

## 学位論文題名

## HTLV-I 感染症のラットモデル

## -HAM ラット病の超微形態学的観察-

## 学位論文内容の要旨

## 【はじめに】

HTLV-I (Human T cell leukemia virus type I) は1980年代初頭ヒトの最初のレトロウイルスとして分離同定され、その後成人T細胞白血病の病因ウイルスとして確立されたが、近年脊髄症 (HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis, HAM/TSP), 関節症, 細気管支肺炎, ふどう膜炎等に深く関与していることが明らかになってきた。これまでHAM/TSP に特徴的な病理所見は脊髄白質のリンパ球・マクロファージの浸潤を伴った慢性進行性炎症と白質変性が主座を占めるとされてきたがその疾患発症機序は依然として明らかではなく、その病因解明のため動物モデルの開発が強く望まれてきた。筆者らはHTLV-I 関連疾患発症機序の解明を目的に以前より作製し解析を進めてきた7系統のHTLV-I持続感染ラットのうち、WKAH系ラット1系統にのみ後肢の痙性麻痺を呈し神経病理学的にもヒトHAM/TSPに類似する脊髄病変を示すモデル動物HAMラット病の作製に初めて成功した。筆者はこのHAMモデル動物の脊髄・末梢神経病変の超微形態学的観察を行い、HAM/TSPの発症機序を考察する。

## 【材料と方法】

## HAMラットの作製

生後4ヵ月齢のWKAH/Hkm(WKAH)系ラット5頭に尾静脈より $10^7$ 個のHTLV-I産生ヒトT細胞株であるMT-2細胞を2週間隔で2度静脈内接種した。

## 電子顕微鏡学的観察

HAMラット病を発症したラット並びに正常コントロールラットを2.5%グルタルアルデヒド、4%パラホルムアルデヒドを含んだ0.1M リン酸緩衝固定液による灌流固定を行い脊髄、坐骨神経の横断切片を作製した。後固定、水洗、脱水を経て、Epon812に包埋した。超薄切片は酢酸ウラン、クエン酸鉛による染色後、電子顕微鏡観察を行った。

## 【結果】

## 持続感染系の成立とHAMラット病の発症

MT-2を接種後1ヵ月の時点でPCR法により5頭すべてのWKAHラットの末梢血リンパ球にHTLV-IプロウイルスDNAを検出しHTLV-I持続感染の成立を確認した。

これらはすべて約15ヵ月の潜伏期を経て歩行障害をおこし徐々に後肢の痙性麻痺が進行したため月齢24ヵ月の時点で灌流固定し電顕的検索を行った。

### 超微形態学的観察：脊髄

トリイジンブルー染色を施したsemithin sectionを光顕的に観察すると頸髄から腰髄上部にかけ白質を中心とする病変が認められた。左右ほぼ対称性で、髄鞘崩壊、空胞変性、マクロファージの浸潤、アストロサイトの増生よりなり、白質周辺帯、特に前索・側索に最も強かった。

電顕的観察では、胸髄を中心として神経線維の脱落と脱髄線維が見られた。多数のmyelin debris等を胞体内に入れたマクロファージが浸潤していた。また、菲薄化した髄鞘に囲まれた空胞がみられ、一部にマクロファージの空胞内浸潤を伴うものも見られた。リンパ球等の炎症性細胞の浸潤は見られなかった。また、髄鞘再生や、アストロサイトの増生も見られた。軸索は比較的構造が保たれていた。病変部位にはC型ウイルスは認められなかった。

特に注目すべき所見として、病変部にはapoptotic bodyを貪食するマクロファージが散見され、とくに血管周囲に多く見られた。さらにはアポトーシス初期像と考えられるオリゴエンドサイトも観察され、アポトーシスが比較的選択的にオリゴエンドサイトにおこっていることが示唆された。

### 超微形態学的観察：坐骨神経

坐骨神経・脛骨神経でも脱髄線維が多く見られ、空胞変性・髄鞘解離の所見も観察された。髄鞘は不規則に解離を起こし大小の空隙には膜様構造物、変性産物がみられた。また、空胞内や脱髄線維に接して変性したミエリン等を貪食するマクロファージの浸潤も見られた。軸索は比較的保たれていた。シュワン細胞、マクロファージ等にウイルス粒子は見られなかった。また、アポトーシスに陥ったシュワン細胞が観察された。

## 【考察】

HAMラット病の神経病理学的所見は光顕的に胸髄を中心とした前側索周辺帯にみられる左右対称性のびまん性白質変性であり、空胞変性とマクロファージの浸潤に特徴づけられ、この病変局在はヒトHAM/TSPに非常に類似している。

今回の超微形態学的観察により脊髄や末梢神経病変の形成過程が初めて明らかにされた。病変の高度な部位では著明な髄鞘崩壊ないしは脱髄像が認められた。髄鞘は不規則に解離を起こし大小様々な空隙には膜様構造物、変性産物がみられ、空胞内にはマクロファージがしばしば認められる。アストロサイトの増生も高度であり、崩壊した髄鞘周辺へのマクロファージの浸潤も著明である。病変は髄鞘の崩壊が主体であり、髄鞘の解離ならびにマクロファージの浸潤により空胞形成に至る変性過程である。

HTLV-Iをはじめとするレトロウイルスはヒトや動物に対して多彩な疾患を発症させ、とくに類似の中枢神経障害はhuman immunodeficiency virus (HIV)、羊・ヤギのvisna/maedi virus、マウスのmurine leukemia virus (MuLV)などのレトロウイルスによる感染症でも引き起こされることが知られており、後天性免疫不全症候群 (AIDS) でみられる空胞性脊髄症では中部から下部胸髄にかけての脊髄に多数の空胞化変性に特徴づけられる白質変性がみられる。病変の強い部位ではマクロファージおよび多核巨細胞の集簇が認められ、HIV粒子が確認されている。

HAMラット病に見られる脊髄病変はHIV感染に見られる空胞化脊髄症にきわめてよく似ている。HIV空胞性脊髄症と異なり多核巨細胞がみられず浸潤するマクロファージにはこれまでの検索ではウイルス粒子、あるいはウイルス抗原が証明されていないが、HTLV-I持続感染ラットに見られる病変であることからこれらの病変形成にはウイルス感染と関係する何らかの共通した機序の存在を想定できる。

この点に関して重要と思われる所見はHAMラット病において、髄鞘の腫大、軽微な髄鞘解離が認められる空胞変性の軽度な病変に既にマクロファージの

浸潤がみられることと、アポトーシスが誘導されたシュワン細胞や、オリゴドロサイトが観察されることであり、病理形成に重要な役割を果たしていると考えられる。

HAMラット病でのアポトーシス誘導の機序は現在のところ充分に明らかではないが、*in vitro*でリンホトキシンやTNF $\alpha$ による培養オリゴドロサイトにアポトーシスが誘導されるとの報告や、一酸化窒素が多発性硬化症の脱髄性脊髄病変においてオリゴドロサイトの細胞死をきたす可能性があることが明らかにされている。HAMラット病では比較的初期から脊髄病変にマクロファージが多数浸潤することが確認されており、マクロファージがこれらの液性因子を産生しこれによってオリゴドロサイトないしはシュワン細胞にアポトーシスが誘導されている可能性が示唆される。

我々が開発したHAM/TSPモデル、HAMラット病はヒトHAM/TSP、あるいはAIDS脳症と多くの類似点があることが明らかとなった。HTLV-I感染からHAM発症に至る過程に関与する宿主要因、ウイルス側要因、脱髄機序を解析する上に極めて有用なモデルと考えられる。

### 【結論】

HAM/TSPのラットモデル、HAMラットの脊髄・末梢神経病変における超微形態学的観察・検討を行い以下の結果を得た。

1. 胸髄を中心とした前側索周辺帯のびまん性白質変性部位では軸索の障害に比較し著明な脱髄像、髄鞘再生、グリオーシス、軸索変性や、変性したミエリンを貪食するマクロファージの浸潤等が確認された。ミエリンの障害が高度な部位では多くの空胞化変性が認められた。
2. アポトーシスを起こしたオリゴドロサイトやシュワン細胞、オリゴドロサイト由来と考えられる apoptotic bodyを貪食するマクロファージが観察され、HAMラット病の初期病変としてオリゴドロサイトやシュワン細胞等のアポトーシス誘導の可能性が強いと考えられた。
3. HAMラット病でのオリゴドロサイトやシュワン細胞等のアポトーシスはTNF $\alpha$ などのサイトカインや一酸化窒素などによる誘導等が推察された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 宮 崎 保  
副 査 教 授 加 藤 正 道  
副 査 教 授 田 代 邦 雄

学 位 論 文 題 名

## HTLV-I 感染症のラットモデル

—HAM ラット病の超微形態学的観察—

### 【研究目的】

HTLV-I (Human T cell leukemia virus type I) は1980年代初頭においてヒトの最初のレトロウイルスとして分離同定され、その後、成人T細胞白血病の病因ウイルスとして確立されたが、近年、脊髄症 (HAM/TSP)、関節症、細気管支肺炎等に深く関与していることが明らかになってきた。HTLV-I関連疾患発症機序の解明を目的に作製した7系統のHTLV-I持続感染ラットのうちWKAH系ラット1系統にのみ後肢の痙性麻痺を呈し、ヒトHAM/TSPに類似する脊髄病変を示すモデル動物HAMラット病の作製に初めて成功し既に報告した。そこで本研究ではその脊髄・末梢神経病変の超微形態学的観察を行いHAM/TSPの発症機序を考察した。

### 【材料と方法】

HAMラットの作製

生後4ヵ月齢のWKAH/Hkm(WKAH)系ラット5頭に尾静脈より $10^7$ 個のHTLV-I産生ヒトT細胞株であるMT-2細胞を2週間隔で、2度、静脈内接種した。

電子顕微鏡学的観察

HAMラット病を発症したラット並びに正常コントロールラットを灌流固定し、後固定、水洗、脱水を経て、Epon812に包埋した。超薄切片は酢酸ウラン、クエン酸鉛による染色後、電子顕微鏡学的に観察した。

### 【結果】

超微形態学的観察：脊髄

トルイジンブルー染色を施したsemithin sectionを光顕的に観察すると頸髄から腰髄上部にかけ左右ほぼ対称性の白質周辺帯、特に前索・側索に最も強い白質変性像が観察された。

電顕的観察では、胸髄を中心として神経線維の脱落と脱髄、マクロファージの浸

潤が認められた。さらに、菲薄化した髄鞘に囲まれた空胞がみられ、一部にマクロファージの空胞内浸潤も認められた。リンパ球等の炎症性細胞の浸潤は認められなかった。一方、髄鞘再生や、アストロサイトの増生が認められた。軸索の構造は比較的保たれていた。病変部位にはC型ウイルスは認められなかった。

特に注目すべき所見として、病変部にはapoptotic bodyを貪食するマクロファージが散見され、さらにapoptosis 初期像と考えられるオリゴデンドロサイトも観察された。

#### 超微形態学的観察：坐骨神経

坐骨神経でも空胞変性・脱髄の所見も観察された。髄鞘は不規則に解離を起こし大小の空隙には膜様構造物、変性産物が認められた。また、変性したミエリン等を貪食するマクロファージの浸潤も見られた。一方、軸索は比較的保たれていた。シュワン細胞、マクロファージ等にウイルス粒子は見られなかった。また、apoptosis に陥ったシュワン細胞が観察された。

#### 【考案及び結語】

HAM/TSPのラットモデル、HAMラットの脊髄・末梢神経病変における超微形態学的観察・検討を行い以下の結果を得た。

1. 胸髄を中心とした前側索周辺帯のびまん性白質変性部位では軸索の障害に比較して著明な脱髄像、髄鞘再生、グリオーシス、軸索変性や、変性したミエリンを貪食するマクロファージの浸潤等が確認された。ミエリンの障害が高度な部位では多くの空胞化変性が認められた。
2. apoptosis を起こしたオリゴデンドロサイトやシュワン細胞、オリゴデンドロサイト由来と考えられる apoptotic bodyを貪食するマクロファージが観察され、HAMラット病の初期病変としてオリゴデンドロサイトやシュワン細胞等のapoptosis 誘導の可能性が強いと考えられた。
3. HAMラット病でのオリゴデンドロサイトやシュワン細胞等のapoptosis はTNF $\alpha$ などのサイトカインや一酸化窒素などによる誘導などが推察された。

我々が開発したHAM/TSPモデル、HAMラット病はヒトHAM/TSP、あるいはAIDS脳症と多くの類似点があることが明らかとなり、HTLV-I感染からHAM発症に至る過程に関与する宿主要因、ウイルス側要因、脱髄機序を解析する上で極めて有用なモデルと考えられる。

以上より、本研究は博士（医学）の学位論文とし妥当なものと判断される。