

201124003B

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21年度～平成23年度 総合研究報告書

研究代表者 田中 憲一

平成24（2012）年5月

目次

I. 総合研究報告書	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	8
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	18
花房秀次	
3. ヒト精子凍結保存の最適化に関する研究	29
兼子智	
4. HIV 除去精子を用いた不妊治療の臨床応用	34
久慈直昭	
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	45
八幡哲郎	
6. 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	47
宇都宮龍馬	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	48
IV. 研究成果の刊行物・別刷	51

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
総合報告書

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、本研究班で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て研究を遂行した。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：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。本研究を通して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きた。本研究班のホームページを作成し、一般に公開し、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-胚移植の臨床応用の全国的な実施の基盤整備のため、本療法に関する講習会を実施した。2) HIV 陽性男性、陰性女性夫婦に対する体外受精 - 胚移植による妊娠により出生した出生児の発育に関する検討：平成 22 年度に実施した。平成 13 年から平成 22 年 12 月までに生まれた児は 95 名で、男女比は女児 54%、男児 46% であった。単胎 66 名、双胎 13 名、品胎 1 名であった。76 名が出産し、うち 4 名が 2 回出産した。76 名の夫のうち 14 名が外国人であった。これらの症例に関し質問票を郵送することにより、児の発育について検討した。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を行った。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) 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：ヒト精子凍結保存に関して緩速法および超急速凍結法の確立を試みた。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。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。このことに関連し、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。

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・アフレスス事業部・学術部 課長）
久慈直昭（慶應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、研究を遂行した。

B. 研究方法

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：

これまでの研究により、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 などを検査した。これらは荻窪病院で行い、この後、実施施設（慶應病院産婦人科、新潟大学医歯学総合病院産婦人科）を受診してもらうこととした。

新潟大学医歯学総合病院を受診した場合、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も問題ないことなどを説明。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った。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、再度の説明を行った。最終的な意思の確認を行ったのち臨床応用を開始することとした。

臨床応用に参加することになった患者の妻に対しては、通常の外受精-胚移植で行われる排卵誘発が行われた。夫から精液を採取し、Percoll 法、Swimup 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）を行うこととしたが、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た。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、治療を中止とし、HIV ウイルスが認められない場合に胚移植を行うこととした。

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った。

胚移植後は、患者の全身状態に注意するとともに、妊娠の確認を行った。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した。妊娠が成立した場合、妊娠中の管理については、通常妊婦健康審査が実施された。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。

HIV 陽性男性、陽性女性夫婦に対しても妻の Superinfection を予防するという観点から夫の洗浄精子を使用する体外受精 - 胚移植を試みた。

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実施した。

2) HIV 陽性男性、陰性女性夫婦に対する体外受精・胚移植による妊娠により出生した出生児の発育に関する検討:平成 22 年度に実施した。平成 13 年から平成 22 年 12 月までに生まれた児は 95 名で、男女比は女児 54%、男児 46%、単胎 66 名、双胎 13 名、品胎 1 名であった。76 名が出産し、うち 4 名が 2 回出産した。76 名の夫のうち 14 名が外国人であった。これらの症例に関し質問票を郵送することにより、児の発育について検討した。

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: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を試作した。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。HIV 陽性患者の精液を用い、カラムによる洗浄を行った後の HIV-RNA の残存について、nested PCR 法により、検討した。

4) ヒト精子凍結保存の最適化に関する研究に関連し、平成 21 年度には、緩速凍結法の有効性を検討した。さらに平成 22 年度には、超急速凍結保存法 (vitrification) による凍結保存を試みた。すなわち、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。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。

精子の凍結保存に適した容器として、新規可変型 2 重腔チューブを用い、液体チッソ直

接投入法の有用性を検討した。また、このような新規の容器を使用するにあたって、取り違え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。

(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) 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については、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 21 年 4 月から平成 23 年 12 月までの間に新潟大学および慶應病院における成績は以下のとおりである。新鮮胚移植数 71 件、妊娠数 20 件、このうち分娩数は 17 例であり、生児獲得数は 17 例であった。凍結胚移植数は 118 例であり、妊娠数 38 例、このうち分娩数は 24 例であり、生児獲得数は 24 例であった。また、5 例が妊娠継続中であった。

平成 12 年以降、新潟大学においては、53 組の夫婦を対象として HIV 陽性男性、陰性女性夫婦に対する体外受精・胚移植を実施している。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。

平成 22 年度、23 年度において、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。本治療の実施に際しては、公開討論会の実施、新潟大学倫理委員会の許可を得るなど特に倫理面に配慮し、慎重を期して開始した。本治療は妻の superinfection を予防する目的で実施したものである。

本研究班のホームページを作成し、一般に公開し、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。

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、基盤整備として、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。

2) HIV 陽性男性、HIV 陰性女性夫婦に対する体外受精 - 胚移植による妊娠により出生した出生児の発育に関する検討:

2001 年から 2010 年 12 月までに生まれた児は 95 名で、男女比は女兒 54%、男児 46%、単胎 66 名、双胎 13 名、品胎 1 名であった。76 名が出産し、うち 4 名が 2 回出産した。76 名の夫のうち 14 名が外国人であった。年次別の出生者数は平成 13 年 2 名、平成 14 年 2 名、平成 15 年 8 名、平成 16 年 12 名、平成 17 年 6 名、平成 18 年 11 名、平成 19 年 13 名、平成 20 年 16 名、平成 21 年 8 名、平成 22 年 17 名であった。

出生体重の中央値(最小値~最大値)は 2700g (571g~4442g)、妊娠期間の中央値(最小値~最大値)は 39 週 (26.5~41.2 週)であった。

男児の身長中央値に関しては、出生時 49.35cm、6 か月で 69.7cm、1 歳 78.1cm、2 歳 88.3cm、3 歳 97cm、4 歳 100.8cm、5 歳 110.3cm、6 歳 120cm、7 歳 123.6cm であった。

男児の体重中央値については、出生時 2.888Kg、6 か月で 8.785Kg、1 歳 10.4Kg、2 歳 12.95Kg、3 歳 14.8Kg、4 歳 16.1Kg、5 歳 18.85Kg、6 歳 22.4Kg、7 歳 24.4Kg であった。

女兒の身長中央値に関しては、出生時 46.9cm、6 か月で 64.25cm、1 歳 71.8cm、2 歳 85.5cm、3 歳 93.3cm、4 歳 100cm、5 歳 107.5cm、6 歳 119cm、7 歳 128.5cm であった。

女兒の体重中央値については、出生時 2.586Kg、6 か月で 7.16Kg、1 歳 8.3Kg、2 歳

10.9Kg、3 歳 12.8Kg、4 歳 14Kg、5 歳 15.5Kg、6 歳 20Kg、7 歳 26Kg であった。

母親の妊娠高血圧症候群のため 1 名が 571g の超未熟児で出生したが、2 歳までに catch up growth を示し、ほぼ年齢相当に発育してきた。未熟児網膜症もなく、身体所見に異常を認めていない。また、品胎の子どもの発育も順調で異常を認めていない。

1 名で心室中隔欠損を認めたが、自然閉鎖している。

7 歳未満の子どもの発達に関しては、以下のようであった。

運動・体の発達: 全員で異常を認めていない。

言葉の発達: 全員で異常を認めていない。

認知・認識力の発達: 2 歳の段階で 2 名に自閉的傾向が認められた。6 歳の段階で 1 名にアスペルガー病が疑われたが、知的発達は良好であった。

7 歳以上の子どもの発達に関しては、以下のようであった。

行動傾向の異常: 全員異常なし。

健康と医学ケアについて: 全員異常なし。

行動傾向について: 全員異常なし。

言語の発達: 全員異常なし。

数の発達: 全員異常なし。

運動機能の発達: 全員異常なし。

生活の発達: 全員異常なし。

仕事、作業の発達: 全員異常なし。

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。

3) ヒト精子凍結保存の最適化に関する研究: 平成 21 年度、22 年度には緩速凍結法および超急速凍結保存法 (vitrification) による凍結保存の検討を行った。緩速凍結用凍結保護剤としては 50mM トレハロース、150mM DMSO、150mM エチレングリコールを使用。また、超急速凍結保存法 (vitrification) ではこの処方 (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。超急速凍結保存法(vitrification)では濃縮された洗浄精子と保護剤各 $10\mu\text{l}$ を混合し、熱伝導性が良好なPCRチューブ(内腔容量 $100\mu\text{l}$)に入れて30秒間室温平衡化した後、液体チツソに投入した。融解は 37°C の温湯中で振盪した。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、超急速法が良好であった。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、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、多糖類の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、総合的には緩速凍結法の有用性が高いことが示された。

平成22年度から23年度には、新規可変型2重腔チューブを用いる液体チツソ直接投入法の有用性、および本容器を用いる際の取り違い防止に関する研究を行った。本法では外容器に氏名、凍結日等の患者情報を人が記載することとした。洗浄、凍結保護剤で平衡化した精子は内容器に充填し、氏名を人が記載した。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。

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と考えられる。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、今回の研究により、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・胚移植後の妊娠により、出生した児の発育に関する追跡調査を実施した。その結果、出生した児の身体的、精神的発育には問題ないものと判断された。ただし、本療法の有効性および安全性の確認、さらに、出生した児に問題が生じないことの確認については、今後のさらなるフォローアップが重要であると考えられる。

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。ただし、精液に含まれる単核球にHIVが存在する可能性があり、今後の検討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、精子の凍結に関し、緩速凍結法および超急速凍結保存法(vitrification)による凍結保存の有用性を検討した。この結果、総合的には緩速凍結法の方が有用であると考えられた。

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) 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) Kinai E, Hanabusa H: Progressive renal tubular dysfunction associated with long-term use of tenofovir DF. AIDS Res Hum Retroviruses, 25: 387-394, 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.

9) 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.

10) 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.

11) 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.

12) 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.

13) Haino K, Serikawa T, Itsukaichi M, Numata M, Kikuchi A, Takakuwa K, Sakakibara S, Hirayama Y, Tanaka K : Morgagni hernia with massive pericardial effusion diagnosed in the second trimester: prenatal diagnosis and perinatal management:. Fetal Diagn Ther. In press

- 14) 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.
- 15) 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 ritodrine: *Gynecol Obstet Invest* 69: 193-196, 2010.
- 16) Yamada K, Fujita K, Quan J, Sekine M, Kashima K, Yahata T, Tanaka K: Increased apoptosis of germ cells in patients with AZFc deletions. *J Assist Reprod Genet* 27: 293-297, 2010.
- 17) 高桑好一: インフルエンザ診療のポイント 妊婦への対応. これでわかるインフルエンザ診療のポイント. 57-65, 2010年12月発行、南江堂
- 18) 高桑好一: パンデミック H1N1 2009 の臨床像 産科. 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. 66-69, 2010年8月10日発行、医薬ジャーナル社.
- 19) 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.
- 20) 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.
- 21) 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.
- 22) 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.
- 23) 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.
- 24) 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.
- 25) 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.
- 26) 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) 高桑好一: 「妊娠と HIV 感染 - HIV 陽性男性、陰性女性夫婦に対する体外受精 - 胚移植の臨床応用を中心として」、ランチョンセミナー、第 51 回日本哺乳動物卵子学会、新潟、2010、5月.
- 2) Takakuwa K, Watanabe A, Makino M, Kashima K, Tanaka K: Results of assisted reproduction techniques (ART) for HIV-1 discordant couples using washed sperm and the nested PCR method. *International Symposium for Immunology of Reproduction 2010*, Osaka, August 28-29, 2010.
- 3) 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
（平成 21 年度～平成 23 年度）

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、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。新潟大学において体外受精を実施した患者夫婦の数は平成 13 年以降では 53 組の夫婦を対象としている。夫婦ともに HIV 陽性の夫婦については通常の性交渉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、体外受精-胚移植を実施した。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りつつあり、HIV 感染者はエイズを発症することなく HIV キャリアの状態で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 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、HIV 陽性男性、陰性女性夫婦に対する生殖補助医療の応用の普及のための基盤整備のための検討を行った。

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。次にカウンセラー及びコーディネーターの面談を受け、治療に対する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。

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。

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。

また、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たものである。

(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)については、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21年4月から平成23年12月までの間に新潟大学および慶應病院における成績は以下のとおりである(久慈直昭分担研究者のデータを含む)。新鮮胚移植数71件、妊娠数20件、このうち分娩数は17例であり、生児獲得数は17例であった。凍結胚移植数は118例であり、妊娠数38例、このうち分娩数は24例であり、生児獲得数は24例であった。また、5例が妊娠継続中であった。

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。患者(妻)の平均年齢は 34.0 ± 4.9 歳であり、20歳代11例、30-34歳19例、35-39歳15例、40歳代8例であり、35歳以降の患者が23例(43.4%)であった。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。

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。

平成22年度からは、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たものである。

HIV陽性男性、陰性女性夫婦に対する体外受精・胚移植の臨床実施を一般に周知せしめるため、ホームページを開設し、本療法の詳細を掲載した。

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。

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。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ー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., Kobayashi, 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.

11) 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.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) Haino K, Serikawa T, Itsukaichi M, Numata M, Kikuchi A, Takakuwa K, Sakakibara S, Hirayama Y, Tanaka K: Morgagni hernia with massive pericardial effusion diagnosed in the second trimester: prenatal diagnosis and perinatal management:. Fetal Diagn Ther. In press
- 16) 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.
- 17) 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 ritodrine: Gynecol Obstet Invest 69: 193-196, 2010.
- 18) 高桑好一: インフルエンザ診療のポイント 妊婦への対応. これでわかる インフルエンザ診療のポイント. 57-65, 2010年12月発行、南江堂
- 19) 高桑好一: パンデミック H1N1 2009 の臨床像 産科. 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. 66-69, 2010年8月10日発行、医薬ジャーナル社.
- 20) 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.
- 21) 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.
- 22) 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) 高桑好一: 「妊娠と HIV 感染 -HIV 陽性男性、陰性女性夫婦に対する体外受精 - 胚移植の臨床応用を中心として」、ランチョンセミナー、第 51 回日本哺乳動物卵子学会、新潟、2010、5 月.
- 2) Takakuwa K, Watanabe A, Makino M, Kashima K, Tanaka K: Results of assisted reproduction techniques (ART) for HIV-1 discordant couples using washed sperm and the nested PCR method. International Symposium for Immunology of Reproduction 2010, Osaka, August 28-29, 2010.
- 3) 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

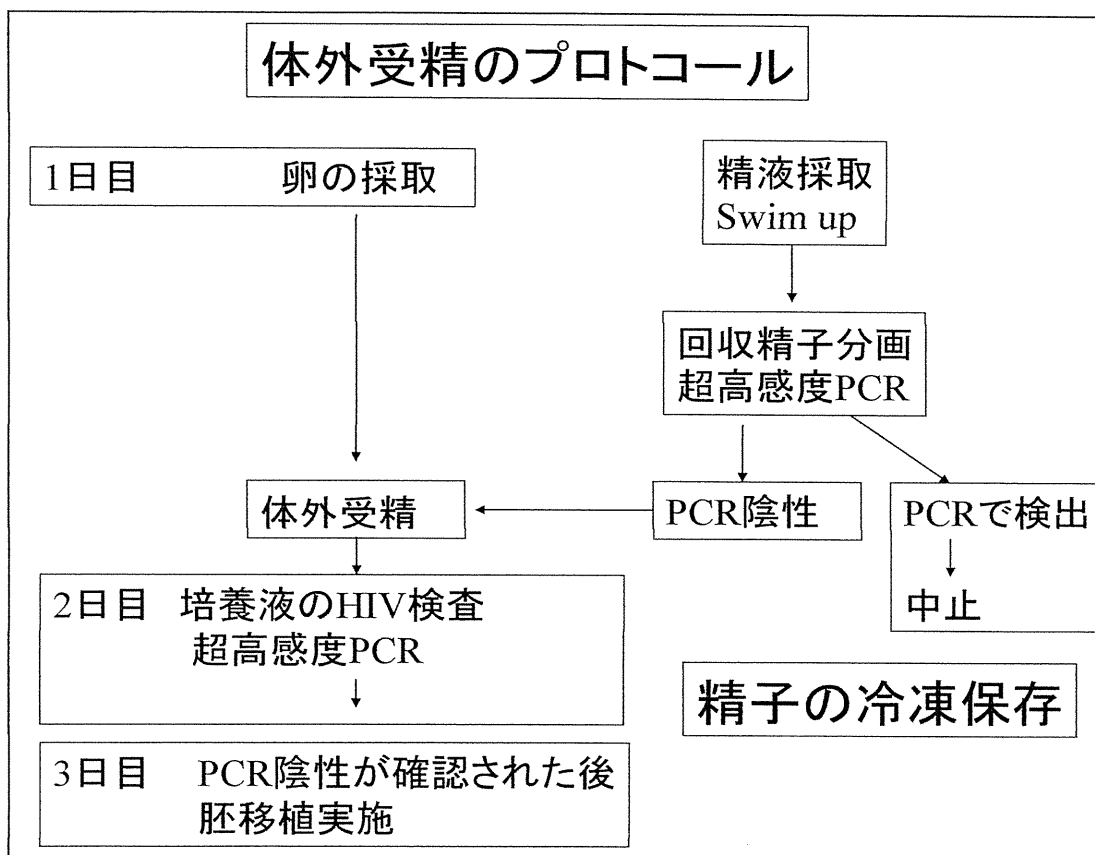


表1 HIV陽性男性、陰性女性夫婦に対する体外受精-胚移植と、一般不妊患者に対する体外受精-胚移植の成績の比較

HIV陽性男性、陰性女性夫婦に対する体外受精-胚移植の成績 一般不妊患者との比較				
	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%

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に伴い結婚して子供を望む夫婦が増えている。本研究班は、HIV 陽性男性と HIV 陰性女性の夫婦が挙児を希望する場合、精液から HIV を完全に除去し 100%安全に挙児可能な方法を開発し、生殖補助医療を実施してきた。しかし、最近 HIV 感染男性において抗 HIV 剤の内服により血液中の HIV RNA 量が低く抑制された場合は異性間の 2 次感染の危険は少なく、生殖補助医療の必要性が少ないとする意見も出てきた。HIV 陽性男性において精子の異常が高率に認められ、性交渉による妊娠の確率は低下すると推測され、さらに抗 HIV 剤の精子への影響も検討されていない。この研究において HIV 陽性男性の精液の検討を行い、HIV 感染や抗 HIV 剤の精子への影響を検討する。HIV 陽性男性から生まれた児の調査により HIV や抗 HIV 剤が児に及ぼす影響を検討する。今後抗 HIV 剤で血中 HIV RNA 量を抑制した場合の生殖補助医療の必要性についても検討する。

B. 研究方法

平成 23 年度までに受診した 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。生殖補助医療実施後に妊娠の有無にかかわらず女性の HIV 検査を行い、出産後に母子の HIV 検査を実施した。HIV 陽性男性から生殖補助医療により生まれた児の発育調査と家庭環境などを検討した。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 0.16%/年前後と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の検討を行った。

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。

平成 21 年度から平成 23 年度において受診した HIV 陽性男性は、血友病患者が 53 名、性感染者