

200902019A

厚生労働科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

安全な生殖補助医療確立のための、精液よりの

HIV ウイルス分離法などの研究

平成21年度 総括研究報告書

研究代表者 田中 憲一

平成22(2010)年5月

目次

I. 総括研究報告書	1
安全な生殖補助医療確立のための、精液よりの HIV ウイルス分離法などの研究	
田中憲一	
II. 分担研究報告書	
1. HIV 陽性男性、陰性女性夫婦に対する生殖補助医療の応用拡大のためのシステム構築に関する研究	6
高桑好一	
2. HIV 感染者の精液中におけるウイルス RNA とプロウイルス DNA の検出	14
加藤真吾	
3. 安全な生殖補助医療を行うための HIV ウイルス分離法の確立	19
花房秀次	
4. ヒト精子凍結保存の最適化に関する研究	22
兼子智	
5. 中空糸膜ウイルス除去カラムによる、より効率的な精液中 HIV 除去方法の開発	27
宇都宮龍馬	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	28
IV. 研究成果の刊行物・別刷	31

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
総括報告書

安全な生殖補助医療を行うための精液よりの HIV ウイルス分離法の確立

研究代表者 田中 憲一 新潟大学教育院医歯学系（産婦人科）教授

研究要旨

HIV 感染は漸増しているが、新しい抗 HIV 薬や併用療法の開発により治療可能な慢性感染症となりつつある。そのような状況の中で、HIV 陽性男性、HIV 陰性女性夫婦において子供を持ちたいと願う夫婦の数が年々増加している。しかしながら、これらの夫婦で通常の性行為により妊娠を望んだ場合妻の二次感染の可能性が高いことは周知の事実である。そこでこのような夫婦に対しより安全に、すなわち妻の二次感染の可能性を限り無くゼロに近付ける妊娠補助技術の開発が重要であり、このための基礎的、臨床的研究を継続、発展させることを目的としている。1) ヒト精子凍結保存の最適化に関する研究：HIV を除去した精子浮遊液の凍結保存に際し、等倍濃度の保護剤を予め添加したコロイドシリカゲル担体（Percoll 等）を用いて洗浄濃縮を行う方法の開発を行った。本法は遠心分離（約 30 分間）と平衡化が同時進行し、平衡化時間を長く取ることができる。遠心後の沈澱はすでに保護剤が浸透した状態であり、直ちに容器に収納して凍結を行うことができる。さらに保護剤添加による希釈を回避できる利点を有する。2) HIV 感染者の精液中におけるウイルス RNA とプロウイルス DNA の検出：HIV 感染者の精液中におけるウイルス量や、それが抗 HIV 治療によってどのように変化するかは、HIV 感染の拡大を予防する上で非常に重要な情報となる。従来、精液中 HIV 量に関する研究は、市販検査キットを流用していたため正確性に乏しく、また感染細胞にあまり注目してこなかった。そこで本研究では、感染者の精液を Ficoll-Paque 密度勾配遠心にかけて精子、精漿、及び精液単核球を分画に分け、各分画中の HIV-1 RNA と DNA の検出を nested PCR により試みた。その結果、被験者 6 人のうち、血中ウイルス量の高い 3 人から精漿中に HIV-1 RNA が検出され、その中の 1 人では単核球成分から HIV-1 プロウイルス DNA が検出された。3) 中空糸膜ウイルス除去カラムによる、より効率的な精液中 HIV 除去方法の開発：本年度の研究では精子数 800 万での B60 カラムによる精子回収率実験。これまで、精子数約 2000 万での研究を行い B60 カラムで 10 回洗浄後の精子回収率は 93.1%、運動率は 87.3%保たれていた。今回精子数 800 万で検証したところ、2 回目、6 回目、8 回目、10 回目のカラム通過後の精子回収率は（95%、95%、87.5%、92.5%）、直進運動率は（80%、84%、50%、84%）と精子数を少なくしても高い回収率と運動率を保たれていた。また、nested PCR により、洗浄後の精液 sample 中の HIV-RNA を増幅し、電気泳動にて確認。HIV-RNA ウイルスの 10copy と 1copy を positive control、H₂O を negative control とし B60 カラムを洗浄前、2 回目、4 回目、6 回目、10 回目のバンドを確認したところ、6 回目以降ではウイルスは検知されなかった。4) HIV 陽性男性、陰性女性夫婦に対する生殖補助医療の応用拡大のためのシステム構築に関する研究：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。125 名に胚移植を実施し、93 名が妊娠し、69 名の児が出生している。（流産例、現在妊娠継続中の例もあり。）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 40 名に対し体外受精、胚移植を施行した。25 症例（60%）に妊娠を認め、18 症例が分娩に至り 23 人の生児が誕生した。2 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、対象症例数を増やしその安全性

および有効性のさらなる確認に努めているが、エイズ治療拠点病院連絡会議において HIV 陽性男性、陰性女性夫婦に対する生殖補助医療のプロトコールおよび成果などを発表し、体外受精-胚移植の実施に関する協力を依頼しており、治療実施施設を増やすことの基盤整備を行っている。また、本研究班のホームページを作成し、一般に公開しており治療を希望する患者が治療に関する詳細な情報を入手しうるような環境を整備するとともに、本治療の成果を公表し情報公開に努めた。また、HIV 陽性男性、陰性女性夫婦に対する体外受精-胚移植の安全性の確認を目的として、本治療法後に出生した児の発育に関する調査を開始した。

研究分担者

花房秀次 (荻窪病院理事長・血液科)
加藤真吾 (慶應義塾大学微生物学・ウイルス学講師)
兼子 智 (東京歯科大学市川病院産婦人科講師) 高桑好一 (新潟大学医歯学総合病院周産母子センター 教授)
八幡哲郎 (新潟大学医歯学系(産婦人科)講師)
宇都宮龍馬 (旭化成クラレメディカル株式会社・アフレス事業部・学術部 課長)

A. 研究目的

HIV 感染は漸増しているが、新しい抗 HIV 薬や併用療法の開発により治療可能な慢性感染症となりつつある。そのような状況の中で、HIV 陽性男性、HIV 陰性女性夫婦において子供を持ちたいと願う夫婦の数が年々増加している。しかしながら、これらの夫婦で通常の性行為により妊娠を望んだ場合妻の二次感染の可能性が高いことは周知の事実である。そこでこのような夫婦に対しより安全に、すなわち妻の二次感染の可能性を限り無くゼロに近付ける妊娠補助技術の開発が重要であり、このための基礎的、臨床的研究を継続、発展させることを目的としている。

B. 研究方法

1) ヒト精子凍結保存の最適化に関する研究: HIV を除去した精子浮遊液の凍結保存時に、これまででは予め洗浄濃縮した精子懸濁液に 2 倍濃度の凍結保護剤を等量添加、混合した後、平衡化(保護剤の細胞内浸透)を行ってきた。本年度は等倍濃度の保護剤を予め添加したコロイドシリカゲル担体(Percoll 等)を用いて洗浄濃縮を行う方法の開発を行った。2) HIV 感染者の精液中におけるウイルス RNA とプロウイルス DNA の検出: 慶應義塾大学病院における「HIV 除去精子を用いた体外受精に関する臨床研究」に参加した HIV 感染不一致夫婦の男性から採取した精液のう

ち、精子洗浄に用いなかった一部(約 0.2 mL)をその日のうちに -80°C で凍結保存したものを、使用直前に室温で解凍して研究に用いた。今回の研究には 6 件の保存精液検体を用いた。精液中のウイルスゲノムの検出は次のようにして行った。まず精液検体に 1.8 mL の 2% FCS 含有 PBS を加え、5 mL の Ficoll-Paque 液に重層し、 $390\times g$ 、室温で 40 分間遠心した。遠心後、遠沈管の底に穴を開け、内液を底部から 0.5 mL ずつほぼ 14 本に分画した。次に、各分画から核酸(DNA と RNA)を QIAamp MinElute Virus Spin Kit (QIAGEN 社)を用いて精製し、60 μL の溶出液を得た。この溶出液 10 μL ずつを用い、逆転写を行ってから、あるいは逆転写を行わないで、HIV-1 の gag 遺伝子 p24 領域を標的とする nested PCR を実施した。この nested PCR の詳しい条件については既に報告しており (Kato et al., AIDS 20(7):967-973)、逆転写を行った nested PCR からは HIV-1 の RNA と DNA が同時に、逆転写を行っていない nested PCR からは HIV-1 の DNA だけをほぼ 1 コピーの感度で検出することができることが確認されている。3) 中空糸膜ウイルス除去カラムによる、より効率的な精液中 HIV 除去方法の開発: 従来より実施している改良型 Percoll-swim up 法による精液中の HIV 除去法では精子数の減少が大きく人工授精の応用には困難な状況である。これに対し、HCV 感染患者の血液中のウイルスを除去するために VRAD 療法として応用されている中空糸膜を使用して HIV 感染男性患者の精液中から HIV を除去するための精液用中空糸膜型カラムの試作した。すなわち、中空糸膜を使用して、精液からウイルスを分離するための小型カラムを作成し、カラム容積、中空糸本数、膜面積などを変更して、至適な条件を設

定した。また、精子数 800 万/ml として、カラムによる洗浄による精子数の変化、運動数精子の変化を検討した。また、カラム洗浄を行った後の HIV-RNA の残存についても検討した。4) HIV 陽性男性、陰性女性夫婦に対する生殖補助医療の応用拡大のためのシステム構築に関する研究: これまでに実施した研究の成果をもとに、HIV 陽性男性、HIV 陰性女性夫婦がより安全に(妻が二次感染することを極力回避すること)妊娠できるようにするために臨床的検討を行ってきた。実施に先立ち、担当医師による説明、カウンセラーによる患者の意思確認を行い、インフォームドコンセントを得ることはもちろんであるが、体外受精-胚移植に際しては、精子浮遊液中に HIV ウィルスが検出されないことを確認するのみならず、胚移植直前に、受精卵培養液中に HIV ウィルスが検出されないことを確認することとした。胚移植実施後は、1 か月ごとに抗 HIV 抗体および HIV-RNA 検査を行い、これを 3 か月間実施し、二次感染のないことを確認した。

(倫理面への配慮)

HIV 陽性男性、陰性女性夫婦に対する体外受精・胚移植の実施については、実施施設の倫理委員会の許可を得て実施している。また、実施に先立ち、公開シンポジウムを実施し、社会の理解を得よう配慮した。実際の実施にあたっては、最初の説明を、荻窪病院で行い、次に新潟大学など実施産婦人科において同意を得るなど二重に行っている。

C. 研究結果

1) ヒト精子凍結保存の最適化に関する研究: HIV を除去した精子浮遊液の凍結保存に際し、等倍濃度の保護剤を予め添加したコロイドシリカゲル担体 (Percoll 等) を用いて洗浄濃縮を行う方法の開発を行った。本法は遠心分離 (約 30 分間) と平衡化が同時進行し、平衡化時間を長く取ることができる。遠心後の沈澱はすでに保護剤が浸透した状態であり、直ちに容器に収納して凍結を行うことができる。さらに保護剤添加による希釈を回避できる利点を有する。凍結保護剤処方を検討した結果、Hanks 等張化 80% Percoll-Plus 液に 50mM トレハロース、150mM DMSO、150mM エチレングリコールを添加した時、最も高い蘇生率が得られた。遠心分離は、400xg、30 分間行った。従来、汎用されてきたグリセリンは至適な保護物質ではなかつ

た。凍結は、すでに報告した 2 重腔凍結容器の容器に回収した沈澱精子 (約 100 μ l) を入れ、外容器に収納して直ちに液体チッソに投入した。本容器は断熱性が高く、液体チッソ蒸気内に容器を懸垂して緩速凍結を行うことなく、精子生存性が確保できた。2) HIV 感染者の精液中におけるウイルス RNA とプロウイルス DNA の検出: 健常人の血液と精液を Ficoll-Paque 密度勾配遠心にかけた後の結果を模式的に図 1 に示す。血液の場合、Ficoll-Paque 液の下に赤血球が沈み、上部に末梢血単核球が層を成し、Ficoll-Paque 液の上に血漿の層ができた。精液の場合、Ficoll-Paque 液の下に精子が沈み、上部に精液中の単核球が末梢血単核球と同じ場所に層を形成し、Ficoll-Paque 液の上に精漿の層ができた。この結果から、精液を Ficoll-Paque 密度勾配遠心にかけることにより、主にリンパ球からなる単核球中の HIV-1 感染細胞と、血漿中の遊離 HIV-1 をそれぞれ別な分画から精子 DNA を含まないで精製できることが分かった。精液検体提供者 6 人の臨床的指標を表 1 に示す。提供者 A、B、C は多剤併用療法を受けており、そのうち提供者 B の血中ウイルス量 (VL) は定量限界以下に抑えられていた。提供者 D、E、F は未治療患者で、比較的多量のウイルスが血中に存在していた。特に提供者 E の VL は 100 万コピー/mL を超えていた。各精液検体の Ficoll-Paque 分画における HIV-1 RNA と DNA の検出結果を表 2 に示す。精液提供者 A と E で分画 10 から 14 に、提供者 E ではすべての分画に HIV-1 の RNA あるいは DNA が検出された。これらすべての分画に HIV-1 DNA が検出されなかったことから、先の陽性反応は HIV-1 RNA の存在によるものと考えられる。一方、HIV-1 DNA が検出されたのは提供者 D の分画 6 のみであった。(図、表は加藤分担報告参照)。3) 中空糸膜ウイルス除去カラムによる、より効率的な精液中 HIV 除去方法の開発: 数種類のカラムを試作、研究し、B60 カラム (カラム容積 1.5 ml、中空糸本数 60 本、膜面積 89-97cm²) が最も効率的に HIV を除去することを観察した。これまでの研究で、精子数約 2000 万での研究を行い B60 カラムで 10 回洗浄後の精子回収率は 93.1%、運動率は 87.3%保たれていた。今回の研究において、精子数 800 万で検証したところ、2 回目、6 回目、8 回目、10 回目のカラム通過

後の精子回収率は(95%、95%、87.5%、92.5%)、直進運動率は(80%、84%、50%、84%)と精子数を少なくとも高い回収率と運動率を保たれていた。また、nested PCRにより、洗浄後の精液 sample 中の HIV-RNA を増幅し、電気泳動にて確認。HIV-RNA ウイルスの 10copy と 1copy を positive control、H₂O を negative control とし B60 カラムによる洗浄前、2 回目、4 回目、6 回目、10 回目のバンドを確認したところ、6 回目以降ではウイルスは検知されなかった。4) HIV 陽性男性、陰性女性夫婦に対する生殖補助医療の応用拡大のためのシステム構築に関する研究: 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。125 名に胚移植を実施し、93 名が妊娠し、69 名の児が出生している。(流産例、現在妊娠継続中の例もあり。)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 40 名に対し体外受精、胚移植を施行した。25 症例(60%)に妊娠を認め、18 症例が分娩に至り 23 人の生児が誕生した。2 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、対象症例数を増やしその安全性および有効性のさらなる確認に努めているが、エイズ治療拠点病院連絡会議において HIV 陽性男性、陰性女性夫婦に対する生殖補助医療のプロトコールおよび成果などを発表し、体外受精-胚移植の実施に関する協力を依頼しており、治療施設を増やすことの基盤整備を行っている。また、本研究班のホームページを作成し、一般に公開しており治療を希望する患者が治療に関する詳細な情報を入手しうるような環境を整備するとともに、本治療の成果を公表し情報公開に努めた。また、HIV 陽性男性、陰性女性夫婦に対する体外受精-胚移植の安全性の確認を目的として、本治療法後に出生した児の発育に関する調査を開始した。

D. 考察

HIV 感染は漸増しているが、新しい抗 HIV 薬の開発により治療可能な慢性感染症となりつつあり、HIV 陽性男性、HIV 陰性女性夫婦において子供を持ちたいと願う夫婦の数が年々増加している。このような夫婦に対しより安全に妊娠しうるような治療法の開発が重要であり、このための基礎的、臨床的研究を継続、発展させてきた。これまでの研究

により、妻が二次感染することなく妊娠に至り、生児を出産した症例を多数経験している。このことは、女性の二次感染者の減少と共に医療費の大幅な減少につながる。子供を安全に持てる方法の開発は HIV 感染者の QOL を向上させるだけでなく社会参加による心理的負担の解消と治療費の抑制、社会の労働力増加など多大な利益に繋がる。本治療の安全性を確認することは極めて重大な問題であり、今後も重点的に研究を進める必要があるものと判断している。また、体外受精・胚移植に比較してより簡便な人工授精の応用も重要な課題である。研究のひとつとして、人工授精実施のため、より効率的に精液から HIV ウイルスを除去するため、中空糸型のウイルス除去カラムを用いて、精液から HIV ウイルスを除去することが可能かどうかの検討を開始した。試作したカラムを用いて不活化 HIV を添加した精液を洗浄したところ、カラムを通すことで HIV が検出されなくなることを観察した。今後さらなる検討を進めることが必要と判断された。HIV 陽性男性、陰性女性夫婦に対する人工授精実施を考慮するための基礎的検討として、本年度は等倍濃度の保護剤を予め添加したコロイドシリカゲル担体 (Percoll 等) を用いて洗浄濃縮を行う方法の開発を行った。凍結保存精子を ART に使用するには、精子から凍結保護剤を除去して最終的に培養液に置換する必要がある。昨年度までの検討において、1. 既存の培養液、すなわち平衡塩類溶液に少量のアルブミンを添加した系では、保護剤の除去に伴い運動能低下とともに尾部細胞膜の浮腫が生じることを報告した。その防止にはコロイド浸透圧の付加が不可欠である。2. すでにコロイド添加輸液 (ヘスパンダー注、低分子デキストラン L 注) から作成した培養液が有用であることを報告した。3. 本年度の検討において、これらの糖由来の高分子よりもさらにタンパク質 (アルブミン等) の有効性が高いことを確認した。最終的に患者血清自体もしくは患者血清を 67% 以上含む培養液を使用することにより、上述した運動率の低下、尾部浮腫の出現を阻止できることが明らかとなった。HIV 陽性患者精液からウイルス除去、凍結保存、一部分を用いたウイルス陰性検査、ART への応用の過程において、凍結保存の効率の低さが臨床応用のボトルネックとなっていた。本研究により、効率的な精子凍結保存への展望が開かれた。HIV 陽性男性、陽性女性夫婦に対する生殖補助医療については、今後も議論を重ねていくことが重要と判断している。

E. 結論

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おり、HIV ウイルスの除去操作を行った

精子浮遊液を用いての体外受精・胚移植の臨床応用は確実に進んでいる。今後も、本療法の安全性、有効性をさらに確認することが重要と判断され、さらに、HIV陽性男性、陰性女性夫婦が安全に妊娠しうるための妊娠補助技術の中でも女性にとって負担の少ない人工授精の応用のための基礎的研究を推進することが重要と判断している。

F. 健康危険情報
該当なし

G. 研究発表

- 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.*, 62: 173-176, 2009.
- 2) Serikawa, T., Takahashi, Y., Ichikawa, K., Uemura, R., Kikuchi, A., Takakuwa, K., Sakakibara, S., Matsunaga, M., Tanaka, K. A case of neonatal alloimmune thrombocytopenia from human platelet antigen 5b incompatibility. *Reprod. Immunol. Biol.* 24: 18-20, 2009.
- 3) Yoshihara, K., Tajima, A., Komata, D., Yamamoto, T., Kodama, S., Fujiwara, H., Suzuki, M., Onishi, Y., Hatae, M., Sueyoshi, K, Fujiwara, H., Kudo, Y., Inoue, I., Tanaka, K. Gene expression profiling of advanced-stage serous ovarian cancers distinguishes novel subclasses and implicates ZEB2 in tumor progression and prognosis. *Cancer Sci.* 100: 1421-1428, 2009.
- 4) Sasahara, J., Kikuchi, A., Takakuwa, K., Sugita, N., Abiko, Y., Yoshie, H., Tanaka, K. Antibody response to Porphyromonas gingivalis outer membrane protein in the

first trimester. *Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaecol.*, 49: 137-141, 2009.

- 5) Yamaguchi, M., Kikuchi, A., Ohkusu, K., Akashi, M., Sasahara, J., Takakuwa, K., Tanaka, K. Abscess formation due to Mycoplasma hominis infection after cesarean section. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 35: 593-596, 2009.
- 6) Nonaka, T., Kikuchi, A., Kido, N., Takahashi, Y., Yamada, K., Usuda, T., Takakuwa, K., Tanaka, K. Prenatal diagnosis of unilateral pulmonary agenesis in a pregnant woman undergoing chronic hemodialysis due to chronic renal failure. *Prenat. Diagn.* 29: 1078-1080, 2009.
- 7) Yamada, K., Takakuwa, K., Tekeyama, S., Minagawa, S., Morikawa, H., Matsunaga, M., Tomita, M., Tanaka, K. A case of fulminant type 1 diabetes mellitus that acutely emerged during pregnancy. *J. Obstet. Gynaecol. Res.*, 2009, in press
- 8) Quan, J., Yahata, T., Tamura, N., Nagata, H., Tanaka, K. Relationship between single nucleotide polymorphisms in CYP1A1 and CYP1B1 genes and the bone mineral density and serum lipid profiles in postmenopausal Japanese women taking hormone therapy. *Menopause.* 16: 171-176, 2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし。
2. 実用新案登録
該当なし。

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
分担研究報告書

安全な生殖補助医療を行うための精液よりの HIV ウイルス分離法の確立

分担研究

HIV 陽性男性，陰性女性夫婦に対する生殖補助医療の応用拡大のためのシステム
構築に関する研究

研究代表者	田中憲一	新潟大学医歯学総合研究科（産婦人科）教授
分担研究者	高桑好一	新潟大学医歯学総合病院総合周産期母子医療 センター教授
研究協力者	加嶋克則	新潟大学医歯学総合病院産婦人科助教
	牧野麻由子	新潟大学医歯学総合病院感染管理部特任助教

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 Percoll 法-Swim up 法を応用し夫精液から HIV ウイルスを除去する方法を用い精子浮遊液を作成し，これを体外受精・胚移植に使用することにより，妻の二次感染をほぼ 0 とし，妊娠しうるような臨床応用を進めてきた。このような生殖補助医療の応用拡大のためのシステム構築、さらにその有用性および安全性を明らかにすることを目的としている。

HIV 陽性男性，陰性女性夫婦に対する体外受精・胚移植の実施については，新潟大学医歯学総合病院においては，これまでに 40 名に対し体外受精、胚移植を施行した。25 症例（60%）に妊娠を認め、18 症例が分娩に至り 23 人の生児が誕生した。2 症例は妊娠継続中である。このような結果を得ているが、一般不妊患者に対する体外受精-胚移植の成績に比較し成績が良好であることを確認した。また、本治療により出生した児に異常の認められないことを確認するためのアンケート調査のための準備を実施した。

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 therapy (HAART) が使用されるようになり，エイズによる死亡者は 80%以上減少し、エイズは死の病気ではなくなりつつある。今日、HIV 感染者はエイズを発症することなく HIV キャリアの状態経過することが多くなり，今後の人生設計を考え QOL の改善を求め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いることも事実である。

妊娠に伴う HIV 二次感染の危険性は HIV 感染者の状態（ウイルス量や精子数・運動率など）によって異なり、主治医が患者個々の危険度を判断して危険性を正確に話して相談する必要がある。

精液中の HIV RNA 量は血中 HIV RNA 量と相関し、HAART によって精液中の free HIV RNA は減少する。しかし、精液での 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。

このような状況の中で、われわれはHIV陽性である夫精液からHIVを除去し、この精子浮遊液を使用した体外受精-胚移植により、妻が二次感染することなく、妊娠しうるような生殖補助技術の開発および応用を実施し、成果を上げてきた。

本研究においては、症例を重ね、有効性、安全性について検討した。さらに、本療法の安全性を確認するためには、本療法後の妊娠により出生した児が順調に発育していることを確認することが重要と判断されるが、これに関する調査の準備を開始した。

B 研究方法および結果

これまでの本研究により、分担研究者の加藤らが開発した世界最高感度のPCR法(図1)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感染男性、非感染女性夫婦に対する体外受精-胚移植の臨床応用」にあたって、参加希望者が臨床応用に参加するまでの経緯(図2)

参加希望者は最初に、荻窪病院血液科(担当；花房秀次医師(本研究班分担研究者))を受診し、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受診することとしている。

新潟大学医歯学総合病院を受診した患者夫婦に対し、担当医師が詳細な説明書をもとに説明している。その内容は、臨床応用の実際、本治療に伴うリスク、万が一、二次感染が発生した場合の患者夫婦の負担、治療開始後中止することになっても問題ないことなど、である。そこで妻の検査(感染症検査、ホルモン検査、基礎体温の確認、他)を実施している。この後、新潟在住のカウンセラーにより、夫婦個別の意思確認を行う。これにより、患者夫婦の意思が強い場合には、再度新潟大学医歯学総合病院産婦人科を受診してもらい、夫婦個別に、説明書を用い、治療についての説明を行っている。最終的な意思の確認を行ったのち、夫婦別々に同意書に、夫婦および担当医師が署名、捺印を行う。同意書は同じものを2部作成し、1部は患者夫婦が、1部は新潟大学医歯学総合病院産婦人科が保管している。以上が、臨床応用に実際に参加するまでの経緯である。

(2)「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を実施される。

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3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血液中の HIV RNA 検査および HIV 抗体検査を実施し、二次感染の有無を判断する。

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

妊娠中の管理については、通常の妊婦健康審査が実施される。

以上が本臨床応用の実施にあたってのプロトコルであり、これに基づいて実施された。

本療法の安全性の確認のため、本療法後に出生した児に異常が認められないことを確認することは重要であり、これに関する調査に着手した。また、本療法の有効性を確認するため、一般不妊患者に対する体外受精-胚移植の成績と本療法による成績の比較を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は HIV 感染患者を対象とした研究であり、倫理的側面に関し、十分な配

慮を行っている。HIV 陽性男性、陰性女性夫婦に対する体外受精・胚移植を開始するに当たっては、市民公開シンポジウムの開催、実施施設における倫理委員会の承認、日本産科婦人科学会倫理委員会の承認を得て開始した。研究に当たり、常に患者のプライバシー保護、倫理的に問題のないことを確認しつつ研究を遂行することとしている。

C. 研究結果

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(慶應病院の症例も含め)は以下のとおりである。125 名に胚移植を実施し、93 名が妊娠し、69 名の児が出生している。(流産例、現在妊娠継続中の例もあり。)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 40 名に対し体外受精-胚移植を施行した。25 症例(60%)に妊娠を認め、18 症例が分娩に至り 23 人の生児が誕生した。2 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。本療法における妊娠率などが一般不妊女性患者のそれと比較してどうかを検討した(表 1)。その結果一般不妊患者に対する体外受精-胚移植の成績に比較し良好な成績であることが明らかとなった。

HIV 陽性男性、陰性女性夫婦に対する体外受精-胚移植の安全性の確認を目的として、本治療法後に出生した児の発育に関する調査のための準備を開始した。

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 の除去率を高めて、精子の回収率を 10%以上にすることに成功している。さらに精子表面に付着した HIV などの物質も殆ど除去できることを超高感度 PCR 法(検出限界は 1copy/ml)で確認し、臨床実施を行っている。

通常行われているように Percoll 法で遠心分離後に HIV の濃度が濃い上層から吸引して最下層の精子分画を回収すると

管壁を伝わって HIV が混入する可能性が高いので、分担研究者の兼子らが開発した特殊な試験管を用いて、上層成分の混入の危険性が全くない方法を導入し、応用している。また、Swim up 法実施に当たっては、培養液の下層に capillary tube を用いて慎重に精子浮遊液を挿入する技術を導入し、応用している。

人工授精ではなく、体外受精-胚移植を選択している理由については、これまでも報告しているとおりでである。受精卵あるいは胎児に CD4 が発現するのはリンパ組織が発達してくる受精後 10-20 週以後である。精子分画に僅かに HIV が混入していた場合、人工授精では妻に二次感染の危険性があるが、体外受精-胚移植では日毎に HIV の感染性が低下することに加えて 2 日目に培養液を交換するために危険性は極めて少なくなる。卵に CD4 や chemokine receptor が発現していないため体外受精では受精卵に感染の危険性はない。これまで、集積した成績により、本療法による妊娠成立および挙児の可能性はかなり高いものと判断されるが、一般不妊患者に対する体外受精-胚移植に比較し、その成績は遜色ないものかむしろ良好であることが強く推察された。

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。体外受精-胚移植の安全性は免疫学的にも疫学的にも明らかであるが、HIV 様粒子が卵細胞の中で発見されたとの報告もあり、より安全を期すためには精度の高い swim up 法を用いた精子による体外受精を施行する方がよいと考える。ただし、女性に対する身体的負担を考慮した場合、体外受精-胚移植に比較し、人工授精の応用も必要と考えられ、今後より安全な人工授精が可能となるような取り組みを行っていく必要があるものと判断している。

さらに本療法の安全性を確認するため、本療法後に出生した児に異常が認められないことを確認するための調査の実施を計画し始めた。これらの成績をふまえ、今後、本療法を普及せしめるためのシス

テム構築を行っていくことが重要であると判断され、そのようなことを計画している。

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、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、われわれが応用しているプロトコルを用いることにより、HIV に感染した男性の夫婦でもほぼ 100%安全に（妻が二次感染することなく）妊娠、出産を行うことが可能であると判断される。Swim up 法や Percoll 分離法には技術と熟練を要し、安全性の確保に努める必要がある。

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 -Comparison of the pregnancy rate in HIV-1 discordant couples and control couples-. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 62: 173-176, 2009.
- 2) Serikawa, T., Takahashi, Y., Ichikawa, K., Uemura, R., Kikuchi, A., Takakuwa, K., Sakakibara, S., Matsunaga, M., Tanaka, K. A case of neonatal alloimmune thrombocytopenia from human platelet antigen 5b incompatibility. *Reprod. Immunol. Biol.* 24: 18-20, 2009.
- 4) Sasahara, J., Kikuchi, A., Takakuwa, K., Sugita, N., Abiko, Y., Yoshie, H., Tanaka, K. Antibody response to

Porphyromonas gingivalis outer membrane protein in the first trimester. Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaecol., 49: 137-141, 2009.

5) Yamaguchi, M., Kikuchi, A., Ohkusu, K., Akashi, M., Sasahara, J., Takakuwa, K., Tanaka, K. Abscess formation due to Mycoplasma hominis infection after cesarean section. J. Obstet. Gynaecol. Res. 35: 593-596, 2009.

6) Nonaka, T., Kikuchi, A., Kido, N., Takahashi, Y., Yamada, K., Usuda, T., Takakuwa, K., Tanaka, K. Prenatal diagnosis of unilateral pulmonary agenesis in a pregnant woman undergoing chronic hemodialysis due to chronic renal failure. Prenat. Diagn. 29: 1078-1080, 2009.

7) Yamada, K., Takakuwa, K., Tekeyama, S., Minagawa, S., Morikawa, H., Matsunaga, M., Tomita, M., Tanaka, K. A case of fulminant type 1 diabetes mellitus that acutely emerged during pregnancy. J. Obstet. Gynaecol. Res., 2010, in press

8) Wada, Y., Sakamaki, Y., Kobayshi, D.,

Ajiro, J., Moro, H., Murakami, S., Ooki, I., Kikuchi, A., Takakuwa, K., Tanaka, K., Sato, T., Nakano, M., Narita, I. HELLP syndrome, multiple liver infarctions, and intrauterine fetal death in a patient with systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome. Intern. Med. 48:1555-1558, 2009.

9) 高桑好一：新型（豚）インフルエンザへの対応、5. インフルエンザ流行時における妊婦への対応、化学療法の領域、25: 2082-2086, 2009.

10) 高桑好一：周産期医療と Inflammatory response -歯周病-、周産期医学、35:745-749, 2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし。

図 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2 HIV 陽性男性、陰性女性夫婦に対する体外受精-胚移植実施までの対応

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



説明書に基づき，
臨床応用の実際
本治療に伴うリスク
万が一二次感染が発生した場合の夫婦の負担
治療開始後中止することになっても問題ないこと
などにつき詳細に説明



妻の検査(HIV他各種感染症，ホルモン検査，基礎体温の確認など)を実施



カウンセラーにより，夫婦個別の意思を確認



患者夫婦の治療に対する意思が強い場合，夫婦個別に，再度治療について詳細に説明
最終的な意思の確認を行い，夫婦別々の同意書に夫婦および担当医師が署名，捺印
臨床実施へ

図3 HIV 陽性男性、陰性女性夫婦に対する体外受精-胚移植の実施プロトコール

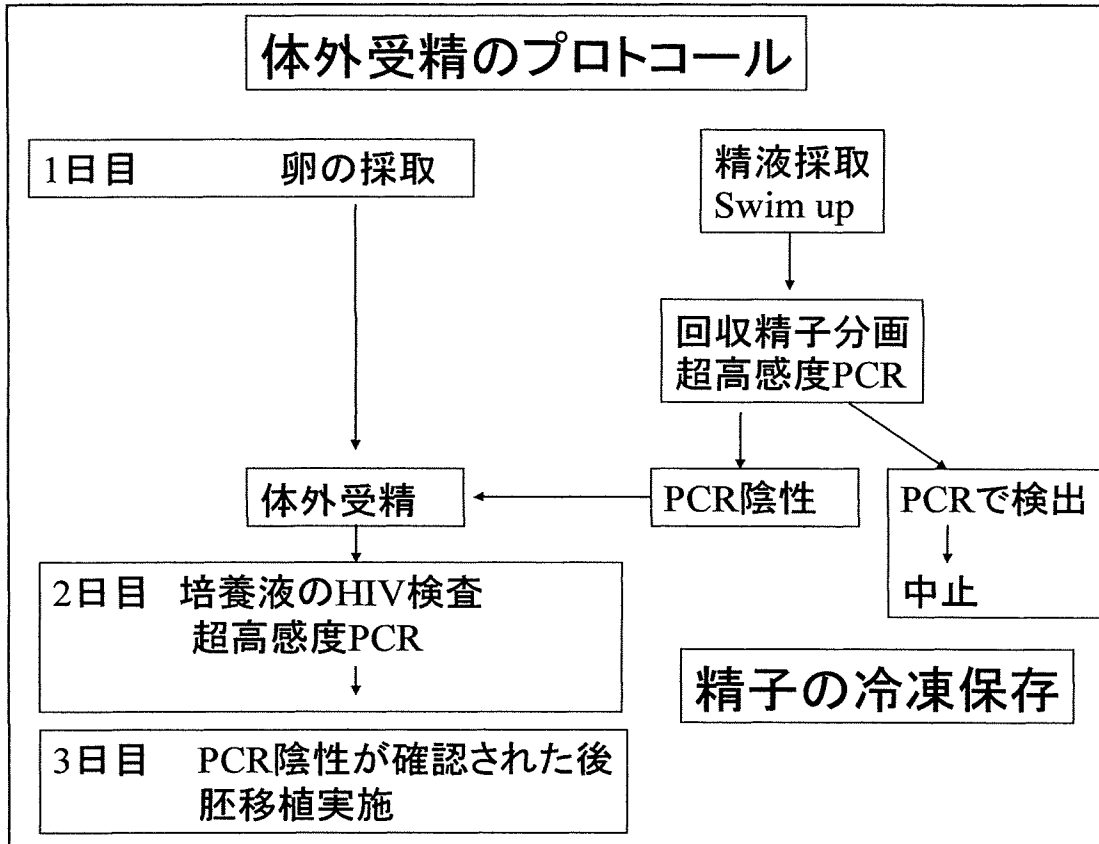


表1 HIV 陽性男性、陰性女性夫婦に対する体外受精-胚移植と、一般不妊患者に対する体外受精-胚移植の成績の比較

	IVF		ICSI	
	HIV	一般不妊	HIV	一般不妊
症例数	12	261	18	118
周期数	13	465	23	209
着床率	42.3%	16.0%	28.9%	15.6%
妊娠率 (対ET)	72.7%	30.3%	54.5%	31.8%
妊娠率 (对患者)	66.7%	42.1%	55.6%	43.2%

厚生労働省科学研究補助金（エイズ対策研究事業）
分担研究報告書

HIV 感染者の精液中におけるウイルス RNA とプロウイルス DNA の検出

研究代表者 田中憲一 新潟大学教育院医歯学系（産婦人科）教授
研究分担者 加藤真吾 慶應義塾大学医学部 専任講師

研究要旨

HIV 感染者の精液中におけるウイルス量や、それが抗 HIV 治療によってどのように変化するかは、HIV 感染の拡大を予防する上で非常に重要な情報となる。従来の精液中 HIV 量に関する研究は、市販検査キットを流用していたため正確性に乏しく、また感染細胞にあまり注目してこなかった。そこで本研究では、感染者の精液を Ficoll-Paque 密度勾配遠心にかけて精子、精漿、及び精液単核球を分画に分け、各分画中の HIV-1 RNA と DNA の検出を nested PCR により試みた。その結果、被験者 6 人のうち、血中ウイルス量の高い 3 人から精漿中に HIV-1 RNA が検出され、その中の 1 人では単核球成分から HIV-1 プロウイルス DNA が検出された。今後、精液の感染性を左右する因子を明らかにするため、これらウイルス核酸の定量化を図ることが必要であると考えられる。

A. 研究目的

我が国における HIV 感染経路は性的接触がほとんどを占めているが、特に、男性同性間の性的接触による感染例が近年増加している。感染男性からの性的接触による HIV 感染は、精液中の遊離 HIV 及び HIV 感染細胞を介して起こる。したがって、HIV 感染者の精液中におけるウイルス量や、それが抗 HIV 治療によってどのように変化するかは、HIV 感染の拡大を予防する上で非常に重要な情報となる。

精液中 HIV 量に関する今までの研究は、血漿中の HIV-1 RNA を定量するための市販検査キットを精液検体に対して用いることにより行われてきた。しかし、この方法では遊離ウイルスの RNA しか定量することができないため、遊離ウイルスよりも感染性が高いと考えられている HIV 感染細胞を見逃してしまうことになる。また、精液中には PCR 等の酵素反応に対する強い阻害物質や大量の精子 DNA が存在するため、市販の検査キットで HIV ゲノムを正しく定量することは非常に困難である。

本研究では、このような問題を解決する

ため、感染者の精液を Ficoll-Paque 密度勾配遠心にかけて精子、精漿、及び精液単核球を分画に分け、各分画中の HIV-1 RNA と DNA の検出を nested PCR により試みた。

B. 研究方法

慶應義塾大学病院における「HIV 除去精子を用いた体外受精に関する臨床研究」に参加した HIV 感染不一致夫婦の男性から採取した精液のうち、精子洗浄に用いなかった一部（約 0.2 mL）をその日のうちに -80°C で凍結保存したものを、使用直前に室温で解凍して研究に用いた。今回の研究には 6 件の保存精液検体を用いた。

精液中のウイルスゲノムの検出は次のようにして行った。まず精液検体に 1.8 mL の 2% FCS 含有 PBS を加え、5 mL の Ficoll-Paque 液に重層し、390×g、室温で 40 分間遠心した。遠心後、遠沈管の底に穴を開け、内液を底部から 0.5 mL ずつほぼ 14 本に分画した。次に、各分画から核酸（DNA と RNA）を QIAamp MinElute Virus Spin Kit（QIAGEN 社）を用いて精製し、60 µL の溶出液を得た。この溶出液 10µL ずつを用い、

逆転写を行ってから、あるいは逆転写を行わないで、HIV-1 の gag 遺伝子 p24 領域を標的とする nested PCR を実施した。この nested PCR の詳しい条件については既に報告しており (Kato et al., AIDS 20(7):967-973)、逆転写を行った nested PCR からは HIV-1 の RNA と DNA が同時に、逆転写を行っていない nested PCR からは HIV-1 の DNA だけをほぼ 1 コピーの感度で検出することができることが確認されている。

(倫理面への配慮)

本研究の実施にあたり「臨床研究に関する倫理指針」(厚生労働省告示第 459 号) で定めた倫理規定等を遵守した。また、精液検体の HIV-1 ゲノム検査の実施は慶應義塾大学医学部倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

健常人の血液と精液を Ficoll-Paque 密度勾配遠心にかけた後の結果を模式的に図 1 に示す。血液の場合、Ficoll-Paque 液の下に赤血球が沈み、上部に末梢血単核球が層を成し、Ficoll-Paque 液の上に血漿の層ができた。精液の場合、Ficoll-Paque 液の下に精子が沈み、上部に精液中の単核球が末梢血単核球と同じ場所に層を形成し、Ficoll-Paque 液の上に精漿の層ができた。この結果から、精液を Ficoll-Paque 密度勾配遠心にかけることにより、主にリンパ球からなる単核球中の HIV-1 感染細胞と、血漿中の遊離 HIV-1 をそれぞれ別な分画から精子 DNA を含まないで精製できることが分かった。

精液検体提供者 6 人の臨床的指標を表 1 に示す。提供者 A、B、C は多剤併用療法を受けており、そのうち提供者 B の血中ウイルス量 (VL) は定量限界以下に抑えられていた。提供者 D、E、F は未治療患者で、比較的多量のウイルスが血中に存在していた。特に提供者 E の VL は 100 万コピー/mL を超えていた。

各精液検体の Ficoll-Paque 分画における HIV-1 RNA と DNA の検出結果を表 2 に示す。精液提供者 A と E で分画 10 から 14 に、提供者 E ではすべての分画に HIV-1 の RNA あるいは DNA が検出された。これらすべての分画に HIV-1 DNA が検出されなかったこと

から、先の陽性反応は HIV-1 RNA の存在によるものと考えられる。一方、HIV-1 DNA が検出されたのは提供者 D の分画 6 のみであった。

D. 考察

抗 HIV 治療を受けている患者 3 人と未治療患者 3 人の計 6 人の精液検体を Ficoll-Paque 密度勾配遠心にかけ、各分画中の HIV-1 RNA と DNA の検出を試みた。その結果、治療患者 1 人と未治療患者 2 人から HIV-1 RNA が検出された。HIV-1 RNA が検出された感染者の血中ウイルス量が 7,000 コピー/mL 以上で、検出されなかった感染者の血中ウイルス量がそれ以下であったことは、血中ウイルス量と精液中ウイルス量が強く相関していることを示唆している。

HIV-1 RNA が見つかった感染者 3 人のうち 2 人では、HIV-1 RNA が検出された分画は精漿からなる分画と一致していた。すなわち、これらの分画の陽性反応は精漿中の遊離ウイルスによるものであると考えられる。他の 1 人では Ficoll-Paque 密度勾配を含むすべての分画から HIV-1 RNA が検出された。これらの分画で HIV-1 DNA が見つからなかったことから、精漿中の遊離ウイルスが白血球や精子の表面に吸着し、これらの細胞と一緒に Ficoll-Paque 密度勾配の中に沈降したのではないかと考えられる。実際、この感染者の精液を用いて swim-up による精子のウイルス除去操作を行ったところ、4 回の試行のうち 3 回で洗浄精子から HIV-1 ゲノムが検出された。この結果は先の推察とよく一致している。

HIV-1 DNA が 1 人の既治療患者の精液の単核球分画から検出された。HIV-1 の RNA あるいは DNA が検出できる逆転写 nested PCR で陽性反応が出なかったのは、HIV-1 DNA が非常に少なかったために、逆転写を行わない nested PCR 反応だけに検査対象 DNA が含まれたと考えられる。未治療患者 3 人を含む他の 5 人から HIV-1 DNA が検出されなかったことは、感染細胞の数が遊離ウイルスに比べて著しく少ないことを示唆している。ただし、今回の研究では射精された精液の一部 (約 0.2 mL) しか核酸精製のために使っておらず、また核酸溶出液の 1/6 だけを nested PCR にかけている。より

大量の精液由来 DNA を調べれば HIV-1 プロウイルスがもっと高頻度に見つかる可能性は高いと思われる。

今回の研究では、精液中の HIV-1 RNA あるいは DNA の検出を試みたが、精液の感染性を評価するためにはこれらを定量することが重要である。今後、リアルタイム PCR あるいはポアソン分析を伴う nested PCR を利用してこの課題に取り組む予定である。

E. 結論

Ficoll-Paque 密度勾配遠心と nested PCR を用いて、HIV 感染者 6 人の精液中の HIV-1 RNA と DNA を調べた。その結果、血中ウイルス量の高い 3 人から精漿中に HIV-1 RNA が検出され、そのうちの 1 人の単核球成分から HIV-1 プロウイルス DNA が検出された。精液の感染性を評価するためには、これらウイルス核酸の定量化を進めることが重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Kondo, M., Sudo, K., Tanaka, R., Sano, T., Sagara, H., Iwamuro, S., Takebe Y., Imai, M., and Kato, S. (2009) Quantification of HIV-1 group M proviral DNA using TaqMan MGB real-time PCR. *J. Virol. Methods* 157(2):141-146.
- (2) Suzuki, T., Yamamoto, N., Nonaka, M., Hashimoto, Y., Matsuda, G., Takashima, S., Matsuyama, M., Igarashi, T., Miura, T., Tanaka, R., Kato, S., and Aida, Y. (2009) Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) nuclear import via Vpr-Importin α interaction as a novel HIV-1 therapy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 380(4):838-843.
- (3) Shima-Sano, T., Yamada, R., Sekita, K., Hankins, R. W., Horr, H., Seto, H., Sudo, K., Kondo, M., Kawahara, K., Tsukahara, Y., Inaba, N., Kato, S., Imai, M. (2010) A human immunodeficiency virus screening algorithm to address the high rate

of false-positive results in pregnant women in Japan. *PLoS One* 5(2):e9382.

- (4) 加藤真吾. (2009) HIV 検査法の現状と課題. *病原微生物検出情報* 30(9), 236-237.
 - (5) 今井光信, 加藤真吾. (2010) HIV 検査—最近のスクリーニング検査と遺伝子検査の進歩—. *日本臨床* 68(3):433-438.
 - (6) 加藤真吾, 今井光信. (2010) HIV 検査と検査相談体制. *最新医学・別冊 新しい診断と治療の ABC* 65, 180-187.
- ### 2. 学会発表
- (1) Shingo Kato. Quantification of HIV-1 RNA in clinical serum samples by the Poisson distribution-based method. The 4th Japan-Germany HIV/AIDS Symposium. 2009, March 23-24, Bochum, Germany.
 - (2) 加藤真吾「シンポジウム：わが国における HIV 検査戦略、我が国における HIV 検査の現状と課題」第 23 回日本エイズ学会学術集会 (2009 年 11 月 26-28 日、名古屋)
 - (3) 植田知幸、加藤真吾「休止期 P BMC における HIV-1 感染防御機構の解析」第 23 回日本エイズ学会学術集会 (2009 年 11 月 26-28 日、名古屋)
 - (4) 服部純子、瀧永博之、吉田繁、千葉仁志、小池隆夫、佐々木悟、伊藤俊広、内田和江、原 孝、佐藤武幸、上田敦久、石ヶ坪良明、近藤真規子、今井光信、長島真美、貞升健志、古賀一朗、太田康男、山元泰之、福武勝幸、田中理恵、加藤真吾、宮崎菜穂子、藤井毅、岩本愛吉、西澤雅子、仲宗根正、巽 正志、椎野禎一朗、林田備総、岡慎一、伊部史朗、藤崎誠一郎、金田次弘、横幕能行、濱口元洋、上田幹夫、大家正義、田邊嘉也、渡辺香奈子、渡邊 大、矢倉裕輝、白阪琢磨、栗原健、小島洋子、森 治代、中桐逸博、高田 昇、木村昭郎、南 留美、山本政弘、松下修三、藤田次郎、健山正男、堀 成美、杉浦 互「2003-2008 年の新規 HIV/AIDS 診断症例における薬剤耐性頻度の動向」第 23 回日本エイズ学会学術集会 (2009 年 11 月 26-28 日、名

古屋)

- (5) 須藤弘二、杉浦 互、加藤真吾「PCR-MS法を用いた新規感染者血漿中の薬剤耐性微小集団の定量」第23回日本エイズ学会学術集会(2009年11月26-28日、名古屋)
- (6) 伊部史朗、横幕能行、椎野禎一郎、田中理恵、服部純子、藤崎誠一郎、岩谷靖男、間宮均人、内海 眞、加藤真吾、濱口元洋、杉浦 互「日本におけるHIV-2感染症の分子疫学的解析」第23回日本エイズ学会学術集会(2009年11月26-28日、名古屋)
- (7) 井戸田一朗、加藤朋子、畑 寿太郎、島川眞知子、佐野貴子、近藤真規子、須藤弘二、加藤真吾、今井光信「急速な進行と多彩な合併症を伴い、初期治療に早期に失敗した急性HIV感染症の一例」第23回日本エイズ学会学術集会(2009年11月26-28日、名古屋)
- (8) 川畑拓也、森 治代、小島洋子、秋吉京子、近藤真規子、中澤よう子、宇宿秀三、貞升健志、長島真美、矢永由里子、今井光信、加藤真吾「HIV検査相談体制における新型インフルエンザウイルス流行の影響」第23回日本エイズ学会学術集会(2009年11月26-28日、名古屋)
- (9) 村山正晃、池野 良、児玉泰光、川口玲、田邊嘉也、加藤真吾、高木律男
- 「唾液中HIV-1濃度が血液中よりも高かった3症例」第23回日本エイズ学会学術集会(2009年11月26-28日、名古屋)
- (10) 近藤真規子、須藤弘二、佐野貴子、倉井華子、立川夏夫、相良裕子、岩室紳也、加藤真吾、今井光信「コバスTaqMan HIV-1でのRNA定量値がアンプリコアHIV-1モニターに比べ100倍以上低値であった症例の解析」第23回日本エイズ学会学術集会(2009年11月26-28日、名古屋)
- (11) 田中理恵、加藤真吾「ポアソン分布を用いた血中のHIV-1 RNA量の定量」第23回日本エイズ学会学術集会(2009年11月26-28日、名古屋)
- (12) 佐野貴子、西大條文一、井戸田一朗、須藤弘二、加藤真吾、近藤真規子、今井光信「抗HIV抗体量により感染時期を推測するための検査法の検討」第23回日本エイズ学会学術集会(2009年11月26-28日、名古屋)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案特許
なし
3. その他
なし

図1. 血液と精液のFicoll-Paque密度勾配遠心の結果

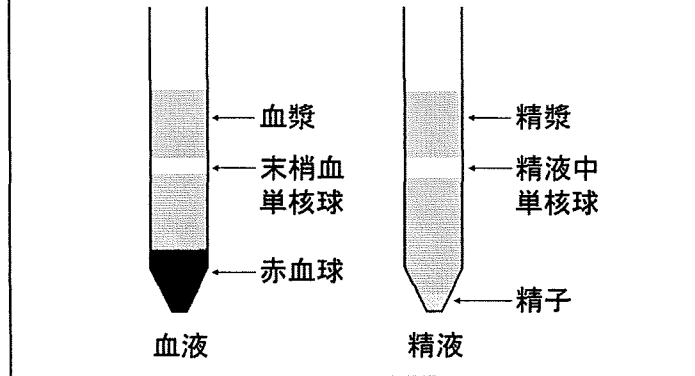


表1. 被験者の臨床的指標

精液提供者	CD4 (per μ L)	VL (copies/mL)	抗HIV治療
A	211	7,000	LPV/r+ABC/3TC
B	535~423	160~1,300	LPV/r+TFV+3TC
C	400~500	<40	LPV/r+AZT+ABC
D	824	12,000	None
E	~500	>1,000,000	None
F	789~1100	1,000~6,600	None

表2. 精液のFicoll-Paque分画におけるHIV-1 RNAとDNAの検出結果

精液提供者	核酸の別	分画													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
A	RNA+DNA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	DNA	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
B	RNA+DNA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	DNA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	RNA+DNA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	DNA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	RNA+DNA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	DNA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E	RNA+DNA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	DNA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	RNA+DNA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	DNA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-