HTLV-1キャリアー血清中のプリン代謝酵素

坪井 泉¹⁾ 新宮 世三²⁾ 横山 三男¹⁾

1) 久留米大学医学部免疫学講座

2) 宮崎県立日南病院小児科

(昭和63年3月9日受付)

PURINE METABOLIC ENZYMES IN SERA OF HEALTHY HTLV-1 CARRIERS

Izumi Tsuboi*, Toshimitsu Shingu** and Mitchel M. Yokoyama*

*Department of Immunology, Kurume University School of Medicine

**Nichinan Hospital, Miyazaki

The purine metabolic enzymes; adenosine deaminase (ADA) and purine nucleoside phosphorylase (PNP) are known to be associated with lymphocyte differentiation. ADA isoenzyme (ADA1 and ADA2) and PNP activities were assayed in the sera of 22 healthy carriers with positive for anti-HTLV-1 antibody and 20 normal individuals. The results revealed that both ADA2 and PNP activities were significantly elevated in sera of healthy carriers ($p<0.001$) as compared with normal controls. No significant difference in ADA1 activity was noted in the two groups. These data imply that ADA2 serum level is more likely to reflect the condition of peripheral T lymphocytes than that of total ADA activity. Measurement of these enzyme activities in serum may be a useful parameter of diagnosis in human T-cell leukemia/lymphoma virus-1 infection.

序 言

アデノシンデアミナーゼ (EC 3.5.4.4; ADA) とプリンヌクレオシドホスホリラーゼ (EC 2.4.2.1; PNP) は、プリン代謝経路に関与する酵素である。そして、これらの両酵素は生体組織に広く分布しているが¹⁾、特に肝、脾、胸腺などのリンパ系組織に多く存在している。

Giblett²⁾らが、赤血球の ADA 欠損による重症複合型の免疫不全症、さらに、PNP 欠損による細胞性免疫不全症との関連を報告³⁾して以来、両酵素の免疫系との関係が注目されるようになった。

ADA は、分子量ならびに動力学的に多様性を示すことが知られており、分子量35,000ダルトンの ADA1 と100,000ダルトンの ADA 活性を持たない蛋白 (combining protein; cp) と ADA1 が各々2分子結合した複合体 (280,000ダルトン) の ADA1+cp, ならびに100,000ダルトンの ADA2 の存在が知られている⁴⁾。

HTLV-1感染による成人 T 細胞白血病 (ATL) が新しい疾患として高月ら⁵⁾によって報告されて

以来、現在までに多くの患者が本邦西南の海岸地域で発生している。我々は、この ATL 患者血清中の ADA 活性が高値を示すことを報告した⁶⁾。今回、HTLV-1キャリアー血清中の ADA アイソザイムとして酵素活性の特異性の異なる ADA1 および ADA2 ならびに PNP の活性を測定し、HTLV-1感染との関係について検討したので報告する。

対象および方法

1. 試薬

Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl) adenine (EHNA) はマルホ株式会社大淀研究所より提供された。ミルク由来のキサンチンオキシダーゼ (バイオザイム社) およびウシ肝由来のグルタミン酸デヒドロゲナーゼ (ジェンザイム社) は和光純薬より購入した。他の試薬類は特級もしくはこれに準ずる級品を使用した。

2. 対象

日南病院での外来患者および集団検診より得たキャリアー (ATL 関連抗体陽性者) 22例および健

常人20例の血清を用いた。

3. 測定方法

ADA アイソザイムの測定：ADA 総活性値は、日立705型オートアナライザーを用いて測定した。アデノシン6mM, α -ケトグルタル酸ナトリウム1.1mM, NADH 0.26mM, グルタミン酸デヒドロゲナーゼ50U/ml および0.1M トリスマレイン酸緩衝液 (pH 7.3) を含む基質緩衝液360 μ l に試料20 μ l を加え、37℃で反応させた。酵素活性の測定は、波長340および376nm の二波長で、4分より9分までの吸光度の変化より、1分間当りのNADHの減少量を求め、アデノシンより生成したイノシン量を算出した。ADA2の活性値は、RatechTMの方法に基づき、基質緩衝液にEHNA 0.1mM を添加し、ADA1およびADA1+cpの活性を選択的に阻害することにより、残ったADA2の活性を測定した。ADA1活性は総活性よりADA2活性を差し引くことにより求めた。活性単位は、1分間に1 μ mol のイノシンを生成する活性を1Uとした。

PNPの測定：PNP 活性は、日立705型オートアナライザーを用いて、イノシン0.5mM, ニトロブルーテトラゾリウム0.24mM, 1-メトキシフェナジンメトサルフェート0.028mM, キサンチンオキシダーゼ0.13U/ml および0.1M 磷酸塩緩衝液 (pH7.0) を含む基質緩衝液360 μ l に試料20 μ l を加え、37℃で反応させた。測定波長546および700nm の二波長で、4分より9分までの吸光度の変化より、予め求めたヒポキサンチンの吸光係数に基づき、イノシンより1分間に生成したヒポキサンチン量を算出した。活性単位は1分間に1 μ mol のヒポキサンチンを生成する活性を1Uとした。

4. 有意差の検定法

有意差については、Student's t 検定を用いて行った。

成 績

1. 健常人の ADA アイソザイムと PNP 活性値

健常人の血清についての ADA1, ADA2および PNP 活性値の分布を図1に示した。健常人の血清各酵素に対する平均値±標準偏差は、ADA1:

図1 健常人の血清中の ADA アイソザイムと PNP 活性値の分布 [図中の破線は、健常人の各酵素に対する平均値+SD (U/L) を示す]

図2 HTLV-1キャリアー血清中の ADA アイソザイムと PNP 活性値の分布 [図中の破線は、健常人の各酵素に対する平均値+SD (U/L) を示す]

1.1 $\pm$ 1.5 (U/L), ADA2: 11.7 $\pm$ 4.4 (U/L), PNP: 2.4 $\pm$ 1.6 (U/L) であった。

2. キャリアーの ADA アイソザイムと PNP 活性値

キャリアーの血清 ADA1, ADA2および PNP 活性値の分布を図2に示した。キャリアーの ADA2および PNP の酵素活性値は、それぞれ

表1 HTLV-1キャリアー血清中の ADA アイソザイムと PNP 活性値

	項目	例 数	平均±SD	t 検定
健 常 人	ADA1	20	1.1± 1.5	
	ADA2	20	11.7± 4.4	
	PNP	20	2.4± 1.6	
HTLV-1 キャリアー	ADA1	22	1.9± 1.3	—
	ADA2	22	23.4±11.0	*
	PNP	22	8.9± 4.3	*

—:有意差なし * : $p < 0.001$

23.4±11.0, 8.9±4.3であり, 健常人に比べて有意に ($p < 0.001$) 上昇した(表1). ADA1については, キャリアーと健常人の有意差は認められなかった.

今回の分析より, HTLV-1キャリアーでは ADA2および PNP の有意な上昇が見られた.

考 察

Van Laarhoven ら⁸⁾は, T リンパ球の ADA および PNP の活性が胸腺細胞の分化段階に応じて変動することを報告している. すなわち, 未熟な T リンパ球では ADA が高く, 細胞が成熟するのに従って順次低下する. これに対して, PNP は, 細胞が成熟するにつれて上昇するという特徴がある.

ATL 患者の末梢血より得られた ATL 細胞の膜表面抗原は, CD3⁺, CD4⁺, CD8⁻, Tac⁺で, 活性化したヘルパー/インデューサー T 細胞の形質を表現している⁹⁾. HTLV-1キャリアーでも, Tac⁺の活性化した T リンパ球の陽性率が健常人に比べてわずかに上昇しており, この細胞を培養すると陽性率が増加することが報告¹⁰⁾されている. また, T 細胞由来の急性リンパ性白血病のリンパ球では, ADA 活性が高値を示し¹¹⁾, T 細胞が活性化した他の疾患でも ADA 活性が上昇するという報告がある¹²⁾. このことは, ATL やキャリアーでは T リンパ球が活性化した形質を持つことから, 細胞内の ADA 活性は亢進していると考えられる. それゆえ, ATL やキャリアー血清中の ADA 活性の上昇は, HTLV-1感染に由来すると推察される.

血清中の ADA アイソザイムと各疾患との関連

性については, 肝疾患で検討されている. すなわち, 急性の肝細胞障害をおこす HB 肝炎, ハローセン肝炎などでは, ADA1が上昇するのに対し, 慢性肝炎, 肝硬変, 肝癌などでは, ADA2が上昇すると報告されている¹³⁾しかし, ADA アイソザイムとリンパ系疾患との関連性については, 現在までに報告がない.

ATL 患者血清中の ADA アイソザイムと PNP 活性を測定した結果¹⁴⁾から, キャリアーに比べて慢性型, 急性型の ATL へと病態が進行するに伴って, ADA2および PNP 活性が高値を示した. このことから, ADA2活性の上昇は, HTLV-1感染による慢性化の程度を表していると考えられた.

一方, 血清中の PNP 活性値と疾患についての報告は少なく, 急性リンパ性白血病で軽度の上昇がみられる¹⁵⁾と報告されているのみであり, 今回の血清 PNP 活性の上昇は, ATL の病態による変動と考えられた.

結 語

血清あるいは血漿中のプリン代謝酵素を測定することにより, HTLV-1 に感染したキャリアーでは ADA アイソザイムである ADA2および PNP 活性が上昇することが判明したことから, これらの酵素活性値を測定することにより, HTLV-1 感染のマーカーになると考えられた.

文 献

- 1) Ma, D.D.F., Sylwestrowica, T.A., Granger, S., Massaia, M., Franks, R., Janossy, G. and Hoffbrand, A.V.: Distribution of terminal-deoxynucleotidyl transferase and purine degradative and synthetic enzyme in subpopulation of human thymocytes. *J. Immunol.*, 129: 1430—1435, 1982.
- 2) Giblett, E.R., Anderson, J.E., Cohen, F., Pollara, B. and Meuwissen, H.J.: Adenosine deaminase deficiency in two patients with severely impaired cellular immunity. *Lancet*, ii: 1067—1069, 1972.
- 3) Giblett, E.R., Ammann, A.J., Wara, D.W., Sandman, R. and Diamond, L.K.: Nucleoside phosphorylase deficiency in a child with severely deficient T-cell immunity and normal B-cell immunity. *Lancet*, i: 1010—1013, 1975.
- 4) Hirschhorn, R. and Ratch, H.: Isozymes of adenosine deaminase. In *Isozymes*. Alan R. Liss

- Inc., New York, 4: 131—157, 1980.
- 5) Takatsuki, K., Uchiyama, T., Sagawa, K. and Yodoi, J.: Topics in hematology (edite by Seno, S., Takaku, F. & Irino, S.), Excerpta Medica, Amsterdam, 1977.
 - 6) 横山三男, 坪井 泉: AIDS ならびに ATL 患者血清中の核酸代謝系の酵素活性値. 臨床免疫, 20: 114—116, 1988.
 - 7) Ratech, H., Thorbecke, G.J., Meredith, G. and Hirschhorn, R.: Comparison and possible homology of isozymes in aves and humans. Enzyme, 26: 74—84, 1981.
 - 8) Van Laarhoven, J.P.R.M., Spierenbur, G.T., Collet, H., Delespesse, G. and De Bruyn, C.H.M. M.: Purine interconversion pathways in T, B, T γ and T-T γ cells from human peripheral blood. Adv. Exp. Med. Biol., 165: 111—118, 1984.
 - 9) Hattori, T., Uchiyama, T., Toibana, T., Takatsuki, K. and Uchino, H.: Surface phenotype of Japanese adult T-cell leukemia cells characterized by monoclonal antibodies. Blood, 58: 645—647, 1981.
 - 10) Yasuda, K., Sei, Y., Yokoyama, M.M. and Tanaka, K.: Healthy HTLV-1 carriers in Japan: The haematological and immunological characteristics. Br. J. Haematol., 64: 195—203, 1986.
 - 11) Van Laarhoven, J.P.R.M. and De Buryn, C.H. M.M.: Purine metabolism in relation to leukemia and lymphoid cell differentiation. Leuk. Res., 7: 451—480, 1983.
 - 12) 森崎隆幸, 藤井寿一, 三輪史朗: 白血病における血漿アデノシンデアミナーゼ (ADA) 活性の臨床的意義. 臨床血液, 26: 1768—1773, 1985.
 - 13) 倉田矩正, 鬼原道夫: 血清 Adenosine deaminase 活性と分子多様性. 臨床病理, 32: 875—880, 1984.
 - 14) 坪井 泉, 村岡俊春, 新里 脩, 荒木弘一, 横山三男: ATL 患者ならびにキャリアー血清中のプリン代謝酵素. 臨床免疫, 20: 487—493, 1988.
 - 15) 磯野倫夫, 沢木春二: 種々の疾患における血清 adenosine deaminase, purine nucleoside phosphorylase の変動. 医学と生物学, 111: 43—46, 1985.
-