

学 位 論 文 題 名

A RAT MODEL OF HTLV - I INFECTION

I. Humoral antibody response, provirus integration
and HAM/TSP like myelopathy in seronegative HTLV - I carrier rats

(ヒトT細胞白血病ウイルス感染ラットモデル

I. 抗 HTLV - I 液性抗体反応, プロウイルスゲノムの
臓器分布, 抗体陰性持続感染ラットにおける
HAM/TSP 様病変の発症)

学位論文内容の要旨

I. はじめに

Human T lymphotropic virus type I (HTLV - I) は1980年に初めてヒトから分離同定されたレトロウイルスの一種で, 成人T細胞白血病(ATL)のみならず慢性進行性の脊髄症 HAM/TSP や関節症 HAAP の原因ウイルスとしても注目されているが, その疾患発症機序は未だ明らかではない。これらの機序解明の為に HTLV - I 関連疾患発症モデル動物の開発が長らく待たれてきた。本研究では, HTLV - I 持続感染ラットを作製して, 抗 HTLV - I 抗体価の変動, HTLV - I プロウイルスゲノムの分布について検討し, さらに臨床的, 神経病理学的にヒトの HAM/TSP に極めて類似する脊髄病変を有する疾患モデル動物の作製に成功したので報告する。

II. 材料と方法

1)細胞株: 4種の近交系ラット(LEW/Hkm, WKAH/Hkm, F344/Slc, ACI/Hkm)の脾細胞と ATL 患者より採取した ATL 細胞とを混合培養して4種類の HTLV - I 不死化ラットT細胞株(LEW - S1, WKA - S1, F344 - S1, ACI - S1)を得た。HTLV - I 不死化ヒトT細胞株として MT - 2 を用いた。

2) 動物及び HTLV - I 感染ラットの作製: 7種の近交系ラット(LEW/Hkm, WKAH/

Hkm, F344/Slc, ACI/Hkm, SDJ/Hkm, BUF/Hkm, LEJ/Hkm) は北海道大学医学部付属動物実験施設及び SLC Japan (静岡) から供給を受け、以下の如く HTLV - I 感染ラットを作製した。(a) マイトマイシン C で処理した LEW - S1, WKA - S1 細胞 (1×10^7 /頭) を各々生後24時間以内の LEW/Hkm, WKAH/Hkm 系新生仔ラットの腹腔内に接種した。(b) MT - 2 細胞 (1×10^7 /頭) を生後24時間以内の LEW/Hkm, WKAH/Hkm, F344/Slc, ACI/Hkm 系新生仔ラットの腹腔内に接種した。(c) 16週令の LEW/Hkm, WKAH/Hkm, F344/Slc, ACI/Hkm, SDJ/Hkm, BUF/Hkm, LEJ/Hkm ラットの尾静脈より MT - 2 細胞 (1×10^7 /頭) を2週間隔において2回静脈内接種した。

3) 抗体価の測定: 血清及び髄液中の抗 HTLV - I 抗体価はゼラチン凝集法 (SERO-DIA・HTLV - I, Fuji Rebio) を用いて測定した。

4) PCR 法による HTLV - I プロウイルスゲノムの検出: 末梢単核球および各実質臓器より Proteinase K & SDS 法を用いて抽出した DNA を鋳型として、HTLV - I の pol 領域及び pX 領域に特異的な塩基配列を増幅するプライマーを用い、変性94℃ 1分、アニーリング58℃ 2分、合成72℃ 2分を1サイクルとした PCR 法により35回増幅を行った。増幅された DNA を2% アガロースゲルに泳動後、ナイロン膜にトランスファーし、 32 P 標識した塩基配列特異的オリゴヌクレオチドプローブとハイブリダイゼーションして、洗浄後オートラジオグラフィーを行った。pol 及び pX 各々の領域のプライマー及びプローブでプロウイルスゲノムが検出された検体を陽性と判定した。

5) 光学顕微鏡的観察: ヘマトキシリン&エオジン染色の他に必要に応じてルクソール・ファスト・ブルー染色、ボディアン染色及びホルツァー染色を用いて標本を観察した。

Ⅲ. 結 果

1) 4種類の HTLV - I 不死化ラット T 細胞株 (LEW - S1, WKA - S1, F344 - S1, ACI - S1) について、各々の HTLV - I プロウイルスゲノムの組み込み、mRNA の発現及びウイルス蛋白の産生を各々サザンブロット法、ノザンブロット法及びウェスタンブロット法によって確認した。

2) HTLV - I 感染ラット作製: 末梢単核球より抽出した DNA を用いて PCR 法を行い感染の有無を判定した。(a) LEW - S1 あるいは WKA - S1 細胞を接種された LEW/Hkm, WKAH/Hkm 系新生仔ラットでは各々18頭中16頭、3頭中3頭に感染が成立した。(b) MT - 2 細胞を接種された LEW/Hkm, WKAH/Hkm, F344/Slc, ACI/Hkm 系新生仔ラット

においては、各々 8 頭中 8 頭、9 頭中 8 頭、20 頭中 16 頭、8 頭中 7 頭に感染が成立した。(c)MT - 2 細胞を接種された LEW/Hkm, WKAH/Hkm, F344/Slc, ACI/Hkm, SDJ/Hkm, BUF/Hkm, LEJ/Hkm 系成熟ラットでは各系統 5 頭中 5 頭全てにプロウイルスゲノムが検出された。以上、接種する細胞の種類、接種時期及びラットの系統による感染率の差異は見い出せなかった。

3) 各種系統ラット間における HTLV - I に対する液性抗体反応：MT - 2 細胞を 2 回静脈内接種された上記 2) - (c)群の 7 系統の各ラットより初回接種後 2, 3, 7, 13, 21, 28, 40 及び 49 週目に採血を行い、抗 HTLV - I 抗体価を測定した。抗体価は接種後 2 ～ 3 週目より検出され (1 : 8 - 1 : 8192), 12 週目にはプラトーに達し、49 週目に至っても比較的高値に維持されていた。抗体価の高低により、各種系統ラットは 3 群に分類された。F 344/Slc, SCI/Hkm, SDJ/Hkm (高反応群)；WKAH/Hkm, BUF/Hkm, LEJ/Hkm (中間反応群)；LEW/Hkm (低反応群)。

4) HTLV - I プロウイルスゲノムの臓器分布：新生児期に MT - 2 を接種された F 344/Slc ラット内 5 頭を生後 50 週目に屠殺して各臓器におけるプロウイルスゲノムの分布を検索したところ、個体間の差は存在するものの検索した全ての臓器（大脳、小脳、胸腺、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、顎下腺、リンパ節、末梢単核球）より検出された。

5) HAM/TSP 様病変 (HAM ラット) の発症：新生時期に MT - 2 を接種してキャリア化した WKAH/Hkm ラット 8 頭中 3 頭を 1 年以上にわたり観察した。これら 3 頭全ては生後 16 ～ 18 か月時に後脚の進行性痙性麻痺症状を呈し、3 頭中 2 頭を解剖し得た。組織学的には胸髄を中心とした前索及び側索における左右対称性の広汎な白質変性像（脱髄、空胞変性、グリオシス及びマクロファージの浸潤等）を認めた。リンパ球浸潤はほとんど存在せず、灰白質はよく保たれていた。病変はヒト HAM/TSP に極めて近いと考えられた。血清及び髄液中より抗 HTLV - I 抗体価は検出されなかった。大脳、脊髄及び全身各臓器より抽出した DNA より HTLV - I プロウイルスゲノムが検出された。WKAH/Hkm 以外の系統に HAM/TSP 様病変は見い出せなかった。

IV. 考 案

1) ヒトにおいて特定の HLA haplotype を持つ HTLV - I キャリアーに HAM 発症が多いとする報告があるが、ラットにおいても WKAH/Hkm 系にのみその発症をみたことからラット MHC (特に RT1^a haplotype) を含めた遺伝的素因が HAM/TSP 様病変発症に関与して

いる可能性がある」と推定された。

2) ヒト HAM/TSP では髄液中の高力価の抗 HTLV - I 抗体の存在, 病変部位におけるリンパ球浸潤の存在等により HAM 発症に免疫学的機序の存在が推定されているが仔細は不明のままである。今回作製した HAM ラットではこれらの所見が欠如しており, 病変形成には免疫学的機序ではなくウイルスの直接侵襲が関与している可能性がある。今後, HAM ラットの検体を用いて in situ hybridization 等を行い脊髄内におけるウイルスの局在部位を明らかにする事により解明されていくものと期待される。

3) 今回開発した HAM ラットモデルはヒト HAM/TSP の発症機序の解明の上で極めて有力なモデル系と考えられた。さらに多発性硬化症をはじめとするヒト神経難病の病因を探る上で重要な手掛かりを与えてくれるものと考えられた。

V. 結 語

1) HTLV - I 感染ラット T 細胞株及びヒト由来の HTLV - I 感染 T 細胞株 MT - 2 を接種することにより 7 系統の近交系ラットに HTLV - I 特続感染が成立した。

2) 7 種の近交系ラットについて HTLV - I に対する液性免疫応答性を検討したところ, 高応答群, 中間応答群, 低応答群の 3 群に大別された。

3) HTLV - I 感染ラットでは中枢神経系を含めてほとんど全ての臓器において HTLV - I 遺伝子の存在を認めた。

4) 新生時期に MT - 2 を接種して HTLV - I に感染した WKAH/Hkm ラットに 16 から 18 か月の潜伏期を経て臨床的, 神経病理学的にヒトの HAM/TSP に極めて類似する脊髄病変が形成された。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	松 本 脩 三
副 査	教 授	吉 木 敬
副 査	教 授	葛 巻 暹

Human T lymphotropic virus type I (HTLV - I) は, 成人 T 細胞白血病 (ATL) の主な

らず、最近は慢性進行性の脊髄症 HAM/TSP や関節症 HAAP の原因ウイルスとしても注目されているが、それらの疾患の発症機序は未だ明らかではない。HTLV - I 関連疾患発症モデル動物を作製してこれらの機序解明に資することを目的として本研究は行われた。

まず4種の近交系ラット (LEW/Hkm, WKAH/Hkm, F344/Slc, ACI/Hkm) の脾細胞と ATL 患者より採取した ATL 細胞とを混合培養して4種類の HTLV - I 不死化ラット T 細胞株 (LEW - S1, WKA - S1, F344 - S1, ACI - S1) を得た。ヒトの HTLV - I 不死化 T 細胞株としては MT - 2 が用いられた。さらに7種の近交系ラット (LEW/Hkm, WKAH/Hkm, F344/Slc, ACI/Hkm, SDJ/Hkm, BUF/Hkm, LEJ/Hkm) を用いてつぎの方法で HTLV - I 感染ラットを作製した。(a) マイトマイシン C で処理した LEW - S1, WKA - S1 細胞を各々生後24時間以内の同系新生仔ラットの腹腔内へ、(b) MT - 2 細胞を生後24時間以内の LEW/Hkm, WKAH/Hkm, F344/Slc, ACI/Hkm 系新生仔ラットの腹腔内へ、(c) 16週令の7種の近交系ラットの尾静脈より MT - 2 細胞を2週間隔をおいて2回静脈内接種。血清及び髄液中の抗 HTLV - I 抗体価の測定はゼラチン凝集法を用いて行われた。HTLV - I プロウイルスゲノムの検出は、末梢単核球及び各実質臓器より Proteinase K & SDS 法を用いて抽出した DNA を鋳型として HTLV - I の pol 領域及び px 領域に特異的な塩基配列を増幅するプライマーを用い PCR 法で行われた。増幅された DNA をナイロン膜にトランスファーし、³²P 標識した塩基配列特異的オリゴヌクレオチドプローブとハイブリダイズして、洗浄後オートラジオグラフィーを行っている。光学顕微鏡ではヘマトキシリン&エオジン染色の他に必要に応じてルクソール・ファスト・ブルー染色、ボディアン染色及びホルツァー染色で観察した。

以上により、以下の結果が得られた。

- 1) HTLV - I 感染ラット T 細胞株及びヒト由来の HTLV - I 感染 T 細胞株 MT - 2 を接種することにより7系統の近交系ラットに HTLV - I 持続感染が成立した。ラットの系統、接種時期及び接種方法による感染率の差異は認められなかった。
- 2) 7種の近交系ラットについて HTLV - I に対する液性免疫応答性を検討したところ、高応答群、中間応答群、低応答群の3群に大別された。
- 3) HTLV - I 感染ラットでは中枢神経系を含めてほとんど全ての臓器において HTLV - I 遺伝子の存在を認めた。
- 4) 新生児期に MT - 2 を接種して HTLV - I に感染した WKAH/Hkm ラットに16から18か

月の潜伏期を経て臨床的，神経病理学的にヒトの HAM/TSP に極めて類似する脊髄病変が形成された。

口頭発表の後，吉木，葛巻，長嶋各教授からヒトの HAM/TSP とラット HAM の病態所見の類似点と相違点，seropositive adult carrier でのラット HAM 発症はありやなどに関し，多数の質問が寄せられ，討議が行われたが，申請者からは何れに関しても極めて順当かつ正確な答えがなされたものと判断された。

この研究で開発された HAM ラットモデルはヒト HAM/TSP の発症機序の解明の上で有力なモデル系になりうるものである。今後この系を通じて HAM ラットの病変発症機序を解明してゆく事により多発性硬化症をはじめとするヒト神経難病の病因を探る上で重要な手がかりが得られる可能性があり，本論文はその意味で学位論文として十分に価値あるものと判断された。