

- sapovirus. *Clin Lab* 2006; 52(7-8):363-366.
- 16) Okitsu-Negishi S, Okame M, Shimizu Y, Phan TG, Tomaru T, Kamijo S, Sato T, Yagyu F, Mueller WEG, Ushijima H. Detection of norovirus antigens from recombinant virus-like particles and stool samples by a commercial norovirus enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 2006 Oct; 44(10):3784-3786.
 - 17) Ozeki N, Ushijima H, Knowles A, Asada Y. Analyses of transcultural stress factors and the mental well-being of female foreign residents in Japan. *J Jp Soc Psychosom Obstet Gynecol* 11(2): 141-151, 2006.
 - 18) Maneekarn N, Khamrin P, Chan-it W, Peerakome S, Sukchai S, Pringprao K, Ushijima H. Detection of rare G3P[19] porcine rotavirus strains in Chiang Mai, Thailand provides evidence for the origin of VP4 genes of Mc323 and Mc345 human rotaviruses. *J Clin Microbiol* 2006 Nov; 44(11):4113-4119. Epub 2006 Sep 20.
 - 19) Phan TG, Khamrin P, Quang TD, Dey SK, Yagyu F, Okitsu S, Nishio O, Ushijima H. Genetic characterization of group A rotavirus strains circulating among children with acute gastroenteritis in Japan in 2004-2005. *Infect Genet Evol* 2007 Mar; 7(2): 247-253.
 - 20) Phan TG, Trinh QD, kaneshi K, Ueda Y, Nakaya S, Nishimura S, Sugita K, Nishimura T, Yamamoto A, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Emergence of new variant rotavirus G3 among infants and children with acute gastroenteritis in Japan during 2003-2004. *Clin Lab*, 2007; 53(1-2): 41-48.
 - 21) Shimizu H, Phan TG, Nishimura S, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H. An outbreak of adenovirus serotype 41 infection in infants and children with acute gastroenteritis in Maizuru city, Japan. *Infect, Genet Evol* 2007 Mar; 7(2):279-284. Epub 2006 Dec 6.
 - 22) Müller WEG, Belikov SI, Kaluzhnaya O, Perovic-Ottstadt S, Fattorusso E, Ushijima H, Krasko A, Schöder HC. Cold stress defense defense in the freshwater sponge *Lubomirskia baicalensis*. Role of okadaic acid produced by symbiotic dinoflagellates, *FEBS J*. 2007 Jan; 274(1):23-36.
 - 23) Phan TG, Trinh QD, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Emergence of rare sapovirus genotype among infants and children with acute gastroenteritis in Japan. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007 Jan; 26(1): 21-27.
 - 24) Zhou Y, Ushijima H, Frey TK. Genomic analyses of diverse rubell virus genotypes. *J Gen Virol* 2007 Mar; 88(pt 3): 932-941.
 - 25) Nguyen TA, Yagyu F, Okame M, Phan TG, Trinh QD, Yan H, Hoang KT, Cao ATH, Hoang PL, Okitsu S, Ushijima H. Diversity of viruses associated with acute gastroenteritis in children hospitalized with diarrhea in Ho Chi Minh city, Vietnam. *J Med Virol*, 2007 May; 79(5): 582-590.
 - 26) Wang XT, Liu PY, Tang JB, Mizukami H, Xin KQ, Ozawa K, Ushijima H.

- Tendon healing in vitro: adeno-associated virus-2 effectively transduces intrasynovial tenocytes with persistent expression of the transgene, but other serotypes do not. *Plast Reconstr Surg* 2007 Jan; 119(1):227-234.
- 27) Phan TG, Khamrin P, Quang TD, Dey SK, Takanashi S, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H. Detection and genetic characterization of group A rotavirus strains circulating among children with acute gastroenteritis in Japan. *J Virol*, 2007 May, 81(9): 4645-4653. Epub 2007 Feb 7.
- 28) Dey SK, Phan TG, Nguyen TA, Nishio O, Salim AFM, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Prevalence of sapovirus infection among infants and children with acute gastroenteritis in Dhaka City, Bangladesh during 2004-2005. *J Med Virol*, 2007 May; 79(5): 633-638.
- 29) Makita K, Hayakawa Y, Okame M, Homma K, Phan TG, Okitsu S, Ushijima H. First detection of IgA against Norovirus in breast milk. (short communication) *Clin. Lab* 53(3-4): 125-128, 2007.
- 30) Terao Y, Takagi H, Phan TG, Okitsu S, Ushijima H. Identification of IgA against coronavirus in breast milk. *Clin Lab* 78(3-4): 129-130, 2007.
- 31) Khamrin P, Maneekarn N, Peerakome S, Chan-It W, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Novel porcine rotavirus of genotype P[27] shares new phylogenetic lineage with G2 porcine rotavirus strain. *Virology*, 2007 May 361(2):243-252, Epub 2007 Jan 9.
- 32) Ushijima H. Foreword. Mother and child health in Asia and Africa. *Pediatrics International*, 2007 Apr; 49(2): 258-259.
- 33) Phengxay M, Ali M, Yagyu F, Soulivanh P, Kuroiwa C, Ushijima H. Risk factors for protein-energy malnutrition of children under 5 years: Study from Luangprabang province, Laos. *Pediatrics International*, 2007 Apr, 49(2): 260-5.
- 34) Nguyen TH, Ushijima H. Nutritional status of low-birth weight ethnic minority infants in Backan province, Vietnam. *Pediatrics International*, 2007 Apr; 49(2): 266-272.
- 35) Li L, Li K, Ushijima H. Moderate-vigorous physical activity and body fatness in Chinese urban school children. *Pediatrics International*, 2007 May; 49(2): 280-285.
- 36) Li Y, Hotta M, Shi A, Li Z, Yin J, Guo G, Kawata K, Ushijima H. Malnutrition improvement for infants under 18 months old of Dai minority in Luxi, China. *Pediatr Int*. 2007 Apr; 49(2): 273-9.
- 37) Kominami M, Kawata K, Ali M, Meena H, Ushijima H. Factors determining prenatal HIV testing for prevention of mother to child transmission in Dar Es Salaam, Tanzania. *Pediatrics International*, 2007 Apr; 49(2): 286-292.
- 38) Hotta M, Ali M, Ushijima H, Lee S, Nakamura Y, Shigeta M, Kobayashi N. Situational analysis of maternal and child health services for foreign

- residents in Japan. *Pediatrics International*, 2007 Apr; 49(2): 293-300.
- 39) Khamrin P, Maneekarn N, Peerakome S, Tonusin S, Phan TG, Okitsu S, Ushijima H. Molecular characterization of rare G3P[9] rotavirus strains isolated from children hospitalized with acute gastroenteritis. *J Med Virol*. 2007 Jun; 79:843-851.
- 40) Lwembe R, Ochieng W, Panikulam A, Mongoina CO, Palakudy T, Koizumi Y, Kageyama S, Yamamoto N, Shioda T, Musoke R, Owens M, Songok EM, Okoth FA, Ichimura H. Ant-retroviral drug resistance-associated mutations among non-subtype B HIV-1-infected Kenyan children with treatment failure. *J Med Virol* 2007 Jul; 79(7):865-72.
- 41) Trinh DQ, Nguyen TA, Phan TG, Khamrin P, Yan H, Hoang PL, Maneekarn N, Li Y, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Sequence analysis of the VP7 gene of human rotavirus G1 isolated in Japan, China, Thailand, and Vietnam in the context of changing distribution of rotavirus G-types. *J Med Virol*, 2007 Jul; 79(7): 1009-1016.
- 42) Dieng H, Boots M, Higashihara J, Satho T, Kato K, Okada T, Komalamisra N, Ushijima H, Takahashi T, Kurane I, Eshita Y. Two dimensional gel analysis of midgut proteins of the dengue vector *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) with reference to sex and body size. *Jpn J Environ Entomol Zool*, 17(4):133-141, 2006.
- 43) X Xu, Liu Y, Sadamatsu M, Tsutsumi S, Akaike M, Ushijima H, Kato, N. Perinatal bisphenol A affects the behavior and SRC-1 expression of male pups but does not influence on the thyroid hormone receptor and its responsive gene. *Neurosci Res*. 2007 Jun; 58(2):149-155. Epub 2007 Feb 23.
- 44) 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*, 2007 Jun; 45(6):2098-9; author reply 2009.
- 45) Dieng H, Boots M, Tamori N, Satho T, Higashihara J, Okada T, Kato K, Komalamisra N, Ushijima H, Takasaki T, Kurane I, Eshita Y. Effect of food, embryo density and conspecific immatures on hatchability in the dengue vector *Aedes albopictus* *House and Household Insect Pests*, 28(2):117-127, 2007.
- 46) Li Y, Hotta M, Shi A, Li Z, Yin J, Guo G, Kawata K, Ushijima H. Malnutrition Improvement for Infants and Young Children under 18 months old of Dai Minority in Luxi, China. *Pediatr Int*, 49(2): 280-285, 2007.
- 47) Phan TG, Khamrin P, Trinh DQ, Dey SK, Takanashi S, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima, H. Emergence of intragenotype recombinant sapovirus in Japan. *Infect Genet Evol* 2007 Jul; 7(4):542-546. Epub 2007 Feb 17.

- 48) 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*, 2007 Aug; 79(8): 1180-1186.
- 49) 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*, 2007 Sep; 79(8): 1388-1400.
- 50) 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*, 2007 Jul; 45(7): 2287-2288. Epub 2007 May 23.
- 51) Muller WEG, Schlossmacher U, Eckert C, Krasko A, Boreiko A, Ushijima H, Wolf SE, Tremel W, Muller IM, Schroder HC. Analysis of the axial filament in spicules of the demosponge *Geodia cydonium*: Different silicatein composition in microscleres (asters) and megascleres (oxeas and trochaenes). *Eur J Cell Biol*, 2007 Aug; 86(8): 473-487. Epub 2007 Jul 19.
- 52) 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*, 2007 Oct; 79(10): 1611-1616.
- 53) 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*, 2007 Aug; 45(8):2641-8, 2007. [E-Pub]
- 54) 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*, 2007; 53 (7-8): 405-412.
- 55) 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*, 2007 53(7, 8):413-21.
- 56) Phan TG, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H. Evidence of intragenic recombination in G1 rotavirus VP7 genes. *J Virol*, 2007 Sep; 81(18):10188-10194, 2007. Epub 2007 Jul 3.
- 57) Phan TG, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H. Genetic heterogeneity, evolution and recombination in emerging G9 rotaviruses. *Infect, Genet Evol*, 2007 Sep; 7 (5) : 656-63, 2007. [Epub 2007 May 6].
- 58) 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*, 2007 Aug; 53(4): 264-9, 2007. [Epub 2007 May 12].
- 59) 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*, 2007 Nov; 79(11): 1775-1782.
- 60) 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*, 2007 Nov; 40 : 218-223, Epub 2007 Sep 18.
- 61) 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*, 2007 Dec; 79: 1921-1926, 2007.
- 62) 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* 2007 Dec; 79: 1959-1965.
- 63) Kihara Y, Satho T, Eshita Y, Sakai K, Kotaki A, Takasaki T, Rongsriyam Y, Komalamisra N, Srisawat R, Lapcharoen P, Sumroiphon S, Iwanaga S, Ushijima H, Endoh D, Miyata T, Sakata A, Kashige N, Miake F, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S, Muzutani T. Rapid determination of viral RNA sequences in mosquitoes collected in the field. *J Virol Method*, 2007 Dec; 146(1-2):372-4, 2007. Sep. 17; [Epub ahead of print]
- 64) Phan TG, Nishimura S, Sugita K, Nishimura T, Okitsu S, Ushijima H. Multiple recombinant noroviruses in Japan. *Clin Lab*, 53:567-70, 2007.
- 65) Fujimoto T, Shinohara M, Ito M, Okafuji T, Okafuji T, Nishio O, Yoshida H, Shimizu H, Chikahira M, Phan TG, Ushijima H. Detection of dual-infected cases of adenoviruses and coxsackieviruses type B by real-time PCR but not by conventional viral culture technique. *Clin Lab*, 53: 605-9, 2007.
- 66) 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*, 2008 Feb; 80(2):298-305.
- 67) 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* 2007 Nov; 81(22): 12298-12306, Epub 2007. Sep 12.
- 68) Rathore A, Chatterjee A, Sivarama P, Yamamoto N, Dhole TN. Role of homozygous DC-SIGNR 5/5 tandem repeat polymorphism in HIV-1 exposed seronegative North Indian Individuals. *J Clin Immunol* 2008 Jan; 28(1): 50-57
- 69) 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*, 2008 Feb; 147:360-363. Epub 2007 Oct 23.
- 70) 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*, 2008 Mar; 148(1-2):1-8, Epub 2007 Dec 3.
- 71) Muller WE, Wang X, Kropf K, Ushijima H, Geurtsen W, Eckert C, Tahir MN, Tremel W, Boreiko A, Schlossmacher U, Li J, Schrodre HC. Bioorganic/inorganic hybrid composition of sponge spicules: Matrix of the giant spicules and of the comitalia of the deep sea hexactinellid *Monorhaphis*. *J Struct Biol*, 2008 Feb; 161(2):188-203. Epub 2007 Oct 26.
- 72) 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 immunosorbent assay (PCR-ELISA) for identification of clinically relevant human group A rotavirus G and P genotypes. *J Clin Microbiol*, 2008 Feb 46(2): 462-469. Epub 2007 Dec 5.
- 73) 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*, 2008, Feb 29; 122(1-2): 204-10, Epub 2007 Dec 4.
- 74) 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*, 2008 Mar, 14(3)235-241. Epub 2008 Jan 10.
- 75) 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.
- 76) 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.
- 77) 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.
- 78) 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.
- 79) 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.
- 80) 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.
- 81) 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.
- 82) 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.
- 83) 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.
- 84) 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.
- 85) 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]
- 86) 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]
- 87) 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.
- 88) 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.
- 89) 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.
- 90) 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.
- 91) 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]
- 92) 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.
- 93) 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.
- 94) 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]
- 95) 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]
- 96) 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.
2. 学会発表
- 1) 柳生文宏、沖津祥子、牛島廣治:絨毛癌細胞および直腸癌細胞におけるGプロテインレセプターの発現 日本ウイルス学会第54回学術集会 2006.11.29-31.
- 2) 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

- 3) 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

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

表1 胎盤栄養膜細胞および母乳細胞における mRNA 発現

Genes	Tropoblast	Breast Milk Cell
CD4	±	+
APJ	-	±
C5a receptor	++	+
CCR1	+	+
CCR4	-	-
CCR5	-	+
CCR7	+	+
CCR9/CCR10	++	+
CXCR3	-	+
CXCR4	+	++
CXCR5/BLR1	+	+
DEZ α	-	±
DEZ β	-	-
Duffy antigen	-	-
GPR-9-6	-	-
GPR5	+	+
GPR12	+	±
GPR15	-	-
GPR25	-	+
RDC1	+	++

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

表2 胎盤栄養膜細胞における G プロテインレセプターの発現の定量結果

G protein receptor	Relative intensity*
C5a receptor	0.012
CCR7	0.026
CCR9	1.112
CXCR4	0.086
CXCR5	0.013
GPR5	0.074
GPR12	0.014
RDC1	0.002

*; β -actin を 100 とする発現量

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
分担総合報告書

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

課題 2. HIV 母子感染とウイルスの性状

分担研究者	牛島廣治	藍野大学 医療保健学部/健康科学センター	教授
研究協力者	山本直彦	名古屋大学環境医動物	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
	柳生文宏	東京大学大学院医学系研究科	助教

研究要旨：

ベトナム（ホーチミン）、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および疫学的研究を行った。これらの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・副作用などの知識と行動が必要である。

A. 研究目的

1：途上国においても HIV の母子感染を防ぐため妊婦に抗 HIV 薬が使われている。また感染妊産婦は同時に HBV や HCV に感染している場合がある。母子感染児の HIV の性状を把握することも重要である。ベトナム ホーチミン市の HIV 感染を取り巻く状況（2004-2005 年）について報告する。

2：ケニアの貧困地区における HIV 母子感染の現状および HIV 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べた。

B. 研究方法

1：1)2004-2005 年、ベトナム ホーチミン市内の小児病院において抗 HIV 薬が投与されていない HIV 陽性の母親から生まれた児より、HIV 抗体陽性の血液 29 サンプルを採取した。血漿をサンプルとし、HBs 抗原をダイナスクリーニング HBsAgII で、また HCV 抗体を HCV/PHA「アボット」を用いて検出した。また同時に RNA を抽出して HBV と HCV の遺伝子を検出した。2)HIV 抗体陽性の感染児 104 例から 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。薬剤耐性を調べる目的でプロテアーゼ領域の配列に変異があるかを調べた。（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。）

2:1)2007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。(当地および名古屋大学で倫理委員会の承認を得た。)

2)2008年同上貧困地区で同様な解析を行った。

3:1)2006年、雲南省の52の郡において137,535人の妊産婦に対しHIVのスクリーニングおよび確認の検査を行った。一部のHIV陽性の女性には、HIVサブグループの検索およびAZTならびにNVPへの薬剤耐性に関与すると思われる遺伝子の変異を調べた。(昆明医学院で倫理委員会の承認を受け、検査対象者からの同意を得た。)

2)上記のスクリーニングの結果、陽性例では薬剤が投与されたため、治療による副作用の有無を血液検査で調べた。薬剤耐性遺伝子の変異の調査を続けて行った。

3)さらにHIV母子感染予防の治療の現状(2005-2007年)を調べる目的でHIV陽性母親、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

1-1)HBVはすべてのサンプルで陰性であった。HCVは5サンプルがPHA陽性であったがPCRは陰性であった。

2)104例の半数は生後6ヵ月以下であった。全体は1.5ヵ月から5歳で、子どもは治療されてなかった。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。

1-2)女性のHIV陽性率は約13%(115人中15人)で、約8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5人で33%(男性は10人中2人の20%)であった。サブタイプはA型9人、C型2人、D

型1人、不明3人であった。

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22%(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。

3-1)137,535人の妊産婦のうち365人がHIV陽性であった。その内250人が妊婦で115人が産婦であった。HIVの陽性率は0.27%、郡ごとを見ると0-1.56%であった。遺伝子を調べることが可能であったHIV陽性の妊産婦25症例のうち15例がAZTとNVPを併用していた。また10例がNVPを使用していた。AZTとNVP例では4例がCRF01_AE、5例がB、6例がCであった。またNVPのみの例では3例がCRF01_AE、4例がB、3例がCであった。AZT+NVP投与例の1例で薬剤耐性が見られた。V35T、V60I、K122E、E36A、T39D、I135V、S162Cであった。またNVP使用例では1例で薬剤耐性が見られた。V35T、V60I、K122E、V245Qであった。総計25例中2例に薬剤耐性が見られた。

3-2)治療による貧血が母親61例の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。前項で調べた例以外の検索でも薬剤耐性HIVが見られた。RT領域では5例で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。

3-3)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多く、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

1-1) ホーチミン市の健常人の HBV、HCV 感染の頻度はそれぞれ 10%、2% であり、HIV 感染児の HBV 重感染の頻度はそれより低かった。HCV 抗体は陽性例がいたが、遺伝子が見出されなかった。

1-2) この検体は生後 6 ヶ月以下が半数以上であり、1-1) でも恐らくは 6 ヶ月以下が多いと思われる母親からの HCV 抗体の移行と考えられた。児は薬剤を使用していないが、マイナーな薬剤耐性に関する変異の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

中国では高いものの、他のアジア、アフリカの国々の中にはもっと高率の国々が存在する。薬剤耐性株が広く見られること、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. 母子感染による HIV/HBV の重感染は見られず、HCV については 5 サンプルが抗体陽性であった。

2. 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 割が生産年齢であり、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. 研究発表

前述項目

G. 知的財産の出願・登録状況 (なし)

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
分担総合報告書

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

課題3：HIV 陽性母乳の加熱不活化についての研究

分担研究者：	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	名古屋大学環境医動物	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	群馬パース大学看護学部	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 の不活化を試みた。10g の燃料の使用で母乳 200ml を 70℃まで温度上昇させることが可能であった。50ml ずつ4回分割しての Flash heating も可能であった。HIV の不活化を逆転写酵素活性で見たところ、加熱なしでも不活化が見られたが 70℃加熱により、不活化が完全にできた。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、溶かし方の知識が問題になっており、現時点では WHO は途上国において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電気やガスがない場所で簡単に行う方法を参考として、固形燃料使用法を検討した。勿

論、ガスなどの設備があればより容易に行える。次の5点について調べた。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℃以上に何回繰り返し上昇できるか、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、HIV 感染妊産婦の声を聞いた。

B.研究方法

1) アルミ缶を使ったコンロ、ナベの作成は、災害時のコンロ、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) をそのまま使い、コンロ用は缶切りで上蓋をくりぬき、側面の上下端に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)(株ニチネン) 10g(φ28mm*H21mm)(表面積 615.8mm²)と 15g(φ37.5mm*H16.5mm)(表面積 1104.5mm²)を用いた。10、15gの固形燃料で70-80℃を目安とし、200ml母乳の温度変化を調べた。また10g、5g、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℃以上にもっていきけるかを調べた。

3) 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、1)2)のFlash heating法を用いて行った。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。

4) 母乳は群馬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った。

5) ナイロビの貧困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活動団体(山本直彦研究協力者ら)の協力を得、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) 10gおよび15gの固形燃料を用いた場合、母乳200mlは15gでは80℃まで10gでは70℃までしか上がらなかった。しかも燃料を使い切る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の固形燃料の上部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℃となったが、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の母乳が70℃を越えると次の母乳の入ったナベに代えることを繰り返し、即ち10gの固形燃料で何回70℃にもっていき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全量を一度に70℃に加熱した場合と同様の結果であるが、温度変化は50mlずつ4回の方がflash heatingの状態を示した(図1)。

4) 3)の条件を用いHIVをリン酸緩衝液と母乳に加え、室温保持と70℃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、加熱により完全に不活化された(表1)。

5) 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、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り、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と、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

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使用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1m³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、1m³のガスでは1075回が可能となる。一方1m³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回で、これは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。

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人/84人)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℃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論文の方法でも良い。

実際にHIVを母乳に加え、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、および母乳哺育のメリットの観点から考え、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の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

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℃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。HIV感染母乳は70℃の加熱でウイルスの不活化が可能であった。実際の場での使用に関しては社会的な他の要因があり、今後の検討が必要があった。

F. 研究発表

前項記載

G. 知的財産の出願・登録状況

なし

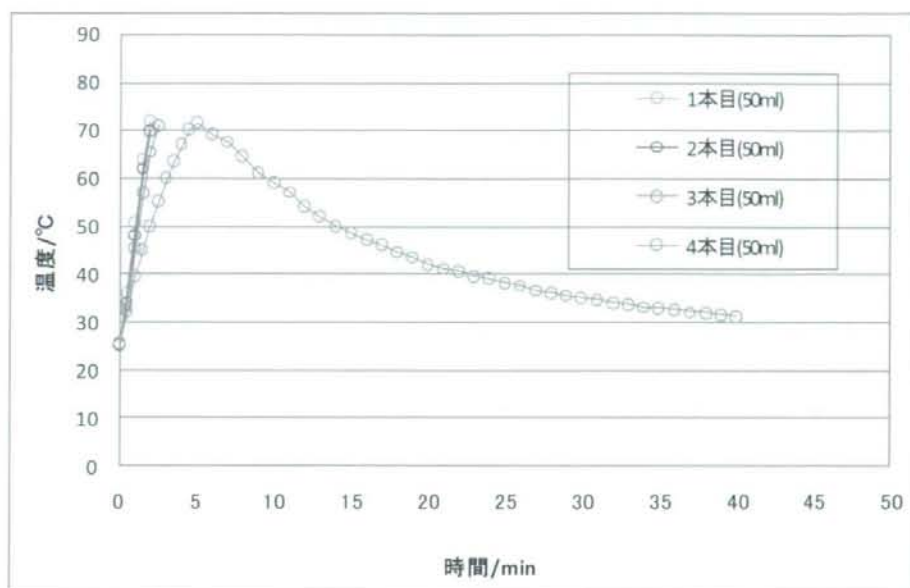


図1 10gの固形燃料で50mlの母乳で何回70°Cを越えることが可能かの実験
4回まで可能なことがわかった。すなわち総計200mlであった。

表1 HIVを加えた母乳の加熱不活化

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

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 陽性妊婦における子宮内の胎児は典型的な暴露非感染者と考えられ、脱落膜胎盤局所における免疫応答は極めて興味のあるところである。しかし、その病態生理には未知の点が多い。我々は HIV 陽性患者の子宮内環境を模倣する細胞を用いて、胎盤関門の分子機構を解析した。その結果、HIV は絨毛細胞、脱落膜リンパ球に対して感染を生じうる。この感染過程においてケモカインレセプターが必須であるが、絨毛細胞は複数のケモカインとそのレセプターを発現し、これらが hCG 産生や細胞増殖など絨毛細胞本来の機能にパラクライン、あるいはオートクラインに作用する。また、絨毛細胞への感染は分化レベルにより決定され、さらに TLR からのシグナルにより調節を受ける。脱落膜リンパ球の主体をなす CD56 陽性大顆粒リンパ球は、HIV に感染するが複製効率は悪く、HIV のリザーバーとなっている可能性がある。

A. 研究目的

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一つである。国連エイズ委員会の推定による全世界の小児エイズ患者は 2003 年に比べて 2006 年では約 100 万人と、依然として増加傾向は続いている。多くの先進国では同性愛・異性愛による HIV 感染者

は減少傾向にあり、HAART による感染者の予後改善も著しい。一方ではサハラ以南のアフリカ諸国や東南アジア、中国では HIV 感染者・エイズ患者の増加は止まないという現状がある。我が国では、近隣アジア諸国に比べると少数ではあるが、21 世紀に入っても HIV 感染者、エイズ患者の増加は止まない。幸いなことに、ここ数

年垂直感染は1%以下にコントロールされているが、HAARTによる副作用や新たな耐性ウイルスの出現などの問題が生じている。一方、HIV陽性妊婦における子宮内の胎児は典型的な暴露非感染者と考えられ、脱落膜胎盤局所における免疫応答は極めて興味のあるところである。本研究ではその解析を目的とした。

B. 研究方法

1) 子宮内における暴露非感染の病態

HIV陽性妊婦より生まれた児の多くは子宮内でHIVに晒されながら、感染しない典型的な暴露非感染者である。脱落膜・胎盤局所では特異な粘膜免疫系が存在し、HIVの感染を制御していると考えられる。我々は当初、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たが、実際の感染効率は成人と差がない。そこでこの問題を解決するため①脱落膜・胎盤・臍帯血より樹状細胞を分離増殖し、HIV、HIV持続感染細胞(本KHYG-1)処理しCTLあるいはHelper T細胞に対する抗原呈示誘導を観察する、②

健常者、HIV陽性母より生まれたHIV陰性児、HIV先天感染児の臍帯血を採取しELISPOT assayによるHIV由来ペプチドのepitope mappingでHIV陽性母より生まれたHIV陰性児に特異的なT細胞が認識する抗原を解析することを試みる、という実験を計画した。

2) 大顆粒リンパ球への感染

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。脱落膜大顆粒リンパ球のモデルとしてNKT細胞株MOTN、NK細胞株KHYG

に*in vitro*でHIV-LAIを感染させ、プロウイルスの組み込みとウイルス産生を各々real time PCRとp24に対するELISAで検討した。

3) TLRリガンドによる胎盤絨毛細胞への影響

HIV陽性妊婦ではしばしば歯周病の合併を見ることが、歯周病がHIV垂直感染のリスクファクターになることが知られている。我々は歯周病の原因菌である*Ps.gingivalis*、*Actinobacillus sp*のLPSがTLR4を介して絨毛細胞の形態や機能に影響を与えるや否やを検討した。

4) 絨毛細胞の分化段階とHIV感受性の検討

我々は、先にHIV陽性妊婦の胎盤を病理組織学的に解析し、HIVの血中濃度が高い場合には栄養膜合胞体細胞syncytial trophoblastに、低い場合にはHofbauer細胞のみに染色されることを明らかにした。ただ、いずれの場合にもtrophoblastic stem cellであるcytotrophoblastには染色されず、絨毛細胞の分化段階により感受性が異なる可能性が示唆された。そこで、絨毛癌細胞株BeWoをForskolinで分化誘導し、HIV複製効率を検討した。また、妊娠初期胎盤への感染の可能性を検討するため、不死化初期絨毛細胞Sw71ならびにH8を用いて同様の検討を行った。

(倫理面への配慮)臨床検体を使用する研究においては、採取医療機関の倫理委員会の許可を得て行う。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

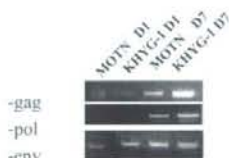
1) 子宮内における暴露非感染の病態

研究期間中に当該施設において HIV 陽性母の分娩がなく、検討が不可能であった。現在、ラオス国立大学マホソット病院ならびにセタテイラート病院、サワナケート病院に検体の採取を依頼中である。

2) 大顆粒リンパ球への感染

MOTN-1 においては有効な複製が見られ、培養上清中に HIVp24 の出現を認めたのに対し、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 α 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

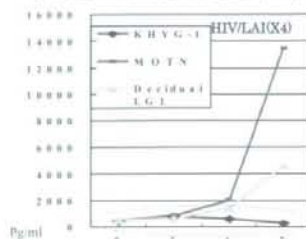
X4 HIV gag/pol/env 転写には差がない (RT-PCR)



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中であるが、現時点では感受性を決定する特定の遺伝子を同定するには至っていない。機能的には、両細胞ともに IL-12 刺激による IFN- γ 産生が抑制された。

しかし、HIV 感染により複数のシグナル伝達因子発現が低下していることから、これが病態形成の上で意義のある現象なのかは現時点では不明である。

X4ウイルスはCD56陽性大顆粒NKT細胞株では複製を生じるがNK細胞株では複製しない(p24ELISA)



3) TLR リガンドによる胎盤絨毛細胞への影響

菌周病における最大血中濃度の 10 倍である 1 μ g/ml の濃度でも絨毛癌細胞株 BeWo の増殖、形態、hCG 産生、syncytin 発現に全く影響を与えなかった。むしろ、BeWo の hCG 産生は TLR リガンドにより、up-regulation された¹⁴⁾。一方、LPSはこの濃度で、CD56^{bright} NK 細胞を活性化し、IFN- γ 産生を増強し、絨毛癌細胞株の apoptosis を誘導した。この所見より、歯周病菌由来物質が、直接胎盤を傷害するのではなく母体免疫系を活性化することより二次的に胎盤関門が破壊され HIV 垂直感染をおこしやすいことが明らかになった。

Effects of TLR 1-9 agonists on hCG production of BeWo cells

