

ATL診断の最新手順

Current diagnostic procedure of ATL

うち まる かおる
 内 丸 薫
 Kaoru UCHIMARU

はじめに

成人T細胞白血病リンパ腫 (Adult T-cell Leukemia/Lymphoma: ATL) は、ヒトT細胞白血病ウイルス1型 (HTLV-1) 感染細胞の腫瘍化によって発症する末梢性T細胞腫瘍である。ATLは、わが国では年間1,100名程度が発症する希少がんに相当するが、最も難治な血液腫瘍の1つであり、悪性度の高い aggressive type である急性型、リンパ腫型の生存期間中央値は1年に満たない¹⁾。HTLV-1感染者自体は、わが国では100万人程度は存在すると考えられる²⁾が、そのほとんどが生涯にわたり無症候性キャリアのままであり、ATLを発症するのはキャリアのうちの5%程度である。本稿では、まずATLを発

症した患者の診断手順について概説したのち、その診断に必須であるHTLV-1感染の診断について、HTLV-1キャリアまで視点をひろげて概説する。

I. ATLの診断

ATLは下山分類により4つの病型、すなわちくすぶり型、慢性型、リンパ腫型、急性型に分類される(表1)³⁾。さらにくすぶり型、および予後不良因子(LDH > 正常上限、BUN > 正常上限、ALB < 正常下限のいずれか最低1つ)を持たない慢性型は indolent type、予後不良因子を持つ慢性型と後2者は aggressive type に分類され、日本血液学会の造血器腫瘍診療ガイドラインでは indolent type は原則として無治療経過観察、aggressive type は多剤併

表1 ATLの下山分類

	急性型	リンパ腫型	慢性型	くすぶり型
抗HTLV-1抗体	+	+	+	+
リンパ球数 (X10E9/L)		<4	≥4 (a)	<4
異常リンパ球	+	≤1%	+	≥5% (b)
花細胞	+	-	時々	時々
LDH			≤2N (d)	≤1.5N
補正カルシウム (mEq/L)			<5.5	<5.5
組織診のあるリンパ節腫大		yes		no
腫瘍病変				
肝腫大				no
脾腫大				no
中枢神経			no	no
骨			no	no
腹水			no	no
胸水			no	no
消化管			no	no
皮膚				(b)
肺				(b)

- (a) Tリンパ球数は3,500以上
- (b) 異常Tリンパ球が5%未満の場合、皮膚や肺に腫瘍性病変があることが組織診で証明されていること
- (c) 異常Tリンパ球が5%未満の場合は組織診で証明された腫瘍性病変が必要
- (d) Nは正常上限値

(文献3)を基に著者作成)

用化学療法とともに、適応がある症例には造血細胞移植を検討することが推奨されている。このうち典型的な ATL である急性型の主な症状を表 2 に示す。

ATL の診断ステップは 3 つのステップに分けて考えることができる。すなわち (1) リンパ性の腫瘍の存在が疑われ T 細胞性であること (2) HTLV-1 に感染していること (3) 腫瘍細胞が HTLV-1 感染細胞であることの 3 つである。以下、このステップを踏んで診断過程を概説する。

1) リンパ性の腫瘍が存在し T 細胞性であること

T 細胞性の腫瘍の存在は、様々な形で疑われて診断される。末梢血においては異常リンパ球が存在すること (リンパ腫型を除く) がきっかけの一つとなる。ATL の腫瘍細胞は、典型的には flower cell と呼ばれる核に複雑な切れ込みの入った特徴的な形態を示すが、indolent type の場合はそこまで派手な形

態異常を示す細胞は少なく、核に軽い切れ込みが入る程度の形態異常のものが多い (図 1) ことから、時に形態診断が困難なことがある。慢性型のように末梢血中の腫瘍細胞が多い場合は、リンパ球増多で異常に気付き、フローサイトメトリーでこれらが T 細胞であると判断されるという場合もある。リンパ節腫脹を認める患者では、生検によりリンパ腫と診断され、免疫組織化学染色により T 細胞性であることを証明する。皮膚病変がみられる症例の場合は、皮膚生検でやはり T 細胞性リンパ腫であると診断されることが、診断の第一歩となることがある。

2) HTLV-1 に感染していること

HTLV-1 感染の診断は、通常 HTLV-1 抗体が陽性であることにより診断されるが、これについては後述する。

3) 腫瘍細胞が HTLV-1 感染細胞であること

HTLV-1 キャリアのうち ATL を発症するのは約 5% 程度であり、HTLV-1 キャリアが別の T 細胞性腫瘍を発症する可能性もある。そのため、腫瘍細胞が HTLV-1 感染細胞の腫瘍化したものであることを確認する必要がある。HTLV-1 は RNA 遺伝子を逆転写してホストゲノムに組み込むが、組み込み部位は基本的にランダムで、感染細胞ごとにホストゲノムのさまざまな部位に組み込まれている。このうち特定の感染細胞が、モノクローナルに増殖して腫瘍

表 2 急性型 ATL の臨床症状

ATL の臨床症状 (急性型)	
1)	リンパ節腫脹 (60%)
2)	皮疹 (39%)
3)	肝脾腫 (20%台)
4)	高カルシウム血症に伴う意識障害
5)	急性型、リンパ腫型ではしばしば発熱を伴う
6)	血液中に特徴的な花細胞 (flower cell) と呼ばれる腫瘍細胞が出現
7)	臓器浸潤 消化管、CNS、骨 etc.
8)	日和見感染症 CMV、Pneumocystis jirovecii、真菌

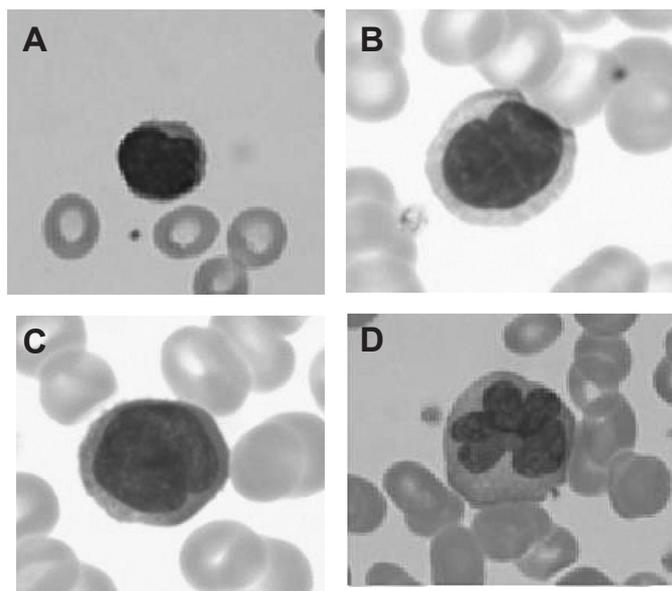


図 1 HTLV-1 感染細胞の形態

(A) キャリア (B) くすぶり型 (C) 慢性型 (D) 急性型の症例で末梢血に見られた異常リンパ球 (東大医科研病院)

化したものがATLであるので、ATL患者ではホストゲノムの特定の部位に組み込まれた細胞が、モノクローナルに増殖していることを証明することでHTLV-1感染細胞の腫瘍化であることを証明する。このためにはサザンブロット法が用いられる。末梢血中に一定程度以上腫瘍細胞が見られるときには、末梢血を用いてサザンブロット法を行い、そこでモノクローナルな増殖を認めた場合にはATLと診断することが多いが、サザンブロット法は比較的感度が低く、検体中に5%程度以上感染細胞がないとモノクローナルな増殖を検出できない。そのため、末梢血中の腫瘍細胞が少ない症例ではリンパ節や皮膚病変検体を用いてサザンブロット法を行うこともある。臨床的に用いられることは通常ないが、inverse PCR⁴⁾によりモノクローナルに増殖している感染細胞をより敏感に検出することができる。最近、サンガーシーケンス法を用いた比較的簡便なモノクローナルな増殖を検出する方法も開発され、臨床応用が期待される。⁵⁾ さらに今後の方向性として、次世代シーケンサーを用いたターゲットシーケンスによるゲノム解析が血液腫瘍の臨床に導入される時代が来ると期待されるが、HTLV-1プロウイルス遺伝子を組み込んだカスタムシーケンスパネルを作成することにより、HTLV-1感染細胞のクローナリティを解析することが可能であり⁶⁾、シーケンス技術の進歩により低価格化した場合には実臨床に応用される可能性がある。

ATLの診断が確定すると、次は病型分類を行う必要がある。下山分類に当てはめて分類を行うためのフローチャートなども提唱されている⁷⁾が、筆者は次のような流れに従って分類を進めている。まずLDHの値に注目し、正常値上限の2倍を超えている場合はaggressive ATLとなり、リンパ節腫脹があって、生検で上記によってATLと診断されていて、末梢血中の異常リンパ球数が1%以下と末梢血にほとんど出現していない場合はリンパ腫型となり、それ以外は急性型となる。LDHが正常値上限の2倍以下の場合は通常indolent ATLとなり、末梢血中の異常リンパ球、(形態的に)正常リンパ球を合わせたリンパ球の絶対数が $4,000/\text{mm}^3$ を超える場合は慢性型となり、さらにLDH、BUN、ALBの異常の有無により、予後不良型と予後良好型に分類することになる。それ以外はくすぶり型を考えることにな

り、末梢血中の異常リンパ球が5%以上あり、LDHの値が正常上限の1.5倍を超えず、皮膚、肺以外にリンパ節腫脹などの病変がなければくすぶり型の診断となる。皮膚病変、あるいは肺病変のみが存在して末梢血中に異常リンパ球が5%以下しか認められない特殊なくすぶり型も存在する。くすぶり型の診断を考えるうえで留意すべき点の一つは、異常リンパ球が5%以上ということで、裏返して言えば5%以下の異常リンパ球のみが異常所見という場合は無症候性キャリアと診断されるということである。実際、無症候性キャリアと診断されるケースの大半のケースで5%以下の少数の異常リンパ球が認められる。末梢血中に異常リンパ球が存在すること=ATL発症ではないことに留意すべきである。一方、異常リンパ球数が5%前後で推移して、くすぶり型の基準を満たしたり満たさなかったりを行ったり来たりする症例がある。特に、異常リンパ球数が形態診断という、ある意味バイアスが入りうるものに依拠することを考慮すると、くすぶり型の概念について改めて検討をする余地がある。この点については後述する。もう一つ病型診断で注意すべき点は、急性型が除外診断、すなわちATLのうち他の3病型の基準を満たさないものと定義されている点である。通常この診断基準で急性型と診断される症例はいわゆる典型的な急性型症例がほとんどであるが、一部、慢性型に近い症例でリンパ節腫脹などを認めるものの、リンパ球の絶対数が4,000に届かず慢性型と診断できないため急性型という診断になってしまう症例や、慢性型に近くくすぶり型で、LDHの値が正常上限の1.5倍を超えていてもリンパ球の絶対数が4,000に届かない症例もやはり急性型と診断されてしまうことになる。ATLの病勢はLDHの値や可溶性IL-2受容体(sIL-2R)などが非常に良いマーカーとなるので、このような症例ではこれらも参考にして病態を検討し、治療適応について考える必要がある。

II. HTLV-1 感染検査

ATLの診断にはHTLV-1感染の診断が必須である。HTLV-1感染の診断は主に抗体検査により行われる。HTLV-1感染診断はキャリアの診断にも必要な検査であり、ここでは無症候性キャリアの場合も含めて概説する。

HTLV-1 抗体検査は大きく分けてスクリーニング検査と確認検査に分けられる。スクリーニング検査に相当する検査には PA 法 (Particle Agglutination)、CLEIA 法 (Chemiluminescent Enzyme Immunoassay)、CLIA 法 (Chemiluminescent Immunoassay)、ECLIA 法 (Electro Chemiluminescent Immunoassay) 法などがある。いずれも偽陽性が一定程度見られるため、スクリーニング法で陽性であった場合には確認検査を行う。確認検査としてはこれまでウェスタンブロット法が用いられてきた。しかし、ウェスタンブロット法は判定保留例が多いのが問題点で、わが国では 10 ~ 20% の症例が判定保留と診断される。ATL の診断においては通常陽性と判断され問題ないが、HTLV-1 キャリアの診断においては、特に妊婦検診において母乳授乳を選択するかどうかの判断根拠となるため、非常に重要な問題となる。日本産科婦人科学会の産科ガイドラインにおいては、確認検査判定保留例ではさらに、HTLV-1 PCR 検査により確認を行うことを推奨度 A としている⁸⁾。Okuma らは、わが国における HTLV-1 感染診断の標準化を目的に各種の抗体検査の性能調査を行った⁹⁾。その結果、特にウェスタンブロット法との比較において、献血、妊婦検診検体においてウェスタンブロット法で判定保留だった 79 検体中ラインイムノブロット法による検討でも、判定保留だった検体はわずかに 10 検体で、ラインイムノブロット法を用いることにより大幅に判定保留例が軽減できることが判明した。Okuma らは、これらの検討結果を元に HTLV-1 感染診断アルゴリズムを提唱し、日本 HTLV-1 学会などでも推奨されている(図 2)¹⁰⁾。現在、臨床検査企業においてもウェスタンブロット法の受注は終了し、ラインイムノブロット (LIA) 法に移行している。ラインイムノブロット法を用いても判定保留の場合は PCR 法により診断の確定が行われる。

Ⅲ. フローサイトメトリーを用いた病態解析

上記の通り ATL の腫瘍細胞の形態は、特に indolent type において異型性が軽度で判断が困難な場合がある。そこで、われわれはより客観的に ATL の異常細胞を検出することを目的にフローサイトメトリーを用いて HTLV-1 感染細胞、ATL 細胞を検出する HAS-Flow 法を開発した¹¹⁾。本法は HTLV-1 感

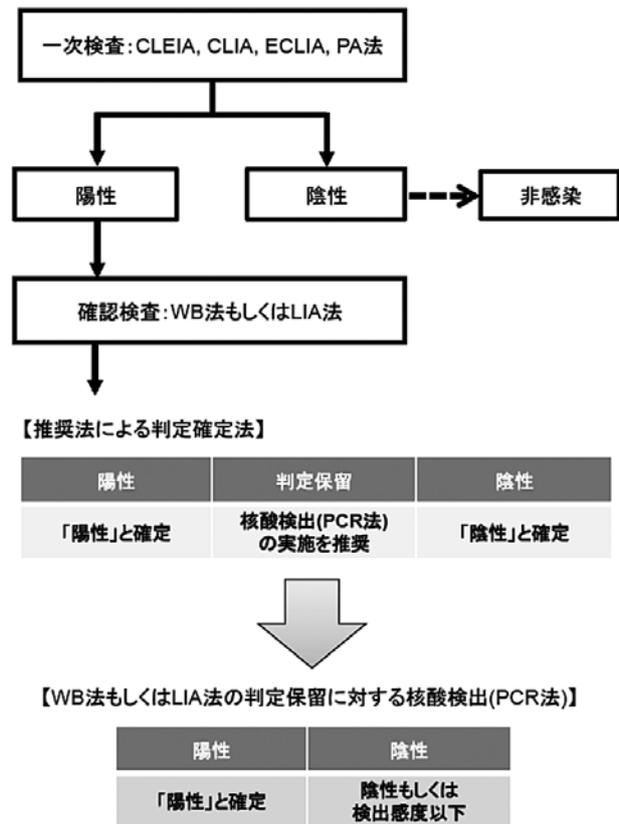
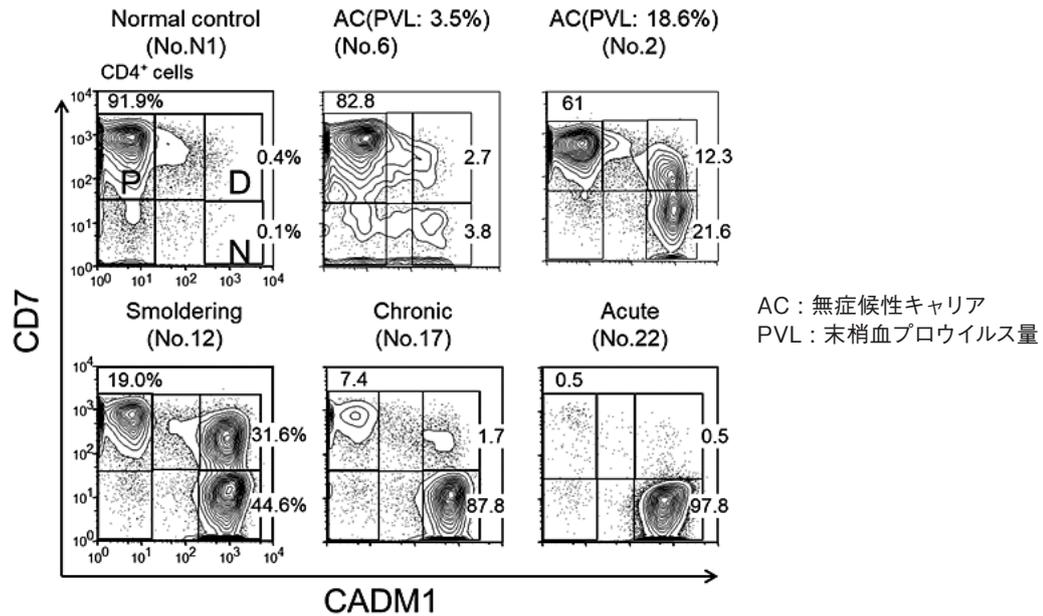


図 2 HTLV-1 感染診断のためのフローチャート
(文献10)より引用)

染細胞のほとんどが肺がんにおけるがん抑制遺伝子 CADM1 を発現し、腫瘍化により汎 T マーカーである CD7 の発現が低下ないし陰性化することを利用して、末梢血単核球の CD4 陽性細胞にゲートをかけて CD4⁺/CD7⁻/CADM1⁺ 細胞集団として ATL 細胞を検出するものである。本法を用いて HTLV-1 キャリアから各病型の ATL にいたる症例を解析すると、HTLV-1 感染により CADM1 が陽性になり、さらに腫瘍化の進展に伴い CD7 の発現が低下した集団が増加していくことがわかる(図 3)¹²⁾。本法は ATL の病型診断に直結するものではないが、HTLV-1 キャリアから ATL 発症への病態の進展を評価するのに有用である。特に CD7dim ~ CD7-/CADM1+ の集団の割合が 25 ~ 50% の症例は異常リンパ球が 5% 前後で推移し、診断基準上は無症候性キャリアとくすぶり型 ATL のボーダーライン上に存在する症例と考えられる。HTLV-1 感染細胞の腫瘍化は典型的な多段階発がんと考えられており、その腫瘍化は連続的な過程と考えられている。このような症例は、無症候性キャリアとくすぶり型 ATL



Kobayashi S et al Clin. Cancer Res. 20:2851-61, 2014

図3 HTLV-1 キャリア～ATL症例の末梢血 HAS-Flow 解析

HTLV-1感染細胞はCADM1陽性となり(図中のD,N)、末梢血プロウイルス量(HTLV-1感染細胞比率)の増加に伴いCD7陰性の集団(図中のN)が増加し、急性型症例ではほとんどの細胞がNの表面形質を示す。

(文献12)より転載)

の間に存在する一群の病態として、新たに定義され直されるべきだろうと考えられる¹³⁾。

おわりに

本稿では、ATLの診断手順について概説するとともに、その重要な診断根拠となるHTLV-1感染の診断について、無症候性キャリアまで視野にいれて解説した。ATLの診断においては病型分類もさることながら、病態について注意深く評価して治療方針を決定することが必要である。また、長らくHTLV-1感染の確認検査として用いられてきたウェスタンブロット法に代わってラインイムノブロット法が用いられるようになり、判定保留例が大幅に減少した。HTLV-1キャリアであることの診断は無症候性キャリアにおいて重要で、特に妊婦における診断は授乳法の選択に極めて重要であることから、本稿で述べたHTLV-1感染診断の手引きに従って適切に診断されることが望まれる。

文献

- 1) Imaizumi Y, Iwanaga M, Nosaka K et al. Prognosis of patients with adult T-cell leukemia/lymphoma in Japan: A nationwide hospital-based study. *Cancer Sci.* 2020; 111: 4567-4580.
- 2) Masahiro Satake, Kazunari Yamaguchi, and Kenji Tadokoro. Current Prevalence of HTLV-1 in Japan as Determined by Screening of Blood Donors. *J. Med. Virol.* 2012; 84: 327-335.
- 3) Shimoyama M, member of the lymphoma study group. Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T-cell leukemia-lymphoma. *Br. J. Haematol.* 1991; 79: 428-437.
- 4) Tian Y, Kobayashi S, Ohno N et al. Leukemic T cells are specifically enriched in a unique CD3dimCD7low subpopulation of CD4+ T cells in acute-type adult T-cell leukemia. *Cancer Sci.* 2011; 102: 569-577.
- 5) Saito M, Hasegawa H, Yamauchi S et al. A high-throughput detection method for the clonality of Human T-cell leukemia virus type-1-infected cells in vivo. *Int. J. Hematol.* 2020; 112: 300-306.
- 6) Makoto Yamagishi, Miyuki Kubokawa, Yuta Kuze, Ayako Suzuki, Akari Yokomizo, Seiichiro Kobayashi, Makoto Nakashima, Junya Makiyama, Masako Iwanaga, Takahiro Fukuda, Toshiki Watanabe, Yutaka Suzuki, Kaoru Uchimaruru. Chronological genome and single-cell transcriptome integration characterizes the evolutionary process of adult T cell leukemia-lymphoma. *Nat. Commun.* in press
- 7) Ishitsuka K and Tamura K. Human T-cell leukaemia virus type I and adult T-cell leukaemia-lymphoma. *Lancet Oncol* 2014; 15: e517-526.

- 8) 日本産科婦人科学会、日本産婦人科医会. 産婦人科診療ガイドライン編2020. 東京：2020. 326-328.
- 9) Okuma K, Kuramitsu M., Niwa T. et al. Establishment of a novel diagnostic test algorithm for human T-cell leukemia virus type 1 infection with line immunoassay replacement of western blotting: a collaborative study for performance evaluation of diagnostic assays in Japan. *Retrovirology* 2020; **17**: 262.
- 10) 国立研究開発法人日本医療研究開発機構、平成29年度日本医療研究開発機構委託研究費(AMED補助金)振興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業「HTLV-1の疫学研究及び総合対策に資する研究」代表浜口功による
- 11) Kobayashi S, Nakano K, Watanabe E et al. CADM1 Expression and Stepwise Downregulation of CD7 Are Closely Associated with Clonal Expansion of HTLV-I-Infected Cells in Adult T-cell Leukemia/Lymphoma. *Clin Cancer Res.* **20**: 2851-2061, 2014.
- 12) Kobayashi S, Nakano K et al. CADM1 Expression and Stepwise Downregulation of CD7 Are Closely associated with Clonal Expansion of HTLV- I -Infected Cells in Adult T-cell Leukemia/Lymphoma. *Clinical Cancer Research.* 2014; **20**(11): 2851-2861.
- 13) Kobayashi S, Watanabe E, Ishigaki T et al. Advanced human T-cell leukemia virus type 1 carriers and early-stage indolent adult T-cell leukemia-lymphoma are indistinguishable based on CADM1 positivity in flow cytometry. *Cancer Sci.* 2015; **106**: 598-603.