日本財団補助金による
２０００年度日中医学学術交流促進事業

⑤．在留中国人研究者研究助成

(3) 日本人（南九州人）、中国人（チベット人）の起源と拡散に関するウイルス学的、人類遺伝学的研究

日本人（南九州人）、中国人（チベット人）の起源と拡散に関する ウイルス学的、人類遺伝学的研究

楼　宏
中国重慶医科大学基礎医学部生物学教研室・講師
鹿児島大学医学部ウイルス学講座

【要旨】
HTLV-Iは日本の南西九州、沖縄、東北、北海道の辺境の人々のほか、アフリカ、中近東、メラネシア、カリブ海ならび南米アンデスの先住民にも感染しATLやHAM/TSP（痙性脊髄麻痺）を発症させている。中国大陸では、チベット族やその他の小数民族のなかにHTLV-I感染のフォーカスがあり同様の疾病が流行している可能性が示唆されている。本研究は、日本人、中国チベット人の血液検体を用いて、HTLV-I感染者のHLA遺伝子型とウイルス遺伝子の塩基配列を決定し、アジアモンゴロイドとともに進化してきたHTLV-Iの起源と拡散の様相をさらに詳細に検索することを目的とした。日本人HTLV-I感染者から採取された末梢血リンパ球からDNAを抽出し、HTLV-I LTR領域をDNAシークエンサーによる塩基配列を決定した。中国チベットラサの東部地域と西部地域から合計272名のチベット族から血液を採取保存した。チベット族のHTLV-I保有者を全く検出できなかったが、HBV抗原の保有率が高く、特に東部地域の某部落では38%の保有率であった。チベット族のHBV保有者の血漿から、DNAを抽出しHBVの遺伝子の亜型を決定した。チベット族のHBVの遺伝子的亜型はタイ、中央アジア、韓国などに広く分布しているC型であった。チベット族のHLA遺伝子型の結果、アジアモンゴロイドに多く見られたA*02, A*24, B*40, B*35, DRB1*0901を保有していた。これらの結果を考察すると、チベット族は中央アジア地域のモンゴロイド集団に属し、日本人やアンデス先住民と共同先祖をもつと考えられた。

KEY WORDS : HTLV-I; HLA; HBV; Japanese; Chinese; Tibet; Phylogenetic Tree;

研究報告

【目的】
HTLV-Iは日本の南西九州、沖縄、東北、北海道の辺境の人々のほか、アフリカ、中近東、メラネシア、カリブ海ならび南米アンデスの先住民にも感染しATLやHAM/TSP（痙性脊髄麻痺）を発症させている。中国大陸では、チベット族やその他の小数民族のなかにHTLV-I感染のフォーカスがあり同様の疾病が流行している可能性が示唆されている。本研究は、日本人、中国チベット人の血液検体を用いて、HTLV-I感染者のHLA遺伝子型とウイルス遺伝子の塩基配列を決定し、アジアモンゴロイドとともに進化してきたHTLV-Iの起源と拡散に関する解析を行うことにより、先史モンゴロイドの起源と移動拡散の軌跡を明らかにする。

【方法】
1. 検体の収集：南九州日本人29名（HTLV-Iキャリア11名 AC001-AC036; ATL患者18名 UTM01710-BMT/ATL011）と中国チベット人272名の同意を得て、minibag用いて、血液検体収集した。採集血液からリンパ球分離し、グアニジン塩酸法により高分子DNAを分離精製した。
2. HTLV-I遺伝子配列の同定：２９名南九州日本人のDNAより、ヒトT細胞白血病ウイルス（HTLV-I）LTR領域のprimerを用いて、DNAシークエンサーによる塩基配列を決定する。（Fig 1.）
3. HLA遺伝子型の同定：10名チベット人のヒト組織適合性抗原(HLA)クラスIアリルタイプはPCR-SSP, PCR-SSO法を用いてHLA遺伝子型を決定した。HLAクラスIIアリルタイプはPCR-SSO法を用いてHLA遺伝子型を決定した。（Table 1.）
4. HBVの感染状況およびHBV遺伝子型の同定：上記チベット検体の血清からHBV(HBsAg, HbsAb,

HbeAg, HbeAb, HbcAb) の検索を行った。HBV保有者の血漿から、DNA を抽出し HBV の遺伝子の亜型を決定した。 (Table 2., Fig 2.)

5. 系統樹の作成：既報の各民族から分離された HTLV-I の遺伝型と比較し、近隣結合法で HTLV-I Subtypes の遺伝系統樹を作成した。 (Fig 3)

【結果】

南九州日本人 HTLV-I キャリアの HTLV-I-LTR 塩基配列は既報の日本人の HTLV-I と高い相同性を持ち、同一系統のウイルスであった。 (Fig 1.) 南九州日本人の HTLV-I-LTR の塩基配列を用いて、既報他の集団の HTLV-I-LTR の塩基配列と比較し、HTLV-I Subtypes の遺伝系統樹を作った。29 名南九州 HTLV-I キャリア中一例除く、全て Japanese subtype であった (Fig 3.) 。

チベット族の HLA-クラス I アリルは A *02 , A *24 , B *40 , B *35 が検出され、DRB1 アリルは *0901, *1401, *1101 , DQB1 アリルは *0301, *0303 が 検出された (Table 1.) 。

チベット検体の HBV の感染は、HBsAg 陽性率 19.1％ (50/262), 過去感染率 29.4％(77/262) であった (Table 2.)。一方、チベット族の HTLV-I 保有者を全く検出できなかった。林芝地区の某部落では 38％の HBV 保有率である、HBV の遺伝子的亜型は全て C 型であった。 (Fig 2.)

【考察】

チベット族に検出された A*02, A*24, B*35, B *40, DRB1 *0901, *1401, DQB1*0301, *0303 は南九州, 沖縄, 北海道アイヌの人々のほか南米アンデス先住民族にも好発する HLA アリルであった。このことから中国のチベット族は南九州・沖縄人, 北海道アイヌおよび南米先住民と共通の祖先をもつ民族である可能性が示唆された。

今回の検体から、チベット人の HBV 感染率高いことが明らかになった。また、地域より大きな差がみられ、遺伝要因および環境要員が関与していることが示唆された。 ヒト B 型肝炎ウイルス (HBV) は、その遺伝子配列の相同性より A~G、6 種類の遺伝子型が分布しておりますが、各々の地域ごとにみると、約 2～3 の遺伝子型で局在がみられます。欧州からユーラシア大陸を東に行くにつれ、A, D 型->B, C 型と分布しており、アメリカ先住民には F 型、西アフリカには E 型が多くみられます。中国には B, C, D 型が存在し、チベットの報告がなかった。今回。我々は初中国チベット族の HBV 陽性者から HBV 遺伝子型を決定し、HBV Genotype C が唯一の遺伝子型と同定された (Fig. 2.) 。チベット族の HBV の遺伝子的亜型はタイ、中央アジア、中国、韓国などに広く分布している C 型であり、チベット族は中央アジア地域のモンゴロイド集団に属し、日本人やアンデス先住民と共同先祖をもつと考えられた。

HTLV-I の感染力は非常に低く、母から子への垂直感染が主で、水平感染は、夫婦間、あるいは輸血などに限られるため、このウイルスの分布は、過去における人種の移動といった人類学的背景と密接に関連することが予想される。現在までに分離されている HTLV-I は、これまでの遺伝子解析から一般に大きく３つのグループに分けられていた。まず第一に、パプアニューギニアやソロモン諸島のメラネシア人からの分離株 (メラネシアグループ) 、次にザイール、ガボンなど中央アフリカからの分離株 (中央アフリカグループ) 、そして最後に日本、カリブ海沿岸地域、西アフリカ等、世界的に広く分布しているもの (コスモポリタングループ) である。さらにコスモポリタングループは四つのサブグループに分類される (Fig 3.) 。そこで、我々は世界各地から分離したウイルスの遺伝子配列を詳細に解析することによって、このウイルスのさらに細かい系統関係を明らかにし、より具体的にこれらウイルスの起源とその人類学的背景との関係について考察を加えた。

解析部位としては LTR 領域を選んだ。その理由は、１) HTLV-I は、非常によく保存されているウイルスであるため、より変異しやすい部位であること、２) 免疫機構などの環境からの正の選択圧による (例えば env など) が少なく、より中立であること、３) これまでにその遺伝子配列が報告されているウイルス数が多いこと、４) 系統解析を行うのに手ごろな長さであることなどである。

日本人の HTLV-I は日本人集団に独特のウイルス (Japanese subgroup) とアフリカ・ユーラシア・南米大陸に広く分布するウイルス (Transcontinental subgroup) がみられる。今回、南九州日本人 HTLV-I キャリアの HTLV-I 塩基配列解析の結果、28／29 例は Japanese subgroup に属く、1／29 例は Transcontinental

subgroup であった（Fig 3.）。

HTLV-I の系統、特に「コスモポリタン型」においては有史以前からの人類の移動の歴史と密接に関連して説明できることである。すなわち、太古の昔、後に古モンゴロイドと呼ばれる系統が、少なくとも二つの集団、Transcontinental Subgroup と Japanese Subgroup に別れてアジア大陸を東へと移動し、おそらくインドの方から日本に別々に到達した。この内、先に到達した一集団 Transcontinental Subgroup が、当時、陸続きであったベーリング海（ベーリング陸橋）を渡って、アメリカ大陸を北米から南米へと南下していった。HTLV-I は、九州・沖縄などの西南日本にかぎらず、北海道の一部地域（アイヌ人）や海岸沿い、特に日本海側の離島、半島に感染率の高い地域がみられた。これらのことから、このウイルスは外から日本に侵入してきたのではなく、原日本人ともいうべき古くから日本にいた人々がもっており、その後、朝鮮半島から渡来した人々の勢力が増すにつれ　地矢南北に押しやられたと推論した。私達も、今回の系統解析から古モンゴロイド集団が日本に HTLV-I を持ち込んだと考えられ、南米先住民族やアンデスミイラの研究結果考慮し、チベット人、日本人と南米アンデス先住民族はアジア系古モンゴロイドの共通先祖に由来することが強く示唆された。

【参考文献】

1. 園田　俊郎、藤吉　利信、屋敷　伸治、李　洪川、楼　宏、カロリーナ・レマ：HLA と HTLV-I. ウイルス　2000; 50: 37-45.

2. Li HC, Fujiyoshi T, Lou H, et al.: The presence of ancient HTLV-I provirus DNA in an Andean mummy. Nature Med 1999;5:1428-1432.

3. Fujiyoshi T, Li HC, Lou H, et al.: Characteristic distribution of HTLV type I and HTLV type II carriers among native ethnic groups in South America. AIDS Res Hum Retroviruses 1999;15:1235-1239.

4. Lou H, Li HC, Kuwayama M, et al.: HLA class I and class II of the Nivkhi, an indigenous population carrying HTLV-I in Sakhalin, Far Eastern Russia. Tissue Antigens 1998; 52: 444-451.

5. Miura T, Fukunaga T, Igarashi T, et al.: Phylogenetic subtypes of human T-lymphotropic virus type I and their relations to the anthropological background. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994;91:1124-1127.

6. Yamashita M, Picchio G, Veronesi R, Ohkura S, Bare P, and Hayami M: HTLV-Is in Argentina are phylogenetically similar to those of other South American countries, but different from HTLV-Is in Africa. J Med Virol 1998;55: 152-160.

7. Suzuki Y, and Gojobori T: The origin and evolution of human T-cell lymphotropic virus type I and type II. Virus Genes 1998;16:69-84.

8. Seiki M, Hattori S, Hirayama Y, and Yoshida M: Human adult T-cell leukemia virus: Complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1983;80:3618-3622.

Table 1. HLA-class I and class II allele typing of the samples in Tibet

		HLA Types							
	HTLV-I	class I				class II			
NO.	Ab#	A		B		DRB1		DQB1	
1	<16	A*02	A*02	B*35	B*51	DRB1*1101	DRB1*0901	DQB1*0301	DQB1*0303
2	<16	A*02	A*11	B*18	B*40	DRB1*1604	DRB1*0403	ND	ND
3	<16	A*02	A*02	B*3915	B*4803	DRB1*1407	DRB1*0403	DQB1*0301	DQB1*0304
4	<16	A*11	A*24	B*4801	B*51	ND##	ND	ND	ND
5	<16	A*02	A*31	B*51	B*52	ND	ND	ND	ND
6	<16	A*02	A*24	B*1538	B*5110	DRB1*1601	DRB1*0403	ND	ND
7	<16	A*11	A*24	B*1538	B*3517	DRB1*1101	DRB1*1401	DQB1*0301	DQB1*0502
8	<16	A*0103	A*11	B*35	B*5001	DRB1*0101	DRB1*0701	DQB1*0501	DQB1*0201
9	<16	A*24	A*68	B*3701	B*4002	DRB1*0901	DRB1*1001	DQB1*0303	DQB1*0501
10	<16	A*24	A*24	B*35	B*40	DRB1*1101	DRB1*1301	ND	ND

#: PA test

##: Not determinated

Table 2. **Prevalence of viral infection among Tibetan, China**

		HBV			
Location	Number of People	Numbers of HBsAg Positive	Rate of Current infection (%)	Numbers of positives either HBcAb or HBsAb	Rate of Past infection (%)*
東部地域					
村1	40	15	37.5	19	47.5
村2	62	5	8.1	13	21.0
村3	10	ND*		ND	
西部地域					
村1	55	7	12.7	16	29.1
村2	105	23	21.9	29	27.6
Total	272	50	19.1	77	29.4

*: Not determinated

Fig 1. The Alignments of HTLV-I-LTR DNA Sequence for HTLV-I Carriers and ATL Patients in Southern Japan

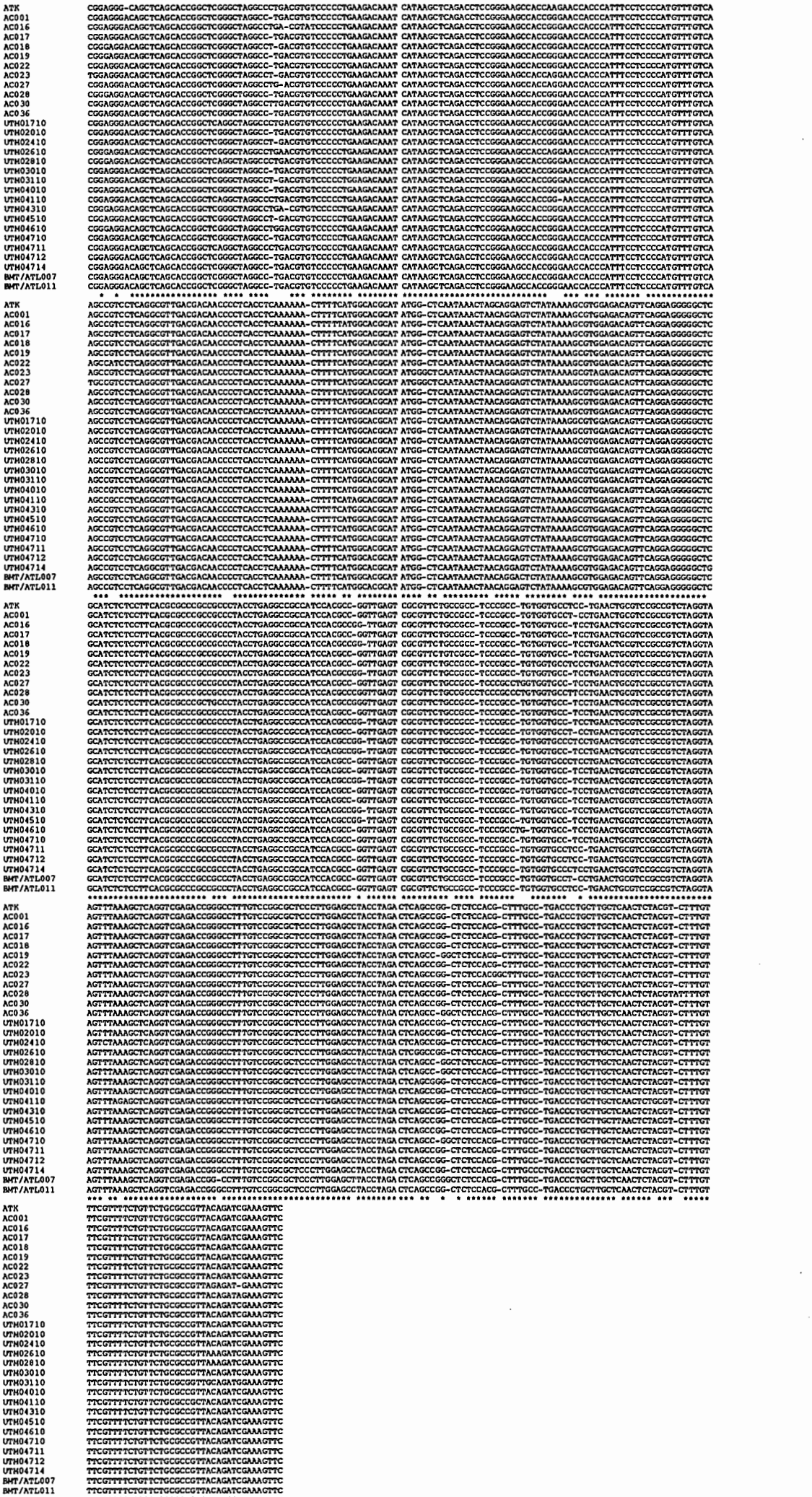


Fig 2. Geographic Distribution of HBV Genotypes

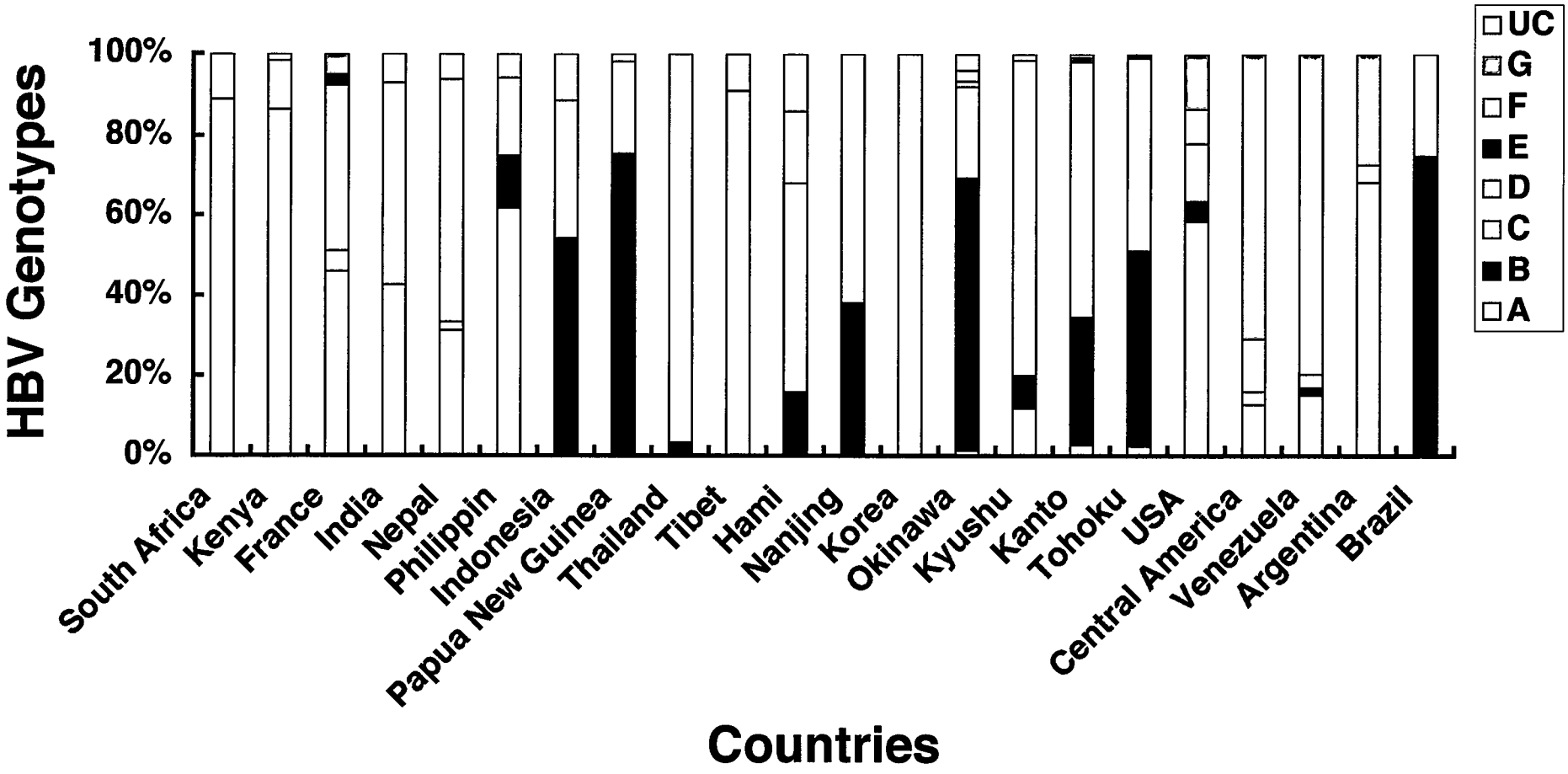
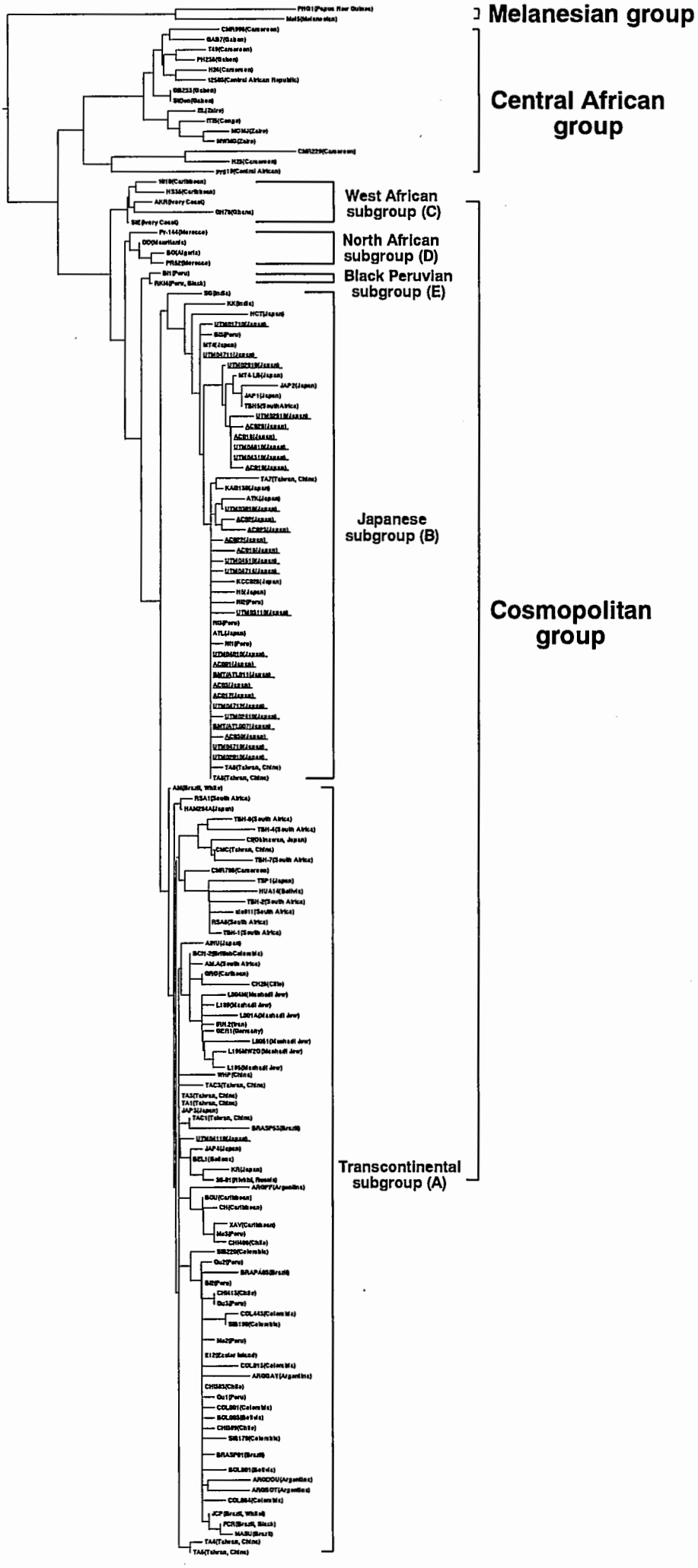


Fig 3. A Phylogenetic Tree of HTLV-I Subtypes (LTR Region, 144-650 n.p. in ATK)



「ATLの予防治療の新展開 - 緑茶による予防介入と骨髄移植」

園田純一郎[1]、李 洪川[1]、楼　宏[1]、カロリーナ・レマ[1]、
屋敷伸治[1]、藤吉利信[1]、宇都宮 與[2]、園田俊郎[1]
([1]鹿児島大学医学部ウイルス学講座、[2]今村病院分院血液内科)

Advances in prevention and treatment of ATL
- Green tea intervention study and bone marrow transplantation -

Jun-ichiro SONODA[1] , Hong-Chuan LI[1] , Hong LOU[1] , Carolina LEMA[1] , Shinji YASHIKI[1] ,
Toshinobu FUJIYOSHI[1] , Atae UTSUNOMIYA[2] and Shunro SONODA[1]
([1] Department of Virology, Faculty of Medicine, Kagoshima University, [2] Department of Hematology, Imamura Bun-in Hospital)

【目的】

ATL 発症予防を目的として、無症候性HTLV-Iキャリアを対象に緑茶抽出カプセル服用による介入試験を行い、血中HTLV-Iプロウイルス量の変動を観察することにより緑茶のATL 発症予防効果を検討する。併せてATL 患者に施行された同種骨髄移植の治療効果も検討する。

【対象と方法】

緑茶介入試験の趣旨を十分に説明し同意が得られた無症候性HTLV-Iキャリア101 名を無作為に2群に分け（第1群は前半6ヶ月緑茶カプセルを服用し後半は服用なしとする。第2群は前半6ヶ月非服用とし、後半は緑茶カプセルを服用する。）、緑茶カプセルを1回3個1日3回計9 カプセル（緑茶10杯分相当）を服用してもらう。全ての被験者から月一回の採血を行い、血中 HTLV-I プロウイルス量をリアルタイムPCR定量装置（LightCycler）で測定した。ATL患者の治療研究に関しては鹿児島大学医学部附属病院、関連医療機関の協力を得て行った。骨髄移植前後のHTLV-I プロウイルスの定量は上記の定量装置で測定し臨床所見との対比を行った。

【試験結果と考察】

1) 緑茶カプセル服用後のHTLV-Iプロウイルス量の変動：介入開始前に末梢血リンパ球1000個あたり100コピー以上の高いHTLV-Iプロウイルス量を示した21/101例を対象に経時変化を追跡し、初期的検討をおこなった。このうち緑茶カプセル服用者群（8名）では、HTLV-Iプロウイルス量の変動は小さく、一定の範囲内に収束する傾向がみられた。一方、非服用者群（13名）のプロウイルス量は50～700 コピーまでの大きな変動が観察された。
2) ATLの骨髄移植による治療成績：過去5年間におこなわれたATL患者に対する骨髄移植の成績がまとめられた。その結果、ATL患者の10例中6 例が骨髄移植後12～35 ヶ月以上にわたり無病状態で生存していることが明らかになった。これは従来の化学療法を主体とするATLの治療と比較して、抜群の好成績である。

子宮頸がんのHPV感染とHLAアリル

藤吉利信，　Carolina Lema，　李洪川，　楼宏，　屋敷伸治，　園田俊郎
（鹿児島大・医・ウイルス）

目的：子宮頸がん発症にはHPV感染とHLA遺伝子多型などの宿主要因の関与が考えられる。子宮頸がん発生率が先進国の5-10倍高いことが報告されているボリビアの子宮頸がん患者群と、日本人（鹿児島県地方）の子宮頸がん患者群のHPV感染とHLA遺伝子多型を比較することにより、子宮頸がん発症におけるHPV感染とHLAの遺伝背景を明らかにすることを目的とする。

結果と考察：1）HPV-DNA検出：ボリビアではHPV typeは31型が最も多く、鹿児島地区では16型が優位であった。2）HLAタイピング：鹿児島症例のHLAクラスIIアリルタイピング解析から子宮頸がんのリスク因子としてHLAクラスII DRB1*0401およびDQB1*0402、防御因子としてHLAクラスII　DRB1* 1302、およびDQB1*604が明らかになった。ボリビア症例については、優位なHPV typeが鹿児島地区と異なることから、それぞれのHLAクラスIIアリルが認識するエピトープが何か興味深く、これを特定することによりHPV抗原ペプチドの候補を決定することができる。