

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。[1]HTLV-1 検査法標準化確立グループでは、HTLV-1 核酸検査の標準品を設定し、研究室レベルで独自に行われてきた HTLV-1 ウイルス量測定法の標準化を確立した。さらに検査法の有効性を、献血血液及び妊婦の判定保留検体を用いて明らかにした。また、本試験法の早期の実用化を目指し、試薬メーカーと協力して、HTLV-1 核酸検査の体外診断薬開発を進めるとともに、医療施設の検査部門に本診断技術を移転し、先進医療による診断法としての実績を示し、早期に保険適用を受けるための準備を推進した。[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 の水平感染の発症が示唆された。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  
望月 學 東京医科歯科大学 教授  
相良康子 日本赤十字社九州ブロック血液センター 課長  
齋藤 滋 富山大学大学院 教授  
山野嘉久 聖マリアンナ医科大学 准教授  
巽 正志 国立感染症研究所 室長  
大隈 和 国立感染症研究所 室長  
岩永正子 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年末に妊婦検診の標準的検査項目に追加され全国的に実施されるようになった。妊婦検査では抗体検査が2段階構成で実施されるが、2次検査のWestern Blotting (WB) 検査の結果判定保留となる場合が少なからず存在することが問題となっている。WB判定保留に対して追加でHTLV-1核酸検査が予定されている。しかしながらHTLV-1核酸検査

は研究ベースで開発され運用されており、妊婦WB判定保留例に対する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。当研究班では、標準品細胞の性状解析、標準品の設定と標準品測定による施設間差補正のための補正係数の算出、およびHTLV-1核酸検査の測定値の標準化、HTLV-1核酸検査の感度測定、妊婦検診のWestern Blotting (WB)判定保留検体に対して核酸検査の有用性について解析した。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 (gDNA)とした。

妊婦WB判定保留検体：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。

日本赤十字社検体：日本赤十字社献血スクリーニングにおいてHTLV-1陽性・判定保留となった検体の血餅または血液型判定の残検体についてgDNA抽出し、試験に使用した。HTLV-1陰性検体は、譲渡血から分離したPBMCを使用した。

・FISH解析：TL-0m1細胞を低張液で処理後、カルノア液で固定し、スライドグラス上に染色体標本作製した。pUC/HTLV-1プラスミドをnick translation法でdigoxigeninラベルしプローブとした。プローブを標本に滴下し、カバーグラスを被せ70 5分後処理後、37 で一晩ハイブリダイズした。標本をwash後、プローブをanti-digoxigenin抗体 (Cy3ラベル)で検出した。解析はLeica CW4000 FISHで行った。

・シーケンス解析：PCR増幅産物に対してBigDye ver3でPCRを行い、3120xGenetic Analyzerで解析した。

・CGHアレイ解析：TL-0m1ゲノムDNAおよびPBMCゲノムDNA (10検体を同量で混合) に対してfilgen Cytosure™ Syndrome Plus v2.0 arrayを用いてプロトコルに従いアレイ解析した。結果はCytoSure™ Interpret softwareで解析した。

### ・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

FISH解析によってTL-0m1のHTLV-1コピー数は平均1.8コピーであることが明らかになった。また間期の細胞でHTLV-1の挿入部位を検討したところ、HTLV-1プロウイルスはすべて1q44プローブと同じ染色体上にあることが明らかとなり、第1番染色体の1p13に挿入されていた。また間期の染色体数からTL-0m1は4倍体であることが明らかになった。TL-0m1 DNAのInverse-PCRにより挿入部位配列を同定したところ、HTLV-1は第1番染色体のNT\_077389 nt. 164570-164576に逆向きに挿入されていることが明らかとなった。

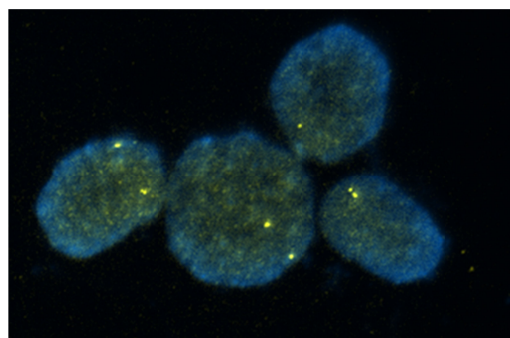


図1. HTLV-1 FISH解析像 (黄色: HTLV-1プローブ)

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、標準化後の測定値を真値に近いものにするためには極めて重要であることから、プロウイルスコピー数のさらに正確に測定するためFISHに加え、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、RNaseP (RPPH1) に対する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 (HTLV-1:1.8コピー/cell, RPPH1: 3.95コピー/cellより算出)とほぼ一致した。またRPPH1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。RPPH1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法でもほぼ結果が一致したことから高い精度でコピー数を規定できていると確認した。

#### ・施設の補正係数の測定 (多施設共同研究)

標準品としてTL-0m1/PBMC希釈系列を設定し、参加8施設に配布し、各施設の方法に従いDNA抽出から定量PCRまでの過程を独立3回測定した。測定結果の平均値には、約5倍の施設間差が認められた。各施設独立3回測定した標準品の測定値をもとに平行線定量法で各施設の補正値を算出した。TL-0m1濃度が0.16%~20%に範囲では全施設で補正が可能となった。

JSPFAD登録キャリア検体からPBMCを分離し、参加施設でDNA抽出およびHTLV-1 PVLの測定を行った。陽性検体のHTLV-1 PVL値には7.4倍の施設間差が認められた。標準品測定から得られた各施設の補正値で補正した結果、施設間差は3.4倍まで減少した。そのうち5施設については補正後に施設間差が1.6倍まで減少し、標準化により測定値の施設間差が縮小することを確認した。

また標準品 (TL-0m1/PBMC希釈系列)の他に比較的準備とロット間差等の品質管理が容易であると考えられる参照品 (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。標準品測定で算出された値を各施設の補正係数とし、参照品の値付けを行った。全2回の標準品測定から計算された補正係数は、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た。

#### ・HTLV-1核酸検査の検出感度

判定保留検体の追加測定としてのHTLV-1核酸検査の有効性を考察する上でおおよその検出感度の確認をした。TL-0m1を極めて低濃度にPBMCに希釈した検体を配布し、それぞれの施設で通常の測定量よりもgDNAを増量し測定したところ、gDNAを500ng使用した場合は、TL-0m1濃度0.002% (PVL 0.004%, 4コピー/ $1 \times 10^5$  cells)まで全施設で陽性となった。また1  $\mu$ gでは、さらに高感度で測定できることが示唆される結果を得た。このことからHTLV-1核酸検査のおおよその感度は、PVL 0.004%, 4コピー/ $1 \times 10^5$  cells付近であることが示唆された。

#### ・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

妊婦WB判定保留検体 (47例)の血漿で、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 核酸検査の標準化

核酸検査 NAT の標準化は、一般的に濃度を規定した標準品を設定し、標準品測定に係る抽出から定量・定性反応までの全体の影響を加味して行われる。標準品は測定するサンプルに出来るだけ近い組成の物質を使用することが望ましいとされることから HTLV-1 核酸検査の標準品として HTLV-1 感染細胞 (TL-0m1 細胞株) の PBMC 希釈系列と設定した。

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度の高い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の簡素化や、作製コストの低減、ロット間差の縮小が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。全 2 回の独立した標準品測定から得られた各施設の補正係数は、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 コピー数測定の施設間差は、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。HTLV-1 核酸検査の検出感度は、おおよそ 4 コピー /  $1 \times 10^5$  cells であり、妊婦 WB 判定保留対策で核酸検査の検出能力を十分に発揮するためには、PCR 反応時に  $1 \mu\text{g}$  以上を用いることが推奨されることが明らかになった。妊婦 WB 判定保留検体 (63 検体) の約 20% (12 検体) 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た。

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, Kawachi 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. Iwanaga M, Watanabe T, Yamaguchi K. Adult T-cell leukemia: a review of epidemiological evidence. *Front Microbiol*. 2012. Sep 10;3:322.
6. Yamagishi M, Nakano K, Miyake A, Yamochi T, Kagami Y, Tsutsumi A, Matsuda Y, Sato-Otsubo A, Muto S, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Uchimaru K, Ogawa S, Watanabe T. Polycomb-mediated loss of miR-31 activates NIK-dependent NF- $\kappa$ B pathway in adult T cell leukemia and other cancers. *Cancer Cell*. 2012. Jan 17;21(1):121-35.
7. 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.
8. 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
9. Nakahata S, Saito Y, Marutsuka K, Hidaka T, Maeda K, Hatakeyama K, Shiraga T, Goto A, Takamatsu N, Asada Y, Utsunomiya A, Okayama A, Kubuki Y, Shimoda K, Ukai Y, Kurosawa G, Morishita K. Clinical significance of CADM1/TSLC1/IgSF4 expression in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Leukemia*. 2012. Jun;26(6):1238-46.
10. Matsumoto C, Igarashi M, Furuta RA, Uchida S, Satake M, Tadokoro K. Xenotropic murine leukemia virus-related virus proviral DNA not detected in blood samples donated in Japan. *Jpn J Infect Dis*. 2012. Jul;65(4):334-6.
11. Kozako T, Akimoto M, Toji S, White Y, Suzuki S, Arima T, Suruga Y, Matsushita K, Shimeno H, Soeda S, Kubota R, Izumo S, Uozumi K, Arima N. Target epitopes of HTLV-1 recognized by class I MHC-restricted cytotoxic T lymphocytes in patients with myelopathy and spastic paraparesis and infected patients with autoimmune disorders. *J Med Virol*. 2011. Mar;83(3):501-9.
12. Mochizuki M, Sugita S, Kamoi K. Immunological homeostasis of the eye. *Prog Retin Eye Res*. 2013. Mar;33:10-27.
13. Kamoi K, Mochizuki M. HTLV infection and the eye. *Curr Opin Ophthalmol*. 2012. Nov;23(6):557-61.
14. Kamoi K, Mochizuki M. HTLV-1 uveitis. *Front Microbiol*. 2012. Jul 24;3:270.
15. 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
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. Takamori A, Hasegawa A, Utsunomiya A, Maeda Y, Yamano Y, Masuda M, Shimizu Y, Tamai Y, Sasada A, Zeng N, Choi I, Uike N, Okamura J, Watanabe T, Masuda T,

- Kannagi M. Functional impairment of Tax-specific but not cytomegalovirus-specific CD8+ T lymphocytes in a minor population of asymptomatic human T-cell leukemia virus type 1-carriers. *Retrovirology*. 2011. Dec 7;8:100.
21. Ogata M, Satou T, Kawano R, Yoshikawa T, Ikewaki J, Kohno K, Ando T, Miyazaki Y, Ohtsuka E, Saburi Y, Kikuchi H, Saikawa T, Kadota J. High incidence of cytomegalovirus, human herpesvirus-6, and Epstein-Barr virus reactivation in patients receiving cytotoxic chemotherapy for adult T cell leukemia. *J Med Virol*. 2011. Apr;83(4):702-9.
22. Kamihira S, Iwanaga M, Doi Y, Sasaki D, Mori S, Tsurda K, Nagai K, Uno N, Hasegawa H, Yanagihara K, Morinaga Y, Tsukasaki K, Taniguchi H. Heterogeneity in clonal nature in the smoldering subtype of adult T-cell leukemia: continuity from carrier status to smoldering ATL. *Int J Hematol*. 2012. Apr;95(4):399-408.
23. Ishihara K, Sasaki D, Tsuruda K, Inokuchi N, Nagai K, Hasegawa H, Yanagihara K, Kamihira S. Impact of miR-155 and miR-126 as novel biomarkers on the assessment of disease progression and prognosis in adult T-cell leukemia. *Cancer Epidemiol*. 2012. Dec;36(6):560-5.
24. Sasaki D, Imaizumi Y, Hasegawa H, Osaka A, Tsukasaki K, Choi YL, Mano H, Marquez VE, Hayashi T, Yanagihara K, Moriwaki Y, Miyazaki Y, Kamihira S, Yamada Y. Overexpression of Enhancer of zeste homolog 2 with trimethylation of lysine 27 on histone H3 in adult T-cell leukemia/lymphoma as a target for epigenetic therapy. *Haematologica*. 2011. May;96(5):712-9.
25. 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.
26. 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.
27. Nishikawa H, Maeda Y, Ishida T, Gnjatic S, Sato E, Mori F, Sugiyama D, Ito A, Fukumori Y, Utsunomiya A, Inagaki H, Old LJ, Ueda R, Sakaguchi S. Cancer/testis antigens are novel targets of immunotherapy for adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood*. 2012. Mar 29;119(13):3097-104.
28. Sugata K, Satou Y, Yasunaga J, Hara H, Ohshima K, Utsunomiya A, Mitsuyama M, Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor impairs cell-mediated immunity by suppressing production of Th1 cytokines. *Blood*. 2012. Jan 12;119(2):434-44.
29. Kamihira S, Iwanaga M, Doi Y, Sasaki D, Mori S, Tsurda K, Nagai K, Uno N, Hasegawa H, Yanagihara K, Morinaga Y, Tsukasaki K, Taniguchi H. Heterogeneity in clonal nature in the smoldering subtype of adult T-cell leukemia: continuity from carrier status to smoldering ATL. *Int J Hematol*. 2012. Apr;95(4):399-408.
30. 岩永正子. ATL の疫学研究の現状と課題. 特集「ATL の基礎と臨床」. *細胞* (ニューサイエンス社), 2012. 44:8-11
31. 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.
32. 齋藤 滋: HTLV-I 母子感染対策. *産婦人科の実際* 2013. 62:543-7.
33. 齋藤 滋: HTLV-I 感染症. *周産期医学*. 2011. 41:1099-103.
- 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

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

全Well陽性  
1 Well陽性  
陰性

DNA量

| TL-Om1<br>濃度 | 鹿児島1 |       | 聖マリ1  |       | SRL1  |       | 聖マリ2  |       | 鹿児島2  |       | 東大    |       | 日赤1   |       | SRL2  |       | 聖マリ3  |       | 長崎    |       | 鹿児島3  |       | 日赤2    |        | 感染研    |        | SRL3   |        | 聖マリ4   |        | 宮崎 |   |
|--------------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|----|---|
|              | 50ng | 100ng | 200ng | 200ng | 200ng | 200ng | 200ng | 200ng | 200ng | 200ng | 500ng | 500ng | 500ng | 500ng | 500ng | 500ng | 500ng | 500ng | 500ng | 500ng | 500ng | 500ng | 1000ng | 1000ng | 1000ng | 1000ng | 1000ng | 1000ng | 2000ng | 2000ng |    |   |
| 0.02%        | +    | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +      | +      | +      | +      | +      | +      | +      | +      | +  | + |
| 0.005%       | +    | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +      | +      | +      | +      | +      | +      | +      | +      | +  | + |
| 0.002%       | +    | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +      | +      | +      | +      | +      | +      | +      | +      | +  | + |
| 0.0005%      | -    | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -  | - |
| 0.0002%      | -    | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -  | - |
| PBMCs        | -    | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -  | - |

宮崎大学はNested-PCRも検討し、PBMCs以外は陽性となった。

図2 . HTLV-1核酸検査の多施設共同測定：検出感度の検討

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

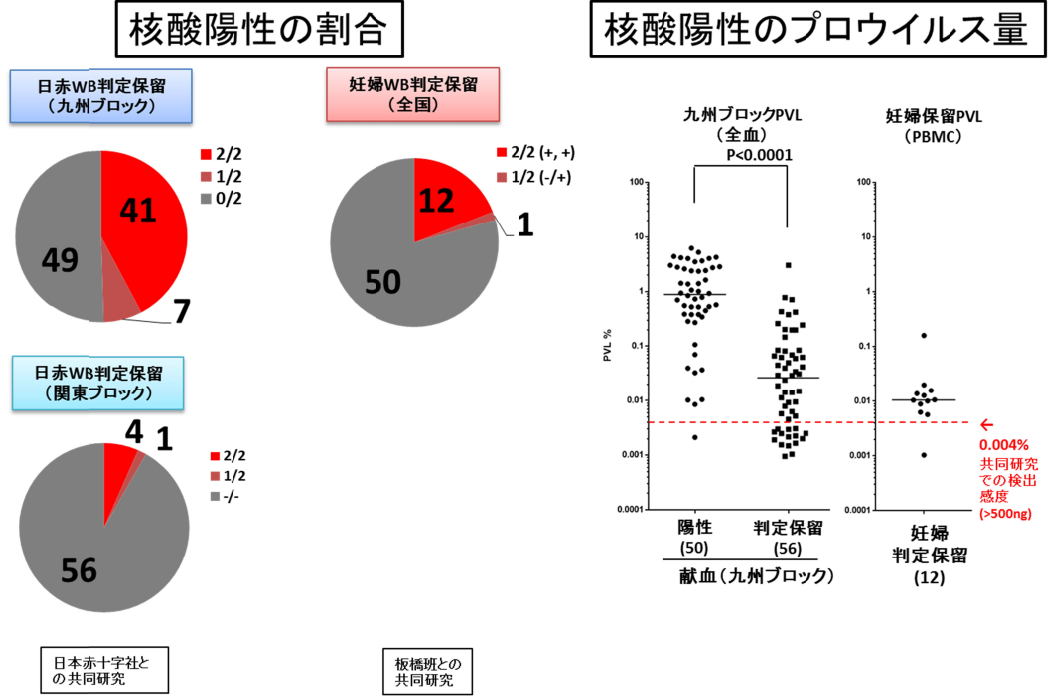


図3 . WB判定保留検体の核酸陽性率

