

分担研究報告



抗 HIV 療法のガイドラインに関する研究

研究分担者： 鯉渕 智彦（東京大学医科学研究所附属病院 感染免疫内科）
 研究協力者： 今村 顕史（がん・感染症センター都立駒込病院感染症科）
 瀧永 博之（国立国際医療研究センター病院エイズ治療開発センター）
 吉野 宗宏（国立病院機構姫路医療センター 薬剤科）
 古西 満（奈良県立医科大学 感染症センター）
 立川 夏夫（横浜市立市民病院 感染症内科）
 外川 正生（大阪市立総合医療センター 小児救急科）
 永井 英明（国立病院機構東京病院 呼吸器科）
 藤井 毅（東京医科大学八王子医療センター）
 村松 崇（東京医科大学 臨床検査医学講座）
 山元 泰之（東京医科大学 臨床検査医学講座）
 四柳 宏（東京大学医学部 感染症内科）

研究要旨

最新のエビデンスに基づいて「抗 HIV 治療ガイドライン」を改訂し、科学的に最も適切で、かつ日本の現状に即した治療指針を提示することを目的として研究を施行した。HIV 感染症の診療経験が豊富な国内の先生方に改訂委員に参画して頂き、治療開始基準や治療推奨薬の改訂を中心に海外のガイドラインやエビデンスを基本としながら、国内の事情をも考慮して合理的な考え方を提示するガイドラインとして充実を図った。また、推奨処方エビデンスとなる臨床試験を掲載した web サイトには、RPV（リルピビリン）と DTG（ドルテグラビル）に関する計 3 つの臨床試験データを新たに追加した。

研究目的

「抗 HIV 治療ガイドライン」は毎年、最新のエビデンスに基づいて、科学的に適切な治療指針を提示することを目的として作成されてきた。平成 10 年度に初めて発行された後、厚生労働科学研究の一環として年 1 回の改訂が行われてきたが、平成 21 年度から「HIV 感染症及びその合併症の課題を克服する研究」班のなかでガイドライン作成を行うこととなった。同研究班が別に作成する「HIV 診療における外来チーム医療マニュアル」が現場の実践的な手順を解説・提唱するのと相互に補完し合って、国内の HIV 診療に役立ててもらえるよう意図している。国内の HIV 感染者数・AIDS 患者報告数は年間 1500-1600 人で推移し、減少傾向にはない。HIV 診療を行う医師および医療機関の不足も懸念される中、診療経験の少ない医師でも本ガイドラインを熟読することで、治療方針の意思決定が出来るように考慮して作成した。

初期の抗 HIV 治療ガイドラインの作成は米国 DHHS (Department of Health and Human Services)

などの海外のガイドラインを日本語訳する作業が主であった。しかし、薬剤の代謝や副作用の発現には人種差があり、また、薬剤の供給体制も日本と諸外国では必ずしも同じではない。したがって、わが国の状況に沿った「抗 HIV 治療ガイドライン」を作成することは、きわめて重要で意義のあることと考えられる。

研究方法

① 上記の目的を達成するために、改訂委員には、国内の施設で HIV 診療を担っている経験豊富な先生方に参加していただく方針とした。今年度は 12 人の委員で改訂作業を行った。毎年 2-3 月に開催される Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI) meeting までに発表される HIV 感染症の治療や病態に関する新たな知見を、主要英文誌や内外の学会から収集した。

② 平成 22 年度から公開していた初回治療の推奨処方エビデンスとなる臨床試験の web サイトに関し、より閲覧者の利便性を図るため、新たな臨床試験結果の収集を行った。

③ 公表された情報のみを研究材料とするため、倫理面への特別な配慮は必要ない。

研究結果

① 治療ガイドラインにおける重要な役割は、最新のエビデンスに基づいた治療開始基準と治療推奨薬を提示することであるが、今年度はどちらにも大きな改訂があった。まず、2015年7月に発表されたSTRAT試験の結果に基づき、治療開始基準に関しては、米国、ヨーロッパおよびWHOなど主要なガイドラインでCD4数に関わらずすべてのHIV感染者に治療開始を推奨すると記載された。これまでは治療開始基準の目安としてCD4数が挙げられており、臨床の場面においてもCD4数やウイルス量を見ながら経過観察をする場合も見られたため、この変化は今後の診療に大きく影響を及ぼし得ると考えられる。しかし、各ガイドラインでは推奨の強さ（程度）については多少の違いが見られ、START試験の解釈の仕方や各地域の実情を反映したものと考えられる。本ガイドラインで図1のような治療開始基準の目安とした。

1. AIDS発症していない場合

(1) CD4陽性Tリンパ球が $500/\mu\text{L}$ より多い

治療を開始してよいが次の点に注意する(BI)

抗HIV療法は健康保険の適応のみでは自己負担は高額であり、医療費助成制度(身体障害者手帳)を利用する機会が多いので、主治医は医療費助成制度(身体障害者手帳)の適応を念頭に置き、必要であれば治療開始前にソーシャルワーカー等に相談するなど、治療は慎重に開始することが求められる。

(2) CD4陽性Tリンパ球が $500/\mu\text{L}$ 以下 治療を開始する(AI)

2. AIDS発症している場合(注1,2) 治療を開始する(AI)

注1: エイズ指標疾患が重篤な場合は、その治療を優先する必要がある場合がある。
注2: 免疫再構築症候群が危惧される場合は、エイズ指標疾患の治療を優先させる。

図1 抗HIV薬治療の開始時期の目安

推奨される組み合わせ	代替の組み合わせ
EVG/cobi/TDF/FTC (AI) ^{1,2}	EFV + TDF/FTC (BI) ⁵
DTG/ABC/3TC (AI) ^{2,3}	EFV + ABC/3TC (BI) ^{3,5}
DRV+rtv + TDF/FTC (AI)	ATV+rtv + TDF/FTC (BI) ⁴
RAL + TDF/FTC (AI)	ATV+rtv + ABC/3TC (BI) ^{3,4}
DTG + TDF/FTC (AI)	DRV+rtv + ABC/3TC (BI) ³
RPV/TDF/FTC (BI) ^{2,4}	RAL + ABC/3TC (BI) ³

注1) ABC/3TC, RPVは血中HIV-RNA量が 10 万コピー/mL未満の患者にのみ推奨。ただし、DTG/ABC/3TCはその限りではない。

注2) RAL以外はすべてQD。

注3) 以下の薬剤は妊婦にも比較的安全に使用できる(DHHS perinatal guidelines 2015): TDF/FTC, ABC/3TC, DRV+rtv, RAL, ATV+rtv。

図2 初回治療として選択すべき抗HIV薬の組み合わせ

日本の医療費助成制度(身体障害者手帳)の利用を考慮して、必要であればソーシャルワーカーなどと相談することを促す内容とした。

初回治療の推奨薬は昨年度の本ガイドラインでは12通りであった。日本人に対する治療成績が蓄積されてきたことや世界のガイドラインを参考として、図2に示すような推奨薬および代替薬とした。

EFVとATV rtvを含む組み合わせは今年度より代替薬となった。その理由はEFVは中枢神経系の副作用(長期使用による自殺率増加への懸念)、ATV rtvでは長期使用での忍容性低下(黄疸、胃痛症状の増加)である。

その他、各項目で最新の情報を加えてアップデートしているが、特に変化が著しいのはHCVに対する経口薬の進歩である。Genotype 1に対するsofosbuvir+ledipasvir 12週併用療法と、Genotype 2に対しsofosbuvir+ribavirinの12週併用療法に関して、HIV(HCV重複)感染者に対しても良好な治療成績が報告されていることを記載した。

② 推奨処方根拠となった臨床試験のサマリーを掲載しているwebサイトに関しては、2015年10月に以下の3つの試験の結果を追加した:(<http://www.haartsupport.jp/evidence/index.htm>)

ECHO試験(RPV+TDF/FTCとEFV+TDF/FTCの比較)、THRIVE試験(RPV+2NRTIsとEFV+2NRTIsの比較)、FLAMINGO試験(DTG+2NRTIsとDRV rtv+2NRTIsの比較)。ウェブサイト上に掲載したFLAMINGO試験の結果の概略を示す。

FLAMINGO (1)

FLAMINGO試験のデザイン

(無作為化・オープンラベル・非劣性試験)

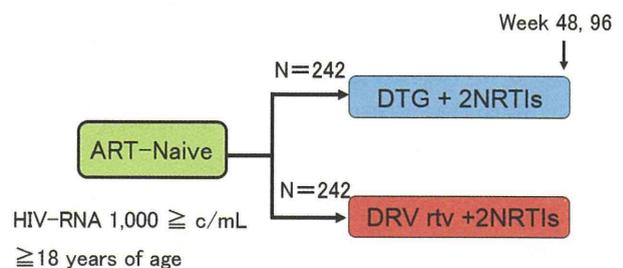


図3 FLAMINGO試験のデザイン

FLAMINGO (2)

主要評価項目

48週および96週時点でのHIV-RNA量 50 コピー/mL未満の達成率

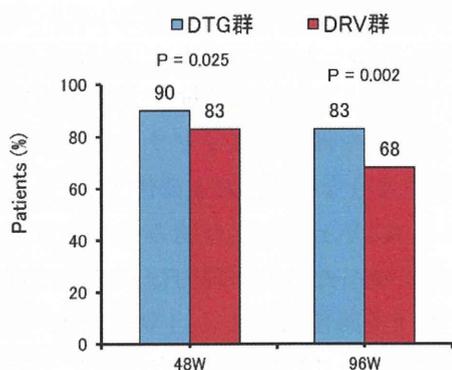


図 4 FLAMINGO 試験の主要評価項目

有害事象
(96週:どちらかの群で6%以上)

	DTG群 (n=242)	DRV群(n=242)
下痢	18% (44)	31% (74)
吐き気	17% (40)	20% (48)
頭痛	17% (40)	11% (26)
鼻咽頭炎	12% (28)	10% (25)
上気道感染	7% (16)	11% (27)
不眠	8% (19)	7% (16)
咳嗽	7% (18)	8% (19)
発熱	7% (16)	7% (16)
嘔吐	6% (15)	7% (17)
背部痛	6% (14)	7% (17)
倦怠感	6% (15)	6% (14)
皮疹	5% (13)	7% (17)
気管支炎	5% (11)	7% (18)
非回転性めまい	6% (14)	5% (13)
胃腸炎	5% (13)	6% (14)
咽頭炎	5% (11)	6% (14)
関節痛	4% (10)	7% (16)
抑うつ	6% (15)	4% (9)

図 5 FLAMINGO 試験の有害事象

この3つの試験の追加により、サマリーを掲載している臨床試験総数は14となり、情報源としての役割をさらに高めることができた。

考 察

「抗 HIV 治療ガイドライン」は、わが国における HIV 診療を世界の標準レベルに維持することを目的に、毎年アップデートがなされている。これは HIV 診療が日進月歩であり、1年前のガイドラインはすでに古いという状況が続いていることによる。HP 上からどなたでも自由にダウンロードできるが、実

際に最新版のアップデート後はダウンロード数は急増しており、また、年間のダウンロード総数は1万を越えるなど広く利用されている。国内の HIV 感染者数は年々増加しており、HIV 診療を行う医師および医療機関の不足も懸念されるなか、診療経験の少ない医師が抗 HIV 治療の進歩を個別にフォローして行くことは困難が伴うと予想される。したがって、今後も最新のエビデンスに基づいて科学的に適切な治療指針を提示する本ガイドラインの改訂が毎年続けられ、国内の HIV 診療のレベルを維持するための指針となっていく必要があると考えられる。

また、新たな臨床試験が毎年発表されているため、推奨処方エビデンスを参照できるウェブサイトに関しても、さらなるアップデートを重ねていく必要がある。

結 論

最新のエビデンスに基づいて「抗 HIV 治療ガイドライン」を改訂し、科学的にもっとも適切と考えられる治療指針を提示してきた。国内の多施設から経験豊富な先生方に改訂委員に参画していただき、国内の現状にも即したガイドラインとして充実を図ることができた。また、初回治療の推奨処方エビデンスとなっている臨床試験の結果を示した web サイトにも、新たな情報を追加して、ガイドライン冊子と web サイトとの連携を深めることができた。今後も HIV 感染症治療の内容は日々変化していくため、ガイドライン改訂が必要な状況が続くと考えられる。

健康危険情報

該当なし

研究発表

1. 論文発表

Furukawa R, Adachi E, Kikuchi T, Koga M, Iwamoto A, Koibuchi T. Methemoglobinemia in an HIV-infected patient treated with primaquine for *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *The Journal of AIDS Research*. 17: 97-100, 2015.

Shimada N, Yuji K, Ohno N, Koibuchi T, Oyaizu N, Uchimaru K, Tojo A. Treatment of chronic lymphocytic leukemia with bendamustine in an

HIV-infected patient on antiretroviral therapy: a case report and review of the literature. Clin Case Rep. 3(6): 453-60, 2015.

2. 学会発表

鯉渕智彦：HIV 感染症 / AIDS の治療 最前線。第 89 回日本感染症学会総会・学術講演会、京都、2015 年 4 月

鯉渕智彦：HIV 感染症治療の手引き 推奨レジメンの新しい分類。第 29 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2015 年 12 月

城戸康年、安達英輔、古川龍太郎、相野田祐介、福田直到、菊地正、古賀道子、大田泰徳、平井由児、鯉渕智彦：病理検査にて粘膜固有層に浸潤を認めた HIV 合併クリプトスポリジウム症の一例。第 29 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2015 年 12 月

菊地正、福田直到、宮崎菜穂子、佐藤秀憲、大亀路生、安達英輔、古賀道子、鯉渕智彦：当院の性交渉感染による HIV 感染者における非エイズ期末治療期の CD4 陽性リンパ球減少速度の歴史的推移。第 29 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2015 年 12 月

福田直到、安達英輔、城戸康年、菊地正、古賀道子、鯉渕智彦：HIV 感染者におけるクレアチンキナーゼ上昇の検討。第 29 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2015 年 12 月

安達英輔、大田泰徳、佐藤秀憲、福田直到、大亀路生、菊地正、古賀道子、松原康朗、立川愛、鯉渕智彦：HIV 感染者における *Helicobacter pylori* 感染と慢性胃炎。第 29 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2015 年 12 月

古賀道子、福田直到、大亀路生、佐藤秀憲、菊地正、安達英輔、鯉渕智彦：非 AIDS 指標悪性腫瘍及び重複癌の後方視的研究。第 29 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2015 年 12 月

知的財産権の出願・取得状況（予定を含む）

該当なし



HIV 陽性者の生殖医療に関する研究

研究分担者：久慈 直昭（東京医科大学産科婦人科）

研究協力者：花房 秀次（荻窪病院 血液科）

小島 賢一（荻窪病院 血液科）

加藤 真吾（慶應義塾大学 医学部 微生物学教室）

須藤 弘二（慶應義塾大学 医学部 微生物学教室）

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）

兼子 智（東京歯科大学市川病院 産婦人科）

研究要旨

2014年より東京医科大学において行っている夫がHIV感染者である夫婦への生殖医療では、患者の出身地は関東が1/3、夫の平均年齢36.9歳、妻の平均年齢34.8歳、感染経路は異性間性的接触が5割、同性間性的接触が2割、血液製剤1割であった。93%が化学療法を受けていた。血液所見が判明していた58例中CD4は81%が351/μL以上、血液中ウイルス量は5例を除いてすべて検出感度以下であり（91%）、これらの率は昨年報告した率とほぼ同様で安定している。洗浄の結果、62例全例でウイルス濃度検出感度以下の運動精子液を得ることができた。洗浄を行った62例中60例は密度勾配溶剤Sil Selectで洗浄後精液中にウイルスは検出されなかったが、血中ウイルス量高値の1症例、およびウイルス濃度は測定感度以下であるがCD4数低値の1症例で、Sil Selectではウイルスが残存し、同時に行ったパーコール洗浄でウイルスを除去することができた。洗浄精子を用いた顕微授精・凍結胚移植の結果、これまで16例の妊娠例（うち分娩4例とon going妊娠9例）を得ている。

一方化学療法奏功例10例においては、従来の方法で洗浄後の沈査にHIV遺伝子が検出された例はなく、これらの例では精液中のウイルス量・感染リンパ球数も低値であることが推測されるため、顕微授精のような懸念のない、低侵襲な人工授精治療の必要性が高いことが明らかとなった。

そのため必要となった運動精子回収率改善の試みでは、swim-up法をswim-side法に変えることで2.54倍、連続密度勾配濃度を改変することで1.2倍の回収率改善が見られた。一方、洗浄法をオプチデンツ法に変更することで、リンパ球除去率は $1/10^5 \sim 1/10^6$ となった。これらのことから、精液性状の良好な症例では、小数回の凍結融解精子を用いた人工授精を試行する運動精子回収率を確保できる可能性が示された。

研究目的

わが国においてHIV感染者はいまだ増加しつつある。厚生労働省エイズ動向委員会による平成26（2014）年エイズ発生動向調査によれば¹、凝固因子製剤を除くHIV感染者・AIDS患者累積報告件数は24万件に達している。HIV感染者新規報告件数1091件のうち日本国籍例が994件、うち男性が959件、女性35件と日本国籍男性が大多数を占めている。以前は同性間の性的接触やHIV混入血液製剤によるものが多かった感染経路は、2014年調査では異性間性的接触が8割を占め、「異性間のセックスによって日本国籍の男性がHIVに感染する」例が大多数で

あることがわかる。このように誰でも罹患する可能性のある感染症となったHIV感染であるが、多剤併用薬物療法の導入によりその予後は劇的に改善されている。その結果、HIV陽性男性、陰性女性夫婦において挙児を希望する夫婦も増加している。

このような夫婦に対し、HIV陽性である夫精液から洗浄によりウイルスを可及的に除去し、それを妻に人工授精あるいは体外受精することにより安全に挙児を行う治療が行われてきた。我々も改良型Percoll-swim-up法によりHIVを除去し（図1）、この精子浮遊液を使用した体外受精-胚移植（実際には顕微授精）を施行することにより、妻が二次感染

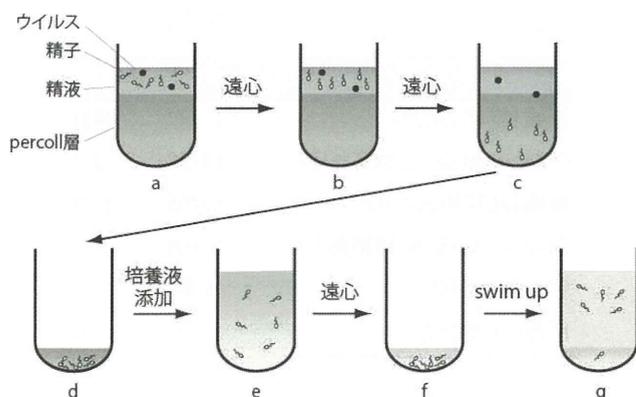


図1 精液洗浄によるウイルス除去

することなく、また出生児にも感染を起さずに拳児をえることができる技術の開発を行い、臨床研究として成果（感染なき妊娠分娩例）を上げてきた。

しかしこの臨床研究も10年以上経過し、その間にHIV感染症の治療方針も大きく変化した。2000年代前半までは生命予後を脅かすほどのイベントが起きるまでは服薬開始を遅らす方針が主流であったが、最近HIVの増殖を無治療で許しておくことそのものが、非AIDS合併症（心血管疾患、肝疾患、腎疾患）のリスクを上昇させると考えられ始めたこと、またあらたな抗HIV薬の開発やその使用法が進歩したことから、副作用は少なくなり、薬物療法の開始は早まる方向にある。本研究班による「抗HIV薬ガイドライン」ⁱⁱにおいても治療開始は早まる傾向にあり、治療開始の目安は免疫機能が臨床的には低下しないCD4数500/μL以下となっている。こうしたことから不妊治療を希望するHIV感染男性も、すでに薬物治療をうけているものが増えており、具体的にはウイルス濃度が測定感度以下、CD4数も351/μL以上の症例が多数を占める様になってきている。

このように血中ウイルス濃度が低い症例では当然精液中のウイルス濃度も低下することが推測され、血中ウイルス濃度が感度以下、血中CD4数高値が一定期間以上持続すれば自然性交による妻への感染リスクは極めて低いとする報告もなされている。こうして自然性交によるリスクが低下すると、問題となってくるのは体外受精や顕微授精に伴う（低いとは考えられているが）母児へのリスクである。従って現在、このような治療奏功例も含めて全例に顕微授精を行う本治療は、その臨床的意義を再確認する必要がでてきている。この意味では一部の症例でも人工授精で妊娠を計ることができるならば、患者にとっては大きな福音となる。

そこで今年度本研究では、第一にHIV陽性者男性カップルに対する不妊治療の臨床を、前述の背景を踏まえて再確認した。第二に、人工授精可能な洗浄法の開発へ向けて、精液中（洗浄後沈渣）のウイルス検定、および運動精子回収効率の高い洗浄法開発に向けて、基礎的検討を行った。

方法・結果

1) HIV陽性者男性夫婦に対する不妊治療の臨床

2014年より東京医科大学において本治療を臨床応用開始し、2016年12月までに精液洗浄を行った62夫婦の住所は関東が1/3の21例を占めるが、全国にわたる。夫の平均年齢36.9歳、妻の平均年齢34.8歳（表1）、感染経路は異性間性的接触が5割、同性間性的接触が2割、血液製剤1割であった（表2）。93%が化学療法を受けており、血液所見が判明していた58例中CD4は81%が351/μL以上、血液中ウイルス量は5例を除いてすべて検出感度以下であった（91%）（表3）。これらの率は昨年報告した率とほぼ同様で安定している。

表1 東京医大における洗浄症例（1）

1)年齢	夫	36.9歳(27-49)
	妻	34.8歳(24-48)
2)婚姻年数	-1年	8例
	-3年	11
	-5年	9
	5年以上	29

表2 東京医大における洗浄症例（2）

3)すでに子どもがいる割合		9/53	(17)
4)感染経路	異性間性的接触	22	(47)
	同性間性的接触	11	(23)
	薬害	5	(11)
	不明	9	(19)

表3 東京医大における洗浄症例（3）

5)化学療法を受けている割合		51/55	(93)
6)CD4数	<200	3/58	(5)
	201-350	8/58	(14)
	351-500	20/58	(34)
	501-750	22/58	(38)
	>750	5/58	(9)
	平均	500	(90-956)
7)血中VL	VL max	2.1x10 ⁵ copies/ml	
	<40の割合	53/58	(91)

洗浄の結果、62例全例でウイルス濃度検出感度以下の運動精子液を得ることができた(表4)。ただ、一方でウイルス量が非常に高いにもかかわらず無症状であるために治療を受けず、しかも本治療を希望する夫婦も存在した。このような場合を含めて、洗浄を行った62例中60例は現在使用されている silane-coated colloid silicagel (Sil Slect plus[®], FertiPro N.V., Beernem, Belgium; メディー・コンインターナショナル、以下 Sil Select) で洗浄後精液中にウイルスは検出されなかったが、ウイルス量が3000 copies/mL以上であった1症例、およびウイルス濃度は測定感度以下であるがCD4が201~350/ μ Lに低下していた1症例の2例で、Sil Selectではウイルスが残存したが、同時に行ったパーコール洗浄でウイルスを除去することができた。

洗浄精子を用いた顕微授精・凍結胚移植の結果、これまで16例の妊娠例(うち分娩4例とon going妊娠9例)を得ており、この治療が従来と変わらず、(すべてではないものの)一定の割合の夫婦に福音を与えていることも確認された(表5、表6)。

また、現行の東京医科大学産婦人科以外から洗浄した精液検体を受け入れ、慶應義塾大学医学部微生物学教室にてウイルスの有無を検査するシステムを構築し、すでに一例の夫婦がこの方法で治療を待っている。

表4 東京医大における洗浄結果

1) 運動精子(+), HIV(-) 62/62 (100)
うち2例はパーコールのみで洗浄成功

2) 精子回収数、回収率

運動精子回収数 ($\times 10^6$ /ml)	n	%	運動精子回収率	n	%
>0.5	3	(5)	1%以上	2	(3)
>0.4	1	(2)	0.1-1%	27	(42)
>0.2	16	(25)	0.01-0.1%	22	(34)
>0.1	10	(16)	0.001-0.01%	13	(20)
<0.1	35	(55)			

表5 洗浄精液による不妊治療結果(1)

	n	(%)
採卵手術症例数	49	
採卵手術数	81	
採卵可能症例数	71	(88)
平均採卵数	4.39	
平均受精卵数	3.23	
平均凍結卵数	2.33	

表6 洗浄精液による不妊治療結果(2)

	n	(%)
妊娠(症例あたり)	16/37	(43)
On-going妊娠(症例あたり)	13/37	(35)
妊娠(胚移植あたり)	16/66	(24)
On-going妊娠(胚移植あたり)	13/66	(20)
平均移植胚数	1.24	
胚あたり着床率	20/82	(24)

2) 人工授精治療を目指したウイルス洗浄法の改良

前項で示したとおり、当院を訪れるHIV感染男性(夫)のほとんどの症例で、化学療法の結果血中ウイルスが測定感度以下となっている。実際、化学療法奏功例(採精時VL<40 copies/mL, CD4>501/ μ L)では洗浄後、swim-up前の検体でウイルス検出できた例は10例中なかった(表7)ことから、これらの症例では精液中のウイルス量や感染リンパ球数は非常に低いことが推測される。

現在この治療で全例に用いている顕微授精法は、単胎であっても周産期・胎児異常を増やす可能性が指摘されているため、ウイルス量が高い症例は別にして、測定感度以下に治療されている例も全例顕微授精を行う必要性は減ってきていると考えられる。このような症例に対しては安全で簡便な人工授精治療の開発が急務であるが、そのためには凍結融解後も人工授精可能な、運動精子濃度の高い精子浮遊液を準備する必要がある。

このようなことから、この目的を達成する準備として、精液洗浄・回収技術の改良を検討した。

表7 東京医大における洗浄結果

症例	夫年齢 (5歳刻)	薬物治療年数	CD4	VL	総運動精子数 ($\times 10^6$)	沈渣HIV遺伝子
1	30	2	487	<20	45.3	—
2	30	2	672	<20	38.1	—
3	30	6	590	<20	140.8	—
4	36	19	611	<20	120.1	—
5	40	23	540	<20	335.1	—
6	30	2	500	<20	94.9	—
7	35	3	529	<20	140.5	—
8	35	23	600	<20	88.9	—
9	35	3	592	<20	50.0	—
10	45	2	600	<20	31.5	—

(1) 洗浄法改良

精液からのウイルス洗浄において、遊離ウイルスを除去する第一段階の操作が密度勾配遠心法である。現在は、Sil Select、および 80% Percoll (北里コーポレーション) を下層に 2ml、対応する培養液 (Hanks 等) を 2ml 上層に重層し、傾斜回転により作成した連続密度勾配に精液を重層し、1600g、10 分間遠心して下層 0.5ml を採取している (図 1、a-d)。しかし我々が以前測定した密度勾配溶剤中の遊離ウイルス浮遊密度推定値は 1.042g/ml であり、これは昨年我々が測定した密度勾配溶剤と Hanks 液の比重をもとにした計算上、Sil Select では原液を 80% とすれば 30% に相当する。従って、より希釈した密度勾配溶剤で連続密度勾配を作成しても、下層の濃度が 30% 以上であれば管底 0.5ml には遊離ウイルスが沈降しない勾配を作成できるはずである。

そこで、今回は密度勾配溶剤 (Sil Select) と Hanks を、1 : 1 に混合して希釈し (40% Sil Select)、これを下層に Sil Select 原液の代わりに置くことで、より低密度の連続密度勾配を作成し、回収される精子数を比較した (図 2)。

結果は、表 8 に示される様に回収率は 0-40% Sil Select で 0-80% Sil Select の 1.19 倍高くなり、運動精子の回収率は 23.7% となった。

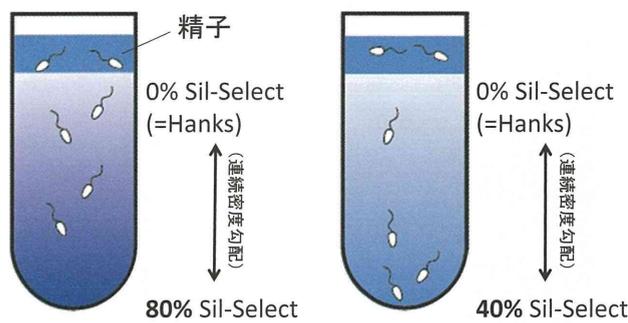


図 2 洗浄法の改良

表 8 洗浄法の改良

使用したSil-Select 連続密度勾配	運動精子回収率 (%)	従来法での 回収率を1と した場合の回収率比
0-80% (従来法)	19.8 ± 1.20	1
0-40%	23.7 ± 4.66	1.2

(2) swim-up 法改良

swim-up はリンパ球をほぼ完全に除去することができるが、精子回収率は低い。そのため従来より、MS チャンバー (Migrate Sedimentation Chamber RI MSC™; JX エネルギー)、あるいは swim-side 法ⁱⁱⁱ (ニプロ #87-433 swim-side-alley) 等の改良 swim-up 法が紹介されている (図 3、図 4)。今回、我々が従来から使用している swim-up 法と、これらの改良法の比較を行った。

従来法では、培養液 0.7ml の下に 0.3ml の沈渣を静かに入れ、45 分後に上層 0.5ml を回収した (図 4、a)。MS チャンバーでは、まず培養液 (Fertilization medium, Sidney IVF-Cook、東機貿) を中央のチャンバーを含め 1ml 注入、その後外側の溝に 0.3ml の沈渣を培養液の下に注入、45 分後に中央のチャンバーから 0.7ml を回収した (図 4、b)。swim-side 法では、円形のシャーレの中央に切った二つの溝の両方に、併せて 1.5ml の培養液を入れ、その後片方の溝に 0.3ml の沈渣を培養液の下に注入、45 分後に沈渣のない方の溝から 1.0ml を回収した (図 4、c)

結果は、表 9 に示すとおり、総運動精子回収率 (swim-up 後運動精子回収数 / 原精液総運動精子数) で比較して swim-side 法は従来法の 2.54 倍の回収率があった。しかし、その回収率は一番高い swim-side 法でも 8% 程度である。

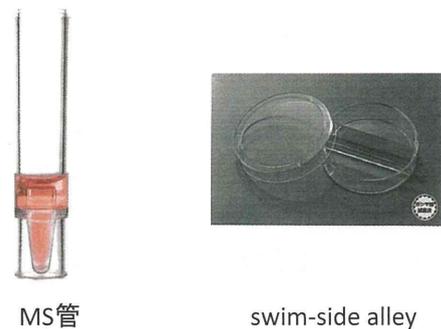


図 3 MS 管と swim-side 法

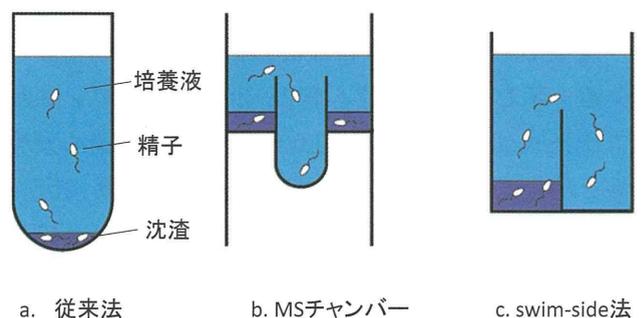


図 4 swim-up 法の改良

表 9 Swimup 法の改良

swim-up法	運動精子回収率 (%; mean±SD)	従来法を1とした場合の回収率比
従来法	2.54±0.06	1
MS管法	4.55±7.08	2.23
Swim-side法	8.65±4.28	2.54

(3) オプチデンツを用いた洗浄法によるリンパ球除去率

運動精子を swim-up させて白血球を除去する方法は前項で示される様に精子回収率が低く、生殖補助医療施行上のボトルネックとなる。そこで、オプチデンツを用いた遠心分離のみで運動精子の分離と精液中の白血球分離を同時に行えるかどうかを検討した。

末梢血 5ml 採取、1.0mM EDTA 生食で 5 倍希釈し、その 1.0ml を精液 2.0ml に添加した。成人血中白血球数は $4.9 \times 10^6/\text{ml}$ であり、添加血液 1.0ml に 4.9×10^6 個が存在する。

こうして調整した血液加精液をハンクス液で約 10ml になるように希釈し、遠心管底部に 0.2ml の 90% Percoll を導入して 1700 rpm 20 分間遠心分離、遠心後、上清を除去し、その 0.5ml をとって細胞を濃縮した。

この濃縮液 0.5ml を 31% オプチデンツ 0.5ml と等量混合、2.0 ml の 15.5% オプチデンツ、1.0ml の 31% オプチデンツに層積して 15,000rpm 10 分間遠心分離した。その中間層を回収し、ハンクス液で数倍に希釈後、90% Percoll 5.0ml に層積 1700rpm 20 分間遠心分離した。沈渣分画 0.1ml を回収し、精子濃度、運動率を測定後、全量を用いてサイトスピンスメアを作成し、当院血液センターの専門検査技師 2 名に依頼してメイギムザ染色法により白血球、赤血球残存率を観察した。

結果であるが、図 5 は血液および血液混濁精液の分離を示している。遠心管 1、2 はオプチデンツおよび Percoll に希釈血液 1.0 ml を層積した遠心分離像を示している。1 において白血球は培養液 /15.5% 界面、赤血球は 15.5% /31% 界面に分布した。2 において白血球、赤血球は Percoll 密度勾配の中間層に分布した。3 は血液混濁精液を Percoll 密度勾配に層積した分離像を示している。未成熟精子、白血球、

赤血球は Percoll の中間層に分布し、運動精子は主として沈澱に回収された。

実際の分離では、始めにオプチデンツで血液混濁精液を遠心分離し、精子および赤血球、少量の白血球を含む中間層 (15.5% /31% 界面) を回収し、これを数倍に Percoll に層積して再度遠心分離し、沈澱を回収して検査に供した。

始めに血液 4.2 ml をオプチデンツ、Percoll 遠心分離法により分離、Percoll 密度勾配沈澱 (運動精子が回収される分画) 中に血球細胞が回収されるかを観察した。スメア上に細胞成分を認めず、2 種の遠心分離法を組み合わせることにより完全に血球細胞を除去できることを確認した。

表 10 に検討した 4 精液標本の精液および洗浄精子所見、白血球残存数をまとめた。洗浄後の運動率は全ての標本で 80% 以上となった。残存白血球数は 18-1 個であり、成人血中の白血球数は $4.9 \times 10^6/\text{ml}$ とされており、添加血液 200 μl に $0.8-1.8 \times 10^6$ 個 (平均 1.3×10^6) と仮定すると、概ね $1/10^5 \sim 1/10^6$ に減少していた。

図 6、7 は 4 標本の沈渣染色像を示している。標本 1 では非精子細胞を見つけることができたが、2-4 においては精子以外の細胞を見つけることができなかった。

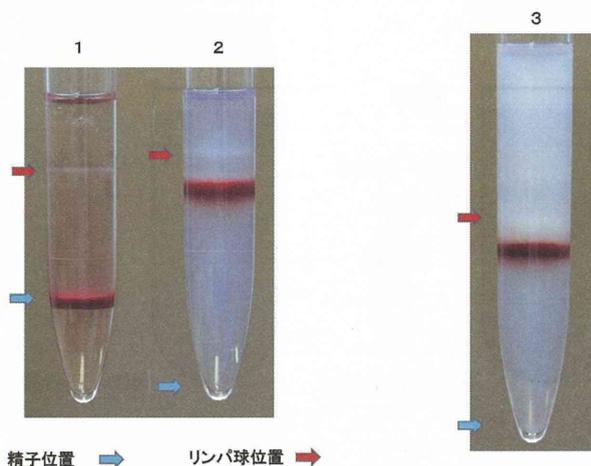


図 5 オプチデンツによる洗浄

表 10 洗浄後結果

原精液			洗浄後			白血球数(個)/全視野		
精液量 (ml)	精子濃度 (X10 ⁶ /ml)	運動率 (%)	精液量 (ml)	精子濃度 (X10 ⁶ /ml)	運動率 (%)	技師 1	技師 2	平均
4.1	22000	49	0.2	3000	80	18	12	15
2.4	9600	71	0.2	8100	88	10	7	8.5
5.4	6400	59	0.2	4300	91	7	5	6
4.8	5500	52	0.2	6200	87	4	1	2.5