

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 24 年度分担研究報告書

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

研究項目 1：1987 年より 26 年間継続した妊婦 HTLV-1 スクリーニング事業成果の検証

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）

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（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・准教授）

研究協力者

上平 憲（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・名誉教授）

研究要旨

平成 23 年度より妊婦の HTLV-1 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-1 ウイルス母子感染予防事業を 26 年間継続しており、すでに申請者等は妊婦の HTLV-1 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-1 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 26 年間継続した妊婦 HTLV-1 スクリーニング事業の成果を検証する。とくに、HTLV-1 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-1 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。

A. 研究目的

長崎県では1987年よりHTLV-1ウイルス母子感染予防事業を26年間継続しており、すでに私どもは妊婦のHTLV-1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-1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-1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。

B. 研究方法

長崎県で1987年より26年間継続している妊婦のHTLV-1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-1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-1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-1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-1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。本研究は、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（承認番号：12052814, 12072358-2）。

検討項目は以下の通りである。

- 1) 妊婦HTLV-1スクリーニング検査成績の26年間の年次推移
- 2) 出生年代別に見た妊婦のHTLV-1スクリーニング検査成績の推移
- 3) 長崎県内の地域別に見た妊婦のHTLV-1スクリーニング検査成績の推移
- 4) キャリア妊婦が選択した栄養法の年次推移と啓発活動の重要性
- 5) 栄養法による母子感染予防効果に関する検討

C. 研究結果

- 1) 妊婦HTLV-1スクリーニング検査成績の26年間の年次推移

26年間に274,808名の妊婦がHTLV-1スクリーニング検査を受けて、9,803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8,340名（2.8%：8,340/274,808例）の妊婦がHTLV-1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、2012年には1.0%にまで低下していた(表1)。

2) 出生年代別に見た妊婦のHTLV-1スクリーニング検査成績の推移

2001年-2012年の期間、長崎県におけるHTLV-1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-1キャリア率を検討した(表2)。1955年以前に出生した妊婦のHTLV-1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-1キャリア率は0.6%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1.48%(1,548/104,683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0.60%(44/7,365例)であった。

3) 長崎県内の地域別に見た妊婦のHTLV-1スクリーニング検査成績の推移

長崎県における女性のATL罹患地図を示す(図2)。五島(福江・南松)などの離島地域は、ATLの発症率が高い。これは、HTLV-1キャリア率が高いことを示している。一方、島原地区はATLの発症率は低く、HTLV-1キャリア率が低いことを意味している。

長崎県全体の妊婦におけるHTLV-1キャリア率は、1987年の7.6%から、2001年には2.0%、2012年には1.0%にまで低下している。島原地区のHTLV-1キャリア率は、2001年には既に1.0%前後を推移し、その頻度は維持されている。一方、五島地区は2001年から2008年ころまで2.0-4.0%台を推移していたが、2009年頃より急激にHTLV-1キャリア率が減少し、2012年には0.44%にまで低下している(表3)。

4) キャリア妊婦が選択した栄養法の年次推移と啓発活動の重要性

表4に1,999年から2,012年の期間に長崎県のHTLV-1キャリア妊婦1,337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927例(69.3%)で最も多く、次いで短期母乳栄養の218例(16.3%)、長期母乳栄養の166例(12.4%)、人工栄養と母乳栄養を併用している混合栄養の26例(1.9%)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。私どもは、HTLV-1関連疾患とその予防に関する啓発が重要と考え、保健師、助産師、看護師、医師および市民を対象にした講習会を2008年より年一回定期開催している。講習会のプログラムは、HTLV-1関連疾患の治療の現状とその母子感染防止対策の必要性と重要性について、患者、血

液内科医、産婦人科医、小児科医のそれぞれの立場からの話を偏りなく聞けるように企画されている。すると、2009年に64.4%、2010年に68.9%、2011年には70.4%そして2012年には75.0%とV字回復の傾向にあった。

5) 栄養法による母子感染予防効果に関する検討

長崎では母子感染の有無は、HTLV-1 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5）。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、2012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、0.6%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。

出生年代別にみた妊婦HTLV-1キャリアの比較検討（2001年-2011年）では、年次推移とともにHTLV-1キャリア妊婦の割合は減少していた。これはHTLV-1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社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0.6%にまで有意に低下しており、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。

地域別にHTLV-1キャリアの頻度をみると、長崎県において特にHTLV-1キャ

リア率が高かった離島地域において、2009年頃から、妊婦のHTLV-1キャリア率が長崎県の平均レベル（1.0%）まで低下していた。福江地区は里帰り分娩が盛んであり、現在は介入試験以降に出生した世代が妊娠出産していることを反映していると考えられ、キャリア妊婦への栄養法の介入には、HTLV-1キャリア率の減少を促進する効果が認められた。

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%、2011年に70.4%そして2012年には75%とV字回復の傾向にあった。これは、2008年以降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（ポスター）。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。

HTLV-1キャリア妊婦より出生した児のHTLV-1検査（1990-2010年）では、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-1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。HTLV-1キャリア妊婦において多くが臍帯血に移行抗体を認めるが、臍帯血中にHTLV-1プロウイルスを認める割合は1.8%であった。これは、胎内感染の可能性を示唆するものであり、人工栄養を選択したキャリア妊婦から生じるHTLV-1母子感染の頻度が2-3%であることと一致する。

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

- 1) 26年間で274,808例の妊婦をスクリーニングし、8,340例のHTLV-1キャリアが同定された。
- 2) 長崎県における妊婦のHTLV-1キャリア率の年次推移は1987年には7.2%であったが、2012年には1.0%にまで低下していた。
- 3) 出生年代別にみると、介入試験が始まった1987年以前に出生した妊婦におけるHTLV-1抗体陽性率は1.48%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0.60%であった。介入試験以降に出生した妊婦のHTLV-1キャリア率は、介入以前に出生した妊婦のそれと比較し

て有意に低下していた。妊婦にHTLV-1スクリーニング検査を実施することはHTLV-1母子感染予防とATL撲滅に対して有効であることが確認された。

- 4) また、長崎県において特にHTLV-1キャリア率が高かった離島地域において、2009年頃から、妊婦のHTLV-1キャリア率が長崎県の平均レベル（1.0%）まで低下していた。福江地区は里帰り分娩が盛んであり、現在は介入試験以降に出生した世代が妊娠出産していることを反映していると考えられ、キャリア妊婦への栄養法の介入には、HTLV-1キャリア率の減少を促進する効果が認められた。
- 5) HTLV-1キャリアが選択した栄養法の選択の年次推移を調査して、定期的な講習会や市民公開講座の開催が、HTLV-1母子感染予防システムの確立にきわめて重要であることを明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 三浦清徳、築山尚史、増崎英明：HTLV-1
臨床婦人科産科 2013；67:152-162.
2. Moriuchi H, Masuzaki H, Doi H, Katamine S. Mother-to-child transmission of human T-cell lymphotropic virus type 1. *Pediatr Infect Dis J* 2013;32:175-177.

3. 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 年 7 月 10 日；1-4.
4. 築山尚史、三浦清徳、増崎英明：長崎県における HTLV-1 母子感染防止の取り組み
日本産婦人科・新生児血液学会誌 2013；22:45-54.
5. 築山尚史、三浦清徳、増崎英明：母子感染の管理-④HTLV-1- 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 J.* 2012;9:40.

2. 学会発表

<国際学会>

なし

<国内学会>

6. 築山尚史、三浦清徳、増崎英明：第 22 回日本産婦人科・新生児血液学会「長崎県における HTLV-1 母子感染予防の取り組み」三重 2012 年 6 月 29-30 日
7. 増崎英明：「ATL 予防対策 国が本腰「長崎方式」普及目指す」長崎新聞 2012 年 8 月 6 日
8. 築山尚史、三浦清徳、増崎英明：第 5 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 2012 年 8 月 26 日
9. 増崎英明：平成 24 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 2013 年 2 月 16 日

10. 築山尚史、三浦清徳、佐々木大介、猪口直子、土井裕子、長谷川寛雄、柳原克紀、上平憲、森内浩幸、吉浦孝一郎、増崎英明：長崎感染症研究会「HTLV-1 キャリア妊婦における妊娠中と分娩後の末梢血中プロウイルス量の検討」長崎 2013 年 3 月 16 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

平成 24 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 24 年度分担研究報告書

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

研究項目 2：定量的 PCR 法を導入した妊婦の HTLV-1 スクリーニングシステムの確立

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）

吉浦孝一郎（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・准教授）

山崎健太郎（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・講師）

木下 晃（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・講師）

研究協力者

上平 憲（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・名誉教授）

柳原克紀（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・教授）

研究要旨

HTLV-1 は、難治性疾患である成人 T 細胞白血病（ATL）や HTLV-1 型関連脊髄症（HAM）の原因ウイルスであり、主な感染経路は母乳を介した母子感染である。HTLV-1 母子感染の予防は、次世代における ATL などの難治性疾患を減少させることにつながる。したがって、妊婦の HTLV-1 スクリーニングにより、陽性あるいは陰性と判定し、キャリア妊婦が栄養法を選択することは重要である。しかし、HTLV-1 抗体スクリーニング検査では、確認検査として Western Blot 法が実施されるが、10-15%に判定保留例が存在する。したがって、これら判定保留例について、HTLV-1 キャリアなのか否かを高精度に最終判定する検査システムの確立が望まれている。そこで、本研究では、定量的 PCR 法を導入した妊婦の HTLV-1 スクリーニングシステムの確立を目指す。

A. 研究目的

HTLV-1 は、難治性疾患である成人 T 細胞白血病 (ATL) や HTLV-1 型関連脊髄症 (HAM) の原因ウイルスであり、主な感染経路は母乳を介した母子感染である。HTLV-1 母子感染の予防は、次世代における ATL などの難治性疾患を減少させることにつながる。したがって、妊婦の HTLV-1 スクリーニングにより、陽性あるいは陰性と判定し、キャリア妊婦が栄養法を選択することは重要である。しかし、HTLV-1 抗体スクリーニング検査では、確認検査として Western Blot 法が実施されるが、10-15%に判定保留例が存在する。したがって、これら判定保留例について、HTLV-1 キャリアなのか否かを高精度に最終判定する検査システムの確立が望まれている。そこで、本研究では、定量的 PCR 法を導入した妊婦の HTLV-1 スクリーニングシステムの確立を目指す。

B. 研究方法

長崎県で1987年より継続している妊婦のHTLV-1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ェスタンブロット (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 インストルメント II384Wellを用いた。

PCR法でプロウイルスゲノムを検出したものは陽性と判定した。本研究における試料収集は、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 (承認番号: 12052814, 12072358-2)。

検討項目は以下の通りである。

- 1) 2011年-2012年に定量的PCR法を導入した妊婦のHTLV-1スクリーニング検査の運用実績
- 2) Western blot法で判定保留例における定量的PCR法の成績

C. 研究結果

定量的PCR法を導入した妊婦のHTLV-1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-1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-1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3）。最終的に、長崎大学でPCR法およびWB法を行い、HTLV-1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、26年間継続された妊婦HTLV-1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（図4）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-2012年に定量的PCR法を導入した妊婦のHTLV-1スクリーニング検査の運用実績：

19,048名の妊婦をスクリーニングし、一次検査で234名が陽性もしくは疑陽性と判定され、WB法および定量的PCR検査による確認検査で197名がHTLV-1キャリアと診断された（図5）。

2) Western blot法で判定保留例における定量的PCR法の成績：

234名の妊婦が1次検査でHTLV-1陽性もしくは疑陽性と診断された。そのうち30例は（30/234例；12.8%）、2次検査で行ったWB法で判定保留と判定された（図5）。定量的PCR法を併用して、20例（20/30例；66.7%）が陽性、10例（10/30；33.3%）が陰性と判定された。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6A-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6-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6-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-1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6-A）。

D. 考察

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-1スクリーニングシステムを確立し、19,048名の妊婦をスクリーニングし、一次検査で234名が陽性もしくは疑陽性と判定され、WB法および定量的PCR検査による確認検査で197名がHTLV-1キャリアと診断された。標準的なHTLV-1の定量的PCR法を導入した妊婦HTLV-1スクリーニングシステムの確立は、正確かつ簡便なHTLV-1キャリア妊婦の確定診断につながり、HTLV-1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に有用な情報をもたらした。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ールの策定につながると期待される。

Western blot法で判定保留例における定量的PCR法の成績は、234名の妊婦が1次検査でHTLV-1陽性もしくは疑陽性と診断された。そのうち30例は（30/234例；12.8%）、2次検査で行ったWB法で判定保留と判定された。定量的PCR法を併用して、20例（20/30

例 ; 66.7%) が陽性、10例 (10/30;33.3%) が陰性と判定された。判定保留例における母体血中HTLV-1プロウイルス量の妊娠に伴う推移を明らかにすることは、妊娠中のHTLV-1感染の有無を判定する基準値の設定、最適な検査時期の決定、母子感染とプロウイルス量との関連の解明さらには母子感染のメカニズム解明につながる知見が得られる可能性があると思われた。

E. 結論

長崎県内の妊婦を対象として、PCR法を導入した妊婦のHTLV-1スクリーニングシステムを確立した。

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-1 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-1 臨床婦人科産科 2011; 65:1029-1037.
4. 増崎英明:HTLV-1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-1- 臨床婦人科産科 2012; 66:182-189.

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 三浦清徳、築山尚史、増崎英明 : HTLV-1 臨床婦人科産科 2013; 67:152-162.
2. Moriuchi H, Masuzaki H, Doi H, Katamine S. Mother-to-child transmission of human T-cell lymphotropic virus type 1. *Pediatr Infect Dis J* 2013;32:175-177.
3. 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 年 7 月 10 日;1-4.
4. 築山尚史、三浦清徳、増崎英明 : 長崎県における HTLV-1 母子感染防止の取り組み 日本産婦人科・新生児血液学会誌 2013; 22:45-54.
5. 築山尚史、三浦清徳、増崎英明 : 母子感染の管理-④HTLV-1- 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. Virol J. 2012;9:40.

2. 学会発表

<国際学会>

なし

<国内学会>

11. 築山尚史、三浦清徳、増崎英明：第 22 回日本産婦人科・新生児血液学会「長崎県における HTLV-1 母子感染予防の取り組み」三重 2012 年 6 月 29-30 日
12. 増崎英明：「ATL 予防対策 国が本腰「長崎方式」普及目指す」長崎新聞 2012 年 8 月 6 日
13. 築山尚史、三浦清徳、増崎英明：第 5 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 2012 年 8 月 26 日

14. 増崎英明：平成 24 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 2013 年 2 月 16 日

15. 築山尚史、三浦清徳、佐々木大介、猪口直子、土井裕子、長谷川寛雄、柳原克紀、上平憲、森内浩幸、吉浦孝一郎、増崎英明：長崎感染症研究会「HTLV-1 キャリア妊婦における妊娠中と分娩後の末梢血中プロウイルス量の検討」長崎 2013 年 3 月 16 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

平成 24 年は、なし

Ⅱ. 分担研究報告書(3)

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 24 年度分担研究報告書

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

研究項目 3: HTLV-1 キャリア妊婦における妊娠と HTLV-1 ウイルス量に関する研究

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・准教授）

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）

研究協力者

上平 憲（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・名誉教授）

柳原 克紀（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・教授）

築山 尚史（長崎大学病院産婦人科・助教）

研究要旨

HTLV-1 キャリアは九州・沖縄など一部の地域で高頻度に認められていたが、HTLV-1 キャリアの大都市圏への拡散が明らかになり、全国的な妊婦の HTLV-1 抗体スクリーニングが行われるようになった。すなわち、これまで HTLV-1 キャリアが低頻度であった地域においても、妊婦の HTLV-1 スクリーニングシステムの確立が必要とされている。しかしながら、HTLV-1 ウイルス量と母子感染に関する知見や妊娠経過に伴う HTLV-1 プロウイルス量の生理的な変化に関する十分な知見はない。

そこで、本分担研究では、妊娠時、分娩直後、産褥 1 ヶ月における母体血中 HTLV-1 プロウイルス量の推移について検討し、より有効な HTLV-1 ウイルス母子感染予防プロトコルの策定につながる知見を得る。

A. 研究目的

HTLV-1 キャリアは九州・沖縄など一部の地域で高頻度に認められていたが、HTLV-1 キャリアの大都市圏への拡散が明らかになり、全国的な妊婦のHTLV-1抗体スクリーニングが行われるようになった。すなわち、これまでHTLV-1 キャリアが低頻度であった地域においても、妊婦のHTLV-1スクリーニングシステムの確立が必要とされている。私どもは、長崎県におけるHTLV-1母子感染予防の目的で、1987年より26年間にわたり県内の産婦人科を受診した全妊婦のHTLV-1抗体スクリーニングを行っている。本分担研究では、妊娠時、分娩直後、産褥1ヶ月における母体血中HTLV-1プロウイルス量の推移について検討し、母体血中HTLV-1ウイルス量を考慮したHTLV-1感染症の診断システムの開発を目指す。

B. 研究方法

HTLV-1 キャリア妊婦あるいはWestern Blot法で判定保留例における末梢血中のHTLV-1プロウイルス量を定量的リアルタイムPCRで測定した。HTLV-1プロウイルス量は、
$$\text{HTLV-1 proviral load} = [(\text{HTLV-1 pX copy number}) / (\beta\text{-globin copy number} / 2)] \times 10,000$$
で算出した。本研究における試料収集は、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（承認番号：12052814, 12072358-2）。

検討項目

- 1) HTLV-1キャリア妊婦の妊娠背景に関する調査
- 2) Western Blot法による判定結果とHTLV-1 viral loadとの関連
- 3) HTLV-1キャリア妊婦の分娩前後におけるHTLV-1 Viral Loadsの推移
- 4) Western Blot法で判定保留例における妊娠中と産褥一ヶ月後のHTLV-1 Viral Loadsの比較
- 5) HTLV-1キャリア妊婦と非感染妊婦におけるsIL-2R値

C. 研究結果

研究3. 妊娠とHTLV-1プロウイルス量との関連を明らかにする。

- 1) HTLV-1キャリア妊婦およびWB法判定保留例の妊娠背景に関する調査：

HTLV-1キャリア妊婦197例およびWB法判定保留かつPCR法陰性の10例について、表6の調査票を用いて妊娠背景を調査した。

- 2) Western Blot法による判定結果とHTLV-1プロウイルス量との関連：

Western Blot法で陰性例には、いずれも定量的PCR法でプロウイルスは検出されなかった（図7）。一方、Western Blot法で陽性例には、いずれも定量的PCR法でプロウイルスは検出された。Western Blot法で判定保留例には、定量的PCR法でプロウイルスを検出されないものから検出されるものまで存在し、そのウイルス量も非常に

低値のものから高値のものまで様々であった。したがって、Western Blot法で判定保留例には、最終判定検査として定量的PCR法によるHTLV-1プロウイルスの検出の有無を確認する有用性が認められた。

Western Blot法で判定保留例における定量的PCR法によるプロウイルス検出の有無とCLEIA法による抗体価との関連を比較すると、CLEIA法で1.7以上のものはPCR法でHTLV-1キャリアと判定され、一方、CLEIA法で0.5未満のものは全て陰性と判定された(表7)。

3) HTLV-1キャリア妊婦の分娩前後におけるHTLV-1 Viral Loadsの推移:

妊娠中のプロウイルス量(中央値(最小値-最大値))は63.07(0.13-520.93)/ 10^4 cellsであった。一方、分娩後のプロウイルス量は21.41(0.07-134.95)/ 10^4 cellsであった(図8)。HTLV-1キャリア妊婦では、妊娠中と比較して分娩後のHTLV-1プロウイルス量は有意に減少していた(Wilcoxon signed rank test, $p < 0.001$)。

4) 妊娠中と産褥一ヶ月後のHTLV-1 Viral Loadsの比較:

Western blot法で判定保留30例のうち10例は最終判定検査として実施した定量的PCR検査でプロウイルスは検出されなかった。しかし、その後の末梢血液中のプロウイルス量を経時的推移をモニターすると、妊娠末期に実施した定量的PCR検査による最終判定で陰性10例のうち1例は、産褥1ヶ月の末梢血液中に0.113(0.0011%) copie

s/ 10^4 cellsのHTLV-1プロウイルスの存在が確認された。Western blot法で判定保留例のうちPCR法で陰性と最終判定された例のなかには、HTLV-1に感染した非常に初期のものも存在している可能性が示唆された。

一方、Western blot法で陽性177例について、定量的PCR検査でいずれも妊娠末期の末梢血液中にHTLV-1プロウイルスを検出することができた。そのうち1例は、妊娠末期に0.327(0.0033%) copies/ 10^4 cellsのHTLV-1プロウイルスの存在が確認されたが、産褥1ヶ月には全く検出されなかった。したがって、妊娠中にのみ末梢血液中にHTLV-1プロウイルスが検出される例が存在することが確認された。妊娠という免疫学的寛容の状態がHTLV-1プロウイルス量を増加させる作用があり、HTLV-1キャリアであることを顕性化させ、普段は定量的PCR法による高精度のHTLV-1検査法でも検出し得ない不顕性なHTLV-1キャリアが存在するのかもしれない。

以上より、妊娠に伴うHTLV-1プロウイルス量の変化については、今後の詳細かつ大規模な解析調査の必要が示された。

5) HTLV-1キャリア妊婦と非感染妊婦におけるsIL-2R値:

HTLV-1 キャリア妊婦 50 例におけるsIL-2R 値(中央値(最小値-最大値))は196(141-561) U/ml、一方の非感染妊婦 50 例におけるそれは 243.5(141-454) U/mlであった(図 9, Mann-Whitney U test $p > 0.05$)。

血中 sIL-2R 値はレトロウイルス感染症、悪性腫瘍あるいは膠原病などの免疫学的に異常な状態で上昇し、その病勢を反映する指標として注目されている。また、血中に遊離される可溶性 IL-2 レセプターの量は、T 細胞活性化の指標となることが知られており、ATL の活動性を示すマーカーとなることが報告されている。

妊娠による免疫学的寛容の状態は、HTLV-1 感染の有無により血中 sIL-2R 値の有意な変化をもたらすと推察されたが、実際には両群間に有意差は認められなかった。妊娠に伴う CD4 陽性 T 細胞数の変化、妊娠と HTLV-1 感染に伴う CD4 陽性 T 細胞数の変化などに関しては知見がなく、その詳細を明らかにすることは妊婦の HTLV-1 スクリーニングとその結果に対する説明あるいは今後の HTLV-1 キャリア妊婦の病態生理の解明に重要な知見をもたらすことが期待され、来年度の検討項目に追加して解明したい。

D. 考察

HTLV-1 キャリア妊婦および WB 法判定保留例の妊娠背景に関する調査では、HTLV-1 キャリア妊婦 197 例および WB 法判定保留かつ PCR 法陰性の 10 例について、調査票を用いて妊娠背景を調査した。妊娠合併症は 17 例に認められた。次年度に妊娠合併症と HTLV-1 ウイルス量との関連を明らかにする予定である。

Western Blot 法による判定結果と HTLV-1 プロウイルス量との関連に

ついて、Western Blot 法で陰性例には、いずれも定量的 PCR 法でプロウイルスは検出されなかった。一方、Western Blot 法で陽性例には、いずれも定量的 PCR 法でプロウイルスは検出された。Western Blot 法で判定保留例には、定量的 PCR 法でプロウイルスを検出されないものから検出されるものまで存在し、そのウイルス量も非常に低値のものから高値のものまで様々であった。したがって、Western Blot 法で判定保留例には、最終判定検査として定量的 PCR 法による HTLV-1 プロウイルスの検出の有無を確認する有用性が認められた。Western Blot 法で判定保留例における定量的 PCR 法によるプロウイルス検出の有無と CLEIA 法による抗体価との関連を比較すると、CLEIA 法で 1.7 以上のものは PCR 法で HTLV-1 キャリアと判定され、一方、CLEIA 法で 0.5 未満のものは全て陰性と判定された。よって、PCR 法による確認検査実施のカットオフ値は、CLEIA 法による HTLV-1 抗体価が 0.5-1.7 の間に存在することが示唆された。したがって、一次スクリーニング検査で HTLV-1 抗体価の低い例では、確認検査として抗体検査を実施するより PCR 法を行う方が判定保留を回避し経済的に効率的なスクリーニングシステムと考えられた。

HTLV-1 キャリア妊婦の分娩前後における HTLV-1 プロウイルス量の推移について、分娩に伴い血中 HTLV-1 プロウイルス量が有意に低下することが明らかになった ($p < 0.001$)。すでに、妊娠合併症と

HTLV-1プロウイルス量との関連を明らかにするため、HTLV-1キャリア妊婦の臨床所見を集積しデータベース化しており、今後は妊娠合併症とHTLV-1プロウイルス量との関連を明らかにする予定である。妊娠に伴いHTLV-1ウイルス量が有意に変化することから、来年度の研究では免疫学的寛容の視点からそのメカニズム解明の手掛かりを得たいと考えている。

また、妊娠中と産褥一ヶ月後のHTLV-1プロウイルス量の比較について、Western blot法で判定保留30例のうち10例は最終判定検査として実施した定量的PCR検査でプロウイルスは検出されなかった。しかし、その後の末梢血液中のプロウイルス量を経時的推移をモニターすると、妊娠末期に実施した定量的PCR検査による最終判定で陰性10例のうち1例は、産褥1ヶ月の末梢血液中に0.113(0.0011%)copies/10⁴cellsのHTLV-1プロウイルスの存在が確認された。Western blot法で判定保留例のうちPCR法で陰性と最終判定された例のなかには、HTLV-1に感染した非常に初期のものも存在している可能性が示唆された。一方、Western blot法で陽性177例について、定量的PCR検査でいずれも妊娠末期の末梢血液中にHTLV-1プロウイルスを検出することができた。そのうち1例は、妊娠末期に0.327(0.0033%)copies/10⁴cellsのHTLV-1プロウイルスの存在が確認されたが、産褥1ヶ月には全く検出されなかった。したがって、妊娠中にのみ末梢血液中にHTLV-1プロウイルスが検出される例が存在する

ことが確認された。妊娠という免疫学的寛容の状態がHTLV-1プロウイルス量を増加させる作用があり、HTLV-1キャリアであることを顕性化させ、普段は定量的PCR法による高精度のHTLV-1検査法でも検出し得ない不顕性なHTLV-1キャリアが存在するのかもしれない。以上より、妊娠に伴うHTLV-1プロウイルス量の変化については、今後の詳細かつ大規模な解析調査の必要が示された。

HTLV-1キャリア妊婦と非感染妊婦におけるsIL-2R値について、HTLV-1キャリア妊婦におけるsIL-2R値は、非感染妊婦におけるそれと比較して有意な差を認められなかった。血中sIL-2R値はレトロウイルス感染症、悪性腫瘍あるいは膠原病などの免疫学的に異常な状態で上昇し、その病勢を反映する指標として注目されている。また、血中に遊離される可溶性IL-2レセプターの量は、T細胞活性化の指標となることが知られており、ATLの活動性を示すマーカーとなることが報告されている。妊娠による免疫学的寛容の状態は、HTLV-1感染の有無により血中sIL-2R値の有意な変化をもたらすと推察されたが、実際には両群間に有意差は認められなかった。妊娠に伴うCD4陽性T細胞数の変化、妊娠とHTLV-1感染に伴うCD4陽性T細胞数の変化などに関しては知見がなく、その詳細を明らかにすることは妊婦のHTLV-1スクリーニングとその結果に対する説明あるいは今後のHTLV-1キャリア妊婦の病態生理の解明に重要な知見をもたらすことが期待され、来