

厚生省  
平成10年度

HIV感染/AIDSの感染病態と  
その生体防御に関する研究班

研究報告書

平成11年3月

主任研究者 倉田 毅  
(国立感染症研究所感染病理部長)

厚生省  
平成10年度

HIV感染/AIDSの感染病態と  
その生体防御に関する研究班

## 研究報告書

平成11年3月

主任研究者 倉田 毅  
(国立感染症研究所感染病理部長)

## HIV 感染/AIDS の感染病態とその生体防御に関する研究班

研究者名	分担	所 属	役 職
倉田 毅	班 長	国立感染症研究所感染病理部	部 長
岡 慎一	班 員	国立国際医療センターエイズ治療・研究開発センター	部 長
佐多 徹太郎	班 員	国立感染症研究所エイズ研究センター	室 長
生田 和良	班 員	北海道大学免疫科学研究所血清学部門	教 授
石川 栄治	班 員	宮崎医科大学医学部生化学第1講座	教 授
高橋 秀実	班 員	日本医科大学免疫学・微生物学教室	教 授
宮沢 正顕	班 員	近畿大学医学部免疫学教室	教 授
松下 修三	班 員	熊本大学エイズ学研究センター病態制御分野	教 授
横田 恭子	班 員	国立感染症研究所免疫部	室 長
向井 鎌三郎	班 員	国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センター	主任研究官
滝口 雅文	班 員	熊本大学エイズ学研究センターウイルス制御分野	教 授
小柳 義夫	班 員	東京医科歯科大医学部微生物学	助 教 授
田沼 靖一	研究協力者	東京理科大学薬学部生化学教室	教 授
天野 富美夫	研究協力者	国立感染症研究所細胞化学部	主任研究官
俣野 哲朗	研究協力者	国立感染症研究所エイズ研究センター	主任研究官
高橋 秀宗	研究協力者	国立感染症研究所感染病理部	主任研究官
石川 晃一	研究協力者	国立感染症研究所感染病理部	主任研究官
神奈木 真理	研究協力者	東京医科歯科大学医学部免疫治療学講座	教 授

## 目 次

1. HIV 感染/AIDS の感染病態とその生体防御に関する研究班 総括研究報告書（平成 10 年度）	1
主任研究者：倉田 毅（国立感染症研究所感染病理部長）	
2. Magic 5 C1-10 を用いた phenotypic drug-resistance assay の臨床応用	5
分担研究者：岡 慎一（国立国際医療センターエイズ治療研究開発センター）	
3. HIV 感染宿主におけるサイトメガロウイルス網膜炎の病態解析	11
分担研究者：倉田 毅（国立感染症研究所感染病理部）	
共同研究者：柏瀬 光寿、佐多 徹太郎、佐藤 由子 岩崎 琢也（国立感染症研究所感染病理部） 永田 洋一（東京大学医学部附属病院分院眼科）	
4. エイズ剖検例各臓器組織における HIV-1 <i>env</i> 領域の性状と HIV 脳症	15
分担研究者：佐多 徹太郎（国立感染症研究所エイズ研究センター）	
共同研究者：櫻井 範子、寺井 政憲、佐藤 由子 倉田 毅（国立感染症研究所感染病理部）	
5. HIV 感染の診断におけるウィンドウ期間の短縮	20
分担研究者：石川 栄治（宮崎医科大学医学部第一生化学講座）	
6. HIV-2 遺伝子の高感度検出法の開発と HIV 混合感染の遺伝子診断	37
研究協力者：石川 晃一（国立感染症研究所エイズ研究センター）	
7. HIV-1 粒子吸着による CD4 <sup>+</sup> T 細胞サブセットの活性化と アポトーシス誘導のためのエフェクター活性誘導	39
分担研究者：生田 和良（北海道大学免疫科学研究所血清学部門）	
共同研究者：堀越 東子、鈴木 聡子、向井 徹 （北海道大学免疫科学研究所血清学部門）	
8. サイトカインによる HIV-1 臨床分離株増殖の修飾	46
分担研究者：小柳 義夫（東京医科歯科大学微生物学）	
共同研究者：鈴木 陽一、前田 直良、山本 直樹（東京医科歯科大学微生物学）	
9. HIV-1 ゲノム複製における変異誘導機構の解析	55
研究協力者：高橋 秀宗（国立感染症研究所感染病理部）	
10. サルエイズ脳炎発症モデルの確立に関する研究	57
分担研究者：向井 鍬三郎（国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センター）	
11. 細胞性免疫誘導を目的とした抗エイズ DNA ワクチン開発研究	65
研究協力者：俣野 哲朗（国立感染症研究所エイズ研究センター）	
12. 粘膜を介した抗 HIV 免疫反応の誘導とその感染防御効果に関する研究	67
分担研究者：横田 恭子（国立感染症研究所免疫部）	
共同研究者：保田 幸子、吉澤 ひとみ（国立感染症研究所免疫部） 早田 陽子、佐々木 剛（東海大学工学部）	

13.	HIV ペプチド断片による CTL 活性抑制；そのメカニズムの解析	72
	分担研究者：高橋 秀実（日本医科大学微生物学免疫学教室）	
	共同研究者：中川 洋子、高橋 めぐみ（日本医科大学微生物学免疫学教室）	
14.	HIV クワシスピーシスと免疫応答	77
	分担研究者：松下 修三（熊本大学エイズ学研究センター病態制御分野）	
15.	CTL による HIV-1 の認識と排除に関する研究	79
	分担研究者：滝口 雅文（熊本大学エイズ学研究センターウイルス制御分野）	
16.	単一エピトープによる CD4 陽性 T 細胞感作はレトロウイルス感染細胞を 早期に排除し免疫抑制を防止する	83
	分担研究者：宮澤 正顕（近畿大学医学部免疫学教室）	
	研究協力者：丹羽 淳子（近畿大学医学部免疫学教室）	
	上西 博英（農林水産省畜産試験場）	
17.	CD8 陽性 T 細胞による HIV 抑制の分類と病期による変化	89
	研究協力者：神奈木 真理（東京医科歯科大学医学系研究科免疫治療学講座）	
18.	ヒト単球系細胞株 U937 およびその HHV6B 耐性変異株を用いた HIV-1 感染・増殖に関する宿主因子の研究 - HIV-1 の潜伏感染した U1 細胞からのウイルス再活性化における MAP キナーゼの関与 -	91
	研究協力者：天野 富美夫（国立感染症研究所細胞化学部）	
19.	タンニン酸による HIV プロモーターの抑制	97
	研究協力者：田沼 靖一（東京理科大学薬学部生化学教室）	
	論文発表	101

# I. 総括研究報告

総括研究報告書

# 1. HIV 感染/AIDS の感染病態とその生体防御に関する研究班

主任研究者 倉田 毅 国立感染症研究所感染病理部長

**研究要旨** ヒト感染個体での HIV 伝播の機序を明らかにし、HIV 遺伝子変異と病態進行過程を詳細に解析し、体内でのウイルス及びその成分による細胞死の機序とそれを制御する生体防御機構との関係を明らかにし、それをさらにサル発症系、モデルを用い、ヒトでは得られない各種の病態解析を行なう。その成果をもとに感染防御ワクチン、発症阻止治療薬等の開発に資する。そのために次の5点について研究を実施した。1)感染個体内での遺伝子変異と病態進行について 2)HIV 感染初期のウィンドウ期の短縮のための超高感度迅速診断法の開発 3) サルモデルでの SIV 感染発症病態の解析 4)HIV 感染宿主の生体防御機序の解析 5) HIV 感染下での細胞障害性 T 細胞の役割と免疫反応の応答強化法等のテーマで研究を実施した。

分担研究者：

岡 慎一： 国立国際医療センター  
生田 和良： 北大免疫科学研血清学部門  
石川 栄治： 宮崎医大第1生化学教室  
高橋 秀実： 日本医大免疫学・微生物学教室  
宮沢 正顕： 近畿大医学部・免疫学教室  
松下 修三： 熊本大エイズ学研究センター  
病態制御分野  
向井 隼三郎： 国立感染研筑波医学実験用霊長類  
センター  
佐多 徹太郎： 国立感染研エイズ研究センター  
横田 恭子： 国立感染研免疫部  
小柳 義夫： 東京医歯大医学部微生物学  
滝口 雅文： 熊本大エイズ学研究センター  
ウイルス制御分野

以上11名（他 研究協力者6名）

## A. 研究目的

有効なワクチンや抗 HIV 療法を開発するためには、HIV 感染者体内でのウイルスの分布、体内伝播の機序を明らかにし、HIV の遺伝子変異と病態進行過程を詳細に解析し、体内での細胞死、それらを制御する生体防御機構との関係を明らかにする必要がある。また遺伝子変異を凌駕する細胞障害性 T 細胞機能の活性化・増強機序を賦活・持続するワクチン、物質の開発を目指す。またエイズ治療を目的とした遺伝子治療に関する基礎研究を行う。わが国でも最近発生したウィンドウ期での輸血感染阻止は血液診断

上緊急かつ重要な課題であり、より迅速正確な診断技術開発が求められている。上記の問題を解決していくために人の症例での検討と同時に非人類霊長類発症系を用いて感染発症機序の解析とその制御法の開発を行なう必要がある。これらの研究から、医療上の感染の防止、HIV 感染防御、エイズ進行防止に対する有効な手段が提供される。

## B. 研究方法

次の大きな研究項目について実施した。

### 1) 感染個体での遺伝子変異と病態進行について：

臨床病理学的には HIV 感染/AIDS 経過中のウイルスを変異させることなく分離できる系は薬剤耐性検査の上で必須であり、その方法の開発を目指す。HIV/AIDS 発症例で剖検例を用い HIV 脳症における脳内ウイルス遺伝子の特徴を明らかにし、また HIV 感染宿主における HCMV 活性化による病理学的特徴について検索する。一方感染個体内での細胞死の機序を明らかにすると共に HIV 感染後の各期における Th1、Th2 細胞系とサイトカインによる増殖性を検討し、また宿主内におけるウイルスゲノム複製開始の際の宿主因子の調節機構を明らかにする。

### 2) 感染初期のウィンドウ期を短縮する超高感度迅速診断系の開発：

免疫複合体転移測定法により種々のパネル血

清により感染初期の診断を迅速化する系を確立すると共に、遅れている HIV-2 の高感度遺伝子検出系を開発する。

### 3) SIV 感染発症サルモデル系での病態の研究:

ヒトの HIV-1 脳炎・脳症に対応するサルの SIV 脳炎モデルを作り、遺伝子変異と病態につき明らかにする。またサルの系を用い、抗エイズワクチン開発の目的で効率よく抗原蛋白を発現し、細胞性免疫を誘導するサル(マカク)モデルを作成する。

### 4) HIV 感染の宿主生体防御一ワクチンを有効にするシステムの開発:

HIV の伝播経路として粘膜は重要な位置にある故、粘膜を介した HIV ワクチンを開発するためのデリバリーシステムや安全かつ強力な粘膜アジュバントを開発する必要がある。また HIV に特異的な細胞性免疫応答については HIV の体内制御のウイルス特異的 CD8 陽性 CTL が HIVenv 蛋白によりアポトーシスに陥る機序を解明し、ダメージを受けない方策を探る。

### 5) HIV 感染下での HIV の細胞障害性と免疫反応及びその応答強化法に関する研究:

HIV 感染個体内でのクワシスピーシスを調べ、その HIV 感染ないし増殖を阻止する液性及び細胞性免疫反応を明らかにしてその誘導法を確立する。また無症候期の CD8 陽性細胞の HIV 抑制現象の機序について CTL による感染細胞障害、CC ケモカインによるマクロファージ向性 HIV-1 の侵入障害の点から検討する。さらに感染防御に有効な CD4 陽性 T 細胞認識エピトープワクチンの T 細胞活性化とエフェクター誘導機序を明らかにし、感染阻止の機序を解明する。

## C&D. 研究結果と考察

### 1) 感染個体内での遺伝子変異と病態進行について:

HIV 感染/AIDS 経過中のウイルスを遺伝子変異させることなく非常に効率よく分離できる Magic5 Cl-10 を見出し、検体株取から 2 週間で逆転写酵素阻害剤及びプロテアーゼ阻害剤の薬剤耐性を phenotype に検出する系を確立し、従来の genotypic assay では分らなかった耐性ウイルスの検出が可能となった(岡)。

また剖検 36 例の脳、リンパ節、脾臓からの nestedPCR 法で HIV-1 env C2V3 領域を増殖し塩基配列を見ると脳症、非脳症の脳で、脳由来クローンが他臓器由来クローン(M 方が多い)と異なる集団を形成(T 型)しており脳内には隔絶したクローンの存在が示唆された(佐多)。HIV 感染宿主では CMV 感染に陥りやすく特に CMV 網膜炎はエイズ末期に頻回に繰り返し、最終的に失明に至る。眼球と視神経を検索し、網膜周辺に初発する indolent type (6 例)と、後極型 fulminant type (8 例)が見られ、9 例では視神経に感染が進行していた。視神経の CMV 感染は HIV 感染宿主以外で生じることなく、重篤な視力障害の原因である(倉田)。

HIV-1 の主標的細胞群である T 細胞群は産生するサイトカインのパターンから Th1、Th2、Th0 細胞に大別されるが、臨床分離株を見ると急性感染期のウイルスは IL-12 刺激 Th1 細胞において増殖性が高い分離株が多かったのに対し、無症候期及び AIDS 発症期の患者より分離したウイルスは IL-4 刺激 Th2 細胞培養系でも増殖性の高い分離株が多いことが明らかとなった。これは体内でのサイトカイン又は Th 細胞サブセットの変更がウイルスの変異を促進する大きな要因であることを示す(小柳)。

健常者末血 T 細胞のサブセット(CD4<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>)が粒子吸着によりアポトーシス誘導エフェクター活性を獲得するが、その機序について非感染性 L-2 粒子吸着による T 細胞の活性化を見たところ、非感染性であっても粒子吸着を受けると CD38 陽性になった T 細胞はウイルス高産生の細胞へと変化することが明らかになり、一方 CD25 陽性となった活性化 T 細胞(CD38)はウイルス低産生で周辺非感染 T 細胞をアポトーシスに導くエフェクター活性を獲得すると考えられる(生田)。

HIV-1 の易変異性は、ワクチンや抗ウイルス剤の開発を阻む大きな要因である。この変異が出現する逆転写機構において宿主 topoisomerase I は、RNA を結合させる作用によりウイルス因子と共同し、逆転写を進めていることが判明した。この反応は ATP により調節されており変異発生の分子機構として重要である(協:高橋秀宗)。

さらにヒト単球マクロファージへの HIV-1 の感染増殖に関与する宿主因子を HIV-1 持続感染



U1 細胞でみると、ERK1/2 のリン酸化を介した活性化が示唆された（協：天野）。

#### 2) 感染初期のウインドウ期を短縮する超高感度迅速診断系の開発：

高感度免疫複合体転移測定法により①19 例のパネル血清で抗 p17IgG、IgM 抗体が HIV-1p24 抗原、RNA より早く検出された②12 例のパネル血清では p24 抗原の出現は RNA と同時か、あるいはより早かった③HIV-2gp36 合成ペプチドを抗原として用いると、19 例中 2 例がウエスタンブロッティングで、他は全てこの方法が高感度であった。この方法の早期実用化が期待される（石川）。

HIV-2 の高感度検出測定系の開発の目的で特異的プライマーを新たに設計（LTR-GAG 領域）したところ西アフリカの血清で 90%以上（ガンビア、ギニアでは 100%）で検出可能であった。さらにガンビア、象牙海岸の検体 209 例（血清学的に混合感染と思われる）のサンプルで PCR で 72%が陽性となった（協：石川）。

#### 3) SIV 感染発症サルモデル系での病態の研究：

SIV/MAC239 株を接種したカニクイザル及びこの血清を輸血したカニクイザルがエイズ脳炎で死亡した。この脳組織を培養し、SIV を産生する細胞株を樹立した（BM1&5）。この BM5 細胞のゲノムは env、nef 領域に突然変異が集中していたが gag、pol 領域には全く変異がみられなかった（向井）。

抗エイズ DNA ワクチン開発を目的とし SIV env をフレンドマウス白血病ウイルスに組換え、キメラウイルス DNA を作成したところ、サル由来細胞(COS)で限局的に感染・複製が確認された（協：俣野）。

#### 4) HIV 感染の宿主生体防御機序—ワクチンを有効にするシステムの開発：

HIV-gag を発現する DNA を用い、gene gun あるいは筋注で投与すると、DNA にはプライミング効果がある、筋注は Th1 型の免疫を誘導しやすい可能性があることが分かった。さらに弱毒化 Salmonella typhimurium を抗体として gag 発現 DNA を投与すると、腸管粘膜に p24IgA 抗体が誘導される（横田）。

HIV 特異的 CD8 陽性細胞障害性 T 細胞(CTL) をエピトープペプチドで処理すると著明にキラー活性が低下し、Anergy に陥るが、この CTL の性状を調べると①キラー活性の抑制は一時的

であり、時間の経過と共に回復する、②キラー活性抑制時に IL-2 レセプターβ鎖発現が低下しているが、活性の回復にともない経時的にβ鎖の発現が上昇する、③キラー活性の低下は Granzyme B の放出による細胞障害生因子の枯渇に起因すること等々を明らかにした（高橋秀実）。

#### 5) HIV 感染下での HIV の細胞障害性と免疫反応及びその応答強化に関する研究：

HIV は生体内では主に少しずつ似ている集団（クワシスピーシス）として存在する。この急激な変化が病状を進行させ、中和が困難となっている例を明らかにしたが、この中和領域のアミノ酸配列をみると tip 配列の両側の 4 個所を含む 5 個所に変異があり、トロピズムに変化が見られ、血清抗体の反応低下が確認された。この中和抗体からのエスケープ変異を抑制する免疫強化を可能とするのが今後の課題である（松下）。

無症候 HIV-1 キャリア(AC)末梢血 CD8 陽性リンパ球は HIV-1 抑制作用を持ち、無症候期のウイルス量の低下に貢献すると考えられるが、HIV 感染の各ステージでの患者での活性を見ると、末梢 CD4 陽性細胞数が 50-200/ $\mu$ l の発症移行期にこれは MHC-1 非拘束性の CD8 陽性細胞の HIV 抑制能は拘束性抑制に先行して減弱することが分かった（協：神奈木）。

CTL による HIV-1 の認識を明らかにするために AIDS 発症を遅らせる因子と考えられる HLA-B51 を提示する HIV-1 CTL エスケープをリバースイムノジェネティクス法を用いて 7 種類の HLA-B5101 拘束性エピトープを同定した。また HIV-1 の CTL からのエピトープ機序についてみると Nef 蛋白による HLA クラス I の細胞表面の発現が低下すると CTL による認識も低下することが分かった（滝口）。

一方ウイルス感染細胞からウイルスの排除をきわめて有効に行なう宿主免疫反応を誘導するために、フレンド白血病レトロウイルスの系を用いて調べると、単一の CD4 陽性 T 細胞エピトープを用いて予め感作しておく、ウイルス感染後 CD8 陽性 T 細胞を活性化し、レトロウイルス感染細胞を排除できる。この際レトロウイルス感染に伴って誘発される免疫抑制状態も回避できる。これによりレトロウイルス感染防御ワクチンの備えるべき要件が明らかにされる（宮

澤)。

AIDS の発症を予防する方法として HIV と MMTV プロモーターの共通の抑制エレメントを探索したところ、天然物であるタンニン酸に反応してプロモーター活性を抑制する ACTG モチーフが存在することが明らかになった。この系を臨床応用に持ち込み、HIV 遺伝子発現をコントロールし、潜伏期間の長期延長の効果が期待される(協:田沼)。

## E. 結 論

当班の研究は、ヒト宿主レベルあるいは動物モデル(サル)での免疫不全ウイルス感染による病態解明とその防御を目指すものである。本年度の成果からヒト体内での多様な HIV-1 遺伝子の変異を性状を変えることなくウイルス分離しうる細胞系を確立したことは、薬剤耐性機構の解明と対策にきわめて大きな貢献をすることが確信できる。ヒト HIV 脳症脳内における遺伝子変異(少ない)と末血内のそれ(多い)との乖離は薬剤の投与方法への工夫が求められるが、脳内ウイルスの遺伝子の把握が困難なことから問題は消えない。その他非感染細胞の細胞死の機序と、細胞障害性とそれに対する対応等の研究が推進された。ワクチン開発への宿主側の基礎研究は着実に進んでいるが、応用段階に入るにはまだ時間が必要となろう。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表 (別紙の通り)

## II. 分担研究報告

## 2. Magic 5 C1-10 を用いた phenotypic drug-resistance assay の臨床応用

分担研究者 岡 慎一 (国立国際医療センターエイズ治療研究開発センター)

**研究要旨** 臨床分離株を非常に効率よく分離できる Magic 5 C1-10 を見いだした。このクローン株を用い、検体採取から 2 週間で逆転写酵素阻害剤及びプロテアーゼ阻害剤の薬剤耐性を phenotype にて検出できる系を確立した。今回の phenotypic assay の結果から、従来から行なわれていた genotypic assay ではわからなかった耐性ウイルスを検出することが可能になった。今後の臨床応用の可能性についてさらに検討を進めたい。

### A. 研究目的

HIV は分離、培養が困難であるため、細菌の抗生物質に対する感受性試験のように、臨床検体中のウイルスの薬剤感受性試験は容易ではない。しかも、検査系の開発において、時間、労力、コストの面での困難性も予想され、一般的には行われていない。そのため現在、遺伝子型 (genotype) での耐性検査が主流であるが、感染者個体から分離した HIV-1 の遺伝子型と表現型がかならずしも相関していないという問題が指摘されている。そのため、今回生物学的な表現型 (phenotype : PH 法) で検出する感受性検査法でありながら、迅速かつ簡便に施行できる耐性検査法を確立する目的で研究を行った。

### B. 研究方法

#### 1. 対象患者

対象は 1997 年 12 月から 1999 年 1 月までに当院に通院した患者 67 名 87 検体について検査を行った。

#### 2. ウイルス分離

感染させる前の日に Complete Medium (10%FCS, 100U/ml penicillin, 100ug/ml streptomycin) で浮遊させた Magic 5 C1-10 (MAGIC-5) cell を 48well プレートに 1

$\times 10^4$ /well で接種。感染当日、患者由来の plasma 1ml を 4500rpm 40min にて遠心し、上清 900ul を取り除いた。Infection Medium (Complete Medium containing 20ug/ml DEAE-Dextran) を 400ul 加え、良く混和後プレートに加え、37℃、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターにて 2 時間培養した。次に、それぞれのウエルからメディウムを取り除き、Complete Medium に置き換え、37℃、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターにて培養を続けた。観察とともに、細胞の発育が 90% の状態となった時点で液換えを行い、プレートを 24well、12well と広げた。また液換えの際に Fix Solution を加え、室温で 5min 放置後、PBS で洗浄、Stain Solution を加え 37℃ 60min インキュベート後、顕微鏡下で blue cell の観察を行った。感染が認められていれば、上清を -80℃ で保存した。

#### 3. 薬剤感受性試験

感染価の測定：感染前日に 96well プレートに  $1 \times 10^4$ /well ずつ細胞を接種。感染当日、ウイルスを融解し、 $\times 1$  から  $\times 1000$  に Infection medium で希釈、各ウエルに 100ul ずつ添加後、37℃、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターにて 2 時間培養した。それぞれのウエルからメディウムを取り除き、

Complete Medium に置き換え、37℃、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターにて培養した。48 h 後、Fix Solution を加え、室温で 5min 放置後、PBS で洗浄し、Stain Solution を加え 37℃ 60 min インキュベートを行い、顕微鏡下で blue cell の観察を行い、数をかぞえ、100 ~ 300 plaque forming unit (PFU) となる希釈倍数を求めた。

逆転写酵素阻害剤：感染前日に 96well プレートに  $1 \times 10^4$ /well ずつ細胞をまき、感染当日、ウイルスを融解し、100 ~ 300 PFU となる濃度のウイルスを Infection Medium にて希釈し、100ul ずつ加えた。さらに Complete Medium で 10 倍希釈系列を作成した抗ウイルス薬を 100ul ずつ加え、37℃、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターにて培養した。検査は 1 検体につきトリプル測定を行った。48 h 後、Fix Solution を加え、室温で 5min 放置後、PBS で洗浄し、Stain Solution を加え 37℃ 60 min インキュベート後、顕微鏡下で blue cell の観察を行い、PFU を測定した。結果は、薬剤を加えていないウエルを 100% とし、50% 発育阻止が出来たところを IC<sub>50</sub> とした。

プロテアーゼ阻害剤：感染前日に 96well プレートに  $1 \times 10^4$  /well ずつ細胞を接種、感染当日、ウイルスを融解し、100 ~ 300 PFU となる濃度のウイルスを Infection Medium にて希釈し、100ul ずつ加えた。さらに Complete Medium で 10 倍希釈系列を作成した抗ウイルス薬を 100ul ずつ加え、1 検体につきトリプル測定を行い、37℃、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターにて培養した。72h 後、前日用意しておいた 96well プレートに上清 100ul と Infection Medium 100ul を加え 37℃、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターにて培養した。48 h 後、Fix Solution を加え、室温で 5min 放置後、PBS で洗浄し、Stain Solution を加え 37℃ 60 min インキュベート後、顕微鏡下で blue

cell の観察を行い、PFU 数をかぞえ、IC<sub>50</sub> を決定した。

**PBMC を用いた薬剤感受性試験：** Current Protocol in Immunology 1993:12.9.1 に基づいて行った。

**genotype (遺伝子型) での耐性検査：** 患者血漿 100ul からハイピュア RNA アイソレーションキットを用いて RNA の抽出を行い、One Step RNA PCR Kit を用い、HIV-1 の pol 領域を増幅した。Wizad<sup>TM</sup> PCR Prep DNA Purification System を用いて PCR 反応産物を濃縮し、電気泳動した後、目的のフラグメントを含むゲル部位を切り出し、SUPREC-01 を用いて精製を行った。こうして得られた各サンプルの塩基配列を Auto sequencer を用いて決定した。アミノ酸配列は、塩基配列より推定し、耐性の有無を調べた。

#### 4. HIV-1 V3 領域のシークエンス

Plasma と MAGIC5 から得られたウイルス液をそれぞれ 100ul ずつスマイテスト (日本ジェネティクス) を用いて RNA を抽出した。One Step RNA PCR Kit を用い、HIV-1 env 遺伝子の V3 領域を増幅した。用いた primer のシークエンスは、C3:5'-ACAATTTCTGGGTCCCCTCCTGAGG A, C2:5'-AATGTCAGCACAGTACAATGT ACAC, S1:5'-ATGGAATTAGGCCAGT A GTG, A1:5'-CTCCTAATTTTGTA ACTACC であった。Wizad<sup>TM</sup> PCR Prep DNA Purification System を用いて PCR 反応産物を濃縮し、電気泳動した後、目的の 303bp のフラグメントを含むゲル部位を切り出し、SUPREC-01 を用いて精製を行った。こうして得られた各サンプルの塩基配列を Auto sequencer を用いて決定した。アミノ酸配列は、塩基配列より推定し、V3 ループのアミノ酸配列の N 末端から 11 番目と 25 番目が塩基性アミノ酸を SI genotype、その他を NSI genotype とした。

## 5. レセプターの解析

MAGIC5 を PBS で洗浄し、さらに 0.5%BSA 加 PBS で洗浄を行った。0.5%BSA 加 PBS にて再浮遊させ、細胞数を数えた。 $1 \times 10^5$  /tube となるように調整し、IgG 1 $\mu$ g/tube を加えた。4℃にて 15min 反応させ、10 $\mu$ l ずつ蛍光色素でラベルされた抗 CXCR4 モノクローナル抗体、抗 CCR5 モノクローナル抗体、抗 CD4 モノクローナル抗体を必要に応じて、それぞれに加えた。4℃、40min 反応させ、0.5%BSA 加 PBS を 4ml 加え、洗浄を 2 回行った。1%パラホルムアルデヒド (PFA) 加 PBS を 400 $\mu$ l 加え、細胞を再浮遊させた。フローサイトメトリーを用いて、各レセプターを発現している割合を算出した。

## C. 結果

### 1.MAGIC5 とウイルス量の相関 (表 1)

MAGIC5 を用いて、87 検体中 31 検体からウイルスを分離した。これらは、顕微鏡下で巨細胞 (blue cell) が観察され、上清中の p24 抗原が検出されるまでが平均 5.3 日であった。また患者 plasma 中のウイルス量とウイルス分離率を調べたところ、ウイルス量が 4 乗以上で分離率 77%と最も多く、3 乗台で 6%、2 乗以下で 1%であった。

### 2.MAGIC5 と plasma 中のウイルス V3 の比較

HIV は感染個体内では常に不均一な集団 (quasi-species) を形成している。MAGIC5 を用いて分離されたウイルスに偏りがないかどうかを調べるため、細胞上清から得られたウイルスの V3 と plasma 中から得られたウイルスの V3 領域をダイレクトシーケンシング法を用いて比較した。plasma と MAGIC5 の細胞上清のウイルスの V3 領域は 10 検体中 8 検体が全く同じアミノ酸配列が得られた。また細胞上清中のウイルス

は、second receptor の CCR-5 を使用する M-tropic、CXCR4 を使用する T-tropic のそれぞれが得られるだけでなく、同一患者から M-tropic、T-tropic の両方のウイルスが混合して得ることが出来た。

### 3.レセプターの発現量 (表 2)

各 MAGIC5 のレセプターの発現をフローサイトメトリーを用いて CD4、CCR5、CXCR4 の割合を調べた。CD4 の発現は MAGIC5A CL1-10 (99%) が最も多く、CXCR4 は、MAGI-CCR5 (米国 NIH より供与) (1.8%)、CCR5 は MAGIC5C C4 (95.9%) が多く発現していた。レセプターの発現の結果をもとにラボ株 (NL432、BaL)、臨床分離株をこれらの細胞に感染させた。T-tropic である NL432 は、MAGIC5 C6 (CD4 0.1%、CXCR4 0.2%) 以外の細胞に感染することが出来、また M-tropic である BaL は、MAGI-CCR5 (CD4 78.5%、CCR5 1.1%) 以外の細胞に感染することが出来た。さらに臨床分離株が得られるかどうかを各細胞にて調べたところ、MAGIC5 C1-10 と MAGIC5C C4 においてウイルスが分離された。しかしウイルス分離の数は MAGIC5 C1-10 が最も多く、検出までの日数は、レセプターの発現量が多い MAGIC5C C4 では 7 日であったが、MAGIC5 C1-10 では 4 日とさらに短縮して得られた。以上のことから MAGIC5 C1-10 を用いて抗 HIV 薬耐性検査を行った。

### 4.抗 HIV 薬耐性検査 表現型と遺伝子型の比較

この MAGIC5 を用いて、得られた臨床分離株 31 検体とラボ株 2 検体を用いて、逆転写酵素阻害剤である、AZT、d4T、3TC、またプロテアーゼ阻害剤である RTV、SQV の耐性検査を行った。今までに AZT26 検体、d4T20 検体、3TC20 検体、RTV16 検体、SQV 6 検体について検査を行い、遺伝型との解析結果と比較した。その一部の

結果のみを表3に示す。遺伝子型との相関をみると NL432 を1倍とし、AZTにおいて無治療群は、平均して-1.42倍であるのに比べ、41、215、184、67の変異があると2倍から128倍の耐性に傾いた。また以前から報告があるように41、215、184が変異すると耐性ではなく、AZTに対し-1.5倍と感受性が戻っていることが確認された。さらにこの3つの変異に加え67が加わるとまた耐性に傾いていることがわかった。3TCでは、184の変異をもつ株では、表現型ではすべて100倍以上の耐性が確認された。しかし184がwild typeであっても他の逆転写酵素阻害剤や3TCの治療歴がある場合は表現型で低い耐性が認められた。d4Tでは耐性に関連するアミノ酸置換は不明な部分が多く、現在知られている75の変異との相関を調べてみた。無治療群は-1.26倍であるのに比べ、d4T治療歴があるものは0.14倍と耐性に傾いてはいるものの75の変異との相関はみられなかった。RTVではprimary mutationである82の変異が加わるとすべて100倍前後の耐性が認められるが、82がwild typeであり他の部位に変異が加わっても耐性の倍数は30倍と82の変異に比べ低い値であった。またMAGIC5の前駆細胞であるMAGI細胞を用いて逆転写酵素阻害剤の薬剤感受性試験のプロトコールは確立されていたが、プロテアーゼ阻害剤についての確立はされてはいなかったため、MAGIC5を用いたこのアッセイ系でのプロテアーゼ阻害剤のIC50の値の信頼性を調べるために、RTVに関してPBMCで行われている標準的な方法で同じ検体のIC50を調べてみた。MAGIC5を用いた系では、NL432は0.025uM/ml、臨床検体は2.7uM/mlであり、PBMCを用いた系ではNL432は0.04uM/ml、臨床検体は3.6uM/mlであった。

#### D. 考察

一般にHIV感染の測定系は、HIV-1の構造蛋白であるgag蛋白p24のELISAによる測定と、逆転写酵素活性の測定に基づくものが多く用いられているが、ウイルス感染価そのものを反映した定量法とは言い難く、現在用いられる感染価測定系としてPBMCを用いたTCID50法があるが、時間、労力、コスト面からの困難性もあって大量検体には、対応できない。また薬剤耐性試験においても遺伝子レベルでの解析と生物学的手法を用いた表現型からの検出方法の2つがあげられるが、表現型の検出方法は、現在急速に改善されつつあるとはいえ、いまだに時間や費用がかかることが考えられ、一般的には行われてはいない。現在、遺伝子レベルでの耐性検査が主流であるが、遺伝子型と表現型が必ずしも相関していないという指摘がされているため、今回われわれは、MAGIC5による表現型での検出方法を用いて、これらの問題を解決し、臨床分離株から直接、感受性試験を迅速に行うことを目的とし、検査を行った。今回用いたMAGIC5は、顕微鏡下で感染細胞が認められ、さらにp24抗原が検出されるまでに平均して5.3日であり、これは現在行われているPHAで刺激したヒト単核球細胞(PBMC)を用いた方法での2週間から4週間の検出日数に比べ、はるかに早い日数でウイルスが検出されたことがわかった。さらにHIV-1は感染個体内では常に不均一な集団(quasi-species)を形成していることが知られているが、この分離されたウイルスのV3領域に関しては、plasma中でメジャーとなっているウイルスとほぼ同じシーケンスが得られた。MAGI細胞ではT-tropicのみが感染可能であったが、この細胞にsecond receptorであるCCR5を加えたMAGIC5は、レセプターの解析においてもCCR5、CD4は85%以上発現し、

CXCR4 の発現が低いものの、臨床検体から M-tropic と T-tropic の両方が得ることができた。これにより健常人での PBMC を用いた方法でのウイルス分離に比べ、腫瘍細胞である cell line を用いることによって非常に維持が簡便となり、分離されるウイルスにも偏りがなくなることがわかった。抗 HIV 薬剤感受性試験では、臨床検体 31 検体とラボ株 2 検体を逆転写酵素阻害剤とプロテアーゼ阻害剤について行った。従来での PBMC を用いた方法では、結果が得られるまでに 4 週間から 6 週間と非常に時間がかかり、また判定するのに p24 を測定するという点でコストがかかることが知られているが、この細胞を用いることによりウイルス分離から感染価測定、薬剤感受性試験までわずか 2 週間ほどで結果が得ることが出来、また p24 を測定するのではなく、細胞を染色することで感染の有無が 1 時間ほどでわかった。また AZT、3TC の感受性試験を行ったところ、感受性株にくらべ、数 10 倍から 100 倍以上の耐性がみられ、この結果は遺伝子型のアミノ酸変異の結果と相関していた。3TC に関しては 184 が wild type であっても表現型では、低い耐性が認められることがあり、AZT についても 74,184,215 のアミノ酸変異が同時にみられた場合は、感受性が戻っていることも、この細胞を用いて確認された。しかしこのようなアミノ酸変化によって起こる感受性の変化が、酵素と基質との反応、相互作用という点からどのように起こっているかについては、現段階の技術と知識では明らかにされていない。また d4T については感受性低下は、数倍から 10 倍までと小さく、genotype においても 75 のアミノ酸変異以外については、ほとんど知られていない。しかし今回、我々が調べた 75 に変異がみられていない株においても表現型では、耐性に傾いていることがわかり、現在これら

の株を用いて遺伝子型の解析を進めている。プロテアーゼ阻害剤については、MAGIC5 を用いて得られた値の信頼性を調べるため、PBMC を用いた標準的な方法と比べたが、若干 MAGIC5 の方が低い値が得られたものの、耐性の度合いをみるとほぼ同様の結果が得られた。一般に PBMC を用いた方法は、MAGIC5 の前駆細胞となっている MAGI 細胞を用いた Syncytium formation の方法に比べ若干高い値が得られることは、知られている。例えば AZT の感受性の範囲は、PBMC = 0.002 から 0.18uM/ml、MAGI 細胞 = 0.001 から 0.045uM/ml と PBMC で用いた値の方が高い。またこの表現型で得られた値と遺伝子型での結果においても相関しており、RTV については、primary mutation である 82 に変異が認められると 100 倍前後という高い耐性結果が得られた。またこの 82 に変異が認められていなければ、他の部位にアミノ酸変異が加算されていても耐性の度合いは数十倍にとどまっていることがわかった。プロテアーゼ阻害剤が治療に加わることにより、体内でのウイルス増殖を極力抑え、著明な効果を挙げる事が報告されている。しかし一端作られてしまった耐性変異は、順次耐性遺伝子の蓄積によってさらに高度の耐性を獲得し、複数のプロテアーゼ阻害剤に交差耐性を示すことが知られているため、臨床の現場では、血中ウイルス量の増減から薬剤の効果判定に加えて、耐性出現を知り、薬剤変更の参考とすることが必要である。そのため、この細胞を用いて薬剤感受性試験を行うことは、患者の臨床経過を追って治療を進める上でも有用であると示唆され、また他の薬剤についても検討を行い、今後の臨床応用が可能であると考えられた。



## E. 結論

今回検討した MAGIC5 による薬剤感受性試験は、臨床分離株から直接耐性検査を迅速に行うことが出来た。今後の臨床応用が期待される。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Gatanaga H, Oka S., Ida S., Wakabayashi T, Shioda T, and Iwamoto A. Active HIV-1 redistribution and replication in the brain with HIV encephalitis. Arch Virol 144; 29-43, 1999.

2. Honda M., Yasuoka A., Aoki M, and Oka S. A generalized seizure following initiation of nelfinavir in a patient with human immunodeficiency virus type 1 infection; suspected due to interaction between nelfinavir and phenytoin. Intern Med (in the press)

3. Tachikawa N., Goto M., Hoshino Y., Gatanaga H., Yasuoka A., Wakabayashi T., Katano Y., Kimura S., Oka S., and Iwamoto A. PCR detects *Toxoplasma gondii*, Epstein-Barr virus, and JC virus DNAs in the cerebrospinal fluid in AIDS patients with focal CNS complications. Intern Med (in the press)

### 2. 学会発表

酒井敦子、相沢佐織、井田節子、岡慎一ら、「CCR5 発現 Hela/CD4<sup>+</sup>LTR-beta Gal 細胞を用いた抗 HIV 薬剤耐性検査に関する検討」、第 73 回日本感染症学会総会、平成 11 年 3 月 30 日、東京。

## G. 研究協力者

国立国際医療センター

酒井敦子、相沢佐織、田中真理、高橋由紀子、井田節子、瀧永博之、平林義弘

国立感染症研究所

巽正志、小島朝人

表 1 : ウイルス分離率とウイルス量の相関

n=87		陽性率
VL量4乗以上	36名	77%
VL量3乗以上4乗未満	33名	6%
VL量2乗以下	16名	1%
未測定	2名	0%

表 2 : レプター発現量と感染

	CD4	CXCR4	CCR5	NL432	BaL	CL1	CL2	CL3
MAGIC5 C16	0.1%	0.2%	95%	—	+	—		
MAGIC5A C11-10	99%	0.2%	86.5%	+	+	+	+	+
MAGIC5C C14	97.8%	0.7%	95.9%	+	+		+	—
MAGI-CCR5(NIH)	78.5%	1.8%	1.1%	+	—	—		

表 3 : 表現型と遺伝子型の比較

	AZT	d4T	3TC	RTV
NL432	0.025	2.6	0.95	0.025 uM/ml
Case1	104倍	6.5倍	9.47倍	108倍
genotype	41	—	—	71/46/82/90
Case2	52倍	4.6倍		
genotype	215	—	—	—
Case3	3.2倍	3.0倍		—4.1倍
genotype	215		184	
Case4	3.2倍	1.9倍	105倍	128倍
genotype	41/215/184/67	75	184	54/82/36
Case5	—7.8倍	—1.2倍		—2.5倍
未治療				

### 3. HIV 感染宿主におけるサイトメガロウイルス網膜炎の病態解析

分担研究者 倉田 毅 (国立感染症研究所感染病理部)  
研究協力者 柏瀬光寿、佐多徹太郎、佐藤由子、岩崎琢也  
(国立感染症研究所感染病理部)  
永田洋一 (東京大学医学部付属病院分院眼科)

**研究要旨** HIV 感染宿主ではサイトメガロウイルス(CMV)感染に陥りやすく、重篤になりやすい。とくに CMV 網膜炎は HIV 感染宿主ではエイズ末期に頻回に繰り返し、最終的に失明に至ることが多い。CMV 網膜炎の形態学的基盤を明らかにすることを目的として、HIV 剖検 15 例の眼球組織ならびに視神経について検討を行い、臨床症状との相関を解析した。その結果、臨床的に 13 例 21 眼に CMV 網膜炎が確認され、網膜周辺部に病巣が初発する indolent type (6 例 10 眼)と、後極に生じる fulminant type (8 例 11 眼)に区別された。病変の組織学的局在は眼底所見とよく一致した。indolent type から fulminant type に、あるいは逆に進行する例はみられなかったが、9 例 14 眼で視神経に感染が進行した。このような視神経の CMV 感染は HIV 感染宿主以外で生じることはなく、HIV 感染宿主特有の CMV 網膜炎の転帰であり、重篤な視力障害をもたらす原因である。

#### A. 研究目的

HIV 感染宿主ではサイトメガロウイルス (CMV) 感染に陥りやすく、失明、消化管出血、呼吸障害等の重篤な症状を呈しやすい。昨年度報告したように、当研究室で集積した HIV 剖検 51 例では約 70%にあたる 36 例で HCMV 感染を病理形態学的に認めている。これらの症例のうち、全身性感染例は 17 例とほぼ半数に達し、肺、消化管、副腎に感染細胞が検出され、感染病巣は臨床症状をもたらし、ときに死因となっていた。

HIV 感染宿主のみられる CMV の由来は、本邦成人の大多数が若年期までに CMV に罹患していることより、体内に潜伏していたウイルスの再活性化であることが多い。この再活性化の機転として、HIV 感染による CD4 細胞の体内からの消失という機転による細胞性免疫機能の障害が第一にあげられるが、潜伏していたウイルスが再活性化する機序は明確にされていない。

AIDS 患者の約 40%に生じる CMV 網膜炎は、免疫不全状態のため治療に抵抗し、その結果として失明に至る重篤な眼合併症として知られている。CMV 網膜炎は CMV の感染病巣を肉眼的に観察できるため、非常に早期に感染の存在を知ることができる一方、他の組織の感染と異なり生検ができないため、病理学的検索は非常に限られています。

今年度の解析は臨床的に CMV 網膜炎を発症した AIDS 患者の剖検時の摘出眼球において、臨床症状と比較しながら、CMV 網膜炎の病理組織学的解析を行った。

#### B. 材料と方法

国立感染症研究所感染病理部に登録された HIV 剖検例 ならびに生検・手術例 (眼球摘出例) を対象とし、HCMV 感染について、ウイルス病理学的に解析した。具体的には、AIDS 剖検 15 例から、剖検時に採取された 24 眼球を対象とした。これらの症例の HIV 治療は 1 剤ないし 2 剤の抗 HIV 剤投与であった。HAART 治療の症例は含まれていない。

剖検時摘出した眼球組織は直ちに緩衝ホルマリン溶液で固定され、パラフィンに包埋された。薄切標本を作製し、hematoxylin-eosin 染色と免疫組織化学的染色を行った。免疫染色の一次抗体として、HCMV のウイルス粒子抗原を認識するウサギ血清、HCMV の主要前初期遺伝子 IE1 の exon 4 の遺伝子産物を認識するウサギ血清、IE2 の exon 5 の遺伝子産物を認識するマウス単クローン抗体を用い、ABC-ペルオキシダーゼ法により、DAB を基質とし、抗原の局在を検討した。核染色はメチルグリーンもしくはヘマトキシリンで行った。

なお、このほかに単純ヘルペスウイルス(HSV)、水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)、ヒトヘルペスウイルス 6 (HHV6)のウイルス構成蛋白を認識する抗体を用いた免疫組織化学的解析、さらに、真菌を検出するため PAS 染色も行った。

#### C. 結果

##### I. 網膜における HCMV 感染：

臨床的には CMV 網膜炎は 13 例 21 眼に認められた。網膜炎発症時の CD4 陽性 T リンパ球数

は1~40/μl、平均8.5/μlであった。生前のCMV抗原血症の解析は臨床的にCMV網膜炎と診断された6例で行われ、全例陽性であった。臨床的にCMV網膜炎は、視神経乳頭や黄斑部を含む後極部に発症するタイプfulminant typeとその周辺に発症するタイプindolent typeに区別された。

a. indolent type (図1): 眼底周辺部にCMV網膜炎が生じ、症状としては視力障害が明らかではなく検査によりCMV網膜炎の存在が明らかにされた6例10眼は非常にゆっくりと進行した。死亡時indolent typeのCMV網膜炎の像を示した眼球組織では、組織学的に感染病巣は網膜周辺部に局限していた。病巣部の網膜の層構造が著しく破壊され、一部壊死に陥り、また脱落消失していた。病巣部辺縁の網膜の層構造が保存されている部分でもCMV感染に特異的な巨細胞封入体が観察された。免疫組織化学的にも、前初期遺伝子産物よりもウイルス構成蛋白抗原が検出され、ウイルス増殖を伴った感染病巣であることが確認された。

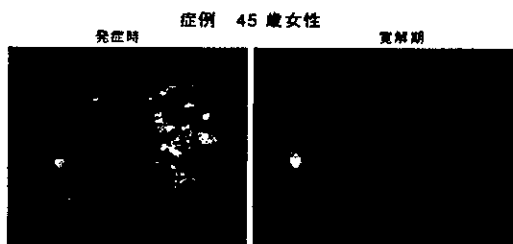


図1. indolent type の眼底所見。45才女性。

b. fulminant type (図2): 視力を司る網膜後極部に感染が生じ、急速に臨床症状が進行するfulminant typeは10例15眼に認められた。眼底所見としては黄斑部を中心として、出血を伴った白い滲出斑等がみられる(図2)。組織学的にはindolent typeとの違いはなく、網膜全層が壊死に陥り、わずかに残存する網膜に感染細胞が認められた。リンパ球などの炎症細胞はみられない。免疫組織学的にもウイルス構成蛋白の抗原が多数みられ、増殖性のウイルス感染病巣であった。

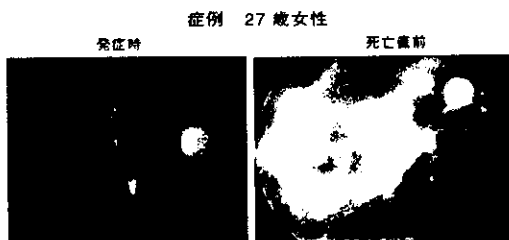


図2. fulminant type の眼底所見。27才女性。

## II. 視神経におけるHCMV感染:

CMV網膜炎がみられた13例のうち、9例14眼に視神経乳頭部に感染が生じ、臨床的に視機能が急激に低下し、失明している。このような症例をoptic nerve involvementとした。眼底所見では視神経乳頭は境界が不鮮明となり、滲出斑と出血を伴っていた(図3)。

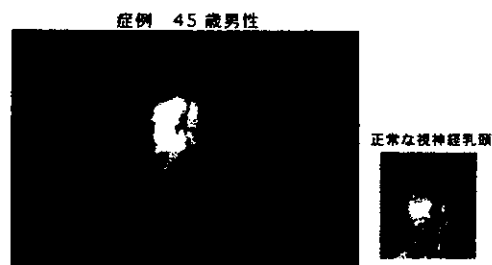


図3. optic nerve involvement の眼底所見

optic nerve involvementを来した症例の視神経乳頭部の病理組織学的解析では、視神経組織に多数の巨細胞封入体が生じていた。網膜と視神経の接点である篩状板では網膜から視神経に連続性に感染細胞が認められた(図4)。

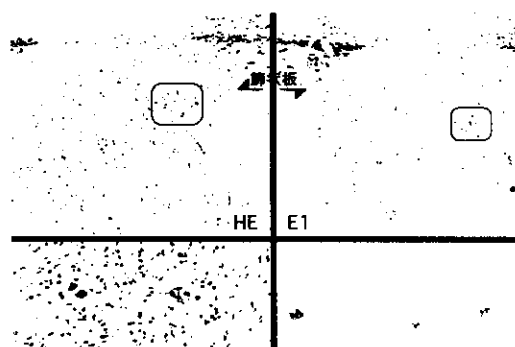


図4. optic nerve involvementを来した症例の視神経乳頭部の組織変化とウイルス抗原

なお、脈絡膜や強膜、角膜、虹彩、毛様体などにCMV感染は検出されなかった。

## III. 網膜のCMV感染の拡大様式

optic nerve involvementは、既存にindolent typeあるいはfulminant typeのCMV網膜炎を罹患していた症例(眼)にのみ認められた。indolent typeのCMV網膜炎を示した9眼のうち7眼が、fulminant typeの10眼のうち7眼が最終的に視神経乳頭に感染が進展した。既存の感染病変が認められない網膜にはoptic nerve involvementは生じていない。従って、視神経乳頭へのCMV感染は網膜組織からの進展によることが予想された。広範囲に感染がみられた例では、網膜の一部では全層性に感染が生じ、その周辺では表層よりの神経節細胞層に広範囲に感染細胞が散在して

いた (図 5)。

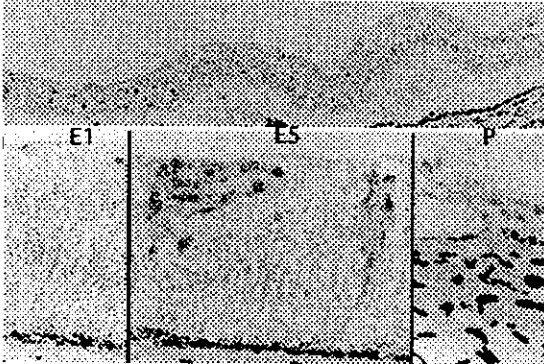


図 5. 広範囲にウイルス抗原陽性細胞が分布していた網膜。

#### D. 考 察

体内に潜伏していた CMV の再燃による CMV 網膜炎の発症には末梢血の CD4 陽性細胞の絶対数が関与していることが示唆されているが、網膜病変の再燃ならびに視神経乳頭部への感染拡大に関与する因子は明らかにはできなかった。

CMV の網膜感染の初期病変を今回の解析で捉えることはできず、感染病巣が網膜のブドウ膜よりから開始されるのか、表層の神経節細胞層から開始されるのかは決定できなかった。しかし、視神経乳頭部の病変が神経節細胞層の感染の延長線上にあるとすれば、網膜の外層より感染が開始され、その後、神経節細胞層内でウイルス感染が拡大し、最終的に視神経乳頭に感染が及ぶと考えるのが合理的であると推察する。

#### E. 結 論

以上の結果を総括すると、CMV 網膜炎は臨床的にも病理組織学的に indolent type と fulminant type の 2 つのタイプに分けられる。CMV 網膜炎の転帰として、神経節細胞層内をウイルス感染が拡大し、視神経乳頭部にまで感染が及び、視機能低下をきたし、失明する。このような転帰は剖検例では約 80% の頻度で生じている。

#### F. 業績リスト

1. Kannagi, M., Nakamura, T., Akari, H., Kuroda, M.J., Fujii, M., Oka, S., Iwamoto, A., Kurata, T., Higashi, D., Harada, S.: Dual phasic suppression of viral replication following de novo human

immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection in lymphocytes of asymptomatic HIV-1 carriers. *Leukemia* 11 (Suppl 3): 545-547, 1997

2. Chiba, J., Nakano, M., Suzuki, Y., Aoyama, K., Ohba, H., Kobayashi, T., Yasuda, A., Kojima, A. & Kurata, T.: Generation of neutralizing antibody to the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1 by immunizing of mice with an infectious vaccinia virus recombinant. *J. Immunol. Methods* 207: 53-60, 1997
3. Ota, S., Kizaka-Kondoh, S., Hashimoto, Y., Nishihara, H., Nagashima, K., Kurata, T., Okayama, H. and Matsuda, M.: Constitutive association of EGF receptor with the CrkII-23 mutant that inhibits transformation of NRK cells by EGF and TGF- $\beta$ . *Cell. Signal.* 10: 283-290, 1998.
4. Takahashi, H., Kurata, T. and Nagashima, K.: AIDS dementia and HIV-1 replication. *Neuropathology* 17: 4-10, 1997.
5. Obara, Y., Furuta, Y., Takasu, T., Suzuki, S., Suzuki, H., Matsukawa, S., Fujioka, Y., Takahashi, H., Kurata, T. and Nagashima, K.: Distribution of Herpes Simplex Virus Types 1 and 2 Genomes in Human Spinal Ganglia Studied by PCR and In Situ Hybridization. *J. Med. Virol.* 52: 136-142, 1997.
6. Hashimoto, Y., Katayama, H., Kiyokawa, E., Ota, S., Kurata, T., Gotoh, N., Otsuka, N., Shibata, M. and Matsuda, M.: Phosphorylation of CrkII adaptor protein at tyrosine 221 by epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* 273: 17186-17191, 1998.
7. Brandful, J.A.M., Ampofo, W.K., Janssens, W., Adu-Sarkodie, Y., Apeagyei, Anyomi, F., Aidoo, S., Yamamoto, N., Ishikawa, K., Sata, T. and Kurata, T.: Genetic and phylogenetic analysis of HIV type 1 strains from Southern Ghana. *Aids Res. Hum. Retrovir.* 14: 815-819, 1998.
8. Tokunaga, K., Kiyokawa, E., Nakaya, M., Otsuka, N., Kojima, A., Kurata, T. and Matsuda, M.: Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 virion entry by dominant-negative Hck. *J Virol* 72: 6257-6259, 1998.
9. Tokunaga, K., Kojima, A., Kurata, T., Ikuta, K., Akari, H., Koyama, H., Kawamura, M., Inubushi, R., Shimano, R. and Adachi, A.: Enhancement of human immunodeficiency virus type 1 infectivity by Nef is producer cell-dependent. *J. Gen. Virol.* 79: 2447-2453, 1998.
10. Tokunaga, K., Kojima, A., Kurata, T., Ikuta,