

201124003A

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を行うための精液よりの

HIVウイルス分離法の確立

平成23年度 総括研究報告書

研究代表者 田中 憲一

平成24（2012）年5月

目次

I. 総括研究報告書	1
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 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. 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	15
花房秀次	
3. ヒト精子凍結保存の最適化に関する研究—新規可変型 2 重腔チューブを用いる 液体チッソ直接投入法による凍結とバーコードシステムによる取り違い防止に 関する研究	21
兼子智	
4. HIV 除去精子を用いた不妊治療の臨床応用	28
久慈直昭	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	34
IV. 研究成果の刊行物・別刷	35

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、本研究はこのための基礎的、臨床的研究を継続、発展させることを目的とし、実施した。1) ヒト精子凍結保存の最適化に関する研究：新規可変型 2 重腔チューブを用いる液体チッソ直接投入法による凍結とバーコードシステムによる取り違え防止に関する研究；HIV 陽性男性、HIV 陰性女性夫婦に対する体外受精-胚移植の臨床応用においては、精子凍結保存における個人識別法が重要である。外容器への氏名、凍結日等の患者情報を人が記載し、さらにバーコードの導入、コンピュータ管理を併用することにより、高精度なチェックが可能であることを確認した。2) 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：平成 12 年以降、新潟大学において体外受精を実施した患者夫婦の数は 53 組であり、患者夫婦の居住地は以下のとおりである。北海道・東北地方 7 組、関東地方 19 組、中部地方 4 組、近畿地方 11 組、中国・四国地方 6 組、九州地方 6 組。これらの患者夫婦に対し、HIV ウイルス除去夫精液を用いた体外受精-胚移植を実施しているが、生児を獲得した患者夫婦は 53 組中 27 組 (50.9%) であった。いずれの症例についても、妻および出生児に HIV 感染は認められなかった。また、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が重要と判断され、全国のエイズブロック拠点病院スタッフを対象とした本治療に関する講習会を実施した。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：種々のカラムを作成、HIV 除去効率が高く、精子運動率に影響を及ぼさないカラムの試作に成功した。B60 カラムが至適カラムであることを確認し、本カラムにより、HIV 感染男性の精液を用いて Nested PCR により HIV-RNA および HIV-DNA の除去効率に関して検討を行った。4) HIV 洗浄精子及び受精卵培養液に HIV-1 RNA/DNA が存在しないことの確認に関する研究：洗浄精子の一部、受精卵培養液あるいは母子の血液血漿から RNA/DNA を精製した。また、HIV 陽性男性あるいは母子の末梢血単核球から DNA を精製した。これらの検体を対象に HIV-1 env 遺伝子 V3 領域を標的とする RT-nested PCR により HIV-1 RNA/DNA を検査した。洗浄精子 40 件 (20 人)、受精卵培養液 42 件 (24 人)、母子の血液 25 件 (17 人) について HIV 遺伝子検査を実施した。結果はすべて陰性であった。

研究分担者

花房秀次（荻窪病院理事長・血液科）

加藤真吾（慶応義塾大学微生物学・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総合周産期母子医療センター 教授）

八幡哲郎（新潟大学医歯学系（産婦人科）准教授）

宇都宮龍馬（旭化成クラレメディカル株式会社・アフエレス事業部・学術部 課長）

久慈直昭（慶応義塾大学産科婦人科学講座・講師）

星合 昊（近畿大学医学部産科婦人科学教室）

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：

新規可変型 2 重腔チューブを用いる液体チップ直接投入法による凍結とバーコードシステムによる取り違い防止に関する研究；これまで、融解時には速い温度上昇を必要とするため、内容器として熱伝導性が良好な PCR チューブを使用してきた。本年度は取り違い防止を考慮したシステム導入を目的として、底部に医療用バーコードを刻印した肉厚容器の使用が可能であるかを検討した。

2) 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-胚移植を実施した。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実施、精子数、運動率、HIV RNA, proviral DNA などを検査している。この後、実施施設（慶応義塾大学産婦人科、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場合であるが、患者夫婦に対し、担当医師が詳細な説明書をもとに臨床応用の実際、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問題ないことなどを説明する。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、再度の説明を行っている。最終的な意思の確認を行ったのち臨床応用を開始している。

臨床応用に参加することになった患者の妻に対しては、通常体外受精-胚移植で行われる排卵誘発が実施される。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、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。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。

初回の胚移植で妊娠が成立しない場合もあるが、通常媒精あるいは顕微授精により得られた胚に余剰がある場合で、胚盤胞まで分割が進んだ胚が得られた時には、凍結保存し、凍結胚移植を実施することもある。

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。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ールであり、これに基づいて実施された。

また、本治療法の普及を目指して、HIV 陽性男性、陰性女性夫婦に対する生殖補助医療に関する講習会を企画した。

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：

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を行った。カラムによる洗浄を行った後の HIV-RNA、さらに HIV-DNA の残存について検討した。

4) HIV 洗浄精子及び受精卵培養液に HIV-1 RNA/DNA が存在しないことの確認に関する研究：

HIV 陽性男性、陰性女性夫婦に対する生殖補助医療を安全に実施するため、HIV 洗浄精子及び受精卵培養液に HIV-1 RNA/DNA が存在しないことを超高感度 HIV-1 遺伝子検査法により確認した。

(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、社会の理解を得るよう配慮した。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：新規可変型 2 重腔チューブを用いる液体チソ直接投入法による凍結とバーコードシステムによる取り違い防止に関する研究；本法では外容器に氏名、凍結日等の患者情報を人が記載する。洗浄、凍結保護剤で平衡化した精子は内容器に充填し、氏名を人が記載する。さらに外容器キャップに 10 色のカラーキャップを装着した。バーコードの導入、コンピュータ管理をすれば、患者取り違いはなくなると単純に考えがちであるが、バーコードリーダーの読み取りミスは人が感知することができない。一般に医療現場では、医師、看護師等の複数人によるダブルチェッ

クが推奨されるが、情報管理学の立場からは思考アルゴリズムが異なる人とコンピュータの組み合わせによるダブルチェックが精度向上に有効である。また人が視覚情報を認識するのに、手書き文字と色の組み合わせは複数情報の統一の観点から有効である。ファイルメーカー等のソフトウェアを用いてバーコード情報を読み取り、人がコンピュータ上に記載された氏名等の患者情報、カラーキャップを識別することにより高精度なチェックが可能となった。

2) 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：

平成 23 年前半期において、新潟大学において体外受精を実施した患者夫婦の数は 6 組であり、7 回の体外受精を実施した。2001 年以降では 53 組の夫婦を対象として実施している。患者夫婦の居住地は以下のとおりである。北海道・東北地方 7 組、関東地方 19 組、中部地方 4 組、近畿地方 11 組、中国・四国地方 6 組、九州地方 6 組。これらの患者夫婦に対し、HIV ウイルス除去精液を用いた体外受精-胚移植を実施しているが、91 周期の採卵を実施した。このうち 28 周期で妊娠が成立、凍結胚移植を行った 26 周期中 7 周期で妊娠が成立した。35 周期の妊娠中 27 妊娠が継続、8 妊娠が流産に至った。生児を獲得した患者夫婦は 53 組中 27 組 (50.9%) であった。いずれの症例についても、妻および出生児に HIV 感染は認められなかった。また、上記のように患者の居住地が全国に分布していることから、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が重要と判断され、全国のエイズブロック拠点病院スタッフを対象とした本治療に関する講習会を実施した。

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：

種々のカラムを作成、ウイルス除去効率が高く、精子運動率に影響を及ぼさないカラムの試作に成功した。B60 カラムが至適カラムであることを確認し、本カラムを用いて 10 名の未治療の HIV 感染男性の精液を用いて Nested PCR により HIV-RNA および HIV-DNA の除去効率に関して検討を行った。B60 カラムによる 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。HIV DNA に関しても 6 回

以上の洗浄では認められなかった。

4) HIV 洗浄精子及び受精卵培養液に HIV-1 RNA/DNA が存在しないことの確認に関する研究：

洗浄精子の一部、受精卵培養液あるいは母子の血液血漿から QIAGEN 社の QIAamp MinElute Virus Kit を用いて RNA/DNA を精製した。また、HIV 陽性男性あるいは母子の末梢血単核球から QIAamp DNA Blood Kit を用いて DNA を精製した。これらの検体を対象に HIV-1 env 遺伝子 V3 領域を標的とする RT-nested PCR により HIV-1 RNA/DNA を検査した。洗浄精子 40 件 (20 人)、受精卵培養液 42 件 (24 人)、母子の血液 25 件 (17 人) について HIV 遺伝子検査を実施した。結果はすべて陰性であった。

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るが、今年度の研究により、臨床応用実施数を増やし、女性に対する安全性の確認を引き続き行った。また、HIV 陽性男性、HIV 陰性女性夫婦に対する体外受精・胚移植を希望する患者夫婦は全国におり、臨床応用実施施設を増やすことが重要であるが、そのための、講習会を実施した。今後もこのような講習会の開催が重要であると判断された。

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

かどうかを検討した。種々のカラムを作成、ウイルス除去効率が高く、精子運動率に影響を及ぼさないカラムを試作し、B60 カラムが至適カラムであることを確認し、未治療の HIV 感染男性の精液を用いて HIV-RNA および HIV-DNA の除去効率に関して検討を行った。その結果、6 回以上の洗浄では HIV-RNA は認められなかった。HIV DNA についても 6 回以上の洗浄では認められなかった。ただし実際の臨床応用においては、精液中の単核球の HIV も問題であり、今後の課題であると考えられた。

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、平成 22 年までの研究で tube in tube 型の可変型 2 重腔容器を考案し、報告した。本年度は臨床応用に際して懸念される凍結精子の取り違えを考慮して、底部に医療用 2 次元バーコードを刻印した肉厚容器の採用を検討した。本法では外容器に氏名、凍結日等の患者情報を人が記載した。洗浄、凍結保護剤で平衡化した精子は内容器に充填し、氏名を人が記載する。さらに外容器キャップに 10 色のカラーキャップを装着した。バーコードの導入、コンピュータ管理をすれば、患者取り違えはなくなると単純に考えがちであるが、バーコードリーダーの読み取りミスは人が感知することができない。一般に医療現場では、医師、看護師等の複数人によるダブルチェックが推奨されるが、情報管理学の立場からは思考アルゴリズムが異なる人とコンピュータの組み合わせによるダブルチェックが精度向上に有効である。また人が視覚情報を認識するのに、手書き文字と色の組み合わせは複数情報の統一の観点から有効である。ファイルメーカー等のソフトウェアを用いてバーコード情報を読み取り、人がコンピュータ上に記載された氏名等の患者情報、カラーキャップを識別することにより高精度なチェックが可能となった。一般的には 2 次元バーコードは民生用に汎用される QR コードが有名である。本法は携帯電話等で簡単に解読可能であり、個人情報の取扱いにおいて不適當である。本研究では data matrix 型バーコードを導入した。これは携帯電話では解読不能であり、また刻印されたバーコードの 30% 程度が欠落しても解読可能な高い冗長性を有している。HIV 除去精子を用いる ART では、培養操作が必須であり、上述した

バーコード管理が単に精子保存に留まらず、採卵、媒精、顕微授精、培養、胚移植、更にはHIV除去確認のPCR等の全操作を総合的に管理することが理想と考えられる。

E. 結論

HIV陽性男性、HIV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) Quan J, Yahata T, Adachi S, Yoshihara K, Tanaka K: Identification of receptor tyrosine kinase, discoidin domain receptor 1 (DDR1), as a potential biomarker for serous ovarian cancer. *Int J Mol Sci*, 31:971-982, 2011.
- 2) Nonaka T, Takakuwa K, Tanaka K: Analysis of the polymorphisms of genes coding biotransformation enzymes in recurrent miscarriage in the Japanese population. *J Obstet Gynaecol Res*, 37: 1352-1358, 2011.
- 3) Yoshihara K, Tajima A, Adachi S, Quan J, Sekine M, Kase H, Yahata T, Inoue I, Tanaka K: Germline copy number variations in BRCA1-associated ovarian cancer patients. *Genes Chromosomes Cancer*, 50: 167-177, 2011.
- 4) Shirahata A, Fukutake K, Mimaya J, Takamatsu J, Shima M, Hanabusa H, Takedani H, Takashima Y, Matsushita T, Tawa A, Higasa S, Takata N, Sakai M, Kawakami K, Ohashi Y, Saito H: Clinical pharmacological study of a plasma-derived factor VIIa and factor X mixture (MC710) in haemophilia patients with inhibitors -

Phase I trial. *Haemophilia*, 18; 94-101, 2012.

- 5) 加藤真吾: HIV検査およびHIV関連検査. *化学療法の領域* 27:71-77, 2011.
- 6) 加藤真吾, 今井光信: HIV検査の新たな展開. *日本エイズ学会誌* 13:132-136, 2011.
- 7) 高桑好一: インフルエンザの最新知識 Q&A 2012 パンデミックH1N1 ~2009の終焉を迎えて~ IV. パンデミックH1N1 2009の臨床像 産科 編者 鈴木宏、渡辺彰、2012年発行予定、医薬ジャーナル社.

口頭発表

国内

- 1) Takakuwa K: Studies on the efficacy of immunotherapy using paternal mononuclear cells for patients with infertility. 16th World Congress on In Vitro Fertilization, Tokyo, September, 2011.
- 2) 加嶋克則, 高桑好一、渡邊亜由子、藤田和之: HIV感染男性非感染女性夫婦に対する体外受精 - 胚移植の臨床成績について: 第56回日本生殖医学会、横浜、2011年12月

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講師
	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、HAART 療法の導入により、HIV 感染者の予後は改善されている。このような状況に対し、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、本研究班では改良型 Percoll 法-Swim up 法を応用し、HIV ウイルスを除去した夫の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研究を遂行した。

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、本研究班が臨床実施を開始した平成 12 年からの総合的な成績（慶應病院の症例も含め）については、のべ 269 例の精子洗浄を実施し、精子回収可能であった例は 263 例であった。平成 23 年前半期において、新潟大学において体外受精を実施した患者夫婦の数は 6 組であり、7 回の体外受精を実施した。平成 12 年以降では 53 組の夫婦を対象として実施している。夫婦ともに HIV 陽性の夫婦については通常の性交による妊娠により妻の superinfection の問題が存在し、夫の洗浄精子を用いた体外受精-胚移植の応用も検討する必要があるため、昨年度に引き続き体外受精-胚移植を試みている。また、HIV 陽性男性、陰性女性夫婦に対する体外受精-胚移植の実施施設を増やすことを目的として、基盤整備として、全国のエイズ拠点ブロック病院を対象とした講習会を実施した。

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った。Bhaskaran らによれば、1996 年以前に HIV 陽性が判明した患者は推計で 14 年後に 60% が死亡するとされていたが、HAART の導入後、HIV 陽性者

の生存率は非 HIV 感染者のそれとあまり変わらなくなったことが報告されている (Bhaskara K, JAMA, 2008)。このように HIV 感染は死の病気ではなくなっており、HIV 感染者はエイズを発症することなく HIV キャリアの状態を経過することが多くなっている。このようなことから、今後の人生設計を考え QOL の改善を求める

ようになってきている。そのような状況下で HIV 感染者の中でも結婚するカップルが増えてきているが、HIV 陽性男性、陰性女性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。

妊娠に伴う妻の HIV 二次感染の危険性は HIV 感染男性の状態（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、精液中の 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 Percoll-Swim up 法の応用により 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。

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 陽性男性、陰性女性夫婦に対する体外受精-胚移植の臨床応用」にあたって、参加希望者が臨床応用に参加するまでの経緯（図 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に実施される。

採卵当日から胚移植を実施するまでのスケジュールの概要をフローチャートとして図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。

初回の胚移植で妊娠が成立しない場合もあるが、通常媒精あるいは顕微授精により得られた胚に余剰がある場合で、胚盤胞まで分割が進んだ胚が得られた時には、凍結保存し、凍結胚移植を実施することもある。

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（二次感染の無いこと）を判断する。妊娠が成立した場合の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。

今年度は、HIV陽性男性、HIV陽性女性夫婦に対する体外受精-胚移植も実施した。これは妻のsuperinfectionを予防する目的で実施しているものであるが、昨年度に引き続き、妊娠成立を試みているところである。

（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。のべ242例の精子洗浄を実施し、精子回収可能であった例は236例であった。平成23年前半期において、新潟大学において体外受精を実施した患者夫婦の数は6組であり、7回の体外受精を実施した。2001年以降では53組の夫婦を対象として実施している。患者夫婦の居住地は以下のとおりである。北海道・東北地方7組、関東地方19組、中部地方4組、近畿地方11組、中国・四国地方6組、九州地方6組。これらの患者夫婦に対し、HIVウイルス除去夫精液を用いた体外受精-胚移植を実施しているが、91周期の採卵を実施した。このうち28周期で妊娠が成立、凍結胚移植を行った26周期中7周期で妊娠が成立した。35周期の妊娠中27妊娠が継続、8妊娠が流産に至った。生児を獲得した患者夫婦は53組中27組(50.9%)であった。

いずれの症例についても、妻および出生児に HIV 感染は認められなかった。

また、上記のように患者の居住地が全国に分布していることから、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が重要と判断され、HIV 陽性男性、陰性女性夫婦に対する体外受精・胚移植の実施施設を増やすことを目的として、全国のエイズ拠点ブロック病院のスタッフを対象とした講習会を実施した。今年度は、昨年度に引き続き、HIV 陽性男性、HIV 陽性女性夫婦に対する体外受精-胚移植も実施している。これは妻の superinfection を予防する目的で実施しているものであるが、妊娠成立を試みているところである。

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 などの物質もほとんど除去できることを超高感度 PCR 法（検出限界は 1copy/ml）で確認し、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。精子分画にわずかに HIV が混入していた場合、人工授精では妻に二次感染の危険性があるが、体外受精-胚移植

では時間が経過するにしたがい 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。さらに本療法の応用を広めるため、実施施設を増やすことが重要と判断している。

E. 結論

Percoll 法および Swim up 法を組み合わせた方法により調整された精子浮遊液を用い、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) Quan J, Yahata T, Adachi S,

Yoshihara K, Tanaka K: Identification of receptor tyrosine kinase, discoidin domain receptor 1 (DDR1), as a potential biomarker for serous ovarian cancer. Int J Mol Sci, 31:971-982, 2011.

2) Nonaka T, Takakuwa K, Tanaka K: Analysis of the polymorphisms of genes coding biotransformation enzymes in recurrent miscarriage in the Japanese population. J Obstet Gynaecol Res, 37: 1352-1358, 2011.

3) Yoshihara K, Tajima A, Adachi S, Quan J, Sekine M, Kase H, Yahata T, Inoue I, Tanaka K: Germline copy number variations in BRCA1-associated ovarian cancer patients. Genes Chromosomes Cancer, 50: 167-177, 2011.

4) 高桑好一: インフルエンザの最新知識 Q&A 2012 パンデミック H1N1 ～2009 の終焉を迎えて～ IV. パンデミック H1N1

2009 の臨床像 産科 編者 鈴木宏、渡辺彰、2012 年発行予定、医薬ジャーナル社.

口頭発表

国内

1) Takakuwa K: Studies on the efficacy of immunotherapy using paternal mononuclear cells for patients with infertility. 16th World Congress on In Vitro Fertilization, Tokyo, September, 2011.

2) 加嶋克則、高桑好一、渡邊亜由子、藤田和之: HIV 感染男性非感染女性夫婦に対する体外受精 - 胚移植の臨床成績について: 第 56 回日本生殖医学会、横浜、2011 年 12 月

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

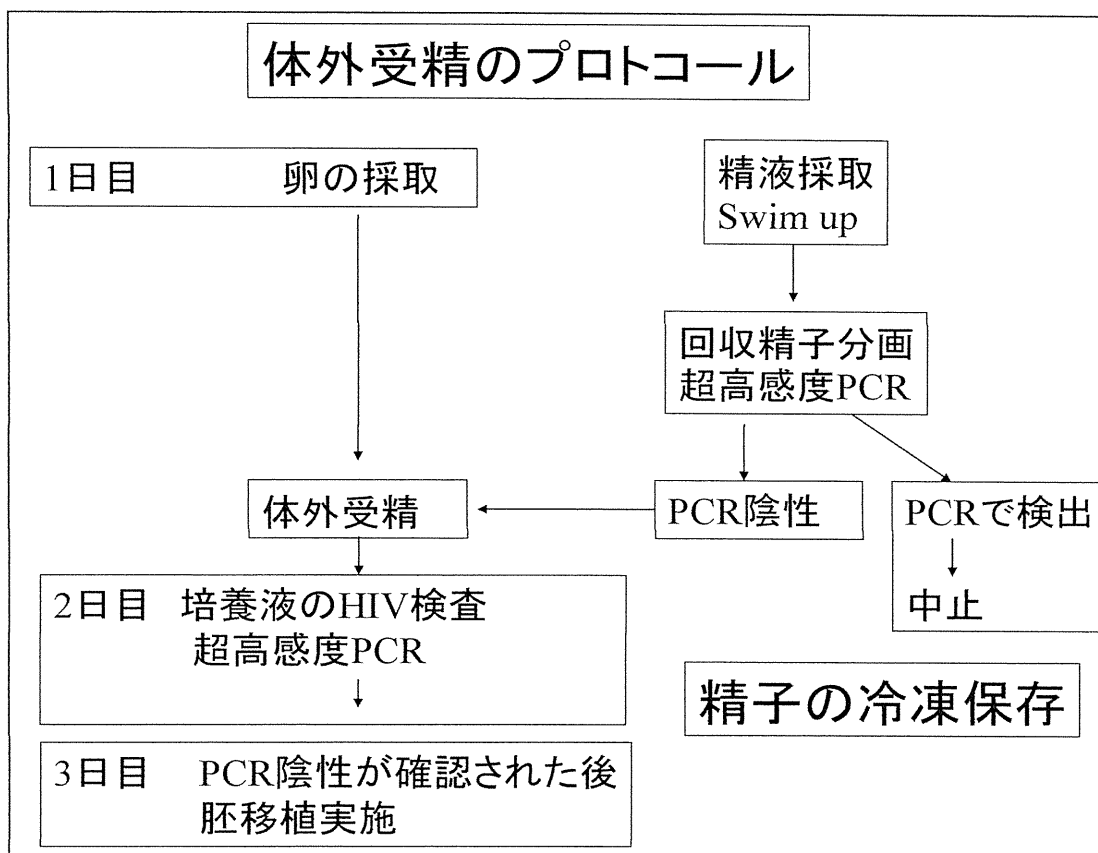


表 1

HIV 陽性男性、陰性女性夫婦に対する体外受精 - 胚移植実施に関する講習会プログラム

13:00 企画者挨拶 新潟大学医歯学系産科婦人科学講座教授 田中憲一

13:10-14:00

HIV 感染最近の動向

関東甲信越エイズブロック拠点病院（新潟大学医歯学総合病院）感染管理部副部長
田邊嘉也

14:00-14:40

HIV 陽性男性、陰性女性夫婦に対する体外受精 - 胚移植実施の流れ

-紹介からカウンセリングまで-

臨床心理士の立場から 新潟大学医歯学総合病院感染管理部 牧野麻由子
医師の立場から 新潟大学医歯学総合病院総合周産期母子医療センター
高桑好一

14:40-15:00

コーヒーブレイク

15:00-15:40

HIV 陽性男性精液からの HIV 除去のテクニック

東京歯科大学市川病院産婦人科講師 兼子 智

15:40-16:20

超高感度 PCR 法による HIV の検出の実際

慶應大学医学部微生物学教室講師 加藤真吾

16:20-17:00

HIV 陽性男性、HIV 陰性女性夫婦に対する体外受精 - 胚移植の実際

新潟大学医歯学総合病院産婦人科講師 加嶋克則

17:00～ 総合討論

厚生労働科学研究費補助金（エイズ研究事業）
（分担）平成23年度研究報告書

研究課題名：安全な生殖補助医療を行うための HIV ウィルス分離法の確立
課題番号：
主任研究者名：田中憲一 新潟大学産婦人科
分担研究者名：花房 秀次 荻窪病院 理事長・血液科

研究要旨

A. 研究目的

HIV 感染者の予後が改善されるとともに結婚して子供を望む夫婦が増えている。我々は長年 HIV 感染者の精液から HIV を除去し安全に挙児可能な方法を研究し、生殖補助医療を実施してきた。最近、抗 HIV 剤で血液中の HIV RNA 量を低く抑制した場合に 2 次感染の危険性が低下し、生殖補助医療の必要性は少ないとの意見がある。HIV 感染男性において精子の異常が約 70% に認められ、精子の異常があれば性交渉による妊娠の確率は低下すると推測される。HIV 陽性男性と陰性女性の夫婦が挙児を希望する場合、生殖補助医療の必要性について検討した。

B. 研究方法

平成 23 年度に受診した HIV 陽性夫婦について検討した。HIV 陽性男性の精液検査を実施し、精子濃度、精子運動率、正常形態率を測定した。HIV 陽性男性と陰性女性の場合は、本研究班において開発した Swim up 法により精液から HIV を除去し、HIV RNA, DNA 共に完全除去を確認した精子を用いて体外受精、顕微授精を施行した。

2011 年度に挙児希望で来院した HIV 陽性男性と陰性女性の夫婦全員に、抗 HIV 療法で血中ウィルス量を低くできた場合には 2 次感染の危険性が大変低くなることを説明し、それでも生殖補助医療を希望するかどうか、夫婦個別カウンセリングを行った。

統計処理は Fisher's exact test を用いて検討した。

倫理面への配慮

本研究に参加する時には、夫婦個別カウンセリングを行い、夫の生命予後の危険性についても説明し、それぞれの自発意思であることを確認した。

C. 研究結果

2000 年度から 2011 年度までに、男性が HIV 陽性で女性が HIV 陰性である夫婦の受診者数は、245 組（血友病患者の夫婦が 89 組、性感染者夫婦が 156 組）であった。このうち、外国人は 28 組であった。

夫婦共に HIV 陽性が 7 組であった。1 組は血液製剤により別々の HIV clones に感染していた。残りの 6 組は夫から妻に感染しており、夫は 7 人全員が抗 HIV 剤内服を開始していたが、妻で内服しているのは 3 人であった。

抗 HIV 療法を受けている男性患者は 141 名であった。141 名のうち血中 HIV RNA 量が 400copies/ml 以下を示したのは 115 名で、血中ウィルス量が検出限界以下であったのは 94 名（40%）であった。現在までに研究班に参加した HIV 感染男性の精液所見を検討した。

精子数が 2000 万未満の乏精子症を 36 名/194 名（19%）で認めた。精子が全くない無精子症を 10 名で認めた。

精子運動率が 50% 以下の精子無力症を 131 名/187 名（70%）で高率に認められた。

精子の正常形態率が 15% 以下の異常は 56 名/180 名（31%）で認められた。

抗 HIV 剤の影響に関する検討

抗 HIV 剤使用の有無による精子への影響を検討した。

精子濃度が 2000 万/ml 未満であったのは、抗 HIV 剤使用群で 21% (29/140)、未使用群で 13% (7/54) であったが有意差は認めなかった。(p=0.213)

精子運動率が 50%以下であったのは、抗 HIV 剤使用群で 71.3% (97/136)、未使用群で 63% (34/54) であったが有意差は認めなかった。(p=0.177)

精子の正常形態率が 15%以下であったのは、抗 HIV 剤使用群で 33% (42/129)、未使用群で 24% (12/51) であったが有意差は認めなかった。(p=0.213)

無精子症を認めた 10 名のうち 9 名が抗 HIV 剤を使用しており、有意に抗 HIV 剤群で無精子症が多かった。(p=0.003)

2011 年度受診した 24 組の HIV 陽性男性と HIV 陰性女性の夫婦に、抗 HIV 療法で血中ウィルス量を低くできた場合の性交渉による妊娠の危険性が少ないことを説明し、夫婦個別カウンセリングを行った。しかし、性交渉を選択した夫婦は皆無で、全員が可能な限り安全な方法を希望したいとして生殖補助医療を選択した。

D. 考察

HIV 感染者では精子数が少なく、運動率が低く、正常形態率も低かった。前年度までの検討では精子濃度減少と年齢、HIV RNA 量、CD4 数との有意な相関は認めなかったが、抗 HIV 剤使用群では無治療群に比較して精子の数が少なく、運動率が低かった。

今回、症例数を増やして検討したところ、HIV 感染者の精子は運動率低下が著明であった。本研究班で HIV 感染者の精子を電子顕微鏡で検討したところ、精子のミトコンドリアが高度に障害されており、抗 HIV 剤により精子のミトコンドリアが障害されるとエネルギー産生障害が生じて精子の運動率が低下すると考えられた。

2011 年に Cohen MS らは抗 HIV 剤の早期開始により異性間での HIV 2 次感染を 96%抑制できると報告して大きな反響を呼んだ。(N Engl J Med. 493-505, 2011) しかし、彼らの研究は挙児希望を目的とする目的ではなく、コンドームを装着しながら抗 HIV 剤内服による異性間の 2 次感染抑制効果を検討している。それでも 2 次感染を完全に抑制できず、HIV sero-discordant couple が挙児希望する時に医療従事者がどのような対応を取るかが問題である。抗 HIV 剤内服により血中の HIV RNA 量が検出限界かになった場合にコンドームを付けずに性交渉を行い 2 次感染する確率を数学モデルから推測すると 0.16 [0.02-1.13, 95%信頼区間] per 100 person-years と考えられている。しかし、今回の我々の検討で明らかになったように、HIV 感染男性の 70%以上において精子の障害が認められている。無精子症や乏精子症もあり、男性不妊を認めた割合も多かった。性交渉で妊娠するためには通常よりも多くの性交渉を要し、2 次感染の危険性が高くなる。

今回の調査において、HIV 陽性男性の全員が、わずかでも妻に 2 次感染する危険性があるならば可能な限りリスクを回避して、より安全で妊娠率の高い生殖補助医療を希望したいとの意見であった。HIV 陰性女性も今後子どもを産んで育てていくことを考えると自分自身への 2 次感染を可能な

限り下げの方法を選択したいとの意見であった。当院に訪れる HIV 陽性夫婦は生殖補助医療を想定して来院しているのでバイアスは生じていると推測される。挙児希望の相談に対して、医師は 2 次感染の危険性がどれだけ低くなれば性交渉を勧めてよいのか、体外受精での女性への負担や費用、人工授精の問題点などを議論して我が国のガイドラインを作成することが必要である。特に、男性の精子数や精子機能、精液中の HIV の感染性、女性の卵巣機能などによって対応も異なり、ガイドラインの作成が求められている。

E. 結論

今回の調査によって、HIV 感染男性の精子では 70%以上に異常が認められることが判明した。一方、抗 HIV 療法の普及により、血中 HIV RNA 量は検出限界以下に抑制されている場合が 40%であった。HIV 陽性男性が抗 HIV 療法で血中 HIV RNA 量が低く抑制されていても性交渉による妊娠を希望する夫婦はならず、より安全な生殖補助医療を選択した。今後、HIV 陽性夫婦の挙児希望に対し、医療従事者の対応を推奨するガイドラインの作成が必要である。

1) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

HIV 感染者は世界中で増加しており、先進国においても新規感染者が多い。一方治療の進歩により感染者は延命可能となり、QOL の改善を求めて挙児希望も増えている。国際的には抗 HIV 療法で血中ウイルス量を低く抑制できれば生殖補助医療の必要性は少ないとの意見もある。国際的にも HIV 感染者の精液研究は少なく、今回の検討は今後の議論にも有用である。HIV 感染男性の精液研究により、より詳細な 2 次感染防止効果が検討可能になる。

2) 今後の展望について

今後、抗 HIV 剤が精液中の HIV RNA, DNA だけでなく、精液中 HIV の感染性に及ぼす影響を検討するとともに、HIV 感染や抗 HIV 剤が精子に及ぼす影響などを検討する。

G. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

別紙参照

H. 知的所有権の出願・取得状況

現在のところ予定なし。

論文

Shirahata A, Fukutake K, Mimaya J, Takamatsu J, Shima M, Hanabusa H, Takedani H, Takashima Y, Matsushita T, Tawa A, Higasa S, Takata N, Sakai M, Kawakami K, Ohashi Y, Saito H. Clinical pharmacological study of a plasma-derived factor VIIa and factor X mixture (MC710) in haemophilia patients with inhibitors - Phase I trial. *Haemophilia*. 2012 Jan;18(1):94-101. Epub 2011 Apr 28.

著書

指導と支援. 花房秀次. はじめての血友病診療 実践マニュアル p86-93, 石黒精 編集. 診断と治療社 2012

雑誌

【小児医療における診断・治療の進歩】 治療技術 HIV 陽性夫婦の生殖補助医療と母子感染防止対策

長尾梓, 花房秀次

小児科(0037-4121)52 巻 12 号 Page1793-1798(2011.11)

【東日本大震災と日本血栓止血学会】 東日本大震災で被災された血友病患者への支援
: 田中一郎, 天野景裕, 瀧正志, 岡敏明, 酒井道生, 嶋緑倫, 白幡聡, 竹谷英之, 花房秀次, 日笠聡, 福武勝幸, 藤井輝久, 堀越泰雄, 松下正, 松本剛史, 三室淳, 吉岡章, 日本血栓止血学会学術標準化委員会血友病部会 : 日本血栓止血学会誌(0915-7441)22 巻 5 号 Page259-265(2011.10)

【ライフスパンからみた小児科診療】 血友病(解説/特集)

長尾梓(荻窪病院 血液科), 花房秀次

小児内科(0385-6305)43 巻 9 号 Page1552-1554(2011.09)

頻回出血を繰り返す血友病患者における滑膜切除術の適応
瀧正志, 花房秀次, 竹谷英之, 沖本由理, 西須孝, 島田幸造

: 小児科臨床(0021-518X)64 巻 9 号 Page2061-2072(2011.09)