

Table 1 Positive Rate of HPV at the Uterine Cervix in Pregnant Women in Japan in Each Age Range.

Age	No. of cases	No. of positive cases	Positive rate (%)
~19	9	4	44.4
20-24	115	24	20.9
25-29	429	53	12.4
30-34	432	50	11.6
35-39	173	13	7.5
40~	25	4	16.0
Total	1183	148	12.5

n.b.: There is a statistically significant difference of positive rate between pregnant women group under 25 y.o. and equal to or older than 25 y.o. ($P < 0.0005$, by Chi-square analysis).

Table 2 Positive Rate of HPV at the Uterine Cervix in Pregnant Women in Japan According to Gestational Week.

Gestational weeks	No. of cases	No. of positive cases	Positive rate (%)
~11W	89	9	10.1
12-15W	138	17	12.3
16-19W	110	25	22.7
20-23W	110	11	10.0
24-27W	126	20	15.9
28-31W	176	20	11.4
32-35W	237	22	9.3
36W~	197	24	12.2
Total	1183	148	12.5

n.b.: No significant difference was observed according to gestational week.

Results

Of 1,183 pregnant women, HPV was detected in 148 cases, for a prevalence of 12.5%. The prevalence was 44.0, 20.9, 12.4, 11.6, 7.5, and 16% in pregnant women <20, 20-24, 25-29, 30-35, 35-39, >39 years old, respectively (Table 1). The prevalence in pregnant women younger than 25 years was 22.6% (28 of 124 cases), significantly higher compared with pregnant women ≥ 25 years (11.3%, 120 of 1059 cases). ($P < 0.0005$, by Chi-square test).

Table 2 shows the prevalence of HPV for each gestational week. The prevalence ranged from 9.3% (at 32-35 weeks) to 22.7% (at 16-19 weeks), but no significant difference was observed among gestational weeks.

In Table 3, the distribution of HPV subtypes is shown. The distribution of high-risk viruses for cancer, namely HPV types 16, 18, 31, 35, 45, 51, 52, and 56 was 9.9%, 3.9%, 0.7%, 2.0%, 0%, 2.6%, 17.8%, and 2.6%, respectively.

Discussion

Epidemiologic observation suggested that cervical cancer is associated with infection by sexually transmissible

agents. A variety of molecular epidemiologic studies suggested that human papillomaviruses (HPVs) may be an important sexually transmissible agent related to the development of neoplastic changes in the cervix [1]. An increasing incidence of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) among young women has been noticed in recent years [9]. For this reason, pregnancy might be a unique opportunity to detect HPV infection for those women who do not take part in a screening program for cervical carcinoma. Although a number of investigators reported the prevalence of HPVs in pregnant women, this varies from study to study [2, 6-8, 14], probably due to the small number of cases in the study populations. In our study, we examined 1,183 pregnant women, and the prevalence of HPV was 12.5%, which is a relatively reliable figure as to the prevalence of HPV in the pregnant population in Japan. De Roda Husman et al. reported that the prevalence of HPV was 9.6% in 709 pregnant women, which was similar to our results [3].

None of the HPV prevalence differed significantly among the first, second and third-trimester. This finding is inconsistent with other observations demonstrating a higher prevalence of HPV in more advanced pregnancy [5, 10]. The discrepancy between our findings and other reports remains unclear. The prevalence in pregnant women younger than 25 years (22.6%, 28 of 124 cases) was significantly higher compared with that in pregnant women ≥ 25 years. It is suggested that further investigation should be conducted concerning the prevalence of HPV infection in younger pregnant women.

One must always take into consideration the effect of pregnancy, per se, on the infection of HPV. As pregnant women are considered to be immunosuppressed, a state which facilitates survival of 'semi-allogeneic' fetus, a possibility exists that new HPV infection or reactivation

Table 3 Number and Rate of Each HPV Genotype.

HPV genotype	Number of each genotype	Rate (%)
HPV16	15	9.9
HPV18	6	3.9
HPV31	1	0.7
HPV33	2	1.3
HPV35	3	2.0
HPV39	4	2.6
HPV51	4	2.6
HPV52	27	17.8
HPV53	5	3.3
HPV54	2	1.3
HPV56	4	2.6
HPV58	10	6.6
HPV59	3	2.0
HPV61	3	2.0
HPV66	3	2.0
HPV68	4	2.6
Unknown	45	29.6
Total	152	100.0

n.b.: Two genotypes were observed in 4 cases.

of HPV might occur during pregnancy. Although such effect of pregnancy on HPV infection is controversial [4, 7, 12], the comparative study of the prevalence of HPV between the pregnant and non-pregnant state of same population is mandatory.

Another major concern in such study is the outcome of the neonates born to the mother with positive HPV, i.e., a possibility exists that respiratory papillomatosis may occur in the neonates. Although this complication is reported to be very rare [11, 13], a follow up study of neonates born to HPV positive mother is also crucial.

Acknowledgements

This study was supported by a research grant from Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan.

References

- [1] CDC: Human papillomavirus infection. *MMWR* 47 (1998) 88
- [2] Chang-Claude J, A Schneider, E Smith, M Blettner, J Wahrendorf, L Turek: Longitudinal study of the effects of pregnancy and other factors on detection of HPV. *Gynecol Oncol* 60 (1996) 355
- [3] De Roda Husman AM, JM Walboomers, E Hopman, OP Bleker, TM Helmerhorst, L Rozendaal, FJ Voorhorst, CJ Meijer: HPV prevalence in cytologically normal cervical scrapes of pregnant women as determined by PCR: the age-related pattern. *J Med Virol* 46 (1995) 97
- [4] Fife KH, BP Katz, EJ Brizendine, DR Brown: Cervical human papillomavirus deoxyribonucleic acid persists throughout pregnancy and decreases in the postpartum period. *Am J Obstet Gynecol* 180 (1999) 1110
- [5] Gopalkrishna V, NS Murthy, JK Sharma, M Roy, DK Das, UK Luthra: Increased human papillomavirus infection with the increasing number of pregnancies in Indian women. *J Infect Dis* 171 (1995) 254
- [6] Kemp EA, AM Hakenwerth, SL Laurent, PE Gravitt, J Stoerker: Human papillomavirus prevalence in pregnancy. *Obstet Gynecol* 79 (1992) 649
- [7] Morrison EAB, MD Gammon, GL Goldberg, SH Vermund, RD Burk: Pregnancy and cervical infection with human papillomaviruses. *Int J Gynecol Obstet* 54 (1996) 125
- [8] Peng TC, C Searle, KV Shah, JT Repke, TR Johnson: Prevalence of human papillomavirus infections in term pregnancy. *Am J Perinat* 7 (1990) 189
- [9] Penna C, MG Fallani, M Maggiorini, E Zipoli, A Cardelli, M Marchionni: High-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN) in pregnancy: clinicotherapeutic management. *Tumori* 84 (1998) 567
- [10] Rando RF, W Lindheim, L Hasty, TV Sedlacek, M Woodland, C Eder: Increased frequency of detection of human papillomavirus deoxyribonucleic acid in exfoliated cervical cells during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 161 (1989) 50
- [11] Shah K, H Kashima, BF Polk, F Shah, H Abbey, A Abramson: Rarity of cesarean delivery in cases of juvenile-onset respiratory papillomatosis. *Obstet Gynecol* 68 (1986) 795
- [12] Tenti P, R Zappatore, P Migliora, A Spinillo, U Maccarini, M De Benedittis, N Vesentini, G Marchitelli, E Silini, L Carnevali: Latent human papillomavirus infection in pregnant women at term: a case-control study. *J Infect Dis* 176 (1997) 277
- [13] Tenti P, R Zappatore, R Migliora, A Spinillo, C Belloni, L Carnevali: Perinatal transmission of human papillomavirus from gravidas with latent infections. *Obstet Gynecol* 93 (1999) 475
- [14] Veress G, MT Csiky, J Konya, J Czegledy, L Gergely: Follow-up of human papillomavirus (HPV) DNA and local anti-HPV antibodies in cytologically normal pregnant women. *Med Microbiol Immunol* 185 (1996) 139
- [15] Yoshikawa H, T Kawana, K Kitagawa, M Mizuno, H Yoshikura, A Iwamoto: Detection and typing of multiple genital human papillomaviruses by DNA amplification with consensus primers. *Jpn J Cancer Res* 82 (1991) 524

Received January 27, 2005. Revised July 26, 2005. Accepted July 29, 2005.

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

Shingo Kato^a, Hideji Hanabusa^c, Satoru Kaneko^d, Koichi Takakuwa^e,
Mina Suzuki^e, Naoaki Kuji^b, Masao Jinno^f, Rie Tanaka^a,
Kenichi Kojima^c, Mitsutoshi Iwashita^f, Yasunori Yoshimura^b
and Kenichi Tanaka^e

Background: Use of antiretroviral drugs has reduced the mortality rate for HIV infection and many HIV-discordant couples wish to have children. It is possible for an HIV-infected man to father children without risk of HIV transmission if HIV-free spermatozoa can be obtained from his semen.

Methods: An improved swim-up method was used to collect HIV-free spermatozoa from the semen of HIV-positive males. Diluted semen was layered over a Percoll solution with a continuous density gradient of 30–98%, and then centrifuged. The bottom layer was collected by cutting the end from the tube and the sperm suspension was collected using the swim-up method. Spermatozoa were tested by nested polymerase chain reaction (PCR) for HIV-1 RNA and DNA, with a detection limit of one copy. Spermatozoa were used for assisted reproduction in 43 couples.

Results: HIV-1 RNA and proviral DNA were not detected by nested-PCR assay in all 73 of the collected spermatozoa samples from 52 patients. The HIV-1-negative sperm was used for *in vitro* fertilization in 12 couples and for intracytoplasmic sperm injection in 31 couples. No detection of HIV-1 RNA or proviral DNA in the culture medium of the fertilized eggs was confirmed again before embryo transfer. Of the 43 female partners, 20 conceived and 27 babies were born. HIV antibodies, HIV RNA and proviral DNA were negative in all of the females and babies.

Conclusions: HIV-negative spermatozoa could be obtained from semen of HIV-positive men. The method involves no risk of HIV transmission to female partners and their children.

© 2006 Lippincott Williams & Wilkins

AIDS 2006, 20:967–973

Keywords: assisted reproductive techniques, HIV-1, sperm,
HIV-free spermatozoa

From the ^aDepartment of Microbiology and ^bDepartment of Obstetrics and Gynecology, Keio University School of Medicine, Tokyo, the ^cDepartment of Hematology, Ogikubo Hospital, Tokyo, the ^dDepartment of Obstetrics and Gynecology, Tokyo Dental College, Ichikawa City, Chiba Prefecture, the ^eDepartment of Obstetrics and Gynecology, Niigata University, Ichibancyo Asahimachidoori Niigata City, Niigata Prefecture and ^fDepartment of Obstetrics and Gynecology, Kyorin University, Mitaka City, Japan.

Correspondence to Dr Hideji Hanabusa, Tokyo Ogikubo Hemophilia Center and Department of Hematology, Ogikubo Hospital, 3-1-24 Imagawa Suginami-ku, Tokyo 167-0035, Japan.

E-mail: hanabusa@muh.biglobe.ne.jp

Received: 24 August 2005; revised: 4 January 2006; accepted: 26 January 2006.

ISSN 0269-9370 © 2006 Lippincott Williams & Wilkins

967

Copyright © Lippincott Williams & Wilkins. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

Introduction

Since the mid-1990s, the use of HAART has spread, and the AIDS mortality rate has decreased by more than 80% in the industrialized world [1]. HIV infection/AIDS is becoming a controllable chronic infection and HIV-infected individuals are now living longer. Many HIV-positive people are getting married and wishing to have children.

Semprini *et al.* [2] reported that they had conducted artificial inseminations in more than 2000 HIV-discordant couples (HIV-positive male and HIV-negative female) using their swim-up method, and that no HIV transmission was observed. However, their method may be suboptimal because it has not been proven to remove HIV RNA completely, and they did not measure proviral DNA in infected cells in the semen. Zhang *et al.* [3] reported that HIV may be present as proviral DNA in seminal cells in HIV-infected men who have achieved undetectable levels of viral RNA in plasma with HAART, and this HIV could be capable of sexual transmission. It has not been determined whether HIV is attached to spermatozoa or whether spermatozoa can be infected with HIV [4,5]. Therefore, contraception is recommended for HIV-discordant couples, even if HIV RNA is undetectable in plasma [3].

Authorities in different countries have different opinions concerning the use of assisted reproductive technology using spermatozoa collected by the swim-up method [6–8]. However, it would be possible for an HIV-infected man to father children without risk of HIV transmission if HIV-free spermatozoa can be obtained from his semen. This study examines an improved swim-up method for isolating HIV-free sperm and its use in assisted reproductive methods.

Methods

This clinical study was approved by the ethics committees of Niigata University, Ogikubo Hospital, Keio University and Kyorin University. All of the couples visited the Hematology Department of Ogikubo Hospital and received counselling and explanations of the clinical study. Informed consent was obtained from all participating couples. Semen was obtained by masturbation, and then tested for sperm concentration, motility and deformity.

Percoll preparation

An isotonic solution of Percoll (Amersham Life Science, Tokyo, Japan) was made by dissolving 980 g Percoll in 10.0 ml 2.0 mol/l Hepes-NaOH, pH 7.4, 10.0 ml human serum albumin (25%w/v), 0.05 g fosfomycin

and 0.05 g cefarotin. The resulting 98% Percoll solution was sterilized with a Millipore filter (0.45 μ m pore size).

Semen pretreatments

The procedure is shown in Fig. 1. Ejaculates were diluted twice with Hanks solution, followed by standing in a test tube for 10 min to precipitate filterable micro-calculus, then filtered through an ART filter (20 μ m clearance; ART filter, Nipro, Osaka, Japan) to remove fibers, micro-calculus and mucinous debris. The upper phase of sperm suspension was loaded onto 6 ml Percoll linear gradient from 98% to 30% in a separable fine-neck tube (Nipro) and centrifuged at 400 \times g for 30 min. The separable fine-neck tube was made of glass, and its bottom was squeezed to minimize the volume of sediment. To recover the sperm precipitated in the bottom tip, the top of the tube was plugged with a rubber cap, and the middle of the squeezed bottom was snapped off with an ampoule cutter.

Motile sperm were separated by the modified swim-up method. A fine glass capillary was inserted in 2 ml of the medium in a vial, then a needle tip was introduced to the bottom through the inner capillary. The motile sperm were allowed to swim up at 37°C in an incubator with 5% CO₂-air. After 60 min, 1 ml of upper layer was collected, containing the sperm that had swum up.

The sperm suspension was divided into two portions. One was used for HIV assessment, and the other was cryopreserved with KS-II medium [9] in a liquid nitrogen container.

Standard HIV-1 materials

MOLT-4 cells infected with HIV_{LAI} and its culture supernatant were used as standards for HIV-1-infected cells and virus stock, respectively. RNA purified from virus stock and the pNL4-3 plasmid [10] were the standards for HIV-1 RNA and DNA, respectively. The concentrations of the standard HIV-1 DNA and RNA were determined by spectrophotometry and the null-class equation of the Poisson distribution of the reverse transcriptase (RT)-nested polymerase chain reaction (PCR). Cells were counted using a Burkert-Turk hemocytometer (Emergo, Landsmeer, the Netherlands). The virion concentration was considered to be half the virus RNA concentration.

Detection of HIV-1 RNA and DNA

The samples of sperm suspension, culture medium or plasma were centrifuged at 35 500 \times g for 1 h at 4°C. RNA and DNA were extracted from the precipitate using QIAamp UltraSens Virus Kit (Qiagen, Tokyo, Japan). One fourth of the eluate was tested in quadruplicate by RT-nested PCR as follows. The RT reaction was performed by incubation at 42°C for 10 min in a

20 μ l solution consisting of 1 \times PCR buffer II (10 mmol/l Tris-HCl pH 8.3, 50 mmol/l KCl; Perkin Elmer Life Sciences, Yokohama, Japan), 3 mmol/l MgCl₂, 0.2 mmol/l each dNTP, 0.1 μ mol/l primer GA1R (5'-CCCAGGATTATCCATCTTTTATAG-3', 1595-1572 [10]), 4 U RNasin (Promega, Tokyo) and 20 U SuperScript II (Invitrogen, Tokyo, Japan). The whole RT product was subjected to a first-round PCR in a 50 μ l solution consisting of 1 \times PCR buffer II, 4 mmol/l MgCl₂, 0.2 mmol/l each dNTP, 0.2 μ mol/l primers GA1F (5'-TGT'TAAAAGACCATCAATGAGG-3', 1388-1411) and GA1R and 0.5 U AmpliTaq (Perkin-Elmer). Then, 1 μ l of the first-round PCR product was used in the second-round PCR in a 50 μ l solution containing primers GA2F (5'-GGCCAGATGAGA-GAACCAAGG-3', 1465-1485) and GA2R (5'-CATCCTATTTGTTCCCTGAAGGGTAC-3', 1535-1511) and the other components in first-round PCR. The primers were located in *gag* p24. The thermal profile of PCR in GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Tokyo, Japan) was 94°C for 2 min; three cycles of 94°C for 5 s, 48°C for 10 s and 72°C for 15 s; 22 cycles of 94°C for 5 s, 60°C for 10 s and 72°C for 15 s; with a final cycle of 72°C for 1 min and then the mixture kept at 4°C. The PCR products were electrophoresed through a 2.0% agarose gel in the presence of 0.5 μ g/ml ethidium bromide and photographed under ultraviolet illumination. Throughout the procedure, the medium used for washed sperm or fertilized eggs was the negative control and this medium with 10 virions added was the positive control. The whole process took approximately 5 h. For samples of peripheral blood mononuclear cells (PBMC), DNA was extracted using QIAamp DNA Kit (Qiagen) and 0.5 μ g of the DNA was tested in triplicate by the PCR procedures omitting reverse transcription. Competitive RT-nested PCR was performed as previously described [11].

Infectivity of HIV-1 during incubation

After incubation at 37°C under 5% CO₂ for various periods, the virus stock was added to 5 \times 10⁶ stimulated donor PBMC in 1 ml RPMI 1640 medium supplemented with 30% immobilized fetal calf serum and 70 U/ml human recombinant interleukin 2 (Shionogi, Osaka, Japan), and further incubated for 5 days. The culture supernatants were tested for p24 concentration with VIDAS HIV P24 II (BioMérieux, Tokyo, Japan).

Clinical study

If the HIV-1 testing for virion RNA and proviral DNA was negative, the other portion of frozen sperm was thawed for use in assisted reproduction. Mature eggs were obtained by means of ovulation-inducing drugs, and then placed in a dish containing 3 ml RPMI culture medium (20% albumin). The HIV-1-negative sperm solution was introduced to eggs by means of *in vitro* fertilization (IVF) or intracytoplasmic sperm injection (ICSI), and the dish containing treated eggs was incubated at 37°C under 5%

CO₂ for 48 h. Before embryo transfer, the culture medium for the fertilized egg was collected and tested for the presence of HIV-1 again. Only when HIV-1 RNA and DNA assays by nested PCR were negative was embryo transfer conducted. All the female partners who underwent assisted reproductive therapy, even those who did not conceive successfully, were tested for HIV antibodies, HIV-1 RNA and proviral DNA in the blood at 1 and 3 months after the assisted reproductive technique and after delivery. The babies were tested for HIV RNA and proviral DNA in umbilical cord blood at birth and in blood until 6 months after birth.

Results

Sensitivity of the HIV-1 RNA/DNA test

The procedure to detect a single copy of either HIV-1 virion RNA or proviral DNA in sperm suspensions (the HIV-1 RNA/DNA test) was developed by selecting and improving techniques in three main steps (collection of HIV-1 virions and infected cells by centrifugation, extraction of viral RNA and DNA with silica-gel-membrane technology, and the detection of the viral RNA and DNA by nested PCR) to achieve zero apparent loss in recovery at each step. First, the exact virion concentration of the standard HIV_{LAI} virus stock was determined by direct RT-nested PCR at endpoint dilution by using the null-class equation of the Poisson distribution. Then, one virion of HIV_{LAI}, on average, was added to 1 ml Sydney IVF medium (Cook, Tokyo, Japan) and the whole procedure was initiated. When one fourth of the eluate from an extraction column was examined (replicated four times) with RT-nested PCR, 12 of

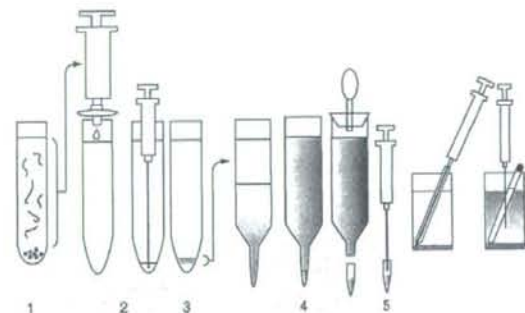


Fig. 1. Revised swim-up method to remove HIV completely.

(1) The semen is diluted and debris allowed to precipitate. (2) The suspension is filtered, 0.1 ml Percoll added to the bottom, and the tube is centrifuged. (3) The sperm sediment is layered onto a linear gradient of Percoll (30-98%). (4) After centrifugation, the sediment is recovered by cutting the tube. (5) The sperm suspension is introduced into the bottom of the culture medium using a microtube. (6) The sperm that swim up are recovered.

20 samples exhibited at least one band in four reactions (Fig. 2). Next, a single MOLT-4 cell chronically infected with HIV_{LAI} was added to 1 ml Sydney IVF medium and subjected to the HIV-1 RNA/DNA test without reverse transcription. RT-nested PCR showed that 6 of 10 samples exhibited positive reactions. The ratios of positive reactions for virions (60%) and infected cells (60%) were in close agreement with that predicted from the Poisson distribution (63%), providing evidence that the protocol has the ability to detect RNA/DNA in a single virion as well as in a single infected cell when present in as much as 1 ml of IVF medium. To study the influence of the presence of sperm in the medium on the sensitivity of the test, two sets of five samples containing 0.5, 1, 2, 4 and 8×10^6 /ml spermatozoa in Sydney IVF medium were tested; one set was mixed with 50 virions and the other set with 100 infected cells. The numbers of virion RNA and proviral DNA from sperm-containing samples that were determined by competitive PCR varied in the range 75–112 copies (note two RNA copies/virion) and 96–122 copies, respectively, in a manner that was not dependent on the sperm quantity. These results strongly suggest that the protocol can detect a single virion or infected cell even in the presence of up to 8×10^6 spermatozoa per sample.

Removal of HIV-1 virions and infected cells from mixed semen by sperm-washing

To assess the efficiency of sperm-washing procedures with Percoll density gradient centrifugation and swim-up for removal of HIV-1 from semen, HIV-1 virions or HIV-1-infected cells were added to healthy donor semen. When 2×10^7 virions HIV-1 were mixed with 1.6 ml healthy donor semen containing 6.3×10^7 spermatozoa/ml, 63 copies of HIV-1 RNA were detected after centrifugation but no HIV-1 RNA was detected after swim-up. When 5×10^5 HIV-1-infected cells were mixed with 1.6 ml of healthy donor semen containing 6.3×10^7 spermatozoa/ml, no HIV-1 DNA was detected after either centrifugation or swim-up. The sperm suspension collected after swim-up was 1.0 ml in volume and contained 50 000 spermatozoa of 100% motility.

Decay of infectivity of HIV-1 during incubation

A virus solution of HIV_{LAI} was incubated in culture medium for various periods and the p24 production ability was quantified in stimulated PBMC to evaluate the stability of HIV-1 *in vitro* with regard to infectivity. Infectivity decreased semiexponentially with a half-life of approximately 13 h.

Results of the clinical study

A total of 52 HIV-1-positive individuals participated in the clinical study (Table 1); 29 were haemophiliacs and 23 had become infected through sexual contact. The median age was 33 years (range, 27–44) in the 16 untreated individuals, 34 years (range, 28–41) in patients receiving antiretroviral drugs and with viral load ≥ 50 copies/ml, and 32 years (range, 20–51) in patients receiving HAART and with viral load < 50 copies/ml. Median plasma viral load was 17 500 copies/ml (range, 70–100 000) in the untreated group and 1500 copies/ml (range, 54–31 000) in patients receiving treatment and with a viral load ≥ 50 copies/ml.

Among 48 patients whose partner had assisted reproductive therapy, the median plasma viral load was 17 500 copies/ml (range, 70–100 000) in 15 patients in the untreated group, 4800 copies/ml (range, 54–31 000) in 10 patients receiving antiretroviral treatment and with viral load ≥ 50 copies/ml, and < 50 copies/ml in 23 patients taking HAART. Median CD4 cell count was 365 cells/ μ l (range, 66–1071) in the untreated group, 457 cells/ μ l (range, 60–652) in patients receiving antiretroviral drugs and with viral load ≥ 50 copies/ml, and 399 cells/ μ l (range, 41–792) in patients receiving HAART and with viral load < 50 copies/ml. The median sperm count of the HIV-positive males was 47×10^6 /ml (range, 0–82) in the untreated group, 41×10^6 /ml (range, 0–65) in patients receiving antiretroviral drugs and with viral load ≥ 50 copies/ml, and 35×10^6 /ml (range, 0–120) in patients receiving HAART and with viral load < 50 copies/ml.

Azoospermia occurred in four patients, who were excluded from this study.

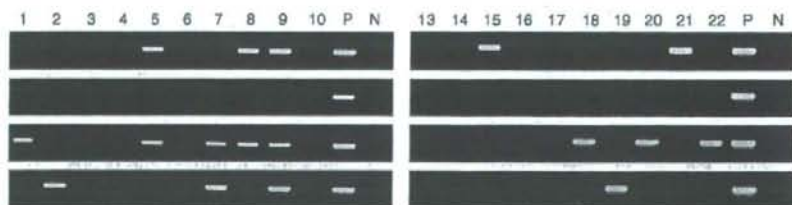


Fig. 2. Reverse transcriptase nested polymerase chain reaction (RT-nested PCR) capable of detecting a single copy of HIV-1 RNA. One virion of HIV-1_{LAI}, on average, was added to 20 sets of 1 ml Sydney IVF medium and then tested with the RT-nested PCR. When one fourth of the eluate from an extraction column was examined (in quadruplicate) with RT-nested PCR, 12 of 20 sets (lanes 1–10 and 13–22) exhibited at least one band in four reactions. Lanes P, positive control using 10 copies of HIV-1_{LAI} RNA; lanes N, negative control with no HIV-1 RNA.

Table 1. Characteristics of male patients with HIV infection.

	Untreated men (n = 16)	Men treated with HAART	
		Viral load \geq 50 copies/ml (n = 13)	Viral load < 50 copies/ml (n = 23)
Median age [years (range)]	33 (27–44)	34 (28–41)	32 (20–51)
Route of infection			
Haemophilia	10	8	11
Sexually transmitted	6	5	12
Median HIV viral load in serum [copies/ml (range)]	17 500 (70–100 000)	1500 (54–31 000)	< 50
CD4 cell count [cells/ μ l (range)]	365 (66–1071)	457 (60–652)	399 (41–792)
Sperm concentration [$\times 10^6$ /ml (range)]	47 (0–82)	41 (0–65)	35 (0–120)
Azoospermia (No.)	1	2	1

In all patients, the median motility rate was 28%, and the median incidence of morphologically normal spermatozoa was 12%. The median concentration of spermatozoa in patients (excluding the four patients with azoospermia) was 42×10^6 /ml (range, 3–120) and 52×10^6 /ml (range, 0–170) spermatozoa were collected after the Percoll centrifugation. The median motility rate was 28% and 45% before and after the Percoll procedure. Following the swim-up method, there were 1.5×10^6 /ml (range, 0–11) collected spermatozoa, and the motility rate was 100%. Spermatozoa could be collected by the swim-up method in 73 semen samples from the 48 patients. No HIV-1 RNA or proviral DNA was detected in any sperm suspensions collected after the swim-up procedure. The HIV-1-negative sperm was used for IVF in 12 couples and for ICSI in 31 couples. HIV-1 RNA or proviral DNA could not be detected in the culture medium of the fertilized eggs before embryo transfer. Of the 43 female partners, 20 conceived and 27 babies were born. HIV antibodies, HIV RNA and proviral DNA were negative in all of the females and babies.

Discussion

This study demonstrated that it is possible to detect a single copy of HIV-1 RNA or proviral DNA, and that HIV-negative spermatozoa can be obtained from the semen of HIV-positive males with the careful use of density gradient centrifugation and the swim-up technique. There has been no HIV-1 transmission in any of the female partners who underwent IVF or ICSI, nor in any of the babies.

Some studies have indicated that HIV can bind and enter into spermatozoa [4,5,12,13]. However, CD4 is not expressed on the surface of spermatocytes or spermatozoa [14,15]. Brogi *et al.* [4] have reported that HIV can attach to the surface glycoprotein of spermatozoa. In children at birth, the infection route is considered to be mother to child [16], and there is no case report of a child or embryo

who has been infected with HIV via spermatozoa. It has also not been proven that a spermatid could be infected with HIV during spermatogenesis. This study showed that spermatozoa collected by the swim-up method were neither infected with HIV-1 nor had HIV-1 attached to them.

Semen contains spermatozoa, seminal plasma, white blood cells, microbes, metallic crystals and fibres of underwear. If components with higher density than spermatozoa are in a sample at centrifugation, those components may bring viruses and infected cells down to the bottom sperm fraction. Therefore, in our technique, we left diluted semen undisturbed to settle heavy components, and then took the sperm-containing upper fraction. If the sperm fraction (the bottom layer) following Percoll centrifugation is pipetted through the other denser layers, as is commonly done, HIV may contaminate the sperm fraction via the tube wall. In this study, we sealed the top of the tube after centrifugation and collected the sperm fraction by cutting off the bottom layer, which prevented contamination from the higher layers.

Gomibuchi *et al.* [17] reported that their method could not reduce HIV-1 RNA in semen to < 100 copies/ml in 55.6% of patients. Kuji *et al.* [18] have reported that the use of endotoxin-free Puresep for semen processing had a lower elimination rate for HIV than the Percoll method. Some groups have used a swim-up technique in which the spermatozoa collected after centrifugation with a separating solution were washed with a culture medium and layered below the medium, followed by swim-up. Because the difference in the specific gravity of the sperm suspension and that of the culture medium is small, HIV and mononuclear cells may easily diffuse to the top layer during the swim-up method [17]. The actual procedures of the swim-up method, such as semen-washing techniques, the materials used in centrifugation, the concentrations of separating solutions, and the methods used to collect the bottom layer (sperm fraction) vary among researchers [17,19,20]. Therefore, it is

considered that the HIV elimination rate will also vary. Our improved swim-up method provides a safer procedure for use in assisted reproductive techniques.

Semprini *et al.* [2] have reported that HIV transmission has not occurred in over 2000 patients who underwent artificial insemination using their method. Their successful results may be explained by the fact that infectious HIV is less than 1/10 000 of all HIV virions [11,21,22] and that removal of the HIV-producing mononuclear cells by the swim-up method is a major factor in reducing infection risk. We have reported that a female was infected with HIV-1 after six artificial insemination procedures using sperm prepared only by centrifugation in another hospital [23]. Artificial insemination should not be performed when inadequate HIV elimination methods are used or when the absence of HIV is not confirmed by highly sensitive tests.

Most HIV-infected patients in this study had low sperm counts and sperm motility rates, and provided a small number of spermatozoa after the swim-up method. As we try to achieve higher virus elimination rates, the number of collected spermatozoa becomes small. Ohl *et al.* [24] reported no pregnancies after artificial insemination using sperm obtained by the swim-up method. If it takes too long for PCR procedures, or if spermatozoa are frozen, the fertilization ability of the spermatozoa may be decreased and the probability of pregnancy may be low. It is difficult to confirm rapidly the removal of HIV-1 RNA and DNA in spermatozoa actually used for artificial insemination. CD4 and chemokine receptors are not expressed on eggs [25] and, therefore, eggs cannot become infected with HIV in the sperm suspensions collected using the swim-up method even if HIV is present in the suspension. If the suspensions are contaminated with a small amount of HIV, the infectivity of the HIV would still decrease to below 1/10 after a 2 day incubation. In addition, in IVF or ICSI, it is possible to confirm the absence of HIV-1 in the culture medium of fertilized eggs before embryo transfer. Therefore, we conducted IVF or ICSI using frozen spermatozoa that had been confirmed negative for HIV-1.

In conclusion, we have demonstrated that it is possible to collect spermatozoa with evidence of the absence of HIV-1 RNA and proviral DNA from semen of HIV-infected males. Whatever method is used for assisted reproductive technique and for removal of HIV from semen to reduce the risk of secondary transmission, it is essential to confirm the absence of HIV-1 RNA and proviral DNA in the sperm preparation used for the assisted reproductive technique with the most sensitive tests possible.

Sponsorship: This study was supported, in part, by grants from the Ministry of Health, Labour and Welfare in Japan.

References

1. Hammer SM, Squires KE, Hughes MD, Grimes JM, Demeter LM, Currier JS, *et al.* A controlled trial of two nucleoside analogues plus zidovudine in persons with human immunodeficiency virus infection and CD4 cell counts of 200 per cubic millimeter or less. AIDS Clinical Trials Group 320 Study Team. *N Engl J Med* 1997; 337:725-733.
2. Semprini AE, Fiore S, Pardi G. Reproductive counselling for HIV-discordant couples. *Lancet* 1997; 349:1401-1402.
3. Zhang H, Domadula G, Beumont M, Livornese L Jr, van Uitter B, Henning K, Pomerantz RJ. Human immunodeficiency virus type 1 in the semen of men receiving highly active antiretroviral therapy. *N Engl J Med* 1998; 339:1803-1809.
4. Brogi A, Presentini R, Moretti E, Strazza M, Piomboni P, Costantino-Ceccarini E. New insights into the interaction between the gp120 and the HIV receptor in human sperm (human sperm/gp120/galactoglycoerolipid/antigalactosylceramide/spermolipid/spermatogonia). *J Reprod Immunol* 1998; 41:213-231.
5. Bagasra O, Farzadegan H, Seshamma T, Oakes JW, Saah A, Pomerantz RJ. Detection of HIV-1 proviral DNA in sperm from HIV-1-infected men. *AIDS* 1994; 8:1669-1674.
6. Garrido N, Meseguer M, Simon C, Pellicer A, Remohi J. Assisted reproduction in HIV and HCV infected men of serodiscordant couples. *Arch Androl* 2004; 50:105-111.
7. Weigel MM, Gentili M, Beichert M, Friese K, Sonnenberg-Schwan U. Reproductive assistance to HIV-discordant couples: the German approach. *Eur J Med Res* 2001; 6: 259-262.
8. Centers for Disease Control and Prevention. Epidemiologic Notes and Reports HIV-1 Infection and Artificial Insemination with Processed Semen. *MMWR* 1990; 39:249, 255-256.
9. Kaneko S, Kobayashi T, Lee HK, Won WK, Oda T, Izumi Y, *et al.* Cryogenic preservation of low-quality human semen. *Arch Androl* 1990; 24:81-86.
10. Adachi A, Gendelman HE, Koenig S, Folks T, Willey R, Rabson A, *et al.* Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *J Virol* 1986; 59:284-291.
11. Kato S, Hiraishi Y, Nishimura N, Sugita T, Tomihama MM, Takano T. A plaque hybridization assay for quantifying and cloning infectious human immunodeficiency virus type 1 virions. *J Virol Meth* 1998; 72:1-7.
12. Nuovo GJ, Becker J, Simsir A, Margiotta M, Khalife G, Shevchuk M. HIV-1 nucleic acids localize to the spermatogonia and their progeny. A study by polymerase chain reaction in situ hybridization. *Am J Pathol* 1994; 144:1142-1148.
13. Baccetti B, Benedetto A, Burrini AG, Collodel G, Ceccarini EC, Crisa N, *et al.* HIV-particles in spermatozoa of patients with AIDS and their transfer into the oocyte. *J Cell Biol* 1994; 127:903-914.
14. Gil T, Castilla JA, Hortas ML, Molina J, Redondo M, Samaniego F, *et al.* CD4+ cells in human ejaculates. *Hum Reprod* 1995; 10:2923-2927.
15. Kim LU, Johnson MR, Barton S, Nelson MR, Sontag G, Smith JR, *et al.* Evaluation of sperm washing as a potential method of reducing HIV transmission in HIV-discordant couples wishing to have children. *AIDS* 1999; 13:645-651.
16. Peckham C, Gibb D. Mother-to-child transmission of the human immunodeficiency virus. *N Engl J Med* 1995; 333:298-302.
17. Gombuchi H, Nagamatsu A, Minoura S, Nonoyama M, Tachikawa N, Oka S. Intrauterine insemination with processed semen of HIV positive husband: study of semen processing. *J AIDS Res* 2001; 3:6-9.
18. Kujii N, Yoshii T, Kato S, Asada H, Sueoka K, Yoshimura Y. Sedimentation kinetics of HIV-1 in two gradient media. *58th Annual Meeting of American Society for Reproductive Medicine*. Seattle, 2002, pp. 12-17.
19. Meseguer M, Garrido N, Gimeno C, Remohi J, Simon C, Pellicer A. Comparison of polymerase chain reaction-dependent methods for determining the presence of human immunodeficiency virus and hepatitis C virus in washed sperm. *Fertil Steril* 2002; 78:1199-1202.

20. Hanabusa H, Kuji N, Kato S, Tagami H, Kaneko S, Tanaka H, *et al.* An evaluation of semen processing methods for eliminating HIV-1. *AIDS* 2000; **14**:1611-1616.
21. Layne SP, Merges MJ, Dembo M, Spouge JL, Conley SR, Moore JP, *et al.* Factors underlying spontaneous inactivation and susceptibility to neutralization of human immunodeficiency virus. *Virology* 1992; **189**:695-714.
22. McKeating JA, McKnight A, Moore JP. Differential loss of envelope glycoprotein gp120 from virions of human immunodeficiency virus type 1 isolates: effects on infectivity and neutralization. *J Virol* 1991; **65**:852-860.
23. Hanabusa H, Kato S, Kaneko S, Suzuki M, Takakuwa K, Kuji N, *et al.* Clinical outcome of artificial reproductive technology using HIV-1 free sperm and the problems. *17th Congress of the Japanese Society for AIDS Research*. Kobe, November 2003 [abstract 148].
24. Ohl J, Partisani M, Wittemer C, Schmitt MP, Cranz C, Stoll-Keller F, *et al.* Assisted reproduction techniques for HIV serodiscordant couples: 18 months of experience. *Hum Reprod* 2003; **18**:1244-1249.
25. Baccetti B, Benedetto A, Collodel G, Crisa N, di Caro A, Garbuglia AR, *et al.* Failure of HIV-1 to infect human oocytes directly. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999; **21**:355-361.

8.

性感染症

STD/STI

国立成育医療センター周産期診療部産科

塚原優己

Yuki Tsukahara

Key words : STD (sexually transmitted diseases), STI (sexually transmitted infections), 梅毒, HIV/AIDS, 淋菌感染症, 性器クラミジア感染症, 性器ヘルペス, 尖圭コンジローマ

概念

性行為(通常のセックス以外にアナルセックス, フェラチオ, クンニリングス, ペッチング等も含める)によって感染するすべての感染症の総称。主なものとして, 梅毒, 淋菌感染症, 性器クラミジア感染症, 性器ヘルペス, 尖圭コンジローマ, 陰トリコモナス症, 性器カンジダ症, 後天性免疫不全症候群(HIV), B型肝炎, アメーバ赤痢, ケジラミ症など。旧「性病予防法」に規定されていた性病(淋病・梅毒・軟性下疳・性病性リンパ肉芽腫症[第4性病])よりも大きな概念である。

定義

1. STD と STI

日本性感染症学会の用語に関する会告(2002年)¹⁾によれば, 「性感染症は, 従来 STD (Sexually Transmitted Diseases) と表現されることが多かったが, 近年 STI (Sexually Transmitted Infections) という用語も使われている。HIV/AIDS に代表されるように, STD の中に, 感染はしていても発症しない疾患が目立つようになってきたこともその一因であるように思われる。英国では STI が一般的で, 一方米国では STD が主流になっているものと思われる。インターネット上で MEDLINE から文献検索を行ってみると, STD をキーワードとした場合と STI をキーワードとした場合とでは, 検索数に大きな差がみられる。例えば STI とした場合に検索できる論文は殆どが前述した英国の「Sexually Transmitted Infections」という雑誌からのものであり, 数がかなり限定されたものになっている。このような結果を踏まえて用語委員会で議論が行われたが, 将来的に STD が STI に変わる可能性はあるものの, 現時点で

表 1 五類感染症

全数把握(すべての医療機関において届け出を行う感染症)
*アメーバ赤痢 *急性ウイルス肝炎[A型及びE型を除く] ジアルジア症 クリプトスポリジウム症 髄膜炎菌性髄膜炎 先天性風疹症候群 *梅毒 破傷風 急性脳炎 クロイツフェルト・ヤコブ病 劇症型溶血性レンサ球菌感染症 *後天性免疫不全症候群 バンコマイシン耐性腸球菌感染症 バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌感染症
定点把握(都道府県より指定された医療機関において届け出を行う感染症)
咽頭結膜熱 インフルエンザ A型溶血性レンサ球菌感染症 感染性胃腸炎急性出血性結膜炎 クラミジア肺炎 [オウム病を除く] 細菌性髄膜炎 水痘 *性器クラミジア感染症 *性器ヘルペスウイルス感染症 成人麻疹 麻疹 [成人麻疹を除く] 手足口病 伝染性紅斑 突発性発疹 百日咳 風疹無菌性髄膜炎 ヘルパンギーナ マイコプラズマ肺炎 ペニシリン耐性肺炎球菌感染症 メチシリン耐性黄色ブドウ球菌感染症 薬剤耐性緑膿菌感染症 流行性角結膜炎 流行性耳下腺炎 *淋菌感染症 *尖圭コンジローマ RSウイルス感染症

*太字:性感染症

(注)2005年現在の性感染症定点は919施設。

は CDC が現在用いている用語の方を優先するべきであろうとの結論に達した」。

2. 性感染症にかかわる法令

1999(平成11)年「感染症の予防および感染症の患者に対する医療に関する法律」(いわゆる感染症新法)が施行された。これに伴い 1897(明治30)年制定の伝染病予防法, 1948(昭和23)年制定の性病予防法, 1989(平成元)年制定の「後天性免疫不全症候群の予防に関する法律」(通称エイズ予防法)は廃止された。さらに平成15年11月5日に感染症新法が改訂され, 多くの性感染症は五類感染症(国が感染症発生動向を行い, その結果等に基づいて必要な情報を一般国民や医療関係者に提供・公開していくことによって, 発生・拡大を防止すべき感染症)に再分類された(表1)。

疫学

1. 全数把握の性感染症

1) 梅毒(表2)

現行の発生動向調査による捕捉率は10%前後と

表2 性感染症報告数の年次推移(梅毒)

		11年	12年	13年	14年	15年	16年
		4~12月	年	年	年	年	年
梅毒	総数	751	759	585	575	509	533
	男	482	512	400	395	388	408
	女	269	247	185	180	121	125

の指摘もある³⁾。年間患者数は4,000から5,000例と推定されており、決して少なくはない。

2) HIV/AIDS(表3, 図1)

エイズ動向委員会からの報告³⁾によれば、2005年までの累計HIV感染者数は7,331人、エイズ患者数は3,623人と合計で1万人を超えている。またその報告は年々増加傾向にあり、2004年以後は、HIV感染者・AIDS患者合わせて年間1,000人を超えている。

2. 定点把握の性感染症^{4,5)}(表4, 図2)

定点把握を行っている性感染症の中で、報告数が

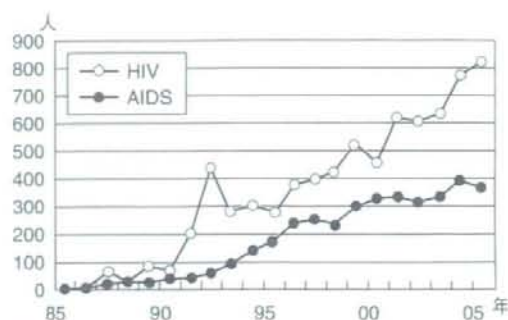


図1 HIV感染者およびAIDS患者報告数の年次推移(エイズ動向委員会:平成17年エイズ発生動向年報より)³⁾

最も多いのは依然として性器クラミジア感染症であるが、2002年以降わずかず減少傾向にある。また2003年まで増加傾向にあった淋菌感染症にも減少の兆しが見受けられる。反対に、2番目に発生頻度の高い性器ヘルペスと尖圭コンジローマは、ここ数年徐々にではあるが増加傾向にある。定点報告に基

表3 エイズ動向委員会報告(平成18年1月27日)(エイズ動向委員会:平成17年エイズ発生動向年報より)³⁾
平成18年1月1日現在のHIV感染者及びAIDS患者の国籍別、性別、感染経路別報告数の累計^{*1)}

診断区分	感染経路	日本国籍			外国国籍			合計		
		男	女	計	男	女	計	男	女	計
HIV感染者	異性間の性的接触	1,366	435	1,801	272	687	959	1,638	1,122	2,760
	同性間の性的接触 ^{*2)}	2,885	1	2,886	197	0	197	3,082	1	3,083
	静注薬物濫用	17	1	18	17	2	19	34	3	37
	母子感染	13	7	20	4	7	11	17	14	31
	その他 ^{*3)}	79	28	107	20	14	34	99	42	141
	不明	470	60	530	270	486	756	740	546	1,286
HIV合計		4,830	532	5,362	780	1,196	1,976	5,610	1,728	7,338
AIDS患者	異性間の性的接触	1,082	130	1,212	201	143	344	1,283	273	1,556
	同性間の性的接触 ^{*2)}	888	1	889	82	2	84	970	3	973
	静注薬物濫用	8	2	10	17	0	17	25	2	27
	母子感染	9	3	12	1	4	5	10	7	17
	その他 ^{*3)}	59	12	71	16	8	24	75	20	95
	不明	524	52	576	262	117	379	786	169	955
AIDS合計 ^{*4)}		2,570	200	2,770	579	274	853	3,149	474	3,623
凝固因子製剤による感染者 ^{*5)}		1,417	18	1,435	—	—	—	1,417	18	1,435

^{*1)}平成16年までは確定値、平成17年は平成18年1月1日現在の速報値である。

^{*2)}両性間性的接触を含む。

^{*3)}輸血などに伴う感染例や推定される感染経路が複数ある例を含む。

^{*4)}平成11年3月31日までの病状変化によるAIDS患者報告数154件を含む。

^{*5)}「血液凝固異常症全国調査」による2004年5月31日現在の凝固因子製剤による感染者数

表4 定点当り報告数の年次推移(性器クラミジア感染症、性器ヘルペス、尖圭コンジローマ、淋菌感染症)(感染症情報センター：感染症発生動向調査年別報告集計表(1999～2004年)を改変)⁵⁾

		1999年	2000年	2001年	2002年	2003年	2004年
性器クラミジア感染症	総数	29.28	41.28	44.83	47.73	45.59	41.65
	男性	12.87	17.68	19.21	19.94	19.27	18.05
	女性	16.4	23.6	25.62	27.79	26.33	23.6
性器ヘルペス	総数	7.68	9.97	10.22	10.54	10.69	10.67
	男性	3.48	4.36	4.34	4.44	4.43	4.23
	女性	4.2	5.62	5.88	6.10	6.26	6.44
尖圭コンジローマ	総数	3.73	5.08	5.68	6.22	6.8	7.17
	男性	2.13	2.8	3.09	3.32	3.59	3.96
	女性	1.6	2.28	2.59	2.90	3.21	3.21
淋菌感染症	総数	13.86	18.87	22.68	23.91	22.5	19.02
	男性	11.83	15.83	18.89	19.18	17.58	15.61
	女性	2.03	3.04	3.79	4.72	4.92	3.41

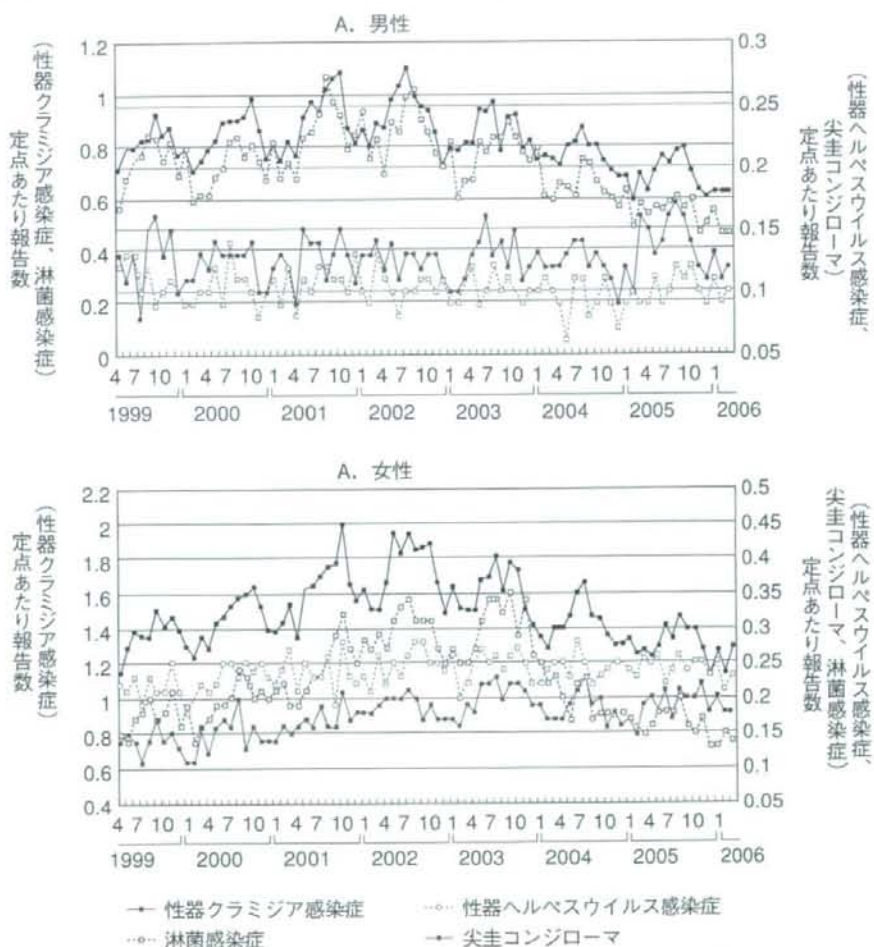


図2 若年齢層(15～29歳)における性感染症の月別発生状況の推移(感染症情報センター：感染症発生動向調査感染症週報2006年第5週による)⁴⁾

づいた若年齢層(15~29歳)における性感染症の月別発生状況の推移を図2に示す⁴⁾。

妊娠前の管理

性感染症の各論については、後述の産科編, Part II 妊娠中, [感染]に譲りたい。性感染症の原因となる病原体の中には、クラミジアや淋菌のように子宮付属器炎や骨盤腹膜炎などの骨盤内炎症性疾患をも引き起こし、これが原因で妊娠を困難とする病原体や、妊娠中に罹患した際に児にも感染の危険が及ぶ病原体も多く、妊娠前に性感染症感染の有無を検査し治療を行うことが、性行為感染のみならず母子感染防止のためにも望ましいと考える。

文献

- 1) <公示>用語について。日性感染症会誌 **13**:7, 2002
- 2) 熊本悦明, 他:日本における性感染症サーベイランス—2002年度調査報告—。日性感染症会誌 **15**:17-45, 2004
- 3) 厚生労働省エイズ動向委員会:平成17年エイズ発生動向年報, http://api-net.jfap.or.jp/mhw/survey/05nenpo/nenpo_menu.htm
- 4) 厚生労働省/国立感染症研究所:性感染症について(4月12日集計分)。感染症発生動向調査感染症週報 **8**:15, 5-7, 2006
- 5) 国立感染症研究所感染症情報センター:感染症発生動向調査週報(IDWR)年別報告集計表。 <http://idsc.nih.go.jp/idwr/ydata/index-j.html>

* * *

平成19年度

第7回 ECC 山口メモリアルエイズ研究奨励賞受賞研究

HIV/AIDS ワクチン開発の基礎的研究および日本における
母子感染の臨床的・疫学的研究Development of HIV/AIDS Vaccine and Clinical & Epidemiological
Study of Mother-to-Child Transmission of HIV in Japan

吉野直人

Naoto YOSHINO

岩手医科大学医学部細菌学講座

Department of Microbiology, Iwate Medical University School of Medicine

日本エイズ学会誌 9: 209-216, 2007

はじめに

ECC 山口メモリアルエイズ研究奨励賞の受賞内容は HIV/AIDS ワクチン開発の基礎的研究と日本における母子感染の臨床的・疫学的研究の異なる二つの研究からなっている。本稿ではそのうちの一方である、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・生殖医療に関する臨床的・疫学的研究」班で調査を行ってきた、妊婦の HIV スクリーニング検査実施率の全国調査に関して述べさせて頂く。

日本の HIV 母子感染の現状は、本研究班の調査により平成 17 年までに全国で 468 例の HIV 感染妊娠症例が明らかになっている^{1,2)}。これらの症例データから、母子感染率は選択的帝王切開群、緊急帝王切開群、経膈分娩群ではそれぞれ 0.5%, 5.9%, 20.8% であり、さらに妊娠早期の HIV スクリーニング検査と抗ウイルス薬投与による血中ウイルス量の良好なコントロール、および選択的帝王切開が HIV 母子感染予防対策として極めて重要であることを示した²⁾。しかし、これらの予防対策は妊娠女性が HIV に感染していることが明らかにされて初めて行われるものである。そのため、母子感染予防対策を行う前提となる、妊娠女性に対する HIV スクリーニング検査の現状を把握する必要がある。

調査方法

平成 11 年から毎年全国の産科または産婦人科を標榜する病院施設(約 1,600 施設)に対し HIV 母子感染に関する

調査用紙を送付し、返信はがきにより回答を得た。また、産科または産婦人科を標榜する診療所施設(約 6,000 施設)に対し、平成 15 年と平成 18 年に同様の調査用紙を送付し、返信はがきにより回答を得た。これらの質問に対しての有効回答の解析を行った。病院施設からの回答率は毎年 70% 前後で、診療所施設からの回答率は約 40% であった。

妊婦の HIV スクリーニング検査実施率(病院調査)

HIV スクリーニング検査実施率は、「各病院での分娩件数」×「各病院での HIV スクリーニング検査実施率」=「各病院での検査件数」÷「総分娩件数」×100 = 「検査率(%)」とした。

最新の調査(平成 18 年度)で、検査率は全国平均で 95.3% であった。最も検査率の高かった県は山梨県、静岡県で 100%、最も検査率の低かった県は宮崎県で 56.4% であった。地域差があるが、平成 11 年度調査から平成 18 年度調査までの都道府県別 HIV スクリーニング検査実施率の推移から、その差は縮小される傾向にあることが明らかになった(図 1)。平成 17 年度と比較すると、宮崎県(11.7% 増)、鳥取県(10.3% 増)、滋賀県(10.3% 増)の 3 県で 10% 以上検査率が上昇し、逆に 10% 以上検査率が減少した都道府県は無かった。調査を開始した平成 11 年度との比較では、50% 以上検査率が上昇した県は、佐賀県(95.9% 増)、沖縄県(87.1% 増)、和歌山県(77.3% 増)、島根県(61.6% 増)、山口県(57.0% 増)、山形県(56.8% 増)、福岡県(55.7% 増)、高知県(55.5% 増)、大分県(53.1%)(11 年度比)の 9 県であった。平成 11 年度比では、47 都道府県で青森県を除く 46 都道府県で検査率が上昇していた。

著者連絡先: 吉野直人 (〒020-8505 岩手県盛岡市内丸 19-1 岩手医科大学医学部細菌学講座)

2007 年 5 月 28 日受付



図1 都道府県別 HIV スクリーニング検査実施率の推移

スクリーニング検査率の地域差

地方ブロック別に HIV スクリーニング検査実施率の推移を解析した (図2)。

北海道・東北ブロック：宮城県、福島県では、高い HIV スクリーニング検査実施率を維持していた。北海道、秋田県、山形県では HIV スクリーニング検査実施率が急激に上昇し、平成 18 年度ではいずれも 90% 以上の HIV スクリーニング検査実施率となった。青森県は、平成 11 年 4 月より県による HIV スクリーニング検査の公的補助を中止したため、検査率が急激に減少し平成 13 年度には 42.6% まで低下したが、平成 15 年から上昇に転じ平成 16 年度以降は 70% 代で推移している。岩手県は、エイズ予防財団主催による研究成果等普及啓発事業研究成果発表会を行った翌年度は HIV スクリーニング検査実施率が 15.2% 増加したが、それ以外の年度では HIV スクリーニング検査実施率が上昇傾向にあるもののその度合いは鈍く、平成 18 年

度では北海道・東北ブロックで最も HIV スクリーニング検査実施率が低く、全国では宮崎県に次いで二番目の低さとなった。

関東ブロック：茨城県、埼玉県、千葉県、神奈川県では平成 11 年度調査以来、HIV スクリーニング検査実施率が常に 90% 以上で推移している。群馬県、東京都では平成 12 年度調査以降、常に 90% 以上で推移している。栃木県は平成 11 年度調査では、関東ブロックの他の都県と比較して HIV スクリーニング検査実施率が約 15~20% 程度低かったが、平成 14 年度調査以降常に 90% 以上で推移している。

甲信越ブロック：山梨県では平成 11 年度調査以来、HIV スクリーニング検査実施率が常に 90% 以上で推移しており、平成 15 年度以降では HIV スクリーニング検査実施率が 100% である。新潟県、長野県では平成 12 年度調査以降、HIV スクリーニング検査実施率が常に 90% 以上で推移しており、新潟県は平成 13 年度以降、長野県は平成 16

HIVスクリーニング検査実施率

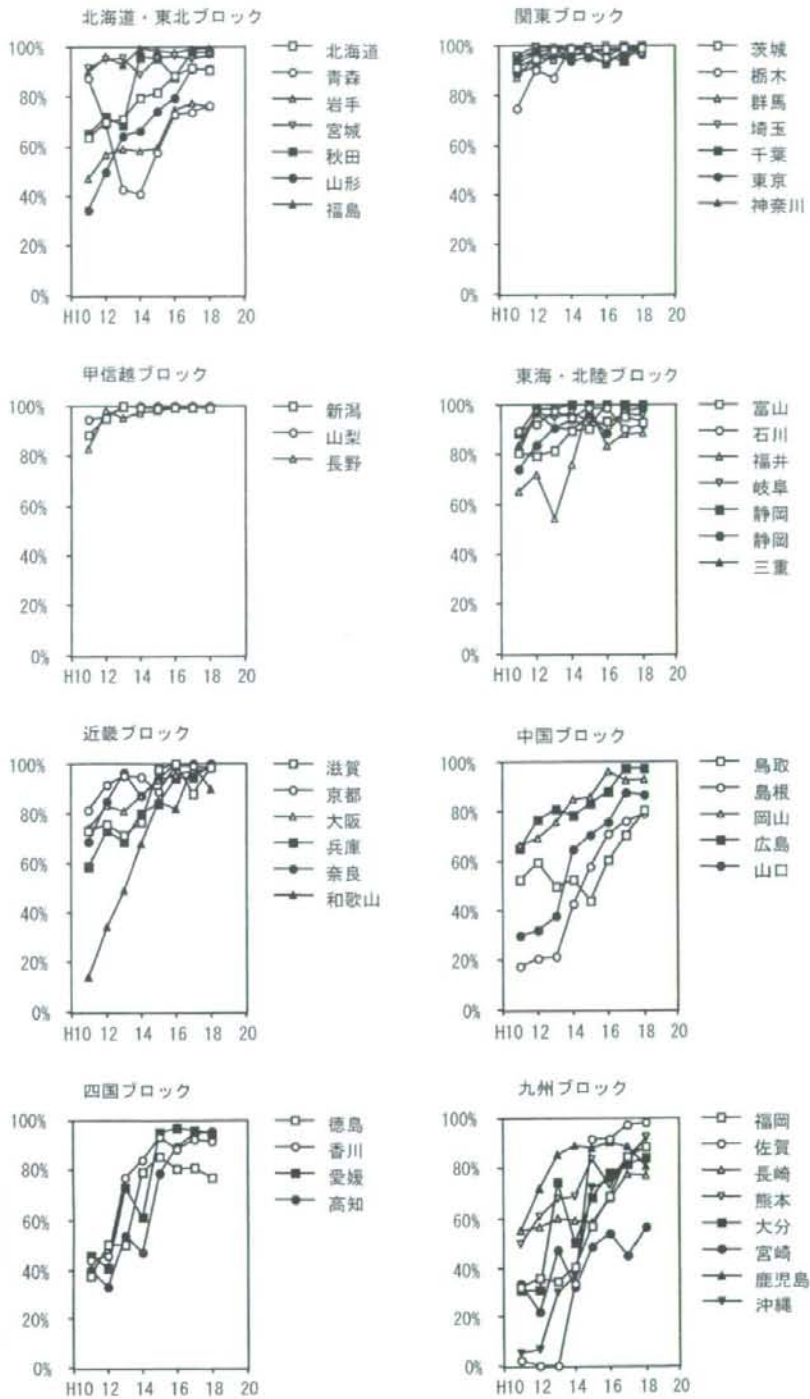


図2 地方ブロック別 HIV スクリーニング検査実施率の推移

年度以降 HIV スクリーニング検査実施率が常に 99% 以上で推移している。

東海・北陸ブロック：静岡県は平成 12 年度調査以降、三重県では平成 16 年度調査以降、HIV スクリーニング検査実施率が常に 98% 以上と極めて高い値で推移している。愛知県は平成 11 年度では東海・北陸ブロックで福井県に次いで二番目の低い HIV スクリーニング検査実施率であったが、その後徐々に上昇した。岐阜県では平成 12 年度調査以降、富山県では平成 15 年度調査以降 HIV スクリーニング検査実施率が常に 90% 以上で推移している。石川県は平成 15、16 年度調査では HIV スクリーニング検査実施率が 98% 以上であったが、その後やや減少している。福井県は平成 15 年度調査では HIV スクリーニング検査実施率が 100% であったが、その後は 80% 代で推移しており、平成 17 年度以降東海・北陸ブロックで唯一 HIV スクリーニング検査実施率が 90% を下回っていた。

近畿ブロック：兵庫県、奈良県、和歌山県で急激な HIV スクリーニング検査実施率の上昇が見られた。特に、和歌山県は平成 11 年度では全国で三番目の低い HIV スクリーニング検査実施率 (13.9%) であったが、平成 15 年度以降では 80% を越えて推移している。京都府、奈良県では平成 16 年度以降 HIV スクリーニング検査実施率が常に 99% 以上で推移していた。大阪府は平成 11 年度では 70% 代、平成 12~14 年度では 80% 代、平成 15~18 年度では 90% 代と徐々に上昇していた。滋賀県は平成 17 年度を除くと平成 15 年度以降 HIV スクリーニング検査実施率が常に 98% 以上であった。

中国ブロック：岡山県、広島県は中国ブロックの中では高い水準で推移しており、岡山県では平成 15 年度以降、広島県では平成 16 年度以降 HIV スクリーニング検査実施率が 90% を越えている。山口県、島根県では急激な HIV スクリーニング検査実施率の上昇が見られた。平成 11 年度で島根県は全国で 4 番目 (17.6%)、山口県は 5 番目 (29.9%) に低い HIV スクリーニング検査実施率であったが、平成 14 年度以降上昇傾向にある。鳥取県では平成 11 年度から 15 年度まで HIV スクリーニング検査実施率が低下傾向にあり、平成 15 年度調査では全国で最も低い HIV スクリーニング検査実施率 (44.2%) であったが、その後上昇に転じ、平成 18 年度では 80% を越えた。

四国ブロック：平成 11、12 年度調査では徳島県、香川県、愛媛県、高知県の 4 県とも 30~50% 程度と低い HIV スクリーニング検査実施率であった。その後増減はあるものの、平成 15 年度調査ではいずれも 80~90% 程度まで上昇した。しかし、その後香川県、愛媛県、高知県では HIV スクリーニング検査実施率が上昇または維持されたのに対し、徳島県では低下傾向が続き平成 18 年度には 80% を下

回り全国でも 5 番目の低さになった。

九州ブロック：平成 11 年度調査と平成 18 年度調査を比較して全国で最も HIV スクリーニング検査実施率が上昇したのは佐賀県であった。佐賀県は平成 12、13 年度調査では HIV スクリーニング検査実施率が 0.1% であったが、平成 14 年度以降急激な上昇が始まり、平成 15 年度以降は 90% 以上を推移している。全国で最も HIV スクリーニング検査実施率が低い県であったが、平成 15 年度調査以降は九州ブロックでは最も検査実施率が高い県となり、平成 18 年度調査でも西日本で 4 番目、全国で 16 番目に検査実施率が高い県となった。沖縄県も佐賀県に次いで HIV スクリーニング検査実施率が上昇した。平成 13、14 年度調査では HIV スクリーニング検査実施率が 30% 代であったが、平成 15、16 年度調査では 70% 代に上昇し、平成 18 年度調査では 92.2% となった。福岡県、大分県は平成 11 年度調査から 50% 以上の HIV スクリーニング検査実施率上昇が見られ、平成 17 年度以降は 80% 以上となった。熊本県の HIV スクリーニング検査実施率は前年度と比較して減少する年もあったが上昇傾向にある。鹿児島県は平成 16 年度調査では 90.1% に HIV スクリーニング検査実施率が上昇するが、その後下降傾向となり、平成 18 年度調査では平成 16 年度調査よりも約 10% 低下した。長崎県は平成 11 年度では鹿児島県と並び九州ブロックで最も HIV スクリーニング検査実施率が高かったが、平成 15 年度まで 50% 代で推移し、その後検査率は上昇しているが平成 17、18 年度調査ではともに 80% 未満である。宮崎県は、平成 11 年度調査と平成 18 年度調査との比較では 20% ほど HIV スクリーニング検査実施率が上昇している。平成 11 年度調査では全国で 8 番目に HIV スクリーニング検査実施率が低い県であったが、平成 14 年度調査では全国で最も低い県となった。全国的に平成 14~16 年度頃に大幅に HIV スクリーニング検査実施率が上昇する県が見られるが、宮崎県は平成 15 年度調査以降も増減を繰り返しており、平成 16~18 年度調査では 3 年連続して検査率の最も低い県となった。

妊婦の HIV スクリーニング検査実施率 (診療所調査)

最新の調査 (平成 18 年度) で、診療所での HIV スクリーニング検査率は全国平均で 90.9% (15 年度比 10.1% 増) であった。最も検査率の高かった県は茨城県、新潟県、山梨県、富山県、石川県、滋賀県、鳥取県で 100%、最も検査率の低かった県は高知県で 26.6% であった。診療所に対する調査でも病院調査と同様に地域差があるが、平成 15 年度調査と平成 18 年度の都道府県別 HIV スクリーニング検査実施率から、その差が縮小される傾向にあることが明らかになった (図 3)。全国平均では病院と診療所での検査率の

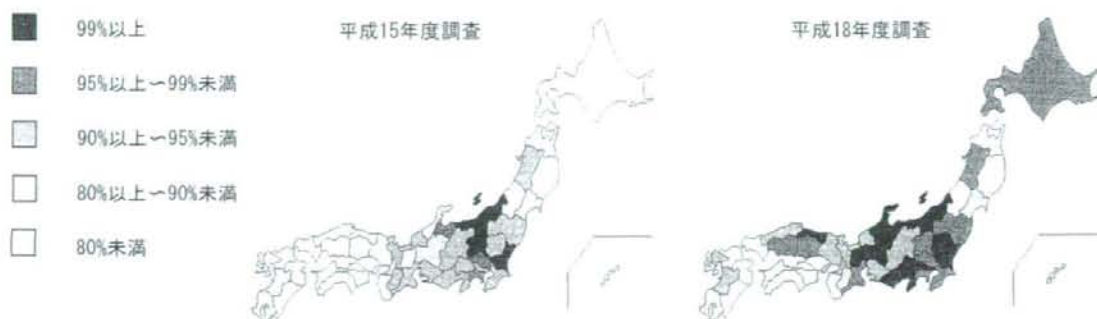


図3 HIVスクリーニング検査実施率の推移

差は4.4%であり病院と診療所との差は縮小された。

しかし、同じ県内でも病院と診療所での検査率の差が大きい県があり、20%以上の差が見られた県は、高知県(68.9%)、山口県(22.0%)、長崎県(20.0%)であった(病院での検査率%－診療所での検査率%)。逆に、診療所でのスクリーニング検査率が病院での検査率を上回っている県も存在しており、10%以上上回っていた県は、鳥取県(19.5%)、島根県(11.7%)、岩手県(11.3%)であった(診療所での検査率%－病院での検査率%)。このように病院と診療所とでHIVスクリーニング検査実施率の差が大きな県が存在するが、都道府県別の病院での検査率と診療所での検査率は相関関係が見られた(相関係数=0.487)(図4)。

病院と診療所を併せた平成18年度調査での全国のHIVスクリーニング検査実施率は93.5%であった。検査率の高かった県は山梨県(100.0%)、埼玉県(99.6%)、静岡県(99.6%)、茨城県(99.5%)、滋賀県(99.4%)、新潟県(99.4%)、栃木県(99.4%)の順で、検査率の低かった県は、宮崎県(60.9%)、長崎県(65.0%)、青森県(69.5%)、大分県(73.0%)、高知県(73.5%)、山口県(76.3%)、徳島県(77.8%)であった。

HIVスクリーニング検査実施率に関わる要因

HIVスクリーニング検査実施率に地域差が生じる理由を検討するために、HIV感染者数と病院でのHIVスクリーニング検査実施率との関係を解析した。47都道府県での比較では、平成12年度調査での相関係数は0.306であり、その後0.312(平成13年度)、0.263(平成14年度)、0.220(平成15年度)、0.176(平成16年度)、0.195(平成17年度)、0.201(平成18年度)であった。全都道府県を対象とした場合、検査率は100%が上限でありHIV感染者がある程度存在する地域では検査率が高いため、それらの地域でのHIV感染者数の差と検査率の差が明確にならない。

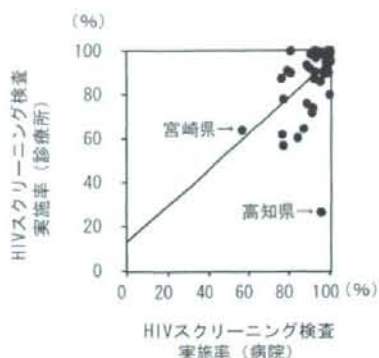


図4 病院と診療所との都道府県別HIVスクリーニング検査実施率の関係

そこで、平成18年度調査で各都道府県でのHIV感染者数が25人以上では検査率が90%以上になることから、HIV感染者数が24人以下の県を対象に相関を求めた(図5)。平成12、13年度では相関係数はそれぞれ0.536と0.659であり、HIV感染者数とHIVスクリーニング検査実施率とに相関があると考えられ、HIV感染者数の発生頻度が低い県ではHIVスクリーニング検査実施率も低い結果になった。しかし、平成14年度では相関係数は0.397に低下し、0.404(平成15年度)、0.383(平成16年度)、0.255(平成17年度)と推移し、相関関係は弱くなった。平成18年度調査での相関係数は0.046であり相関関係はほとんど無いと考えられる。即ち調査を開始した頃は周囲にHIV感染者がいるかどうか大きな要因になっていたが、現在ではHIV感染者数に拘わらずHIVスクリーニング検査実施率の高い地域と低い地域が存在する。

本研究班では平成13年度より毎年、エイズ予防財団主催による研究成果等普及啓発事業研究成果発表会を行って

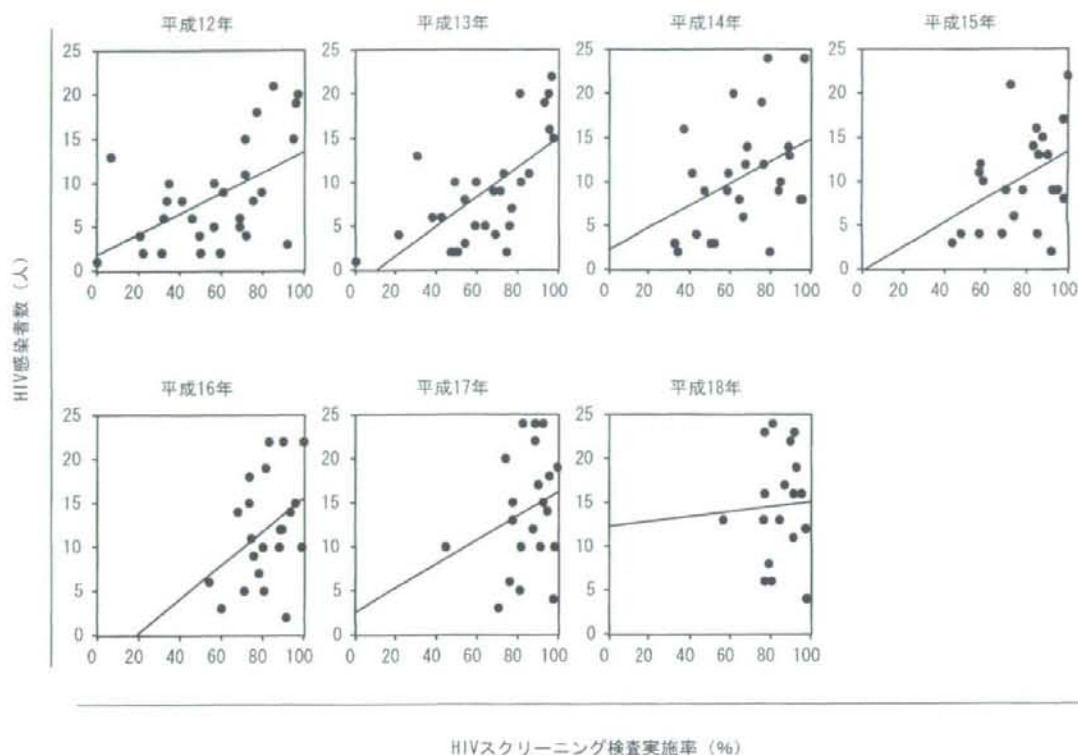


図 5 HIV 感染者数と HIV スクリーニング検査実施率

いる。これまでに、東京都、大阪府、福岡県（平成 13 年度）、宮城県、熊本県、広島県（平成 14 年度）、福岡県、岩手県、愛知県（平成 15 年度）、大分県、東京都、山形県（平成 16 年度）、北海道、山口県、沖縄県（平成 17 年度）、山梨県、神奈川県、宮崎県（平成 18 年度）で開催した。平成 17 年度までの 15 回の発表会のうち 11 ヶ所の開催地で発表会翌年度の病院での検査率が、各年度の全国での検査率の伸び率よりも上昇していた。特に岩手県（15.2% 増：59.5%→74.7%）、熊本県（15.2% 増：68.5%→83.7%）、福岡県（11.7% 増：56.9%→68.6%）、山形県（11.2% 増：79.8%→91.0%）で検査率が大幅に増加していた。上記 15 発表会での開催地における検査率上昇の平均は 5.5% 増であった。これは、全国での検査率変化の年次推移（平成 13 年度→14 年度：2.4%、平成 14 年度→15 年度：4.7%、平成 15 年度→16 年度：1.4%、平成 16 年度→17 年度：3.6%、平成 17 年度→18 年度：0.7%）と比べて大きな変化であり、HIV スクリーニング検査実施率上昇のための啓発活動の重要性が示唆された。

エイズ拠点病院・拠点病院以外の病院との区別による

HIV スクリーニング検査実施率は、エイズ拠点病院で 97.2%、拠点病院以外の病院で 93.5% であり、その差は 3.7%（前年比 1.5% 増）であった。拠点病院では回答のあった 260 施設中 5 施設（1.9%）で全く検査を行っていなかった。拠点病院での HIV スクリーニング検査未実施施設の割合は、平成 11 年度調査では 279 施設中 46 施設で 16.5% 存在したが、年々その割合は低下し平成 17 年度調査では 265 施設中 5 施設で 1.9% となった（図 6）。しかし、依然としてエイズ拠点病院であるが HIV スクリーニング検査を全く行っていない施設が存在する。

次に、産科および産婦人科医の不足が地域によっては社会的な問題になっていることを踏まえ、産科および産婦人科の医師 1 人あたりの分娩施行件数と HIV スクリーニング検査実施率との関係を検討した（図 7）。産科および産婦人科の医師数と分娩件数は、『平成 16 年医師・歯科医師・薬剤師調査の概況（厚生労働省大臣官房統計情報部）』と『母子保健の主なる統計—2007—（財団法人母子衛生研究会）』の数値から、医師 1 人あたりの分娩施行件数を算出した。HIV スクリーニング検査実施率は、病院および診療所