

- II) 何らかの環境要因
- III) HTLV-Iが増えやすいような subtype がある。
- IV) たまたま夫婦ともウイルスが増えやすい様な素因を持っていた。

【結論】

1. 急性型 ATL の発症様式に、始めから急性型として発症する様式があるかを、遺伝的背景が存在すると仮定して家族のウイルスの増殖モードを調べたが、家族のキャリアーの数が十分でなく結論を出せなかった。しかし今回検討した症例では急性型の家族ではウイルスの検出率は一般のキャリアーに近く、むしろ慢性型のATLの家族でプロウイルスの増加及びクローナルな増殖を高頻度に認めた。ATLには家族内に多発する症例があるのでこのような患者家族のキャリアーでのウイルス増加のモードを検討する必要がある。
2. ATLにおいてもHTLV-Iプロウイルス増加に遺伝的背景の存在する事が示唆されたが、HTLV-Iウイルスの増加は、血縁者キャリアー以外に夫婦間でもみられ、遺伝的背景ばかりでなく、その他の因子も存在している事が示唆された。

【研究発表】

1. 論文発表

Furukawa, Y., Fujisawa, J., Osame, M., Toita, M., Sonoda, S., Kubota, R., Ijichi, S., and Yoshida, M. Frequent clonal proliferation of human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1)-infected T cells in HTLV-1-associated myelopathy (HAM-TSP). *Blood*, 80: 1012-1016, 1992.

HTLV-1キャリアの血清学調査

—確認検査方法の比較検討—

分担研究者 東郷正美 鹿児島県衛生研究所・所長
共同研究者 吉國謙一郎 鹿児島県衛生研究所
共同研究者 永田告治 鹿児島県衛生研究所

【目的】

当県において、平成10年1月から開始された「鹿児島ATL制圧10カ年計画」に基づき当所に確認を依頼され、搬入された23検体について、検査方法の異なる粒子凝集反応（PA）法、ウエスタンブロット（WB）法、酵素免疫測定（EIA）法の3法で実施し、これらの結果から若干の知見を得たので報告する。

なお、WB法については、当所で実施している確認検査であるため、2社製の試薬キットを用いた。

また、IF法については現在実施していないため、医療機関等で実施されて、結果の判明している検体のみ掲載し、併せて比較検討した。

【方法】

1. PA法

SERODIA・HTLV-1（富士レビオ社製）を用いて定量試験を実施し、最終希釈16倍において、（±）以上の検体を陽性とした。

2. EIA法

New Eitest-ATL（エーザイ社製）を使用した。判定は、カットオフ値以上を陽性とした。

3. WB法

1) プロブロットHTLV-1（富士レビオ社製）を用い、対照として強陽性、弱陽性、陰性コントロールを目視で判読して、基準に一致していることを確認のうえエンヴタンパク（gp46）のバンドが認められ、かつギャグタンパク（p19, p24, p53）のうち一つ以上のバンドが認められる検体を陽性とした。

2) ニューエイテストATL-WB（エーザイ社製）を用い、コントロール血清が目視で判読して、基準に一致していることを確認のうえ、rgp46とp19がともに認められる場合と、rgp46のバンドは認められないが、p19のバンドに加えてp24またはp28のバンドが認められる場合を陽性とした。

【結果】

検査方法別の結果を表1に示した。

PA法においては、すべて（23件）の検体が陽性を示したのに対し、EIA法、両WB法で1検体（検体番号20）が陰性であった。

ここで、検体番号8については昨年、ロットの差によりgp46バンドの出現に、有無の差があったことを報告しているため、gp46のバンドを（+）とし、これについての説明は割愛する。

検体番号20については、PA法で64倍と低力価の陽性像を示したものの、EIA法、WB（2社製）法では陰性であったため、IF法についてエーザイ筑波研究所に依頼し、陰性が確認された。

なお、PA法における検査結果は、ウインドウピリオドも考えられたため、1ヶ月後、同一者からの再検査も実施したが、前回同様、PA法のみが64倍の低力価陽性で、EIA法、WB法は陰性であった。

このことからPA法の結果は非特異反応が強く考えられ、他法の結果を考慮し、検体番号20については検査結果を陰性とした。

また、表1に示すように2社製のWB法でも、エンヴ、ギャグタンパクのバンドの出現に差がみられた（gp46；検体番号10、p24；検体番号6.11.12.15.17）が、試薬メーカーによって判定基準が違うため、全ての判定結果は一致した。

表1 検査方法別最終判定結果の比較

検体番号	PA法	判定	EIA法		判定	WB法(プロプロット)				判定	WB法(ニューイテスト)				判定	IF法	総合判定
	定量		吸光度	カットオフ		判定	gp46	p19	p24		p53	gp4	p19	p24			
1	1024	+	1.568	0.182	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			陽性
2	2048	+	2.093	0.182	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			陽性
3	2048	+	1.706	0.182	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			陽性
4	>8192	+	2.081	0.182	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			陽性
5	2048	+	1.810	0.182	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			陽性
6	512	+	1.096	0.182	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			陽性
7	4096	+	2.151	0.182	+	+	+	+	+	+	tw	+	-	+			陽性
8	128	+	1.635	0.182	+	tw	+	+	+	(+)	tw	+	tw	-		40	陽性
9	1024	+	2.068	0.182	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			陽性
10	2048	+	2.200	0.182	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+			陽性
11	1024	+	1.242	0.182	+	+	+	+	+	+	+	+	-	tw		>40	陽性
12	512	+	0.343	0.182	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-		40	陽性
13	2048	+	2.249	0.182	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-		80	陽性
14	1024	+	1.709	0.182	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		80	陽性
15	512	+	1.201	0.182	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+			陽性
16	>8192	+	2.243	0.182	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			陽性
17	1024	+	1.185	0.182	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-		40	陽性
18	4096	+	2.174	0.182	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		80	陽性
19	256	+	1.187	0.182	+	+	+	+	+	+	tw	+	+	+		20	陽性
20	64	+	0.022	0.182	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		(-)	陰性
21	2048	+	2.284	0.182	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			陽性
22	2048	+	1.899	0.182	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			陽性
23	2048	+	1.868	0.182	+	+	+	+	+	+	+	+	+	tw		80	陽性
																40	陽性

【考察】

平成10年1月から「鹿児島ATL制圧10カ年計画」が開始され、それに伴う検体23件について、今回検査方法別に結果の比較検討を行ったが、23検体中1件に判定結果の不一致が認められた。この検体はPA法を実施した23検体中、最も低力価の陽性（64倍）を示したが、

E I A法, W B法, I F法では陰性であった。

また, 次に低かった(128倍)検体番号8の検体も, W B法でエンヴタンパク(gp46)のバンドの出現が微妙であったことから, 特にP A法における低力価陽性検体は, 今後2~3法を併用した確認検査が必須条件であると考えられる。

今後, 当所における検体数も増加すると思われるが, それに伴う検査結果の蓄積を続行するとともに, 検査体制の充実化を計るためにもI F法, P C R法の導入を急ぎ, 鹿児島県のHTLV-1抗体検査システムを確立していきたい。

【参考文献】

1. 上平 憲他: Recombinant env 抗原を添加したウエスタンブロット法による抗 HTLV-1 抗体の検出. 臨床と微生物 1995;Vol.22-No.5
2. 吉木 景子他: 改良ウエスタンブロット法による HTLV-1 抗体の判定基準. 臨床検査 1995;39:1221-1223
3. 福岡 直美他: ウエスタンブロット法“プロブロット HTLV-1”による HTLV-1 抗体の測定方法—WHO判定基準の見直し—. 臨床検査 1992;36(2):193-196
4. 宮本 寛治: [SERODIA・HTLV-1] PA 法キットによる HTLV-1 抗体検出の検討. 医学と薬学 1990;23(2)351-353
5. 鈴木恵美子: 新しいP A法による抗 HTLV-1 抗体測定の有用性. 臨床検査機器・試薬 1990;13:1

ATL 発症宿主要因の解析

—ATL の発症リスクを規定する HLA class I と HTLV-I Tax ペプチド—

主任研究者：園田俊郎（鹿児島大学医学部ウイルス学講座教授）

共同研究者：屋敷伸治（鹿児島大学医学部ウイルス学講座）

【研究要旨】

HLA-A*26, B*4002, B*4006, B*4801 は ATL 患者に好発し ATL の発症に関連することが示唆されている。今回、これらの HLA class I が拘束する抗 HTLV-I CD8⁺CTL の機能と ATL の発症リスクの遺伝背景を明らかにするため、HLA class I が認識する抗原ペプチドのアンカーモチーフとエピトープを解析した。その結果、ATL の HLA class I は HTLV-I Tax ペプチドを認識するアンカーモチーフを欠如していることが明らかになった。

【研究目的】

成人 T 細胞白血病（ATL）はヒトレトロウイルスの一種、human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) の感染でおこる白血病である。九州の南西部、沖縄、四国、紀伊、三陸、東北、北海道には HTLV-I キャリアが多発しており、ATL と HTLV-I 関連疾患（HAM/TSP など）が発生している。この HTLV-I キャリアの地域集積性と同一家族や患者に ATL と HAM/TSP が併発することは極めて稀であり、ATL と HAM/TSP は同一種の HTLV-I が感染しておこることから両者の発症を振分ける要因は宿主の免疫遺伝要因の関与が示唆されていた。そこで鹿児島の ATL、HAM/TSP と HTLV-I キャリアの同意を得て家系調査と HLA の遺伝解析をおこなった。ATL 患者では HLA-A*26, B*4002, B*4006, B*4801、HAM/TSP 患者では A*24, B*07 が高頻度に認められた（Table 1）。

本研究は、これらの HLA class I 分子と ATL の発症リスクとの関連を明らかにするため、HTLV-I 特異的 CD8⁺CTL が認識する HTLV-I 抗原エピトープと HLA class I 結合性アンカーモチーフを解析した。

【材料と方法】

HTLV-I キャリアと HAM 患者の末梢血リンパ球（19 例）より分画した CD8⁺T 細胞を HLA 適合抗原提示細胞（HTLV-I 非感染者の末梢血単核球細胞）、HTLV-I 合成ペプチド（Tax: 69 種類, Env: 96 種類）、IL-2 存在下で 30 日間培養し、HTLV-I Tax および HTLV-I Env に対する CD8⁺CTL クローンを樹立した。CTL 活性は HTLV-I 合成ペプチドをパルスした HLA 適合 EBV- B 細胞を標的とし LDH 法で測定した。

Table 1 HLA class I allele frequencies among ATL, HAM/TSP, asymptomatic HTLV-I carriers and healthy controls

HLA alleles	ATL N=103	HAM/TSP N=135	Asymptomatic HTLV-I carriers N=152	Healthy controls N=175
A*01	0.005	0.000	0.001	0.000
A*02	0.204	0.193	0.237	0.211
A*03	0.000	0.000	0.000	0.006
A*11	0.078	0.107	0.059	0.134
A*24^{b)}	0.282	<u>0.426</u>	0.385	0.369
A*26^{a)}	<u>0.291</u>	0.130	0.151	0.120
A*30	0.000	0.004	0.000	0.000
A*31	0.112	0.100	0.086	0.077
A*33	0.029	0.041	0.072	0.083
B*07^{b)}	0.024	<u>0.141</u>	0.049	0.040
B*13	0.019	0.011	0.013	0.011
B*15	0.117	0.059	0.072	0.106
B*18	0.000	0.000	0.003	0.000
B*27	0.005	0.007	0.000	0.000
B*3501	0.083	0.070	0.066	0.114
B*37	0.000	0.000	0.001	0.003
B*38	0.000	0.004	0.000	0.000
B*39	0.015	0.022	0.026	0.026
B*4001	0.053	0.085	0.076	0.074
B*4002^{a)}	<u>0.126</u>	0.063	0.109	0.004
B*4006^{a)}	<u>0.112</u>	0.030	0.072	0.097
B*44	0.034	0.044	0.056	0.091
B*4601	0.025	0.059	0.066	0.029
B*4801^{a)}	<u>0.044</u>	0.007	0.013	0.020
B*51	0.107	0.104	0.082	0.077
B*52^{b)}	0.039	<u>0.093</u>	0.095	0.097
B*5401	0.112	0.111	0.082	0.094
B*55	0.019	0.026	0.043	0.031
B*56	0.010	0.007	0.003	0.006
B*5801	0.005	0.015	0.016	0.009
B*5901	0.034	0.037	0.023	0.026
B*6701	0.015	0.004	0.023	0.009

^{a)}HLA alleles increased in ATL patients (A*26: ATL vs HAM/TSP p=0.00002, ATL vs asymptomatic HTLV-I carriers p=0.0002, ATL vs healthy controls p=0.000001; B*4002: ATL vs HAM/TSP p=0.026, ATL vs healthy controls p=0.0003; B*4006: ATL vs HAM/TSP p=0.001; B*4801: ATL vs HAM/TSP p=0.012, ATL vs asymptomatic HTLV-I carriers p=0.043).

^{b)}HLA alleles decreased in ATL patients (A*24: ATL vs HAM/TSP p=0.000001, ATL vs asymptomatic HTLV-I carriers p=0.021, ATL vs healthy controls p=0.045; B*07: ATL vs HAM/TSP p=0.00002; B*52: ATL vs HAM/TSP p=0.035, ATL vs asymptomatic HTLV-I carriers p=0.025, ATL vs healthy controls p=0.019).

【結果】

抗 HTLV-I Tax CD8⁺CTL (119 クローン), 抗 HTLV-I Env CD8⁺CTL (171 クローン) を用い、HTLV-I 特異的 CD8⁺CTL エピトープと HLA class I 結合性アンカーモチーフを同定した (Fig. 1)。ATL の HLA class I (A*26, B*4002, B*4006, B*4801) は HTLV-I Env に対する CD8⁺CTL をよく誘導したが、HTLV-I Tax に対する CTL は全く誘導しなかった。一方、ATL に関連しない HLA class I (A*02, A*24, B*07, B*35, B51, B*52, B*54) は HTLV-I Tax, Env に対する CD8⁺CTL が高率に誘導された。ATL 患者のなかで HLA-A*26, B*4002, B*4006, B*4801 を保有するものは、他の HLA アレルを保有するものより 12.6 歳若く ATL を発症していた (Fig.2)。

【考察】

ATL 患者に好発する HLA-A*26, B*4002, B*4006 分子は、HTLV-I のウイルス蛋白 (Gag, Pol, Env, Tax, Rex) のうち、Tax 蛋白 (宿主細胞の転写因子や増殖分化にかかわる機能蛋白とも相互作用し、HTLV-I 感染 T 細胞の不死化とがん性変化を導き ATL の発症につながる) を全く認識できず抗 HTLV-I Tax CD8⁺CTL の non-responder であることが明らかになった。そして、これらの HLA を保有する ATL 患者は非保有者に比して、12.6 歳早く ATL を発症していることが明らかになった。すなわち ATL 患者は Tax 抗原を認識する CTL が作動できず、HTLV-I 感染 T 細胞の排除が不十分で ATL 細胞の増殖を許容している可能性が考えられた。一方、HAM/TSP に好発する HLA-A*24, B*07 は Tax 蛋白をよく認識し、CTL が誘導されやすく HTLV-I 感染細胞の増殖を阻止していることも明らかになった。

以上、ATL 患者が保有する HLA class I 分子は HTLV-I Tax エピトープを認識できず CD8⁺CTL を誘導できない。この HLA の遺伝背景が ATL の発症リスクを高めていることが示唆された。

【共同研究者】

有馬直道 (鹿児島大学医学部第一内科)、花田修一 (鹿児島大学医学部第二内科)、納 光弘 (鹿児島大学医学部第三内科)、野村紘一郎 (鹿児島県北薩病院)、太良光利 (鹿児島市立病院)、宇都宮 與 (慈愛会今村病院分院)

【研究発表】

論文発表

Shinji Yashiki, Toshinobu Fujiyoshi, Mitsutoshi Tara, Kouichiro Nomura, Atae Utsunomia, Naomichi Arima Syuichi Hanada, Mitsuhiro Osame and Shunro Sonoda. HLA class I alleles associated with risk of adult T-cell leukemia fail to generate anti-HTLV-I Tax CD8⁺CTL due to lack of the binding peptide motifs in HTLV-I Tax protein. submitted

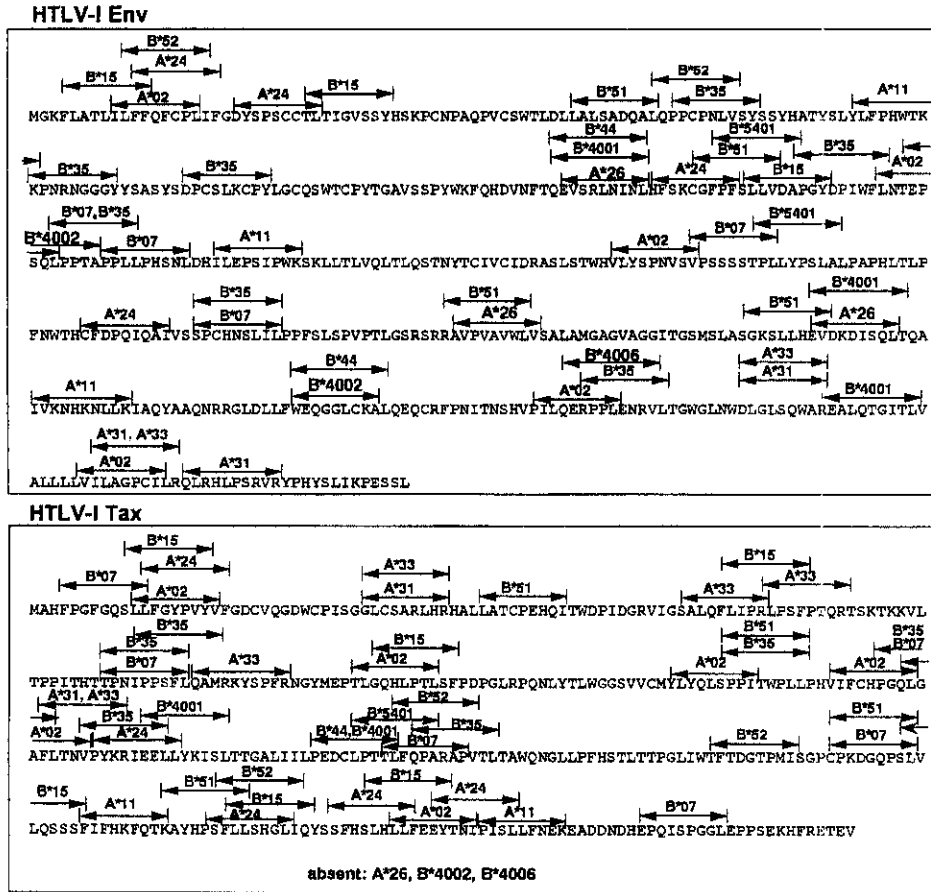


Fig.1 HLA class I alleles and the binding motifs of HTLV-I Env and Tax peptides

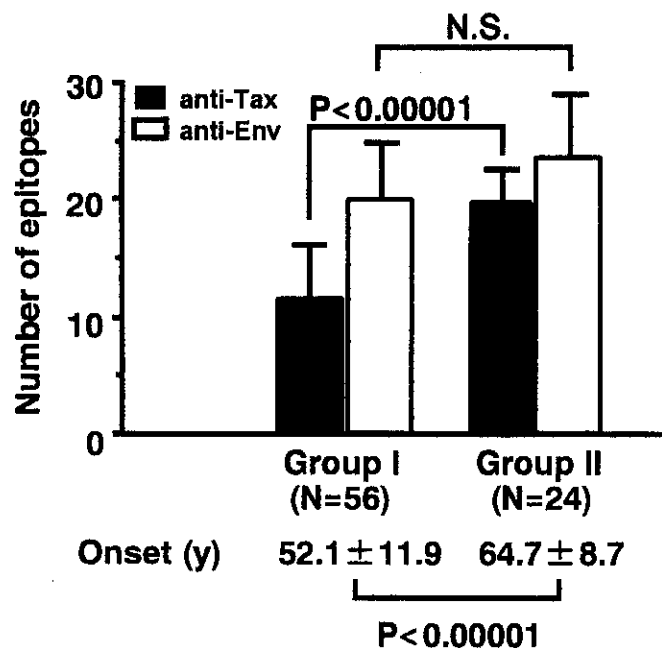


Fig. 2 Relationship between age of ATL onset and number of HTLV-I Tax and Env epitopes recognized by CD8⁺CTL. A total of 80 cases with ATL patients was divided into two groups, group I possessing HLA-A*26, B*4002, B*4006 and B*4801, and group II possessing other HLA alleles. The mean age of ATL onset in group I was 52.1 ± 11.9 years and 64.7 ± 8.7 years in group II. Number of HTLV-I Tax epitopes and Env epitopes recognized by respective HLA alleles was estimated as in Table 3. Group I shows significantly less number of Tax epitopes and 12.6 years earlier onset of ATL than group II (p<0.00001), but not of Env epitopes (p=0.091).

学会発表

- 1) 屋敷伸治、園田俊郎. ATLの発症リスクを規定する HLA class I と HTLV-I Tax ペプチド。第 58 回日本がん学会 広島、9 月.
- 2) 園田俊郎、屋敷伸治、李 洪川、藤吉利信 ATL のハイリスク HLA (HLA-A*26, B*4002, B*4006, B*4801) は HTLV-I Tax ペプチドを認識できない。第 47 回日本ウイルス学会 横浜、10 月.

末梢血中に出現する異常リンパ球の形態学的検討 —末梢血塗抹染色標本でHTLV-1キャリアがわかるか？—

協力研究者：野村紘一郎（鹿児島県立北薩病院院長）

【研究要旨】

HTLV-1キャリアを対象とする研究では、まず多くの非キャリアの中からキャリアを抽出することが必要な場合がある。この様なときにスクリーニングの目的で、一般人に対してHTLV-1抗体の検査を実施することは、倫理上の問題、効率性、費用の面などで困難なことが多い。この研究では日常臨床の場で行われている「末梢血白血球分類」を利用して、キャリアのスクリーニングを行う方法を検討した。

【研究目的】

HTLV-1キャリアの末梢血塗抹染色標本には、少数であるがATLに見られる特有な「核変形のある異常リンパ球」が出現する。この異常リンパ球の出現数および形態からATLとキャリア、非キャリアが区別できるかを検討した。

【研究方法】

1. 対象

県立北薩病院を受診した患者で、診療の目的でHTLV-1抗体および末梢血血液像を検査した患者の中から次のものを抽出した。

- (A) HTLV-1抗体陽性者（キャリア）30人
- (B) 同抗体陰性者（非キャリア）30人
- (C) ATL患者（当病院入院患者）10人

2. 方法

- (1) それぞれの対象の末梢血塗抹染色標本（メイ・グリュンワルド・ギムザ染色）で、リンパ球500個を数えた。
- (2) その中で核の形態異常を認めるリンパ球（異常リンパ球）の数を算定した。
さらに次に述べる異常リンパ球の「核の形態の分類」に従い算定した。
- (3) HTLV-1抗体の結果は、検者に知らせずに判定した。

3. 核の形態の分類（図1）

- (1) 異常リンパ球の核の形態を次の三つに分類した。
「くさび形変形」、「分葉型変形」、「不整型変形」

- (2) さらにそれぞれについて、変形の強さの程度で4段階に分類した。

4. 末梢血標本の鏡検でキャリアか否かを判定できるか？ について次の方法で試

みた。

- (1) 対象 (A) と (B)、計 60 人の標本を混ぜて並べておき、結果 1 - 5 で得られた所見を元にして「キャリア、非キャリア」の判定をした。検者には HTLV-1 抗体の結果を知らせずに行った。

【倫理面への配慮】

本研究で対象とした患者および検体は、県立北薩病院を受診し、診療の目的で HTLV-1 抗体および末梢血血液像を検査した患者である。すなわち HTLV-1 に関連する、何らかの血液学的異常を疑われて検査した患者であるので、倫理的な問題は生じない。

【研究結果】

1. ATL 群とキャリア群における異常リンパ球出現の違い (図 2) (表 1) 末梢血リンパ球 (500 個) 中の異常リンパ球の出現は、ATL 群では 17.0-94.0% (平均 55.2%)、キャリア群では 0.4-5.8% (平均 2.0%) であった。「分葉型核変形」の中の「花卉状核変形」は ATL 群だけに見られた。
2. キャリア群と非キャリア群 (表 2)
 - (1) 末梢血リンパ球 (500 個) の中に異常リンパ球の出現する頻度キャリア群の大部分で 1% より多く、非キャリア群では 1% 以下であった。
 - (2) 「くさび型核変形」の出現頻度と変形の程度 (表 3)
 - ① 「くさび型核変形」を示す異常リンパ球は、キャリア群では極めて多くの対象例 (90%) において認められた。しかし非キャリア群においても対象例の 2/3 (66.7%) に認められた。
 - ② キャリア群では、非キャリア群に比べて、「くさび型核変形」の程度のより強いもの (くさび型 IV 型) が多く認められた。
 - (3) 「分葉型核変形」の出現頻度と変形の程度 (表 4)
 - ① 「分葉型核変形」を示すリンパ球は、キャリア群においては大部分の対象例 (93.3%) に認められた。しかし非キャリア群においても約半数例 (53.3%) に認められた。
 - ② キャリア群では非キャリア群に比べて「分葉型核変形」の出現が著しい傾向があった。
 - ③ キャリア群で見られる「分葉型核変形」は、変形の比較的軽度のもの (I 型、II 型、III 型) が多かった。この傾向は非キャリア群でも同様であった。
 - ④ ATL に特徴的な核変形である「花卉状 (クローバー状) 核変形」 (分葉型 IV 型) はキャリア群、非キャリア群共にほとんど認められなかった。
 - (4) 「不整型核変形」の出現頻度と変形の程度 (表 5)

①「不整型核変形」はキャリア群、非キャリア群共に認められその型もⅠ型、Ⅱ型、Ⅲ型、Ⅳ型全てにわたっていた。

②「不整型核変形」はリンパ球の核の性質そのものの外に、採血から塗抹標本作製までの過程で受ける人工的操作の影響によって起こることも少なくないと思われる。例えば、採血から標本作製までの時間、温度、標本の厚み。塗抹時の乾燥不良など。

(5) キャリア群と非キャリア群の特徴 (まとめ) (表6)

両群の要点についてまとめた。

3. 鏡検によるキャリアの判別 (表7)

末梢血塗抹標本の鏡検で、HTLV-1 キャリアまたは非キャリアの判別が正しかったものは、対象60人中49例であった。(一致率81.7%)

【考察】

1. ATLとキャリアの違いについて

ATLとキャリアでは異常リンパ球の出現率に大きな差がある。キャリア群での出現率はリンパ球全体の約2% (最大5%) であるが、ATLでは10%以上である。

(臨床の場で見える「末梢血白血球分類」で、リンパ球の比率は通常20%から30%であるので、キャリアの場合、白血球分類上での異常リンパ球は1%内外である)。通常の臨床の場での「白血球分類」で5%以上異常リンパ球を認める場合は、ATL (低白血型またはくすぶり型) を考える必要がある。

2. キャリアと非キャリアについて

リンパ球中の異常リンパ球の出現頻度については1%を堺にして分かれる。また、核変形の程度もキャリア群に強い。とくに「分葉型核変形」はキャリア群に見られ、非キャリア群には少ないことが特徴である。

3. これらの知識と技術に習熟した検者では、一般の人の中から、約80%の一致率でキャリアを抽出できる。検体も日常行われる白血球分類用の血液染色標本を、そのまま利用できるため、多くの対象の中から、キャリアの可能性の高い人を抽出する方法として利用できる。

【結論】

1. ATLとHTLV-1 キャリアにおける異常リンパ球は、出現頻度と核変形の程度に差が認められた。

2. キャリア群と非キャリア群における異常リンパ球は、出現頻度、核変形の程度に違いが認められた。またキャリア群では「分葉型核変形」が認められることが特徴である。

3. これらの知識と技術に習熟していれば、末梢血染色標本で、キャリアか否かを判別することが出来る。

図1 異常リンパ球の「核の変形」の分類













核の変形	I型	II型	III型	IV型
「くさび型」				
「分葉型」				
「不整型」				

図2 「異常リンパ球」の出現頻度
(末梢血中リンパ球500個中)

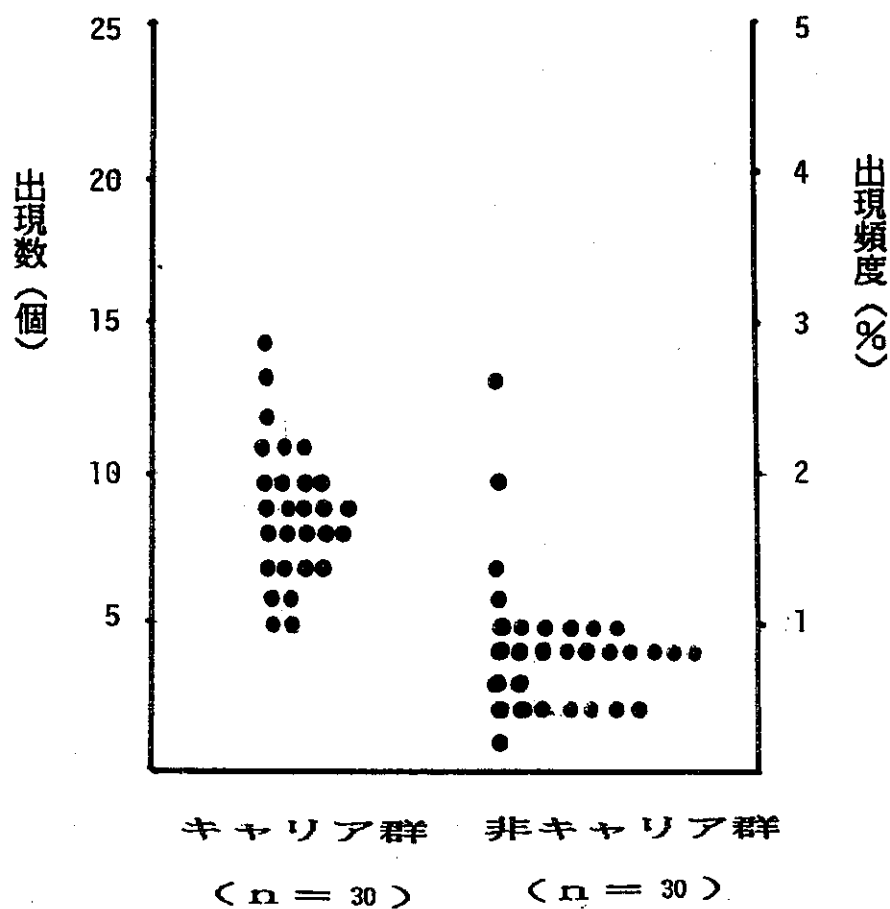


表 1 異常リンパ球の出現頻度

(末梢血染色標本)

	対象数	末梢血リンパ球500個中の 異常リンパ球 (%)		末梢血白血球分類中の 異常リンパ球 (%)	
		分布	平均	分布	平均
ATL	10	17.0-94.0	55.2	8.6-88.4	37.9
HTLV-1 キャリア	30	0.4-5.8	2.0	0.2-1.9	0.7
HTLV-1 非キャリア	30	0.2-0.6	0.4	0.07-0.3	0.09

表 2 「異常リンパ球」の出現頻度

異常リンパ球の数(頻度) [リンパ球500個中]	キャリア群	非キャリア群
	例数 (%)	例数 (%)
6個以上出現 (1%より以上)	28/30 (93.3)	4/30 (13.3)
5個以下出現 (1%以下)	2/30 (6.7)	26/30 (86.7)

表 3 「くさび型核変形」の出現頻度

	キャリア群	非キャリア群
出現症例数	27/30	20/30
%	90.0	66.7

表 4 「分葉型核変形」の出現頻度

	キャリア群	非キャリア群
出現症例数	28/30	16/30
%	93.3	53.3

表 5 「不整型核変形」の出現頻度

	キャリア群	非キャリア群
出現症例数	27/30	17/30
%	90.0	56.7

表 6 キャリア群と非キャリア群の特徴 (まとめ)

	キャリア	非キャリア
1. 異常リンパ球の出現率	1%より以上	1%以下
2. 「くさび型変形」の程度	強い	強くない
3. 「分葉型変形」の出現	多い	少ない
4. 総合的印象		

表 7 「異常リンパ球」による HTLV-1 キャリアの判別

	症例数	%
一致	49/60	81.7
不一致	11/60	18.3

成人T細胞白血病とヨーロッパの末梢性T細胞リンパ腫におけるG1/S移行期の転写因子の発現の超高感度免疫組織化学による比較検討

協力研究者：蓮井和久（鹿児島大学医学部病理学第2講座講師）

【研究要旨】

この研究は、超高感度免疫組織化学でG1/S移行期の転写因子の発現を、9例のATLLと9例のヨーロッパのT細胞性リンパ腫で比較した。更に、ATLLでは、HTLV-1 proviral DNA pX領域の関連蛋白であるp40Tax (Tax) とp27Rex (Rex) の発現とG1/S移行期の転写因子の発現の関係も検討した。ATLLでは、E2F転写因子の発現の亢進とその失活障害を伴う例と発現しない例を認めた。一方、EPTLは、cyclin Eを細胞質と核に高発現していた。この転写因子の発現の相違は、ATLLでのHTLV-1のTaxによる造腫瘍作用の結果がE2Fの発現の亢進と抑制に表現されていることを示唆した。また、4例のATLLではTaxの弱い発現を認め、そのTaxの発現と弱いcyclin Eの発現に相関があった。ATLLでは、強いRexの発現が認められ、ATLLでのHTLV-1関連細胞株よりも弱いTaxの発現を説明したが、更に、Rexの造腫瘍作用の研究の必要性も示唆された。

【研究目的】

成人T細胞白血病・リンパ腫(ATLL)は、human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) 関連蛋白p40Tax (Tax) により発病すると考えられている。Taxは、感染宿主T細胞の遺伝子をtransに活性化ないし抑制し、増殖シグナル伝達系の抑制遺伝子p53の転写やその蛋白の機能を阻害し、遺伝子異常を誘導し、細胞周期の紡錘糸形成に関与して細胞をpolyploid化する。これらのTaxの多彩な作用は近年の分子生物学的研究で解明されてきたのであるが、ATLL発病へのTaxの直接的な作用は何かの問題は未解決である。

一方、細胞周期の分子機序が明らかにされ、G1/S期移行期の転写因子の発現を高感度免疫組織化学で把握できるようになっている。この研究は、HTLV-1のTaxの諸作用により発病を誘導されているATLLと遺伝子レベルでの発癌の機序が明らかにされていないヨーロッパの末梢T細胞性リンパ腫(EPTL)を、このG1/S期移行期の転写因子であるE2F、DP-1とcyclin Eの発現を検出する高感度免疫組織化学で、比較したものである。また、ATLLでは、HTLV-1のTaxとp27Rex (Rex)の高感度免疫組織化学も実施して、これらの転写因子の発現とTaxとRexの発現に相関があるのか否かも検討した。

【材料と方法】

この研究には、9例の ATLL と9例の EPTL のホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いた。抗体は、抗 E2F 抗体 (E2F-1, E2F-4) と抗 cyclin E 抗体、抗 Tax 抗体 (WATM-1) と抗 Rex 抗体 (Rec-6) を用いた。切片は、脱パラフィン後に、citrate buffer pH 6.0 ないし 4M Urea 溶液での抗原回復前処理を行い、各抗体と 4°C 一晩で反応させ、反応した抗体を、TSA 法ないし ImmunoMax 法と DAB-H₂O₂ 反応で呈色させた。核のヘマトキシリンないしメチルグリーン染色後に、プラスチックで封入した。内因性 biotin のマスキングは行わなかった。これらの高感度免疫組織化学の陽性コントロールは、HTLV-1 関連細胞株 MT-2 のホルマリン固定パラフィン包埋セルブロック切片を用いて、上記の免疫染色を行ったものである。陰性コントロールは、抗体希釈液のみの反応を抗体反応として他の染色過程を同様に行ったものである。

【結果】

1) HTLV-1 関連細胞株 (MT-2) での検索 (陽性コントロールと評価の基準)

MT-2 細胞は、抗体を含まない抗体希釈液での陰性コントロール電飾では、極少量の endogenous biotin を含有細胞を少数含み、Tax と Rex の ImmunoMax 法による染色では、細胞質に、多量の Tax をと少量の Rex を発現していた。HTLV-1 関連蛋白の発現は、MT-2 細胞での Tax の発現を 3+、Rex の発現を 1+ として、評価した。

MT-2 細胞の多くは、E2F-4 を核に発現し、ほとんどの細胞は DP-1 を細胞質に強く、発現していた。しかし、MT-2 細胞には、cyclin E の発現を認めなかった。MT-2 での E2F と DP-1 の染色結果を基準に、ATLL と EPTL での転写因子の発現を評価した。

2) ATLL における HTLV-1 関連蛋白 Tax と Rex、E2F、DP-1 と Cyclin E の発現

ATLL での Tax の発現は、4例が 1+、3例が +/- で、2例が - であった。Rex の発現は、ATLL の全例で、MT-2 細胞より強い発現が認められ、一部の ATLL 細胞は核内に Rex を示した。ATLL 4例の多くの ATLL 細胞は、E2F-1 あるいは E2F-4 を核に発現していた。ATLL の9例で DP-1 の細胞質発現が認められた。DP-1 の発現は、1例で +/- であったが、他の例では 2+ 以上の強い発現であった。ATLL の8例で、cyclin E の発現が認められた。7例では少数の ATLL 細胞の核に cyclin E の発現は認められた。1例では、少数の ATLL 細胞の核と細胞質に cyclin E の発現が認められた。HTLV-1 関連蛋白 Tax の 1+ の発現している例では、少数の ATLL 細胞は核内に 2+ の cyclin E の発現を示した。

3) EPTL における E2F、DP-1 と Cyclin E の発現

EPTL における E2F の発現は、3例で E2F-1 あるいは E2F-4 の発現が認められ、5例で E2F-1 と E2F-4 の発現が認められた。EPTL での E2F の発現は、1例で多くのリンパ腫細胞が強く核に発現を示したが、その他の例では少数のリンパ腫細胞が E2F

の核内発現を示すのみであった。

EPTLでのDP-1の発現は、E2F-1とE2F-4を強く核に発現した1例では核と細胞質に2+の、その他は細胞質に2+以上の発現が認められた。cyclin Eの発現は、1例では細胞質のみに、その他の例では細胞質と核に例が1+、2例が2+、4例が3+の強いものであった。

【考察】

E2F、DP-1とcyclin Eは、細胞周期のG1/S移行期の転写因子である。E2FとDP-1の複合体はretinoblastoma (Rb) 蛋白と結合し、増殖シグナルの伝達に伴い、Rb蛋白が分離し、核に移行して機能する。S期に細胞周期が進行すると、E2F-DP-1複合体は失活する。一方、cyclin Eは、cdc2と複合体を形成し、増殖・癌遺伝子の活性化のシグナルに呼応して、核に移行し、DNA複製開始複合体に作用する。このATLLとEPTLでのこれらの転写因子の発現の高感度免疫組織化学的検出による比較で、1) E2Fの発現は、ATLLでは失活障害を伴う核内強発現か抑制であるのに対して、EPTLでは1例を除くと発現が低くE2F-1とE2F-4の両分子の発現が認められ、2) DP-1の発現は、1例のEPTLを除くと細胞質に発現を認め、ATLLよりEPTLにより強い発現が認められ、3) cyclin Eの発現では、ATLLでは少数のATLL細胞の核に低い発現であったのに対して、EPTLでは細胞質と核に強い発現が認められた。これらのATLLとEPTLでのG1/S移行期の転写因子の発現の相違は、ATLLとEPTLでの増殖シグナルの発生と伝達の違いを示唆している。また、EPTLのE2F、DP-1とcyclin Eの強い発現を示した例はEPTLでの例外の例であると考えられた。

ATLLは、HTLV-1関連蛋白の一つであるTaxによる発癌が示唆されているが、このTaxの諸作用でATLL細胞やHTLV-1感染細胞の増殖に関係するものには、interleukin 2 (IL2)の発現、IL2 receptor (IL2R)の発現、Fos癌・増殖遺伝子の活性化等が明らかにされている一方、増殖シグナルを抑制するp53蛋白の機能や転写障害、Rb蛋白からのE2F-DP-1複合体の乖離を抑制している因子の作用障害や産生障害等も報告されている。この研究が明らかにしたATLLにおけるMT-2よりも低いTaxの発現とE2Fの失活障害を伴う核内過剰発現と抑制は、IL2とIL2Rによるautocrineないしparacrine的なTaxによって誘導された増殖シグナルの過剰状態が増殖シグナル伝達の最終段階であるE2F-DP-1複合体の核内発現の過剰発現ないし荒廃を誘導していることを示唆した。一方、1+のTaxを発現するATLLで、cyclin Eの2+の核内発現が少数のATLL細胞で認められことは、低く発現したTaxはATLL細胞のcyclin Eの発現を誘導していることを示唆した。

【共同研究者】

(佐藤榮一¹、花田修一²、Hansmann ML³、屋敷伸治⁴、出雲周二⁵、園田俊郎⁴、納光弘⁶；¹鹿児島大学医学部病理学第2、²国立南九州病院、³フランクフルト大学病理学、⁴鹿児島大学医学部ウイルス

学、⁵同難治性ウイルス疾患研究センター分子病理・遺伝子疫学、⁶同内科学第3)

【研究発表】

論文発表

- 1) 蓮井和久、佐藤榮一、田中勇悦、屋敷伸治、質心善、出雲周二. HTLV-1 関連疾患病変に於ける HTLV-1 proviral DNA とそのシグナル mRNA や関連蛋白を検出する組織化学の現状. 日本リンパ網内系学会誌 39 (1) : 33-43, 1999
- 2) 蓮井和久、佐藤榮一、東美智代、高城千彰、末吉和宣、中村敬夫、田中貞夫. HTLV-1 と消化管病変, 胃と腸 34(7): 873-881, 1999
- 3) Kazuhisa Hasui, Eiichi Sato, Michiyo Higashi, Michiko Horinouchi, Shuichi Hanada, Shinji Yashiki, Shuji Izumo, Shunro Sonoda, Mitsuhiro Osame. Expression of E2F Transcription Factors in Adult T-cell Leukemia/Lymphoma cells in vivo; A Highly Sensitive Immunohistochemical Study. Lymphoreticular Cells and Diseases. Proceedings of the Sixth Japanese-Korean Lymphoreticular Workshop, Akagi T, Ree HJ eds. Lymphoreticular Study Group, Department of Pathology, Okayama University Medical School, Okayama, Japan, March 1999, p89-101

学会発表

- 1) Kazuhisa Hasui, Michiyo Higashi, Eiichi Sato, Shuichi Hanada, Shinji Yashiki, Shuji Izumo. A HIGHLY-SENSITIVE IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF E2F TRANSCRIPTION FACTORS (E2F) EXPRESSION IN ADULT T-CELL LEUKEMIA/ LYMPHOMA (ATLL). The Sixth Japanese-Korean Lymphoreticular Workshop 1999.3, Kurashiki, Japan
- 2) Hasui K, Higashi M, Sato E, Hanada S, Yashiki S, Izumo S. Expression of E2F Transcription Factors (E2F) in Adult T-cell Leukemia/Lymphoma (ATLL): A highly sensitive immunohistochemistry, The Ninth International Conference on Human Retrovirology: HTLV-1, 1999.4, Kagoshima, Japan
- 3) 蓮井和久、東美智代、高城千彰、迫田晃子、佐藤榮一、花田修一、屋敷伸治、出雲周二、園田俊郎、納光弘. 成人 T 細胞白血病ないしリンパ腫 (ATLL) に於ける E2F 転写調節因子の発現の高感度免疫組織化学による検討, 日本リンパ網内系学会 (1999.5)、名古屋
- 4) 蓮井和久、佐藤榮一、屋敷伸治、園田俊郎、納光弘. 成人 T 細胞白血病・リンパ腫 (ATLL) 腫瘍細胞に於ける E2F 転写調節因子の発現の高感度免疫組織化学による検討, 日本癌学会 (1999.9)、広島
- 5) Hasui K, Sato E, Kitazono M, Akiyama S, Tanaka Y, Higashi M, Taki C, Sakoda A, Tashiro Y, Shirahama H. Immunohistochemical analysis of thymidine phosphorylase overexpression in malignant lymphomas (ML), especially in adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL). DENDRITIC CELLS 9:15-25, 1999

ATL 細胞に発現されるカドヘリンの活性制御機構に関する研究

研究協力者：小澤 政之（鹿児島大学医学部第二生化学講座教授）

【研究要旨】

我々はこれまで ATL 細胞の細胞表面に N-カドヘリンが発現していることを明らかにした。そして、この発現が同細胞の示す皮膚浸潤あるいは神経系への浸潤に関与している可能性を指摘した。今回、ALT 細胞上に発現される N-カドヘリンの活性制御機構を知る目的で実験を行い、カテニンのひとつ p120 がカドヘリンの細胞接着活性の負の制御因子であることを明らかにした。

【研究目的】

カドヘリンの活性がどのようにして制御されているかを明らかにすることは、ATL 細胞と周りの細胞との接着の成り立ちを考える上で重要である。そこで、各種変異カドヘリンを細胞上に発現させ、それがどのように制御されるかを検討した。

【研究方法】

- 1) 変異カドヘリンの発現ベクターの作製：適当な制限酵素、あるいは PCR 反応により行った。
- 2) 発現細胞の確立：リン酸カルシウム法にて細胞にベクターを導入後、G418 耐性細胞を単離し、それぞれのクローンのカドヘリン発現を抗体を用いた蛍光染色により行った。
- 3) カドヘリン活性の測定：通常の aggregation assay を用いて行った。
- 4) カドヘリンに結合している p120 の解析：カドヘリン抗体による免疫沈降反応物を SDS-PAGE 後、p120 に対する抗体による免疫ブロット法により行った。

【研究結果】

カドヘリンの細胞質ドメインは約 150 アミノ酸残基からなるが、C 末端側 70 残基を除去すると細胞接着活性がなくなる。これは β -カテニンがカドヘリンに結合出来なくなる結果、 α -カテニン、ひいてはアクチン骨格系と結合出来なくなるためであると考えられてきた。ところが、さらに細胞質ドメインを短くしていき、7 残基あるいは全く細胞質ドメインを持たないカドヘリンは細胞接着活性を有することが判明した。このことは、細胞質ドメインの N 末端側の部位に細胞内の分子が結合し、カドヘリンの活性を抑えていることを示唆していた。そこで、この部位に結合する細胞内分子の探索を行い、p120 を同定した。確かに p120 がカドヘリン活性の抑制因子であることは、p120 の結合部位を上記カドヘリンより除去すると活性が現れてくる