

201318019A

平成25年度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-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 (H23-新興-一般-026)

平成25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26年(2014)3月

平成25年度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-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（H23-新興-一般-026）

平成25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26年（2014）3月

目 次

I. 総括研究報告書

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-----	4
--	---

増崎英明（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・教授）

II. 分担研究報告書

研究1: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の検証-----	19
--	----

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2:定量的PCR検査法を導入した妊婦HTLV-1感染症スクリーニングシステムの確立-----	26
--	----

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）

柳原克紀（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）

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）

山崎健太郎（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・客員研究員）

研究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-----	31
---	----

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）

柳原克紀（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）

淵 直樹（長崎大学医歯薬学総合研究科・大学院生）

研究 4：母乳以外の HTLV-1 母子感染経路の解明に関する研究

-----39

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）

柳原克紀（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）

築山尚史（長崎大学病院産婦人科・助教）

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----71

IV. 研究成果の刊行物・別冊 -----72

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 25 年度総括研究報告書

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-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 27 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。

分担研究者

柳原克紀（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）
柳原克紀（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）
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）

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）
築山尚史（長崎大学病院産婦人科・助教）
淵 直樹（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・大学院生）
山崎健太郎（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

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。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-1ウイルス母子感染予防事業を27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。

長崎県における妊婦のHTLV-1スクリーニングシステムを図1に示す。まず、長崎県内の全妊婦を対象にして、妊娠28週から32週にPA法もしくはCLEIA法で一次スクリーニング検査を実施する。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（二次検査）

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法を併用している。最終的に陽性（HTLV-1キャリア）と判定された例には、HTLV-1関連疾患（ATL）に関する情報提供とHTLV-1母子感染予防に関する人工栄養、短期母乳栄養、凍結母乳栄養および長期母乳栄養それぞれの効果について説明し、妊婦がいずれかの栄養法を選択している。

目的完遂のために、研究期間内の具体的な平成25年度の目標を以下に示す。

- 1) 研究1：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検証する。
- 2) 研究2：定量的 PCR 検査法を導入した妊婦 HTLV-1 感染症スクリーニングシステムを確立する。
- 3) 研究3：妊娠と HTLV-1 ウイルス量との関連を明らかにする。
- 4) 研究4：母乳以外の感染経路の存在の有無を明らかにする。

B. 研究方法

研究1. 1987年より27年間継続した妊婦HTLV-1スクリーニング事業成果の検証：

長崎県で1987年より27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27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

研究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構築：

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。一次検査として妊娠30週頃に長崎県内の診療所や病院が契約している検査センターでPA（particle agglutination）法もしくはchemiluminescent enzyme immunoassays（CLEIA）法を行った。陽性もしくは疑陽性と診断されたすべての検体は長崎大学病院検査部に集められ、新たにPCR用に末梢血採血を行った。一次検査で陽性あるいは疑陽性とされた検体はCLEIA法（ルミパレスHTLV-1、富士レビオ）、PA法（セロディアHTLV-1；富士レビオ）を施行した。さらに2次検査としてWestern Blot（WB）法（プロブロットHTLV-1；富士レビオ）を施行した。WB法で陽性例は陽性、陰性例は陰性と判定した。WB法で判定保留例は定量的リアルタイムPCR法を施行し、プロウイルスゲノムを検出したものを陽性、検出しなかったものを陰性と最終判定した。定量的リアルタイムPCR法に使用した検体のDNA濃度は最も検出感度が高くなるように希釈しない検体を用いた。定量的リアルタイムPCR法はロッシュ・ダイアグノスティック株式会社LightCycler480 systemを用いた。

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-2013年に定量的リアルタイム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

研究 3. 妊娠とHTLV-1ウイルス量との関連を明らかにする。

1 次検査で陽性あるいは疑陽性とされた例は全例に定量的リアルタイム PCR 法およびデジタル PCR 法を施行し、HTLV-1 プロウイルス量を測定した(末梢血リンパ球より抽出した 100ng DNA を使用)。また、分娩後 24 時間以内に母体末梢血採血を行い、母体血の HTLV-1 プロウイルス量と CLEIA 法・PA 法による HTLV-1 抗体検査を行い、妊娠経過に伴うプロウイルス量の変化を検討した。

定量的リアルタイム PCR 法はロッシュ・ダイアグノスティクス株式会社 LightCycler480 system を用いた。デジタル PCR 法はバイオラッド社の QX100 Droplet Digital PCR システムを用いた。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。

さらに、妊娠と HTLV-1 感染の影響を調べるために、HTLV-1 キャリア妊婦ならびに非感染妊婦において、妊娠 12 週、妊娠 24 週、妊娠 30 週、妊娠 36 週、産褥 1 日、産褥 1 ヶ月それぞれにおいて母体末梢血を採取し、白血球数、リンパ球数、CD4 陽性 T 細胞数、CD4 陽性 CD25 陽性 T 細胞数、sIL2R 値および CRP 値を測定し、妊娠経時的な変化について検討した。

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 プロウイルス量との関連について
- 3) 妊娠経過に伴う HTLV-1 キャリア妊婦の末梢血中 HTLV-1 プロウイルス量の推移について
- 4) HTLV-1 キャリア妊婦と非感染妊婦における妊娠経時的なリンパ球数ならびに sIL2R の推移を検討する

研究 4. 母乳以外の感染経路の存在の有無を明らかにする。

HTLV-1 の母子感染経路は、母乳を介した母子感染がその多くを占めるが、その他の感染経路として胎盤・臍帯を介した子宮内感染の可能性が考えられる。しかし、臍帯血中の HTLV-1 抗体やプロウイルス量に関する知見はほとんどない。臍帯血中の HTLV-1 抗体や HTLV-1 プロウイルス量を測定し、母乳以外の母子感染の可能性を検討した。

分娩後 24 時間以内に母体末梢血、臍帯血および胎盤を採取し、定量的リアルタイム PCR 法で HTLV-1 プロウイルス量を、また母体血、臍帯血の CLEIA 法・PA 法による HTLV-1 抗体検査を行い、妊娠経過に伴うプロウイルス量との変化を検討した。母体血中における HTLV-1 プロウイルス量は研究 3 の結果を用いた。

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) スクリーニング陽性例の母体血と臍帯血におけるHTLV-1抗体の関連について
- 2) スクリーニング陽性例の母体血と臍帯血におけるHTLV-1プロウイルスの関連について
- 3) 胎盤におけるHTLV-1プロウイルスの検出
- 4) HTLV-1キャリア妊婦より出生した児のHTLV-1感染成立の有無の検討：

C. 研究結果

研究 1. 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の検証：

1) 妊婦HTLV-1スクリーニング検査成績の27年間の年次推移

27年間に285,209名の妊婦がHTLV-1スクリーニング検査を受けて、9,936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8,448名(2.8%：8,448/285,209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、2011年以降は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-2013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1.46%(1,641/112,628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0.63%(64/10,131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%、2011年以降は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、2013年には2.0%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2,013年の期間に長崎県のHTLV-1キャリア妊婦1,436例が選択した栄養法の動向を示す。期間全体でみると、人工栄養を選択した妊婦は1,002例(70.5%)で最も多く、次いで短期母乳栄養の234例(16.3%)、長期母乳栄養の173例(11.6%)、人工栄養と母乳栄養を併用している混合栄養の27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64.0%、2010年に68.8%、2011年には70.7%そして2013年には75.8%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。

研究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構築

(図1、図3) :

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、27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-2013年に定量的リアルタイム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:

2011年1月から2014年3月までに長崎県内で30,731名の妊婦をスクリーニングした。1次検査で陽性は338名(338/30,731; 1.1%)、疑陽性は39名(39/30,731; 0.13%)、陰性は30,354名(30,354/30,731; 98.8%)であった。

2) Western blot法で判定保留例における定量的PCR法の成績:

1次検査で陽性ないし疑陽性とされた377名のうち、2次検査として施行したWB法で陽性は285名(285/377; 75.6%)で、HTLV-1キャリアと診断した。WB法で陰性は46名(46/377; 12.2%)で、非キャリアと診断した。判定保留の46名(46/377; 12.2%)は、定量的リアルタイムPCR法を施行し、31名(31/46; 67.4%)はHTLV-1プロウイルスを認め、HTLV-1キャリアと診断し、15名(15/46; 32.6%)は非キャリアと診断した。最終的に316例(316/30,731; 1.03%)がHTLV-1キャ

リアと診断された。WB法で判定保留の例に定量的リアルタイムPCR法を導入することで陽性と陰性の判定を行うことができた(図5)。

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316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:

WB法で判定保留とされた例で、CLEIA法とPA法、定量的PCR法によるHTLV-1プロウイルス量測定を行った31例の結果を示す。20例(20/31; 64.5%)において、定量的リアルタイムPCR法でプロウイルスを検出し、最終的に陽性と診断した。11例(11/31; 35.5%)はプロウイルスが検出されず、陰性と診断した(表7)。

次にWB法の結果とウイルス量について検討した。WB法で陰性であった29例ではいずれにおいてもプロウイルスは検出されなかった(0/29; 0%)。WB法で判定保留であった31例のうち、プロウイルスが検出されたものは20例(20/31; 64.5%)で、11例(11/31; 35.4%)でプロウイルスが検出されなかった。WB法で陽性の144例のうち、プロウイルスが検出されたものは141例(141/144; 97.9%)で、3例(3/144; 2.1%)でプロウイルスが検出されなかった(図6)。WB法において判定保留例と陽性例におけるプロウイルス量は、WB陽性例の方が高値であった($p=0.006$)。

WB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。

WB法での判定保留例において、定量的リアルタイム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について検討した。C. O. I 2.5以上の症例は1例を除いて全て、PCR法で陽性と判定された。CLEIA法によるC. O. I 6.7でHTLV-1プロウイルス検出されない症例を認めた。これは、プライマー部位に遺伝子多型が存在していた可能性が考えられた。C. O. I 2.3未満でHTLV-1プロウイルスが検出される症例は認められなかった(表7)。そこで、CLEIA法で2.3未満の症例には、確認検査としてWB法に加えてPCR法の併用が有効と思われた。

3) 妊娠経過に伴うHTLV-1キャリア妊婦の末梢血中HTLV-1プロウイルス量の推移：

妊娠30週頃と分娩後24時間以内の母体血でHTLV-1プロウイルス量を測定した。妊娠中のプロウイルス量(中央値(最小値-最大値))は29.0(0-616.8) copies/ 10^4 cellsであった。一方、分娩後のプロウイルス量は10.2(0-195.6) copies/ 10^4 cellsであった。102例中70例(70/102; 69%)でHTLV-1プロウイルス量が減少し、29例(29/102; 28%)で増加した。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た(Wilcoxon signed rank test, $p < 0.01$) (図7)。

次に、デジタルPCR法を用いてHTLV-1プロウイルス量を測定し、同様の検討を行った。まず、定量的リアルタイムPCRを用いて測定したHTLV-1プロウイルス量とデジ

タルPCR法を用いて測定したHTLV-1プロウイルス量には有意な相関関係があることを確認した(Pearson's correlation coefficient, $r=0.932$, $p < 0.01$) (図8)。

また、妊娠中は母体末梢血よりHTLV-1プロウイルスを検出したが、分娩後はHTLV-1プロウイルスが検出されなかった症例を5例認めた(表8、図9)。いずれの症例も比較的HTLV-1プロウイルス量が微量な症例であった。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症例が存在することが確認された。

4) HTLV-1キャリア妊婦と非感染妊婦における妊娠経時的なリンパ球数ならびにsIL2Rの推移の検討：

HTLV-1キャリア妊婦と非感染妊婦における白血球数、リンパ球数、CD4陽性T細胞数、CD4陽性CD25陽性T細胞数、sIL2R値およびCRP値について、それぞれ妊娠12週、妊娠24週、妊娠30週、妊娠36週、産褥1日および産褥1ヶ月に測定し、妊娠経時的な推移について検討した。

HTLV-1キャリア妊婦は、妊娠12週群が9例、妊娠24週群が5例、妊娠30週群が6例、妊娠36週群が5例、産褥1日群が4例、産褥1ヶ月群が5例測定された。非感染妊婦は、妊娠12週群が26例、妊娠24週群が20例、妊娠30週群が18例、妊娠36週群が5例、産褥1日群が11例、産褥1ヶ月群が6例測定された。

HTLV-1キャリア妊婦におけるそれぞれの項目で妊娠中の経時的な変化に統計学的に有意差を認めたものはCRP値のみであった(Kruskal Wallis test, $p < 0.05$)

(図10)。

非感染妊婦におけるそれぞれの項目で妊娠中の経時的な変化が統計学的に有意差を認めたものは白血球数, CD4 陽性 CD25 陽性 T 細胞数, CRP 値であった (Kruskal Wallis test, $p < 0.001$) (図11)。リンパ球数や CD4 陽性 T 細胞は妊娠中に推移しないが, CD4 陽性 CD25 陽性 T 細胞のみ妊娠経時的な変化を示した (図11)。

次に, HTLV-1 キャリア妊婦と非感染妊婦における妊娠週数毎の両群の比較では, CD4 陽性 CD25 陽性細胞数ならびに sIL2R 値において, 妊娠 12 週でのみ両群に有意差を認めたが, その他の時期では両群に有意差を認めなかった (Mann-Whitney' s U test $p < 0.01$) (図12)。リンパ球や sIL2R 値の妊娠経時的変化は, HTLV-1 感染の有無により影響を受けていないことが示唆された。

研究4. 母乳以外の感染経路の存在の有無を明らかにする。

1) HTLV-1スクリーニング陽性例の母体血と臍帯血におけるHTLV-1抗体価の関連:

スクリーニング陽性例の母体血および臍帯血のCLEIA法の結果を比較した。検討した124例全例において母体血、臍帯血ともにCLEIA法により抗体が検出され、cut off index (C. O. I) は正の相関関係を認めた ($p < 0.001$, $r = 0.972$) (図13,14)。

臍帯血には、母体血と同レベルのHTLV-1抗体が検出され、母体から胎児への移行抗体が存在することが明らかになった。

2) 臍帯血中のプロウイルス量の検討:

スクリーニング陽性例において、定量的

PCR (100ngDNA) を用いて臍帯血のHTLV-1プロウイルス量を測定した。臍帯血中に124例中6例 (6/124; 4.8%) でHTLV-1プロウイルスが検出された (図15, 16)。臍帯血からHTLV-1プロウイルスが検出される例が確かに存在し、母乳による感染経路以外に、臍帯血を介した胎内感染の可能性が示唆された。

3) 胎盤におけるHTLV-1プロウイルスの検出

スクリーニング陽性例において、定量的リアルタイムPCR法 (100ngDNA使用) で分娩後母体血および胎盤のHTLV-1プロウイルス量を測定した。93例中52例で胎盤からプロウイルスが検出された (図17)。臍帯血よりプロウイルスが検出された6例のうち2例で胎盤組織からプロウイルスが検出された。少なくとも胎盤はHTLV-1母子感染のバリアとして働いており、胎盤組織へ感染することと臍帯血へ感染細胞が存在することは必ずしも一致しないことが明らかになった。

4) HTLV-1キャリア妊婦より出生した児のHTLV-1感染成立の有無の検討:

2011年にHTLV-1キャリア妊婦より出生した児が2014年に3歳になり、長崎県のHTLV-1母子感染防止対策プロトコールに従い、HTLV-1抗体検査による母子感染成立の有無の判定をうける。アンケート調査を行い、母子感染成立の有無について検討する予定である。

D. 考察

長崎県では1987年より27年間にわたり妊婦のHTLV-1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

におけるHTLV-1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-1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-1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-1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25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。

研究1：長崎県で1987年より27年間継続した妊婦HTLV-1スクリーニング事業成果の検証

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年以降は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る。

出生年代別にみた妊婦HTLV-1キャリアの比較検討(2001年-2013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%-2.0%)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年の79.1%から2008年には59.4%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2013年には75.8%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(表4)。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4.8%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%であることを裏付けるものと考えられる。

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については、その実施状況など確認する必要があると思われた。

研究2：長崎県に定量的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-1スクリーニングシステムを確立し、30,701名の妊婦をスクリーニングし、一次検査で377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316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。

Western blot法で判定保留例における定量的PCR法の成績は、377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46例(46/377例;12.2%)は、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、31例(31/46例;67.3%)が陽性、15例(15/46;32%)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。

研究3. 妊娠とHTLV-1ウイルス量との関連を明らかにする。

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、いずれも定量的リアルタイムPCR法でプロウイルスは検出されなかった。一方、Western Blot法で陽性例では、1例を除き定量的リアルタイムPCR法でプロウイルスが検出された。定量的リアルタイムPCR法でプロウイルスを検出し得なかった1例は、妊娠中、産褥1日目の末梢血液中でWB法は陽性であったが、HTLV-1プロウイルスは検出されなかった例である。妊娠初期に感染が成立した

可能性も否定できず、今後もフォローしていく予定である。

Western Blot法で判定保留例には、定量的PCR法でプロウイルスが検出されるものから検出されないものまで存在し、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2.5以上のものはC. O. Iが6.7でPCR法陰性であった1例を除いて全てウイルスが検出された。一方、CLEIA法で2.3未満のものは全てPCR法で陰性と判定された。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2.3-2.5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WB法を用いた抗体検査に加えてPCR法を行うスクリーニングシステムが有効と考えられた。

次に、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 ($p < 0.001$)。これはリアルタイムPCR法でもデジタルPCR法でも同様の結果であった。また、妊娠期間中にのみ末梢血液中にHTLV-1プロウイルスを検出し、分娩後にはプロウイルスが検出し得なかった症例が5例存在した。いずれもほとん

どがHTLV-1プロウイルス量は微量であったが、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。

また、妊娠に伴いHTLV-1ウイルス量が増加することが判明し、またHTLV-1ウイルスの標的細胞がCD4陽性CD25陽性T細胞であることから、これは妊娠に伴う免疫学的寛容との関連が示唆された。その視点からメカニズム解明の手掛かりを得るために、HTLV-1キャリア妊婦と非感染妊婦における妊娠および産褥期間中の経時的なリンパ球数、sIL2R値の推移について検討した。非感染妊婦ではCD4陽性CD25陽性T細胞数が妊娠期間中に増加し、産褥1ヶ月に減少傾向になるという結果を得た。HTLV-1キャリア妊婦では同様の結果は得られなかった。また、HTLV-1キャリア妊婦と非感染妊婦の妊娠週数毎の両群の比較では、妊娠12週でCD4陽性CD25陽性T細胞数およびsIL2R値のみ両群で統計学的に有意差を認めたが、その他の時期では統計学的な有意差は認めなかった。症例数が少なく、今後症例数を蓄積して検討すべき課題と考える。また、CD4陽性CD25陽性T細胞数とともにHTLV-1プロウイルス量の経時的推移について検討を加えた

い。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る。

研究4. 母乳以外の感染経路の存在の有無を明らかにする。

HTLV-1キャリア妊婦124例のうち、全ての臍帯血中にHTLV-1抗体を確認されたが、HTLV-1抗体とともにプロウイルスも検出されたものは6例(4.8%, 6/124例)のみであった。したがって、胎内感染の可能性が示唆された。

E. 結論

平成25年度本研究課題により得られた結論を以下に列記する。

- 1) 27年間で285,209例の妊婦をスクリーニングし、8,448例のHTLV-1キャリアが同定された。
- 2) 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。
- 3) 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、2011年は1.0%にまで低下していた。
- 4) 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1.46%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0.63%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。

5) 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。

6) 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。

7) 母乳以外の母子感染経路として胎内感染の存在が示唆された。

8) 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2.3-2.5の間に存在することが示唆された。

10) 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WB抗体検査に加えてPCR法の併用が有効な妊婦HTLV-1スクリーニングシステムと考えられた。

11) Western blot(WB)法と定量的PCR法によるHTLV-1感染の判定結果をみると、WB法で陰性例にはプロウイルスは認められず、陽性例には全てプロウイルスの存

在を確認し得た。一方、WB法で判定保留例には、プロウイルスが存在しないものから、WB法で陽性例と同等のウイルス量を認めるものまで様々であった。

WB法で判定保留例に定量的PCR法による精密検査を実施する有用性が示唆された。

12) 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 ($p < 0.001$)。また、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。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。

13) HTLV-1キャリア妊婦124例のうち6例の臍帯血液中にプロウイルスの存在を確認し、胎内感染の可能性が考えられた。また、臍帯血液中におけるHTLV-1プロウイルスの有無と妊婦のHTLV-1プロウイルス量との関連は認められなかった。これは、妊娠合併症などの妊娠背景が胎内感染に影響を及ぼしている可能性が考えられ、今後の調査が必要である。

以上、平成25年度の研究計画は全て完遂された(表9)。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 増崎英明：HTLV-1 母子感染 感染症症候群 別冊日本臨床 2013;25:708-711.
2. 増崎英明：HTLV-1 母子感染対策事業における保健師の役割 長崎県における取り組みを中心に 保健師ジャーナル 2013 ; 69 : 795-800.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 築山尚史、三浦清徳、増崎英明：長崎県において26年間継続したHTLV-1スクリーニング検査から得られた母子感染防止効果の検証とスクリーニングシステムの開発 九州連合産婦人科学会誌 2013; 64:66-69.
7. Ishihara K, Inokuchi N, Tsushima Y, Tsuruda K, Morinaga Y, Hasegawa H, Yanagihara K, Kamihira S. Relevance of molecular tests for HTLV-1 infection as confirmatory tests after the first sero-screening. *J*

Immunoassay Immunochem.
2014;35:74-82.

<新聞報道等>

1. 増崎英明、三浦清徳：「～長崎県の妊婦 HTLV-1 スクリーニング検査～25年間継続で母子感染予防と ATL 撲滅に有効」 Medical Tribune 2014年3月13日

2. 学会発表

<国際学会>

1. Naoki Fuchi, Kiyonori Miura, Takashi Tsukiyama, Daisuke Sasaki, Naoko Inokuchi, Katsunori Yanagihara, Shimeru Kamihira, Hiroyuki Moriuchi, Koichiro Yoshiura, Hideaki Masuzaki. Proviral loads of human T-cell leukemia virus type 1 in the peripheral blood samples from carrier pregnant women. 63th Annual meeting of American Society of Human Genetics. (Boston, USA, 2013, Oct 22-26)

<国内学会>

1. 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：妊婦 HTLV-1 スクリーニングシステムにおけるリアルタイム PCR 検査の有用性に関する検討 第65回日本産婦人科学会学術講演会(ロイトン札幌、札幌)2013.5.10-12

2. 築山尚史、三浦清徳、増崎英明：長崎県において 26 年間継続した HTLV-1 スクリーニング検査から得られた母子感染防止効果の検証とスクリーニングシステムの開発 第70回九州連合産科婦人科学会(熊本市国際交流会館・ホテル日航熊本, 熊本)2013.6.8-9
3. 三浦清徳、築山尚史、猪口直子、佐々木大介、上平 憲、柳原克紀、森内浩幸、吉浦孝一郎、増崎英明：HTLV-1 キャリア妊婦から出生した児における臍帯血中の HTLV-1 抗体価およびプロウイルス量に関する検討 第6回 HTLV-1 研究会・シンポジウム(東京大学医科学研究所講堂、東京)2013.8.23-25
4. 淵直樹、築山尚史、吉田敦、三浦清徳、増崎英明：妊娠と分娩後における HTLV-1 プロウイルス量の推移に関する検討第6回 HTLV-1 研究会・シンポジウム(東京大学医科学研究所講堂、東京)2013.8.23-25

H. 知的財産権の出願・登録状況

平成25年は無し