

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）  
総括研究報告書

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：近年HTLV-1感染者が感染率の高いとされる九州・沖縄地方から大都市圏に拡散する傾向にあり、今後全国的な対策が必要になっている。このような中、HTLV-1の検査体制に改善すべき点が存在することが明らかになってきた。研究班に[1]HTLV-1検査法標準化確立グループ、[2]HTLV-1感染の疫学検討グループを組織し、HTLV-1感染の実態を明らかにするとともに、各グループが有機的に情報を交換することにより、迅速かつ総合的にHTLV-1の感染の実態解明およびHTLV-1関連疾患の発症リスクの低減を目標とした。平成25年度の[1]HTLV-1検査法標準化確立グループでは、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）の標準品および参照品の多施設共同測定、妊婦検査での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、標準品、参照品ともにこれまでの結果と同様に施設間で一定の隔たりが確認され、標準品または参照品を用いることで測定値の標準化は可能であることが確認された。妊婦WB判定保留検体の核酸検査の結果、約20%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。[2]HTLV-1感染の疫学検討グループにおいては、HTLV-1の水平感染の実態を明らかにするために、日本赤十字社で行っている献血時のHTLV-1検査の結果をもとに、検査において陽転化する症例の解析を行った。平成17-18年に検査を受けた全国330万人について後ろ向きコホートの手法で平成23年12月までの約6年の観察期間中の陽転化の比率を算出した。この結果、全国で年間に3000-4000人にHTLV-1の水平感染の発生が示唆された。また、JSPFADマテリアルバンクの検体を用いた発症リスクの検討を行った。

研究分担者

山口一成 熊本大学 学術研究員  
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  
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  
大隈 和 国立感染症研究所 室長  
岩永正子 東京慈恵会医科大学 予防医学センター 講師  
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 鹿児島医療センター 部長  
緒方正男 大分大医 准教授  
鴨居功樹 東京医科歯科大学 講師

研究協力者

上平 憲 長崎市民病院 検査部

久保田龍二 鹿児島大学難治ウイルス研究所  
梅木一美 宮崎大学病院 検査部  
野坂生郷 熊本大学大学院 血液内科・感染免疫診療部  
橋倉悠輝 宮崎大学病院 検査部  
山本成郎 宮崎大学病院 検査部  
堀江真太郎 東京医科歯科大学 眼科学  
寺田裕紀子 東京医科歯科大学 眼科学  
倉光 球 国立感染症研究所  
成瀬 功 株式会社エスアールエル  
浜口行雄 シスメックス/国際試薬株式会社  
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

A. 研究目的

HTLV-1検査は、平成22年末に妊婦検診項目に追加されたが、2次検査のWestern Blotting(WB)検査の結果で判定保留となる場合が少なからず存在し、それらの判定保留の判定にHTLV-1核酸検査が予定されている。しかしながら核酸検査実施の有効性については明らかになっていなかった。

本年度は、標準品と参照品を多施設で測定し、標準品と参照品の測定値をもとに施設の補正値を算出した。妊婦検診のWestern Blotting (WB)判定保留検体に対して核酸検査を行い、核酸検出率を解析し、判定保留対策として核酸検査の有用性を検討した。標準品細胞TL-0m1について、核酸検査標準品としての特性に関する解析を進めた。また、母子感染以外の重要な感染ルートとされているものの、十分に解析が行われていないHTLV-1の水平感染の実態を明らかにする。さらに、JSPFADマテリアルバンクの検体を用いたキャリアからのATL、HAMの発症リスクの検討を行った。

## B．研究方法

### 1) HTLV-1核酸検査の標準化

#### ・検体

標準品：CFSE染色したTL-0m1をPBMC (All Cells)で希釈し、測定用検体を準備した。参照品はTL-0m1およびJurkatのゲノムDNAとした。

また板橋班とSRL社と協力して、妊婦検診の判定保留検体を収集しPBMC分離とDNA精製後、核酸検査を行った。妊婦判定保留血漿は、SRL社にて分離し保管した。

#### ・q-PCRによるPVL定量

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。参加施設を以下に示す。国立感染症研究所、東京大学医科学研究所、聖マリアンナ医科大学、長崎大学病院、宮崎大学病院、鹿児島大学、日本赤十字社、SRL。

### 2) HTLV-1の水平感染についての疫学調査

日本赤十字社で行っている献血時のHTLV-1検査の結果をもとに、検査において陽転化する症例の解析を行った。平成17-18年に検査を受けた全国330万人について後ろ向きコホートの手法で平成23年12月までの約6年の観察期間中の陽転化の比率を算出した。

### 3) JSPFADマテリアルバンクの検体を用いた発症リスクの検討

全国の協力医療機関から提供されたJSPFADマテリアルバンクの無症候性キャリア検体2180検体の中から、ATLへの進展する症例について解析した。

#### (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。

## C．研究結果

### 1) HTLV-1核酸検査の標準化

#### ・核酸検査標準品細胞TL-0m1の解析

これまでFISH解析によってTL-0m1のHTLV-1コピー数は約1.8コピーであることが明らかになっていた。核酸検査の標準品としてプロウイルスコピー数の正確な規定は極めて重要である。プロウイルスコピー数のさらなる確度の向上を目指してFISH, digital PCRおよびQ-PCRでTL-0m1細胞中のプロウイルス量を測定した。その結果、HTLV-1プロウイルスコピー数はdigital PCRでは0.51、Q-PCRでは0.48となり、FISH解析の結果の0.46とほぼ一致した。またRNasePに対するALBのコピー数の比率はFISH 0.76, digital PCR 0.74, Q-PCR 0.74となり内部標準遺伝子のコピー数の比率も上記の3種の方法でほぼ一致した。RNasePおよびALBのコピー数は、FISH解析でそれぞれ3.95コピー/cellおよび3コピー/cellであった。このことからこれまでFISH解析で明らかになった結果の1.8コピー/cellが他の独立した2法でもほぼ一致して規定できたことから高い精度でコピー数を規定できていることを確認した。

#### ・施設の補正係数の測定(多施設共同研究)

標準品(TL-0m1/PBMC希釈系列)および参照品(TL-0m1/Jurkat希釈系列)を各施設の方法に従い、HTLV-1のコピー数を測定し、標準品の理論値からの隔たりについて平行線定量法で測定した。算出された値を各施設の補正係数とし、参照品の測定値を補正することにより参照品の値付けを行った。各施設の補正係数は、前回の標準品測定の補正值から全体として大きな変化は認められなかった。今後は標準品の他にも値付けされた参照品を用いて、測定値のコントロールが可能となると考えられる。

#### ・妊婦WB判定保留検体の核酸検査

板橋班とSRL(株)の協力で収集された妊婦WB判定保留検体PBMCから精製したgDNAでHTLV-1核酸検査(1 $\mu$ g input)を行ったところ、63検体中12検体(約20%)で核酸陽性となった。SRLと感染研で結果が異なった2検体あった。この2検体については、追加で新規に開発した多プライマーでの核酸高用量測定(特願2013-196247)を試みたところ、いずれも複数箇所のwellでHTLV-1核酸が検出された。よって結果の異なった2検体は、プロウイルス量が通常のPCRでは検出限界以下となる非常に低コピー数の検体であることが示唆された。また陰性検体についても同様に多プライマーで測定したところ、すべて陰性となったことから、感染研とSRLのプライマーの配列が原因の偽陰性は、極めて稀であることが示唆された。

またDNAの収量が十分にあった妊婦WB判定保留検体について当班研究の参加8施設で測定したところ、陽性検体はほとんどの施設で陽性となった。一部の検体で陽性と陰性が混在する結果が生じたがどの施設

設も定量結果は極めて低値であることから、検体中のプロウイルス量が極めて低く検出感度以下の検体であったことが考えられる。

これらのことから妊婦WB判定保留検体について核酸検査の追加実施は、一定の割合で陽性判定が可能であり、有効に機能すると考えられる。

#### ・妊婦WB判定保留検体のWB再測定

板橋班とSRLの協力で収集された妊婦WB判定保留検体(47例)の血漿を用いて、WBを再測定したところ、陰性(10例)および判定保留(37例)となった。このことからWB判定保留例に対しては、採血時期が異なる血漿を用いてWBを再測定した場合でも、陽性とはならないことが示され、WBの再試は意味が無いことが示唆された。

#### ・日本赤十字社WB判定保留検体の測定

日本赤十字社の協力で献血スクリーニングにおけるHTLV-1抗体検査WB判定保留検体(血液型判定の残検体)を収集し、関東ブロック血液センターおよび九州ブロック血液センターのそれぞれの検体について核酸検査を実施した。その結果、関東ブロックでは4例(全61例中)、九州ブロックでは16例(全49例中)で核酸陽性となり、各ブロック血液センターで核酸陽性率は異なるものの核酸検査によって一定の成果が期待できることが確認された。

## 2) HTLV-1の水平感染についての疫学調査

HTLV-1感染においては母乳による感染が最も主要な感染経路とされるが、水平感染の実態は明らかにされていない。日本赤十字社で行っている献血時のHTLV-1検査の結果をもとに、検査において陽転化する症例の解析を行った。平成17-18年に検査を受けた全国330万人について後ろ向きコホートの手法で平成23年12月までの約6年の観察期間中の陽転化の比率を算出した。この結果、全国で年間に3000-4000人にHTLV-1の水平感染の発生が示唆された。水平感染の実態調査をさらに進め、キャリア再生産の根絶に繋げる方策の検討が必要である。

## 3) JSPFADマテリアルバンクの検体を用いた発症リスクの検討

平成25年度までに全国の協力医療機関から提供されたJSPFADマテリアルバンクの無症候性キャリア検体2180検体の中から、26例にATLへの進展が見られた。このうち、24例はウイルスコピー数が4%以上でATL発症リスクに大いに関連している事が明らかとなった。ウイルスコピー数の評価を取り入れたキャリアフォローの体制の構築が必要である。

## D. 考察

#### ・HTLV-1感染症の診断法の標準化

各施設で運用されるHTLV-1核酸検査の測定値の標準化のため、標準品の設定および標準品の多施設測定を行い、測定値の標準化を試みた。標準品の解析では、TL-0m1の標準品としての性質の中でもHTLV-1コピー数と内部標準遺伝子の規定は極めて重要な因子となるが、3種類の測定方法でほとんど一致した結果となったことから、確度の高い規定を行うことが出来たと考えられる。このことから標準化のために設定した標準品の理論的値が極めて信頼できるものであることが確認できた。当研究班の標準品は市販品のPBMCを使用して準備したが、Jurkat細胞を使用することにより管理が簡素化でき、ロット間差が比較的縮小できると期待されたため、標準品とは別にTL-0m1とJurkatのgDNAを参照品として準備した。今回標準品と参照品を同時測定し参照品を値付けしたことによって、今後は比較的準備が簡単であるTL-0m1とJurkat細胞のgDNAも利用できると期待される。

標準品測定から得られた各施設の補正係数は、これまでの結果と全体として大きな差はなく、それぞれの試験法の試験毎の隔たりは小さく、測定値は安定しているものと考えられる。またこのことは、これまでの標準化作業の過程で同一のHTLV-1陽性検体を測定した結果からも、それぞれの施設の測定値は全体として測定時期に関係無く一致していたことから裏付けられる。

#### ・妊婦WB判定保留対策としての核酸検査の有効性

妊婦検体のWB判定保留例のうち20%で核酸陽性となったことは、WB判定保留対策の追加検査としての核酸検査は、一定の割合で判定を出すことができると考えられ、実施する意義は高いと考えられる。

今回の妊婦検体は全国から収集されたものであるが、日赤の九州ブロックと関東ブロック血液センターのWB判定保留検体の核酸検査結果から核酸陽性率には地域差が認められる可能性があった。今後は核酸検査と様々な抗体検査の一致率等の比較検討により、核酸検査の確度を一層高めることができると期待される。

#### ・水平感染によるキャリアの発症の実態調査の検討と実施

本班研究により、国内で年間3000-4000人の水平感染によるキャリアが発生している事が示唆された。水平感染キャリアの追跡調査と関連疾患発症のリスク評価を行うなど、キャリア再生産の根絶に繋げる方策の検討が必要である。

#### ・JSPFADマテリアルバンクの検体を用いた発症リスクの検討

今回の解析の結果、ウイルスコピー数が4%以上でATL発症リスクに大いに関連している事が明らかと

なった。ウイルスコピー数の評価を取り入れたキャリアフォローの体制の構築が必要である。

## E . 結論

最大5倍とされたHTLV-1コピー数測定の実験間差は、標準品や参照品を用いることで縮小することができた。今後は定期的に施設毎で標準品または参照品を測定することで測定値の標準化は可能であると考えられる。また、妊婦WB判定保留検体の約20%で核酸検査陽性となったことから、核酸検査の追加実施は有効に機能すると考えられる。

献血血液を用いた疫学調査の結果、全国で年間に3000-4000人にHTLV-1の水平感染の発生が示唆された。水平感染の実態調査をさらに進め、キャリア再生産の根絶に繋げる方策の検討が必要である。

## F . 健康危険情報 特になし。

## G . 研究発表

### 1. 論文発表

1. Takizawa K, Nakashima T, Mizukami T, Kuramitsu M, Endoh D, Kawauchi S, Sasaki K, Momose H, Kiba Y, Mizutani T, Furuta R, Yamaguchi K, Hamaguchi I. Degenerate PCR strategy with DNA microarray for detection of multiple and various subtypes of virus in the blood screening. *Transfusion*. 2013. 53(10 Pt 2):2545-55.

2. Odaka C, Kato H, Otsubo H, Takamoto S, Okada Y, Taneichi M, Okuma K, Sagawa K, Hoshi Y, Tasaki T, Fujii Y, Yonemura Y, Iwao N, Tanaka A, Okazaki H, Momose S, Kitazawa J, Mori H, Matsushita A, Nomura H, Yasoshima H, Ohkusa Y, Yamaguchi K, Hamaguchi I. Online reporting system for transfusion-related adverse events to enhance recipient haemovigilance in Japan: a pilot study. *Transfus Apher Sci*. 2013. 48: 95-102.

3. Asanuma S, Yamagishi M, Kawanami K, Nakano K, Sato-Otsubo A, Muto S, Sanada M, Yamochi T, Kobayashi S, Utsunomiya A, Iwanaga M, Yamaguchi K, Uchimaru K, Ogawa S, Watanabe T. Adult T-cell leukemia cells are characterized by abnormalities of Helios expression that promote T cell growth. *Cancer Sci*. 2013. Aug;104(8):1097-106.

4. Nakano K, Ando T, Yamagishi M, Yokoyama K, Ishida T, Ohsugi T, Tanaka Y, Brighty DW, Watanabe T. Viral interference with host mRNA surveillance, the nonsense-mediated mRNA decay (NMD) pathway, through a new function of HTLV-1 Rex: implications for retroviral replication. *Microbes Infect*. 2013. Jun;15(6-7):491-505.

5. Ishida YI, Yamasaki M, Yukizaki C, Nishiyama K, Tsubouchi H, Okayama A, Kataoka H. Carnosol, rosemary ingredient, induces apoptosis in adult T-cell leukemia/lymphoma cells via glutathione depletion: proteomic approach using fluorescent two-dimensional differential gel electrophoresis. *Hum Cell*. 2013. Dec 10.

6. Umekita K, Hidaka T, Miyauchi S, Ueno S, Kubo K, Takajo I, Hashiba Y, Kai Y, Nagatomo Y, Okayama A. Treatment with anti-tumor necrosis factor biologics in human T-lymphotropic virus type 1 positive patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2013. Oct 14

7. Mochizuki M, Sugita S, Kamo K. Immunological homeostasis of the eye. *Prog Retin Eye Res*. 2013. Mar;33:10-27.

8. 相良康子、後藤信代、井上由紀子、守田麻衣子、倉光球、大隈和、浜口功、入田和男、清川博之 抗HTLV-1抗体検査(ウエスタンブロット法)判定保留例の解析 **日本輸血・細胞治療学会誌** 印刷中

9. Tamai Y, Hasegawa A, Takamori A, Sasada A, Tanosaki R, Choi I, Utsunomiya A, Maeda Y, Yamano Y, Eto T, Koh KR, Nakamae H, Suehiro Y, Kato K, Takemoto S, Okamura J, Uike N, Kannagi M. Potential contribution of a novel Tax epitope-specific CD4+ T cells to graft-versus-Tax effect in adult T cell leukemia patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Immunol*. 2013. Apr 15;190(8):4382-92.

10. Kobayashi S, Tian Y, Ohno N, Yuji K, Ishigaki T, Isobe M, 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*. 2013. 8(1):e53728.

11. Sato T, Coler-Reilly A, Utsunomiya A, Araya N, Yagishita N, Ando H, Yamauchi J, Inoue E, Ueno T, Hasegawa Y, Nishioka K, Nakajima T, Jacobson S, Izumo S, Yamano Y. CSF CXCL10, CXCL9, and neopterin as candidate prognostic biomarkers for HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013. Oct 10;7(10):e2479.

12. Ishihara M, Araya N, Sato T, Tatsuguchi A, Saichi N, Utsunomiya A, Nakamura Y, Nakagawa H, Yamano Y, Ueda K. Preapoptotic protease calpain-2 is frequently suppressed in adult T-cell leukemia. *Blood*. 2013. May 23;121(21):4340-7.

13. Narita T, Ishida T, Masaki A, Suzuki S, Ito A, Mori F, Yamada T, Ri M, Kusumoto S, Komatsu H, Miyazaki Y, Takatsuka Y, Utsunomiya A, Niimi A, Iida S, Ueda R. HTLV-1 bZIP Factor-Specific CD4 T Cell Responses in Adult T Cell Leukemia/Lymphoma Patients after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *J Immunol*. 2014. Feb 1;192(3):940-7.

14. Kinpara S, Kijiyama M, Takamori A, Hasegawa A, Sasada A, Masuda T, Tanaka Y, Utsunomiya A, Kannagi M. Interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) suppresses HTLV-1 gene expression and cell cycling, while IFN- $\alpha$  combined with zidovudine induces p53 signaling and apoptosis in HTLV-1-infected cells. *Retrovirology*. 2013. May 20;10:52.

15. Matsubara F, Sagara Y, Kato Y, Harada K, Koizumi A, Haraguchi K. Detection of antibodies to human T-cell leukemia virus types 1 and 2 in breast milk from East asian women. *Biol Pharm Bull.* 2014. 37(2):311-4.

16. 齋藤 滋: HTLV-I 母子感染対策. *産婦人科の実験* 2013. 62:543-7.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

出願番号：特願2013-196247. 発明の名称：HTLV-1プロウイルス検出のためのプライマーセット、およびそれを用いた検出法. 発明者：倉光球、浜口功、大隈和

2. 実用新案登録  
なし。

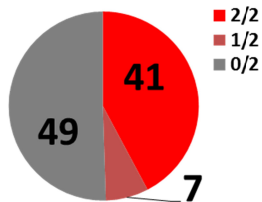
3. その他  
なし

核酸検査の有効性の検討

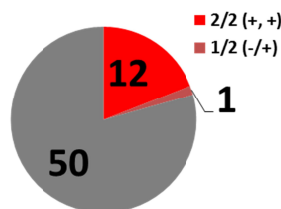
抗体検査のWB判定保留の核酸検査結果

核酸陽性の割合

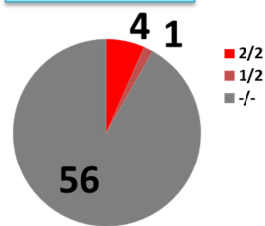
日赤WB判定保留 (九州ブロック)



妊婦WB判定保留 (全国)

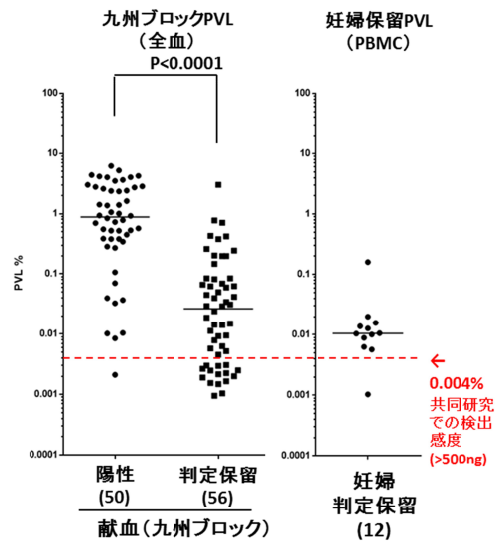


日赤WB判定保留 (関東ブロック)



日本赤十字社との共同研究

核酸陽性のプロウイルス量



板橋研との共同研究

