

学位論文題名

HIV-1の増殖抑制および分離に及ぼすCD8+細胞の効果

学位論文内容の要旨

I はじめに

Human immunodeficiency virus type 1(HIV-1)抗体陽性者は、末梢血中に抗ウイルス効果を持つCD8+細胞を有することが知られている。

本研究では、まず42名の抗体陽性者から得られた末梢血、212検体からCD8+細胞除去法を用いてHIV-1分離を行った成績について報告する。次にCD8+細胞のHIV-1増殖に及ぼす影響を検討するために、抗体陽性者から得られた末梢血リンパ球より、CD8+細胞を除去して得られたHIV-1と、CD8+細胞を除去せずに得られたHIV-1について、その両者を比較検討したので、以下にその要約を述べる。

II 対象

HIV-1抗体陽性者42名(血友病33名、同性愛者5名、異性愛者3名及び針刺し事故1名)を対象とし、これらの症例についてそれぞれ一回から複数回にわたり、のべ212回のウイルス分離を試みた。さらにCD8+細胞のHIV-1の増殖に対する影響を血友病Aの4名と針刺し事故により感染した症例1名の計5名(CDC II)について検討した。

III 方法

HIV-1の分離：症例より得られた末梢血リンパ球(PBL)を抗CD8単クローン抗体と反応させた後、抗マウスIgG抗体をコートしたプレートをを用いて非付着細胞を回収し、PHA刺激正常人PBLと混合培養を行った(B法)。一部の検体についてはPBLよりCD8+細胞を除かずに同様に混合培養を行った(A法)。培養開始後、3-4日毎に培養上清を回収し、逆転写酵素(RT)活性とp24抗原量を測定し、HIV-1の分離を確認した。

CD8+細胞のHIV-1増殖に対する影響の検討：CDC IIにある3症例からA法、B法で分離されたHIV-1をそれぞれPHA刺激正常人リンパ球に感染させた後、この培養系に同症例のCD8+細胞、または他の無症候症例のCD8+細胞を混合し培養を行った。上清中のRT活性値を測定することにより、産生されるウイルス量を測定し、CD8+細胞を加えずに同様に培養を行った系のRT活性値と比較した。

宿主域の検討：MT2、HUT78、Raji、U937の各種培養細胞株と正常人末梢

血から得られたprimary macrophageに対してA、B法それぞれにより分離されたHIV-1の感染性を検討した。

Southern blot法による検討：A、B両方法で分離されたHIV-1をそれぞれ、正常人リンパ球に感染させた後、細胞全DNAを抽出した。DNAを各制限酵素で消化後、southern blot法を行った。プローブはHIV-1の全遺伝子を含むpZ6を用いた。

V3ループの遺伝子解析：上記で得られたDNAを用いてpolymerase chain reaction (PCR) 法により、HIV-1のエンベロ-プ遺伝子のV3領域を増幅し、それぞれのPCR生成物について直接シークエンスを行った。さらにそれぞれについてクロ-ニングを行い、得られたクロ-ンについても同様にシークエンスを行った。

IV 結果

HIV-1の分離：42名中39名からHIV-1を分離した(92.9%)。HIV-1を分離できなかった3名は、ウイルス分離を一回しか試みなかった血友病の症例であった。これらは、データの得られなかった1名を除きCD4/CD8比、CD4+細胞数ともに正常範囲にあった。19名については、経時的に複数回ウイルス分離を試みたが、うち5名はCD8+細胞の除去の有無に拘らずウイルス分離しづらかった。このうち4名はCDCⅡにある症例であったが、1名についてはAIDSを発症した同性愛者であった。CD8+細胞除去法の有効性を検討するために、A法とB法を行い分離率、p24抗原陽性化の時期について検討したところ、B法のみでウイルス分離し得た例は10%に達した。また両方法でウイルス分離し得た102検体においても、15検体においてB法による分離の方がA法に比して抗原陽性化が早かった。

CD8+細胞の増殖に及ぼす影響：CD8+細胞のHIV-1増殖に及ぼす影響を検討したところ、CD8+細胞を除去せずに得られたウイルス("A"ウイルス)とCD8+細胞を除去して得られたウイルス("B"ウイルス)では、自己または非自己のCD8+細胞を培養系に加えた時に、HIV-1の増殖に差のある場合があった。即ち、"B"ウイルスは"A"ウイルスに比してCD8+細胞の有する増殖抑制作用に対して感受性を有していた。一方、AIDS関連症候群(ARC)に近い症例においては、CD8+細胞を加えても"A"、"B"ウイルス両者への増殖抑制作用が認められなかった。次に、両法で分離したウイルスの増殖速度及び、宿主域を検討したところ、両ウイルス間に差を認めなかったが、検討した5症例のうち4症例で、両ウイルスの制限酵素切断パターンに明瞭な差を認めた。残る1症例は病期が進んでいる症例であるが、この症例から両方法で分離したウイルスは類似の制限酵素切断パターンを示した。V3ループの塩基配列の検討では、両ウイルスの間での相同性は87.9~100%と高く、クローン間でも"A"ウイルス、"B"ウイルスの間の塩基配列の違いに共通する傾向は認められなかった。

V 考察

42名のHIV-1抗体陽性者から得られた212検体よりCD8+細胞除去法を用い

てウイルス分離を行い、従来わが国で報告されている抗体陽性症例からの分離率と比較し、極めて高い分離率を得た。この高い分離率が得られた理由の一つに、CD8+細胞を除去して分離を試みたことがあげられる。すなわち、CD8+細胞を除去することによってのみHIV-1を分離し得た検体は全体の10%を占めたこと、またCD8+細胞を除いた方がp24抗原の陽性化が早かったことから、CD8+細胞がHIV-1増殖に対して抑制的に働き、CD8+細胞の除去によってウイルスの増殖が促進されることが示唆された。特に、より病初期の症例からHIV-1を分離する場合は、CD8+細胞除去法は有用な方法と思われた。CD8+細胞の抗ウイルス効果としては、感染細胞に対する抗原特異的な細胞障害性T細胞(CTL)活性を介する機序の他に、CD8+細胞から分泌される可溶性物質によるウイルス増殖抑制機序が報告されている。今回示した増殖抑制作用は、自己及び非自己双方のCD8+細胞について認められたことから、MHCの拘束をうけるCTL活性とは異なっており、他の機序すなわち可溶性物質などによる効果である可能性が示唆された。さらに今回、病初期にある症例において、CD8+細胞のウイルス増殖抑制作用に対して異なる感受性を有する複数種のウイルスが生体内に存在することを明らかにした。一方、病期が進行した症例では、両ウイルスともCD8+細胞のウイルス増殖抑制作用に抵抗性を示し、制限酵素切断パターンにも差を認めず、かつ分子生物学的に類似のウイルスであった。これらのことから、病期の進行と分離されるウイルスのCD8+細胞に対する感受性との関係について、以下の二つの機序が考えられる。1)病期の進行とともにCD8+細胞のウイルス増殖抑制作用が減少し、CD8+細胞の有無に関係なく同一のウイルスが分離された。2)病期の進行とともにCD8+細胞のウイルス増殖抑制作用に抵抗性のあるウイルスが優位に増殖してきた。どちらの機序がより強く関与しているかに関しては、今後の検討課題である。最近、AIDS、ARCの症例にCD8+細胞を投与し、治療的效果が得られたという報告がある。いまだ致死率の高いAIDSのより効果的な治療法の確立のため、CD8+細胞の抗ウイルス作用について詳細に検討していくことは臨床的にも重要なことと思われる。

VI 結語

- 1) HIV-1抗体陽性症例42名, 212検体よりCD8+細胞除去法を用いてHIV-1分離を行い、約90%の高いHIV-1分離率を得た。
- 2) 病初期の抗体陽性者はHIV-1の増殖を抑制する作用を有するCD8+細胞を持っており、病期の進行とともにこのCD8+細胞のウイルス増殖抑制作用は低下した。
- 3) 病初期の症例においてCD8+細胞のウイルス増殖抑制作用に対して感受性が異なるHIV-1が同一個体内に同時に存在した。
- 4) これらCD8+細胞に対して感受性を有するウイルスがAIDS発症における潜伏期を規定している可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 松 本 脩 三

副 査 教 授 小 林 邦 彦

副 査 教 授 生 田 和 良

HIV-1の増殖抑制および分離に及ぼすCD8+細胞の効果

Human immunodeficiency virus type 1(HIV-1)抗体陽性者は末梢血中に抗ウイルス効果を持つCD8+細胞を有することが知られている。立野氏の研究は42名の抗体陽性者から得られた末梢血、212検体からCD8+細胞除去法を用いてまずHIV-1分離を行ったうえで次にCD8+細胞のHIV-1増殖に及ぼす影響を検討するために、抗体陽性者から得られた末梢血リンパ球より、CD8+細胞を除去して得られたHIV-1と、CD8+細胞を除去せずに得られたHIV-1について、その性格を比較検討したものである。ウイルス分離の対象はHIV-1抗体陽性者42名であり、CD8+細胞のHIV-1の増殖に対する影響に関しては血友病Aの4名と針刺し事故により感染した1名の計5名を対象とした。HIV-1抗体陽性者から得られた212検体よりCD8+細胞除去法を用いてウイルス分離を行ったところ、従来わが国で報告されている分離率と比較し、極めて高い分離率がえられた。この高い分離率が得られた理由の1つにCD8+細胞を除去して分離を試みたことがあげられる。すなわち、CD8+細胞を除去することによってのみHIV-1を分離しえた検体は全体の10%を占めたこと、またCD8+細胞を除いた方がp24抗原の陽性化が早かったことからCD8+細胞がHIV-1増殖に対して抑制的に働き、CD8+細胞の除去によってウイルスの増殖が促進されることが示唆された。今回立野氏が示した増殖抑制作用は、自己および非自己双方のCD8+細胞について認められたことから、MHCの拘束をうけるCTL活性とは異なっており、他の機序すなわち可溶性物質などによる効果である可能性が示唆された。さらにこの研究で病初期にある症例においては、CD8+細胞のウイルス増殖抑制作用に対して異なる感受性を有する複数種のウイルスが存在することが明らかにされた。一方、病期が進行した症例では、両ウイルスともCD8+細胞のウイルス増殖抑制作用に抵抗性を示し、分子生物学的に類似のウイルスであることが示された。これらのことから、病期の進行と分離されるウイルスのCD8+細胞に対す

る感受性との関係について、以下の2つの機序が考えられる。すなわち第一は病期の進行とともにCD8+細胞のウイルス増殖抑制作用が減少し、CD8+細胞の有無に関係なく同一のウイルスが分離される場合。第二は病期の進行とともにCD8+細胞のウイルス増殖抑制作用に抵抗性のあるウイルスが優位に増殖してくる場合である。どちらの機序がより強く関与しているかに関しては、今後の検討課題である。

以上をまとめると同氏の研究によりHIV-1抗体陽性症例の212検体よりCD8+細胞除去法を用いてHIV-1分離を行うと約90%の高いHIV-1分離率が得られること、また病初期の症例においてはCD8+細胞のウイルス増殖抑制作用に対して感受性が異なるHIV-1が同一個体内に同時に存在すること、さらにこれらCD8+細胞に対して感受性を有するウイルスがAIDS発症における潜伏期を規定している可能性のあることが示された。以上の結果はいずれもHIV感染個体を性格づけるユニークな結果であり、学位論文として十分に評価できるものと判断された。発表に引き続き副査の小林、生田両教授並びに小野江教授からそれぞれ質問があり、更に又副査の両教授からは後日個別的に質疑が行われたが、いずれに関しても極めて妥当な答えがなされたものと評価された。