

天然薬物シジュウムの抗 HIV 作用
HIV 母児感染予防に関連して

分担研究者 早川 智 日本大学医学部産婦人科学教室

研究要旨 HIV 感染妊婦において、HIV 垂直感染の予防法を確立することは、産科臨床的にたいへん意義の深いことである。HIV の経胎盤感染は比較的少なく何らかの局所的防御機構の存在が挙げられる。さらに、胎盤絨毛には CD4 が存在せず、HIV 感染機構も興味深い。したがって、CD4 非依存的な HIV 感染機構を解明することは垂直感染予防のみならず中枢神経への HIV 感染機構の解明にもつながると考えられる。今回、HIV 感染患者胎盤の解析並びに培養絨毛細胞を対象に各種検討を行なった。さらに、我々が先に報告した Th1 誘導活性、IFN- γ 産生増強活性を有する天然物質シジュウムを用いて HIV の CD4 依存性、非依存性に対する効果について検討した。

A. 研究目的

I HIV 母児感染の解析

近年、我が国において、不法滞在外国人の増加や異性間、同性間の接触による HIV 感染者が著しく増加している。また、血液製剤による感染者とその配偶者が妊娠、出産を希望する事も多い。HIV 感染妊婦において胎児新生児に対する垂直感染の予防は産科臨床的に重要な課題である。AIDS の垂直感染は多くの場合、産道感染によるために陣痛発来前に選択的帝王切開を施行することによって予防が可能であるが、妊娠中に成立する経胎盤感染は確実な予防が困難である。文献的には HIV 感染妊婦より生まれた新生児の約 10% に垂直感染がみられ、多くの場合 10 才以前に発病し死亡するとされる。しかしながら、HIV の経胎盤感染は比較的少なく何らかの局所的防御機構の存在する可能性が示唆される。胎盤絨毛細胞には CD4 が存在せず、CD4 を介さない HIV の感染機構の解明は垂直感染予防の確立のみならず中枢神経への HIV 感染機構の解明にもつながると考えられる。本学ならびに国立感染症研究所エイズ研究センターにおいて 1998 年から 1999 年に収集した HIV 感染患者胎盤と培養絨毛癌細胞を対象として以下の検討を行った。

II シジュウムの抗 HIV 作用

南米インディオはシジュウムならびに関連生薬をウイルス感染症に使用しておりその臨床的有効性から、消炎作用と同時に抗ウイルス作用の存在が推定される。我々は先に天然物質シジュウムの細胞性免疫活性化作用として Th1 細胞の誘導活性や IFN- γ 産生増強を報告した。現在、致命的なウイルス感染症である HIV の CD4 依存性、非依存性感染に及ぼすシジュウムの作用について検討した。

B. 研究方法

I HIV 母児感染の解析

HIV 感染妊婦胎盤の病理組織学的解析

我が国において HIV 陽性が確認できた妊婦 12 例の胎児付属物（臍帯、卵膜、胎盤）における病理所見を検討した。

HIV 感染妊婦胎盤における HIV の局在

酵素抗体法により臍帯、卵膜、胎盤における HIVp24 の局在を検討した。

胎盤における HIV の感染機構

一般に胎盤絨毛細胞は CD4 を発現しないとされている。従って HIV 感染患者胎盤に対する HIV の侵入機構の解析が問題になる。そこで、樹立絨毛癌細胞株 JEG-3、JAR に *in vitro* で HIV をチャレンジし、120 時間後に培養上清中の HIV p 24 を定量した。この実験系においてウイルスの添加前に抗 CD4 抗体、抗 CCR5 抗体、抗 CXCR4 を加えて検討した。

胎盤脱落膜局所におけるケモカインによる情報伝達機構

胎盤におけるケモカインレセプターの発現と機能を解析した。妊娠初期、中期、後期各時期 4-8 例の胎盤と絨毛癌細胞株 JEG-3 において RT-PCR、Flow cytometry で各種のケモカインレセプター発現を検討した。また、絨毛細胞に各種濃度の MIP-1、MCP-1、MCP-3、RANTES を加えて絨毛細胞機能に対する影響を検討した。

子宮内感染を来す HIV のウイルス学的解析

胎内感染を起こしやすいウイルス株があるのかを検討した。

臍帯血における IL-16 の意義

近年、クローニングされた T 細胞の遊走、活性化因子である IL-16 は同時に HIV p120 の CD4 への結合を阻害し、HIV 感染者で高値、発病前に低下することから内因性の抗 HIV サイトカインとして注目される。健常妊婦における血中 IL-16 を ELISA によって測定したところ非妊婦に比較して有意に高値であり、さらに臍帯血では非妊婦の約 10 倍の濃度に達していた。同一患者においても臍帯血中の IL-16 は母体末梢血よりも常に高値であり、臍帯血 CD8 リンパ球は構成的に IL-16mRNA を発現していることから IL-16 が胎児リンパ球の HIV に対する自然抵抗性に関与している可能性が示唆された。しかし

ながら、臍帯血リンパ球を用いた *in vitro* の感染実験では、臍帯血中濃度である 1,000-2,000 ng は HIV の感染を完全に防ぐには必ずしも十分では無いため、さらにウイルス量や母児接点局所における IL-16 の作用など今後の検討が必要である。母体側組織である脱落膜に多く存在する CD56 陽性 LGL も構成的に IL-16 を産生しており、局所における HIV 感染防御に作用している可能性がある。

II シジュウムの抗 HIV 作用

CD4 依存性感染に及ぼすシジュウムの作用

健常人 4 名の末梢血より採取した CD4 陽性 T リンパ球に国立感染症研究所において維持している日本人由来の HIV 株をチャレンジし 120 時間後に培養上清中の HIVp24 を ELISA により定量した。この実験系においてウイルスの添加前にシジュウム粗抽出物を加えて検討した。

CD4 非依存性感染に及ぼすシジュウムの作用

樹立絨毛癌細胞株 JEG-3 に国立感染症研究所において維持している日本人由来の HIV 株をチャレンジし 120 時間後に培養上清中の HIVp24 を ELISA により定量した。

この実験系においてウイルスの添加前にシジュウム粗抽出物を加えて検討した。

HIV 感染患者由来リンパ球における HIV 産生に及ぼすシジュウムの作用

HIV 感染患者 2 例より同意を得て採血し、CD4 リンパ球をマグネチックビーズによって分離した。このリンパ球を PHA 5 µg/ml、IL-2 100 IU/ml によって刺激し、120 時間後に培養上清中の HIVp24 を ELISA により定量した。この実験系にシジュウム粗抽出物を加えて検討した。

HIV 感染患者由来リンパ球のアポトーシスに対するシジュウムの作用

HIV 感染患者 2 例より採血した CD4 リンパ球を PHA 5 µg/ml、IL-2 100 IU/ml によって刺激し 72 時間後にアポトーシスを DNA ladder の形成より検討した。この実験系にシジュウム粗抽出物を加えて検討した。

C 結果および考察

I HIV 母児感染の解析

HIV 感染妊婦胎盤の病理組織学的解析

胎盤では従来報告される cholangiosis、(絨毛における胎児血管の増生) fibrinoid 変性に加えて絨毛間腔の小円形細胞の出現 (intervillitis)、リンパ球と絨毛の接着、絨毛の未熟性に加えて絨毛細胞の apoptosis の増加がみられた。HTLV の経胎盤感染では感染絨毛細胞の脱落による局所感染予防機構が報告されているが、同様の機序の存在が示唆された。卵膜、臍帯においては特別な所見を認めなかった。

HIV 感染妊婦胎盤における HIV の局在

12例中2例の胎盤において合胞体絨毛、syncytial trophoblast ならびに Hofbauer 細胞に HIVp24 の染色を認めた。卵膜、臍帯においては全例とも染色性は陰性であった。そこで新鮮な4検体において抗原性によって分画した胎盤細胞における HIVmRNA の発現の有無を検討した。胎盤を生理食塩水で十分に洗浄して付着した母体血、を除きトリプシン処理後、マグネチックビーズあるいは抗体プレートによって EGF-R 陽性の villous trophoblast erbB2 陽性の extravillous trophoblast、CD11b 陽性の Hofbauer 細胞に分画して RT-PCR を行った。その結果 HIV 感染患者では5例中4例の villous trophoblast、extravillous trophoblast、Hofbauer 細胞に HIVmRNA の発現を認めた。この所見から胎盤に HIV は感染しているが大部分の胎児には感染しないという事実が明らかになった。

胎盤における HIV の感染機構

JEG-3 ではウイルス量は抗 CCR5 抗体、抗 CXCR-4 抗体で有意に減少したが 抗 CD4 抗体では全く影響を受けなかった。この結果、絨毛癌細胞株 JEG-3 は HIV に感受性であり、胎盤絨毛への HIV の感染は CD4 非依存的であるが、ケモカインレセプターは関与するらしいという事実が明らかになった。

胎盤脱落膜局所におけるケモカインによる情報伝達機構

妊娠初期胎盤では CCR1,2,3,4,5 CXCR-1,2,4、中期胎盤では CCR1,2,4、CXCR-2,4、妊娠後期胎盤では CCR-2,4、CXCR-4 の発現を認め、JEG-3 では CCR-3,4,5、CXCR-1,2,4 の発現が見られた。

ケモカインとそのレセプターの脱落膜胎盤局所における機能として、胎盤機能の調節、母児免疫寛容への関与、胎内感染の防御などの可能性がある。その結果、10-100 ng/ml レベルでは絨毛細胞の増殖を促進し、それ以上では hCG 分泌を促進する作用が明らかになった。

ケモカインを産生源となる細胞を RT-PCR で検索した。絨毛細胞自体はケモカインを産生せず、脱落膜リンパ球、特に未熟な NKT 細胞を含む CD56 陽性顆粒リンパ球が IL-2 の存在下に MIP-1、MCP-1、MCP-3、RANTES を産生することが明らかになった。この事実より脱落膜（母体側）と胎盤（胎児側）の間にケモカインを介した情報伝達が行われている事実が明らかになった。

子宮内感染を来す HIV のウイルス学的解析

我々は、先に我が国において HIV 垂直感染の成立した8例のうち6例はV3ループの29例がDがNに置換していることを報告した。個々の症例内でも母親血中には複数のクローンが存在しても感染した児の HIV はほぼ単独クローンであることから母体に感染した HIV は変異を繰り返しそのごく一部が胎児・新生児に感染すると考えられた。この現象がウイルスの性状に相違によるものかそれとも単に感染機会が少ない事の反映かを検証するため HIV 胎盤から分離した HIV のシーケンシングを行っているが、現時点では確定的な結論を得られていない。

臍帯血における IL-16 の意義

近年、クローニングされた T 細胞の遊走、活性化因子である IL-16 は同時に HIV p120 の CD4 への結合を阻害し、HIV 感染者で高値、発病前に低下することから内因性の抗 HIV サイトカインとして注目される。健常妊婦における血中 IL-16 を ELISA によって測定したところ非妊婦に比較して有意に高値であり、さらに臍帯血では非妊婦の約 10 倍の濃度に達していた。同一患者においても臍帯血中の IL-16 は母体末梢血よりも常に高値であり、臍帯血 CD8 リンパ球は構成的に IL-16mRNA を発現していることから IL-16 が胎児リンパ球の HIV に対する自然抵抗性に関与している可能性が示唆された。しかしながら、臍帯血リンパ球を用いた *in vitro* の感染実験では、臍帯血中濃度である 1,000-2,000 ng は HIV の感染を完全に防ぐには必ずしも十分では無いため、さらにウイルス量や母児接点局所における IL-16 の作用など今後の検討が必要である。母体側組織である脱落膜に多く存在する CD56 陽性 LGL も構成的に IL-16 を産生しており、局所における HIV 感染防御に作用している可能性がある。

II シジュウムの抗 HIV 作用

CD4 依存性感染に及ぼすシジュウムの作用

CD4 陽性 T リンパ球ではウイルス量はシジュウム添加により 100 ng/ml 以上の濃度で濃度依存的に減少した。

CD4 非依存性感染に及ぼすシジュウムの作用

CD4 陽性 T リンパ球ではウイルス量はシジュウム添加により 100 ng/ml 以上の濃度で濃度依存的に減少した。

HIV 感染患者由来リンパ球における HIV 産生に及ぼすシジュウムの作用

HIV 感染者 CD4 陽性 T リンパ球ではウイルス量はシジュウム添加により 1000 ng/ml 以上の濃度で減少した。

HIV 感染患者由来リンパ球のアポトーシスに対するシジュウムの作用

HIV 感染者 CD4 陽性 T リンパ球のアポトーシスはシジュウム添加により 100 ng/ml 以上の濃度で抑制された。

D. 結論

I HIV 母児感染の解析について

- 1 HIV 感染妊婦胎盤に特異的な所見はないが HIVp24 が染色される症例がある。
- 2 抗原性によって分離した絨毛細胞、Hofbauer 細胞に HIVmRNA が存在する。
- 3 HIV は CD4 非依存的に絨毛癌細胞に感染するがケモカインレセプターは関与する。
- 4 絨毛細胞と脱落膜リンパ球の間にケモカインを介した情報伝達が行われている。
- 5 胎児に感染する HIV は母体に感染した HIV のごく一部である。
- 6 健常新生児臍帯血には健常成人の約 10 倍濃度の IL-16 が存在する。

- 7 新生児臍帯血リンパ球は構成的に IL-16mRNA を発現する。
- 8 IL-16 は臍帯血 CD4 リンパ球に対する HIV 感染を濃度依存性に抑制する。
- 9 脱落膜リンパ球は IL-16 を産生しており局所における HIV 感染防御に作用している可能性がある。

II シジュウム抗 HIV 作用について

- 1 シジュウム粗抽出物は 100 ng/ml 以上の濃度で CD4 陽性 T リンパ球における HIV HIVp24 産生を濃度依存性に抑制した。
- 2 シジュウム粗抽出物は 1000 ng/ml 以上の濃度で絨毛癌における HIVp24 産生を濃度依存性に抑制した。
- 3 シジュウム粗抽出物は 1000 ng/ml 以上の濃度で HIV 感染患者 CD4 リンパ球における HIV 産生を抑制した。
- 4 シジュウム粗抽出物は 1000 ng/ml 以上の濃度で HIV 感染患者 CD4 リンパ球における アポトーシスを抑制した。