

ヒト精子凍結保存の最適化に関する研究—超急速凍結保存法 (vitrification) による凍結保存の試み

東京歯科大学市川総合病院産婦人科 兼子智

要旨

本年度はヒト精子凍結保存に関して超急速凍結法の確立を試みた。本法は緩速法に比して融解時の蘇生率は高かったが、最終的な保護剤除去の過程で運動性保持が困難であり、総合的には緩速法が有用であると考えられた。

A. 目的

本研究は夫 HIV 陽性、妻陰性夫婦間において夫精液中の浮遊ウイルスおよび感染リンパ球を除去し、調製した運動精子を用いた生殖補助医療 (ART) により挙児を図ることを目的としている。in vitro における分離精子の生存、妊孕能保持時間は数時間である。分画した精子懸濁液中の HIV 陰性確認 (高感度 HIV 検出) には時間を要し、しかも検査に精子半量を使用するため、媒精に供する精子の量は少量となってしまう。これまで新鮮精子を用いて受精を行い、その後検査結果に従い、受精胚の破棄または培養続行を決定する方法が採られてきた。精子凍結保存は射精と排卵の時間的同調を不要とする。具体的には、分画した精子懸濁液を凍結保存し、HIV 陰性が確認された後に排卵誘発、採卵を行うことにより胚の破棄を強いられることを防止できる。また排卵は月に一回であるが、採精は週に一回程度可能であり、乏精子症例など精液所見不良例にお

いてより多数の精子を受精に供することが可能となる。しかし、現実には精子保存における融解後精子蘇生率 (融解後における運動精子回収率) の低さが ART 臨床応用へのボトルネックとなっている。

精液中の HIV を除去する過程において精漿の完全除去が求められる。そのため、精子は精漿中から人工培養液に置換されるが、われわれはこの過程における体液タンパク質除去に伴うコロイド浸透圧の低下が精子蘇生率の低下の主因であることを明らかにした。

凍結保存精子の妊孕性向上には、凍結保護剤および凍結速度の組み合わせ、融解後の保護剤除去を最適化することが不可欠である。前年度は保護剤除去、特にコロイド浸透圧の影響を検討した。本年度は近年胚の凍結保存に汎用される超急速凍結保存法 (vitrification) による凍結保存を試みた。

本法は緩速凍結法に比して高濃度の保護剤に短時間暴露し、細胞を液体

チッソに直接浸漬することにより数千から数万度/分の超高速で凍結を行う。これにより細胞内に形成される氷晶を微細化するもしくは非晶質（アモルファス）化できる利点がある。一方、高濃度の保護剤を使用することによる細胞毒性が問題となる。

B. 方法

精子の分画には、1. クッション法による精子濃縮、2. Optidenz 沈降平衡、3. Percoll 沈降速度差遠心分離法を用いた。前年報告した緩速凍結法で用いた保護物質 150mM DMSO、150mM エチレングリコールの濃度を各々 10 倍（1500mM）に増量した保存液を作成した。精子、保存液を等量混和し、熱伝導性が良好な PCR チューブを用いて液体チッソに直接浸漬する方法を検討した。対照として前年報告した緩速凍結法を用いた。37°Cの温湯中で融解し、最終的に融解剤を添加した培養液で希釈し、精子内の凍結保護剤を除去した。

倫理面への配慮

東京歯科大学市川総合病院リプロダクションセンターを受診し、精液検査を施行した検体のうち、研究使用へのインフォームドコンセントが得られた精液を使用した。

C. 結果

前年度に確立した観測凍結用凍結保護剤処方（50mM トレハロース、150mM DMSO、150mM エチレングリコール）を改変し、DMSO、エチレングリコール濃度を 10 倍にした保護剤を作成した。濃縮された洗浄精子と保護剤 各 10 μ l を混合し、熱伝導性が良好な PCR チューブ（内腔容量 100 μ l）に入れて 30 秒間室温平衡化した後、液体チッソに投入した。融解は 37°Cの温湯中で振盪した。対照として、前年度に報告した緩速凍結法を施行した。

射精精液から調製した洗浄精子（n=5）の運動率は $76 \pm 8.5\%$ であった。緩速、超急速法による凍結保存、融解後運動率は $51 \pm 9.2\%$ 、 $62 \pm 7.7\%$ と、超急速法が有効であった。緩速凍結を行い、融解した精子懸濁液を低コロイド浸透圧培養液で希釈すると運動率は大幅に低下し、不働化した精子に多様な尾部異常、とくに先端に特有な浮腫を認めた。0.2M トレハロースを添加した 67%血清を用いて希釈した場合には尾部浮腫をほとんど認めず、 $44 \pm 6.7\%$ の精子が前進運動性を保持していた。一方、高濃度の保護物質を使用する超急速凍結法は、前年問題となった保護物質除去に伴う浸透圧変化の幅がより大きく、緩速凍結では有用であったタンパク質、多糖類を添加による浸透圧保護も無効であり、最終的に運動精子を得ることができなかった。以上の結果から、総合的には前年確立した緩速凍結法の有用性が高いことが示された。結果を表 1 にまとめた。

表1 凍結、融解、保護剤除去過程

| 運動率(%) | 緩速凍結法 | 超急速凍結法 |
|---------|--------|--------|
| 洗浄精子 | 76±8.5 | 76±8.5 |
| 融解後精子 | 51±9.2 | 62±7.7 |
| 凍結保護剤除去 | 44±6.7 | 0 |

D. 考察

一般に精子凍結保存に関する研究は、融解直後の運動率（蘇生率）を指標として検討することが多い。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。前年度の検討において、ART臨床における胚培養に汎用される平衡塩類溶液に少量のアルブミンを添加した既存の培養液では、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、これが妊孕性低下の主因であることを示した。その防止にはコロイド浸透圧の付加が不可欠であると考え、培養液へのヒドロキシエチルデンプン、ポリエチレングリコール、細胞膜非透過糖類、タンパク質（アルブミン、血清、卵胞液）を添加し、融解精子をこれらで希釈した場合の尾部浮腫発現を観察した。検討した全てのコロイド物質において、浮腫抑制効果を確認した。糖由来の高分子よりもさらにタンパク質の有効性が高いことを確認した。血清もしくは卵胞液自体を培養液として使用することに

より、上述した運動率の低下、尾部浮腫の出現を阻止できた。

近年、ヒト胚凍結保存にはvitrificationによる超急速凍結法が汎用されており、高い蘇生率、さらには融解胚により高い妊娠率が報告されている。胚の融解直後、1.0M程度のsucroseを含む培養液に胚を浸漬して細胞浮腫を防止するとともに数段階(0.75、0.50、0.25M)のsucrose溶液ドロップ内を順次移して胚から徐々に保護剤を除去していく。すなわち、細胞内の高張を徐々に下げていく方法が有用であることが示されている。一方、精子においては胚のようにキャピラールを用いて1胚ずつ操作することが不可能であり、希釈によらなくてはならない。また精子は胚に比してsucroseに対する耐性が低く、1.0M sucrose中では不可逆的に運動性を失う。結果に示したようにタンパク質によるコロイド浸透圧保護を図ったが、保護剤濃度が高く、運動性保持は実現できなかった。

以上の結果から、総合的には前年度に確立した緩速凍結法の方が有用であると考えられた。

E. 結論

超急速凍結法は緩速法に比して融解時の蘇生率は高かったが、最終的な保護剤除去の過程で運動性保持が困難であり、総合的には緩速法が有用であると考えられた。

厚生労働省科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
分担研究報告書

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
研究分担者：八幡哲郎、宇都宮徳馬

研究要旨：新たに開発した中空糸膜ウイルス除去カラムを使用して、精液中の HIV をより簡便かつ効率的に除去を行う方法を開発する。本方法による HIV 除去は、従来の swim up 法による HIV 除去の問題点であった精子数の減少を最小限に抑えて運動精子回収率を高めることにより、身体的・経済的な負担の少ない人工授精への応用への可能性も高まる。

A. 研究目的

平成 21 年度の研究によりカラム容積、中空糸本数、膜面積などを変更し数種類の試作カラムの作成に成功し、洗浄後の精子回収率および HIV 除去効率に関し、至適カラムの作成に成功した。平成 22 年度は、引き続き中空糸膜が精子生存率および運動率与える影響に関する検討を実施するとともに、至適カラムを使用して、HIV 感染男性から得られた精液を使用し、HIV 除去に関する有効性の確認を行うことを目的とした。

B. 研究方法

平成 21 年度に作成したカラムのうち、洗浄後の精子回収率および HIV 除去高率が最も良好であった B60 カラム（カラム容量 10ml、中空糸 60 本、中空糸表面積 89-97m²）を使用し、健常男性精液に HIV RNA を混じた感染モデル精液の精子回収率および HIV 除去効率について引き続き検討を行った。また、未治療の HIV 感染男性から得られた精液を使用し、同様に HIV 除去効率を検討した。HIV 感染男性からの精液の提供については、新潟大学伊医学部遺伝子倫理審査委員会での承認を得て、提供男性への説明と同意得て研究を行った。

C. 研究結果

B60 カラムを使用した精子回収率および HIV 除去効率に対する追加検討では、精子回収率は、10 回のカラム洗浄までほぼ 100%の回収が得られ、以降は回収率が

低下し 20 回洗浄ではおよそ 10%まで低下した。Nested PCR による HIV-RNA の除去効率に関する検討では、3 回の洗浄までは HIV-RNA が認められていたが、6 回以上の洗浄では HIV-RNA は認められなかった。8 名の未治療の HIV 感染男性の精液を用いた HIV 除去効率に対する検討でも、感染モデル精液を使用した場合と同様に 6 回以上の洗浄では HIV RNA は認められなかった。

D. 考察

現在、HIV 感染男性/非感染女性に対する夫婦間および母子間の HIV 感染を防ぐための妊娠に対して、改良型 Percoll-swim up 法による精液中の HIV 除去法による医学的介入を行っている。これまでの研究において、本方法により確実に HIV は除去されるものの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った。新たに開発した中空糸膜カラムにより、精子回収率を高めつつ、より簡便・効率的に精液から HIV を分離することが可能であった。B60 カラムによる 6-10 回の洗浄が至適条件であった。

E. 結論

新たに開発した中空糸カラムにより、精子回収率を高めつつ、より簡便・効率的に精液から HIV を分離することが可能となり、人工授精への応用が期待できある。

G. 研究発表

学会発表

第 28 回日本産婦人科感染症研究会 (2010/6/5)

新たに開発した中空糸膜カラムによる精液中の HIV 除去に関する研究

南川高廣、全錦華、加嶋克則、八幡哲郎、高桑好一、田中憲一、加藤真吾

第 23 回日本性感染症学術大会 (2010/12/11-12)

新たに開発した中空糸膜カラムによる精液中の HIV 除去に関する研究

南川高廣、全錦華、加嶋克則、八幡哲郎、高桑好一、田中憲一、加藤真吾

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策事業）
分担研究報告書

分担研究者 宇都宮 龍馬

旭化成クラレメディカル株式会社 アフェレシス事業部 学術部

研究要旨

精液中からのエイズウイルス分離研究に用いる中空糸血漿分離膜の提供を行った。

A. 研究目的

精液からの HIV 除去を簡便に実施でき、受精の確率を高めることが予想される HIV 除去法の確立

B. 研究方法

旭化成クラレメディカルが提供する中空糸血漿分離膜に精液懸濁液を通過させることにより HIV のみが除去される。この操作を繰り返すことにより受精可能な精液が精製される。

C. 研究結果

本年度は本研究に用いられた中空糸血漿分離膜 10 本の提供を行った。

D. 考察

HIV が混入している可能性のある、精液中白血球の除去法として、本処置の前に、白血球除去能力のある不織布に浸す対応が考えられた。

E. 結論

中空糸血漿分離膜 10 本の提供を行った。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

以上

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

HIV 除去精子を用いた不妊治療の臨床応用

研究分担者 久慈 直昭 慶應義塾大学医学部産婦人科

研究要旨

パーコール連続密度勾配による精液洗浄と swimup を組み合わせた HIV-1 感染精液洗浄法は、男性因子合併例においても HIV-1 陰性と判断される運動精子を高い確率で回収可能であった。また当大学の加藤らが開発した env あるいは gag 領域を標的とする nested-PCR 法 PCR 解析系は、回収精子からのウイルスを高感度・高特異度で検出可能である一方、受精卵培養液の HIV-1 遺伝子検出系としては改良の余地があることが示された。

また本年度の臨床成績の検討からは、胚盤胞培養の普及により妊孕性の高い胚の選別が可能になってきていること、および凍結保存技術の応用によって総合的な臨床的治療効率が改善していることが示唆された。

A. 研究目的

精液中ヒト後天性免疫不全ウイルス（以下 HIV-1）は洗浄操作によって希釈・除去できることが知られている。

しかし約 5%の検体では洗浄後ウイルスが残存するといわれており、また洗浄後の精子回収率が低いために、男性不妊合併症例では精子の回収が不能となる例が出現する。さらに PCR を用いた HIV-1 検出系は極めて高感度ではあるが、高感度ゆえに contamination による疑陽性の risk が常に存在し、臨床的治療効率の体面をもたらす恐れがある。そこで今年度我々は、精子回収率、洗浄後精液と受

精卵培養液の PCR 検査結果、妊娠転帰の三点から本法の臨床的有用性を検討した。これに平成 22 年度の精液洗浄・および顕微授精・凍結胚移植による治療結果を加えて報告する。

B. 研究方法

1) 対象

洗浄精液を用いた生殖補助医療を希望して慶應義塾大学病院産婦人科を受診した夫 HIV-1 陽性、妻 HIV-1 陰性の夫婦。

2) 精液洗浄法および HIV-1 遺伝子検査法

精液は原則として洗浄・swim up によりウイルス除去、得られた精子浮遊液を 2

分し、一方を env あるいは gag 領域を標的とする nested-PCR 法により HIV-1 遺伝子の有無を確認、遺伝子が陰性であった検体の残り一方を不妊治療のため凍結保存した。ART 治療は原則として long 法による排卵誘発を行い、全例顕微授精を行った。さらに移植前に受精卵培養液について、HIV-1 遺伝子の有無を確認した。本法による感染の確認は、非妊娠例および流産例では移植後 3 ヶ月後の妻の抗体検査、分娩例では分娩時の母体血・臍帯血または分娩後 6 ヶ月の母体血・乳児血中 HIV-1 遺伝子の有無にて評価した。

C. 研究結果

1) 精液洗浄の精子回収効率、および洗浄効率に関する検討

2002 年 1 月から 2010 年 12 月までに 167 症例の HIV-1 感染男性に対し精液洗浄を行い、洗浄前の平均精子濃度・平均精子運動率は各々 $2000 \pm 600 \times 10^6/\text{ml}$ 、 $55 \pm 15\%$ 、163 症例 (97.6%) で運動精子を回収でき、HIV-1 陽性と判断された 4 検体 (3%) のうち 3 検体で PCR 産物塩基配列は夫血液中ウイルス塩基配列と一致した。233 周期の IVF-ICSI 治療を施行し、8 周期 (3%) では受精卵培養液中に HIV-1 ウイルスの存在が疑われ、うち 5 周期で PCR 産物の塩基配列確認を行ったところ、1 例で夫血液のウイルス塩基配列と一致した。これまで出生児 50 例をえることができ、現在まで妻への水平感染、出生児への垂直感染は確認されていない。

2) 平成 22 年度の臨床成績

精液洗浄に関しては、平成 22 年 4 月より平成 23 年 3 月までに 14 症例 (新規患者 10 例、再洗浄希望患者 4 例) を洗浄し、全症例で運動精子を回収、13 症例では症例あたり 10 本の tube に分注して凍結保存が可能であった (表 1)。残る一症例では、精液濃度 $1500 \text{ 万}/\text{ml}$ 、運動率 60% であったが $10 \text{ 万}/\text{ml}$ 以下 (平均 $8.5 \text{ 万}/\text{ml}$) しか swimup 精子が回収できなかったため、2 本に分注・凍結保存した。

採卵・新鮮胚移植については、平成 22 年 4 月より平成 23 年 3 月までの期間では症例あたりの平均年齢は 36.2 歳 (24-43 歳)、症例あたりの既往採卵回数は 2.0 (0-14) 回であった (表 2)。採卵あたりの平均採卵数は 4.7 個、成熟卵 (採卵時 MII であった卵) 数は 3.98 個、受精卵数 (採卵後 24 時間で 2 前核を確認したもの) 1.85 で受精率は 47% であった。臨床妊娠例は 7 例で、うち 5 例が妊娠継続中で、胚あたりの着床率は 29% であった。採卵できた 52 症例のうち、11 症例が全胚凍結となっている。

凍結胚移植については、胚移植 30 回で妊娠例 10 例、一卵性双胎 1 例を含む 8 症例が妊娠継続している。着床率は 22% であった。

D. 考察

まず精液洗浄の精子回収効率、および洗浄効率に関する検討では、平均精子濃度が $2000 \text{ 万}/\text{ml}$ であることから

半数近くの乏精子症症例を含んでいるにもかかわらず、運動率の極端に低い症例以外ではほとんどの例で洗浄・swimup を行つての精子回収が可能であり、あくまで顕微授精を前提としてではあるがこの手法は高い精子回収率を維持している。また、洗浄後の nested PCR の結果 HIV-1 陽性と判定された 4 検体中 3 例で夫由来のウイルスを検出していることから、特異度・感度とも高い HIV-1 検出システムであることが示された。ただ受精卵培養液ではやや疑陽性が多い結果となり、これらの症例では形態良好胚が得られているにもかかわらず胚移植が不能となることから、今後の改良の余地があるといえよう。

また、今年度の臨床成績を見てみると、いくつかの特徴がある。第一は、胚盤胞までの体外培養が一般的になった結果、移植に適した胚ができないために胚移植不能となった症例が増加している一方で、胚あたりの着床率が 29% となっていることである。本治療では、胚移植に伴ってわずかではあるが水平感染のリスクが残っていることから、真に妊孕性のある胚を選別して移植できる胚盤胞培養は目的に適した治療法であると考えられ、今後

もこの傾向は続いていくと考えられる。第二は、OHSS 回避あるいは着床環境改善のために全胚凍結となる症例が増加していることである。これも、凍結胚の着床率が 22% と新鮮胚移植で最も良好な胚を移植した例を含めても 20% を超えていることから、多胎回避、および 2 児目の居時希望者への対処を考えた時には望ましい方向であると考えられた。

E. 結論

本法は、男性因子合併例においても HIV-1 陰性と判断される運動精子を高い確率で回収可能であり、また本法で用いた PCR 解析系は、回収精子からのウイルスを高感度・高特異度で検出可能である一方、受精卵培養液の HIV-1 遺伝子検出系としては改良の余地があることが示された。

また、本年度の臨床成績の検討からは、胚盤胞培養による妊孕性の高い胚の選別が可能になってきていること、および凍結保存技術の高い効率が確認された。

F. 研究発表

なし

表1. 精液洗淨(2010.4~2011.3)

| | 症例数 (%) |
|-------------------|---------|
| 洗淨後回収精子濃度10万/ml以上 | 13 (7) |
| 洗淨後回収精子濃度10万/ml未満 | 1 (93) |
| 洗淨後HIV-1遺伝子残存 | 0 |
| 計 | 14 |

表2. 採卵・新鮮胚移植(2010.4~2011.3)

| | 症例数 (%) |
|------------|---------|
| 採卵あり | 52 |
| 胚移植 | 17 |
| 臨床妊娠 | 7 (18)* |
| うちon-going | 5 |
| 胚移植にいたらず | 23 |
| 全胚凍結 | 11 |
| 採卵総数 | 57 |

* 胚移植施行した40例を分母とした

** 移植胚24個、着床率29%

表3. 凍結胚移植(2010.4～2011.3)

| | 症例数 (%) |
|----------|-----------|
| 臨床妊娠 | 10 (33) * |
| 出産 | 6 |
| on-going | 2 |
| 流産 | 1 |
| 胚移植総数 | 30 |

* 胚移植施行した30例を分母とした

** 移植胚45個、着床率は22%

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、また感染細胞に対してほとんど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 密度勾配遠心によって精漿、精液単核球、精子/顆粒球を含む分画に分け、各分画中の HIV-1 RNA と DNA を nested PCR により検出した。その結果、被験者 10 例のうち血中ウイルス量が 7,000 コピー/ml 以上の 7 例から HIV-1 RNA が検出され、そのうちの 4 例ではプロウイルス DNA が検出された。感染性の高いと考えられる感染細胞の存在を反映するプロウイルスが半数近くの症例で検出されたことは、HIV 除去精子の調製において感染細胞の除去を確認することの重要性を示している。

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。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と考えられる。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、遊離ウイルスよりも感染性が高いと考えられる HIV 感染細胞を見逃してしまう。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 ゲノムを正しく検出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

配遠心によって精漿、精液単核球、精子/顆粒球を含む分画に分け、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。

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 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いる (Kato et al., AIDS 20(7):967-973)。この研究において、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 液の下に赤血球と顆粒球が沈み、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 液の下に精子と顆粒球が沈み、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 9 人の臨床的指標を表 1 に示す。提供者 A から 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 から J 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、E、G は分画 10~14、提供者 D は全ての分画、提供者 I は 5 以外のすべての分画、提供者 J は分画 9~14、提供者 K は分画 4、6、8~14 に RT-nested PCR で

HIV の RNA/DNA が検出された。提供者 A、D、E、G、の分画からは HIV-1 DNA が検出されなかったことから、これらの陽性反応は HIV-1 RNA の存在によるものと考えられる。一方、提供者 A、I、J、K からは nested PCR により HIV-1 DNA が検出された。

D. 考察

抗 HIV 治療を受けている患者 3 人と未治療患者 7 人の計 10 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 6 人から HIV-1 RNA が検出された (検出率 70%)。HIV-1 RNA が検出された感染者の血中ウイルス量は 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 7 人のうち 3 人 (A、E、G) 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 PCR 陽性反応は精漿中の遊離ウイルスによるものと考えられる。他の 2 人 (D と I) ではほぼすべての分画から HIV-1 RNA/DNA が検出されたが、被検者 D ではすべての分画で HIV-1 DNA が検出されず、被検者 I では分画 1 と 8~14 で HIV-1 DNA が検出された。分画 1~9 に HIV-1 RNA だけが検出された結果は、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ことを示唆している。実際、被検者 D 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 RNA/DNA が検出された。この結果は先の推察と一致している。

HIV-1 DNA が 1 人の既治療患者と 3 人の無治療患者の精液の単核球分画から検出された。そのうちの 2 人 (I と K) は精子/顆粒球分画からも検出され、1 人 (I) は精漿分画からも検出された。前者は HIV-1 が感染した精子あるいは顆粒球が存在したこと、後者はビリオン内で逆転写を起こしたウイルスが存在したことを示唆している。しかし、感染細胞の混入した可能性は除外でき

ない。いずれにしろ、感染性の高いと考えられる感染細胞の存在を反映するプロウイルスが半数近くの症例で検出されたことは、HIV 除去精子の調製において感染細胞の除去を確認することの重要性を示している。

E. 結論

Ficoll-Paque 密度勾配遠心と nested PCR を用いて、HIV 感染者 10 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 7 人から精漿中に HIV-1 RNA が検出され、そのうちの 4 人の単核球成分から HIV-1 プロウイルス DNA が検出された。HIV 除去精子の調製においては、HIV-1 の RNA と DNA の両方が除去されたことを確認することが重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) 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.
- (2) Mizusawa, Y., Kuji, N., Tanaka, Y., Tanaka, M., Ikeda, E., Komatsu, S., Kato, S., and Yoshimura, Y. (2010) Expression of human oocyte-specific linker histone protein and its incorporation into sperm chromatin during fertilization. *Fertil. Steril.* 93(4):134-141.
- (3) Ibe, S., Yokomaku, Y., Shiino, T., Tanaka, R., Hattori, J., Fujisaki, S., Iwatani, Y., Mamiya, N., Utsumi, M., Kato, S., Hamaguchi, M., Sugiura, W. (2010) HIV-1 CRF01_AB: First circulating recombinant from of HIV-2. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 54(3):241-247.
- (4) 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.

- (5) 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.
- (6) 加藤真吾. (2011) HIV 検査および HIV 関連検査. 化学療法の領域 27(3):71-77.

2. 学会発表

- (1) 加藤真吾: 日本の流行状況から求められる HIV 検査戦略の課題～根拠にもとづいた計画とその評価のために何を解決すべきか～「HIV 検査体制 現在の課題」、第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会 (2010 年 11 月 24-26、東京)
- (2) 加藤真吾, 須藤弘二: 次世代シーケンサーを用いた薬剤耐性 HIV の遺伝的多様性解析法の開発、第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会、2010 年 11 月、東京.
- (3) 服部純子、椎野禎一郎、瀧永博之、林田庸総、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、加藤真吾、藤井毅、岩本愛吉、西澤雅子、仲宗根正、岡慎一、伊部史朗、横幕能行、上田幹夫、大家正義、田邊嘉也、渡辺香奈子、渡辺大、白阪琢磨、小島洋子、森治代、中桐逸博、高田昇、木村昭郎、南留美、山元政弘、松下修三、藤田次郎、健山正男、杉浦互: 2003~2009 年の新規 HIV/AIDS 診断症例における薬剤耐性頻度の動向、第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会 (2010 年 11 月 24-26、東京)
- (4) 須藤弘二、加藤真吾: LC-MS/MS を用いた毛髪中および血液中の抗 HIV 剤の定量、第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会 (2010 年 11 月 24-26、東京)
- (5) 伊部史朗、横幕能行、服部純子、岩谷靖雅、加藤真吾、杉浦互: 抗レトロウイルス療法のモニタリングのための plasma HIV-2 viral load 測定系の確立、第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会 (2010 年 11 月 24-26、東京)

- (6) 山崎さやか、加藤真吾：リアルタイム PCR を用いた HIV-1 と HIV-2 の同時検査法の開発、第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会（2010 年 11 月 24-26、東京）
- (7) 村山正晃、池野良、児玉泰光、田邊嘉也、川口玲、山崎さやか、加藤真吾、高木律夫：唾液中ウイルスと血中ウイルスの定量値とウイルス RNA 鎖の比較、第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会（2010 年 11 月 24-26、東京）
- (8) 南宮湖、長谷川直樹、小林芳夫、加藤真吾、小谷宙、戸蒔祐子、岩田敏、根岸昌功：当院において糖代謝異常を来した HIV 患者の臨床的検討、第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会（2010 年 11 月 24-26、東京）
- (9) 柳瀬未季、吉田直子、赤沢学、木村和子、加藤真吾：未承認 HIV 自己検査キットの使用実態調査、第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会（2010 年 11 月

24-26、東京）

- (10) Tomoyuki Ueda and Shingo Kato. Purine deoxynucleosides inhibit the replication of human immunodeficiency virus type 1 in non-stimulated peripheral blood mononuclear cells. The 5th Japan-Germany HIV/AIDS Symposium. 2010, May 10-11, Tokyo, Japan.

G. 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

図1. Ficoll-Paque密度勾配遠心による血液と精液の成分分離

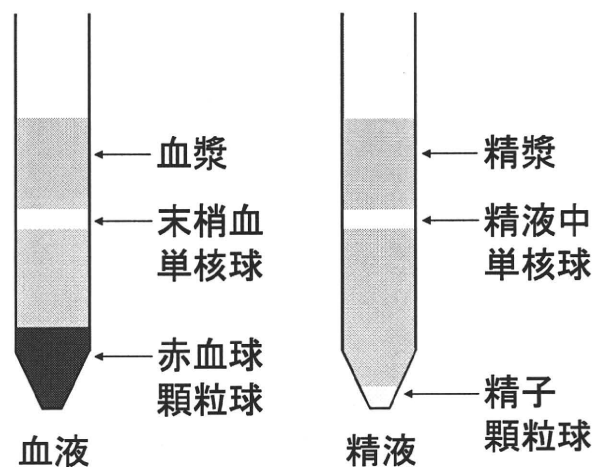


表1. 被験者の臨床的指標

| 精液提供者 | CD4 (per μL) | 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 |
| G | ~400 | 3,000~10,000 | None |
| H | 410 | 30,000 | None |
| I | 400 | 34,000 | None |
| J | 691 | 9,800 | None |

表2. 精液の各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 | 分析液量 | 分画 | | | | | | | | | | | | | | |
|-------|---------|------|----|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|---|
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | |
| A | RNA+DNA | 1/6 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + |
| | DNA | 1/6 | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| B | RNA+DNA | 1/6 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | DNA | 1/6 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| C | RNA+DNA | 1/6 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | DNA | 1/6 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| D | RNA+DNA | 1/6 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | RNA+DNA | 1/30 | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + |
| E | DNA | 1/6 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | RNA+DNA | 1/30 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + |
| F | DNA | 1/6 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | RNA+DNA | 1/6 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| G | RNA+DNA | 1/6 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + |
| | RNA+DNA | 1/30 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + |
| H | DNA | 1/6 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | RNA+DNA | 1/6 | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| I | RNA+DNA | 1/60 | - | - | + | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | DNA | 1/6 | + | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| J | RNA+DNA | 1/6 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + |
| | DNA | 1/6 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - |
| K | RNA+DNA | 1/6 | - | - | - | + | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | DNA | 1/6 | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - |

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

| 著者氏名 | 論文タイトル | 書籍全体の編集者名 | 書籍名 | 出版社名 | 出版地 | 出版年 | ページ |
|------|------------------------|-----------|---|----------|-----|------|-------|
| 高桑好一 | インフルエンザ診療のポイント 妊婦への対応 | 藤田次郎 | これでわかるインフルエンザ診療のポイント | 南江堂 | 東京 | 2010 | 57-65 |
| 高桑好一 | パンデミックH1N1 2009の臨床像 産科 | 鈴木宏、松本慶蔵 | インフルエンザの最新知識 Q&A 2101 パンデミックH1N1 2009 第一波を振り返って | 医薬ジャーナル社 | 東京 | 2010 | 66-69 |

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|---|--|--|----------|-----------|------|
| Serikawa T, Kobayashi S, Tamura T, Uchiyama M, Tsukada H, Takakuwa K, Tanaka K, Ito M | Pseudo outbreak of burkholderia cepacia in vaginal cultures and intervention by hospital infection control team | Journal of Hospital Infection | 75 | 242-243 | 2010 |
| Tsuchiya M, Kikuchi A, Takakuwa K, Tanaka K | Increased pulsatility of the ductus venosus blood velocity in the first trimester is associated with the delivery of small for gestational age or low birth weight infants | The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research | 36 | 1151-1160 | 2010 |
| Takahashi Y, Ishii K, Honda K, Kikuchi A, Takakuwa K, Tanaka K | Establishment of reference ranges for ductus venosus waveform indices in the Japanese population | Journal of Medical Ultrasonics | 37 | 201-207 | 2010 |
| 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 | The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research | 36 | 424-427 | 2010 |
| Haino K, Serikawa T, Itsukaichi M, Numata M, Kikuchi A, Takakuwa K, Sakakibara S, | Morgagni hernia with massive pericardial effusion diagnosed in the second trimester: prenatal diagnosis and perinatal management | Fetal Diagnostic Therapy | in press | | |
| Furushima H, Chinushi M, Sato A, Aizawa Y, Kikuchi A, Takakuwa K, Tanaka K | Fetal atrioventricular block and postpartum augmentative QT prolongation in a patient with long-QT syndrome with KCNQ1 mutation | Journal of Cardiovascular Electrophysiology | 21 | 1170-1173 | 2010 |
| Serikawa T, Ichikawa K, Kikuchi A, Takakuwa K, Tanaka K | A case study of a pregnant patient with a congenital heart block accompanied by left isomerism and uncontrolled type 2 diabetes who was treated successfully with | Gynecologic Obstetrics Investigation | 69 | 193-196 | 2010 |
| 高桑好一、大木泉、芹川武大、田中憲一 | 産婦人科検査マニュアル II. 感染症 7. 風疹ウイルス | 産科と婦人科増刊号 | 77 | 69-74 | 2010 |
| Yamada K, Fujita K, Quan J, Sekine M, Kashima K, Yahata T, Tanaka K | Increased apoptosis of germ cells in patients with AZFc deletions | Journal of Assisted Reproductive Genetics | 27 | 293-297 | 2010 |
| 花房秀次 | 【迷わない!重症感染症への抗菌薬・抗ウイルス薬】各種感染症・病態における診断の決め手と治療薬の選びかた 小児のHIV感染症 | 小児科診療 | 73 | 1994-2000 | 2010 |
| Takako Shima-Sano, Rika Yamada, Kazuyo Sekita, Raleigh W. Hankins, Hiromasa Hori, Hiroshi Seto, Koji Sudo, Makiko Kondo, Kazuo Kawahara, Yuki Tsukahara, Noriyuki Inaba, Shingo Kato, | 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 | 2010 |

| | | | | | |
|---|---|------------------------------|-------|----------|------|
| Hattori J, Shiino T, Gatanaga H, Yoshida S, Watanabe D, Minami R, Sadamasu K, Kondo M, Mori H, Ueda M, Tateyama M, Ueda A, Kato S, Ito T, Oie M, Takata N, Hayashida T, Nagashima M, Matsuda M, Ibe S, Ota Y, Sasaki S, Ishigatsubo Y, Tanabe Y, Koga I, Kojima Y, Yamamoto M, Fujita J, Yokomaku Y, Koike T, | Trends in transmitted drug-resistant HIV-1 and demographic characteristics of newly diagnosed patients: nationwide surveillance from 2003 to 2008 in Japan. | Antiviral Res. | 88(1) | 72-79 | 2010 |
| Ibe S, Yokomaku Y, Shiino T, Tanaka R, Hattori J, Fujisaki S, Iwatani Y, Mamiya N, Utsumi M, Kato S, Hamaguchi M, Sugiura W. | HIV-2 CRF01_AB: first circulating recombinant form of HIV-2. | J Acquir Immune Defic Syndr. | 54(3) | 241-247 | 2010 |
| Mizusawa, Y., Kuji, N., Tanaka, Y., Tanaka, M., Ikeda, E., Komatsu, S., Kato, S., and Yoshimura, Y. | Expression of human oocyte-specific linker histone protein and its incorporation into sperm chromatin during fertilization. | Fertil. Steril. | 93(4) | 134-141 | 2010 |
| 今井光信, 加藤真吾. | 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. | 2010 |
| 加藤真吾, 今井光信. | 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 | 65 | 180-187 | 2010 |
| 加藤真吾. | HIV検査およびHIV関連検査 | 化学療法領域 | 27(3) | 71-77 | 2011 |

これでわかる

インフルエンザ 診療のポイント

診断・治療・予防がすっきりわかる

 藤田次郎

南江堂