



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（慶應義塾大学医学部微生物学教室免疫学教室 専任講師）

小島 賢一（荻窪病院血液凝固科 臨床心理士）

須藤 弘二（慶應義塾大学医学部微生物学教室免疫学教室 特任助教）

本田 徹郎（倉敷中央病院産婦人科 部長）

研究要旨

2018年度、新規来院患者は通常の体外受精の症例に比較するとやや若年で、感染経路別構成はこれまで同様であった。2014年以來、当院を訪れた119夫婦のうち、43症例に挙児を得、それ以外に8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。

一方、射出精液中の信頼性のあるウイルス量検定については、血液型の異なる二人の提供者に由来するリンパ球と精子を混合して、血液型遺伝子の違いを指標として大過剰の精子中からのリンパ球遺伝子検出法を確立することを考案した。今年度、核内ゲノムに存在する血液型遺伝子を識別できるプライマーペアを設計し、その有効性を確認した。一方この過程で、血液型遺伝子には亜型が存在するため、系として用いる場合は実際に提供者のゲノムを用いて確認することが必要である事が明らかになった。

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29（2017）年エイズ発生動向調査によれば、HIV感染者新規報告件数976件は2016年度より微減しているが、日本国籍例が824件、うち男性が802件（前年857件）と大半を占めており、女性は22件（前年28件）と新規感染者の中で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149件（15.3%）、同性間の性的接触による感染が709件（72.6%）で、性的接触による感染は合わせて858件（87.9%）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これからも出現すると考えられる。

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。しかし最近 HIV 感染症に対する薬物療法は非常に有効になるとともに開始が早まる傾向にあり、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、血中濃度測定感度以下となっている症例が殆どとなっている。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、かつ血中 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され、2015年には我が国でも HIV 感染男性であっても血中 HIV ウイルス量が 20copies/ml 未満の場合、「感染リスクを説明した上で、自己責任による排卵期の性交渉」が対応として示されている（表1）。

しかし無制限の自然性交には、一定のリスクも存在する。たとえば尿路感染症がある例では感染危険性が高まり、また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いることから、自然性交による妊娠企図は危険

性がまったくないとはいえないと同時に、水平感染の危険性が予測しにくいという問題がある。

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の状況について、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あるいは人工授精を行うことを最終的な目的として、精液中のウイルス検定法の信頼性について、その方法論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

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、2018年12月までに精液洗浄を行った119夫婦についてみると、夫の平均年齢36.9歳、妻の平均年齢34.8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2)。この119例全例で洗浄は成功し、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。この5年間の新規治療希望夫婦数は若干減少しているものの、2018年は18夫婦が治療を求めて訪れている(図1)。ただ、中に自然性交を試みたが妊娠しないために訪れた、という夫婦も複数認められ、自然性交という option が普及していることが推察される。

表1. 男性が HIV 陽性の場合の挙児対応

精液検査	血中 HIV-RNA (copies/ml)	挙児対応
良好	<20	・感染リスクを説明した上で、自己責任による排卵日の性交渉 ・より安全な方法を希望する場合は精子洗浄を用いた人工授精や体外受精・顕微受精
	≥20	・精子洗浄を用いた人工授精 ・より安全な方法を希望する場合は精子洗浄を用いた体外受精・顕微受精
不良	関係なし	・精子洗浄を用いた人工授精や体外受精・顕微受精

* 1/1000sexと言われる
(厚生労働科学研究「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」2015年3月)

表2. 東京医大における洗浄症例 (2014/5-2018/12)

1) 年齢	夫	36.9歳 (27-49)
	妻	34.8歳 (22-48)
2) 感染経路	異性間性的接触	40 (34%)
	同性間性的接触	36 (31%)
	薬害	15 (13%)
	不明	27 (23%)

洗浄精子を用いた顕微授精・凍結胚移植の結果、これまで68例の妊娠例を得ている(表3)。このうち一回でも臨床妊娠が成立した症例は46%、一回でも on-going 妊娠が成立した症例は37%であった。胚移植あたりの妊娠率は26%、on-going 妊娠率は20%で、平均移植胚数は1.38個、移植胚1個あたりの着床率は21%であった。2018年12月までに分娩43例(うち双胎3例)と on-going 妊娠8例をえており、現在までのところ先天異常を認めていない(表4)。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。

精液洗浄を行った夫の HIV 治療状況を見てみると、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4%にすぎないことから、早期治療開始の原則が徹底さ

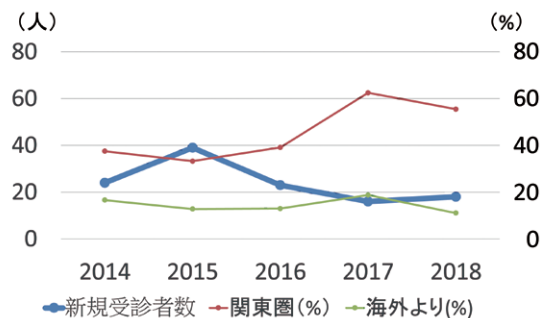


図1. 新規治療希望夫婦数と内訳

表3. 洗浄精液による不妊治療結果 (1)
(2014/5-2018/12)

	n	(%)
妊娠(症例あたり)	55/119	(46)
On-going妊娠(症例あたり)	44/119	(37)
妊娠(胚移植あたり)	68/262	(26)
On-going妊娠(胚移植あたり)	53/262	(20)
平均移植胚数	1.38	
	(361/262)	
胚あたり着床率	75/361	(21)

表4. 洗浄精液による不妊治療結果 (2)
(2014/5-2018/12)

	n	(%)
総妊娠数	68	
分娩	43	(63)
うち双胎	3	
On-going妊娠	8	(12)
自然流産	17	(25)

現在までのところ先天異常なし

れており、病状が安定していることが示されている（表5）。血中ウイルス量は測定感度以下（40 以下）である症例が 87%と多数である。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。

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たのち（承認番号 3202）、日本産科婦人科学会に登録して施行している。なお、2019 年度以降はこれまでウイルス検定を行っていた慶應義塾大学医学部微生物学教室が検査を中止することが予定されており、その後継として株式会社ハナ・メディテック（東京都新宿区、代表取締役 加藤真吾）に検査を委託して診療を継続する予定で有り、現在倫理委員会にて審査中である。

表5. 東京医大における洗浄症例（3）
（2014/5-2018/12）

1) 化学療法を受けている割合	110/119	(92)
2) CD4数	<200	5/113 (4)
	201-350	16/113 (14)
	351-500	36/113 (32)
	501-750	39/113 (35)
	>750	17/113 (15)
平均	519	(90-1151)
3) 血中VL	VL max	2.1x10 ⁵ copies/ml
	<40の割合	100/115 (87)

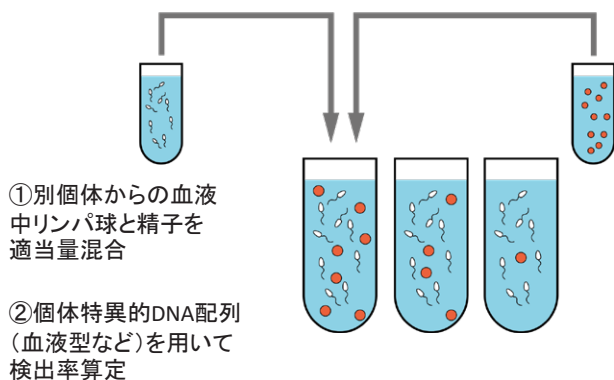


図2. 別個体からのリンパ球・精子混合液による検出率算定

2) 射出精液中ウイルス量の検定

今年度研究では、大過剰の精子の中に少量存在するリンパ球中の遺伝子を検出する検出率算定のモデルとして、異なるヒト個体からのリンパ球・精子混合液による検出率算定を考案した（図2）。具体的には、異なる個体からの血液中リンパ球と、精子を、既知の割合で混合し、どの程度の精子中であればリンパ球何個が検出できる、と言う率を算定しようというものである。たとえばこの方法で1億個の精子中1個のリンパ球にある遺伝子が検出できれば、検出率は1億精子あたり1個、となる。

この実験には異なるヒト個体を識別する遺伝子が必要であるが、今回は個体特異的 DNA 配列として、情報が得られやすく、また偶発的所見などの問題が起こる危険性が少ないことから、ABO 血液型遺伝子を用いることとした。まず図3に示すようなプライマーを設計した。forward primer (A,B) は 261 番塩基が G の場合のみ有効、対して (O) は 261 番が欠失の場合のみ有効なプライマーとなる。同様に reverse primer(A,O) は 297 番塩基が A の場合のみ、(B) は G の場合のみ有効となる。これらのプラ

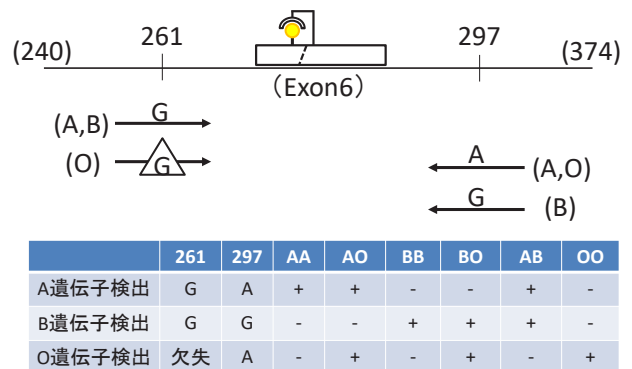


図3. プライマー設計

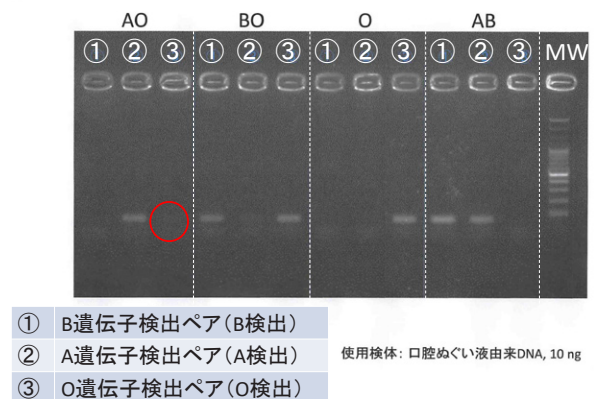


図4. プライマーの有効性検定

イマーを組み合わせると、たとえばA遺伝子を検出するためにはforward primer (A,B)とreverse primer (A,O)の組み合わせを用いればよく、これで遺伝子型AA、AO、ABの場合にPCR反応が起こる。同様にB遺伝子検出はforward primer (A,B)とreverse primer (B)の組み合わせ、O遺伝子検出はforward primer(O)とreverse primer(A,O)で、それぞれPCR反応が起こるはずである。

設計したプライマーペアの有効性をまずPCRで検証したのが図4である。偽陽性を避けるために60cycleという高増幅度の条件を設定したが、BとO遺伝子、O遺伝子のみ、AおよびB遺伝子に反応するはずのBO,O(OO),AB型の個体はそれぞれ予想通りの結果となった。しかし左列のAOと申告された個体では、O遺伝子にO遺伝子検出プライマーペア(forward primer(O)とreverse primer(A,O))が、予想に反して反応しなかった。PCR産物の塩基配列解析を行った結果、この個体ではO遺伝子の297番の塩基がAではなく、B遺伝子と同様のGであったことが明らかになった(図5)。

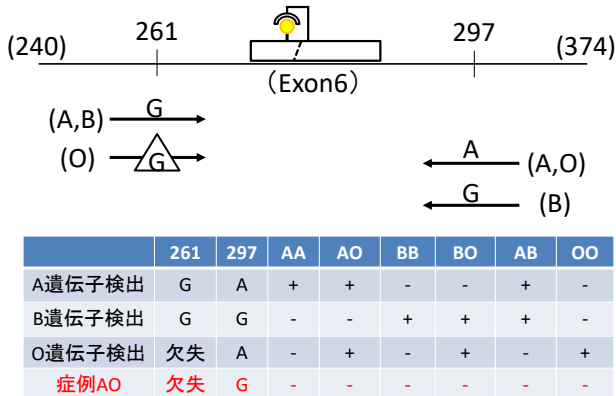


図5. 症例AO

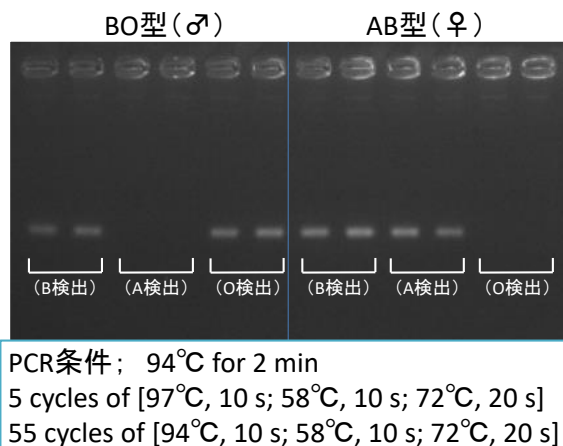


図6. ドナーペア例での遺伝子型確認

実際にドナーとして提供を申し出た男女のリンパ球の解析結果を図6に示す。このドナーペアではBO型の男性ではB検出プライマーペアとO検出プライマーペアでバンドが見られ、一方AB型の女性ではB検出プライマーペアとA検出プライマーペアでバンドが見られるという予想通りの結果となった。

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、2018年度の患者背景(夫婦の年齢、感染経路)は2014年度から2017年度とほぼ同様であった。

2017年度同様、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若干減った一因として、前述した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。そのことは、前述したように自然性交を試みたが妊娠しないために訪れた、という夫婦が複数いたことから裏付けられる。

しかしその一方で、治療を希望した119カップル中で、感染が判明する以前に既に自然性交で挙児を得て、2児目を顕微授精治療によって希望して来院したカップルが16カップルいたことは注目すべきである。これらのカップルは、自然性交で妊娠可能であるにも関わらず、二児目の妊娠方法としてわざわざ負担の多い顕微授精を選んでいることになる。その理由は不明であるが、ひとつは既にいる未感染の子どもの負担も考え、考えられる限り水平・垂直感染の危険性の少ない方法をあえて選択したのではないかと推察される。このようにいくら測定感度以下の個体では他人への感染力がほぼ無い、という事実が認識されはじめていても、実際に子どもをつくる、セックスをする、と言う場面での夫婦の選択には別の要素が入ってくる可能性がある。

もう一つ、夫婦がこの治療を選ぶ理由として、もともと自然性交では妊娠しにくい夫婦である場合も考えられる。不妊夫婦の割合は年々高まっていることから、今後こうした夫婦もまた増えてくると考

えられる。

いずれにしても、すでに本治療で 43 分娩、46 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、かつ未だそれを必要としている夫婦が存在することが再確認された。

2. 射出精液中ウイルス量の検定

現在挙児希望のほとんどの 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。もしこのような例で、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の意味で有用な情報となる。第一に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夫婦自身が客観的に確認することが可能となる。これは、自然性交をえらぶか、体外受精を選ぶかという夫婦の選択に影響してくる可能性があるだろう。第二にウイルス陰性であると検定できた精液だけを（洗浄せずに）凍結保存して人工授精を行うことにより、水平感染の危険性を減らすことも可能となる（図 7）。この方法であれば、現在の洗浄法と比べて格段に多量の精子を利用できることから、一回の凍結で数回の人工授精も可能となり、臨床的治

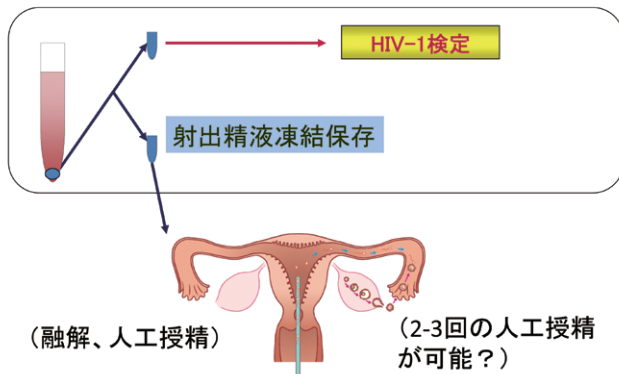


図 7. 射出精液を用いた人工授精

表 6. ウイルス遺伝子検出の標的は感染リンパ球と考えられる

- 1) 血中では遊離ウイルスは測定感度以下
- 2) 感染力(細胞内侵入力)
- 3) 少量が精子とともに沈降

問題点:

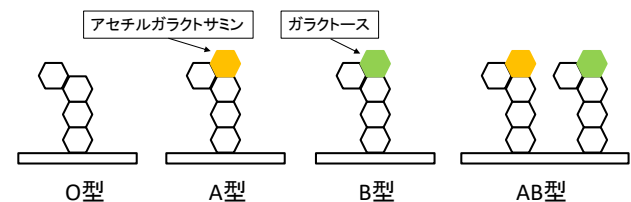
- 1) 大過剰の精子 DNA からの検出率が不明

療としての現実性がでてくる。

精液中で感染源として重要なウイルス遺伝子検出の標的細胞は、とくに治療奏功例においては主に洗浄の際に精子とともに沈降する感染リンパ球と考えられる（表 6）。その理由は、1) 精液中遊離ウイルス量は血中の約 1/10 と言われることから遊離ウイルスが精液中に存在する可能性は低い、2) リンパ球内のウイルスは既に感染が起きていることから感染力(細胞内侵入力)を持っていると考えられる、3) 実際に洗浄の際に少量が精子とともに沈降し、感染源となっている可能性がある、ことからである。しかしリンパ球中のウイルス検出の問題点として、大過剰の精子 DNA からの検出は、PCR の特性上困難で、その検出率を確認することが難しい。

標的遺伝子として設定した血液型遺伝子は、周知の通り赤血球上の O 型遺伝子糖鎖に、A 型ではアセチルガラクトサミン転移酵素がアセチルガラクトサミンを結合させ、B 型ではガラクトース転移酵素がガラクトースを結合させてそれぞれも血液型物質を作る（図 8、上段）。キーエンザイムであるアセチルガラクトサミン転移酵素、ガラクトース転移酵素はおそらく同じ遺伝子（アセチルガラクトサミン転移酵素遺伝子）から点変異によって進化したもので、O 型ではこの遺伝子の上流エクソン 6 の 261 番目の塩基に欠失があってフレームシフトが起こり、終止コドンが入るためにどちらの活性も持たない短縮タンパクができる。それぞれの遺伝子の遺伝子配列は、原則図 8 下段に示したところだけが塩基配列に違いが見られると考えられている。

血液型遺伝子は、誰がどの遺伝子を持っているかが容易に情報として得られることから候補としたが、



エクソン	6		7		8		9		
CDS*	261	297	526	657	703	796	803	930	
A型	G	A	C	C	G	C	G	G	アセチルガラクトサミン 転移酵素
B型	G	G	G	T	A	A	C	A	ガラクトース転移酵素
O型	欠失	A	C	C	G	C	G	G	短縮タンパク質

*CDS; coding sequence

島田ら、IATSS review 40(1): 45-54, 2015

図 8. 血液型と遺伝子変異

もうひとつ、疾患との関連がそれほど強くないことを考慮した。提供者をリクルートするに際して、もし標的とした遺伝子が疾患と関連があるかもしれないことが後からでもわかると、その情報は本人に予期せぬ影響を与えうる（偶発的所見）。しかし血液型は多くの人々が自分ですでに知っている遺伝子型であり、後に人生を左右するような情報となる可能性は少ない。このことは、たとえば極端な比較例として、劣性疾患遺伝子を個体識別の標的遺伝子とした場合を考えれば容易にその危険性が想像できるであろう。

今後リンパ球に組み込まれた HIV 遺伝子の検出率を検定するためには、リンパ球核 DNA に 1 コピー含まれて PCR で検出可能な遺伝子であることが理想である。そこで、あえてエクソンをまたがないように、同一エクソン内にプライマーペアを設定した。このプライマーが血液型遺伝子特異的に反応すれば、プライマー間の配列に適合する Taqman プローブを設計することにより、定量的 PCR の系を構築することが可能となり、精子とリンパ球の混合率ごとに検出率を検定できる。

今回の実験で、このプライマーペアが定量的 PCR プライマーとして有効である可能性が示されたが、その際に今回発見されたような、多数存在すると考えられる血液型遺伝子亜型を考慮する必要があることが示された。

今後は、このプライマーを元に実際に Taqman プローブを設計してその感度・特異度を確認するとともに、個々の提供者について、遺伝子検出に有効な定量 PCR 系を設定する必要がある。これを考慮しながら、次年度以降実験を進めていく予定である。

結論

2018 年度、新規来院患者は通常の体外受精の症例に比較するとやや若年で、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 119 夫婦のうち、43 症例に挙児を得、それ以外に 8 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。

一方、射出精液中の信頼性のあるウイルス量検定については、血液型の異なる二人の提供者に由来するリンパ球と精子を混合して、血液型遺伝子の違いを指標として大過剰の精子中からのリンパ球遺伝

子検出法を確立することを考案した。今年度、核内ゲノムに存在する血液型遺伝子を識別できるプライマーペアを設計し、その有効性を確認したが、血液型遺伝子には亜型が存在するため、系として用いる場合は実際に提供者のゲノムを用いて確認することが必要である。

健康危険情報

該当なし

知的財産権の出願・取得状況

該当なし

研究発表

1) 論文

久慈 直昭, 小島 淳哉, 西 洋孝. 【生殖医療のいま】他科疾患と生殖医療 他科疾患と女性不妊症. *Modern Physician*(0913-7963)38 巻 7 号 Page741-745. 2018.07

2) 口頭発表

久慈 直昭. 生殖医療の医療安全, 第 59 回日本卵子学会 (埼玉). 2018.5.26-27

山中 紋奈, 北水 真理子, 上野 啓子, 長谷川 朋也, 小島 淳哉, 伊東 宏絵, ○久慈 直昭, 西 洋孝. HIV 陽性精液からのリンパ球分離に関する基礎的検討. 旭川市民文化会館. 2018.9.6-7

本田 徹郎 (倉敷中央病院 産婦人科), 久慈 直昭, 丸山 理恵, 須藤 弘二, 加藤 真吾. 健康な HIV 陽性男性が陰性女性との間に子供を持つために 洗浄精子を用いた顕微授精について. 第 32 回日本製図学会学術集会・総会 (大阪). 2018.12.2-4

文献

1. Harada T, Kuji N, Ishihara O, Ichikawa T, Irahara M, Katagiri Y, Saito H, Harada T, Wada-Hiraike O, Taniguchi F; Ethics Committee in Japan Society of Reproductive Medicine. Guideline for cryopreservation of unfertilized eggs and ovarian tissues in Japan Society of Reproductive Medicine: Ethics Committee in Japan Society of Reproductive Medicine. *Reprod Med Biol.* 23;18(1):3-6. Oct 2018
doi: 10.1002/rmb2.12236. eCollection 2019 Jan.
2. Tanaka A, Suzuki K, Nagayoshi M, Tanaka A, Takemoto Y, Watanabe S, Takeda S, Irahara

M, Kuji N, Yamagata Z, Yanagimachi R.; Ninety babies born after round spermatid injection into oocytes: survey of their development from fertilization to 2 years of age. *Fertil Steril.* 110(3):443-451. Aug 2018
doi:10.1016/j.fertnstert.2018.04.033.

3. Hasegawa T, Kuji N, Notake F, Tsukamoto T, Sasaki T, Shimizu M, Mukaida K, Ito H, Isaka K, Nishi H.; Ultrasound Elastography can Detect Placental Tissue Abnormalities. *Radiol Oncol.* 6;52(2):129-135. Jun 2018
doi:10.2478/raon-2018-0024. eCollection Jun. 2018