

平成13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：H12-エイズ-002)

主任研究者

新潟大学大学院医歯学総合研究科(産婦人科)

田中憲

平成13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」

- 研究1. 多施設共同による若年妊婦（30才未満）のHIV，クラミジア，淋菌およびパ
 ピローマウイルス（子宮頸部）の感染状況に関する研究
 研究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
 研究3. HIV母子感染予防の臨床的研究 - (1) 産婦人科診療所を対象としたHIV感
 染妊娠婦人の診療経験に関するアンケート調査

主任研究者	田中憲一	新潟大学大学院医歯学総合研究科（産婦人科）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
	高桑好一	新潟大学大学院医歯学総合研究科（産婦人科）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
研究協力者	宇津正二	聖隷三方原病院産科部長
	大谷嘉明	おおたにレディースクリニック院長
	加藤真吾	慶応義塾大学医学部微生物学教室
	兼子智	東京歯科大学市川病院産婦人科講師
	木下吉登	大垣市民病院産婦人科医長
	木村英三	東京慈恵会医科大学第三病院産婦人科助教授
	久保田繁	久保田産婦人科病院院長
	島典子	新潟県派遣カウンセラー
	杉本充弘	日本赤十字社医療センター産婦人科部長
	鈴木暁	国立大阪病院婦人科部長
	鈴木美奈	新潟大学医学部附属病院産婦人科
	長阪恒樹	武蔵野赤十字病院産婦人科部長
	藤田和之	新潟大学医学部附属病院産婦人科
	三輪忠人	トヨタ記念病院副院長（産婦人科）
	松沢克治	安城更生病院産婦人科部長
	松本雅彦	大阪市立総合医療センター産科部長
	八幡剛喜	伊勢原協同病院産婦人科副部長
	山崎俊彦	済生会川口総合病院産婦人科部長
	吉村泰典	慶応義塾大学医学部産科婦人科学教室教授

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、とくに若年妊娠婦人における蔓延の程度を明らかにするため、多施設共同により、30才未満の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のひとつであり、妊娠婦人における蔓延状況について、昨年度本研究において検討したが、本年度はとくに、30才未満の若年妊娠婦人におけるHPVの蔓延の程度を明らかにすることを目的として、検討した。HIV抗体については3629例について施行した。また、クラミジア、淋菌については1828例に対し、HPVについては1185例に対し施行した。HIV抗体については陽性例は認められなかったものの、参加施設の中で、エイズ拠点病院であり研究期間中に他院からの紹介などで、2例のHIV合併妊婦を管理した施設があった。全施設におけるクラミジア抗原陽性症例は1828例中79例(4.3%)であり、淋菌の陽性症例は1828例中10例(0.5%)であった。HPVについては1185例中249例(21.0%)で陽性であった。

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。昨年度の本研究で、2コピー/mlのHIVウイルスを検出するPCR法を開発したが、今年度は1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、臨床応用(体外受精-胚移植)を行った。この結果、3症例で妊娠が成立し、2症例はすでに分娩にいたり、1症例は順調な経過を認めている。母子ともにHIVウイルスの感染は認められていない。本臨床応用に当たり、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十分に行い、インフォームドコンセントを得た。

従来より、産婦人科および小児科を有する病院施設に対し、HIV合併妊娠婦人、HIV合併乳幼児に関するアンケート調査を実施してきたが、とくに産婦人科に関しては、診療所施設におけるHIV合併妊娠婦人診療の実態は不明であった。そこで、本年度はこのことに関するアンケート調査を初めて実施した。5938施設にアンケートを送付し、2676施設から回答を得た。分娩を取り扱っている診療所においてHIV検査を100%実施している施設は52.9%であり、病院施設と同様の実施率であった。地方別では、東日本でHIV抗体検査の実施率が高く、西日本で低い傾向が認められた。回答の得られた施設のうちHIV感染妊婦の診療経験を有する施設は1.9%であり、経年的に増加傾向にあることが認められた。

1. 多施設共同による若年妊婦（30才未満）のHIV、クラミジア、淋菌およびパピローマウイルス（子宮頸部）の感染状況に関する研究

担当者：

主任研究者	田中憲一	新潟大学大学院医歯学総合研究科（産婦人科）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
	高桑好一	新潟大学大学院医歯学総合研究科（産婦人科）助教授
	鳥居裕一	聖隷浜松病院副院長（産婦人科）
研究協力者	宇津正二	聖隷三方原病院産科部長
	大谷嘉明	おおたにレディースクリニック院長
	木下吉登	大垣市民病院産婦人科医長
	木村英三	東京慈恵会医科大学第三病院産婦人科助教授
	久保田繁	久保田産婦人科病院院長
	杉本充弘	日本赤十字社医療センター産婦人科部長
	鈴木暁	国立大阪病院婦人科部長
	長阪恒樹	武蔵野赤十字病院産婦人科部長
	三輪忠人	トヨタ記念病院副院長（産婦人科）
	松沢克治	安城更生病院産婦人科部長
	松本雅彦	大阪市立総合医療センター産科部長
	八幡剛喜	伊勢原協同病院産婦人科副部長
	山崎俊彦	済生会川口総合病院産婦人科部長

A. 研究目的

本邦におけるHIVの感染者およびAIDSの患者数は増加傾向にあることが指摘されている。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。昨年度の検討により、これらHPVも含めたSTD感染が若年妊娠婦人において高率であることが推察されたが、対象症例数が十分ではなかった。このような観点から、妊娠婦人とくに30才未満の若年妊娠婦人における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7施設，中京地区7施設，関西地区2施設の計16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（順不同）。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，久保田産婦人科病院，武蔵野赤十字病院，東京慈恵会医科大学第三病院，聖隷浜松病院，名古屋第二赤十字病院，おおたにレディースクリニック，聖隷三方原病院，トヨタ記念病院，大垣市民病院，安城更生病院，大阪市立総合医療センター，国立大阪病院，の16施設である。

これらの施設において，平成13年10月から平成14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。対象妊娠婦人は30才未満の妊娠婦人とした。

- (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抗体検査

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

C. 研究成果

1. HIV抗体陽性率

HIV抗体については妊娠中スクリーニング検査として3629例について施行されたが，陽性例は認められなかった。ただし，参加施設の中で，エイズ拠点病院であり研究期

間中に他院からの紹介などで，2例のHIV合併妊婦を管理した施設があった。

2. 地区別クラミジア抗原陽性率

図1に地区別の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1828例中79例（4.3％）であった。地区別では，関東地区が793例中37例（4.7％），中京地区が770例中32例（4.2％），関西地区が265例中10例（3.8％）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。

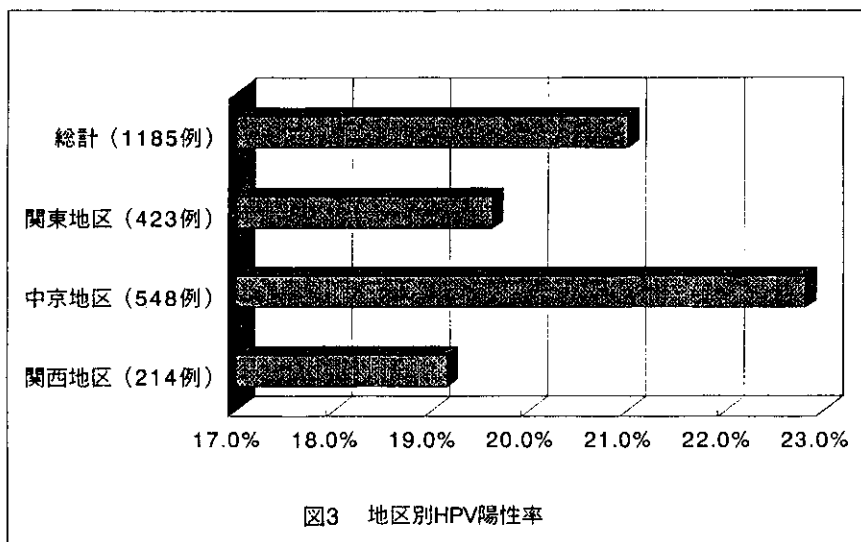
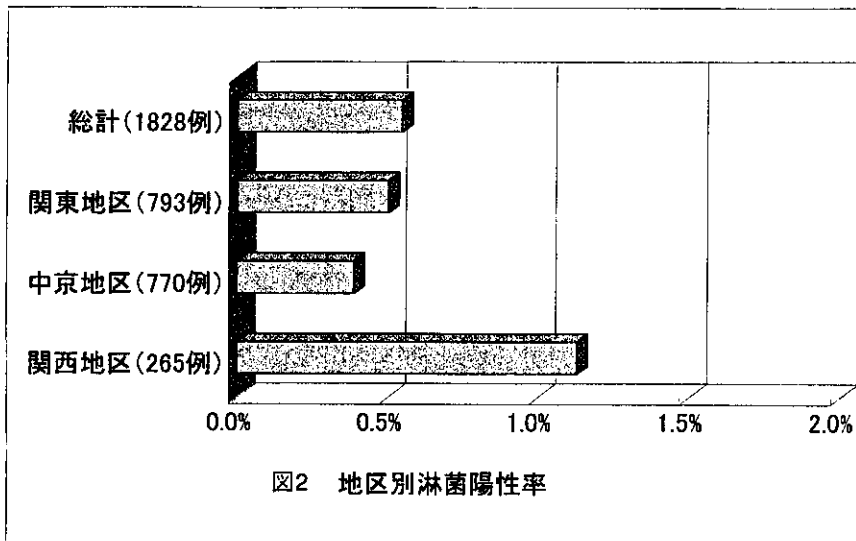
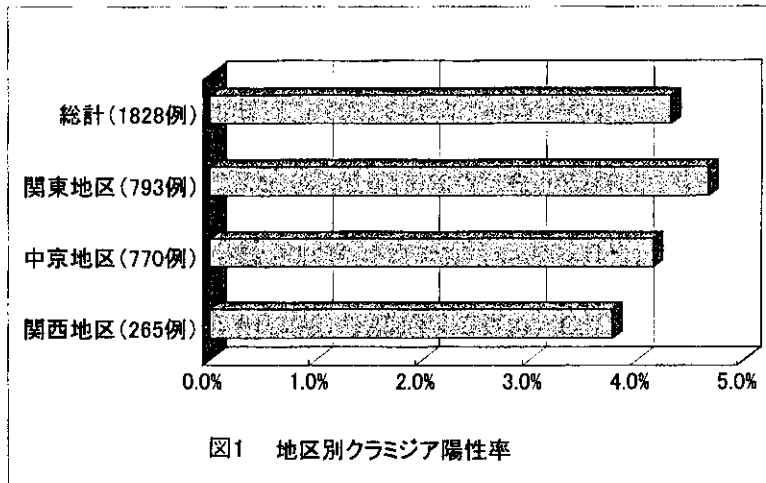
3. 地区別淋菌陽性率

図2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1828例中10例（0.5％）であった。地区別では関東地区では793例中4例（0.5％），中京地区では770例中3例（0.4％），関西地区では265例中3例（1.1％）であり，地区別に有意の差は認められなかった。

4. 地区別HPV陽性率

図3に各地区別のHPV陽性率を示した。HPVについては1185例を対象に検討を行い，全体で249例（21.0％）の症例で陽性であった。また，地区別では，関東地区423例中83例（19.6％），中京地区548例中125例（22.8％），関西地区214例中41例（19.2％）でそれぞれ陽性であった。地区別に有意差は認められなかった。



5. 年齢別クラミジア抗原陽性率

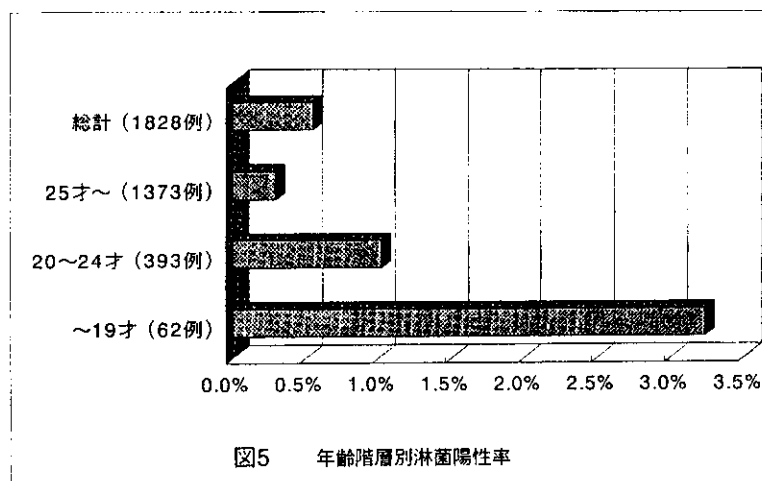
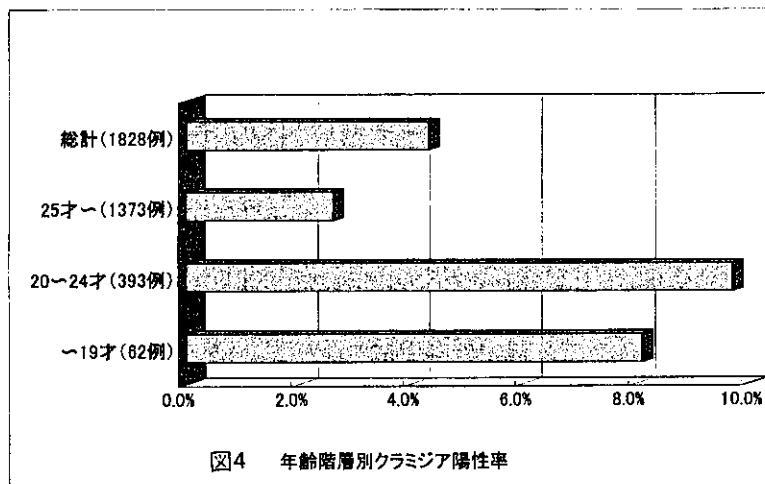
図4に年齢を5才区切りに分けた年齢階層別のクラミジア抗原陽性率を示した。

年齢別のクラミジア抗原陽性率では若年者に陽性率が高い傾向が認められた。すなわち、～19才では62例中5例（8.1％）で陽性であり、20才から24才では393例中38例（9.7％）で陽性であった。一方25～29才では1373例中36例（2.6％）であり、～19才および20～24才の年齢階層では、25才～の年齢階層に比較し、有意に高率であった。

た。（～19才vs25才～： $p<0.05$ ，20～24才vs25才～： $p<0.00000005$ ）

6. 年齢別淋菌陽性率

図5に年齢を5才区切りに分けた年齢階層別の淋菌陽性率を示した。～19才の年齢階層では62例中2例（3.2％），20～24才では393例中4例（1.0％），25才～では1373例中4例（0.3％）に陽性であった。～19才の年齢階層において25才～の年齢階層に比較し、有意に高率であった（ $p<0.05$ ）。



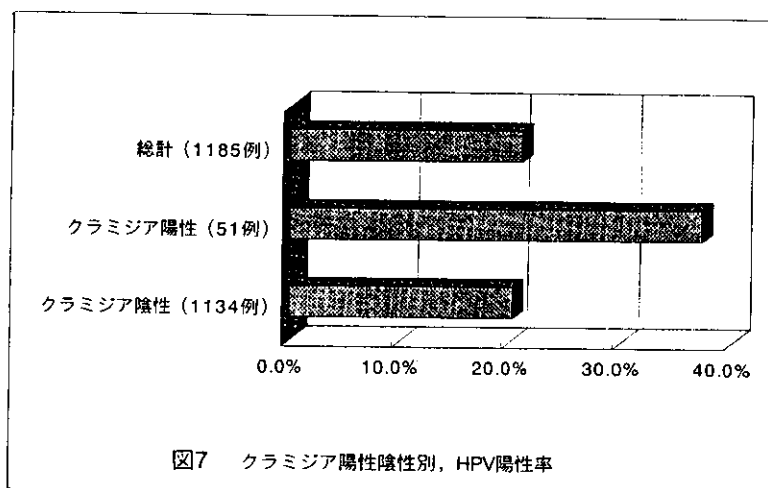
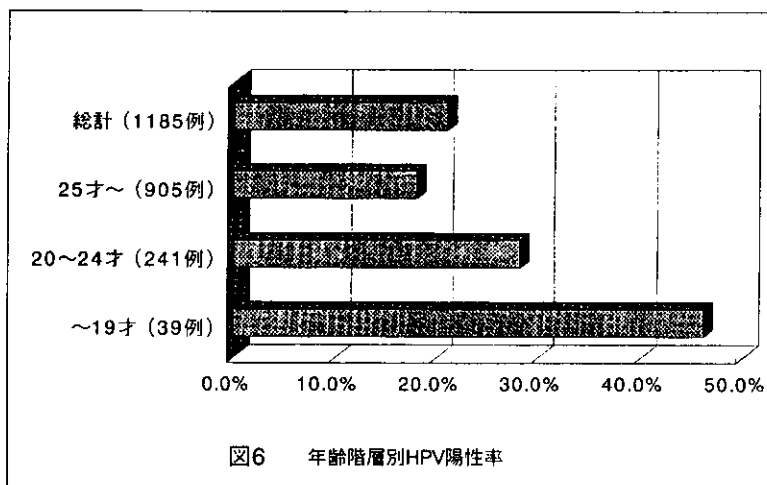
7. 年齢別HPV陽性率

図6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。～19才の年齢階層では39例中18例（46.2%）、20～24才では241例中68例（28.2%）、25才～の年齢階層では905例中163例（18.0%）に陽性であった。～19才の年齢階層における陽性率は20～24才の年齢階層に比較し有意に高率であり（ $p<0.05$ ）、25才～の年齢階層に比較してさらに有意に高率であった（ $p<0.00005$ ）。また、20～24才に年齢階層では、25才～の年齢階層に比較し、有意に

高率であった（ $p<0.0005$ ）。

8. クラミジア抗原陽性症例、陰性症例におけるHPV陽性率

図7にクラミジア抗原陽性症例、陰性症例におけるHPVの陽性率を示した。クラミジア陰性症例1134例中230例（20.3%）でHPVが陽性であり、クラミジア陽性51症例では19例（37.3%）でHPVが陽性であった。この結果、クラミジア陽性症例において、陰性症例に比較し、HPV陽性率が有意に高率であった（ $p<0.005$ ）。



9. HPV型別頻度

HPVのウイルス型の頻度を表1に示した。今回検出された型はHPV6型、16型、18型、31型、33型、39型、51型、52型、53型、54型、56型、58型、59型、61型、66型、68型、70型、82型であった。頻度

としては、52型がのべ262例中23例（8.78%）であり、最も高かった。また、58型が5.73%に、56型が5.34%に陽性であった。また、79例（30.15%）は未知の型であった。

表1 HPV遺伝子型の頻度

HPV遺伝子型	例数	全体に占める割合
6	1	0.38%
16	7	2.67%
18	7	2.67%
31	4	1.53%
33	5	1.91%
39	7	2.67%
51	11	4.20%
52	23	8.78%
53	7	2.67%
54	4	1.53%
56	14	5.34%
58	15	5.73%
59	2	0.76%
61	7	2.67%
66	3	1.15%
68	6	2.29%
70	5	1.91%
82	3	1.15%
未確定	52	19.85%
未知	79	30.15%
総計	262	100.00%

D. 考察

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おり、当然のことながら妊娠婦人における感染率も高いものである。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。今回の検討では研究参加施設において妊婦健診を施行している、30才未満の若年妊娠婦人3629例に対しスクリーニング検査としてHIV抗体の検査が施行された。この結果HIV陽性例は1例も認められなかった。ただし、研究参加施設の中でエイズ拠点病院であり、他院からの紹介などで2例のHIV合併妊婦を管理した施設があった。

昨年度の本研究における検討では、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ず、本年度も同様の結果であった訳であるが、今回の研究で明らかになったHIV以外のSTDの蔓延状況とくに若年妊娠婦人におけるそれを考慮するとき、今後のHIVの蔓延に十分な注意が必要なものと判断され、嚴重なサーヴェ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。昨年度の本研究では、全年代の妊婦におけるクラミジアの陽性率を検討し、3062例中58例（1.9%）の陽性症例が認められた。今年度は、対象を30才未満の若年妊娠婦人に限定し検討した結果、クラミジ

ア抗原陽性症例は1749例中79例（4.3%）であった。特に、～19才の年齢階層では、62例中5例（8.1%）に、20～24才の年齢階層では、393例中38例（9.7%）といずれも1割近い妊娠婦人において陽性であった。今回の検討は、有症状の症例を対象としているものではなく、一般妊娠婦人を対象とした研究である。このことを考慮する時、若年層におけるSTDの蔓延は深刻な状況であり、上述のように、HIV感染の伝播についても十分な注意を払う必要がある。

淋菌については、検索を行った1828例中10例（0.5%）において陽性であった。昨年度の全年代の妊婦を対象とした検討では3062例中15例（0.5%）の陽性率であったが、今年度は30才未満の妊娠婦人を対象として検討を行った訳であるが、蔓延の程度は、クラミジア程ではないものと判断された。ただし、～19才の年齢階層における陽性率は3.2%（62例中2例）であり、25才～の年齢階層における陽性率（1373例中4例、0.3%）に比較し、有意に高率であった。このことから、淋菌に関しても若年層における蔓延には注意が必要であるものと判断された。

子宮頸癌の発症ウイルスであることが明らかとなっているヒトパピローマウイルス（HPV）感染も重要な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。

昨年度の全年代の妊婦を対象としたHPVの検索では、1183例中148例（12.5%）に陽性であり、一般妊娠婦人の1割強にHPVの感染が生じていることが示された。今年度は、他のSTDと同様、30才未満の妊娠婦

人を対象に昨年度と同程度の1185例についてHPVの検査を施行した。この結果、249例（21.0%）においてHPVが陽性であった。とくに年齢階層別の検討では、～19才の年齢階層において、39例中18例（46.2%）において陽性であり、10才台の妊娠婦人の半数近くでHPVが陽性であることが明らかとなった。また、20～24才の年齢階層においても241例中68例（28.2%）において陽性であり、25才～の年齢階層に比較し、有意に高率であり、年齢が低下する程HPVの感染が蔓延していることが示された。

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。これらの結果は昨年度と同様であった。

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。今回、30才未満の若年妊娠婦人のみを対象に検討することにより、25才未満の妊娠婦人についても多数例の解析を行うことができた。この結果、HPVも含めたSTDが若年婦人において蔓延していることが、明確になり、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た。

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

担当者

主任研究者	田中憲一	新潟大学大学院医歯学総合研究科（産婦人科）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
	高桑好一	新潟大学大学院医歯学総合研究科（産婦人科）助教授
	花房秀次	荻窪病院血液科部長
研究協力者	加藤真吾	慶応義塾大学医学部微生物学教室
	兼子智	東京歯科大学市川病院講師
	島典子	新潟県派遣カウンセラー
	鈴木美奈	新潟大学医学部附属病院産婦人科
	藤田和之	新潟大学医学部附属病院産婦人科
	吉村泰典	慶応義塾大学医学部産科婦人科学教室教授

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の改善を求める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、従来は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二次感染の危険性はHIV感染者の状態（ウィルス量や精子数・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次感染する危険性が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

1. 超高感度PCR法の開発

昨年度の本研究により、研究協力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。従来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。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、さらに昨年度の研究により、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。本年度はさらに改良を加え、1 copy/mlを検出するPCR法の改良に成功した（表1）。今年度は、この改良PCR法を用いて、HIV陽性男性から得られた精子浮遊液中のHIVウイルスが検出されないことを確認し、HIV陽性男性、非感染女性夫婦に対し、体外受精-胚移植を実施した。

表1

HIV-1 ビリオン RNA の高感度迅速検出法

- 低濃度ウイルス液 1 ml を15,000 rpm、4°C で60分間遠心。
- 沈殿から RNeasy Mini Kit を用いて RNA を抽出。
- 抽出した RNA を用いて RT-nested PCR を行う。

(SuperScript II、Z-Taq、GeneAmp 9700使用)

RT: 42°C, 10 min

95°C, 2 min

First round PCR:

94°C, 2 min

5 cycles (94°C, 2 s; 48°C, 2 s; 72°C, 10 s)

18 cycles (94°C, 2 s; 60°C, 2 s; 72°C, 10 s)

72°C, 1 min

Second round PCR:

94°C, 2 min

5 cycles (94°C, 2 s; 48°C, 2 s; 72°C, 10 s)

15 cycles (94°C, 2 s; 64°C, 2 s; 72°C, 10 s)

72°C, 1 min

- PCR 産物を9 V/cm で30分間アガロースゲル電気泳動。

2. HIV陽性男性，非感染女性夫婦に対する体外受精-胚移植の臨床応用

(1) 昨年度までの取り組み

昨年度は，本臨床応用に参加を希望された患者の精子の性状について報告した。17名（平均年齢は33.3歳(28-45歳)）で精液検査を施行し，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例であった。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遠心後の回収精子については，回収精子量は0.3mlで濃度は平均5400万/ml (200-15000x10⁴/ml)，回収精子の運動率は平均58% (2.5-95%)であった。また，Swim up後の回収精子量は1mlで濃度は平均360万/ml(0-810x10⁴/ml)であった。回収精子の運動率は平均93% (27-100%)であり，Swim up法における精子の回収率は10.2%であった。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。これらが，昨年度報告した概要であるが，今年度は，これらのデータをもとに，HIV感染男性，非感染女性に対し，体外受精-胚移植の臨床応用を行った。

(2) 「HIV陽性男性，非感染女性夫婦に対する体外受精-胚移植の臨床応用」にあたって，参加希望者が臨床応用に参加するまでの経緯

表2および表3に本臨床応用に，参加を希望する患者夫婦が，実際に臨床応用を受けるまでの経緯を示した。

参加希望者は最初に，荻窪病院血液科を

受診する。医師により男性の診察が行われ，病状の安定していることなどを判断し，夫婦の意思を確認する。次に夫婦個別に，カウンセラー及びコーディネーターの面談を受け，それぞれの参加の意思を確認する。夫婦ともに自発的な意思であることが確認され，出産後の育児に対する社会的背景などに問題がないか医療スタッフで検討する。また，HIV陽性男性の精液検査を荻窪病院で実施，精子数，運動率，HIV RNA, proviral DNAなどを検査する。これと並行して，continuous percoll gradientによるHIVの除去を確認する。HIVが検出感度以下になることが確認されることを適正参加基準として，新潟大学医学部附属病院産婦人科を受診する。

新潟大学医学部附属病院産婦人科を受診した患者夫婦に対し，担当医師が，詳細な説明書をもとに，説明する。その内容は，臨床応用の実際，本治療に伴うリスク，万が一二次感染が発生した場合の患者夫婦の負担，治療開始後中止することになっても問題ないことなど，である。そこで妻の検査（感染症検査，ホルモン検査，基礎体温の確認，他）を実施する。この後，新潟在住のカウンセラーにより，夫婦個別の意思確認を行う（これは，原則的には，患者夫婦の居住地で行う。）。これにより，患者夫婦の意思が強い場合には，再度新潟大学医学部附属病院を受診してもらい，夫婦個別に，説明書を用い，治療についての説明を行う。最終的な意思の確認を行ったのち，夫婦別々に同意書に，夫婦および担当医師が署名，捺印を行う。同意書は同じものを2部作成し，1部は患者夫婦が，1部は新潟大学医学部附属病院産婦人科が保管する。以上が，臨床応用に実際に参加するま

での経緯である。

表2

「HIV感染男性、非感染女性夫婦に対する妊娠補助技術の臨床応用」
について体外受精-胚移植実施までの対応

1. 参加申込み及び検討

荻窪病院血液科を受診し、医師によるHIV陽性男性の診察を行い適正を判断し、夫婦の意志の確認する。



夫婦個別にカウンセラー及びコーディネータースの面談を受け、それぞれの参加意志の確認。



夫婦共に自発的な意思であることが確認され、出産後の子育てに対する社会的背景などに問題がないか医療スタッフで検討。



HIV陽性男性の精液検査を荻窪病院で施行。



精子数・運動率・HIV RNA, proviral DNAなどを検査。



Continuous Percoll gradientによるHIVの除去を確認する: PCR, In situ hybridization法



HIVが検出感度以下になることが確認された場合を適正参加基準とし、新潟大学を受診。

表3

2. 臨床実施までの新潟大学医学部附属病院産婦人科での対応

詳細な説明書をわたし、臨床応用の実際、
本治療に伴うリスク、
万が一二次感染が発生した場合の患者夫婦の負担、
治療開始後中止することになっても問題ないこと、などにつき説明。



妻の検査を実施。
感染症検査 (HIV抗体(EIA), HCV抗体, HBs抗原・抗体,
クラミジアトラコマティス抗体, TPHAなど),
ホルモン検査,
基礎体温の確認など。



新潟在住のカウンセラーにより、夫婦個別の意思の確認を行う。



患者夫婦の治療に対する意思が強い場合に、夫婦個別に説明書を用い治療についての説明を行う。
最終的な意思の確認を行い、夫婦別々の同意書に、夫婦および担当医師が署名・捺印する。
同意書は同じものを2部作成し、1部は患者夫婦が、1部は新潟大学医学部附属病院産婦人科で保管する。

(3) 「HIV陽性男性，非感染女性夫婦に対する体外受精-胚移植の臨床応用」における実施スケジュール

臨床応用に参加することになった，患者の妻に対しては，通常の体外受精-胚移植で行われる排卵誘発が実施される。内因性の卵胞刺激ホルモン（FSH），黄体刺激ホルモン（LH）などを抑制する薬剤（GnRHアゴニスト）を使用しつつ，排卵誘発剤を投与する。排卵誘発剤の投与量は，卵胞の大きさをモニターしながら決めていく。卵胞が至適な大きさになった段階で，採卵（卵巣から卵子を採取すること）を行なう。採卵は静脈麻酔による全身麻酔下に実施される。

採卵当日から胚移植を実施するまでのスケジュールの概要をフローチャートとして図1に示した。

採卵当日に，夫から精液を採取し，Percoll法，Swim up法を用いた方法により，HIV除去精子浮遊液を調整する。この精子浮遊液中にHIVウイルスが検出されないことを超高感度PCR法により確認し，媒精（卵子と精子浮遊液をともに培養すること）を実施する。HIVウイルスの確認に時間を要する場合には，先に媒精を実施し，仮に精子浮遊液中にHIVウイルスが検出された場合には中止とする，という選択肢も

ある。

媒精を開始した後2日後に胚移植（受精卵を女性の子宮内に戻すこと）を行うこととなるが，これに先立ち，受精卵を培養している培養液について，再度，超高感度PCR法によりHIVウイルスの検出を試みる。ここで，HIVウイルスが認められた場合には，胚移植を行わず，治療を中止とする。HIVウイルスが認められない場合に胚移植を行う。

胚移植後は，患者の全身状態に注意するとともに，妊娠の確認を行う。妊娠が成立した場合でも，成立しない場合でも，移植された妻について，3か月にわたり，血液中のHIV RNA検査およびHIV抗体検査を実施し，二次感染の有無を判断する。また，妊娠が成立した場合，妊娠12～14週に，胎児の感染を確認する目的で，羊水穿刺の実施が可能であることについて説明し，施行するか否かの意思の確認を行う。施行について希望があれば，これを実施し，希望がない場合には実施せず経過を観察することとする。

妊娠中の管理については，通常の妊婦健康審査が実施される。

以上が本臨床応用の実施にあたってのプロトコルであり，これに基づいて実施された。

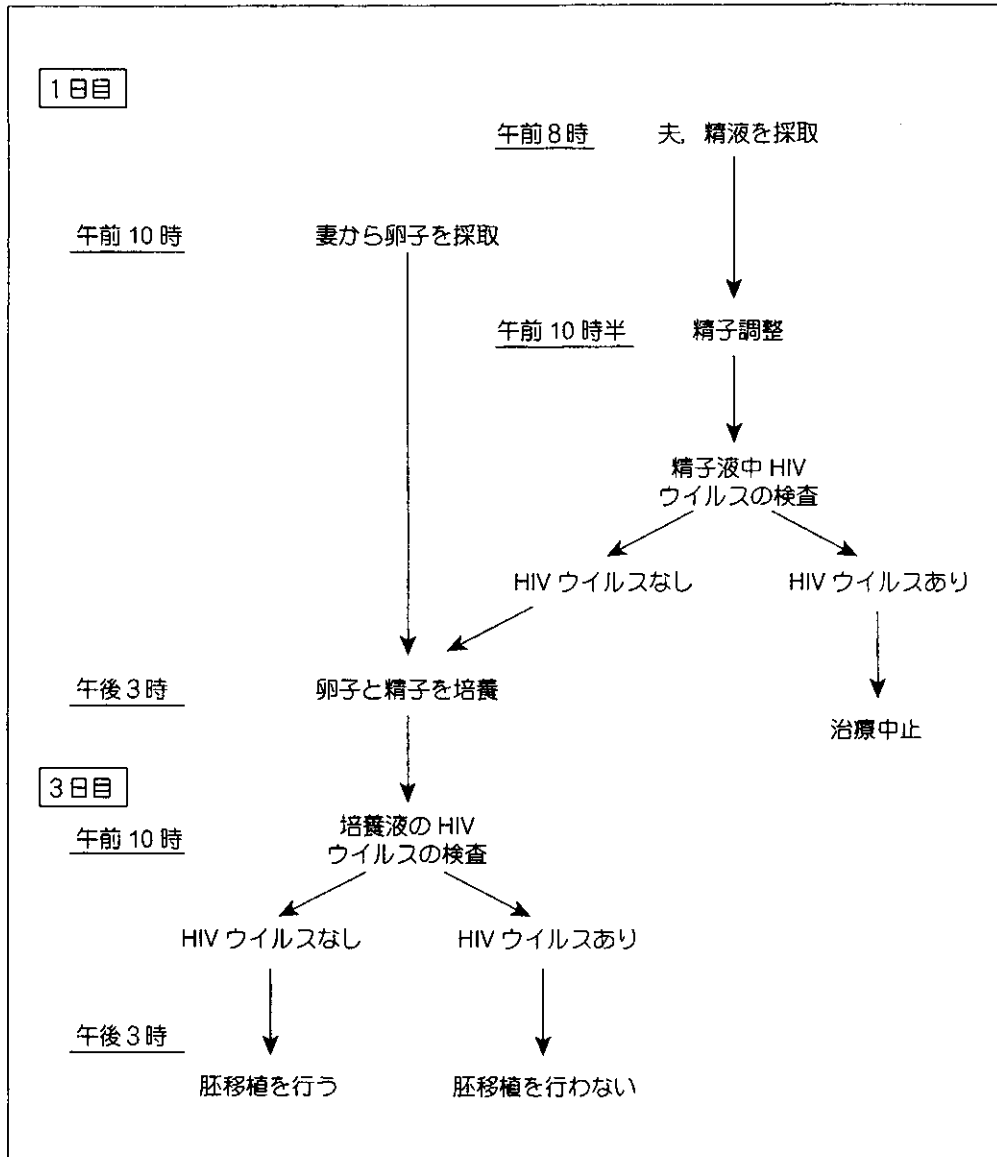


図 1 採精，採卵およびその後のスケジュール

夫から得られた精液を調整した後の精子浮遊液，移植胚を培養している培養液それぞれにおいて，HIV ウイルスが検出感度以下であることが重要であると判断している。

(4) 「HIV陽性男性，非感染女性夫婦に対する体外受精-胚移植の臨床応用」の結果

平成13年度に，前述のプロトコールに基づいて，新潟大学医学部附属病院産婦人科を受診し，夫婦の意思確認を行った夫婦は5例である。また，平成12年度（平成13年2月）に本臨床応用の結果妊娠が成立した症例が，平成13年度に出産に至った。

症例1 妻20才台，夫20才台，平成12年12月に新潟大学医学部附属病院産婦人科を受診し，説明を開始した。患者夫婦とも臨床応用に参加する意思があり，平成13年2月に体外受精-胚移植を実施し，妊娠が成立した。平成13年10月正常分娩となった。妊娠経過中母体のHIV検査で陰性を確認，出産時母体血，臍帯血によりHIV陰性であることを確認している。羊水検査は夫婦の希望に沿い，実施しなかった。

症例2 妻20才台，夫20才台，平成13年3月新潟大学医学部附属病院産婦人科を受診し，説明を開始した。患者夫婦とも臨床応用に参加する意思があったものの，その後の検索で精子数の減少が認められ，臨床応用は断念した。

症例3 妻20才台，夫20才台，平成13年4月新潟大学医学部附属病院産婦人科を受診し，説明を開始した。患者夫婦とも臨床応用に参加する意思があり，排卵誘発を開始，採卵まで行ったが，受精が認められず，胚移植を行うに至らなかった。

C 考察 -問題点および今後の取組みについて-

我々は昨年度報告したように，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

症例4 妻40才台，夫30才台，平成13年3月新潟大学医学部附属病院産婦人科を受診し，説明を開始した。患者夫婦とも臨床応用に参加する意思があり，臨床応用を開始した。平成13年6月体外受精-胚移植を実施，妊娠が成立した。平成14年3月正常分娩となった。妊娠経過中母体のHIV検査で陰性を確認，出産時母体血，臍帯血によりHIV陰性であることを確認している。羊水検査は夫婦の希望に沿い，実施しなかった。

症例5 妻20才台，夫20才台，平成13年6月新潟大学医学部附属病院産婦人科を受診し，説明を開始した。患者夫婦とも臨床応用に参加する意思があり，臨床応用を開始した。排卵誘発剤による卵巣刺激によっても卵胞の発育が認められず，採卵を断念した。

症例6 平成13年11月新潟大学医学部附属病院産婦人科を受診し，説明を開始した。患者夫婦とも臨床応用に参加する意思があり，臨床応用を開始した。平成14年2月体外受精-胚移植を実施し，妊娠が成立した。平成14年3月現在妊娠は順調に経過しており，母体のHIV RNA， HIV検査は陰性である。

以上のように体外受精-胚移植を実施しえた症例は3症例であり，3症例すべて（100%）で妊娠が成立した。また，母体および新生児の二次感染は認められなかった。

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1copy/ml)で確認し、

臨床実施を行っている。

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ってHIVが混入する可能性が高いので、研究協力者の兼子らが開発した特殊な試験管を用いて、上層成分の混入の危険性が全くない方法を導入し、応用している。また、Swim up法実施に当たっては、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、応用している。

人工授精ではなく、体外受精を選択した理由については、昨年度も報告したが、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、人工授精では妻に二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などいろいろなウィルスが混入している場合があるが、体外受精で卵がウィ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。

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二次感染の危険性が次第に高くなってしまう。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。

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。このような経緯を踏まえ、昨年度から「HIV陽性男性、非感染女性夫婦に対する体外受精-胚移植の臨床応用」を実施し、今年度はさらに症例を重ね、一定の成果を得ることができた。

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二次感染の危険性