原 著

順天堂医学 40 (3)
p. 341~351 (1994)

HTLV-Ⅱ感染の血清学的診断法の確立と日本の血友病患者を 含むアジア地域でのヒトレトロウイルス感染の血清学的研究

Serological differentiation of HTLV-Ⅱ infections and its application to survey of the HTLV infections in Asian countries

福 島 誉 子¹⁾²⁾³⁾ 小 室 勝 利¹⁾ 本 多 三 男²⁾

YOSHIKO FUKUSHIMA, KATSUTOSHI KOMURO, M. D., Ph. D. and MITSUO HONDA, M. D., Ph. D.

HTLV-Ⅱは、欧米等でその感染地域が明らかにされてきたウイルスだが、HIV-1感染が流行する前に経静脈麻薬濫用者の間で広がっており、HIV-1感染症の増悪因子との関連が問われている。われわれは、これまで市販の3種のHTLV-ⅡペプチドELISA法を用いて、日本の血友病患者のHTLV-Ⅱ感染を解析したが、この際、極めて高率に偽陽性反応が検出されることを見出した。この偽陽性反応物質はIgG分画にあり、HTLV-Ⅱ抗原を認識しないIgGであることを確認したが、その認識抗原については不明であった。

そこでわれわれは、HTLV-Ⅱに特異的なK-15ペプチドを新たに合成し、新しいHTLV-ⅡペプチドELISA法を開発した。この方法はSerodia HTLV-Ⅰ (Fujirebio ; Tokyo, Jpn) と組み合わせると、HTLV-Ⅱの血清診断をより正確に行うことのできるアッセイ法であり、実際に南ヴェトナムの供血者血清から8名、また、南ヴェトナムの供血者血清以外のリスクグループから125名のHTLV-Ⅱ感染者を検出した。この125名中の119名は経静脈濫用者であったが、この中の2名にHTLV-Ⅰ感染を、また15名にHIV-1感染を認めた。一方、北ヴェトナムの供血者血清および供血者血清以外のリスクグループからは、HTLV-Ⅰを含めたレトロウイルス感染は検出されなかった。

キーワード: HTLV-Ⅱ, HTLV-Ⅰ, HIV-1, ヒトレトロウイルス感染, ペプチドELISA法

Key words: HTLV-Ⅱ, HTLV-Ⅰ, HIV-1, human retrovirus infections, peptide ELISA

- * 1) 国立予防衛生研究所細菌血液製剤部
- * 2) 国立予防衛生研究所エイズ研究センター
- * 3) 順天堂大学医学部病理学第二講座

- * 1) *Department of Bacterial and Blood Products, National Institute of Health of Japan, Tokyo, Japan.*
- * 2) *AIDS Research Center, National Institute of Health of Japan, Tokyo, Japan.*
- * 3) *Department of Pathology (Ⅱ), Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan.*

[April 21, 1994 原稿受領] (May 26, 1994 掲載決定)

緒 言

ヒトTリンパ球指向性ウイルスⅡ型 (HTLV-Ⅱ) は、1982年に米国で毛様細胞白血病患者より分離された¹⁾。現在、HTLV-Ⅱと同疾患の直接の関連性については疫学的に否定的であり、疾患との相関については不明な点が多い。しかし、最近になってHIV-1やHTLV-Ⅰとの重複感染例が米国の経静脈麻薬濫用者に高率に発見されること²⁾、さらに、これらの感染者では、HTLV-Ⅱ感染が

HIV-1 よりも早くから感染していることなど³⁾の事実から, HTLV-II 感染が注目されるようになった。

これまで HTLV-II 感染は, 南米や北米の限定された地域に住むインディアンや南アジアの原住民に検出されてきた^{4)~8)}。さらに近年, 米国の他にカリブ海諸国・ヨーロッパ各国でも HTLV-II 感染が, 主に麻薬濫用の HIV-1 感染者に重複感染していることが報告され^{9) 10)}, HIV-1 感染の増悪因子との関連や, 日和見感染の一つとしても注目を集めている。

従来から HTLV-II 感染のスクリーニングは, 主に市販の HTLV-II ペプチド ELISA 法を用いた血清反応で行われてきた^{11) 12)}。ところが, われわれはこの方法で日本の血友病患者血清を調べたところ, その 50~80% 以上と高率に偽陽性を見いだした。そこで, その原因を検討するために, 新たに HTLV-II に特異的な合成ペプチド (K-15)¹³⁾ を作成し, これを用いた ELISA 法と従来からの市販の HTLV-II ELISA 法との比較を行い, 臨床データとの関連を検索した。また, HIV-1 感染者の急増が始まったベトナムに焦点をあて HTLV-II 感染と HIV-1, および HTLV-I 感染との共感染について検索し, その由来について考察した。

図-1 日本の血友病患者血清の市販 HTLV-II ELISA 法による血清学的交差反応

実験材料および方法

1. 検体およびコントロール血清

国立予防衛生研究所・エイズ研究センターにウイルス分離と臨床解析の目的で, 集められている日本の血友病患者血清 187 検体・非血友病患者血清 17 検体, またベトナム・タイ・インドの供血者血清 (南ベトナム: 1000 検体・北ベトナム: 1000 検体・タイ: 8 検体・インド: 92 検体), さらに, 供血者血清以外 (表-1) のベトナムのリスクグループ化した 1899 検体を用いた。また, 非血友病患者の HTLV-I 陽性血清 100 検体は, 日赤中央血液センターより供与された。HTLV-II のコントロール血清としては, 血清診断および DNA 診断で HTLV-II 感染の確定した患者血清を米国ロシュ社, Cathreen Lynch 博士より供与された。

2. 従来の HTLV-II スクリーニング法

血中特異抗体のスクリーニングには, DETECT-HTLV Test Kit (Coulter Corp.; Hialeah, FL)・Synth EIA HTLV-II EIA¹⁴⁾ (Olympus Corp.; NY, USA)・Eitest ATL (Eisai; Tokyo, Jpn)・Serodia HTLV-I^{15) 16)} (Fujirebio; Tokyo, Jpn) の 4 種類のキットを用いた。

3. HTLV-II 特異的 K-15ELISA 法の開発と HTLV-II 感染の血清学的確認

HTLV-II の特異ペプチドである K-15 を Millipor model 9050 Peptide synthesizer を使用し, Fmoc (9-fluorenylmethoxycarbonyl) 固相法により合成した。合成したペプチドの側鎖の脱保護および固相単体からの切り出しは, m-cresol; 0.6ml, ethanedithiole; 1.8ml, thioanisole; 3.5 ml, TFA (trifluoroacetic acid); 22.4ml, trimethylsilyl bromide (TMSBr); 4.1ml のカクテル中で 0℃ 2 時間反応させ, その後, N₂ ガスを吹き付け TMSBr の除去およびカクテルの濃縮を行い, Ethyl Ether を加え粗ペプチドを回収した。粗ペプチドは, BioLinker 法¹⁷⁾ (Millipore) と逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC/column

: μ Bondasphere 5 μ C18 100A/3.9 $\times$ 150mm) で精製し, 抗原として用いた. 精製した K-15 (2 μ g/ml) を 96 ウェルプレートに吸着させ, アルカリフォースファターゼ (AL-P) の発色系 (AL-P 標識山羊抗ヒト IgG 抗体; ZYMED; California, USA) を用いてペプチド ELISA 法¹⁸⁾を開発した. さらにその陽性検体は, ウェスタンブロット (W. B.) 法^{19) 20)}/HTLV BLOT 2.3 (Diagnostic Biotechnology [Pte] Ltd., Singapore) で確認した.

3. ゲル濾過高速液体クロマトグラフィー

市販の ELISA キットに反応する血友病患者血清 0.3ml を Superose16 カラム (16 $\times$ 500mm; Pharmacia Fine Chemicals Uppsala; Sweden) でゲル濾過した. 流速は 0.3ml/min で 0.3ml ずつ分画した.

4. 抗ヒト IgG 免疫吸着カラム

抗ヒト IgG ウサギ血清より IgG を精製し, CNBR 活性化 Sepharose 4B に結合させ, 抗ヒト IgG アフィニティカラムを作製した.

結 果

1. 従来の HTLV-II 感染スクリーニング法による日本の血友病患者血清の偽陽性反応

3 種の合成ペプチド ELISA 法 (Detect-HTLV-II Test Kit; D 法・Synth EIA HTLV-II EIA; S 法・Eitest ATL; E 法) を用いて, 日本の血友病患者血清 137 検体を解析した. 図-1 に示したように, D 法で 55 検体 (40.1%)・S 法で 89 検体 (64.9%)・E 法で 12 検体 (8.8%) 陽性を示した. 3 種類の kit 間で陽性の検体は 6 検体 (4.4%), D 法と S 法の両 kit 間での陽性は 32 検体 (23.4%), D 法と E 法の両 kit 間での陽性は 2 検体 (1.5%), S 法と E 法の両 kit 間での陽性は 4 検体 (2.9%), D 法のみ陽性は 15 検体 (10.9%), S 法のみ陽性は 47 検体 (34.3%) と高率に検出された. E 法のみ陽性の検体は検出されなかった. また, 3 Kit で陰性であった検体は 31 検体 (22.6%) であった.

図-2 日本の血友病患者血清の HTLV-II ウェスタンブロット法による解析

レーン 2: HTLV-I 陽性血清, レーン 3: HTLV-II 陽性血清, レーン 4-20: 日本の血友病患者血清のパターンを示す.

2 種類のアッセイ系で陽性となつた 44 検体について, W. B. 法で特異性の確認を行ったが, HTLV-II 抗原を認識する特異抗体は全く確認されなかった (図-2). コントロールとして, 非血友病 HTLV-I 感染血清 100 例を用いたが全て陰性であった. 従って, これら市販の HTLV-II ELISA キットは, 血友病患者血清を用いる限りにおいて, 極めて高率に偽陽性反応が検出されることが明らかになり, HTLV-II スクリーニング法としては不適であることが示唆された²¹⁾.

2. ELISA 偽陽性反応物質の解析

市販の ELISA キットの反応する血友病患者血清をゲル濾過し, ELISA 反応分画を分析した (図-3). 分画 No. 49-53 に強い HTLV-II ELISA 反応性が確認され, これらの分画を回収した. この分画は, 分子量 15-20kDa で IgG 分画に相当した.

この分画の IgG を抗ヒト IgG アフィニティカラムで吸着し, 一番高い陽性率を示した S 法で解析した (図-4). IgG を除去した分画中の ELISA 反応性は完全に消失し, 吸着・溶出した IgG 分画に

図-3 ゲルろ過 HPLC による ELISA 反応分画の同定

図 A は、ゲルろ過による吸光度 OD280nm の分析パターン、図 B は、各フラクションの ELISA 反応活性を示す。

図-4 抗ヒト IgG 免疫吸着カラムによる ELISA 反応分画の吸着と回収

Non-IgG fraction: 抗ヒト IgG 免疫吸着カラムを用い IgG を除去したろ液での反応、IgG fraction: 抗ヒト IgG 免疫吸着カラムに吸着・溶出した IgG 分画での反応を示す。

■: 血友病患者血清, □: 健康人血清での反応を示す。

は、強い ELISA 反応性が確認された。活性の回収率は 90% であった。これらのことより、血友病患者血清中に検出される高い ELISA 反応活性分画は、HTLV-II 抗原以外の何らかのエピトープを認識している血清 IgG であることがわかった。また、対象として、胃癌等の腫瘍性疾患で輸血歴を有する患者血清 10 検体を検索したが、全例陰性であった。

3. K-15 ペプチド ELISA 法の開発

そこで、HTLV-II 感染のスクリーニングを行えるペプチド ELISA 法の開発を検討した。まず、HTLV-II 特異ペプチドとして、N 末から C 末まで 49 個のアミノ酸よりなる K-15 を選択し合成した。さらに、HPLC で精製するとアセトニトリル 40~45% に単一のピークとして得られた。このペプチドを用いて、HTLV-II 抗体が含まれていることが明かな血清を 1000U の標準試薬として、ELISA 法の確立を試みた。標準曲線が得られ希釈限界は約 30U であることが明らかになった。さらに、特異性を検討するために、K-15 ペプチドを使って抑制試験を行った。K-15 の添加量を増加することによって抑制が認められ、 $10 \mu\text{g/ml}$ の K-15 で正常血清 (NHS) のレベルまで低下することが確認された。

4. K-15 ELISA 特異性の検討

K-15 ELISA 法を用いて日本の血友病患者血清を検索した (図-5)。血友病患者血清を HIV-1 陽性群と HIV-1 陰性群に分けて検討したが、陽

性群も陰性群も健康人と同程度の値を示し、HTLV-II 陽性血清に比べ有意に低値を示した。図-1 に示した市販の ELISA キットの結果では、血友病患者血清で HTLV-II 抗体の偽陽性が高率に検出されたが、この K-15 ELISA 法を用いた血友病患者血清の解析では健康人の値と同程度の値を示し、HTLV-II 抗体は陰性であった。

K-15 における HIV-1 以外のウイルスとの特異

図-5 K-15 ペプチド ELISA 法を用いた日本の血友病患者血清の解析

HTLV-II : HTLV-II 感染者コントロール血清, HIV-1 (+) : HIV-1 抗体陽性血友病患者血清, HIV-1 (-) : HIV-1 抗体陰性血友病患者血清, Healthy control : 健康人血清を示す. SP 比 (Sample OD/Positive control OD) の平均値を数字で示した.

図-6 種々のウイルス感染者血清を用いた K-15 ペプチド ELISA 法の特異性の検討

HTLV-II : HTLV-II 感染者コントロール血清, HTLV-I : HTLV-I 抗体陽性血清, HCV : C 型肝炎陽性血清, HBV : B/Positive control OD) の平均値を数字で示した.

図-7 日本の血友病患者血清を用いた K-15 HTLV-II ELISA 法と市販のペプチド ELISA 法との比較

矢印で示した値は HTLV-II の W. B. 法で陽性と判定された検体での SP 比 (Sample OD/Positive OD) を示す.

性を検討する目的で, HCV や HBV 感染血清を用いて解析を行った (図-6). HBV では弱陽性を示したが, HTLV-I では健康人の値と同程度の値であった.

今回作成した K-15 ELISA 法と市販 ELISA キット (Detect-HTLV Test Kit・Synth EIA HTLV-II EIA) の結果をまとめ図-7 に示した. 市販キットは, OD 値 K-15 は SP 比 (sample OD/P. C. OD) で示した. 日本の血友病患者血清では, K-15 の結果で一番値のばらつきが少なく, それに比べ 2 種の市販キットでは値のばらつきが見られ, 特に Synth EIA HTLV-II EIA では陽性と判定される検体が多く見られた. これらの検体に関しては W. B. 法で確認を行ったが, HTLV-II の特異的バンドは認められなかった.

5. 日本を含めたアジア地域における HTLV-II 感染の血清学的検討

日本の血友病患者血清 187 検体・非血友病患者

図-8 日本・ヴェトナム・インド・タイの供血者におけるレトロウイルス感染の血清学的検索

表-1 検索に用いた供血者以外のリスクグループ

	South Vietnam	North Vietnam
Healthy Control	200	211
Children	200	200
Pregnant women	100	100
Prostitutes	200	134
I.V. Drug Abusers	200	200
Patients under Hemodialysis	30	51
Hemophiliacs	24	49
Total	954	945

血清 17 検体・ヴェトナムの供血者血清 2000 検体（南ヴェトナム；1000 検体・北ヴェトナム；1000 検体）・インドの供血者血清 92 検体・タイの供血者血清 8 検体について、上記の K-15 ELISA 法および Serodia HTLV-I でスクリーニングを行った。陽性検体は W. B. 法で確認し、これらの血清学的結果を図-8 にまとめた。日本の血友病患者血清では HTLV-II 感染者は検出されず、HTLV-I 感染者は 10 名（5.3%）・HIV-1 感染者は 113 名（60.4%）検出された。非血友病患者では、HTLV-I HTLV-II HIV-1 感染者は検出されなかった。

ヴェトナムの供血者血清では、南ヴェトナムの

供血者血清から HIV-1 感染者が 6 名（0.6%）・HTLV-II 感染者が 8 名（0.8%）検出されたが、HTLV-I 感染者は検出されなかった。また、北ヴェトナムの供血者血清からは HTLV-I HTLV-II HIV-1 感染者は検出されなかった。タイ・インドの供血者血清からは HIV-1 感染者は検出されたが、HTLV-I HTLV-II 感染者は検出されなかった。

6. ヴェトナムでの供血者血清以外のリスクグループ血清を用いた HTLV-II 感染の検索

南ヴェトナムの供血者血清で HTLV-II 陽性者が検出されたため、さらに詳しくヴェトナムの HTLV-II 感染を解析した。表-1 に示したように、南ヴェトナムと北ヴェトナムに分かれた検体について、血清学的に HTLV-II 感染の有無を検索した。表-2 にそれぞれの抗体陽性者数と抗体陽性率を示した。南ヴェトナムでは、HTLV-II 感染者は、954 名中 125 名（13.1%）に検出され、そのほとんどが経静脈麻薬濫用者 119 名（59.5%）であった。また、HTLV-I 感染・HIV-1 感染は、HTLV-II 感染が高率に検出された経静脈麻薬濫用者から、それぞれ 2 名（0.2%）と 15 名（7.5%）検出された。北ヴェトナムの検体では、供血者血清同様、HTLV-I HTLV-II HIV-1 感染者は

表-2 ヴェトナムにおける HTLV-II, HTLV-I, HIV-1 感染の血清学的検索

	South Vietnam				North Vietnam			
	number	seropositive			number	seropositive		
		HIV-1	HTLV-I	HTLV-II		HIV-1	HTLV-I	HTLV-II
Healthy control	200	0	0	1 (0.5%)	211	0	0	0
Children	200	0	0	2 (1.0%)	200	0	0	0
Pregnant women	100	0	0	0	100	0	0	0
Prostitutes	200	0	0	1 (0.5%)	134	0	0	0
I. V. drug abusers	200	15 (7.5%)	2 (1.0%)	119 (59.5%)	200	0	0	0
Pts. under hemodialysis	30	0	0	2 (6.7%)	51	0	0	0
Hemophiliacs	24	0	0	0	49	0	0	0
total	954	15 (1.6%)	2 (0.2%)	125 (13.1%)	945	0	0	0

図-9 ヴェトナム人血清における HTLV-II ウエスタンブロット法による解析

N: HTLV-I, -II 陰性血清, P1: HTLV-I 陽性血清, P2: HTLV-II 陽性血清, Intravenous Drug User: 麻薬濫用者, Pro.: 売春婦, Gen.: 健康人, Other: 子供, 透析患者および血友病患者のパターン (ここまでは, 南ヴェトナムの検体), N. Viet.: 北ヴェトナムの検体でのパターンを示す。

検出されなかった。これら検体のウイルス感染は, W. B. 法で確認した (図-9)。

7. 南ヴェトナムにおける経静脈麻薬濫用者の重複感染の検討

約 60% の HTLV-II 感染を認めた南ヴェトナムの経静脈麻薬濫用者における HTLV-II HTLV-I HIV-1 の重複感染を検討した (図-10)。HTLV-I 抗体陽性者 2 名は HTLV-II との重複感染で, HTLV-I に関しては単独感染は検出されなかった。HTLV-II と HIV-1 の関係では, HIV-1 感染者 15

名中 10 名が HTLV-II との重複感染者であった。

考 察

従来の市販 HTLV-II ペプチド ELISA 法は, これまでの広範な使用にもかかわらず, わが国の血友病患者血清を用いる限りにおいて, 交差反応性のために全く使えないことがわかった。わが国の血友病患者に認められた高い ELISA 活性分画は, HTLV-II 抗原特異のエピトープ以外のものを認識する IgG で, 抗 IgG 抗体への吸着分画にあることを確認したが, そ

の認識抗原については現在不明である。輸血あるいは, 凝固因子製剤の頻回輸注を受けている血友病患者に特異的であることから, HLA 等のアロ抗原²²⁾ がその候補であると思われる。

これらの交差反応性については, 1993 年 8 月, 米国 CDC レトロウイルス部の Renu Lal 博士に依頼した再検査で, 米国の血友病患者血清を検索すると類似の結果が得られることが確認された (Renu L., personal communication)。これらの結果を受けて, 米国でも現在, HTLV-II ペプチド

HTLV-I: 2/200=1.0% HTLV-II: 119/200=59.5%

図-10 南ヴェトナムの麻薬濫用者におけるレトロウイルス感染の検索

ELISA 法の再検討が行われつつあるとの連絡をうけた。その意味でも、今回のわれわれの発見は、重要な契機を与えたものとして価値あるものと考えられる。

HTLV-II ペプチド ELISA 法に使われているペプチドのアミノ酸組成を製造元に問い合わせたが、10 個以下の短いペプチドと言う解答しか得られなかった。従って、われわれは 49 個のアミノ酸よりなる HTLV-II 特異的 K-15 ペプチドを合成し、それを抗原に用いた HTLV-II ペプチド ELISA 法を開発した。その検出感度および HTLV-II への特異性から、極めて有用な HTLV-II 抗体のスクリーニング法となりうることが示唆された。

われわれの開発した方法を Serodia HTLV-I と組み合わせると、HTLV-I / II のスクリーニングが可能であった。ヴェトナムにおける HTLV-II 感染を上記の新しく開発した方法で解析すると、驚くべきことに南ヴェトナムの経静脈麻薬濫用者の 59.5% に、HTLV-II 感染者が確認された。北ヴェトナムの検体からは、HTLV-II HTLV-I HIV-1 感染者は検出されなかった²³⁾。

また、HTLV-II 感染の 95% が検出された南ヴェトナムの経静脈麻薬濫用者での重複感染を検討したところ、抗 HTLV-I 抗体陽性者 2 名が抗 HTLV-II 抗体との重複感染者であり、抗 HTLV-I 抗体単独感染者は検出されなかったことから、HTLV-II 感染は HTLV-I 感染の促進因子である可能性も考えられる。抗 HIV-1 抗体陽性者の 67% が、

抗 HTLV-II 抗体との重複感染者であった。このことから、東南アジア諸国での HIV-1 感染の爆発的な伝播から推測して、HTLV-II 感染は重複感染に際して、HIV-1 感染の進行を促進する可能性も示唆される²⁴⁾。

ヴェトナムにおけるこれらヒトレトロウイルス感染の南北差は、複雑な歴史に由来している可能性を示唆している。すなわち、ヴェトナム戦争は 1960 年代前半から 1974 年まで続いたが、1970 年代の始めアメリカの経静脈麻薬濫用者から、南ヴェトナムに HTLV-II 感染が広まったとしたら、HTLV-II 感染が 30~40 歳代の経静脈麻薬濫用者に多発していることがよく説明できる。この年齢分布は、南ヴェトナムの経静脈麻薬濫用者の年齢分布とほぼ一致している。これらの HTLV-II 感染が、その後の南ヴェトナムにおける HIV 感染の流行の背景にあった可能性が強く示唆される。HTLV-II が東南アジアの経静脈麻薬濫用者に広く蔓延している可能性も考えられるので、今後の分子疫学的解析の結果が待たれる。

結 語

HTLV-II 感染症は、近年、各国で激増している HIV-1 感染と重複感染していることが多く注目され始めている。しかし、今回われわれはその検出のための市販のペプチド ELISA 法が、血液製剤の頻回輸注をうけた日本の血友病患者で、高率に偽陽性を示すことを発見した。その偽陽性は、血清 IgG 値が高い血友病患者血清に高率に検出され、明らかに HTLV-II と異なるエピトープを認識している抗体によることが示された。このため、われわれは新しい HTLV-II 抗原を用いた ELISA 法を開発した。この K-15 ELISA 法は、感度・特異性共に、スクリーニング法として極めて有用な方法と思われた。K-15 ELISA 法と Serodia HTLV-I を併用してスクリーニングを行い、南ヴェトナムの供血者血清から、HTLV-II 感染を血清学的に 8 名・経静脈麻薬濫用者から 119 名・健常人から 1 名・子供から 2 名・売春婦から 1 名・透析患者

から2名検出した。この中には特に、HIV-1との重複感染を示すものが多く、HTLV-II感染がHIV-1感染の促進因子となっている可能性も示唆された。

稿を終えるにあたり、ご指導・ご校閲を賜った病理学教室第二講座白井俊一教授に深く感謝致します。また、ご指導いただいた聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター山田兼雄教授・同小児科目黒 崇先生、名古屋大学医学部附属病院輸血部高松純樹助教授・同第一内科斎藤英彦教授、東京医科大学臨床病理学教室福武勝幸教授、奈良県立医科大学輸血部藤村吉博助教授、国立医療センター国際医療協力部中田 進先生、またご協力頂いた国立予防衛生研究所エイズ研究センターエイズ予防治療室の諸兄に、心からお礼申し上げます。

文 献

- 1) Kalyamaraman, B. S., Sarngadharan, M. G., Robert-Guroff, M., *et al.*: A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. *Science*, **218**: 571~573, 1982
- 2) Lee, H., Weis, L. H., Brown, L. S., *et al.*: Patterns of HIV-I and HTLV-I/II in intravenous drug abusers from the middle Atlantic and central regions of the USA. *J. Infect. Dis.*, **162**: 347~352, 1990
- 3) Khabbaz, R. F., Hartel, D., Lairmore, M., *et al.*: Human T lymphotropic virus type II (HTLV-II) infection in a cohort of New York intravenous drug users: an old infection? *J. Infect. Dis.*, **163**: 252~256, 1990
- 4) Heneine, W., Kaplan, J. E., Gracia, F., *et al.*: HTLV-II endemicity among Guaymi Indians in Panama. *N. Engl. J. Med.*, **324**: 565, 1991
- 5) Lairmore, M. D., Jacobson, S., Gracia, F., *et al.*: Isolation of human T-lymphotropic virus type 2 from Guaymi Indians in Panama. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **87**: 8840~8844, 1990
- 6) Fujimura, C., Fujiyoshi, T., Miura, T., *et al.*: A new endemic focus of human T lymphotropic virus type II carriers among Orinoco natives in Colombia. *J. Infect. Dis.*, **168**: 1075~1077, 1993
- 7) Levine, P. H., Jacobson, S., Elliott, R., *et al.*: HTLV-II infection in Florida Indians. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, **9**: 123~127, 1993
- 8) Hjelle, B., Mills, R., Swenson, S., *et al.*: Incidence of hairy cell leukemia, mycosis fungoides and chronic lymphocytic leukemia in first known HTLV-II-endemic population. *J. Infect. Dis.*, **163**: 453~440, 1991
- 9) Page, J. B., Lai, S., Chitwood, D. D., *et al.*: HTLV-I/II seropositivity and death from AIDS among HIV-1 seropositive intravenous drug users. *Lancet*, **335**: 1439~1441, 1990
- 10) Lee, H., Weis, L. H., Brown, L. S., *et al.*: Patterns of HIV-I and HTLV-I/II in intravenous drug abusers from the middle Atlantic and central regions of the USA. *J. Infect. Dis.*, **162**: 347~352, 1990
- 11) Roberts, C. R., Mitra, R., Hyams, K., *et al.*: Serologic differentiation of human T lymphotropic virus type I from type II infection by synthetic peptide immunoassays. *J. Med. Virol.*, **36**: 298~302, 1992
- 12) Lal, R. B., Heneine, W., Rudolph, D. L., *et al.*: Synthetic peptide-based immunoassays for distinguishing between human T-cell lymphotropic virus type I and type II infections in seropositive individuals. *J. Clin. Microbiol.*, **29**: 2253~2258, 1991
- 13) Hadlock, K. G., Lipka, J. J., Chow, T. P., *et al.*: Cloning and analysis of a recombinant antigen containing an epitope specific for human T-cell lymphotropic virus type II. *Blood*, **79**: 2789~2796, 1992
- 14) Wang, C. Y.: Synthetic-peptide based immunodiagnosis of retrovirus infections: Current status and future prospects. *Adv. Biotechnol. Processes*, **10**: 131~148, 1988
- 15) Yoshida, T., Matsui, T., Kobayashi, S., *et al.*: A novel agglutination test for the human immunodeficiency virus antibody: a comparative study with enzyme-linked immunosorbent assay and immunofluorescence. *Jpn. J. Cancer*

- Res., 77 : 1211~1213, 1986
- 16) Fujino, R., Kawato, K., Ikeda, M., *et al.*: Improvement of gelatin particle agglutination test for detection of anti-HTLV-I antibody. Jpn. J. Cancer Res., 82 : 367~370, 1991
 - 17) Funakoshi, S., Fukuda, H., and Fujii, N.: Chemoselective one-step purification method for peptides synthesized by the solid-phase technique. Proc. Natl. Acad. Sci., 88:6981~6985, 1991
 - 18) National Institute of Allergy and Infectious Diseases: AIDS Research and Reference Reagent Program Catalog. 1994
 - 19) Wiktor, S. Z., Alexander, S. S., Shaw, G. M., *et al.*: Distinguishing between HTLV-I and HTLV-II by Western Blot. Lancet, 335 : 1533, 1990
 - 20) Lal, R. B., Brodine, S., Kazura, J., *et al.*: Sensitivity and specificity of a recombinant transmembrane glycoprotein (rgp 21)-spiked Western Immunoblot for serological confirmation of Human T-cell Lymphotropic Virus Type I and Type II infections. J. Clin. Microbiol., 30 (2) : 296~299, 1992
 - 21) Fukushima, Y., Nakasone, T., Kitamura, K., *et al.*: Serum IgG is highly cross reactive with HTLV-II ELISA in Japanese hemophiliacs with no relations to HIV-1 or HTLVs infections. J. Infect. Dis, 1994 (submitted for publication).
 - 22) Sayers, M. H., Beatty, P. G., and Hausen, J. A.: HLA antibodies as a cause of false positive reactions in screening enzyme immunoassays for antibodies to human T-lymphotropic virus type III. Transfusion, 26 : 113~115, 1986
 - 23) Fukushima, Y., Nakasone, T., Nakata, S., *et al.*: Human T-lymphotropic virus type II in Vietnam. Lancet, 344 : 485, 1994
 - 24) Fukushima, Y., Takahashi, H., Nakasone, T., *et al.*: Extraordinary High Rate of HTLV-II Seropositivity in Intravenous Drug Abusers in South Vietnam. AIDS Res. Hum Retroviruses in press.

Original Paper

Summary

Serological differentiation of HTLV-II infections and its application to survey of the HTLV infections in Asian countries

Human T-lymphotropic virus type II (HTLV-II) was initially isolated from a patient with hairy cell leukemia in the United States. Recently, it was demonstrated to be infected concomitantly with human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) and human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) in intravenous drug abusers (IVDAs) in the United States. Further more, HTLV-II was present in American intravenous drug abusers by the early 1970s and was introduced into this population before HIV-1. Moreover, HTLV-II infections have been found in the Guaymi Indians in Panama and American Indians in New Mexico. Although HTLV-II has been suggested to be related with a neurological disorder and studied for the effects on HIV-1-induced diseases, it is not known to be associated with any specific disease, in contrast to HTLV-I.

A seroepidemiologic survey was performed to study the spread of retrovirus infections of the HTLVs and HIV in Japan, Vietnam, Thailand and India. In initial experiments, various

enzyme-linked immunoassays (ELISA) for HTLV-II, that are commercially available, were used for screening assays. However, they detected false-positive in more than fifty percent of the serum specimens of Japanese hemophiliacs that had been injected non-heated and heated factor VIII or prothrombin complex concentrates, repeatedly. Then, we devised HTLV-II ELISA using the K15 peptide that is specific for HTLV-II, the combination of the ELISA test and PA test for HTLV-I were selected as a primary screening assay for seropositivity for HTLV-I/II because both tests successfully detected seropositives for HTLV-I or HTLV-II.

Serum specimens were assayed for HTLV-II infections in Japanese hemophiliacs, and blood donors in Thailand, India and Vietnam. HTLV-II infections have not been detected in the Japanese hemophiliacs or blood donors in Thailand and India. By contrast, approximately one percent of these donors exhibited seropositive for HTLV-II in South Vietnam, but none of them in North Vietnam. Further more, all these individuals seropositive for HTLV-II were detected in IVDAs that were seronegative for HIV-1 or HTLV-I. To confirm the findings, we further studied the HTLV-II infections in classified risk groups; normal healthy controls, children, pregnant women, prostitutes, IVDAs, patients under hemodialysis and hemophiliacs. Interestingly, we revealed the HTLV-II infections exclusively in 60 percent of the IVDAs in South Vietnam. The median of the age of HTLV-II infected IVDAs was 36-40 (45%). These findings show that HTLV-II infection is specifically prevalent in IVDAs in South Vietnam.

Collectively these findings show that approximately 60 percent of these IVDAs in South Vietnam (119/200) exhibited seropositive for HTLV-II, showing that HTLV-II is prevalent in IVDAs in South Vietnam.

Key words : HTLV-II, HTLV-I, HIV-1, Human retrovirus infections, Peptide ELISA

YOSHIKO FUKUSHIMA*1) 2) 3), KATSUTOSHI KOMURO, M. D., Ph. D.*1)
and MITSUO HONDA, M. D., Ph. D.*2)

*1) *Department of Bacterial and Blood Products, National Institute of Health of Japan, Tokyo, 162 Japan*

*2) *AIDS Research Center, National Institute of Health of Japan, Tokyo, 162 Japan*

*3) *Department of Pathology (II), Juntendo University School of Medicine, Tokyo, 113 Japan*