

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：22604

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590800

研究課題名(和文) 東アジアにおける成人T細胞白血病1型の起源、進化的変遷、宿主への適応

研究課題名(英文) Origin, evolutional change and host adaptation of HTLV-1 in East Asia

研究代表者

江口 克之 (Eguchi, Katsuyuki)

首都大学東京・理工学研究科・准教授

研究者番号：30523419

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：日本各地から得られたHTLV-1の系統解析を行った。結果、それらの大半はJPN系統かEAS系統に属し、縄文時代から日本に存在していた可能性が高い。ニホンザルに感染しているPTLV-1系統は、HTLV-1とは異なり、血中に感染力のあるウイルス粒子を放出する可能性が認められた。現在は血中ウイルスRNAを検出、定量する実験系を構築中である。本課題での利用を目的として構築した微量DNA検出系を活用し、結核菌の古病理標本(1970年代前後)を対象としたSMおよびRFP耐性関連遺伝子の変異検出を試みた。結果、当時結核に感染して通院し、病理検査に供試された患者は半数以上がSM耐性であったことが推察された。

研究成果の概要(英文)：Phylogenetic analyses of HTLV-1 isolates obtained from various parts of Japan were conducted. As a result, most of the isolates obtained from Japan were classified into the JPN or the EAS lineages, which means that there were more likely to be endemic in Japan from the Jomon period. In contrast to HTLV-1, PTLV-1 infecting *Macaca fuscata* may have an ability to release infective viral particles in blood. Now we are trying to establish a method to detect and quantify viral RNA to focus on difference between the viral species. A research environment to detect a trace level of nucleotides from historical samples was used to detect DNA of *Mycobacterium tuberculosis* from pathological samples around 1970's. Genetic mutations related to SM and RFP resistances were verified to estimate the frequency of drug resistance in the past. As a result, it is estimated that more than half of tuberculosis patients diagnosed by pathological analysis were suffered from SM resistant strains.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・公衆衛生学・健康科学

キーワード：分子系統学 分子疫学 人畜共通感染症 HTLV-1 STLV-1

1. 研究開始当初の背景

霊長類 T 細胞白血病ウイルス 1 型 (PTLV-1) は真猿類、類人猿、ヒトの T 細胞に感染するレトロウイルスである。ヒトを宿主とするウイルスは HTLV-1 (成人 T 細胞白血病ウイルス 1 型)、サル、類人猿を宿主とするウイルスは STLV-1 と便宜的に分類されるが、両者は遺伝的に非常に近縁である。HTLV-1 感染者は全世界で 1,000 万~2,000 万人にのぼり、中央・西アフリカ、ニューギニア・メラネシア、カリブ、南米そして日本に集積する。

HTLV-1 は日本国内においても特異な分布をしている。日本列島の両端で陽性率が高いことから、日本人研究者の多くは日本人の起源に関する二重構造説に立脚し、HTLV-1 の縄文起源説を提唱・支持している。申請者らは日本各地の HTLV-1 株のシーケンスを含めた系統解析と分岐年代推定を進めており、後期旧石器時代から弥生時代(12,000 年前から 3,000 年前)の間に日本に持ち込まれたという暫定的な解析結果を得ている。しかしながら、年代推定の要となる較正点が現状では 1 点しかないことから、分岐年代推定結果の信頼性には疑問も残されている。

HTLV-1 プロウイルスゲノムは T 細胞のみに存在し、無症候陽性者の末梢血液中の感染 T 細胞の割合は 0.1~10% である。そのため、遺跡から発掘された遺体からの HTLV-1 の検出成功例はこれまで 1 例しかない。Li らはアンデスの 1,500 年前の遺跡から発掘されたミイラ 1 体の骨髄から HTLV-1 のゲノム断片の増幅、配列決定に成功している。もし、日本の中世から近世にかけての遺体から HTLV-1 の検出、部分配列の決定ができれば、日本へ流入・定着した HTLV-1 株の歴史の変遷を追跡することが可能となり、また分岐年代推定の信頼性を検証することも可能となる。

HTLV-1 が発見されて間もない 1980 年代の日本では、陽性率が数%~数十%に達する地域もあった。HTLV-1 陽性者のうち数パーセントは、母子感染後 50~60 年を経て ATL と呼ばれる極めて予後の悪い白血病を発症する。一方、先行研究および我々が行った研究から、ニホンザルでは STLV-1 陽性率が群によっては 50% を超えることが明らかとなっており、水平感染が STLV-1 の主要な感染経路であることを示唆する結果も得られている。前述のように HTLV-1 と STLV-1 は、系統的に近縁なのにもかかわらず、感染経路、感染効率において大きく異なる可能性がある。また、STLV-1 がアフリカミドリサルに ATL 類似の疾患を起こすという報告があるが、自然感染時の病原性の有無、強度、病態に関してはほとんど不明である。

日本には HTLV-1 と STLV-1 がともに集積しており、また HTLV-1 の疫学的知見、STLV-1 の宿主であるニホンザルの生態学的な知見が蓄積されているので、HTLV-1

の起源や感染自然史の研究を行う上で非常に適したフィールドである。

2. 研究の目的

我々は、HTLV-1 の起源と宿主への適応に関する 3 つのトピックについて研究を行う：

HTLV-1 の起源：系統解析法、分岐年代推定法を用いて日本で流行している HTLV-1 の起源を探る； ウイルス株の歴史の変遷：九州地方の中世~近世の遺体からの HTLV-1 プロウイルス DNA の検出と遺伝子型の決定を試みる； 宿主への適応：ニホンザルに蔓延し、HTLV-1 と近縁なサル T 細胞白血病ウイルス 1 型 (STLV-1) の感染自然史を解明し、HTLV-1 と比較検討することにより、宿主の繁殖生態の違いに応じたウイルス側の適応を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究課題は、3 つの多少とも独立したサブ・テーマから構成される。

(1) HTLV-1 の起源

日本各地の HTLV-1 株のシーケンスを行い、それらを含めた分子系統解析、分岐年代推定を行う。

(2) ウイルス株の歴史の変遷

九州地方から発掘された中世~近世の遺体の歯から歯髄を取り出し、DNA を抽出し、HTLV-1 プロウイルスの検出と部分配列の決定を試みる。

(3) 宿主への適応

STLV-1 に感染したニホンザルから、血液、唾液、精液、膺分泌液、母乳等を集め、プロウイルス DNA 及びウイルス RNA を定量する。陰性の幼齢個体を経時的に検査し、陽転の時期と性成熟の時期の関連性を明らかにする。

4. 研究成果

(1) HTLV-1 の起源

日本各地から得られた HTLV-1 ウイルス株の env 遺伝子の塩基配列と、GenBank に登録されている世界各地の HTLV-1/STLV-1 株の相同配列を合わせてアラインメントを行ったデータセットをもとに、系統樹の作成と分岐年代推定を行った。その結果、日本には 3 つのウイルス系統が存在することが分かった。JPN 系統はほぼ日本固有の系統である。EAS 系統は日本および中国のウイルス株からなる。日本から得られた株の大半はこれらのいずれかであった。これら 2 系統は縄文時代から日本に存在していた可能性が示唆された。一方、GLB1 系統は世界各地から知られ、日本にもわずかながら存在した。

(2) ウイルス株の歴史の変遷

平成 23 年度に、微量 DNA の抽出と増幅の実験系は確立したものの、数十年前の骨標本からの グロビン遺伝子回収率が低いこと、それより古い時代の骨断片からの HTLV-1 プ

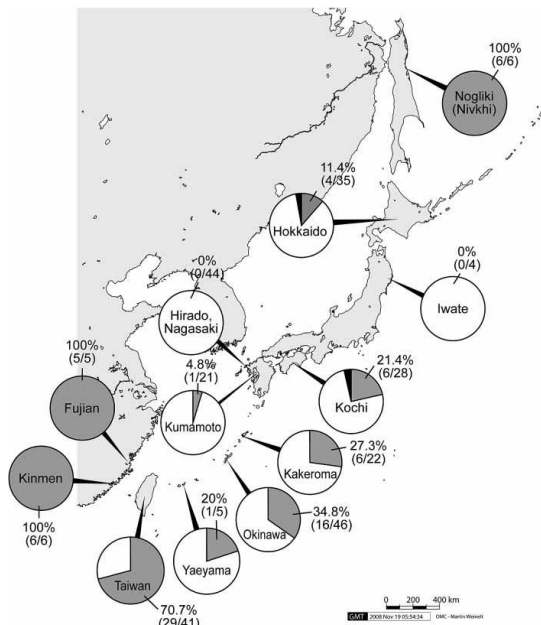


図1. ウイルス系統の分布 (Otani, Honda et al. 2012).

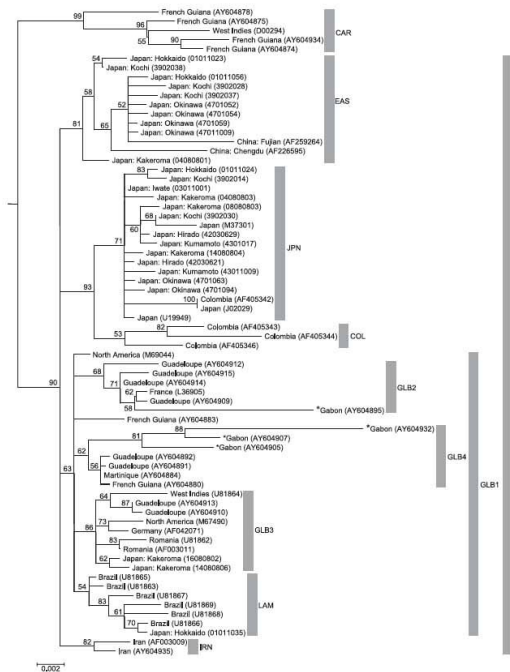


図2. 世界各地で得られたウイルス株の系統樹 (Otani, Eguchi et al., 2012)

ロウイルス DNA の回収と配列決定は困難であると結論づけた。そのため、その検出系を活用して、結核菌の古病理標本を対象とした薬剤耐性遺伝子の変異検出を試みた。

結核は全世界で年間約 880 万人が新規に発症し、200 万人が死亡している。結核治療には抗結核薬が用いられるが、その多用によって出現する耐性菌の拡散が懸念されている。現在最も有効な結核薬として、リファンピシン (RFP) が挙げられる。RFP が我が国で 1971 年に基準収載された後、それまで主要薬であったストレプトマイシン (SM) は使用量が減り、現在は多剤耐性結核菌を対象とした第二選択薬となっている。SM 耐性結核菌の出現頻度は現在約 8% であるが、SM 使用量が多かった時代における耐性株の蔓延状況に

ついては不明である。

そこで、1966 年～1980 年において結核と診断された 214 症例のうち、標本として保存されていた 168 検体(病変部のパラフィンブロック) から抽出した DNA を用いて SM 耐性関連遺伝子 *rpsL* (K43R) および RFP 耐性関連遺伝子 *rpoB* (81 bp hotspot 領域) における変異を確認することにより、当時の耐性率について検証した。

その結果、結核菌 DNA 陽性と判定された 88 検体 (52.4%) のうち 42 検体 (25.0%) について *rpsL* が分析可能であり、耐性変異は 15 検体 (35.7%) で認められた。耐性株は 1971 年から 75 年のサンプルに集中していることがわかった。*rpoB* の変異は分析可能であった 45 検体中 2 検体で確認され、いずれも 1971 年以降の患者であった。SM 耐性株の *rpsL* 変異頻度は国内では約 60% と推計されていることから、当時結核に感染して通院し、病理検査に供試された患者は半数以上が SM 耐性であったことが推察された。

(3) 宿主への適応

ニホンザルの PTLV-1 陽性率は近縁なタイワンザルのそれと比べると非常に高く、ニホンザルに感染している PTLV-1 系統が血中に感染力のあるウイルス粒子を放出することが考えられた。PTLV-1 陽性ニホンザルの血中のウイルス RNA 量を RT-PCR で検出、定量する実験系を構築中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 5 件)

- Hirata A, Tachikawa Y, Hashimoto K, Sakai H, Kaneko A, Suzuki J, Eguchi K, Shigematsu K, Nikami H, Yanai T (2013) Spontaneous T/NK-cell lymphoma associated with simian lymphocryptovirus in a Japanese macaque (*Macaca fuscata*). *Journal of Comparative Pathology*, 148, 43-46.
- El-Habashi N, Kato Y, EL-Nahass E, Fukushi H, Hirata A, Sakai H, Kimura J, Yanai T (2013) An ocular infection model using suckling hamsters inoculated with equine herpesvirus 9 (EHV-9): kinetics of the virus and time-course pathogenesis of EHV-9-induced encephalitis via the eyes. *Veterinary Pathology*, 50, 56-64.
- El-Dakhly KM, El-Nahass E, Inui K, Kimura J, Sakai H, Yanai T (2013) *Hypodectus propus* (Acarina: Hypoderatidae) in a rufous turtle dove, *Streptopelia orientalis* (Aves: Columbiformes), in Japan. *Journal of*

Veterinary Science, 14, 421-424.
Otani M, Eguchi K, Ichikawa T, Takenaka Takano K, Watanabe T, Yamaguchi K, Nakao K, Yamamoto T (2012) Phylogeography of Human T-lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1) Lineages Endemic to Japan. Tropical Medicine and Health, 40, 117-124.

Murai A, Inoue M, Sakai H, Yanai T (2012) Pathological features of Mycobacterium kansasii infection in black bearded Sakis (Chiropotes satanas). Journal of Comparative Pathology, 147, 566-569.
Otani M, Honda N, Xia PC, Eguchi K, Ichikawa T, Watanabe T, Yamaguchi K, Nakao K, Yamamoto Y (2012) Distribution of Two Subgroups of Human T-Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1) in Endemic Japan. Tropical Medicine and Health, 40, 55-58.

[学会発表](計8件)

和田崇之. 抗酸菌感染症～動物とヒト、環境の理解を目指す One Health の一例. 第2回水文化・水環境シンポジウム. 香川大学, 2014/02/07.

Wada T, Yoshida S, Takata M, Tomita M, Tsuyuguchi K, Yanai T, Yamamoto T. Mycobacterium kansasii: its epidemiological background in humans and a case of infection in black bearded Sakis in a zoo. 6th Asian Meeting on Zoo and Wildlife Medicine / Conservation in Singapore in 2013. Singapore, 2013/10/26-29.

Haridy M, Tachikawa Y, Wada T, Yoshida S, Maeda S, Inoue S, Sakai H, Yanai T. Pathological findings of Mycobacteriosis in Japanese forest green tree frogs, Rhacophorus arboreus. 6th Asian Meeting on Zoo and Wildlife Medicine / Conservation in Singapore in 2013. Singapore, 2013/10/26-29.

飛永祥平、松本充生、吉田志緒美、北市正則、鈴木克洋、露口一成、岡田全司、林清二、山本太郎、和田崇之. 昭和初期における結核菌の薬剤耐性を探る-抗結核薬の変遷とその影響に関する考察. 第54回熱帯医学会大会. 長崎市, 2013/10/03-05.

江口克之、山本太郎. 霊長類 T 細胞白血病ウイルス 1 型 (PTLV-1) の系統分化. 第22回サル類の疾病と病理のための研究会ワークショップ. 岐阜ホテルパーク, 2013/07/06.

吉田志緒美、江口克之、岩本朋忠、山本太郎、和田崇之. 結核患者由来病理組織標本からの結核菌 DNA 抽出と遺伝子型別解析の試み. 日本細菌学会第85回総会. 長崎市, 2012年3月29日.

和田崇之. ゲノム比較に基づく結核菌臨床

分離株の遺伝的多様性包囲網の構築. NGS 現場の会第二回研究会. 吹田市, 2012年5月24日~25日

吉田志緒美、鈴木克洋、露口一成、岡田全司、林清二、岩本朋忠、和田崇之. 半世紀前における結核患者由来病理組織標本からの結核菌 DNA 抽出の試み. 第87回日本結核病学会総会. 広島市, 2012年5月10日~11日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江口 克之 (EGUCHI, Katsuyuki)
首都大学東京・理工学研究科・准教授
研究者番号: 30523419

(2) 研究分担者

和田 崇之 (WADA, Takayuki)
長崎大学・熱帯医学研究所・助教
研究者番号: 70332450

(3) 研究分担者

柳井 徳磨 (YANAI, Tokuma)
岐阜大学・応用生物科学部・教授
研究者番号: 10242744

(4) 連携研究者

山本 太郎 (YAMAMOTO, Taro)
長崎大学・熱帯医学研究所・教授
研究者番号: 70304970