

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791712

研究課題名(和文) 妊娠中のHTLV-Iプロウイルス量測定法の開発とその臨床的意義に関する研究

研究課題名(英文) Measurement of HTLV-1 provirus loads in pregnant women with HTLV-1 carrier

研究代表者

三浦 生子 (MIURA, SHOKO)

長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・研究員

研究者番号：00404301

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：1)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。2)妊娠に伴いHTLV-1ウイルス量が変化することが明らかになった。一方、HTLV-1ウイルスの標的細胞であるCD4陽性CD25陽性T細胞は変化しておらず、ウイルス量の変化は妊娠に伴う免疫学的寛容との関連が示唆された。3)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。

研究成果の概要(英文)：CR primers for HTLV-1 genome were located at the pX region, while PCR primers for beta-globin as an internal control were on exon 2. HTLV-1 proviral load was calculated by the formula $[(HTLV-1 \text{ pX copy number}) / (\text{beta-globin copy number} / 2)] \times 10,000 \text{ cells}$. 1) Quantitative PCR test of HTLV-1 infection is useful for the HTLV-1 screening system in pregnant women. 2) The proviral load of HTLV-1 genome in blood samples was decreased significantly after delivery. However, the changes of HTLV-1 proviral load may not reflect the changes of CD4+CD25+T cells in pregnant women. 3) In six pregnant women with HTLV-1 carrier, HTLV-1 provirus was detected in umbilical blood cells, suggesting that the intrauterine infection may be one of the mother-to-child transmitted infection of HTLV-1.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：母子感染 HTLV-1 スクリーニング検査 PCR検査

1. 研究開始当初の背景

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 24 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。本申請課題では、以下に述べる私どもの研究成果から見えてきた課題を解決するために、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を開発し、その臨床的意義を明らかにする。

2. 研究の目的

本申請課題では、HTLV-1 抗体スクリーニングにおけるウエスタンブロット法による判定保留の課題を解決するため、定量的 PCR 検査法を用いた HTLV-1 プロウイルス量測定システムを開発し、HTLV-1 プロウイルス量と母子感染との関連を検討することで HTLV-1 母子感染対策における臨床的意義を明らかにする。目的達成のための期間内の具体的なターゲットを以下に 3 つ挙げる。

- 1) TaqManPCR 法を応用した母体血中 HTLV-1 プロウイルス量測定法の有用性を確認する。
- 2) 妊娠経過に伴う母体血中 HTLV-1 プロウイルス量の変化を明らかにして、妊娠時期による HTLV-1 プロウイルス量に関する知見を得て、最適な検査時期の存在と検査法について考察する。
- 3) 母体血中あるいは臍帯血液中の HTLV-1 ウイルス量と母子感染成立との関連を明らかにする。

3. 研究の方法

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(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・ダイアグノスティックス株式会社 LightCycler480 system を用いた。HTLV-1 プロウイルス量は、 $HTLV-1 \text{ proviral load} = [(HTLV-1 \text{ pX copy number}) / (-\text{globin copy number} / 2)] \times 10,000$ 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)。

4. 研究成果

1) TaqManPCR 法を応用した母体血中 HTLV-1 プロウイルス量測定法の有用性を確認する: 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。

2) 妊娠経過に伴う母体血中 HTLV-1 プロウイルス量の変化を明らかにする。:

妊娠中の HTLV-1 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 19.9(0-195.6) copies/ 10^4 cells であった。HTLV-1 プロウイルス量は妊娠中と比較して分娩後に有意に減少していた(Wilcoxon signed rank test, $p < 0.01$)。

一方、HTLV-1 キャリア妊婦における CD4 陽性 CD25 陽性 T 細胞数(中央値(最小値-最大値))は、妊娠 12 週が 105(54-562)copies / μ l、妊娠 24 週が 148(76-193)copies / μ l、妊娠 30 週が 158(96-373)copies / μ l、妊娠 36 週が 156(23-290)copies / μ l、産褥 1 日が 267(88-396)copies / μ l、産褥 1 ヶ月が 215(105-301)copies / μ l であった。sIL2R 値(中央値(最小値-最大値))は、妊娠 12 週が 260(180-439) U/ml、妊娠 24 週が 216(112-423) U/ml、妊娠 30 週が 251(141-451) U/ml、妊娠 36 週が 193(103-426)U/ml、産褥 1 日 240(122-511) U/ml、産褥 1 ヶ月が 275(146-322) U/ml であった。妊娠経過に伴い、T 細胞数および sIL-2R 値に優位な変化は認められなかった。妊娠に伴い HTLV-1 ウイルス量が変化することが明らかになった。一方、HTLV-1 ウイルスの標的細胞である CD4 陽性 CD25 陽性 T 細胞は変化しておらず、ウイルス量の変化は妊娠に伴う免疫学的寛容との関連が示唆された。

3) 母体血中あるいは臍帯血液中の HTLV-1 ウイルス量と母子感染成立との関連を明ら

かにする。:

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。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。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 11 件)

1. Miura K, Higashijima A, Shimada T, Miura S, Yamasaki K, Abe S, Jo O, Kinoshita A, Yoshida A, Yoshimura S, Niikawa N, Yoshiura K, and Masuzaki H. Clinical application of fetal sex determination using cell-free fetal DNA in pregnant carriers of X-linked genetic disorders. *Journal of Human Genetics*. 2011;56:296-299.
2. Yamasaki K, Miura K, Shimada T, Miura S, Abe S, Murakami M, Sameshima T, Fujishita A, Kotera K, Kinoshita A, Yoshiura K, and Masuzaki H. Epidemiology of human papillomavirus genotypes in pregnant Japanese women. *Journal of Human Genetics*. 2011;56:313-315.
3. Yamasaki K, Miura K, Shimada T, Ikemoto R, Miura S, Murakami M, Sameshima T, Fujishita A, Kotera K, Kinoshita A, Yoshiura K, Masuzaki H. Pre-vaccination epidemiology of human papillomavirus infections in Japanese women with abnormal cytology. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. 2011;37:1666-1670.
4. Higashijima A, Miura K, Mishima H, Kinoshita A, Jo O, Abe S, Hasegawa Y, Miura S, Yamasaki K, Yoshida A, Yoshiura KI, and Masuzaki H. Characterization of placenta-specific microRNAs in fetal growth restriction pregnancy. *Prenatal Diagnosis* 2013; 33:214-222.
5. Abe S, Miura K, Kinoshita A, Mishima H, Miura S, Yamasaki K, Hasegawa Y, Higashijima A, Jo O, Sasaki K, Yoshida A, Yoshiura KI, and Masuzaki H. Copy number variation of the antimicrobial-gene, *defensin beta 4*, is associated with susceptibility to cervical cancer. *J Hum Genet*. 2013; 58:250-253.
6. Hamaguchi D, Miura K, Abe S, Kinoshita A, Miura S, Yamasaki K, Yoshiura K, Masuzaki H. Initial viral load in cases of single human papillomavirus 16 or 52

persistent infection is associated with progression of later cytopathological findings in the uterine cervix. *J Med Virol*. 2013;85:2093-2100.

7. Miura K, Higashijima A, Miura S, Mishima H, Yamasaki K, Abe S, Hasegawa Y, Kaneuchi M, Yoshida A, Kinoshita A, Yoshiura KI, Masuzaki H. Predominantly placenta-expressed mRNAs in maternal plasma as predictive markers for twin-twin transfusion syndrome. *Prenat Diagn*. 2014;34:345-349.
8. Tsukamoto O, Miura K, Mishima H, Abe S, Kaneuchi M, Higashijima A, Miura S, Kinoshita A, Yoshiura KI, Masuzaki H. Identification of Endometrioid Endometrial Carcinoma-associated microRNAs in Tissue and Plasma. *Gynecologic Oncology* 2014;132:715-21.
9. Abe S, Miura K, Kinoshita A, Mishima H, Miura S, Yamasaki K, Hasegawa Y, Higashijima A, Jo O, Yoshida A, Kaneuchi M, Yoshiura KI and Masuzaki H. Single human papillomavirus 16 or 52 infection and later cytological findings in Japanese women with NILM or ASC-US. *Journal of Human Genetics* (in press).
10. Miura K, Hasegawa Y, Abe S, Higashijima A, Miura S, Mishima H, Kinoshita A, Kaneuchi M, Yoshiura KI, Masuzaki H. Clinical Applications of Analysis of Plasma Circulating Complete Hydatidiform Mole Pregnancy-Associated miRNAs in Persistent Gestational Trophoblastic Disease. *Placenta*. (in press).
11. Miura K, Morisaki S, Abe S, Higashijima A, Hasegawa Y, Miura S, Tateishi S, Mishima H, Yoshiura KI, Masuzaki H. Circulating levels of maternal plasma cell-free pregnancy-associated placenta-specific microRNAs are associated with placental weight. *Placenta*. (in press).

[学会発表](計 2 件)

1. Kiyonori Miura, Ai Higashijima, Shoko Miura, Kentaro Yamasaki, Ozora Jo, Shuhei Abe, Yuri Hasegawa, Koh-ichiro Yoshiura and Hideaki Masuzaki Identification of Pregnancy-Associated microRNAs in Maternal Plasma. The 16th International Conference on Prenatal Diagnosis and Therapy (2012.6.3-6, Miami, Florida, USA).
2. Kiyonori Miura, Shuhei Abe, Akira Kinoshita, Hiroyuki Mishima, Shoko Miura, Koh-ichiro Yoshiura, and Hideaki Masuzaki.

Copy number variation of the antimicrobial-gene, *defensin beta 4*, is associated with susceptibility to cervical cancer.

63th Annual meeting of American Society of Human Genetics. (Boston, USA, 2013, Oct 22-26).

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 1件)

名称:胎盤機能の網羅的かつ非侵襲的評価方法および検査用試薬

発明者:三浦清徳、増崎英明、新川詔夫、吉浦孝一郎、山崎健太郎、三浦生子

権利者:国立大学法人 長崎大学

種類:特許取得

番号:特許第5487555号

取得年月日:2014年3月7日

国内外の別:国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/gynecology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三浦 生子 (MIURA SHOKO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・客員研究員

研究者番号:00404301

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号:

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号: