

表3 患者背景

	PSL	MP pulse
患者数 (人数)	16	5
男/女 (人数)	4/12	1/4
年齢 (歳)	57.5 (40 ~ 68)	70.0 (62 ~ 72)
罹病期間 (年)	10.5 (4 ~ 28)	3.0 (2 ~ 41)
PVL (copies/100cells)	13.3 (0.3 ~ 98.0)	24.3 (2.5 ~ 69.9)
納の運動障害重症度	6.5 (2 ~ 8)	8.0 (3 ~ 12)
ステロイド投与量 (mg/day)	2.5 (2.5 ~ 5)	500mg, 3days 後療法 5.0 (4 ~ 10)

PSL : prednisolone 内服群, MP pulse : methylprednisolone pulse 群, PVL : HTLV-1 proviral load  
数値は中央値 (範囲)

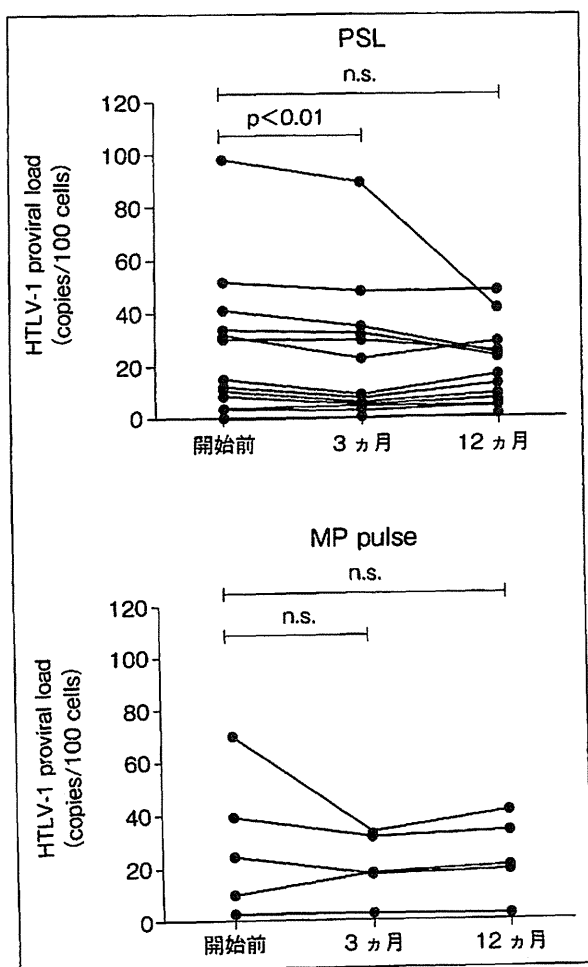


図1 ステロイド治療開始前後のHTLV-1 proviral loadの推移  
統計解析はFriedman検定後, Dunn検定を行った。  
PSL : prednisolone 内服群, MP pulse : methylprednisolone pulse 群

考 察

今回, 症例集積報告のまとめ (表2) では, 腎移植を施行した69例にATLおよびHAMの発症は認められなかったが, 症例報告のまとめ (表1) では, 腎移植後にATL 11例およびHAM 6例の発症を認めた。これらの報告ではD/Rにおける腎移植

前の感染不明例が多く, D+/R-腎移植でのHTLV-1感染率およびR+腎移植のATLおよびHAMの発症率に関する結論は得られなかった。また, ステロイド治療によりHTLV-1 PVLは上昇しなかった (図1)。

まずD+/R-腎移植についてであるが, HTLV-1感染および関連疾患発症の危険が存在することが示された。しかし, 情報不足のため感染率や発症率の算出はできず, そのリスク評価は困難であるのが現状である。また, 米国からD+死体肝移植81例でATLおよびHAMの発症はなかったとの報告があるが<sup>9)</sup>, HTLV-1とHTLV-2を区別しておらず, また確認検査未施行で多くの偽陽性を含む可能性が高い, 平均観察期間1.21年と短いなどの問題があり, 安全性の評価はやはり困難である。ATLは致死的でHAMも機能予後不良の難治性疾患であることから, そのリスクと腎移植のベネフィットバランスを検討するためには, 今後, 全国的かつ継続的な情報の集積が必要と考えられる。その際, PVLによりリスクが異なる可能性も考えられるので, PVL情報も蓄積することによりリスクの層別化が可能となるかもしれない。

次にR+腎移植において免疫抑制療法がATL発症を促進するか否かについてであるが, 腎移植後ATLの症例報告の9例が30~40歳代と通常のATLよりも若年発症であること, さらにR-からの発症を認め, 腎移植による感染後比較的短期間でのATL発症を示していることから, 移植に伴う免疫抑制療法がATL発症を促進する可能性が示唆される。HTLV-1感染細胞の制御には免疫系による監視が重要で, その重度な機能低下は感染細胞の増加に繋がる。造血幹細胞移植後に再発したATLがCyclosporine A (CyA) 中止により消滅したという報告は, 免疫抑制薬の危険性を示唆している<sup>10)</sup>。一方, 69例の症例集積報告 (表2) ではATLや

HAMの発症がないことから、発症率は低いことが示唆され、腎移植による生命予後改善効果の方が大きい可能性もあり、リスクベネフィットについて慎重に判断することが重要と考える。今回の検討では、HAM患者の検体ではあるがステロイドによりPVLは上昇しなかった。さらに最近、HAM患者7名に対する48週間のCyA療法（trough濃度中央値87ng/mL）でもPVLは上昇しなかったことが報告された<sup>11)</sup>。以上の結果からは、維持用量のCyA、PSLおよびMP pulseではPVLは上昇しないことが示唆されるが、現在の腎移植後の標準的免疫抑制療法（calcineurin阻害薬、代謝拮抗薬およびステロイド併用療法）の影響および腎移植のリスクとベネフィットを明らかにするには、感染経路や移植前からのPVLの推移を含む長期的なデータの蓄積が必要であろう。

欧米はHTLV-1感染率が低いため術前検査が必須ではないが<sup>11)</sup>、浸淫地域である日本では、明確な指標が必要であると考えられる。PVLの測定は現在のところ一部の研究機関でのみ可能で、HTLV-1研究組織と協力し確実なデータの蓄積が望まれる。

## 結 論

HTLV-1感染者における腎移植の影響について検討した。HTLV-1陽性ドナーからの腎移植はレシピエントに感染および関連疾患発症のリスクを伴う。HTLV-1陽性レシピエントの関連疾患発症率が腎移植により上昇するというエビデンスは得られなかったが、報告の症例数や観察期間は十分ではなく、その適応は慎重に判断する必要がある。したがってHTLV-1感染者における腎移植の安全性評価の精度を高めるために、今後の情報集積が必要である。

利益相反自己申告：申告すべきものなし

## 文 献

- 1) Armstrong MJ, Corbett C, Rowe IA, et al. HTLV-1 in solid-organ transplantation: current challenges and future management strategies. *Transplantation* 2012; 94: 1075-84.
- 2) Yamano Y, Sato T. Clinical pathophysiology of human T-lymphotropic virus-type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Front Microbiol* 2012; 3: 389.
- 3) Iwanaga M, Watanabe T, Utsunomiya A, et al. Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-1) proviral load and disease progression in asymptomatic HTLV-1 carriers: A nationwide prospective study in Japan. *Blood* 2010; 116: 1211-19.
- 4) Yamano Y, Nagai M, Brennan M, et al. 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* 2002; 99: 88-94.
- 5) Toro C, Rodés B, Poveda E, et al. Rapid development of subacute myelopathy in three organ transplant recipients after transmission of human T-cell lymphotropic virus type I from a single donor. *Transplantation* 2003; 75: 102-4.
- 6) 新垣義孝, 宮里義久, 中村信之, 他. 腎移植とHTLV-1 (human T-lymphotropic virus-type 1). *今日の移植* 1995; 8: 119-22.
- 7) Nakamura N, Arakaki Y, Sunagawa H, et al. Influence of immunosuppression in HTLV-1-Positive renal transplant recipients. *Transplant Proc* 1998; 30: 1324-6.
- 8) Nakamura N, Tamaru S, Ohshima K, et al. Prognosis of HTLV-I-positive renal transplant recipients. *Transplant Proc* 2005; 37: 1779-82.
- 9) Marvin MR, Brock GN, Kwarteng K, et al. Increasing utilization of human T-cell lymphotropic virus (+) donors in liver transplantation: Is it safe? *Transplantation* 2009; 87: 1180-90.
- 10) Ohguchi H, Sai T, Hamazaki Y, et al. Cyclosporin A withdrawal causes spontaneous remission of recurrent subcutaneous tumors after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation for adult T-cell leukemia/lymphoma. *Rinsho Ketsueki* 2003; 44: 102-7.
- 11) Martin F, Castro H, Gabriel C, et al. Cyclosporin a proof of concept study in patients with active, progressive HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *PLoS Negl Trop Dis* 2012; 6: e1675.
- 12) Zanke BW, Rush DN, Jeffery JR, et al. HTLV-1 T cell lymphoma in a cyclosporine-treated renal transplant patient. *Transplantation* 1989; 48: 695-7.
- 13) Tsurumi H, Tani K, Tsuruta T, et al. Adult T-cell leukemia developing during immunosuppressive treatment in a renal transplant recipient. *Am J Hematol* 1992; 41: 292-4.
- 14) Williams NP, Buchner LM, Shah DJ, et al. Adult T-cell leukemia/lymphoma in a renal transplant recipient: An opportunistic occurrence. *Am J Nephrol* 1994; 14: 226-9.
- 15) Jenks PJ, Barrett WY, Raftery MJ, et al. Development of human T-cell lymphotropic virus type I-associated adult T-cell leukemia/lymphoma during immunosuppressive treatment following renal transplantation. *Clinical Infectious Diseases* 1995; 21: 992-3.
- 16) 毛利淳, 上領頼啓, 矢野誠司, 他. ABO血液型不適合腎移植後にATLを発症した1例. *腎移植・血管外科* 2000; 12: 137-41.
- 17) Ichikawa Y, Iida M, Ebisui C, et al. A case study of adult T-cell lymphoma in a kidney transplant patient. *Transplant Proc* 2000; 32: 1982-3.

- 18) Hoshida Y, Li Ting, Dong Zhiming, et al. Lymphoproliferative disorders in renal transplant patients in Japan. *International Journal of Cancer* 2001 ; 91 : 869-75.
- 19) 土岐清秀, 小角幸人, 矢澤浩治, 他. 移植後 HTLV-1 関連ミエロパチーを発症した 1 例. *腎移植・血管外科* 2000 ; 12 : 42-5.
- 20) Nakatsuji Y, Sugai F, Watanabe S, et al. HTLV-I-associated myelopathy manifested after renal transplantation. *J Neurol Sci* 2000 ; 177 : 154-6.
- 21) 新谷寧世, 平野敦之, 稲垣武, 他. 献腎移植後 HTLV-1 関連ミエロパチーを発症した 1 例. *移植* 2002 ; 37 : 85-7.
- 22) Inose Y, Akiyama S, Mochizuki A, et al. A case report of HTLV-1 associated myelopathy (HAM) manifested after renal transplantation. *Clinical Neurology* 2010 ; 50 : 241-5.
- 23) Tanabe K, Kitani R, Takahashi K, et al. Long-term results in human T-cell leukemia virus type 1-positive renal transplant recipients. *Transplant Proc* 1998 ; 30 : 3168-70.
- 24) Naghibi O, Nazemian F, Naghibi M, et al. Prognosis of HTLV-1 positive renal transplant recipients in Iran. *Saudi journal of kidney diseases and transplantation : an official publication of the Saudi Center for Organ Transplantation. Saudi Arabia* 2011 ; 22 : 670-4.
- 25) Shirai H, Suzuki M, Tomita Y, et al. Renal transplantation in patients with human T-cell lymphotropic virus type 1. *Transplant Proc* 2012 ; 44 : 83-6.

### Kidney Transplantation and Human T-Lymphotropic Virus Type I-Infected Patients

Junji Yamauchi<sup>1,2)</sup>, Naoko Yagishita<sup>2)</sup>, Hitoshi Ando<sup>2)</sup>, Tomoo Sato<sup>2)</sup>, Natsumi Araya<sup>2)</sup>, Ariella Coler-Reilly<sup>2)</sup>, Naohiko Imai<sup>1)</sup>, Ryuto Nakazawa<sup>3)</sup>, Hideo Sasaki<sup>3)</sup>, Yugo Shibagaki<sup>1)</sup>, Takashi Yasuda<sup>1)</sup>, Tatsuya Chikaraishi<sup>3)</sup>, Kenjiro Kimura<sup>1)</sup>, Yoshihisa Yamano<sup>2)</sup>

Division of Nephrology and Hypertension, Department of Internal Medicine,  
St Marianna University School of Medicine<sup>1)</sup>

Department of Rare Diseases Research, Institute of Medical Science, St Marianna University School of Medicine<sup>2)</sup>

Department of Urology, St Marianna University School of Medicine<sup>3)</sup>

To assess the safety of kidney transplantation to and from patients infected with human T-lymphotropic virus type I (HTLV-1), past cases were reviewed using literature (12 case reports and 6 case series) available on PubMed, SciVerse Scopus and Ichushi-Web (for Japanese literature). Data points analyzed include: age, seropositivity of HTLV-1 in donor and recipient, immunosuppressive agents, follow-up period, the incidence rate of adult T cell leukemia (ATL) and HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). Among the case reports there were 11 patients who developed ATL and 6 patients who developed HAM/TSP following kidney transplantation; of these, 2 ATL and all 6 HAM/TSP patients were seronegative before transplantation. Among all 6 case series, which included 69 transplants in which either the donor or recipient or both were HTLV-1-positive, no patients developed ATL or HAM/TSP post-transplant. In addition, at our hospital, we used blood samples from HAM/TSP patients treated with oral prednisolone or methylprednisolone pulse therapy to assess the influence of corticosteroids on HTLV-1 proviral load. Proviral loads were not significantly different from before to 12 months after the corticosteroid therapies. In conclusion, HTLV-1 can be transmitted via transplantation and cause ATL or HAM/TSP in some recipients. The influence of the immunosuppressive drugs used with kidney transplants remains to be elucidated.

**key words** HTLV-1, ATL, HAM/TSP, kidney transplantation

# Annual Review 神経 2014

2014年1月25日発行

中外医学社

## 1) レトロウイルスと神経疾患

京都府立医科大学附属北部医療センター教授・病院長 中川正法  
京都府立医科大学大学院医学研究科医療フロンティア展開学教授

**key words** retrovirus, neurologic complications, HAND, HAM, T<sub>HAM</sub>

### 要旨

レトロウイルスは逆転写酵素をもつ一本鎖RNAウイルスである。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。HIV感染者の長期予後の改善に伴い、HIV関連神経認知障害 (HIV-associated neurocognitive disorders: HAND) の増加が指摘されている。HTLV-1感染者数は約108万人と推定される。T<sub>HAM</sub>の発見をはじめHAMの免疫学的病態解明が進んでいる。HTLV-1に対策が強化され、今後の治療法開発が期待される。

### 動向

HIV感染による神経障害の最近の特徴は、抗レトロウイルス療法 (combination antiretroviral therapy: cART) の普及により神経系の日和見感染症が減少したこと、長期にcARTを受けているHIV感染者におけるHIV関連神経認知障害 (HIV-associated neurocognitive disorders: HAND) が増加していること、神経毒性の低いcARTレジメにより末梢神経障害が減少していること、HIVがよくコントロールされた状態で長期生存する

HIV感染者は加齢と共に増加する神経疾患に対して脆弱性をもっていることなどである。HANDの発症機構の解明と治療戦略は、延命化したHIV感染症対策において最も重要な課題である。

HTLV-1感染の全国疫学調査が行われ、HTLV-1感染者は約108万人で関東、関西などの都市圏でHAM患者が増加していることが明らかとなった。ALSの有病率との比較に基づいて、HAMの人口10万人当たりの推定有病率は3.0人と推定された。HTLV-1 basic leucine zipper factor (HBZ), IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup>T細胞 (T<sub>HAM</sub>), CXCL10/IP10などがHAMの病態に関与していることが報告された。“Positive feedback loop” がHAMにおける慢性炎症を惹起していることが示唆された。

### A. HIV感染症

厚生労働省エイズ動向委員会の報告によれば、凝固因子製剤による感染例を除いた2012年12月31日までの累計は、HIV感染者14,706件、AIDS患者6,719件で計21,425件となった。2008年以降、新規HIV感染者報告数は増加傾向から横ばいに転じている。新規AIDS患者報告数も横ばい傾向となりつつある (図1)。

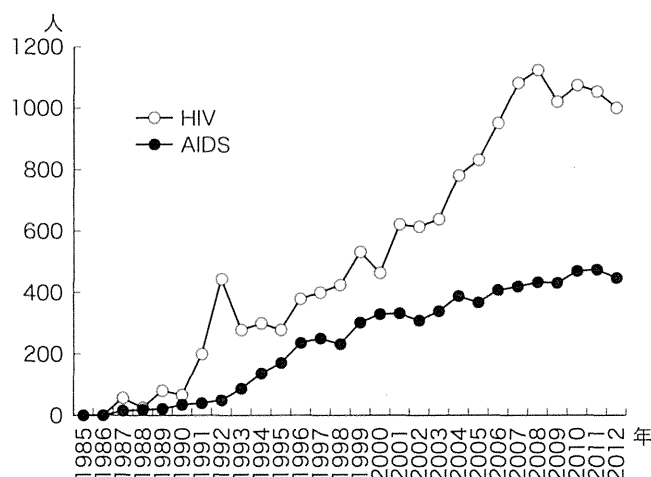


図1 新規HIV感染者およびAIDS患者報告数の年次推移  
(厚生労働省エイズ動向委員会ホームページより)

HIV感染によって引き起こされる神経障害は neuroAIDSと総称される。cARTにより、全 neuroAIDSの発症は大幅に減少した<sup>1,2)</sup>。しかし、HIV感染者の長期生存によりHIV関連神経認知障害 (HAND) のリスクが高まることが指摘されている。また、cARTに関連して引き起こされる進行性多巣性白質脳症 (PML)、免疫再構築症候群、薬剤耐性による日和見感染、薬剤関連神経障害などに注意が必要である<sup>3)</sup>。

## B. HIV関連神経認知障害(HIV-associated neurocognitive disorders: HAND)

以前は、AIDS-dementia complex (ADC) と言われていたが、最近は、より広い概念として HANDが提唱されている<sup>4)</sup>。HANDは、無症状のHIV感染者の約30%、AIDS患者の約50%にあると言われ、HANDの鋭敏な評価法が課題となっている<sup>5,6)</sup>。European AIDS Clinical Society (EACS) は、HIV-associated neurocognitive impairment (NCI) のガイドラインを2011年発

表している<sup>7)</sup>。

HANDは、2つ以上の認知領域の機能低下 (< 1SD) はあるが日常生活に支障はない無症候性神経心理学的障害 (asymptomatic neurocognitive impairment: ANI)、2つ以上の認知領域の機能低下 (< 1SD) と日常生活に軽度の障害がある軽度神経認知障害 (HIV associated mild neurocognitive disorder: MND)、および、2つ以上の認知領域の顕著な低下 (< 2SD) と著しい機能障害を認めるHIV関連認知症 (HIV-associated dementia: HAD) に分類される (図2)<sup>4)</sup>。

HANDの発症に関与する要因として、HIV感染後の長期生存、中枢神経における低頻度のHIV増殖と炎症反応の持続、抗ウイルス薬や他の治療薬への累積曝露量、慢性炎症反応による血管障害の悪化、加齢に伴う種々の疾患 (高血圧症、脂質異常症など) や神経変性疾患の影響などが言われている。また、cARTの早期開始による認知機能に対する長期的な予防効果が論議されている<sup>1)</sup>。

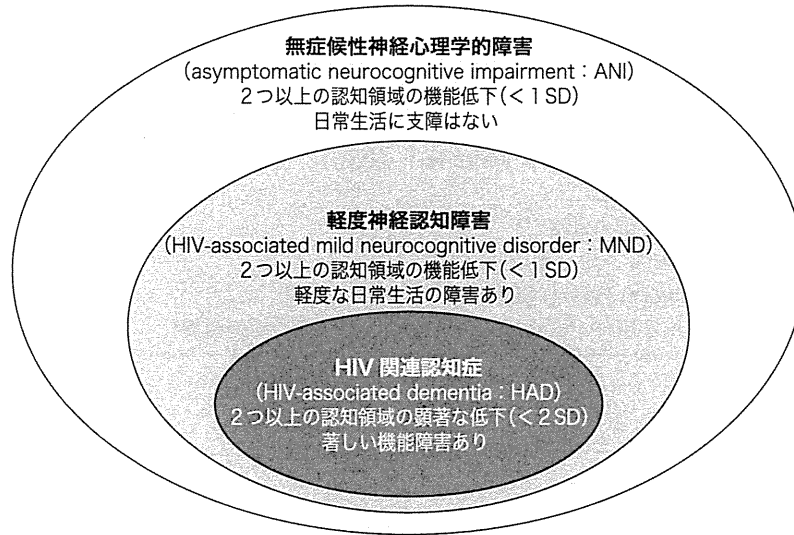


図2 HIV関連神経認知障害(HIV-associated neurocognitive disorders: HAND) (2007年Frascati criteriaより)

cARTによりHIV感染者の免疫機能は改善し、HADは減少したがANI、MNDが大きな問題として残っている。

### C. HANDの臨床症状

注意力・集中力の低下、軽度の健忘、思考・問題処理能力の緩慢化、無気力、興味の喪失などが初期にみられる。また、うつ症状を示す気分障害がみられることもある。症状の進行に伴い、幻覚、妄想、気分の変動などの多様な精神症状を合併することもある。さらに、歩行障害、振戦、巧緻運動障害などがみられるようになり、末期には広範な認知機能障害を示し、植物状態となる<sup>8)</sup>。

頭部MRI所見では、全般的な脳萎縮、左右対称性の白質病変を認め、経過と共に進行する。病変の左右差が顕著な場合はリンパ腫、PMLなどの鑑別が重要である。髄液所見では、HIV RNA量、MCP-1 (CCL2)、CXCL2 (IP10)、ネオプテリン、 $\beta$ 2ミクログロブリン、キノリン酸、腫瘍壊死因子、マトリックスメタロプロテアーゼなどがHANDの重症度に応じて上昇する。ニューロフィラメント軽鎖、タウ蛋白、14-3-3蛋白なども上昇し治療効果の指標として利用できる<sup>9)</sup>。

### D. 高次脳機能評価バッテリーと神経画像所見

我々は、中枢神経異常のないHIV感染者の高次脳機能評価のために、国際的HIV痴呆スケール (IHDS) に加え、遂行機能、注意、視空間能力、言語機能、総合認知機能を評価する検査法を組み合わせた評価バッテリーを作成した (表1)<sup>10)</sup>。HIV感染者群では、RCMT、ROCFTの再生、数唱、符号問題で低下が目立ち、記憶、注意、遂行機能の障害が示唆された。頭部MRIでは明らかな脳萎縮はみられず、脳血流SPECTは主に後頭葉、頭頂葉の軽度血流低下を認めた。高次脳機能検査はHIV感染者群では前頭葉機能低下を示しており、神経画像所見との関連については今後の経過観察と検討症例数の増加が必要である。

### E. 推定されるエイズ脳症の発症機序

AIDS脳症の病態の中心は、脳内血管周囲に存

表1 HIV感染者用の高次脳機能評価バッテリー (所要時間 約50分間)  
(中川正法, Clin Neurosci. 2010; 28: 331-4)<sup>10)</sup>

- 
- ①IHDS (国際HIV痴呆スケール)
  - ②Raven's Matrices (遂行機能)
  - ③Rey-Osterrieth complex figure test (記憶)
  - ④数唱 (記憶, 注意)
  - ⑤符号問題 (複雑注意能力)
  - ⑥Draw a Clock Test (視空間能力)
  - ⑦Word Fluency Test (言語機能)
  - ⑧Mini Mental State Examination (MMSE) (総合認知機能)
- 

在するHIV-1感染マクロファージとミクログリアである。AIDS脳症患者の脳より検出されるウイルスは、CCR5をコレセプターとして使用するマクロファージ指向性HIVである。神経細胞やオリゴデンドログリアへの直接の感染増殖はなく、間接的細胞障害が病態の中心であると考えられている(図3)<sup>11)</sup>。血管周囲に浸潤しているマクロファージは、CD163, CD68, CD387陽性であり、HIVを産生している細胞もみられる。これらのマクロファージからアストロサイトへHIVが感染していくと考えられる。また、腸管免疫の低下とそれに関連するmicrobial translocationによる全身的な炎症反応がHIV感染の病態と関連しているとの報告がある<sup>12)</sup>。

AIDS脳症の病理像として、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<sup>13)</sup>。大脳皮質変性病態ではアストロサイトによるEAAT-2の発現低下とミクログリアのびまん性活性化が生じている。炎症惹起性サイトカインであるIL-1 $\beta$ が、HIV脳炎に特徴的な多核巨細胞に一致して強く発現しており、HIV脳炎の炎症の持続、組織の変性に関与していることが、サルAIDS脳症モデルおよびヒトAIDS脳症剖検例の検討から示唆されている<sup>14)</sup>。HIS (human immune system) -HIVマウスモデル(ヒト-マウスキメラモデル)などのエイズ脳症マウスモデルも開発されつつあり、この分野での更なる発展

が期待される<sup>11)</sup>。

## F. HANDの治療法

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。服薬率100%を目標に基本的に生涯にわたって継続する。岸田らはcART中でもプロテアーゼ阻害薬は脳血管関門を通過しにくく、中枢神経組織がHIVのリザーバーとなる可能性を指摘している<sup>15)</sup>。cART中であっても髄液中HIV-RNA量が血中よりも高い場合などは、髄液移行性にも配慮した処方と脳症発症を見逃さない経過観察が重要である。最近、中枢神経系への移行度と有効性(CPE: CNS penetration-effectiveness)に基づいて、抗HIV薬のランク付けが試みられている(表2)<sup>2)</sup>。

## G. 免疫再構築症候群とAIDS脳症

cARTの導入に伴って、免疫再構築症候群 (immune reconstitution inflammatory syndrome: IRIS) が重要な問題となっており、cART中患者の35%がIRISを発症し、中枢神経系のIRISは1.0%弱のcART中患者にみられるとの報告がある<sup>16)</sup>。IRISは、cART開始後にHIVウイルス量が減少し、CD4陽性T細胞が上昇する過程で見られる感染・炎症の再燃・顕在化をいう。多くは、



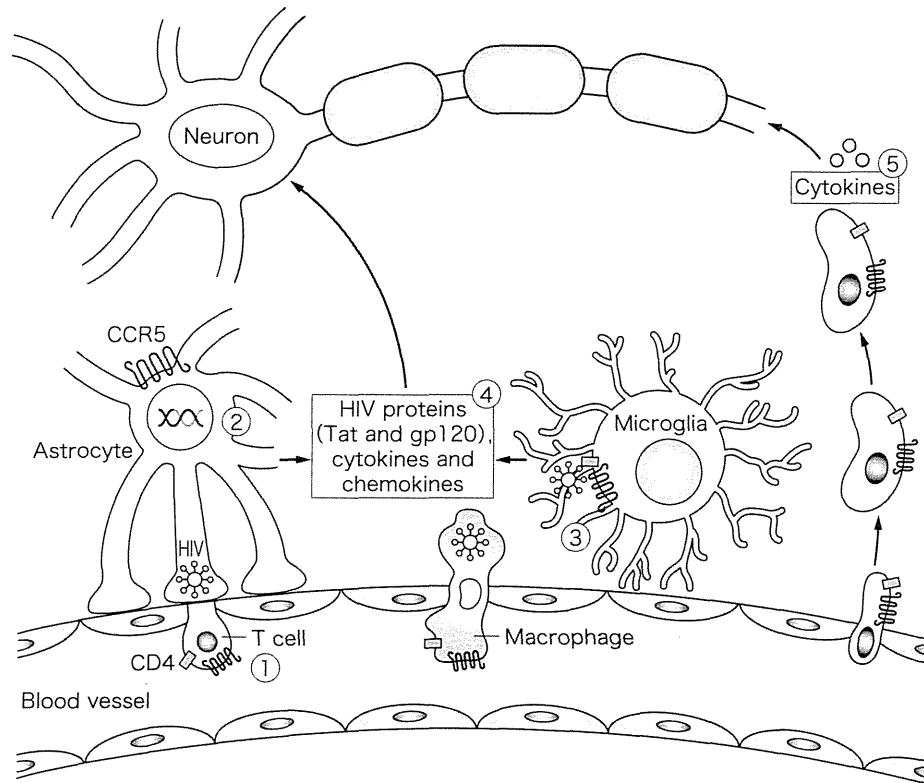


図3 HANDの発症に関する細胞メカニズム

(Jaeger LB, et al. Dis Models Mechanisms. 2012; 5: 313-22<sup>11)</sup> より改変)

①感染T細胞とアストロサイトの直接の接触によるウイルスシナプスを介したHIVの感染, ②アストロサイトに感染したHIVはゲノムに取り込まれ潜在化, ③HIV感染マクロファージは感染初期に脳内に侵入。その後, HIVはCD4/CCR5複合体に結合し, 血管周囲のマクロファージやミクログリアに感染, ④HIV感染マクロファージやアストロサイトは, 神経障害性物質 (Tat, gp120, サイトカイン, ケモカイン) を放出し, 間接的に神経細胞を傷害, ⑤cARTに関わらず, 中枢神経における低レベルの持続的なHIVの増殖は, 慢性的に活性化されたT細胞の侵入を促進する。侵入したT細胞から神経障害性の炎症性サイトカインが放出される。

cART開始後60日以内にIRISを発症している。IRISは脳炎以外にも, PML, クリプトコックス髄膜炎, サイトメガロウイルス感染症に発症頻度が高い。IRISに対して副腎皮質ステロイドホルモンの投与が有効な場合もあるが, 死に至ることも多くIRISの病態解明がneuroAIDSの治療においても重要な課題となっている<sup>17)</sup>。

## H. HIV関連の神経系日和見感染症

HIV関連の神経系日和見感染症は, 1/1000人程度の頻度で見られ, 進行性多巣性白質脳症(PML) 0.7/1000人, トキソプラズマ脳炎0.4, クリプトコックス髄膜炎0.2との報告がある(重複感染あり)<sup>18)</sup>。わが国のエイズ動向委員会の報告では, 2012年末におけるAIDS指標疾患における割合(累積)は, トキソプラズマ脳炎1.8%, PML1.2%であった。HIV関連の神経系日和見感

表2 中枢神経系への移行度と有効性(CPE: CNS penetration-effectiveness)に基づく抗HIV薬のランク付け  
(Spudich S, et al. Cold Spring Harb Perspect Med. 2012; 2: a007120<sup>2)</sup> より改変)

中枢神経への浸透率	0	0.5	1
核酸系逆転写酵素阻害剤	ジダノシン テノホビル ザルシタビン アデホビル	エムトリシタビン ラミブジン サニルブジン	アバカビル ジドブジン
非核酸系逆転写酵素阻害剤		エファビレンツ	デラビルジン ネビラピン
プロテアーゼ阻害剤	ネルフィナビル リトナビル サキナビル サキナビル/r チプラナビル/r	アンブレナビル アタザナビル ホスアンブレナビル インジナビル	アンブレナビル/r アタザナビル/r ホスアンブレナビル/r インジナビル/r ロピナビル/r
エントリー阻害薬	エンフュービルタイド T-1249		マラビロク ビクリビロク
インテグラーゼ阻害剤		ラルテグラビル エルビテグラビル	

r: リトナビル含有.

染症は、CD4陽性T細胞数が200細胞/ $\mu$ L以下になった場合に顕在化しやすいが、IRISとの鑑別などに難渋することもまれではない。その診断と治療に関するアルゴリズムが提案されている<sup>18)</sup>。

## I. HIV関連脊髄症

HIV関連脊髄症はvacuolar myelopathyと言われ、特に側索・後索にマクロファージの活性化と空胞変化が多く見られる。臨床的には、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。海外ではAIDS患者の5～10%に臨床症状が認められ、剖検例の50%にvacuolar myelopathyを認めると言われている<sup>19)</sup>。わが国のAIDS患者ではその頻度は低く、剖検例でも10%以下である<sup>20)</sup>。HIV-1関連脊髄炎は臨床的に横断性脊髄炎の症状を示すが比較的

まれな疾患であり、HTLV-1、梅毒、結核、サイトメガロウイルス、ヘルペスウイルスなどによる脊髄炎との鑑別が必要である。

## J. HIV関連末梢神経障害

HIV感染に伴う末梢神経障害として、多発脳神経炎、慢性炎症性脱髄性多発根神経炎(CIDP)、感覚優位多発神経炎が知られている。HIV関連感覚優位多発神経炎(HIV-SN)は、HIV自体に関連した多発神経炎とHIV治療に伴う薬剤性末梢神経障害が含まれるが両者の鑑別は困難なことが多い。HIV-SNの臨床的特徴は、“痛み”または“不快な異常感覚”であり、歩行時や夜間に悪化する。神経伝導検査では軸索性感覚神経障害を認める。現時点では、HIV-SNに対する有効な治療法はないが、適切なcARTの適応と免疫療法(IVIg, 副腎皮質ステロイドなど)が有効な場合がある<sup>21)</sup>。

### K. HAM: HTLV-1 Associated Myelopathy (HTLV-1 関連脊髄症)

1980年HTLVが発見され、翌年にはHTLVがATLの原因ウイルスと確認された。そして、1985年6月にHAM患者第一例が発見された<sup>22,23)</sup>。1986年11月からは、献血のHTLV-Iスクリーニング開始され、その後、スクリーニングを受けた血液由来のHAM発症はない。HAMは2008年に厚生労働省特定疾患に指定されたが、慢性進行性の疾患であり医療費軽減措置を含む総合的なHAM対策の充実が望まれる。

### L. HAMの疫学

最近、HTLV-1感染者および第三次HAM患者全国調査が行われた。その結果、HTLV-1感染者は全国で約108万人存在し(図4)<sup>24)</sup>、関東、関

西などの都市圏でHAM患者が増加していることが明らかとなった(図5)<sup>25)</sup>。また、1995年以降は高齢発症のHAM患者が多く、高齢発症割合(65歳以上)は、1994年前は4/317例(1.3%)、1995年以降は122/464例(26.3%)、 $p < 0.0001$ (Fisher's直接法)であった。ALSの有病率との比較に基づいて、HAMの人口10万人当たりの推定有病率は3.0人と推定された。

### M. HAMの診断上の注意点

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。抗HTLV-I抗体価、HTLV-I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<sup>26,27)</sup>。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。急速進行を示すHAM患者の定義は、発症2年以内に両杖歩行レベル以上に悪化、または、

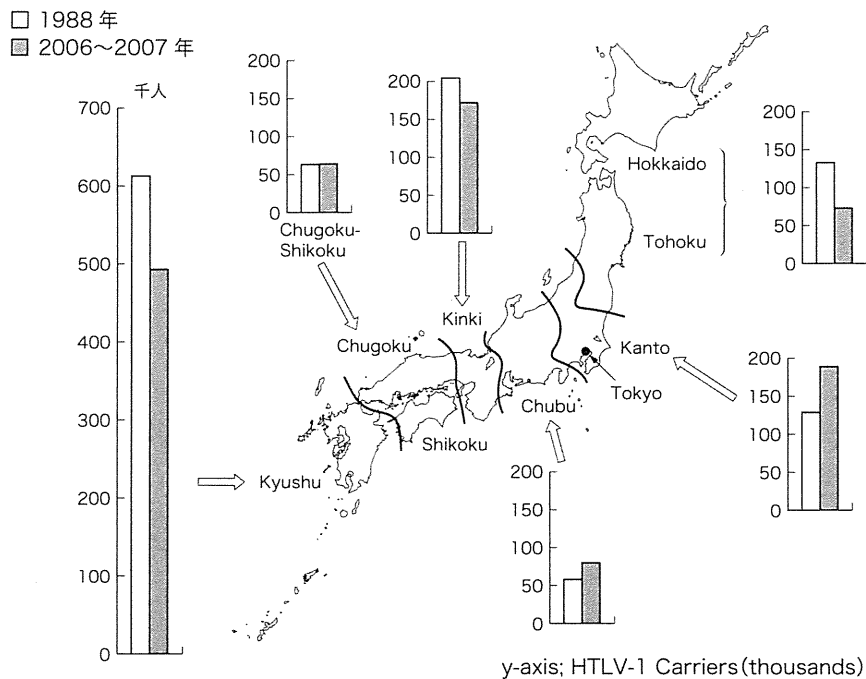


図4 HTLV-1 保因者の変遷 (Satake M, et al. J Med Virol. 2012; 84: 327-35)<sup>24)</sup>  
現時点のHTLV-1保因者数は108万人と推定された。

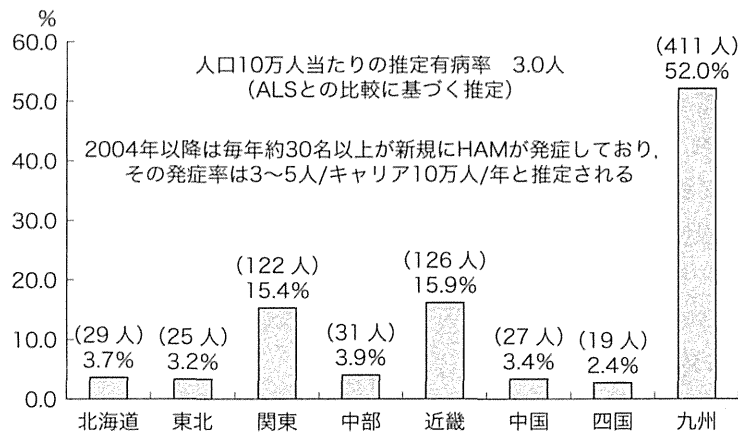


図5 第3次HAM全国調査で登録されたHAM患者790名の地域分布 (出雲周二, 他, 神経内科, 2011; 75: 369-73)<sup>25)</sup>

3~6カ月以内に納の運動障害重症度 (OMDS) が1段階以上の悪化としている。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α注射 (保険適応あり) などが有効な場合がある<sup>28)</sup>。

ルと体幹筋の再教育・強化を行うことで体幹を円筒状に強化保持し、骨盤周囲筋の再教育・強化を行うことで、足の振り出しがスムーズになりリハビリ効果の向上に役立つと考えられる (図6)<sup>29)</sup>。ロボットスーツHAL福祉用 (HAL®) はCYBERDYNE (株) により開発された装着型動作支援機器でOMDS 5度以上のHAM症例がHAL装着歩行練習に適應していると考えている。

### N. HAMとリハビリテーション -インナーマッスルの再教育-

HAMの治療において、継続的なりハビリテーション (リハビリ) は必須である。痙性のコントロー

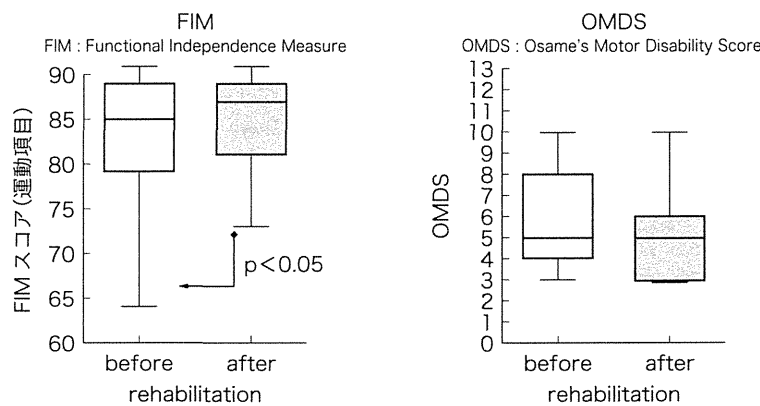


図6 HAMに対するリハビリ効果 (武澤信夫, 他, 神経内科, 2011; 75: 393-401)<sup>29)</sup>  
HAM症例15例 (男性3例, 女性12例) に4週間の集中リハビリを行った。

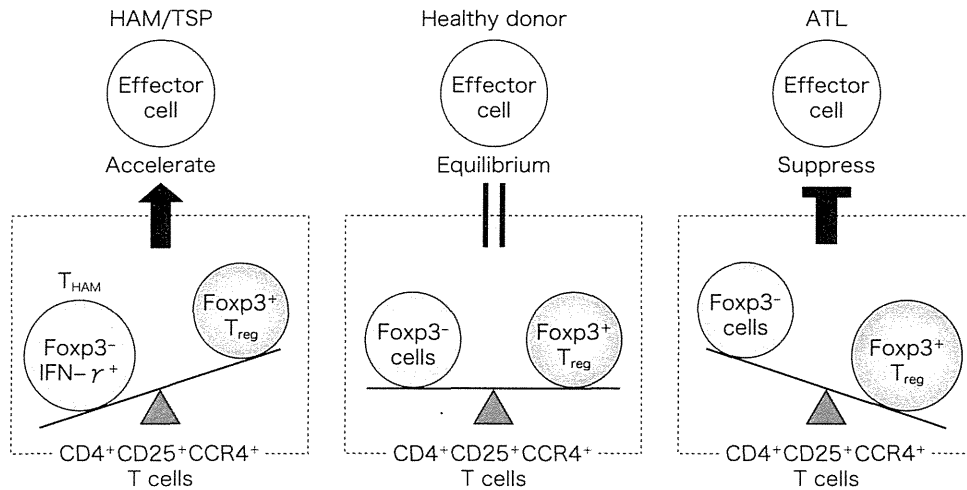


図7 HAMとATLにおける免疫反応と $CD4^+CD25^+CCR4^+$  T細胞における $T_{HAM}/T_{reg}$ 比  
(Araya N, et al. Viruses. 2011; 3: 1532-48<sup>37)</sup>より改変)

## O. HAM患者に対するバクロフェン髄注療法(ITB療法)

バクロフェンは、脊髄後角に分布する $GABA_B$ 受容体にアゴニストとして作用し、 $\gamma$ 運動ニューロンの活性を低下させる。バクロフェン髄注療法(ITB療法)が開発され、わが国でも2006年4月保険適応となった。われわれは、ITB療法のスクリーニングで有効性が認められたHAM患者3例にバクロフェン髄注療法用ポンプの埋め込み術を行い、その後、継続的なりハビリを施行した。三次元動作解析装置(VICON MX)を用いて、歩行中の計測空間に対する骨盤角度、左右の下肢の各関節角度を計測し、3例ともに下肢痙性および歩行の改善を認めた。

## P. HAMの病態

脊髄の病理学的検討から、HAMでは胸髄中下部の左右対称性の側索、前側索、後索腹側部の変性、血管周囲から実質内にひろがる小円形細胞の浸潤がみられる<sup>30-33)</sup>。HTLV-1 mRNAおよびプ

ロウイルスDNAは浸潤単核細胞内の $CD4$ 陽性Tリンパ球内のみ確認される。HAMの発症には宿主側とウイルス側の発症関連要因(HLA、ウイルスタイプなど)が関与している。脊髄病巣部のHTLV-1感染 $CD4$ 陽性Tリンパ球とそれを攻撃するHTLV-1特異的 $CD8$ 陽性Tリンパ球との相互作用により種々のサイトカインが持続的に放出され、神経組織を傷害していると想定されている(by stander効果)<sup>34)</sup>。

## Q. HAMに関連した最近の研究

HTLV-1 basic leucine zipper factor(HBZ)は、HTLV-1Tax遺伝子の逆方向からの転写により産生される。Saitoらは、HAM 56例のHBZ mRNA発現量を検討し、HAM重症度および髄液中ネオプテリン量と相関し、 $IFN-\alpha$ 治療により減少すると報告している<sup>35)</sup>。Yamanoらは、 $IFN-\gamma + CD4^+CD25^+CCR4^+$  T細胞( $T_{HAM}$ )がHAM患者で増加しており、HAMの臨床的重症度および髄液中ネオプテリン量と相関していると報告している(図7)<sup>36,37)</sup>。Satouらは、HAM患者では



の整備, ④普及啓発・情報提供, ⑤研究開発の推進が掲げられた。その結果, 新たな厚生労働省研究班が組織され, 全国的なHAM患者登録事業(HAMねっと)がスタートした(図8)。また, ATL研究者も含めた「HTLV-1研究会・合同班会議」が組織され年々活発になっており, HAM研究は新たな時代を迎えている。

#### 〈謝辞〉

本研究の一部は, 厚生労働科学研究費補助金(エイズ研究事業)「NeuroAIDSの発症病態と治療法の開発を目指した長期フォローアップ体制の構築に関する研究(H18—エイズ—一般—009)」, 同(難治性疾患克服研究事業)「重症度別治療指針作成に資すHAMの新規バイオマーカー同定と病因細胞を標的とする新規治療法の開発」班, および同「HTLV-1関連脊髄症(HAM)の新規医薬品開発に関する研究」班の助成を受けて行われた。

#### 文献

- 1) Yoritaka A, Ohta K, Kishida S. Prevalence of neurological complications in Japanese patients with AIDS after the introduction of HAART. *臨床神経*. 2007; 47: 491-6.
- 2) Spudich S, González-Scarano F. HIV-1-related central nervous system disease: current issues in pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012; 2: a007120.
- 3) Croucher A, Winston A. Neurological complications of HIV. *Medicine*. 2013; 41: 8; 450-5.
- 4) Antinori A, Arendt G, Becker JT, et al. Updated research nosology for HIV-associated neurocognitive disorders. *Neurology*. 2007; 69: 1789-99.
- 5) Gandhi NS, Moxley RT, Creighton J, et al. Comparison of scales to evaluate the progression of HIV associated neurocognitive disorder. *HIV Ther*. 2010; 4: 371-9.
- 6) Simioni S, Cavassini M, Annoni JM, et al. Cognitive dysfunction in HIV patients despite long-standing suppression of viremia. *AIDS*. 2010; 24: 1243-50.
- 7) European Treatment Guideline. <http://www.europeanclinicalaidsociety.org/>
- 8) 三浦義治, 岸田修二. HIV感染に伴う神経疾患. *Brain and Nerve*. 2013; 65: 275-81.
- 9) Schouten J, Cinque P, Gisslen M, et al. HIV-1 infection and cognitive impairment in the cART era: a review. *AIDS*. 2011; 25: 561-75.
- 10) 中川正法. HIV感染と神経合併症. *Clin Neurosci*. 2010; 28: 331-4.
- 11) Jaeger LB, Nath A. Modeling HIV-associated neurocognitive disorders in mice: new approaches in the changing face of HIV neuropathogenesis. *Dis Models Mechanisms*. 2012; 5: 313-22.
- 12) Lackner AA, Lederman MM, Rodriguez B. HIV pathogenesis-The host. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2011; a007005.
- 13) Xing HQ, Hayakawa H, Gelpi E, et al. Reduced expression of excitatory amino acid transporter 2 and diffuse microglial activation in the cerebral cortex in AIDS cases with or without HIV encephalitis. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2009; 68: 199-209.
- 14) Xing HQ, Moritoyo T, Mori K, et al. Expression of proinflammatory cytokines and its relationship with virus infection in the brain of macaques inoculated with macrophage-tropic simian immunodeficiency virus. *Neuropathology*. 2009; 29: 13-9.
- 15) 岸田修二. HAART導入後の神経系AIDSとその関連疾患—真菌性髄膜炎を含めて. *Neuroinfection*. 2009; 14: 78-84.
- 16) Johnson T, Nath A. Neurological complications of immune reconstitution in HIV-infected populations. *Ann N Y Acad Sci*. 2010; 1184: 106-20.
- 17) Zaffiri L, Verma R, Struzzi K, et al. Immune reconstitution inflammatory syndrome involving the central nervous system in a patient with HIV infection: a case report and review of literature. *New Microbiologica*. 2013; 36: 89-92.
- 18) Tan IL, Smith BR, von Geldern G, et al. HIV-associated opportunistic infections of the CNS. *Lancet Neurol*. 2012; 11: 605-17.
- 19) McArthur JC, Brew BJ, Nath A. Neurological complications of HIV infection. *Lancet Neurol*. 2005; 4: 543-55.
- 20) Funata N, Maeda Y, Koike M, et al. Neuropathology of the central nervous system in acquired immune deficiency syndrome (AIDS) in Japan.

- With special reference to human immunodeficiency virus-induced encephalomyelopathies. *Acta Pathol Jpn.* 1991; 41: 206-11.
- 21) Centner CM, Bateman KJ, Heckmann JM. Manifestations of HIV infection in the peripheral nervous system. *Lancet Neurol.* 2013; 12: 295-309.
  - 22) Osame M, Usuku K, Izumo S, et al. HTLV-I associated myelopathy: A new clinical entity. *Lancet.* 1986; 1: 1031-2.
  - 23) Osame M, Matsumoto M, Usuku K, et al. Chronic progressive myelopathy associated with elevated antibodies to HTLV-I and adult T-cell leukemia-like cells. *Ann Neurol.* 1987; 21: 117-22.
  - 24) Satake M, Yamaguchi K, Tadokoro K. Current prevalence of HTLV-I in Japan as determined by screening of blood donors. *J Med Virol.* 2012; 84: 327-35.
  - 25) 出雲周二, 松崎敏男, 久保田龍二. HAMの新しい展開. *神経内科.* 2011; 75: 369-73.
  - 26) Koga M, Takahashi T, Kawai M, et al. Neuromyelitis optica with HTLV-1 infection: different from acute progressive HAM? *Intern Med.* 2009; 48: 1157-9.
  - 27) 梅原藤雄. HAMの臨床的多様性. *神経内科.* 2011; 75: 374-9.
  - 28) 山野嘉久, 佐藤知雄. HTLV-1関連脊髄症(HAM)の病態・治療とバイオマーカー. *日本臨牀.* 2013; 71: 870-5.
  - 29) 武澤信夫, 奥田求己, 中川正法. HAMのリハビリテーション. *神経内科.* 2011; 75: 393-401.
  - 30) Izumo S, Ijichi T, Higuchi I, et al. Neuropathology of HTLV-I-associated myelopathy—a report of two autopsy cases. *Acta Paediatr Jpn.* 1992; 34: 358-64.
  - 31) 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.
  - 32) Umehara F, Izumo S, Takeya M, et al. Expression of adhesion molecules and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in the spinal cord lesions in HTLV-I-associated myelopathy. *Acta Neuropathol (Berl).* 1996; 91: 343-50.
  - 33) Moritoyo T, Reinhart TA, Moritoyo H, et al. Human T-lymphotropic virus type I-associated myelopathy and tax gene expression in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. *Ann Neurol.* 1996; 40: 84-90.
  - 34) 納光弘, 宇宿功市郎, 梅原藤雄, 他. HAMの病態と治療. *日本内科学会雑誌.* 2003; 92: 1673-82.
  - 35) Saito M, Matsuzaki T, Satou Y, et al. In vivo expression of the HBZ gene of HTLV-1 correlates with proviral load, inflammatory markers and disease severity in HAM/TSP. *Retrovirology.* 2009; 6: 19.
  - 36) Yamano Y, Araya N, Sato T, et al. Abnormally high levels of virus-infected IFN-gamma<sup>+</sup> CCR4<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells in a retrovirus-associated neuroinflammatory disorder. *PLoS One.* 2009; 4: e6517.
  - 37) Araya N, Sato T, Yagishita N, et al. Human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and regulatory T cells in HTLV-1-associated neuroinflammatory disease. *Viruses.* 2011; 3: 1532-48.
  - 38) Satou Y, Utsunomiya A, Tanabe J, et al. HTLV-1 modulates the frequency and phenotype of FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells in virus-infected individuals. *Retrovirology.* 2012; 9: 46.
  - 39) Ando H, Sato T, Tomaru U, et al. Positive feedback loop via astrocytes causes chronic inflammation in virus-associated myelopathy. *Brain.* 2013; 136(Pt9): 2876-87.



# HTLV-1 の Tax 発現リンパ腫細胞の ウシラクトフェリンによる 腫瘍増殖抑制効果

ラクトフェリン 2013

田中正和<sup>\*1)</sup>、和田直樹<sup>\*1, 2)</sup>、橋本岩雄<sup>\*1)</sup>・竹之内徳博<sup>\*1)</sup>、  
津田洋幸<sup>\*3)</sup>、藤澤順一<sup>\*1)</sup>、三輪正直<sup>\*2)</sup>

## *Anti-tumor effects by bovine lactoferrin on lymphoma cells expressing HTLV-1 tax*

成人 T 細胞性白血病(ATL)は、ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型(HTLV-1)感染により引き起こされる悪性リンパ腫であるが、有効な治療法がいまだに確立されていない。

本研究において、われわれはウシラクトフェリン(bLF)をマウスに前投与したあとに HTLV-1 の tax 遺伝子を組み込んだ白血病細胞株を移植して、その後生じた腫瘍の増殖抑制効果が有意に認められた。脾臓の HE 染色では、bLF 投与群の樹状細胞が多く局在する辺縁帯の肥大が認められ、さらに蛍光免疫染色では、樹状細胞とヘルパー T 細胞の活性化が確認出来た。

Masakazu Tanaka<sup>\*1)</sup>, Naoki Wada<sup>\*1, 2)</sup>, Iwao Hashimoto · Norihiro Takenouchi<sup>\*1)</sup>,  
Hiroyuki Tsuda<sup>\*3)</sup>, Jun-ichi Fujisawa<sup>\*1)</sup>, Masanao Miwa<sup>\*2)</sup>

Key words : ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型(HTLV-1), 腫瘍増殖抑制, 樹状細胞活性化

## 背景と目的

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型(human T-cell leukemia virus type1, HTLV-1)は世界ではじめて発見されたヒトを宿主とするレトロウイルスで、成人 T 細胞性白血病(adult T-cell leukemia, ATL)発症の原因となるウイルスである<sup>1, 2)</sup>。

ATL は日本の南西地方に多発し、特異な臨床

像を伴う T リンパ球の悪性腫瘍性疾患として日本で見出された<sup>3)</sup>。感染者の大多数は無症候(HTLV-1 キヤリア)で、ウイルス感染してから、30~50年の潜伏期間を経たあと、生涯発症約5%の割合でATLを発症、約1%がHTLV-1 関連脊髄症(HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis, HAM/TSP)<sup>4)</sup>が引き起こされる。また、その他の炎症性疾患を同時に発症することも知られている<sup>5)</sup>。かつて主に九州・沖縄地方の風土病とまでいわれていたATLだが、近年の疫学調査ではHTLV-1 キヤリアが関東、近畿の大都市圏をはじめ全国に拡大していると報告されており、ウイルス排除を目指した対策が必要

<sup>\*1)</sup> Department of Microbiology, Kansai Medical University 関西医科大学微生物学

<sup>\*2)</sup> Bioscience, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology 長浜バイオ大学バイオサイエンス学部

<sup>\*3)</sup> Department of Molecular Toxicology, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences 名古屋大学立大学分子毒性学分野

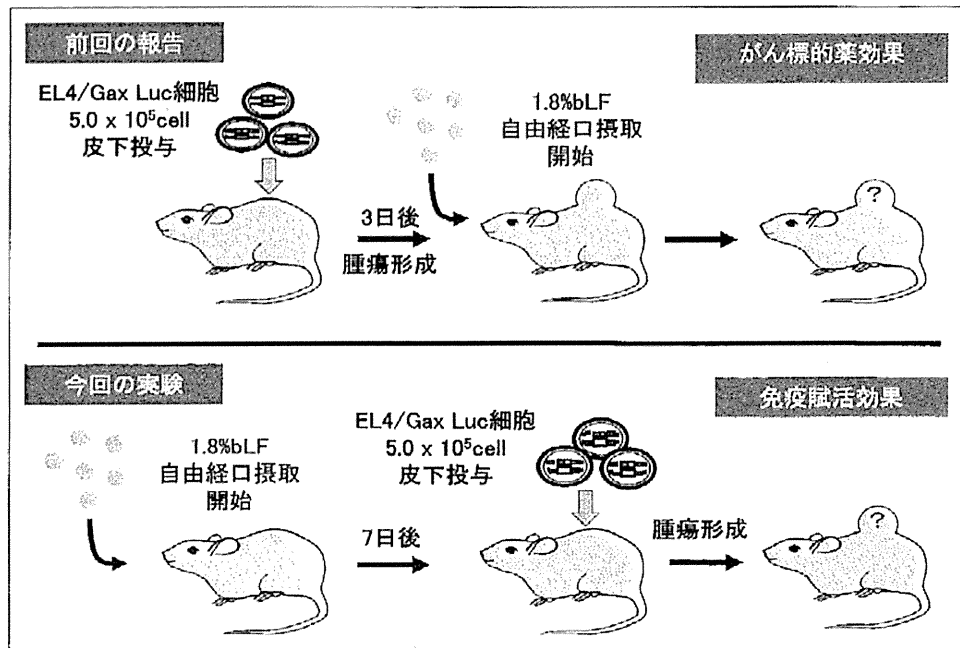


図1 HTLV-1 抗原を発現する細胞(EL4/Gax 細胞)をマウスへ移植したあとにウシラクトフェリン(bLF)をがん標的の効果として検討した前回の報告(上段)とウシラクトフェリン(bLF)を事前に自由経口摂取したあとにHTLV-1 抗原を発現する細胞(EL4/Gax 細胞)を移植し免疫賦活剤としての効果を検討した今回の報告(下段)の概略図

であるといわれている。さらに同時に HTLV-1 キャリアの高齢化も懸念されており、高齢者への現行の治療方法(骨髄療法や多くの抗がん剤を用いた化学療法)では体への負担が非常に大きく、有効な治療法はまだまだ確立されておらず、改善が求められているのが現状である。

筆者らは以前 bLF 投与が *in vitro* および *in vivo* における HTLV-1 感染を抑制する効果が認められたことを報告し、HTLV-1 の発がん遺伝子産物 Tax を発現させた細胞を移植することでリンパ腫が形成されるモデルマウスを用いて、bLF がこのリンパ腫形成時において腫瘍標的薬としての抑制効果が認められることを報告した<sup>6)</sup>(図1上)。

そこで今回われわれは、Tax 発現 EL4 細胞(EL4/Gax)を同系(B6)マウスに移植する1週間前から経口自然摂取させることで、生体内の免疫力を向上させる、すなわち免疫賦活化作用として、bLF が HTLV-1 腫瘍細胞増殖を抑制することが出来るのかを調べることにした(図1下)。

## 材料と方法

### 1. ラクトフェリン(LF)

本実験で使用した LF は、森永乳業栄養科学研究所より恵与されたウシラクトフェリン(bLF)を使用した。

### 2. 細胞株とマウスへの投与方法

MLV LTR U3 領域を HTLV-1 の LTR と入れ替え、Tax と蛍光蛋白質 GFP との融合蛋白質 Gax を発現するように構築した組換えレトロウイルスとルシフェラーゼ遺伝子をもつウイルスベクターをマウス T リンパ腫細胞株である EL4 細胞株へ感染させて EL4/Gax-Luc 細胞として用いた<sup>6)</sup>。

培養液は RPMI1640, 10% FCS, 1% ペニシリン・ストレプトマイシンを用いた。また、 $5 \times 10^5$  cells/50  $\mu$ L に調整した EL4/Gax-Luc 細胞をマウス右腹部皮下に移植投与した。ジャクソンラボラトリー(Maine, USA)より購入し自家繁殖した 18 週齢 C57BL/6(Cg)-Tyr<sup>c2/j</sup> 雌マウスを実

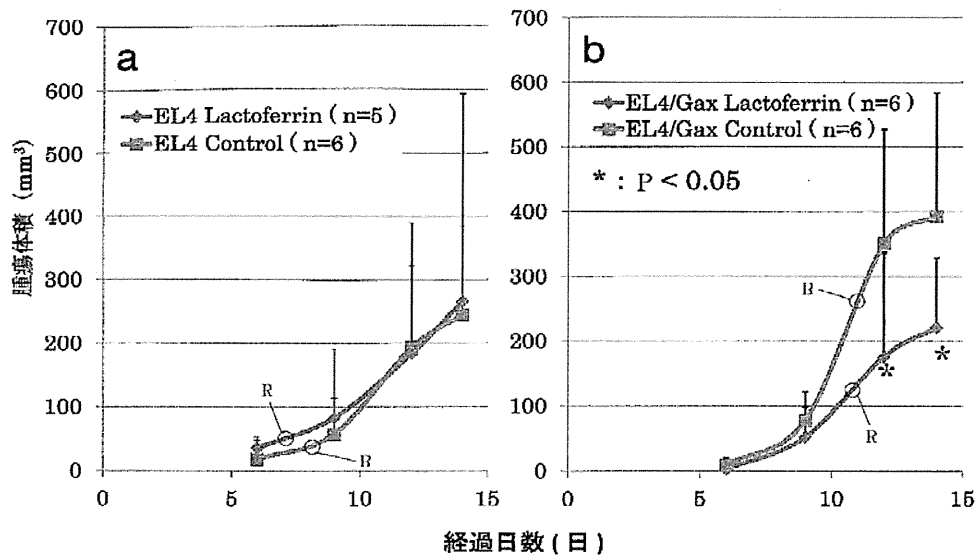


図2 触診による腫瘍体積の比較

- a: EL4細胞投与6日目から14日目までの腫瘍の体積を示した。赤実線(R): EL4 bLF投与群(n=5)。青実線(B): EL4対照群(n=6)  
 b: EL4/Gax細胞投与6日目から14日目までの腫瘍体積を示した。赤実線(R): EL4/Gax bLF投与群(n=6)。青実線(B): EL4/Gax対照群(n=6)

験に用いた。

### 3. 触診法と *in vivo* イメージング法による腫瘍体積測定

触診法についてはノギス(ミットヨ)にて腫瘍の長径・短径および奥行を計測し、その積を腫瘍体積として評価した。また *in vivo* イメージングについては、イソフルラン(Abbott Laboratories社製)にて麻酔を行い、ルシフェリン(Beetle Luciferin, potassium salt, Promega社)を3.9 mg/mLに調整して200  $\mu$ L(体重1 kg当たり30 mg)を腹腔内投与した。ルシフェリン投与20分後、IVIS Image System(Xenogen社)にて測定を行った。

### 4. パラフィン切片作成とHE染色法

マウスから脾臓摘出後、約3 mm四方に切除し、15%緩衝ホルマリン溶液にて24時間固定を行った。その後、水道水にて水洗を行った。つづいて自動固定包埋装置(サクラファインテック・ジャパン社)にてパラフィン包埋を行い、組織の

パラフィンブロックサンプルを作成した。その後、手動回転式マイクローム(ライカ RM2125, Leica社)にて4  $\mu$ mに切り出し、スーパーフrostスライドガラス(MATSUNAMI社)に貼り付けた。その後、ヘマトキシレン・エオジン染色法に準じた染色を行った。

### 5. 凍結切片作成と蛍光免疫染色

マウスから脾臓摘出後に約3 mm四方になるように切り出して、ティッシュ・テック(サクラファインテック・ジャパン社)に入れ、ドライアイスを入れたヘキサンに浸けて瞬間凍結した。その後、凍結切片をクリオスタットで5~10  $\mu$ mに切り出し3-aminopropyltriethoxysilane (APS)コーティングスライドガラス(MATSUNAMI社製)に貼り付け、30分間風乾させた。PBS(-)で10分間洗浄後、2%パラホルムアルデヒド含有PBS(-)で室温20分間固定を行った。PBS(-)で5分間×3回洗浄後、1% BSA/PBSで1時間ブロッキングを行った。さらにFITC標識抗マウス

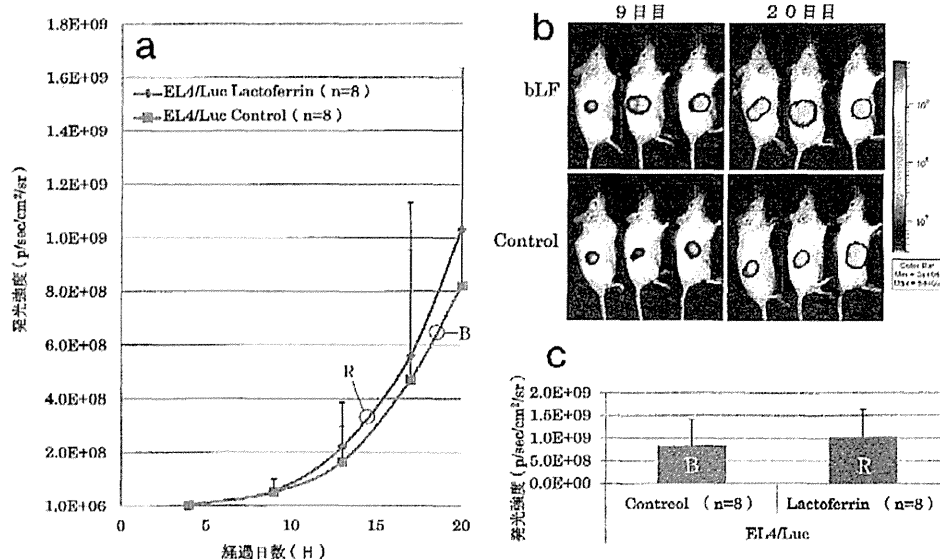


図3 *In vivo* イメージング法による腫瘍増殖比較(EL4-Luc細胞)

a: EL4/Luc細胞投与4日目から20日目までのbLF投与群および対照群の発光強度を図示した。赤実線(R): EL4-Luc bLF投与群(n=8)。青実線(B): EL4-Luc対照群(n=8)  
 b: 細胞投与9日目および20日目における*in vivo*イメージング写真を示した。  
 c: 細胞投与20日目における発光強度を示した。赤棒(R): EL4-Luc bLF投与群(n=8)。青棒(B): EL4-Luc対照群(n=8)

CD4およびPE標識抗マウスCD8(各1%BSA/PBSで20倍希釈した)を10 $\mu$ L滴下し、4 $^{\circ}$ C遮光条件下で一晩抗原抗体反応を行った。その後、PBS(-)で10分 $\times$ 4回洗浄し、95%グリセロール(Tris-HCl(pH7.4):10mM, 1,4-diazabicyclo-2,2,2-octane[DABCO], 25g/L, MERCK社)にて封入した。その後、nano-zoomer(浜松フotonクス)にて観察した。

## 結果

### 1. マウスの体重と摂水量

本実験では、18週齢のC57BL/6J-Tyr<sup>c2j</sup>/J(B6 albino:H-2<sup>b</sup>)マウスに2% bLF水溶液を自由摂取させた1週間後にEL4/GaxおよびEL4細胞を皮下投与にて移植した(図1)。移植日から全個体の体重を3日おきに測定したが、bLF投与によるマウスの体重変動に有意な差は認められなかった。EL4/Gax細胞:bLF群(0日目, 14日目: 21.8 $\pm$ 0.6g, 21.6 $\pm$ 1.1g)と対照群(0日目, 14日

目: 22.0 $\pm$ 1.1g, 21.9 $\pm$ 0.9g), EL4細胞:bLF群(0日目, 14日目: 21.6 $\pm$ 1.3g, 21.5 $\pm$ 0.8g)と対照群(0日目, 14日目: 21.6 $\pm$ 0.4g, 21.7 $\pm$ 0.7g)であった。

また、摂水量においても対照群と比較してbLF投与群では有意な差は認められなかった。EL4/Gax細胞:bLF群(1回目, 5回目: 4.1mL, 3.8mL)と対照群(1回目, 5回目: 4.4mL, 4.2mL), EL4細胞:bLF群(1回目, 5回目: 3.9mL, 3.8mL)と対照群(1回目, 5回目: 4.6mL, 4.1mL)であった。

### 2. 触診法による腫瘍体積の比較結果

EL4/GaxおよびEL4細胞投与5日目から3日おきに測定を行い、腫瘍をノギスで長径、短径および奥行を計測し、その積を求めることで比較検討した。その結果、EL4細胞ではbLF投与群(12日目, 14日目: 183.8 $\pm$ 206.7mm<sup>3</sup>, 265.8 $\pm$ 327.5mm<sup>3</sup>)が対照群(12日目, 14日目: 193.0 $\pm$ 129.8mm<sup>3</sup>, 190.6 $\pm$ 140.6mm<sup>3</sup>)で有意な差は認められなかった(図2a)。それに対しEL4/Gax細胞では、細胞