

<p>Kita J, Tamai M, Arima K, Nakashima Y, Suzuki T, Kawashiri SY, Okada A, Koga T, Yamasaki S, Nakamura H, Origuchi T, Aramaki T, Nakashima M, Fujikawa K, Tsukada T, Ida H, Aoyagi K, Uetani M, Eguchi K, Kawakami A</p>	<p>Delayed treatment with tumor necrosis factor inhibitors in incomplete responders to synthetic disease-modifying anti-rheumatic drugs shows an excellent effect in patients with very early rheumatoid arthritis with poor prognosis factors.</p>	<p>Mod Rheumatol</p>	<p>22(2)</p>	<p>195-201</p>	<p>2012</p>
<p>Ichinose K, Origuchi T, Kawashiri SY, Iwamoto N, Fujikawa K, Aramaki T, Kamachi M, Arima K, Tamai M, Nakamura H, Ida H, Kawakami A, Eguchi K</p>	<p>Long-term follow-up of adalimumab monotherapy for rheumatoid arthritis in Japanese patients: a report of six cases.</p>	<p>Rheumatol Int</p>	<p>32(2)</p>	<p>483-7</p>	<p>2012</p>
<p>Awazawa R, Yamamoto Y, Mine Y, Nakamura I, Kishimoto K, Kinjyo F, Hagiwara K, Fujita J, Uezato H, Takahashi K</p>	<p>Systemic lupus erythematosus complicated with protein-losing enteropathy: a case report and review of the published works.</p>	<p>J Dermatol</p>	<p>39(5)</p>	<p>454-61</p>	<p>2012</p>

屋良さとみ, 山里代利子, 熱海恵理子, 玉寄真紀, 藤田次郎	気道感染症 HTLV-1 関連気 管支病変	日本胸部臨床	71	S132- S138	2012
平田哲生, 藤田次郎	糞線虫過剰感染症候群	内科	109(6)	1437- 1438	2012
天野正宏, 瀬戸山充	皮膚リンパ腫と鑑別すべ き疾患、偽リンパ腫を中心 に	日本皮膚科学会 雑誌	122(13)	3165- 3168	2012
Mochizuki M, Sugita S, Kamoi K	Immunological homeo- stasis of the eye.	Prog Retin Eye Res	33	10-27	2013
Kamoi K, Mo- chizuki M	HTLV-1 uveitis.	Front Microbiol	3	270	2012
Kamoi K, Mo- chizuki M	HTLV infection and the eye.	Curr Opin Ophthalmol	23(6)	557-561	2012
Ohguro N, Sonoda K, Takeuchi M, Matsumura M, Mochizuki M	The 2009 prospective multi-center epidemio- logic survey of uveitis in Japan.	Jpn J Ophthalmol	56(5)	432-435	2012

IV. 研究成果の刊行物・別刷（抜粋）

Proviral loads of human T-lymphotropic virus Type 1 in asymptomatic carriers with different infection routes

Shiro Ueno¹, Kazumi Umeki¹, Ichiro Takajo¹, Yasuhiro Nagatomo¹, Norio Kusumoto¹, Kunihiko Umekita¹, Kazuhiro Morishita² and Akihiko Okayama¹

¹ Department of Rheumatology, Infectious Diseases and Laboratory Medicine, Faculty of Medicine, University of Miyazaki, Miyazaki, Japan

² Division of Tumor and Cellular Biochemistry, Department of Medical Sciences, University of Miyazaki, Miyazaki, Japan

High human T-lymphotropic virus Type 1 (HTLV-1) proviral DNA load (PVL) has been reported to be one risk factor for the development of adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL). ATL is also believed to develop in HTLV-1 carriers who acquire infection perinatally. ATL cells have been reported to frequently harbor defective provirus. In our study, PVLs for three different regions of HTLV-1 provirus (5'LTR-*gag*, *gag* and *pX*) were measured in 309 asymptomatic carriers with different infection routes. PVLs for the *pX* region in 21 asymptomatic carriers with maternal infection was significantly higher than in 24 carriers with spousal infection. Among 161 carriers with relatively high *pX* PVLs (equal to or greater than 1 copy per 100 peripheral blood mononuclear cells), 26 carriers (16%) had low *gag* PVL/*pX* PVL (less than 0.5) and four (2%) had low 5'LTR-*gag* PVL/*pX* PVL (less than 0.5). Low *gag* PVL/*pX* PVL ratio, which reflects deficiency and/or polymorphism of HTLV-1 proviral DNA sequences for the *gag* region, was also associated with maternal infection. These data suggest that HTLV-1 carriers with maternal infection tend to have high PVLs, which may be related to provirus with deficiency and/or the polymorphism of proviral DNA sequences. In addition, there is a possibility that this ratio may be used as a tool to differentiate the infection routes of asymptomatic HTLV-1 carriers, which supports the need for a large scale study.

Human T-lymphotropic virus Type 1 (HTLV-1) is the causative agent of adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL) and a progressive neurological disease known as HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP).¹⁻⁴ Major routes of HTLV-1 infection have been reported as mother to child infection at infancy, sexual contact between spouses and blood transfusion.⁵⁻⁷ The majority of HTLV-1 carriers are asymptomatic, and only a fraction of carriers develop ATL after a long latent period.^{8,9} It has been reported that approximately 4% of HTLV-1 carriers develop ATL eventually.¹⁰ Studies of the mothers of patients with

ATL have reported most of them to be HTLV-1 carriers.^{11,12} Therefore, ATL is believed to develop in HTLV-1 carriers who acquire infection perinatally. However, there has been no method of identifying the infection route of HTLV-1 positive individuals without information on family HTLV-1 status.

When an individual is infected by HTLV-1, the virus randomly integrates into the genome of affected T-cells in the form of provirus.¹³ HTLV-1 infection drives the proliferation of T-cells, leading to the clonal expansion of HTLV-1 infected cells.¹⁴⁻¹⁶ Recently, it was reported that HTLV-1 clonal expansion *in vivo* is favored by orientation of the provirus in the same sense as the nearest host gene.¹⁷ We have reported that the clonality of HTLV-1 infected cells in adult seroconverters who were newly infected from HTLV-1 carrier spouses is more heterogeneous and less stable than that of long-term carriers who acquired infection from their mothers at infancy.¹⁸ The selective maintenance of certain clones is supposed in the latter. Recently, we reported that clonal expansion of HTLV-1 infected cells was found in a certain population of asymptomatic carriers and that these carriers had high proviral DNA loads (PVLs).¹⁹ High PVLs have been reported to be a risk factor for developing ATL.^{20,21} In another study, we analyzed the PVLs of 13 pairs of HTLV-1 seroconverters and their spouses.²² Although seroconverters and their spouses shared the same HTLV-1, PVLs in both individuals in a couple were not always equivalent. These findings suggested that host-related factors play an important role to determining the PVL in each carrier. However, it was

Key words: HTLV-1, defective virus, infection route, proviral DNA loads

Abbreviations: ATL: adult T-cell leukemia/lymphoma; HTLV-1: human T-lymphotropic virus type 1, LTR: long-terminal repeat, PBMCs: peripheral blood mononuclear cells, PCR: polymerase chain reaction; PVLs: proviral DNA loads

Grant sponsors: Ministry of Education, Science, Sports and Culture, Japan, Miyazaki Prefecture Collaboration of Regional Entities for the Advancement of Technological Excellence, JST

DOI: 10.1002/ijc.26289

History: Received 22 Feb 2011; Accepted 16 Jun 2011; Online 21 Jul 2011

Correspondence to: Akihiko Okayama, Department of Rheumatology, Infectious Diseases and Laboratory Medicine, Faculty of Medicine, University of Miyazaki, 5200 Kihara, Kiyotake, Miyazaki 889-1692, Japan, Tel.: 81-985-85-7284
Fax: 81-985-85-4709, E-mail: okayama@med.miyazaki-u.ac.jp

not clear in that study whether HTLV-1 carriers who acquired infection from their mothers at infancy have more PVLs than the carriers who acquired infection from their spouses in adulthood.

Defective provirus has frequently been detectable in patients with ATL.^{23–27} The complete HTLV-1 provirus is approximately 9 kb and contains the coding regions for core protein (*gag*), protease (*pro*), polymerase (*pol*), envelope protein (*env*), regulatory proteins, such as Tax and Rex, and some accessory molecules between 5' and 3' long-terminal repeats (LTRs).^{8,28} Tamiya *et al.*²³ reported two types of genome deletion in defective provirus. One form retains both LTRs and lacks internal sequences, such as the *gag* and *pol* regions. The other form has the 3' LTR, and the 5' LTR and its flanking internal sequences are preferentially deleted. HTLV-1 infected cells harboring the latter defective virus were frequently found in patients with ATL.²⁶ Both types of defective provirus were suspected of being harbored by the clonally expanded HTLV-1 infected cells in asymptomatic carriers.¹⁹ The polymorphism of the proviral genome was also found in asymptomatic carriers in that study; however, we could not show how commonly the deficiency or polymorphism of the proviral genome was detectable.

These questions prompted us to investigate HTLV-1 PVLs in asymptomatic carriers with different infection routes. In addition, to clarify whether the defective provirus and/or polymorphism of the proviral genome affected PVLs, we tested PVLs for three different regions (5'LTR-*gag*, *gag* and *pX*) of provirus in each individual and compared them among the carriers with different infection routes in our study.

Material and Methods

Samples

Samples of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained from 309 HTLV-1 carriers (103 men and 206 women, median age: 67 years), who had no symptoms or laboratory data suggesting HTLV-1 related disease, in the Miyazaki Cohort Study.²⁹ Infection routes were investigated by family HTLV-1 status and history of HTLV-1 seroconversion.^{18,22} An HTLV-1 carrier with HTLV-1 positive mother/HTLV-1 negative spouse or with HTLV-1 positive siblings/HTLV-1 negative spouse or with HTLV-1 seroconverter was defined as infected by his/her mother. An HTLV-1 carrier who was a HTLV-1 seroconverter with HTLV-1 positive spouse or with HTLV-1 negative mother/HTLV-1 positive spouse was defined as infected by his/her spouse. Carriers with history of blood transfusion were excluded from the analysis of family status. As a result, 21 and 24 carriers were defined as infected by their mothers and by their spouses, respectively. Infection routes could not be determined in 264 carriers. Informed consent was obtained from the study par-

ticipants and the study protocol was approved by the institutional review board at University of Miyazaki.

Real-time polymerase chain reaction

PVLs for three different proviral regions (5'LTR-*gag*, *gag* and *pX*) were determined by real-time polymerase chain reaction (PCR) using Light Cycler 2.0 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Genomic DNA was isolated from PBMCs of asymptomatic HTLV-1 carriers by sodium dodecyl sulfate-proteinase K digestion, followed by phenol-chloroform extraction and ethanol precipitation. Approximately 100 ng genomic DNA was used as the template. The nucleotide position number of HTLV-1 provirus was according to Seiki *et al.*³⁰ (accession no. J02029). The primers and probes for real-time PCR were designed to minimize the differences of the melting points 5'LTR-*gag*, *gag* and *pX* and were as follows: 5'LTR-*gag*: the forward primer (5'LTR-SDS-F 5'-AAGTACCGGC-GACTCCGTTG-3': positions 700–719), the reverse primer (HTLV-*gag*-LTR-R2 5'-GGCTAGCGCTACGGGAAAAG-3': positions 854–835) and the FAM-labeled probe (5'-FAM-CGTCCGGGATACGAGCGCCCTT-TAMRA-3': positions 788–810); *gag*: the forward primer (HTLV-*gag*-F5 5'-ACCCTTCCTGGGCTCTATC-3': positions 1,602–1,621), the reverse primer (HTLV-*gag*-R5 5'-TCTGGCAGCCCATTGT-CAAG-3': positions 1,695–1,676) and the FAM-labeled probe (HTLV-*gag*-P5 5'-FAM-ACCACGCCTTCGTAGAACGCCT-CAAC-TAMRA-3': positions 1,644–1,669); *pX*: the forward primer (HTLV-*pX*-S 5'-CGGATACCCAGTCTACGTGTT-3': positions 7,359–7,379), the reverse primer (HTLV-*pX*-AS 5'-CAGTAGGGCGTGACGATGTA-3': positions 7,458–7,439) and the FAM-labeled probe (HTLV-*pX*-Probe 5'-FAM-CTGTGTACAAGGCGACTGGTGCC-TAMRA-3': positions 7,386–7,408).^{18,26} A coding region for albumin (*Alb*) was used to measure the copy number of human genome. The primers and the probe for the *Alb* were as follows: The forward primer (*Alb*-S2 5'-TGTCATCTCTTGTGGGCTGT-3'), the reverse primer (*Alb*-AS2 5'-GGTTCTCTTCACTGACATCTGC-3') and the FAM-labeled probe (*Alb*-probe 5'-FAM-CCTGTTCATGCCCACACAAATCTCTCC-TAMRA-3'). A plasmid containing PCR products for HTLV-1 5'LTR-*gag*, *gag*, *pX* regions and *Alb* was constructed using pGEM T-Easy Vector (Promega Corporation, Madison, WI) and was used as a control template for real-time PCR. PVLs of each region of HTLV-1 provirus were measured in a duplicate manner and were shown as copies per 100 PBMCs.

Detection of provirus with deletion of HTLV-1 internal sequence by long PCR

To detect the provirus with large deletion of HTLV-1 internal sequence, long PCR, which amplifies provirus maintaining both 5' and 3' LTR, was performed as described previously.¹⁹ The primers were as follows: 5'LTR (HTLV-0647F 5'-GTTCCACCCCTTCCCTTTCATTACGACTGACTGC-3': positions 647–682) and 3'LTR (HTLV-8345R 5'-GGCTCTAAGCCCCCGGGGATATTTGGGGCTCATGG-3': positions

8,345–8,310).²⁶ Long PCR was performed using LA Taq Hot start version (Takara Bio, Shiga, Japan). Genomic DNA containing 200 copies of HTLV-1 provirus for the *pX* region was used for this assay. To ensure that the same amount of provirus was used in each reaction, PCR for the *pX* region was performed as an internal control. Primers for this PCR were as follows: the forward primer (HTLV-7396F 5'-GGCGACTGGTGCCCATCTCTGGGGGACTATGTTTCG-3'; positions 7,396–7,431) and the reverse primer described above (HTLV-8345R). The PCR products were electrophoresed on 0.8% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining.

Detection of provirus with deletion of 5'LTR and its flanking internal sequence by inverse long PCR

As described in results, both *gag* PVL/*pX* PVL ratio and 5'LTR-*gag* PVL/*pX* PVL ratio were low at less than 0.5 in two carriers (C20 and 21) and they were suspected of having provirus with deletion of 5'LTR and its flanking internal sequence. Inverse long PCR (IL-PCR) was used to amplify the genomic DNA adjacent to the 3'LTR of HTLV-1 provirus according to the method described previously with slight modifications.¹⁵ In brief, the genomic DNA was digested with *Kpn* I, *Hind* III, *Sal* I or *Spe* I, and then self-ligated by T4 ligase following digestion with *Mlu* I. Amplification of the resultant DNA was performed using the LA Taq Hot start version. The primers used in this analysis were as follows; a forward primer in the U5 region of the LTR (5'-TGCCTGACCCTGCTTGCTCAACTCTACGTCTTTG-3'; positions 8,856–8,889) and a reverse primer, HTLV-7002R (5'-AGTATTTGAAAAGGAAGGAAGAGGAGAAGGCA-3'; positions 7,002–6,971). Subcloning of the amplified fragments of IL-PCR were subjected to sequencing assay according to the protocol of the Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) using ABI Prism 310 DNA Sequencer (Applied Biosystems) and the human genomic sequence downstream of the HTLV-1 provirus was obtained. The human genomic sequence upstream of the provirus was assumed based on this information by BLAT search (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>).³¹ The primers for human genomic sequence upstream of the provirus were designed and long PCR was performed using a forward primer (5'-GTGATC-CATGGTGTGTTGTCCACCTGAAAGC-3') and a reverse primer HTLV-7002R in C20, and a forward primer (5'-TCCAAGTGGGATGTCACGGCCACTTCTC-3') and a reverse primer HTLV-7002R in C21. To determine the upstream junction sequence between host genome and provirus, the PCR products were subjected to direct sequencing using the Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit.

Statistical Analysis

Mann-Whitney's U test was used to compare *pX* PVLs, *gag* PVL/*pX* PVL or 5'LTR-*gag*/*pX* PVL ratios among the groups of asymptomatic HTLV-1 carriers with different infection routes. Spearman's correlation coefficient by rank was used

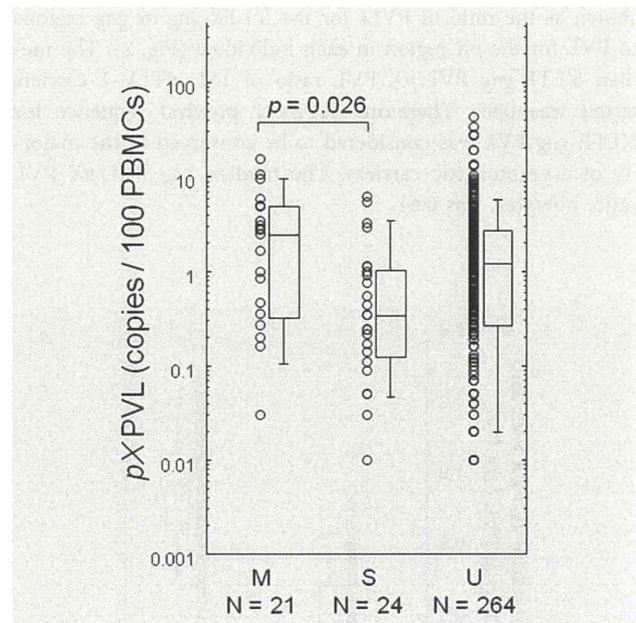


Figure 1. *pX* PVLs in HTLV-1 carriers with different infection routes M: Carriers with infection from mothers; S: Carriers with infection from spouses; U: Carriers with undetermined infection routes.

to determine the relationship between *pX* PVL and *gag* PVL/*pX* PVL or 5'LTR-*gag* PVL/*pX* PVL ratio.

Results

pX PVLs in HTLV-1 carriers with different infectious routes

PVLs for the 5'LTR-*gag*, *gag* and *pX* regions in each individual were measured in 309 asymptomatic HTLV-1 carriers. Because the *pX* region has been reported to be conserved in the HTLV-1 provirus, *pX* PVL was considered to represent total PVLs.^{23,25} As shown in Figure 1, median *pX* PVL (2.49 copies/100 PBMCs) in 21 asymptomatic carriers, who were infected by their mothers, was significantly higher than that (0.34 copies/100 PBMCs) in 24 carriers who were infected by their spouses ($p = 0.026$). Median *pX* PVL in 264 asymptomatic carriers, whose infection routes were undetermined, was between these values (1.24 copies/100 PBMCs).

PVLs for 3 different proviral regions (5'LTR-*gag*, *gag* and *pX*) of HTLV-1

To determine whether PVLs for three different proviral regions (5'LTR-*gag*, *gag* and *pX*) of HTLV-1 were equal in asymptomatic carriers, PVLs for the 5'LTR-*gag* and *gag* regions were measured and compared to PVLs for the *pX* region. Because 100 ng of genomic DNA, which is derived approximately 15,000 PBMCs, was used for the template for real time-PCR, 148 carriers with *pX* PVL, which was less than 1 copy/100 PBMCs, were not provided for further analysis to avoid unstable result due to the small number of proviral copies in each reaction. The results of our study were

shown as the ratio of PVLs for the 5'LTR-gag or gag regions to PVL for the pX region in each individual (Fig. 2). The median 5'LTR-gag PVL/pX PVL ratio of 161 HTLV-1 carriers tested was 0.97. Therefore, HTLV-1 proviral sequence for 5'LTR-gag PVL was considered to be conserved in the majority of asymptomatic carriers. The median gag PVL/pX PVL ratio, however, was 0.61.

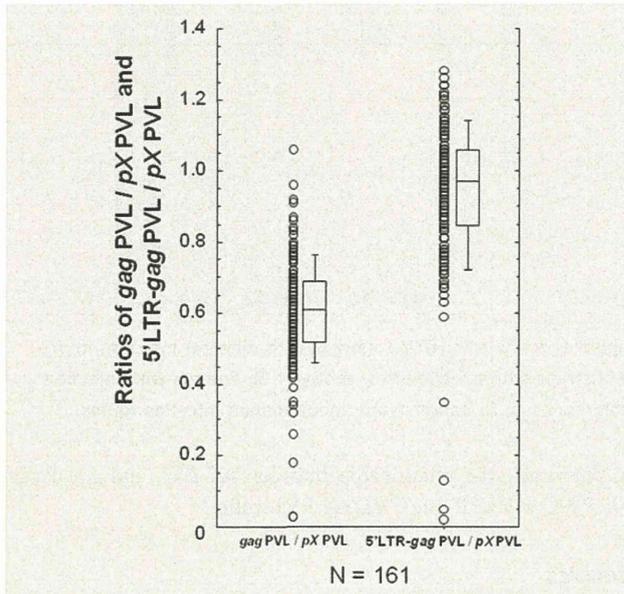


Figure 2. The ratios of PVLs for the 5'LTR-gag or gag regions to PVL for the pX region in 161 asymptomatic HTLV-1 carriers, whose pX PVLs were equal to or greater than 1 copy/100 PBMCs.

Detection of provirus with deletion of HTLV-1 internal sequence by long PCR

To determine whether the provirus with deletion of HTLV-1 internal sequence accounted for low gag PVL/pX PVL ratio, long PCR was performed. For this analysis, we chose 26 carriers with low gag PVL/pX PVL ratios of less than 0.5; however, adequate DNA sample for long PCR was available in only 17 of the 26 subjects. All subjects except C1 showed a band of 7.7 kb, which was considered to be derived from complete provirus, and some additional smaller bands suggesting defective provirus (Fig. 3a). C1 showed only a dense band of 4.5 kb. C1 was analyzed in our previous study and a large deficiency (3.2 kb, positions 1,203–4,368) of internal sequence was shown.¹⁹ Additional four carriers (C3, 4, 11 and 13) showed dense bands equal to or stronger than the band for complete provirus (arrows in Fig. 3a). Cloning and DNA sequencing of these dense bands showed large deficiencies of internal sequences (4.9 kb, positions 1,368–6,286 in C3; 0.9 kb, positions 1,413–2,284 in C4; 4.8 kb, positions 1,009–5,763 in C11 and 4.8 kb, positions 1,133–5,974 in C13).

Four carriers (C18–21) had low 5'LTR-gag PVL/pX PVL ratios of less than 0.5. Long PCR of C18 and 19 showed dense bands of 7.7 kb, which were considered to be derived from complete provirus, and some additional smaller bands (Fig. 3b). Polymorphism of proviral DNA sequence of the sites for primers and/or probe for 5'LTR-gag PVL was suspected in these two cases, and cloning and DNA sequencing of the PCR products were performed. The polymorphisms of DNA sequence for the annealing site of the forward primer (708 G > A and 709 C > G in C18; 712 C > T in C19) were consistently found, and these polymorphisms were

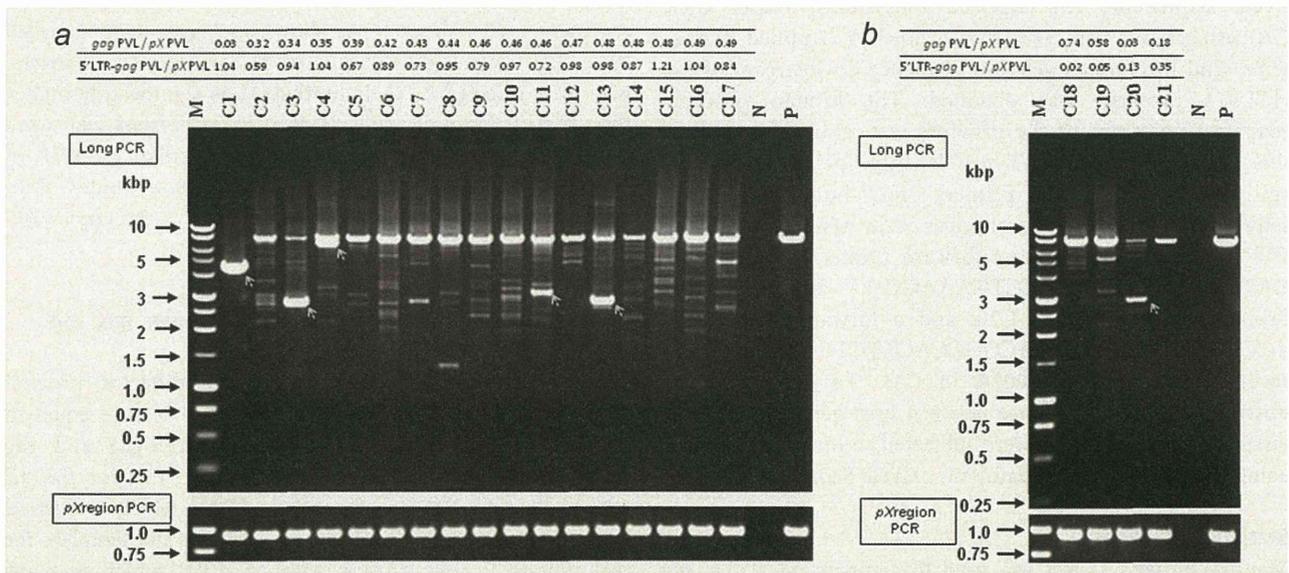


Figure 3. Detection of defective provirus by long PCR. (a) Asymptomatic HTLV-1 carriers with low gag PVL/pX PVL ratios less than 0.5. (b) Asymptomatic HTLV-1 carriers with low 5'LTR-gag PVL/pX PVL ratios less than 0.5. Arrows indicate PCR products for HTLV-1 provirus lacking large internal sequence. M: Molecular weight marker; N: HTLV-1-negative subject; P: HTLV-1-positive cell line, ED-40515(-).

considered to account for the decreased efficacy of real time-PCR for 5'LTR-gag PVL.

Detection of provirus with deletion of 5'LTR and its flanking internal sequence by IL-PCR

Both gag PVL/pX PVL ratio and 5'LTR-gag PVL/pX PVL ratio were low at less than 0.5 in the additional two carriers (C20 and 21). Long PCR showed a weak band of 7.7 kb for complete provirus and a stronger band of 2.9 kb in C20 (Fig. 3b). In the

case of C21, only a weak band for complete band was observed (Fig 3b). These data suggested defective provirus, which had not been detected by long PCR, existed in C20 and C21. Because these proviruses were suspected of lacking 5'LTR and its flanking internal sequence, we attempted to identify them by IL-PCR. First, the genomic DNA of C20 and C21 were digested with *Kpn* I, *Hind* III, *Sal* I or *Spe* I, and resultant DNA was provided for IL-PCR as a template. In C20, approximately 1.1 kb of PCR product was obtained in digestion with *Kpn* I alone (Fig. 4a-1). No IL-PCR product was obtained using other restriction enzymes (data not shown). When this PCR product was digested with *Kpn* I, two major bands appeared, as expected (Fig. 4a-1). Cloning and sequencing revealed that this product consisted of HTLV-1 provirus (*Kpn* I site at position: 6,141 to the end of 3'LTR) and its flanking genomic DNA of human chromosome 2 (2q13). Based on the information obtained, a forward primer to anneal the upstream human genome adjunct to the provirus was prepared and clone-specific PCR was performed. Cloning and sequencing of this clone-specific PCR product revealed that it lacked 5'LTR and its internal flanking sequence (until position 5,999; Fig. 4a-2). In the case of C21, IL-PCR product was obtained in digestion with *Hind* III alone. Following the same procedure as in C20, it was revealed that a provirus integrated in human chromosome 18 (18p11.32), and that it lacked 5'LTR and its internal flanking sequence (until position 4,976) (Figs. 4b-1 and 4b-2).

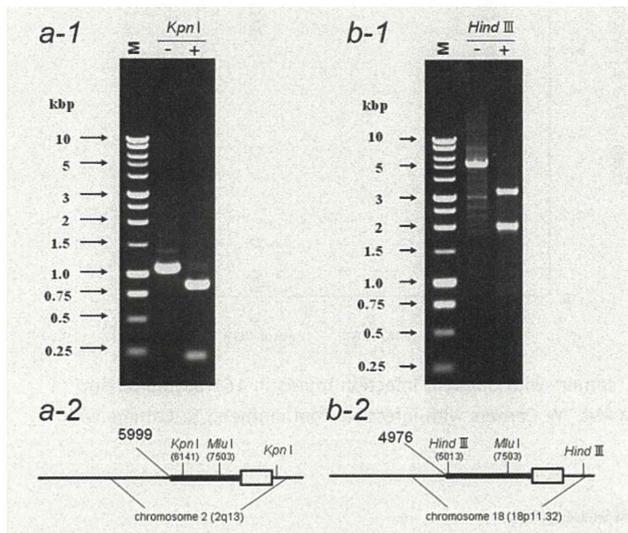


Figure 4. Detection of provirus with deletion of 5'LTR and its internal flanking sequence by IL-PCR. (a-1) Long PCR products from an asymptomatic HTLV-1 carrier, C20, with or without *Kpn* I digestion. (a-2) Scheme of the structure of defective provirus in C20. (b-1) Long PCR products from an asymptomatic HTLV-1 carrier, C21, with or without *Hind* III digestion. (b-2) Scheme of the structure of defective provirus in C21.

Relationship between pX PVL and gag PVL/pX PVL or 5'LTR-gag/pX PVL ratios

To determine whether the HTLV-1 PVLs correlated with the number of provirus with deficiency and/or polymorphism of the gag or 5'LTR-gag regions, the relationship between pX PVL and gag PVL/pX PVL or 5'LTR-gag/pX PVL ratios was analyzed. As shown in Figure 5a, there was a negative

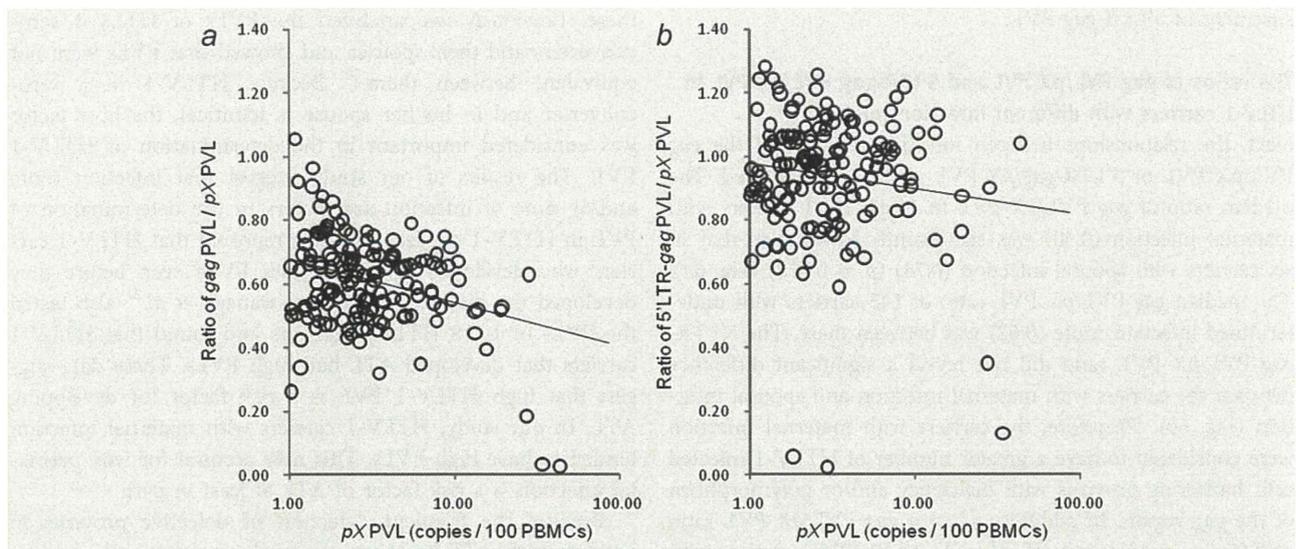


Figure 5. Relations of pX PVL and gag PVL/pX PVL or 5'LTR-gag PVL/pX PVL ratios in 161 asymptomatic carriers. (a) Relation of pX PVL and gag PVL/pX PVL. (b) Relation of pX PVL and 5'LTR-gag PVL/pX PVL.

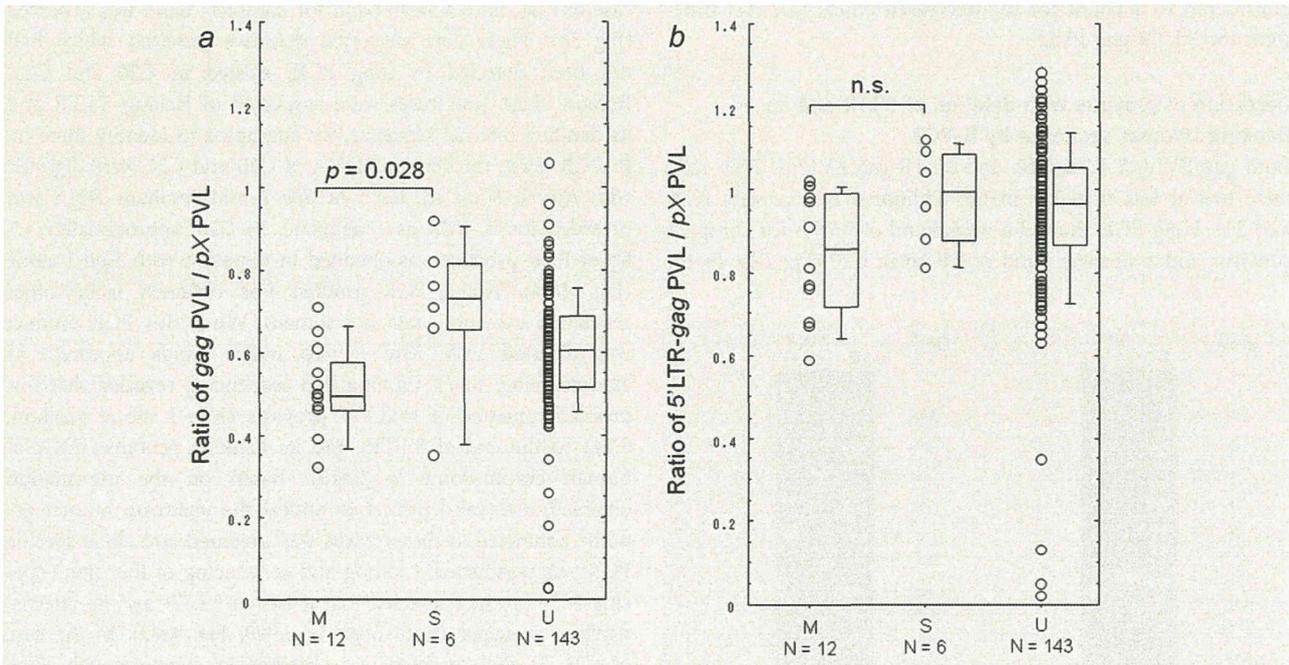


Figure 6. The ratios of *gag* PVL/*pX* PVL or 5'LTR-*gag* PVL/*pX* PVL in HTLV-1 carriers with different infection routes in 161 asymptomatic carriers. (a) The ratio of *gag* PVL/*pX* PVL. (b) The ratio of 5'LTR-*gag* PVL/*pX* PVL. M: Carriers with infection from mothers; S: Carriers with infection from spouses; U: Carriers with undetermined infection routes.

correlation between *pX* PVL and the *gag* PVL/*pX* PVL ratio ($r = -0.46$, $p = 0.02$). Therefore, HTLV-1 infected cells harboring provirus with deficiency and/or polymorphism of the *gag* region were considered to be more prevalent in asymptomatic carriers with high PVL. In the case of 5'LTR-*gag*/*pX* PVL ratio, the trend was not obvious (Fig. 5b) ($r = -0.20$, $p = 0.94$). However, variability of the 5'LTR-*gag*/*pX* PVL ratio was greater than that of *gag* PVL/*pX* PVL ratio. This may have been the result of technical inadequacies in the measurement of 5'LTR-*gag* PVL.

The ratios of *gag* PVL/*pX* PVL and 5'LTR-*gag* PVL/*pX* PVL in HTLV-1 carriers with different infection routes

Next, the relationships between infection routes and the *gag* PVL/*pX* PVL or 5'LTR-*gag*/*pX* PVL ratios were analyzed. The median ratio of *gag* PVL/*pX* PVL in 12 HTLV-1 carriers with maternal infection (0.50) was significantly lower than that in six carriers with spousal infection (0.74) ($p = 0.028$) (Fig. 6a). The median *gag* PVL/*pX* PVL ratio of 143 carriers with undetermined infection route (0.62) was between these. The 5'LTR-*gag* PVL/*pX* PVL ratio did not reveal a significant difference between the carriers with maternal infection and spousal infection (Fig. 6b). Therefore, the carriers with maternal infection were considered to have a greater number of HTLV-1 infected cells harboring provirus with deficiency and/or polymorphism of the *gag* region. In addition, when a *gag* PVL/*pX* PVL ratio of 0.65 was used as cut-off value, 11 of 12 (92%) carriers with maternal infection, against only one of six (17%) carriers with spousal infection, showed lower values.

Discussion

First, HTLV-1 PVLs in asymptomatic carriers with different infection routes were analyzed. *PX* PVL in 21 asymptomatic carriers with maternal infection was significantly higher than that in 24 carriers with spousal infection. These results agreed with data reported by Roucoux *et al.*³² showing that PVLs in index HTLV-1 positive carriers were higher than those of their newly infected partners. Asymptomatic carriers whose infection routes were undetermined showed values between these. Previously, we analyzed the PVLs of HTLV-1 seroconverters and their spouses and showed that PVLs were not equivalent between them.²² Because HTLV-1 in a seroconverter and in his/her spouse is identical, the host factor was considered important in the determination of HTLV-1 PVL. The results of our study suggest that infection route and/or time of infection are factors in the determination of PVL in HTLV-1 carriers. We also reported that HTLV-1 carriers who developed ATL had high PVLs even before they developed the disease.²⁰ Recently, Iwanaga *et al.*²¹ also tested the PVLs of 1,218 HTLV-1 carriers and found that HTLV-1 carriers that developed ATL had high PVLs. These data suggest that high HTLV-1 PVL is a risk factor for developing ATL. In our study, HTLV-1 carriers with maternal infection tended to have high PVLs. This may account for why perinatal infection is a risk factor of ATL at least in part.

Because the frequent detection of defective provirus in patients with ATL has been reported, we examined provirus with deficiencies and/or polymorphism of proviral sequence in asymptomatic HTLV-1 carriers. The *pX* region has been

reported to be conserved in HTLV-1 provirus, and PCR for this region was used to measure total PVL.^{23,25} Ohshima *et al.*²⁵ reported that variation of DNA sequence is frequently detected in the *gag* region of HTLV-1 provirus in patients with ATL. Kamihira *et al.*²⁴ also reported that most of deficient provirus in patients with ATL lacked part of the *gag* region in the proviral regions of HTLV-1 tested. HTLV-1 provirus with deletion of the 5'LTR, and its flanking internal sequences was also found in patients with ATL.²⁶ In our study, therefore, we tried to find provirus with deficiencies and/or polymorphism of DNA sequence in the asymptomatic carriers by measuring PVLs for the *gag* and 5'LTR-*gag* regions as ratios to *pX* region PVLs. As a result, median 5'LTR-*gag* PVL/*pX* PVL and *gag* PVL/*pX* PVL ratios of 161 HTLV-1 carriers with relatively high *pX* PVL (equal to or greater than one copy per 100 PBMCs) were 0.97 and 0.61, respectively. Our interpretation of this result was that many HTLV-1 infected cells in asymptomatic carriers harbor provirus with deficiency and/or polymorphism of DNA sequences for the sites of primers and/or probe for *gag* real time-PCR.

Long PCR analysis was performed on 17 carriers with low *gag* PVL/*pX* PVL ratios. Five of 17 carriers (29%) were shown to have the provirus with large deletions of internal DNA sequence including the *gag* region. The clonal expansion of HTLV-1 infected cells harboring defective provirus in these five carriers was most likely. In fact, clonal expansion of HTLV-1 infected cells in C1 was already shown in our previous study.¹⁹ The reason for the low *gag* PVL/*pX* PVL ratios in the other 12 carriers was not clear. Contribution of the sum total of HTLV-1 infected cells with defective provirus, which did not reveal dense bands, was possible. Alternatively, polymorphism of the proviral DNA sequence for the *gag* region may have decreased the efficiency of real time-PCR for *gag* PVL. However, cloning and DNA sequencing of the sites for primers and probes for real time-PCR for *gag* PVL in these carriers did not show consistent polymorphism of the proviral DNA (data not shown). This may be because there is high diversity of proviral DNA sequence in the *gag* region of HTLV-1 and it was not possible to prepare cloning primers to work for all of them.

The other two (C20 and 21) showed low ratios not only of 5'LTR-*gag* PVL/*pX* PVL but also of *gag* PVL/*pX* PVL. Our previous study showed that they had high PVLs and clonal expansion of HTLV-1 infected cells with defective provirus.¹⁹ We could not identify the type of defective provirus in the previous study. In our study, however, we found provirus lacking 5'LTR and its internal flanking region existed in these carriers.

In our study, the provirus with deficiency and/or polymorphism of the *gag* region was commonly found in asymptomatic HTLV-1 carriers. Few carriers had provirus lacking 5'LTR and its flanking sequence. Carriers with provirus with deficiency and/or polymorphism of the *gag* region were found frequently among asymptomatic carriers with high PVLs. These infected cells may not express certain HTLV-1

proteins. This change may make it possible for the HTLV-1 infected cells to avoid attack by cytotoxic T-lymphocytes.³³ Therefore, there is a possibility that provirus with deficiency and/or polymorphism of HTLV-1 provirus contributes to the survival of HTLV-1 infected cells. Indeed, our previous study showed that C1, 20 and 21 had clonal expansion of HTLV-1 infected cells.¹⁹

Low *gag* PVL/*pX* PVL ratio was found to be associated with maternal infection. The reason carriers with maternal infection have a greater number of HTLV-1 infected cells harboring provirus with deficiency and/or polymorphism of the *gag* region was not clear in our study. The replication of HTLV-1 infected cells in long-term infected carriers may account for this. Alternatively, a low level of new cell to cell infection *in vivo* can contribute to the creation of deficiency and/or polymorphism in proviral genome.

Maternal infection has been considered to be a risk factor for the development of ATL in asymptomatic carriers. However, there has been no method to identify infection route in the absence of information on family HTLV-1 status. The results of our study suggest the possibility that *gag* PVL/*pX* PVL ratio can be used as a tool to differentiate the infection routes of asymptomatic HTLV-1 carriers. Due to the fact that only a small number of HTLV-1 carriers with known infectious routes were analyzed in our study, further study with a larger number of subjects is necessary.

A major limitation of our study is that the subjects were elderly individuals, whose median age was 67 years old. The average age at onset of ATL was reported as 60 years.³⁴ Therefore, it is not clear whether the same result would be obtained from an analysis of younger HTLV-1 asymptomatic carriers. In addition, carriers with low *pX* PVL (less than 1 copy/100 PBMCs) were not provided for the analysis of deficiency and/or polymorphism of HTLV-1 proviral sequence because of technical limitations. Further analysis of carriers with low PVLs using improved methodology is necessary.

In conclusion, our study showed that *pX* PVL in carriers with maternal infection was significantly higher than that in carriers with spousal infection. Low *gag* PVL/*pX* PVL ratio reflecting deficiency and/or polymorphism in proviral genome was associated with high PVLs and maternal infection. These data suggest that development of ATL in carriers with maternal infection may be due in part to high PVL, which can be related to provirus with deficiency and/or polymorphism in proviral genome. In addition, *gag* PVL/*pX* PVL ratio has potential for use as a tool to differentiate infection routes of asymptomatic HTLV-1 carriers. Further study is necessary to clarify the mechanism of deficiency and/or polymorphism in HTLV-1 proviral genome and its implications in ATL development.

Acknowledgements

The authors thank Ms. Y. Kaseda and Ms. N. Kanemaru (Miyazaki University) for their technical assistance and Dr. M. Maeda (Kyoto University) for the gift of the HTLV-1 infected cell line, ED-40515(-).

References

- Uchiyama T, Yodoi J, Sagawa K, Takatsuki K, Uchino H. Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. *Blood* 1977;50:481-92.
- Yoshida M, Miyoshi I, Hinuma Y. Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:2031-5.
- Osame M, Usuku K, Izumo S, Ijichi N, Amitani H, Igata A, Matsumoto M, Tara M. HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet* 1986;1:1031-2.
- 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;2:407-10.
- Hino S, Yamaguchi K, Katamine S, Sugiyama H, Amagasaki T, Kinoshita K, Yoshida Y, Doi H, Tsuji Y, Miyamoto T. Mother-to-child transmission of human T-cell leukemia virus type 1. *Jpn J Cancer Res (Gann)* 1985;76:474-80.
- Kajiyama W, Kashiwagi S, Ikematsu H, Hayashi J, Nomura H, Okochi K. Intrafamilial transmission of adult T cell leukemia virus. *J Infect Dis* 1986;154:851-7.
- Okochi K, Sato H, Hinuma Y. A retrospective study on transmission of adult T cell leukemia virus by blood transfusion: seroconversion in recipients. *Vox Sang* 1984;46:245-53.
- 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;85:319-24.
- Yamaguchi K, Watanabe T. Human T lymphotropic virus type-I and adult T-cell leukemia in Japan. *Int J Hematol* 2002;76(Suppl 2):240-5.
- Murphy EL, Hanchard B, Figueroa JP, Gibbs WN, Lofters WS, Campbell M, Goedert JJ, Blattner WA. Modelling the risk of adult T-cell leukemia/lymphoma in persons infected with human T-lymphotropic virus type I. *Int J Cancer* 1989;43:250-3.
- Bartholomew C, Jack N, Edwards J, Charles W, Corbin D, Cleghorn FR, Blattner WA. HTLV-I serostatus of mothers of patients with adult T-cell leukemia and HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Hum Virol* 1998;1:302-5.
- Wilks R, Hanchard B, Morgan O, Williams E, Cranston B, Smith ML, Rodgers-Johnson P, Manns A. Patterns of HTLV-I infection among family members of patients with adult T-cell leukemia/lymphoma and HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Int J Cancer* 1996;65:272-3.
- Seiki M, Eddy R, Shows TB, Yoshida M. Nonspecific integration of the HTLV provirus genome into adult T-cell leukaemia cells. *Nature* 1984;309:640-2.
- Wattel E, Vartanian JP, Pannetier C, Wain-Hobson S. Clonal expansion of human T-cell leukemia virus type I-infected cells in asymptomatic and symptomatic carriers without malignancy. *J Virol* 1995;69:2863-8.
- Etoh K, Tamiya S, Yamaguchi K, Okayama A, Tsubouchi H, Ideta T, Mueller N, Takatsuki K, Matsuoka M. Persistent clonal proliferation of human T-lymphotropic virus type I-infected cells in vivo. *Cancer Res* 1997;57:4862-7.
- Cavrois M, Leclercq I, Gout O, Gessain A, Wain-Hobson S, Wattel E. Persistent oligoclonal expansion of human T-cell leukemia virus type 1-infected circulating cells in patients with Tropical spastic paraparesis/HTLV-1 associated myelopathy. *Oncogene* 1998;17:77-82.
- Gillet NA, Malani N, Melamed A, Gormley N, Carter R, Bentley D, Berry C, Bushman FD, Taylor GP, Bangham CR. The host genomic environment of the provirus determines the abundance of HTLV-1-infected T cell clones. *Blood* 2011;117:3113-22.
- Tanaka G, Okayama A, Watanabe T, Aizawa S, Stuver S, Mueller N, Hsieh CC, Tsubouchi H. The clonal expansion of human T lymphotropic virus type 1-infected T cells: a comparison between seroconverters and long-term carriers. *J Infect Dis* 2005;191:1140-7.
- Takenouchi H, Umeki K, Sasaki D, Yamamoto I, Nomura H, Takajo I, Ueno S, Umekita K, Kamihira S, Morishita K, Okayama A. Defective human T-lymphotropic virus type 1 provirus in asymptomatic carriers. *Int J Cancer* 2010;128:1335-43.
- Okayama A, Stuver S, Matsuoka M, Ishizaki J, Tanaka G, Kubuki Y, Mueller N, Hsieh CC, Tachibana N, Tsubouchi H. Role of HTLV-1 proviral DNA load and clonality in the development of adult T-cell leukemia/lymphoma in asymptomatic carriers. *Int J Cancer* 2004;110:621-5.
- Iwanaga M, Watanabe T, Utsunomiya A, Okayama A, Uchimar K, Koh KR, Ogata M, Kikuchi H, Sagara Y, Uozumi K, Mochizuki M, Tsukasaki K, et al. Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-1) proviral load and disease progression in asymptomatic HTLV-1 carriers: a nationwide prospective study in Japan. *Blood* 2010;116:1211-9.
- Iga M, Okayama A, Stuver S, Matsuoka M, Mueller N, Aoki M, Mitsuya H, Tachibana N, Tsubouchi H. Genetic evidence of transmission of human T cell lymphotropic virus type 1 between spouses. *J Infect Dis* 2002;185:691-5.
- Tamiya S, Matsuoka M, Etoh K, Watanabe T, Kamihira S, Yamaguchi K, Takatsuki K. Two types of defective human T-lymphotropic virus type I provirus in adult T-cell leukemia. *Blood* 1996;88:3065-73.
- Kamihira S, Sugahara K, Tsuruda K, Minami S, Uemura A, Akamatsu N, Nagai H, Murata K, Hasegawa H, Hirakata Y, Takasaki Y, Tsukasaki K, et al. Proviral status of HTLV-1 integrated into the host genomic DNA of adult T-cell leukemia cells. *Clin Lab Haematol* 2005;27:235-41.
- Ohshima K, Kikuchi M, Masuda Y, Kobari S, Sumiyoshi Y, Eguchi F, Mohtai H, Yoshida T, Takeshita M, Kimura N. Defective provirus form of human T-cell leukemia virus type I in adult T-cell leukemia/lymphoma: clinicopathological features. *Cancer Res* 1991;51:4639-42.
- Miyazaki M, Yasunaga J, Taniguchi Y, Tamiya S, Nakahata T, Matsuoka M. Preferential selection of human T-cell leukemia virus type 1 provirus lacking the 5' long terminal repeat during oncogenesis. *J Virol* 2007;81:5714-23.
- Korber B, Okayama A, Donnelly R, Tachibana N, Essex M. Polymerase chain reaction analysis of defective human T-cell leukemia virus type I proviral genomes in leukemic cells of patients with adult T-cell leukemia. *J Virol* 1991;65:5471-6.
- Yoshida M. Multiple viral strategies of HTLV-1 for dysregulation of cell growth control. *Annu Rev Immunol* 2001;19:475-96.
- Mueller N, Okayama A, Stuver S, Tachibana N. Findings from the Miyazaki

- Cohort Study. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1996;13(Suppl 1): S2–7.
30. Seiki M, Hattori S, Hirayama Y, Yoshida M. Human adult T-cell leukemia virus: complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80: 3618–22.
31. Kent WJ. BLAT—the BLAST-like alignment tool. *Genome Res* 2002;12: 656–64.
32. Roucoux DF, Wang B, Smith D, Nass CC, Smith J, Hutching ST, Newman B, Lee TH, Chafets DM, Murphy EL. A prospective study of sexual transmission of human T lymphotropic virus (HTLV)-I and HTLV-II. *J Infect Dis* 2005;191:1490–7.
33. Kannagi M. Immunologic control of human T-cell leukemia virus type I and adult T-cell leukemia. *Int J Hematol* 2007; 86:113–7.
34. Matsuoka M, Jeang KT. Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. *Nat Rev Cancer* 2007;7:270–80.

特集/ストップ ザ 性感染症

性感染症 - 診断・治療

HTLV-1 感 染

岡 山 昭 彦

I. ヒト T リンパ向性ウイルス
1 型 (HTLV-1)

HTLV-1 は1981年、米国の Gallo, 本邦の日沼らによって発見された C 型レトロウイルスである¹⁾。HTLV-1 によって引き起こされる主な疾患として成人 T 細胞性白血病 (ATL) や HTLV-1 関連脊髄症 (HAM), HTLV-1 関連ぶどう膜炎 (HU) がある¹⁾。感染の主なターゲットは CD4 陽性 T リンパ球であるが, フリーのウイルス粒子による感染効率は極めて低く, 感染細胞と非感染細胞が直接接触することにより新規感染が成立する。このような機会は自然界では母子間, 配偶者間などの男女間等に限定されている。細胞-細胞間接触により HTLV-1 に感染したリンパ球では逆転写酵素により相補的 DNA が形成される。この相補的 DNA はリンパ球のゲノム DNA に組み込まれ, プロウイルスとなる。ヒトからヒトに感染するウイルスであるにもかかわらず, HTLV-1 の感染力が非常に弱いために浸淫地域は限られている。世界における HTLV-1 感染者は約2,000万人という推測がある。主な浸淫地域は日本, カリブ海沿岸諸国, 南米, 南-中央アフリカ, メラネシア, パプアニューギニアなどである。これらのサブグループはおおよそ, そのウイルスキャリアの居住地と一致しており, 民族やヒトの移動といった人類学的背景を反映したものと考えられる。本邦においては1980年代の疫学研究により全国の感染者は120万人と推測され, 九州, 沖縄を中心とした西南日本に高頻度であることが示された。この調査の時点では感染者 (キャリア) 数はその後減少すると予想されていたが, 約20年後の2007年に行われた疫学調査による全

宮崎大学医学部内科学講座免疫感染病態学分野

国の推定キャリア数は108万人であり, 当初予想されたよりもあまり減少していないことが判明した²⁾。さらに地域的な広がりとして西南日本におけるキャリア数は減少傾向であるのに対して, 関東, 中部圏などの都市部においては相対的に増加傾向にあることも示された。

II. 無症候性キャリアと疾患

HTLV-1 の新規感染では, 感染初期に発熱やリンパ節腫脹など HIV 初感染で見られるような症状は報告されておらず, 抗体陽性の無症候性キャリアとなる。抗体陽転直後の末梢血液単核細胞中の感染細胞の割合は (1 個の細胞にプロウイルス 1 コピー感染していると仮定すると) 0.1%以下と少ないものから10%以上まで個体により1,000倍以上の大きな差がある。このような状態の感染者に症状はないが, 末梢血液スミアにおいては異型な核を有するリンパ球がみられることがある。キャリアの95%は生涯無症候性であるが, 一部のキャリアから ATL や HAM, HU 等の発症がみられる。

1. ATL

ATL は高月らによって1977年に報告された疾患であり, HTLV-1 感染 T リンパ球がモノクローナルに増殖し, 腫瘍化したものである。キャリアからの ATL 生涯発症率は約 2~5% と推測されており, ATL 患者のほとんどは母児間感染により乳児期以前に感染し, 通常50年以上の潜伏期間をへて発症するものと推測されている。最近の疫学調査では平均発症年齢は67歳とされている。キャリアが女性に多いのに対して, ATL 患者は男性にやや多い。日本全体で年間約1,000例の患者死亡があるとされている。ATL の主な症状, 所見は, 発熱, 倦怠感, リンパ節腫大, 皮疹, 肝脾腫などであり, 末梢

血液に特徴的な花弁状の核を有する白血病細胞を認める。白血病細胞にはHTLV-1プロウイルスがモノクローナルに組み込まれており、これをサザンブロット法により検出することによって確定診断することができる。主な合併症として高カルシウム血症や日和見感染症がある。ATLは抗がん剤多剤併用化学療法に抵抗性であり、易感染性のためもあるが、予後不良な疾患であるが、骨髄移植の併用やCCR4に対する抗体療法など新たなATLの治療法の開発が進められている。

2. HAM

1986年に納らがHTLV-1キャリアの一部が慢性進行性の痙性脊髄麻痺を示すことを見出し、新しい疾患単位、HAMとして報告した。ほぼ同じところカリブ海沿岸で同様の症状とHTLV-1感染との関連が示され、熱帯性痙性麻痺 tropical spastic paraparesisとして報告されていたため、HAM/TSPと呼ばれることもある。本邦での正確な患者数は把握されていないがキャリア約1,000人にひとり程度存在するとされており、ATLと異なって若い年齢層にも発症する。平均発症年齢は45歳であり、男女比も1:2と女性に多い。HTLV-1の感染経路としては母子間、配偶者間、輸血のどの経路からも発症する。輸血による症例は、血液センターにおけるHTLV-1のスクリーニング開始以降見られなくなった。症状としては、慢性進行性の痙性脊髄麻痺が主体で膀胱直腸障害を伴うことが多い。治療としては、ステロイド剤により臨床症状の改善が認められる症例があり、またインターフェロンも有効であることが判明し保険適応にもなっている。

3. HU

1992年に望月らにより提唱された疾患で本邦における頻度はキャリア1,000人に対して1~2人と報告されている。男女比は1:2と女性に多く、家族内発症の報告がみられる。片眼または両眼のブドウ膜炎で、症状は霧視、飛蚊症、視力低下などである。治療としてはステロイドの局所または全身投与が行われよく奏効するが、半数が再発するといわれている。

4. そのほかの疾患との関連

上記の疾患の他にHTLV-1高浸淫地域において関節炎、膠原病、肺病変、皮膚疾患など

種々の慢性炎症疾患と本ウイルスとの関連が示唆されている。

Ⅲ. HTLV-1 感染症の診断

HTLV-1キャリアは抗体陽性であり陰性化することはないと考えられているため、HTLV-1感染のスクリーニングには抗体が測定される。スクリーニング法としては酵素免疫法や粒子凝集法が一般的に用いられるが、偽陽性があるため、陽性の場合にはウエスタンブロット法あるいは蛍光抗体法など他の方法による確認が必要になる。抗体陽性であればHTLV-1キャリアと診断される。ウイルスそのものの分離同定は日常の臨床検査では行われず、HTLV-1そのものの検出にはウイルス遺伝子の検出をPCR法により行うが、いまだ研究的な検査であり、保険適応になっていない。

Ⅳ. HTLV-1 の感染経路 (表1)

前述したように、ヒトからヒトへのHTLV-1新規感染の成立にはキャリアの感染細胞が非感染者の体内に入り、細胞間接触が起こることが必要である。疫学的にも、感染が基本的には家族内で成立することが強く示唆されている³⁾。

家族内感染が主な感染経路であるため、地域における感染率は隣接する地域、市町村単位であっても大きく異なる。このため周囲との交通の不便な離島や集落単位で陽性率の高い地域がある。このような地域における1980年代の研究では、感染率は年齢が高いほど高く、また特に中年以降において女性が男性よりも高いことが示された(図1)。年齢が高くなるほど感染率が高い理由としては2つ考えられる。ひとつは出生コホート効果とよばれるもので、年齢が高い人たちの陽性率が高いのは、その人々が出生した時代における感染率(おそらく母児感染の頻度)が高かったことを反映したというものである。もうひとつの考え方は後述するように配

表 1 HTLV-1 感染経路と頻度

1. 母子感染	
母乳による感染	20%前後
それ以外(経産道?)	2~3%
2. 配偶者間感染	不明であるが男性から女性の頻度が高い
3. 輸血による感染	1986年以降なし

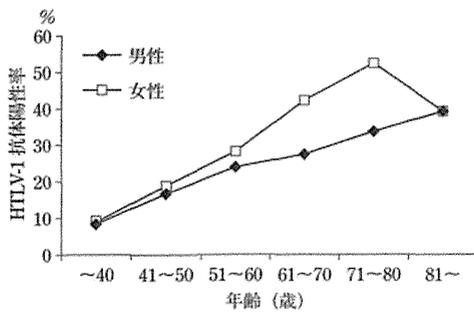


図 1 HTLV-1 高浸淫地域における年齢男女別抗体陽性率

偶者間の新規感染のため一定の年齢以降の感染率が高くなるというものである。

1. 母子感染

HTLV-1 の母子感染については、疫学的、実験的な結果から主な経路は母乳を介したものであることが判明した。ATL は母子間感染により乳児期に感染したキャリアから発症すると考えられているため、母乳を介した母子感染を遮断し、ATL を主とする将来の HTLV-1 関連疾患の発症を予防しようとする試みが行われてきた。すなわち抗体が陽性と判明した妊婦のなかで、母乳を与えないことに同意したキャリア母親には出産後母乳分泌抑制剤が投与され児の人工栄養が行われた。この結果、キャリア母親から出生した児の感染率は、6 ヶ月以上の母乳栄養で 20.5% であるのに対して、人工栄養では 2.4% と有意に低下することが示された⁴⁾⁵⁾。

2. 性行為に伴う感染

HTLV-1 の配偶者間感染については、配偶者間での HTLV-1 陽性の一致率が高く、とくに年齢の高い夫婦ほど配偶者両者とも HTLV-1 が陽性となる率が高いことが判明している。また HTLV-1 キャリアの陰性の配偶者（たとえば夫が陽性で妻陰性）を長期にフォローすると、陰性であった配偶者の抗体陽転化が一定の割合で生じる（妻が陽性になる）⁶⁾⁷⁾。さらにこのようなケースにおける両者のウイルスの遺伝子配列を比較すると同一であることから、配偶者間感染が証明されている⁸⁾。感染は女性から男性においても成立しうるが、男性から女性において頻度が高い。このことは疫学的に、HTLV-1 抗体陽性率が中年以降において女性のほうが男性よりも高いという事実と合致している。配偶者間感染が性行為に伴って起こることについて

の直接的な証拠はない。しかし、HTLV-1 陽性男性の精液に感染性が証明されていることや⁹⁾、このウイルスの感染には細胞間接触が必要なことを合わせて考えると、性行為に伴っての感染が最も考えやすい。成人における配偶者感染によって ATL が発症したという明らかな報告はないが、完全に否定されたわけではない。また成人における感染においても HAM や HU 等の HTLV-1 関連疾患の発症は認められている。母子感染においては母乳哺育遮断という感染防止の方法論が確立されているが、性行為感染においてはこのような感染防止法として確立したものはないのが現状である。

V. HTLV-1 感染症への対策

前述したように、母子感染については母乳を介した感染の遮断により感染率を大幅に減少させることに成功している。しかしながら、母乳感染遮断の介入を行った場合にも 2~3% 程度の児に感染が成立することが判明しており、母乳遮断のみによる母子感染防止には課題が残る。今後の可能性のひとつとしてワクチンによる感染予防法の開発がある。これが実現すれば、現在全く対策のない配偶者間感染や医療機関における針刺し事故などの対策においても福音となると思われる。HTLV-1 感染に対するワクチン開発も基礎研究レベルでは開始されており、今後さらなる発展が期待される。また新たな感染を予防することに加えて、現在国内に 108 万人いると考えられている HTLV-1 キャリアについては HTLV-1 関連疾患発症予防法や治療法の開発が必要である。これまでの研究から、感染細胞数の多いキャリアから HTLV-1 関連疾患が発症することが判明しており¹⁰⁾、今後キャリアのウイルス量を減らす方法が開発されれば、HTLV-1 関連疾患の発症防止に大きく貢献できる可能性がある。

2010年に国において「HTLV-1 総合対策」が取りまとめられ、HTLV-1 感染予防、相談支援、医療体制の整備、啓発・情報提供、研究開発の推進が重点施策として挙げられており、今後の発展が期待されている。

ま と め

本ウイルスが発見されて30年が経過し、ウイ

ルスに関する基礎的な研究の発展はめざましいものがある。また、母子感染予防法の開発は大きな貢献といえる。しかし本邦においてははまだ100万人以上のキャリアが存在しており、キャリアからウイルスを駆逐する方法や関連疾患を予防する方法は発見されていない。また今回の特集の主題「ストップザ性感染症」の観点からは男女間の HTLV-1 の新規感染予防法については手つかずの状態であり、残された課題は大きい。我が国はいわゆる先進工業国の中では唯一の HTLV-1 高浸淫国であり、これらの課題解決に今後も取り組んでいくことは世界的に対する貢献としてもぜひ必要であると思われる。

文 献

- 1) Murphy, E., Biswas, H. H.: Human T-cell lymphotropic virus types I and II in Mandell, G. L., Bennett, J. E., Dolin, R. (ed.): "Principles and Practice of Infectious Diseases", Churchill Livingstone Elsevier, Philadelphia, pp2303-2322, 2010.
- 2) Satake, M., Yamaguchi, K., Tadokoro, K.: Current prevalence of HTLV-1 in Japan as determined by screening of blood donors. *J Med Virol*, 84: 327-335, 2012.
- 3) Tajima, K., Kamura, S., Ito, S. et al.: Epidemiological features of HTLV-1 carriers and incidence of ATL in an ATL-endemic island: a report of the community-based co-operative study in Tsushima, Japan. *Int J Cancer*, 40: 741-746, 1987.
- 4) Hino, S.: Establishment of the milk-borne transmission as a key factor for the peculiar endemicity of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1): the ATL Prevention Program Nagasaki. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 87: 152-166, 2011.
- 5) 長崎県 ATL ウイルス母子感染防止研究協力事業連絡協議会: 長崎県 ATL ウイルス母子感染防止研究事業 (APP) 報告書-20年のあゆみ-. 2008.
- 6) Stuver, S. O., Tachibana, N., Okayama, A. et al.: Heterosexual transmission of human T cell leukemia/lymphoma virus type I among married couples in southwestern Japan: an initial report from the Miyazaki Cohort Study. *J Infect Dis*, 167: 57-65, 1993.
- 7) Okayama, A., Stuver, S., Iga, M. et al.: Sequential change of viral markers in seroconverters with community-acquired infection of human T-lymphotropic virus type 1. *J Infect Dis*, 183: 1031-1037, 2001.
- 8) Iga, M., Okayama, A., Stuver, S. et al.: Genetic evidence of transmission of human T cell lymphotropic virus type 1 between spouses. *J Infect Dis*, 185: 691-695, 2002.
- 9) Iwahara, Y., Takehara, N., Kataoka, R. et al.: Transmission of HTLV-I to rabbits via semen and breast milk from seropositive healthy persons. *Int J Cancer*, 12; 45: 980-983, 1990.
- 10) Okayama, A., Stuver, S., Matsuoka, M. et al.: Role of HTLV-1 proviral DNA load and clonality in the development of adult T-cell leukemia/lymphoma in asymptomatic carriers. *Int J Cancer*, 110: 621-625, 2004.

HTLV-1 感染症：母子感染予防対策とその課題

岡山昭彦 宮崎大学医学部 内科学講座 免疫感染病態学分野

1. はじめに

ヒト T リンパ向性ウイルス 1 型 (HTLV-1) は 1981 年, 米国の Gallo, 本邦の日沼らによって発見された C 型レトロウイルスである¹⁾. HTLV-1 感染者 (ウイルスキャリア) は世界的には本邦およびアフリカ, 中南米を中心に見られる²⁾. 本邦においては 1980 年代の疫学研究により全国の感染者は 120 万人と推測され, 九州, 沖縄を中心とした西南日本において高頻度に見られることが示された³⁾. この調査の時点ではキャリア数はその後減少すると予想されていたが, 約 20 年後の 2007 年に行われた疫学調査による全国の推定キャリア数は 108 万人であり, 当初予想されたよりもあまり減少していないこと

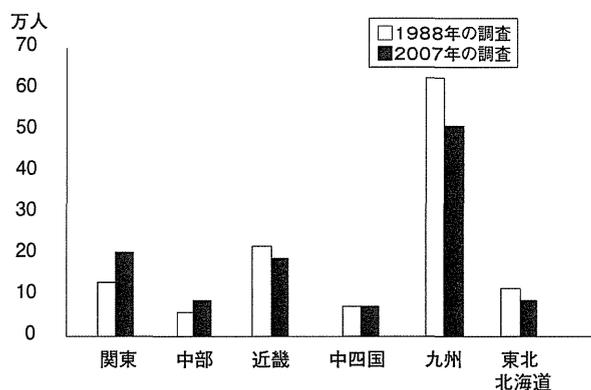


図1 地域別キャリア数の推移

(本邦における HTLV-1 感染及び関連疾患の実態調査と総合対策. 厚生労働科学研究費補助金研究事業研究班. 平成 21 年度総括研究報告書より改変)

が判明した⁴⁾. さらに地域的な広がりとして西南日本におけるキャリア数は減少傾向であるのに対して, 関東, 中部圏の都市部においては相対的に増加傾向にあることも示された(図 1).

HTLV-1 によって引き起こされる主な疾患は成人 T 細胞性白血病 (ATL) や HTLV-1 関連脊髄症 (HAM), HTLV-1 関連ぶどう膜炎である⁵⁻⁷⁾. このほかにも皮膚疾患, 肺疾患, 膠原病の一部についても関連が示唆されている. ATL の発症頻度は HTLV-1 キャリアにおいて年間 1,000 人に 1 名程度, 生涯発症率は 5% 程度と推定されており, HAM の頻度はこれよりも低いと考えられている⁸⁾. いいかえれば HTLV-1 キャリアの 95% は生涯無症候性である. しかしながら特に ATL は抗がん剤の多剤併用療法に対して抵抗性であり, 予後の改善が期待できる骨髄移植を用いた治療の適応となる患者数も高齢発症の傾向があるため多くない. このため現在においても ATL は極めて予後不良な疾患である⁹⁾. HTLV-1 感染を予防することにより ATL の発症を防ごうとする取り組みがキャリアの多い地域を中心に長年にわたり行われてきた¹⁰⁾. 本稿においては HTLV-1 母子感染予防についてのこれまでの取り組みと今後の展望・課題を紹介する.

2. HTLV-1 の感染経路 (表 1)

HTLV-1 キャリアにおいてウイルスは主に T リンパ球のゲノムに組み込まれたプロウイルス

Prevention of mother to child infection of HTLV-1

Akihiko OKAYAMA, Department of Rheumatology, Infectious Diseases and Laboratory Medicine, Faculty of Medicine, University of Miyazaki

別刷請求先: 岡山昭彦 〒889-1692 宮崎県宮崎市清武町木原5200

宮崎大学医学部 内科学講座 免疫感染病態学分野

Tel: 0985-85-7284 Fax: 0985-85-4709 E-mail: okayama@med.miyazaki-u.ac.jp

として存在しており、ウイルス粒子を体液中より直接検出することは難しい。このため新規感染の成立にはキャリアの感染細胞が非感染者の体内に入り、細胞—細胞間接触が起こることが必要である^{11,12)}。このような機会は自然界では母子間、性行為等に限られており、ウイルスの感染は基本的には家族内に限定される¹³⁻¹⁵⁾。新規感染者は抗体が陽転し、生涯ウイルスが消失することはない。以前は存在した輸血を介した感染は1986年に赤十字血液センターにおいて抗体スクリーニングが行われるようになってからはなくなったと考えられている¹²⁾。

ATLの発症予防という観点からは母子間感染の予防が重要である。これはHAMやぶどう膜炎が性行為や輸血等による感染後にも発症するのに対して、ATLはこれまでの疫学的なデータから母子間感染により乳児期に感染したキャリアから発症すると考えられているためである^{14,15)}。さらに母子間で乳児期に感染したキャリアは配偶者間で感染したキャリアよりも高いウイルス量を示すことが判明しており、ATL発症のリスクと関連がある可能性がある¹⁶⁾。しかしながら成人の性行為感染由来のHTLV-1キャリアからATLが発症しないというエビデンスはない。

HTLV-1の母子感染経路としては、当初子宮内感染、分娩時の産道感染、母乳を介した感染の3つが主に考えられた。その後、キャリアの母乳中に感染細胞が存在すること、その感染細胞を経口的に投与することによってマーマセツトに感染が成立すること、キャリア母親から出生した児における感染率は母乳栄養児で高いことなどの研究成績により、HTLV-1の母子感染の主な経路は母乳を介したものであることが判明した¹⁷⁻¹⁹⁾。

3. 長崎県におけるHTLV-1母子感染予防の取り組み(表2)

以上のような成績をもとに母乳を介した母子感染を遮断し、ATLを主とする将来のHTLV-1関連疾患の発症を予防しようとするプロジェクトが1987年より長崎県において発足した。医師会、日本母性保護医協会(産婦人科医会)、小児科医会、長崎大学、国立長崎中央病院、長崎県で構成される「長崎県ATLウイルス母子感染防止研究協力事業連絡会」が設置され、長崎県全域の産婦人科においてHTLV-1母子感染予防の取り組みが開始された。すなわち妊婦や関連の医療機関を対象にHTLV-1感染症および母子感染についての啓発活動が推進され、妊婦の承諾を得たのちに抗体スクリーニングが行われた。抗体が陽性と判明した妊婦のなかで母乳を与えないことに同意したキャリアには出産後母乳分泌抑制剤が投与され児の人工栄養が行われた¹⁰⁾。キャリア母親から出生した児の感染率は、6ヶ月以上の母乳栄養で20.5%であったのに対して、6ヶ月未満の母乳栄養で8.3%、人工栄養で2.4%と有意に低下したことが示された。1998年にはインフォームドコンセントとカウンセリングを強化したプログラムが開始されたが、このプログラムでは母乳栄養を希望する母親には3ヶ月以内の短期母乳が推奨された。その結果、1999年～2006年の集計対象となった834人のキャリア母親において、71%が人工栄養、12.7%が短期母乳、13.8%が母乳栄養を選択した。フォローアップできた児の感染率は人工栄養3.2%、短期母乳3.0%、母乳栄養が15.8%であったとされている。

1987年から2007年までの20年間に長崎県においては約7,000人の母親がHTLV-1陽性である

表1 HTLV-1感染経路と頻度

1. 母子感染	
母乳による感染	20%前後
それ以外(経産道?)	2~3%
2. 配偶者間感染	不明
3. 輸血による感染	1986年以降なし

表2 HTLV-1母子感染対策(栄養法による介入)と児の感染率

	児の感染率
1. 人工栄養	2~3%
2. 3カ月未満の母乳栄養	3~7%
3. 凍結母乳による栄養	不明

ことが判明した。人工栄養を選択した母親の割合を80%とした場合、児の感染はこのプロジェクトにより20.3%から2.5%に低下したと考えられた。この結果約1,000人の児のキャリア化が阻止され、そのことにより50人程度の将来のATL発症を予防したと推測されている。

4. HTLV-1総合対策

妊婦におけるHTLV-1抗体スクリーニングは九州沖縄以外の地域においても大多数の産科施設で行われていることが2009年のアンケートにより示された²⁰⁾。また献血者を対象とするHTLV-1感染率の全国調査により2008年の時点で全国に約108万人のHTLV-1キャリアが存在すると推定された。このような実態をもとに2010年9月に内閣総理大臣の指示により「HTLV-1特命チーム」が設置され、12月に「HTLV-1総合対策」が取りまとめられた。HTLV-1感染予防、相談支援、医療体制の整備、啓発・情報提供、研究開発の推進が重点施策として挙げられ、母子感染予防に関しては全国の妊婦健診の標準的な項目にHTLV-1抗体検査が追加され公費負担の対象となった²¹⁾。さらにHTLV-1母子感染予防のための保健指導、カウンセリング充実のための研修会の実施、マニュアルの作成等が開始されている。

5. HTLV-1感染症対策の課題

① HTLV-1母子感染予防の全国展開にともなう啓蒙・情報提供・カウンセリング

長崎県において素晴らしい成果をあげたHTLV-1母子感染予防対策であるが、この事業を成し遂げるためには、研究者のみならず関連する産科小児科の医療従事者や自治体、保健指導関係者の多大な努力が必要であったと思われる。全国的に同様の対策を行う場合、特にHTLV-1キャリアの頻度が少ない地域においてはさまざまな問題が発生しうる。妊娠中という重要な時期に初めてHTLV-1感染を知る妊婦の不安やショックの大きさは容易に推測できる。しかしこれらの地域においてはHTLV-1感染症と関連疾患について知識の豊富な医療従事者や保健指導関係者の絶対数が少ない。このためキャリア母親のカウンセリ

ングを行うことが容易でない。さらにATL患者の発症頻度が非常に少ない地域では、その診療にかかわった経験のある医療関係者も少ないため、その疾患を予防する重要性についての医療関係者の認識が得られにくいことが危惧される。このような点から「HTLV-1総合対策」にもとづいて進められているHTLV-1母子感染予防のための保健指導、カウンセリング充実のための研修会の実施、マニュアルの作成等を充実させる必要がある²¹⁾。

② HTLV-1抗体測定法：判定保留の問題

HTLV-1キャリアはすべて抗体が陽性であり、抗体検査によりキャリアと同定されてきた。抗体のスクリーニング検査は多くの場合粒子凝集法や化学発光法等が行われ、スクリーニング検査陽性例について確認検査として免疫ブロット法が主に用いられている。しかしながらスクリーニング検査陽性検体が確認検査で陰性や判定保留となるケースがみられ、とくにHTLV-1キャリアの頻度が少ない地域においてはスクリーニング陽性検体の多数がこのような結果を示すことが問題となっている²⁰⁾。研究班の報告によれば、長崎県においては妊婦スクリーニング検査HTLV-1抗体陽性と判定された8,504検体は確認検査により85.4%が陽性、14.6%が陰性と判定され判定保留はなかったが、東京都においてはスクリーニング検査陽性と判定された36検体は確認検査により25%が陽性、55.6%が陰性となり、判定保留が19.4%あった。母子感染予防の観点からは、特に免疫ブロット法で判定保留となった妊婦に人工栄養を勧めるか否かということについては一定の見解がない。判定保留の場合に血清学的方法ではなく、末梢血液細胞よりHTLV-1プロウイルスを検出するPCR法を用いる検査が検討されている。しかしいまだ標準的で汎用性にある検査としては確立されていない現状である。

③ 母乳以外の感染経路

HTLV-1キャリア母親から出産後人工栄養で育てた児においても2%程度抗体が陽転化しキャリアとなる場合があることが判明している。このような児の感染経路としては子宮内感染、産道における感染、それ以外の感染

(唾液そのほか)が可能性として挙げられる。臍帯血液細胞について HTLV-1 プロウイルスの有無を検討した結果、PCR 陽性例は検出されたがその後の児のキャリア化とは関係なかったことが示されている²²⁾。このため子宮内感染についてはその存在を完全には否定できないものの、人工栄養児の HTLV-1 陽性化の原因としてその関与は少ないと考えられており、産道感染がより疑われている。しかし、キャリア化率およびその後の ATL 発症率の低さを考慮に入れて、現在のところ、産道感染予防のための帝王切開等は勧められていない²³⁾。人工栄養児における HTLV-1 キャリア化は少数であるが、授乳をあきらめたにもかかわらず児に HTLV-1 感染が成立した場合の母親の心情を考えれば、この経路の解明も重要な課題である。

- ④ 母乳遮断以外の方法による新規感染防止策
現在ほかに有効な方法がないために行われている人工栄養による HTLV-1 母子感染予防策であるが、本来自然な栄養法である授乳による児の栄養が望ましいことはいうまでもない。3ヶ月以下の短期母乳栄養では感染率が下がることは判明しているが、人工栄養に比較すると感染率は高いとされており²³⁾、また3ヶ月目の時点で断乳することの困難さも指摘されている。短期母乳以外の方法として、凍結保存することによって感染力を喪失させた母乳を与える方法も知られている。しかし現実的には長期間これを行うことは母親の多大な労力を要する。今後の可能性のひとつとして B 型肝炎ウイルスキャリア母親からの出産で行われているようなワクチンによる母子感染予防法の開発がある。これは現在全く対策のない配偶者間感染や医療機関における針刺し事故などの対策においても福音となると思われる。しかしながら現在のところ HTLV-1 感染に対するワクチン開発はまったくの基礎研究レベルにとどまっている。さらに通常の母乳栄養を行った場合なぜ一部（おおそ20%）の児にのみ HTLV-1 の母子感染が成立し、そのほかの80%の児には起こらないかということについても理由は判明していない。新規感染のハイリスク因子が判明すれ

ば、人工栄養を勧めないといけない妊婦を絞り込むことができる可能性がある。

⑤ キャリアからの ATL 発症予防法の開発

新たな感染を予防することは重要であるが、現在すでに国内に108万人いると考えられている HTLV-1 キャリアについては HTLV-1 関連疾患発症予防法や治療法の開発が必要である。HTLV-1 キャリアの95%は生涯 HTLV-1 関連疾患とは無縁である。このためどのようなキャリアが関連疾患を発症し、どのような方法でそれを阻止することができるか解明することが重要である。最近の研究によりウイルス量が高いキャリアから ATL が発症することが明らかとなってきた^{24,25)}。配偶者間で感染が成立したキャリアのウイルス量の比較からは、ウイルス量はウイルスの性質ではなくそれ以外の因子で決まることが判明している²⁶⁾。今後キャリアのウイルス量を減らす方法が開発されれば、HTLV-1 関連疾患の防止に大きく貢献できる可能性がある。

6. ま と め

HTLV-1 母子感染予防事業では母乳による栄養法の中止を勧めることになるが、それは重篤で予後の悪い疾患である ATL 発症を予防できるという観点から許されると考えられている。この事業は大変な労力を要するが、HTLV-1 感染とそれに関連する疾患を撲滅することが可能であることを示すことは、世界の中でも多数の感染者をかかえる唯一の先進工業国である日本の責務と思われる。また新規感染を遮断すると同時に、現在国内に108万人存在するとされる HTLV-1 キャリアからの ATL や HAM のような関連疾患発症を予防する方策を開発することも同じように重要である。

参考文献

- 1) Yoshida M, Miyoshi I, Hinuma Y : Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. Proc Natl Acad Sci U S A 79 : 2031-2035, 1982
- 2) Blattner W, Charurat M : Human T-cell lymphotropic virus types I and II in Mandell GL, Bennett