

論文要旨

Clinical symptoms and the odds of human T cell lymphotropic virus type-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) in healthy virus carriers: application of best-fit logistic regression equation based on host genotype, age, and provirus load.

〔健康 HTLV-1 保因者における HAM 発症オッズの検討
・ 宿主遺伝子多型、年齢、プロウイルス量に基づく
ロジスティック回帰式の有用性 〕

能勢 裕久

【序論および目的】

HAM は中年女性に多く発症する緩徐進行性の痙性脊髄麻痺であるが、HTLV-I 感染者のごく一部に発症し、大部分の感染者は生涯にわたって無症候性キャリアー (HC) として経過する。我々はこれまでに HAM 発症に関連する複数の HLA、非 HLA 宿主遺伝子多型と HTLV-I ウイルスサブタイプの変量解析から、HAM 発症リスクを計算する式を示し報告した (Journal of Infectious Diseases 2002; 186:932)。この式の有用性の検討のため、以下の検討を行った。

【対象および研究方法】

1999 年 2 月から 2004 年 11 月までに鹿児島大学病院 HTLV-I キャリアー外来に来院し、協力の得られた 181 名を対象とした。末梢血単核球からゲノム DNA を抽出し、HTLV-I プロウイルス量を定量的 PCR 法により測定する一方で、TNF- α -863A/C、SDF-1-801A/G、HLA-A*02、HLA-Cw*08 の各遺伝子多型および HTLV-I Tax サブタイプを決定した。得られたデータを前出論文掲載の計算式に適用して Odds of HAM を算出、臨床症状と比較した。検討項目は、性別、輸血歴、血液疾患及び HAM の家族歴、下肢腱反射亢進、腹壁反射の消失、痙性(クローヌス及び病的反射)、1 日排尿回数、夜間尿回数、表在リンパ節腫脹、皮膚病変とした。また、臨床検査より、LDH 及び白血球数、その分画であるリンパ球、異型リンパ球、異常リンパ球、CD4+、CD8+、CD4+CD3+、CD8+CD3+、CD16+CD56+CD3-、CD16+CD56+CD3+ に関してはその実数及びパーセンテージについて、Mann-Whitney's U test を用い、統計学的解析を行なった。

(倫理面への配慮)

臨床検体を扱うため、患者よりの採血に関しては、十分なインフォームド・コンセントのもと、書面による研究協力承諾書を頂いた。本研究は鹿児島大学倫理委員会の承諾を得て行った。

【結 果】

対象患者の年齢は、46.5±12.8歳。男性95名、女性86名の計181名。抗HTLV-I抗体価(中央値):1024倍。HTLV-Iプロウイルス量(中央値):82Copy/10⁴PBMC。(Table1参照)

各検査の結果は、Table2に示すとおりで、既に報告済みのデータと比べ、大きな差を認めなかった。Table3に示す計算式を用いて、Odds of HAMを計算した。本対象患者のOdds of HAM(中央値)は、0.359であった。Odds of HAMの有用性とカットオフ値を決めるべく、Receiver Operating Characteristic curve(ROC曲線)を描いた。ROC曲線の下面積(Area under the curve of the ROC)を用い、その正確度(accuracy)を検討した結果、Fig.1に示す如く、HTLV-I抗体価(点線;0.86)、HTLV-Iプロウイルス量(破線;0.88)、Odds of HAM(実線;0.95)となり、Odds of HAMの有用性は明らかであった ($p < 0.001$)。

感度を出来るだけ上げ、疑陽性率を出来るだけ下げるポイントを求め、Odds of HAM 0.78をもってカットオフとした。この時、感度92.1%、特異度85.6%となった。

Odds of HAMが0.78以上の群において、下肢深部腱反射が亢進していた (OR: 2.18, 95%CI; 1.11-4.31, $p=0.036$)。臨床検査においては、Odds of HAMが0.78以上の群に、異常リンパ球数($p=0.011$)と異常リンパ球の割合($p=0.010$)の多いことが分った。

【結論及び考察】

下肢腱反射亢進、腹壁反射の消失、痙性は、脊髄病変を反映すると考えられる。特に下肢腱反射亢進は、ごく早期の症状として、注目すべき臨床病態であると考えられた。我々が日常臨床の中で抱いていたHAMの初期臨床像とOdds of HAMの高い群とが概ね一致することが分った。

異常リンパ球の増加は、成人T細胞白血病(ATL)の経過観察の際にも注目されるが、HC及びHAMにおいても、注目すべきである。Hisadaらの報告によれば、HCにおいて、異常リンパ球の割合とHTLV-Iプロウイルス量は、相関するという。また、Odds of HAMも、HTLV-Iプロウイルス量の影響を受けており、多くの抗原暴露の結果として、クローナルな増殖が起こり、異常リンパ球が出現する。Odds of HAMの高い群に異常リンパ球が多いことは、理解しやすく、また、臨床検査において、より良いマーカーとなりうる。

論 文 審 査 の 要 旨

報告番号	医研第 624 号	氏名	能勢 裕久
審査委員	主 査	有馬 直道	
	副 査	熊本 一朗	馬場 昌範

Clinical symptoms and the odds of human T cell lymphotropic virus type-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) in healthy virus carriers: application of best-fit logistic regression equation based on host genotype, age, and provirus load.

(健康 HTLV-1 保因者における HAM 発症オッズの検討

-宿主遺伝子多型,年齢,プロウイルス量に基づくロジスティック回帰式の有用性-

Journal of Neurovirology Vol.12, No. 8 or 10 2006 年掲載予定

HAM は中年女性に多く発症する緩徐進行性の痙性脊髄麻痺であるが、HTLV-I 感染者のごく一部に発症し、大部分の感染者は生涯にわたって無症候性キャリア (HC) として経過する。我々はこれまでに HAM 発症に関連する複数の HLA、非 HLA 宿主遺伝子多型と HTLV-I サブタイプの変異解析から、HAM 発症リスクを計算する式を示し報告した (Journal of Infectious Diseases 2002; 186:932)。本研究では、HC における早期 HAM の病態把握とこの式の臨床的有用性の検討を行った。

1999 年 2 月から 2004 年 11 月までに鹿児島大学病院 HTLV-I キャリア外来に来院し、協力の得られた 181 名を対象とした。末梢血単核球からゲノム DNA を抽出し、HTLV-I プロウイルス量を定量的 PCR 法により測定する一方で、TNF- α -863A/C、SDF-1-801A/G、HLA-A*02、HLA-Cw*08 の各遺伝子多型および HTLV-I Tax サブタイプを決定した。得られたデータを前出論文掲載の計算式に適用して Odds of HAM を算出した。また、Odds of HAM の有用性とカットオフ値を決めるべく、Receiver Operating Characteristic curve (ROC 曲線) を描いた。ROC 曲線の下面積 (Area under the curve of the ROC) を用い、その正確度 (accuracy) を検討した。算出した Odds of HAM と臨床症状を比較し、検討した項目は、性別、輸血歴、血液疾患及び HAM の家族歴、下肢腱反射亢進、腹壁反射の消失、痙性 (クローヌス及び病的反射)、1 日排尿回数、夜間尿回数、表在リンパ節腫脹、皮膚病変とした。また、臨床検査より、LDH 及び白血球数、その分画であるリンパ球、異型リンパ球、異常リンパ球、CD4+、CD8+、CD4+CD3+、CD8+CD3+、CD16+CD56+CD3-、CD16+CD56+CD3+ に関してはその実数及びパーセンテージについて、Mann-Whitney's U test を用い、統計学的解析を行なった。

本研究で得られた知見は以下の通りである。

- ① 本計算式を用いて、Odds of HAM を計算すると、対象患者の Odds of HAM (中央値) は、0.359 であった。
- ② ROC 曲線の下面積 (Area under the curve of the ROC) を用い、その正確度を検討した結果、HTLV-I 抗体価 (0.86)、HTLV-I プロウイルス量 (0.88)、Odds of HAM (0.95) となり、Odds of HAM の有用性は明らかであった ($p < 0.001$)。
- ③ 感度を出来るだけ上げ、疑陽性率を出来るだけ下げるポイントを求め、Odds of HAM 0.78 をもってカットオフとした。この時、感度 92.1%、特異度 85.6% となった。
- ④ Odds of HAM が 0.78 以上の群において、身体所見では、下肢深部腱反射が有意に亢進していた (OR: 2.18, 95% C.I.; 1.11-4.31, $p = 0.036$)。臨床検査においては、Odds of HAM が 0.78 以上の群に、異常リンパ球数 ($p = 0.011$) と異常リンパ球の割合 ($p = 0.010$) が多かった。

以上の結果から、本計算式で表される Odds of HAM は、下肢深部腱反射の亢進及び異常リンパ球の増加などの身体所見及び検査所見と相関し、ごく早期の注目すべき臨床病態と考えられた。以上より、本研究の成果は、健康 HTLV-1 保因者の外来経過観察において早期 HAM の病態をとらえ、判定する基準のひとつとなり、その管理に大きく貢献できるものと考えられる。よって、本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	医研第 624 号	氏名	能勢 裕久
審査委員	主 査	有馬 直道	
	副 査	熊本 一朗	馬場 昌範

主査および副査の3名は、平成18年6月15日、学位請求者 能勢 裕久 君に対して、論文の内容について質疑応答を行うと共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) Odds 計算式を設定したときに使われたパラメーターは、本学の第三内科で発見された HAM 発症の危険因子をすべて盛り込んだ上でそれ以外に何かを加えて作られたものでしょうか？

(回答) Alison M.Vine の 2002 年に発表した JID 論文は、我々の提唱した危険因子だけでなく、①HLA の Class I および Class II、②HTLV-1 関連網膜炎と関連があると言われている TNF- α などを含むサイトカインやその受容体、③ICAM-1 などの細胞接着因子、④ケモカインや抗原呈示の過程に関わる、その他の免疫応答に関連した因子、⑤MMP などリンパ球の組織侵入に関わる因子、⑥NF κ B などの Tax が誘導する T 細胞活性化に関わる因子など、広く多くの因子を調べており、それを多変量解析した上で、因子を抽出し、それに係数をかけることで、因子の重みづけをしています。

質問2) これからまだまだ、さらに研究が進んでいって、色々な因子が発症リスクに絡んでくると分つてくると、それを多変量解析に入れて、さらに Odds 式が改良されて、特異性がさらにあがっていくと言うことでしょうか？

(回答) 確かにその通りです。今後、他の危険因子が判明していけば、ある時点で、計算式を見直すべきかと思えます。ただし、現在、当科で経験した HAM 症例が、300~400 症例、キャリア外来で 200 名前後ですので、今後、新しい因子を検討していくにあたり、既知の危険因子よりも強い因子を同定し、多変量解析に耐えられるだけ症例の数を集めるのは、困難が予想されます。

質問3) HIV の場合と違い、HTLV-1 には、健康なキャリア状態というものがあり、どの患者にいつ抗ウイルス療法などの治療を開始するかが大事になるかと思えます。現状、無症候性キャリアの治療を開始しないといけないポイントはどのあたりにあるとお考えでしょうか？

(回答) 大変難しい判断になるかと思えます。HAM の家族歴を持った無症候性キャリア患者は、自分も発症するのではないかと怯えているのが現状です。我々の研究の中で、論文には掲載していませんが、Odds が 3 (特異度 96%、感度 75.9%) を境界にしたサブ解析では、高 Odds 群 (Odds 3 以上) で、腹壁反射の消失に有意差が出ております。下肢深部腱反射の亢進、腹壁反射の消失、HTLV-1 プロウイルス量が HAM の中央値 (約 500 copy/10⁴ PBMC) を超えるような症例、末梢血中の異常リンパ球が上昇するなどの危険因子 4 つのうち、3 個以上持つような方は、何らかの治療的アプローチを行なう対象になるかと思えます。

質問4) 多重ロジスティックの式を作ったときの症例と ROC Curve を描く際に使用された症例は重複していますか？

(回答) 症例の多くが、重複しております。

質問5) Alison M.Vine らの JID 論文(2002 年)では、なぜ多重ロジスティック回帰分析を用いたのですか？ステップ・ワイズ法も利用してありますか？

(回答) 危険因子が複数あり、結果を何らかの形で予測したい場合には多変量解析が広く行われますが、結果が数値の連続変数では重回帰分析が、結果が疾患のありなし、治療の有効無効などの二分数になる場合には、多重ロジスティック解析か比例ハザード分析が行われるのが一般的です。この論文の解析では疾患群 HAM と非疾患群 HTLV-1 キャリアの 2 群の検討を行っているわけで、比例ハザード分析のような治療介入そしてその後に出る打ち切り例などが存在しないので、多重ロジスティック回帰分析を行っています。また危険因子はこの式に取り上げたもの以外にもいくつかあったのですが、変数となる危険因子が多すぎますとこの式も使いにくくなります。その点も考慮して、ご指摘のようなステップワイズ法による変数となる危険因子の選択も行い、最終的にこれらの変数となっています。

質問6) ROC Curve を用いた解析で、Odds と HTLV-1 プロウイルス量 (Proviral load, 以下 PVL と略す) の間、Odds と HTLV-1 抗体価の間には、有意差があったようですが、PVL と HTLV-1 抗体価の間には、有意差があったのでしょうか？

(回答) Odds と PVL の間、Odds と HTLV-1 抗体価の間に関しましては、 $P=0.001$ 未満で、有意差があります。PVL と HTLV-1 抗体価の間に関しましては、 $P=0.305$ で有意水準にありません。よって、PVL と HTLV-1

抗体価の間には、有意差はありません。

質問 7) Odds のカットオフを変えて、検討を行ないましたでしょうか？

(回答) Odds が 1 及び 2 及び 3 の場合を分けて検討したことがあります。疑陽性率が 5%以下になるポイントが、Odds 3(特異度 96%, 感度 75.9%)でしたので、そこでサブ解析を行ないました。Odds 3 を境界にすると、下肢深部腱反射の消失に加え、腹壁反射の消失に有意差($P=0.042$)が出ました。脊髄(下部胸髄 Th6~上部腰髄 L1)の表在反射として知られる腹壁反射は、HAM において消失することが知られています。Odds がより高く、より HAM に近いと予想される集団に新たに有意差が出たことは、非常に興味深いデータです。キャリアの中に腹壁反射が消失する症例があり、高 Odds 群(Odds3 以上)に有意差が出たことは、日頃我々が日常臨床の中で感じていたことが、統計学的な数値として現れたのだなというのが率直な感想です。論文発表するにあたり、Odds のカットオフをどこに持ってくるべきかの妥当性を検討すべく、ROC Curve 解析を行ない、感度が高く、疑陽性率も低い Odds 0.78 という数字が浮かび上がりました。

質問 8) 関節リウマチの概念の中に、early RA という考えがありますが、腱反射の亢進を呈する方は、early HAM として、今後認識しても良いとお考えでしょうか？

(回答) HTLV-1 キャリアと言われる状態と HAM の病態の間に明確な線引きは難しく、グレーゾーンが存在するかと考えられます。キャリア外来の症例ではありませんが、歩行障害で来院され、当初は病的反射なく、腱反射が亢進していた方が、精査したところ、HTLV-1 抗体陽性で、半年後に病的反射が両側に陽性となり、HAM となった方がいらっしゃいます。

元気に普通に外来に歩いて来院する患者さんに下肢深部腱反射陽性のみで、早期 HAM というのは、言い過ぎかと思いますが、異常リンパ球の上昇や腹壁反射の消失や便秘などの膀胱直腸障害などの早期の症状をとらえることができるなら、より慎重な外来経過観察が必要になると思われれます。実験室からのアプローチとして、計算式の数値として出せる Odds と神経所見や一般的な検査所見の中に、ともに重なる有用なデータがあるということが、今回の研究で強調したい大事な点です。

質問 9) 抗 HTLV-1 抗体価は、PVL と相関するとおっしゃいましたが、Alison M.Vine らの JID 論文(2002 年)では、検討されていますでしょうか？

(回答) 我々は、抗 HTLV-1 抗体価を PA 法で測定しております。抗 HTLV-1 抗体価に関しましては、本文中には、出てまいりません。もし、検討したとしても、抗 HTLV-1 抗体価は、PVL とは、よく相関しますので、多変量解析しますと、抗 HTLV-1 抗体価は、PVL によって相殺され、計算式に残るような因子とはならないことが予想されます。

質問 10) abnormal lymphocyte と atypical lymphocyte に関して、どのように定義されていますか？

(回答) 耳朶採血をしまして、Sacher らの論文(Br. J. Hematol. 1999;105:758)に定義されていますアズール顆粒の有無、核の切れ込み、細胞の大きさ、核/細胞質 (N/C) 比などを形態学的に検討しまして、決定しております。

質問 11)。一般的に HTLV-1 感染者の免疫状態は、Th1 に傾いているのでしょうか？Th2 に傾いているのでしょうか？どちらの傾向が強く反映するために、HAM を発症するのでしょうか？逆に言えば、細胞性免疫を非常に高めることで、その裏腹として、液性免疫が落ちてきますよね。キャリアの患者さんに抗 Tax か何かのワクチンなどやって、CTL を増強すれば、かえって病気を悪くするのではないか。そこで、細胞性免疫を誘導するワクチンを打つとどうなるか、先生のお考えを教えてください。

(回答) HAM は、多発性硬化症と並び、 $IFN\gamma/IL4$ 比が高く、一般に Th1 病と言われています。キャリアに関しては、どのような免疫状態にあるかを示すだけの傍証やデータを持っていないので、明言は避けます。CTL に関しては、数が増えていることと、機能がうまく働いていることに関しては別物と考えています。CTL が増えていたとしても、持続的な感染に対する免疫応答により疲弊し、機能的には落ちているといった状態が存在するのではないかと考えています。CTL の機能不全とでも申します状態になっている為に病気をコントロールすることが出来ずに、免疫が暴走した状態になっている。よって、CTL を再教育(良い方向に誘導)するような効果が、ワクチン治療で可能であれば、それは、有効な手段となりうるかと思えます。

質問 12) 論文の最初に戻りますが、HTLV-1 は、ブドウ膜炎やその他の合併症を起こすのですが、そのような患者さんには、この計算式は応用できませんでしょうか？

(回答) キャリア外来の患者さんの中にすでに、190 例の中に合併症として 2 例ブドウ膜炎の方がいらっしゃいました。急性型はいらっしゃいませんでしたが、慢性型やくすり型の ATL の患者様は 9 名いらっしゃり、特に PVL が高いので、今回は除外しております。この計算式自体は HAM に関して作成されたものですので、HAM にのみ適応するべきですが、HTLV-1 が増殖しやすい好環境ともいえるので、HTLV-1 に伴う他の合併症の場合にどうかという検討は行なってもよいと思っています。

以上の結果から、3名の審査委員は本人が大学博士課程修了者としての学力・識見を十分に具備しているものと判断し、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認めた。