

研究要旨 ヒト造血幹細胞を移植し免疫系を再構築した NOD/SCID/IL2R $\gamma$ <sup>null</sup> (NOG) マウスに EBV を感染させたところ、末梢血および主要臓器に EBV が証明され、一部のマウスではリンパ腫が発生した。また、CD8 陽性細胞の増加など EBV 特異的免疫応答の存在を示唆する結果が得られた。本実験系は EBV 感染モデルとして有用であると考えられた。

#### A. 研究目的

EB ウイルス (EBV) は移植後などの免疫不全状態で発生する日和見感染症の病因として最も重要なものの一つであり、リンパ増殖性疾患 (LPD) を引き起こす。本研究では、LPD の病態および発症機構を解明し、それに基づき治療法を開発することを目標として基盤研究を行う。EBV は B リンパ球に感染するとこれを不死化し、無制限に増殖するリンパ芽球様細胞へとトランスフォームするという、極めて特徴的な能力をもつが、生体内においては通常、このような EBV 感染細胞は免疫監視機構により除去される。しかし、移植治療などにおいて免疫能が低下した場合は感染細胞が体内で増殖し、LPD を発症する。このように LPD の病態および発症機構の根底には EBV による細胞増殖の誘発があると考えられるため、治療法開発のためには EBV による細胞増殖誘発メカニズムを解明し、治療の標的となる分子を探索する必要がある。本研究は、EBV 感染細胞の増殖機構およびウイルス特異的免疫応答によるその制御機構を *in vivo* で解析するための動物モデルを作製し、LPD 発症機構の解明と新規治療法の評価の場として利用することを具体

的な目標とする。

NOD/SCID/IL2R $\gamma$ <sup>null</sup> (NOG) マウスは免疫不全マウスの一種であり、ヒト造血幹細胞を移植すると、EBV の主な標的となる B 細胞の他、T 細胞、NK 細胞、マクロファージ、樹状細胞など免疫系の主要な細胞の発生が認められる。我々のこれまでの予備的な研究により、このようないわゆるヒト化 NOG マウスには EBV が感染しうることが示されているので、本研究では、この実験系を詳細に検討し、EBV 感染モデルとしての応用を図る。

#### B. 研究方法

##### 1. 臍帯血

東京臍帯血バンク分離保存施設 (日本大学医学部) に提供された臍帯血のうち、細胞数不足のため移植に使用できなかったものを利用した。

##### 2. NOD/SCID/ $\gamma$ <sup>null</sup> マウス (NOG マウス)

NOD/SCID/ $\gamma$ <sup>null</sup> マウス (以下、NOG マウス) は NOD/Shi-*scid* マウスと、IL-2 受容体  $\gamma$  鎖ノックアウトマウスを掛け合わせたもので、現在、ヒト造血幹細胞の移植に最も適した免疫不全マウスの一つである。6~8 週齢

の NOG マウスを実験動物中央研究所より購入し、国立感染症研究所無菌飼育室で飼育・実験を行った。

### 3. 臍帯血造血幹細胞の分離と移植

臍帯血から Ficoll 比重遠心法により単核細胞を分離し、MACS CD34+ アイソレーションキット (Miltenyi Biotec) あるいは Stemsep キット (ステムセルテクノロジー社) を用いて CD34 陽性造血幹細胞を分離した。1×10<sup>4</sup>~1.2×10<sup>5</sup> 個の CD34 陽性細胞を、尾静脈、腹腔あるいは骨髄内投与により移植した。その後、フローサイトメトリーにより末梢血、骨髄、脾臓、胸腺などからヒト CD45、CD19、CD3 陽性細胞を検出し、それぞれヒトリンパ球、ヒト B 細胞、ヒト T 細胞の指標とした。

### 4. EBV 感染実験

臍帯血造血幹細胞移植後 3 ヶ月および 6 ヶ月のマウスに感染実験を行った。前者においては、末梢血中ヒトリンパ球はほぼ全て B 細胞であり、後者においては半数以上が T 細胞であった。EBV は、Akata 細胞の培養上清を 0.45 μm フィルターを通過させたのちに用いた。約 1×10<sup>8</sup> transforming units のウイルスを腹腔内あるいは尾静脈内に接種した。

### 5. フローサイトメトリー

Beckman Coulter 社 Cytomics FC-500 を用いて解析した。

### 6. EBV 遺伝子発現の解析

組織内の EBV 蛋白質 EBNA2 および LMP1 は免疫化学染色により、また EBV がコードする小分子 RNA である EBER は in situ hybridization により検出した。また、RT-PCR により末梢血細胞および各臓器における EBV 遺伝子発現を解析した。

### (倫理面への配慮)

本研究には直接ヒトを対象とする医療行為は含まれないが、ヒト臍帯血細胞を利用するため、ヘルシンキ宣言に則った倫理的配慮を必要とする。臍帯血バンクに提供された臍帯血には、細胞数の不足などの理由により移植に用いることができないものが一定の割合で含まれ、多くは廃棄されているが、本研究はこのような臍帯血を利用するものであり、提供者に不利益は生じない。バンクへの臍帯血提供の際には、移植に使用できない場合は研究に利用する旨を説明し同意を得ている。また、臍帯血バンクより提供を受ける際には、連結不可能匿名化を行い、個人情報の保護を徹底した。動物実験においては、動物実験指針を遵守し、動物愛護の観点から十分な配慮をした。本研究は国立成育医療センターおよび東京臍帯血バンク倫理委員会の承認を得ている。

## C. 研究結果

### 1. ヒト造血幹細胞移植後 3 ヶ月における感染実験

6 頭のヒト化 NOG マウスを用い、3 頭には静脈内 (IV)、他の 3 頭には腹腔内 (IP) に Akata 株 EBV を投与した。その後、1 週間毎に末梢血を採取し EBV DNA を定量したところ、IV 投与のマウスでは 3 頭全てにおいて感染後 3 あるいは 4 週間で高レベル (10<sup>6</sup> copies/μg DNA) の EBV DNA が出現した。IP 投与のマウスでは、3 頭のうち 1 頭で同様の高レベル DNA が検出された (図 1)。末梢血に EBV DNA が検出されなかった 2 頭のうち 1 頭では、後に脾臓などの臓器から EBV DNA が検出され、感染が確認された。これらの EBV 感染マウスでは、感染ルートを問わず、

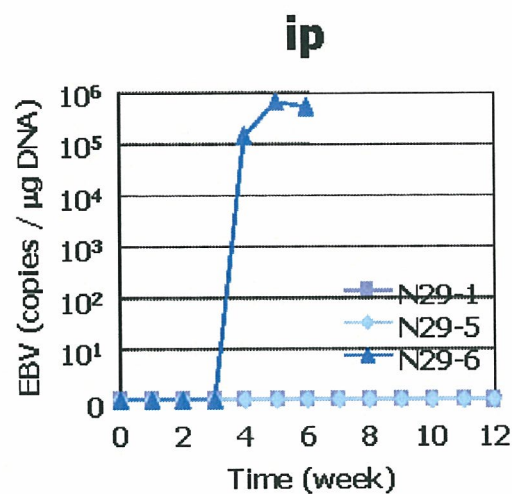
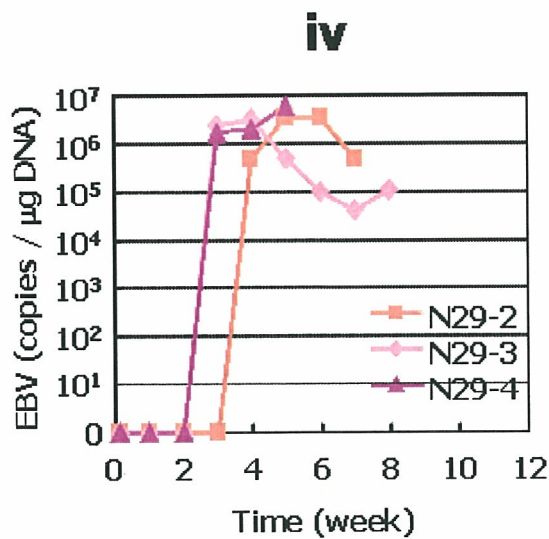


図1. 臍帯血幹細胞移植後3ヶ月でEBV接種したマウスにおける末梢血EBV DNA量の変化。静脈内 (iv) 或いは腹腔内 (ip) 接種。

EBV DNA の上昇と同時に体重の減少および全身状態の悪化が著名であったため、CO<sub>2</sub>により安楽死させウイルス学的・病理学的・免疫組織化学的検索を行った。その結果、脾臓、リンパ節、肝臓、腎臓、副腎、肺などでEBV感染Bリンパ球が浸潤・増殖していることが判明した(図2、3)。

2. ヒト造血幹細胞移植後6ヶ月における

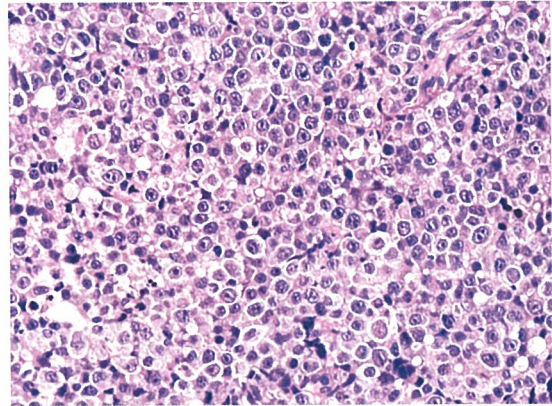


図2. マウスリンパ腫のHE染色。

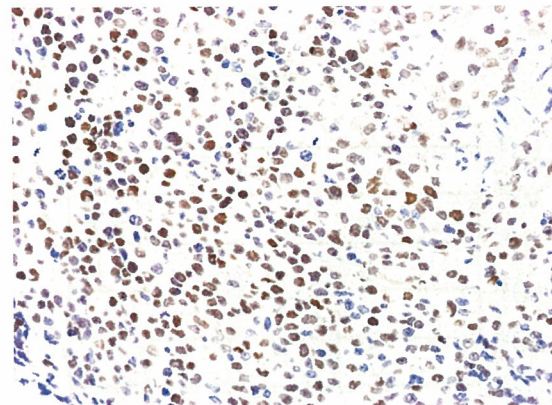


図3. マウスリンパ腫のEBER発現

2. ヒト造血幹細胞移植後6ヶ月における感染実験

移植後3ヶ月の場合と同様に6頭のヒト化マウスを用い、3頭には静脈内 (IV)、他の3頭には腹腔内 (IP) にAkata株EBVを投与した。6頭全てにおいて感染が成立し、10<sup>4</sup>~10<sup>5</sup> copies/μg DNAレベルのEBV DNAが末梢血に検出された(図4)。これらのマウスでは、一度上昇した末梢血EBV DNAレベルがその後低下し、検出感度以下となるものがあった。また、ピーク時における末梢血EBV DNAレベルも3ヶ月の場合と比べて10分の1程度であった。これらのマウスのうち5頭も、時間の経過とともに徐々に体重が減少し全身状態が悪化したため、最終的には安楽死させたが、肉

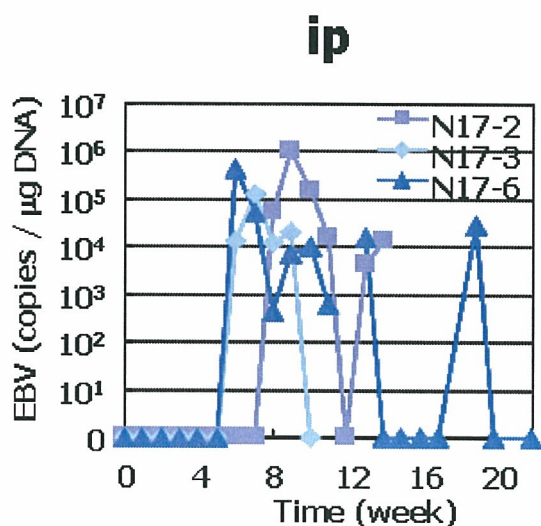
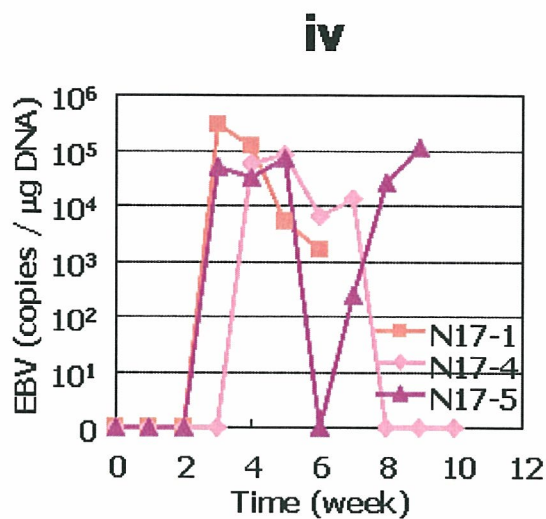


図4. 臍帯血幹細胞移植後6ヶ月でEBV接種したマウスにおける末梢血EBV DNA量の変化。静脈内 (iv) 或いは腹腔内 (ip) 接種。

眼的なリンパ腫は認められなかった。残る1頭 (IP感染のもの) は長期生存した。

### 3. 臓器におけるEBV検出

移植後3ヶ月および6ヶ月で感染させたマウス双方について、全身状態が悪化したものについては剖検して主要臓器におけるEBV DNA量を測定した (表1)。その結果、末梢血のほかに、骨髄、胸腺、脾臓、腸間膜リンパ節、腎臓、肝臓から  $10^2 \sim 10^6$  copies/ $\mu$ g DNA レベルのEBV DNAが検出された。移植後3ヶ月

で感染させたマウスでは、6ヶ月のものよりEBV DNA量が高い傾向が認められた。

表1. EBV感染マウス臓器におけるEBV DNAの定量

	EBV (copies / $\mu$ g DNA)			
	移植後3ヶ月で感染		移植後6ヶ月で感染	
	N29-3(iv)	N29-6(ip)	N17-5(iv)	N17-3(ip)
末梢血	$6.7 \times 10^5$	$3.8 \times 10^6$	検出限界以下	検出限界以下
脾臓	$7.0 \times 10^5$	$1.2 \times 10^6$	$2.4 \times 10^3$	$3.0 \times 10^4$
胸腺	未測定	$2.8 \times 10^4$	$1.5 \times 10^2$	未測定
骨髄	$4.3 \times 10^5$	$2.6 \times 10^4$	$1.2 \times 10^3$	$1.1 \times 10^4$
肝臓	未測定	$6.4 \times 10^5$	$4.2 \times 10^3$	$1.3 \times 10^4$
腎臓	未測定	$3.5 \times 10^6$	$7.9 \times 10^5$	$2.1 \times 10^4$
腸間膜リンパ節	$2.0 \times 10^6$	$1.6 \times 10^6$	$1.7 \times 10^6$	$8.0 \times 10^5$

### D. 考察

EBVによるリンパ球不死化はよく知られた現象であり、その分子メカニズムについても多くの研究があるが、不死化細胞が体内においてどのような挙動をとるかについては、適当なモデル動物の不在などが障害となり、研究が遅れている。本研究の結果は、臍帯血由来造血幹細胞によりヒト化したNOGマウスにはEBV感染が成立し、ヒトのLPDと類似した組織像およびEBV遺伝子発現パターンを示すリンパ腫が発生することを示し、このマウスがLPDのモデルマウスとして有用であることを示唆している。LPDのモデルマウスとしては従来EBVにより不死化されたヒトB細胞株あるいはEBV感染者末梢血リンパ球を接種したscidマウスがよく用いられてきたが、この系では感染の初期過程、ウイルス特異的免疫応答、潜伏感染状態などヒトのEBV感染の重要なステップが再現されておらず不十分なモデルであった。これに対してヒト化NOGマウスにおいては、感染後の経過観察により初期過程の解析が可能である。また、移植後6ヶ月で感染させた

マウスでは、ウイルス感染後いったん末梢血 EBV DNA が上昇した後検出感度以下まで低下し、長期生存したマウスも認められ、ヒトと同様な潜伏感染状態の再現の可能性が考えられる。また特に注目される点は、ヒト T 細胞が発生するため、ウイルスに対する免疫応答の中心となるウイルス特異的細胞障害性 T 細胞を含めた免疫応答の誘導が期待されることである。今回の実験で、移植後 6 ヶ月で T 細胞が十分に発生した段階で感染させたマウスでは、肉眼的リンパ腫が認められず、一度上昇した末梢血 EBV DNA が陰性化した例が多く見られたことは、何らかの免疫応答の存在を示唆している。実際に EBV 感染後の末梢血においては CD8/CD4 比が上昇しており、T 細胞応答の存在が期待されるため、現在 ELISPOT 法などにより EBV 特異的細胞傷害性 T 細胞の検出を試みている。今後、感染させるウイルスの量および経路を検討し、ヒト化 NOG における EBV 感染の実態を明らかにし、モデル動物としての応用を進めていきたい。

#### E. 結論

EBV 感染ヒト化 NOG マウスは、感染後の初期過程およびリンパ増殖性疾患の発症を再現できる優れたモデル実験系であることが示唆された。免疫応答と潜伏感染状態の再現についても現在検討中である。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし。

##### 2. 学会発表

1) 矢島美彩子、今留謙一、渡辺哲、寺嶋一夫、中村浩幸、山本直樹、藤原成悦. ヒト臍帯血幹細胞移植 NOG マウスを用いた EB ウイルス感染モデルの作製. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会. 2006 年 11 月、名古屋.

2) 矢島美彩子、今留謙一、渡辺哲、寺嶋一夫、中村浩幸、山本直樹、藤原成悦. ヒト臍帯血幹細胞移植 NOG マウスを用いた EB ウイルス感染モデルの作製. 第 36 回日本免疫学会学術集会. 2006 年 12 月. 大阪.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

## 厚生労働科学研究費補助金

「臓器移植や悪性腫瘍による免疫低下状態で発生するウイルス感染症の予防と治療に関する研究」事業

分担研究報告書

「骨髄移植患者の難治性ヘルペスウイルス感染症に出現する薬剤耐性ウイルス」

分担研究者 白木公康 富山大学医薬学研究部ウイルス学教授

### 要約

2例の骨髄移植患者の難治性単純ヘルペスウイルス (HSV) 感染症とサイトメガロウイルス (CMV) 感染症患者から、それぞれアシクロビル (ACV) とガンシクロビル (GCV) 耐性ウイルスを得て、それらの抗ウイルス薬感受性、遺伝子変異の同定とウイルス学的検討を行った。ACV 耐性株はチミジンキナーゼ (TK) 遺伝子に変異があり TK 活性を欠損するだけでなく、指で増殖したためか、高温で増殖能を損なった温度感受性であった。この温度感受性はマウスの側腹部と耳介(低温部)での病原性の差から確認できた。また、肝炎ウイルス以外による肝障害を起こす hepatiticomimetic ウイルスによる肝細胞傷害と肝臓酵素の漏出について検討し、肝細胞傷害と肝臓酵素漏出の程度とパターンには関係がないことを明らかにした。

#### A. 研究目的

骨髄抑制患者などの免疫不全患者においては、難治性 HSV 感染症と CMV 感染症が認められ、その予防と早期診断と早期治療が行われている。しかし、今回報告するように、骨髄移植患者の難治性 HSV 感染症と CMV 感染症患者から、それぞれ ACV 耐性、GCV 耐性ウイルスを分離した。それらのウイルスの遺伝子変異と分離ウイルスの性状解析を行い、適切な治療法を検討する基礎とすることを目的とした。また、免疫不全患者においては、hepatiticomimetic ウイルスによる肝障害が顕性化することが考えられる。これらウイルス感染症における肝細胞機能と肝臓酵素の漏出との関係について検討し、肝障害の評価としての酵素の漏出と肝臓細胞の障害の程度との相関性について検討を行った。

#### B. 研究方法

HSV については、患者の病変部位(外陰部病変、親指瘰癧)の塗抹標本から分離した。CMV は尿、血液から分離した。分離されたウイルスは、各抗ウイルス薬に対するブラック減少法に

よる IC<sub>50</sub> により感受性を算出した。HSV の温度感受性は 33 度と 39 度で 39 度でのブラック形成率(悪さ)で示した。

HSV の動物での病原性は、側腹部と耳介部(低温部位 27 度)での皮膚病原性により検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては、富山大学動物実験委員会にて、実験の承認を得ている。

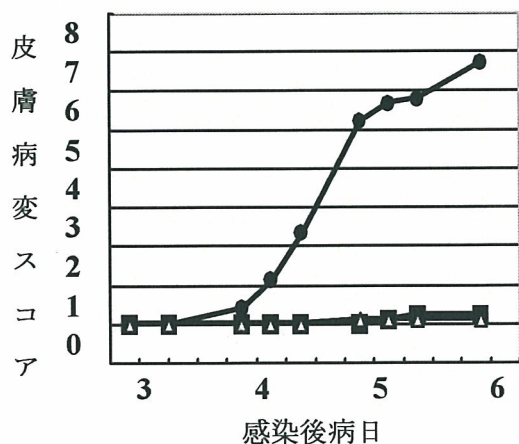
#### C. 研究結果

分離した HSV 株 (Genital, whitlow1 と 2) の感受性(表 1)のように、whitlow 株はアシクロビル耐性で TK 欠損株であった。そして、TK 欠損株は、4 個のシトシンの連続する部分でシトシンの欠損があり、フレームシフトが起こり、TK 活性を失っていた。登録された配列は、AB178228, AB178229, AB178230 である。

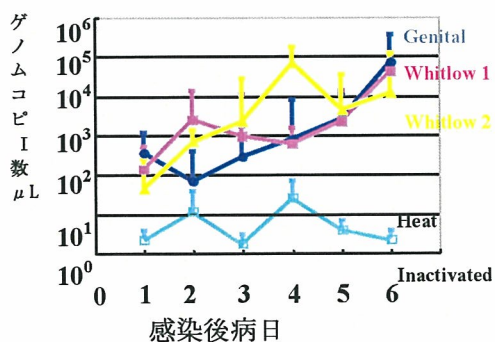
表 1 分離ウイルスの薬剤感受性

μg/ml	Acyclovir	IDU	Vidarabine	Foscarnet
Genital	0.52 ± 0.18	2.2 ± 0.44	9.6 ± 1.2	34.8 ± 1.8
Whitlow 1	19.4 ± 2.2	29.3 ± 7.5	7.6 ± 1.4	23.3 ± 1.7
Whitlow 2	21.0 ± 2.7	36.7 ± 3.8	7.4 ± 1.2	43.3 ± 1.5
野生株	0.85 ± 0.25	3.3 ± 0.35	7.6 ± 0.2	35.9 ± 0.5

側腹部では、下図のように genital (●) は病変を形成するが、whitlow からのウイルス (■、△) は、病変を形成しなかった。



一方、耳介感染においては、3株とも同様な病変を形成して、側腹部と耳介での病原性の違いが、温度に依存することがわかった。



以上のことから、骨髄移植患者で認められた

薬剤耐性ウイルスは、再発を繰り返す慢性性器ヘルペスから、アシクロビル治療中にアシクロビル耐性ウイルスによる瘰癧として発症し、半年後に再発した。指の温度が 33 度以下とされ、指に感染し増殖する際に、温度依存性病原性を獲得したと考えられる。

第 2 例目の骨髄移植患者で分離されたガンシクロビル耐性 CMV は、治療がガンシクロビルだけでなく、フォスカビルによる治療も行われていた。そのため、分離されたウイルスの感受性 (表 2) から、両者に耐性であることが判明した。そして、遺伝子変異を決定した。その結果、UL97 (リン酸化酵素) と UL54 (DNA 合成酵素) の両者に変異が認められた。UL54 の変異は、フォスカビルに高い耐性を有するが、ガンシクロビルに対しては、2 倍程度と軽い耐性であったので、最終的に、高濃度のガンシクロビル治療に反応していたようであった。その後、薬剤感受性測定結果からシドフォビルが使われ、患者は CMV 感染症から離脱して、再発さえ認めなかった。

表 2 分離ウイルスの薬剤感受性

(μg/ml)	Towne	分離株
GCV	0.66+0.05	4.54+1.03
CDV	0.11+0.05	0.20+0.05
PFA	13.9+3.1	>100

表 3 ガンシクロビル耐性遺伝子変異

A. UL97 (リン酸化酵素)
A594V アラニンからバリン (ガンシクロビル耐性)
その他、A140V
B. UL54 (DNA 合成酵素)
Q578H グルタミンがヒスチジン (フォスカビル耐性)
その他、V11L、S655L、G874R

hepatiticomimetic ウイルスによる肝障害は、HSV、アデノウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、麻疹ウイルス、エンテロウイルスについて、初代肝臓培養細胞と HepG2 細胞で検討した結果、麻疹ウイルスは感染を認めず、他のウイルスは肝培養細胞に、細胞傷害を起こすが、傷害の程度と肝臓の酵素の逸脱とは相関しなかった。肝酵素の逸脱が相関したのは、エンテロウイルスによる apoptosis または HSV による necrosis による細胞表面の性状変化であった。

#### D. 考察と E. 結論

骨髄移植患者では、免疫抑制剤の血中濃度管理や予防的処置や早期診断早期治療によって、難治性ヘルペスウイルス感染症は減少している。しかし、免疫抑制が強く、免疫不全状態において今回報告したような難治性感染症、耐性ウイルス感染症は避けられない。アシクロビル耐性 HSV には海外ではフォスカビルが標準的であり、ガンシクロビル耐性 CMV にはフォスカビルとシドフォビルが標準的である。しかし、わが国では、適応症となっておらず使用できない。第2例目のように、シドフォビルが奏効していることから、わが国でもこれらの抗ウイルス薬が使用できることが望ましい。

Hepatiticomimetic ウイルス感染症は、肝臓酵素の上昇している以上に、肝細胞が傷害を受けていることが確認できたので、今後これらの感染症にはその点を考慮して経過を観察することが必要と思われた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1)Phromjai J, et al., Infection and direct injury in human hepatocyte explants and a hepatoblastoma

cell line due to hepatiticomimetic (non-hepatitis) viruses. J Med Virol in press

##### 2. 学会発表

1).Shiraki K, et al.:Genital herpes by acyclovir-sensitive herpes simplex virus caused secondary and recurrent herpetic whitlow by thymidine kinase-deficient/temperature-sensitive virus. 31st International Herpesvirus Workshop, 演題番号 3.35, 2006, 7, Seattle.

2).Phromjai J ら: Hepatocyte injury by non-hepatitis viruses in vitro. 第47回日本臨床ウイルス学会, 演題番号 1B-07, 2006, 6, 東京.

3).Phromjai J ら:Apoptosis in hep G2 infected by non-hepatitis viruses in vitro. 日本ウイルス学会第54回学術集会, 演題番号 2P-105、2006, 11, 名古屋.



厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

臓器移植や悪性腫瘍による免疫低下状態で発生するウイルス感染症の予防と治療に関する研究  
「免疫低下状態でウイルス感染症治療応用のための人工リンパ組織ストローマ細胞の樹立」

分担研究者 末松 佐知子 独立行政法人医薬基盤研究所

研究要旨 免疫不全状態においてもウイルスに対する免疫反応を効率よく誘導できる人工リンパ組織構築のためにストローマ細胞にいくつかの遺伝子を導入して安定発現細胞株を樹立した。樹立したストローマ細胞株を用いて人工リンパ組織を構築すると、導入遺伝子によって優位にリンパ球の集積が増加する組織が構築されることが分かった。このような組織では抗原特異的な免疫反応の増強が期待される。

#### A. 研究目的

独自に開発したマウスでの人工リンパ組織構築法を応用して、臓器移植や悪性腫瘍による免疫不全状態でウイルス感染症の予防と治療法を開発すること。

#### B. 研究方法

人工リンパ組織は「ストローマ細胞、サイトカイン、及び高分子生体材料」の3要素に抗原刺激を加えた骨髄由来活性化樹状細胞(BMDC)を添加してマウスの腎皮膜下に移植して構築する。これにより、免疫刺激を受けた免疫担当細胞を集積させて抗原特異的な免疫反応を効率よく誘導できる人工組織が構築される。

我々は人工リンパ組織の組織構造形成と効率のよい免疫反応にはストローマ細胞が最も重要であり、BMDCとの相互作用によって発現が誘導される何らかのタンパクが関与していると考えている。ストローマ細胞のDNA microarrayの結果からいくつかの遺伝子についてストローマ細胞に導入し、それぞれ安定発現細胞株を樹立して人工リンパ組織構築における影響を検討した。(倫理面への配慮：該当せず)

#### C. 研究結果

いくつかの遺伝子を強制発現させたストローマ細胞を用いて人工リンパ組織を構築してその組織構造を比較検討すると、導入した遺伝子によってリンパ球の集積程度に優位に差が見られることが分かった。また、人工リンパ組織には血管やリンパ管も存在することが明ら

#### D. 考察

我々の予測通り、ストローマ細胞に発現させた遺伝子によって人工リンパ組織へのリンパ球の集積程度に差が見られることから、人工リンパ組織の免疫能もストローマ細胞の発現遺伝子によって影響されると予測できる。また、人工リンパ組織に形成されるリンパ管や豊富な血管構造も効率のよい免疫反応の誘導に寄与していることが推察される。

#### E. 結論

今回樹立した遺伝子強制発現ストローマ細胞のうち、リンパ球を多数集積させる性質のものを用いて人工リンパ組織を構築すれば、ウイルス抗原特異的な免疫反応性を高めた人工リンパ組織を構築可能であると考えて、実験を進めている。

#### F. 健康危険情報

(該当せず)

#### G. 研究発表

1. 論文発表なし
2. 学会発表

Vascular Structure of Tissue-Engineered Secondary Lymphoid Tissue-like Organoid in mice. HATTORI Yuki, WATANABE Takeshi, SUEMATSU Sachiko. 第36回日本免疫学会総会・学術集会 12月11-13日 大阪国際会議場

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

分担研究報告書

水痘帯状疱疹ウイルス（VZV）特異的細胞性免疫能の評価法の検討

分担研究者 森 康子 医薬基盤研究所・感染制御プロジェクト（チーフプロジェクトリーダー）

協力研究者 岡本成史 医薬基盤研究所・感染制御プロジェクト（研究員）

協力研究者 羽田敦子 財団法人田附興風会医学研究所・第1研究部（主任研究員）

研究要旨：VZV に対する感染防御効果は、一般に VZV 抗原反応性 ヘルパー1 型 T 細胞による細胞性免疫応答が主とすることが示唆されている。我々は IFN- $\gamma$  ELISPOT 法を用いた VZV 特異的な細胞性免疫応答評価を確立するために、健常人における VZV 特異的な細胞性免疫応答ならびに T 細胞活性化能を測定した。さらに健常人における VZV 特異的な細胞性および体液性免疫応答の相関性についても検討した。今回の結果より、健常人 50 人（男性 36 人、女性 14 人、平均年齢±標準偏差は 36.9±12.0）での平均の VZV 反応性スポット数±標準偏差はヒト末梢血単核球（PBMC） $3 \times 10^5$  個あたり 47.19 ± 50.54、PHA 反応性スポット数±標準偏差は PBMC  $3 \times 10^4$  個あたり、32.43 ± 31.11 であり、20-60 代までほぼ同じ VZV 反応性スポット数の分布を示していた。

A. 研究目的

本研究は、免疫抑制状態における VZV 細胞性免疫能を測定し、健常人と比較することにより、VZV 再活性化と細胞性免疫能の相関性を明らかにすることを目的とする。そのためにはまず、VZV に対する細胞性免疫能の測定法およびその評価法を確立する必要がある。研究初年度は、VZV に対する細胞性免疫応答の測定法を確立するため、健常人における IFN- $\gamma$  ELISPOT 法を用いた細胞性免疫能の測定に関して検討を行った。

B. 研究方法

1. 対象

医薬基盤研究所、健常人ボランティア 50 人（男性 36 人、女性 14 人、平均年齢±標準

偏差は 36.9±12.0）を対象とした。

（倫理面への配慮）

本研究は、臨床研究に関する倫理指針を遵守し、医薬基盤研究所における倫理委員会において承認を得た上で研究を行った。研究対象者に対して個人の不利益・危険性が伴わないように配慮し、また研究の目的、個人の不利益、危険性に対しては十分に説明し、医薬基盤研究所の倫理委員会により承認されたインフォームドコンセントにサイン或いは捺印を得た上で研究を行った。

2. PBMC の分離と IFN- $\gamma$  ELISPOT 法

採血された血液より末梢血単核球（PBMC）を分離した。

IFN- $\gamma$  ELISPOT 法は、以下に示す方法で

行った。96 穴メンブレンプレート（ミリポア）に抗 IFN- $\gamma$  抗体（clone 2G1, Endogen）をコートした。次に PBMC をマイクロスクリーン 96 穴に加え、その上に VZV ワクチン原液（阪大微研、 $9 \times 10^5$  pfu/ml）を感染力価  $10^5, 10^4, 10^3, 10^2$  pfu になるように添加した。一方、PHA による刺激も行った。37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で 36 時間培養した後、プレートを洗浄し、ビオチン標識抗 IFN- $\gamma$  抗体（clone B133.5, 0.2  $\mu$ g/ml; Endogen）を添加、1 時間室温にて反応させた。洗浄後、ペロキシダーゼ標識ストレプトアビジン（1:800; BD-Pharmingen）にて反応させ、TMB-H 発色液（Moss）にて発色させた。スポット数の測定は、KS-ELISPOT 測定装置（Karl Zeiss）により行った。

被験者	10 <sup>6</sup>	3x10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	3x10 <sup>4</sup>
A	87.5 ± 5.5	42.2 ± 8.5	11.6 ± 6.6	0
	140 ± 22.3	67.3 ± 11.6	20.2 ± 7.3	0
B	47.1 ± 14.4	20.8 ± 5.9	7.5 ± 5.6	0
	22.2 ± 7.5	10.3 ± 4.5	0	0
C				
D				

表 1. 検体および細胞数別での IFN- $\gamma$  ELISPOT 数の比較  
96 穴マルチスクリーンメンブレンプレート上にて各検体の PBMC と未処理の VZV ウイルス（ $10^5$  cfu/ml）を 37°C 下にて 36 時間反応させた後のスポット数を測定した。

### 3. 血清中の抗 VZV 抗体価の測定

抗体価の測定は、水痘 immune adherence hemagglutination（IAHA）法により行った。

### C. 研究結果

#### 1. 測定条件の設定

##### 1-1) 細胞数の設定

まず、PBMC（ $10^6, 3 \times 10^5, 10^5, 3 \times 10^4$  個/well）の VZV 刺激（ $10^5$  pfu）に対する反応について比較検討を行なった（健常人 4 人）。その結果、PBMC  $10^5$  個以上で 4 人ともに 10 個前後のスポットが検出されたが、 $3 \times 10^5$  個では 10-50 個とサンプル間でスポット数の違いが明確になった。一方  $3 \times 10^4$  個ではいずれの検体からもスポットが検出されなかった。また、無刺激での非特異的なスポット数は 5 個未満であり、刺激により現れたスポット数から非特異的なスポット数を減じた特異的なスポット数は以下ようになった（表 1 参照）。また、PHA 刺激では  $10^5$  個で全ての被験者から 300 個以上のスポットが検出された。上記の結果を踏まえ、本試験では細胞数を  $3 \times 10^5$  個で行うこととした。

##### 1-2) ウイルス力価および不活化条件の設定

PBMC（ $3 \times 10^5$  個/well）に VZV 刺激を行ったところ、 $10^5$  pfu の力価では 30 個前後のスポットが検出されたが、 $10^4$  pfu のウイルス刺激では検出できなかった。そこで、 $10^5$  pfu にウイルス力価を固定し、56°C 30 分熱処理、紫外線処理、未処理の 3 種類に

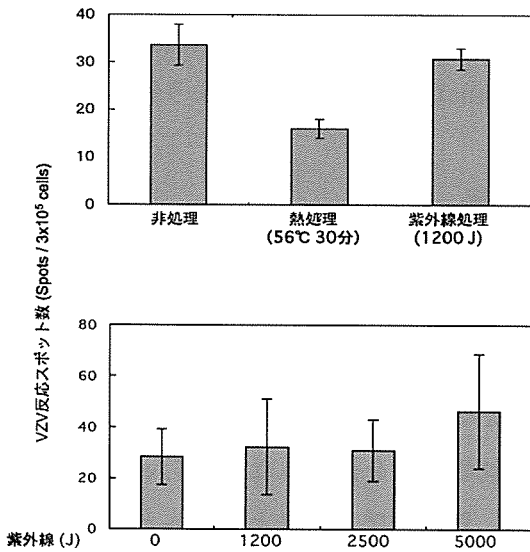


図1 VZVの不活化処理によるスポット数の変化 (上図) 熱処理および紫外線処理によるスポット数の変化 (下図) 紫外線照射量の違いによるスポット数の変化を示す。

ついてスポット数を測定した。熱処理では未処理での刺激よりもスポット数は減少したが、紫外線 1200 J 処理では、未処理の場合とほぼ同じスポット数が検出された(図1上)。また、紫外線照射量を 5000 J にまで上昇させてもスポット数の減少は見られなかった(図1下)。本実験では 10<sup>5</sup> pfu の VZV を 5000 J 紫外線処理したものを VZV 刺激抗原として使用した。

## 2. 健康人ボランティアでの VZV 特異的細胞性免疫応答の分布

健康人 50 人の PBMC を用いてスポット数の測定を行なった。母集団は男性 36 人、女性 14 人、平均年齢±標準偏差は 36.9 ± 12.0 であった。平均の VZV 反応性スポット

健康人ボランティア 50 人の PBMC に VZV 数±標準偏差は、3 x 10<sup>5</sup> 細胞あたり

47.19 ± 50.54, PHA 反応性スポット数±標準偏差は 3 x 10<sup>4</sup> 細胞あたり、32.43 ± 31.11 であった。さらに年齢別の分布について調べたところ、20-60 代までほぼ同じスポット数の分布を示していた(図2)。また、VZV に対する細胞性免疫能と体液性免疫能の相関性の有無を、IFN-γ ELISPOT 法と IAHA 法を用いて検討したところ、図3に示すように両者の間には相関性がないことが明らかとなった。

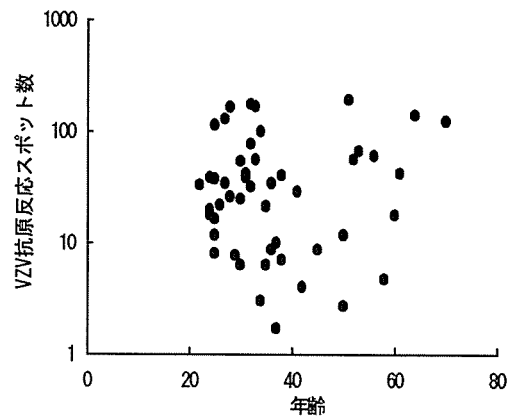


図2 年齢別での VZV スポット数の分布 抗原で刺激された時のスポット数 (Y 軸) と被験者の年齢 (X 軸) の相関を示す。

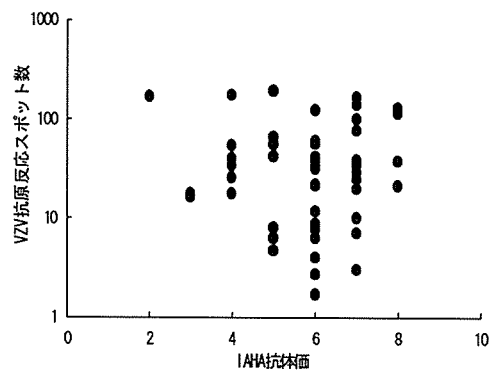


図3 VZV に対する細胞性免疫応答と体液性免疫応答の相関性 健康人ボランティア 50 人の PBMC を用いた IFN-γ ELISPOT 法による細胞性免疫応答 (Y 軸) と血清中の IAHA 抗体価による体液性免疫応答 (X 軸) の相関を示す。

#### D. 考察

VZV 感染に対する感染防御効果は細胞性免疫によることが示唆されている。しかし、VZV 特異的細胞性免疫能の評価法が確立されていないため、どのような条件下で帯状疱疹が発症しやすいかを予測することが困難である。今回、我々は、VZV 特異的細胞性免疫能の評価法を確立するための方法として、末梢血単核球を用いた IFN- $\gamma$  ELISPOT による細胞性免疫能の測定法を検討した。今回の検討により、PBMC  $3 \times 10^5$  個/well を紫外線 5000 J 処理した VZV ( $10^5$  pfu) にて 36 時間刺激という条件設定を行った。今後は本方法を用いた細胞性免疫能の測定法を確立するため、さらに検体数を増やし、検討する予定である。

これまで VZV 特異的細胞性免疫応答についての研究は、高齢者や移植患者などの免疫抑制状態にある患者などごく一部に限られ、一般健常人での上記免疫応答の分布および他の免疫活性との相関についての報告は殆どなされていなかった。今回我々は、

20-60 歳代の健常人ボランティア 50 人について VZV 特異的細胞性免疫応答と体液性免疫応答を測定した。結果、両者には正の相関性が認められなかった。年齢と VZV 特異的細胞性免疫応答との相関性を検討したが、現時点では明らかな結論を得ることはできなかった。さらなる検討が必要であると思われる。

#### E. 結論

1. IFN- $\gamma$  ELISPOT 法による VZV 特異的細胞性免疫能の測定に関して検討した。
2. 今回の結果からは、VZV 特異的細胞性免疫能と体液性免疫能の間に正の相関性は認められなかった。

#### F. 健康危険情報

特に問題なし。

#### G. 研究発表

該当なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

HHV-6 の病態解明 ～HHV-6 と樹状細胞との相互作用解析～

分担研究者 森 康子 医薬基盤研究所・感染制御プロジェクト（チーフプロジェクトリーダー）

協力研究者 武本眞清 医薬基盤研究所・感染制御プロジェクト（研究員）

研究要旨：ヒトヘルペスウイルス 6（HHV-6）を単球由来樹状細胞（MDDC）に感染させ、DNA マイクロアレイによって遺伝子発現の変化を網羅的に解析した。その結果 Integrin  $\beta 5$  の発現低下を発見し、HHV-6 感染 MDDC の形態観察によって、確かに感染細胞の接着能が抑えられていることを明らかにした。さらに FACS 解析により CD11b (Mac-1) や CD54 (ICAM-1), Integrin  $\alpha 2$ , Integrin  $\alpha 5$  などの複数の接着因子の発現抑制も、HHV-6 感染によって引き起こされていることを発見した。HHV-6 の MDDC での感染効率は低い、感染 MDDC と T 細胞との共培養後に感染性ウイルス粒子の産生を示した。以上のことから、HHV-6 の T 細胞への伝播において樹状細胞が運搬体としての役割を担っている可能性が示唆された。

A. 研究目的

DC は抗原提示細胞として感染免疫において重要な役割を果たすが、一方で微生物の侵入経路として利用され得ることが、近年明らかになってきた。HHV-6 感染における DC の役割を検討した。

B. 研究方法

末梢血由来単核球 (PBMC) より単球を分離し、GM-CSF および IL-4 存在下にて 1 週間培養して未熟 MDDC を得た。HHV-6B HST 株を MDDC に感染させ、経時的な形態観察と FACS による細胞表面抗原の発現変化の解析を行った。さらに HHV-6 感染 5 日後の MDDC から、臍帯血由来単核球 (CBMC) または PBMC 由来 CD4<sup>+</sup> T 細胞へのウイルス伝播を確認した。

（倫理面への配慮）

PBMC 等ヒト検体の取り扱いに際しては、本研究機関における倫理委員会の承認を得た上で、倫理指針を遵守しつつ研究を行った。

C. 研究結果

- 1) DNA chip による解析で、HHV-6 に感染した MDDC では Integrin  $\beta 5$  を含む多数の膜タンパクの発現低下の傾向が見られた。
- 2) HHV-6 感染 MDDC は接着が抑制されており、UV 不活化ウイルスでも同様であったため、ウイルス粒子の細胞表面への付着が接着抑制を引き起こしていることが示唆された。

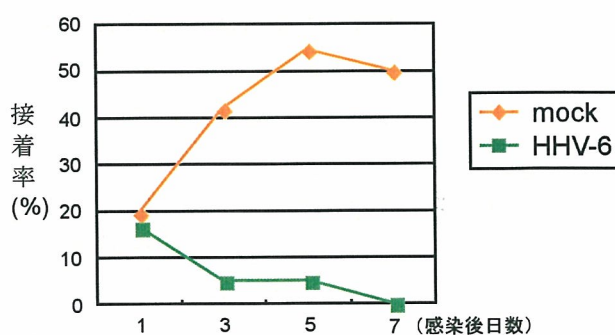


図 1. HHV-6 感染後の MDDC の接着率変化

- 3) HHV-6 感染 MDDC は、前述の Integrin  $\beta 5$  と既に報告のある DC-SIGN をはじめ、CD11b (Mac-1) や CD54 (ICAM-1), Integrin  $\alpha 2$ , Integrin  $\alpha 5$  などの複数の接着因子の発現が抑制されて

いた。

名古屋（2006年11月19-21日）

4) HHV-6 感染 MDDC と CBMC または CD4<sup>+</sup>T 細胞との共培養によって、コロニーの形成および MDDC からのウイルス伝播が確認された。

H. 知的財産権の出願・登録状況  
該当なし

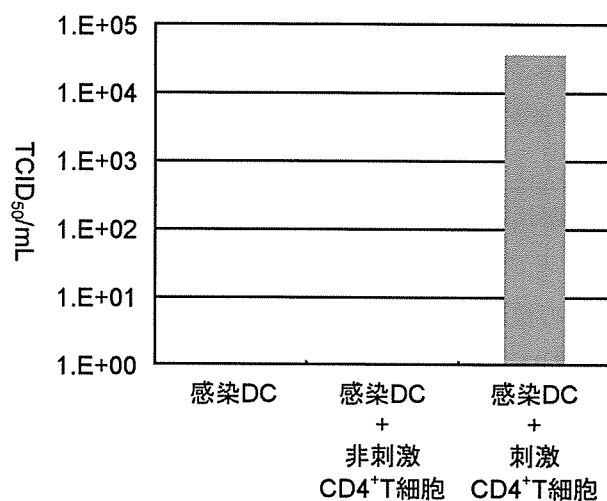


図 2. HHV-6 感染 MDDC と T 細胞との共培養後のウイルス産生

#### D. 考察

HHV-6 は DC に感染し一部において増殖はするものの、本格的な増殖は感染 DC と許容細胞とが接触する場、すなわちリンパ節において行うものと予想される。DC 表面上の接着因子の発現抑制は、DC のリンパ節への移動を容易にするための一つの要因ではないかと考えられる。

#### E. 結論

HHV-6 は MDDC に感染して接着因子の発現抑制を起こし、MDDC と T 細胞との接触後に感染性ウイルス粒子を産生する。

F. 健康危険情報 特に問題なし

#### G. 研究発表

1. 論文発表 該当なし

2. 学会発表

武本眞清、山西弘一、森康子 ヒトヘルペスウイルス 6 は樹状細胞表面上の接着因子発現を抑制する 第 54 回日本ウイルス学会・

研究成果の刊行に関する一覧表（業績）

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
L. T. Krug, C. G. Teo, K. Tanaka-Taya, N. Inoue	Newly identified human herpesviruses	I. W. Fong, K. Alibek	Emerging Infectious Diseases of the 21st Century	Springer	NY	2006	197-278

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
G.Q. Wang, T. Suzutani, Y. Yamamoto, Y. Fukui, N. Nozawa, D. S. Schmid, I. Kurane, N. Inoue.	Generation of a reporter cell line for the detection of infectious varicella-zoster virus and its applications for antiviral studies.	Antimicrob Agents Chemother.	50	3142-3145	2006