

厚生科学研究費補助金
エイズ対策研究事業

平成13年度 研究報告書

研究課題：

HIV等のレトロウイルスによる痴呆や神経障害の
病態と治療に関する研究

平成14年3月

主任研究者 出雲周二

(鹿児島大学医学部 難治性ウイルス疾患研究センター 教授)

厚生科学研究費補助金研究報告書概要

研究費の名称：厚生科学研究費

研究事業名：エイズ対策研究事業

研究課題名：HIV等のレトロウイルスによる痴呆や神経障害の

病態と治療に関する研究

(H-12-エイズ-005)

国庫補助金精算所要額（円）： 38,000,000円

研究期間： 2000年～2002年

研究年度： 2001年度

主任研究者名： 出雲 周二

鹿児島大学医学部 難治性ウイルス疾患研究センター 教授

分担研究者名： 田平 武 国立長寿医療研 センター長
岸田修二 都立駒込病院 内科医長
馬場昌範 鹿児島大学難治ウイルス研 教授
納 光弘 鹿児島大学 教授
宇宿功市郎 鹿児島大学 助教授
斉藤邦明 岐阜大学 講師
高宗暢暁 熊本大学 助手
木戸 博 徳島大学分子酵素研 教授

目 次

総括研究報告書

HIV 等のレトロウイルスによる痴呆や神経障害の病態と治療に関する研究

主任研究者 鹿児島大学医学部難治性ウイルス疾患研究センター 出雲周二

分担研究報告書

1. サルエイズモデルを用いたエイズ脳症の病態機序の解析（第2報）：大脳皮質病変と白質グリア結節は独立の異なる病態として生じている
鹿児島大学医学部難治性ウイルス疾患研究センター 出雲周二、他
2. AIDS dementia complex 治療薬としての TNF- α 阻害剤の評価ならびにその発症メカニズムの解析に有用な TNF- α 欠損骨髄キメラマウスの作成
岐阜大学医学部臨床検査医学 齊藤邦明
3. HIV 脳症の神経障害の臨床・病態に関する研究：「HIV 脳症の臨床・免疫病理学的検討」
東京都立駒込病院神経内科医長 岸田修二
4. HIV 感染に伴う中枢神経障害の髄液診断：14-3-3 蛋白質の EIA 測定法の確立と 14-3-3 蛋白質機能の考察
徳島大学分子酵素学研究センター・酵素分子化学部門 木戸 博、他
5. HIV-1 感染による中枢神経障害に対する治療薬の開発研究
鹿児島大学医学部難治性ウイルス疾患研究センター 馬場昌範
6. HIV 感染細胞が産生する神経細胞致死誘導因子
熊本大学薬学部 高宗暢暁
7. HTLV-I ウイルス量と HAM 発症関連宿主因子の影響について
鹿児島大学医学部医療情報管理学 宇宿功市郎、他
8. HTLV-I キャリアーにおける HTLV-I 関連症状
鹿児島大学医学部第3内科 納 光弘、他
9. HTLV-I 感染 S100 β 抗原特異的 T 細胞を用いた HAM ラットモデル作成の試み
鹿児島大学医学部難治性ウイルス疾患研究センター 出雲周二、他
10. ウイルスの持続感染と神経障害に関する研究
国立療養所中部病院・長寿医療研究センター センター長 田平 武、他

総括研究報告書

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
総括研究報告書

研究課題：HIV等のレトロウイルスによる痴呆や神経障害の病態と治療に関する研究
(H-12-エイズ-005)

主任研究者 出雲周二 鹿児島大学 難治性ウイルス疾患研究センター 教授

分担研究者：

国立長寿医療研究センター センター長
田平 武
都立駒込病院 内科医長
岸田修二
鹿児島大学難治ウイルス研 教授
馬場昌範
鹿児島大学 教授
納 光弘
鹿児島大学 助教授
宇宿功市郎
岐阜大学 講師
斉藤邦明
熊本大学 助手
高宗暢暁
徳島大学分子酵素研 教授
木戸 博

れに対する宿主の免疫応答との関連で神経組織が傷害されるという、HTLV-I が引き起こす HAM と共通する機序も想定される。本研究の目的は HAM や類似の病態を示すいくつかの疾患と HIV 脳症の病態を比較しながら解析することにより、発症病態の共通するもの、それぞれに特異的なものを明らかにし、病態に則した治療法を開発することである。

B. 研究方法及び成果

1) HIV 脳症に関する研究

動物モデルを用いた分子病理学的解析治療法の開発：

出雲らは、昨年度に引き続き感染研つくば霊長類センター森研究員との共同研究をすすめ、サルエイズモデルの脳組織を用いた解析を病理組織学的に解析した。マクロファージ指向性ウイルス SIV239env/MERT 感染サルにおいて典型的なエイズ脳症の病理組織像が、エイズ未発症の段階で認められた。この事はエイズ脳症はエイズの進展、すなわち免疫不全の程度とは独立して生じていることを示している。一方、T 細胞指向性ウイルス SIVmac239 感染サルではリンパ組織の破壊と日和見感染や腫瘍の発症を伴う典型的なエイズを発症したが、エイズ脳症の病理

A. 研究目的

HAART の確立により、HIV 感染症は不治の病から長期間コントロールしうる慢性疾患へと変貌しつつある。しかしリンパ組織病変とは独立して起こっている HIV 脳症が HAART 療法によりどのように変貌するかは不明であり、今後あらたな問題となることが懸念される。HIV 脳症の病態はウイルスが直接神経細胞に感染するのではなく、感染リンパ球やマクロファージが中枢神経内に侵入し、ウイルス抗原の発現とそ

組織像であるミクログリア結節や多核巨細胞の出現はみられず、SIV 感染細胞もほとんどみられなかった。しかし、大脳皮質ニューロピルに局所的なグリオシスがみられ、免疫組織化学、電顕によりシナプス構造の微細な変性像が認められた。エイズ末期の中枢神経障害にはウイルスの脳内侵入を伴わない脳障害が存在する可能性を示唆している。

動物モデルを用いた病態解析と治療薬の開発：

斉藤らは TNF- α を介するエイズ脳症様の記憶障害を引き起こす LP-BM5 ウイルス感染マウスを用い、エイズ脳症治療薬としての TNF- α 阻害剤の評価、ならびに発症メカニズム解析のための TNF- α 欠損骨髄キメラマウスの作成を行った。TNF- α 阻害剤（プロペントフィリン、ペントキシフィリン）を LP-BM5 ウイルス感染 10 週後より、マウスに連続経口投与し、それらの効果について行動薬理学的指標として Y-maze 等を実施し、さらに行動薬理試験終了後の脳内 TNF 発現量を定量的に解析した。その結果、LP-BM5 感染により亢進した脾臓の TNF- α 合成がプロペントフィリン投与により有意に抑制されたが、脳ではその抑制効果は全く認められなかった。それに対し、ペントキシフィリン投与では、脾臓および脳の両方における TNF- α の合成を抑制し、行動薬理学試験については Y-maze 試験を実施し、記憶障害の改善効果は脳内 TNF- α を抑制したペントキシフィリンにおいてのみ認められた。また、WT マウスに TNF- α 欠損骨髄を移植した TNF- α 骨髄キメラマウスの作成に成功した。ウイルス感染により活性化された脳内グリア系細胞と骨髄由来浸潤細胞のいずれが産生する TNF- α が

痴呆の発症に深く関係しているかを明らかにするため実験動物に有用である。

HIV 脳症の臨床病態と病理所見の比較検討：

HIV 脳症の臨床的重症度と髄液内 HIV ウイルス量との相関は報告があるが、脳組織内のウイルスの存在と HIV 脳症（HIV 脳炎）との直接の関連はまだ十分解明されていない。岸田らは HIV 脳症の 8 剖検脳を用いて、臨床的重症度（痴呆重症度・髄液中ウイルス量・ β 2MG）と、病理組織所見の程度、HIVp24 陽性細胞数、活性化ミクログリア/マクロファージ数とを比較検討した。その結果、①臨床的重症度に比例して、基底核、髄質、皮質の順に HIV 感染細胞数が多くみられる傾向があったが、軽症例では HIV が必ずしも検出できなかった。②HIV 脳症では全例で活性化ミクログリア/マクロファージが基底核で増加し、重症度に応じて髄質、皮質に広く発現していた。③髄液 β 2MG 値と脳内活性化ミクログリア/マクロファージ数とは相関する傾向がみられた。これらの結果より、高度な HIV 脳症の基礎病変は HIV 脳炎であり、活性化ミクログリア・マクロファージ数は HIV 陽性細胞数以上に臨床的な痴呆重症度と相関していることが明らかとなった。髄液中の HIV 量とともに、 β 2MG は中枢神経内の出来事を反映し、HIV 脳炎の活動性の推移を判断する良い指標となることが示された。

HIV 脳症の早期診断法の開発：

木戸らは HIV 感染に伴う中枢神経障害の進行状況を適確に把握する髄液 14-3-3 蛋白質検査法の確立を目指した。昨年度確立した 6 種の 14-3-3 isoform (β 、 τ 、 η 、 ζ 、 ϵ 、 γ) 特異抗体と、今年度確立した全 isoform

共通認識抗体を組み合わせることで、脳脊髄液中の全ての 14-3-3 量を測定する EIA 系と、それぞれの isoform 量を特異的に測定する EIA 系の確立を試みた。当初の予想に反して、これらの抗体は、Western Immunoblotting システムに比べ EIA で抗体の反応性が悪く、臨床検体の測定にはさらに約 5-10 倍の高感度化が必要と判定された。その原因の一つとして、脳脊髄液中に含まれる Lentil lectin 反応性の糖蛋白質が EIA の抗原抗体反応を阻害していることを見出した。今後、反応阻害物質除去法の確立と、反応性の高い抗 14-3-3 抗体の作成により、患者脳脊髄液中の 14-3-3 蛋白質の高感度測定を実現する。また、14-3-3 蛋白質の神経細胞内における生理機能の解明をすすめ、細胞内のアミノ酸センサーとして蛋白質の翻訳調節を行っているリン酸化 FRAP (別名 mTOR) と 14-3-3 蛋白質が結合することを見出した。今後、HIV 感染による神経細胞の破壊機序と、14-3-3 蛋白質とリン酸化 FRAP の結合がどのように関連しているかを検討する。

中枢神経障害予防・治療の薬剤の開発

馬場らは HIV-1 感染による神経細胞死を再現する *in vitro* アッセイ系として、レチノイン酸で分化させた神経芽腫細胞株 SK-N-SH 細胞を、HIV-1 感染マクロファージと直接あるいはセルカルチャーインサートを用いて間接的にコカルチャーし、神経細胞死を引き起こす系を作成した。生じた神経細胞死は必ずしもマクロファージとの直接的な接触を必要とせず、セルカルチャーインサートを用いた間接コカルチャーや、コカルチャー後の培養上清の添加でも同様に誘導された。また、コカルチャーにより、培養上清中に大量の炎症性サイトカ

インおよびケモカインが産生されることが確認された。IL-6, IL-8, MCP-1 および TNF- α に対する中和抗体を添加しても、神経細胞死は抑制出来なかった。一方、HIV-1 転写阻害薬 K-37 および CXCR4 拮抗薬 AMD3100 は、コカルチャーによる神経細胞死を部分的に抑制した。今回樹立した *in vitro* の系による神経細胞死にはマクロファージから産生される HIV-1 抗原と、さらに何らかのウイルスもしくは細胞由来の因子が関与していると思われる。また本実験系は HIV-1 による中枢神経障害の予防・治療薬を発見・評価するスクリーニング系として有用であると思われる。

高宗らはウイルス粒子のダイレクトな刺激によって誘導される神経細胞死に伴う関連分子群の探索し、その細胞死誘導機構の解明を目指した。ヒト神経芽細胞種 SK-N-SH 細胞を分化誘導させ得られた神経細胞に対し、CXCR4 ウイルスを接種、接種後 96 時間目に観察される DNA ラダーを指標として、抗 gp120 抗体、dextran sulfate, Z-8 (CXCR4 antagonist) の細胞死抑制効果を検索した。その結果、これら阻害剤による細胞死の抑制効果は部分的なものであった。一方、MT-4 細胞では細胞死は効果的に阻害された。この系で誘導される神経細胞死の誘導は HIV-1 ウイルス粒子によること、および神経細胞への感染の結果ではないことを確認しており、これまで報告されている gp120 と CXCR4 を介する機構の他に、別の誘導機構もまた存在することが示唆された。

2) HTLV-I 関連脊髄症に関する研究 HAM 発症に関連する宿主因子に関する研究:

HAM は HTLV-I 感染者の 1% 前後に発症

し、末梢血リンパ球中 HTLV-I ウイルス量は健常キャリアの7～16倍に増加していること、ウイルス量が1%以上になるとHAM発症の危険率が等比級数的に上昇すること、発症には宿主側の要因として、HLA-A*02、Cw*08は発症抑制に、HLA-DRB1*0101、B*540は発症促進に作用していることが明らかになっている。納・宇宿は、HTLV-I ウイルス量と宿主因子とのHAM発症への関連について検討し、ウイルス量から発症予測がどの程度可能かについて検討した。HAM 224例、HTLV-I キャリア 202名を対象として、HTLV-I プロウイルス定量、HLA タイピングを行なった。そのデータよりプロウイルス量の0.5%ごとにHAM発症数、HTLV-I キャリア数を算出し、ROC曲線を描画後に、cut off値を算出した。その値でHAM群、キャリア群を各々2群に分け、前記の要因のHAM発症への関与を検討した。その結果、ROC曲線からは、HTLV-I ウイルス量2%で、感度80%以上、特異度80%以上でHAM群とキャリア群を区別できることが明らかとなった。HLA-DRB1*0101は、ウイルス量2%以下のHAM群でキャリア群より高頻度に見られ、2%以上群では認められなかった。HLA-A*02は、ウイルス量2%以下のHAMでキャリアより有意に頻度が低く、2%以上ではこの関係は認められなかった。HLA-B*54では、HTLV-I ウイルス量2%以上のHAMで強く見られ、2%以下では認められなかった。これらの結果はHAM発症関連因子の中には、ウイルス量が低い群で関連する因子と高い群で関連する因子が存在することを示している。また、重回帰分析によりHAM発症の予測が可能かを解析し、今回の集団の80%において、HAMもしくはキャリアの予想が可能であった。こ

のことはHAM発症に関するHTLV-I ウイルス量に閾値があることを示唆しており、これまでの末梢血リンパ球の1%以上にHTLV-I ウイルスが感染すると等比級数的にHAM発症の危険率が増すことに対応していると考えられた。

発症に関わるウイルス要因の検索：

納・出雲は昨年度、HTLV-IはtaxにもサブグループTax A、Tax Bが存在し、その違いによりHAM発症のリスクが異なることを報告した。今年度はサブグループによる発症リスク差の原因を知る目的で、Tax A、Tax B感染HAM患者の各10名について、末梢血リンパ球をBrefeldin A存在下に12時間培養し、細胞内Taxとサイトカインを染色し、flow cytometryを用いて、感染細胞あたりのTax蛋白の発現とTax発現細胞でのIFN- γ 、TNF- α 産生に差があるかどうかを検討したが、有意の差は見いだされなかった。一方、自覚症のないHTLV-I キャリアー111名において、pre-clinicalなHTLV-I関連疾患症状・検査所見の有無を検討し、HAM発症のリスクが高いTax Aをもつキャリアーは、下肢深部腱反射の亢進、夜間頻尿などのHAM関連所見、ブドウ膜炎の既往がTax B群より高頻度に認められた。HTLV-I 関連炎症性疾患とTax Aとの関連が改めて示唆された。

HAM動物モデル作成の試み：

HAMの発症機序として、ウイルス感染T細胞が中枢神経系の血流の停滞しやすい部に接着因子を介して浸潤し、そこでウイルス抗原を発現、それを排除しようとする細胞性免疫応答が生じ、周囲の神経組織が変性崩壊するby-stander脳脊髄炎の機序を想定している。その機序に沿った動物モデ

ルの開発は、HAM の病態に則した治療法の開発に有用である。出雲・納は、受け身移入により中枢神経に組織傷害を起こさない細胞浸潤を引き起こすことが知られている S100 β 蛋白特異的のリスラット T 細胞株に HTLV-I を感染させ、血流を介して中枢神経内へ HTLV-I を持ち込むモデルを用い、HTLV-I 抗原で前感作したラットへの細胞株投与により中枢神経内で HTLV-I 感染細胞に対する免疫反応を誘導することによる By-stander 脳脊髄炎モデルの確立をめざした。S100 β 蛋白特異的 T 細胞株(STLC) と放射線照射した HTLV-I 感染細胞ヒト細胞株である HUT102 との共培養により、STLC の一部が感染した SHUT を作成、リコンビナント HTLV-I 蛋白である G-E 蛋白で前感作したリスラットに受け身移入し、非感作コントロールに比してやや強い炎症性病変が認められた。しかし、共培養による感染効率が悪く、また、共培養後は脳炎惹起性が減弱しており、感染効率の向上と、免疫応答を高める工夫が必要である。

3) その他のウイルス持続感染による神経疾患

亜急性硬化性全脳炎(SSPE)は変異型麻疹ウイルスの脳内感染により進行性痴呆をきたす疾患で、エイズ脳症の病態との類似性が注目される。田平らは近年髄鞘の構成蛋白として再認識されている CD9 に対する抗体の出現を種々の炎症性神経疾患で検索した。抗 CD9 抗体は SSPE 患者において特異的に強く検出され、病勢と関連していた。抗 CD9 抗体の検索は SSPE の診断、病勢の把握に有用で、さらに、中枢神経の変性過程における CD9 とその抗体の役割についての解析は HIV 脳症の発症機序との関連でも重要である。

(倫理面への配慮)

患者・無症候性ウイルスキャリアーを対象とし、疾患個人情報や血液・組織試料を用いて行うものについては、本研究について十分な説明を行い研究への理解を求め、文書による承諾を得た上でおこなわれた。また、得られた結果の公表に当たっては個人が特定できないよう配慮している。また、動物実験に際しては動物愛護の精神に沿って、各施設のマニュアルに従って適切な疼痛緩和などの方策をおこない、遂行された。

C. 考察

本研究班は、日本で世界をリードする研究がすすめられている HAM の研究を基礎に、レトロウイルスが引き起こす HIV 脳症と HAM という二つの中枢神経疾患を共通の目で見ることにより、類似性と相違点を明らかにし、それぞれの疾患の研究に新たな視点から取り組もうとする世界的にもユニークな研究組織である。

本研究のスタートとして HIV 脳症はエイズという免疫不全に伴う神経合併症の一つではなく、リンパ組織病変とは独立した病態であることを認識の出発点とした。そしてこの二年間の研究により、HIV 脳症には免疫不全の進行に伴い急激なウイルス増殖とともに神経傷害性ウイルス蛋白やサイトカインを介して末期に亜急性に進行する大脳皮質の神経細胞・ニューロピルの障害としての脳症と、HAM と類似した機序、すなわち感染細胞が血流を介して大脳白質に持ち込まれ、その場でのウイルス増殖とそれを排除しようとする免疫応答がおこり、周囲の神経組織が緩徐に傷害される慢性神経疾患としての脳症、という二つの独立した神経障害機構が存在することが示唆された。この視点での研究は国際的にもほとん

どなされていない。エイズの多発する地域で、エイズのみをみている研究組織では気づかない視点で見ることができたと思われる。

HAARTにより免疫不全の進行が長期コントロールされ、末期エイズ患者の減少とともに、通常は両者が混在している二つの病態のうち、エイズ末期に亜急性に進行する脳症としての HIV 脳症は短期的には減少することが予想される。一方、免疫不全が進行する以前に、慢性変性疾患を思わせる緩徐進行性の神経疾患としての HIV 脳症が徐々に増加してくるものと思われる。この視点での具体的な臨床例、剖検例の全国的な調査を計画している。さらに、多数の臨床・剖検例が蓄積されている欧米でもこの視点での解析はなされておらず、共同研究を予定している。

HIV 脳症の治療法については明らかとなった二つの病態にそれぞれ則した治療を考える必要がある。治療薬をスクリーニングする系として神経細胞傷害機序を想定して SK-N-SH 細胞を用いる *in vitro* の系と、マウスエイズモデルを用いて TNF- α を介する系が確立された。今後この系を用いて多数の薬剤の中から有力な薬剤の絞り込みが行われる。免疫機序を介する病態については SIV239env/MERT を用いたサルが *in vivo* のモデルとして利用可能であるが、より簡便な系を考案する必要がある。

日本のエイズ研究の中ではこれまで HIV 脳症を正面から取りくんだ研究は少なく、エイズ脳症についての社会的認知度は低いままである。しかし、前述したように HAART や化学療法の進歩により、免疫不全の進行や日和見感染症がコントロールされる中で、HIV 脳症は HIV 感染症の臨床の現場で大きな問題となることが予想され

る。本研究班の役割は重要で、HIV 脳症の社会的重要性の認知度を高めていく努力も必要である。

HAM についてはこれまで免疫機構の特異性を中心に、自己免疫疾患との関連で研究がすすめられてきた。そして、本研究組織の中で HIV 脳症と平行して比較しながら研究をすすめる中で、ウイルスの動態に注目した解析が進展した。昨年度報告したウイルスロードの変動と臨床像との相関や、本年度のウイルスロードと発症関連宿主因子との関連、発症に関わるウイルス要因の研究は HIV 脳症のこれまでの研究成果を視野に入れてすすめられたもので、本研究組織の特徴である HAM と HIV 脳症を比較しながら研究をすすめる体制がもたらした成果である。また、CD9 と亜急性硬化性全脳炎との関連は世界的にも全く新しい視点であり、HIV 脳症をはじめとする慢性ウイルス感染における神経障害機序解明のブレイクスルーの研究となることが期待される。

D. 結 論

今年度の研究により HIV 脳症には独立した二つの発症病態が存在することが示唆された。また、治療薬開発のための *in vitro*、*in vivo* の系が確立した。

HAM に関してはウイルス動態、宿主の免疫動態、及び臨床像の相互関連が明らかとなった。また、発症病態を再現する動物モデルの開発が進められた。

E. 研究発表（誌上発表のみ掲載）

1. 出雲周二. AIDS 痴呆症候群. 杉田秀夫、他 監修、先端医療シリーズ 14、神経・筋疾患. pp149-152, 先端医療技術研究所, 2001.

2. 出雲周二. HAMの発症機序. 21世紀の神経免疫学—展望. 別冊医学のあゆみ. 医歯薬出版. pp119-123, 2001.
3. 出雲周二. HTLV-I-associated myelopathy. 脊髄 -update. Clinical Neuroscience 19:795-798, 2001.
4. Yamano Y, Nagai M, Brennan M, Mora CA, Soldan SS, Tomaru U, Takenouchi N, Izumo S, Osame M, Jacobson S. Correlation of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) mRNA with proviral DNA load, virus-specific CD8(+) T cells, and disease severity in HTLV-1-associated myelopathy (HAM/TSP). Blood. 99:88-94, 2002.
5. Matsuzaki T, Nakagawa M, Nagai M, Usuku K, Higuchi I, Arimura K, Kubota H, Izumo S, Akiba S, Osame M. HTLV-I proviral load correlates with progression of motor disability in HAM/TSP: analysis of 239 HAM/TSP patients including 64 patients followed up for 10 years. J Neurovirol. 7:228-234, 2001.
6. Furukawa Y, Kubota R, Tara M, Izumo S, Osame M. Existence of escape mutant in HTLV-I tax during the development of adult T-cell leukemia. Blood. 97:987-93, 2001.
7. Makino M, Utsunomiya A, Maeda Y, Shimokubo S, Izumo S, Baba M. Association of CD40 ligand expression on HTLV-I-infected T cells and maturation of dendritic cells. Scand J Immunol. 54:574-581, 2001.
8. Umehara F, Itoh K, Michizono K, Abe M, Izumo S, Osame M. Involvement of Fas/Fas ligand system in the spinal cords of HTLV-I-associated myelopathy. Acta Neuropathol. 103:384-390, 2002.
9. Nakagaki K, Nakagaki K, Takahashi K, Schols D, De Clercq E, Tabira T. CXCR4 is the primary receptor for feline immunodeficiency virus in astrocytes. J Neurovirol. 7:487-492, 2001.
10. Koirala T R, Nakagaki K, Ishida T, Nonaka S, Morikawa S, Tabira T. Decreased expression of MAP-2 and GAD in the brain of cats infected with feline immunodeficiency virus. Tohoku J Exp Med. 195:141-151, 2001.
11. 岸田修二, 他. AIDS 関連トキソプラズマ脳症と脳原発悪性リンパ腫の鑑別 (自験例を中心に). Neuro・infection 6:82-84, 2001.
12. 岸田修二, 他. AIDS 関連進行性多巣性白質脳症の1剖検例—特に病態進行とJC ウイルス DNA の動態について. Neuro・infection 6:85-87, 2001.
13. Baba M. Cellular factors as targets for anti-human immunodeficiency virus therapy. In: De Clercq E (Ed), Antiviral Therapy, pp. 191-217, ASM Press, Washington, DC, 2001.
14. Sawada H, Tamada D, Kawase T, Hayakawa Y, Lee K, Kyokane J, Baba M. Synthesis and properties of novel fluoroalkyl end-capped oligomers containing phosphorous segments. J. Appl. Polym. Sci. 79:228-245, 2001.
15. Fujii R, Okamoto M, Aratani S, Oishi T, Ohshima T, Taira K, Baba M, Fukamizu A, Nakajima T. A role of RNA helicase A in cis-acting transactivation response element-mediated transcriptional regulation of human immunodeficiency

- virus type 1. *J. Biol. Chem.* 276:5445-5451, 2001.
16. Konda Y, Takahashi Y, Arima S, Sato N, Takeda K, Dobashi K, Baba M, Harigaya Y. First total synthesis of Mer-N5075A and a diastereomeric mixture of alpha and beta-MAPI, new HIV-1 protease inhibitors from a species of *Streptomyces*. *Tetrahedron* 57:4311-4321, 2001.
 17. Okamoto M, Ono M, Baba M. Suppression of cytokine production and neural cell death by the anti-inflammatory alkaloid cepharanthine: a potential agent against HIV-1 encephalopathy. *Biochem. Pharmacol.* 62:747-753, 2001.
 18. Nitanda T, Wang X, Somekawa K, Yuasa S, Baba M. Three-drug combinations of emivirine and nucleoside reverse transcriptase inhibitors in vitro: Long-term culture of HIV-1-infected cells and breakthrough viruses. *Antiviral Chem. Chemother.* 12:161-167, 2001.
 19. Takashima K, Miyake H, Furuta RA, Fujisawa J, Iizawa Y, Kanzaki N, Shiraiishi M, Okonogi K, Baba M. Inhibitory effects of small-molecule CCR5 antagonists on human immunodeficiency virus type 1 envelope-mediated membrane fusion and viral replication. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:3538-3543, 2001.
 20. Baba M, Okamoto M, Kashiwaba N, Ono M. Anti-HIV-1 activity and structure-activity relationship of cepharoline derivatives in chronically infected cells. *Antiviral Chem. Chemother.* 12:307-312, 2001.
 21. Kawamura M, Naito T, Ueno M, Akagi T, Hiraiishi K, Takai I, Makino M, Serizawa T, Sugimura K, Akashi M, Baba M. Induction of mucosal IgA following intravaginal administration of inactivated HIV-1-capturing nanospheres in mice. *J. Med. Virol.* 66:291-298, 2002.
 22. Machigashira N, Yoshida Y, Wang Sy, Osame M. HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis with pseudohypoparathyroidism. *Neurology.* 56:104-106, 2001.
 23. Yashiki S, Fujiyoshi T, Arima N, Osame M, Yoshinaga M, Nagata Y, Tara M, Nomura K, Utsunomiya A, Hanada S, Tajima K, Sonoda S. HLA-A*26, HLA-B*4002, HLA-B*4006, and HLA-B*4801 alleles predispose to adult T cell leukemia: the limited recognition of HTLV type I tax peptide anchor motifs and epitopes to generate anti-HTLV type I tax CD8(+) cytotoxic T lymphocytes. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 17:1047-61, 2001.
 24. Matsuyama W, Kubota R, Hamasaki T, Mizoguchi A, Iwami F, Wakimoto J, Kawabata M, Osame M. Enhanced inhibition of lymphocyte activation by *Mycobacterium avium* complex in human T lymphotropic virus type I carriers. *Thorax.* 56:394-397, 2001.
 25. Wodarz D, Hall SE, Usuku K, Osame M, Ogg GS, McMichael AJ, Nowak MA, Bangham CR. Cytotoxic T-cell abundance and virus load in human immunodeficiency virus type 1 and human T-cell leukaemia virus type 1. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 268:1215-21, 2001.
 26. Saito M, Taylor GP, Saito A, Furukawa Y, Usuku K, Weber JN, Osame M, Bangham CR. Nucleotide, Protein In vivo selection

- of T-cell receptor junctional region sequences by HLA-A2 human T-cell lymphotropic virus type 1 Tax11-19 peptide complexes. *J Virol.* 75:1065-1071, 2001.
27. Wada H, Saito K, Kanda T, Kobayashi I, Fujii H, Fujigaki S, Maekawa N, Takatsu H, Fujiwara H, Sekikawa K, Seishima M. Tumor necrosis factor- α (TNF- α) plays a protective role in acute viral myocarditis in mice: A study using mice lacking TNF- α . *Circulation*, 103: 626-629, 2001
28. Morita T, Saito K, Takemura M, Maekawa N, Fujigaki S, Fujii H, Wada H, Takeuchi S, Noma A, Seishima M. 3-Hydroxyanthranilic acid, an L-Tryptophan metabolite, induces apoptosis in monocyte-derived cell stimulated by interferon- γ . *Annals of Clinical Biochemistry*, 38 : 242-251, 2001.
29. Fujigaki S, Saito K, Sekikawa K, Tone S, Takikawa O, Fujii H, Wada H, Noma A, Seishima M. Lipopolysaccharide induction of indoleamine 2,3-dioxygenase is mediated dominantly by an IFN- γ -independent mechanism. *Eur J Immunol*, 31: 2313-2318, 2001.
30. Fujigaki S, Saito K, Takemura M, Maekawa N, Yamada Y, Wada H, Seishima M. L-Tryptophan-kynurenine Pathway Metabolism Accelerated by *Toxoplasma gondii* Infection Is Abolished in Interferon- γ Gene-Deficient Mice: Crossregulation between iNOS and indoleamine-2,3-dioxygenase. *Infect. Immun.* 70: 779-786, 2002.
31. Fujii H, Saito K, Takami T, Hamakawa H, Maekawa N, Fujigaki S, Wada H, Noma A, Seishima M. Immunohistochemical localization and mRNA expression of apolipoprotein A-I in rat spinal cord. *J. Arterioscler Thromb* (in press)
32. Maekawa N, Wada H, Kanda T, Niwa T, Yamada Y, Saito K, Fujiwara H, Sekikawa K, Seishima M. Improved myocardial ischemia/reperfusion injury in mice lacking tumor necrosis factor- α ? *J Am Coll Cardiol.* (in press)
33. 高宗暢暁, 三隅将吾, 庄司省三. HIV1-による神経細胞死の誘導に関する検討. *生化学*, 73, 1034, 2001.
34. 淵上貴司, 三隅将吾, 高宗暢暁, 庄司省三. 精製 HIV-1 粒子内の細胞・ウイルス由来タンパク質のプロテオーム解析. *生化学*, 73, 1033, 2001.
35. Wakabayashi, H., Yano, M., Tachikawa, M., Oka, S., Maeda, M., and Kido, H.: Increased levels of 14-3-3 ϵ , γ and ζ isoforms in cerebrospinal fluid of AIDS patients with neuronal destruction. *Clinica chimica Acta* 312, 97-105, 2001.

F. 知的所有権の出願・取得状況

特許取得 (平成 13 年度)

1. 木戸 博、清藤 勉、前田 雅弘、若林 英樹。エイズ関連脳疾患の診断方法および診断用キット。出願人：免疫生物研究所、特願 2000-262098。平成 12 年 8 月 31 日出願。

分 担 研 究 報 告 書

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
分担研究報告書

サルエイズモデルを用いたエイズ脳症の病態機序の解析（第2報）：
大脳皮質病変と白質グリア結節は独立の異なる病態として生じている

主任研究者	出雲周二	鹿児島大学医学部難治性ウイルス疾患研究センター
研究協力者	Xing Hui Qin	鹿児島大学医学部難治性ウイルス疾患研究センター
	森豊隆志	鹿児島大学医学部第3内科
	早川 仁	鹿児島大学医学部第3内科
	森 一泰	国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センター

研究要旨： サルの SIV 感染実験系を用いて、リンパ系組織や中枢神経組織を病理組織学的に詳細に解析し、ウイルスの感染ターゲットの違いによるリンパ組織病変の進行と脳病変の進展の差異を比較し、エイズの発症過程と脳症の発症過程との関連を明らかにすることを目的とした。マクロファージ指向性ウイルス SIV239env/MERT 感染サルにおいて典型的なエイズ脳症の病理組織像が、エイズ未発症の段階で認められた。一方、T 細胞指向性ウイルス SIVmac239 感染サルではリンパ組織の破壊と日和見感染や腫瘍の発症を伴う典型的なエイズを発症したが、エイズ脳症の病理組織像であるミクログリア結節や多核巨細胞の出現はみられず、SIV 感染細胞もほとんどみられなかった。しかし、大脳皮質ニューロピルに局所的なグリオシスがみられ、免疫組織化学、電顕によりシナプス構造の微細な変性像が認められた。リンパ組織病変と脳病変は SIV 感染症の独立した病変であり、大脳白質の多核巨細胞を伴うグリア結節病変と皮質ニューロピルの病変はそれぞれ独立した病態として起こっていることが明らかとなった。

A. 研究目的

エイズの本態であるリンパ組織の崩壊とは独立して起こっている HIV 脳症は HAART 療法によりリンパ節病変の進行が制御される中でどのように変貌するかは不明である。最近の剖検組織に解析では脳神経障害はむしろ増加していると報告されており、今後あらたな問題となることが懸念される。

エイズの脳神経障害については大脳白質の多核巨細胞を伴うグリア結節と深部白質の淡明化が知られ、多核巨細胞、浸潤マクロファージ、ミクログリアにウイルスが感染していることが証明されている。一方、エイズにおける大脳皮質病変についてはニューロンの脱落、萎縮、樹状突起の単純化、MAP II、シナプトフィジン発現の低下、ニューロピルの空胞変性などいろいろな報告があるが必ずしも明らかではなく、その機序は不明である。

我々は、サルの SIV 感染実験系を用いて、リ

ンパ系組織や中枢神経組織を病理組織学的に詳細に解析し、ウイルスの感染ターゲットの違いによるリンパ組織病変の進行と脳病変の進展の差異を比較し、エイズの発症過程と脳症の発症過程との関連を明らかにし、エイズ脳症の病態機序を解明することを目的とした。

昨年度までに SIV 感染サルの一部に明らかでないエイズ脳症病変がみられ、脳症の進展とリンパ節病変の進行とは必ずしも平行していないことを見出し、また、脳症の病理組織像として大脳白質の多核巨細胞を伴うグリア結節に加え、皮質のニューロピルの局所的なグリオシスも脳症の指標となりうることを示した。本年度は解析動物数を増やすとともに、大脳皮質病変の詳細を、免疫組織化学と電顕により解析した。

B. 研究方法

B ウイルス、SRV、SIV、STLV 抗体陰性のアカゲザル（ミャンマー原産）を用いた。T 細胞指向性の SIVmac239、マクロファージ指向性に

変異した SIV 239 *env*/MERT、HIV-1 の逆転写酵素遺伝子を持つ SIV キメラウイルスの RT-SHIV の各 2 頭と、非感染サル 2 頭を対照として検索した (表)。感染後、定期的な血液採取し、ウイルス量および CD4⁺細胞を測定し、感染後 2 週、8 週、7 2 週、8 2 週にリンパ節生検を施行した。

それぞれのサルは 4%パラフォルムアルデヒドで灌流固定し、リンパ節、脾臓及び脳を採取、パラフィン包埋し、病理組織標本を作製した。また、CD3、CD20、CD68、GFAP に対する抗体を用いて免疫染色をし、顕微鏡にて観察した。

表：

Animal	sex	Age at Inoculation (weeks)	Age at Death (weeks)	Infection Duration (weeks)	Viral inoculum	CD4 ⁺ cell / μ l	AIDS symptoms
#24(532)	male	260	392	132	SIVmac239	380	+
#25(627)	male	312	358	46	SIVmac239	90	+
#17(531)	male	208	362	154	239/ <i>env</i> MERT	270	—
#19(626)	male	156	374	218	239/ <i>env</i> MERT	220	—
#08(631)	female	156	262	106	RT-SHIV	200	+
#09(677)	male	104	260	156	RT-SHIV	100	+
630					Control		
671					Control		

C. 研究結果

T 細胞指向性ウイルスの SIVmac239 及び RT-SHIV 感染サルではリンパ組織の破壊と日和見感染や腫瘍の発症を伴う典型的なエイズを発症したが、大脳白質にエイズ脳症特有の病理組織像であるミクログリア結節や多核巨細胞の出現はみられず、SIV 感染細胞もほとんどみられなかった。一方、大脳皮質ではニューロピルに局所的なグリオシスがみられた。MAP-2、シナプトフィジンによる免疫組織化学では明らかな染色性の低下は見られなかったが (図 1)、電顕により樹状突起内に層状構造物や dense body などの異常構造物が増加し、シナプス形成の少ない樹状突起やアストロサイト突起の膨化、グリア線維束の増加など、ニューロピルの微細な変性像が確認された (図 2)。

感染後、エイズを発症し、大脳皮質の局所的なグリオシスを認めた SIVmac239 感染アカゲザルと、多核巨細胞を伴う典型的なミクログリア結節病変 (SIVE) を白質に生じ、エイズは発症していない SIV 239 *env*/MERT 感染アカゲザルの前頭葉皮質、海馬領域についてシナプス小胞を染める抗シナプトフィジン抗体、樹状突起を染色する抗 MAP-2 抗体にて免疫染色とを行い、コントロールと比較した。また、同部を 1%オスミウム酸にて再固定後、エポン包埋し、ニューロピルの微細構造を観察した。

マクロファージ指向性の SIV239 *env*/MERT 接種サルでは、リンパ組織病変はリンパ濾胞の過形成がみられるものの明らかな濾胞崩壊の所見はなく、病理組織学的にエイズの発症には至っていないと考えられた。大脳では白質淡明化はみられないものの、HIV 脳症の病理像として典型的な多核巨細胞を伴ったミクログリア・マクロファージ系細胞の集簇が白質血管周囲に認められ、周囲にアストロサイトの軽度増生が認められた。in situ Hybridization にて多核巨細胞およびミクログリアにウイルス RNA の発現が認められた。しかし大脳皮質の神経細胞は良く保たれており、抗 GFAP 抗体による免疫染色では皮質深層で軽度のグリオシスがみられるもののコントロールと有意の差はなく、MAP-2、シナプトフィジンの免疫組織化学、電顕観察でもシナプス構造の異常は見ら

れなかった。

D. 考 察

今回の検索により、SIV 感染サルに明らかなエイズ脳症特有の病理組織所見がみられ、特に HIV 脳症の特徴的な病理組織像としての大脳白質の多核巨細胞を伴うグリア結節がリンパ組織の崩壊を伴わないエイズ未発症のマクロファージ指向性ウイルス感染サルに生じていたことは、この多核巨細胞を伴うグリア結節というエイズ脳症特有の病変はエイズの進展、すなわち免疫不全の程度とは独立して生じていることを示している。一方、T 細胞指向性ウイルスに感染し、エイズを発症したサルにはグリア結節は見られない一方、大脳皮質ニューロピルの微細な変性像が見られ、これはエイズの進展と平行して生じているものと思われた。

ヒトの HIV 脳症・エイズ痴呆症候群については疾患概念確立の当初より臨床像と病理組織所見との対応が必ずしも認められないことが指摘されていた。今回のサルの検索から得られた上記の結果は、HIV 脳症にはエイズの末期に免疫不全の進行に伴い急激なウイルス増殖とともに神経傷害性ウイルス蛋白やサイトカインを介して亜急性に進行する大脳皮質の神経細胞・ニューロピルの障害としての脳症と、HAM と類似した機序、すなわち感染細胞が血流を介して大脳白質に持ち込まれ、その場でのウイルス増殖とそれを排除しようとする免疫応答がおこり、周囲の神経組織が緩徐に傷害される慢性神経疾患としての脳症、という二つの独立した神経障害機構が存在することを示唆している。この視点での研究は国際的にもほとんどなされていない。エイズの多発する地域で、エイズのみをみている研究組織では気づかない視点で見ることができたと思われる。

HAART により免疫不全の進行が長期コントロールされ、末期エイズ患者の減少とともに、通常は両者が混在している二つの病態のうち、エイズ末期に亜急性に進行する脳症としての HIV 脳症は短期的には減少することが予想される。一方、免疫不全が進行する以前に、慢性変性疾患を思わせる緩徐進行性の神経疾患としての HIV 脳症が徐々に増加してくるものと思われる。この視点での具体的な臨床例、剖検例の検索が必要である。

E. 結 論

1. SIV 感染サルモデルを用いてエイズ病変と脳

症の作成に成功した。

2. リンパ組織病変と脳病変は SIV 感染症の独立した病変である。
3. エイズ脳症における大脳白質の多核巨細胞を伴うグリア結節病変と皮質ニューロピルの病変はそれぞれ独立した病態として起きている。

F. 研究発表

1. 出雲周二. AIDS 痴呆症候群. 杉田秀夫, 他監修, 先端医療シリーズ 14, 神経・筋疾患. pp149-152, 先端医療技術研究所, 2001.
2. 出雲周二. HAM の発症機序. 21 世紀の神経免疫学—展望. 別冊医学のあゆみ. 医歯薬出版. pp119-123, 2001.
3. 出雲周二. HTLV-I-associated myelopathy. 脊髄-update. Clinical Neuroscience 19:795-798, 2001.
4. Matsuzaki T, Nakagawa M, Nagai M, Usuku K, Higuchi I, Arimura K, Kubota H, Izumo S, Akiba S, Osame M. HTLV-I proviral load correlates with progression of motor disability in HAM/TSP: analysis of 239 HAM/TSP patients including 64 patients followed up for 10 years. J Neurovirol. 7:228-234, 2001.
5. Furukawa Y, Kubota R, Tara M, Izumo S, Osame M. Existence of escape mutant in HTLV-I tax during the development of adult T-cell leukemia. Blood. 97:987-93, 2001.
6. Makino M, Utsunomiya A, Maeda Y, Shimokubo S, Izumo S, Baba M. Association of CD40 ligand expression on HTLV-I-infected T cells and maturation of dendritic cells. Scand J Immunol. 54:574-581, 2001.
7. Yamano Y, Nagai M, Brennan M, Mora CA, Soldan SS, Tomaru U, Takenouchi N, Izumo S, Osame M, Jacobson S. Correlation of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) mRNA with proviral DNA load, virus-specific CD8(+) T cells, and disease severity in HTLV-I-associated myelopathy (HAM/TSP). Blood. 99:88-94, 2002.
8. Umehara F, Itoh K, Michizono K, Abe M, Izumo S, Osame M. Involvement of Fas/Fas ligand system in the spinal cords of HTLV-I-associated myelopathy. Acta Neuropathol. 103:384-390, 2002.

図 1 : mac239感染サル大脳皮質の免疫染色

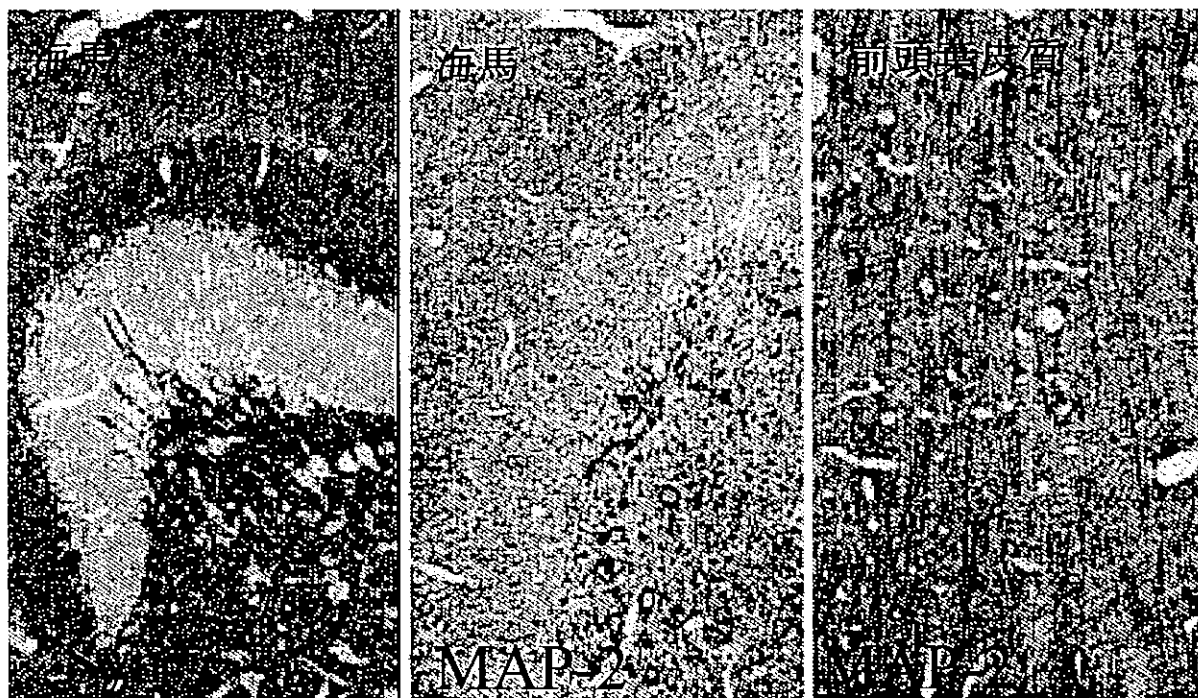
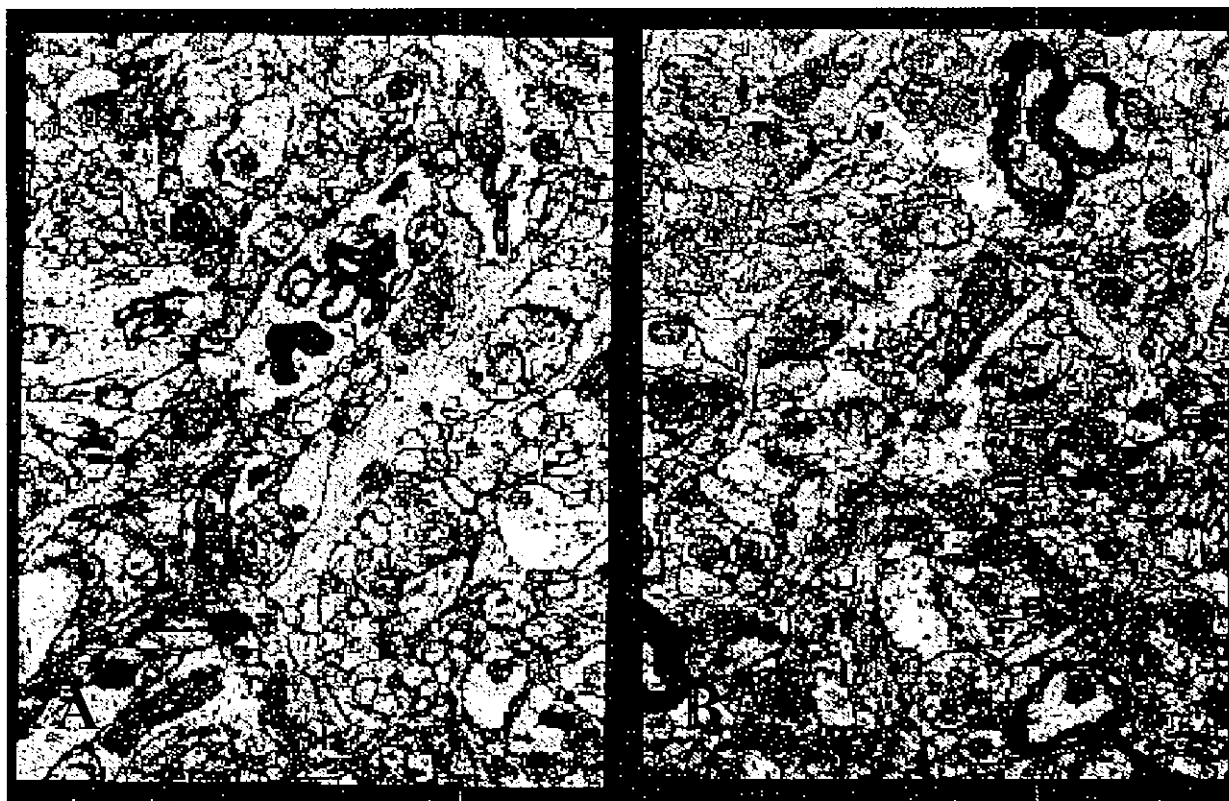


図 2 : mac239感染サル前頭葉皮質のニューロピルの変性



厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
分担研究報告書

AIDS dementia complex治療薬としてのTNF- α 阻害剤の評価ならびにその発症メカニズム
の解析に有用なTNF- α 欠損骨髄キメラマウスの作成

分担研究者	斉藤邦明	岐阜大学医学部講師
研究協力者	清島 満	岐阜大学医学部教授
研究協力者	鍋島俊隆	名古屋大学医学部教授

研究要旨:マウスエイズモデルにおいて、ペントキシフィリンを投与することにより脳のTNF- α を阻害可能で、さらに行動薬理学的検索の結果から、ペントキシフィリン投与によりAIDS dementia complex(ADC)改善作用を認めた。TNF- α 遺伝子欠損マウスを用いた分担研究者らの研究と今回の結果を総合的に解釈すると、薬剤によって脳のTNF- α を抑制することによりADCを改善できることが明らかとなった。また、ADC発症のメカニズムを解析するために作成したTNF- α 欠損骨髄キメラマウスは、ウイルス感染により活性化された脳内グリア系細胞とモノサイトをはじめとした骨髄由来浸潤細胞のいずれの細胞が産生するTNF- α が痴呆の発症に深く関係しているかを明らかにするための有用な実験動物であると考えられた。

A. 研究目的

Wild type(WT)マウスにLP-BM5ウイルスを感染させることにより、感染8-10週後のマウスはエイズ患者末期に見られる記憶障害[AIDS dementia complex, (ADC)]様の症状を発症する。ADC発症のメカニズムにTNF- α が関与していることを研究分担者は遺伝子組み換え実験動物を用いた研究により明らかにした。本研究は(1)薬剤投与による脳でのTNF- α 抑制法を確立し、マウスの記憶障害が脳内TNF- α を薬剤により抑制したときに改善するかどうかを判定する。(2)痴呆の発症に深く関与していることが考えられるTNF- α のウイルス感染後の脳内における由来について明らかにする。すなわち、ウイルス感染により活性化された

脳内グリア系細胞とモノサイトをはじめとした骨髄由来浸潤細胞のいずれが産生するTNF- α が痴呆の発症に深く関係しているかを明らかにするため、骨髄移植(BMT)によりTNF- α 欠損骨髄キメラマウスを作成する。

B. 研究方法

1) マウスエイズモデルを用いたTNF- α 阻害剤の評価: TNF- α 阻害剤(プロペントフィリン、ペントキシフィリン)をLP-BM5ウイルス感染10週後より、マウスに1週間連続経口投与し、それらの効果について下に示すとおり免疫不全の指標として脾細胞のCon A、LPS刺激試験、さらに行動薬理学的指標としてY-mazeなどを行った。また、行動薬理試験終了後の脳内TNF- α 発現

量を定量的に解析した。

a) 脾細胞の Con A、LPS 刺激試験

マウス脾臓を無菌的に摘出し脾臓の一部から脾細胞を抽出した。さらに Fetal bovine serum (Equitech) を10%添加したRPMI-1640培地で3回洗浄後、 0.5×10^6 個/mlに調整し96穴培養用プレート(Falcon 3072)に200 μ l播種した。細胞刺激剤(Con A, LPS)を各穴10 μ g添加し48時間培養した。さらに³H標識チミジンを各穴に10 μ Ci添加後、12時間培養しチミジンを細胞内に取り込ませた。培養終了後、細胞をすべてセルハーパー(Bio-science)で洗浄し、 γ -カウンター(Beckman-710)で細胞内の³H測定を行い細胞の刺激応答の指標とした。

b) 行動薬理的検索(Y-maze試験)

自発交替行動の測定は、Sarter(1988)らの方法に準じて以下の手順で行った。マウスをY字迷路のいずれかのarmの先端に置き、8分間にわたって迷路内を自由に探索させ、マウスが移動したarmの位置を選択した順に記録する。マウスが測定時間内に各armに移動した回数をカウントしこれを total arm entriesとする。つぎに、この中で連続して異なる3つのarmを選択した組み合わせを調べ、この数をnumber of alternationとする。Number of alternationをtotal arm entriesから2を引いた数で割り、それに100を掛けて求めた値をpercent alternationとし、これを自発的交替行動の指標とした。

2) TNF- α 欠損骨髄キメラマウスの作成:

TNF- α 欠損骨髄キメラマウスの作成は、通常実施されているマウスBMT技術を応用して、放射線照射を分割することによりほぼ完全に骨髄細胞を置換させた。

a) 骨髄移植術(BMT)

マウスはSPF環境で飼育し、BMT2日前よ

り抗生剤(ゲンタマイシン500ug/L、メタキシリン125,000U/L)を飲料水に混ぜて自由摂取させた。レシピエントには、放射線照射を2回に分割して行い合計10Grayを照射した。2回目の放射線照射後に、ドナーの骨髄細胞を 5×10^6 cells/ml濃度に調整し、レシピエントに尾静脈より250 μ l静注した。BMT実施3週間後に、尾静脈より血液を採取しPCRで骨髄の置換を確認した。

b) LPS投与試験

BMT実施後5-6週のマウスを用い、200 μ gのLPSを腹腔(i.p)に投与し、経時的に血中サイトカインなどの変動を測定した。

C. 研究結果

脳内TNF- α を薬剤により阻害するためプロペントフィリン、ペントキシフィリンをLP-BM5感染後9週目より1日2回1週間連続投与しTNF- α 合成に及ぼす薬剤の影響ならびにADCに対する薬効の行動薬理学試験(Y-maze test)などを実施した。その結果、LP-BM5感染により合成の亢進した脾臓のTNF- α がプロペントフィリン投与により有意にその合成を抑制していた。しかし、脳ではその抑制効果は全く認められなかった。これに対し、ペントキシフィリン投与では、脾臓および脳の両方においてTNF- α の合成を抑制していた(図1)。脳におけるTNF- α の合成を抑制したペントキシフィリンを用いて行動薬理学試験を行った。その結果、図2に示すとおり脳内TNF- α を抑制したペントキシフィリンにおいてADC改善効果が認められた。免疫不全の程度の指標になることが知られている脾細胞のConA、LPS刺激に対するチミジンの取り込み量の変化は、薬剤投与によって何ら改善されなかった。