

200500693A

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17年度 総括研究報告書

主任研究者 田中憲一

平成18年(2006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	10
(3) 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研究	14
厚生労働省科学研究費補助金分担研究報告書	17
酸化チタンによる HIV の経母乳感染の防止に関する基礎的研究	20
研究成果の刊行に関する一覧表	25
研究成果の刊行物・別刷	27

平成 17 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 藤田和之 牧野麻由子 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産婦人科講師 慶應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感染症管理室カウンセラ ー 慶應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孵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。

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50名の患者に対し体外受精・胚移植を実施し、35名で妊娠が成立し、このうち26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るとの結果を

得ている。

#### 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 の改善を求める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育児を希望し、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、精液中での 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。

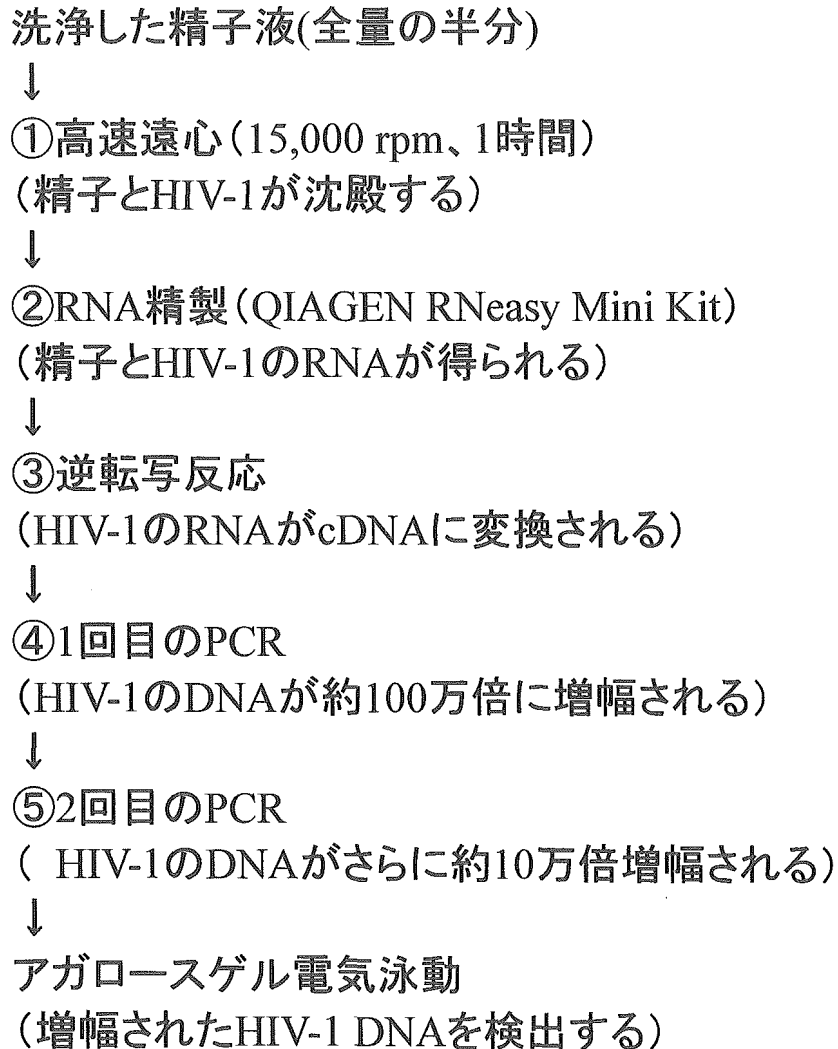
イタリアの Semprini らは現在までに 2000 人以上に Percoll 法, swim up 法により調整された精子浮遊液を用いた人工授精を実施し、二次感染が全くないとの報告を行っている。しかし、彼らの 2 層しか用いない Percoll 法は精液からの HIV 除去が不十分であり、100% 安全とはいえないと考えられる。われわれは、本研究において、安全性を可能な限り高めた体外受精-胚移植法の開発と臨床実施を検討してきたが、本年度においてもさらに症例を重ね、有効性、安全性について検討した。

#### 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



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

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。この後、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**

荻窪病院血液科で治療につき説明, 治療の希望が強く, 患者男性の病状, 精子の状態に問題がない場合新潟大学医歯学総合病院産婦人科を受診



説明書に基づき,  
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  
などにつき詳細に説明



妻の検査(HIV他各種感染症, ホルモン検査, 基礎体温の確認など)を実施



カウンセラーにより, 夫婦個別の意思を確認



患者夫婦の治療に対する意思が強い場合, 夫婦個別に, 再度治療について詳細に説明  
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  
臨床実施へ

(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 of 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。

従来の方法では, 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していた。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) を実施することとしていた。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こととしていた。最近では, 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を主としている。

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。

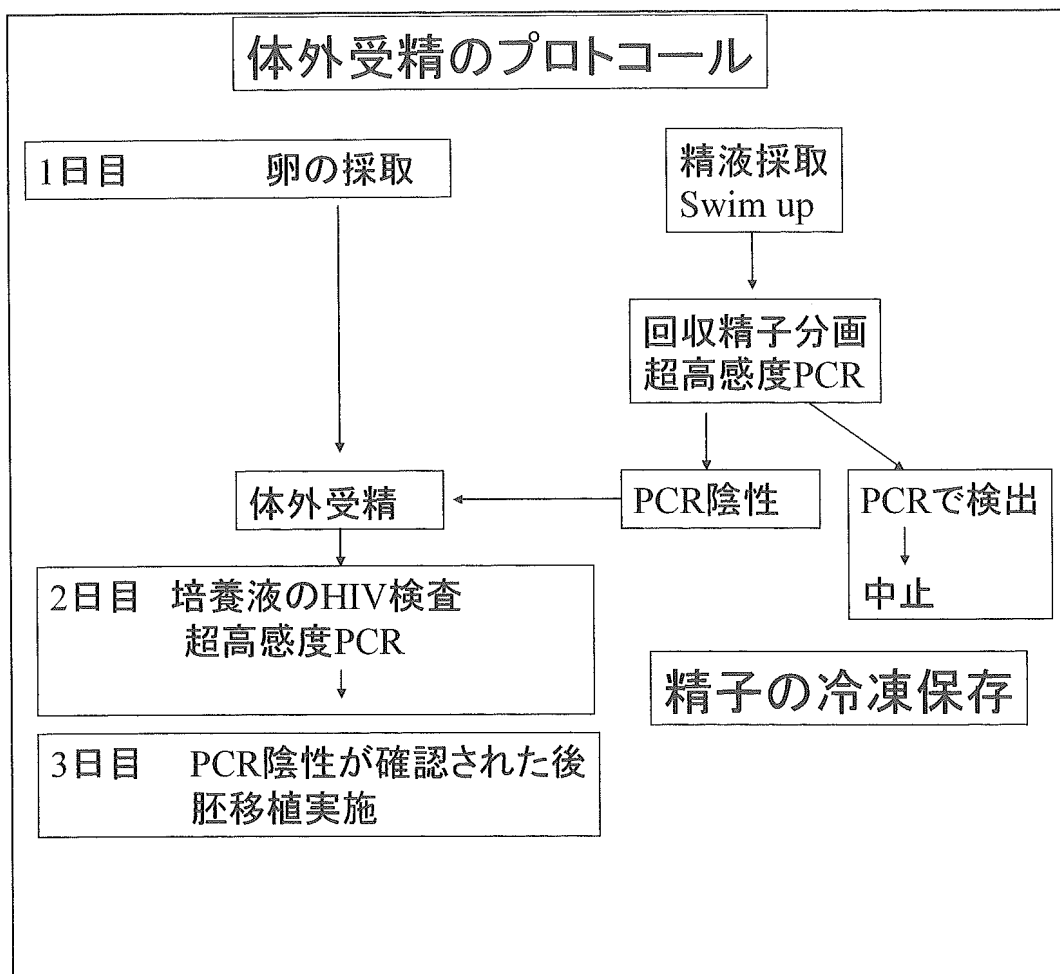
また, 妊娠が成立した場合, 妊娠 12~14 週に, 胎児の感染を確認する目的で, 羊水穿刺の実施が可能であることについて説明し, 施行するか否かの意思の確認を行う。施行について希望があれば, これを実施し, 希望がない場合には実施せず経過を観察することとする。

妊娠中の管理については, 通常 of 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 体外受精・胚移植のプロトコール



(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・胚移植実施症例数を図3に示した。

これまでに、50症例に対し、胚移植を実施し、妊娠成立例は35例であり、初期流産に終わったもの8例、子宮外妊娠 1例であり、26例で妊娠が継続し、対症例当たりの妊娠継続率は 52.0%となってい

る(表2)。また、生児数は33名である

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。

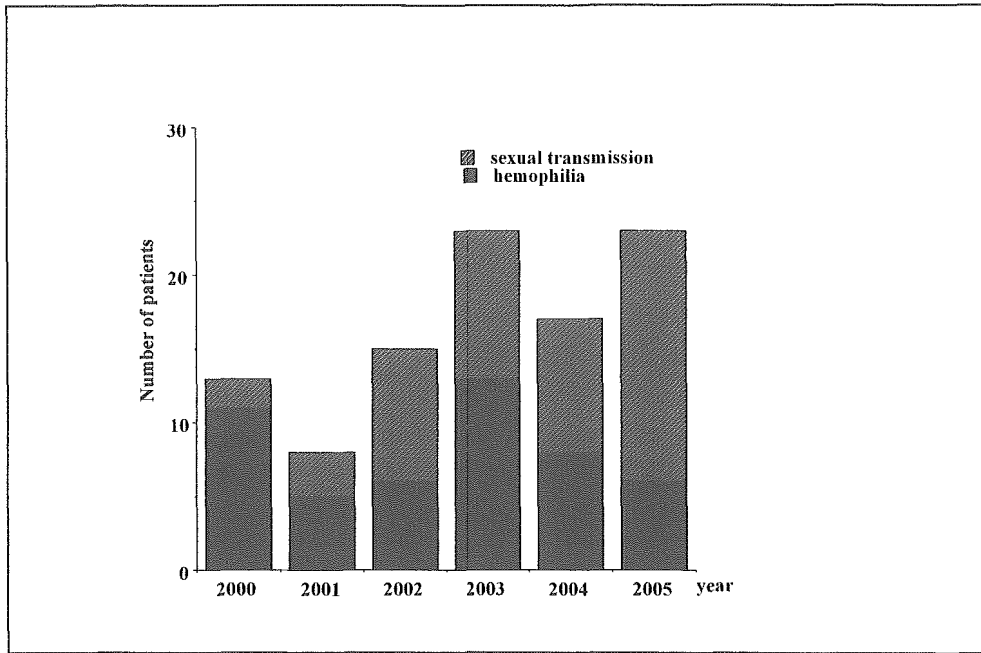


図3 年次別患者数の推移

表2 各施設における実施状況

大学	紹介数	方法	胚移植	妊娠	出産	baby
新潟	22組	IVF	8名	7名	7名	10名
		ICSI	10名	6名	3名	5名
杏林	6組	ICSI	5名	4名	3名	5名
慶應	36組	IVF	0			
		ICSI	27名	18名	9名	13名

## C 考察

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。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。

平成17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 竹山 智 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 新潟大学医歯学総合病院産婦人科 新潟大学大学院医歯学総合研究科産婦人科講師

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：室温（26℃）にて孵置

C群：4℃にて孵置

し、3, 7, 10時間後の精子の運動率、良好精子獲得率を測定した(n=9)。また、4℃にて孵置のち、37℃に孵置した場合も検討した。

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92.1±13%であった。これに対し3時間後、

7時間後、10時間後の運動率はそれぞれ78.9±15.5%、68.5±21.9%、65.5±33.4%であり、調整直後に比較し7時間後、10時間後に有意の低下が認められた(図1)。常温での孵置については、調整直後の運動率92.1±13%に対し、3時間後、7時間後、10時間後の運動率はそれぞれ71.5±14.4%、67.3±11.8%、69.5±16.3%であり、調整直後に比較し3時間後、7時間後に有意の低下が認められた(図2)。

4℃に孵置した場合には、調整直後の運動率92.1±13%に対し、3時間後、7時間後、10時間後の運動率はそれぞれ72.8±15.9%、53.7±16.3%、39.8±7.9%であり、調整直後に比較し3時間後、7時間後、10時間後のいずれも有意の低下が認められた(図3)。

一方、4℃に孵置した後、7時間後から37℃に孵置した場合には運動率が回復する傾向が認められた(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。昨年度も同様の検討を行ったが、今回は症例数を増やし、常温での検討を加えた。また、時間を10時間まで延長して検討した。

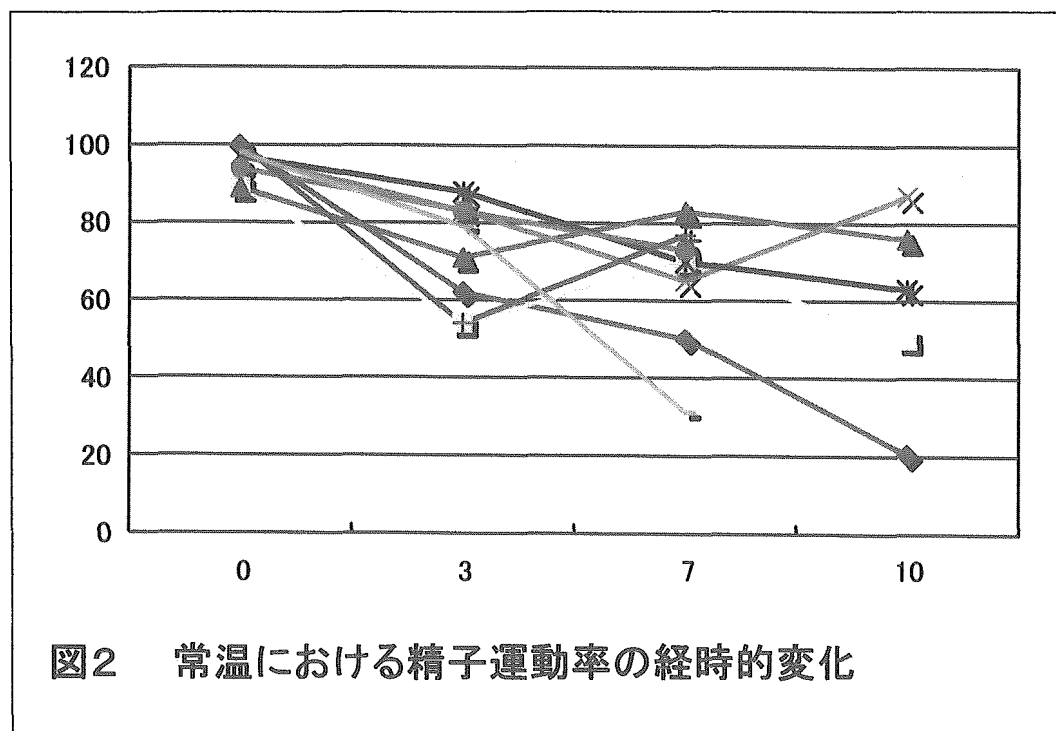
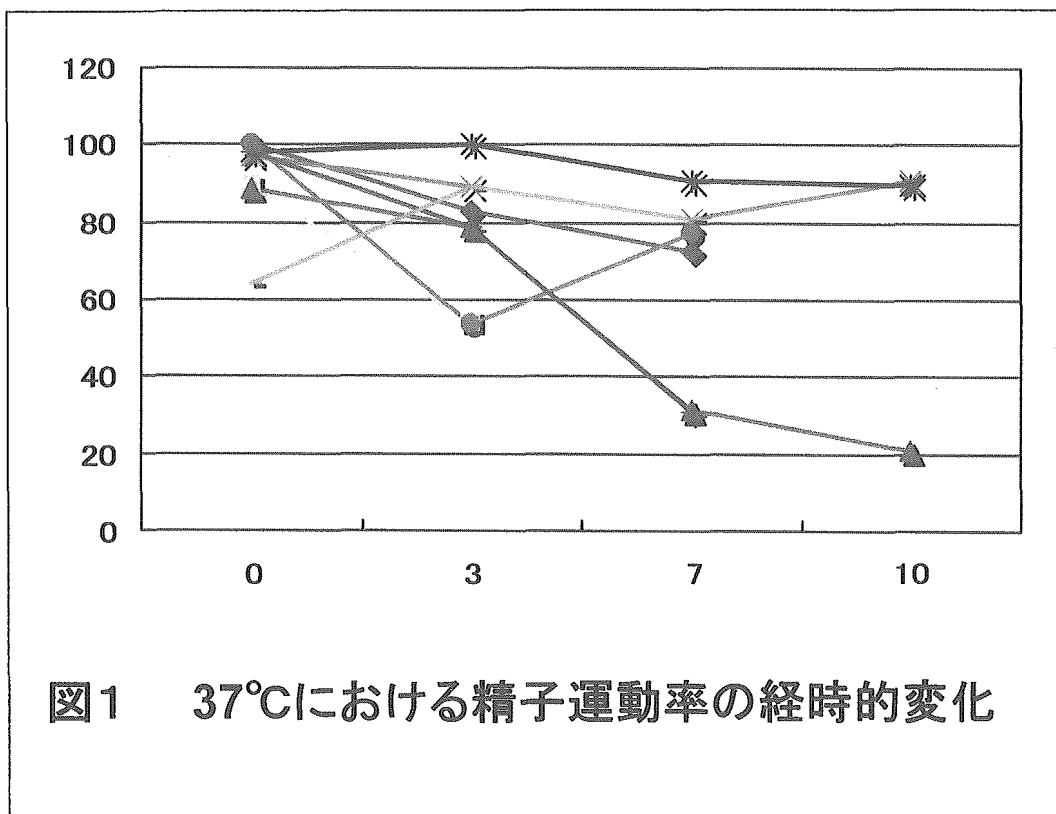
今回の結果は以下のようにまとめることができる。

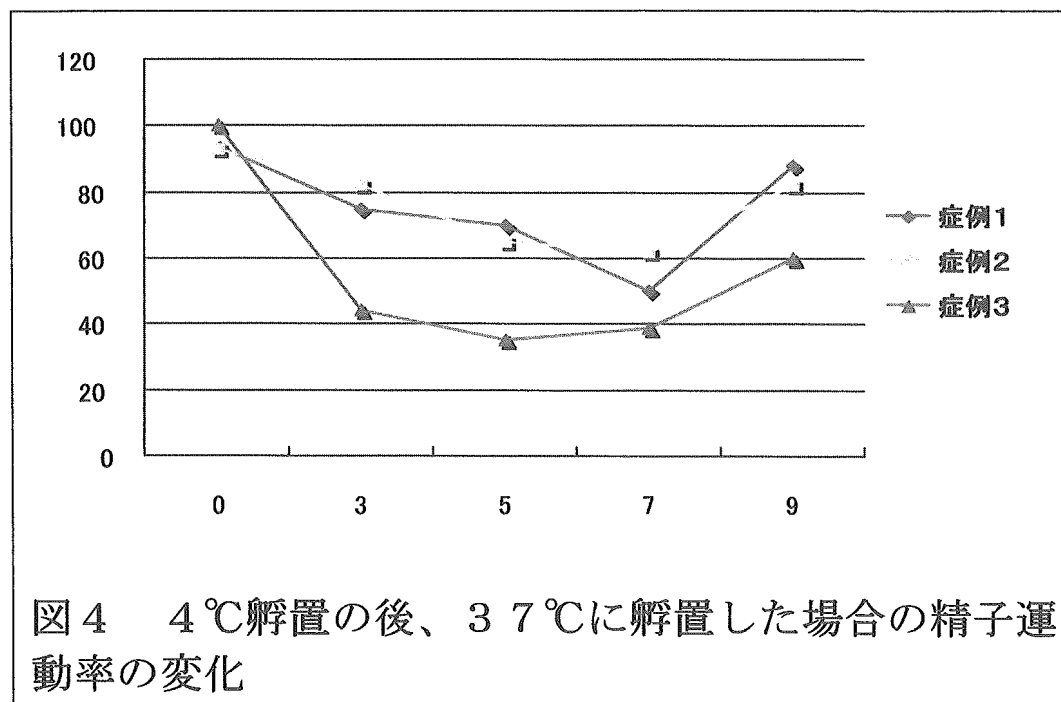
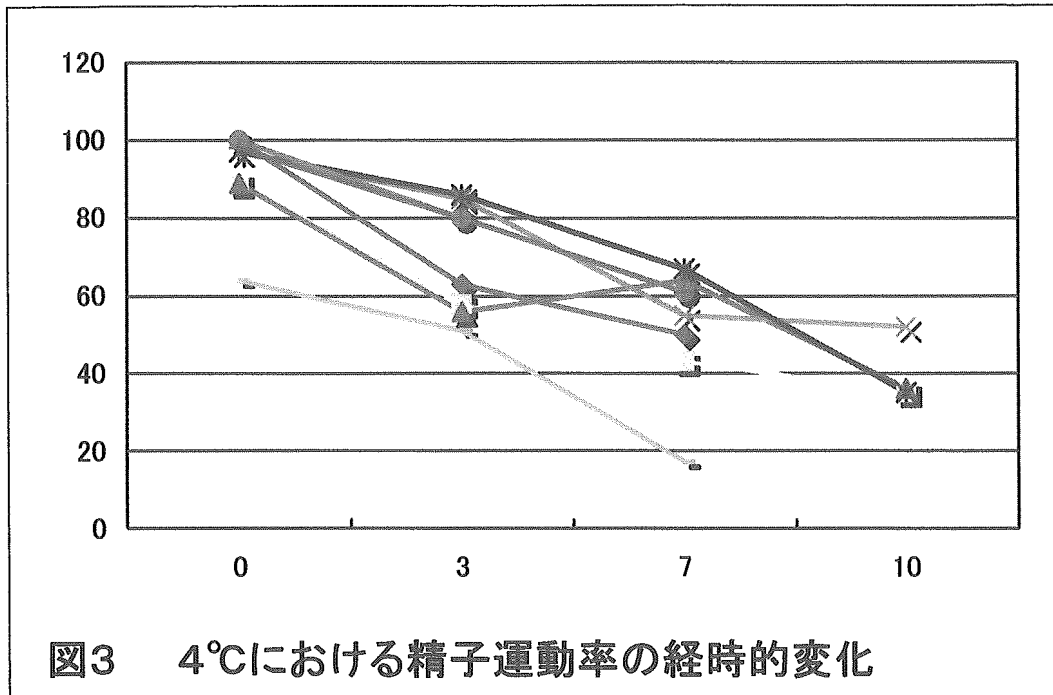
(1) 4℃、常温での孵置は調整後3時間で既に有意な精子運動率低下を認めた。

(2) 37℃の環境では調整後5時間までは有意な精子運動率低下は認められなかった。

(3) 4℃下の孵置で運動性が不良となった精子でも、再び保温することで運動能の回復が認められた。

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℃にて孵置することは、精子の運動率に影響を与えず、また、4℃から37℃に保存温度を変えることで、HIVの検査を複数回実施することにより、AIHが実施可能であることが示唆された。





研究課題名 : 若年婦人における HIV 感染状況および HIV 感染と生殖医療との関連性に関する研究

課題番号 : H15 エイズ 008

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

(3) 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研究

主任研究者名 : 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  
分担研究者名 : 花房 秀次 荻窪病院血液科部長  
研究協力者 : 加藤 真吾 慶應義塾大学微生物学教室・  
免疫学教室助手  
兼子 智 東京歯科大学市川病院産婦人科講師

## 1. 研究目的

HIV 感染男性非感染女性夫婦に対する体外受精-胚移植(IVF-ET)に関する基礎的、臨床的研究であり、妻と子どもへの二次感染を完全に防御すると共にDNA損傷のない精子を選択し体外受精の安全性を高めることを目的とする。HIV感染者における精巣機能低下の原因を明らかにする。さらに、HIV感染や免疫不全及び抗HIV剤の精子DNAに及ぼす検討を行い、異常のない精子回収を検討する。本研究の有用性および安全性を明らかにするとともに、より簡便である人工授精実施に向けた研究を進める。

## 2. 研究方法

HIV 感染男性の精巣機能を評価するために、血中テストステロン、エストロゲン、下垂体ホルモンなどの測定を行った。従来の swim up 法より簡便でウィルス除去効率のよい方法を開発するため、密度勾配遠心分離法においてヨード剤を用いた HIV 分離法を検討した。また、IVF-ET より簡便で患者の負担の少ない人工授精実施のための基礎的検討として、洗浄し

た精子浮遊液を静置した場合の精子の運動率などの変化について検討した。HIV 感染者に対する治療が精子にどのような影響を与えるかを検討するため、電子顕微鏡や特殊染色による検討を行った。

細胞密度を指標とする精子核 DNA 2 重鎖切断陽性精子の排除の検討するために、個々の細胞の DNA 2 重鎖断片化(以下、DSB)を可視化できる single cell pulse field gel electrophoresis (以下、SCPFGE)を開発し、断片化様式の分類を試みるとともに、SCPFGE における泳動像を指標として、DSB 精子の排除を試みた。精子は精製トリプシンを含む 0.7%アガロース、0.7%シーナゲル混合物に懸濁して表面親水化スライドガラス上に薄膜を形成し、さらにその上に保護層を作成した。本研究で、DNA ファイバーと断片化 DNA を同時観察するため、SCPFGE を開発した。すなわち直交する 2 組の電極に 3 秒間ずつ交互に 2.0V/cm 電位勾配で、10 分間通電し、DNA をアガロース内で鍵状に泳動した。泳動後、Syber Gold で DNA 染色して DSB による DNA 断片化像を蛍光観察した。つぎに SCPFGE



における精子泳動像を指標として、DSB 精子の排除を試みた。精子精製は Percoll 沈降速度差遠心法、Nycodenz 沈降平衡法で分離し、最終に swim up 法により運動精子を分離した。Percoll 法で得られた沈澱分画を 15-60% Nycodenz 直線密度勾配に層積して沈降平衡を行った。つぎに Nycodenz 上層に回収された精子をさらに Swim up して得られた運動精子の性状を観察した。

### 3. 研究結果

HIV 感染男性の血中ホルモンバランスを検討したところ、エストロゲン、エストロゲン/テストステロン比や LH 濃度が高いことが判明した。基礎的研究としては、HIV 感染者の精子について電子顕微鏡や特殊染色を用いて検討し、HIV/C 型肝炎の治療として IFN+ribavirin 治療を行うと精子の核酸代謝障害をもたらし、necrosis を高率に合併するだけでなく、ミトコンドリア障害を引き起こすことが判明した。

また、ヨード剤単独ではウィルス除去率が悪く、Percoll 遠心分離後にヨード剤による遠心処理を行う方がよいと考えられた。

精液の泳動像は個人差が大きく、観察される DNA 断片化パターンは極めて多様であった。断片化が最も軽度な、原点から伸展する連続したファイバー状 DNA の先に少量の分離した長い DNA ファイバーを認めるもの、ファイバー状 DNA の先に粒子状の短鎖 DNA を認めるもの、さらに断片化が進行すると原点は萎縮し、1-3 群の短鎖 DNA が長く伸びたもの、最も断片化が進行したものでは原点部分がほとんど消失し、泳動度が速い断片のみを認めるもの、などに分類された。Percoll 法で得られた沈澱分画を Nycodenz 直線密度勾配に層積して沈降平衡を行った結果、精子は 2 峰性に分布した。両者の SCPFGE 電気泳動像は大きく異なり、下層ではほとんどの精子が DSB 陽性像を示した。逆に、上層ではほとんどが DSB 陰性であった。Nycodenz

上層では、非運動精子が混在するにも拘わらず、DSB 陰性精子比率は 94%に達した。最終的に swim up することにより、頭部形態、先体反応誘起能とも良好で運動性を有する DSB 陰性精子を調製することができた。

精液中の LPV 薬剤濃度を測定し、血中濃度と比較したところ約 30 分の 1 であった。一方、人工授精実施のための基礎的検討として行っている洗浄精子の静置実験では、37℃における静置で 7 時間後でも運動率良好精子獲得率が低下しないことが観察された。

### 4. 考察

HIV 感染男性では精子数が減少し、精子奇形率が高く、運動率が低下しているなど著明な精巣機能の低下を認めた。この原因が HIV 感染によるのか、免疫不全に起因するのか、抗 HIV 剤の影響か不明である。しかし、今回の検討から原発性の精巣機能低下が生じ、LH が増加していることが示唆された。

また、精子の電顕において著明なミトコンドリア障害を認め、HAART による副作用と考えられた。精子への影響を懸念して抗 HIV 療法を回避している患者も認められた。血友病 HIV 感染者においては C 型肝炎の合併が多く、死因の 1 位を占めており重要な問題であるが、PEG IFN+ribavirin 併用療法を行うと精子が極めて高率に奇形を生じ、壊死を起こすことを確認した。IFN 治療を過去に受けた群では明らかに無精子症が多く、HIV 感染者においては IFN による精巣機能障害が疑われた。さらに、精子の回復には IFN 治療終了後 1 年以上を要する場合も多かった。HIV/HCV 感染者において挙児を希望する場合は PEG IFN+ribavirin 併用療法を行う前に体外受精を相談するか、精子の冷凍保存も検討すべきである。

Apoptosis を生じた精子の核は比重が重くなることが知られている。今回の基礎的研究により、Percoll 法と Nycodenz 直線密度勾配を用いることにより、効率的に DNA 損傷精子を排除しうるものが

可能になりつつある。この方法の応用により、生殖補助医療による児の安全性向上が期待できる。

## 5. 自己評価

### 1) 達成度

第 1 の研究については当初の目的をほぼ達成しているものと判断している。しかし、体外受精の安全性が高まるか否かについてはさらなる臨床研究が必要である。また、人工授精実施に向けた臨床研究も今後必要である。

### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

現在、生殖補助医療により誕生する児の異常率が高いか否かが議論されている。精子の選択は重要な要素であり、DNA 損傷のある精子を排除できる技術の開発は有用と考えられる。特に HIV 感染者においては精子の異常率が高く、HAART や免疫不全の影響もあり、本研究は大変有用である。

### 3) 今後の展望について

HIV 感染男性、非感染女性夫婦に対する体外受精-胚移植の応用については、治療を継続し、その有効性、安全性を確認するとともに、基礎的研究をもとにし

た精子選別法や人工授精の応用も考慮していく予定である。今後の課題として、精液処理により完全に HIV を除去した精子を冷凍保存し、感染者夫婦の地元の協力施設に搬送することができれば、患者負担を少なくできる。そのための医療施設ネットワーク形成が求められる。

精液中の薬剤濃度を高めることができれば性交渉による 2 次感染を減少させ、感染者の増加抑制に有効と思われる。

また、現在 HIV 感染者では薬剤の副作用に伴うリポジトロフィーが大変深刻となっているがホルモン検査の検討は対処法の検討に有効である。さらに、HIV を完全に除去した精子が得られることから HIV は精巣に感染していないと思われる。精巣に HIV が潜んでいないことが証明できれば体内から HIV を完全除去する検討において有用である。

## 6. 結論

HIV 感染は確実に増加しており、本研究グループでなされている各研究の継続は意義あるものと判断される。

## 7. 知的所有権の出願・取得状況

現在のところ予定なし。

# 厚生労働科学研究費補助金 分担研究報告書

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

所属：東京大学大学院 医学系研究科 発達医科学教室

分担研究者：教授 牛島廣治

協力者：沖津祥子、柳生文宏

## 【目的と意義】

(1) いまだ HIV 感染症は世界中で急増傾向にあり、アジア諸国では爆発的に流行している。

母子感染と性行為感染がその主な感染経路と考えられているがベトナムにおいては薬物注射使用も多い。またベトナムでの HIV は CRF01\_AE が優位であり、数%が薬剤耐性を持っているとされている。しかしながら HIV の母子感染についてはほとんど調査されていない。そこで、母子感染を起こした児についてサブタイプ特異的プライマーを用いた PCR によりサブタイピングを行った。またシーケンスにより薬剤耐性について解析を行った。

(2) 一方、日本では同性間の性的接触による HIV 感染は増加の一途をたどっている。厚生労働省 HIV 研究班の報告によると、同性間の性的接触の感染様式全体の中での比率は、平成 16 年の統計で 60.0%となっている。また同様に、平成 15 年は 55.6%、平成 14 年は 53.6%と、年々比率が増加していることが伺える。感染が起こるためには、主要レセプターである CD4、かつコレセプターと呼ばれる主要レセプターに付属するものの 2 つのレセプターが必要である。そして最近、いくつかの共役型 G プロテインレセプターが HIV のコレセプターとなることが発見され注目されている。そこで直腸感染の可能性を in vitro のレベルで検討するために、直腸癌細胞である CaCo-2 細胞に、CD4、およびコレセプターとして考えられている 18 種類の共役型 G プロテインレセプターの mRNA の発現の有無を調べた。

## 【材料と方法】

(1) ベトナム・ホーチミン市内の小児病

院において抗ウイルス剤を投与されていない HIV 陽性の母親から生まれた児で、HIV 抗体陽性の血液 29 サンプルから DNA を抽出し用いた。v3 領域及び pol 領域を PCR で増幅し、シーケンスを行った。

v3 領域のシーケンスよりサブタイプ、pol 領域のシーケンスよりサブタイプおよび薬剤耐性を決定した。gp41 領域に設定したサブタイプ特異的プライマーを用いた PCR (J Med Virol. 2005;76:16-23)によりサブタイプを決定した。

(2) CaCo-2 から、RNA 抽出キット

(RNeasy Mini Kit: QIAGEN) を用いて total RNA の抽出を行った。DNase 処理を行った後、RT-PCR により、目的とする遺伝子の増幅反応を行った。PCR 法の際に用いられたプライマーは以下の表の通りである (表 1)。

## 【結果】

(1) 28 サンプルが v3 領域のシーケンスより CRF01\_AE であると決定された。また、26 サンプルはサブタイプ特異的プライマーを用いた PCR でも同じ結果を得た。1 サンプルは HIV に関する PCR すべてにおいてネガティブであった。

薬剤耐性については逆転写酵素阻害剤耐性、プロテアーゼ阻害剤耐性の major mutation は共に見つからなかった。

(2) 18 種類の G プロテインレセプターのうち、C5a receptor、CCR1、CCR7、CCR9、CXCR3、CXCR4、CXCR5、RDC1 の 8 種類の mRNA が CaCo-2 において発現されていることが確認された。また、その他の G プロテインレセプター、および CD4 の mRNA の発現は確認できなかった。

## 【考察】

(1) すべての PCR でバンドが見られた

かった 1 サンプルは HIV 陰性であると思われ、母親の移行抗体によって ELISA 陽性となった可能性がある。

(2) 今まで CaCo-2 において C5a receptor、CCR1、CCR7、CCR9、CXCR3、CXCR5、RDC1 の mRNA 発現は確認されていなかったが、今回の研究において初めて発現を確認した。これらのうち CCR9、CXCR4、RDC1 は先行研究から既に HIV のコレセプターとして機能することが確認されている。また、今回発現量を半定量的に調べたところ、RDC1 の発現量が高かったことから HIV のエントリーに働く可能性がある。一方、HIV の主要レセプターである CD4 の mRNA 発現は確認されなかった。従来の先行研究でも、CaCo-2 では CD4 の mRNA 発現は確認されていない。そのため、直腸感染では CD4 以外の未知の

主要レセプターが関与する可能性がある。

### 【結論】

(1) 本研究でベトナムにおいて母子感染を起こした HIV はすべて CRF01\_AE であった。サブタイプ特異的プライマーの感度は約 93 % であった。6 サンプルにプロテアーゼ阻害剤耐性である minor mutation が見られた。

(2) CaCo-2 において、C5a receptor、CCR1、CCR7、CCR9、CXCR3、CXCR4、CXCR5、RDC1 の 8 種類の mRNA の発現が確認された。

[表 1]

Human gene	Product length, bp	Sequence
CD4	589	sense:5'-GGA TAC AGT GGA ACT GAC CTG-3' antisense:5'-TTC AAC TGT AAA GGC GAG TGG-3'
APJ	1143	sense:5'-ATG GAG GAA GGT GGT GAT TTT GAC AAC TAC-3' antisense:5'-CTA GTC AAC CAC AAG GGT CTC CTG GCT GTA G-3'
C5a receptor	1053	sense:5'-ATG AAC TCC TTC AAT TAT ACC ACC CCT GAT-3' antisense:5'-CTA CAC TGC CTG GGT CTT CTG GGC CAT AGT G-3'
CCR1	1068	sense:5'-ATG GAA ACT CAA AAC ACC ACA GAG GAC TAT G-3' antisense:5'-TCA GAA CCC AGC AGA GAG TTC ATG CTC CCC TG-3'
CCR4	1083	sense:5'-ATG AAC CCC ACG GAT ATA GCA GAT ACC ACC-3' antisense:5'-CGT CGC ATT CGC GGC CGC CTA CAG AGC ATC ATG AAG-3'
CCR7	573	sense:5'-CGC GTC CTT CTC ATC AGC AAG CTG TCC TGT G-3' antisense:5'-GTG CCG ACA GGA AGA CCA CTG CCG GAG CTG-3'
CCR9/CCR10	510	sense:5'-ATC CCT GAT ATG GTC TTT GTA CAG ACA CAT G-3' antisense:5'-GCT GGA TAA TGA GGC CTG GGC AGT GCC AGG-3'
CXCR3	555	sense:5'-CGG GGG CCC CCG GCC CGC GTG ACC CTC ACC TG-3' antisense:5'-CTG GAG CCC TCT CTG GTT GGG GCA GCC CAG GC-3'
CXCR4	570	sense:5'-CCA AGG AAG CTG TTG GCT GAA AAG GTG GTC TA-3' antisense:5'-TCC ACC TCG CTT TCC TTT GGA GAG GAT CTT-3'
CXCR5/BLR1	570	sense:5'-GGG ACC ATC TGG CTG GTG GGC TTC CTC CTT G-3' antisense:5'-GAG ACT GCT CCT GCG CCA GCT AGG GAA GAG-3'
DEZ $\alpha$	1122	sense:5'-ATG AGA ATG GAG GAT GAA GAT TAC AAC ACT TC-3' antisense:5'-TCA AAG CAT GCC GGT CTC CCT CTC ATT CAT AG-3'
DEZ $\beta$	1116	sense:5'-ATG GAG GAT GAA GAT TAC AAC ACT TCC ATC-3' antisense:5'-TCA AAG CAT GCC GGT CTC CCT CTC ATT CAT AG-3'
Duffy antigen	1017	sense:5'-ATG GCC TCC TCT GGG TAT GTC CTC CAG GCG GAG-3' antisense:5'-CTA GGA TTT GCT TCC AAG GGT GTC CAG ATG AG-3'
GPR-9-6	1074	sense:5'-ATG GCT GAT GAC TAT GGC TCT GAA TCC ACA TC-3' antisense:5'-TCA GAG GGA GAG TGC TCC TGA GGT TGT CTC C-3'
GPR5	1002	sense:5'-ATG GAG TCC TCA GGC AAC CCA GAG AGC ACC-3' antisense:5'-TCA GTA GAA GGA GGC GCC CTC ATA GGC GAA G-3'
GPR12	1005	sense:5'-ATG AAT GAA GAC CTG AAG GTC AAT TTA AGC GG-3' antisense:5'-CTA CAC ATC ACT GGG CGA GCG CGC TCT CTG GG-3'
GPR15	1083	sense:5'-ATG GAC CCA GAA GAA ACT TCA GTT TAT TTG-3' antisense:5'-TTA GAG TGA CAC AGA CCT CTT CCT CCT CCT GG-3'
GPR25	1083	sense:5'-ATG GCC CCC ACA GAG CCC TGG AGC CCC AGC CC-3' antisense:5'-CTA CCA GGA GGC CGA GGC AGT GTT CGC GGC C-3'
RDC1	281	sense:5'-AAG AAG ATG GTA CGC CGT GTC GTC TGC ATC CTG-3' antisense:5'-CTG CTG TGC TTC TCC TGG TCA CTG GAC GCC GAG-3'