

題名 HTLV-1感染症の診断法の標準化と発症リスクの解明に関する研究
（測定方法および標準株組み込みプロウイルスに関する検討）

研究分担者 岡山昭彦 宮崎大学医学部 教授

研究協力者 梅木一美、橋倉悠輝、山本成郎

研究要旨： HTLV-1 感染細胞数（プロウイルス量）は ATL 発症のリスクファクターである。しかし HTLV-1 プロウイルス量の測定は施設毎に異なる方法を用いているため得られた値にバラツキを生じている。本研究班の目的の一つはこのプロウイルス量測定の標準化にある。本分担研究では、当施設の測定法を用いて研究班より供与された検体の測定を行い、その性能の評価を行った。この測定法では、アルブミン遺伝子を内部標準とし同一プラスミド上にプロウイルスの複数の部位を組み込んだプラスミドを用いており、欠損プロウイルスについても評価できる。またプロウイルス量測定の基準となる標準物質としては、プラスミドや株細胞由来ゲノム DNA を用いるが、株細胞の場合は欠損ウイルスの存在や長期培養によるプロウイルスをふくむゲノム DNA の変化が問題となる。この点について汎用されている株細胞である MT-2 を用いて検討した。

その結果、当施設のリアルタイム PCR 法によりキャリアプロウイルス測定は、Nested PCR 法と同等の感度を得ることができた。またトータルプロウイルス量を評価する pX 領域と内部標準配列を用いる当施設の方法により、研究班より配布されたサンプルについて理論値に近い結果が得られた。このことからローカルラボにおいても適切な手順を踏むことにより正確なプロウイルス量測定が可能であることが示された。

標準細胞株として汎用されている MT-2 細胞にはこれまでの報告とは異なり、よりも多数のプロウイルスが組み込まれており、様々な欠損パターンを有していることが明らかとなった。また、複数の施設で長期継代培養された細胞株の比較からは HTLV-1 プロウイルスの組み込みパターンにバリエーションがあることが示唆された。内部標準として HTLV-1 感染細胞株を用いる場合は、事前に十分な性状確認が必須であり、また経時的な変化についても考慮する必要がある。

A. 研究目的

HTLV-1感染細胞数（プロウイルス量）はATL発症のリスクファクターである。しかしこれまでの研究でHTLV-1プロウイルスの測定は施設毎に異なる方法を用いているため得られた値にバラツキがあることが示されている。浜口班においては施設間の差を最小にとどめ、また適切な方法で補正することにより全国のローカルラボで同じ尺度でプロウイルス量を測定できる体制の構築を目指し、標準化の試みがなされている。

本分担研究では1)当施設で用いている測定法を用いて研究班より供与された検体の測定を行い、その性能の評価を行った。また2)ウイルス量測定において大きな問題となりうる標準細胞株のプロウイルスについてMT-2細胞株を用いて検討した。

B. 研究方法

1)単一ベクター内に標的配列と内部標準配列を組み込んだプラスミドを用いた当施設でのリアルタイムPCR法の正確性の検討：

当施設の測定法では、アルブミン遺伝子を内部標準とし同一プラスミド上にプロウイルスの複数の部位を組み込んだプラスミドを用いており、欠損プロウイルスについても評価できる。この方法を用いて国立感染症研究所で作成された標準物質及び検討対象サンプルを用いて以下の検討を行った。

臨床検体と標準物質の評価：班より配布された臨床検体60サンプルの測定を行った。また、他施設共同研究として理論値からの隔たりを検証した。

リアルタイムPCR法の測定値とNested PCRによる検出感度の比較：班より配布された低濃度標準候補品サンプルについてリアルタイムPCR法の測定値とNested PCRによる検出感度について検討を行った。このとき鋳型として用いる検体DNAを濃縮することによる検出感度を検討した。また、高感度測定法としてHTLV-1 pX領域をターゲットとしたNested PCR法を作成した。この方法のプライマーは複数の報告で配列の安定性が示されているHTLV-1プロウイルス塩基配列を基に作成した。

HTLV-1ウエスタンブロット判定保留の妊婦検体の検討：班より供与された24検体のHTLV-1ウエスタンブロット判定保留の妊婦サンプルについて当施設のリアルタイムPCR法を用いて評価した。

2)HTLV-1感染標準細胞株の組み込みプロウイルスの検討：

本邦のウイルス量を測定できる一般的な施設では、標準として用いる感染細胞株は施設ごとで異なっている。このため感染細胞の性状および、組み込まれているプロウイルスの変異や欠損の有無が標準曲線やプライマーを選択する際に大きな問題となる。本研究では汎用されている代表的なHTLV-1感染細胞株であるMT-2細胞株について性状および組み込まれているプロウイルスの欠損パターン

を複数の細胞株で検討した。

C. 研究結果

1) 単一ベクター内に標的配列と内部標準配列を組み込んだプラスミドを用いた当施設でのリアルタイムPCR法の正確性の検討

臨床検体と標準物質の評価:

臨床検体60サンプルを6施設で測定したサーベイ参加の結果ではコアラボとの相関係数0.76、傾き0.984と概ね良好な結果が得られたが、1検体の測定結果がコアラボと大きく乖離した。このサンプルについて5'LTR領域、gag領域、pX領域を組み込んだプラスミドを用いた測定を行った結果では、100細胞あたりのコピー数が、5'LTR領域で0.3%、gag領域で0.1%、pX領域で71.2%と少なくとも5'LTR領域からgag領域を欠損するプロウイルスが組み込まれた細胞のモノクローナルな増殖を主とした検体であることが示唆された。

平成23年10月配布のHTLV-1候補品7本、臨床検体32本について、他の6施設と当施設の測定結果を比較したところ、それぞれのサンプルの測定値は各施設の実測値のほぼ中央に位置していた。

リアルタイムPCR法の測定値とNested PCRによる検出感度の比較:

班より配布された低濃度標準候補品について、サンプルDNAをエタノール沈殿法で濃縮し1反応あたり2μgのDNAを用いることにより、プロウイルスDNAの検出感度は300,000細胞中に感染細胞が1.5個あれば検出できる高感度となることが示された。またNested PCR法でもほぼ同等の感度であった。

HTLV-1ウエスタンブロット判定保留の妊婦検体の検討:

24検体のHTLV-1ウエスタンブロット判定保留の妊婦サンプルについて当施設のリアルタイムPCR法を用いて評価した結果、4例が陽性と判定された。これは他施設の結果と同等の結果であった。

2) HTLV-1感染標準細胞株の組み込みプロウイルスの検討:

代表的なHTLV-1感染細胞株であるMT-2細胞株について性状および組み込まれているプロウイルスの欠損パターンを3施設由来の細胞株で検討した。まず、同一の細胞株であっても、染色体分析の結果、個々の細胞ごとに染色体本数などの多様性がみられた。さらにinverse-PCR法とPCR産物のクローニング、組み込み部位特異的PCR法を用いた解析により、細胞株ごとに組み込まれているプロウイルスの欠損パターンやゲノム位置が以前のMT-2細胞についての報告とは異なっていた。3施設由来の細胞株について、通常のアльブミン(ALB)を内部標準とした方法でプロウイルス量を株ごとに測定すると、1.5-4倍異なっており、異なる施設での長期培養により、同一とされる株であってもプロウイルス量が異なることが示された。

プロウイルスの欠損パターンとしては、欠損の検出されない完全長と思われるプロウイルス以外に、内部領域が大きく欠損したプロウイルスが高頻度に見られ、5'側が欠損したもの、そのほかの欠損等多様なパターンがみられた。

D. 考察

同一のベクターに目的ウイルス遺伝子配列と内部標準配列を組み込んだプラスミドを用いた測定法により再現性の良い結果が得られた。しかし、モノク

ローナルな増殖細胞が感染細胞の多くを占めるキャリアの測定では、ウイルスあるいはゲノムの遺伝子多型や欠損が各施設で用いられるプライマーやプローブなど定量PCR測定系に大きな影響を与える可能性があり、この点を考慮した統一化を図る必要があることが判明した。

さらにリアルタイムPCR法の条件を調整することによりNested PCR法と遜色のない感度を得ることができた。施設間で常に同等の感度を得ることが可能か、またサンプルとして用いるテンプレートDNA量を統一するべきか、国内外の地域によってキャリアのプロウイルスの一塩基多型の頻度が異なり結果に影響しないかなどの検討が必要と思われた。

またHTLV-1ウエスタンブロット判定保留の妊婦検体については、今回の検討では比較的安定した結果が得られたが、今後さらに多数例での検討を行う必要があると思われた。

MT-2細胞株のプロウイルスの検討により、さまざまな欠損を有するプロウイルスが多数組み込まれていることが判明した。さらに染色体数についても大きな幅があり、細胞数をカウントする際の内部標準として通常用いられているアλブミン等の遺伝子についても、細胞株ごとに事前に検討する必要があると思われた。また長期の培養により同じ細胞株であっても上記のような性状の変化が同一施設あるいは異なる施設で起きる可能性が大きく、ローカルラボで細胞株由来ゲノムDNAを標準物質としてプロウイルス量の測定を行う際には特に注意を要すると思われた。

E. 結論

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

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Ueno S, Umeki K, Takajo I, Nagatomo Y, Kusumoto N, Umekita K, Morishita K, Okayama A. Proviral loads of human T-lymphotropic virus type 1 in asymptomatic carriers with different infection routes. *Int J Cancer*. 2012, 130, 2318-26.

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, 26:1238-46.

岡山昭彦. 特集/ストップ ザ 性感染症 性感

染症 診断・治療 HTLV-1 感染. 臨床と研究. 2012;89:7, 907-910.

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*. 2013. [Epub ahead of print]

Umekita K, Umeki K, Miyauchi S, Ueno S, Kubo K, Kusumoto N, Takajo I, Nagatomo, Okayama A. Use of anti-tumor necrosis factor biologics in the treatment of rheumatoid arthritis does not change human T-lymphotropic virus type 1 markers: a case series. *Modern Rheumatology*. 2013. [Epub ahead of print]

Ishida Y, 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. [Epub ahead of print]

Kai H, Akamatsu E, Torii E, Kodama H, Yukizaki C, Akagi I, Ino H, Sakakibara Y, Suiko M, Yamamoto I, Okayama A, Morishita K, Kataoka H, Matsuno K. Identification of a Bioactive Compound against Adult T-cell Leukaemia from Bitter Gourd Seeds. *Plants*. 2014; 3: 18-26.

2. 学会などの発表

梅木一美, 山本成郎, 上野史朗, 高城一郎, 岡山昭彦: HTLV-1 無症候性キャリアにおける 2 型欠損プロウイルスの解析. 日本臨床検査医学会学術総会. 2011

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

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

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

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

久保和義, 梅北邦彦, 飯屋裕美, 川口剛, 坂口翔太, 橋場弥生, 松田基弘, 宮内俊一, 上野史朗, 楠元規

生, 高城一郎, 長友安弘, 岡山昭彦. HTLV-1 陽性関節リウマチ患者に対する TNF 製剤の効果ならびにウイルス学的影響. 第 57 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 第 22 回国際リウマチシンポジウム. 2013.

中武彩子, 小林行治, 西片一朗, 中畑新吾, 岩永正子, 相良康子, 北中明, 天野正宏, 前田宏一, 末岡榮三朗, 瀬戸山充, 岡山昭彦, 宇都宮與, 下田和哉, 渡邊俊樹, 森下和弘. 血中可溶性 CADM1/TSLC1 測定による ATL 診断法の開発. 第 6 回 HTLV-1 研究会/シンポジウム. 2013.

宮内俊一, 梅北邦彦, 日高利彦, 橋場弥生, 川口剛, 松田基弘, 久保和義, 上野史朗, 楠元規生, 高城一郎, 長友安弘, 岡山昭彦. HTLV-1 陽性関節リウマチ患者に対する抗 TNF 療法. 第 6 回 HTLV-1 研究会/シンポジウム. 2013.

岡山昭彦, 川上純, 藤田次郎, 瀬戸山充, 望月學. 慢性炎症性疾患における HTLV-1 感染の基礎的臨床的検討. 第 41 回日本臨床免疫学会総会. 下関開催記念シンポジウム 免疫制御と自己免疫: 臨床と基礎免疫学のクロストーク. 2013.

Miyauchi S, Umekita K, Hidaka T, Hashiba Y, Kawaguchi T, Matsuda M, Kubo K, Ueno S, Kusumoto N, Takajo I, Kai Y, Nagatomo Y, Okayama A. Treatment with anti-tumor necrosis factor(TNF)biologics to Human T-lymphotropic virus type 1(HTLV-1)positive patients with rheumatoid arthritis (RA): a case-control study. *Annual European Congress of Rheumatology. EULAR* 2013.. 2013.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし