

図2 体外受精・胚移植のプログラム

		運動率(%)
凍結前		71 ± 7.8%
融解後		55 ± 6.0%
等張化	Hanks 液	12 ± 3.3%
	等張化保護剤	47 ± 8.2%

図3 精子凍結、融解、保護剤除去による精子運動率の変化

## 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

五味淵秀人 国立国際医療センター産科医長  
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。その結果、本法施行の賛成意見 63.2%、反対意見 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。すでに本法は 4 施設で計 4 例に行われていたが、施行に当たっての条件や方法などに検討すべき課題があった。この平成 18 年度の検討をふまえ、1) HIV 感染の観点から妊娠分娩が許容できる状態であり、妊娠後も適切、十分な管理が受けられること。2) 生殖医療の観点から人工授精によって妊娠が期待できる状態であること。3) 夫婦個々に育児を希望しており、その後の児の養育が可能であること、などの条件を含めたガイドライン（案）を作成した。

また、患者支援の観点からの検討については、20-30 代の出産歴のない HIV 陽性女性 10 名について対面式による調査を行った。人工授精が感染回避に重要であることは理解できるものの、妊娠の希望があっても人工授精に抵抗を感じていることがわかった。

### 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いる昨今だが、わが国では生殖年齢にある HIV 感染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のガイドラインを試案することを目的とした。

## B. 研究方法

平成 18 年度に行ったアンケート調査結果を解析し、国立国際医療センターでの基準をもとにガイドラインの作成を行った。

また、患者支援の観点からの検討については、20～30 代の出産歴のない HIV 陽性女性 10 名について対面式による調査を行った。

## C. 研究結果

夫精液を用いた人工授精施行にあたって満たす必要があると考える。

### 施行のための手引き（案）

1. 現在無症状で AIDS を発症しておらず、長期存命の可能性が十分ある。血中ウイルス量は問わないが、CD4 値は 200 以上とする。
2. 夫は HIV 陰性である。
3. 婚姻している夫婦で、かつ、子の養育が可能である。
4. 不妊スクリーニング検査に異常がなく、人工授精によって妊娠が可能と考えられる。また、妊娠成立後においても問題となる産婦人科的異常がない。不妊症スクリーニング検査としては、卵管通気検査（或は、子宮卵管造影）、超音波、ホルモン検査、精液検査を行う。また、細胞診、他の感染症検査、筋腫や卵巣嚢腫などの有無は超音波にて確認し、必要があれば治療を行っておく。夫に関しても HIV 陰性とともにも B 型肝炎などの感染症についても検索しておく

必要がある。

5. 施行する施設は自院において HIV 陽性者の分娩取り扱いの既に経験を有していることが望ましい。人工授精はパートナーへの感染を防ぐことが目的であって、母子感染を防ぐ物ではない。よって、妊娠後は十分な周産期管理を必要とする。
6. 施行にあたっては、院内倫理委員会の承諾を受けておくことが望ましい。
7. 夫婦個別の希望確認と同意書をとる必要がある。すでに抗ウイルス薬による治療を開始されている場合は、薬剤の選択について十分に検討しなければならない。しかし、現時点で胎児への影響が少ないとされている薬剤についても児への影響が全くないことは証明されていないため十分な説明と了承を得ておく必要がある。
8. 施行にあたっては、症例毎に関連各科での協議する場を設け、十分な検討を行う必要がある。
9. 施行にあたっては、患者へのカウンセリングと看護支援が必要である。必ずしも 1 回の人工授精で妊娠成立せず長時間を要することがあり、不妊症におけるカウンセリング同様十分な配慮と理解が必要である。

患者支援の観点からの検討については、20～30 代の出産歴のない HIV 陽性女性 10 名について対面式による調査を行った。人工授精が感染回避に重要であることは

理解できるものの、妊娠の希望があっても人工授精に抵抗を感じていることがわかった(表)。

## 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。その結果、235施設から回答(回答率71.9%)であった。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する。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。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。

その一方で、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。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。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。

国立国際医療センターにおいては、院内倫理委員会の承認を得て本法を既に施行し妊娠分娩例をえているため、これを基本としてガイドラインの試案をこころみた。今後は、この基準をもとに複数の施設で本法が行われることができるよう知らしめる必要があると考えられた。

## 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) 施行に当たった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広報していく必要があると考えられた。

分担班研究名

「HIV 経胎盤・母乳感染メカニズムの解明に関する免疫・ウイルス学的研究」

課題1：HIV 陽性母乳の加熱不活化についての研究

－ 簡易に行える固形アルコール燃料の使用法：ウイルス不活化の前実験 －

分担研究者：	牛島廣治	鹿児島国際大学・教授
研究協力者：	山本直彦	名古屋大学環境医動物・助教授
	沖津祥子	藍野学院短期大学・講師
	清水優子	鹿児島国際大学・研究補助員
	早川有子	群馬パース大学・准教授
	一杉定恵	元東京大学・研究補助員

研究要旨：

アルミ缶を用いたコンロ、ナベと固形アルコール燃料を用いて母乳の不活化を試みた。10g の燃料で母乳 200ml を 70℃ に温度上昇が可能であった。50ml で 4 回分の Flash heating も可能であった。いずれの方法にしても総計 15 分ぐらいで終わった。都市ガスが 0.1 円で出来るのに比べ固形燃料は 7 円と高いが国際協力としては可能であると考えられた。文献では HIV の不活化がこの温度で可能とされている。今後 HIV の不活化を試してみる。

A 目的：HIV の母子感染は途上国において大きな問題である。その中で母乳を介しての感染があり調整粉乳使用が望ましいが、調整粉乳には免疫物質が含まれていない、購入金が必要、溶かす水の衛生状態、溶かし方の知識が問題になっており、WHO は現時点では途上国において調整粉乳より母乳を勧めている。しかしながら HIV 感染母乳を介しての児への感染があることから、母乳を何らかの方法でウイルスを除去あるいは不活化して児に与えることが望ましい。

ウイルスの不活化には加熱が簡単であるが、母乳の免疫成分、栄養成分を損なわないことが大切である。Flash heating 法は 65-70℃ の温度に短い時間母乳を加熱し、なるべく早く常温に戻す方法である。

ここでは、Flash heating 法を用いて災害時の避難地などで電気やガスがない場所に簡単に行うための固形燃料を使用する方法を述べる。勿論、ガスなどの設備があればより容易に行える。次の 3 点について述べる。①通常のコロ、ナベなどの容器の代わりにアルミ缶を再利用したコロ、ナベの方法、②燃料としてのアルコール固形燃料の量、母乳の量と温度変化 ③一定の固形燃料で 70℃ 以上に何回繰り返し 50ml を上昇できるかを見た。

B 材料と方法：

1) アルミ缶を使ったコロ、ナベの作成は、災害時のコロ、ナベを用いた飯の炊き方を参考にして行った。即ちナベは市

販のアルミ缶の飲み物容器（350ml）をそのまま用い、コンロ用は缶切りで上ぶたをくりぬき、側面の上下端2つずつ四角い（高さ 1.5×横 3cm）空気穴を作り空気が通るように工夫した。ナベ用缶にサンプルを入れ、コンロ用缶に固形燃料を入れ重ねた。

2) 固形燃料（主成分メタノール、アルミ箔付）（㈱ニチネン） 10g（φ28mm×H21mm）（表面積 615.8mm<sup>2</sup>）と 15g（φ37.5mm×H16.5mm）（表面積 1104.5mm<sup>2</sup>）を用いた。10、15gの固形燃料で70・80℃を目安とし、200mlの温度変化をみた。また10g5g、4g、3gで50mlの母乳の温度上昇とその変化を、また10gで何回50mlを70℃以上にもっていけるかを見た。

3) 母乳は群馬パーツ大学での倫理委員会の承認ならびに提供者からの承諾を得た。

#### C 結果：

1) 10g および 15g の固形燃料を用いた場合母乳 200ml では 15g では 80℃まで 10g では 70℃までしか上がらなかった。しかも燃料が使い切る 15分の時点である。温度曲線はややゆっくりと立ち上がり温度が下がるのに時間がかかった。

2) 50ml の母乳を用い 10g の固形燃料を表面積を変えずに半分量（5g）にした場合は 3分で 80℃を越えた。しかし 4g,3g とするとそれぞれ 3分で 75℃、70℃になった。また 5分で 80℃、75℃となった。それ以上の温度にはならなかった。温度曲線は flash heating に合致した（急激に立ち上がり、火を止めると速やかに下がる）。

3) 50ml の母乳で 70℃を越えると次のナベに代え、即ち 10g の固形燃料で何回

70℃にもっていけるか調べたところ 4回、即ち 200ml が可能であった。最高温度は 1個 10g の燃料で 200ml 全量を暖めた 70℃と同様の結果であるが、温度変化は 50ml で 4回の方が flash heating の状態を示した。

#### D 考察：

この実験を行う前に前実験として 2種類の市販のアルコールランプと固形燃料での母乳の温度の上がり方を調べた。固形燃料の方が発火する面積が大きいためか温度の上がり方が早かった。ビーカーに母乳を入れた場合とアルミ缶に入れた場合との比較ではアルミ缶の方が温度の上昇は良かった。また、母乳とミルクの比較では母乳の方が僅かだが早く温度の上昇が見られたが、優位な差はなかった。

燃料費に関しては、この温度に上げるためには自宅でのガスの方がはるかに安い、固形燃料 10g の場合は 7円程度である。因みに都市ガスを例とすると、ガス 1m<sup>3</sup> 当たり 45MJ である。これは 10750kcal に相当する。200ml（あるいは 50ml の水、4回）を 50℃上昇させるには 10kcal 必要で、1m<sup>3</sup> のガスでは 1075回が可能となる。一方 1m<sup>3</sup> 当たり 141.96円であるため 200ml を加熱するコストは 141.96円/1075回は 0.132円/回である。即ち都市ガスで水 200ml（50ml、4回）を 20℃から 70℃〔50℃上昇〕にする時のコストは 1回当たり約 0.1円である。費用については開発途上国等では援助として持ち込むことが可能であろう。

中間報告として簡易に行える固形アルコール燃料の使用法をウイルス不活化の前実験



として行った。今後 HIV を加えて不活化を逆転写酵素活性で調べる予定である。

文献によると南アフリカで84人のHIV陽性母親から母乳を得、逆転写酵素活性を見たところ31% (26/84) が陽性であった。Flash heating 法で加熱を行うと栄養、免疫物質の損傷が少なく HIV は逆転写酵素活性では消失した。文献の実験では Cell free のウイルスを用いたが、Cell associated virus も検討する必要があるとしている (Israel-Ballard K et al. Flash-heat inactivation of HIV-1 in human milk. *J Acquir Immune Defic Syndr* 45: 318-323, 2007)。この文献は同じ Flash heating 法としても我々とは異なり、急激にガスバーナーで 100°C に持っていき、母乳の温度が上がったら急に冷やす方法である。我々の方法は、被災地および避難地でも行える方法である。勿論ガスバーナーが使えれば以前の論文でも良い。

現在、我々の方法で Free の HIV の不活化が可能であるか実験を行っているところである。予備実験としてコバスアンプリコア HIV-1 モニター高感度 PCR 法 (ロッシュダイアグノスティック)、T-tropic HIV, M-tropic HIV, Drug-resistant HIV を用い 56°C, 6分(flash heat)で行ったところ HIV 遺伝子の増幅は見られなかった。

E 結論: 固形アルコール燃料とアルミ缶を利用したコンロとナベとを用いて母乳の加熱条件を調べた。200ml の母乳を 10g の固形燃料で 70°C 以上にすることが出来た。50ml で 4 回の flash heating も可能であった。都市ガスで行うことに比較すると 7 円

と高いが、非常時、ガスがない場所では有用な方法と考えられる。

#### F 研究発表:

- 1) Phan TG, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H, Duan ZJ. Possible misidentification of G5P[6] rotavirus as a novel strain detected in humans for the first time. *J Clin Microbiol*, 45(6):2098-9, 2007.
- 2) 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*, 7(4):542-6, 2007.
- 3) Okame M, Shiota T, Hansman G, Takagi M, Yagyu F, Takanashi S, Phan TG, Shimizu Y, Kohno H, Okitsu S, Ushijima H. Anti-norovirus polyclonal antibody and its potential for development of an antigen-ELISA. *J Med Virol*, 79(8): 1180-1186, 2007.
- 4) Phan TG, Kaneshi K, Ueda Y, Nakaya S, Nishimura S, Yamamoto A, Sugita K, Takanashi S, Okitsu S, Ushijima H. Genetic heterogeneity, evolution and recombination in norovirus. *J Med Virol*, 79(8): 1388-1400, 2007.
- 5) Pham NT, Khamrin P, Nguyen TA, Dey SK, Phan TG, Okitsu S, Ushijima H. Isolation and molecular characterization of Aichi

- viruses from fecal specimens collected in Japan, Bangladesh, Thailand and Vietnam. *J Clin Microbiol*, 45(7) : 2287-2288, 2007.
- 6) Trinh QD, Pham NTK, Nguyen TA, Phan TG, Khamrin P, Yan H, Hoang PL, Maneekarn N, Li Y, Kozlov A, Okitsu S, Ushijima H. Amino acid substitutions in the VP7 protein of human rotavirus G3 isolated in China, Russia, Thailand, and Vietnam during 2001-2004. *J Med Virol*, 79(10): 1611-1616, 2007.
- 7) Honma S, Chizhilov V, Santos N, Tatsumi M, Timenetsky MD, Linhares AC, Mascarenhas JD, Ushijima H, Amah GE, Gentsch JR, Hoshino Y. Development and validation of DNA microarray for genotyping group A rotavirus VP4 ( P[4] P[6], P[8], P[9] and P[14]) and VP7 (G1-G6, G8-G10 and G12) genes. *J Clin Microbiol*, 45(8):2641-8, 2007. [E-Pub]
- 8) Phan TG, Khamrin P, Akiyama M, Yagyu F, Okitsu S, Maneekarn N, Nishio O, Ushijima H. Detection and genetic characterization of Norovirus in oyster from China and Japan. *Clin Lab*, 53 (7, 8): 405-412, 2007.
- 9) Sang XJ, Ushijima H, Okitsu S, Sugihara S, Yagyu F, Maneekarn N. Photocatalytic inactivation of diarrheal viruses by visible-light-catalytic titanium dioxide. *Clin Lab*, 53(7, 8):413-21, 2007.
- 10) Phan TG, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H. Evidence of intragenic recombination in G1 rotavirus VP7 genes. *J Virol*, 81(18):10188-10194, 2007. Epub 2007 Jul 3.
- 11) Phan TG, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H. Genetic heterogeneity, evolution and recombination in emerging G9 rotaviruses. *Infect Genet Evol*, 7 (5) : 656-663, 2007. [Epub 2007 May 6].
- 12) Nguyen TA, Khamrin P, Takanashi S, Hoang PL, Pham LD, Hoang KT, Satou K, Masuoka Y, Okitsu S, Ushijima H. Evaluation of immunochromatography test for detection of rotavirus and norovirus among Vietnamese children with acute gastroenteritis and the emergence of a novel norovirus GII.4 variant. *J Tropical Pediatrics*, 53(4): 264-9, 2007. [Epub 2007 May 12].
- 13) Khamrin P, Peerakome S, Tonusin S, Malasao R, Okitsu S, Ushijima H, Maneekarn N. Changing pattern of rotavirus G genotype distribution in Chiang Mai, Thailand from 2002 to 2004: Decline of G9 and reemergence of G1 and G2. *J Med Virol*, 79(11): 1775-1782, 2007.
- 14) Dey SK, Nguyen TA, Phan TG, Nishio O, Salim AFM, Rahman M, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Molecular

- and epidemiological trend of norovirus associated gastroenteritis in Dhaka City, Bangladesh. *J Clin Virol*, 40 : 218-223, 2007.
- 15) Khamrin P, Maneekarn N, Peerakome S, Tonusin S, Malasao R, Mizuguchi M, Okitsu S, Ushijima H. Genetic diversity of noroviruses and sapoviruses in children hospitalized with acute gastroenteritis in Chang Mai, Thailand. *J Med Virol*, 79: 1921-1926, 2007.
  - 16) Nguyen TA, Khamrin P, Trinh QD, Phan TG, Pham LD, Hoang LP, Hoang KT, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Sequence analysis of Vietnamese P[6] rotavirus strains suggests evidence of interspecies transmission. *J Med Virol* 79: 1959-1965, 2007.
  - 17) Phan TG, Nishimura S, Sugita K, Nishimura T, Okitsu S, Ushijima H. Multiple recombinant noroviruses in Japan. *Clin Lab*.53:567-70, 2007.
  - 18) Nguyen TA, Hoang LP, Pham LD, Hoang KT, Mizuguchi M, Okitsu S, Ushijima H. Identification of human astrovirus infections among children with acute gastroenteritis in the Southern Part of Vietnam during 2005-2006. *J Med Virol*, 80(2):298-305, 2008.
  - 19) Khamrin P, Nguyen TA, Phan TG, Satou K, Masuoka Y, Okitsu S, Maneekarn N, Nishio O, Ushijima H. Evaluation of immunochromatography and commercial enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection of norovirus antigen in stool samples. *J Virol Methods*, 147:360-363, 2007; [Epub ahead of print].
  - 20) Shiota T, Okame M, Takanashi S, Khamrin P, Takagi M, Satou K, Masuoka Y, Yagyu F, Shimizu Y, Kohno H, Mizuguchi M, Okitsu S, Ushijima H. Characterization of broad reactive monoclonal antibody against Norovirus genogroup I and II: Recognition of a novel conformational epitope. *JVI* 81(22): 12298-12306, 2007. Sep 12; [Epub ahead of print].
  - 21) Takanashi S, Okame M, Shiota T, Takagi M, Yagyu F, Phan TG, Nishimura S, Katsumata N, Igarashi T, Okitsu S, Ushijima H. Development of a rapid immunochromatographic test for noroviruses genogroup I and II. *J Virol Method*, in press. Nov. 28 [Epub ahead of print]
  - 22) Santos N, Honma S, Timenetsky MD, Linhares AC, Ushijima H, Armah GE, Gentsch JR, Hoshino Y. Development of a microtiter plate hybridization-based PCR-enzyme-linked immnosorbent assay (PCR-ELISA) for identification of clinically relevant human group A rotavirus G and P

- genotypes. *J Clin Microbiol*, 2007 Dec 5 [Epub ahead of print]
- 23) Kittigul L, Pombubpa K, Rattanatham T, Dirapha P, Ultrarachkij F, Pungchitton S, Khamrin P, Ushijima H. Development of a method for concentrating and detecting rotavirus in oysters. *Int J Food Microbiol*, 2007, Dec 4 [Epub ahead of print]
- 24) Nguyen TA, Hoang LP, Phan LD, Hoang KT, Okitsu S, Muzuguchi M, Ushijima H. Use of sequence analysis of the VP4 gene to classify recent Vietnamese rotavirus isolates. *Clin Microbiol Infect*, 2008, [Epub ahead of print]
- 25) Lwenbe R, Ochieng W, Panikulam A, Mongonia CO, Yamamoto N, Shiota T, Ichimura H. Anti-retroviral drug resistance-associated mutations among non-subtype B HIV-1 infected Kenyan children with treatment failure. *J Med Virol* 9:865-872, 2007.
- G 知的財産の出願・登録状況  
特になし

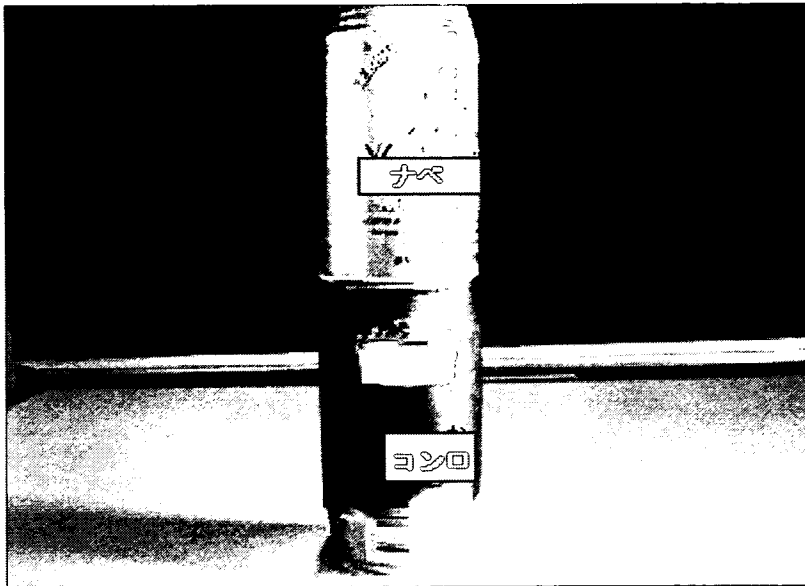


図1 350mlのアルミ缶 下のアルミ缶をコンロとして穴を開けて用いる。上のアルミ缶はナベとする。コンロに固形燃料を入れる。

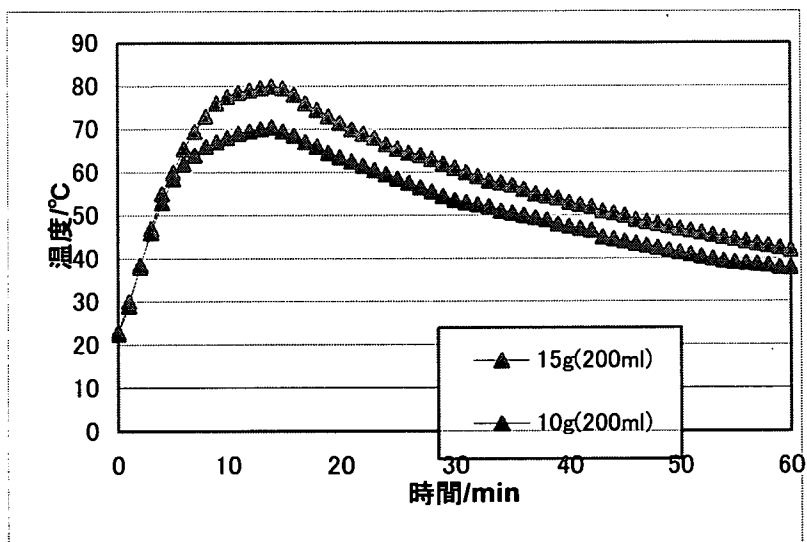


図2 固形燃料の重量と200mlの母乳の温度変化。15gでは最高80°Cまで10gでは最高70°Cまで上昇し燃料は消失した。

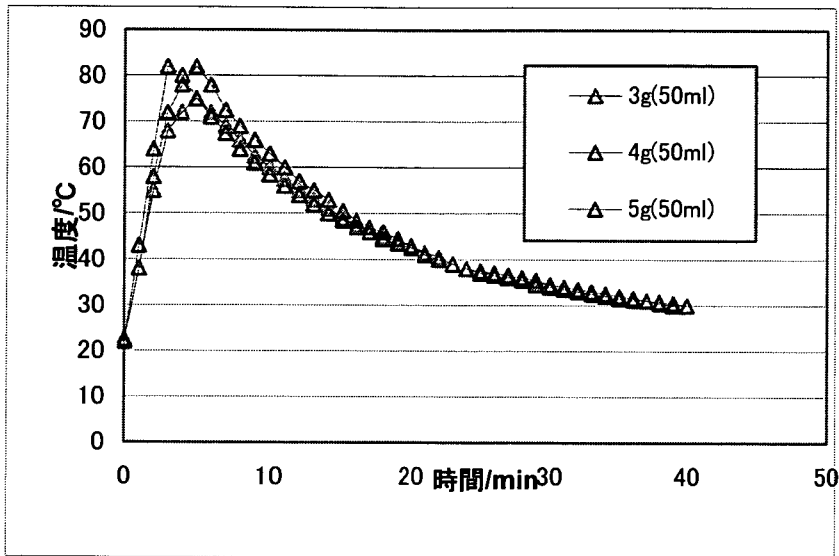


図3 固形燃料の重量と50mlの母乳の温度変化。5gの場合は3分で80°Cを越えたため3分で止めた。4gの場合はそのままの燃料でのカーブであり80°Cを越えたところで消費した。3gの場合は80°Cまでにはいかず75°Cで消費した。

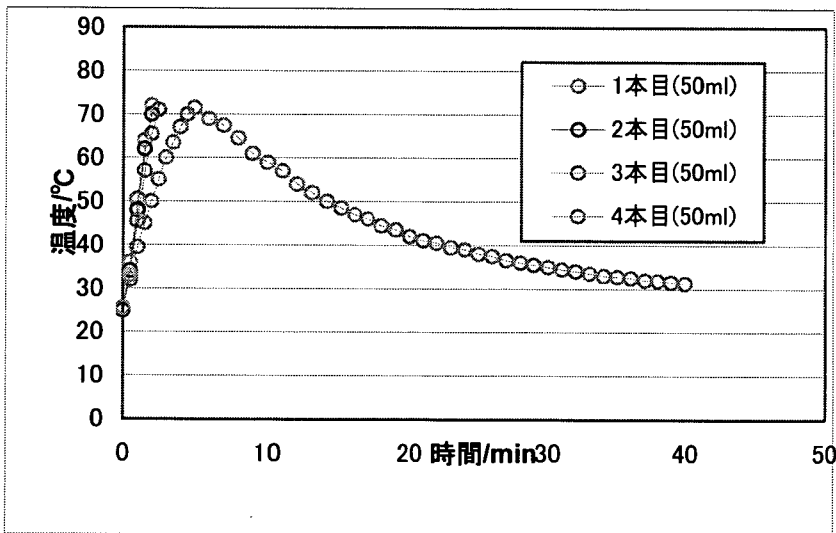


図4 10gの固形燃料で50mlの母乳で何回70°Cを越えることが可能かの実験4回まで可能なことがわかった。すなわち総計200mlであった。

平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）  
「周産期・小児・生殖医療における HIV 感染対策に関する集学的研究」班  
分担研究報告書

「分担班研究名」 HIV 感染に関する局所因子（胎盤関門）解析

分担研究者：氏名	早川 智	所属・職	日本大学・医学部・教授
研究協力者：氏名	北村 勝彦	所属・職	横浜市立大学・医学部・准教授
	齋藤 滋	所属・職	富山大学・医学部・教授
	安孫子宣光	所属・職	日本大学・松戸歯学部・教授
	宮田 隆	所属・職	(特活)歯科医学教育国際支援機構理事長
	泉 泰之	所属・職	日本大学・医学部・専修研究員

・ 研究要旨

- わが国では妊婦検診によるスクリーニングと HAART,帝王切開と断乳による十分な治療により、ほぼ 100%の垂直感染予防が達成されている。これに対し、医療介入が最小限もしくはほとんど行われないラオスの症例を比較し、HIV 子宮内感染の成立に関する病理機構の解明を目的とした臨床的研究ならびに、胎盤絨毛細胞と脱落膜免疫細胞における感染成立因子の解析を行っている。現時点で、①絨毛細胞は分化の状態によって、HIV 感受性が異なるが、基本的に CD4 非依存性に感染が成立する。②TLR を介したシグナルは HIV 複製を抑制する。③脱落膜 NK 細胞、NKT 細胞は HIV の持続感染をきたし、そのリザーバーとなる。④HIVp24 に対する抗体は中和活性と同時に細胞性免疫応答の遮断抗体となる。⑤マラリアや慢性尿路感染、歯周病などの慢性炎症が子宮内感染のリスクファクターとなる。可能性が示唆された。

A 研究目的

- HIV 垂直感染には、脱落膜・胎盤の局所因子が深く関与する。胎盤において合胞体細胞や Hofbauer 細胞には HIV が感染し、また HIV に感染した脱落膜リンパ球は胎児循環中に入る機会があるが、子宮内感染を来すことは稀である。一方、マラリアや絨毛羊膜炎などの合併によって HIV 子宮内感染が誘発されることが知られている。脱落膜・胎盤局所で HIV 垂直感染に関する因子の解析を目的とする。

B 研究方法

- HIV 垂直感染における胎盤関門ならびに脱落膜免疫細胞の関与について、以下の点を検討する。
- 胎盤関門の分子基盤の分子的基盤すなわち絨毛細胞の分化と HIV 感受性ならびに細胞内センシングのメカニズム
  - CD4 非依存性の HIV の絨毛への感染機序
  - 脱落膜リンパ球への感染とアポトーシス

- 4) 母体リンパ球による胎児免疫系への抗原提示
- 5) 胎盤に発現する内在性レトロウイルスの関与

具体的には、正常分娩胎盤より絨毛細胞を分離培養あるいは絨毛癌細胞を継代する。この培養システムにおいて、HIV を感染させ絨毛細胞より HIV/HERV *chimeric virus* の分離を試みる。次に HIV 陽性母から生まれた陰性児の胎盤、臍帯血より HIV/HERV *chimeric virus* の分離を試みる。さらにこのような児の臍帯血中の T 細胞が HERV 由来抗原を認識するや否を ELISPOT 法で検討する。HIV 培養絨毛細胞、絨毛癌細胞株に HIV を添加してその複製を検出する。次に 絨毛幹細胞に近い性質を有する BeWo 株を Forskolin で分化誘導し、HERV 発現の変化と HIV 感受性を解析する。さらに、絨毛癌細胞株あるいは培養絨毛細胞における HERV 発現を siRNA 法や PI ポリアミド法で抑制し、HIV 複製に及ぼす影響を検討する。マラリアや結核など偶発感染症が胎盤における HIV 複製に及ぼす影響を検討するため、培養絨毛癌細胞株に TLR 1-9 アゴニストを加え、HIV 複製効率と、胎盤機能の指標として hCG 産生、増殖速度、分裂細胞分画、ならびに HERV 発現を検討する。共同研究しているラオスマホソット病院、サバナケット病院において採取した HIV 陽性妊婦の胎盤ならびに臍帯血検体で、子宮内での垂直感染が成立した症例と成立しなかった症例のマイクロアレイ解析ならびにプロテオーム解析を行い、HIV 感染時における細胞内の調節遺伝子の役割について解析する。

(倫理面への配慮) HIV 感染は性行為感染症の一つであり、また不治の病であるという誤解から、偏見を生みやすい。従って、検体の処理に当たっては採取者と解析者の間で匿名化を行い、患者さんのプライバシーを最大限に尊重する。さらに輸送には危険を伴うため、感染症

法ならびに WHO などの定める国際的な基準を遵守する。

## C 研究結果

ヒト子宮内に形成される脱落膜は多数の免疫細胞を含むが、これが HIV 感染において何らかの関与をする、すなわち HIV 感染の標的あるいはリザーバーとなっている可能性がある。そこで、脱落膜より分離した CD56 LGL.NKT 細胞株 MOTN, NK 細胞株 KHYG に *in vitro* で HIV を感染させたところ、前二者においてはウイルスの複製が見られたのに対し、KHYG は HIV の *integration* による provirus は見られるものの、virus RNA の発現や上清中への p24 の産生はまったく認められず、リザーバーとなっている可能性が示唆された。しかし霊長類細胞で HIV 感受性を調節する TRIM5 $\alpha$  の発現には差がなく、他の機序が関与すると推定された。HIV を有効に複製する NKT 細胞株 MOTN と、不完全な複製を行う KHYG 細胞の遺伝子ならびにタンパク発現プロファイルを網羅的に解析し、約 40 遺伝子の発現の差を認めた。現在、HIV 複製に関する転写因子発現を解析中である。次に、絨毛細胞は分化の程度により HIV 感受性が著しく異なり、分化した syncytial trophoblast や invasive trophoblast は HIV 感受性であるが cytotrophoblast, trophoblastic stem cell は HIV 抵抗性であることが判明した。さらに、TLR を介したシグナルが HIV 複製を抑制することから、未知の内在性 TLR リガンドが HIV 垂直感染を調節している可能性が示唆された。最後に HIV 垂直感染では、母体の栄養状態や免疫状態に加え HLA ハプロタイプや HIV サブタイプにより感染効率に著しい差が生じることが知られている。そのための臨床的解析を心がけたが残念ながら(医師としては極めて幸いなことに)研究期間中に垂直感染を来した症例は日本では見られず、この件につ



いてはラオスとの共同研究を進めている

#### D. 考察

HIV 陽性妊婦より生まれた新生児は,典型的な曝露非感染者である.興味深いことに,その一部は本人が HIV に感染していないにも関わらず, HIV に対する細胞性免疫応答が誘導されている. 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が明らかになってきた. 胎児は妊娠経過中に何度も少量のウイルス粒子やウイルス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. 我々は, ヒト脱落膜において分化する胸腺外 T 細胞の存在を世界で初めて報告し, 脱落膜と悪性腫瘍局所に浸潤する自然免疫リンパ球の共通点とくに CD56 陽性 NK, NKT 細胞の性状とホルモン,サイトカインによる調節を明らかにしてきた. 非常に興味深いことに, これら CD56 陽性大顆粒リンパ球は,HIV に感受性があるが,複製能がほとんどなく, ウイルスゲノムを取り込み, 一部を mRNA として転写しながらアポトーシスに陥ることが明らかになった.また,絨毛細胞は分化の程度により HIV 感受性が著しく異なり,分化した syncytial trophoblast や invasive trophoblast は HIV 感受性であるが cytotrophoblast, trophoblastic stem cell は HIV 抵抗性であることが判明した. さらに, TLR を介したシグナルが HIV 複製を抑制することから,未知の内臓性 TLR リガンドが HIV 垂直感染を調節している可能性が示唆された.

#### E. 結論

「脱落膜・胎盤関門」と仮称される機構の分子機構の一端が明らかになった.曝露非感染者である HIV 陽性妊婦における HIV 陰性胎児・新生児の解析よりワクチン開発の新たな可能性が示唆された.

#### G 研究発表

##### 1 論文発表

1 Murayama R, Harada Y, Shibata T, Kuroda K, Hayakawa S, Shimizu K, Tanaka T. Influenza A virus non-structural protein 1 (NS1) interacts with cellular multifunctional protein nucleolin during infection. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Nov 3;362(4):880-5.

2 Chishima F, Hayakawa S, Yamamoto T, Sugitani M, Karasaki-Suzuki M, Sugita K, Nemoto N. Expression of inducible microsomal prostaglandin E synthase in local lesions of endometriosis patients. *Am J Reprod Immunol.* 2007 Mar;57(3):218-26.

3 Watanabe N, Hatano J, Asahina K, Iwasaki T, Hayakawa S. Molecular cloning and histological localization of LH-like substances in a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) placenta.*Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2007 Jan;146(1):105-18.

4 Hayakawa S, Komine-Aizawa S, Osaka S, Iida T, Hayakawa J, Nishinarita S, Nemoto N. Rembrandt's Maria Bockenolle has a butterfly rash and digital deformities: overlapping syndrome of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Med Hypotheses.* 2007;68(4):906-9.

5 早川智, 真島洋子, 相澤志保子 生殖器の感染症 女性生殖器における免疫機構  
実験医学 25 巻 20 号  
Page3254-3261(2007.12)

6 相澤志保子, 長縄聰, 真島洋子, 北村勝彦, 本多三男, 早川智 ベルガモットは HIV 複製を抑制する. 産婦人科漢方研究のあゆみ 24 号 Page123-126(2007.05)

7 相澤志保子, 早川智, 本多三男結核菌感染

- 防御システム CD1による脂質抗原提示  
日大医学雑誌 66 巻 4 号  
Page375-376(2007.08)
- 8 早川智【妊婦のウイルス感染】 妊婦とインフルエンザ 日本産科婦人科学会雑誌 59 巻 5 号 Page1084-1088(2007.05)
- 9 真島洋子, 早川智 ホルモンによる女性生殖器粘膜免疫の調節 日大医学雑誌 (0029-0424)66 巻 1 号  
Page145-146(2007.02)
- 10 相澤志保子, 早川智, 長縄聰, 永石真木, 本多三男, 砂川恵伸, 根本則道 HIV 垂直感染と胎盤関門 炎症と免疫(0918-8371)15 巻 1 号 Page87-93(2006.12)
- 11 Shihoko Komine-Aizawa, Hiroko Majima, Chiikako Yoshida-Noro, and Satoshi Hayakawa Stimuli through Toll-like receptor (TLR) 3 and 9 affect human chorionic gonadotropin (hCG) production in a choriocarcinoma cell line J.Obstet.Gynecol.Res 2008 in press

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
吉野直人	H I V / A I D S ワクチン開発の基礎的研究および日本における母子感染の臨床的・疫学的研究	日本エイズ学会誌	9	209-216	2007
喜多恒和	わが国におけるH I V感染妊娠の現状	臨床研究会	266	77	
谷口晴記 塚原優己 喜多恒和 和田裕一 外川正生 戸谷良造 稲葉憲之	母子感染H I Vの母子感染と対策		65	518	2007
吉川智之 喜多恒和	ヒト乳頭腫ウイルス (HPV) と子宮頸癌 リニアアレイ法	医学書院	51-8	861	2007
水主川純・箕浦茂樹	肝炎ウイルスのスクリーニング検査と陽性症例の取り扱い	産科と婦人科別刷	11	1271	2007
井上孝実 藤原多子 中原辰夫 岡本早苗 柴田大二郎 今井陽子 後藤滂二 片平智行 谷口晴記 戸谷良造 鈴置洋三	名古屋医療センターにおけるH I V感染妊婦31例の臨床的統計	東海産科婦人科学会	43	53-57	2007
松田秀雄	母子感染—ウイルス感染症	産婦人科の実際	56-11	1904-1908	2007
松田秀雄	妊婦のバルボウイルス感染症—リング病患者と接触した可能性がある妊婦から相談されたら—	日本産科婦人科学会	59-5	1077-1083	2007
T.Shibasaki,H.Matsuda,K.Furuya	Haptoglobin therapy during pregnancy for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria with renal failure	BRIEF COMMUNICATIONS		267	2007
Tomoko Shibasaki,MD,Hideo Matsuda,MD,Yuichi Kawakami,MD,and Kenichi Furuya,MD	Fetal Leukemia With Umbilical Artery Embolism and Circulatory Failure	OBSTETRICS & GYNECOLOGY	109-2	521	2007
外川正生	日本における小児H I V感染症の現状	日本医事新報	4373	105	2008
外川正夫	日本で今エイズはどのくらい発生している？ 母子感染は？ ~H I V / A I D S ~	チャイルドヘルス	10	793-798	2007
國方徹也	H I V感染 —新生児科医の立場から—	周産期医学	37-12	1569	2007
國方徹也	H I V母子感染の現状	小児外科	39-9	1068	2007

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
國方徹也	H I V 母子感染—予防を中心に—	周産期医学	37	689	2007
山中純子 山中ひかる 松下竹次	H I V 感染症	小児内科	39—11	2027	2007
國方徹也 田村正徳	H F O	Neonatal Care	21—2	38	2008
田中順子 加藤天美 尾崎由和 山崎麻美	定位的ラジオ波焼灼術により、てんかん発作および情動障害が改善した視床下部過誤腫の1例	てんかん研究	25—2	81—87	2007
葛西健郎	未熟児動脈管開存症	周産期医学	37	697	2007
葛西健郎	新生児医療と看護の臨床手技70	Neonatal Care	春季増刊	104—107	2007
内田俊彦 松橋一彦 嶋田泉司 高橋明雄 松本敦 戸津五月 葛西健郎 武井恒知 千田勝一	合成ペプチドを用いた合成肺サーファクタントの評価：（1）生理活性の比較	日本肺サーファクタント・界面医学会雑誌	38	44	2007
葛西健郎 松橋一彦 嶋田泉司 高橋明雄 松本敦 戸津五月 武井恒知 千田勝一	合成ペプチドを用いた合成肺サーファクタントの評価：（2）肺組織像の比較	日本サーファクタント・界面医学会雑誌	38	41	2007
Masaki Takahashi Yuichi Kudaka Naoya Okumura Atsushi Hirano Kazuhide Banno Tsuguhiko Kaneda	Pharmacokinetic Parameters of Lopinavir Determined by Moment Analysis in Japanese HIV Type 1-Infected Patients	AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES	24	114	2008
SHIRO IBE, JUNKO HATTORI, SEIICHIRO FUJISAKI, URARA SHIGEMI, SAEKO FUJISAKI, KAYOKO SHIMIZU, KAZUYO NAKAMURA, TAKEJIRO KAZUMI, YOSHIYUKI YOKOMAKU, NAOTO MAMIYA, MOTOHIRO HAMAGUCHI, and TSUGUHIRO KANEDA	Trend of Drug-Resistant HIV Type 1 Emergence among Therapy-Naive Patients in Nagoya, Japan: An 8-Year Surveillance from 1999 to 2006	AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES	24	7	2008
Junko Hattori, Naoya Okumura, Yumiko Yamazaki, Masataka Uchiyama, Motohiro Hamaguchi, Yukihiko Nishiyama, and Tsuguhiko Kaneda	Beneficial Effect of GB Virus C Co-Infection in Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Individuals	Microbiol.immunol	51—2	193-200	2007