

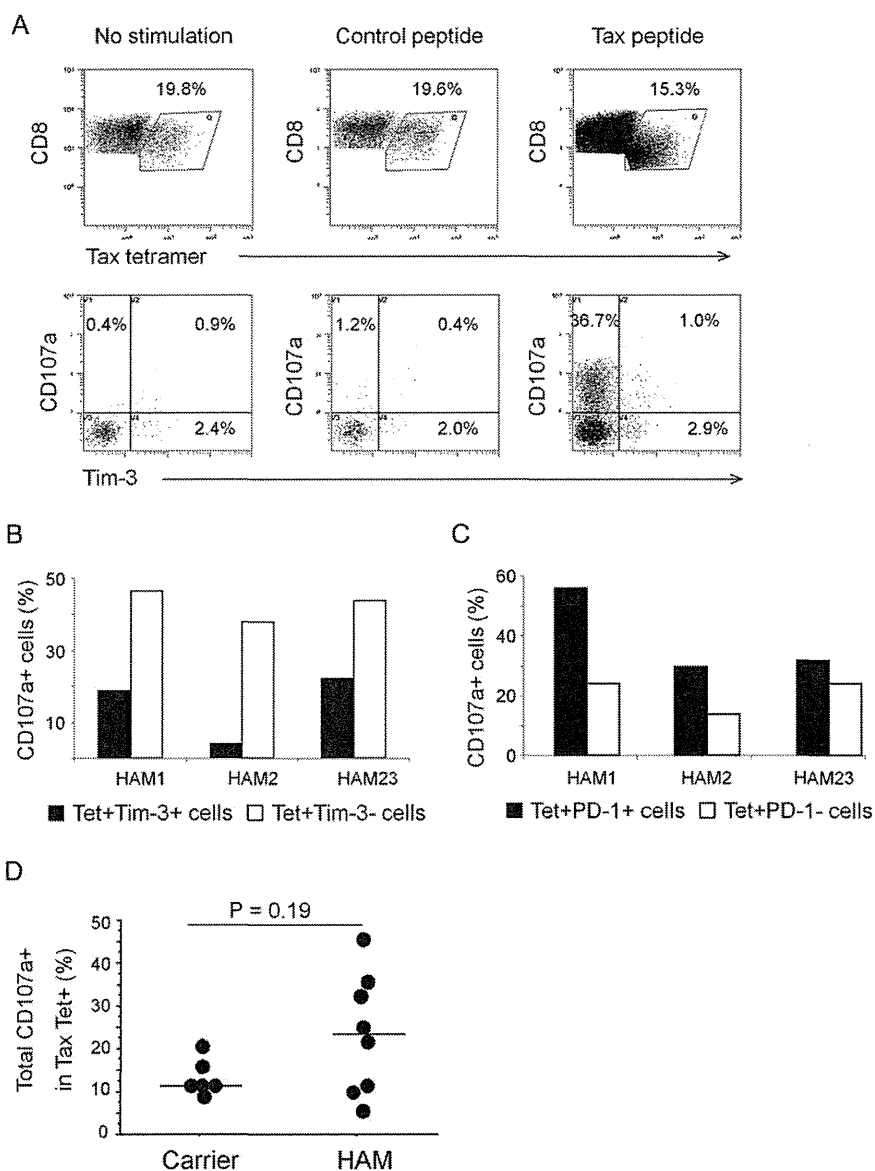
**Figure 4.** Reduced IFN- $\gamma$  production by Tim-3<sup>+</sup> HTLV-I Tax-specific CTLs. PBMCs from 5 HAM/TSP patients were stimulated with PMA and ionomycin, and cultured for 6 hours in the presence of brefeldin A. IFN- $\gamma$  production was determined by flow cytometry in CD8<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>Tax tetramer<sup>+</sup> cells with or without Tim-3 or PD-1 expression. (A, D) Representative data from a HAM/TSP patient are shown. The upper and lower rows show the percentage of IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> cells in gated CD8<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>Tax tetramer<sup>+</sup> cell populations, respectively. In A, Tim-3<sup>+</sup> cells within CD8<sup>+</sup> and Tax tetramer<sup>+</sup> cell populations have a lower percentage of IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> cells than do Tim-3<sup>-</sup> cells. In D, PD-1<sup>+</sup> cells within CD8<sup>+</sup> and Tax tetramer<sup>+</sup> cell populations have a higher percentage of IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> cells than do PD-1<sup>-</sup> cells. (B) Summary data from 5 HAM/TSP patients show a significantly lower percentage of IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> cells within the CD8<sup>+</sup>Tim-3<sup>+</sup> cell population than within the CD8<sup>+</sup>Tim-3<sup>-</sup> one, after background subtraction ( $P = .043$  by Wilcoxon signed-rank test). (C) Summary data from 3 HAM/TSP patients with high percentage of CTLs show a lower percentage of IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> cells within the Tax tetramer<sup>+</sup>Tim-3<sup>+</sup> cell population than within the Tax tetramer<sup>+</sup>Tim-3<sup>-</sup> one, after background subtraction. (E) Summary data from 5 HAM/TSP patients show a significantly higher percentage of IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> cells within the CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> cell population than within the CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>-</sup> one ( $P = .043$  by Wilcoxon signed-rank test). (F) Summary data from 4 HAM/TSP patients with high percentage of CTLs show a higher percentage of IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> cells within the Tax tetramer<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> cell population than within the Tax tetramer<sup>+</sup>PD-1<sup>-</sup> one.

**NOTE:** PBMCs: peripheral blood mononuclear cells; HAM/TSP: HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis; PMA: phorbol 12-myristate 13-acetate; IFN- $\gamma$ : interferon- $\gamma$ ; Tim-3: T cell immunoglobulin and mucin domain-containing molecule-3; PD-1: programmed cell death-1; CTLs: cytotoxic T lymphocytes; Tet: tetramer.

respectively). Conversely, IFN- $\gamma$  was predominately produced by PD-1<sup>+</sup> cells and less by PD-1<sup>-</sup> cells in both groups (Figures 4E and 4F). Statistical analysis showed a significant difference in IFN- $\gamma$  production within CD8<sup>+</sup> cells, as measured by frequency ( $P = .043$ ). However, no difference was observed in the MFI.

#### Reduced CD107a Expression on Tim-3<sup>+</sup> HTLV-I Tax-specific CTLs

To assess the cytolytic activity of HTLV-I Tax-specific CTLs with or without Tim-3 or PD-1 expression, we measured CD107a expression after specific peptide stimulation of Tax-specific

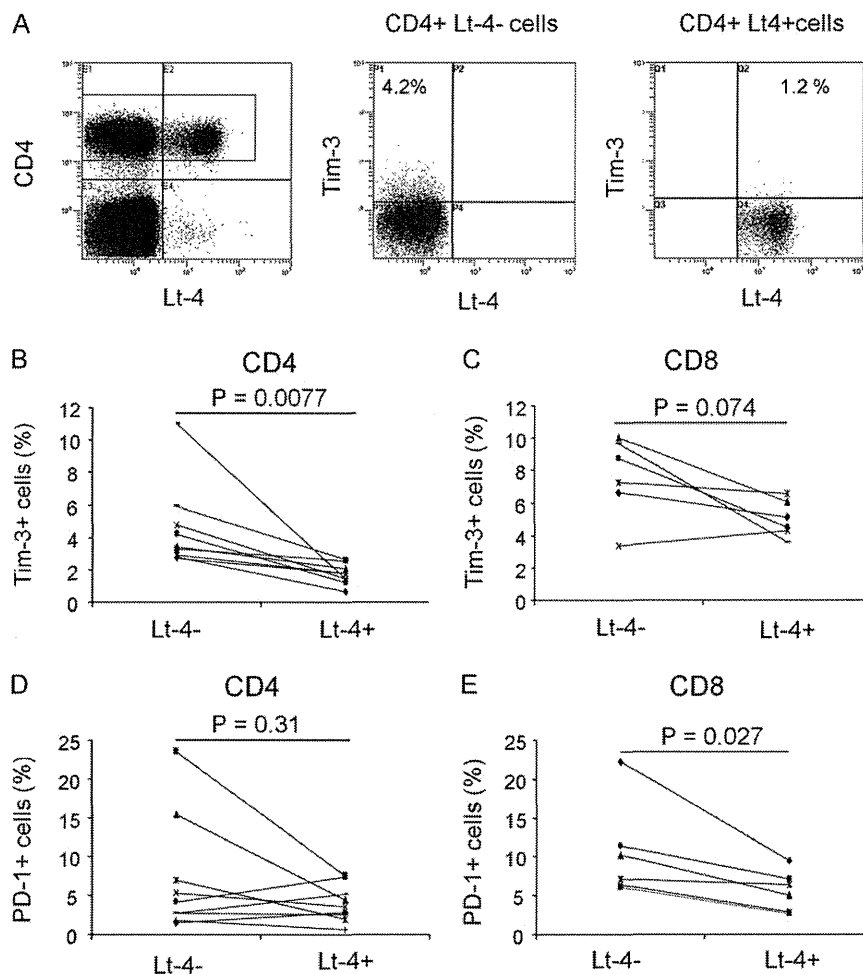


**Figure 5.** Reduced CD107a expression on Tim-3<sup>+</sup> HTLV-I Tax-specific CTLs. PBMCs from 8 HAM/TSP patients and 6 carriers were stimulated with HTLV-I Tax peptide or a control peptide, and cultured in the presence of an anti-CD107a antibody and brefeldin A for 4 hours. The expression of CD107a on CD8<sup>+</sup>Tax tetramer<sup>+</sup> cells was analyzed. (A) Representative data from a HAM/TSP patient are shown. In the upper row, Tax peptide-stimulated Tax tetramer<sup>+</sup> cells show a parallel decrease in fluorescence intensity for CD8 and Tax tetramer. The same was not observed with the control peptide. The percentage of tetramer<sup>+</sup> cells is reduced after Tax peptide stimulation. In the lower row, the frequency of CD107a-expressing cells is analyzed in tetramer<sup>+</sup>Tim-3<sup>+</sup> and tetramer<sup>+</sup>Tim-3<sup>-</sup> cells. Tetramer<sup>+</sup>Tim-3<sup>+</sup> cells show a lower percentage of CD107a<sup>+</sup> cells than tetramer<sup>+</sup>Tim-3<sup>-</sup> cells. (B, C) Three HAM/TSP patients from whom more than 10<sup>4</sup> Tax-tetramer<sup>+</sup> cells could be collected were chosen for a precise evaluation. (B) The summary data show low CD107a expression in tetramer<sup>+</sup>Tim-3<sup>+</sup> cells in comparison with tetramer<sup>+</sup>Tim-3<sup>-</sup> cells, after background subtraction. (C) The summary data show high CD107a expression in tetramer<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> cells in comparison to tetramer<sup>+</sup> PD-1<sup>-</sup> cells. (D) The percentage of CD107a<sup>+</sup> cells within Tax tetramer<sup>+</sup> cells from 8 HAM/TSP patients and 6 carriers is shown. No significant difference was observed in the percentage of CD107a<sup>+</sup> cells between the 2 groups (*P* = .19 by Mann-Whitney *U* test). The bars indicate the medians.

**NOTE:** PBMCs: peripheral blood mononuclear cells; HAM/TSP: HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis; HTLV-I: human T-lymphotropic virus type I; CD107a: cluster of differentiation 107a; HAM: HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis; Tet: tetramer.

CTLs from 8 HAM/TSP patients and 6 asymptomatic carriers. Representative data from a HAM/TSP patient are shown in Figure 5A. Specific antigen-induced CD107a expression was higher in tetramer<sup>+</sup>Tim-3<sup>-</sup> cells than in tetramer<sup>+</sup>Tim-3<sup>+</sup>

cells. At the same time, CD107a expression was higher in tetramer<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> cells than in tetramer<sup>+</sup>PD-1<sup>-</sup> cells from 3 HAM/TSP patients from whom we could collect more than 10<sup>4</sup> tetramer<sup>+</sup> cells for a more precise evaluation (Figures 5B and 5C).



**Figure 6.** Low expression of Tim-3 on HTLV-I-infected cells. PBMCs from 9 HAM/TSP patients were cultured for 12 hours. Cells were double stained for the intracellular HTLV-I Tax protein, using the Lt-4 antibody, and the cell surface Tim-3 or PD-1. (A) After gating on CD4<sup>+</sup> cells, expression of Tim-3 was analyzed in either CD4<sup>+</sup>Lt-4<sup>-</sup> or CD4<sup>+</sup>Lt-4<sup>+</sup> cells. Representative data from a HAM/TSP patient show low percentage of Tim-3<sup>+</sup> cells in CD4<sup>+</sup>Lt-4<sup>+</sup> cells in comparison to CD4<sup>+</sup>Lt-4<sup>-</sup> cells. (B, D) Combined data from 9 HAM/TSP patients show significantly lower Tim-3 expression in CD4<sup>+</sup>Lt-4<sup>+</sup> cells than in CD4<sup>+</sup>Lt-4<sup>-</sup> cells. No significant difference in PD-1 expression between both groups was found by Wilcoxon signed-rank test. (C, E) Combined data from 6 HAM/TSP patients show that Tim-3 expression tended to be lower in CD8<sup>+</sup>Lt-4<sup>+</sup> cells than in CD8<sup>+</sup>Lt-4<sup>-</sup> cells and that PD-1 expression was significantly lower in CD8<sup>+</sup>Lt-4<sup>+</sup> cells than in CD8<sup>+</sup>Lt-4<sup>-</sup> cells, by Wilcoxon signed-rank test.

**NOTE:** PBMCs: peripheral blood mononuclear cells; HAM/TSP: HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis; HTLV-I: human T-lymphotropic virus type I; Tim-3: T cell immunoglobulin and mucin domain-containing molecule-3; PD-1: programmed cell death-1.

Furthermore, when we reanalyzed the frequency or MFI of CD107a<sup>+</sup> cells within the Tax tetramer<sup>+</sup> cell population, we could not detect a significant difference between HAM/TSP patients and asymptomatic carriers (Figure 5D). Also, we could not detect a significant correlation between the frequency of CD107a<sup>+</sup> cells and HTLV-I proviral load (data not shown).

#### Low Expression of Tim-3 on CD4<sup>+</sup> HTLV-I-infected Cells

To assess Tim-3 expression on HTLV-I-infected cells, we cultured PBMCs from 9 HAM/TSP patients for 12 hours in order to induce the expression of the HTLV-I Tax protein [30]. After harvesting, Tax protein was simultaneously detected with Tim-3 or PD-1 (Figure 6A). We observed that

Tim-3 expression was significantly lower in Tax<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> cells (Lt-4<sup>+</sup> cells) than in Tax<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> cells ( $P = .0077$  [Figure 6B]). On the contrary, we observed no significant differences in PD-1 expression between Tax<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> and Tax<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> cells ( $P = .31$  [Figure 6D]). In addition, we assessed the expression of Tim-3 or PD-1 in infected CD8<sup>+</sup> cells from 6 cases that showed a reasonable percentage of infected CD8<sup>+</sup> cells. We found that Tim-3 expression tended to be lower in Tax<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> cells than in Tax<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> cells ( $P = .074$  [Figure 6C]), whereas PD-1 expression was significantly lower in Tax<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> cells than in Tax<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> cells ( $P = .027$  [Figure 6E]). No significant correlations were observed between the MFI of Lt-4-positive cells and the frequency or

MFI of Tim-3 or PD-1 within CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> cells (data not shown). The percentage of infected CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells in asymptomatic carriers or tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cells in HAM/TSP patients was too small to assess Tim-3 or PD-1 expression.

## CONCLUSIONS

We found that the proportion of Tim-3<sup>+</sup> cells within CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell populations of HTLV-I-infected individuals (both HAM/TSP patients and asymptomatic carriers) is significantly lower than in healthy controls (Figure 1). This reduction was much clearer in Tax-specific CTLs because the frequency of Tim-3-expressing cells in CTLs was lower than in the total CD8<sup>+</sup> population of infected individuals (Figures 2B–D). In addition, Tim-3<sup>+</sup> cell frequency in HTLV-I Tax-specific CTLs was significantly lower than in CMV-specific CTLs from HAM/TSP patients (Figure 2B). Interaction of Tim-3 with its ligand, galectin-9, regulates Th1 cell responses by promoting the death of IFN- $\gamma$ -producing Th1 cells, suggesting that Tim-3 may play a role in suppressing Th1-mediated immune responses [18]. Our results showing that the frequency of Tim-3<sup>+</sup> cells is reduced within CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in HTLV-I infection strongly suggest that the Th1/Tc1 immune response is not negatively regulated by Tim-3 in HTLV-I infection. Rather, immune cells such as HTLV-I-specific CTLs may be resistant to cell death through the Tim-3/galectin-9 pathway [18]. In this sense, the increased number of Tim-3<sup>-</sup> HTLV-I Tax-specific CTLs may contribute to the control of viral replication. In the present study, we found that IFN- $\gamma$  production was decreased in CD8<sup>+</sup> cells and HTLV-I Tax-specific CTLs that expressed Tim-3 as compared with their Tim-3<sup>-</sup> counterparts in HAM/TSP patients (Figure 4). In addition, CD107a expression was lower in Tim-3<sup>+</sup> HTLV-I Tax-specific CTLs from HAM/TSP patients (Figure 5). These results indicate that Tim-3 identifies a subset of CTLs with impaired production of cytokines and cytolytic activity. The decreased expression of Tim-3 in HTLV-I infection is in marked contrast to other chronic viral infections such as HIV and HCV infections, where Tim-3 expression is increased in T cells, including the virus-specific CTLs [19, 20]. It would be of interest to determine whether Tim-3 expression is also reduced in other chronic viral infections and to clarify the mechanisms underlying Tim-3 down-regulation in HTLV-I infection.

Interestingly, our data demonstrated that Tim-3 and CD107a expression in HTLV-I Tax-specific CTLs was not significantly different between HAM/TSP patients and asymptomatic carriers (Figures 2F and 5D); however, Tim-3 MFI was higher in asymptomatic carriers than in HAM/TSP patients. Our data suggest that the killing activity of the CTLs is not different between the 2 groups. Controversially, others have reported that CD107a expression is lower in HTLV-I Tax-specific CTLs from HAM/TSP patients than from asymptomatic carriers, and that CTL function is impaired in HAM/TSP patients as compared with

asymptomatic carriers [24]. This controversy may result from differences in sample type and procedures, including the gating for tetramer<sup>+</sup> cells after antigen stimulation. To address this issue, more detailed analyses of HTLV-I-specific CTL function in HAM/TSP patients and asymptomatic carriers would be necessary to ascertain whether differences could define the clinical condition.

In this study, we found that PD-1 expression levels on T cells of HAM/TSP patients and asymptomatic carriers were not different from those of healthy controls. However, we observed that PD-1 expression was significantly higher in HTLV-I Tax-specific CTLs than in CMV-specific CTLs (Figure 3E) and significantly higher in HTLV-I Tax-specific CTLs from asymptomatic carriers than from HAM/TSP patients. This result is in partial agreement with a previous study on HTLV-I infection, in which a marked increase of PD-1 expression was found in HTLV-I Tax-specific CTLs from both asymptomatic carriers and ATL patients as compared with CMV- and EBV-specific CTLs [31]. We found that IFN- $\gamma$  production was higher in CD8<sup>+</sup> cells and HTLV-I Tax-specific CTLs that expressed PD-1 as compared with their PD-1<sup>-</sup> counterparts in HAM/TSP patients (Figures 4E and 4F). In addition, CD107a expression was higher in PD-1<sup>+</sup> HTLV-I Tax-specific CTLs of HAM/TSP patients (Figure 5C). These results indicate that PD-1<sup>+</sup> HTLV-I Tax-specific CTLs are capable of producing proinflammatory cytokines and have high cytolytic activity during HTLV-I infection. An increase in IFN- $\gamma$  production by PD-1<sup>+</sup> T cells has been recently shown in simian immunodeficiency virus (SIV) infection and in an animal model of autoimmune nephritis [32, 33]. Interestingly, PD-1<sup>+</sup> cells were predominantly detected within CD107a<sup>+</sup> antigen-specific T cells in SIV infection [34]. In this context, it is proposed that the primary mechanism by which PD-1 affects CD8<sup>+</sup> T cell function involves regulation of cell proliferation and survival [32, 35]. Our results suggest that HTLV-I Tax-specific CTLs exhibit an increased expression of PD-1, albeit a reduced expression of Tim-3. This is in marked contrast to other chronic viral infections such as HIV and HCV infections, in which both PD-1 and Tim-3 are expressed at high levels in the virus-specific CTLs [19, 20]. Double staining for Tim-3 and PD-1 revealed that these are expressed by distinct populations of CD8<sup>+</sup> T cells in HIV infection and that the predominance of either Tim-3<sup>+</sup>PD-1<sup>-</sup> or Tim-3<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> cells in HIV-specific CTLs differs among individuals [19]. At the same time, CMV- and HCV-specific CTLs are predominantly Tim-3<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> and Tim-3<sup>+</sup>PD-1<sup>-</sup>, respectively [20]. In our study, the average percentage of PD-1<sup>+</sup> cells in HTLV-I Tax-specific CTLs was 65.9% and 22.3% in carriers and HAM/TSP patients, respectively (Figure 3C); the average percentage of Tim-3<sup>+</sup> cells was 3.5% and 3.2%, respectively (Figure 2F), suggesting that the majority of the CTLs expressing T cell exhaustion molecules has a Tim-3<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> phenotype. Taken together, these results suggest that PD-1 and Tim-3 may have a distinct function in regulating immune responses in HTLV-I infection.

We observed that HTLV-I Tax-expressing cells show a significant reduction in Tim-3 expression as compared with Tax<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cells and that Tim-3 expression in Tax<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cells tends to be lower than in Tax<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> cells. Tax<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cells also showed significantly lower PD-1 expression (Figure 6). This suggests that HTLV-I-infected cells may be resistant to cell death through the Tim-3/galectin-9 pathway. HTLV-I Tax combines a positive effect on cell cycle with a negative effect on apoptosis through transactivation of several host genes [36]. It would be of interest to further investigate whether Tax might regulate Tim-3 expression.

In summary, we demonstrated that the expression of the negative immune regulator Tim-3, but not of PD-1, is reduced on HTLV-I Tax-specific CTLs, CD4<sup>+</sup>, and CD8<sup>+</sup> T cells in both HAM/TSP patients and asymptomatic carriers. Moreover, we showed that Tim-3<sup>+</sup>, but not PD-1<sup>+</sup>, cells produce less IFN- $\gamma$  and exhibit low cytolytic activity within the CTL population. Tim-3 expression and CTL cytolytic activity were not different between HAM/TSP patients and asymptomatic carriers. In addition, CD4<sup>+</sup> HTLV-I Tax-expressing cells showed a significant reduction in Tim-3 expression as compared with Tax<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cells. These results suggest that HTLV-I Tax-specific CTLs preserve their cytolytic activity, thereby controlling viral replication.

## Funding

Grant-in-Aid for Research on Brain Science from the Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan, and Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan.

## Acknowledgments

We thank Ms. Takako Inoue for the excellent technical assistance.

## References

- Richardson JH, Edwards AJ, Cruickshank JK, Rudge P, Dalglish AG. In vivo cellular tropism of human T-cell leukemia virus type I. *J Virol* **1990**; 64:5682–7.
- Uchiyama T, Yodoi J, Sagawa K, Takatsuki K, Uchino H. Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. *Blood* **1977**; 50:481–92.
- Gessain A, Barin F, Vernant JC, et al. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet* **1985**; 2:407–10.
- Osame M, Usuku K, Izumo S, et al. HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet* **1986**; 1:1031–2.
- 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* **1993**; 52:424–30.
- Osame M, Matsumoto M, Usuku K, et al. Chronic progressive myelopathy associated with elevated antibodies to human T-lymphotropic virus type I and adult T-cell leukemia-like cells. *Ann Neurol* **1987**; 21:117–22.
- Nagai M, Usuku K, Matsumoto W, et al. Analysis of HTLV-I proviral load in 202 HAM/TSP patients and 243 asymptomatic HTLV-I carriers: high proviral load strongly predisposes to HAM/TSP. *J Neurovirology* **1998**; 4:586–93.
- Jacobson S, Shida H, McFarlin DE, Fauci AS, Koenig S. Circulating CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes specific for HTLV-I pX in patients with HTLV-I associated neurological disease. *Nature* **1990**; 348:245–8.
- Greten TF, Slansky JE, Kubota R, et al. Direct visualization of antigen-specific T cells: HTLV-1 Tax11-19-specific CD8(+) T cells are activated in peripheral blood and accumulate in cerebrospinal fluid from HAM/TSP patients. *Proc Natl Acad Sci USA* **1998**; 95:7568–73.
- Bangham CR, Osame M. Cellular immune response to HTLV-1. *Oncogene* **2005**; 24:6035–46.
- Blank C, Mackensen A. Contribution of the PD-L1/PD-1 pathway to T-cell exhaustion: an update on implications for chronic infections and tumor evasion. *Cancer Immunol Immunother* **2007**; 56:739–45.
- Sharpe AH, Wherry EJ, Ahmed R, Freeman GJ. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat Immunol* **2007**; 8:239–45.
- Okazaki T, Honjo T. Rejuvenating exhausted T cells during chronic viral infection. *Cell* **2006**; 124:459–61.
- Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* **2006**; 439:682–7.
- Trautmann L, Janbazian L, Chomont N, et al. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat Med* **2006**; 12:1198–202.
- D'Souza M, Fontenot AP, Mack DG, et al. Programmed death 1 expression on HIV-specific CD4<sup>+</sup> T cells is driven by viral replication and associated with T cell dysfunction. *J Immunol* **2007**; 179:1979–87.
- Hafler DA, Kuchroo V. TIMs: central regulators of immune responses. *J Exp Med* **2008**; 205:2699–701.
- Zhu C, Anderson AC, Schubart A, et al. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat Immunol* **2005**; 6:1245–52.
- Jones RB, Ndhlovu LC, Barbour JD, et al. Tim-3 expression defines a novel population of dysfunctional T cells with highly elevated frequencies in progressive HIV-1 infection. *J Exp Med* **2008**; 205:2763–79.
- Golden-Mason L, Palmer BE, Kassam N, et al. Negative immune regulator Tim-3 is overexpressed on T cells in hepatitis C virus infection and its blockade rescues dysfunctional CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. *J Virol* **2009**; 83:9122–30.
- Koguchi K, Anderson DE, Yang L, O'Connor KC, Kuchroo VK, Hafler DA. Dysregulated T cell expression of TIM3 in multiple sclerosis. *J Exp Med* **2006**; 203:1413–8.
- Vine AM, Witkover AD, Lloyd AL, et al. Polygenic control of human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) provirus load and the risk of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Infect Dis* **2002**; 186:932–9.
- Kubota R, Kawanishi T, Matsubara H, Manns A, Jacobson S. Demonstration of human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) tax-specific CD8<sup>+</sup> lymphocytes directly in peripheral blood of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients by intracellular cytokine detection. *J Immunol* **1998**; 161:482–8.
- Sabouri AH, Usuku K, Hayashi D, et al. Impaired function of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-specific CD8<sup>+</sup> T cells in HTLV-1-associated neurologic disease. *Blood* **2008**; 112:2411–20.
- Yashiki S, Fujiyoshi T, Arima N, et al. 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 1 tax peptide anchor motifs and epitopes to generate anti-HTLV type 1 tax CD8(+) cytotoxic T lymphocytes. *AIDS Res Hum Retroviruses* **2001**; 17:1047–61.
- Kozako T, Arima N, Toji S, et al. Reduced frequency, diversity, and function of human T cell leukemia virus type 1-specific CD8<sup>+</sup> T cell in adult T cell leukemia patients. *J Immunol* **2006**; 177:5718–26.
- Bunce M, O'Neill CM, Barnardo MC, et al. Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 &

- DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP). *Tissue Antigens* **1995**; 46:355–67.
28. Betts MR, Brenchley JM, Price DA, et al. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J Immunol Methods* **2003**; 281:65–78.
  29. Lee B, Tanaka Y, Tozawa H. Monoclonal antibody defining tax protein of human T-cell leukemia virus type-I. *Tohoku J Exp Med* **1989**; 157:1–11.
  30. Hanon E, Hall S, Taylor GP, 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* **2000**; 95:1386–92.
  31. Kozako T, Yoshimitsu M, Fujiwara H, et al. PD-1/PD-L1 expression in human T-cell leukemia virus type 1 carriers and adult T-cell leukemia/lymphoma patients. *Leukemia* **2009**; 23: 375–82.
  32. Petrovas C, Price DA, Mattapallil J, et al. SIV-specific CD8+ T cells express high levels of PD1 and cytokines but have impaired proliferative capacity in acute and chronic SIVmac251 infection. *Blood* **2007**; 110:928–36.
  33. Kasagi S, Kawano S, Okazaki T, et al. Anti-programmed cell death 1 antibody reduces CD4+PD-1+ T cells and relieves the lupus-like nephritis of NZB/W F1 mice. *J Immunol* **2010**; 184:2337–47.
  34. Hokey DA, Johnson FB, Smith J, et al. Activation drives PD-1 expression during vaccine-specific proliferation and following lentiviral infection in macaques. *Eur J Immunol* **2008**; 38:1435–45.
  35. Petrovas C, Casazza JP, Brenchley JM, et al. PD-1 is a regulator of virus-specific CD8+ T cell survival in HIV infection. *J Exp Med* **2006**; 203:2281–92.
  36. Sieburg M, Tripp A, Ma JW, Feuer G. Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2 tax oncoproteins modulate cell cycle progression and apoptosis. *J Virol* **2004**; 78:10399–409.

# HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の治療法を 確立していくために—その現状と展望—

The current and future approaches to the treatment of HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP)

山野嘉久 佐藤知雄 安藤 仁  
新谷奈津美 八木下尚子

## Abstract

Human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) is a retrovirus that is the causative agent of a progressive neurological disease termed HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). HAM/TSP is a chronic neuroinflammatory disease characterized by spastic paraparesis, lower limb sensory disturbance and bladder/bowel dysfunction. Over the twenty-five years since the discovery of this disease, significant advancements have been made in the pathogenic mechanisms associated with HAM/TSP, however, little progress has been made in the treatment of this disorder. This review highlights the natural history of HAM/TSP, informative results of clinical trials, and discusses the current and future approaches to the treatment of HAM/TSP within the context of our understanding of the underlying pathogenic mechanisms.

**Key words:** HAM/TSP, natural history, biomarker, treatment, unmet medical needs

## はじめに

ヒトT細胞白血病ウイルス (HTLV-1) 感染症は疫学的に我が国に特有の感染症であり、感染者は全国で約100万人以上存在する。また、感染者の一部に神経難病であるHTLV-1関連脊髄症 (HAM) あるいは致死率の高い成人T細胞白血病 (ATL) を発症することから、その対策は厚生行政のうえでも重要課題であるにもかかわらず、十分な方策が講じられていなかったが、2010年、政府に‘HTLV-1特命チーム’が発足し、全国一律で公費による妊婦HTLV-1抗体検査、HTLV-1感染症やHAM、ATLなどの関連

疾患に対する総合的な対策‘HTLV-1総合対策’の実施が決まった。HAMは、進行性の痙攣性対麻痺を特徴とし、患者の生活の質が大きく損なわれる極めて深刻な難治性疾患である。HAMの発見から25年、これまでに病態研究は精力的に進められ多くのことが判明してきたが、治療に関するエビデンスは乏しく、そのため治療指針は不明確でありHAMの治療は混乱しているのが現状である。しかもHAMは欧米の先進国では患者数が少ないために、これらの地域での治療エビデンスはほとんど存在しない。先進国でHAM患者が多いのは日本のみであるため、治療法を確立していくために必要な治療エビデ

Yoshihisa Yamano, Tomoo Sato, Hitoshi Ando, Natsumi Araya, Naoko Yagishita: Department of Rare Diseases Research, Institute of Medical Science, St. Marianna University School of Medicine 聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター 病因・病態解析部門

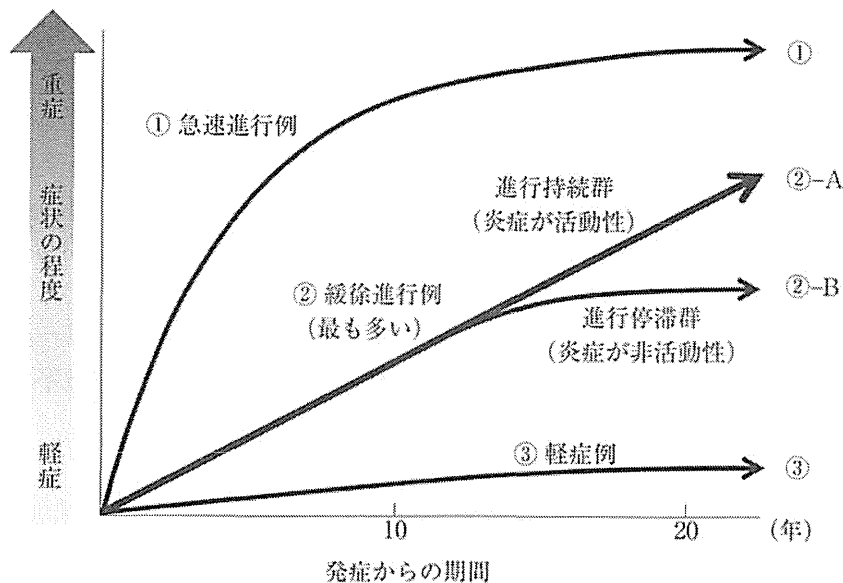


図1 HAMの臨床経過の特徴

ンスづくりに課せられた我が国の責務は大きい。

本稿では、このようにアンメットメディカルニーズの高いHAMの治療の現状をまとめ、これから治療法を確立していくために必要な課題や取り組みについて述べたい。

## 1. HAMの診療の現状

HAMは、1986年にOsameらにより一つの疾患単位として提唱され<sup>1)</sup>、2009年度からは国の難治性疾患克服研究事業の対象疾患(いわゆる難病)に認定されている。最近の疫学調査では、全国のHAM患者数は約3,000例と推定され、関東などの大都市圏で患者数が増加していると報告されている。初期症状は、歩行の違和感、足のしびれ、つっぱり感、足がもつれる、走ると転びやすいなどであるが、多くは進行し、歩行困難、頻尿、尿閉、高度の便秘、時に両下肢の疼痛などが出現し、徐々に日常生活が困難になる。重症例では下肢の完全麻痺や体幹の筋力低下による座位保持困難により、寝たきりになる場合もある。

著者らは2007年4月から関東でHAM専門外来を開設し、これまで約100例のHAM患者を診療しているが、その診療を通して様々な問題点が浮かび上がってきた。例えば、発病してから診断までに時間がかかる、HAMの進行には

かなりの個人差のあることがまだあまり知られていない、疾患活動性を評価するための検査が実施されていない、治療を受けていない患者が多いなどである。このような問題の背景には、疾患の認知度の低さや、HAMの臨床経過に関する情報不足、疾患活動性の評価法や治療方針の決定に関する指針がない、治療エビデンスが少ないためガイドラインが確立されていないことなどが挙げられる。HAMのように希少な疾患は日常的に遭遇することは少なく、神経内科医でもHAMの診療に慣れていないことが多いのが現状であると思われ、HAMの円滑な治療を行うためには、早急な治療ガイドラインなどの作成とそれに資する臨床試験の実施が必要である。

## 2. HAMの経過の特徴

HAMの治療ガイドライン作成に必要な治療エビデンスの蓄積に向けた臨床試験を実施していくためには、まずHAMの経過の特徴を把握する必要がある。図1に示すように、HAMには‘経過に個人差が大きい’という特徴があるが、そのことは意外と知られていない。HAM患者の約8割は年単位で緩徐慢性に進行するが(②緩徐進行例)、この群は更に、症状の進行が持続する場合(②-A)と、経過の途中から比較的症



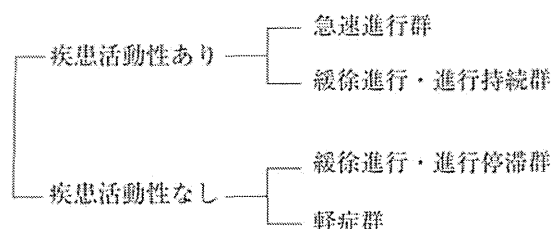


図2 HAMの病型分類(案)

る。また、症状が急速に進行し数カ月で歩行不能となる例もみられ(①急速進行例)、特に高齢者にこのような場合が多い傾向にある。一方で、運動障害が軽度のまま数十年以上の長期にわたり症状がそれほど進行しない例も認められる(③軽症例)。ごくまれにはあるが、比較的落ち着いた症例が感染や出産などを契機に症状が悪化する場合も認められる。

これらの特徴を考慮してHAMの病型を整理すると、図2に示すように、HAMは疾患活動性の高い群と低い群に大別され、更に疾患活動性の高い群は‘急速進行群’と‘緩徐進行群’に、また疾患活動性の低い群は‘進行停滞群’と‘軽症群’とに分類される(疾患活動性を判定するバイオマーカーについては後述する)。このようにHAMの疾患活動性や経過は患者ごとに大きく異なるので、治療方針を決定する際はこれらの特徴を考慮する必要がある。しかしながら、これまでこのような特徴に基づいた臨床試験は実施されておらず、今後はそれぞれの病型に応じた治療指針を作成するための臨床試験をデザインし実施していくことが求められる。

### 3. HAMの病態

HAMの疾患活動性を評価し、また治療薬開発や治療法を確立していくためには、HAMの病態の理解が重要である。

#### 1) 病 理

HAMの病理組織所見では、慢性炎症過程が脊髄、特に胸髄中・下部を中心に起こっている。病変はほぼ左右対称性で、小血管周囲から脊髄実質にひろがる炎症細胞浸潤と周囲の脊髄実質、すなわち、髄鞘や軸索の変性脱落がみられる。主として両側側索に強くみられ、時に灰白質に

も及んでいる。その他の詳細な解析も含めて、HAM患者脊髄では細胞性免疫反応が持続的に起こっていることを示す所見が得られている。

更にHAMの脊髄病変において、HTLV-1感染細胞について*in situ* PCR法を用いて解析された結果、HTLV-1の感染は脊髄に浸潤したT細胞にのみ確認され、周囲の神経細胞やグリア細胞には確認されていない<sup>2)</sup>。このことは、浸潤したHTLV-1感染T細胞が慢性炎症の要因として中心的な役割を果たしていることを示唆している。

#### 2) ウイルス・免疫学的な特徴

HAM患者では、末梢血単核球中のプロウイルス量、すなわちHTLV-1感染細胞数が無症候性キャリアに比較して有意に多いことが判明している<sup>3)</sup>。また、ウイルス感染細胞に反応するHTLV-1特異的細胞傷害性T細胞や抗体の量も異常に増加しており、ウイルスに対する免疫応答が過剰に亢進しているという免疫学的な特徴を有している<sup>4)</sup>。更に、脊髄病変局所や髄液中でウイルスの発現、一部の炎症性サイトカインやケモカインの産生が非常に高まっていることが知られている<sup>5)</sup>。

これらのウイルス・免疫学的特徴と病理学的な所見などを総合すると、HAMの主要な病態は、①HTLV-1感染細胞の増加、②脊髄の慢性炎症、③脊髄組織の破壊と変性と考えられる。すなわち図3に示すように、HTLV-1感染細胞が脊髄へ遊走してウイルス発現により炎症反応が惹起され、ケモカインなどの過剰産生によって更に炎症細胞が病変部へリクルートされ炎症の慢性化が成立し、サイトカインや細胞傷害性T細胞などにより周囲の神経組織が破壊され変性を生じていると考えられている。

### 4. HAMの病態を把握する

#### バイオマーカー

上述のようにHAMの病態は、‘ウイルス感染症’と‘脊髄の慢性炎症’という2つの大きな側面を有しており、これらを把握して病態に則した治療を実践することが重要である。これらを把握するバイオマーカーとして、以下の項目が

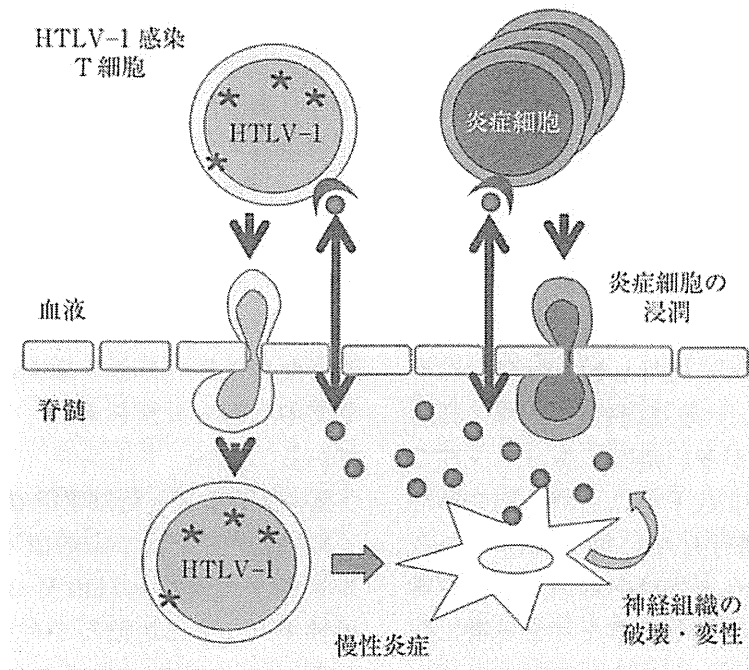


図3 HAMの病態

挙げられる。

### 1) ウイルス量

HAMのウイルス感染症としての側面を把握する方法として、ウイルス量の定量測定は患者におけるHTLV-1制御の程度を反映しており有用である。ウイルス量の測定は、エイズウイルスや肝炎ウイルスが血清中の濃度を測定するのと異なり、HTLV-1はウイルス発現レベルが低く血清中には同定できないため、末梢血単核球細胞(PBMC)中に感染している割合をreal-time PCR法により測定する系が各研究室レベルで確立されている<sup>9)</sup>。しかし、HTLV-1ウイルス量の定量的測定を実施している施設は全国でも数少なく(HTLV-1情報サービスウェブサイト参照)、外注検査で測定することはできない。現在、厚生労働省研究班でHTLV-1ウイルス量測定法の標準化に向けた研究が実施されており、将来保険承認されることが期待される。なお、HAM患者でウイルス感染細胞数が増加している機構については解明されていないが、HTLV-1は生体内でのウイルス発現レベルが低く、またフリーな状態では極めて感染効率が悪いことが知られている。そのため、感染細胞数の増加は細胞間接着による感染拡大、あるいは

感染細胞の増殖によると考えられている。

### 2) 脊髄の慢性炎症のバイオマーカー

HAMにおける脊髄炎症の程度を把握するためには、髄液検査が必須である。一般的な髄液検査で測定できる項目では、細胞数、IgG濃度がHAM患者では高いことがある。しかし、これらの項目は時にHAMの炎症を把握するには感度が低く、実際は炎症があり症状が進行性であってもこれらの値は正常範囲内にとどまることがあるので注意が必要である。その意味で、保険承認はされていないが髄液中のネオプテリン濃度は外注検査可能(SRL)であり、より感度に優れている。

髄液検査は非常に優れているが、患者への侵襲もあり日常診療で実施することは必ずしも容易ではない。現在著者らは、関節リウマチ患者が関節炎の程度を採血(MMP-3濃度など)で把握できるように、HAM患者の血清中のバイオマーカー候補分子について研究を進めている。病気の程度や治療効果を採血で判定できるようになれば、患者の診療参加への意欲向上につながると期待される。

### 3) 疾患活動性を反映するバイオマーカー

このようにウイルス量や髄液所見など、HAM

患者で高い値を示すことが知られているマーカーは複数存在するが、これらの項目の中で、どの因子が疾患活動性を把握するうえでより有用であるかを比較検討した研究報告はない。そこで著者らは、治療介入のないHAM患者において多くのバイオマーカー候補分子を定量的に測定し、疾患活動性の高い群(過去5年間で症状が進行)と疾患活動性が低い群(過去5年間で症状の進行が停滞)で比較検討したところ、髄液の細胞数、ネオプテリン、特定のケモカイン濃度が、疾患活動性を有意に反映することを明らかにした(論文準備中)。また、予後との相関性に関する解析でも、髄液所見の重要性が明らかとなった。すなわち、HAM患者における脊髄炎症の程度は疾患活動性や予後と極めて強い相関があり、その把握は、HAMの治療方針決定や治療効果判定において重要であることが示されつつある。一方でウイルス量は、発症リスクや発病後の予後とある程度相関することが報告されているが<sup>9)</sup>、疾患活動性のマーカーとしてはそれほど有用ではない印象である。

HAMの治療の最終目標(エンドポイント)は、長期予後の改善である。しかし、このエンドポイントを対象に治験をデザインすることは非現実的であるため、最終エンドポイントと統計学的に相関し、かつ定量性の高い代替エンドポイントを設定する必要がある。髄液中の細胞数、ネオプテリン濃度、特定ケモカイン濃度、末梢血中ウイルス量などは、患者の長期予後と相関することが明らかとなったため、これらの項目の改善を代替エンドポイントとして必要症例数を統計学的に算出した。HAMの新しい標準的な治験プロトコルの作成が可能となってきた。

## 5. HAMの治療

### 1) HAMの治療に window of opportunity は存在するか

関節リウマチでは、発症2年以内を‘window of opportunity’(治療効果の最も高い時期)と呼んでおり、この時期を逃さずに治療導入をすることが関節リウマチ悪化を克服するのに最も重要であるといわれている。慢性炎症による神経

組織の破壊性疾患であるHAMも、発症早期に治療介入した方が治療の反応が良い可能性が高く、実際、インターフェロン $\alpha$ (IFN- $\alpha$ )の市販後調査の報告でも、その傾向が認められている<sup>7)</sup>。脊髄の神経組織はいったん変性してしまうとその再生治療は現時点では困難であるので、HAMも脊髄に不可逆的な組織破壊が起こる前に、すなわちできるだけ発症早期に疾患活動性を判定し、その程度に応じて治療介入の必要性を検討することが望ましいと考えられる。今後、HAMの臨床試験を実施する際には、罹病期間が治療効果に影響するかに関する解析も視野に入れてデザインすることが求められ、発症早期の治療介入が重要であることが明らかになれば、発病前のキャリアの時期から注意しておくことの重要性がより明確になる。

### 2) HAMの病態に則した治療戦略

上述したようにHAMの病態は、HTLV-1感染細胞に起因した脊髄での慢性炎症による神経組織障害とされている。よってその治療には①HTLV-1感染細胞の排除、②脊髄炎症の鎮静化、③神経細胞の再生、などが必要であるが、現時点では抗ウイルス療法や神経再生治療は研究開発段階であり、HAMの治療は炎症抑制効果をもつステロイドと、免疫調整・抗ウイルス作用をもつIFN- $\alpha$ によるものが主である。しかしながらこれらの治療薬ですら、適切な投与時期や投与量の参考になるような臨床試験のエビデンスに乏しいのが現状である。まずは、これまでに得られた主な知見を整理した(表1)。

#### a. ステロイドによる治療

HAMを対象としたステロイド治療の有効性に関する報告は古くからある<sup>8-11)</sup>(表1)。規模の大きなものでは、HAM 131例を対象として1-2mg/kg連日or隔日投与で治療開始され1カ月投与後に6カ月かけて減量し、81.7%に有効、特に納(Osame)の運動障害重症度(表2)で1段階以上改善した症例が69.5%と、高い有効率が示されている<sup>10)</sup>。この報告では、上述した急速進行型にメチルプレドニゾロン・パルス療法が10例中6例で有効であったという情報も記載されている<sup>10)</sup>。一方で、外国からの報告ではメ

表1 HAMの主な治療報告のまとめ

年	国	報告者	試験 デザイン	薬 剤	投与量	観察期間	症例数	有効率	その他
1990	日本	Osame M. et al <sup>9)</sup>	オープン	プレドニゾン	60-80 mg 隔日 2カ月 10 mg/月で減量 4カ月 5 mg 隔日 3カ月	9カ月	65	59/65 56.9% (1>) (著効13人)	副作用(13/65)
1990	英国	Duncan J. et al <sup>9)</sup>	case series	メチルプレドニゾン	500 mg×5 days		9	6/9	効果は一過性
2008	ブラジル	Croda M. et al <sup>10)</sup>	case series	メチルプレドニゾン	1g×3 days/月を3-4カ月	2.2年	39	24.5% (2年後)	効果は一過性
1996	日本	Nakagawa M. et al <sup>11)</sup>	オープン	プレドニゾン	1-2 mg/kg 速日 or 隔日 を1-2カ月投与後減量	6-12カ月	131	81.7% 69.5% (1>)	髄液ネオプテリン減少
				メチルプレドニゾン	500 mg-1g×3 days		10	60%	急速進行型が対象
				インターフェロン $\alpha$	3 MU/day×30 days	1-3カ月	32	62.5% 21.9% (1>)	効果の持続なし 副作用(21/32)
1996	日本	Izumo S. et al <sup>12)</sup>	多施設 二重盲検 無作為抽出	インターフェロン $\alpha$	0.3 MU/day×28 days	8週間	15	7.1%	副作用(4/15)
					1 MU/day×28 days		17	23.5%	副作用(5/17)
					3 MU/day×28 days		16	66.7%	副作用(8/16)
1997	日本	Yamasaki K. et al <sup>13)</sup>	case series	インターフェロン $\alpha$	6 MU/day×14 days 後 6 MU/3 times/wk×22 wk	6カ月	7	5/7	2例継続不能
2007	日本	Arimura K. et al <sup>7)</sup>	Phase IV 市販後調査	インターフェロン $\alpha$	3 MU/day×4-793 (median 30) days	6カ月 (治療期間含)	167	66.2% 29.2% (1>)	副作用 87.4% 重篤副作用 7.0%
2006	英国 日本	Taylor GP. et al <sup>14)</sup>	placebo 無作為抽出	zidobudine+ lamivudine	AZT 300 mg+ 3TC 150 mg 2回/day	48週間	16	臨床的改善なし	ウイルス量変化なし
2011	英国	Macchi B. et al <sup>15)</sup>	case series	tenofovir	245 mg/day	2-16カ月	6	臨床的改善なし	ウイルス量変化なし

(1&gt;) : 納の運動障害重症度が1グレード以上改善.

MU: million unit. wk: week. AZT: zidobudine. 3TC: lamivudine.

表2 納の運動障害重症度

grade	状態
13	足の指も動かさない
12	寝返り不可能
11	自力では移動不能、寝返り可
10	四つばい移動不能、いざり等移動可
9	両手によるつたい歩き不能、四つばい移動可
8	両手によるつたい歩き5m以内可
7	両手によるつたい歩き5m以上、10m以内可
6	片手によるつたい歩き不能：両手なら10m以上可
5	片手によるつたい歩き
4	階段昇降に手すり必要
3	かけ足不能
2	歩行異常(つまずき、膝のこわばり)
1	歩くスピードが遅い
0	歩行、走行ともに異常認めない

チルプレドニゾロン・パルス療法の間欠的な投与は効果が一過性であったと報告されている<sup>9,10)</sup>。問題は、いずれもオープン試験であり、プラセボを用いた多施設二重盲検無作為化比較試験が実施されていないため、その効果に関する信頼性に乏しいことである。またこれまでは、HAMの病型別に臨床試験がデザインされておらず、どのような症例にどれくらいの量をどれくらいの期間投与したらよいかなどに関するエビデンスが存在しない。ステロイドはHAMの治療薬として世界的に使用頻度が高いため、日常診療に役立つ情報を提供しうる臨床試験の実施が望まれている。

**b. インターフェロンα治療**

IFN-αは、その抗ウイルス作用と免疫調整作用を踏まえ、HAMへの応用が比較的早期から報告されている<sup>11)</sup>。48例のHAM患者を対象とした、IFN-α: 30万、100万、300万単位の1日1回28日間連続投与の、多施設二重盲検無作為抽出法による3群比較の用量設定試験では、4週間の投与終了時点での有効率はそれぞれ7.1%、23.5%、66.7%で、300万単位群は有意差をもって機能障害の改善を示した<sup>12)</sup>。一方で、長期治療の効果に関しては、少数例を対象にした報告があるのみで<sup>13)</sup>、証明されていない。また、市販後調査の報告では、1カ月間投与した

その後の効果持続に関しては不明確であるとしており、副作用も87.4%に出現しているので注意深い観察を呼びかけている<sup>7)</sup>。このようにIFN-αは、HAMに対して唯一、多施設二重盲検無作為抽出法による臨床試験で効果が証明された薬剤であり、対象症例数が少ないもののエビデンスレベルは比較的高い。しかし、国際的なその治療効果に関する評価は決して高くないのが現状である。またIFN-αに関しても、病型別の患者を対象とした臨床試験は実施されておらず、治療対象となる患者、投与時期、投与期間などに関する情報が不足している。実際、急速進行性のHAM患者に対してはIFN-α治療では効果を示さず脱落したと報告されており<sup>14)</sup>、ステロイド治療などとの使い分けに関する情報の整理が必要である。

**6. HAMの治療法の確立に向けて**

**1) 臨床試験の実施体制の確立を**

上述のように、HAMの治療に関するエビデンスは世界的にも絶対的に不足しており、様々なクリニカルクエスションに指針を示すことのできる治療ガイドラインを作成するには情報が不足しているのが現状である。したがって、希少疾患であるHAMの治療法を確立していくためには、治療ガイドライン作成に資する臨床試

験を実施しエビデンスを蓄積していく必要性が極めて高い。そのためには、薬効評価に必要な症例数を確保できるように全国的あるいは国際的な取り組み体制を構築し、薬事承認申請に必要なデータの収集が可能なプロトコールに則って治験を実施し、そのデータを客観的に解析できる体制が必要である。先進国でHAM患者が多いのは日本のみであるため、その体制づくりに課せられた我が国の責務は大きい。2011年に行われたHTLV-1国際会議において、このような状況に危機感を共有した世界中のHAM専門家がHAMの国際共同臨床試験グループ(HAM clinical trial study group: HAM CTSG)を結成し、臨床試験の実施に向け現在準備を進めている。

## 2) ウイルス量の制御とATL発病リスクを 意識

HAMの治療として免疫抑制作用薬による脊髄炎症の鎮静化が重要であることは明らかであるが、HAMはウイルス感染症であること、またATLという腫瘍性疾患の発症のリスクを抱えるという側面も有しており、免疫抑制作用薬による治療がそれらに及ぼす影響について留意する必要がある。免疫抑制の程度が異なるが、生体肝移植後にタクロリムスなどを使用していたキャリアからATLを発症した症例が報告されており<sup>16)</sup>、過度の免疫抑制には十分に注意する必要がある。ただし、通常ステロイド治療でウイルス量が増加することはない。また膠原病や関節リウマチなどの内科的疾患で免疫抑制療法を受けている患者にATLの発症が多いというエビデンスはなく、すなわちHAM患者やHTLV-1キャリアに対して内科的疾患レベルの免疫抑制治療を否定するエビデンスはないということも考慮し、慎重な対応が必要であろう。しかしながらこのような背景からも、ウイルス感染症およびATLの発症リスクを制御しながらHAMの抗炎症療法を実施できるようになることが、理想的な治療法であると考えられている。

HAMに対する抗ウイルス療法としては、逆転写酵素阻害剤を用いた臨床試験が報告されているが、zidovudineとlamivudineの併用に関する多施設無作為抽出臨床試験<sup>17)</sup>、tenofovirを用い

たパイロット試験<sup>18)</sup>などでは、ウイルス量の減少効果は全く得られていない。HTLV-1はエイズウイルスとは異なり、血清中でウイルスが存在せず転写レベルが低いという特徴を有しているため、ウイルス量の制御には異なった戦略が必要であると考えられる。またATL発症リスクの軽減という視点においては、ATLの治療で副作用の少ない治療法の応用も考慮される。最近、zidovudineとIFN- $\alpha$ の併用療法<sup>17)</sup>、抗CCR4抗体療法<sup>18)</sup>の有効性が報告されており、その後の結果に注目したい。

## 3) 分子標的治療法の開発

近年の免疫性疾患の治療において最も大きなインパクトを与えたものの一つに、関節リウマチの治療において炎症の鍵となっている一つの分子を標的とした治療によって、劇的な改善のみならず寛解をもたらすことが可能となった生物学的製剤の開発・導入が挙げられる。HAMに関しても、病態の主役を担っている分子の同定研究が進められている。希少疾患はその市場性から、これまでは製薬会社も開発に興味を示してこなかったが、他の希少難病治療薬の成功により、最近ではアンメットメディカルニーズの高い難治性疾患に対する開発が進められるようになってきた。今後は、研究者と製薬会社の協力と連携が進み、HAMの分子標的治療薬の開発とその治験の実施が加速することが望まれる。

## おわりに

HAMが発見されてこの25年間、研究の進展により多くの病態が明らかとなり、治療薬も病態に応じて検討できるようになってきている。しかしながら、先進国で患者が多いのは日本のみであるという事情もあり、よくデザインされた臨床試験のエビデンスが絶対的に不足しており、治療法が確立されていないのが現状である。この現状を打破するためには、日常診療のクリニカルクエスションに指針を示すことのできる治療ガイドライン作成が必要であり、そのためにはガイドライン作成に資する臨床試験の実施が急務であり、その実現に課せられた我が国の責務は大きい。また、脊髄の慢性炎症とウイル

ス感染症の制御が、当面のHAM治療の達成すべき課題であるが、損傷された脊髄の再生治療が成功して、初めて患者が満足できる治療を提供できるようになるであろう。‘普通に楽しく暮らせるようになりたい’という患者の願いが一日でも早く実現できるように、多くの研究者がその英知を結集してこの課題に取り組んでいただけることを願ってやまない。

## 圖文 献

- 1) Osame M, et al: HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet* 1: 1031-1032, 1986.
- 2) Matsuoka E, et al: Perivascular T cells are infected with HTLV-I in the spinal cord lesions with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: Double staining of immunohistochemistry and polymerase chain reaction in situ hybridization. *Acta Neuropathol* 96(4): 340-346, 1998.
- 3) Nagai M, et al: Analysis of HTLV-I proviral load in 202 HAM/TSP patients and 243 asymptomatic HTLV-I carriers: High proviral load strongly predisposes to HAM/TSP. *J Neurovirol* 4(6): 586-593, 1998.
- 4) Matsuura E, et al: Neuroimmunity of HTLV-I Infection. *J Neuroimmune Pharmacol* 3: 310-325, 2010.
- 5) Kamihira S, et al: Intra- and inter-laboratory variability in human T-cell leukemia virus type-1 proviral load quantification using real-time polymerase chain reaction assays: a multi-center study. *Cancer Sci* 101(11): 2361-2367, 2010.
- 6) Matsuzaki T, et al: 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(3): 228-234, 2001.
- 7) Arimura K, et al: Safety and efficacy of interferon- $\alpha$  in 167 patients with human T-cell lymphotropic virus type 1-associated myelopathy. *J Neurovirol* 13: 364-372, 2007.
- 8) Osame M, et al: HTLV-I-associated myelopathy(HAM) Treatment trials. Retrospective survey and clinical and laboratory findings. *Hematol Rev* 3: 271-284, 1990.
- 9) Duncan J, Rudge P: Methylprednisolone therapy in tropical spastic paraparesis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 53: 173-174, 1990.
- 10) Croda M, et al: Corticosteroid therapy in TSP/HAM patients: the results from a 10 years open cohort. *J Neurol Sci* 269: 133-137, 2008.
- 11) Nakagawa M, et al: Therapeutic trials in 200 patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Neurovirol* 2(5): 345-355, 1996.
- 12) Izumo S, et al: Interferon-alpha is effective in HTLV-I-associated myelopathy: A multicenter, randomized, double-blind, controlled trial. *Neurology* 46: 1016-1021, 1996.
- 13) Yamasaki K, et al: Long term, high dose interferon-alpha treatment in HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: a combined clinical, virological and immunological study. *J Neurol Sci* 147: 135-144, 1997.
- 14) Taylor GP, et al: Zidovudine plus lamivudine in human T-lymphotropic virus type I-associated myelopathy: a randomized trial. *Retrovirology* 3: 63-72, 2006.
- 15) Macchi B, et al: Susceptibility of primary HTLV-1 isolates from patients with HTLV-1-associated myelopathy to reverse transcriptase inhibitors. *Viruses* 3: 469-483, 2011.
- 16) Kawano N, et al: Adult T-cell leukemia development from a human T-cell leukemia virus type I carrier after a living-donor liver transplantation. *Transplantation* 82: 840-843, 2006.
- 17) Bazarbachi A, et al: Meta-analysis on the use of zidovudine and interferon-alfa in adult T-cell leukemia/lymphoma showing improved survival in the leukemic subtypes. *J Clin Oncol* 28: 4177-4183, 2010.
- 18) Yamamoto K, et al: Phase I study of KW-0761, a defucosylated humanized anti-CCR4 antibody, in relapsed patients with adult T-cell leukemia-lymphoma and peripheral T-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 28: 1591-1598, 2010.


 特集◇神経・筋疾患の病態と診断・治療 (III)
 

# ウイルス感染と神経疾患

中川 正法 京都府立医科大学大学院神経内科学

Key words: ウイルス性髄膜炎・脳炎, レトロウイルス感染症, 遅発性ウイルス感染症

## はじめに

神経組織は, Blood Brain Barrie (血液脳関門) または Blood Nerve Barrie (血液神経関門) によって病原微生物の侵入から保護されているが, ウイルスの向神経性, 特異的レセプターおよび神経組織における免疫機構の特殊性のために, ウイルス感染による中枢神経系, 末梢神経系の疾患が引き起こされる (表1)。抗ウイルス薬の開発により, ある程度は治療が可能になってきているが, いずれの病態においても感染予防が重要である。本稿では, ウイルス感染が原因となる主な神経疾患について概説する (表2)。

## I. ウイルス性髄膜炎・脳炎

ウイルス性髄膜炎の臨床的特徴は, 急性発症の頭痛, 発熱, 悪心・嘔吐, 項部硬直, Kernig徴候, 軽度の意識障害, 羞明, 聴覚過敏, 眼球圧痛などである。頭痛が光, 音により増強することが特徴的である。脳脊髄液検査では, 単核球優位の細胞数増多, 蛋白濃度の軽度増加を認める。糖濃度は一般的に正常範囲であるが, 低下する例もある (表3)。頭部CT・MRIでは, 一般的に特異的变化に乏しい。原因ウイルスの診断は, 髄液からのウイルス分離, ウイルス抗体価, PCR法などにより行う。ムンプス, エンテロウイルス (エコー, コクサッキーなど), ヘルペスウイルス感染によることが多い。通常は

表1 神経系のウイルス感染症の特徴

1) Blood Brain Barrie (血液脳関門), Blood Nerve Barrie (血液神経関門) の存在
2) ウイルスの向神経性
3) 特異的レセプターの存在
4) 神経組織における免疫機構の特殊性
・免疫抵抗性が低い
細胞性免疫不全の存在 (AIDS, 進行性多巣性白質脳炎など)
・ウイルスの持続感染・潜伏感染をきたし, 再活性化する (亜急性硬化性全脳炎など)
・免疫学的寛容を誘発する
・宿主の免疫機構に補足されないように変異を起こす (HIV など)
・ウイルス遺伝子が宿主DNAへ組み込まれる (レトロウイルス, ヘルペスウイルスなど)



表 2 ウイルス感染による主な神経疾患

ウイルス性髄膜炎・脳炎
レトロウイルス感染症
HIV-1 感染症
HIV 脳症
HIV 関連脊髄症
HIV 関連末梢神経障害
免疫再構築症候群
HTLV-1 (ヒト T 細胞白血病ウイルス : human T cell lymphotropic virus type 1) 感染症
HAM (HTLV-1 associated myelopathy)
遅発性ウイルス感染症
亜急性硬化性全脳炎 subacute sclerosing panencephalitis : SSPE
進行性多巣性白質脳症 (progressive multifocal leukoencephalopathy : PML)
その他のウイルス感染症
急性灰白髄炎 (acute poliomyelitis) (ポリオ polio)
帯状疱疹 herpes zoster
Ramsay Hunt 症候群
狂犬病 rabies

表 3 各種髄膜炎および関連疾患の平均的な髄液所見

髄膜炎など	細胞数 (/ $\mu$ L)	総蛋白 (mg/dL)	糖濃度	備考
ウイルス性	50~1,000 (M)	<100	低下する例もある	ムンプス エンテロ系ウイルス 単純ヘルペス 帯状ヘルペス
細菌性	>1,000 (P)	100~1,000	高率に低下	
真菌性	50~1,000 (M)	50~300	高率に低下	クリプトコックス
結核性	50~1,000 (M)	100~500	高率に低下	アデノシンデアミナーゼ上昇 結核菌の PCR 陽性
癌腫性	<100 (P)	<200	約半数で低下	腫瘍細胞の細胞診
サルコイドーシス	<50 (P)	50~100	正常範囲	
Behçet 症候群	<300 (M, P)	<100	約半数で低下	
くも膜下出血	増加	増加	正常範囲	キサントクロミー

M : 単核球 P : 多核球

対症療法で軽快するが、ヘルペスウイルス感染の場合には、アシクロビルやピダラビン等の投与を行う。

単純ヘルペス脳炎は重篤なウイルス性脳炎のひとつである。単純ヘルペスウイルス (HSV) 1 型株 (HSV-1) 感染が主に側頭葉や大脳辺縁

系に起こり、髄膜刺激症状、記憶障害、人格変化、言語障害、意識障害、痙攣発作などを引き起こす。抗ウイルス薬を使用しても致死率 10% と比較的高い。脳炎からの回復例でも人格障害、記憶障害などの後遺症が約 3 割に残る。頭部 MRI T2 強調画像では側頭葉に左右差のある高

信号を認め、脳血流 SPECT では高集積を認める。脳波検査では、一側・両側側頭葉の徐波または周期性棘波 (PLEDs) を認める。髄液中の HSV を検出することで診断される。アシクロビル、ピダラビンが有効である。HSV-2 感染は脊髄炎の原因となることがある。日本神経感染症学会から単純ヘルペス脳炎診療ガイドラインが出されている<sup>1)</sup>。

インフルエンザ脳症は、インフルエンザ流行中にみられる小児の脳症で、意識障害、けいれん、異常言語・行動発作が出現し、死亡率も高い。全身および中枢神経系での炎症性サイトカインの産生過剰が病態の中心にあるとされている。約9割の例でPCR法により髄液からインフルエンザウイルスが検出される。治療法として、抗ウイルス薬(オセルタミビル)、メチルプレドニゾン・パルス療法、ガンマグロブリン大量療法の有用とされている。インフルエンザ脳症ガイドラインが出されている<sup>2)</sup>。

## II. レトロウイルス感染症

レトロウイルスは逆転写酵素を持つ一本鎖 RNA ウイルスである。外在性レトロウイルスのレンチウイルス亜科の HIV-1, HIV-2, オンコウイルス亜科の HTLV-1, HTLV-2 などがヒトに感染して、神経疾患である NeuroAIDS (HIV 感染に伴う神経合併症) や HAM (HTLV-1 Associated Myelopathy) を引き起こす。

### III. NeuroAIDS (HIV 感染に伴う神経合併症)

HIV 感染によって引き起こされる神経障害の総称である。NeuroAIDS は、AIDS 脳症や薬剤関連末梢神経障害など極めて多彩である(表4)。抗レトロウイルス療法(ART: anti-retroviral therapy)により、全 NeuroAIDS の発症は大幅に減少した。しかし、わが国における HIV 感染者・AIDS 患者数は毎年増加傾向にある。AIDS 指標疾患における割合は、HIV 脳症 4.1%、トキソプラズマ脳症 1.9%、進行性多巣性白質脳症(PML) 1.3%である。ART に関連

表 4 HIV 感染による神経合併症 (NeuroAIDS)

AIDS 脳症
軽度認知機能障害
脊髄症
パーキンソン病/症候群
脳梗塞・脳出血
トキソプラズマ脳炎
進行性多巣性白質脳症 (PML)
脳原発リンパ腫
サイトメガロウイルス脳炎
アメーバ脳炎
クリプトコックス髄膜炎
ヘルペス髄膜炎
単純ヘルペス
水痘ヘルペス
無菌性髄膜炎
結核性髄膜炎
運動ニューロン病
末梢神経障害
感覚優位多発神経炎
ギラン・バレー症候群
慢性炎症性脱髄性神経炎 (CIDP)
サイトメガロウイルス関連神経炎
脳神経炎 (顔面神経麻痺など)
薬剤関連
筋疾患
多発性筋炎
ネマリンミオパチー
薬剤関連ミオパチー

して、PML、免疫再構築症候群、薬剤耐性による日和見感染、薬剤関連神経障害、脳血管障害に注意が必要である<sup>3)</sup>。

## IV. HIV 脳症

HIV 脳症は HIV 感染により引き起こされる認知運動障害であり、主に AIDS 発症時期に著明となり亜急性に進行するが、緩徐進行性の経過を示す例もある。HIV 感染を知らない、あるいは治療を自己中断して認知機能障害を発症する患者の割合が増加している。

急性感染期には、発熱、発疹、リンパ節腫脹などを示す。その後、数年の無症候期を経て、

表 5 HAM/TSP 診断指針 (WHO)

**臨床診断**

慢性痙性対麻痺の多彩な臨床像が初診時からそろっているとは限らず、発症初期の HAM/TSP では単一の徴候または身体所見のみが認められることもある。

1. 年齢ならびに性  
多くは孤発例で成人期発症。時に家系内発症や小児期発症。女性に多い。
2. 発症様式  
通常緩徐な発症であるが、急激な発症のこともある。
3. 主要な神経学的症候
  - 1) 慢性痙性対麻痺。通常緩徐進行性。時に、初め進行した後に症状の停止する例あり
  - 2) 両下肢 (特に近位部) の筋力低下
  - 3) 膀胱障害は通常初期症状。便秘は通常後期症状。インポテンツや性欲減退もまれでない。
  - 4) 刺痛・ジンジン感・灼熱感などのような感覚症状のほうが他覚的身体所見よりも優位
  - 5) 下肢に放散する下部腰痛がまれでない。
  - 6) 振動覚はしばしば障害されるが、固有感覚はより保たれる。
  - 7) 下肢反射亢進, しばしば足クローヌスや Babinski 徴候を伴う。
  - 8) 上肢反射亢進, しばしば Hoffmann 徴候や Tromner 徴候陽性。上肢脱力は認めないこともある。
  - 9) 下顎反射の亢進例も存在
4. より出現頻度の少ない神経学的所見  
小脳症状・視神経萎縮・難聴・眼振・その他の脳神経障害・手指振戦・アキレス腱反射の減弱または消失 (痙攣・認識力障害・認知症・意識障害はほとんどみられることはない)
5. HAM/TSP に伴う他の神経学的症候  
筋萎縮・筋束性攣縮 (まれ)・多発筋炎・末梢神経障害・多発神経炎・脳神経炎・髄膜炎・脳症
6. HAM/TSP に伴う他の系統的症候  
肺炎・ぶどう膜炎・Sjogren 症候群・関節障害・血管炎・魚鱗癬・クリオグロブリン血症・単クローン性免疫グロブリン血症・成人 T 細胞白血病

**実験室的診断**

- 1) HTLV-1 抗体または抗原が血清ならびに髄液に存在すること
- 2) 髄液に軽度のリンパ球性細胞増多をみることがある。
- 3) 血液あるいは髄液中に核の分葉したリンパ球を認めることがある。
- 4) 脳脊髄液中に軽度から中等度の蛋白増多を認めることがある。
- 5) 可能なら血液あるいは脳脊髄液からの HTLV-1 ウイルスの分離

(鹿児島大学 WHO 学術会議, 1988) TSP : tropical spastic paraparesis

CD4 陽性 T リンパ球が 200/ $\mu$ l 以下になると指標疾患を併発し AIDS 期になる。HIV 脳症に特異的な症状はないが、認知機能低下、抑うつ、巧緻運動障害、運動麻痺などを示すことが多い。頭部 MRI で大脳萎縮と白質変化を認めることが多い。脳血流 SPECT では前頭部の集積低下が報告されている。HIV 感染者の高次脳機能検査では前頭葉機能低下が示唆される。アルツハイマー病などの認知機能低下を示す疾患との鑑別が必要である。

HIV 脳症では、多核巨細胞を伴う HIV 脳炎と大脳皮質の神経変性病態が知られている。脳

内血管周囲に存在する HIV-1 感染マクロファージとミクログリアが病態の中心である。HIV 脳症患者脳組織からは CCR5 をコレセプターとするマクロファージ指向性 HIV-1 が検出され、神経細胞やオリゴデンドログリアへの感染はなく、間接的細胞障害が病態の中心である。

HIV 脳症の予後は不良であるが、ART で免疫力が改善し認知機能の改善がみられることもある。米国での ALLRT 調査などでは、ART 中でも軽症の認知障害患者が相当数いること、逆に軽症認知障害が残存する場合や ART が奏

功しても新たに認知障害が発症することが指摘されている。

治療としては、CD4陽性Tリンパ球数が350/ $\mu$ Lより多い段階での治療開始が推奨されている。ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤、非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤、プロテアーゼ阻害剤、インテグラーゼ阻害剤、侵入阻害剤などの抗ウイルス薬を3~4種類組み合わせで治療する。服薬率100%を目標に基本的に生涯にわたって継続する<sup>4)</sup>。

ART開始後にHIVウイルス量が減少し、CD4陽性Tリンパ球が上昇する過程でみられる感染・炎症の再燃・顕在化を免疫再構築症候群 (Immune reconstitution inflammatory syndrome: IRIS) という。病理学的には、白質を中心に小血管周囲へのCD8陽性T細胞を主体とする著明な細胞浸潤、軸索・髄鞘の変性を特徴とする。一般的に致死的である。

HIV-1関連脊髄症は、緩徐進行性の痙性対麻痺で感覚性運動失調、神経因性膀胱を合併することが多い。側索・後索にマクロファージの活性化と空胞変化が多くみられる (vacuolar myelopathy)。HIV-1感染による末梢神経障害には表4に示す疾患があるが、感覚優位多発神経炎 (HIV-SN) が最も多い。歩行時や夜間に悪化する“痛み”、“不快な異常感覚”が特徴的である。

## V. HTLV-1 (ヒトT細胞白血病ウイルス: human T cell lymphotropic virus type 1) 感染症

HTLV-1は主にCD4陽性Tリンパ球に感染し、さまざまな免疫異常を引き起こす。代表的疾患として、HTLV-1関連脊髄症 (HAM: HTLV-1 associated myelopathy) と成人T細胞白血病 (ATL) がある。

## VI. HAM (HTLV-1 associated myelopathy)<sup>5)</sup>

HAMは、HTLV-1感染者の一部に発症する錐体路障害が前景に立つ緩徐進行性の脊髄疾患

で、髄液・血清の抗HTLV-1抗体が陽性である。末梢血の感染細胞数 (HTLV-1プロウイルス量) が健康なHTLV-1保因者 (キャリア) より高値である。2008年に厚生労働省特定疾患に指定された。HTLV-1感染者は全国で約108万人存在し、感染者の数%にHAMあるいはATLを発症する。最近、関東、関西などの都市圏でのHAM患者が増加している。感染経路は、母乳を介する母子間垂直感染、輸血、性交渉である。男女比は1:2.4で女性に多い。

臨床所見として、痙性対麻痺、腰帯部の筋力低下、腱反射亢進、腹壁反射消失、バビンスキー徴候を認める。下顎反射は通常正常である。下肢優位の感覚障害、排尿障害、便秘、下半身の発汗障害、起立性低血圧、インポテンツなどを認めることが多い。小脳症状、眼球運動障害、手指振戦などを示す例もある。若年発症例では低身長傾向がある。

白血球・血小板減少、血清IgG・IgDの増加、IgEの減少、CD4/8比高値を示すことが多い。末梢血単核球中のHTLV-1プロウイルス量の測定は、HTLV-1キャリアとの鑑別や病勢把握の参考となる。髄液所見では、軽度の細胞数・IgG・ネオプテリン・IP10などの増加を示す。頭部MRIではT2強調画像、FLAIR画像にて多発性白質病変を認めることがある。脊髄MRIでは、数~10数%に脊髄内信号異常を認める。傍脊柱筋の針筋電図では障害レベルに対応して脱神経所見を認める。末梢神経伝導検査異常を示す例もある (表5)。

抗HTLV-1抗体陽性の症例において、多発性硬化症、視神経脊髄炎、頸椎症性脊髄症などとの鑑別が重要となる。いずれの疾患においても抗HTLV-1抗体価、HTLV-1プロウイルス量、抗アクアポリン4抗体、電気生理学的検査所見が参考となる。まれにATLの合併例もある。一般的に緩徐進行性であるが、時に急速に進行する例がある。

比較的急速に症状が進行している例には、ステロイドホルモン大量投与、インターフェロン $\alpha$ 注射 (保険適応あり) などを行う。合併症の