

毒性が少なく安全なアジュバントは現在見あたらない。

我々は、オリゴマンノースを導入した人工糖脂質(M5-DPPE)で被覆したリポソームがそのリポソーム中に封入されたタンパク質抗原またはペプチド抗原に特異的な DTH や MHC-Class I 拘束性 CTL を強く誘導するアジュバント活性を持っていることを示してきた。また、人工糖脂質及び人工糖脂質リポソームがヒトに対して安全に使用できるかどうかを確認するため、サルを用いた安全性試験を行なったところ、通常の免疫に用いる 100 倍量の M5-DPPE または M5-DPPE 被覆リポソームをカニクイザルの胸部皮下に投与しても、接種部位、体温、血算および末梢血リンパ球数などに目立った変化は観察されず、人工糖脂質自体にも人工糖脂質被覆リポソームにも毒性は全く認められなかった。これらの結果は、強力な免疫誘導アジュバント活性を有する M5-DPPE 被覆リポソームがヒトに対しても安全に使用できる有効なアジュバントであることを強く示唆している。これまでの研究成果は M5-DPPE 被覆リポソームを用いることで、人に使用できる細胞性免疫誘導型のエイズワクチン開発が可能であると考えられる。

しかし、実用的なエイズワクチンを開発し実際にエイズ流行地域で使用するためには、まだ解決しなければならないいくつかの問題点がある。その一つとして、M5-DPPE 被覆リポソームの品質管理があげられる。これまで、M5-DPPE 被覆リポソームを構成する脂質成分である DPPC やコレステロールは個々に酵素法を用いて定量可能であったが、M5-DPPE 被覆リポソームのアジュバント活性を担う M5-DPPE の定量法は存在しない。従って、M5-DPPE を含めた脂質成分の簡便で精度の良い定量法の確立がワクチン開発のために望まれていた。そこで本年度はまず M5-DPPE 被覆リポソームの脂質成分を簡便に同時定量するための分析法の開発を試みた。

一方、実用的なワクチンとして使用するためには長期保存が可能であり、また簡便にとりあつか

えることが望ましい。しかし、これまで我々が作製している抗原封入 M5-DPPE 被覆リポソームは、懸濁状態で低温下に保存する必要があり、また保存中に封入された抗原タンパク質・ペプチドの漏出や分解が起こる等、長期間の保存には適していない。そこで、水溶液中に懸濁したリポソームを凍結乾燥後再水和して得られる再水和リポソームが凍結乾燥状態で長期間保存可能であることに着目し、再水和法を応用した長期保存可能な抗原封入人工糖脂質被覆リポソームを作製することを試みた。

## B. 研究方法

### 1. 人工糖脂質の作製

マンノペンタオース(M5)とジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン(DPPE)を還元アミノ化反応で化学的に結合させ M5-DPPE を合成した。合成した M5-DPPE は HPLC を用い精製した。

### 2. HPLC システム

KT-27 デガッサー (昭和電工社)、モデル 7125 インジェクター (レオダイン社)、LC-6A 送液ポンプ (島津社)、CTO-6A カラムオーブン (島津社)、SLC-6A システムコントローラ (島津社) および SEDEX-55 エバポレイティブ光散乱ディテクター (SEDER 社) で構成された HPLC 装置を用いた。なお、ディテクターは、圧縮空気を用いた噴霧化用気圧を 2.0 bar に、気化温度を 50 °C に調整して用いた。クロマトグラフィーは Wakosil 5TMS カラム (0.46×25 cm ; 和光純薬社) を用い、50 °C 恒温下で行った。移動相としてクロロホルム/メタノール/水 (1 : 33 : 6, v/v) を用い、流速 0.8 ml/min でアイソクラティックに溶出した。試料注入量は 20 µl とした。

### 3. 標準脂質溶液の調製および標準曲線の作成

人工糖脂質、コレステロールおよび DPPC をクロロホルム/メタノール/水 (10 : 10 : 3, v/v) に溶解し、それぞれ 0.4、4 および 4 mM の各保存液を作

製した。各溶液を適量ずつ混合した後、同溶媒で希釈し、種々の濃度の脂質混合液を調製した。この混合液 250 ml を、あらかじめ同量のリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline ; PBS) を加えて減圧乾固したガラスバイアル中に添加した。これをボルテックスミキサーで激しく攪拌した後、0.5  $\mu\text{m}$  のシリンジフィルターで濾過し、この濾液を標準溶液とした。各種脂質の注入量 (mol) とクロマトグラムのピークエリアの関係を示す標準曲線を作成するため、0.15、0.3、0.6、1.0、1.5、2.0 もしくは 3.0 nmol の M5-DPPE と、0.5、1.0、2.0、5.0、10、20 あるいは 30 nmol のコレステロールおよび DPPC をそれぞれ含む標準液 (20  $\mu\text{l}$ ) を HPLC にかけて。ELSD によって得られたピークエリアの対数と注入した試料のモル量の対数をプロットし、標準曲線を作成した。標準曲線の直線性は、最小二乗法を用いて得られた回帰直線から決定した。

#### 4. リポソームおよび HPLC 分析用試料の調製

被覆していないリポソーム (未被覆リポソーム) は、コレステロールと DPPC (1 : 2、mol/mol) から成る脂質フィルムを作製し、次いでボルテックスミキサーを用いて PBS 中に分散させ作製した。さらに、未被覆リポソームを M5-DPPE の存在下でインキュベートして M5-DPPE を組み込み、糖鎖被覆リポソームを作製した。各リポソームの構成成分を HPLC で分析するため、ガラスバイアル中に適量の各リポソーム懸濁液をとり、PBS を加えて 250  $\mu\text{l}$  とした後、減圧乾固した。これに 250  $\mu\text{l}$  のクロロホルム/メタノール/水 (10 : 10 : 3、v/v) を加え、ボルテックスミキサーで激しく攪拌することでリポソーム構成脂質を溶解した。これらの試料溶液は濾過後、先に記した HPLC 装置を用いて分析した。

#### 5. 再水和リポソームの作製

再水和リポソームは次に記す 2 通りの方法で作製した。

「方法 1」: コレステロールと DPPC (1 : 2、

mol/mol) から成る脂質フィルムに蒸留水を加えボルテックスミキサーでマルチラメラリポソームを作製した。このリポソームを凍結乾燥後、乾燥粉末に PBS を加え、再水和リポソームを作製した。その後、M5-DPPE を組み込み糖鎖被覆再水和リポソームとした。

「方法 2」: まず、コレステロールと DPPC (1 : 2、mol/mol) と様々な比率で M5-DPPE を含む脂質フィルムを作製した。この M5-DPPE を含む脂質フィルムに蒸留水を加え、ボルテックスミキサーで激しく攪拌することで、M5-DPPE を含むリポソームを作製した。このリポソームを凍結乾燥後、蒸留水を加え糖鎖被覆再水和リポソームとした。作製した糖鎖被覆再水和リポソームの脂質組成は本年度確立した HPLC 法を用いて定量した。

## C. 研究結果

### 1. M5-DPPE、コレステロールおよび DPPC の HPLC による分離

リポソームをアジュバントとして実験動物に投与する場合、リポソームは、pH や塩濃度を生理的な条件に合わせた PBS 中で調製され保存されているのが一般的である。本研究の予備実験において、この HPLC 分析では試料溶液中の塩濃度がリポソーム構成成分の溶出時間に影響を与えることが判明した。そのため、HPLC 分析に用いる標準試料に一定量の PBS を添加してから分析を行った。M5-DPPE (2 nmol)、コレステロール (5 nmol) および DPPC (5 nmol) を含む標準溶液を HPLC で分析したところ、M5-DPPE、コレステロールおよび DPPC はそれぞれが効率よく分離溶出され、しかも PBS に由来の塩とも分離できることが明らかとなった。次に、上と同じ M5-DPPE (2 nmol)、コレステロール (5 nmol) および DPPC (5 nmol) を含む標準溶液を連続的に 7 回分析し、各物質の保持時間とピークアリアの再現性について検討した。その結果、TMS カラムから溶出される保持時間に関する相対標準偏差は全ての化合物で 0.5% 以下であり、ELSD で得られるピークエリアに関

しても 2.7%以下であったことから、この HPLC 法は十分な再現性を有することが明らかとなった。次に、標準曲線の直線性を評価した。標準曲線は、M5-DPPE に関しては 0.15 nmol から 3.0 nmol の範囲で、コレステロールおよび DPPC に関しては 0.5 nmol から 30.0 nmol の範囲で直線性を示した。また、この HPLC 法の検出限界はいずれの化合物においても 0.05 nmol から 0.1 nmol の範囲にあった。

## 2. リポソーム構成成分の定量分析

実際のリポソームの構成成分定量における本 HPLC 法の応用性を検討するため、3 つの M5-DPPE 被覆リポソーム試料および 1 つの未被覆リポソーム試料を作製し HPLC で分析した。M5-DPPE 被覆リポソームを試料として用いた場合、M5-DPPE、コレステロールおよび DPPC の 3 成分のピークが明瞭に検出された。また、各成分のピークエリアの大きさは、各成分の同時定量に十分なほどであった。一方、未被覆リポソームを試料として用いた場合には、コレステロールと DPPC のみのピークが検出され、M5-DPPE に相当するピークは全く検出されなかった。

次に、この HPLC 分析で得られる定量結果と、従来法である酵素反応に基づく比色法で得られる定量結果を比較した。コレステロールおよび DPPC の分析では、本 HPLC 法による定量結果と酵素反応による比色法で得られた結果は非常に良く一致しており、本研究で考案した HPLC 法の信頼性が確認された。さらに、M5-リポソームに含まれる M5-DPPE 量を定量も可能であった。この HPLC 法による定量結果から、各リポソーム構成成分のモル比を導き出した。測定した 3 種の M5-DPPE 量被覆リポソーム試料の M5-DPPE、コレステロールおよび DPPC のモル比は、1:2.11:0.14、1:2.10:0.16、および 1:2.12:0.17 であった。

## 3. 再水和法によるリポソームと従来法によるリポソームとの比較

コレステロールと DPPC (1:2, mol/mol) から

成る脂質フィルムに蒸留水を加えボルテックスミキサーでマルチラメラリポソームを作製した。このリポソームを凍結乾燥後、乾燥粉末に PBS を加え、再水和リポソームを作製した。この時抗原をどの時点で封入するのが効果的かを調べる目的で、抗原を封入したリポソームを凍結乾燥した場合と凍結乾燥後抗原を含む PBS を加えた場合の抗原封入率の比較を行った。なお抗原タンパク質としては BSA を用いた。その結果、最初に抗原を封入したリポソームを凍結乾燥後再水和しても、リポソームの再水和時に抗原を加えてもともに抗原の封入率は 15%~16%であり、従来法によるリポソームの抗原封入率(14%)と大きな違いは認められなかった。また、従来法と同様の操作で再水和したリポソームに対して M5-DPPE を組み込んだところ、再水和リポソームが ConA により凝集したことから、再水和リポソームでも M5-DPPE がリポソーム表面に被覆されていることが確認された。なお、従来法によって作製した糖鎖被覆リポソームと再水和法で作製した糖鎖被覆リポソームの構成脂質の比率はそれぞれコレステロール:DPPC:M5-DPPE が 1:1.89:0.080 および 1:1.87:0.071 であった。

## 4. 簡便な糖鎖被覆再水和リポソームの作製法

上記の方法で糖鎖被覆再水和リポソームを作製する場合、リポソームに M5-DPPE を被覆するという操作が必要となる。そこで、操作を簡便にするために脂質中に M5-DPPE をあらかじめ加えて作製した脂質フィルムからリポソームを作製し、凍結乾燥後、再水和した。この時、脂質中に含まれる M5-DPPE の比率をコレステロールに対して 0.02~0.2 まで変化させた脂質フィルムを作製した。このようにして作製した再水和リポソームの脂質組成比を HPLC 法で分析した結果、リポソーム中のコレステロール、DPPC、M5-DPPE の比率は、脂質フィルム作製時に加えた脂質組成比をほぼ正確に反映するものであった。また、M5-DPPE を様々な比率で含む脂質フィルムから作製した再水和リ

ポソームのすべてで ConA による凝集反応が観察されたことから、脂質フィルム中に任意の比率で M5-DPPE を加えてリポソームを作製しても、糖鎖はリポソーム表面に露出していることが明らかとなった。

#### 5. 再水和リポソームによる細胞性免疫誘導能の確認

我々は、従来法で作製した糖鎖被覆リポソームにはリポソームに封入された抗原特異的な細胞性免疫誘導能があることを示してきている。そこで再水和法で作製した抗原封入糖鎖被覆再水和リポソームにも抗原特異的な細胞性免疫誘導能が有るかどうかを DTH 反応を指標として検討した。従来法で作製した BSA 封入糖鎖被覆リポソーム、再水和法で作製した BSA 封入糖鎖被覆リポソームおよび BSA 封入糖鎖未被覆リポソームで Balb/c マウスを一回免疫（タンパク質量として 25  $\mu\text{g}$ ）し、7日後に抗原（20  $\mu\text{g}$ ）を footpad にチャレンジし、その後の footpad の腫脹を経時的に測定した。この時非免疫群、BSA のみで免疫した群をネガティブコントロール、BSA を FCA とともに免疫した群をポジティブコントロールとした。その結果、非免疫群、BSA のみで免疫した群および BSA 封入糖鎖未被覆リポソームで免疫した群では DTH 反応が見られなかったのに対し、BSA を FCA とともに免疫した群では典型的な DTH 反応が観察された。またこれまでと同じように、従来法で作製した BSA 封入糖鎖被覆リポソームで免疫した群のマウスでは、BSA を FCA とともに免疫した群と同程度の DTH 反応が観察された。一方、再水和法で作製した BSA 封入糖鎖被覆リポソームで免疫したマウスは従来法で作製した BSA 封入糖鎖被覆リポソームで免疫したマウスと同様に強い DTH 反応が観察された。

#### D. 考察

本年度の研究では、我々が開発し且つ強い細胞性免疫誘導能をもつ人工糖脂質被覆リポソームを実用

的なワクチンのアジュバントとして使用するためにリポソームの品質管理法および長期保存法の確立を目的とした。その結果、トリメチル基結合シリカカラム（TMS カラム）を用いた HPLC をおこない、脂質成分をエバポレイティブ光散乱ディテクター（ELSD）で検出することで、簡便かつ迅速にリポソームの構成脂質を定量する方法を確立することができた。すなわち、TMS カラムとクロロホルム/メタノール/水（1:33:6, v/v）の移動相を用いると、各化合物の十分な分離と、分析の迅速さにおいて優れていることが明らかとなった。また、実際の M5-DPPE 被覆リポソームの構成成分である M5-DPPE、cholesterol および DPPC を標準物質と同様に分離溶出できることも明らかとなった。さらに、標準物質の検量線の直線性や再現性に関しても満足のいく結果が得られた。これらのことから、TMS カラムとクロロホルム/メタノール/水（1:33:6, v/v）の移動相を用いる本 HPLC 法により M5-DPPE 被覆リポソーム構成成分の同時定量が可能であることが明らかとなった。

次に、ワクチンの長期保存を可能にするために、再水和法による人工糖脂質被覆リポソームの作製法の確立を試みたところ、人工糖脂質被覆再水和リポソームを、DPPC とコレステロールおよび M5-DPPE を用いて作製した脂質フィルムに蒸留水を加え作製したマルチラメラリポソームを凍結乾燥し、そのリポソームの凍結乾燥粉末に BSA を含む PBS を加え軽く振盪することで BSA 封入人工糖脂質被覆リポソームを作製できることが明らかとなった。また再水和法リポソームでは、ほぼ脂質フィルムを作製する時に加えた脂質比でリポソームが構成されていることも明らかになった。さらに、再水和法リポソームもマンノースを認識するレクチンであるコンカナバリン A による凝集がみられたことから、リポソーム表面にマンノペンタオースが露出していることが判明した。また、人工糖脂質被覆再水和法リポソームのタンパク質封入率は、従来法で作製したものとほぼ同じであった。次いで、人工糖脂質被覆再水和法リポソ-

ムの DTH 誘導能を検討したところ、抗原を封入した人工糖脂質被覆再水和法リポソームは従来法で作製した抗原封入人工糖脂質被覆リポソームと同様に、封入抗原(BSA)に特異的な強い DTH 誘導能を示した。さらに再水和法で作製した人工糖脂質被覆リポソームにも顕著な毒性は認められなかった。この結果は、M5-DPPE を任意の割合で含む人工糖脂質被覆リポソームを凍結乾燥状態で保存し、任意の抗原と混和することで、任意の場所で細胞性免疫誘導能をもつ安全なワクチンを非常に簡便に作製できることを意味している。

## E. 結論

本研究ではまず、簡便かつ迅速にリポソームの構成脂質を正確に定量する方法を確立した。これまで人工糖脂質の正確な定量法が存在しなかったこと、またコレステロールや DPPC の定量にはそれぞれ酵素法が用いられており、別途定量する必要があるなど、M5-DPPE 被覆リポソームの品質管理上多くの問題点があったが、本法の確立により、人工糖脂質被覆リポソームの脂質成分を短時間に同時定量することが可能となった。本法の確立により、実用的なワクチンのアジュバントとしての人工糖脂質被覆リポソームの品質管理が可能になったといえる。さらに、再水和法による抗原封入人工糖脂質被覆リポソームの作製方法を確立した。この方法では、人工糖脂質被覆リポソームの凍結乾燥粉末と抗原溶液を混和することで細胞性免疫を誘導できるワクチンを作製することができる。このことは、実際にエイズ流行地域で、特別な装置がなくとも人工糖脂質の乾燥粉末と抗原溶液（あるいはその乾燥粉末）さえあれば、有効なワクチンを再構成して作製できることを意味しており、人工糖脂質被覆リポソームをアジュバントとするエイズワクチンの実用化の時、きわめて大きな意味を持つと考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Shimizu, Y., Nakata, M., Matsunuma, J.,

Mizuochi, T.: Simultaneous quantification of components of neoglycolipid-coated liposomes using high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *J. Chromatogr. B*, 745: 127-133, 2001.

- 2) Yoshizawa, I., Soda, Y., Mizuochi, T., Yasuda, S., Rizvi, T. A., Mizuochi, T., Takemori, T., and Yokota-Tsunetsugu, Y.: Enhancement of mucosal immune response against HIV-1 gag by DNA immunization, *Vaccine*, 19: 2995-3003, 2001.
- 3) Mizuochi, T., Pastore, Y., Shikata, K., Kuroki, A., Kikuchi, S., Fulpius, T., Nakata, M., Fossati-Jimack, L., Reininger, L., Matsushita, M., Fujita, T., and Izui, S.: Role of Galactosylation in the Renal Pathogenicity of Murine IgG3 Monoclonal Cryoglobulins, *Blood*, 97: 3537-3543, 2001
- 4) Kenjo, A., Takahashi, M., Matsushita, M., Endo, Y., Nakata, M., Mizuochi, T., and Fujita, T., Cloning and characterization of novel ficolins from the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*, *J. Biol. Chem.*, 276: 19959-19965, 2001.
- 5) Shimizu, Y., Nakata, M., Kuroda, Y., Tsutsumi, F., Kojima, N., and Mizuochi, T., Rapid and simple preparation of N-linked oligosaccharides by cellulose column chromatography, *Carbohydr. Res.* 332: 381-388, 2001.
- 6) Tang, W., Seino K., Ito, M., Konishi, T., Senda, H., Makuuchi, M., Kojima N., and Mizuochi T. Requirement of ceramide for adhesion of *Helicobacter pylori* to glycosphingolipids, *FEBS Lett.* 504: 31-35, 2001.
- 7) Sekine, H., Kenjo, A., Azumi, K., Ohi, G., Takahashi, M., Kasukawa, R., Ichikawa, N.,

- Nakata, M., Mizuochi, T., Matsushita, M., Endo, Y., and Fujita, T., An Ancient lectin-dependent complement system in an Ascidian: Novel lectin isolated from the plasma of the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*, *J. Immunol.* 167: 4504-4510, 2001.
- 8) Kuroda, Y., Nakata, M., Hirose, S., Shirai, T., Iwamoto, M., Izui, S., Kojima, N., and Mizuochi, T., Abnormal IgG galactosylation occurs independently of the development of arthritis in MRL-*lpr/lpr* mice, *Pathol. Int.*, in press, 2001.
- 9) Kuroda, Y., Nakata, M., Nose M., Kojima N., and Mizuochi, T., Abnormal IgG galactosylation and arthritis in MRL-*Fas<sup>lpr</sup>* or MRL-*FasL<sup>gd</sup>* mice are under the control of the MRL genetic background, *FEBS Lett.*, 507, 210-214, 2001
- 10) Kuroki, A., Kuroda, Y., Kikuchi, S., Lajaunias, F., Fulpius, T., Pastore, V., Liliane Fossati-Jimack, L., Reininger, L., Toda, T., Nakata, M., Kojima, N., Mizuochi, T., and Izui, S. : Level of Galactosylation Determines Cryoglobulin Activity of Murine IgG3 Monoclonal Rheumatoid Factor. *Blood.* in press
2. 学会発表
- 1) Mizuochi, T., Matsumoto, A., Kojima, N., and Takeuchi, F.: Relationship between rheumatoid factor activity and glycosylation in IgG from RA patients. The 20th Congress of the International League of Associations for Rheumatology. Edmonton, Alberta, Canada, August, 2001
- 2) Kojima, N., Matsumoto, A., Takeuchi, F., and Mizuochi, T.: Characterization of RF immune complex formation by surface plasmon resonance. The 20th Congress of the International League of Associations for Rheumatology. Edmonton, Alberta, Canada, August, 2001
- 3) Kojima, N. and Mizuochi, T.: Role of lipid portions of glycosphingolipids in adhesion of *Helicobacter pylori*. XVIth International Symposium on Glycoconjugates. The Hague, The Netherlands, August, 2001
- 4) Nakata, M., Tang, W., Mafune, K., Konishi, T., Sugawara, Y., Mizuochi, T., and Makuuchi, M.: Prognostic potential of *Maakia amurensis* leukoagglutinin for histochemical analysis of human gastric cancers. XVIth International Symposium on Glycoconjugates, The Hague, The Netherlands, August 2001.
- 5) Mizuochi, T., Pastore, Y., Shikata, K., Kuroki, A., Nakata, M., Matsushita, M., Fujita, T., and Izui, S.: Significance of galactosylation of IgG3 cryoglobulins in the renal pathogenicity. XVIth International Symposium on Glycoconjugates, The Hague, The Netherlands, August 2001.
- 6) Shimizu, Y., Nakata, M., Matsunuma, J., and Mizuochi, T.: Simultaneous quantification of neoglycolipid-coated liposome components by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. XVIth International Symposium on Glycoconjugates, The Hague, The Netherlands, August 2001.
- 7) Matsumoto, A., Kojima, N., Takeuchi, F., and Mizuochi, T.: Characterization of oligosaccharides and activity of IgG rheumatoid factor. XVIth International Symposium on Glycoconjugates, The Hague, The Netherlands, August 2001.
- 8) Kuroda, Y., Nakata, M., Kuroki, A., Izui, S., Kojima, N., and Mizuochi, T.: Role of IgG1 oligosaccharide in binding of IgG1 to FcγRIII. XVIth International Symposium on Glycoconjugates, The Hague, The Netherlands, August 2001.

- 9) 合田(日向寺)祥子, 井上靖, 小島直也, 水落次男, 高田俊和, 細矢治夫: **mannose-binding protein** の糖鎖選択性に関する理論的研究、内毒素・LPS 研究会 (東京) 2001 年 6 月
- 10) 小島直也、水落次男: *Helicobacter pylori* のスフィンゴ糖脂質への接着性の検討、第 15 回 **Bacterial Adherence** 研究会 (新潟) 2001 年 7 月
- 11) 黒田泰弘、中田宗宏、黒木亜紀、Shozo Izui、小島直也、水落次男: **FcγRIII** とマウス **IgG1** の結合における **IgG1** 糖鎖の役割、第 74 回日本生化学会大会 (京都) 2001 年 10 月
- 12) 佐藤好亜、小島直也、清野慶太、水落次男: スフィンゴ糖脂質への *Helicobacter pylori* の接着における脂質部分の役割、第 74 回日本生化学会大会 (京都) 2001 年 10 月
- 13) 高橋宜聖、水落次男、幡野雅彦、徳久剛史、竹森利忠: ホメオボックス遺伝子 **Hox11** による胚中心クローン選択機構の修飾、第 31 回日本免疫学会総会・学術集会 (大阪) 2001 年 12 月
- 14) 水落次男、中田宗宏: 生体防御レクチンと糖鎖認識、文部科学省科学研究費特定領域研究 (B) 平成 13 年度公開シンポジウム「自然免疫による異物認識の分子基盤」(福岡) 2001 年 12 月
- 15) 水落次男、小島直也: 人工糖脂質リポソームを用いる細胞性免疫誘導型感染症ワクチンの開発、科学研究費補助金「特定領域研究」感染の成立と宿主応答の分子基盤、平成 13 年度第 1 回全体班会議 (公開) (東京) 2002 年 1 月

## HIV 脳炎発症病理に関する研究

分担研究者：佐多徹太郎（国立感染研・感染病理）

研究協力者：中島典子、佐藤由子（国立感染研・感染病理）

**研究要旨：** HIV 脳炎の発症機序を明らかにする目的で、高感度で特異性にすぐれた *in situ* hybrAT-CSA 法を開発し、これと免疫染色法との蛍光二重染色により、ヒト剖検リンパ節および脳組織における HIV mRNA の局在すなわち HIV 増殖部位について明らかにした。今後は *microdissection* 法による検討も合わせて、HIV 感染動態さらにサイトカイン等の宿主因子の病原性への関与についても検討していきたい。

### A. 研究目的

AIDS 患者の 20% に合併する HIV 脳炎及び AIDS 痴呆の発症病理はいまだ不明な点が多く、その機序を明らかにすることにより将来の HIV 脳炎の治療に結びつく知見が得られる可能性がある。HIV 脳炎では、病理組織学的に、Microglial nodule, Gliosis, Myeline paillor 等が脳組織切片にみられるものの、特異的所見は白質内の小血管周囲にみられる多核巨細胞の存在で、これを MGC (multinucleated giant cell) とよんでいる。この MGC の存在が神経病理学的特異的所見といえる。脳内 HIV の検出には、免疫組織化学による HIVp24 抗原の検出及び *in situ* hybridization 法によるゲノム RNA、HIV mRNA の検出が行われているが、検体の条件によっては後者の検出は困難なことが多い。

我々は高感度で特異性の高い新しい *in situ* hybridization 法である *in situ* HybrAT-CSA (ISH-AT-CSA) 法を開発した（前年度報告）。

今回はルーマニア小児エイズ剖検脳及びリンパ節標本 40 例において p24 抗原の検出、ISH-AT-CSA 法による mRNA の検出、PCR 法による provirus の検出を試みた。また免疫染色と ISH-AT-CSA 法との二重染色により、感染細胞を同定し、共焦点レーザー顕微鏡を導入して解析した。HIV のリザーバーの候補であるリンパ節で臨床末期に HIV がどのような動態を示すかを考察した。また HIV 脳炎のモデルとして SHIV 脳炎サル脳の脳及びリンパ節の SHIV の動態に関しても同様に解析検討した。

### B. 研究方法

#### 1. 小児エイズ剖検組織

1989~2000年にルーマニアの Dr. V. Babes infectious disease hospital において AIDS と診断された小児 40 症例の剖検リンパ節および脳組織材料を対象とした。年齢は 0~1 才が 13 例、1~5 才が 14 例、5~12 才が 13 例であった。HIV 脳炎は組織学的にほとんど認められず、リンパ節についてのみ（1）病理組織学的分類（2）HIV p24 抗原の検出（3）ISH-AT-CSA 法による HIV-mRNA の検出（4）組織切片からの nested PCR 法による HIV-DNA の検出を試みた。

#### 2. SHIV 脳炎サル剖検組織

カニクイザルに SHIV89PD を 10TCID<sub>50</sub> 静注し、8

ヶ月後に安楽死させた。このサルの剖検脳組織およびリンパ節をホルマリン固定パラフィン包埋した。

#### 3. ISH-AT-CSA 法

ISH-AT-CSA 法は、ISH-AT 法のシグナルを Tyramide を用いた catalyzed signal amplification (CSA) 法を用いて検出する方法である。CSA 法はともすれば非特異的なシグナル（バックグラウンド）も増強してしまい、signal/noise (S/N) 比が減少してしまうこともあるが、ISH-AT-CSA 法の場合、プローブ量を 1/10 に減少させ、洗いを強化し、標識時間（AT tailing 反応時間）を 1/2 に短縮することでバックグラウンドの増強を抑え、ISH-AT 法と比較して、より優れた signal/noise (S/N) 比の検出系とすることができた。

### C. 研究結果

#### 1. 小児エイズ末期のリンパ節における HIV

40 例の小児エイズ剖検リンパ節は病理組織学的に濾胞が種々の程度に硝子様変化をともなった萎縮傾向を示していた。病理組織分類の stage 1 である follicular hyperplasia は 1 例も認められず、stage 2 の follicular involution ないしは stage 3 の follicular depletion であった。

5 歳以下では半数が stage 2、半数が stage 3 であった。また 1 歳以下のリンパ節の 46%、1~5 歳のリンパ節の 93% で、CD21 陽性細胞（濾胞樹状細胞）が残存する濾胞部分に一致して HIV p24 抗原が検出された。一方、HIV mRNA は半数に検出されたが濾胞内ではなく、濾胞周囲に散在する細胞に検出された。酵素標識法による免疫組織化学と ISH-AT-CSA 法の二重染色、および蛍光標識法による共焦点レーザー顕微鏡を用いた二重蛍光染色による解析を行った結果、HIV-mRNA 陽性細胞は CD3 陽性 T 細胞であることがわかった。

一方 5 歳以上では 85% が stage 3 でリンパ節の萎縮はより強く、濾胞消失例もみられた。P24 抗原は 62% に HIV mRNA は 13 例中 1 例のみ（8%）にしか検出されなかったが、nested-PCR 法により HIV-DNA (provirus) は組織切片から 12 例（92%）に検出された（1 歳以下では 13 例中 6 例であった）。

#### 2. SHIV 脳炎サルのホルマリン固定パラフィン包



#### 埋脳組織標本とリンパ節標本の解析

HIV 脳炎例同様、SHIV 脳炎例では大脳灰白質直下の白質の小血管周囲に多数のマクロファージの浸潤が認められ、ときに多核巨細胞を形成している。SIVp27 抗原は免疫染色で CD68 陽性であるマクロファージで陽性であった。ISH-AT-CSA 法により SHIV RNA も同様にマクロファージの細胞質内に陽性となることが分かった。Sense probe では反応が得られないことにより、特異的シグナルと考えられた。多核巨細胞だけでなく、他の脳細胞にもシグナルが観察できたが、特異性については、より検討が必要である。

リンパ節は *granulomatous lymphadenitis* の像を呈し、リンパ節全体に多数のマクロファージと多角巨細胞がみとめられた。特に皮膜下辺縁洞はこれらの細胞で満たされていた。ISH-AT-CSA のシグナルは多角巨細胞の 1 数個の核と細胞質に一致して検出された。本症例のサルリンパ節内には濾胞構造はなく、ISH-AT-CSA のシグナルはマクロファージと一部の T 細胞に検出された。

#### D. 考察

ヒト HIV 脳炎における脳組織内の HIV の感染動態については、いまだ十分な検討ができていない。HIV 脳炎の脳組織における HIV 発現細胞の研究報告は現在まで多くあるが、いずれも MGC 以外の細胞についての陽性所見は信頼性がやや欠けるものであり、疑問視されている。

RI 標識 RNA プローブを用いた *in situ hybridization* 法によると HIV は主に MGC に検出され、神経細胞等には検出されないため、脳内の HIV はおもに MGC で増殖し、神経症状はなんらかの神経毒性物質や炎症性サイトカインの産生によるものと考えられている。一方、*In situ PCR* 法によると、増殖はわずかなものの脳固有細胞のほとんどに HIV は感染しておりこれが神経症状と関係しているのではと考えられている。しかしながら *In situ PCR* 法のシグナルの特異性に関しては議論の余地があり、脳固有細胞における HIV の動態を明らかにするには高感度のみならず特異性にすぐれた新しい *in situ hybridization* 法が必要である。

我々が最近開発した *in situ HybrAT* 法は RNA プローブを用いた *in situ hybridization* (ISH) 法に少なくとも匹敵する感度を持ち、オリゴプローブを用いた ISH 法と同等の特異性と簡便性を有している。標的核酸とハイブリダイズする Probe 部分は 40 base 前後であるので、sequence database から簡単に合成できクローン化 DNA を必要としない。そして標的核酸と特異的に結合したあとでこの probe の 3' 末端に結合した AT 配列部分でシグナルの増殖反応を特異的に行うという特徴がある。したがって、probe が特異的に結合していれば、そのシグナルは特異的結合部位周辺に観察されるはずである。*In situ PCR* 法では、DNA repair という非特異的シグナルが現れること、また検出目的の核酸は増殖核酸であり増殖反応中に特異的部位から遊離してしまう可能性が考えられ、

非特異的シグナルの原因となる。実際、この非特異的シグナルの存在のため、なかなか一般的に普及していない。

今回、*in situ HybrAT* 法と CSA 法を合わせた ISH-AT-CSA 法を用いてヒト剖検例の脳およびリンパ節から HIV の検出を試みた。小児エイズでは脳炎例が多いという報告があるにもかかわらず、用いた標本の中で組織学的に脳炎の所見 (MGC など) が認められたのは 1 例のみであった。一方、リンパ節では剖検例にもかかわらず、病理組織学的に濾胞が残存している例が多く、濾胞内に濾胞樹状細胞が抗 CD21 抗体で染色された。ここに一致して p24 抗原が検出されたもの、ISH-AT-CSA のシグナルは濾胞周囲に散在して検出された。ISH-AT-CSA 法で検出できる HIV のシグナルは増殖しつつあるウイルスの mRNA と考えられた。すなわち、sense 鎖のプローブで検出されないこと、P24 抗原が陽性となるリンパ節濾胞領域にはほとんど検出されないこと、切片を *heat denature* してもしなくてもシグナルの局在には変化がないこと、proviral DNA を検出するほど感度は高くないことがその理由である。

P24 抗原と HIV-RNA、HIV-mRNA の分布が関連しなかった理由として以下のことが考えられた。(1) 小児の HIV 感染の末期には、濾胞内に残存する T 細胞、濾胞樹状細胞 (FDC) では HIV の増殖 (HIV mRNA の産生) は認められないか、あっても少ない。(2) p24 抗原陽性細胞は FDC であり、IgG、補体も同一部分に検出されることから従来報告されているように免疫複合体を形成して、HIV 粒子が FDC に trap されていることが考えられる。(3) FDC に trap されている HIV 粒子中のゲノム RNA に関しては、分解されてしまったため検出できないか、感度以下の少量のため検出できない。(4) HIV 粒子はタンパク質で覆われているため、この中のゲノム RNA へのプローブの到達度 (accessibility) が低いため検出が困難である。実際、Target retrieval solution 中で 95°C、40 分処理後、いろいろな濃度のプロテナーゼ K やグリシンによる高度の前処理をしても検出不可能であったので、(4) のようには考えられない。

従来困難であった剖検組織において HIV mRNA 陽性細胞を検出することが新しい方法を適用することで可能となった。また免疫組織化学法により、ゲノムと抗原を同じ細胞に検出する目的で、二重染色が酵素標識法および蛍光標識法を用いて試み、特異的に HIV mRNA 陽性細胞を同定し、性格を決定することができた。

濾胞部分の濾胞樹状細胞についてさらに解析を進めることで、HIV 感染リンパ節での HIV の動態を組織構築と局在する細胞に関連して明らかにできると思われる。今後、症例を増やし、検出できたシグナルから、HIV 増殖部位の詳細な情報が得られると考えられる。また *microdissection* 法による検討も組み合わせ、HIV 感染動態さらにサイトカイン等の宿主因子の病原性への関与についても検討していきたい。

HIV 脳炎の病理標本の入手が困難なため今回は SHIV 感染サルの剖検組織標本 (エイズセンター侯

野先生より)を使用した。今後 CD14、CD16、CD45 などのマーカーを使用し、脳内に検出される感染細胞が末梢由来 (perivasucular マクロファージ) のものか、脳固有細胞 (resident microglia) なのかなど詳細に検討していきたいと考えている。

#### E. 結論

In situ hybrAT-CSA 法と免疫染色法による蛍光二重染色によりホルマリン固定パラフィン包埋切片中の HIV 感染細胞を同定することができた。脳炎の合併のない小児エイズ例では、末期リンパ節における HIV mRNA 陽性細胞は CD68(-)CD21(-) CD3(+)の T 細胞であった。

#### F. 研究倫理

Romania 小児エイズ剖検例については、剖検時に遺族の承諾を得ていること、当病院から共同研究のため使用する許可を得ている。動物実験に関しては、当研究所動物実験委員会の許可のもとに行った。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Aidoo S, Ampofo WK, Brandful JAM, Nuvor SV, Ansah JK, Nii-Trebi N, Barnor JS, Apeagyuei F, Sata T, Ofori-Adjei D, Ishikawa K.: Suitability of a rapid immunochromatographic test for detection of antibodies to human immunodeficiency virus in Ghana, West Africa. *J Clin Microbiol* 2001, 39: 2572-2575.
2. Nuvor SV, Katano H, Ampofo WK, Barnor JS, Sata T.: Higher prevalence of antibodies to human herpesvirus 8 in HIV-infected individuals than in the general population in Ghana, West Africa. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001, 20 : 362-364.
3. Shimizu S, Katano H, Sata T, Chen KR, Tagami H, Hanabusa H, Shimizu H.: Absence of anti-human herpesvirus 8 antibody in 32 Japanese hemophiliacs with the advanced HIV infection. *Arch Dermatol Res* 2001, 293: 380-381.
4. Suda T, Katano H, Delsol G, Kakiuchi C, Nakamura T, Shiota M, Sata T, Higashihara M, Mori S: HHV-8 infection status of AIDS-unrelated and AIDS-associated multicentric Castleman's Disease. *Pathol Int* 2001, 51: 671-679.
5. Ishikawa K, Janssen W, Banor JS, Shiino T, Piedade J, Sata T, Ampofo WK, Brandful JAM, Koyanagi Y, Yamamoto N, Canas-Ferreira WF, Adu-Sarkodie Y, Kurata T.: Phylogenetic analysis of HIV type 2 in Ghana and Guinea-Bissau, West Africa. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2001, 7: 1661-3.
6. Hanaki K, Nishihara T, Odawara T, Nakajima N, Yamamoto K, and Yoshikura H: RNase A treatment of Taq and Tth DNA polymerases eliminates primer / template-independent poly(dA-dT) synthesis. *Biothechniques* 2001 Oct; 31(4): 734, 736, 738.
7. Nakajima N, Lu R, and Engelman A: Human immunodeficiency virus type 1 replication in the absence of integrase-mediated DNA recombination:

definition of permissive and nonpermissive T-cell Lines. *J. Virol.* 2001; 75 (17): 7944-7955.

G. 知的所有権の取得状況  
特になし。

## サルエイズ脳炎発症モデルに関する研究

分担研究者 向井鎌三郎 国立感染研・筑波霊長類センター（室長）  
研究協力者 佐多徹太郎 国立感染研・感染病理部（部長）  
小松原博文 国立感染研・筑波霊長類センター（研究生）  
菊池 俊彦 国立感染研・筑波霊長類センター（協力研究員）

研究要旨 SIVmac 239 株を 2 頭のカニクイザルに接種し、感染実験を行った結果、2 頭中 1 頭 (Cy 1-1) がエイズ脳炎を発症した。この 2 頭のカニクイザルから死亡 1 日前に採取した血液を 2 代目のカニクイザルにそれぞれ接種した。その結果、2 代目のカニクイザルは 2 頭 (Cy 1-2, Cy 2-2) とも脳炎を発症し、脳炎を発症したカニクイザルの脳組織から SIV 産生が認められる細胞株 (BM1, BM5 細胞株) を樹立した。この BM 細胞の諸特性と BM 細胞が由来したサル脳炎組織の病理組織学的解析結果とを合わせて考察することにより、SIV を産生する BM 様細胞の集簇巣が脳血管周囲に形成されることがエイズ脳炎発症病因の一つであるという作業仮説を立てている。本年度は、BM1 細胞が産生する SIV bm 1 の全塩基配列が決定されたので、1) SIV bm 2 株の全塩基配列の比較検討を行うことと、2) 肺胞Mφの他に *in vitro* で分化させた単球、骨髄細胞、脳組織初代培養細胞等への SIV bm1, SIV bm5 の感染増殖を検討することを目的とした。

その結果、SIV bm5 にはマクロファージ (Mφ) 指向性 SIV に特徴的な点突然変異の一部があるが、SIV bm1 にはこの変異が全く無いことが明らかになった。また、SIV bm の宿主域に関し、末梢血 PBMC や CEMx174 細胞株では、SIVmac239, SIV bm1, SIV bm5 すべてに感染・増殖が認められたが、肺胞Mφ、分化血中単球、骨髄細胞、アストロサイトには SIV bm1, SIV bm5 のみの感染増殖がみられた。

今後、細胞レベル、動物個体レベルで、Mφ 指向性と神経組織指向性の差異や BM 細胞の成因とその無限増殖性獲得機序に関して解析を行いたい。

### A. 研究目的

世界的なエイズの蔓延とともに最近ではアジア、アフリカ大陸にもその流行がみられ、HIV の感染予防とともにエイズ発症の予防・治療法の開発が待たれている。

最近、開発された新しいプロテアーゼ阻害薬等が HAART (Highly Active Antiretroviral Therapy) 療法により直ちに臨床に用いられているが、エイズウイルスの増殖を一時的に抑制したり、患者の延命を期待できるものしかないのが現状である。また、投薬により、

中枢神経系、脳脊髄液中のウイルス量を低下させる薬剤は AZT と我々の報告した 6-Cl-ddG を含めてもまだ少ない (1-5)。

エイズ脳炎・痴呆症は HIV 感染者のうち約 30% に見られ HIV 感染に特徴的である。従って、サルエイズ脳炎発症モデルの開発とその発症機構の解明は、HIV 感染とその予防にとって重要な意義をもつ。

SIVmac 239 株を接種した 2 頭のカニクイザル (Cy 1-1 と Cy 1-2) では 3 年 7 カ月

目と3年10カ月目に、それぞれ脳炎と、肉芽腫様肺炎(GP 肺炎)及びリンパ節炎(GL)を認め、輸血により *in vivo* でウイルスの継代を行ない2代目サル2頭においても脳炎の発症を確認した(図1)。

エイズ脳炎発症サル2頭(Cy 1-2, Cy 2-2)の脳組織より、それぞれウイルス産生培養細胞株(2株; BM1, BM5)を樹立し、この細胞の特性を明らかにした。BM細胞2株はいずれもM $\phi$ 様細胞表面抗原及びM $\phi$ 、モノサイト系マーカーを持ち、CD4陰性でSIVを産生する無限増殖性細胞である(図2)。このBM細胞の諸特性とBM細胞が由来したサル脳炎組織の病理組織学的解析結果とを合わせて考察することにより、SIVを産生するBM様細胞の集簇巣が脳血管周囲に形成されることがエイズ脳炎発症病因の一つであるという作業仮説を立てている。

本年度の目的は、BM1細胞が産生するSIV bm1の全塩基配列が決定されたので、1) SIV bm2株の全塩基配列の比較検討を行うこと、2) 肺胞M $\phi$ の他に *in vitro* で分化させた単球、骨髄細胞、脳組織初代培養細胞へのSIV bm1, SIV bm5の感染増殖を検討することである。

## B. 研究方法

使用動物は、カニクイザル4頭で、初代カニクイザルには、SIVmac239株(TCID<sub>50</sub>~5x10<sup>4</sup>)を静脈接種し、2代目カニクイザルには5mlの輸血をおこなうことにより、SIVの接種を行った。

肺胞M $\phi$ は肺洗浄により得られた細胞を、骨髄細胞はカニクイザル腸骨及び坐骨より吸引法により得た細胞を低張処理により赤血球を除去して用いた。また、アストロサイトの分画は正常カニクイザルの解剖時に大脳皮質の一部を分与されたものを Gilles ら(J. Neurovirol. 6:173-186, 2000)の方法を用いて行った。脳組織由来細胞株、BM1、

BM5細胞株の培養には通常のRPMI培地と6穴平底プレートを用い、培地は3日毎に交換した。また、BM細胞産生SIVは培地交換後3.5日目に培養上清を回収しウイルス(SIV bm1, SIV bm5)として使用した。

SIVmac239株の増殖およびウイルスTiterはのTCID<sub>50</sub>は常法に従ってCEMx174細胞株を用いて行った。その他のウイルス(BM SIV)は他の宿主細胞を用いることなくRT(逆転写酵素)活性を合わせて、宿主細胞に感染させた。また、ウイルス感染は、SIVmac239とCEMx174細胞株の組み合わせで、moi 0.3で感染させ、3日目毎に培養上清を回収した後、よく懸濁後半量の培地を細胞ごと交換した。

各種ウイルスの各種宿主細胞における増殖は、培養上清中SIVの逆転写酵素を測定し、市販のリコンビナントHIVRTを用いて標準化して定量した。また、産生ウイルスのピーク付近や、産生ウイルスの初期の立ち上がりの時期にはp27ELISA(p27 core antigen capture assay kit; Coulter)を用い、2重に確認を行った。

SIVゲノム遺伝子塩基配列は、独自にデザインしたプライマーによるPCR産物をTAクローニングし、1回のPCR反応あたり、3~5クローンの塩基配列を確認して決定した。塩基配列決定に用いた機種はLi-COR Seqencerである。また、BM1、BM5が産生するSIVのRNAゲノムの塩基配列決定は、RT-PCR反応以外は同様に行った。

## (倫理面への配慮)

本研究は、国立感染症研究所動物実験委員会による審査の結果承認を受けた。また、研究の実施にあたっては、筑波医学実験用霊長類センター諸内規、作業方式に従って繁殖育成サルを用い、動物に与える苦痛の軽減と排除に努めた。

## C. 研究結果

### SIV bm1, SIV bm5 の全塩基配列の比較

本年度は、昨年度報告した SIV bm5 に加えて、SIV bm1 株の全塩基配列が決定されたので、野生型株である SIV mac239 との比較を行った (図 3)。その結果、SIV bm1 では、LTR で 18、*gag* で 15 (A.a.; 4)、*env* で 48 (A.a.; 39)、*nef* で 27 (A.a.; 23) 個の置換が確認され、*vif*, *vpx*, *vpr*, *tat*, *rev* ではそれぞれ 9 (A.a.; 6), 3 (A.a.; 1), 4 (A.a.; 2), 9 (A.a.; 5), 4 (A.a.; 3) 個の置換が認められた。またこれ以外に *gag* では 12 個、*pol* では 12 個、3 個、*env* では *env* 領域内の多様性領域である V 領域中の V1 領域に 9 個、V4 領域に 18 個の連続した欠失が認められた。

また SIV bm5 では、*env* 領域において 46 (A.a.; 33) 個の置換と V4 領域に 21 塩基の連続した欠失が認められた。*Env* 領域以外では、*nef*, *vif*, *tat*, *rev* の各領域に塩基置換がそれぞれ 18 (A.a.; 15), 7 (A.a.; 5), 3 (A.a.; 1), 5 (A.a.; 2) 個の置換が確認されたが、*pol*, *vpx*, *vpr*, *nef* などのアクセサリ-遺伝子をコードしない LTR 領域には変異が認められなかった。

中枢神経指向性 SIV は通常、マクロファージ指向性も獲得していることが現在までに明らかになっている。さらに T 細胞指向性の SIVmac239 に *env* 領域内に 4 ヶ所 (6802, 7130, 7750, 8323 番目の塩基) の特異的塩基置換を導入することにより、マクロファージ指向性を獲得することが報告されている。

上述の 4 ヶ所の点突然変異に関して、SIV bm 株で解析を行ったところ、SIV bm5 では、6802 番目の塩基がグアニンからアデニンに置換 (A.a.; V → M) し、7750 番目の塩基がアデニンからグアニンに置換 (A.a.; G → R) しており、マクロファージ指向性特有の置換と同じ置換が認められた。

しかし、7130 番目の塩基はアデニンはグアニンの置換ではなくシトシンに置換し (A.a.; K → Q)、8323 番目のヌクレオチドでは置換は確認されなかった。これに対し SIV bm1 では、6802 番目の塩基がグアニンからチミン (A.a.; V → L) に置換し、マクロファージ指向性特有の置換とは異なる置換を示しているのみで、他の 3 ヶ所の置換は確認されなかった。また、脳組織由来血管内皮細胞への *in vivo* での感染には 8854 番目の塩基がアデニンからグアニンに置換 (A.a.; R → G) することが重要であると報告されているので、SIV bm1 及び SIV bm5 について同様の解析を行ったところ、SIV bm1 と SIV bm5 共に同じ置換 (R → G) を保有することが認められた (図 4)。

### SIVbm1, SIVbm5 のみがMφで感染・増殖

SIV bm5 にはMφ指向性特有の4カ所の置換のうちの2カ所に同一置換がみられたことと、脳炎発症カニクイザルの脳組織にはSIV産生Mφ系多核巨細胞が認められたので、SIV bm5、BM5細胞株の由来したサル (Cy 2-2) の死亡直前の血漿、SIV bm1 およびSIVmac239 を用いて *in vitro* でサル肺胞Mφへの感染実験を行った。また、対照宿主細胞としてCEMx174細胞株を用いた (図5)。

サル肺胞Mφでは親株のSIVmac239は感染・増殖できなかったが、SIV bm1とSIV bm5のみの増殖が感染33日目から45日目までみられた (図5上)。一方、CEMx174では親株のSIVmac239、Cy 2-2血漿SIV、SIV bm1とSIV bm5の用いた4種SIVすべての増殖がみられた。用いた宿主細胞における各種SIVの増殖が混入しているQuasi Species SIVによるものかどうかを調べるため、SIV bm1、SIV bm5についてCEMx174細胞とMφで増殖したSIVの全*env*領域の遺伝子配列をRT-PCRで決定したところ、調べた限りのクローンにおいて、差はなく

SIV bm1, SIV bm5 のゲノム塩基配列と同じ配列を持っていた。

#### SIV bm 株のみが分化モノサイト、骨髄細胞に感染・増殖できる。

GMCSF により分化させた血中モノサイトや骨髄細胞への感染実験では、SIV bm1, SIV bm5 のみの感染増殖が確認された。興味深い結果は、血中モノサイトを *in vitro* で GMCSF により 1 日だけ分化を誘導した後、ウイルスを感染させたものと、1 週間 GMCSF 処理後ウイルスを感染させたものとの比較では、後者で、SIV bm 2 株の増殖（立ち上がり）が早い点である（図 5 下）。

一方、骨髄細胞を宿主として SIVmac239, SIV bm1, SIV bm5 を感染させた場合にはやはり、SIV bm 2 株の増殖のみが認められ、SIVmac239 の感染・増殖は見られなかった（図 6 下）。同様の感染実験を末梢血単核球を用いて、ConA の刺激有り、ConA なしの条件で検討を行ったところ、SIVmac239, SIV bm 2 株のすべての SIV が感染・増殖した（図 6 上）。

#### SIV bm 株のみがアストロサイトに感染・増殖できる

カニクイザル脳組織より得たアストロサイト初代培養細胞への感染実験を行い、培養上清中の SIV の有無は RT-PCR 及び p27 (SIV gag) ELISA 法により、また、感染の有無をアストロサイトのゲノム DNA の PCR による確認の結果、SIVmac239 は感染のみ確認されウイルスは産生されなかつたが、SIV bm1, SIV bm5 は共にアストロサイトへの感染・増殖が確認された。

#### D. 考察

##### SIV bm1, SIV bm5 の全塩基配列の比較

1) SIV bm 1 株には既知の M $\phi$  tropic 配列がない。

SIV bm1, SIV bm5 は共に、M $\phi$ 系細胞、骨髄細胞および神経系細胞への感染・増殖が確認されたことから共通の表現型をもつが、報告された env 領域の遺伝子配列に関し、M $\phi$  指向性特異的 point mutation が SIV bm5 には一部みられるのに対して、SIV bm1 にはそれが全くみられないことが明らかになった。従って、SIV bm 株の M $\phi$ /神経組織指向性は M $\phi$  単独指向性とは異なる塩基置換による可能性も示唆された。

Flaherty M. T. ら (J. Virol., 71: 5790-5798, 1997) のグループは、脳炎を発症する SIV 株 (SIV / 17E-F r) は脳組織由来血管内皮細胞に *in vivo* で感染・増殖し、この感染・増殖には 8854 番目の塩基がアデニンからグアニンに置換 (A.A.; R $\rightarrow$ G) することが重要であると報告しているので、SIV bm1, SIV bm5 について同様の解析を行った結果、SIV bm1, SIV bm5 共に同じ置換を保有することが認められたことから、この point mutation が神経組織指向性には重要であるのかもしれない。

2) SIV bm1, SIV bm5 を区別できる in frame deletion 。

BM5 細胞が産生する SIV の全塩基配列を SIVmac239 と比較すると、env 領域を中心に変異が見られ、特に V4 に変異が集中し、21 塩基 deletion が検出された。SIV bm1 においても 18 塩基 in frame deletion が SIV bm5 と同様の位置にみられた。SIV bm1 ではさらに、V1 領域にも 9 塩基の deletion が認められた。

#### SIV bm 株のみが肺胞 M $\phi$ 、分化モノサイト、骨髄細胞に感染・増殖

GMCSF により分化させた血中モノサイトや骨髄細胞への感染実験では SIV bm1, SIV bm5 のみの感染増殖が確認された。末梢血

PBMC や CEMx174 細胞株では、SIVmac239, SIV bm1, SIV bm5 のすべてのウイルスで感染・増殖が確認された。SIV bm による感染細胞はすべて、長期培養（3～4ヶ月）を行って、*in vitro* での不死化の有無の検討を行っているが、現在までのところ確認出来ていない。

#### SIV bm 株のみがアストロサイトに感染・増殖

カニクイザル脳組織より得たアストロサイト初代培養細胞への感染実験の結果、SIVmac239 は感染のみ確認されウイルスは産生されず、SIV bm1, SIV bm5 は共にアストロサイトへの感染・増殖が確認された。

Gilles G.らは SIVmac251 poly-clone ウイルスをアストロサイト初代培養細胞へ感染させたところ、感染のみ確認され、この細胞に IFN- $\gamma$  や TNF- $\alpha$  を加えると SIV の産生がみられたことを報告している (J. Neurovirol., 6: 173-186, 2000)。

SIV bm1 と SIV bm5 は共にアストロサイトへの感染・増殖が確認されたことから、その、転写・翻訳レベルが神経系細胞で強力であることが推測できる。

今後は、BMSIV の 2nd Receptor の確認、Molecular Clone の作成とともに、SIV 感染サルにおける BM 細胞の出現と脳炎発症を確認することが必要であると考えられる。

#### E. 結論

##### 1) SIV bm 2 株の全塩基配列の比較

BM5 細胞が産生する SIV の全塩基配列を SIVmac239 と比較すると、env 領域を中心に変異が見られ、特に V4 に変異が集中し、21 塩基 deletion が検出された。SIV bm1 においても 18 塩基 in frame deletion が SIV bm5 と同様の位置にみられた。SIV bm

1 では V1 にも 9 塩基の deletion が認められた。

##### 2) SIV bm 株のみが肺胞 M $\phi$ 、分化モノサイト、骨髄細胞に感染・増殖

GM-CSF により分化させた血中モノサイトや骨髄細胞への感染実験では SIV bm1, SIV bm5 のみの感染増殖が確認された。末梢血 PBMC や CEMx174 細胞株では、SIVmac239, SIV bm1, SIV bm5 すべて感染・増殖が確認された。

##### 3) SIV bm 株のみがアストロサイトに感染・増殖

カニクイザル脳組織より得たアストロサイト初代培養細胞への感染実験の結果、SIVmac239 は感染のみ確認されウイルスは産生されず、SIV bm1, SIVbm5 は共にアストロサイトへの感染・増殖が確認された。

##### 4) SIV bm 1 株には既知の M $\phi$ tropic 配列がない。

SIV bm1, SIV bm5 は共に、M $\phi$  系細胞および神経系細胞への感染・増殖が確認され、共通の表現型をもつが、報告された env 領域の M $\phi$  指向性特異的 point mutation が SIV bm5 には一部みられるのに対して、SIV bm1 にはそれが全くみられないことが明らかになった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Fuji, Y., Mukai, R., Murayama, Y., Akari, H., Machida, M., Mori, K., Takasaka, M., Murakami, K., and Yoshikawa, Y. : Efficacy of 6-chloro-2',3'-dideoxyguanosine (6-Cl-ddG) on an ARC/AIDS rhesus macaque (*Macaca mulatta*) infected with simian immunodeficiency virus. *Exp. Anim.* 46: 83-87, 1997

2) Otani I., Fuji, Y., Akari, H., Mukai, R., Mori, K., Ono, F., Kojima, E., Machida, M., Murakami, K., Doi, K., Yoshikawa, Y. : Effects of 6-chloro-2',3'-

dideoxy guanosine (6-Cl-ddG) in surface lymph nodes of rhesus mon-keys (*Macaca mulatta*) chronically infected with simian immunodeficiency virus (SIVmac239).

J. Veterinary Med. Sci. 59: 891-896, 1997.

3) Otani I., Fuji, Y., Akari, H., Mukai, R., Mori K., Ono, F., Kojima, E., Machida, M., Murakami, K., Doi, K., Yoshikawa, Y.: Effects of 6-chloro-2',3'-dideoxy guanosine (6-Cl-ddG) in surface lymph nodes of rhesus mon-keys (*Macaca mulatta*) chronically infected with simian immunodeficiency virus (SIVmac239).

J. Veterinary Med. Sci. 59: 891-896, 1997.

4) Fuji, Y., Mukai, R., Murayama, Y., Akari, H., Machida, M., Mori, K., Takasaka, M., Murakami, K., and Yoshikawa, Y.: Efficacy of 6-chloro-2',3'-dideoxyguanosine (6-Cl-ddG) on rhesus macaque chronically infected with simian immunodeficiency virus (SIVmac239)

J. Acquir. Immune. Defic. Syndr. Hum. Retro-virol. 16: 313-317, 1997

5) Fuji, Y., Mukai, R., Akari, H., Machida, M., Mori, K., Takasaka, M., Kojima, E., Murakami, K., and Yoshikawa, Y.: Antiviral effects of 6-chloro-2',3'-dideoxy guanosine (6-Cl-ddG) in rhesus monkeys acutely infected with SIV.

Antiviral Chem. & Chemother. 9: 85-92, 1998

6) Takano J., Narita, T., Fujimoto, K., Mukai, R., Yamada, A.: Detection of B-virus infection in cynomolgus monkeys by ELISA using simian agent 8 as alternative antigen *Exp. Anim.* 50: 345-347, 2001

7) Uda, A., Tanabayashi, K., Mukai, R., Yachi, M., and Yamada, A.: CD3 polymorphism in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J. Med. Primatol.* 30: 141-147, 2001

8) Tanabayashi, K., Mukai, R., and Yamada, A.: Detection of B virus antibody in monkey sera using glycoprotein D expressed in mammalian cells. *J. Clin. Microbiol.*, 39: 3025-3030, 2001.

9) Misumi, S., Takamune, N., Ido, Y., Hayashi, S., Endo, M., Mukai, R., Tachibana, K., Umeda, M., Shoji, S.: Evidence as a HIV-1 self-defense vaccine of cyclic chimeric dodecapeptide wrapped from undecapeptidyl arch of extracellular loop 2 in both CCR5 and CXCR4.

*B. Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285, 13095-13163, 2001.

## 2. 学会発表

1) 小松原博文、菊池俊彦、佐多徹太郎、松田基夫、宇田晶彦、向井隼三郎：中枢神経指向性 SIV のマクロファージ感染性と遺伝子解析

第 15 回日本エイズ学会（東京）2001 年

2) 中山大介、林辰一郎、向井隼三郎、橘 園臣、梅田 衛、高宗暢暁、三隅将吾、庄司省三：Chemokine receptor を基礎にした HIV-1 dual tropic ウイルスの感染を防止する単クローン抗体の調整及び性質

第 15 回日本エイズ学会（東京）2001 年

3) 菊池俊彦、小松原博文、佐多徹太郎、松田基夫、宇田晶彦、向井隼三郎：Cloning and Analysis of Neurotropic SIV (Simian Immunodeficiency Virus)

第 24 回日本分子生物学会（横浜）2001 年

4) 本藤 良、植田富貴子、向井隼三郎、棚林清、山田章雄、吉川泰弘：B ウイルス感染の DNA 診断と分子疫学に関する基礎的研究

第 49 回ウイルス学会（大阪）2001 年

5) 棚林清、宇田晶彦、谷内真由美、向井隼

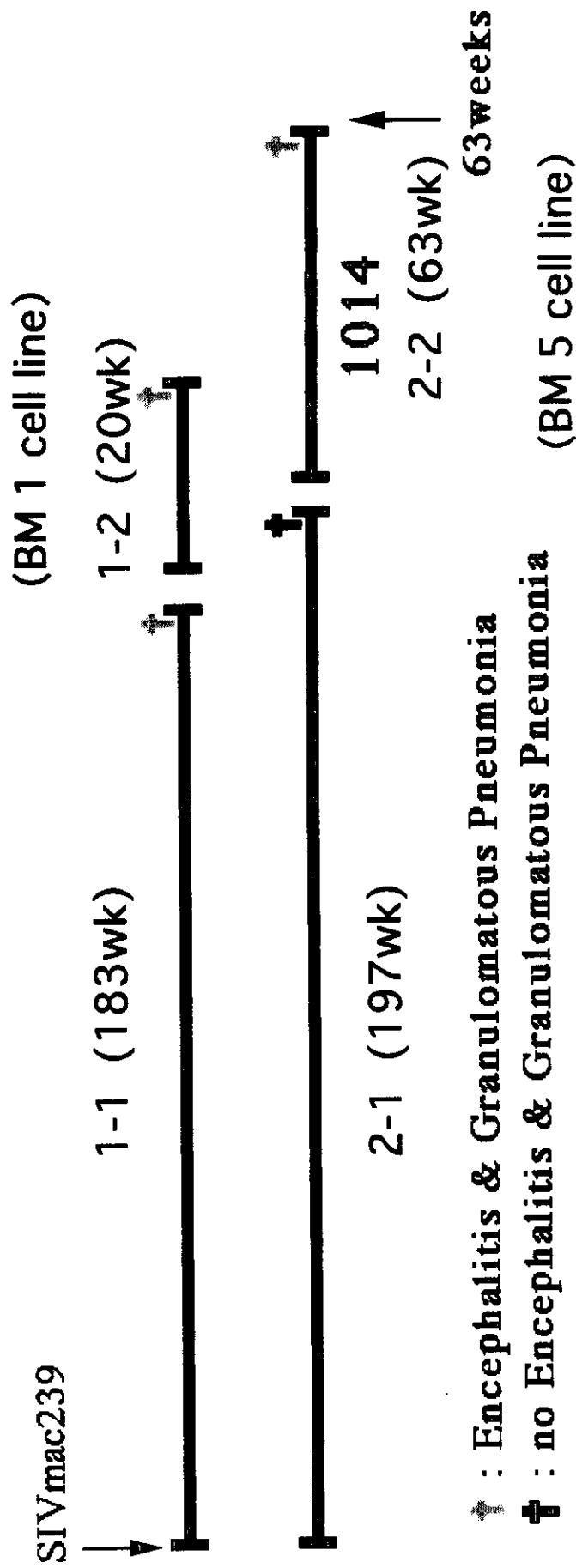


三郎、山田章雄：Bウイルス特異的 mAb の  
認識する gB 蛋白抗原部位の解析  
第 49 回ウイルス学会（大阪）2001 年

- G. 知的所有権の所有状況
1. 特許取得           なし
  2. 実用新案登録       なし
  3. その他               なし

**Fig 1**

### Onset of AIDS Encephalitis in Cynomolgus Monkeys and Passage by Blood Transfusion



† : Encephalitis & Granulomatous Pneumonia

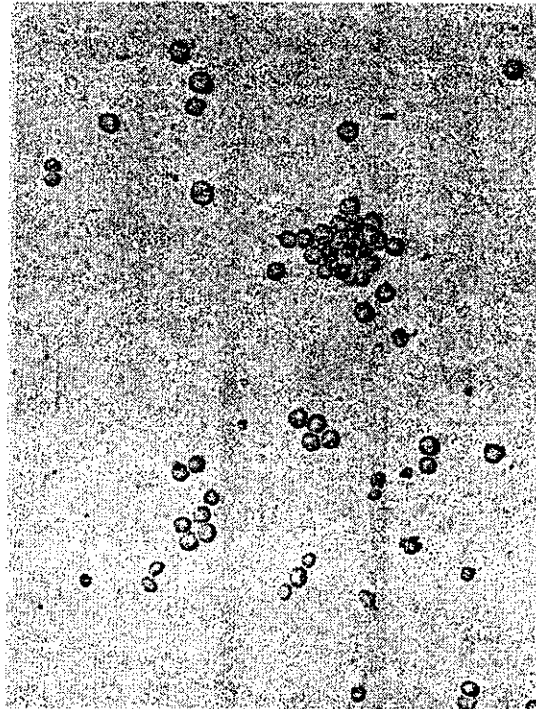
‡ : no Encephalitis & Granulomatous Pneumonia

All macaques: Depressed at final stage

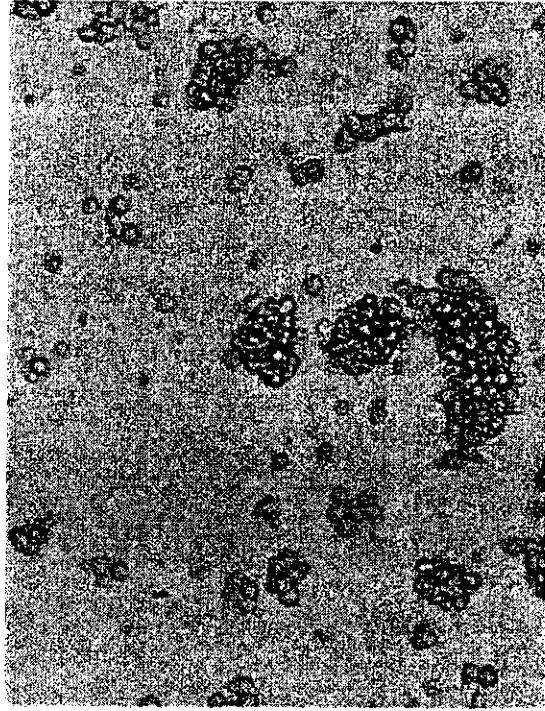
3/4 macaques: Encephalitis

图 2

## BM cell lines



BM1 cell line

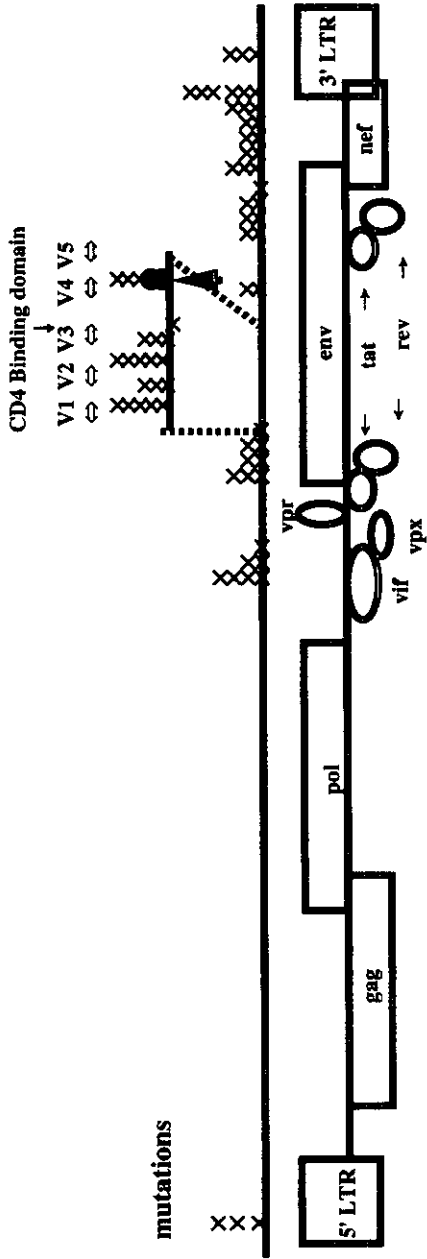


BM5 cell line

( x 100 )

3

### Mutations in SIV bm5



### Mutations in SIV bm1

