

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)
(分担)研究報告書

題名 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

研究分担者 齋藤 滋 富山大学大学院医学薬学研究部産科婦人科 教授

研究要旨:

富山県における妊婦 HTLV-I スクリーニングの実態につき、富山県産婦人科医会、富山県の協力を得て、2011年1月～2012年3月の実態を調査した(全分娩施設より回収)。HTLV-I 抗体検査を9,929名に行ない、HTLV-I 抗体陽性者が20名確認された。19人にWestern blot(WB)法が施行され、WB 陰性が8名、判定保留が6名、陽性5名であった。WB 未施行の1名はすでに前回妊娠時に陽性と確認されていたので、今回は省略されていた。従って陽性者は6名となる。判定保留6名中、3名にPCR法が施行され、全例が陰性であった。富山県の1年間の分娩数より、全国の判定保留者を推定すると659人となり、今後の栄養法を決定するためにも早急にPCR法を行なう必要があることが判った。

A. 研究目的

妊婦に対して、HTLV-I抗体検査が全国で行なわれるようになったが、二次検査のWestern Blot法を行なって陰性となる偽陽性例や、判定保留となるケースもある。またnon-endemic areaでは一次検査では陽性だが、Western Blot法で陰性となる判定保留者が多いことは経験的に知られているが、その実態は明らかでない。今回、富山県における妊婦抗体スクリーニングの実態を富山県産婦人科医会、富山県の協力のもと調査した。

B. 研究方法

富山県産婦人科医会、富山県厚生部の協力のもと、富山県内のすべての産婦人科医療施設にアンケートを送付し、2011年1月～2012年3月までの期間で、一次抗体検査で陽性であった実数、WB法の結果、PCR法の結果を報告していただいた。

C. 研究結果

富山県の全分娩施設よりデータを回収できた。富山県の年間分娩数は、約8,700人であるが、1年3ヶ月の調査でHTLV-I抗体陽性者は20名であり、前回の妊娠時にすでにWBを施行し、キャリアであることが判明していた1例を除く全員にWB法が施行されていた。WB法陰性が8名、陽性が5名、判定保留が6名であった。前回、妊娠時にHTLV-Iキャリアであることが確定している1名を加えると、キャリア率は0.06%(6/9,929)であった。判定保留6名中、PCR法が3名に対して行なわれ、全例陰性であった。そのため、3名に対しては母乳哺育が行なわれた。PCR法

未施行の3名には、十分なフォローアップが行なわれておらず、母子ともに全く小児科を受診していなかった。

D. 考察

現在、初回献血時のHTLV-I抗体陽性率から、日本におけるHTLV-Iキャリア率が推定されているが、今回は、全妊婦に対してHTLV-I抗体検査が行なわれているので、極めて正確な値であり、富山県の出産年齢女性のキャリア率は0.06%であることが判明した。2011年に産婦人科診療ガイドラインが改定され、HTLV-I抗体検査で陽性となった際は、確認検査(WB法)を行ない、確認検査陽性の場合にHTLV-Iキャリアと診断し、妊婦に結果を伝えるとしているが、会員には十分にこのガイドラインが周知されていた。一次検査陽性者に対しては、19例にWB法が行なわれており、真の陽性率は5/19(26.3%)と低率であった。厚生労働科学研究齋藤班の報告でも東京都では真の陽性率が9/36(25%)と低く、鹿児島県(88.3%)、長崎県(85.4%)と大きく異なっていた。すなわち、HTLV-I非浸淫地域では、偽陽性が多いことが、改めて確認された。また、一次抗体陽性者の31.6%が判定保留という結果であった。判定保留であった6例中、3例にPCR法が施行されており、全例陰性であったため、長期母乳哺育が選択されていた。一方、PCR未施行であった3例では、その後のフォローアップが全例に行なわれておらず、十分な説明が行なわれていなかった可能性と、判定があいまいなため、心配ないと自己判断した可能性が考えられる。いずれにしても、判定保留者に対するPCR法検査等の十分な情報提供が必要であることが認識された。厚生労働科学研究齋

藤班の報告では、東京都での判定保留率は7/36 (19.4%)であり、全国の分娩数と富山県の分娩数から判定保留者数を推定すると、659人が判定保留となる。現在、厚生労働科学研究浜口班と板橋班で、判定保留者に対するPCR法を行なう計画をたて、すでに全国の大学病院、周産母子センターに研究協力を依頼し症例を集積している。

E. 結論

出産年齢にある女性のHTLV-Iキャリア率が non-endemic areaで初めて明らかとなった。現在、20～40歳の女性のHTLV-Iキャリア率は、0.2～0.3%程度と推察されているが、非浸淫地域である富山県では、わずか0.06%であった。HTLV-I非浸淫地域では、一次検査陽性であっても偽陽性が多い。またWB法を行なっても、19.4%～31.6%に判定保留となる問題点が抽出された。PCR法による感染の有無につき、全国データを集計する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 齋藤 滋: シンポジウム 2「HTLV-I 母子感染」HTLV-I 検査が全国で行なわれるようになった経緯。日本周産期・新生児医学会雑誌. 48, in press.
- 2) 齋藤 滋, 板橋家頭夫: シンポジウム 2「HTLV-I 母子感染」座長のまとめ。日本周産期・新生児医学会雑誌. 48, in press.
- 3) 齋藤 滋: 成人 T 細胞白血病。産科婦人科疾患最新の治療 2013-2015. in press.
- 4) 鮫島 梓, 齋藤 滋: 母児感染症の診断と管理. in press.
- 5) 齋藤 滋. HTLV-I 母子感染対策のために助産師が知っておきたい知識。ペリネイタルケア. 31: 65-71, 2012.

2. 学会発表

- 1) 齋藤 滋: HTLV-I 母子感染予防対策について。妊娠中からの支援に関する地域医療関係者研修会, 2013, 1, 9, 石川県庁行政庁舎.
- 2) 齋藤 滋: HTLV-I 母子感染に関する保健指導、カウンセリングについて。横須賀市 HTLV-I 母子感染予防対策研修会, 2012, 11, 22, 横須賀.
- 3) 齋藤 滋: HTLV-I 抗体スクリーニング検査、確認検査の意義。HTLV-I 母子感染予防対策講習会

(板橋班主催), 2012, 11, 4, 東京.

- 4) 齋藤 滋: HTLV-I 撲滅に向けての軌跡。第 39 回日本産婦人科医学会学術集会, 2012, 10, 6, 大阪.
- 5) 齋藤 滋: HTLV-I 母子感染予防のための基本的事項と具体的な対応策。愛知県 HTLV-I 母子感染予防対策研修会, 2012, 8, 30, 名古屋.
- 6) 齋藤 滋: HTLV-I 母子感染予防対策について。山形県 HTLV-I 母子感染予防対策研修会, 2012, 7, 17, 山形.
- 7) 齋藤 滋: シンポジウム 2 「HTLV-I 母子感染」HTLV-I 抗体検査が全国で行なわれるようになった経緯。第 48 回日本周産期・新生児医学会, 2012, 7, 8, 大宮.
- 8) 齋藤 滋: HTLV-I 母子感染防止対策。HTLV-I 抗体検査の実際とキャリアへの対応。青森県 HTLV-I 母子感染予防対策研修会, 2012, 5, 19, 青森.
- 9) 齋藤 滋: HTLV-I に関する最新情報と保健指導のあり方。藤沢市母子保健業務研究会, 2012, 2, 28, 藤沢.
- 10) 齋藤 滋: HTLV-I スクリーニングについての実際と注意点—産科的立場から—。厚生労働科学研究「HTLV-I 母子感染予防に関する研究: HTLV-I 抗体陽性妊婦からの出生児のコホート研究」HTLV-I 母子感染予防対策講習会, 2012, 2, 12, 大阪.
- 11) 齋藤 滋: HTLV-I スクリーニングについての実際と注意点—産科的立場から—。厚生労働科学研究「HTLV-I 母子感染予防に関する研究: HTLV-I 抗体陽性妊婦からの出生児のコホート研究」HTLV-I 母子感染予防対策講習会, 2012, 2, 5, 東京.
- 12) 齋藤 滋: HTLV-I に関する最新情報と保健指導のあり方。HTLV-I 母子感染対策研修(神奈川県公開講座), 2012, 2, 2, 横浜.
- 13) 齋藤 滋: 妊婦健診における HTLV-I 抗体検査の実際と注意点—ノンエンデミック地域での連携体制の確立を目指して—。第 1 回 HTLV-I 医療講演会, 聖マリアンナ大学, 2012, 1, 17, 川崎.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

題名 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）

研究分担者 岡山昭彦 宮崎大学医学部 内科学 教授
研究協力者 梅木一美、橋倉悠輝、山本成郎

研究要旨： HTLV-1 感染細胞数（プロウイルス量）は ATL 発症のリスクファクターである。しかし HTLV-1 プロウイルス量の測定は施設毎に異なる方法を用いているため得られた値にバラツキを生じている。本研究班の目的の一つはこのプロウイルス量測定の標準化にある。本分担研究ではリアルタイム PCR 法による測定感度の決定とプロウイルス量測定の問題となりうる標準細胞株の欠損ウイルスについて検討した。その結果、リアルタイム PCR 法によるキャリアプロウイルス測定は、条件を調整することにより Nested PCR 法と遜色のない感度を得ることができた。また標準細胞株として汎用されている MT-2 細胞にはこれまでの報告とは異なり、少なくとも 9 個のプロウイルスが組み込まれており、様々な欠損パターンを有していることが明らかとなった。内部標準として HTLV-1 感染細胞株を用いる場合は、事前に十分な性状確認が必須であり、また経時的な変化についても考慮する必要がある。

A. 研究目的

HTLV-1感染細胞数（プロウイルス量）はATL発症のリスクファクターである。しかしHTLV-1プロウイルスの測定は施設毎に異なる方法を用いているため得られた値にバラツキが生じているのが現状であり、浜口班において施設間の差を最小にとどめることを目指し、標準化の試みがなされている。本年度は1)本施設でのリアルタイムPCR法を用いた場合の検出限界の検討、2)ウイルス量測定において大きな問題となりうる標準的細胞株のプロウイルスについてMT-2細胞株を用いて検討した。

B. 研究方法

1)リアルタイムPCR法を用いた場合の検出限界の検討
国立感染症研究所で作成したHTLV-1標準候補品の測定と当施設での定量の解析について、当施設で構築した同一のベクターに目的遺伝子配列(HTLV-1 pX領域)と内部標準遺伝子配列(アルブミン遺伝子)を組み込んだプラスミドを用いた。これにより1系列の標準希釈溶液でHTLV-1プロウイルス・コピー数(pX領域)とアルブミン遺伝子コピー数が測定可能となった。理論的に目的配列と内部標準配列のモル比が正確に1:1であるため、得られる感染率の精度も高いことが期待された。さらに鋳型として用いる検体DNAを濃縮することにより検出感度の向上を検討した。また、高感度測定法としてHTLV-1 pX領域をターゲットとしたNested PCR法を作成した。この方法のプライマーには複数のHTLV-1プロウイルス塩基配列を基に保存されている配列を用いた。

2)MT-2細胞株の組み込みプロウイルスの検討
キャリアのプロウイルス量を測定する際には標準曲線を作成するために、プラスミド希釈を用いる場合とHTLV-1感染細胞株由来DNAを希釈する場合がある。後者として本邦のウイルス量を測定で

きる一般的な施設では、用いる感染細胞株は施設ごとで異なり、その際は感染細胞の性状および、組み込まれているプロウイルスの変異や欠損の有無が標準曲線やプライマーを選択する際に大きな問題となる。本研究では代表的なHTLV-1感染細胞株であるMT-2細胞株について性状および組み込まれているプロウイルスの欠損パターンを検討した。

C. 研究結果

1)リアルタイムPCR法を用いた場合の検出限界の検討
リアルタイムPCRについてはサンプルDNAをエタノール沈殿法で濃縮し1反応あたり2 μ gのDNAを用いることにより、プロウイルスDNAの検出感度を300,000細胞中に感染細胞が1.5個あれば検出できる高感度の測定方法となった。またNested PCR法でもほぼ同等の感度であった。

2)MT-2細胞株の組み込みプロウイルスの検討
染色体分析の結果、個々の細胞ごとに染色体本数などの多様性がみられた。さらにinverse-PCR法とPCR産物のクローニング、組み込み部位特異的PCR法を用いた解析では、少なくとも9個の異なるゲノム位置にプロウイルスの組み込みがみられ、以前のMT-2細胞についての報告とは異なっていた。プロウイルスの欠損パターンとしては、内部領域が大きく欠損したプロウイルスが最も高頻度にみられ、5'側が欠損したもの、そのほかの欠損等多様なパターンがみられたが、欠損の検出されない完全長と思われるプロウイルスは1個しか見られなかった。

D. 考察

リアルタイムPCR法の条件を調整することによりNested PCR法と遜色のない感度を得ることができた。施設間で常に同等の感度を得ることが

可能か、またサンプルとして用いるテンプレートDNA量を統一するべきか、国内外の地域によってキャリアのプロウイルスの一塩基多型の頻度が異なり結果に影響しないかなどの検討が必要と思われた。

MT-2細胞株のプロウイルスの検討により、さまざまな欠損を有するプロウイルスが多数组み込まれていることが判明した。さらに染色体数についても大きな幅があり、細胞数をカウントする際の内部標準として通常用いられているアルブミン等の遺伝子についても、細胞株ごとに事前に検討する必要があると思われた。また長期の培養により同じ細胞株であっても上記のような性状の変化が同一施設あるいは異なる施設で起きる可能性が大きいと考えられた。

E. 結論

リアルタイムPCR法によるキャリアプロウイルス測定は、条件を調整することによりNested PCR法と遜色のない感度を得ることができると思われた。また内部標準としてHTLV-1感染細胞株を基準とする場合は、事前に十分な性状確認が必須であり、また培養期間が長期の場合、経時的な変化についても考慮する必要がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

①Ueno 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.

②岡山昭彦. 特集/ストップ ザ 性感染症 性感染症—診断・治療 HTLV-1 感染. *臨床と研究*. 2012;89:7, 907-910.

2. 学会などの発表

①梅木一美, 山本成郎, 橋倉悠輝, 上野史朗, 高城一郎, 森下和弘, 岡山昭彦. HTLV-1 キャリア末梢血単核球を移植した NOG マウスにおける HTLV-1 プロウイルス DNA のメチル化の動態. 第5回 HTLV-1 研究会. 2012.

②岡山昭彦. 本邦における HTLV-1 感染とキャリア指導の留意点. 第36回日本血液事業学会総会共催ランチョンセミナー. 2012.

③岡山昭彦. HTLV-1 感染と慢性炎症性疾患. 平成24年度長崎大学大学院セミナー. 2012.

④岡山昭彦. HTLV-1 感染とは? 宮崎大学医学部市民公開講座 HTLV-1 感染症から ATL. 2012.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

題名 Multi-color FACSによる発症高危険HTLV-1キャリアの同定

研究分担者 内丸 薫 東京大学医科学研究所 准教授

研究要旨：昨年検討した HTLV-1 感染細胞の CD3/CD7 発現の multi-color FACS 解析に ATL で高発現していることが報告されている TSLC1 を組み込むことにより TSLC1/CD7 の発現を解析した。この改良型の multi-color FACS は HTLV-1 感染細胞特異的に HTLV-1 感染細胞における病態の進行をとらえることができ、より正確な評価が可能となった。この FACS により HTLV-1 キャリアの中で感染細胞のモノクローナルな増殖が見られるハイリスクキャリアを同定することが可能であることが示唆された。

A. 研究目的

当研究班疫学グループでは一貫して発症ハイリスクグループの同定に取り組んできている。その中で我々のグループは昨年度までにmulti-color FACSを用いて、HTLV-1感染細胞/ATL細胞をCD3/7の発現によってCD7 P(positive), D(dim positive), N(negative)の3つの集団に分けられ、CD7D, CD7Nの%により2次元プロットすることにより、健康人コントロールと同じ領域(G1)に分布する症例、CD7D+L>45%以上、かつCD7L<80%(G2)の主にindolent ATLが分布する領域に分布する症例、CD7L>80%(G3)に分布する急性型症例に分けられること、無症候性キャリアのなかでG2に分布する症例はモノクローナルに増殖する集団を含み発症ハイリスク群と考えられることを明らかにしてきた。CD7の発現低下はHTLV-1感染細胞以外でも種々の生理的、病理的条件で認められることから、今年度はよりHTLV-1 感染細胞特異的に解析できる系の開発を行う。

B. 研究方法

対象はHTLV-1キャリア10例、くすぶり型、慢性型7例、急性型ATL各5例、健康人対象6例で、末梢血単核球を分離後、CD3, 4, 7, 14抗体およびビオチン化トリ抗TSLC1 (CADM1) を用い、ストレプトアビジンPEで反応させた後FACSAriaによりCD14陽性単球をゲートアウト後CD3, 4陽性T細胞にゲートをかけ、TSLC1/CD7の発現を検討した。

（倫理面への配慮）本研究は東京大学医科学研究所倫理審査委員会の承認を得て（承認番号22-4-0518）、文書による説明同意を得たうえで検体を採取した。

C. 研究結果

TSLC1はCD7の発現が低下すると同時に強陽性に発現し、TSLC1/CD7により展開することでこれまで以上に比べCD7PとDを明瞭に区分することが可能となった。TSLC1陽性細胞は定量PCR、FISHによる解析の結果ほとんどがHTLV-1感染細胞であり、高率にHTLV-1感染細胞を濃縮して、HTLV-1感染細胞のみの変化を解析することが可能となった。CD3/7による解析の時と同様末梢血プロウイルス量が高く異常リンパ球の多い進行したキャリアではCD7D/Nの集団の比率が増加し、これらの集団にはinverse PCRによりモノクローナルに増殖している集団が検出できた。CD3/7による検討の時と同様にCD7D, CD7Nの%により2次元プロットすることにより、無症候性キャリアからA

TL発症まで病態の進行に伴って分布位置が変化した。

D. 考察

TSLC1は肺癌における癌抑制遺伝子として同定されたがATL細胞、キャリアのHTLV-1感染細胞において高発現していることが報告されている。TSLCを導入した今回の解析により非HTLV-1感染細胞の混入、影響を除いた評価が可能になった。年齢など生理的にCD7の発現が低下することによる影響を除くことができる。また、これまで一部の症例で分離が困難であったCD7DとPを明瞭に区別できるのでより正確な解析が可能である。この解析でCD7D、Pが増加している無症候性キャリアは2次元プロットでindolent ATLと同様の場所に分布するが、これらの症例ではCD7D、Nにモノクローナルに増殖する集団が検出され、ATL発症のリスクの高いハイリスク集団と考えられた。

E. 結論

multi-color FACSによるHTLV-1感染細胞のTSLC1/CD7発現の解析はHTLV-1キャリア中のハイリスク群の同定に有用であった。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Makoto Yamagishi, Kazumi Nakano, Aiko Miyake, Tadanori Yamochi, Yayoi Kagami, Akihisa, Tsutsumi, Yuka Matsuda, Aiko Sato-Otsubo, Satsuki Muto, Atae Utsunomiya, Kazunari Yamaguchi, Kaoru Uchamaru, Seishi Ogawa, and Toshiki Watanabe. Polycomb-Mediated Loss of miR-31 Activates NIK-dependent NF- κ B Pathway in Adult T-cell Leukemia and Other Cancers. *Cancer cell*. 2011 21(1):121-135
2. 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. and Uchamaru K. The CD3 versus CD7 plot in multicolor flow cytometry reflects progression of disease stage in patients infected with HTLV-I. *PLoS ONE* 8: e53728,

2. 学会発表

1. 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 東京2011
2. 石垣知寛、小林誠一郎、大野伸広、渡辺恵理、田野崎隆二、渡辺信和、東條有伸、内丸薫：TSLC1/CD7を用いた造血細胞移植後のATL細胞のモニタリング 第5回HTLV-1研究会 2011 東京
3. 矢持忠徳、守田洋平、矢持淑子、佐々木陽介、渡辺信和、Sanaz Firouzi、内丸薫、宇都宮與、渡邊俊樹：成人T細胞白血病におけるtumor initiating cellの探索の試み 第5回HTLV-1研究会 2012 東京
4. 大野伸広、田野崎隆二、小林誠一郎、石垣知寛、渡辺信和、内丸薫：同種造血幹細胞移植を見据えたATLの治療戦略：その後方視的解析 第5回HTLV-1研究会 2011 東京
5. 笹島悟史、中野和民、内丸薫、渡邊俊樹：成人T細胞白血病(ATL)における新規TIAM2変異体の同定と遺伝子発現の解析 第5回HTLV-1研究会 2012 東京
6. Makoto Yamagishi, Ryutaro Takahashi, Kazumi Nakano, Satomi Asanuma, Atae Utsunomiya, Kazunari Yamaguchi, Kaoru Uchimaru, Seishi Ogawa, and Toshiki Watanabe :Molecular Hallmarks of Adult T cell Leukemia: miRNA, Epigenetics, and Emerging Signaling Abnormalities 第74回日本血液学会学術集会 2012 京都

7. Seiichiro Kobayashi, Eri Watanabe, Tomohiro Ishigaki, Nobuhiro Ohno, Koichiro Yuji, Yukio Tsukada, Akihiro Ohmoto, Naoki Shimada, Nobukazu Watanabe, Arinobu Tojo and Kaoru Uchimaru:CD7 vs CADM1 in FACS reflects multi-step oncogenesis of ATL and discriminates HTLV-1 infected cells. 第74回日本血液学会学術集会 2012 京都
8. 石垣 知寛、小林 誠一郎 (、大野 伸広、田野崎 隆二、渡辺 信和、内丸 薫、東條 有伸、中内 啓光：Monitoring ATL cells after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with CADM1 and CD7. 第74回日本血液学会学術集会 2012 京都
9. 大野伸広、小林誠一郎、渡辺信和、石垣知寛、湯地晃一郎、東條有伸、内丸薫：CD3とCD7の展開による急性型ATL細胞の同定：治療後のCD3dimCD7(-)分画のクローナリティ解析第74回日本血液学会学術集会 2012 京都

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

ウエ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

研究分担者 山野嘉久 聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター 准教授

研究要旨：HTLV-1 総合対策の施行により、HTLV-1 抗体検査が妊婦健診の標準的検査項目となった。この検査によって HTLV-1 キャリアと告げられる妊婦は生まれてくる子供への栄養法の選択を迫られるだけでなく、自分自身が HTLV-1 関連疾患の発症リスクに関する不安等を抱えることになり、非常に大きな心理的負担を受ける。そのため、HTLV-1 感染の有無や程度を調べる検査はより高い精度が求められる。現在、スクリーニング検査は陽性であっても偽陽性の可能性があるため、ウエスタンブロット（WB）法による確認検査が必要であるが、WB 法での検査においても「判定保留」例が少なからず認められることが問題となっている。本研究では、より高精度に HTLV-1 感染を検出する目的でリアルタイム PCR による HTLV-1 核酸検査の条件を検討し、偽陽性が出ずに従来の方法よりも高感度の条件を決定することができた（理論的には検出限界 PVL = 0.001%、1 コピー/1 × 10⁵）。この高感度 PCR 方法を用いて 21 例の WB 法「判定保留」例の HTLV-1 感染の有無と程度を調べたところ、21 例中 8 例（38.1%）で HTLV-1 が陽性と判明し、陽性者のプロウイルス量は平均 0.05 copis/100 cells と極めて低い感染率であった。また、高感度 PCR 陰性例の感染の有無についてさらに検討するために、PBMC を 24 時間培養した後の検体を用いて検討したところ、培養前の検体で PCR 陰性であった 13 例のうち 1 例（7.7%）において、培養後に PCR 陽性が認められた。さらに本症例は 1 年後に再検し、培養前の検体において高感度 PCR 陽性の結果が得られた。以上の結果より、高感度 PCR 法は従来の WB 法と比較してより感度が高い可能性が示唆された。しかしながら、高感度 PCR 法においても WB 「判定保留」例の HTLV-1 感染を否定することは困難であることが示唆され、これらの検査結果を臨床的にどのように活用していくかに関する検討が今後必要であると考えられた。

A. 研究目的

HTLV-1総合対策の実施によりHTLV-1抗体検査が妊婦健診の標準的検査項目に追加され、全国一律で公費によるHTLV-1抗体検査が実施されるようになった。これにより全国的にHTLV-1の感染予防が強化される一方で、HTLV-1キャリアと告げられる妊婦が増えることが予想された。HTLV-1は母乳による垂直感染が主な感染経路であるため、キャリアである妊婦は生まれてくる子の栄養法を考えなくてはならない。また同時に、自分自身が白血病や脊髄

症といったHTLV-1関連疾患の発症リスクを抱えていることを知ることとなり、キャリアと告げられることで受ける心理的負担は非常に大きい。そのため、HTLV-1感染の有無や程度を調べる検査はより高い精度が求められる。また、臓器移植の際にもドナーあるいはレシピエントがHTLV-1キャリアであるか否かは移植後のHTLV-1関連疾患の発症に関わる重要な問題であるため、その点においてもHTLV-1感染の有無を調べる検査はより高い正確性が求められる。

現在、HTLV-1抗体検査はスクリーニング検査としてPA法ないしEIA法が実施され、その後、ウエスタンブロット (WB) 法による確認検査が行われる。WB法は陽性であれば感染が確定し、陰性であれば非感染となるが、「判定保留」となるケースが少なからずあり、問題となっている。

本研究では、リアルタイムPCRによるHTLV-1核酸検査の正確性を維持しながら感度を高める条件を決定し、その条件を用いて、WB法「判定保留」例におけるHTLV-1感染の有無と程度を検証した。

B. 研究方法

1) -1

HTLV-1プロウイルス量測定のためのリアルタイムPCRの偽陽性に関する条件検討

感染研より送付されたHTLV-1非感染PBMCを用いて、templateとするゲノムDNA量を100ng, 200ng, 500ng, 1000ngとし、PCRのサイクル数を40 cyclesと45 cyclesと変化させた場合におけるHTLV-1感染の偽陽性の有無について検討した。具体的な方法は、以下の通りである。

1wellあたりの DNA 量 : 100ng, 200ng, 500ng, 1000ng

HTLV-1 検量線用の標的 : HTLV-1 pX 領域

HTLV-1 標準用 DNA の由来 : TARL-2 細胞株

Forward Primer Sequence:

ACAAAGTTAACCATGCTTATTATCAGC

Reverse Primer Sequence:

ACACGTAGACTGGGTATCCGAA

Probe Sequence:

TTCCCAGGGTTTGGACAGAGTCTTCT

内部標準の標的遺伝子 : β -actin

内部標準用の DNA の由来 : 健常者 PBMCs

Forward Primer Sequence:

CACACTGTGCCCATCTACGA

Reverse Primer Sequence:

CTCAGTGAGGATCTTCATGAGGTAGT

Probe Sequence:

ATGCCCTCCCCCATGCCATCCTGCGT

検出器 : Applied Biosystems 7500

PCR 条件 :

50°C 2min, 95°C 10min 後に

(95°C 15sec & 60°C 1min) x 40 cycles or 45 cycles

測定計算式 (copies / 100 cells) :

(pX コピー数) x 2 / β -actin コピー数 x 100)

1) -2

HTLV-1プロウイルス量測定のためのリアルタイムPCRの検出感度に関する条件検討

感染研より送付された標準品 (下記参照) を用いて、PCRのサイクル数は40 cyclesに固定し、templateとするゲノムDNA量を100ng, 200ng,

500ng, 1000ngと変化させた場合におけるHTLV-1感染の検出感度について検討した。

< 標準品の内容 >

- 0.8% TL-Om1/PBMCs
- 0.02% TL-Om1/PBMCs
- 0.005% TL-Om1/PBMCs
- 0.002% TL-Om1/PBMCs
- 0.0005% TL-Om1/PBMCs
- 0.0002% TL-Om1/PBMCs
- PBMCs (negative control)

2) WB法「判定保留」例のPBMC (培養なし) を用いたリアルタイムPCRによるHTLV-1プロウイルス量の測定

福岡大学病院より供与された血液7検体 (No.1~No.7) および当施設で収集した血液14検体 (No.8~No.21)、計21検体のWB法「判定保留」例を用いた。上記の条件検討で決定されたリアルタイムPCRの条件 (template 1000ng、PCRサイクル数 40cycles) を採用して、HTLV-1プロウイルス量の測定を実施した。

3) WB法「判定保留」例の培養24h後PBMCを用いたリアルタイムPCRによるHTLV-1プロウイルス量の測定

判定保留例の21検体すべてについて、96wellプレートに 1×10^5 細胞/wellで10 wellずつ播種し、培養を開始し、24時間後に細胞を回収、ゲノムDNAを抽出後、template量100ng、40 cyclesという条件のリアルタイムPCRによってプロウイルス量を測定した。

(倫理面への配慮)

臨床検体の収集に際しては、本学の生命倫理委員会で承認された (承認番号: 第 1646 号) 同意書を用いて、不利益や危険性の排除などに関するインフォームドコンセントを行った。また検体は、個人情報管理者により連結可能匿名化による番号化を行い、提供者を特定できないようにし、患者の人権擁護に努めた。

C. 研究結果

1) -1

HTLV-1プロウイルス量測定のためのリアルタイムPCRの偽陽性に関する条件検討

表1に示すように、ゲノムDNA 200ng以上を鋳型として、サイクル数を45回とした場合、非感染細胞であるにもかかわらず3回ともHTLV-1プロウイルスが検出され、偽陽性となった。鋳型とするゲノムDNAが100ngであってもサイクル数を45回とした場合、3回のうち1回は偽陽性となった。一方、サイクル数を40回とした場合は100ngから1000ngまで、どのゲノムDNA量であってもHTLV-1プロウイルス量は0.000となり、偽陽性を認めなかった。

1)-2

HTLV-1プロウイルス量測定のためのリアルタイムPCRの検出感度に関する条件検討

表2に示すように、鋳型を1000ng使用した場合に最も検出感度がよかった。最も感染率の低い0.0002% TL-Om1/PBMCs (4コピー/ 1×10^6 cells) を使用しても3回のうち2回はHTLV-1プロウイルスが検出された。

2) WB法「判定保留」例のPBMC (培養なし) を用いたリアルタイムPCRによるHTLV-1プロウイルス量の測定

WB法「判定保留」21例のうち8例 (38.1%) でHTLV-1プロウイルスが検出され、感染が認められた (表3「培養なし」欄参照)。その平均プロウイルス量は0.05 copies/100 cellsであった。

またendemic areaである福岡の検体が判定保留7例中4例陽性 (57.1%) であるのに対し、non-endemic areaである関東の検体は判定保留14例中4例陽性 (28.6%) であった。

3) WB法「判定保留」例の培養24h後PBMCを用いたリアルタイムPCRによるHTLV-1プロウイルス量の測定

WB法「判定保留」例において、培養してHTLV-1感染細胞を増やすことによって検査の感度を上昇させるかについて検討した。

すると、培養前PBMCにおけるプロウイルス量が検出感度以下であった13例のうち、1例において、24時間培養後のPBMCを使用することでHTLV-1プロウイルスが検出された (表3「培養後24h」参照)。本症例については、1年後の再診時にウイルス量を再検し、その際は培養前のPBMCで高感度PCR検査が陽性であり (表3参照, 症例No.9)、感染している可能性が高いと判断される。

なお、培養前のPBMCにてHTLV-1プロウイルスが検出された8例については、全例において培養後も検出された (表3参照)。

D. 考察

研究結果1)-1および1)-2より、HTLV-1を検出するリアルタイムPCRではサイクル数を40 cycles、鋳型量は1000ngを使用した場合に偽陽性が少なく、かつ感度がよいことが判明した。感染研の試算によると、検出限界は理論的には検出限界PVL = 0.001%、1コピー/ 1×10^5 と算出された。

こうして決定した条件を用いた高感度リアルタイムPCRによって、WB法「判定保留」例のHTLV-1プロウイルス量を調べてみると、約4割 (21例のうち8例) はHTLV-1に感染していることが判明し、そのウイルス量は0.05 copies/100 cellsであった。これは当研究室におけるHTLV-1無症候性キャリアの平均プロウイルス量1.48 copies/100 cellsと比較して、極

めて低いプロウイルス量であった。このことから、HTLV-1感染者であってもプロウイルス量が極めて低い場合、HTLV-1に対する抗体の産生量が低く、WB法で「判定保留」となる可能性が示唆された。

また少数例の検討であるが、endemic areaのWB法「判定保留」例はnon-endemic areaと比較して、HTLV-1感染であると判明する例が多く認められた。これはendemic areaにおいて真のHTLV-1陽性者の割合 (母集団における陽性率) が高いことを反映するものと思われる。

さらに、1例ではあるが、PBMCを24h培養することによって、HTLV-1が検出される例があったことから、鋳型を1000ng使用した高感度PCR検査が検出限界以下となる症例であっても、HTLV-1の感染を完全に否定することは困難であることが示唆された。例えば臓器移植 (特に腎移植) のドナー等、結果の解釈や説明においてより慎重な対応が必要となる場合もあることが想定され、今後、検査結果をどのように役立てるか、その臨床的な意義付けについてはさらなる検討が必要になってくるものと考えられる。

E. 結論

本研究により、HTLV-1を検出するにあたって高感度のリアルタイムPCR条件を確立することができた。この方法を用いることで、約4割のWB「判定保留」例においてHTLV-1感染を明らかにすることができたことから、高感度PCR法は従来のWB法と比較してより感度が高い可能性が示唆された。また、培養後にHTLV-1陽性であると判明する例があることから、高感度PCR法においてもWB「判定保留」例のHTLV-1感染を完全に否定することは困難であることが示唆され、これらの検査結果を臨床的にどのように活用していくかに関する検討が今後必要であると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamano Y., Sato T.
Clinical pathophysiology of human T-lymphotropic virus-type1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Frontiers in Virology*, 3(389):1-10, 2012.
- 2) 山野嘉久、佐藤知雄.
HTLV-1関連脊髄症 (HAM) の病態・治療とバイオマーカー
日本臨牀, in press 2013.
- 3) 山野嘉久、佐藤知雄、宇都宮與.
HTLV-1関連脊髄症 (HAM)
日本臨牀, in press 2013.

- 4) 山野嘉久.
HAM (HTLV-1関連脊髄症)
すべての内科医が知っておきたい神経疾患の
診かた、考え方とその対応, 279-281, 2013.
- 5) 山野嘉久, 佐藤知雄, 安藤仁, 新谷奈津美, 八木
下尚子.
HTLV-1関連脊髄症 (HAM) の治療法を確立して
いくために—その現状と展望—
日本臨牀, 70(4):705-713, 2012.
2. 学会発表
- 1) 佐藤知雄, 安藤仁, 新谷奈津美, 山内淳司, 八木
下尚子, 出雲周二, 山野嘉久. HTLV-1 関連脊髄
症 (HAM) の進行度に関連するバイオマーカー
の同定, 第 17 回日本神経感染症学会, 2012 年 10
月 20 日, 京都.
- 2) 山野嘉久, 安藤仁, 佐藤知雄, 外丸詩野, 新谷奈
津美, 山内淳司, 八木下尚子, 吉田眞理, 宇都宮
與. HAM における CXCL10 の炎症慢性化機構に
おける重要性和治療標的としての可能性, 第 24
回日本神経免疫学会学術集会, 2012 年 9 月 21 日,
軽井沢.
- 3) 佐藤知雄, 安藤仁, 新谷奈津美, 山内淳司, 八木
下尚子, 出雲周二, 山野嘉久. HTLV-1 関連脊髄
症 (HAM) の進行度に関連する新規バイオマ
ーカーとしての髄液 CXCL10 の重要性, 第 5 回
HTLV-1 研究会・第 1 回 ATL シンポジウム・
HTLV-1 国際シンポジウム, 2012 年 8 月 26 日, 東京.
- 4) 齊藤祐美 高田礼子, 菊地誠志, 藤原一男, 中川
正法, 竹之内徳博, 永井将弘, 吉良潤一, 中村龍
文, 高嶋博, 齊藤峰輝, 渡嘉敷崇, 法化図陽一,
松崎敏男, 出雲周二, 山野嘉久. HAM 患者登録シ
ステム (HAM ねっと) の構築, 第 5 回 HTLV-1
研究会・第 1 回 ATL シンポジウム・HTLV-1 国
際シンポジウム, 2012 年 8 月 26 日, 東京.
- 5) 安藤仁, 佐藤知雄, 新谷奈津美, 八木下尚子, 山
内淳司, 山野嘉久. HTLV-1 関連脊髄症 (HAM)
の炎症慢性化に果たす CXCL10 の役割と治療応
用への解析, 第 5 回 HTLV-1 研究会・第 1 回 ATL
シンポジウム・HTLV-1 国際シンポジウム, 2012
年 8 月 26 日, 東京.
- 6) 石原誠人, 新谷奈津美, 佐藤知雄, 山野嘉久, 中
村祐輔, 中川英刀, 植田幸嗣. 脳脊髄液プロテオ
ームプロファイリングによる HAM/TSP 重症度
指針マーカーの同定, 第 5 回 HTLV-1 研究会・第
1 回 ATL シンポジウム・HTLV-1 国際シンポジ
ウム, 2012 年 8 月 26 日, 東京.
- 7) 山内淳司, 安藤仁, 新谷奈津美, 佐藤知雄, 八木
下尚子, 山野嘉久. ステロイドの血中 HTLV-1 プ
ロウイルス量に対する影響と免疫抑制による
HTLV-1 関連疾患発症リスクに関する検討, 第 5
回 HTLV-1 研究会・第 1 回 ATL シンポジウム・
HTLV-1 国際シンポジウム, 2012 年 8 月 26 日, 東京.
- 8) 長谷川温彦, 高森絢子, 宇都宮與, 前田裕弘, 山
野嘉久, 増田昌人, 清水由紀子, 玉井洋太郎, 笹
田亜麻子, 崔日承, 鶴池直邦, 岡村純, 渡邊俊樹,
神奈木眞理. HTLV-1 感染者における Tax 特異的
T 細胞応答および ATL 発症予防, 第 5 回 HTLV-1
研究会・第 1 回 ATL シンポジウム・HTLV-1 国
際シンポジウム, 2012 年 8 月 25 日, 東京.
- 9) 山野嘉久. HAM における HTLV-1 感染 T 細胞の
異常, 第 5 回 HTLV-1 研究会・第 1 回 ATL シン
ポジウム・HTLV-1 国際シンポジウム, 2012 年 8
月 25 日, 東京.
- 10) 山野嘉久. HAM (HTLV-1 関連脊髄症) 対策に関
する現状と課題, 第 3 回 HTLV-1 対策推進協議会,
2012 年 6 月 6 日, 東京.
- 11) 山野嘉久. HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の臨床経
過と関連する疾患活動性マーカーの同定, 第 53
回日本神経学会学術大会, 2012 年 5 月 24 日, 東京.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
- 1) US61/668,686, Yoshihisa Yamano, 2012.7.6, A
Therapeutic Method And Medicament For
HTLV-1 Associated Myelopathy(HAM)
- 2) 特願2012-189318, 植田幸嗣, 石原誠人, 山野嘉
久, 2012.8.29, ヒト T リンパ球向性ウイルス I
型関連疾患検出用ポリペプチドとその利用
2. 実用新案登録
- 該当なし
3. その他
- 該当なし

表1 HTLV-1プロウイルス量測定のためのリアルタイムPCRの偽陽性に関する条件検討

サンプル名	proviral load_40 cycles			proviral load_45 cycles		
	1回目	2回目	3回目	1回目	2回目	3回目
HTLV-1 非感染 PBMCs_100ng	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0037	0.0000
HTLV-1 非感染 PBMCs_200ng	0.0000	0.0000	0.0000	0.0046	0.0017	0.0018
HTLV-1 非感染 PBMCs_500ng	0.0000	0.0000	0.0000	0.0017	0.0042	0.0014
HTLV-1 非感染 PBMCs_1000ng	0.0000	0.0000	0.0000	0.0021	0.0023	0.0004

表2 HTLV-1プロウイルス量測定のためのリアルタイムPCRの検出感度に関する条件検討

1回目	100ng	200ng	500ng	1000ng
0.8%TL-Om1/PBMCs	2.0212	3.5471	3.4947	3.2936
0.02%TL-Om1/PBMCs	0.0829	0.0823	0.1072	0.1131
0.005%TL-Om1/PBMCs	0.0400	0.0297	0.0238	0.0289
0.002%TL-Om1/PBMCs	0.0156	0.0185	0.0115	0.0179
0.0005%TL-Om1/PBMCs	0.0060	0.0076	0.0034	0.0063
0.0002%TL-Om1/PBMCs	0.0000	0.0000	0.0035	0.0014
0% PBMCs	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
2回目	100ng	200ng	500ng	1000ng
0.8%TL-Om1/PBMCs	3.7572	3.2601	3.3063	3.4740
0.02%TL-Om1/PBMCs	0.0722	0.0838	0.1023	0.1167
0.005%TL-Om1/PBMCs	0.0310	0.0325	0.0222	0.0296
0.002%TL-Om1/PBMCs	0.0134	0.0215	0.0126	0.0161
0.0005%TL-Om1/PBMCs	0.0096	0.0000	0.0000	0.0026
0.0002%TL-Om1/PBMCs	0.0037	0.0037	0.0000	0.0000
0% PBMCs	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
3回目	100ng	200ng	500ng	1000ng
0.8%TL-Om1/PBMCs	3.8186	3.4186	2.9986	3.2554
0.02%TL-Om1/PBMCs	0.0733	0.0875	0.1008	0.1115
0.005%TL-Om1/PBMCs	0.0035	0.0110	0.0240	0.0244
0.002%TL-Om1/PBMCs	0.0000	0.0148	0.0121	0.0126
0.0005%TL-Om1/PBMCs	0.0039	0.0012	0.0000	0.0040
0.0002%TL-Om1/PBMCs	0.0000	0.0044	0.0000	0.0024
0% PBMCs	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000

表3 WB法「判定保留」例のPBMC（培養前、培養後24h）由来DNAを用いたリアルタイムPCRによるHTLV-1プロウイルス量の測定

	サンプル No.	年齢	性別	Proviral load (培養前)	Proviral load (培養後 24h)
福岡由来 の症例	No.1	35	女	検出感度以下	検出感度以下
	No.2	30	女	0.07	0.07
	No.3	27	女	検出感度以下	検出感度以下
	No.4	35	男	検出感度以下	検出感度以下
	No.5	38	女	0.06	0.39
	No.6	24	女	0.35	0.18
	No.7	29	女	0.12	0.05
関東由来 の症例	No.8	23	女	検出感度以下	検出感度以下
	No.9	67	男	検出感度以下	0.17
	No.10	32	女	検出感度以下	検出感度以下
	No.11	42	女	検出感度以下	検出感度以下
	No.12	34	女	0.02	0.05
	No.13	34	女	0.01	55.15
	No.14	67	男	0.30	1.06
	No.15	42	女	0.94	0.10
	No.16	31	女	検出感度以下	検出感度以下
	No.17	36	女	検出感度以下	検出感度以下
	No.18	65	男	検出感度以下	検出感度以下
	No.19	69	男	検出感度以下	検出感度以下
	No.20	36	女	検出感度以下	検出感度以下
	No.21	30	女	検出感度以下	検出感度以下

題名 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

研究分担者 長谷川寛雄 長崎大学病院 検査部 講師

研究要旨：近年、フローサイトメトリー(FCM) 検査の一般化とreal time PCR による感染細胞の評価が容易となり、HTLV-1 キャリアとくすぶり型ATLの鑑別が求められる症例が多くなっている。欧米ではいわゆるindolent ATL症例に対する積極的治療介入の報告があり、我が国でもindolent ATLに対する治療のあり方が議論されているところである。このような背景のもと、検査の視点から、発症リスクの解明に寄与するバイオマーカー検査をおこなった。HTLV-1 Southern blot hybridization (SBH) 法は唯一の分子生物学的なATL確定診断法といえるが、日常検査としては問題点を多く抱えている（検体量、時間、結果の解釈など）。我々のこれまでの研究成果より、成人T細胞白血病(ATL)細胞において高頻度にCD26抗原発現減少が起こっていること（Tsuji T et al. Int J Hematol. 2004;80(3):254-60.）に着目し、ATL確定診断法であるHTLV-1 SBH法のclonalityとCD26発現も含めたFCM検査結果の関係を検討した。CD26発現は、HTLV-1キャリア、リンパ腫型、くすぶり型、慢性型、急性型の順に低値となり、腫瘍量との逆相関が示唆された。CD25 及びCCR4は、HTLV-1キャリア、リンパ腫型、くすぶり型、慢性型、急性型の順に高値となった。CD26発現とCD25発現は逆相関関係を示した。ATLcellにおける減少マーカーの候補としてCD26およびCD7が示唆されたが、キャリアとくすぶり型ATL間の差という視点では、CD26発現低下はCD7発現低下より差が明確であった。特にCD26/CD25比は、各病型間の差がCD26、CD7よりも明確となった。HTLV-1 キャリア・くすぶり型98例のSBH法腫瘍性解析とCD26/CD25比の関係をさらに検討したところ、HTLV-1SBH陽性例55例中44例はCD26/CD25比が1より小さく、これをカットオフとして ROC解析をおこなうとAUC(area under ROC curve)=0.940 とすぐれたマーカーになることがわかった。すなわちSBH検査結果をもって確定診断としている今日において、FCM検査のCD26/CD25比は優れた代替マーカーであることを意味している。全国的にHTLV-1定量PCRが行われるバックグラウンドが整いつつあるものの、ウィルス量に変動のある全キャリアにSBHを行うことは現状では困難であり、このような代替マーカーは臨床的に非常に有用と考えられる。

A. 研究目的

HTLV-1 キャリア 及び ATL各病型におけるCD抗原の発現パターンをフローサイトメトリー法 (FCM) にて解析し、ATL確定診断法であるHTLV-1 Southern blot hybridization (SBH) 法のclonalityの検査結果との関係を検討する。

B. 研究方法

長崎大学病院検査部にて、1997年～2012年3月までにFCM検査およびSBH検査の依頼のあったHTLV-1 キャリア 及び 成人T細胞白血病 (ATL) 症例の末梢血検体383例について解析をおこなった。検討マーカーはCD3,CD4,CD25,CCR4,CD7,CD26,HLA-DR,CD30,CD38。

C. 研究結果

(1) CD26発現は、HTLV-1キャリア、リンパ腫型、くすぶり型、慢性型、急性型の順に低値となり、腫瘍量との逆相関が示唆された。

(2) CD25発現とCCR4発現は、各病型間の関係が良く相関した。また、CD25 及びCCR4は、HTLV-1キャリア、リンパ腫型、くすぶり型、慢性型、急性型の順に高値となった。

(3) CD26発現とCD25発現は逆相関関係を示した。

(4) CD26,CD7発現はATLcellにおける減少マーカーの特徴を有していたが、キャリアとくすぶり型ATL間の差という視点では、CD26発現低下はCD7発現

低下より差が明確であり、かつ早期から低下することが認められた。

(5) ATLcellにおける減少マーカーCD26と増加マーカーであるCD25のCD26/CD25比は、各病型間の差がCD26あるいはCD7単独よりも明確となった。

(6) HTLV-1 キャリア・くすぶり型98例のSBH法腫瘍性解析とCD26/CD25比の関係をみるとHTLV-1SBH(+)55例中44例はCD26/CD25比が1より小さく、これをカットオフとして ROC解析をおこなうとAUC (area under ROC curve)=0.940 とすぐれたマーカーになることがわかった。

D. 考察

CD26は感染早期から減少しはじめ、減少の程度は病態の進行をよく反映するが、この現象の意義をさらに解析する必要があると思われる。

E. 結論

CD26/CD25比は、臨床上問題となりうるHTLV-1 キャリア、くすぶり型ATLの鑑別に有用で、簡便にHTLV-1 clonalityを判断できるサロゲートマーカーとなりうる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Heterogeneity in clonal nature in the smoldering subtype of adult T-cell leukemia: continuity from carrier status to smoldering ATL.

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. *Int J Hematol.* 2012 Apr;95(4):399-408.

2) Paradoxical expression of IL-28B mRNA in peripheral blood in human T-cell leukemia virus type-1 mono-infection and co-infection with hepatitis C virus.

Kamihira S, Usui T, Ichikawa T, Uno N, Morinaga Y, Mori S, Nagai K, Sasaki D, Hasegawa H, Yanagihara K, Honda T, Yamada Y, Iwanaga M, Kanematsu T, Nakao K. *Virology.* 2012 Feb 15;9:40.

3) Impact of miR-155 and miR-126 as novel biomarkers on the assessment of disease progression and prognosis in adult T-cell leukemia.

Ishihara K, Sasaki D, Tsuruda K, Inokuchi N, Nagai K, Hasegawa H, Yanagihara K, Kamihira S. *Cancer Epidemiol.* 2012 Dec;36(6):560-5.

2. 学会発表

1) 成人 T 細胞白血病の病態進行評価における新規バイオマーカーとしての miR-155 と miR-126. 石原香織、佐々木 大介、鶴田 一人、長谷川 寛雄、柳原克紀、第 16 回日本がん分子標的治療学会学術集会、2012 年 6 月、小倉

2) 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、鶴田一人、佐々木大介、森沙耶香、浜崎典子、松野貴子、本村裕実子、長谷川寛雄、柳原克紀、上平憲、第 13 回日本検査血液学会学術集会、2012 年 7 月、高槻

3) HIV の HAART 療法中に発症したくすぶり型 ATL の一例、浜崎典子、鶴田一人、松野貴子、本村裕実子、長谷川寛雄、柳原克紀、塚崎邦弘、宮崎康司、安岡彰、上平憲、第 13 回日本検査血液学会学術集会、2012 年 7 月、高槻

4) オステオポンチン-インテグリン相互作用を分子標的とした成人 T 細胞白血病に対する抗体免疫療法、前田直良、大橋貴、浩日勲、服部俊夫、高橋弥生、張替秀郎、長谷川寛雄、藤井雅寛、前仲勝実、上出利光、第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月、

札幌

5) 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、長谷川寛雄、塚崎邦弘、宮崎康司、上平憲、第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月、札幌

6) ATL 細胞株の細胞死を TRAIL 依存性に促進させる生物活性物質のスクリーニング、林日出喜、長谷川寛雄、河野友子、中尾一彦、松山俊文、第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月、札幌

7) CD26 antigen act as a predictive biomarker in the evolution from early to overt smoldering ATL. 長谷川寛雄、鶴田一人、佐々木大介、森沙耶香、土井裕子、石原香織、長井一浩、柳原克紀、塚崎邦弘、宮崎康司、上平憲、第 74 回日本血液学会学術集会、2012 年 10 月、京都

8) Impact of miR-155 and miR-126 as novel biomarkers on the assessment of disease progression and prognosis in adult T-cell leukemia. 石原香織、長谷川寛雄、鶴田一人、佐々木大介、猪口直子、長井一浩、柳原克紀、塚崎邦弘、宮崎康司、上平憲、第 74 回日本血液学会学術集会、2012 年 10 月、京都

9) Lymphoma cases without detectable monoclonal HTLV-1 integration in HTLV-1 carrier. 今泉芳孝、塚崎邦弘、對馬秀樹、松尾真稔、佐々木大介、長谷川寛雄、上平憲、新野大介、大島孝一、宮崎康司、第 74 回日本血液学会学術集会、2012 年 10 月、京都

10) 幹細胞移植治療後にドナー由来の HTLV-1 感染細胞の一時的増殖と移植前皮膚病変が残存した ATL の 1 例、土井 裕子、佐々木大介、森 沙耶香、臼井哲也、鶴田 一人、田口 正剛、宮崎 泰司、長谷川寛雄、柳原 克紀 第 59 回日本臨床検査医学会学術集会、2012 年 12 月、京都

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

CD26 antigen act as a predictive biomarker in the evolution from early to overt smoldering ATL

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

長谷川寛雄¹⁾, 鶴田一人¹⁾, 佐々木大介¹⁾, 柳原克紀¹⁾
塚崎邦弘²⁾, 宮崎泰司²⁾, 上平 憲³⁾

長崎大学病院検査部¹⁾, 長崎大学病院 血液内科²⁾, 長崎市立市民病院³⁾

背景

成人T細胞白血病(ATL)細胞において高頻度にCD26抗原発現減少が起こっている。

Tsuji T. Int J Hematol. 2004;80(3):254-60.

HTLV-1 Southern blot hybridization (SBH)法はATL確定診断法であるが、日常検査としては問題点を抱えている(検体量、時間、結果の解釈など)。

最近、FCM検査の一般化とreal time PCRによる感染細胞の評価が容易となり、HTLV-1 carrierとくすぶり型ATLの鑑別が求められる症例が多くなっている。

欧米ではindolent ATLに対する積極的治療介入の報告があり、我が国でもindolent ATLに対する治療のあり方が議論されている。

目的

HTLV-1 carrier 及び ATL各病型におけるCD26抗原の発現パターンを解析すること。

ATL確定診断法であるHTLV-1 Southern blot hybridization(SBH)法のclonalityとFCM検査結果の関係を検討する。

日常検査におけるSBH法の代替となりうる「ものさし」を探索すること。

対象

長崎大学病院検査部にて、1997年~2012年3月までにFCM検査およびSBH検査の依頼のあったHTLV-1 carrier 及び 成人T細胞白血病(ATL)症例の末梢血。

HTLV-1 carrier	70例
成人T細胞白血病	313例
くすぶり型	74例
慢性型	60例
リンパ腫型	27例
急性型	152例
合計	383例

検討事項

ATL細胞は、CD3⁺CD4⁺CD25⁺CCR4⁺(基本抗原)CD7⁻CD26⁻HLA-DR⁺CD30⁻CD38⁻を示すが、HTLV-1 carrier, ATL病型により各抗原発現プロファイルが異なる。

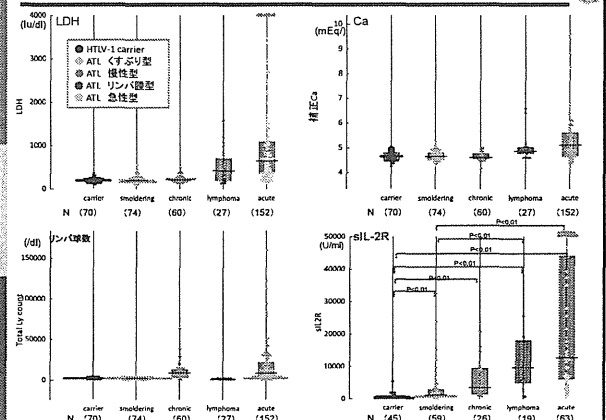
● 解析症例の再評価

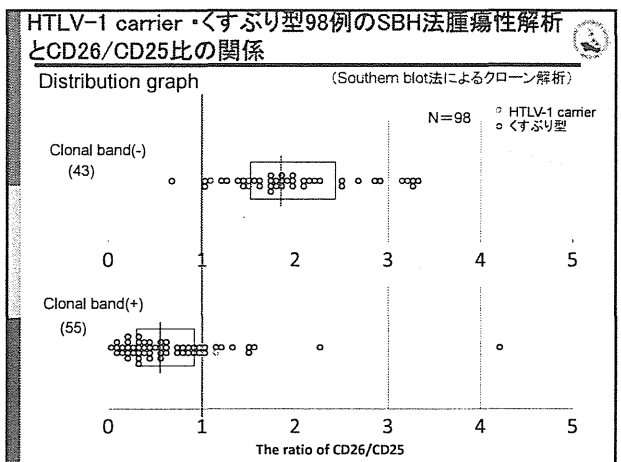
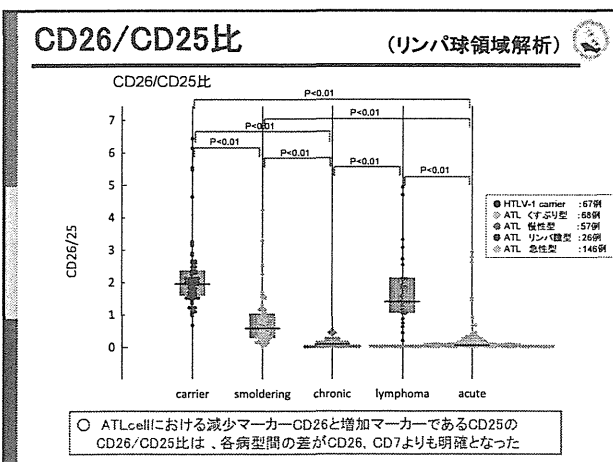
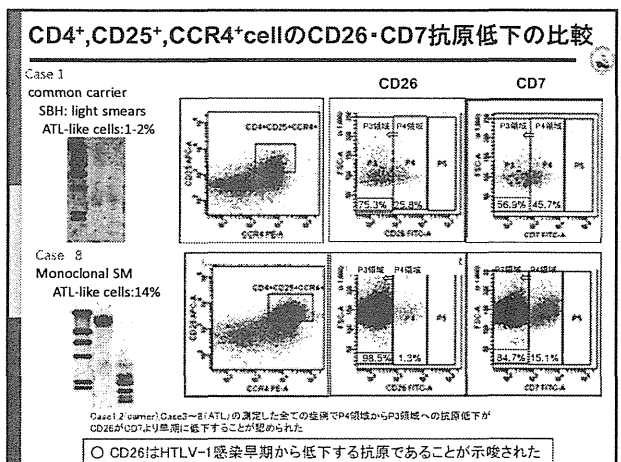
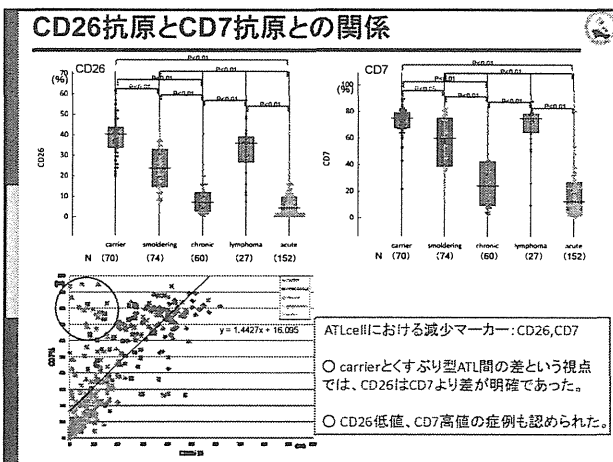
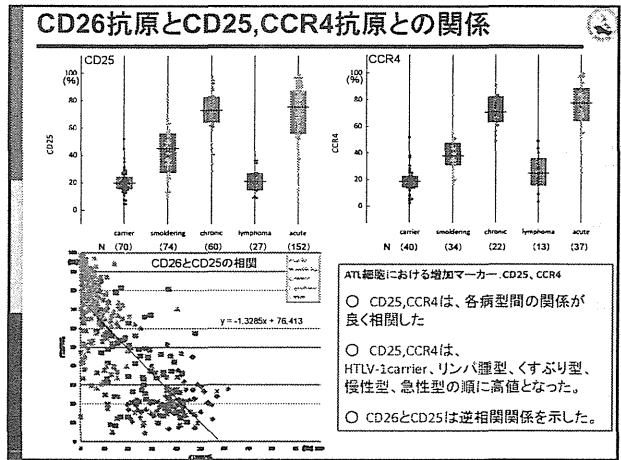
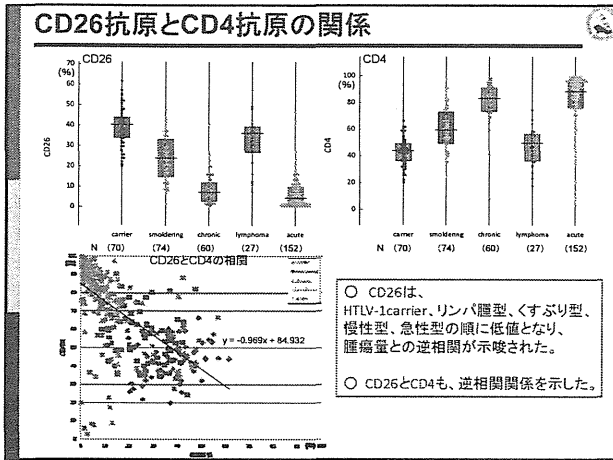
認定血液検査技師による異常リンパ球数の再検証、HTLV-1 carrier、ATL病型(急性型、慢性型、リンパ腫型、くすぶり型)の再検証。分類症例のLDH、Ca、sIL-2R値の検証。

● CD26抗原と各種抗原(CD4, CD25, CCR4, CD7)との関係

CD25, CCR4: ATL cell における増加マーカー
CD26, CD7: ATL cell における減少マーカー

解析症例再評価の結果



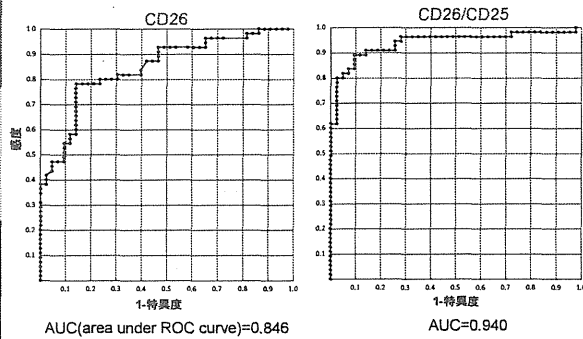


HTLV-1SBH(+)⁵⁵例 CD26,CD26/CD25比のROC解析

ROC Analysis

N=55

(Southern blot法によるクローン解析)



結語

CD26/CD25比は、臨床上問題となりうるHTLV-1 carrier、くすぶり型ATLの鑑別に有用で、簡便にHTLV-1 clonalityを判断できるサロゲートマーカーとなりうる。

CD26は感染早期から減少しはじめ、減少の程度は病態の進行をよく反映するが、この現象の意義を解析する必要がある。

題名 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

研究分担者 望月 學 東京医科歯科大学 眼科学 教授
研究協力者 鴨居功樹 東京医科歯科大学 眼科学 助教
寺田裕紀子 宮田眼科病院

研究要旨：ヒトTリンパ向性ウイルス1型（HTLV-1）は成人T細胞白血病（ATL）、HTLV-1関連脊髄症（HAM）、HTLV-1ぶどう膜炎（HU）の原因ウイルスである。本研究のテーマである“HTLV-1感染症の診断法の標準化と発症リスク解明に関する研究”のうち、本分担では、HU患者における全身疾患の発症リスクの解明に焦点を当てて研究を進める。現在までにHU患者が時間経過を経てATLを発症するリスクについては十分な調査が行われていない。HTLV-1に感染することにより炎症惹起能を得て眼内浸潤した細胞が時間経過とともに腫瘍化する期間や要因を、臨床的な追跡調査によって解明をする。

A. 研究目的

HTLV-1感染症の診断法の標準化と発症リスク解明に関する研究における我々の分担での研究目的は、HTLV-1陽性のぶどう膜炎はATL発症のリスクになるか、追跡調査を行う。他の全身合併症についても調査を行う。

B. 研究方法

宮田眼科病院ぶどう膜炎外来を受診中、あるいは過去に受診していたが通院の途絶えた患者についてその経過中にATLを発症したかどうかを追跡調査した。またHU発症前後でATL以外にも全身疾患が起きたかを、調査する。

（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。実施計画については、宮田眼科病院倫理審査委員会に附議され、承認を得ている

C. 研究結果

現在通院中の62例、通院が途絶えたHU患者のうち14例は追跡が可能であり、合計76例の調査が可能であった。追跡調査の期間は最長で24年、最短で6ヶ月であった。追跡中にATLが発症した症例は1例のみ（35歳女性）で、ATLの分類としてはくすり型であった。この症例は、ステロイド治療による反応性が他のHU患者と比較して鈍く、硝子体に軽度の浸潤細胞が残存するという特徴があった。

次に全身疾患の調査をしたところ、HAM、甲状腺機能亢進症が認められた。両疾患ともに、HU発症前に出現するという特徴があった。また、シェーグレン症候群と診断されている症例は1例のみであったが、ドライアイ自覚症状・他覚所見のあるものが散見された。関節リウマチ、間質性肺炎と診断されている症例はそれぞれ3例、1例であった。

D. 考察

HUはHTLV-1感染によって起きる代表的な炎症性疾患である。これまでの研究から、HUはHTLV-1感染・非腫瘍化細胞の眼内浸潤のより引き起こされていることが明らかになっている。しかしながら、炎症を引き起こすHTLV-1感染細胞が、腫瘍細胞になる

機序は明らかになっていない。今回の結果では、期間の長短はあるものの、HU患者がその後の追跡調査でATLになった患者は76例中1例のみで、非常に頻度が少ないことが分かった。今回の結果を考察すると、眼に炎症を引き起こすHTLV-1感染T細胞は、その後の時間経過を経ても腫瘍化T細胞（ATL細胞）になりにくいことが示唆された。これは基礎的な研究にフィードバックした際に重要な臨床研究になると考えられる。全身疾患の合併に関しては今後発症機序の検討が必要と考えている。

E. 結論

HU患者が将来的にATLを発症するリスクは少ないことがわかった。今後基礎研究と合わせてHU患者におけるHTLV-1感染細胞が腫瘍化しにくいメカニズムを解明していく必要があると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

Mochizuki M, Sugita S, Kamoi K. Immunological homeostasis of the eye. Prog Retin Eye Res. 2012; in press.

Kamoi K, Mochizuki M. HTLV-infection and the eye. Curr Opin Ophthalmol. 2012;23:557-561.

Kamoi K, Mochizuki M. HTLV-1 uveitis Front in Microbiol. 2012;3:270.

学会発表

なし

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

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
山野嘉久	HAM (HTLV-1関連脊髄症)	大生 定義	すべての内科医が知っておきたい神経疾患の診かた、考え方とその対応	羊土社	東京	2013	279-81

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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 Uchimaru K	The CD3 versus CD7 plot in multicolor flow cytometry reflects progression of disease stage in patients infected with HTLV-I.	PLoS One	8(1)		2013
Mochizuki M Sugita S Kamoi K	Immunological homeostasis of the eye.	Prog Retin Eye Res	33	10-27	2013
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 Epi demiol	36(6)	560-5	2012
Kamoi K Mochizuki M	HTLV infection and the eye.	Curr Opin Ophthalmol	23	557-61	2012
Kamoi K Mochizuki M	HTLV-1 uveitis.	Front Microbiol	3(270)		2012