

20030558

厚生労働科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

若年婦人におけるHIV感染状況およびHIV感染症と
生殖医療との関連性に関する研究

平成15年度 研究報告書

主任研究者 田中憲一

平成16年(2004年)3月

目 次

研究 1.	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	3
研究 2.	HIV 陽性婦人における STD および 若年婦人における HIV 感染実態に 関する研究	20
	研究成果の刊行に関する一覧表	34
	研究成果の刊行物・別刷	35

平成 15 年度厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

「若年婦人における HIV 感染状況および HIV 感染症と生殖医療との関連性に関する研究」

研究 1. 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 2. HIV 陽性婦人における STD および若年婦人における HIV 感染実態に関する研究

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 高桑好一	杏林大学医学部産科婦人科学講座教授 新潟大学大学院医歯学総合研究科（産婦人科） 助教授
研究協力者	花房秀次 加嶋克則 加藤真吾 兼子智 島典子 鈴木美奈 田村正毅 藤田和之 吉村泰典 伴千秋 宇田川秀雄 井上孝実 谷口晴記	荻窪病院血液科部長 新潟大学医歯学総合病院産婦人科 慶応義塾大学医学部微生物学教室 東京歯科大学市川病院産婦人科 日本性科学会認定カウンセラー 新潟大学医歯学総合病院産婦人科 新潟大学医歯学総合病院産婦人科 新潟大学医歯学総合病院産婦人科 慶応義塾大学医学部産科婦人科学教室教授 国立大阪病院産婦人科 旭中央病院産婦人科 国立名古屋病院産婦人科 三重県立医療センター産婦人科

研究要旨

第 1 の研究は、HIV 感染男性非感染女性夫婦に対する体外受精-胚移植に関する基礎的、臨床的研究である。従来より HIV 感染男性、非感染女性夫婦の妊娠については、妻の二次感染の危険性があることから妊娠しないよう指導されることが通例であった。これに対し、夫精液から HIV ウイルスを除去する方法を用い精子浮遊液を作成し、これを体外受精・胚移植に使用することにより、妻の二次感染をほぼ 0 とし、妊娠しうるような臨床応用を進めているが、その有

用性および安全性を明らかにすることを目的としている。また、体外受精-胚移植に比較して簡便である人工授精を実施するためには、精子回収率の高率化が必要であり、その際に多量の精子存在下でも PCR により、わずかな HIV ウィルスを検出することが可能か否かは重要な問題である。そこで、基礎的研究として、この点を明らかにすることを目的としている。

第2の研究は、HIV 感染と STD との関連性に関する研究であり、若年婦人における STD および HIV 抗体の陽性率を把握すること、HIV 陽性婦人における STD 感染の実態を明らかにすることを目的としている。

HIV 感染男性、非感染女性夫婦に対する体外受精-胚移植の実施については、平成 13 年（2001 年）から現在まで 32 症例に対して、十分な説明を行った後同意を得て、排卵誘発周期に入った。（1 例は予定）。年次別の症例数は平成 13 年 5 例、平成 14 年 17 例、平成 15 年 20 例である。このうち 30 症例に対し 34 回の胚移植を実施した。7 例では卵胞発育不全あるいは受精が認められないため胚移植を実施せず、1 例は培養液の HIV 検査により偽陽性所見が得られたため、胚移植を実施しなかった。対症例数では 30 症例中 17 例で妊娠が継続しており、56.7%であった。施設別妊娠継続率については、胚移植を実施した症例に関して新潟大学では 100%（10 症例対 10 症例）、慶応大学では 36.4%（11 症例対 4 症例）、杏林大学では 33.3%（9 症例対 3 症例）であった。また、母児ともに二次感染は認めていない。基礎的研究としては、前年度までの HIV-1 RNA/DNA の同時検出法は、大量の精子が存在する場合の HIV-1 DNA の回収率が悪かった。そこで、 8×10^6 個という大量の精子が存在しても 1 コピーの HIV-1 DNA が検出できるように検査プロトコルの改良を行った。そして、この方法を用いても、現行の精子洗浄法によってウィルスおよび感染細胞がほぼ確実に除去されることを確かめた。

HIV 陽性婦人の STD についての検討については以下のとおりである。全国のエイズ拠点病院 363 施設にアンケート調査を行い 233 施設（64.2%）から回答があった。このうち HIV 陽性婦人の診察経験のある施設は 69 施設（29.6%）であった。HIV 陽性婦人に関し、何らかの STD 検査または子宮頸部スメアテストの実施に関連し、アンケートによる個票調査および前方視的に検査を行なった 88 症例について解析を行なった。クラミジア DNA 検査が実施された症例は 61 症例であり、このうち 9 例（14.8%）が陽性であった。年齢階層別では、若年婦人において陽性率が高かった。若年婦人における STD および HIV 抗体の陽性率については、若年婦人 831 名が HIV 抗体検査を受けいずれも陰性であった。クラミジア DNA については 386 例に検査が行われ、41 例（10.6%）で陽性であった。年齢別陽性率に関しては、19 才以下では 61 名中 16 名（26.2%）、20-24 才では 152 例中 15 例（9.9%）に、25 才以降では 173 例中 10 例（5.8%）で陽性であり、19 才以下の階層で有意に高率であった。

1. 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 教授	新潟大学大学院医歯学総合研究科（産婦人科）
分担研究者	岩下光利 高桑好一	杏林大学医学部産科婦人科学講座教授 新潟大学大学院医歯学総合研究科（産婦人科） 助教授
研究協力者	花房秀次 加嶋克則 加藤真吾 兼子智 島典子 鈴木美奈 藤田和之 吉村泰典	荻窪病院血液科部長 新潟大学医歯学総合病院産婦人科 慶応義塾大学医学部微生物学教室 東京歯科大学市川病院 日本性科学会認定カウンセラー 新潟大学医歯学総合病院産婦人科 新潟大学医歯学総合病院産婦人科 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。今日、HIV 感染者は HIV キャリアの状態経過することが多くなり、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 感染男性、非感染女性の夫婦が挙児を希望し、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、二次感染の危険性を危惧しつつも、妊娠、出産を行った夫婦が数多くいる。

妊娠、出産に伴う HIV 二次感染の危険性は 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、精液中の 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、二次感染する危険性が残っていることが証明されている。

HIV 感染男性夫婦がコンドームを使用することなく通常の夫婦生活を行なった場合年間で 4.8 人の妻が二次感染を起こすとされている。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、実際二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
精液を介して二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 (表 1)。

表 1

HIV感染男性、非感染女性夫婦における 通常性交による妻の二次感染確率

毎年約4.8%ずつ感染

血中HIV量が多いほど感染確率が高くなる。
治療によってウィルスが少なくなると1回の感
染確率は低くなるが、薬剤の副作用によって
精子の数や機能が傷害されると1回の妊娠率が
低くなり妊娠までの危険性は増す。

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 による二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 が二次感染すると治療が困難になると予想されるので、二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 Percoll 法, swim up 法により調整された精子浮遊液を用いた人工授精を行い二次感染が全く

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。

われわれは、平成 12 年度から平成 14 年度の厚生労働科学研究費補助金「エイズ対策研究事業・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」において、安全性を可能な限り高めた体外受精-胚移植法の開発と臨

床実施を検討してきたが、本研究においてもさらに症例を重ね、有効性、安全性について検討した。

B 研究方法および結果

1. 超高感度 PCR 法の開発

平成 12 年度から平成 14 年度の厚生労働科学研究費補助金「エイズ対策研究事業・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」において、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。昨年度はさらに改良を加え、1copy/ml を検出する PCR 法の改良に成功した。今年度からの研究では、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 感染男性、非感染女性夫婦に対し、体外受精-胚移植を実施した。

2. HIV 感染男性、非感染女性夫婦に対する体外受精-胚移植の臨床応用

(1) 「HIV 感染男性、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、荻窪病院血液科を受診し、新潟大学医学部附属病院で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、新潟大学医歯学総合病院産婦人科を受診する。新潟大学医歯学総合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、再度新潟大学医歯学総合病院産婦人科を受診してもらい、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部は新潟大学医歯学総合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。

HIV 感染男性、非感染女性夫婦に対する体外受精-胚移植の臨床応用は、杏林大学医学部附属病院、慶応大学医学部附属病院でも実施しているが、十分なインフォームドコンセントを得た上で、実施していることは同様である。

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トイス抗体, 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 感染男性，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

基本的には平成 12 年度から平成 14 年度の厚生労働科学研究費補助金「エイズ対策研究事業・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」において用いたプロトコールに基づいて研究を進めている。

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。

従来は採卵当日に，夫から精液を採取し，研究協力者の兼子らが開発した 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した。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）を実施した。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とのプ

ロトコールを採用していた。

これに対し，当日の採精が困難であることもあり，この対策として事前に採精を行い，HIV 除去精子浮遊液を調整した。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，凍結保存をしておく。これを利用して通常媒精または顕微授精を実施し，受精卵を得るというプロトコールを主として用いている。

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。これに関しては，十分な説明を実施した結果，羊水検査を希望された症例はいなかった。

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
 従来のプロトコル
 現在のプロトコル
 について実施された。
 ての
 プロトコルであり、これに基

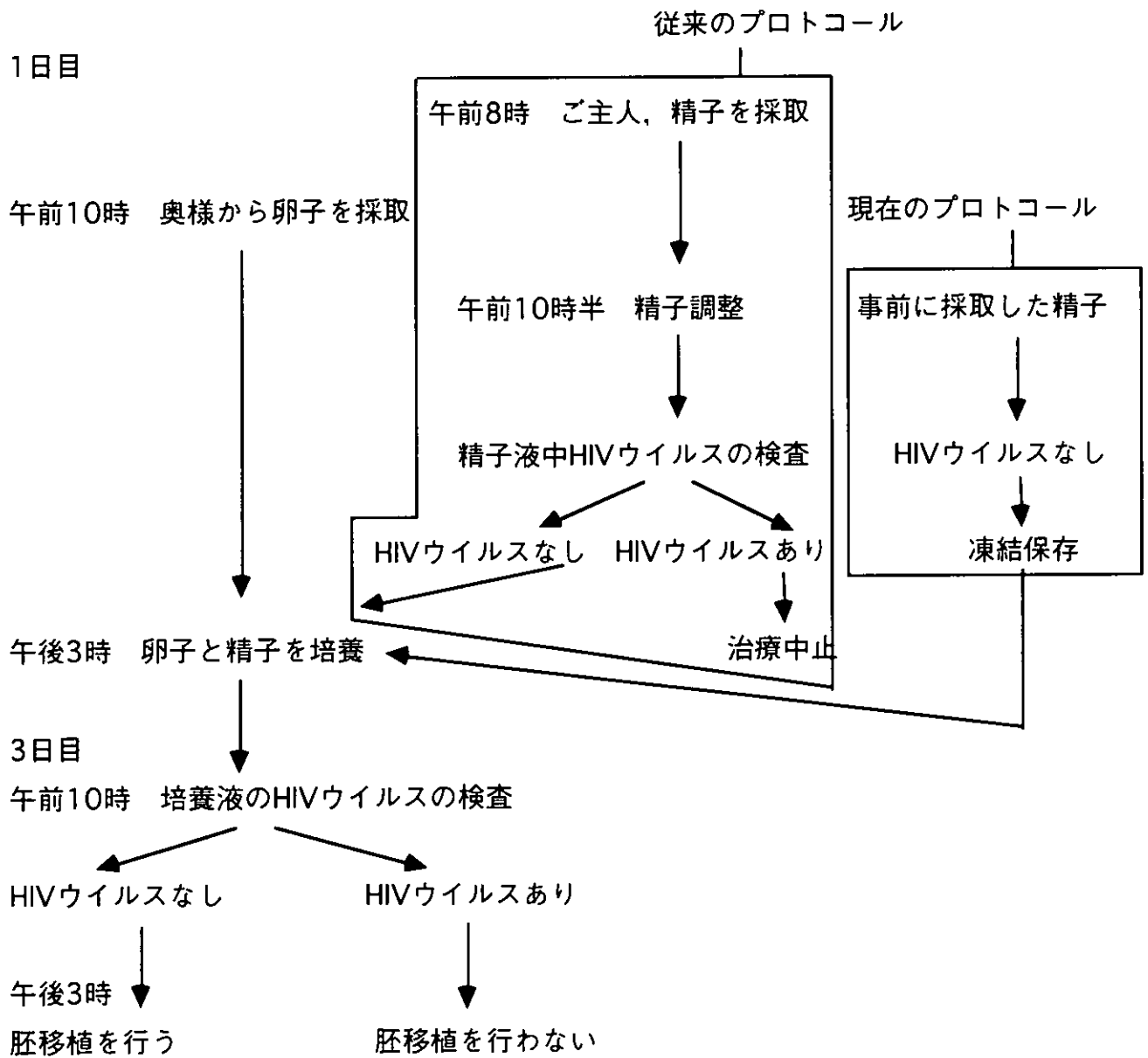


図 1 採精、採卵およびその後のスケジュール

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

平成 12 年度から平成 14 年度の厚生労働科学研究費補助金「エイズ対策研究事業・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」に引き続いて臨床応用を実施している。

既述のように，実施施設として，新潟大学医歯学総合病院，杏林大学医学部附属病院および慶応大学医学部附属病院において「HIV 感染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ている。

平成 13 年（2001 年）から現在まで 32 症例に対して前述の十分な説明を行った後，排卵誘発周期に入った。（1 例は予定）。年次別の症例数は平成 13 年 5 例、平成 14 年 17 例、平成 15 年 20 例である（図 2）。31 症例でのべ 42 周期の排卵誘発を実施した。このうち 30 症例に対し 34 回の胚移植を実施した。胚移植に至らなかった 8 例の内訳は，7 例では卵胞発育不全あるいは受精が認められないため胚移植を実施せず，1 例は培養液の HIV 検査により偽陽性所見が得られたため，胚移植を実施しなかった。

34 回の胚移植に対し，19 例で妊娠が成立した。このうち 2 症例は前臨

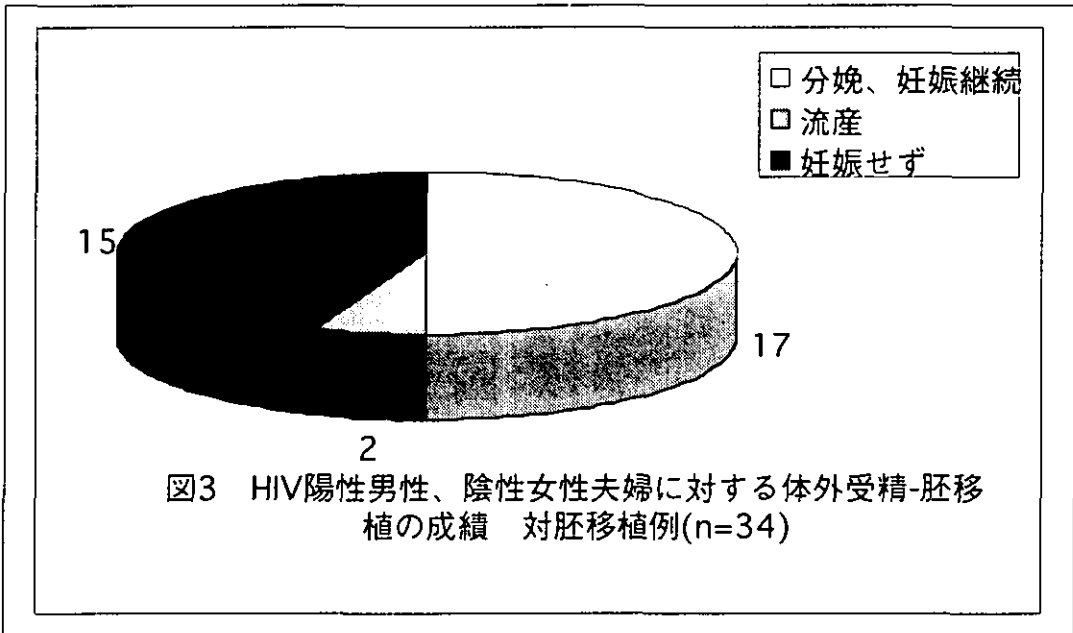
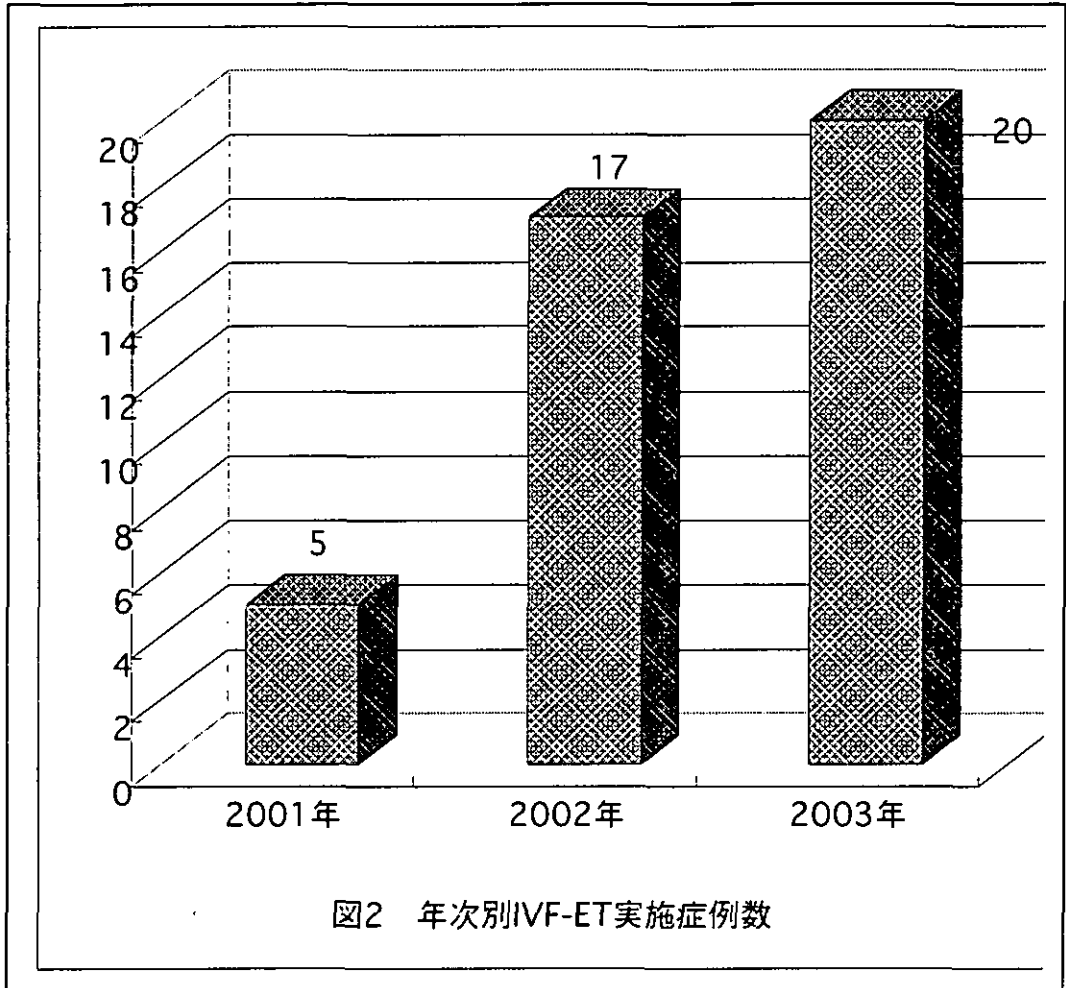
床的流産に終わったものの 17 症例において妊娠が継続した（妊娠継続率 50.0%）（図 3）。11 例はすでに分娩を終了しており，6 例は順調に経過している。

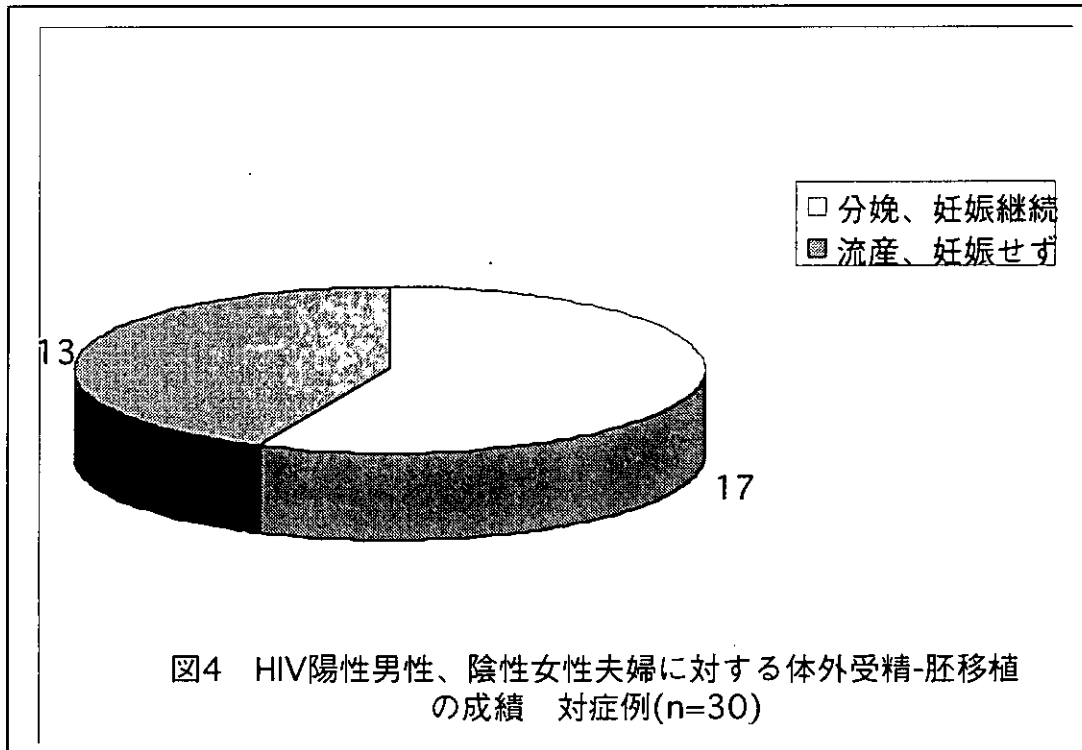
したがって対胚移植の妊娠率は 55.9%（34 胚移植対 19 例），妊娠継続率は 50.0%（34 胚移植対 17 例）であった。対排卵誘発周期に対しては妊娠率は 45.2%（42 排卵誘発周期対 19 例）、妊娠継続率は 40.5%（42 排卵誘発周期対 17 例）であった。

対症例数では 30 症例中 17 例で妊娠が継続しており，56.7%であった（図 4）。17 例中 7 例（41.2%）が多胎妊娠（双胎 6 例、品胎 1 例）であった。施設別妊娠継続率については，胚移植を実施した症例に関して新潟大学では 100%（10 症例対 10 症例）、慶応大学では 36.4%（11 症例対 4 症例）、杏林大学では 33.3%（9 症例対 3 症例）であった。

胚移植例では，胚移植後 3 か月間連月にわたり HIV 抗体および HIV-RNA 検査を実施しているが，二次感染は認められていない。

出生した児については，臍帯血および生後 3-6 か月で HIV 抗体および HIV-RNA 検査を実施しているが，二次感染は認められていない。





C 考察

我々は平成 12 年度から平成 14 年度の厚生労働科学研究費補助金「エイズ対策研究事業・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」の研究で報告したように、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わって 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 (図 5、 図 6)。

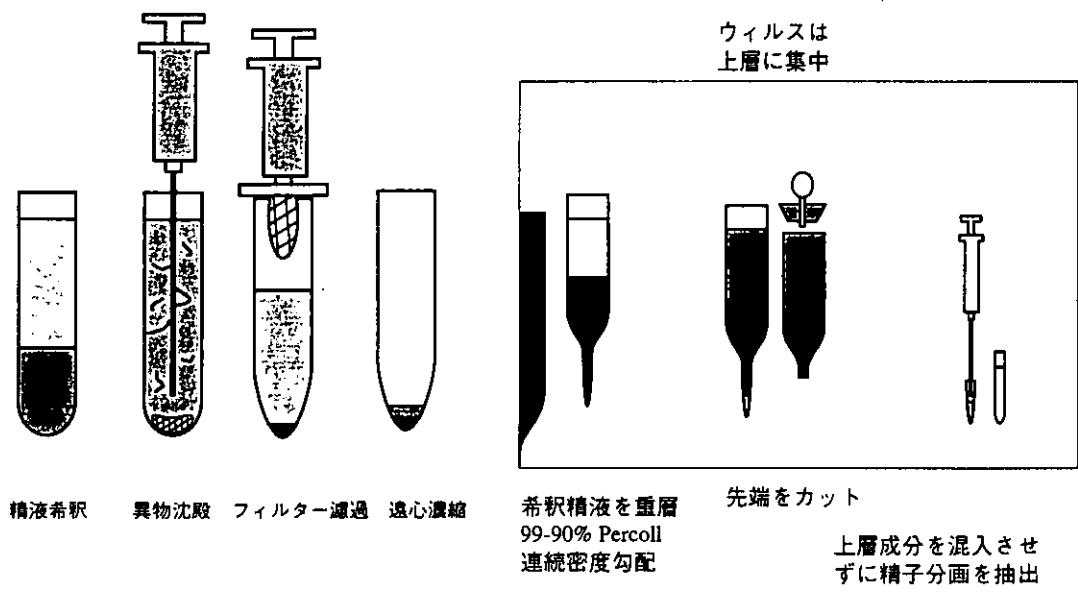


図 5 精液からHIV除去を目的とした精液処理法

Swim up法 (従来法)

Swim up(Virus等の除去を目的とした改良法)

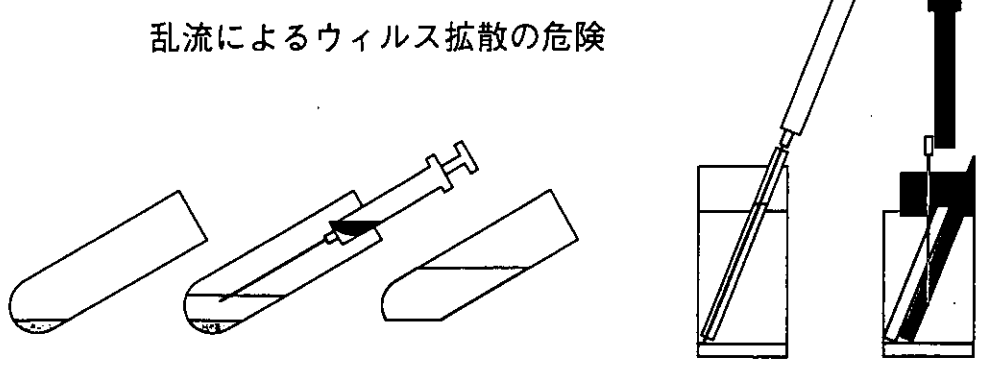


図 6 Swim up法の相違

受精卵あるいは胎児に 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。

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。

一方、体外受精-胚移植にも問題がある。今回の検討では、胚移植を実施した 30 症例中 17 例 (56.7%) で妊娠が継続し、極めて高い妊娠継続率となっている。一般の体外受精-胚移植における妊娠継続率はせいぜい 30% であり、今回の検討で、極めて高い妊娠率を得ている背景には、対象となる婦人がもともと不妊症というわけではないということが関係している可能性はある。

しかしながら、過排卵刺激による卵巣過剰刺激症候群が認められた症例もあり、体外受精-胚移植による副作用も無視しえないものがある。そこで、今後人工授精も考慮すべき状況である (表 4)。ただし上述のように人工授精を考慮する場合には、二次感染の予防がもっとも重要な課題となる。また、人工授精を実施するには体外受精-胚移植を実施するよりも多量の精子が必要である。多量の精子を得た場合の、HIV ウイルスの測定法が問題となるが、今回の基礎的検討により、多量の精子が存在する場合でも HIV ウイルスを検出する方法を確立した。これについては、次項において報告する。

今後、人工授精の実施も考慮するため、HIV をほぼ完全に除去する精子調整法を現在開発中であり、これに新たに開発した HIV 検出法を応用して、人工授精実施について検討していくことが重要と判断される。

表 4

体外受精の利点と問題

1回での妊娠率が 50% と高い (女性が不妊症でないためか)

ウィルス除去に関しては人工授精よりも安全

排卵誘発剤による女性への負担 (卵巣過剰刺激症候群で4名が輸液治療)

費用と時間がかかる

人工授精: 費用が安く、簡単で女性への負担が少ない

新技術の開発により人工授精への応用

回収精子数・運動率によって個々での適応を検討

D 結論

平成 12 年度の研究から、「HIV 感染男性、陰性女性夫婦に対する体外受精-胚移植の臨床応用」を希望する症例は徐々に増加している。

我々は MTC(Mother to child)の予防だけでなく、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 感染した男性の夫婦でもほぼ 100%安全に (妻が二次感染することなく) 妊娠, 出産を行うことが可能であると判断し、前年度までの研究に引き続き、倫理委員会の承認を得た後に臨床実施を行っている。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ものと判断される。また、患者にとってはより負担の少ない人工授精の実施も

検討していく必要があるものと判断される。

一方、挙児を希望する HIV 感染男性、非感染女性夫婦は全国におり、これらの患者さんの希望に応えるため、治療に関するネットワークを構築を検討している。

大量の精子を含む培地中の HIV-1 の RNA と DNA の同時検出法の開発

協力研究者 加藤 真吾 慶応義塾大学医学部微生物学・免疫学教室助手

研究要旨

前年度までの HIV-1 RNA/DNA の同時検出法は、大量の精子が存在する場合の HIV-1 DNA の回収率が悪かった。そこで、 8×10^6 個という大量の精子が存在しても 1 コピーの HIV-1 DNA が検出できるように検査プロトコルの改良を行った。そして、この方法を用いても、現行の精子洗浄法によってウイルスおよび感染細胞がほぼ確実に除去されることを確かめた

A. 研究目的

前年度まで用いていた HIV-1 RNA/DNA の同時検出法は、 10^6 個以下の精子が存在する培地からは RNA と DNA をほぼ 1 コピーまで検出できるが、大量の精子、例えば 8×10^6 個の精子が存在する場合、HIV-1 RNA の回収率は 100% 近いが、HIV-1 DNA の回収率は 10% 以下に低下することが判明した。つまり、多くの精子が採取できるほど HIV-1 DNA の検出感度が低下することになる。この技術のままでは大量の精子を必要とする人工授精の安全確認に対応できない。そこで、大量の精子が存在しても HIV-1 DNA を確実に検出できるように検査法を改良した。そして、この方法を用いて、現行の精子洗浄法のウイルス除去率を求めた。

B. 研究方法

射精後の精液 1.6 ml に 2×10^7 個のウイルス粒子あるいは 2×10^5 個の HIV-1 感染 MOLT-4 細胞を加えた。この精液を Hanks 液で 3 倍に希釈し、3000 rpm で 10 分間遠心して上清を除

いた。沈殿精子を Hanks 液で懸濁し、ART 用異物除去フィルターを通した後、ART キャピラールをあらかじめ立てかけた 98% から 0% の Percoll 密度勾配に重層し、2500 rpm で 25 分間遠心し、底部に集まった精子を ART キャピラールを通してシリンジで採取した。この精子液を、あらかじめ立てかけたマイクロピペットを通して 2 ml の HTF 液の底に入れ、CO₂ インキュベーターの中で 1 時間ほど静置して swim-up を行い、上から 1 ml の HTF 液を採取した。

所定の数の精子と HIV-1 を含む液を 18000 rpm で 60 分間遠心して上清を除き、その沈殿から QIAamp UltraSens Virus Kit (QIAGEN) を用いて RNA と DNA を精製し、検出限界が 1 コピーの RT-nested PCR 法によって HIV-1 RNA あるいは DNA を定量した。

C. 研究成果

今までは HIV-1 の RNA と DNA の精製のために QIAGEN の RNeasy Kit