

201123054A

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

25年間継続した妊婦のHTLV-I抗体検査から得られた
母子感染予防効果の検証および高精度スクリーニン
グシステム開発

平成23年度
総括・分担研究報告書

研究代表者：増崎英明
長崎大学大学院・医歯薬学総合研究科・教授

平成24年（2011年）3月

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

25年間継続した妊婦の HTLV-I 抗体検査から得られた
母子感染予防効果の検証および高精度スクリーニン
グシステム開発

平成23年度
総括・分担研究報告書

研究代表者：増崎英明
長崎大学大学院・医歯薬学総合研究科・教授

平成24年（2011年）3月

目 次

I. 総括研究報告書

25年間継続した妊婦のHTLV-I抗体検査から得られた母子感染予防効果の検証および高精度スクリーニングシステム開発

増崎英明（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・教授） 3

II. 分担研究報告書

1. 定量的PCR法を導入した妊婦の

HTLV-Iスクリーニングシステムの構築 11

研究分担者

上平 憲（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・教授）

吉浦孝一郎（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・教授）

森内浩幸（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・教授）

木下 晃（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・講師）

2. 妊婦のHTLV-I感染症スクリーニングがもたらす

母子感染予防効果の検証 16

研究分担者

増崎英明（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・教授）

三浦清徳（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・客員研究員）

三浦生子（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・客員研究員）

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 33

IV. 研究成果の刊行物・別冊 34

I. 総括研究報告書

I. 厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）

平成 23 年度総括研究報告書

25 年間継続した妊婦の HTLV-I 抗体検査から得られた母子感染予防効果の検証および高精度スクリーニングシステム開発

研究代表者：増崎英明（長崎大学大学院・医歯薬学総合研究科・教授）

研究要旨

平成 23 年度より妊婦の HTLV-I 感染症スクリーニング検査が全国展開された。その効果を評価するには、スクリーニング導入後に出生した児が次の世代を出産するまで追跡して調査する必要がある。一方、長崎県では 1987 年より HTLV-I ウイルス母子感染予防事業を 25 年間継続しており、すでに子どもは妊婦の HTLV-I スクリーニング検査導入後に出生した妊婦に関する情報とその疫学調査システムを構築している。そこで、本研究課題の目的は、妊婦の HTLV-I 感染症スクリーニングがもたらす母子感染予防効果を検証し、HTLV-I の母子感染経路の全容解明と高精度スクリーニングシステムを開発することである。

分担研究者

上平 憲（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・教授）

吉浦孝一郎（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・教授）

森内浩幸（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・教授）

三浦清徳（長崎大学病院・准教授）

木下 晃（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・講師）

三浦生子（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・客員研究員）

A. 研究目的

平成23年度より妊婦のHTLV-I感染症スクリーニング検査が全国展開されることになったが、その効果を評価するには、スクリーニング導入後に出生した児が次の世代を出産するまで追求して調査する必要がある。一方、長崎県では1987年よりHTLV-Iウイルス母子感染予防事業を25年間継続しており、すでに私どもは妊婦のHTLV-Iスクリーニング検査導入後に出生した妊婦に関する情報とその疫学調査システムを構築している。そこで、本研究課題の目的は、妊婦のHTLV-I感染症スクリーニングがもたらす母子感染予防効果を検証し、HTLV-Iの母子感染経路の全容解明と高精度スクリーニングシステムを開発することである。

目的完遂のために、研究期間内の具体的な平成23年度の目標を以下に示す。

- 1) 長崎県における妊婦とキャリアから産まれた児のHTLV-I検査システムに定量的PCR検査法を導入する。
- 2) 1987年より25年間継続した妊婦HTLV-Iスクリーニング事業の成果を検証する。とくに、HTLV-Iキャリア妊婦への母乳抑制介入試験を開始した1987年以降に出生した妊婦とそれ以前に出生した妊婦についてキャリア率を比較し、妊婦HTLV-Iスクリーニング検査とキャリア妊婦に対する母乳介入の有効性について検討する。

B. 研究方法

1. 定量的PCR法を導入した妊婦のHTLV-Iスクリーニングシステムの構築：

長崎県で1987年より継続している妊婦のHTLV-Iスクリーニングシステムを利用した。PA法もしくはCLEIA法で陽性もしくは

は疑陽性と判定された例は、長崎大学へ血清検体を集積してウエスタンブロット (WB) 法で確認検査を行っている。WB法には10-15%の例が判定保留になるため、2011年度より確認検査としてWB法に加えて定量的PCR法を併用した。Nested PCR法は、バイオメトラ社製 T Professional Standard96を用いた。定量的PCR法は、ロッシュ・ダイアグノスティックス株式会社LightCycler480インスツルメントII384Wellを用いた。

検討項目は以下の通りである。

- 1) 2011年に定量的PCR法を導入したHTLV-Iスクリーニングシステムの運用実績
- 2) WB法で判定保留と判定された例におけるPCR法の成績

2. 1987年より25年間継続した妊婦HTLV-Iスクリーニング事業成果の検証：

長崎県で1987年より25年間継続している妊婦のHTLV-Iスクリーニング事業で集積されたデータを用いて検討を行った。妊婦のHTLV-I検査は、長崎県下の産婦人科施設を受診した妊婦を対象にして、妊娠28週から妊娠32週の期間に実施された。母子感染の有無は、HTLV-Iキャリアから生まれた児が3歳のときに検査された。事業プログラムは10年ごとに改訂された。栄養法について、1987年に開始したATL母子感染予防プログラム (APP87：1987-1997年) では、人工栄養、6ヶ月未満の短期母乳、6ヶ月以上の母乳栄養と母子感染との関連について検討した。そして、1998年に開始したAPP98 (1998-2008年) では、人工栄養、3ヶ月未満の短期母乳、混合栄養 (母乳とミルクの併用)、6ヶ月以上の母乳栄養と母子感染との関連について検討した。APP09 (2009-現在)

では、妊婦 HTLV-I スクリーニング検査とキャリア妊婦に対する母乳介入が実施された1987年以降に出生した妊婦とそれ以前に出生した妊婦を比較することで、妊婦 HTLV-I スクリーニング検査とキャリア妊婦に対する母乳介入の有効性について検討した。

検討項目は以下の通りである。

- 1) 妊婦 HTLV-I スクリーニング検査成績の25年間の年次推移
- 2) キャリア妊婦が選択した栄養法の年次推移とその影響要因の考察
- 3) 出生年代別にみた妊婦 HTLV-I キャリアの比較検討
- 4) 栄養法からみた HTLV-I キャリア妊婦より出生した児への母子感染率

試料収集は、長崎大学倫理委員会の承認を得て開始し、インフォームド・コンセントを書面で取得して研究を行った。

C. 研究結果

1. 定量的PCR法を導入した妊婦のHTLV-I スクリーニングシステムの構築 (図1、図2) :

長崎県において定量的PCR法を導入した妊婦のHTLV-Iスクリーニングシステムを構築した。まず、長崎県下で妊娠28週～妊娠32週の妊婦を対象にして、PA法もしくはCLEIA法を用いた妊婦のHTLV-Iスクリーニング検査（一次検査）を行う。そして、一次検査で陽性もしくは疑陽性と判定された例の血清検体は、確認検査としてWB法を行うために長崎大学病院へ集積される。また、研究事務局（長崎大学産婦人科）より、検査依頼施設（長崎県内の産婦人科施設）へPCR検査に用いるEDTA採血と分娩後の母体

血、臍帯血および胎盤の採取依頼を行う（図2）。最終的に、長崎大学でPCR法およびWB法を行い、HTLV-Iキャリアの有無を最終判定して、検査結果を依頼者へ通知する。このスクリーニングシステムは、25年間継続された妊婦HTLV-I抗体スクリーニングシステムを利用したので、定量的PCR法を導入した後も順調に運用され、以下の成績を得た。

1) 2011年に定量的PCR法を導入したHTLV-I スクリーニングシステムの運用実績 :

2011年は、9,873名の妊婦をスクリーニングし、一次検査で117名が陽性もしくは偽陽性と判定され、WB法および定量的PCR検査による確認検査で102名がHTLV-Iキャリアと診断された（表1）。

2) WB法で判定保留と判定された例におけるPCR法の成績 :

2011年に117名の妊婦が1次検査でHTLV-I陽性もしくは疑陽性と診断された。そのうち15例は（15/117例；12.8%）、2次検査で行ったWB法で判定保留と判定された（表2）。定量的PCR法を併用して、10例（10/15例；66.7%）が陽性、5例（5/15；33.3%）が陰性と判定された。PCR法の結果と抗体価との関連を見てみると、CLEIA法で1.7以上のものは陽性と判定され、それ未満のものは陰性と判定された。また、WB法で判定保留とされた3例について、定量的PCR法およびnested PCR法を施行した（図3A-C）。PC（positive control）のWB法の結果は、gp46、p53、p24およびp19のいずれのバンドも認められ、陽性と判定される。一方、N0.109のそれは、gp46のバンドが認められないため、判定保留と判定される（図3-B）。一方、Nested PCR法

では、PC および No. 109 の血液 DNA サンプルのいずれでもバンドを検出された（図 3-C）。定量的 PCR を行うと、判定保留例の血液 DNA サンプル中の HTLV-I ウイルス量は PC のそれと比較していずれも低値であった（図 3-A）。

2. 妊婦の HTLV-I 感染症スクリーニングがもたらす母子感染予防効果の検証：

1) 妊婦 HTLV-I スクリーニング検査成績の 25 年間の年次推移

25 年間に 265,210 名の妊婦が HTLV-I スクリーニング検査を受けて、9,681 名が一次検査で陽性もしくは疑陽性と判定された。そして、最終的に 8,243 名（3.11%：8,243/265,210 例）の妊婦が HTLV-I キャリアと診断された（表 1）。

長崎県における妊婦の HTLV-1 抗体陽性率は 1987 年の時点には 7.2%であったが、2003 年には 2.0%以下、2011 年には 1.0%にまで低下していた（表 1, 図 4）。

2) キャリア妊婦が選択した栄養法の年次推移とその影響要因

表 3 に 1,999 年から 2,011 年の期間に長崎県の HTLV-1 キャリア妊婦 1,178 例が選択した栄養法の動向を示す。期間全体で見ると、人工栄養を選択した妊婦は 811 例（68.8%）で最も多く、次いで短期母乳栄養の 184 例（15.6%）、長期母乳栄養の 158 例（13.4%）、人工栄養と母乳栄養を併用している混合栄養の 25 例（2.1%）と続いている。キャリア妊婦が選択した栄養法の年次推移をみると、1999 年は 79.1%であった人工栄養の選択率が、2008 年には 56.6%にまで落ち込んだが、

2009 年に 64.4%、2010 年に 68.9%そして 2011 年には 70.4%と V 字回復の傾向にあった。

3) 出生年代別にみた妊婦 HTLV-I キャリアの比較検討（2001 年-2011 年）

2001 年-2011 年の期間、長崎県における HTLV-I キャリア妊婦の出生年代を 1955 年から 5 年ごとにグループ化して、各年代の妊婦における HTLV-I キャリア率を検討した（表 4）。1955 年以前に出生した妊婦の HTLV-I キャリア率は 10%であったが、年代を経るごとにその率は低下し、母乳介入が開始された 1987 年以降の世代では妊婦の HTLV-I キャリア率は 0.7%にまで減少していた。また、母乳抑制の介入が始まった 1987 年以前に出生した妊婦における HTLV-1 抗体陽性率は 1.51%（1472/97634 例）であるのに対して、1987 年以降に出生した妊婦におけるそれは 0.70%（38/5448 例）であった。

4) HTLV-I キャリア妊婦より出生した児の HTLV-I 検査（1990-2010 年）

長崎では母子感染の有無は、HTLV-I キャリアから生まれた児が 3 歳のときに検査された。

1987 年に開始した ATL 母子感染予防プログラム（APP87：1987-1997 年）では、人工栄養、6 ヶ月未満の短期母乳、6 ヶ月以上の母乳栄養と母子感染との関連について検討した。人工栄養を選択した HTLV-1 キャリア妊婦から出生した児の母子感染率は 962 名中 23 名（2.4%）、授乳期間が 6 ヶ月未満の短期母乳栄養児では 169 名

中 14 名 (8.3%)、6 ヶ月以上の長期母乳栄養児では 346 名中 71 名 (20.5%) であり、人工栄養 vs 短期母乳、短期母乳 vs 長期母乳、人工栄養 vs 長期母乳すべての比較において統計学的に有意差が認められた。そして、1998 年に開始した APP98 (1998-2008 年) では、人工栄養、3 ヶ月未満の短期母乳、混合栄養 (母乳とミルクの併用)、6 ヶ月以上の母乳栄養と母子感染との関連について検討した (表 6)。人工栄養を選択した HTLV-1 キャリア妊婦から出生した児の母子感染率は 218 名中 8 名 (3.7%)、授乳期間が 3 ヶ月未満の短期母乳栄養児では 36 名中 1 名 (2.8%)、混合栄養では 14 名中 1 名 (7.1%)、6 ヶ月以上の長期母乳栄養児では 25 名中 4 名 (16.0%) であった。

D. 考察

長崎県では1987年より25年間にわたり妊婦のHTLV-I抗体スクリーニング検査を実施しており、本研究課題では、スクリーニング開始後に出生した妊婦の世代におけるHTLV-I母子感染の現状を把握することが可能である。したがって、本申請研究は、妊婦のHTLV-I抗体スクリーニング検査と母乳介入試験の問題点の把握、さらにはHTLV-Iの母子感染経路の全容解明に繋がるため、高精度なスクリーニングシステムの開発に貢献し、厚生労働行政において確実なHTLV-I母子感染予防政策を推進することが出来ると期待される。

平成23年度の研究計画は、全て完遂された。以下に、その成果に対する考察を加える。

1) 長崎県に定量的PCR検査法を導入し

た妊婦のHTLV-Iスクリーニングシステムを確立する：まず、当初の研究計画の通りに、長崎県において定量的PCR検査法を導入した妊婦のHTLV-Iスクリーニングシステムを確立し機能させた。標準的なHTLV-Iの定量的PCR法を導入した妊婦HTLV-Iスクリーニングシステムの確立は、正確かつ簡便なHTLV-Iキャリア妊婦の確定診断につながり、HTLV-Iキャリア妊婦に対する結果説明と人工栄養あるいは短期母乳栄養などの介入の説明が容易になると思われる。また、母乳以外の母子感染経路の同定につながる可能性があり、より確実な母子感染予防プロトコルの策定につながると期待される。

2) 長崎県で 1987 年より 25 年間継続した妊婦HTLV-Iスクリーニング事業成果の検証：長崎県では 25 年間に 265,210 名の妊婦がHTLV-Iスクリーニング検査を受けて、9,681 名が一次検査で陽性もしくは疑陽性と判定され、最終的に 8,243 名 (3.11% : 8,243/265,210 例) の妊婦がHTLV-I キャリアと診断された。長崎県における妊婦の HTLV-1 抗体陽性率は 1987 年の時点には 7.2%であったが、2003 年には 2.0%以下、2011 年には 1.0%にまで低下していた。また、介入試験以降に出生した妊婦における長崎県のHTLV-1キャリア率は、キャリア率が低頻度の関東や関西地域とほぼ同レベルにまで低下しており、母乳介入試験はHTLV-1母子感染予防とATL撲滅に対して有効であると示唆され、今後 2 年間の研究継続により最終結論が導き出されると期待された。

3) 公開講座を通じた啓発の重要性：キャリア妊婦が人工栄養を選択する割合は、1999年から2008年にかけて56.6%にまで落ち込んだが、2009年に64.4%、2010年に68.9%そして2011年には70.4%とV字回復の傾向にあった。これは、2008年11月と2011年3月に長崎県内の保健師、助産師、看護師、医師を対象としたHTLV-1母子感染に関する講習会、2010年3月にはHTLV-1キャリアとATLを話題に取り上げた市民公開講座を開催した効果と思われた。講習会では、血液内科医がATL治療の現状、HAM患者の会代表による患者の視点、産婦人科医と小児科医がHTLV-1母子感染予防について講演を行った。定期的な講習会や市民公開講座の開催は、医療者側と市民の双方にとってHTLV-1母子感染に対する意識を高めることにつながり、HTLV-1母子感染予防システムの確立にきわめて重要と思われた。

4) 出生年代別にみた妊婦HTLV-Iキャリアの比較検討(2001年-2011年)：年次推移とともにHTLV-I キャリア妊婦の割合は減少していた。これはHTLV-I キャリアの自然減少ではなく、1960年代以降の人工栄養(ミルク)の普及や女性の社会進出による母乳栄養期間の短縮など夜会的背景が一因であると考えられた。さらに、母乳抑制の介入が始まった1987年以前に出生した妊婦における長崎県のHTLV-1キャリア率は、キャリア率が低頻度の関東や関西地域とほぼ同レベルの0.7%前後にまで低下しており、現在のところ母乳介入試験はHTLV-1母子感染予防とATL撲滅に対して有効であると示唆された。

5) HTLV-I キャリア妊婦より出生した児のHTLV-I 検査(1990-2010年)：母乳感染がHTLV-1 母子感染の主要経路であることが明らかになった。また、母子感染率は人工栄養児より短期母乳栄養児、短期母乳栄養児より長期母乳栄養児と、児の母乳への暴露期間が長いほど母子感染率が上昇するという成績であった。一方、HTLV-I 母子感染の主な経路は母乳であるが、人工栄養を選択したキャリア妊婦の2-3%前後にも母子感染が成立していることから、母乳以外の感染経路の存在も伺われた。今後、産道感染や胎内感染の存在について確認する必要があると思われた。また、母子感染予防における3ヶ月未満の短期母乳栄養の有効性を確認する必要があると思われた。

E. 結論

平成23年度本研究課題により、1) 長崎県において定量的PCR検査法を導入した妊婦のHTLV-Iスクリーニングシステムを確立した。2) 長崎県で1987年より25年間継続した妊婦HTLV-Iスクリーニング事業の成果を検証し、妊婦HTLV-Iスクリーニングとキャリア妊婦に対する母乳介入の有効性が示された。3) 定期的な講習会や市民公開講座の開催は、医療者側と市民の双方にとってHTLV-1母子感染に対する意識を高めることにつながり、HTLV-1母子感染予防システムの確立にきわめて重要と示唆された。4) 母乳以外の母子感染経路の存在が示唆された。

平成23年度の研究計画は全て完遂された。次年度以降は、本研究の成果を以下に述べるように展開する予定である。

1) 検体集積：平成23年度に確立したHTLV-I感染症のPCR検査・診断法を導入したスクリーニングシステムを利用し、HTLV-Iキャリア妊婦およびHTLV-I陰性妊婦の血液サンプル、臍帯血、胎盤および羊水を採取する。

2) 母乳以外の感染経路の存在の有無を明らかにする：臍帯血、羊水などにおけるHTLV-Iの定量実験を行い、母乳以外の感染経路の存在の有無を明らかにする。また、切迫早産や妊娠高血圧症候群などの妊娠合併症とHTLV-I量との関連を検討し、HTLV-Iの母子感染予防に対する栄養法の選択以外の介入法の可能性を探る。

3) 妊娠経過中のウイルスロードを明らかにする：定量的PCR法を用いた妊婦のHTLV-Iスクリーニングにはウイルスロードが妊娠週数に伴い変化するの否か知る必要があるため、妊娠経過に伴う母体血中のHTLV-Iウイルスロードの推移を明らかにする。

4) キャリア化と栄養法との関連：1987年以降に出生した妊婦10,000例とその児について、キャリア化と栄養法との関連を疫学的に明らかにし、3ヶ月未満の短期母乳栄養の有用性を確認する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 長崎県 ATL ウイルス母子感染防止協力事業平成23年事業報告(会長 増崎英明) 2012;1-2.
2. 増崎英明：HTLV-I 母子感染について日本医師会雑誌 2011;140:808-811.
3. 三浦清徳、増崎英明：HTLV-I 臨床婦人科産科 2011; 65:1029-1037.
4. 増崎英明：HTLV-I 母子感染防止-長崎県における24年間の取り組み-日本周産期・新生児医学会雑誌 2011; 47:769-771.
5. 築山尚史、三浦清徳、増崎英明：母子感染の管理-④HTLV-I- 臨床婦人科産科 2012; 66:182-189.
6. Kamihira S, Iwanaga M, Doi Y, Sasaki D, Mori S, Tsurda K, Nagai K, Uno N, Hasegawa H, Yanagihara K, Morinaga Y, Tsukasaki K, Taniguchi H. Heterogeneity in clonal nature in the smoldering subtype of adult T-cell leukemia: continuity from carrier status to smoldering ATL. *Int J Hematol.* 2012;95:399-408.
7. Kamihira S, Usui T, Ichikawa T, Uno N, Morinaga Y, Mori S, Nagai K, Sasaki D, Hasegawa H, Yanagihara K, Honda T, Yamada Y, Iwanaga M, Kanematu T, Nakao K. Paradoxical expression of IL-28B mRNA in peripheral blood in human T-cell leukemia virus type-1 mono-infection and co-infection with hepatitis C virus. *Virology* 2012;9:40.

2. 学会発表

<国際学会>

なし

<国内学会>

1. 増崎英明:協和発酵キリン(株)セミナー
ー第1回抗体医薬が拓く、新しい製薬・医療の現場 2011「HTLV-1ー母子感染防止ー長崎方式 24年間の成果ー母子感染するウイルス性白血病、ATLについて学ぶ」東京 2011年6月30日
2. 増崎英明:第47回日本周産期・新生児学会学術集会 教育講演 9「HTLV-1 Up-to-date HTLV-1 母子感染防止ー長崎県における 24年間の取り組みー」札幌 2011年7月12日
3. 増崎英明:第4回 HTLV-1 研究会「25年間継続した妊婦の HTLV-1 抗体検査から得られた母子感染予防効果の検証および高精度スクリーニングシステム開発」東京 2011年9月18日
4. 増崎英明:平成23年度厚生労働科学研究費 HTLV-1 関連疾患研究領域研究班合同発表会「25年間継続した妊婦の HTLV-1 抗体検査から得られた母子感染予防効果の検証および高精度スクリーニングシステム開発」東京 2012年3月3日

H. 知的財産権の出願・登録状況

平成23年は、なし

Ⅱ . 分担研究報告書(1)

II. 厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）

平成 23 年度分担研究報告書

25年間継続した妊婦の HTLV-I 抗体検査から得られた母子感染予防効果の検証および高精度スクリーニングシステム開発

研究項目：定量的 PCR 法を導入した妊婦の HTLV-I スクリーニングシステムの構築

研究分担者

上平 憲（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・教授）

吉浦孝一郎（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・教授）

森内浩幸（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・教授）

木下 晃（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・講師）

研究要旨

現在用いられている妊婦の HTLV-I ウイルス感染の抗体検査法には偽陽性・偽陰性が認められるため、HTLV-I の標準検査法として定量的 PCR 法を用いた妊婦 HTLV-I スクリーニングシステムを確立する。

A. 研究目的

平成23年度より妊婦のHTLV-I感染症スクリーニング検査が全国展開されることになったが、現在用いられている妊婦のHTLV-Iウイルス感染の抗体検査法には偽陽性・偽陰性が認められるため、HTLV-Iの標準検査法として定量的PCR法を用いた妊婦HTLV-Iスクリーニングシステムの確立が望まれている。

そこで、本分担研究では、定量的PCR法を導入した妊婦HTLV-Iスクリーニングシステムを長崎県において確立し、その有用性を検討する。

B. 研究方法

1. 定量的PCR法を導入した妊婦のHTLV-Iスクリーニングシステムの構築：

長崎県で1987年より継続している妊婦のHTLV-Iスクリーニングシステムを利用した。PA法もしくはCLEIA法で陽性もしくは疑陽性と判定された例は、長崎大学へ血清検体を集積してウエスタンブロット(WB)法で確認検査を行っていた。WB法には10-15%の例が判定保留になるため、2011年度より確認検査としてWB法に加えて定量的PCR法を併用した。Nested PCR法は、バイオメトラ社製 T Professional Standard96を用いた。定量的PCR法は、ロッシュ・ダイアグノスティクス株式会社 LightCycler480 インストゥルメント II384Wellを用いた。

検討項目は以下の通りである。

1) 2011年に定量的PCR法を導入したHTLV-Iスクリーニングシステムの運用実績

2) WB法で判定保留と判定された例におけるPCR法の成績

C. 研究結果

1. 定量的PCR法を導入した妊婦のHTLV-Iスクリーニングシステムの構築(図1、図2)：

長崎県において定量的PCR法を導入した妊婦のHTLV-Iスクリーニングシステムを構築した。まず、長崎県下で妊娠28週～妊娠32週の妊婦を対象にして、PA法もしくはCLEIA法を用いた妊婦のHTLV-Iスクリーニング検査(一次検査)を行う。そして、一次検査で陽性もしくは疑陽性と判定された例の血清検体は、確認検査としてWB法を行うために長崎大学病院へ集積される。また、研究事務局(長崎大学産婦人科)より、検査依頼施設(長崎県内の産婦人科施設)へPCR検査に用いるEDTA採血と分娩後の母体血、臍帯血および胎盤の採取依頼を行う(図2)。最終的に、長崎大学でPCR法およびWB法を行い、HTLV-Iキャリアの有無を最終判定して、検査結果を依頼者へ通知する。このスクリーニングシステムは、25年間継続された妊婦HTLV-I抗体スクリーニングシステムを利用したので、定量的PCR法を導入した後も順調に運用され、以下の成績を得た。

1) 2011年に定量的PCR法を導入したHTLV-Iスクリーニングシステムの運用実績：

2011年は、9,873名の妊婦をスクリーニングし、一次検査で117名が陽性もしくは偽陽性と判定され、WB法および定量的

PCR 検査による確認検査で 102 名が HTLV-I キャリアと診断された (表 1)。

2) WB 法で判定保留と判定された例における PCR 法の成績 :

2011 年に 117 名の妊婦が 1 次検査で HTLV-I 陽性もしくは疑陽性と診断された。そのうち 15 例は (15/117 例 ; 12.8%)、2 次検査で行った WB 法で判定保留と判定された (表 2)。定量的 PCR 法を併用して、10 例 (10/15 例 ; 66.7%) が陽性、5 例 (5/15;33.3%) が陰性と判定された。PCR 法の結果と抗体価との関連を見てみると、CLEIA 法で 1.7 以上のものは陽性と判定され、それ未満のものは陰性と判定された。また、WB 法で判定保留とされた 3 例について、定量的 PCR 法および nested PCR 法を施行した (図 3A-C)。PC (positive control) の WB 法の結果は、gp46、p53、p24 および p19 のいずれのバンドも認められ、陽性と判定される。一方、No.109 のそれは、gp46 のバンドが認められないため、判定保留と判定される (図 3-B)。一方、Nested PCR 法では、PC および No.109 の血液 DNA サンプルのいずれでもバンドを検出された (図 3-C)。定量的 PCR を行うと、判定保留例の血液 DNA サンプル中の HTLV-I ウイルス量は PC のそれと比較していずれも低値であった (図 3-A)。

D. 考察

平成 23 年度の研究計画は、全て完遂された。以下に、その成果に対する考察を加える。

1) 定量的 PCR 検査法を導入した妊婦の

HTLV-I スクリーニングシステムを確立:まず、当初の研究計画の通りに、長崎県において定量的 PCR 検査法を導入した妊婦の HTLV-I スクリーニングシステムを確立し機能させることが出来た。標準的な HTLV-I の定量的 PCR 法を導入した妊婦 HTLV-I スクリーニングシステムの確立は、正確かつ簡便な HTLV-I キャリア妊婦の確定診断につながり、HTLV-I キャリア妊婦に対する結果説明と人工栄養あるいは短期母乳栄養などの介入の説明が容易になると思われる。また、母乳以外の母子感染経路の同定は、より確実な母子感染予防プロトコールの策定につながると期待される。

E. 結論

平成 23 年度本研究事業により、1) 長崎県において定量的 PCR 検査法を導入した妊婦の HTLV-I スクリーニングシステムを確立した。

平成 23 年度の研究計画は全て完遂された。次年度以降は、本研究の成果を以下に述べるように展開する予定である。

1) 検体集積 : 平成 23 年度に確立した HTLV-I 感染症の PCR 検査・診断法を導入したスクリーニングシステムを利用し、HTLV-I キャリア妊婦および HTLV-I 陰性妊婦の血液サンプル、臍帯血、胎盤および羊水を採取する。

2) 母乳以外の感染経路の存在の有無を明らかにする : 臍帯血、羊水などにおける HTLV-I の定量実験を行い、母乳以外の感染経路の存在の有無を明らかにする。また、切迫早産や妊娠高血圧症候群などの妊娠合

併症と HTLV-I 量との関連を検討し、HTLV-I の母子感染予防に対する栄養法の選択以外の介入法の可能性を探る。

3) 妊娠経過中のウイルスロードを明らかにする：定量的 PCR 法を用いた妊婦の HTLV-I スクリーニングにはウイルスロードが妊娠週数に伴い変化するの否か知る必要があるため、妊娠経過に伴う母体血中の HTLV-I ウイルスロードの推移を明らかにする。

4) キャリア化と栄養法との関連：1987 年以降に出生した妊婦 10,000 例とその児について、キャリア化と栄養法との関連を疫学的に明らかにし、3 ヶ月未満の短期母乳栄養の有用性を確認する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 長崎県 ATL ウイルス母子感染防止協力事業平成 23 年事業報告(会長 増崎英明) 2012;1-2.
2. Kamihira S, Iwanaga M, Doi Y, Sasaki D, Mori S, Tsurda K, Nagai K, Uno N, Hasegawa H, Yanagihara K, Morinaga Y, Tsukasaki K, Taniguchi H. Heterogeneity in clonal nature in the smoldering subtype of adult T-cell leukemia: continuity from carrier status to smoldering ATL. *Int J Hematol.* 2012;95:399-408.
3. Kamihira S, Usui T, Ichikawa T, Uno

N, Morinaga Y, Mori S, Nagai K, Sasaki D, Hasegawa H, Yanagihara K, Honda T, Yamada Y, Iwanaga M, Kanematu T, Nakao K. Paradoxical expression of IL-28B mRNA in peripheral blood in human T-cell leukemia virus type-1 mono-infection and co-infection with hepatitis C virus. *Virology* 2012;9:40.

2. 学会発表

<国際学会>

なし

<国内学会>

1. 増崎英明：協和発酵キリン（株）セミナー第 1 回抗体医薬が拓く、新しい製薬・医療の現場 2011「HTLV-1—母子感染防止—長崎方式 24 年間の成果—母子感染するウイルス性白血病、ATL について学ぶ」東京 2011 年 6 月 30 日

2. 増崎英明：第 47 回日本周産期・新生児学会学術集会 教育講演 9「HTLV-1 Up-to-date HTLV-1 母子感染防止—長崎県における 24 年間の取り組み—」札幌 2011 年 7 月 12 日

3. 増崎英明：第 4 回 HTLV-1 研究会 「25 年間継続した妊婦の HTLV-1 抗体検査から得られた母子感染予防効果の検証および高精度スクリーニングシステム開発」東京 2011 年 9 月 18 日

4. 増崎英明：平成 23 年度厚生労働科学研究費 HTLV-I 関連疾患研究領域研究班合同発表会 「25 年間継続した妊婦の HTLV-1 抗体検査から得られた母子感染予防効果の検証および高精度スクリーニングシステム開発」

東京 2012年3月3日

H. 知的財産権の出願・登録状況

平成23年は、なし

Ⅱ . 分担研究報告書(2)

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）

平成 23 年度分担研究報告書

25 年間継続した妊婦の HTLV-I 抗体検査から得られた母子感染予防効果の検証および高精度スクリーニングシステム開発

研究項目：妊婦の HTLV-I 感染症スクリーニングがもたらす母子感染予防効果の検証

研究分担者：

増崎英明（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・教授）

三浦清徳（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・客員研究員）

三浦生子（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・客員研究員）

研究要旨

平成 23 年度より妊婦の HTLV-I 感染症スクリーニング検査が全国展開された。その効果を評価するには、スクリーニング導入後に出生した児が次の世代を出生するまで追跡して調査する必要がある。一方、長崎県では 1987 年より HTLV-I ウイルス母子感染予防事業を 25 年間継続しており、すでに申請者等は妊婦の HTLV-I スクリーニング検査導入後に出生した妊婦に関する情報とその疫学調査システムを構築しているため、全国展開された妊婦 HTLV-I 抗体スクリーニングがもたらす母子感染予防効果を推定することが可能である。

そこで、1987 年より 25 年間継続した妊婦 HTLV-I スクリーニング事業の成果を検証する。とくに、HTLV-I キャリア妊婦への母乳抑制介入試験を開始した 1987 年以降に出生した妊婦とそれ以前に出生した妊婦についてキャリア率を比較し、妊婦 HTLV-I スクリーニング検査とキャリア妊婦に対する母乳介入の有効性について検討する。