

2010

2)山口 徹 編著「今日の治療指針」  
早川 智 妊婦の感染症 2011 年版  
2011 医学書院

## 2. 学会発表

根岸正実, 泉泰之, 大島教子, 稲葉憲之, 早川智 Th1 サイトカインはヒト脱落膜リンパ球の LPS 感受性を亢進する  
第 37 回日本臨床免疫学会 11 月 14 日  
東京

Y Izumi, QDTrinh, S Komine-Aizawa, M Honda, N Yamamoto, S.Hayakawa  
CD4 independent replication of HIV in an immortalized human trophoblast is up-regulated by lipopoly saccharide(LPS). 31<sup>st</sup> annual meeting of the American society for reproductive immunology. May 19-22 2011 Salt Lake City Utah USA

厚生労働科学研究費補助金(エイズ対策研究事業)

HIV 感染妊婦とその出生児の調査・解析および診療・支援体制の整備に関する総合的研究  
平成 21～23 年研究分担報告書

研究分担課題名：海外における HIV 母子感染と HIV の母乳感染のメカニズム

研究分担者：牛島廣治 日本大学医学部病態病理学系微生物学分野・客員教授

研究協力者：星野洪郎 群馬大学大学院医学系研究科分子予防医学・客員教授

山本直彦 南医療生協共同組合有松診療所・所長

沖津祥子 東京大学大学院医学系研究科・客員研究員

Trinh Duy Quang 日本大学医学部病態病理学系微生物学分野・特別研究員

Ariful Hoque 群馬大学大学院医学系研究科分子予防医学・研究員

海外協力者：Nguyen Anh Tuan ホーチミン市第一小児病院 講師

Nguyen An Nghia ホーチミン市第一小児病院 講師

Li Yan 昆明医学院・副学長

研究要旨：

(1) ケニアのスラム街の住民の HIV 感染率は男女ともに減少傾向が認められた。(2) ベトナムの未治療 HIV 感染小児から得られたウイルス遺伝子に関して薬剤耐性関連遺伝子の検索を行ったところ、逆転写酵素領域に変異が見られた。(3) 母乳中に含まれる豊富な免疫物質には抗 HIV 作用があることが知られているが、その作用機序については不明な点が多い。今回はウシラクトフェリン(LF)とその分解物(dLF およびラクトフェリシン(LFcin))の作用機序の解析を行った。LF のみに効果が認められた。LF は低毒性で、ウイルスおよび宿主細胞に作用し、HIV-1 の細胞への吸着および侵入を阻害することで、抗ウイルス活性を示すことが示唆された。(4) GFP 発現細胞を用いて母乳中の HIV 不活性化物質について検討したところ、初乳および成乳でもその存在が確認できた。さらに母乳中の HIV 活性は加熱 56°C 30 分の場合よりも母乳の濃度、接触時間により影響を受けることがわかった。(5) 加熱による簡易な母乳中の HIV の不活化を行うため、簡易ガスコンロと小型なべを用い、加熱 65°C でより簡単に速く HIV の不活化ができることを感染価や GFP 発現細胞を用いて明らかにした。直接鍋に母乳をいれても水を沸かしその中に母乳の瓶をいれても共に 65°C まで瞬間的に上げることにより不活性化された。母乳が冷める時間を入れても 10 分以内であった。栄養分の損失も殆どないとわかった。ウイルス等の感染母親が母乳保育を希望する場合の手段として 加熱不活性化が可能である。(6) ベトナムで HIV 感染褥婦に対し、母乳保育の現状について調査をしたところ、母乳による HIV 感染について知ってはいるものの、母乳を与えている母親が 20 名中 7 名で見られた。母乳の加熱不活性化に関しては、HIV 感染褥婦は行いたいとの意見であった。(7) アジア 3 国での HIV 母子感染症への取り組みを調べた。2005 年から雲南省の少数民族地域で介入的 HIV 母子感染予防を行っており、今年度までに HIV 母子感染が減少した。妊婦の HIV 検査の向上、治療薬服用の向上を見た。一方、ベトナム、特にラオスは母子感染が見られ、介入的支援がより必要と考えられた。

1. ケニアにおける疫学調査とベトナム・ホーチミン市における感染児から得た HIV の薬剤耐性

A. 研究目的：HIV の母子感染はわが国では少ないものの、アフリカ・アジアの開発途上国では多く、大きな問題である。また、わが国の HIV 母子感染者は外国籍のパートナーとの間の児であることが多い。そこで開発途上国における HIV 感染の現状を疫学あるいは分子疫学的に調査し、重感染、薬剤耐性関連遺伝子についても調べることが目的とする。

B. 研究方法：(1) ケニアの首都ナイロビ市内の貧困地区であるプムワニ村における住民の感染率を 2009 年に 2 回(4 月と 9 月)、2010 年 9 月に 1 回調査した。インフォームドコンセントが得られた対象者は 2009 年 4 月では 123 名、9 月では 198 名、2010 年は 156 名であった。HIV 感染患者血清より HIV RNA を抽出し、HIV のサブタイプ、薬剤耐性関連遺伝子変異を解析した。HIV-1 抗体、B 型肝炎(HBV)ウイルス抗体、C 型肝炎ウイルス(HCV)抗体についても検索した。さらに HIV-1 型感染患者で経過観察中の 68 名について HIV-2 型の重感染の有無を調べた。方法は富士レビオ社の抗体検出用試薬セロディア・HIV-1/2 を用い、ゼラチン粒子凝集反応による定性法で観察した。この研究は現地および名古屋大学の倫理委員会の承認を得て行った。

(2) ベトナム・ホーチミン第一小児病院で 2004-2005 年に得られた、104 症例のサブクラス CRF01\_AE の HIV 陽性の患児から得た HIV DNA を抽出し、42 症例でプロテアーゼ領域を、24 症例で逆転写酵素領域を遺伝子解析した。検体は 2004 年 10 月から 2005 年 9 月に採取した血液で、児は当時治療をしてない。さらに HIV 陽性患児 89 例の血清中のクラミジアニューモニエ IgG 抗体、IgA 抗体を ELISA 法 (Savyon

Diagnostics Ltd キット) で調べた。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を得て行った。

C. 研究結果：(1) 2009 年 4 月の調査における対象者 123 名中、17 名に HIV-1 の抗体陽性がみられた。感染率は 14%で、うち女性は、69 名中 11 名 (感染率 16%)、男性は 54 名中、6 名 (感染率 11%) で、男性の感染率は昨年と同じであったが、女性の感染率は上昇した。HIV-1 のサブタイプは、A 型が 11 例、B/D 型が 1 例、C 型が 2 例、D 型が 1 例、不明が 2 例であった。9 月の調査における対象者 198 名中、12 名に HIV-1 の抗体陽性がみられた。感染率は 6%で、うち女性は、129 名中 8 名 (感染率 6%)、男性は 69 名中、4 名 (感染率 6%) で、男女共、感染率は減少した。HIV-1 のサブタイプは、A 型が 2 例、C 型が 8 例で、2 例は解析不能であった。2010 年の対象者 156 名中、14 名に HIV-1 の抗体陽性がみられた。感染率は 9%で、うち女性は、93 名中 9 名 (感染率 10%)、男性は 63 名中、5 名 (感染率 8%) であった。男女とも 2009、2010 年の感染率はほぼ同じであった。年度別に比較すると、抗 HIV 薬剤が入手可能になった 2006 年より漸次減少しており、我々の調査の対象地区においても、WHO/UNAIDS によるケニア全体の報告と同様の傾向を示している。なお、薬剤耐性関連遺伝子は 2010 年に 1 例で、プロテアーゼ阻害剤に対する変異が見られた。新規患者では HIV1 と HIV2 の混合感染は検出されなかったが、HIV-1 型感染者で治療および経過観察中の患者 68 例中、10 例に HIV-2 型の抗体陽性が見られた。内訳は男性 1 例、女性 9 例であった。年齢は男性 38 歳で、女性は 20 代 2 例、30 代 2 例、40 代 4 例、50 代 1 例であり、すべて ARV 治療を受けている。HBs 抗原は、2009 年 4 月に男性で陽性が 1 例、2010 年に HBVs 抗体陽性が 1 名検出された。HCV 抗体の陽性者は、男女共、見られなかった。2010

年に梅毒抗体陽性が2名いた。

(2) ベトナム・ホーチミン第一小児科病院で得られた42例についてプロテアーゼ領域の解析をしたところ、I13V, G16E, M36I, I93Lのマイナーな変異はあるものの薬剤耐性はなかった(図1)。24例について逆転写酵素領域の解析をしたところ、V75Iが1例、M184Iが3例、V179Dが1例に認められた。その中でM184Iはemtricitabineとlamivudine耐性と関連があった(図2、3)。

クラミジアニューモニエに対するIgA陽性は29/89(32.6%)で、IgG陽性は56/89(69.2%)であった。特異IgG抗体が高いのは6か月未満に多く、特異IgA抗体は6か月から2歳の子どもに見られた。同時に血液細胞中および血清中のクラミジアニューモニエ遺伝子を半数ほどで調べたが現在のところ、全て陰性であった。IgAが陽性であることは感染を示している。血液中からは今のところクラミジアの遺伝子を見出していない。

**D. 考察:** (1) ケニア・ナイロビ市の貧困地区におけるHIV感染率は2009年と2010年の調査でほぼ同じであり、2006年の調査に比べ漸次減少傾向にある。これはWHO/UNAIDSによるケニア全体の調査結果と同様の傾向を示していた。

(2) ベトナムでのHIV感染小児のHIVウイルスの解析結果から逆転写酵素領域での薬剤耐性遺伝子変異が検出された。この検体は未治療の患児から得た検体であったが、最近抗HIV薬が広く使用されており、薬剤耐性遺伝子変異については今後とも検討が必要である。

ベトナム・ホーチミン第一小児科病院のHIV感染児の死亡原因として肺炎が多いが、その病原体がしばしば不明である。そこで日和見感染の原因としてクラミジアニューモニエの可能性を考えてHIV感染児の血清中の抗体価測定を行った。その結果特異IgAが検出され、感染のあることが確認された。

**E. 結論:** (1) ケニアにおけるHIV感染率は男女ともに減少傾向が認められた。

(2) ベトナムのホーチミン市で2004-2005年に得られたHIV感染患児のウイルスから、感染児に薬剤を投与していないにもかかわらず、逆転写酵素領域での薬剤耐性変異が認められた。また、患児の32.6%にクラミジアニューモニエIgA抗体が検出された。このことはHIV感染患児の死亡原因として多い肺炎の病原体がクラミジアニューモニエである可能性が考えられた。

#### F. 研究発表

- 1) 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, 2009; 55(1-2):23-30.
- 2) Rathore A, Chatterjee A, Sivarama P, Yamamoto N, Singhal PK, Dhole TN. Association of CCR5-59029 A/G and CCL3L1 copy number polymorphism with HIV type 1 transmission/progression among HIV Type 1-seropositive and repeatedly sexually exposed HIV type 1-seronegative North Indians. AIDS Res Human Retroviruses. 2009, 25: 1149-1156.
- 3) Trinh QD, Pham NT, Lam BQ, Le TP, Truong KH, Le TQ, Vo HT, Tanq TC, Ha TM, Izumi Y, Mizuguchi M, Hayakawa S, Ushijima H. Subtyping and env C2/V3 sequence analysis of HIV-1 isolated from HIV-infected children hospitalized in Children Hospital 1, Vietnam during 2004-2005. J Trop Pediatr, 2009; 55(6): 399-401.

- 4) Shimizu N, Tanaka A, Oue A, Mori T, Ohtsuki T, Apichartpiyakul C, Uchiumi H, Nojima Y, Hoshino H. Broad usage spectrum of G protein-coupled receptors as coreceptors by primary isolates of HIV. AIDS, 2009 Apr 27; 23(7): 761-9.
- 5) Nedellec R, Coetzer M, Shimizu N, Hoshino H, Polonis VR, Morris L, Martensson UE, Binley J, Overbaugh J, Mosier DE. Virus entry via the alternative coreceptor CCR3 and FPRL1 differs by human immunodeficiency virus type 1 subtype. J Virol Sep; 83(17): 8353-63.
- 6) Trinh DQ, Pham NT, Lam BQ, Le TP, Truong KH, Izumi Y, Mizuguchi M, Ushijima H, Hayakawa S. Drug resistance mutations in the HIV-1 protease and reverse transcriptase genes in antiretroviral-naïve Vietnam children. AIDS Res Hum Retroviruses. In press.
- 7) Hoque SA, Ohtsuki T, Tatsumi M,

Shimizu N, Islam S, Jinno-Oue A, Hoshino H. Lack of the trans-receptor mechanism of HIV-1 infection. Microbes Infect. 2011.Dec (E-pub)

- 8) Nakamura K, Ohtsuki T, Mor H, Hoshino H, Hoque A, Oue A, Kanou F, Sakagami H, Tanamoto K, Ushijima H, Kawasaki N, Akiyama H, Ogawa H. Novel anti-HIV-1 activity produced by conjugating unsulfated dextran with polyL-lysine. Antivir Res., in press.

### G. 健康危機情報

なし

### H. 知的財産権の出願。登録状況

なし

42 strains

IAS list

No major mutation was found at positions 30, 32, 46-48, 50, 54, 76, 82, 84, 88, 90

MUTATIONS IN THE PROTEASE GENE ASSOCIATED WITH RESISTANCE TO PROTEASE INHIBITORS\*\*

Atazanavir +/ ritonavir	L 103	G 16	C 24	V 32	L 33	E 34	M 36	M 46	G 48	I 50	F 53	I 54	D 60	I 62	I 64	A 71	G 73	V 82	I 84	I 88	N 89	L 90	L 93
Darunavir/ ritonavir	V 11			V 32	L 33			I 47		I 50	I 54		T 74	I 76				I 84	I 89	L 90	L 93		
Fosamprenavir/ ritonavir	L 10			V 32				M 46	I 47	I 50	I 54		G 73	L 76	V 82	V 84	V 90						
Indinavir/ ritonavir	L 10	K 20	L 24	V 32	M 33	M 36	M 46	I 47	I 50	I 54		A 71	G 73	L 76	V 82	V 84	V 90						
Lopinavir/ ritonavir	L 10	K 20	L 24	V 32	L 33	M 36	M 46	I 47	I 50	I 54		L 71	A 73	G 76	L 82	V 84	V 90						
Nelfinavir	L 10			D 30	M 36	M 46							A 71	V 73	V 82	V 84	V 90						
Saquinavir/ ritonavir	L 10	L 24							G 48	I 54	I 62	I 64	A 71	G 73	V 82	V 84	V 90						
Tipranavir/ ritonavir	L 10	I 13	K 20	L 24	E 33	M 36	K 43	M 46	I 47	I 54	O 58	H 69	I 74	I 77	V 82	N 84	L 90						

Minor mutations: I 13 V, G 16 E, M 36 I, H 69 K, I 93 L  
(ritonavir, tipranavir, atazanavir, indinavir, nelfinavir)

図1 プロテアーゼ領域における薬剤耐性変異

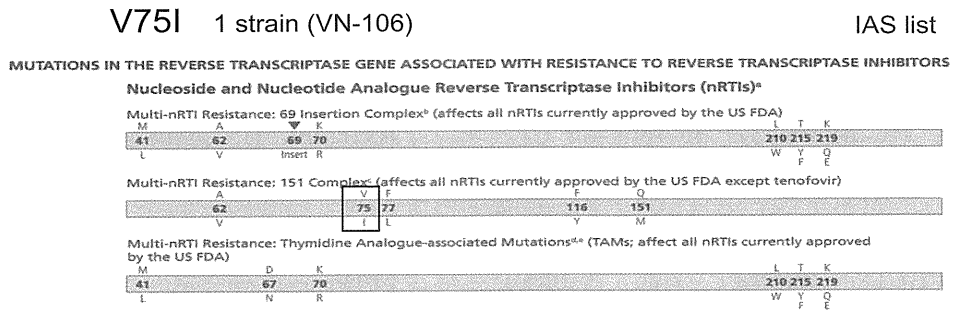


図2 逆転写酵素領域での薬剤耐性変異 (1)  
1例 (VN-106) に V75I の変異が認められた。

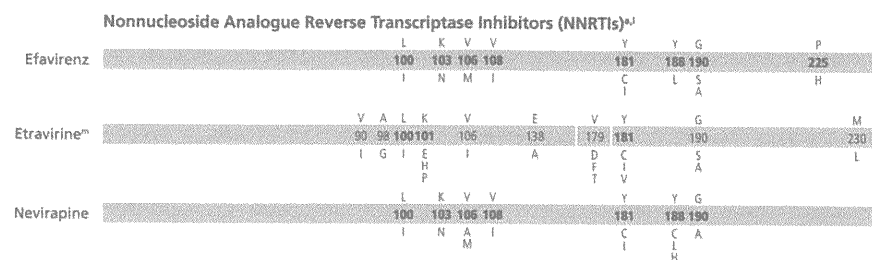
M184I 3 strains: VN-48, VN-106, VN-108

Resistance to emtricitabine and lamivudine IAS list



V179D 1 strain: VN-47

IAS list



Only M184I in the WHO list

図3 逆転写酵素領域での薬剤耐性変異 (2)  
3例に M184I の変異が、1例で V179D の変異が見られた。

## 2. ラクトフェリンの抗 HIV 作用機序の解明

### A. 研究目的

HIV の母子感染は主に、胎内感染、産道感染、母乳感染の 3 つのルートにわけられ、現在では母子への抗ウイルス剤治療、帝王切開、代替乳育児により 90%以上の母子感染を防ぐことが可能である。今回我々は、牛乳中のラクトフェリン (LF) を用い、その抗 HIV 作用について検討した。LF は HIV の感染を抑制することが報告されているが、抗 HIV 作用機序については不明な点が多い。そこで我々は、ウシ LF (bLF)、LF 分解物 (dLF)、陽イオンペプチド領域を持つ LF 分解物のラクトフェリシン (LFcin) の抗 HIV 作用機序について解析を行った。

### B. 研究方法

#### NP-2/iGFP 細胞

本研究では、ヒトグリオーマ由来の NP-2 細胞に、CD4 および CCR5 あるいは CD4 および CXCR4 を発現させた N4R5/iGFP 細胞あるいは N4X4/iGFP 細胞を用いた。これらの細胞は、HIV-1 LTR の下流に、核局在シグナルを融合させた GFP 遺伝子が導入されており、HIV 感染の成立により細胞核内に GFP の発現が強く誘導される。細胞は EMEM/10%FBS 培地で培養した。

#### ウイルス

マクロファージ指向性で CCR5 を使用する HIV-1 (R5 ウイルス) として BaL 株、T 細胞株指向性で CXCR4 を使用する HIV-1 (X4 ウイルス) として IIIB 株を使用した。BaL 株および IIIB 株は、C8166/CCR5 細胞に感染させ、上清を回収し、0.45 $\mu$ m のフィルターでろ過し、-80 $^{\circ}$ C に凍結保存し、用いた。

#### 薬剤

ウシ LF (bLF)、LF 分解物 (dLF)、陽イオンペプチド領域を持つ LF 分解物のラクトフェリシン (LFcin) を用いて抗 HIV 作用機序について解析

を行った。抗 HIV 剤のコントロールとして heparin および Dextran sulfate 50 k を使用した。

#### 細胞毒性試験

薬剤の 50%細胞毒性濃度 (CC<sub>50</sub>) は、N4R5/iGFP 細胞および N4X4/iGFP 細胞に薬剤を添加し、培養 2 日後に Tetracolor one を加え、OD<sub>450</sub> を測定して算出した。

#### 抗ウイルス活性試験

N4R5/iGFP 細胞または N4X4/iGFP 細胞を、5,000 個/100 $\mu$ l で 96-well plate の各 well に播種した。翌日薬剤を EMEM/10%FBS 培地で段階希釈して 10 $\mu$ l 各 well に加えた。37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応後、HIV-1 BaL 株あるいは IIIB 株 100 $\mu$ l を、GFP 陽性細胞数が 1 well あたり 50-200 個出る濃度で感染させた。2 日後 GFP 陽性細胞数をカウントし、薬剤を添加していない対照と比較し、感染を 50% 抑制する濃度 (IC<sub>50</sub>) を算出した。

#### 細胞およびウイルスへの LF 処理による抗ウイルス効果の検討

LF の抗ウイルス作用を解析するために、LF がウイルスあるいは細胞のどちらに作用しているか検討した。ウイルス側への作用を解析するために、LF と BaL 株あるいは IIIB 株を 37 $^{\circ}$ C で 1 時間処理し、N4R5/iGFP 細胞あるいは N4X4/iGFP 細胞に感染させた。細胞への作用を解析するために、LF を N4R5/iGFP 細胞または N4X4/iGFP 細胞に添加し、37 $^{\circ}$ C で 1 時間処理し、薬剤を洗浄除去後、BaL 株あるいは IIIB 株を感染させた。感染 2 日後に GFP 陽性細胞をカウントして感染価を算出した。

#### 細胞融合抑制試験

R5 あるいは X4 ウイルスの Env および Tat を発現している細胞として HeLa/Menv/Tat 細胞あるいは HeLaKS386 細胞を用いた。N4R5/iGFP 細胞あるいは N4X4/iGFP 細胞は、R5 ウイルスあるいは X4 ウイルスの Env を発現している細胞と混



合培養すると合胞体（多核巨細胞）を形成する。さらにその細胞が Tat を発現していると、細胞融合により、Tat が LTR 下流の GFP 発現を強く誘導し、合胞体の核が GFP 陽性となり合胞体形成を簡便に判定することが可能である。これらの HeLa 細胞と N4R5/iGFP 細胞あるいは N4X4/iGFP 細胞を薬剤存在下で混合培養し、合胞体形成への影響を検討した。

また X4 ウイルス (IIIB 株) が持続的に感染している MOLT-4/IIIB 細胞とヒト T 細胞株 C8166 細胞を用いて薬剤存在下で混合培養し、合胞体形成への影響を検討した。合胞体数を顕微鏡下で計測した。

#### p24 ELISA

HIV-1 p24 の測定は ELISA 法で行った。すなわち、p24 に対する単クローン抗体で、ELISA プレートのコートし、ブロッキングの後に HIV-1 を接種した細胞の溶解液を加えた。HIV-1 陽性ヒト血清を反応させ、次に HRP 標識抗ヒト IgG の結合後、基質を加えて発色させた。OD<sub>450</sub> をプレートリーダーで測定した。

#### HIV-1 の細胞への吸着・侵入阻害試験

細胞への HIV-1 の吸着量は、薬剤存在下で N4X4/iGFP 細胞と IIIB 株を 1 時間 4°C で反応させ、細胞を洗浄し、未吸着のウイルスを除去し、細胞を溶解し、溶解液中に含まれる p24 を ELISA 法で定量し判定した。細胞、ウイルスおよび薬剤を 37°C で 1 時間培養した際の細胞内に侵入したウイルス量は、未吸着のウイルスを洗浄し、除去後に ELISA で定量した。細胞に吸着させた後、細胞内に侵入したウイルス量は、N4X4/iGFP 細胞に IIIB 株を 4°C で 1 時間吸着後、薬剤を添加し、37°C で 1 時間培養後、未吸着のウイルスを洗浄除去し、ELISA 法で定量した。

(倫理面への配慮)

今回は倫理面への配慮の必要な研究は行わなかった。

### C. 研究結果および考察

#### LF の細胞毒性効果と抗 HIV 活性

bLF、dLF および LFCin について NP-2/iGFP 細胞を使用して細胞毒性効果と抗 HIV-1 活性測定を行った。bLF、dLF、LFCin は、ともに 100µg/ml 以上の CC<sub>50</sub> 値を示し、細胞毒性効果は明らかでなかった (表 1、図 1)。

次に LF の抗 HIV 活性を測定した。bLF は、R5 指向性 BaL 株および X4 指向性 IIIB 株に対して 20、6µg/ml の IC<sub>50</sub> 値を示し、量依存的にウイルスの感染を抑制したが、dLF、LFCin は感染を抑制しなかった (表 1、図 2)。bLF は、R5 および X4 指向性の HIV-1 の感染を抑制し、その分解物である dLF、LFCin は効果がないことから、ラクトフェリンの持つ高次構造がウイルス感染の抑制に重要であることが示唆された。

#### LF の抗 HIV 作用メカニズム

次に LF の抗 HIV 作用がウイルス側、細胞側のどちらに作用しているか調べるため、ウイルスあるいは細胞を LF で処理して抗ウイルス活性を調べた (表 1、図 3)。ラクトフェリンは、細胞側およびウイルス側のどちらに処理した場合も R5 および X4 ウイルスに対する抗 HIV 活性を示した。

次に LF が、ウイルスの細胞への吸着あるいは侵入を阻害するか検討した。bLF および dLF は、濃度依存的に細胞へのウイルス吸着を阻害した (図 4A)。100µg/ml では、ウイルスの細胞への吸着量を約 70% に阻害した。また吸着阻害の陽性コントロールとして用いた 100µg/ml の heparin および dextran sulfate 50 k と同程度の吸着阻害効果を示した。

次に LF が HIV-1 の細胞への吸着および侵入過程を阻害するか検討した。bLF は、濃度依存的に細胞への侵入を阻害した (図 4B)。100µg/ml では、ウイルスの細胞への吸着侵入量を約 40% に阻害した。dLF は、細胞へのウイルスの吸着は阻害したが、侵入は阻害しなかった。

次にウイルスが細胞へ吸着後、細胞内に侵入する過程を LF が阻害するか検討した。LF は、細胞へのウイルス吸着後の侵入過程も約 30%抑制していることが明らかとなった (図 4C)。以上の結果から、LF はウイルスの細胞への吸着および侵入を阻害することが示唆された。

#### ラクトフェリンの細胞融合抑制効果

ラクトフェリンがウイルス-細胞間における抗 HIV 活性を示すことが分かったので、はじめに NP-2/iGFP 細胞と、R5 あるいは X4 ウイルスの Env および Tat 発現細胞を用いて、ラクトフェリンの Env を介した細胞融合抑制効果について検討した。ラクトフェリンは、R5 ウイルスの Env を介した細胞融合は抑制したが、X4 ウイルスの

Env を介した細胞融合は抑制しなかった (図 5A、B)。次に HIV 持続感染細胞と T 細胞株を用いて、X4 ウイルスの細胞融合抑制効果を検討した。ラクトフェリンは、HIV 持続感染細胞でも細胞融合抑制効果を示さず、Env/Tat 発現細胞を用いた結果を再現した (図 5C)。これらの結果から、ラクトフェリンは、R5 ウイルスの Env を介した細胞融合のみ抑制することが示唆された。

#### **D.結論**

ラクトフェリンは、低毒性で、ウイルスおよび宿主細胞に作用し、HIV-1 の細胞への吸着および侵入を阻害することにより、抗ウイルス活性を示すことが示唆された。

表1 ラクトフェリンの抗ウイルス活性

Drug	IC <sub>50</sub> (μg/ml)								
	Virus entry		Cell-treatment		Virus-treatment		Cell-cell fusion		CC <sub>50</sub> (μg/ml)
	BaL	IIIIB	BaL	IIIIB	BaL	IIIIB	R5-Env	X4-Env	
Bovine lactoferrin	20	6	40	40	30	23	30	>100	>100
Lactoferrin digestion	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Lactoferricin	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Heparin	70	2	N.D	N.D	N.D	N.D	>100	>100	>100
Dextran sulfate 50k	4	2	N.D	N.D	N.D	N.D	8	4	>100

図1 ラクトフェリンの細胞毒性効果

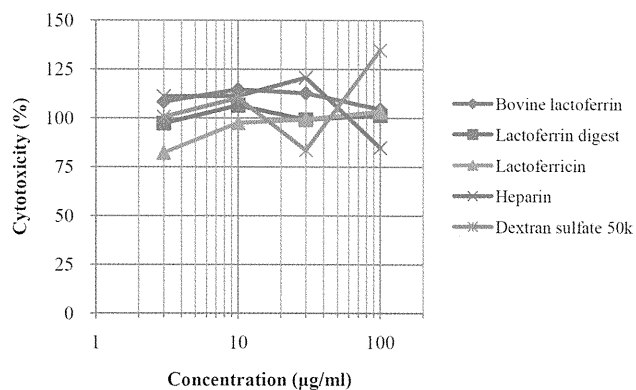
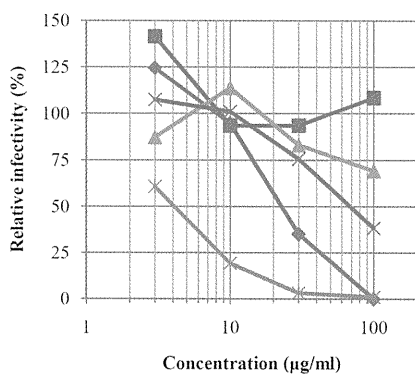


図2 ラクトフェリンの抗ウイルス活性

(A) R5ウイルス(BaL株)に対する効果



(B) X4ウイルス(IIIIB株)に対する効果

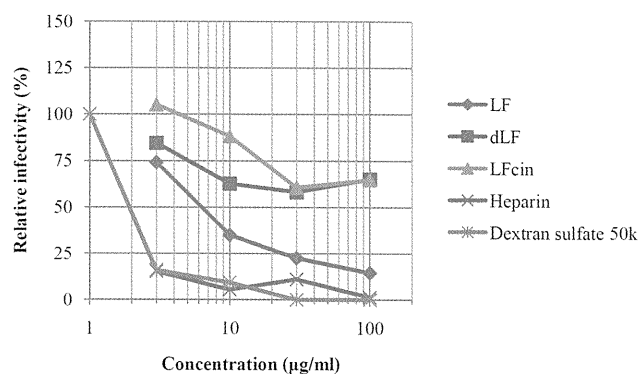


図3 細胞およびウイルスへの処理によるラクトフェリンの抗ウイルス活性

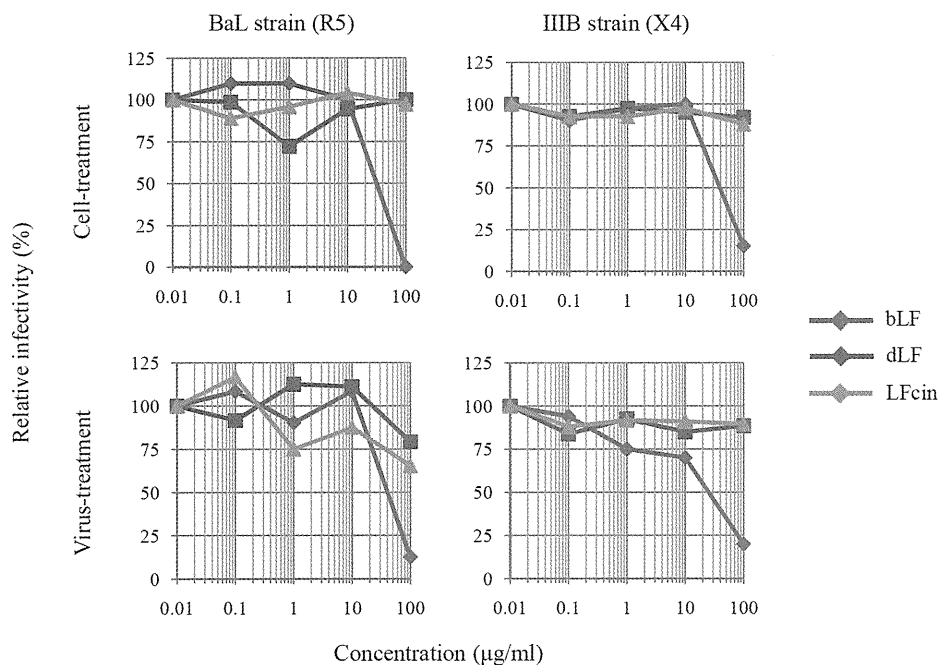
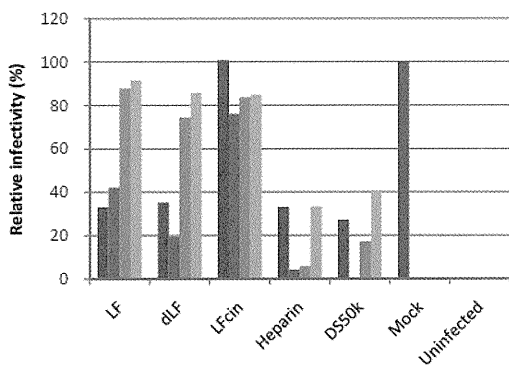
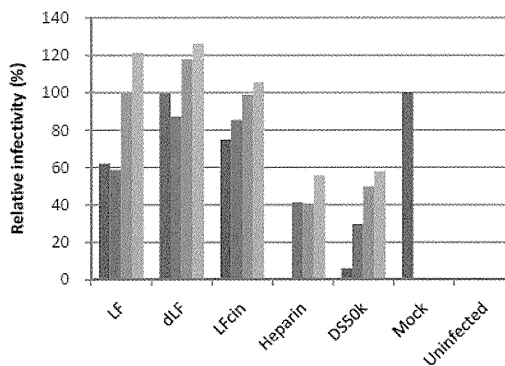


図4 ラクトフェリンのHIV-1吸着および侵入阻害効果

(A) 細胞へのHIV-1吸着阻害効果



(B) 細胞へのHIV-1吸着・侵入阻害効果



(C) 細胞へのHIV-1侵入阻害効果

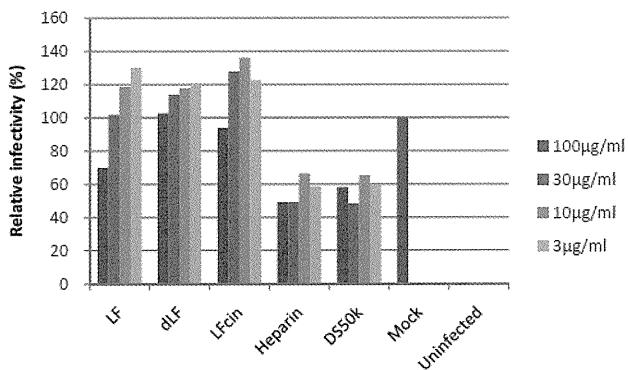
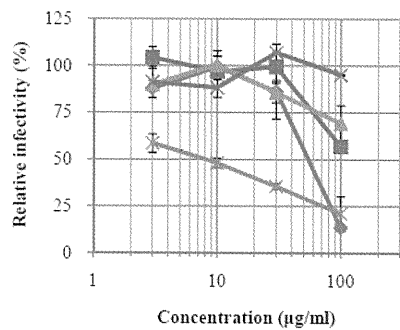
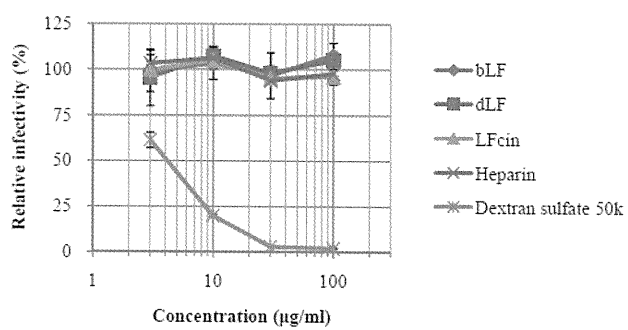


図5 ラクトフェリンによる細胞融合抑制効果

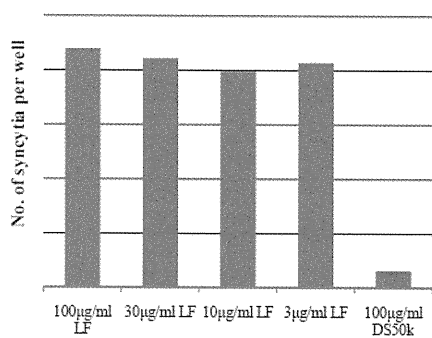
(A) R5ウイルスEnvを介した細胞融合の抑制効果



(B) X4ウイルスEnvを介した細胞融合抑制効果



(C) X4ウイルス感染細胞による細胞融合抑制効果



### 3. 母乳加熱による HIV 不活化の検討およびベトナムにおける母乳加熱の意識調査

#### A. 研究目的

(1) HIV に対する母乳の効果に関する研究：平成 21 年度に母乳中のラクトフェリンに抗 HIV 作用があることを示した。今回はヒトグリオーマ由来の NP-2 細胞に CD4 および CCR5 を発現させた細胞を用いて、母乳中に加えた HIV の加熱条件による安定性について調べた。

(2) 母乳の熱不活化のさらなる工夫（65℃加熱は HIV の母子感染を防ぐ）：母乳保育によって HIV の母子感染が見られる。母乳中の液性成分や細胞中に HIV および HIV 関連物質がある。母子感染は 40% に及ぶことがある。一方、完全母乳栄養の方が母乳と人工乳や固形物との混合栄養よりも母子感染が少ないとの報告がある。WHO は HIV 感染産婦の母乳を児に飲ませないで、人工乳を勧めている。人工乳でない場合は最初の 6 か月は完全母乳保育を、そしてその後母乳を少なくしていくことを勧めている。多くの HIV 陽性母親は、資源の少ない地域に住んでおり人工乳のみでの保育は難しい。これは人工乳の費用、不衛生な水や環境、社会環境的な要因による。また完全母乳保育でも HIV 母子感染を防ぐことが完全には出来ない。さらに完全母乳保育をしようと思っても子どもが嫌がったり、不足だったり、泣いたり、また仕事にもどり中断されることがある。この様な理由から母乳の熱不活化が推奨される。

そこで別の方法として加熱によるウイルスの不活化が考えられるが、直接加熱沸騰すると栄養分が壊される可能性があり、また 62.5℃30 分のウイルスの不活化では長い時間一定の温度に保つことが難しいし場合によっては不活化が十分でない可能性もある。沸騰したお湯の中に母乳の瓶を入れる方法もあるがやや複雑であり、HIV 陽性母乳の不活化としては一般化していない。ここ

ではもっと簡単に日常的に速くできる方法を考えた。

(3) ベトナムにおける HIV 感染の状況、母乳保育の現状および母乳加熱不活化に関する意識調査：我々はこの研究班における以前の研究から母乳を熱(低温、短時間：56℃、6 分)で不活化することにより、HIV 感染母乳を用いても母乳保育が可能であることを実験的に示した。また、このような加熱は母乳それ自体を温めて不活化温度に持っていくことも可能であるが、あらかじめ煮沸した湯の中に哺乳瓶を入れること、あるいは 70℃の温水に哺乳瓶を漬けることでも可能な事を報告した。ここではベトナムで母子感染予防の立場から児へのミルクの使用の有無、および小型ガスコンロを提供することにより母乳の不活化を行って母乳保育を行うことが可能かを調査した。母乳の加熱による HIV 不活化を再度実験的に検討するとともに、人工乳を児に使用しない場合、加熱処理した母乳の利用が可能か、ベトナムにおいて調査した。

#### B. 研究方法

(1) HIV に対する母乳の効果に関する研究

1) 加熱温度および加熱時間と HIV の安定性実験

20 人の産婦から提供された母乳はプール凍結保存し、使用する前に融解した。母乳は生後 3 日目(初乳)と 1 か月後(成乳)である。15000rpm, 10 分遠心した後に乳清のみを得た。対照としてヒト血清、ウシ胎児血清、培養液 (RPMI 1640) を用いた。加熱は 56℃、30 分で行った。その後母乳は 50% (RPMI1640 65  $\mu$ l, Sample 75  $\mu$ l, HIV-1 Ba-L 10  $\mu$ l) と 10% (RPMI1640 125  $\mu$ l, Sample 15  $\mu$ l, HIV-1 Ba-L 10  $\mu$ l) になるようにそれぞれ HIV Ba-L 株と混合し、0 時間、8 時間、22 時間 37℃に放置した。加熱しない 37℃の母乳、加熱したヒト血清、加熱しないウシ胎児血清、

RPMI1640 も 0、8、22 時間で反応を見た。その後、NP2/CD4/CCR5/GFP 細胞に重層させた。2 時間 4°C で培養した後、10% Eagle MEM で洗浄し、2 日間 CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養し、GFP 陽性細胞 (HIV 陽性細胞) を数えた。

## 2) 37°C での HIV の安定性の再確認

上記の実験結果を踏まえて 37°C で、時間を 8 時間以下の 0、2、4、6 時間として行った。

(2) 母乳の熱不活化のさらなる工夫 (6 5°C 加熱は HIV の母子感染を防ぐ)

・母乳サンプル : 哺乳で余った初乳 (出産後退院するまで) を健康な母親から同意のもとに集めた。使用時まで -80°C に保管した。この研究は群馬大学の倫理委員会で認められた。

・ウイルス : Ba-L (マクロファージ向性 HIV) を C8166/CCR 細胞に感染させてウイルスを得た。8 X 10<sup>9</sup> コピー/ml の HIV-1 RNA を元とした。母乳は EMEM で 25% にして用い、それに HIV を加えた。

・加熱条件 : 500ml の水を直径 16cm のアルミ鍋にいれ、ガスボンベ付き小型コンロにて 70°C 以上とした。200ml のガラス瓶に 10ml の母乳を入れ振りながら温めた。デジタル温度計で温度をモニターした。目的とした温度に達したら直ちにガラス瓶を鍋から取り出して、15ml のチューブに入れて 37°C にした。

・HIV 感染 : HIV-1 の感染は NP2/CD4/CCR5/GFP 細胞を指標とした。LTR-GFP-HIV Rev の核局在シグナルを有するこれらの細胞は感染すると HIV-1 TAT 存在下、GFP の発現が見られウイルスの存在 (感染) を発色細胞で調べることが出来る。加熱、不加熱の HIV 添加母乳は EMEM で 10 倍段階希釈した。さらにそれらを 10 倍希釈して NP2/CD4/CCR5/GF に加えた。2 時間半反応させた後、細胞を再度 EMEM で洗った。2 日後 GFP 陽性細胞を見ることによって感染価 (IU) を調べた。また TCID<sub>50</sub> を計測した。加熱処理後の RT

活性の測定はロッシュ社のキットを用いて行った。

・熱処理による生細胞数の測定 : Molt 4 細胞を熱処理しその後、遠心して細胞を集め、生細胞数を Tetracolor one で染色し調べた。

(3) ベトナムにおける HIV 感染の状況、母乳保育の現状および母乳加熱不活化に関する意識調査 : ベトナムホーチミン市第一小児病院において HIV 母子感染を予防する目的で診察と投薬を受けている 20 家族に対して医師による下記の質問を行った。質問は日本語を英語からベトナム語に変換して行った。

質問 1 : あなたは(母親)は毎日抗エイズ薬を服用しますか? (はい、いいえ)

質問 2 : あなたの子どもは出産時、抗エイズ薬の投与を受けましたか? (はい、いいえ)

質問 3 : あなたの子どもは毎日薬を飲んでいますか? (はい、いいえ)

質問 4 : あなたの子どもは人工乳を飲んでいますか? (はい、いいえ)

質問 5 : あなたは母乳をいままで一回以上与えたことがありますか? (はい、いいえ)

質問 6 : 母乳で保育すると、母乳中の HIV で児が感染する危険があることを御存じですか? (はい、いいえ)

質問 7 : あらかじめ母乳を搾乳し、熱不活化してから児に与えることが可能でしょうか。勿論、加熱のための器具は提供します。(はい、いいえ)

## C. 結果

(1) HIV に対する母乳の効果に関する研究 : 図 3 では 1 か月、3 日の母乳の 56°C 30 分加熱と 37°C、および対照として加熱したヒト血清、加熱しないウシ胎児血清、培養液を用いた。0 時間では母乳の方が HIV 感染を抑えた。母乳の濃度が高い 50% がより強く HIV 感染抑制を認めた。10% で

は初乳がより抑制した。56°C加熱により HIV の不活化が見られた。しかし 10%の母乳の場合、8 時間では初乳より成乳が感染を強く抑えた。ヒト血清、ウシ胎児血清では 8 時間、22 時間で培養液より HIV の安定性が強いことが示された。即ち母乳には抑制物質があるが血清はむしろ逆を示唆した。

図 4 では、HIV の安定性をさらに短い時間で調べた。37°Cの条件とした。やはり濃い母乳の方がより HIV の増殖抑制を見た。しかしこの条件では 10%の母乳では 2 時間でもウイルスが生きることがわかった。さらにウシ血清では培養液よりも増強効果があった。特に 2 時間では 0 時間よりも安定性があった。

(2) 母乳の熱不活化のさらなる工夫 (65°C 加熱は HIV の母子感染を防ぐ)

・Cell free HIV-1 の不活化(間接的不活化): 母乳中に含まれると思われる HIV-1 の濃度より 100, 1000 倍高い濃度で不活化実験を行った。熱いお湯の中にガラス瓶の中の母乳を約 55°C、60°C、65°C、70°Cとした。この温度には急速に達し 1 分以内であった。55°Cでも不活化が見られた(表 1)。

・生細胞数の測定: 死細胞においては HIV-DNA が RNA となることはないので加熱による生細胞数をしらべることで目的を達成できたとした。65°Cに達すると生細胞はなくなった(表 2)。

・栄養分の加熱による変化: 65°Cで Cell-free ウイルスは不活化できるし、感染細胞からの感染も抑えられると考えた。従って 65°Cにおける総タンパク、ビタミン A、ビタミン B12、IgG および IgA、リゾチームの変化を調べた。特にこの温度ではこれらの栄養分に量的な差は見られなかった(表 3)。

・母乳を直接加熱した場合の栄養分の状況: 母乳を鍋に入れ中火の状態ですぐ温めた。65°Cの条件で直接加熱しこの温度に達したら、鍋から他の容器に移した。65°Cの加熱で HIV が不活化される

が栄養分も幾分か壊れることを想定した。実験結果としてリゾチームは低下し、IgG は軽度低下したが他の栄養分は低下しなかった(表 3)。リゾチームの低下も容認できる範囲と思われた。この鍋とコンロを使用した場合の加熱温度の変化と加熱した母乳の量との関係を比較した。いずれの場合でも 65°Cに達したら火を止めて別の瓶に移した。いずれも急速に温度は上昇した。量が多くなると 65°Cになるのに時間がよりかかるがそれでも直接母乳を鍋に入れた場合(直接法)が 90 秒程度で、お湯の中で(間接法)は 3 分程度であった。

・直火(直接的加熱)による母乳の Cell free あるいは Cell-associated HIV-1 の不活化

細胞成分が細胞の活性化に関係があるかを考えた。そのため HIV-1 である Ba-L 株を EMEM に入れて 60°C、65°C、70°Cとした。HIV 活性を RT 活性および GFP 誘導で調べた。60°Cでは約 22%の RT 活性はあるも GFP は見られなかった。65°C以上ではともに不活化されていた。

(表 4)

(3) ベトナムにおける HIV 感染の状況、母乳保育の現状および母乳加熱不活化に関する調査:

2-1) ベトナムにおける HIV 感染の状況

2009 年 12 月 31 日現在、累積 HIV 患者数は 160,019 人、AIDS は 35,603 人、44,540 人が AIDS で死亡している。HIV 感染はすべての県・市に広がっている。すべての HIV 感染者の中で 85.1% は 20-39 歳台で、男性が 73%である。HIV 感染者の若年化と異性間感染が問題となっている。IDUs が 20%、FSWs が 4%、妊婦が 0.3%、軍人が 0.15%である。

2009 年、1372 人の HIV 陽性妊婦が予防的に治療薬を服用した。1618 人の子どもが生まれ、1558 人が治療薬を服用した。このような状況である。

2-2) ベトナムにおける HIV 感染褥婦の母乳保育の現状および母乳加熱不活化プロジェクトに



## 関する意識調査

表 5 に示すように、質問 1 に対し 15 名が (はい) であった。質問 2 には 7 名が (はい) であった。質問 1 が (いいえ) であった 5 名はすべて質問 2 も (いいえ) であった。質問 3 に対しては、すべて (はい) であった。また質問 4 では 7 名が (はい) であり、質問 5 では 13 名が (はい) であった。質問 4 と 5 は、答えが逆であった。質問 6 はすべて、質問 7 では 19 名が (はい) であった。このことから全ての母親は、母乳による HIV の母子感染については知っているものの、ミルクを与えていない母親が 13 名あった。母乳の加熱不活化についての実施については一人を除きすべて行ってみたいとの意見であった。

## D. 考察

(1) HIV に対する母乳の効果に関する研究：1985 年に HIV の母乳感染の最初の報告がなされた後、幾つかの方法を用いて HIV-1 の母乳による母子感染が報告されている。しかし多くの研究は、試験管内実験として HIV の安定性を RT-PCR、リアルタイム PCR やプロウイルス DNA の遺伝子増幅で調べられてきた (J Clin Microbiol, 2003)。我々は今回、HIV 感染と母乳について GFP 発現細胞を用いて行った。その結果母乳中には総じて HIV 活性を抑制する物質があることがわかった。また HIV の母乳感染は加熱 56°C 30 分よりも母乳との接触時間、濃度が影響した。今回の報告に続き今後は、(i) 56°C より高い温度での作用、すなわち 60、65、70°C での作用 (ii) 異なるウイルス量での反応、(iii) Ba-L 以外に IIIB、CBL 23 のウイルスの使用、(iv) 70°C、30 分反応によりラクトフェリンやリゾチームを不活化による HIV の安定性、(v) 母乳の脂肪成分の役割について研究したい。

(2) 母乳の熱不活化のさらなる工夫 (65°C 加熱は HIV の母子感染を防ぐ) : HIV 陽性の母乳をいかに簡単に加熱不活化するかが目的である。

65°C に一瞬でも達すると細胞内および細胞外のウイルスが不活化されることがわかった。RT よりもエンベロープが先に破壊されることにより、60°C での差が生じたと思われる。その温度に達するまでには母乳量と加熱の状況で異なるが、数分で可能であった。母乳は栄養としても勿論大切である。72°C 15 秒の滅菌がより母乳中の栄養物質をより自然に近く保つことができると知られている。母乳中のビタミン B12、総タンパク、IgG は直接鍋で温めても、沸騰している湯の中に母乳の瓶を入れても変わらなかった。リゾチームは有意ではあるがそれでも直接加熱で僅かに低下していた。HIV を含む母乳を児に与えることはリスクがあるが、児に与えなくても母乳は出てくるしそれを止めることは難しい場合がある。

母乳は栄養物質であるとともに抗体など免疫物質を多く含む。従って、65°C で病原体を不活化すれば児に与えることが可能である。

ここで行う方法は簡単で迅速である。家庭用品で簡単に出来る。100ml の母乳で 65°C に加熱し飲む温度に下がるまでで 10 分足らずである。鍋に母乳を絞って出し、65°C まで加熱すれば済むことである。

(3) ベトナムにおける HIV 感染の状況、母乳保育の現状および母乳加熱不活化に関する調査

ベトナムでは HIV 陽性患者に無料で抗エイズ薬を提供している。また 18 カ月未満の乳児にはミルクを無料で配布している。大人と子どもは異なる HIV コントロールセンターから抗 HIV 薬が配られており、時に行き違い等で母親が治療を受けない場合がある。これが質問 1 に関係している。また、母親が十分に抗 HIV 薬治療の重要性を認識せず、薬を勝手に中断することがある。

人工乳を使用していない場合があるのは母親が児を産んでから HIV 感染を長く気づかれなかったためである。もし HIV 陽性とわかればミルクの選択となった。とにかくベトナムでは 18 カ

月未満では、人工乳を推薦しており、ただで人工乳が得られる状況ではある。感染褥婦には加熱不活化を行いたいとの意見があった。このプロジェクトについて母親は協力的であるが実際は、国の倫理委員会の承認が必要であり、過去の経験から慎重に進める必要がある。

#### E. 結論

(1) 母乳中の HIV 不活化物質について GFP 発現細胞を用いて検討した結果、母乳には初乳、生乳ともに HIV の活性を抑制する物質が存在することが確認された。さらに母乳の HIV 不活化作

用は加熱 56°C30 分よりも母乳の濃度、接触時間が影響することがわかった。

(2) 母乳保育の利点から HIV 感染母乳を児に飲ませる場合、65°C で HIV の不活化(母乳が 65°C になれば加熱中止で良い) が可能とわかった。栄養分もほとんど壊れなかった。

(3) ベトナムでは、母親が HIV 感染と判明した場合、無料で人工乳を得ることが可能である。しかし、HIV 感染に気がつかなかった母親で母乳保育が見られた。母乳の加熱不活化に対しては協力的な回答が得られた。

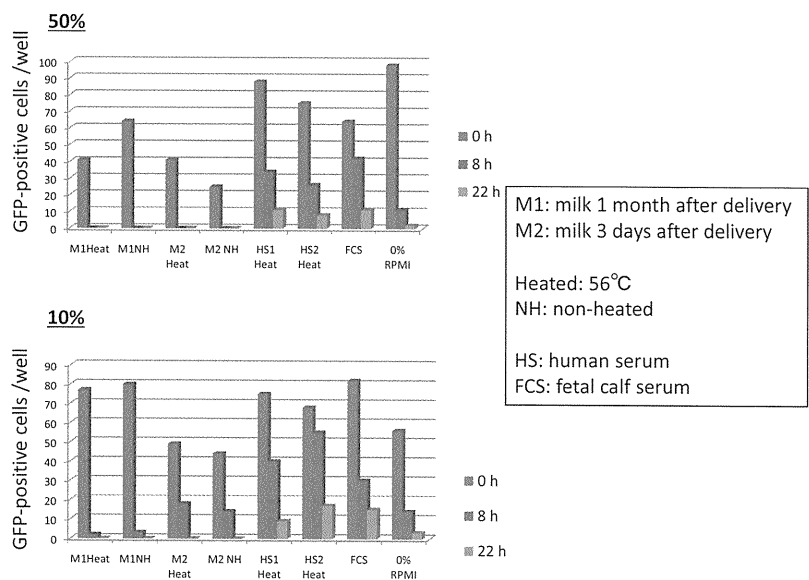
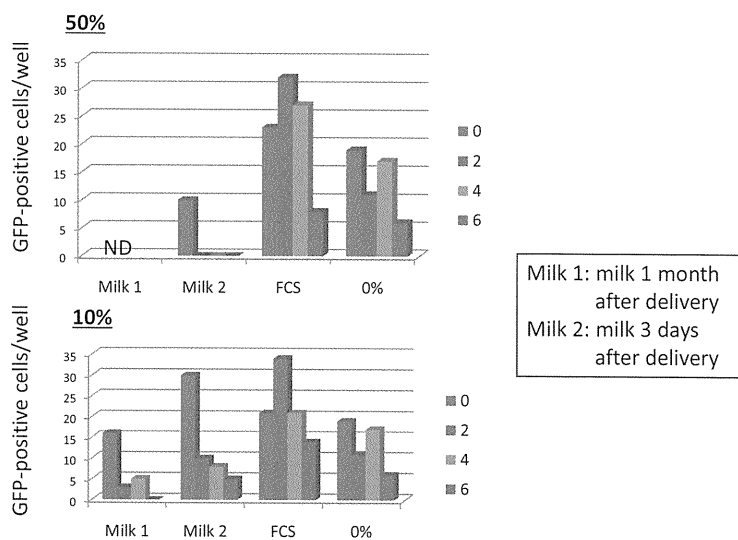


図 1. 成乳および初乳の HIV に対する効果－ 1 （22 時間まで）



Half-life of HIV-1 in 10% of milk plasma is about 1 hr 30 min.

図 2. 成乳および初乳の HIV に対する効果－ 2 （6 時間まで）

Table 1 Inactivation of cell-free HIV-1 in breast milk

	Unheated	55°C	60°C	65°C	70°C
Infectious unit/ml	4x10 <sup>4</sup>	-	-	-	-

-, No GFP detected per well i.e. <25/ml

Table 2 Destruction of cells in breast milk after heating.

	Unheated	60°C	65°C	70°C
Relative percentage of viable cells	100	47	-	-

-, O.D. was similar to background level (only culture medium)

Table 3 Nutritional content

	Unheated	Indirect heating	Direct heating
Vitamin B12 (pg/ml)	769±33	739.5±18	766±49
Vitamin A (μg/dl)	3.0>	3.0>	3.0>
IgG (mg/dl)	45.05±8	40.5±8	36.6±3
Total IgA (mg/dl)	0.3>	0.3>	0.3>
Total Protein (g/dl)	0.75±0.2	1.1±0.1	1.2±0.1
Lysozyme (μg/ml)	97±1	98.75±1	79.5±5*

\* p<0.05

Table 4 Inactivation of cell-free HIV-1 by direct heating

	Unheated	60° C	65°C	70°C
HIV-1 RT (pg/ml)	370	80	-*	-*
Infectious unit/ml	7x10 <sup>3</sup>	-**	-**	-**

-\* , <1 pg/ml

-\*\* , No GFP detected per well, i.e. <4/well