

学 位 論 文 題 名

ヒトT細胞白血病ウイルスⅡ型の分子特性

学位論文内容の要旨

Human T - cell lymphotropic virus, type I (HTLV - I) と type II (HTLV - II) は類似した生物学的特性を有するレトロウイルスであり発生学的に関連していると考えられている。HTLV - I の感染は特定の地方に局限して認められ、成人T細胞白血病や慢性進行性脊髄症などの発症に関連していることが判明している。

一方 HTLV - II の感染はアメリカのインディアンに見られ、さらにアメリカやヨーロッパの都市部の麻薬常習者 intravenous drug abusers (IVDAs) の間では広く蔓延していることが報告されてきている。病気としてはリンパ球増殖性疾患や慢性進行性脊髄疾患との関連が示唆されているが、未だ特定の疾患との明確な結び付きを示すものは知られていない。AIDS 患者の多い New York 市においては IVDAs の少なくとも60%は HIV に感染しており、その内の12.5%が血清学的に HTLV - I または HTLV - II の両方に交叉する抗原 (HTLV - I / II) に陽性であると予想されている。Polymerase chain reaction 法 (PCR 法) を用いた検索では HTLV - II による感染の方が多いと指摘されている。HIV 感染の流行は一方で HTLV - II の感染状況やヒト疾患における役割を調べるのに絶好の機会を提供していると言えよう。

本研究では IVDS 患者より HTLV - II を分離しそれらを分子生物学的および血清学的に検討することにより HTLV - II の分子特性を明確にし、さらにこのウイルスのヒト疾患に関する役割を研究するための基盤の確立を目的とする。

研究方法

患者とウイルス分離：対象は New York に在住し IVDS ないしその関連疾患で North Shore University Hospital を受診した患者よりウイルス分離が可能であった8名の患者で、そのうち6名は HIV 及び HTLV - I / II に陽性で、2名は HTLV - I / II のみ陽性であった。患者末梢血単核球を BJAB 細胞と混合培養し、細胞変性効果を示したものについて電子顕微鏡観察および逆転写酵素活性の測定によってウイルスの分離状況を判定した。

Southern Hybridization : HTLV - II provirus DNA を *Bam* HI により 5' (4.7kb), 3' (3.5kb) にサブクローニングし, それぞれをプローブとし, 混合培養細胞より phenol - chloroform により抽出した DNA とハイブリダイズさせた。

PCR 法による DNA の増幅 : *gag* 領域(bp756-1274)についてプライマーを HTLV - II (Mo 株) の塩基配列にしたがって作成し, denature94°C40秒, annealing56°C55秒, extension72°C 2分の条件で30サイクル増幅した。

DNA のクローニングと塩基配列の決定 : PCR 法にて増幅した DNA を agarose gel に電気泳動し, 目的のバンドを切り取り pBluescript vector の *EcoRV* 切断部へ挿入し, *E. coli* ヘトランスフォームした。DNA 塩基配列は M13forward ・ reverse primers を用いて dideoxy chain termination 法にて決定した。

Gag 蛋白 p19発現プラスミドの構築 : HTLV - II Gag 蛋白のうち野生型 (II p19) と欠失型 (II dp19), さらに HTLV - I の p19 (I p19) とを maltose 結合蛋白との融合蛋白として発現するプラスミドベクターを作成した。HTLV - II p19, HTLV - II dp19, HTLV - I p19 領域を増幅するプライマーを設定し PCR 産物を *EcoRI*, *Bam*HI 切断部に挿入した。

融合蛋白の発現と精製 : 発現プラスミドを有するコロニーを LB 培地で培養し 0.5mM IPTG で 1 時間蛋白発現を誘導した。細菌のペレットを凍結融解, 超音波破碎後 amylose resin のカラムに吸着させ, maltose を含む液にて溶出し, 抗原として用いた。Western blot および ELISA は常法にて行った。

結 果

1. 患者末梢血単核球と BJAB 細胞とを混合培養すると合胞体の形成がみられ, 培養上清には Mg^{2+} 依存性の逆転写酵素活性が認められ, 電子顕微鏡にて C 型ウイルス粒子が認められた。

2. 培養細胞から抽出した DNA の Southern hybridization にて HTLV - II provirus の存在が確認された。制限酵素による切断パターンをみると 8 つの分離株にうち 4 株はすでに報告されている HTLV - II の Mo 株とほとんど一致し, 他の 4 株は HTLV - II NRA 株と極めて類似していた。このことから HTLV - II には 2 種類のサブタイプが存在することが示唆され, それぞれを HTLV - II a, HTLV - II b と記載した。

3. *gag* 遺伝子がコードする p19 を含む 518 の塩基配列を調べると HTLV - II a と HTLV - II b との間に 1 アミノ酸の変異を含む 14 箇所で単一塩基変化が見られ, さらに HTLV - II b には 5' 側に 66bp の欠損が認められた。

4. HTLV - II a, HTLV - II b, HTLV - I のそれぞれの Gag 蛋白 p 19 を融合蛋白として作成し, それぞれを抗原として患者血清との免疫反応を Western blot にて検討した。HTLV - II a と HTLV - II b の抗原はどちらのタイプの患者血清とも反応し, Gag p 19 を抗原とした血清学的反応では両者を区別できなかった。しかしながら HTLV - I と HTLV - II との鑑別は可能であった。

5. Gag 蛋白における欠損部分を含む 22 アミノ酸と親水性 C 末端を含む 15 アミノ酸の合成ペプチドを抗原として患者血清との免疫反応を ELISA にて調べたところ HTLV - II b 感染患者血清はすべて陰性であったが HTLV - II a 感染患者では 10 名中 6 例で強い反応が認められた。

考 察

多数の HTLV - II 感染患者よりウイルスを分離して制限酵素地図を作成してみると 2 つのサブタイプが存在することが判明し, それぞれを HTLV - II a と HTLV - II b とした。Gag 領域の塩基配列の違いに着目してそれぞれの Gag p 19 の融合蛋白を作成して患者血清との免疫反応を見たが両者に反応の差が見られなかった。このことは欠損部以外の残存する部位に感染者に対するエпитープがあるものと考えられた。欠損部位を中心として作成した合成ペプチドでは HTLV - II a と HTLV - II b との鑑別に有用であるばかりでなくウイルスと細胞との相互作用を解析するうえで重要な知見を含んでいるものと考えられた。

結 語

New York 在住 AIDS およびその関連患者 8 名より HTLV - II を分離解析し以下の結果が得られた。

1. 制限酵素地図により HTLV - II の provirus を 2 つのサブタイプに分類し, それらを HTLV - II a と HTLV - II b とした。HTLV - II a はすでに報告されている Mo 株に一致しており, HTLV - II b は NRA 株に類似していた。

2. gag 領域 p 19 コード部位の塩基配列を調べると HTLV - II b では 66 bp の欠損を認めた。そこで p 19 蛋白を E. coli で融合蛋白として発現させて作成し, それを抗原として患者血清との反応を調べたが HTLV - II a と HTLV - II b との両方ともに反応し差異がなかった。しかし HTLV - I とは反応せず HTLV - I と HTLV - II との区別に使用可能であった。

3. HTLV - II b で欠損している部位を含む合成ペプチドによる ELISA 測定では HTLV - II b はすべて陰性 (0 / 6) であったが HTLV - II a では半数以上 (6 / 10) 陽性となり, 両

者の鑑別の指標となった。

以上の結果は HTLV - II の臨床病理学的、ウイルス学的ならびに疫学的研究を進めていくうえで極めて重要な情報を提供しているものと考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 長 嶋 和 郎

副 査 教 授 葛 巻 暹

副 査 教 授 生 田 和 良

Human T - cell leukemia virus type II (HTLV - II) は hairy cell leukemia の二人の患者から分離されたためにリンパ球増殖性疾患に関連している可能性が示唆されているが、未だヒトの病気の原因としては未知の状態にある。New York 地方においては麻薬常習者の60%が HIV に感染しておりそのうち12.5%が血清学的に HTLV に陽性であると報告されており、このウイルスの研究に重要な機会を提供している。我々は HTLV - II のヒト疾患に関する役割を明らかにすることを目的として分子生物学的並びに血清学的手段により検索した。

材料と方法： New York 市に在住し North Shore University Hospital (New York) に通院した患者を対象として検索した。ウイルス分離を行った合計 8 名の患者のうち 2 名は HIV 及び HTLV の抗体陽性で、残る 2 名は HTLV の抗体のみが陽性であった。患者末梢血単核球 (PBMC) と BJAB 細胞とを混合培養しウイルスの分離を行った。次に HTLV - II provirus の制限酵素地図を作製するために Southern blotting を行った。また gag 領域の塩基配列を決定し、欠損を見つけたため患者血清の反応性の違いをバクテリアによる発現蛋白と合成ペプチドを用いて調べた。

結果：患者 PBMC と BJAB を混合培養したところ 1 時間で合胞体形成が現れた。培養上清には Mg^{2+} 依存性の逆転写酵素活性が認められ、電子顕微鏡による検索でタイプ C 粒子が認められた。分離株 8 種の provirus の制限酵素地図を作製したところ四つの分離株は Mo 株に相似で

あり残る四つの分離株は NRA 株に一致しそれぞれ HTLV - II a, HTLV - II b と命名した。次に II a と II b の gag p 19 領域の塩基配列を決定したところ 18bp の単一の塩基変化と II b には 66bp の欠損が認められた。p 19 または欠損した p 19 の融合蛋白をバクテリアにより作製したが Western blotting で両者を区別することはできなかった。一方 HTLV - I と HTLV - II の gag p 19 の抗原性には交差がないことが分かった。欠損部分全てを含む 22 アミノ酸を合成し患者血清に対する免疫反応を ELISA にて調べたところ II b に感染している 6 名の患者血清はどれも反応をしめさず、対照的に II a の 10 名の血清は陽性反応をしめし両者の鑑別のスクリーニングに使用可能と思われた。

考案： HTLV - II の 8 種の分離株の解析により HTLV - II には二つのサブタイプが存在することが判明したが、このサブタイプと HIV 感染やリンパ球増殖性疾患との間に特定の関連は認められなかった。しかし gag p 19 の E. coli 発現蛋白で HTLV - I と HTLV - II が容易に鑑別できるようになり、また gag p 19 欠損部合成ペプチドで HTLV - II a と HTLV - II b との区別が可能になったことから今後さらに多数の分離株にて検索する基礎を確立することができた。

結語： New York 在住 HIV 陽性患者 6 名と非陽性患者 2 名の合計 8 名より HTLV - II を分離解析し以下の結果が得られた。制限酵素地図により HTLV - II の provirus を二つのサブタイプに分けられたことを示し、それぞれ HTLV - II a, HTLV - II b とした。HTLV - II a は既に報告された分離株 Mo に類似し HTLV - II b は分離株 NRA に相似する株であることが判明した。gag 領域の塩基配列を決定してしらべた結果 II b の p 19 領域に 66bp の欠損を認めた。欠損のあった p 19 領域の抗原性の差異を E. coli で発現させて調べた所 II a, II b と患者血清との反応において差は認められなかったが HTLV - I 患者とは交差反応を示さず HTLV - I と HTLV - II のスクリーニングに使用可能と考えられた。欠損部位の合成ペプチドによる ELISA では II b は全て陽性 (0 / 6) であったが II a は半数以上 (6 / 10) 強陽性であり、この部位で二つのサブタイプの区別が可能となった。

口頭発表に当たり、生田教授より HTLV - II ウイルス分離率に関する患者の免疫状態の影響について、HTLV - II の二つのサブタイプと HIV との関連について、gag 蛋白を用いた理由について、また葛巻教授より HTLV - II における HTLV - I tax 様蛋白の機能について、

HTLV - II の感染状況と腫瘍発生，あるいは免疫能との関連等に関して質問がなされたが，発表者はおおむね適切な解答をした。また生田教授，葛巻教授より個別に審査を受け，それぞれ合格とされた。

以上，本研究はヒトT細胞白血病ウイルスⅡ型に二つのサブタイプが存在することを見だし，さらにそれらの診断法を確立したもので学位論文に値するものと判断された。