

が104名であった。受診者の居住地については、東京44組、東京以外の関東甲信越53組、東海14組、近畿15組、中四国13組、九州19組、北海道5組、東北4組、北陸2組、国外9組であった。国外からは中国4組、米国2組、英国2組、ニュージーランド1組であった。在日の外国人はアジア系9組、アフリカ系6組、米国1組、英国1組などであった。

夫婦共にHIV陽性が7組相談に訪れた。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、夫は全員抗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。

平成21年度から平成23年度においてHIV陽性夫婦を産婦人科に依頼したのべ人数は、血友病患者35組、性感染者89組であった。精液処理を行ったのべ件数は、血友病患者53組、性感染者104組であった。

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。

#精液検査

194名のHIV感染男性の精液所見を検討した。全体の中央値(最低値~最高値)は、年齢35(20~58)歳、精子数(濃度)5800万(0~40700万)/ml、運動率40%(0~80%)、正常形態率29%(0~81%)、CD4数410(41~1481) / μ l、HIV RNA 60(0~300000)copies/mlであった。

精子数が2000万以下の精子減少症を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%)で高率に認めた。

精子の正常形態率が15%以下の異常は48名/145名(33%)で認められた。

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。

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。

#精子数減少群の検討

精子数が2000万以下の群(36名)は、年齢35.5(20~51)歳、精子数600万(0~2000万)/ml、運動率15%(0~80%)、正常形態率13.5%(0~42%)、CD4数416(65~1030) / μ l、HIV RNA 70(0~100000)copies/mlであった。

このうち、無精子症が7名認められ、7名中6名が抗HIV治療を受けていた。中央値(最低値~最高値)は、年齢37(20~51)歳、CD4数280(65~577) / μ l、HIV RNA 90(0~100000)copies/mlであった。

精子濃度減少と年齢、HIV RNA量との相関は認められなかった。

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。

#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。

抗HIV剤使用群の中央値(最低値~最高値)は、年齢35(20~58)歳、精子数5400万(0~40700万)/ml、運動率40%(0~75%)、正常形態率31.5%(0~81%)、CD4数398(41~1481) / μ l、HIV RNA <40(0~210000)copies/mlであった。

無治療群の中央値(最低値~最高値)は、年齢35(23~47)歳、精子数7000万(0~23400万)/ml、運動率45%(3~80%)、正常形態率31%(3~68%)、CD4数492(66~1216) / μ l、HIV RNA 6400(70~300000)copies/mlであった。

精子濃度が 2000 万/ml 未満であったのは、抗H I V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H I V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H I V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H I V剤を使用しており、有意に抗H I V群で無精子症が多かった。(p=0.003)

CD4 数の影響の検討

CD4 数が 400 未満/ μ l の群と 400 以上/ μ l の群に分けて比較検討した。

CD4 数 400 未満群の中央値 (最低値~最高値) は、年齢 36 (26~58) 歳、精子数 7800 万 (0~40700 万) /ml, 運動率 45%(0~71%), 正常形態率 26.5%(0~74%), CD4 数 300 (41~399) / μ l, HIV RNA <40 (0~210000)copies/ml であった。

CD4 数 400 以上群の中央値 (最低値~最高値) は、年齢 34 (23~49) 歳、精子数 5500 万 (100~25700 万) /ml, 運動率 40%(0~80%), 正常形態率 33%(2~81%), CD4 数 525 (400~1481) / μ l, HIV RNA 90 (0~300000)copies/ml であった。

#HIV RNA 量の影響の検討

HIV RNA 量が 1000 未満/ml の群と 1000 以上/ml の群に分けて比較検討した。

HIV RNA 量が 1000 未満群の中央値 (最低値~最高値) は、年齢 36 (25~58) 歳、精子数 6400 万 (0~40700 万) /ml, 運動率 40%(0~75%), 正常形態率 25%(0~81%), CD4 数 400 (41~1481) / μ l, HIV RNA <40 (0~720)copies/ml であった。

HIV RNA 量が 1000 以上群の中央値 (最低値~最高値) は、年齢 35 (23~47) 歳、精子数 6500 万 (100~23400 万) /ml, 運動率 46.5%(3~80%), 正常形態率 34.5%(3~68%), CD4 数 439 (60~1100) / μ l, HIV RNA 10000 (1000~300000)copies/ml であった。

CD4 数が高いと精子数が少なく、CD4 数が低いと正常形態率が低くなる傾向が認められた。HIV RNA 量が低いと運動率が低く、正常形態率が低くなる傾向が認められた。

生殖補助医療の選択について

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。その結果、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。

#HIV 陽性男性から生まれた児の発育調査

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%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。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。

男児の身長に関する中央値については、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。

男児の体重の中央値については、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。

成長曲線の検討において、男女とも日本人の子どもの平均身長、平均体重を上回る発育を示した。

7 歳未満の子どもの発達に関しては、全員運動・体・言語の発達で異常を認めなかった。

しかし、認知・認識力の発達調査において、2 歳の段階で 2 名に自閉的傾向を認め、6 歳になって 1 名アスペルガー病が疑われた。

7 歳以上の子どもの発達に関して、行動傾向・健康と医学ケア・行動傾向・言語の発達・数の発達・運動機能の発達・生活の発達・仕事、作業の発達・行動傾向について検討したが、全員で異常を認めなかった。

本研究に参加した夫婦の中で 2 名の HIV 感染血友病男性が死亡した。1 名は C 型肝炎の悪化で、もう 1 名は脳出血であった。

D. 考察

精液検査の結果、HIV 感染男性では、精子数が少なく、運動率が低く、正常形態率も低かった。精子数減少と年齢、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。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ことが疑われた。

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. 364:493-505, 2011) しかし、彼らの研究は抗 HIV 剤内服を早期に開始した群と遅く開始した群でコンドームを装着しながら異性間の 2 次感染の抑制効果を検討している。その結果で HIV 感染者夫婦が抗 HIV 剤を内服すればコンドームを付けずに挙児が可能としているわけではなく専門医の誤解も大きい。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った場合の 2 次感染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 と報告されている。しかし、今回の我々の検討では、HIV 感染男性の 70% 以上において精子の障害が認められており、男性不妊になっている場合や、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て 2 次感染の危険性が高くなることも懸念される。

本研究班の検討において、HIV 陽性男性と陰性女性の間で生殖補助医療を実施した結果、妻

も子も全員 HIV の 2 次感染がないことが確認された。また、今回の検討における HIV 陽性男性全員が、例えわずかでも妻に 2 次感染する危険性があるならばリスクを回避して、より安全で妊娠率の高い生殖補助医療を希望した。HIV 感染夫婦の挙児希望の相談に対して、どれだけ 2 次感染の危険性を下げれば医療従事者が性交渉による妊娠を勧めてもよいのか、あるいは医療従事者は深く関与せずあくまでも感染者夫婦の自己責任で決定すべきかなどが今後検討すべき課題は多い。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も問題になる。特に、男性の精子数や精子機能や精液中の HIV の感染性、女性の卵巣機能などによって多様で詳細な我が国のガイドラインの作成が求められている。

本研究班により生まれた児の調査では、子どもの身体的発育に関しては男女ともに身長、体重共に日本人の平均を上回っていた。これは、外国人の参加も影響している可能性が考えられた。精神発達の調査で、アスペルガーを含む自閉的傾向を示した児が 3 名 (95 名の中での回答者が分母) おり、全国平均の 2/1000 を上回った。HIV に感染した男性から生まれた子どもの発育調査はほとんどされていない。HIV 感染が精子や児に及ぼす影響や、抗 HIV 剤が精子の DNA や児に及ぼす影響も今までに殆ど検討されていない。本研究班では HIV 感染男性の精液を Percoll で遠心処理し、Swim up 法で運動精子を回収しており、ミトコンドリアが障害されて運動機能が障害された精子を排除していると推測される。今回の調査で生まれた子どもに自閉的傾向が認められたが、その原因が HIV 感染や抗 HIV 剤によるかどうか今後の検討が必要である。本研究班で実施している精液処理により、運動機能が良好で、正常形態の精子を選別していることが、その他の疾患を抑制しているかどうかなどについても今後の検討が必要である。

出産後、現在までに 2 名の夫が HIV 感染症/C 型肝炎が原因で死亡した。本研究班に参加する前に、夫の生命予後厳しいことを説明し、カウンセリングを繰り返し、夫婦の同意を確認して実施に踏み切った。本研究班の抱える課題として HIV 感染者の生命予後の問題がある。しかし、妻も出産を後悔しておらず、むしろ、子供がいなかったら一人では生きていけなかったと感謝の気持ちを表明している。本研究班で出産した親の問題として、生まれた子供に父親の病気や体外受精で生まれた経緯を話すべきかどうか悩んでいたり、夫の健康面を心配する意見も寄せられた。出産後の母子の検査で HIV 陰性を確認し、日常生活で父親から 2 次感染することはないと理解しているが、やはり心配で定期的に検査を受けて陰性を確認したいとの意見も寄せられた。出産したのちも児と両親のカウンセリングや医療相談が必要と考えられる。

回答者の半数以上から、居住地に近い医療機関での実施を求める要望が寄せられた。地方から通院する事の負担(金銭面、身体面)が大きいので、今後地元の病院でも実施して頂けるような体勢になれば、2 人目も考えられるのにとの意見が多かった。

仕事の調整や交通費などの問題で、思うように参加できない事情もあった。

本研究班に参加して挙児希望をかなえるかどうかに関しては、夫婦でとても悩み、話し合い、夫婦二人の意見が一致し、子供を授かったおかげで互いの信頼が以前以上に強くなったとか、夫の HIV 感染という夫婦の危機を乗り越えたなどの意見も寄せられた。

E. 結論

HIV 陽性男性と陰性女性の間で生殖補助医療を実施した結果、妻も子も全員 HIV の 2 次感染がなく、安全であることが確認された。一方、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。HIV 感染男性から生まれた児の身体的発育は良好であったが、自閉的傾向が強まる可能性があり、今後の追跡調査が必要である。

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 の改善を求めており、HIV 感染者から生まれる子どもも増えている。HIV 感染男性の精液所見を検討し、HIV 感染や抗 HIV 剤の影響を調べることは国際的に有意義である。さらに、HIV 感染者が挙児を希望する場合に、精液検査を行ったうえで、抗 HIV 剤により血中 HIV RNA 量がどれだけ低く抑制されたかによって、今後どのような挙児の方法を医療従事者が勧めるべきか国際社会での意義は大きい。HIV 感染者から生まれた子どもの検討は世界中で不十分で、HIV や抗 HIV 剤などが子どもに及ぼす影響は全く検討されていないので意義がある。

2) 今後の展望について

HIV感染者の精液中のHIV RNA, DNAと共にHIV感染能力を抑制できれば異性間性感染群だけでなく、同性間においても2次感染を低下させることが可能であり、海外では治療介入が検討されているが我が国では実施されていない。精液中のHIV RNA, DNA濃度と抗HIV剤濃度の測定を行い、精液中のHIVを効果的に抑制できる薬剤の組み合わせを検討する。その後、男性同性愛者群と異性間における2次感染防止への早期の治療介入を検討する。

また、抗HIV剤が精子に及ぼす影響は今までほとんど検討されておらず、児への影響の検討も必要である。昨年までの検討で、HIV陽性男性から生まれた子どもに自閉的傾向が高いことが疑われており追跡調査と精子の検討が必要である。

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。

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.

Kashima K, Takakuwa K, Suzuki M, Makino M, Kaneko S, Kato S, Hanabusa H, Tanaka K. Studies of assisted reproduction techniques (ART) for HIV-1-discordant couples using washed sperm and the nested PCR method: a comparison of the pregnancy rates in HIV-1-discordant couples and control couples. *Jpn J Infect Dis*. 2009 May;62(3):173-6.

AIDS Res Hum Retroviruses. 2009 Apr;25(4):387-94.

Progressive renal tubular dysfunction associated with long-term use of tenofovir DF. Kinai E, Hanabusa H.

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

C型肝炎/B型肝炎の治療. 花房秀次. みんなに役立つ血友病の基礎と臨床 p246-255:白幡聡 編集: 医薬ジャーナル社, 2009

雑誌

【Emergency 実戦ガイド】 疾患と対応 血液 血友病患者における出血
木内英(荻窪病院 血液科), 花房秀次
内科(0022-1961)103 巻 6 号 Page1620-1626(2009.06)

【小児感染症のすべて】 感染症の種類別に小児感染症を考える 小児の HIV 感染症
木内英(荻窪病院 血液科・小児科), 花房秀次
化学療法の領域(0913-2384)25 巻増刊 Page995-1005(2009.04)

【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 卷 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 卷 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 卷 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 卷 9 号 Page2061-2072(2011.09)

【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

花房秀次

: 小児科診療(0386-9806)73 卷 11 号 Page1994-2000(2010.11)

小児の HIV 感染症

花房秀次

小児科診療 73 卷 11 号 1994-2000, 2010

小児の HIV 感染症

木内英, 花房秀次

東京小児科医会報(0287-3613)28 卷 3 号 Page56-63,2010

HIV 感染者の生殖補助医療

花房秀次

感染・炎症・免疫(0387-1010)39 卷 1 号 Page52-55,2009

学会

日本エイズ学会

2010年

我が国の血友病 HIV 感染者の特徴と脳血管障害

花房秀次, 木内英, 石倉未緒, 和田育子, 小島賢一

: 日本エイズ学会誌(1344-9478)12 巻 4 号 Page400(2010.11)

HIV 感染者におけるシスタチン C と HIV RNA の関係

木内英, 小島賢一, 和田育子, 石倉美緒, 花房秀次

: 日本エイズ学会誌(1344-9478)12 巻 4 号 Page389(2010.11)

2009年

HIV 感染者の腎機能評価とシスタチン C の有用性に関する検討

木内英, 小島賢一, 和田育子, 石倉美緒, 花房秀次

日本エイズ学会 (2009.11)

多剤耐性 HIV 感染者における Raltegravir 長期使用における有効性と安全性の検討

花房秀次, 木内英, 和田育子, 石倉未緒, 小島賢一

日本エイズ学会(2009.11)

HIV/AIDS の現状と HIV 陽性夫婦の生殖補助医療 HIV 完全除去精子を用いた体外受精、

夫婦共に HIV 陽性の場合における superinfection 防止、母子感染防止対策など

花房秀次(荻窪病院 血液科)

臨牀と研究(0021-4965)86 巻 9 号 Page1219(2009.09)

第 VIII 因子製剤固有のインヒビター価測定法の検討

荒木辰也(化学及血清療法研究所 蛋白製剤研究部), 金栗沙耶香, 友清和彦, 石原範之, 中垣

智弘, 木内英, 花房秀次

日本血栓止血学会 (2009.04)

患者・家族を対象とした血友病在宅治療状況調査の成績

福武勝幸, 白幡聡, 高松純樹, 竹谷英之, 花房秀次, 日笠聡, 藤井輝久, 松下正, 松本剛史,

三間屋純一, 大西赤人, 血友病在宅治療支援プログラム委員会

日本血栓止血学会 (2009.04)

後天性血友病 A の免疫抑制療法ガイドライン案

日笠聡(日本血栓止血学会), 新谷憲治, 花房秀次, 毛利博, 天野景裕, 岡敏明, 酒井道生, 白

幡聡, 高田昇, 高松純樹, 瀧正志, 竹谷英之, 田中一郎, 福武勝幸, 藤井輝久, 松下正, 三間屋純一, 三室淳, 吉岡章, 嶋緑倫, 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 (2009.04)

後天性血友病 A の止血療法ガイドライン(案)

松下正(日本血栓止血学会), 酒井道生, 藤井輝久, 家子正裕, 新谷憲治, 山崎雅英, 天野景裕, 瀧正志, 岡敏明, 白幡聡, 高田昇, 高松純樹, 竹谷英之, 花房秀次, 日笠聡, 福武勝幸, 田中一郎, 三間屋純一, 三室淳, 吉岡章, 嶋緑倫, 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 (2009.04)

後天性血友病 A の診断ガイドライン案

天野景裕(日本血栓止血学会), 瀧正志, 家子正裕, 山崎雅英, 岡敏明, 酒井道生, 白幡聡, 高田昇, 高松純樹, 竹谷英之, 田中一郎, 花房秀次, 日笠聡, 福武勝幸, 藤井輝久, 松下正, 三間屋純一, 三室淳, 吉岡章, 嶋緑倫, 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 (2009.04)

国際学会

2011 年

X X III ISTH2011, Kyoto Jul23-28, 2011

FINE (FEIBA INHIBITOR ENTRY) POST-AUTHORIZATION SAFETY SURVEILLANCE (PASS) : CAPTURING LONG-TERM EXPERIENCE IN JAPANESE INHIBITOR SUBJECTS UNDER ROUTINE CLINICAL MANAGEMENT
Satoshi Higasa¹), Kagehiro Amano²), Hideji Hanabusa³), Shinji Muto⁴), Tadashi Matsushita⁵), Midori Shima⁶), Teruhisa Fujii⁷), Michio Sakai⁸), Study Group FINE⁹)

THE POST-AUTHORIZATION SAFETY SURVEILLANCE (PASS) PROGRAM CONFIRMED ACTUAL CLINICAL SAFETY AND EFFICACY OF RECOMBINANT PLASMA/ALBUMIN-FREE METHOD FACTOR VIII IN JAPAN
Katsuyuki Fukutake¹), Hideji Hanabusa²), Masashi Taki³), Tadashi Matsushita⁴), Midori Shima⁵), Akira Shirahata⁶), The Advate PASS Study Group⁷)

CLINICAL EXPERIENCE OF PREVIOUSLY UNTREATED PATIENTS WITH ANTIHEMOPHILIC FACTOR (RECOMBINANT), PLASMA/ALBUMIN-FREE

METHOD FROM POST-AUTHORIZATION SAFETY SURVEILLANCE IN JAPAN

Masashi Taki¹⁾, Hideji Hanabusa²⁾, Katsuyuki Fukutake³⁾, Tadashi Matsushita⁴⁾, Midori Shima⁵⁾, Akira Shirahata⁶⁾, the Advate PASS Study Group⁷⁾

PROSPECTIVE ADVATE IMMUNE TOLERANCE REGISTRY (PAIR) IN JAPANESE HEMOPHILIA A PATIENTS WITH INHIBITORS: AN INTERIM REPORT

Tadashi Matsushita¹⁾, Hideji Hanabusa²⁾, Katsuyuki Fukutake³⁾, Masashi Taki⁴⁾, Midori Shima⁵⁾, Akira Shirahata⁶⁾, the Advate PASS Study Group⁷⁾

CLINICAL PHARMACOLOGICAL STUDY OF A PLASMA-DERIVED FACTOR VIIA AND FACTOR X MIXTURE (MC710) IN HAEMOPHILIA PATIENTS WITH INHIBITORS - PHASE I TRIAL -

Tadashi Matsushita¹⁾, Akira Shirahata²⁾, Katsuyuki Fukutake³⁾, Jun-ichi Mimaya⁴⁾, Junki Takamatsu¹⁾, Midori Shima⁵⁾, Hideji Hanabusa⁶⁾, Hideyuki Takedani⁷⁾, Yoshifumi Takashima⁴⁾, Akio Tawa⁸⁾, Satoshi Higasa⁹⁾, Noboru Takata¹⁰⁾, Michio Sakai²⁾, Kiyoshi Kawakami¹¹⁾, Yasuo Ohashi¹²⁾, Hidehiko Saito¹³⁾

STUDY ON THE METHOD FOR ASSAYING FVIII INHIBITOR TITER USING FVIII CONCENTRATE FOR THE NEUTRALIZATION THERAPY

Tatsuya Araki¹⁾, Kohei Hashimoto¹⁾, Sayaka Oonishi-Kanakuri¹⁾, Noriyuki Ishihara²⁾, Kazuhiko Tomokiyo¹⁾, Takayoshi Hamamoto¹⁾, Tomohiro Nakagaki¹⁾, Hideji Hanabusa³⁾

ヒト精子凍結保存の最適化に関する研究

東京歯科大学市川総合病院産婦人科 講師 兼子智

要旨

ヒト精子凍結保存の簡便化を目的として液体チッソ直接投入法による凍結保存を試みた。凍結保護物質として 150mM DMSO、150mM エチレングリコール、50mM トレハロースを用いた時、最も高い融解後蘇生率が得られた。さらに凍結時と融解時にそれぞれ最適な温度変化率が得られる可変型 2 重腔チューブの容器について、医療用 2 次元バーコード管理が可能なチューブを採用し、取り違え防止に配慮した。

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。ヒト精子凍結保存は約 50 年の歴史を有しており、グリセリンを凍結保護剤とする保存液が汎用され、精子凍結保存に関する手法はすでに完成されたものと考えられてきた。一方、精子凍結保存に際して、融解後蘇生率に個体差が存在することは広く知られており、

精液所見不良例では融解後精子蘇生率 (融解後における運動精子回収率) の低い場合が多い。本研究の対象となる HIV 陽性、抗 HIV 薬投与例では精液所見不良例が多く見られ、凍結保存精子臨床応用のボトルネックとなっている。本研究は、ヒト精子凍結保存の最適化を検討した。

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。20mM HEPES 緩衝化 Hanks 等張化 90% Percoll 液に凍結保護物質として 150mM DMSO、150mM エチレングリコール、50mM トレハロースを添加したものを遠心媒体とした。遠心分離後、沈澱した精子 (50-100 ml) は底面に 2 次元バーコードを刻印した容器に充填、閉封した後さらに 2.0ml 容量のセラムチューブに入れて閉封した。これを直ちに液体チッソ中に投入して凍結を行った。融解時は、容器を液体チッソタンクから取り出し、直ちに外容器を開封し、取り出した容器を 37°C の温湯中に浸漬して融解した。

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

凍結保護剤とともに融解後等張化保護剤を使用する精子凍結保存システム (平成 21 年度)

凍結保存ヒト精子は、凍結、融解そして保護剤除去の過程で細胞傷害を受ける。融解直後に高い蘇生率を示した精子であっても、保護剤除去に伴う浸透圧低下が細胞膜を傷害し、運動能低下の一因となる。これは、光学顕微鏡レベルでは尾部先端の浮腫として観察される (図 1)。

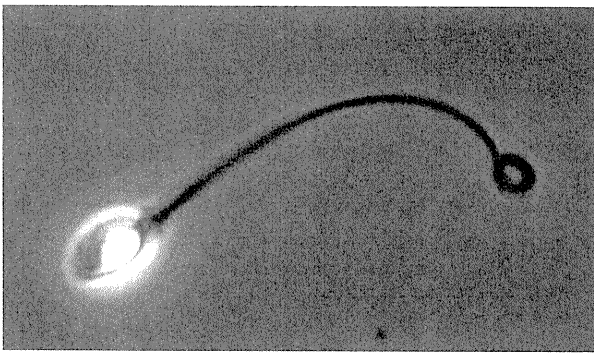


図 1 凍結融解後の精子を低コロイド浸透圧培養液で希釈した際に見られる尾部浮腫

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が明らかになり、融解後の等張化保護剤が不可欠であった。凍結保護剤 (500mM DMSO、500mM エチレングリコール、4%ヒドロキシエチルスターチ (HES)、0.2M トレハロース、0.1mM ペントキシフィリン) と精子懸濁液を等量混合して 10 分間平衡化した後、PCR 容器を使用して液体チッソ蒸気中で緩速凍結した。融解は 37°C の

微温湯中で行い、最終的に等張化保護剤 (4% HES、0.1M トレハロース) を用いて 5 倍希釈し、運動率ならびに精子尾部の浮腫を観察した。

凍結融解前後の運動率は、各々 $71 \pm 7.8\%$ 、 $55 \pm 6.0\%$ (蘇生率 $76 \pm 3.7\%$) であった。ハンクス液を用いて凍結保護剤除去を行うと、運動率は $12 \pm 3.3\%$ へと大幅に低下し、不働化した精子の尾部に浮腫を認めた。一方、等張化保護剤を使用すると尾部の浮腫を抑制でき、 $47 \pm 8.2\%$ の精子が運動性を保持していた。精子凍結保存において、凍結、融解過程よりもむしろ最終的な等張化操作が最大の障害因子であることを認めた。

等倍濃度の保護剤を予め添加した担体を用いて精子を洗浄濃縮し、凍結保存する方法の開発 (平成 21、22 年度)

従来、精子凍結保存は凍結保護剤と等量混合した精液または洗浄精子を小容器に充填し、凍結速度調節するため液体チッソ蒸気中で凍結する方法が採られてきた。融解は、取り出した容器を 37°C の温湯中に浸漬して行う。前項は、一般的な方法で凍結を行ったが、本項では tube in tube 型の変型 2 重腔容器を考案し、その有用性を検討した。図 2 に容器形状を示した。

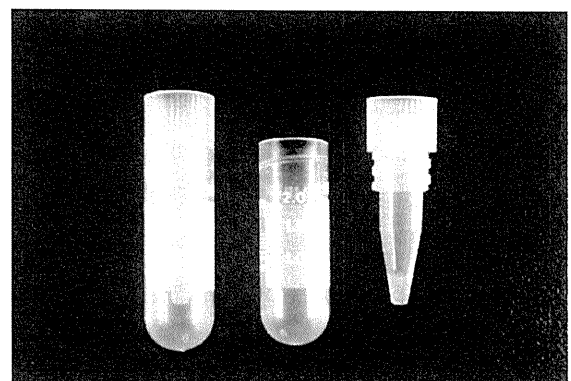


図 2 変型 2 重腔凍結容器

凍結保護剤処方を検討した結果、Hanks 等張化 80% Percoll 液に 150mM DMSO、150mM エチレングリコール、50mM トレハロースを添加した時、最も高い蘇生率が得られた。遠心分離は、400xg、30 分間行った。凍結は、すでに報告した tube in tube 型の可変型 2 重腔容器の内容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。

本法においても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過程において、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溶液では前項で述べたのと同様に運動能低下とともに尾部細胞膜の浮腫が生じ、その防止にはコロイド浸透圧を付加した等張化保護剤が有用であった。コロイドとして、糖由来の高分子とともにタンパク質（アルブミン等）の有効性が高いことを認めた。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同様の効果が得られたが、HIV を対象とする場合は、血清の使用は避けるべきである。

凍結容器管理システムの評価(平成 23 年度)

これまで使用した PCR 用チューブを用いる可変型 2 重腔容器（図 2）は、氏名識別はマジックインキ等で内外容器に氏名、凍結日などを記載した。図 3 は今回検討した底部に 2 次元バーコードを刻印した容器を内容容器として用いるシステムを示した。本法では外容器に氏名、凍結日等の患者情報と 1 次元バーコードを印刷したシールを貼付する。外容器の 1 次元バーコードに関しては、試験したソフトウェアに含まれていたため使用したが、実際には不要と考える。内容容器は底部のバーコードと患者情報を手書きで

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。エクセルまたは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る。また実際に試験運用を行った結果、ファイルメーカーを用いて当該するチューブが収納されている液体チッソタンクの番号、ラック番号、ケーン番号を検索し、チューブを取り出すが、カラーキャップを視認することにより素早く取り出すことが可能となり、他の検体の温度上昇を防ぐことができた。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、個人情報取り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。図 4 は同時に検討した培養シャーレのバーコード管理案を示している。HIV 除去精子を用いる ART では、培養操作が必須である。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である。ここではその一部であるシャーレ管理を示した。現在、

data matrix 型バーコードは粘着紙に印刷して、それをシャーレに貼付する方法が採られる。汎用される QR コードではすでに全生産量に対して連番を印刷したシャーレが市販されている。さらには IC チップを搭載した情報トレーサーシールも市販されている。また 128bit の LSI を搭載した 1mm 角のチップも開発されている。これは耐熱性であり、ポリスチレン製シャーレを溶融形成する際にシャーレ内に包埋することが可能である。今後、どのような管理法を導入したら最も簡便かつ高精度に臨床応用が出来るかを議論する必要がある。

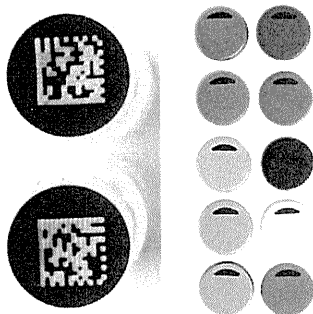
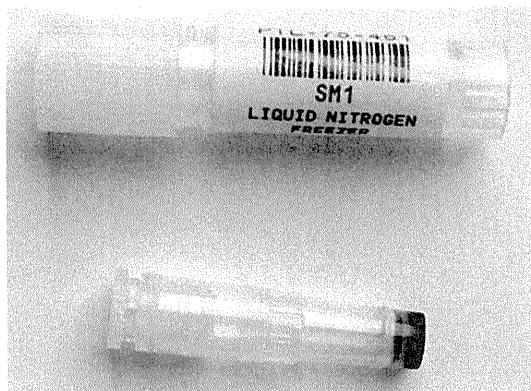


図3 バーコード刻印容器を内容器とする可変型2重腔チューブによる精子凍結保存

凍結容器の精子蘇生率に及ぼす影響(平成 23 年度)

同一検体を 50 μ l ずつ2種の容器に充填して凍結保存を行った。液体チツソから容器を取り出し、直ちに外容器を開封して内容器を微温湯に

浸漬した。5 分後に運動率を観察して、両者の融解後運動率を比較した。

射精精液 (6600 \pm 2100 \times 10⁴ 精子/ml、運動率 52 \pm 12%、n=6) から調製した洗浄精子の運動率は 86 \pm 48.5%であった。熱伝導性の高い PCR チューブとバーコード刻印チューブを内容器とした場合、融解後運動率は各々64 \pm 6.3%、60 \pm 5.4%と両者に有意な差を認めず、今回検討したバーコード刻印チューブを内容器としても問題ないことが示された。

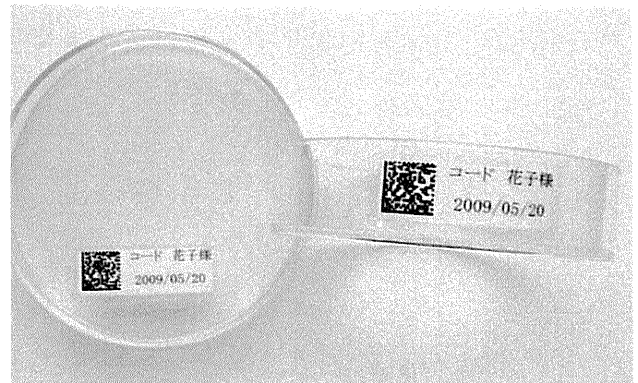


図4 培養用シャーレにおけるバーコード識別システム

D. 考察

凍結保護剤としてグリセリンが汎用されてきたが、低分子両親媒性物質であるエチレングリコール、DMSO は細胞浸透性が高く、凍結保護作用機序が異なる。エチレングリコール、DMSO の共沸混合物を組み合わせた時、融解直後の残存運動率は最も高かった。

凍結、融解した精子を ART に使用するためには、保護剤を除去して培養液に置換しなくてはならない。一般的な胚培養液は塩溶液に少量のアルブミンを添加したものが多い。これらの培養液は、コロイド浸透圧が低く、希釈により外環境の保護剤濃度が低下すると、この過程で細胞浮腫、細胞膜の障害が誘起された。すなわち、凍結保存における凍結、融解、最終的な保護剤

除去の段階の内、最後の保護剤除去が最も細胞障害性が高いことが明らかとなった。胚凍結保存における融解時は、高張ショ糖溶液のドロップ内を順次移していく手法が採られるが、精子においても同様なプロセスが重要である。現在、高分子糖類を添加することにより浮腫抑制効果が得られた。

本研究は、tube in tube 型の可変型 2 重腔容器を用いたヒト精子凍結法の簡便化とともに、臨床応用において不可欠な検体識別による取り違い防止システムの最適化を行った。特に本研究では、精液提出、精子分離による HIV 除去とその検査、ART 施行、最終的な胚移植に至る複雑な検体処理、検体識別が行われ、総合的なセキュリティ対策が不可欠である。われわれは、ヒトが識字することによる確認とバーコードによる機械的識別を組み合わせることにより高度な識別を提案した。最終的にはこれを利用して児の長期予後調査に至るトレーサビリティの構築を目指すべきである。

E. 結論

HIV 除去ヒト精子凍結保存の最適化を目的とし、1. 凍結保護剤の最適化、2. HIV 除去を目的とした密度勾配遠心分離担体に凍結保護剤を添加し、遠心分離時間中に保護剤の細胞内浸透、平衡化を行う工程数減少、3. 融解後に精子から保護剤を除去過程における細胞保護、4. 臨床応用において検体識別による取り違い防止システムの最適化を行った。今後、積極的な臨床応用が期待される。

G. 研究発表

学会発表

原 唯純、兼子 智、石川 博通、高松 潔、佐藤 博久、コロイド浸透圧を考慮したヒト精子凍結、融解システムの構築、第 140 回、日本生殖医学会関東地方部会、2009

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）
なし

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策 研究事業）

21-23 年度総括研究報告書

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 swim up 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事が示された。さらに、水平・垂直感染をさらに低下させるための受精卵培養液の HIV-1 遺伝子検出については、夫由来と考えられた症例がまだ一例出はあるが存在することから、今後検討すべき課題であると考えられた。

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。

そこで本研究期間に我々は、第一に 2002 年から 2009 年までの洗浄による

精子回収率、洗浄後精液と受精卵培養液の PCR 検査結果を解析することにより、我々の行っている高感度 HIV-1 検出系の効率を検討した。第二に、本研究の研究期間である 2009-2011 年度の顕微授精による治療成績を検討した。

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) 精液調整法・保存法および 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(図1, 図2, 図3)、得られた精子浮遊液をまず2分し、同時に同じ精液調整を開始した。これにより、提出された検体が調整後にもHIV陽性となり、再提出をしなければならぬという自体を防ぎ、また二つのラインともに陽性の場合には重度の精子への結合を考慮するなど、付加的情報を得ることを試みた。

各ラインの精液検体は、それぞれ調整後にさらに精子浮遊液を二分し、その一方を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。

なお、HIV感染精子浮遊液を精液保存容器の液体窒素に直接接触させることは、理論的には容器内でのHIV汚染拡大につながる可能性があるため、検査結果がHIV陰性と判明するまでは精子浮遊液は液体窒素蒸気を用いた保存タンク内で1-2ヵ月保存し、陰性であることが判明してから長期保存用の液体窒素容器に移している。

ART治療はlong法あるいはantagonist法による排卵誘発を行い、全例顕微授精を行った。このとき、移植前に受精卵培養液について、洗浄精子浮遊液に用いたと同様の検出系を用いて、HIV-1遺伝子の有無を確認した(図4)。

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) 精液調整の精子回収効率、およびHIV-1検出系の特異度に関する検討

2002年1月から2010年12月までに165症例のHIV-1感染男性に対し精液調整を行い、調整前の平均精子濃度・平均精子運動率は各々 $4803 \pm 2423 \times 10^4/\text{ml}$ 、 $49 \pm 21\%$ 、163症例(98.8%)で運動精子を回収できた。このうちHIV-1陽性と判断された5検体(3.1%)のうち3検体でPCR産物塩基配列解析を行い、うち2例は夫血液中ウイルス塩基配列と一致した(表2-1, 表3)。

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(表2-2)、うち5周期でPCR産物の塩基配列確認を行ったところ、1例では夫血液のウイルス塩基配列と一致した(表4)。

これまで通算で出生児50例をえることができ、全ての妊娠分娩例で母体・児への感染例は1例も認められなかった。

1例のG6PDdeficiencyが認められた他は、児の異常を認めていない。(表5)。

2) 2009-2011 年度の臨床成績

採卵・新鮮胚移植については、2009年4月より2012年3月までの期間、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

精液から精子調整法(semen processing)、具体的には密度勾配遠心法あるいはswim-up法を用いてウイルスを可及的に除去、調整した精子浮遊液を用いて人工授精または体外受精・顕微授精を施行することによって児をえる治療法が従来より行われている。この方法は自然性交による妊娠では4%程度に起こるといわれている夫婦間の水平感染を防ぎながら、健常児を得ることが出来る方法として

普及しつつある。

しかし、世界中で行われているこの方法も、詳しく分類するといくつかの点で治療拠点毎に違いが見られる。その主な違いは、精液調整法と、HIV陰性を確認するためのHIV検出系、及びその精度管理である。

1) 精液調整法

精液調整法については、浮遊ウイルスやHIV感染単核球の除去に密度勾配遠心法が有効であることはもちろんであるが、初期の報告からこの方法だけでは完全にウイルスを除去する事は出来ず、感染性が残ってしまう事が明らかになっている。そのため、ほとんどの施設が密度勾配法にswimup法を組み合わせるか、あるいはswimup法単独でウイルスを除去する方法をとっている。しかしながら精子の運動性が低い症例では、精子の運動性に大きく依存している密度勾配法やswimup法を施行する間に、十分な量の回収精子が得られなくなる症例も出現することになる。

我々は、独自に開発した連続密度勾配法とswimup法の組み合わせによって、高い回収率で妊孕性を持つ運動精子を回収可能であることを少数例の検討から報告してきたが、今回の165症例の解析結果より、乏精子症、精子無力症を含むこれらの症例から、98.8%という高い確率で運動精子を回収できた。これら精子の妊孕性については、本研究の研究期間3年間におこなった顕微授精の全症例において、新

鮮胚で胚移植あたり生児獲得率 14%、胚あたり着床率 17.5%、凍結胚において胚移植あたり妊娠率 25%、胚あたり着床率 23%と比較的良好な成績を得ることが出来たことから、少なくとも通常の顕微授精症例に比較して、精子調整操作があきらかに妊孕性を低下させることはないと考えられる。

2) HIV 検出系

HIV 検出系についても、様々なシステムが報告されている。初期の p24 抗原を用いた抗原タンパクを標的とする検出系は、現在ではほとんどの施設で PCR を用いた系によって置き換えられているが、PCR の感度・特異度ともに、どこまで徹底的に検査を行うか、について若干の違いが見られる。これまでの報告を見る限り、調整した精子浮遊液を検体として、各施設が独自に精度管理を行う PCR 法によって検出を行う施設が圧倒的に多い。

我々は、あらかじめ患者毎に 1copy の HIV を検出可能な nestedPCR 検出系を設定し、これを調整精子浮遊液だけでなく、顕微授精後の受精卵培養液についても HIV 有無の check を行ってから胚移植を行っている。

PCR プライマーは変異の多い HIV ウイルスの constant region に設定しているので、これまでほとんどの患者に共通のプライマーが有効であったが、一例、夫が日本人でない男性について、このプライマーが反応せず、あらたにプライマーの設定、および nestedPCR 系の感度・特異度の検定

を余儀なくされた症例もあった。

nested-PCR 系は非常に高い特異度で、高感度に HIV ウイルス遺伝子の有無を解析可能であるが、その高い感度故に、いつも陽性コントロールに使用した HIV 遺伝子配列の混入による false-positive の危険をはらんでいる。実際、これまで何度か精子浮遊液あるいは受精卵培養液の HIV が陽性となり、顕微授精や胚移植を中止せざるを得ないことがあった。しかし、その危険性はこれまで運動精子を回収できた 163 症例中 5 症例 (3.0%)、受精卵培養液 233 例中 8 例 (3.4%) と、いずれも 5%以下であり、許容できる範囲であると考えられた。

さらに、調整精子浮遊液で 2 例の夫由来と考えられる遺伝子配列が検出されたことは、この検出系の感度が十分高いことを示している。

受精卵培養液の HIV 検査は、理論的には精子に結合したウイルスが顕微授精の際に卵子に持ち込まれることが有り得ることや、体外受精・顕微授精後に受精卵中にウイルス様粒子が電子顕微鏡による検索で照明されていることから、理想的なことを考えれば必要である。ただ、顕微授精の際に卵子内に持ち込まれたウイルスが、胚盤胞までの時期に細胞外の培養液中に放出されるかどうかについては報告がなく、培養液の検査そのものの必要性を疑問視する意見もある。しかし、今回の解析により、一例ではあるが夫遺伝子配列と一致する遺伝子配列が検出されたことは、少なくとも

受精卵培養液の HIV 遺伝子検査をこれからも続ける価値があることを示していると考えられた。

さらにこのような nested-PCR による高感度 HIV 検出系では、検査をする技師の習熟度が偽陽性例発生防止に大きく貢献していることが、技師の雇用期間が 3 年目に入った平成 23 年度には一例もこのようなテクニカルエラー（もちろん高感度検出系では一定の確立で発生することはやむを得ないのであるが）が発生していないことを考慮すると、明らかである。今後は、これらのノウハウをどのように普及させていくかについても、検討を進めるべき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

能である事が示された。さらに、水平・垂直感染をさらに低下させるための受精卵培養液の HIV-1 遺伝子検出については、夫由来と考えられた症例がまだ一例出はあるが存在することから、今後検討すべき課題であると考えられた。

F. 研究発表

Osamu INOUE, Naoaki KUJI, Tomoko FUKUNAGA, Seiji OGAWA, Kana SUGAWARA, Mitsutoshi YAMADA, Toshio HAMATANI, Hideji HANABUSA, Yasunori YOSHIMURA and Shingo KATO. Processing of semen from an HIV-1-positive male and its use in the IVF-ICSI procedure -clinical efficacy. 27th Annual Meeting of the European Society of Human Reproductoin and Embryology, Stockholm, Sweden, 3-6 July, 2011.