

# 琉球大学学術リポジトリ

[原著] 沖縄におけるHTLV-Iキャリア妊婦の実態とWestern blot法によるIgM抗体の解析および児のキャリア化について

メタデータ	言語: 出版者: 琉球医学会 公開日: 2010-07-02 キーワード (Ja): キーワード (En): HTLV-I, antibody of IgM class, mother-to-child transmission 作成者: 前濱, 俊之, 中山, 道男, 長嶺, 勝, 中嶋, 安嗣, 武居, 洋, Maehama, Toshiyuki, Nakayama, Michio, Nagamine, Masaru, Nakashima, Yasutsugu, Takei, Hiroshi メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002015886">http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002015886</a>

## 沖縄におけるHTLV-Iキャリア妊婦の実態とWestern blot法によるIgM抗体の解析および児のキャリア化について

前濱 俊之\* 中山 道男\* 長嶺 勝\*\* 中嶋 安嗣\*\*  
武居 洋\*\*

\* 琉球大学産婦人科

\*\* 同第2生化学

(1991年8月23日 受付、1991年10月18日 受理)

### 緒 言

### 対象および方法

Human T cell leukemia virus Type I (HTLV-I)は成人T細胞白血病 (adult T cell leukemia: ATL)の病因ウイルスとして発見されたが、その後の研究にて変性性神経疾患であるHTLV-I associated myelopathy (HAM)の病因にも関与していることが明らかとなっている。本症の特徴は患者の発生地域が九州南西部に集中して多いこと、感染経路に関して母児感染が注目されていることで、われわれ産科医にとっては見過ごすことのできない問題を抱えている。このHTLV-Iの母児感染は母乳を介した経路が最も重要とされているが、母乳哺育児のキャリア率は諸家の報告により15~20%であり<sup>1)</sup>、経母乳感染の成立要因については、まだ十分解明されていない。またHTLV-Iキャリアにおいては、長期の持続ウイルス感染にもかかわらず、IgM抗体が存在する事実が報告され、ウイルスと宿主の特異的な免疫学的相互関係が注目されている<sup>2)</sup>。

沖縄県はこれまでの調査でendemic areaとして注目されており、それだけに地域医療面での対応が急務である。今回われわれは、当科および3つの関連病院にて妊婦の抗HTLV-I抗体の検査を行い、地域分布の特殊性と、キャリア母におけるIgM抗体の意義について、western blot法にて検討した。

### 1. 対象

昭和61年4月から平成元年3月まで沖縄本島を中心に当科および3つの関連病院を受診した5465人について抗HTLV-I抗体の検索を行った<sup>3)</sup>。年齢は16歳から45歳で、年齢別、初産および経産についても検討を行った。地域の特殊性を検討するため、妊婦の現住所により北部、中部、南部、離島、その他に区分した。

HTLV-Iキャリア母63例についてIgM抗体の検索を行った。その時期は全例、産後1年~5年である。さらにそのキャリア母32例より出生した母乳哺育児65例(生後1~12歳)の抗HTLV-I抗体の検索を行った。

### 2. 抗HTLV-I抗体、IgG/IgM抗体の測定

1) 免疫酵素抗体法 (enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA法)

エイテスターATLキット (Eisai, Tokyo) を用いた。抗原としてMT2 cell lysateをプレートに固定し、希釈被検血清と40℃・30分反応する。洗浄後、酵素標識抗体溶液 (alkaline phosphatase-labeled rabbit antihuman IgG) と40℃・30分の2次反応に引き続き、酵素基質溶液 (P-nitrophenyl phosphate solution) を添加し発色させる。発色液は光路長1mmのセルを用い、分光光度計にて波長405nmにおける吸光度を測定した。なお、これら一連の操作にあたり、測定条件を一定にするため、反応にはELISA用

オートインキュベーターを用いた。判定は、陰性コントロールの2.5倍をcut off値とし、測定したoptical density(OD)値がcut off値未満を示した検体を陰性とした。ODがcut off値の3倍以上を陽性とした。cut off値よりcut off値3倍未満の検体については確認試験、western blot法を施行した。

2) 特異確認試験

抗原液をコートしていないカップの一方に特異確認試験用抗原溶液、他の一方にコントロールとして反应用溶液(正常家兔血清)を加える。被検血清をそれぞれのカップに添加して30℃・60分間反応後、抗原液をコートしたカップにそれぞれ、移し換える。以後の操作は前述の方法で行った。確認試験を行った検体のOD値を求めコントロールに比し50%以上の抑制を認めたものを陽性と判定した。

3. Western blot (WB)法(IgG/IgM抗体)

MT 2 cell由来の抗原液をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動後、ニトロセルロース膜に転写し酵素抗体法(PAP法)にて血中抗HTLV-I抗体(IgGおよびIgM抗体)の有無を調べた。

測定法の概略を示す。

- 1) MT2 cell由来の抗原液をSDSポリアクリルアミド電気泳動により分離する<sup>4,6)</sup>。
- 2) ニトロセルロース膜に転写する。
- 3) 10倍希釈した被検血清を反応させる。
- 4) 抗ヒトIgGヤギ抗体(Cappel, USA)を反応させる。

- 5) 抗ヤギIgG家兔抗体(Cappel, USA)を反応させる。
- 6) peroxidase 抗 peroxidase ヤギ抗体(Cappel, USA)を反応させる。
- 7) 4-クロール-1-ナフトール(nakarai, kyoto)によるペルオキシダーゼ発色を行う。判定は、HTLV-I主要構成コア蛋白である分子量28000 dalton(P28), 24000 dalton(P24)および19000 dalton(P19)の蛋白質バンドを重視し、これらのうちいずれか2本以上出たものを陽性と判定した。

4. 抗HTLV-I抗体価の測定

改良PA(particle agglutination)法であるSerodia HTLV-I-kit(Fujirebio, Tokyo)を用いた<sup>7,8)</sup>。被検血清の最終希釈8倍以下を陰性、16倍以上を陽性とした。

結 果

1. 妊婦における抗HTLV-I抗体陽性率

昭和61年4月から平成元年3月までの3年間において、妊婦5465人のスクリーニングをEIA法で行った結果、陽性が302例、陰性が5077例であった。また、cut off値よりcut off値3倍未満が76例あり、確認試験(特異確認試験、western blot法)により、陽性が55例、陰性が21例であった。総合すると、妊婦の5465例中357例が陽性であり、キャリア率は6.5%であった(Table 1)。年齢別に検討した結果、加齢により陽性率の増

Table 1. Screening of anti-HTLV-I antibodies in pregnant women

妊 婦	抗 HTLV-I 抗体	確 認 試 験	判 定
5 4 6 5 例	(+) 3 0 2	(+) 5 5	(+) 3 5 7 (6.5%)
	(±) 7 6		
	(-) 5 0 8 7	(-) 2 1	(-) 5 1 0 8

加傾向を示した。さらに初・経産別に検討した結果、初産婦1902人中抗HTLV-I抗体陽性者は、88人(4.6%)で、経産婦は3563人中269人(7.6%)の陽性率であり、初産婦に比べて経産婦で有意に高率であった(Table 2) ( $p < 0.05$ )。

## 2. キャリア妊婦の地域分布について

キャリア妊婦の地域分布をFig. 1に示した。また、この地域を5地区に分けて比較すると北部地区8.2%、中部地区2.4%、南部地区6.1%、離島8.8%、その他3.8%のキャリア率を示した。

## 3. キャリア母におけるIgM抗体陽性率と抗体価および児のキャリア化の検討

HTLV-Iキャリア母63例についてwestern blot法によりIgM抗体を検索した結果、18例が陽性であり、陽性率は28.6%であった(Table 3)。さらにこのキャリア母63例のうち、抗HTLV-I抗体価を改良PA法で測定した32例についてIgM抗体との相関性を検討した。その結果、低い抗体価(16倍~128倍)でのIgM抗体陽性例は1例もなく、IgM抗体陰性例と比較して、IgM抗体陽性例において抗体価が高い傾向を示した(Table 4)。

さらにそのキャリア母32例についてIgM抗体と児のキャリア化について検討を行った。結果はTable 4の如く、IgM抗体陽性のキャリア母12例の児23例中3例が抗体陽性であり、陽性率は13.1%であった。一方、IgM抗体陰性のキャリア母19例の児41例中7例が抗体陽性で16.7%の陽性率であった。

## 考 察

高月らによって提唱されたATLは、その病因がGalloらおよび日沼らによりC-retro-virus (HTLV-I)と証明され本疾患についての研究は急速に進んでいる<sup>9,11)</sup>。抗HTLV-I抗体陽性者は、日本の南西部地方、カリブ海沿岸諸国、アフリカ、イタリア南東部などに集中的に存在している。沖縄県もHTLV-I感染のendemic areaであり、古波倉らの検索の結果、男女平均21.1%と報告されている<sup>12,13)</sup>。われわれは、沖縄の妊婦を対象として抗HTLV-I抗体陽性率の検討を行った。その結果、抗体陽性率は6.5%であり、本土の他地方に比較すると高率であった。妊婦の年齢が20~30代に集中して多いため、沖縄の一般の健康成人に比べ低い陽性率になったと思われる。一般の健康成人(女性)の20代・30代の抗体陽性率は7.2%, 15.3%であった。このように一般健康成人および妊婦においても年齢とともに抗体陽性率が増加傾向を示すのは広く認められている。この理由として、現在は植田らの研究により出生コホートの違いによるものだということが示されている<sup>14)</sup>。したがって、年々、抗体陽性率は低下の傾向をたどることが予想される。妊婦の初・経産別の抗体陽性率は経産婦が有意に初産婦より高かった。この原因は年齢、感染の時期(夫婦感染)などが考えられるが、なお明らかではない。沖縄県下における、各地方の地域差については、北部の海辺や南部地方

Table 2. Age-and parity-dependent prevalence of anti-HTLV-I antibody in pregnant women

年齢	初産(陽性数/検索数) %	経産(陽性数/検索数) %	計	%
16~19(歳)	3/89 3.4	1/15 6.7	4/104	3.8
20~29	54/1306 4.1	102/1588 6.4	156/2894	5.4
30~39	27/485 5.6	162/1927 8.4	189/2412	7.8
40~45	4/22 18.2	4/33 12.1	8/55	14.5
計	88/1902 4.6	269/3563 7.6	357/5465	6.5



Tabel.3 Incidence of IgM antibodies in HTLV-I carrier mothers

I g M抗体	
キャリア母 (63例)	(+ ) 18例(28.6%)
	(- ) 45例(71.4%)

の海岸沿いに若干高い陽性率を示しているが、症例数の差異が大きいため、今後の検討が必要である。HTLV-Iの感染の有無はまず、IgG抗体の検出によって決められている。また、この安定したHTLV-Iの持続感染期にもかかわらずHTLV-Iがしばしば検出されることにより、一般のウイルス感染症とはやや趣きを異にすることが報告されている<sup>15)</sup>。特にHAMにおけるIgM抗体陽性率は70~90%と高く、長期に持続することが報告され、宿主とHTLV-Iとの密接な免疫学的関連性が示唆されている<sup>16)</sup>。この特有な相互の関連性はウイルスの側の再活性化のためか、あるいは反応する側の遺伝的な免疫反応の違いなのか、明らかではない。

われわれは、このようなHTLV-I感染におけるIgM抗体の特異性に注目し、キャリア母の抗HTLV-I抗体価およびIgM抗体を検索し、その実態を検討した。HTLV-IキャリアにおけるIgM抗体を検索した報告は少なく、上平らが26%のIgM抗体陽性率を報告している。われわれのデータにおいては、HTLV-Iキャリア母の28.6%がIgM抗体陽性であり、前述の成績と同等であった。したがって、一般的なHTLV-IキャリアのIgM抗体陽性率はおおよそ25~30%であることが確認された。このように、ウイルスの持続感染症において長期にわたりIgM抗体が高頻度に存在することは通常では考えにくく、持続感染のある時期に、reinfection, reactivationなどによりIgM抗体産生が惹起されている可能性が示唆される。

Table.4 Correlation between IgM antibodies and titer of antibodies in HTLV-I carrier mothers and relationship between IgM antibodies in carrier mothers and seroconversion rate in children

キャリア母(32例)	IgM抗体(+)	IgM抗体(-)
抗HTLV-I抗体価(改良PA法)	12例	20例
×16~128	0	8
×256~512	3	6
×1024~2048	3	5
×4096~8192	6	1
児	23	42
キャリア化した児(%)	3(13.1%)	7(16.7%)

しかしHTLV-Iキャリアにおいては、このような宿主の特別な状態の変化もなく、IgM抗体が高頻度に検出されるため、他の特異な宿主とHTLV-Iの相互関係が予想される。またこのIgM抗体と抗HTLV-I抗体価との関連性を検討した結果、IgM抗体陽性例において高力価な抗体価を示す傾向がみられ、抗体産生に関連していることが示唆された。この特異な免疫反応を示唆するIgM抗体陽性キャリア母において、HTLV-Iの児への感染性を検討した報告はいまだなく、IgM抗体の存在と児のキャリア化について検討した。われわれのデータではキャリア母より出生した母乳哺育児165例のうち10例のキャリア化があり、この児10例の母親10例を含めて32例の検索を行った。その結果、IgM抗体陽性キャリアと陰性キャリアにおいて、児のキャリア化に関して有意差はみられなかった。しかし、IgM抗体の存在は、感染細胞における抗原の周期的あるいは持続的な発現により産生される可能性は否定できず、キャリアにおけるcell to cell infectionの活性化も示唆される。また、児のキャリア化に関しては、p40<sup>tax</sup>抗体の存在も注目されているが<sup>17)</sup>、まだ決定的なparameterではない。cell to cell infectionに深く関与する抗原は感染細胞の表面に発現しているenv蛋白

であり、このenv蛋白がリンパ球のreceptorに結合し、感染が成立することが推測されている。そこで、このenv蛋白に対する抗体の分析が注目されている。しかし、現在のwestern blot法においてはenv抗体が容易に検出できない。これは、env蛋白がSDSにより抗原性が弱くなり、抗原・抗体反応がうまく行われていないことが原因とされている。そのため、env抗体の分析を行うことは非常に難しく、今後、radio immuno assay (RIA) 法やenv蛋白を阻害しない検査法が必要と思われる。

### 結 語

1. 沖縄県におけるキャリア妊婦の頻度は6.5%であった。
2. 経産婦は初産婦よりHTLV-Iキャリア率が有意に高かった。
3. HTLV-Iキャリア母63例におけるIgM抗体陽性率は28.6%であった。
4. HTLV-Iキャリア母のIgM抗体陽性例は高い抗体価を有する傾向がみられた。
5. HTLV-Iキャリア母のIgM抗体と児のキャリア化との相関性はみられなかった。

### 文 献

- 1) 田島和雄：成人T細胞白血病ウイルス (HTLV-I) の水平・垂直感染, 臨床科学24:1579-1585,1988.
- 2) 上平憲、早田央、樺田三郎、池田修一、森内幸美、親川信幸、尾崎辰彦、山田恭暉、市丸道人、中村龍文、木下研一郎：Human T lymphotropic virus type-I (HTLV-I) 持続感染者IgM抗adult T-cell leukemia associated antigens(ATLA)抗体について、日内会誌 77:11-16,1988.
- 3) 中山道男、佐久本薫、神谷仁、前浜俊之、城間肇、永山孝：沖縄における妊婦抗ATLA抗体の地域分布について、産婦人科の実際 37:91-95,1988.
- 4) Towbin, F., Staehelin, T. and Godon,

J.:Electro phoretic transfer of proteinis from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets:Procednre and Some applications, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:4350-4354,1979.

- 5) Miyoshi, T., Kubonishi, I., Yoshimoto, S., Akagi, T., Ohtuki, Y., Shirshish, Y., Nagata, K., and Hinuma, Y: Type C virus particles in a cord T-cell line derived by co-cultivating normal human cord leukocytes and human leukaemic T cells, Nature 294:770-771,1981.
- 6) Hattori,S.,Kiyokawa,T.,Imagawa,K., Shimizu,F.,Hashimura,E.,Seiki,M.,and Yoshida,M.:Identication of gag and env Gene Products of Human T-cell leukemia virus,Virology 136:338-347,1984.
- 7) 安藤良弥、一條元彦： HTLV-I抗体の測定法とその成績の解釈について、産婦人科の実際 39:1707-1771,1990.
- 8) Ikeda, m., Fujino, R., Matsui, T., Yoshida, T., Komoda, H. and lmai, J. :A new agglutination test for serum antibodies to adult T-cell leukemia virus, Gann 75:845-848, 1984.
- 9) Yoshida, M., Osame, M., Usuku, K., Matusumoto, M. and lgata, A. : Viruses detected in HTLV-I-associated myelopathy and adult T-cell leukemia are identical on DNA blotting, Lancet 1:1085-1086, 1987.
- 10) Osame, M., Usuku, K., Izuno, S., Ijichi, N., Amitani, H., lgata, A., Matsumoto, M. and Tara, M.: HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity, Lancet 1:1031-1032, 1986.
- 11) Kinoshita, K., Amagasaki, T., ldeda, S., Suzuyama, J., Toriya, K., Nishno, K., Tagawa, M., Ichimaru, M., Kamihira, S., Yamada, Y., Momita, S., Kusano, M., Morikawa, T., Fujita, S., Ueda, Y., Ito, N. and Yoshida, M.: preleukemic state of adult T cell leukemia:

- abnormal T lymphocytosis induced by human adult T cell leukemia-lymohomavirus, *Blood* 66:120-127, 1985.
- 12) 古波倉正照、仲田精伸、与那原稔、糸満国次、平安山英達、池原修、宮国毅、伊集守政、中山仁、久田友一郎、新里修、荒木弘一、高江洲均、大浜長照、清水利恭、池宮喜春、日沼頼夫： 沖縄県における健康成人のATLA(ATL関連抗原)抗体について、*沖縄医学会誌* 23:310-313,1986.
  - 13) 荒木弘一、新里脩、田島博之、三村悟郎： 沖縄県下一般健康成人及びハワイ在住 沖縄県出身の抗HTLV-I抗体, *臨床血液* 27:659-663,1986.
  - 14) Ueda, K., kusahara, k., Tokugawa, K., Miyazaki, C., Yoshida, C., Toyumra, K., Sonoda, S., Takahashi, K.: Cohort effect on HTLV-I seroprevalence in southern Japan, *Lancet* 2:979, 1989.
  - 15) 上平憲、早田央、親川信幸、森内幸美、市丸道人：成人T細胞白血病ウイルス (HTLV-I) の感染におけるIgG、IgM 抗体のウエスタンブロット法による解析、*臨床とウイルス* 16:207-210,1988.
  - 16) 上平憲、早田央、縦田三郎、尾崎辰彦、山田恭暉、池田柁一、朝長万左男、市丸道人、木下憲一郎、沢田高志：成人T細胞白血病ウイルス (HTLV-I) 感染におけるIgG/IgM抗体、抗p40抗体からみた抗体反応性の個人差、*臨床血液*30:823-829,1989.
  - 17) Kashiwagi, S., Kajiyama, W., Hayashi, J., Noguchi, A., Nakashima, K., Nomura, H., Ikematsu, H., Sawada, T., Kida, S. and Koide, A: Antibody to p40<sup>tax</sup> protein of human T cell leukemia virus 1 and infectivity, *J Infect. Dis.* 161:426-429, 1990.

## Prevalence of HTLV-I Antibodies in Pregnant Women in Okinawa and Relationship between IgM Antibodies in Carrier Mothers and Virus Transmission to Children

Toshiyuki Maehama<sup>\*</sup>, Michio Nakayama<sup>\*</sup>, Masaru Nagamine<sup>\*\*</sup>,  
Yasutsugu Nakashima<sup>\*\*</sup>, Hiroshi Takei<sup>\*\*</sup>

<sup>\*</sup> Department of Obstetrics and Gynecology and

<sup>\*\*</sup> Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, University of the Ryukyus

Key word: HTLV-I, antibody of IgM class, mother-to-child transmission

### Abstract

The overall prevalence of HTLV-I antibodies in pregnant women was 6.5% in Okinawa. Antibody-positive rate was significantly higher in multiparous patients than in primiparous patients ( $P < 0.05$ ).

Although breast milk feeding is considered to be the primary route of the mother-to-child transmission of HTLV-I, precise mechanisms of the virus transmission have not been elucidated. We surveyed the titer of the HTLV-I antibody in carrier mothers and analysed the immunoglobulin classes.

The HTLV-I antibodies of IgM class were detected in 18 of 63 carrier mothers (28.6%). The mothers having the IgM antibodies showed relatively higher titer of antibodies to HTLV-I. However, the seroconversion rate in children born from these mothers was not significantly high.