

平成12年度厚生科学研究費補助金  
(エイズ対策研究事業)

エイズ対策の評価に関する研究

「妊産婦のSTD及びHIV陽性率と妊婦STD及びHIVの  
出生児に与える影響に関する研究」

(課題番号：12110401)

主任研究者

新潟大学医学部産科婦人科学講座

田中憲一

平成12年度厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）  
 エイズ対策の評価に関する研究  
 「妊産婦のSTD及びHIV陽性率と妊婦STD及びHIVの出生児に与える  
 影響に関する研究」

主任研究者	田中憲一	新潟大学医学部産科婦人科学講座教授	
分担研究者	岩下光利	杏林大学医学部産科婦人科学講座教授	
	小林巖	名古屋第二赤十字病院第一産婦人科部長	
	鈴木瞭	国立大阪病院婦人科部長	
	杉本充弘	日本赤十字社医療センター産婦人科部長	
	高桑好一	新潟大学医学部産科婦人科学講座助教授	
	鳥居裕一	聖隷浜松病院副院長（産婦人科）	
	花房秀次	荻窪病院血液科部長	
	松本雅彦	大阪市立総合医療センター産科部長	
	研究協力者	大野剛	済生会川口総合病院副院長（産婦人科）
		小田高明	国立小倉病院産婦人科部長
		加藤真吾	慶応義塾大学医学部微生物学教室
		兼子智	東京医科大学講師
		八幡剛喜	伊勢原協同病院産婦人科副部長

#### 研究要旨

大都市部の妊娠婦人における後天性免疫不全症候群(HIV)、クラミジア、淋菌などの性感染症（STD）の蔓延の程度を明らかとするため、多施設共同により、妊娠婦人について各種STD関連の検査を実施した。また、近年、子宮頸癌の原因として注目されているヒトパピローマウイルス（HPV）は性行為により感染することが指摘されており、HIV感染と重複感染となった場合には、免疫能の低下から子宮頸癌の発症の高率化が推察される。このようにHPVも重要なSTDのひとつであるが、妊娠婦人における蔓延状況については明かとなっていない。そこで、これについても検討を行った。血中HIV抗体については3048例について検索を行った。子宮頸部クラミジア抗原、子宮頸部淋菌については3062例について、また、HPVについては1183例について検討を行った。HIV抗体は3048例中陽性例は0であった。また、クラミジア抗原、淋菌は3062例中それぞれ58例（1.9%）、15例（0.5%）に陽性であった。また、HPVは12.5%に陽性であった。年齢階層別陽性率では、～19才、20～24才の年齢層においてクラミジア、HPVが高率に認められ、若年妊娠婦人においてこれらの感染症が蔓延していることが判明した。

昨年度の本研究において、子宮頸管クラミジアが陽性であることが確認された妊娠婦人から出生した新生児につき、分娩時の状況、新生児期間における異常の有無について検討した。その結果、クラミジア陽性妊娠婦人では出生した新生児に関し、コントロールと比較し異常は観察されなかった。

一方、妊娠補助技術を応用し、HIV感染男性、HIV非感染女性夫婦がより安全に（妻が二次感染することを極力回避すること）妊娠できるようにするために、基礎的、臨床的検討を行った。従来、PCR法によるHIVウイルスの検出感度は50コピー/mlであったが、2コピー/mlを検出できる超高感度PCR法を開発した。これにより、HIV陽性男性精液をPercoll法、Swim up法により調整した精子浮遊液からHIVウイルスがほぼ完全に除去されることを確認した。この技術によりHIVウイルスを除去した精子浮遊液を用い、HIV感染男性、HIV非感染女性夫婦で、妊娠を強く希望する夫婦に対し、臨床実施（体外受精-胚移植）を行った。事前に、実施施設倫理委員会に付託し、許可を得た。実施に先立ち、担当医師による説明、カウンセラーによる患者の意思確認を行い、インフォームドコンセントを得た。

## 1. 多施設共同による妊婦の各種STD、HIVおよびパピローマウイルスの感染率に関する研究、および出生児の異常の有無に関する研究

担当者：田中憲一（主任研究者）、岩下光利（分担研究者）、小林巖（分担研究者）  
杉本充弘（分担研究者）、高桑好一（分担研究者）、鳥居裕一（分担研究者）  
松本雅彦（分担研究者）、大野剛（研究協力者）、小田高明（研究協力者）、  
八幡剛喜（研究協力者）

### A. 研究目的

本邦におけるHIVの感染者およびAIDSの患者数は潜在的な患者も含めると30000人に達するとされており、今後も増加傾向にある。このようなHIVも含めた性感染症（STD）の増加は重大な問題であり、その対策は緊急の課題である。

STD感染とHIV感染は悪循環を作り感染伝播することが知られている。すなわち、STD感染がある場合局所の粘膜組織の障害が生じ、HIV感染が生じやすくなる。一方、HIV感染がある場合免疫能の低下が認められ、STD感染の可能性も高くなる。

当然のことながらSTDは性成熟期にある女性に多く認められ、妊婦において、これらの感染症が多発することが推察され、また、妊婦がこれらの感染症に罹患している場合、次世代の担い手である出生児に様々な悪影響を与えることが予想される。一方、婦人科悪性腫瘍の中で最も高頻度であ

る子宮頸癌はヒトパピローマウイルス（HPV）が原因であることが明らかとなっているが、HPVもまた、性行為により伝播することからSTDの一種と捉えられる。HIV感染との関連性で考えた場合、上述のような感染に関する悪循環の存在が考えられると同時に、HIV感染者で免疫能が低下した場合HPV感染が生じていれば子宮頸癌の発症が高率となることが推察される。このような観点から、妊婦におけるHIV及びHPVも含めたSTDの蔓延の程度を明らかにすることを目的とした。

### B. 研究方法

関東地区4施設、中京地区2施設、西日本地区3施設の計9施設で共同研究を行った。

研究参加施設は以下の通りである。  
杏林大学医学部付属病院、伊勢原協同病院、済生会川口総合病院、日本赤十字社医療センター、聖隷浜松病院、名古屋第二赤

十字病院，大阪市立総合医療センター，国立大阪病院，国立小倉病院の9施設であり，合計3062例について検討を行った。各施設別の症例数を表1に示した。地区別で

は関東地区1012例，中京地区1101例，西日本地区949例である。

施設名	症例数	地区	地区別合計
杏林大学	427	関東地区	1012
伊勢原協同病院	204		
済生会川口病院	150		
日赤医療センター	231		
聖隷浜松病院	700	中京地区	1101
名古屋第二赤十字病院	401		
大阪市立総合医療センター	398	西日本地区	949
国立大阪病院	454		
国立小倉病院	97		
合計	3062		

これらの施設において，平成12年10月から平成13年2月の間に，産科外来を受診した妊娠婦人を対象として，インフォームドコンセントを得た後，以下の検査を行った。

- (1) 子宮頸管クラミジアDNA検査
- (2) 子宮頸管淋菌DNA検査
- (3) 子宮頸管HPV検査
- (4) 血清中HIV抗体

これらの各種検査について施設別陽性率，地区別陽性率，年齢別陽性率などについて解析を行った。

### C. 研究成果

各施設における対象症例数は表1に示したとおりである。

対象総症例数は3062例であり，クラミジア，淋菌については，これらすべての症例について施行した。HIVについては3048例について施行し，HPVについては，1183例について施行した。

#### 1. 施設別HIV抗体陽性率

表2に施設別HIV抗体陽性症例数を示したが，今回の検討では，3048例中HIV抗体陽性例は認められなかった。

施設名	陽性	陰性	総計
杏林大学	0	427	427
伊勢原協同	0	204	204
済生会川口	0	150	150
日赤医療セ	0	231	231
聖隷浜松	0	700	700
名古屋第二日赤	0	401	401
大阪市立総合	0	395	395
国立大阪	0	454	454
国立小倉	0	86	86
合計	0	3062	3062

#### 2. 施設別クラミジア抗原陽性率

表3に各施設におけるクラミジア抗原陽性症例数およびクラミジア抗原陽性率を示した。

全施設におけるクラミジア抗原陽性症例は3062例中58例（1.9％）であった。施設別では0.1％から3.5％の間に分布していた。また地区別では、関東地区が1012例中

14例（1.4％）、中京地区が1101例中27例（2.5％）、西日本地区が949例中17例（1.8％）に陽性であり、各地区の間に有意の差は認められなかった（表4）。

表3 施設別クラミジア陽性数

施設名	陽性	陰性	総計	陽性率
杏林大学	4	427	427	0.9%
伊勢原協同病院	1	204	204	0.1%
済生会川口病院	1	150	150	0.7%
日赤医療センター	8	231	231	3.5%
聖隷浜松病院	19	700	700	2.7%
名古屋第二赤十字病院	8	401	401	2.0%
大阪市立総合医療センター	6	395	401	1.5%
国立大阪病院	10	454	454	2.2%
国立小倉病院	1	86	86	1.0%
<b>合計</b>	<b>58</b>	<b>3062</b>	<b>3062</b>	<b>1.9%</b>

表4 地区別クラミジア陽性数

地区名	陽性	陰性	総計	陽性率
関東地区	14	998	1012	1.4%
中京地区	27	1074	1101	2.5%
西日本地区	17	932	949	1.8%
<b>合計</b>	<b>58</b>	<b>3062</b>	<b>3062</b>	<b>1</b>

### 3. 施設別淋菌陽性率

表5に各施設における淋菌陽性症例数を示した。また、表6に各地区別淋菌陽性率を示した。

全施設における淋菌の陽性症例は3062例中15例（0.5％）であった。施設別陽性率は0.0％から1.3％の間に分布していた。地区別では関東地区では1012例中5例（0.5％）、中京地区では1101例中7例（0.6％）、西日本地区では949例中3例（0.3％）であった。

### 4. 施設別HPV陽性率

HPVについては7施設1183例について検討を行った。表7に施設別HPV陽性率を示した。全体でHPVは148例（12.5％）の症例で陽性であった。また、地区別では、関東地区260例中25例（9.6％）、中京地区400例中53例（13.3％）、西日本地区523例中70例（13.4％）でそれぞれ陽性であった。関東地区で低い傾向が認められたが有意差は認められなかった。

施設名	陽性	陰性	総計	陽性率
杏林大学	1	426	427	0.2%
伊勢原協同病院	1	203	204	0.5%
済生会川口病院	0	150	150	0.0%
日赤医療センター	3	228	231	1.3%
聖隷浜松病院	7	693	700	1.0%
名古屋第二赤十字病院	0	401	401	0.0%
大阪市立総合医療センター	0	398	398	0.0%
国立大阪病院	3	451	454	0.7%
国立小倉病院	0	97	86	0.0%
<b>合計</b>	<b>15</b>	<b>3047</b>	<b>3062</b>	<b>0.5%</b>

地区名	陽性	陰性	総計	陽性率
関東地区	5	1007	1012	0.5%
中京地区	7	1094	1101	0.6%
西日本地区	3	946	949	0.3%
<b>合計</b>	<b>15</b>	<b>3047</b>	<b>3062</b>	<b>0.5%</b>

施設名	陽性	陰性	総計	陽性率
杏林大学	4	52	56	7.1%
伊勢原協同病院	21	183	204	10.3%
聖隷浜松病院	25	175	200	12.5%
名古屋第二赤十字病院	28	172	200	14.0%
大阪市立総合医療センター	28	207	235	11.9%
国立大阪病院	26	174	200	13.0%
国立小倉病院	16	72	88	18.2%
<b>合計</b>	<b>148</b>	<b>1035</b>	<b>1183</b>	<b>12.5%</b>

地区名	陽性	陰性	総計	陽性率
関東地区	25	235	260	9.6%
中京地区	53	347	400	13.3%
西日本地区	70	453	523	13.4%
合計	148	1035	1183	12.5%

### 5. 年齢別クラミジア抗原陽性率

表9に年齢を5才区切りに分けた年齢階層別のクラミジア抗原陽性率を示した。

年齢別のクラミジア抗原陽性率では若年者ほど陽性率が高い傾向が認められた。すなわち、15才から19才では26例中2例（7.7%）で陽性であり、20才から24才では285例中17例（6.0%）で陽性であった。一方30才から34才では1132例中11例（1.0%）

），35才から39才では462例中5例（1.1%）の陽性率であり、40才以降では0%であった。表9に示したように～19才の年齢階層では30～34才および35才～39才の年齢階層に比べ有意に高率であった。また、20～24才の年齢階層では25才以降のいずれの年齢階層に比較しても、有意に高率であった。

年齢階層	陽性	陰性	総計	陽性率
～19才	2	24	26	7.7%
20～24才	17	268	285	6.0%
25才～29才	23	1072	1095	2.1%
30才～34才	11	1121	1132	1.0%
35才～39才	5	457	462	1.1%
40才～	0	62	62	0.0%
合計	58	3004	3062	1.9%

  

～19才 Vs 30～34才：p<0.05	20～24才 Vs 25～29才：p<0.001
～19才 Vs 35～39才：p<0.05	20～24才 Vs 30～34才：p<0.000001
	20～24才 Vs 35～39才：p<0.005
	20～24才 Vs 40才～：p<0.05

6. 年齢別淋菌陽性率

表10に年齢を5才区切りに分けた年齢階層別のクラミジア抗原陽性率を示した。

年齢別の淋菌陽性率については、クラミジア抗原で認められたような若年者における高い陽性率は認められなかった。

年齢階層	陽性	陰性	総計	陽性率
～19才	0	26	26	0.0%
20～24才	6	279	285	2.1%
25才～29才	3	1092	1095	0.3%
30才～34才	5	1127	1132	0.4%
35才～39才	1	461	462	0.2%
40才～	0	62	62	0.0%
<b>合計</b>	<b>15</b>	<b>3047</b>	<b>3062</b>	<b>0.5%</b>

7. 年齢別HPV陽性率

表11に年齢を5才区切りに分けた年齢階層別のHPV陽性率を示した。

年齢別のHPV陽性率を示した。

年齢階層	陽性	陰性	総計	陽性率
～19才	4	5	9	44.0%
20～24才	24	91	115	20.9%
25才～29才	53	376	429	12.4%
30才～34才	50	382	432	11.6%
35才～39才	13	160	173	7.5%
40才～	4	21	25	16.0%
<b>合計</b>	<b>148</b>	<b>1035</b>	<b>1183</b>	<b>12.5%</b>
～19才 Vs 25～29才 : $p < 0.05$ 20～24才 Vs 25～29才 : $p < 0.05$ ～19才 Vs 30～34才 : $p < 0.05$ 20～24才 Vs 30～34才 : $p < 0.01$ ～19才 Vs 35～39才 : $p < 0.01$ 20～24才 Vs 35～39才 : $p < 0.001$				



すでに示したように、全体でのHPVの陽性率は12.5%であったが、年齢別のHPV陽性率では若年者ほど陽性率が高い傾向が認められた。とくに～19才の年齢階層では9例中4例（44.4%）でHPVが認められた。また20才～24才の年齢階層でも115例中24例（20.9%）に陽性であった。一方25～29才では、12.4%（429例中53例）、30～34才では11.6%（432例中50例）、35～39才では7.5%（173例中13例）と年齢に従い、陽性率は低下した。40才以降では16.0%（25例中4例）に陽性であった。表11に示したように～19才の年齢階層では25～29才、30～34才および35才～39才の年齢階層に比べ有意に高率であった。また、20～24才の年齢階層でも同じく25～29才、30

～34才および35才～39才の年齢階層に比べ有意に高率であった。

#### 8. クラミジア抗原陽性症例、陰性症例におけるHPV陽性率

表12にクラミジア抗原陽性症例、陰性症例におけるHPVの陽性率について示した。クラミジア抗原陽性の18症例中6例（33.3%）にHPVが陽性であった。また、クラミジア抗原陰性症例1165例ではHPVは142例（12.2%）に陽性であった。クラミジア抗原陽性症例におけるHPV陽性率はクラミジア抗原陰性症例に比較し、推計学的に有意に高率であった。

表12 クラミジア陽性・陰性別HPV陽性数

	陽性	陰性	総計	陽性率
クラミジア陽性例	6	12	18	33.3%
クラミジア陰性例	142	1023	1165	12.2%
合計	148	1035	1183	12.5%

p<0.05

#### 9. HPV型別頻度

HPVのウイルス型の頻度を表13に示した。今回検出された型はHPV16型、18型、31型、33型、35型、39型、51型、52型、53型、54型、56型、58型、59型、61型、66型、68型であり、148例中4例では、重複したウイルスが検出された。頻度としては、52型が152例中27例（17.8%）

であり、最も高かった。また、16型が9.9%に、18型が3.9%に陽性であった。また、45例（29.6%）は未知の型であった。各地区別のウイルスの型の分布を表14に示した。地区による分布の差は認められなかった。

表13 HPV型別頻度

HPV型	実数	頻度
HPV16	15	9.9%
HPV18	6	3.9%
HPV31	1	0.7%
HPV33	2	1.3%
HPV35	3	2.0%
HPV39	4	2.6%
HPV51	4	2.6%
HPV52	27	17.8%
HPV53	5	3.3%
HPV54	2	1.3%
HPV56	4	2.6%
HPV58	10	6.6%
HPV59	3	2.0%
HPV61	3	2.0%
HPV66	3	2.0%
HPV68	4	2.6%
未知の型	45	29.6%
合計	152	100.0%

注：4例では2個の型が検出

表14 地区別各HPV型頻度

地区	HPV16	HPV16, 52	HPV16, 58	HPV18	HPV18, 68
関東地区	2 (8.0%)	0	0	1 (4.0%)	0
中京地区	3 (5.7%)	0	0	1 (1.9%)	0
西日本地区	7 (10.0%)	2 (2.9%)	1 (1.4%)	3 (4.3%)	1 (1.4%)
総計	12 (8.1%)	2 (1.4%)	1 (0.7%)	5 (3.4%)	1 (0.7%)

  

地区	HPV31	HPV33	HPV35	HPV39	HPV51
関東地区	0	1 (4.0%)	0	1 (4.0%)	0
中京地区	0	1 (1.9%)	3 (5.7%)	2 (3.8%)	1 (1.9%)
西日本地区	1 (1.4%)	0	0	1 (1.4%)	3 (4.3%)
総計	1 (0.7%)	2 (1.4%)	3 (2.0%)	4 (2.7%)	4 (2.7%)

  

地区	HPV52	HPV53	HPV54	HPV56	HPV58
関東地区	4 (16.0%)	1 (4.0%)	0	1 (4.0%)	2 (8.0%)
中京地区	7 (26.4%)	2 (3.8%)	1 (1.9%)	0	1 (1.9%)
西日本地区	7 (10.0%)	2 (2.9%)	1 (1.4%)	3 (4.3%)	6 (8.6%)
総計	25 (16.9%)	5 (3.4%)	2 (1.4%)	4 (2.7%)	9 (6.1%)

表14 地区別各HPV型頻度 (つづき)

地区	HPV61	HPV66	HPV68	未知の型	総計
関東地区	0	0	1 (4.0%)	11 (44.0%)	25
中京地区	1 (1.9%)	2 (3.8%)	1 (1.9%)	17 (32.1%)	53
西日本地区	2 (2.9%)	1 (1.4%)	1 (1.4%)	28 (40.0%)	70
総計	3 (2.0%)	3 (2.0%)	3 (2.0%)	56 (37.8%)	148

#### 10. クラミジア陽性妊婦の妊娠予後

平成11年度の本研究において、子宮頸管クラミジアが陽性であった妊娠婦人から出生した新生児につき、分娩時の状況、新生児期間における異常の有無について検討した。検討項目は分娩週数、新生児体重、新生児アプガール点数、新生児の異常の有無

である。コントロールとして、集計用紙においてクラミジア陽性妊娠婦人の次の症例（クラミジア陰性症）の記録を採用した。その結果、出生した新生児に関し、コントロールと比較し異常は観察されなかった（表15）。

表15 クラミジア陽性妊婦の妊娠予後

	クラミジア陽性例 (n=52)	治療有 (n=33)		治療無 (n=19)	クラミジア陰性例 (n=48)
	年齢	27.8±4.9	26.9±4.9	29.3±4.6	30.6±4.9
経妊回数	1.1±1.7	1.0±1.5	1.2±2.1	1.1±1.0	
経産回数	0.7±1.2	0.5±0.8	0.9±1.6	0.6±0.7	
分娩週数	39.1±1.2	39.2±1.3	38.8±1.0	39.0±1.4	
新生児体重	2993±382	3032±357	2924±426	3026±413	
新生児アプガール点数	8.5±1.3	8.3±1.5	8.7±0.7	8.6±0.8	
新生児クラミジア感染	なし	なし	なし	なし	
新生児特記事項		1例：VSD	1例：IUGR	1例：口蓋裂 1例：IUGR	

#### D. 考察

妊婦のHIVも含めたSTDの感染状況については国により大きな差異がある。特にHIV感染者については欧米、東南アジア諸国、アフリカ諸国などでは高い感染率を示している。本邦においては一般人口におけるHIV抗体陽性率はいまだ低く、妊婦にお

ける陽性率も低いものと考えられているが具体的な陽性率に関する報告は少ない。今回の検討では関東地区、中京地区、西日本地区の9施設で3048例の妊娠婦人を対象に検査を行いHIV抗体については陽性例は認められなかった。昨年度の本研究におけるHIV陽性率は3706例中1例（0.0.3%）で

あった。いまだ、一般妊娠婦人におけるHIVの感染率は高いものではないが、感染者が徐々に増加していることは事実であり、厳重なサーベイランスが必要であるものと判断される。

研究目的で指摘したようにHIV感染に関し悪循環を形成する可能性の大きいSTDの感染率特に妊娠婦人における感染率は重要である。最近では、子宮頸癌の発症ウイルスであるヒトパピローマウイルス（HPV）がSTDとして注目されている。HPVは子宮頸癌というわが国で最も多い婦人科悪性疾患の原因ウイルスであり、HIV感染と合併した場合には免疫能の低下などから発症の高率化が危惧される。今回は、一般妊娠婦人について上記のSTDについての陽性率を検討した。さらに、STDの中でも感染の割合が高いクラミジア陽性妊婦から出生した新生児の予後についても検討した。

その結果3062例中58例（1.9％）にクラミジア抗原が陽性であった。昨年度の検討では3709例中80例（2.2％）にクラミジア抗原が陽性であり、ほぼ同様の結果となった。淋菌については、3062例中15例（0.5％）で陽性であり昨年度と同じ結果（3709例中19例、0.51％）であり、クラミジア抗原に比較し、感染率は低いものと判断された。一方HPV感染については1183例中、148例（12.5％）で陽性であり、一般妊娠婦人の1割強にHPVの感染が生じていることが推察された。

クラミジア感染妊婦から出生した新生児については幸いにも、コントロール群に比較し、その予後の悪化は認められなかった。クラミジア感染が判明した場合、抗生物質による治療がなされるケースも多く、そのことがこのような結果に結び付いているとも考えられる。

STD感染と年齢との関連性ではクラミジア抗原について、～19才および20～24才の年齢階層で有意に高率であり、これは昨年度の検討結果と同じであった。淋菌感染については年齢階層による差は認められなかったが、HPVについては、～19才で44.0％、20～24才で20.9％などの高い陽性率が示され、クラミジア感染と同様、以降の年齢階層に比較し、有意に高率であった。

HPVについては16, 18, 31, 35, 51, 52, 58型などが子宮頸癌の扁平上皮癌の危険型とされており、16型、18型は腺癌の危険型とされている。今回の検討では、多くがこれらの危険な型とされる型のウイルスであった。関東地区、中京地区、西日本地区それぞれにおける型の分布についても検討を行ったが、地域による差は認められなかった。

クラミジアとHPVの混合感染について検討するため、クラミジア抗原陽性症例と陰性症例におけるHPV感染率を比較した。この結果、クラミジア陽性症例におけるHPV感染の率がクラミジア陰性症例に比較し有意に高率であり、混合感染を生じやすいことが示唆された。

STD感染が蔓延している状況でHIV感染が蔓延しやすいことは従来より指摘されていることである。今回の研究結果で、特に若年妊娠婦人においてHPVも含めたSTDの感染が高率であることが明らかとなった。このことは、今後若年婦人を中心にクラミジア感染-HIV感染-HPV感染という複合感染が蔓延していくことを危惧させる所見であるものと判断される。

## E. 結論

本研究により妊娠婦人におけるHIVおよびHPVも含めたSTDの感染の状況、特に大

都市部における感染の状況が明らかになった。特にHPVも含めたSTDについては若年婦人での感染の蔓延が明らかであり、今後

若年層を中心としたさらなる検索が重要であると判断される。

## 2. HIV感染者の人工受精・体外受精に関する基礎的・臨床的研究

担当：田中憲一（主任研究者）、花房秀次（分担研究者）、高桑好一（分担研究者）、加藤真吾（研究協力者）、兼子智（研究協力者）

### A 研究目的

1996年以後、プロテアーゼ阻害剤を含む Highly active antiretroviral treatment (HAART)の普及によりエイズによる死亡者は80%以上減少し、エイズは死の病気ではなくなりつつある。今、HIV感染者は生き続けることが可能になり、今後の人生設計を考え直してQOLの改善を求めようになってきている。

そのような状況でHIV感染者の中でも結婚するカップルが増えてきているが、HIV感染者夫婦が子供を持ちたいと思って医療機関に相談に行っても今までは2次感染の危険性を指摘されるだけであった。その結果、2次感染の危険性を顧みずに子どもを作った夫婦が数多く実在する。子どもを持つまでのHIV 2次感染の危険性はHIV感染者の状態（ウイルス量や精子数・運動率など）によって異なり、主治医が患者個々の危険度を判断して危険性を正確に話して相談する必要がある。精液中のHIV RNA量は血中HIV RNA量と相関し、HAARTによって精液中のfree HIV RNAは減少する。しかし、精液でのHIV感染力は精液中の単核球が最も強くHAARTで血中のHIV RNAが検出限界以下になっても精液中のHIV感染単核球は残存し2次感染する危険性が残っていることが証明されている。HAARTで

精液中の遊離HIV RNAが検出限界以下になった場合の2次感染の危険性は4.8%よりも低いと予測されるが今のところ不明であり、実際2次感染の報告例はある。HAARTで血中HIV RNAが検出限界以下になっても精液を介して2次感染する危険性はあるのでコンドームの使用は続けなければならない。

さらに現在、HIVの薬剤耐性が深刻な問題になっている。変異HIVの感染性に問題はあるが、変異HIVによる2次感染も報告されており、今後の大きな問題である。多剤耐性HIVが2次感染すると治療が困難になると予想されるので、2次感染は可能な限り避ける手段が必要である。

イタリアのSempriniらは現在までに2000人以上にswim upによる人工授精を行い2次感染が全くないと報告している。しかし、彼らの2層しか用いないPercoll法は精液からのHIV除去が不十分であり、100%安全とはいえない。そこで、今回我々は安全性を可能な限り高めた体外受精の開発と臨床実施を検討した。

### B 研究方法および結果

#### 超高感度PCR法の開発

共同研究者の加藤らは超遠心を用いて検出感度が2 copies/mlの世界最高感度の

PCRの開発に成功した。現在、PCRの検出限界は超遠心を用いたアンプリコア法の50 copies/mlである。しかし、精液中におけるHIV RNA, proviral DNAのPCRによる測定はPercollや精液中のPCR阻害物質により困難を極めている。NASBAによる測定が最も感度がよいといわれてきたが、検出感度は400 copies/mlである。加藤らはエタノール抽出を繰り返すことなどによりPCR阻害物質を除去し、検出限界が50 copies/mlのPCR法を開発し報告した。

今回の研究において、超遠心を加えることにより検出感度が2 copies/mlのPCR法の開発に成功した。その結果、今回の臨床実施における安全性の確認が飛躍的に高まった。Percoll法による精子浮遊液は約0.3mlで、Swim upを用いた体外受精に使用する精子浮遊液は約1 mlのため今回の超高感度PCRの開発の意義は大きい。

高感度In situ hybridization法の開発

逆転写酵素領域とVif遺伝子領域をnested PCRで増幅し、2nd PCRにおいてPCR DIGプローブ合成キット(Roche Cat. No. 1686 090)を用いてproducts自体にDIG標識してプローブとして用い、CAS(Catalyzed signal amplification system)によるIn situ hybridization法を開発した。今回の方法の開発により精子表面にHIV RNAが付着しているかどうか、HIV付着精子の割合の検討、及びPercoll法とSwim up法による精子表面のHIV除去率を検討した。

臨床研究への参加希望者

今回の臨床研究への参加希望者は32組を超えている。血友病患者が大半で、性感染者が2組訪れた。地域は東北から大阪まで幅広く分布しており、主治医の理解度と患者夫婦への説明による地域差が見受けられ

た。しかし、中には夫婦での意志に差がありカウンセリングの結果断念した例もあった。今年度は、そのうち17名で精液検査を施行した。平均年齢は33.3歳(28-45歳)であった。

感染者の精液検査

精子数

17名において28回精液検査を施行したところ、精子数は平均3600万/mlで0から9000万/mlまで分布した。無精子症が4/17と高率に認められた。4例ともHAARTを受けていたが、1例はC型肝炎の治療に伴うIFN投与後に無精子症となった。前回の検討で抗HIV剤の投与を受けていない1/12例で無精子症を認めたがIFNの治療を受けておりC型肝炎の治療にも慎重である必要がある。

運動率

原精液における精子運動率は平均37.8%(0-70%)と低下していた。

Percoll遠心後の回収精子

無精子症を除いた患者でのPercoll遠心後の回収精子量は0.3ccで濃度は平均5400万/ml( $200-15000 \times 10^4$ /ml)であった。回収精子の運動率は平均58%(2.5-95%)であった。

Swim up後の回収精子

Swim up後の回収精子量は1mlで濃度は平均360万/ml( $0-810 \times 10^4$ /ml)であった。回収精子の運動率は平均93%(27-100%)であった。

回収率

今回のSwim up法における精子の回収率は10.2%であった。

HIV RNA量

今回検討した精液中のHIV RNA濃度は簡易PCR法で全員100copies/ml以下であった。今後、超高感度PCRでの検討を行う予

定である。

#### In situ hybridization法

8名のswim up回収精子と2名の原精液中の精子を検討した結果、精子表面にHIVは検出されなかった。

#### 体外受精-胚移植の臨床実施

HAARTにより血中HIV RNA量は50 copies/ml以下であるが時々ウィルスを検出していた。CD4細胞数は490/ $\mu$ lであった。HCV RNA量は850 Kcopies/ml以上でtype 1Bであった。

Swim upにより回収した精子浮遊液でのHIV RNA量は2 copies/ml以下であった。排卵誘発剤の投与により22個の卵を採取した。体外受精により3個の受精卵を確認した。4 cell G1 2個と2 cell G1 1個の受精卵を胚移植した。

#### 今後の予定

平成12年度から13年度にかけて他の3組の夫婦が新潟大学を訪れて、臨床実施の参加を検討する予定である。

#### C 考察 -問題点および今後の取組みについて-

##### 精子へのHIV感染について

精子にHIVが感染するかどうかは意見が分かっている。精子からHIV RNA, DNAが検出されたとの報告もあるが、精子でHIVが増殖したとの報告はない。精子表面にCD4やchemokine receptorは発現していないが、精子表面のGalAAG (putative receptor for HIV in sperm)にHIVが付着するとの報告がある。しかし、今回の検討においてHAARTで血中HIV RNAが50 copies/mlとなっている患者において精子表面を含めた精子分画からはHIV RNAは検出されなかった。

##### Percoll法とSwim up法について

精液を希釈し、濃度の異なるpercollの層に希釈精液を重層して遠心分離すると、単核球や浮遊HIVが除去される。その時のPercollの濃度設定と密度勾配の作成が最も重要である。我々はSempriniらの方法を改良して実験したところ、2層から4層のPercollにしてようやく $10^6$  copiesという極めて高濃度のHIVを精液に混ぜても50 copies/ml以下にできることを報告した。国立国際医療センターの五味淵らはSempriniらと同様の方法ではHIVが100 copies/ml以下になったのは9例中5例(55.6%)にすぎなかったと報告している。

##### Percoll分離法の技術的問題

Sempriniらの行っている90%と45%の2層のpercollによる分離では原精液のHIVを1/100程度にしかできない可能性が高い。それでも彼らの方法で2000人近い人工授精で2次感染者がでていないのは精液中のviral loadは血中のviral loadと相関しており治療などにより大半が10000copies/ml以下であると推測されること、および感染性を持ったHIVが1/10000程度であり2次感染が成立するにはある程度以上のウィルス量が必要であるからではないかと考えている。しかし、我々はSempriniらの方法は安全性が十分ではないと考えている。

我々が報告した4層のPercoll法でのHIV除去率はSempriniらの方法の100倍以上は高いと考えられる。しかし、それでも実際に感染者の精液を用いて実験を行うと12例中1例で多段Percoll法だけではHIVを検出限界以下にできなかった。その原因として、精液に含まれる下着の繊維などのゴミやクリスタルなどの除去が十分でなかったと考えている。比重の重い不純物を濾過して取り除いておかないとウィルスや細胞成分を巻き込んで沈殿させてしまう危険性が

生じる。HIV RNAのみでなく、HIV proviral DNAの検討においてもSwim up法を併用して初めて検出限界以下にすることが可能になった。Percollの層を増やせば増やすほど精子回収率が悪くなるので臨床応用には4層が限界である。

今回、我々は4層のPercoll法をさらに改良し、高濃度のendotoxin除去Percollをgradient mixerにより連続密度勾配を作成して遠心分離することによりHIVの除去率をさらに高めて、精子の回収率を10%以上にすることに成功した。さらに精子表面に付着したHIVなどの物質も殆ど除去できることを超高感度PCR法(検出限界は2copies/ml)で確認したので、臨床実施に踏み切ることにした。

#### 精子回収法の技術的問題

通常行われているようにPercoll法で遠心分離後にHIVの濃度が濃い上層から吸引して最下層の精子分画を回収すると管壁を伝わってHIVが混入する可能性が高いので、我々は当初L-tubeを用いて最下層の精子から回収した。今回、我々は共同研究者の兼子らが開発した特殊な試験管を用いてL-tubeなしに上層成分の混入の危険性が全くない方法を導入した。

#### Swim up法における技術的問題

swim upを行う時に普通は洗浄精子浮遊液に培養液を慎重に重層してswim upしてくる精子を回収するのであるが、それでは下層に含まれるHIVを乱流によって混入させてしまう可能性が高い。今回、我々は培養液の下層にcapillary tubeを用いて慎重に精子浮遊液を挿入する技術を導入した。人工授精ではなく、体外受精を選択した理由について

受精卵にCD4が発現するのはリンパ組織が発達してくる受精後10~20週以後であ

る。精子分画に僅かにHIVが混入していた場合、人工授精では妻に2次感染の危険性があるが、体外受精では日毎にHIVの感染性が低下することに加えて2日目に培養液を交換するために危険性は極めて少なくなる。卵にCD4やchemokine receptorが発現していないため体外受精では受精卵に感染の危険性はない。我が国では毎年100万人近い出産があるが、その内体外受精での出産が1万人近い。精液中にはHBV, HCV, herpes virusなどいろいろなウイルスが混入している場合があるが、体外受精で卵がウイルス感染したとの報告は全くない。またWHOの報告では1999年までに380万人の子ども(14歳以下)がAIDSで死亡しているが、精液によって卵のみが感染して母体が感染していない例は報告されていない。体外受精の安全性は免疫学的にも疫学的にも明らかであるが、HIV様粒子が卵細胞の中で発見されたとの報告もあり、より安全を期するためには精度の高いswim up法を用いた精子による体外受精を施行する方がよいと考える。

もしも卵に感染してHIVがintegrateしたとすると分裂の度にHIVが複製されて全身細胞にHIVが組み込まれることになる。このような症例は1例も報告されていない。また、免疫学的に考えると、この場合のHIVは自己と認識されるのでhealthy carrierとなる可能性が高いが、そのような症例も報告されていない。これらの理論の一部を証明したのが今年Scienceに発表されたtransgenic monkeyである。レトロウイルスをベクターとして海クラゲの遺伝子をサルの卵子に注入して全身細胞にレトロウイルスと海クラゲの遺伝子が発現した元気なサルが誕生した。ただし、卵子にレトロウイルスを注入しただけでは遺伝子導入



できず特殊技術が必要である。

HIV感染者の中には精子の数が減少していたり、運動能力が低下している場合がしばしば認められる。妊娠するまでに不十分な人工授精を繰り返すと妻への2次感染の危険性が次第に高くなってしまふ。また卵にHIVが感染する可能性はないと考えており、我々が人工授精ではなく体外受精を選択した根拠である。

#### 顕微受精について

精子にHIVが付着していた場合に顕微受精を行うと、強制的にHIVを卵細胞に注入してしまう危険性がある。卵細胞にHIVビリオンを注入してもintegrateして増殖するかどうかは検討されておらず安全性は不明である。今回、我々は顕微受精の実施には慎重な姿勢をとっており、今後の検討を待ちたいと考えている。

#### 倫理問題

現在、日本産婦人科学会の作成している倫理規定によると、人工授精や体外受精は不妊の夫婦にしか認められていない。Swim up法による人工授精や体外受精の安全性が確立していない現状ではHIV感染者夫婦に対して臨床実施するには倫理的な議論が必要不可欠である。我々はswim upを用いた体外受精の臨床実施を求めて倫理委員会に申請を行い、弁護士や他の医療関係者などを交えた議論を何度も繰り返してきた。

この方法が100%安全と判明するまでは臨床実施にあたっては患者夫婦のインフォームドコンセントを得るのは当然ながら、事前に各施設の倫理委員会の許可を得る必要がある。

しかし一方では、100%安全でなければ人工授精などの医療行為は行うべきではないと主張する者もいる。今回、我々が行う体

外受精の安全性は予防接種の安全性よりもはるかに安全と考えられるが、100%安全かどうかは今後の臨床実施によって検証されていく。

各方法による妊娠での2次感染の危険性の数字は明らかになってきている。危険性がほぼ0に近い体外受精を取るか、数千分の1以下の人工授精をとるか、HAARTで血中ウィルス量が検出限界以下の場合にある程度安全と推測される自然妊娠にかけるか、4.8%近い危険性の自然妊娠にかけるか、あるいは子どもをあきらめるべきかなどの選択を必要としている。この選択は少なくとも医療従事者だけで判断するのではなく、患者夫婦の意見を最大限尊重して社会でも判断すべき課題である。

#### 夫婦の個別の意思確認の必要性

荻窪病院に子どもの相談に訪れた感染者夫婦は多いが、中には子どもを持ちたい気持ちに夫婦で差が大きい場合もあった。妻の気持ちが強すぎる場合や、夫の気持ちが先行している場合など様々である。夫婦個別に面接して個別にカウンセリングを行い、個々の意思確認を慎重に行う必要がある。

#### 子どもの権利と親の義務

今回の臨床試験において倫理的に最も問題になったのは生まれてくる子どもの権利であった。親はインフォームドコンセントを得て自己責任のもとに選択したのであるが、生まれてくる子供には意思確認ができず、もしも2次感染した場合の責任をどうとるのが議論となった。我々医療従事者は最大限の安全な方法を取るよう努めることは当然であるが、親の責任や医療機関の責任についても議論された。我々の臨床試験に参加を希望している夫婦の多くは生まれてくる子どもに対して親として可能な

限り感染を防ぐ努力をしたいと願っており、親として最善の努力をし尽くした手段をとった結果であれば子どもの結果に責任を持てるが、もしも、安易な方法で妻も子どもも感染させてしまったり、あるいは妻のみ感染させて将来エイズ孤児にしてしまうような無責任な事態だけは避けたいと願っている。子どもを持つべきではないと考える人もいるだろうが、科学の進歩によりここまで安全性が高まった状況でわずかの危険性であれば子どもを持てることの幸せの方がはるかに大きいと考える人も多い。

#### D 結論

我々はMTC(Mother to child)の予防だけではなく、Mother and childの予防が最も望ましいと考えて対策を検討してきた。

Swim up法を用いた体外受精を用いればHIV感染した男性でもほぼ100%安全に子

どもを持てると考えており、今回倫理委員会の承認を得た後に臨床実施に踏み切った。Swim up法やPercoll分離法には技術と熟練を要し、安全性の確保に努める必要がある。今回の臨床研究における安全性が十分に証明されるまでは一般の医療機関での臨床実施は控えた方がよい。

現在、体外受精においてウイルス感染症の対策は十分に示されておらず、精液の処理が不十分な場合に妻への肝炎ウイルスの2次感染も報告されており海外では危険性が指摘されている。Swim up法は精液中のHIVだけでなくHCV RNAも除去できることが昨年フランスから報告された。HIV感染症だけではなく、肝炎などのウイルス感染症に対するガイドラインの作成が早急に必要である。

#### 論文発表

1. 田中憲一他, 市民公開シンポジウム: 「HIV感染と妊娠, 世界エイズデーによせて」記録集, 2001, 1月発行
2. Yoichi Aoki, Kenichi Tanaka, et al.: High risk group in node-positive patients with stage IB, IIA, and IIB cervical carcinoma after radical hysterectomy and postoperative pelvic irradiation. Gynecol Oncol 77:305-309, 2000
3. 小林真紀子, 高桑好一, 田中憲一: 小林医院開設以来のクラミジア頸管炎の検討. 日産婦新潟地方会誌 84:12-15, 2000
4. Hanabusa H, Kuji N, Kato S, Tagami H, Kaneko S, Tanaka H, Yoshimura Y. An evaluation of semen processing methods for eliminating HIV-1. AIDS 2000 Jul 28; 14 (11):1611-6
5. 花房秀次. Percoll法およびSwim up法によるHIV感染男性精液からのHIV除去と人工授精・体外受精の安全性について-HIV陽性男性とHIV陰性女性が子どもを望む場合の対応. 日本エイズ学会誌 3: 50-56, 2001
6. 高桑好一, 鈴木美奈, 藤田和之, 花房秀次, 田中憲一: 不妊治療とウイルス感染症. 化学療法の領域, 6:2001掲載予定

#### 学会発表

1. 花房秀次. HIV陽性男性の精液からのHIV除去法の評価と除去率: Swim up法による体外受精の安全性と臨床実施について. 第14回日本エイズ学会 京都 11月28-30, W 12-5, 2000
2. 花房秀次, 田上尚道, 杉田哲佳, 加藤真吾. HIV感染者のトータルケア. 第14回日本エイズ学会 京都 11月28-30, 1033a, 2000
3. 高桑好一, 石井桂介, 松下宏, 鈴木美奈, 東野昌彦, 石井史郎, 倉林工, 田中憲一: HIV感染者の一妊娠例 第125回新潟産科婦人科集談会 新潟 2月20日, 2000
4. 高桑好一, 田中憲一, 厚生科学研究「妊産婦のSTD及びHIV陽性率と妊婦STD及びHIVの出生児に与える影響に関する研究」研究グループ: 本邦の大都市部における妊婦性感染症の蔓延に関する多施設共同研究 第2回新潟性感染症研究会 新潟 9月22日, 2000

# 実験報告書

## 「迅速 nested RT-PCR」

齊藤有紀、加藤真吾  
慶応義塾大学医学部微生物学教室

### 【目的】

HIV-1 virus RNA を迅速かつ確実に検出する方法を開発する。具体的には、所要時間を 3 時間以内とし、1 コピーの HIV-1 RNA を検出できるようにする。

### 【方法】

従来の方法を図 1 に、新しい方法を図 2 に示す。

変更した点は以下の通りである。

1. DNA polymerase を AmpliTaq (PE Applied Biosystems) から、DNA 合成速度が 5 倍といわれている Z-Taq (Takara) に変更した。それにともなって PCR buffer を AmpliTaq 用から Z-Taq 用に変更した。また、反応液量を半分にした。
2. 42°C の RT 反応を 30 分から 10 分に短縮した。
3. PCR 装置で 4°C にまで冷却していたところを氷で冷却することにした。
4. 1st. PCR を 30 サイクルから 20 サイクルに、2nd PCR を 25 サイクルから 20 サイクルにした。 25
5. 各サイクルにおいて、94°C の denaturation を 15 秒から 2 秒に、48°C、60°C あるいは 64°C の annealing を 30 秒から 2 秒に、72°C の elongation を 1 分から 10 秒に短縮した。
6. Sevag 抽出による流動パラフィンの除去を省略した。
7. 電気泳動を 120V、60 分から 150V、20 分に変更した。

### 【結果】

従来の方法では 7 時間かかっていたが、新しい方法は 2 時間 50 分で終了した。

従来の方法と新しい方法による結果をそれぞれ図 3 と図 4 に示す。図 3 の結果で、10 反応のうち 3 反応が陽性であったことから、ポアソン分布の式を用いて、 $10^3$  wild-type HIV-1 DNA の濃度が 17.8 copies/ $\mu$ l と計算された。この値をもとに、1 反応あたり 1 コピーとなるように新しい方法を用いたところ、6 反応あたり 5 反応が陽性であった。この結果は新しい方法の HIV-1 RNA 検出感度が 1 コピーであることを示している。

### 【考察】

従来の方法における検出感度を低下させることなく nested RT-PCR の操作時間を大幅に短縮させることができた。RNA の精製はおそらく 1 時間以内でできるので、前述の方法を用いることにより、検体中の HIV-1 RNA の存在の有無を 4 時間以内で診断できると考えられる。