

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)

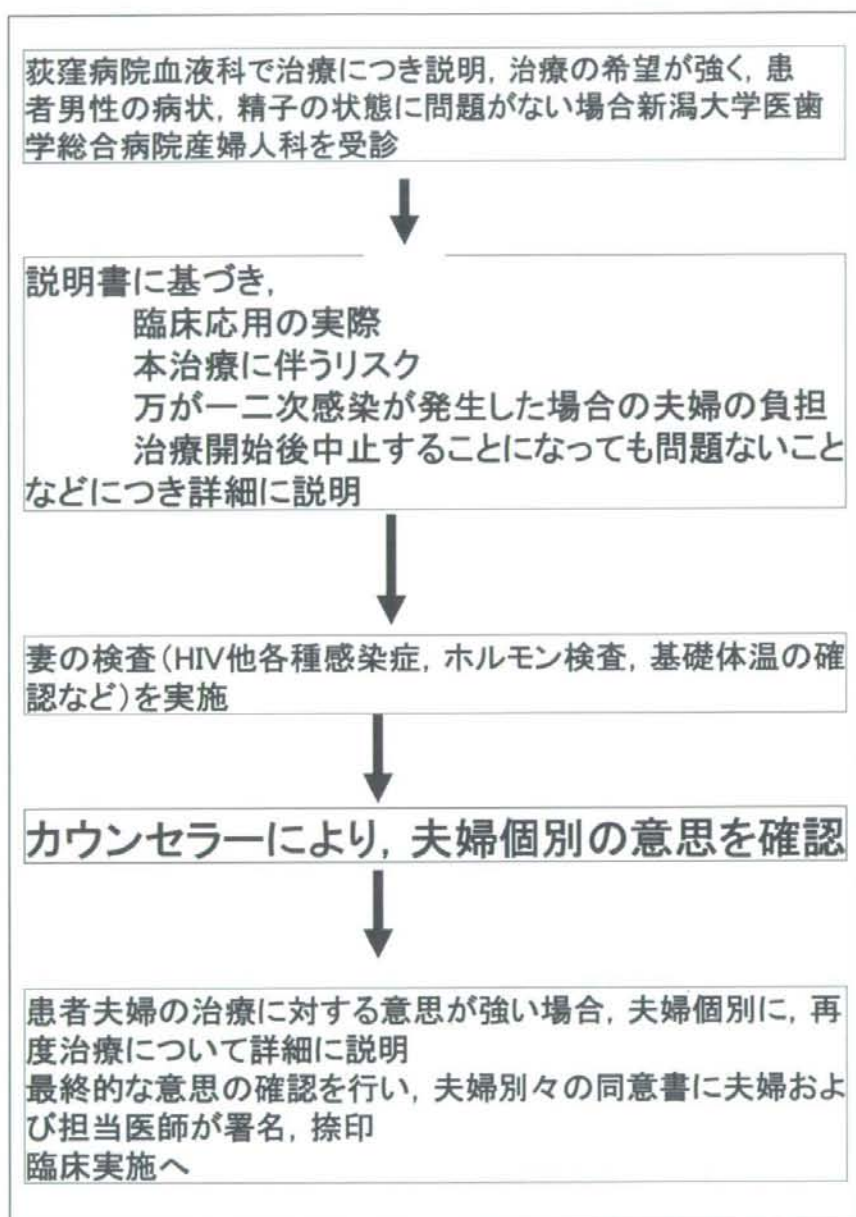


図1 HIV陽性男性、陰性女性夫婦に対する体外受精・胚移植の実施までの対応

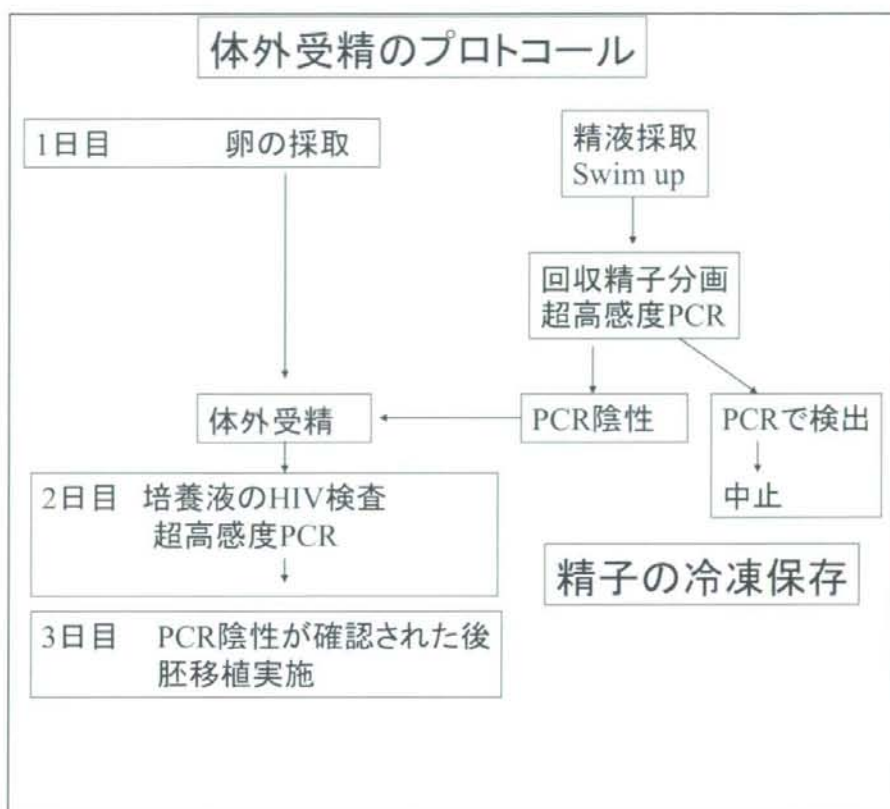


図2 体外受精・胚移植のプロトコール

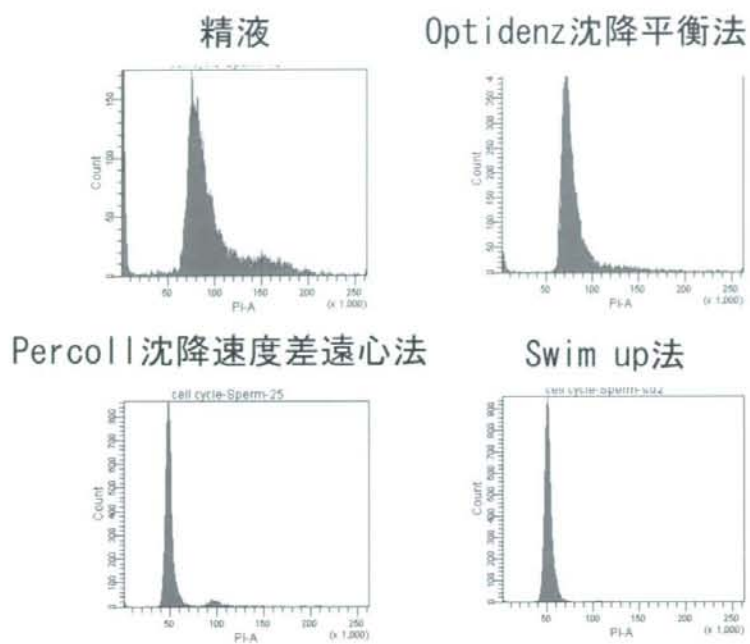


図3 フローサイトメトリーによる精液内細胞 DNA 量の観察

平成 20 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
研究分担報告書

分担研究「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」

研究分担者： 五味淵秀人 国立国際医療センター産婦人科医長
研究協力者： 大金 美和 国立国際医療センターACC コーディネーターナース
松岡 恵 静岡県立大学看護学部教授
塚原 優己 国立成育医療センター産科医長

1. 研究の目的

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。そこで、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検討し指針を提示する。また、患者支援の立場からは、感染女性の性行動と感染防御対策の実態と妊娠・出産の希望に関する調査を行い、感染防御と育児希望の相反する性行動の間で苦慮する女性患者に対するケアのあり方を具体的に提示する。

2. 研究の背景およびこれまでの研究成果の概要

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。平成 18 年度本研究において、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 拠点病院の産婦人科医に調査を依頼した。本法施行の賛否については賛成 63.2%、反対 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（第 21 回日本エイズ学会学術集会（平成 19 年 11 月 28 日、広島市）にて発表した）。施行に当たって、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、などの条件が必要と考えられた。

一方、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。

3. 研究の意義

HIV 感染女性がより安全な妊娠、分娩の手段を得ることは WHO の「リプロダクティブヘルスアンドライツ」にも合致し、感染者の QOL を向上させ、同時に少子化にも寄与する。

4. 研究計画の概要

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。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として、不妊治療で行われている夫精液を用いた人工授精施行について HIV 拠点病院の産婦人科医に調査施行した結果（平成 18 年度）、施行についてはほぼ同意が得られるものと考えた。平成 19 年度は標準化と指針作成を目的として検討を行い、これを作成した。平成 20 年度はこれを公表し、施行施設間において情報の共有が可能なシステムを構築していく。一方、患者支援の観点からの検討については、対面式による調査により感染女性の性行動と感染防御対策の実態と妊娠・出産の希望に関する検討を行い、感染防御と育児希望の相反する性行動の間で苦慮する女性患者に対するケアのあり方を具体的に提示する。

5. 20 年度の成果

妊娠、分娩を希望するすべての HIV 感染女性が安全手段を得ることができるよう、上記検討結果を医療者のみならず広く知らせ、また、これが可能な情報ネットワークを構築する。また、データベース用ソフトを作成し希望施設に提供した。

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
研究分担報告書

研究分担課題名：HIV 母子感染のメカニズム、免疫・ウイルス学的研究および国際保健学的研究
1. HIV 母子感染とウイルスの性状

研究分担者：牛島廣治 藍野大学医療保健学部藍野健康科学センター・教授
研究協力者：山本直彦 名古屋大学大学院医学系研究科環境医動物学・准教授
李 燕 昆明医学院公衆衛生学・教授
Trinh Duy Quang 東京大学大学院医学系研究科・大学院生

研究要旨：

ベトナム（ホーチミン市）、中国（雲南省）、ケニア（ナイロビ）において HIV 母子感染のウイルス学的研究、疫学的研究を前年度より継続して行った。どの国においても薬剤耐性の HIV が見られることから治療薬の選択が重要であることがわかった。少数民族や貧困地区においては HIV 母子感染の予防、治療の必要性、治療薬の服用法・副作用などの周知が必要である。

A. 研究目的

1：2004-2005年のベトナム ホーチミン市で、母子感染により感染した児の HIV の性状を調べた。

2：ケニアの貧困地区における HIV 母子感染の現状およびウイルスの遺伝型、薬剤耐性の状況を調査した。

3：中国では感染者が急激に増加しており、それに伴って HIV 母子感染も増加している。雲南省はタイ、ミャンマーなどと近く、中国で最初に HIV 患者が認められたところである。近年、この地方も抗レトロウイルス薬の使用により母子感染は1/10程度に減少してきている。最近の妊婦の感染状況ならびに薬剤耐性 HIV の頻度および遺伝子の状況を調べた。さらに母親の薬剤使用状況ならびに副作用について調査した。

B. 研究方法

1：HIV 抗体陽性の感染児 104 例の末梢血細胞から HIV の DNA を抽出し、V3 領域の遺伝子を増幅、その配列の解析を行った。薬剤耐性があるかを調べる目的でプロテアーゼ領域の

配列の変異を調べた。この研究は東京大学および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。

2：2008年ケニア ナイロビ貧困地区で当研究のインフォームドコンセントが得られた患者の血清から HIV RNA を抽出し、RT-PCR により DNA を得て、Env、Pol、Gag 領域の遺伝子を解析し、各領域の subtype および薬剤耐性に関与すると思われる変異を解析した。この研究は当地および名古屋大学で倫理委員会の承認を得た。

3：2006年、雲南省の 52 の郡において 137,535 人の妊産婦で、HIV のスクリーニングおよび確認の検査を行い（昆明医学院の倫理委員会の承認を受けた）、陽性例には薬剤を投与した。治療による副作用の有無を血液検査により調べ、ウイルスの薬剤耐性も調べた。さらに HIV 母子感染予防の現状(2005-2007年)を調べる目的で HIV 陽性の母親、医療従事者にアンケートおよびインタビューを行った。

C. 研究結果

1：検体提供者は 1.5 カ月から 5 歳で半数は生後

6 カ月以下であった。これらの感染児は治療されてなかった。サブクラスは全例 CRF01_AE であり、V3 loop は 90% が GPGQ で、その地域に流行している株であった。プロテアーゼ領域の遺伝子 10、13、16、36、69、93 番目に変異が見られた。2 : 女性の HIV の陽性率は約 12% (66 人中 8 人) で、約 7 割が 20 歳代と 30 歳代であった。うち、薬剤耐性関連遺伝子を持っている感染者は 2 人の 25% (男性は 6 人中 1 人の 17%) であった。サブタイプは A 型 9 例、C 型 2 例、D 型 2 例、G 型 1 例であった。

3 : 治療による貧血が母親 61 例中 28% に見られた。児 37 例の 22% に貧血と 8% に肝機能障害が見られた。薬剤耐性 HIV の検索では、RT 領域で 5 例が T69S、K103R、V179T、V179T、V179D であった。プロテアーゼ領域では 2 例で L33F、1 例で Q58E、3 例で A71V、2 例で A71T であった。167 例の HIV 陽性の母親のうち最初に決められた治療法をきちんと守っていたのは 66% であった。複数の薬剤の使用は 51% であった。守れなかったのは少数民族において多く、その理由で多いのは治療の重要性を認識しなかった等であった。

D. 考察

1. 2004-2005 年のホーチミン市では感染児に薬剤を投与していないにもかかわらず、ウイルスはマイナーな薬剤耐性に関する変異遺伝子を持っていた。

2. 2000 年から毎年、調査を行なっているが、女性の感染率は年により増減があり、13%~36% を推移しており、2006 年はもっとも低かった。しかし、薬剤耐性率は最も高く、今後の推移を注視したい。ケニアでは、2006 年から、妊産婦検診で HIV 検査が義務づけられるようになり、母子感染への国や国民の意識も次第に高まってきている。サブタイプは A、C、D、G と多彩であった。

3. 雲南省の母子保健について我々は 7 年以上介入型の調査を行っている。最初、ビタミン

B₁ を中心とした栄養不良児が問題となり栄養指導と B₁ の補給で患児は改善してきた。一方、HIV が雲南省で増加するにつれ HIV 母子感染も増加を示した。雲南省での妊産婦の陽性率は中国国内では高い方であるが、他のアジア、アフリカ諸国にはもっと高率の国が存在する。薬剤耐性株が広く見られた。HIV の母子感染の予防教育を、特に少数民族地区で進める必要がある。

E. 結論

1. 2004-2005 年のホーチミン市では感染児に薬剤を投与していないにもかかわらず、ウイルスはマイナーな薬剤耐性に関する変異遺伝子を持っていた。

2. ケニアにおける昨年の我々の調査では、女性 HIV 感染者の 8 割が生殖年齢であり、薬剤耐性率は 3 割以上にのぼった。2006 年から女性の妊産婦検診で HIV 検査が義務づけられるようになり、HIV の母子感染予防への関心が高まってきている。

3. 中国雲南省での HIV 母子感染率は中国国内では高く、今後母子感染の防止対策がより強く望まれる。

F. 研究業績

論文発表

1. Chan-It W, Khamrin P, Saekhow P, Pantip C, Thongprachum A, Peerakome S, Ushijima H, Maneekarn N. Multiple combinations of P[13]-like genotype with G3, G4, and G5 in porcine rotaviruses. *J Clin Microbiol.* 2008 Apr;46(4):1169-73. Epub 2008 Jan 30.
2. Yan H, Koyano S, Inami Y, Yamamoto Y, Suzutani T, Mizuguchi M, Ushijima H, Kurane I, Inoue N. Genetic variations in the gB, UL144 and UL149 genes of human cytomegalovirus strains collected from congenitally and postnatally infected

- Japanese children. *Arch Virol*. 2008;153(4):667-74. Epub 2008 Feb 14.
3. Khamrin P, Okitsu S, Ushijima H, Maneekarn N. Novel nonstructural protein 4 genetic group in rotavirus of porcine origin. *Emerg Infect Dis*, 14(4): 686-688, 2008.
 4. Nguyen TA, Hoang L, Pham LD, Hoang KT, Okitsu S, Mizuguchi M, Ushijima H. Norovirus and sapovirus infections among children with acute gastroenteritis in Ho Chi Minh City during 2005-2006. *J Trop Pediatr*. 2008 Apr;54(2):102-13. Epub 2008 Mar 4.
 5. Rathore A, Chatterjee A, Sood V, Khan SZ, Banerjee AC, Yamamoto N., Dhole TN. Risk for HIV-1 infection is not associated with repeat-region polymorphism in the DC-SIGN neck domain and novel genetic DC-SIGN variants among North Indians *Clin Chim Acta* 2008 May; 391(1-2): 1-5.
 6. Pham NTK, Trinh, QD, Khamrin P, Nguyen TA, Dey SK, Phan TG, Hoang LP, Maneekarn N, Okitsu S, Ushijima H. Sequence analysis of the capsid gene of Aichi viruses detected from Japan, Bangladesh, Thailand, and Vietnam. *J Med Virol* 2008 Jul; 80(7):1222-1227.
 7. Rathore A, Chatterjee A, Sivarama P, Yamamoto N., Singhal PK, Dhole TN. Association of RANTES_403 G/A, _28 C/G and In1.1 T/C polymorphism with HIV-1 transmission and progression among North Indians. *J Med Virol* 2008 Jul; 80 (7):1133-1141.
 8. Khamrin P, Maneekarn N, Peerakome S, Okitsu S, Mizuguchi M, Ushijima H. Bovine Kobuviruses from Cattle with Diarrheic. *Emerg Infect Dis*, 14(6): 985-986, 2008.
 9. Schröder HC, Wang X, Tremel W, Ushijima H, Müller WE. Biofabrication of biosilica-glass by living organisms. *Nat Prod Res*. 2008 Jun; 25(3):455-474. Epub 2008 Apr 8.
 10. Dey SK, Islam A, Mizuguchi M, Okitsu S, Ushijima H. Epidemiological and molecular analysis of astrovirus gastroenteritis in Dhaka City, Bangladesh. *J Trop Pediatr* 2008 Dec, 54(6):423-425. Epub 2008 Jul 9.
 11. Khamrin P, Peerakome S, Malasao R, Mizuguchi M, Okitsu S, Ushijima H, Maneekarn N. Genetic characterization of group C rotavirus isolated from a child hospitalized with acute gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand. *Virus Genes*. 2008 Aug 12; 37: 314-321. [Epub ahead of print]
 12. Malasao R, Maneekarn N, Khamrin P, Pantip C, Tonusin S, Ushijima H, Peerakome S. Genetic diversity of norovirus, sapovirus, and astrovirus isolated from children hospitalized with acute gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand. *J Med Virol*, 2008 Aug 19; 80(10):1749-1755. [Epub ahead of print]
 13. Rathore A, Chatterjee A, Yamamoto N, Dhole TN. Absence of H186R polymorphism in exon 4 of the APOBEC3G Gene among North Indian individuals. *Genet Test* 2008 Sep; 12(3):453-456.
 14. Yan H, Koyano S, Inami Y, Yamamoto Y, Suzutani T, Mizuguchi M, Ushijima H, Kurane I, Inoue N. Genetic linkage among human cytomegalovirus glycoprotein N (gN) and gO genes, with

- evidence for recombination from congenitally and post-natally infected Japanese infants. *J Gen Virol* 89(pt 9): 2275-2279, 2008.
15. Khamrin P, Maneekarn N, Peerakome S, Malasao R, Thongprachum A, Chan-It W, Mizuguchi M, Okitsu S, Ushijima H. Molecular characterization of VP4, VP6, VP7, NSP4, and NSP5/6 genes identifies an unusual G3P[10] human rotavirus strain. *J Med Virol* 2008 Nov 21; 81(1): 176-182.
 16. Thongprachum A, Khamrin P, Saekhow P, Pantip C, Peerakome S, Ushijima H, Maneekarn N. Analysis of the VP6 gene of human and porcine group A rotavirus strains with unusual subgroup specificities. *J Med Virol* Nov 21; 81(1): 183-191.
 17. Pham NT, Trinh QD, Nguyen TA, Dey SK, Phan TG, Hoang LP, Khamrin P, Maneekarn N, Okitsu S, Mizuguchi M, Ushijima H. Development of genotype-specific primers for differentiation of genotypes A and B of Aichi viruses. *J Virol Method*, 2008 Dec 4. [Epub ahead of print]
 18. Kittigul L, Pombubpa K, Taweekate Y, Yeephoo T, Khamrin P, Ushijima H. Molecular characterization of rotaviruses, noroviruses, sapovirus, and adenoviruses in patients with acute gastroenteritis in Thailand. *J Med Virol* 2009 Feb; 81(2): 345-353.
 19. Dey SK, Hayakawa Y, Rhaman M, Islam R, Mizuguchi M, Okitsu S, Ushijima H. G2 strain of rotavirus among infants and children, Bangladesh. *Emerg Infect Dis*, 2009 Jan; 15(1): 91-94.
 20. Takanashi S, Hashira S, Matsunaga T, Yoshida A, Shiota T, Phan TG, Khamrin P, Okitsu S, Mizuguchi M, Igarashi T, Ushijima H. Detection, genetic characterization, and quantification of Norovirus RNA from sera of children with gastroenteritis. *J Clin Virol* 2009 Jan 6 [Epub ahead of print]
 21. Khamrin P, Takanashi S, Chan-It W, Kobayashi M, Nishimura S, Katsumata N, Okitsu S, Maneekarn, N, Nishio O, Ushijima H. Immunochromatography test for rapid detection of norovirus in fecal specimens. *J Virol Methods* 2009 Jan 9. [Epub ahead of print]
 22. Usami M, Trinh QD, Yagyu F, Hayakawa Y, Inaba N, Okitsu S, Phan TG, Ushijima H. Throughput expression of multiple G-protein coupled receptors for HIV infection in choriocarcinoma cells, trophoblasts, and breast milk cells. *Clin Lab*, in press.
- 学会発表
1. 牛島廣治、早川有子、清水優子、沖津祥子、山本直彦. HIV 陽性母乳の加熱不活性化についての研究 第 23 回日本母乳哺育学会学術集会(2008.10.4-5) 岡山
 2. 牛島廣治、早川有子、Phengxay Manilay、清水優子、沖津祥子、山本直彦
どこでも出来る固形アルコール燃料と飲料アルミ缶を用いた HIV 陽性母乳の加熱不活性化について 第 23 回日本国際保健医療学会学術集会 (2008.10.25-26) 東京
- G. 知的財産の出願・登録状況 (なし)

「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
研究分担報告書

研究分担課題名：HIV 母子感染のメカニズム、免疫・ウイルス学的研究および国際保健学的研究
2. 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とアルミ缶の使用法：ウイルス不活化とケニア貧困地区での使用に関する聞き取り調査—

研究分担者：牛島廣治 藍野大学医療保健学部藍野健康科学センター・教授
研究協力者：山本直彦 名古屋大学大学院医学系研究科環境医動物学・准教授
沖津祥子 藍野学院短期大学・講師
清水優子 藍野大学医療保健学部藍野健康科学センター・研究補助員
早川有子 群馬バース大学看護学部・准教授

研究要旨：

アルミ缶を用いたコンロ、ナベと市販の固形アルコール燃料を用いて母乳中 HIV の不活化を試み、昨年度は不活化の条件を決定した。今年度はこの条件で実際に HIV が不活化されるかを逆転写酵素活性で調べた。母乳の加熱なしでも活性の低下が見られたが 70℃加熱により、活性は完全に消失した。実際の使用を考えてケニア ナイロビでインタビューを行ったところ幾つかの問題点がわかった。

A. 研究目的

HIV の母子感染は途上国において大きな問題である。HIV 感染母乳を介しての児への感染があることから調整粉乳使用が望ましい。一方調整粉乳には免疫物質が含まれていない、購入資金が必要、溶かす水の衛生状態、溶かし方が問題になっており、現時点では WHO は途上国においては調整粉乳より母乳を勧めている。そこで母乳中のウイルスを何らかの方法で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℃の温度に短い時間で母乳を加熱し、なるだけ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の電気やガスがない場所で簡単に加熱する方法を参考とし、固形アルコール燃料の使用を検討し

た。勿論、ガスなどの設備があればより容易に行える。昨年度、①通常のコンロ、ナベなどの容器の代わりにアルミ缶を再利用したコンロ、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 50ml の母乳を 70℃以上に何回繰り返すことができるか、について検討した。今年度は④HIV を母乳に加え加熱による不活化を検討した。⑤さらに実際の使用を考えて、現地の保健婦、医師の声を聞いた。

B. 研究方法

1) HIV の加熱による不活化は、一定量のウイルスを母乳に加え、昨年度検討した Flash heating 法の条件を用いて行った。不活化の状態は、逆転写酵素活性を Lenti RT Activity Kit (Cavidi AB, Uppsala, Sweden) で調べた。

2) 母乳は群馬バース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。また HIV の不活化実験は名古屋大学で行われた。

3) ナイロビの貧民地区で我々の方法の利用を考え、HIV 感染者のサポートをしている NPO 活動者 (山本直彦研究協力者ら) の協力のもと、現地のボランティア 1 名およびマタニティ・クリニックの医師 1 名にインタビューを行った。

C. 研究結果

1) HIV をリン酸緩衝液と母乳に加え、室温保持と 70°C 加熱有無での逆転写酵素活性を調べた。リン酸緩衝液では加熱によってウイルスの不活化が見られたが、母乳では加熱しなくても一部不活化され、加熱によって完全に不活化された (表 1)。

2) 現地のボランティアおよびマタニティ・クリニックの医師各 1 名にインタビューを行ったところ次の意見が出た。毎回母乳を与えるときに加熱するというのは手間がかかる、何らかの金銭的援助が欲しい、人によっては搾乳器がないとできないのではないかと、温度調整が難しいか、成分は壊れないかの質問が出た。これらの質問に対し成分は壊れることはなく、上手にすれば搾乳器はいらないがこの方法を行うのに幾つか考慮すべきことがわかった。また母乳を加熱しているところを周囲に見られると不審がられ差別の対象になる恐れがあるとの意見があった。

D. 考察

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 の逆転写酵素活性は消失した。

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)。この文献での Flash heating 法は我々の方法とは異なり、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この文献の方法でも良い。

実際、母乳に HIV を加え、あらかじめ決めた条件での Flash heating を行った。母乳そのものでも不活化されることがわかったが完全ではなかった。加熱により完全に不活化された。実際に行う場合は不活化のための温度管理に難点が考えられた。HIV 感染の実態と母乳哺育のメリットの観点から考え、またさらにケニアでのインタビューの結果を考え合わせると我々の方法を実際に行う上で問題点をどう解決するか、今後の検討が必要である。

E. 結論

母乳添加 HIV は 70°C の加熱で不活化が可能であった。現地でのこの方法の使用には社会的な要因があり、今後検討する必要がある。

F. 研究業績

前項掲載

G. 知的財産の出願・登録状況

なし

表1 HIVを加えた母乳の加熱不活化

				OD	pg/ml
HIV(IIIB)	+	PBS (50ml)	加熱なし	1.459	1403
HIV(IIIB)	+	PBS (50ml)	加熱 (70°C、2分)	0	0
HIV(IIIB)	+	母乳 (50ml)	加熱なし	0.792	123
HIV(IIIB)	+	母乳 (50ml)	加熱 (70°C、2分)	0	0

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

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

平成 20 年度研究分担報告書

分担総合報告書

研究分担課題名：脱落膜・胎盤局所免疫からみた HIV 垂直感染の解析と予防に関する研究

研究分担者：早川 智	所属・職	日本大学 医学部	教授
研究協力者：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
相澤志保子	所属・職	日本大学 医学部	助手

研究要旨：

HIV の経胎盤感染を *in vitro* において再現するため、複数の絨毛癌細胞株、不死化栄養芽細胞を用い、HIV 感受性を検討し、インフルエンザウイルスと比較した。その結果、HIV は syncytial trophoblast に感受性が高いが、cytotrophoblast, invasive trophoblast には殆ど感受性がないこと、一方 A 型インフルエンザウイルスは cytotrophoblast, invasive trophoblast に感受性が高いが、syncytial trophoblast には殆ど感受性が低いこと、両ウイルスはともに trophoblast に apoptosis を誘導することが明らかになった。慢性感染症である HIV 感染と急性感染症であるインフルエンザでは胎盤関門は異なった戦略をとっている可能性がある。

A.研究目的

1. HIV 陽性妊婦では、血中ウイルスが検出限界以下の場合でも、しばしば胎盤に HIV 関連抗原が染色される。しかし、経胎盤感染を来すことはきわめて稀である。胎盤は様々な細胞成分よりなるが、その主体をなすのは trophoblast である。しかし、

trophoblast は複数の分化段階があり、免疫学的あるいは生理学的な形質も異なる。我々は HIV に対する感受性とその調節因子を解析するため、複数の絨毛癌細胞株、不死化栄養芽細胞を用いた検討を行った。

B. 研究方法 ヒト絨毛癌細胞株 BeWo, JEG-3, JAR, 不死化初期栄養芽細胞 Sw71, HTR8 に CXCR4 指向性ウイルスである HIV-LAI を感染させ、培養上清中の HIVp24 を ELISA で検討した。又、ウイルス RNA 量を real time PCR で検討した。同様に H3N2 influenza virus Udorn を感染させ、検討した。BeWo については、Forskolin で分化を誘導しウイルス産生への影響を検討した。さらに TLR 3, 7, 8, 9 アゴニストである Poly(IC), LPS, Imiquimod, R848, CpG を添加しウイルス複製への影響を検討した。

(倫理面への配慮)

HIV 感染実験は BSL3 施設の使用が必須条件であり、日本大学医学部バイオリスク管理委員会の許可を受け、同大学感染症ゲノム研究センターにおいて登録された研究者のみが実験を行う。

C. 研究結果

1) 細胞株による HIV 感受性の差異

ヒト絨毛癌細胞株 JEG-3 は HIV 感受性であったが、BeWo, JAR では複製が見られなかった。不死化初期栄養芽細胞 Sw71, HTR8 も感受性がなかった。

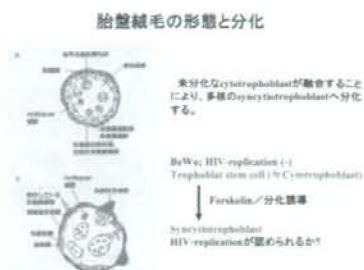
2) 絨毛細胞の分化段階と HIV 感受性の検討

未分化な BeWo は HIV 非感受性であるが、Forskolin による分化誘導を受けると HIV に CD4 非依存性に感染し複製することが判明した。分化の過程で CXCR4 発現は変化せず、CD4 の発現も誘導しない

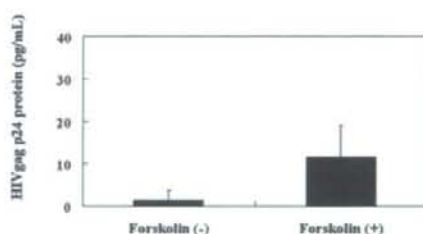
3) TLR agonist による調節

HIV の複製は、TLR-7, 8 からのシグナルで有意に抑制される。他の TLR か

らのシグナルは現在検討中である。

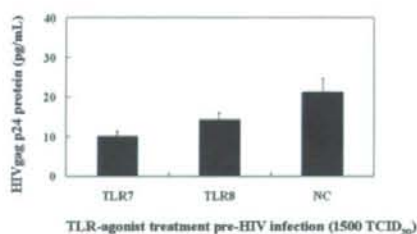


BeWo の分化と HIV 複製



HIV gag p24 production in supernatant after HIV-infection (1000TCID₅₀)

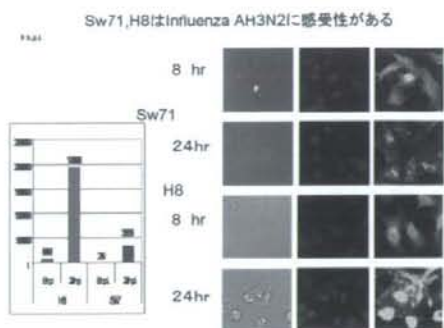
TLR-agonist 前処理が HIV 複製に及ぼす影響



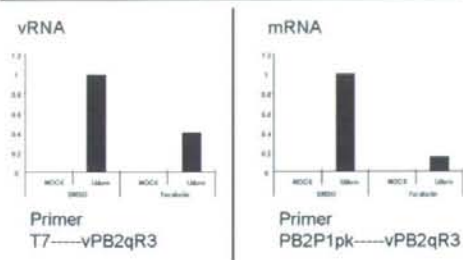
TLR-agonist treatment pre-HIV infection (1500 TCID₅₀)

4) trophoblast における influenza 感染

不死化初期栄養芽細胞 Sw71, HTR8, 未分化な BeWo は HIV 感受性であるが、BeWo は Forskolin による分化誘導を受けると HIV に抵抗性を獲得する。



forskolinを用いて分化誘導したBeWoでは vRNA、mRNAの発現が抑制される



D.考察

HIV の経胎盤感染を *in vitro* において再現するため、複数の絨毛癌細胞株、不死化栄養芽細胞を用い、HIV 感受性を検討し、インフルエンザウイルスと比較した。その結果、HIV は syncytial trophoblast に感受性が高いが、cytotrophoblast, invasive trophoblast には殆ど感受性がないこと、一方 A 型インフルエンザウイルスは cytotrophoblast, invasive trophoblast に感受性が高いが、syncytial trophoblast には殆ど感受性が低いこと、両ウイルスはともに trophoblast に apoptosis を誘導することが明らかになった。インフルエンザが妊婦・胎児に与える影響については 1918 年のスペイン風邪、1957 年のアジアでのパンデミックにおいて、妊婦の死亡率が高く流産が増加したという報告がある。また、軽症であっても、思春期以降に統合失調症を発症するリスクが数倍に高まる。In vitro で trophoblast にインフルエンザウイルスが感染することを明らかにし

たのは世界中で我々が初めてである。

胎盤関門は慢性感染症である HIV 感染では、胎盤が度々ウイルスに曝露されるために、最初に接触する syncytium の感受性を高めて cytotrophoblast への波及を防ぎ、一方急性感染症であるインフルエンザでは最初に曝露する syncytium のウイルス抵抗性を高めて、中和抗体の出現を待つという異なった戦略をとっている可能性がある。

E.結論

急性感染症であるインフルエンザに対して胎盤は感染抵抗性の syncytial trophoblast を組織表面に配置し、中和抗体の出現を待つ。一方、中和抗体の期待できない HIV 感染症では、syncytium への感染を許すが cytotrophoblast への感染は許さず、アポトーシスによってこれを排除することで胎児を感染から防御する。

F.研究業績

- 1) Komine-Aizawa S et al. Forskolin induced differentiation of a human choriocarcinoma cell line BeWo decreases its susceptibility to H3N2 influenza virus 投稿中
- 2) Quang T et al. H3N2 influenza A virus replicates in immortalized human first trimester trophoblast cell lines and induces their rapid apoptosis
- 3) Shibata T et al., Immunofluorescence imaging of the influenza virus M1 protein is dependent on the fixation method. J Virol Methods. 2009 Mar;156(1-2):162-5.,
- 4) Naganawa S et al. Net positive charge of HIV-1 CRF01_AE V3 sequence regulates viral sensitivity to humoral immunity. PLoS ONE. 2008 Sep 12;3(9):e3206

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
Tsunekazu KITA Naoto YOSHINO Yuki TSUKAHARA Masao TOGAWA Noriyuki INABA Yuichi WADA	Epidemiological Study on Prevalance of HIV infected Pregnant Woman and Evaluation of Trans- Vaginal Delivery Regarding to Prevention of Mother-to- Child Transmission	CHALLENGING PRACTICES ON HIV/AIDS in Japan		100-102	2008
稲葉憲之	周産期におけるHIV感染の現 状 —厚労省班研究に基づいて	日本産婦人科学会 熊本地方部会雑誌	52	25-29	2008
稲葉憲之・大島教子・西川正能・ 岡崎隆行・庄田亜紀子・ 根岸正実・林田志峯・ 稲葉未知世・和田裕一・ 喜多恒和・外川正生・塚原優己・ 名取道也・牛島廣治・戸谷良三・ 五味淵秀人・早川智・尾崎由和・ 吉野直人・田中憲一・熊曙康	周産期におけるHIV/エイ ズ、その現状と対策 —厚労省研究班の成績をも とに	臨婦産	63-2	151-155	2009
稲葉憲之・大島教子・林田志峯・ 西川正能・林田綾子・岡崎隆行・ 庄田亜紀子・稲葉未知世・ 根岸正実・多田和美・稲葉不知之 田所 望・深澤一雄・渡辺 博・ 高見澤裕吉	肝炎ウイルス	産科と婦人科	75-11	1504- 1510	2008
林田志峯・稲葉憲之・大島教子・ 西川正能・岡崎隆行・ 庄田亜紀子・根岸正実・ 稲葉未知世・深澤一雄・ 渡辺 博・高見澤裕吉	HBV母子感染予防対策の比 較検討 —厚生省方式、千葉大方 式、獨協医大方式—	日産婦関東連会誌	45	381-384	2008
稲葉憲之・大島教子・林田志峯・ 西川正能・岡崎隆行・稲葉未知世 根岸正実・稲葉不知之・ 田所 望・深澤一雄・渡辺 博・ 熊 曙康・高見澤裕吉	母体ウイルス感染と母乳哺 育	産科と婦人科	76-1	62-66	2009
尾崎由和・外川正生・葛西健郎・ 大場 悟・國方徹也・吉野直人・ 榎本てる子・戸谷良三・ 喜多恒和・和田裕一・塚原優己・ 稲葉憲之	わが国におけるHIV母子感染 の現状—全国の病院小児科 へのアンケート調査から	The Journal of AIDS Reserch	10-2	107-117	2008
喜多恒和	HIV	産科と婦人科	75-11	1600- 1606	2008
喜多恒和・和田裕一	HIV垂直感染とその予防	産婦人科治療	97-5	502-508	2008

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
N. Yoshino, M. Kanekiyo, Y. Hagiwara, T. Okamura, K. Someya, K. Matsuo, Y. Armi, S. Sato, N. Yamamoto, M. Honda	Mucosal Administration of Completely Non-Replative Vaccinia Virus Recombinant Dairen 1 strain Elicits Effective Mucosal and Systemic Immunity	Journal compilation	68	476-483	2008
塚原優己・関矢早苗・ 矢永由里子・内山正子・ 喜多恒和・外川正生・大金美和・ 稲葉憲之・和田裕一	シンポジウム14「HIV母子感 染予防対策の20年」—現在 の医学的・社会的問題点と その対策	The Journal of AIDS Reserch	10-3	170-174	2008
佐久本薫・青木陽一	沖縄県妊娠HIV抗体スクリー ニングの現状	沖縄医報	44-9	48-50	2008
箕浦茂樹	—産科医療従事者からみた 周産期医療の変遷— 周産期指標はどのようにし て向上したか？	周産期医学	38-3	279-283	2008
松田秀雄・川上裕一・芝崎智子・ 吉田昌史・古谷健一	—妊娠中に注意すべきウイ ルス感染— サイトメガロウイルス	周産期医学	37-12	1505- 1508	2008
松田秀雄	バルボウイルスB19による胎 児水腫の治療法は？	臨婦産	62-4	384-391	2008
松田秀雄・上里忠司・川上裕一・ 藤田寿太郎・古谷健一	先天性風疹症候群感染症予 防のための工夫 —風疹抗体価低値の妊婦に おける産後予防接種施行調 査—	産婦人科の実態	57-5	789-791	2008
吉田昌史・松田秀雄	バルボB19ウイルス感染対峙 に対する診断と治療	臨婦産	62-6	859-861	2008
高桑好一・大木 泉・田中憲一	風疹ウイルス	産科と婦人科	75-11	1607- 1611	2008
Rie Tanaka, Hideji Hanabusa, Ei Kinai, Naoki Hasegawa, Masayoshi Negishi, and Shingo Kato	Intracellular Efavirenz Levels in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Human Immunodeficiency Virus-Infected Individuals	Antimicrobial Agents and Chemotheray	Feb	782-785	2008
Naoaki Kuji, Tsuyoshi Yoshii, Toshio Hamatani, Hideji Hanabusa, Yasunori Yoshimura, and Dhingo Kato	Buoyant density and sedimentation dynamics of HIV-1 in to density-gradient media for semen processing	Ferility and Sterility	90-5	1983- 1987	2008

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yasuhito Tanaka, Kousuke Hanada, Hideji Hanabusa, Fuat Kurbanov, Takashi Gojobari and Masashi Mizokami	Increasing genetic diversity of hepatitis C virus in haemophiliacs with human immunodeficiency virus coinfection	Journal of General Virology	88	2513-2519	2007
Ei Kinai, Hideji Hanabusa, and Shingo Kato	Prediction of the Efficacy of Antiviral Therapy for Hepatitis C Virus Infection by an ultrasensitive RT-PCR Assay	Journal of General Virology	79	1113-1119	2007
Satoru Kaneko, Kiyoshi Takamatsu, Joji Yoshida, Keisuke Miyaji, Hiromichi Ishikawa, Toru Kawamata, Naoshi Shinozaki	Individual tissue culture system in a disposable capsule with hypoxic atmosphere	Ann. Cancer Res. Therap.	16-1	8-11	2008
Izumi Ooki, Koichi Takaruwa, Mamiko Akashi, Taro Nonaka, Tomokazu Yokoo, Kenichi Tanaka	Studies on the Compatibility of HLA-Class II Alleles in Patient Couples with Severe Pre-Eclampsia Using PCR-RFLP Methods	American Journal of Reproductive Immunology	60	75-84	2008
塚原優己	性感染症の最近の動向	産科と婦人科	75-11	1452-1458	2008
塚原優己	性感染症 (STI) と妊娠 —産婦人科診療ガイドライン (案) から—	産婦人科の実際	57-5	807-810	2008
高橋宏典・塚原優己・北川道弘	妊娠初期の異常と画像診断 多胎妊娠	産婦人科の実際	57-3	385-390	2008
谷口晴記・井上孝実・大金美和・山田里佳・減河いくみ・佐野(嶋)貴子・辻麻里子・内山正子・沼直子・渡邊英恵・喜多恒和・外川正生・塚原優己	わが国独自の「HIV母子感染 子防対策マニュアル」 改定の骨子	産婦人科の実態	58-3	445-451	2009

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
塚原優己・山田里佳・嶋 貴子 外川正生・喜多恒和・稲葉憲之・ 和田裕一	HIV Prevention of mother to child transmission of HIV	日性感染症会誌	19-1	63-68	2008
塚原優己・関矢早苗・ 矢永由里子・内山正子・ 喜多恒和・外川正生・大金美和・ 稲葉憲之・和田裕一	シンポジウム14「HIV母子感 染予防対策の20年」—現在 の医学的・社会的問題点と その対策	The Journal of AIDS Reserch	10-3	170-174	2008
國方徹也・へるす出版	II、キャリアオーバーが問 題となる主な疾病 HIV母子感染後	キャリアオーバー と成育医療 小児慢性疾患患者 の日常生活向上の ため周産期医学	11	1059	2008
Nguyen TA, Hoang LP, Phan LD, Hoang KT, Okitsu S, Mizuguchi M, Ushijima H.	Use of sequence analysis of the VP4 gene to classify recent Vietnamese rotavirus isolates.	Clin Microbiol Infect.	14-3	235-241	2008
Chan-It W, Khamrin P, Saekhow P, Pantip C, Thongprachum A, Peerakome S, Ushijima H, Maneekarn N.	Multiple combinations of P[13]-like genotype with G3, G4, and G5 in porcine rotaviruses.	J Clin Microbiol.	46(4)	1169-73	2008
Yan H, Koyano S, Inami Y, Yamamoto Y, Suzutani T, Mizuguchi M, Ushijima H, Kurane I, Inoue N.	Genetic variations in the gB, UL144 and UL149 genes of human cytomegalovirus strains collected from congenitally and postnatally infected Japanese children.	Arch Virol	153(4)	667-74	2008
Khamrin P, Okitsu S, Ushijima H, Maneekarn N.	Novel nonstructural protein 4 genetic group in rotavirus of porcine origin.	Emerg Infect Dis	14(4)	686-688	2008
Nguyen TA, Hoang L, Pham LD, Hoang KT, Okitsu S, Mizuguchi M, Ushijima H.	Norovirus and sapovirus infections among children with acute gastroenteritis in Ho Chi Minh City during 2005-2006.	J Trop Pediatr.	54(2)	102-13	2008
Rathore A, Chatterjee A, Sood V, Khan SZ, Banerjee AC, Yamamoto N., Dhole TN.	Risk for HIV-1 infection is not associated with repeat- region polymorphism in the DC-SIGN neck domain and novel genetic DC- SIGN variants among North Indians	Clin Chim Acta	391 (1-2)	1-5	2008