

201225038A

厚生労働科学研究費補助金
新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

HTLV-1 感染症の診断法の標準化と
発症リスクの解明に関する研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 浜口 功

平成25(2013)年 3月

厚生労働科学研究費補助金
新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

HTLV-1 感染症の診断法の標準化と
発症リスクの解明に関する研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 浜口 功

平成25（2013）年 3月

目 次

I. 総括研究報告

- HTLV-1 感染症の診断法の標準化と発症リスクの解明に関する研究 P.3
浜口 功、山口一成、渡邊俊樹、出雲周二、岡山昭彦、佐竹正博、
長谷川寛雄、望月 學、相良康子、齋藤 滋、山野嘉久、巽 正志、
大隈 和、岩永正子、宇都宮 與、内丸 薫、高 起良、魚住公治、
緒方正男、上平 憲、梅木一美、山本成郎、橋倉悠輝、鴨居功樹、
寺田裕紀子、成瀬 功、浜口行雄、篠田達也、梶山直毅、齋藤由美子、
澤野 薫、水上拓郎、百瀬暖佳、倉光 球

II. 分担研究報告

1. 疫学手法によるHTLV-1関連疾患発症リスク解明：全国 HTLV-1キャリア
コホート(JSPFAD) P.11
岩永正子、渡邊俊樹、岡山昭彦、宇都宮 與、内丸 薫、高 起良、
魚住公治、緒方正男、相良康子、山口一成、上平 憲
2. HTLV-1 水平感染の実態推定に関する研究..... P.16
佐竹正博、相良康子、岩永正子
3. HTLV-I non-endemic areaにおけるHTLV-I抗体検査、Western Blot法、PCR法
検査の実態調査..... P.18
齋藤 滋
4. HTLV-1感染症の診断法の標準化と発症リスクの解明に関する研究
(測定方法および標準株組み込みプロウイルスに関する検討)..... P.20
岡山昭彦、梅木一美、橋倉悠輝、山本成郎
5. Multi-color FACS による発症高危険 HTLV-キャリアの同定 P.22
内丸 薫
6. ウェスタンブロット法での「判定保留」例におけるリアルタイムPCRを
用いたHTLV-1プロウイルス検出に関する検討..... P.24
山野嘉久
7. HTLV-1 感染細胞の早期腫瘍バイオマーカーとしてのCD26抗原..... P.30
長谷川寛雄

8. HTLV-1 ぶどう膜炎患者における全身疾患の発症リスクの解明に関する研究	P.35
望月 學、鴨居功樹、寺田裕紀子	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	P.37
IV. 研究成果の刊行物・印刷	P.45

研究組織

研究代表者：

浜口 功 国立感染症研究所 血液・安全性研究部

研究分担者：

山口一成 国立感染症研究所 血液・安全性研究部

渡邊俊樹 東京大学大学院 新領域創成科学研究科

出雲周二 鹿児島大学大学院 難治ウイルス病態制御研究センター

岡山昭彦 宮崎大学医学部 内科学

佐竹正博 日本赤十字社 中央血液研究所

長谷川寛雄 長崎大学病院 検査部

望月 學 東京医科歯科大学 眼科学

相良康子 日本赤十字社 九州ブロック血液センター

齋藤 滋 富山大学大学院 医学薬学研究部 産科婦人科

山野嘉久 聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター

巽 正志 国立感染症研究所 エイズ研究センター

大隈 和 国立感染症研究所 血液・安全性研究部

岩永正子 帝京大学大学院 公衆衛生学研究科

宇都宮 與 公益財団法人慈愛会 今村病院分院

内丸 薫 東京大学医科学研究所附属病院 血液腫瘍内科

高 起良 JR大阪鉄道病院 血液内科

魚住公治 鹿児島大学大学院 難治ウイルス病態制御研究センター

緒方正男 大分大学医学部附属病院 輸血部

研究協力者：

上平 憲 長崎市立市民病院 検査部

梅木一美 宮崎大学医学部附属病院 検査部

山本成郎 宮崎大学医学部附属病院 検査部

橋倉悠輝 宮崎大学医学部附属病院 検査部

鴨居功樹 東京医科歯科大学 眼科学

寺田裕紀子 医療法人明和会 宮田眼科病院

成瀬 功 株式会社エスアールエル
浜口行雄 シスメックス株式会社
篠田達也 協和メデックス株式会社
梶山直毅 株式会社キアゲン
斎藤由美子 富士レビオ株式会社
澤野 薫 アボット ジャパン株式会社
水上拓郎 国立感染症研究所 血液・安全性研究部
倉光 球 国立感染症研究所 血液・安全性研究部
百瀬暖佳 国立感染症研究所 血液・安全性研究部

I. 総括研究報告

HTLV-1感染症の診断法の標準化と発症リスクの解明に関する研究

研究代表者 浜口 功 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 部長

研究要旨： HTLV-1核酸検査法は、様々な施設で開発され運用されているが、HTLV-1検査Western Blotting (WB)判定保留に対する追加測定検査としての有用性や、それぞれの施設の方法での検出感度等、未だ明らかになっていない点がある。本年度のHTLV-1感染症の診断法の標準化研究では、HTLV-1核酸検査（定量PCR法）の検出感度およびWB判定保留におけるPCRの追加検査の有用性について検討した。その結果、500ng以上ゲノムDNAを使用した場合には、PVL 0.004%まで全施設で検出可能であることを確認した。また日本赤十字社WB判定保留検体の検討の結果、DNAを1 μ g使用した場合に約半数でPCR陽性となることが明らかになり、WB判定保留に対して追加で定量PCRを行うことは有用であると考えられた。また、HTLV-1関連疾患の全国疫学コホートであるJSPFADを継続・維持し、17都道府県47施設より集積された累積症例数2,691人（HTLV-1キャリア2020人、ATL489人、HAM45人、HU107人）、累積検体数7,309検体のデータベースを構築した。さらに、検体より抽出されたバイオマテリアルバンクは、HTLV-1検査法標準化確立グループや他の研究グループの研究サポートとして有効に活用された。さらに、献血者のHTLV-1スクリーニング検査結果を一般集団における水平感染率の推定に応用し、HTLV-1キャリアの水平感染による増加の根絶の方策を探る目的で、本年度末より研究を開始した。

研究分担者

山口一成 国立感染症研究所 客員研究員
渡邊俊樹 東京大学大学院 教授
出雲周二 鹿児島大学大学院 教授
岡山昭彦 宮崎大学医学部 教授
佐竹正博 日本赤十字社中央血液研究所 副所長
長谷川寛雄 長崎大学病院 講師
望月 學 東京医科歯科大学 教授
相良康子 日本赤十字社九州ブロック
血液センター 課長
齋藤 滋 富山大学大学院 教授
山野嘉久 聖マリアンナ医科大学 准教授
巽 正志 国立感染症研究所 室長
大隈 和 国立感染症研究所 室長
岩永正子 帝京大学大学院 講師
宇都宮 與 今村病院分院 院長
内丸 薫 東京大学医科学研究所 准教授
高 起良 JR大阪鉄道病院 医長
魚住公治 鹿児島大学大学院 准教授
緒方正男 大分大学医学部 輸血部副部長

篠田達也 協和メデックス株式会社
梶山直毅 株式会社キアゲン
斎藤由美子 富士レビオ株式会社
澤野 薫 アボット ジャパン株式会社
水上拓郎 国立感染症研究所 室長
百瀬暖佳 国立感染症研究所 主任研究官
倉光 球 国立感染症研究所 研究員

A. 研究目的

HTLV-1検査は、平成23年末より妊婦健診に追加されたが、2次検査のWestern Blotting(WB)検査の結果なお判定保留となる場合が少なからず存在し、それらの保留検体の判定にHTLV-1核酸検査が予定されているが、核酸検査実施の有効性については科学的に明らかになっていなかった。そこで本年度は、①各施設のHTLV-1核酸検査法で検出できるウイルスコピー数の限界について確認し、②Western Blotting(WB)判定保留検体に対して核酸検査を行った場合の核酸検出効率の測定を試みた。また③核酸検査の保険適用への道筋として、先進医療制度の活用へ向けた取り組みを開始した。

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

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

研究協力者

上平 憲 長崎市立市民病院 検査部長
梅木一美 宮崎大学医学部附属病院 技師長
山本成郎 宮崎大学医学部附属病院 副技師長
橋倉悠輝 宮崎大学医学部附属病院 臨床検査技師
鴨居功樹 東京医科歯科大学 助教
寺田裕紀子 宮田眼科病院 医局員
成瀬 功 株式会社エスアールエル
浜口行雄 シスメックス株式会社

さらに水平感染に関する解析グループでは、献血者のHTLV-1スクリーニング検査結果を一般集団における水平感染率の推定に応用し、HTLV-1キャリアの水平感染による増加の根絶の方策を探る。

B. 研究方法

・核酸測定検体の作成

低濃度ウイルス核酸検体として、CFSE染色したTL-Om1をPBMC (AllCells)で希釈し、0.02~0.0005%までの濃度でTL-Om1を含む測定用検体を準備した。また日本赤十字社判定保留検体として、日本赤十字社の判定基準でIF法とWB法の結果が不一致となった献血液検体を153検体使用した。

・核酸定量検査

各施設の方法に従い、genomic DNA (gDNA)の核酸抽出を行い、HTLV-1核酸および内部標準遺伝子のコピー数をQ-PCRで測定し、プロウイルス量を測定した。結果はPBMCs100細胞中の陽性細胞数(Proviral Load (PVL) (%))とした。

・JSPFADデータベースの維持・継続および発症リスク解明

既に確立されたJSPFADの研究実施方法に基づいて、血液検体・臨床情報・疫学情報の収集を行った。得られたウイルス学的解析ならびに臨床・疫学情報を付きあわせ、HTLV-1キャリアからATLおよびHAMへの発症リスクを疫学的に解析する。

・HTLV-1水平感染の実態推定

2005年~2006年度献血陰性者でかつ2011年末まで2回以上の複数回献血がある者を対象とし(追跡母集団)、HTLV-1スクリーニング検査の縦断的データを抽出し、2011年度までのHTLV-1陽転化をアウトカムとした後ろ向きコホート研究である。陽転化していない者の追跡期間の人年計算は2005年~2006年度陰性献血確認日と最終献血日から計算し、陽転化した者の追跡期間の人年計算には、献血の特性上、interdonation intervalを適応する。

(倫理面への配慮)

HTLV-1陽性・判定保留臨床検体の測定について、国立感染症研究所の倫理審査会で承認されている。また、JSPFAD活動に関してすべての研究協力実施医療機関は当該施設の倫理委員会による研究実施承認を受けており、すべての研究協力対象者からはインフォームドコンセントが得られており、情報はすべて匿名化コード処理して収集される仕組みとなっており、十分な倫理面の配慮がなされている。水平感染に関する解析においては、すべての情報はすべて匿名化コード処理されており、十分な倫理面の配慮がなされている。

C. 研究結果

・HTLV-1感染症の診断法の標準化

検出感度測定: TL-Om1を低濃度にPBMCに希釈した一連の検体gDNAをそれぞれの施設の通常の測定量よりも大量に反応系に使用したところ、gDNAを500ng使用した場合は、TL-Om1濃度0.002% (PVL=0.004%, 4コピー/ 1×10^5 cells)まで全施設で陽性となった。また1 μ g使用した場合は、さらに高感度で測定できることが示唆される結果を得た (Fig. 1)。

日本赤十字社判定保留検体の測定: 使用するgDNA

量を1 μ gに統一し、定量PCRで測定したところ、WB判定保留検体97検体のうち41検体 (42%) でPCR陽性となった。2wellで測定中1wellのみ陽性となった検体は7検体 (7%) あった。使用するgDNA量を100ngに統一した場合は、97検体中28検体(29%)で陽性となった (Fig. 2)。

またHTLV-1核酸検査の保険適用へ向けて浜口班参加施設に加えて、熊本大学医学部において先進医療制度を利用した保険適用への道筋の検討に着手した。

・JSPFADデータベースの維持・継続および発症リスク解明

2012年(平成24年)12月31日現在、研究協力実施医療機関は、17都道府県にまたがる47施設であり前年度より3施設増加、登録者数は2,691例であり前年度より328人増加、累積検体数は7,309検体であり前年度より1,110件増加した。登録者の内訳は、HTLV-1キャリア 2,020人(75%)、ATL 489人(18%)、HAM 45人(2%)、HU(HTLV-1関連ブドウ膜炎) 107人(4%)であった。追跡期間中にキャリアからATLへ 24例、HAMへ3例が進展した。ATL進展者のうち23例は登録時プロウイルス量が4%以上であったが、HAM進展者の登録時プロウイルス量は4%以下であり、両疾患の発症に関わるプロウイルス量の意義に相違があることが示唆された。

・HTLV-1水平感染の実態推定

パイロット研究として、九州圏内献血データベースによる抽出作業を検討した。新規HTLV-1陽転者は、検体陽性をメルクマールとして抽出することによって、縦断データセットを比較的容易に作成可能であった(2011年末までに九州圏内で約130人)。一方、母集団設定にはさらなる工夫が必要で、現在検討中である。

D. 考察

・HTLV-1感染症の診断法の標準化

HTLV-1感染の検査法としてのHTLV-1核酸測定(定量PCR)の有用性についてこれまで不明な点が多かったが、本年度の班研究の結果、DNA量を500ng以上使用することで、それぞれの施設でPVL 0.004%まで検出可能であることが確認できた。検査法の感度としては十分であると考えられた。また、日本赤十字社WB判定保留検体の測定の結果、WB判定保留検体の約半数でPCR陽性となったことから、PCRの実施は効果的判定方法となることが期待でき、WB保留検体の対策として核酸検査の追加測定の意義は高いことが確認できた。

・JSPFADデータベースの維持・継続および発症リスク解明

本年度も、JSPFADの検体データベース、疫学データベース、バイオマテリアルの発展的活用を検討した。2009年(平成21年度)のJSPFAD論文では、HTLV-1キャリアとして登録され、追跡観察中にATLに進展した症例は14例、HAMに進展した症例はゼロであった。本年度は、ATL進展者24例、HAM進展者3例(HUからの進展者を含めると6例)を確認し、HTLV-1キャリアを長期追跡すると、確実にATL・HAMへの進展リスクが高くなることが確認された。10例の新規ATL進展者すべての登録時プロウイルス量は4%以上であり、2009年度のJSPFAD論文における「プロウイルス量は

4%以上」のキャリアはハイリスクキャリアであることをさらに確認できた。一方、HAM進展者では全員の登録時プロウイルス量は4%以下であり(2~3%)、両疾患の発症に関わるプロウイルス量の意義に相違があることが示唆される。

・HTLV-1水平感染の実態推定

献血者データベースは個人ベースではなく検体ベースのデータベースであるため、縦断研究に応用するには工夫が必要である。

E. 結論

今年度の核酸検査法標準化に関する検討の結果、1 μ g程度のgDNAを用いて定量PCRを行うことによつて、十分な検出感度を得ることができることを確認し、またWB判定保留検体に対しても定量PCRによる核酸検査を実施することでそれなりの割合で陽性検体を明確にできることを確認した。今後は、保険適用に向けた取り組みを推進することが期待された。疫学グループの解析ではJSPFADに登録されているキャリアからATLへ24例、HAMへ3例が進展した。ATL進展者のうち23例は登録時プロウイルス量が4%以上であったが、HAM進展者では全員の登録時プロウイルス量は4%以下であり、両疾患の発症に関わるプロウイルス量の意義に相違があることが示唆された。水平感染に関する解析においては、献血者のHTLV-1スクリーニング検査結果を縦断的に追跡する研究デザインの研究はこれまで報告されたことはなく、今回の検討で工夫すれば可能で、献血者のHTLV-1スクリーニング検査結果を一般集団における水平感染率の推定に応用可能であることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamagishi M, Watanabe T. Molecular hallmarks of adult T cell leukemia. *Front Microbiol.* 2012;3:334.
- 2) Iwanaga M, Watanabe T, Yamaguchi K. Adult T-cell leukemia: a review of epidemiological evidence. *Front Microbiol.* 2012;3:322.
- 3) Kannagi M, Hasegawa A, Takamori A, Kinpara S, Utsunomiya A. The roles of acquired and innate immunity in human T-cell leukemia virus type 1-mediated diseases. *Front Microbiol.* 2012;3:323
- 4) Kamihira S, Iwanaga M, Doi Y, Sasaki D, Mori S, Tsuruda K, Nagai K, Uno N, Hasegawa H, Yanagihara K, Morinaga Y, Tsukasaki K, Taniguchi H. Heterogeneity in clonal nature in the smoldering subtype of adult T-cell leukemia: continuity from carrier status to smoldering ATL. *Int J Hematol.* 2012;95:399-408.
- 5) Ishihara K, Sasaki D, Tsuruda K, Inokuchi N, Nagai K, Hasegawa H, Yanagihara K, Kamihira S. Impact of miR-155 and miR-126 as novel biomarkers on the assessment of disease progression and prognosis in adult T-cell leukemia. *Cancer Epidemiol.* 2012 Dec; 36(6):560-5.

6) Ichikawa T, Taura N, Miyaaki H, Matsuzaki T, Ohtani M, Eguchi S, Takatsuki M, Soyama A, Hidaka M, Okudaira S, Usui T, Mori S, Kamihira S, Kanematsu T, Nakao K. Human T-cell leukemia virus type 1 infection worsens prognosis of hepatitis C virus-related living donor liver transplantation. *Transpl Int.* 2012;25:433-8.

7) Satou Y, Utsunomiya A, Tanabe J, Nakagawa M, Nosaka K, Matsuoka M. HTLV-1 modulates the frequency and phenotype of FoxP3+CD4+ T cells in virus-infected individuals. *Retrovirology.* 2012;9:46.

8) Otani M, Honda N, Xia PC, Eguchi K, Ichikawa T, Watanabe T, Yamaguchi K, Nakao K, Yamamoto T. Distribution of Two Subgroups of Human T-Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1) in Endemic Japan. *Trop Med Health.* 2012;40:55-8.

9) 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;130:2318-26.

10) Kobayashi S, Tian Y, Ohno N, Yuji K, Ishigaki T, Isobe M, Ohfuchi-Tsuda M, Oyaizu N, Watanabe E, Watanabe N, Tani K, Tojo A, Uchimarui K. The CD3 versus CD7 plot in multicolor flow cytometry reflects progression of disease stage in patients infected with HTLV-I. *PLoS One.* 2013;8(1):e53728.

11) Matsumoto C, Igarashi M, Furuta RA, Uchida S, Satake M, Tadokoro K. Xenotropic murine leukemia virus-related virus proviral DNA not detected in blood samples donated in Japan. *Jpn J Infect Dis.* 2012;65:334-6.

12) 岩永正子. ATLの疫学研究の現状と課題. 特集「ATLの基礎と臨床」, 細胞 (ニューサイエンス社), 44 (8):332-5, 2012.

13) 山口一成. 造血器腫瘍の疫学: 成人T細胞白血病・リンパ腫/HTLV-1感染の疫学. HTLV-1感染症の根絶に向けて. 【造血器腫瘍学-基礎と臨床の最新研究動向-】日本臨床 (日本臨床社) 70(増刊2):32-36, 2012.

14) 岡山昭彦. HTLV-1感染. 【ストップ ザ 性感染症】性感染症 診断・治療, 臨牀と研究 (大道学館), 89(7):907-910, 2012.

2. 学会発表

- 1) 倉光球, 大隈和, 矢持忠徳, 山岸誠, 水上拓郎, 百瀬暖佳, 滝沢和也, 菅村和夫, 山口一成, 渡邊俊樹, 浜口功: HTLV-1 核酸検査標準品としての HTLV-1 感染細胞株 TL-Om1 の性状解析 P-18, 第5回 HTLV-1 研究会 2012.8
- 2) 大隈和, 館山誠司, 森下和弘, 広瀬国孝, 山本直樹, 山口一成, 浜口功: 腫瘍溶解性ウイルス VSV を用

いた ATL に対する新規治療法の開発 O-25 第 5 回
HTLV-1 研究会 2012.8

3) 水上拓郎、滝澤和也、山崎淳平、倉光球、百瀬暖佳、長谷川秀樹、山口一成、浜口功：動物モデルを用いた ATL 癌幹細胞及びニッチの同定 O-27 第 5 回
HTLV-1 研究会 2012.8

4) 井上由紀子、後藤信代、相良康子、清川博之。抗 HTLV-1 抗体陽転化献血者の抗体エピトープの解析。第 60 回 日本輸血・細胞治療学会 総会, [抄録] 日本輸血細胞治療学会誌 58 巻 2 号 263, 2012.

5) 後藤信代、井上由紀子、相良康子、清川博之。抗 HTLV-1 抗体に関する各種抗体検査の反応性について。第 60 回 日本輸血・細胞治療学会 総会, [抄録] 日本輸血細胞治療学会誌 58 巻 2 号 262, 2012.

6) 蕎麦田理英子、松本千恵子、篠原直也、金子萌、内田茂治、平力造、佐竹正博、田所憲治。ウエスタンブロット法で判定保留となった献血者の HTLV-1 プロウイルス遺伝子の解析。第 60 回 日本輸血・細胞治療学会 総会, [抄録] 日本輸血細胞治療学会誌 58 巻 2 号 348, 2012.

7) 相良康子、井上由紀子、後藤信代、長野冬子、入田和男、清川博之、矢持忠徳、渡邊俊樹、JSPFAD。HTLV-1 感染者における産生抗体の性状解析 - プロウイルス量との関連について - 第 5 回 HTLV-1 研究会・第 1 回 ATL シンポジウム, 2012 年 8 月 25 日～26 日, 東大医科研.

8) Masako Iwanaga, Toshiki Watanabe, Kazunari Yamaguchi. HTLV-1 and ATL: the epidemiological evidence. International Symposium "Progress in HTLV-1/ATL research", 第 5 回 HTLV 研究会・第 1 回 ATL シンポジウム, 2012 年 8 月 25 日～26 日, 東大医科研.

9) 相良康子、井上由紀子、後藤信代、相良康弘、脇本麗、原孝之、原田信広、長野冬子、清川博之。HTLV-1 の水平感染と 17β -Estradiol (E_2) の関与について。第 60 回 日本ウイルス学会学術集会, [抄録] 第 60 回 日本ウイルス学会学術会議抄録集, p355, 2012.

H. 知的財産権の出願・登録状況

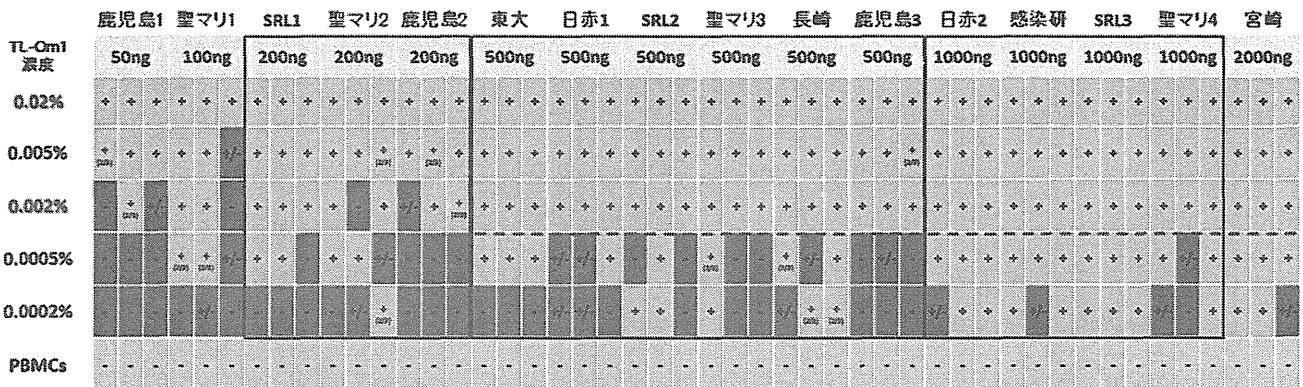
1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。

Figure 1 各施設の検出感度の測定

TL-Om1(CFSE染色)をPBMCsで希釈し、低濃度の検体をそれぞれ作製した。
各施設の方法に従い、DNAを抽出し、PVLを測定した。
結果はDNA量の少→大の順に示す。

全Well陽性
1 Well陽性
陰性

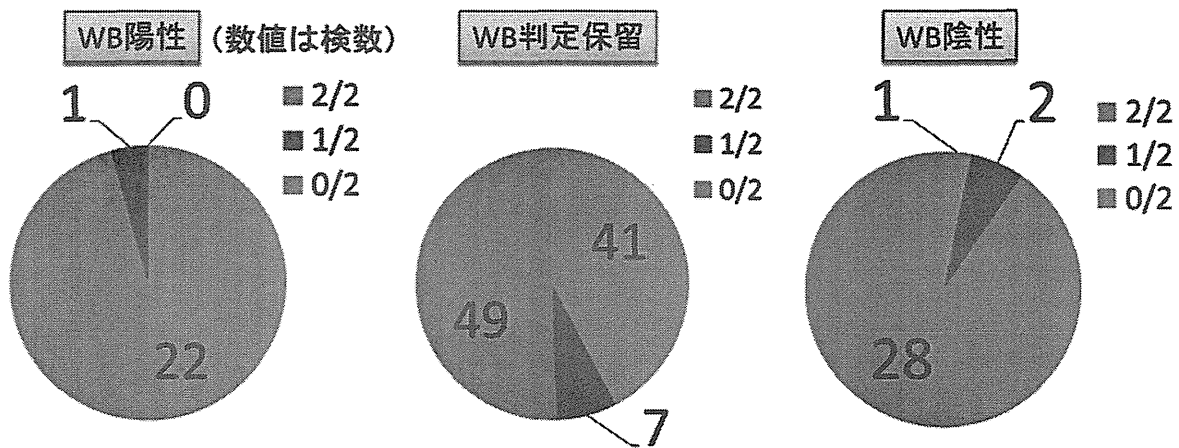
DNA量



宮崎大学はNested-PCRも検討し、PBMCs以外は陽性となった。

Figure2 日本赤十字社HTLV-1 Western Blotting判定保留検体等の定量PCR測定結果

日本赤十字社の基準でIF法とWB法の結果不一致検体について定量PCRを行った。数値は件数を示す。



	WB陽性	WB判定保留	WB陰性
2/2 well 陽性	22 (95.7%)	41 (42.3%)	1 (3.2%)
1/2 well 陽性	1 (4.3%)	7 (7.2%)	2 (6.5%)
0/2 (陰性)	0 (0%)	49 (50.5%)	28 (90.3%)

II. 分担研究報告

疫学手法によるHTLV-1関連疾患発症リスク解明：全国 HTLV-1キャリアコホート(JSPFAD)

研究分担者：岩永正子（帝京大公衆衛生大学院・講師）・渡邊俊樹（東大院・教授）
岡山昭彦（宮崎大医・教授）・宇都宮與（今村病院分院・院長）
内丸薫（東大医科研・准教授）・高起良（JR大阪鉄道病院・医長）
魚住公治（鹿児島大院・准教授）・緒方正男（大分大医・准教授）
相良康子（日本赤十字社九州ブロック血液センター・課長）
山口一成（国立感染研・客員研究員）
研究協力者：上平憲（長崎市民病院・検査部長）

研究要旨：前年度より引き続き、HTLV-1関連疾患の全国疫学コホートである JSPFAD を継続・維持し、17 都道府県 47 施設より集積された累積症例数 2,691 人(HTLV-1 キャリア 2020 人、ATL489 人、HAM45 人、HU107 人)、累積検体数 7,309 検体のデータベースを構築した。さらに、検体より抽出されたバイオマテリアルバンクは、HTLV-1 検査法標準化確立グループや他の研究グループの研究サポートとして有効に活用された。追跡期間中にキャリアから ATL へ 24 例、HAM へ 3 例が進展した。ATL 進展者のうち 23 例は登録時プロウイルス量が 4%以上であったが、HAM 進展者の登録時プロウイルス量は 4%以下であり、両疾患の発症に関わるプロウイルス量の意義に相違があることが示唆された。

A. 研究目的

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

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

ただし、2)のウイルス感染経路の見直しと疾患発症との関連の研究は、前年度の検討により、現状のJSPFADのシステムでは実態を疫学的に解析することは困難であるという結論に達し、日赤の献血データを用いて別の分担研究を行った（「HTLV-1水平感染の実態推定に関する研究」を参照）。

B. 研究方法

1) JSPFADデータベースの維持・継続：

既に確立されたJSPFADの研究実施方法に基づいて、血液検体・臨床情報・疫学情報の収集を行った。具体的には、研究協力実施医療機関の担当者は、同意が得られた研究対象者からの検体と情報を東大医科研(責任者：渡邊)に送付する。検体は東大医科研の検体データベースに登録後、生物学的処理を行いバイオマテリアル(細胞、DNA、血漿)とする。その一部を用いて東大医科研でウイルス学的解析(プロウイルス量の測定とモノクロナリティー検査)と遺伝子情報解析を行い、残余バイオマテリアルは福岡県赤十字血液センター(担当：相良)へ送付して長期

保存する。臨床・疫学情報は帝京大学大学院(担当：岩永)へ送付して疫学データベース内で管理維持する。(倫理面への配慮)すべての研究協力実施医療機関は当該施設の倫理委員会による研究実施承認を受けており、すべての研究協力対象者からはインフォームドコンセントが得られており、情報はすべて匿名化コード処理して収集される仕組みとなっており、十分な倫理面の配慮がなされている。

2) HTLV-1キャリアからATL進展ならびにHAM進展に関わる発症リスク解明：

ウイルス学的解析ならびに臨床・疫学情報を付きあわせ、HTLV-1キャリアからATLおよびHAMへの発症リスクを疫学的に解析する。

3) バイオマテリアルバンクの活用：

国内外研究者しよりバイオマテリアルバンク利用申請があった場合、すべての分担担当者はJSPFAD運営委員会において、申請内容の検討を行っている。他の申請については、JSPFADメンバーの研究内容との競合および下記の条件を考慮し、申請内容の修正を依頼している。さらに、今後のバイオマテリアルバンク利用申請者が増加するに伴い、希少性にある検体の保護が必要であることから、検体の希少性を順位づけるために検体を、(1)高度希少検体、(2)中等度希少検体、(3)一般検体、(4)希少性の少ない検体、に区分するシステムを考案して、供給を管理している。

C. 研究結果

1) JSPFADデータベース登録状況：

2012年(平成24年)12月31日現在、研究協力実施医療機関は、17都道府県にまたがる47施設(図1)であり前年度より3施設増加、登録者数は2,691例であり前年度より328人増加、累積検体数は7,309検体であり前年度より1,110件増加した(図2)。登録者の内訳は、HTLV-1キャリア 2,020人(75%)、ATL 489人(18%)、HAM 45人(2%)、HU(HTLV-1関連ブドウ膜炎) 107人

(4%)であった(図3)。

2)HTLV-1キャリアからのATL進展リスク:

2012年(平成24年)12月31日までの追跡期間中、HTLV-1キャリアとして登録され、ATLに進展した症例は24例であった。HTLV-1キャリア集団からのATL進展率は、6.15 per 1000 PYであった。24例中登録時プロウイルス量(PVL)が4%以下の症例は1名であり、のこり23例はすべてPVL4%以上であった。HTLV-1キャリアからATLの進展様式を分類すると、17例(70%)がくすぶり型・慢性型に進展し、のこり7例(30%)が急性型・リンパ腫型に進展していた。前年度に考案したいくつかの発症リスクスコア案の評価については現在検討中である。

3)HTLV-1キャリアからのHAM進展リスク:

2012年(平成24年)12月31日現在、HTLV-1キャリアとして登録され、追跡観察中にHAMに進展したとみなされた症例は3例であった。3例とも登録時PVLは4%以下であった。HTLV-1キャリア集団からのHAM進展率は、0.77 per 1000 PYであった。また、HUとして登録され、追跡観察中にHAMに進展(合併)した症例も3例で、いずれも登録時PVLは4%以下であった。HU患者集団からのHAM進展率は、8.90 per 1000 PYであった。

4)バイオマテリアルバンクの活用状況:

2012年(平成24年)12月31日現在までに8件の研究に対しマテリアルの供給を行った。うち3件の研究において、本年度内に学会会議や論文による成果が発表され、HTLV-1キャリアの発症リスクの解明に貢献することができた。

D. 考察

本年度も、JSPFADの検体データベース、疫学データベース、バイオマテリアルの発展的活用を検討した。2009年(平成21年度)のJSPFAD論文では、HTLV-1キャリアとして登録され、追跡観察中にATLに進展した症例は14例、HAMに進展した症例はゼロであった。本年度は、ATL進展者24例、HAM進展者3例(HUからの進展者を含めると6例)を確認し、HTLV-1キャリアを長期追跡すると、確実にATL・HAMへの進展リスクが高くなることが確認された。10例の新規ATL進展者すべての登録時プロウイルス量は4%以上であり、2009年度のJSPFAD論文における「プロウイルス量は4%以上」のキャリアはハイリスクキャリアであることをさらに確認できた。一方、HAM進展者では全員の登録時プロウイルス量は4%以下であり(2~3%)、両疾患の発症に関わるプロウイルス量の意義に相違があることが示唆される。

E. 結論

追跡期間中にキャリアからATLへ24例、HAMへ3例が進展した。ATL進展者のうち23例は登録時プロウイルス量が4%以上であったが、HAM進展者では全員の登録時プロウイルス量は4%以下であり、両疾患の発症に関わるプロウイルス量の意義に相違があることが示唆された。

F. 健康危険情報なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1)Yamagishi M, Watanabe T. Molecular hallmarks of adult T cell leukemia. *Front Microbiol.* 2012;3:334.

2)Iwanaga M, Watanabe T, Yamaguchi K. Adult T-cell leukemia: a review of epidemiological evidence. *Front Microbiol.* 2012;3:322.

3)Kannagi M, Hasegawa A, Takamori A, Kinpara S, Utsunomiya A. The roles of acquired and innate immunity in human T-cell leukemia virus type 1-mediated diseases. *Front Microbiol.* 2012;3:323

4)Kamihira S, Iwanaga M, Doi Y, Sasaki D, Mori S, Tsuruda K, Nagai K, Uno N, Hasegawa H, Yanagihara K, Morinaga Y, Tsukasaki K, Taniguchi H. Heterogeneity in clonal nature in the smoldering subtype of adult T-cell leukemia: continuity from carrier status to smoldering ATL. *Int J Hematol.* 2012;95:399-408.

5)Ishihara K, Sasaki D, Tsuruda K, Inokuchi N, Nagai K, Hasegawa H, Yanagihara K, Kamihira S. Impact of miR-155 and miR-126 as novel biomarkers on the assessment of disease progression and prognosis in adult T-cell leukemia. *Cancer Epidemiol.* 2012 Dec; 36(6):560-5.

6)Ichikawa T, Taura N, Miyaaki H, Matsuzaki T, Ohnishi M, Eguchi S, Takatsuki M, Soyama A, Hidaka M, Okudaira S, Usui T, Mori S, Kamihira S, Kanematsu T, Nakao K. Human T-cell leukemia virus type 1 infection worsens prognosis of hepatitis C virus-related living donor liver transplantation. *Transpl Int.* 2012;25:433-8.

7)Satou Y, Utsunomiya A, Tanabe J, Nakagawa M, Nosaka K, Matsuoka M. HTLV-1 modulates the frequency and phenotype of FoxP3+CD4+ T cells in virus-infected individuals. *Retrovirology.* 2012;9:46.

8)Otani M, Honda N, Xia PC, Eguchi K, Ichikawa T, Watanabe T, Yamaguchi K, Nakao K, Yamamoto T. Distribution of Two Subgroups of Human T-Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1) in Endemic Japan. *Trop Med Health.* 2012;40:55-8.

9)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;130:2318-26.

10)Kobayashi S, Tian Y, Ohno N, Yuji K, Ishigaki T, Isobe M, Ohfuchi-Tsuda M, Oyaizu N, Watanabe E, Watanabe N, Tani K, Tojo A, Uchimaruru K. The CD3 versus CD7 plot in multicolor flow cytometry reflects progression of disease stage in patients infected with HTLV-I. *PLoS ONE* (in press).

- 11) 岩永正子. ATLの疫学研究の現状と課題。特集「ATLの基礎と臨床」, 細胞 (ニューサイエンス社), 44(8):8-11, 2012.
- 12) 山口一成. 造血器腫瘍の疫学: 成人T細胞白血病・リンパ腫/HTLV-1感染の疫学. HTLV-1感染症の根絶に向けて. 【造血器腫瘍学-基礎と臨床の最新研究動向-】日本臨床 (日本臨床社) 70(増刊2):32-36, 2012.
- 13) 岡山昭彦. HTLV-1感染. 【ストップ ザ 性感染症】性感染症 診断・治療, 臨床と研究 (大道学館), 89(7):907-910, 2012.
2. 学会発表
- 1) Shigeki Takemoto, Ratiorn Pornkuna, Yoshiko Inoue, Tatsunori Sakai, Naoko Harada, Shoichi Nagakura, Michihiro Hidaka, Tetsuyuki Kiyokawa, Koji Uzawa, Kazuki Morita, Yoshio Haga, Masako Iwanaga, Yasuko Sagara, Toshiki Watanabe, Fumio Kawano. Intervention in Adult T-Cell Leukemia Following Soluble CD30 Elevation. 第74回日本血液学会学術集会, 2012年10月19日(金)~21日(日), 国立京都国際会館, [抄録] 臨床血液, 53(9):1070, 2012.
- 2) Masako Iwanaga, Toshiki Watanabe, Kazunari Yamaguchi. HTLV-1 and ATL: the epidemiological evidence. International Symposium "Progress in HTLV-1/ATL research", 第5回HTLV研究会・第1回ATLシンポジウム. 2012年8月25日~26日, 東大医科研.
- 3) 武本重毅, Ratiorn Pornkuna, 西村直, 井上佳子, 榮達智, 原田奈穂子, 長倉祥一, 塚本敦子, 日高道弘, 清川哲志, 鶴澤耕治, 守田和樹, 芳賀克夫, 岩永正子, 相良康子, 渡邊俊樹, 河野文夫. HTLV-1キャリアから成人T細胞白血病(ATL)発症・急性転化・治療前後におよぶ全経過における可溶性タンパク(sCD30とsIL-2R)の変化とその役割. 第5回HTLV研究会・第1回ATLシンポジウム. 2012年8月25日~26日, 東大医科研.
- 4) 小林誠一郎, 中野和民, 渡辺恵理, 石垣知寛, 大野伸広, 渡辺信和, 東條有伸, 内丸薫: 患者検体を用いたCD7とTSLC1/CADM1のFACS解析はATLの多段階発癌を反映する. 第1回ATLシンポジウム 2012年8月25日~26日, 東大医科研.
- 5) 井上由紀子, 後藤信代, 長野冬子, 相良康子, 入田和男, 清川博之, 矢持忠徳, 渡邊俊樹, JSPFAD. HTLV-1キャリアにおける産生抗体の性状解析 プロウイルスロードとの関連について. 第36回日本血液事業学会総会, 2012年10月17日~10月19日, 仙台国際センター, [抄録] 血液事業, 35(2):435, 2012.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得 なし
 2. 実用新案登録 なし
 3. その他 なし

図1 協力参加施設 (2012年12月31日現在)

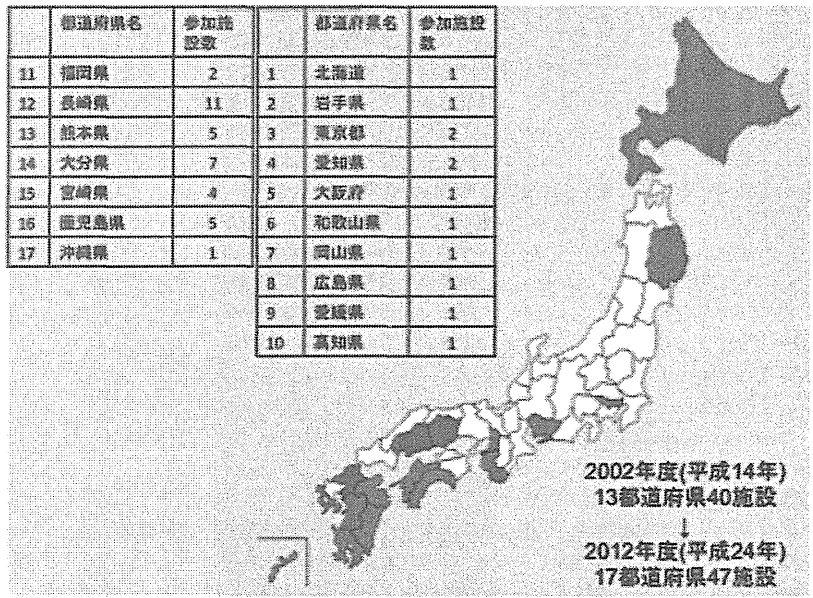


図2 登録症例数と検体数(2012年12月31日現在)

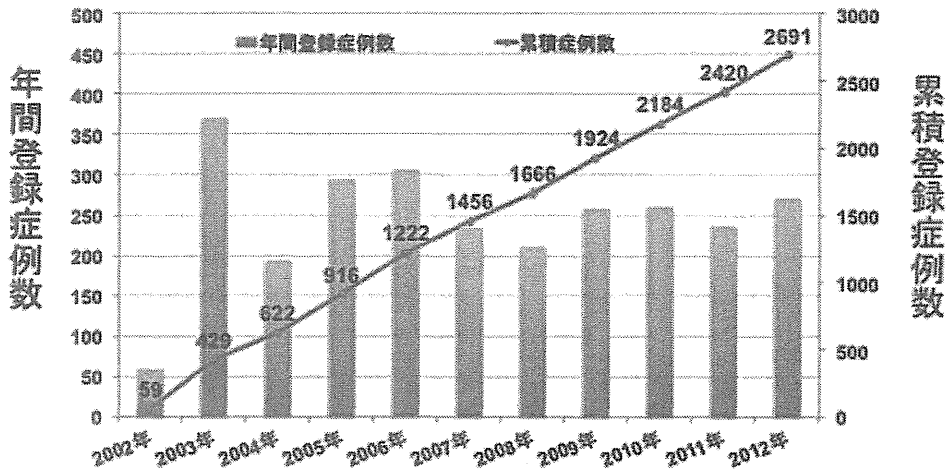
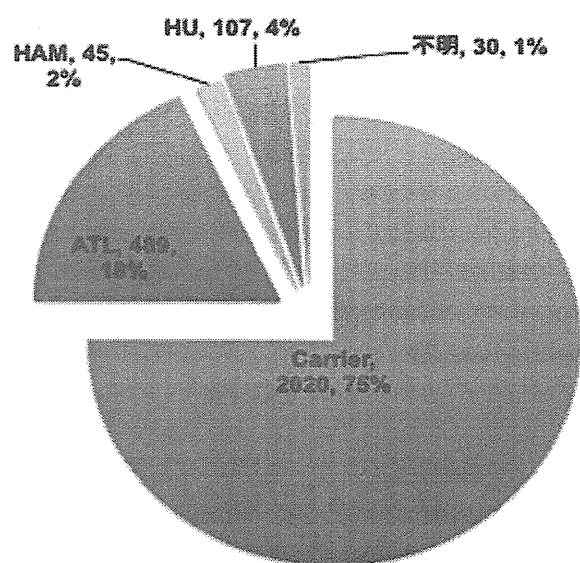


図3 登録例の内訳



HTLV-1水平感染の実態推定に関する研究

研究分担者：佐竹正博（日本赤十字社中央血液研究所・副所長）
相良康子（日本赤十字社九州ブロック血液センター・課長）
岩永正子（帝京大公衆衛生大学院・講師）

研究要旨：献血者のHTLV-1スクリーニング検査結果を一般集団における水平感染率の推定に応用し、HTLV-1キャリアの水平感染による増加の根絶の方策を探る目的で、本年度末より研究を開始した。準備段階として、献血者データベースの後ろ向きコホート研究デザインへの応用可能性について検討した。新規HTLV-1陽転者は、検体陽性をメルクマールとして抽出することによって、縦断データセットを比較的容易に作成可能であったが、母集団設定にはさらなる工夫が必要であった。

A. 研究目的

HTLV-1は主として3つの感染ルート（母子感染、輸血感染、男女間感染）によってヒト-ヒト感染する。母子感染ルートの主体である母乳を介した感染は、有効な予防的対策が確立し、endemic areaにおいては、HTLV-1の新規感染者は激減している。輸血感染については、1986年以降すべての献血に対しHTLV-1スクリーニングが実施されているため、現在では実質的に輸血による新規感染者はいない。一方、水平感染ルートの1つである男女間感染については、1980～90年代の小規模の疫学研究によって「夫から妻への感染が大半を占めるであろう」ということが推定されているのみで、集団レベルにおける実態がまだまだ十分に把握されておらず、新規感染者の予防対策もとられていない。

本研究では、献血者のHTLV-1スクリーニング検査結果を一般集団における水平感染率の推定に応用し、HTLV-1キャリアの水平感染による増加の根絶の方策を探る。

B. 研究方法

研究デザインは、2005年～2006年度献血陰性者でかつ2011年末まで2回以上の複数回献血がある者を対象とし（追跡母集団）、HTLV-1スクリーニング検査の縦断的データを抽出し、2011年度までのHTLV-1陽転化をアウトカムとした後ろ向きコホート研究である。陽転化していない者の追跡期間の人年計算は2005年～2006年度陰性献血確認日と最終献血日から計算し、陽転化した者の追跡期間の人年計算には、献血の特性上、inter-donation intervalを適応する。ただし、これまで献血者のウイルススクリーニング検査結果をコホートして縦断的に追跡する手法は行なったことがなかったため、本年度は、献血者データベースの研究デザインへの応用可能性について検討した。（倫理面への配慮）すべての情報はすべて匿名化コ

ード処理されており、十分な倫理面の配慮がなされている。

C. 研究結果

まずパイロット研究として、九州圏内献血データベースによる抽出作業を検討した。新規HTLV-1陽転者は、検体陽性をメルクマールとして抽出することによって、縦断データセットを比較的容易に作成可能であった（2011年末までに九州圏内で約130人）。一方、母集団設定にはさらなる工夫が必要で、現在検討中である。

D. 考察

献血者データベースは個人ベースではなく検体ベースのデータベースであるため、縦断研究に応用するには工夫が必要である。

E. 結論

献血者のHTLV-1スクリーニング検査結果を縦断的に追跡する研究デザインの研究はこれまで報告されていない。今回の検討で工夫すれば可能で、献血者のHTLV-1スクリーニング検査結果を一般集団における水平感染率の推定に応用可能であることが示唆された。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Matsumoto C, Igarashi M, Furuta RA, Uchida S, Satake M, Tadokoro K. Xenotropic murine leukemia virus-related virus proviral DNA not detected in blood samples donated in Japan. *Jpn J Infect Dis.* 2012, 65:334-6.

2) Iwanaga M, Watanabe T, Yamaguchi K. Adult T-cell leukemia: a review of epidemiological evidence. *Front Microbiol.* 2012;3:322.

3) 岩永正子. ATLの疫学研究の現状と課題。特集「ATLの基礎と臨床」, *細胞* (ニューサイエンス社), 44(8):8-11, 2012.

2. 学会発表

1) 井上由紀子, 後藤和代, 相良康子, 清川博之. 抗HTLV-1抗体陽転化献血者が保有する抗体について. 日本輸血・細胞治療学会九州支部会第58回総会・第79回例会, [抄録]日本輸血細胞治療学会誌58巻4号632, 2012

2) 後藤信代, 井上由紀子, 相良康子, 清川博之. Line Immunoassay法による抗HTLV-1抗体の反応性について. 日本輸血・細胞治療学会九州支部会第58回総会・第79回例会, [抄録]日本輸血細胞治療学会誌58巻4号631-632, 2012.

3) 井上由紀子, 後藤信代, 相良康子, 清川博之. 抗HTLV-1抗体陽転化献血者の抗体エピトープの解析. 第60回 日本輸血・細胞治療学会 総会, [抄録]日本輸血細胞治療学会誌58巻2号263, 2012.

4) 後藤信代, 井上由紀子, 相良康子, 清川博之. 抗HTLV-1抗体に関する各種抗体検査の反応性について. 第60回 日本輸血・細胞治療学会 総会, [抄録]日本輸血細胞治療学会誌58巻2号262, 2012.

5) 蕎麦田理英子, 松本千恵子, 篠原直也, 金子萌, 内

田茂治, 平力造, 佐竹正博, 田所憲治. ウェスタンブロット法で判定保留となった献血者のHTLV-1プロウイルス遺伝子の解析. 第60回 日本輸血・細胞治療学会 総会, [抄録]日本輸血細胞治療学会誌58巻2号348, 2012.

6) 相良康子, 井上由紀子, 後藤信代, 長野冬子, 入田和男, 清川博之, 矢持忠徳, 渡邊俊樹, JSPFAD. HTLV-1感染者における産生抗体の性状解析 -プロウイルス量との関連について- 第5回HTLV-1研究会・第1回ATLシンポジウム, 2012年8月25日~26日, 東大医科研.

7) Masako Iwanaga, Toshiki Watanabe, Kazunari Yamaguchi. HTLV-1 and ATL: the epidemiological evidence. International Symposium "Progress in HTLV-1/ATL research", 第5回HTLV研究会・第1回ATLシンポジウム, 2012年8月25日~26日, 東大医科研.

8) 相良康子, 井上由紀子, 後藤信代, 相良康弘, 脇本麗, 原孝之, 原田信広, 長野冬子, 清川博之. HTLV-1の水平感染と17 β -Estradiol (E₂)の関与について. 第60回 日本ウイルス学会学術集会, [抄録] 第60回日本ウイルス学会学術会議抄録集, p355, 2012.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし