

グ検査キットを組み合わせることにより、偽陽性の多くを解消できることが示唆された。今後、上記2次検査による結果の報告形式なども含めた具体的な検査システムが構築され、全国検査センターで普及することが望まれる。

(5) HIV 治療薬の母体に対する影響調査（喜多班と共同研究）

今年度は、妊娠中に HIV 治療薬の投与を受けた感染妊婦の臨床データの集積と解析及び一般 HIV 感染者集団との比較のため、まず実施可能でデータ回収率が高率となる最も有効な調査方法を検討・立案し、必要不可欠な調査項目を具体的に選定した。来年度以降、これまでに産婦人科及び小児科全国調査で捕捉された症例の担当医を対象にアンケート調査を行う予定である。

A. 研究目的

(1) 「HIV 母子感染予防対策マニュアル」の改訂

HIV 感染者数の増加に伴い HIV 感染妊娠例も年々増加しているが、その発生数は年間数十件程度であり、HIV 感染妊娠の診療経験を有する施設も未だ小数に限られている。一方、HIV 治療は急速に進歩しており、HIV 感染妊婦の治療や母子感染予防対策もこの進歩に同調し改良が加えられている。常にわが国における最新の HIV 母子感染対策マニュアルを作成し全国関連施設に提供することは、これまで HIV 感染未経験の施設も含め、広く全国での HIV 感染妊娠の医療レベルの向上に寄与するものである。また、これまで言及されていなかった一般産科診療中の異常妊娠（切迫流産、切迫早産、前期破水など）も、HIV 感染妊娠に特化した対応が必要となることが多く、これらの産科異常についても最適な診療基準を提示する必要がある。

(2) 妊婦 HIV スクリーニング検査に関する一般妊婦向け啓発

一般妊婦に対し HIV 検査の意義と高率に発生する偽陽性について判りやすく解説した「妊婦向け小冊子」を全国産科施設から配布することで、妊婦 HIV スクリーニング検査実施率の更なる増加と、検査結果が偽陽性だった妊婦の不安の回避に寄与するものである。

(3) 感染女性を対象とした HIV/AIDS 解説書

わが国でも増加傾向にある生殖年齢の女性感染者にとっても、性生活は日常生活に欠くこ

とのできない関心事であり、妊娠、出産、育児を希望される感染女性も多い。性行為感染の防御と妊娠・出産という女性の背反した問題にも言及した感染女性向けの HIV/AIDS 解説書を全国の感染女性に配布し理解を得ることで、妊娠・出産の可能性を含め感染女性の生活の質を高めることとなる。

(4) 妊婦 HIV スクリーニング検査における偽陽性への対応策（検査体制の構築に関する研究班との共同研究）

現在全国 90%以上の妊婦が受検している HIV スクリーニング検査では、その 90%以上が偽陽性と陽性例のほとんどを偽陽性例が占めている（スクリーニング検査の陽性的中率は 7～8%）。たとえスクリーニング検査といえども陽性と告げられた妊婦の心理的重圧は極めて重く、また一般産科施設ではスクリーニング陽性妊婦への対応に苦慮することが多い。

偽陽性を減少させ得る検査方法の確立およびその普及（「妊婦 HIV 検査マニュアル」の発行など）と、スクリーニング検査陽性妊婦への実地臨床上の対応策を提示することで、真の感染者の十数倍にも及ぶ偽陽性妊婦を減少し、陽性妊婦への対応を速やかに行なうことで、わが国の妊娠女性の HIV 感染に対する不安を回避することが可能となる。

(5) 妊娠中に投与を受けた抗 HIV 薬の母体に対する影響調査（喜多班と共同研究）

従来 HIV 治療は、AIDS の重篤さゆえに妊婦にも非妊娠時とほぼ同様の抗 HIV 薬投与が推

奨されてきた。新規 HIV 治療薬など、妊娠中投与の安全性に関わる検証が十分とは考えにくい治療薬もある。一方、治療の進歩により HIV 感染症が慢性疾患へと転換しつつある現状下、妊娠・出産を求める感染者の増加も見込まれる。わが国における妊娠中に投与された HIV 治療薬の母児に対する影響調査も必要と考える。わが国での対象症例数は少数といえども既に約 400 例の HIV 感染妊娠例が報告されており、これら妊娠中に HIV 治療薬の投与を受けた感染妊婦の臨床データの集積と解析及び一般 HIV 感染者集団との比較を行なうことで、妊娠中の HIV 治療薬に関する安全性の評価に寄与することが可能となる。

B. 研究方法

(1) 「HIV 母子感染予防対策マニュアル」の改訂

①妊娠の有無に関わらず、医療支援のみならず社会支援も含め、女性感染者のトータルケア・マニュアルの作成を目指す。

②産科的異常妊娠（切迫流産、切迫早産、前期破水など）への対応を盛り込む。
に主眼を置き改訂項目を検討する。

(2) 妊婦 HIV スクリーニング検査に関する一般妊婦向け啓発刊行

「あなた自身の健康と赤ちゃんの健やかな誕生のために一妊娠初期検査の一環として HIV 検査をお受けになることをお勧めします」を、HIV 治療の進歩に合わせ、逐次改訂の上全国各施設に提供する。

(3) 感染女性を対象とした HIV/AIDS 解説書刊行

HIV 感染女性に、感染防御の観点から望ましい性行動のあり方や感染者の妊娠出産に関わる情報を提供する小冊子「女性のための Q&A—あなたと赤ちゃんのためにできること—」も HIV 治療の進歩に合わせ、逐次改訂の上全国各施設に提供する。

(4) 妊婦 HIV スクリーニング検査における偽陽性率の検討と陽性例への対応（検査体制の構築に関する研究班との共同研究）

偽陽性が少ないスクリーニング法開発のために、まず既存のスクリーニング検査キットの組み合わせによる偽陽性解消につき検討し、有効な偽陽性解消法を確立する。

(5) HIV 治療薬の母体に対する影響調査（喜多班と共同研究）

妊娠中に HIV 治療薬の投与を受けた感染妊婦の臨床データの集積と解析及び一般 HIV 感染者集団との比較のため、まず実施可能でデータ回収率が高率となる最も有効な調査方法を検討・立案し、必要不可欠な調査項目を具体的に選定する。

C. 研究結果

(1) 「HIV 母子感染予防対策マニュアル」の改訂

①妊娠の有無に関わらず、医療支援のみならず社会支援も含め、女性感染者のトータルケア・マニュアルの作成を目指す。

②産科的異常妊娠（切迫流産、切迫早産、前期破水など）への対応を盛り込む。

に主眼を置き、次年度発行予定第 5 版の具体的な改訂項目を検討した。

主な改訂項目を以下に示す。

1) 偽陽性妊婦に陰性の結果報告するための具体策を提示（産科医療者向け「妊婦 HIV 検査マニュアル」として別刷も作成予定）

2) 抗 HIV 薬の選択と開始時期、安全基準の刷新

3) HIV 感染妊娠に特化した対応の簡略化（スタンダードプレコーションと同等の対応を目指す）

4) 経膈分娩の可能性について言及

5) 産科的異常への対応

- ・分娩周辺期の産科初診
- ・飛び込み分娩

- ・切迫早産
- ・早産・前期破水
- ・羊水穿刺の適応 等々

6) 新生児管理

- ・カリニ肺炎予防のための ST 合剤投与の必要性を再検討
- ・妊娠中の抗 HIV 薬母体投与と出生直後から児に投与する AZT シロップなどが児に及ぼす副作用
- ・感染予防を目的とした投薬を早期に中止するためにも、非感染を早期診断する方法の提示

7) パートナーへの感染回避可能な妊娠法の具体的提示

- ・感染女性：人工授精
- ・感染男性：体外受精

8) その他

(2) 妊婦 HIV スクリーニング検査に関する一般妊婦向け啓発刊行

「あなた自身の健康と赤ちゃんの健やかな誕生のために一妊娠初期検査の一環として HIV 検査をお受けになることをお勧めします」を、全国産科診療施設に提供した。

(3) 感染女性を対象とした HIV/AIDS 解説書刊行

HIV 感染女性に、感染防御の観点から望ましい性行動のあり方や感染者の妊娠出産に関わる情報を提供する小冊子「女性のための Q&A—あなたと赤ちゃんのためにできること—」を全国の HIV/AIDS 関係各施設に提供した。

(4) 妊婦 HIV スクリーニング検査における偽陽性率の検討と陽性例への対応(検査体制の構築に関する研究班との共同研究)

偽陽性を可能な限り除外するスクリーニング検査システムとして、二つの異なったスクリーニング検査キットを組み合わせることによ

り、偽陽性の多くを解消できることが示唆された。

現在繁用されている抗原抗体同時検査法(エンザイグノスト HIV インテグラル)を1次スクリーニング検査として用いた場合に発生した陽性13検体中、2次スクリーニング検査(追加検査)として更に高感度の別の検査キットである抗原抗体同時検査法(バイダス HIV デュオII)を用いることにより、12例は陰性の結果が得られ、この12例は確認検査でも陰性であった。残りの1例は、2次スクリーニング検査も陽性でかつ確認検査も陽性であった。今後は、上記2次検査による結果の報告形式なども含め具体的な検査システムを構築し、全国の検査センターへ普及することが望まれる。

(5) HIV 治療薬の母体に対する影響調査(喜多班と共同研究)

今年度は、妊娠中にHIV治療薬の投与を受けた感染妊婦の臨床データの集積と解析及び一般HIV感染者集団との比較のため、まず実施可能でデータ回収率が高率となる最も有効な調査方法を検討・立案し、必要不可欠な調査項目を具体的に選定した。来年度以降、これまでに産婦人科及び小児科全国調査で捕捉された症例の担当医を対象にアンケート調査を行う予定である。具体的調査項目を示す。

ART の内容について

ART の開始時期 開始時の妊娠週数 ART 開始直前の CD4 数 ART 開始直前の HIV-RNA 量
 出産直前の CD4 数 出産直前の HIV-RNA 量
 ART の内容 (抗 HIV 薬の組み合わせ)

副作用調査

自覚症状の有無、血液検査データについて ART 開始後(妊娠中のみ)4週ごとに記載。

(4週毎のデータがない場合は最低3ヶ月毎のデータを記載。また出産直前の受診などで長期のデータがない場合は ART 投与前後で記載可能なデータを記載)

- 1) 自覚症状：嘔気・嘔吐、下痢、皮疹、頭痛、しびれ、精神症状（うつ、イライラなど）、全身倦怠感、その他の症状

*有害事象ガイドラインに基づき副作用のグレード記載

2) 血液検査

WBC Hgb MCV PLT AST ALT TG
T-CHO 血糖 乳酸

D. 考察

(1) 今年度はマニュアル改訂の狭間の年にあたり、来年度の改訂に向けた準備を中心に活動した。来年度以降、今年度検討した項目案に立脚し母子感染予防対策マニュアルを改訂する。

(2) 妊婦 HIV スクリーニング検査に関する一般妊婦向け啓発冊子「あなた自身の健康と赤ちゃんの健やかな誕生のために一妊娠初期検査の一環として HIV 検査をお受けになることをお勧めします」

(3) 感染女性を対象とした HIV/AIDS 解説書「女性のための Q&A—あなたと赤ちゃんのためにできること—」の両冊子は今年度も送付依頼が多く寄せられており、来年度も引き続き改訂及び全国関係施設への配布を行う。また、感染女性向け冊子だけでなく感染女性の支援者向けにも「感染女性支援マニュアル」(五味淵班と共同研究)を作成する予定である。

(4) 妊婦 HIV スクリーニング検査における偽陽性率の検討と陽性例への対応(検査体制の構築に関する研究班との共同研究)では、確立した偽陽性解消法について、来年度以降その取り扱いを「妊婦 HIV スクリーニング検査マニュアル」として発行し、全国の検査センター、妊婦 HIV スクリーニングを行なう産科施設などに提供し普及・啓発を行なう予定である。

(5) HIV 治療薬の母体に対する影響調査(喜多班と共同研究)は、来年度以降これまでに産婦人科及び小児科全国調査で捕捉された症例の担当医を対象にアンケート調査を行う予定

である。

以下、(4)(5)に関する担当研究協力者からの報告を提示する。

業績

1. 書籍

- 1) 矢永由里子：HIV と心理臨床～新たな枠組み。井上孝代(編)：コミュニティ支援のカウンセリング。東京：川島書店、2006：203-217
- 2) 矢永由里子：HIV と臨床心理地域援助。野島一彦(編)：現代のエスプリ別冊 臨床心理地域援助研究セミナー。東京：至文堂：2006：203-213
- 3) 大金美和：女性の感染者の方に必要な支援には、どのようなことがありますか。岡慎一(編)：HIV Q&A。東京：医薬ジャーナル社：2006：64-66

2. 論文発表

- 1) 種元智洋, 塚原優己, 北川道弘：母子感染総論 1. 母体徴候. 産婦人科の実際 2006：55：371-374
- 2) 坂田麻里子, 塚原優己, 久保隆彦, 北川道弘：母子感染各論 AID ウイルス. 産婦人科の実際 2006：55：457-463
- 3) 源河いくみ：合併症妊娠の予後 HIV 感染合併妊娠—感染症(HIV) 専門医—. 周産期医学 2006：36：19-23
- 4) 箕浦茂樹, 大金美和, 三島典子, 石川真由美, 与那嶺辰美：HIV 感染妊娠女性に対する看護と支援. 周産期医学 2006：36：45-48
- 5) 谷口晴記, 塚原優己, 喜多恒和, 和田裕一, 外川正生, 戸谷良造, 稲葉憲之：HIV の母子感染と対策. に本臨床 2007：65 (増刊号 3)：518-521

3. 学会発表

1) Yamada R., Shima T., Imai M., Genka I., Ogane M., Kawado M., Taniguchi H., Tsukahara Y., Inaba N., : The false positive rate of antenatal HIV screening is very high in Japan. XVI International AIDS Conference. 13-18 August, 2006, (Toronto, Canada)

2) 嶋 貴子, 今井光信, 谷口晴記, 早川智, 外川正生, 塚原優己, 稲葉憲之 : 妊婦集団における HIV スクリーニング検査の偽陽性出現率に関する調査. 第 80 回日本感染症学会総会・学術講演会. 2006. 4. 20-21 (東京)

3) 谷口晴記, 塚原優己, 外川正生, 早川智, 嶋貴子, 太田順子, 西川正能, 正田亜紀子, 岡崎隆行, 池田綾子, 大島教子, 稲葉憲之 : HIV 母子感染成立例の産科的背景について. 第 80 回日本感染症学会総会・学術講演会. 2006. 4. 20-21 (東京)

4) 早川智, 塚原優己, 吉野直人, 北村勝彦, 稲葉憲之 : 我が国における HIV 感染妊婦の現状と垂直感染のコントロール (平成 16 年度の全国調査成績より). 第 80 回日本感染症学会総会・学術講演会. 2006. 4. 20-21 (東京)

5) 塚原優己, 山田里佳, 谷口晴記, 和田裕一, 喜多恒和, 戸谷良造, 稲葉憲之 : 胎児期・新生児期の抗 HIV 薬投与が児に及ぼす影響 - HIV 感染妊婦より出生した児の追跡調査 -. 第 58 回日本産科婦人科学会総会. 2006. 4. 21-25 (横浜)

6) 山田里佳, 塚原優己, 谷口晴記, 瀬戸裕, 堀裕雅, 和田裕一, 喜多恒和, 戸谷良造, 稲葉憲之 : 妊婦 HIV スクリーニング検査の偽陽性に関する前方視的検討. 第 58 回日本産科婦人科学会総会. 2006. 4. 21-25 (横浜)

7) 谷口晴記, 塚原優己, 井上孝実, 喜多恒和, 和田裕一, 戸谷良造, 稲葉憲之 : HIV 母子感染成立例の産科的背景と児の予後. 第 58 回日本産科婦人科学会総会. 2006. 4. 21-25 (横浜)

8) 塚原優己, 谷口晴記, 和田裕一, 蓮尾泰之, 松田秀雄, 箕浦茂樹, 国方徹也, 尾崎由和, 葛西健郎, 稲葉憲之 : わが国の HIV 感染妊娠の将

来予測. 第 42 回日本周産期・新生児医学会総会. 2006. 7. 9-11 (宮崎)

9) 谷口晴記, 塚原優己, 和田裕一, 蓮尾泰之, 松田秀雄, 箕浦茂樹, 国方徹也, 尾崎由和, 葛西健郎, 北村勝彦, 稲葉憲之 : 妊婦 HIV スクリーニング検査偽陽性に関する前方視的検討とその対策. 第 42 回日本周産期・新生児医学会総会. 2006. 7. 9-11 (宮崎)

10) 嶋 貴子 : シンポジウム「感染女性の妊娠・出産・育児支援」スクリーニング検査偽陽性の現状と対策. 第 20 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2006. 11. 30-12. 2 (東京)

11) 矢永由里子 : シンポジウム「感染女性の妊娠・出産・育児支援」妊婦 HIV 検査陽性への対応の問題点. 第 20 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2006. 11. 30-12. 2 (東京)

12) 大金美和 : シンポジウム「感染女性の妊娠・出産・育児支援」HIV 感染女性の妊娠・出産希望に対する支援の問題. 第 20 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2006. 11. 30-12. 2 (東京)

13) 大金美和, 三島典子, 楯朋子, 井上誉子, 矢野麻子, 石垣今日子, 畑中祐子, 山田由紀, 武田謙治, 池田和子, 島田恵, 与那嶺辰美 : HIV 感染妊婦に対する看護の検討 (その 1) 外来看護について. 第 20 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2006. 11. 30-12. 2 (東京)

14) 楯朋子, 大金美和, 三島典子, 井上誉子, 矢野麻子, 石垣今日子, 畑中祐子, 山田由紀, 武田謙治, 池田和子, 島田恵, 与那嶺辰美 : HIV 感染妊婦に対する看護の検討 (その 2) 病棟看護について. 第 20 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2006. 11. 30-12. 2 (東京)

15) 矢永由里子 : 第 20 回日本エイズ学会学術集会「電話相談の現状と課題～今後の電話相談のあり方を考える～」. 第 20 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2006. 11. 30-12. 2 (東京)

16) 嶋 貴子 : シンポジウム IV 「わが国における HIV 感染妊娠の現状と対応」妊婦 HIV 検査実

施率および検査偽陽性とその対応. 19 回日本性感染症学会第学術大会. 2006. 12. 9-10 (金沢)

17) 塚原優己: シンポジウムIV「わが国における HIV 感染妊娠の現状と対応」HIV 感染妊婦への対応～最新のマニュアルから. 19 回日本性感染症学会第学術大会. 2006. 12. 9-10 (金沢)

18) 谷口晴記, 塚原優己, 川戸美由紀, 源河いくみ, 山田里佳, 大金美和, 嶋貴子, 和田裕一, 喜多恒和, 稲葉憲之: わが国の HIV 感染妊娠の将来予測 (中・長期展望). 19 回日本性感染症学会第学術大会. 2006. 12. 9-10 (金沢)

4. 講演

1) Yuriko Yanaga: Seminar on Sexual Transmitted Disease, Control of AIDS and ATL 「HIV/AIDS Mental Health Psychosocial Issues of People living with HIV/AIDS and its intervention」2006. 8. 8. (Kumamoto, Japan)

2) 塚原優己: HIV 母子感染の現状と問題. 神奈川県立高等学校性・エイズ教育実践研究会性・エイズ教育セミナー. 2006. 08. 01 (横浜)

3) 大金美和: 女性患者の看護支援. HIV 感染妊婦の看護研修会. 2006. 1. 27 (東京)

4) 山田里佳: 性行為感染による HIV の蔓延と母子感染予防対策. エイズ予防財団主催平成 18 年度研究成果発表会「わが国における HIV 感染妊娠」. 2006. 10. 22 (甲府)

(4) 妊婦 HIV スクリーニング検査における偽陽性発生率の検討および陽性例への対応

研究協力者： 山田 里佳 石川県立中央病院産婦人科 医師
嶋 貴子 神奈川県衛生研究所微生物部 主任研究員
今井 光信 神奈川県衛生研究所 所長
分担研究者： 塚原 優己 国立成育医療センター周産期診療部産科 医長

研究要旨

昨年度までの妊婦集団における HIV 検査の前方視的研究により、妊婦における HIV 陽性率は 0.02%と低率であり、一方、HIV スクリーニング検査試薬の偽陽性率は約 0.3%であることから、妊婦集団における陽性的中率は 7.7%と極めて低いことが判明した。妊婦健診時における HIV スクリーニング検査の陽性判定は、そのスクリーニング検査結果を受検者に通知する場合、非常に大きな心理的重圧となることが懸念されることから、スクリーニング検査の段階で偽陽性例を出来る限り除外できる検査システムについて検討を行った。

妊婦健診で HIV 検査を受検した 4424 件について、抗原抗体同時検査試薬（エンザイグノスト HIV インテグラル）を 1 次スクリーニング検査として実施した。1 次スクリーニング検査が陽性となった検体について、2 次スクリーニング検査として、さらに感度が高い別の抗原抗体同時検査試薬（バイダス HIV デュオ II）で測定を行った。また、1 次スクリーニング検査で陽性となった検体についてはすべて確認検査（WB 法、PCR 法）を実施した。その結果、1 次スクリーニング検査を実施した 4424 検体のうち 13 例が陽性となり、その 13 例について 2 次スクリーニング検査を実施したところ 12 例が陰性、1 例が陽性となった。陰性となった 12 例は確認検査でも陰性となり、陽性となった 1 例は確認検査でも陽性となった。このことから、このキットの組み合わせにおいては、1 次スクリーニング検査陽性例の偽陽性例は 2 次スクリーニング検査を実施することで除外可能なことが分かった。

A. 研究目的

平成 18 年度の全国病院調査において妊婦 HIV スクリーニング検査の実施率は 94.7%を示しており、HIV 検査は妊婦健診の一項目として定着しているのが伺える。しかし、昨年度までの妊婦集団における HIV 検査の前方視的研究により、妊婦における HIV 陽性率は 0.02%と低率であり、一方、HIV スクリーニング検査試薬の偽陽性率が約 0.3%であることから、妊婦集団における陽性的中率は 7.7%と極めて低いことが判明した。妊婦健診時における HIV スクリーニング検査の陽性判定は、そのスクリ

ーニング検査結果を受検者に通知する場合、非常に大きな心理的重圧となることから、スクリーニング検査の段階で偽陽性例を出来る限り除外できる検査システムについて検討を行った。

B. 研究方法

研究協力が得られた年間分娩数 1000 件以上の産婦人科病院 2 施設および民間検査センターとの共同研究により、妊婦健診で HIV 検査を受検した 4424 件について、1 次スクリーニング検査として多数検体が同時処理可能な抗原

抗体同時検査法のエンザイグノスト HIV インテグラル（デイドベーリング社）を使用した。1 次スクリーニング検査が陽性であった 13 例について、今回、2 次スクリーニング検査としてさらに感度が高く、少数検体の検査に使用しやすい別の抗原抗体同時検査法であるバイダス HIV DUO II（日本ビオメリュー社）で測定を行った。また、1 次スクリーニングで陽性となった検体についてはすべて WB 法、PCR 法による確認検査を実施した。

今回の調査においては、妊婦健診での HIV 検査の同意については妊婦から担当医が得ており、確認検査については、担当医からの依頼の下に研究班が検査を実施した。

なお、本研究は厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業「HIV 検査相談機会の拡大と質的充実に関する研究」班と共同で実施した。

研究協力産婦人科施設： 堀病院、瀬戸病院
研究協力民間検査センター： 保健科学研究所

確認検査実施施設： 神奈川県衛生研究所

1 次スクリーニング検査キット：

EIA 法 エンザイグノスト HIV インテグラル

（デイドベーリング社：抗原抗体同時検査法）

2 次スクリーニング検査キット：

ELFA 法 バイダス HIV DUO II（薬事申請中）

（日本ビオメリュー社：抗原抗体同時検査法）

確認検査

WB 法 ラブブロット 1、2

（富士レビオ社：抗体検査法）

PCR 法 アンプリコア HIV-1 モニター Ver. 1.5

（ロシュ・ダイアグノスティクス社：核酸増幅検査法）

C. 研究結果

妊婦健診で HIV 検査を受検した 4424 件について、1 次スクリーニング検査（エンザイグノスト HIV インテグラル）を実施したところ、13 例が陽性となった。この 13 例について 2 次スクリーニング検査（バイダス HIV デュオ II）を実施したところ、12 例が陰性、1 例が陽性となった。陰性となった 12 例は確認検査でも陰性となり、陽性となった 1 例は確認検査でも陽性となった。このことから、1 次スクリーニング検査にエンザイグノスト HIV インテグラルを使用する場合、陽性例に 2 次スクリーニング検査としてバイダス HIV デュオ II を組み合わせて実施することで、スクリーニング検査の段階で 1 次スクリーニング検査の偽陽性例を除外できることが分かった。

D. 考察

今回使用した検査試薬の組み合わせでは、1 次スクリーニング検査陽性例に 2 次スクリーニング検査を実施することで偽陽性例を除外できたことから、検査現場において 2 次スクリーニング検査を取り入れたスクリーニング検査法を用いることで、偽陽性の大部分を除外できる可能性があることが分かった。しかし、2 段階でスクリーニング検査を実施しても、両方の試薬に偽陽性反応を示す検体があることも考えられ、また他試薬の組み合わせの検討は今後の課題となっている。このことから、産科施設において、HIV 検査実施前の受診者への説明の充実や、スクリーニング検査が陽性であった場合には、確認検査の必要性や偽陽性の可能性も含めた説明の実施、また確認検査を実施した後に受診者に検査結果を通知する等の工夫が必要であると思われた。また今後は、一般産科施設への HIV 検査についての十分な情報提供等も必要と考えられた。

E. 結論

日本における妊婦 HIV スクリーニング検査の実施率は年々増加しているが、妊婦集団の HIV 感染率は 0.02% と低く、スクリーニング検査の陽性的中率は極めて低率となっている。このことから、スクリーニング検査の段階において偽陽性を除外できるようなスクリーニング検査方法の体制整備、産科施設におけるスクリーニング検査施行前の説明の充実やスクリーニング陽性者に対する十分な心理的配慮、またその実施をサポートするための、研究班から一般産科施設への情報提供やマニュアル配布等の充実が必要と考える。

参考文献

- 1) 嶋 貴子, 林 孝子, 斎藤隆行, 川田かおる, 伊藤 章, 相楽裕子, 今井光信: マイクロプレートを用いた HIV 抗原抗体同時検出試薬の検討. 医学と薬学 43(6):1131-1140, 2000

研究発表

1. 学会発表

- 1) Yamada R., Shima T., Imai M., Genka I., Ogane M., Kawado M., Taniguchi H., Tsukahara Y., Inaba N., : The false positive rate of

antenatal HIV screening is very high in Japan. XVI International AIDS Conference. 13-18 August, 2006, (Toronto, Canada)

- 2) 嶋 貴子, 今井光信, 谷口晴記, 早川智, 外川正生, 塚原優己, 稲葉憲之: 妊婦集団における HIV スクリーニング検査の偽陽性出現率に関する調査. 第 80 回日本感染症学会総会・学術講演会. 2006. 4. 20-21 (東京)
- 3) 山田里佳, 塚原優己, 谷口晴記, 瀬戸裕, 堀裕雅, 和田裕一, 喜多恒和, 戸谷良造, 稲葉憲之: 妊婦 HIV スクリーニング検査の偽陽性に関する前方視的検討. 第 58 回日本産科婦人科学会総会. 2006. 4. 21-25 (横浜)
- 4) 嶋 貴子: シンポジウム「感染女性の妊娠・出産・育児支援」スクリーニング検査偽陽性の現状と対策. 第 20 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2006. 11. 30-12. 2 (東京)
- 5) 嶋 貴子: シンポジウムIV「わが国における HIV 感染妊娠の現状と対応」妊婦 HIV 検査実施率および検査偽陽性とその対応. 19 回日本性感染症学会第学術大会. 2006. 12. 9-10 (金沢)

(5) HIV 感染妊婦に投与中の ART (Antiretroviral therapy) の内容と副作用についての調査 (母子感染予防として ART (Antiretroviral therapy) を投与された HIV 感染者の副作用についての調査)

研究協力者： 源河いくみ (国立国際医療センター エイズ治療研究開発センター)
喜多恒和 (防衛医科大学産婦人科)
小林裕幸 (防衛医科大学総合臨床部)
分担研究者： 塚原優己 (国立成育医療センター周産期診療部産科)

研究概要

AZT を HIV 感染妊婦に投与することにより母子感染率を低下することが示された PACTG076 の study の発表以降、母子感染予防として ART を投与することにより母体の HIV ウイルス量を低下させることは基本的な母子感染予防策のひとつとなっている。さらに現在では、ART の内容は AZT 単剤ではなく、妊婦に対しても多剤を併用した強力な抗ウイルス療法 (HAART) が基本となっている。しかし、ART による消化器症状や肝機能異常はよくみられる副作用であり、最近では乳酸アシドーシスや耐糖能異常、高脂血症といった代謝異常が問題となっている。これら抗 HIV 薬の妊婦に対する影響や安全性についての調査報告は未だ少ない。本研究では、我々研究班に登録されている感染妊婦について、妊娠中の抗 HIV 薬投与の影響について検討を加える。今年度は、来年度調査に向け調査対象や調査項目、調査方法など調査の具体化について検討した。

A. 研究目的

昨年度国立国際医療センターで経験した 17 例の HIV 感染妊婦症例について ART の内容や開始時期、副作用についての調査の結果は、ART は妊婦に対してもアドヒアランスが保たれ、消化器症状や貧血も中止にいたるほどのものはなく、ART 投与による重篤な乳酸アシドーシスなどの代謝性の副作用も出現せず比較的安全に投与が可能であったというものであった。しかし症例数が少ないためさらなる検討が必要である。来年度は、全国調査のアンケート調査：「HIV 感染妊婦の実態調査とその解析および HIV 感染妊婦とその出生児に関するデータベースの構築」(分担研究者：喜多恒和先生) の二次調査に副作用調査の項目を追加し、そのデータを集積することによる全国の ART 投与内容や副作用についての調査を行う予定であ

る。更にこれまで我々研究班に集積された症例についても、同様の調査を別途行なう予定である。今年度は、来年度の調査に向けた準備段階として、検討項目や調査方法を検討した。

B. 研究方法

厚生労働科学研究「HIV 感染妊婦の実態調査とその解析および HIV 感染妊婦とその出生児に関するデータベースの構築」(分担研究者：喜多恒和先生) 班の全国アンケート調査で得られた、母子感染予防として ART が投与された 175 症例についてそれぞれの担当医に対して調査票を送付し、以下の項目について調査を行う。また、可能であれば同時期の HIV 感染のない妊婦症例についても調査を行い、これらを比較することにした。

調査項目

ART の内容について

ART の開始時期：

開始時の妊娠週数：妊娠前から投与、 妊娠後（妊娠 週）

ART 開始直前の CD4 数（測定日）：

ART 開始直前の HIV-RNA 量（測定日）：

出産直前の CD4 数（測定日）：

出産直前の HIV-RNA 量（測定日）：

ART の内容（投与量までではなくてもよい）

分娩様式

破水の有無

児への感染の有無

副作用調査

自覚症状の有無、血液検査データについて ART 開始前、開始後後（妊娠中のみ）4 週ごとに記載。ただし、4 週毎のデータがない場合は最低 3 ヶ月毎のデータを記載（経時的なデータを記入するのが大変であれば最も悪いデータを記載）。また出産直前の受診などで長期のデータがない場合は ART 投与前後で記載可能な

データを記載する。

（1） 自覚症状：嘔気・嘔吐、下痢、皮疹、頭痛、しびれ、精神症状（うつ、イライラ

など）、全身倦怠感、その他の症状

* 副作用のグレードについて記載（有害

事象ガイドラインに準拠）

** 副作用の出現した時期

（2） 血液検査

WBC

Hgb

MCV

PLT

AST

ALT

ALP

γ GTP

TG（空腹 or 食後）

T-CHO（空腹 or 食後）

血糖（空腹 or 食後）

乳酸

「経母乳感染」

分担研究者： 名取道也 国立成育医療センター 副院長
研究協力者： 山口晃史 国立成育医療センター母性内科医師

研究要旨： HIV の経母乳感染を防止することを目的とした基礎的実験を行った。その結果をもとに、母乳中の細胞を孔径 $8\mu\text{m}$ のフィルターにより除去し、ひなたの太陽光線量に相当する $3\text{mW}/\text{cm}^2$ の紫外線を約 60 分照射することが可能な特殊搾乳・哺乳瓶を設計し試作した。

A. 研究目的

我々が開発した特殊な構造を有する搾乳瓶の使用により、授乳を介する母子感染を回避することの可能性を、最終的にはフィールドワークを行った結果母子感染率を低下させることにより証明することを目的としている。HIV 感染母体から児への感染のうち母乳保育を原因とする割合はおよそ 10-30%程度と推測される。経済的理由により抗ウイルス薬の投与が困難、かつ人工栄養も困難な開発途上国では、結果として母子感染による HIV 患者の増加を招いている。乳児の発達・発育に関して母乳の有用性は明らかであり、本搾乳瓶の有用性が確認されれば、開発途上国における経母乳 HIV 母子感染を減少させることが可能となるばかりか、先進国においても HIV 感染母体の母乳保育を可能とする道を開くことが期待される。

B. 研究方法

HIV 感染母体の母乳が、フィルターを装着し酸化チタン処理を行った搾乳瓶を使用することにより感染能力を消失するかを検証する計画の第一歩として、本年度は第一段階として試作した特殊搾乳・哺乳瓶について、その形状、材質などに改良を加えた。母乳中に含まれる細胞をトラップする上で

最適なフィルターのサイズは $8\mu\text{m}$ であることが判明しているが、搾乳・哺乳瓶の試作、改良については、(株)ピジョンの大貫研究室と共同して研究を行った。

またその有効性を検証するため、人工的に HIV を混入させた非感染母乳を、フィルターを組み込んだ特殊搾乳・哺乳瓶で搾乳した後約 1 時間日光下においた母乳を用いて実験を行った。ウイルスの activity は、p24 抗原の濃度換算で 400 ng/ml の HIV-1_{IIIB} を含む母乳を用い、日光下に 60 分置いた後に乳汁を M8166 と 5 分間インキュベートし、RPMI 培地で 3 日間培養後、p24 抗原の産生量を酵素抗体法にて計測して算出した。

C. 研究結果

メンテナンスを考慮し極力シンプルな構造を目指した。試作した特殊搾乳・哺乳瓶は、搾乳カップ（シリコン製）部、フィルター部、貯乳部の三つの部位よりなる。現在フィルターはセルロース製直径 47mm であるが、現在ポリカーボネート製のメンブレンを使用したカートリッジ式フィルターに変更する予定である（図 1）。また乳汁がフィルターを通過する時間を短縮するため、吸引ポンプを用いる方式も試作した（図 2）。図 1 に示した哺乳瓶を用い、フィルターで

ろ過後日光下に 60 分間置いたサンプルの p24 抗原の産生量はほぼ 0 であった。

D. 考察

現在孔径 $8\mu\text{m}$ の取り外し可能なフィルターを装備し、管壁に酸化チタン処理を行い、十分な時間太陽光線の照射が可能な、特殊搾乳哺乳瓶を試作した。この哺乳瓶の有用性の本当の証明のためには、フィールドワークが実施される必要がある。わが国他の多くの国では、HIV 感染母体への抗ウイルス薬の投与、帝王切開による分娩、人工乳による保育などにより母子感染を減少させることが可能となっている。しかし多くの開発途上国では抗ウイルス薬の投与、帝王切開による分娩、人工乳による保育などはコスト面からみて不可能である。この哺乳瓶の有用性を証明するには、開発途上国における水の問題、燃料の問題など国の経済状態に関する状況、文化や識字率などの問題を十分に検討した後のフィールドワークが必要である。

目的とする特殊搾乳・哺乳瓶は、最終的に開発途上国での使用者のコンプライアンスを十分に考えた設計である必要がある。このためには部品数が少ないこと、洗浄や取り扱いが容易であること、耐久性が高いことなどが最低限求められる。今後さらにこれらの観点からの改良が必要と考えている。

E. 結論

HIV の経母乳感染を防止することを目的とした基礎的実験を行った。その結果をもとに、母乳中の細胞を孔径 $8\mu\text{m}$ のフィルターにより除去し、太陽光線を約 60 分照射することが可能な特殊搾乳哺乳瓶を設計し試作した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Yamaguchi K, Sugiyama T, Takizawa M, Honda M and Natori M. Prospects for prevention of mother-to-child HIV transmission via breast milk by filtration and sunlight-UV irradiation. AVR2007 in press.

2) Hayashi S, Sago H, Hayashi R, Nakagawa S, Kitagawa M, Miyasaka K, Chiba T, Natori M: Manifestation of Mirror Syndrome after Fetoscopic Laser Photocoagulation in Severe Twin-Twin Transfusion Syndrome. Diagnosis Therapy 2006 ; 21 : 51-54

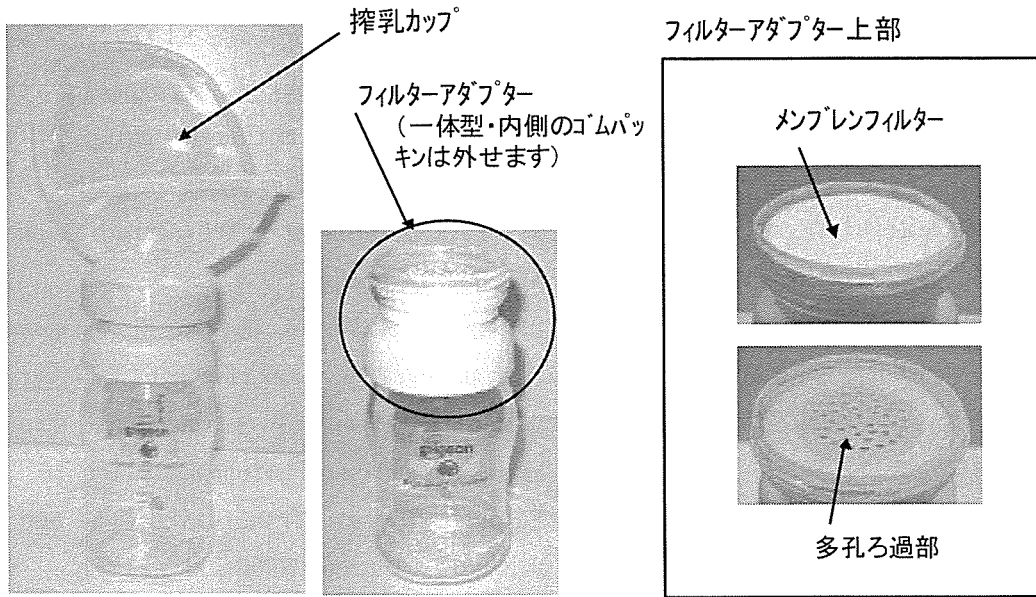
3) Hayashi S, Sago H, Kitano Y, Kuroda T, Honna T, Nakamura T, Ito Y, Kitagawa M, Natori M : Fetal pleuroamniotic shunting for bronchopulmonary sequestration with hydrops. Ultrasound Obstet Gynecol 2006 ; 28 : 963-967

2. 学会発表

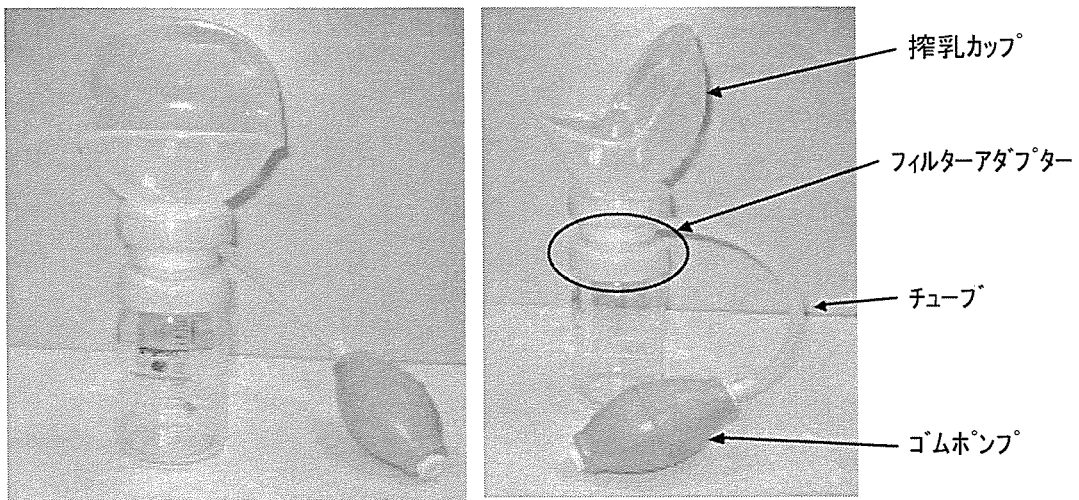
なし

G. 知的所有権の取得状況

なし



●吸引式



「周産期・小児・生殖医療における HIV 感染対策に関する集学的研究」班
「HIV 陽性男性、陰性女性夫婦に対する生殖補助医療の応用に関する基礎的・臨床的
研究」

分担研究者	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
研究協力者	花房秀次 高桑好一	荻窪病院血液科部長 新潟大学大学院医歯学総合研究科（産婦人科） 助教授
	加藤真吾 兼子 智	慶応義塾大学医学部微生物学教室助手 東京歯科大学市川病院産婦人科講師

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 陽性男性、陰性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、本研究班では夫精液から HIV ウイルスを除去する方法を開発し、HIV 陽性男性、陰性女性夫婦が安全に妊娠しうるような生殖補助医療技術の開発を進めてきたが、本年度はさらに検討を進めた。すなわち、1. HIV 陽性男性、陰性女性夫婦に対する体外受精に関する基礎的・臨床的検討、2. HIV 陽性男性、陰性女性夫婦に対する人工授精の応用に関する基礎研究をテーマとして、研究を進めた。1. HIV 陽性男性、陰性女性夫婦に対する体外受精に関する基礎的・臨床的検討については、夫精液から HIV ウイルスを除去し体外受精・胚移植を実施しているが、平成 12 年からの総合的な成績は、55 名に胚移植を実施し、37 名が妊娠し、36 名の児が出生している。体外受精・胚移植を実施した女性ならびに出生した児に HIV 感染は認められていない。2. HIV 陽性男性、陰性女性夫婦に対する人工授精の応用に関する基礎研究に関しての結果については以下のとおりである。(1) 人工授精の実際の臨床応用に際しては、体外受精・胚移植に比較して多量の精子数が必要となる。このため従来の Percoll 法、Swim up 法に比較しより効率的な精子回収法と考えられる swim side allay (SSA) を作製し、その有用性を検討し有用であることを確認した。(2) 人工授精を行う際には、調整した精子から HIV が除去されていることを確認する作業に 6 時間程度の時間を要する。この間、調整した精子を保存する至適条件について検討し、血清を添加した培養液で保存した精子は、他の条件と比較して、運動率の低下は少ないものの、DNA 損傷率が若干高いことが観察された。(3) 人工授精に用いる精子のダメージは少ないほど臨床成績が上昇すると考えられる。精子と HIV ウイルスを分離するためには Percoll 法および swim-up 法が広く用いられているが、我々はその分離工程において精子が受けるダメージの差が各症例ごとに異なることを臨床的に認識していた。そこで本法の安全性の確立を目的に、精子の遺伝子発現パターンと、そこから着目した遺伝子多型を各症例ごとに調べることで、本法による精子のダメージ予測ができないかどうか検討を行った。その結果精子に対するダメージの保護に関与する遺伝子群の存在の可能性が認められた。(4) より簡便にそしてコンタミネーションを防ぎうる超高感度 PCR 法の開発を試み、有用性を確認した。

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 キャリアの状態で

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 陽性男性、陰性女性の夫婦が拳児を希望し、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 量と関連し、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があるが、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。

われわれは、平成 12 年度から厚生労働科学研究所の研究として、「HIV 陽性男性、陰性女性夫婦に対する体外受精・胚移植の臨床応用」に取り組んできた。HIV 陽性男性の精液から改良 Percoll-Swim up 法により HIV を極力除去し精子浮遊液を調整し、1 コピー/ml の HIV-RNA を検出可能な超高感度 PCR 法を併用することにより、より安全に（妻の二次感染を極力防ぎ）妊娠しようするようなプロトコールを開発してきた。本研究において、このような体外受精-胚移植の有効性と安全性をさらに確認するとともに、女性にとってより負担の少ない人工授精の臨床応用をめざした基礎的検討を行った。

B 研究方法

1. HIV 陽性男性、陰性女性夫婦に対する体外受精に関する基礎的・臨床的検討

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 copy/ml の世界最高感度の PCR の開発に成功している（表 1）。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、陰性女性夫婦に対し、体外受精-胚移植を実施している。

(1) 「HIV 陽性男性、陰性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、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 陽性男性、陰性女性夫婦に対する体外受精-胚移植の臨床応用を実施している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。

(3)「HIV 陽性男性、陰性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。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。

2. HIV 陽性男性、陰性女性夫婦に対する人工授精の応用に関する基礎研究

(1) swim side alley (SSA) 法による運動精子回収率の向上に関する研究

従来生殖補助医療における運動精子の分離には swim up 法が汎用されてきた。この方法は、精液、濃縮精子懸濁液等を培養液等の底部に導入し、自身の運動能により swim up した精子を回収するという方法であるが、本法の問題点として、回収率が低い、操作過程において swim up した精子数をモニターできない、などが挙げられる。今回、これらの問題点を改良した swim side alley (SSA) を作製し、その有用性を検討した。

方法であるが、swim side alley (SSA) は中央に隔壁を有する細溝を 6.0cm ディッシュ内に設置し、隔壁の約 1.0mm 上まで培養液 (1.5ml) を注ぎ、2 列の細溝を連通させた。一方の溝の底部に濃縮精子懸濁液約 0.3ml を導入し、培養ガス環境下、37°C、30 分間静置した後、精子を吸引、回収した (図3)。対照として従来法により swim up を行った。精子濃度、運動率は CASA により測定した。ヒト精液はインフォームドコンセントを得て使用した。

(2) 調整した精子浮遊液を保存する至適条件についての検討

HIV 陽性男性、陰性女性に対して、HIV 除去精子浮遊液を用いた人工授精を実施する際には、妻の二次感染を防ぐという観点から、調整した直後および、人工授精を実施する直前の 2 回、精子浮遊液に関して超高感度 PCR を実施し、陰性であることを確認することが望ましい。精子調整後に HIV が

除去されているかを確認するため6時間程度の時間を要するため、その間の精子浮遊液に関する至適保存条件を検討した。

精子調整後、代替血清添加 HTF、非動化血清添加 HTF、血清添加 HTF での 37°C 保存、および凍結保存を行い、運動率の変化、DNA 損傷率 (TUNEL 法) を比較した (図 4)。

(3) 精子のダメージ保護に関する遺伝子群に関する検討

①マイクロアレイを用いた精子ダメージの保護に関与する遺伝子群の抽出：予備実験として、パーコールを用いた swim-up 法の後、顕微鏡的に精子運動率が明らかに低下した症例、および運動率に差を認めなかった症例を 2 群に分け、精子より RNeasy Mini Kit を用いて抽出した RNA を対象とし、Human 1A Oligo Microarray kit (V2) (約 2 万遺伝子、Agilent) を用いたマイクロアレイ解析を行い、あわせて Real time RT-PCR による発現の確認実験を TaqMan Reverse Transcription Reagents を用いて ABI7900 にて行った。

②SNP 多型解析による精子ダメージ感受性症例の予測：発現解析により得られた候補遺伝子上に存在する SNP をアプライドバイオシステム社の SNP タイピングシステム Taq-Man 法を用いて解析を行った。SNP プローブは Assay-on-Demand、Assay-by-design にて設定した。PCR 反応は Taq-Man Universal PCR master mix を用い、ABI7900 にて判定した。

(4) より簡便かつコンタミネーションを防ぎうる超高感度 PCR 法の開発の試み

HIV-1 検査法のうち、逆転写と 1 回目の PCR を以下のようにして同時に行った。まず、28 μ l の試料に種々の試薬を含むマスター混合液 22 μ l を室温で加えた。反応液の組成は 20 mM Tris-HCl (pH 8.4)、50 mM KCl、3 mM MgCl₂、0.2 mM each dNTP、0.2 μ M GA1FE (上流プライマー)、0.2 μ M GA1RF (下

流プライマー)、4 U RNasin RNase inhibitor (プロメガ)、20 U SuperScript III reverse transcriptase (インビトロジェン)、1 U Platinum Taq DNA polymerase (インビトロジンインビト) である。検体由来 RNA 抽出液の半分ずつ 2 本を試料として用いた。対照としては、PCR 陰性 2 本、PCR 陽性 2 本 (それぞれ 10 コピーの HIV-1 RNA を含む)、HIV-1 陰性試料由来 RNA 抽出液の半分ずつ 2 本、HIV-1 陽性試料 (5 個の HIV-1 を含む) 由来 RNA 抽出液の半分ずつ 2 本を用いた。マスター混合液は、対象試料が 2 検体あることを考慮し、13 本分ずつ事前にまとめて調製した。この反応液をまず 50°C で 10 分保温して逆転写反応を起こさせた後、94°C で 2 分処理し、1 サイクルが 94°C 5 秒、48°C 10 秒、72°C 15 秒の温度変化を 5 サイクル行った後、1 サイクルが 94°C 5 秒、60°C 15 秒の温度変化をさらに 25 サイクル行って cDNA を、最後に 72°C で 1 分処理した。精子、胚培養液、血漿などの検体からの RNA と DNA の精製は従来どおり QIAamp UltraSens Virus Kit (キアゲン) を用いたが、キットの開封時にすべての内包試薬 (Buffer AR、Buffer AB、Buffer AW1、Buffer AW2、Carrier RNA、Proteinase K、Buffer AVE) を 4 検体分ずつ滅菌済みプラスチック試験管に分注した。マスター混合液と QIAamp UltraSens Virus Kit の分注は紫外線を一晚照射した P3 実験室で細心の注意を払って行った。(倫理面への配慮) 本研究は HIV 陽性男性、陰性女性夫婦を対象とした研究であり、倫理面への配慮が重要であることを強く認識している。治療、研究の実施にあたっては、対象各個人から書面による同意を得ることとしている。とくに臨床応用にあたっては、すでに述べたように、医療者側から十分な情報を提供し、夫婦個別の同意を得て実施している。

C 研究結果

1. HIV 陽性男性、陰性女性夫婦に対する体外受精に関する基礎的・臨床的検討

これまでに、55 症例に対し、体外受精・胚移植を実施し、妊娠成立例は 37 例 (67.3%) であった。このうち、初期流産に終わった症例が 9 例であり、子宮外妊娠 1 例

が認められた。27 例で妊娠が継続し、対症例当たりの妊娠継続率は 49.1% となっている。また、生児数は 36 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、生後 3

〜6 か月で採取された血液などで、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。

2. HIV 陽性男性、陰性女性夫婦に対する人工授精の応用に関する基礎研究

(1) swim side allay (SSA)法による運動精子回収率の向上に関する研究

10 精液標本(精子濃度 $42.9 \pm 24.1 \times 10^6/\text{ml}$ 、運動率 $33.2 \pm 9.10\%$)からクッション法で濃縮、調製した精子懸濁液 0.3ml(精液 2.0ml 相当)を用いて、従来法および swim side allay 法で運動精子を分離した。

運動精子回収率は従来法が $7.71 \pm 1.56\%$ であったのに対し、swim side allay 法では $31.7 \pm 5.79\%$ と平均 4.2 倍の運動精子が得られた。

(2) 調整した精子浮遊液を保存する至適条件についての検討

Percoll 法により、精液を調整した直後の精子の運動率、DNA 損傷率はそれぞれ、55.6%、22.4%であった。凍結し解凍した直後はそれぞれ、20.5%、27.3%であった。

HTF と代用血清で 37°C 、5 時間保存した場合の運動率、DNA 損傷率はそれぞれ 24.9%、39.3%であり、HTF と非動化血清で保存した場合の運動率、DNA 損傷率はそれぞれ 27.4%、37.9%であった。また、HTF と血清で保存した場合には運動率、DNA 損傷率はそれぞれ 40.8%、42.4%であった。

(3) 精子のダメージ保護に関する遺伝子群に関する検討

①マイクロアレイを用いた精子ダメージの保護に関与する遺伝子群の抽出：ダメージあり群 5 例、ダメージなし群 5 例にて約 2

万遺伝子を対象に発現解析を行った結果、1020 遺伝子に有意な発現差を認めた。そのうち、p-value から発現差が最も大きいと考えられる有力遺伝子を抽出し Real time RT-PCR による確認実験を行い、有意な発現変化が確認した。

② SNP 多型解析による精子ダメージ感受性症例の予測：上記の有力候補遺伝子内に設定した 46 SNP の多型解析を行った結果、ダメージあり群、ダメージなし群の比較で有意差を認める SNP を認めなかった。

(4) より簡便かつコンタミネーションを防ぎうる超高感度 PCR 法の開発の試み

逆転写と 1 回目の PCR を別に行う従来の方法と両者を同時に行う新しい方法の HIV-1 RNA 検出感度を比較するために、HIV-1 LAI 株 RNA の終点希釈液を用いてそれぞれの方法で $n=45$ のポアソン分布による HIV-1 RNA 定量を行った。その結果、HIV-1 RNA 原液濃度は従来の方法では 1.47 copies/ μl 、改良法では 1.85 copies/ μl となり、両者の間に有意差は認められなかった。

また、5 個のウイルス粒子を含む HTF 培地から RNA を調製し、新しい方法で HIV-1 RNA の検出を行う実験を 20 回繰り返したところ、半分ずつ用いた RNA 抽出液 2 本のうち、2 本とも HIV-1 核酸が検出されたのが 18 回、1 本だけ検出されたのが 2 回であり、2 本とも HIV-1 核酸が検出されなかった例はなかった。以上の結果を受けて、平成 19 年 1 月より、HIV-1 除去精子を用いた生殖医療における HIV-1 検査は改良法によって実施されている。

D 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、この方法により調整された精子浮遊液を用いて HIV 陽性男性、陰性女性夫婦に対する体外受精・胚移植の臨床応用を実施している。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 1 copy/ml)で確認し、HIV 陽性男性、陰性女性夫婦に対する体外受精・胚移植の臨床応用を実施し、その有効

性ならびに安全性について検討を行っている。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ため、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。現在のところ、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おりであり、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。今年度の検討により、体外受精・胚移植の臨床応用により、児を得ることができた症例がさらに集積され、二次感染も認められず、その有効性、安全性についてのデータを集積できたものと判断されるが、さらに症例を増やすことが重要であると判断している。

一方、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、女性に対する身体的負担を考慮した場合、体外受精・胚移植に比較しより簡便な、人工授精の応用も必要と考えられる。上述のように精子浮遊液中にわずかの HIV が残存した場合、妻の子宮に直接精子浮遊液を注入することは二次感染のリスクがごくわずかでも存在することを意味することになるが、現在行っている超高感度 PCR 法により陰性であることが確認される場合、二次感染の可能性は極めて低いものになると考えられる。

今年度の研究においては、人工授精の応用のための基礎的検討を行った。精子懸濁液に直接培養液を層積する従来の swim up 法においては、個々の運動精子が swim up, down をくり返しており、回収率は低いことが指摘されていた。これに対し、今回開発した swim side array 法では隔壁を越えて反対側の溝に移動した精子が沈下、蓄積するため回収率が向上したと考えられる。また、本法は精子の移動を顕微鏡下にモニターできるので、生殖補助医療に必要、十分な運動精子が回収されたことを確認後に操作を終了できた。これらのことから人工授精の臨床応用に際し、swim side array 法は極めて有用であるものと考えられる。

また、すでに述べたように、HIV 陽性男

性、陰性女性に対して、HIV 除去精子浮遊液を用いた人工授精を実施する際には、妻の二次感染を防ぐという観点から、調整した直後および、人工授精を実施する直前の 2 回、精子浮遊液に関して超高感度 PCR を実施し、陰性であることを確認することが望ましい。精子調整後に HIV が除去されているかを確認するため 6 時間程度の時間を要するため、その間の精子浮遊液に関する至適保存条件を検討したが、その結果、血清添加 HTF、37°C で保存した場合、40.8% の運動率が認められた。ただし、DNA 損傷率が若干高く、今後検討する必要があるものと判断される。

人工授精を実施するに当たっては、精子のダメージが少ないほど、成功率が上昇すると考えられる。そこで、精子のダメージに対し保護的に作用する遺伝子の有無の検討を行った。その結果、そのような遺伝子の存在の可能性が示唆されたが、これにより、事前に遺伝子型を検査することにより、精子調整によるダメージの程度を推察できる可能性がある。ただし、今後さらなる検討が必要であるものと思われる。

より簡便かつコンタミネーションを防ぎうる超高感度 PCR 法の開発の試みに関してであるが、逆転写と 1 回目の PCR を同時に行うように検査法を変更したが、それによる HIV-1 RNA の検出感度の低下は認められなかった。この変更によって、PCR 前のチューブの開け閉めを行う必要がなくなった。このことは、HIV-1 核酸のコンタミネーションを抑える上で大きく寄与すると思われる。また、1 回の反応で分析できる試料 RNA 液の体積を従来法の倍に増やすことができるようになった。その結果、従来法では検体から抽出した RNA 液を 4 分割してそれぞれ HIV-1 核酸を分析していたが、改良法では 2 分割して分析できるようになり、検査法がかなり簡便化された。核酸精製キットの分注とマスター混合液の調製を事前にまとめることにより検査試薬のキット化を計り、酵素以外のすべての試薬が使い捨てできるようにした。これによって検査試薬へのコンタミネーションの危険性が低減することが期待される。この方法の信頼性を確実なものにするためには、キット調製時にコンタミネーションが起きないように細心の注意を払いことと、ロットチェックを頻