

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16年度 研究報告書

主任研究者 田中憲一
平成17年(2005年)3月

目 次

HIV 感染者の人工授精・体外受精に関する基礎的・臨床的研究

(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関する研究	1
(2) 濃縮洗浄調整精子の保存温度と時間経過に おける精子状況に関する研究	13
(3) 洗浄精子中の非サブタイプ BHIV-1 を 1 コピー まで検出できる方法の検討	18
(4) HIV 陽性男性精液からのウイルス除去, 運動精子の選別 DNA 損傷精子観察法の開発	23
酸化チタンによる HIV の経母乳感染の防止に関する 基礎研究	33
妊産婦の HIV 感染に関する分子疫学的研究並びに 子宮内感染の機序に関する研究	38
研究成果の刊行に関する一覧表	44
研究成果の刊行物・別刷	47

平成 16 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」

HIV 感染者の人工授精・体外受精に関する基礎的・臨床的研究

(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
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 久慈直昭 島典子 鈴木美奈 田村正毅 藤田和之 吉村泰典	荻窪病院血液科部長 新潟大学医学部附属病院産婦人科 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講師 慶応義塾大学医学部産科婦人科学教室講師 HIV カウンセラー 新潟大学医学部附属病院産婦人科 新潟大学医学部附属病院産婦人科 新潟大学医学部附属病院産婦人科 慶応義塾大学医学部産科婦人科学教室教授

研究要旨

本邦においても HIV 感染者は徐々に増加しつつあるが、従来より HIV 感染男性、非感染女性夫婦の妊娠については、性交渉により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てきた。これに対し、本研究班では Percoll 法-Swim up 法を応用し夫精液から 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きた。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、Percoll 法-Swim up 法により調整した精子浮遊液について時間をおいて複数回 HIV についての検査を行い、陰性であることを確認することが重要である。このためには、調整した精子浮遊液を一定時間静置した場合の精子の運動性などに与える影響が問題となる。そこでこの点について検討した。

一方、HIV 陽性男性の体外受精・胚移植施行に際しては、ウイルスの除去とともに積極的に DNA 損傷精子の排除を行う必要があることが重要と考えられる。このため、個々の精子の DNA 損傷を多面的に解析する方法を開発することを試みた。

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、これまでに 40 名の患者に対し約 54 回の体外受精・胚移植を実施し、27 名で妊娠が成立し、このうち 20 名で妊娠が継続するという結果を得ている。調整した精子浮遊液の孵置に関する研究では、37℃に孵置した場合、7 時間経過しても運動率が維持されたとの結果を得ている。個々の精子の DNA 損傷を多面的に解析する方法に関する研究では、精液所見不良例から効率よく運動精子を回収することを目的とした精液前処理法、Separable Fine Neck Tube を用いる Percoll 連続密度勾配法、微小環境 swim up 法を開発し、また、個々のヒト精子の DNA2 重鎖切断を高精度で観察できる single cell pulse field electrophoresis 法を開発した。

A 研究目的

1996 年以後、HIV 感染者に対しプロテアーゼ阻害剤を含む Highly active antiretroviral treatment (HAART) が使用されるようになり、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 感染者はエイズを発症することなく 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 の改善を求めようになってきている。そのような状況下で 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、従来は二次感染の危険性を指摘され、避妊を指導されるだけであった。一方では、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ことも事実である。

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、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。

HAART で精液中の遊離 HIV RNA が検出限界以下になった場合の二次感染の危険性は 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も存在する。このように 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。

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 により二次感染が生ず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実施し、二次感染が全くないとの報告を行っている。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

いと考えられる。われわれは、本研究において、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、本年度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。

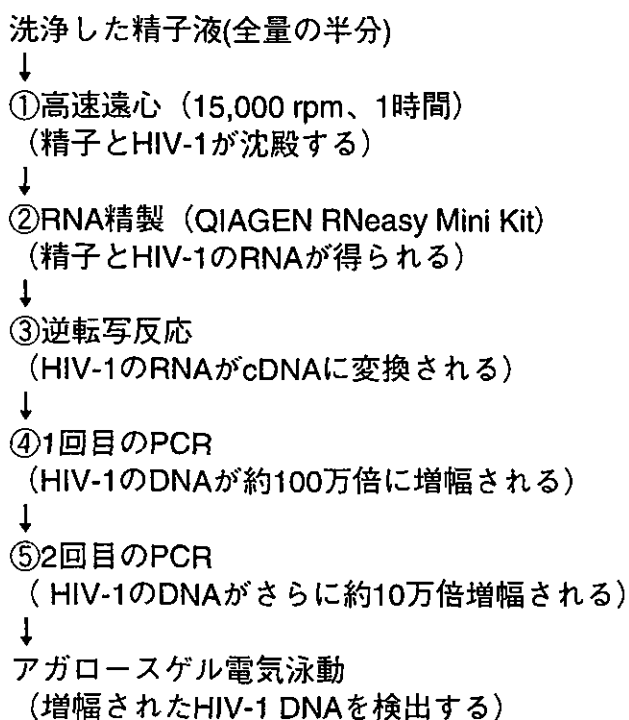
B 研究方法および結果

これまでの本研究により、研究協力者の加藤らは超遠心を用いて検出

感度が 1 copies/ml の世界最高感度の PCR の開発に成功している (表 1)。

表 1

Swim-upによって洗浄した精子調製液中の HIV-1 を高感度で検出するための方法



**検出感度 1copy/ml :
4時間以内に終了**

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-胚移植を実施している。

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

図 1 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、新潟大学医歯学総合病院はじめ実施施設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し、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、夫婦の意思を確認している。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している。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し、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 などを検査している。これと並行して、continuous percoll gradient による HIV の除去を確認している。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

はじめとする研究参加施設を受診することとしている。

新潟大学医歯学総合病院産婦人科を受診した場合を例にとって説明すると、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、説明している。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）を実施している。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っている。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している。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-胚移植の臨床応用を実施している、杏林大学医学部附属病院、慶応大学医学部附属病院でも、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。

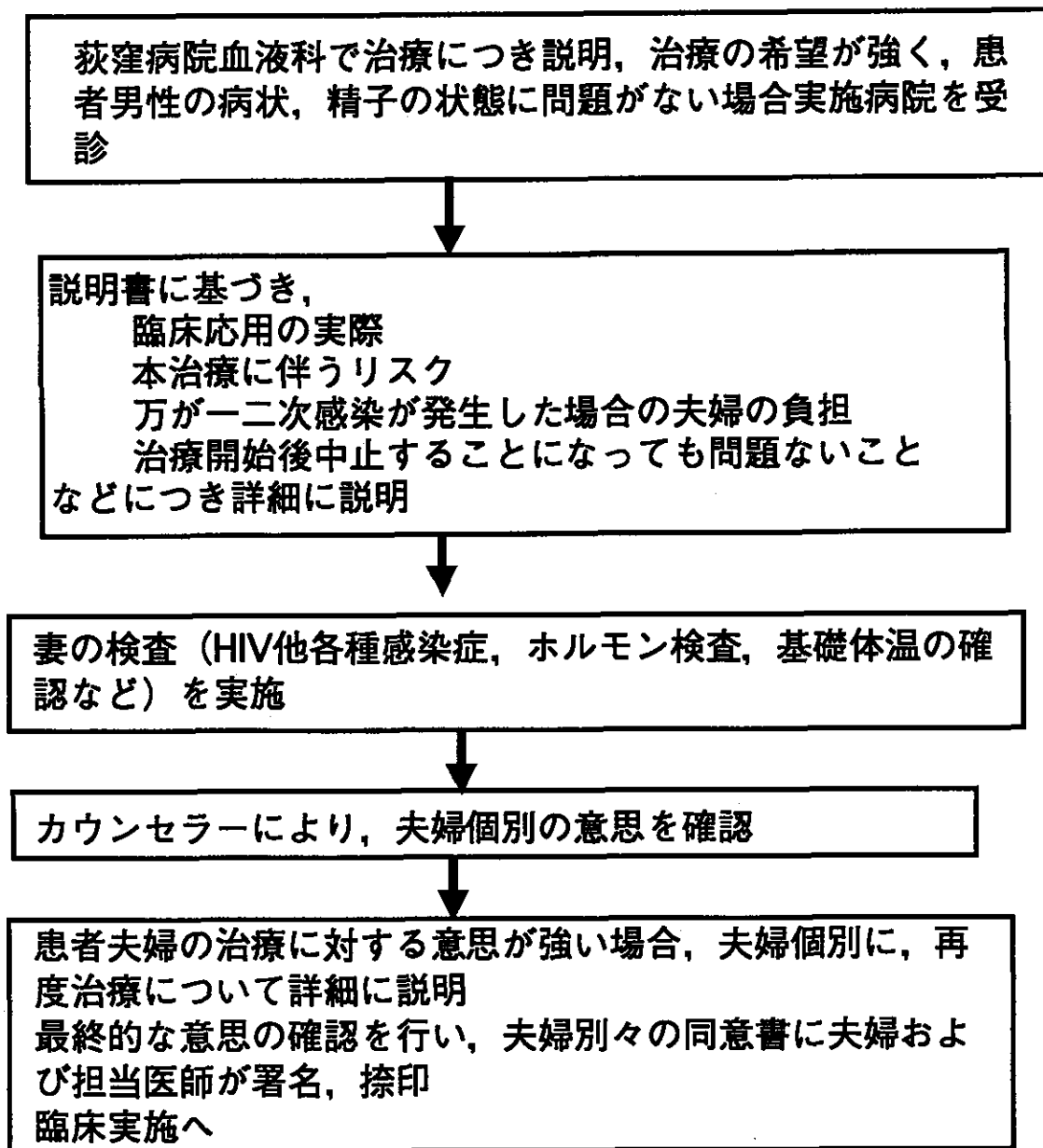


図1 HIV感染男性，非感染女性夫婦に対する体外受精-胚移植実施までの対応

(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

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2に示した。

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。

なお，採卵当日に夫精子が十分採取できない可能性もあるため，事前に精子を採取，凍結しこれを使用することも選択肢としてある。

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ールであり，これに基づいて実施された。

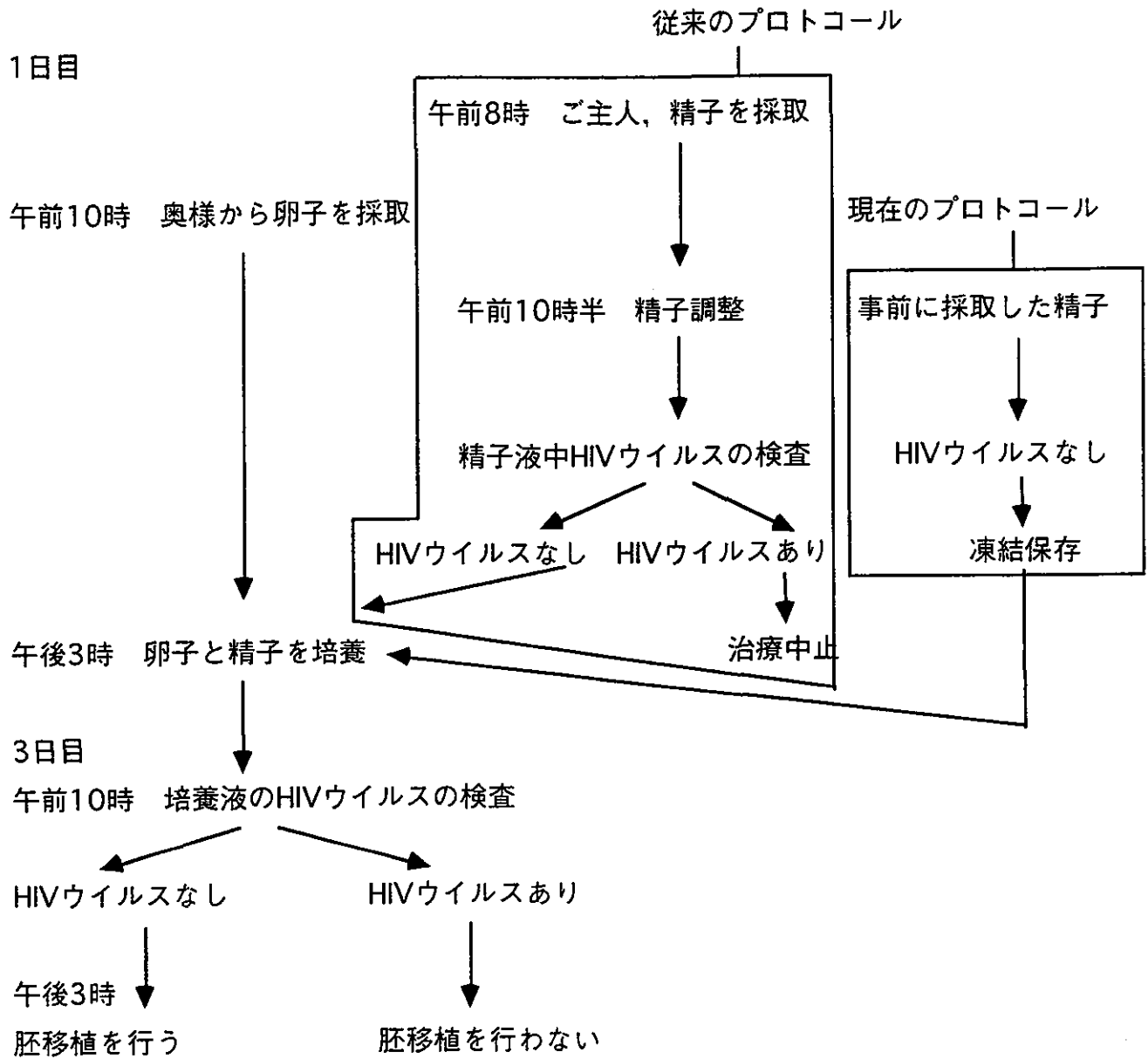


図 2

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」の結果

年次別体外受精・胚移植実施症例ののべ人数を図3に示した。2001年に5例であったものが，2004年には22例となっている。現在まで荻窪病院血液科に，体外受精・胚移植の相談のために受診したカップル数は77組であり，このうち40組の夫婦に対し，のべ54回の体外受精・胚移植を実施している。

妊娠成立例は27例であり，初期流産に終わったものが6例，子宮外妊娠であったものが1例あり，20例で妊娠が継続し，対症例当たりの妊娠継続率は50.0%となっている。現在，待機中のカップルが16組いる（表

2）。

妊娠継続例では，すでに出産した19名中単胎が13名，双胎が5名，品胎が1名となっており，生児数は26名である。体外受精・胚移植に伴う合併症として，卵巢過剰刺激症候群が4例に認められている（表3）。

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（表4）。

各施設別の成績をまとめると表5のようになる。

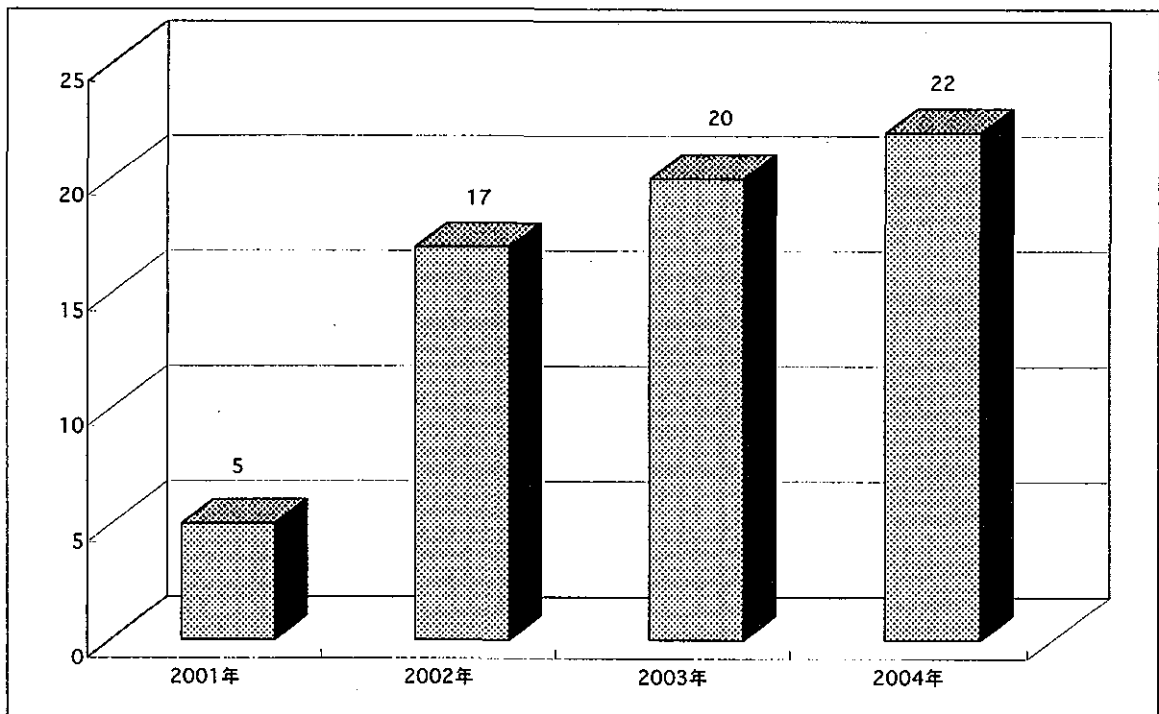


図3 年次別体外受精・胚移植実施症例数の推移（のべ人数）

表 2

妊娠継続例の内訳

出産：19名

単胎：13名

双胎：5名

品胎：1名

出生Baby数：26名

妊娠継続中：1名

合併症として：卵巣過剰刺激症候群；4例

表 3

受診者数：77組 血友病：42名

性感染：35名

受精卵の胚移植：40名（のべ54回）

妊娠例：27名

妊娠継続：20名

初期流産：6名

子宮外妊娠：1名

待機中：16名

表 4

母子検査：HIV RNA, proviral DNA, HIV抗体

体外受精実施後（1か月後、2か月後、3か月後）

出産時臍帯血+母体血

出生後6ヶ月以内に母子の採血

全員で陰性を確認

出生Babyの身体的異常もなかった

表 5 施設別成績

	対象 症例	誘発周期 (症例数)	胚移植回数 (症例数)	妊娠 症例数	妊娠 継続数	対症例 妊娠 継続率
新潟大学	17	18 (14)	13 (13)	12	10	10/13 (76.9%)
慶應大学	18	37 (18)	32 (18)	11	7	7/18 (38.9%)
杏林大学	9	9 (9)	9 (9)	4	3	3/9 (33.3%)
合計	44	64 (41)	54 (40)	27	20	20/40 (50.0%)

C 考察

我々はすでに報告してきたように、Percoll による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。

人工授精ではなく、体外受精・胚移植を選択している理由については、これまでも報告しているとおりである。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・胚移植では日毎に 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 万人を越えている。

体外受精・胚移植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。ただし、女性に対する身体的負担を考慮した場合、体外受精・胚移植に比較し、人工授精の応用も必要と考えられ、今後より安全な人工授精が可能となるような取り組みを行っていく必要があるものと判断している。

なお、夫婦の個別の意思確認の必要性は極めて重要であり、荻窪病院に挙児希望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。

D 結論

Percoll 法および Swim up 法組み合わせた方法により調整された精子浮遊液を用い、高感度 PCR 法により HIV ウイルスがほぼ除去されていることを、2 段階にわたって検索するという今回の方法を用いれば、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、これまでに引き続き、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。

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し、利便性をはかることについては、引き続き検討を行っている。

平成 16 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」

HIV 感染者の人工授精・体外受精に関する基礎的・臨床的研究

(2) 濃縮洗浄調整精子の保存温度と時間経過における精子状況に関する研究

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	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
研究協力者	加嶋克則 鈴木美奈 田村正毅 藤田和之	新潟大学医歯学総合病院産婦人科助手 新潟大学医歯学総合病院産婦人科助手 新潟大学大学院医歯学総合研究科（産婦人科） 講師 新潟大学医歯学総合病院産婦人科助手

研究の背景：

HIV 感染男性、非感染女性夫婦間の妊娠については、Percoll 法および Swim up 法により夫精子を調整し、この精子浮遊液について、超高感度 PCR を用いて、HIV ウイルスがほぼ完全に除去されていることを確認した後行う体外受精・胚移植により、女性の二次感染をほぼ 0 にすることが可能であり、臨床応用を行っている。

一方、体外受精・胚移植の実施は女性に対する身体的負担が大きく、より簡便な人工授精(AIH)の実施が望まれる。その際に二次感染の可能性を極力回避するため、洗浄精子について、時間をおいて、複数回の HIV の検査を行うことが望ましい。その場合、洗浄精子を孵置することによる精子の運動率、良好精子獲得率が問題となるため、時間経過、保存温度等による影響を検討した。

対象および方法：

新潟大学医歯学総合病院産婦人科不妊外来通院中の患者のうち、夫婦間人工授精(AIH)または、体外受精・胚移植による治療を実施している夫婦で、文書による同意の得られた 4 症例を対象とした。

射精後、精子を Percoll 法により洗浄調整し、実際の AIH または体外受精・胚移植で使用した余剰精子について

A 群：37℃にて孵置

B 群：4℃にて孵置

し、1、3、5、7 時間後の精子の運動率、良好精子獲得率を測定した。

結果

パーコール法により洗浄調整した精子について、37℃にて孵置したところ、調整直後の運動率は平均 89.0 ± 16.9% であった。これに対し 1 時間後、3 時間後、5 時間後、7 時間後

の運動率はそれぞれ $88.3 \pm 7.6\%$, $86.0 \pm 11.3\%$, $87.0 \pm 21.6\%$, $83.0 \pm 16.3\%$ であり、調整直後に比較し有意の低下は認められなかった(図1)。良好精子獲得率について、調整直後が平均 $65.8 \pm 15.5\%$ であった。これに対し1時間後、3時間後、5時間後、7時間後の良好精子獲得率はそれぞれ $73.5 \pm 14.6\%$, $85.5 \pm 16.8\%$, $74.8 \pm 12.2\%$, $72.0 \pm 23.0\%$ であり、調整直後に比較し有意の低下は認められなかった(図2)。

一方、 4°C に孵置した場合には、調整直後の運動率は、平均 $89.0 \pm 16.9\%$ であったものが、1時間後、3時間後、5時間後、7時間後の運動率はそれぞれ $73.8 \pm 17.7\%$, $76.8 \pm 18.0\%$, $52.8 \pm 21.9\%$, $51.0 \pm 23.6\%$ であり、調整直後に比較し5時間後、7時間後では有意の低下が認められた(図3)。また良好精子獲得率については、調整直後は平均 $65.8 \pm 15.5\%$ であったのに対し1時間後、3時間後、5時間後、7時間後の運動率はそれぞれ $67.5 \pm 16.7\%$, $51.8 \pm 11.2\%$, $37.8 \pm 8.7\%$, $50.8 \pm 29.1\%$ であり、調整直後に比較し、5時間後において有意の低下が認められた(図4)。

考察

現在、本研究班において、HIV 感染男性・非感染女性夫婦の妊娠補助に関して、人工授精ではなく、体外受精・胚移植を選択した理由については、別に述べているとおりである。すなわち、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1万人を越えており、体外受精・胚移植の安全性もほぼ確立されている。

しかしながら、体外受精・胚移植は多数の卵子を採取する必要があることから、強力な卵巣刺激が必要であり、それに伴う合併症も生ずることがある。また、採卵に伴う麻酔のリスク、感染のリスクなどもあり、また、経済的負担も考慮しなければならない。これに対し、人工授精は身体的、経済的負担は体外受精・胚移植に比べはるかに少ない。ただし、上述のように安全性の担保に難点があることは事実である。

そこで、安全性を担保する一方法として、調整した精子浮遊液の検査(超高感度PCRによるHIVウイルスの検索)を複数回行うことにより、陰性を確認することが有用と考えられる。その場合精子浮遊液を孵置することによる精子運動能の低下などが危惧されるため、今回の検討を行った。

今回の研究により、Percoll法により洗浄調整した精子について、 37°C にて孵置することは、精子の運動率、良好精子獲得率に影響を与えず、この条件により、精子を孵置し、HIVの検査を複数回実施することにより、より安全にAIHが実施可能であることが示唆された。

各種の方法による妊娠での二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・胚移植を選択するか、数千分の1以下の人工授精を選択するかは難しい問題であるが、医療者の立

場としては、女性の二次感染は極力防がなければならないことは言うまでもない。今後、さらに安全性を追

求しつつ人工授精の応用も考慮し検討を進めていくことが重要と判断している。

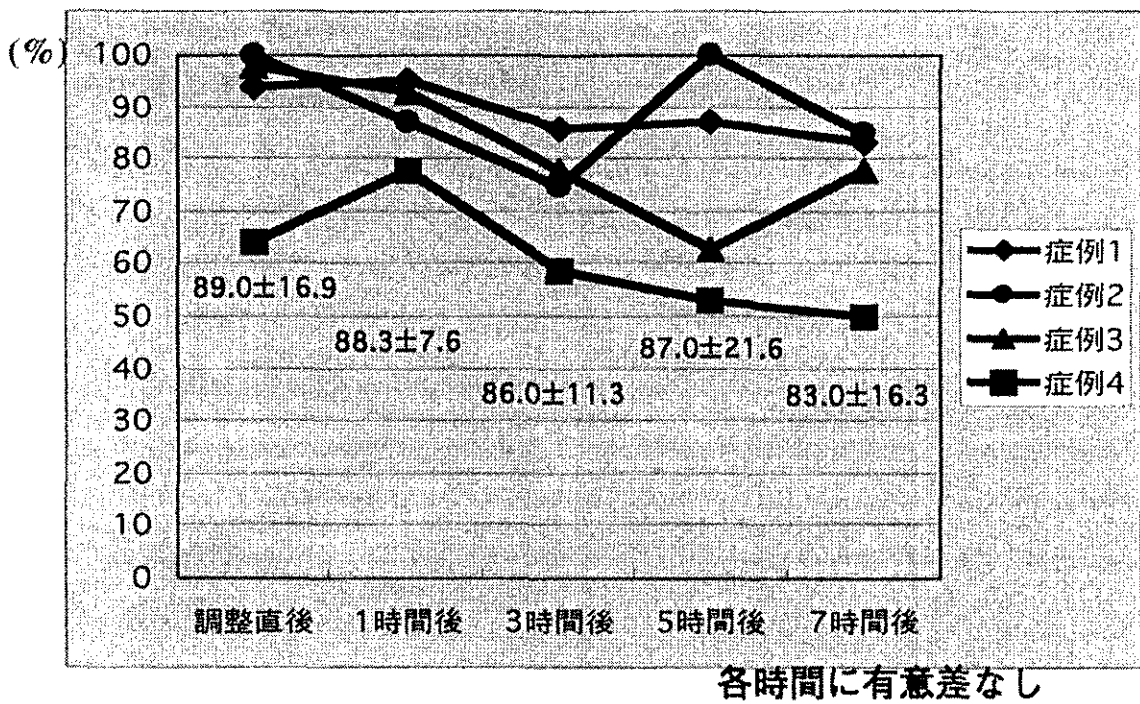


図1 パーコール洗浄精子の37°C、孵置による運動率への影響

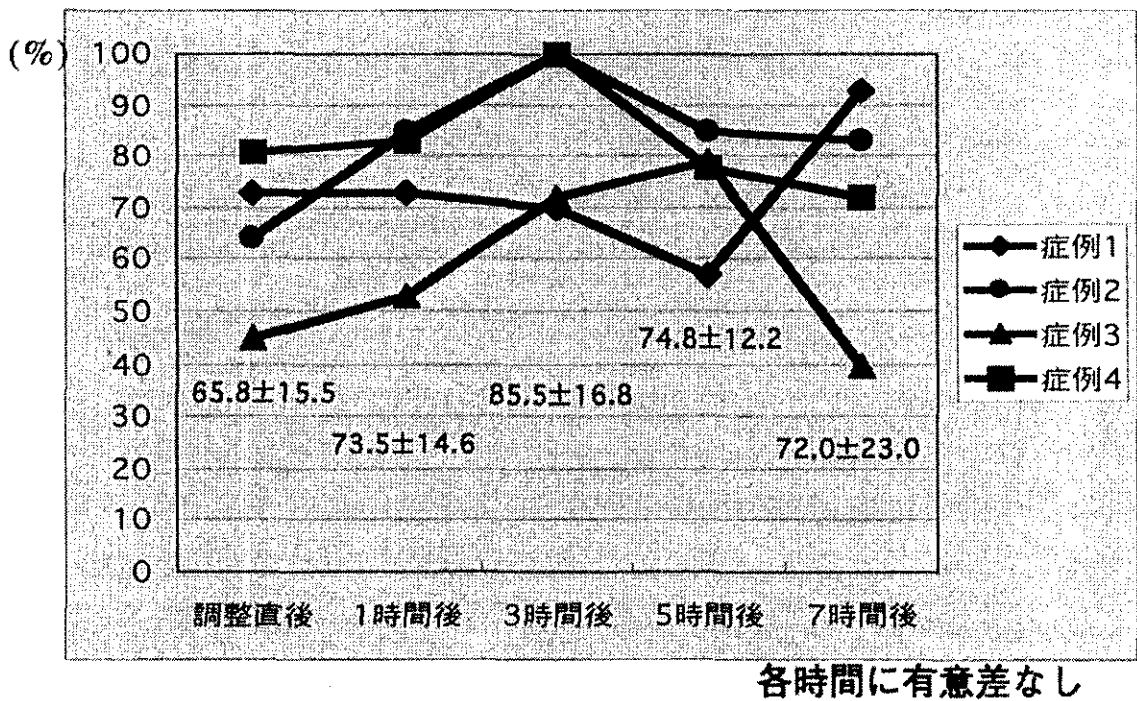
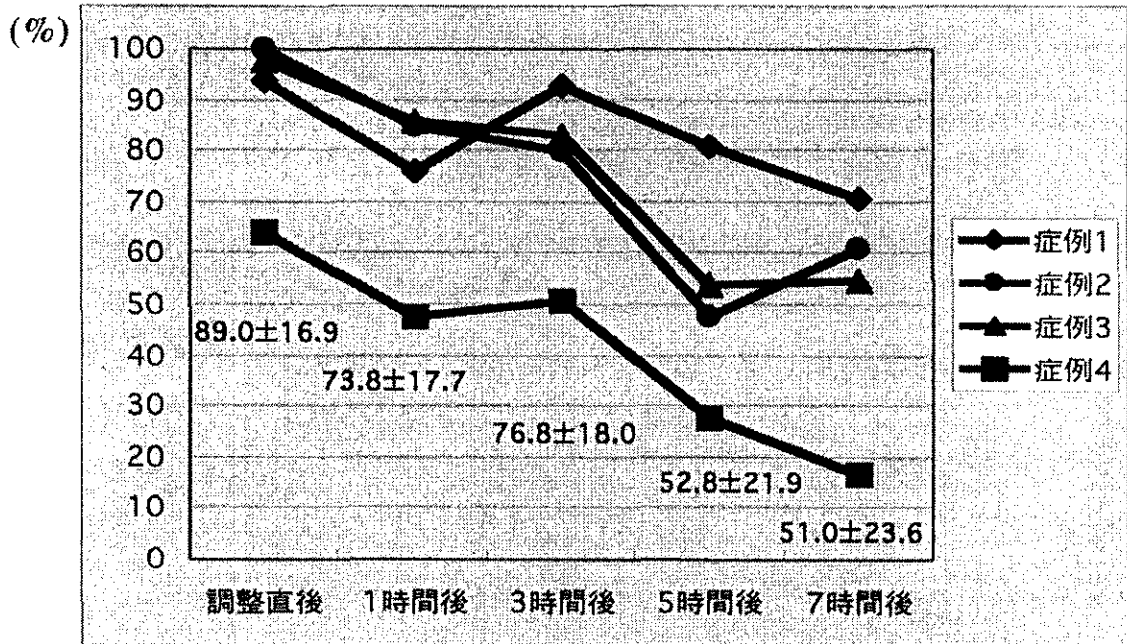
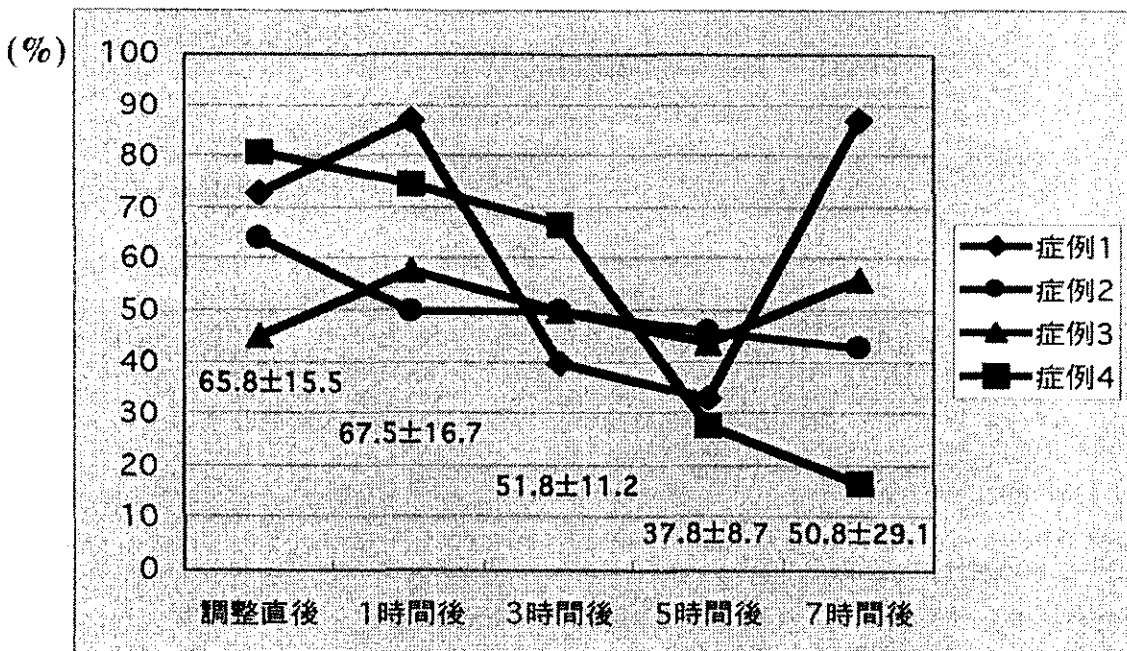


図2 パーコール洗浄精子の37°C、孵置による良好精子獲得率への影響



調整直後 vs 5時間後: $P < 0.05$
 調整直後 vs 7時間後: $P < 0.05$

図3 パーコール洗浄精子の4°C, 孵置による運動率への影響



調整直後 vs 5時間後: $P < 0.05$

図4 パーコール洗浄精子の4°C, 孵置による良好精子獲得率への影響

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）分担研究報告書

HIV 感染者の人工授精・体外受精に関する基礎的・臨床的研究 (3) 洗浄精子中の非サブタイプ B HIV-1 を 1 コピーまで検出できる方法の検討

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

HIV 不一致夫婦における洗浄精子を用いた生殖医療において、非サブタイプ B の HIV-1 もサブタイプ B と同様にほぼ 1 コピーの検出感度でウイルス除去を証明するために、サブタイプ特異的なプライマーを設計し、その定量性を評価した。サブタイプ A、AE、B および C の HIV-1 分離株の HIV-1 RNA 濃度を、サブタイプ B 特異的プライマーあるいは各サブタイプ特異的プライマーを用いたポアソン分布による定量法と Amplicor HIV-1 Monitor Test, version 1.5 によって決定し、これらの測定値を比較した結果、非サブタイプ B の HIV-1 株に対しては、サブタイプ特異的プライマーを用いた場合の方がサブタイプ B 特異的プライマーを用いた場合より HIV-1 の濃度が同等かそれ以上で、Amplicor による値に近かった。すなわち、1 コピーのウイルス RNA を検出するためには、少なくとも、対象ウイルスのサブタイプに特異的プライマーを用いるべきであることが明らかとなった。以上の結果を受けて、被験者の HIV-1 サブタイプを前もって決定し、そのサブタイプに合ったプライマーを用いて、洗浄精子ならびに胚移植前の胚培養液の HIV-1 検査を行うように作業過程を変更した。

A. 研究目的

HIV 不一致夫婦における洗浄精子を用いた生殖医療に関する研究において、洗浄精子の中に HIV-1 が存在しないことを実験的に証明することが、妻および児への感染リスクをほぼゼロであることを担保するものとして重要な意味をもっている。この臨床研究が始まった当初は、被験者の大半が血友病 HIV-1 感染者であった。国内の血友病 HIV-1 感染者は 1980 年初期に米国から輸入された血液製剤が感染源であったため、HIV-1 サブタイプは例外なく当時米国で流行していた B 株であることがその後の研究で明らかとなっていた。そのため、当初、洗浄精子中の HIV-1 を検出する RT-nested PCR のプライマーにはサブタ

イプ B のコンセンサス配列と一致するものを用いていた。しかし昨年度あたりから、被検者の中に外国人を含む血友病以外の HIV-1 感染者が目立つようになってきたため、サブタイプ B のプライマーを用いて HIV-1 の検査をしていることに疑問が生じてきた。本臨床研究において妻や児に一人の感染者も極力出さないことが至上命題であるとするならば、この問題を看過するわけにはいかない。そこで本研究では、非サブタイプ B にも対応できるように HIV-1 検出方法の改良を行うことにした。

B. 研究方法

各種サブタイプの HIV-1 分離株 (5 株) を神奈川衛生研究所から分与していただい