

効な予防対策の確立が急務である。母子感染のメカニズムとして経胎盤感染、分娩時の血液を介する感染、分娩後の授乳による感染が考えられる。ここでは経胎盤感染の具体的なメカニズムがいまだ不明であることからこの解明を目的とした。そこで、胎盤にHIV特異的なエントリールートが存在する可能性を調べるため、絨毛癌細胞を対象にし、HIVのコレセプターとなり得るGタンパク受容体の発現について探索的に調べた。

B. 研究方法

B-1. ベトナムにおける妊産婦の HIV の分子疫学

ホーチミン市第一小児病院においてHIV陽性産婦から生まれた児の末梢血のサンプルを採取し、昨年度開発したgp41領域をターゲットとするサブタイプ鑑別用プライマーを用いたPCR、またv3領域のシーケンシスによるサブタイピングを行った。

B-2. HeLa/KS386とHeLa/T4の巨細胞形成の電子顕微鏡観察

HeLa/KS386とHeLa/T4を1:1の比率で混ぜ合わせ、経時的に融合過程を観察した。プラスチックシートに培養した両細胞を等量添加して、10分、20分、50分、60分、70分、80分、90分、100分、110分後に細胞を固定した。最終濃度1.5%グルタルアルデヒド(1/15 Mリン酸緩衝液,pH7.4)になるように固定液を加えて前固定を行った。その細胞を1%四酸化オスミウムと0.8%フェロシアン化カリの混

合液(0.1Mカコジル酸緩衝液)で1時間、後固定した。その後、標本を1%没食酸水溶液に室温、30分浸漬し、1%酢酸ウランで更に30分処理した。さらに、アルコール脱水した後に、Quetol 812樹脂に細胞を培養しているシートを包埋した。シートに載っている細胞から切片を作製し、これらに4%酢酸ウランで20分、クエン酸鉛で10分、電子染色を施した。これら切片は日立電子顕微鏡(H-7100型)で観察した。

B-3. 絨毛癌細胞に発現するGタンパクレセプター

三つの絨毛癌細胞(BeWo,JEG-3,JAR)にどのようなGタンパク受容体が発現しているかRT-PCRを用いて調べた。RT-PCRに用いたGタンパク受容体のプライマーは、APJ、C5a receptor、CCR1、CCR4、CCR7、CCR9/CCR10、CXCR3、CXCR4、CXCR5/BLR1、DEZ α 、DEZ β 、Duffy antigen、GPR9-6、GPR5、GPR12、GPR15、GPR25、RDC1のmRNAをターゲットにしたものを用いた。

C. 研究結果

C-1. ベトナムにおける妊産婦の HIV の分子疫学

平成16年10月より11月までベトナム、ホーチミン市、ツズー病院および第一小児病院を訪れたHIV陽性妊婦より生まれた児より11サンプルの血液を採取した。すべてHIV抗体テスト陽性であった。PBMCよりDNAを抽出し、v3領域のPCR及びgp41

領域をターゲットとするサブタイピングPCRをしたところ、8サンプルがHIV陽性であった。V3領域のシークエンス及びサブタイピングPCRの結果は一致し、8サンプルすべてがサブタイプCRF01_AEであった。

C-2. HeLa/KS386とHeLa/T4の巨細胞形成の電子顕微鏡観察

電顕解析すると、二種の細胞は混合培養後、時間が経過するにつれてお互いが接着し、大形の細胞塊を形成した。始めは細胞表面の細胞突起が別の細胞表面に接触し、ついで接触面は広範囲になった。接触面では細胞突起は消失し平滑な細胞膜がお互いに向き合っていた。両者の細胞の細胞膜は完全に密着することなく少しの間隔を開けて向かい合って存在し、その間に30nmの大きさの高電子密度の粒子が観察された。この粒子と両者の細胞膜は接触していた。しかし、混合培養110分後に至るまで、両者の細胞膜が融合している場面に遭遇しなかった。写真は図1に示した。

C-3. 絨毛癌細胞に発現するGタンパクレセプター

実験は4回行い、同様の結果が得られた。結果は表2に示した。C5a receptor、CCR7、CCR9/CCR10、RDC1は三つの細胞間で発現の強弱に差はあるものの、どの細胞にも発現していることが確認された。この中で、少なくともCCR9やCXCR4、RDC1は他の論文からHIVのコレセプターとなることが確認されている。

D. 考察

D-1. ベトナムにおける妊産婦のHIVの分子疫学

先行研究にあるようにベトナムではサブタイプCRF01_AEが優位で、今回のサンプルもすべてCRF01_AEであった。またPCRで陰性だった3サンプルは月齢2ヶ月が2、9ヶ月が1サンプルで、いまだに母親からの移行抗体によりHIV抗体陽性になった可能性が高い。D-2. HeLa/KS386とHeLa/T4の巨細胞形成の電子顕微鏡観察

細胞の融合にかかる時間は110分以上である事が分かった。混合培養後110分では多核の細胞塊は完全な合胞体とはならず多数の細胞が密着している像であると判断出来る。これらの細胞を抗HIV薬のスクリーニングに用いる際は混合培養16時間後に固定観察をするので、110分以降の経過を1時間ごとの観察を今後予定している。また、向かい合った細胞膜に見られた高電子密度の粒子は何か融合に関わる構造的基盤を示している可能性がある。

D-3. 絨毛癌細胞に発現するGタンパクレセプター

同じ絨毛癌細胞でも、種類が違っていると発現しているコレセプターの種類に違いが見られ、また発現量も異なっている。実際の胎盤での発現とその量は興味のあるところである。また垂直感染がこのようなコレセプターを介して行われるかは、ウイルスのコレセプターユースの研究と共に今後の研究課題である。

E. 結論

E-1. ベトナムにおける妊産婦のHIVの分子疫学

抗体陽性11サンプル中8サンプルがPCRでHIV陽性であった。また陽性サンプルのすべてがサブタイプCRF01_AEであった。

E-2. HeLa/KS386とHeLa/T4の巨細胞形成の電子顕微鏡観察

細胞の融合にかかる時間は110分では足りない事が分かった。また細胞膜間に30nmの大きさの高電子密度の粒子が観察された。

E-3. 絨毛癌細胞に発現するGタンパクレセプター

C5a receptor、CCR7、CCR9/CCR10、RDC1は三つの細胞に発現していることが確認された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

Yagy F, et al. Determination of HIV-1 subtypes (A-D, G, CRF01_AE) by PCR in the transmembrane region (gp41) with novel primers. *J Med Virol* 76 : 16-23, 2005.

Phan TG, et al. Etiologic agents of acute gastroenteritis among Japanese infants and children: virus diversity and genetic analysis of sapovirus. *Arch Virol* In press

Hansman GS, et al. Characterization of polyclonal antibodies raised against five virus-like particles. *Arch Virol* In press

Oka T, et al. Proteolytic processing of sapovirus ORF1 polyprotein. *J Virol* In press

Phan TG, et al. A novel RT-multiplex PCR for enteroviruses, hepatitis A and E viruses and influenza A virus among infants and children with diarrhea in Vietnam. *Arch Virol* In press

Li L, et al. Molecular Epidemiology of Adenovirus Infection among Pediatric Population with Diarrhea in Asia. *Microbiol Immunol* 49(2):121-128, 2005

Phan TG, et al. Genetic diversity of sapovirus in fecal specimens from infants and children with acute gastroenteritis in Pakistan. *Arch Virol* 150(2):371-377, 2005

Yan H, et al. Outbreak of acute gastroenteritis associated with group A rotavirus and genogroup I sapovirus among adults in a mental health care facility in Japan. *J Med Virol* 75(3):475-481, 2005

Hansman GS, et al. Viral gastroenteritis in Mongolian infants. *Emerg Infect Dis* 11(1): 180-182, 2005

Hansman GS, et al. Cross-reactivity among sapovirus recombinant capsid proteins. *Arch Virol* 150(1):21-36, 2005

Li L, et al. Characterizations of adenovirus type 41 isolates from children with acute gastroenteritis in Japan, Vietnam, and Korea. *J Clin Microbiol* 42(9):4032-4039, 2004

Phan TG, et al. Virus diversity and an outbreak of group C rotavirus among infants and children with diarrhea in Maizuru city, Japan during 2002-2003. *J Med Virol* 74(1):173-179, 2004

Yan H, et al. Development of RT-multiplex PCR assay for detection of adenovirus and group A and C rotaviruses in diarrheal fecal specimens for children in China. *Kansenshogakuzasshi* 78(8):699-709, 2004

Hansman GS, et al. Detection of norovirus and sapovirus infection among children with

gastroenteritis in Ho Chi Minh City, Vietnam. Arch Virol 149(9):1673-1688, 2004

Phan TG, et al. Human astrovirus, norovirus (GI, GII), and sapovirus infections in Pakistani children with diarrhea. J Med Virol 73(2):256-261, 2004

Okitsu-Negishi S, et al. Molecular epidemiology of viral gastroenteritis in Asia. Pediatr Int 46(2):245-252, 2004

Ushijima H and Eshita Y. Foreward: Molecular epidemiology of viral infection in Asia. Pediatr Int 46(2):202-206, 2004

Sakamoto T, et al. Establishment of an HIV cell-cell fusion assay by using two genetically modified HeLa cell lines and receptor gene. J Virol Methods 114:159-166, 2004

Hansman GS Genetic diversity of Norovirus and Sapovirus in hospitalized infants with sporadic cases of acute gastroenteritis in

Chiang Mai, Thailand. J Clin Microbiol 42:1305-1307, 2004

Adhikary AK, et al. Characterization of hexon and fiber genes of a novel strain of adenovirus involved in epidemic keratoconjunctivitis. J Clin Pathol 57:95-97, 2004

Tran TTH, et al. Genotypic C of hepatitis B virus can be classified into at least two subgroups. J Gen Virol 85 :283-292, 2004

Tran TTH, et al. Characteristics of core promoter and precore stop codon mutants of hepatitis B virus in Vietnam. J Med Virol 74:228-236, 2004

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表1 絨毛癌細胞に発現するGタンパクレセプター

gene	BeWo	JEG-3	JAR
C5a	+	±	+
CCR7	++	±	++
CCR9/CCR10	++	++	++
CXCR4	+	+	-
CXCR5/BLR1	-	+	+
GPR5	±	-	±
RDC1	++	++	++

±,faint ; +,weak ; ++,strong ; -,not detected



図1.A HeLa/KS386とHeLa/T4の巨細胞形成の電子顕微鏡写真

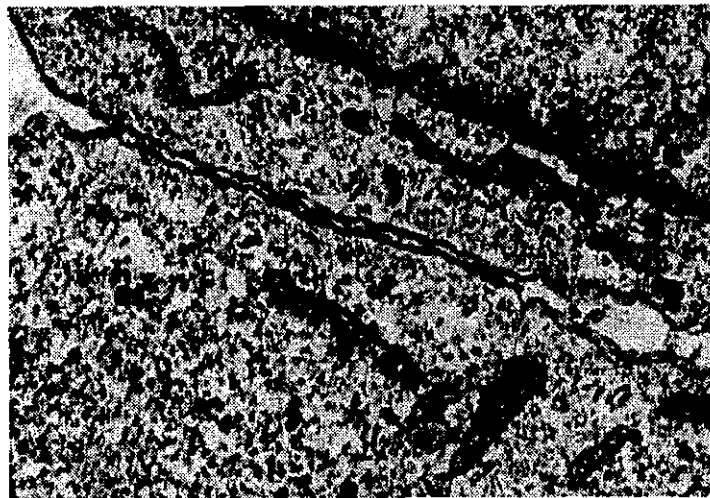


図1.B HeLa/KS386とHeLa/T4の巨細胞形成の電子顕微鏡写真
(接合部を拡大)

研究成果の刊行に関する一覧表

1. Takakuwa K, Kashima K, Suzuki M, Fujita K, Tamura M, Kaneko S, Kato S, Hanabusa H, Tanaka K: Studies on the IVF-ET for discordant couples where the man is HIV positive and the women is negative using sperm washing technique and highly sensitive PCR method. The Proceedings of the IX Congress of the International Society of Reproductive Immunology, 107-111, Medimond, S.r.l., Bologna, Italy, 2004
2. 高桑好一, 田中憲一: 検査値をどう読むか。 -産婦人科診療へのアプローチ- II 感染症 4 HIV 産科と婦人科, 71:56-59, 2004
3. 木内英, 花房秀次.: 必携今日の生殖医療, 精液中 HIV の完全除去法 産婦人科治療 309-314, 2004 増刊
4. Miyake A, Enose Y, Ohkura S, Suzuki H, Kuwata T, Shimada T, Kato S, Narayan O, Hayami M: The quantity and diversity of infectious viruses in various tissues of SHIV-induced monkeys at the early and AIDS stages. Arch Virol 149, 943-955, 2004.
5. 和田誠司, 左合治彦, 松本隆万, 川口里恵, 杉本公平, 尾見裕子, 林 聡, 小澤伸晃, 藤井絵理子, 塚原優己, 久保隆彦, 北川道弘, 田中忠夫, 名取道也: 妊娠中期胎児超音波スクリーニング検査による胎児異常検出率. 日本周産期・新生児医学会雑誌 2004; 40(1):24-27 4月
6. 名取道也: 双胎間輸血症候群. 日本医師会雑誌 2004; 132 (5):663 9月
7. Yagyu F, Okitsu S, Tanamoto K, Ushijima H: Determination of HIV-1 subtypes (A-D, G, CRF01_AE) by PCR in the transmembrane region (gp41) with novel primers. J Med Virol 76:16-23, 2005.
8. Phan TG, Nguyen TA, Yan H, Okitsu S, Ushijima H: A novel RT-multiplex PCR for enteroviruses, hepatitis A and E viruses and influenza A virus among infants and children with diarrhea in Vietnam. Arch Virol published online January 13, 2005.
9. Li L, Phan TG, Nguye TA, Kim KS, Seo JK, Shimizu H, Suzuki E, Okitsu S, Ushijima H: Molecular Epidemiology of Adenovirus Infection among Pediatric Population with Diarrhea in Asia. Microbiol Immunol 49(2):121-128, 2005
10. Phan TG, Okame M, Nguyen TA, Nishio O, Okitsu S, Ushijima H: Genetic diversity of sapovirus in fecal specimens from infants and

children with acute gastroenteritis in Pakistan. *Arch Virol* 150(2):371-377, 2005

11. Yan H, Abe T, Phan TG, Nguyen TA, Iso T, Ikezawa Y, Ishii K, Okitsu S, Ushijima H: Outbreak of acute gastroenteritis associated with group A rotavirus and genogroup I sapovirus among adults in a mental health care facility in Japan. *J Med Virol* 75(3):475-481, 2005

12. Hansman GS, Kuramitsu M, Yoshida H, Katayama K, Takeda N, Ushijima H, Surenkhand G, Gantulga D, Kuroiwa C: Viral gastroenteritis in Mongolian infants. *Emerg Infect Dis* 11(1): 180-182, 2005

13. Hansman GS, Natori K, Oka T, Ogawa S, Tanaka K, Nagata N, Ushijima H, Takeda N, Katayama K: Cross-reactivity among sapovirus recombinant capsid proteins. *Arch Virol* 150(1):21-36, 2005

14. Li L, Shimizu H, Doan LTP, Tung PG, Okitsu S, Nishio O, Suzuki E, Seo JK, Kim KS, Muller WEG, Ushijima H: Characterizations of adenovirus type 41 isolates from children with acute gastroenteritis in Japan, Vietnam, and Korea. *J Clin Microbiol* 42(9):4032-4039, 2004

15. Phan TG, Nishimura S, Okame M, Nguyen TA, Khamrin P, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H: Virus diversity and an outbreak of group C rotavirus among infants and children with diarrhea in Maizuru city, Japan during 2002-2003. *J Med Virol* 74(1):173-179, 2004

16. Yan H, Nguyen TA, Phan TG, Okitsu S, Yan LI, Ushijima H: Development of RT-multiplex PCR assay for detection of adenovirus and group A and C rotaviruses in diarrheal fecal specimens for children in China. *Kansenshogakuzasshi* 78(8):699-709, 2004

17. Hansman GS, Doan LTP, K Nguyen TA, Okitsu S, Katayama K, Ogawa S, Natori K, Takeda N, Kato Y, Nishio O, Noda M, Ushijima H: Detection of norovirus and sapovirus infection among children with gastroenteritis in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Arch Virol* 149(9):1673-1688, 2004

18. Phan TG, Okame M, Nguyen TA, Maneekarn N, Nishio O, Okitsu S, Ushijima H: Human astrovirus, norovirus (GI, GII), and sapovirus infections in Pakistani children with diarrhea. *J Med Virol* 73(2):256-261, 2004

19. Okitsu-Negishi S, Nguyen TA, Phan TG, Ushijima H: Molecular epidemiology of viral gastroenteritis in Asia. *Pediatr Int* 46(2):245-252, 2004

20. Ushijima H, Eshita Y: Foreward: Molecular epidemiology of viral

infection in Asia. *Pediatr Int* 46(2):202-206, 2004

21. Hansman GS, Katayama K, Maneekarn N, Peerakome S, Khamrin P, Tonusin S, Okitsu S, Nishio O, Takeda N, Ushijima H: Genetic diversity of Norovirus and Sapovirus in hospitalized infants with sporadic cases of acute gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand. *J Clin Microbiol* 42:1305-1307, 2004

22. Adhikary AK, Inada T, Numaga J, Suzuki E, Ushijima H, Banik U, Mukoyama A, Matsuno S: Characterization of hexon and fiber genes of a novel strain of adenovirus involved in epidemic keratoconjunctivitis. *J Clin Pathol* 57:95-97, 2004

23. Tran TTH, Ushijima H, Quang VX, Khin MW, Pairoj L, Kikuchi K, Sata T, Abe K: Genotype C of hepatitis B virus can be classified into at least two subgroups. *J Gen Virol* 85: 283-292, 2004

24. Tran TTH, Ushijima H, Quang VX, Trinh TN, Hayashi S, Sata T, Abe K: Characteristics of core promoter and precore stop codon mutants of hepatitis B virus in Vietnam. *J Med Virol* 74:228-236, 2004

Studies on the IVF-ET for Discordant Couples Where the Man is HIV Positive and the Woman is Negative Using Sperm Washing Technique and Highly Sensitive PCR Method

K. Takakuwa¹, K. Kashima¹, M. Suzuki¹, K. Fujita¹, M. Tamura¹, S. Kaneko², S. Kato³, H. Hanabusa⁴ and K. Tanaka¹

¹*Department of Obstetrics and Gynecology, Niigata University School of Medicine, Niigata, Japan*

²*Department of Obstetrics and Gynecology, Tokyo Dental College, Tokyo, Japan*

³*Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Keio University, Tokyo, Japan*

⁴*Department of Hematology, Ogikubo Hospital, Tokyo, Japan*

Summary

Thirteen discordant couples, where the man is HIV positive and the woman is negative, were enrolled into this study. The spermatozoa were separated from semen samples from HIV-positive husband by discontinuous Percoll gradient centrifugation and the swim up method. The HIV-1 RNA and proviral DNA were measured using a highly sensitive PCR twice, i.e., before the fertilization and before the transfer of fertilized eggs to the wives, and confirmed the almost complete elimination of HIV from the samples. So far, 10 women underwent 10 times of embryo-transfer. All of 10 women conceived (100%), and all pregnancy continued without early abortion, and all of them gave birth to HIV-negative infants. All of the wives remained HIV-negative through the study period. Such data strongly indicates that the technology may allow discordant couples, where the man is HIV positive and the woman is negative, to conceive more safely.

Introduction

Recently, people infected with human immunodeficiency virus (HIV)

are living longer and experiencing improved health, especially, the application of highly active antiretroviral therapy (HAART) has greatly improved survival in HIV-infected patients (1, 2). It is said that patients infected with HIV who has access to the treatment can expect to live for at least 20 years from the time of diagnosis. Consequently an increasing number of couples discordant with respect to HIV-infection are seeking safe ways to have children. In this study, we applied IVF-ET technique for discordant couples where the man is HIV positive and the woman is negative, using sperm washing technique and a highly sensitive PCR method.

Materials and Methods

Information of this modality to the patient couples: Firstly, the patients visited to Ogikubo Hospital and the condition of HIV infection of the husband was assessed, and were also informed the detail of this treatment by one of the doctors in this study group (H.H) and a counsellor. After the patients couple revealed the first desire for this treatment, they visited to Niigata University Hospital, and they again were informed the detail of this treatment by another doctor in this study group (Ko.T.) and a counsellor. The explanation consisted of (1) the detail of the procedure of the ovulation induction, the oocyte retrieval, and the embryo transfer as well as the risks of these procedures, (2) the protocol for confirming the elimination of HIV virus from husband's semen. The risk of the secondary HIV infection to both mother and fetus, if the wife would conceive, was also sufficiently announced. After the patients revealed the final decision undergoing this treatment and gave the consent to this treatment, the treatment started. The approval of ethical committee of Niigata University School of Medicine was obtained.

Patient Couples: Thirteen couples, who were discordant couples where the man is HIV positive and the woman is negative, were enrolled into this study. The age of the wives ranged from 21 to 40 with the mean of 29.5 years old.

The protocol for IVF-ET using sperm washing technique and a highly sensitive PCR method. (Figure 1): The spermatozoa were separated from semen samples from HIV-positive husband by discontinuous percoll gradient centrifugation and the swim up method. The HIV-1 RNA and proviral DNA were measured by a highly sensitive PCR which was developed by Kato et al. (3). The oocytes obtained from the HIV-negative wife were fertilized in vitro with the spermatozoa of her husband, after confirming that the HIV-1 could not be detected in the washed semen samples by the highly sensitive PCR. The fertilized eggs were cultured for two days, and transferred in utero after the negative

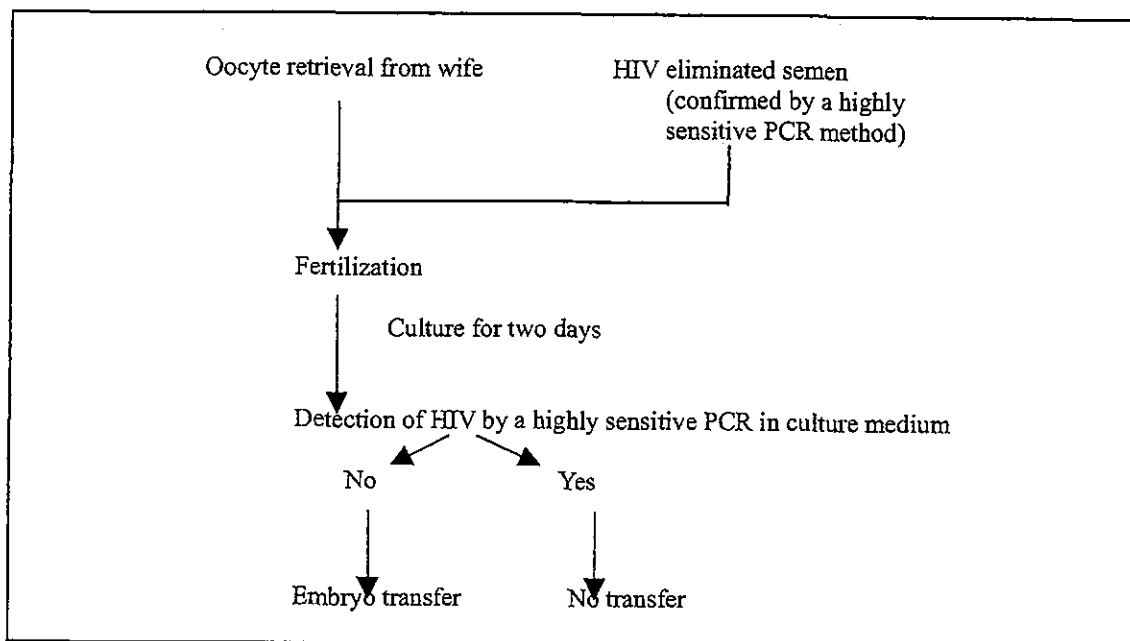


Figure 1 Protocol for the IVF-ET for Discordant Couples Where the Man is HIV Positive and the Woman is Negative Using Sperm Washing Technique and Highly Sensitive PCR Method

result was obtained by the highly PCR procedure in the medium for fertilized eggs.

Follow-up of wives: The serum samples for HIV DNA and antibody were obtained serially after the embryo transfer for three months. If the women became pregnant, the usual prenatal care was offered.

Results

Thirteen couples were enrolled into this study, and 12 women underwent 15 times of ovulation induction. Of 12 patients, one patient underwent twice of ovulation induction, and another one patient underwent three times of ovulation induction. Remaining 10 patients underwent once of induction. So far, the fertilized eggs were obtained in 10 women and embryo transfer was performed in all 10 women after confirming that the HIV-1 could not be detected in the culture medium of fertilized eggs. All of these 10 women conceived (100%), and all pregnancy continued without early abortion, and all of them gave birth to HIV-negative infants. All of the women remained HIV-negative through the study period.

Conclusion

Heterosexual transmission of the virus is not so high, but a risk does

exist. Areneta et al. reported that the risk of transmission with insemination using non-washed semen from an infected man is 3.52% (95% confidence interval, 1.55-7.41%) (4). European Study Group on Heterosexual Transmission of HIV reported the seroconversion rate of 4.8 per 100 person-years among couples who used condoms inconsistently (5). For HIV discordant couples where the man is positive and the woman is negative, a technique known as "sperm washing" is a way to further reduce the risk of transmission. Semprini et al. reported that the sperm can be combined with ova from the female partner using in vitro fertilisation (IVF) techniques or direct injection of the sperm into a selected oocyte-intracytoplasmic sperm injection (ICSI) after washing of semen (6). They also reported that three hundred children have been born without seroconversions in children or uninfected partners since the technique has been offered (7). And now, sperm washing with IVF or ICSI is routinely offered by centers in Italy and Spain, and a protocol for the treatment of HIV discordant couples using their own gametes has now been developed in Australia (8).

However, the procedure, which confirmed the complete elimination of HIV from the semen samples obtained from HIV-positive man and the medium of fertilized eggs, was not applied in these protocols, and the safer protocol needs to be established. In fact, it is not readily available in the United States, because a woman seroconverted after being inseminated with her husband's sperm. The US Center for Disease Control has been reluctant to support future trials until the procedure can be proved safe, although it has not been proven that it was the insemination techniques that caused the infection in the woman (9, 10). In this context, we adopted the highly sensitive PCR method in two occasions during the treatment, i.e., before the fertilization and before the transfer of fertilized eggs to the wives. And we confirmed the almost complete elimination of HIV from the both samples (washed semen samples and culture medium of fertilized eggs). We consider that HIV discordant couples should be given access to "sperm washing" and IVF technique, if they desire safer pregnancy. And the technology employed in this study is considered to offer the most promising results to the discordant couples, who wish to conceive more safely.

References

- 1) Hogg RS, O'Shaughnessy MV, Gatarić N, et al. Decline in deaths from AIDS due to new antiretrovirals [letter]. *Lancet*, 349, 1294, 1997.
- 2) Palella FJ, Delaney KM, Moorman AC, et al. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med*, 338, 853-860, 1998.
- 3) 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*, 14, 1611-1616, 2000.

- 4) Areneta MR, Mascola L, Eller A, et al.: HIV transmission through donor artificial insemination. *J Am Med Assoc*, 273, 854-858, 1995.
- 5) European Study Group on Heterosexual Transmission of HIV: A longitudinal study of human immunodeficiency virus transmission by heterosexual partners. *N Engl J Med*, 331, 341-346, 1994.
- 6) Semprini AE, Levi-Setti P, Bozzo M, et al. Insemination of HIV negative women with processed semen of HIV positive partners. *Lancet*, 340, 1317-1319, 1992.
- 7) Gilling-Smith C, Smith RJ, Semprini AE. [editorial] HIV and infertility: time to treat. *Brit Med J*, 322, 566-567, 2001.
- 8) Baker HWG, Mijch A, Garland S, et al. Use of ART to reduce the risk of transmission in HIV discordant couples wishing to have their own children: male seropositive with undetectable viral load. *J Med Ethics*, 29, 315-320, 2003.
- 9) Anonymous. HIV 1 infection and artificial insemination with processed semen. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 39, 249-256, 1990.
- 10) ASRM (American Society for Reproductive Medicine) Ethics Committee. Human immunodeficiency virus and infertility treatment. *Fertil Steril*, 77, 218-222, 2002.

**International Proceedings of IX International Congress of
Reproductive Immunology**

Editors: Tsunehisa Makino, Tositaka Sugi

Published by Medimond S.r.l., Bologna, Italy, October, 2004

II. 感染症

4. HIV

新潟大学大学院医歯学総合研究科 (産婦人科) たかくわこういち たなかけんいち
高桑好一, 田中憲一

はじめに

1982年, 米国のCDCにより, AIDS (後天性免疫不全症候群) の症例が報告されて以来, アフリカ, アジアなどを中心に世界的な広がりを見せ, 2000年における死亡者数は300万人にのぼるといわれている。わが国においては, AIDS患者およびAIDSの原因ウイルスであるHIV (Human Immunodeficiency Virus, ヒト免疫不全ウイルス) 感染患者の絶対数は諸外国に比べ多くないものの, 患者数は漸増傾向にあり, 2010年には5万人を超えると推計されている。産婦人科領域においては, 各種性感染症患者に対するHIV検査, 妊婦健診時の検査としてのHIV抗体検査が推奨されている。とくに後者については, 出生する児への垂直感染を防ぐという意味からも重要なものである。本稿においては, HIV感染症とHIV関連検査の実際について解説する。

HIV感染症の経過と

HIV抗体スクリーニング検査の重要性

HIV感染症の臨床経過は, 以下のような3期に分類され, 進行していく¹⁾。

1. 感染初期 (急性期)

HIVに感染後, 体内で急速に増殖する。感染機会があった6~8週間後に70~80%の患者には発熱, 倦怠感, 筋肉痛といったインフルエンザ類似の症状が認められる。このような症

状は一過性で消失する。

2. 無症候期 (無症候性キャリア期)

急性症状が消失した後, ウイルスは増殖を繰り返す。宿主の免疫的な抵抗性により症状のない期間が長期にわたり続くことが多い (長期の潜伏期)。しかし, この無症候性キャリアの間でも, HIVは1日100億個前後という割合で増殖し, CD4陽性Tリンパ球はHIVに感染し, その平均寿命は2.2日とされる。

3. ARCあるいはAIDS発症期

無治療では感染後5~10年の経過で, ウイルスの増殖能が宿主の免疫能に優るようになり, 血中ウイルス量 (HIV-RNA量) の増加に伴い, CD4陽性リンパ球数が減少する。やがて, 全身のリンパ節腫脹, 下痢, 発熱, 体重減少, 倦怠感, 口腔カンジダ症などを伴う, いわゆる「エイズ関連症候群 (AIDS-related complex ; ARC)」の状態となる。さらに免疫能が高度に障害された場合, 免疫不全状態となって, カリニ肺炎などの日和見感染症, カポジ肉腫などの悪性腫瘍, HIV脳症などを発症してくる。この病態がエイズ (Acquired Immunodeficiency Syndrome ; AIDS) であり, 生命に危険を及ぼすようになる。

以上がHIV感染後の経過であるが, 上記の経過のなかで, 臨床症状からHIV感染を診断する (あるいは疑う) ことのできる時期は感染初期と, ARCになってからであり, このことが臨床における大きな問題である。しかも感染

初期には抗体検査により陽性を示さないことがあり、また、単にインフルエンザ様の症状では、HIV 抗体検査を行わない可能性もある。

HIV 感染の可能性のある患者が一般病院を受診する契機を進行期別に表 1 に示した²⁾。産婦人科領域では、クラミジア、淋菌、梅毒、外陰部ヘルペス、治療抵抗性を示すカンジダ感染などを診断することは多く、これらの患者に対し、積極的に HIV 抗体検査を実施することが重要であるが、その理由として以下のようなことがあげられる³⁾。

HIV 抗体検査により、HIV 感染が判明した場合、各種抗 HIV 薬の服用により、無症候キャリアの状態をより長期にわたり保つことが可能となる。また、性感染症でもある HIV 感染は、1 人の HIV 感染者の発見により、そのパートナーの感染の有無を確認することが可能であり、陰性であれば、コンドームの使用などの「安全なセックス」の指導により二次感染を未然に防ぐことが可能である。

また、妊娠初期の感染症検査の一つとして、HIV 抗体検査を行うことも重要である。HIV 抗体陽性妊婦については、妊娠期間中抗 HIV 薬を服用し、陣痛発来前に帝王切開術を行うこ

とにより、児への垂直感染を 2% 以下に低下させることが可能であることが示されている⁴⁾。HIV 感染妊婦に対し対策の講じられていないアフリカ諸国での垂直感染の割合は 20 ~ 40% といわれており、妊娠初期に HIV 抗体検査を行うことの重要性を示している。

われわれが、産婦人科診療所施設を対象として行ったアンケート調査では、妊娠初期における HIV 抗体検査の実施率はいまだ低いものであり、今後、実施率を増加させるような方策が必要であるものと判断される⁵⁾。

ただし、HIV 抗体のスクリーニング検査に当たっては、十分な説明を行い、同意を得てから実施する必要があることは当然のことである。

■ HIV 感染の診断

HIV 感染の診断は最初に HIV 抗体検査により行われるが、酵素抗体法 (ELISA 法) あるいは粒子凝集法 (PA 法) により行われる。これらが陰性であれば、HIV 感染は否定されるが、感染のリスクが高く、感染初期の可能性が考えられる場合には、数週間後に再度の抗体検査が必要である。

ELISA 法または PA 法による HIV 抗体検査が陽性的場合にはウェスタンブロット法 (WB 法)、核酸増幅法 (polymerase chain reaction ; PCR 法) を実施する。HIV には HIV-1 と HIV-2 の 2 種類があり、HIV-1 感染が主であるが、一般には両者同時の抗体検査が行われる。

より鋭敏な抗体検査が WB 法であるが、HIV-1 の WB 法では、HIV 抗原蛋白質の gag (p 55, p 25, p 18), pol (p 68, p 52, p 34), env (gp 160, gp 110, gp 41) に対する特異抗体が検出されるが、2 本以上の env バンドが検出された場合に陽性と判断される。WB 法の判定基準を表 2 に示した。

HIV の抗原検査は核酸増幅法 (PCR 法) に

表 1 HIV 感染者が一般病院を受診する契機となる症状

初感染期	発熱、全身倦怠感、インフルエンザ様症状
無症候 キャリア期	一般的な各種性感染症 (クラミジア、淋菌、梅毒、外陰ヘルペス)、反復性のカンジダ症、帯状疱疹、急性 B 型肝炎、A 型肝炎、赤痢アメーバ、結核、口腔カンジダ症、伝染性軟属腫など
エイズ (ARC を含む)	上記に加え カリニ肺炎、トキソプラズマ脳症、クリプトコッカス髄膜炎、食道カンジダ症 原因不明の発熱、下痢、体重減少 他エイズ指標疾患

より行われる。血液中の HIV は RT-PCR 法で検査され、HIV-RNA を逆転写酵素 (RT) により DNA に転写し測定し、その量はコピー数/ml で表わされる。この検査は確認検査としても行われるが、HIV 感染者の病態の進展、治療開始時期の決定および治療の経過観察などに用いられる。核酸増幅の定量法には通常の定量法と高感度定量法があり、通常の定量法では測定範囲は $4.0 \times 10^2 \sim 7.5 \times 10^6$ コピー/ml であ

り、高感度定量法では $5.0 \times 10^1 \sim 1.0 \times 10^5$ コピー/ml である。HIV 感染者の病勢把握においては、通常の定量法で 4.0×10^2 コピー/ml 未満となった場合、高感度定量法を実施することが臨床的に有用とされている。

確認検査の判定であるが、WB 法が陽性である場合、核酸増幅法が陽性である場合はもちろん、検出感度未満であっても HIV 感染と判定される。WB 法が判定保留あるいは陰性であっても核酸増幅法が陽性的場合には、感染初期の可能性が高いので、数週間後に再度検査を行い、WB 法を再検査することが必要である。WB 法が判定保留または陰性で、核酸増幅法が検出感度未満の場合には陰性と判定されるが、感染のリスクが高く、感染初期の可能性が考えられる場合には、数週間後の再検査が望ましい。

HIV はリンパ球中の CD4 陽性細胞 (ヘルパー-インデューサー T 細胞) に感染し、その機能を破壊する。そこで、HIV 感染者に対する治療の選択に当たっては、CD4 陽性細胞数

表2 HIV-1 に関するウェスタンブロット (WB 法) の解釈 (WHO 判定基準)

陽性:	env バンドが 2 本以上検出された場合
陰性:	HIV 抗原に対するバンドが検出されない場合
判定保留:	HIV 抗原に対するバンドが検出されるが、陽性の判定基準に一致しない場合 (HIV 感染の疑いがある場合には数週間後の再検査が必要)

表3 未治療患者に対する抗 HIV 療法の開始基準 (推奨)

臨床症状*がある場合		
CD4 陽性リンパ球数・血中ウイルスの数値にかかわらず		治療開始
臨床症状*がない場合		
CD4 陽性リンパ球数 (/mm ³)	治療開始に際し考慮すべき項目	
≤ 200		治療開始
200 ~ 350	CD4 陽性リンパ球数の減少速度が速い場合 *** 血中ウイルス量が高い場合 ***	治療開始を考慮** 治療開始を考慮**
> 350		血中ウイルス量が低ければ *** 3 ~ 4 カ月に 1 回程度の検査で経過観察を行う 血中ウイルス量が高ければ *** 検査を頻回 (1 ~ 2 カ月に 1 回程度) 行う

* : AIDS および AIDS に関連する重篤な症状。

** : 患者の状態、服薬アドヒアランスへの意識・理解度、副作用および薬物相互作用なども考慮する。

*** : CD4 陽性リンパ球数の減少速度: > 100/mm³/年の場合を速いと考ええる。

血中ウイルス量: 5 万 ~ 10 万コピー/ml 以下を低い、それ以上を高いと考ええる。

(文献 1 より引用)

が重要である。CD4 陽性細胞数は、抗 CD4 抗体を用いたフローサイトメトリーにより測定され、リンパ球に対する百分率で表される。したがって、白血球数、リンパ球分画の割合、CD4 陽性細胞の割合により、CD4 陽性細胞数が算出される。CD4 陽性細胞は HIV 感染者の治療開始基準として重要であり、その基準を表 3 に示した⁴⁾。

■ おわりに

わが国における HIV 感染は増加傾向にあり、感染爆発が危惧される状況である。性感染症を管理する機会が多い産婦人科領域における HIV 抗体のスクリーニング検査が今後重要性を増すものと考えられる。

■ 文 献

- 1) HIV 感染症治療研究会：HIV 感染症「治療の手引き」第 6 版，2002 年 11 月発行。
- 2) 岡 慎一：ウイルス性感染症の現状とその問

題点—特にその感染伝播における精液の意義について—5. 性感染症としての HIV/AIDS 感染症。化学療法領域 16：2061-2067, 2000.

- 3) 久保隆彦：妊婦スクリーニング検査：感染症の検査 HIV 抗体検査。産と婦 69 (Suppl)：101-104, 2002.
- 4) 平成 14 年度厚生労働科学研究費補助金「妊産婦の STD 及び HIV 陽性率と妊婦の STD 及び HIV の新生児に与える影響に関する研究」班 (主任研究者：田中憲一) 研究報告書，2003 年 3 月。
- 5) 高桑好一・他：産婦人科診療所における妊婦 HIV 抗体検査実施率に関するアンケート調査結果—平成 13 年度厚生労働省エイズ対策研究事業による一日産婦新潟地方部会誌 89：31-34, 2003.

● 著者連絡先

〒 951-8510 新潟市旭町通 1-757
新潟大学大学院医歯学総合研究科
(産婦人科)
高桑好一

§ 7 ART のラボ手技

49. 精液中 HIV の完全除去法

49. Semen processing method for complete elimination of HIV-1

木内 英 花房 秀次
KINAI Ei HANABUSA Hideji

永 井 書 店

必携 今日の生殖医療

§ 7 ART のラボ手技

49. 精液中 HIV の完全除去法

49. Semen processing method for complete elimination of HIV-1

木内 英 花房 秀次

KINAI Ei

HANABUSA Hideji

荻窪病院血液科 (東京都)

Key Words 精液, HIV, 体外受精, 改良 Swim up 法, 超高感度 PCR

治療の進歩にともないエイズ死亡率が減少し, HIV 陽性の夫を持つ夫婦の挙児希望が増えている。Swim up 法により精液中の HIV 量を減らすことが可能となり, EU を中心に Swim up 法による人工授精が広まりつつあるが, ウィルス除去が完全ではなく安全性に疑問が残る。われわれは改良 Swim up 法により精液からの HIV 完全除去法を開発し, 超高感度 PCR でウィルスの完全除去を確認した。現在 HIV 除去精子を用いた体外受精や顕微受精を実施し, 良好な成績をあげている。

背景

AIDS が死の病であったとき, HIV 陽性男性と陰性女性の夫婦が子どもを希望しても妻に 2 次感染させる可能性があり, 挙児をあきらめるよう医療従事者は指導してきた。しかし 1996 年にプロテアーゼ阻害剤 (PI) を含む多剤併用療法 (Highly Active Antiretroviral Treatment: HAART) が導入されて以来, AIDS 死亡率は以前の 20% 以下まで減少し, HIV/AIDS はコントロール可能な慢性感染症になりつつある。長期生存が可能になった HIV 感染者の間で, 結婚して子が欲しいと願う患者が増えている。しかし, 夫婦間で男性のみが HIV 感染者の場合, コンドームを使わない性交渉は妻に二次感染する危険があるため, 挙児をあきらめるケースが多かった。

こうしたなか, 人工授精による二次感染防止の

試みがイタリアを中心に EU 各地で行われている。しかし, ウィルス除去に関して十分な安全性が確認されておらず, アメリカ CDC (Centers for Disease Control and prevention) は今でも禁止勧告を解除していない。HIV に感染した乳幼児の予後はいまだに不良で, 抗 HIV 薬の催奇形性の問題もある。筆者らは母も子も感染させないために HIV 感染者の精液から HIV を完全に除去し, 100% 安全に子ができる方法を開発した¹⁾。

精液中の HIV 存在様式 (図 1)

精液には精漿の HIV-RNA のほかに精子に付着した HIV-RNA が存在し, 精液中の単核球には proviral DNA が検出されている。精液中の HIV で感染力が最も強いのは感染細胞から作られる HIV-RNA である。抗 HIV 療法で血液中のウィルス量 (Viral Load: VL) が検出限界以下になった場合