

診療 (依頼稿)

HTLV-I (human T-lymphotropic virus type-I) の 母児感染について

長崎大学医学部小児科教室

教授 辻 芳 郎

吉 国 裕 文 土 居 浩

長崎大学医学部産婦人科教室

教授 山 辺 徹

助教授 石 丸 忠 之

長崎大学医学部細菌学教室

教授 宮 本 勉

助教授 日 野 茂 男

杉 山 秀 徳

Mother-to-child Transmission of Human T-lymphotropic Virus Type-I

Yoshiro TSUJI, Hirofumi YOSHIKUNI and Hiroshi DOI

Department of Padiatrics, Nagasaki University School of Medicine, Nagasaki

Tohru YAMABE and Tadayuki ISHIMARU

Department of Obstetrics and Gynecology, Nagasaki University School of Medicine, Nagasaki

Tsutomu MIYAMOTO, Shigeo HINO and Hidenori SUGIYAMA

Department of Bacteriology, Nagasaki University School of Medicine, Nagasaki

Key words: Adult T-cell leukemia・Human T-lymphotropic virus type-I・Mother-to-child transmission・Milk-borne infection

はじめに

成人 T 細胞白血病・リンパ腫 (adult T-cell leukemia/lymphoma: ATLL) の原因ウイルスは HTLV-I (human T-lymphotropic virus type-I) と呼ばれている。ATLL は、ヒトにおいてウイルスと腫瘍との因果関係が最初に判明した疾患でいくつかの特徴がみられている。即ち①小児期の発症はみられず、主として40歳以上の成人に発症する。② HTLV-I 抗体を持つキャリアより発症する。③患者やキャリアに地域集中性がみられ、九州・沖縄に多い⁷⁾。④ ATLL は男女比1.0~1.5である⁹⁾。⑤発症すると予後が極めて悪く、ほとんどは2年以内に死亡する、などである。

HTLV-I に感染すると、ほとんどはキャリア化し、無症状で HTLV-I 抗体を保持し続ける。年間1,000人のキャリアから1人の割合で発症するといわれている。長崎県では40歳以上の成人の約10%がキャリアであり、年間約60人の患者が発生している。

ヒトにおける感染経路として①輸血⁴⁾¹³⁾、②夫婦間(夫→妻)¹⁵⁾、③母児感染⁵⁾¹¹⁾¹⁵⁾¹⁷⁾、が考えられているが、現在のところ①②による感染者からの発症の報告はみられていない。小児期における ATLL 発症は報告されていないが、将来の発症に関係する感染経路は、主として母児感染であるとの結論にいたつた長崎大学グループのこれまでの

研究成績を中心にして、現在行なっている母児感染予防対策について述べる。

1. キャリアの診断 (抗体・抗原の測定)

直接ウイルス遺伝子や構成蛋白を血液中より検出することは非常に困難である。しかしほとんどのキャリアは HTLV-I に対する抗体を持っているので、この抗体を測定することで代用できる。抗体の検出法には、間接蛍光抗体法 (IF 法)、ゼラチン凝集法 (PA 法)、酵素抗体法 (ELISA 法)、免疫ブロット法 (Western blotting 法) などがある。IF 法、PA 法、ELISA 法は比較的簡単に利用できるが、いずれも非特異的の反応がみられるため、我々は IF 法と PA 法を併用し、両方法で陽性者をキャリアとして告知している。

IF 法⁵⁾⁶⁾では MT₂細胞と非感染 CEM 細胞を混合したものを標的細胞とし、一次抗体として被験者血清を、二次抗体として IgG 抗体に対しては FITC 標識抗ヒト IgG ウサギ IgG を、IgM 抗体に対しては FITC 標識ヒト μ 鎖ウサギ IgG を用い

た (表 1)。

PA 法⁸⁾は、FUJIREBIO 社 Serodia ATLA キットを用いた。

HTLV-I 感染リンパ球の検出には、被験者末梢血より T 細胞を分離し、IL-2 存在下に培養し、抗原陽性の判定には間接蛍光抗体法にて観察し、F10 モノクローナル抗体、標準抗体陽性血清、標準抗体陰性血清を用い、それぞれの結果が一致したものを抗原陽性としている⁹⁾ (表 2)。

2. キャリアの疫学

長崎県における小児期のキャリア率を調べた。長崎大学小児科入院患児は 2.6% で頻回輸血を受けた陽性児を除くと 1.4% であった。看護学生 0.5%、供血者 1.6% であった。長崎県の中でも 30% と高い成人のキャリア率を示す上五島では生徒のキャリア率は 4.6% と高率であるが、県下を平均するとキャリア率は 1% をこえる程度と考えられる⁵⁾ (表 3)。

長崎市及び周辺の妊婦 5,015 人の血液を調べたところ、3.7% がキャリアであった。キャリアの母より生まれた 1 歳以上の児 78 人中 17 人が陽性でキャリア率 22% と有意に高く、母から児への感染を強く疑わせる結果を得た⁵⁾ (表 4)。五島富江町の学童のスクリーニングで得られたキャリア 13 人の母親を調べたところ 12 人がキャリアであった。キャリア妊婦の母親 10 人中 8 人がキャリアであつ

表 1 間接蛍光抗体法による HTLV-I 抗体測定法

1. 標的細胞, MT₁もしくは MT₂細胞, 10⁴cells/well とし乾燥, アセトン固定(10well スライドグラス使用)
2. 一次抗体, 被験者10倍希釈血清10 μ l/well 37 $^{\circ}$ C, 30分反応
3. PBS にて10分間, 2回洗浄
4. 二次抗体, FITC 標識抗ヒト IgG ウサギ IgG, 100 μ /スライドグラス37 $^{\circ}$ C, 30分反応
5. PBS にて10分間, 3回洗浄
6. 50%グリセロール PBS にてマウント後, 蛍光顕微鏡で観察, 特異蛍光を示すものを陽性とする。

表 2 HTLV-I 抗原測定法

1. 末梢血へパリン採血(室温, 24hr 以内)
2. 1,500rpm 15分遠心(室温), 血漿 \rightarrow 抗体測定
3. Ficoll-Conray 1,500rpm 30分 \rightarrow 3回洗浄
4. RPMI 1640 medium に羊赤血球と rosette 形成 4 $^{\circ}$ C overnight
5. Ficoll-Conray, T細胞B細胞分離 NH₄Cl にて赤血球溶解 \rightarrow 3回洗浄
6. 10⁵ cells/well とし culture 1,2,3,4w medium (10% FBS, RPMI 1640, 2U/ml IL-2)
7. 判定(蛍光抗体法)
 - ① negative control
 - ② positive control
 - ③ F10 monoclonal 抗体

表 3 小児, 若年成人の HTLV-I 抗体保有率

	陽性/検体	%	χ^2
キャリア母の児 コントロール (1~13歳)	17/ 78	22	
入院患者 (0~19歳)	14/ 533	2.6	53
看護学生 (18~19歳)	1/ 192	0.5	40
供血者 (16~19歳)	21/1,274	1.6	109
生徒(上五島) (9~12歳)	12/ 263	4.6	23
妊婦	187/5,015	3.7	65

表 4 キャリアの母親の HTLV-I 抗体

	HTLV-I 抗体陽性/検体	%
キャリア児の母*	12/13	92%
キャリア妊婦の母	8/10	80%

* 五島富江地区

た。母親が陰性であつた2人のキャリア妊婦は2人とも大量輸血を受けた既往があり、輸血による感染と考えられる。以上の如くキャリア母より出生した児のキャリア率が高く、逆にキャリア児の母親も同様に高率にキャリアであることから、何らかの形で母から児への感染が存在することが強く推測される。

3. 感染経路

母から児への感染経路としては①遺伝子感染、②子宮内感染、③産道感染、④出生後感染が考えられる。⑤幼児期以後の感染についても検討する必要がある。

1) 遺伝子感染

HTLV-Iがヒトの全ての体細胞にウイルス遺伝子として存在する内在性ウイルスではないことから否定される。

2) 子宮内感染

麻疹ウイルス、サイトメガロウイルス、ヘルペスウイルスなど子宮内感染をおこすウイルスは数多く知られている。一般的に子宮内感染をおこした場合、臍帯血中にそのウイルスに対するIgM抗体が出現するか、疾患によつては臍帯血中にウイ

ルス感染細胞が証明される。HTLV-Iは感染リンパ球中にプロウイルスとして存在するため、リンパ球の培養によりウイルス抗原が検出されてもよいと考えられる。

キャリア妊婦より出生した115人の児の臍帯血中のIgM抗体、IgG抗体及びHTLV-I抗原を検索したところ、115人の検体中IgM抗体と検出できた児は1人もなく、抗原が発現したものもいなかった。IgG抗体は115人中113人に検出された(表5)。臍帯血中のIgG抗体価と母体血中の抗体価との相関をみると、相関係数0.85とよく相関していた。また児の追跡調査で抗体価は急速に減衰したので移行抗体と考えられる⁵⁾(図1)。

子宮内で母親の血液が胎盤を通過し胎児に移行することはすでに知られており、臍帯血よりHTLV-I抗原を検出したとの報告もあるが、子宮内での感染経路の頻度は非常に少ないと考えられる。

3) 産道感染

キャリア妊婦より出生した児及び同胞の初回採血時の抗体保有状況を蛍光抗体法で検査したところ、生後5カ月までの児には母からの移行抗体と思われるIgG抗体保有児が認められるが、生後6~11カ月の児には抗体保有児はいなかつた。生後1歳以後で抗体保有児すなわちキャリア児が存在していた(図2)。追跡調査を行なつた22人についてみても抗体陽性者は多くは1~3歳に出現して

表5 キャリア妊婦より出生した児の臍帯血のHTLV-I抗体及び抗原

	HTLV-I 抗体陽性/検体	%	HTLV-I 抗原陽性/検体	%
血清 IgG	113/115	98		
IgM	0/115	0		
リンパ球抗原			0/115	0

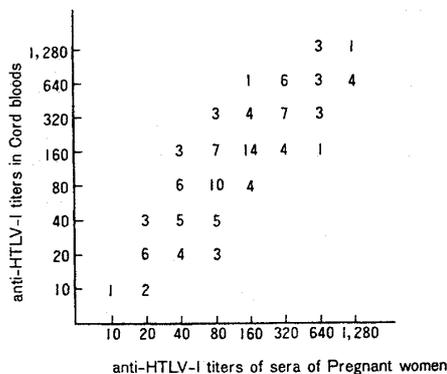


図1 縦軸 児の臍帯血中のHTLV-I抗体価、横軸 対応する母体血中のHTLV-I抗体価、数字は例数を示す。

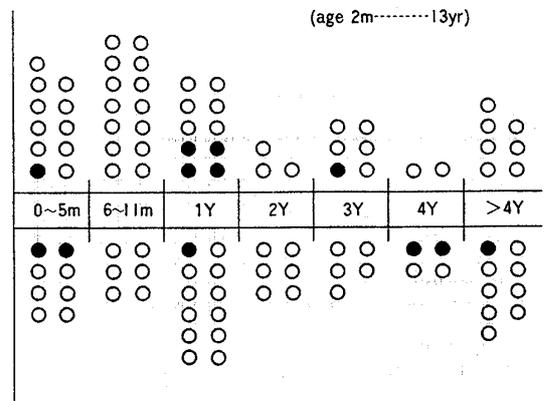


図2 HTLV-Iキャリア母より出生した児の初回採血時の保有状況。●: HTLV-I抗体陽性者(蛍光抗体法)、○: HTLV-I抗体陰性者、上段 男児、下段 女児

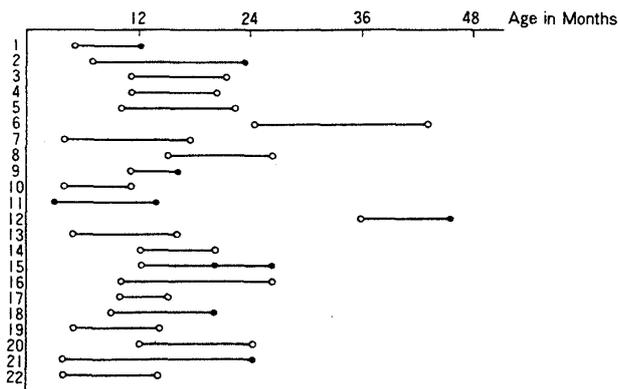


図3 キャリア母より出生した児の追跡調査。●：HTLV-I抗体陽性(蛍光抗体法)，○：HTLV-I抗体陰性，経過中抗体陽転した者7例

おり，キャリア妊婦より出生した児へのHTLV-I感染の証拠となる抗体は生後1～3歳頃に出現すると推定される(図3)。

B型肝炎ウイルスの母児感染においては，産道での垂直感染が主と考えられており，その潜伏期間は2～3カ月で，水平感染によるものと大差はない。HTLV-Iの輸血や動物実験での潜伏期間は約2～3カ月といわれており，我々が調査した結果と大きな差があつた。感染細胞の投与量や乳児期の免疫学的特性は考慮されるべきであるが，後述する栄養法のちがいによるキャリア率の有意の差は感染経路が産道感染によるものであれば説明がつかない。産道感染を全く否定はできないが主たる感染経路とは考えがたい。

4) 出生後感染

1)，2)，3)の感染経路が考えにくいとすれば，出生後の感染が最も疑わしい。感染の証明となる抗体は生後1～3歳に出現しており，感染は乳児期に成立していると推定される。HTLV-Iの感染は細胞から細胞への感染¹²⁾¹⁶⁾が特徴的であることから，可能性として母乳中の感染細胞による母児感染経路が最も疑わしいとして研究が進められた。

ATLL患者より得られたHTLV-I陽性細胞をコモンマーモセットに経口的に与えることによつて感染が成立することが確かめられた¹⁷⁾。ヒトでキャリアの母より得られた母乳中にHTLV-I感染細胞が存在することが証明された¹⁰⁾¹⁷⁾。次にヒ

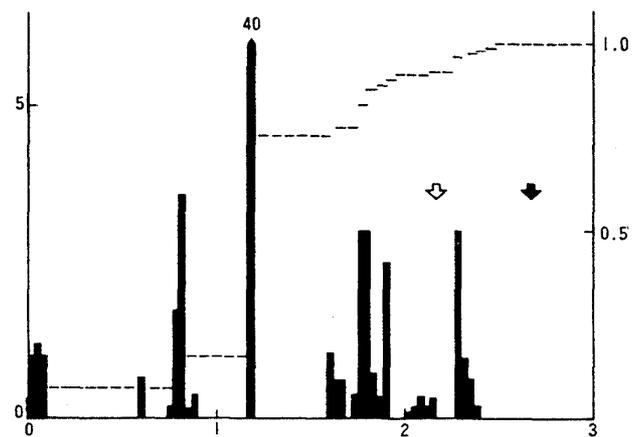


図4 ヒト母乳によるマーモセットへの経口感染実験，左縦軸：投与細胞数($\times 10^7$)右縦軸：総投与細胞数に対する投与細胞数の累積率，横軸：投与開始後の時間(カ月)，◊：HTLV-I抗体弱陽性，↓：HTLV-I陽性

表6 1歳以上の児の栄養方法とHTLV-I抗体保有率

栄養方法	HTLV-I抗体(+)	HTLV-I抗体(-)	計
母乳	14(38%)	23	37
混合	3(10%)	28	31
人工	0(0%)	10	10
計	17(22%)	61	78

χ^2 ① 母乳-混合 7.1 $p < 0.01$

② 母乳-人工 5.4 $p < 0.05$

ト母乳中の感染細胞をコモンマーモセットに経口投与し感染が成立することが確認された¹⁰⁾¹¹⁾¹⁷⁾。図4は縦軸に投与した母乳中の総細胞数を示し，破線でその累積率を示した。実験期間中の全投与細胞数は 6.8×10^8 個で，感染細胞はその約1,000分の1の 7×10^5 と推定された。使用した母乳は児出生後4～7日目のもので総計200mlを使用した。投与開始後約2カ月にコモンマーモセットのHTLV-I抗体は弱陽性となり，3カ月に蛍光抗体法で80倍まで上昇していた。その後リンパ球培養にて抗原も発現した。追跡検査で感染が持続していることも確認された。ヒト母乳中の総細胞数は初乳と成熟乳，また個体間で大きな差があるが，HTLV-I類縁のウシ白血病ウイルスにおいては，経口感染に必要な細胞は約2,000個といわれており，1回の授乳でも感染の危険性があると思われる。

コモンマーマセツトにおける経口感染の成立が確認されたが、ヒトにおいてはどうか。キャリア妊婦より出生した児及び同胞について栄養法別に検討した。HTLV-I抗体は1歳以後に出現しているので1歳以上の児78人を対象とした。抗体は母乳栄養児では37人中14人(38%)、混合栄養児では31人中3人(10%)に認められたが、人工栄養児では10人中1人も認められなかった(表6)。母乳栄養児の抗体保有率は有意に高く、母乳による感染がヒトにおいても成立していると考えられる成績であった。

5) 幼児期以後の感染

長崎市及びその周辺の妊娠のスクリーニングにおけるキャリア率は約4%であるのに対し、小児のキャリア率は約1%と大きな差がある。その説明として①乳児期に感染が成立していても抗体発現が直ぐにはおこらず加齢とともに抗体が出現してくる。②幼児期以後に水平感染が頻回におこる。③生活習慣などの変化に伴い小児への感染率が低下している。④結婚などにより妊婦キャリア率が成人になつて増加しているなどが考えられる。そこで幼児期以後青年期までにキャリア率の増加が

表7 キャリア母より出生した児の年齢別の抗体保有率の累積分布

年齢(歳)	抗体陽性/検体	%
1	11/34	32
1~2	12/44	27
1~3	14/56	25
1~4	16/64	25
1~13	17/78	22

表8 出生年代別 HTLV-I 抗体保有率とその推移 (五島富江町)

年齢 出生年代	6~8	9~11	12~14	15~17
1956~1958			20/512(3.9)	23/264(8.7)
59~61				
62~64				
65~67		6/370(1.6)		5/243(2.1)
68~70	5/290(1.7)		4/298(1.3)	
70~73		0/298 (0)		
74~76	1/273(0.4)			

抗体陽性/検体 (%)

あるかどうかを調査した。1集団について経時的に採血してキャリア率を比較する方法が最良であるが、そのような集団が得られなかったので1歳から13歳までを累積してキャリア率を比較した。1歳32%、1~2歳27%、1~3歳25%、1~4歳25%、1~13歳22%とキャリア率の有意な増加はなく¹⁴⁾(表7)、母児感染により1~3歳までにキャリアが出現した後は少なくとも13歳頃までは水平感染や抗体発現遅延によるキャリア出現はほとんどないと考えられる。同様に五島富江地区における小児のキャリア率は、1965~1967年に出生した小児、1968~1970年に出生した小児ともに6年後のキャリア率は高くなつていない¹⁴⁾(表8)。従つてHTLV-I母児感染の予防効果を判定するには、出生後約3年の経過観察で充分と考えられる。

4. 母児感染予防と問題点

非流行地域におけるATLL発症例は九州出身者に多く、高齢者では女性のキャリアが多いのにATLL発症はむしろ男性に多いこと、輸血による感染者からの発症の報告がないことなどから成人になつてからの感染はATLL発症につながることは少ないと考えられている。現在年間キャリア1,000人に1人といわれる発症率には成人になつてからの夫婦間感染や輸血によるキャリアも含まれている。母児感染が大多数をしめる幼児期の感染のみが発症につながるとすれば、母乳感染によるキャリアが生涯の中でATLLを発症する率は100人に1人かそれより高くなると考えられる。ATLLは一旦発症すれば2年以内にほとんどの人が死亡するため母児感染を予防することが将来のATLL発症をも予防することにつながり、その意義は大きい。

現在B型肝炎においてはHBe抗原陽性の母親より出生した児に対して、HBIGによる受動免疫とHBワクチンによる能動免疫の組合わせた方法で母児感染予防に成功している。HTLV-Iに対してはHBIGの様な有効な製剤は発見されていない。遺伝子内に組込まれたプロウイルスDNAに直接作用する薬剤を作ることは現在までのところ成功していない。またワクチンが作られたにし

てもその効果判定には長年月かかり実用化は遠い先と思われる。

長崎県では年間約20,000人の出生があり、濃厚汚染地区を含めると約1,000人のキャリア妊婦が出産する。その20~30%即ち約300人の小児が毎年キャリア化していることになり何らかの方法で母児感染を予防することが急務となつている。我々は今まで述べた如く経母乳感染が主たる感染経路と考えており、産婦人科、小児科、細菌学教室の三科で度重なる検討を行ない、結局出生後直ぐに薬剤にて母乳分泌を抑制し人工栄養に切換える方法を volunteer study として採用し、昭和60年8月より開始し進行中である²⁾。可能な限り母乳栄養にしたいと思い、搾乳した母乳を冷凍、加熱、超音波などで処理して与える方法を考えたが、直接授乳による母児間相互作用促進には役立たないこと、種々の処理によつて100%HTLV-Iを不活化できるか疑問が残ること、できるとして家庭内で頻回の授乳のたびに確実に処理が可能であるかどうかなどを検討し、母乳を与えなければ児はキャリアにならないことを証明するために人工栄養で保育してもらおうようお願いすることとした。

我々は人工栄養導入による母児感染予防が最善のものとは考えていない。人工栄養が児に与える肉体的影響、授乳をしないことによる母児間の相互関係に対する心理的な影響、母親が母乳を与えられないことによる肉体的精神的社会的影響などは決して小さなものではない。そのことによる不利益が、将来の ATLL 発症の不利益より大きくなる様であれば当然人工栄養導入は受け入れられないものとなる。この様な問題については今後さらに検討を重ねると同時に母乳栄養を可能な限り残せる方法も検討する必要がある。

長崎県では ATL ウイルス母子感染防止研究協力事業連絡協議会が作られ、医師会と研究機関とが一体となつて昭和62年8月から全県下の妊婦の HTLV-I 抗体検査と陽性者に対する児のキャリア化防止対策を実施している¹⁾。

おわりに

最近 HTLV-I が関与する ミエロパチーの存在が明らかになり HAM (HTLV-I associated

myelopathy) として報告され HTLV-I 感染予防は益々注目されてきている。

文 献

1. 長崎県 ATL ウイルス母子感染防止研究協力事業連絡協議会：成人 T 細胞白血病・リンパ腫ウイルス母子感染の予防・指導者用テキスト。昭和62年5月。
2. 辻 芳郎, 吉国裕文, 土居 浩, 山辺 徹, 石丸忠之, 宮本 勉, 日野茂男, 杉山秀徳：HTLV-I の母児間感染予防。臨床とウイルス, 15: 191, 1987。
3. Fujii, M., Sugamura, K. and Hinuma, Y.: A monoclonal antibody that defines p24, a core protein of adult T-cell leukemia virus, and its precursor. Gann., 75: 595, 1984。
4. Hino, S., Kawamichi, T., Funakoshi, M., Kanamura, M., Kitamura, T. and Miyamoto, T.: Transfusion mediated spread of the human T-cell leukemia virus in chronic hemodialysis patients in a heavily endemic area, Nagasaki. Gann, 76: 1075, 1984。
5. Hino, S., Yamaguchi, K., Katamine, S., Sugiyama, H., Amagasaki, T., Kinoshita, K., Yoshida, Y., Doi, H., Tsuji, Y. and Miyamoto, T.: Mother-to-child transmission of human T-cell leukemia virus type-I. Gann, 76: 474, 1985。
6. Hinuma, Y., Nagata, K., Hanaoka, M., Nakai, M., Matsumoto, T., Kinoshita, K., Shirakawa, S. and Miyoshi, I.: Adult T cell leukemia: Antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 78: 6476, 1981。
7. Hinuma, Y., Komoda, H., Chosa, T., Kondo, T., Kohakura, M., Takenaka, T., Kikuchi, M., Ichimaru, M., Yunoki, K., Sato, M., Matsuo, R., Takeuchi, Y., Uchino, H. and Hanaoka, M.: Antibodies to adult T cell leukemia virus associated antigen (ATLA) in sera from patients with ATL and controls in Japan: A nationwide serioepidemiologic study. International Journal Cancer, 29: 631, 1982。
8. Ikeda, M., Fujino, R., Matsui, T., Yoshida, T., Komoda, H. and Imai, J.: A new agglutination test for serum antibodies to adult T-cell leukemia virus. Gann, 75: 845, 1984。
9. Kinoshita, K., Kamihira, S., Yamada, Y., Amagasaki, T., Ikeda, S., Momita, S. and Ichimaru, M.: Adult T cell leukemia-lymphoma in the Nagasaki district. Gann Monograph, 28: 167, 1982。
10. Kinoshita, K., Hino, S., Amagasaki, T., Ikeda,

- S., Yamada, Y., Suzuyama, J., Momita, S., Toriya, K., Kamihira, S. and Ichimaru, M.: Demonstration of adult T-cell leukemia virus antigen in milk from three seropositive mothers. *Gann*, 75: 103, 1984.
11. Kinoshita, K., Yamanouchi, K., Ikeda, S., Momita, S., Amagasaki, T., Soda, H., Ichimaru, M., Moriuchi, R., Katamine, S., Miyamoto, T. and Hino, S.: Oral infection of a common marmoset with human T-cell leukemia virus type-I (HTLV-I) by inoculating fresh human milk of HTLV-I carrier mothers. *Gann*, 76: 1143, 1985.
 12. Miyoshi, I., Kubonishi, I., Yoshimoto, S., Akagi, T., Ohtsuki, Y., Shiraishi, Y., Nagata, K. and Hinuma, Y.: Type C particles in a cord T cell derived by cocultivating normal human cord leukocytes and human leukemic T cells. *Nature*, 294: 770, 1981.
 13. Okochi, K., Sato, H. and Hinuma, Y.: A retrospective study on transmission of adult T cell leukemia virus by blood transfusion; seroconversion in recipients. *Vox Sanguinis*, 46: 245, 1984.
 14. Sugiyama, H., Doi, H., Yamaguchi, K., Tsuji, Y., Miyamoto, T. and Hino, S.: Significance of postnatal mother-to-child transmission of human T-lymphotropic virus type-I on the development of adult T-cell leukemia/lymphoma. *J. Med. Virology*, 20: 253, 1986.
 15. Tajima, K., Tominaga, S. and Suchi, T.: Clinico-epidemiological analysis of adult T cell leukemia. *Gann Monograph*, 28: 197, 1982.
 16. Yamamoto, N., Okada, M., Koyanagi, Y., Kanagaki, M. and Hinuma, Y.: Transformation of leukocytes by cocultivation with an adult T-cell leukemia virus producer cell line. *Science*, 217: 737, 1982.
 17. Yamanouchi, K., Kinoshita, K., Moriuchi, R., Katamine, S., Amagasaki, T., Ikeda, S., Ichimaru, M., Miyamoto, T. and Hino, S.: Oral transmission of human T-cell leukemia virus type-I into a common marmoset (*Callithrix jacchus*) as an experimental model for milk-borne transmission. *Gann*, 76: 481, 1985.
-