

# 学 位 論 文

## Doctor's Thesis

論文題名 : ヒト T 細胞白血病ウイルス I 型感染者における免疫不全  
(Immunodeficiency in human T-cell leukemia virus type I-Infected Individuals)

著者名 : 安永 純一郎  
Jun-ichiro Yasunaga

指導教官名 : 脳免疫統合科学系免疫病態学教授  
満屋 裕明

審査委員名 : 免疫識別学教授 西村 泰治  
エイズ学研究センター病態制御分野教授 松下 修三  
免疫学教授 阪口 薫雄

2003 年 3 月

# 目次

	page
1) 要旨	5
2) 発表論文リスト	8
3) 謝辞	9
4) 略語一覧	10
5) 研究の背景と目的	12
5)-1 はじめに	12
5)-2 ATLと日和見感染症	12
5)-3 HTLV-I キャリアと日和見感染	13
5)-4 T細胞サブセットと免疫不全	14
5)-5 胸腺機能と免疫不全	15
5)-6 本研究の目的	15
6) 実験方法	17
6)-1 被験者	17
6)-2 実験に使用した検体	17
6)-3 T細胞サブセットの解析（フローサイトメトリー）	17
6)-4 リアルタイムPCR法	19
6)-4-1 原理	19
6)-4-2 HTLV-Iプロウイルスの定量	20

6)-4-3 Epstein-Barr virus (EBV) DNAの定量	21
6)-4-4 T-cell receptor rearrangement excision circle (TREC) の定量	22
6)-4-5 recombination activating gene 1 (RAG-1) の定量	24
6)-5 interleukin-7 (IL-7) 濃度の測定	25
6)-6 統計処理	26
7) 実験結果	27
7)-1 T細胞サブセットの変化	27
7)-1-1 ATL患者におけるナイーブT細胞およびメモリーT細胞	27
7)-1-2 HTLV-I感染者におけるナイーブT細胞数	27
7)-1-3 HTLV-I感染者におけるメモリーT細胞数	28
7)-2 HTLV-Iプロウイルス量の測定	28
7)-3 胸腺機能の解析	29
7)-4 EBV DNAの定量	30
7)-5 IL-7濃度の測定	30
8) 考察	32
8)-1 HTLV-I感染とナイーブT細胞減少および胸腺機能低下	32
8)-2 HTLV-I感染とメモリーT細胞増加	33
8)-3 HTLV-I感染と日和見感染症	34
8)-4 HTLV-I感染とIL-7濃度	35
9) 結語	36

10) 図表とその説明	37
11) 参考文献	52

## 1) 要旨

【背景・目的】ヒトT細胞白血病ウイルスI型（Human T-cell leukemia virus type I: HTLV-I）が原因である成人T細胞白血病（adult T-cell leukemia: ATL）は治療抵抗性および免疫不全のため非常に予後不良の疾患である。ATLではヘルパーT細胞の腫瘍化による機能異常のため高度の細胞性免疫不全が生じるが、発症していないキャリアにおいても日和見感染を合併するケースが経験されることから腫瘍化以外に免疫を不活化する機序の存在が示唆されてきた。本研究ではHTLV-Iキャリア、HTLV-I関連脊髄症（HAM/TSP）、ATL患者におけるT細胞サブセット、胸腺機能を解析することでHTLV-I感染により惹起される免疫学的異常を見いだすことを目的とした。

【方法】HTLV-Iキャリア31例、HAM/TSP患者9例、ATL患者11例、非感染者29例の末梢血中単核球（PBMC）を分離後、以下の実験に使用した。

1. 分離したPBMCを抗CD4もしくはCD8抗体、抗CD45RA抗体、抗CD62L抗体にて染色しフローサイトメトリーにてT細胞サブセットを解析した。CD4+T細胞、CD8+T細胞各々におけるCD45RA+CD62L+の分画をナイーブT細胞、それ以外の分画をメモリーT細胞として測定した。
2. T-cell receptor rearrangement excision circles（TRECs）をreal-time PCR法にて定量した。
3. PBMC中のHTLV-Iプロウイルス量をreal-time PCR法にて測定した。

4. PBMC中Epstein-Barr virus(EBV)のDNA量をreal-time PCR法にて測定した。

5. IL-7の血漿中濃度をELISA法にて測定した。

【結果】 1. ナイーブT細胞数はATL患者において著しく減少していた。また50歳未満の症例では非感染者に比べてHTLV-Iのキャリアにおいては有意にナイーブT細胞は減少しており（CD4陽性ナイーブT細胞： $p=.0002$ 、CD8陽性ナイーブT細胞： $p=.0402$ ）、逆にメモリーT細胞は増加していた。

2. メモリーT細胞数の増加はプロウイルス量と正の相関があった（CD4陽性メモリーT細胞： $p=.0004$ 、CD8陽性メモリーT細胞； $p=.0282$ ）。

3. TRECsの値は50歳未満の群でHTLV-Iキャリアは非感染者に比して有意に減少しており（ $p=.0117$ ）、50歳以上では差がなかった。

4. EBV DNAは70歳未満では非感染者では11人中1人（9%）しか検出されなかったのに対し、HTLV-Iキャリアでは16人中6人（38%）に検出された。70歳以上では両群に検出がみられた。

5. 血漿中IL-7濃度は非感染者に比してHTLV-Iキャリアでは有意に高値であった（ $p=.0016$ ）。

【考察】 1. HIV-1感染者では感染初期からナイーブT細胞数の減少を来すことが知られておりこのことが免疫不全の原因の一つと考えられているが、本研究の結果からHTLV-Iキャリアにも同様の傾向があることが判明した。ナイーブT細胞の減少はHTLV-Iキャリアにおける易感染性の原因の一つである可能性が考えられた。

2. HTLV-I キャリアにおける胸腺でのTリンパ球産生減少がナイーブT細胞数減少の原因であると考えられた。

3. 70歳未満のHTLV-I キャリアでは非感染者よりも多数にEBV DNAが検出可能であったことは、ナイーブT細胞やTREC<sub>s</sub>の減少の動向と一致しており、これらの変化が、キャリアにおける免疫不全の一因であることを示唆させた。

4. リンパ球分化に重要なサイトカインであるIL-7の濃度がHTLV-I キャリアで上昇していたことは、減少したナイーブT細胞の数を増やそうとする代償性の変化ではないかと考えられた。

## 2) 発表論文リスト

### 学位論文の骨格となる発表論文

1. Jun-ichirou Yasunaga, Tatsunori Sakai, Kisato Nosaka, Ken-ichiro Etoh, Sadahiro Tamiya, Shin Koga, Shuji Mita, Makoto Uchino, Hiroaki Mitsuya, and Masao Matsuoka  
Impaired production of naive T-lymphocytes in human T-cell leukemia virus type I infected individuals: its implications in the immunodeficient state  
Blood 97:3177-3183, 2001

### 過去の論文リスト

1. 安永純一郎, 松岡雅雄.  
抗HTLV-I抗体陽性患者の管理の実際  
治療 84:307-312, 2002
2. 安永純一郎, 松岡雅雄  
ATLと免疫不全  
血液・腫瘍科 44:387-391, 2002



### 3) 謝辞

本研究において、御指導いただきました、熊本大学医学部内科学第二講座（免疫病態学）教授、満屋裕明先生、京都大学ウイルス研究所教授、松岡雅雄先生、共同研究者の熊本大学医学部神経内科学教授、内野誠先生、同講師（現国立療養所再春荘病院内科医長）、箕田修治先生、京都大学ウイルス研究所研究員、野坂生郷先生、天草中央総合病院内科、古賀震先生、米国国立癌研究所研究員、田宮貞宏先生、熊本大学医学部内科学第二講座、榮達智先生、江藤健一郎先生に厚く深謝致します。

#### 4) 略語一覽

AIDS : acquired immunodeficiency syndrome

ATL : adult T-cell leukemia

EBV : Epstein-Barr virus

ELISA : sandwich enzyme-linked immunosorbent assay

FAM : 6-carboxyfluorescein

FITC : fluorescein isothiocyanate

HAART : highly active antiretroviral therapy

HAM/TSP : HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis

HIV-1 : human immunodeficiency virus type 1

HTLV-I : human T-cell leukemia virus type I

IL-7 : interleukin-7

LIF : leukemia inhibitory factor

MAC : *Mycobacterium avium complex*

PBMC : peripheral blood mononuclear cell

PCR : polymerase chain reaction

PE : phycoerythrin

PML : progressive multifocal leukoencephalopathy

RAG-1 : recombination activating gene 1

SCF : stem cell factor

TAMRA : 6-carboxy tetramethyl rhodamine

TCR : T-cell receptor

TREC : T-cell receptor rearrangement excision circle

## 5) 研究の背景と目的

### 5)-1 はじめに

Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) が原因ウイルスとなって惹起される成人T細胞白血病 (adult T-cell leukemia: ATL) (1)はATL細胞自身の薬剤抵抗性や免疫不全による日和見感染症の合併により非常に予後が悪く、急性型において生存期間は一年に満たない。ウイルス感染による免疫不全としてはHuman Immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) によるエイズが最もよく知られているが、これはヘルパーTリンパ球の破壊により免疫不全を発症する。これに対しATL患者のみならず無症候性キャリアにおいても日和見感染を合併するケースが経験されることから腫瘍化以外に免疫異常をおこす機序の存在が示唆されていた。

### 5)-2 ATL と日和見感染症

ATL患者は高度の細胞性免疫不全状態を合併することを特徴とし、ホジキン病や非ホジキンリンパ腫の症例に比して、日和見感染を併発する頻度が高いことが知られている(2)。Shimoyamaらは818人のATL患者における合併感染症を調査し報告している(3)が、全ATL患者中の26.0%に診断時に感染症の合併を認め、各病型における頻度は急性型27.1%、リンパ腫型10.9%、慢性型35.5%、くすぶり型35.6%

となっている。起因病原体としては細菌が最も頻度が高いが、その他真菌、ウイルス、原虫なども認められ、Tリンパ球の機能障害としての特徴を呈している（表1））。一方、Whiteらは41例のATL患者における臨床経過を解析し、統計上、一人の患者が年に1.4回の頻度で感染症を合併し、0.71回の頻度で重症の感染症を発症する計算になると発表した(2)。実際、感染症はATL患者の直接死因において腫瘍死に次いで第二位となっている(4)。免疫能低下に起因するカポジ肉腫(5)や Epstein-Barr virus (EBV) 関連リンパ腫(6)といった日和見癌の合併を認めるケースもある。またJCウイルスの日和見感染により発症する進行性多巣性白質脳症 progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) が、ATLに合併した症例の報告も増えてきている(7) (8)。これらのことからATL患者において免疫能の低下は予後を左右する因子であると言える。

### 5)-3 HTLV-I キャリアと日和見感染

ATLを発症していないキャリアにおいても種々の日和見感染を来した症例の報告やツベルクリン反応の陰転化の頻度が高いという報告(9)があり、潜在的免疫不全の存在が示唆されてきた。日和見感染症の報告例としてはカリニ肺炎、クリプトコッカス髄膜炎、糞線虫症が多く(10)、サイトメガロウイルス肺炎(11)、播種性带状疱疹(12)なども報告されている。近年では*Mycobacterium avium complex* (MAC) 感染症患者の解析により、肺MAC感染症患者内に占めるHTLV-I キャリア

の割合は34.5%であり、非感染者に比べて発症頻度が高いことが報告され(13)、その後の解析にてHTLV-Iキャリアにおいては*Mycobacterium avium complex* (MAC) の特異抗原によるリンパ球の活性化が障害されていることも判明した(14)。また日和見リンパ腫の原因として重要なEBVに対するT細胞の反応性が低下していることが判明しており(15)、実際 HTLV-I キャリアに発症したEBV関連ホジキン病も経験されている(16)。これらの現象はHTLV-I キャリアにおける免疫不全がATL患者同様、細胞性免疫不全を特徴としていることを示している。

#### 5)-4 T細胞サブセットと免疫不全

HIV-1感染により発症する後天性免疫不全症候群acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) においてはCD4陽性T細胞の減少がその免疫不全の主たる原因である。加えてRoedererらはHIV-1感染初期からCD8陽性ナイーブT細胞 (CD45RA+CD62L+の分画) が減少し、その事が細胞性免疫の障害につながっていると報告した(17)。またFagnoniらは、上記と同じCD8陽性ナイーブT細胞 (CD45RA+CD62L+) が加齢とともに減少することを示し、高齢者に認められる細胞性免疫不全に関与していると報告した(18)。これらのことからナイーブT細胞とメモリーT細胞のサブセットの異常は免疫不全の一因を説明するものと考えられる。

## 5)-5 胸腺機能と免疫不全

T細胞は分化早期に骨髄より胸腺に移入して、特殊な微小環境のもとでT細胞レセプターT-cell receptor (TCR) 遺伝子の再構成を起し分化、成熟する。胸腺の大きさは思春期に最大となりT細胞の産生数も最も多いが、思春期以後では萎縮および脂肪変性が進み、その機能も加齢とともに低下する。免疫不全を来すHIV-1感染によっても胸腺の萎縮を来すことが知られている。DouekらはT細胞がTCR遺伝子の再構成を起す際にゲノムDNAから切り出され欠失する環状DNA、T-cell receptor rearrangement excision circle (TREC) に注目し、この量をPCRで定量することにより胸腺でのT細胞産生量を測定でき胸腺機能の指標とすることを提唱した(19)。また同時に、HIV-1感染者ではCD4陽性T細胞の減少に相関しTRECが減少しているが、多剤併用抗ウイルス療法highly active antiretroviral therapy (HAART) の効果により免疫の再構築が起こるとCD4陽性T細胞の回復とともにTRECのレベルも増加することを示した。これらのことからTRECの定量による胸腺機能の解析は、被験者の免疫能評価法の一つとして認識されている。

## 5)-6 本研究の目的

HTLV-I感染者における免疫不全のメカニズムは未だ不明な点が多い。上記の

ような背景をもとに、細胞性免疫不全の原因としてT細胞サブセットや胸腺機能に着目しHTLV-I感染者における異常の有無と、感染者の年齢、プロウイルス量など種々の変数の影響などにつき解析することを目的とした。



## 6) 実験方法

### 6)-1 被験者

本研究において、我々はHTLV-Iキャリア31例、HAM/TSP患者9例、ATL患者11例、HTLV-I非感染者29例を解析した。HAM/TSPおよびATL患者は全例において、解析した時点で免疫抑制剤や抗癌剤による化学療法を受けていなかった。

### 6)-2 実験に使用した検体

上記被験者より静脈血を採取し、Ficoll-Paqueを用いた密度勾配遠心法にて末梢血単核細胞peripheral blood mononuclear cell (PBMC) を分離した。この細胞はフローサイトメトリーによるT細胞サブセットの解析およびゲノムDNA抽出に用いられた。ゲノムDNA抽出はフェノール法にて行った。

### 6)-3 T細胞サブセットの解析 (フローサイトメトリー)

CD4陽性およびCD8陽性T細胞におけるナイーブT細胞とメモリーT細胞の割合を解析するために次のモノクローナル抗体を使用した。

PC5標識抗CD4抗体 (Immunotech)

PC5標識抗CD8抗体 (Immunotech)

fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗CD45RA抗体 (Immunotech)

phycoerythrin (PE) 標識抗CD62L抗体 (Pharminogen)

被験者から分離したPBMCを上記の抗CD4抗体もしくは抗CD8抗体、抗CD45RA抗体、抗CD62L抗体の3種類と抗体反応を行い、フローサイトメトリーにて解析した。測定機器はEPICS-XL (Beckman Coulter) を使用した。解析は以下の要領で行った (図1)。

1. 最初にforward scatter とside scatter にて細胞集団を展開
2. リンパ球分画をgating
3. リンパ球内のCD4 もしくはCD8陽性細胞をgating
4. CD4陽性、CD8陽性細胞におけるCD45RA陽性CD62陽性のダブルポジティブ分画をナイーブT細胞、それ以外の分画をメモリーT細胞とし、割合を測定

上記の手順にてCD4陽性およびCD8陽性ナイーブT細胞、メモリーT細胞の割合を測定し、解析当日のヘモグラムから、それぞれの絶対数を算出した。

## 6)-4 リアルタイムPCR法

### 6)-4-1 原理 (図2、図3)

本研究では4種類の定量をリアルタイムPCRにて行った。ここに簡単な原理を示す。

1. PCRにて検出するシーケンス内の両プライマーの間に2つの蛍光色素 (R : reporter, Q : quencher) を持ったオリゴヌクレオチドプローブ (TaqManプローブ) を設計し、PCR反応液に混合する。リアルタイムPCR法はこのR色素の発光強度を検出し定量するが、このプローブが分解されないうちは発光が抑えられている。

2. Taqポリメラーゼによりプライマーから伸長反応が進みTaqManプローブに達すると、5'→3'エキソヌクレアーゼ活性によりプローブが分解される。このため2つの蛍光色素のうちR色素が強い発光を発するようになり、測定機器により強度を検出する。つまり目的遺伝子が存在しなければPCR反応は起こらず蛍光は検出されないが、目的遺伝子の量が増えるに従い、検出される蛍光の強度も強くなる。

3. 検出するシーケンスを挿入したプラスミドを作成し精製する。その濃度および分子量から、作成したプラスミド溶液に含まれるプラスミドのコピー数を算出、希釈系列を作成し、スタンダード曲線を引く (図3)。

4. 各測定のたびに、このスタンダードも同時に作成し、各サンプルに含まれる目的遺伝子のコピー数を求める。

表2にそれぞれの測定に用いたプライマーとTaqManプローブの配列を示す。

## 6)-4-2 HTLV-I フロウウイルスの定量

HTLV-Iの*gag*領域を検出するプライマー、プローブを設計した。以下にPCRの条件を示す。

### 反応液組成

1×TaqMan buffer A

3.5mM MgCl<sub>2</sub>

200 μM dATP.dCTP.dGTP

400 μM dUTP

300nM each primer

200nM TaqMan probe

1.25U AmpliTaq Gold polymerase

0.5U AmpErase UNG

200ng genomic DNA

### 反応条件

95°C 10min. 1cycle

95°C 15sec.

60°C 60sec. 50cycles

測定機器はABI PRISM 7700 Sequence Detection Systems (Applied

Biosystems) を使用した。

スタンダードとして検出配列を含むプラスミドの希釈系列を毎回同時に測定し、臨床サンプル、スタンダードともにduplicateで測定した平均値を算出した。

尚、各測定値は後述するrecombination activating gene 1 (*RAG-1*) の定量値を利用し、PCR反応に用いられたDNA量の補正を行った。

#### 6)-4-3 Epstein-Barr virus (EBV) DNAの定量

EBVのDNA polymerase領域を検出するプライマー、プローブを設計した。以下にPCRの条件を示す。

##### 反応液組成

1×TaqMan buffer A

3.5mM MgCl<sub>2</sub>

200 μM dATP, dCTP, dGTP

400 μM dUTP

300nM each primer

200nM TaqMan probe

1.25U AmpliTaq Gold polymerase

0.5U AmpErase UNG

200ng genomic DNA

## 反応条件

95℃ 10min. 1cycle

95℃ 15sec.

60℃ 60sec. 50cycles

測定機器はABI PRISM 7700 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems) を使用した。

スタンダードとして検出配列を含むプラスミドの希釈系列を毎回同時に測定し、臨床サンプル、スタンダードともにduplicateで測定した平均値を算出した。

尚、各測定値は後述するrecombination activating gene 1 (*RAG-1*) の定量値を利用し、PCR反応に用いられたDNA量の補正を行った。

## 6)-4-4 T-cell receptor rearrangement excision circle (TREC) の定量

TRECとはT細胞がTCR遺伝子の再構成を起こす際にゲノムDNAから切り出され欠失する環状DNAのことである。図4の如く、環状DNAが切り出される際の両端が結合する部分を検出できるようにプライマー、プローブを設計した。この場合、プライマーの方向はゲノムDNA上では反対向きになりPCRはかからないため、環状DNA以外のゲノムを検出する可能性はなくなる。以下にPCRの条件を示す。

## 反応液組成

1×TaqMan buffer A  
3.5mM MgCl<sub>2</sub>  
200 μM dATP, dCTP, dGTP  
400 μM dUTP  
300nM each primer  
200nM TaqMan probe  
1.25U AmpliTaq Gold polymerase  
0.5U AmpErase UNG  
200ng genomic DNA

#### 反応条件

95°C 10min. 1cycle  
95°C 15sec.  
60°C 60sec. 50cycles

測定機器はABI PRISM 7700 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems) を使用した。

スタンダードとして検出配列を含むプラスミドの希釈系列を毎回同時に測定し、臨床サンプル、スタンダードともにduplicateで測定した平均値を算出した。

尚、各測定値は後述するrecombination activating gene 1 (*RAG-1*) の定量値を利用し、PCR反応に用いられたDNA量の補正を行った。

6)-4-5 recombination activating gene 1 (*RAG-1*) の定量 (内在性コントロール)

上記3種類の測定にテンプレートとして用いた DNAの量を厳密に補正するため、各サンプルの*RAG-1*の量をリアルタイムPCRにて測定し、補正に使用した。*RAG-1*のexon2領域を検出するプライマー、プローブを設計した。以下にPCRの条件を示す。

#### 反応液組成

1×TaqMan buffer A

3.5mM MgCl<sub>2</sub>

200 μM dATP, dCTP, dGTP

400 μM dUTP

300nM each primer

200nM TaqMan probe

1.25U AmpliTaq Gold polymerase

0.5U AmpErase UNG

200ng genomic DNA

#### 反応条件

95°C 10min. 1cycle



95°C 15sec.

60°C 60sec. 50cycles

測定にはABI PRISM 7700 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems) を使用した。

スタンダードとして検出配列を含むプラスミドの希釈系列を毎回同時に測定し、臨床サンプル、スタンダードともにduplicateで測定し平均値を算出した。

このPCRにて検出する*RAG-1*遺伝子内の領域は、1つの細胞当たり2コピーずつ存在しているため、各定量値は以下の式にて補正し、細胞 $10^5$ 個当たりのコピー数として算出した。

$$\text{補正定量値} = 2 \times 10^5 \times \text{各測定値} / \text{RAG-1測定値}$$

#### 6)-5 interleukin-7 (IL-7) 濃度の測定

ATL、HAM/TSP患者、HTLV-Iキャリアおよび非感染者血漿中のIL-7濃度を sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法にて測定した。

Quantikine HS (R&D) を使用し、スタンダード、各サンプルともduplicateで測定し平均値を算出した。

## 6)-6 統計処理

6)-3から6)-5の結果を解析するにあたり、感染者と非感染者のグループ間での有意差を検討するためにマン・ホイットニ検定を、またナイーブT細胞数と年齢など2変量間での相関関係を検討するためにスピアマンの順位相関係数を用いた。

## 7) 実験結果

### 7)-1 T細胞サブセットの変化

#### 7)-1-1 ATL患者におけるナイーブT細胞およびメモリーT細胞 (図5)

CD45RAとCD62Lの発現を解析することにより、CD4もしくはCD8陽性T細胞は4つのサブセットに分けられる。RodererらはCD45RA+CD62L+の分画をナイーブT細胞、残りの3分画をメモリーT細胞とした(17)。この3分画はそれぞれM1 (CD45RA-CD62L-)、M2 (CD45RA-CD62L+)、M3 (CD45RA+CD62L-)と分けられる。ATL症例ではほとんどのリンパ球がCD4陽性メモリーT細胞 (M1およびM2) であり、過去の報告(20)と同様の結果であった。一方、ナイーブT細胞はCD4陽性、CD8陽性細胞ともに著しく減少していた。

#### 7)-1-2 HTLV-I感染者におけるナイーブT細胞数

図6に示すように非感染者においては加齢とともにナイーブT細胞数は有意に減少し、メモリーT細胞は増加する傾向にある。HTLV-IキャリアおよびHAM/TSP患者のCD4陽性ナイーブT細胞数を年齢別に見てみると年齢に関係なく減少していることが判明し、50歳未満のHTLV-I感染者における平均 ( $269 \pm 149/\mu\text{l}$ ) は有意に

同年代の非感染者の平均 ( $680 \pm 234/\mu\text{l}$ ) よりも低値であった ( $p=0.0002$ ) (図7) 。同様にCD8陽性ナイーブT細胞も50歳未満のHTLV-I感染者の平均値 ( $138 \pm 73/\mu\text{l}$ ) は有意に非感染者の平均 ( $301 \pm 195/\mu\text{l}$ ) と減少していた ( $p=0.0402$ ) 。高齢者では非感染者においてもナイーブT細胞数は減少するため、50歳以上のHTLV-I感染者におけるナイーブT細胞数はCD4、CD8陽性ともに非感染者との間に有意差は認められなかった。

#### 7)-1-3 HTLV-I感染者におけるメモリーT細胞数

50歳未満ではCD8陽性メモリーT細胞数はHTLV-I感染者の平均値 ( $246 \pm 191/\mu\text{l}$ ) は非感染者の平均値 ( $95 \pm 50/\mu\text{l}$ ) に比して有意に高値であった ( $p=0.0403$ ) 。しかし、CD4陽性メモリーT細胞数においては両群間に有意差は認めなかった。50歳以上のグループにおいてはCD4、CD8陽性ともにメモリーT細胞数に有意差は認められなかった (図8) 。

#### 7)-2 HTLV-Iプロウイルス量の測定

Etohらの報告(21)にもあるように、HTLV-Iキャリアの感染細胞率は1%に満たない症例から数十%に達するものまで100倍以上の差が認められる。今回プロウイルス量とナイーブT細胞数およびメモリーT細胞数との間の相関関係をみるため、リア

リアルタイムPCR法にて各症例のプロウイルス量を決定した。図9に示すようにCD4陽性、CD8陽性ともにメモリーT細胞数とプロウイルス量との間には正の相関関係があった（CD4陽性メモリーT細胞は $p=0.0004$ 、CD8陽性メモリーT細胞は $p=0.0282$ ）。しかし、ナイーブT細胞数との間には相関関係は認められなかった。

Richardsonらにより、HTLV-Iプロウイルスは主にCD4陽性メモリーT細胞に検出されることが証明されている(20)。本研究においてプロウイルス量が増加するとメモリーT細胞数も増えることが明らかとなったため、メモリーT細胞中どの程度が感染細胞であるかを検討した。HTLV-Iキャリア数症例からマグネットビーズを用いてCD4陽性細胞、CD8陽性細胞を純化し（セレクション後の純度はともに97%以上であった）、同様の方法でその細胞中のプロウイルス量を測定した。表3に示すとおり、殆どの症例においてCD4陽性細胞に比べるとその頻度は低いもののCD8陽性細胞にもHTLV-Iが感染していると予想された。またCD4、CD8陽性細胞中の感染細胞の割合はメモリーT細胞の割合よりも低いと考えられ、メモリーT細胞のごく一部が感染細胞であることが示唆された。

### 7)-3 胸腺機能の解析

50歳未満のHTLV-I感染者におけるナイーブT細胞の減少の原因を解明するためTRECをリアルタイムPCR法にて定量し、胸腺でのT細胞産生能の評価を行った。非感染者においてTRECのレベルは加齢とともに減少し、この動向はナイーブT細胞

数と同じである。図10に示すように、50歳未満を比較した場合HTLV-I感染者では非感染者に比べて有意にTRECの低下を認めた（HTLV-I感染者 $3701 \pm 3041/105$ 個PBMC、非感染者 $6817 \pm 4523/105$ 個PBMC、 $p=.0117$ ）。50歳以上では有意差は認められず、プロウイルス量との相関関係も無かった。このこともナイーブT細胞の動きと同じであった。これらのことから50歳未満のHTLV-I感染者におけるナイーブT細胞低下は胸腺によるT細胞産生能低下に起因するものと考えられた。

#### 7)-4 EBV DNAの定量

EBVはほとんどの成人に潜伏感染が認められる(22)が、免疫不全状態にある患者においては、しばしば再活性化が認められる(23)。今回HTLV-I感染者における免疫不全の評価のため、PBMC中のEBV DNA量をリアルタイムPCR法にて定量した。図11に示すように70歳未満のHTLV-I感染者では16人中6人（38%）に検出されたのに対し、非感染者では11人中1人（9%）にのみ検出可能であった。70歳以上の高齢者では両群ともにEBV DNAを検出可能であり、高齢者における免疫不全状態を反映しているものと考えられた。

#### 7)-5 IL-7濃度の測定

IL-7は胸腺におけるT細胞の初期分化に重要なサイトカインとして知られてい

る(24)。そこでHTLV-I感染者と非感染者における血漿中IL-7濃度をELISAにて測定し、比較した。図12に示すとおり、HTLV-I感染者においてIL-7濃度は有意差をもって高値であった。このことは、胸腺におけるT細胞産生低下の代償性的変化ではないかと考えられた。

## 8) 考察

### 8)-1 HTLV-I感染とナイーブT細胞減少および胸腺機能低下

本研究にてHTLV-I感染者においてはCD4陽性、CD8陽性両者のT細胞中のナイーブT細胞が減少していることが明らかとなった。ナイーブT細胞減少の度合いはHTLV-Iプロウイルス量との間に相関関係は無く、HTLV-Iの感染自体が影響するものと考えられた。TRECの定量結果よりHTLV-I感染者においては胸腺におけるT細胞の産生能に障害があり、その結果ナイーブT細胞数の減少を来していることが示唆された。SimpsonらはラビットにHTLV-I感染細胞株を接種すると胸腺の萎縮を来し、病理学的には胸腺内にHTLV-I感染細胞の浸潤を伴っていることを示した(25)。またFurutaらはHTLV-IのpX領域を遺伝子導入したラットでも胸腺の萎縮を認めることを発表した(26)。感染者胸腺細胞でHTLV-Iが、どの程度、感染しているかは現時点では不明であるが、これらの所見はHTLV-I感染と胸腺萎縮の関連性を示している。Sempowskiらは加齢により、胸腺におけるleukemia inhibitory factor (LIF)、oncostatin M、IL-6、stem cell factor (SCF)の発現が増加し、胸腺の萎縮ならびにナイーブT細胞の減少を来すことを報告した(27)。更にこれらの炎症性サイトカインをマウスに接種すると胸腺が萎縮することが観察されている。HTLV-I感染者では血清中IL-6が高値であることは以前から知られており(28)、こういった炎症性サイトカインの産生増加が胸腺におけるT細胞産生に抑制的に作用



しているのかもしれない。

HIV感染者においても早期よりナイーブT細胞の減少がCD4、8分画で認められ、免疫不全発症における意義が示されたが、本研究からHTLV-I感染者においても同様にナイーブT細胞の減少が、その免疫不全の一原因として示された。これはHIV感染症においてもナイーブT細胞の減少にHIVの直接の作用に加えて増加している炎症性サイトカインが関連している可能性を示している。

#### 8)-2 HTLV-I感染とメモリーT細胞増加

HTLV-IIはT細胞、B細胞、単球、線維芽細胞など種々の細胞に感染することができるが、T細胞を特異的に増殖させる。今回の実験でも、CD4陽性メモリーT細胞とHTLV-Iプロウイルス量との間には正の相関関係を認めており、このことと矛盾しない結果であった。しかし、増加しているメモリーT細胞の大部分が非感染細胞であり、メモリーT細胞増加の大半は免疫反応に起因するものであると考えられた。ATL腫瘍細胞はCD4陽性メモリーT細胞の表面形質を持つことが知られているが、この場合モノクローナルな感染細胞である。ATLの発症は同一クローンのclonal expansion によることが証明されている(29)(30)が、その過程において一感染細胞としてのメモリーT細胞がどのようにして腫瘍性を獲得していくのかという問題は今後解析すべきテーマである。

### 8)-3 HTLV-I感染と日和見感染症

ATL患者における日和見感染症合併の頻度は他の造血器腫瘍と比較して高いことが知られている(2)。ATLを発症していないHTLV-IキャリアやHAM/TSP患者においても真菌、ウイルス、原虫などによる日和見感染の報告が散見されている。今回の研究結果からHTLV-I感染者に認められるナイーブT細胞数の減少が、その易感染状態を惹起する原因の一つであると考えられた。ATL患者の中にはしばしばリンパ節内にEBV DNAを有する症例があり(31)、またHTLV-Iキャリアに発症したEBV関連ホジキン病症例の報告(16)もあることから、これらはHTLV-Iによる免疫能低下を反映していると考えられた。我々のリアルタイムPCRの結果からも、70歳未満では非感染者に比してHTLV-I感染者ではEBV DNAを検出できる頻度が高くこのことを裏付けていると思われる。70歳以上ではHTLV-I感染の有無に関わらずEBVの検出率は高くなっているが、このことは高齢者における免疫不全によると考えられる。また最近、高齢者にEBV陽性リンパ腫が多いという報告もある。高齢者では胸腺機能の低下（TRECの減少）、ナイーブT細胞数の減少が認められHTLV-I感染による変化と共通している。

#### 8)-4 HTLV-I感染とIL-7濃度

IL-7はT細胞の分化に重要なサイトカインであり、その濃度は加齢の影響を受けないことが知られている(27)。今回の結果からHTLV-I感染者においては、その血漿中濃度が高値であることが判明したが、胸腺におけるT細胞産生能低下を補おうとする代償性の上昇である可能性が示唆された。ATL腫瘍細胞はIL-2レセプター、IL-15レセプターを高発現し、これらのサイトカインと腫瘍化の関連が以前より指摘されてきた(32)。最近これらのレセプターと $\gamma$ 鎖を共有するIL-4レセプター、IL-7レセプターも多くの症例で発現が認められ、また反応性を有することも報告された(33)。ATL細胞は、IL-2では殆ど増殖しないことが明らかになっており、またIL-15には反応するものの、その産生は認められない。従って、今回の研究で明らかとなったIL-7の増加は腫瘍化の過程で主要な役割を担っている可能性がある。IL-7は、その受容体発現細胞のアポトーシスを抑制するとともに、増殖も促進する。我々の研究でもATL細胞では高率にIL-7に反応して増殖することが示されており、今後、腫瘍化における意義に関して明らかにする必要があるものと考えられる。

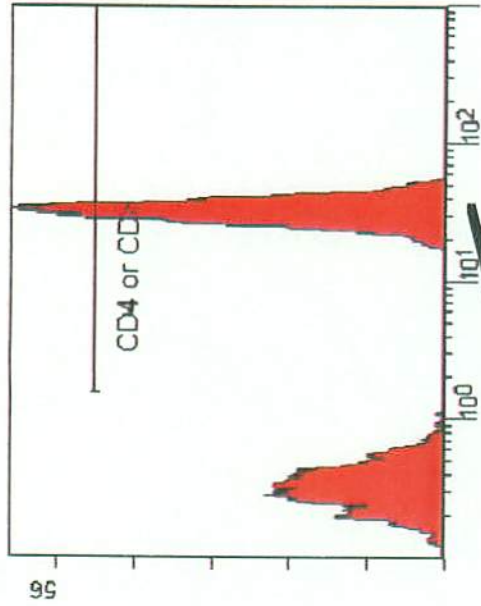
## 9) 結語

ATL患者が著しい細胞性免疫不全をきたすことは、その臨床像からも明らかであり、HTLV-Iキャリアでも潜在的に原因不明の免疫不全が存在することは以前から臨床的に示唆されていたが、その機序は不明なままであった。ATLの経過中、自然寛解をきたす症例の存在や、近年積極的にATLに対し行われている造血幹細胞移植療法が従来の化学療法を中心とした治療よりも好成績を修めていることを考慮すると、ATL患者における免疫状態を理解することは、患者を診療する上で有益であると思われる。また原因不明の免疫不全患者を診療する際にHTLV-I感染の有無や胸腺機能の評価を行うことは、その原因を解明する指標となり得るかもしれない。

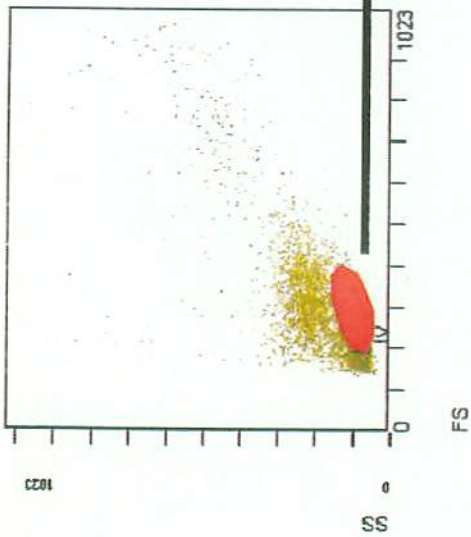
HTLV-Iが発見され、ATLの原因であることが見出されてから20年が経過し様々なことが明らかとなってきたが、未解決の問題も多く残されている。その中でも最も大きな謎は、ATL発症のメカニズムである。患者のほとんどが母乳により感染し、平均60年という長期の潜伏期間を経て発症する。HTLV-IがコードするTax蛋白がleukemogenesisの中心的な役割を担っていると考えられるが、host側の要因、すなわち癌遺伝子、癌抑制遺伝子の発現変化や免疫能の変化などが、その発症に大きく関わっていると思われる。ATLの発症機構を含めたHTLV-Iの自然史を解明するために今後もあらゆる側面からの研究が必要である。

10) 図表とその説明

2. CD4陽性もしくはCD8陽性分画をgatingする

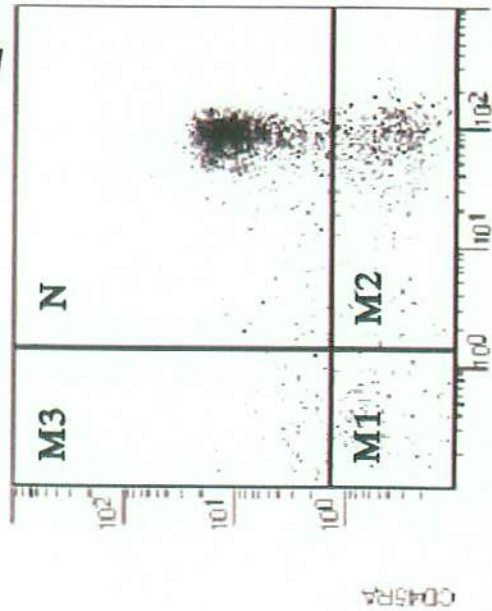


1. リンパ球分画をgatingする



3. CD4もしくはCD8陽性T細胞におけるCD45RAとCD62Lの発現を解析し以下のように分類する。

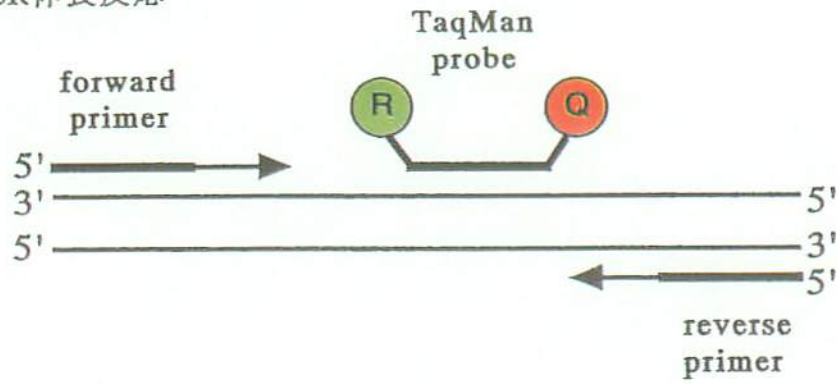
- ナイーブT細胞: CD45RA+CD62L+ (N)
- メモリーT細胞: CD45RA-CD62L- (M1)
- CD45RA-CD62L+ (M2)
- CD45RA+CD62L- (M3)



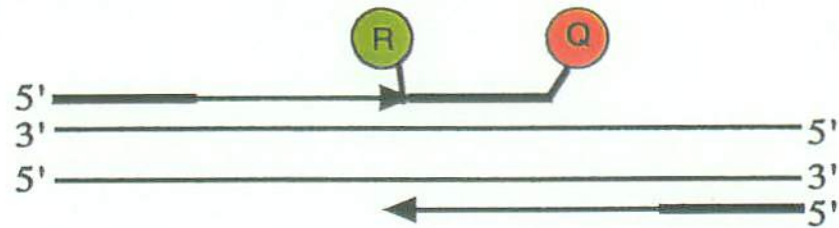
CD62L

図1 フローサイトメトリーによるナイーブT細胞、メモリーT細胞検出の手順

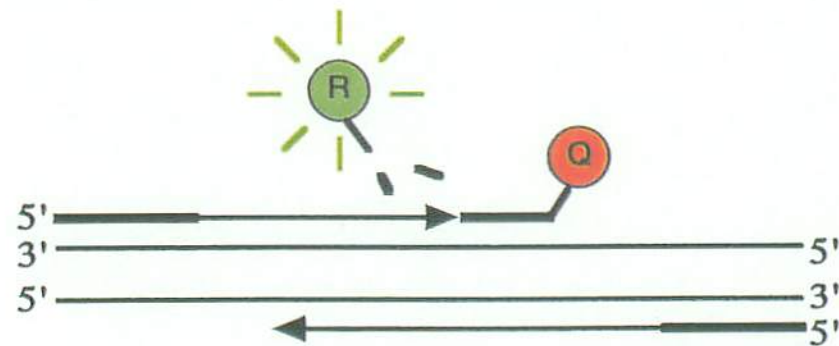
1. PCR伸長反応



2. 伸長反応がTaqManプローブに達する



3. TaqManプローブの分解（蛍光色素の発光）



4. 蛍光強度の測定によるPCR産物の定量

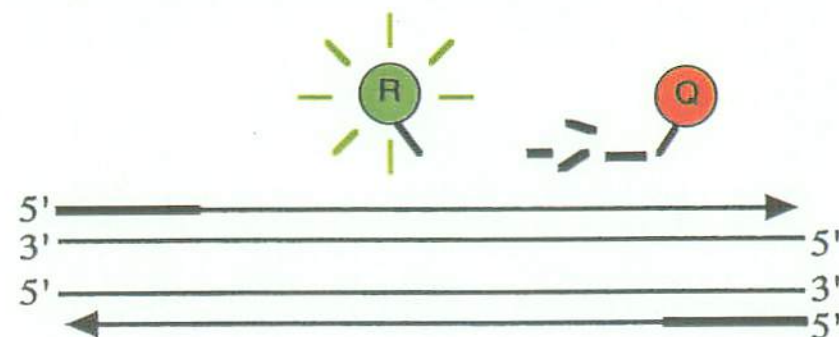


図2 リアルタイムPCR法の原理（シエーマ）

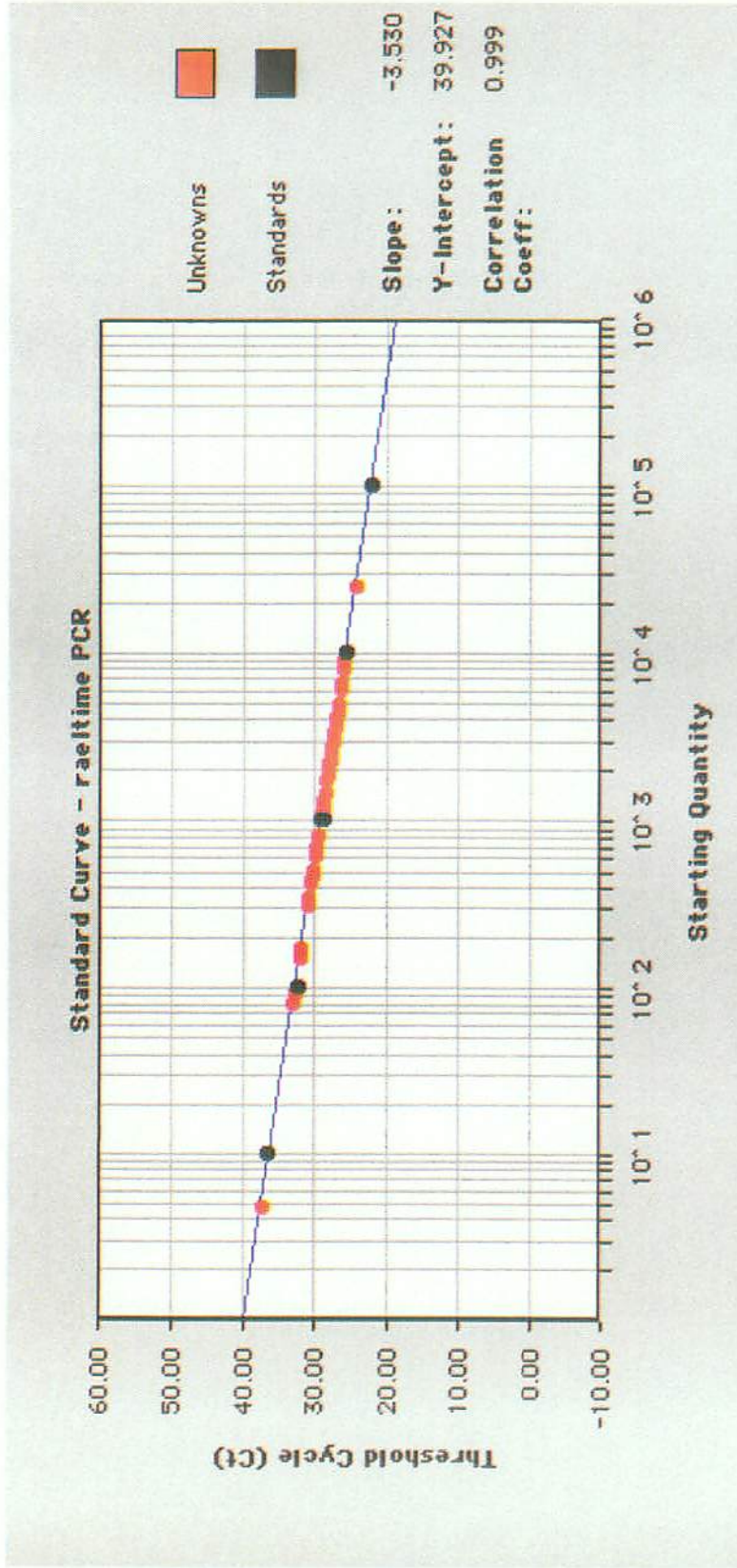


図3 リアルタイムPCR法による定量直線

グラフ内の●はプラスミドをテンプレートにしたスタンダード用サンプル  
 ●は実際の測定サンプル  
 ともにduplicateにて測定している

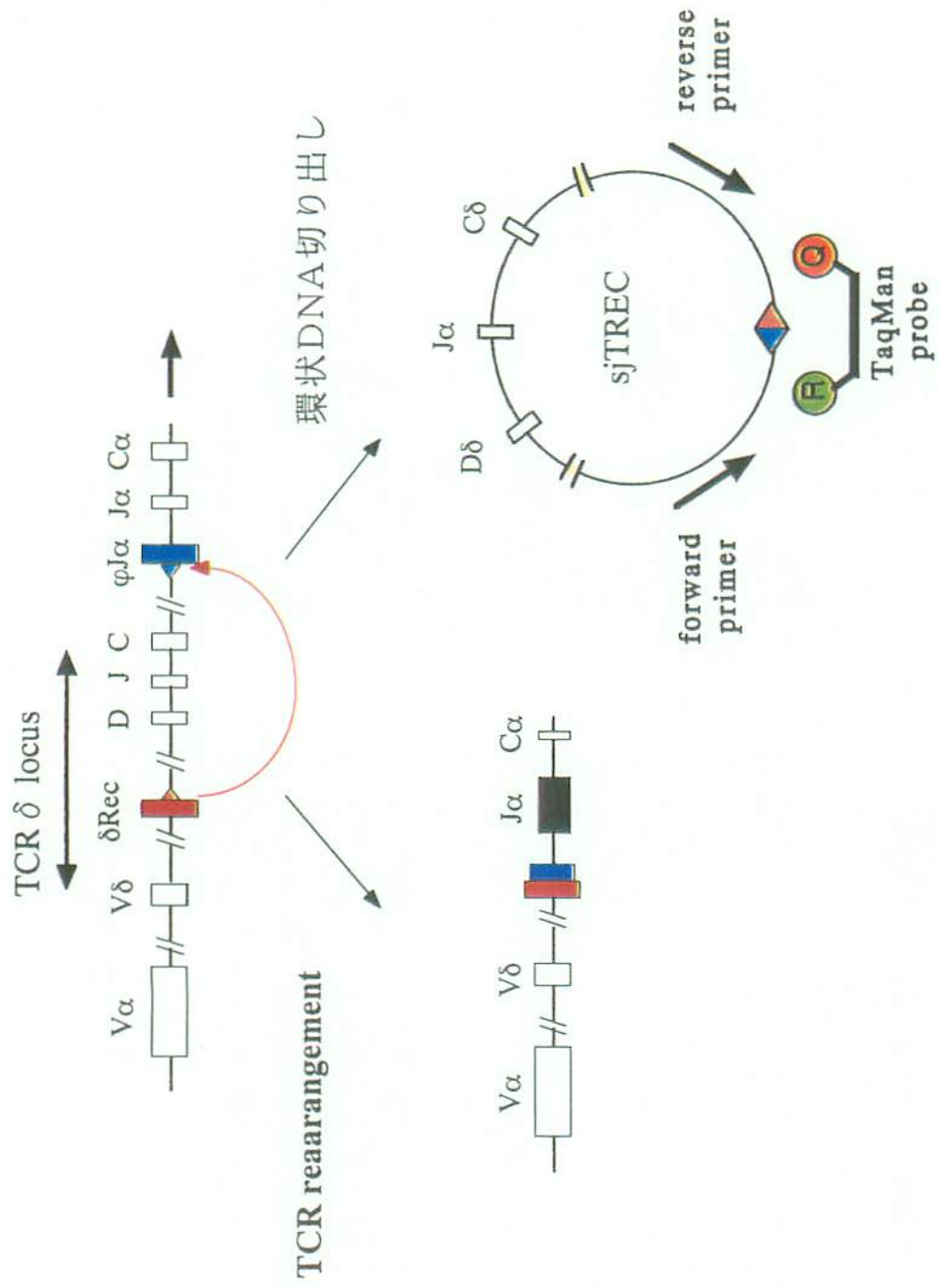


図4 TRECCの切り出しとプライマー、TaqManプローブの位置



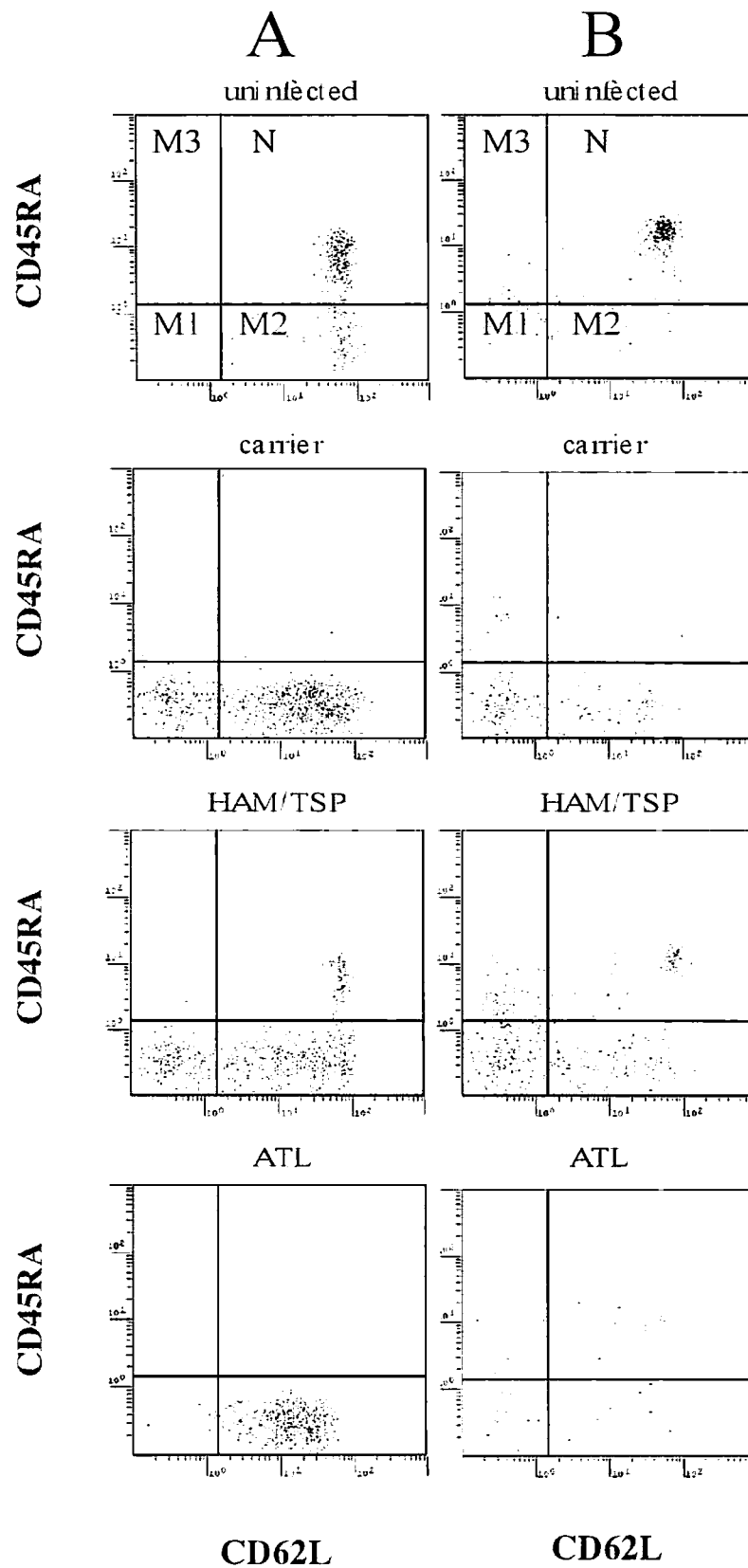


図5 ナイーブ、メモリーT細胞サブセット解析結果の例

HTLV-I非感染者、キャリア、HAM/TSP患者、ATL患者それぞれ一例ずつの解析結果。AはCD4陽性T細胞、BはCD8陽性T細胞分画であることを示している。ATL患者ではCD4でgatingした細胞のほとんどがATL細胞であるが、その大部分がメモリー分画であることが分かる。

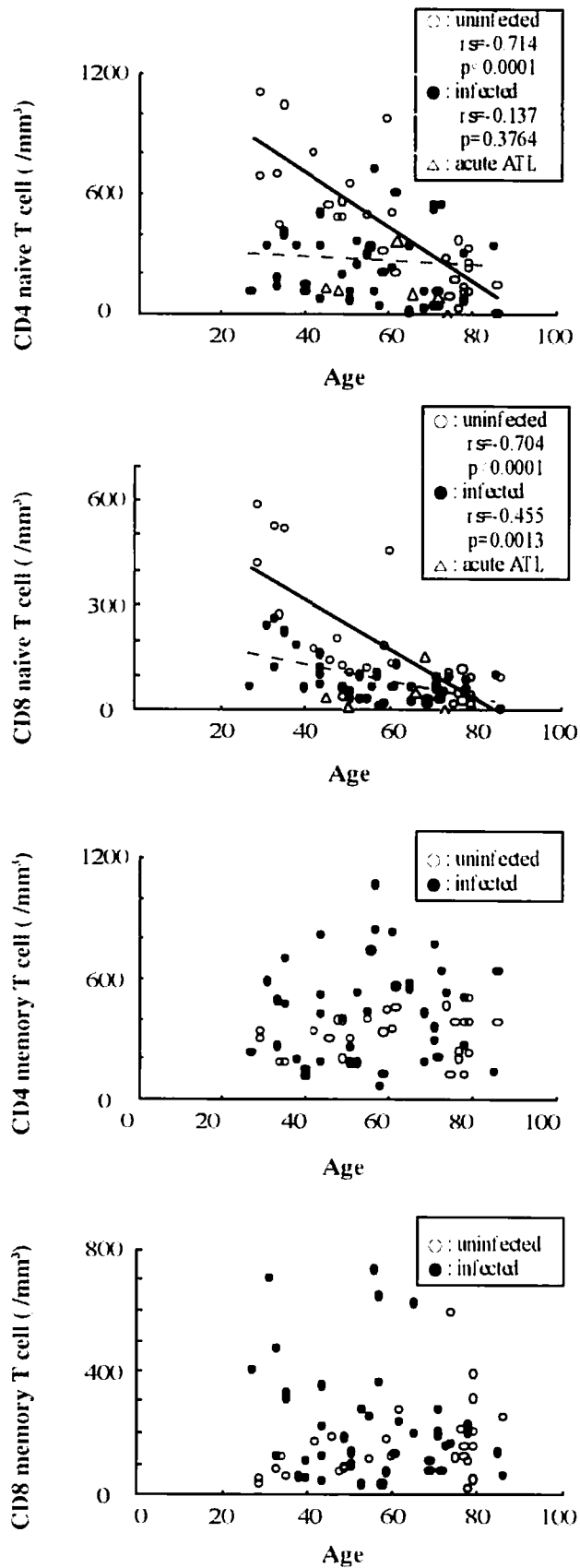


図6 ナイーブT細胞、メモリーT細胞と年齢の関係

HTLV-I非感染者では年齢とナイーブT細胞数は負の相関関係にあり、感染者ではその相関関係がなくなる。メモリーT細胞数と年齢には相関関係は認めない。

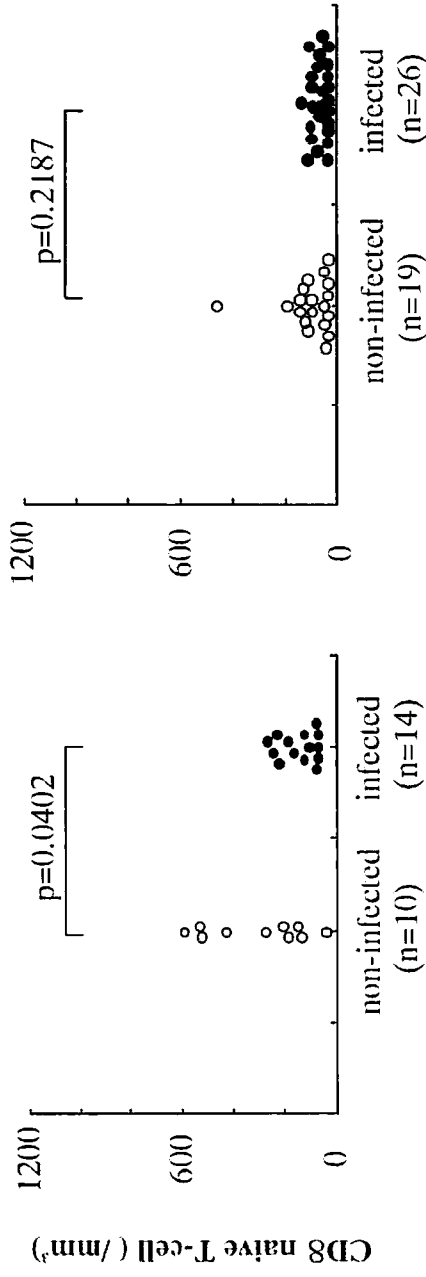
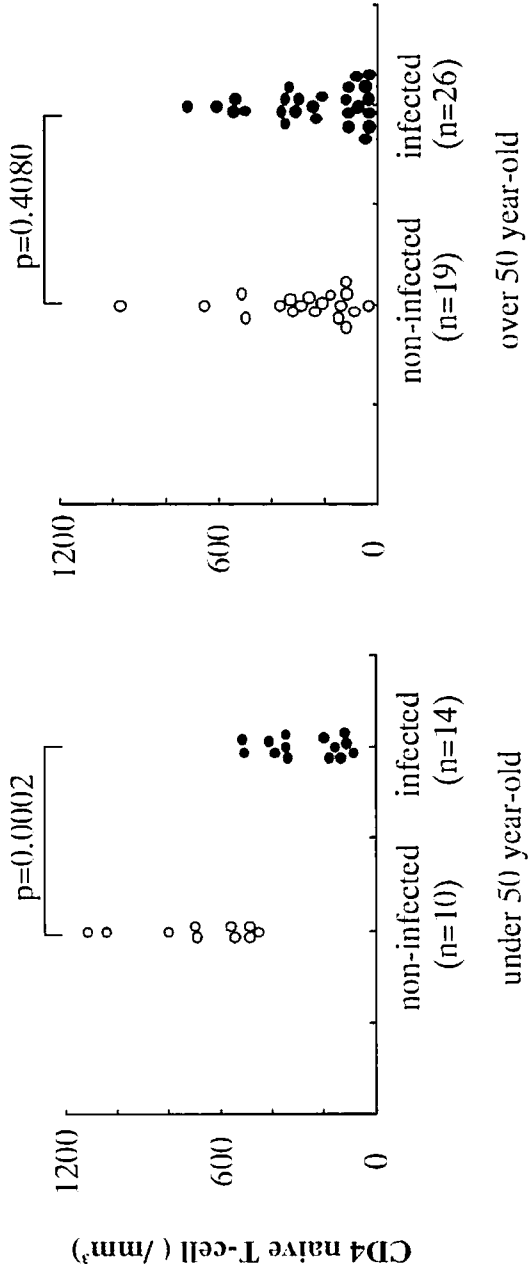


図7 HTLV-I感染者と非感染者におけるナイーブT細胞数の差

50歳未満で比較すると、CD4陽性ナイーブT細胞数、CD8陽性ナイーブT細胞数ともにHTLV-I感染者において減少している。高齢になると非感染者でもナイーブT細胞数が減少するため有意差が無くなる。

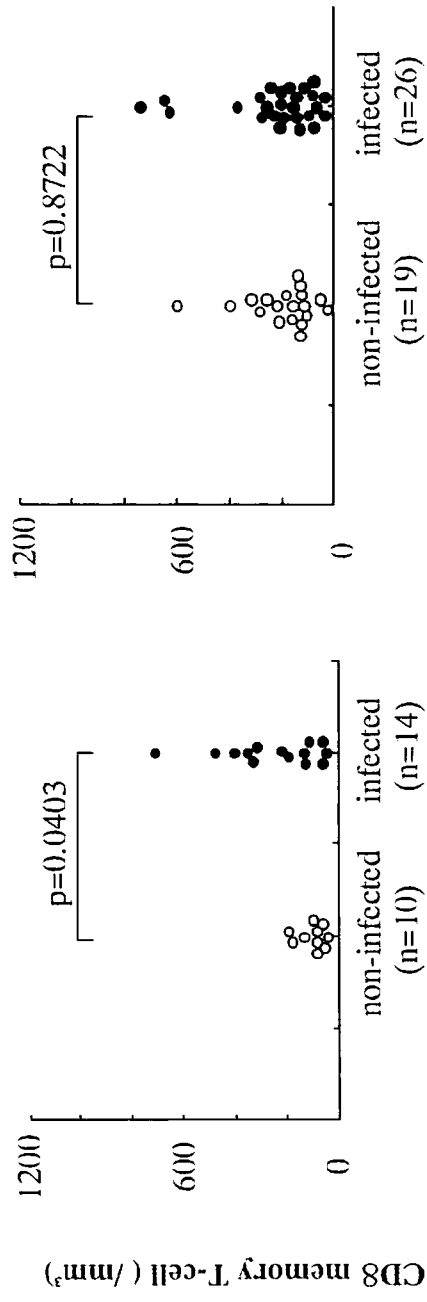
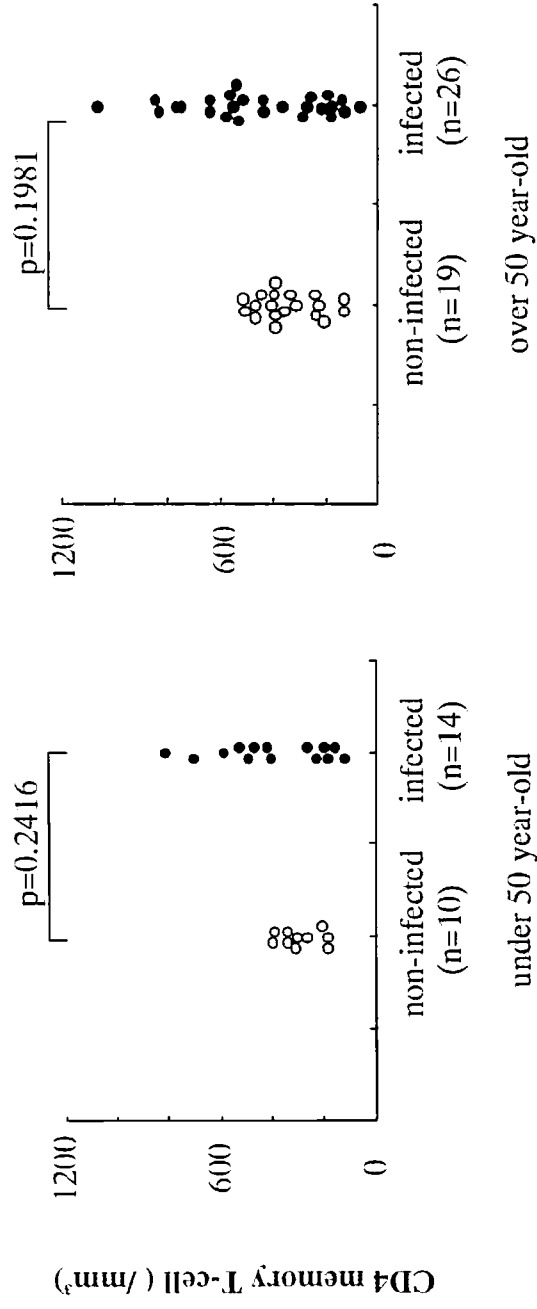


図8 HTLV-I感染者と非感染者におけるメモリーT細胞数の差

50歳未満ではHTLV-I感染者にてCD8陽性メモリーT細胞数は有意に増加しているが、CD4陽性メモリーT細胞では有意差は認めない。50歳以上では両群に有意差は認めない。

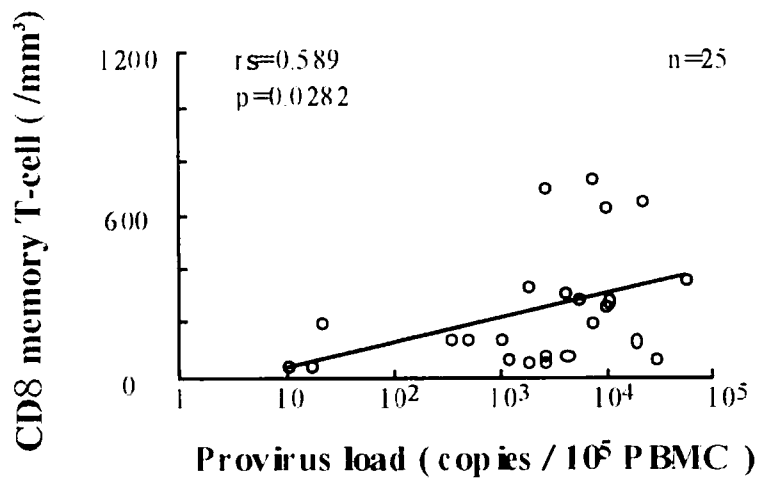
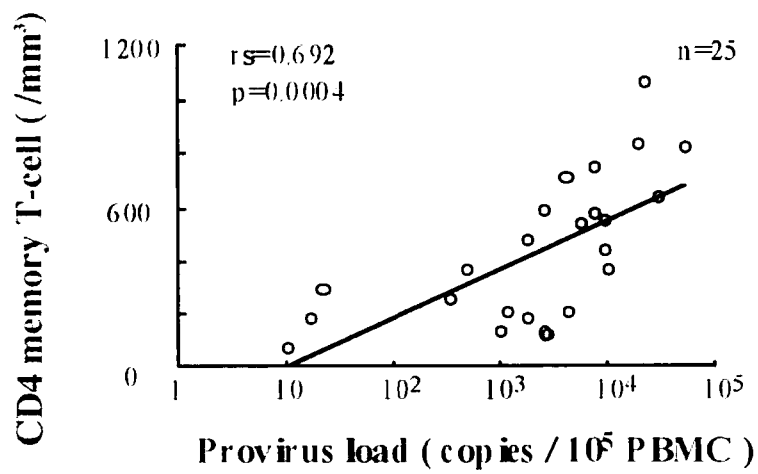


図9 HTLV-Iプロウイルス量とメモリーT細胞数の相関

CD4陽性メモリーT細胞数、CD8陽性メモリーT細胞数ともにHTLV-Iプロウイルス量と正の相関関係を認める。

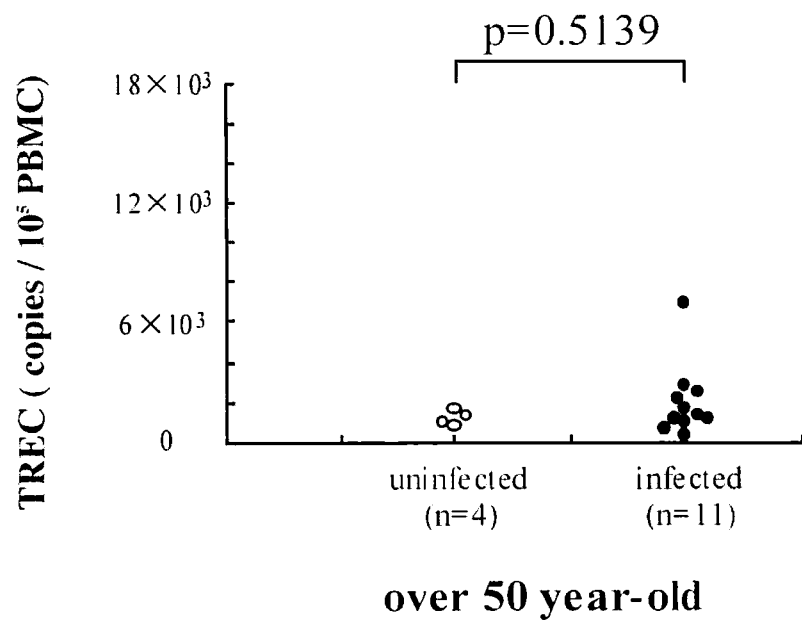
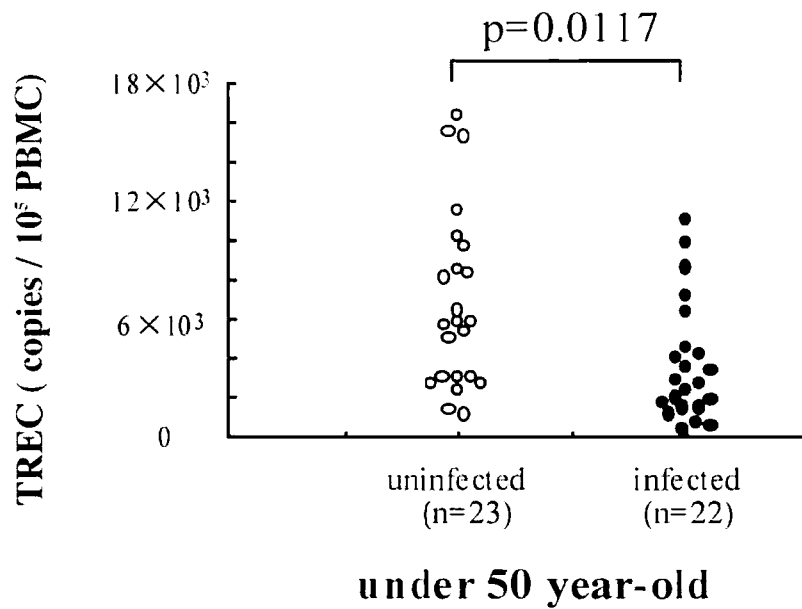


図10 HTLV-I感染者と非感染者におけるTREC量の差

50歳未満のHTLV-I感染者と非感染者を比較すると、有意に感染者においてTREC量は減少しており、50歳以上では有意差が消失する。この事は両群間におけるナイーブT細胞数の差と一致する。

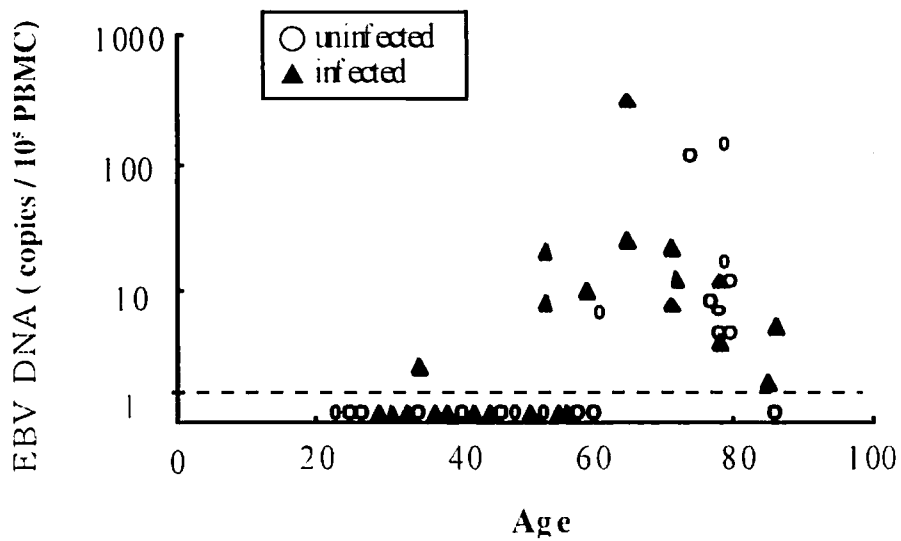


図11 HTLV-I感染者と非感染者におけるEBV DNA量の加齢による変化および差

EBV DNAは70歳未満では非感染者では11人中1人（9%）しか検出されなかったのに対し、HTLV-I感染者では16人中6人（38%）に検出された。70歳以上では両群に検出がみられた。

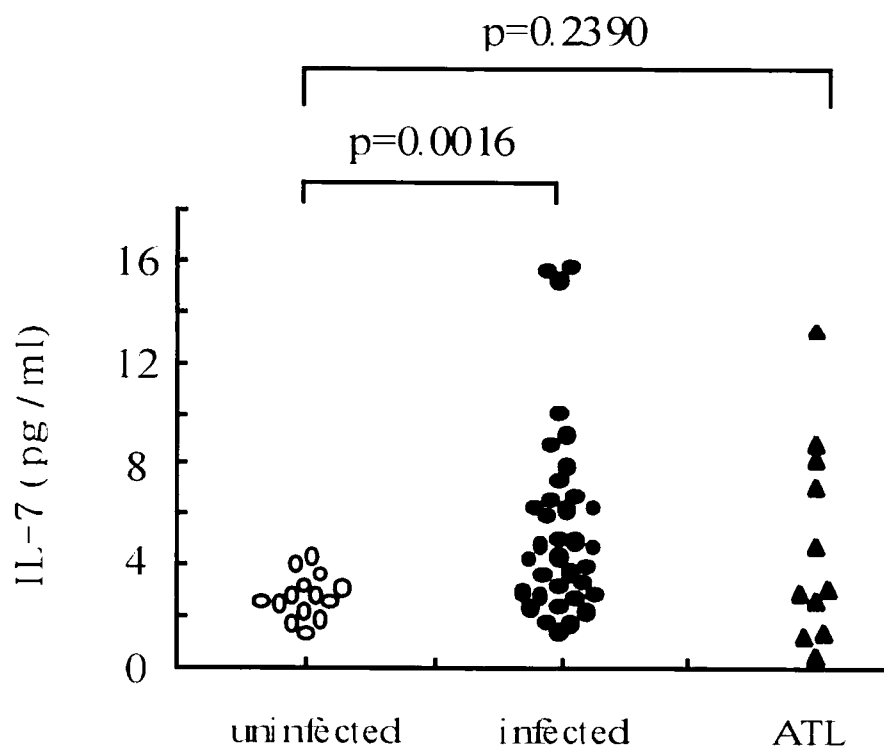


図12 血漿中IL-7濃度

血漿中IL-7濃度は非感染者に比してHTLV-I感染者では有意に高値である。



## 患者数

	急性型	リンパ腫型	慢性型	くすぶり型	計
<b>細菌感染症</b>					
肺炎	35	1	14	4	54
膿皮症	1	1	31	0	5
敗血症	6	0	1	0	7
結核	7	1	3	0	11
その他	6	6	4	0	16
<b>真菌感染症</b>					
皮膚炎	26	5	12	5	48
口内炎	2	0	0	0	2
食道炎	2	0	2	1	5
肺炎	5	1	1	0	7
髄膜炎	1	0	1	2	4
<b>原虫感染症</b>					
糞線虫症	13	2	5	1	21
鞭毛虫症	1	0	0	0	1
カリニ肺炎	8	0	5	3	16
<b>ウイルス感染症</b>					
带状疱疹	7	0	2	0	9
CMV肺炎	3	0	0	0	3
肺臓炎	2	0	1	0	3
尖圭コンジローム	1	0	0	0	1
合併感染症なし	339	139	98	29	605
計	465	156	152	45	818

表 1. ATL診断時の合併感染症

CMV: サイトメガロウイルス  
合併頻度の高い感染症を赤字で示した。

表2 リアルタイムPCR法で使した  
プライマー、TaqManプローブ

---

HTLV-Iプロウイルス

Forward primer	5'-TTATGCAGACCATCCGGCTT-3'
Reverse primer	5'-TATCTAGCTGCTGGTGATGG-3'
TaqMan probe	5'-CGGTGCAGCAGTTTGACCCCACTGC-3'

---

EBV DNA

Forward primer	5'-AGTTTTTCCTTTTGGGCGGC-3'
Reverse primer	5'-GGACGATGGGCAGCAGATC-3'
TaqMan probe	5'-CCAGGAGGCAGGAGAACACGC-3'

---

TREC

Forward primer	5'-TCCCTTTCAACCATGCTGACA-3'
Reverse primer	5'-TGCCTATGCATCACCGTGC-3'
TaqMan probe	5'-CTCTGGTTTTTGTAAAGGTGCCCACTCCTG-3'

---

*RAG-1*

Forward primer	5'-CCCACCTTGGGACTCAGTTCT-3'
Reverse primer	5'-CACCCGGAACAGCTTAAATTC-3'
TaqMan probe	5'-CCCCAGATGAAATTCAGCACCCACATA-3'

---

各TaqManプローブには  
5'側にreporter色素として6-carboxyfluorescein (FAM)  
3'側に 6-carboxy tetramethyl rhodamine (TAMRA)  
を付加している。

subjects*1	provirus load (copies/10 <sup>5</sup> CD4 <sup>+</sup> or CD8 <sup>+</sup> T cells)	the rate of infected cell (%) *2	the rate of memory T cell (%)
C-1	CD4 13846 CD8 2115	13.85 2.12	42.0 62.6
C-2	CD4 716 CD8 ND	0.72 ND	54.0 74.0
C-3	CD4 41 CD8 ND	0.04 ND	78.5 81.2
C-4	CD4 1319 CD8 185	1.32 0.18	46.6 66.3
C-5	CD4 1294 CD8 92	1.29 0.09	70.0 72.0
C-6	CD4 3723 CD8 442	3.72 0.44	42.9 45.2
C-7	CD4 3043 CD8 440	3.04 0.44	31.3 10.1
ATL	CD4 95413	95.4	99.7

\*1 C : carrier

\*2ND : not detected

### 表3 HTLV-I感染者におけるCD4、CD8陽性細胞中プロウイルス量の比較

感染細胞率は1細胞中1コピーのウイルスが感染していると仮定して算出した。キャリアアにおいてはCD8陽性T細胞にもCD4陽性T細胞の10%程度の割合で感染している。キャリアアではその各々の感染細胞率は、メモリーT細胞率に比して低値であるため、メモリーT細胞の多くは非感染細胞であると仮定される。一方、ATL患者での感染細胞率はほとんどすべてが腫瘍細胞であり、それらはメモリー形質を持つことがわかる。

## 11) 参考文献

1. Matsuoka M. Adult T-cell leukemia/lymphoma. In Goedert JJ, editor. Infectious causes of cancer. Totowa : Humana Press. 198. 2000.
2. White. J. D., Zaknoen. S. L., Kasten-Sportes. C., Top. L. E., Navarro-Roman. L., Nelson. D. L., and Waldmann. T. A. Infectious complications and immunodeficiency in patients with human T- cell lymphotropic virus I-associated adult T-cell leukemia/lymphoma. *Cancer*. 75: 1598-607.. 1995.
3. Shimoyama. M. Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T- cell leukaemia-lymphoma. A report from the Lymphoma Study Group (1984- 87), *Br J Haematol*. 79: 428-37.. 1991.
4. Lymphoma Study Group(1984-1987). 共同研究による成人T細胞白血病・リンパ腫(ATL)の臨床研究：予後因子解析. 臨床病型の診断基準, 臨床病態並びに治療成績の実態. *癌の臨床*. 37: 333-349.. 1991.
5. Greenberg. S. J., Jaffe. E. S., Ehrlich. G. D., Korman. N. J., Poiesz, B. J., and Waldmann. T. A. Kaposi's sarcoma in human T-cell leukemia virus type I-associated adult T-cell leukemia, *Blood*. 76: 971-6.. 1990.
6. Tobinai. K., Ohtsu, T., Hayashi, M., Kinoshita. T., Matsuno, Y., Mukai, K., and Shimoyama. M. Epstein-Barr virus (EBV) genome carrying

monoclonal B-cell lymphoma in a patient with adult T-cell leukemia-lymphoma. *Leuk Res.* 15: 837-46. 1991.

7. Shimizu, N., Imamura, A., Daimaru, O., Mihara, H., Kato, Y., Kato, R., Oguri, T., Fukada, M., Yokochi, T., Yoshikawa, K., Komatsu, H., Ueda, R., and Nitta, M. Distribution of JC virus DNA in peripheral blood lymphocytes of hematological disease cases. *Intern Med.* 38: 932-7., 1999.
8. 越智博文,山田猛,原英夫,由村健夫,岩城徹,長嶋和郎,余郷嘉明,小林卓郎  
PETにてmethionine集積を認めた進行性多巣性白質脳症の1例.  
*臨床神経.* 36: 858-63, 1996.
9. Welles, S. L., Tachibana, N., Okayama, A., Shioiri, S., Ishihara, S., Murai, K., and Mueller, N. E. Decreased reactivity to PPD among HTLV-I carriers in relation to virus and hematologic status. *Int J Cancer.* 56: 337-40., 1994.
10. 田口博國,三好勇夫  
ウイルスキャリアーと免疫不全, *臨床と研究.* 70: 1460-4, 1993.
11. 色井淳子,宮下暢夫,中村真一郎,大泉英樹,水野美邦  
著名な免疫不全を呈したHTLV-Iキャリアの1例, *臨床神経.* 40: 135-9.,2000.
12. Fujii, N., Itoh, Y., and Tomoda, H. Disseminated herpes zoster with

multifocal neurologic involvement in an HTLV-1 carrier. *Intern Med.* 32: 854-6.. 1993.

13. Matsuyama, W., Mizoguchi, A., Iwami, F., Koreeda, Y., Wakimoto, J., Kanazawa, H., Mori, S., Kawabata, M., Fukunaga, H., and Osame, M. Clinical investigation of pulmonary Mycobacterium avium complex infection in human T lymphotropic virus type I carriers, *Thorax.* 55: 388-92.. 2000.
14. Matsuyama, W., Kubota, R., Hamasaki, T., Mizoguchi, A., Iwami, F., Wakimoto, J., Kawabata, M., and Osame, M. Enhanced inhibition of lymphocyte activation by Mycobacterium avium complex in human T lymphotropic virus type I carriers, *Thorax.* 56: 394-7.. 2001.
15. Katsuki, T., Katsuki, K., Imai, J., and Hinuma, Y. Immune suppression in healthy carriers of adult T-cell leukemia retrovirus (HTLV-I): impairment of T-cell control of Epstein-Barr virus- infected B-cells. *Jpn J Cancer Res.* 78: 639-42., 1987.
16. Sadahira, Y., Nishihara, H., Shimizu, M., Hirokawa, M., Wada, H., Yamada, O., Yawata, Y., and Manabe, T. Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's disease in HTLV-I seropositive patients: a report of two cases. *Pathol Int.* 48: 67-73.. 1998.
17. Roederer, M., Dubs, J. G., Anderson, M. T., Raju, P. A., and

- Herzenberg, L. A. CD8 naive T cell counts decrease progressively in HIV-infected adults. *J Clin Invest.* 95: 2061-6., 1995.
18. Fagnoni, F. F., Vescovini, R., Passeri, G., Bologna, G., Pedrazzoni, M., Lavagetto, G., Casti, A., Franceschi, C., Passeri, M., and Sansoni, P. Shortage of circulating naive CD8(+) T cells provides new insights on immunodeficiency in aging. *Blood.* 95: 2860-8., 2000.
19. Douek, D. C., McFarland, R. D., Keiser, P. H., Gage, E. A., Massey, J. M., Haynes, B. F., Polis, M. A., Haase, A. T., Feinberg, M. B., Sullivan, J. L., Jamieson, B. D., Zack, J. A., Picker, L. J., and Koup, R. A. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature.* 396: 690-5., 1998.
20. Richardson, J. H., Edwards, A. J., Cruickshank, J. K., Rudge, P., and Dalgleish, A. G. In vivo cellular tropism of human T-cell leukemia virus type 1. *J Virol.* 64: 5682-7., 1990.
21. Etoh, K., Yamaguchi, K., Tokudome, S., Watanabe, T., Okayama, A., Stuver, S., Mueller, N., Takatsuki, K., and Matsuoka, M. Rapid quantification of HTLV-I provirus load: detection of monoclonal proliferation of HTLV-I-infected cells among blood donors. *Int J Cancer.* 81: 859-64., 1999.
22. Weiss, R. A. Viruses, cancer and AIDS, *FEMS Immunol Med Microbiol.*

26: 227-32.. 1999.

23. Okano, M. and Gross, T. G. A review of Epstein-Barr virus infection in patients with immunodeficiency disorders. *Am J Med Sci.* 319: 392-6.. 2000.
24. Akashi, K., Kondo, M., and Weissman, I. L. Role of interleukin-7 in T-cell development from hematopoietic stem cells, *Immunol Rev.* 165: 13-28.. 1998.
25. Simpson, R. M., Zhao, T. M., Hubbard, B. S., Sawasdikosol, S., and Kindt, T. J. Experimental acute adult T cell leukemia-lymphoma is associated with thymic atrophy in human T cell leukemia virus type I infection. *Lab Invest.* 74: 696-710., 1996.
26. Furuta, Y., Aizawa, S., Suda, Y., Ikawa, Y., Kishimoto, H., Asano, Y., Tada, T., Hikikoshi, A., Yoshida, M., and Seiki, M. Thymic atrophy characteristic in transgenic mice that harbor pX genes of human T-cell leukemia virus type I. *J Virol.* 63: 3185-9.. 1989.
27. Sempowski, G. D., Hale, L. P., Sundy, J. S., Massey, J. M., Koup, R. A., Douek, D. C., Patel, D. D., and Haynes, B. F. Leukemia inhibitory factor, oncostatin M, IL-6, and stem cell factor mRNA expression in human thymus increases with age and is associated with thymic atrophy, *J Immunol.* 164: 2180-7.. 2000.



28. Nishimoto, N., Yoshizaki, K., Eiraku, N., Machigashira, K., Tagoh, H., Ogata, A., Kuritani, T., Osame, M., and Kishimoto, T. Elevated levels of interleukin-6 in serum and cerebrospinal fluid of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Neurol Sci.* 97: 183-93., 1990.
29. Etoh, K., Tamiya, S., Yamaguchi, K., Okayama, A., Tsubouchi, H., Ideta, T., Mueller, N., Takatsuki, K., and Matsuoka, M. Persistent clonal proliferation of human T-lymphotropic virus type I- infected cells in vivo, *Cancer Res.* 57: 4862-7., 1997.
30. Cavrois, M., Leclercq, I., Gout, O., Gessain, A., Wain-Hobson, S., and Wattel, E. 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.* 17: 77-82., 1998.
31. Tokunaga M. I. S., Uemura Y, Tokudome T, Osato T, Sato E Epstein-Barr virus in adult T-cell leukemia/lymphoma, *Am J Pathol.* 143: 1263-8, 1993.
32. Yamada, Y., Sugawara, K., Hata, T., Tsuruta, K., Moriuchi, R., Maeda, T., Atogami, S., Murata, K., Fujimoto, K., Kohno, T., Tsukasaki, K., Tomonaga, M., Hirakata, Y., and Kamihira, S. Interleukin-15 (IL-15) can replace the IL-2 signal in IL-2-dependent adult T-cell leukemia (ATL)

cell lines: expression of IL-15 receptor alpha on ATL cells, *Blood*. *91*:  
4265-72.. 1998.

33. Baba, H., Yamada, Y., Mori, N., Hayashibara, T., Harasawa, H., Tsuruda, K., Sugahara, K., Soda, H., Takasaki, Y., Tawara, M., Hirakata, Y., Tomonaga, M., and Kamihira, S. Multiple gammac-receptor expression in adult T-cell leukemia. *Eur J Haematol*. *68*: 362-9.. 2002.