

3. Magic 5 を用いた Phenotypic resistance assay 法の確立と臨床的意義

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部長)
研究協力者 蜂谷 敦子 (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良く分離出来る MAGIC5 Cl1-10 を用いて、ウイルス分離から逆転写酵素阻害剤およびプロテアーゼ酵素阻害剤の薬剤耐性検査までを2週間で検出できる系を確立した。genotype 法では、薬剤耐性変異が複数蓄積した場合や明らかにされていない薬剤耐性変異を伴っていた場合の評価は明確ではなかったが、MAGIC5 を用いた phenotype 法は耐性ウイルスを総合的に判断することが可能となった。治療前の自然耐性や、治療失敗後の薬剤変更時に有用な情報を与えてくれるものと期待される。

A. 研究目的

プロテアーゼ阻害剤を中心とした多剤併用療法により HIV 感染症の予後は飛躍的に改善したが、治療失敗例も少なくなく、その一因として薬剤耐性変異ウイルスの出現が挙げられる。現在、それらのウイルスを検出するためには、遺伝子型(genotype)での耐性検査が主流であるが、多剤併用療法に伴い蓄積された耐性変異や現在報告されていない耐性変異の存在など、genotype 法による結果の総合的な解釈は非常に難しいとされている。そのため、耐性の度合いを総合的に判断することができる生物学的な表現型(phenotype)での感受性試験を確立する目的で今回の研究を行った。そしてこの phenotype による解析データが、臨床側で多数承認されている抗 HIV 薬の選択および変更の際の判断の1つとして用いられるかどうかについて検討を行った。

B. 研究方法

1. 対象患者

対象は1997年12月から2000年1月までに当院に通院した患者137名245検体について検査を行った。

2. ウイルス分離

昨年報告した方法と同様、感染当日、患者由来の plasma 1ml を 15000rpm 90min にて遠心し、上清を取り除いた。Infection Medium (Complete Medium containing

20ug/ml DEAE-Dextran) を 300ul 加え、培養し、細胞の発育が 90%の状態になったら液換えを行った。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・・・感染当日、ウイルスを×1から×1000に Infection medium で希釈し、各ウェルに 100ul ずつ加え、37℃、5% CO₂ インキュベーターにて培養した。48h 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・・・感染当日、100~300 plaque forming unit(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 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% CO₂ インキュベーターにて培養した。48h 後、染色を行い、数をかぞえ、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 IC₅₀ とした。

プロテアーゼ阻害剤・・・100~300 plaque forming unit(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 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%

CO2 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、培養した。48h 後、染色を行い、数をかぞえ、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 IC50 とした。

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 TM 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。

C. 結果

1. MAGIC5 とウイルス量の相関

MAGIC5 を用いて、210 検体中 129 検体からウイルスを分離した。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%、4 乗未満で 8% であった。このことからウイルス量が 4 乗以上であれば、この方法を用いてウイルス分離が可能であると認められた。

2. NL432 における再現性

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、NFV について NL432 での再現性 (triplicate × 5 回) を調べたところ、Table. 1 に示す通り良好な再現性が示された。

3. 表現型 (phenotype) と遺伝子型 (genotype) の比較

この MAGIC5A CL1-10 を用いて、得られた臨床分離株 129 検体とラボ株 2 検体を用いて、各薬剤の耐性検査を行った。さらに臨床分離株は、AZT46 検体、d4T47 検体、3TC48 検体、RTV41 検体、SQV41 検体、NFV43 検体について、遺伝型との解析結果と比較した。また無治療での各薬剤に対する IC50 の値を Table. 2 に示した。無治療であるにもかかわらず、AZT、RTV、SQV、NFV については、NL432 と比べ 4 倍以上耐性に傾いていることが認められた。

AZT(Fig. 1)

NL432 を用いて得られた値を 1 倍とし、無治療群での AZT に対する phenotype での耐性の度合いは、0.1~5 倍 (平均 1.2 倍) であった。それに比べ genotype での耐性変異が 41、215 の単独もしくは、両者の組合わさった変異が認められた場合、2.6 倍~106 倍 (平均 70 倍) と耐性に傾くことがわかった。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、0.53~14 倍 (平均 6.7 倍) と感受性を取り戻していることが確認された。そしてこの 3 つの組み合わせに、67、219 の耐性変異が加算された場合には、2.6~106 倍 (112 倍) となり、再び高度耐性を獲得していることがわかった。

3TC(Fig. 2)

無治療群での 3TC に対する phenotype での耐性の度合いは、0.12~3.86 (平均 1.4 倍) であった。それに比べ genotype で 184 の耐性変異が認められた場合、すべての検体において 120 倍以上の高度耐性を獲得していた。また 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 0.12~31 倍 (平均 9.5 倍) と低い耐性が認められた。

d4T(Fig. 3)

無治療群での d4T に対する phenotype での耐性の度合いは、0.4~3.2 倍 (平均 1 倍) であった。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が、当センターにおいて 75 に対する変異を獲得したウイルスは見つかっているものの、耐性変異と報告されているアミノ酸置換ではなかった。しかし 3TC と同様、75 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 0.04~8.18 倍 (平均 2.3 倍) と低い耐性が認められた。

RTV(Fig. 4)

無治療群 15 名、また RTV の治療歴があるが genotype での耐性変異が全く認められない 6 名に対する phenotype での耐性変異の度合いは、0.33~2.53 倍 (平均 0.8 倍) であった。Primary mutation である 82 が wild type であり、secondary mutation が 1 つ (36 か 71) の変異であれば、0.33~1.33 倍であるが、2 つ以上の変異が伴うと 12~106 倍 (平均 72 倍) と中等度耐性から高度耐性を獲得していた。そして primary mutation である 82 の耐性変異が伴うと、secondary mutation の

数にかかわらず、すべて100倍前後(平均105倍)の高度耐性を獲得していた。

SQV(Fig. 5)

無治療群16名、またSQVの治療歴があるがgenotypeでの耐性変異が全く認められない12名に対するphenotypeでの耐性変異の度合いは、0.1~10倍(平均1.9倍)であった。またsecondary mutationが1つ(10か82)の変異であれば、0.34~3.2倍であるが、primary mutationである90に耐性変異が認められると6.6~100倍(平均60.7倍)と中等度耐性から高度耐性を獲得していた。

NFV(Fig. 6)

無治療群4名、またNFVの治療歴があるがgenotypeでの耐性変異が全く認められない2名に対するphenotypeでの耐性変異の度合いは、0.33~10倍であった。そして無治療であるにもかかわらず、secondary mutationである36、63、77の単独変異もしくは63、77の組合わさった変異については、ウイルスのpolymorphismであると考えられた。そのため無治療群ではsecondary mutationが1つであれば、0.3~4.6倍(平均1.2倍)、2つ同時に認められれば0.3~1.5倍(平均1.3倍)とどちらも感受性を示しているのに対して、治療群については1つであれば、0.6~103倍(平均21.3倍)、2つ同時に認められれば10.6~333倍(平均115倍)と中等度耐性から高度耐性を獲得していた。またprimary mutationである30に耐性変異が認められると53~333倍(平均165倍)と高度耐性を獲得していた。

D. 考察

現在、薬剤耐性変異ウイルスを検出するためには、(1)薬剤作用領域の塩基配列の変異を調べる遺伝子型(genotype法)と(2)直接HIVを薬剤存在下で培養し、増殖を抑えることのできる濃度(IC₅₀、IC₉₀)を求めて評価する表現型(phenotype法)、そして(3)組み替え(recombinant)DNA技術を利用し、患者由来の感染性recombinant HIVを作り、phenotype法を行うrecombinant virus assayの3つが挙げられる。このうち短時間で、操作性にも優れ、比較的容易に結果が得ることができるgenotype法が主流となっているが、その反面、報告されていない耐性変異の出現や複数の変異が蓄積した場合での総合的な判断は、この方法において難しいとされている。それに比べ、耐性の度合いを総合的

に判断することができるphenotype法での検出方法は、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、労力が必要であると考えられ、一般的には行われてはいない。またrecombinant virus assayについても、患者由来のウイルスの薬剤作用領域をHIVベクタープラスミドに組み込む技術が非常に熟練を要するため、phenotype法と同様、一般的には行われていない。そこで今回われわれは、MAGIC5によるphenotype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。従来でのPBMCを用いたphenotype法では、結果が得られるまでに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でき、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。我々の結果から、無治療の患者ではコントロールであるNL42に比べ、耐性の度合いが、平均して1倍前後であったが、中には10倍という検体が認められた。これらのウイルスは、genotype法でも耐性変異が認められていないにもかかわらず、phenotype法では低度耐性を獲得していることがわかり、今後臨床において治療開始時の薬剤選択の判断時に参考となるデータであることがわかった。さらにgenotype法とphenotype法を比較したところ、75の耐性変異を検出出来なかったd4Tを除く薬剤については、良好な相関が得られた。しかし3TC、d4Tについては、wild typeであっても、逆転写酵素阻害剤の治療歴があるものでは、低度耐性が認められた。またAZTについても41,184,215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。さらにプロテアーゼ阻害剤では、primary mutationが認められると100倍前後の高度耐性を示し、genotype法とphenotype法で得られた結果が一致したことが認められた。ウイルスは薬剤投与下に適応するためsecondary mutationを獲得することが知られている。以前に他のプロテアーゼ阻害剤で治療された患者では、NFVに対する反応が50%程度しかないということが報告されたが、今回このようなケースにおいてNFVに対するprimary mutationが認められなくてもsecondary

mutation が見つかった。この secondary mutation は、無治療の患者では感受性に示しているものの、プロテアーゼ阻害剤の治療歴がある患者については、耐性を示しているということが、phenotype 法により示唆された。これらの結果から MAGIC5 を用いた phenotype 法は、genotype 法で判断できなかった耐性の度合いを明確にし、今後の多剤併用療法で使用する薬剤選択の判断の一つとして有用であると考えられた。また今後、新たに承認される他の薬剤についても検討を行い、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、今後の臨床応用の可能性として (1)無治療から抗 HIV 薬投与開始時の薬剤選択の判断、(2) PI を含む治療失敗例での薬剤選択の判断として示唆された。

F. 研究発表

- 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.
- Ishikawa S., Hashinaka K., Hashida S., Oka S., and Ishikawa S. Use of indirectly immobilized recombinant p17 antigen for detection of antibodies to HIV-1 by enzyme immunoassay. *J Clin Lab Analysis* 13; 9-18, 1999.
- 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* 38:302-303, 1999.
- Tomiyama H., Chujoh Y., Shioda T., Miwa K., Oka S., Kaneko Y., and Takiguchi M. Cytotoxic T-lymphocyte recognition of HLA-B*5101-restricted HIV-1 Rev epitope which is naturally processes in HIV-1 infected cells. *AIDS* 13: 861-863, 1999.
- Tomiyama H., Sakaguchi T., Miwa K., Oka S., Iwamoto A., Kaneko Y., and Takiguchi M. Identification of multiple HIV-1 CTL epitopes by HLA-B*5101 molecules. *Hum. Immunol.* 60: 177-186, 1999.
- Aizawa S., Gatanaga H., Ida S., Sakai A., Tanaka M., Takahashi Y., Hirabayashi Y., and Oka S. Clinical benefits of resistance assay for HIV-specific protease inhibitors: when to check and in whom? *AIDS* 13: 1278-1279, 1999.
- 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* 38: 556-562, 1999
- Fukada K., Chujoh Y., Tomiyama H., Miwa K., Kaneko Y., Oka S., and Takiguchi M. HLA-A*1101-restricted CTL recognition of HIV-1 Pol protein. *AIDS* 13: 1413-1414, 1999.
- Gatanaga H., Hoshikawa N., Tahara T., Kato T., and Oka S. Serum thrombopoietin levels correlate with disease progression of AIDS. *AIDS* 13: 1590-1591, 1999.
- Toriyoshi H., Shioda T., Sato H., Sakaguchi M., Eda Y., Tokiyoshi S., Kato K., Nohtomi K., Kusagawa S., Taniguchi K., Shiino T., Kato A., Foongladda S., Oka S., Iwamoto A., Wasi C., Nagai Y., and Takebe Y. Sendai virus based production of HIV-1 subtype B and E gp120 and their use for highly sensitive detection of subtype-specific serum antibody. *AIDS Res Hum Retrovirus* 15: 1109-1120, 1999.
- Aizawa S., Ida S., Sakai-Hachiya A., Tanaka M., Takahashi Y., Hirabayashi Y., Sugiura W., Kimura S., and Oka S. Intention-to-treat analysis of anti-HIV therapies and incidence of drug resistance after a year of treatment. *Jap J Infect Dis* 52: 129-131, 1999.
- Gatanaga H., Aizawa S., Kikuchi Y., Tachikawa N., Genka I., Yoshizawa S., Yamamoto Y., Yasuoka A., and Oka S. Anti-HIV effect of saquinavir combined with ritonavir is limited by previous long-term therapy with protease inhibitors.

- AIDS Res Hum Retrovirus 15: 1493-1498, 1999.
13. Tanaka M., Hirabayashi Y., Gatanaga H., Aizawa S., Sakai A., Takahashi Y., Tashiro E., Kohsaka T., Oyamada M., Ida S., and Oka S. Decrease of IL-2-producing cells but not TH1 to TH2 shift in moderate and advanced stages of disease in human immunodeficiency virus type-1-infected individuals; direct analyses of intracellular cytokines in CD4+CD8- T cells. *Scand J Immunol* 50: 550-554, 1999.
 14. Kojima T., Tachikawa N., Yoshizawa S., Yasuoka C., Yamamoto Y., Genka I., Teruya K., Kikuchi Y., Aoki M., Yasuoka A., and Oka S. Hepatitis A virus outbreak; A possible indicator of high risk sexual behaviour among HIV-1 infected homosexual men. *Jap J Infect Dis* 52: 173-174, 1999.
 15. Tachikawa N., Yoshizawa S., Kikuchi Y., Yasuoka A., and Oka S. Saquinavir therapy in patients with the advanced HIV infection and liver cirrhosis. *Jap J Infect Dis* 52: 177-178, 1999.
 16. Fukada K., Tomiyama H., Chujoh Y., Miwa K., Kaneko Y., Oka S., and Takiguchi M. HLA-A*1101-restricted CTL recognition for novel epitope derived from HIV-1 ENV protein. *AIDS* 13: 2597-2599, 1999.
 17. Yamamoto Y., Yasuoka A., Tachikawa N., Gatanaga H., and Oka S. Mitigation of hepatocellular injury caused by HIV-specific protease inhibitors with glycyrrichin compound in patients co-infected with HCV and HIV. *Jap J Infect Dis* 52: 248-249, 1999.
 18. Tachikawa N., Yasuoka A., and Oka S. Improvement of onychomycosis without antifungal therapy after initiation of highly active anti-retroviral therapy in an HIV-infected patient. *Jap J Infect Dis* 52: 245-246, 1999.
 19. Yoshizawa S., Yasuoka A., Kikuchi Y., Honda M., Gatanaga H., Tachikawa N., Hirabayashi Y., and Oka S. A 5-day course of oral desensitization to trimethoprim/sulfamethoxazole (T/S) is successful in patients with human immunodeficiency virus type-1 infection who were previously intolerant to T/S but had no sulfamethoxazole-specific IgE. *Ann Allergy Asthma Immunol* (in the press)
 20. Gatanaga H., Yasuoka A., Kikuchi Y., Tachikawa N., Aoki M., and Oka S. Influence of prior HIV-1 infection on the development of chronic hepatitis B infection. *Eur J Clin Microbiol Infect* (in the press)
 21. Hachiya A., Aizawa S., Tanaka M., Takahashi Y., Ida S., Gatanaga H., Hirabayashi Y., Kojima A., Tatsumi M., and Oka S. A rapid and simple phenotypic assay for drug susceptibility of human immunodeficiency virus by using CCR5 expressed HeLa/CD4-positive cells clone 1-10 (Magic 5). *Antimicrob Agent Chemother* (submitted).

G. 学会発表

1. 酒井敦子、相沢佐織、巽正志、岡慎一ら、「CCR5発現 HeLa/CD4 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
2. 蜂谷敦子、相沢佐織、巽正志、岡慎一ら、「CCR5発現 HeLa/CD4 LTR-beta Gal 細胞を用いた抗 HIV 薬剤耐性検査に関する検討」第 13 回日本エイズ学会総会、平成 11 年 12 月 3 日、東京

Table.1 Reproducibility of the MAGIC 5 assay with NL432

drug ^a	No. of repeat	IC ₅₀ (μ M)		SEM ^b	CV ^c
		mean	range		
AZT	5	0.03	0.015 - 0.04	0.005	0.15
d4T	5	2.32	0.68 - 4.2	0.568	0.25
3TC	5	0.83	0.5 - 1.0	0.089	0.11
RTV	5	0.03	0.018 - 0.06	0.008	0.26
SQV	5	0.01	0.001 - 0.032	0.006	0.41
NFV	5	0.003	0.001 - 0.004	0.001	0.17

a: AZT; zidovudine, d4T; stavudine, 3TC; lamivudine, RTV; ritonavir, SQV; saquinavir, NFV; nelfinavir

b: standard error of the mean

c: coefficient of variation

Table.2 Variability of IC₅₀s of clinical isolates obtained from anti-viral naive patients

drug ^a	n	IC ₅₀ (μ M)		SEM ^b	fold increase ^c
		median	range		
AZT	22	0.03	0.003 - 0.15	0.006	0.1-5
d4T	21	2.1	0.33 - 7.5	0.436	0.14-3.23
3TC	20	1	0.1 - 3.2	0.202	0.12-3.86
RTV	15	0.03	0.01 - 0.08	0.005	0.33-2.67
SQV	16	0.01	.001 - 0.1	0.006	0.1-10
NFV	14	0.004	0.001 - 0.03	0.002	0.3-10

a: AZT; zidovudine, d4T; stavudine, 3TC; lamivudine, RTV; ritonavir, SQV; saquinavir, NFV; nelfinavir

b: standard error of the mean

c: Fold increase was calculated by dividing IC₅₀s of each drug by the mean IC₅₀ for NL432.

Fig. 1 Relation of phenotypic zidovudine resistance and genotype

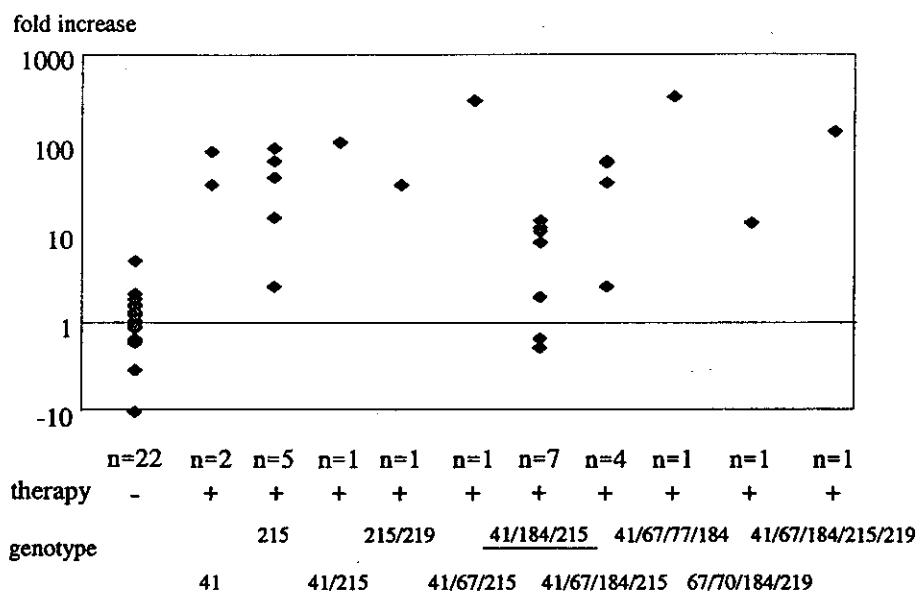


Fig. 2 Relation of phenotypic lamivudine resistance and genotype

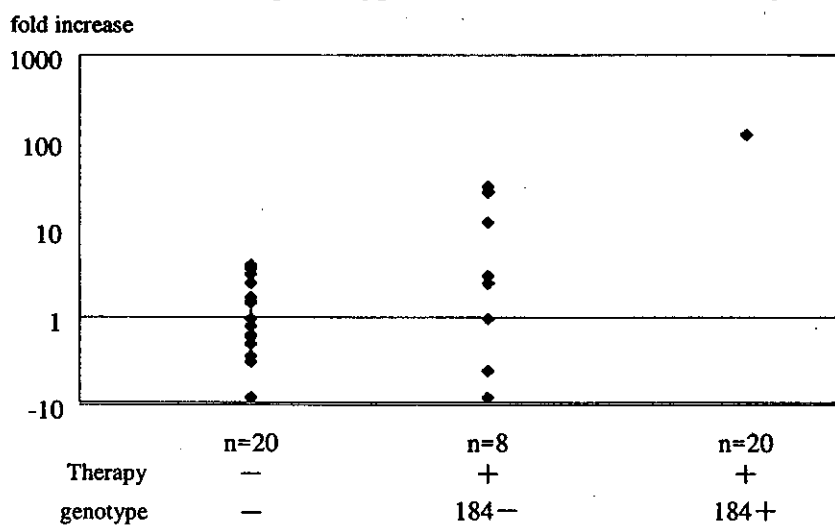


Fig. 3 Relation of phenotypic stavudine resistance and genotype fold increase

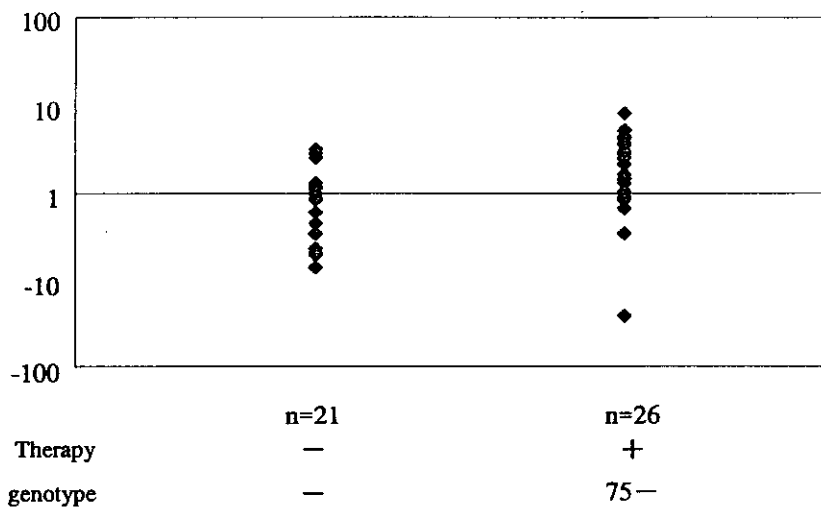


Fig. 4 Relation of phenotypic ritonavir resistance and genotype fold increase

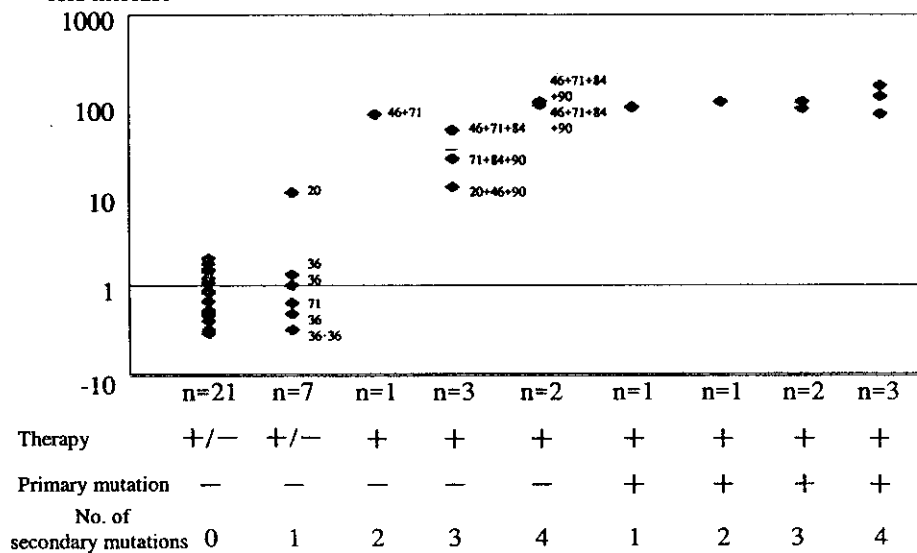


Fig. 5 Relation of phenotypic saquinavir resistance and genotype

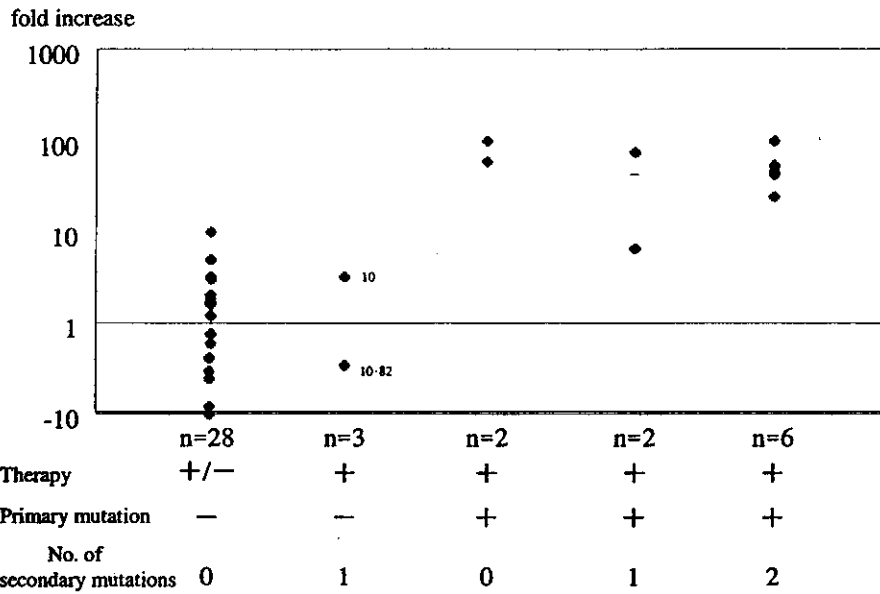
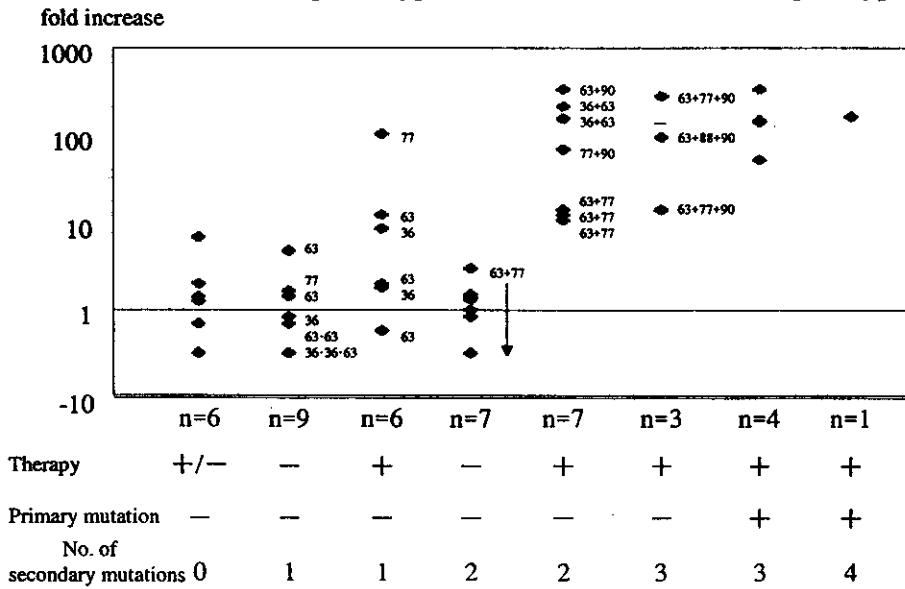


Fig. 6 Relation of phenotypic nelfinavir resistance and genotype



4. CD4⁺ T 細胞サブセット間の T-tropic、M-tropic HIV-1 に対する感受性の違い

分担研究者 生田 和良 (大阪大学微生物病研究所ウイルス免疫分野教授)
共同研究者 堀越 東子・笹尾 芙美子・向井 徹
(大阪大学微生物病研究所ウイルス免疫分野)

研究要旨 *in vivo* において病態進行と相関して T 細胞上の CD38 の発現が変化することが数多く報告されている。そこで、我々は CD4⁺/CD38⁺ と CD4⁺/CD38⁻ 分画の HIV-1 トロピズム、ウイルス産生量についての比較を行った。両分画の CD4、CCR5、CXCR4 の発現を Flow cytometry 解析により検討したところ、CD4、CXCR4 の発現については両分画で差がなかったが、CCR5 の発現は CD38⁻ 分画の方が有意に高かった。次に M-tropic、T-tropic なウイルスの感染実験を行い、両分画のウイルス産生量を比較したところ、M-tropic なウイルスの感染実験においては予想した通り、CD38⁻ の分画が高いウイルス産生能を示した。ところが、T-tropic なウイルスの感染実験においては、予想に反して CD38⁺ 分画において CD38⁻ 分画よりも高いウイルス産生が認められた。CD4⁺/CD38⁺、CD4⁺/CD38⁻ の両分画の CD4、CXCR4 の発現、また、ウイルス吸着量に差が認められなかったことから、吸着・侵入の段階では両分画に差はなく、その後のインテグレーション等の過程で両分画に差があると予想される。以上の結果は、CD38 陽性、陰性細胞率を指標に HIV 感染者の病態進行度を予測し得るばかりでなく、病態進行機序とともに M-tropic から T-tropic なウイルスへシフトする機構の解明につながると考えられる。

A. 研究目的

HIV-1 感染病態はプラズマウイルス負荷と相関する。ウイルス産生は感染初期から活発に起こっている。また、HIV-1 キャリアから得られるウイルスの Population は heterogeneous であり、これはキャリア生体内の細胞が heterogeneous であることに起因していると考えられる。病態進行とともにウイルスのトロピズムが変化するのも、病態進行とともに CD4⁺ 細胞の Population が変化することが原因と考えられている。従って、病態進行とともに変化していく細胞集団と病態との関連性を追求することは病態機序の理解に必須である。

これまで、CD4⁺ T 細胞サブセット間のウイルス感受性の差異については、Memory と Naive、Th1 と Th2 間などで検討されてきた。この分野の研究、特にウイルストロピズムの研究はコレセプターの発見により飛躍的に発展

した。それまで、T-cell tropic、Macrophage-tropic ウイルスの存在が明らかとなっていたが、そのメカニズムについては不明であった。ケモカインレセプターの発見により、T-cell-tropic ウイルスが CXCR4、Macrophage-tropic ウイルスが CCR5 をそれぞれコレセプターとして用い、感染を成立させていることが明らかとなった。しかしながら、Fusion 以降の過程を左右する細胞側の因子、すなわち細胞障害性、ウイルス産生を左右する細胞側の因子の存在については残された課題である。特に、ウイルス産生を左右する細胞側の因子は直接プラズマウイルス負荷に関わる重要な因子であり、それゆえ CD4⁺ T 細胞の中でもウイルス高産生なサブセットを明らかにし、そのウイルス産生のメカニズムを解明することは重要な研究課題である。

細胞の状態を適切に表現するものとして表

面マーカーがあげられる。Memory、Naive はそれぞれ CD45RO、CD45RA で特徴づけることが出来る。また、活性化細胞は CD25、HLA-DR といった表面マーカーで特徴づけられる。AIDS キャリア体内において、病態進行に相関して宿主細胞表面における CD38、CD25、HLA-DR といった活性化マーカーの発現が増強することが知られており、現在では *in vivo* における病態評価、特に薬剤効果の評価の際に一般的にこれらのマーカーが用いられるようになった。今のところ、この現象は HIV 感染による免疫担当細胞の異常な活性化状態を示すと考えられており、ウイルス感染に対する感受性との関わりについては注目されていない。この3種の活性化マーカーは AIDS 病態を評価する際、同等に扱われることが多いが、CD25、HLA-DR 陽性細胞がもともと末梢血中に数%しか存在しないのに対し、CD38 陽性細胞は約 50% といった高い比率で存在する。また、CD25、HLA-DR が Cell activation により一時的に発現される分子であるのに対し、CD38 は分化の未熟な細胞と成熟の最終段階にある細胞の両方に発現されるというユニークな発現パターンを示す。すなわち、CD38 は T 細胞分化の初期に発現し、成熟分化段階の途中で消失し、さらに分化の最終段階になって再度発現する。さらに CD38 は Adhesion molecules として細胞の遊走にも関わる分子であり、CD38+細胞はリンパ節へ遊走し、リンパ節での樹状細胞を介した活発なウイルスの伝播に関与している可能性がある。

本年度は、CD4⁺/CD38⁺ T cell と病態進行との相関関係を検討するため、Healthy donor 由来 CD4⁺/CD38⁺ 分画、CD4⁺/CD38 分画の HIV 感受性を比較した。

B. 材料と方法

1. ウイルスと細胞

HIV-1 の LAI 株に持続感染した MOLT-4 (MOLT-4/LAI) および Ba-L 感染 PBMC の産生するウイルス粒子を用いた。

2. HIV-1 抗原検出 ELISA

ウイルス粒子量の定量は、HIV-1 Gag p24 抗原 ELISA により行った。

3. PBMC の分画

健康人末梢血より Ficoll-Paque (Pharmacia) 遠心にて PBMC を調製し、

さらにナイロンウールカラム、CD8、CD11b、CD14、CD19 抗体を用いたパニングにより CD4⁺ T 細胞分画を得た。CD4⁺ T 細胞にさらに CD25 抗体、次いで CD38 抗体、CD45RA 抗体または CD45RO 抗体のいずれかの抗体を作用させることにより resting CD4⁺/CD38⁺、CD4⁺/CD38⁻、CD4⁺/CD45RA⁺、CD4⁺/CD45RA⁻、CD4⁺/CD45RO⁻ T 細胞を分画した。

4. HIV-1 感染

それぞれの T 細胞分画 1×10⁶ に対し、Ba-L または LAI 300ng を 37℃、1 時間吸着させ、PHA、IL-2 存在下にて 3 日間活性化刺激を加えた。その後、IL-2 存在下で 8~9 日間培養を行った。上清中のウイルス量 (抗原検出 ELISA) を解析することにより、HIV-1 複製効率を比較した。また、LAI 株の感染実験においては、1 時間の吸着後の細胞の Env 抗原レベル、11 日目の細胞の Env 抗原発現レベルをフローサイトメトリーで解析することにより、両分画の HIV-1 吸着効率、複製効率を比較した。

5. フローサイトメトリー解析

CD4、CXCR4、CCR5 の発現はそれぞれの抗体を用いたフローサイトメトリー解析にて検討した。また、HIV-1 Env の発現は患者血清を用いて解析した。

C. 研究結果

1. 健康人末梢血由来 CD4⁺ T cell における活性化マーカーの発現

CD38、CD25、HLA-DR は、AIDS キャリアにおける免疫系細胞の異常な活性化状態の指標として同等に扱われることが多い。この3つのマーカーの末梢血 CD4⁺ T cell における陽性率を比較するため、健康人末梢血より CD4⁺ T 細胞を精製し、CD38、CD25、HLA-DR の発現を Flow cytometry 解析により検討した。CD38 の陽性率は 56%、CD25、HLA-DR の陽性率はそれぞれ 1%、3%であった。末梢血由来 CD4⁺ T 細胞はほとんどの細胞が Resting な状態にあり、CD25、HLA-DR 陽性細胞はほとんど存在しない。これに対し、CD38 陽性細胞は末梢血 CD4⁺ T 細胞にもともと約 50% 存在する。以上のことより、CD38 は CD4⁺ T 細胞を大きくふたつの Population

- に分ける表面分子であることが確認された。
2. CD4⁺ T cell における CD38 発現とケモカインレセプター発現との関連性
CD38 により特徴づけられるふたつの Population が、HIV-1 感染に対し異なる感受性を示す可能性を検討するため、HIV-1 のレセプター、コレセプターである CD4、CXCR4、CCR5 の発現を CD4⁺CD38⁺、CD4⁺CD38⁻ 分画で比較、検討した。CD4、CXCR4 の発現は CD38⁺ 分画、CD38⁻ 分画間で大きな差はなかった。しかし、CCR5 の発現は CD38⁺ 分画において 4%、CD38⁻ 分画において 7% と、CD38⁻ 分画の方が有意に高かった。一方、CCR5 はメモリー T 細胞に高発現であることがこれまでに報告されている。そこで、CD38 の発現と CD45RO、CD45RA の発現との関連性を検討したところ、CD38⁺ 分画は CD45RA⁺ 分画、CD38⁻ 分画は CD45RO⁺ 分画に高い割合で一致していたが、CD38⁺ 分画対し CD45RA⁺ 細胞の占める割合は 68%、CD38⁻ 分画に対し CD45RO⁺ 細胞の占める割合は 76% となり、完全には一致しなかった。そこで、CD4⁺CD45RA⁺、CD4⁺CD45RO⁺ 分画で CD4、CXCR4、CCR5 の発現を検討したところ、予測したとおり、CD4、CXCR4 の発現は CD45RA⁺ 分画、CD45RO⁺ 分画で差はなく、また、CCR5 の発現は CD45RA⁺ 分画において 2%、CD45RO⁺ 分画において 10% と CD45RO⁺ 分画の方が有意に高かった。以上の結果より、CD4⁺ T 細胞をウイルスに対する感受性の異なるふたつのサブセットに区別する細胞表面分子には CD38 と CD45 という少なくとも 2 種類の分子が存在していた。
 3. CD4⁺CD38⁺、CD4⁺CD38⁻ T 細胞の Ba-L 感染効率の比較
CD4⁺CD38⁺、CD4⁺CD38⁻ T 細胞の CCR5 発現の違いを確認するため、M-tropic なウイルスである Ba-L の感染実験を行い、両分画のウイルス産生量を比較したところ、CD38⁻ 分画は CD38⁺ 分画に比べ、有意に高いウイルス産生能を示した (Fig 1 A)。以上のことにより、CCR5 の発現の差が M-tropic なウイルスの感染実験によって確認された。次に、同じドナー由来の PBMC を用い、CD45RA⁺、CD45RA⁻ 分画のウイルス産生量を比較、検討した。予測したように、CD45RA⁻ 分画は CD45RA⁺ 分画に比べ、

有意に高いウイルス産生能を示した (Fig 1 B)。また、CD45RA⁻ のウイルス産生量は同じドナー由来の CD38⁻ 分画のウイルス産生量よりも顕著に高かった。これは、CCR5 陽性細胞の割合が CD45RA⁻ 分画の方が CD45RA⁺ 分画、CD38⁻ 分画よりも高い結果と一致する。

4. CD4⁺CD38⁺、CD4⁺CD38⁻ T 細胞の LAI 感染効率の比較
CD38⁺、CD38⁻ 両分画間で、CD4、CXCR4 の発現に差のないことが明らかとなった。この点を別の角度から確認するため、T-tropic なウイルスである LAI の感染実験を行い、両分画のウイルス産生量を比較した。予想に反して、CD38⁺ 分画は CD38⁻ 分画に比べ有意に高いウイルス産生能を示した (Fig 2 A)。合計 4 回の実験を行い、産生量に顕著な差異の認められた感染 9~11 日目のウイルス産生量を Fig 2 B に示した。Lot 1 と Lot 2 はそれぞれ 4.6×10^4 TCID₅₀ / ml、 3.2×10^4 TCID₅₀ / ml のウイルス上清を用いたときの結果を示す。また、CD45RA⁺、CD45RA⁻ 両分画のウイルス産生量に顕著な違いは認められず、CD4⁺CD38⁺ は、同じドナー由来の CD38⁻ 分画、CD45RA⁺ 分画、CD45RA⁻ 分画に比べ有意に高いウイルス産生能を示した (Fig 3 A)。さらに、CD38 MAb (CD38⁺ 分画調整時に用いた MAb) の細胞刺激等の影響を検討するため、naive (CD45RO⁻) 分画に CD38 MAb を作用させ、そのウイルス産生に与える影響を検討したところ、CD38 MAb による顕著な感染増強効果は認められなかった (Fig 3 B)。これにより、CD4⁺ T cell において T-tropic な HIV-1 の複製をおもに行っているサブセットは CD38 陽性で特徴づけられることが明らかとなった。

D. 考察

今回の論文において、AIDS 病態との関連性が示唆されている細胞表面マーカー CD38 分子に着目し、CD4⁺CD38⁺、CD4⁺CD38⁻ T 細胞の HIV 感受性を比較検討した。ウイルスレセプターである CD4 分子の発現は CD38⁺ 分画、CD38⁻ 分画で差は認められなかった。一方、ウイルスコレセプターである CCR5 の発現は CD38⁻ 分画で有意に高く、この点は Ba-L 株が

CD38⁻分画で顕著な増殖を示した (Fig 1 A) ことと一致する。もうひとつのコレセプターである CXCR4 の発現は両分画で同程度であったが、LAI 株の増殖は CD38⁺分画の方が有意に高かった (Figs 2 and 3 A)。

CD38 と同様に CD4⁺ T 細胞サブセットを大きくふたつの Population に分ける CD45 についても同様の検討を行ったところ、CCR5 の発現の高い Memory (CD45RA⁻) 分画で Ba-L 株の顕著な増殖が見られた。また、CCR5 発現細胞のうち Memory 分画に含まれるものはほぼ 90% であるのに対し、CD38⁻に分画されるのは 78% であり、この点についても、Ba-L 産生量が CD38⁻分画よりも Memory 分画で高いことと一致していた。しかし、CD38⁺分画、CD38⁻分画の T-tropic なウイルスの産生量の違いについては CD4、CXCR4 の発現だけでは説明出来ない。この違いはウイルスの吸着過程における差異に起因するものではなかった。Naive (CD45RA⁺)、Memory (CD45RA⁻) T 細胞の T-tropic なウイルスの産生量についても同様の実験系で比較を行ったところ、両分画はほぼ同じウイルス産生量を示し (Fig 3 A)、これは他のグループによる報告と一致している。以上の結果は、ケモカインレセプターによってウイルスのトロピズムは決定されるが、それ以降、すなわち、感染細胞のウイルス産生効率が決定されるのは吸着以降の過程であり、CD38 分子を発現しているか否かによって産生量が大きく異なることを示す。

CD45RA 陽性分画と CD38 陽性分画とは Population が 68% という高い割合で一致していた。それにもかかわらず、Fig 3 A の LAI 感染実験における両分画のウイルス産生量は大きく異なる。この原因として、今回我々の実験系において実際に精製してきて感染実験に用いた CD38⁺分画と CD45RA⁺分画は Population がほとんど一致していない可能性があげられる。CD38 抗体、Magnetic beads を用いたパニング法による精製の際、Fig 1 から予測される CD38⁺分画の収量は CD4 陽性細胞の 50% であるのに対し、実際の収量は予測される収量よりもはるかに少ない量の 10~20% である。これに対し、CD45RA⁺は予測される収量とほぼ同じ量、すなわち CD4 陽性細胞の約 50% の量を回収することが出来る。Fig 1 から CD38 陽性細胞中には CD38 の発現が非常に弱い集団も含まれることが予想され、この CD38^{low} の Population が分画操作の段階

で回収されていない可能性が考えられる。以上のことより、CD38 強陽性集団が LAI 感染に対し高感受性であり、CD4⁺ T 細胞になかでもこの Population は群を抜いてウイルス産生量が高いということが予測される。もうひとつの可能性として、CD38 抗体による細胞活性化の可能性があげられる。CD38 抗体により Macrophage 存在下において細胞に Mitogen 刺激の入ることが報告されている。しかしながら、我々の行った今回の実験系においては、CD38 抗体の結合している CD38⁺分画と抗体の結合していない CD38⁻分画とでは細胞増殖性にはほとんど差はなく、これは Macrophage 存在下、非存在下の感染実験においても同じ結果であった。また、naive (CD45RO⁻) 分画に CD38 MAb を作用させ、そのウイルス産生に与える影響を検討したところ、CD38 MAb による顕著な感染増強効果は認められなかった (Fig 3 B)。よって、今回の LAI 産生量の差は CD38 抗体による両分画に対する刺激の差に起因するものではないと考えられる。

CD38 陰性の分画は、M-tropic なウイルスの感染実験においては CD38 陽性分画よりも高いウイルス産生能を示し、T-tropic なウイルスの感染実験においては CD38 陽性分画と同程度のウイルス吸着量を示した。このことから、CD38 陰性の分画においても T-tropic なウイルスの吸着は CD38 陽性分画と同程度に行われており、インテグレーション等の過程で両分画になんらかの違いが生ずると考えられる。

E. 結論

in vivo において、病態進行と CD38 の発現上昇が相関すること、病態進行と Virus load が相関することからも、CD38 の発現上昇と Virus load との密接な相関関係が予測できる。また、in vivo において、病態進行に伴い M-tropic なウイルスから T-tropic なウイルスへとウイルスの tropism が移行することが知られている。今回の報告は、これらの現象を in vitro で説明できる系と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Tanaka, Y., Kameoka, M., Ota, K., Itaya, A., Ikuta, K. and Yoshihara, K.:

- Establishment of persistent infection with HIV-1 abrogates caspase-3-dependent apoptotic signaling pathway in U937 cells. *Exp. Cell Res.* 247, 514-524, 1999.
2. Tokunaga, K., Ikuta, K., Adachi, A., Matsuda, M., Kurata, T., and Kojima, A.: The cellular kinase binding motifs (PxxP and RR) in human immunodeficiency virus type 1 Nef protein are dispensable for producer-dependent enhancement of viral entry. *Virology* 257, 285-289, 1999.
 3. Inabe, K., Nishizawa, M., Tajima, S., Ikuta, K., and Aids, Y.: The YXXL sequences of a transmembrane protein of bovine leukemia virus are required for viral entry and incorporation of viral envelope protein into virions. *J. Virol.* 73, 1293-1301, 1999.
 4. Zheng, Y.-H., Sentsui, H., Sugita, M., Nakaya, T., Kishi, M., Hagiwara, K., Inoshima, Y., Ishihara, C., Kono, Y., Lu, J.-L., and Ikuta, K.: Replication Ability in vitro and in vivo of equine infectious anemia virus avirulent Japanese strain. *Virology* 266, 129-139, 2000.
 5. Bahmani, M. K., Kameoka, M., Goto, T., Sano, K., Luftig, R. B., and Ikuta, K.: Fusion of uninfected T-cells occurs with immature HIV-1 protease-mutant, but not morphologically similar protease inhibitor derived particles. *Virus Res.*, in press.
 6. Suzuki, S., Tobiume, M., Kameoka, M., Sato, K., Takahashi, T. A., Mukai, T., and Ikuta, K.: Exposure of normal monocyte-derived dendritic cells to human immunodeficiency virus type-1 particles leads to the induction of apoptosis in co-cultured CD4+ as well as CD8+ T cells. *Microbiol. Immunol.* 44, 111-121, 2000.
 7. Auwanit, W., Ayuthaya, P.I.N., Mukai, T., Kurata, T., and Ikuta, K.: Highly variable sequences at env V3 region of HIV-1 distributing among Thai carriers during 1995 to 1997. *AIDS Res. Human Retroviruses* 16, 283-289, 2000
2. 学会発表
 1. 向井徹、河本聡志、黒須剛、生田和良、Wattana Auwanit、巽正志:HIV-1 タイ E 型塩基配列解析および感染性プラスミドの構築。第 13 回近畿エイズ研究会学術集会 5 月 大阪
 2. 堀越東子、Wattana Auwanit、向井徹、生田和良:末梢血 CD4+/CD38-T 細胞分画の HIV 誘導アポートシスにおける役割。第 13 回近畿エイズ研究会学術集会 5 月 大阪
 3. 河本聡志、Wattana Auwanit、高橋宏和、向井徹、生田和良:HIV-1 サブタイプ B および E Nef 蛋白質における血清学的比較。第 13 回近畿エイズ研究会学術集会 5 月 大阪
 4. 向井徹、河本聡志、黒須剛、巽正志、生田和良:HIV-1 タイ E 型塩基配列解析および感染性プラスミドの構築。第 47 回日本ウイルス学会学術集会 10 月 横浜
 5. 河本聡志、向井徹、大竹徹、生田和良:HIV-1 サブタイプ B および E 感染者における抗 Nef 抗体の検討。第 47 回日本ウイルス学会学術集会 10 月 横浜
 6. 向井徹、河本聡志、大竹徹、生田和良:HIV-1 タイ E 型 Nef の遺伝子配列解析および血清学的解析。第 13 回日本エイズ学会学術集会 12 月 東京
 7. 河本聡志、飛梅実、鈴木総子、向井徹、生田和良:HIV-1 Nef による潜伏ウイルス活性化に関わる Ras 分子。第 13 回日本エイズ学会学術集会 12 月 東京

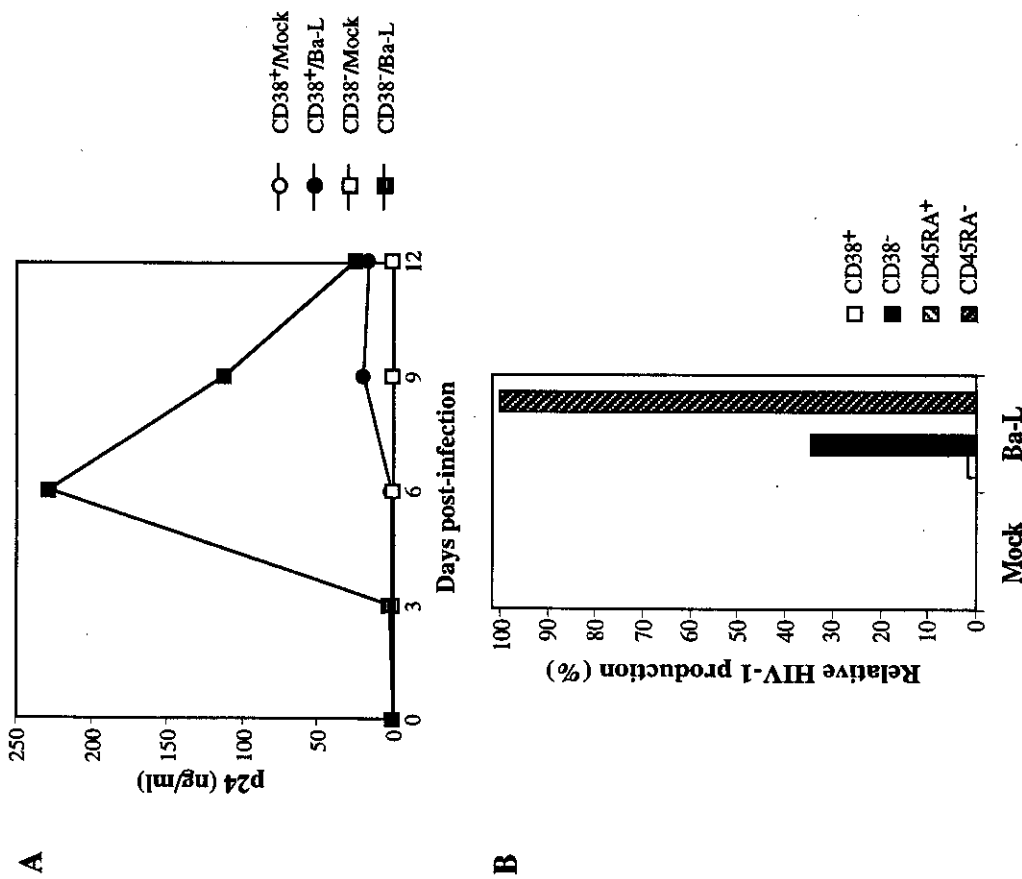


図1 M-tropicなウイルスであるBa-Lの感染実験を行い、CD4⁺CD38⁺、CD4⁺CD38⁻ T cell分画のウイルス産生量を比較した。それぞれの分画にBa-Lを1時間吸着後、PHA処理を行い、3日毎の上清中のウイルス産生量をp24ELISAにより比較した。CD38⁻分画はCD38⁺分画に比べ、有意に高いウイルス産生能を示した (A)。次に、CD45RA⁺、CD45RA⁻分画のウイルス産生量を同様に比較したところ、CD45RA⁻分画はCD45RA⁺分画に比べ、有意に高いウイルス産生能を示した (B)。また、CD45RA⁻のウイルス産生量は同じドナー由来のCD38⁻分画のウイルス産生量よりも顕著に高かった。

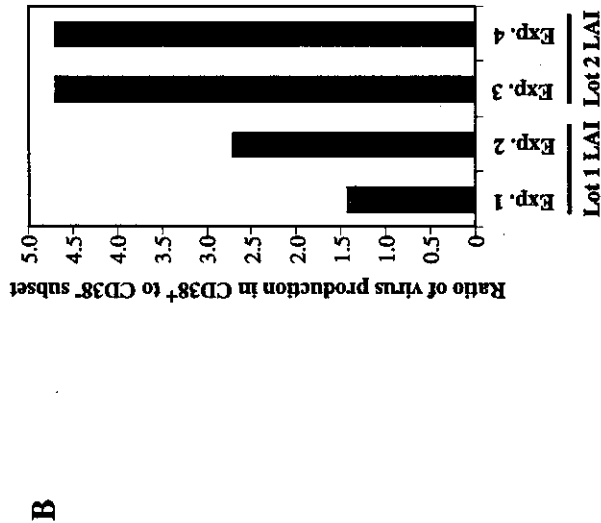
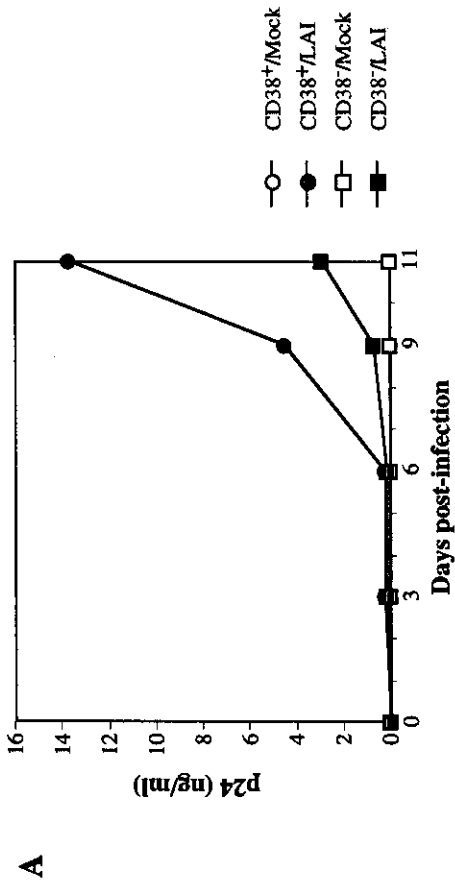


図2 T-tropicなウイルスであるLAIの感染実験を行い、両分画のウイルス産生量を比較した。CD38⁺分画はCD38⁻分画に比べ、有意に高いウイルス産生能を示した (A)。合計4回の実験を行い、産生量に顕著な差異の認められた感染9~11日目のウイルス産生量をBに示した。Lot1とLot 2はそれぞれ4.6×10⁴ TCID₅₀ / ml、3.2×10⁴ TCID₅₀ / mlのウイルス上清を用いたときの結果を示す。

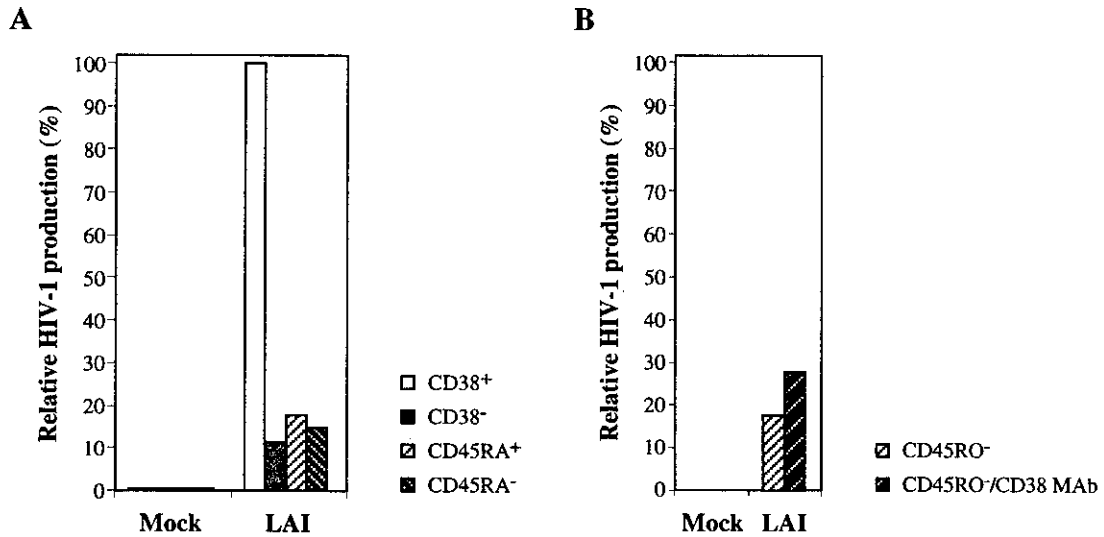


図3 CD45RA⁺、CD45RA⁻両分画でLAI産生量に顕著な違いは認められなかった (A)。CD38⁺分画は、同じドナー由来のCD38⁻分画、naive分画、memory分画に比べ有意に高いウイルス産生能を示した。次に、CD38 MAb (CD38⁺分画調整時に用いたMAb) の細胞刺激等の影響を検討したところ、CD38 MAbによる顕著な感染増強効果は認められなかった (B)。

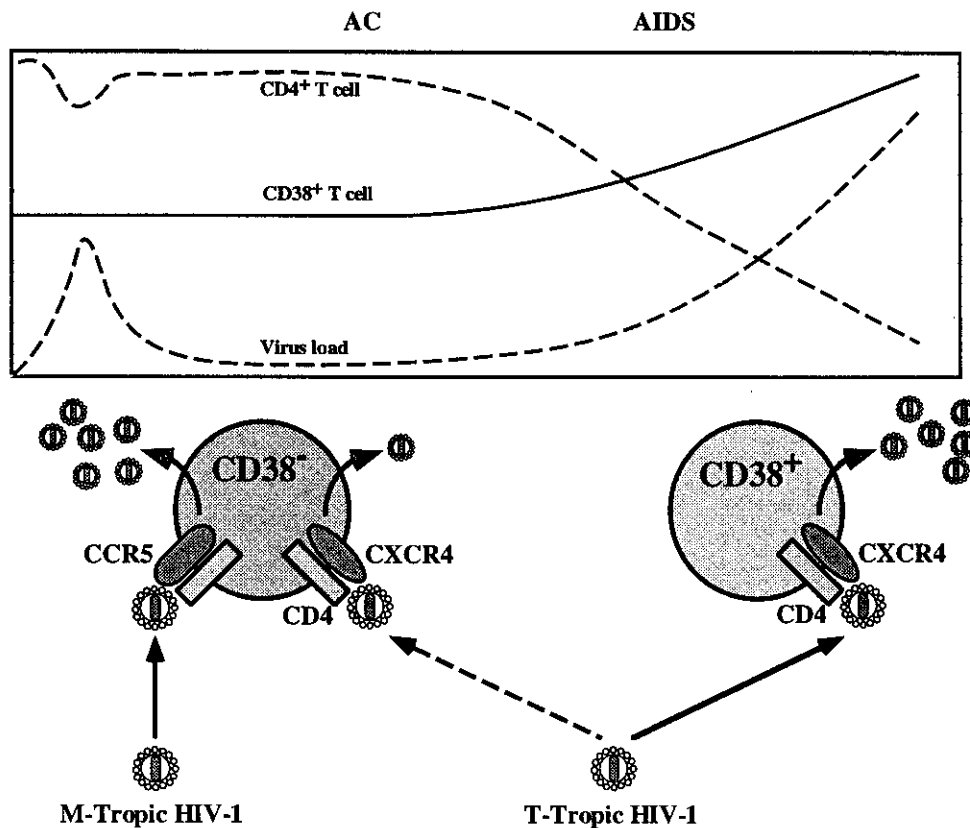


図4 in vivoにおいて、病態進行とCD38の発現上昇が相関すること、病態進行とVirus loadが相関することからも、CD38の発現上昇とVirus loadとの密接な相関関係が予測できる。また、in vivoにおいて、病態進行に伴いM-tropicなウイルスからT-tropicなウイルスへとウイルスのtropismが移行することが知られている。今回の報告は、これらの現象をin vitroで説明できる系と考えられる。

5. HIV 由来浮遊抗原ペプチドによる特異的 CTL のキラー活性抑制とそれに伴う T 細胞活性化因子の産生・放出

分担研究者 高橋 秀実 (日本医科大学微生物学免疫学教室教授)
共同研究者 高橋 めぐみ (日本医科大学微生物学免疫学教室助手)
中川 洋子 (日本医科大学微生物学免疫学教室助手)

研究要旨 これまで報告者らは HIV 特異的 CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞(CTL) をエピトープペプチドと共に短時間培養すると、著明にキラー活性が低下し Anergy に陥ることを報告してきた。今回は、このキラー活性の抑制状態は一時的であり時間の経過とともに回復すること、及びこの抑制は Granzyme B 及び Perforin の発現低下に起因することを見出した。一方エピトープペプチドで処理された CTL の培養上清中には大量の IL-2, IFN- γ , TNF- α 及び MIP-1 β が産生・放出されており、こうしたウイルスエピトープ特異的 CTL においてはサイトカインの産生とキラー活性は reciprocal に制御されていることを見出した。更に、このペプチド処理を受けた CTL の培養上清で、未刺激の resting 状態にある CTL やヘルパー T 細胞を処理すると、いずれも強く活性化されることから、ウイルス抗原によって活性の抑制された CTL が一時的にヘルパー機能を発揮することで生体防御システムのバランスが保たれている可能性が示唆された。

A. 研究目的

HIV の体内制御において、HIV 特異的 CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞(CTL)がその鍵を握ることが明らかとなってきた。この CTL が何らかの原因でダメージを受けた場合には、病状の進行が予想され、CTL の速やかなる機能回復が急務となる。よって、ダメージを受けた CTL のキラー活性抑制機序及びその細胞内の変化を知ることは、その回復機構を模索する上で重要な知見を提供するものと考えられる。我々はこれまでの研究で、HIV-V3 ペプチドを特異的 CTL に添加し短時間培養することにより、Apoptosis ではなく一時的な麻痺状態が誘導されることを見出し報告した(J.Exp.Med. 183:879, 1996)。そしてこの実験系を用いることにより、キラー活性の抑制に関わるシグナル伝達や機能分子の発現に関し若干の知見を得ることができ、昨年報告に至った。本年度は、細胞傷害活性の抑制された CTL の実体を明らかにする目的で、こうした CTL の細胞内および細胞外へ放出する様々な因子を経時的に追跡したところ、細胞活性化に関わる様々なサイトカインの産生・放出状況を見出した。本研究では、こうした因子の生物学的

意義を明らかにし、ウイルス特異的 CTL による生体制御の実態に迫ることを目的とした。

B. 研究方法

HIV-1 (IIIB 株)env 蛋白 gp160 を特異的に認識する CTL Line (LINE-IIIB)をペプチド I-10 (minimal immunodominant epitope; RGPGRFVVTI)とともに 1 時間培養し、洗浄後経時的にそのキラー活性を ^{51}Cr リリース法により測定した。またペプチド I-10 処理後 1 日目の CTL Line から RNA を抽出し、granzyme B, perforin 及び Fas ligand の発現を Northern blot 法により解析した。次に I-10 処理した CTL の培養上清(I-10 sup)中のサイトカイン産生量を ELISA 法で、また mRNA の発現量を RT-PCR 法を用いて測定した。更に、I-10 sup の他の細胞に及ぼす影響を調べるために以下の実験を実施した。1) 未刺激の CTL を I-10 sup とともに 1 日培養しそのキラー活性を測定した。2) ヘルパー T 細胞を I-10 sup とともに 1 日培養した後、細胞表面の CD4, IL-2 receptor 及び class II MHC 分子の発現を FACS にて解析した。

C. 研究結果

抗原提示細胞(APC)非存在下で CTL(LINE IIB)をペプチド I-10 で処理すると、処理後1日目にキラー活性の著明な低下がみられた。しかしその後何らの刺激を加えなくても時間の経過とともに徐々にキラー活性は回復し、3日後にはほぼ通常の状態に回復した(図1)。この際、キラー活性が最も低下している時期の granzyme B, perforin, Fas-L の mRNA の発現を Northern blot 法により解析した結果、図2の如く granzyme B 及び perforin の著明な低下が観察されたことからキラー活性の低下は、主にこれら細胞障害物質の低下によることが明らかになった。

一方、ペプチド I-10 処理後経時的に採取した培養上清中の因子を検討したところ、IL-2, IFN- γ , TNF- α 及び MIP-1 β が放出されていた。そして、これらの液性因子は、キラー活性が一番低い処理後1日目に一致して最も大量に産生・放出されていることが観察された。このことは RT-PCR によるサイトカイン mRNA の発現量を半定量的に測定した結果ともよく一致した(図3)。

更に、この I-10 sup と共に未刺激の CTL を培養するとそのキラー活性が著しく増強されること(図4)、また未刺激のヘルパー T 細胞培養すると、class II MHC 分子及び IL-2R の発現が増強され(図5)、I-10 sup 中に CTL 及びヘルパー T 細胞を活性化する因子が産生されていることが示された。

D. 考察

今回の検討により、最小エピトープペプチドと共に短時間培養した CTL のキラー活性は著しく低下するが、この活性の低下は一時的であり、時間の経過とともに徐々に回復することが明らかとなった。こうした結果は、以前に示したように活性低下が CTL の Apoptosis に起因するのではないことを裏付けるものである。またこの活性の低下した CTL は、Northern blot 法により Fas-L の発現に差がないことや、抗 Fas-L 抗体によりキラー活性の阻害が見られないことから、こうしたキラー活性の低下は、主として granzyme B 及び perforin の発現低下に起因することが判明した。

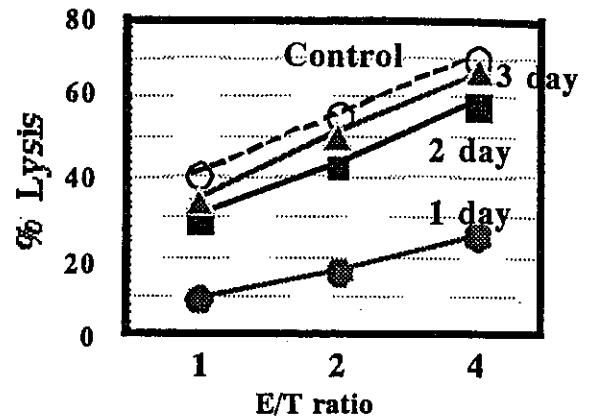


図1 I-10処理後のキラー活性の経時的回復

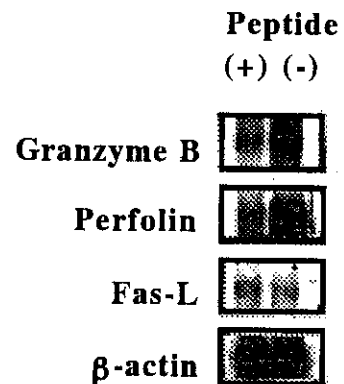


図2 活性抑制に関与する細胞傷害因子の同定

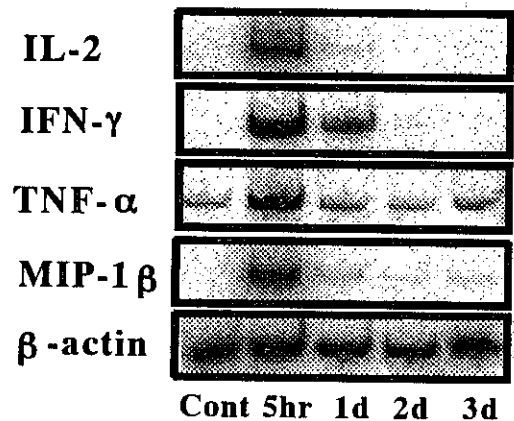


図3 RT-PCR法による放出因子の経時的同定

CTL による HIV の体内制御は、標的細胞の破壊と同時のみならず、細胞内ウイルス増殖を抑制すると推測される CTL の産生する IFN- γ などの Th1 型サイトカイン、あるいはウイルスの細胞内への潜入を阻止する MIP-1 α 、MIP-1 β 、SDF-1 などのケモカインによるものと推測されている。今回の検討で、HIV エピトープペプチドで処理された CTL は、そのキラー活性は著しく低下するものの、IL-2、IFN- γ 、TNF- α など Th1 型のサイトカイン及び MIP-1 β の産生・放出が、キラー活性の低下に逆相関して著しく亢進することが観察された。実際、RT-PCR の結果及びサイトカイン蛋白量の測定から、どのサイトカインもキラー活性が一番低下している処理後 1 日目に最も大量に産生されており、またキラー活性の回復とは逆に時間の経過とともにその産生量が減少することが観察された。このことから、CD8 陽性 CTL のキラー活性の発現とサイトカインの産生は、reciprocal に制御されている可能性が示唆された。

更に、ペプチド処理後 1 日目の培養上清(I-10 sup)中には大量のサイトカインが含まれており、この I-10 sup が他の細胞に及ぼす影響を調べてみたところ、未刺激の CTL やヘルパー T 細胞が強く活性化されることが判明した。興味深いことに、こうした T 細胞の活性化作用は、IL-2 や IFN- γ など既知のサイトカインに対する抗体では抑制されなかったことから、CTL の放出する未知の因子が強い T 細胞の活性化能を有する可能性がある。現在こうした活性化因子の性状について検討中である。

以上の結果から、短時間のエピトープペプチド処理により CTL のキラー活性は一時的に強く抑制され、標的細胞の破壊は困難になるものの、様々なサイトカインを大量に産生することで周囲の細胞群を活性化し、免疫監視機構のバランスを保っていることが示唆された。

この際放出された IFN- γ や TNF- α などのサイトカインは、細胞を活性化すると同時に細胞傷害性も発揮するため、今回のような一過性のサイトカインの産生ならびに T 細胞活性化因子の大量放出は、ウイルスを制御するためのより有効な免疫システムを確立するためのステップかも知れない。これまでサイトカイン産生による免疫応答の制御は、ヘルパー T 細胞が中心であると考えられてきたが、キラー T 細胞にもヘルパー機能が存在し発揮されることが、本研究により明らかとなった。

E 結論

HIV 由来のエピトープペプチド処理により、キラー活性が低下した特異的 CTL の培養上清中には大量の様々なサイトカインが含まれており、これらサイトカインは周囲の未刺激 T 細胞群を活性化すること、すなわちウイルス抗原により活性が抑制された CTL が一時的にヘルパー機能を発揮することで、生体防御システムのバランスが保たれている可能性が示唆された。

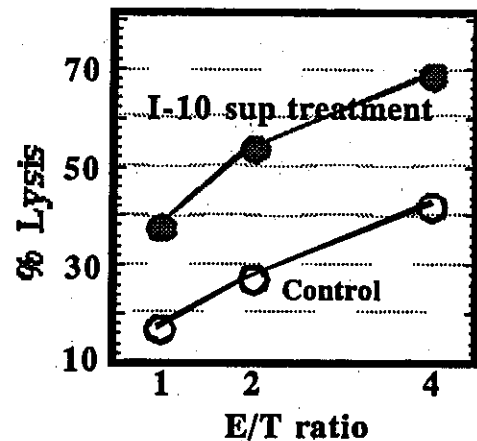


図4 I-10 supによる未刺激CTLの活性化

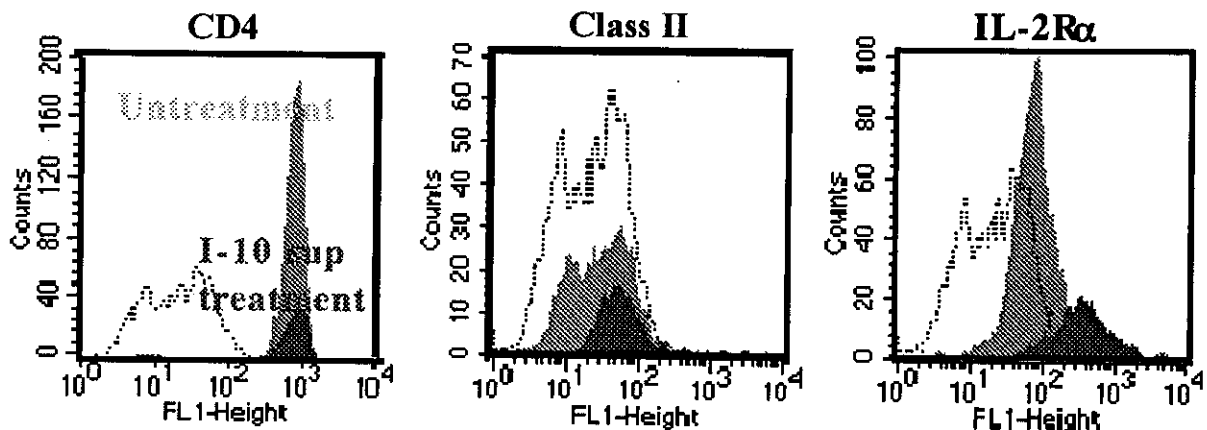


図5 I-10 supによる未刺激ヘルパーT細胞の活性化

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Ohashi, T., Kubo, M., Kato, H., Iwamoto, A., Takahashi, H., Fujii, M., Kannagi, M.: Role of class I major histocompatibility complex-restricted and -unrestricted suppression of human immunodeficiency virus type 1 replication CD8⁺ T lymphocytes. *J.Gen.Virol.* 80: 209-216, 1999.
2. Shirai, M., Arichi, T., Chen, M., Nishioka, M., Ikeda, K., Takahashi, H., Feinstone, S.M., Berzofsky, J.A.: T cell recognition of hypervariable region-1 from hepatitis C virus envelope protein with multiple class II MHC molecules in mice and humans: Preferential help for induction of antibodies to the hypervariable region. *J. Immunol.* 162: 568-576, 1999.
3. Chiaba, M., Takahashi, H., Kato, K., Nakagawa, Y., Fukushima, T., Iinuma, H., Nerome, K.: Recombinant vaccinia virus expressing an immunodominant epitope of HIV-1 envelope protein within an influenza hemagglutinin cassette predominantly prime epitope-specific CD8⁺ CTL. *Arch. Virol.* 144: 1469-1485, 1999.
4. Terabe, M., Hatabu, T., Takahashi, H., Onodera, T., Matsumoto, Y.: *Leishmania amazonensis* infection in nude mice. *Exp. Animals* 42: 119-123, 1999.
5. Nakatsuka, K., Sugiyama, H., Nakagawa, Y., Takahashi, H.: Purification of antigenic peptide from murine hepatoma cells recognized by class-I major histocompatibility complex molecule-restricted cytotoxic T-lymphocytes induced with B7-1-gene transfected hepatoma cells. *J. Hepatol.* 30: 1119-1129, 1999.
6. Mabuchi, A., Shimizu, M., Kikuchi, K., Nakagawa, Y., Takahashi, H., Kakiuchi, T., Yokomuro, K.: Cultured murine parenchymal liver cells induce differentiation of bone marrow cells to macrophage like cells which present antigen to Th1 clones but inhibit their proliferation by nitric oxide and prostaglandins. *Cell Immunol.* 196: 14-22, 1999.
7. Takeshita, T., Satomi, M., Akira, S., Nakagawa, Y., Takahashi, H., Araki, T.: Preventive effect of monoclonal antibodies to ICAM-1 and LFA-1 on murine spontaneous fetal resorption. *Am. J. Rep. Immunol.* (in press).
8. 中川洋子, 高橋秀実: HIV の抗原エピソードと免疫応答. *臨床免疫* 31: 287-292, 1999.
9. 高橋秀実: AIDS 最新の進歩: ワクチン開発の現状と展望 *BIO Clinica* 14: 440-444, 1999.
10. 高橋秀実: DNA ワクチン: その実体と可能性. *医学のあゆみ* 189: 416-417, 1999.
11. 野呂瀬嘉彦, 高橋秀実: 手指に付着した細菌群の実体と腫瘍排除を司る免疫システム. *日本医科大学雑誌* 66: 158-159, 1999.
12. 高橋秀実: 胃炎慢性化とピロリ菌ウレアーゼに対する抗体産生. *臨床免疫* 32: 721-725, 1999.
13. 高橋秀実: 樹状細胞と腫瘍免疫. *癌と化学療法* 14: 2121-2126, 1999.
14. 高橋秀実: ワクチン接種. *免疫学イラストレイティッド* (多田富雄監訳) 263-272, 2000.

2. 口頭発表

1. Takahashi, H., Nakagawa, Y., Norose, Y., Takahashi, M., Nohtomi, K., Toda, M., Sakaguchi, M., Takebe, Y.: Dendritic cells as a major target to prime HIV-specific CD8+CTL by HIV-DNA plasmid using gene gun. Japan-US Cooperative Medical Science Program: The 11th Joint Scientific Meeting of AIDS March 17~19, 1999.
2. Takahashi, H.: Importance and elicitation of cellular immunity to HIV: An major target for vaccine development. International AIDS Symposium on "Frontiers of HIV/AIDS Research" March 20, 1999.
3. 高橋秀実: ウイルス感染と免疫. 第1回肝病態・治療研究会 1999年5月14日~15日.
4. 高橋秀実: 細胞性免疫による体内制御 第61回東京医科大学免疫・アレルギー研究会 1999年5月18日.
5. 中塚雄久, 中川洋子, 清水真澄, 金沢秀典, 黒田肇, 坂本長逸, 小林正文, 杉山弘高, 高橋秀実: マウス肝細胞癌特異的 CTL が