

各群のマウスあるいはラットをエーテル麻酔下にて屠殺後、脾細胞を取り出し、96 穴培養マイクロプレートにて 1 穴あたり 5×10^5 に調整して RPMI1640, 0.5% 同種血清中で培養した。3 穴ずつ同条件で各穴に特異抗原を 1, 5mg ずつ加えて刺激し、5% CO₂ インキュベーター内で 72 時間培養した。こののち各穴にトリチウムチミジンを 1mCi 加え 24 時間後にハーベストし、液体シンチレーションカウンターにて細胞のトリチウムチミジンの取り込みを測定した。

抗 TMEV 抗体：

マウスは屠殺前に採血し、血清を保存した。紫外線不活化精製 TMEV を抗原として ELISA 法にて抗 TMEV 抗体を測定した。

ELISPOT アッセイ：

個々の脾細胞のサイトカイン産生能について ELISPOT 法について検討した。培養マイクロプレートの各穴の底にニトロセルロース膜をしきに各種抗サイトカイン抗体を吸着させた。この膜上に脾細胞を 1×10^5 / 穴の割合で入れ、培養液中で 24 時間培養した。このニトロセルロース膜をウサギ抗マウスサイトカイン抗体と反応させ、さらにヤギアルカリフォスファターゼ標識抗ウサギ抗体と反応させた後基質を加え、膜上のサイトカインをスポットとして出現させ拡大鏡下にてスポット数を算定した。

組織学的検索：

各 5 匹のマウスをパラホルムアルデヒドで灌流固定後、パラホルムアルデヒドとグルタルアルデヒドにて浸潤固定し、標本を作製した。

結果

GPMBP 感作対照群のレイラットでは全例 EAE を発症した。これに対し抗 B7-1 抗体投与群では非特異的 IgG 投与群に比し有意な発症率及び重症度の抑制が認められた (図 1)。抗 B7-2 抗体投与群で有意な増悪が認められたが、両抗体投与群では明らかな抑制が認められた (図 1)。また抗原特異的遅延型過敏反応、抗原特異的 T 細胞増殖アッセイとともに両抗体投与群で

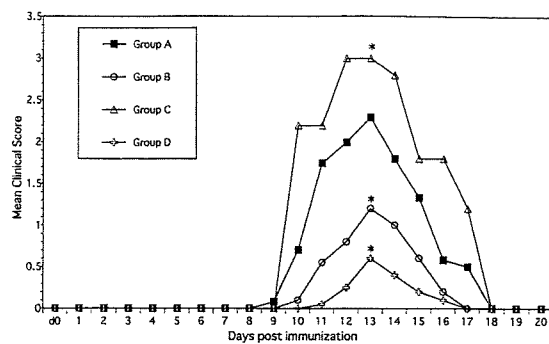


図 1. EAE 臨床経過

は非特異的 IgG 投与群に比し抗原特異的細胞性免疫反応の低下がみとめられた (図 2A, 2B)

TMEV-IDD では抗 B7-1 抗体投与群では非特異的 IgG 投与群に比し明らかな抑制が認められた (図 3)。抗 B7-2 抗体投与群、両抗体投与群では明らかな差が認められなかった (図 3)。また抗原特異的遅延型過敏反応、抗原特異的 T 細胞増殖アッセイとともに抗 B7-1 抗体投与群では非特異的 IgG 投与群に比し抗原特異的細胞性免疫反応の低下がみとめられた (図 4, 5)。これに対し抗 B7-2 抗体投与群、両抗体投与群では明らかな

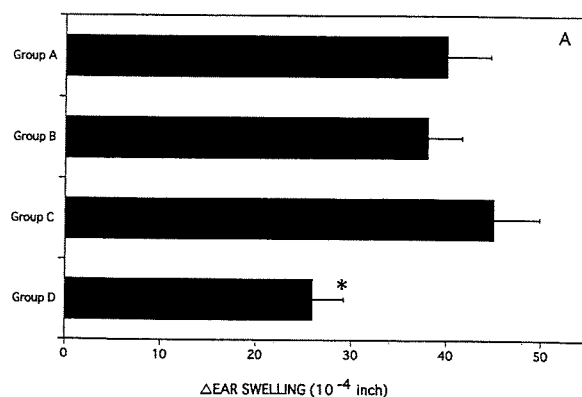


図 2A. EAE 抗原特異的遅延型過敏反応

差が認められなかった (図 4, 5)。抗 TMEV 抗体は 4 群いずれも抗 TMEV 抗体の上昇がみられ、4 群間に有意な差異は認められなかったがアイソタイプの検索では、抗 B7-1 抗体投与群では IgG2a が検出されなかったのに対し他の 3 群では IgG2a も検出された (図 6)。ELISPOT 法による脾細胞のサイトカイン産生能では抗 B7-1 抗体投与群では炎症性サイトカインである TNFα, IFN-g の産生能は他群に比し低下していたが、IL4, IL10

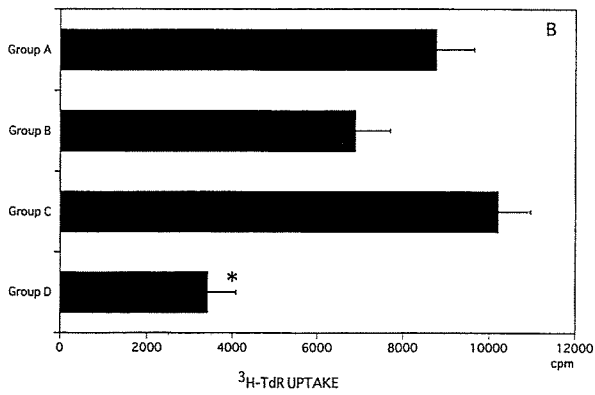


図 2B. EAE 抗原特異的 T 細胞増殖アッセイ

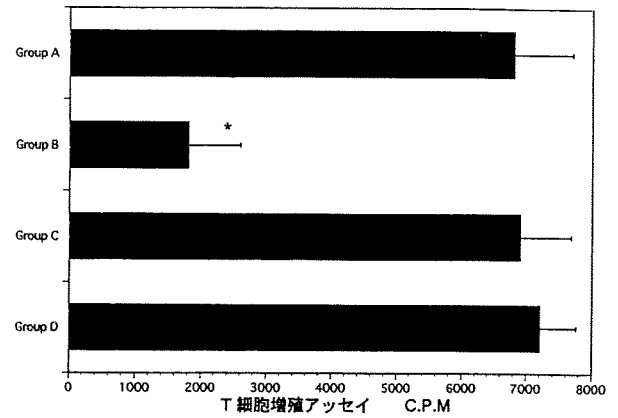


図 5. TMEV-IDD 抗原特異的 T 細胞増殖アッセイ

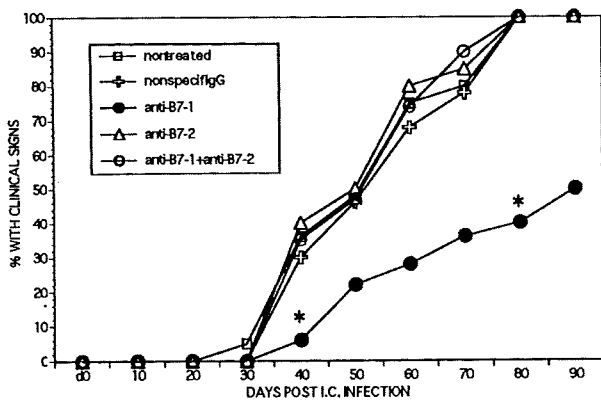


図 3. TMEV-IDD 臨床経過

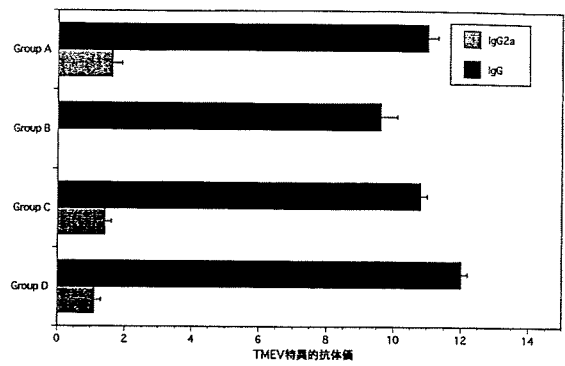


図 6. 抗 TMEV 抗体

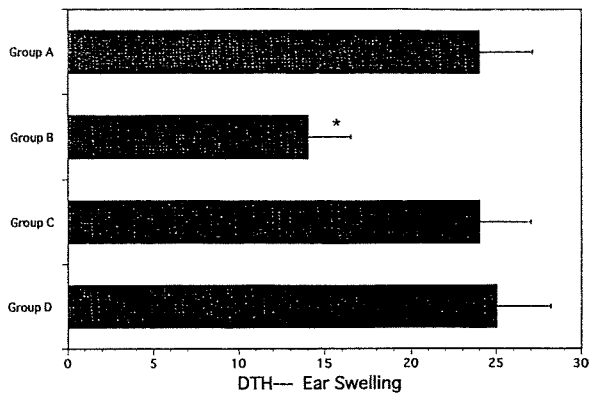


図 4. TMEV-IDD 抗原特異的遅延型過敏反応

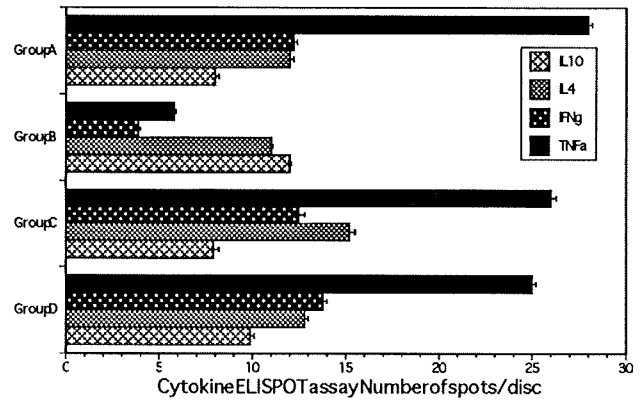


図 7. TMEV-IDD 脾細胞のサイトカイン産生能

などの Th2 系サイトカインは比較的優位の傾向にあった (図 7)。

考察

T 細胞は APC から抗原特異的な第 1 シグナルと CD28, CTLA-4 などの副刺激分子を介した第 2 シグナルを受

け取ることによって、初めて抗原に対して増殖、分化反応を起こす。副刺激分子のなかでも CD28 からは正のシグナルが、CTLA-4 からは負のシグナルが伝達され、このバランスにより T 細胞の反応の調節が行われていると考えられるが、詳細は不明である。CD4 陽性 Th1 細胞が中心的な役割を果たす TMEV-IDD 及び EAE

においてこの副刺激が脱髄疾患の病因にどのような影響を与えているかこれまで詳細な検討が行われていなかった。今回の研究により B7-1 は Th 1 への分化に B7-2 は Th 2 の分化に深く関与しているという従来の説が脱髄疾患モデルにおいても裏付けられた結果となった。しかし両者をブロックした際の結果については TMEV-IDD と EAE では異なっており、CD28 からは正のシグナルと、CTLA-4 からは負のシグナルのバランスに疾患および種による差があるもの考えられた。

まとめ

免疫性脱髄疾患の発症機序を検索するため、副刺激因子である B7-1, B7-2 分子の果たす役割を検討した。SJL/J マウスに TMEV-IDD を、ルイスラットに EAE を作成し、感染あるいは感作後抗 B7-1 あるいは B7-2 モノクローナル抗体を投与、症状観察後種々の免疫学的検索を行った。対照群では全例発症したが TMEV-IDD, EAE ともに抗 B7-1 抗体投与群では有意に発症を抑制、抗 B7-2 抗体投与群では発症を増悪させた。対照群及び抗 B7-2 抗体投与群では Th1 系サイトカイン産生が優位であり、抗 B7-1 抗体投与群では Th1 系サイトカイン産生の抑制がみられた。また両抗体投与群では EAE ではより著明に抑制、TMEV-IDD では増悪傾向にあった。今回の研究により B7-1 は Th 1 への分

化に B7-2 は Th 2 の分化に深く関与しているという従来の説が脱髄疾患モデルにおいても裏付けられ、病因に重要な役割を果たしていることが示された。なを両者をブロックした際の結果については TMEV-IDD と EAE では異なっており、CD28 からは正のシグナルと、CTLA-4 からは負のシグナルのバランスに疾患および種による差があるもの考えられた。

文献

- 1) Kuchroo VK et al: B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell* 80: 707, 1995
- 2) Miller SD et al: Blockade of CD28/B7-1 interaction prevents epitope spreading and clinical relapses of murine EAE. *Immunity* 3: 739, 1995
- 3) Inoue A, Koh C-S, et al: Suppressive effect on Theiler's murine encephalomyelitis virus-induced demyelinating disease by the administration of anti-IL-12 antibody. *J Immunol* 5586, 1998
- 4) Yauch RL, Palma JP, Yahikozawa H, Koh C-S, Kim BS: Role of individual T-cell epitopes of Theiler's virus in the pathogenesis of demyelination correlates with the ability to induce a Th1 response. *J Virol* 72: 6169, 1998

HAM における *Matrix metalloproteinases* の役割

納 光弘 梅原 藤雄 松浦 英治

目 的

HAM の中枢神経組織の破壊と再生および神経組織の線維化（グリオーシス）の過程で、いかなる分子が関与しているのだろうか。これらの疑問に答えるために、我々は、細胞外マトリックス蛋白の分解とその抑制に関与する MMPs, TIMPs の役割を検討した。HAM における MMPs, TIMPs の発現は、血液脳関門の破綻と再生及び中枢神経線維化の分子機構を解明するための重要な鍵である。

対象と方法

1) Sandwich enzyme immunoassay

血清：HAM 42 例，非炎症性神経疾患 (other neurological disease, OND) 25 例，他の炎症性神経疾患 (Other inflammatory neurological disease, OIND) 6 例 血漿：HAM 45 例，OND 20 例，髄液：HAM 44 例，OND 30 例

2) 髄液 Gelatin zymogram HAM 18 例 OND 13 例

3) 免疫組織化学：MMPs, TIMP-1, TIMP-2 に対するモノクローナル抗体を用いて，HAM 剖検脊髄標本を染色した。

結 果

血清中 MMP-2 は，HAM 群において，OND 群，OIND 群に比べ，有意に高値を示した。MMP-1, MMP-3, MMP-7, TIMP-1, TIMP-2 に関しては，HAM 群，OND 群，OIND 群で有意差は認めなかった。血漿中 MMP-9 は，HAM 群において有意に OND 群より高値を示した（表 1）。髄液中では，MMP-2 は，やはり HAM 群において OND 群より有意に高値を示したが，OIND 群と有意差はなかった（図 1）。髄液中の MMP-2 と TIMP-2 の相関をみると，HAM 群では，OND 群に比べ，MMP-2 が優位になっていた（図 2）。MMP-9 では，OND 群では全例測定感度以下であったが，HAM 群では 46 例中 8 例で測定感度以上であり，その陽性頻度は有意に高かった。さらに，髄液中における MMPs の活性を測定するために

ザイモグラフィーを行った。68kDa の proMMP-2 は，HAM 群及び OND 群で全例にみられ，NIH image を用いた定量的解析でも有意差はみられなかった。しかしながら，92kDa の proMMP-9 は，HAM 群では 18 例中 13 例（72%）で陽性であったのに比べ，OND 群では，13 例中 1 例（8%）で陽性であったにすぎず，HAM 群で有意に高率に陽性であった。以上の結果から，HAM 群では，血中及び髄液中ともに MMP-2, MMP-9 の発現が亢進していることを示している。

免疫組織化学：活動性炎症部位では，血管周囲及び実質内に浸潤している単核球（主に T リンパ球およびマクロファージ）の細胞膜表面に MMP-2 の発現がみられた。非活動性炎症部位及び正常脊髄では，MMP-2 は，血管内皮細胞及び血管周囲マクロファージに恒常的に発現がみられた。MMP-9 は，活動性炎症部位においてのみ，血管周囲及び血管内皮細胞に付着している単核球に発現がみられた。

考 察

中枢神経の血管基底膜はコラーゲン IV を主成分とする細胞外マトリックス蛋白からなっている。HAM 脊髄炎症部位の血管周囲のリンパ球，マクロファージに発現している MMP-2, MMP-9 は，コラーゲン IV を分解することから，これらの分子は，血管基底膜の破壊に直接的に関与しているものと考えられる。MMP-2 は，髄液中に恒常的に存在する事が知られており，我々の結果においても，MMP-2 は髄液中において，SIA 法，ザイモグラフィの両者において，非炎症性神経疾患群においても検出された。免疫組織化学的検討においても，正常脊髄では，血管内皮細胞及び血管周囲ミクログリアにおいて MMP-2 が陽性であった。これらの所見から，MMP-2 は恒常的に中枢神経に発現しており，中枢神経の血管基底膜の再生，維持に関与していることが推定される。HAM 脊髄ではこれに加え，浸潤 T 細胞，マクロファージ/活性化ミクログリアに発現が見られた。髄液 MMP-2 は，SIA において有意に HAM 群で増加しており，これは中枢神経内に浸潤している炎症細胞に由来するものと推定される。また，血中においても高値を示したことは，HAM が単に中枢神経内の炎症に止まらず，肺，唾液腺，

関節などに炎症を伴う全身性疾患であることを示唆しているのかもしれない。一方、MMP-9は、正常脊髄での発現は見られず、HAM脊髄で血管周囲及び血管内皮細胞に接着するリンパ球に発現が見られた。髄液ザイモグラフィにおいて、OND群では、MMP-9は殆ど検出されなかったが、HAM群では約7割で陽性であった。これらの所見をあわせて考えると、中枢神経内の炎症部位において、MMP-9は、浸潤細胞（おもにTリンパ球）に発現していることが推定される。MMP-9遺伝子は、そのプロモーター領域にNF- κ B, TREを有しており、TNF- α , taxにより発現が亢進することから、HTLV-I感染リンパ球においてMMP-9の発現は亢進し、中枢神経内への浸潤能が亢進している可能性がある。以上の結果は、MMP-2, MMP-9はHAMの治療戦略上重要な標的分子であることを示している。

研究協力者

慶應大学病理学 岡田保典教授, 富士科学工業 藤本昇博士

文 献

- Osame M, Matsumoto M, Usuku K, et al. Chronic progressive myelopathy associated with elevated antibodies to human T-lymphotropic type I and adult T-cell leukemia like cells. *Ann Neurol* 21:117-122, 1987
- 梅原藤雄, 納 光弘 : HAM 最新脳と神経科学シリーズ3 遅発性ウイルス感染症とその類縁疾患 Medical View p24-39,1996
- Umehara F, Izumo S, Nakagawa M, et al. immunocytochemical analysis of the cellular infiltrate in the spinal cord lesions in HTLV-I-associated myelopathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 52:424-430, 1993
- Kubota R, Umehara F, Izumo S, et al. HTLV-I proviral DNA amount correlated with infiltrating CD4+ lymphocytes in the spinal cord from patients with HTLV-I associated myelopathy. *J Neuroimmunol* 53:23-29, 1994
- Umehara F, Nakamura A, Izumo S, et al. Apoptosis of T lymphocytes in the spinal cord lesions in HTLV-I-associated myelopathy: a possible mechanism to control viral infection in the central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 53:617-624,1994
- Umehara F, Izumo S, Ronquillo TA, et al. Cytokine expression in the spinal cord lesions in HTLV-I-associated myelopathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 53:72-77,1994
- Umehara F, Izumo S, Takeya M, et al. Expression of adhesion molecules and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in the spinal cord lesions in HTLV-I-associated myelopathy. *Acta Neuropathol* 91:343-350, 1996
- Umehara F, Okada Y, Fujimoto N, Abe M, Izumo S, Osame M. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in HTLV-I-associated myelopathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 57:839-849,1998
- 梅原藤雄 : HAM の病態と治療—マトリックスメタロプロテイナーゼを中心として— *Brain Medical* 10:395-402,1998
- 梅原藤雄. HAM の分子病理 *日獨医報* 43:195-204, 1998

表 1. 血中及び髄液中の MMPs, TIMP s 値 (SIA 法)

| | HAM | OND | p value |
|---------------|-------------------|------------|----------|
| <i>Serum</i> | | | |
| MMP-1 | 13.9±25.6 (ng/ml) | 13.8±11.1 | 0.99 |
| MMP-2 | 813±361* | 524±144 | *<0.05 |
| MMP-3 | 91±146 | 128±144 | 0.31 |
| MMP-7 | 14±23 | 5.9±1.2 | 0.94 |
| TIMP-1 | 193±83 | 192±72 | 0.99 |
| TIMP-2 | 57±36 | 49±15 | 0.47 |
| cTIMP-2* | 865±369* | 576±151 | *<0.0001 |
| <i>Plasma</i> | | | |
| MMP-8 | <1.9 | n.e. | |
| MMP-9 | 21.3±13.0* | 14.8±13.0 | *<0.005 |
| <i>CSF</i> | | | |
| MMP-1 | < (ng/ml) | <1 (ng/ml) | |
| MMP-2 | 123±102* | 78±60 | *<0.05 |
| MMP-3 | <12.5 | <12.5 | |
| MMP-7 | <0.625 | <0.625 | |
| MMP-8 | <1.9 | <1.9 | |
| TIMP-1 | 38±14 | 38±20 | 0.66 |
| TIMP-2 | 57±33 | 61±33 | 0.58 |
| cTIMP-2 | 179±132 | 137±78 | 0.21 |

Serum: HAM n=42, OND n=25
 Plasma: HAM n=45, OND n=20
 CSF: for MMP-2,9,TIMP-1,2: HAM n=44, OND n=30, for MMP-1,3,7,8: HAM n=18, OND n=9
 n.e.; not examined
 *cTIMP-2; corrected TIMP-2 (MMP-2+TIMP-2)

HAM 群では、OND 群に比べ有意に血清 MMP-2、血漿 MMP-9、髄液中 MMP-2 が高値を示している。

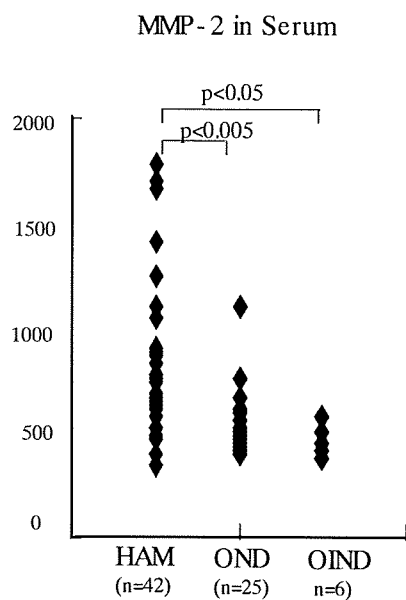


図 1. HAM, OND, OIND における血清及び
髄液中MMP-2量の比較

血清中では、HAM では、OND, OIND に比べ、有意に MMP-2 量が増加している。髄液中でも、HAM では、OND に比べ有意に MMP-2 量が増加しているが、OIND との有差はみられない。(SIA 法)

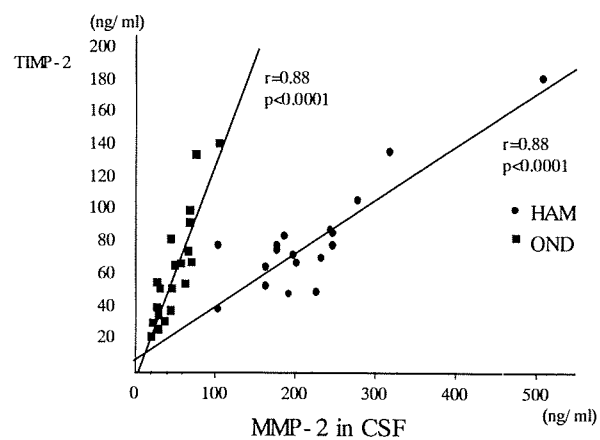


図 2. 髄液中 MMP-2 と TIMP-2 の相関
HAM では、OND に比べ、MMP-2 が TIMP-2 より優位
になっている。

HAM 発症と HLA-DRB1*0101 遺伝子多型・ HTLV-I プロウイルス量との関連

宇宿功市郎、竹之内徳博、延原康幸、ジェラルド・サラザール、児玉大介、
古川良尚、松岡 英二、出雲 周二、納 光弘

目的

HAM は HTLV-I 感染者の一部に発症し、その発症に HLA 遺伝子多型特に HLA-DRB1*0101¹⁾²⁾が関与することが報告されている。また HTLV-I プロウイルス量と HAM 発症の相関が報告されており、末梢血リンパ球の1%以上の細胞が HTLV-I に感染するとその発症リスクが飛躍的に上昇することがわかってきている(図)³⁾。今回 HAM 発症に関連すると考えられる HLA-DRB1*0101 と HTLV-I プロウイルス量との関連を検討するために以下の研究を行った。

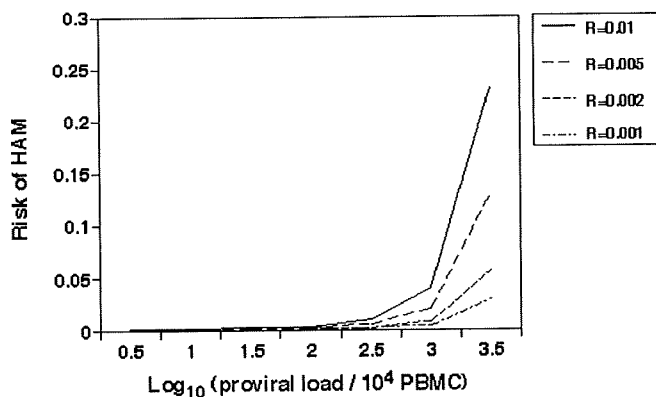


図. HAM 発症リスクと HTLV-I プロウイルス量

対象と方法

HAM 患者 301 例、HTLV-I キャリア 200 例の末梢血リンパ球より genomic DNA を抽出後に、PCR-SSP 法で HLA classII タイピングを行い、ABI Prism7700TMにて HTLV-I プロウイルス量を定量的 PCR 法により計測した。

結果

HLA-DRB1*0101 保有者は HAM 患者群で 62 例、HTLV-I キャリア群で 22 例観察され、HAM 患者群でより有意に増加 ($\chi^2=7.93$ 、 $p=0.0048$)していた(表1.)。HTLV-I プロウイルス量は HTLV-I キャリア群においては HLA-DRB1*0101 保有者・非保有者間で差が見られなかった。HAM 患者群では HLA-DRB1*0101 保有者における HTLV-I プロウイルス量は、 10^4 リンパ球当たり平均 598 コピー、非保有者では 10^4 リンパ球当たり平均 848 コピーであり、HLA-DRB1*0101 保有群では非保有群に比し、有意に HTLV-I プロウイルス量の低下 ($p=0.021$)が見られた(表 2.)。

表1. HLA-DRB1*0101 Frequency in patients with HAM and HTLV-I carriers

| | n | DRB1*0101 |
|----------------|-----|-----------|
| HAM | 301 | 62 |
| HTLV-I carrier | 200 | 22 |

$\chi^2=7.93$, $p=0.0048$

表 2. HTLV-I Proviral Load in patients with HAM and HTLV-I carriers

| | DRB1*0101 | | p |
|----------------|-----------|----------|-------|
| | positive | negative | |
| HAM | 598 | 848 | 0.021 |
| HTLV-I carrier | 137 | 121 | 0.72 |

考 察

HTLV-I 感染と HTLV-I ウイルス量の増加が HAM 発症に必要であること、またある特定の免疫遺伝学的背景を持つ集団に HAM 発症が多く見られることがわかっており、HTLV-I ウイルスの増加とそれに対する過剰な免疫応答により HAM が発症するものと考えられている。今回の検討では、HLA-DRB1*0101 保有者が HAM に多いことがこれまで以上に大規模な検討で再確認された。

HAM 患者においては髄液内特異的抗 HTLV-I 抗体産生が HTLV-I キャリアに比し高く、これは HLA-DRB1*0101 保有者でより高いこと⁴⁾、また HLA-DRB1*0101 に認識されやすい HTLV-I 上の epitope は HTLV-I の env gp21 に存在することが明らかにされており⁵⁾⁶⁾、HLA-DRB1*0101 の存在が HAM 発症に関わる過剰免疫反応に関与することが示されている。今回 HAM 発症 HLA-DRB1*0101 保有者では HTLV-I プロウイルス量が非保有者に比し低いことが示されたわけであるが、このことは、HLA-DRB1*0101 保有者ではより低い HTLV-I プロウイルス量で HAM 発症に至る可能性が大きいことを示していると考えられた。この事は HTLV-I 感染後に HAM 発症に至る期間を短くしている可能性があり、HAM 発症群での HLA-DRB1*0101 保有者の増加につながっていると考えられた。また HLA-DRB1*0101 保有 HAM 患者での低プロウイルス量は HTLV-I 特異的免疫の高反応により HTLV-I プロウイルス量が低く抑えられているとも考えられ、この高反応性が HAM 発症につながる要因かどうか今後とも解析を続けるべきものと考えられた。更に今回のこの情報は今後の HAM 発症予測、予後管理に有用であるものと考えられ、HTLV-I キャリアにおいて HLA-DRB1*0101 保有者はより

注意深く経過観察する必要があることを示唆するものと考えている。

結 論

HAM 発症者では HLA-DRB1*0101 保有者において HTLV-I プロウイルス量が低いことが明らかとなった。このことは HLA-DRB1*0101 保有者ではより低いウイルス量で HAM 発症に至ることを示唆していると考えた。HTLV-I キャリアから HAM 発症に至る危険因子としての HLA-DRB1*0101 の有用性を指摘した。

文 献

- 1) Usuku K, Sonoda S, Osame M, Yashiki S, Takahashi K, Matsumoto M, Sawada T, Tsuji K, Tara M, Igata A. HLA haplotype-linked high immune responsiveness against HTLV-I in HTLV-I-associated myelopathy: comparison with adult T-cell leukemia/lymphoma. *Ann. Neurol.* 1988; 23: S143-150
- 2) Usuku K, Nishizawa M, Matsuki K, Tokunaga K, Takahashi K, Eiraku N, Suehara M, Juji T, Osame M, Tabira T. Association of a particular amino acid sequence of the HLA-DR beta 1 chain with HTLV-I-associated myelopathy. *Eur. J. Immunol.* 1990; 20: 1603-1606
- 3) Nagai M, Usuku K, Matsumoto W, Kodama D, Takenouchi N, Moritoyo T, Hashiguchi S, Ichinose M, Bangham CRM, Izumo S, Osame M. Analysis of HTLV-I proviral load in 202 HAM/TSP patients and 243 asymptomatic HTLV-I carriers: High proviral load strongly predispose to HAM/TSP. *J. NeuroVirol.* 1998 4:586-593
- 4) Kitze B, Usuku K, Yashiki S, Ijichi S, Fujiyoshi T, Nakamura M, Izumo S, Osame M, Sonoda S. Intrathecal humoral immune response in HAM/TSP in relation to HLA haplotype analysis. *Acta Neurol.*

Scand. 1996;94:287-293

- 5) Kitze B, Usuku K, Yamano Y, Yashiki S, Nakamura M, Fujiyoshi T, Izumo S, Osame M, Sonoda S. Human CD4+ T lymphocytes recognize a highly conserved epitope of human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) env gp21 restricted by HLA DRB1*0101. Clin. Exp. Immunol. 1998;111:278-285
- 6) Yamano Y, Kitze B, Yashiki S, Usuku K, Fujiyoshi T, Kaminagayoshi T, Unoki K, Izumo S, Osame M, Sonoda S. Preferential recognition of synthetic peptides from HTLV-I gp21 envelope protein by HLA-DRB1 alleles associated with HAM/TSP (HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis). J. Neuroimmunol. 1997; 76: 50-60

HAM患者Tリンパ球におけるVCAM-1を介したMMP-2亢進の検討

中村 龍文 神原 千晶 古屋 孝文 右田 清志
調 漸 江口 勝美

目 的

HTLV-I-associated myelopathy (HAM)の病理像の主体は慢性脊髄炎である(1)。我々はこれまでにHAM患者末梢血Tリンパ球の血管内皮細胞に対する接着能の亢進(2)および、基底膜透過能の亢進(3)を報告してきた。リンパ球の組織への浸潤には、血管基底膜の分解が必要であり、この点において我々は昨年度、第10回日本神経免疫学会において、HAM患者末梢血Tリンパ球ではvascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)を介したmatrix metalloproteinase-2 (MMP-2)発現が亢進していることを報告した。今回は、さらに症例数を増やし検討を重ねるとともに、VCAM-1に対するTリンパ球側の細胞接着因子であるVLA-4発現について検討した。

対 象、方 法

- HAM患者13例、対照群として他の神経疾患患者21例(anti-HTLV-I seropositive carrier 8例を含む)を対象とした。
- 1) Tリンパ球を対象者の末梢血から、E-roset法にて単離した。
 - 2) Glioblastoma由来のcell line, T98GをTNF- α で刺激し、VCAM-1発現細胞として用いた。(約98%にVCAM-1発現)
 - 3) VCAM-1発現細胞とTリンパ球を12時間 co-cultureした後Tリンパ球のみ回収し、serum free mediumで更に6時間 cultureし上清を回収した。
 - 4) T98GをTNF- α で刺激後、抗VCAM-1抗体でVCAM-1のblocking処理をおこない、同上の実験を行った。
 - 5) 1), 2)で得られた培養上清でgelatin zymographyを行い、MMP-2活性を測定した。得られたバンドはNIH image softをもちいて、densitometricに数値化し、これを、MMP-2活性とした。また、この値を用いてMMP-2活性上昇率(IR)を算出した。IR=T98Gとのcoculture後のMMP-2活性/T cellのみculture後のMMP-2活性
 - 6) 1)で得られた上清に抗MMP-2抗体を用いてimmunoprecipitationを行い、immunoblot法にてMMP-2蛋白発現を検討した。
 - 7) 被験者末梢血Tリンパ球を12時間cultureした後、フローサイトメトリーにてVLA-4発現を測定した。
 - 8) 統計処理にはMann-Whitney U検定およびWilcoxon single-rank testを用いた。

結 果

- 1) VCAM-1発現細胞との接着により末梢血Tリンパ球のMMP-2活性亢進をみとめた(図1)
- 2) ImmunoprecipitationにおいてもHAM患者におけるMMP-2蛋白発現亢進が認められ(図2)、MMP-2活性の亢進は、蛋白の発現量の増加に基づく事が示された。
- 3) 図3に示すようにMMP-2活性の上昇率はHAM患者では対照群と比較し、有意に高値であった。
- 4) T98Gに対し、抗VCAM-1抗体でblocking処理を行うと、MMP-2活性の亢進は阻止された。コントロールとして、マウスIgGで処理を行った場合には、MMP-2活性亢進は阻止されなかった。(図4)
- 5) 図5に示すように、末梢血Tリンパ球におけるVLA-4発現細胞の頻度はHAM患者と対照群とで有意差を認めなかった。

考 察

今回の結果より、末梢血Tリンパ球はVCAM-1の接着により、MMP-2の活性がup-regulateされ、MMP-2活性の上昇率は、HAM患者では、対照群と比較し著明であることが明らかにされた。また、抗VCAM-1抗体によりVCAM-1とVLA-4の接着を阻害することにより、MMP-2のup-regulationは阻害され、この系は、VCAM-1/VLA-4の接着を介し、特異的に起こることが証明された。HAM患者の脊髄では、リンパ球浸潤のみられる部位において、血管内皮細胞のVCAM-1発現が亢進していることが報告されており(4)、腫瘍細胞と同様、HAMのリンパ球においても、組織への浸潤のステップにおいて、接着因子が重要な役割を果たしていることが推測される。しかし末梢血Tリンパ球でのVLA-4発現細胞の頻度はHAM患者と対照群の間で有意差は認められなかった。この点について、HAM患者においては末梢血Tリンパ球のVLA-4の発現様式が異なっているのか、あるいはVLA-4/VCAM-1接着後のシグナル伝達機構に差があるのか、現在のところ不明である。いずれにせよ、今回の我々が示した結果はHAM患者末梢血Tリンパ球は血管内皮細胞との接着後、MMP-2発現亢進により組織に浸潤しやすい状態にあることを示しているものと思われる。

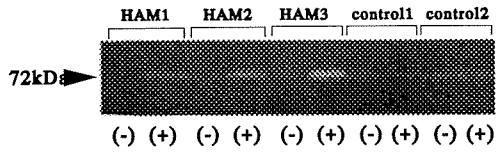


図1 : Gelatin zymographyによるMMP-2活性の解析

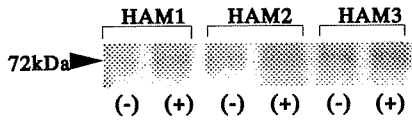


図2 : ImmunoblotによるMMP-2蛋白発現の解析

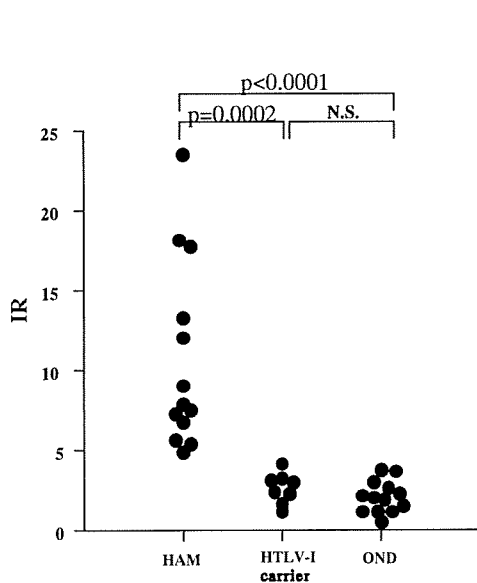


図3 : MMP-2活性上昇率(IR)

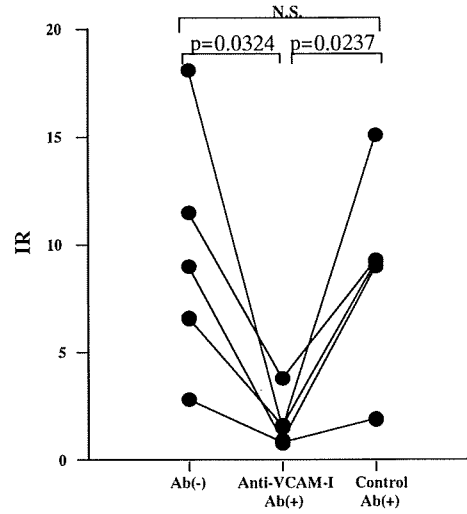


図4 : 抗VCAM-1抗体処理によるIRの変化

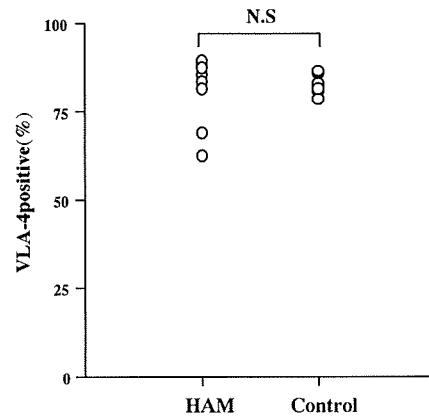


図5 : 末梢血Tリンパ球におけるVLA-4発現細胞(%)

文 献

- 1) Akizuki, S. et al : Necropsy findings in HTLV-I associated myelopathy. *Lancet* 1, 156-157. 1987
- 2) Ichinose, K. et al : Increased adherence of T cells to human endothelial cells in patients with human T-cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy. *Arch. Neurol.* 49, 74-76. 1992
- 3) Furuya, T. et al : Heightened transmigrating activity of CD4-positive T cells through reconstituted basement membrane in patients with human T-lymphotropic virus type I-associated myelopathy. *Proc. Assoc. Am. Physician.* 109, 228-236. 1997
- 4) Umehara, F. et al : Expression of adhesion molecules and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in the spinal cord lesions in HTLV-I-associated myelopathy. *Acta Neuropathol.* 91, 343-350. 1996

HAM 患者末梢血単核球における CD44 v6 variant 発現の検討

出雲 周二¹ 松岡 英二¹ 宇宿 功市郎² 伊佐敷 靖¹

城之園 学³ 竹之内 徳博^{1,3} 納 光弘³

目的

CD44 分子は種々の細胞表面に発現している接着分子であり、alternative splicing により様々な variant form が合成される事が知られている。これらの CD44 variant はリンパ球の活性化・遊走・homing、腫瘍の浸潤・転移に重要な役割を持つことが多数報告されている¹⁾が、炎症性神経疾患、自己免疫疾患との関連性については十分な検討はなされていない。今回我々は、HTLV-I associated myelopathy (HAM)の病変形成と CD44 の関連について明らかにするため、末梢血単核球(PBMC)での CD44 v6 variant (v6 を含む CD44 分子) の発現について検討したので報告する。

対象・方法

HAM 患者 15 名、HTLV-I キャリア 22 名(無症状 15、Sjogren 症候群 7)、ATL 患者 5 名、多発性硬化症患者 7 名、健常者 7 名の PBMC から RNA を抽出し、v6 (exon10)及び定常部 (exon15)の primer を用いて RT-PCR を行った後、v6 特異的 probe を用い Southern hybridization を行い、CD44 v6 variant (v6 variant)の発現パターンを調査した。また、HTLV-I 感染と v6 variant 発現の関連性を、HAM 患者 PBMC の PCR in situ hybridization(PCR-ISH)と免疫染色の二重染色²⁾で検討し、HAM 脊髄病変での v6 variant の発現を免疫組織学的方法で検討した。

結果

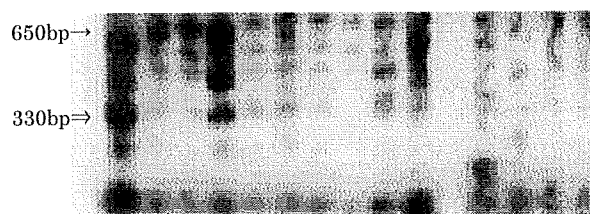
RT-PCR 及び Southern hybridization での検討では、4 本の v6 variant が認められ、そのうち約 330bp の v6 variant の発現が HAM で高率(87.7%)に認められた(図 1)。

その発現率は HTLV-I 無症状キャリアでは 20%、多発性硬化症では 42.9%、健常者では 14.3%であった(表 1)。この v6 variant の遺伝子配列を解析したところ、v6 (exon10)と v10 (exon14)が介在配列無しに結合したものであることが判明した。また、約 650bp の v6 variant の発現が HTLV-I 感染者で高頻度に見られたが、その比率は各群間で有意な差は見られなかった。健常人では低い傾向があった(表 1)。

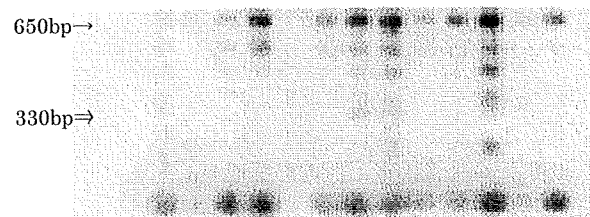
HAM 患者 PBMC での PCR-ISH と免疫染色の二重染色による検討では HTLV-I PCR-ISH 陽性細胞 (HTLV-I 陽性細胞)は全て CD4 陽性であった。また、HTLV-I 陽性細胞の一部に v6 陽性細胞が認められ、HTLV-I 陰性で v6 陽性のものもあった。

免疫組織学的検討では、HAM 脊髄病変で側索の微小血管内及び血管周囲に v6 陽性細胞が散見され、その多くは血管内壁に付着している細胞であった。また、これらの細胞は CD4 陽性であった。

図 1. Southern hybridization of v6 variant
HAM



Carrier



v6(exon10)及び定常部(exon15)の primer を用いた RT-PCR 後に v6 特異的 probe で hybridization を行った。

1. 鹿児島大学医学部難治ウイルス研 分子病理・遺伝子疫学
2. 鹿児島大学医学部 医療情報管理学
3. 鹿児島大学医学部 第三内科

表1.PBMCのRT-PCR-Southern Hybridizationの結果

| | v6 variant | |
|---------------------|------------|-----------|
| | 330bp | 650bp |
| HAM (15) | 13(87.7%) | 14(93.3%) |
| Carrier (15) | 3(20.0%) | 10(66.7%) |
| Carrier-Sjögren (7) | 0 | 3(42.9%) |
| ATL (5) | 1(20.0%) | 3(60.0%) |
| MS (7) | 3(42.9%) | 7(100%) |
| Normal (7) | 1(14.3%) | 2(28.6%) |

結論

HAM患者PBMCではCD44 v6+v10の発現が増加している。

HAMにおけるリンパ球の脊髄浸潤にCD44 v6 variantが関与している。

考察

RT-PCRによる検討でHAM患者ではPBMCにおいて、CD44 v6 variantのうちv6+v10というform (CD44 v6+v10)の発現の増加が認められた。これまでにCD44 v6+v10の発現は炎症性疾患では報告されておらず、その役割は不明であるが、Guriecらは乳癌でCD44 v6+v10の発現を確認し、これを発現している症例では、発現していない症例に比較して予後が良いことを報告しており³⁾、HAMとATLの予後の比較との関連で興味深い点であると考えられる。また、650bpのbandはその長さからv6以降のexonを全て含むもの(CD44 v6~v10)と考えられ、このtypeは抗原刺激を受けたリンパ球で発現が増加することが知られている^{3),4)}。HTLV-I感染者でCD44 v6~v10の発現比率が大きいことは感染者では活性化リンパ球が多いことを示唆していると考えられる。

PBMCを用いたPCR-ISHと免疫染色による二重染色による検討では、HTLV-I感染CD4+T細胞の一部にv6陽性細胞が見られ、免疫組織学的検討ではHAM脊髄病変の細胞浸潤の分布に一致してv6陽性細胞が見られ、これらの細胞はCD4陽性細胞であった。今回使用した抗v6抗体はv6(Exon10)を含む全てのvariantを認識するため、HTLV-I感染とCD44 v6+v10発現の関連性については直接的に証明することはできなかったが、我々は他にHAM脊髄病変ではv7+v8陽性細胞の分布はv6陽性細胞の分布と異なるという知見も得ており、HTLV-I感染CD4+T細胞の脊髄浸潤にCD44 v6 variant特にCD44 v6+v10が関与している可能性が示唆された。Giordanengoらは培養T細胞においてHIV感染によりCD44 variantの変化が起こることを報告しており⁵⁾、HTLV-I感染においてもCD44 variantの変化が起こる可能性があると考えられる。

今後、特異的primerを用いたRT-PCR、特異的probeを用いたin situ hybridization、in vitroでのHTLV-I感染実験等により検討する必要があると考えられる。

文献

- 1)Naor D. et al. CD44: Structure, Function, and Association with the Malignant Process. *Adv. in Cancer Res.* 70: 241-319, 1997
- 2)Matsuoka E. et al. Perivascular T cells are infected with HTLV-I in the spinal cord lesions with HAM/TSP: Double staining of immunohistochemistry and PCR in situ hybridization. *Acta. Neuropathol.* 96: 340-346, 1998
- 3)Guriec N. et al. CD44 isoforms with exon v6 and metastasis of primary N₀M₀ breast carcinomas. *Breast Cancer Res. Treat.* 44: 261-268, 1997
- 4)Koopman G. et al. Activated Human Lymphocyte and Aggressive Non-Hodgkin's Lymphomas Express a Homologue of the Rat Metastasis-associated Variant of CD44. *J.Exp.Med.* 177: 897-904, 1993
- 5)Giordanengo V. et al. Alteration of CD44 Expression in HIV Type 1-Infected T Cell Lines. *AIDS Res. And Human Retroviruses* 12: 1615-1622, 1996

緑茶ポリフェノール成分は HAM 患者の HTLV-I 感染細胞の増殖抑制と HTLV-I pX 遺伝子発現を抑制する

屋敷伸治、李 洪川、楼 宏、園田俊郎

目 的

緑茶ポリフェノール成分の抗酸化 DNA 損傷作用 (Ruch ら 1989, Leanderson ら 1997)、HIV-1 reverse transcriptase 活性の抑制作用 (Nakane ら 1990、Moor ら 1992)、Influenza 感染抑制作用 (Nakayama ら 1995)、がん細胞に対するアポトーシス誘導作用 (Ahmad ら 1997) に注目し、HAM 患者の HTLV-I 感染細胞に対する増殖、アポトーシスおよび HTLV-I pX 遺伝子発現に及ぼす効果を検討した。

対 象 と 方 法

1. 緑茶成分の抽出: 鹿児島県茶業試験場で栽培された荒茶 (品種名: やぶきた) 10 g を温湯 (95°C) 100ml で 30 分間浸出後、濾過液を 1 容の酢酸エチルで振とうして、酢酸エチル層に抽出された成分を減圧濃縮乾固させて緑茶ポリフェノール成分粗抽出物 (TEA) を調製した。比較対照品として緑茶の主要成分であるエピガロカテキンガレート (EGCg) をもちいた (図 1)。
2. T 細胞増殖反応の測定: 4 例の HAM 患者、1 例の HTLV-I 抗体陰性者の末梢血リンパ球および HAM 患者由来の HTLV-I 感染 T 細胞株を試験管内で培養し、増殖反応の抑制効果を測定した。ここでは、TEA と EGCg の 3 倍希釈段階液 (1~81 µg/ml) をつくり、それぞれの末梢血リンパ球と rIL-2 存在下で 3 日間培養後、細胞増殖の変化
鹿児島大学医学部ウイルス学

を Cell Counting Kit-8 を用いて測定した。

3. TUNEL 法によるアポトーシス細胞の検出: 3 日間培養後の培養細胞 5×10^4 個を中性緩衝ホルマリンで固定し、Apoptosis in situ Detection Kit を用いてアポトーシス細胞の検出を行った。
4. HTLV-I pX mRNA の検出: 緑茶成分各濃度ごとの培養細胞から mRNA を抽出し、それぞれを第 1 段プライマーセット (RPX11, PX9) で 40 サイクルの RT-PCR を行い、これを第 2 段プライマーセット (RPX3, RPX4) で 20 サイクルの nested-PCR を行い HTLV-I pX mRNA を測定した。さらに、mRNA 検体を 10 倍段階希釈し、同様の nested RT-PCR 法により HTLV-I pX mRNA の発現量を測定した。

結 果

1. T 細胞増殖抑制効果: 緑茶成分は HAM 患者の末梢血リンパ球に対し、濃度依存性に細胞増殖の抑制効果が観察された。TEA は 9 µg/ml の濃度で 4 例の HAM 患者の末梢血リンパ球の増殖を 47.4~93.0%抑制し、EGCg は 78.8~92.5%抑制した。一方、HTLV-I 感染 T 細胞株では、TEA で 24.2%、EGCg で 25.8%の抑制がみられたが、27 µg/ml の濃度ではそれぞれ 38.6%、74.9%抑制していた。HTLV-I 抗体陰性者の末梢血リンパ球では、9 µg/ml の濃度で TEA は 10.9%、EGCg で 5.4%、27 µg/ml の濃度でそれぞれ 12.0%、27.9%の抑制が観察された (図 2)。

2. アポトーシス作用効果 : TEA と EGCg で 3 日間培養した細胞を Apoptosis in situ 法による染色で TUNEL 陽性細胞が検出された。HAM 患者の末梢血リンパ球中の CD 8+CTL の細胞障害反応により緑茶成分無添加の細胞で 40~60% の TUNEL 陽性細胞が観察され、緑茶成分の濃度依存性に TUNEL 陽性細胞のアポトーシス細胞が増加していることが観察された。一方、HTLV-I 感染 T 細胞株も濃度依存性にアポトーシスを誘導していた。HTLV-I 抗体陰性者の末梢血リンパ球では、9~27 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で 15.3%~25.4% であった (図 3)。

3. HTLV-I pX 遺伝子発現抑制効果 : TEA (0~81 $\mu\text{g/ml}$) で培養した HAM 患者の末梢血リンパ球での HTLV-I pX 遺伝子の発現抑制は、27、81 $\mu\text{g/ml}$ で宿主遺伝子の β -actin に比し著明な完全抑制が観察された (図 4)。さらに、mRNA 検体を 10 倍段階希釈し、同様の nested RT-PCR をおこない HTLV-I pX mRNA の発現量を測定した結果、TEA および EGCg は HTLV-I pX mRNA の発現を 100 倍から 1000 倍抑制していた (図 5)。

考 察

緑茶ポリフェノール成分 (TEA) は、抗酸化作用の他に種々の抗ウイルス作用、がん細胞などに対するアポトーシス誘導作用が知られており、今回、TEA を HAM 患者の末梢血リンパ球 (HTLV-I 感染 T 細胞を含む) に対する効果を解析した。

本研究では TEA ならびに EGCg の HTLV-I 感染 T 細胞の増殖抑制とアポトーシスならびに HTLV-I pX 遺伝子発現に対する効果を in vitro 培養系で測定した。緑茶ポリフェノールの細胞増殖抑制効果では、正常 T 細胞や HTLV-I 感染 T 細胞株に比し、HAM 患者の末梢血 T リンパ球に対する効果が顕著に認められた。その効果は 9~27 $\mu\text{g/ml}$ 濃度の TEA および EGCg で 47.4%~92.5% の抑制がみられた (図 2)。9~27 $\mu\text{g/ml}$ 濃度の TEA お

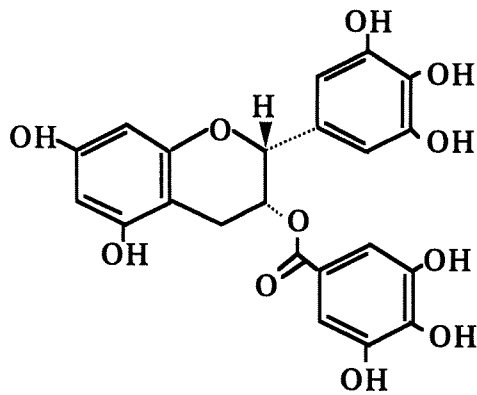
よび EGCg の培養系での HAM 患者の末梢血 T 細胞のアポトーシスは HTLV-I 感染細胞と思われる T 細胞に選択的に起こり、反応性 T 細胞 (おそらく CTL) のアポトーシスは著明ではなかった (図 3)。さらに、これらのアポトーシス発現系で HTLV-I pX 遺伝子発現抑制効果がみられ (図 4、5)、細胞増殖抑制/アポトーシス/HTLV-I pX 遺伝子発現抑制の一連の効果が作動しているのではないかと推察された。

今後の課題として、TEA および EGCg が作用する HTLV-I 感染 T 細胞の標的分子 (群) を同定し、それぞれの相互作用を明らかにすることが緑茶ポリフェノール成分の薬効の解明につながるとと思われる。

文 献

1. Ruch RJ, Cheng SJ and Klaunig JE. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis* 10:1003-8 (1989).
2. Leanderson P, Faresjo AO and Tagesson C. Green tea polyphenols inhibit oxidant-induced DNA strand breakage in cultured lung cells. *Free Radic Biol. Med.*, 23: 235-42 (1997).
3. Nakane H and Ono K. Differential inhibitory effects of some catechin derivatives on the activities of human immunodeficiency virus reverse transcriptase and cellular deoxyribonucleic and ribonucleic acid polymerases. *Biochemistry* 29: 2841-5 (1990).
4. Moore PS and Pizza C. Observations on the inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by catechins. *Biochem. J.*, 288 : 717-9 (1992).
5. Nakayama M, Suzuki K, Toda M, Okubo S, Hara Y and Shimamura T. Inhibition of the infectivity of influenza virus by tea polyphenols. *Antiviral Res.* 21: 289-99 (1993).

6. Ahmad N, Feyes DK, Nieminen AL, Agarwal R and Mukhtar H. Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate and induction of apoptosis and cell cycle arrest in human carcinoma cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 89: 1881-6 (1997).



(-)-Epigallocatechin gallate (EGCg)

図1 緑茶ポリフェノール主要成分の構造式

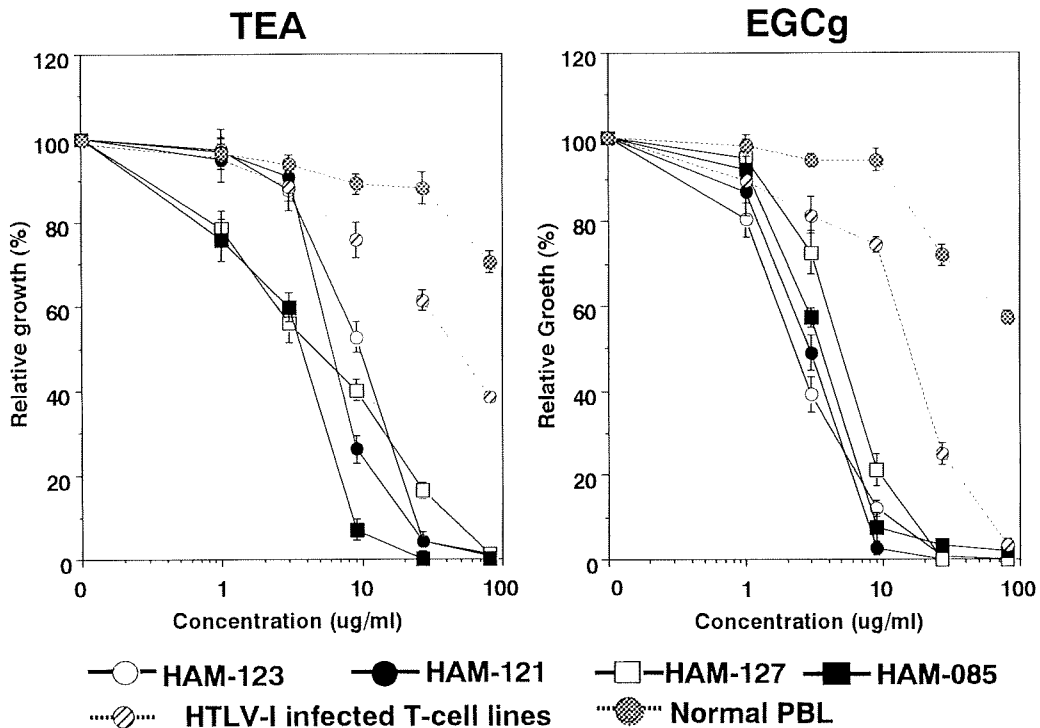
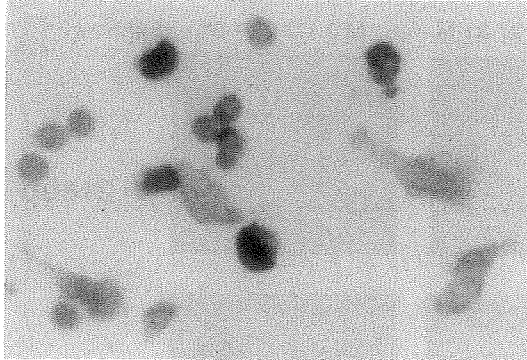
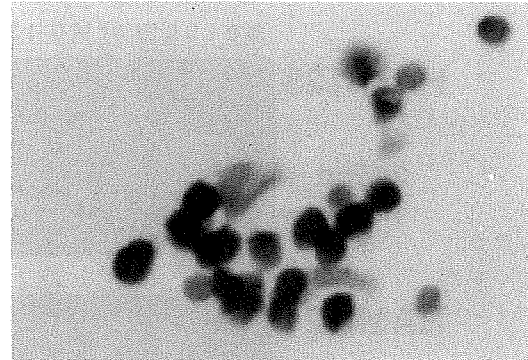


図2 HAM患者末梢血リンパ球に対する緑茶ポリフェノール成分の細胞増殖抑制効果

TUNEL陽性細胞 (HAM-123)



0 μg/ml



9 μg/ml

Concentration of TEA

図3 緑茶ポリフェノール成分のアポトーシス誘導効果

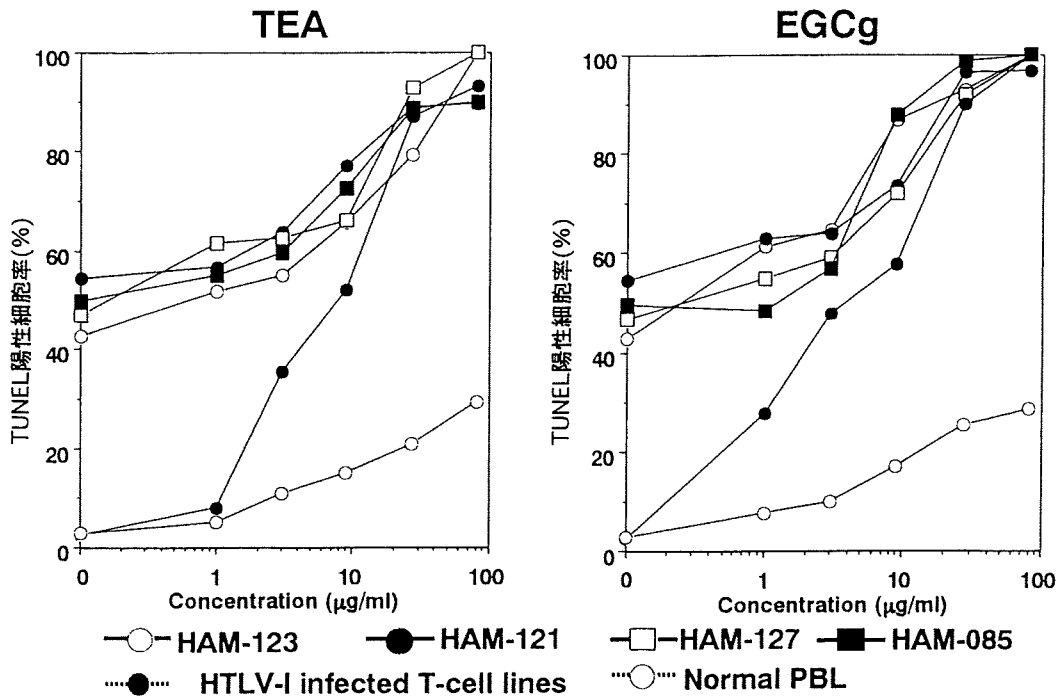


図4 緑茶ポリフェノール成分のアポトーシス誘導作用UNEL陽性細胞率

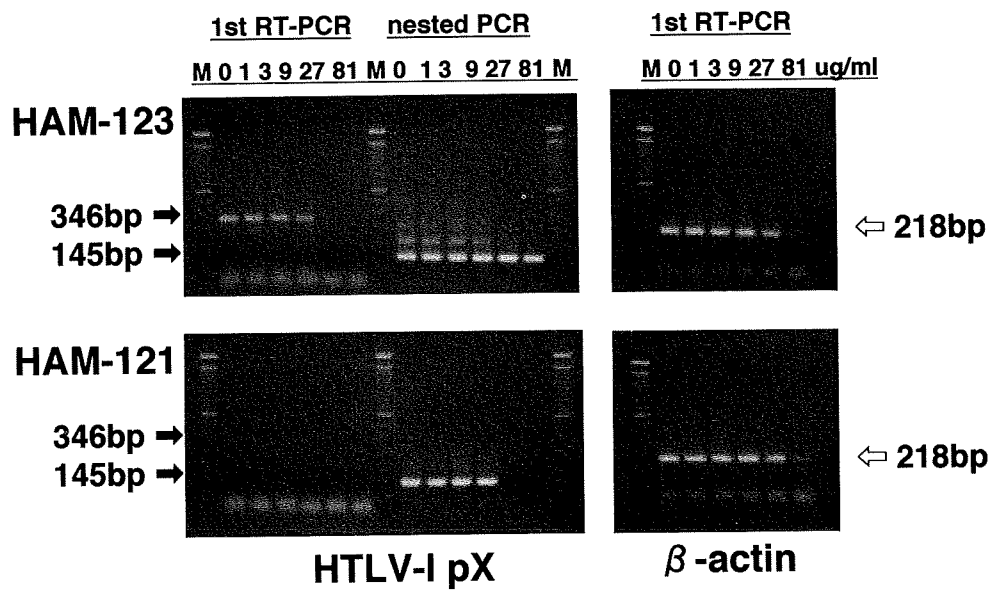


図5 緑茶成分 (TEA)のHTLV-I pX mRNA発現に及ぼす効果

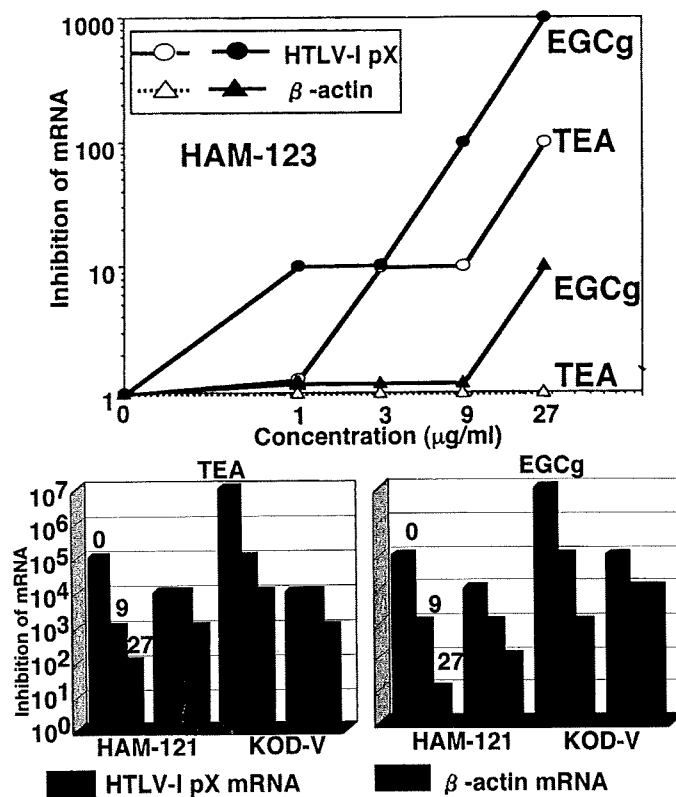


図5 緑茶成分のHTLV-I pX mRNA発現抑制効果

Guillain-Barré症候群全国疫学調査 第一次アンケート調査の結果報告

斎藤 豊和 有村 公良* 納 光弘*

目的

近年、Guillain-Barré症候群（GBS）領域では *campylobacter jejuni* 感染による発症、軸索型などの variant form の存在、静脈内免疫グロブリン (IVIg) 療法の開発などの新知見が数多く得られつつある。このような状況下で、本邦のGBSの情報を収集し、分析することは極めて重要である。GBSは米国、西欧等ではすでに大規模な疫学調査が実施されているが、本邦での全国規模の調査はなく、僅かに本研究班の一部で軸索型の疫学の報告があるにすぎない。本邦におけるGBSの実態を把握することを目的として、本調査を行なった。

対象及び方法

神経内科を含む内科、小児科、老年科の診療科を有し、200以上の病床を持つ全国4,350の医療機関を対象とした。第一次アンケート調査内容を記した往復葉書を郵送し、発送1.5ヶ月後に回収し、内容を分析した。GBSは平成5年3月から平成10年2月までの過去5年間の症例数、年次別症例数、年齢層（15歳以下、16歳から64歳、65歳以上）、季節別発症数（春；3月～5月、夏；6月～8月、秋；9月～11月、冬；12月～2月）、前駆症状（下痢、上気道感染、その他）を調査内容とした。

結果

対象医療機関4,350施設のうち、返信のあったのは1,764施設で、回収率は40.1%であった。GBS症例を有するとした施設は547で、1,764医療機関のうちの31%、全対象医療機関の12%にすぎなかった。過去5年間のGBS発症総数は2,987例であったが、分析上での有効解答数は2,937症例であり、記載不十分な症例が50存在した。年度別のGBS例数は平成5年度458例、平成6年度559例、平成7年度604例、平成8年度572例、平成9年度744例であり（図1）、平成9年度の症例数が他年度に比較し、発症例数が多い傾向にあった。年齢層別では15歳以下326例（男176例、女150例）、16歳から64歳までの症例数は2,221例（男1,362例、女859例）、65歳以上の症例は391例（男203例、女188例）であり、成人に多い結果を得た（図2）。

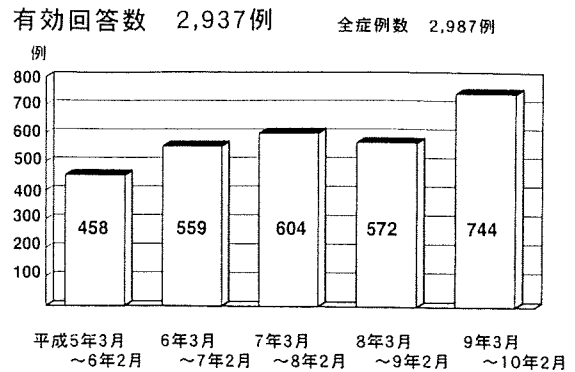


図 1. 年度別発症例数

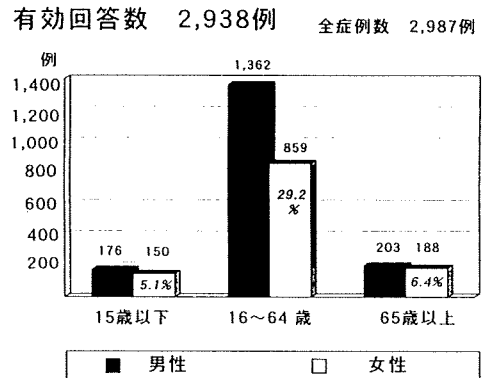


図 2. 年齢層別発症例数

また男女比は約3:2で男子の発症が多かった。全国の地方別における発症数を検討した。総数2,987例で北海道は147例(4.9%)、関東地方での発症例数は968例(32.4%)、中部地方は409例(13.6%)、近畿地方は578例(19.3%)、九州・沖縄地方は329例(11%)であった。季節別の発症例数は有効回答数2,588例中春が726例(28%)、夏657例(25.4%)、秋は519例(20%)、冬は686例(26.5%)で、春、冬、夏、秋の順に多かった。季節別の前駆症状については、記載のない404例を除外しての検討では、下痢を前駆症状とするものは20.6%で、春、夏に多く、一方上気道感染は70%で、春、冬に多かった。特に夏

北里大学東病院神経内科、*鹿児島大学医学部第三内科