

HTLV-1 とその検査法

梅 木 一 美 (宮崎大学医学部附属病院検査部)

成人 T 細胞白血病 (ATL) は 1977 年高月らにより独立した疾患として確立され、その 3 年後に ATL の原因ウイルスとしてヒト T リンパ向性ウイルス 1 型 (HTLV-1) が発見されている。HTLV-1 感染者の多くは ATL を発症せずに一生を経過するキャリアであるが、キャリアの一部 (3 ~ 5%) が数十年の潜伏期を経て ATL を発症する。HTLV-1 の感染経路は母子間感染 (特に母乳を介した感染)、夫婦間感染、輸血を介した感染が主な経路である。また HTLV-1 の感染には地域集積が認められ、カリブ海沿岸諸国、南アメリカ、中央アフリカ、国内では西南日本に集中している。現在日本には約 108 万人のキャリアが存在し、1 年間に約 1000 人が ATL を発症すると推定されている。HTLV-1 は ATL の他に HTLV-1 随伴脊髄症 (HAM)、HTLV-1 関連ぶどう膜炎 (HU) の発症の原因であることが報告され、さらに関節、肺などの慢性炎症疾患との関連性も示されている。

HTLV-1 感染の検査は ATL や HAM 等の診断、輸血ドナーのスクリーニング、妊婦検診、術前検査等の目的で測定される。そのスクリーニングは血清抗体の検出が行われ、発光基質を用いた酵素抗体法あるいはゼラチン粒子凝集法 (PA 法) などが一般的に用いられる。いずれの測定法でも一部で擬陽性が認められることから陽性の場合にはウエスタンブロット法などによる確認が必要になる。現在、ウエスタンブロット法の抗原にはウイルス分画にエンベロープ抗原を追加した改良法が広く用いられ WHO 推奨基準に沿った判定が可能となっているが、判定保留例が少なからず存在し問題となっている。特に抗体陽性率の低い地域では判定保留の比率が高いことが知られている。判定保留は抗体価が低い場合や非特異反応に起因することから、高い感度と特異性を兼ね備えた抗体確認法の導入が必要と考えられる。

HTLV-1 ウイルスの直接証明には Nested PCR 法あるいはリアルタイム PCR 法で HTLV-1 プロウイルスを検出することが多い。いずれもプロウイルス DNA の中で保存性の高い pX 領域を増幅するのが一般的で、高い検出感度を得るため十分量の DNA を用いた測定法が推奨されている。2010 年より妊婦検診の項

目として HTLV-1 抗体検査が実施されているが、前述したように抗体検査では判定保留が発生し授乳方法の選択などを判断する上で問題となっていることから、HTLV-1 核酸増幅検査の導入が検討されている。

頻度は少ないが極めて低いプロウイルス量の場合、PCR で増幅産物が検出されないことがあり、HTLV-1 感染を確定させるためには PCR 法だけでなく高い感度と特異性を有する抗体確認法と相互に補完することが必要と考えられる。

HTLV-1 のキャリアにおける高いプロウイルス量は ATL 発症のリスクファクターであることが報告されており、キャリアのリスク評価に有用とされている。プロウイルス量の測定は末梢血の単核球分画 DNA を鋳型にリアルタイム PCR 法でプロウイルス DNA (pX 領域) を測定するとともに、PNase P 遺伝子やアルブミン遺伝子などを内部標準として定量し、細胞数に換算して細胞数当たりのプロウイルスのコピー数として表す。厚生労働省研究班の調査で測定施設により得られた結果に施設間差が認められたことから、現在標準物質を設定しプロウイルス DNA 定量法の標準化が検討されている。

ATL 細胞は感染細胞の 1 個のクローンが腫瘍化したものであり、そのクローナリティーを証明するサザンブロットが ATL の診断根拠のひとつとして用いられている。HTLV-1 プロウイルス DNA には制限酵素 Eco RI の切断部位がないため、Eco RI を用いたサザンブロット解析で ATL 細胞由来のバンドは通常 1 本検出される。このほかにクローナリティーの解析法には Linker ligation PCR、Inverse PCR、inverse long-PCR 法などが考案されており、我々は HTLV-1 キャリアのクローナリティーや組み込み部位の解析に使用している。

ATL は現在でも治療に抵抗性で予後不良な疾患である。また国内には 100 万人以上のキャリアが存在しており、臨床検査においても HTLV-1 検査法の特異性向上および ATL 発症リスクの解析法の開発が望まれている。

連絡先：0985-85-9400

ATL 診断に有用な表面マーカーについて

鶴田 一人 (長崎大学病院 検査部 副技師長)

【はじめに】

成人 T 細胞白血病 (ATL) は HTLV-1 virus の感染を起因に発症する。当施設では ATL 診断支援として、臨床所見、一般検査 (LDH、補正 Ca 濃度、総リンパ球数、細胞形態) と sIL-2R、細胞免疫形質、HTLV-1 virus 量、HTLV-1 southern blot hybridization (SBH) 法による腫瘍性から総合的に HTLV-1 carrier と ATL 病型分類の診断を行なっている。ATL 細胞は CD3、CD4、CD25、CCR4 陽性で、各種抗原が ATL 病型により発現・低下 / 欠失を示す。本発表では ATL 診断に有用な抗原をリンパ球領域解析から示す。また CD45、CD3、CD4、CD25、CCR4、CD26 の 6 抗体を用いた ATL 細胞量の評価も述べる。

【対象及び方法】

1997 年 3 月～2012 年 3 月までの約 15 年間に検査依頼された HTLV-1 carrier 70 例、ATL 313 例 (くすぶり型: 74 例、慢性型: 60 例、リンパ腫型: 27 例、急性型: 52 例) の 383 例を対象とした。表面マーカー解析は日本 BD 社製 FACSCanto II を用いて、末梢血リンパ球分画の解析より T 細胞、B 細胞、NK 細胞の構成と ATL 細胞割合を推定し病型診断に有用な抗原を検討した。

【検討事項】

1. 解析症例の検証: HTLV-1 carrier、ATL の病型別に LDH、補正 Ca 値、総リンパ球数から再検証した後に、各病型群の sIL-2R、HTLV-1 provirus 細胞率を評価した。
2. ATL 診断に有用な抗原検討: リンパ球分画における抗原の発現・低下 / 欠失 (CD2、CD3、CD4、CD5、CD7、CD8、CD25、CD26、CD30、CD38、CCR4、HLA-DR) を陽性率で比較解析した。
3. CD26/CD25 比の意義: ATL 細胞量と共に減少する CD26 抗原と ATL 細胞量と共に増加する CD25 抗原との比を HTLV-1 SBH 法の腫瘍性から検討した。

【結果】

1. 症例の検証では ATL 病型分類の診断基準を全て満たしていた。そこで sIL-2R は HTLV-1 carrier、くすぶり型、慢性型、リンパ腫型、急性型の順に高値となり ATL の病勢と一致する傾向を示した。HTLV-1 provirus 細胞率は、慢性型で最も高く諸家の報告と一致していた。
2. 各種抗原の発現・低下 / 欠失の特徴的なものを記載した。

- 1). CD3 抗原: ATL 細胞の 1 つの特徴とされる CD3 抗原量低下を示し、一部の例は CD3 抗原の欠失例も認められた。特にくすぶり型 ATL のような ATL 細胞と正常 T 細胞混在症例の診断に有用であった。
 - 2). CCR4 抗原: CD25 抗原と同様に ATL の本質的抗原であり急性型、慢性型で高値を示し相関を示した。腫瘍量の多い急性型で CD25 より高値を示す例が認められた。
 - 3). CD38 抗原: 本来活性化抗原で ATL では慢性型で最も低く、細胞の低活性化状態との関連性が示唆された。腫瘍量の多い急性型と慢性型の鑑別に有用性が示唆された。
 - 4). CD7・CD26 抗原: HTLV-1 carrier、リンパ腫型、くすぶり型、慢性型、急性型の順に低値となり ATL 細胞で減少し腫瘍量の増加とともに欠失した。そこで CD26 と CD7 の相関を見ると、CD26 低値・CD7 高値例が認められた。この抗原低下の相違は CD26 抗原が HTLV-1 感染早期から低下する抗原であることが示唆された。
 - 5). CD26/CD25 比: 腫瘍量に比例し低下する抗原である CD26 と増加する抗原 CD25 との比は臨床的鑑別が最も問題となる HTLV-1 carrier とくすぶり型 ATL 間での差が明確になった。
3. CD26/CD25 比の意義: HTLV-I SBH 法による clonal band 検出から腫瘍性境界疾患である HTLV-1 carrier とくすぶり型 ATL と診断された症例 98 例を検討した。大きな特徴として CD26/CD25 比の 1 を境に clonal band 陽性と陰性が大別される傾向が認められた。また clonal band 陽性を示した 55 例の感度・特異度を ROC 解析した所 CD26/CD25 比は AUC = 0.940 と優れていた。

【結論】

ATL 診断に有用な表面マーカーには、CD3 抗原量の低下があり ATL 細胞と正常 T 細胞が混在すると FCM ヒストグラムが 2 峰性を示すことや、ATL 細胞により増加する CD25 抗原、CCR4 抗原と減少する CD26、CD7 抗原が有用と考えられ、その CD26/CD25 比は HTLV-1 SBH 法の腫瘍性を知る簡便なサロゲートマーカーとなることが示唆された。

HTLV- I 感染 (症) の今

末 岡 榮三朗 (佐賀大学医学部 臨床検査医学講座 教授)

我が国には、人口の 1% に上る約 110 万人のヒト T 細胞白血病ウイルス (HTLV-1) 感染者がおり、感染者のうちの約 5% の方々から様々な難治性の疾患が発症する。最も悪性度の高い成人 T 細胞白血病・リンパ腫 (ATL)、極めて難治性で慢性・進行性の神経疾患である HAM、いまだ本体や診断基準が確立していない HTLV-1 ぶどう膜炎 (HU) 等多彩な疾患が報告されているが、どの疾患も根本的な治療が確立していない現状がある。従って、HTLV-1 関連疾患の制圧のためには、正確かつ高感度検査法の確立、予防体制の整備、治療法の開発が望まれる。

本セッションでは、HTLV-1 感染症の診断法の確率と最新の検査法の情報を前演者が発表されることを受けて、予防体制の整備状況、HTLV-1 関連疾患に対する治療法の現状と新しい治療法開発の現状について概説したのちに、私どもが取り組んでいる HTLV-1 専門外来の実施状況を報告し、つぎに新しい HTLV-1

感染細胞の同定法として期待される HAS (HTLV-1 analyzing system by Flow cytometry) フロー法について紹介する。

HTLV-1 関連疾患対策として、政府は、平成 22 年末に「HTLV-1 総合対策」を策定し、感染予防対策 (妊婦の抗体スクリーニング)、相談支援 (カウンセリング)、医療体制の整備、普及啓発・情報提供、診断法や治療のための研究開発の推進を宣言した。しかしながら、感染予防のためのワクチンや免疫グロブリン製剤がないことや、有効な抗ウイルス療法がないことから現実的には、母子感染予防としてのキャリアマザーの正確な診断、発症高危険群の推定、治療後の効果判定のための適切な残存腫瘍細胞の同定法など、検査部門の関わる場面は多い。ウイルスキャリアの層別化から、治療対象患者の評価などの場面において検査部門が注意すべき問題点についても言及する。