12) 阪木淳子，辻麻理子，長与由紀子，井上緑，米山朋子，首藤美奈子，山本政弘：自治体派遣カウンセラーの活用拡大に関する研究　HIV 検査相談研修会の実践からの考察．第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会．2008.11. 26-28（大阪）

13) 長与由紀子，城崎真弓，辻麻理子，本松由紀，首藤美奈子，安藤仁，南留美，山本政弘：社会的背景の複雑な患者の退院調整を振り返って　発達地帯の患者の事例を通して．第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会．2008.11. 26-28（大阪）

14) 森尚義，谷口晴記：Darunavir と Raltegravir の併用が奏効した多剤耐性の症例．第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会．2008.11. 26-28（大阪）

15) 田沼順子，大金美和，矢崎博久，本田美和子，潟永博之，照屋勝治，立川夏夫，菊池嘉，岡慎一，瓜生英子，山中純子，国方徹也，宮澤廣文，松下竹次，源河いくみ：当院における HIV 合併妊娠に対する抗レトロウイルス療法．第 82 回日本感染症学会．2008.04.19（島根）

16) 塚原優己，井上孝実，谷口晴記，山田里佳，明城光三，大島教子，林公一，蓮尾泰之，佐久本薫，喜多恒和，和田裕一，稲葉憲之：わが国独自の「HIV 母子感染予防対策マニュアル」改訂の骨子．第 60 回日本産科婦人科学会総会．2008.04.12-15（横浜）

17) 谷口晴記，田中浩彦，吉田佳代，樋口恭仁子，朝倉徹夫：特別な支援を必要とした外国人 HIV 感染妊婦の 3 症例．第 60 回日本産科婦人科学会総会．2008.04.12-15（横浜）

18) 谷口晴記，塚原優己，井上孝実，山田里佳，大金美和，辻麻里子，内山正子，渡邊英恵，源河いくみ，外川正生，喜多恒和，稲葉憲之，和田裕一：HIV 母子感染予防対策—マニュアル・改訂第 5 版について．第 26 回日本産婦人科感染症研究会．2008.06.14（宮崎）

19) 草川聡子，杉本和史，橋本明，森尚義，谷口晴記：いきなりエイズの 1 例．平成 1 9 年度三重 HIV 会議．　2008.03.14（津）

4．講演

1) 塚原優己：HIV 母子感染予防対策と多剤併用療法 20 年—現在の問題点とその対策—．第 16 回静岡エイズシンポジウム．2009.03.14（静岡）

2) 塚原優己：教育シンポジウム　プライマリケアに必要な専門領域の知識 ―骨盤領域（直腸・泌尿器・産婦人科）におけるプライマリケアー；妊娠・分娩にかかわる外科系知識．第 33 回日本外科系連合学会学術集会．2008.07.12-13（浦安）

3) 山田里佳：HIV 母子感染予防対策マニュアル（第 5 版）その変遷．エイズ予防財団主催平成 20 年度研究成果発表会「わが国における妊婦の HIV 感染～対応策とその進歩」．2006.11.01（富山）

4) 谷口晴記：母子感染予防対策マニュアルとその変遷．エイズ予防財団主催平成 20 年度研究成果発表会「わが国における妊婦の HIV 感染～対応策とその進歩」．2006.1.24（仙台）

5) 谷口晴記：母子感染予防対策マニュアルとその変遷．エイズ予防財団主催平成 20 年度研究成果発表会「わが国における妊婦の HIV 感染～対応策とその進歩」．2006.2.01（佐世保）

6) 大金美和： HIV 陽性者のためのプログラム．ぷれいす東京主催 何でも訊いてみよう HIV 医療．2008 年 2 月（東京）

7) 大金美和：女性・CSW の課題とアプローチ．（財）エイズ予防財団主催平成 20 年度「エイズ予防・ケア研修会（入門編）」．東京，7 月，2008 年 7 月（東京）

8) 大金美和：HIV 感染妊婦の心理状況とそのケア，知っておきたい 検査・相談で役立つ妊婦の HIV 検査と母子感染対策の最新情報．AIDS 文化フォーラム in 横浜 HIV/AIDS 保健・医療・教育関係者向け研修．2008 年 8 月（横浜）．

9) 辻麻理子，古谷野淳子，高田知恵子：第 7 分科会 HIV 領域．日本臨床心理士会第 14 回医療における心理臨床ワークショップ．2008.02.10（東京）

10) 辻麻理子：性の多様性を考える．（財）エイズ予防財団平成 20 年度 HIV 検査・相談研修会（応

用編）．2008.05.16-17（東京）

11）<u>辻麻理子</u>：担当者の基本姿勢．（財）エイズ予防財団平成 20 年度 HIV 検査・相談研修会（基礎編）．2008.09.16（東京）

12）<u>辻麻理子</u>：HIV 感染者と人権．福岡県主催平成 20 年度人権相談従事職員研修．2008.09.17（福岡）

13）<u>辻麻理子</u>：HIV 陽性者のメンタルヘルス．（財）エイズ予防財団平成 20 年度予防ケア研修（入門編）．2008.10.11-12（福岡）

14）<u>辻麻理子</u>：子どもと HIV．福岡 HIV ネットワークシンポジウム．2008.12. 12（福岡）

平成20年度厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
「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

分担研究（経母乳感染）研究報告書

分担研究者：名取道也　国立成育医療センター研究所長
研究協力者：山口晃史　国立成育医療センター病院母性内科医師

研究要旨：HIV の経母乳感染を防止することを目的とした前フィールドワーク研究を行った。現在までの研究において、母乳中の細胞を孔径 8μm のフィルターにより除去して哺乳が可能な特殊搾乳・哺乳瓶を試作したが、研究室での実験で問題がなかったフィルターが、ボランティアの協力により行われた母乳を直接哺乳瓶にて濾過する試験において、容易に目詰まりを起こすことが判明した。この原因は温度の低下による脂肪の変化と考えているが、フィルターを含め濾過方式の再検討を開始した。またフィールドワークを予定しているラオスに渡航し、ビエンチャンにおいて現地の調査を行い、母子保健指導担当者の配備状況等を確認した。

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た。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ィルス薬の投与が困難、また人工栄養等一般的に標準とされる対応が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 感染母体の母乳は、8μm のフィルターを通過させることにより細胞成分が除去され、この目的に沿った搾乳・哺乳瓶の試作、改良について㈱ピジョンの大貫研究室と共同して研究を行った。

平成 20 年度は試作した哺乳瓶が大量生産に向くよう、また消毒などを含め開発途上国での実際の使用に耐えうるような仕様とするための改良を行ったが、ボランティアの協力により行われた母乳を直接哺乳瓶にて濾過する試験において、容易に目詰まりを起こすことが判明した。

3 名の授乳中のボランティアーに依頼して、試作した特殊哺乳瓶中に乳汁を搾乳して、陰圧によりフィルターを通過させて貯乳する方法に参加してもらった。フィルター目詰まりの原因究明のために冷凍保存してある母乳を解凍し、温度を変えてフィルター通過性の実験を行った。

またフィールドワークを想定しての現地調査をラオスに渡航して行った。

C　研究結果

研究に協力いただいた授乳婦の実験では、1名では 50ml のフィルター処理に 5 分、次の50mlのフィルター処理に同じく5分を必要とした。乳汁中細胞量はそれぞれ 3 X 10^3 cells/ml、1.8 X 10^3 cells/ml であり、フィルター処理後の細胞数は 0 であった。2 番目の協力者では最初の50ml のフィルター処理が 8 分、次の 50ml のフィルター処理に 20 分を必要とした。さらに細胞は濾過されておらず、事後の聞き取りから、濾過にかなりの圧力を要したこと、予想外に濾過に時間を要したためフィルター部分を触ったことが判明した。これを踏まえ 3 番目の協力者では母乳を単に 50ml とってもらい、研究者が直ちに濾過処理を行った。高い圧力で濾過を行ったが、フィルターは目詰まりを起こしたと考えられた。

冷凍保存してある母乳を解凍し、温度を変えてフィルター通過性の実験を行った結果、一旦温度が低下した母乳は 37.5 度に上昇させてもフィルターの通過に大きな支障があることが判明した。

D 考察

フィールドワーク用特殊哺乳瓶の開発を行ってきたが、いわゆる粉ミルクでは全く問題がなかった装置が、3 例中 2 例で母乳ではフィルターによる濾過に大きな問題が生じることとなった。

その原因は人工乳では通過障害がみられなかったこと、冷凍－解凍の母乳にも通過障害が求められたことから、脂質が最もその原因として再検討を行っている。

今後これらの原因を明らかとし、脂質通過とフィルター素材、陰圧に対するフィルター口径の安定した素材、有効フィルター処理面積、吸引力の検討を行う必要がある。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。開発途上国での使用者のコンプライアンスを充分に考えた設計である必要があり、フィルター部分のディスポーザブル化または回収・再処理後の再配達などの方式を検討する。

わが国他の多くの国では、HIV 感染母体への抗ウィルス薬の投与、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ィルス薬の投与、帝王切開による分娩、人工乳による保育などはシステムやコスト面からみて困難が多い。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充分に検討した後のフィールドワークが必要である。

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研究を行った。その結果をもとに、母乳中の細胞を孔径 8μm のフィルターにより除去することが可能な特殊搾乳哺乳瓶を設計し試作した。

しかしボランティアによる臨床試験ではフィルターの濾過能力に問題があることが判明し、再検討することとなった。またフィールドの調査を行った。開発途上故国におけるフィールドワークを実施するため、哺乳瓶の配布、回収、教育などの運用とも関連して機器の設計について更なる改良を行いたい。

F 研究発表

1．論文発表

なし

2．学会発表

なし

H. 知的所有権の取得状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
「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
研究分担報告書

子宮頚管粘液中 HIV コピー数、α-defensins (1-3)、Secretory Leukocyte Protease Inhibitor (SLPI) 測定による経膣分娩選択の可能性

研究分担者	大島　敦子	獨協医科大学医学部産科婦人科学講座講師
研究協力者	稲葉　憲之	獨協医科大学医学部産科婦人科学講座主任教授
	戸谷　良造	和合病院　副院長
	渡辺　博	獨協医科大学医学部産科婦人科学講座教授
	深澤　一雄	同上
	有坂　治	獨協医科大学医学部小児科学講座教授
	西川　正能	獨協医科大学医学部産科婦人科学講座講師
	岡崎　隆行	獨協医科大学医学部産科婦人科学講座助教
	庄田　亜紀子	同上
	根岸　正実	獨協医科大学医学部産科婦人科学講座大学院
	林田　志峯	同上
	吉田　穂波	ウィミンズ・ウェルネス銀座クリニック
	熊　曙康	大連市婦産医院助教授
	Deshratn Asthana	University of Miami Miller School of Medicine, Associate Professor
	Mugerwa Kidza Yvonne	Instructor, Makerere University, faculty of Medicine, Department of OB/GYN

研究要旨

現状では、先進国において HIV-1 母子感染予防対策の一環としての選択的帝王切開術は標準的である。しかし、母体低 HIV ウイルス量の場合における帝王切開分娩の意義は未だ controversial である。本研究では、子宮頚管粘液中の HIV-1 ウイルス量と生体感染防御マーカーである α-defensins (1-3) および SLPI を測定し、その相関から α-defensins (1-3) と SLPI の経膣分娩選択における有用性を検討した。

A. 研究の目的

先進諸国において HIV-1 母子感染率は約 1.5% と、適切な医療介入を受けた HIV-1 感染妊婦の児への垂直感染率は低率である。一方、サハラ以南のアフリカ諸国や近年特に HIV-1 感染者の増加が著しいアジア圏において、依然 HIV-1 母子感染は主要な HIV-1 感染経路の 1 つである。分娩様式については、先進諸国において標準化されている母体低 HIV-1 ウイルス量（1,000 copies/mL 以下）における選択的帝王切開の有益性に関する明ら

かなエビデンスは得られておらず、またHIV感染妊婦においては術後合併症が有為に増加するという報告がある。

一方、近年種々の自然免疫因子の研究が盛んであるが HIV-1 と自然免疫防御を担うα-defensinsおよびSLPIの2つの因子の関連が示唆されている。本研究では頚管粘液中の SLPI とα-defensins を測定、母体低 HIV-1 ウイルス量症例においてこれらの因子と母子感染とに関連を認めた場合、分娩方法選択に際し補助的診断となる事が考えられ、よりリスクの高い帝王切開術を避ける手段となり得る。またHIV-1母子感染の機序は未だ完全に解明されておらず、自然免疫防御因子の側面から解明を試みる当研究は必要と考えられる。

B. 研究方法

1） α-defensins

日本人のHIV感染妊婦（2名）の分娩時母体血-臍帯血ペア検体においてα-defensin 1-3 濃度を sandwich ELISA kit により測定し、HIV 非感染妊婦の結果と比較した。

2）SLPI

本邦においては、HIV-1感染妊婦の症例数が極めて少ないため、検体を米国マイアミの Jackson Memorial Hospital で採取した。対象は 34 名のHIV-1感染妊婦で、インフォームドコンセントを得て子宮頚管粘液および血清の検体採取を行った。また対照として、HIV-1 感染非妊婦 35 名、HIV-1非感染妊婦15名をリクルートした。

収集された頚管粘液および血清の SLPI 定量は市販されているELISAキットを用い測定

(Quantikine kit, from R&D System, Minneapolis, Minn.)。頚管粘液および血清中HIV-1ウイルス量測定はRT-PCR kit (AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test V1.5, Roche Diagnostic, Indianapolis, IN)を用いた。更に母体T細胞サブセットをフローサイトメトリーで解析した（FACS Calibur, BD Biosciences, San Jose, CA.)。

また研究協力施設の小児科と連携しHIV-1感染妊婦の出生児の母子感染成立の有無を追跡した。

（倫理面への配慮）

検体採取にあたっては学内倫理委員会の指針に基づく同意書を作成し、インフォームドコンセントを得た。またデータの管理においては、個人情報保護法に基づいて細心の注意を払った。

C. 研究結果

1） α-defensins

図1に臍帯血中α-defensin 1-3 濃度を示す。臍帯血中α-defensin 1-3濃度は陰性妊婦群の範囲内にあり、母体血／臍帯血濃度比は 0.09 で陰性群（4.0）に比して低値であった。

2）HIV-1ウイルス量とSLPI

初産婦が 14 人（41.2%）、28 人（82.4%）が妊娠前に HIV-1 感染を診断されていたが 5 人（14.7%）のみが ART が行われていた。人種構成はアフリカ系米国人 21 人（62%）、ハイチ系 6 人（18%）、ヒスパニック系 4 人（12%）、白人 3 人（8%）であった。HIV 感染経路は 32 名（94%）が heterosexual contact によるもので、母子感染によるものが2名いた。

85%の妊婦に血中 HIV-1 ウイルス量が 25 copies/ml 以上検出され、頚管粘液中では 68%に検出された。平均HIV-1ウイルス量は血中 93,530 copies/ml、頚管粘液中 8,018 copies/ml であった。血中および頚管粘液中のHIV-1ウイルス量に

統計学的有為な相関関係を認めた。

一方34例中5例（14.7%）において、頚管粘液中HIV-1ウイルス量が血中を上回った。個々の値はそれぞれ血中44 / 頚管粘液210 （以下x/y）、<25/1,000 、 4,600/20,000 、 1,800/11,000 、39,000/100,00であった。つまり血中HIV-1ウイルス量が頚管粘液中 HIV-1 ウイルス量を反映しない症例が存在し、このことから血中HIV-1ウイルス量が1,000 copies/ml以下のHIV-1母子感染低危険群において、局所のHIV-1増殖を確認するために頚管粘液中 HIV-1 ウイルス量を測定する事は有用であると考えられた。

次に、図2に示したようにSLPI値はCVF中において血中の約10倍の高値を呈し、妊娠により更に増加する事が示された。またHIV-1感染妊婦とHIV-1非感染妊婦のCVF 中SLPI値は、非感染者で有意に高かった（mean±SD: 397.2±286.9 vs 184.1±194.9ng/mL; $p<0.01$）。更にHIV-1感染妊婦において分娩様式別のCVF中HIV-1ウイルス量およびSLPI値の比較では、帝王切開群において経腟分娩群と比較してCVF中HIV-1ウイルス量は有意に多く（mean 3,130 vs 145 copies/m; $p<0.01$）、一方CVF中SLPI値は有意に低値を示した（mean 260 vs 520 ng/mL; $p<0.05$）（図3）。

D. 考　察

1） α-defensins

HIV-1母子感染とdefensinsに関する研究は少ない。母乳中α-defensinがHIV-1母子感染と関連を認めたという報告があるが、妊婦血中および頚管粘液中α-defensinとHIV-1母子感染との研究は調べる限り未だない。一方、妊娠中の細菌性腟症と腟分泌液中 defensins 濃度に有為な相関関係を認めた報告があり、頚管粘液中α-defensinの局所感染防御とHIV-1母子感染の研究は興味深いと思われる。今回は予備実験のため、カリニ肺炎を併発した HIV-1感染妊婦の血中α-defensinsのみの測定であった。HIV陽性妊婦の血中α-defensin 1-3濃度は、陰性群とは違って妊娠経過とともに低下する傾向にあった。治療経過より、血中α-defensin 1-3濃度がカリニ肺炎の病勢を反映したと考えるのが最も自然であるが、高濃度のα-defensin 1-3が抗HIV作用を発揮した可能性も否定はできない。また、好中球減少症はAZTの一般的な副作用であり、マウスの好中球分化を抑制したとの報告がある。本症例の臍帯血中α-defensin 1-3濃度はHIV陰性群とほぼ同等であった。すなわち母児間血中α-defensin 1-3濃度勾配が陰性群よりも緩やかであった。母体血中からの移行分に加え、胎児骨髄ではさかんにα-defensin 1-3が合成されている。胎児骨髄では、胎盤を介して移行したAZTの作用を受けてもなお豊富なα-defensin 1-3の供給が推測される。実際、AZT治療中の妊婦より出生した児での好中球減少症の報告はない。引き続きHIV陽性妊婦検体について血中α-defensin 1-3濃度を測定すると共に、AZTのヒト好中球への作用機序とα-defensin 1-3放出に対する影響、胎児・胎盤系でのα-defensin 1-3発現状況並びにAZTの作用機序につき検討を要する。

2） SLPI

現在、分娩前の血中HIV-1ウイルス量が1,000 copies/ml以下の妊婦に対する選択的帝王切開術の有益性は未だ明らかではない*。今回 CVF 中HIV-1 ウイルス量が血中 HIV-VL を上回る症例を１５%認めたことより、頚管内HIV-1 VLの測定は分娩方法の判断に際して有用である可能性が示唆された。

一方、CVF 中 SLPI は細菌性腟症を含む性感染症合併時に低値を呈し、これが HIV-1 感染の感受性を高める危険因子と考えられるという報告があるが、実際に HIV-1 感染婦人又は妊婦における頸管粘液中／腟分泌物中 SLPI の研究はこれまでのところ1文献のみである。SLPI は粘膜における感染防御免疫において重要な役割を担っている事が判明、ヒト子宮内膜や子宮頚管、脱落膜、羊水中での発現が確認されており女性生殖器における感染防御に大きく関わっていると考えられる。本研究では HIV-1 妊婦における血中および頚管粘液中の SLPI 濃度を測定した。頚管粘液では血中の 10 倍の高濃度であり、SLPI が子宮頸部において粘膜免疫として働いている事がわかる。今回、HIV-1 非感染妊婦において CVF 中 SLPI が最も高値を示した事より、HIV-1 感染により局所免疫の低下が示唆され、SLPI が HIV-1 の母子感染防御に関与している可能性が考えられた。またこれは、帝王切開群において血中 HIV-1 ウイルス量が高値であるが、SLPI 値は逆相関していた事からも、HIV-1 感染との関与が示唆された。

*: Public Health Service Task Force, Recommendation for Use of Antiretroviral Drugs in Pregnant HIV-1 Infected Women for Maternal Health and Interventions to Reduce Perinatal HIV-1 Transmission in the US

E. 結　論

今回の検討で、頚管粘液中の HIV-1 ウイルス量が血中を上回る症例が存在したことから、HIV-1 陽性妊婦の分娩様式を決定する上で血中 HIV-1 ウイルス量測定以外の補助診断が必要である事が示された。α-defensins や SLPI など生体内免疫防御マーカーや頚管粘液中 HIV-1 ウイルス量がその役目を担っている可能性が示唆され、今後更なる研究が必要と考えられた。

F.　**健康危険情報**　なし

G.　研究発表

論文発表

1. Kitajima K, Murakami K, Yamazaki E, Hagiwara S, Fukasawa I, Inaba N, Kaji Y, Sugimura K: Performance of FDG-PET/CT in the diagnosis of recurrent endometrial cancer. Ann Nucl Med 22:103-09, 2008
2. Shiraki K, Ohto H, Inaba N, Fujisawa T, Tajiri H, Kanzaki S, Matsui A, Morishima T, Goto K, Kimura A, Hino S: Guidelines for care of pregnant women carrying hepatitis C virus and their infants. Pediat Int 50: 138-40, 2008
3. Schdeva N, Oshima K, Cotter A, Ashman M, Davila L, Okazaki T, Inaba N, Asthana D : Analysis of immunological markers associated with pregnancy and HIV-1 infection; Relevance in perinatal transmission in HIV-1-infected pregnant women with low plasma viral load : Am J Reprod Immunol 60: 264-273, 2008
4. Hayashi M, Tomita S, Fukasawa I, Inaba N: Large angioleiomyoma, rich of mast cell and sex hormone receptor. Archices of Gynecology and Obstetrics 279: 932-67, 2008
5. 渡辺 博、西川正能、根岸正実、稲葉憲之：［あなたの患者が妊娠したら一内科疾患患者の妊娠相談］C 型肝炎ウイルスキャリアの妊娠. JIM 18: 238-40, 2008
6. 稲葉憲之：周産期における HIV 感染の現状一

厚労省班研究に基づいて.日本産科婦人科学会熊本地方部会雑誌 52:25-29,2008

7. 山崎龍王、渡辺博、稲葉未知世、深澤一雄、野口崇夫、稲葉憲之：当院における受刑者の分娩の検討. 矯正医学 57:6-8,2008

8. 田所 望、稲葉憲之：周産期診療プラクティス 呼吸器疾患合併妊娠. 産婦人科治療 96:201-05, 2008

9. 坂本尚徳、深澤一雄、稲葉憲之：婦人科疾患とPET. 産婦人科治療 96:882 - 88,2008

10. 安田 充、上坊敏子、古谷健一、大蔵健義、吉川裕之、稲葉憲之、佐々木寛、鈴木光明、小西郁生:表層上皮性卵巣癌に対する初回化学療法としてのDocetaxel/Carboplatin(DC)療法の検討. 日本婦人科腫瘍学会雑誌 26 :149-154,2008

11. 稲葉憲之、大島教子、林田志峯、西川正能、林田綾子、岡崎隆行、庄田亜紀子、稲葉未知世、根岸正実、多田和美、稲葉不知之、田所望、深澤一雄、渡辺 博、高見澤裕吉：肝炎ウイルス.産科と婦人科 75:1504-1510,2008

12. 渡辺 博、多田和美、大島教子、稲葉憲之：臍帯の構造異常.周産期医学 38:1129-1132,2008

13. 稲葉憲之、大島教子、林田志峯、西川正能、岡崎隆行、庄田亜紀子、稲葉未知世、根岸正実、多田和美、稲葉不知之、田所 望、深澤一雄、渡辺 博、高見澤裕吉:わが教室における妊産婦の感染症管理 - とくにB型肝炎ウイルスの母子感染対策について - The management of infectious diseases at department of OBGY, Faculitu of Medicine, Dokkyo Medical University with special reference to HBV mother-to-child transmission(MTCT). 産婦人科治療 97:509-516,2008

14. 稲葉憲之、大島教子、林田志峯、西川正能、岡崎隆行、庄田亜紀子、稲葉未知世、根岸正実、多田和美、稲葉不知之、田所 望、深澤一雄、渡辺 博、熊 曙康、高見澤裕吉：母体ウイルス感染と母乳哺育. 産科と婦人科 76:62-66,2009

15. 林田志峯、稲葉憲之、大島教子、西川正能、岡崎隆行、庄田亜紀子、根岸正実、稲葉未知世、深澤一雄、渡辺 博、高見澤裕吉：HBV母子感染予防対策の比較検討―厚生省方式、千葉大方式、獨協医大方式―.関東連合地方部会会誌 45:381-84,2009

16. 林田志峯、稲葉憲之、大島教子、西川正能、多田和美、庄田亜紀子、岡崎隆行、林田綾子、稲葉未知世、田所 望、深澤一雄、渡辺 博、高見沢裕吉：HBV MTCT対策漏れゼロを目指した予防法の確立―厚生省方式より千葉大、獨協医大方式へ―.栃木県産婦人科医報（発行予定)

17. 坂本尚徳、深澤一雄、稲葉憲之；Gynecologic Cancer 婦人科がん 婦人科がん治療ガイドライン策定の背景と今後の動向Ⅱ. 子宮頸癌再発の治療.癌と化学療法 36:209-214,2008

18. 稲葉憲之、大島教子、西川正能、岡崎隆行、庄田亜紀子、根岸正実、林田志峯、稲葉未知世、和田裕一、喜多恒和、外川正生、塚原優己、名取道也、牛島廣治、戸谷良造、五味淵秀人、早川 智、尾崎由和、吉野直人、田中憲一、熊 曙康:周産期におけるHIV/エイズ、その現状と対策 - 厚労省研究班の成績をもとに.臨床婦人科産科 63:151-55,2009

学会発表

1. N Inaba, K Oshima, S Hayashida, A Shoda, M Negishi, M Inaba: National cooperative group study on HIV MTCT in Japan supported by the Japan Ministry of Health, Labour and Welfare, 2003-2008. 4th APCMF 10.17-19, 2008 (Macau)
2. S Hayashida, N Inaba, K Oshima, A Shoda, M Negishi, M Inaba : The evidence-based method for preventing HBV MTCT-the cooperative clinical study supported by Japan two Ministries of Health and, Labour and Welfare and Education and Science. 4th APCMF 10.17-19, 2008 (Macau)
3. M Inaba, N Inaba, K Oshima, S Hayashida, A Shoda, M Negishi : The frequency of TT virus (TTV) in Japanese non-pathological pregnant women and the women co-infected with hepatitis B, C and G viruses and the natural history of TTV mother-to-child transmission. 4th APCMF 10.17-19, 2008 (Macau)
4. N Inaba:Perinatal HIV infection in Japan-Based on national cooperative group study supported by ministry of health, labor and welfare, 2003-2008. 2009 TAOG Annual Meeting 3.1, 2009
5. 根岸正実、林田志峯、岡崎隆行、庄田亜紀子、西川正能、大島教子、渡辺　博、稲葉憲之：C型肝炎ウイルス(HCV)キャリア母から生まれた同胞の予後－HCVリスクファクターの検討. 第60回日本産科婦人科学会学術講演会 4.12-15, 2008 (横浜)
6. 西川正能、稲葉憲之、大島教子、岡崎隆行、庄田亜紀子、根岸正実、林田志峯、深澤一雄、渡辺　博大戸　斉、白木和夫：C型肝炎ウイルスキャリア妊婦・出生児の母子感染率と予後－厚労省班研究成果から. 第60回日本産科婦人科学会学術講演会 4.12-15, 2008 (横浜)
7. 大島教子、林田志峯、根岸正実、岡崎隆行、庄田亜紀子、西川正能、渡辺 博、稲葉憲之：HIV感染妊婦における頚管粘液中 Secretroy leukocyte protease inhibitor(SLPI) と sexually transmitted infection(STI)の関連. 第60回日本産科婦人科学会学術講演会 4.12-15, 2008 (横浜)
8. 林田志峯、稲葉憲之、大島教子、西川正能、岡崎隆行、庄田亜紀子、根岸正実、深澤一雄、渡辺　博、高見澤裕吉: HBV母子感染予防対策法の比較検討. 第60回日本産科婦人科学会学術講演会 4.12-15, 2008 (横浜)
9. 香坂信明、田中聡子、稲葉不知之、山崎龍王、朱　坤、亀森　哲、坂本尚徳、山澤功二、深澤一雄、稲葉憲之：卵巣癌Ⅲ期症例における周期的化学療法の有効性の検討. 第60回日本産科婦人科学会学術講演会 4.12-15, 2008 (横浜)
10. 田中聡子、亀森 哲、山崎龍王、稲葉不知之、香坂信明、坂本尚徳、山澤功二、深澤一雄、稲葉憲之：子宮頸癌の診断における FDG-PET の有用性. 第60回日本産科婦人科学会学術講演会 4.12-15, 2008 (横浜)
11. 野口崇夫、渡辺　博、久野達也、林田綾子、星野恵子、北澤正文、稲葉憲之：IVF-ET による双胎妊娠の周産期医療に対する影響について. 第60回日本産科婦人科学会学術講演会 4.12-15, 2008 (横浜)

12. 大石　曜、望月善子、村越友紀、稲葉憲之：閉経周辺期の血清尿酸値の変動に関する検討. 第 60 回日本産科婦人科学会学術講演会 4.12-15,2008（横浜）
13. 坂本尚徳、田中聡子、山崎龍王、稲葉不知之、亀森　哲、香坂信明、山澤功二、深澤一雄、稲葉憲之：再発手術例を含む、卵巣癌における術前 FDG-PET の検討. 第 60 回日本産科婦人科学会学術講演会 4.12-15,2008（横浜）
14. 多田和美、渡辺 博、柳田充雄、林田志峯、岡崎隆行、西川正能、大島教子、田所　望、稲葉憲之: 当センターに受診した妊婦検診未受診者の検討. 第 60 回日本産科婦人科学会学術講演会 4.12-15,2008（横浜）
15. 稲葉不知之、田中聡子、山崎龍王、亀森 哲、香坂信明、坂本尚徳、山澤功二、深澤一雄、稲葉憲之：子宮体癌：small cell carcinoma の１症例. 第 60 回日本産科婦人科学会学術講演会 4.12-15,2008（横浜）
16. 望月善子、大石　曜、村越友紀、稲葉憲之：日本人女性の性機能に関する検討. 第 60 回第 60 回日本産科婦人科学会学術講演会 4.12-15,2008（横浜）
17. 亀森 哲、田中聡子、山崎龍王、稲葉不知之、香坂信明、坂本尚徳、山澤功二、深澤一雄、稲葉憲之：子宮内膜癌組織における子宮内膜間質細胞増殖と IGF-１との関係について. 第 60 回日本産科婦人科学会学術講演会 4.12-15,2008（横浜）
18. 林田綾子、三ツ矢和弘、北澤正文、野口崇夫、久野達也、稲葉憲之：Long protocol による conventional IVF においてｈCG 切り替え日の血中 progesterone 値が種々の要素および妊娠成績に及ぼす影響. 第 60 回日本産科婦人科学会学術講演会 4.12-15,2008（横浜）
19. 矢追正幸、大蔵健義、稲葉憲之：更年期女性におこなった肌のメンテナンス両方－HRT と光治療による美肌への検討. 第 60 回日本産科婦人科学会学術講演会 4.12-15,2008（横浜）
20. 坂本秀一、濱田佳伸、矢追正幸、友部勝実、堀中俊孝、榎本英夫、大蔵健義、稲葉憲之：卵巣性無月経に対し、メトフォルミンが有効であった一例. 第 60 回日本産科婦人科学会学術講演会 4.12-15,2008（横浜）
21. 西川正能、稲葉憲之、大島教子、岡崎隆行、根岸正実、渡辺　博：Ｃ型肝炎ウィルスキャリア妊婦と出生児における母子感染率とその予後. 第 82 回日本感染症学会総会・学術講演会 4.17-18,2008（島根）
22. 根岸正実、林田志峯、岡崎隆行、庄田亜紀子、西川正能、大島教子、稲葉憲之：HCV 陽性妊婦２症例より出生した同胞の予後. 第 82 回日本感染症学会総会・学術講演会 4.17-18,2008（島根）
23. 林田志峯、稲葉憲之、大島教子、西川正能、岡崎隆行、庄田亜紀子、林田綾子、根岸正実：ＨＢＶ母子感染－予防対策法（厚労省方式・千葉大方式・獨協医大方式）の比較検討－. 第 82 回日本感染症学会総会・学術講演会 4.17-18,2008（島根）
24. 多田和美、渡辺　博、柳田充雄、岡崎隆行、西川正能、大島教子、田所　望、稲葉憲之：出生した四倍体(92.XXYY)新生児の一症例. 第 115 回日産婦関東連合地方部会 6.15,2008（東京）
25. 林田志峯、稲葉憲之、大島教子、西川正能、岡崎隆行、庄田亜紀子、林田綾子、根岸正実、

深澤一雄、渡辺　博、高見澤裕吉：妊娠後期に急性B型肝炎を発症したが、体内感染を免れた1例．第26回日本産婦人科感染症研究会学術集会 6.14,2008（宮崎）

26. 根岸正実、林田志峯、岡崎隆行、庄田亜紀子、西川正能、大島教子、渡辺　博、稲葉憲之：HCVキャリア母から生まれた同胞の予後．第26回日本産婦人科感染症研究会学術集会 6.14,2008（宮崎）

27. 大島教子、林田志峯、田中聡子、根岸正実、庄田亜紀子、稲葉不知之、亀森　哲、香坂信明、深澤一雄、渡辺　博：妊娠に合併した巨大尖圭コンジローマの1症例．第26回日本産婦人科感染症研究会学術集会 6.14,2008（宮崎）

28. 村越友紀、渡辺　博、岡崎隆行、多田和美、西川正能、大島教子、稲葉憲之：妊婦のシートベルト、チャイルドシートに関する実態調査．第44回日本周産期・新生児医学会学術集会 7.13-15,2008（横浜）

29. 多田和美、渡辺　博、村越友紀、西川正能、大島教子、田所　望、稲葉憲之：VBAC不成功症例の検討．第44回日本周産期・新生児医学会学術集会 7.13-15,2008（横浜）

30. 野口崇夫、渡辺　博、多田和美、西川正能、大島教子、田所　望、稲葉憲之：当センターにて分娩した妊婦健診未受診者に対する検討．第44回日本周産期・新生児医学会学術集会 7.13-15,2008（横浜）

31. 林田志峯、稲葉憲之、大島教子、西川正能、多田和美、庄田亜紀子、岡崎隆行、林田綾子、稲葉未知世、田所 望、深澤一雄、渡辺 博：HBV MTCT 対策漏れゼロを目指した予防法の確立‐厚労省方式より千葉大、獨協医大方式へ‐．第68回日産婦栃木地方部会 9.7,2008（宇都宮）

32. 鈴村　宏、新田晃久、坪井弥生、渡辺功之、有阪　治、渡辺　博、稲葉憲之：早産児RSウイルス感染予防のためのパリビズマブ投与について‐2007年度の投与実績と効果．第68回日産婦栃木地方部会 9.7,2008（宇都宮）

33. 林田綾子、稲葉不知之、亀森 哲、香坂信明、林　正路、坂本尚徳、深澤一雄、稲葉憲之：子宮腺筋症から発症したと考えられる子宮体癌の一例．第68回日産婦栃木地方部会 9.7,2008（宇都宮）

34. 久野達也、稲葉不知之、亀森 哲、香坂信明、林　正路、坂本尚徳、深澤一雄、稲葉憲之：急激な転機をたどった Primitive neuroectodermal tumor(PNET)の一例．第68回日産婦栃木地方部会 9.7,2008（宇都宮）

35. 林田志峯、稲葉憲之、根岸正実、林田綾子、稲葉不知之、野口崇夫、香坂信明、大島教子、望月善子、北澤正文、深澤一雄、渡辺 博：経膣的子宮筋腫核出術の検討．第31回日本産婦人科手術学会 11.24,2008（金沢）

36. 村越友紀、渡辺　博、岡崎隆行、多田和美、西川正能、大島教子、田所　望、稲葉憲之：妊婦のシートベルト、チャイルドシートに関する実態．第116回日本産科婦人科学会関東連合地方部会・学術集会 11.29-30,2008（宇都宮）

37. 林田志峯、稲葉憲之、根岸正実、林田綾子、稲葉不知之、野口崇夫、香坂信明、大島教子、望月善子、北澤正文、深澤一雄、渡辺　博：当院における経膣的子宮筋腫核出術の検討．第116回日本産科婦人科学会関東連合地方部

会・学術集会 11.29-30,2008（宇都宮）

38. 大石　曜、望月善子、大蔵健義、稲葉憲之：更年期障害に対する漢方治療とSSRIとの併用効果．第36回栃木県産婦人科漢方研究会 12.12,2008（宇都宮）
39. 林　正路、多田和美、香坂信明、深澤一雄、稲葉憲之：卵巣腫瘍の診断で腹腔鏡が施行されたPresacral epidermoid cystの一例．第69回日産婦栃木地方部会 1.25,2009（宇都宮）
40. 稲葉不知之、北澤正文、稲葉未知世、林　正路、深澤一雄、稲葉憲之：腹腔鏡手術コスト削減への道．第69回日産婦栃木地方部会 1.25,2009（宇都宮）
41. 稲葉憲之：わが国の周産期医療におけるHIV感染の現状ー厚労省班研究の成果をもとにー．久留米大学産婦人科平成20年度同門会総会並び学術講演会 11.8,2008（久留米）
42. 稲葉憲之：妊婦HIVスクリーニング栃木方式について．厚生労働省エイズ対策研究事業研究成果発表会 2.1,2009（長崎）

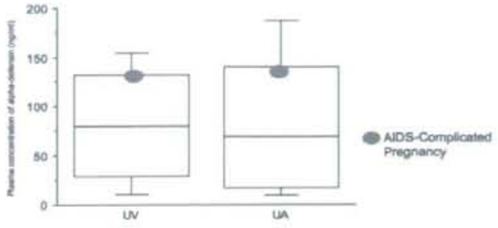
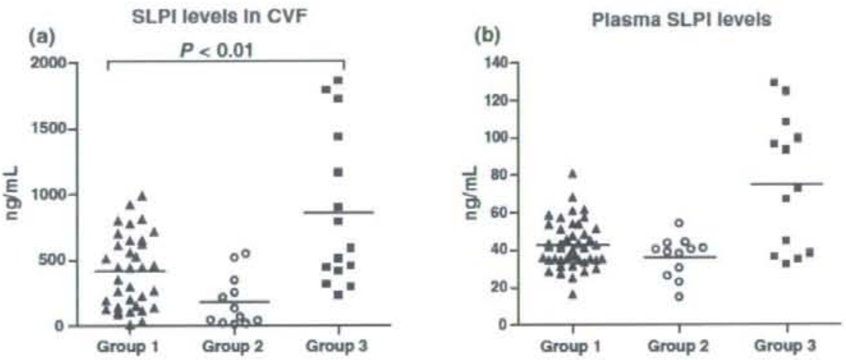


図１　臍帯血中α-defensins濃度の比較



Group 1: HIV-1(+)pregnant　Group2: HIV-1(+)non-pregnant　Group 3: HIV-1(-)pregnant

図２　CVFおよび血中SLPIとHIV-1ウイルス量

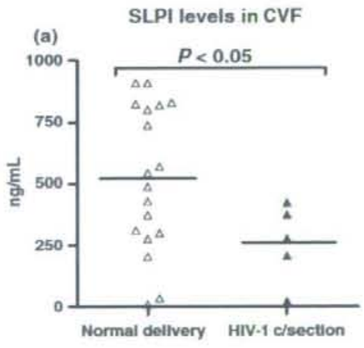


図３　分娩様式とCVF中SLPI

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

平成２０年度分担研究報告書

「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	荻窪病院副院長（血液科）
	高桑好一	新潟大学大学院医歯学総合研究科（産婦人科）准教授
	加藤真吾	慶応義塾大学医学部微生物学教室助教
	兼子智	東京歯科大学市川病院産婦人科講師
	加嶋克則	新潟大学医歯学総合病院産婦人科助教

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、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ついての平成12年からの総合的な成績は以下のとおりである。105名に胚移植を実施し、82名が妊娠し、72名の児が出生している。一方、新潟大学における成績は以下のとおりである。これまでに35名に対し体外受精、胚移植を施行した。22症例(62.9%)に妊娠を認め、17症例が分娩に至り22人の生児が誕生した。1症例は妊娠継続中である。いずれの女性も児もHIVに感染していない。現在、本治療法に対する希望者は増加している状況である。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）ヒト精液からフリーHIVおよび感染リンパ球の除去により得られた精子の性状を観察し、分離技法の安全性を確認する研究を行ったが、その概要は以下のとおりである。ヒト精液からフリーHIVおよび感染リンパ球の除去は、Optidenz沈降平衡法、Percoll沈降速度差遠心分離法による分画、swim up法による運動精子回収を行った。精製過程における精液中細胞のDNA量をフローサイトメトリにより解析した。各射分画中の細胞はPI染色を行った後、解析に供した。精液は血液細胞等の非精子細胞を含むためDNA量は幅広く分布したが、精製の進行に伴い分布幅は狭小化した。本法はHIV除去のみならず、DNA量が均一な精子調製に有用であることが示された。(2) 現在HIV感染男性の精液中のHIVを除去する方法として、Percoll法により精子とHIV virusの分離後、swim upまたはswim side法を行い精子を回収する方法が行われている。これにより高率にHIV virusの除去が可能となっているが、この除去方法だと得られる精子数が少なくなり、通常の方法では受精不可能でIVF（体外受精）が必要になる。さらにHIV感染男性では抗ウイルス剤の治療によって精子数の減少や運動率の低下をきたすことが多く、より効率的なウイルス除去方法の開発が望まれている。このため、中空糸型のカラムを用いたHIV除去に関する検討を開始した。中空糸型のカラムは人工透析、白血球除去療法、血漿交換療法、腹水濾過還元療法等に対する医療用機器として広く使用されている。精子頭部の大きさは2.5-3.5μmであり、HIVウイルスの大きさは約0.1μmである。この大きさの違いを利用し、ウイルスは通過可能で精子は通過できない中空糸を使用し、ウイルス分離用のカラムを試作した。

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。現在、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。

われわれは，平成12年度から厚生労働科学研究班の研究として、「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）妊娠しう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（図1）

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ー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，通常の妊婦健康診査が実施される。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。

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) ヒト精液からフリーHIV および感染リンパ球の除去により得られた精子の性状を観察し、分離技法の安全性を確認する研究については以下のとおりである。ヒト精液のフリーHIV および感染リンパ球と精子の分離には、Optidenz 沈降平衡法、Percoll 沈降速度差遠心分離法が用いられ、swim up 法による運動精子回収を行う。精製過程における精液中細胞の DNA 量をフローサイトメトリにより解析した。各射分画中の細胞は PI 染色を行った後、解析に供した。おのおの 10^4 細胞を観察し、ヒストグラムを作成した。

(2) 効率的に精液中の HIV ウイルスを除去するため、中空糸型のカラムの開発を開始した。中空糸型のカラムは人工透析、白血球除去療法、血漿交換療法、腹水濾過還元療法等に対する医療用機器として広く使用されている。精子頭部の大きさは 2.5-3.5 μm であり、HIV ウイルスの大きさは約 0.1 μm である。この大きさの違いを利用し、ウイルスは通過可能で精子は通過できない中空糸を使用し、ウイルス分離用のカラムを試作した。試作したカラムを用いて、最初に精子の回収率を検討した。

（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

HIV 感染男性、陰性女性夫婦に対する体外受精・胚移植の臨床応用についての平成 12 年からの総合的な成績は以下のとおりである。105 名に胚移植を実施し、82 名が妊娠し、72 名の児が出生している。一方、新潟大学における成績は以下のとおりである。これまでに 35 名に対し体外受精、胚移植を施行した。22 症例(62.9%)に妊娠を認め、17 症例が分娩に至り 22 人の生児が誕生した。1 症例は妊娠継続中である。いずれの女性も児も HIV に感染していない。現在、本治療法に対する希望者は増加している状況である。

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) 精液は半数体である精子の他に2倍体である体細胞、細菌など多種の細胞を含むため、DNA 量は幅広く分布した。原理が異なる 2 種の遠心分離法を組み合わせて細胞分画を行うと、精製の進行に伴い分布幅は狭小化した。Percoll 沈降速度差遠心分離後は、顕微鏡観察により鏡検細胞はほぼ精子で占められることが確認されたが、ヒストグラム上 少数の 2 倍体細胞が残存していた(図3)。

次いで swim up を行うと 2 倍体細胞は消失し、DNA 量が均一な運動精子が得られた。

(2)効率的に精液中の HIV ウイルスを除去するため、中空糸型のカラムの開発を開始した。中空糸型のカラムは人工透析、白血球除去療法、血漿交換療法、腹水濾過還元療法等に対する医療用機器として広く使用されている。精子頭部の大きさは2.5-3.5μm であり、HIV ウイルスの大きさは約 0.1μm である。この大きさの違いを利用し、ウイルスは通過可能で精子は通過できない中空糸を使用し、ウイルス分離用のカラムを試作した。試作したカラムを用いて、最初の検討として、精液中の精子の回収率を検討した。この結果、精液に不活化 HIV を加えて中空糸膜カラムを通して精液の洗浄を行ったところ、6 回の反復洗浄により HIV が検出されなくなることを観察した。

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 などの物質もほとん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,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。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，これまでにも報告しているとおりであり、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ー20 週以後である。精子分画にわずかに 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・胚移植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・胚移植での出産が 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。人工授精とは、妻の子宮内に夫の精子浮遊液をそのまま注入する方法である。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、昨年度に引き続き、人工授精の応用のための基礎的検討を行った。昨年度の研究では、凍結保存した精子を解凍した場合より大量の精子を得ることができるような検討を行った。凍結保存ヒト精子は、凍結、融解そして保護剤除去の過程で細胞傷害を受ける。融解直後に高い蘇生率を示した精子であっても、保護剤除去に伴う浸透圧低下が細胞膜を傷害し、運動能低下の一因となる。これは、光学顕微鏡レベルでは尾部先端の浮腫として観察される。われわれは凍結融解過程における細胞膜保護を考慮し、凍結保護剤とともに融解後等張化保護剤を使用する新規精子凍結保存システムを構築した。凍結保護剤（0.5M DMSO、0.5Mエチレングリコール、4%ヒドロキシエチルスターチ(HES)、0.2Mトレハロース、0.1mMペントキシフィリン）と精子懸濁液を等量混合して10分間平衡化した後、PCR容器を使用して液体チッソ蒸気中で緩速凍結した。融解は37℃の微温湯中で行い、最終的に等張化保護剤(4% HES、0.1Mトレハロース）を用いて5倍希釈し、運動率ならびに精子尾部の浮腫を観察した。この結果、等張化保護剤を使用すると精子の尾部の浮腫はほとんど発生せず、47±8.2%の精子が運動性を保持していた。精子凍結保存において、凍結融解過程よりもむしろ最終的な等張化操作が最大の障害因子であることを認め、この点に注意することにより、より凍結・解凍によってもより大量の精子を得ることができ、人工授精に応用しうる可能性を指摘した。今年度の研究では、精液は半数体である精子の他に2倍体である体細胞、細菌など多種の細胞を含むため、DNA量は幅広く分布した。原理が異なる2種の遠心分離法を組み合わせて細胞分画を行うと、精製の進行に伴い分布幅は狭小化した。Percoll沈降速度差遠心分離後は、顕微鏡観察により鏡検細胞はほぼ精子で占められることが確認されたが、ヒストグラム上、少数の2倍体細胞が残存していた。次いでswim upを行うと2倍体細胞は消失し、DNA量が均一な運動精子が得られた。遠心分離による精液中のHIV除去はフリーHIVおよび感染リンパ球(主として単球)の分離を目的とする。本研究の結果は、2種の遠心分離を組み合わせた分離を施行した後も、少数の2倍体細胞が残存することを認めた。単球は精子と比して比重が軽く、残存2倍体細胞が単球である可能性は低いが、予防安全の観点からswim upを行うことが好ましいと考えられた。

一方、効率的に精液中のHIVウイルスを除去するため、中空糸型のカラムの開発を開始した。中空糸型のカラムは人工透析、白血球除去療法、血漿交換療法、腹水濾過還元療法等に対する医療用機器として広く使用されている。精子頭部の大きさは2.5-3.5μmであり、HIVウイルスの大きさは約0.1μmである。この大きさの違いを利用し、ウイルスは通過可能で精子は通過できない中空糸を使用し、ウイルス分離用のカラムを試作した。試作したカラムを用いて、最初の検討として、精液中の精子の回収率を検討した。この結果、精液に不活化HIVを加えて中空糸膜カラムを通して精液の洗浄を行ったところ、6回の反復洗浄によりHIVが検出されなくなることを観察した。HIVウイルスの除去について今後さらに検討していくことが重要であると判断している。

E 結論

Percoll法およびSwim up法を組み合わせた方法により調整された精子浮遊液を用い，超高感度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体外受精・胚移植に関する今回のプロトコールにより、HIV陽性男性、陰性夫婦に対し、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される。ただし、より確実な結論を得るためには、引き続き，臨床応用を実施していくことが重要であると考えられる。また、HIV陽性男性、陰性夫婦に対する人工授精の臨床応用については、昨年度および今年度の基礎的検討結果の結果を踏まえつつ、検討していくことが重要であると判断している。

F 健康危険情報

なし。

G 研究発表

論文発表

(1) Kashima K, Takakuwa K, Suzuki M, Makino M, Kaneko S, Kato S, Hanabusa H, Tanaka K: Studies on assisted reproduction techniques (ART) for HIV-1 discordant couples using washed sperm and the nested PCR method -Comparison of the pregnancy rate in HIV-1 discordant couples and control couples- Jpn J Infect Dis, in press, 2009.

(2) Kuji N, Yoshii T, Hamatani T, Hanabusa H, Yoshimura Y, Kato S. Buoyant density and sedimentation dynamics of HIV-1 in two density-gradient media for semen processing. Fertil Steril. 90; 1983-1987, 2008.

(3) Tanaka R, Hanabusa H, Kinai E, Hasegawa N, Negishi M, Kato S: Intracellular efavirenz levels in peripheral blood mononuclear cells from human immunodeficiency virus-infected individuals. Antimicrob Agents Chemother, 52:782-785, 2007.

(4) Tanaka Y, Hanada K, Hanabusa H, Kurbanov F, Gojobori T, Mizokami M. Increasing genetic diversity of hepatitis C virus in haemophiliacs with human immunodeficiency virus coinfection. J Gen Virol, 88:2513-2519, 2007.

(5) Kinai E, Hanabusa H, Kato S.: Prediction of the efficacy of antiviral therapy for hepatitis C virus infection by an ultrasensitive RT-PCR assay. J Med Virol. 79: 1113-1119, 2007.

(6) Kaneko S, Takamatsu K, Yoshida J, Miyaji K, Ishikawa H, Kawamata T, Shinozaki N: Individual tissue culture system in a disposable capsule with hypoxic atmosphere. Ann Cancer Res Ther, 16: 8-11 , 2008.

(7) Ooki I, Takakuwa K, Akashi M, Nonaka T, Yokoo T, Tanaka K: Studies on the compatibility of HLA-class II alleles in patient couples with severe pre-eclampsia using PCR-RFLP methods. Am J Reprod Immunol, 60: 75-84, 2008.

(8) 高桑好一、大木泉、田中憲一： 産婦人科母子感染マニュアル 風疹ウイルス. 産科と婦人科、75: 1607-1611, 2008.

H 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし