

(5) クリニカルカンファレンス(3) ; 産婦人科と感染症を考える

4) HIV-discordant couple に対する IVF-ET

座長：江東病院顧問
松田 静治

荻窪病院
血液科 部長
花房 秀次

獨協医科大学教授
稲葉 憲之

はじめに

HIV 感染者の現状

現在、HIV 感染者は世界中で急速に増加しつつあり、WHO によると2005年末で約4,030万人が感染していると推測されている。アフリカをはじめとする発展途上国での感染者増加が深刻な問題となっているが、アジアにおいても中国、インドでの HIV 感染者の爆発的な増加が懸念されている。一方、先進国の中で日本は唯一 HIV 感染者が急増しており、実際の感染者は2006年では約2万人を越えていると推測されている。

HIV/エイズ診療の進歩はめざましく、1996年以後、プロテアーゼ阻害剤を含む多剤併用療法 Highly active antiretroviral treatment(HAART)の普及によりエイズによる死亡者は80%以上減少し、エイズは死の病気ではなくなりつつある。現在では、HIV 感染者は長期生存が可能になり、結婚して子どもを求める夫婦が増えてきており QOL の改善が求められている。しかし、現段階ではエイズを完全に治すことはできず、薬剤を飲み続ける必要があり、長期内服に伴う重度の副作用が深刻になっている。HIV に感染した乳幼児の予後はいまだに不良で、妊婦の抗 HIV 剤内服には催奇形性問題もある。そのため我々は単に母子感染を防ぐだけでなく、母も子も感染させないために、HIV 感染者の精液から HIV を完全に除去し100%安全に子どもができる方法を検討してきた¹⁾。

精液中の HIV の存在様式(図1)

精液には精漿や精子の他に白血球、微生物、下着の繊維などが存在する。精液中では精漿に浮遊する HIVRNA と、HIV 感染した単核球 DNA から作られる HIVRNA がある(図1-a)。精子表面には CD4は発現しておらず精子に HIV が感染することはない。しかし、精子表面に HIV が付着するとの報告があり、Swim up 法で完全に除去できるか否かが問題である。

IVF-ET for HIV-discordant Couple

Hideji HANABUSA

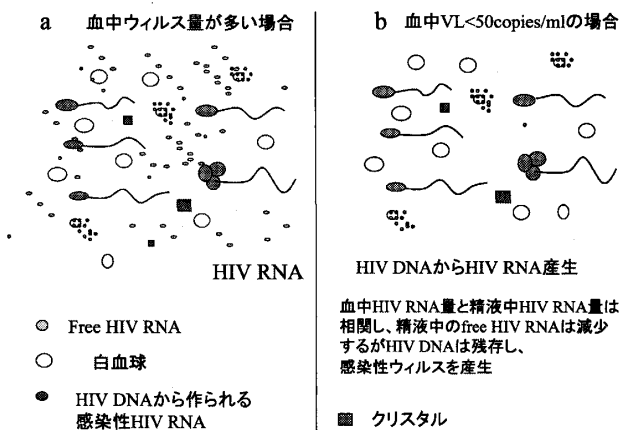
Department of Hematology, Ogikubo Hospital, Tokyo

Key words : HIV · Semen · Swim-up · IVF · RNA

HIV 感染者のパートナーへの 2 次感染の危険性比較

1980年代後半に行われていた AID によって HIV 感染者の AID で 2 次感染率が 3.8% であることが判明し、HIV 感染者の人工授精が禁止されてきた。また、コンドームを時々使用しない夫婦での 2 次感染率は毎年 4.8% と推測されている。HIV 感染は 1 回の性交渉で感染する危険性は 1/1,000 とされているが、血中のウィルス量が高い場合は感染確率が高く、血中のウィルス量が低い場合は 2 次感染の危険性が低くなる。

イタリアの Semprini et al. は現在までに 2,000 人以上に swim up による人工授精を行い 2 次感染が全くないと報告している。しかし、彼らの方法ではウィルスの除去は完全でなく、我々は改良を積み重ねた方法を開発し科学的に安全性を証明した。



(図 1) 精液中の HIV 存在形式

多剤併用療法で血中 HIV RNA が検出限界以下になった場合の危険性(図 1-b)

精液中の HIV RNA 量は血中 HIV RNA 量と相関すると考えられ、血中 HIV RNA 量が低いほど 2 次感染率が低くなる。HAART によって精液中の free HIV RNA は減少するが、精液中の感染単核球の HIV DNA は残存し 2 次感染する危険性が残っていることが証明されている。抗 HIV 療法で血液中のウィルス量(viral load: VL)が検出限界以下になった場合も、精液中の単核球 HIV proviral DNA は残存し、感染性の強い HIV RNA が作られており、精液を介する二次感染の危険性があるのでコンドームを使用するように勧告されている。

改良 Swim up 法: HIV 除去を目的とした Percoll 法と Swim up 法(図 2)について以下に述べる。

1) 精液の希釈

精液からウィルスを除去するには精液を希釈する方が除去率が高まる。

2) 希釈精液の処理

精液に含まれる成分で精子よりも重いのは、下着の繊維やクリスタル、ムチン成分である。遠心処理の時に精子よりも比重の重い成分が含まれるとウィルスや細胞成分を巻き込んで最下層の精子分画に混入してしまう。希釈精液を静置して精子よりも重い成分を沈殿させて上層の精子浮遊液を採取する。

3) 精子浮遊液の濾過

クリスタルやゴミをフィルターを使って濾過して、重い成分を除去する。

精液を希釈して、Percoll の連続密度勾配層に希釈精液を重ねて遠心分離すると、単核球や浮遊 HIV が除去される。その時の Percoll の濃度設定と密度勾配の作成が最も重要である。

4) Percoll 分離法の技術的問題

海外で行われている 90% と 45% の 2 層の分離液による遠心分離では原精液の HIV 除去

率は高くない。それでもイタリアで2,000人近い人工授精で2次感染者がでていないのは精液中の viral load は血中の viral load と相関しており治療などにより大半が10,000copies/ml以下であると推測されること、および感染性を持った HIV が1/10,000程度であり2次感染が成立するにはある程度以上のウィルス量が必要であるからではないかと考えている。我々が以前に報告した4層の Percoll 法での HIV 除去率は Semprini et al. の方法の100倍以上は高いと考えられるが、それでも実際に感染者の精液を用いて実験を行うと12例中1例で多段 Percoll 法だけでは HIV を検出限界以下にできなかった。その原因として、精液に含まれる下着の繊維やクリスタルなどの除去が十分

でなかったと考えている。比重の重い不純物を濾過して取り除いておかないとウィルスや細胞成分を巻き込んで沈殿させてしまう危険性が生じる。HIV RNA のみでなく、HIV proviral DNA の検討においても Swim up 法を併用して初めて検出限界以下にすることが可能になった。

今回、我々は共同研究者の兼子らにより4層の Percoll 法をさらに改良し、98~30% Percoll の連続密度勾配を作成して遠心分離することにより HIV の除去率を高めて、精子の回収率もよくすることに成功した。さらに精子表面に付着した HIV も完全に除去できることを超高感度 PCR 法(検出限界は1 copy)で確認したので、臨床実施に踏み切った。

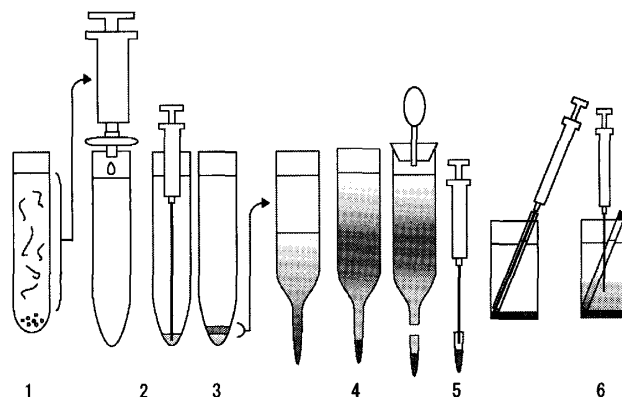
5) 精子回収法の技術的問題

通常行われているように Percoll 法で遠心分離後にまた、最下層の精子を回収するとき、HIV 濃度が高い上層部から吸引していくと試験管の管壁を伝って HIV や白血球が混入する危険性がある。今回、我々は共同研究者の兼子らが開発した特殊な試験管を用いて上層成分の混入の危険性が全くない方法を導入した。

6) Swim up 法における技術的問題

swim up を行う時に普通は洗浄精子浮遊液に培養液を慎重に重層して swim up してくる精子を回収するのであるが、それでは下層に含まれる HIV を乱流によって混入させてしまう可能性がある。遠心処理後の精子を培養液で洗浄してしまうと、得られた精子分画は swim up で添加する培養液と比重差が無くなりウィルスを混ぜてしまう危険性が高い。今回、我々は培養液の下層に capillary tube を用いて慎重に精子浮遊液(99%Percoll よりも比重が重い)を挿入する技術を導入した。

国立国際医療センターの五味淵らは従来の Swim up 法では HIV が100 copies/ml 以下になったのは9例中5例(55.6%)にすぎなかったと報告している。技術者や方法によっ



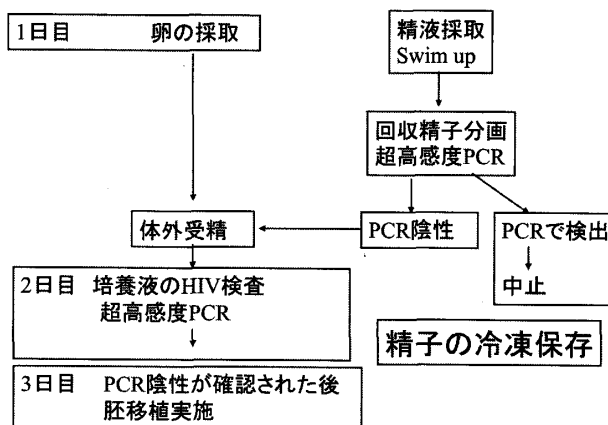
(図2) 1. 精液を希釈して静置し異物を沈殿させる
2. フィルター濾過
3. 遠心処理して濃縮
4. 精子を98~30% Percoll 連続密度勾配に重層し遠心処理する
5. 試験管の先端をカットし、上層成分を混入せずに精子分画を抽出
6. Swim up (Virus等の除去を目的とした改良法)

てウィルス除去率は大きく異なる。

人工授精ではなく、体外受精を選択した理由について

体外受精は人工授精に比して2次感染防止の面では数段優れている。人工授精でHIVが混入した精子を子宮に注入した場合、子宮内の細胞に感染する危険性がある。受精卵にCD4が発現するのは受精後10～20週以後である。体外受精で卵を取り出して精子と培養する時にHIVがもし混入していたとしても

卵には感染せず、HIVの感染性は二日目には10分の1以下に低下する。さらに培養液を2日目に交換し、受精卵を洗浄すると、たとえ精子液にHIVが混入していても相当減少できる。我々は胚移植前に培養液中のHIVが全くないことを超高感度PCRで確認している。



(図3) 体外受精のプロトコール

HIV感染者精子における問題

HIV感染者は、精子の数が減少し、奇形率も高く、運動率も低下しており、Swim upで回収可能な精子は極めて少ない。精子異常の原因として、抗HIV剤の副作用によるミトコンドリア障害が確認され、その他にもDNA損傷が確認された。妊娠するまでに十分な人工授精を繰り返すと妻への2次感染の危険性が次第に高くなってしまう。また卵にHIVが感染する可能性はないと考えており、我々は体外受精を選択した。しかし、体外受精は排卵誘発剤による過剰刺激症候群など女性への負担が大きい。

顕微授精について

精子にHIVが付着していた場合に顕微授精を行うと、強制的にHIVを卵細胞に注入してしまう危険性があるが、超高感度PCRにより付着HIVも除去されることが確認され安全が確認された。ICSIにおける精子の選択は重要な要因と考えられ、選別方法を検討している。

異常精子の排除

HIV感染者の精子には多様な異常が認められる。抗HIV療法によるミトコンドリア障害が電子顕微鏡検査によって確認された。さらにDNA損傷精子も認められる。共同研究者の兼子はDNA損傷精子の除去を検討している。Percoll法で得られた沈澱分画をNycodenz直線密度勾配に層積して沈降平衡を行った結果、精子は2峰性に分布し、下層ではほとんどの精子がDSB陽性、上層ではほとんどがDSB陰性であった。最終的にswim upすることにより、頭部形態、先体反応誘起能とも良好で運動性を有するDSB陰性精子を調製することができた。

実際の実施方法(図3)

HIV陽性で育児希望者は荻窪病院を受診して説明を受け、夫婦個別カウンセリングで参加意思確認後、精液のスクリーニング検査を行う。精子に問題なければ産科施設に紹介

して改めて説明を受け、同意後に実施する。Swim up 法で回収精子浮遊液で HIV が 1 copy も検出されないことを超高感度 PCR で確認して体外受精し、2 日後に培養液にも HIV がいないことを再確認して胚移植を実施する。

超高感度 PCR による 安全確認の必要性

今回の研究で我々は共同研究者の加藤らにより精子浮遊液の HIV RNA, proviral DNA が 1 copy もないことを確認した。HIV が十分に除去されているかどうかを確認されれば、どの方法をとってもよいと思われる。

妻が HIV 陽性で夫が陰性の場合

人工授精を行えば感染を回避できる。

夫婦共に HIV 陽性である場合の対応

夫婦が共に HIV に感染していた場合に子どもを望む場合の対応も問題となる。夫婦感染でも妻に感染した HIV が wild type で薬剤感受性が高く、夫の major clone が薬剤耐性になっている場合、性交渉では妻に薬剤耐性 HIV が新たに 2 次感染する危険性がある。このような場合に体外受精の適応があるか否かは今後の議論を必要とする。

感染対策の必要性

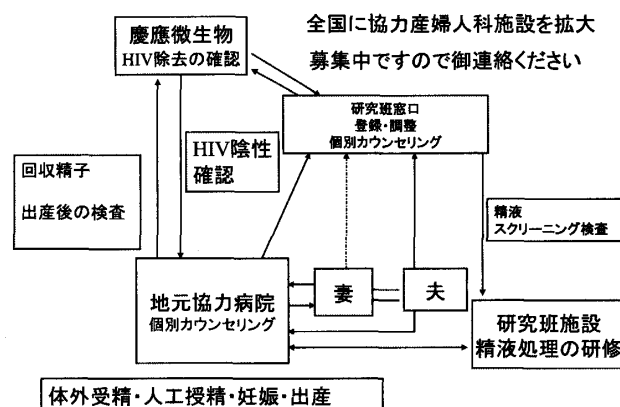
IVF での C 型肝炎 2 次感染の報告もされており、精液中には肝炎ウイルス(B, C, D, G, TTV など)やヘルペス属ウイルスなど多くの感染源が存在する危険性があり、精液処理による感染対策が必要である。

ネットワーク構想(図 4)

現在までに我々の所には100組を超える感染者夫婦が日本各地から子どもの相談に訪れている。今後も HIV 感染者の増加と共に相談件数は増えると予測される。地元の産婦人科で精液処理を行い、ウイルス除去の確認を慶應などの研究施設で行うか、ウイルス除去を研究班施設で行い冷凍して搬送し IVF-ET を地元で行うなどすれば患者夫婦の負担を減らすことができる。さらに、より簡便な人工授精の方法を確立できるように検討中である。研究班に協力していただける産婦人科医がおられたら是非連絡していただきたい。

《参考文献》

1. Kato S, Hanabusa H, Kaneko S, Takakuwa K, Suzuki M, Kuji N, Jinno M, Tanaka R, Kojima K, Iwashita M, Yoshimura Y, Tanaka K. Complete removal of HIV-1 RNA and proviral DNA from semen by the swim-up method: assisted reproduction technique using spermatozoa free from HIV-1. AIDS 2006; 20: 967-973



(図 4) 今後のネットワーク構想