

母乳からのHTLV-1感染および 成人T細胞白血病(ATL)発症に関する追跡調査

第一薬科大学 生命薬学講座 免疫薬品学分野

教授 松原 大

(共同研究者)

第一薬科大学 分析化学研究室 教授 原口 浩一

京都大学医学部 環境衛生学教室 教授 小泉 昭夫

はじめに

成人T細胞白血病 (Adult T-cell leukemia; ATL) は、病因ウイルスである human T-cell leukemia virus type I (HTLV-1) の感染により引き起こされる CD4 陽性 T 細胞の悪性腫瘍である。レトロウイルスであることから、HTLV-1 のゲノム RNA が標的細胞内に取り込まれ、逆転写酵素により DNA をプロウイルスとして宿主ゲノム内に組み込まれる。

ATL の発病率は、0.2-0.3% であり、感染経路で問題となっているのが母乳を介した垂直感染 (母子感染) である。ATL は、赤道アフリカ、カリブ海諸国、コロンビア、ブラジル、南インド、パプア・ニューギニア、北東オーストラリア、南米アンデス高地の辺境地にすむ先住民族に保有され、日本国内においては、西日本特に九州で感染率が高いことが報告されている。

HTLV-1 感染は、輸血、性交のほかに、母乳による母子感染が問題となっており、垂直感染の原因が母乳中のリンパ球を介した感染と言われている。キャリア妊婦に対しては、感染防止策として、人工乳への切り替えが必要となってくる。全国的に妊婦に対する HTLV-1 検査が求められており、検査方法には、血液を用いた抗原検査法や抗体検査法が中心であるが、最近では自動核酸抽出機を用いた ATL プロウイルス DNA 検査についても検討されている。しかしながら、発展途上国においては、かならずしも採血による検査が十分なものでないことは容易に推察される。

一方の HTLV-2 は、白血病患者以外からも分離され、病気との関連性は明確でなく、中南米に HTLV-2 感染者が多いという報告はあるものの地域性も詳細に調べられているわけではない。われわれは、非侵襲的に採取することができ、直接的な感染源と考えられている母乳から HTLV-1 感染について凝集法を用いて測定することができることを初めて報告した⁽¹⁾。凝集法は、実験室内だけでなくフィールドワークなどでも比較的簡便に行うことができる方法である。

本方法を用いて、日本国内 11 カ所、266 サンプルと、中国、ベトナム、韓国 (ソウル、釜

山) 279サンプル、計545サンプルについてPA法による一時スクリーニングの後、western blotting法によるHTLVの確認を行ったところ、29サンプルが要検討となった。さらには、1サンプルにおいて、HTLV-2陽性と思われる興味深い結果が得られた⁽²⁾。

本研究では、国内5ヶ所24名に対するHTLV-1感染の有無に関する現地調査を行い、現場における状況を把握してより正確な情報を入手して母乳の結果と照合することを目的として調査した。その結果を報告するとともに、あらたな研究の進展が見られたので併せて報告する。

結 果

母乳578検体について、凝集反応を行った結果、粒子がボタン状に集まり、外周縁が均等でなめらかな円形を示すもの(－)は549例であった。粒子が小さなリングを形成し、外周縁が均等でなめらかなもの、判定保留(±; 11例)、粒子リングが明らかに大きく、その外周縁が不均等で荒く、周辺に凝集のみられるもの(+; 8例)、凝集が均一に起こり、凝集粒子が底全体に膜状に広がっているもの(++; 10例)、29サンプル(5.3%)が確認試験対象であった。29例の母乳の地域は、日本国内では沖縄7例、長崎3例、宝塚3例、仙台3例、北海道8例であり、その他の地域は、すべて陰性であった。一方中国で2例、ベトナムで1例、韓国で2例を認めた。海外では、5例(1.8%)が確認対象であった。

InnogeneticsTM社製Inno-liaTMHTLV I/II Scoreを用いて母乳中HTLV-1もしくはHTLV-2抗体の有無を測定した。apply量を10倍に変更することにより測定した。その結果、次頁表のように、6検体で要検討となった。

WBで要検討となった中国の1例において、HTLV-2を疑うバンドを認めた。そこでさらに、Sp-ELISA法によりHTLVについて検討した結果、1例において、gp46に反応する母乳が検出された。このことから、この検体は、HTLV-2陽性であることが確認できた。

国内の疑わしい24検体について、出産時の記録などからHTLV-1感染に関する情報を入手するべく追跡調査を行った。

母乳採取を担当した共同研究者である京都大学、小泉教授⁽³⁾に連絡し、国内の該当する5つの病院もしくは産婦人科を照会した。その結果、沖縄7例、宝塚3例及び北海道8例の担当病院は、すでに閉院もしくは、担当者が不在ということが判明し、追跡が困難であることが判明した。北海道8例は、HTLV-1キャリアが多いという報告がある日高郡静内地区内の病院であったので、詳細な検討ができなかったことは残念なことである。

長崎3例を担当した病院、仙台3例を担当した病院については、担当者が健在であり、直接訪問することとした。主旨と目的を説明し、分析の精度と発症の有無、母乳提供者の出産時のHTLV-1検査についての照会を行った。その結果、長崎3名のうち、2例は陰性、1例が陽性であることが判明した。仙台的3例はすべて陰性であった。長崎の陽性の方については、他県に転居してその後の動向は不明であるとの情報を得た。

Table Screening assay for antibodies to HTLV-1 in breast milk samples using PA and WB

No	Prefecture/City	Sampling year/month	Age	PA	WB
1	Beijing	2008 Sep	27	±	—
2	Beijing	2009 Feb	26	±	±
3	Hanoi	2008 Sep	19	±	±
4	Seoul	2010 Jan	31	+	+
5	Seoul	2010 Feb	31	±	—
1	Okinawa	2005 May	31	±	—
2	Okinawa	2005 Nov	35	+	—
3	Okinawa	2005 Nov	29	±	—
4	Okinawa	2005 Dec	29	++	—
5	Okinawa	—	—	++	ND
6	Okinawa	—	—	++	ND
7	Okinawa	—	—	+	ND
8	Nagasaki	2010 Jun	28	±	—
9	Nagasaki	2010 Aug	23	±	—
10	Nagasaki	2010 Aug	29	+	—
11	Takarazuka	2008 Aug	28	±	—
12	Takarazuka	2008 Aug	32	+	—
13	Takarazuka	2009 Dec	29	±	—
14	Sendai	2009 Jun	33	++	—
15	Sendai	2009 May	30	+	+
16	Sendai	2009 May	31	+	±
17	Hokkaido	2005 Mar	31	++	—
18	Hokkaido	2005 Apr	29	±	—
19	Hokkaido	2005 May	33	++	—
20	Hokkaido	2005 May	28	++	—
21	Hokkaido	2005 Jul	33	++	—
22	Hokkaido	2005 Jul	40	++	—
23	Hokkaido	2005 Nov	30	+	±
24	Hokkaido	2005 Oct	35	++	—

本研究の調査を行う中で、1病院担当者より、血液から母乳へのプロウイルスの浸潤に関する研究を行うことの賛同を得た。母乳からの感染原因を検討するために、キャリアである妊婦から採血と母乳採取を同時に行い、両者を分析することにより因果関係を検討するものである。この研究により、母乳と血液の関連性がより正確に把握できるものと期待され、現在詳細な分析及び解析中である。

考 察

成人T細胞白血病 (Adult T-cell Leukemia) の原因ウイルスであるHTLV-1 (Human T-cell Leukemia virus type I) は、1979年にヒトレトロウイルスとして最初に発見さ

れた。HTLV-1は、細胞内に取り込まれた後、ウイルスRNAが逆転写酵素によりDNAにコピーされ細胞のDNAに組み込まれる。近年、この対象細胞がCD4⁺T細胞であること、CD8⁺T細胞が重要なウイルスのリザーバーであることなどが報告されている。抗HTLV-1抗体陽性者はHTLV-1を保有しており、サンプル中のHTLV-1を検査することにより、HTLV-1に感染しているかどうかを判定することができる。PA法は、抗HTLV-1抗体を検出するばかりでなく、ATLやHTLV-1関連脊髄症 (HAM) に対してもスクリーニングできることが示されている。本来は、血清を想定したものであり、母乳を対象に検査に採用したのは、我々が初めてである⁽¹⁾。

本法は、凍結乾燥品で用時調製であること、検体を希釈、マイクロプレートによる目視で判断できることから、一次スクリーニングとしては簡便で、フィールドでの使用が有用であるといえる。陽性もしくは判定保留のサンプルに対して精査することで、その利用価値がある。

sp-ELISA法は、特異タンパク質のアミノ酸配列を考慮したsequential peptidesを合成したものを抗原としたELISA法であり、今回は、p19 gag protein 100 to 130, gp46 protein 175 to 199, and gp46 288 to 317を用いた。この配列は、HTLV-2に特異的なアミノ酸配列であり、western blottingよりもさらに高感度に測定可能である⁽⁴⁾。

HTLV-2は、白血病患者以外からも分離され、病気との関連性は明確でない。また、中南米やスウェーデン、スペイン、ブラジルなどで観察されており、そのルーツとしては、アメリカのフロリダ半島、メキシコのユカタン半島、パナマなどの先住民族と考えられている。今回、中国でHTLV-2陽性者が確認されたことは大変貴重である。

日本、アメリカ、フランス、オランダなどでは、献血の際にいろいろな感染症に対するチェックがなされているが、中国などでは、献血における十分なチェックがなされていないのが現状であり、韓国においては数年前にチェック体制が確立された状況である。

HTLV感染状況についての疫学調査の報告が少ないことから、HTLV-1、HTLV-2の潜在的キャリアが存在する可能性は十分あると推察される。

献血時におけるチェックをはじめ、地道なスクリーニングなどを通して、感染状況を把握するとともに、感染拡大を予防することも重要な課題である。

要 約

成人T細胞白血病 (Adult T-cell leukemia ; ATL) は、病因ウイルスであるhuman T-cell leukemia virus type I (HTLV-1) の感染により引き起こされるCD4⁺T細胞の悪性腫瘍である。本研究は、非侵襲的に採取することができ、直接的な感染源と考えられている母乳を用いて、国内および東南アジアの一部地域のHTLV-1感染の分布をPA法およびWestern Blotting法を用いて検討し、陽性と思われる被験者のその後の動向を追跡調査することを目的とした。

【方法】京都大学ヒト生体試料バンクに保管されている2004年から2010年にかけて採取された母乳578検体（国内13地区299サンプル、国外4地区279サンプル（北京；91、ハノイ；88、ソウル；50、釜山；50））を用時解凍し、試験に供した。PA法およびWB法は、既報に準じた。またWB法において陽性となったサンプルについては、sp-ELISAを行った。要検討（±）以上の判定を呈した国内の検体提供者について、分析の精度と発症の有無などについて追跡調査を行った。

【結果】PA法により、海外5例、国内24例に 要検討以上の反応性が認められた。WB-1法により、陽性（+）が1例、要検討（±）が5例認められた。WB-2法により、要検討（±）が6例認められた。また、1例においてWB-1法及びsp-ELISA法により、HTLV-2陽性と判断される結果が得られた。追跡調査対象24事例中、1例については受診時の血液検査から陽性キャリアと確定診断されたことが判明した。

【考察】母乳からのHTLV-1感染検出について検討したところ、PA法およびWB法により特異抗体の検出が可能であった。国内においては、西日本地域での感染率が高いとの報告があるが、今回の検討ではキャリアの地域偏在は観察されなかった。また、中国、韓国、ベトナムにおいてもHTLV-1キャリアの存在が示唆された。また、HTLV-2感染疑い例も検出された。母乳のみの検査であったが、追跡調査の結果、母乳からのキャリアの同定を行うことができその有用性が示唆された。今後、母乳と血液の関連性を詳細に検討することで、精度をあげた調査研究が可能になるものと期待する。

文 献

1. Matsubara F., Haraguchi K., Harada K. and Koizumi A. Screening for antibodies to Human T-cell Leukemia Virus type -1 in Japanese breast milk. *Biol. Pharm. Bull.*, 35 (5) 773-776 (2012)
2. Matsubara F., Sagara Y., Haraguchi K., Harada K. and Koizumi A., Detection of Antibodies to Human T-Cell Leukemia Virus Types 1 and 2 in Breast Milk from East Asian Women, *Biol. Pharm. Bull.*, 37 (2) 311-314 (2014)
3. Koizumi A., Harada K., Inoue K., Hitomi T., Yang H-R., Moon C-S., Wang, P., Hung N., Watanabe T., Shimbo S., Ikeda M. Past, present, and future of environmental specimen banks. *Environ. Health Prev. Med.*, 14, 307-318 (2009) .
4. Washitani Y, Kuroda N, Shiraki H, Itoyama Y, Sato H, Ohshima K, Kiyokawa H, Maeda Y. Linear antigenic regions of the structural proteins of human T-cell lymphotropic virus type I as detected by enzyme-linked immunosorbent assays using synthetic peptides antigens. *J. Clin. Microbiol.*, 30, 287-290 (1992) .