シェーグレン症候群患者唾液腺からのレトロウイルスの検出

山 野 精 一

Detection of retrovirus in salivary glands of patients
with Sjögren's syndrome

Seiichi YAMANO

Abstract: Sjögren's syndrome (SS) is an autoimmune disease that is characterized by dryness of the mouth and eyes. The loss of salivary and lacrimal gland function is accompanied by lymphocytic infiltration. Because similar symptoms and glandular pathology are observed in certain persons infected with human immunodeficiency virus (HIV), a search was initiated for a possible retroviral etiology in this syndrome. To investigate the possibility of an immune response to retroviral antigens or that of detecting retrovirus in primary SS, I performed immunoblotting assay, immunohistochemical assay, polymerase chain reaction (PCR), and reverse transcriptase (RT) activity assay. Sera from 33% of 15 patients with SS reacted against p24 group specific antigen (*gag*) of HIV. Labial salivary gland biopsy specimens from 47% of the 15 patients with SS contained an epithelial cytoplasmic protein reactive with a monoclonal antibody to p24 of HIV. I performed PCR to detect HIV and human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) genes in salivary gland tissues and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with SS. I also detected Mn^{2+} dependent, Mg^{2+} independent RT activity in the salivary gland tissues in 3 of 10 patients with SS. Target genes for HIV and HTLV-I were not found in any of the salivary gland tissues or PBMC from patients with SS. These data suggested the presence of an unknown retrovirus similar to HIV in the salivary gland that may contribute to chronic inflammation in SS.

Key words: Sjögren's syndrome (シェーグレン症候群), retrovirus (レトロウイルス), HIV (ヒト免疫不全ウイルス), HTLV-I (成人 T 細胞白血病ウイルス), reverse transcriptase (逆転写酵素)

緒 言

シェーグレン症候群 (SS) は、眼や口腔の乾燥症状を主徴とする疾患で、その病変が涙腺、唾液腺を始めとする外分泌腺に主として起こり、腺組織にリンパ球を主体とした細胞浸潤を示すこと¹⁻³⁾やリウマチ因

子、抗核抗体などのポリクローナルな自己抗体⁴⁻⁶⁾が検出されることから自己免疫疾患の一つとされている^{7,8)}。従来より、本疾患は遺伝的素因のほかに微生物などの環境的要因が発症に関与すると推察されており、なかでもウイルス感染が SS の病態を形成するのではないかとする状況証拠は数多く報告されてきた。レトロウイルスは RNA を遺伝子としてもち、RNA 依存性 DNA 合成酵素 (逆転写酵素, reverse transcriptase) をもつウイルスの総称である。現在レトロウイルスは、oncogenic virus, lenti virus, spuma virus の 3 つの亜科に分類されている。そのうち、oncogenic virus は腫瘍ウイルスとして最初に

東京医科大学口腔外科学講座

(主任: 内田安信教授)

Department of Oral Surgery, Tokyo Medical College

(Chief: Prof. Yasunobu Uchida)

受付日: 平成 6 年 5 月 16 日

分離され、これまで主として細胞癌化の機構解明の研究の中心的な役割を担ってきた。ヒトへの感染性を示すウイルスとしては、human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I)⁹⁾や human immunodeficiency virus (HIV)¹⁰⁾があげられるが、これらのウイルスによる病態の形成機序には不明な点が多い。

近年、HIV や HTLV-I 感染者が SS 様の症状を示すという報告^{11~17)}や、SS 患者唾液腺から HIV に類似したウイルスが検出されたという報告^{18,19)}、SS 患者血清中に HIV に関連する抗 *gag* (p24) 抗体が存在するという報告²⁰⁾などと併せ、SS の発症にレトロウイルスによる関与が示唆されている。また、最近では HIV 感染者に認められる可溶性 CD 4 分子が SS 患者末梢血中にも増加しているという報告²¹⁾や SS 患者唾液腺から HTLV-I *tax* gene が検出されたという報告²²⁾もあり、レトロウイルスによる直接的、間接的な本疾患の発症が考えられているが、日常の臨床でみられる SS 患者には HTLV-I、HIV 感染者は少なく、これらに類似したウイルスによる発症機序が示唆されている。

これらのことから、著者は、SS 患者唾液腺生検材料および末梢血を用いて、既知のレトロウイルスである HIV ならびに HTLV-I の検出を試み、更にレトロウイルスに特有な逆転写酵素活性について検索を行い、未知のレトロウイルスの関与の可能性を検討した。

材料および方法

1. 対象

今回の検索に用いた SS 患者は、他の合併症を認め

ず、Fox らが American Rheumatism Association (ARA) に提案した診断基準²³⁾、すなわち、

1) Schirmer テスト陽性で、かつ Rose bengal テストで角膜あるいは結膜に陽性所見を認めること

2) 口腔乾燥症状を呈し、無刺激もしくは刺激時において唾液分泌量の低下を認めること

3) 唾液腺組織にリンパ球の浸潤を認め、focus score ≥ 2 個 / 4 mm^2 であること

4) 血清中に自己抗体が存在すること

以上の4項目すべてを満たし、生検施行時までにステロイドや免疫抑制剤の投与を受けていないものとした。

2. 検索に用いた材料

一次性 SS 患者と診断された 15 名（女性 15 名、平均年齢 54.7 歳）の口唇小唾液腺生検時の材料を用いた。対照として SS や他の自己免疫疾患、血液疾患の既往のない剖検例より得た口唇小唾液腺材料 10 例を用いた。生検材料は、免疫組織染色に用いるものは 10 %ホルマリン液で固定後、パラフィン包埋し、DNA および RNA の抽出ならびに逆転写酵素活性の測定に用いるものは -80°C に凍結保存した。

また、SS 患者と健常者 10 名（女性 10 名、平均年齢 48.6 歳）より、肘静脈から採血分離した血清を用い、レトロウイルスに対する抗体を測定するまで -80°C に保存した。

3. 方法

1) ウエスタンブロット法

血清より NovapathTM HIV-1 Immunoblot (BIO-RAD 社) キットを用いて、指定の方法に従って HIV に対する抗体の検索を行った^{24,25)} (図 1)。

陽性コントロールとして、HIV 感染者の血清を用

図 1 ウエスタンブロット法の手順

図 2 SAB 法の手順

図3 HTLV-1, HIV-1の遺伝子構造および産生タンパク

いた。

2) 免疫組織染色法

組織片は4 μ m 切片を作製し、HIVのgagタンパクであるp24 (主要内部殻タンパク) に対するモノクローナル抗体MAB880-A (CHEMICON 社) を用い、streptoavidin-biotin (SAB) 法²⁶⁾にて免疫組織染色を行い、唾液腺組織局所におけるレトロウイルスの局在を検索した (図2)。

陽性コントロールとして、HIV 感受性細胞株であるCEM細胞に、HIV を感染させたものを用いた。

3) Polymerase chain reaction (PCR) 法

生検材料を溶解緩衝液 (100mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH8.0, 25mM EDTA, 0.5% SDS, 10mg/ml RNase, 1mg/ml proteinase K) に入れ、37℃で一昼夜、約16時間反応させた後、フェノール/クロロホルムでDNAを分離精製し、エタノール沈澱、乾燥後、滅菌蒸留水に溶解した^{27,28)}。DNA溶液を核酸分析プログラム内蔵の分光光度計 (DU65, BECK-

MAN 社) により260nmの吸光度で測定、定量し、その1 μ g をPCR に用いた。

また、RNAの抽出は、生検材料を Chomczynski ら^{29,30)}の方法に従い、200 μ l の solution D [guanidium thiocyanate, 25mM sodium citrate pH7.0, 0.1M 2-mercaptoethanol, 0.1% sarcosyl, diethyl pyrocarbonate-treated water (DEPC-W)] を加え、22gage デイスポーサブル注射針 (テルモ社製) を用いて40—50回通過させ、DNAを切断した後、フェノール200 μ l、クロロホルム/イソミルアルコール (49:1 vol/vol) 20 μ l, 2M 酢酸ナトリウム40 μ l, を加え、水中に放置した。4℃, 15000 $\times$ g, 20分間遠心して上清を回収した後、その上清と等量のイソプロピルアルコールを加え、-20℃で一昼夜放置した。次いで、4℃, 15000 $\times$ g, 20分間遠心して沈澱を得た後、solution Dを60 μ l、イソプロピルアルコールを200 μ l加え、-20℃, 1時間放置した。さらに4℃, 15000 $\times$ g, 20分間遠心して沈澱を得た後、75%エタノールで洗浄し、4℃, 15000 $\times$ g, 10分間遠心した後、乾燥させDEPC-Wに溶解した。DNA溶液を核酸分析プログラム内蔵の分光光度計 (DU-65, BECKMAN 社) により260nmの吸光度で測定、定量し、その10ngをreverse transcriptase (RT)-PCRに用いた。

RT-PCRのための第一段階のcomplementary DNA (cDNA) の合成は10ngのRNAを用い、65℃, 5分間加熱した後、水中に5分間静置し、これにcDNA反応溶液として、ribonuclease inhibitor (宝酒造社製)、10倍濃度のPCR buffer (50mM KCl, 10mM Tris pH8.4, gelatin 200mg/ml), dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; Pharmacia 社) 200mM, 10倍濃度のhexanucleotide mixture (Boehringer Mannheim 社), 0.1% diethiothreitol (Aldrich Chemical 社), Rous associated virus 2

HIV: gag (920bp fragment)

Forward: 5'-GTAATACCCATGTTTTTCAGC-3' (20mers)

Reverse: 5'-TGAGAGGGAGTTGTTGTGTC-3' (20mers)

LTR (533bp fragment)

Forward: 5'-AACTACACACCAGGGCCAGG-3' (20mers)

Reverse: 5'-ACACTGACTAAAAGGGTCTG-3' (20mers)

HTLV-I: LTR-gag (240bp fragment)

Forward: 5'-CCACCCCTTTCCCTTTCAT-3' (19mers)

Reverse: 5'-ATGAGCGGCCAGCCCCGGG-3' (20mers)

図4 HIV, HTLV-Iのprimer sequence

写真1 HIVのウエスタンブロット解析

由来の reverse transcriptase (RTase; 200units/ml, 宝酒造社製)を加え, 42℃, 30分間反応させた。その後, 94℃, 5分間加熱して, 反応を停止させた後, 水中で急冷した。得られたcDNAを用いてPCR反応を施行した³¹⁾。

PCRに用いたプライマーはオリゴ合成機(model 391 DNA Synthesizer PCR-MATE, Applied Biosystem社)で作製した。合成したプライマーは高速液体クロマトグラフィー(TOSOH社製)とカラムクロマトグラフィー(Sephadex G-50, Pharmacia社製)で精製した。今回著者がPCRを行うに際し, HIVはgag領域とlong terminal repeat (LTR)領域の2カ所に, HTLV-IはgagからLTRにまたがる領域にプライマーの塩基配列を設定した(図3, 4)。

Internal controlとしてヒトミトコンドリアのDisplacement (D) loop領域330bp³²⁾, β -globin325bp(宝酒造社)を検出するプライマーを用いた。

抽出したDNA 1 μ gに対し, 10倍濃度のPCR buffer (50mM KCl, 10mM Tris pH8.4), 2.5mM $MgCl_2$, 各プライマー 100pmol, dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 200mM, gelatin 200mg/ml, Taq polymerase (宝酒造社) 1unitを加え, 滅菌蒸留水で100 μ lになるよう調整した後, DNAサーマルサイクラー(perkin-Elmer Cetus社)で以下に示す温度の周期変化を与えた^{33,34)}。

HIV, HTLV-I共に, 前反応94℃5分間, 94℃1分間, 55℃1分間, 72℃1分間, 後反応72℃10分間の条件で行い, 増幅回を35回に設定した。

増幅されたPCR productの1/10量を用い, loading buffer (5mlグリセロール, 0.1ml 100mM EDTA, 0.04g ブロムフェノールブルー, 4.9ml 蒸留水) 1 μ lを加え, エチジウムブロマイドを含むTAE buffer (40mM Tris, 1mM EDTA, 氷酢酸, 蒸留水) 中で, サイズマーカー (pBR322 DNA-

A

B

写真2 SS患者抗体HIVp24抗体による免疫染色陽性例
A: $\times 100$ B: $\times 200$

MspI)と共にTAE bufferで濃度調整した4% NuSieve アガロースゲル(FMC Bio-Products社)で100V, 45分間, 電気泳動した。

陽性コントロールとして, HIV感受性細胞株であるCEM細胞に, HIVを感染させたものから, また, HTLV-I持続感染細胞株であるMT-4細胞から, それぞれ抽出したDNAを用いた。

4) 逆転写酵素(RT)活性の測定

生検材料をlysing buffer (10mM Tris-HCl pH8.0, 0.14M NaCl, 3mM $MgCl_2$, 0.1% Triton-X100, 1mM DTT, 2mM PMSF)に溶かし, 30分間振盪し, 37℃で10分間加温する。そして, 4℃, 12000 $\times$ g, 10分間遠心した後, 上清をタンパク定量キット(BIO-RAD社)で定量し, そのタンパク量10 μ gをRT活性の測定に用いた。

上清中のタンパクに対し, 40 μ lの反応液[10 μ g/ml Poly (A) $\cdot$ Oligo (dT)₁₈ mixture (Pharmacia社), 50mM Tris-HCl pH8.0, 0.1mM DTT, 20mM KCl, 0.5mM $MnCl_2$, 15% glycerol, 4 μ M cold dTTP, 15pmol [³H] $\cdot$ TTP (1.11MBq/mmol,

写真3 HIV遺伝子のPCR法による検索

写真4 HTLV-I 遺伝子のPCR法による検索

Amersham 社]] を加え、よく混和した後、37℃で1時間反応させた。そして20μlの0.2M EDTAを加えて反応を停止させた後、水中で急冷した。次にDE81 (Whatman 社) ろ紙に吸着させ、5%Na₂HPO₄で5回、蒸留水で2回洗浄し、100%エタノールで脱水、乾燥させた後、液体シンチレーションカウンターにてカウントした^{35,36)}。

なお、反応条件設定のため、Mn²⁺によっても測定できるHIV精製RTを用いて検討し、かつ、本試験における陽性コントロールとして用いた。また、SS患者唾液腺組織のRT反応のMn²⁺濃度は、本反応系で至適な0.5mMに決定した³⁷⁾。

結 果

1. ウエスタンブロット法による HIV 関連抗体の検索

ウエスタンブロット法によって、HIV感染者の血清 (positive control) からは、HIV タンパク p15, p18, p24, p32, gp41-43, p51, p55, p65, gp120, gp160 に対する抗体のバンドが認められた。SS患者血清からは、15例中5例 (33%) において、HIVp24 (gag) のみに対する抗体のバンドが認められた (写真1)。他のgagタンパクであるp15, p18, p55は検出されず、また、polタンパクであるp32, p51, p65, envタンパクであるgp41-43, gp120, gp160も認められなかった。健常者の血清 (normal control) からは、HIVに対する抗体のバンドは10例中いずれも認められなかった。

2. 唾液腺組織における HIVp24 抗原の検索

免疫組織染色によってSS患者唾液腺組織15例中7例 (47%) に、抗HIVp24抗体に陽性所見が認められた。陽性反応は、唾液腺導管上皮細胞や少数の単核球に見られた (写真2A, B)。SS患者血清のHIVのウエスタンブロットで、p24にのみ陽性のバンドが認められた5例の唾液腺組織からは、すべて陽性反応が見られた。また、健常者唾液腺組織10例からは、抗HIVp24抗体に対する陽性所見はいずれも認められなかった。

3. PCR 法による HIV, HTLV-I の検索

PCR法によって、SS患者唾液腺組織におけるHIV遺伝子の検索を行ったところ、15例全例、DNAからもRNAからも検出はされなかった (写真3)。陽性コントロールはgag領域 (920bp) とLTR領域 (533bp) に、internalコントロールも目的のサイズ (330bp) にバンドが認められた。また、HTLV-I遺伝子も同様に、SS患者15例全例、DNAからもRNAからも検出されなかった (写真4)。陽性コントロールはgagからLTRにまたがる領域 (240bp) のところに、internalコントロールもβ-globin (325bp) のところにバンドが認められている。健常者の唾液腺組織からも10例中全例、HIV, HTLV-I遺伝子は検出されなかった。

4. 唾液腺組織における RT 活性の測定

レトロウイルスに特有なRT活性を検索したところ、SS患者唾液腺組織において10例中3例 (30%) にRT活性が検出された (図5A)。このRT活性が検出できた3例においては、血清からのHIVウエスタンブロット、唾液腺組織における抗HIVp24抗体による免疫染色、共に陽性所見が認められている。なお、通常RT活性測定に適した濃度である5.0mM Mg²⁺をMn²⁺に置換して測定したところ、この活性は3例とも消失した (図5B)。また、健常者の唾液腺組織10例からは、RT活性は検出されなかった。

考 察

自己免疫疾患の一つであるSSの原因は不明であるが、免疫異常、遺伝的要因、性ホルモンなどの他に、何らかの環境要因が関与しているものと推測されている。環境要因の関与を考えさせる根拠として、第一に涙腺、唾液腺などの外界に接している臓器に病変が初発すること、第二に一卵性双生児での本症の一致率が低いこと、第三に伝染性単核症から移行して本疾患が発症することなどが理由にあげられる。

環境要因として最も考えられているのが、ウイルス

図5 逆転写酵素活性の測定 A: Mn^{2+} B: Mg^{2+}

感染である。ウイルス感染を介した本疾患発症のメカニズムには、まず一番目にウイルス感染により直接に過剰ないし、異常な免疫反応を誘導するという考えがある。HTLV-Iのつくるタンパクには、ウイルス転写の活性化を促すのみならず、一群のIL-2, IL-2レセプター α ³⁸⁾, *c-fos*³⁹⁾, GM-CSF⁴⁰⁾, MHC class I⁴¹⁾など細胞遺伝子の活性化を誘導する働きを有するとされている。二番目には感染したウイルスがヒトの自己抗原と共通の抗原性をもつ場合で、molecular mimicry (分子相同性)とよばれる現象がある。ウイルスの抗原が自己の抗原と共通する領域をもつために、ウイルス感染により産生された抗体、あるいは感作リンパ球が自己の抗原と交差反応を起こすことにより、組織破壊や自己抗体の産生が誘導されるという考えである。SS患者血清中にみられるSS-B (La)はHIVやfeline sarcoma virusとの共通のアミノ酸配列があり、その関連性が考えられている⁴²⁾。三番目にはウイルス感染を介して生体成分が変化を受け、あらたな抗原性が発現することも推察されている。ウイルス感染などによる抗原の変性、遊離により、本来腺組織には存在しない抗原が出現し、その抗原に対応した免疫応答の結果、本疾患のような病態を形成するのではないかと考えるもある。

そこで、今回著者は、SS患者におけるレトロウイルスの関与を検討する目的で、まずHIVに対する抗体の検索をウエスタンブロット法で行った。その結果、SS患者血清からは、15例中5例(33%)においてHIVp24 (*gag*)に対する抗体が検出された。他の*gag*タンパクであるp15, p18, p55に対する抗体は認めら

れず、また*pol*, *env*タンパクに対する抗体も検出されなかった。陽性コントロールのHIV感染患者血清では、*gag*, *pol*, *env*すべてのタンパクに対する抗体が検出された。これらのことから、抗HIVp24抗体に陽性のこれらの患者は、HIVに感染しているのではなく、p24と交差反応するようなHIVに類似した他のウイルス、もしくはp24に類似した自己抗原に反応し、このような抗体が検出されたものと考えられる。

Talalら²⁰⁾は、一次性SS患者47例中14例(30%)において、HIV-1p24 (*gag*)のみに対する血清抗体がウエスタンブロット法で検出され、そのうち2例は他の*gag*タンパクであるp17の抗体にも反応することを報告している。しかし、*pol*, *env*タンパクに対する抗体は、検出されなかったと報告している。この結果より、これらp24ならびにp17陽性のSS患者はHIV, HTLV-Iとは異なるレトロウイルスに免疫反応を起こし、抗HIVp24抗体が出現したものと推察している。Eguchiら⁴³⁾は、SS患者血清の33%においてHTLV-I抗体が検出されたと報告している。Ruchetonら⁴⁴⁾は、systemic lupus erythematosus (SLE)患者において、murine sarcoma virusのp30 (*gag*)タンパクに対する抗体がenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法で検出されたとし、またそれに加え、SLE患者血清中にHTLV-Iタンパクに対する抗体が検出されたという報告もある⁴⁵⁾。Southern hybridization法を用いた研究で、Graves病患者から摘出した甲状腺組織においてHIV*gag*配列が検出されたと報告されている⁴⁶⁾。

次に、SS患者血清中にHIVp24 (*gag*)抗体が存在

することより、病変局所である唾液腺組織における p24 抗原の局在を検討する目的で、抗 HIVp24 抗体を用いて免疫組織染色を行った結果、SS 患者 15 例中 7 例 (47%) において、唾液腺導管上皮細胞や少数の単核球に陽性所見が認められた。このことより、唾液腺組織局所に HIVp24 抗原が局在していることが示唆された。陽性患者 7 例は、すべてウエスタンブロット法においても HIVp24 抗体が検出されている。これは、血清中に存在する抗体は、組織局所に存在する p24 に対するものである可能性が推察される。

Shattles ら⁴⁷⁾は、human T-cell lymphotropic virus (HTLV) -related endogenous sequence (HRES) -1 と呼ばれているヒト内在性レトロウイルス配列が SS 患者の唾液腺上皮細胞に、過剰に発現しているのを認めたとし、また、一次性 SS 患者 39 例中のうち 31% の口唇唾液腺の上皮細胞において、HTLV-Igag タンパクである p19 抗原が免疫組織染色によって検出されたが、健常者コントロールでは検出されなかったとも報告している⁴⁸⁾。そして、この SS 患者から検出された p19 抗原は、HRES-1 とは異なる新しい内在性レトロウイルスの gag 配列である可能性を推察している。Banki ら⁴⁹⁾は、抗 HRES-1/p28 抗体は HTLV-Ip24 (gag) タンパクと交差反応することができ、SS 患者血清 19 例中 2 例 (10%) において、この抗体がウエスタンブロット法で検出されたと報告している。最近では、*in situ* hybridization 法と PCR 法を用いて、SS 患者 9 例中 2 例の口唇唾液腺上皮細胞と少数のリンパ球において、HTLV-I tax 遺伝子が検出されたが、gag, pol, env 遺伝子は検出されず、また患者血清中に HTLV-I 抗体は認められなかったという報告もある²²⁾。

現在知られているヒトレトロウイルスである HIV および HTLV-I の感染細胞は、CD 4 陽性細胞 (T 細胞、単球/マクロファージ) であるといわれている⁵⁰⁾、その他に HIV は中枢神経組織におけるミクログリア細胞に⁵¹⁾、HTLV-I は多発性筋炎の症例で筋線維に^{52,53)}、*in vitro* でウイルス粒子が腸細胞上皮膜に融合してこれらの細胞に感染することが報告されている⁵⁴⁾。このようにレトロウイルスが、上皮細胞に感染することが多数報告されていることから、今回著者の唾液腺組織局所における HIVp24 の局在の検索で、陽性所見のみられた導管上皮細胞や単核球にレトロウイルスが感染していることが推察される。

そして、この唾液腺組織局所に感染が示唆されている抗原が、レトロウイルスである HIV もしくは HTLV-I であるかどうかを検討する目的で、生検材料より抽出した DNA および RNA から PCR 法および RT-PCR 法で検索を行った。HIV は、p24 タンパクをコードしている gag 領域と LTR 領域の 2 カ所に、HTLV-I は gag から LTR をはさむ領域にプライマー

を設定し、増幅した。その結果、DNA および RNA からも HIV ならびに HTLV-I 遺伝子は検出されなかった。このことより、唾液腺組織局所に HIV および HTLV-I は感染しておらず、存在する抗原はこれらのものではないタンパクであり、HIVp24 と交差反応をしている可能性が示唆された。しかも、Marette ら²²⁾の SS 患者唾液腺組織から HTLV-I tax 遺伝子のみが検出された報告と、著者が検索をした gag から LTR にかけての領域が検出されなかったことを合わせると、LTR から遺伝子の翻訳が開始されるので、この tax は HTLV-I 由来のものではなく、未知のものであることが推察される。

今までの多数のレトロウイルスに関連する報告から、この p24 と交差反応して唾液腺組織局所に存在している抗原が、HIV ならびに HTLV-I 以外のレトロウイルスである可能性を検討する目的で、レトロウイルスに特有の逆転写酵素活性の検出を試みた。その結果、SS 患者 10 例中 3 例 (30%) の唾液腺組織において、逆転写酵素活性が検出された。この酵素は、2 価のイオンに依存性があり、今回の検索では Mn^{2+} イオンを入れたときに検出されたが、 Mg^{2+} イオンを入れたときにはこの活性が消失したことより、 Mn^{2+} 依存性のものであることが示唆された。HIV および HTLV-I の逆転写酵素活性は Mg^{2+} イオン依存性であり、今回検出された酵素活性はこれらのものとは異なるものであることが示唆された。活性が検出された SS 患者 3 例は、ウエスタンブロット法および免疫組織染色法においてもすべて陽性であった。これらのことより、逆転写酵素活性が検出された陽性 SS 患者 3 例においては、唾液腺組織局所に HIV に類似した未知のレトロウイルスが存在していることが推察された。

Garry ら¹³⁾は、SS 患者唾液腺 homogenate と混合培養した RH-9 T リンパ芽球株から、HIV に類似した intracisternal A-type retroviral particle が検出されたと報告している。これは、電子顕微鏡にてウイルス粒子を確認し、さらに Mn^{2+} 依存性の逆転写酵素活性を検出している。

数々の SS におけるレトロウイルス感染の状況証拠の他に、SS の動物モデルの報告がある⁵⁵⁾。HTLV-I tax 導入トランスジェニックマウスを作製し、唾液腺に注目し生後より詳細に調べたところ、生後数週間より導管上皮細胞の増殖が著明になり、その後リンパ球の浸潤と腺細胞の破壊が認められ、tax の発現も障害の程度に比例して増加すると報告している。これは、ヒトの SS に似た病像として注目されており、HTLV-I 感染が単に SS においてみられるのではなく、疾患の発症過程においてレトロウイルスが関与していることを示唆している。

レトロウイルスの他に SS と関連が示唆されているウイルスとして、Epstein-Barr virus (EBV) がある。

Fox ら⁵⁶⁾は、免疫組織学的検索を行い、SS 患者の唾液腺組織 14 例中 8 例 (57%) から EBV 早期抗原 (EA-D) を検出し、健常者からは検出できなかったとし、さらにサザンブロット法とスロットブロット法を用いて SS 患者耳下腺から EBV-DNA を検出している。また Saito ら²⁶⁾は、PCR 法により SS 患者の唾液腺組織より健常者と比較して高率に EBV-DNA を検出したことを報告している。Mariette ら⁵⁷⁾は、*in situ* hybridization 法および PCR 法を用いて、一次性 SS 患者の唾液腺上皮細胞において EBV-DNA を検出している。また最近では、肝炎ウイルスである Hepatitis C virus (HCV) と SS との関連もいわれている^{58,59)}。

ウイルス感染は、SS 患者にみられる上皮細胞において、human leukocyte antigen (HLA)-DR 抗原の発現⁶⁰⁾と接着分子の発現を引き起こすことが可能である。これは、通常は発現していない腺房や導管上皮細胞がレトロウイルスなどの感染によって、上皮細胞に HLA-DR 抗原が異常に発現し、これらの細胞が T リンパ球に抗原提示細胞として機能し、SS に特有であるリンパ球浸潤が誘導される可能性も推察される。

今回の著者の報告と数々のレトロウイルスに関連した報告から、未知のレトロウイルスが SS において何らかの関与している可能性が示唆されるが、このウイルスによる SS の病態発症は直接証明されておらず、今後このウイルスの分離、構造遺伝子配列およびその機能の解析について、詳細に検討していきたいと考えている。

結 語

1. SS 患者血清 15 例中 5 例 (33%) において、ウエスタンブロット法で HIVp24 (*gag*) のみに対する抗体が検出された。これは、HIV に感染したときに検出される抗体ではなく、HIV に類似した他のウイルスかもしくは自己の抗原に交差反応した抗体であることが示唆された。

2. SS 患者口唇唾液腺 15 例中 7 例 (47%) において、免疫組織染色によって HIVp24 (*gag*) 抗原が、導管上皮細胞や少数の単核球に検出された。これは、唾液腺組織局所に p24 抗原が存在し、これに対する抗体が血清中に検出されたことが推察された。

3. SS 患者唾液腺より抽出した DNA および RNA から PCR 法ならびに RT-PCR 法によって、HIV、HTLV-I 遺伝子は検出されなかった。このことより、唾液腺組織に局在した p24 抗原は、HIV でも HTLV-I でもない別のタンパクである可能性が示唆された。

4. SS 患者唾液腺 10 例中 3 例 (30%) において、レトロウイルスに特有である逆転写酵素活性が検出された。この活性は Mn^{2+} 依存性であるが、HIV ならび

に HTLV-I のものは Mg^{2+} であることより、唾液腺組織にはこれらとは異なる未知のレトロウイルスが存在する可能性が推察された。

以上の結果より、唾液腺組織局所に HIVp24 と交差反応する Mn^{2+} 依存性の逆転写酵素活性をもつ未知のレトロウイルスが存在し、SS の病態に何らかの関与をしていることが示唆された。

本論文の要旨は、第 46 回日本口腔科学会総会 (平成 4 年 4 月、名古屋)、第 36 回日本リウマチ学会総会 (平成 4 年 5 月、東京)、第 37 回日本口腔外科学会総会 (平成 4 年 11 月、横浜) において発表した。

稿を終えるに臨み、終始ご懇篤なるご指導とご校閲を賜りました恩師内田安信教授に深甚なる感謝の意を捧げます。また、本研究の遂行にあたり終始多大なるご指導とご教示をいただきました微生物学教室水野文雄教授、ルナール純子助教授ならびに東京医科歯科大学難治疾患研究所ウイルス・免疫疾患部門斎藤一郎助教授に心より感謝いたします。そして、ご教示とご校閲を賜りました成田令博教授に深謝いたしますとともに、ご理解ご尽力下さいました教職員各位に対して謝意を表します。

引 用 文 献

- 1) Fox, R.I., Howell, F.V., et al.: Primary Sjögren's syndrome: clinical and immunopathologic features. *Arthritis Rheum* 14: 77-105 1984.
- 2) Whaley, K., Williamson, J., et al.: Sjögren's syndrome. I. Sicca components. *Quarterly J Med* 42: 279-304 1965.
- 3) Strand, V. and Talal, N.: Advances in the diagnosis and concept of Sjögren's syndrome (autoimmune exocrinopathy). *Bull Rheum Dis* 30: 1046-1052 1980.
- 4) Diaz-Jouanen, E., Ruiz-Arguelles, G.L., et al.: From benign polyclonal to malignant monoclonal lymphoproliferation in a patient with primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 24: 850-835 1981.
- 5) Nagasaki, M., Morikawa, S. et al.: A novel EBV-related nucleocytoplasmic antigen in a null-cell line (HLN-STL-C) reactive to antibodies in the sera from patients with Sjögren's syndrome. *J Autoimmun* 2: 457-462 1989.
- 6) Inagaki, Y., Jinno, Y., et al.: Higher incidences of anti-SS-A/Ro and anti-SS-B/La autoantibodies in Japanese patients with autoimmune disorders-studies of antigens and antibodies using the immunoblotting method. *Arch Dermatol Res* 281: 89-94 1989.

- 7) Talal, N. and Bunim, J.J.: The development of malignant lymphoma in the course of Sjögren's syndrome. *Am J Med* 36: 529-540 1964.
- 8) Bloch, K., Buchanan, W., et al.: Sjögren's syndrome: a clinical, pathological and serological study of 62 cases. *Medicine* 44: 187-231 1965.
- 9) Yoshida, M., Miyoshi, I., et al.: Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 2031-2035 1982.
- 10) Popovic, M., Sarngadharan, M.G., et al.: Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retrovirus (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* 224: 497-500 1984.
- 11) Coudere, L.-J., d'Agay, M.F., et al.: Sicca complex and infection with human immunodeficiency virus. *Arch Intern Med* 147: 898-901 1987.
- 12) De Clerck, L.S., Couttenye, M.M., et al.: Acquired immunodeficiency syndrome mimicking Sjögren's syndrome and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 31: 272-275 1988.
- 13) Ulirsch, R.C. and Jaffee, E.S.: Sjögren's syndrome-like illness associated with the acquired immunodeficiency syndrome-related complex. *Hum Pathol* 18: 1063-1068 1987.
- 14) Schiødt, M., Greenspan, D., et al.: Parotid gland enlargement and xerostomia associated with labial sialadenitis in HIV infected patients. *J Autoimmun* 2: 415-426 1989.
- 15) Papadopoulos, G.K. and Moutsopoulos, H.M.: Slow virus and the immune system in the pathogenesis of local tissue damage in Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 51: 136-138 1992.
- 16) Itescu, S., Brancato, L.J., et al.: A sicca syndrome in HIV infection: association with HLA-DR 5 and CD 8 lymphocytosis. *Lancet* I: 468 1985.
- 17) Gessain, A., Barin, F., et al.: Antibodies to human T lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet* II: 407-411 1985.
- 18) Garry, R.F., Fermin, C.D., et al.: Detection of a human intracisternal A-type retroviral particle antigenically related to HIV. *Science* 250: 1127-1129 1990.
- 19) Talal, N., Hart, D.J., et al.: Sjögren's syndrome: detection of antibodies to retroviral proteins in patient sera and isolation of an A-type retrovirus following exposure of lymphoblastoid cells to patient biopsy material (abstract). *FASEB J* 4: A2102 1990.
- 20) Talal, N., Dauphinée, M.J., et al.: Detection of serum antibodies to retroviral proteins in patients with primary Sjögren's syndrome (autoimmune exocrinopathy). *Arthritis Rheum* 33: 774-781 1990.
- 21) Sawada, S., Sugai, S., et al.: Increased soluble CD 4 and decreased soluble CD 8 molecules in patients with Sjögren's syndrome. *Am J Med* 92: 134-140 1992.
- 22) Mariette, X., Agbalika, F., et al.: Detection of human T lymphotropic virus type I *tax* gene in salivary gland epithelium from two patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 36: 1423-1428 1993.
- 23) Fox, R.I., Robinson, C.A., et al.: Sjögren's syndrome: proposed criteria for classification. *Arthritis Rheum* 29: 577-585 1986.
- 24) Sarngadharan, M.G., Veronese, F., et al.: Immunological properties of HTLV-III antigens recognized by sera of patients with AIDS and AIDS-related complex and of asymptomatic carriers of HTLV-III infection. *Cancer Res* 45: 4574-4577 1985.
- 25) Groopman, J.E., Chen, F.W., et al.: Serological characterization of HIV infection in AIDS and related disorders. *J Infect Dis* 153: 736-742 1986.
- 26) Warnke, R., Levy, R., et al.: Detection of T and B cell antigens with hybridoma monoclonal antibodies: a biotin-avidin-horseradish peroxidase method. *J Histochem Cytochem* 28: 771-776 1980.
- 27) Saito, I., Servenius, B., et al.: Detection of Epstein-Barr virus DNA by polymerase chain reaction in blood and tissue biopsies from patients with Sjögren's syndrome. *J Exp Med* 169: 2191-2198 1989.
- 28) Saito, I., Nishimura, S., et al.: Detection of Epstein-Barr virus and human herpes virus type 6 in saliva from patients with lymphoproliferative diseases by polymerase chain reaction. *Arch Oral Biol* 36: 779-784 1991.

- 29) Chomczynski, P. and Sacchi, N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162 : 156-159 1987.
- 30) Rappolee, D.A., Wang, A., et al.: Novel method for studying mRNA phenotypes in single or small numbers of cells. *J Cell Biochem* 39 : 1-11 1989.
- 31) Chang, H.L., Zaroukian, M.H. et al.: T200 alternate exon use in murine lymphoid cells determined by reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Immunol* 143 : 315-321 1989.
- 32) Horai, S. and Hayasaka, K.: Intrasppecific nucleotide sequence differences in the major noncoding region of human mitochondrial DNA. *Am J Hum Genet* 46 : 828-842 1990.
- 33) Saiki, R.K., Bugawan, T.L., et al.: Analysis of enzymatically amplified β -globin and HLA-DQ α DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 324 : 163-166 1989.
- 34) Saiki, R.K., Gelfand, D.H., et al.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239 : 487-491 1988.
- 35) Davies, J.W. and Cocking, E.C.: Liquid scintillation counting of samples using glass fiber or filter paper discs. *Biochim biophys Acta* 115 : 511-513 1966.
- 36) Nozaki, J. and Atanasiu, P.: Etude comparative *in vitro* des antigènes rabiques et des virus apparentés à la rage, par la technique des lymphocytes sensibilisés. *Ann Microbiol* 127A: 429-438 1976.
- 37) Rey, M.A., Spire, B., et al.: Characterization of the RNA dependent DNA polymerase of a new human T lymphotropic retrovirus (lymphadenopathy associated virus). *Biochem Biophys Res Commun* 121 : 126-133 1984.
- 38) Inoue, J., Seiki, M., et al.: Induction of interleukin 2 receptor gene expression by p40X encoded by human T-cell leukemia virus type I. *EMBO J* 5 : 2883-2888 1986.
- 39) Fujii, M., Sassone-Corsi, P., et al.: C-fos promoter transactivation by the tax₁ protein of human T-cell leukemia virus type I. *Proc Natl Acad Sci USA* 85 : 8526-8530 1988.
- 40) Miyatake, S., Seiki, M., et al.: Activation of T cell derived lymphokine genes in T-cell and fibroblasts: effects of human T cell leukemia virus type I p40X protein and bovine papilloma virus encoded E2 protein. *Nucleic Acid Res* 16 : 6547-6566 1988.
- 41) Sawada, M., Suzumura, A., et al.: Human T-cell leukemia virus type I transactivator induces class I major histocompatibility complex antigen expression in glial cells. *J Virol* 64 : 4002-4006 1990.
- 42) Garry, R.F.: Extensive antigenic mimicry by retrovirus capsid proteins. *AIDS Res Hum Retroviruses* 6 : 12 1990.
- 43) Eguchi, K., Matsuoka, N., et al.: Primary Sjögren's syndrome with antibodies to HTLV-I: clinical and laboratory features. *Ann Rheum Dis* 51 : 769-776 1988.
- 44) Rucheton, M., Greatland, H., et al.: Presence of circulating antibodies against gag-gene MuLV protein in patients with autoimmune connective tissue disorders. *Virology* 144 : 468-480 1985.
- 45) Phillips, P.E., Johnston, S.L., et al.: High IgM antibody to human T-lymphotropic virus type I in SLE. *J Clin Immunol* 6 : 234-241 1986.
- 46) Ciampolillo, A., Marini, V., et al.: Retrovirus-like sequences in Graves'disease: implications for human autoimmunity. *Lancet* I: 1096-1100 1989.
- 47) Shattles, W.R., Venables, P.J.W., et al.: Detection of endogenous retroviral sequences in salivary gland epithelium in patients with Sjögren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 9 : 337 1991.
- 48) Shattles, W.G., Brookes, S.M., et al.: Expression of antigen reactive with a monoclonal antibody to HTLV-I p19 in salivary glands in Sjögren's syndrome. *Clin Exp Immunol* 89 : 46-51 1992.
- 49) Banki, K., Maceda, J., et al.: Human T-cell lymphotropic virus (HTLV) -related endogenous sequence, HRES-1, encodes a 28-kDa protein: a possible autoantigen for HTLV-I gag reactive autoantibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 : 1939-1943 1992.
- 50) Gallo, R.C., Mann, D., et al.: Human T-cell leukemia-lymphoma virus (HTLV) is in T but not B lymphocytes from a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 79 : 5680-5683 1982.

- 51) Koyanagi, Y., Miles, S., et al.: Dual infection of the central nervous system by AIDS virus with distinct cellular tropisms. *Science* 236 : 819-822 1987.
 - 52) Wiley, C.A., Nerenberg, M., et al.: HTLV-I polymyositis in a patient also infected with the human immunodeficiency virus. *N Engl J Med* 320 : 992-995 1989.
 - 53) Agbalika, F., Fardeau, M., et al.: Polymyositis mediated by HTLV-I infection may also be associated with T-lymphocytes expressing gamma/delta receptors (abstract). VIIIth International Conference on AIDS/IIIrd STD World Congress, Amsterdam, The Netherlands, 1992.
 - 54) Zacharopoulos, V.R., Perrotti, M.E., et al.: Lymphocyte-facilitated infection of epithelia by human T-cell lymphotropic virus type I. *J Virol* 66 : 4601-4605 1992.
 - 55) Green, J.E., Hinrichs, S.H., et al.: Exocrinopathy resembling Sjögren's syndrome in HTLV-I *tax* transgenic mice. *Nature* 341 : 72-74 1989.
 - 56) Fox, R.I., Pearson, G., et al.: Detection of Epstein-Barr virus associated antigens and DNA in salivary gland biopsies from patients with Sjögren's syndrome. *J Immunol* 137 : 3162-3168 1986.
 - 57) Mariette, X., Gozlan, J., et al.: Detection of Epstein-Barr virus DNA by in situ hybridization and polymerase chain reaction in salivary gland biopsy specimens from patients with Sjögren's syndrome. *Am J Med* 90 : 286-294 1991.
 - 58) Haddad, J., Deny, P., et al.: Lymphocytic sialadenitis of Sjögren's syndrome associated with chronic hepatitis C virus liver disease. *Lancet* I : 321-323 1992.
 - 59) Mariette, X., Zerbib, M., et al.: Hepatitis C virus and Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 36 : 280-281 1993.
 - 60) Dauphinée, M.J., Tovar, Z., et al: The expression and function of CD 3 and CD 5 in patients with primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 32 : 420-429 1989.
-