

細胞を放射線処理し APC として S100  $\beta$  蛋白にて STCL を刺激。刺激 2 日後に APC を除去し、IL2 を加え 2 日間培養した。STCL が増殖しているのを確認した後、マイトマイシン処理した HTLV-I 感染細胞株 (HUT102) と 4 日間培養した。培養後 HUT102 を除去し、再度 APC と S100  $\beta$  蛋白にて STCL を刺激して 3 日後 APC を除去し HTLV-I 感染 S100  $\beta$  抗原特異的 T 細胞 (以下 SHUT) を作成した。

## 2) HTLV-I 感染の確認

SHUT の HTLV-I 感染率については、anti-rat CD3 抗体と anti-HTLV-I gag 抗体を用いた免疫染色を行いフローサイトメトリーとレーザースキャニングサイトメーターにて検討した。また、HTLV-I pX 領域と rat の GAPDH を標的とした定量的 PCR を行い、HTLV-I 感染率の再確認を行った。HUT102 の混入の有無について確認するため anti-human CD4 抗体を用いたフローサイトメトリーと、human の  $\beta$  actin を標的とした定量的 PCR も行った。

## 3) 接種実験

生後 8 週 of ラットを SHUT、STCL、HUT102、PBS 接種群の 4 群に分け、各群 4 匹ずつ計 16 匹に尾静脈より接種した。接種 1 週後と 4 週後に各群を 2 匹ずつ解剖し、脳と脊髄を摘出しホルマリン固定後パラフィン標本とした。また、生後 6 週 of ラットを recombinant HTLV-I-gag-env 蛋白 (以下 GE 蛋白) と CFA にて感作し、その 2 週後に SHUT、STCL、HUT102、PBS を

各々 4 匹ずつ計 16 匹に尾静脈より接種した。接種 1 週後と 4 週後に各群を 2 匹ずつ解剖し、未感作群と同様に標本を作成した。

## 4) 組織学的検討

HE 染色を行い炎症性細胞浸潤の有無と程度を確認した。さらに HTLV-I tax 特異的抗体 LT-4 を用いた免疫染色を行い、HTLV-I 感染 SHUT の脳実質への浸潤を確認した。

## C. 研究結果

SHUT の HTLV-I の感染は、数%の細胞に認められた (図 1, 表 1)。SHUT は human CD4 抗原陰性 (図 2) であり、human の  $\beta$  actin gene 陰性 (表 1) であることから HTLV-I 陽性 SHUT は HUT102 の混入ではないことが確認された。

表 1. ABI PRISM7700 を用いた定量的 PCR による HTLV-I 感染効率の検定。

	STCL 接種群	SHUT 接種群
$\beta$ actin	0%	0%
tax	0%	2.1%

HUT102 と PBS を接種した群ではいずれも、中枢神経系に病理学的変化は認められなかった。STCL と SHUT を接種した群では、1 週後に髄膜及び、脳内血管周囲への炎症性細胞浸潤が認められ (図 3)、4 週後には炎症性細胞浸潤は消失した。STCL 接種群の場合は、GE 蛋白で前感作した群の炎症細胞浸潤の程度が前感作しない群と比較して弱い傾向にあったが、SHUT

接種群では逆に強い傾向にあった(表2)(図4)。

表2. 血管周囲への炎症性細胞浸潤程度の評価のまとめ。

	STCL 接種群	SHUT 接種群
GE 蛋白(-)	+++	+
GE 蛋白(+)	++	++

SHUT 接種群の LT-4 を用いた免疫染色では、陽性細胞が検出されており、尾静脈より接種された HTLV-I 感染 SHUT が脳内に血行性に浸潤し HTLV-I tax を発現していることが確認された。(図5)

#### D. 考察

STCL はラットへの受け身移入によりこれまでの報告通り、臨床症状を示さない一過性の脳脊髄炎を起こすことが確認された。しかしながら前感作しない群において、SHUT 接種群は STCL 接種群と比較して炎症性細胞浸潤が減少する傾向が認められており、STCL は HUT102 と共培養することにより脳炎惹起性が減弱化する可能性が考えられた。一方で STCL を接種した群間での比較では、前感作した群において炎症性細胞浸潤が前感作しない群に比べて減少する傾向が認められた。この事は、GE 蛋白での前感作というストレスが、その後の抗原特異的 T 細胞による炎症反応を非特異的に抑制した可能性を示唆していると考えられた。反対に SHUT を接種した群間での比較で、前感作した群は前感作しない群に比べて脳脊髄炎の増強が

認められており、この増強効果は脳内に浸潤した HTLV-I 感染 SHUT が発現する HTLV-I 抗原に対する免疫応答が存在する事を示唆していると考えられた。しかしながら本研究では SHUT の HTLV-I 感染率は数%と低く、実際のところ中枢神経内における浸潤感染細胞数は非常に少なかったため、これらの傾向が感染細胞によるものかどうかは疑問が残った。今後はより感染率を高めることでこれらの傾向がより明確になるかどうか確認の必要があると思われた。

#### E. 結論

本研究により、血流を介して浸潤した感染細胞が発現する HTLV-I 抗原に対する免疫応答を中枢神経内に惹起することが出来た。今後このモデルは HAM の病態解明に有用であると考えられた。しかしながら、このモデルは炎症が一過性であることや、臨床症状を呈さないなどの問題点もあるため、今後は SHUT の HTLV-I 感染率を高めることや、毎週投与などの方法にて持続感染系を作り臨床症状についても検討することが必要であると思われた。さらにこのモデル動物脳内での感染細胞の同定や、種々の免疫染色による病態の解析も必要だと思われた。

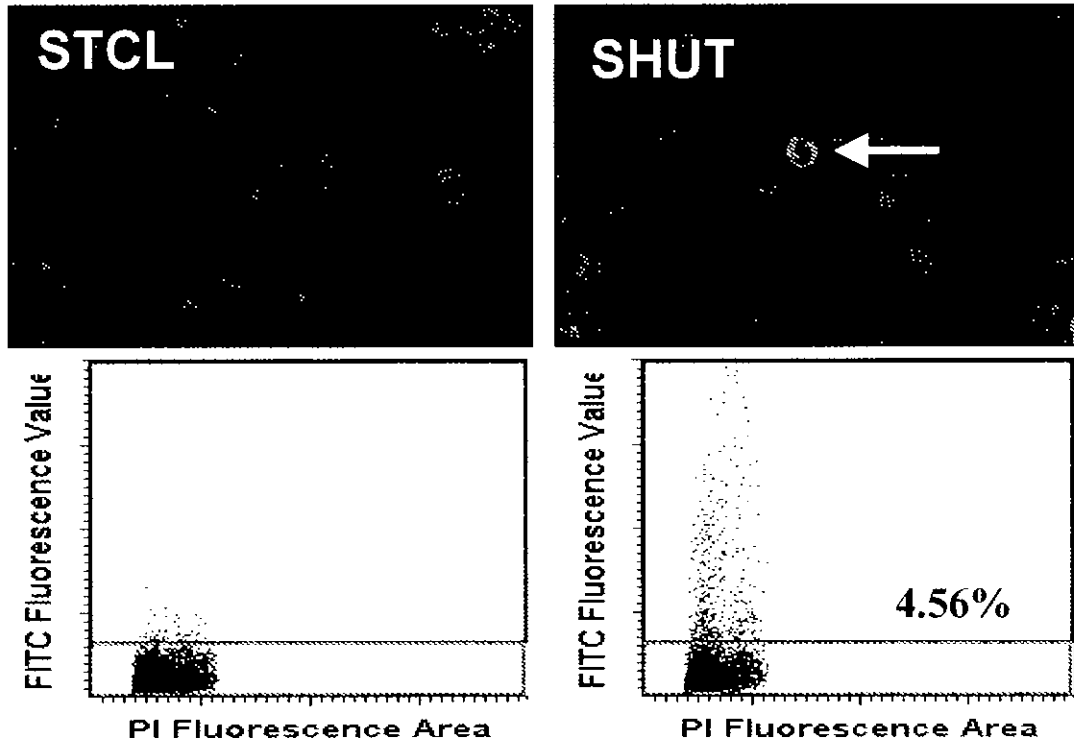


図1. レーザースキャニングサイトメーターによる HTLV-I 感染効率の検定  
 (← HTLV-I-gag 陽性細胞)。

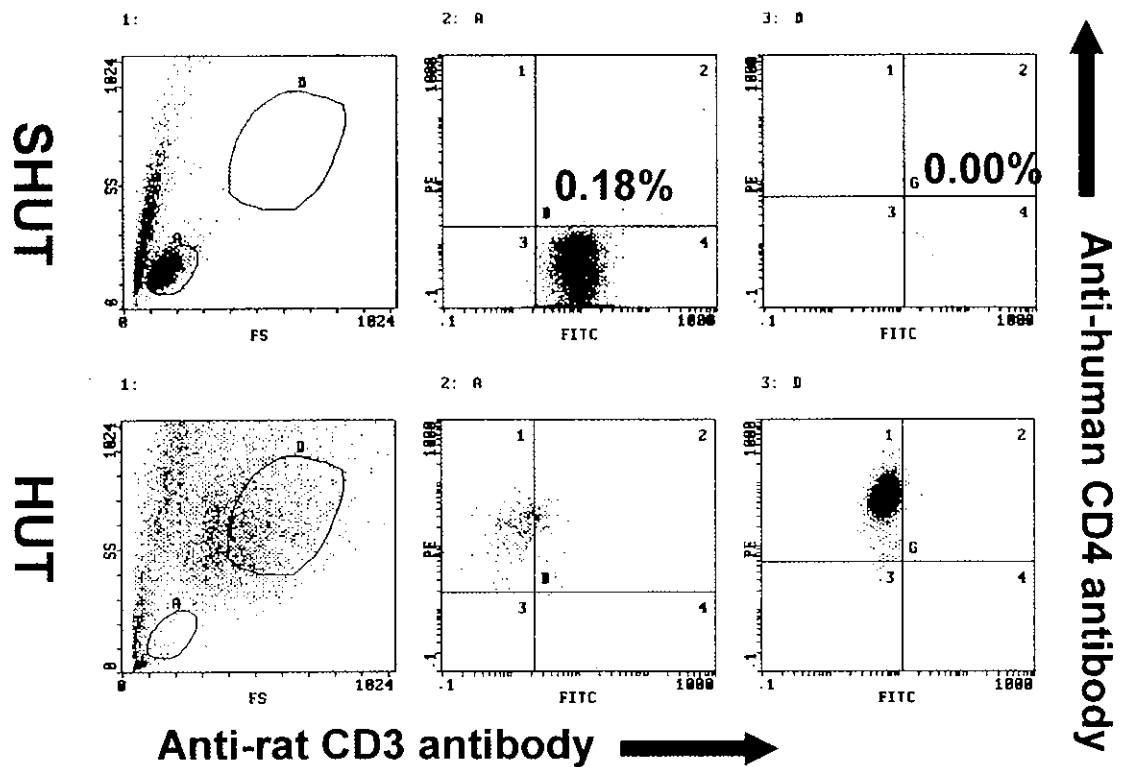


図2. フローサイトメトリーによる HUT102 混入の有無の確認



図3. STCL 接種1週後群（前感作-）のHE染色  
 A：大脳表面～髄膜、B：大脳半球

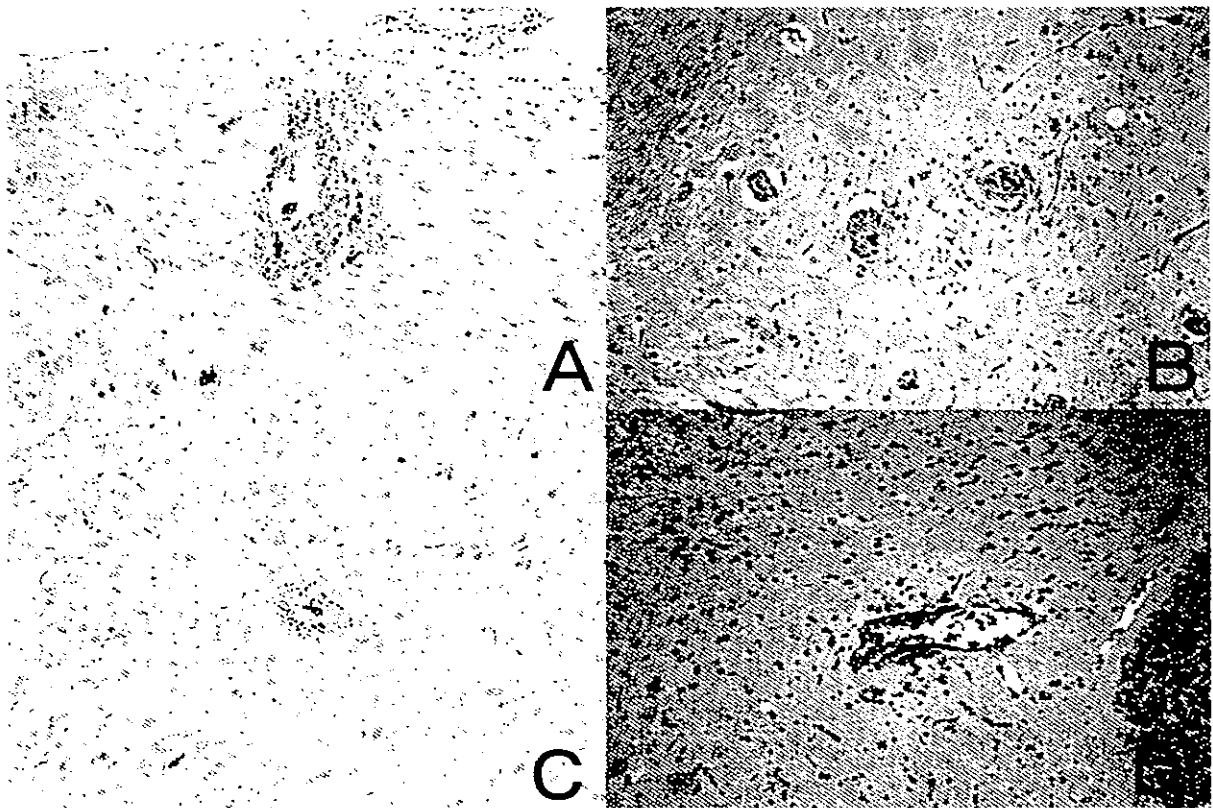


図4. STCL 及び SHUT 接種1週後群のHE染色（大脳皮質）  
 A：STCL 接種群（前感作-）、B：STCL 接種群（前感作+）  
 C：SHUT 接種群（前感作-）、D：SHUT 接種群（前感作+）

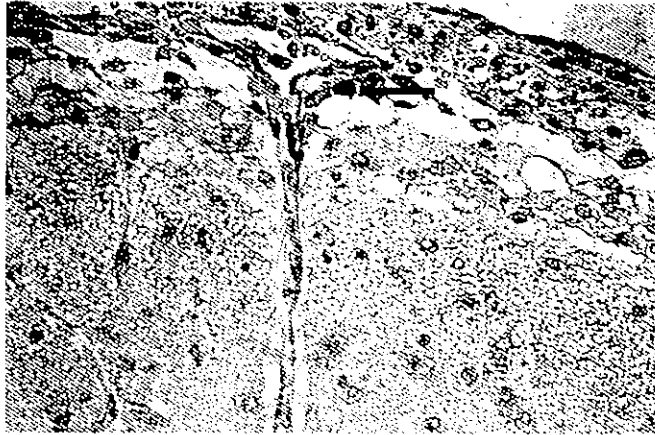


図5. SHUT 接種1週後群（前感作+）のLT-4を用いた免疫染色（大脳皮質）。  
（←LT-4 陽性細胞）

## ウイルスの持続感染と神経障害に関する研究

分担研究者 田平 武 国立療養所中部病院・長寿医療研究センター

共同研究者 清水透子 同

原 英夫 同

### 研究要旨

CD9は全身に広く分布している膜蛋白で、細胞接着や遊走性に関与しているといわれる。神経系では胎生期では神経の軸索伸長に関与し、出生後は中枢、末梢ともに主要な髄鞘蛋白の構成成分となる。そこで、各種神経疾患に於いてCD9の障害の有無を検討するため、髄液中の抗CD9抗体を測定したところ、髄液中の抗CD9抗体はSSPE患者14例全例で上昇していた。これに対し、他の神経疾患では殆ど検出されなかった。また、SSPE患者髄液中の抗CD9抗体は発症早期よりすでに高値をとっており、進行と共にピークを迎え、末期では減少してくることがわかった。SSPEの剖検脳において、CD9の発現は麻疹ウイルスの存在領域に一致して、脱髄巢のみならず、非脱髄巢でも減少していた。よってSSPEの発症や病勢にCD9は関係している。

### A 研究目的

エイズ脳症では白質の淡明化がみられ、病態に関与していると考えられる。その発症機序は明らかでないが、ウイルスの持続感染が関与していると考えられる。本研究はウイルスの持続感染による神経障害の発症機序を明らかにする為に亜急性硬化性全脳炎をモデルとして研究することを目的とする。

CD9は膜4回貫通型のglycoproteinで血球系や非血球系の細胞に広く発現しており、細胞増殖や細胞接着、細胞の遊走性に関与し、癌細胞の転移等に関係している。神経系では胎生期に交感神経に発現し、神経細胞の突起伸長を促し、出生後は中枢、末梢ともに主要な髄鞘蛋白の構成成分となる。

そこで、脱髄を来す神経疾患に於いてCD9の障害の有無を検討するため、髄液中の抗CD9抗体を測定した。

### B 研究対象、方法

健常人8例、  
疾患群例136例

抗原として、GST-CD9とback ground用にGSTを用いたELISA法により検討した。陽性患者はすべて、Western blot法により髄液中の抗CD9抗体を再確認した。神経感染症として、亜急性硬化性全脳炎14例、無菌性髄膜炎25例、サイトメガロウイルス脳炎3例、進行性多巣性白質脳症4例、HIV脳症7例、日本脳炎4例、HTLV-1 associated myelopathy 3例、脱髄性疾患と

して MS 14 例 (8 例 acute exacerbation phase, 6 chronic remitting condition) CIDP 4 例、ADEM 3 例、その他の神経変性疾患として Machado-Joseph disease 3 例、ALS 7 例、先天性髄鞘形成不全症 3 例、脳腫瘍 3 例について検討した。さらに、CD9 が血球系の細胞にも発現していることから、血液疾患 21 例についても検討した。また、自己抗体検出のため、自己免疫性疾患 18 例についても検討した。さらに、陽性であった疾患の剖検脳を免疫組織化学染色し、CD9 の発現を検討した。

(倫理面の配慮)

本研究にご協力を頂いた患者髄液はすべて書面にて患者、主治医の同意を得て行った。また、SSPE 患者家族で組織されている SSPE 青空の会のご協力を頂いた。HIV 患者髄液は都立駒込病院 岸田修二先生から提供して頂いた。

## C 研究結果

1) 患者髄液中の抗 CD9 抗体は SSPE 患者全例で上昇していた。これに対し、他の神経感染症や神経変性症では殆ど検出されなかった。さらに、脱髄性疾患でもその病期にかかわらず、髄液中の抗 CD9 抗体は殆ど検出されず、血液疾患や自己免疫疾患も髄液中抗 CD9 抗体は殆ど検出されなかった (Fig.1A,B)。これは Western blot 法で確認された (Fig.1C)。HIV 脳症患者では CD9 抗体の上昇は認めなかった。

2) SSPE 患者髄液中の抗 CD9 抗体は SSPE 発症早期よりすでに高値をとっており、Jabbour の分類で stage 2-3 の脳萎縮が画像的に確認される以前か同時期にピークとなり、stage 4 の末期では減少してくること

がわかった。

3) SSPE の剖検脳において CD9 と MBP を免疫染色したところ、CD9 は脱髄巣のみならず、MBP が温存されているような比較的髄鞘が保たれている非脱髄巣でもその染色性が減少していた。さらに、CD9 に対しその染色性が低下している領域は麻疹ウイルスの存在領域と一致していた。

## D 考察

SSPE は麻疹ウイルスによって起る slow virus infection で、致命的な疾患である。しかし、その発症機構や病態については殆ど分っていない。以前、SSPE の発症は麻疹ウイルスの構成成分である M 蛋白が変異した変異ウイルスによる感染であるといわれていたが、近年、一般の麻疹症状のみを呈した患者からもこの種の変異ウイルスが数多く分離され、SSPE の発症をウイルス側の因子だけで説明するのは困難になってきている。一方で麻疹ウイルスレセプターの一つである CD46 と CD9 が血球系の培養細胞において associate しており、互いに complex を形成しているとの報告がある。抗 CD9 抗体が SSPE 患者の髄液中に産生されるのは、麻疹レセプターである CD46 に結合した麻疹ウイルスと CD9 が近接しているために CD9 も抗原として認識されている可能性がある。

一方、T-cell 系の培養細胞に抗 CD9 抗体を投与したところ、アポトーシスを引き起こしたとの報告もあり、現在、我々は、神経系の培養細胞にて抗 CD9 抗体によるアポトーシスの誘導実験および、マウスに CD9 抗原を免疫し、それに対して、産生された抗 CD9 抗体の中樞神経系への影響を調べる実験を行なっている。

F 研究発表

1.T.Shimizu ,et al. Elevated Cerebrospinal Fluid Levels of Anti-CD9 Antibodies in Patients with Subacute Sclerosing Panencephalitis. *Journal of Infectious Disease* (in press).

2.Koirala TR, Nakagaki K, Ishida T, Nonaka S, Morikawa S and Tabira T: Decreased Expression of MAP-2 and GAD in the Brain of Cats Infected with Feline Immunodeficiency Virus. *Tohoku J Exp Med* (in press).

3.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* 7:487-92, 2001