

HTLV-1 定量PCR検査の標準化および判定保留例に対する有用性に関する研究

研究分担者 聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター 准教授
山野 嘉久

研究要旨：

HTLV-1のプロウイルス量を調べる定量PCR検査は、感染の有無のみならず、HTLV-1感染細胞の制御状態を把握する上でも重要な検査である。しかし、これまで

- 1) 測定方法が標準化されていない、
 - 2) HTLV-1判定保留例に対する本検査の有効性が証明されていない、
- といった課題もあって、未だ保険承認されていない。

課題である前者1)の「測定方法の標準化」に向けて、一昨年度、本研究班において”HTLV-1感染細胞株TL-Om1と非感染者の末梢血単核球（PBMC）を用いた標準品”が完成し、定量化のベースが確立された。しかし、この標準品は利便性に乏しく、簡便に利用できる参照品が必要とされたため、今年度、感染細胞株TL-Om1と非感染細胞株Jurkatから成る参照品を各施設で測定し、標準品から求められた各施設の補正係数を用いて、参照品の値付けを実施することになった。一方、後者2)の「判定保留例に対する定量PCR検査の有効性」については、今年度、妊婦のウエスタンブロット(以下、WB)判定保留例のHTLV-1プロウイルス量を多施設で測定し、核酸検出効率を調査することになった。

当施設において上記を検討した結果、1)に関しては、当施設のTL-Om1/Jurkat参照品の測定値に、標準品から算出された補正係数0.31を掛けて得られた値が他の施設で算出された補正值とも近い値を示し、本参照品がHTLV-1の定量PCR検査の標準化に利用できることが判明した。一方、2)の「判定保留例に対する定量PCR検査の有効性」に関して当施設でも検討した結果、妊婦WB判定保留例24名中3名（12.5%）でプロウイルスが検出され、この3名は他の施設でも同様に検出されたことから、定量PCR検査の方がWB確認検査よりも感度・特異度の点で優れている可能性があり、判定保留例に対する定量PCR検査の有効性が示された。この点から、定量PCR検査がWB法による確認検査に変わり得る可能性も考えられるが、その場合、WB陽性例や陰性例についても定量PCR検査を実施するなどして、さらなる検討を加える必要がある。

A. 研究目的

ヒトT細胞白血病ウイルス（HTLV-1）のプロウイルス量を調べる定量PCR検査は、感染の有無のみならず、HTLV-1感染細胞の制御状態を把握する上でも重要な検査であり、HTLV-1関連脊髄症（HAM）の予後予測や、無症候性キャリアにおける成人T細胞白血病（ATL）の発症リスク予測などに利用することができる。しかし、これまで

- 1) 測定方法が標準化されていない
- 2) HTLV-1判定保留例に対する本検査の有効性が証明されていない

といった課題もあって、未だ保険承認されていない。

課題である前者1)の「測定方法の標準化」に向けて、一昨年度、本研究班において”HTLV-1感染細胞株TL-Om1と非感染者の末梢血単核球（PBMC）を

用いた標準品”が完成し、定量化のベースが確立された。しかし、この標準品はヒトのPBMCを用いることから利便性に乏しく、簡便に利用できる参照品が必要とされた。昨年度、この参照品を感染細胞株TL-Om1と非感染細胞株Jurkatから作成してはどうかという提案がなされ、今年度はこの参照品を各施設で測定し、標準品から求められた各施設の補正係数を用いて、参照品の値付けを実施することになった。

一方、後者2)の「判定保留例に対する定量PCR検査の有効性」については、今年度、妊婦のウエスタンブロット(以下、WB)判定保留例のHTLV-1プロウイルス量を多施設で測定し、核酸検出効率を調査することになった。

そこで我々は、本研究班における上記の活動に参加し当施設の測定方法を用いて以下の検討を行った。

B. 研究方法

1) TL-Om1/Jurkat参照品に関する検討

国立感染症研究所から提供された TL-Om1/Jurkat 参照品は、提供された TL-Om1 ゲノム DNA 溶液 (200ng/μl) を、同じく提供された Jurkat ゲノム DNA 溶液 (200ng/μl) によって 5 倍希釈系列を作成し、Template として用いた。

< TL-Om1/Jurkat 参照品の内容 >

- ・ TL-Om1/Jurkat 1/5
- ・ TL-Om1/Jurkat 1/25
- ・ TL-Om1/Jurkat 1/125
- ・ TL-Om1/Jurkat 1/625
- ・ TL-Om1/Jurkat 1/3125

一方、TL-Om1/PBMC 標準品は提供を受けた凍結細胞から当施設でゲノム DNA を抽出し、Template として用いた。ゲノム DNA の抽出方法はフェノール/クロロホルム処理による。

< 標準品の内容 >

- ・ 4% TL-Om1/PBMCs
- ・ 0.8% TL-Om1/PBMCs
- ・ 0.16% TL-Om1/PBMCs

< 当施設での測定方法 >

TL-Om1/Jurkat 参照品および標準品の測定は以下の方法を用いて、独立して 3 回実施した。

1well あたりの DNA 量 : 100ng

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:

TTCCAGGGTTTGGACAGAGTCTTCT

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:

ATGCCCTCCCCATGCCATCCTGCGT

検出器 : Applied Biosystems 7500

PCR 条件 :

50 2min, 95 10min 後に

(95 15sec & 60 1min) x 40 cycle

測定計算式 (copies / 100 cells) :

(pXコピー数) x 2 / β-actinコピー数 x 100)

2) 妊婦HTLV-1判定保留例に対する定量PCR検査の有効性に関する検討

国立感染症研究所から提供された妊婦WB判定保留24例のゲノムDNA溶液を用いた。HTLV-1プロウイルス量の測定は、上記と同じ測定方法を実施した

が、templateとして使用する1wellあたりのDNA量のみ100ngと500ngの2通りで実施した。

(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) TL-Om1/Jurkat参照品に関する検討

FISH および FACS 解析の結果を元に国立感染症研究所が算出した標準品の HTLV-1 感染率の理論値は 4% TL-Om1/PBMC, 0.8% TL-Om1/PBMC, 0.16% TL-Om1/PBMC それぞれが 8.45, 1.84, 0.365 copies/cell であった。それに対して、当施設で得られた値はそれぞれ 27.53, 5.56, 1.05 で、理論値よりも 2.9 - 3.3 倍高い値となった(表1)。平行線定量法で解析された結果、当施設の補正係数は 0.31 と決定した。そこで、当施設で得られた TL-Om1/Jurkat 参照品の値に補正係数 0.31 を掛けて得られた参照品のプロウイルス量の補正値を算出した(表2)。

2) 妊婦WB判定保留例に対する定量PCR検査の有効性に関する検討

WB判定保留であった妊婦24名のうち、定量PCR検査によってHTLV-1プロウイルスが検出された症例は、S-0035, S-0049, S-0056の3名(12.5%)であった(表3)。Templateの量は100ngであっても、500ngであっても検出された症例は同じで、両条件で得られたプロウイルス量に、わずかな違いを認めしたが、一定の傾向は認めなかった(表3)。上記の結果を得るために6回リアルタイムPCRを実施しており、その都度、TL-Om1/PBMC 0.80%およびNormal PBMCを陽性コントロール、陰性コントロールとして同時に測定した。その結果、陰性コントロールであるNormal PBMCは6回ともすべてnegativeであった(data not shown)。

D. 考察

1) TL-Om1/Jurkat参照品に関する検討

当施設において測定されたTL-Om1/Jurkat参照品の測定値に、標準品から算出された補正係数0.31を掛けて得られた値は、他の施設で算出された補正値とも近い値を示した(data not shown)。このことは、当施設の測定値は理論値から3倍程度高い値ができるものの、結果は繰り返し安定して得られていることを示している。また、この結果は各施設においてTL-Om1ゲノムDNA溶液をJurkatゲノムDNA溶液で希釈して作成する参照品が、HTLV-1の定量PCR検査の標準化に利用できることを示唆するもの

である。

2) 妊婦WB判定保留例に対する定量PCR検査の有効性に関する検討

陰性コントロールであるNormal PBMCが6回すべてnegative となっているため、negativeの症例をpositiveと判定する偽陽性という可能性は低く、妊婦の検体でpositiveとなった症例は、真にpositiveである可能性が高い。実際、今回positiveであった3名は他施設の測定によってもpositiveであることが証明された (data not shown)。測定に使用するTemplate量に関しては、100ngよりも500ngのDNAを使用した方で検出感度が高くなると考えられるが、今回の結果では100ngよりも500ngで検出される症例が増えることはなかった。

本研究により、妊婦のWB確認検査の判定保留例に対し、定量PCR検査を実施することでHTLV-1プロウイルスを検出する例が少なからず存在することが判明した。したがって、定量PCR検査の方がWB確認検査よりも感度・特異度の点で優れている可能性が示唆される。この点から、定量PCR検査がWB法による確認検査に変わり得る可能性も考えられるが、その場合、WB陽性例およびWB陰性例についても定量PCR検査を実施して、「WB陽性例では必ずプロウイルスが検出され、WB陰性例では検出されない」という結果が得られるか、さらなる検討を加える必要がある。

E . 結論

本研究により、妊婦HTLV-1判定保留例に対して定量PCR検査は有効であることが判明し、これまで以上にHTLV-1の定量PCR検査が臨床的に重要であることが明らかとなった。したがって、HTLV-1の定量PCR検査が保険承認されることが望まれる。そのためにも測定方法の標準化が求められているが今回、検証したTL-Om1/Jurkat参照品は、HTLV-1 定量PCR検査の標準化に利用可能であることが判明し、標準化に向けて、また一歩前進したと考えられる。

F . 健康危険情報

特になし

G . 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ando H., Sato T., Tomaru U., Yoshida M., Utsunomiya A., Yamauchi J., Araya N., Yagishita N., Coler-Reilly A., Shimizu Y., Yudoh K., Hasegawa Y., Nishioka K., Nakajima T., Jacobson S., Yamano Y. Positive feedback loop via astrocytes causes chronic inflammation in virus-associated myelopathy. **Brain**, 136(9) : 2876-2887, 2013.
- 2) 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.**, 7(10): e2479, 2013.

- 3) 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**, 121(21): 4340-4347, 2013.
- 4) Grassi MF, Olavarria VN, Kruschewsky Rde A, Silva MT, Yamano Y, Jacobson S, Taylor GP, Martin F, Galvão-Castro B. Utility of HTLV proviral load quantification in diagnosis of HTLV-1-associated myelopathy requires international standardization. **J Clin Virol.** 58(3): 584-6, 2013.
- 5) 山内淳司、八木下尚子、安藤仁、佐藤知雄、新谷奈津美、Ariella, Coler-Reilly、今井直彦、中澤龍斗、佐々木秀郎、柴垣有吾、安田隆、力石辰也、木村健二郎、山野嘉久. Human T-lymphotropic virus type 1 感染者における腎移植の影響. **日本臨床腎移植学会雑誌** 1(1), 55-60, 2013.
- 6) 山野嘉久、佐藤知雄、宇都宮與. 白血病 非定型白血病および特殊型 HTLV-1 関連脊髄症 (HAM). **別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ 血液症候群(第2版)**, 23():195-199, 2013.
- 7) 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 **日本臨床**, 71 (5) :870-875, 2013.

2. 学会発表

国際学会

- 1) Yamano Y. Development of novel molecular targeted therapies for HAM/TSP. 第3回 HTLV-1 国際シンポジウム 2013年8月23日・24日・25日 東京都(港区).
- 2) Yamano Y., Sato T., Ando H., Araya N., Yagishita N., Yamauchi J., Coler-Reilly A., Utsunomiya A., Jacobson S., Izumo S. CXCL10 and Neopterin in cerebrospinal fluid are Candidate Prognostic Biomarkers for

HTLV-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis. The 16th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses, 26-30 June, 2013, Montréal, Canada.

- 3) Sato T., Ando H., Tomaru U., Yoshida M., Utsunomiya A., Yamauchi J., Araya N., Yagishita N., Coler-Reilly A., Jacobson S., Yamano Y. Virus-induced CXCL10-CXCR3 positive feedback loop via astrocytes is critical for maintaining chronic inflammatory lesions in HAM/TSP. The 16th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses, 26-30 June, 2013, Montréal, Canada.
- 4) Coler-Reilly A., Hashimoto M., Yagishita N., Sato T., Ando H., Yamauchi J., Araya N., Kimura M., Yamano Y., Takata A. Nation-wide epidemiological study in Japan on HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis using HAM-net, a novel patient registration system. The 16th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses, 26-30 June, 2013, Montréal, Canada.
- 5) Yamano Y., Sato T., Coler-Reilly A., Ando H., Araya N., Yagishita N., Yamauchi J., Utsunomiya A., Jacobson S., Izumo S. CXCL10, CXCL9 and Neopterin in cerebrospinal fluid as Candidate Prognostic Biomarkers for HAM/TSP. The 16th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses, 26-30 June, 2013, Montréal, Canada.

国内学会

- 1) 山野嘉久, Ariella Coler-Reilly, 八木下尚子, 佐藤知雄, 新谷奈津美, 橋本充代, 木村美也子, 高田礼子. HAM 患者登録システム(HAM ねっと)の構築による疫学調査と満足度調査の概要報告, 第 34 回日本臨床薬理学会学術総会, 2013 年 12 月 4~6 日(6 日), 東京都(千代田区)[東京国際フォーラム].
- 2) 山野嘉久. HAM におけるバイオマーカーと炎症慢性化機構, 厚生労働省科学研究費補助金障害者対策総合研究事業「慢性疲労症候群の病因病態の解明と画期的診断・治療法の開発」班 平成 25 年度第 2 回班会議, 2013 年 12 月 3 日, 大

阪府(大阪市北区)[グランフロント大阪].

- 3) 山野嘉久, 山内淳司, 新谷奈津美, 安藤仁, Ariella Coler-Reilly, 八木下尚子, 宇都宮與, 佐藤知雄. HAM における抗 CCR4 抗体製剤の有用性に関する検討, 第 25 回日本神経免疫学会学術集会, 2013 年 11 月 27~29 日(29 日), 山口県(下関市)[海峡メッセ下関]
- 4) Hasegawa A., Tamai Y., Takamori A., Sasada A., Tanosaki R., Choi I., Utsunomiya A., Suehiro Y., Maeda Y., Yamano Y., Uike N., Kannagi M. 同種造血幹細胞移植後 ATL 患者からの新規 HTLV-1 特異的 CD4 エピトープの同定 (Identification of novel HTLV-1-specific CD4 epitopes in ATL patients after hematopoietic stem cell transplantation.) 第 72 回日本癌学会学術総会, 2013 年 10 月 3~5 日, 神奈川県(横浜市).
- 5) 佐藤知雄, 新谷奈津美, 安藤仁, Ariella Coler-Reilly, 山内淳司, 八木下尚子, 山野嘉久. HTLV-1 関連脊髄症(HAM)の治療標的としての CCR4+CD4+T 細胞. 第 6 回 HTLV-1 研究会 2013 年 8 月 23 日・24 日・25 日 東京都(港区).
- 6) Coler-Reilly A.L.G., Hashimoto M., Yagishita N., Sato T., Ando H., Yamauchi J., Araya N., Kimura M., Yamano Y., and Takata A. The "HAM-net" HAM/TSP Patient Registration System and its Applications: A Sampling of Epidemiological Findings in Japan. 第 6 回 HTLV-1 研究会 2013 年 8 月 23 日・24 日・25 日 東京都(港区).

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

表1 当施設で測定された標準品のプロウイルス量と理論値の比

標準品	1回目	2回目	3回目	平均	理論値	平均/理論値
TL-Om1/PBMC 4.00%	26.87	25.47	30.25	27.53	8.45	3.3
TL-Om1/PBMC 0.80%	5.54	5.34	5.80	5.56	1.84	3.0
TL-Om1/PBMC 0.16%	1.10	0.89	1.16	1.05	0.365	2.9

表2 当施設で測定された参照品のプロウイルス量とその補正值

TL-Om1/Jurkat 参照品	1回目	2回目	3回目	平均	補正值
TL-Om1 genomic DNA	264.50	230.93	227.59	241.01	74.71
Jurkat genomic DNA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
TL-Om1/Jurkat 1/5	35.16	31.28	32.45	32.97	10.24
TL-Om1/Jurkat 1/25	6.64	5.95	6.34	6.31	1.96
TL-Om1/Jurkat 1/125	1.07	0.90	1.28	1.09	0.34
TL-Om1/Jurkat 1/625	0.26	0.26	0.23	0.25	0.08
TL-Om1/Jurkat 1/3125	0.05	0.08	0.04	0.06	0.02

表3 妊婦WB判定保留例 (n = 24) に対する当施設における定量PCR検査結果

Sample 名	100ng	500ng
S-0024	0.00	0.00
S-0025	0.00	0.00
S-0026	0.00	0.00
S-0027	0.00	0.00
S-0030	0.00	0.00
S-0031	0.00	0.00
S-0032	0.00	0.00
S-0035	0.02	0.02
S-0042	0.00	0.00
S-0043	0.00	0.00
S-0045	0.00	0.00
S-0047	0.00	0.00
S-0048	0.00	0.00
S-0049	0.02	0.01
S-0051	0.00	0.00
S-0052	0.00	0.00
S-0053	0.00	0.00
S-0054	0.00	0.00
S-0056	0.02	0.04
S-0058	0.00	0.00
S-0060	0.00	0.00
S-0063	0.00	0.00
S-0065	0.00	0.00
S-0067	0.00	0.00