

学 位 論 文 題 名

無症候性 HTLV-I キャリアにおける
EB ウイルス特異的免疫能の解析

学位論文内容の要旨

【はじめに】

Human T-cell leukemia virus type1 (HTLV-I) はヒトで最初に同定されたレトロウイルスであり、成人T細胞白血病 (ATL) の成因に密接に関連することが知られている。ATLを発症するHTLV-Iキャリアの多くは母児感染によると考えられ、感染後数十年の潜伏期が存在する。ATL患者では再刺激抗原への不応答や日和見感染の発症等から免疫抑制状態にあることが示されているが、発症前の無症候キャリア期においても幾つかの免疫異常が観察されており、この免疫能低下はATL発症に至る過程での重要な危険要因と考えられる。

一方、Epstein-Barrウイルス (EBV) は、発癌活性を秘めつつヒトに広く浸淫しているヘルペスウイルスである。EBVの持つヒト癌原性は通常、EBV特異的細胞傷害性T細胞 (EBV-CTL) を主体とする宿主免疫防御機構により制御されている。しかし、諸種免疫抑制患者では、免疫能の不全・変調の程度に応じたEBV再活性化が容易に生じてくる。即ち、宿主免疫能全般の機能不全状態が、EBV特異的細胞性免疫能の低下あるいはEBV特異血清抗体像の異常としてよく反映される。

以上に基つき、本研究は無症候性HTLV-IキャリアにEBV学的検索を施行することにより、その免疫能の全体像を明らかにすることを目的とした。併せて、免疫抑制因子を負荷することにより、キャリアにおける潜在的免疫機能不全の存在を試験管内に検索した。

【対象と方法】

1. 対象

HTLV-I抗体陽性で、遺伝子増幅法 (PCR) により末梢血リンパ球中にプロウイルスDNAが検出された無症候性HTLV-Iキャリア43例 (年齢18-63歳) を対象とした。これらキャリアでは血球計数検査、生化学検査所見上の異常は認められていない。対照は、HTLV-I非感染健康人10例 (年齢22-61歳) である。

2. 血清学的検索

EBVキャプシド抗原 (VCA) IgG, 早期抗原 (EA) IgG抗体価は蛍光抗体間接法にて、EBV特異核内抗原 (EBNA) IgG抗体価は蛍光抗体補体法にて測定した。HTLV-I Tax抗体、可溶性

IL-2レセプター (sIL-2R) 測定はELISA法によった。

3. EBV特異的細胞性免疫能 (EBV-CTL活性) 測定

被験者末梢血リンパ球にEBVを試験管内接種し培養, EBV感染Bリンパ球を認識して培養中に活性化されてくるEBV-CTLにより, Bリンパ球トランスフォーメーションが阻害される頻度をEBV-CTL活性の指標とするregression assayを用いた。結果はReed-Muench式により算出した, 50%の頻度でEBVトランスフォーメーションを阻止するのに必要な最少リンパ球濃度

(regression index, RI: $\times 10^4/\text{ml}$) で表わした。また本法を実施する際, 培養中に免疫抑制作用を有する4-deoxyphorbol ester (4-DPE) を微量添加, これによるEBV-CTL活性の変化を観察することで, キャリアと健常人での免疫抑制負荷に対する感受性の差異を検討した。

4. 有意差検定

Mann-Whitney U testおよびKruskal-Wallis testにより検定した。

【結 果】

1. EBV特異血清抗体価

HTLV-Iキャリア, 健常人対照とも全員がVCAIgG陽性 (EBV既感染) であった。VCA IgG抗体価の幾何平均値は, キャリアで869.3, 健常人対照で343.0と, 前者で有意な高値を示した ($P<0.05$)。またEBNA IgG抗体価はキャリアで65.9であったのに対し, 健常人対照は197.0と, キャリアで有意な低値 ($P<0.05$) を示し, HTLV-IキャリアでのEBV再活性化ならびにEBV特異的細胞性免疫能の低下が示唆された。EAIgG抗体は陽性率, 抗体価とも両方で差を認めなかった。

2. EBV特異的細胞性免疫能

健常人対照のEBV-CTL活性 (RI) が 4.8 ± 2.4 (平均値 $\pm$ SD) であったのに対し, キャリアでは 21.0 ± 45.5 とCTL活性の低下を示した。結果を個々のキャリアについて見ると, 対照とほぼ同等のCTL活性を保持する者も見られたが, 活性が全く検出されない例 ($\text{RI} \geq 160.0$) が4例, 健常人対照より低活性値 ($160.0 > \text{RI} > 10.0$) を示した例が5例認められた。

3. EBV関連検索によるHTLV-Iキャリアの免疫学的分類

無症候性HTLV-Iキャリア43例は, 血清EBV抗体価とEBV-CTL活性がともに異常を示した群 (I群) 9例 (20.9%), CTL活性は正常域にあるが血清抗体価の異常を示した群 (II群) 23例 (53.5%), および両者ともに正常範囲内であった群 (III群) 11例 (25.6%) の3群に分類された。各群でのHTLV-I Tax抗体陽性率は, III群の18.2%に比し, I群で44.4%, II群では56.5%と高率であり ($P<0.05$), キャリア免疫能異常へのHTLV-I感染活動性の関与が示唆された。血清sIL-2R濃度ではキャリア各群と健常人対照群の間に有意差は見られず, 上記免疫異常に対するsIL-2Rの影響は低いものと考えられた。なお, 宿主免疫能に影響を及ぼしうる他のウイルス—サイトメガロウイルス, 単純ヘルペスウイルス1型, 水痘帯状疱疹ウイルス, B型およびC型肝炎ウイルス—の感染頻度は, キャリア3群間に有意な差を認めなかった。

4. HTLV-Iキャリアにおける細胞性免疫能低下の潜在

EBV-CTL活性が正常域にあったII群およびIII群のHTLV-Iキャリアについて, 健常人対照で

は影響がみられない低濃度（0.8ng/ml）の免疫抑制物質4DPE存在下にregression assayを行ったところ、CTL活性の著明な低下を来す例が認められた。

【考 察】

検討した無症候性HTLV-Iキャリアの70%以上がVCAIgG高値、ないしはEBNAIgG低値というEBV血清抗体異常を呈し、キャリアの大半が既に何らかの免疫抑制状態にあることが窺われた。さらに、約20%の例では抗体異常に加え、明らかなEBV-CTL活性の低下を示したことは、キャリア免疫能不全の段階的進展を示唆している。HTLV-Iはin vivoでCD4⁺T細胞以外のCD8⁺T細胞、B細胞、単球・マクロファージにも感染することが知られ、事実、無症候性キャリア末梢血CD4⁺T細胞の0.16 - 6.8%、CD8⁺T細胞の0.02 - 2.2%がHTLV-Iに感染している。このHTLV-I感染T細胞頻度は、本研究結果より概算される健常人末梢T細胞中のEBV-CTL前駆細胞頻度の0.015 - 0.045%に比べてもはるかに高率であることから、上記HTLV-IキャリアでのEBV-CTL活性低下に対するHTLV-I感染の関与が考えられる。HTLV-I感染に起因するCTL活性抑制作用が、アロ抗原特異的CTLへのin vitro感染実験で示されていること、また今回の検索でEBV学的マーカーの異常とHTLV-I Tax抗体陽性率に有意な相関が認められた結果も、この可能性を支持している。したがって、キャリアの細胞性免疫能全般が、体内のHTLV-I感染T細胞量に比例して低下するものと推察される。

HTLV-I感染に関連すると考えられる免疫機能不全は、一見正常な免疫能を示した無症候性キャリアにも潜在することが、EBV-CTL活性測定系への4DPE負荷実験により明らかとなった。本物質はCTLに対する直接的抑制作用を有するとともに、HTLV-I感染T細胞において著しいウイルス発現増強に働くことが示されており、HTLV-Iの免疫抑制性envelope糖蛋白であるgp21を含むHTLV-I蛋白産生とウイルス増殖の促進を介して、潜在する免疫機能不全を顕在化させた可能性が考えられる。

【結 論】

EBV特異血清抗体像、EBV-CTL活性を指標とする免疫学的評価により、一般臨床検査上で異常を認めない無症候性HTLV-Iキャリアに、既に多様な免疫機能不全の存在することが明らかとなった。HTLV-I感染に起因すると考えられるこのような段階的免疫抑制が、無症候キャリア期からATL発症に至る上での、重要な進展要因となっている可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 大 里 外 誉 郎
副 査 教 授 皆 川 知 紀
副 査 教 授 生 田 和 良

学 位 論 文 題 名

無症候性 HTLV-I キャリアにおける EB ウイルス特異的免疫能の解析

1. 研究目的

Human T-cell leukemia virus type1 (HTLV-I) は成人T細胞白血病(ATL)の成因に密接に関連している。ATL患者では再刺激抗原への不応答や日和見感染の発症等、免疫抑制状態にあるが、発症前の無症候キャリア期においても幾つかの免疫異常が観察されており、この免疫能低下がATL発症に至る過程での重要な危険要因と考えられる。一方、Epstein-Barrウイルス(EBV)の持つヒト癌原性は通常、EBV特異的細胞傷害性T細胞(EBV-CTL)を主体とする宿主免疫防御機構により制御されている。しかし、諸種免疫抑制患者では、免疫能の不全・変調の程度に応じたEBV再活性化が容易に生じてくる。即ち、宿主免疫能全般の機能不全状態が、EBV特異的細胞性免疫能の低下あるいはEBV特異血清抗体像の異常としてよく反映される。以上に基づき、本研究は無症候性HTLV-IキャリアにEBV学的検索を施行することにより、その免疫能の全体像を明らかにすることを目的とした。

2. 対象と方法

対象は血球計数検査、生化学検査所見上の異常は認められない無症候性HTLV-Iキャリア43例(年齢18-63歳)である。HTLV-I非感染健常人10例(年齢22-61歳)を対照とした。EBV特異血清抗体価は蛍光抗体法にて、HTLV-I Tax抗体はELISA法にて測定した。EBV特異的細胞性免疫能(EBV-CTL活性)測定には被験者末梢血リンパ球にEBVを試験管内接種し培養、50%の頻度でBリンパ球トランスフォーメーションを阻止するのに必要な最少リンパ球濃度($\times 10^4$) (regression index:RI)を指標とするregression assayを用いた。また培養中に免疫抑制作用を有する4-deoxyphorbol ester (4-DPE)を微量添加、キャリアと健常人での免疫抑制負荷に対する感受性の差異を検討した。有意差検定はMann-Whitney U testおよびKruskal-Wallis testにより行い、 $P<0.05$ を有意と判定した。

3. 結 果

<EBV特異血清抗体価> VCAIgG抗体価の幾何平均値は、キャリアで869.3、健常人対照で

343.0と、前者で有意な高値を示した。またEBNAIgG抗体価はキャリアで65.9であったのに対し、健常人対照は197.0と、キャリアで有意に低値であり、HTLV-IキャリアでのEBV再活性化ならびにEBV特異的細胞性免疫能の低下が示唆された。

＜EBV特異的細胞性免疫能＞ 健常人対照のEBV-CTL活性（RI）が 4.8 ± 2.4 （平均値 $\pm$ SD）であったのに対し、キャリア群では 21.0 ± 45.5 とCTL活性の低下を示した。個々のキャリアでは、対照とはほぼ同等のCTL活性を保持する者も見られたが、活性が全く検出されない例（ $RI \geq 160.0$ ）が4例、健常人対照より低活性値（ $160.0 > RI > 10.0$ ）を示した例が5例認められた。

＜EBV関連検索によるHTLV-Iキャリアの免疫学的分類＞ 無症候性HTLV-Iキャリア43例は、血清EBV抗体価とEBV-CTL活性がともに異常を示した群（I群）9例（20.9%）、CTL活性は正常域にあるが血清抗体価の異常を示した群（II群）23例（53.5%）、および両者ともに正常範囲内であった群（III群）11例（25.6%）の3群に分類された。各群でのHTLV-I Tax抗体陽性率は、III群の18.2%に比し、I群で44.4%、II群では56.5%と高率であり（ $P < 0.05$ ）、キャリア免疫能異常へのHTLV-I感染活動性の関与が示唆された。EBV-CTL活性が正常なII群およびIII群のHTLV-Iキャリアについて、健常人対照では影響がみられない低濃度（0.8ng/ml）の免疫抑制物質4-DPE存在下で、CTL活性の著明な低下を来す例が認められた。

4. 考 察

検討した無症候性HTLV-Iキャリアの70%以上がEBV血清抗体異常を呈し、既に何らかの免疫抑制状態にあることが窺われた。さらに、約20%の例では抗体異常に加え、明らかなEBV-CTL活性の低下を示したことは、キャリア免疫能不全の段階的進展を示唆している。無症候性キャリアでは末梢血CD4⁺T細胞の0.16 - 6.8%、CD8⁺T細胞の0.02 - 2.2%がHTLV-Iに感染している。このHTLV-I感染T細胞頻度は、本研究結果より概算される健常人末梢T細胞中のEBV-CTL前駆細胞頻度の0.015 - 0.045%に比べてもはるかに高率であることから、上記HTLV-IキャリアでのEBV-CTL活性低下に対するHTLV-I感染の関与が考えられる。EBV学的マーカーの異常とHTLV-I Tax抗体陽性率に有意な相関が認められた結果も、この可能性を支持している。従って、キャリアの細胞性免疫能全般が、体内のHTLV-I感染T細胞量に比例して低下するものと推察される。さらにEBV-CTL活性測定系への4-DPE負荷実験により、HTLV-I感染に関連すると考えられる免疫機能不全が、一見正常な免疫能を示した無症候性キャリアにも潜在することが示された。

5. 結 語

EBV特異血清抗体像、EBV-CTL活性を指標とする免疫学的評価により、一般臨床検査上で異常を認めない無症候性HTLV-Iキャリアに、既に多様な免疫機能不全の存在することが明らかとなった。HTLV-I感染に起因すると考えられるこのような段階的免疫抑制が、無症候キャリア期からATL発症に至る上での、重要な進展要因となっている可能性がある」と結論した。

なお試問において、質問に対する学位申請者の返答は概ね適切であった。また、副査の皆川・生田両教授により詳細な論文審査ならびに指導を受けた。以上の通り、無症候性HTLV-IキャリアにおけるEBウイルス特異的免疫能を多数例について検討し、的確な分析により免疫機能不全の多様性を初めて明らかにしたことは学位授与に相当するものであると判定した。