

厚生労働科学研究費 創薬基盤推進研究事業
分担研究報告書

カニクイザルモデルを用いたウイルス感染症に関する研究

研究分担者：岡村 智崇

医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター 研究員

研究要旨

霊長類医科学研究センターでは、原産地（インドネシア、フィリピン、マレーシア）を把握したカニクイザルの SPF 繁殖コロニーを確立し、良質なカニクイザルの供給体制を整えている。本研究では、産地および系統が明らかな SPF カニクイザルを用いて SIV とカニクイザルの感染系の確立を試みる。本年度は、SIV および SHIV 感染慢性期における病態および免疫反応について検討した。SIV_{mac239} 接種後 50 週を超えたカニクイザルのウイルス量は平均 1.6×10^6 /ml、ウイルス量の高い個体では CD4+T 細胞の減少が認められた。一方、SHIV89.6P 感染カニクイザルでは、接種後 50 週を超えて平均 1.1×10^4 /ml、CD4+T 細胞は接種直後から急激な減少が認められ、現在まで回復はみられなかった。これらのサル免疫反応について検討したところ、SIV 抗体価は SIV 接種カニクイザルで接種後、速やかに抗体の上昇が認められた。また IFN- γ 産生細胞数も時間経過と共に強い反応が認められた。SHIV 接種カニクイザルでは、抗体価および IFN- γ 産生細胞数は SIV 感染カニクイザルと比較して低値を示し、CD4+T 細胞（ヘルパー T 細胞）の喪失が関連していると考えられた。また接種後 1 年を経て、SIV 感染した 7 頭中 2 頭でエイズ病態（エイズ脳症 1 頭、多発性血管炎 1 頭）、SHIV89.6P 感染した 5 頭中 1 頭で間質性肺炎を呈し、それぞれ安楽殺を行った。これらの結果から、エイズ感染カニクイザルは、産地に関係なく高いウイルス量を検出し、またヒトのエイズ病態と類似の症状を呈することから、エイズ動物モデルとして有用であると考えられた。

A. 研究目的

感染症研究における実験動物としての霊長類は極めて重要であり、特にワクチン研究において霊長類を用いた検討は必須となっている。HIV は人以外ではチンパンジーにしか感染せず、そのチンパンジーもエイズを発症することがない。このためにエイズウイルス感染症では HIV と近縁ウイルスであり、エイズを発症する SIV とアカゲザルの実験系を用いて、病態やワクチン開発研究等が行われてきた。

霊長類医科学研究センターでは、SPF 化されたカニクイザルを繁殖し、実験に供給することが可能である。カニクイザルはアカゲザルよりも小型で取り扱い易く、世界中で様々な動物実験に用いられている。しかしながら、SIV に対する感受性・病原性

といった詳細な研究は行われていない。

本研究では、当センターで繁殖育成された原産地（インドネシア、フィリピン、マレーシア）が明らかになっている SPF カニクイザルを用いて、サル免疫不全ウイルス（SIV_{mac239}）およびサルヒト免疫不全ウイルス（SHIV89.6P）の病態を明らかにする。これまでの研究で、SIV_{mac239} および SHIV89.6P 感染カニクイザルの急性期における病態を明らかにした。本年度は慢性期における病態（ウイルス量および CD4+T 細胞）および免疫応答（細胞性免疫応答・液性免疫）について検討を行う。

B. 研究方法

1. 接種スケジュール

エイズ病態を明らかにするため、各産地

SPF カニクイザル 7 頭に SIVmac239、5 頭に SHIV89.6P の静脈内接種を行った。ウイルス接種後、ウイルスコピー数、CD4+T 細胞数および免疫学的解析を行った。

2. ウイルスコピー数および CD4+T 細胞数

ウイルスコピー数は、血漿からウイルス RNA を抽出し、SIVgag 特異的 Primer および probe を用いて Real time PCR を行った。また CD4+T 細胞数の算定には、フローサイトメーターを用いて検討した。

3. SIV 特異的抗体価の測定

採血より採取した血漿を用いて、SIV 抗原特異的な ELISA 法を行い、抗体価を測定した。

4. 細胞性免疫反応の解析

経時的な採血より分離した PBMC (接種後 4, 16, 50 週)は、エフェクター細胞とし、抗原提示細胞には、各自己由来の B-LCL に SIVgag-pol 遺伝子および env 遺伝子を組み込んだワクシニアウイルスを感染させた感染細胞をそれぞれ用いた。エフェクター細胞および抗原提示細胞を共培養し、抗原特異的 IFN- γ 産生 ELISPOT assay を行った。

5. 病理組織学的解析

エイズ病態を呈したカニクイザルは安楽殺を行い、各臓器・リンパ節を回収し、病理組織学的解析を行った。

6. 倫理面への配慮

本研究では動物実験申請、バイオセーフティー、組換え DNA 申請等の必要な委員会での承認は既に得ており、ヒトサンプル、情報等は一切用いていない。

C. 研究結果

1. ウイルスコピー数および CD4+T 細胞の動態

SIVmac239 接種後 50 週を超えた慢性期におけるカニクイザルのウイルス量は、平均 1.6×10^6 /ml であった。また比較的ウイルス量の高い個体では、CD4+T 細胞の強い減少が認められた。一方、SHIV89.6P に感染したカニクイザルでは、接種後 50 週を超えて

平均 1.1×10^4 /ml であり、また CD4+T 細胞は接種直後から急激な減少が認められ、CD4+T 細胞の枯渇状態は継続して確認された。(図 1A, B)。

2. SIV 特異的抗体価の測定

経時的に採取した血漿を希釈して、SIV 特異的抗体価を測定したところ、SIV 感染カニクイザルでは感染初期より高い抗体価を示し、時間経過と共に高値を示した(図 2A)。SHIV 感染カニクイザルでは、SIV 感染カニクイザルと比較して抗体価は低く、また、#5014 の個体では抗体の誘導は認められなかった(図 2B)。

3. 細胞性免疫反応の解析

SIV および SHIV 感染カニクイザルよりそれぞれ採取した PBMC (接種後 4, 16, 50 週)を用いて SIV 抗原特異的 IFN- γ 産生 ELISPOT 反応を行った。SIV 接種カニクイザルでは接種 4 週より反応は確認され、その反応は時間経過と共に強く認められた(図 3A)。SHIV 接種カニクイザルの IFN- γ 産生細胞数は、SIV 感染カニクイザルと比較して低い値を示し、また、#5002、#5014、#5024 の 3 頭の IFN- γ 産生細胞数は、時間経過と共に上昇はみられなかった(図 3B)。

4. 病理学的解析

SIV 感染サル 2 頭(#0060、#0062)、SHIV 感染サル 1 頭(#5014)は、エイズ症状を呈し安楽殺を行った。病理学的解析を行ったところ、#0060 はエイズ脳症、#0062 は多発性血管炎、#5014 は間質性肺炎と病理組織学的に診断された(Table 1)。

D. 考 察

近年、モーリシャス産のカニクイザルと SIV 感染モデルは、低病原性であると報告されている。本研究ではフィリピン、インドネシア、マレーシアの各地域で産出されたカニクイザルを用いて、SIV、SHIV 感染

後の病態解析を試みた。SIVmac239 および SHIV89.6P 感染慢性期におけるウイルス量は産地に関係なく高い数値が検出された。これらのウイルス量は、過去に報告されているインド産アカゲザルのウイルス量と、ほぼ同程度であることが確認された。

また、SIV 感染カニクイザルにおける CD4+T 細胞は、感染初期において全頭で変化が無いが、慢性期になるとウイルス量の高い個体では減少傾向にある。一方で、SHIV 感染カニクイザルの CD4+T 細胞は、感染初期より喪失し、接種後 100 週を超えても回復の傾向はみられていない。これらの結果は免疫応答の結果に関連しており、CD4+T 細胞の保存されている SIV 感染カニクイザルでは、ヘルパ-T 細胞の機能により細胞性免疫および液性免疫が強く誘導される。一方で、CD4+T 細胞を喪失している SHIV 感染カニクイザルの免疫応答は、SIV 感染カニクイザルより低値を示すことが確認された。

さらに接種後、1~2 年で SIV 感染サル 2 頭、SHIV 感染サル 1 頭がエイズ症状を発症し、それぞれエイズ脳症、多発性血管炎、肺炎を呈することが確認された。これらの病態は、ヒトのエイズ症状と同じ病態を呈したことから、有力なエイズ動物モデルとして活用できると考えられた。

今後、引き続き経過観察を行いエイズ発症および非発症カニクイザルの違いを明らかにするため、免疫応答だけでなく Trim 遺伝子や MHC 遺伝子等の宿主因子についても解析を行う。

E. 結 論

カニクイザルの SIV 病態が明らかになり、エイズ動物モデルとしての有用性が示唆された。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
特になし

2. 学会発表
「国内」

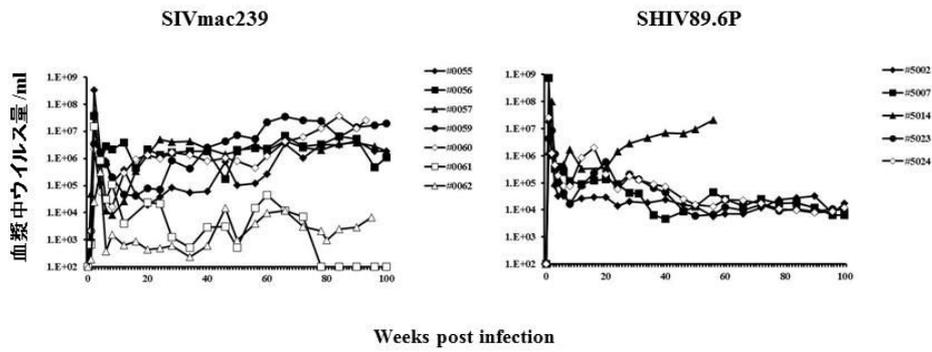
(1) 加藤 誠一、岡村 智崇、張 険峰、向井 徹、井上 誠、五十嵐 樹彦、志田 壽利、松尾 和浩、保富 康宏 BCG ウレアーゼ欠損株を用いたエイズワクチンの評価 第 62 回 日本ウイルス学会学術集会 横浜 2014 年 11 月 10 日-12 日

「国際」
特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

特許出願
なし

(A)



(B)

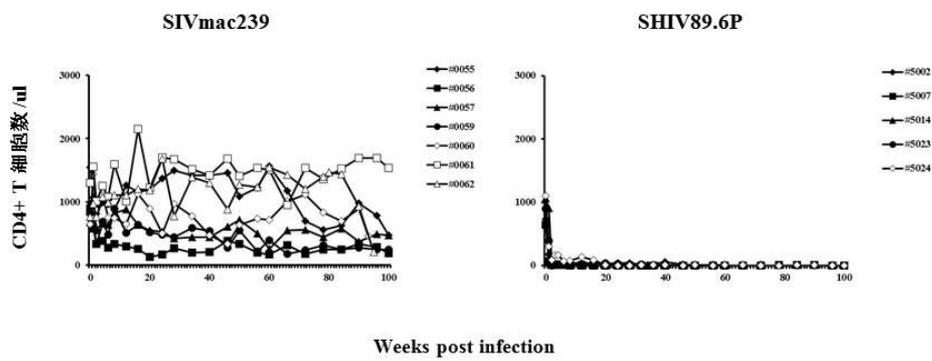
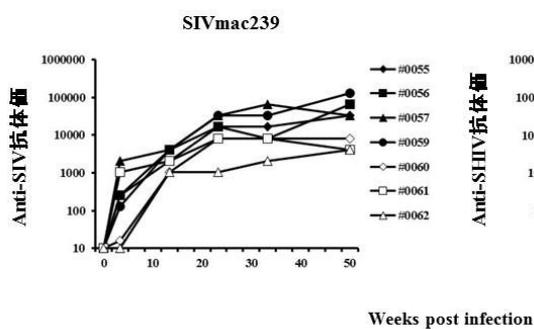


図1 SIVmac239 および SHIV89.6P 接種後のウイルス量 (A) および CD4+T 細胞 (B)。

(A)



(B)

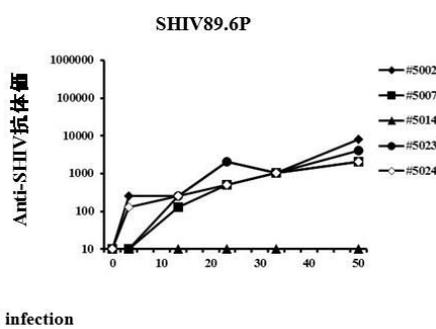


図2 SIVmac239(A)および SHIV89.6P(B)接種後の血漿中のウイルス抗体価。

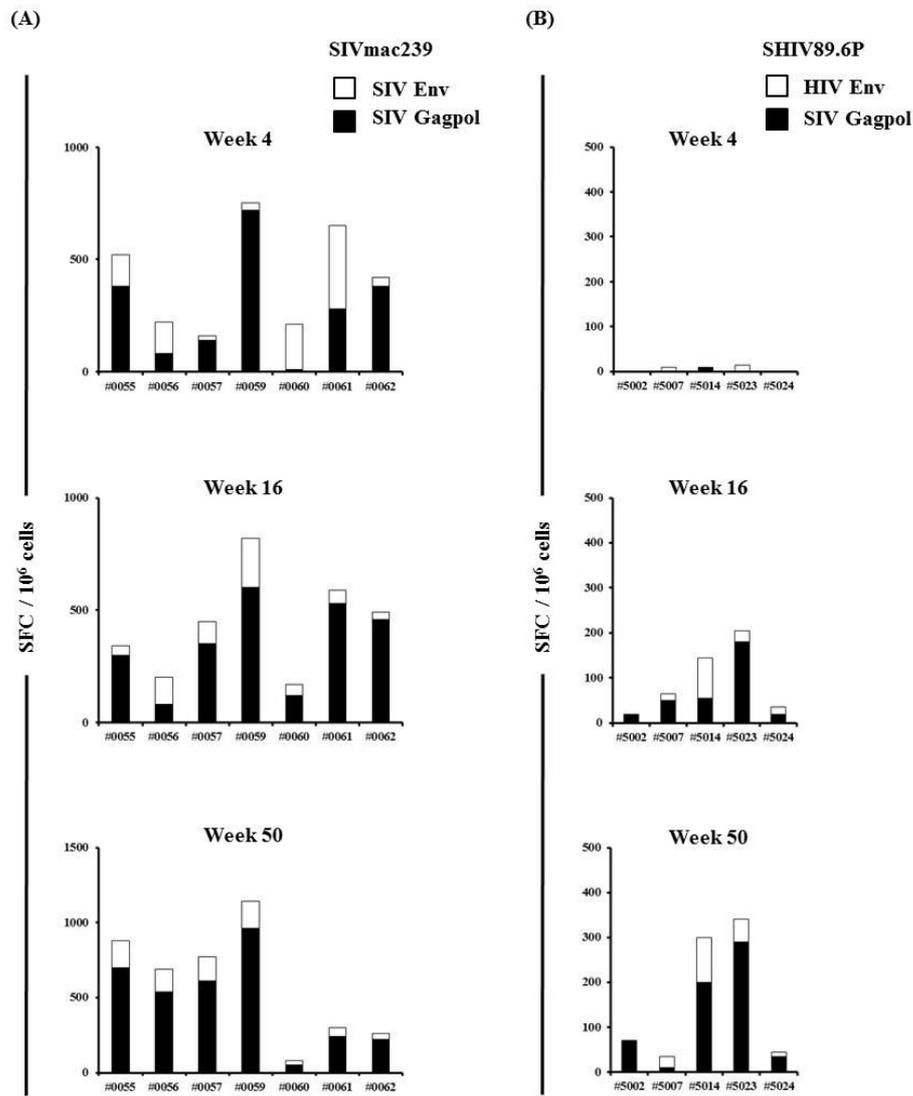


図3 SIVmac239(A)および SHIV89.6P(B)接種後の IFN- γ 産生細胞

Table 1 エイズを発症したカニクイザルの所見

Monkey	臨床症状	安楽殺	病理組織学的所見
#0060	食欲不振、体重減少、神経症状	658 日	エイズ脳症、脳脊髄炎
#0062	食欲不振、体重減少、白血球増多症	672 日	肺高血圧症、多発性血管炎
#5014	食欲不振、体重減少	391 日	間質性肺炎、リンパ組織リンパ球喪失