

201123050A

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

HTLV-1 感染症の診断法の標準化と
発症リスクの解明に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 浜口 功

平成24(2012)年 3月

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

HTLV-1 感染症の診断法の標準化と
発症リスクの解明に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 浜口 功

平成24（2012）年 3月

目 次

I. 総括研究報告

- HTLV-1 感染症の診断法の標準化と発症リスクの解明に関する研究 P.3
浜口 功、山口一成、渡邊俊樹、出雲周二、上平 憲、岡山昭彦、
佐竹正博、山野嘉久、大隈 和、成瀬 功、水上拓郎、倉光 球

II. 分担研究報告

1. JSPFAD疫学コホートの現状と疫学解析の進展状況..... P.13
渡邊俊樹、岩永正子、岡山昭彦、宇都宮 與、内丸 薫、高 起良、
魚住公治、緒方正男、上平 憲、相良康子、山口一成
2. 抗HTLV-1抗体のWB判定保留血清の provirus status P.15
上平 憲
3. Multi-color FACS による発症高危険 HTLV-1 キャリアの同定/HTLV-1
キャリア対応の実態調査 P.16
内丸 薫
4. HTLV-I non-endemic areaにおけるHTLV-I抗体検査、Western Blot法、
PCR法検査の実態調査 P.45
齋藤 滋
5. HTLV-1 キャリアにおける末梢血中HTLV-1 プロウイルス量の検討..... P.48
宇都宮 與
6. HTLV-1 感染症の診断法の標準化と発症リスクの解明に関する研究(当施設
での検討) P.55
岡山昭彦、梅木一美
7. HTLV-1 定量PCR 検査の標準化に関する研究 P.56
山野嘉久
8. HTLV-1 ぶどう膜炎における末梢血中 HTLV-1 ウイルス量の検討..... P.67
望月 學
9. ATL 発症危険因子としてのバイオマーカーに関する検討 P.69
大隈 和、巽 正志、百瀬暖佳

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 P.73

IV. 研究成果の刊行物・印刷 P.87

研究組織

研究代表者：

浜口 功 国立感染症研究所 血液・安全性研究部

研究分担者：

山口一成 国立感染症研究所 血液・安全性研究部

渡邊俊樹 東京大学大学院 新領域創成科学研究科

岡山昭彦 宮崎大学医学部 内科学

佐竹正博 日本赤十字社 東京都西赤十字血液センター

出雲周二 鹿児島大学大学院 難治ウイルス病態制御研究センター

望月 學 東京医科歯科大学 眼科学

齋藤 滋 富山大学大学院 医学薬学研究部 産科婦人科

大隈 和 国立感染症研究所 血液・安全性研究部

高 起良 JR大阪鉄道病院

内丸 薫 東京大学 医科学研究所

山野嘉久 聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター

魚住公治 鹿児島大学大学院

緒方正男 大分大学医学部

上平 憲 長崎大学大学院

相良康子 福岡県赤十字血液センター

宇都宮 與 公益財団法人慈愛会 今村病院分院

岩永正子 帝京大学大学院 公衆衛生学研究科

巽 正志 国立感染症研究所 エイズ研究センター

研究協力者

梅木一美 宮崎大学医学部 内科学

成瀬 功 株式会社エスアールエル

水上拓郎 国立感染症研究所 血液・安全性研究部

倉光 球 国立感染症研究所 血液・安全性研究部

百瀬暖佳 国立感染症研究所 血液・安全性研究部

I. 総括研究報告

HTLV-1感染症の診断法の標準化と発症リスクの解明に関する研究

研究代表者 浜口 功 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 部長

研究要旨： HTLV-1 核酸検査法は、さまざまな研究施設で研究目的に開発されてきた。しかしながら、それぞれ施設の測定値には差が認められる。そこで国内の HTLV-1 核酸検査実施施設 8 施設の測定値の標準化を行った。標準品として HTLV-1 感染細胞の希釈系列を用い、それぞれの施設での標準品測定結果から各施設の補正値を算出した。その結果、感染細胞率 0.16%-20%の広範囲で補正が可能であることが明らかになった。全体の施設間差は約 7 倍から約 3 倍となり、その内 5 施設に関しては施設間差が 1.6 倍となった。これらのことから、HTLV-1 核酸検査の標準化は可能であることが考えられた。また、「ATL 克服に向けた研究の現状調査と進捗状況把握にもとづく効率的な研究体制の構築に関する研究（渡邊班）」との共催で、HTLV-1 関連疾患研究領域研究班合同発表会を開催した。

研究分担者

山口一成 国立感染症研究所 客員研究員
渡邊俊樹 東京大学大学院 教授
出雲周二 鹿児島大学大学院 教授
上平 憲 長崎大学大学院 教授
岡山昭彦 宮崎大学医学部 教授
山野嘉久 聖マリアンナ医科大学 准教授
佐竹正博 日本赤十字社東京都西赤十字血液
センター センター長
大隈 和 国立感染症研究所 室長

研究協力者

成瀬 功 株式会社エスアールエル 課長
水上拓郎 国立感染症研究所 室長
倉光 球 国立感染症研究所 研究員

A. 研究目的

HTLV-1核酸検査は、様々な研究施設において研究目的で開発・実施されている。しかしながら同一検体の測定値には施設間で隔たりがある。近年HTLV-1キャリアの末梢血単核球(PBMC)中のHTLV-1感染細胞数が4%以上であることがATL発症の危険因子であることが明かにされ、キャリアのViral Load (VL)の測定は予後予測に重要な測定項目となりつつある。また妊婦検診におけるHTLV-1抗体検査での判定保留例に対してHTLV-1核酸検査でのHTLV-1感染の確認が予定されている。このような背景からこれまで独自に運用されてきたHTLV-1核酸検査の測定値の統一を計るため、HTLV-1核酸検査の標準化作業を進めた。

B. 研究方法

細胞：TL-Om1は菅村和夫教授より分与された。HTLV-1キャリア血液は、JPSFADより分与された。健常人末梢血は、日本赤十字社より譲渡された血液またはAllCells社より購入し、使用した。
標準品の作製：CFSE染色したTL-Om1細胞を無染色のPBMC (Allcells)で5倍希釈し、希釈系列を作製

した。作製した希釈系列は100%TL-Om1, 20%, 4%, 0.8%, 0.16%, 0.032%の6点。作製した希釈系列はフローサイトメーターを用いてCFSE陽性細胞率を測定し、希釈率を確認した。

・FISH解析：TL-Om1細胞を低張液で処理後、カルノア液で固定し、スライドガラス上に染色体標本作製した。pUC/HTLV-1プラスミドをnick translation法でdigoxigeninラベルしプローブとした。プローブを標本に滴下し、カバーガラスを被せ70°C5分後処理後、37°Cで一晩ハイブリダイズした。標本をwash後、プローブをanti-digoxigenin抗体(Cy3ラベル)で検出した。解析はLeica CW4000 FISHで行った。

・シーケンス解析：PCR増幅産物に対してBigDye ver3でPCRを行い、3120xGenetic Analyzerで解析した。

・CGHアレイ解析：TL-Om1ゲノムDNAおよびPBMCゲノムDNA（10検体を同量で混合）に対してfilgen CytoSure™ Syndrome Plus v2.0 arrayを用いてプロトコルに従いアレイ解析した。結果はCytoSure™ Interpret softwareで解析した。

・核酸抽出および定量PCR：各施設の方法に従い、検体からゲノムDNAを抽出し、各施設のプライマーおよびTaqmanプローブを用いて定量PCRを行った。HTLV-1コピー数の定量値を内部標準遺伝子のコピー数で補正し、VL (%、copies/100cells)を算出した。

・各施設の補正値の算出：独立3回の測定結果からBioassay assist softwareを用いて平行線定量法で各施設の補正値を算出した。

(倫理面への配慮)

HTLV-1陽性臨床検体の測定については、国立感染症研究所の倫理審査会で承認されている。

C. 研究結果

(a) 標準品としてのTL-Om1細胞の評価

(a-1) TL-Om1のHTLV-1コピー数および挿入部位の染色体位置について

TL-Om1は、これまでサザンプロットの結果からHTLV-1の挿入はモノクローナルであることが明らかとなっていた。そこで1細胞あたりのHTLV-1コピー数をさらに詳細に調べるためHTLV-1 DNAをプローブにFISH解析を行い、TL-Om1のHTLV-1コピー数を測定した。その結果、TL-Om1には、HTLV-1が1コピー

一持つ細胞と2コピー持つ細胞があり、平均して1.8コピー/細胞のHTLV-1が含まれることが明らかになった(Fig 1A)。また間期の細胞でHTLV-1の挿入部位を検討したところ、HTLV-1プロウイルスはすべて1q44プローブと同じ染色体上にあることが明かとなり、第1番染色体の1p13に挿入されていた。また間期の染色体数からTL-Om1は4倍体であることが明らかになった(Fig 1B, 1C)。

(a-2)HTLV-1プロウイルスの染色体挿入部位の配列決定

HTLV-1挿入部位をSplinkerette PCRおよび制限酵素処理後self-ligationしたTL-Om1 DNAのInverse-PCRにより同定した(Fig 1D, 1E)。シーケンス解析の結果HTLV-1は第1番染色体のNT_077389 nt. 164570-164576に逆向きに挿入されていることが明らかとなった(Fig 1F)。

(a-3) CGHアレイによるTL-Om1全染色体のコピー数解析

TL-Om1と健常人PBMCのゲノムDNAをCGHアレイで比較したところ、TL-Om1の染色体のコピー数は不均一であることが明らかになった(Fig 2A)。しかしながら国内で使用される内部標準遺伝子の染色体領域についてコピー数を調べたところ、どの遺伝子領域についてもTL-Om1の平均的な遺伝子コピー数に近いコピー数にあることが明らかとなり著しい遺伝子コピー数の増加・減少は認められなかった(Fig 2B, 2C)。

(b) 標準品の測定

標準品として設定したTL-Om1/PBMC希釈系列を作製し、参加8施設に配布した。各施設の方法に従いDNA抽出から定量PCRまでの過程を独立3回測定した。測定結果の平均値には、約5倍の施設間差が認められた(Fig 3A)。

(c) 補正値の算出

各施設独立3回測定した標準品の測定値をもとに平行線定量法で各施設の補正値を算出した。TL-Om1濃度が0.16%~20%に範囲では全施設で補正が可能となった(Fig 3B)。

(d) HTLV-1陽性臨床検体の測定

JSPFAD登録キャリア22検体、日本赤十字社より陰性検体を10検体からPBMCを分離し、参加施設でDNA抽出およびHTLV-1 VLの測定を行った。陽性検体のHTLV-1 VL値には7.4倍の施設間差が認められた。標準品測定から得られた各施設の補正値で補正した結果、施設間差は3.4倍まで減少した。そのうち5施設については補正後に施設間差が1.6倍まで減少した(Fig 3C)。

D. 考察

核酸検査NATの標準化は、一般的に濃度を規定した標準品を設定し、標準品測定に係る抽出から定量・定性反応までの全体の影響を加味して行われる。標準品は測定するサンプルに出来るだけ近い組成の物質を使用することが望ましいとされることからHTLV-1核酸検査の標準品としてHTLV-1感染細胞(TL-Om1細胞株)のPBMC希釈系列と設定した。

TL-Om1の性状解析からは細胞あたり1.8コピーのプロウイルスを持つことや染色体挿入部位が1p13であること、核型が4倍体であることが明らかとなった。またプロウイルスのゲノム配列解析では国内8施設が使用するHTLV-1のPrimerおよびTaqman Probeの配列は完全に一致することが確認された。国内で 사용되는内部標準遺伝子のコピー数はどの遺伝子も

4N付近にあると考えられた。これらのことからHTLV-1の核酸検査の標準品としてのTL-Om1の品質は十分に使用可能なレベルにあると考えられた。

HBVやHCV、HIV-1等の血漿中のウイルスの核酸検査の標準品では高濃度の陽性血漿を陰性血漿で希釈して測定するが、細胞の標準品の場合は測定するその場での希釈は困難であることから希釈系列をあらかじめ作製した。希釈率はFACSによるTL-Om1の濃度測定で正確性を担保できると考えられた。FISH解析での細胞あたりのHTLV-1コピー数の測定値とFACSで濃度測定値からそれぞれの希釈品のVLを計算できることから、計算値をそれぞれの標準品の値として設定した。

国内8施設が参加した標準品の測定では、測定の結果20%~0.16%の広範囲のTL-Om1濃度で標準化が可能であることが統計学的解析から明らかとなった。臨床検体の測定値の標準化の結果、5施設に関しては施設間差がほぼなくなったと考えられたが、施設によっては3倍程度の差が依然として認められた。臨床検体のプロウイルスのシーケンス解析ではPrimer・Probe配列に変異は認められなかったため、差が生じた原因は試験毎の測定結果のぶれであると考えられた。毎回の試験に試験精度をモニターできるコントロールを置くことで技術面の改善ができると考えられる。

E. 結論

本研究の結果、感染細胞のPBMC希釈系列を標準品として設定し、各施設で標準品を測定した結果から算出した補正値で測定結果を補正することでHTLV-1核酸検査の標準化は可能であると考えられた。今後は、試験毎に特定のコピー数を規定した品質管理用のコントロールを各施設で設定し、試験毎に品質チェックすることや核酸検査における陰性判定の基準の設定等の試験内容の整備によって試験精度が向上すると期待出来る。

また、本年度は「ATL克服に向けた研究の現状調査と進捗状況把握にもとづく効率的な研究体制の構築に関する研究(渡邊班)」(パンフレット別添)との共催で、HTLV-1関連疾患研究領域研究班合同発表会を開催し、活発な発表討論や研究者間の情報交換が行われ、研究全体の発展・推進に寄与した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Satake M, Yamaguchi K, Tadokoro K. Current prevalence of HTLV-1 in Japan as determined by screening of blood donors. *J Med Virol.* 84(2):327-35, 2012
- 2) Kuramitsu M, Sato-Otsubo A, Morio T, Takagi M, Toki T, Terui K, Wang R, Kanno H, Ohga S, Ohara A, Kojima S, Kitoh T, Goi K, Kudo K, Matsubayashi T, Mizue N, Ozeki M, Masumi A, Momose H, Takizawa K, Mizukami T, Yamaguchi K, Ogawa S, Ito E, and Hamaguchi I. Extensive gene deletions in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia. *Blood* (in press)

2. 学会発表

- 1) 大隈 和、館山誠司、森下和広、広瀬国孝、山本

直樹、山口一成、浜口 功. 腫瘍溶解性ウイルス VSV を用いた ATL に対する TSLC1 分子標的療法の開発. 第4回 HTLV-1 研究会 2011年9月19日 東京大学弥生講堂

2) 水上拓郎、滝沢和也、倉光 球、狭間俊介、百瀬暖佳、益見厚子、山崎淳平、長谷川秀樹、山口一成、浜口 功. 脾臓及び骨髓由来の ATL 癌幹細胞の性状解析. 第4回 HTLV-1 研究会 2011年9月19日 東京大学弥生講堂

3) 水上拓郎、滝沢和也、山崎淳平、倉光 球、百瀬暖佳、益見厚子、長谷川秀樹、山口一成、浜口 功. HTLV-1 Tax トランスジェニックマウスを用いた ATL 癌幹細胞及びそのニッチの同定. 第152回日本獣医学会 大阪 2011年9月21日

4) Mizukami T, Takizawa K, Kuramitsu M, Momose H, Mausmi A, Yamazaki J, Hasegawa H, Hall W, Yamaguchi K, Hamaguchi I. Identification of cancer stem cell niche in Adult T-Cell Leukemia / lymphoma (ATL) model mouse. 73rd Japanese Society of Hematology, Nagoya, 14-16 Oct, 2011

5) Kuramitsu M, Matsubara A, Morio T, Takagi M, Toki T, Terui K, Wang R, Kanno H, Ohga S, Ohara A, Masumi A, Momose H, Mizukami T, Takizawa K, Yamaguchi K, Ogawa S, Ito E, Hamaguchi I. Extensiv

gene deletions in Japanese patients with Diamond Blackfan anemia. 73rd Japanese Society of Hematology, Nagoya, 14-16 Oct, 2011

6) Okuma K, Fukagawa K, Kohma T, Morishita K, Yamamoto N, Yamaguchi K, Hamaguchi I. A novel potential anti-ATL therapeutic based on a vesicular stomatitis virus targeting TSLC1. XXV IACRLRD Symposium Tokyo. 17 Sept, 2011.

7) Mizukami T, Takizawa K, Kuramitsu M, Momose H, Mausmi A, Yamazaki J, Hasegawa H, Hall W, Yamaguchi K, Hamaguchi I. Identification and Characterization of Bone Marrow-derived Leukemic Stem Cells in a Tax-transgenic Mouse Model of Adult T-Cell Leukemia / Lymphoma. XXV IACRLRD Symposium Tokyo. 17 Sept, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。

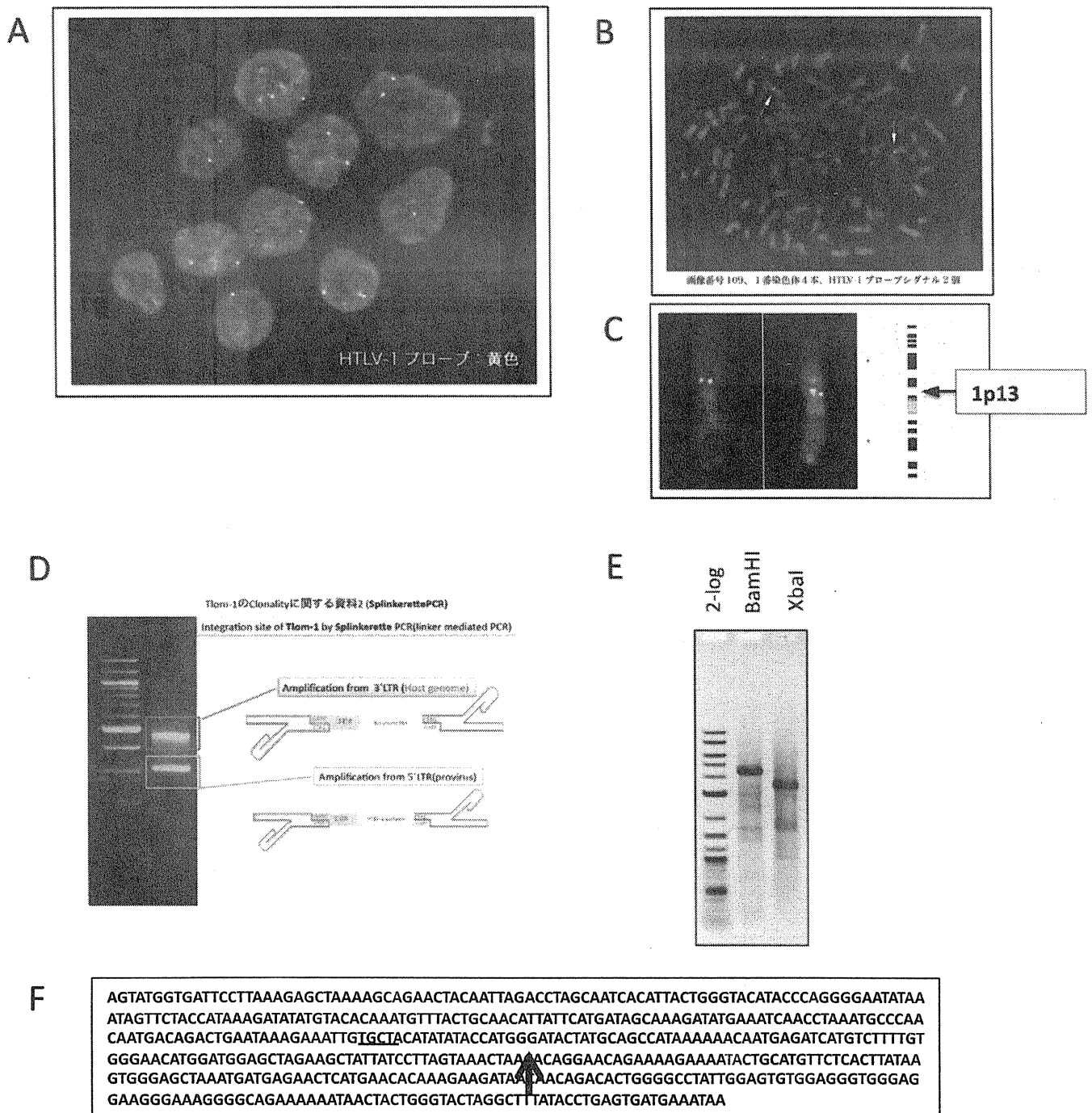
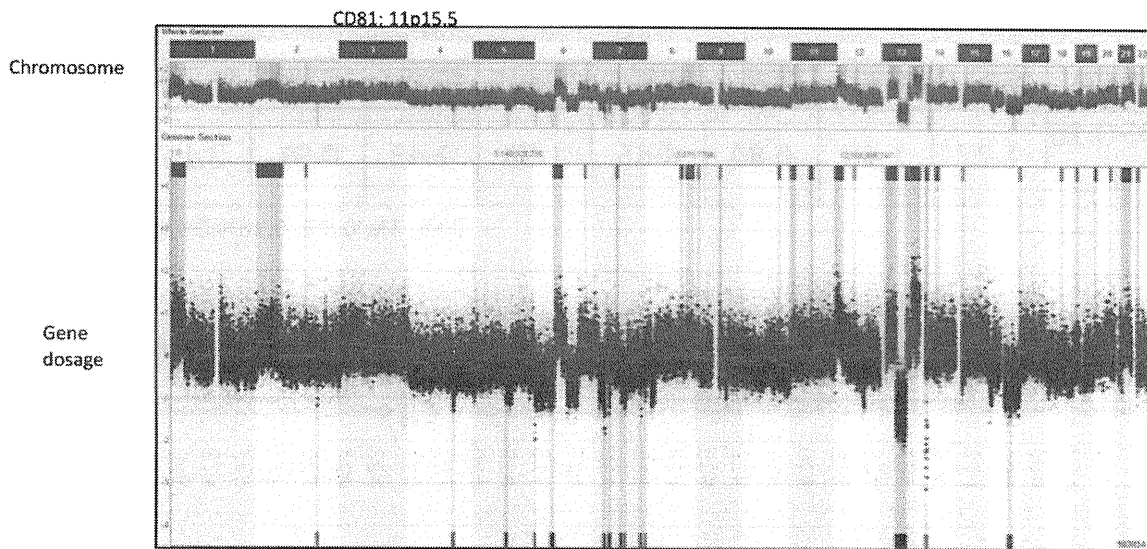


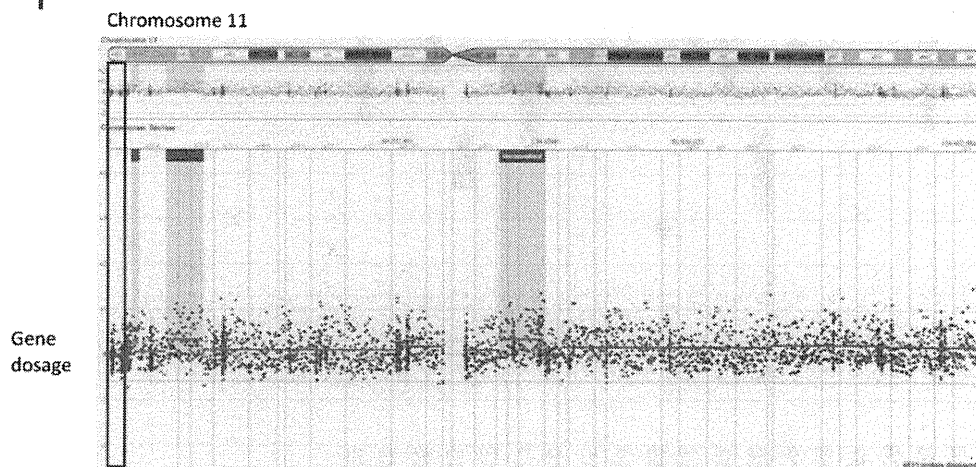
Figure 1. TL-Om1の性状解析

A. 細胞あたりのHTLV-1プロウイルスコピー数をHTLV-1完全長ゲノムに対するFISHプローブでFISH解析した。HTLV-1シグナルは細胞あたり平均1.78コピーであった。B. 間期の細胞の染色体数からTL-Om1は4倍体であった。C. 1q44プローブのFISH解析からHTLV-1は第1番染色体1p13に挿入されていた。D. SplanterettePCR法により3'LTR挿入部位配列を同定した。E. Self-ligationによるinverse-PCRから5'LTRの挿入部位を同定した。F. 同定した配列解析からHTLV-1プロウイルスの挿入部位はChromosome 1 NT_077389 164570-164576 (矢印、下線配列)で、HTLV-1は逆向きに挿入されていることが明らかになった。

A



B i



ii

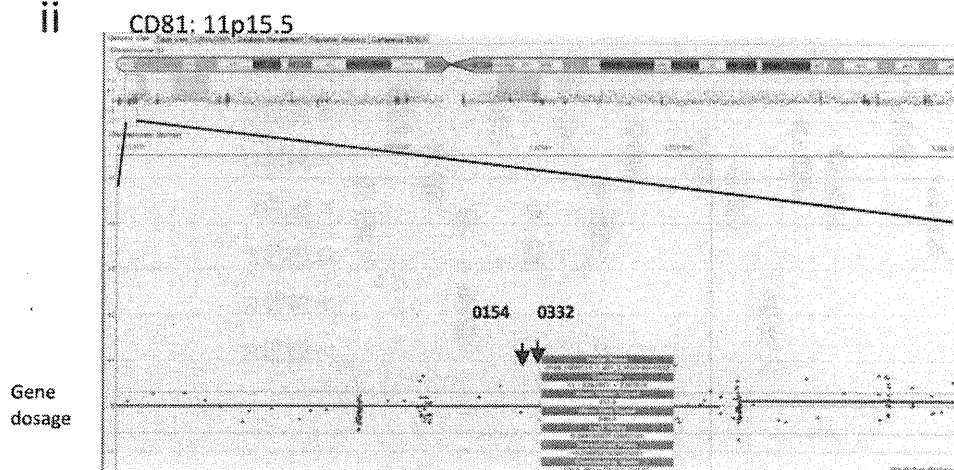


Figure 2. TL-Om1の内部標準遺伝子のコピー数解析

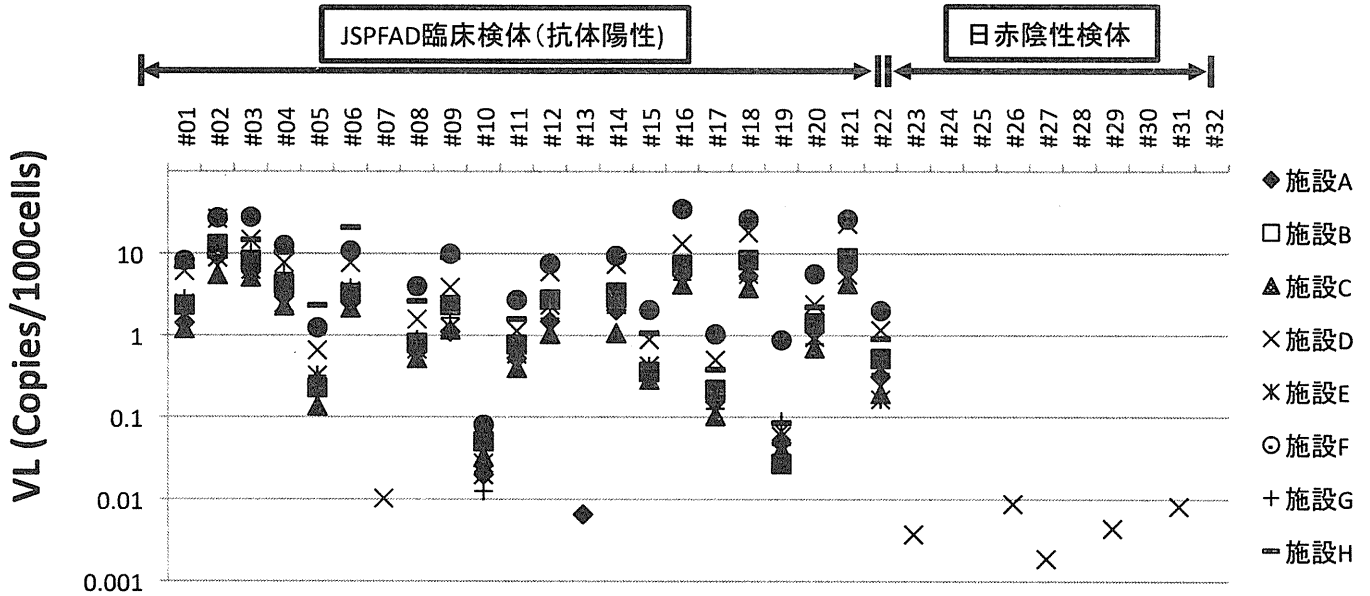
A. CGHアレイ解析でTL-Om1とPBMCのゲノムを比較した。TL-Om1の染色体は不均一であることが明らかになった。B. i. 国内で使用される内部標準遺伝子の1つCD81の遺伝子領域(第11番染色体)。ii. 11p15.5領域の拡大図。CD81遺伝子はプローブ0154と0332の間に位置する。Gene dosageの値(青線)からCD81は平均的染色体コピー数付近のコピー数であると予想された。その他の内部標準遺伝子(ALB, RPPH1, RAG-1, ACTB, HBB)も同様の傾向であった。

A

補正係数	施設A	施設B	施設C	施設D	施設E	施設F	施設G	施設H
20%-0.16%	1.27	1.58	0.84	4.45	1.38	2.45	0.91	3.16

20%, 4%, 0.8%, 0.16%の4点

B



C

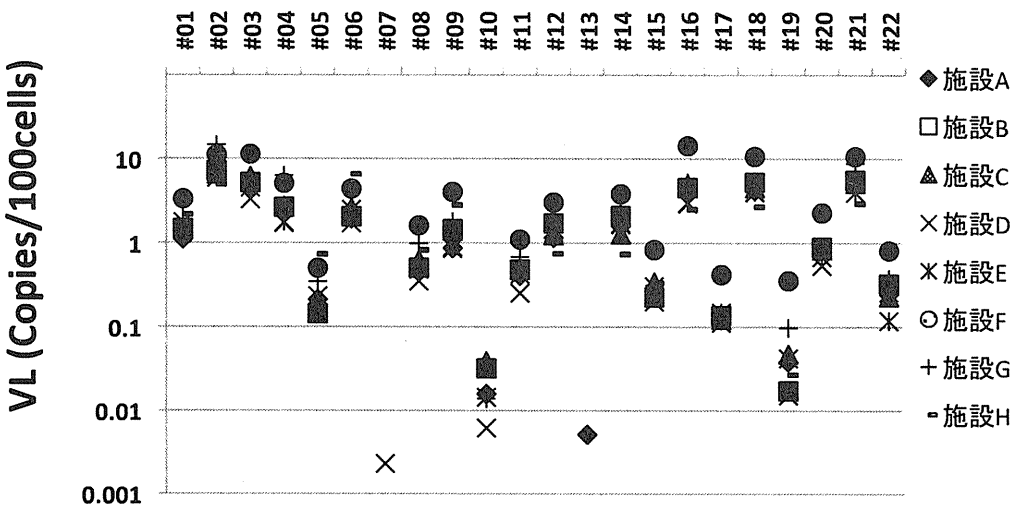


Figure 3. 施設ごとの補正值と臨床検体測定結果

A. 独立3回の核酸抽出・HTLV-1核酸定量測定からそれぞれの施設の補正值を平行線定量法で算出した。施設間で約5倍の差が認められた。

B. 臨床検体の測定結果。施設間で約7倍の差が認められた。C. 臨床検体の測定結果の補正值による補正結果。施設間差は、約3倍となった。補正後の値が近くなった5施設では施設間差は1.6倍となった。

The logo for HTLV, consisting of the letters 'HTLV' in a bold, white, sans-serif font, set against a dark, circular background. This logo is part of a vertical sequence of overlapping circles on the left side of the page, each containing a different image related to research or healthcare.

平成23年度
厚生労働科学研究費

HTLV-1関連疾患研究領域 研究班合同発表会

2012年 **3月3日** (土)
9:30-16:00

東京大学医科学研究所大講堂
東京都港区白金台4-6-1

共催

厚生労働科学研究費
ATL克服に向けた研究の現状調査と
進捗状況把握にもとづく効率的な研究体制の構築に関する研究
研究代表者 渡邊俊樹

厚生労働科学研究費
HTLV-1感染症の診断法の標準化と発症リスクの解明に関する研究
研究代表者 浜口 功

II. 分担研究報告

研究課題： JSPFAD疫学コホートの現状と疫学解析の進展状況

研究分担者： 渡邊俊樹（東大医科研）・岩永正子（帝京大院）・岡山昭彦（宮崎大）
宇都宮興（今村病院分院）・内丸薫（東大医科研）・高起良（JR大阪鉄道病院）
魚住公治（鹿児島大）・緒方正男（大分大）・上平憲（長崎大院）
相良康子（福岡県赤十字血液センター）・山口一成（国立感染症研）

研究要旨： HTLV-1 関連疾患の全国疫学コホートである JSPFAD を継続・維持し、累積検体数 6,199 検体、累積症例数 2,363 人のデータベースを構築した。このデータベースを活用して HTLV-1 キャリアから ATL 進展に関わる発症リスク解明のために、ウイルス量や既知のリスクファクターに加え新たなバイオマーカーや予後予測のためのスコアリングシステムを考案した。複数回献血者より初回献血後に抗体陽転化した例を抽出し、水平感染の実態を推測した。JSPFAD におけるバイオマテリアルバンクが、HTLV-1 検査法標準化確立グループや他の研究グループの研究サポートとして有効に活用された。

A. 研究目的

本研究分担者グループでは、2002年(平成14年)から継続しているHTLV-1関連疾患の全国疫学コホートであるJSPFADを継続・維持することによって、下記の3つの研究を行うことを目的としている。

- 1) HTLV-1ウイルス量測定を基礎的指標として、HTLV-1関連疾患の発症リスクを疫学的に解明する。
- 2) 水平感染も含めて、HTLV-1ウイルス感染経路を見直し、疾患発症との関連について検討する。
- 3) HTLV-1感染者のマテリアルバンクとして機能し、HTLV-1検査法標準化確立グループの研究サポートやHTLV-1関連疾患の発症に関連する新たなバイオマーカー探索研究をサポートし、HTLV-1キャリアの発症リスクの解明に貢献すること。

B. 研究方法

- 1) JSPFADデータベースの維持・継続：既に確立されたJSPFADの研究実施方法に基づいて、研究協力実施医療機関より研究協力対象者からの血液検体収集・臨床及び疫学情報収集を行う。具体的には、まず研究協力実施医療機関の担当者は研究対象者の検体と臨床・疫学情報を東大医科研に送付する。検体は東大医科研の検体データベースに登録後、生物学的処理を行いバイオマテリアル（細胞、DNA、血漿）とする。その一部を用いて東大医科研でウイルス学的解析（プロウイルス量の測定とモノクロナリティー検査）と遺伝子情報解析を行い、残余バイオマテリアルは福岡県赤十字血液センターへ送付して長期保存する。臨床・疫学情報は長崎大学(平成23年11月より帝京大学大学院)へ送付して疫学データベース内で管理維持する。
(倫理面への配慮)すべての研究協力実施医療機関は当該施設の倫理委員会による研究実施承認を受けており、すべての研究協力対象者からはインフォームドコンセントが得られており、情報はすべて匿名化コード処理して収集される仕組みとなっており、十分な倫理面の配慮がなされている。

- 2) HTLV-1キャリアからATL進展に関わる発症リスク解明：ウイルス学的解析ならびに臨床・疫学情報を付きあわせ、HTLV-1キャリアからATLへの発症リスクを疫学的に解析する。CarrierからATL進展に関与するリスクファクターとして、これまでのJSPFADコホート研究によって明らかとなった高ウイルス量に加え、最新の生化学的・分子生物学知見をもとに新規バイオマーカーを検討する。さらに、既知のリスクファクターを組み合わせ、予後予測につながるスコアリングシステムを検討する。

- 3) ウイルス感染経路の見直しと疾患発症との関連：HTLV-1キャリアの多くは、乳児期の母乳感染による垂直感染であるが、水平感染による実態についてはこれまで十分には検討されていない。現状のJSPFADのシステムでは水平感染の実態を疫学的に解析することは困難であるため、日赤の献血データを用いて水平感染の実態を「推測」することを試みた。まず、九州地区の複数回献血者について抗HTLV-1抗体陽転化事例を抽出し、解析を行った。

- 4) バイオマテリアルバンクの活用を検討する。

C. 研究結果

- 1) JSPFADデータベース登録状況：平成23年12月現在、研究協力実施医療機関は、15都道府県にまたがる43施設である。平成14年から平成23年までの期間、検体データベース上の累積検体数は6,199検体、疫学データベース上の累積症例数は2,363人であった。症例の内訳は、無症候性HTLV-1キャリア約70%、ATL約17%、HAM約2%、HU(HTLV-1関連ブドウ膜炎)約4%であった。無症候性HTLV-1キャリアとして登録され、経過観察中にATLに進展したとみなされた17例が特定された。

- 2) HTLV-1キャリアからATL進展に関わる発症リスク解明：感染による生体反応で特異的に発現することが既に論文等で発表され重要視されているCD44、OPN、KL6、ALT、NCB1をバイオマーカー候補(生体側因子)として討議した。さらに、発症リスクのスコア化について、リスクファクターとして確定している年齢・ウイルス量・家族歴・配偶者の感染歴

などの項目に点数をつけ、点数により高危険群を絞りこめるかどうか、4つの案を考案した。

- 3) 献血者における水平感染の推測：2008年1月2日から2010年12月31日の期間に九州地区で採血された複数回献血者978,013例（男 692,023, 女 285,990）のうち、160例が初回献血後に抗体陽転化を示した。陽転化率は、男性50例（0.0072%）、女性110例（0.038%）と女性が多かった。年齢は19歳から65歳と幅広く、男性では20代後半から60代前半まで同程度の陽転化率であったが、女性では出産年齢前後と閉経年齢以降に陽転化率が高い傾向が認められた。陽転化率の対前年比は118～138%と直近の3年間で明らかな上昇を示していた。
- 4) バイオマテリアルバンクの活用状況：本研究組織において、HTLV-1検査法標準化確立グループの研究サポートのために、本バンクより検体の供給をおこなった。本研究組織以外に、国内から4件、海外から3件の利用申請があり、研究内容を検討後、2件について検体の供給を行った。他の申請については、JSPFADメンバーの研究内容との競合および下記の条件を考慮し、申請内容の修正を依頼している。さらに、今後のバイオマテリアルバンク利用申請者が増加するに伴い、希少性にある検体の保護が必要であることから、検体の希少性を順位づけるために検体を、(1)高度希少検体、(2)中等度希少検体、(3)一般検体、(4)希少性の少ない検体、に区分するシステムを考案した。

D. 考察

本年度は主として、JSPFADの検体データベース、疫学データベース、バイオマテリアルの発展的活用を検討した。今回候補となったバイオマーカーの有用性や、今回考案した発症リスクのスコアリングの有用性については、今後の検討課題である。初回献血後に抗体陽転化した献血者の解析から、出産年齢前後と閉経年齢以降の女性に陽転化率が高い傾向が認められ、婚姻によるHTLV-1の水平感染の可能性が強く推測された。水平感染者のATL進展リスクの有無については、「確実に水平感染」とみなされるHTLV-1キャリア群の特定と前向き調査が必要である。

E. 結論

JSPFADの検体データベース、疫学データベース、バイオマテリアルは、本研究グループのみならず、他の研究グループへの情報提供を通して、HTLV-1キャリアからATLへの発症リスクの解明に有効的に活用可能である。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamagishi M, (他8名), Utsunomiya A, Yamaguchi K, Uchimaru K, Ogawa S, Watanabe T. Polycomb-Mediated Loss of miR-31 Activates NIK-Dependent NF-kB Pathway in Adult T Cell Leukemia and Other Cancers. *Cancer Cell* 21:121-135, 2012.
- 2) Watanabe T. Current status of HTLV-1 infection.

Int J Hematol 94:430-4, 2011.

- 3) Tian Y, (他8名), Uchimaru K. 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. *Cancer Sci* 102:569-77, 2011.
- 4) Ueno S, (他6名), Okayama A. Proviral loads of human T-lymphotropic virus type 1 in asymptomatic carriers with different infection routes. *Int J Cancer* 2011 (Epub).
- 5) Umino A, Nakagawa M, Utsunomiya A, et al. Clonal evolution of adult T-cell leukemia/lymphoma takes place in the lymph nodes. *Blood* 117:5473-8, 2011.
- 6) Kozako T, (他11名), Uozumi K, Arima N. Target epitopes of HTLV-1 recognized by class I MHC-restricted cytotoxic T lymphocytes in patients with myelopathy and spastic paraparesis and infected patients with autoimmune disorders. *J Med Virol* 8: 501-9, 2011.
- 7) Ogata M, et al. High incidence of cytomegalovirus, human herpesvirus-6, and Epstein-Barr virus reactivation in patients receiving cytotoxic chemotherapy for adult T cell leukemia. *J Med Virol* 83:702-9, 2011.
- 8) Sasaki D, (他11名), Kamihira S, Yamada Y. Overexpression of Enhancer of zeste homolog 2 with trimethylation of lysine 27 on histone H3 in adult T-cell leukemia/lymphoma as a target for epigenetic therapy. *Haematologica* 96:712-9, 2011.
- 9) 高崎由美, 岩永正子, 塚崎邦弘. 話題：くすぶり型・慢性型成人T細胞白血病リンパ腫に対する無治療経過観察は適切な選択か? *血液内科* (科学評論社) 63:40-45, 2011.
- 10) 上平憲. HTLV-1感染の特性と成人T細胞白血病 -ウイルス母子感染対策- 宝函32:13-23, 2011.
- 11) Koh H, (他11名), Koh KR, et al. Factors that contribute to long-term survival in patients with leukemia not in remission at allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Exp Clin Cancer Res* 30:36, 2011.
- 12) Kamihira S, et al. Heterogeneity in clonal nature in smoldering ATL. *Int J Hematol* (In press)

2. 学会発表

- 1) Uchimaru K, Yamano Y, Tsukasaki K, Uike N, Utsunomiya A, Iwanaga M, Hamada T, Iwatsuki K, Watanabe T. Nation-wide survey of the management of adult T-cell leukemia and HTLV-1 carrier. 第73回日本血液学会総会, 2011年10月14-16日, 名古屋, 臨床血液, 52 (9), 448, 2011.
- 2) 相良康子, 他. 複数回献血者における抗HTLV-1抗体陽性化に関する解析—水平感染の可能性—. 第4回HTLV-1研究会, 2011年9月18日 東大弥生講堂
- 3) 高起良. 成人T細胞白血病とその原因ウイルス、ヒトT細胞白血病ウイルス-1型(HTLV-1)に関する現状について. 日本交通医学会第82回関西地方会 2011年11月19日 大阪.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

題名 抗HTLV-1抗体のWB判定保留血清のprovirus status

研究分担者 長崎大学 上平憲 教授

研究要旨：当院検査部で経験した PA(+), CLEIA(+), WB(判定保留；WHO 基準にて env 抗体 (-)(gag 抗体+)の 3 サンプルについて、Real time qPCR 及び nested PCR にて HTLV-1 provirus の検出状況を検討した。その結果、全 3 サンプルとも Nested PCR で positive band が陽性となった。このことは WB を確認最終試験とすると WB 判定保留サンプルは HTLV-1 持続感染者とするべきと考えられた。

A. 研究目的

抗HTLV-1抗体の血清学的乖離サンプルにおいて、PCR で検出されるHTLV-1 provirusが存在するか。

B. 研究方法

APP in Nagasakiの検体等のなかからPA(+), CLEIA(+), Western Blot法(判定保留)の3サンプル末血から単核球を分離し、genome DNAを抽出し、pX部分にprimersを設定しreal-time qPCRとnested PCR 法にて比較検討した。倫理的20年間続けている長崎県の母乳感染対策の一巻で妊娠採血時に説明と同意が得られている。

C. 研究結果

3 サンプルとも定量PCRでは、測定可能範囲外に弱い増幅反応(+)出会ったために、さらに 10^{1-2} 高感度のNested PCRを行ったところsharp Band (+)となった。

D. 考察

HTLV-1の持続感染は、本ウイルスの感染形態から抗HTLV-1抗体の検出にて判定される。抗体価が弱い場合は、一般にWB法にてWHO criteriaで最終判定される。しかし、env抗体が陰性となり、判定保留が多くこのような抗体profileが実際感染しているか否か決着がついていない。我々の今回の研究では 10^{-3} ないし 10^{-5} 程度のlow virus carrying infectionと考えられた。

E. 結論

WB法で判定保留の検体は、low virus infection Stateと考えられる。このようなlow virus carrierが母乳感染源となるか否かは不明である。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

- 論文発表
1. 上平 憲。HTLV-1感染の特性と成人T細胞白血病 -ウイルス母子感染対策-、宝函 3 2 (2) 13-23, 2011.
2. Kamihira S., et al. Heterogeneity in clonal nature in smoldering ATL. In press (IJH)
3. Hasegawa H., Kamihira S. et al: Aberrant Expression of membrane Mucin contributes in tumor progression in ATL. Leuk & Lym 52:1108-1117, 2011
4. Hasegawa H, Yamada Y, Tsukasaki K, Mori N, Tsuruda K, Sasaki D, Usui T, Osaka A, Atogami S, Ishikawa C, Machijima Y, Sawada S, Hayashi T, Miyazaki Y, Kamihira S. LBH589, a deacetylase inhibitor, induces apoptosis in adult T-cell leukemia/lymphoma cells via activation of a novel RAIDD-caspase-2 pathway. Leukemia. 25(4):575-87, 2011.

2. 学会発表

- 1) 上平 憲。Blood-Borne Virus. 第58回輸血・細胞治療学会。特別講演 2011/12/17

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

題名 Multi-color FACSによる発症高危険HTLV-1キャリアの同定/HTLV-1キャリア対応の実態調査

研究分担者 内丸 薫 東京大学 医科学研究所 准教授

研究要旨： HTLV-1 キャリア中の発症ハイリスク群の同定のために、HTLV-1 キャリア、ATL 患者において CD3,4,7,14 抗原の発現を multi-color FACS で検討した。CD4 陽性細胞における CD7 発現レベルにより CD7P(positive)、D(dim)、N(negative)にわけてその比率を検討することにより CD7D+L>45%の症例は発症ハイリスク群であることが示唆された。末梢血プロウイルス量が4%以下の症例でこのグループに入る症例は1例もなく、改めて4%以下の症例が発症 low risk であることが示唆された。疫学班の課題としてキャリア対策の基礎資料とするため全国の保健所におけるキャリア対応の現状を調査した。

A. 研究目的

当班疫学グループの先行研究で末梢血中HTLV-1プロウイルス量が4%以上の症例がハイリスクグループと同定されている。しかし、その中でも特に発症の近いハイリスクグループの同定はウイルス量の定量のみでは困難である。本研究では先行研究で明らかにした急性型ATL細胞のmulti-color FACSを用いた検出系を用いてHTLV-1感染細胞の表面形質の変化から発症高危険群を同定することを試みた。合わせて疫学班で取り組んでいるHTLV-1キャリア対応の基礎資料とするため全国の保健所における現状の調査を行う。

B. 研究方法

対象はHTLV-1キャリア40例、くすぶり型ATL7例、慢性型ATL7例、急性型ATL13例、健常人対象6例で、末梢血単核球を分離後、CD3, 4, 7, 14抗体を用いてFACS AriaによりCD14陽性単球をゲートアウト後CD3, 4陽性T細胞にゲートをかけ、CD3, 7の発現を検討した。（倫理面への配慮）本研究は東京大学医科学研究所倫理審査委員会の承認を得て（承認番号22-4-0518）、文書による説明同意を得たうえで検体を採取した。保健所のキャリア対応の把握のため、全国495ヶ所の保健所を対象に調査票による実態調査を行った。

C. 研究結果

各検体のC4陽性T細胞はCD7の発現レベルによりCD7P(positive)、D(dim positive)、N(negative)の3つの集団に分けられ、CD7D、CD7Nの%により2次元プロットすることにより、健常人コントロールと同じ領域(G1)に分布する症例、CD7D+L>45%以上、かつCD7L<80%(G2)の主にindolent ATLが分布する領域に分布する症例、CD7L>80%(G3)に分布する急性型症例に分けられた（図1、論文準備中）。無症候性キャリアのうち一部の症例はG2に分布し、これらの症例は末梢血中異常リンパ球の%が高く、サザンプロット、inverse PCRでmajor cloneの存在を示唆する症例が多く見られた。末梢血プロウイルス量が4%以下の症例は、全例G1に分布したが、4%以下の症例はG1~G2に渡って分布した。保健所実態調査は2011年12月に施行し、ノンエンデミックエリアでは84%の施設で月間対応数が0であることが判明した。

D. 考察

無症候性キャリアのうち一部の症例はCD7の発現パターンがindolent ATLと同様のパターンを示し、これらの症例はmajor cloneが出現してHTLV-1感染細胞のクローナルな増殖が始まっている症例と考えられた。病勢の悪化を継時的に経過を追った症例ではG1→G2→G3と変化しており、本解析はHTLV-1感染細胞の腫瘍化過程の評価に有用と考えられた。末梢血中プロウイルス量が4%以下の症例は全例G1に分布し、4%以下の症例が発症low riskであることを改めて示唆する結果であった。

保健所でのキャリア対応は現状では少なく、保健所での対応に必要な対策の整備の必要性が示唆された。

E. 結論

CD3, 4, 7, 14を用いたmulti-color FACSによるHTLV-1感染細胞の解析はHTLV-1キャリア中のハイリスク群の同定に有用であった。保健所でのキャリア対応のための対策の整備の必要性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
 1. Makoto Yamagishi, Kazumi Nakano, Ariko Miyake, Tadanori Yamochi, Yayoi Kagami, Akihisa Tsutsumi, Yuka Matsuda, Aiko Sato-Otsubo, Satsuki Muto, Atae Utsunomiya, Kazunari Yamaguchi, Kaoru Uchimaruru, Seishi Ogawa, and Toshiki Watanabe. Polycomb-Mediated Loss of miR-31 Activates NIK-dependent NF- κ B Pathway in Adult T-cell Leukemia and Other Cancers. Cancer cell in press.
 2. Uchimaruru K. Current problems on the management of HTLV-1 asymptomatic carriers and ATL patients. Rinsho Ketsueki. 2011 52(10):1432-1438.
2. 学会発表
 1. 大野伸広、田 亜敏、小林誠一郎、磯部優理、津田

- 真由子、在家裕司、渡辺信和、谷憲三朗、東條有伸、内丸 薫. CD3 と CD7 の展開による ATL 細胞の同定: 急性型 ATL の治療反応性のモニタリングとして 第 73 回日本血液学会総会 名古屋 2011
2. Kobayashi S, Tian Y, Ohno N, Isobe M, Tsuda M, Zaike Y, Watanabe N, Tani K, Tojo A Uchimaru K. CD3 vs CD7 plot in multi-colour FACS reflects progression of disease stage of HTLV-1 infected patients. 第 73 回日本血液学会総会 名古屋 2011
3. Uchimaru K, Yamano Y, Tsukasaki K, Uike N, Utsunomiya A, Iwanaga M, Hmada T, Iwatsuki K, Watanabe T. Nation-wide survey of the management of adult T-cell leukemia and HTLV-1 carrier. 第 73 回日本血液学会総会 名古屋 2011
4. 石垣知寛、在家裕司、小林誠一郎、大野伸広、内丸 薫、渡辺信和、小柳津直樹、東條有伸、中内啓光. フローサイトメトリーによるフェノタイプ解析を用いた、急性型 ATL の末梢血腫瘍細胞数の評価 第 4 回 HTLV-1 研究会 東京 2011
5. 大野伸広、湯地晃一郎、小林誠一郎、渡辺信和、石垣知寛、東條有伸、内丸 薫. Multi-color FACS 用いた CD3/7 展開による急性型 ATL の治療反応性のモニタリング 第 4 回 HTLV-1 研究会 東京 2011
6. 小林誠一郎、田 亜敏、大野伸広、湯地晃一郎、石垣知寛、磯部優理、津田真由子、在家 裕司、渡辺恵理、渡辺信和、谷憲三朗、東條 有伸、内丸 薫. マルチカラーFACSにおける CD3 と CD7 の展開は HTLV-1 感染患者の病期の進行を反映する 第 4 回 HTLV-1 研究会 東京 2011
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

Figure 1

