

- 16) Yu H, Fujita J, Higa F, et al. Nonspecific interstitial pneumonia pattern as pulmonary involvement in human T-cell lymphotropic virus type 1 carriers. *J Infect Chemother* 2009 ; 15 : 284.
- 17) Einsiedel L, Fernandes L, Spelman T, et al. Bronchiectasis is associated with human T-lymphotropic virus 1 infection in an Indigenous Australian population. *Clin Infect Dis* 2012 ; 54 : 43.
- 18) Nomori H, Mori T, Iyama K, et al. Risk of bronchioalveolar carcinoma in patients with human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-I): case-control study results. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 2011 ; 17 : 19.
- 19) Teruya H, Tomita M, Senba M, et al. Human T-cell leukemia virus type I infects human lung epithelial cells and induces gene expression of cytokines, chemokines and cell adhesion molecules. *Retrovirology* 2008 ; 5 : 86.
- 20) Bittencourt AL, de Oliveira Mde F. Cutaneous manifestations associated with HTLV-1 infection. *Int J Dermatol* 2010 ; 49 : 1099.
- 21) Souza-Machado A, Galvão TS, Porto A, et al. Skin reactivity to aeroallergens is reduced in human T-lymphotropic virus type I-infected healthy blood-donors (asymptomatic carriers). *Allergy* 2005 ; 60 : 379.
- 22) Watanabe A, Kawajiri M, Ikezoe K, et al. HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis accompanied with psoriasis. *J Neurol Sci* 2004 ; 221 : 95.
- 23) Araya N, Sato T, Yagishita N, et al. Human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and regulatory T cells in HTLV-1-associated neuroinflammatory disease. *Viruses* 2011 ; 3 : 1532.
- 24) Umekita K, Hidaka T, Miyauchi S, et al. Treatment with anti-tumor necrosis factor biologics in human T-lymphotropic virus type 1 positive patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res*. In press 2013.
- 25) Nakamura H, Ueki Y, Saito S, et al. Development of adult T-cell leukemia in a patient with rheumatoid arthritis treated with tocilizumab. *Int Med* 2013 ; 52 : 1983.
- 26) Bittencourt AL, Oliveira PD, Bittencourt VG, et al. Adult T-cell leukemia/lymphoma triggered by adalimumab. *J Clin Virol* 2013 ; 58 : 494.
- 27) Umekita K, Umeki K, Miyauchi S, et al. 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. *Mod Rheumatol*. In press 2013.

* * *

特集

ATL/HTLV-1研究の最近の進展

HTLV-1関連脊髄症(HAM)に対する分子標的治療薬開発の現状と将来*

新谷 奈津美**
 山野 嘉久**

Key Words : HTLV-1, HTLV-1-associated myelopathy (HAM), CCR4, CXCL10

はじめに

ヒトT細胞白血病ウイルス1型(HTLV-1)の感染者は本邦で約108万人存在し、その一部に発症するHTLV-1関連脊髄症(HAM)は、進行性の痙性対麻痺を特徴とする疾病で、有効な治療法がなく患者の生活の質(QOL)は大きく損われており、アンメットニーズの高い、きわめて深刻な難治性希少疾患である。このためHAMは、国の難治性疾患克服研究事業の対象疾患(難病)に認定されている。現在、HAMの治療はステロイドやインターフェロン α が主に使用されているが、これら薬剤は効果が不十分で、また副作用の問題もあり継続が困難である場合が多く、HAM患者の機能予後はきわめて不良であるのが現状で、より効果や長期忍容性に優れ、患者の長期予後の改善に結びつく画期的な新規治療薬開発の要望が強い。

これまでの研究により、HAMの主な病態は、HTLV-1感染細胞の増加や活性化が引き金となって脊髄に慢性炎症が成立し、神経組織の不可逆的な損傷をひき起こすものと考えられている。そのためHAMの新薬開発は感染細胞や炎症を制

御する治療薬の開発を目指して進められてきた。

近年、HAMの分子病態解明に伴い、ケモカイン受容体CC chemokine receptor 4(CCR4)がHTLV-1感染細胞に対する特異的な治療標的分子となりうることが明らかとなり、臨床試験が実施されるまでに発展した。また、脊髄病巣でのアストロサイトから過剰産生されるケモカインCXC motif ligand 10(CXCL10)が、炎症の慢性化において主要な役割を果たしていることが明らかとなってきている。本稿では、HAMの分子レベルでの病態解明に関連する基礎研究やバイオマーカー研究の成果を踏まえた、新薬開発の現状や今後の展望について概説する。

HAMの特徴

HAMは、1986年にOsameらにより一つの疾患単位として提唱された¹⁾。日本では、HTLV-1感染者の生涯において約0.3%の確立で発症すると推定されており、最近の疫学調査では、全国の患者数は約3,600名と推定され、関東などの大都市圏で患者数が増加していると報告されている。その主病態は、HTLV-1感染細胞に起因した脊髄での慢性炎症による神経組織障害である。すなわち、HTLV-1感染細胞が脊髄へ遊走して炎症反応が惹起されると、炎症細胞が病変部へリクルートされることで炎症の慢性化が成立し、病変部

* The current and future approaches to the development of molecular targeted therapy for HTLV-1-associated myelopathy (HAM).

** Natsumi ARAYA, Ph.D. & Yoshihisa YAMANO, M.D., Ph.D.: 聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター病因・病態解析部門[〒216-8512 神奈川県川崎市宮前区菅生2-16-1]; Department of Rare Diseases Research, Institute of Medical Science, St. Marianna University School of Medicine, Kawasaki, Kanagawa 216-8512, JAPAN

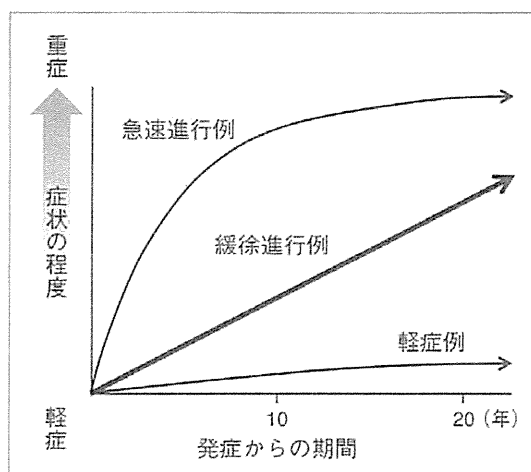


図1 HAMの臨床経過の特徴

でのサイトカインや細胞傷害性T細胞の作用により周辺の神経組織が破壊されることで変性が生じると考えられている²⁾。その結果、HAMの初期症状として歩行の違和感、足のもつれ、走ると転びやすい、足のしびれ、頻尿などがあらわれ、その後多くは進行し、歩行困難、極度の頻尿、尿閉、高度の便秘、時に両下肢の疼痛などが出現し、徐々に日常生活が困難になっていく。さらに、重症例では、下肢の完全麻痺や体幹の筋力低下による座位保持困難により、寝たきりになる場合もある^{3,4)}。

HAMの自然史は(図1参照)、多くの患者では歩行障害などが10年単位で緩徐に進行する経過を示す(緩徐進行例)。また、発症して急速に症状が進行し、発症から2年以内に歩行不能となる比較的急速な進行を示す例(急速進行例)もある。一方で、数十年の経過においてほとんど進行せず軽症の状態を持続する例も認められる(軽症例)。このようにHAM患者の経過(進行度)には個人差が大きいという特徴があり、診療の際には経過や疾患活動性を踏まえた治療の実施が望まれる。

HAMのバイオマーカー

上述のようにHAMの臨床症状の進行度にはバリエーションがあることから、患者個々人に応じた適切な治療を提供するためには、予後予測や疾患活動性の評価、経過のモニタリングや治療効果の判定等を可能にするバイオマーカーが

必要とされる。またHAMに対する新薬開発を実現するためには、その有効性を証明する検証的臨床試験の実施が必要となるが、HAMの経過は一般に数十年と長いため、治療の最終目標(true end point)である長期予後の改善を対象に臨床試験を実施することは非現実的であり、true end pointと統計学的に相関し、かつ定量性の高いsurrogate marker(代替マーカー)を決定し、その改善を代替エンドポイントとした臨床試験の実施が望まれる。しかしながら、HAMにおいてsurrogate markerは確立しておらず、その開発に向けた研究推進の必要性が高い。

Surrogate markerの候補は、まず病気の進行度と相関するマーカー(prognostic marker)として証明される必要がある⁵⁾、これまでHAMにおいて進行度や長期予後との相関性が報告されているバイオマーカーとしては、末梢血HTLV-1プロウイルス量⁶⁾、髄液/血液HTLV-1プロウイルス量比⁷⁾がある。さらに最近われわれは、治療介入歴のないHAM患者において26種類のバイオマーカー候補分子を定量的に測定し、症状進行群と非進行群で比較検討したところ、髄液のCXCL10、CXCL9、ネオプテリンの濃度が、進行度とより強く相関することを明らかにし、またこれら髄液の炎症マーカーのレベルは末梢血プロウイルス量と相関することを示した⁸⁾。これらの報告は、HAMの長期予後を真に改善するためには、HTLV-1感染細胞数ならびに脊髄での炎症レベルを、症状が進行しない患者群のレベルにまで制御できる治療薬の開発が必要であることを示唆している。さらにこれらのマーカーは、HAMのprognostic markerやsurrogate markerの有望な候補であり、その検証と確立を目指した前向きな多施設共同によるオミックス解析も含めた長期的な研究の実施がきわめて重要な課題である。

HAMにおける感染細胞の特徴

最近、HAM患者においてHTLV-1感染細胞が非常にユニークな特徴を有することが判明してきた。HTLV-1は、免疫の司令塔であるCD4⁺ヘルパーT(Th)細胞に持続感染するが、このTh細胞はナイーブT細胞からTh1, Th2, Th17, 制御性T細胞(Treg)などのThサブセットに分化し、

それぞれ特徴的な転写因子やサイトカイン、ケモカイン受容体を発現している。通常、これらのThサブセットはバランスを保って存在しているが、そのバランスに破綻が生じると宿主に免疫異常が引き起こされると考えられており、近年、このバランス破綻にTh細胞の分化異常の重要性が注目されている⁹⁾。これに関連して、われわれはHAMにおけるHTLV-1感染細胞が主にTregやTh2細胞に発現するケモカイン受容体CCR4陽性のCD4⁺T細胞であり、興味深いことにHAMの末梢血CCR4⁺CD4⁺T細胞は、炎症性サイトカインIFN- γ を産生するTh1細胞様の異常細胞に変化し増加していることを示した¹⁰⁾。また、HTLV-1由来の機能遺伝子であるtaxやHBZの発現がTregの免疫制御機能の低下を誘導することが報告されている¹¹⁾¹²⁾。このようにHAM患者におけるCCR4⁺CD4⁺T細胞は、HTLV-1感染によって機能的な異常を伴って増加しており、Thバランスにも影響を与え、HAM病態形成に重要な役割を果たしていることが示唆されている。

HAMにおける炎症の慢性化機構

HAM脊髄病巣の病理所見では、小血管周囲の炎症細胞の浸潤やIFN- γ などの炎症性サイトカインの発現を認め、持続的な炎症が起こっていることが示されてきた¹³⁾。さらに、HTLV-1感染細胞についてin situ PCR法を用いて解析されており、HTLV-1の感染は浸潤したT細胞にのみ確認され、周辺の神経細胞やグリア細胞には確認されていない¹⁴⁾。以上から、HAMの脊髄病巣ではHTLV-1感染T細胞に起因する慢性炎症が存在すると考えられているが、その炎症の形成および慢性化機構については不明であった。

最近、われわれはHAM患者脊髄における炎症の慢性化が脊髄局所での病的なケモカイン産生を軸とする炎症のポジティブフィードバックループに起因するという仮説を立て、HAMの病態の主軸となるケモカインの同定を試みた¹⁵⁾。その結果、HAM患者髄液中で高値を示した炎症性ケモカインの中で、Th1細胞に発現するCXCR3のリガンドであるCXCL10のみが、血清中よりも髄液中で高い濃度勾配を示し、髄液CXCL10濃度は髄液細胞数と相関していた。また、HAM患者の髄液

や脊髄病変には、CXCR3を発現する細胞(主にCD4⁺T細胞とCD8⁺T細胞)が多数を占めており、CXCL10によりCXCR3陽性細胞が優先的に脊髄に遊走していることが示された。さらに、CXCL10により遊走するCXCR3⁺CD4⁺T細胞は、その一部にHTLV-1感染を認め、HTLV-1感染細胞の脊髄への遊走にもCXCL10が重要な役割を果たしていることが示唆された。また、患者脊髄病変部におけるCXCL10の主な産生細胞はアストロサイトであることが判明し、アストロサイトは患者由来CD4⁺T細胞からのIFN- γ 産生によりCXCL10を過剰産生することが示された。以上より、HAMの脊髄病変では浸潤したHTLV-1感染細胞から産生されるIFN- γ によってアストロサイトからのCXCL10産生を刺激し、そのCXCL10はCXCR3陽性の感染CD4⁺T細胞やCD8⁺T細胞などの炎症細胞の脊髄への遊走を促し、それらの細胞がIFN- γ を産生してアストロサイトからのさらなるCXCL10産生を刺激するという、炎症のポジティブフィードバックループ(IFN- γ -CXCL10-CXCR3ループ)の形成が炎症の慢性化機構の主軸であり、HAMの脊髄病巣の形成・維持に重要な役割を果たしていると考えられる(図2)¹⁵⁾。

HAMに対する抗CCR4抗体療法の開発

上述したようなこれまでのHAMの病態研究や臨床的なデータから、HAM患者においてHTLV-1感染細胞の劇的な低下とその維持を実現することは、病態ならびに長期予後の改善につながることを予想され、HAMにおいて感染細胞を標的とした薬剤開発の必要性が高い。そのためこれまでも世界中の研究者がHAMに対する抗ウイルス療法の開発を試みてきた。逆転写酵素阻害薬やプロテアーゼ阻害薬などは*in vitro*での感染阻害作用が示され、実際にHAM患者を対象として臨床試験が実施されたが、ウイルス量の減少効果はまったく得られず、治療効果に乏しかった¹⁶⁾¹⁷⁾。HTLV-1は、エイズウイルスや肝炎ウイルスなどとは異なり転写レベルが低いため血清中にウイルスが存在せず、また感染細胞はオリゴクローナルな集団を形成する特徴を有しているので¹⁸⁾¹⁹⁾、ウイルス量の制御には異なった戦略、たとえば感染細胞を特異的に攻撃・死滅させる

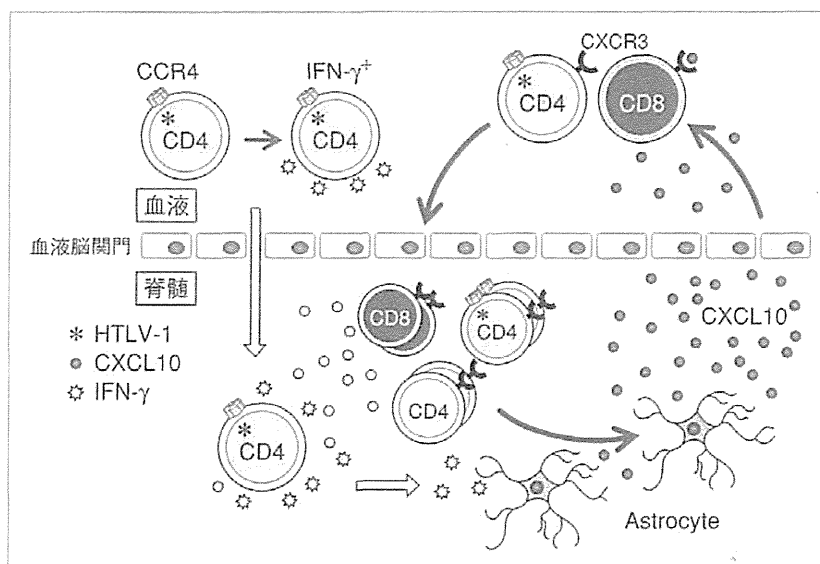


図2 HAM感染細胞を起因とした炎症のポジティブフィードバックループ

抗体療法などの開発が必要と考えられる。

そこでわれわれは、HAM患者においてHTLV-1が主にCCR4陽性T細胞に感染し、その細胞機能が炎症促進的になっていると報告したことなどを踏まえ¹⁰⁾、CCR4抗原を標的として抗体依存性細胞障害活性を示すヒト化抗CCR4抗体製剤mogamulizumab (KW-0761)に着目して研究を進めた。KW-0761はわが国で開発され、HTLV-1感染者より発症する成人T細胞白血病・リンパ腫(ATLL)の治療薬として最近承認された薬剤である。われわれはKW-0761を用いて、HAM患者の血液・髄液由来細胞における感染細胞殺傷効果、自発的細胞増殖抑制効果、炎症性サイトカイン産生抑制効果等を証明し、CCR4がHAMの有用な治療標的分子であることを示した²⁰⁾。さらに、これまでのKW-0761を用いた他の治験において、健康成人やATL等患者に対する安全性が確認されており、またATL患者におけるCCR4陽性ATL細胞の劇的な減少効果が示されていることから²¹⁾²²⁾、KW-0761は、HAMに対する安全かつ有効な治療薬になりうると考えられた。そこで、KW-0761のHAMに対する医師主導治験の実施を計画した。試験デザインは、HAMが希少難病であることを踏まえ、できるだけ早期に新薬承認がなされるよう、第I/IIa相試験と工夫した。治験プロトコルの内容は、対象を既存治療で効果不十分なHAM患者とし、主要評価項目は安全性で、用量制限

毒性の発現状況に基づき、最大耐用量を明らかにし、同時に薬物動態について検討する。また副次的に、抗感染細胞効果や歩行時間の非増悪期間などを検討して有効性を探索する。すでに治験プロトコルに関して医薬品医療機器総合機構(PMDA)の対面助言を終了しており、厚生労働省科学研究費補助金の助成のもと、2013年12月から治験を開始した。今回実施するKW-0761の治験が成功すれば、これまで有効な治療法が確立していない神経難病であるHAMの長期予後改善に結びつく、日本発の革新的な治療薬の創出につながり、HAMの治療にパラダイムシフトをもたらすことが期待される。

おわりに

HAMは長期にわたり障害を強いられる疾患で、患者の苦痛は大変深刻であり、一刻も早い有効な治療法の開発が切望されている。HAMのこれまでの研究により、感染細胞を標的とした薬剤開発はHAMの根本的な治療薬となることが期待されてきたが、これまで実現されなかった。ところが、近年の分子レベルでの病態解明やわが国の研究者によるバイオテクノロジー技術の進展などにより、その実現の可能性を探る臨床試験実施の機会が得られる段階にまで発展してきている。HAMは慢性炎症性疾患であるので、薬剤開発においては、安全性や長期忍容性などを

十分に配慮することが求められる。現状では、抗CCR4抗体製剤がHTLV-1感染細胞の劇的な減少を期待できる唯一の薬剤であるので、安全に治療可能な用量や用法などの決定に向け、慎重かつ綿密な臨床試験の実施を重ね、有用なエビデンスを蓄積していくことが重要と考える。

近年ではHAMの治療標的と成りうる細胞や分子の理解が進んできており、今後、新薬につながる成果がさらに得られることが期待される。また、ウイルス感染症と脊髄の慢性炎症の制御が、当面のHAM治療の達成すべき課題であるが、最近注目を集めている再生医療の応用も必要と考えられる。HAM患者は世界中に存在するが、先進国の中で患者数が多いのは日本のみであり、HAMの新薬開発研究におけるわが国の役割は大きい。

文 献

- 1) Osame M, Usuku K, Izumo S, et al. HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet* 1986 ; 1 : 1031.
- 2) Yamano Y, Sato T, Ando H, et al. [The current and future approaches to the treatment of HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP)]. *Nihon Rinsho* 2012 ; 70 : 705. Japanese.
- 3) Nakagawa M, Izumo S, Ijichi S, et al. HTLV-I-associated myelopathy : analysis of 213 patients based on clinical features and laboratory findings. *J Neurovirol* 1995 ; 1 : 50.
- 4) Martin F, Fedina A, Youshya S, et al. A 15-year prospective longitudinal study of disease progression in patients with HTLV-1 associated myelopathy in the UK. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2010 ; 81 : 1336.
- 5) Buyse M, Sargent DJ, Grothey A, et al. Biomarkers and surrogate end points--the challenge of statistical validation. *Nat Rev Clin Oncol* 2010 ; 7 : 309.
- 6) Olindo S, Lezin A, Cabre P, et al. HTLV-1 proviral load in peripheral blood mononuclear cells quantified in 100 HAM/TSP patients : a marker of disease progression. *J Neurol Sci* 2005 ; 237 : 53.
- 7) Takenouchi N, Yamano Y, Usuku K, et al. Usefulness of proviral load measurement for monitoring of disease activity in individual patients with human T-lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Neurovirol* 2003 ; 9 : 29.
- 8) Sato T, Coler-Reilly A, Utsunomiya A, et al. CSF CXCL10, CXCL9, and Neopterin as Candidate Prognostic Biomarkers for HTLV-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 2013 ; 7 : e2479.
- 9) Zhou X, Bailey-Bucktrout SL, Jeker LT, et al. Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. *Nat Immunol* 2009 ; 10 : 1000.
- 10) Yamano Y, Araya N, Sato T, et al. Abnormally high levels of virus-infected IFN-gamma⁺ CCR4⁺ CD4⁺ CD25⁺ T cells in a retrovirus-associated neuro-inflammatory disorder. *PLoS One* 2009 ; 4 : e6517.
- 11) Yamano Y, Takenouchi N, Li HC, et al. Virus-induced dysfunction of CD4⁺CD25⁺ T cells in patients with HTLV-I-associated neuroimmunological disease. *J Clin Invest* 2005 ; 115 : 1361.
- 12) Yamamoto-Taguchi N, Satou Y, Miyazato P, et al. HTLV-1 bZIP Factor Induces Inflammation through Labile Foxp3 Expression. *PLoS Pathog* 2013 ; 9 : e1003630.
- 13) Izumo S, Umehara F, Osame M. HTLV-I-associated myelopathy. *Neuropathology* 2000 ; 20 : S65.
- 14) Matsuoka E, Takenouchi N, Hashimoto K, et al. Perivascular T cells are infected with HTLV-I in the spinal cord lesions with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis : double staining of immunohistochemistry and polymerase chain reaction in situ hybridization. *Acta Neuropathol* 1998 ; 96 : 340.
- 15) Ando H, Sato T, Tomaru U, et al. Positive feedback loop via astrocytes causes chronic inflammation in virus-associated myelopathy. *Brain* 2013 ; 136 : 2876.
- 16) Taylor GP, Goon P, Furukawa Y, et al. Zidovudine plus lamivudine in Human T-Lymphotropic Virus type-I-associated myelopathy : a randomised trial. *Retrovirology* 2006 ; 3 : 63.
- 17) Macchi B, Balestrieri E, Ascolani A, et al. Suscepti-

- bility of primary HTLV-1 isolates from patients with HTLV-1-associated myelopathy to reverse transcriptase inhibitors. *Viruses* 2011 ; 3 : 469.
- 18) Wattel E, Vartanian JP, Pannetier C, et al. Clonal expansion of human T-cell leukemia virus type I-infected cells in asymptomatic and symptomatic carriers without malignancy. *J Virol* 1995 ; 69 : 2863.
- 19) Cavrois M, Leclercq I, Gout O, et al. 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.
- 20) 国際出願番号 : PCT/JP2013/068296, 発明者 : 山野嘉久. A THERAPEUTIC METHOD AND MEDICAMENT FOR HTLV-1 ASSOCIATED MYELOPATHY (HAM). 国際出願日 : 2013年7月3日.
- 21) Yamamoto K, Utsunomiya A, Tobinai K, et al. Phase I study of KW-0761, a defucosylated humanized anti-CCR4 antibody, in relapsed patients with adult T-cell leukemia-lymphoma and peripheral T-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2010 ; 28 : 1591.
- 22) Ishida T, Joh T, Uike N, et al. Defucosylated anti-CCR4 monoclonal antibody (KW-0761) for relapsed adult T-cell leukemia-lymphoma : a multicenter phase II study. *J Clin Oncol* 2012 ; 30 : 837.

* * *

第一部 サロゲートエンドポイントの上手な決め方

希少な慢性進行性の神経難病HAMにおける治療有効性評価モデルの探索

Search for a model of drug efficacy for a rare chronic progressive neurological disease HAM



山野 嘉久

Yoshihisa Yamano

聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター病因・病態解析部門

Department of Rare Diseases Research, Institute of Medical Science, St. Marianna University School of Medicine

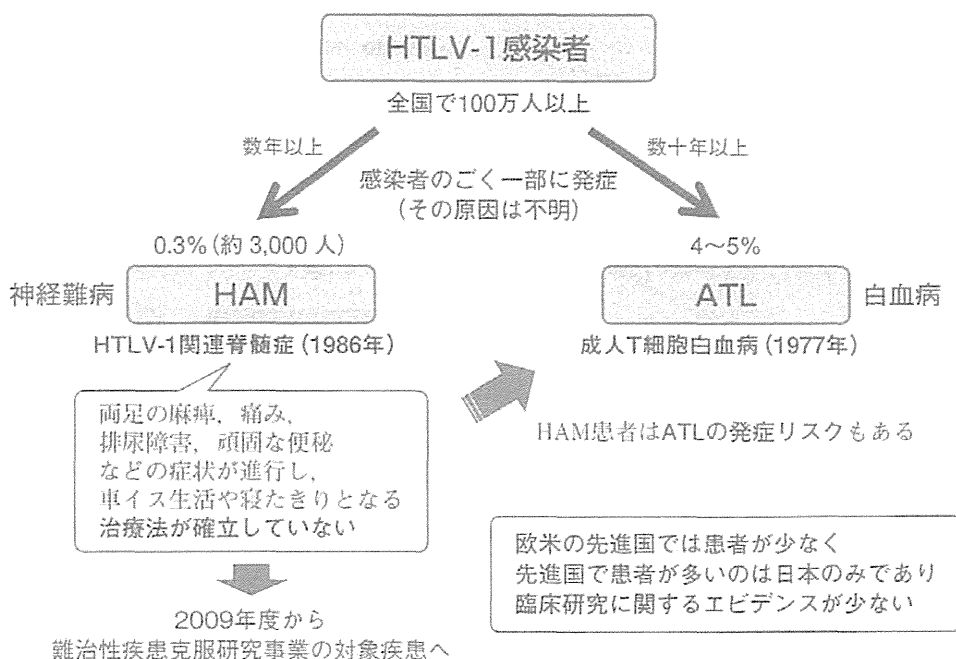
1. HAMとは

我々は希少難病、特に希少神経難病をターゲットに研究を進めています。臨床試験に取り組んでおられる先生方とより交流を深め、一緒に治療薬を開発していけることを望んでいます。今日はHAM (HTLV-1 Associated Myelopathy : HTLV-1 関連脊髄症) という希少神経難病についての治療

効果評価指標の確立に向けた研究の内容を紹介させていただきます。HAMは、rareでchronicという難しい疾患です。

まず、HAMとはHTLV-1感染者の一部に発症する神経難病です (Fig. 1)。HTLV-1とは、ヒトのT細胞に白血病を起こすウイルス1型 (Human T-cell Leukemia Virus type-1) のことで、世界共通でHTLV-1と呼ばれています。日本には100万人以上の感染者があり、すなわち約100人に1人

Fig. 1 HTLV-1関連脊髄症 (HAM) とは



が感染しています。HTLV-1の感染者は、その約0.3%にHAMを発症します。日本には約3,000人のHAM患者がいるといわれています。

このウイルスは感染者の4～5%に致死的な成人T細胞白血病 (Adult T-cell Leukemia: ATL) を引き起こし、残念ながらATLの治療法は確立されていません。一方、HAMは脊髄が傷害されるので両足の麻痺、痛み、排尿障害、頑固な便秘などの症状が進行し、重症な方は車イス生活や寝たきりになる病気です。残念ながらHAMも治療法が確立されておらず、2009年に国の難病に指定されています。

HTLV-1感染症やHAMは欧米の先進国で感染者、患者が少ないという特徴があります。先進国で患者が多いのは日本のみで、欧米での臨床研究に関するエビデンスがとても少ないことが、他の難病と比較してこの病気の研究が進展しにくい大きな原因の1つとなっています。したがって、日本で積極的に取り組むことが強く求められています。

2. HAMのバイオマーカー

HAMの治療は、その臨床経過や疾患活動性を踏まえて治療戦略を考える必要があると思われます (Fig. 2)。HAM患者の経過は様々という特徴があるので、できるだけ早く疾患活動性を判定し、経過や疾患活動性に応じた治療を実施することが望まれます。重要なことは、治療の最終目標が長期予後の改善であることを認識することで、これを見据えた治療戦略が必要です。そのためには、長期予後や経過と相関するバイオマーカーの情報が必要です。そして、経過や疾患活動性に応じた治療成績に関するエビデンスを作ることがさらに必要と思います。

今日のセッションのテーマはサロゲートエンドポイントですので、HAMのサロゲートエンドポイントについて考えてみたいと思います (Fig. 3)。希少難病であるHAMでは、まだサロゲートエンドポイントが確立されていませんが、これからど

Fig. 2 HAMの経過の特徴を踏まえた治療の考え方 (案)

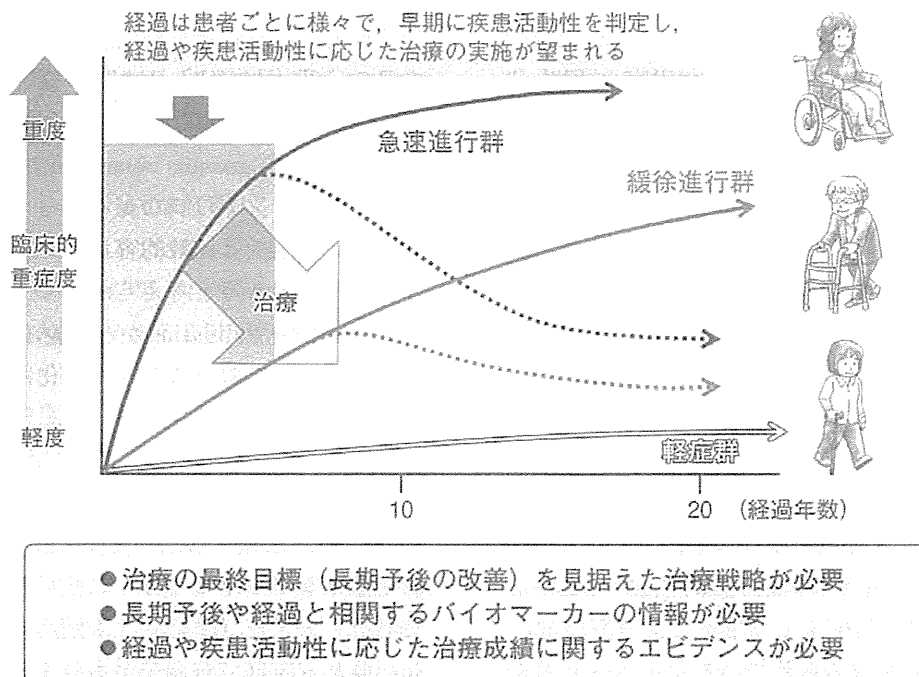


Fig. 3 HAMにおける治療効果判定方法に関する課題

HAMは、歩行障害などが数十年かけて緩徐に進行し最終的に歩行不能となるので治療の最終目標（最終エンドポイント）は、長期予後の改善。
しかし、このエンドポイントを対象に臨床試験をデザインすることは非現実的であるため、最終エンドポイントと統計学的に相関し、かつ定量性の高いsurrogate markerを決定し、その改善を代替エンドポイントとした試験の実施が理想的。



しかしHAMでは、治療効果を判定するための、
●標準的な臨床的評価指標が確立していない
●標準的なバイオマーカーが確立していない
というのが現状



バイオマーカーや臨床的評価指標に関する研究が必要

のようにして確立していくのか、今日は特にバイオマーカーに焦点をあててお話しします。HAMは、歩行障害などが数十年かけて緩徐に進行し、最終的に歩行不能となりますので、治療の最終目標、true endpointは長期予後の改善です。しかし、これを標的に臨床試験をデザインすることは非現実的です。したがって、true endpointと統計学的に相関し、かつ定量性の高いsurrogate markerを決定し、その改善を代替エンドポイントとした試験の実施が求められます。しかしながら、現時点では治療効果を判定するための標準的な臨床的評価指標すら確立しておらず、標準的なバイオマーカーも確立していないのが現状であり、バイオマーカーや臨床的評価指標に関する研究をしっかりと進めていかなければならないのです。

今日は、そのための取り組みを紹介します。バイオマーカーには、prognostic biomarkerとpredictive biomarker、そしてサロゲートエンドポイントがあります。Prognostic biomarkerは予後を予測する因子、predictive biomarkerは治療効果を予測する因子と定義づけられています。サロゲートエンドポイントは実験的治療のclinical endpointに対する効果をより早く、より高感度に評価できることを求められているマーカーと考え

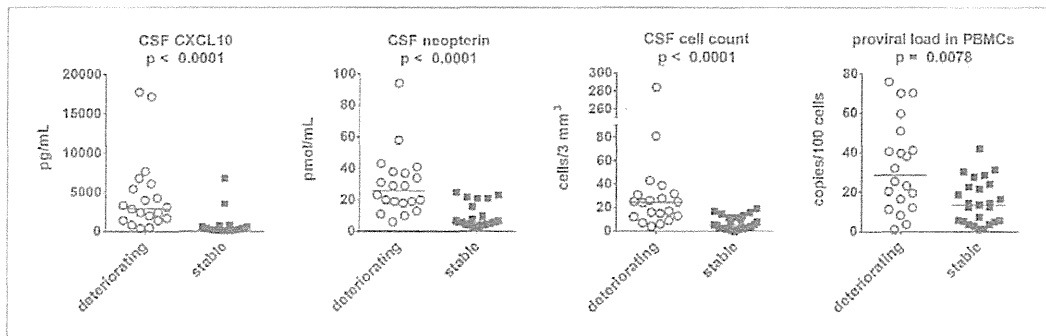
られています。

サロゲートエンドポイントはtrue endpointが予測可能でないといけません。Surrogate markerに対する治療効果がtrue endpointに対する効果と相関していることを示さないとはいけません。同定と並行し、臨床試験を通し、きちんと証明する作業が必要になります。

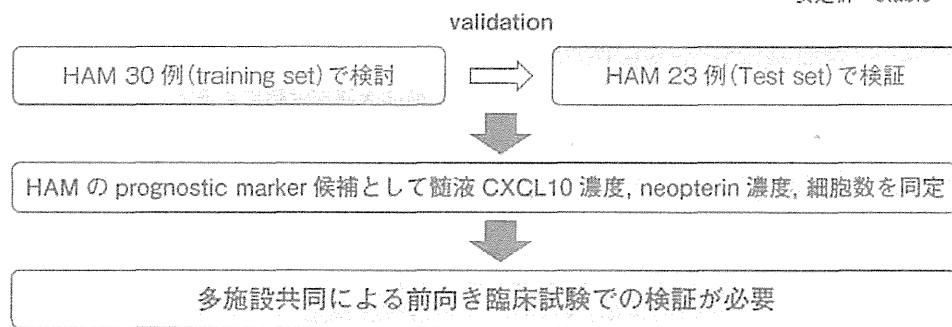
Surrogate markerは、まずprognostic markerとして有用であることを証明することが求められますので、我々は最近、HAMについて、candidate prognostic biomarkerをみつける取り組みを進めています。Prognostic biomarkerは将来サロゲートエンドポイントにつながるマーカーと思われませんが、その候補は比較的容易に、後ろ向き研究でも同定可能であると考えられます。しかしその後multicenter validationかcross-validationが必要で、臨床試験におけるランダム化前向き試験が必要です。

最近我々は、過去4年間で重症度が3 grade以上悪化する進行群と1 grade以下しか悪化しない安定群に無治療のHAM患者を群分けし、この2群で様々なバイオマーカーの候補となる分子を比較解析しました (Fig. 4)。末梢血のウイルス量は進行群と安定群で有意差がありましたが、もっと

Fig. 4 HAMの prognostic biomarker 候補の同定



進行群 : deteriorating
安定群 : stable



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; 7(10): e2479.

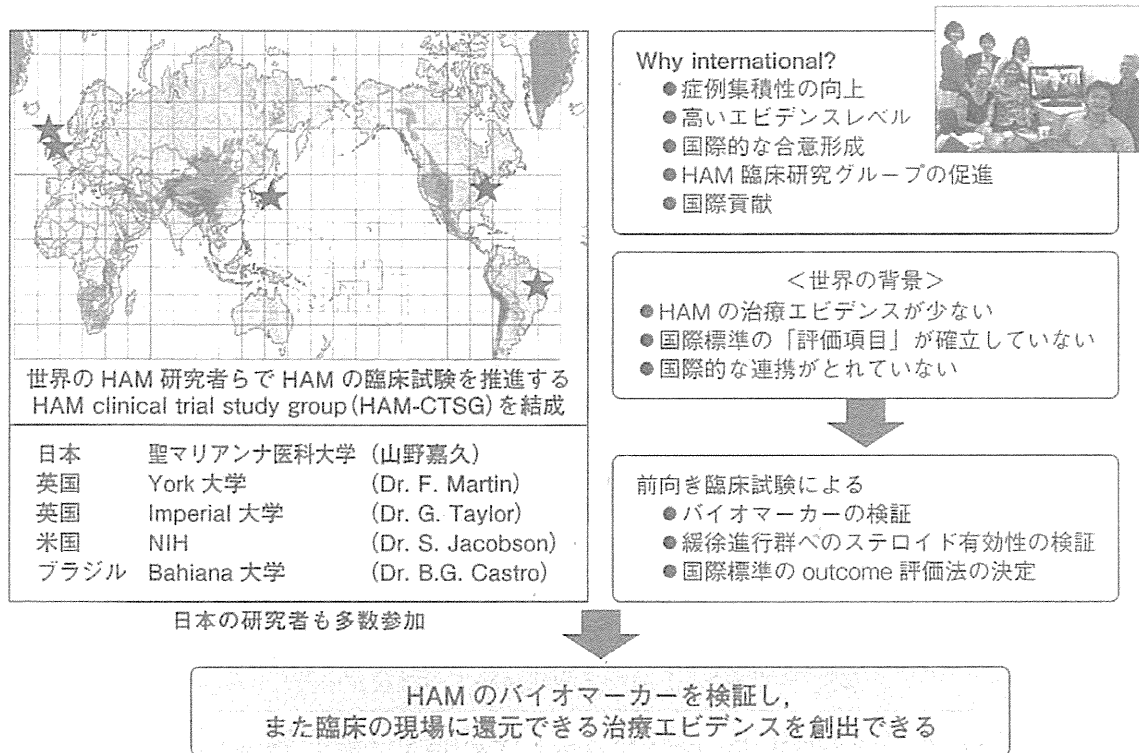
高い有意差があったのは、髄液中のCXCL10 (C-X-C motif chemokine 10) という chemokine 濃度と neopterin 濃度、そして細胞数でした。ただし、細胞数は感度が低いことが判明しています (data not shown)。この髄液CXCL10濃度と neopterin 濃度がよい prognostic marker であることを、無治療30例の training set で証明し、さらに、引き続き来院した異なる23例の無治療HAM患者で検証して、全く同じ結果が出ていますので、かなり信頼性の高い結果であることが示されました。

3. HAMの国際共同臨床研究チーム

このように retrospective study で、candidate prognostic marker を同定しましたが、次に、多施設による前向き臨床試験での検証が必要になってきます。そこで我々は、国際共同臨床研究チームを結成しています (Fig. 5)。アメリカの NIH (National

Institutes of Health)、イギリス、ブラジル、日本の研究者が参加し、clinical trial を推進するHAM clinical trial study group (HAM-CTSG) を結成しています。国際共同で実施することによって高いエビデンスレベルが得られます。しかも前向きの臨床試験によってバイオマーカーや治療効果を検討し、国際的なコンセンサスを得ていこうと考えています。そしてこの結果は、臨床現場に還元できる重要なエビデンスを創出できるのではないかと考えています。サロゲートエンドポイントは true endpoint が予測可能でないといけません。すなわち、surrogate marker に対する治療効果が true endpoint に対する効果と相関していることを示さないといけませんので、多施設の前向き臨床試験をこのようなコンソーシアムで複数実施していくことによって、HAMのサロゲートエンドポイントの確立に向けて研究を進めていきたいと考えています。

Fig. 5 HAMの国際共同臨床研究チームを結成



* * *

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

相良 康子¹⁾ 後藤 信代¹⁾ 井上由紀子¹⁾ 守田麻衣子¹⁾ 倉光 球²⁾
 大隈 和²⁾ 浜口 功²⁾ 入田 和男¹⁾ 清川 博之¹⁾

本邦における HTLV-1 感染者は 108 万人と推計されており、HTLV-1 は成人 T 細胞性白血病 (ATL) や HTLV-1 関連脊髄症 (HAM/TSP) といった重篤な疾患の原因として知られている。日本赤十字社血液センターでの抗 HTLV-1 抗体の確認検査としては、2012 年 9 月よりウエスタンブロット (WB) 法が採用され、検査結果の通知を希望される献血者への通知に際しての判定基準となっている。しかしながら、WB 法では判定保留例が多く確定に至らない事例が蓄積されている。今回、我々は WB 法における判定保留事例を対象として、複数の方法による抗体検出ならびに HTLV-1 プロウイルス (PV) 検出を試み、性状解析を行った。その結果、WB 法判定保留事例 239 例中 89 例 (37.2%) で HTLV-1 PV が検出されたが、そのうち 4 例は化学発光酵素免疫測定 (CLEIA) 法で、また 2 例は化学発光免疫測定 (CLIA) 法で陰性を示した。また、PV 陰性 150 例中 19 例 (12.7%) では複数の抗体検出系で特異抗体が認められたことから、末梢血中の PV が検出限界以下を示すキャリアの存在が示唆され、精確なキャリア確定判定のための抗原同定と検査系確立を要すると思われる。

キーワード：HTLV-1, 抗体検査系, 判定保留, エピトープ, 易抗体産生領域

第 61 回日本輸血・細胞治療学会総会座長推薦論文

緒 言

1977 年、高月らは成人 T 細胞性白血病 (ATL) を新しい病態として報告し¹⁾²⁾、1980 年には Poiesz らが ATL 患者から初めてのヒトレトロウイルスを発見しヒト T 細胞性白血病ウイルス I 型 (HTLV-1) と命名した³⁾。HTLV-1 は母乳による垂直感染とパートナー間の水平感染を主な感染ルートとして伝播する⁴⁾が、感染者からの新鮮凍結血漿では感染は成立せず⁵⁾、凍結融解した母乳では感染率が低下する⁶⁾とされ、感染成立には感染生細胞の存在を要する。また、日沼らは ATL 患者血清中に抗 HTLV-1 抗体を見出した⁷⁾。これらの結果を受け、感染の有無を判断する検査法として抗体検出系が広く用いられている⁸⁾。

日本赤十字社血液センターでの抗 HTLV-1 抗体検査は、化学発光酵素免疫測定法による一次検査の後、献血者への通知の判定基準としてウエスタンブロット (WB) 法を採用している。WHO 基準では HTLV-1 感染者は Env gp46 または gp62/68 に対する抗体と Gag p19, p24, p53 のいずれかに対する抗体の双方を有するものとされているが、HTLV European Research Net-

work の基準はより厳密で、Gag p19, p24 と Env gp21, gp46 に対する抗体の検出を条件とする⁹⁾。一方、血液センターでの WB 法判定基準は Env gp46 のバンドおよび Gag p19, p24, p53 のうち一つ以上のバンドが陽性の場合を陽性、gp46, p19, p24, p53 のバンドが全く認められない場合を陰性とし、これらの判定基準に一致しない場合は判定保留としている。

今回、我々は、固相化抗原種の異なる複数の方法による抗体検出ならびにプロウイルス (PV) の検出を試み、WB 判定保留事例を対象として HTLV-1 感染を確実に検出することを目的にキャリアが産生する抗体のエピトープを同定するための性状解析を行った。

対象と方法

対象

九州ブロック管内にて 2011 年 5 月 25 日～2012 年 4 月 15 日に献血され、抗 HTLV-1 抗体確認検査対象となった事例、1,355 検体のうちの WB 判定保留 239 例を対象とした。

1) 日本赤十字社九州ブロック血液センター

2) 国立感染症研究所血液・安全性研究部

〔受付日：2013 年 9 月 13 日、受理日：2013 年 11 月 26 日〕

Table 1 Indeterminate pattern and provirus prevalence in WB-deferred cases

Env	Gag			n	PCR (+)		
	gp46	p19	p24		p53	n	%
Gag (+): 208 samples							
-	+	+	+	113	45	39.8	0.508 ± 1.298
-	+	+	-	6	0	0.0	—
-	+	-	+	10	2	20.0	0.033 ± 0.047
-	-	+	+	2	0	0.0	—
-	+	-	-	37	9	24.3	0.049 ± 0.069
-	-	+	-	35	4	11.4	0.040 ± 0.052
-	-	-	+	5	0	0.0	—
Env (+): 1 sample							
+	-	-	-	1	1	100.0	0.202
Env (+), Gag (+): 30samples							
+ / ±	+ / ±	+ / ±	+ / ±	21	20	95.2	0.516 ± 0.794
+ / ±	+ / ±	+ / ±	-	2	2	100.0	0.001 ± 0.001
+ / ±	+ / ±	-	+ / ±	3	3	100.0	0.006 ± 0.011
+ / ±	+ / ±	-	-	4	3	75.0	0.043 ± 0.042
+ / ±	-	+ / ±	-	0	0	0.0	—
+ / ±	-	-	+ / ±	0	0	0.0	—

+, protein band of equal or greater intensity than that with weak-positive control serum

±, protein band of less intensity than that with weak-positive control serum

方法

1. 抗体検出系

抗体検出系としてはスクリーニング法として下記の1)~3)の3法, 確認試験として4)~7)の4法を用いた。

1) 凝集 (particle agglutination ; PA) 法 ; セロディアア HTLV-I[®] (富士レビオ) を使用した。

2) 化学発光酵素免疫測定 (chemiluminescence enzyme immunoassay ; CLEIA) 法 ; CL4800 (富士レビオ) を使用した。

3) 化学発光免疫測定 (chemiluminescence immunoassay ; CLIA) 法 ; Architect[®] (Abbott) を使用した。

4) 間接蛍光抗体 (indirect immunofluorescence ; IF) 法 ; HTLV-1 感染細胞株 MT-2 と非感染細胞株 Molt-4 を 1 : 4 の細胞比で混合し, 固定したプレートを使用した。

5) WB 法 ; プロブロット HTLV-I[®] (富士レビオ) を使用した。

6) Line immunoassay (LIA) 法 ; INNO-LIA HTLV-1/2[™] (INNOGENETICS) を使用した。

7) ELISA 法 ; HTLV-1 構造蛋白質上の immunodominant region [Gag p19 100-130A.A. (p19-100), Env gp46 175-199A.A. (gp46-175), Env gp46 288-312A.A. (gp46-288)] に相当する合成ペプチドを固相化したマイクロプレートを用いた。

2. HTLV-1 PV 検出系

末梢血より QIAamp DNA Blood midi キット (QIAGEN) のプロトコルに従ってゲノム DNA を抽出した。ゲノム DNA 1μg に対して HTLV-1 pX 領域と内部標準遺伝子の RNaseP を TaqMan PCR により Applied Biosystems 7500 fast システムを用いてそれぞれ検出, HTLV-1 PV 量を定量し, 有核細胞に対する PV 検出率 (%) を算出した。HTLV-1 pX 領域の定量 PCR の Primer および Probe 配列は, Watanabe らの方法¹⁰⁾ に従った。内部標準遺伝子の定量 PCR は RNaseP 検出キット (Taqman RNaseP Control kit (VIC dye), Applied Biosystems) を使用した。本法での検出限界は HTLV-1 感染細胞 TL-Om1 株 DNA を標品とした標準曲線より 0.0005% と算出された。

結 果

1. WB 保留事例の抗体反応性と PV 検出

WB 保留 239 例について, その WB 反応性と PV 検出率と PV 量を Table 1 に示す。PV 検出事例は, 89 例 (37.2%) であった。WB では, 抗 Gag 抗体のみ検出された事例が 208 例で, そのうち PV 検出例は 60 例であった。p19, p24, p53 のすべてに反応した事例が 113 例と最も多く, その PV 陽性率は 39.8%, PV 量は平均 0.508% を示した。一方, Env gp46 に対する抗体のみ陽性の事例は 1 例で PV 陽性 (PV 量 0.202) であった。抗 Env, 抗 Gag 抗体とも認められるが, 一部のバンドが, 弱陽性対照より弱い反応 (±) を示し判定保留となっ

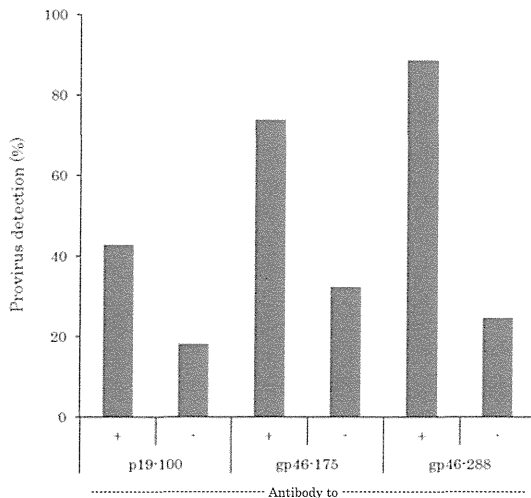


Fig. 1 Comparison of provirus detection ratios among the WB-deferred cases based on antibody reactivity to each immunodominant region on HTLV-1 proteins. A total of 239 WB-deferred cases were examined for antibody reactivity using ELISA with an immobilized synthetic peptide derived from immunodominant regions on HTLV-1 structural proteins, p19-100, gp46-175, and gp46-288. Provirus detection was conducted using PCR, and the provirus prevalence in samples with or without immunoreactivity to each peptide was compared.

た事例は 30 例で、そのうち 28 例 (93.3%) で PV が検出された。Fig. 1 に ELISA 法での抗体検出と PV 検出率を示す。p19-100 に対する抗体陽性例では PV 検出率が 42.8% であったのに対し、陰性例では 18.2% と著減した。さらに、抗 gp46-175 抗体陽性例での PV 検出率は 73.9%、抗 gp46-288 抗体陽性例では 88.6% と、Env 領域に対する抗体保有と PV 検出は非常に強く相関していた。

2. WB 保留プロウイルス陽性 89 例の性状

1) スクリーニング法における反応性

WB 保留 PCR 陽性 89 例について CL4800, Architect® (以下, Arch), PA の 3 法における反応性の比較を行った (Table 2, Fig. 2)。対象検体中 83 例 (93.3%) は 3 法陽性を呈したが、CL4800 陰性が 4 例 (4.5%)、Arch 陰性が 2 例 (2.2%) 認められた (Table 2)。CL4800, Arch 両法における測定値 (COI, S/Co) は弱い相関を示した (Fig. 2A, $r^2=0.428$)。また、PA 法では 47 例 (52.8%) が $x2^6$ 以上の高力価を示したが、 $x2^3 \sim 4$ の低力価例も 9 例 (10.1%) あり、2 例 (2.2%) は陰性であった (Fig. 2B)。

2) スクリーニング法における固相化抗原と反応性の連関

今回の検討に用いたスクリーニング 3 法の固相化抗原は以下のとおりである。CL4800 と PA は WB と同様に日本人 ATL 由来細胞 TCL-Kan 株¹¹⁾の細胞溶解液が

用いられ、Gag 主体である。CL4800 では同株由来 gp46 を精製添加している。Arch の抗原は白人 ATL 由来 PV 塩基配列に基づく組換型 gp21 と、同 PV gp46 アミノ酸配列に相当する合成ペプチドからなる¹²⁾。これらの抗原の特性とそれに対する反応性を基に、WB 保留 PCR 陽性 89 例の有する抗体を推定した結果を Table 2 に示す。3 法陽性の事例は Gag, Env の両方に反応する抗体を有すると考えられるが、CL4800, PA とも陰性の 1 例 (1.1%) は抗 Gag 抗体陰性、Arch 陰性 2 例 (2.2%) は抗 Env 抗体陰性と推測された。CL 陽性 PA 陰性の 1 例 (1.1%) は抗 Gag 抗体が弱陽性で検出感度の相違に起因する乖離と考えられる。さらに、PA と Arch で検出され、抗 Gag, 抗 Env 抗体のいずれも有すると考えられるが CL4800 では陰性を呈した事例が 3 例 (3.4%) 認められた。

3) スクリーニング法で陰性を呈した事例の解析

WB 保留 PCR 陽性 89 例中、各スクリーニング試薬にて陰性を呈した事例について IF, WB, LIA を用いてその反応性を解析した結果を Table 3 にまとめた。A) には CL4800 陰性事例 4 例、B) には Arch 陰性事例 2 例を示している。6 例とも WB 法で gp46 バンド陰性を呈し判定保留とされたが、A), B) とも IF 弱陽性例が 1 例ずつ認められた。また、LIA (INNO-LIA) では抗 gp21 抗体、抗 Gag 抗体とも検出され、全例が HTLV-1 陽性判定となった¹³⁾。LIA の抗原には、HTLV-1/2 分別判定のために HTLV-1 由来 p19(p19-I), gp46(gp46-I) と HTLV-2 由来 gp46 (gp46-II) の 3 抗原も固相化されている¹³⁾。これらの LIA 抗原に対する反応性からみると、CL4800 陰性検体は 4 例とも抗 gp46, 抗 gp21 抗体のいずれも有しているが、抗 Gag p19 抗体は弱陽性、抗 p24 抗体は陰性であった。一方、Arch 陰性事例は 2 例とも WB, LIA 両法において抗 p19 抗体が認められた。抗 Env 抗体としては、LIA において、1 例では gp46 ++, gp21 ±, 他の 1 例では gp21 に対してのみ ++ で、抗 Env 抗体を保有するものの Arch 固相化 Env 抗原に対する反応は検出限界以下であると推測された。

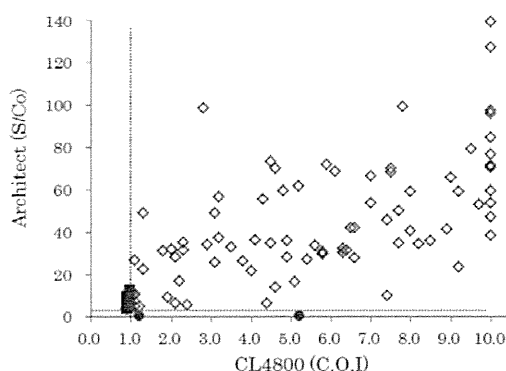
3. WB 保留 PV 陰性 150 例の性状

今回解析に用いた WB 判定保留 239 例中 PV 陰性となった事例は 150 例であった。これらの抗体検出系における反応性は、74 例 (49.3%) が CL4800 陽性、Arch 陽性事例は 34 例 (22.7%)、LIA 陽性事例は 21 例 (14.0%) であった。CL4800, Arch, LIA の 3 法での反応性としては、3 法陽性が 15 例 (10.0%)、スクリーニング法と LIA の 2 法陽性を示した事例が 4 例 (2.67%) であった (Table 4)。

Table 2 Antibodies in provirus-positive samples deduced from the reactivity to the immobilized antigens in each screening reagent

CL4800	PA	Architect	n	%	Deduced antibodies	
					anti-Gag Ab	anti-Env Ab
+	+	+	83	93.3	+	+
+	+	-	1	1.1	+	-
+	-	+	0	0		
+	-	-	1	1.1	+ ^w	-
-	+	+	3	3.4	+	+
-	+	-	0	0		
-	-	+	1	1.1	-	+
-	-	-	0	0		
total			89	100		

A) CL4800 and Architect



B) PA

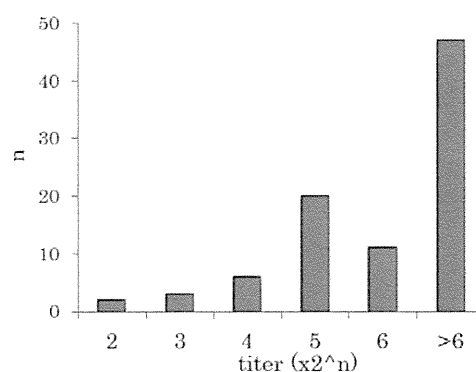


Fig. 2 Results of antibody screening for 89 WB-deferred cases that showed provirus-positive results. A total of 89 WB-deferred and provirus-positive cases were examined using 3 methods of antibody screening. A) CL4800 and Architect: Vertical axis shows CL4800 COI, and horizontal axis Architect S/Co. ■, CL4800 positive cases; ●, Architect positive cases. B) PA: Vertical axis shows numbers of cases and horizontal axis the antibody titer.

考 察

今回、九州 8 県において献血された約 70 万人の献血者のうち、確認試験対象となった 1,355 検体に認められた WB 判定保留例 239 例を解析対象とした。このうち 89 例 (37.2%) において HTLV-1 PV が検出されたことは、現行の確認試験において感染確定に至らないキャリアが献血者全体の約 0.013% 程度存在することを意味し、弱陽性対照に基づく WB 判定基準の再検討を要する。また、HTLV-1 PV は T リンパ球のゲノム上に組み込まれた形で潜伏感染するが、末梢血中に検出されない感染状態も存在し、その生体内での reservoir は未だ判明していない。そのため最も有効な感染の有無の判定は特異抗体の検出によるものとされる。本検討でも PV 陰性抗体陽性の事例が 83 例認められ、これらは末梢血中では感染因子が検出限界以下であるキャリアである可能性を示しており、高感度抗体検出系の確立が喫緊の課題である。また、今回の解析においては、PV 陽性であるにもかかわらずスクリーニング検査において

陰性を示す事例が CL4800 で 4 例、PA 法で 2 例、Arch では 2 例見出された。さらに、PA 陽性 Arch 陽性で抗 Gag、抗 Env 抗体の両方を有すると推測されるものの CL4800 陰性となった事例も 3 例 (3.4%) 認められ、使用されている抗原蛋白質の由来が同一である試薬間でも反応性の差が認められた。PV 陽性 CL4800 陰性事例では抗 Gag 抗体の反応性が弱いため CL4800 での検出閾値に達せず、さらに CL4800 での固相化 gp46 抗原では検出できないものと推測された。以上の結果は、抗体検出感度は担体に固相化された抗原の由来および構造蛋白質上の領域、固相量、固相化法、固相化抗原の様態ならびに検出原理に依存する¹⁴⁾ことを示唆しており、同一感染細胞株由来抗原を用いた CL4800 と WB の 2 法のみでの適応では PV 陽性にもかかわらず確定判定が得られない事例が集積していることが判明した。また、PV 陽性率は抗 Env 抗体陽性率と相関が認められ、Env 抗原はキャリアにおける易抗体産生抗原であり¹⁵⁾¹⁶⁾、キャリア判定に Env 抗原が有用であることが示唆された。

Table 3 Provirus-positive cases that showed false-negative results on antibody screening

A) CL4800																	
No.	CL4800		Architect		PA x2 [^] n	IF result	WB				INNO-LIA				PCR Proviral Load (%)		
	COI	result	S/Co	result			gp46	p19	p24	p53	result	p19	gp21	gp46		gp46-I	gp46-II
1	0.9	-	3.65	+	4	+w	-	+	+	+	+	±	±	±	±	HTLV-1	0.03
2	0.9	-	4.12	+	3	?	-	+	+	+	+	±	±	±	±	HTLV-1	0.03
3	0.9	-	4.19	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	HTLV-1	0.08
4	0.9	-	9.46	+	5	?	-	±	-	-	-	+	+	+	+	HTLV-1	0.12

B) Architect																	
No.	CL4800		Architect		PA x2 [^] n	IF result	WB				INNO-LIA				PCR Proviral Load (%)		
	COI	result	S/Co	result			gp46	p19	p24	p53	result	p19	gp21	gp46		gp46-I	gp46-II
5	1.2	+	0.60	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	±	±	HTLV-1	0.03
6	5.2	+	0.59	-	3	+w	-	+	+	+	+	±	±	±	±	HTLV-1	0.03

def, deferred

Table 4 Characterization of the 150 provirus-negative cases on the basis of antibody reactivity

CL4800		Architect		LIA (INNO-LIA)	
+	74	+	27	+	15
				-	0
				deferred	10
				NT	2
-	76	+	7	+	3
				-	16
				deferred	28
				+	1
				-	5
				deferred	1
-	69	+	7	+	2
				-	54
				deferred	13

NT, not tested

しかしながら、本検討対象において、スクリーニング3法のすべてで陰性を呈した事例はなく、複数の抗体検出系を併用することで補完的な抗体検出が可能となり偽陰性発生が防止できると推察される。

これまでにも、WBにおいて indeterminate pattern を呈し HTLV-1 感染確定に至らない事例に関する解析に関しては多数の報告がある。中央アフリカにおいては WB 保留事例からピグミー族等の少数民族に HTLV-1 類似の新規ウイルス HTLV-3, HTLV-4 感染者が見出されている¹⁷⁾¹⁸⁾。一方、マラリア感染者血清が WB 上の HTLV-1 Gag 蛋白質との交差反応性を示すことによって Indeterminate pattern が生じることも判明しており¹⁹⁾、他種の感染因子の共存により WB 判定に影響が生じる可能性も考えられる。

結 語

今回の検討により確定試験判定保留例中にも 37.2% の PV 陽性事例が含まれることが明らかになった。また、PV 陰性事例中 12.7% に HTLV-1 特異抗体が認められ、現行の HTLV-1 感染判定基準に改良の必要性があることを意味する。また、PV 検出例を捉えるには Env 抗原を加えた確定検査系の採用が有用であることが示唆された。HTLV-1 感染を確実に捕捉することは献血血液の有効利用ならびに献血者への的確な情報提供と健康増進のための利益還元を行うと共に、本邦における HTLV-1 キャリアの実態を把握することが、HTLV-1 感染ならびに関連疾患発症予防に有用であると考えられる。

著者の COI 開示：本論文発表内容に関連して特に申告なし

謝辞：本稿の投稿に当たり、ご推薦を賜りました鹿児島大学医学部付属病院輸血部 古川良尚先生に深謝いたします。

文 献

- 1) Takatsuki K, Uchiyama T, Sagawa K, et al: Adult T cell leukemia in Japan. In: Seno S, Takaku F, Irino S, eds, Topic in Hematology, the 16th International congress of Hematology Amsterdam, 1977, 73—77.
- 2) Uchiyama T, Yodoi J, Sagawa K, et al: Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features in 16 cases. *Blood*, 50: 481—492, 1977.
- 3) Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, et al: Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 77: 7415—7419, 1980.
- 4) Hino S: Establishment of the milk-borne transmission as a key factor for the peculiar endemicity of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-1): the ATL Prevention Program Nagasaki. *Proc Jpn Acad Scr B*, 87: 152—166, 2011.
- 5) Okochi K, Sato H, Hinuma Y: A retrospective study on transmission of adult T cell leukemia virus by blood transfusion: seroconversions in recipients. *Vox Sang*, 46: 245—253, 1984.
- 6) Ando Y, Ekuni Y, Matsumoto Y, et al: Long-term serological outcome of infants who received frozen-thawed milk from human T-lymphotropic virus type-I positive mothers. *J Obstet Gynaecol Res*, 30: 436—438, 2004.
- 7) Hinuma Y, Nagata K, Hanaoka M, et al: Adult T-cell leukemia: antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. *Proc Natl Acad Sci USA*, 78: 6476—6480, 1981.
- 8) Andersson S, Thorstensson R, Godoy Ramirez K, et al: Comparative evaluation of 14 immunoassays for detection of antibodies to the human T-lymphotropic virus types I and II using panels of sera from Sweden and West Africa. *Transfusion*, 39: 845—851, 1999.
- 9) Rouet F, Meertens L, Courouble G, et al: Serological, epidemiological, and molecular differences between human T-cell lymphotropic virus Type I (HTLV-1)-seropositive healthy carriers and persons with HTLV-I Gag indeterminate Western blot patterns from the Caribbean. *J Clin Microbiol*, 39: 1247—1253, 2001.
- 10) Watanabe M, Ohsugi T, Shoda M, et al: Dual targeting of transformed and untransformed HTLV-1-infected T cells by DHMEQ, a potent and selective inhibitor of NF-kappaB, as a strategy for chemoprevention and therapy of adult T-cell leukemia. *Blood*, 106: 2462—2471, 2005.
- 11) Sugamura K, Matsuyama M, Fujii M, et al: Establishment of human cell lines constitutively producing immune interferon: transformation of normal T cells by a human retrovirus. *J. Immunol*, 131: 1611—1612, 1983.
- 12) 絹川秀樹, 谷本朋陽, 吉村 徹: HTLV の抗体検出キットの進歩—第3世代試薬の原理と性能—. *細胞*, 44: 350—354, 2012.
- 13) Zrein M, Louwagie J, Boeykens H, et al: Assessment of a new immunoassay for serological confirmation and discrimination of human T-cell lymphotropic virus infections. *Clin Diagnostics Lab Immuno*, 5: 45—49, 1998.
- 14) 出口松夫, 鍵田正智, 吉岡 範, 他: 6種 HTLV 抗体測定試薬の基本性能について. *月刊医学と薬学*, 66: 1053—1059, 2011.
- 15) Washitani Y, Kuroda N, Shiraki H, et al: Linear antigenic regions of the structural proteins of human T-cell lymphotropic virus type I detected by enzyme-linked immunosorbent assays using synthetic peptides as antigens. *J Clin Microbiol*, 30: 287—290, 1992.
- 16) Londos-Gagliardi D, Jauvin V, Armengaut M-H, et al: Influence of amino acid substitutions on antigenicity of immunodominant regions of the HTLV type I envelope surface glycoprotein: A study using monoclonal antibodies raised against relevant peptides. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 15: 909—920, 1999.
- 17) Calattini S, Betsem E, Bassot S, et al: New strain of human T lymphotropic virus (HTLV) type 3 in a pygmy from Cameroon with peculiar HTLV serologic results. *J Infect Dis*, 199: 561—564, 2009.
- 18) Filippone C, Bassot S, Betsem E, et al: A new and frequent human T-cell leukemia virus indeterminate Western blot pattern: Epidemiological determinants and PCR results in central African inhabitants. *J Clin Microbiol*, 50: 1663—1672, 2012.
- 19) Mahieux R, Horal P, Mauciere P, et al: Human T-cell lymphotropic virus type I Gag indeterminate Western blot patterns in central Africa: Relationship to *Plasmodium falciparum* infection. *J Clin Microbiol*, 38: 4049—4057, 2000.

HUMAN T-CELL LEUKEMIA VIRUS TYPE I (HTLV-1)-INDETERMINATE WESTERN BLOT PATTERNS IN VOLUNTARY DONATED BLOOD SAMPLES IN JAPAN

*Yasuko Sagara*¹⁾, *Nobuyo Gotoh*¹⁾, *Yukiko Inoue*¹⁾, *Maiko Morita*¹⁾, *Madoka Kuramitsu*²⁾, *Kazu Okuma*²⁾, *Isao Hamaguchi*²⁾, *Kazuo Irita*¹⁾ and *Hiroyuki Kiyokawa*¹⁾

¹⁾Japanese Red Cross Kyushu Block Blood Center

²⁾Department of Safety Research on Blood and Biological Products, National Institute of Infectious Diseases

Abstract:

Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-1) is estimated to have infected 15-20 million worldwide, and over 1 million in Japan. HTLV-1 is well-known as the cause of several severe diseases, such as adult T-cell leukemia and HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. A screening test for the antibody to HTLV-1 was implemented to test all donated blood samples in the Japanese Red Cross Blood Center in 1986. The examination is carried out using chemiluminescence enzyme immunoassay (CLEIA). Western blotting (WB), instead of indirect immunofluorescence assay (IF), has been adopted as a confirmatory process following CLEIA since September 2012. However, numerous cases have been deferred in which serum samples, positive on CLEIA, displayed indeterminate patterns on subsequent WB. To clarify the specificity of these WB indeterminate patterns, 239 serum samples deferred on WB were examined using particle agglutination assay, chemiluminescence immunoassay (CLIA), IF, line immunoassay, and PCR for HTLV-1 provirus detection, with findings for the differences in reactivity for antibody tests compared on the basis of the kinds and origins of immobilized antigens in each examination. Results from PCR showed that 89 (37.2%) of the 239 deferred samples in WB were positive for HTLV-1 provirus. In contrast, specific antibodies were detected in 19 (12.7%) of 150 PCR-negative cases. While 83 (93.3%) were positive for all antibody tests, anti-Gag antibody was predominantly observed in only 2 (2.2%) of 89. Only anti-Env antibody was detected in 1 (1.1%) case, which was positive only on CLIA. These findings indicate that genuine HTLV-1 carriers are included among individuals with indeterminate patterns on WB and suggest the existence of occult HTLV-1 carriers, indicating a much higher incidence of HTLV-1 in Japan than previously reported.

Keywords:

HTLV-1, antibody detection, indeterminate pattern, epitope, immunodominant region

©2014 The Japan Society of Transfusion Medicine and Cell Therapy

Journal Web Site: <http://www.jstmct.or.jp/jstmct/>

Carnosol, rosemary ingredient, induces apoptosis in adult T-cell leukemia/lymphoma cells via glutathione depletion: proteomic approach using fluorescent two-dimensional differential gel electrophoresis

Yo-ichi Ishida · Masao Yamasaki · Chizuko Yukizaki · Kazuo Nishiyama · Hirohito Tsubouchi · Akihiko Okayama · Hiroaki Kataoka

Received: 9 September 2013 / Accepted: 7 October 2013
© Japan Human Cell Society and Springer Japan 2013

Abstract Adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL) is a fatal malignancy caused by infection with human T-lymphotropic virus type-1 and there is no accepted curative therapy for ATL. We searched for biological active substances for the prevention and treatment of ATL from several species of herbs. The ATL cell growth-inhibitory activity and apoptosis assay showed that carnosol, which is an ingredient contained in rosemary (*Rosmarinus officinalis*), induced apoptosis in ATL cells. Next, to investigate the apoptosis-inducing mechanism of carnosol, we applied proteomic analysis using fluorescent two-dimensional differential gel electrophoresis and mass spectrometry. The proteomic analysis showed that the expression of reductases, enzymes in glycolytic pathway, and enzymes in pentose phosphate pathway was increased in carnosol-treated cells, compared with untreated cells. These results suggested that carnosol affected the redox status in the cells. Further, the quantitative analysis of glutathione,

which plays the central role for the maintenance of intracellular redox status, indicated that carnosol caused the decrease of glutathione in the cells. Further, *N*-acetyl-L-cystein, which is precursor of glutathione, canceled the efficiency of carnosol. From these results, it was suggested that the apoptosis-inducing activity of carnosol in ATL cells was caused by the depletion of glutathione.

Keywords ATL · Rosemary · Carnosol · Apoptosis · Glutathione depletion

Introduction

Adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL) is a fatal malignancy caused by infection with human T-lymphotropic virus type-1 (HTLV-1) [1]. Ten to twenty million people is infected worldwide with HTLV-1 and about 2.5–5 % of

Y. Ishida (✉)
Department of Biochemistry, Meiji Pharmaceutical University,
2-522-1 Noshio, Kiyose, Tokyo 204-8588, Japan
e-mail: ishida@my-pharm.ac.jp

Y. Ishida · A. Okayama
Miyazaki Prefectural Industrial Support Foundation,
16500-2 Higashi-Kaminaka, Sadowara-cho,
Miyazaki 880-0303, Japan

M. Yamasaki · K. Nishiyama
Department of Biochemistry and Applied Biosciences,
Faculty of Agriculture, University of Miyazaki,
1-1 Gakuenkibanadai-nishi, Miyazaki 889-2192, Japan

C. Yukizaki
Miyazaki Prefecture Food Research
and Development Center, 16500-2 Higashi-Kaminaka,
Sadowara-cho, Miyazaki 880-0303, Japan

H. Tsubouchi
Digestive Disease and Lifestyle-related
Disease Health Research, Human and Environmental Sciences,
Kagoshima University Graduate School of Medicine
and Dental Sciences, 8-35-1 Sakuragaoka,
Kagoshima 890-8544, Japan

A. Okayama
Division of Rheumatology, Infectious Diseases,
and Laboratory Medicine, Department of Internal Medicine,
Faculty of Medicine, University of Miyazaki, 5200 Kihara,
Kiyotake, Miyazaki 889-1692, Japan

H. Kataoka
Section of Oncopathology and Regenerative Biology,
Department of Pathology, Faculty of Medicine,
University of Miyazaki, 5200 Kihara, Kiyotake,
Miyazaki 889-1692, Japan