



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本研究班の臨床研究において、洗浄精子を用いた不妊治療（顕微授精・凍結胚移植）の結果、治療を1回でも受けた症例あたりで4割の症例で挙児につながる妊娠（on-going妊娠）を得ることができ、またすでに16分娩、18生児を得て、これまで出生児の異常は認めていない。

人工授精治療を目指したウイルス洗浄法の改良については、これまでの本研究班での研究結果をもとに、低濃度密度勾配とMS管による改良法を考案した。その結果、ウイルス除去効率や手技によるコンタミネーション回避率はあまり落とさずに、総運動精子の約5%、従来法の4倍程度の回収率を確保することができた。

凍結精液からのウイルス除去については、パーコールを用いた従来法によるswim upを行い、swim up後総運動精子数3000と、これまでの当施設における分娩例の最小値以上の精子数がえられ、妊孕性ある運動精子を得られ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27（2015）年エイズ発生動向調査によれば、凝固因子製剤を除くHIV感染・AIDS累積報告件数は25万件に達している。HIV感染者新規報告件数1006件のうち日本国籍例が898件、うち男性が860件、女性38件と日本国籍男性が大多数を占めている。感染経路は、2015年調査では異性間の性的接触による感染が196件（19.5%）、同性間の性的接触による感染が691件（68.7%）で、性的接触による感染は合わせて887件（88.2%）を占めた。性的接触による感染に占める異性間の割合は22.1%（昨年18.5%）、同性間の占める割合は77.9%（昨年81.5%）で、昨年より異性間の感染の割合が増加した。

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、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・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、妻が二次感染することなく、また出生児にも感染を起こさずに挙

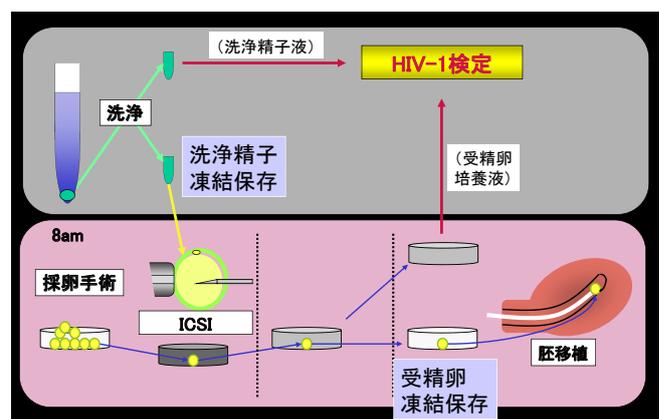


図1 洗浄精子を用いた顕微授精

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。以前は薬剤の種類が限られていたため、生命予後を脅かすほどのイベントが起きるまでは耐性ウイルス出現の催奇形性を考慮して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、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」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350/mL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多くなっており、具体的にはウイルス濃度が測定感度以下、CD4数も351/mL以上の症例が多数を占める状況となってきている。

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、相対的に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おり、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。第三に、凍結感染精液からのウイルス除去を試みた。

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87夫婦についてみると、夫の平均年齢36.8歳、妻の平均年齢34.9歳、感染経路は異性間性的接触が3割、同性間性的接触が3割、血液製剤1割であった（表1）。この87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。

まず洗浄精子を用いた顕微授精・凍結胚移植の結果、これまで33例の妊娠例を得ており、妊娠率は症例あたりで57%、胚移植1回あたりで25%、移植胚1個あたりの着床率は21%であった（表2）。これまでに分娩16例（うち双胎2例）とon going妊娠7例をえており、児の出生時平均体重は2977g（2435-3710g）、現在までのところ先天異常を認めていない（表3）。このように本治療は一定の割合で夫婦に福音を与えていることが再確認された。

表1 東京医大における洗浄症例

1)年齢	夫	36.8歳(27-49)
	妻	34.9歳(24-48)
2)感染経路	異性間性的接触	26(31)
	同性間性的接触	25(30)
	薬害	12(14)
	不明	21(25)

表2 洗浄精液による不妊治療結果(1)

	n	(%)
妊娠(症例あたり)	33/58	(57)
On-going妊娠(症例あたり)	24/58	(41)
妊娠(胚移植あたり)	33/131	(25)
On-going妊娠(胚移植あたり)	24/131	(18)
平均移植胚数	1.30	
胚あたり着床率	36/170	(21)

表3 洗浄精液による不妊治療結果(2)

	n	(%)
総妊娠数	33	
分娩	16	(49)
(うち双胎)	2)	
On-going妊娠	7	(21)
自然流産	10	(30)

出生時平均体重 2977g (2435-3710)
現在までのところ先天異常なし

あらためて精液洗浄症例の治療状況をみてみると、化学療法を受けている割合は 90%、CD4 数は 8 割以上が 350 以上、200 以下の症例は 6%にすぎないことから、早期治療開始の原則が徹底されていることが示された。血中ウイルス量は測定感度以下（40 以下）である症例が 84%と多数であるが、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やはり存在した。なおこれまでの検討から、血中ウイルス量の高い症例、および精液性状（精子運動率、精子濃度など）の悪い症例では現在使用されている密度勾配溶剤 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) ではなく、パーコール(北里コーポレーション)を使用している。

表4 精液洗浄症例の治療状況

3)化学療法を受けている割合		76/84	(90)
4)CD4数	<200	5/84	(6)
	201-350	12/84	(16)
	351-500	27/84	(35)
	501-750	24/84	(29)
	>750	5/84	(19)
	平均	518	(90-1151)
5)血中VL	VL max	2.1x10 ⁵ copies/ml	
	<40の割合	66/79	(84)

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。血中および精液中ウイルス濃度はよく相関することが知られており、実際昨年度研究でも化学療法奏功例（採精時 VL<40copies/ml, CD4>501/μl）10 例では洗浄後、swim up 前の検体でウイルス検出できた例は全くなかったことから、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。

妊娠成立のために現在用いている体外受精・顕微授精法（IVF-ICSI）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ともかく、測定感度以下に治療されている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。

しかし、目視で精子一匹を注入する顕微授精法と

異なり、人工授精では体内で自然な受精を起こす必要があることから一定数の運動精子を子宮内に注入することが必要であり、必要な運動精子数はおおよそ 100 万個以上といわれている。ここで化学療法奏功例であっても精液へのウイルス排出は sporadic に起こることが知られており、これまでと同等な安全性を確保するためにはウイルス除去確認のため洗浄後精液凍結が理想的である。従って、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とになる（表5）。

これまでの検討で、密度勾配溶剤の濃度を半分に希釈することによりおよそ 1.2 倍（図2）、また MS 管（Migrate Sedimentation Chamber RI MSCTM；JX エネルギー）、あるいは swim-side dish（ニプロ #87-433 swim-side-alley）を用いることにより 2 倍以上の回収率を得ることが出来ることを明らかにしている（図3）。

表5 普及型人工授精法開発の要点

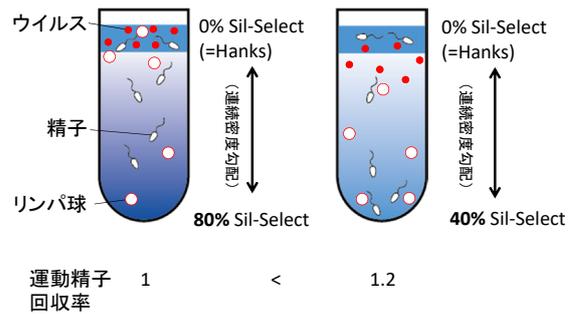
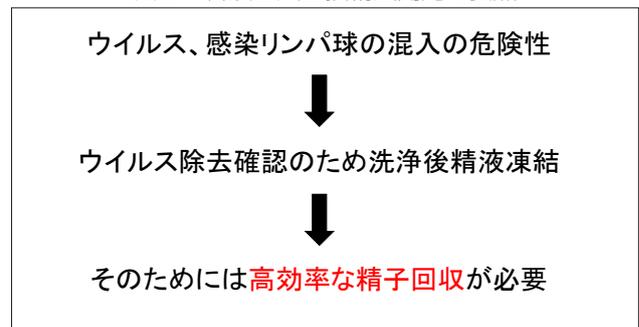


図2 洗浄法の改良（昨年度報告1）

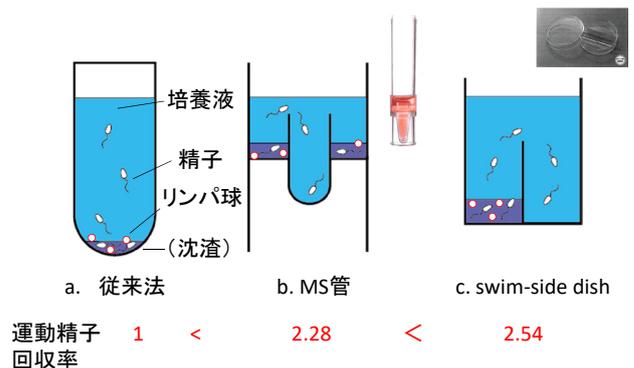


図3 洗浄法の改良（昨年度報告2）

今回、我々が従来から使用している洗浄 - swim up 法と、希釈密度勾配 - MS 管法による改良法の精子回収率の比較を行ったところ (図4)、有意差はまらないものの改良法は従来法の4倍、原精液の運動精子のおよそ5%を回収可能であった。

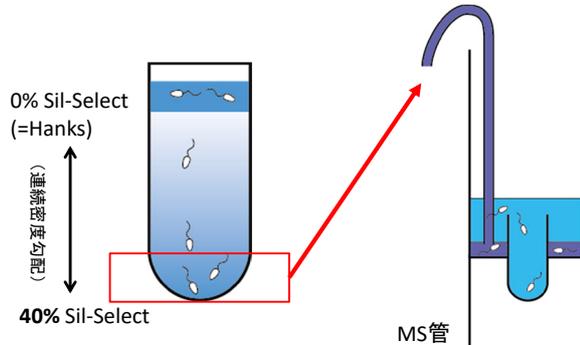


図4 改良精液洗浄法

3) 凍結感染精液からの運動精子回収

今年度、我々は凍結保存した HIV 感染精液から洗浄後に運動精子を回収できた症例を経験した。

症例は、10年以上の治療歴を持つ男性患者である。HIV 感染判明後、化学療法でコントロール良好であったが、定期検診中に白血球著増、芽球出現を呈し、フィラデルフィア染色体陽性急性リンパ性白血病と診断された。白血病に対して寛解導入後、同種末梢血幹細胞移植を行い、現在は寛解しており、HIV 感染もコントロール良好である (表6)。

表6 症例

- 1) 30代後半の男性、X年にHIV感染判明。
- 2) X+12年の定期外来受診時、末梢血芽球増多、Ph陽性、Bcell-Acute Lymphocytic Leukemiaと診断
- 3) 緊急的に、**近医で精子保存**の上、ALLに対する治療を行い、現在経過良好。(化学療法後は乏精子症)
- 4) 精子保存の前後のHIV-RNA量は全て検出感度(20コピー/mL)未満、CD4数640/μL。

この症例では、幹細胞移植後に結婚・挙時希望となり、精液検査を行ったところ無精子症であったため、白血病発症時に凍結保存した精液による不妊治療を求めて来院した。白血病に対する化学療法剤使用前、使用直後の精液所見を表7に示す。

本症例では、パーコールによる洗浄、および従来法による swim up を行った。その結果、swim up 後総運動精子数3000と、これまでの当施設における分娩例の最小値以上の精子数がえられ、また swim up 後に残った沈渣分画も HIV 陰性であった。現在、IVF-ICSI を計画中である。

表7 白血病治療前後の精液性状

	精液量 (ml)	精子濃度 ($\times 10^6/ml$)	総精子数 ($\times 10^6$)	運動率 (%)	奇形率 (%)
治療直前	3.5	70	245	93	64
治療中 (1月後)	4.2	220	924	41	59
(WHO基準)	1.5以上	15以上	22以上	40以上	96未満

考察

1) HIV 陽性者男性夫婦に対する不妊治療の患者解析と普及

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たが、2016年度の患者背景(出身地、夫婦の年齢、感染経路)は2014年度、2015年度とほぼ同様であった。

洗浄精子を用いた顕微授精・凍結胚移植の結果、治療を1回でも受けた症例あたりで4割の症例で挙児につながる妊娠(on-going妊娠)を得ることができ、またすでに16分婏、18生児を得ることが出来、これまで児の異常は認めていないことから、本治療に一定の臨床的意義が認められることが再確認された。

2) 人工授精治療を目指したウイルス洗浄法の改良

密度勾配洗浄と swim up を組み合わせた従来の精液洗浄法では、swim up 後の運動精子回収率は平均1-2%であり、仮に5000万の運動精子を持つ非常に精液性状が良好な男性でも、回収できる運動精子はわずかに50-100万となる。さらに凍結融解で50%の運動精子が運動性を失うとすれば、多くの症例で融解後に妊娠につながる人工授精をおこなうことは困難である。

そこでこれまでの検討結果を組み合わせ、ウイルス除去効率や手技によるコンタミ回避率はあまり落とさずに、低濃度密度勾配とMS管による改良法を考案し、計算通り4倍程度の回収率を確保することができた。

とくに、この方法はこれまで我々が高濃度のウイルスを含む HIV 感染精液に対して行ってきた洗浄法のノウハウをそのまま使用できるため、ウイルス量の高い症例も含めて今後の洗浄に直ぐ応用可能である。

密度勾配法の工夫など更なる改良は継続して行っていくが、それと平行して今回の改良洗浄法を今後

の精液洗浄に用いることにより、精液性状が極めて良好な希望者には比較的早期に人工授精を試みる事が出来るかもしれない。ただ、その際も安全が第一であるので、血中のウイルス量測定感度以下を6ヵ月以上継続していることなど、一定の条件を満たした症例に限ることが肝要であろう。

3) 凍結感染精液からの運動精子回収

化学療法が奏功するようになって HIV 患者の予後は劇的に改善したが、強力な治療効果が「免疫再構築症候群」と総称される多様な病態を引き越すことが明らかになってきた。その中のひとつに、悪性腫瘍（カポジ肉腫、悪性リンパ腫）がある。従って、すでに凍結してある精液の洗浄を行わなければならない今回のような症例はこれからも時に遭遇すると考えられる。

凍結により精液の運動性は低下し、おそらくその運動状態も変化する。そのため平均50%低下する運動率以上に、回収率は悪くなる可能性がある。

実際今回の精子回収率は、0.016%と凍結前の精液性状が極めて良かったことを考慮すると低めである。しかし、前項で紹介した改良 swim up 法などを用いることにより、今回の症例より精液性状の低い症例であっても洗浄した精子を回収出来る可能性はある。

ただし回収した精子の受精能・妊孕性については、今後の IVF-ICSI の結果を待つ必要がある。

結論

2014 年より東京医科大学において行っている臨床研究では、患者の出身地、夫妻の平均年齢、感染経路などの患者背景に変化はなかった。洗浄精子を用いた顕微授精・凍結胚移植の結果、治療を1回でも受けた症例あたりで4割の症例で挙児につながる妊娠（on-going 妊娠）を得ることができ、またすでに16分娩、18生児を得ることが出来たことから、一定の臨床的意義が認められることが再確認された。

人工授精治療を目指したウイルス洗浄法の改良については、これまでの本研究班での結果をもとに、低濃度密度勾配とMS管による改良法を考案し、ウイルス除去効率や手技によるコンタミ回避率はあまり落とさずに、総運動精子の約5%、従来法の4倍程度の回収率を確保することができた。

凍結精液からのウイルス除去については、パーコールを用いた従来法による swim up を行い、

swim up 後総運動精子数3000と、これまでの当施設における分娩例の最小値以上の精子数がえられ、妊孕性ある運動精子を得られる可能性が示された。

健康危険情報

該当なし

研究発表

1. 原著論文

Inoue O, ○ Kuji N, Ito H, Yamada M, Hamatani T, Oyadomari A, Kato S, Hanabusa H, Isaka K, Tanaka M. Clinical efficacy of a combination of Percoll continuous density gradient and swim-up techniques for semen processing in HIV-1 serodiscordant couples. Asian J Androl. 2016 Feb;19:208-213

上野 啓子, ○久慈 直昭, 長谷川 瑛, 伊東 宏絵, 花房 秀次, 小島 賢一, 加藤 真吾, 井坂 恵一. HIV 陽性男性と HIV 陰性女性の生殖医療における最近の動向 日本受精着床学会雑誌 (0914-6776) 33 巻号 Page 220-224 (2016.08) : 原著論文 / 比較研究

2. 口頭発表

伊東 宏絵, ○久慈 直昭, 永光 雄造, 吉田 梨恵, 長谷川 瑛, 野平 知良, 名取 道也, 井坂 恵一. HIV 陽性男性と HIV 陰性女性の生殖医療の動向 第52回日本周産期・新生児医学会総会 2016.7.16-18. 富山県。富山国際会議場・富山県民会館・ANA クラウンプラザホテル富山・富山市民プラザ

土田 奈々枝, ○久慈 直昭, 長谷川 瑛, 伊東 宏絵, 井坂 恵一. 挙児希望 HIV 感染男性のプロフィールと不妊治療との関連 第149回関東生殖医学会 2016. 7.4 東京都 持田製薬ルークホール

知的財産権の出願・取得状況（予定を含む）

該当なし

ⁱ 厚生労働省エイズ動向委員会. <http://api-net.jfap.or.jp/status/2015/15nenpo/h27gaiyo.pdf>

ⁱⁱ HIV 感染症及びその合併症の課題を克服する研究班（研究分担者 鯉淵智彦、研究代表者 白阪琢磨）。抗 HIV 治療ガイドライン。2015

ⁱⁱⁱ 黒田 優佳子, 兼子 智, 高松 潔. 運動精子の回収率向上を目的とした swim side array の開発. 日本生殖医学会雑誌 (1881-0098) 51 巻 4 号 Page 298 (2006.10)