ヒトTリンパ球向性ウイルスI型 (HTLV-I) キャリアーに みられるぶどう膜炎-第3報 分子生物学的研究-

11久留米大学医学部眼科学教室, 20東京大学医科学研究所病理学研究部 30宮田眼科病院, 40熊本大学医学部附属病院内科学教室

要 約

ヒト T リンパ球向性ウイルス I 型(HTLV-I)キャリアーに見られる原因不明のぶどう膜炎(HTLV-I uveitis)の発病における HTLV-I の関与を解析するために HTLV-I uveitis 患者 9 例とキャリアーで他の特定の原因診断がついたぶどう膜炎患者 3 例の房水浸出細胞について、感染細胞の有無を PCR 法を用いて検索した。その結果、HTLV-I uveitis 患者 9 例全例で HTLV-I プロウイルス DNA が検出されたのに対し、他のぶどう膜炎と診断された 3 例中 2 例は検出されなかった。以上の結果から、病変局所には HTLV-I uveitis で特異的に感染細胞が存在しており、これらがこの疾患の発症あるいは病像形成に積極的に関与している可能性が示唆された。(日眼会誌 97:741—746、1993)

キーワード:ヒト T リンパ球向性ウイルス I 型, ぶどう膜炎, polymerase chain reaction (PCR) 法, プロウイルス DNA

Uveitis in Human T-lymphotropic Virus Type I (HTLV-I) Carriers
—3. A molecular biological study—

Shunsuke Nakashima¹⁾, Makoto Shirao¹⁾, Manabu Mochizuki¹⁾, Toshiki Watanabe²⁾, Shigeo Mori²⁾, Shinji Araki³⁾, Norio Miyata³⁾, Kazunari Yamaguchi⁴⁾ and Kiyoshi Takatsuki⁴⁾

1)Department of Ophthalmology, Kurume University School of Medicine
2)Department of Pathology, The Institute of Medical Science, University of Tokyo
3)Miyata Eye Hospital 4)Department of Internal Medicine, Kumamoto University Medical School

Abstract

The presence of proviral DNA of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) in the inflammatory cells in the aqueous humor was examined by polymerase chain reaction. The proviral DNA was detected in all the tested patients (n=9) with HTLV-I uveitis. On the other hand, the provirus was not detected in 2 out of 3 HTLV-I seropositive patients with other types of uveitis, i.e., Behçet's disease, toxoplasmosis and Vogt-Koyanagi-Harada's disease. None of the 11 seronegative patients with other types of uveitis or senile cataract had proviral DNA in the aqueous humor. Thus,

別刷請求先:830 久留米市旭町 67 久留米大学医学部眼科学教室 望月 學

(平成4年7月20日受付,平成5年2月15日改訂受理)

Reprint request to: Manabu Mochizuki, M.D. Department of Ophthalmology, Kurume University School of Medicine. 67 Asahi-machi, Kurume 830, Japan

(Received July 20, 1992 and accepted in revised form February 15, 1993)

the foct that HTLV-I-infected cells were present in the aqueous humor of all HTLV-I uveitis patients suggests significant involvement of HTLV-I in the pathophysiology of the uveitis. (J Jpn Ophthalmol Soc 97:741—746, 1993)

Key words: Human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I), Uveitis, Polymerase chain reaction (PCR), Provirus DNA

I 緒 言

ヒトTリンパ球向性ウイルスI型(Human lymphotropic virus type I; HTLV-I) は, 西南部日 本,カリブ海沿岸地方,中部アフリカなどを流行地域 とするレトロウイルスである1)2)。このウイルスは、西 南日本に多発する成人 T 細胞性白血病 (adult T-cell leukemia: ATL) の原因ウイルスであることが明らか にされている3)。さらに、慢性の痙性脊椎麻痺(tropical spastic paraparesis; TSP/HTLV-I associated myelopathy; HAM) の原因ウイルスとしても注目さ れてきた4). ATL の発症頻度は感染者 1,000~2,000 人当り一人の割合と言われ、HAM/TSPでは、さらに 低いと考えられている5)6). したがって、大部分の感染 者は無症候性のキャリアーとして存在している.近年, HTLV-I 感染が ATL や HAM/TSP 以外に, 肺疾患 や関節炎などの疾患とも関連する可能性が議論されて いる7)~9), さらに、眼科領域においても、HTLV-I 感染 と眼病変の関連性については、ATL 患者に見られた 日和見感染によるサイトメガロウイルス (CMV) 感染 症や HAM/TSP 患者に見られた血管炎を主体にした ぶどう膜炎などが報告されている10)-12)。また, HTLV-I無症候性キャリアーの中にいわゆる原因不 明のぶどう膜炎を伴う症例も九州南部を中心に報告さ れ12)13), 注目されている.

我々は、HTLV-I 感染とぶどう膜炎発症との関連をさらに詳しく検討するために福岡県と宮崎県の二施設において臨床眼科的および疫学的な調査研究を行った。その結果、従来原因不明とされているぶどう膜炎患者の HTLV-I 抗体陽性率は、原因の明らかなぶどう膜炎やぶどう膜炎以外の眼疾患患者のそれに比べて統計的に有意に高く、特に成人若年者においてその傾向が顕著であることが明らかにされた140~160.これらのことから、これまで原因不明とされてきたぶどう膜炎の中に HTLV-I が病因として関与しているものが存在する可能性が示唆される.

今回, この HTLV-I 感染とぶどう膜炎発症との関連

を明らかにすることを目的とした解析の一段階として、HTLV-Iキャリアーに認められる原因不明のぶどう膜炎(HTLV-I uveitis)と診断された患者の炎症の現場に HTLV-I 感染細胞が存在するかどうかを房水中の浸出細胞を対象に、polymerase chain reaction (PCR) 法¹⁷⁾を用いて検索した結果を要約する.

II 対象と方法

1. 対象

抗 HTLV-I 抗体陽性で原因不明のぶどう膜炎 (HTLV-I uveitis)と診断された患者 9 例, 抗 HTLV-I 抗体陽性でぶどう膜炎があり、ベーチェット病、眼ト キソプラズマ症あるいはフォークト・小柳・原田病と 診断された患者各1例、HTLV-I 陰性対照として抗体 陰性のベーチェット病患者 4 例と白内障患者 7 例を対 象とした。これらの患者から前房水を採取するにあ たっては、十分に患者に説明をし、同意を得た後に、 手術室にて眼内手術と同様に消毒し手術用顕微鏡下に て, 27 G 針を用いて房水を 0.1~0.12 ml 採取した。な お白内障患者は,水晶体嚢外摘出手術時に,前嚢切開 前に房水を採取した.採取後は抗生物質軟膏を点入し, 以後一週間は, 抗生物質点眼を行った. 前房水採取に より眼内炎が増強した症例はなかった. 抗体測定には, particle agglutination assay (PA法)18)と enzymelinked immunosorbent assay (EIA 法)19)を用い、必 要に応じて western blot 法20)も用いた.

2. 試料

HTLV-I プロウイルスの陽性対照としては、ATL 腫瘍細胞および HTLV-I 感染 T 細胞株 MT-2(高知 医大三好勇夫教授より供与),陰性対照としては HTLV-I 非感染ヒト T リンパ球細胞株 CEM を用いた。これらの細胞株は、RPMI 1640/10% FCS で継代培養したものを用いた。患者試料は、あらかじめ informed consent を得た患者から、前房より注射針にて約 $100~\mu$ l の房水を採取し、直ちに凍結保存したものを使用した。

3. DNA の抽出

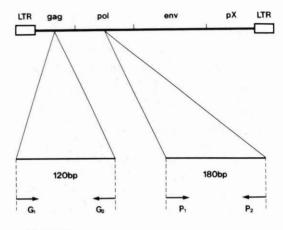
ATL 腫瘍細胞は患者末梢血から Ficol-Paque による比重遠心法で分画したものを用い、細胞株は必要に応じて増殖期の細胞を回収して用いた。これらの細胞ベレットを STE バッファー (100 mM NaCl, 10 mM Tris HCl, pH 8.0, 0.1 mM EDTA) に懸濁した後、SDS を 0.1% となるように加えて可溶化した。Proteinase K (200 μ g/ml)で蛋白を消化後、フェノール抽出、エタノール沈殿により高分子染色体 DNA を回収した。採取した患者房水は、15,000 rpm、5 分間の遠心により細胞を回収し、同様の操作を行ってDNA を抽出し、20 μ l の蒸留水に溶解してその一部をPCR の解析に用いた。なお、患者房水の試料は、DNAが微量のため定量は行わず、 β -actin ブライマーによる PCR によって DNA の存在を確認した。

4. PCR

用いたプライマーおよびプローブは、HTLV-Iの gag 領域 pol 領域に設定した。その塩基配列は以下の 通りであり、合成には cyclon plus DNA synthesizer (Milligen/Biosearch) を用いた. gag 領域は, G1; 5'-TTATGCAGACCATCCGGCTT-3'(1301~1320). G2:5'-GGTAGTGGTCGTCGATCTAT-3' (1401~1420), G3 (probe); 5'-AGACCTCCTGCAGTACCTTT-3'(1359~1368, 相 補鎖)であった。一方, pol領域は, P1;5% GTTTCACCCATTGCGGACAG-3' (4319~4338). P2;5'-CGTTCCGCTGTAATGGGTAA-3' (4479~4498), P3 (probe); 5'-TGAGGCTTCCAATATCCTGC-3'(4371~4390, 相 補鎖). 反応条件は、primer ; 1 μM deoxyribonucleotides; 20 µM MgCl₂; 1 mM Taq polymerase (Boehringer)2.5 U/reaction, バッファーは添付のも のを用いた. 反応は、50 µlの反応液で、denature 94℃1.5分, anneal 55℃2分, extension 70℃2分の サイクルを50回行った(図1).

5. PCR 産物の解析

PCR 産物は、1/5 の aliquot を、3 % NuSieve Agarose gel で電気泳動し、ethidium Bromide (EtBr) 染色およびサザンブロットハイブリダイゼーションで解析した。一部の例では、6 % polyacrylamide gel 電気泳動後 EtBr 染色を行い、electro blot 法を利用した。Membrane は、charged nylon membraue (biodyne B、pall) を用いた。プローブは γ -32P-ATP を用いて γ -3次端標識した internal oligomer を用い、ハイブリダ



(Primer)

- G: TTATGCAGACCATCCGGCTT(+) 1301-1320
- G2: TATCTAGCTGCTGGTGATGG(-) 1420-1401
- P1: GTTTCACCCATTGCGGACAG(+) 4319-4338
- P₂: AATGGGTAATGTCGCCTTGC(-) 4498-4479 (Probe)
 - G3: AGACCTCCTGCAGTACCTTT(+) 1359-1368
 - P3: TGAGGCTTCCAATATCCTGC(+) 4371-4390
- 図1 PCR に用いた primer, probe の位置と塩基配列.

イゼーション後の洗いは stringent condition $(55^{\circ}C, 2\times SSC)$ で行い、オートラジオグラフィーで解析した。

III 結 果

1. PCR の検出感度

DNA レベルでの希釈による検討では、ATL 細胞由来 DNA を CEM DNA 溶液を用いて 10^{-1} から 10^{-6} までの階段希釈系列検体 $(0.1\,\mu g/\mu l)$ を作成した。この検体 $5\,\mu g$ を鋳型 DNA とした PCR によりプロウイルス DNA の検出の有無を検討した。細胞レベルでの希釈による検討では、MT-2 を STE バッファーで希釈して、チューブ当りの細胞数が 2,500, 500, 50, 5 となる検体を作成して DNA を抽出し、その 1/4 を使用して PCR を行い、HTLV-I プロウイルス DNA の増幅を検討した。

これらの解析の結果、図 2 に示すように、DNA 希釈系列では 10^{-5} まで、すなわち反応液中に約 5 コピーのブロウイルス DNA が存在すれば確実に検出できることが示された。また、細胞の希釈では、MT-2 の細胞が 5 個存在するチューブからの DNA で検出できる場合と出来ない場合があり、これが検出限界であることが

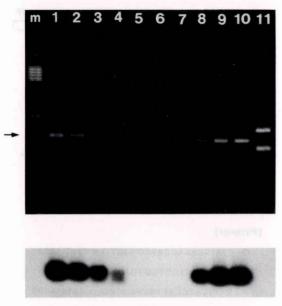


図2 PCRの感度検定.

gag 領域プライマーを用い、DNA 溶液、細胞からの希 釈系列の PCR を行い、アガロースゲル電気泳動後、サザンブロットハイブリダイゼーションを行った。 レーン m:サイズマーカー、レーン $1\sim6$:右から順に ATL 細胞由来 DNA $(0.1\,\mu\mathrm{g}/\mu\mathrm{l})$ を HTLV-I 非感染 細胞株 CEM DNA $(0.1\,\mu\mathrm{g}/\mu\mathrm{l})$ 溶液を用いて 10^{-1} から 10^{-6} まで段階希釈した溶液それぞれ $5\,\mu\mathrm{g}$ を反応させたもの、レーン $7\sim10$:MT-2 細胞を 5、50、500、2、500 個と調製し、その 1/4 を反応させたもの.

明らかになった。また、gag と pol のプライマーの検出 感度には有意な差が見られなかった。

これらの結果を総合すると、房水浸出細胞中に数個の感染細胞が存在すれば PCR により検出できることが明らかとなった。

2. 房水浸出細胞中の HTLV-I 感染細胞の検出

HTLV-I uveitis 9 例について解析した結果, gag および pol のプライマーを用いた PCR いずれかの場合でも7 例でプロウイルス DNA を検出することが出来た.一方のみのプライマーで検出された例があるため,全体をまとめると,9 例全例で gag, pol 両方あるいはどちらか一方の PCR でプロウイルス DNA の存在が確認されたことになる.図3に gag プライマーによる PCR の結果の一部を示す.HTLV-I キャリアーに見られたぶどう膜炎であっても,トキソプラズマ症,ベーチェット病および原田病の3名中,原田病の患者のサンプルはプロウイルス DNA が検出されたが,他の2 例では gag, pol いずれのプライマーを用いてもプロ

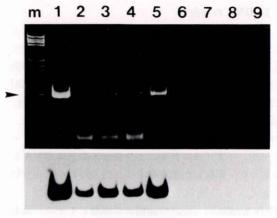


図3 検体の PCR.

レーン m: サイズマーカー, レーン 1:陽性対照, レーン 2~5: 房水 (HTLV-I uveitis), レーン 6, 7: 抗 HTLV-I 抗体 (+) トキソプラズマ症, ベー チェット病の房水, レーン 8: 陰性対照, レーン 9: DNA (-).

ウイルス DNA は検出されなかった。また、HTLV-I 抗体陰性の対照症例ではすべて PCR の結果は陰性で あった。これらの房水浸出細胞の解析結果をまとめる と、HTLV-I uveitis 患者に特異的に HTLV-I 感染細 胞が存在することが示されたことになる。

IV 考 按

HTLV-I 感染細胞が、ATL 以外にも多彩な病態に 関与していることが次第に明らかになってきている. これまで、HTLV-I感染と眼疾患との関連について は、幾つかの症例報告的な論文が発表されているが、 HTLV-I 感染と眼症状との因果関係を明確にするよ うな報告はなされていなかった。 今回我々は、一連の 血清疫学的および眼科的解析から、原因不明とされる ぶどう膜炎患者のグループに、HTLV-I 感染者が有意 に多いことを明らかにし、HTLV-I 感染とぶどう膜炎 の発症との疫学的相関関係を明確にした14)~16)。実際 に、HTLV-I 感染がぶどう膜炎の発症に関与するかど うか、また、その場合どのような発症機序が存在する のかを理解する上で, 患者におけるウイルス感染の状 況と病変局所におけるウイルスの有無および遺伝子の 発現状態についての知見は欠くことの出来ないもので ある。これらの点に関する解析の一環として、今回我々 は, 病変局所の浸出細胞中の HTLV-I 感染細胞の有無 をPCRを利用して検討した。その結果、我々が HTLV-I uveitis と呼んでいる HTLV-I キャリアーに

見られるぶどう膜炎患者に特異的にウイルス感染細胞 が病変部浸出細胞中に存在することを明らかにした. すなわち, 9例全例にウイルス感染細胞が病変部浸出 細胞中に存在し、一方、3症例ではあるが、HTLV-I キャリアーであっても他の原因のぶどう膜炎(ベー チェット病, 眼トキソプラズマ症, フォークト・小柳・ 原田病)の対照群では、3例中2例において、眼局所 にウイルス感染細胞が検出されなかった.このことは, ぶどう膜炎の発症あるいは病態形成に HTLV-I 感染 リンパ球が積極的に関与していることを示唆するもの であると考えられる. 無論, HTLV-I キャリアーで眼 内に炎症がある場合には, 破綻した眼血液関門を通っ て房水中へ末梢血中の HTLV-I 感染細胞が passive に侵入してくる可能性がある。今回のデータでも、対 照の HTLV-I キャリアーで原因の明らかなぶどう膜 炎3例中1例がPCRで陽性であったのは、このよう な機序によるものと考える. これについては, 今後, さらに対照の症例数を増やし検討する必要があるが. 現実にはこのような症例はまれであり、その上、患者 から informed consent が得られるものはさらに少な い. 現在, 我々は HTLV-I 感染細胞がどのようにぶど う膜炎の発症あるいは病態の形成に関与するのかを明 らかにするために、現在病変部におけるウイルス遺伝 子の発現の解析と患者生体内におけるウイルスの増殖 状態についての解析を進めている。 これらの解析結果 が明らかになれば、HTLV-I 感染によるぶどう膜炎発 症の機構を理解する上で重要な手がかりが得られるも のと考える.

文 献

- Hinuma Y, Komoda H, Chosa T, Kohakura M, Takenaka T, Kikuchi M, et al: Antibodies to adult T-cell leukemia virus-associated antigen (ATLA) in sera from patients with ATL and controls in Japan: a nation wide seroepidemiologic study. Int J Cancer 29: 631—635, 1982.
- Saxinger W, Blattner WA, Levine PH, Clark J, Biggar R, Hoh J, et al: Human T-cell leukemia virus (HTLV-I) antibodies in Africa. Science 225: 1473—1476, 1984.
- 3) Matsumoto M, Nomura K, Matsumoto T, Nishioka K, Hanada S, Furusho H, et al: Adult T-cell leukemia-lymphoma in Kagoshima district, southwestern Japan: Clinical and hematological characteristics. Jpn J Clin Oncol 9(Suppl): 325—336, 1979.

- 4) Osame M, Matsumoto M, Usuki K, Izumi S, Ijichi N, Amitani H, et al: Chronic progressive myelopathy associated with elevated antibodies to Human T-lymphotropic virus type I and adult T-cell leukemialike cell. Am Neural 21: 117—122, 1986.
- 5) Tajima K, Tominaga S, Suchi T, Kawagoe T, Komoda H, Hinuma, et al: Epidemiological analysis of the distribution of antibody to adult T-cell leukemia lymphoma-virus-associated antigen: Possible horizontal transmission of adult T-cell leukemia virus. Gann 73:831—901, 1982.
- 6) Yunoki K, Matsumoto M, Matsumoto T, Kikuchi H, Nomura K, Furusho H, et al: Adult T-cell leukemia in Kagoshima: Its clinical features and skin lesions, Gann Monograph on Cancer Research 28: 151—163, 1982.
- 7) 中嶋ゆう子: HAM. 肺病変 HTLV-I 型関節炎の 臨床. 最新医学 45: 201, 1990.
- 8) 佐藤和人,中嶋ゆう子,谷口敦夫,北島 勲,桧垣 恵,宮坂信行,他:HAM,肺病変 HTLV-I型関節 炎の概念と病理。最新医学 45:200-201,1990.
- 9) 森進一郎, 溝口 亮, 是枝快房, 丸山征郎, 納 光 弘: HAM 肺病変 HTLV-I 持続感染と関連した 気管支肺病変, 気管支肺胞洗浄液中リンパ球の免 疫学的検討. 最新医学 45:191—192, 1990.
- 10)樺山八千代,伊佐敷誠,上原文行,大庭紀雄,有馬直道:成人 T 細胞白血病における眼症状。臨眼42:139-141,1988.
- 11) 門田康子, 秋山嘉彦, 坂口依理子, 山下秀明:成人 T 細胞白血病患者に見た眼底病変. 眼臨 78:113, 1984.
- 12) Ohba N: Ophthalmological comprication of HTLV-I infections. In: E. Roman GC, et al (Eds): HTLV-I and the Nervous System. Neurology and neurobiology Vol. 51, Alan R. Liss, New York 451—455, 1989.
- 13) 松尾健治, 吉村浩一, 宮田典夫, 疋田直文, 吉岡久春: 抗 HTLV-I 抗体陽性患者にみられた網膜ぶどう膜炎。眼紀 41:764-770, 1990.
- 14) Mochizuki M, Watanabe T, Yamaguchi K, Takatsuki K, Yoshimura K, Shirao M, et al: HTLV-I uveitis: A distinct clinical entity caused by HTLV-I. Jpn J Cancer Res 83: 236 -239, 1992.
- 15) Mochizuki M, Watanabe T, Yamaguchi K, Yoshimura K, Shunsuke N, Shirao M, et al: Uveitis associated with human T-cell lymphotropic virus type I. Am J Ophthalmol 114: 123—129, 1992.
- 16) Mochizuki M, Yamaguchi K, Takatsuki K,

- Watanabe T, Mori S, Tajima K: HTLV-I and uveitis. Lancet 339: 2, 1992.
- 17) Ehrlich GD, Greenberg S, Abott MA: Detection of human T-cell lymphoma/leukemia viruses. In PCR Protocols. In: Innis MA, et al (Eds): PCR Protocols, Academic Press, San Diego, 325—336, 1990.
- 18) Ikeda M, Fujino R, Matsui T, Yoshida T, Komoda H, Imai J: A new agglutination test for serum antibodies to adult T-cell leukemia virus. Jpn J Cancer Res 75: 845—848, 1984.
- 19) Taguchi H, Sawada T, Fujita M, Morimoto T, Niiya K, Miyoshi I: Enzyme-linked immunosorbent assay of antibodies to adult T-cell leukemia associated antigens. Jpn J Cancer Res 74: 185—187, 1983.
- 20) Ohtsu T, Tsugane S, Tobanai K, Shimoyama M, Nanri S, Watanabe S: Prevalence of antibodies to human T-cell leukemia type I and human immunodeficiency virus in Japanese immigrant clones in Bolivia and Bolivian natives. Jpn J Cancer Res 78: 1347—1353, 1987.