンパ球を組み合わせを変えて検討したがいずれにおいてもウイルス複製に差を認めず、臍帯血自体の HIV 感受性が低いという仮説は成立しない。Sundaravaradan ら<sup>23)</sup> は、臍帯血リンパ球、マクロファージを *in vitro* で HIV 処理すると成人末梢血に比較してはるかに感受性が高いことを示し、これは、HIV レセプターである CD 4 やコレセプターである CXCR 4、CCR 5 の発現レベルの差ではなく、HIV-1 LTR の転写亢進によるものであるとしている。臍帯血中の PLAP を指標として母体から胎児への microtransfusion の量を定量すると、一定量以上の母体血が胎児循環内に入れば垂直感染が成立するという<sup>24)</sup>。おそらく、胎児は一定量までのウイルスや感染細胞の侵入には耐性であっても、

マラリア感染や絨毛羊膜炎、切迫早産、妊娠高血圧症候群などで胎盤関門が破綻し、許容量を超えた HIV が進入した場合には子宮内感染を避け得ないのであろう。HIV 陽性母から出生した児の臍帯血において、感染が成立していない場合は、HIV-1 env 抗原に対するヘルパー T 細胞応答やβケモカイン産生を認めるが、感染をきたした児の場合にはこれが認められないことから、子宮内で HIV に対する有効な免疫応答を誘導できるか否かが垂直感染の成立に重要な要因と考えられる<sup>25)</sup>。また、HIV に対する細胞性免疫応答を獲得した児は産道感染や、母乳を介した感染にも抵抗性であるという<sup>26)</sup>。

Biggar ら<sup>27)</sup>は、HIV 陽性の母から出生した胎児が男児の場合、女児にくらべて子宮内感染の比率が有意に少ないことから、Y 染色体に連鎖した組織適合性抗原の認識が重要ではないかという仮説を提唱している。母児双方の HLA ハプロタイプの組み合わせや、ウイルス抗原のバリエーションにより胎児側の免疫応答の質と程度に相違を生じる可能性がある。

## 5. ウイルス側の要因

Wolinsky らは垂直感染をきたすウイルスは母体内に多数存在する HIV サブクローンのなかでもきわめてかぎられた変異株にすぎないという報告をしているが<sup>28)</sup>、わが国においても HIV 垂直感染の成立した 8 例のうち 6 例は V3 ループの 29D が N に置換していた<sup>29)</sup>。さらに 66 例の HIV 垂直感染症例を検討したところ、母体内 HIV の集団は様々なサブタイプ(A, B, B', D, E)が混在するが、新生児においては B, D のみが存在していた。さらに個々の症例内でも、母親血中には多数のウイルスクローンが存在するのに対して、感染した児の HIV-1 はほぼ単独もしくはきわめて少数のクローンであることから、母体に感染した HIV は変異を繰り返し、そのごく一部が胎児・新生児に感染すると考えられる<sup>30)</sup>。この現象がウイルス

の性状に相違によるものかそれとも単に感染効率がきわめて低い事実の反映であるのかは現在検討中であるが、日本では垂直感染症例がほとんどないこともあり十分な結論を得ることは困難である(外国の研究者と話す時に“fortunately as a clinician but unfortunately as a researcher”というのが早川の口癖である)。

## おわりに

### 何が胎児を免疫するのか

脱落膜は子宮内膜間質が妊娠に伴う高エストロゲン・高プロゲステロン環境によって変化したものである。リンパ球、マクロファージ、樹状細胞など多くの免疫細胞が集簇するが、その主体をなすものは CD 56 陽性の未熟な NK 細胞(dNK 細胞)と NKT 細胞である。これらの細胞の性状と内分泌支配については本特集の真島洋子の稿に詳しいが、われわれはこれらの細胞群の HIV 垂直感染に及ぼす影響を現時点における研究の主要テーマの 1 つにしている。

NK 細胞は HIV 感染細胞を破壊するのみならず、複数の CC ケモカインを産生して感染を抑制する<sup>31)</sup>。一方、HIV に対して感受性であり、潜伏感染をきたすことによって HIV の reservoir となる可能性が指摘されている<sup>32)</sup>。同様に NKT 細胞も HIV に高い感受性を有する<sup>33)</sup>。筆者らは樹立 NK 細胞株における HIV 複製が培養条件や液性因子によって調節を受けることを明らかにした(投稿中)。HIV に感染し、抗原を提示しながら複製できない母体側細胞が胎児側に侵入することで胎児に HIV に対する有効な免疫応答が生じているとすれば、“natural vaccine”となっている可能性があり、現時点ではいささか手詰まりとなっている HIV ワクチン開発に新たな展開を期待できるのではないかと考えている。

## 文献

- 1) Read JS *et al* : Efficacy and safety of cesarean

- delivery for prevention of mother-to-child transmission of HIV-1. *Cochrane Database Syst Rev* **19** : CD 005479, 2005
- 2) [http://api-net.jfap.or.jp/mhw/survey/05nenpo/nenpo\\_menu.htm](http://api-net.jfap.or.jp/mhw/survey/05nenpo/nenpo_menu.htm)
  - 3) Whitty CJ *et al* : Malaria in pregnancy. *BJOG* **112** : 1189-1195, 2005
  - 4) Camus M *et al* : Increased expression of MDR1 mRNAs and P-glycoprotein in placentas from HIV-1 infected women. *Placenta* **27** : 699-706, 2006
  - 5) Mock PA *et al* : Maternal viral load and timing of mother-to-child HIV transmission, Bangkok, Thailand. Bangkok Collaborative Perinatal HIV Transmission Study Group. *AIDS* **13** : 407-414, 1999
  - 6) Arias RA *et al* : Transmission of HIV-1 infection between trophoblast placental cells and T-cells take place via an LFA-1-mediated cell to cell contact. *Virology* **307** : 266-277, 2003
  - 7) Ishii M *et al* : Expression of functional chemokine receptors of human placental cells. *Am J Reprod Immunol* **44** : 365-373, 2000
  - 8) Dolcini G *et al* : Cell-free HIV type 1 infection is restricted in the human trophoblast choriocarcinoma BeWo cell line, even with expression of CD 4, CXCR 4 and CCR 5. *AIDS Res Hum Retroviruses* **19** : 857-864, 2003
  - 9) Maldonado-Estrada J *et al* : Predominant intracellular expression of CXCR 4 and CCR 5 in purified primary trophoblast cells from first trimester and term human placentae. *Am J Reprod Immunol* **50** : 291-301, 2003
  - 10) Al-Harhi L *et al* : Trophoblasts are productively infected by CD 4-independent isolate of HIV type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses* **18** : 13-17, 2002
  - 11) Parry S *et al* : Transcytosis of Human immunodeficiency virus 1 across the placenta is enhanced by treatment with tumour necrosis factor alpha. *J Gen Virol* **87** : 2269-2278, 2006
  - 12) Moussa M *et al* : Placental cytokine and chemokine production in HIV-1-infected women : trophoblast cells show a different pattern compared to cells from HIV-negative women. *Clin Exp Immunol* **125** : 455-464, 2001
  - 13) Zachar V *et al* : Role of placental cytokines in transcriptional modulation of HIV type 1 in the isolated villous trophoblasts. *AIDS Res Hum Retroviruses* **18** : 839-847, 2002
  - 14) Goldenberg RL *et al* ; HPTN 024 Study Team : HPTN 024 study : histologic chorioamnionitis, antibiotics and adverse infant outcomes in a predominantly HIV-1-infected African population. *Am J Obstet Gynecol* **195** : 1065-1074, 2006
  - 15) Mi S *et al* : Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature* **403** : 785-789, 2000
  - 16) Ponferrada VG *et al* : The envelope glycoprotein of human endogenous retrovirus HERV-W induces cellular resistance to spleen necrosis virus. *Arch Virol* **148** : 659-675, 2003
  - 17) Nagy G *et al* : Regulation of CD 4 expression via recycling by HRES-1/RAB 4 controls susceptibility to HIV infection. *J Biol Chem*, 2006 ; [Epub ahead of print]
  - 18) Rowland-Jones SL *et al* : HIV-specific cytotoxic T-cell activity in an HIV-exposed but uninfected infant. *Lancet* **341** : 860-861, 1993
  - 19) Cheynier R *et al* : Cytotoxic T lymphocyte responses in the peripheral blood of children born to human immunodeficiency virus-1-infected mothers. *Eur J Immunol* **22** : 2211-2217, 1992
  - 20) Aldhous MC *et al* : Cytotoxic T lymphocyte activity and CD 8 subpopulations in children at risk of HIV infection. *Clin Exp Immunol* **97** : 61-67, 1994
  - 21) Marchant A *et al* : Mature CD 8<sup>+</sup>T lymphocyte response to viral infection during fetal life. *J Clin Invest* **111** : 1747-1755, 2003
  - 22) Bryson YJ *et al* : Clearance of HIV infection in a perinatally infected infant. *N Engl J Med* **332** : 833-838, 1995
  - 23) Sundaravaradan V *et al* : Differential HIV-1 replication in neonatal and adult blood mononuclear cells is influenced at the level of HIV-1 gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* **103** : 11701-11706, 2006
  - 24) Kwiek JJ *et al* : Maternal-fetal microtrans-

- fusions and HIV-1 mother-to-child transmission in Malawi. *PLoS Med* **3** : e 10, 2006
- 25) Wasik TJ *et al* : Protective role of  $\beta$ -chemokines associated with HIV-specific Th responses against perinatal HIV transmission. *J Immunol* **162** : 4355-4364, 1999
- 26) Kuhn L *et al* : T-helper cell responses to HIV envelope peptides in cord blood : protection against intrapartum and breast-feeding transmission. *AIDS* **15** : 1-9, 2001
- 27) Biggar RJ *et al* : Higher in utero and perinatal HIV infection risk in girls than boys. *J Acquir Immune Defic Syndr* **41** : 509-513, 2006
- 28) Wolinsky SM *et al* : Selective transmission of human immunodeficiency virus type-1 variants from mothers to infants. *Science* **255** : 1134-1137, 1992
- 29) Yoshino N *et al* : Vertical transmission of human immunodeficiency virus type 1 in Japan, 1989-1997 : presence of two subtypes B and E with subtype E predominance. National Cooperative Study Investigators on Vertical Transmission of HIV-1. *Acta Paediatr Jpn* **40** : 503-509, 1998
- 30) Hara T *et al* : Presence of multiple HIV type 1 subtypes among mothers and children in Japan. *AIDS Res Hum Retroviruses* **17** : 569-575, 2001
- 31) Fauci AS *et al* : NK cells in HIV infection : paradigm for protection or targets for ambush. *Nat Rev Immunol* **5** : 835-843, 2005
- 32) Valentin A *et al* : Persistent HIV-1 infection of natural killer cells in patients receiving highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* **99** : 7015-7020, 2002
- 33) Moutsinger A *et al* : CD1d-restricted human natural killer T cells are highly susceptible to human immunodeficiency virus 1 infection. *J Exp Med* **195** : 869-879, 2002