

- Takahashi K, Fujita J. Cytomegalovirus-associated gastric ulcers in a patient with dermatomyositis treated with steroid and cyclophosphamide pulse therapy. *Endoscopy*. 2011;43 Suppl 2 UCTN:E277-8. Epub 2011 Sep 13. No abstract available.
- 9) Nakamura K, Ito A, Yara S, Haranaga S, Hibiya K, Hirayasu T, Sako Y, Fujita J. A case of pulmonary and hepatic cystic Echinococcosis of CE1 stage in a healthy Japanese female that was suspected to have been acquired during her stay in the United Kingdom. *Am J Trop Med Hyg*. 2011 Sep;85(3):456-9.
- 10) Li H, Zhou Y, Fan F, Zhang Y, Li X, Yu H, Zhao L, Yi X, He G, Fujita J, Jiang D. Effect of azithromycin on patients with diffuse panbronchiolitis: retrospective study of 51 cases. *Intern Med*. 2011;50(16):1663-9. Epub 2011 Aug 15.
- 11) Nakayama Y, Ishikawa C, Tamaki K, Senba M, Fujita J, Mori N. Interleukin-1 alpha produced by human T-cell leukaemia virus type I-infected T cells induces intercellular adhesion molecule-1 expression on lung epithelial cells. *J Med Microbiol*. 2011 Dec;60(Pt 12):1750-61. Epub 2011 Aug 4
- 12) Fujita J, Sunagawa S, Higa F, Tateyama M, Uno T. Comparison of critically ill patients between different outbreaks caused by pandemic H1N1 2009 influenza virus in Okinawa, Japan. *Influenza Other Respi Viruses*. 2011 Nov;5(6):e477-8. doi: 10.1111/j.1750-2659.2011.00275.x. Epub 2011 Jul 14.
- 13) Sunagawa S, Fujita J, Higa F, Tateyama M, Haranaga S, Nakasone I, Yamane N, Uno T. Comparison of drug sensitivity and genotypes of clinically isolated strains of levofloxacin-resistant *Streptococcus pneumoniae* obtained from Okinawa Island, the Japanese main island and Hong Kong. *J Antibiot (Tokyo)*. 2011 Aug;64(8):539-45.
- 14) Higa F, Akamine M, Furugen M, Hibiya K, Koide M, Tamayose M, Tamaki Y, Haranaga S, Arakaki N, Yara S, Tateyama M, Fujita J. Hepatocyte growth factor levels in *Legionella pneumoniae*: a retrospective study. *BMC Infect Dis*. 2011 Mar 23;11:74.
- 15) Niki Y, Hanaki H, Matsumoto T, Yagisawa M, Kohno S, Aoki N, Watanabe A, Sato J, Hattori R, Koashi N, Terada M, Kozuki T, Maruo A, Morita K, Ogasawara K, Takahashi Y, Matsuda K, Nakanishi K, Sunakawa K, Takeuchi K, Fujimura S, Takeda H, Ikeda H, Sato N, Niitsuma K, Saito M, Koshiba S, Kaneko M, Miki M, Nakanowatari S, Takahashi H, Utagawa M, Nishiya H, Kawakami S, Aoki Y, Chonabayashi N, Sugiura H, Ichioka M, Goto H, Kurai D, Saraya T, Okazaki M, Yoshida K, Yoshida T, Tsukada H, Imai Y, Honma Y, Yamamoto T, Kawai A, Mikamo H, Takesue Y, Wada Y, Miyara T, Toda H, Mitsuno N, Fujikawa Y, Nakajima H, Kubo S, Ohta Y, Mikasa K, Kasahara K, Koizumi A, Sano R, Yagi S, Takaya M, Kurokawa Y, Kusano N, Mihara E, Nose M, Kuwabara M, Fujiue Y, Ishimaru T, Matsubara N, Kawasaki Y, Tokuyasu H, Masui K, Kido M, Ota T, Honda J, Kadota J, Hiramatsu K, Aoki Y, Nagasawa Z, Yanagihara K, Fujita J, Tateyama M, Totsuka K. Nationwide surveillance of bacterial respiratory pathogens conducted by the Japanese Society of Chemotherapy in 2008: general view of the pathogens' antibacterial susceptibility. *J Infect Chemother*. 2011 Aug;17(4):510-23. Epub 2011 Mar 17.
- 16) Hibiya K, Tateyama M, Teruya H, Nakamura H, Tasato D, Kazumi Y, Hirayasu T, Tamaki Y, Haranaga S, Higa F, Maeda S, Fujita J. Immunopathological characteristics of immune reconstitution inflammatory syndrome caused by *Mycobacterium parascrofulaceum* infection in a patient with AIDS. *Pathol Res Pract*. 2011 Apr 15;207(4):262-70. Epub 2011 Mar 4.
2. 学会発表 (国際学会のみ)
- 1) Fujita J, Kohno S. Clinical and bacteriological efficacies of sitafloxacin against community-acquired pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae*. 21th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 27th International Congress of Chemotherapy (7-10 May 2011, Milan, Italy)
- 2) Kadota J, Yanagihara K, Yamamoto Y, Tokimatsu I, Hiramatsu K, Higa F, Tateyama M, Fujita J, Kohno S. Early switch therapy from intravenous sulbactam/ampicillin to oral garenoxacin in patients with community-acquired pneumonia: a multicenter, randomized study. CHEST 2011 (October 22-26, 2011, Honolulu, Hawaii)
- 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

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

HTLV-1 感染に関連する非 ATL 非 HAM 希少疾患の実態把握と病態解明（皮膚疾患）

研究分担者 瀬戸山 充
宮崎大学医学部感覚運動医学講座皮膚科学分野 教授

研究協力者 天野 正宏
宮崎大学医学部 附属病院 准教授
研究協力者 前久保 理恵
宮崎大学医学部 附属病院 助教

研究要旨 種々の疾患における臨床所見や治療反応などが、HTLV-1 キャリア陽性患者と陰性患者において異なるか否かについて、症例対照研究を行う。

A. 研究目的

中毒疹・薬疹、紅皮症、湿疹・皮膚炎群、膠原病などにおいて HTLV-1 陰性患者と陽性患者における、臨床所見、検査値、病理組織像、臨床経過に違いがあるかを検討する。

B. 研究方法

当科を受診した中毒疹・薬疹、紅皮症、湿疹・皮膚炎群が疑われる患者のうち、同意を得られた患者を対象に、聞き取り調査、血液データの比較、病理組織像の比較などを施行する。

（倫理面への配慮）

なお、本研究の内容は「疫学研究に関する倫理指針」（文部科学省・厚生労働省）に基づき、宮崎大学倫理審査委員会により倫理審査をうけ承認されている。患者への説明と同意取得を行う。

C. 研究結果

当科を受診した中毒疹・薬疹、紅皮症、湿疹・皮膚炎群が疑われる患者に対して、説明と同意取得を行い、聞き取り調査、血液データの比較、病理組織像の比較などを開始した。

D. 考察

当科における過去のデータを参考にすると、HTLV-1 陽性率は 25.4% と高く、HTLV-1 キャリア患者においては、薬疹、湿疹・皮膚炎、紅皮症を主訴として受診する患者の占める割合が多かった。HTLV-1 は、CD4 陽性細胞に限らずランゲルハンス細胞、ケラチノサイト、血管内皮細胞にも感染することが分かっている。上記の疾患群はいずれもこれらの細胞との関わりがみられる病態であり、これらの感染細胞の機能失調、免疫のターゲットとなり得る

ことなど考慮すると興味深いと考えている。

E. 結論

症例数を増やし湿疹皮膚炎群、薬疹、膠原病、乾癬、悪性腫瘍等において、HTLV-1 キャリア陽性患者と陰性患者の間に臨床所見や治療反応などの相違があるか検討していく予定である。

F. 健康危険情報

現時点では該当する情報なし。

G. 研究発表（平成 23 年度）

1. 論文発表

■宮崎大学 瀬戸山充

1) Amano M, Marutsuka K, Sugimoto T, Todaka T, Setoyama M: Epstein-barr virus-associated primary central nervous system lymphoma in a patient with adult T-cell leukemia/lymphoma, The Journal of Dermatology, vol38 no. 6, P575-580, 2011 (5).

2) 石井千寸、天野正宏、持田耕介、堀川永子、瀬戸山充、久富木庸子：複数の治療法を併用した皮膚型成人 T 細胞白血病／リンパ腫の 1 例、西日本皮膚科、Vol. 73, No. 4, p362-367, 2011 (8).

学会発表

1) Amano M, Setoyama M: A CASE OF ADULT T CELL LEUKEMIA/LYMPHOMA (ATLL) MIMICKING SISTER MARY JOSEPH' S NODULE, 22nd World Congress of Dermatology, 2011, 5, Seoul.

2) Amano M, Setoyama M: Assessment of cutaneous involvements by F-18 fluorodeoxyglucose

emission tomography imaging in patients with adult T-cell leukemia/ lymphoma, 15th International Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Viruses, 2011, 6, ベルギー.

3) 天野正宏、飯川まどか、前久保理恵、瀬戸山充：特異な臨床像を呈した皮膚型成人 T 細胞白血病／リンパ腫 (ATLL) の 2 例、日本皮膚科学会愛媛地方会第 54 回学術大会、2011、9、愛媛。

4) 成田幸代、持田耕介、加嶋亜紀、天野正宏、瀬戸山充、江良幸三、綾部貴典、石崎淳三：肺癌および胃原発 ATLL を合併した皮膚筋炎の 1 例、第 63 回日本皮膚科学会西部支部学術大会、2011、10、沖繩。

5) 堀川永子、石井千寸、持田耕介、帖佐宣昭、天野正宏、瀬戸山充、菊池英維：リツキシマブに耐性化を示した primary cutaneous diffuse large B cell lymphoma (PCDLBCL), leg type の 1 例、第 63 回日本皮膚科学会西部支部学術大会、2011、10、沖繩。

6) 前久保理恵、持田耕介、天野正宏、瀬戸山充、植原進一郎：メソトレキサート関連リンパ球増殖性疾患 (MTX-LPD) の 1 例、第 62 回日本皮膚科学会中部支部学術大会、2011、11、三重。

7) Amano M, Nagamachi S, Setoyama M：FDG-PET imaging of cutaneous involvements in adult T-cell leukemia / lymphoma, The 36th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2011, 12, Kyoto.

■特別講演

1) 天野正宏：成人 T 細胞白血病の診断と治療、第 74 回日本皮膚科学会東京支部学術大会、2011、2、東京。

2) 瀬戸山充：皮膚リンパ腫の臨床と最近の話題、第 57 回広島県皮膚科講習会、2011、3、広島。

3) 瀬戸山充：成人 T 細胞白血病・リンパ腫について－免疫学的側面も含めて－、第 12 回和歌山皮膚アレルギー・感染症フォーラム、2011、和歌山。

4) 瀬戸山充：皮膚リンパ腫ガイドラインについて、第 27 回日本臨床皮膚科医会九州ブロック総会・学術教育講習会、2011、5、福岡。

■著書・総説

1) 瀬戸山充：皮膚リンパ腫の分類と治療戦略、非上皮性腫瘍 (リンパ球・組織球性など)、皮膚科診療カラーアトラス大系 第 7 巻 [腫瘍] 非上皮性・転移性、鈴木啓之、神崎保 (編)、講談社、p22-23、2011 (5.24)

2) Amano M, Setoyama M, Annika Grant, Francisco A. Kerdel：Human T-lymphotropic Virus 1 (HTLV-1) infection - dermatological implications, International Journal of Dermatology, vol50, no. 8, P915-920, 2011 (8).

H. 知的所有権の取得状況
現時点では出願・登録なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

HTLV-1 感染に関連する非 ATL 非 HAM 希少疾患の実態把握と病態解明(ぶどう膜炎)

研究分担者 望月 學

東京医科歯科大学 眼科学 教授

研究要旨 HTLV-1 は、ATL、HAM のほかにぶどう膜炎、関節炎、一部の膠原病、肺病変、皮膚疾患などの種々の慢性炎症疾患において関連が示唆されてきた（非 ATL 非 HAM 希少疾患）。しかし HTLV-1 陽性の慢性炎症疾患を独立した疾患群として取り扱うべきかについてはいまだ明らかとなっていない。近年、何らかの疾患で加療中に発見されたキャリアでは ATL 発症リスクが高いことが報告され、また一方で難治性の慢性炎症性疾患に高頻度に使われるようになった免疫抑制剤や生物学的製剤では ATL の頻度を増加させる可能性が示唆されている。HTLV-1 陽性の慢性炎症性疾患そのものが ATL 発症リスクとなるのか、治療が発症リスクを増加させるのかが重要な問題である。本研究の分担である、ぶどう膜炎疾患で後方視的調査および症例対照研究を行い、HTLV-1 陽性患者では陰性者と異なる臨床所見を有するか、またウイルス学的検討により ATL 発症リスクが高いかどうかを明らかにする。治療反応性や予後については前方視的研究を行う。

A. 研究目的

慢性炎症を主な病態とする膠原病、呼吸器疾患、皮膚疾患、ぶどう膜炎について HTLV-1 感染との関連を解明することを目的とした、多施設共同研究。当分担での研究目的は、HTLV-1 陽性のぶどう膜炎患者の、①ウイルス学的検討②陰性者との臨床的所見の違いの検討③ATL や HAM、その他の慢性炎症疾患との関連を解析し本ウイルス感染症の全体像の把握をする。

B. 方法

Setting: HTLV-1 高侵淫地域である宮崎県都城市
対象: HTLV-1 ぶどう膜炎患者連続症例
方法: 後方視的診療録調査、並びに、前向き疫学調査

(倫理面への配慮)

本研究はヘルシンキ宣言に基づく原則に従い、かつ「疫学研究に関する倫理指針」に準じて実施する。当該臨床研究実施計画書及びその他、最新の審査資料に基づき、倫理的、科学的及び医学的妥当性の観点から、その実施の適否について倫理審査委員会に付議され、承認を得た後に実施する。

C. 研究結果

当研究の実地施設である宮田眼科病院(宮崎県都城市)倫理委員会用の資料(臨床研究実地計画書、患者説明用の文章)を作成した。2012年1月25日に宮田眼科病院倫理委員会で上記資料を提示、承認された。また過去に診断、治療された HTLV-1 ぶどう膜炎患者のリストアップと、新規患者に本研究の通知を開始した。

D. 考察

1992年以降、診断、治療した HTLV-1 ぶどう膜炎患者約200例を目標にリストアップを開始したところ、長期にわたり通院し、追跡可能な患者も存在することが明らかになり、長期予後の検討、例えば HTLV-1 ぶどう膜炎患者が ATL の発症のリスクかなど、有用な知見を得られる可能性があると考えられた。

また今後年間約20例を見込まれる HTLV-1 ぶどう膜炎発症患者とすでに診断・治療されている患者の血清を、宮崎大学内科学講座免疫感染病態学分野の岡山昭彦教授に送付し、HTLV-1 ウイルスマーカー測定を行うことで、ウイルスマーカーと眼科的検査

所見（視力、眼圧、前房内フレア値、細隙灯顕微鏡検査、眼底検査、蛍光造影眼底撮影、OCT 検査）の関連性の検討が可能になり、新たな知見が得られると考えられた。

E. 結論

実地施設である宮田眼科病院の倫理審査委員会で当研究の承認を得ることができた。臨床研究実地計画書に沿って、研究を開始しており、今後データの蓄積、解析をしていく予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表（平成 23 年度）

論文発表

なし

学会発表

なし

著書・総説

なし

H. 知的所有権の取得状況

特許取得：

なし

実用新案登録：

なし

その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
研究報告書

膠原病におけるHTLV-1感染の解析

研究分担者 岡山 昭彦
宮崎大学医学部内科学講座・免疫感染病態学分野、膠原病、感染症学

研究協力者
梅木一美 宮崎大学医学部附属病院 検査部
上野史朗、梅北邦彦、宮内俊一 同 膠原病・感染症内科
日高利彦 市民の森病院膠原病リウマチセンター

研究要旨 ヒトTリンパ向性ウイルス1型（HTLV-1）陽性のぶどう膜炎、関節炎、膠原病、慢性肺疾患、慢性皮膚疾患など種々の慢性炎症疾患の病態を明らかにする研究の一環として、宮崎県における HTLV-1 陽性膠原病患者の実態調査を行い、HTLV-1 陰性患者との病態や予後、治療反応性の違いについて明らかにする研究を開始した。またこれら疾患において、ATL や HAM の発症頻度が高いかどうか、また治療として頻繁に使用されるステロイドを含む免疫抑制治療が特に ATL の発症促進につながるかどうかについても、これら疾患を合併している膠原病患者のウイルス学的特徴を検討した。平成 23 年度においては、初回献血者の HTLV-1 抗体陽性率の結果から慢性炎症性疾患を合併し易い 40 歳から 60 歳の宮崎県の成人において 2-8%と高率に HTLV-1 キャリアが存在していること、またこのような地域背景において、膠原病患者における HTLV-1 抗体陽性率は特にシェーグレン症候群患者などで高いことが示された。このことは HTLV-1 感染によりこれら疾患の頻度が上昇することを示唆している。さらに HTLV-1 陽性関節リウマチ患者において抗サイトカイン薬である生物学的製剤による治療に反応しにくい可能性が示された。また慢性炎症性疾患の合併及び治療が HTLV-1 感染の病態に与える影響については、自己抗体による偽陽性は検出されなかった。抗体価やプロウイルス量は高めの傾向を示したが、幅広く分布した。また関節リウマチ患者において TNF 阻害薬治療中の患者において、検討した限りではプロウイルス量や感染細胞のクローナリティに変化はなく、ただちに ATL のリスクが上昇しているおそれはないものと思われた。今後さらに症例数を増加させ、また他のフィールドの結果と総合して診療ガイドラインなどに反映できるデータの収集を行う予定である。

A. 研究目的

ヒトTリンパ向性ウイルス1型（HTLV-1）はC型レトロウイルスであり、成人T細胞白血病(ATL)や神経変性疾患である HTLV-1 関連脊髄症(HAM)の原因である。ATL、HAM 以外にも HTLV-1 高浸淫地域においてぶどう膜炎、関節炎、膠原病、慢性肺疾患、慢性皮膚疾患など種々の慢性炎症疾患に本ウイルスキャリアが高頻度に見られ関連が示唆されている。

本研究では HTLV-1 感染とこれらの疾患のうち膠原病との関連について解析を行い、HTLV-1 感染に関連している膠原病の頻度、特徴、ウイルス感染と疾患発症のメカニズムを明らかにし、HTLV-1 関連膠原病の臨床像を明らかにする。すなわち

HTLV-1 高浸淫地域である宮崎県における実態調査を行い、HTLV-1 陽性患者と陰性患者の病態や予後、治療反応性の違いについて明らかにする。膠原病や関節リウマチにはすでに診断や治療のガイドラインが存在するが、HTLV-1 陽性のこれらの疾患患者において明らかに異なる病像が見られる場合は、独立した clinical entity として取り扱う必要が生じ、それぞれのカテゴリーについて診断基準や治療法のガイドラインに組み込むことが必要となる。またこれら疾患において、ATL や HAM の発症頻度が高いかどうか、また治療として頻繁に使用されるステロイドを含む免疫抑制治療が特に ATL の発症促進に

つながらないかどうかは重要な疑問である。このためにはこれら疾患を合併している膠原病患者のウイルス学的特徴を明らかにする。

B. 研究方法

■研究対象と方法

関節リウマチあるいはリウマチ様関節炎およびシェーグレン症候群他の膠原病について宮崎大学医学部付属病院とそれらの協力病院(研究協力者:市民の森病院膠原病リウマチセンター所長日高利彦)で対象症例のリクルートを行う。

1) HTLV-1 陽性疾患の頻度をふくめた実態調査研究について説明後同意を得た対象疾患患者について HTLV-1 スクリーニングを行い、対象疾患患者のうち HTLV-1 陽性者を同定する。

2) HTLV-1 マーカー調査と症例対照研究

①各疾患を有する HTLV-1 キャリアと無症候性キャリアのウイルスマーカの比較: HTLV-1 抗体陽性と判明したキャリア患者について、スクリーニング偽陽性の有無、抗体価、リアルタイム PCR 法を用いた感染細胞の測定を行い、対照無症候性キャリアと比較することで、疾患を有するキャリアに特徴的なウイルス学的変化について検討する。とくにステロイド、タクロリムスなどの免疫抑制剤、抗サイトカイン療法などの生物学的製剤治療を受けている患者において変化があるか否かを検討する。

②病態に関する症例対照研究:各疾患の臨床症状や検査成績、予後、治療反応性についての調査票に基づいて、臨床所見や治療反応性などが HTLV-1 陽性患者と陰性患者で異なるか否かについて症例対照研究を行う。

3) HTLV-1 感染と疾患発症メカニズムについての研究

①HTLV-1 欠損ウイルスと疾患の関連の検討(担当:宮崎大学 岡山): HTLV-1 感染者の感染細胞に組み込まれているプロウイルスには完全型と2種類の欠損ウイルスがあり、ATL 発症のハイリスク群である母子感染による長期キャリアではウイルス量増加に加えて欠損ウイルス保有細胞が増加していることが判明している。この欠損のパターンが病態と関連している可能性を考え、われわれが開発した欠損ウイルス測定用リアルタイム PCR 法を用いて測定を行う。

②感染細胞クローナリティの検討

膠原病合併 HTLV-1 キャリアにおいて ATL 発症頻度が高いか否かを知るためには本来これら患者の長期フォローアップが必要であるが、十分な患者数を長期にわたりフォローアップすることは困難である。このため ATL 発症リスク増加の代替マーカーとして、これまで関連が報告されているウイルス量測定に加えて、inverse-long PCR 法を用いて感染細胞のクローナリティを評価し、特定の感染細胞クローンの増加などがないかどうかを検討する。

■倫理面への配慮

「疫学研究に関する倫理指針」に従って対象となる患者に対して説明と同意取得を行う。研究プロトコールは宮崎大学医学部において倫理審査を申請し承認を得ている。

C. 研究結果

1) HTLV-1 陽性疾患の頻度をふくめた実態調査研究について説明後同意を得た対象疾患患者について HTLV-1 スクリーニングおよび患者登録を開始した。宮崎地域におけるプレリミナリーな検討では、膠原病患者(平均年齢 56 歳、男女比 3:7)における HTLV-1 抗体陽性率は、同一年齢の初回献血者の抗体陽性率男性 2.6%、女性 4.9%に比して高い傾向にあった。過去のデータも参考にすると、とくにシェーグレン患者における抗体陽性率は明らかに高い傾向を示した。

2) HTLV-1 マーカー調査と症例対照研究

①膠原病合併 HTLV-1 キャリアのウイルスマーカー:宮崎地域における膠原病患者において HTLV-1 抗体陽性と判明したキャリア患者について、スクリーニング偽陽性の有無、抗体価、リアルタイム PCR 法を用いた感染細胞数(プロウイルス量)の検討を行った。宮崎地方における膠原病では、少数例の検討範囲ではあるが、ウエスタンブロットによる確認検査や HTLV-1 核酸検査でスクリーニング偽陽性はなかった。また抗体価とプロウイルス量も幅広く分布した。しかしながら強皮症や関節リウマチの病像を呈した患者のなかで末梢血液単核細胞 100 個当たりのプロウイルスコピー数が 10 個を超える高ウイルス量キャリアが比較的高い頻度で見られた。

②病態に関する症例対照研究:臨床所見の比較に十分な症例数はいまだ集積されていないが、これまでの複数の生物学的製剤の投与を受けた関節リウマチ患者における比較では、通常高い奏効率を示す TNF 阻害薬であるインフリキシマブ、エタネルセプトによって治療された患者が HTLV-1 陽性である場合、治療反応性が良くない傾向が認められた。

3) HTLV-1 感染と疾患発症メカニズムについての研究

①HTLV-1 欠損ウイルスと疾患の関連の検討(担当:宮崎大学 岡山): HTLV-1 抗体陽性と判明したキャリア膠原病患者について、欠損ウイルス測定用リアルタイム PCR 法を用いて測定を検討中である。膠原病患者に抗核抗体等の影響によるスクリーニング法抗体偽陽性者や、抗体価の分布、ウエスタンブロット法による抗体反応パターンの違いがあるか否かはさらに検討が必要である。しかし、末梢血液単核細胞 100 個当たりのプロウイルスコピー数が 10 個を超える高ウイルス量キャリアが比較的高い頻度で見られたことは興味深く、今後の検討を要する。

②感染細胞クローナリティの検討:ATL 発症リス

ク増加の代替マーカーとして、ウイルス量測定に加えて、inverse-long PCR法を用いた感染細胞のクローナリティ測定を開始した。関節リウマチ患者において生物学的製剤（炎症性サイトカイン TNF 阻害薬）であるインフリキシマブ、エタネルセプト投与後数カ月のフォローアップでは、プロウイルス量や感染細胞のクローナリティに変化のないことが示された。（図1）

D. 考察

今回の研究では、まず初回献血者の HTLV-1 抗体陽性率の結果から宮崎県においては、慢性炎症性疾患を合併し易い 40 歳から 60 歳の成人において 2-8%と高率に HTLV-1 キャリアが存在していることが推定された。このような地域背景において、膠原病患者における HTLV-1 抗体陽性率は特にシェーグレン症候群患者などでは明らかに高いことが示された。このことは HTLV-1 感染によりこれら疾患の頻度が上昇することを示唆している。しかしながらいまだ少数例の検討であり、今後の症例の蓄積が必要である。

慢性炎症性疾患を合併している患者のうち HTLV-1 陽性者と陰性者の比較については、いまだ臨床所見の比較に十分な症例数はいまだ集積されていないが、HTLV-1 陽性者では、関節リウマチ患者において抗サイトカイン薬である生物学的製剤による治療に反応しにくい可能性が示された。さらに慢性炎症性疾患の合併及び治療が HTLV-1 感染の病態に与える影響については、自己抗体などによる偽陽性は検討した範囲ではなく、ウイルス量が高めの患者がみられた。また関節リウマチ患者においての TNF 阻害薬治療中の患者において、検討した限りではプロウイルス量や感染細胞のクローナリティに変化はなく、ただちに ATL のリスクが上昇しているおそれはないものと思われた。

E. 結論

平成 23 年度における宮崎地域の検討結果から、本研究が HTLV-1 感染と膠原病の関連を明らかにする研究手法として有用であることが示唆された。また、一部の結果は HTLV-1 と慢性炎症性疾患の interaction が確かに存在するという仮説を支持するものであった。しかしいまだ少数例の検討結果であり、平成 24 年度においてさらに検討対象者数を拡大し、また各研究者の情報交換を密に行い、他のフィールドの結果と総合することで、より精密な解析を行う必要がある。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

■宮崎大学 岡山昭彦

- 1) Takenouchi H, Umeki K, Sasaki D, Yamamoto I, Nomura H, Takajo I, Ueno S, Umekita K, Kamihira S, Morishita K, Okayama A. Defective human T-lymphotropic virus type 1 provirus in asymptomatic carriers. *Int J Cancer*. 128(6), p. 1335-1343. (2011)
- 2) 梅北邦彦, 日高利彦, 岡山昭彦. 話題4. IL-6 阻害薬と感染症のマスクングとは?. *臨床検査. 増刊号 ここまでわかった自己免疫疾患*. 55(11), p. 1367-1370. (2011)
- 3) Umekita K, Kaneko Y, Yorita K, Hashiba Y, Matuda M, Miyauchi S, Ueno S, Takajo I, Kusumoto N, Nagatomo Y, Marutsuka K, Okayama A. Arthropathy with infiltrate IgG4 positive plasma cells in synovium. *Rheumatology*. doi: 10.1093/rheumatology/ker350. (2011)
- 4) Ueno S, Umeki K, Takajo I, Nagatomo Y, Kusumoto N, Umekita K, Morishita K, Okayama A. Proviral loads of human T-lymphotropic virus type 1 in asymptomatic carriers with different infection routes. *Int J Cancer*. 2012, 130(10), p2318-26 (May 15) doi: 10.1002/ijc.26289. Epub 2011 Aug 29.
- 5) Nakahata S, Saito Y, Marutsuka K, Hidaka T, Maeda K, Hatakeyama K, Shiraga T, Goto A, Takamatsu N, Asada Y, Utsunomiya A, Okayama A, Kubuki Y, Shimoda K, Ukai Y, Kurosawa G, Morishita K. Clinical significance of CADM1/TSLC1/IgSF4 expression in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Leukemia*. 2012 Jan 6. doi: 10.1038/leu.2011.379. [Epub ahead of print]

2. 学会発表:

- 1) 日高利彦, 久保和義, 坂口翔太, 黒田宏, 松本亮, 濱砂重仁, 梅北邦彦, 岡山昭彦. 高齢者に対する抗 TNF 製剤の治療効果と安全性. 第 41 回九州リウマチ学会. (2011)
- 2) 梅北邦彦, 濱田浩朗, 岡山昭彦, 帖佐悦男. 宮崎県における関節リウマチ生物学的製剤使用実態調査. 第 41 回九州リウマチ学会 (2011)
- 3) 金子裕美, 梅北邦彦, 橋場弥生, 松田基弘, 宮内俊一, 上野史朗, 楠元規生, 高城一郎, 長友安弘, 岡山昭彦. 胸腹部大動脈病変を呈した ANCA 関連血管炎. 第 41 回九州リウマチ学会. (2011)
- 4) 橋場弥生, 梅北邦彦, 金子裕美, 松田基弘, 宮内俊一, 楠元規生, 上野史朗, 高城一郎, 長友安弘, 岡山昭彦. 蛋白漏出性胃腸炎と間質性肺炎を合併した皮膚筋炎の 1 例. 第 41 回九州リウマチ学会. (2011)
- 5) 日高利彦, 久保和義, 坂口翔太, 黒田宏, 梅北邦彦, 岡山昭彦. 関節リウマチに対するインフリキシマブの増量・短縮療法の治療効果. 第 55 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 第 20 回国際リウマチシンポジウム. (2011)
- 6) 梅北邦彦, 宮内俊一, 上野史朗, 高城一郎, 楠元

規生, 坂口翔太, 金子裕美, 橋場弥生, 松田基弘, 久保和義, 長友安弘, 日高利彦, 岡山昭彦. 関節リウマチにおける末梢血血小板由来マイクロパーティクルの臨床的意義. 第 55 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 第 20 回国際リウマチシンポジウム. (2011)

7) 久保和義, 日高利彦, 坂口翔太, 黒田宏, 梅北邦彦, 岡山昭彦. 当院における関節リウマチに対するトシリズマブの治療成績. 第 55 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 第 20 回国際リウマチシンポジウム. (2011)

8) 宮内俊一, 梅北邦彦, 金子裕美, 坂口翔太, 橋場弥生, 松田基弘, 久保和義, 上野史朗, 楠元規生, 高城一郎, 長友安弘, 日高利彦, 岡山昭彦. 血漿 Pentraxin3 の関節リウマチにおける臨床的意義の検討. 第 55 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 第 20 回国際リウマチシンポジウム. (2011)

9) 森林耕平, 鬼塚久充, 川越純志, 鶴田敏博, 石川哲憲, 今村卓郎, 北村和雄, 高城一郎, 岡山昭彦. 関節リウマチに合併した肺動脈性肺高血圧の 1 例. 第 294 回日本内科学会地方会. (2011)

10) 橋場弥生, 坂口翔太, 日高利彦, 久保和義, 春山聡志, 黒田宏, 岡山昭彦. タクロリムスにマクロライド系薬剤を追加併用した際の治療効果と安全性. 第 42 回九州リウマチ学会. (2011)

11) 日高利彦, 橋場弥生, 春山聡志, 黒田宏, 梅北邦彦, 岡山昭彦. バイオフリーを目指すにはどの生物学的製剤を選択するか. 第 42 回九州リウマチ学会. (2011)

12) 金子裕美, 梅北邦彦, 川口剛, 坂口翔太, 宮内俊一, 楠元規生, 上野史朗, 高城一郎, 長友安弘, 岡山昭彦. ループス腸間膜血管炎および蛋白漏出性胃腸症を合併した SLE に対するタクロリムスの使用経験. 第 42 回九州リウマチ学会. (2011)

13) 梅木一美, 山本成郎, 上野史朗, 高城一郎, 岡山昭彦. HTLV-1 無症候性キャリアにおける 2 型欠損プロウイルスの解析. 第 58 回日本臨床検査医学会学術集会. (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

生物学的製剤導入患者の HTLV-1プロウイルス・クロナリティーの推移

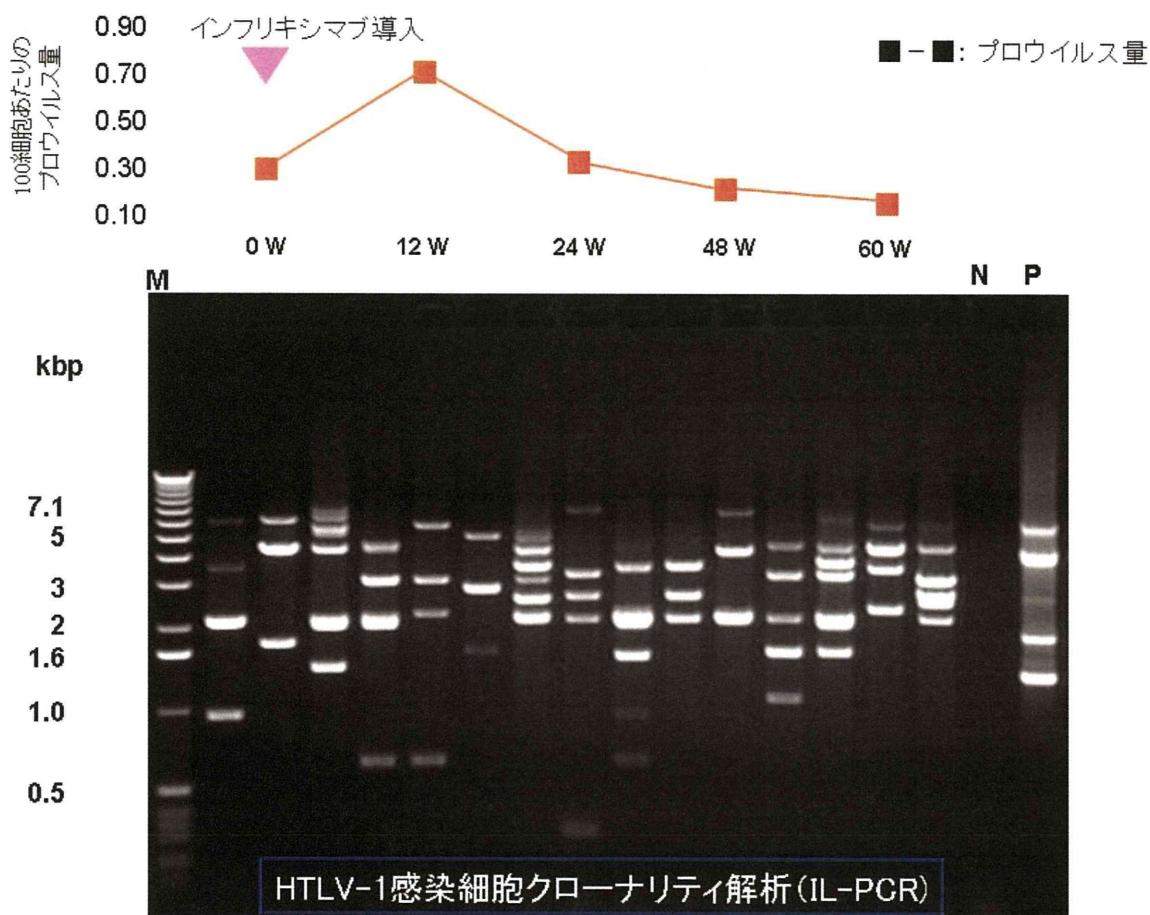


図 1

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	ページ
Takenouchi H, Umeki K, Sasaki D, Yamamoto I, Nomura H, Takajo I, Ueno S, Umekita K, Kamihira S, Morishita K, Okayama A	Defective human T-lymphotropic virus type 1 provirus in asymptomatic carriers.	Int J Cancer	128(6)	1335-1343	2011
梅北邦彦, 日高利彦, 岡山昭彦	話題4. IL-6 阻害薬 と感染症のマスキング とは？	臨床検査. 増刊 号 ここまで わかった 自己免疫疾患	55(11)	1367-1370	2011
Umekita K, Kaneko Y, Yorita K, Hashiba Y, Matuda M, Miyuchi S, Ueno S, Takajo I, Kusumoto N, Nagatomo Y, Marutsuka K, Okayama A	Arthropathy with infiltrate IgG4 positive plasma cells in synovium	Rheumatology	doi:10.10 93/rheum atology/k er350		2011
Ueno S, Umeki K, Takajo I, Nagatomo Y, Kusumoto N, Umekita K, Morishita K, Okayama A	Proviral loads of human T-lymphotropic virus type 1 in asymptomatic carriers with different infection routes.	Int J Cancer	130(10)	2318-26	2012
Nakahata S, Saito Y, Marutsuka K, Hidaka T, Maeda K, Hatakeyama K, Shiraga T, Goto A, Takamatsu N, Asada Y, Utsunomiya A, Okayama A, Kubuki Y, Shimoda K, Ukai Y, Kurosawa G, Morishita K	Clinical significance of CADM1/TSLC1/Ig SF4 expression in a dult T-cell leukemia/ lymphoma.	Leukemia	doi:10.10 38/leu.20 11.379. [Epub ah ead of pr int]		2012
Koga T, Yamasaki S, Migita K, Kita J, Okada A, Kawashiri S, Iwamoto N, Tamai M,	Post-transcriptional regulation of IL-6 production by Zc3h12a in fibroblast-like synovial cell.	Clin Exp Rheumatol	29 (6)	906-12	2011

Arima K, Origuchi T, Nakamura H, Osaki M, Tsurumoto T, Shindo H, Eguchi K, Kawakami A					
Ohyama K, Ueki, Kawakami A, Tamai M, Osaki M, Kamihira S, Nakashima K, Kuroda N	Immune complexome analysis of serum and its application in screening for immune complex antigens in rheumatoid arthritis.	Clin Chem	57 (6)	905-909	2011
Kawashiri SY, Kawakami A, Iwamoto N, Fujikawa K, Sato K, Tamai M, Nakamura H, Okada A, Koga T, Yamasaki S, Ida H, Origuchi T, Eguchi K	The power Doppler ultrasonography score from 24 synovial sites or 6 simplified synovial sites, including the metacarpophalangeal joints, reflects the clinical disease activity and level of serum biomarkers in patients with rheumatoid arthritis.	Rheumatology	50 (5)	962-965	2011
Koga T, Okada A, Kawashiri S, Kita J, Suzuki T, Nakashima Y, Tamai M, Sato K, Origuchi T, Iwamoto N, Yamasaki S, Nakamura H, Migita K, Ida H, Ueki Y, Eguchi K, Kawakami A	Soluble urokinase pl asminogen activator receptor as a useful biomarker to predict the response to adalimumab in patients with rheumatoid arthritis in a Japanese population.	Clin Exp Rheumatol	29 (5)	811-815	2011
Kawashiri SY, Kawakami A, Okada A, Koga T, Tamai M, Yamasaki S, Nakamura H, Origuchi T, Ida H, Eguchi K	CD4+CD25highCD12 7low/- treg cell frequency from peripheral blood correlates with disease activity in patients with Rheumatoid Arthritis	J Rheumatol	38 (12)	2517-2521	2011
Li H, Zhou Y, Fan F, Zhang Y, Li X, Yu H, Zhao L, Yi X, He G, Fujita J, Jiang D	Effect of azithromycin on patients with diffuse panbronchiolitis: retrospective study of 51 cases.	Intern Med	50(16)	1663-9	2011

Nakayama Y, Ishikawa C, Tamaki K, Senba M, Fujita J, Mori N	Interleukin-1 alpha produced by human T-cell leukaemia virus type I-infected T cells induces intercellular adhesion molecule-1 expression on lung epithelial cells.	J Med Microbiol.	60(Pt 12)	1750-61	2011
Hibiya K, Tateyama M, Teruya H, Nakamura H, Tasato D, Kazumi Y, Hirayasu T, Tamaki Y, Haranaga S, Higa F, Maeda S, Fujita J	Immunopathological characteristics of immune reconstitution inflammatory syndrome caused by Mycobacterium parascrofulaceum infection in a patient with AIDS.	Pathol Res Pract	207(4)	262-70	2011
Amano M, Marutsuka K, Sugimoto T, Todaka T, Setoyama M	Epstein-barr virus- associated primary central nervous system lymphoma in a patient with adult T-cell leukemia/lymphoma	The Journal of Dermatology	138(6)	575-80	2011
Amano M, Setoyama M, Annika Grant, Francisco A. Kerdel	Human T-lymphotropic Virus 1(HTLV-1) infection - dermatological implications	International Journal of Dermatology	150(8)	915-20	2011

IV. 研究成果の刊行物・別刷（抜粋）

Interleukin-1 alpha produced by human T-cell leukaemia virus type I-infected T cells induces intercellular adhesion molecule-1 expression on lung epithelial cells

Yuko Nakayama,^{1,2} Chie Ishikawa,^{1,3} Kazumi Tamaki,¹ Masachika Senba,⁴ Jiro Fujita² and Naoki Mori¹

Correspondence

Naoki Mori
naokimori50@gmail.com

¹Department of Microbiology and Oncology, Graduate School of Medicine, University of the Ryukyus, Nishihara, Okinawa, Japan

²Department of Infectious, Respiratory and Digestive Medicine, Graduate School of Medicine, University of the Ryukyus, Nishihara, Okinawa, Japan

³Transdisciplinary Research Organization for Subtropics and Island Studies, University of the Ryukyus, Nishihara, Okinawa, Japan

⁴Department of Pathology, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University, Nagasaki, Japan

The pathogenic mechanism of human T-cell leukaemia virus type I (HTLV-I)-related pulmonary disease, which involves overexpression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in lung epithelial cells, was investigated. The supernatant of HTLV-I-infected Tax⁺ MT-2 and C5/MJ cells induced ICAM-1 expression on A549 cells, a human tumour cell line with the properties of alveolar epithelial cells. Neutralization of ICAM-1 partially inhibited HTLV-I-infected T-cell adhesion to A549 cells. Analysis of the ICAM-1 promoter showed that the nuclear factor-kappa B-binding site was important for supernatant-induced ICAM-1 expression. Induction of interleukin (IL)-1 alpha (IL-1 α) expression in MT-2 and C5/MJ cells was observed compared with uninfected controls and HTLV-I-infected Tax-negative cell lines. The significance of IL-1 α as a soluble messenger was supported by blocking the biological activities of MT-2 supernatant with an IL-1 α -neutralizing mAb. Moreover, Tax and IL-1 α expression was demonstrated in the bronchoalveolar lavage cells of patients with HTLV-I-related pulmonary disease. Immunohistochemistry confirmed ICAM-1 and IL-1 α expression in lung epithelial cells and lymphocytes of patients with HTLV-I-related pulmonary diseases, and in a transgenic mouse model of Tax expression. These results suggest that IL-1 α produced by HTLV-I-infected Tax⁺ T cells is crucial for ICAM-1 expression in lung epithelial cells and subsequent adhesion of lymphocytes in HTLV-I-related pulmonary diseases.

Received 16 April 2011

Accepted 2 August 2011

INTRODUCTION

Human T-cell leukaemia virus type I (HTLV-I) is a retrovirus associated with adult T-cell leukaemia (Hinuma *et al.*, 1981) and HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (Gessain *et al.*, 1985; Osame *et al.*, 1986). HTLV-I is also implicated in inflammatory disorders, such as uveitis, arthropathy and Sjögren's syndrome (Watanabe,

1997). Transgenic mice expressing the Tax protein, encoded by the *pX* gene, develop arthropathy (Iwakura *et al.*, 1991) and exocrinopathies affecting the lacrimal and salivary glands (Green *et al.*, 1989). HTLV-I is also associated with pulmonary involvement. Patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis and uveitis or asymptomatic carriers exhibit pulmonary complications characterized by T-lymphocyte alveolitis or lymphocytic interstitial pneumonia (Sugimoto *et al.*, 1987, 1993). Furthermore, in Tax-expressing transgenic mice, inflammatory cells consisting of lymphocytes accumulate in peribronchiolar and perivascular areas, as well as in alveolar septa (Miyazato *et al.*, 2000).

It has been estimated that there are 28 000 type I pneumocytes and 1400 type II pneumocytes per alveolus in a human (Crandall & Kim, 1991). Because of its strategic

Abbreviations: AP-1, activator protein-1; BAL, bronchoalveolar lavage; BALF, bronchoalveolar lavage fluid; BCECF, 2',7'-bis-(2-carboxyethyl-5)- and 2',7'-bis-(2-carboxyethyl-6)-carboxyfluorescein, acetoxymethyl ester; EMSA, electrophoretic mobility shift assay; FBS, fetal bovine serum; HBZ, HTLV-I basic leucine zipper domain protein; HTLV-I, human T-cell leukaemia virus type I; ICAM-1, intercellular adhesion molecule-1; IL, interleukin; LFA-1, lymphocyte function-associated antigen-1; MMC, mitomycin C; NF- κ B, nuclear factor-kappa B; pAb, polyclonal antibody; TNF- α , tumour necrosis factor alpha.

location, the alveolar epithelium encounters infectious agents and inflammatory molecules. It is thought to play an important role in the immune response by expressing biologically active mediators and adhesion molecules (Diamond *et al.*, 2000).

The pathogenesis of HTLV-I-associated diseases is poorly understood. Viral and host factors, such as proviral load and immune response, are believed to play an important role in the pathogenesis and progression of diseases. CD4⁺ T cells are the main target of HTLV-I and carry the proviral load (Bangham, 2003; Kinet *et al.*, 2007). In the broncho-alveolar lavage (BAL) fluid (BALF) of carriers, the copy number of proviral DNA correlates with the number of lymphocytes (Mori *et al.*, 2005). The interaction between infected T cells with a different kind of host cell and immune reactions mediated by these infected cells may play a role in the pathogenic process of HTLV-I-associated complications.

Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) interacts with its receptor, lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1), on leukocytes, and plays an important role in the recruitment and migration of immune effector cells to the site of inflammation (Jutila, 1992; Marlin & Springer, 1987). Infected lymphocytes produce no cell-free virions *in vivo*, and a specialized cell–cell contact, termed the virological synapse, is required for transmission of HTLV-I between cells (Igakura *et al.*, 2003). ICAM-1 and LFA-1 play a key role in the formation of the virological synapse (Barnard *et al.*, 2005).

T cells and their mediators are major players in the immune responses to viral infection. During infection, the expression levels of cytokines and chemokines are significantly higher in the BALF of patients with HTLV-I-related pulmonary diseases than in that of healthy subjects (Yamazato *et al.*, 2003). However, little is known regarding how such humoral factors contribute to the pathological changes in HTLV-I-related pulmonary diseases. Here, we evaluated the biological effects of HTLV-I-infected T-cell supernatants on lung epithelial ICAM-1 expression.

METHODS

Reagents. Recombinant human interleukin (IL)-1 alpha (IL-1 α), tumour necrosis factor alpha (TNF- α) and IL-17 were purchased from PeproTech. Blocking anti-human IL-1 α mAb (clone 4414) and anti-human ICAM-1 polyclonal antibody (pAb) were purchased from R&D Systems.

Cells. The HTLV-I-infected T-cell lines MT-2 (Miyoshi *et al.*, 1981), MT-4 (Yamamoto *et al.*, 1982), C5/MJ (Popovic *et al.*, 1983), HUT-102 (Poiesz *et al.*, 1980), MT-1 (Miyoshi *et al.*, 1980), TL-OmI (Sugamura *et al.*, 1984) and ED-40515(-) (Maeda *et al.*, 1985), and uninfected T-cell lines Jurkat, MOLT-4 and CCRF-CEM were cultured in RPMI 1640 containing 10% fetal bovine serum (FBS). MT-2, MT-4 and C5/MJ are HTLV-I-transformed T-cell lines established by an *in vitro* co-culture protocol and constitutively express viral genes, including Tax. MT-1, TL-OmI and ED-40515(-) are T-cell lines of leukaemic cell origin that were established from patients with adult T-cell leukaemia but do not express viral genes.

HUT-102 was established from a patient with adult T-cell leukaemia, but its clonal origin is unclear.

Preparation of culture supernatants. Human T-cell lines were incubated at a cell density of 1×10^6 cells ml⁻¹ for 72 h. The supernatants were stored at -80 °C until use. Dilution of the supernatants from cultured HTLV-I-infected T-cell lines was carried out using RPMI 1640 containing 10% FBS.

Subjects. The subjects consisted of 11 consecutive HTLV-I infected patients with lung lesions in computed-tomography scan findings and various pulmonary symptoms (chronic cough and/or dyspnoea on effort) who visited our hospital and received BAL analysis. All patients were designated carriers, and included four patients with diffuse panbronchiolitis and three with autoimmune diseases. Two control subjects were also included who were seronegative for HTLV-I. This study was approved by the Institutional Review Board at the University of the Ryukyus.

BAL and cell preparation. BAL was performed in the 11 patients using a standard technique (Yamazato *et al.*, 2003). The BALF obtained was passed through two sheets of gauze. After washing three times with PBS supplemented with 1% heat-inactivated fetal calf serum, the total number of cells was counted. An aliquot was centrifuged and the supernatants were stored at -80 °C until assayed. The remaining cells were pelleted by centrifugation, mixed with Isogen (Wako Pure Chemical Industries) and stored at -80 °C until use. All subjects provided informed consent before BAL.

Adhesion assay. Human A549, a tumour cell line from a human lung carcinoma with the properties of type II alveolar epithelial cells (Lieber *et al.*, 1976), was plated at a confluent density. C5/MJ cells were suspended in serum-free RPMI 1640 containing 5 μ M 2',7'-bis-(2-carboxyethyl-5)- and 2',7'-bis-(2-carboxyethyl-6)-carboxyfluorescein, acetoxymethyl ester (BCECF; Dojin Chemicals). After incubation for 45 min at 37 °C, these cells were washed with PBS and resuspended in culture medium. Before adhesion experiments, A549 cells were pre-incubated for 1 h in the presence of either anti-ICAM-1 pAb or control IgG. Subsequently, BCECF-labelled C5/MJ cells (10^5 cells per well) were deposited on MT-2 supernatant-stimulated A549 cell monolayers for 30 min at 37 °C. Each experiment was run in triplicate. Non-adherent cells were removed by inverting the plates and washing with PBS. Adherent cells were solubilized with 1% NP-40 in PBS, and the fluorescence intensity of each well was measured using an ARVO MX spectrophotometer (PerkinElmer).

HTLV-I infection by co-cultivation. A549 cells were maintained in RPMI 1640 containing 10% FBS. MT-2 cells (Miyoshi *et al.*, 1981) were used as the HTLV-I-infected T-cell line and produced viral particles. MT-2 cells were treated with 100 μ g mitomycin C (MMC) ml⁻¹ (Sigma-Aldrich) for 1 h at 37 °C. After washing three times with PBS, they were cultured with an equal number of A549 cells in RPMI 1640 containing 10% FBS. A549 cells were harvested at 24, 48 and 72 h.

RT-PCR. Total RNA was extracted with TRIzol (Invitrogen) or Isogen (Wako Pure Chemical Industries) according to the protocol provided by the manufacturer. First-strand cDNA was synthesized from 1 μ g total cellular RNA using an RNA PCR kit (Takara Bio) with random primers. Thereafter, cDNA was amplified. The sequences of the primers have been described elsewhere (Ansai *et al.*, 2002; Brenner *et al.*, 1989; Hieshima *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2006; Nakayama *et al.*, 2008). The PCR products were fractionated on 2% agarose gels and assessed qualitatively by (0.5 μ g ml⁻¹) ethidium bromide staining.

Immunofluorescence staining. Fixed cells were washed with PBS containing 7% FBS and permeabilized with PBS containing 0.1%

Triton X-100. The cells were washed with PBS/7% FBS and resuspended in PBS/7% FBS containing mouse mAb against Tax (Lt-4; Tanaka *et al.*, 1990). The cells were washed with PBS/7% FBS and resuspended in PBS/7% FBS containing Alexa Fluor 488-labelled goat anti-mouse IgG (Invitrogen). The nuclei were stained with Hoechst 33342 (Wako Pure Chemical Industries). Finally, the cells were washed with PBS/7% FBS and observed under a DMI6000 microscope (Leica Microsystems).

Immunohistochemical staining. We examined lung biopsy specimens from three patients with HTLV-I-related pulmonary diseases, and lung biopsy specimens from transgenic mice bearing Tax or control littermate mice (Iwakura *et al.*, 1991). All human subjects provided informed consent before samples were obtained. The tissue samples were subjected to immunohistochemical staining using mouse mAbs to ICAM-1 (clone 15.2) and IL-1 α (clone B-7) (Santa Cruz Biotechnology). Sections were counterstained with methyl green.

Flow cytometry. To measure the expression of ICAM-1 and LFA-1 on the surface of A549 cells after the addition of culture supernatants or after HTLV-I infection, FITC-labelled mouse mAb against ICAM-1 (CD54, clone 84H10), LFA-1 α -chain (CD11a, clone 25.3) or control mouse IgG1 (Coulter Immunotech) was used. Cells were analysed on an Epics XL flow cytometer (Beckman Coulter).

Measurement of IL-1 α . IL-1 α levels in culture supernatants and BALF were measured by ELISA (Invitrogen) following the procedure recommended by the manufacturer. A sufficient quantity of BALF was available from HTLV-I carriers to estimate the level of IL-1 α after concentrating the supernatant using a Centricon Plus-70 centrifugal filter (Millipore), which is used to concentrate low-molecular-mass components with a cut-off of 5000 Da. As BAL has a diluting effect on the recovery of IL-1 α , measurements were standardized against albumin.

Reporter assay. A549 cells were transfected with luciferase reporter constructs for the ICAM-1 promoter (Ledebur & Parks, 1995) using Lipofectamine (Invitrogen). After 24 h, the transfected A549 cells were cultured in the presence or absence of MT-2 supernatant for 24 h before the luciferase assay. For reporter assays, a nuclear factor- κ B (NF- κ B) site-dependent luciferase vector, κ B-LUC (Suzuki *et al.*, 1995), and an expression plasmid for Tax (Matsumoto *et al.*, 1997) were also used. Luciferase activities were measured using a dual luciferase assay system (Promega) and normalized against *Renilla* luciferase activity from plasmid phRL-TK (Promega).

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA). Nuclear extracts were obtained as described by Antalis & Godbolt (1991) with modifications, and EMSA was performed as described by Mori & Prager (1996). Briefly, 5 μ g nuclear extract was incubated with ³²P-labelled probes. The DNA-protein complex was separated from the free oligonucleotides on a 4% polyacrylamide gel. For competition experiments, the cold oligonucleotide probe or competitors were used, and supershift analysis was performed using rabbit pAbs against the NF- κ B subunits p50, p65, c-Rel, p52 and RelB (Santa Cruz Biotechnology). The probes used were an NF- κ B element of the ICAM-1 gene (5'-tcgaTAGCTTGGAAATTCGGAGC-3'), a typical NF- κ B element from the IL-2 receptor α chain (IL-2R α) gene (5'-gatcCGGCAGGGGAATCTCCCTCTC-3') and an activator protein-1 (AP-1) element of the IL-8 gene (5'-gatcGTGATGACTCAGGTT-3'). Underlined sequences represent the NF- κ B- or AP-1-binding site, and lower-case letters indicate residues added for labelling purposes.

Statistical analysis. Data are expressed as means \pm SD. Statistical difference was analysed using Student's *t*-test. *P* values of <0.05 were considered significant.

RESULTS

Effect of supernatants of HTLV-I-infected and uninfected T cells on the induction of ICAM-1 expression

We first examined the effects of the supernatant from HTLV-I-infected cell culture on A549 cells. The culture supernatants of HTLV-I-uninfected T-cell lines (Jurkat, MOLT-4 and CCRF-CEM) had no substantial effect on A549 cells. In contrast, the culture supernatants of MT-2 and C5/MJ cell lines induced the mRNA expression of ICAM-1 (Fig. 1a). ICAM-1 mRNA was detected at 1 h after the initiation of culture and remained elevated for at least 6 h following incubation compared with the control (Fig. 1b). The effects of the MT-2 and C5/MJ supernatants on A549 cells were observed at a concentration as low as 6% (Fig. 1c). Among the HTLV-I-infected T-cell lines, the culture supernatants of MT-4 and HUT-102 cell cultures and the Tax-negative HTLV-I-infected T-cell lines MT-1, TL-OmI and ED-40515(-) had no substantial effect on A549 cells.

Flow cytometry studies indicated that A549 cells started to express a significant amount of ICAM-1 at 2 or 3 h after the initiation of exposure to C5/MJ or MT-2 supernatant. However, LFA-1 expression on A549 cells was not induced by MT-2 supernatant. ICAM-1 expression remained at a plateau level at 24 h (Fig. 2a). The cell-surface expression of ICAM-1 was also significantly increased after the addition of IL-1 α and TNF- α for 3 h (Fig. 2a). In contrast, its expression on A549 cells was not enhanced in cultures with Jurkat supernatant. The dose dependency of MT-2 supernatant was observed in A549 cells. Consistent with the results of RT-PCR, the highest level of ICAM-1 expression was observed after exposure to 6% MT-2 supernatant (Fig. 2b).

Involvement of ICAM-1 in HTLV-I-infected T-cell adhesion to A549 cells

We examined the surface expression of LFA-1, the major counterligand of ICAM-1, on human T-cell lines by flow cytometry. Jurkat, an HTLV-I-uninfected T-cell line, and the Tax-negative HTLV-I-infected T-cell lines did not express LFA-1. However, of the four Tax⁺ HTLV-I-infected T-cell lines, three (MT-4, C5/MJ and HUT-102) expressed LFA-1 (Fig. 3a). We next investigated the potential role of ICAM-1 in HTLV-I-infected T-cell adhesion to A549 cells. An anti-human ICAM-1 pAb that blocks cell adhesion was pre-incubated with A549 cells exposed to MT-2 supernatant. One hour after the addition of ICAM-1 pAb, fluorescently labelled C5/MJ cells were added to the A549 culture, and the adherence of C5/MJ cells was measured after 30 min. As indicated in Fig. 3(b), the adhesion of C5/MJ cells to MT-2 supernatant-exposed A549 cells was reduced by the ICAM-1-blocking pAb, suggesting that ICAM-1 acts, at least in part, on HTLV-I-infected T-cell adhesion to lung epithelial cells.

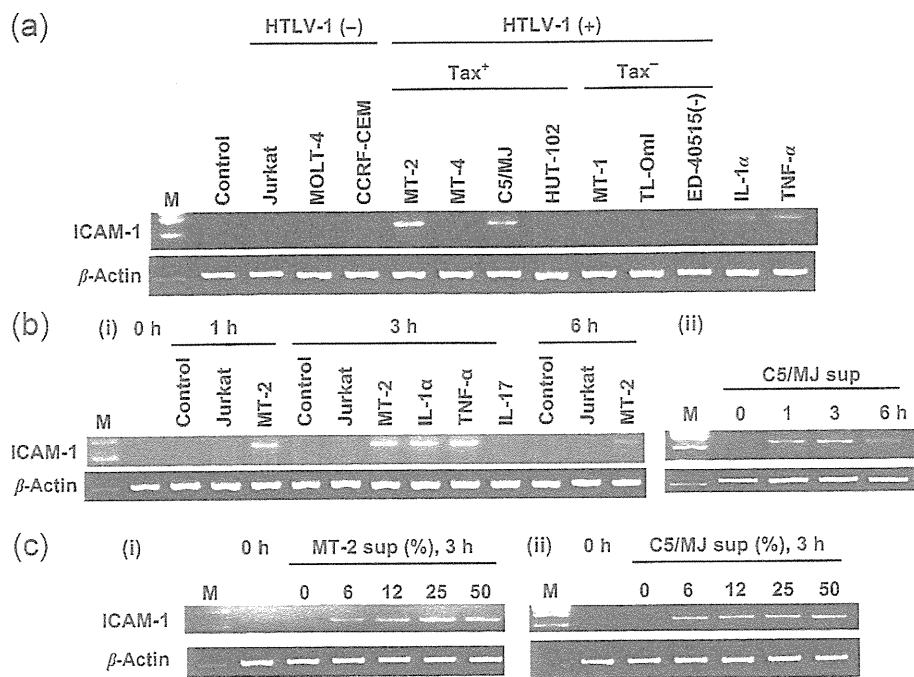


Fig. 1. Effect of the supernatant of HTLV-I-infected and uninfected T cells on mRNA expression of ICAM-1 in A549 cells. (a) MT-2 and C5/MJ supernatants induce ICAM-1 mRNA expression in A549 cells. Total RNA was extracted from A549 cells cultured with 10% supernatant of the indicated cell lines, or with IL-1 α (10 ng ml⁻¹) or TNF- α (10 ng ml⁻¹), for 3 h and used for RT-PCR. (b) Time course of expression of ICAM-1 mRNA in A549 cells exposed to MT-2 (i) and C5/MJ (ii) supernatant (sup). Total RNA was extracted from A549 cells cultured with 10% supernatant of the indicated cell lines, or with IL-1 α (10 ng ml⁻¹), TNF- α (10 ng ml⁻¹) or IL-17 (10 ng ml⁻¹), for various time intervals and used for RT-PCR. (c) Effect of HTLV-I-infected cell supernatant on A549 cells. Total RNA was extracted from A549 cells exposed to serial 1 : 2 dilutions of MT-2 (i) and C5/MJ (ii) supernatant for 3 h and used for RT-PCR. Human β -actin mRNA was used as a control in all experiments. M, 100 bp ladder (Toyobo Life Science).

Activation of the ICAM-1 promoter by MT-2 supernatant

To confirm that MT-2 supernatant-induced ICAM-1 upregulation is mediated by activation of gene transcription, the ICAM-1 5'-flanking region was analysed with promoter/reporter gene constructs. A549 cells were transiently transfected with a reporter gene construct containing 1353 nt of the ICAM-1 upstream regulatory sequences (pGL1.3). Exposure of MT-2 supernatant caused a 25-fold increase in the activity of this ICAM-1-driven reporter construct in A549 cells, whereas the negative-control vector, pGL2-Basic, showed only low background activity (Fig. 4a). TNF- α - and IL-1 β -induced activation of the ICAM-1 promoter has been reported to require the NF- κ B site (nt -187 to -178; Hou *et al.*, 1994; Ledebur & Parks, 1995). To determine the functional importance of the NF- κ B site, transfections of mutant ICAM-1 promoter/luciferase reporter gene construct with specific mutations in the NF- κ B binding site (designated pGL1.3 κ B⁻; Ledebur & Parks, 1995) were carried out (Fig. 4a). Mutation of the NF- κ B site in the ICAM-1 promoter significantly reduced MT-2 supernatant-mediated luciferase activity in A549

cells. These experiments indicated that the response to MT-2 supernatant stimulation required an intact binding site for NF- κ B.

We investigated the induction and binding of nuclear factors to the NF- κ B-binding sequence in the ICAM-1 promoter region by MT-2 and C5/MJ supernatants. As shown in Fig. 4(b), a complex formed with the ICAM-1 NF- κ B-binding site oligonucleotide probe was induced in A549 cells exposed to MT-2 and C5/MJ culture supernatants. This binding activity was reduced by the addition of cold probe or the IL-2 receptor α chain gene NF- κ B-binding site, but not by an oligonucleotide containing the AP-1-binding site (Fig. 4c, lanes 2–4). We also characterized the supernatant-induced complex identified by the ICAM-1 NF- κ B-binding site probe. This complex was supershifted by the addition of anti-p50 or anti-p65 antibodies (Fig. 4c, lanes 5 and 6), suggesting that the supernatant-induced ICAM-1 NF- κ B-binding activity is composed of p50 and p65. Therefore, the supernatants induced ICAM-1 gene expression, at least in part, through the induced binding of p50 and p65 to the NF- κ B-binding site in the ICAM-1 promoter region.

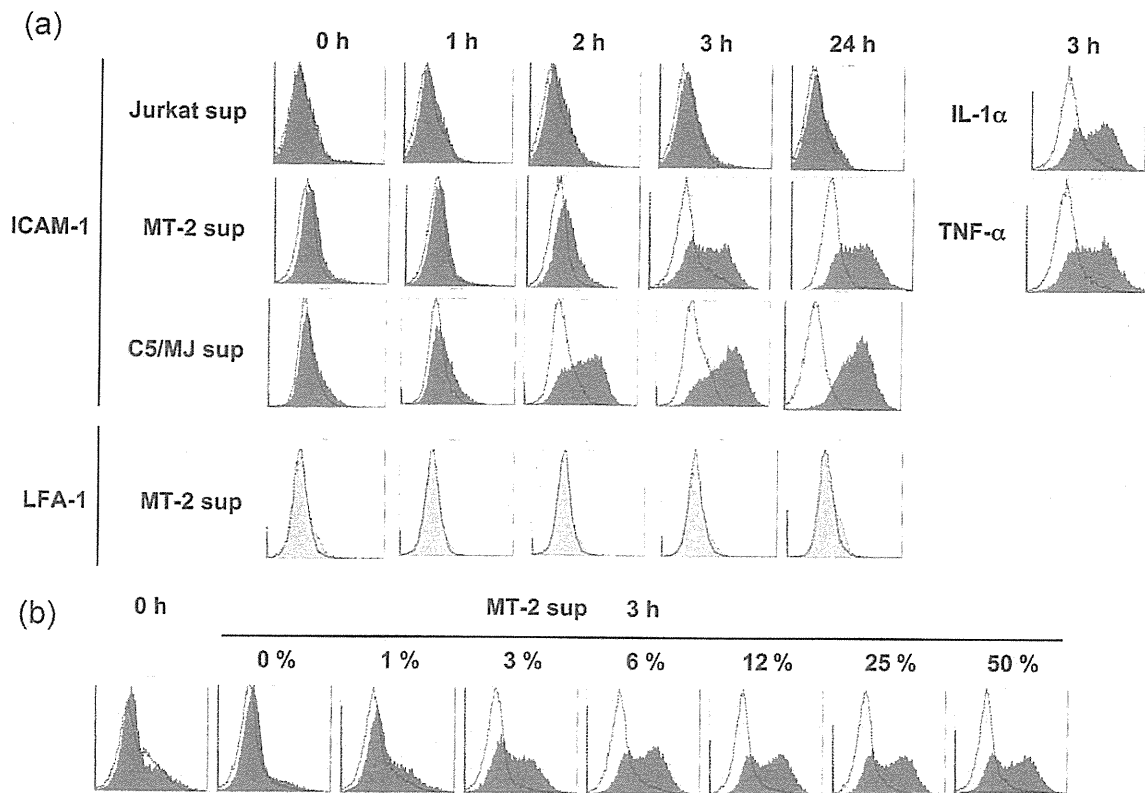


Fig. 2. Supernatants of HTLV-I-infected T cells increase cell-surface expression of ICAM-1 on A549 cells. (a) Time course of cell-surface expression of ICAM-1 on A549 cells exposed to supernatants. A549 cells were cultured for the indicated time intervals in the presence of 10% supernatant of the indicated cell lines, IL-1 α (10 ng ml⁻¹) or TNF- α (10 ng ml⁻¹). After cell harvest, ICAM-1 and LFA-1 expression on the cells was determined by flow cytometry. (b) MT-2 supernatant increases cell-surface expression of ICAM-1 on A549 cells in a dose-dependent fashion. A549 cells were exposed to varying concentrations of supernatant of MT-2 cells, and ICAM-1 levels were measured by flow cytometry on cells harvested after 3 h.

IL-1 α mediates most of the supernatant-induced ICAM-1 expression

HTLV-I-infected T-cell lines are known to express various types of cytokine, including IL-1 α , IL-1 β and TNF- α , all of which are known to be strong inducers of ICAM-1 in various types of cells through NF- κ B activation (Hou *et al.*, 1994; Ledebur & Parks, 1995; Springer, 1990). To test whether some of these cytokines might be responsible for the induction of ICAM-1 in A549 cells, we examined the mRNA expression levels of IL-1 α , IL-1 β and TNF- α by RT-PCR. As shown in Fig. 5(a), the pattern of cytokine expression varied among the HTLV-I-infected T-cell lines tested. Low levels of IL-1 β mRNA were expressed in C5/MJ cells. Expression of TNF- α mRNA was increased in Tax⁺ HTLV-I-infected T-cell lines (MT-2, MT-4, C5/MJ and HUT-102). In contrast, consistent with the induction of ICAM-1 expression, high expression levels of IL-1 α mRNA were detected in MT-2 and C5/MJ cells.

We next measured IL-1 α levels in the culture supernatants using ELISA. As shown in Fig. 5(b), IL-1 α was secreted in MT-2 and C5/MJ cells. To examine whether the effects of the

MT-2 supernatant were caused by IL-1 α , we performed a blocking test using an anti-IL-1 α mAb. The inducible effect of the MT-2 supernatant on ICAM-1 mRNA expression in A549 cells was almost completely blocked by anti-IL-1 α mAb (Fig. 5c). Similar to the mRNA expression, the inducible activity of MT-2 supernatant on the cell-surface expression of ICAM-1 was substantially blocked by anti-IL-1 α mAb (Fig. 5d).

HTLV-I infection also induces ICAM-1 expression in A549 cells

To determine whether HTLV-I infection of A549 cells upregulated the expression of ICAM-1, A549 cells were co-cultivated with MMC-treated MT-2 cells. After co-cultivation for 2 days, the A549 cells were washed extensively and harvested for assessment by RT-PCR of expression of HTLV-I viral antigen. As the MT-2 cells had been pre-treated extensively with MMC, which causes cell death, no discernible MT-2 cells were seen. Trypan blue staining confirmed the lack of viable MT-2 cells. This finding, together with repeated washing, ensured that no MMC-treated MT-2 cells were present in the A549 culture at the