

**Table 2 Clinical information and summary for Tax-specific CD8<sup>+</sup> T cells in 14ACs**

ID	Age	Sex	WBC (/μl)	CD4 (%) <sup>1</sup>	CD8 (%) <sup>1</sup>	HLA	Tetramer (%) <sup>2</sup>	Functions and phenotype of Tax-specific CD8 <sup>+</sup> T-cells <sup>3</sup>			Abyl (%) <sup>7</sup>	PVL <sup>B</sup>
								IFN-γ <sup>+</sup> (%) <sup>4</sup>	CFSE <sup>low</sup> (%) <sup>5</sup>	PD-1 <sup>+</sup> (%) <sup>6</sup>		
#217	70s	F	6800	ND <sup>9</sup>	5.72	A24	1.94	27.7	78.9	78.7	0	14
#236	30 s	F	6500	ND	11.9	A24	2.54	31.1	0	54.1	0	22
#238	60 s	F	5700	ND	12.7	A11	1.29	36.4	100	0	0	2
#243	50 s	F	4100	ND	24.6	A2/24	0.39/3.67	11.3	27.6	93.8	0	3
#245	40 s	F	5000	ND	22.6	A2	0.73	62.5	75	ND	1	58
#251	60 s	M	4800	ND	11.9	A2/11	0.70/8.23	35.8	84.4	36.7	0	2
#279	40 s	M	6200	34.1	11.6	A2/24	4.70/0.18	12.9	30.8	70.2	1	48
#287	70 s	M	4800	72.5	10.0	A2/24	1.17/0.23	11.1	0	55.6	2	81
#309	60 s	F	4600	37.5	24.8	A11/24	6.88/4.26	51.7	76.2	85.3	1.5	29
#311	60 s	F	3200	30.6	14.8	A2/24	1.02/1.94	51.3	ND	ND	0	6
#312	50 s	F	2700	27.3	36.4	A24	2.03	77.8	ND	ND	ND	UN <sup>10</sup>
#313	60 s	M	7300	25.4	31.0	A24	1.11	55.7	60	90.6	ND	4
#315	50 s	F	7500	26.5	7.9	A2/24	6.88/0	24.5	84.7	20	0.6	17
#360	50 s	M	6200	37.7	29.9	A2	2.6	63.1	68.4	10.2	0	UN

<sup>1</sup>The number indicates percentage of CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T cells in lymphocytes.

<sup>2</sup>The number indicates percentages of tetramer<sup>+</sup> cells in CD8<sup>+</sup> T-cells. Two numbers divided by a slash represent those detected by two different tetramers corresponding to two HLA alleles shown in the HLA column.

<sup>3</sup>In case of a sample carrying two of three HLA-A alleles (A2, A11, or A24), Tax-specific CTLs predominantly detected by a tetramer were used. The number represents percentage of indicated cells in the tetramer-binding CD8<sup>+</sup> T cells.

<sup>4</sup>Evaluated by intracellular IFN-γ staining following 6 hours stimulation with corresponding Tax peptide.

<sup>5</sup>Evaluated by CFSE intensities in labeled PBMC after 6 days incubation with corresponding Tax peptide stimulation.

<sup>6</sup>The number represents percentage of indicated PD-1<sup>+</sup>Tax-specific CD8<sup>+</sup> T cells without culture.

<sup>7</sup>Abyl; abnormal lymphocytes

<sup>8</sup>PVL; proviral load. The number represents copy number per 1000 PBMCs.

<sup>9</sup>ND; not determined

<sup>10</sup>UN; undetectable

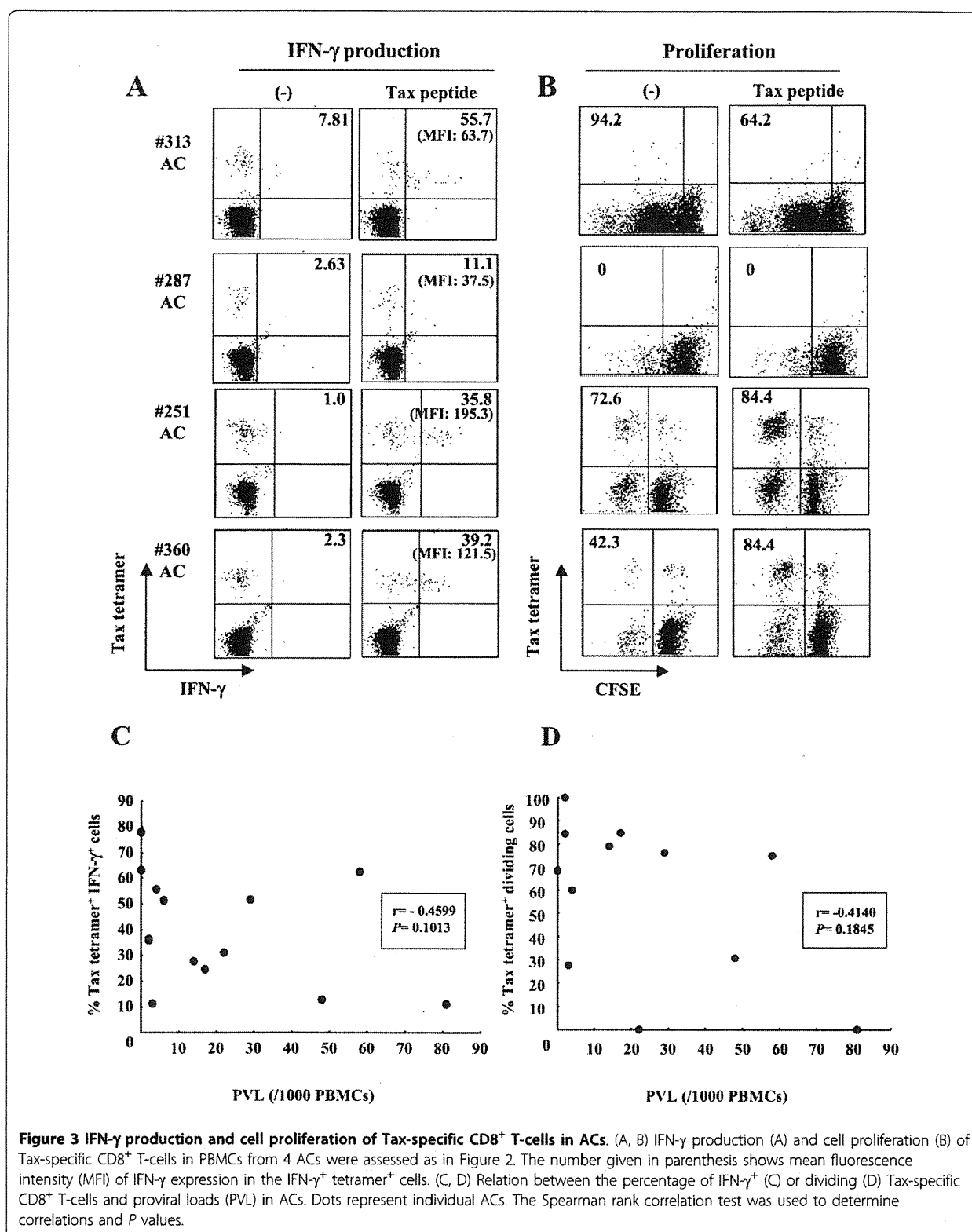
specific CD8<sup>+</sup> T-cells in these ACs spontaneously proliferated without stimulation with Tax peptide, probably due to viral reactivation in HTLV-1-infected cells *in vitro*[38,39]. IFN-γ production was specifically detected for peptide stimulation, and 35.8-55.7% of Tax-specific CD8<sup>+</sup> T-cells produced a good amount of IFN-γ (mean fluorescence intensity, MFI: 63.7-195.3) upon stimulation in the samples of #251, #313, and #360. In contrast, Tax-specific CD8<sup>+</sup> T-cells in one AC (#287) did not proliferate in response to Tax peptide and showed a very weak IFN-γ response with low amounts of IFN-γ (MFI: 37.5) in a low percentage (11.1%) of Tax-specific CD8<sup>+</sup> T-cells (Figures 3A and 3B). In other ACs (#243 and #279), low frequency of IFN-γ<sup>+</sup> Tax-specific CD8<sup>+</sup> T-cells was observed, but the levels of IFN-γ production (MFI: #243; 58.8, #279; 77.6) and the proliferative responses were comparable to other ACs (Table 2). Tax-specific CD8<sup>+</sup> T-cells in #236 failed to proliferate but showed favorable IFN-γ production (MFI: 80.1) in 31.1% of the cells.

Among AC samples tested, AC#287 carried higher proviral load (81 copies in 1000 PBMCs) than any other ACs (Table 2). Since Tax-specific CD8<sup>+</sup> T-cells in #287 had severely impaired IFN-γ production and proliferative

potential, we examined the relationship of the function of these T-cells with proviral loads. Both percentages of IFN-γ<sup>+</sup> and dividing Tax-specific CD8<sup>+</sup> T-cells among CD8<sup>+</sup> T-cells were likely to be inversely correlated with proviral loads although they were not statistically significant (Figure 3C and 3D). Because of the limited availability of the samples, we focused mainly on two ACs (#287 and #313) in the studies hereafter.

#### Dysfunction of Tax-specific CD8<sup>+</sup> T-cells and inefficient CD8<sup>+</sup> cell-mediated HTLV-1 control in AC #287

To examine whether Tax-specific CD8<sup>+</sup> T-cell responses were influenced by activation of antigen-presenting cells (APCs), PBMC from #313 (responder) and #287 (low responder) were stimulated with Tax peptide in the presence or absence of LPS, a potent activator of APCs such as dendritic cells (DCs) and monocytes/macrophages. In #313, the frequency of Tax-specific CD8<sup>+</sup> T-cells increased from 1.11% to 6.47% or 4.07% at day 13, after stimulation with or without Tax peptide, respectively. The frequency of Tax-specific CD8<sup>+</sup> T-cells in #313 further increased in the presence of Tax peptide and LPS (15.81%). In contrast to #313, the frequency of Tax-specific CD8<sup>+</sup> T-cells in #287 decreased from 1.17%



to 0.2% after stimulation with Tax peptide, and was not recovered by LPS stimulation (Figure 4A). In addition, HTLV-1-infected cells have been reported to express C-C chemokine receptor type 4 (CCR4) and have FoxP3<sup>+</sup> Treg-like function[18,40]. However, the proliferative ability of Tax-specific CD8<sup>+</sup> T-cells in #287 was not restored even in the absence of CCR4<sup>+</sup> infected cells (data not shown).

To further examine the function of Tax-specific CD8<sup>+</sup> T-cells in #313 and #287, we observed the expression of CD69, an early activation marker transiently expressed on T lymphocytes that precedes cytokine secretion after antigenic stimulation, and CD107a, a marker of degranulation associated with cytotoxic activity in an antigen-specific manner[41]. CD69 was up-regulated on Tax-specific CD8<sup>+</sup> T-cells in #313 when stimulated with Tax peptide, but not in #287, which was in agreement with their abilities to produce IFN- $\gamma$  (Figure 4B). In #313, 22.4% of Tax-specific CD8<sup>+</sup> T-cells mobilized CD107a to the surface during a 6-hr culture with Tax peptide stimulation, while CD107a surface expression was detected on 4% of Tax-specific CD8<sup>+</sup> T-cells in the culture without stimulation (Figure 4C). However, no CD107a mobilization was detected on the surface of Tax-specific CD8<sup>+</sup> T-cells in #287 with or without Tax peptide stimulation (Figure 4C). These results indicate that HTLV-1-specific CD8<sup>+</sup> T-cells in AC #287 did not properly activate upon antigen stimulation, and therefore failed to control HTLV-1-infected cells.

The Tax/HLA tetramers used in this study allow us to evaluate the functions of CD8<sup>+</sup> T-cells only against an immunodominant epitope, Tax. We therefore compared HTLV-1 Gag p19 in the culture between whole and CD8<sup>+</sup> cell-depleted PBMCs to examine the role of total HTLV-1-specific CD8<sup>+</sup> T-cells including the dominant Tax-specific CD8<sup>+</sup> T-cells, in suppression of HTLV-1 production from infected cells (Figure 4D). As expected, depletion of CD8<sup>+</sup> cells from PBMCs in #313 led to significantly higher HTLV-1 production compared to whole PBMCs ( $P = 0.0115$ ). In contrast, HTLV-1 p19 production increased only a little in the culture of CD8<sup>+</sup> cell-depleted PBMCs in #287 ( $P = 0.1563$ ), indicating that HTLV-1-specific CD8<sup>+</sup> T-cells other than the dominant Tax-specific CD8<sup>+</sup> T-cells might have a reduced ability to control the infected cells in this donor. It is of note that HTLV-1-infected cells from both two donors carried intact HTLV-1 proviral genomic DNA because HTLV-1 p19 could be detected after 7 day-culture.

#### Phenotypic analysis of functional and dysfunctional Tax-specific CD8<sup>+</sup> T-cells

We next characterized the differentiation status of memory T-cells in Tax-specific CD8<sup>+</sup> T-cells. Human

CD8 T-cells may be classified as naïve T-cells (CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>), T<sub>CM</sub> (CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>), T<sub>EM</sub> (CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>), and T<sub>Diff</sub> (CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>) cells[42-44]. As shown in Figure 5A, almost all Tax-specific CD8<sup>+</sup> T-cells in both #313 and #287 were skewed to CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup> T<sub>EM</sub> cells, and there was no essential difference between two donors.

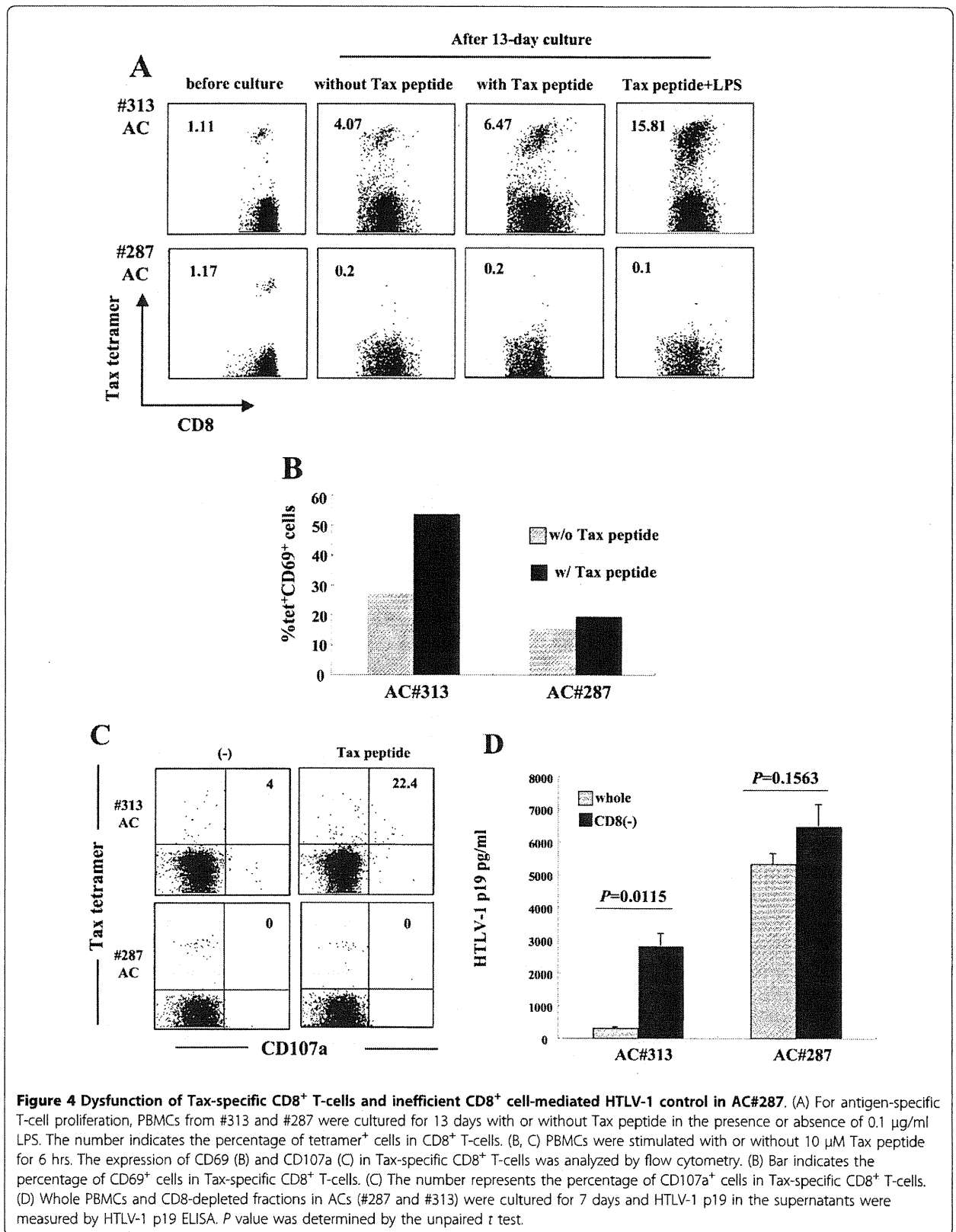
A previous report has shown that PD-1 was highly up-regulated on Tax-specific CD8<sup>+</sup> T-cells in ATL patients and ACs[32]. We therefore examined PD-1 expression on Tax-specific CD8<sup>+</sup> T-cells in several AC samples, including #287. The frequency of PD-1<sup>+</sup> Tax-specific CD8<sup>+</sup> T-cells was very high in #309 (85.3%) and #313 (96%) (Figure 5B and Table 2) while those Tax-specific CD8<sup>+</sup> T-cells retained the proliferative and the cytokine-producing abilities (Figure 3A and Table 2). In #287, the frequency of PD-1-expressing Tax-specific CD8<sup>+</sup> T-cells (55.6%) was lower than #309 and #313, but higher than that of PD-1<sup>+</sup> CMVpp65-specific CD8<sup>+</sup> T-cells in the same donor (Figure 5B). The levels of PD-1 expression showed a similar tendency to the frequency of PD-1<sup>+</sup> T-cells. In addition, the blockade of PD-1/PD-ligand 1 (PD-L1) pathway did not restore the proliferative capacity of Tax-specific CD8<sup>+</sup> T-cells in #287 (data not shown).

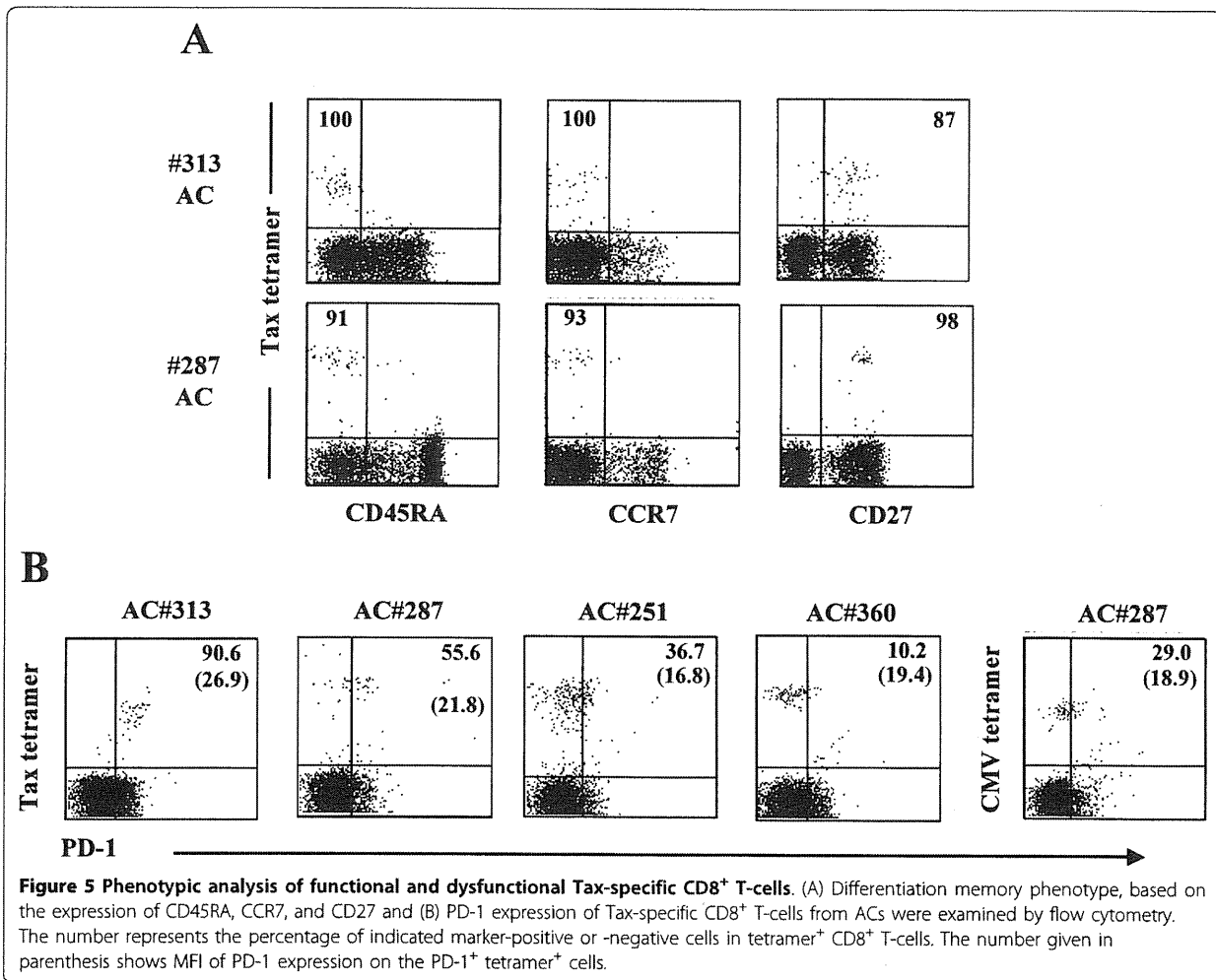
#### Conserved functions of CMV-specific CD8<sup>+</sup> T-cells in #287

We next examined whether the impairment of proliferative capacity and effector functions observed in #287 CD8<sup>+</sup> T-cells were specific for HTLV-1 antigens or the result of general immune suppression. PBMC from #287 contained CMVpp65-specific CD8<sup>+</sup> T-cells (2.3% of CD8<sup>+</sup> T-cells), as detected by tetramer staining. The frequency of CMVpp65-specific CD8<sup>+</sup> T-cells increased from 2.3% to 66.0% following in vitro CMVpp65 peptide stimulation, but not without the peptide stimulation (Figure 6A). Antigen-specific IFN- $\gamma$  and CD69 expression were clearly detected in CMVpp65-specific CD8<sup>+</sup> T-cells in #287 (Figures 6B and 6C). Furthermore, CMVpp65-specific CD8<sup>+</sup> T-cells mobilized CD107a to the surface in response to CMVpp65 peptide (Figure 6D). These results demonstrate that in #287, CMVpp65-specific CD8<sup>+</sup> T-cells, but not Tax-specific CD8<sup>+</sup> T-cells, have proliferative potential and effector functions, such as cytotoxic activity and IFN- $\gamma$  release, suggesting that the impaired CD8<sup>+</sup> T-cell function in #287 was specific for HTLV-1.

#### Dysfunction of Tax-specific but not CMVpp65-specific CD8<sup>+</sup> T-cells also in sATL patients

Finally, we extended the study to see whether patients with early stage ATL might exhibit similar dysfunction selective for HTLV-1-specific CD8<sup>+</sup> T-cells. We found two smoldering ATL (sATL) patients (#110 and #353)



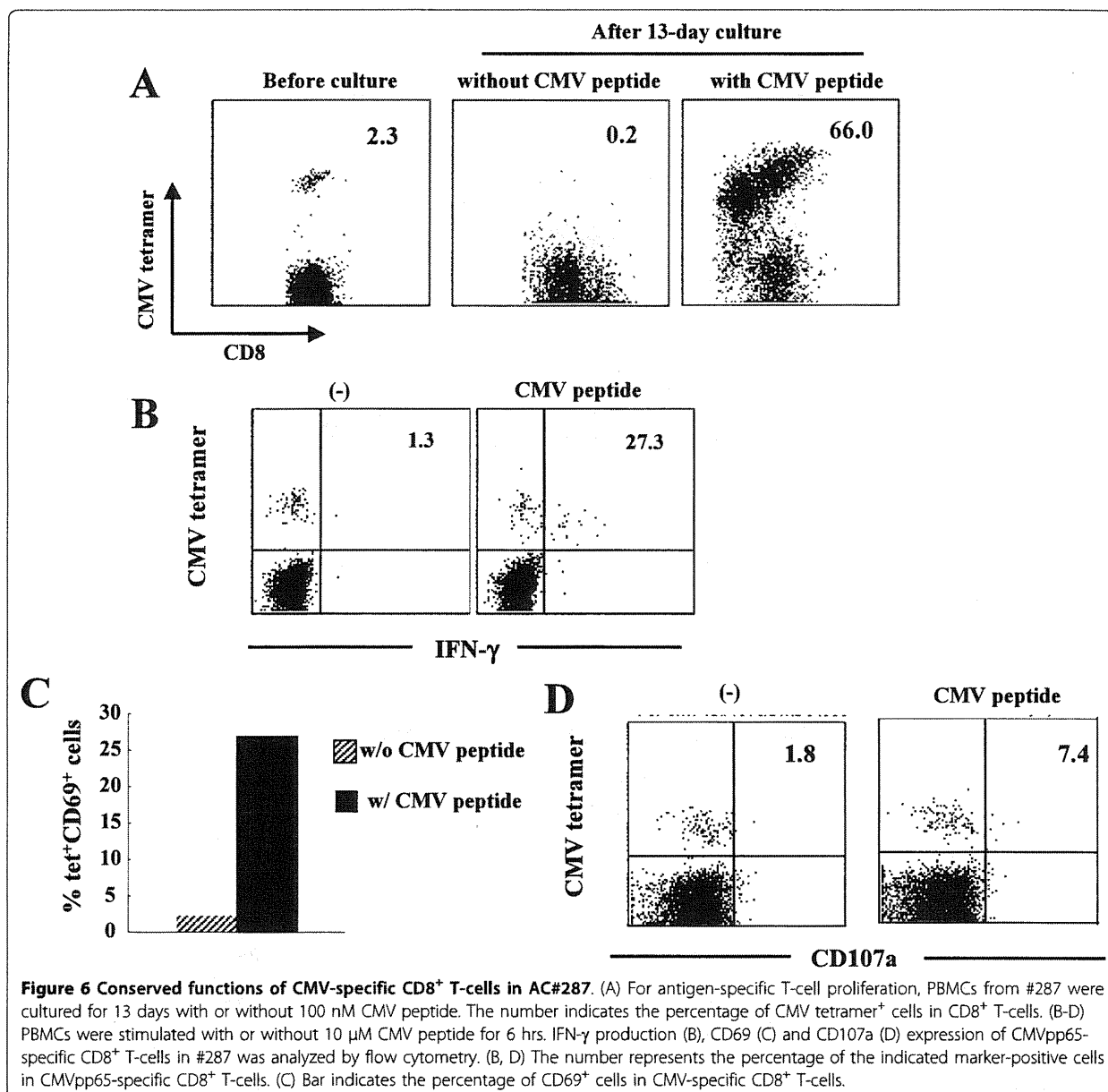


possessing 6.89% and 3.15% of tetramer-binding Tax-specific CD8<sup>+</sup> T-cells, respectively. The sATL patient #353 carried 5% of abnormal lymphocytes (ably) with a normal range of lymphocyte number, whose status is very close to the borderline with ACs. Patient #110 carried 4% of abnormal lymphocytes with mild lymphocytosis. Tax-specific CD8<sup>+</sup> T-cells of two sATL patients (#110 and #353) did not proliferate in response to Tax peptides as similarly observed in a cATL patient (#224) (Figure 7A) and most other cATL patients (Figure 2A and Additional file 1). In contrast, CMVpp65-specific CD8<sup>+</sup> T-cells in both sATL patients vigorously proliferated when stimulated with CMVpp65 peptides. CMVpp65-specific CD8<sup>+</sup> T-cells in a cATL (#224) also proliferated, but to a lesser degree, which might reflect general immune suppression in this patient (Figure 7).

### Discussion

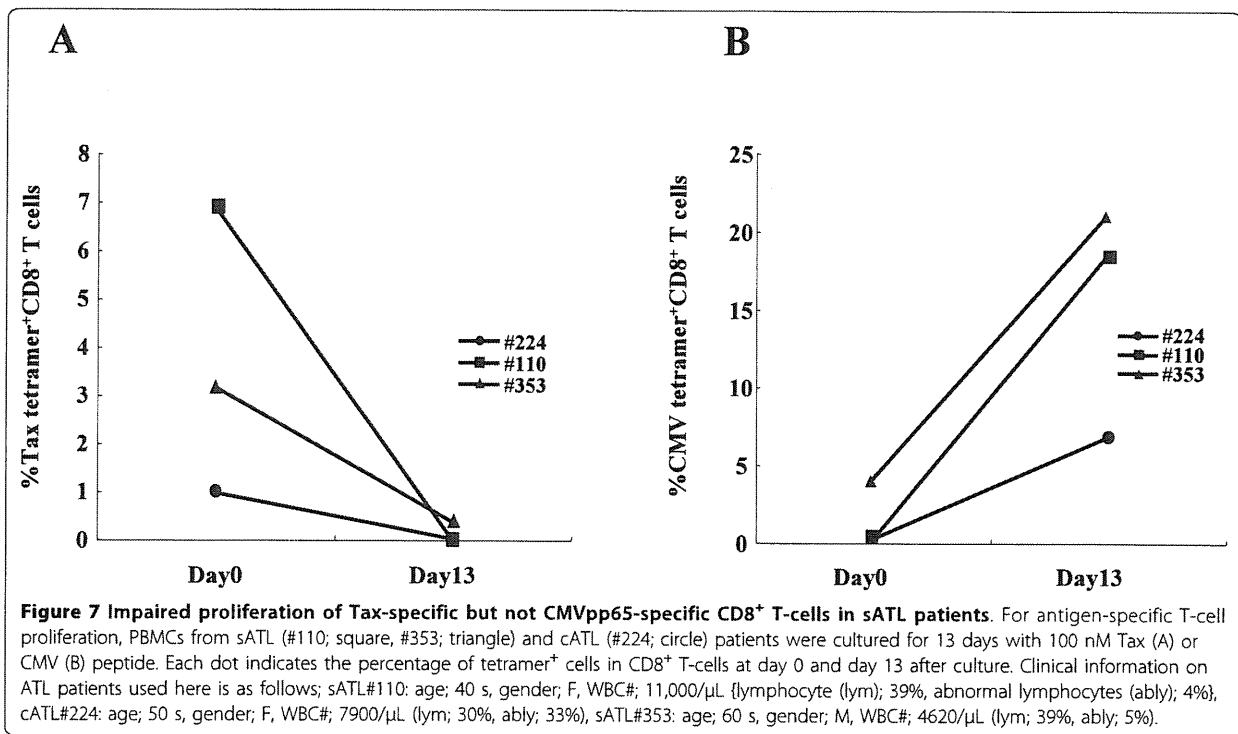
In this study, we detected Tax-specific CD8<sup>+</sup> T-cells in 87%, but not the rest of ACs tested, by using tetramers

containing Tax major epitope-peptides presented by HLA-A\*0201, A\*1101, and A\*2402. Tax-specific CD8<sup>+</sup> T-cells were also detected in 38% of cATL patients, but at reduced frequencies and with severely impaired functions. Further analysis of Tax-specific CD8<sup>+</sup> T-cells in 14 ACs indicated that they were functional in most of ACs tested except one (#287), whose Tax-specific CD8<sup>+</sup> T-cells poorly responded to specific peptides. However, CMVpp65-specific CD8<sup>+</sup> T-cells of this individual were fully functional. Similar T-cell dysfunction selective for HTLV-1, but not CMV, was also observed in sATL patients, one of which (#353) had no clinical symptoms but 5% abnormal lymphocytes. General immune suppression might partly account for the scarcity and/or the dysfunction of Tax-specific CD8<sup>+</sup> T-cells in ATL patients, but not those in the AC or the sATL patients as they were selective for HTLV-1. These findings suggest that HTLV-1-specific immune suppression is undergoing in a minor group of ACs and an early stage of ATL.



The presence of tetramer-binding Tax-specific CD8<sup>+</sup> T-cells in cATL patients, although at low frequencies, implies that they have encountered antigen during the chronic phase of ATL disease, suggesting that Tax may be expressed *in vivo*. This may be supported by a previous report showing that virus-specific CD8<sup>+</sup> T-cells fails to acquire memory T-cell property of long-term antigen-independent persistence during chronic lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) infection[45]. However, there is no direct evidence that infected cells produce Tax in infected individuals. HTLV-1-specific T-cell responses in cATL patients are largely different

from HAM/TSP patients. In HAM/TSP patients, Tax-specific CD8<sup>+</sup> T-cells proliferated vigorously and a large population of them produced IFN-γ. In contrast, the function of Tax-specific CD8<sup>+</sup> T-cells in cATL patients was profoundly suppressed, similarly to tumor infiltrating lymphocytes (TIL)[46]. In cATL patients, Tax-specific CD8<sup>+</sup> T-cells that were detected before culture decreased in number to undetectable or very low levels after 6 days, regardless of peptide stimulation (data not shown). This is not likely to be due to TCR down-regulation, because TCRs on Tax-specific CD8<sup>+</sup> T-cells in HAM/TSP patients are down-regulated on days 1 to 4



and reappeared by day 6 in vitro[34]. Moreover, we could not observe any tetramer<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-cells even in the 13-day culture (data not shown), suggesting these cells might have died during the culture.

Severe dysfunction of Tax-specific CD8<sup>+</sup> T-cells was observed not only in cATL patients, but also in an AC #287. Fresh PBMCs of #287 contained 1.17% tetramer<sup>+</sup> cells in the CD8<sup>+</sup> T-cell fraction. However, none of these tetramer-positive T-cells proliferated in culture, with or without Tax peptide stimulation (Figure 3B). Although a few populations of them (11.1%) produced a small amount of IFN- $\gamma$ , they lacked degranulation activity for cytotoxicity or expression of CD69, an early activation marker, upon specific stimulation (Figures 3 and 4). Importantly, CMVpp65-specific CD8<sup>+</sup> T-cells in the same donor were clearly activated, and exhibited these characteristics upon stimulation with pp65 peptides (Figure 6). These observations indicated that the impaired Tax-specific CD8<sup>+</sup> T-cells function in #287 was not attributable to general immune suppression, but to an HTLV-1-specific phenomenon. In addition, CD8-depletion study indicated that not only the dominant Tax-specific CD8<sup>+</sup> T-cell function but also other HTLV-1-specific CD8<sup>+</sup> T cell responses might be reduced in #287 (Figure 4D). Since CMV-specific CD8<sup>+</sup> T-cells responded well to the specific peptides, antigen-presenting cells in culture were not likely to be responsible for the selective suppression of Tax-specific CD8<sup>+</sup> T-cells.

In addition, it has been shown that HTLV-1-infected cells generally express CCR4 and have Treg-like function[18,40]. However, depletion of CCR4<sup>+</sup> cells did not restore the proliferative ability of Tax-specific CD8<sup>+</sup> T-cells (data not shown), indicating that suppression of the infected cells were not likely to be the major reason for the impaired Tax-specific CD8<sup>+</sup> T-cell function in our culture system. These observations suggest that in #287, Tax-specific CD8<sup>+</sup> T-cells themselves might lose their functions.

Many chronic viral infections affect the phenotype, function, and maintenance of memory T-cells [24,42,47,48]. T<sub>EM</sub> cells predominate in infections in which relatively high levels of antigen persist and continuous antigen stimulation are required for maintenance of T<sub>EM</sub> cells. As described in HAM/TSP patients [34], Tax-specific CD8<sup>+</sup> T-cells in both ACs (#287 and #313) were primarily enriched in T<sub>EM</sub> memory pool in spite of the functionality of Tax-specific CD8<sup>+</sup> T-cells (Figure 5A), which may support continuous or periodical expression of viral antigen in vivo during an asymptomatic stage.

PD-1 is known to play a major role in regulating T-cell exhaustion during chronic infection. In this study, we could not obtain any data supporting the involvement of PD-1 in the dysfunction of Tax-specific CD8<sup>+</sup> T-cells. However, we observed that Tax-specific CD8<sup>+</sup> T-cells in some ACs showed IFN- $\gamma$  production, but not

proliferative capacity (Table 2). This partially lacked function of Tax-specific CD8<sup>+</sup> T-cells is similar to the features of T-cell exhaustion. Whether Tax-specific CD8<sup>+</sup> T-cells are exhausted in HTLV-1 infection, and whether other molecules associated with T-cell exhaustion are involved in the impairment of Tax-specific CD8<sup>+</sup> T-cell responses are necessary to be clarified because some inhibitory molecules such as T-cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein-3 (TIM-3), lymphocyte activated gene-3 (LAG-3), and transcription factors including BLIMP-1 are also found to be associated with T-cell exhaustion [49].

The incidence of Tax-specific CD8<sup>+</sup> T-cell detection was high (87.0%) in ACs. Given the fact that the incidence of Tax-specific CD8<sup>+</sup> T-cells in HAM/TSP patients was 100%, a small fraction of ACs lacking detectable tetramer-binding cells might lack Tax-specific T-cell responses. Our previous study investigating GST-Tax protein-based T-cell responses supports this notion [20]. In the present study, even in ACs possessing Tax-specific CD8<sup>+</sup> T-cells, at least one individual exhibited T-cell dysfunction selectively for HTLV-1. The incidence of tetramer-positive cells was reduced in ATL patients (38.1%), and the function of these cells was impaired in all the ATL patients even with detectable tetramer-binding Tax-specific CD8<sup>+</sup> T-cells. Our findings suggest that HTLV-1-specific T-cell responses are selectively impaired in a small percentage of HTLV-1-infected individuals in the asymptomatic stages, and the proportion of individuals with such characteristics increase as the stages proceed towards ATL. Strategies to reactivate HTLV-1-specific T-cells at early stages might contribute to a reduction in the immunological risk of ATL.

## Conclusions

Tax-specific CD8<sup>+</sup> T-cells were scarce and dysfunctional in a limited AC population and ATL patients, and the dysfunction of CD8<sup>+</sup> T-cells was selective for HTLV-1 in early stages. These results implied the presence of some HTLV-1-specific T-cell suppressive mechanisms even in asymptomatic stages, which are not a result of general immune suppression in ATL but could be underlying conditions toward disease progression.

## Methods

### Samples

Blood samples from 64 HTLV-1-seropositive individuals were used in this study: 23 asymptomatic carriers (ACs), 18 HAM/TSP patients, 2 smoldering type ATL (sATL) patients, and 21 chronic type ATL (cATL) patients. All blood samples were obtained following written informed consent, and this study was reviewed and approved by

the Institutional Review Board of the Tokyo Medical and Dental University.

### Peptides

Peptides used in this study were HLA-A2-restricted CTL epitopes (Tax11-19, LLFGYPVYV)[12] (Hokudo Co., Hokkaido, Japan) and (CMV495-503, NLVPMVATV)[50] (Sigma Aldrich St. Louis, MO), HLA-A11-restricted CTL epitope (Tax88-96, KVLTPPITH)[36] (Hokudo Co) and HLA-A24-restricted CTLs epitopes (Tax301-309, SFHSLHLF)[35] (Hokudo Co) and (CMV341-349, QYDPVAALF)[51] (Sigma Aldrich).

### Cell Surface staining

To select samples carrying HLA-A2, -A11, or -A24, whole blood was screened with antibodies for HLA-A2, -A11, and -A24 subtypes (One Lambda, Inc., Los Angeles, CA). FITC-conjugated goat anti-mouse Ig (G +M) (Beckman Coulter Inc., Webster, TX) was used as a secondary antibody. For cell surface staining, whole blood samples were stained with the following fluorochrome-conjugated mouse anti-human mAbs; CD3-FITC, CD8-PE/Cy5, CD8-PerCP/Cy5.5 (RPA-T8, BioLegend), CD27-FITC (O323, BioLegend) CD45RA-FITC (HI 100, BD Biosciences), CD45RA-APC (HI 100, BioLegend), CD69-FITC (FN 50, BioLegend), PD-1-FITC (EH12.2H7, BioLegend), CCR7 (TG8/CCR7, BioLegend).

### Tetramer staining

PE-conjugated HLA-A\*0201/Tax11-19, HLA-A\*1101/Tax88-96, HLA-A\*2402/Tax301-309, HLA-A\*0201/CMVpp65, HLA-A\*2402/CMVpp65 tetramers were purchased from MBL (Nagoya, Japan). Whole blood samples or peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were stained with PE-conjugated Tax/HLA tetramer in conjunction with FITC-conjugated anti-CD3 (UCHT1, BioLegend San Diego, CA), and PE-Cy5-conjugated anti-CD8 monoclonal antibodies (mAbs) (HIT8a, BD Biosciences San Jose, CA). Whole blood samples were lysed and fixed in BD FACS lysing solution (BD Biosciences) before washing the cells. Samples were analyzed on a FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA) and data analyses were performed using CellQuest software (Becton Dickinson).

### Tetramer-based IFN- $\gamma$ flow cytometry

Tetramer-based intracellular IFN- $\gamma$  flow cytometry was performed as described previously[17], with slight modifications. In brief, PBMCs ( $2.0 \times 10^5$  cells) were incubated with HLA tetramer-PE and anti-CD8-PE/Cy5, washed, and stimulated with 10  $\mu$ M antigenic peptide for 6 hrs at 37°C in the presence of brefeldin A (BFA, 10  $\mu$ g/ml; Sigma Aldrich). The cells were stained with a



tetramer, permeabilized, and stained with anti-human IFN- $\gamma$ -FITC (4S.B3, BD Biosciences).

#### T-cell proliferation

PBMCs ( $2.0$ - $5.0 \times 10^5$  cells/well) labeled with carboxy-fluorescein succinimidyl ester (CFSE; Sigma Aldrich) were cultured for 6 days with or without 100 nM antigenic peptide and then stained with Tax/HLA tetramer-PE and anti-CD8-PE/Cy5. In some experiments, PBMCs ( $2.0 \times 10^5$  cells) were cultured for 13 days with 100 nM antigenic peptide and 10 U/ml recombinant human IL-2 (IL-2; Shionogi, Osaka, Japan) in the presence or absence of 0.1  $\mu$ g/ml Lipopolysaccharide (LPS; Sigma Aldrich). The cells were then stained with HLA tetramer-PE, anti-CD8-PE/Cy5 and anti-CD3-FITC, and analyzed by flow cytometry.

#### Quantification of HTLV-1 proviral load

The HTLV-1 proviral load was measured using LightCycler DNA Master SYBR Green 1 (Roche, Mannheim, Germany) with a LightCycler (Roche). Genomic DNA was extracted from PBMCs ( $2 \times 10^6$  cells) using DNeasy Blood & Tissue kits (QIAGEN, Courtaboeuf, France). The primer sets used in this study were as follows: pX2 (5'-CGGATACCCAGTCTACGTGTTTGGAGACTGT-3') and pX3 (5'-GAGCCGATAACGCGTCCATCGATGGGGTCC-3') for HTLV-1 pX, and B-globin (5'-ACA-CAACTGTGTTCACTAGC-3') and  $\alpha$ B-globin (5'-CAACTTCATCCACGTTACC-3') for  $\beta$ -globin. The proviral load was calculated as: [(copy number of pX)/(copy number of  $\beta$ -globin/2)]  $\times$  1000. HTLV-1 proviral loads in some of the PBMC samples were measured by the Group of Joint Study on Predisposing Factors of ATL Development (JSPFAD, Japan) as described previously [20].

#### CD107a mobilization assay

PBMCs were stained with Tax/HLA tetramers-PE and anti-CD8-PE/Cy5, washed, and stimulated with 10  $\mu$ M antigenic peptide for 6 hrs at 37°C in the presence of mouse anti-human CD107a-PerCP/Cy5.5 (H4A3, Biolegend) or mouse IgG<sub>1</sub>-PerCP/Cy5.5 (MOPC-21, Biolegend). BFA (10  $\mu$ g/ml) was added 1 hr after incubation was started. The cells were then collected and stained with an HLA tetramer.

#### Depletion of CD8<sup>+</sup> cells and Detection of HTLV-1 p19

CD8<sup>+</sup> cells were depleted from PBMCs by negative selection using 10-fold numbers of Dynabeads M-450 CD8 (Invitrogen, Carlsbad, CA), according to the manufacturer's instructions. The PBMCs were adjusted to  $1 \times 10^6$  cells/ml before depletion, and the resulting CD8<sup>+</sup> cell-depleted fractions were resuspended in medium with the same initial volume, irrespective of the remaining cell

number. PBMCs ( $1 \times 10^6$  cells/ml) and CD8<sup>+</sup> cell-depleted PBMCs were cultured for 7 days. HTLV-1 p19 in the supernatants of those PBMCs were measured by HTLV p19 antigen ELISA (RETRO tek, Buffalo, NY).

#### Statistics

The Mann-Whitney U-test, the unpaired t test, and the Spearman rank correlation test were performed for statistical significance by using the Graphpad Prism software (Graphpad Software). In all cases, two-tailed P values less than 0.05 were considered significant.

#### Additional material

**Additional file 1: Tax-specific CD8<sup>+</sup> T-cells in cATL patients could not proliferate against Tax-peptide stimulation.** (A) CFSE-labeled PBMCs were cultured with or without 100 nM Tax-peptide for 6 days. The number indicates the percentage of tetramer<sup>+</sup> cells in CD8<sup>+</sup> T cells (Day 0) or the percentage of dividing (CFSE<sup>low</sup>) cells in Tax-specific CD8<sup>+</sup> T-cells (Day 6). In a cATL sample #54, CFSE-labeled PBMCs were cultured in the presence of mouse IgG for other experiment. (B) PBMCs (#224) and CCR4-depleted PBMCs (#280) were cultured for 13 days in the presence of 100 nM Tax-peptide. The number indicates the percentage of tetramer<sup>+</sup> cells in CD8<sup>+</sup> T-cells.

#### Acknowledgments and Funding

This work was supported by a grant from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology in Japan, and a grant for an anticancer project from the Ministry of Health, Labour, and Welfare in Japan.

#### Author details

<sup>1</sup>Department of Immunotherapeutics, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan. <sup>2</sup>Department of Hematology, Imamura Bun-in Hospital, Kagoshima, Japan. <sup>3</sup>Division of Hematology, Department of Internal Medicine, Kinki University School of Medicine, Osaka, Japan. <sup>4</sup>Department of Molecular Medical Science, Institute of Medical Science, St. Marianna University School of Medicine, Kawasaki, Japan. <sup>5</sup>Cancer Centre, University of the Ryukyus Hospital, Okinawa, Japan. <sup>6</sup>Department of Hematology, National Kyushu Cancer Center, Fukuoka, Japan. <sup>7</sup>Institute for Clinical Research, National Kyushu Cancer Center, Fukuoka, Japan. <sup>8</sup>Laboratory of Tumor Cell Biology, Department of Medical Genome Science, Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo, Tokyo, Japan. <sup>9</sup>Department of Hematology, Osaka Minami Medical Center, Osaka, Japan.

#### Authors' contributions

AT carried out immunological and virological analyses, and drafted the manuscript. AH conceived of the study, participated in its design and coordination, and drafted the manuscript. AU, YM, YY, MM, IC, NU, and JO provided clinical samples. YS, YT, AS, and NZ carried out a part of the experiments. TW provided the data on proviral load of some HTLV-1-infected individuals. TM helped to draft the manuscript. MK participated in study design and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 16 August 2011 Accepted: 7 December 2011

Published: 7 December 2011

#### References

1. Hinuma Y, Nagata K, Hanaoka M, Nakai M, Matsumoto T, Kinoshita KI, Shirakawa S, Miyoshi I: 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* 1981, **78**:6476-6480.
- Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC: **Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1980, **77**:7415-7419.
  - de The G, Bomford R: **An HTLV-1 vaccine: why, how, for whom?** *AIDS Res Hum Retroviruses* 1993, **9**:381-386.
  - Arisawa K, Soda M, Endo S, Kurokawa K, Katamine S, Shimokawa I, Koba T, Takahashi T, Saito H, Doi H, Shirahama S: **Evaluation of adult T-cell leukemia/lymphoma incidence and its impact on non-Hodgkin lymphoma incidence in southwestern Japan.** *Int J Cancer* 2000, **85**:319-324.
  - Gessain A, Barin F, Vernant JC, Gout O, Maurs L, Calender A, de The G: **Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis.** *Lancet* 1985, **2**:407-410.
  - Osame M, Izumo S, Igata A, Matsumoto M, Matsumoto T, Sonoda S, Tara M, Shibata Y: **Blood transfusion and HTLV-I associated myelopathy.** *Lancet* 1986, **2**:104-105.
  - Tajima K: **The 4th nation-wide study of adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL) in Japan: estimates of risk of ATL and its geographical and clinical features. The T- and B-cell Malignancy Study Group.** *Int J Cancer* 1990, **45**:237-243.
  - Uchiyama T, Yodoi J, Sagawa K, Takatsuki K, Uchino H: **Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases.** *Blood* 1977, **50**:481-492.
  - Bangham CR: **HTLV-1 infection: role of CTL efficiency.** *Blood* 2008, **112**:2176-2177.
  - Jacobson S, Shida H, McFarlin DE, Fauci AS, Koenig S: **Circulating CD8+ cytotoxic T lymphocytes specific for HTLV-I pX in patients with HTLV-I associated neurological disease.** *Nature* 1990, **348**:245-248.
  - Bieganowska K, Hollsberg P, Buckle GJ, Lim DG, Greten TF, Schneck J, Altman JD, Jacobson S, Ledis SL, Hanchard B, Chin J, Morgan O, Roth PA, Hafler DA: **Direct analysis of viral-specific CD8+ T cells with soluble HLA-A2/Tax11-19 tetramer complexes in patients with human T cell lymphotropic virus-associated myelopathy.** *J Immunol* 1999, **162**:1765-1771.
  - Kannagi M, Shida H, Igarashi H, Kuruma K, Murai H, Aono Y, Maruyama I, Osame M, Hattori T, Inoko H, et al: **Target epitope in the Tax protein of human T-cell leukemia virus type I recognized by class I major histocompatibility complex-restricted cytotoxic T cells.** *J Virol* 1992, **66**:2928-2933.
  - Parker CE, Daenke S, Nightingale S, Bangham CR: **Activated, HTLV-1-specific cytotoxic T-lymphocytes are found in healthy seropositives as well as in patients with tropical spastic paraparesis.** *Virology* 1992, **188**:628-636.
  - Parker CE, Nightingale S, Taylor GP, Weber J, Bangham CR: **Circulating anti-Tax cytotoxic T lymphocytes from human T-cell leukemia virus type I-infected people, with and without tropical spastic paraparesis, recognize multiple epitopes simultaneously.** *J Virol* 1994, **68**:2860-2868.
  - Uchiyama T: **Human T cell leukemia virus type I (HTLV-I) and human diseases.** *Annu Rev Immunol* 1997, **15**:15-37.
  - Arnulf B, Thorel M, Poirot Y, Tamouza R, Boulanger E, Jaccard A, Oksenhendler E, Hermine O, Pique C: **Loss of the ex vivo but not the reinducible CD8+ T-cell response to Tax in human T-cell leukemia virus type 1-infected patients with adult T-cell leukemia/lymphoma.** *Leukemia* 2004, **18**:126-132.
  - Kozako T, Arima N, Toji S, Masamoto I, Akimoto M, Hamada H, Che XF, Fujiwara H, Matsushita K, Tokunaga M, Haraguchi K, Uozumi K, Suzuki S, Takezaki T, Sonoda S: **Reduced frequency, diversity, and function of human T cell leukemia virus type 1-specific CD8+ T cell in adult T cell leukemia patients.** *J Immunol* 2006, **177**:5718-5726.
  - Chen S, Ishii N, Ine S, Ikeda S, Fujimura T, Ndhlovu LC, Soroosh P, Tada K, Harigae H, Kameoka J, Kasai N, Sasaki T, Sugamura K: **Regulatory T cell-like activity of Foxp3+ adult T cell leukemia cells.** *Int Immunol* 2006, **18**:269-277.
  - Hishizawa M, Imada K, Kitawaki T, Ueda M, Kadowaki N, Uchiyama T: **Depletion and impaired interferon-alpha-producing capacity of blood plasmacytoid dendritic cells in human T-cell leukaemia virus type I-infected individuals.** *Br J Haematol* 2004, **125**:568-575.
  - Shimizu Y, Takamori A, Utsunomiya A, Kurimura M, Yamano Y, Hishizawa M, Hasegawa A, Kondo F, Kurihara K, Harashima N, Watanabe T, Okamura J, Masuda T, Kannagi M: **Impaired Tax-specific T-cell responses with insufficient control of HTLV-1 in a subgroup of individuals at asymptomatic and smoldering stages.** *Cancer Sci* 2009, **100**:481-489.
  - Gruener NH, Lechner F, Jung MC, Diepolder H, Gerlach T, Lauer G, Walker B, Sullivan J, Phillips R, Pape GR, Klenerman P: **Sustained dysfunction of antiviral CD8+ T lymphocytes after infection with hepatitis C virus.** *J Virol* 2001, **75**:5550-5558.
  - Klenerman P, Hill A: **T cells and viral persistence: lessons from diverse infections.** *Nat Immunol* 2005, **6**:873-879.
  - Kostense S, Vandenberghie K, Joling J, Van Baarle D, Nanlohy N, Manting E, Miedema F: **Persistent numbers of tetramer+ CD8(+) T cells, but loss of interferon-gamma+ HIV-specific T cells during progression to AIDS.** *Blood* 2002, **99**:2505-2511.
  - Shankar P, Russo M, Harnisch B, Patterson M, Skolnik P, Lieberman J: **Impaired function of circulating HIV-specific CD8(+) T cells in chronic human immunodeficiency virus infection.** *Blood* 2000, **96**:3094-3101.
  - Wherry EJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, van der Most R, Ahmed R: **Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment.** *J Virol* 2003, **77**:4911-4927.
  - Zajac AJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, Sourdive DJ, Suresh M, Altman JD, Ahmed R: **Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function.** *J Exp Med* 1998, **188**:2205-2213.
  - Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, Brown JA, Moodley ES, Reddy S, Mackey EW, Miller JD, Leslie AJ, DePierres C, Mncube Z, Duraiswamy J, Zhu B, Eichbaum Q, Altfeld M, Wherry EJ, Coovadia HM, Goulder PJ, Klenerman P, Ahmed R, Freeman GJ, Walker BD: **PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression.** *Nature* 2006, **443**:350-354.
  - Radziejewicz H, Ibegbu CC, Fernandez ML, Workowski KA, Obideen K, Wehbi M, Hanson HL, Steinberg JP, Masopust D, Wherry EJ, Altman JD, Rouse BT, Freeman GJ, Ahmed R, Grakoui A: **Liver-infiltrating lymphocytes in chronic human hepatitis C virus infection display an exhausted phenotype with high levels of PD-1 and low levels of CD127 expression.** *J Virol* 2007, **81**:2545-2553.
  - Zhang JY, Zhang Z, Wang X, Fu JL, Yao J, Jiao Y, Chen L, Zhang H, Wei J, Jin L, Shi M, Gao GF, Wu H, Wang FS: **PD-1 up-regulation is correlated with HIV-specific memory CD8+ T-cell exhaustion in typical progressors but not in long-term nonprogressors.** *Blood* 2007, **109**:4671-4678.
  - Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, Freeman GJ, Ahmed R: **Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection.** *Nature* 2006, **439**:682-687.
  - Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, Fitz LJ, Malenkovich N, Okazaki T, Byrne MC, Horton HF, Fouser L, Carter L, Ling V, Bowman MR, Carreno BM, Collins M, Wood CR, Honjo T: **Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation.** *J Exp Med* 2000, **192**:1027-1034.
  - Kozako T, Yoshimitsu M, Fujiwara H, Masamoto I, Horai S, White Y, Akimoto M, Suzuki S, Matsushita K, Uozumi K, Tei C, Arima N: **PD-1/PD-L1 expression in human T-cell leukemia virus type 1 carriers and adult T-cell leukemia/lymphoma patients.** *Leukemia* 2009, **23**:375-382.
  - van Lier RA, ten Berge IJ, Gamadia LE: **Human CD8(+) T-cell differentiation in response to viruses.** *Nat Rev Immunol* 2003, **3**:931-939.
  - Johnson-Nuroth JM, Graber J, Yao K, Jacobson S, Calabresi PA: **Memory lineage relationships in HTLV-1-specific CD8+ cytotoxic T cells.** *J Neuroimmunol* 2006, **176**:115-124.
  - Harashima N, Kurihara K, Utsunomiya A, Tanosaki R, Hanabuchi S, Masuda M, Ohashi T, Fukui F, Hasegawa A, Masuda T, Takaue Y, Okamura J, Kannagi M: **Graft-versus-Tax response in adult T-cell leukemia patients after hematopoietic stem cell transplantation.** *Cancer Res* 2004, **64**:391-399.
  - Harashima N, Tanosaki R, Shimizu Y, Kurihara K, Masuda T, Okamura J, Kannagi M: **Identification of two new HLA-A\*1101-restricted tax epitopes recognized by cytotoxic T lymphocytes in an adult T-cell leukemia patient after hematopoietic stem cell transplantation.** *J Virol* 2005, **79**:10088-10092.
  - Elovaara I, Koenig S, Brewah AY, Woods RM, Lehky T, Jacobson S: **High human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-specific precursor**

- cytotoxic T lymphocyte frequencies in patients with HTLV-1-associated neurological disease. *J Exp Med* 1993, **177**:1567-1573.
38. Hanon E, Hall S, Taylor GP, Saito M, Davis R, Tanaka Y, Usuku K, Osame M, Weber JN, Bangham CR: **Abundant tax protein expression in CD4+ T cells infected with human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) is prevented by cytotoxic T lymphocytes.** *Blood* 2000, **95**:1386-1392.
  39. Sakai JA, Nagai M, Brennan MB, Mora CA, Jacobson S: **In vitro spontaneous lymphoproliferation in patients with human T-cell lymphotropic virus type I-associated neurologic disease: predominant expansion of CD8+ T cells.** *Blood* 2001, **98**:1506-1511.
  40. Yoshie O, Fujisawa R, Nakayama T, Harasawa H, Tago H, Izawa D, Hieshima K, Tatsumi Y, Matsushima K, Hasegawa H, Kanamaru A, Kamihira S, Yamada Y: **Frequent expression of CCR4 in adult T-cell leukemia and human T-cell leukemia virus type 1-transformed T cells.** *Blood* 2002, **99**:1505-1511.
  41. Betts MR, Brenchley JM, Price DA, De Rosa SC, Douek DC, Roederer M, Koup RA: **Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation.** *J Immunol Methods* 2003, **281**:65-78.
  42. Appay V, Dunbar PR, Callan M, Klenerman P, Gillespie GM, Papagno L, Ogg GS, King A, Lechner F, Spina CA, Little S, Havlir DV, Richman DD, Gruener N, Pape G, Waters A, Easterbrook P, Salio M, Cerundolo V, McMichael AJ, Rowland-Jones SL: **Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections.** *Nat Med* 2002, **8**:379-385.
  43. Klebanoff CA, Gattinoni L, Restifo NP: **CD8+ T-cell memory in tumor immunology and immunotherapy.** *Immunol Rev* 2006, **211**:214-224.
  44. Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A: **Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions.** *Nature* 1999, **401**:708-712.
  45. Wherry EJ, Barber DL, Kaech SM, Blattman JN, Ahmed R: **Antigen-independent memory CD8 T cells do not develop during chronic viral infection.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, **101**:16004-16009.
  46. Radoja S, Saio M, Schaer D, Koneru M, Vukmanovic S, Frey AB: **CD8(+) tumor-infiltrating T cells are deficient in perforin-mediated cytolytic activity due to defective microtubule-organizing center mobilization and lytic granule exocytosis.** *J Immunol* 2001, **167**:5042-5051.
  47. Champagne P, Ogg GS, King AS, Knabenhans C, Ellefsen K, Nobile M, Appay V, Rizzardi GP, Fleury S, Lipp M, Forster R, Rowland-Jones S, Sekaly RP, McMichael AJ, Pantaleo G: **Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes.** *Nature* 2001, **410**:106-111.
  48. Penna A, Pilli M, Zerbini A, Orlandini A, Mezzadri S, Sacchelli L, Missale G, Ferrari C: **Dysfunction and functional restoration of HCV-specific CD8 responses in chronic hepatitis C virus infection.** *Hepatology* 2007, **45**:588-601.
  49. Yi JS, Cox MA, Zajac AJ: **T-cell exhaustion: characteristics, causes and conversion.** *Immunology* 2010, **129**:474-481.
  50. Wills MR, Carmichael AJ, Mynard K, Jin X, Weekes MP, Plachter B, Sissons JG: **The human cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to cytomegalovirus is dominated by structural protein pp65: frequency, specificity, and T-cell receptor usage of pp65-specific CTL.** *J Virol* 1996, **70**:7569-7579.
  51. Kuzushima K, Hayashi N, Kimura H, Tsurumi T: **Efficient identification of HLA-A\*2402-restricted cytomegalovirus-specific CD8(+) T-cell epitopes by a computer algorithm and an enzyme-linked immunospot assay.** *Blood* 2001, **98**:1872-1881.

doi:10.1186/1742-4690-8-100

**Cite this article as:** Takamori et al.: Functional impairment of Tax-specific but not cytomegalovirus-specific CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in a minor population of asymptomatic human T-cell leukemia virus type 1-carriers. *Retrovirology* 2011 **8**:100.

**Submit your next manuscript to BioMed Central  
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
www.biomedcentral.com/submit





## 諸 題

# HTLV-1キャリアー, HTLV-1-associated myelopathy (HAM) 患者診療の現状と問題点\*

山 野 嘉 久\*\*

Key Words : HTLV-1, antibody test, quantitative PCR test, HAM, clinical subtype

### はじめに

HTLV-1 (human T-cell leukemia virus type 1)は, 成人 T 細胞白血病 (adult T-cell leukemia; ATL) や神経難病であるHTLV-1関連脊髄症 (HTLV-1-associated myelopathy; HAM)などをひき起こすヒトレトロウイルスである<sup>1)~3)</sup>. このウイルスは, 縄文時代以前よりわが国に存在し, 主に母乳を介した母子感染により現代まで引き継がれてきたといわれている. HTLV-1は約30年前に発見され<sup>4)</sup>, 約20年前に実施された全国疫学調査では, 本邦での感染者数は約120万人で, 約半数の感染者が九州地方などに偏在していることが明らかとなったが, 母乳栄養方法の変化などにより感染者は自然減少するであろうとの予測がなされ, 無用な差別や費用対効果などの理由から感染予防に関する全国的な対策は講じられず, これまでHTLV-1の感染予防対策は各自治体の判断に委ねられていた. しかしながらその後, HTLV-1に対する国民や医療関係者の関心は低くなり, 「風土病」という偏見が生まれ, 感染者や患者はかえって不当な差別を受けるようになっていった. 約20年ぶりに実施された最近の全国疫学調査により, 本邦における感染者数は約108万人といまだに多くの感染者が存在することが明らかとなり, 感染予防対策を実施していた九州地方などの都道府県においては感

染者数が減少しているが, 関東などの大都市圏ではむしろ増加していることが判明し, 全国への感染拡散を予防するためにはこれまでの感染予防対策では不十分であり, 全国レベルでの感染予防対策の実施が急務であることが判明した. これらの経緯を踏まえ, 平成22年9月, 政府に「HTLV-1特命チーム」が発足, 全国一律で公費による妊婦HTLV-1抗体検査や, HTLV-1に対する総合的な対策の実施が決まった. 本稿では, HTLV-1キャリアーやHAM患者の診療の現状や問題点などについて概説する.

### なぜ「予防」が重要なのか

HTLV-1は, 主にCD4陽性 T リンパ球に持続感染を成立させ<sup>5)~7)</sup>, ひとたび感染すると体の中から排除することは不可能である. HTLV-1キャリアーのほとんどは, HTLV-1に起因する病気を発病することなく生涯を終えるが, 約5%にATLを, 約0.3%にHAMを発症する<sup>8)9)</sup>. ATLは白血病の中でも予後の悪い疾患で, 化学療法や骨髄移植が積極的に行われているが, いまだ致死率が高い<sup>10)</sup>. 一方, HAMは感染 T 細胞が胸髄に慢性炎症をひき起こして起こる脊髄症で, 両足の麻痺, 感覚障害, 膀胱直腸障害などの症状が進行し, 最終的には車イスや寝たきりとなり患者の機能予後はきわめて不良であるが, 有効な治療

\* Actual status and issues of medical care for asymptomatic HTLV-1 carriers and patients with HTLV-1-associated myelopathy (HAM).

\*\* Yoshihisa YAMANO, M.D., Ph.D.: 聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター病因・病態解析部門(〒216-8512 川崎市宮前区菅生2-16-1); Department of Rare Diseases Research, Institute of Medical Science, St. Marianna University School of Medicine, Kawasaki 216-8512, JAPAN

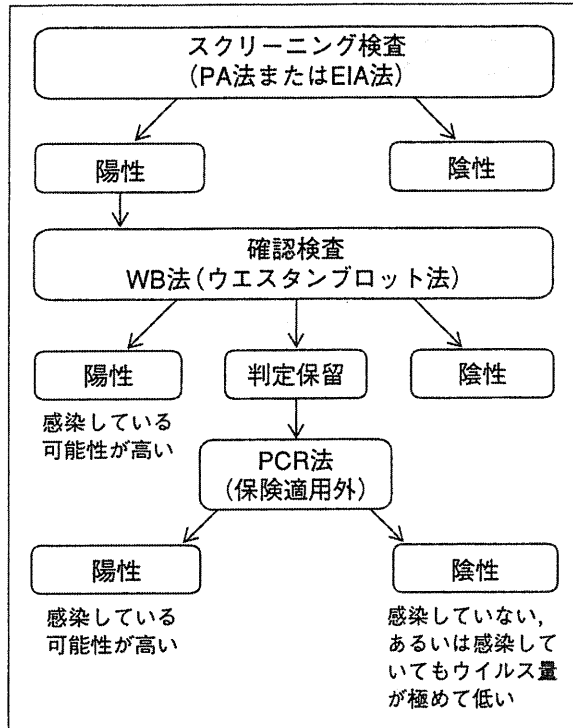


図1 HTLV-1感染の検査の進め方

法は確立されていない<sup>11)</sup>。このような状況の中、一人でも新たな患者を減らすためには、徹底した感染予防対策の実施が、現実的かつ確実な方法である。

本来、HTLV-1の感染力は弱く、生体内に感染リンパ球が生存した状態で侵入し、正常リンパ球と細胞間接着を介して感染が成立すると考えられている。感染経路としては母子感染が約6割と最も多く、性行為感染、血液を介する感染と続く。以前は輸血による感染もあったが、1986年から日赤で献血の抗体検査が行われており、現在はなくなっている。

母子感染のほとんどは母乳を介した垂直感染であり、母乳中に含まれる感染Tリンパ球が児に取り込まれることにより感染が成立するといわれている。これまでの調査報告で、キャリアの妊婦が母乳栄養で育てた場合、児への感染率は約20%であったが、キャリアの妊婦が出産直後より人工栄養で育てた場合、感染率は約3%と著しく減少した<sup>12)</sup>。また、出産後3か月以内の短期授乳や一度冷凍した母乳を与えた場合も、調査症例数が不十分であるが同等の感染率の低下を認めている<sup>13)14)</sup>。生後3か月は移行抗体があるため、また母乳の凍結によりウイルス感染

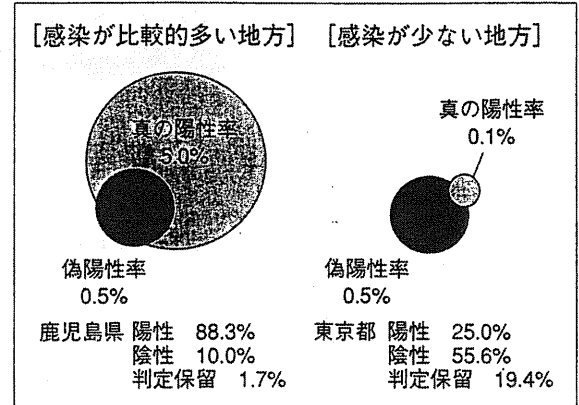


図2 一次検査には偽陽性が一定の比率で出現する

細胞が死滅するため感染率が低くなるといわれている。

このように、断乳などの母子感染対策により子供への感染は大きく減少するので、その徹底を図ることにより次世代のHTLV-1キャリアーは減少していくことが予想される。

### HTLV-1感染の診断と問題点

HTLV-1の感染は、まず血液中の抗HTLV-1抗体の有無について粒子凝集法(PA法)または酵素免疫測定法(EIA法)といったスクリーニング検査方法により調べる(図1)。ここで陽性であれば感染の疑いがあるとみなされるが、偽陽性の可能性があるためHTLV-1に感染していると判断してはならない。必ずウエスタンブロット(WB)法による精密検査が必要である(保険適用あり)。WB法で陽性であれば感染が確定し、陰性であれば非感染とみなす。しかし、WB法では「判定保留」という結果がでる可能性があり、この場合は感染の有無を確定することができない(図1)。これらの抗体検査法の結果を解釈する上で、認識していなければならない重要な調査報告がある。平成21年度の厚生労働省研究班「HTLV-1の母子感染予防に関する研究班」の調査によると、スクリーニング検査法で陽性の場合に、感染率が比較的高い地域ではWB法で陽性が約88.5%、陰性が約10%、判定保留が約1.5%などであったが、感染率が低い地域では、陽性が約25%、陰性が約55%、判定保留が約20%など、偽陽性や判定保留の割合が高いことが明確になった(図2)。この違いは、スクリーニング検査における偽陽

性率と真の陽性率との比率の関係から生じる問題で、HTLV-1の検査に限られた現象ではない。診療の現場で検査結果を判断・説明する医師は、偽陽性の可能性について常に留意し、HTLV-1キャリアでない人にキャリアであると説明することは絶対に避けなければならない。

WB法で「判定保留」となった場合の対応として、PCR法で確認する方法がある。しかし、保険未承認であるため自費で検査すると数万円の費用がかかる。また、ウイルス量をreal-time PCR法で定量検査する方法もあるが、現状では全国で数か所の医療機関でしか実施しておらず、値に施設間差があり標準化が必要である<sup>15)</sup>。これらのPCR検査法に関しては、その標準化と保険承認の重要性について国も認識しており、現在、厚生労働省の研究班で検討中である。また、PCR法にも限界があることを認識しておくことは重要であろう。HTLV-1のPCR検査では、一般的に約2万個の単核球由来のDNAにウイルスが含まれているか検査するのであるが、その検出限界が約10コピー弱である。すなわち、約2千個に1個以上の細胞にウイルスが感染しているとPCRで検出できるが、それ以下の感染率である場合には検出することができない。このように、PCR検査法で陽性の場合には感染しているとみなしてよいが、陰性の場合には“感染していない、あるいは感染していてもウイルス量がきわめて低い”という解釈が正しい理解である。

これらの情報に関する全国的な均てん化を図るため、HTLV-1に関連する複数の厚生労働省研究班が合同でパンフレットやウェブサイトを作成し情報提供を行っている(<http://www.htlv1joho.org/index.html>)。このサイトでは、HTLV-1に関する基本的な情報が記載されているのみならず、HTLV-1やHAM、ATLに関するパンフレットをダウンロードすることや、ウイルス量の定量検査を実施している医療機関の掲載、「HTLV-1キャリア外来」を専門に実施している医療機関の検索などができるようになっており、ぜひ参照されたい。

### キャリアの不安にどう対処するか

キャリアであることを告げられた人は大き

な不安を抱える。キャリアのほとんどが発病しないと説明されても、発病を予防する治療法が確立されておらず、しかも病気が難病であるために、発病するわずかな可能性に恐怖さえ覚える。まして妊婦であれば、出産への不安と同時に子供や夫へ感染しないかと悩みは深くなる。

このたびの全国妊婦抗体検査実施は、感染予防に対して大きな効果を生む一方で、キャリアと診断されて悩みを抱える妊婦がこれまで以上に増加することが予想される。医療機関での医師や助産師などによる十分な説明は当然必要なことであるが、キャリア外来を実施している専門医療機関との連携や、妊婦や家族がいつでも気軽に相談できる体制の整備は急務である。現在、各自治体で保健所を中心として相談窓口の設置など支援体制作りが進んでいるが、十分な機能を果たすまでにはもう少し時間を要すると思われる。また、これと同時に市民への啓蒙活動が必須である。日本人のほとんどがHTLV-1のことを知らないため、周囲の無理解や間違った知識により、キャリアや患者が精神的苦痛を受ける可能性があるからである。患者会を中心としたシンポジウムや講演会などのイベントも積極的に行われているが、行政や公的機関が主導する啓蒙キャンペーンなどを継続的に実施していく必要があると考える。

### HAMの診療の現状

HAMは、1986年にOsameらにより一つの疾患単位として提唱され<sup>2)3)</sup>、2009年度からは国の難治性疾患克服研究事業の対象疾患(いわゆる難病)に認定されている。最近の疫学調査では、全国のHAM患者数は約3,000人と推定され、関東などの大都市圏で患者数が増加していると報告されている。初期症状は、歩行の違和感、足のしびれ、つっぱり感、足がもつれる、走ると転びやすいなどであるが、多くは進行し、歩行困難、頻尿、尿閉、高度の便秘などが出現し、徐々に日常生活が困難になる。重症例では下肢の完全麻痺や体幹の筋力低下による座位保持困難により、寝たきりになる場合もある。

われわれは平成19年4月から関東でHAM専門外来を開設し、これまで約80例のHAM患者を継

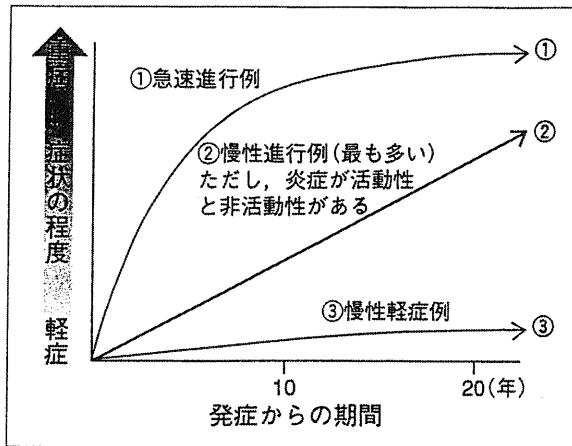


図3 HAMの臨床経過の特徴

続的に診療しているが、その診療を通してさまざまな問題点が浮かび上がってきた。たとえば、発病してから診断されるまでに平均で約5年と時間がかかっている、HAMの経過にバリエーションのあることが認識されていない、疾患活動性を評価するための検査が実施されていない、特に治療を受けていない患者が多い、などである。このような問題の背景には、疾患の認知度が低い、HAMの臨床経過に関する情報不足、疾患活動性の評価法や治療方針の決定に関する指針やマニュアルが確立していないことなどがあげられる。HAMのように希少な疾患は日常的に遭遇することは少なく、神経内科医でもHAMの診療に慣れていないことが多いのが現状であろう。

### 経過と疾患活動性を把握して 治療方針決定を

HAMの臨床経過の特徴を図3に示す。HAMは、年単位で緩徐に慢性に進行する 경우가多いが(慢性進行例)、なかには脊髄での炎症が強く、症状が急速に進行し数か月で歩行不能となる例もみられ(急速進行例)、特に高齢者にこのような場合が多い傾向にある。一方で、運動障害が軽度のまま数十年以上の長期にわたり症状がそれほど進行しない例も認められる(慢性軽症例)。このように、HAMの経過には個人差が大きいという特徴があるが、そのことは意外と知られていない。経過は疾患活動性(脊髄での炎症)の程度を反映している場合が多いので、治療方針を決定する上でこれらの特徴を考慮する必要がある。

脊髄での炎症の程度を評価するためには髄液検査が必須であり、HAMの治療方針決定や治療効果の判定において重要である。ただし、一般的な髄液検査で把握できる細胞数、IgG indexなどでは、HAMの炎症を把握するには感度が低く、実際は炎症があり症状が進行性であってもこれらの値は正常範囲内にとどまることがあり注意が必要である。現時点では、保険承認されていないが髄液中のネオプテリンが外注検査可能(SRL)であり、重症度との相関性もかなり高く、HAMの疾患活動性の把握に有用である<sup>16)17)</sup>。これまでの経験では、5 pmol/ml以下では活動性がほとんどなく進行もほとんど認められず、5~10 pmol/mlでは活動性が軽度、10~25 pmol/mlは中等度、25 pmol/ml以上は活動性が高度という傾向にある。最近、われわれはネオプテリンよりもさらに感度や重症度との相関性に優れたマーカーとなる分子も同定しており論文準備中である。

このようにHAMは、病気の進行の早さや炎症の強さに応じて、治療内容を決定することが重要であるが、大変残念なことに、慢性軽症例で炎症所見も弱いのに大量のステロイド療法が選択されている症例や、急速進行例で炎症所見が強いにもかかわらず治療が施されていない症例などが散見されるのが現状であり、正確な情報の全国的な普及の必要性が高い。また、HAMの診療を一般化するには、血液などの検体で比較的簡便に測定可能なバイオマーカーを開発する必要性も高く、現在、これらの課題に対してHAMに関する厚生労働省研究班でその対策や開発に取り組んでいる。HAM患者におけるウイルス量測定の意義については、字数の関係で今回は省略する。

### HAMの治療の現状とこれから

HAMの理想的な治療は、原因となっているHTLV-1感染細胞を根絶することであろうが、その目的を達成できる治療法はまだ研究開発中である。現状では、できるだけ発症早期に脊髄炎症を抑え少しでも病気の進行を抑制するために病型に応じプレドニゾロン(PSL)やインターフェロン $\alpha$ (IFN- $\alpha$ )などが用いられる(図4)。PSLは最も使用された実績があり、多くの後ろ向き研



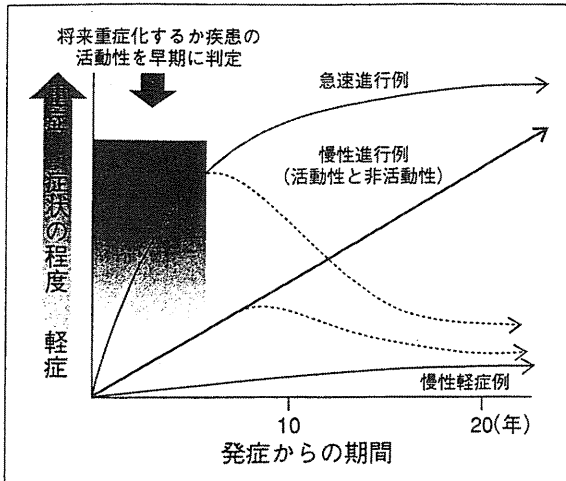


図4 HAMの治療の考え方(案)

究があるが、規模の大きなものでは131名の患者で81.7%に有効、69.5%に著効し、同じ報告でIFN- $\alpha$ は32名の患者で62.5%に有効、21.9%に著効を示している<sup>18)</sup>。IFN- $\alpha$ に関しては、二重盲検法による多施設共同臨床試験が実施され、計48名の患者で28日間毎日注射療法を行った場合に用量依存的に効果を有することが報告された<sup>19)</sup>。

HAMの治療は、経過や炎症の程度に応じて計画を立てることが重要であろう。急速進行例は髄液の細胞数やネオプテリン値の上昇が認められ、メチルプレドニゾロンパルス療法後にPSL内服療法を実施する。その後PSLは速やかに減量を図るが、経過や髄液ネオプテリン値を参考に維持量を決定する。慢性進行例は、炎症の程度により活動性と非活動性に分けることができる。非活動性の症例はそれほど進行しないため、これらの治療は積極的には実施しない。活動性の症例には、少量のPSLあるいはIFN- $\alpha$ の治療が有効であることが多い。慢性軽症例は炎症も非活動性であり、これらの治療は積極的には実施しない。もちろん、リハビリや合併症状に対する治療はいずれの症例も必要である。

HAMの治療の最終目標は長期予後の改善である。PSLもIFN- $\alpha$ も長期間の治療成績に関する報告はないが、われわれの後ろ向き調査では、PSL長期内服継続例が非内服群よりも髄液のネオプテリン値が低く、重症度も低いという結果を得ている(論文作成中)。しかし、PSL長期内服は副作用の問題があり、またIFN- $\alpha$ 注射療法も長期間

の継続は困難で、これらの治療薬の長期使用患者は限定されるのが現状であり、より効果や長期忍容性に優れた新規治療薬開発の要望が強い。HAMの新規治療薬を開発するには、薬事承認申請に必要なデータの収集が可能なプロトコールにのっとりて治験を実施し、そのデータを客観的に解析しエビデンスを蓄積していく体制の整備が必要である。先進国でHAM患者が多いのは日本のみであるため、その体制づくりに課せられたわが国の責務は大きい。

#### 文 献

- 1) Uchiyama T, Yodoi J, Sagawa K, et al. Adult T-cell leukemia : clinical and hematologic features of 16 cases. *Blood* 1977 ; 50 : 481.
- 2) Osame M, Usuku K, Izumo S, et al. HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet* 1986 ; 1 : 1031.
- 3) Gessain A, Barin F, Vernant JC, et al. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet* 1985 ; 2 : 407.
- 4) Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, et al. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980 ; 77 : 7415.
- 5) Richardson JH, Edwards AJ, Cruickshank JK, et al. In vivo cellular tropism of human T-cell leukemia virus type 1. *J Virol* 1990 ; 64 : 5682.
- 6) Yamano Y, Cohen CJ, Takenouchi N, et al. Increased expression of human T lymphocyte virus type I (HTLV-I) Tax11-19 peptide-human histocompatibility leukocyte antigen A\*201 complexes on CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells detected by peptide-specific, major histocompatibility complex-restricted antibodies in patients with HTLV-I-associated neurologic disease. *J Exp Med* 2004 ; 199 : 1367.
- 7) Yamano Y, Araya N, Sato T, et al. Abnormally high levels of virus- infected IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells in a retrovirus-associated neuroinflammatory disorder. *PLoS One* 2009 ; 4 : 1.
- 8) Kaplan JE, Osame M, Kubota H, et al. The risk of development of HTLV-I-associated myelopathy/



- tropical spastic paraparesis among persons infected with HTLV-I. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1990 ; 3 : 1096.
- 9) Arisawa K, Soda M, Endo S, et al. Evaluation of adult T-cell leukemia/lymphoma incidence and its impact on non-Hodgkin lymphoma incidence in southwestern Japan. *Int J Cancer* 2000 ; 85 : 319.
- 10) Tsukasaki K, Hermine O, Bazarbachi A, et al. Definition, prognostic factors, treatment, and response criteria of adult T-cell leukemia-lymphoma : a proposal from an international consensus meeting. *J Clin Oncol* 2009 ; 27 : 453.
- 11) Izumo S, Umehara F, Osame M. HTLV-I-associated myelopathy. *Neuropathology* 2000 ; 20 Suppl : S65.
- 12) Moriuchi M, Moriuchi H. A milk protein lactoferrin enhances human T cell leukemia virus type I and suppresses HIV-1 infection. *J Immunol* 2001 ; 166 : 4231.
- 13) Takahashi K, Takezaki T, Oki T, et al. Inhibitory effect of maternal antibody on mother-to-child transmission of human T-lymphotropic virus type I. The Mother-to-Child Transmission Study Group. *Int J Cancer* 1991 ; 49 : 673.
- 14) Ando Y, Ekuni Y, Matsumoto 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 Gynecol Res* 2004 ; 30 : 436.
- 15) Kamihira S, Yamano Y, Iwanaga M, et al. Intra- and inter-laboratory variability in human T-cell leukemia virus type-1 proviral load quantification using real-time polymerase chain reaction assays : a multicenter study. *Cancer Sci* 2010 ; 101 : 2361.
- 16) Nomoto M, Utatsu Y, Soejima Y, Osame M. Neopterin in cerebrospinal fluid : a useful marker for diagnosis of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Neurology* 1991 ; 41 : 457.
- 17) Nakagawa M, Izumo S, Ijichi S, et al. HTLV-I-associated myelopathy : analysis of 213 patients based on clinical features and laboratory findings. *J Neurovirol* 1995 ; 1 : 50.
- 18) Nakagawa M, Nakahara K, Maruyama Y, et al. Therapeutic trials in 200 patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Neurovirol* 1996 ; 2 : 345.
- 19) Izumo S, Goto I, Itoyama Y, et al. Interferon-alpha is effective in HTLV-I-associated myelopathy : a multicenter, randomized, double-blind, controlled trial. *Neurology* 1996 ; 46 : 1016.

\* \* \*

## 特集(1) : HTLV-1 感染の検査と臨床

### 5. HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の病態と治療

安藤 仁\*<sup>1</sup> 八木下 尚子\*<sup>2</sup> 新谷 奈津美\*<sup>3</sup>  
佐藤 知雄\*<sup>4</sup> 山野 嘉久\*<sup>5</sup>

[Key Words] HAM, HTLV-1, pathogenesis, treatment

#### はじめに

HTLV-1-associated myelopathy (HAM) は、成人 T 細胞性白血病 (ATL) の原因ウイルスである human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) の感染者 (キャリア) の一部に発症する慢性進行性の痙性脊髄麻痺を特徴とする神経難病である<sup>1)~3)</sup>。1986 年に納らにより一つの疾患単位として提唱され、2009 年度からは国の難治性疾患克服研究事業の対象疾患 (いわゆる難病) に認定されている。HAM の発見からこの 25 年の間に、臨床像の確立、発症病態の解析、様々な治療の試みなどが進められた。これまでに蓄積された知見を踏まえて、疫学、診断、臨床像、病態、そして治療などについて概説する。

#### I. HAM の疫学

日本では、HTLV-1 キャリアの生涯において約 0.3% の確率で発症すると推定されている<sup>4)</sup>。1998 年の全国疫学調査では 1,422 名の HAM 患者の存在が確認され、患者の分布は西日本を中心に全国に広がっており、特に九州・四国・沖縄に多く認められた。最近の全国疫学調査では、

全国の患者数は約 3,000 名と推定され、関東などの大都市圏で患者数が増加していることが判明している。

HTLV-1 の感染経路として、主として母乳を介する母子感染と、輸血、性交渉による水平感染が知られているが、HAM はそのいずれでも発症することが知られている。輸血後数週間で発症した例もあり、感染成立後長期のキャリア状態を経て発症する ATL とは異なっている。輸血後発症する HAM の存在の指摘により、1986 年 11 月より献血時の抗 HTLV-1 抗体スクリーニングが開始され、以後、輸血後発症はなくなった。発症は中年以降の成人が多いが (平均発症年齢は 40 代)、10 代、あるいはそれ以前の発症と考えられる例も存在する。男女比は 1:2 ないし 2:3 と女性に多く、男性に多い ATL と対照的である<sup>5)</sup>。

#### II. HAM の診断

対称性の錐体路障害を示唆する痙性対麻痺などの所見を認める場合は、HAM の可能性を考慮して血清中の抗 HTLV-1 抗体の有無について確認する。抗体検査は、まず PA 法あるいは CLEIA

\*1~5 Hitoshi ANDO, MD, Naoko YAGISHITA, MD, Natsumi ARAYA, MD, Tomoo SATO, MD & Yoshihisa YAMANO, MD  
聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター 病因・病態解析部門  
(〒216-8512 神奈川県川崎市宮前区菅生 2-16-1)

法でスクリーニングし、陽性である場合はウエスタンブロット法で確認し感染を確定する。感染が確認された場合は髄液検査を施行し、髄液中の抗 HTLV-1 抗体の有無を PA 法あるいは CLEIA 法で確認する。髄液中の抗 HTLV-1 抗体が陽性である場合は、その他のミエロパチーを来たす脊髄圧迫病変、脊髄腫瘍、多発性硬化症などの疾患を鑑別した上で、HAM と確定診断する。

### III. HAM の臨床症状・徴候

臨床症状の中核は、緩徐進行性の両下肢痙性不全麻痺で、両下肢の筋力低下と痙性による歩行障害を示す。初期症状は、歩行の違和感、足のしびれ、つっぱり感、足がもつれる、走ると転びやすいなどであるが、多くは進行し、片手杖、両手杖、さらに車椅子が必要となり徐々に日常生活が困難になる。重症例では下肢の完全麻痺や体幹の筋力低下による座位保持困難により、寝たきりになる場合もある。

感覚の異常は、下半身の触覚や温痛覚の低下がみられることがある。持続するしびれ感や痛みなどを伴う場合もあり、特に痛みを伴う場合は ADL (activities of daily living) 低下の主要な原因となる。

自律神経症状は高率にみられ、特に排尿困難、頻尿、便秘などの膀胱直腸障害は病初期よりみられる。また進行例では起立性低血圧や下半身の発汗障害なども認められ、発汗低下による鬱熱のため、夏場に微熱、倦怠感が続き、適切な室温管理が必要となることもある。そのほか男性ではインポテンツがしばしばみられる。

神経内科学的診察では、両下肢の深部腱反射の亢進、腹壁反射の消失が認められる。またバビンスキー徴候などの病的反射が下肢でみられる。通常、両上肢は自覚症状を欠いているが、深部腱反射は亢進していることが多い。感覚障害についてはレベルのはっきりしない下半身の表在覚低下がみられる例が多く、しびれ感や痛みなどを認める場合がある。また振動覚低下を認めることが多い。

### IV. HAM の経過

図1に示すように HAM 患者の約 8 割は年単位で緩徐に慢性に進行するが(慢性進行例)、時に急速に進行し、数ヵ月で歩行不能になる例もみられ(急速進行例)、特に高齢での発症者で進行度が早い傾向がある。一方で、運動障害が軽度のまま数十年以上の長期にわたり症状の進行があまり認められない例もある(慢性軽症例)。

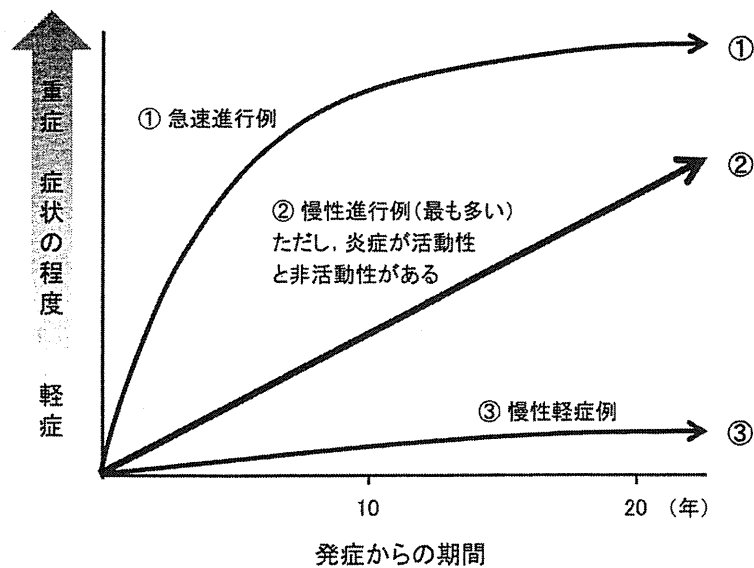


図1 HAM の臨床経過の特徴

このように、HAMの経過には個人差が大きいという特徴があり、その経過は疾患活動性(特に脊髄炎症)の程度と相関している場合が多いので、治療方針を決定する上でこれらの特徴を考慮する必要がある。

## V. HAMの病態

### A. 病理

HAMの病態を理解する上で、病理所見を理解することは重要である。HAMの剖検例では、肉眼的に頸髄下部から腰髄上部までびまん性の萎縮がみられる<sup>6)</sup>。脊髄の横断面では両側索の萎縮と変性が肉眼的に観察されるが、大脳・小脳・脳幹には肉眼的に明らかな病変を指摘できる例はほとんど無い<sup>6)</sup>。

HAMの病理組織所見では、慢性炎症過程が脊髄、特に胸髄中・下部に強調されて起こっている。病変はほぼ左右対称性で、小血管周囲から脊髄実質にひろがる炎症細胞浸潤と周囲の脊髄実質、すなわち、髄鞘や軸索の変性脱落がみられる。主として両側側索に強くみられ、灰白質にも及んでいる。その他の詳細な解析も含めて、HAM患者脊髄では細胞性免疫反応が持続的に起こっていることを示す所見が得られている。

さらにHAMの脊髄病変において、HTLV-1感染細胞について*in situ* PCR法を用いて解析されており、HTLV-1の感染は浸潤したT細胞にのみ確認され、周辺の神経細胞やグリア細胞には確認されていない<sup>7)</sup>。このことは、浸潤したHTLV-1感染T細胞が慢性炎症の要因として中心的な役割を果たしていることを示唆している。

### B. ウイルス免疫学的な特徴

HAM患者では、末梢血単核球(PBMC)中のプロウイルス量、すなわち感染細胞数が健常キャリアに比較して有意に多いことが判明している<sup>8)~10)</sup>。また、ウイルス感染細胞に反応するHTLV-1特異的細胞傷害性T細胞や抗体の量も異常に増加しており、ウイルスに対する免疫応答が過剰に亢進しているという免疫学的な特徴

を有している<sup>11)~14)</sup>。さらに、髄液中や脊髄病変局所で一部の炎症性サイトカインやケモカインの産生が非常に高まっていることが知られている<sup>15)16)</sup>。これらのウイルス・免疫学的特徴と病理学的な所見などを総合すると、HAMの主要な病態は、①HTLV-1感染細胞の増加、②脊髄の慢性炎症、③脊髄組織の破壊と変性、と考えられる。

## VI. HAMの病態を把握する検査

HAMは、感染細胞数(ウイルス量)が多いと発症リスクや発病後の予後とある程度相関することが報告されており<sup>5)17)18)</sup>、ウイルス量の測定は患者におけるHTLV-1制御の程度を把握するうえで有用である。ウイルス量の測定は、エイズウイルスや肝炎ウイルスが血清中の濃度を測定するのと異なり、HTLV-1はウイルスが血清中に存在しないため、PBMC中に感染している割合をreal-time PCR法で測定する系が各研究室レベルで確立されている。現状では、HTLV-1ウイルス量の定量的測定を実施している施設は全国でも数少なく(HTLV-1情報センターウェブサイト参照：[http://www.htlv1joho.org/medical/medical\\_exam.html](http://www.htlv1joho.org/medical/medical_exam.html))、外注検査で測定することはできない。現在、厚生労働省研究班でHTLV-1ウイルス量測定法の標準化に向けた研究が実施されており、将来保険承認されることが期待される。なお、HAM患者でウイルス感染細胞数が増加している機構については解明されていないが、HTLV-1は生体内でのウイルス発現が低く、感染細胞数の増加は主に感染細胞の増殖による部分が大きいと考えられている。

HAMにおける脊髄炎症の程度は患者の疾患活動性や予後と極めて強い相関があり、その把握は最も重要である。脊髄での炎症の程度を評価するためには髄液検査が必須であり、HAMの治療方針決定や治療効果の判定において重要である。ただし、一般的な髄液検査で把握できる細胞数、IgG indexなどでは、HAMの炎症を把握するには感度が低く、実際は炎症があり症状が進行性であってもこれらの値は正常範囲内