

うこともできるからである。しかし、最初から夫婦に結果を伝えることは避けなければならない。

HTLV-Iは、日本で108万人のキャリアがいて、決して稀なウイルスでないこと、キャリアからATLやHAMなどを発症するリスクがあることを説明する。なお、ATLの発症は40歳を過ぎてから年間キャリア1,000人に1人の割合で、HAMは30~50歳の発症が多く年間キャリア3万人に1人の割合で発症することを説明した後、母子感染防止のために人工栄養、満3カ月までの短期母乳、凍結母乳の三つの方法があることを説明する。人工乳のメリットは、現在のところ最も確実な感染予防法であると証明されていることである。しかし直接、自分の乳房から哺乳させることができず、精神的な満足度が得られにくいこと、母乳中に含まれる免疫グロブリン(IgA)の補供ができないこと等である。満3カ月までの短期母乳はメリットも多いが、2カ月頃から混合栄養に切り換え、徐々に人工乳を多くしていかないと、3カ月に急に母乳哺育を中止することは現実的に困難であり、結果的には長期母乳となってしまうことがある。この点が最大の欠点である。凍結母乳は母乳の栄養素を確保でき、感染リンパ球を死滅させることができ、メリットがあるが、手間がかかるのがデメリットであり、多くは3カ月頃に人工乳に自然に移行する。十分に説明した上で、できれば夫婦で栄養法を選択してほしい。人工乳を選択すれば、分娩後48時間以内にカバーサル錠1mg 1回内服、もしくはパーロデル錠2.5mg 2錠分2、10日間内服か、テルロン0.5mg 2錠分2、10日間の服用を行う。

キャリアに関する情報は厳格に秘密を守る必要があり、また家族に知られると家庭内問題を引き起こす場合があるので注意が必要である。病院内のスタッフは、家族の誰と誰が知っているかを把握しておく必要がある。

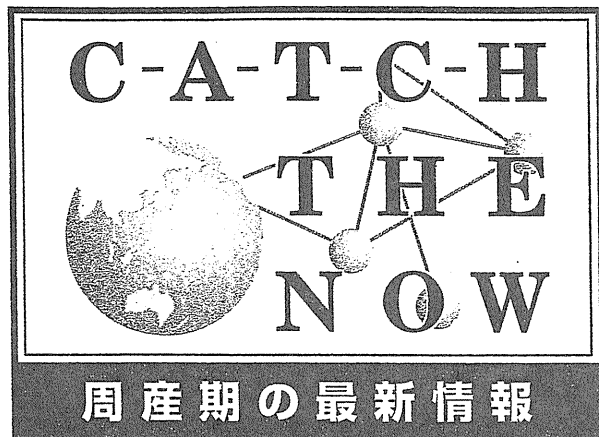
おわりに

すでに産婦人科診療ガイドラインでは妊婦に対するHTLV-Iスクリーニング検査の推奨レベルがAとなっており、スクリーニング陽性であった場合、必ずウエスタンブロット法を行う(推奨レベルA)とされている。これらのことを十分に遵守していただきたい。またHBVやHCVなどのように、十分な予防措置があるにもかかわらず、それを怠り感染が成立した場合、大きな問題となり、その責任を問われることになる。厚生労働省はすでにHTLV-I母子感染に関する情報の提供について各自治体に通知している。そのため、十分な対策をとらなかった場合、産科診療施設がその責任を問われることになる。十分に留意していただきたい。

文献

- 1) 研究代表者山口一成：山口班厚生労働省研究 厚生労働科学研究費補助金新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業 本邦におけるHTLV-1感染及び関連疾患の実態調査と総合対策 平成21年度総括研究報告書、2010
- 2) 研究代表者齋藤 滋：齋藤班厚生労働省研究 厚生労働科学研究費補助金厚生労働科学特別研究事業 HTLV-Iの母子感染予防に関する研究班 平成21年度総括研究報告書、2010

* * *



はじめに

これまで九州・沖縄など、ごく一部の地域で行われてきた HTLV-I 母子感染対策が、2011 年から全国で行われるようになった。2011 年度からは全国の都道府県で HTLV-I 母子感染対策協議会が設置される予定で、各地域での保健指導およびカウンセリング体制の検討、市町村職員などへの研修、HTLV-I 母子感染対策に関する普及啓発が行われることになっている。この中で保健所、女性健康支援センターでは授乳に関する指導、助言や不安や悩みのカウンセリングを担当し、産婦人科医療機関では、妊婦の HTLV-I 抗体スクリーニング、確認検査の実施、結果の説明の後に授乳に関する指導、助言を行うことになっている¹⁾。HTLV-I は後述するように成人 T 細胞白血病 (ATL) や HTLV-I 関連脊髄症 (HAM) などの難治性の疾患を、キャリアのごく一部に引き起こすが、母乳を介して母子感染することが知られている^{2, 3)}。母子感染を防ぐために母乳を制限することを指導するが、従来のように断乳の上、人工乳で育てる方法以外に、母乳を搾乳していった

2011 年から全妊婦に対して妊婦健診で HTLV-I 抗体検査が行われるようになった。今後、キャリア減少を目指して取っていくべき方策と、キャリア妊婦へのかかり方など、母子感染対策のために産科スタッフが知っておきたい知識を解説する。

HTLV-I 母子感染対策のために助産師が知っておきたい知識

齋藤 滋

富山大学医学部産科婦人科教授

ん凍らせてから、解凍して哺乳瓶で与える凍結母乳法⁴⁾、3 カ月までの短期母乳も母子感染を減少させることが分かっている⁵⁾。臨床現場で HTLV-I キャリア妊婦に母乳哺育法を直接指導する立場にある助産師や看護師にも、HTLV-I の知識は必須事項となっており、また不安や悩みのカウンセリングにも対応することが今後増してくると思われる。本稿では HTLV-I 母子感染について概説する。



HTLV-I について

1981 年に京都大学の日沼頼夫らにより、成人 T 細胞白血病 (ATL) の原因ウイルスとして HTLV-I が発見された⁶⁾。このウイルスは CD4 陽性の T 細胞に感染し、いったん感染すると、生涯にわたりウイルスを持ち続ける (キャリアという)。HTLV-I キャリアは 1990 年ごろは 120 万人と推定され、九州・沖縄にキャリアの大半が居住していた⁷⁾。その後、2006 年、2007 年の全国調査 (厚生労働研究: 山口班) で、キャリア数は 108 万人と少し減少したが、キャリアの居住地が九州・沖縄から、全国に拡散していることが明らかとなった (表 1)⁸⁾。重要なことと

表1 HTLV-I キャリア推定数 (献血者からの陽性率から推定)

地域	1990年		2006年, 2007年	
	キャリア数	キャリア地域別 (%)	キャリア数	キャリア地域別 (%)
北海道・東北	108,000	9.1	74,753	6.9
関東 (東京)	128,300	10.8	190,609	17.7
北陸・東海	82,100	6.9	81,802	7.6
近畿	202,300	17.0	171,843	15.9
中国・四国	65,000	5.4	67,133	6.2
九州・沖縄	607,300	50.9	492,582	45.7
全国	1,193,000	100.0	1,078,722	100.0

平成2年度厚生省成人T細胞白血病(ATL)の母子感染防止に関する研究(重松班)、平成20年度厚生省研究本邦におけるHTLV-I感染及び関連疾患の実態調査と総合対策(山口班)のデータを一部改変

して、HTLV-I キャリアのすべてがATLやHAMを発症するのではなく、ATLだと40歳を過ぎたころから毎年キャリア1,000人に1人くらいの発病(生涯発病率は約5%)、HAMでは生涯発病率は0.25%と低率であることを認識する必要がある。HTLV-I ウイルスの感染を家系調査したところ、家族内集積が認められ、母親がキャリアであれば高率に子どもに感染することが知られていた⁹⁾。その後の詳細な疫学調査、基礎研究により、HTLV-Iは母乳を介して子どもに感染することが判明した。そのほかの感染ルートとして、輸血感染、性行為を介した夫婦間感染があるが、輸血感染に関しては、1986年より献血時に感染症スクリーニングを行っているため、現在は皆無である。ATLの発病には、感染してから数十年を要することから(平均発症年数は58歳である)、ATL患者のすべては母子感染例である。従ってATLを撲滅するためには母子感染対策が極めて重要になる。

国はこれらのことを受け、HTLV-Iを地方の風土病ではなく、全国に広がるウイルスとして認め、母

子感染を防ぐために、妊婦に対するHTLV-I抗体検査を2010年度より公費負担とし、各都道府県にHTLV-I母子感染対策協議会を設置し、スムーズに母子感染対策が行われるように、各都道府県に働き掛けた。



母乳を介した母子感染

HTLV-IはCD4陽性Tリンパ球(免疫を司るリンパ球)の中に潜んでおり、血漿中には存在しない。感染したリンパ球が、非感染リンパ球と接触することにより感染が生じる(図1)。感染は生きたリンパ球同士でないと起こらないので、いったん母乳を凍らせると母乳中のリンパ球は死んでしまうため、感染が起こらなくなる。また母体血中には感染を中和する抗体が存在する。これらの抗体(IgG, IgM, IgA, IgE)の中のIgG抗体は、胎盤を通過して胎児に移行するため、胎児は生まれた際、母体と同量の感染中和抗体を持っている。母体由来の感染中和抗体の半減期は1カ月であるため、出生後3カ月ま

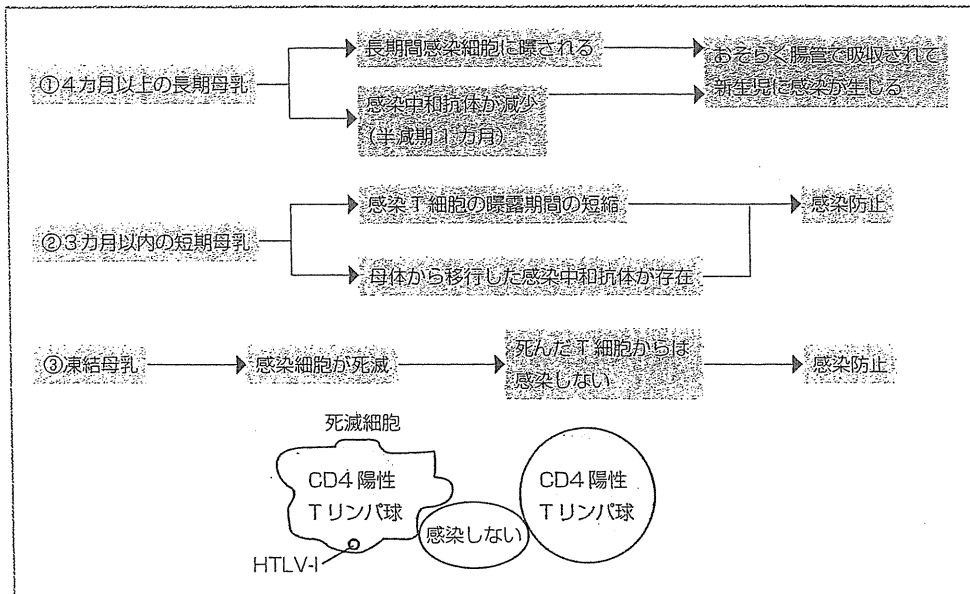


図1 HTLV-I 感染様式

では感染中和抗体は、少なくとも8分の1以上存在する。3カ月までの短期授乳だと、感染曝露期間も短くなり、中和抗体も存在するため母子感染が生じにくい(図1)。

表2に1990年までのHTLV-I母子感染率のデータと1990年以降のデータを示す⁵⁾。1990年ごろまでは、HTLV-I母子感染防止のためには、人工哺育の選択肢しかなかったが、人工乳では母乳哺育に比べて母子感染率が明らかに減少している。1990年以降は、凍結母乳、3カ月までの短期母乳でも十分に人工乳と同程度の母子感染防止効果があることが判明した⁵⁾。このため2011年発刊の『産婦人科診療ガイドライン 産科編2011』では人工哺育、凍結母乳、3カ月までの短期母乳のいずれかを勧めている¹⁰⁾。しかし、一方的に勧めるのではなく、妊婦の意思を尊重する。母子感染のリスクを承知で強

く母乳哺育を希望する際は、妊婦の希望に添うように対応する。



完全人工栄養、3カ月までの短期母乳、凍結解凍母乳法のメリットとデメリット

HTLV-Iキャリア妊婦ならびに夫に、上記3つの栄養法を提示した際、必ず各栄養法のメリットとデメリットを質問される。

人工栄養は、感染したリンパ球を子どもが飲むことがなく、これまでに1,500例以上のデータがあり、最も確実に母子感染を防ぐことが証明されている方法である。しかし、約3%に母子感染以外の感染ルートが見られたことから、完全には母子感染を予防できない。また、母子間の母乳哺育を介したスキンシップ、愛情形成が不十分となるデメリットがある。そのほか、母乳中に含まれるIgA抗体が補給され

表 2 HTLV-I 母子感染率

〈1990 年まで〉	
・母乳哺育	: 103/788 (13.1%)
・人工哺育	: 36/953 (3.8%)
〈1990 年以降〉	
・母乳哺育	
4 カ月以上	: 93/525 (17.7%)
3 カ月以下	: 3/162 (1.9%)
・人工哺育	: 51/1,553 (3.3%)
・凍結母乳	: 2/64 (3.1%)

ないデメリットもある。人工乳の際は、しっかりと子どもを抱きしめ、目を見つめるようにして哺乳するように指導してほしい。また、母乳をあげたいのに母乳をやめたお母さんのその気持ちは、子どもに対する強い愛情であることをカウンセリングしていただきたい。筆者の経験では、人工乳哺育を行ったために母子関係がうまく形成されなかったということはない。

凍結解凍母乳哺育では、まず搾乳を行い、母乳パックに母乳を移してから、1 晩から 1 日間、家庭用冷凍庫（- 18 度）で母乳を凍らせる。凍結することで感染リンパ球は死滅し、感染性が消失するので、しっかりと凍っていることを確認する。その後、ぬるま湯（37 度前後）で解凍し、母乳が人肌の温度になるまで温めて哺乳瓶で哺乳させる。栄養学的には母乳と全く同じなので、IgA 抗体も補給される上に、3 カ月以上の長期母乳も可能である。ただし手間がかかることと、直接母乳を与えることができないという不満感はある。しかし、この方法は理論的にも妥当性があり、母乳の持つ栄養成分を損なわずに栄養できるので、もう少し普及してもよい方法と思われる。

3 カ月までの短期母乳は人工乳と同等の感染予防効果を有し、かつ直接自分の乳房から哺乳できるため、母親の満足感も高く、母子間愛情形成にも有利に働く。ただし、症例数が少ないことと、途中で母乳哺育をやめられずズルズルと長期母乳になるケースが散見されることがある。2 カ月の終わりごろ、もしくは 3 カ月に入ったころより徐々に粉ミルクと母乳の混合栄養にしていき、3 カ月末には母乳から人工乳に切り替えることが重要である。また 3 カ月まで母乳を与えた場合、薬剤で母乳分泌を止めることは難しい。そのため、しばらくは乳房緊満は続くが、乳房を冷やしたりして対応する。4 カ月目から凍結母乳に切り替えることは可能かと質問されることがあるが、この点にはいまだエビデンスはない。おそらく感染のリスクは増加しないと思うが、実行される場合は、いまだエビデンスにはなっていないと説明した上で、行っていただきたい。



HTLV-I キャリアと説明した後の対応

図 2 に示すように、妊娠 30 週ごろまでに HTLV-I 抗体スクリーニング法を公費で行う。陽性となった場合、偽陽性である可能性があるため、必ず確認検査が必要であると説明した上で、ウエスタンブロット（WB）法を保険診療で行う⁵⁾。九州・沖縄などの一部の地域を除いては、一次検査で陽性となった症例の 20～30%のみが、真の陽性（キャリア）である。そのため一次検査の結果のみでキャリアと判断せず、必ず WB 法を行い、陽性であれば、その時点でキャリアと説明し、十分な時間とって対応、説明する^{5, 10)}。WB 法陰性の場合、母乳哺育を勧める。ただし、WB 法で 10～20%に

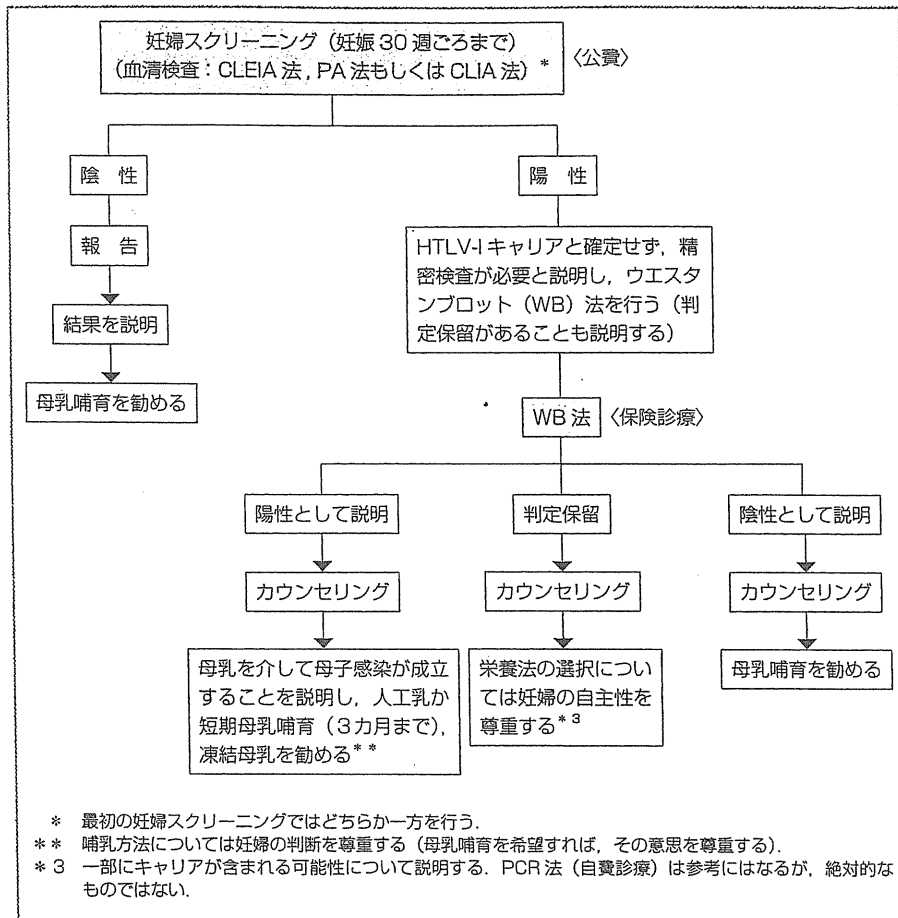


図 2 HTLV-I スクリーニングの進め方

判定保留となるケースがある。このような場合、自費診療となるが PCR 法で精査することも可能である⁵⁾。しかし、高価な検査であるため、厚生労働研究：板橋班、浜口班が検査会社と協力して無償で判定保留例に PCR 法を行い、その結果を伝える事業を始めたので、これを利用いただきたい。余ったサンプルで、PCR 法の評価を 7カ所の施設で行い、将来 HTLV-I PCR 法が保険適用される際の試料とさせていただく。また血漿は判定保留の少ない WB 法の確立に役立てる計画である。



典型的な HTLV-I キャリア

表 3 に示すように、まず自分が HTLV-I キャリアであることに大きなショックを受ける。HTLV-I キャリアのすべてが ATL, HAM になるのではなく、40 歳を過ぎてからキャリア 1,000 人に 1 人の割合で発症する（喫煙による肺癌の発癌の半分程度）と話し、無用の心配をしないよう説明するが、この際、カウンセリングが必要なこともある。

表3 典型的なキャリア例

1. HTLV-Iキャリアであることを知り、大きなショックを受ける。
2. 母子感染予防法があることを知り、子どもには感染させたくないと言え。
3. 夫、家族に結果を知らせるべきか悩む。
4. 夫と相談し、母乳栄養法について決定する。
5. 自分自身のATL、HAMのことで不安になる。

※1～5の間、カウンセリングが必要なことがある。

次に、子どもにHTLV-Iを感染させることを減らす方法があると説明すると、ほぼすべてのキャリア妊婦は、自分の子どもには感染させたくないと言え。このときは、分かりやすく人工乳、凍結母乳、3カ月までの短期母乳について説明する。

次に必ず、自分がHTLV-Iキャリアであることを夫や家族に伝えるべきか悩む。本人の悩みは深刻なので、医療者側からアドバイスをするとよい。夫婦の状況によって変わらと思うが、可能であれば夫には相談したほうがよいと考える。その理由は、HTLV-Iは「親の意思」によって防ぐことが可能な感染症であり、子どもの将来を決定するためには、2人で相談したほうがよいからである。またキャリアである妊婦を支えてくれるのは夫であるからである。しかし、そのほかの家族にキャリアであることを伝える必要は原則的にはなく、またメリットも特別の場合を除いてない。

その後、夫と本人とに対して3つの授乳方法を説明し、いずれかの授乳方法を選択した際は、助産師・看護師は母乳外来などで対応することになる。人工乳を選択した場合は、目の前でほかの患者に乳房管理の指導を行うことは避けるなど、配慮していただきたい。場合によっては相談にも乗ってほしい。凍結母乳もしくは短期母乳を選択した場合は、積極的

に母乳外来などで出産前の乳房管理に努めてほしい。凍結母乳を選択した場合は、搾乳の方法や母乳パックなどの情報を提供していただきたい。3カ月までの短期授乳を選択された場合、2カ月末から3カ月に入った時点で、徐々に粉ミルクに切り替えていく方法を提示していただきたい。

またいったん、授乳法を決めたが、その後に気持ちが揺らぐこともあるので、その際も時間を取って、本人が納得するまで十分に相談に乗ってあげてほしい。

最後にキャリア妊婦は「自分がこの先どうなるのか?」ということで必ず悩む。分娩後もしくは40歳以降になってから、2011年度に全国で設置される予定となっている「HTLV-Iキャリア外来」を紹介して、専門的な話をしてもらうことを勧めていただきたい。種々の不安を解消した上で、お産に臨み、その後の育児もスムーズにいくよう支援していただきたい。また出産後の赤ちゃんは小児科でフォローしてもらい、3歳時の採血で感染の有無が分かることも説明してほしい。小児科外来でも看護師は育児に関する種々の悩みや質問を受けると思うので、その際も丁寧な説明をお願いしたい。



おわりに

国が本格的にHTLV-I撲滅に向けて動き出した。この中で母子感染予防対策は、最重要課題である。全国で毎年約3,000人の妊婦が突然、HTLV-Iキャリアであると告げられることになるが、十分な説明の上で、医師、助産師、看護師が協力し合って、HTLV-I母子感染が減少し、かつキャリアの健康が維持されることを望む。



◆参考文献◆

- 1) HTLV-I 母子感染予防対策保健指導マニュアル. 平成 22 年度厚生労働科学特別研究事業「ヒト T 細胞白血病ウイルス-I 型 (HTLV-I) 母子感染予防のための保健指導の標準化に関する研究」. 研究代表者: 森内浩幸.
- 2) Nakano, S. et al. Search for possible routes of vertical and horizontal transmission of adult T-cell leukemia virus. *Gann*. 75 (12), 1984, 1044-5.
- 3) Yamanouchi, K. et al. Oral transmission of human T-cell leukemia virus type-I into a common marmoset (*Callithrix jacchus*) as an experimental model for milk-borne transmission. *Jpn. J. Cancer Res.* 76 (6), 1985, 481-7.
- 4) Ando, Y. et al. Long-term serological outcome of infants who received frozen-thawed milk from human T-lymphotropic virus type-I positive mothers. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 30 (6), 2004, 436-8.
- 5) 厚生労働科学特別事業: HTLV-I の母子感染予防に関する研究. 平成 21 年度報告書. 研究代表者: 齋藤 滋.
- 6) Hinuma, Y. et al. Adult T-cell leukemia: antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78 (10), 1981, 6476-80.
- 7) 厚生省心身障害研究. 成人 T 細胞白血病 (ATL) の母子感染防止に関する研究班. 平成 2 年度報告書. 主任研究者: 重松逸造.
- 8) 厚生労働科学補助金: 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業. 本邦における HTLV-I 感染及び関連疾患の実態調査と総合対策. 平成 20 ~ 22 年度総合研究報告書. 研究代表者: 山口一成.
- 9) Tajima, K. et al. Epidemiological analysis of the distribution of antibody to adult T-cell leukemia-virus-associated antigen: possible horizontal transmission of adult T-cell leukemia virus. *Gann*. 73 (6), 1982, 893-901.
- 10) 日本産科婦人科学会/日本産婦人科医会編. "CQ612: 妊娠中に HTLV-I 抗体陽性が判明した場合は?". 産婦人科診療ガイドライン 産科編 2011. 東京, 日本産婦人科学会, 2011, 270-2.

HIV 感染と HTLV 感染

-2つのレトロウイルス母子感染の比較

MORIUCHI MASAKO / MORIUCHI HIROYUKI

森内昌子/森内浩幸

◎長崎大学大学院医歯薬学総合研究科感染症病態制御学

要旨 HIV-1とHTLV-Iには多くの共通点があるが、我が国における疫学状況や対応策には少なからぬ相違点や問題点がある。この両者を比較しながら概説することで理解を深め、最近全国的に開始されたHTLV-I母子感染予防対策の問題点をまとめた。

はじめに

ヒトT細胞白血病ウイルスI型(HTLV-I)とヒト免疫不全ウイルス1型(HIV-1)は、どちらもレトロウイルスの仲間であり、重大な疾患を引き起こすことや感染経路が似ているなどの共通点がある。この稿では、両者の類似点と相違点を示しながら、現在の我が国における母子保健の中でどのような重要性を持っているのかを概説する。

■ウイルス学的比較(表1)

HTLV-Iは最初に発見されたヒトレトロウイルスであり、レトロウイルス科デルタレトロウイルス属の代表的ウイルスである。一方、HIV-1は発見当初HTLV-IIIと命名されるくらいに類似した構造を有するが、レンチウイルス属のレトロウイルスである。どちらもレトロウイルスの中では複雑なゲノム構造を持っていて、根幹となるgag(ウイルス粒子のカプシド構造を構築する蛋白質)、pol(逆転写酵素)、env(膜蛋白質)以外にも様々な遺伝子産物がコードされている。

レトロウイルスに共通の生活環、つまり細胞に感染後、自らのRNAゲノムを逆転写酵素で2本

鎖DNAに変換し、細胞ゲノムの中に入り込み、その一部と化して転写・翻訳の流れに乗って自分自身を複製していくところは、HTLV-IもHIV-1も同様である。しかし、HIV-1がフリーのウイルス粒子として細胞外に発芽していくのに対し、HTLV-Iは基本的に細胞に強く依存してフリーのウイルス粒子として出ていくことは少ない。ここが両者の感染性の違いにもなっている。

■疫学的比較(表1)

HIV-1の起源はアフリカであり、チンパンジーのウイルスであるSIVcpzからヒトに伝播したのは19世紀末か20世紀初めではないかと見られている¹⁾。その後は急速に世界中に広がっていったが、主たる流行地はサハラ砂漠以南アフリカや南・東南アジアである。2009年の時点で世界のHIV-1キャリアは3300万人に及ぶが、年間180万人近くがエイズで亡くなっていて、累積のキャリア数は6000万人、累積の死亡者は3000万人と想定されている²⁾。幸い日本にはまだキャリアは多くなく、2010年の報告ではHIV感染者は全国で1,544人(未発症キャリア1,075人、エイ

表1 HTLV-I と HIV-1 の比較 (その1)

	HTLV-I	HIV-1
ウイルス分類	レトロウイルス科デルタレトロウイルス属	レトロウイルス科レンチウイルス属
起源 (ヒトへの伝播)	多源性? (数万年以上前?)	アフリカ (19世紀末~20世紀初め?)
類縁ウイルス (その宿主)	STLV-I (各種霊長類)	SIVcpz (チンパンジー)
流行地	日本, カリブ海沿岸, 中央・西アフリカ等に限定	全世界 (特にサハラ砂漠以南のアフリカ, 南・東南アジア等)
キャリア数 (日本国内)	3000万人以上? (108万人)	3330万人 (1,544人)
感染経路	母子感染 性行為感染 (主に男→女) IVDU, 輸血 (今はまれ)	母子感染 性行為感染 IVDU, 輸血 (今はまれ)
母子感染の経路	主に母乳	経胎盤, 経産道, 母乳

ズ患者 469 人) であった³⁾。ただし, エイズ患者に対する未発症キャリアの率が低く, 多くのキャリアが見過ごされている可能性を示している。

一方, HTLV-I の起源はアジアとアフリカの数カ所以上において, 数万年以上も昔に霊長類のウイルスである STLV-I からヒトに伝播したと考えられている^{4,5)}。最も広く見られるコスモポリタン型の HTLV-I は, その起源は今なお不明だが, 南アフリカ経由で南アメリカ大陸とカリブ海沿岸に到達した他, 日本を経由して北海道からカムチャッカ半島, アラスカ, 北米を経て南米に到達したのもあったようである。その他西アフリカ型のウイルスは奴隷貿易の際にカリブ海沿岸に別途広がっていったし, 明治以降の日本 (特に沖縄) からの南米への移民もまた HTLV-I をこの地へ運んでいったとされる^{4,5)}。全世界でキャリアは 3000 万人を超すと想定されているが, 地域的に偏在している。いわゆる縄文人とのかかわりが深いウイルスであって, 日本国内では 108 万人のキャリアがいるが, 九州, 沖縄, 四国太平洋側に多く, その他紀伊半島, 隠岐島, 佐渡島, 三陸海岸, そして北海道の一部などでキャリアの割合が高い^{6,7)}。

どちらのウイルスも母子感染, 性行為感染, 輸血感染を起こすが, フリーのウイルス粒子が無数に血液・体液中に存在する HIV-1 と比べると, 著しく細胞に依存する HTLV-I の感染性は低い。

また HTLV-I の母子感染の主たる経路は母乳であるが, HIV-1 の場合は経胎盤的 (出生前) にも経産道的 (周産期) にも, そして経母乳的 (出生後) にも感染が起こる。

■臨床的比較 (表2)

どちらのウイルスも CD4 陽性 T 細胞 (ヘルパー T 細胞) に感染するが, HIV-1 感染が細胞死をもたらし, エイズ (後天性免疫不全症候群) を引き起こすのに対して, HTLV-I に感染した T 細胞は不死化して白血病・リンパ腫 (成人 T 細胞白血病・リンパ腫, adult T-cell leukemia/lymphoma: ATL, ATLL) を起こす。その他に, HTLV-I に対する異常免疫応答により起こる疾患群があり, その代表は HTLV-I 関連脊髄症 (HTLV-I-associated myelopathy: HAM) である。

HIV キャリアに対して, ウイルス量や CD4 陽性 T 細胞数をモニターしながら, きちんと管理し, 適切なタイミングで多剤併用の強力な抗レトロウイルス療法 (highly active antiretroviral therapy: HAART) を行うことによって, エイズの発症を防ぎ, 平均余命を非感染者とあまり変わらないレベルにまで押し上げることが可能になる。しかし, 「いきなりエイズ」, つまりエイズを発症して初めて HIV 感染者であることがわかった場合には, 今なお予後は悲惨である。HIV-1 に感

表2 HTLV-I と HIV-1 の比較 (その2)

	HTLV-I	HIV-1
主たる感染細胞とその予後	CD4 陽性 T 細胞 (不死化「悪性転換」)	CD4 陽性 T 細胞 (細胞死)
起こす病気	ATL, HAM	エイズ
その予後	ATL: きわめて悲惨 HAM: QOL の顕著な低下	「いきなりエイズ」では悲惨 早期発見できていれば良好
発症頻度	ATL: 約 5%, HAM: 0.3%	治療介入しない限りほぼ必発
潜伏期	ATL: 40~80 年 HAM: 数年以上	5~10 年 (母子感染例: 1~数年)
キャリアからの発症予防法	発症を防ぐ方法は不明	適正なタイミングで抗レトロウイルス療法を開始
発症リスク因子	高い proviral load ATL の家族歴	高い viral load 低い CD4 ⁺ 細胞数
ワクチン	ない (開発の兆しなし)	ない (巨万の研究費投入)
抗ウイルス薬	確立していない	数多くの有効な治療薬による多剤併用療法 (HAART)

染したら、ごく一部の例外を除き、治療介入しないとエイズ発症は必須で、自然経過での臨床的潜伏期は 10 年前後といわれてきた。しかし近年、エイズ発症までの年月が短くなってきたことが指摘されており、注意を要する。また母子感染の場合には潜伏期が非常に短く、乳幼児期に発症してしまう。

一方、HTLV-I キャリアからの ATL 発症には 40~80 年かかり、しかも発症するのは母子感染によるキャリアの約 5% に過ぎない。性行為感染によるキャリアからの ATL 発症は認められていない。HAM はキャリアの 0.3% に発症し、こちらは母子感染、性行為感染を問わず発症する。ATL は最も予後の悪い白血病・リンパ腫であって、最新の治療を駆使しても 5 年生存率は 14% に過ぎず、多くの患者は発症後 1~2 年で死亡する⁸⁾。HAM の生命予後はひどく悪いわけではないが、下肢麻痺や直腸膀胱障害などを起こし QOL を著しく下げてしまう。近年の研究で proviral load の高いキャリア、そして ATL の家族歴のあるキャリアでは、ATL の発症率が高いことがわかってきた⁹⁾。しかしながらキャリアが ATL を発症しないよう防ぐ方法は開発されていない。HTLV-I に有効な抗レトロウイルス薬は、実験室レベルや小規模の臨床経験では知られてい

るが、それらをどう使っていけばいいのかは定まっていない。

■母子感染の予防策の原理 (図 1)

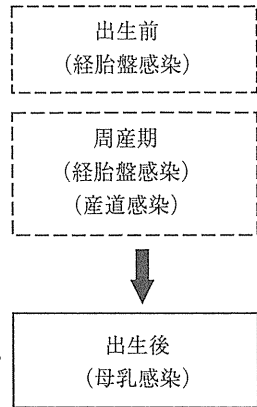
HIV-1 の場合、出生前には経胎盤的に、周産期には陣痛開始後の母子間の microtransfusion や産道を通ずる際に、そして生後は母乳を介して母子感染が成立する。母子感染を防ぐためには妊娠中の母体と出生後の児の両方へ抗レトロウイルス療法を行う他、陣痛開始前に選択的帝王切開術で娩出し、出生後は完全人工栄養で育てることが必要で、これらすべての措置を確実に行うことができれば 20~30% の確率で生じる母子感染を 0.5% 未満にまで押し下げることができる¹⁰⁾。

一方、HTLV-I の母子感染経路の主たるものは母乳であるため、やはり完全人工栄養を行うことによって感染率を 1/5~1/8 に下げることができる^{11,12)}。おそらく胎内感染や産道感染がある程度寄与しているものと思われるが、実態は明らかになっていない。母子感染を起こしても、その大多数は発症することなく一生を終えることもあり、抗レトロウイルス療法が確立していないことや帝王切開術のリスクも考えると、HIV-1 の場合に行われているような予防対策を、そのまま HTLV-I に応用することには無理がある。

HTLV-I 予防対策

実態不明だが、おそらく母子感染の1/5～1/8はこれらの経路を取ると予想される（予防対策法は未確定）

母乳遮断



HIV-1 予防対策

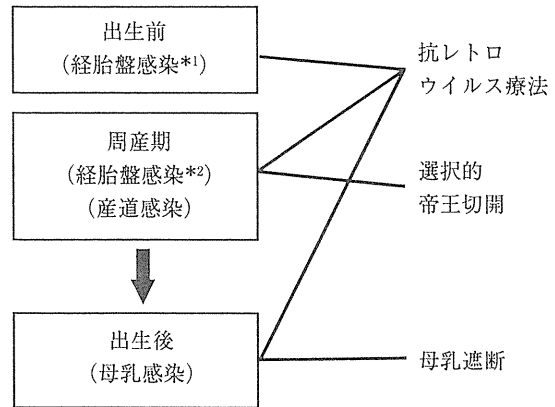


図1 HIV-1 と HTLV-I の母子感染が起こる時期と経路および予防対策の比較

*1: 出生前の経胎盤感染は HIV の胎盤感染に続いて、または FcRn を介したウイルスの能動輸送で起こる

*2: 周産期の経胎盤感染は、分娩開始後の母子間の microtransfusion を介して起こる

■現在の本邦における母子感染予防対策

妊婦における HIV-1 スクリーニング検査の実施率は、1999 年には 73.2%であったが、2010 年 4 月からは妊婦検診における公的補助の対象にも組み入れられ、実施率は 2010 年には 99.7%にまで上昇した。ほとんどすべての妊婦がスクリーニングされる中で、確認検査まで行って HIV キャリアであることが確認された妊婦は年間 30～50 例くらいで、近年は 2006 年の 55 例をピークに減少傾向にあり、2009 年の集計では 22 例だった。真の陽性例がきわめて少ないために、スクリーニングの時点では偽陽性者の割合が高くなる。当初は若干混乱した地域もあったが、現在は確定診断とその後の説明・指導までの道筋は整ってきたと思われる¹⁰⁾。

一方、HTLV-I スクリーニング検査は元々流行地以外で行われることは少なかったが¹¹⁾、次第に全国的にも実施されることが増えてきた¹²⁾。しかし、スクリーニング検査陽性者に確認検査まで行うことが徹底しなかったり、キャリアであることがわかった場合の説明や指導について戸惑ったりすることが問題となった。これを受けて、平成 21 年度厚生労働省科学研究費補助金「HTLV-1 の母児感染予防に関する研究（研究代表者：斎藤

滋）」および平成 22 年度厚労科研費補助金「ヒト T 細胞白血病ウイルス-1 型母子感染予防のための保健指導の標準化に関する研究（研究代表者：森内浩幸）」により、医療従事者に向けての啓蒙と指針が与えられた。妊婦検診におけるスクリーニング検査実施からキャリア妊婦から生まれた子どもの追跡調査に至るまでの大まかな流れを、図 2 に示す。現在は日本産婦人科学会の診療ガイドラインにおいても妊婦の HTLV-I スクリーニング検査の実施およびスクリーニング陽性者への確認検査の実施は「推奨レベル A」に指定され、またスクリーニング検査の費用も公的補助の対象となった。国全体として HTLV キャリア数はあまり減っていないが、近年若年層におけるキャリアの減少は明らかであり、献血ドナーのうち妊孕年齢層の HTLV-I 陽性率が 0.2%程度であることから、おそらく年間 2,000 人程度のキャリアが発見されることが予想されている。

■HTLV-I 母子感染対策のジレンマ

(表 3, 4)

長崎県では 1987 年以降四半世紀にわたって切れ間なくずっと、県を上げて HTLV-I 母子感染対策を行ってきたが¹¹⁾、全国的に実施されることになって様々なジレンマが予想されている。

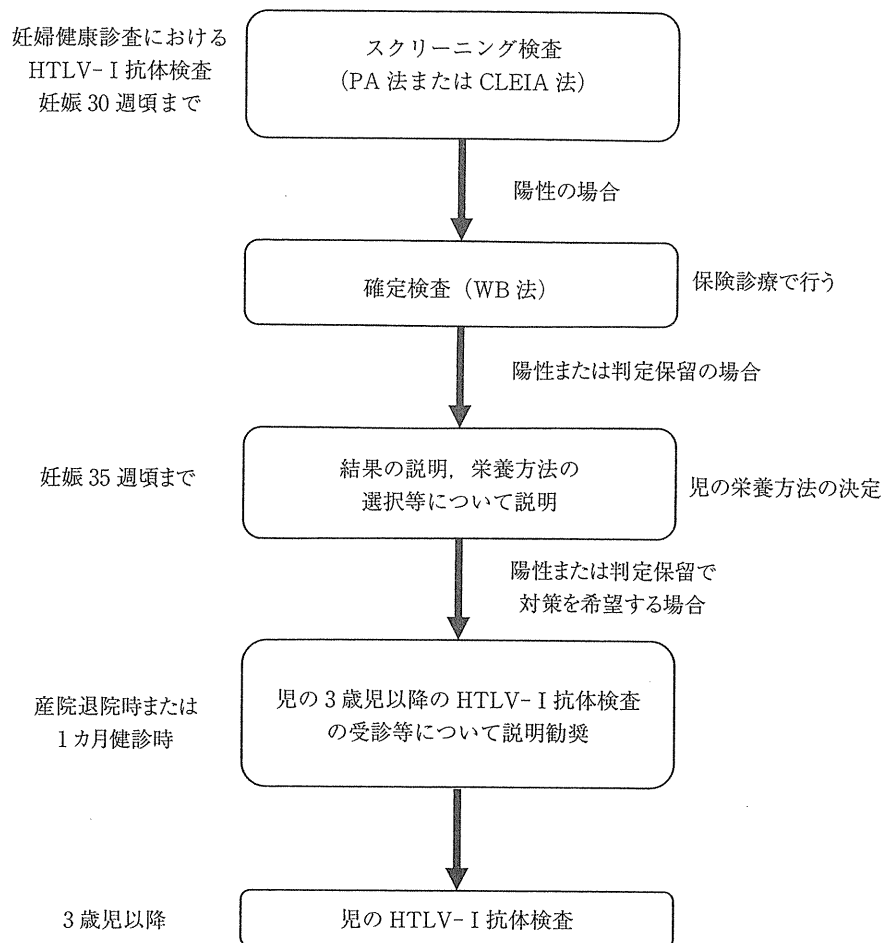


図 2 HTLV-I 母子感染予防対策の概要
文献 12) より引用

①妊婦へのメリットがない？

まず、すべての妊婦を検査してキャリアを同定することによるメリットが、妊婦自身にはないことが問題である。HIV-1 の場合には発症前に感染がわかることで、本人はショックを受ける反面、その後の管理をきちんと行うことで生活の QOL を保ち生命予後を向上させることが可能となる。しかし、HTLV の場合はキャリアが ATL や HAM などの疾患にならないようにする方法が見つかっていないため、知って不安に陥るだけということになりかねない。もちろん、自分から子どもへの感染のリスクを最小限に留めることができるような選択を与えることができることは、母親にとっていいことではある。

②母乳をあげないことへの葛藤

次に、母子感染予防策が「母乳遮断」であることが、デリケートな問題を醸し出す。いうまでもなく母乳は本来よいものであり、それをあげないことのデメリットに見合うだけのメリットがあることを示すことができないと、意味がなくなる。自分がキャリアであることを周囲（含、姑などの身内）に知られたくない中で、母乳で育てないことに避難めいた目で見られることのプレッシャーも決して小さいものではない。

③All or Nothing ではないこと

母乳を完全に遮断したからといって感染率がゼロになるわけではない（約 2~3% 残る）し、逆に全く意に介さず母乳哺育を行った場合でも感染率は 100% ではない（約 20%）。これらの数字を

表3 HTLV-I 母子感染対策のジレンマ (その1)

	HTLV-I	HIV-1
妊婦のメリット	ない	適正な管理下に置かれれば、エイズ発症を防ぐことが可能
妊婦のデメリット	キャリアであることを知るショック	キャリアであることを知るショック
母子感染予防の方法	母乳遮断	母子への抗レトロウイルス療法 + 選択的帝王切開分娩 + 母乳遮断
予防効果	母子感染の確率を約20%から2~3%に減少できる	母子感染の確率を20~30%から0.5%未満に減少できる
子どものメリット	遠い将来のATL (やHAM)* の発症を防ぐことができる	近い将来におけるエイズの発症を防ぐことができる
子どものデメリット	母乳の恩恵に預かれない	抗レトロウイルス薬の副作用 帝王切開の合併症 母乳の恩恵に預かれない

*: HAM に関しては、その後の性行為感染等でキャリア化したら、そのリスクは残る

表4 HTLV-I 母子感染対策のジレンマ (その2)

	HTLV-I	HIV-1
スクリーニング検査法	PA, CLEIA	EIA など
スクリーニング検査での陽性率	流行地: 1~4% (近年では1%かそれ未満) 非流行地: 非常に低い	非常に低い
スクリーニング検査の偽陽性	流行地: 低い 非流行地: 高い	高い
確認検査法	WB (非流行地では判定保留例が多い)	WB (確立している)
ウイルスゲノム検出法	HTLV-I proviral DNA (PBMC→全血が必要) (確立していない)*	HIV-1 RNA (血漿), HIV-1 proviral DNA (PBMC) (確立している)

*: HTLV-I PCR 検査法の標準化と保険適用化を目指しての厚労省班研究が現在進行中

眺みながら意思決定をしなければならないところにも難しさがある。

④検査法の不具合

スクリーニング検査は現在 CLEIA 法または PA 法で行われている。どちらも高い感度と特異性を持った検査であるが、真の陽性者が少ない集団で実施する場合には偽陽性の出現は避けて通れない。実際流行地の長崎県のデータではスクリーニング検査陽性者の約85%が確認検査でも陽性であったのに対し、非流行地である東京都内の病院での検査ではスクリーニング陽性者のわずか1/4が確認検査で陽性が確認されている。

このようなスクリーニング検査における偽陽性

の問題は、上述したように HIV-1 の場合も同様である。しかし、HTLV-I の場合に問題となっているのは、確認検査として実施するウェスタンブロット法において、少なからぬ「判定保留例」が出てしまうことである。非流行地で実施されたデータでは、この判定保留例が全体の約2割にも達している。このような場合の次の手段として考えられる PCR による HTLV-I ゲノム検出にも、実は問題がある。HIV-1 の場合とは異なり、まだ標準化がきちんとされているわけではなく信頼性がどれくらいあるのか評価できていないし、保険適用もないため高額な費用を払わなければならないからである。さらに、細胞に強く依存した

HTLV-I では PCR 検査の材料として全血を新たに採取する必要がある（保存血清または血漿があっても役に立たない）。そのため、HIV-1 の場合に行われている「栃木方式」（スクリーニング検査の検体の残りを凍結保存しておき、陽性だった場合には新たに採血することなく確認検査まで実施する）は、HTLV-I の場合には実施できない。

⑤最終成果の不透明さ

HIV キャリアのエイズ発症は治療介入しなければほぼ必発で、しかも母子感染の場合の潜伏期は1～数年程度である。一方、HTLV キャリアの場合、約5%のみが40～80年という長い潜伏期を経てATLを発症する点で、大きく異なる。つまり、HIV 母子感染阻止の必要性は明確で、しかもその成果（エイズ発症の防止）はすぐに現れるのに対し、HTLV の場合は成果（ATL/HAM 発症の防止）が出るまで途轍もなく時間がかかり判断しにくい。

おわりに

同じヒトレトロウイルスで母子感染を起こす HIV-1 と HTLV-I を比較しながら概要を述べた。そして、国内ではより多くのキャリアが存在し、全国的な母子感染予防対策が始まったばかりの HTLV-I について、その難しさを解説した。

具体的な実施方法については保健指導マニュアルを参照していただき¹²⁾、また HTLV に関するその他の様々な情報については「HTLV-1 情報サービス」をブラウザして欲しいが¹³⁾、母子へのデメリットを極力小さくした上で、HTLV-I キャリアの数、引いては将来の ATL/HAM 患者の数ができるだけ少なくなるように、正しく運用されることを願う。

文 献

- 1) AVERTing HIV and AIDS : The origin of AIDS and HIV and the first cases of AIDS.
<http://www.avert.org/origin-aids-hiv.htm>
- 2) UNAIDS : Global Report - UNAIDS Report on the Global AIDS Epidemic 2010.
<http://www.unaids.org/>
- 3) API-Net エイズ予防情報ネット : 日本の状況 = エイズ動向委員会報告. 平成 22 年エイズ発生動向年報.
<http://api-net.jfap.or.jp/>
- 4) Yamashita M, Miura T, Ibuki K *et al.* : Phylogenetic relationships of HTLV-I/STLV-I in the world. *Leukemia* 11 (Suppl 3) : 50-51, 1997.
- 5) Proietti FA, Carneiro-Proietti ABF, Catalan-Soares BC *et al.* : Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. *Oncogene* 24 : 6058-6068, 2005.
- 6) 厚生労働省科学研究費補助金「本邦における HTLV-1 感染及び関連疾患の実態調査と総合対策（研究代表者：山口一成）」平成 21 年度報告書
- 7) Yamaguchi K : Human T-lymphotropic virus type 1 in Japan. *Lancet* 343 : 213-216, 1994.
- 8) Tsukasaki K, Utsunomiya A, Fukuda H *et al.* : VCAP-AMP-VECP compared with biweekly CHOP for adult T-cell leukemia-lymphoma : Japan Clinical Oncology Group Study JCOG9801. *J Clin Oncol* 25 : 5458-5464, 2007.
- 9) Iwanaga M, Watanabe T, Utsunomiya A *et al.* : Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-1) proviral load and disease progression in asymptomatic HTLV-1 carriers : a nationwide prospective study in Japan. *Blood* 116 : 1211-1219, 2010.
- 10) 平成 22 年度厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業. 平成 22 年度 HIV 母子感染予防対策マニュアル第 6 版.
http://api-net.jfap.or.jp/siryou/siryou_Frame.htm
- 11) 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 : ATL (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, 2009.
- 12) 平成 22 年度厚労科研費補助金「ヒト T 細胞白血病ウイルス-1 型母子感染予防のための保健指導の標準化に関する研究（研究代表者：森内浩幸）」
- 13) HTLV-I 情報サービス. <http://www/htlv1joho.org>

* * *

Leukemic T cells are specifically enriched in a unique CD3^{dim}CD7^{low} subpopulation of CD4⁺ T cells in acute-type adult T-cell leukemia

Yamin Tian,^{1,2} Seiichiro Kobayashi,¹ Nobuhiro Ohno,³ Masamichi Isobe,³ Mayuko Tsuda,³ Yuji Zaike,⁴ Nobukazu Watanabe,⁵ Kenzaburo Tani,² Arinobu Tojo^{1,3} and Kaoru Uchimaru^{3,6}

¹Division of Molecular Therapy, Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo; ²Department of Molecular Genetics, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, Fukuoka; ³Department of Hematology/Oncology; ⁴Clinical Laboratory, Research Hospital; ⁵Laboratory of Diagnostic Medicine, Division of Stem Cell Therapy, Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

(Received July 27, 2010/Revised November 1, 2010/Accepted December 8, 2010/Accepted manuscript online December 14, 2010/Article first published online January 23, 2011)

The morphological discrimination of leukemic from non-leukemic T cells is often difficult in adult T-cell leukemia (ATL) as ATL cells show morphological diversity, with the exception of typical "flower cells." Because defects in the expression of CD3 as well as CD7 are common in ATL cells, we applied multi-color flow cytometry to detect a putative leukemia-specific cell population in the peripheral blood from ATL patients. CD4⁺CD14⁻ cells subjected to two-color analysis based on a CD3 vs CD7 plot clearly demonstrated the presence of a CD3^{dim}CD7^{low} subpopulation in each of nine patients with acute-type ATL. The majority of sorted cells from this fraction showed a flower cell-like morphology and carried a high proviral load for the human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-I). Genomic integration site analysis (inverse long-range PCR) and analysis of the T cell receptor V β repertoire by flow cytometry indicated that the majority of leukemia cells were included in the CD3^{dim}CD7^{low} subpopulation. These results suggest that leukemic T cells are specifically enriched in a unique CD3^{dim}CD7^{low} subpopulation of CD4⁺ T cells in acute-type ATL. (*Cancer Sci* 2011; 102: 569–577)

Adult T-cell leukemia (ATL) is a malignant disorder caused by human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-I)⁽¹⁾ and is characterized clinically by generalized lymphadenopathy, hepatosplenomegaly, skin lesions, hypercalcemia and a characteristic morphology termed "flower cells." Importantly, ATL is one of the most incurable lymphoid malignancies. This disease is endemic to several regions in the world, including sub-Saharan Africa, the Caribbean basin, South America and Japan, and 10–20 million people are estimated to be infected by this virus worldwide.^(2,3)

Evaluation of the response after chemotherapy for ATL partly depends on the proportion of ATL cells in the peripheral blood. However, the morphological diversity of ATL cells may lead to inaccurate estimations. Accurate estimation of the chemotherapeutic effect is pivotal in clinical practice because ATL cells often become chemoresistant, even during chemotherapy. Methods to detect ATL cells with greater precision than morphological examination are therefore required.

Aberrant expression of cell-surface antigens in myeloid/lymphoid leukemia cells has been studied extensively.^(4–6) Using fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis, gating cells with diminished CD45 expression in acute myeloid/lymphoid leukemia is widely used for purifying leukemia cells. However, in ATL there are only limited data regarding the identification of transformed leukemia cells by similar methods. Previous studies indicated that most ATL cells lack CD7 and exhibit diminished CD3 expression.^(7–10) Although a study using CD3 gating by FACS analysis has indicated that ATL cells were

distinguishable from normal lymphocytes as a CD3^{low} population,⁽¹⁰⁾ these cells were not well characterized as ATL cells.

In the present study, we focused on the enrichment of ATL cells by constructing CD3 vs CD7 plots from multi-color FACS. CD3^{dim}CD7^{dim} and CD3^{dim}CD7^{low} cells were extensively studied and compared with normal control samples. Taken together, our data suggest that ATL cells are purified in CD3^{dim}CD7^{low} subpopulations. The purification of ATL cells by FACS may therefore allow monitoring of disease activity and yield insight into the biology of this disease.

Materials and Methods

Cell lines and patient samples. TL-Om1, a HTLV-I-infected cell line, was provided by Dr. Toshiaki Watanabe (The University of Tokyo), and was cultured in RPMI 1640 medium containing 10% fetal bovine serum. Peripheral blood samples were collected from patients admitted to our hospital (Research Hospital, Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo, Japan) during the period from August 2009 to April 2010 with written informed consent. All patients were diagnosed with acute-type ATL according to Shimoyama's criteria.⁽⁸⁾ Blood samples were collected before treatment using the LSG15 protocol⁽¹¹⁾ or during the recovery phase between chemotherapy sessions. Samples collected from five healthy volunteers (median age, 45 years) were used as normal controls. The present study was approved by the institutional review board of our hospital.

Flow cytometry and cell sorting. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from heparin-treated whole blood by density gradient centrifugation using Lymphoprep (Axis-Shield, Dundee, UK) and subsequently suspended in phosphate-buffered saline (PBS) containing 5% mouse serum (DAKO, Glostrup, Denmark) for prevention of nonspecific antibody binding. Cells were stained using a combination of phycoerythrin (PE)-CD7, PE-Cy7-CCR4, allophycocyanin (APC)-CD25, APC-Cy7-CD3, Pacific Blue-CD4 and Pacific Orange-CD14. Pacific Orange-CD14 was purchased from Caltag-Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). All other antibodies were obtained from BD BioSciences (San Jose, CA, USA). Propidium iodide (PI; Sigma, St Louis, MO, USA) was added to the samples to stain dead cells immediately prior to FACS analysis. Cells were also stained with APC-FoxP3 (eBioscience, San Diego, CA, USA) using intracellular staining methods as previously described.⁽¹²⁾ A TCR-V β repertoire kit (Beckman Coulter, Miami, FL, USA) was used for T-cell receptor (TCR) V β repertoire analysis according to the manufacturer's instructions.

⁶To whom correspondence should be addressed.
E-mail: uchimaru@ims.u-tokyo.ac.jp

A BD FACS Aria (BD Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA) was used for all multi-color FACS analysis and cell sorting. Data were analyzed using FlowJo software (Treestar, San Carlos, CA, USA).

Quantification of HTLV-I proviral load by real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR). The HTLV-I proviral load in PBMC was quantified by real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR; TaqMan method) using the ABI Prism 7000 sequence detection system (Applied Biosystems, Foster

City, CA, USA) as previously described.⁽¹³⁾ Briefly, a total of 50 ng of genomic DNA was extracted from human PBMC using a QIAamp DNA blood Micro kit (Qiagen, Hilden, Germany). Triplicate samples of the DNA were amplified. Each PCR mixture containing a HTLV-I pX region-specific primer pair at 0.1 μ M (forward primer 5'-CGGATACCCAGTCTACGTGTT-3' and reverse primer 5'-CAGTAGGGCGTGACGATGTA-3'), FAM-labeled probe at 0.1 μ M (5'-CTGTGTACAAGGC-GACTGGTGCC-3') and 1 \times TaqMan Universal PCR master mix

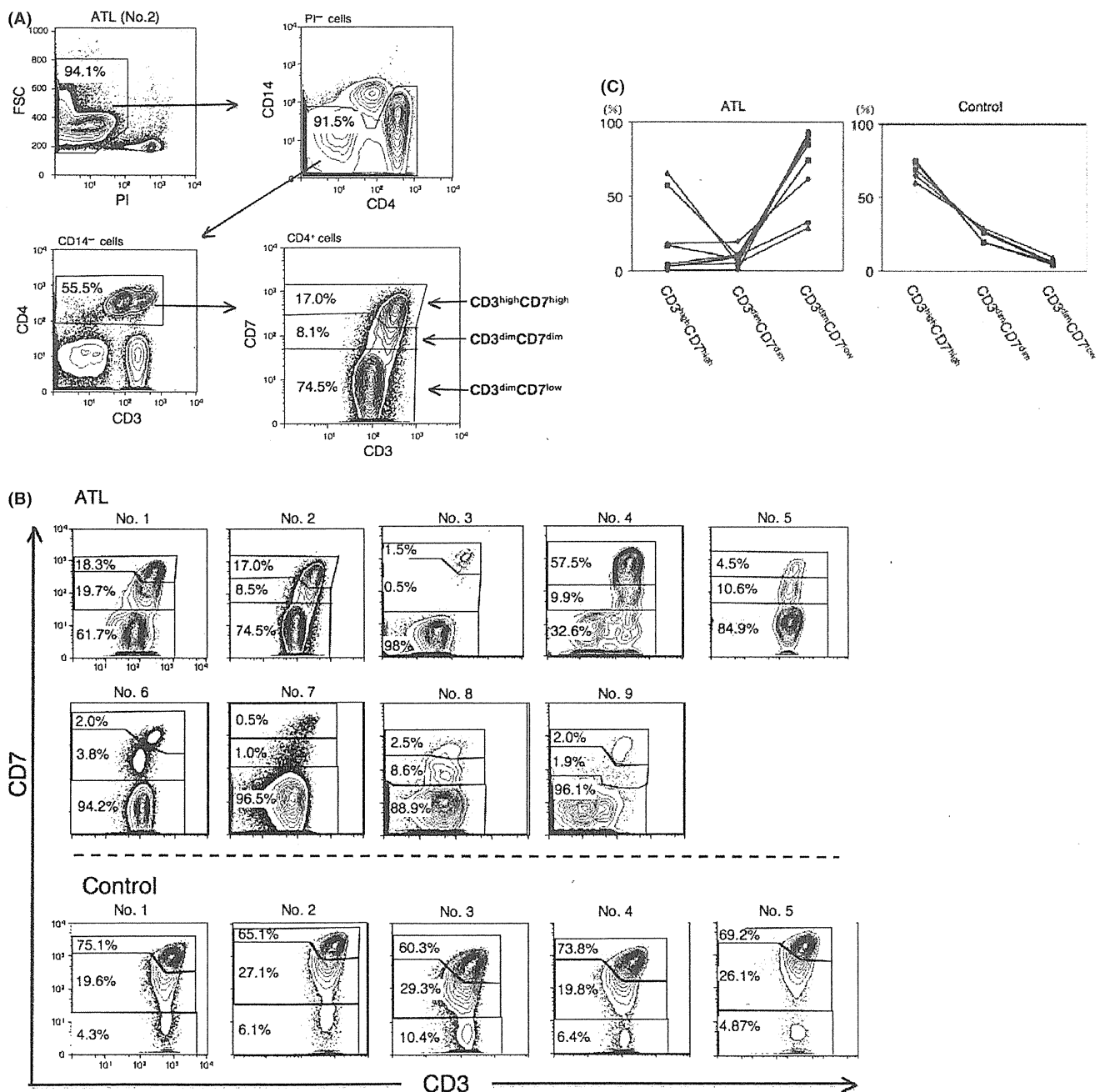


Fig. 1. CD3 vs CD7 plots from FACS analysis of patients with acute-type adult T-cell leukemia (ATL) and normal controls. (A) Representative flow cytometric analysis of a patient with acute-type ATL (patient no. 2). The CD3 vs CD7 plot in CD4⁺ cells was constructed according to the gating procedure shown in this figure. In the plot, we designated three subpopulations: CD3^{high}CD7^{high}, CD3^{dim}CD7^{dim} and CD3^{dim}CD7^{low}. (B) Flow cytometric profile of the CD3 vs CD7 plot in patients with acute-type ATL and normal controls. (C) Percentages of CD3^{high}CD7^{high}, CD3^{dim}CD7^{dim} and CD3^{dim}CD7^{low} subpopulations in CD4⁺ T cells in patients with acute-type ATL and normal controls. Each line represents an individual sample. ATL group, *n* = 9; control group, *n* = 5; FSC, forward scatter; PI, Propidium iodide.

Table 1. Clinical profile of nine acute-type ATL patients in the present study

No.	Age	Sex	WBC (/μL)	Lymph (%)	ATL cellst (%)	Organ involvement
1	60	M	5200	15.0	11.0	Skin
2	69	F	1600	43.5	9.0	Liver, LN, pleural effusion
3	61	M	18 620	24.7	43.7	Liver, uvea
4	59	F	6420	8.5	0.0	Liver, LN, skin
5	70	F	290	56.0	2.0	Liver, spleen, LN
6	60	F	4570	19.0	73.0	Skin
7	53	F	12 210	11.0	52.0	LN
8	74	F	6480	16.5	25.5	Liver, spleen, LN
9	63	F	34 810	21.5	33.5	Liver, spleen, LN, lung

†Proportion of ATL cells in the peripheral blood WBC evaluated by morphological examination. ATL, adult T-cell leukemia; LN, lymph nodes; Lymph, lymphocytes; WBC, white blood cells (normal range, 3500–9100/μL).

(Applied Biosystems) were subjected to 50 cycles of denaturation (95°C, 15 s) and annealing to extension (60°C, 1 min), following an initial Taq polymerase activation step (95°C, 10 min). The RNase P control reagent (Applied Biosystems) was used as an internal control for calculation of the input cell number (using VIC reporter dye). DNA extracted from TL-Om1 and normal human PBMC were used as positive and negative controls, respectively. The HTLV-I proviral load (%) was calculated as the copy number of the pX region per input cell number. To correct the deviation of acquired data in each experiment, data from TL-Om1 (positive control) were adjusted to 100% and the sample data was corrected by proportional calculation accordingly.

Inverse long PCR. For clonality analysis, inverse long PCR was performed. First, 1 μg of genomic DNA extracted from the FACS-sorted cells was digested with *EcoRI*, *HindIII* and *PstI* at 37°C overnight. Purification of DNA fragments was performed using a QIAEX2 gel extraction kit (Qiagen). The purified DNA was self-ligated with T4 DNA ligase (Takara Bio, Otsu, Japan) at 16°C overnight. The circular DNA obtained from the *EcoRI* digestion fragment was then digested with *MluI*, which cuts the pX region of the HTLV-I genome and prevents amplification with the viral genome. Inverse long PCR was performed using Takara LA Taq polymerase (Takara Bio). The primer pairs for the *EcoRI*-treated template were: forward primer 5'-TGCCCTGACCCTGCTTGCTCAACTCTACGTCTTTG-3' and reverse primer 5'-AGTCTGGGCCCTGACCTTTTCAGACTTCTGTTTC-3'. For the *HindIII*-treated group, forward primer 5'-TAG-

CAGGAGTCTATAAAAGCGTGGAGACAG-3' and reverse primer 5'-TGGGCAGGATTGCAGGGTTAGAGTGG-3' were used. For the *PstI*-treated group, forward primer 5'-CAGCCCATTCTATAGCACTCTCCAGGAGAG-3' and reverse primer 5'-CAGTCTCCAAACACGTAGACTGGGTATCCG-3' were used. Each 50-μL reaction mixture contained 0.4 mM of each dNTP, 25 mM MgCl₂, 10× LA PCR buffer II containing 20 mM Tris-HCl and 100 mM KCl, 0.5 mM primer, 2.5 U LA Taq polymerase and 50 ng of the processed genomic DNA. The reaction mixture of the *EcoRI*- or *PstI*-treated group was subjected to 35 cycles of denaturation (94°C, 30 s) and annealing to extension (68°C, 8 min). For the *HindIII* group, the PCR conditions were denaturation (98°C, 30 s), annealing to extension (64°C, 10 min) for 5 cycles, followed by 30 cycles of denaturation (94°C, 30 s), annealing (64°C, 3 min) and extension (72°C, 15 min). Following PCR, the products were subjected to electrophoresis in 0.8% agarose gels. In the CD3^{dim}CD7^{low} subpopulation from which a sufficient amount of DNA was extracted, PCR were performed in duplicate.

Cytospin and May-Giemsa staining. Cells enriched by cell sorting were washed twice with PBS. Aliquots of 100 μL of the cell suspension were mixed with 20 μL of 10% bovine serum albumin. The mixtures were centrifuged at 20g for 5 min onto glass slides. The fixed cells were air-dried and then subjected to May-Giemsa staining.

Statistical analyses. Data are expressed as the means ± standard deviation (SD). One-way analysis of variance (ANOVA) was used for statistical analyses, and *P* < 0.05 was taken to indicate statistical significance.

Results

Multi-color FACS, including CD3 vs CD7 plots, in patients with acute-type ATL. We constructed a gating procedure for flow cytometric analysis of acute-type ATL cells using a combination of CD3 and CD7. Figure 1A shows the representative flow cytometric data of an ATL sample (from patient no. 2 in Table 1). Dead cells (PI positive) were initially excluded on the forward scatter (FSC) vs PI plot. Next, monocytes (CD4^{dim} CD14⁺) were excluded on the CD4 vs CD14 plot. After CD4⁺ T lymphocytes were gated on the CD3 vs CD4 plot, a CD3 vs CD7 plot was constructed. Based on the cell density and fluorescence intensity of CD3 and CD7, we designated three subpopulations on this plot: CD3^{high}CD7^{high}, CD3^{dim}CD7^{dim} and CD3^{dim}CD7^{low} (Fig. 1A). Using the same gating procedure, we analyzed nine patients with acute-type ATL and five normal controls (Fig. 1B). The patient characteristics analyzed in the present study are shown in Table 1. In normal controls, the expression pattern of CD3 vs CD7 was similar. The highest cell density was observed in the CD3^{high}CD7^{high} subpopulation, and the CD3^{dim}CD7^{dim} subpopulation was observed adjacent to it. The CD3^{dim}CD7^{low}

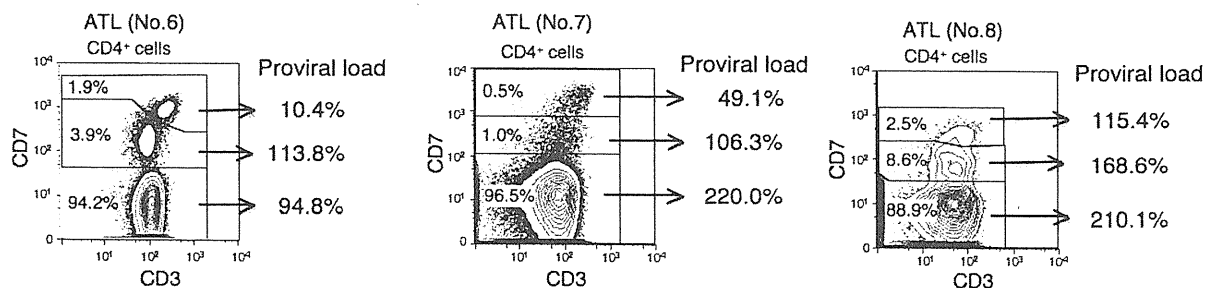


Fig. 2. Quantification of the human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-I) proviral load in CD3^{high}CD7^{high}, CD3^{dim}CD7^{dim} and CD3^{dim}CD7^{low} subpopulations. Genomic DNA was extracted from the FACS-sorted cells of each subpopulation and subjected to real-time quantitative PCR. Representative data of three cases (patients no. 6, 7 and 8) are shown.

subpopulation was a minor but distinct subpopulation. In contrast, the highest cell density was observed in the CD3^{dim}CD7^{low} subpopulation in all acute-type ATL samples except for patient no. 4, from whom the sample was obtained under conditions of well-controlled ATL during chemotherapy. These subpopulations were distinct but the expression pattern of the CD3 vs CD7 plot, such as the degree of downregulation of CD3 and CD7, was variable among patients. The proportion of the CD3^{dim}CD7^{low} subpopulation was significantly higher in acute-type ATL CD4⁺ lymphocytes than in normal controls (Fig. 1C).

Analysis of the HTLV-I proviral load in CD3^{high}CD7^{high}, CD3^{dim}CD7^{dim} and CD3^{dim}CD7^{low} subpopulations. We next estimated the HTLV-I proviral load by quantitative real-time PCR in each FACS-sorted subpopulation. Representative results from three patients with acute-type ATL (patients no. 6, 7 and 8) are shown in Figure 2. In all patient samples, HTLV-I proviral integration, analyzed by real-time PCR, was detected in all subpopulations. However, the proviral load (%) was significantly

higher in CD3^{dim}CD7^{dim} and CD3^{dim}CD7^{low} subpopulations compared with the CD3^{high}CD7^{high} subpopulation. The proviral load of the CD3^{dim}CD7^{low} subpopulation in patients no. 7 and 8 was nearly 200%, indicating integration of two copies of the HTLV-I viral genome and that almost all of the cells were infected with HTLV-I. Similarly, in patient no. 6, the majority of the CD3^{dim}CD7^{low} subpopulation was infected with HTLV-I. A substantial proportion of the CD3^{dim}CD7^{dim} subpopulation was infected with HTLV-I in patients no. 7 and 8, and nearly all the cells in the same subpopulation in patient no. 6 were infected with HTLV-I.

Differences in the immunophenotype of CD3^{high}CD7^{high}, CD3^{dim}CD7^{dim} and CD3^{dim}CD7^{low} subpopulations in patients with acute-type ATL. To further characterize these three subpopulations, we next examined CCR4 and CD25 expression in each subpopulation. Representative results of a normal control and a patient with acute-type ATL are shown in Figure 3A. The mean fluorescence intensities (MFI) of CD25 and CCR4 of each sub-

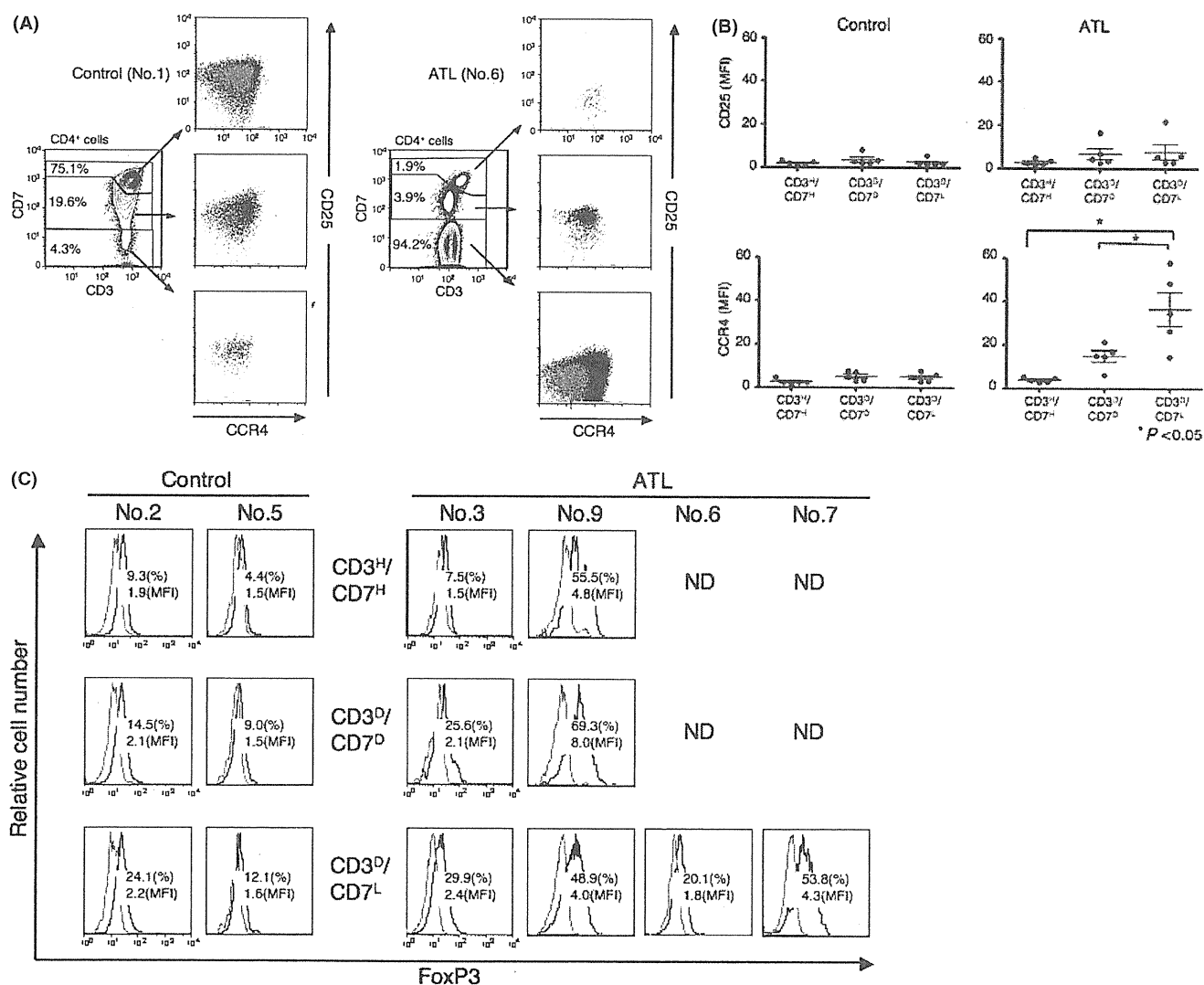


Fig. 3. Immunophenotypic analysis in CD3^{high}CD7^{high}, CD3^{dim}CD7^{dim} and CD3^{dim}CD7^{low} subpopulations. (A) Expression of CCR4 and CD25 in each subpopulation. Representative FACS data of a normal control (no. 1) and a patient with adult T-cell leukemia (ATL) (no. 6) are shown. Gray dots, isotype antibody-stained cells; black dots, specific antibody-stained cells. (B) Mean fluorescence intensity (MFI) of CD25 and CCR4 in each subpopulation from all normal controls and patients with ATL. The MFI is shown in arbitrary units defined as follows: MFI of specific antibody/MFI of isotype antibody. Each dot represents a sample. **P* < 0.05 by ANOVA. (C) Expression of FoxP3 in each subpopulation. ND, analysis could not be performed in the CD3^{high}CD7^{high} and CD3^{dim}CD7^{dim} subpopulations in patients no. 6 and 7 due to an insufficient number of cells.

population in all patients with ATL and normal controls are shown in Figure 3B. Both CCR4 and CD25 expression levels were very low and maintained at similar levels throughout all subpopulations in normal control cells and in the CD3^{high}CD7^{high} subpopulation of patients with ATL. In contrast, CCR4 expression was significantly upregulated in the CD3^{dim}CD7^{dim} and CD3^{dim}CD7^{low} subpopulations of patients with ATL compared with the CD3^{high}CD7^{high} subpopulation. The expression of CD25 was also upregulated in these subpopulations but this difference was not significant ($P = 0.36$). The expression of Forkhead box P3 (FoxP3), a master regulator in the development and function of regulatory T (Treg) cells,⁽¹⁴⁾ was also analyzed in some patients. As shown in Figure 3C, FoxP3 expression in the CD3^{dim}CD7^{low} subpopulations was variably upregulated among patients. In addition, in patient no. 9, FoxP3 was upregulated in the CD3^{high}CD7^{high} and CD3^{dim}CD7^{dim} subpopulations.

Analysis of clonality in the CD3^{high}CD7^{high}, CD3^{dim}CD7^{dim} and CD3^{dim}CD7^{low} subpopulations by inverse long PCR. To further analyze the enrichment of ATL cells in the CD3^{dim}CD7^{low} subpopulation, we estimated clonality in each FACS-sorted subpopulation by inverse long PCR in four patients with acute-type ATL (Fig. 4). An intense band, suggesting a major clone, was detected in the CD3^{dim}CD7^{low} subpopulations in all patients. In the same subpopulation, multiple bands with weak intensity were also observed. As the levels of DNA extracted from the CD3^{dim}CD7^{low} subpopulation were sufficient, we performed duplicate PCR in three patient samples (Fig. 4B–D). Detection of the major bands was consistent, but the presence of the minor bands was variable. In the CD3^{dim}CD7^{dim} subpopulations, bands of the same size as those of the CD3^{dim}CD7^{low} subpopulations were observed, indicating that a distinct population in the CD3^{dim}CD7^{dim} subpopulations belonged to identical clones.

Clonality in the CD3^{high}CD7^{high}, CD3^{dim}CD7^{dim} and CD3^{dim}CD7^{low} subpopulations by flow cytometry-based TCR-V β repertoire analysis. To further confirm clonality and to evaluate the degree

of enrichment in each subpopulation, we performed TCR-V β repertoire analysis by flow cytometry⁽¹⁵⁾ in three ATL cases. The representative results are shown in Figure 5. In patient no. 3, over 95% of the CD3^{dim}CD7^{low} subpopulation used specific TCR-V β (V β 9) and their proportion was quite low in the CD3^{high}CD7^{high} and CD3^{dim}CD7^{dim} subpopulations. In addition, in the two other cases, over 90% of cells in the CD3^{dim}CD7^{low} subpopulation used the same TCR-V β (data not shown). These results indicate that ATL cells are highly purified in the CD3^{dim}CD7^{low} subpopulation.

Differences in morphology of the CD3^{high}CD7^{high}, CD3^{dim}CD7^{dim}, and CD3^{dim}CD7^{low} subpopulations in patients with acute-type ATL. We reviewed the glass-slide specimens of FACS-sorted samples to evaluate the morphology of each subpopulation on the CD3 vs CD7 plots. Representative results for two patients (no. 6 and 7) are shown in Figure 6A. In both patients, atypical lymphocytes with notched nuclei and/or basophilic cytoplasm were observed in all three subpopulations. In contrast, abnormal lymphocytes, including cells with multilobulated nuclei (flower cells) were mainly observed in the CD3^{dim}CD7^{low} subpopulation in patient no. 6 (Fig. 6, left) and in the CD3^{dim}CD7^{dim} and CD3^{dim}CD7^{low} subpopulations in patient no. 7 (Fig. 6, right panel).

Discussion

To investigate the characteristics of ATL cells, the purification of tumor cells is essential. In the present study, we successfully discriminated the CD3^{dim}CD7^{low} subpopulation in CD4⁺ T cells in the peripheral blood of patients with acute-type ATL by constructing a CD3 vs CD7 plot of CD4⁺ T cells from multi-color FACS (Fig. 1). Previously, Yokote *et al.*⁽¹⁰⁾ reported that CD3^{low} gating facilitated the discrimination of ATL cells by flow cytometry. If we constructed a CD4 vs either CD3 or CD7 plot, in which the downregulated cell subpopulation was not clearly separated, then we could not define distinct cell subpopu-

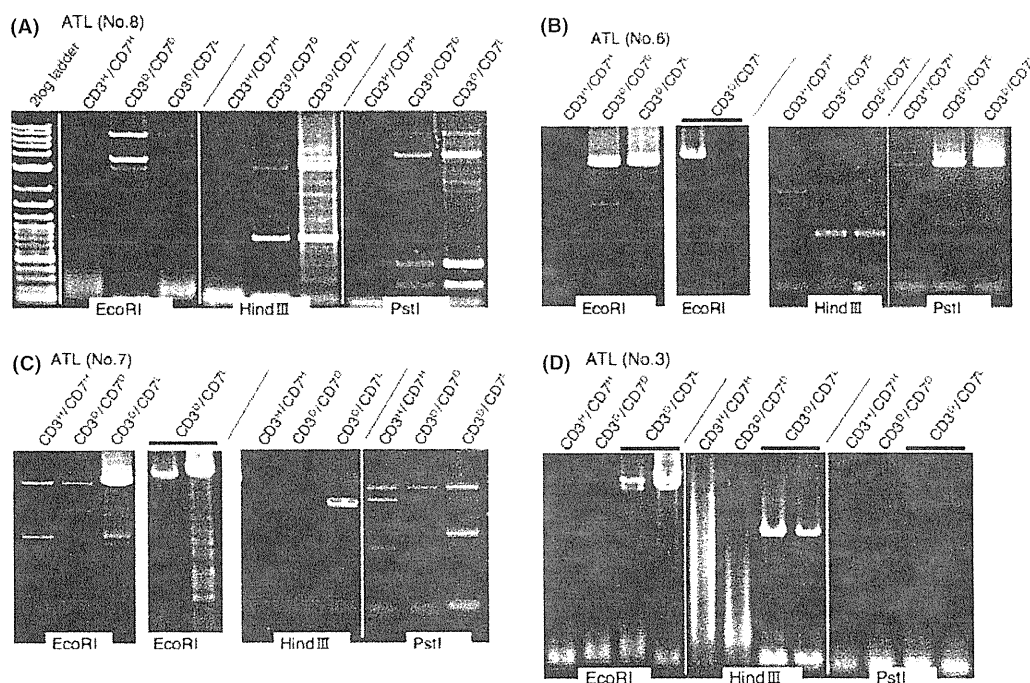


Fig. 4. Analysis of clonality in the CD3^{high}CD7^{high}, CD3^{dim}CD7^{dim} and CD3^{dim}CD7^{low} subpopulations using inverse long PCR. (A–D) Genomic DNA was extracted from FACS-sorted cells of each subpopulation and subjected to inverse long PCR. Representative data of four cases (patients no. 3, 6, 7 and 8) are shown. For the CD3^{dim}CD7^{low} subpopulations of patients no. 3, 6 and 7, PCR was performed in duplicate (black bars). ATL, adult T-cell leukemia.