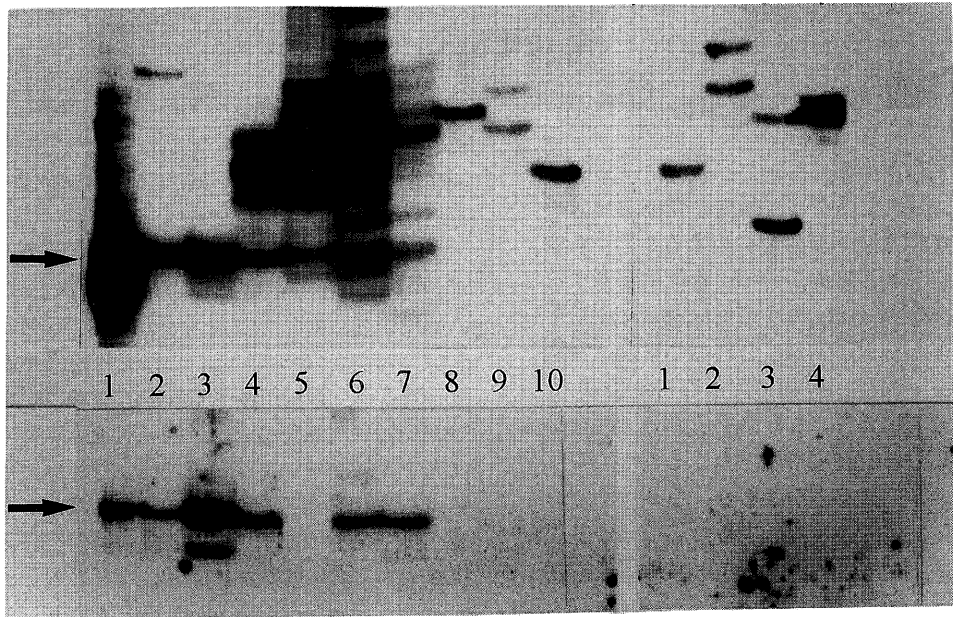


**A**

**B**



## 多発性硬化症の治療法の開発

錫村 明生<sup>1)</sup> 菊井 祥二 吉川 民香 田丸 司 中室 卓也

## 目的

我々は昨年度までの本会議において、フォスホジエステラーゼ阻害薬 (PDEI) がグリア細胞の腫瘍壊死因子 (TNF $\alpha$ ) や一酸化窒素 (NO) 産生を抑制すること、末梢血のヘルパー T 細胞を Th1 優位から Th2 優位に誘導することから、多発性硬化症 (MS) の有用な治療薬になりうる可能性を示してきた<sup>1-4)</sup>。実際にこれらの薬剤は実験的アレルギー性脳炎を抑制し、MS における Pilot Study でも再発率を半減させている<sup>5)</sup>。この治療法の有効性を確立するには Controlled Study が必須であり、そのためにはいくつかの問題をクリアする必要がある、今回は問題点とそれに対する対応策について報告する。また、PDEI 療法に限らず、抗 TNF 療法には限界があり、TNF 以外のエフェクターの存在が示唆されていた。最近、炎症に際し、マクロファージが産生する high morbidity group-1 (HMG-1) protein が TNF などのサイトカインに遅れて産生され late phase mediator として細胞傷害性に働くことが示されている<sup>6)</sup>。今回、ミクログリアの HMG-1 産生とその調節機構も検討した。

## 方法

1) PDEI と別機序で cAMP を上昇させる Adenylate Cyclase (AC) 賦活薬により、3 種類の PDEI を減らし得るかを検討した。AC 賦活薬として Forskolin の合成水溶性誘導体である Colforsin (Adehl) を使い、1-100 $\mu$ M で LPS 刺激ミクログリアに添加し、その TNF、NO 産生抑制効果を検討した。

また従来同様、他の PDEI との相乗効果についても検討した。2) 医師主体の臨床研究では薬事法上、メーカーからの Placebo の提供が受けられないが、これをクリアする法的根拠を探った。3) 分離培養ミクログリアの HMG-1 産生を検索し、この産生を抑制するサイトカイン、薬剤を HMG-1 mRNA 表現量を指標にして検討した。

## 結果

Colforsin は他の PDEI と同様に高濃度 (100 $\mu$ M) ではミクログリアの NO 産生を優位に抑制したが、1、10 $\mu$ M では効果がみられなかった。他の PDEI との協調作用においても、1、10 $\mu$ M で十分な NO 産生抑制を得るためには Colforsin の他に PDEI を 2 剤必要とした (図 1、2)。

ミクログリアは LPS 刺激、IL-2 刺激で時間、容量依存性

に HMG-1 mRNA の発現増強がみられ、LPS による HMG-1 mRNA の増加は IL-13 や PDEI (ibudilast ; ケタス) で容量依存性に抑制された (図 3)。

薬事法上、他の医薬品に似せて作られた医薬品 (プラセボ) の販売、授与は禁止されており (第 55 条)、事実上医師の臨床研究に対して製薬メーカーがプラセボを提供することは不可能となっている。これを可能にする対応策としては 1) 製薬メーカーが厚生省管理指導課にプラセボ提供の申請を出し許可を得る方法、2) 研究者、研究班がメーカーと共同でオーファンドラッグ開発として厚生省研究振興課に申請し認可をえる方法、3) プラセボのカプセルのみの提供をうけて自前で充填し、各施設の倫理委員会の承認のもとに治験を行う (医療法上可能)、などの限られた方法しかないことが明らかになった。しかしながら、こうして作成したプラセボを他施設へ渡すことは、薬事法 55 条に抵触し 3 年以下の懲役または 200 万円以下の罰金に処せられる可能性がある。

## 考察

PDEI の 3 種混合療法は我々の Pilot Study の結果から MS の再発率を低下させることが期待されるが、この治療法が受け入れられるためには Controlled Study が必須であり、これを容易にするために 3 剤を 2 剤または 1 剤に減らすことが重要である。今回 PDEI の効果を高め、単剤か多くても 2 剤で TNF、NO の産生を抑制する方法を検索するために、cAMP 合成酵素の adenylate cyclase (AC) を活性化することにより PDEI の効果を高める方法を検討し、AC が PDEI と協調性に働きその活性を高めることを見出した。しかしながら、AC と PDEI 2 剤のみで十分に TNF $\alpha$  や NO を抑制するためには通常の使用量の 100 倍近い量を必要とした。したがって、AC は PDEI 療法の組み合わせの中のひとつの候補薬剤になる事が明らかになったが、これを加えることによってもやはり 3 剤が必要であり、Controlled Study を容易にする結果にはならなかった。

また、敗血症性ショックや炎症局所において TNF より later phase で働く障害因子である HMG-1 が産生されることが明らかになっている<sup>6)</sup>。HMG-1 の産生細胞、産生の調節機序については不明であるが、今回ミクログリアが LPS や IL-2 刺激で HMG-1 を産生することを明らかにした。今後蛋白レベルの検討も含め、神経系での病態における HMG-1 の機能を検討する必要性があると考えられた。

Placebo の使用を可能とする方法についてはいくつかの法

<sup>1)</sup> 奈良県立医科大学 神経内科

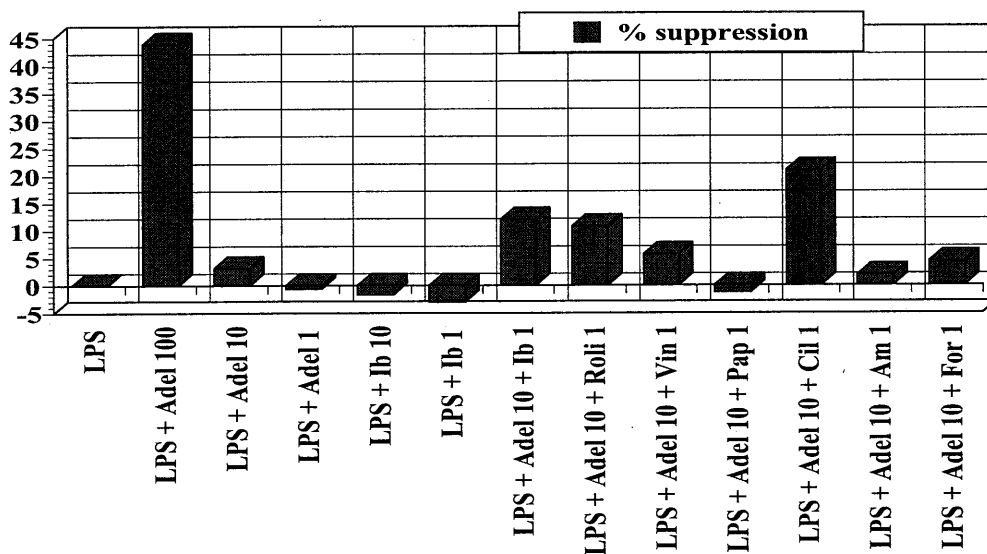


図1. ACとPDEIによるミクログリアのNO産生抑制

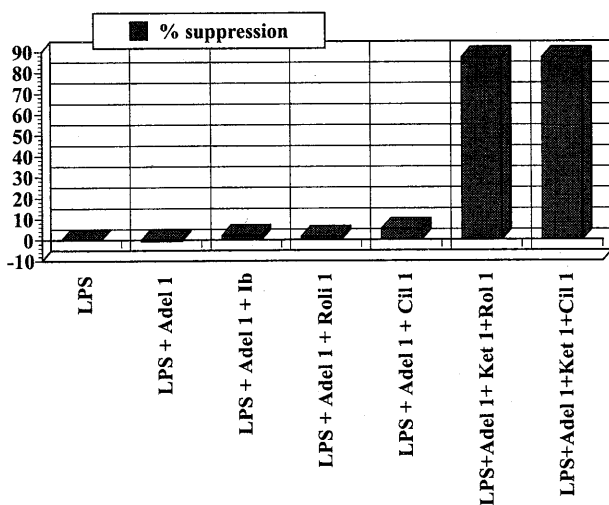


図2. ACとPDEIによるミクログリアのNO産生抑制

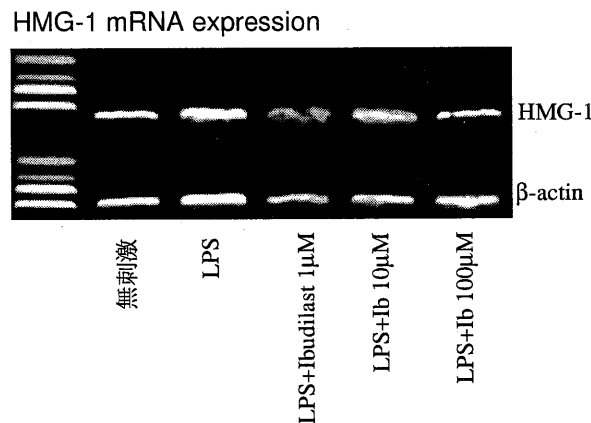


図3. ミクログリアのHMG-1産生とPDEI (ibudilast) による抑制

的根拠に基づき、その方法を模索中であり、今後引き続き検討する予定である。一研究者として Controlled Study を行う上での種々の申請をしても許可される可能性は少なく、研究班全体で取り組むことが必須であると考えられた。

#### 文 献

- 1) Suzumura, A., Sawada, M., Makino, M. and Takayanagi, T. Propentofylline inhibits production of TNF $\alpha$  and infection of LP-BM5 murine leukemia virus in glial cells. *J. Neurovirol.*, 4 : 553-559, 1998.
- 2) Suzumura, A., Ito, A., Yoshikawa, M and Sawada, M. Ibudilast Suppresses TNF $\alpha$  Production by Glial Cells Functioning

Mainly as Type III Phosphodiesterase Inhibitor in the CNS. *Brain Res.* 837 : 203-212, 1999.3) Yoshikawa, M., Suzumura, A., Tamaru, T., Takayanagi, T. and Sawada, M. Effects of phosphodiesterase inhibitors on microglia. *Multiple Sclerosis*, 5 : 126-133, 1999.

- 4) Suzumura, A. and Sawada, M. Effects of vesnarinone on activation of murine microglia. *Life Science* 64 : 1197-1203, 1999.
- 5) Suzumura, A., Nakamuro, T., Tamaru, T. and Takayanagi, T. Drop in relapse rate of multiple sclerosis patients using combination therapy of three different phosphodiesterase inhibitors. *Multiple Sclerosis*, in press.
- 6) Wang, H., Bloom, O., Zhang, M., et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 285 : 248-251, 1999.

2. 3. 4.

# ヒトIgMによる多発性硬化症の治療：Theilerウイルス実験モデル における検討

祖父江 元 朝倉 邦彦 河合 邦幸 犬飼 晃  
Moses Rodriguez \* Srinivas E. Kaveri \*\*

## 目的

我々はTheilerウイルスを用いた多発性硬化症(MS)実験モデルにおいて単一の免疫グロブリン、即ちモノクローナル抗体によるMSの治療の可能性について研究を行ってきた。その結果髄鞘再生を促進する2つのモノクローナル抗体を作製し、また既存のモノクローナル抗体の中に髄鞘再生を促進するものを見出し本学会議において報告してきた<sup>1) 2)</sup>。これらの抗体の特徴を調べた結果、いずれもオリゴデンドロサイト特異的な抗原と反応し、自然自己抗体の範疇に属する抗体であることが明かとなった<sup>1) 2) 3)</sup>。また、複数のオリゴデンドロサイトを認識する自然自己抗体を同時に投与すると髄鞘再生が相乗的に促進する<sup>4)</sup>ことから、自然自己抗体を用いたMS治療の可能性が示唆された。自然自己抗体は通常IgM分画に存在するため、今回健常人の血清プールよりIgMのみを精製し、Theilerウイルスを用いたMS実験モデルにおいて髄鞘再生促進能があるかどうかを検討した。

## 対象および方法

赤十字から得た2500人以上の健常成人血清プールより、ヒトIgMを精製した。ヒトIgGとして市販のガンマグロブリン製剤を用いた。また、高IgM血症をきたすWaldenström macroglobulinemia患者2名の血清よりそれぞれIgMを精製して、対照IgMとして用いた。脳内にTheilerウイルスを播種したSJL/Jマウス(感染後5~6ヶ月)に精製したそれぞれの抗体1mgを腹腔内に1回投与した。さらに、対照としてリン酸緩衝液(PBS)を投与した。投与より5週後に、灌流固定し全脊髄を摘出した。脊髄連続横断切片を作製し、脊髄白質内の脱髄病変およびオリゴデンドロサイトによる髄鞘再生を定量的に解析した。またこれらの抗体がTheilerウイルスの殻蛋白と反応するかどうかを、ウエスタン・ブロットとELISAにより検討した。これらの抗体の抗原特異性を調べるために、各種蛋白自己抗原およびハプテンとの反応性をELISAに

より検討した。さらに、これらの抗体がオリゴデンドロサイトを含む中枢神経系の細胞と反応するかどうかを、培養オリゴデンドロサイトおよび小脳培養切片を用いた免疫染色により検討した。

## 結果

### (1) 抗体投与による髄鞘再生(表1)

いずれの治療群においても、脊髄内の脱髄病変の程度に差はなかった。ヒトIgM投与群では、脱髄病変の約30%に髄鞘再生がみられ、ヒトIgGを含む他のいずれの群に比べても有意な髄鞘再生の増加を認めた( $p < 0.01 \sim 0.05$ )。ヒトIgG投与群では、脱髄病変の約17%に髄鞘再生を認めたが、Waldenström macroglobulinemia患者血清より抽出した対照IgM投与群およびPBS投与群に比べて有意差は認めなかった。対照IgM投与群はPBS投与群と比較して髄鞘再生の増加はみられなかった。

### (2) ウエスタン・ブロット, ELISA

調べたいずれの抗体もウエスタン・ブロットおよびELISAにおいて、Theilerウイルス由来のどの殻蛋白とも反応せず、ウイルス中和作用も認めなかったことから、Theilerウイルスの複製に影響を及ぼさないと考えられた。蛋白自己抗原やハプテンを用いたELISAでは、ヒトIgMは多数の抗原と弱い反応性を示した。ヒトIgGは多数の蛋白自己抗原やハプテンと強い反応性を示した。対照IgM抗体は調べた抗原とはまったく反応しなかった。

### (3) 免疫染色

ラット培養オリゴデンドロサイトを用いた免疫染色ではヒトIgMは分化したオリゴデンドロサイト表面を染色したが、他の抗体はいずれも細胞表面は染色しなかった。培養小脳切片ではヒトIgMはとくに白質を染色し、対照IgMのうちの1つが主に白質を染色した。ヒトIgGと他の対照IgMは小脳切片とほとんど反応しなかった。

## 考察

健常成人血清プールより分離したヒトIgMは、我々がすでに報告したマウスIgMモノクローナル抗体と同じくTheilerウイルスを用いたMS実験モデルにおいて髄鞘再生を促進した。自然自己抗体はそのほとんどがIgM分画に

名古屋大学医学部神経内科

\*メイヨークリニック神経内科

\*\*INSERM

表1 ヒトIgMによる中枢神経系髄鞘再生

Treatment	No. of mice	Area of white matter (mm <sup>2</sup> )	Area of demyelinated lesion (mm <sup>2</sup> )	Area of CNS-type remyelination (mm <sup>2</sup> )	Area of CNS-type remyelination/area of lesions (%)
Pooled IgM	10	9.16 ± 0.62	0.85 ± 0.15	0.24 ± 0.04	29.6 ± 4.7
Pooled IgG	8	8.66 ± 0.63	0.97 ± 0.10	0.17 ± 0.04	17.1 ± 3.2*
Control IgM #1	5	9.74 ± 0.62	0.72 ± 0.08	0.07 ± 0.02	9.7 ± 1.6**
Control IgM #2	4	9.72 ± 1.99	0.69 ± 0.11	0.04 ± 0.01	7.0 ± 3.3**
PBS	6	7.39 ± 0.60	0.82 ± 0.19	0.06 ± 0.01	7.4 ± 4.0**

Irrelevant IgM controls were obtained from two patients with Waldenström macroglobulinemia. Values represent the mean ± SEM. Statistics by one-way ANOVA of the percent area of CNS-type remyelination/area of lesions in mice treated with pooled human IgM compared to mice treated with pooled human IgG or isotype controls or PBS revealed \* $p < 0.05$  or \*\* $p < 0.01$ .

存在することがわかっているが、我々が精製したヒトIgM抗体は、ELISAにおいて多くの自己抗原に対し低親和性を示し、自然自己抗体を多数含んでいるものと考えられた。また培養オリゴデンドロサイト、培養小脳切片と反応し、中枢神経系自己抗原に反応する自然自己抗体は髄鞘再生を促進するという仮説を支持するものと考えられた。市販のガンマグロブリン製剤では対照群に比して有意な髄鞘再生が認められなかったことから、ヒトIgM抗体はガンマグロブリン製剤よりもMSの治療において有用である可能性が示唆された<sup>9)</sup>。

#### まとめ

(1) 健常成人血清プールより精製したヒトIgM抗体は、自然自己抗体を多数含み、Theilerウイルスを用いたマウス脱髄モデルにおいて、髄鞘再生を促進した。

(2) このヒトIgM抗体は、市販のガンマグロブリン製剤と比較して有意な髄鞘再生促進作用を示した。現在ガンマグロブリン製剤によるMSの治療が試みられているが、今後健常成人血清プールより精製したIgMによるMS治療の可能性が示唆された。

#### 文献

1) Miller D.J. et al. Monoclonal antibodies promote central nervous system repair in animal model of multiple sclerosis. *J Neurosci* 14:6230-6238, 1994.

2) Asakura K. et al. Targeting of IgM antibodies to oligodendrocytes promotes central nervous system

remyelination. *J Neurosci* 18:7700-7708, 1998.

3) Asakura K. et al: Oligodendrocyte-reactive monoclonal antibodies, O1, O4, and HNK-1 are encoded by germline immunoglobulin genes. *Mol Brain Res* 154: 2460-2469, 1995

4) 朝倉邦彦他. 自然自己抗体による相乗的髄鞘再生. *神経免疫学* 7:223-226, 1999.

5) Asakura, K. et al. Human IgM from healthy donors enhanced central nervous system remyelination in a murine virus model of multiple sclerosis: A potential novel treatment for multiple sclerosis. (submitted)

## 抗 IL-12 抗体は再発寛解型実験的自己免疫性脳脊髄炎を抑制する

市川元基<sup>1)</sup>, 高 昌星<sup>2)</sup>, 井上 敦<sup>2)</sup>, 露崎 淳<sup>2)</sup>, 八木田秀雄<sup>3)</sup>

## 目的

Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) peptide 35-55 を NOD マウスに感作することにより慢性再発寛解型の実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)を誘導できる<sup>1)</sup>. この脳脊髄炎はその神経症状の発症パターンと病理所見が多発性硬化症に似ていることからヒトの炎症性脱髄疾患の動物実験モデルと考えられている<sup>2)</sup>. IL-12 は抗原に反応した抗原提示細胞やマクロファージ系の産生するサイトカインで, IFN- $\gamma$  などのサイトカイン産生の誘導, 細胞障害性の増強, 活性化 T 細胞や NK 細胞の増殖刺激, 未分化な Th0 細胞から Th1 細胞への分化誘導など多彩な作用をもつ<sup>3)</sup>. 自己免疫性脳脊髄炎の発症には一般に Th1 型サイトカインが重要であると考えられており, われわれは抗 IL-12 抗体の投与により慢性再発寛解型 EAE の発症と症状の重症化を抑制できるかどうかについて検討した.

## 方法

- 1) NOD マウスを MOG35-55 (100  $\mu$ g/mouse) と complete Freund's adjuvant で免疫し, 慢性再発寛解型 EAE を誘導した.
- 2) モノクローナル抗 IL-12 抗体は MOG35-55 感作後 day 0, 7, 10 に 0.5 mg 腹腔内投与した.
- 3) 感作後 2 週間毎に血清を採取し, MOG35-55 に対する抗体価を ELISA 法で検討した.

- 4) 感作後 2 週間目に脾細胞を採取し, MOG35-55 に対するリンパ球増殖反応および ELISPOT 法によるサイトカイン (INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10) 産生能を測定した.

## 結果

- 1) 臨床症状: control 抗体投与群では 13 匹中 12 匹で EAE を発症し, そのうち 4 匹は慢性再発寛解型を呈した. 抗 IL-12 抗体投与群では 13 匹中 3 匹しか EAE の発症はみられず, 全例軽症であった. 抗 IL-12 抗体投与群は control 抗体投与群に対し day 65-78 および day 106-153 で有意に症状の重症度の差がみられた (図 1).
- 2) 抗 MOG35-55 抗体価については IgG および IgG1 抗体価が抗 IL-12 抗体投与群で有意に高かった.
- 3) MOG35-55 に対するリンパ球増殖反応は抗 IL-12 抗体投与により有意に抑制された.
- 4) 脾細胞のサイトカイン産生能は TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10 については抗 IL-12 抗体投与群と control 抗体投与群との間に差はみられなかったが, INF- $\gamma$  産生能は抗 IL-12 抗体投与により有意に抑制された.

## 考察

抗 IL-12 抗体投与により, MOG35-55 により誘導された慢性再発寛解型 EAE の症状は有意に抑制された. 抗 IL-12 抗体はマウスの生体内で MOG 蛋白 35-55 反応性 T 細胞の誘導や INF- $\gamma$  などの Th1 サイトカイン産生に抑制的に働き, EAE の症状を改善させた可能性が考えられる. IL-12 は液性免疫にも関わっており, IgG1 抗体の産生に抑制的に働くことが知られている<sup>4)</sup>. 実際, 抗 MOG35-55IgG および IgG1 抗体価は抗 IL-12 抗体投与

<sup>1)</sup> 信州大学医学部小児科

<sup>2)</sup> 信州大学医学部第三内科

<sup>3)</sup> 順天堂大学医学部免疫

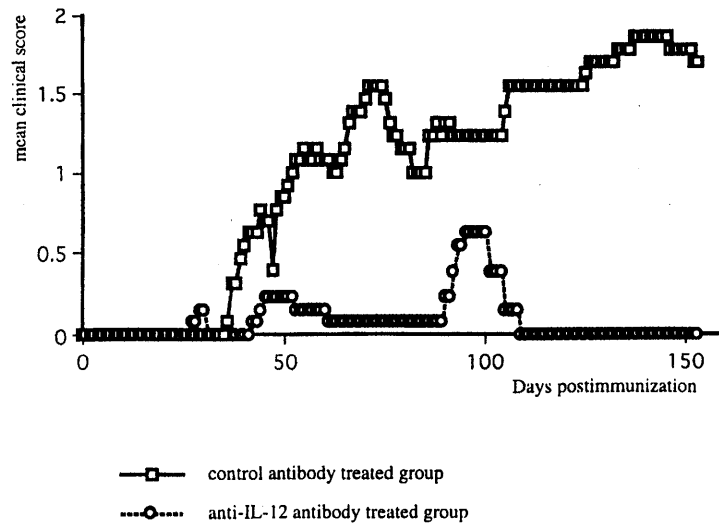


図 1. Effects of anti-IL-12 mAb treatment on clinical severity of mice immunized with MOG<sub>35-55</sub>. NOD/Shi mice received 100 μg of MOG<sub>35-55</sub> on day 0 and 300 ng of pertussis toxin on days 0 and 2. Control and anti-IL-12 mAb treatment mice were injected with 0.5 mg of control and anti-IL-12 mAb on day 0, 7 and 10, respectively. Mice were monitored daily and disease severity is documented as mean clinical score in each experimental group. *n* = 13, control mAb treatment group; *n* = 13, anti-IL-12 mAb treatment group.

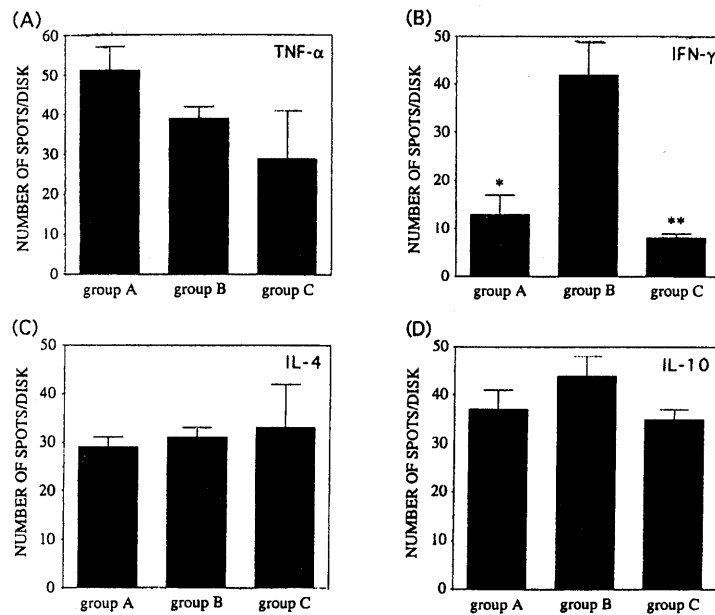


図 2. ELISPOT assay for cytokine production of spleen cells from MOG<sub>35-55</sub> immunized NOD mice with anti-IL-12 mAb treatment (group A), control mAb treatment (group B), and NOD mice injected with CFA only (group C). The number of IFN-γ producing spleen cells was significantly increased in mice of the control mAb-treated group compared with those of the anti-IL-12 mAb-treated group (\**p* < 0.05) and those of group C (\*\**p* < 0.01). In contrast, the numbers of TNF-α, IL-4 and IL-10 producing spleen cells did not differ between anti-IL-12 and control mAb-treated groups.

により control 抗体投与群に比して高かったが、症状の重症化には関係しなかった。

以上のことから MOG35-55 により誘導された慢性再

発寛解型 EAE の発症と重症化には内因性の IL-12 が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。



## 文献

- 1) Ichikawa M. et al. IgG subclass switching is associated with the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis induced with myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide in NOD mice. *Cell. Immunol.* 191:97-104, 1999.
- 2) Bernard C.C.A. et al. Myelin oligodendrocyte glycoprotein : a novel candidate autoantigen in multiple sclerosis. *J. Mol. Med.* 75:77-88, 1997.
- 3) Trinchieri G. Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type-1 and cytotoxic lymphocytes. *Blood* 84:4008-4027, 1994.
- 4) Metzger D.W. et al. Enhancement of humoral immunity by interleukin-12. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 795:100-115, 1996.

# CpG 含有 DNA の免疫活性化作用と受身 EAE に対する影響の検討

Gyorgy Fazekas、田平 武

## 目 的

多発性硬化症は中枢神経系の脱髄疾患であり、ミエリン抗原に対する自己免疫機序が考えられている。その発症は遺伝因子の関与と環境因子の関与が指摘されており、環境因子としてはウイルス等の感染が重要視されている。感染因子によって自己免疫が生じる機序としてウイルスと自己抗原の分子相同性が上げられているが、また、感染因子に含まれる DNA の免疫賦活作用の重要性も指摘されている。実際 Freund 完全アジュバンド (CFA) は結核死菌を含み、結核死菌に含まれるペプチドや DNA によるリンパ球の活性化が EAE の誘導を増強していると考えられる。しかし、DNA による免疫賦活作用の詳細はまだよく分かっていない。本研究はシトシン (C)、グアニン (G) モチーフをもつ合成オリゴヌクレオチド CpG-ODN の免疫系に与える影響について検討することを目的とする。

## 方 法

Cp 配列をもつ個の塩基からなるオリゴヌクレオチドを合成した (CpG: GCATGACGTTGAGCT)。CpG 配列の C がメチル化された同じ塩基配列のオリゴヌクレオチド (ZpG) をコントロールした。生後 8 週の SJL/J マウスを 100  $\mu$ g の PLP136-150 ペプチドと CFA で免疫し 10 日後にリンパ節細胞、脾細胞を分離、PLP136-150, CpG-ODN, ZpG-ODN で刺激、30~60 時間後の増殖反応をみた。また、刺激後 48 時間のリンパ球表面マーカー CD4, CD19, CD25, CD69, B7-1, B7-2 を FACS 解析した。また、サイトカイン IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10, IL-12 を ELISA で測定した。受身 EAE は PLP136-150, CpG-ODN,

又は ZpG-ODN で刺激した 72 時間後のリンパ節細胞  $5 \times 10^6$  を移入して誘導した。

## 結 果

PLP 感作リンパ節細胞、脾細胞を PLP ペプチド、CpG-ODN, ZpG-ODN で刺激した場合、CpG-ODN で刺激した場合に最も強い増殖反応が見られた。反応時間には違いがみられ、CpG-ODN 刺激の場合は 36 時間で最も高く、PLP の場合は 60 時間であった。リンパ球表面マーカーをしらべると、活性化の指標となるマーカーの増強がいずれも観察され、興味深いことに CpG-ODN で刺激すると B 細胞の CD25, CD69 が著しく増強され、B7-1, B7-2 の増強もみられた。サイトカインの産生パターンをしらべると、PLP 刺激の場合 IFN- $\gamma$  が上昇したのに対し、CpG-ODN の場合 IL-10 の上昇が観察された (図 1)。受身 EAE は PLP 刺激の場合のみ可能で、CpG, ZpG 刺激では誘導されなかった (図 2)。

## 考 察

昨年本研究では CpG-ODN を不完全 Freund アジュバンド (IFA) 及び PLP ペプチドとともに動物を感作すると激しい EAE がおこることを報告した<sup>1)</sup>。今回は受身移入 EAE に対する ODN の影響をしらべた。その結果、CpG-ODN は in vitro では EAE の誘導効果を抑えることが分かった。その理由をしらべたところ、CpG-ODN 刺激によって Th2 サイトカインである IL-10 が産生されること、B 細胞の活性化マーカーが upregulate されることが分かった。即ち、CpG-ODN は in vitro では B 細胞を刺激することにより Th2 サイトカインを産生し、EAE を抑制することが分かった。このことは新しい EAE の

調節系が存在することを意味している。微生物の DNA は CpG 配列を有し、一方で自己免疫を促進するが、一方では抑制系も存在することが明らかになった。これをうまく使い分けることにより新しい治療法が開発される可能性がある。これは MS などの自己免疫疾患や、遺伝子治療における免疫応答の抑制にも応用されると期待される。

## 文 献

- 1) Gyorgy Fazekas, 山村 隆、田平 武：CpG-ODA アジュバンドを利用した EAE の誘導。厚生省特定疾患免疫生神経疾患調査研究分科会 平成 10 年度研究報告書、p29-30、1999

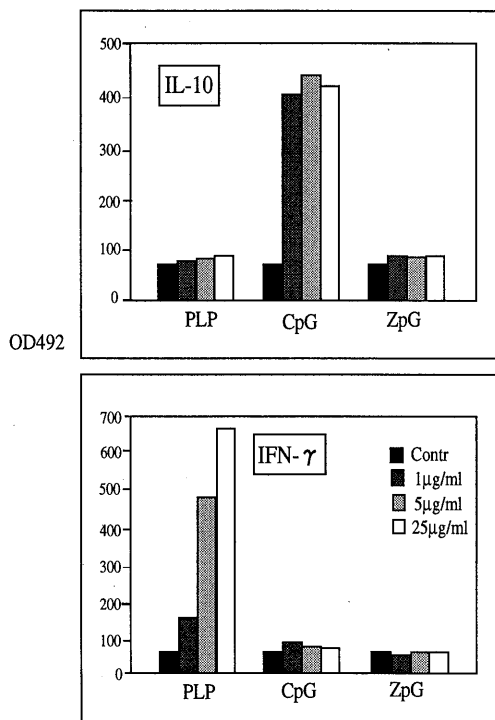


Fig.1. IL-10 and IFN- $\gamma$  production after in vitro PLP or ODN restimulation.

PLP136-150 で感作したリンパ節細胞を PLP で刺激すると IFN- $\gamma$  が強く産生されたが、CpG で刺激すると IL-10 が産生された。

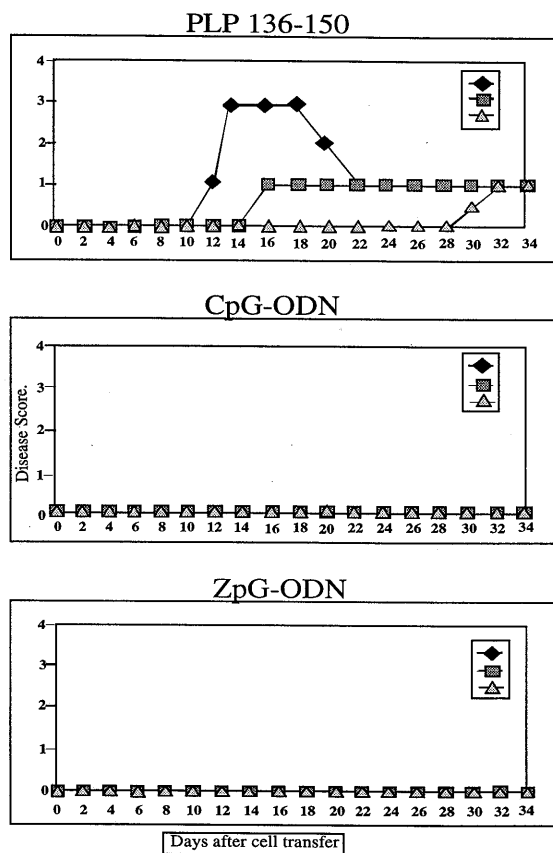


Fig.2. Passive EAE in SJL/J mice. PLP136-150 感作リンパ節細胞を PLP で刺激した場合 EAE が誘導されたが、CpG, ZpG では誘導されなかった。

1000

## β amyloid precursor protein の発現からみた HAM 脊髄神経軸索病変の検討

梅原藤雄<sup>1)</sup> 阿部真由美<sup>1)</sup> 出雲周二<sup>2)</sup> 納 光弘<sup>1)</sup>

## 目 的

HAM の主病変は脊髄、主に胸髄中下部にあり、組織の基本は慢性炎症性病変で、血管周囲から実質内に広がる単核球の浸潤があり、胸髄側索特に外側皮質脊髄路を中心に髄鞘と軸索の変性、脱落が見られる。HAM 患者に見られる痙性脊髄麻痺は、脊髄錐体路を主とする脊髄側索の神経線維障害に起因するものであるが、その機序については十分解明されていない。β-amyloid precursor protein (以下 APP する) は神経細胞体で作られ、前向きに fast axonal transport により、神経終末へ輸送される。通常のパラフィン切片においては、正常の神経軸索内を走行する APP は検出されないが、軸索流障害がある場合はその近位部の軸索内に APP が蓄積するため、免疫組織学的に異常軸索のみを認識することが出来る。これにより、従来認識出来なかった可逆性の機能的障害を含めた初期の軸索病変を検出することが可能になっている。今回 我々は、β APP に対する免疫組織化学法を用いて HAM 脊髄病変を検討した。

## 対 象

9 例の HAM 剖検脊髄のパラフィン包埋標本を用いて、通常の方法で抗 APP モノクローナル抗体による免疫組織化学染色を行ない、さらに髄鞘染色を加えた。また、一部は、活性化マクロファージ・ミクログリアを認識する抗 MRP8 抗体、活性化 T 細胞、マクロファージを認識する抗 CD45RO 抗体 (UCHL1) との二重染色を行なった。対照として、他の神経疾患 (筋萎縮性側索硬化症 4 例、POEMS 症候群 1 例)、非神経疾患 3 例の剖検脊髄のパラフィン包埋標本を用い、比較検討した。

## 結 果

結果は表 1 に示す。HAM 脊髄では、APP 陽性線維はクラスターをなし、それらは活動性炎症部位に高頻度に見られた。一部は炎症細胞浸潤の近傍に存在し、特に活性化マクロファージ・ミクログリアと関連していた。クラスターは通常の髄鞘染色では異常を認めない前索、

後索にも存在した。神経線維が高度に脱落した側索の内部に残存する神経線維にも APP の発現した線維が散在性にみられ、これらは髄鞘を有していた。これらの所見は、脊髄の神経線維の障害が軸索障害主体であることを示唆している。下部胸髄レベルを中心に脊髄神経根 (全根、後根) の軸索に APP の発現がみられ、神経根の軸索障害が確認された。長期経過例では、クラスター - の数は少ないが、一部の症例では側索、前索に存在した。これらは、必ずしも炎症細胞浸潤を伴ってはいなかった。一方、対照として用いた ALS 脊髄では、罹病期間 2 - 15 年のいずれの例においても、脊髄特に側索に APP 陽性線維は認めなかった。正常脊髄では、APP の発現は前角細胞に限られていた。

## 考 察

HAM では 9 例中 7 例で脊髄特に胸髄を中心に APP 陽性線維がみられ、これらは炎症所見の強い例ほどその程度は高度であった。HAM の神経線維障害の分布は血管と密接に関連しており、浸潤 T 細胞及び活性化マクロファージから産生されるサイトカイン、あるいは血液脳関門を介して浸透した可溶性神経傷害物質により神経軸索病変が生じる可能性が示唆された。特に、10 年近い長期経過例においても、APP 陽性線維の出現の程度は軽減するものの、一部に陽性線維がみられており、長期例においても比較的初期の軸索病変が存在していることを示唆していた。また胸髄下部から腰髄レベルでは、脊髄神経前根、後根に APP 陽性線維を認めた。これらはほぼ正常の髄鞘を有しており、一次性的軸索障害を示唆していた。HAM 患者では傍脊椎筋には中部胸髄レベルから腰髄レベルを中心として fibrillation potential が見られることから、二次運動神経軸索病変の存在が指摘されていたが、従来これに対応する病理所見は確認されておらず、今回脊髄神経根病変を初めて確認出来た。対照として用いた ALS 脊髄では APP 陽性軸索は認めなかった。この結果は ALS では主に slow axonal transport の障害が主体であるとする最近の報告に一致しており、HAM と ALS では脊髄側索運動神経線維障害の機序が基本的に異なっていることを示唆している。昨年、我々は HAM では血中、髄液中及び脊髄炎症部位において、matrix

<sup>1)</sup> 鹿児島大学医学部第三内科<sup>2)</sup> 鹿児島大学医学部難治性ウイルス疾患研究センター

metalloproteinase 2, 9 の発現が亢進していることを報告し、これらの分子が血液脳関門の破綻に関与している可能性を指摘したが、HAM の神経線維障害に血液脳関門の障害が関与していることが示唆された。HAM の治療という観点から考えると、神経軸索内の APP の発現は、軸索流障害という機能的、可逆的障害を含んでおり、いかにしてこれを不可逆的変化に移行させない様にするかが運動障害の改善には重要である。HAM 脊髄における fast axonal transport の障害は、HAM の神経障害の機序を考える上で極めて重要な現象である。

## 文 献

1. Umehara F, et al. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in HTLV-I-associated myelopathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998;57:839-849
2. Abe M, Umehara F, Kubota R, et al. Activation of macrophages/microglia with the calcium-binding proteins MRP14 and MRP8 is related to the lesional activities in the spinal cord of HTLV-I associated myelopathy. *J Neurol* 1999, 246: 358-64.

図1. Clinical and pathological data

case No. Age/Sex	Duration of illness	Diagnosis	Cause of death	CNS neuropathology		
				Inf	Myelin loss	β APP #
1. 77/M	2.5 yr	HAM/TSP	embolism of femoral A	+++	++	+++
2. 71/F	4.5 yr	HAM/TSP	pneumonia	++	+++	-~++(pons)
3. 52/F	8 yr	HAM/TSP	pontine hemorrhage	+	+++*	-
4. 68/F	9 yr	HAM/TSP	cholecystitis	±	+++	+
5. 73/M	10 yr	HAM/TSP	hepatic failure	±	+	++
6. 59/M	9 yr	HAM/TSP	sepsis	-	+++	+
7. 74/F	14 yr	HAM/TSP	pneumonia	++	++	+
8. 75/F	14 yr	HAM/TSP	pancreas carcinoma	±	+++	+
9. 47/F	20 yr	HAM/TSP	ATL	-	+++	-
<u>Other neurological disorders</u>						
11. 67/F	2y	ALS	ALS	-	++	-
12. 66/M	5y	ALS	ALS	-	++	-
13. 53/M	11y	ALS	ALS	-	++	-
14. 56/M	15y	ALS	ALS	-	++	-
15. 74/M	1y	POEMS	respiratory failure	-	++	+
<u>Non-neurological disorders</u>						
16. 66/F	6m	ATL	ATL	-	-	-
17. 65/M	4m	ATL	ATL	-	-	-
18. 67/F	2y	pneumonia	pneumonia	-	-	-

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

## HAM 患者末梢血単核球の接着・浸潤に関する分子病理学的検討

出雲 周二<sup>1</sup> 松岡 英二<sup>1</sup> 宇宿 功市郎<sup>2</sup> 伊佐敷 靖<sup>1</sup>  
竹之内 徳博<sup>1,3</sup> 納 光弘<sup>3</sup>

## 目的

HTLV-I 感染細胞の脊髄血管内皮細胞への接着、血管外への遊走・浸潤は HAM 脊髄病変の形成において重要な初期過程であると考えられるが、これまで十分な検討はなされていない。我々は昨年度の本研究班において、リンパ球浸潤に関与する接着分子である CD44 の v6 variant (CD44v6v) の特徴について報告したり。今回は HTLV-I 感染細胞の脊髄血管内皮細胞への接着、浸潤に関与する分子として、VLA-4 及び Rho family 蛋白質に着目し、これらの分子の末梢血単核球(PBMC)での発現について分子病理学的検討を行った。

## 対象・方法

HAM 患者 10 名、HTLV-I キャリア 10 名の PBMC から RNA を抽出し cDNA を作成した。この cDNA を用い、VLA-4 を特徴付ける  $\alpha$  鎖である Integrin  $\alpha 4$  に特異的な primer を用い RT-PCR を行い、その発現量について検討した。また、HAM 患者 4 名、キャリア 2 名の PBMC から抽出した蛋白質を用いて Western blot を行い、タンパク質レベルでの発現パターンについて検討した。

HAM 患者 PBMC において有意に発現量の増加している Rho family 蛋白質を同定するため、Rho family 蛋白質に共通の蛋白配列を元に作製した degenerate primer、degenerate probe を用いて、HAM 2 名、キャリア 2 名の PBMC より抽出した RNA の RT-PCR-Differential hybridization (図 1) を行った。Differential hybridization において HAM とキャリアの間で差の見られた band について遺伝子解析を行い、それを元に新たに primer を作製し、HAM 10 名、HTLV-I キャリア 10 名の PBMC の RNA を用いて RT-PCR を行い、発現量について検討した。また、HAM 患者 PBMC を用い、

同定した Rho family 蛋白質に対する抗体で免疫染色を行った後、抗 CD4 抗体及び抗 CD8 抗体で二重染色を行い、Rho family 蛋白質を発現している細胞の種類について検討した。

## 結果

Integrin  $\alpha 4$  の RT-PCR では、HAM では全例 (10 例) に明瞭な band を認めたが、Carrier では band 濃度が低いものがみられ、2 例では Integrin  $\alpha 4$  の発現が見られなかった。Western blot による検討では、HAM 患者 4 例中 4 例で Integrin  $\alpha 4$  鎖の 150kDa 分子が消失し、80kDa と 70kDa のバンドのみが認められた (図 2)。一方、Carrier 2 例では 80kDa と 70kDa のバンドに加え、150kDa のバンドも明瞭に認められた (図 2)。

Rho family 蛋白質の Differential hybridization において HAM と Carrier の間で発現に差の見られた band を解析したところ、Rho family 蛋白質の Rac2 であることが判明した。Rac2 の RT-PCR では HAM では 10 例中 8 例に明瞭な band を認めたが、Carrier では 10 例中 2 例でわずかに発現が見られたのみであった。PBMC の二重染色では Rac2 の発現は主に CD4 陽性細胞に見られ、特に胞体の変形を伴うものに強く発現していた。

(図 3)

## 考察

Integrin  $\alpha 4$  鎖は VLA-4 を特徴付ける分子であり、150kDa の分子として mRNA から翻訳され、IL-2 で長時間刺激した T 細胞では翻訳後修飾により 80kDa と 70kDa の fragment に cleavage (切断) される事が知られている<sup>2)</sup>。今回、HAM と Carrier の間で Integrin  $\alpha 4$  鎖の RT-PCR ではメッセンジャーレベルでの発現に有意な差は見られなかったが、Western blot で泳動パターンに差が見られ、HAM では 150kDa 分子の cleavage が亢進している事が示唆された。この cleavage に関しての病的意義はいまだ明らかにされていないが、Takeuchi らは vasculitis を伴う SLE 患者の PBMC で

1. 鹿児島大学医学部難治ウイルス研究 分子病理・遺伝子疫学
2. 鹿児島大学医学部 医療情報管理学
3. 鹿児島大学医学部 第三内科

Integrin  $\alpha 4$  鎖の cleavage の亢進が見られることを報告している<sup>3)</sup>。我々は Integrin  $\alpha 4$  の主要な ligand である VCAM-1 の splicing pattern が脊髄の側索と他の部分で異なるという知見も得ており、cleavage された Integrin  $\alpha 4$  と VCAM-1 splicing variant との相互作用が HTLV-I 感染細胞と脊髄血管内皮細胞の特異的な接着に関与している可能性が示唆された。

Rho family 蛋白質である Rac2 は低分子量 GTP 結合蛋白質の一種であり、Integrin family からのシグナル伝達に関与している蛋白質である。Integrin family からのシグナルは Rac2 を介して伝達され、細胞骨格変化、細胞形態変化、細胞浸潤を誘導することが知られている。Reibel らは活性化 T 細胞で Rac2 の発現が亢進することを報告している<sup>4)</sup>。今回の検討において、HAM 患者 PBMC で RT-PCR では Rac2 の発現の亢進が見られ、免疫染色では胞体の変形を伴う CD4 陽性細胞に Rac2 が強く発現していたことから、HAM 患者では CD4 陽性細胞の変形、浸潤能が亢進していることが示唆された。また、Integrin  $\alpha 4$  に関する検討から Rac2 の発現の亢進には Integrin  $\alpha 4$  鎖の cleavage によるシグナルの変化が関与している可能性も示唆された。

HAM 患者の PBMC で Integrin  $\alpha 4$  及び Rac2 に変化が見られたことは、HAM 発症の初期過程における HTLV-I 感染 CD4 細胞の脊髄血管内皮への接着、脊髄内への浸潤にこれらの分子の変化が関与している可能性があると考えられる。今回の検討からは HTLV-I 感染と Integrin  $\alpha 4$  の cleavage 及び Rac2 発現の亢進についての直接的な関連について明らかにすることはできなかったが、今後、In vitro での感染実験、PCR in situ hybridization 等により検討する必要があると考えられる。また、HAM 脊髄病変形成における VLA-4 及び Rac2 の関与についても、組織学的検討が必要であると考えられる。

### 結論

HAM 患者 PBMC では Integrin  $\alpha 4$  鎖の cleavage 及び Rac2 の発現が亢進している。

### 文献

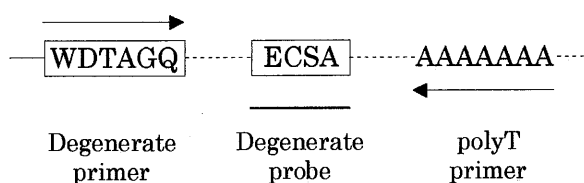
- 1) Matsuoka E et al. CD44 splice variant involvement in the chronic inflammatory disease of the spinal cord: HAM/TSP. *J. Neuroimmunol.* 1999; 102(1): 1-7
- 2) Teixeira J. et al. Functional and structural analysis of VLA-4 integrin alpha 4 subunit cleavage. *J. Biol. Chem.* 1992; 267(3): 1786-1791.

Chem. 1992; 267(3): 1786-1791.

3) Takeuchi T. et al. Upregulated Expression and Function of Integrin Adhesive Receptors in Systemic Lupus Erythematosus Patients with Vasculitis. *J. Clin. Invest.* 1993; 92: 3008-3016.

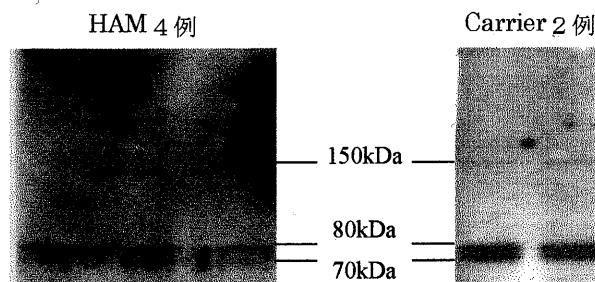
4) Reibel L. et al. A hemopoietic specific gene encoding a small GTP binding protein is overexpressed during T cell activation. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 1991; 175(2): 451-458.

図 1. Differential hybridization の概要



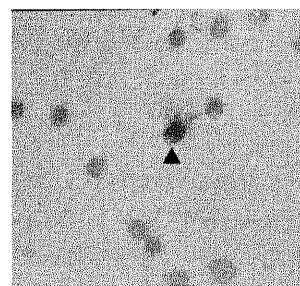
Degenerate primer と polyT primer を用いた RT-PCR を行った後、Degenerate probe で hybridization を行った。

図 2. Western blot of Integrin  $\alpha 4$



Carrier では 150kDa のバンドが明らかに認められるが、HAM では cleavage の亢進によりほとんど消失している。

図 3. PBMC の免疫染色



Rac2 は主に CD4 陽性細胞で胞体の変形を伴うものに強く発現していた (▲)。



# 一卵性双生児におけるHTLV-I関連脊髄症 (HAM) のウイルス学的, 免疫学的比較検討

中村龍文, 中根俊成, 調 漸, 鈴木善幸\*, 五條堀孝\*, 森内良三\*\*, 片峰 茂\*\*

## 目 的

HTLV-Iはquasispeciesとして宿主中に存在することが知られている。HAMにおいてはその発症にHTLV-I tax mutationなどの関与を示唆する報告もなされているが<sup>1)</sup>, 未だに確立されていない。我々はHAMとhealthy carrier (HC) に分かれるmonozygotic twinsを含むHTLV-I感染濃厚家系にてウイルス学的検討としてtax領域 (塩基配列およびDn/Ds ratioの検討), HTLV-I proviral DNA量定量, CAT-ELISAによるtransactivation能評価を, 免疫学的検討として抗HTLV-I抗体価測定, HLA typingを行った。

## 対 象

HTLV-I感染濃厚家系 (輸血歴なし) における一卵性双生児 (HAM=twin A, HC=twin B) は16種類の血液型で同一の形質を示し, twin Aは36歳時にHAM発症した<sup>2)</sup>。他の対象はmother (HC), elder brother (HAM) であった。

## 方 法

- (1) 家系図の作成, HTLV-I proviral DNA量定量: HTLV-I proviral DNA量定量はcompetitive PCRにより行った。
- (2) HTLV-I tax領域の塩基配列およびDn/Ds ratioの検討: DNA抽出し, 全tax領域をnested-PCRにて増幅しsubcloning. Miniprepし, sequencing (最終的にATK-1と比較)。さらにDn/Ds ratioを計算。
- (3) CAT-ELISAによるtransactivation能評価: Monozygotic twinsそれぞれのHTLV-I tax領域のsequenceのうちconsensus sequenceのみで施行。vectorへsubcloning. Maxiprep後にCAT-plasmid (LTR-CAT, kB enhancer/promoter) と共にlipofection法にて293T cellsにco-transfection. 4日後にharvestし, BCA assayに

長崎大学医学部第一内科, \* 国立遺伝学研究所,  
\*\* 長崎大学細菌学

て蛋白定量後, 調製しCAT-ELISA kitにてtransactivation能を測定 (RSV-β-galにより補正)。

- (4) 抗HTLV-I抗体価測定: PA法により測定した。
- (5) HLA typing: Immunomagnetic HLA typing techniqueにてHLA serotypeを決定。

## 結 果

- (1) HTLV-I proviral DNA量は1,000 PBMCsあたりでHAM例 (twin A=31.0, elder brother=23.5) の方がHC例 (twin B=4.0, mother=0.8) より多かった。
- (2) 既に報告されているHAM発症のリスクを高めるtax mutationは認められなかった。塩基置換のfrequencyは1クローンあたりでHC例の方がHAM例より高かった (表1)。同様にDn/Ds ratioでもHC例において高かった (表2)。また, 本家系におけるvirus genotypeはtwin Bのみがnon-ATK-1 typeであった (図1)。
- (3) Transactivation能の検討ではLTR-CAT, kB enhancer/promoterのいずれのCAT-ELISAにおいてもtwins間で差は認められなかった。
- (4) 抗HTLV-I抗体価においてはHAM, HC間では特に差は認められなかった。
- (5) HLA serotypeはelder brotherとtwinsにて父親由来のHLAは同一であったが, 母親由来のHLAは異なっていた (図1)。

## 考 察

本家系においては父親由来のHLAとvirus genotypeとしてはATK-1 typeの組み合わせがHAMを発症しやすく, HAM発症のトリガーとしてHLAとHTLV-Iウイルス一次構造のコンビネーションによる可能性が考えられた<sup>3)</sup>。またこれまでも報告されているように, HTLV-I proviral DNA量はHAM例で多く, 塩基置換のfrequency, Dn/Ds ratioはいずれもHC例において高かったが, これらは宿主の免疫学的選択圧との関連が示唆された<sup>4)</sup>。

図1. 家系図, HTLV-I genotype, HLA serotype

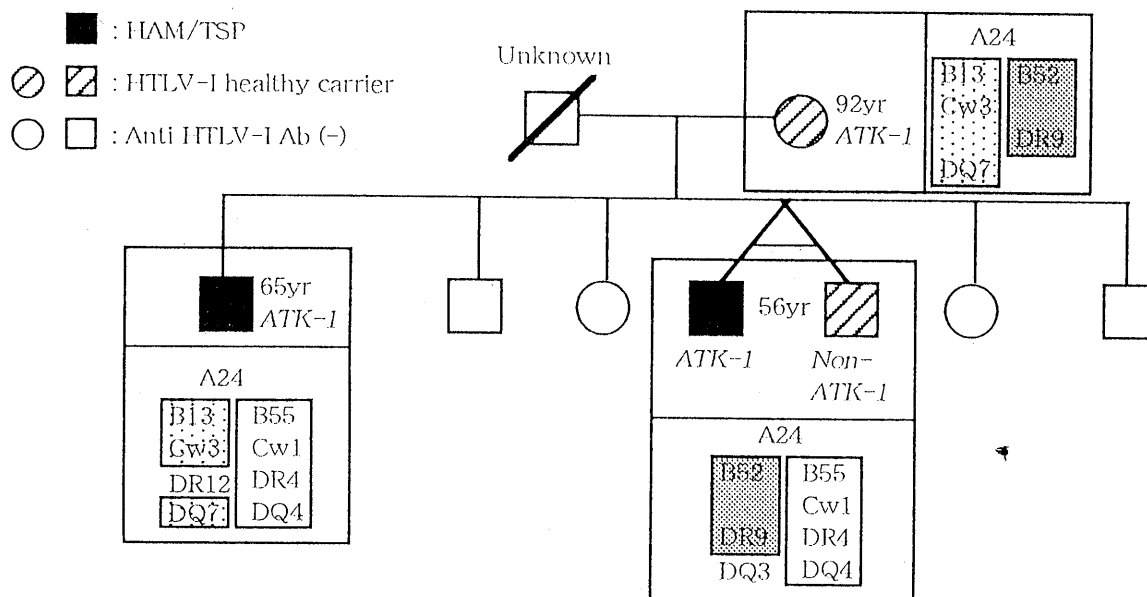


表1. HTLV-I tax領域のsequence variationの解析

Subjects	Number of clones	Number of substitutions	Substitutions/clone	Nonsynonymous substitutions/substitutions
Twin A	18	8	0.44	0.50
Twin B	18	14	0.78	0.71
Mother	18	13	0.72	0.54
Elder brother	10	4	0.40	0.25

文 献

表2. 双生児間におけるHTLV-I tax領域のDn/Ds ratio比較

Subjects	Dn	Ds	Dn/Ds
Twin A	0.00051	0.00223	0.23
Twin B	0.00152	0.00075	2.04

- 1) Renjifo B. et al. Tax mutation associated with tropical spastic paraparesis/human T-cell leukemia virus type I-associated myelopathy. J Virol 69:2611-2616,1995
- 2) Motomura M et al. HTLV-I associated myelopathy in an identical twin. Lancet 336:55,1990.
- 3) Nakane S et al. Comparative molecular analysis of HTLV-I proviral DNA in HTLV-I infected members of a family with a discordant HTLV-I-associated myelopathy in monozygotic twins. J Neurovirol (in press)
- 4) Bangham CRM et al. Genetic control and dynamics of the cellular immune response to the human T-cell leukaemia. Phil Trans R Soc Lond 354:691-700,1999

〔Tax 領域における HTLV-I subtype の存在と HAM 発症のリスクについて〕

古川 良尚<sup>1)</sup>、納 光弘

目 的

HAM 発症のメカニズムは十分解明されていないが、HLA のタイプと疾患との関連が議論され、最近 HLA-A\*02 が HAM 発症のリスクを下げる事が報告されている<sup>1)</sup>。しかしながら、HTLV-I ウイルスそのものには、疾患特異的な変異は見つかっていない。HTLV-I はこれまで、LTR の部位の変異を元にしてメラネシアン・セントラルアフリカン・コスモポリタンの3つのグループに分けられ、更にコスモポリタングループは4つのサブグループに分けられている。HTLV-I の tax 領域については変異が少ないために、tax 領域で HTLV-I を分類する試みはされていない。しかし tax 蛋白はウイルス自体の転写を亢進したり、proto-oncogene を活性化して感染細胞を増殖させ、また炎症性のサイトカインの産生を活性化したりする。更に tax は HTLV-I 感染細胞に対する CTL の主な標的であることから、tax の変異と疾患との関係については非常に興味もたれる。そこで Tax 領域の変異と疾患との関連を調べた。

対 象 ・ 方 法

無症候性キャリア(HC) 62 人、HAM61 人、ATL55 人について tax の 5-1062 塩基 (HTLV-I の 7295-8356 塩基) を direct sequence 法にて解析した。HTLV-I の subtype について分子系統解析を行い、また LTR の領域についても各 subtype について sequence を行い LTR の領域ではどの Subtype に属するのかを調べた。更に HAM, HCs については RFLP 解析を行い各 200 例づつ Tax 領域での Subtype 分類を行った。又 tax 領域における各 subtype による各疾患の頻度、HC と HAM については HTLV-I プロウイルス量、HLA-A\*02 の存在頻度についても調べた。

表 1. Tax サブグループに特異的な塩基置換

	7897 <sup>a</sup>	7959 <sup>a</sup>	8208 <sup>a</sup>	8344 <sup>a</sup>
amino acid change in tax A <sup>b</sup>	N	A→V	S→N	N
ATK	C	C	G	A
Tax B (n=158)	C	C	G	A
Tax A (n=20)	T	T	A	C

a. ATK 株での相当塩基位置。

b. 塩基置換に伴うアミノ酸変化。Nは変化なし。

結 果 ・ 考 察

Tax にはいくつかの塩基置換が見られたが、そのなかで、

7897, 7959, 8208, 8344 が常に同時に置換している HTLV-I のサブグループがあることに気づいた。

このような4つの特別な塩基置換を伴っている HTLV-I は 178 人中 20 人にみられ (表 1)、Tax A と名づけた。またこの4つの特別な部位の塩基がコンセンサスの配列であるものを Tax B と名づけた。

tax の塩基配列を元に分子系統樹を書いてみると、4つの塩基置換をもつかもたないかで二つのサブグループに分けられた。また既に full sequence がわかっている6つのクローンを系統樹に入れてみると、Tax A を持っているものは LTR の分類ではコスモポリタン A に属し、Tax B を持っているクローンは、コスモポリタン B に属しており、tax でのサブグループと LTR での分類に密接な関係が有ることが示唆された。

これを確かめるために、今回我々が Tax のシーケンスを行ったサンプルについて LTR のシーケンスを行い、LTR の部位での系統樹を書いてみたところ、Tax A をもつ HTLV-I は LTR での分類ではコスモポリタン A に属し、Tax B をもつ HTLV-I は LTR での分類ではコスモポリタン B に属しており、tax でのサブグループと LTR での分類に密接な関係が有ることがわかった。

シーケンスによる検討で Tax A は HAM で 61 名中 10 名、HC で 62 名中 5 名、ATL で 55 名中 5 名と HAM に高頻度に見られる傾向があり、Tax A が HAM 発症のリスクを高めている可能性が示唆された (表 2)。この事を確かめるために、HAM および HC 200 例づつについてサブタイプ分類を行った。Tax A タイプでは ACCII 制限酵素部位が生じる事を利用して、RFLP 解析を行った。その結果、Tax A は HAM では 200 例中 30 名 15% にみられ一方、健康なキャリアーでは 200 人中 14 名、7% にしか Tax A タイプはみられず、Tax A は有意に HAM に多く見られる事が分かった。Tax A を持つことで HAM になる Odds 比は 2.34 で HAM になりやすい事が判明した (表 2)。

一方宿主側の因子として HLA-A\*02 を持っている場合は HAM になりやすいことが報告されている。そこで、Tax A を持っている人が HAM になりやすいのは HTLV-I の違いが原因ではなく、HLA-A\*02 を持っていない集団だからではないかという可能性がある。HLA-A2 についても調べてみた。すると Tax A HTLV-I に感染している人では HLA-A-02 の頻度は 44 人中 22 人と 50% で Tax B HTLV-I に感染している人での HLA-A-02 の頻度 (356 人中 123 人 34.6%) よりもむしろ高い事が分かり、この二つの要素について、ロジスティック回帰解析を行ったところ、HL

1. 鹿児島大学第 3 内科

A-A\*02の要素を補正した場合、Tax Aを持つことでのHAM発症に対するオッズ比は2.79とむしろ補正前の2.34よりも高く、Tax A自体がHAM発症のリスクであることがはっきりした(表3)。

さらにTax A, Tax B HTLV-Iに感染している人においてHLA-A\*02がどれだけHAM発症を予防しているかを調べてみた。HLA-A\*02は両方のサブグループにおいてHAM発症のオッズ比は1以下で予防的に働いていたが、そのオッズ比はTax B HTLV-Iに感染している場合には0.40、Tax A HTLV-Iに感染している場合には0.66であり、HLA-A\*02のHAM発症を予防する効果はTax B HTLV-Iに感染している場合により著明であった(表4)。

Tax Aに感染しているとHAMが発症しやすくなる機序として感染細胞が増殖しやすいのではないかと考えてウイルスロードを測定してみた。TaxのグループにかかわらずHAMではHCに比べてウイルスロードは高かったが、Tax A, Bではロードに差がなかった(表5)。

Renjifoらは以前7959番目の塩基置換をHAMに特異的なmutationとして報告している<sup>2)</sup>。しかしこれはコロンビアのHTLV-IではHAMもHCでもそうであり、HAMに特異的であるという事は否定されている。また他の塩基置換には言及せず、taxのサブグループ分けはしていない。しかし興味あることにこの塩基置換をもつ患者のtaxクローンではLTRに対する転写活性能が高い事を報告している。我々の検討ではTax Aと

Tax Bではウイルスロードについては差を認めなかったが、Tax A HTLV-IのほうがHAM発症のリスクが高くなる可能性として、サイトカイン遺伝子に対するtransactivation能が違う可能性も考えられる。また別の可能性としてtaxのsequenceが違うためにCTLの反応が異なり、HAMの発症のしやすさが違うのかも知れない。

### 結語

1. Tax A HTLV-IはTax B HTLV-IよりもHAM発症のリスクが高く、HAM発症のリスクに宿主側の素因だけでなく、ウイルスのタイプも影響していることがわかった。
2. HLA-A\*02を持つことは、両方のTaxのサブグループでHAMの発症リスクを低下させるが、この作用はTax Bにおいてより顕著であった。

### 文献

- 1) Jeffery, K. J., K. Usuku, S. E. Hall, W. Matsumoto, G. P. Taylor, J. Procter, M. Bunce, G. S. Ogg, K. I. Welsh, J. N. Weber, A. L. Lloyd, M. A. Nowak, M. Nagai, D. Kodama, S. Izumo, M. Osame, and C. R. Bangham. 1999. HLA alleles determine human T-lymphotropic virus-I (HTLV-I) proviral load and the risk of HTLV-I-associated myelopathy. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96:3848-3853.
- 2) Renjifo, B., I. Borrero, and M. Essex. 1995. Tax mutation associated with tropical spastic paraparesis/human T-cell leukemia virus type I-associated myelopathy. J. Virol. 69:2611-2616.

表2. Tax A HTLV-IによるHAM発症のオッズ比

Analysis	HAM/TSP, No.		HCs, No.		ATL, No.		Odds of HAM/TSP by Tax A				
	Tax A	Tax B	Tax A	Tax B	Tax A	Tax B	$\chi^2$	P	Odds ratio	CI, 95%	Fp
Sequence	10	51	5	57	5	50					
+ RFLP	30	170	14	186	N.D.	N.D.	6.54	0.01	2.34	1.20-4.57	-0.09

表3. ロジスティック回帰解析によるTaxA+/-、HLA\*A02+/-によるHAM発症のオッズ比

	$\chi^2$	P	Odds ratio	CI, 95%
HLA-A*02	15.30	0.0001	0.43	0.27-0.65
HTLV-I Tax A	8.49	0.0036	2.79	1.34-5.55

表4. HLA\*A02はTax B HTLV-IでよりHAM発症に大して予防的に働いている。

Tax subgroup	HAM/TSP			HCs		
	Median provirus load	No. of subjects	P	Median provirus load	No. of subjects	P
Tax A	580	28	0.66	19	13	0.15
Tax B	571	164		73	184	

表5. HAM、キャリアーでのTaxA/Bによるウイルスロード

Tax subgroup	HAM/TSP		HCs		Odds of HAM/TSP by the presence of HLA-A*02 in each Tax subgroup				
	No. of subjects A*02+	No. of subjects A*02-	No. of subjects A*02+	No. of subjects A*02-	$\chi^2$	P	Odds ratio	CI, 95%	Fp
All	55	145	90	110	13.3	0.0003	0.46	0.31-0.69	0.24
Tax A	14	16	8	6	0.41	0.52	0.66	0.22-1.41	0.20
Tax B	41	129	82	104	15.7	<0.0001	0.40	0.26-0.62	0.26