

学位論文題名

HTLV-I 持続感染ラットにおける HAM/TSP の  
動物モデル HAM ラット病の解析

学位論文内容の要旨

【はじめに】

ヒトの感染性レトロウイルスである HTLV-I (Human T cell leukemia virus type I) は、成人 T 細胞性白血病 (ATL) の原因ウイルスのみならず、慢性進行性脊髄症 (HAM/TSP)、関節症 (HAAP)、細気管支肺炎 (HAB) などにも病因論的な関係が示されている。我々は、これら HTLV-I 関連疾患の発症機序解明のため HTLV-I 持続感染ラットを作製し、これまでに新生仔期に MT-2 を接種した抗体陰性の WKAH/Hkm ラット 3 頭に後肢の対麻痺が出現し、胸髄主体の脱髄、空胞変性及びマクロファージ浸潤をみる脊髄病変を有する HAM/TSP モデル動物として報告した。

本研究では、生後 3~6 ヶ月齢に MT-2 を接種し抗体陽性となった WKAH/Hkm 系ラットに HAM/TSP 様症状を認めたので、その神経病理学的及び分子生物学的解析を報告すると共に、HAM ラット病の末梢神経病変、免疫組織化学的解析及び脊髄病変の経時的観察などについても報告し、発症機序を考察する。

【材料と方法】

1) HTLV-I 感染ヒト T 細胞株 MT-2 を以下の各方法にて接種し、HTLV-I 持続感染ラットを作製した。A 群:  $1 \times 10^7$  個/頭を 12~37 週齢の LEW/Hkm、WKAH/Hkm、F344/Slc、ACI/Hkm、SDJ/Hkm、BUF/Hkm、LEJ/Hkm 系ラットに 2 回静脈内接種。B 群:  $1 \times 10^7$  個/頭を 8~28 週齢の LEW/Hkm、WKAH/Hkm 系ラットに 2 回腹腔内接種。C 群:  $1 \times 10^7$  個/頭を 17 週齢の WKAH/Hkm 系ラットに腹腔内接種。D 群:  $1 \times 10^8$  個/頭を 14 週齢の WKAH/Hkm 系ラットに腹腔内接種。E 群:  $1 \times 10^7$  個/頭を生後 24 時間以内の WKAH/Hkm 系新生仔ラットに腹腔内接種。

2) 血清及び髄液中の抗 HTLV-I 抗体価はゼラチン凝集法を用いて測定した。

3) HTLV-I プロウイルスゲノムの検出は、末梢リンパ球及び脊髄から抽出した DNA を鋳型とし、HTLV-I の pX 領域のプライマー及びプローブを用いた PCR 法にて常法に従って行った。

4) 病理組織学的検索には、HE 染色、KB 染色、KB-PAS 染色及び Toluidine-blue 染色などを行い、また免疫組織化学的検索は各種の一次抗体を用いて ABC 法により

行った。

5) 脊髄におけるアポトーシスの検索は、パラフィン包埋切片で核のDNA断片化を検出するTUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) 法を用いた。

## 【結果】

### 1) HTLV-I持続感染の確認

末梢リンパ球から抽出したDNAを用い、PCR法によりA～E群全てに持続感染の成立を確認した。成熟期にMT-2を接種したA～D群は抗体陽性、新生仔期に接種したE群は抗体陰性の持続感染ラットとなった。

### 2) 抗体陽性群におけるHAMラット病の発症

A及びB群：WHAH/Hkmラット5頭中3頭に約16ヵ月の潜伏期を経て後肢対麻痺が出現し、組織学的には5頭全てにHAMラット病の発症を確認した。髄液中の抗体は検索し得た1頭では陰性であった。他系統のラットには麻痺症状及び脊髄病変を認めなかった。C群：麻痺症状のない接種後14～16ヵ月齢の3頭中3頭に、組織学的にHAMラット病の発症を確認した。D群：接種後15ヵ月齢の2頭に後肢対麻痺が出現した。組織学的には接種後11～16ヵ月齢に検索した麻痺症状のない3頭を含め、5頭にHAMラット病の発症を確認した。

### 3) 抗体陽性HAMラット病の神経病理学的所見

脊髄前索及び側索周辺帯を主体とする左右対称性の髄鞘の変性、消失、空胞変性、グリオシス及びミエリンを貪食するマクロファージ浸潤像を認めた。リンパ球浸潤像は存在しなかった。病変は胸髄中部を中心に上下に拡がっていたが、延髄より上部の中樞神経系には病的変化を認めなかった。坐骨神経や神経根には有髄線維の減少、脱髄、髄鞘の再生及びミエリンを貪食するマクロファージ浸潤像を認めた。

### 4) HAMラット病の免疫組織化学的所見

病変脊髄には、抗マクロファージ抗体陽性の多数のマクロファージ浸潤、抗GFAP抗体陽性の腫大したアストロサイト増生像を認めた。抗Pan T、CD4及びCD8抗体を用いた免疫染色においてもTリンパ球浸潤を認めず、抗HTLV-Iコア、エンベロップ及びpX蛋白に反応するウイルス感染細胞は証明されなかった。

### 5) アポトーシスの検索

病変脊髄に核クロマチンの濃縮、核の断片化を呈する細胞を認めた。TUNEL法により、前・側索の白質周辺帯を主体として分布するアポトーシスによる細胞死を確認した。

### 6) 病変脊髄におけるHTLV-Iプロウイルスゲノムの局在

抗体陽性HAMラット1/2頭で脊髄にプロウイルスゲノムが検出された。また、HAMラット病非発症系の持続感染ラットにも陽性例を認めた。

### 7) 脊髄病変の経時的観察

E群における経時的な組織学的検索では、接種後12ヵ月齢に初めて限局性の初期病変像を確認した。発症に至るまでリンパ球浸潤は認めなかった。

### 【考案】

- 1) 抗体陽性群においてもWKAH/Hkm系に限りHAMラット病の発症を認めた事より、発症に宿主の遺伝的背景が関与することが重ねて示唆された。
- 2) HAMラット病は、脊髄におけるウイルスの存在のみでは発症に至らず、恒常的なウイルスの存在は必要条件でない可能性が示唆された。更に、仮にウイルスが存在してもウイルス抗原の発現がない、あるいは特定の時期のみ表出されている可能性も考えられた。
- 3) HAMラット病の発症機序に関しては、浸潤マクロファージなどから放出されるTNF $\alpha$ に代表される各種のサイトカインや、アポトーシス誘導によるオリゴデンドロサイトの障害などが想定されるが、ヒトHAM/TSPと比較してエフェクターT細胞による免疫学的脱髄機序の関与は乏しいと考えられた。
- 4) HAMラット病は、ヒトHAM/TSPの病態解明、更にその予防及び治療を検討するための有用な動物モデルであると考えられた。

### 【結語】

1. 7系統の抗体陽性持続感染ラットの中で、WKAH/Hkm系にのみHAMラット病が発症した。
2. 抗体陽性HAMラット病の神経病理学的所見は、胸髄を主体とした脱髄、空胞変性、グリオーシス及びマクロファージ浸潤で、抗体陰性HAMラット病と基本的に同様であったが、その程度は軽症の傾向を示した。また末梢神経においても脱髄、有髄線維の減少及びマクロファージ浸潤等を認めた。
3. HAMラット病脊髄の経時的観察では、その全経過を通じてリンパ球浸潤像を認めなかった。
4. HAMラット病の病変脊髄において、アポトーシスによる細胞死の存在を確認した。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 宮 崎 保  
副 査 教 授 皆 川 知 紀  
副 査 教 授 田 代 邦 雄

学 位 論 文 題 名

## HTLV-I 持続感染ラットにおける HAM/TSP の 動物モデル HAM ラット病の解析

### 【研究目的】

HTLV-I (Human T cell leukemia virus type I) は、成人T細胞性白血病の原因ウイルスのみならず、慢性進行性脊髄症 (HAM/TSP)、関節症 (HAAP) などにも病因論的な関係を有することが示唆されている。これらHTLV-I関連疾患の発症機序解明のためHTLV-I持続感染ラットを作製し、これまでに抗体陰性WKAH系ラットにおいてHAM/TSPの疾患モデルとなるHAMラット病を樹立し既報した。本研究では、抗体陽性WKAH系ラットに発症したHAMラット病の神経病理学的及び分子生物学的検索を行い、同時にHAMラット病の末梢神経病変、免疫組織化学的検索及び脊髄病変の経時的所見についても検討した。

### 【材料及び方法】

- 1) HTLV-I感染ヒトT細胞株MT-2を以下の方法にて接種し、HTLV-I持続感染ラットを作製した。A群： $1 \times 10^7$ 個を7系統の成熟ラットに2回静脈内に接種した。B群： $1 \times 10^7$ 個を2系統の成熟ラットに2回腹腔内に接種した。C群： $1 \times 10^7$ 個をWKAH系成熟ラットに腹腔内に接種した。D群： $1 \times 10^8$ 個をWKAH系成熟ラットに腹腔内に接種した。E群： $1 \times 10^7$ 個をWKAH系新生仔ラットに腹腔内に接種した。
- 2) 血清及び髄液中の抗HTLV-I抗体価はゼラチン凝集法を用いて測定した。
- 3) HTLV-Iプロウイルスゲノムの検出は、末梢リンパ球及び脊髄から抽出したDNAを鋳型とし、HTLV-IのpX領域のプライマー及びプローブ用いたPCR法にて行った。
- 4) 病理組織学的検索には、HE染色、KB染色及びToluidine-blue染色などを行い、また免疫組織化学的検索は各種の一次抗体を用いてABC法により行った。
- 5) apoptosisの検索は、パラフィン包埋切片上で核のDNA断片化を検出するTUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) 法を用いた。

### 【結果】

- 1) HTLV-I持続感染の確認：末梢リンパ球から抽出したDNAを用い、PCR法にて感染成立を確認した。A～D群は抗体陽性、E群は抗体陰性の持続感染系となった。
- 2) 抗体陽性群におけるHAMラット病の発症：A及びB群；WKAH系ラットに限り5頭中3頭に約16カ月の潜伏期を経て後肢対麻痺が出現し、5頭全てに脊髄病変を確認した。

髄液中の抗体は陰性であった。C群；接種後14～16ヵ月齢の3頭中3頭に脊髄病変を確認した。D群；接種後15ヵ月齢の2頭に後肢対麻痺が出現し、計5頭に脊髄病変を確認した。

3) 抗体陽性HAMラット病の神経病理学的所見：胸髄前・側索周辺帯を主体とする左右対称性の脱髄、空胞変性、グリオーシス及びミエリンを貪食するマクロファージ浸潤を認め、リンパ球浸潤は存在しなかった。坐骨神経や神経根には有髄線維の減少、脱髄、髄鞘再生及びマクロファージ浸潤を認めた。

4) 免疫組織化学的所見：病変脊髄に、抗マクロファージ抗体陽性の多数のマクロファージ浸潤、抗GFAP抗体陽性の腫大したアストロサイト増生像を認めた。抗Pan T、CD4及びCD8抗体を用いた免疫染色においてTリンパ球浸潤は認められず、抗HTLV-Iコア、エンベロープ及びpX蛋白に反応するウイルス感染細胞は証明されなかった。

5) apoptosisの検索：核クロマチンの濃縮、核の断片化を呈する細胞を認め、TUNEL法にて前・側索の白質周辺帯を主体に存在するapoptosis像を確認した。

6) 脊髄におけるHTLV-Iプロウイルスゲノムの局在：抗体陽性HAMラット1/2頭、非発症系持続感染ラット2/2頭にプロウイルスゲノムが検出された。

7) 脊髄病変の経時的観察：E群における経時的な組織学的検索で、接種後12ヵ月齢に初めて限局性の初期病変像を確認した。発症に至るまでリンパ球浸潤は認められなかった。

#### 【考案及び結語】

1) 7系統の抗体陽性持続感染ラットの中で、WKAH系ラットに限りHAMラット病の発症を認めた事より、発症に宿主の遺伝的背景の関与が示唆された。

2) 抗体陽性HAMラット病の神経病理学的所見は、胸髄を主体とした脱髄、空胞変性、グリオーシス及びマクロファージ浸潤であった。末梢神経にも同様の病変を認めた。

3) 血清中の抗体の有無を問わず発症し、髄液中の抗体は陰性であり、全経過を通じてリンパ球浸潤は認められなかった事より、ヒトHAM/TSPと比較してエフェクターT細胞による免疫学的脱髄機序の関与は乏しいと考えられた。

4) 脊髄でのウイルスの存在のみでは発症に至らず、恒常的なウイルスの存在は必要条件でない可能性が示唆された。発症機序に関しては、マクロファージなどから放出されるTNF $\alpha$ に代表されるサイトカインや、apoptosis誘導によるオリゴデンドロサイトの障害などの関与の可能性が想定された。

以上の結果、HAMラット病は、ヒトHAM/TSPの病態解明、予防及び治療を検討するための有用な疾患モデルであると考えられた。

以上より、本研究は博士（医学）の学位論文として妥当なものと判断される。