及びカートリッジ部分は、工作の容易さ、コストの 2 点からベリリウム製とベリリウム－銅製の二つで検討を行ったが、ベリリウム製のほうが優るとの結論となった。

図に示した哺乳瓶を用い、日光下に 60 分間置いたサンプルの p24 抗原の産生量はほぼ 0 であった。

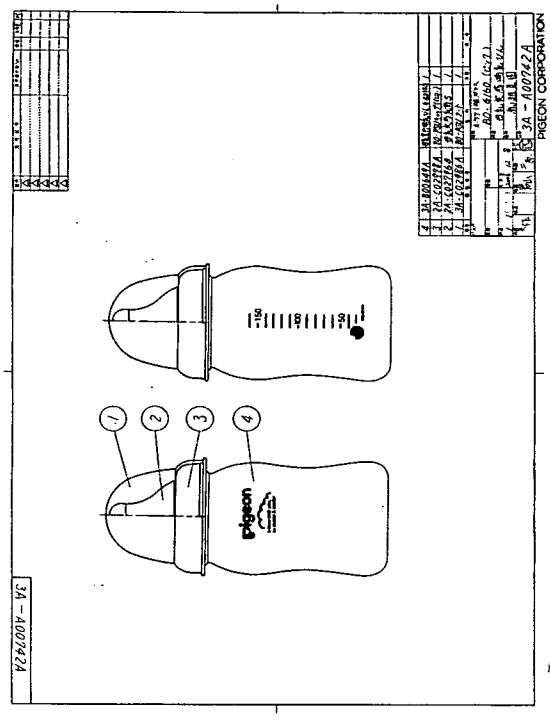


図　哺乳瓶設計図

D　考察

今年は開発途上国での使用が可能とすることを目的に、特殊搾乳哺乳瓶のさらなる改良を行った。なおこの哺乳瓶の有用性の本当の証明のためには、フィールドワークが実施される必要がある。わが国他の多くの国では、HIV 感染母体への抗ウィルス薬の投与、帝王切開による分娩、人工乳による保育などにより母子感染を減少させることが可能となっている。しかし多くの開発途上国では抗ウィルス薬の投与、帝王切開による分娩、人工乳による保育などはコスト面からみて不可能である。この哺乳瓶の有用性を証明するには、開発途上国における水の問題、燃料の問題など国の経済状態に関する状況、文化や識字率などの問題を充分に検討した後のフィールドワークが必要である。

開発した特殊搾乳・哺乳瓶が開発途上国での使用に耐えるかもフィールドワークに負うことになるが、まずは洗浄や取り扱いが容易であること、耐久性が高いことは満足させることができたと考える。

E　結論

HIV の経母乳感染を防止することを目的とし、開発途上国での使用に耐える哺乳瓶の開発を行った。

F　研究発表

1．論文発表

1)名取道也，山口晃史：特集　母乳と人工乳―正しい理解と選択―　ＨＩＶと母乳．産婦人科の実際　2007；56(3)：371-374　3 月

2)Yamaguchi K, Sugiyama T, Takizawa M, Yamamoto N, Honda M, Natori M : Viability of infectious viral particles of HIV and BMCs in breast milk. Journal of Clinical Virology 2007 ; 39 : 222-225

2．学会発表

なし

H.　知的所有権の取得状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

分担研究報告書

子宮頚管粘液中HIVコピー数、α-defensins (1-3)、Secretory Leukocyte Protease Inhibitor (SLPI) 測定による経膣分娩選択の可能性

分担研究者	大島　教子	獨協医科大学産科婦人科学講師
研究協力者	戸谷　良造	和合病院　副院長
	渡辺　博	獨協医科大学産科婦人科学教授
	深澤　一雄	同上
	有坂　治	獨協医科大学小児科学教授
	西川　正能	獨協医科大学産科婦人科学助教
	岡崎　隆行	同上
	庄田　亜紀子	同上
	根岸　正実	獨協医科大学産科婦人科学大学院
	林田　志峯	同上
	吉田　穂波	ウィミンズ・ウェルネス銀座クリニック
	熊　曙康	大連市婦産医院助教授
	Deshratn Asthana	University of Miami Miller School of Medicine, Assistant Professor
	Mugerwa Kidza Yvonne	Makerere Medical School

研究要旨

先進国においてHIV母子感染予防対策の一環としての選択的帝王切開術は標準的であるが、母体低HIVウイルス量の場合における帝王切開分娩の意義は未だcontroversialである。本研究では、子宮頚管粘液中のHIVウイルス量と生体感染防御マーカーであるα-defensins (1-3)およびSLPIを測定し、その相関よりα-defensins (1-3)とSLPIの経膣分娩選択における有用性を検討する。

A. 研究の目的

現在、先進諸国におけるHIV-1母子感染率は約1.5%と、適切な医療介入を受けたHIV-1感染妊婦の児への垂直感染率は低率である。しかしサハラ以南のアフリカ諸国や近年HIV-1感染者の増加が著しいアジアにおいて、依然HIV-1母子感染は主要なHIV-1感染経路の1つである。一方、先進諸国において標準化されている母体低HIV-1ウイルス量（1,000 copies/mL以下）における選択的帝王切開の有益性に関する明らかなエビデンスは得られておらず、またHIV感染妊婦においては術後合

併症が有為に増加するという報告がある。

一方、近年種々の自然免疫因子の研究が盛んであるが HIV-1 と自然免疫防御を担うα-defensinsおよびSLPIの２つの因子の関連が示唆されている。本研究では頚管粘液中のSLPI とα-defensins を測定、母体低HIV-1 ウイルス量症例においてこれらの因子と母子感染とに関連を認めた場合、分娩方法選択に際し補助的診断となる事が考えられ、よりリスクの高い帝王切開術を避ける手段となり得る。また HIV-1 母子感染の機序は未だ完全に解明されておらず、自然免疫防御因子の側面から解明を試みる当研究は必要と考えられる。

B. 研究方法

１） α-defensins

日本人の HIV 感染妊婦（２名）の分娩時母体血-臍帯血ペア検体においてα-defensin 1-3濃度をsandwich ELISA kitにより測定し、HIV 非感染妊婦の結果と比較した。

２） SLPI

本邦においては、HIV-1 感染妊婦の症例数が極めて少ないため、検体を米国マイアミの Jackson Memorial Hospital で採取した。対象は 34 名の HIV-1 感染妊婦で、インフォームドコンセントを得て子宮頚管粘液および血清の検体採取を行った。

収集された頚管粘液および血清の SLPI 定量は市販されている ELISA キットを用い測定 (Quantikine kit, from R&D System, Minneapolis, Minn.)。頚管粘液および血清中HIV-1 ウイルス量測定はRT-PCR kit (AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test V1.5, Roche Diagnostic, Indianapolis, IN)を用いた。更に母体T細胞サブセットをフローサイトメトリーで解析した（FACS Calibur, BD Biosciences, San Jose, CA.)。

また研究協力施設の小児科と連携し HIV-1 感染妊婦の出生児の母子感染成立の有無を追跡した。

（倫理面への配慮）

本研究は学内倫理委員会で審理にされ、研究許可を得た。対象候補者に対しては研究参加の依頼、本研究の目的と意義、研究協力への参加は本人の意思による”voluntary”である事を伝え、同意を得られインフォームドコンセント（母国語にて作成）に署名をした者を研究対象者として登録した。また研究協力への同意の撤回の自由についても説明した。

個人情報の保護に関しては、研究対象者と直接接する研究者（臨床医師）のみがそのデータを扱い、その管理も徹底した。

C. 研究結果

１） α-defensins

臍帯血中α-defensin 1-3 濃度を図１に示す。臍帯血中α-defensin 1-3濃度は陰性妊婦群の範囲内にあり、母体血／臍帯血濃度比は 0.09 で陰性群（4.0）より低値であった。

２） HIV-1 ウイルス量と SLPI

患者背景を表１に示す。人種構成はアフリカ系米国人 21 人（62%)、ハイチ系６人（18%)、ヒスパニック４人（12%)、白人３人（8%）でアジ

ア系はいなかった。HIV 感染経路は 32 名（94%）が heterosexual contact によるもので、母子感染によるものが 2 名いた。

対象の 34 人の HIV-1 感染妊婦のうち 5 人のみ（5%）に検体採取の際（初診時）に、抗 HIV 療法が行われていた。85%の妊婦に血中 HIV-1 ウイルス量が 25 copies/ml 以上検出され、頚管粘液中では 68%に検出された。平均 HIV-1 ウイルス量は血中 93,530 copies/ml、頚管粘液中 8,018 copies/ml であった。血中および頚管粘液中の HIV-1 ウイルス量に統計学的有為な相関関係を認めた。

一方 34 例中 5 例（14.7%）において、頚管粘液中 HIV-1 ウイルス量が血中を上回った。その個々の値はそれぞれ血中 44 / 頚管粘液 210（以下 x/y）、<25/1,000、4,600/20,000、1.800/11,000、39,000/100,00 であった。つまり血中 HIV-1 ウイルス量が頚管粘液中 HIV-1 ウイルス量を反映しない症例が存在しており、血中 HIV-1 ウイルス量が 1,000 copies/ml 以下の HIV-1 母子感染低危険群において、局所の HIV-1 増殖を確認するために頚管粘液中 HIV-1 ウイルス量を測定する事は有用であると考えられた。

SLPI 値の比較では、CVF 中において plasma SLPI の約 10 倍の高値を呈した（図２）。

HIV-1 感染妊婦と HIV-1 非感染妊婦の CVF SLPI 値は、非感染者で有意に高かった。また HIV-1 感染者において妊婦の CVF SLPI は非妊婦 CVF SLPI より高値であった(Mean±SD; 397.2±286.9 ng/dl vs 184.1±194.9ng/ml, P<0.01)。しかしながら、HIV-1 ウイルス量と SLPI 値は血中、CVF 中において統計学的有意な相関を認めなかった。（図３）

D. 考 察

1）α-defensins

2002 年α-defensin が CD8 T-cell antiviral factot（CAF）の候補であるとの報告以来、defensins の抗HIV活性の研究は内外で盛んに行われているが、HIV-1 母子感染と defensins に関する研究は少ない。母乳中α-defensin が HIV-1 母子感染と関連を認めたという報告があるが、妊婦血中および頚管粘液中α-defensin と HIV-1 母子感染との研究は調べる限り未だない。一方、妊娠中の細菌性腟症と腟分泌液中 defensins 濃度に有為な相関関係を認めた報告があり、頚管粘液中α-defensin の局所感染防御と HIV-1 母子感染の研究は興味深いと思われる。今回は予備実験のため、カリニ肺炎を併発した HIV-1 感染妊婦の血中α-defensins のみの測定であった。HIV 陽性妊婦の血中α-defensin 1-3 濃度は、陰性群とは違って妊娠経過とともに低下する傾向にあった。治療経過より、血中α-defensin 1-3 濃度がカリニ肺炎の病勢を反映したと考えるのが最も自然であるが、高濃度のα-defensin 1-3 が抗HIV 作用を発揮した可能性も否定はできない。また、好中球減少症は AZT の一般的な副作用であり、マウスの好中球分化を抑制したとの報告がある。本症例の臍帯血中α-defensin 1-3 濃度は HIV 陰性群とほぼ同等であった。すなわち母児間血中α-defensin 1-3 濃度勾配が陰性群よりも緩やかであった。母体血中からの移行分に加え、胎児骨髄ではさ

かんにα-defensin 1-3が合成されている。胎児骨髄では、胎盤を介して移行したAZTの作用を受けてもなお豊富なα-defensin 1-3の供給が推測される。実際、AZT治療中の妊婦より出生した児での好中球減少症の報告はない。引き続きHIV陽性妊婦検体について血中α-defensin 1-3濃度を測定すると共に、AZTのヒト好中球への作用機序とα-defensin 1-3放出に対する影響、胎児・胎盤系でのα-defensin 1-3発現状況並びにAZTの作用機序につき検討を要する。

2) SLPI

HIV-1感染妊婦における頚管内HIV-1 VLは、大部分の症例において血中HIV-1 VLを反映した。現在、分娩前の血中HIV-1ウイルス量が1,000 copies/ml以下の妊婦に対する選択的帝王切開術の有益性は未だ明らかではない*。今回頚管粘液中HIV-VLが血中HIV-VLを上回る症例を１５％認めたことより、頚管内HIV-1 VLの測定は分娩方法の判断に際して有用である可能性が示唆された。

*: Public Health Service Task Force, Recommendation for Use of Antiretroviral Drugs in Pregnant HIV-1 Infected Women for Maternal Health and Interventions to Reduce Perinatal HIV-1 Transmission in the US)

一方、腟分泌物中SLPIは細菌性腟症を含む性感染症合併時に低値を呈し、これがHIV-1感染の感受性を高める危険因子と考えられるという報告があるが、実際にHIV-1感染婦人又は妊婦における頚管粘液中／腟分泌物中SLPIの研究はこれまでのところ１文献のみである。SLPIは粘膜における感染防御免疫において重要な役割を担っている事が判明、ヒト子宮内膜や子宮頚管、脱落膜、羊水中での発現が確認されており女性生殖器における感染防御に大きく関わっていると考えられる。本研究ではHIV-1妊婦における血中および頚管粘液中のSLPI濃度を測定した。頚管粘液では血中の10倍の高濃度であり、SLPIが子宮頚部において粘膜免疫として働いている事がわかる。現在、HIV-1非感染妊婦からの検体を採取しており、コントロール群としてHIV-1群と比較し局所免疫機構を研究する予定である。今回の結果からは頚管粘液中SLPIとHIV-1ウイルス量とに相関は認められなかったが、症例数が少ないため症例数を増やしての検討を行う必要がある。特に母体低HIV-1ウイルス量におけるSLPIと母子感染の関連を調査し、分娩様式選択の補助診断と成りうるか同定を行う予定である。

E. 結　論

頚管粘液中のHIV-1ウイルス量が血中を上回る症例の存在は、HIV-1陽性妊婦の分娩様式を決定する上で血中HIV-1ウイルス量測定以外の補助診断が必要である事を示す。α-defensinsやSLPIなど生体内免疫防御マーカーや頚管粘液中HIV-1ウイルス量がその役目を担っている可能性が考えられ、更なる研究が必要である。

F. 健康危険情報　　なし

G. 研究発表

論文発表

1. Sachdeva N. Yoon S. Oshima K. Garcia D. Goodkin K. Asthana DBiochip Array-based Analysis of Plasma Cytokines in HIV Patients with Immunological and Virological DiscordanceScandinavian J Immunology 1-6,2007
2. Oishi A, Mochizuki Y, Otsu , Inaba N Pilot study of flucoxamine treatment for climacteric symptoms in Japanese women Bio Psychosocial Medicine 12 2007
3. 稲葉憲之、大島教子、西川正能、岡崎隆行、庄田亜紀子、根岸正実、林田志峯、稲葉未知世、和田裕一、喜多恒和、外川正生、塚原優己、名取道也、牛島廣治、戸谷良造、五味淵秀人、尾崎由和、吉野直人、早川 智田中憲一、熊　曙康：予防と対策「スクリーニング無くして対策無し」HIV MTCT：Prevention and Measures HIV Screening in Pregnant Women Is the First Step to Prevent HIV Mother - to - Child Transmission(MTCT)：The Journal of AIDS Reserch 9 6-10,2007
4. 稲葉憲之、大島教子、西川正能、林田綾子、林田志峯、岡崎隆行、庄田亜紀子、根岸正実、稲葉未知世、深澤一雄、渡辺　博 B型肝炎ウイルス・C型肝炎ウイルスの母子感染とその対策：産婦人科治療 95 43-49,2007
5. 高山直秀、庄田亜紀子、岡崎隆行、一戸貞人、斉加志津子、稲葉憲之：妊婦における麻疹中和抗体価、HI 抗体価、PA 抗体価の相関と各測定法の発症予防レベル 感染症学会誌　81　675-680,2007
6. 林田志峯、稲葉憲之、大島教子、西川正能、岡崎隆行、庄田亜紀子、根岸正実、稲葉未知世、高見澤裕吉：感染症検査：周産期医学　37 209-13,2007
7. 稲葉憲之、大島教子、西川正能、林田綾子、林田志峯、稲葉未知世、根岸正実、岡崎隆行、庄田亜紀子、稲葉不知之、多田和美、田所　望、渡辺　博、熊　曙康：B 型肝炎、C 型肝炎ウイルス－産科医の立場から－ 周産期医学　37　1539－43,2007
8. 渡辺　博、西川正能、根岸正実、稲葉憲之 C 型肝炎ウイルスキャリアの妊娠　JIM 18 238-40,2008

学会発表

1. Watanabe H, Tada K, Nishikawa M, Oshima K, Tadokoro N, Inaba N：Maternal smoking and slimness, which factor is much affective on the neonatal birth weight and postnatal wellbeing 3rd APCMFM(China) 29-31.8,2007
2. Mochizuki Y, Oishi A, Igarashi Y, Inaba N Comparison of serum Tartrate-resistant acid phosphatase type 5b assays and other bone resorption markers for monitoring raloxifene therapy.：American society for bone and mineral research 29th annual meeting 9.16-19, 2007 (Honolulu)
3. Mochizuki Y, Oishi A, Inaba N：Comparison of serum Tartrate-resistant acid phosphatase type

5b assays for monitoring raloxifene therapy. The XXth asian and oceanic congress of obstetrics and gynecology 9.21-25,2007 (Tokyo)

4. Kitazawa M, Noguchi T, Hayashida A, Kuno T, Inaba N : Oocyte quality in polycystic ovary syndrome : The international Ovarian Conference 2007(Hakone) 11.2-3,2007
5. 望月善子、大石　曜、大津礼子、稲葉憲之 塩酸ﾗﾛｷｼﾌｪﾝ治療における骨型酒医歯酸抵抗性酸性ﾌｫｽﾀｰｾﾞ(TRACP-5b)測定ｷｯﾄの比較検討：第59回日本産科婦人科学会学術集会（京都）4.14-17,2007
6. 坂本尚徳、田中聡子、山崎龍王、稲葉不知之、亀森　哲、香坂信明、朱　坤、太田順子、深澤一雄、稲葉憲之：当科の婦人科診療におけるFDG-PETの有用性の検討 第59回日本産科婦人科学会学術集会(京都) 4.14-17,2007
7. 大島教子、林田志峯、根岸正実、林田綾子、庄田亜紀子、岡崎隆行、西川正能、田所 望、深澤一雄、渡辺　博、稲葉憲之：HIV-1感染妊婦の頚管粘液中 Secretory Leukocyte Protease Inhibitor(SLPI)と HIV-1ｳｲﾙｽ量 第59回日本産科婦人科学会学術集会(京都) 4.14-17,2007
8. 西川正能、稲葉憲之、大島教子、庄田亜紀子、岡崎隆行、根岸正実、林田綾子、深澤一雄、渡辺　博、大戸　斉、白木和夫 C型肝炎ウイルス(HCV)キャリア妊婦・出生児の取り扱いについて - 厚労省班研究成果に基づいて - ：第59回日本産科婦人科学会学術集会（京都）4.14-17,2007
9. 亀森 哲、太田順子、田中聡子、山崎龍王、稲葉不知之、香坂信明、朱 坤、坂本尚徳、深澤一雄、稲葉憲之：系統的ﾘﾝﾊﾟ廓清を伴う Optimal surgery を施行したⅢc期上皮性卵巣癌におけるﾘﾝﾊﾟ節因子と予後の検討 第59回日本産科婦人科学会学術集会(京都) 4.14-17,2007
10. 稲葉不知之、深澤一雄、山崎龍王、亀森 哲、香坂信明、坂本尚徳、太田順子、稲葉憲之 術前における子宮体癌の筋層浸潤に関する検討：第59回日本産科婦人科学会学術集会（京都）4.14-17,2007
11. 野口崇夫、藤ノ木政勝、久野達也、林田綾子、北澤正文、渡辺　博、深澤一雄、稲葉憲之：ハムスター精子の運動性に対するプロゲステロンの影響：第59回日本産科婦人科学会学術集会（京都）4.14-17,2007
12. 多田和美、渡辺 博、根岸正実、林田綾子、岡崎友紀、岡崎隆行、多田和美、西川正能、大島教子、田所　望、大蔵健義、稲葉憲之 既往に上位胎盤早期剥離既往のある妊婦の出産：第59回日本産科婦人科学会学術集会（京都）4.14-17,2007
13. 林田志峯、稲葉憲之、大島教子、西川正能、岡崎隆行、庄田亜紀子、林田綾子、根岸正実、深澤一雄、渡辺　博、高見澤裕吉：B型肝炎ウイルス(HBV)母子感染予防 - 厚労省班研究における当科方式の再検討と文科省科学研究費による新方式の国際共同研究 ― 第59回日本産科婦人科学会学術集会(京

都）4.14-17,2007

14. 大島教子、林田志峯、根岸正実、庄田亜紀子、岡崎隆行、西川正能、渡辺　博、稲葉憲之：頚管粘液中 Secretory Leukocyte Protease Inhibitor(SLPI)と HIV ウイルス量の関連：第 25 回日本産婦人科感染症研究会（東京）6.16,2007
15. 西川正能、稲葉憲之、大島教子、林田志峯、庄田亜紀子、岡崎隆行、根岸正実、深澤一雄、渡辺　博、大戸　斉、白木和夫：厚労省班研究成果に基づくＣ型肝炎ウイルス(HCV)母子感染のリスクファクターとキャリア妊婦・出生児の取り扱い　第 25 回日本産婦人科感染症研究会（東京）6.16,2007
16. 林田志峯、稲葉憲之、根岸正実、岡崎隆行、庄田亜紀子、西川正能、大島教子、深澤一雄、渡辺　博、高見澤裕吉：B 型肝炎ウイルス(HBV)母子感染予防 - 当科方式および新方式の再検討：第 25 回日本産婦人科感染症研究会（東京）6.16,2007
17. 根岸正実、岡崎隆行、林田志峯、庄田亜紀子、西川正能、大島教子、渡辺　博、稲葉憲之、HIV 感染妊娠の２症例：第 25 回日本産婦人科感染症研究会（東京）6.16,2007
18. 岡崎隆行、林田志峯、根岸正実、庄田亜紀子、西川正能、大島教子、渡辺　博、稲葉憲之：膣分泌物中 Mycoplasmas 陽性妊婦における臨床的検討：第 25 回日本産婦人科感染症研究会（東京）6.16,2007
19. 稲葉不知之、田中聡子、朱 坤、山崎龍王、亀森 哲、香坂信明、坂本尚徳、山澤功二、深澤一雄、稲葉憲之：子宮体癌における筋層浸潤の治療前評価：第 66 回日産婦栃木地方部会　（栃木）9.9,2007
20. 岡崎隆行、吉田穂波、吉田 敦、鈴木里和、奥住捷子、大内友二、林田志峯、根岸正実、庄田亜紀子、西川正能、大島教子、渡辺 博、稲葉憲之：膣分泌物中 Mycoplasmas 陽性妊婦における周産期予後の検討：第 56 回日本感染症学会　東日本地方部会総会（東京）10.27,2007
21. 大島教子、根岸正実、岡崎隆行、渡辺 博、稲葉憲之：HIV 感染妊婦における頚管粘液中 Secretory Leukocyte Protease Inhibitor(SLPI)と HIV ウイルス量の関連　第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会（広島）11.28-30,2007

H. **知的財産権の出願・登録状況**　　なし

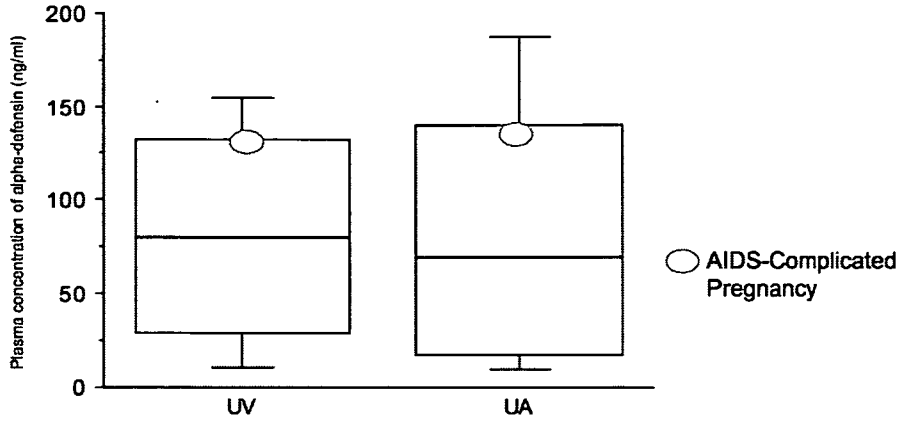


図１　臍帯血中α-defensins 濃度の比較

表１　　患者背景

産科歴	初産	14 (41.2%)
	経産	20 (58.8%)
初診時妊娠週数	1st trimester (-12wks)	7 (20.6%)
	2nd trimester (13-27wks)	21 (61.8%)
	3rd trimester (28wks-)	6 (17.6%)
HIV 感染診断時期	今回妊娠前	28 (82.4%)
	今回妊娠中	6 (17.6%)
初診時 ART の有無	有	5 (14.7%9
	無	29 (85.3%)

表2　頚管粘液中 HIV-1 ウイルス量が血中を上回った症例

年齢	妊娠週数	HIV-1 ウイルス量 (copies/ml)		
		血中	頚管粘液中	CD4+細胞数
33	14	44	210	347
14	14	<25	1,000	361
27	12	4,600	20,000	380
24	20	1,800	11,000	538
25	15	39,000	100,000	424

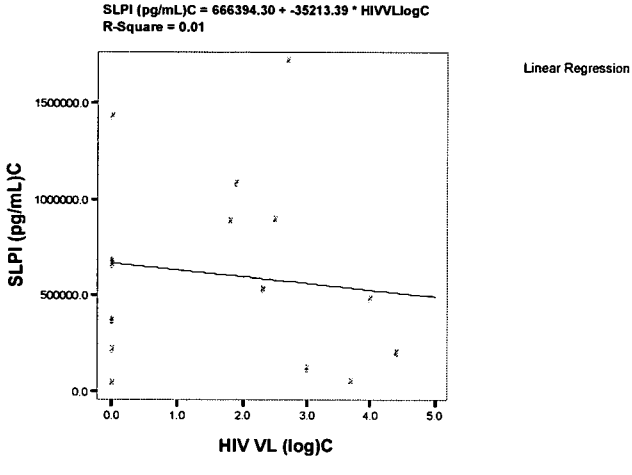
表3　血中および頚管粘液中 SLPI 濃度

	SLPI 濃度[SE] (pg/ml)
頚管粘液中	333,075 [77,559] (2,650 – 1,698,521)
血中	36,604 [1,694] (18,245 – 60,940)
参考値(血中)*	39,647

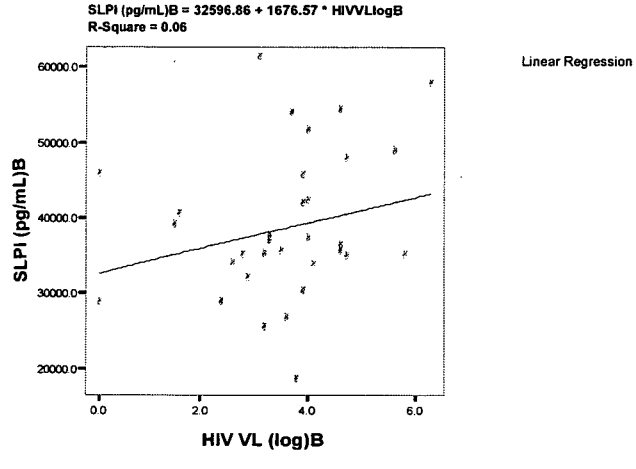
*: SLPI ELIZA kit の添付書にある参考値(非妊娠)

図2 SLPIとHIV-1ウイルス量

頚管粘液中



血中



厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

分担研究報告書

「周産期・小児・生殖医療におけるHIV感染対策に関する集学的研究」班
「HIV陽性男性、陰性女性夫婦に対する生殖補助医療の応用に関する基礎的・臨床的研究」

分担研究者	田中憲一	新潟大学大学院医歯学総合研究科（産婦人科）教授
研究協力者	花房秀次	荻窪病院血液科部長
	高桑好一	新潟大学大学院医歯学総合研究科（産婦人科）准教授
	加藤真吾	慶応義塾大学医学部微生物学教室助教
	兼子智	東京歯科大学市川病院産婦人科講師
	加嶋克則	新潟大学医歯学総合病院産婦人科助教

研究要旨

本邦においてもHIV感染者は徐々に増加しつつあるが，従来よりHIV陽性男性、陰性女性夫婦の妊娠については，性交渉により妻の二次感染の危険性があることから，妊娠しないよう指導されてきた。これに対し、本研究班では夫精液からHIVウイルスを除去する方法を開発し、HIV陽性男性、陰性女性夫婦が安全に妊娠しうるような生殖補助医療技術の開発を進めてきたが、本年度はさらに検討を進めた。すなわち、1．HIV陽性男性、陰性女性夫婦に対する体外受精に関する基礎的・臨床的検討、2．HIV陽性男性、陰性女性夫婦に対する人工授精の応用に関する基礎研究をテーマとして、研究を進めた。1．HIV陽性男性、陰性女性夫婦に対する体外受精に関する基礎的・臨床的検討については、夫精液からHIVウイルスを除去し体外受精・胚移植を実施しているが、平成12年からの総合的な成績は、77名に胚移植を実施し、53名が妊娠し、47名の児が出生している。現在、希望者は増加している状況である。体外受精・胚移植を実施した女性ならびに出生した児にHIV感染は認められていない。2.HIV陽性男性、陰性女性夫婦に対する人工授精の応用に関する基礎研究に関しての結果については以下のとおりである。HIV除去精子を用いた体外受精・胚移植に関しては、HIV除去精度とHIV検出感度に関しては満足すべき結果を得ている。一方、生殖補助医療（ART）の臨床において、HIV感染者は精液所見が不良であることが多く、分離後の精子濃度が低い場合が多い。分離した精子は一旦凍結保存して、一部を用いてHIV陰性確認試験を行う。さらに確認試験で陰性であった精子は、ART当日まで保存される。これまで融解後の運動率が良好であった精子を最終的に培養液に懸濁すると、急速に運動性を失ってARTに困難をきたす症例が多かった。またこのため、体外受精・胚移植には応用できるものの、人工授精には応用しづらい状況であった。そこで、この点の改善を行うことにより、人工授精に応用できないかどうかを検討した。等張化保護剤を使用すると精子の尾部の浮腫はほとんど発生せず、47±8.2%の精子が運動性を保持していた。精子凍

結保存において、凍結融解過程よりもむしろ最終的な等張化操作が最大の障害因子であることを認めた。

A　研究目的

1996年以後、HIV感染者に対しプロテアーゼ阻害剤を含むHighly active antiretroviral treatment (HAART)が使用されるようになり，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。今日、HIV感染者はエイズを発症することなくHIVキャリアの状態で経過することが多くなり，今後の人生設計を考え直してQOLの改善を求めるようになってきている。そのような状況下でHIV感染者の中でも結婚するカップルが増えてきているが、HIV陽性男性，陰性女性の夫婦が挙児を希望し，医療機関に相談に行っても，従来は二次感染の危険性を指摘され，避妊を指導されるだけであった。

妊娠，出産に伴うHIV二次感染の危険性はHIV感染者の状態（ウィルス量や精子数・運動率など）によって異なり、主治医が患者個々の危険度を判断して危険性を正確に話して相談する必要がある。

精液中のHIV RNA量は血中HIV RNA量と相関し、HAARTによって精液中のfree HIV RNAは減少する。しかし、精液でのHIV感染力は精液中の単核球が最も強く，HAARTで血中のHIV RNAが検出限界以下になっても精液中のHIV感染単核球は残存し，二次感染する危険性が残っていることが証明されている。

一般にHIV陽性男性、陰性女性夫婦が自然妊娠を試みた場合、1年間で4.8%の女性に二次感染が生ずることが報告されている。HAARTで精液中の遊離HIV RNAが検出限界以下になった場合の二次感染の危険性は4.8%よりも低いと予測されるが今のところ不明であり、実際二次感染の報告例も存在する。このようにHAARTで血中HIV RNAが検出限界以下になっても精液を介して二次感染する危険性はあるのでコンドームの使用は続けなければならない。

さらに現在、HIVの薬剤耐性が深刻な問題になっている。変異HIVの感染性に問題はあるが、変異HIVによる二次感染も報告されており、今後の大きな問題である。多剤耐性HIVにより二次感染が生ずると治療が困難になると予想されるので、二次感染は可能な限り避ける手段が必要である。

われわれは，平成12年度から厚生労働科学研究班の研究として、「HIV陽性男性、陰性女性夫婦に対する体外受精・胚移植の臨床応用」に取り組んできた。HIV陽性男性の精液から改良Percoll-Swim up法によりHIVを極力除去し精子浮遊液を調整し、1コピー/mlのHIV-RNAを検出可能な超高感度PCR法を併用することにより、より安全に（妻の二次感染を極力防ぎ）妊娠しうるようなプロトコールを開発してきた。本研究においては，このような体外受精-胚移植の有効性と安全性をさらに確認するため、対象症例を増やし検討した。一方、体外受精・胚移植は排卵誘発剤の使用、麻酔下での卵子の採取（採卵）など、女性にとって負担のかかる治療である。このため、女性にとってより負担の少ない人工授精の臨床応用をめざした基礎的検討を引き続き行った。

B 研究方法

1．HIV 陽性男性、陰性女性夫婦に対する体外受精に関する基礎的・臨床的検討

これまでの本研究により，研究協力者の加藤らは超遠心を用いて検出感度が 1 copy/ml の世界最高感度の PCR の開発に成功している（表 1)。この改良 PCR 法を用いて，HIV 陽性男性から得られた精子浮遊液中のHIV ウイルスが検出されないことを確認し，HIV 陽性男性，陰性女性夫婦に対し，体外受精-胚移植を実施している。

(1)「HIV 陽性男性，陰性女性夫婦に対する体外受精-胚移植の臨床応用」にあたって，参加希望者が臨床応用に参加するまでの経緯

参加希望者は最初に，荻窪病院血液科を受診し，医師により男性の診察が行われ，病状の安定していることなどを判断し，夫婦の意思を確認している。

次に夫婦個別に，カウンセラー及びコーディネーターの面談を受け，それぞれの参加の意思を確認している。夫婦ともに自発的な意思であることが確認され，出産後の育児に対する社会的背景などに問題がないか医療スタッフで検討し，また，HIV 陽性男性の精液検査を荻窪病院で実施，精子数，運動率，HIV RNA，proviral DNA などを検査している。この後、新潟大学医歯学総合病院産婦人科をはじめとする研究参加施設を受診することとしている。

新潟大学医歯学総合病院産婦人科を受診した場合を例にとって説明すると，受診した患者夫婦に対し，担当医師が，詳細な説明書をもとに，説明している。その内容は，臨床応用の実際，本治療に伴うリスク，万が一、二次感染が発生した場合の患者夫婦の負担，治療開始後中止することになっても問題ないことなど，である。そこで妻の検査（感染症検査，ホルモン検査，基礎体温の確認，他）を実施している。

この後，新潟在住のカウンセラーにより，夫婦個別の意思確認を行う。これにより，患者夫婦の意思が強い場合には，夫婦個別に，説明書を用い，治療についての説明を行っている。最終的な意思の確認を行ったのち，夫婦別々に同意書に，夫婦および担当医師が署名，捺印を行う。同意書は同じものを 2 部作成し，1 部は患者夫婦が，1 部は新潟大学医歯学総合病院産婦人科が保管している。

以上が，臨床応用に実際に参加するまでの経緯である。HIV 陽性男性，陰性女性夫婦に対する体外受精-胚移植の臨床応用を実施している慶応大学医学部附属病院でも，十分なインフォームドコンセントを得た上で，実施していることは同様である。

(3)「HIV 陽性男性，陰性女性夫婦に対する体外受精-胚移植の臨床応用」における実施スケジュール

臨床応用に参加することになった，患者の妻に対しては，通常の体外受精-胚移植で行われる排卵誘発が実施される。内因性の卵胞刺激ホルモン（FSH)，黄体刺激ホルモン（LH）などを抑制する薬剤（GnRH アゴニスト）を使用しつつ，排卵誘発剤を投与する。排卵誘発剤の投与量は，卵胞の大きさをモニターしながら決めていく。卵胞が至適な大きさになった段階で，採卵（卵巣から卵子を採取すること）を行なう。採卵は静脈麻酔による全身麻酔下に実施される。

採卵当日から胚移植を実施するまでのスケジュールの概要をフローチャートとして図２に示した。従来の方法では、採卵当日に，夫から精液を採取し， Percoll 法，Swim up 法を用いた方法により，HIV 除去精子浮遊液を

調整していた。この精子浮遊液中にHIV ウイルスが検出されないことを超高感度PCR 法により確認し，媒精（卵子と精子浮遊液をともに培養すること）を実施することとしていた。HIV ウイルスの確認に時間を要する場合には，先に媒精を実施し，仮に精子浮遊液中にHIV ウイルスが検出された場合には中止とする，という選択肢もあることとしていた。最近では，採卵当日に夫精子が十分採取できない可能性もあるため，事前に精子を採取，凍結しこれを使用することを主としている。

媒精を開始した後 2 日後に胚移植（受精卵を女性の子宮内に戻すこと）を行うこととなるが，これに先立ち，受精卵を培養している培養液について，再度，超高感度 PCR 法により HIV ウイルスの検出を試みる。ここで，HIV ウイルスが認められた場合には，胚移植を行わず，治療を中止とする。HIV ウイルスが認められない場合に胚移植を行う。

胚移植後は，患者の全身状態に注意するとともに，妊娠の確認を行う。妊娠が成立した場合でも，成立しない場合でも，移植された妻について，3 か月にわたり，血液中の HIV RNA 検査およびHIV 抗体検査を実施し，二次感染の有無を判断する。また，妊娠が成立した場合，妊娠 12ー14 週に，胎児の感染を確認する目的で，羊水穿刺の実施が可能であることについて説明し，施行するか否かの意思の確認を行う。施行について希望があれば，これを実施し，希望がない場合には実施せず経過を観察することとする。

妊娠中の管理については，通常の妊婦健康審査が実施される。以上が本臨床応用の実施にあたってのプロトコールであり，これに基づいて実施された。

２．HIV 陽性男性、陰性女性夫婦に対する人工授精の応用に関する基礎研究

凍結保存ヒト精子は、凍結、融解そして保護剤除去の過程で細胞傷害を受ける。融解直後に高い蘇生率を示した精子であっても、保護剤除去に伴う浸透圧低下が細胞膜を傷害し、運動能低下の一因となる。これは、光学顕微鏡レベルでは精子の尾部先端の浮腫として観察される。われわれは凍結融解過程における細胞膜保護を考慮し、凍結保護剤とともに融解後等張化保護剤を使用する新規精子凍結保存システムを構築した。凍結保護剤（0.5M DMSO、0.5M エチレングリコール、4% ヒドロキシエチルスターチ(HES)、0.2M トレハロース、0.1mM ペントキシフィリン）と精子懸濁液を等量混合して 10 分間平衡化した後、PCR 容器を使用して液体チッソ蒸気中で緩速凍結した。融解は 37℃の微温湯中で行い、最終的に等張化保護剤（4% HES、0.1M トレハロース）を用いて 5 倍希釈し、運動率ならびに精子尾部の浮腫を観察した。

（倫理面への配慮）本研究は HIV 陽性男性、陰性女性夫婦を対象とした研究であり、倫理面への配慮が重要であることを強く認識している。治療、研究の実施にあたっては、対象各個人から書面による同意を得ることとしている。とくに臨床応用にあたっては、すでに述べたように、医療者側から十分な情報を提供し、夫婦個別の同意を得て実施している。

C　研究結果

１．HIV 陽性男性、陰性女性夫婦に対

する体外受精に関する基礎的・臨床的検討

HIV 感染男性、陰性女性夫婦に対する体外受精・胚移植の臨床応用についての平成 12 年からの総合的な成績は以下のとおりである。

77 名の女性に対し胚移植を実施し、53 名が妊娠し、47 名の児が出生している。一方、新潟大学における成績は以下のとおりである。これまでに 32 名に対し体外受精、胚移植を施行した。18 症例（56.3%）に妊娠を認め、15 症例が分娩に至り 21 人の生児が誕生した。1 症例は妊娠継続中、1 症例は妊娠初期であり、1 症例に流産を認めた。（その他に結果として生児を得た症例で2回の流産あり）。胚移植例では，胚移植後 3 か月間連月にわたり HIV 抗体および HIV-RNA 検査を実施しているが，二次感染は認められていない。出生した児については，臍帯血、生後 3 ー6 か月で採取された血液などで、HIV 抗体および HIV-RNA 検査を実施しているが，二次感染は認められていない。

２．HIV 陽性男性、陰性女性夫婦に対する人工授精の応用に関する基礎研究

凍結保存ヒト精子は、凍結、融解そして保護剤除去の過程で細胞傷害を受ける。融解直後に高い蘇生率を示した精子であっても、保護剤除去に伴う浸透圧低下が細胞膜を傷害し、運動能低下の一因となる。これは、光学顕微鏡レベルでは尾部先端の浮腫として観察される。われわれは凍結融解過程における細胞膜保護を考慮し、凍結保護剤とともに融解後等張化保護剤を使用する新規精子凍結保存システムを構築した。凍結保護剤（0.5M DMSO、0.5M エチレングリコール、4%ヒドロキシエチルスターチ(HES)、0.2M トレハロース、0.1mM ペントキシフィリン）と精子懸濁液を等量混合して 10 分間平衡化した後、PCR 容器を使用して液体チッソ蒸気中で緩速凍結した。融解は 37℃の微温湯中で行い、最終的に等張化保護剤（4% HES、0.1M トレハロース）を用いて 5 倍希釈し、運動率ならびに精子尾部の浮腫を観察した。

凍結融解前後の運動率は、各々71±7.8%、55±6.0%（蘇生率 76±3.7%）であった。ハンクス液を用いて凍結保護剤除去を行うと、運動率は 12±3.3%へと大幅に低下し、不働化した精子の尾部に浮腫を認めた。一方、等張化保護剤（4% HES、0.1M トレハロース）を使用すると尾部の浮腫はほとんど発生せず、47±8.2%の精子が運動性を保持していた。精子凍結保存において、凍結融解過程よりもむしろ最終的な等張化操作が最大の障害因子であることを認めた。

D　考察

すでに報告してきたように，Percoll による連続密度勾配を作成して精子浮遊液を重層、遠心分離することにより HIV の除去率をさらに高めて、精子の回収率を 10%以上にすることに成功し、この方法により調整された精子浮遊液を用いて HIV 陽性男性、陰性女性夫婦に対する体外受精・胚移植の臨床応用を実施している。さらに精子表面に付着した HIV などの物質もほとんど除去できることを超高感度 PCR 法（検出限界は 1copy/ml）で確認し，HIV 陽性男性、陰性女性夫婦に対する体外受精・胚移植の臨床応用を実施し、その有効性ならびに安全性について検討を行っている。通常行われているように Percoll 法で遠心分離後に HIV の

濃度が濃い上層から吸引して最下層の精子分画を回収すると管壁を伝わってHIVが混入する可能性が高いので、研究協力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，応用している。また，Swim up 法実施に当たっては，培養液の下層に capillary tube を用いて慎重に精子浮遊液を挿入する技術を導入し，応用している。現在のところ、人工授精ではなく、体外受精・胚移植を選択している理由については，これまでにも報告しているとおりであり、受精卵あるいは胎児にCD4 が発現するのはリンパ組織が発達してくる受精後10ー20週以後である。精子分画にわずかにHIVが混入していた場合、人工授精では妻に二次感染の危険性があるが、体外受精・胚移植では日毎にHIVの感染性が低下することに加えて2日目に培養液を交換するために危険性は極めて少なくなる。卵にCD4 や chemokine receptor が発現していないため体外受精・胚移植では受精卵に感染の危険性はない。我が国では毎年 100 万人近い出産があるが、その内，体外受精・胚移植での出産が1万人を越えている。今年度の検討により、体外受精・胚移植の臨床応用により、児を得ることができた症例がさらに集積され、二次感染も認められず、その有効性、安全性についてのデータを集積できたものと判断されるが、さらに症例を増やすことが重要であると判断している。

一方、体外受精・胚移植の安全性は免疫学的にも疫学的にも明らかであるが、女性に対する身体的負担を考慮した場合，体外受精・胚移植に比較しより簡便な，人工授精の応用も必要と考えられる。人工授精とは、妻の子宮内に夫の精子浮遊液をそのまま注入する方法である。上述のように精子浮遊液中にわずかのHIVが残存した場合、妻の子宮に直接精子浮遊液を注入することは二次感染のリスクがごくわずかでも存在することを意味することになるが、現在行っている超高感度PCR 法により陰性であることが確認される場合、二次感染の可能性は極めて低いものになると考えられる。

今年度の研究においては、昨年度に引き続き、人工授精の応用のための基礎的検討を行った。昨年度の研究ではSwim side array 法の有用性について検討した。すなわち、精子懸濁液に直接培養液を層積する従来の swim up 法においては、個々の運動精子が swim up、down をくり返しており、回収率は低いことが指摘されていた。これに対し、昨年度開発した swim side array 法では隔壁を越えて反対側の溝に移動した精子が沈下、蓄積するため回収率が向上したと判断された。また、本法は精子の移動を顕微鏡下にモニターできるので、生殖補助医療に必要、充分な運動精子が回収されたことを確認後に操作を終了できた。これらのことから人工授精の臨床応用に際し、swim side array 法は極めて有用であるものと考えられた。

今年度の研究では、凍結保存した精子を解凍した場合より大量の精子を得ることができるような検討を行った。凍結保存ヒト精子は、凍結、融解そして保護剤除去の過程で細胞傷害を受ける。融解直後に高い蘇生率を示した精子であっても、保護剤除去に伴う浸透圧低下が細胞膜を傷害し、運動能低下の一因となる。これは、光学顕微鏡レベルでは尾部先端の浮腫として観察される。われわれは凍結融解過程における細胞膜保護を考慮し、凍結保護剤とともに融解後等張化保護剤を使用する新規精子凍結保存システムを構築した。凍結保護剤と精子懸濁

液を等量混合して 10 分間平衡化した後、PCR 容器を使用して液体チッソ蒸気中で緩速凍結した。融解は 37℃の微温湯中で行い、最終的に等張化保護剤（4% HES、0.1M トレハロース）を用いて 5 倍希釈し、運動率ならびに精子尾部の浮腫を観察した。この結果、等張化保護剤を使用すると精子の尾部の浮腫はほとんど発生せず、47±8.2%の精子が運動性を保持していた。精子凍結保存において、凍結融解過程よりもむしろ最終的な等張化操作が最大の障害因子であることを認め、この点に注意することにより、より大量の精子を得ることができ、人工授精に応用しうる可能性が示唆された。

E 結論

Percoll 法および Swim up 法を組み合わせた方法により調整された精子浮遊液を用い，超高感度 PCR 法により HIV ウイルスがほぼ除去されていることを，２段階にわたって検索するという体外受精・胚移植に関する今回のプロトコールにより、HIV 陽性男性、陰性夫婦に対し、ほぼ 100%安全に（妻が二次感染することなく）妊娠，出産を行うことが可能であると判断される。ただし、より確実な結論を得るためには、引き続き，臨床応用を実施していくことが重要であると考えられる。また、HIV 陽性男性、陰性夫婦に対する人工授精の臨床応用については、昨年度および今年度の基礎的検討結果の結果を踏まえつつ、検討していくことが重要であると判断している。一方、最近男性、女性ともに HIV 陽性である夫婦に関して、妊娠を試みた場合、妻が superinfection を起こすということが問題となっている。このような点から、男性、女性ともに HIV 陽性である夫婦に対する生殖補助医療の応用の可能性についても検討する意義があるものと考えられる。

F 健康危険情報

なし。

G 研究発表

１．論文発表

(1) Kinai E, Hanabusa H, Kato S: Prediction of the efficacy of antiviral therapy for hepatitis C virus infection by an ultrasensitive RT-PCR assay. J Med Virol, 79: 1113-1119, 2007.

(2) Nonaka T, Takakuwa K. Ooki I, Akashi M, Yokoo T, Kikuchi A, Tanaka K: Results of immunotherapy for patients with unexplained recurrent primary recurrent abortions-prospective non-randomized cohort study. Am J Reprod Immunol, 58: 530-536, 2007.

(3) 木内英、花房秀次：後天性免疫不全症候群. 薬局、58：909-920、2007.

(4) 花房秀次：HIV 感染夫婦の生殖補助医療. The Journal of AIDS Research, 9: 223-230, 2007.

(5) Kaneko S, Takamatsu K, Yoshida J, Miyaji K, Ishikawa H, Kawamata T, Shinozaki N: Individual tissue culture system in a disposable capsule with hypoxic atmosphere. Ann. Cancer Res. Therap., 16: 8-11, 2008

(6) Ishikawa H, Kaneko S, Mamm J: Human sperm cryopreservation - theory and clinical application.. Ova Res., 24: 14-17, 2007

(7) Ishikawa H, Kaneko S, Miyaji K, Takamatsu K, Cryopreservation of human sperm in patients with

malignancy; 2 years' experience. Reprod. Med. Biol. 6：127-132, 2007
(8) 精子形成機能障害対策　精子凍結保存について，石川博通、兼子智、血液・腫瘍科、54：319-323、2007

２．学会発表
(1) 菊池朗、山口雅幸、明石真美、笹原淳、土谷美和、高橋泰洋、山田京子、富田雅俊、高桑好一、田中憲一：当科におけるHIV陽性妊婦の管理経験. 第22回新潟産婦人科感染症研究会、2007年2月17日、新潟市
(2) 加嶋克則、高桑好一、竹山智、岡田潤幸、藤田和之、田中憲一：HIV感染男性非感染女性夫婦に対する体外受精・胚移植の臨床成績について。第52回日本生殖医学会、2007年10月25日-26日、秋田市。
(3) 花房秀次：　血友病HIV感染者の特徴と今後求められる医療。日本エイズ学会、広島市、2007年11月28日-30日。
(4) 花房秀次，小島賢一，加藤真吾，兼子智，高桑好一，久慈直昭，木内英，加嶋克則，吉村泰典，田中憲一：　HIV感染者夫婦の生殖補助医療。日本エイズ学会、広島市、2007年11月28日-30日。
(5) 木内　英、岩室紳也、近藤真規子、今井光信、花房秀次、加藤真吾：母子感染予防における出生児へのHAARTの安全性の検討。日本エイズ学会、広島市、2007年11月28日-30日。
(6) 上西理恵、正兼亜季、近藤真規子、長谷彩希、廖華南、小野木成美、今井光信、上田幹夫、相良裕子、花房秀次、加藤真吾、草川茂、武部豊：CRF01とサブタイプBからなる新規組換えウイルス株（URF）の同定とその公衆衛生上の意義
(7) 田中一郎，天野景裕，瀧正志，岡敏明，酒井道生，白幡聡，高田昇，高松純樹，竹谷英之，花房秀次，日笠聡，福武勝幸，藤井輝久，松下正，三間屋純一，吉岡章，嶋緑倫：インヒビター保有先天性血友病患者に対する止血治療ガイドライン案。日本血栓止血学会、2007年10月。
(8) 松下正，天野景裕，瀧正志，岡敏明，酒井道生，白幡聡，藤井輝久，高田昇，高松純樹，竹谷英之，花房秀次，日笠聡，福武勝幸，三間屋純一，田中一郎，吉岡章，嶋緑倫：血友病患者の凝固因子補充療法の標準化。日本血栓止血学会、2007年10月。
(9) 花房秀次：　HIV/AIDSの現状とHIV診療の進歩　HIV superinfection、HIV陽性夫婦の生殖補助医療など、神奈川県感染症医学会、2007年9月。
(10) 兼子智、郡山純子，谷垣伸治，中川博之，石川光也，小林佑介，斎藤優，吉田丈児，高松潔：ICSIにおける穿刺精子の品質管理、第59回日本産科婦人科学会、京都市、2007年4月。

H　知的所有権の取得状況
１．特許取得
なし
２．実用新案登録
なし
３．その他
なし

荻窪病院血液科で治療につき説明，治療の希望が強く，患者男性の病状，精子の状態に問題がない場合新潟大学医歯学総合病院産婦人科を受診

↓

説明書に基づき，
臨床応用の実際
本治療に伴うリスク
万が一二次感染が発生した場合の夫婦の負担
治療開始後中止することになっても問題ないこと
などにつき詳細に説明

↓

妻の検査（HIV他各種感染症，ホルモン検査，基礎体温の確認など）を実施

↓

カウンセラーにより，夫婦個別の意思を確認

↓

患者夫婦の治療に対する意思が強い場合，夫婦個別に，再度治療について詳細に説明
最終的な意思の確認を行い，夫婦別々の同意書に夫婦および担当医師が署名，捺印
臨床実施へ

図1　HIV 陽性男性、陰性女性夫婦に対する体外受精・胚移植の実施までの対応

表 1 Swim-up によって洗浄した精子調製液中の HIV-1 を高感度で検出するための方法

洗浄した精子液(全量の半分)
↓
①高速遠心（15,000 rpm、1時間）
（精子とHIV-1が沈殿する）
↓
②RNA精製（QIAGEN RNeasy Mini Kit）
（精子とHIV-1のRNAが得られる）
↓
③逆転写反応
（HIV-1のRNAがcDNAに変換される）
↓
④1回目のPCR
（HIV-1のDNAが約100万倍に増幅される）
↓
⑤2回目のPCR
（ HIV-1のDNAがさらに約10万倍増幅される）
↓
アガロースゲル電気泳動
（増幅されたHIV-1 DNAを検出する）