

表1 高IgE血症とアレルギー特異的IgEを伴う脊髄炎51例の臨床所見の比較

症状	AD合併 気道アレルギー合併 (n=12)		その他のアレルギー		正IgE血症性脊髄炎 (n=12)
	BA合併 (n=7)	AR合併 (n=5)	合併 (n=3)	合併なし (n=12)	
異常感覚	23	3	5	1	10
感覚鈍麻	10	5	5	3	10
運動麻痺	6	6	3	1	5
膝関節拘縮	1	1	3	1	6
腱反射亢進	18	5	3	0	7
病巣					
頸髄	23	6	4	3	7
胸髄	1	1	1	0	5
脊・髄	0	2	0	0	1

AD: atopic dermatitis
BA: bronchial asthma
AR: allergic rhinitis

動麻痺が強く、腱反射亢進のみの例は1例もなかった。更に、BA 先行群7例中3例は、前角運動ニューロン障害を認めた。この事は、先行するアトピー性疾患と脊髄内における障害部位には一定の関連性があり、後索障害の背景因子としてはADが、側索・前角運動ニューロン障害の背景因子としては気道アレルギーが重要であることを示唆している。

他方、平山病でも有意に気道アレルギーの合併率が有意に高く、全例でダニ特異的IgEが陽性であったことから、背景因子としての気道アレルギーの重要性が示唆された。私どもは既に、脊髄性進行性筋萎縮症でBAの合併が健常対照に比し有意に高いことを見出している⁶⁾。これらの事実からも、前角運動ニューロン障害の背景因子として気道アレルギーが重要であることが示唆される。平山病例で血小板低親和性IgE受容体発現量が増加していたことから、アレルギー特異的IgEにより血小板が凝集・活性化され易い可能性が示唆される。したがって、平山病は機械的因子に加えて、アレルギー機序による血小板活性化が関与した複合的機序により発症する可能性がある。一方、今回の検討では抗神経抗体や抗ガングリ

表2 平山病自験5例の臨床像と免疫学的特徴

症例	1	2	3	4	5	6
発症年齢 (歳)	12	13	15	16	17	17
検査時年齢 (歳)	13	15	22	17	19	18
性別	女	女	男	男	男	男
上肢遠位筋萎縮	右>左	右	右<左	右	右>左	右<左
アレルギー疾患の合併				(-)		
気管支喘息	-	-	-	(-)	-	-
アレルギー性鼻炎 (AR)	-	-	-	-	-	-
アトピー性皮膚炎 (AD)	-	-	-	-	-	-
花粉症 (Po1)	-	-	-	-	-	-
アトピー性皮膚炎 (AD)	-	-	-	-	-	-
アトピー性疾患の家歴	兄: AD 姉: AD	父: Po1 母: Po1	父: AR 兄: AR	父: AR 姉: AR	兄: AD 姉: AD	-
おじ: AR						
末血好酸球 (%)	7.8	7.6	2.7	1.5	6.7	5.2
血清全IgE (IU/ml)	1874	1225	201	2100	150	150
アレルギー特異的IgE (IU/ml)						
ヤケヒョウヒダニ	85.96	>100	9.19	>100	1.52	28.27
コナヒョウヒダニ	90.66	>100	7.75	>100	2.63	20.85
スギ花粉	-	1.53	54.68	0.52	-	-
大豆	-	-	0.38	未施行	-	-
他	-	-	-	未施行	-	-
CD23発現量	32.20%	20.60%	10.6	未施行	12.70	12.40
抗神経抗体	-	-	-	未施行	-	-
抗ガングリオン抗体	-	-	-	未施行	+	-

(-) : 既往歴あるも平山病発症時はなし
+ : 平山病発症時もあり

オン抗体などの自己抗体の関与は明らかではなかった。しかし、発症早期にはこのような自己抗体が関与している可能性もあり、今後は発症早期にこれらの検討を行うことが重要と思われる。

結 論

先行するアトピー性疾患とその後に起こる脊髄障害の分布には一定の関連があり、今後発症にかかわる免疫学的機序の相違を検討する必要がある。

文 献

- 1) Kira J. et al. J Neurol Sci 148:199-203, 1997.
- 2) Kira J. et al. J Neurol Neurosurg Psychiatry 64:676-679, 1998.
- 3) Kira J. et al. J Neurol Sci 162:56-61, 1999.
- 4) Horiuchi I. et al. J Neurol Neurosurg Psychiatry 68:665-668, 2000.
- 5) Kira J. et al. J Neurol Neurosurg Psychiatry (in press).
- 6) 吉良潤一 他. 神経免疫学 8:78-79, 2000.

ガングリオシドは再発寛解型実験的自己免疫性脳脊髄炎を抑制する

関口 幸男^{a)} 市川 元基^{a)} 井上 敦^{c)}
高 昌星^{b)}

目的

Myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide 35-55 (MOG₃₅₋₅₅) をNODマウスに感作することにより慢性再発寛解型の実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)を誘導できる¹⁾。この脳脊髄炎はその神経症状の発症パターンと病理所見が多発性硬化症に似ていることからヒトの炎症性脱髄性疾患の動物実験モデルと考えられている。

ガングリオシドはシアル酸を含んだglycosphingolipidであり、脊椎動物の外細胞膜上に豊富に表出されている。特に中枢神経系細胞ではその含有量が高いことが知られている²⁾³⁾。ガングリオシドの機能は完全には解明されていないが、多彩な生体反応への関与の一つとして免疫調節作用を有することが報告されており、in vitroでガングリオシドがサイトカイン産生とT cell 増殖反応を抑制することが知られている^{4)~11)}。われわれはガングリオシド投与により慢性再発寛解型EAEの発症と症状の抑制が出来るかどうかについて検討した。

方法

- 1)NODマウスをMOG₃₅₋₅₅(100 μg/mouse)とcomplete Freund's adjuvant で感作し、慢性再発寛解型EAEを誘導した。
- 2)ガングリオシド100mg/kgを感作後70日まで腹腔内に連日投与した(Table 1)。
- 3)感作後4週間目に感作抗原特異的遅発型過敏反応(Delayed-type hypersensitivity (DTH) reaction)を検討した。
- 4)感作後2週間毎に血清を採取し、MOG₃₅₋₅₅に対する抗体価をELISA法で検討した。
- 5)感作後2週間目に脾細胞を採取し、MOG₃₅₋₅₅に対するリンパ球増殖反応およびELISPOT法によるサイトカイン(IFN-γ, TNF-α, IL-4, IL-10)産生能を測定した。

- a)信州大学医学部小児科学教室
b)信州大学医学部第三内科学教室
c)長野県立木曽病院内科

Group	Sensitization	Treatment	Number of mice	Duration of Treatment
A	MOG35-55 + CFA	Gangliosides	12	Day 0-70
B	MOG35-55 + CFA	Saline	12	Day 0-70
C	CFA only	Saline	12	Day 0-70

Gangliosides: Purified gangliosides mixture from bovine brain (19% GM1, 40% GD1a, 16% GD1b, 19% GT1b, average MW 1756), generously provided by Fidia Research Laboratories (Abano Terme, Italy) through Eisai Co. (Tokyo, Japan)

Table 1

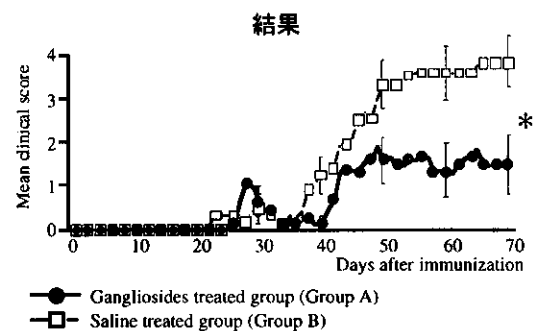


Fig.1 臨床症状経過

- 1)臨床症状：生食投与群では12匹中12匹がEAEを発症し、そのうち7匹が慢性再発寛解型EAEを呈した。他の5匹中の2匹は重症急性型を呈し、残りの3匹は重症慢性型EAEを呈した。ガングリオシド投与群では12匹中10匹で発症したが、重症度スコアは有意に低値であった($p < 0.05$ [repeated measured ANOVA])。発症した10匹中の7匹は慢性再発寛解型EAEであったが、残りの3匹は一過性の神経症状を示すEAEで軽症であった(Fig. 1)。

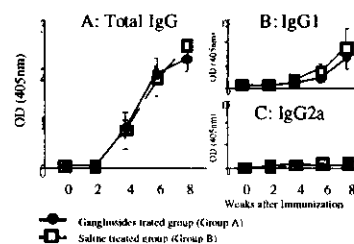


Fig.2 抗MOG35-55抗体価推移

2) 抗MOG₃₅₋₅₅抗体価については、総IgG値、IgG分画ともにガングリオシド投与群とcontrol群に差を認めなかった(Fig.2)。

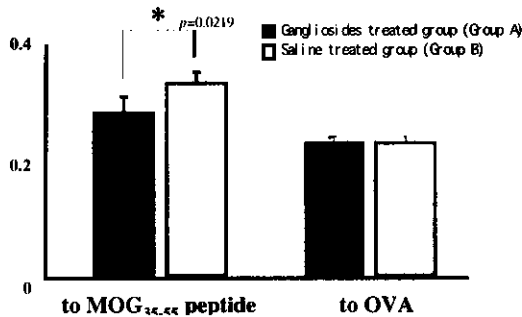


Fig.3 DTH反応

3) DTH反応はガングリオシド投与により有意に抑制された($p=0.0219$, Fig. 3)。

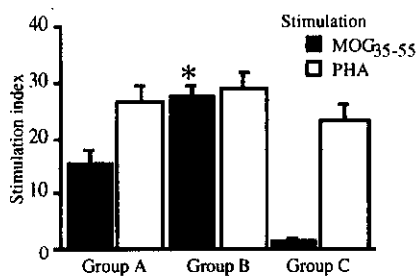


Fig.4 リンパ球増殖反応

4) MOG₃₅₋₅₅に対するリンパ球増殖反応はガングリオシド投与により有意に抑制された($p=0.0392$, Fig. 4)。

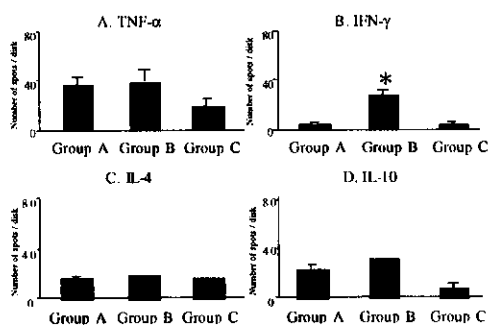


Fig.5 MOG₃₅₋₅₅に対するサイトカイン産生能

5) 脾細胞のサイトカイン産生能はTNF- α 、IL-4、IL-10についてはガングリオシド投与群とcontrol群の間に差を認めなかったが、IFN- γ 産生能はガングリオシド投与により有意に抑制された($p=0.0119$, Fig. 5)。

考察

ガングリオシド投与により、慢性再発寛解型EAEが抑制された。これまで我々が報告してきたガングリオシドによるMBPにより誘導されたEAEの抑制¹²⁾、および Theiler's murine encephalomyelitis virus-induced demyelinating disease (TMEV-IDD: chronic progressive paralysis with demyelinating CNS inflammatory disease) の抑制¹³⁾の結果と合わせて、ガングリオシドによる中枢神経系での免疫反応抑制効果がさらに明らかになった。最近、Iraniらはガングリオシドによるrtinoblastoma proteinやNF- κ Bを介するIFN- γ 産生抑制による免疫反応の抑制について報告している¹⁴⁾。ガングリオシドが細胞接着、細胞内シグナルへの影響を持つことも報告されている。慢性再発寛解型EAEにおいてIL-4、IL-10への抑制効果を示さず、かつ抗体産生を抑制せずに、Th1サイトカインであるIFN- γ を抑制することは、ガングリオシドの中枢神経系における免疫反応への防御反応としての機能のみならず、脱髄性疾患に対する治療面からも注目すべき結果と考えられた。

文献

- 1) Bernard, C.C.A., Ichikawa, M., Johns, T.G., Menon, K., Slavin, A., 1997a. Autoantigens in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. In: Abramsky, O., Ovadia, H. (Ed.), *Frontiers in Multiple Sclerosis: Clinical Research and Therapy*, Martin Dunitz, London, pp. 61-70.
- 2) Cochran, F.B., Ledeen, R.W., Yu, R.K., 1982. Gangliosides and proteins in developing chicken brain myelin. *Brain Res.* 282, 27-32.
- 3) Stults, C.L., Sweeley, C.C., Macher, B.A., 1989. Glycosphingolipids: structure, biological source, and properties. *Method Enzymol.* 179, 167-214.
- 4) Cheresch, D.A., Pierschbacher, M.D., Herzig, M.A., Mujoo, K., 1986. Disialogangliosides GD2 and GD3 are involved in the attachment of human melanoma and neuroblastoma cells to extracellular matrix proteins. *J. Cell Biol.* 102, 688-696
- 5) Momoi, T., 1986. Activation of protein kinase C by ganglioside GM3 in the presence of calcium and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 138, 865-871.

- 6) Skaper, S.D., Leon, A., Toffano, G., 1989. Ganglioside function in the development and repair of the nervous system. From basic science to clinical application. *Mol. Neurobiol.* 3, 173-199.
- 7) Whisler, R.L., Yates, A.J., 1980. Regulation of lymphocyte responses by human gangliosides. I. Characteristics of inhibitory effects and the induction of impaired activation. *J. Immunol.* 125, 2106-2111.
- 8) Robb, R.J., 1986. The suppressive effect of gangliosides upon IL 2-dependent proliferation as a function of inhibition of IL 2-receptor association. *J. Immunol.* 136, 971-976.
- 9) Offner, H., Thieme, T., Vandenbark, A.A., 1987. Gangliosides induce selective modulation of CD4 from helper T lymphocytes. *J. Immunol.* 139, 3295-3305.
- 10) Chu, J.W., Sharom, F.J., 1993. Gangliosides inhibit T-lymphocyte proliferation by preventing the interaction of interleukin-2 with its cell surface receptors. *Immunology* 79, 10-17.
- 11) Irani, D.N., Lin, K.I., Griffin, D.E., 1996. Brain-derived gangliosides regulate the cytokine production and proliferation of activated T cells. *J. Immunol.* 157, 4333-4340.
- 12) Shimada, K., Koh, C.S., Uemura, K., Yanagisawa, N., 1994. Suppression of experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats by administration of gangliosides. *Cell Immunol.* 154, 231-239.
- 13) Inoue, A., Koh, C.S., Yanagisawa, N., Taketomi, T., Ishihara, Y., 1996. Suppression of Theiler's murine encephalomyelitis virus induced demyelinating disease by administration of gangliosides. *J. Neuroimmunol.* 64, 45-53.
- 14) Irani, D.N., 1998. Brain-derived gangliosides induce cell cycle arrest in a murine T cell line. *J. Neuroimmunol.* 87, 11-16.

ヒトモノクローナル抗体による多発性硬化症の治療

祖父江 元 朝倉 邦彦 河合 邦幸 犬飼 晃 Moses Rodriguez*

目的

我々はTheiler ウイルスを用いた多発性硬化症 (MS) 実験モデルにおいて、モノクローナル抗体による MS の治療の可能性について研究を行ってきた。その結果、髄鞘再生を促進するマウスモノクローナル抗体を作製し、また既存のモノクローナル抗体の中に髄鞘再生を促進するものを見出した。いずれも IgM 抗体でオリゴデンドロサイト特異的な抗原と反応し、自然自己抗体の範疇に属する抗体であることが明かとなった^{1) 2) 3)}。また、自然自己抗体を用いた MS 治療の可能性を検証するため、健常人の血清プールより自然自己抗体を多く含む IgM のみを精製し、Theiler ウイルスを用いた MS 実験モデルにおいて、ポリクローナルヒト IgM が髄鞘再生促進能があることを示した⁴⁾。これらの結果を踏まえて、今回はヒトモノクローナル抗体で髄鞘再生が促進されるかどうかを検討した。

方法

高 IgM 血症をきたす Waldenström macroglobulinemia 患者 52 例の血清よりそれぞれ IgM を精製し、また、高 IgG 血症をきたす多発性骨髄腫患者 50 例の血清よりそれぞれ IgG を精製した。これらの抗体の反応性をラット小脳培養切片および培養ラットオリゴデンドロサイトを用いた免疫染色によりスクリーニングした。脳内に Theiler ウイルスを播種した SJL/J マウス (感染後 5 ~ 6 ケ月) に、精製したスクリーニング陽性の抗体をそれぞれ 0.5mg 腹腔内に 1 回投与した。さらに、対照としてスクリーニングにて陰性の抗体とリン酸緩衝液 (PBS) を投与した。投与より 5 週後に、灌流固定し全脊髄を摘出した。脊髄連続横断切片を作製し、脊髄白質内の脱髄病変およびオリゴデンドロサイトによる髄鞘再生を定量的に解析した。また、これらの抗体が Theiler ウイルスの殻蛋白と反応するかどうかを、ウエスタン・ブロットにより検討した。さらに、これらの抗体の抗原特異性を ELISA により検討した。

結果

(1) スクリーニング

ラット培養小脳切片および培養オリゴデンドロサイトを用いた免疫染色では、多発性骨髄腫患者より得られたヒト IgG 抗体は 50 例すべてがスクリーニング陰性であった。一方、ヒト IgM 抗体は 52 例中 6 例で培養小脳切片による免疫染色で陽性であった。この 6 つのヒト IgM 抗体のうち、3 つの抗体がオリゴデンドロサイト表面を染色した。

(2) 抗体投与による髄鞘再生 (表 1)

ラット培養小脳切片および培養オリゴデンドロサイトを用いたスクリーニングのいずれでも陽性であった 3 つのヒト IgM 抗体を精製し、Theiler ウイルスを感染させた脱髄マウスに投与した。スクリーニング陽性のヒト IgM 投与群のうち、2 つの抗体で対照 IgM 投与群および PBS 投与群に比較して有意な髄鞘再生の増加が認められた ($p < 0.01 \sim 0.05$)。もう 1 つのヒト IgM 投与群では、対照 IgM 投与群および PBS 投与群に比べて有意差は認めなかった。

(3) ウエスタン・ブロット, ELISA

調べたいずれの抗体もウエスタン・ブロットおよび ELISA において、Theiler ウイルス由来のどの殻蛋白とも反応せず、ウイルス中和作用も認めなかったことから、Theiler ウイルスの複製に影響を及ぼさないと考えられた。蛋白自己抗原やハプテンを用いた ELISA では、いずれの IgM 抗体もほとんど反応性を示さず、スクリーニングにて陰性の対照 IgM 抗体は調べた抗原とはまったく反応しなかった。

考察

健常成人血清プールより分離したポリクローナルヒト IgM が、Theiler ウイルスを用いた MS 実験モデルにおいて髄鞘再生を促進することを既に報告しているが、ヒト IgM 抗体の中に髄鞘再生を促進するモノクローナル抗体が存在することが示された。また、培養小脳切片、培養オリゴデンドロサイトと反応する IgM 抗体が髄鞘再生を促進することから、中枢神経系自己抗原に反応する自然自己抗体は髄鞘再生を促進するという仮説を支持する

名古屋大学医学部神経内科

*メイヨークリニック神経内科

表 1. *Enhancement of CNS remyelination by human monoclonal IgM*

Treatment	No. of mice	Area of white matter (mm ²)	Area of demyelinated lesion (mm ²)	Area of CNS-type remyelination (mm ²)	Area of CNS-type remyelination/area of lesions (%)
Human IgM #14	7	11.01 ± 0.60	1.13 ± 0.18	0.08 ± 0.03	8.4 ± 2.6
Human IgM #22	8	10.55 ± 0.41	1.16 ± 0.22	0.19 ± 0.05	17.1 ± 3.4
Human IgM #46	5	9.44 ± 0.36	0.66 ± 0.06	0.18 ± 0.04	27.1 ± 4.0
Control IgM #1	5	9.74 ± 0.62	0.72 ± 0.08	0.07 ± 0.02	9.7 ± 1.6
Control IgM #2	4	9.72 ± 1.99	0.69 ± 0.11	0.04 ± 0.01	7.0 ± 3.3
PBS	6	7.39 ± 0.60	0.82 ± 0.19	0.06 ± 0.01	7.4 ± 4.0

All IgM monoclonal antibodies were obtained from patients with Waldenström macroglobulinemia. Values represent the mean ± SEM. Statistics by one-way ANOVA of the percent area of CNS-type remyelination/area of lesions in mice treated with human IgM #22 and #46 compared to mice treated with isotype control or PBS revealed $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.

ものと考えられた。

結 論

現在ガンマグロブリン製剤によるMS治療が試みられているが、今回の結果から、ヒトIgMモノクローナル抗体によるMS治療の可能性が示された。

文 献

- 1) Asakura K, Miller D.J. et al. Oligodendrocyte-reactive monoclonal antibodies, O1, O4, and HNK-1 are encoded by germline immunoglobulin genes. *Mol. Brain Res.* 154: 2460-2469, 1995
- 2) Asakura K, Pogulis R.J. et al. A monoclonal autoantibody which promotes central nervous system remyelination is highly polyreactive to multiple known and novel antigens. *J. Neuroimmunol.* 65:11-19, 1996
- 3) Asakura K, Miller D.J. et al. Targeting of IgMκ antibodies to oligodendrocytes promotes central nervous system remyelination. *J Neurosci* 18:7700-7708, 1998.
- 4) Warrington A.E, Asakura K. et al. Human monoclonal antibodies reactive to oligodendrocytes promote remyelination in a model of multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:6820-6825, 2000

日本赤十字献血 HTLV-I 陽性者における HTLV-I 関連疾患の解析

古川 良尚¹⁾、久保田 龍二、榮樂 信隆、宇宿 功市郎、納 光弘

目 的

HTLV-I は ATL のみならず HAM/TSP などの神経疾患の発症にもかかわるウイルスである。1999 年 4 月より鹿児島県では日本赤十字(日赤)献血の際、HTLV-I 抗体陽性であった場合希望者に通知している。通知された HTLV-I 感染者に対して各地区の保健所、医療機関が相談に応じている。鹿児島大学第 3 内科にも多数受診があり、HAM・ATL などの前病変の頻度、患者との差を明らかにする目的で、臨床所見・検査値を調べた。

対 象

日赤にて献血後 HTLV-I 陽性であることを通知され、1999 年 5 月 19 日～2000 年 12 月 1 日までに鹿児島大学第 3 内科を受診した 100 症例(男性 57 症例、女性 43 症例)、およびその家族の受診者 13 症例(内 5 症例は HTLV-I 感染者)。また受診はしなかったが、受診者の配偶者 12 名についても HTLV-I 感染の有無が聴取できた。

方 法

献血者について家族歴・既往歴を聴取し、診察を希望した 97 症例については腱反射・病的反射の有無・一日尿回数・夜間尿回数・末梢血白血球数(リンパ球の%; 異常リンパ球の%)、CD4、CD8、LDH を調べた。また研究目的での採血に同意の得られた 88 症例については更に HTLV-I provirus 量・HTLV-I tax の subgroup、HLA-A*02 の有無についても調べた。

結 果・考 察

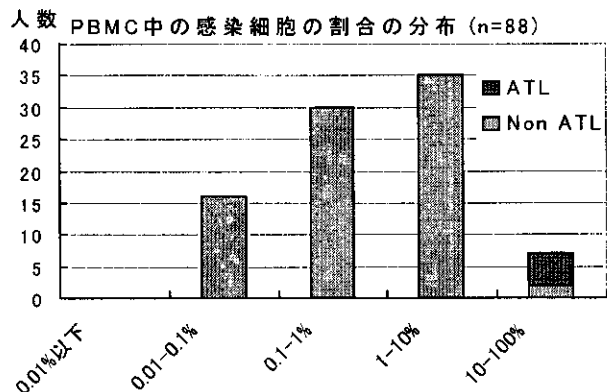
[対象症例の背景について]

平均年齢は 45 才。父母または兄弟に ATL の家族歴を 6 症例に認めた。また ATL とは確定診断されていないが悪性リンパ腫の家族歴を 2 症例に認めた。兄弟に HAM の家族歴を 1 症例に認めた。一般採血における検査結果では、白血球数、リンパ球の割合、CD4、CD8、CD4/8 比については平均としては特に一定の傾向を認めなかった。

図 1 に HTLV-I provirus load の分布を示す。解析した

88 例の HTLV-I プロウイルス量の Median 値は 0.84%(100PBMC 中 0.84 個)、平均の provirus load は 3.8%。これは我々が以前報告した一般のキャリアーでの Median load 0.34%、平均 1.2%¹⁾よりも多少高い。(因みに HAM では 5.44%、7.98%、HAM の血縁家族では 3.21%、4.96%) ATL の家族や何らかの症状の既往のあるキャリアーが混じっている為かも知れない。

図 1.



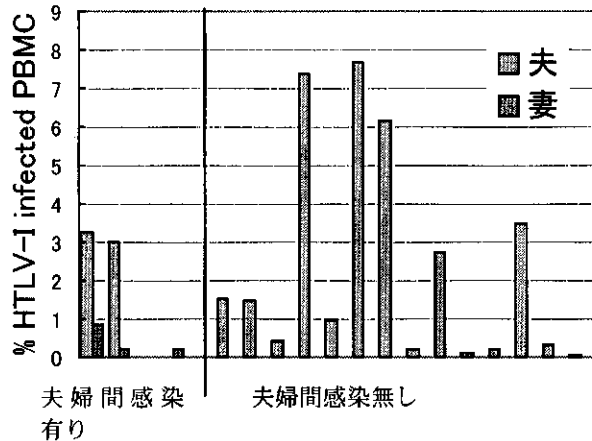
[夫から妻への感染率について]

性交渉による感染ではこれまで沖縄県八重山地方での研究より 10 年あたり夫から妻への感染が 60%におけると報告されている²⁾。当キャリアー外来での配偶者での HTLV-I 感染状況(夫が陽性だった場合の妻の感染状況)は 19 家族で調べられ、19 家族中妻の感染は 5 家族(26%)で見られた。夫の平均年齢は 43.5 才で殆どの症例は結婚後 10 年は経っていた。また夫の平均年齢は妻が HTLV-I 陽性である 5 例で平均 46.4 才、妻が HTLV-I 陰性である 14 例で 42.4 才で結婚後の年数とともに感染率が上昇する可能性もあるが 10 年間で夫から妻への感染率は報告されているよりも鹿児島では低いものと思われた。この差が何によるものかは不明だが、virus の subgroup が違う事が影響するかも知れない。HAM では夫が HAM であった場合、9 家族全例で妻が

¹⁾鹿児島大学医学部第 3 内科

HTLV-I 陽性であったので夫の provirus 量が多い方が妻の感染率が高いかどうか検討した。妻に感染のある夫の virus load は 2 例でのみ調べられ 3.15% で、妻へ感染のない場合は 14 例で load が測定でき平均 2.34% であった。しかしながら必ずしも夫の virus load が高ければ妻が感染しているという訳ではなかった。(図 2)

図 2. 夫婦間感染あり (左: n=2) となし (右: n=14) での夫の HTLV-I プロウイルス量



[Symptomatic Carrier について]

明らかな HAM の発症例はなく、慢性型の ATL を 1 例に、くすぶり型 ATL を 4 例に認めた。(これらの症例を除いた Median load 0.82%, 平均ウイルス 2.3%)。注目される事としてブドウ膜炎の既往を 4 症例に認めた。HTLV-I の関連したブドウ膜炎の有病率は筑後地方では HTLV-I キャリアー 10 万人当たり 112 で約 1000 人に一人であり³⁾ 鹿児島でも HTLV-I キャリアー 1000 人から 2000 人に一人と報告されている⁴⁾。我々は 100 人中 4 例にブドウ膜炎の既往を認め、HTLV-I の関連したぶどう膜炎は一過性に出現し短期間で軽快する例が多いと推測された。**腱反射について** 上肢の 2+以上の反射亢進を 7/97 例に認め、下肢では 2+以上の反射亢進を 20/96 例に認め、内 3+以上の亢進を 2/96 例に認めた。病的反射は認めなかった。就寝後起床までに 2 回以上排尿のある症例を 4/97 例認めた。HTLV-I キャリアーで下肢の反射が亢進する人が多いかという事については、他疾患合併の否定もできていないし、HTLV-I 非感染者における下肢の反射亢進の頻度との比較がないので結論できないが、外国では血液センターの HTLV-I キャリアーの 11.2% に hyper reflexia を認め、非感染者では 4.8% に認めたという報告がある⁵⁾ ので HTLV-I 感染者には考えているよりも高率に HAM の前段階の病態が存在する可能性がある。

ATL の家族歴の有無と Virus load について ATL の家族歴のある受診者は provirus 量が多い傾向を認め、遺伝的背景の存在が示唆されたが症例数が少なくまたバラ

ツキも大きいため有意差はなかった。

[HTLV-I tax の subgroup について]

今年の班会議で tax subgroup A のほうが HAM に多く見られる事を報告した⁶⁾。今回のキャリアー外来 88 例では subgroup A を 5 例 (5.7%)、subgroup B を 83 例 (94.3%) 認め、以前解析したキャリアーと同様な結果で、これまでの報告例と併せて解析すると tax A をもつ事による HAM 発症のオッズ比は 2.66 で有意に (p=0.0019) 危険因子となっている事が再確認された。(表 1.)

表 1. tax A の有無による HAM のオッズ比

HAM/TSP, No.		HCs, No.		χ^2	P	Odds 比
tax A	tax B	tax A	tax B			
34	208	17	277	9.6	0.0019	2.66
Confidence interval, 95% 1.45-4.90						

[HLA-A*02 について]

HLA-A*02 については今回のキャリアー外来での頻度は 40% で、キャリアー全体では HLA-A*02 は 45%、HAM 全体では 27% で、これまで報告した症例とまとめて解析すると HLA-A*02 の有無による HAM 発症のオッズ比は 0.46 で HLA-A*02 を持つことは有意に (p=0.0001) HAM 発症のリスクを下げていた。(表 2.)

表 2. HLA-A*02 の有無による HAM のオッズ比

HAM/TSP, No.		HCs, No.		χ^2	P	Odds 比
A*02+	A*02-	A*02+	A*02-			
49	132	114	142	13.1	0.0001	0.46
Confidence interval, 95% 0.31-0.70						

まとめ

1. 鹿児島での HTLV-I の夫婦間感染は 26% 以下で従来の報告 (10 年間で夫から妻へ 60%) より低い。
2. ブドウ膜炎の既往歴を 4% に認め、HTLV-I との関連が再度示唆されるとともに、罹患率が高く、罹病期間が短い事が示唆された。
3. 下肢深部腱反射の亢進しているキャリアーを 20% 程度認めた。
4. HTLV-I tax A は HAM のオッズを上げる。
5. HLA-A*02 は HAM のオッズを下げる。

文 献

- 1) 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. J. Neurovirol. 4:586-593. 1998.

- 2) Kajiyama, W. Kashiwagi, S. Ikematsu, H. Hayashi, J. Nomura, H. Okochi, K. Intrafamilial Transmission of Adult T cell leukemia virus. *J. Infect. Dis.* 154:851-857. 1986.
- 3) 池田 英子、小野 綾子、疋田 直文、有馬 加津子、望月 学、山口 一成、田島 和雄、清川 博之. 福岡県筑後地方における HTLV-I ぶどう膜炎の推定有病率. *日眼会誌.* 102:327-332. 1998.
- 4) 中尾 久美子、大庭 紀雄. 鹿児島県における内因性ぶどう膜炎の実態. *日眼会誌.* 100:150-155. 1996.
- 5) Murphy, EL. Glynn, SA. Fridey, J. Sacher, RA. Smith, JW. Wright, DJ. Newman, B. Gibble, JW. Ameti, DI. Nass, CC. Schreiber, GB. Nemo, GJ. Increased prevalence of infectious diseases and other adverse outcomes in human T lymphotropic virus type I and II infected blood donors. *J. Infect. Dis.* 176: 1468-1475. 1997.
- 6) Furukawa, Y. Yamashita, M. Usuku, K. Izumo, S. Nakagawa, M. Osame, M. Phylogenetic subgroups of human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) in the *tax* gene and their association with different risks for HTLV-I-associated myelopathy/ tropical spastic paraparesis. *J. Infect. Dis.* 182:1343-1349. 2000.

HAM 脊髄における Fas/FasL の発現

梅原藤雄 伊藤香世子 道園久美子 阿部真由美 納 光弘

目 的

HTLV-I 感染患者末梢血中には HTLV-I 特異的 CD8 陽性 CTL が存在し、virus の clearance に重要な役割を果たしている可能性が指摘されており(1)、実際 HAM 脊髄の活動性炎症部位には細胞傷害性蛋白を有する CD8 陽性 CTL が浸潤していることが確認されている(2)。CTL は標的細胞にアポトーシスによる細胞死を誘導するが、これには perforin/granzyme/TIA-1 等の細胞傷害性蛋白を介する系と、Fas/FasL ligand (以下 FasL) を介する系の 2 種類がある。Fas/FasL システムが HAM の病態に関与している可能性は以前から指摘されており、例えば HAM 患者末梢血および髄液中で soluble Fas が増加していること(3)、末梢血リンパ球で FasL mRNA が発現していること(4)、急性進行型 HAM 髄液中 soluble FasL が増加している(5)ことが報告されている。また in vitro において、Tax は感染リンパ球における FasL gene の転写を誘導する(6)ことや、Fas によるアポトーシスに対して抵抗性を誘導する(7)ことも知られている。今回我々は、脊髄局所における Fas/FasL の発現の意義について検討した。

対 象

HAM、その他の神経疾患、非神経疾患から得られた剖検脊髄パラフィン包埋切片(表 1)を用いて免疫組織化学(ABC法)にて Fas、FasL の発現を検討した。抗体はモノクローナル抗 Fas 抗体(Novo castra, GM30)、モノクローナル抗 FasL 抗体(Novo castra, 5D1)を使用した。二重染色は、いったん上記の方法で染色した後、ポリクローナル抗 CD3 抗体、ポリクローナル抗 GFAP 抗体、ビオチン化 RCA-1 レクチンを反応させ、Streptoavidin-rhodamine による蛍光染色を行なった。さらに、凍結脊髄サンプルを用いて、RT-PCR で mRNA の発現を確認した。用いた primer は FasL (Forward 5'-CTGGGGATGTTTCAGCTCTTC-3', Reverse:5'-CCTCCATCATCACCAGATCC-3'), Fas (Forward:5'-CACTATTGCTGGAGTCATG-3, Reverse 5'-CTGAGTCACTAGTAATGTCC-3')。

結 果

活動性炎症部位で、免疫組織学的には Fas は血管周囲の浸潤細胞、血管周囲から実質内に浸潤している細胞及び実質内の小血管の内皮細胞にも発現していた。形態的にはこれらはリンパ球様であり、二重染色でもこれらの多くは CD3 陽性でリンパ球であることを確認した。一方、FasL は多数の円形細胞と突起を有するグリア様細胞に発現しており、しばしばこれらの FasL 陽性細胞は apoptotic cell に隣接していた。炎症細胞浸潤が目立たない部位でも、ミクログリアと思われるグリア細胞、及び血管内皮細胞に FasL は発現していた。二重染色で、これらの多くはマクロファージ・ミクログリアのマーカーである RCA-1 lectin 陽性であった。一方、CD3 との二重染色では、FasL 陽性細胞の多くは CD3 陰性であることから、FasL の多くはマクロファージ・ミクログリアと判明した。一方、長期経過例の非活動性炎症部位では、Fas は一部の血管内皮細胞に、FasL はミクログリアに発現しているのみであった。非神経疾患の正常脊髄でも同様の所見であり、FasL は血管内皮細胞、FasL はミクログリアに恒常的に発現していた。これらの発現を定量的に評価すると、HAM 活動性炎症部位では Fas/FasL の発現が亢進していた(表 1)。

活動性炎症部位では、アポトーシス細胞の 63% に Fas が発現しており、この結果は浸潤リンパ球のアポトーシスに Fas/FasL システムが関与していることが示唆している。

RT-PCR では、FasL は HAM 及び対象において全例で発現しており、免疫組織所見から主に microglia、血管内皮細胞に恒常的に発現しているものと推定された。FasL も 1 例を除く全ての症例で発現を確認した。

考 察

HAM 活動性炎症部位では浸潤リンパ球に Fas が発現し、一方 FasL は macrophag/microglia における発現が亢進しており、これは Fas 陽性リンパ球の浸潤に対する防御的役割を果たしている可能性が示唆された。FasL は中枢神経には恒常的に発現し、Immune privilege の維持に関与しているものと思われる。HAM 活動性炎症部位では浸潤した Fas 陽性リンパ球に対して、ミクログリア/

マクロファージは FasL の発現を亢進し、免疫応答の制御を行なっているものと推定される。その他の可能性としては、CTL による HTLV-I 感染細胞への攻撃、及び感染リンパ球自体が CTL に counter attack を起こし、CTL から escape する機序に関与している可能性もある。Fas/FasL システムの機能不全は、ウイルス感染における炎症の遷延化、自己免疫機序に関与していることが実験的に報告されており(8)、HAM の慢性炎症、自己免疫的側面に関与している可能性がある。

文 献

- 1) Jacobson S, Shida H, McFarlin DE, Fauci AS, Koenig S. Circulating CD8+ cytotoxic T lymphocytes specific for HTLV-I pX in patients with HTLV-I associated neurological disease. *Nature* 348:245-248, 1990.
- 2) 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* 53:617-24, 1994.
- 3) Inoue A, Koh CS, Sakai T, et al. Detection of the soluble form of the Fas molecule in patients with multiple sclerosis and human T-lymphotropic virus type I-associated myelopathy. *J Neuroimmunol* 75:141-6, 1997.
- 4) Saito M, Nakamura N, Nagai M, et al. Increased levels of soluble Fas ligand in CSF of rapidly progressive HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Neuroimmunol* 98:221-6, 1998
- 5) Kawahigashi N, Furukawa Y, Saito M, Usuku K, Osame M. Predominant expression of Fas ligand mRNA in CD8+ T lymphocytes in patients with HTLV-I-associated myelopathy. *J Neuroimmunol* 90:199-206, 1998
- 6) Chen X, Zachar V, Zdravkovic M, Guo M, Ebbesen P, Liu X. Role of Fas/Fas ligand pathway in apoptotic cell death induced by the human T cell lymphotropic virus type I Tax transactivator. *J Gen Virol* 78:3277-85, 1997.
- 7) Kishi S, Saijyo S, Arai M, et al. Resistance to Fas-mediated apoptosis of peripheral T cells in human T lymphocyte virus type I (HTLV-I) transgenic mice with autoimmune arthropathy. *J Exp Med* 186:57-64, 1997.
- 8) Zhang HG, Fleck M, Kern ER, et al. Antigen presenting cells expressing Fas ligand down-modulate chronic inflammatory disease in Fas ligand -deficient mice. *J Clin Invest*:105:813-21, 2000.

表 1. Clinical and pathological data

Case No. Age:Sex	Duration of illness	Diagnosis	Cause of death	CNS neuropathology			
				Infl	Myelin loss	Fas*	FasL*
1. 77/M	2.5 yr	HAM/TSP	embolism of femoral A	+++	++	+++	+++
2. 71/F	4.5 yr	HAM/TSP	pneumonia	++	+++	++	+
3. 52/F	8 yr	HAM/TSP	pontine hemorrhage	+	+++*	+	++
5. 73/M	10 yr	HAM/TSP	hepatic failure	±	+	+	+
7. 74/F	14 yr	HAM/TSP	pneumonia	++	+++	+	+
8. 75/F	14 yr	HAM/TSP	pancreas carcinoma	±	+++	+	+
Other neurological disorders							
11. 67/F	2y	ALS	ALS	-	++	±	++
12. 53/M	5y	ALS	ALS	-	++	±	+
14. 77/M	9m	neuropathy	macroglubulinemia	-	++	±	+
15. 62/M	2y	ALS	ALS	-	++	±	+
Non-neurological disorders							
17. 38/F	1y	ATL	ATL	-	-	±	+
18. 67/F	2y	pneumonia	pneumonia	-	-	±	+

* Wallerian degeneration, ATL: adult T cell leukemia, ALS: amyotrophic lateral sclerosis. Infl: inflammation, -negative, ±: slight, +: mild, ++: moderate, +++: marked #Evaluation of βAPP expression is described in materials and methods.

HAM 患者末梢血中 HTLV-I 特異的 CTL の抗原認識はウイルス量とともに変動する

出雲 周二¹⁾、久保田 龍二²⁾、古川 良尚²⁾、宇宿 功市郎³⁾、納 光弘²⁾

目的

HAM 患者では、末梢血中に HTLV-I プロウイルスと HTLV-I 特異的細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) の増加が報告されており、脊髄中には HTLV-I 感染 CD4+細胞と HTLV-I 特異的 CD8+CTL が認められている。これらのことより、HAM では HTLV-I 感染 CD4+細胞と、HTLV-I 特異的 CD8+CTL の免疫反応が発症に深く関与していると考えられている¹⁾。しかしながら、HAM 患者末梢血中の CTL の頻度が高いにもかかわらず、HTLV-I 感染は持続し、高いウイルス量が観察されることより、これらの CTL が生体内で HTLV-I 感染細胞を実際に認識し排除しているのかは不明である²⁾。生体内での HTLV-I と CTL の動態を明らかにするために、今回我々は、HAM 患者の HTLV-I ウイルス量、ウイルス変異、HTLV-I 特異的 CTL の頻度、および CTL 認識の緩さの経時的観察を行った。

対象および方法

HLA-A2 陽性 HAM 患者においては主要なウイルスエピトープは Tax11-19 (LLFGYPVYV) であることが報告されているため、対象を HLA-A2 陽性患者とし、Tax11-19 特異的 CTL について検討を行った³⁾。対象は HLA-A2 陽性 HAM 患者 53 例。Tax11-19 をはじめとした 9 個のアミノ酸からなるペプチドを合成し、HLA-A2 陽性の抗原提示細胞にパルスした。これらの抗原提示細胞と HAM 患者の末梢血単核球 (PBMC) を brefeldin A 存在下に 6 時間培養した。抗原を認識した CTL はインターフェロン- γ (IFN- γ) を産生することが知られている。HTLV-I 特異的 CTL の検出には、培養後の細胞内 IFN- γ を FITC 標識抗体で染色し、flow cytometry で CD8 陽性細胞中の頻度を測定した⁴⁾。HAM 患者 53 例の HTLV-I 特異的 CTL の頻度は平均 2.01% であった。この内、HTLV-I 特異的 CTL の頻度が 2% 以上で、経時的に PBMC を保存してある 3 症例を選択した。この 3 例につき、5-10 年の経過で 1) 定量的 PCR によるウイルス量の測定、2) HTLV-I のシーケンスによる Tax エピトープの変異、3) flow cytometry による HTLV-I 特異的 CTL 頻度

の測定、4) Tax11-19 抗原の T 細胞レセプター (TCR) 結合部位と推定される 4, 5, 6, 8 番目のアミノ酸をアラニンに置換した人工変異抗原 (altered peptide ligand: APL) を合成し、それぞれ G4A, Y5A, P6A, Y8A とした⁵⁾。これらの APL を認識する CTL の頻度を測定し、野生型 Tax11-19 に対する頻度で除して、HTLV-I 特異的 CTL の抗原認識の緩さの観察を行った。

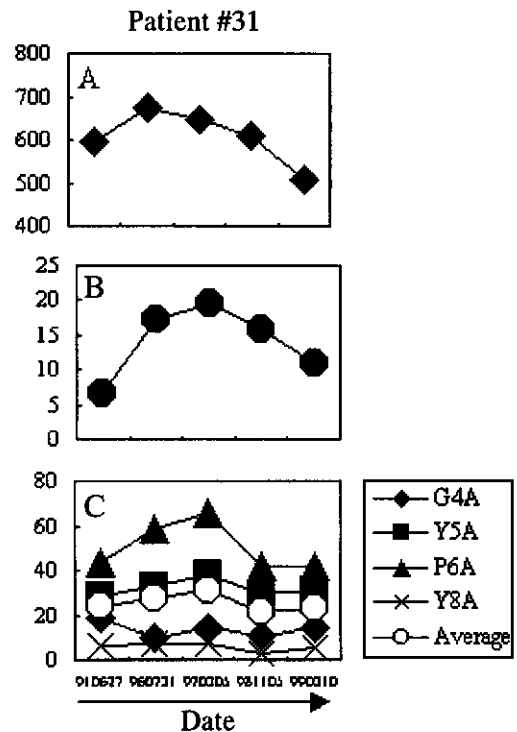


図 1. HAM 患者 #31 における A: プロウイルス量 (copy/10⁴ cells)、B: HTLV-I Tax11-19 特異的 CTL の頻度 (% IFN- γ + / CD8+)、および C: HTLV-I Tax11-19 特異的 CTL の変異抗原に対する抗原認識 (%) の経時的変化。

結果

1) 各症例でウイルス量の変動と、CTL 頻度の変化はよく相関していた (図 1)。2) ウイルス量が増えた時に、

¹⁾ 鹿児島大学医学部難治性ウイルス疾患研究センター

²⁾ 鹿児島大学医学部第 3 内科

³⁾ 鹿児島大学医学部医療情報学

表 1. HAM 3 症例の HTLV-I プロウイルス量、Tax11-19 特異的 CTL の頻度、および CTL の抗原認識の緩さの比較。

Patient	Proviral load (copy/1e4 cells)	CTL frequency (% in CD8+ cells)	CTL diversity (%)
#31	606.0±64.0	14.0±5.1	25.4±18.6
#38	1823.0±303.1	2.7±0.5	7.5±3.8
#48	306.5±240.5	2.7±2.0	52.3±30.1

The numbers indicate mean ± SD. CTL diversity is assessed by the average of relative CTL responses to APLs during the time course.

Tax11-19 由来 APL に対する CTL の認識は緩くなっていた。特にこの変化は、CTL の頻度が高い症例で著明であった (図 1)。3) 3 症例の比較では、2 症例で CTL の頻度がほぼ同じであった。この 2 例においては、CTL の認識が厳密な細胞集団を持つ症例で、ウイルス量が 6 倍高かった (表 1)。4) CTL の抗原に対する avidity は、抗原認識パターンの変化にかかわらず、ほぼ一定であった。5) エピトープの変異率は、CTL の頻度が低い症例の CTL 認識が厳密な時に最大であった。6) Tax11-19 エピトープの変異は、HLA への結合部位より TCR 結合部位付近に集中していた。7) 経過中、特定の変異エピトープの集積は認めなかった。

考 察

1) より、HAM 患者末梢血中の CTL は、生体内の HTLV-I に感作されて増減していることが予想された。2) より、ウイルス量が増加した時に CTL は増加し、その時に認識が緩い細胞群が増加していた。3) より、この抗原認識が緩い CTL は、認識が厳密な CTL よりも、より有効に HTLV-I を減らす可能性があると考えられた。また 5) より、抗原認識が緩い CTL は、より有効に変異ウイルスを排除する可能性がある。一般に急性のウイルス感染症では、最初ウイルス特異的 CTL の TCR は多様化しているが、感染後期にはこの多様性は減少することが知られている。慢性感染症である HTLV-I 感染においては、経過中のウイルス量の増大に伴い、ウイルス特異的 CTL の抗原認識は多様化し、ウイルス排除により有効に働いている可能性が考えられた。しかしながら、HIV 感染症とは異なり、HTLV-I 感染において特定の変異エピトープの集積は、観察されなかった。このことに加え、HTLV-I 特異的 CTL 反応が高

いにもかかわらず感染が持続していることより、エピトープに変異が無いにもかかわらず、CTL に認識されない感染細胞が存在する可能性がある。HTLV-I プロウイルス量の増加は、主に HTLV-I 感染細胞の増殖によっているという感染形態、および流血中ではほとんどの感染リンパ球がウイルス抗原を発現していないことなどが、この持続感染に影響を与えている可能性が考えられる^{2, 6)}。

ま と め

HAM 患者末梢血において、HTLV-I ウイルス量が増加した時に、HTLV-I 特異的 CTL 頻度の増加のみでなく、抗原認識の多様性の増加も観察された。この CTL の変化は、生体内においてウイルスを排除するのに有利に働いている可能性がある。

文 献

- 1) Jacobson S: Cellular immune responses to HTLV-I: immunopathogenic role in HTLV-I-associated neurologic disease. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 13: S100-S106, 1996.
- 2) Kubota R, et al.: HTLV-I specific IFN- + CD8+ lymphocytes correlate with the proviral load in peripheral blood of infected individuals. *J Neuroimmunol* 102:208-215, 2000.
- 3) Elovaara I, et al.: High human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-specific precursor cytotoxic T lymphocyte frequencies in patients with HTLV-1-associated neurological disease. *J Exp Med* 177:1567-1573, 1993.
- 4) Kubota R, et al.: Demonstration of human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) tax-specific CD8+ lymphocytes directly in peripheral blood of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients by intracellular cytokine detection. *J Immunol* 161: 482-488, 1998.
- 5) Garboczi DN, et al.: Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2. *Nature* 384:134-141, 1996.
- 6) Hanon E, et al.: Abundant tax protein expression in CD4+ T cells infected with human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) is prevented by cytotoxic T lymphocytes. *Blood* 95:1386-1392, 2000.

HAM患者末梢血CD4陽性Tリンパ球におけるetoposide-induced apoptosis に対する抵抗性の検討

中村 龍文¹⁾ 浜崎 真二²⁾ 古屋 孝文²⁾ 川上 純²⁾ 一瀬 克浩²⁾
中島 友紀²⁾ 西浦 義博²⁾ 調 漸²⁾ 江口 勝美²⁾

目 的

HTLV-I associated myelopathy (HAM)の病理像は慢性脊髄炎である(1)。我々はこれまでにHAM発症のトリガーとして高い組織浸潤能を持った末梢血CD4陽性Tリンパ球が重要な役割を果たしている可能性を報告してきた(2, 3)。しかし、慢性脊髄炎という慢性炎症の形成のためには、浸潤したリンパ球は効果を発揮するためには、一定期間組織においてsurviveしておく必要がある。炎症の終息とリンパ球のアポトーシスは密接な関係にあるが、Bcl-2ファミリー(Bcl-xL, Bcl-2など)およびIAPファミリーの一つであるXIAP(X chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein)などの抗アポトーシス蛋白はそのアポトーシスを阻止することは周知の事実である。今回、我々はHAMでの慢性脊髄炎形成におけるCD4陽性Tリンパ球の役割をアポトーシス惹起物質であるetoposideに対する抵抗性と抗アポトーシス蛋白発現との面から検索した。

対 象・方 法

1, 対象：9例のHAM患者(男性；2例，女性；7例，平均年齢；55.2歳)を対象とし，HTLV-Iキャリアー1例を含む他の神経疾患11例(男性；3例，女性；8例，平均年齢；54.9歳)を対照患者とした。

2, 方法：HAM患者および対照患者末梢血単核球よりマグネット・ビーズ法を用い，CD4陽性Tリンパ球を単離し，以下の実験に供した。

1) etoposideによるアポトーシスの誘導：24 well culture plateを用い， 1×10^6 cells/wellを10 μ Mのetoposide存在下および非存在下に36時間培養後，リンパ球を回収，propidium iodideで染色しflow cytometry法にてapoptotic cellとしてのhypodiploid DNA⁺ cellを検出した。etoposideの効果としてのPercent hypodiploid DNA⁺ cellは以下の式によって算出した：Percent hypodiploid DNA⁺ cells = % of hypodiploid DNA⁺ cells in each culture with

etoposide - % of hypodiploid DNA⁺ cells in each culture without etoposide

2) 抗アポトーシス蛋白の検出：CD4陽性Tリンパ球のcell lysateを作成した。一次抗体として抗ヒトBcl-xL, Bcl-2, XIAP抗体を，二次抗体としてペルオキシダーゼラベル抗マウスIgGを用いWestern blotを行ない，chemiluminescence systemにて抗アポトーシス蛋白を検出した。抗アポトーシス蛋白の発現量はNIH-imageにより解析し，internal controlとしてのヒト β -actinの発現量に対する比によって算出しER値として示した：ER = densitometric counts in each anti-apoptotic protein / densitometric counts in each β -actin

3) 統計処理：Mann-Whitney U検定を用いた。

結 果

1, HAM患者末梢血CD4陽性Tリンパ球のetoposideによるアポトーシスの抵抗性：

図1a)に代表例を示す。図に示すようにetoposide処理による末梢血CD4陽性Tリンパ球でのhypodiploid DNA⁺ cellsの出現率はHAM患者では対照患者に比較して低値を示した。図1b)にHAM患者9例，対照患者11例での比較を示す。etoposide処理によるCD4陽性Tリンパ球でのPercent hypodiploid DNA⁺ cellsはHAM患者では対照患者に比較して有意に低値を示した(7.2 \pm 2.5% vs 29.9 \pm 5.9%, p=0.0034)。この事実はHAM患者末梢血CD4陽性Tリンパ球はetoposideで誘導されるアポトーシスに対して抵抗性であることを示している。

2, HAM患者末梢血CD4陽性Tリンパ球における抗アポトーシス蛋白発現の亢進：

図2a)にHAM患者および対照患者それぞれ代表例4症例でのデータを示す。図に示すように末梢血CD4陽性Tリンパ球におけるBcl-xLの発現量のER値はHAM患者では対照患者に比較して高値を示した。図2b)にHAM患者9例，対照患者11例での比較を示す。Bcl-xL発現量のER値はHAM患者では対照患者に比較して有意に高い値を示した(p=0.007)。しかし，Bcl-2およびcaspase-3, -7, -9に対して阻害作用を示すXIAPの発現量について

¹⁾長崎大学・院・感染分子病態学，²⁾長崎大学第一内科

は両群間で有意差は見出されなかった(図省略)。

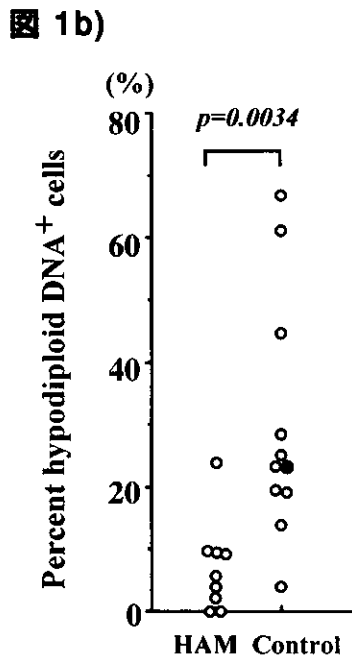
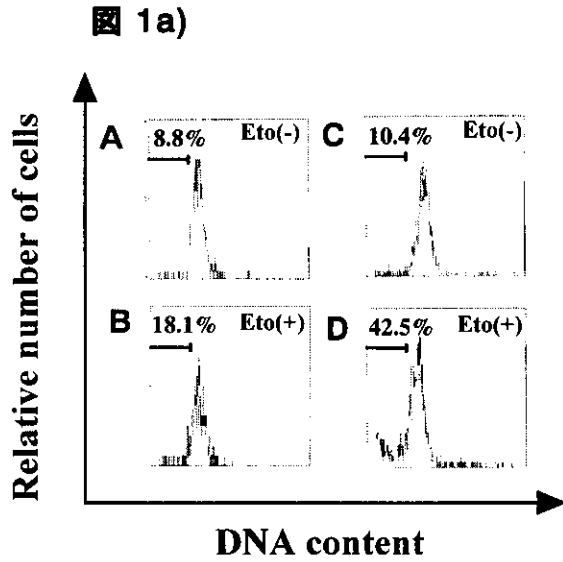


図1. Etoposideで惹起される末梢血CD4陽性Tリンパ球のアポトーシス。

a) 代表例のEtoposide処理(10 μ M)末梢血CD4陽性Tリンパ球におけるhypodiploid DNA⁺ cell出現率のフローサイトメトリーによる解析。Eto(+): etoposide処理, Eto(-): etoposide未処理。A, B: HAM患者, C, D: 対照患者。%はhypodiploid DNA⁺ cell出現率を示している。b) HAMおよび対照患者におけるPercent hypodiploid DNA⁺ cellsの比較。Percent hypodiploid DNA⁺ cellsは対照患者(n=11)に比較してHAM患者(n=9)では有意に低値を示した。

●: HTLV-Iキャリアー

図 2a)

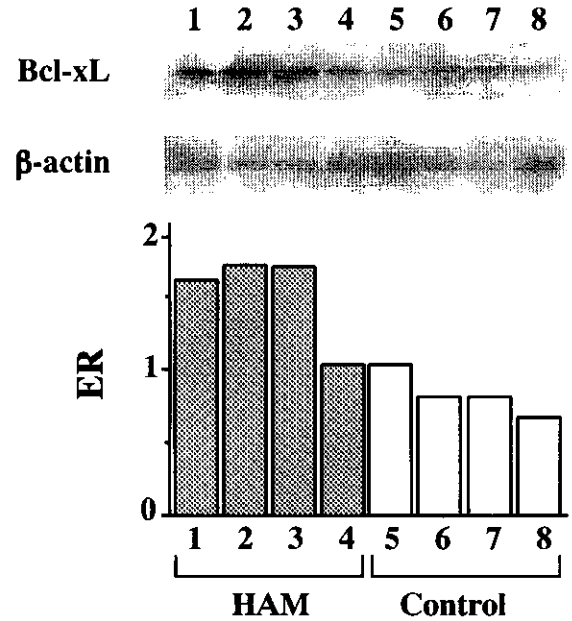


図 2b)

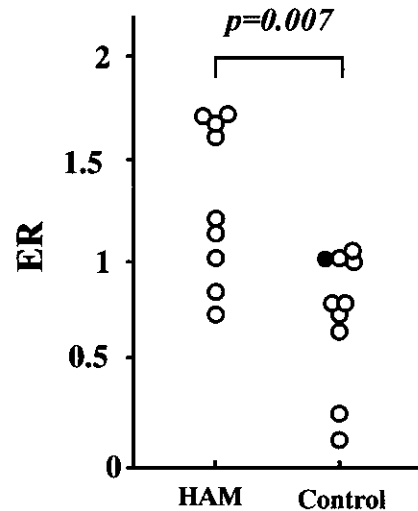


図2. 末梢血CD4陽性Tリンパ球におけるBcl-xL発現のWestern blot解析。

a) HAMおよび対照患者代表例それぞれ4例におけるBcl-xLのWestern blot解析。HAM患者でのBcl-xL発現量は対照患者に比較して高いことがわかる。b) HAMおよび対照患者におけるBcl-xL発現の比較。Bcl-xL発現量は対照患者(n=10)に比較してHAM患者(n=9)では有意に高値を示した。

●: HTLV-Iキャリアー

考 察

生体における細胞死はapoptotic signalとanti-apoptotic signalのバランスによって規定されているが、アポトーシスのプロセスには2つの独立したpathwayが存在する(4, 5)。一つはFasを含むdeath receptorを介したpathwayで、もう一つはetoposideなどの抗癌剤や紫外線などのcellular stressによるミトコンドリアからのチトクロムcの放出によって惹起されるpathwayである。Bcl-2ファミリーはミトコンドリアからのチトクロムcの放出を抑制することによってリンパ球のapoptosisを阻止するといわれている。したがって、HAM患者末梢血CD4陽性Tリンパ球はBcl-2ファミリーの中の一つであるBcl-xLの発現亢進を基盤としてミトコンドリアを介するアポトーシスに対して抵抗性を獲得していると考えられる。TsukaharaらはHTLV-I TaxをtransfectしたT細胞株ではNF- κ Bを介してのBcl-xLの発現がアポトーシスに対する抵抗性に関係していると報告している(6)。したがって、今回我々が示した結果はHAM患者末梢血におけるhigh HTLV-I proviral loadに起因していることが窺える。しかし、これらの事実はhigh HTLV-I proviral loadのみでは説明できない。おそらく、これら現象にはHAM患者末梢血Tリンパ球でのTNF- α などの炎症性サイトカインの発現亢進がHTLV-I非感染細胞に対してもNF- κ Bの活性化を起させていることも関与していると考えられる。

以上、我々はHAM患者末梢血CD4陽性Tリンパ球のアポトーシス誘導に対する抵抗性を報告した。このことが慢性脊髄炎という慢性炎症形成の一因を成していると考えられた。

ま と め

HAM患者末梢血CD4陽性Tリンパ球は抗アポトーシス蛋白の一つであるBcl-xLの発現亢進を基盤として、etoposideによるアポトーシスに対して抵抗性を示すことが明らかにされた。すなわち、HAM患者末梢血CD4陽性Tリンパ球はミトコンドリアを介したアポトーシスの誘導に対して抵抗性を持つことが示された。このことがHTLV-IIによって引き起こされる慢性脊髄炎という慢性炎症の形成において重要な要因の一つになっている可能性を示していると考えられた。

文 献

1) Iwasaki Y : Pathology of chronic myelopathy associated with HTLV-I infection (HAM/TSP). J Neurol Sci 96: 103-123, 1990

2) Nakamura T et al : Importance of immune deviation toward Th1 in the early immunopathogenesis of human T-lymphotropic virus type I-associated myelopathy. Med Hypotheses 54: 777-782, 2000

3) Nakamura T : Immunopathogenesis of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. Ann Med 32: 600-607, 2000

4) Ashkenazi A et al : Death receptors: signaling and modulation. Science 281: 1305-1312, 1998

5) Kroemer G et al : Mitochondrial control of cell death. Nature Med 6: 513-519, 2000

6) Tsukahara T et al : Induction of Bcl-xL expression by human T-cell leukemia virus type 1 tax through NF- κ B in apoptosis-resistant T-cell transfectants with tax. J Virol 73: 7981-7987, 1999

HTLV-I 感染者 PBMC を用いた Tax 発現誘導に伴う感染細胞、HTLV-I 特異的 CTL の表面抗原、サイトカイン動態の解析

宇宿 功市郎¹ 齊藤 峰輝 古川良尚 出雲 周二 納 光弘

目 的

HTLV-I は、ATL や HAM/TSP の原因ウイルスであるが、特に HTLV-I に特異的な転写活性化因子 Tax は、転写因子をはじめとする様々な細胞性因子と相互作用することによって、宿主細胞遺伝子の転写活性化だけでなく、転写の抑制や細胞周期調節など多面的に作用し、細胞のがん化や炎症反応の形成に寄与していることが推定され、ATL や HAM/TSP の発症に密接に関与しているものと考えられている¹⁾。しかし、実際の HTLV-I 感染者の生体内ではウイルスの発現が抑制されているため、培養細胞系を用いて明らかにされた様々な現象が実際に *in vivo* で起こっているかどうかを検証することは容易ではない。すなわち、Tax 蛋白の発現と、それに伴う細胞性因子の発現を同時に、また系統的に検出可能な系があれば、培養細胞系を用いて明らかにされてきた様々な現象について、実際の感染者から得られた臨床検体を用いて直接解析することが可能となる。よって、報告されている Tax の各種細胞性因子に対する効果を、例えば ATL、HAM/TSP 患者と無症候性キャリアーとで直接比較する等の検討により、HTLV-I 関連疾患の病態形成に関するきわめて有用な情報が得られるものと期待される。そこで今回我々は、HTLV-I 感染者の末梢血リンパ球を短時間培養することで Tax の発現をフローサイトメーターで検出する系を確立し、この系を用いて *ex vivo* における Tax の誘導に伴う細胞性因子の動態を解析した。

対象と方法

3 例の HAM/TSP 患者、2 例の無症候性 HTLV-I キャリアー及び 1 例の非感染者コントロールの末梢血より分離したリンパ球 (PBMC) を用いて以下の実験を行った。

1. リンパ球を、RPMI1640-10%FCS で 6 時間培養後、2% Paraformaldehyde を用いて室温で 20 分間固定した。
2. 洗浄後、各種細胞表面マーカーの抗体で染色した。
3. 洗浄後、0.1% の Triton X-100 を含んだ PBS に suspend し、室温で 10 分間細胞膜表面を処理した。
4. 洗浄後、抗 Tax monoclonal 抗体 Lt-4 および FITC ラベルした 2 次抗体で細胞内 Tax 蛋白を染色した。また

、各種細胞内サイトカインの抗体で染色した。

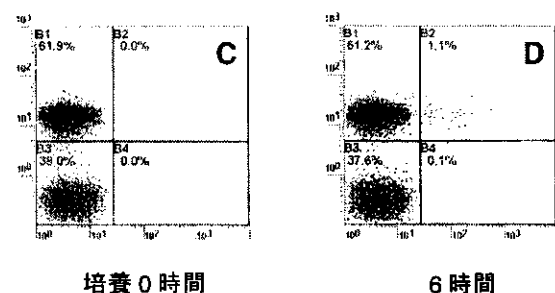
5. 洗浄後、フローサイトメーターで解析した。

今回、細胞表面マーカーは、T 細胞活性化マーカーである CD25、CD69、CD71 について、細胞内サイトカインは、Th1 type サイトカインは IFN- α 及び TNF- α 、Th2 type サイトカインは IL-4 について検討した。

結 果

1. HTLV-I 感染者の PBMC を短時間培養することによって、Tax 蛋白の発現をフローサイトメーターで検出することが可能であった (図 1)。この Tax の発現は、培養開始後 6 時間でピークとなり、以後時間とともに減少し、48 時間後には検出されなかった。また、RT-PCR により mRNA の発現も同様の変化をすることを確認した (data not shown)。
2. この系を用いて、Tax 発現誘導に伴う各種細胞活性化マーカーの動態を検討した。CD25、CD69、CD71 の 3 種の活性化マーカーが Tax 発現に伴って感染細胞内に誘導されるのみならず、非感染細胞にも誘導された (図 2)。
3. Tax 発現誘導に伴う各種細胞内サイトカインの動態を検討した。IFN- γ が Tax 発現後、Tax 発現細胞内に誘導されることを直接示すことができた (図 3)。TNF- α も同様の発現動態を示したが、Th2 type のサイトカインである IL-4 は Tax 発現細胞内には誘導されなかった (data not shown)。

図 1. フローサイトメーターによる Tax 蛋白の検出 (X 軸:Tax, Y 軸:CD4)



6 時間の培養後、一部の CD4 陽性細胞に Tax 蛋白の発現が認められる。

¹ 鹿児島大学医学部医療情報管理学

図 2. Tax 発現に伴う細胞活性化マーカーの発現誘導 (X 軸:Tax, Y 軸:CD69)

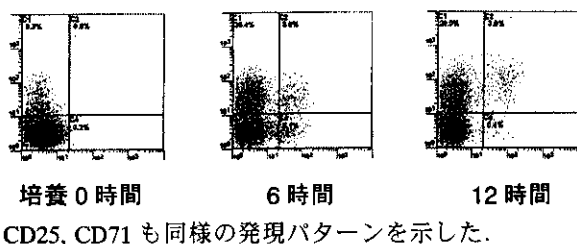
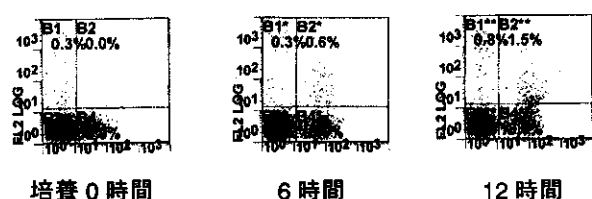


図 3. Tax 発現に伴う細胞内サイトカインの発現誘導 X 軸:Tax, Y 軸:IFN- α



考 察

HTLV-I は HAM/TSP および ATL の原因遺伝子であり、これまでの *in vitro* の実験系を用いた解析から、HTLV-I にコードされる特異的な転写制御因子 Tax が、炎症反応や、細胞がん化の鍵をにぎる遺伝子産物であることが明らかになっている¹⁾。通常、ヒトの疾患においては、発症後の結果を解析することはできても、発症までさかのぼって解析することは困難であるため、ウイルス感染という原因が明らかな HTLV-I 感染症は、ヒトの自己免疫性炎症性疾患や、がんの研究のモデルとして適している。今回われわれが報告した実験系は、HTLV-I Tax と各種細胞性因子を個々の細胞レベルで同時に、また簡便に検出できるため、今後多数の症例において過去に報告された事実を網羅的に解析することが可能であり、非常に有用である。

実際に、図 1 に示すように、6 時間の培養後に Tax 蛋白の発現を HTLV-I の host cell である CD4 細胞内に確認することができた。また、Tax 蛋白の発現に伴って CD25 (低親和性 IL-2 レセプター)、CD69、CD71 (トランスフェリンレセプター) といった T 細胞活性化因子が、Tax 発現細胞内に発現誘導されることが直接示された。これらの活性化因子の出現頻度は HTLV-I 感染者において非感染者コントロールより明らかに高く、とくに HAM/TSP 患者において最大であった (data not shown)。このことは、過去に報告された HAM/TSP 患者におけるいわゆる spontaneous proliferation^{2) 3)} を反映しているものと考えられる。

一方、細胞内サイトカインとの二重染色のデータから

は、Tax 蛋白発現細胞自身が Th1 type のサイトカインを産生することが直接証明された。このことも、過去に報告された、HAM/TSP 患者では CD4+ T cell における IFN- γ 陽性細胞と IL-4 陽性細胞の比 (IFN- γ IL-4 ratio) が高く、免疫状態が Th1 優位になっているとの所見⁴⁾ と矛盾しない。今回の我々の結果は、さらにこの HAM/TSP における Th1 優位な免疫状態が、Tax による Th1 type サイトカインの発現誘導を通じてもたらされる、つまり HTLV-I 感染による直接の効果である可能性を示している。

今後も、今回確立した実験系を用いて細胞内 HTLV-I Tax 発現と各種細胞表面抗原・サイトカインの発現動態を詳細に解析する事で、HTLV-I 感染から HAM/TSP 発症にいたる経過の解明、病態進行の抑制、新治療法開発に向けた研究が推進できるものと考ええる。

ま と め

1. HAM/TSP 患者、無症候性キャリアーの PBMC を短時間培養することで、Tax 蛋白の発現をフローサイトメーターで検出する系を確立した。
2. この系を用いて抗 Tax 抗体と、各種細胞表面抗原、サイトカインの抗体で多重染色し、系時的に HTLV-I 感染細胞、非感染細胞における複数の細胞マーカーの動態を観察した。
3. HAM/TSP 患者、無症候性キャリアーの PBMC において、CD25 等の活性化マーカーが Tax 発現に伴って感染細胞内のみならず、非感染細胞にも誘導された。
4. HTLV-I 感染細胞は Th1 type のサイトカインを誘導した。
5. HAM/TSP 患者において報告されている現象が、Tax の作用によることを個々の細胞レベルで証明した。

文 献

- 1) Yoshida M: Multiple targets of HTLV-1 for dysregulation of host cells. *Seminars in Virology* 7: 349-360, 1996.
- 2) Eiraku N et al: Cell surface phenotype of *in vitro* proliferation lymphocytes in HTLV-I associated myelopathy (HAM/TSP). *J Neuroimmunol* 37: 223-228, 1992
- 3) Itoyama Y et al: Spontaneous proliferation of peripheral blood lymphocytes increased in patients with HTLV-I associated myelopathy. *Neurology* 38: 1302-1307, 1988.
- 4) Horiuchi I et al: Th1 dominance in HAM/TSP and the optico-spinal form of multiple sclerosis versus Th2 dominance in mite antigen-specific IgE myelitis. *J Neurol Sci* 172: 17-24, 2000.

高 VEGF 血症ヌードマウスの病理所見：Crow-Fukase 症候群との対比

有村 公良¹⁾ 橋口 照人¹⁾ 渡嘉敷 崇¹⁾ 梅原 藤雄¹⁾
納 光弘²⁾ 後藤 正道³⁾ 上山 義人³⁾ 中村 雅登³⁾

目 的

Crow-Fukase 症候群において Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) が血清中で著明に増加しており、病態に重要な役割を果たしている可能性をこれまで報告してきた。しかし、VEGF が実際に病態にどのように関与するかを個々の症例で検討することは困難である。そこで VEGF が Crow-Fukase 症候群の病態にどのように関与するかを検討する目的で、VEGF 産生腫瘍を移植後、高 VEGF 血症を来したヌードマウスを作成し、その病理所見を Crow-Fukase 症候群の剖検所見と比較検討した。

方 法

VEGF を産生するヒト glioblastoma multiforme を移植したヌードマウスを (財) 実験動物中央研究所より供与を受け、その腫瘍を BALB/c 背景ヌードマウスの背部皮下に移植した。移植したヌードマウスは 2-3 ヶ月後に麻酔科に屠殺し、血清 VEGF 濃度の測定、循環血漿量の測定を行った。そのうち 3 匹で各臓器の病理標本を作成した。このヌードマウスの病理所見と実際の Crow-Fukase 症候群における病理所見を比較検討する目的で、典型的な症状から臨床的に診断が確定し、鹿児島大学医学部で病理解剖を行った Crow-Fukase 症候群患者 2 例の病理標本を用いた。

結 果

腫瘍を移植したヌードマウスは移植後 2 ヶ月頃より弱り始め、3 ヶ月以内にほとんどが死亡した。2-3 ヶ月の間に測定した血清 VEGF 濃度は 3,000-30,000pm/ml (剖検マウスでは 3550, 3063, 4462) と著明に増加していた。抗 VEGF 抗体を用いた Western blot にて、ヌードマウスの血清中の VEGF isoform は Crow-Fukase 症候群でのものと同じ VEGF165 が優位であった。ヌードマウスでは循環血漿量はコントロールの 2-6 倍に増加し、また剖検時に皮下の浮腫が著明であった。臓器腫大は肝臓(コ

ントロールの 1.3-1.5 倍)、脾臓 (同 1.9-2.7 倍)、腎臓 (1.1-1.3 倍) に見られたが、その他の臓器では肉眼的には明らかな異常は認められなかった。

病理所見 (HE 染色) では、肝臓、脾臓、腎臓に以下のような明らかな病変が認められた。

(肝臓病理所見) (図 1)

1. 肉眼的腫大
2. Sinusoid の著明な拡張と相対的肝細胞の減少 (periosis hepatis)
3. グリソン鞘の変化、肝細胞自体の変性は見られない。
4. 病変が高度になると、肝細胞の軽度萎縮が見られる。

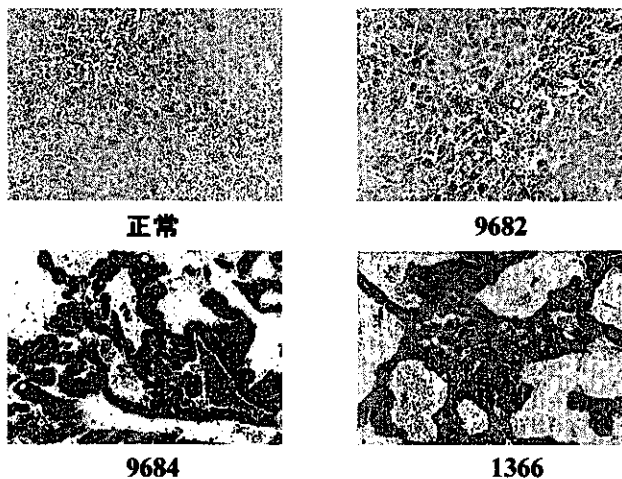


図1. 高 VEGF 血症ヌードマウスの肝臓病理所見

(脾臓病理所見)

1. 肉眼的腫大
2. 血管腔の著明な拡大
3. リンパ濾胞の減少
4. 髄外造血における megakaryocyte の増加

(腎臓病理所見) (図 2)

1. 糸球体の著明な腫大：各糸球体の最大径を測定し、そのヒストグラムを作成して比較した結果、平均および中央値ともに、コントロールに比較して 1.5 ~ 2 倍の腫大が認められた。
2. capillary (とくに糸球体内) の拡大、sinusoid 様に血管内皮細胞の増殖

¹⁾鹿児島大学医学部第三内科

²⁾鹿児島大学医学部第二病理

³⁾東海大学医学部病理学教室

3. Mesangium matrix の増殖

4. 尿細管には変化を認めず、血管炎の所見もない。

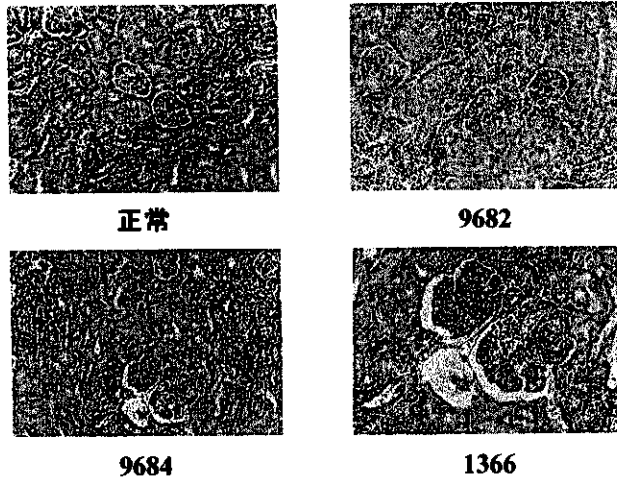


図 2. 高 VEGF 血症ヌードマウスの腎臓病理所見

Crow-Fukase 症候群で臓器の病理所見が最も詳細に報告されている腎病変について PAS 染色, PAM 染色, CD34 トロンボモジュリンに対する抗体による免疫染色を用いて、高 VEGF 血症を伴うヌードマウスと Crow-Fukase 症候群の病理所見の比較検討を行った。その結果両者に共通していたのは腎糸球体の著明な腫大であり、浮腫に伴う毛細血管腔の拡大はヌードマウスで高度であり、一方基底膜の肥厚やメサンギウムの拡大肥厚は患者で高度であった。また患者病理所見では凝固異常に基づくと考えられる血管内皮の高トロンボモジュリン抗体の染色性亢進が明らかであった。

表 1. 高 VEGF 血症ヌードマウスと Crow-Fukase 症候群患者の腎臓病理所見の比較

	nude mouse	patients
腎糸球体の腫大	あり	あり
糸球体毛細血管拡大	著明	軽度
基底膜の肥厚	なし	軽度あり
メサンギウム領域の拡大・肥厚	～軽度	あり
毛細血管内皮の TM 染色性亢進	—	あり

一方、その他の臓器（肺、心臓、脾臓、小腸、脳）には明らかな異常は認められなかった。末梢神経系では坐骨神経で subperineurium に軽度の浮腫が見られるのみで、軸索、髄鞘には異常を認めなかった。

考 察

今回ヒト glioblastoma を移植したヌードマウスはいずれも血清 VEGF 濃度が高値を示し、かつ isoform も VEGF165 であったことより、血清 VEGF が高値を示す Crow-Fukase 症候群の動物モデルの一つとなると思われた。Crow-Fukase 症候群は全身疾患であり、とくに肝脾腫が特徴的であるが、その病理所見の詳細な報告は少ない。今回の比較したヒト剖検所見では肝臓では軽度の sinusoid の拡大が認められたがヌードマウスの所見はより高度であった。脾臓もヌードマウスにおいて異常が高度であった。一方近年腎の病理所見は本邦から生検所見を含めた詳細な病理所見が報告されている。1) その特徴は membranoproliferative glomerulonephritis (MPGN)-like change と呼ばれているが、免疫グロブリンの沈着は 31% に見られるのみで、残りの約 70% は negative であった。その病理所見の詳細な特徴は、glomerular enlargement, cellular proliferation, mesangiolytic, marked swelling of endothelial-mesangial cells である。Nakamoto らの検討では、これらの異常な病理所見を示した 92% で VEGF が高値を示しており、VEGF との関連を強く指摘している。今回のヌードマウスの腎病理所見はこの報告された所見より高度であるものの、基本的には一致しており、VEGF の関与を確認できた。しかし、腎病理所見ではヌードマウスと患者では所見にやや違いが見られたが、今回作成したヌードマウスは体重に比較した血清 VEGF 濃度は著しく高値であり、しかも VEGF の上昇から比較的短期に解剖を行っていることから、VEGF の生理活性の中でも、早く活性が出現しうる血管透過性亢進作用が強く見られ、細胞の増殖活性亢進による所見は軽度にとどまった可能性が考えられる。一方 Crow-Fukase 症候群に必発である末梢神経障害がヌードマウスでは見られなかった。このことは末梢神経障害の発症機序には VEGF 以外の factor が必要なことを示している。ヌードマウスは元来 T 細胞機能が欠落している系であり、このことから末梢神経障害の発症には T 細胞機能が重要である可能性が考えられる。

結 論

高 VEGF 血症を伴うヌードマウスでは Crow-Fukase 症候群で見られる臓器病変と一致する病変が認められたが、末梢神経の病変は認められなかった。

文 献

Nakamoto, Y et al.: A spectrum of clinicopathological features of nephropathy associated with POEMS syndrome. Nephrol Dial Transplant 14:2370-2378, 1999.