

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

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10-20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

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。

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。

3年間の研究において、人工授精の応用のための基礎的検討を行った。平成18年度の研究では Swim side array 法の有用性について検討した。すなわち、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、平成18年度に開発した 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判断された。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た。

平成19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窒素蒸気中で緩速凍結した。融解は 37°C 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・融解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が示唆された。平成 20 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ることで細胞分画を行うと、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

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。

F 健康危険情報

なし。

G 研究発表

1. 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

—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 2.5-3.5 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。

-Comparison of the pregnancy rate in HIV-1 discordant couples and control couples- Jpn J Infect Dis, in press, 2009.

(2) 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.

(3) 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.

(4) 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.

(5) 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, 2008.

(6) 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.

(7) Nonaka T, Takakuwa K, Ooki I, Akashi M, Yokoo T, Kikuchi A, Tanaka K: Results of immunotherapy for patients with unexplained recurrent primary recurrent abortions- prospective non-randomized cohort study. *Am J Reprod Immunol*, 58: 530-536, 2007.

(8) Ishikawa H, Kaneko S: Human sperm cryopreservation- theory and clinical application. *J Mamm Ova Res*, 24: 14-17, 2007.

(9) Ishikawa H, Kaneko S, Miyaji K, Takamatsu K, Cryopreservation of human sperm in patients with malignancy; 2 years' experience. *Reprod. Med. Biol.* 6: 127-132, 2007

(10) 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*, 2007 88:2513-2519, 2007.

(11) Takakuwa K, Honda K, Yokoo T, Hataya I, Tamura M, Tanaka K: Molecular genetic studies on the compatibility of HLA-class II alleles in patients with unexplained recurrent miscarriage in the Japanese

population. *Clinical Immunology*, 118: 101-107, 2006.

(12) Takakuwa K, Mitsui T, Iwashita M, Kobayashi I, Suzuki A, Oda T, Torii T, Matsumoto M, Yahata G, Tanaka K: Studies on the prevalence of human papillomavirus in pregnant women in Japan. *J Perinat Med*, 34: 77-79, 2006.

(13) Kato S, Hanabusa H, Kaneko S, Takakuwa K, Suzuki M, Kuji N, Jinno M, Tanaka R, Kojima K, Iwashita M, Yoshimura Y, Tanaka K: Complete removal of HIV-1 RNA and proviral DNA from semen by the swim-up method: assisted reproduction technique using spermatozoa free from HIV-1. *AIDS*, 20:967-73, 2006.

(14) 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.

(15) 石川博通、兼子智: 精子形成機能障害対策 精子凍結保存について、血液・腫瘍科、54: 319-323, 2007.

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

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

洗浄した精子液(全量の半分)

↓

①高速遠心(15,000 rpm、1時間)

(精子とHIV-1が沈殿する)

↓

②RNA精製(QIAGEN RNeasy Mini Kit)

(精子とHIV-1のRNAが得られる)

↓

③逆転写反応

(HIV-1のRNAがcDNAに変換される)

↓

④1回目のPCR

(HIV-1のDNAが約100万倍に増幅される)

↓

⑤2回目のPCR

(HIV-1のDNAがさらに約10万倍増幅される)

↓

アガロースゲル電気泳動

(増幅されたHIV-1 DNAを検出する)

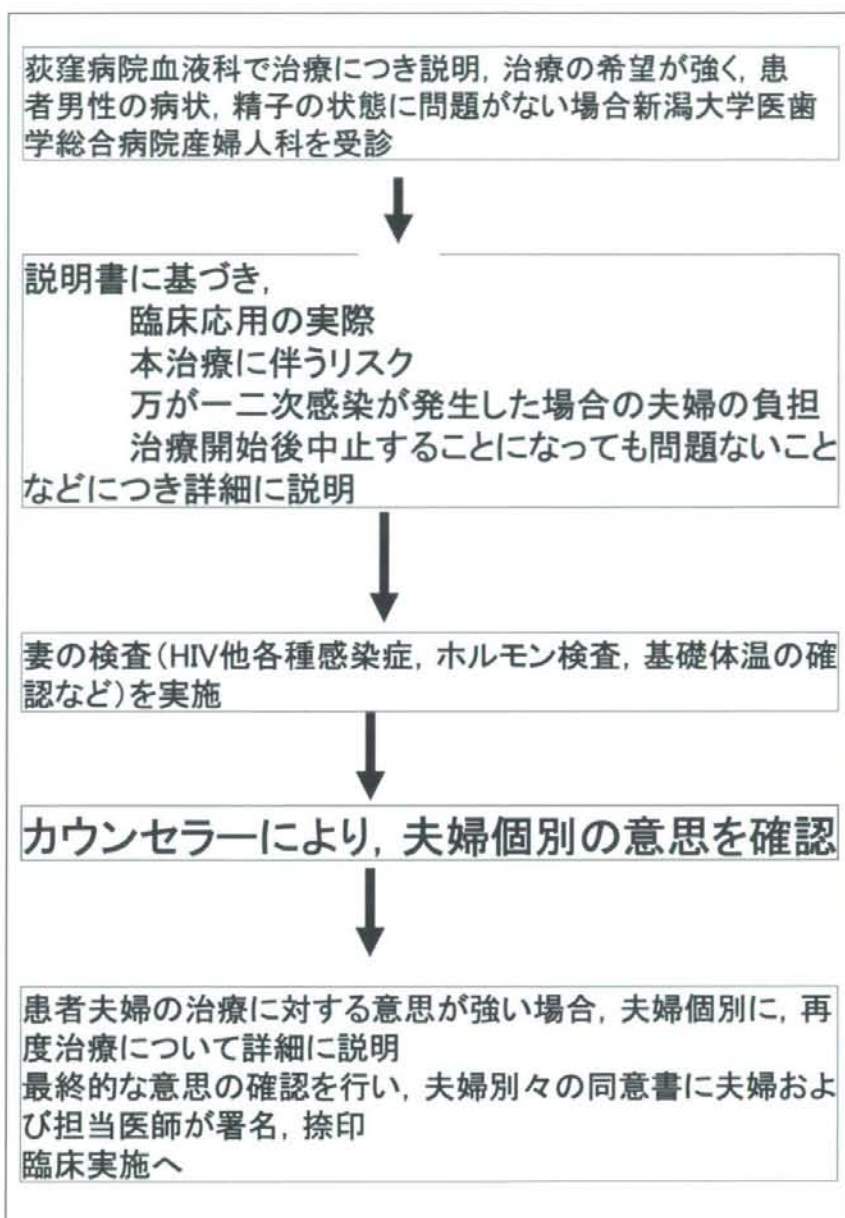


図1 HIV陽性男性、陰性女性夫婦に対する体外受精・胚移植の実施までの対応

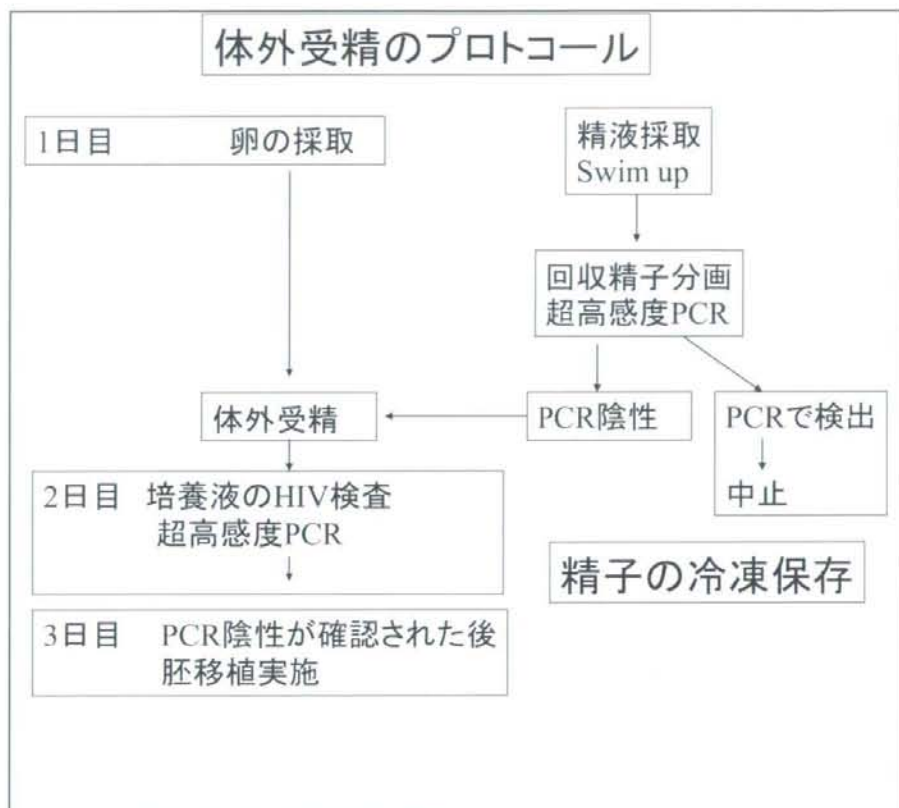


図2 体外受精・胚移植のプログラム

		運動率(%)
凍結前		71 ± 7.8%
融解後		55 ± 6.0%
等張化	Hanks 液	12 ± 3.3%
	等張化保護剤	47 ± 8.2%

図3 精子凍結、融解、保護剤除去による精子運動率の変化

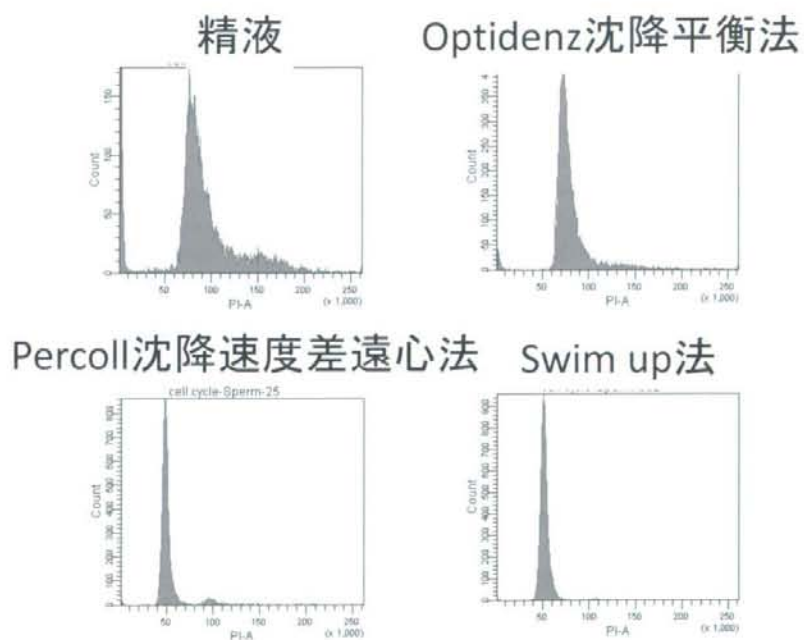


図4 フローサイトメトリーによる精液内細胞 DNA 量の観察

平成 18-20 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

分担総合研究報告書

HIV 感染女性の性行動とパートナーへの感染回避可能な妊娠に関する検討

五味淵秀人 国立国際医療センター産科医長
大金美和 国立国際医療センターエイズ治療・研究開発センターケア支援室
看護師
松岡恵 東京医科歯科大学大学院保健衛生学研究科
リプロダクティブヘルス看護学教授
(現：静岡県立大学看護学部母性看護学・助産学教授)

研究要旨

わが国でも、生殖年齢にある女性感染者が増加しており、HIV 感染症が治療の進歩により慢性疾患の様相を呈してきた昨今、HIV 陽性女性におけるリプロダクティブヘルスの向上は重要な課題である。妊娠・出産を望む声も聞かれており、パートナーへの感染を回避しながら、安全で健康な妊娠・出産を可能とする手段の提供を行う必要性が生じている。今回、不妊治療で行われている人工授精に着眼し、パートナーへの感染回避を目的とした夫精液を用いた人工授精施行について HIV 拠点病院 330 施設の産婦人科医に調査を依頼し 235 施設からの回答を得た。本法施行の賛否については「是非やるべき」22 施設(9.4%)、「やってもいい」126 施設(53.8%)と賛成意見は 63.2%であった。「やらないほうがいい」25 施設(10.7%)、「やるべきでない」6 施設(2.6%)と反対意見は 13.3%であったことより、本法施行は容認されるものと考えられた。挙児希望者が「いる」と回答した施設は 12 施設（希望者総数 16 名）であった。人工授精は 4 施設で計 4 例に行われていた。21 施設は本法施行に前向きであり、「わからない」と回答した 104 施設においても状況によって施行が期待できる施設もあると思われた。一方、患者支援の観点から出産歴のない HIV 陽性女性に対面式調査を行い、本法の重要性は理解できるものの人工授精に抵抗を感じていることがわかった。施行に当たっての条件や方法などに未だ検討すべき課題があった。そこで、1) HIV 感染の観点から妊娠分娩が許容できる状態であり、妊娠後も適切、十分な管理が受けられること。2) 生殖医療の観点から人工授精によって妊娠が期待できる状態であること。3) 夫婦個々に挙児を希望しており、その後の児の養育が可能であること、などの条件を含めた標準化を目的とした「手引き」を作成した。さらにこの手技の広報が必要であると考え治療経過保存できるデータベースを作成した。

A. 研究目的

HIV 感染症が治療法の進歩により慢性疾患の様相を呈してきた昨今、わが国でも生殖年齢にある HIV 陽性女性が増加している現実がある。このような女性の quality of life を考えた場合、パートナーへの感染を回避しながら、安全かつ健康な妊娠・出産を可能にする臨床的手法の必要性が生じている。今回、パートナーへの感染を回避する方法として、不妊治療で行われている人工授精に着眼し、夫精液を用いた人工授精施行について HIV 陽性女性の診療にあたっている産婦人科医に挙児希望者の有無、本法への意見、問題点等の調査と、HIV 陽性女性の意識調査を行ない現状を把握する。この結果を踏まえて、標準化を目的としたと指針を作成、この手技の広報も含めて治療経過保存できるデータベースを作成する。

B. 研究方法

HIV 感染症の医療体制の整備に関する研究班編の「拠点病院診療案内」にある病院のうちで診療科として産婦人科が標榜されている 330 施設にアンケート調査票（図）を郵送し、その結果を解析した。また、20～30 代の出産歴のない HIV 陽性女性 10 名に対面式による調査を行った。

本法の施行にあたっての手引き作成については、アンケート調査の結果と院内倫理委員会の承認を得て本法を既に施行し妊娠分娩例をえている国立国際医療センターのものを基本として作成した。

C. 研究結果

1. 産婦人科医師への調査

アンケート調査票を郵送した 330 施設の

うち 3 施設は現在産婦人科の診療が行われていない旨の返事があった。結果として 235 施設から回答（回答率：71.9%）があった。

1-1 経験症例数

なし 147 施設(62.6%)、1～2 例 49 施設(20.9%)、3～4 例 20 施設(8.5%)、5～9 例 8 施設(3.4%)、10～29 例 9 施設(3.8%)、30 例以上 2 施設(0.9%)であった。

1-2 受診理由（複数回答可）

妊娠関連 75 施設(63.0%)、婦人科疾患 27 施設(22.7%)、癌検診などの定期チェック 14 施設(11.8%)。その他は 3 例(2.5%)あり、いずれも挙児希望の相談であった。

1-3 分娩症例の経験数

なし 174 施設(74.0%)、1～2 例 41 施設(17.4%)、3～4 例 10 施設(4.3%)、5～9 例 6 施設(2.6%)、10 例以上 4 施設(1.7%)であった。

1-4 婦人科手術症例の経験数

なし 212 施設(85.1%)、1～2 例 19 施設(8.1%)、3～4 例 3 施設(1.3%)、5～9 例 1 施設(0.4%)、10 例以上経験している施設はなかった。

2-1 挙児を希望する女性患者の有無

「いる」と回答した施設は 13 あった。ただし、経験症例が「なし」と回答した施設であるにもかかわらず「いる」と回答した施設が 1 施設あった。149 施設は「いない」と回答し、「わからない」が 23 施設であった。

2-2 「いる」場合、その数

1名が8施設、2名が4施設あった（未記入1施設）。3名以上いる施設はなかった。

3-1 妻HIV陽性・夫陰性夫婦に対する人工授精の賛否

「是非やるべき」は22施設(9.4%)、「やってもいい」126施設(53.8%)と賛成意見は63.2%であった。「どちらでもいい」は50施設(21.4%)であった。「やらないほうがいい」25施設(10.7%)、「やるべきでない」6施設(2.6%)で反対意見は13.3%であった。選択肢にはなかったが「わからない」という記入が5(2.1%)、「記入なし」が1施設あった。

3-2 3-1の理由

賛成理由としては「夫婦間感染が防げる」が最も多かった。夫婦間の問題であり、医療者は危険性の説明とともにより安全な手技を提供するべきである、という意見も多かった。一方、反対理由としては児への感染を危惧するものが最も多く16施設からあった。児の福祉の問題が5施設からあった。

3-3 人工授精の施行経験

妻HIV陽性・夫陰性夫婦に対する人工授精の施行経験のある施設は4施設あった。いずれも1症例ずつであった。「なし」は220施設、未記入11施設であった。

3-4 施行の意向

「あり」は18施設、「なし」88施設、「わからない」104施設であった。

その他として、「希望者があれば」が3施設あった。

3-5 実施する場合、行っておくべき事項（複数可）

「夫婦個別の育児希望確認と同意書」は195施設(88.6%)、「症例毎の感染症科、産科、小児科の合意と許可」149施設(67.7%)、「倫理委員会での承認」128施設(58.2%)、「不妊スクリーニング検査」76施設(34.5%)、「戸籍謄本による夫婦の確認」72施設(32.7%)、「不妊カウンセリング」61施設(27.7%)であった。未回答は15施設あった。

3-6 人工授精実施する場合の施設条件

「HIV妊娠分娩例を十分経験している施設に限定」が119施設(48.4%)、「経験が少なくても、他科と連携の取れる分娩取り扱い施設」52施設(21.1%)、「連携が取れていれば人工授精、妊娠分娩の管理が同一施設でなくともよい」49施設(19.9%)、「限定すべきでなく、希望があればどこでもよい」7施設(2.8%)であった。その他は8施設あり、このうち「HIV経験のある施設」としたものが1施設あった。未記入は11施設、重複選択は11施設あった。

3-7 夫婦共に陽性の場合の人工授精

「是非やるべき」は3施設(1.3%)、「やってもいい」55施設(24.7%)、「どちらでもいい」72施設(32.3%)であった。しかし、「やらないほうがいい」56施設(25.1%)、「やるべきでない」26施設(11.7%)と反対意見が賛成意見を上回った。また、選択肢にはなかったが、「やる理由がわからない」との

記入が2施設、「わからない」が9施設あった。未記入15施設、重複選択1施設であった。」

2. 出産歴のない HIV 陽性女性への対面調査

人工授精が感染回避に重要であることは理解できるものの、妊娠の希望があっても人工授精に抵抗感があった。(表1)

3. 施行のための手引き (図1)

4. データベース

図2、3、4にその抜粋を示す。

考察

人工授精は排卵にあわせて夫精液(あるいは精子)を妻の子宮内腔に注入する方法である。わが国で行われるようになって既に半世紀以上になり多くの施設で容易に行えるために、不妊治療として確立された手技となっている。日本不妊学会(現日本生殖医学会)のガイドラインでは、1)精子・精液の量的・質的異常、2)射精障害・性交障害、3)精子-頸管粘液不適合、4)機能性不妊、を医学的適応としており、感染症の伝搬を回避することが目的である人工授精は想定範囲外であった。感染症がある場合にはその治療後に人工授精を行うことになるが、治療法の進歩により慢性感染症のひとつといえるにまで至ったとはいえ HIV 感染については容易に解決できない種々の問題がある。とくに、血友病患者男性の挙児希望に対して大きな問題であった。そこで、平成15年1月に日本産科婦人科学会からは「現状では精漿より HIV を完全

に除去する方法が確立されていないことに鑑み、HIVに罹患した夫から採取した精液を用いた人工授精を行う場合は、当該夫婦から感染の可能性を含めた十分なインフォームド・コンセントを得るとともに、実施にあたっては1例ごとに施設内倫理委員会で審査を受けることが望ましい」との通達が出された。近年増加している HIV 陽性女性の quality of life を考えた場合、パートナーへの感染を回避しながら、安全にかつ健康に妊娠し出産を可能にする臨床指針の作成の必要性がでてきたが、検討はほとんど行われていなかった。そこで今回 HIV 拠点病院の産婦人科330施設に妻 HIV 陽性・夫陰性夫婦に対する人工授精の可否を主目的としたアンケート調査を行った。

235施設から回答があり、その回答率は71.9%であった。HIV陽性者の取り扱い経験のある施設は88施設(37.4%)で3例以上の経験を有する施設は39施設(16.5%)であった。受診理由で最も多かったものは妊娠関連であったが、分娩例の経験を有する施設は61施設(37.0%)、3例以上の経験では20施設(8.6%)にすぎなかった。婦人科手術症例の経験数はさらに少なかった。

挙児を希望する HIV 陽性女性が「いる」と回答した施設では8施設で1名、4施設で2名と、回答があった235施設で16名は明確に挙児の意思を表していた。「いない」と回答した149施設でも「わからない」と回答した23施設でも調査をすれば更に希望者はいるものとする。これらのなかで人工授精の施行経験のある施設は4施設で、いずれも1症例ずつであった。現状で

は HIV 陽性女性のニーズはありながらも応じられていないことが推察される。しかし、人工授精施行の意向がないと回答した施設は 88 施設 (41.3%) であり、今後施行が期待できる施設は少なからずあると思われる。

妻 HIV 陽性・夫陰性夫婦に対する人工授精の賛否については「是非やるべき」は 22 施設 (9.4%)、「やってもいい」126 施設 (53.8%) と賛成意見は 6 割を超えた。「やらないほうがいい」25 施設 (10.7%)、「やるべきでない」6 施設 (2.6%) という反対意見は 1 割強であったことより、本法施行は容認されるものと考えられた。HIV 陽性女性の取り扱い経験症例数から検討すると、経験症例 0-2 例の施設における賛成は 116、反対 30 であったが、3 例以上の経験を有する施設では賛成 31、反対 2 であった。症例を重ねるに従って HIV 感染についての知識や現実的対応を考慮しなければならなくなっていることが推察される。

反対理由としては、児への感染を危惧するものが 16 施設からあり最も多かった。本法はあくまで水平感染を防ぐものであり、垂直感染を予防するものではないことは当然である。しかし、挙児希望のある夫婦は感染の危険を顧みず夫婦生活を行うことを余儀なくされているのが現状である。当然、担当医は安全な夫婦生活、すなわち、コンドームの使用を薦めることが一般的であろう。担当医に相談をしないままに妊娠を試みることになれば、病状からみて許可できない状態での妊娠があり得るであろうし、催奇形性があるとされる薬剤を投与されているままに妊娠することもあるだろう。結

果、望まざる方向へ行かざるを得ない可能性も高くなってくると考えられる。また、コンドームを使わない夫婦生活をむやみに繰り返せば、夫への感染の確率が高くなることは当然危惧されるところである。しっかりとした指針に則った人工授精は結果的に母子感染の予防に繋がると言えるのではなかろうか。

他方、夫婦共に陽性の場合の人工授精については賛成 26.0%、反対 36.8% と反対意見が賛成意見を上回った。わからない、あるいは、未記入が 24 施設、さらには「やる理由がわからない」との記入が 2 施設あったことから、今後十分に議論されなければならない課題であろう。

今回の検討では、国立国際医療センターを除いているが、国立国際医療センターでは HIV 陽性女性の診療経験数は有に 100 例を超えており、分娩、婦人科手術も多くこなしている。また、院内倫理委員会の承認を得て本法を既に 9 例に施行し 6 例が妊娠 (2 例は体外受精胚移植による)、うち 4 例は分娩を終了し児への感染は認められておらず、また、2 例は妊娠継続中である。人工授精の実施にあっては今回の質問条項の全てを行っている。「夫婦個別の挙児希望確認と同意書」、「症例毎の関連各診療科の合意と許可」、「倫理委員会での承認」は過半数を超える賛成があったが、「不妊スクリーニング検査」は 34.5% に留まった。しかし、人工授精を行うにあたっては医学的要約も満たしていなければならない。著者らも既に報告しているように HIV 陽性女性には混合感染の可能性も低からずあり、卵管障害などによる妊孕性の低下があれば人

工授精の実施期間をいたずらに延長させ本来の疾病の病状に影響を及ぼす可能性もあるため、省くことのできない項目と考えている。

施設の基準については、「HIV 妊娠分娩例を十分経験している施設に限定」が 119 施設 (48.4%)、「経験が少なくても、他科と連携の取れる分娩取り扱い施設」52 施設 (21.1%)であり、HIV 合併妊娠の周産期管理の可能な施設で人工授精を行い、一貫した管理が求められていた。

国立国際医療センターにおいては、院内倫理委員会の承認を得て本法を既に施行し妊娠分娩例をえているため、これを基本として本法の施行にあたっての手引きを示した。そして、複数の施設で本法が同様なレベルで安全に行われることで、HIV 陽性女性の QOL の向上に寄与することを期待する。

E. 結論

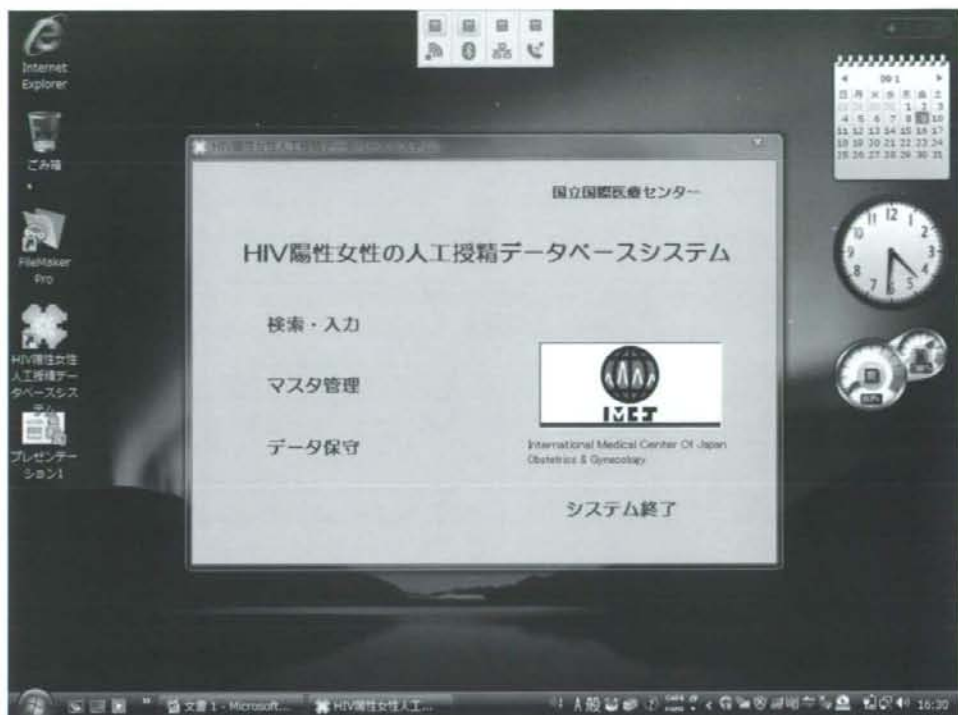
治療法の進歩により慢性感染症と言われるまでになってきた現在、リプロダクティブ・ヘルス/ライツの観点からも、HIV 陽性女性がより安全な方法で妊娠が効能となる手段を提示し行なっていく必要があり、本法もまたこの一手段であると考えらる。

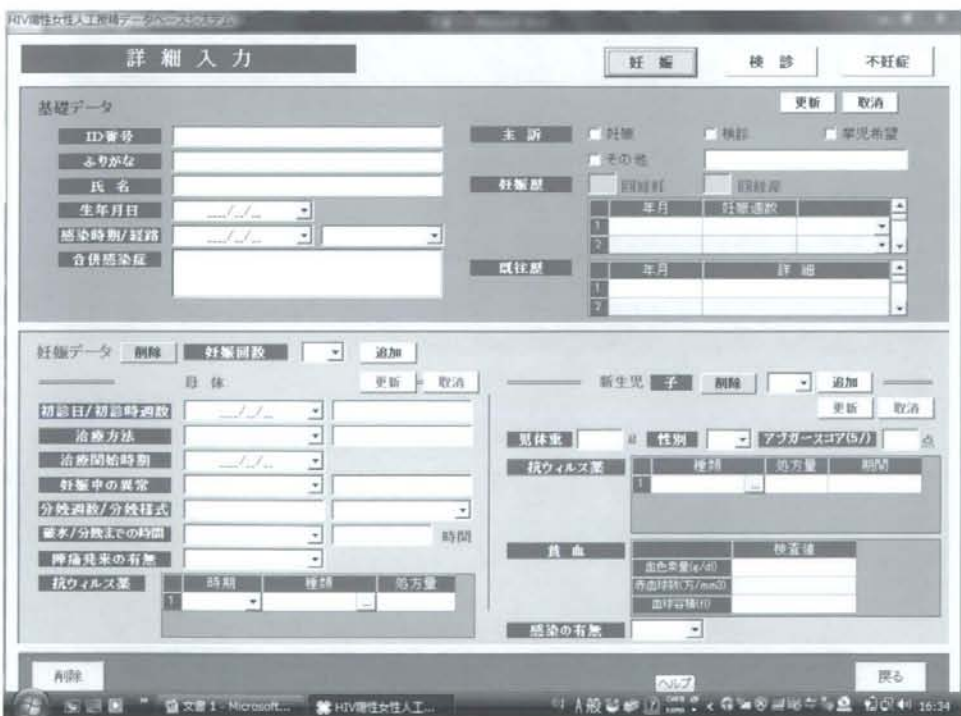
図 1

施行のための手引き

1. 現在無症状で AIDS を発症しておらず、長期存命の可能性が十分ある。血中ウイルス量は問わないが、CD4 値は 200 以上とする。
2. 夫は HIV 陰性である。
3. 婚姻している夫婦で、かつ、子の養育が可能である。
4. 不妊スクリーニング検査に異常がなく、人工授精によって妊娠が可能と考えられる。また、妊娠成立後においても問題となる産婦人科的異常がない。不妊症スクリーニング検査としては、卵管通気検査 (或は、子宮卵管造影)、超音波、ホルモン検査、精液検査を行う。また、細胞診、他の感染症検査、筋腫や卵巣嚢腫などの有無は超音波にて確認し、必要があれば治療を行っておく。夫に関しても HIV 陰性ととも B 型肝炎などの感染症についても検索しておく必要がある。
5. 施行する施設は自院において HIV 陽性者の分娩取り扱いの既に経験を有していることが望ましい。人工授精はパートナーへの感染を防ぐことが目的であって、母子感染を防ぐ物ではない。よって、妊娠後は十分な周産期管理を必要とする。
6. 施行にあたっては、院内倫理委員会の承諾を受けておくことが望ましい。
7. 夫婦個別の希望確認と同意書をとる必要がある。すでに抗ウイルス薬による治療を開始されている場合は、薬剤の選択について十分に検討しなければならない。しかし、現時点で胎児への影響が少ないとされている薬剤についても児への影響が全くないことは証明されていないため十分な説明と了承を得ておく必要がある。
8. 施行にあたっては、症例毎に関連各科での協議する場を設け、十分な検討を行う必要がある。

9. 施行にあたっては、患者へのカウンセリングと看護支援が必要である。必ずしも1回の人工授精で妊娠成立せず長時間を要することがあり、不妊症におけるカウンセリング同様十分な配慮と理解が必要である。





アンケート用紙

- ・ 貴施設名
- ・ 記入者のお名前
- ・ 1. HIV陽性女性患者の取り扱い回数についてお伺いします。
- ・ (1) いままでにご貴科で取り扱われた症例数はどれぐらいですか
 a. なし b. 1～2 c. 3～4 d. 5～9 e. 10～29 f. 30例以上
- ・ (2) 受診理由はどのようなことでしょうか(複数可)
 a. 妊娠 b. 婦人科疾患 c. 癌検診などの定期チェック
 d. その他()
- ・ (3) いままでに分娩症例の経験はありますか。
 a. なし b. 1～2 c. 3～4 d. 5～9 e. 10例以上
- ・ (4) いままでにご婦人科手術症例の経験はありますか。
 a. なし b. 1～2 c. 3～4 d. 5～9 e. 10例以上
- ・ 2. 拳児希望の有無についてお伺いします。
- ・ (1) 貴科受診中のHIV陽性女性患者さんで拳児を希望される方はいらっしゃいますか。
 a. いる b. いない c. わからない
- ・ (2) 「いる」場合、どれぐらいの数ですか
 a. 1 b. 2 c. 3 d. 4 e. 5例以上
- ・ 3. 感染者のご夫婦には、夫婦共に感染者の場合とどちらか一方が感染者の非感染者があります。拳児希望がある「妻HIV陽性、夫陰性のご夫婦」の場合、非感染者である夫の精液を感染者である妻に人工授精すれば、少なくとも夫婦間感染は防ぐことができます。
- ・ (1) このような妻HIV陽性・夫陰性夫婦に対する人工授精についてどう思われますか。
 a. 是非やるべき b. やってほしい c. どちらでもいい
 d. やらないほうがいい e. やるべきでない
- ・ (2) (1) の理由はどのようなことでしょうか。
- ・ (3) いままでにご妻HIV陽性・夫陰性夫婦に対する人工授精の施行経験はありますか
 a. あり(例) b. なし
- ・ (4) 今後、施行されるご意向はありますか
 a. あり b. なし c. わからない
 d. その他()
- ・ (5) 妻HIV陽性・夫陰性夫婦に対する人工授精を実施する場合、行っておくべき事項についてはどのようなようにお考えですか(複数可)
 a. 夫婦個別の拳児希望確認と同意書
 b. 症例毎の感染症科、産科、小児科の合意と許可
 c. 倫理委員会での承認
 d. 不妊スクリーニング検査
 e. 戸籍謄本による夫婦の確認
 f. 不妊カウンセリング
 g. その他()
- ・ (6) 妻HIV陽性・夫陰性夫婦に対する人工授精を実施する場合、実施施設には条件があると思いますか
 a. HIV妊婦分娩例を十分経験している施設に限定する
 b. HIV症例の経験が少なくても、他科と連携の取れる分娩取り扱い施設であればよい
 c. 限定すべきでなく、希望があればどこでもよい
 d. その他()
- ・ (7) 夫婦共に陽性のご夫婦にも人工授精をした方がよいと思われませんか
 a. 連携が取れれば人工授精、妊娠分娩の管理が同一施設でなくともよい
 b. 是非やるべき c. やってほしい
 d. やらないほうがいい e. やるべきでない
- ・ ご協力ありがとうございました。

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
分担総合報告書

研究分担課題名：HIV 母子感染のメカニズム、免疫・ウイルス学的研究および国際保健学的研究

課題 1. HIV 経胎盤・母乳感染メカニズムに関する研究

研究分担者：牛島廣治 藍野大学医療保健学部／藍野健康科学センター・教授

研究協力者：宇佐美雅史 元東京大学大学院医学系研究科・大学院生

沖津祥子 藍野学院短期大学／藍野健康科学センター・講師

研究要旨：

HIV 母子感染の可能性として、胎盤栄養膜細胞のレセプターの存在を調べたところ CD4 の mRNA は僅かに認めることもあったが、コレセプターである C5a receptor、CCR1、CCR7、CCR9、CXCR4、CXCR5、GPR5、GPR12、RDC1 の 9 種類の mRNA の発現がわずかに認められた。一方、母乳中の細胞ではリンパ球、マクロファージなどが存在するため CD4 の mRNA の他に C5a receptor、CCR1、CCR5、CCR7、CCR9、CXCR3、CXCR4、CXCR5、DEZ α 、GPR5、GPR12、GPR25、RDC1 の 13 種類の mRNA の発現が確認された。

A. 研究目的

HIV の母子感染は経胎盤、経産道、経母乳の感染が考えられる。その中で経胎盤については、胎盤におけるレセプターの存在など具体的なメカニズムは解決されていない。HIV 感染のコレセプターとなる可能性がある G プロテインレセプターおよび主要レセプターである CD4 がヒト胎盤栄養膜細胞において mRNA が発現しているか調べた。また母乳細胞についても研究がないために調べた。

B. 研究方法

胎盤は発生 7～9 週の初期胎盤を使用した。パーコール分離、CD9 ビーズを用い、栄養膜細胞のみを精製した。母乳については遠心分離によりリンパ球、マクロファージなどを含んだ細胞のみを採取した。次に RNA 抽出キットを用いてこれらの細胞から total RNA の抽出を行った。DNase 処理の後、さらに mRNA の逆転

写反応により cDNA を作製し、PCR 法により目的とする遺伝子の増幅反応を行った。さらに mRNA の発現が確認されたものについては定量も行った。定量は画像解析ソフト NIH image を用いてバンドの濃さを測定した。

（倫理面への配慮：東京大学医学系研究科の倫理委員会の承認のもとに行われた。）

C. 研究結果

19 種類の G プロテインレセプターのうち、胎盤栄養膜細胞においては C5a receptor、CCR1、CCR7、CCR9、CXCR4、CXCR5、GPR5、GPR12、RDC1 の 9 種類の mRNA の発現が見られた。一方、母乳中の細胞では C5a receptor、CCR1、CCR5、CCR7、CCR9、CXCR3、CXCR4、CXCR5、DEZ α 、GPR5、GPR12、GPR25、RDC1 の 13 種類の mRNA の発現が確認された。その他の G プロテインレセプターについては発現を確認することができなかった。また

CD4については母乳細胞では認められたが、胎盤栄養膜細胞においては胎盤サンプル3サンプルのうち1サンプルで発現を認めるものも、再現性を確認することはできなかった。バンドが確認されたものについては定量も行い、 β アクチンを100とした時の数値結果を胎盤栄養膜細胞のみで示した。

D. 考察

C5a receptor, CCR1, CCR7, CCR9, CXCR5, GPR12, RDC1 の mRNA については胎盤栄養膜細胞における発現は今まで確かめられていなかったが、今回の研究において初めて発現を確認することができた。また C5a receptor, CCR1, CCR7, CCR9, CXCR3, CXCR5, DEZ α , GPR12, RDC1 の mRNA については母乳細胞において初めて発現を確認することができた。CCR9, CXCR4, RDC1 は先行研究から HIV のコレセプターとして機能することが確認されており、また胎盤において定量的結果から相対的に特に強く発現していた CCR9 が HIV の細胞へのエントリーにおいて機能している可能性がある。CD4 の発現が母乳細胞で見られることはリンパ球、マクロファージが多いことから理解できる。胎盤細胞での CD4 の発現はないとの報告もあることから今後も検討する必要がある。今後、タンパクレベルでの実験による確認が必要である。しかし、そもそも HIV レセプター、コレセプターの発現が悪い胎盤の細胞が HIV に感染するとの報告は見られない。したがって HIV の経胎盤感染は、胎盤が一部破壊されたりして母親の血液が児に移行することが考えられる。その際に HIV が児に移行すると考えられる。

E. 結論

胎盤栄養膜細胞において、C5a receptor, CCR1, CCR7, CCR9, CXCR4, CXCR5, GPR5, GPR12, RDC1 の9種類の mRNA の

発現が、母乳中細胞では CD4 の mRNA の他に C5a receptor, CCR1, CCR5, CCR7, CCR9, CXCR3, CXCR4, CXCR5, DEZ α , GPR5, GPR12, GPR25, RDC1 の13種類の mRNA の発現が確認された。

F. 研究業績

1. 原著論文

- 1) Muller WE, Ushijima H, Batel R, Krasko A, Borejko A, Meller IM, Schroder HC. Novel mechanism for the radiation-induced bystander effect: Nitric oxide and ethylene determine the response in sponge cells. *Mutat Res* 2006 May 11; 597(1-2):62-72. Epub 2006 Jan 20.
- 2) Kawata K, Li Y, Liu H, Zhang XQ, Ushijima H. Specific factor for prenatal lead exposure in the border area of China. *Int J Hyg Environ Health* 2006 Jul; 209(4):377-383. Epub 2006 May 11.
- 3) Phan TG, Kuroiwa T, Kaneshi K, Ueda Y, Nakaya S, Nishimura S, Yamamoto A, Sugita K, Nishimura T, Yagyu F, Okitsu S, Müller WEG, Maneekarn N, Ushijima H. Changing Distribution of Norovirus Genotypes and Genetic Characterization of Recombinant GIIb among Infants and Children with Diarrhea in Japan. *J Med Virol*. 2006 Jul; 78(7): 971-978.
- 4) Phan TG, Yagyu F, Kozlov V, Kozlov A, Okitsu S, Müller WEG, Ushijima H. Viral gastroenteritis and Genetic Characterization of Recombinant Norovirus Circulating in Eastern Russia. *Clin Lab* 2006; 52 (5-6): 247-253.

- 5) Phan TG, Yan H, Li Y, Okitsu S, Müller WEG, Ushijima H. Novel Recombinant Norovirus in China. *Emerg Infect Dis.* 2006 May; 12(5): 857-858.
- 6) Phan TG, Okitsu S, Müller WEG, Kohno H, Ushijima H. Novel Recombinant Sapovirus in Japan. *Emerg Infect Dis.* 2006 May; 12(5): 865-867.
- 7) Schröder HC, Boreiko A, Koizhev M, Tahir MN, Tremel W, Eckert C, Ushijima H, Müller IM, Müller WE. Co-expression and functional interaction of silicatein with galectin: Matrix-guided formation of siliceous spicules in the marine demosponge *Suberites domuncula*. *J Bio Chem* 2006 Apr 28; 281 (17): 12001-12009. Epub 2006 Feb 22.
- 8) Khamrin P, Maneekern N, Peerakome S, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Molecular characterization of a rare G3P[3] human rotavirus reassortant strain reveals an evidence for human-animals multiple interspecies transmissions. *J Med Virol* 2006 Jul; 78(7):986-994.
- 9) Yagyu F, Sunada A, Kojima T, Ikeda M, Okitsu-Negishi S, Ushijima H. Detection of Norovirus by reverse transcriptase-polymerase chain reaction method. *Kansenshogaku Zasshi* 2006 May; 80(3):275-276.
- 10) Phan TG, Trinh OD, Yagyu F, Sugita K, Okitsu S, Muller WEG, Ushijima H. Outbreak of sapovirus infection among infants and children with acute gastroenteritis in Osaka City, Japan during during 2004-2005. *J Med Virol* 2006 Jun 78(6):839-846.
- 11) Schroeder HC, Breter HJ, Fattorusso E, Ushijima H, Wiens M, Steffen R, Batel R, Mueller WEG. Okadaic acid, an apoptogenic toxin for symbiotic/parasitic toxic annelids in the demosponge *Suberites domuncula*. *Appl Environ Microbiol* 2006 Jul; 72(7): 4907-4916.
- 12) Okame M, Akihara S, Hansman G, hainan Y, Thien Tuan Tran H, Phan TG, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Existence of multiple genotypes associated with acute gastroenteritis during 6-year survey of norovirus infection in Japan. *J Med Virol* 2006 Oct; 78(10):1318-1324.
- 13) Phan TG, Shimizu H, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H. Human adenovirus type 1 related to feline adenovirus: evidence of interspecies transmission. *Clin Lab* 2006; 52 (9-10): 515-518.
- 14) Phan TG, Takanashi S, Kaneshi K, Ueda Y, Nakaya S, Nishimura S, Sugita K, Nishimura T, Yamamoto A, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Detection and genetic characterization of norovirus strains circulating among infants and children with acute gastroenteritis in Japan during 2004-2005. *Clin Lab* 2006; 52 (9-10): 519-525.
- 15) Phan TG, Yan H, Khamrin P, Quang T, Dey SK, Yagyu F, Okitsu S, Mueller WEG, Ushijima H. Novel intragenotype recombination in