3

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学分野 教授）
研究協力者：加藤　真吾（慶應義塾大学微生物学教室 専任講師）
小島　賢一（医療法人財団荻窪病院血液凝固科 臨床心理士）
須藤　弘二（慶應義塾大学微生物学教室 特任助教）

研究要旨

2014年以来、当院を訪れた101症例（夫妻）のうち、31症例に挙児を得、それ以外に4例がon-going妊娠となっている。一方、新規患者数そのものは、おそらく化学療法の普及と奏功、およびこれを基礎とした自然妊娠という選択肢の提示によって、やや減少傾向にある。

今後、精液中のウイルス量検定が必要となってくると考えられるが、今年度の検討では不妊臨床で用いられている精子洗浄液であるSepasperm60%が、血液中からのリンパ球分離液であるLymphoprepと同程度に精液中の精子・リンパ球・ウイルス分離できる可能性があることが明らかとなった。この結果を用いて、精液からの高感度ウイルス検出法を検討中である。

研究目的

わが国においてHIV 新規感染者はいまだ減少していない。厚生労働省エイズ動向委員会による平成28（2016）年エイズ発生動向調査によれば 、HIV 感染者新規報告件数1011件は2015年度より微増しており、うち日本国籍例が885件、うち男性が857件、女性28件と日本国籍男性が大多数を占めている状況は変わっていない。感染経路は、異性間の性的接触による感染が170件(16.8％)、同性間の性的接触による感染が735件(72.7％)で、性的接触による感染は合わせて905件(89.5％)を占めた。

一方多剤併用薬物療法の導入により、HIV 感染症の予後は劇的に改善され、平均余命が延長したことからHIV 陽性男性、陰性女性夫婦において挙児を希望する夫婦は増加していると考えられる。このような夫婦に対し、我々は精液洗浄法によりHIV を除去し、HIV 陰性を検定したこの精子浮遊液を使用した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児をえてきたが、この臨床研究も10年以上経過し、HIV 感染者の生殖医療は新しい時代に入っている。

特に最近、HIV 感染症に対する薬物療法開始は早まる傾向にあり、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いる。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。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。

しかしこのような治療奏功例であっても、きわめて稀に突発的にウイルスが精液中に出現する例も報告されており、自然性交は危険性がないわけではない。理想的には、我々が行ってきた洗浄法でHIV を除去した精子を人工授精することが出来れば水平感染リスクは非常に少なくなるはずであるが、これまでの検討で密度勾配法とswim up を併用した場合には回収できる精子数が非常に少なく、人工授精で妊娠を得ることは難しい。

一方、血中ウイルス量が測定感度以下のような、精液中ウイルス量が少ないと考えられる症例に限って言えば、射出精液中のウイルス量の検定が出来れば、（洗浄操作をしなくても）陰性である精液だけを

用いて挙児をはかることが可能になる。しかし精液中でのウイルスの検定には、（精子に由来する）極めて多量のDNAが存在する中で、極少数含まれるHIV遺伝子を検出するという（およそ10^6個以上の細胞（精子）が存在すると1コピーのHIVを検出することは出来なくなる）技術的な問題点が存在する。従って精液中のウイルス定量には、その前提条件として遊離ウイルスやリンパ球を精子からあらかじめ分離する前処理が必要となる。

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。第二に治療が奏功している男性患者に対して、より安全性を高めた自然性交を行うことを目的として、精液中のウイルス検定法の信頼性について、その前処理についての基礎的検討を行った。

研究方法・結果

1）HIV陽性者男性夫婦に対する不妊治療の臨床

東京医科大学において2017年12月までに精液洗浄を行った101夫婦についてみると、夫の平均年齢36.9歳、妻の平均年齢34.7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101例全例でウイルス濃度検出感度以下の運動精子浮遊液を得ることができた。

表1．東京医大における洗浄症例（101症例）

1）年齢	夫	36.9歳（27-49）
	妻	34.7歳（22-48）
2）感染経路	異性間性的接触	32 (31)
	同性間性的接触	31 (30)
	薬害	15 (15)
	不明	23 (23)

この洗浄精子浮遊液を用いた顕微授精・凍結胚移植の結果、これまで39症例で妊娠例を得ており、妊娠率は症例あたりで39%、On-going妊娠獲得率35%であった。胚移植あたりの妊娠率は26%、On-going妊娠率は18%で、平均移植胚数は1.8個、移植胚1個あたりの着床率は15%であった（表2）。2017年12月までに分娩31例（うち双胎2例）とOn-going妊娠4例をえており、児の出生時平均体重は3021 g（1609-3710g）、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2．洗浄精液による不妊治療結果（1）

	n	(%)
妊娠（症例あたり）	39/101	(39)
On-going妊娠（症例あたり）	35/101	(35)
妊娠（胚移植あたり）	50/193	(26)
On-going妊娠（胚移植あたり）	35/193	(18)
平均移植胚数	1.80	
胚あたり着床率	52/348	(15)

表3．洗浄精液による不妊治療結果（2）

	n	(%)
総妊娠数	50	
分娩	31	(62)
（うち双胎	2）	
On-going妊娠	4	(8)
自然流産	15	(30)

出生時平均体重　3021g（1609-3710）
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（男性）の治療状況をみてみると、化学療法を受けている割合は92%、CD4数は8割以上が351/μl以上、一方200以下の症例は5%にすぎないことから、早期治療開始の原則が徹底されており、病状が安定し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88%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．東京医大における洗浄症例（2）

3）化学療法を受けている割合		93/101	(92)
4）CD4数	<200	5/95	(5)
	201-350	13/95	(14)
	351-500	27/95	(28)
	501-750	35/95	(37)
	>750	15/95	(16)
	平均	526	(90-1151)
5）血中VL			
	VL max	$2.1x10^5$	copies/ml
	<40の割合	85/97	(88)

なお、本治療は臨床研究として行っており、東京医科大学倫理委員会にて承認を受けている（承認番号 3202）。

2）精液中のウイルス検定法の信頼性についての基礎的検討

現在の挙児希望の HIV 感染男性は治療が奏功し、血中ウイルス量が測定感度以下で病状も安定していることが多い。このような例で精液中のウイルス量を信頼性ある方法で確認することが出来れば、挙児希望の患者には二つに意味で有用な情報となると考えられる（表５）。まず、血中でしか確認できていない治療効果を、精液中で確認することによって、自然性交の安全性をある程度確認することが可能となる。また、こうしてウイルス陰性であると検定できた精液だけを用いて人工授精を行うことによって、水平感染の危険性を減らすことが可能となる。

表５．精液中のウイルス量検定の有用性

1. 自然性交の安全性を確認することが可能
2. 検定した精液を用いて人工授精することで、水平感染の危険性を減らすことが可能

しかし、精液中のウイルス量の検定は、量が少ないこと以外に、１）大量の精子 DNA に隠れた HIV-RNA/DNA をどうやって検出するかという問題と、２）粘度の高い精液をどのように均一化して検定するかという問題がある（表６）。

表６．精液中のウイルス量検定の問題点

1. 大量の精子DNAに隠れたHIV-RNA/DNAをどうやって検出するか
2. 粘度の高い精液をどのように均一化するか

そこで、今年度研究では、希釈して均一化した精液中から精子と、遊離ウイルス、リンパ球をある程度分離し、それぞれ別々に解析することによって精液中のウイルス量を推定する方法を検討した。血液中からリンパ球を分離する溶液としてリンフォプレップ（Lymphoprep）が広く知られているが、この溶液は適当な密度勾配溶液を血液の下に置いて、遠心することにより軽いリンパ球は界面に残り、重いその他の白血球や赤血球は溶剤の下に沈殿する原理を用いている（図１）。

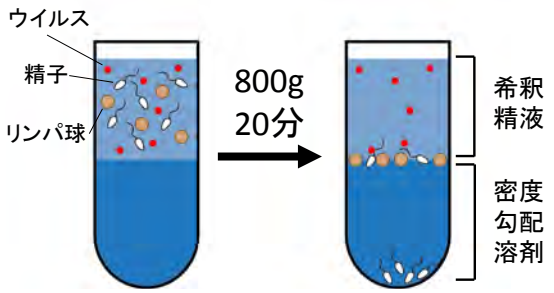
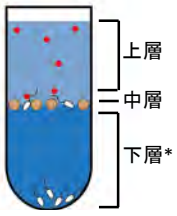


図１．精液中のウイルス定量

そこで、まずこの Lymphoprep により Hanks 液で２倍に希釈した精液を遠心分離してみた（図２）。遊離ウイルスは上層、感染リンパ球は中層に分離されるはずであるから、精子が出来るだけ下層に分離される分離液の効率が良いことになる。結果として、上層には 1%以下の精子しか残らなかったが、界面でありリンパ球を濃縮できるはずの中層には、運動精子の 2.47%と、非運動精子の 5.92%がトラップされる結果となった。

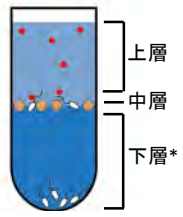


	運動精子	非運動精子	有核球
上層	0.82%	0.93%	0.00%
中層	2.47%	5.92%	0.32%
下層	96.71%	93.15%	99.67%

*Lymphoprep

図２．Lymphoprep による精子の分離

また、Lymphoprep（比重 1.070）と近い比重を持つ精子洗浄液である Sepasperm60%（比重 1.075、北里コーポレーション）を用いて精子の分離を行ったところ、運動精子についてはほぼその全てが下層に含まれたが、非運動精子の 8%程度が界面（中層、リンパ球層）にとどまる結果となった（図３）。同時に行った血液中有核球の分離実験では、Lymphoprep で 0.32%、Sepasperm60%で 1.66%が中層にとどまる結果となった。



	運動精子	非運動精子	有核球
上層	0.00%	0.00%	0.07%
中層	0.00%	7.78%	1.66%
下層	100.00%	92.22%	98.27%

*Sepasperm60%

図 3. Sepasperm60%による精子の分離

考 察

1．HIV 感染者の生殖医療

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、2017 年度の患者背景（夫婦の年齢、感染経路）は2014 年度から 2016 年度とほぼ同様であった。

ただ、2017 年度の患者背景では関東圏からの来院の割合が多くなり、また新規患者数としても 20 人を下回る結果となっている。このようにこの治療を希望するカップルが減った一因として、後述するように化学療法が普及・奏功した結果、治療現場ではおそらく治療が奏功して薬剤アドヒアランスのよい男性感染者・女性非感染者のカップルに対して、自然性交による挙児をも選択肢として提示しており、それらの患者のうちで自然性交によって妊娠にいたるカップルもいるのではないかと推察される。感染男性の妊孕性がそれ程損なわれないことは、従来からいくつも報告されており、我々の治療を希望した 101 カップル中にも、感染が判明するまでに既に挙児を得て、2 児目を希望して来院したカップルが 15 カップルいたことはこれを裏付ける。

その一方で、すでに本治療で 31 分娩、33 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．精液中のウイルス検定法の信頼性についての基礎的検討

HIV 感染男性であっても、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がなされ[i]、これらの事実から ART 投与時に男女間感染がおこる確率はおよそ 1 万回の性交渉につき 1 件と推計されている[ii]。これらの報告に基づいて、2013 年の National Institute for Health and Care Excellence（NICE）ガイドラインでは、男性が HIV 陽性・女性が陰性のカップルに対して、表 7 の条件がすべて当てはまる場合には自然妊娠が可能であると述べている[iii]。我が国でも、2015 年 3 月厚生労働科学研究費補助金エイズ対策政策研究事業の「HIV 感染症の医療体制の整備に関する研究班」から出された「HIV 感染者の挙児希望にかかるカウンセリングガイドライン」[iv]において、男性 HIV 陽性の serodiscordant couple に対して、ART によるウイルス抑制下での自然妊娠も選択肢に含まれることが明記されている。

表 7. NICE guideline（2013）

抗レトロウイルス療法を行っている場合、下記の条件が満たされれば性交による（妻や子どもへの）感染はきわめて稀。

1. **指示に従った規則的な服薬**
2. **血中HIV-RNA；過去6ヶ月以上測定感度以下**
3. **他の感染症がない**
4. **自然性交は排卵期に限る**

ただ一方で、長期にわたって HIV が血中から検出されなくなっても、精液中にウイルスが排出される症例があること[v]、またそれが極めて短期間に変化するために予測不能であることも報告されている[vi]。2016 年に再度確認されている前掲の NICE ガイドラインでも、「妻への水平感染の危険性を下げるため、挙児のためでない性交では（コンドームなどの）予防法を使用することが大変重要である」と述べており、決して性行為が無条件で安全であるといっているわけではない。米国は NIH の AIDSinfo のガイドラインにおいて 、HAART を含む化学療法により血中ウイルス量が測定感度以下になった場合には性交による女性への感染リスクは減るけれども、血中と精液中のウイルス濃度には解離があり、前述のように血中ウイルス量が測定感度以下でも精液中にウイルスが認められる例があることが明記されている。さらに使用される薬剤によって精液中への薬剤移行は異なり、HAART を含む化学療法は性交による感染リスクを減らすけれども 0 にはならないことを繰り返し述べている。最新のアメリカ不妊学会（ASRM）の recommendation[vii]では 、提供精子や養子以外の挙児の方法として洗浄による人工授精・体外受精を挙げているが、洗浄法の真の安全性はまだ不明であるとしている。ただ、このガイドラインでは血中ウイルス濃度測定感度以下の症例に対する自然性交による妊娠についての言及はない。

このような状況を考えると、主治医が自然性交を選択肢として提示しても、この感染症が未だ社会から強く差別されている現状をよく知る当該夫婦は、そのリスク判断にやはり困惑すると考えられる。また、何回か自然性交を試みて妊娠出来なかった場合に、再度精液中に本当にウイルスが排出されていないのか、また数回のセックスでいつも排出されていないことが確認されているのかどうかが、再度不安要素の一つとして現れることは容易に想像できる。

挙児を不妊症専門医の立場から考えると、健康な夫婦が妊娠を試みたとしても決して全ての夫婦が直ぐ妊娠できるわけではない。HIV 感染が男性の妊孕性を全く下げないとしても、一般人口と同様に 10-15%の夫婦は不妊であるはずであり、これらの夫婦は不妊治療を受けない限り水平感染の危険性だけを繰り返さなければならないことになる。

従って、自然性交を考えている夫婦の不安を少しでも和らげることが出来るように、信頼性のある精液中ウイルス濃度検定法を開発し、さらに可能であればこうして検定した洗浄精子を用いて人工授精を行うことによって、夫婦が納得した形で体外受精を避けながら挙児を考えることが出来るようになるよう、研究を進めていくべきであると考えられる。

結 論

2017 年度、新規来院患者は比較的若年、感染経路別構成はこれまで同様で安定している。2014 年以来、当院を訪れた 101 人患者のうち、33 症例に挙児を得、それ以外に 7 例が On-going 妊娠となっている。一方、新規患者数そのものは、おそらく化学療法の普及と奏功、およびこれを基礎とした自然妊娠という選択肢の提示によって、やや減少傾向にあると考えられる。

今後、射出精液中のウイルス量検定と、これをもちいた安全な人工授精の普及は患者の福音となると考えられるが、今年度の検討で精子洗浄液である Sepasperm60%が lymphoprep と同程度に精液中の精子・リンパ球・ウイルス分離できる可能性があることが明らかとなった。この結果を用いて、精液からの高感度ウイルス検出法を検討中である。

健康危険情報

該当なし

知的財産権の出願・取得状況 （予定を含む）

該当なし

研究発表

1）原著論文による発表 （予定を含む）

なし

2）口頭発表

○久慈直昭、高見澤重篤、長谷川朋也、小島淳也、伊東宏絵、須藤弘二、加藤真吾、井坂恵一。MS 管を用いた swim up 法における精子回収率改善。第 58 回日本卵子学会学術集会、沖縄、2017 年 6 月

[i] Attia S, Egger M, Müller M et al. Sexual transmission of HIV according to viral load and antiretroviral therapy: systematic review and meta-analysis. AIDS. 2009; 23: 1397-404.

[ii] Supervie V, Viard JP, Costagliola D et al. Heterosexual risk of HIV transmission per sexual act under combined antiretroviral therapy: systematic review and bayesian modeling. Clin Infect Dis. 2014; 59 :115-22.

iii Fertility problems: assessment and treatment. Nice Guideline. https://www.nice.org.uk/guidance/cg156/ifp/chapter/hiv-hepatitis-b-and-hepatitis-c#couples-where-the-man-is-hiv-positive (Accessed May 23rd, 2017)

[iv] 花房秀次。体外受精における医学的情報と HIV 感染者の挙児希望への対応。「HIV 感染者の挙児希望にかかるカウンセリングガイドライン」、山本政弘　編、HIV 感染症の医療体制の整備に関する研究班 , 2015（平成 27）年 3 月

[v] Donnell D, Baeten JM, Kiarie J et al. Heterosexual HIV-1 transmission after initiation of antiretroviral therapy: a prospective cohort analysis. Lancet. 2010; 375(9731): 2092-8.

[vi] Ferraretto X, Estellat C, Damond F et al. Timing of intermittent seminal HIV-1 RNA shedding in patients with undetectable plasma viral load under combination antiretroviral therapy. PLoS One. 2014; 9(3) :e88922.

[vii] Ethics Committee of American Society for Reproductive Medicine. Human immunodeficiency virus (HIV) and infertility treatment: a committee opinion. Fertil Steril. 2015; 104: e1-8.