EXPERIMENTAL RESEARCH CENTER FOR INFECTIOUS DISEASES LABORATORY OF PRIMATE MODEL

To pave the road to develop preventive and therapeutic measures against AIDS, animal model system of the disease is doubtlessly a requisite. Nonetheless, HIV can infect only human beings although there exist some exceptions like chimpanzees. Such expensive and endangered primate species, however, are not suitable to be used as experimental animals. SIV-monkey system might be an alternative model, but this virus is genetically and virologically different from HIV as revealed by the above-mentioned phylogenetic studies. Construction of HIV-1/SIV chimeric virus (SHIV) and its experimental infection into monkeys are major contributions of our research group because the usefulness of SHIV is now widely appreciated and many researchers in the world are utilizing this tool to clarify the pathogenic nature of HIV using monkeys. This project also aims at developing AIDS vaccines. Some SHIV strains induced dramatic CD4 reduction to lead to lethal pathogenesis in inoculated monkeys, whereas other SHIV strains induced sufficient protective humoral and cellular immunity in the animals with only temporary CD4 reduction. The finding of the latter phenomenon provides a model for analyzing a live-attenuated vaccine against AIDS. Thus, current research efforts are focusing on how to ensure the safety of the vaccine in addition to how to increase its effectiveness.

Impaired T cell differentiation in the thymus at the early stages of acute pathogenic SHIV infection in contrast to less pathogenic SHIV infection: Motohara, M., Ibuki, K., Miyake, A., Fukazawa, Y., Inaba, K., Suzuki, H., Masuda, K., Minato, N., Kawamoto, H., Nakasone, T., Honda, M., Hayami, M., and Miura, T.

One of the mechanisms by which HIV infection induces the depletion of CD4• T cells has been suggested to be impairment of T-cell development in the thymus, although there is no direct evidence that this occurs. To examine this possibility, we compared T-cell maturation in the intrathymic progenitors between macaques infected with an acute pathogenic chimeric simianehuman immunodeficiency virus (SHIV), which causes profound and irreversible CD4• T-cell depletion, and macaques infected with a less pathogenic SHIV, which causes only a transient CD4• T-cell decline. Within 27 days post-inoculation (dpi), the two virus infections caused similar increases in plasma viral loads and similar decreases in CD4• T-cell counts. However, in the thymus, the acute pathogenic SHIV resulted in increased thymic involution, atrophy and the depletion of immature T cells including CD4•CD8• double-positive (DP) cells, whereas the less pathogenic SHIV did not have these effects. Ex vivo differentiation of CD3 CD4 CD8 triple-negative (TN) intrathymic progenitors to DP cells was assessed by a monkeyemouse xenogenic fetal thymus organ culture system. Differentiation was impaired in the TN intrathymic progenitors of the acute pathogenic SHIV-infected monkeys, while differentiation was not impaired in the TN intrathymic progenitors of the less pathogenic SHIV-infected monkeys. These differences suggest that dysfunction of thymic maturation makes an important contribution to the irreversible depletion of circulating CD4•T cells in vivo.

 Rapid dissemination of a pathogenic simian/human immunodeficiency virus to systemic organs and active replication in lymphoid tissues following intrarectal infection: Miyake, A., Ibuki, K., Enose, Y., Suzuki, Y., Horiuchi, R., Motohara, M., Saito, N., Nakasone, T., Honda, M., Watanabe, T., Miura, T., and Hayami, M.

A better understanding of virological events during the early phase of human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) infection is important for development of effective antiviral vaccines. In this study, by using quantitative PCR and an infectious plaque assay, virus distribution and replication were examined in various internal organs of rhesus macaques for almost 1 month after intrarectal inoculation of a pathogenic simian immunodeficiency virus/HIV chimeric virus (SHIV-C2/ 1-KS661c). At 3 days post-inoculation (p.i.), proviral DNA was detected in the rectum, thymus and axillary lymph node. In lymphoid tissues, infectious virus was first detected at 6 days p.i. and a high level of proviral DNA and infectious virus were both detected at 13 days p.i. By 27 days p.i., levels of infectious virus decreased dramatically, although proviral DNA load remained unaltered. In the intestinal tract, levels of infectious virus detected were much lower than in lymphoid tissues, whereas proviral DNA was detected at the same level as in lymphoid tissues throughout the infection. In the thymus and jejunum, CD4CD8 double-positive T cells were depleted earlier than CD4 single-positive cells. These results show that the virus spread quickly to systemic tissues after mucosal transmission. Thereafter, infectious virus was actively produced in the lymphoid tissues, but levels decreased significantly after the peak of viraemia. In contrast, in the intestinal tract, infectious virus was produced at low levels from the beginning of infection. Moreover, virus pathogenesis differed in CD4 single-positive and CD4CD8 double-positive T cells.

3) DNA vaccination of macaques by a full-genome SHIV plasmid that has an IL-2 gene and Produces non-infectious virus particles: Horiuchi, R., Akahata, W., Kuwata, T., Enose, Y., Ido, E., Suzuki, H., Miyake, A., Saito, N., Ibuki, K., Goto, T., Miura, T., and Hayami, M.

We previously reported that a mutant full-sized plasmid DNA vaccine regime in macaques was effective against a homologous challenge

[Akahata W, Ido E, Shimada T, Katsuyama K, Yamamoto H, Uesaka H, et al. DNA vaccination of macaques by a full genome HIV-1 plasmid which produces non-infectious virus particles. Virology 2000;275:116–24; Akahata W, Ido E, Akiyama H, Uesaka H, Enose Y, Horiuchi R, et al. DNA vaccination of macaques by a full genome SHIV-1 plasmid that produces non-infectious virus particles. J Gen Virol 2003;84:2237–44]. In this study, to evaluate the DNA vaccination regime against a heterologous challenge, a novel plasmid named pSHIV-ZF1*IL-2 was constructed. Four monkeys were intramuscularly and intradermally injected four times with the pSHIV-ZF1*IL-2. Vaccinated monkeys were intravenously challenged with a highly pathogenic, heterologous SHIV at 11 weeks post vaccination. All the vaccinated monkeys suppressed the challenge virus rapidly under the detectable level by 16 weeks post challenge. One vaccinated monkey was protected from a loss of CD4+ T cells. These results suggest pSHIV-ZF1*IL-2 alone seems partially effective even against a challenge with a heterologous, pathogenic virus.

Construction and in vitro characterization of a chimeric simian and human immunodeficiency virus with the RANTES gene: Shimizu, Y., Okoba, M., Yamazaki, N, Goto, Y., Miura, T., Hayami, M., Hoshino, H., and Haga, T.

Chimeric simian-human immunodeficiency virus (SHIV) containing the env gene of HIV-1 infects macaque monkeys and provides basic information on HIV-1 vaccine developments. Regulated-on-activation-normal-T-cell-expressed-and-secreted (RANTES), a CC-chemokine, enhances antigen-specific T helper type-1 responses against HIV-1. With the final goal of testing the adjuvant effects of RANTES in SHIV-macaque models, we constructed a SHIV having the RANTES gene (SHIV-RANTES) and characterized its properties in vitro. SHIV-RANTES replicated both in human and monkey T cell lines. Along with SHIV-RANTES replication, RANTES was detected in supernatant of the human and monkey cell cultures, at the maximum level of 98.5 ng/ml and 4.1 ng/ml, respectively. A flow cytometric analysis showed that the expressed RANTES induced the down-modulation of CC-chemokine receptor 5 (CCR5) on PM1 cells, which was restored by adding anti-RANTES antibody. UV-irradiated culture supernatants from the SHIV-RANTES-infected cells suppressed replication of CCR5-tropic HIV-1 BaL in PM-1 cells. Differentiating real-time RTPCR showed that pre-infection of SHIV-RANTES in C8166 cells expressing CCR5 suppressed the replication of HIV-1 BaL. Biological activity of the expressed RANTES and the inserted RANTES gene in SHIV-RANTES remained stable after 10 passages. These results suggest that SHIV-RANTES is worth to test in macaque models.

5) In vitro and in vivo stability of plasmids in attenuated Salmonella enterica serovar Typhimurium used as a carrier of DNA vaccine is associated with its replication origin: Haga, T., Kumabe, S., Ikejiri, A., Shimizu, Y., Li, H., Goto, Y., Matsui, H., Miyata, H., and Miura, T.

Abilities of live attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. typhimurium*) as a carrier of DNA vaccine were evaluated using model plasmid encoding beta-galactosidase (-Gal) and BALB/c mice. Expression of -gal was occasionally observed in macrophage-like cells from pCMV delivered by two strains (3306 *phoP* and SL7207) of *S. typhimurium*. We constructed pBRCMY ... -Gal expression apparatushaving replication origin from low copy pBR322. Comparison of the plasmid stability showed that pBRCMY remained stable in *Salmonella* even after oral administration, while pCMV tended to be lost quickly. However, titers for -gal specific IgG in sera did not significantly increase in mice orally administrated with *S. typhimurium* having either pBRCMV or pCMV. These data suggest that further studies are required to rationally establish this methodology.

6) Whole genome sequence data of an infectious molecular clone of the SIVagm TYO-1 strain: Miura, T., Matsuyama, M., Ogatsu, F., and Hayami, M.

We first sequenced a full genome of simian immunodeficiency virus isolated from African green monkey (SIVagm) but the clone sequenced was found not to be biologically active. We subsequently succeeded in reconstructing a full genome infectious molecular clone, named pSA212. The infectious pSA212 clone (known as the TYO-1 strain of SIVagm) has been distributed widely for research analysis of SIVagm but its genome has never been fully sequenced. Here, we report the whole genome sequence of the infectious pSA212.

LIST OF PUBLICATIONS

Experimental Research Center for Infectious Diseases Laboratory of Primate Model

Motohara, M., Ibuki, K., Miyake, A., Fukazawa, Y., Inaba, K., Suzuki, H., Masuda, K., Minato, N., Kawamoto, H., Nakasone, T., Honda, M., Hayami, M., Miura, T. : Impaired T-cell differentiation in the thymus at the early stages of acute pathogenic chimeric simian-human immunodeficiency virus(SHIV) infection in contrast to less pathogenic SHIV infection. Microbe&Infect, 8:1539-1549,2006

Miyake, A., Ibuki, K., Enose, Y., Suzuki, H., Horiuchi, R., Motohara, M., Saito, N., Nakasone, T., Honda, M., Watanabe, T., Miura, T., Hayami, M. : Rapid dissemination of a pathogenic simian/human immunodeficiency virus to systemic organs and active replication in lymphoid tissues following intrarectal infection . J.Gen.Virol, 87:1311-1320, 2006

Horiuchi, R., Akahata, W., Kuwata, T., Enose, Y., Ido, E., Suzuki, H., Miyake, A., Saito, N., Ibuki, K., Goto, T., Miura, T., and Hayami, M. : DNA vaccination of macaques by a full-genome SHIV plasmid that has an IL-2 gene and produces non-infectious virus particles. Vaccine, 24,17:3677-3685, 2006

Shimizu, Y., Okoba, M., Yamazaki, N., Goto, Y., Miura, T., Hayami, M., Hoshino, H., Haga, T. : Construction and in vitro characterizition of a chimeric simian and human immunodeficiency virus with the RANTES gene. Microbe & Infect, 8:105-113, 2006

Haga, T., Kumabe, S., Ikejiri, A., Shimizu, Y., Li, H., Goto, Y., Matsui, H., Miyata, H., and Miura, T.: In vitro and in vivo stability of plasmids in attenuated Salmonella enterica serovar Typhimurium used as a carrier of DNA vaccine is associated with its replication origin. Experimental Animals, 55(4): 405-409, 2006

Miura, T., Matsuyama, M., Ogatsu, F., Hayami, M. : Whole genome sequence data of an infectious molecular

Shimizu, Y., Okoba, M., Ibuki, K., Kaneyasu, K., Goto, Y., Miura, T., Hayami, M., Haga, T.: In vitro and In vivo properties of chimeric simian and human immunodeficiency viruses having human RANTES genes. Keystone Symposia HIV Vaccines, March 27- April 2, 2006, keystone, Colorado, USA

Miura, T.: Virological and immunopathological analysis of systemic lymphoid tissues in SHIV-infected monkeys: Importance of small intestine as target organ of AIDS. The 7th Kumamoto AIDS Seminar, Sep. 21-22, 2006, Kumamoto.

Fukazawa, Y., Miyake, A., Ibuki, K., Inaba, K., Saito, N., Motohara, M., Horiuchi, R., Himeno, A., Matsuda, K., Nakamura, M., Matsuyama, M., Hayami, M., Miura, T.: Even low pathogenic SHIV lead to decrease CD4+ T-cell of the small intestine significantly from early phase of infection. The 7th Kumamoto AIDS Seminar, Sep. 21-22, 2006, Kumamoto.

伊吹謙太郎、深澤嘉伯、姫野愛、斉藤尚紀、元原麻貴子、稲葉一寿、松田健太、松山めぐみ、速水 正憲、三浦智行:遺伝子欠損サル/ヒト免疫不全キメラウイルスワクチン接種による感染防御効果の 検討-腸管粘膜免疫細胞群の動態解析を主体として-、第142回日本獣医学会学術集会、2006年9月22 日-24日、山口

稲葉一寿、深澤嘉伯、堀内励生、松田健太、松山めぐみ、姫野愛、斉藤尚紀、中村仁美、伊吹謙太郎、速水正憲、三浦智行:ウイルス血症が抑制されているSHIV感染アカゲサルでも小腸では絨毛萎縮とCD4陽性T細胞の減少が認められる、第142回日本獣医学会学術集会、2006年9月22-24日、山口

Matsuyama, M., Horiuch, R., Fukazawa, Y., Inaba, K., Ibuki, K., Hayami, M., Miura, T.: Full genome sequence analysis in systemic tissues of acute pathogenic SHIV-infected monkeys. 24th annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS. Oct. 4-7, 2006, Atlanta.

Inaba, K., Fukazawa, Y., Horiuch, R., Matsuda, K., Matsuyama, M., Himeno, A., Saito, N., Matsuyama, M., Ibuki, K., Hayami, M., Miura, T.: CD4reduction and villous atrophy in small intestinal tract are caused by even controlled simian/human immunodeficiency virus infection. 24th annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, Oct. 4-7, 2006, Atlanta.

Fukazawa, Y., Miyake, A., Ibuki, K., Inaba, K., Saito, N., Motohara, M., Horiuchi, R., Himeno, A., Matsuda, K., Nakamura, M., Matsuyama, M., Hayami, M., Miura, T.: Even low pathogenic SHIV lead to decrease

CD4+ T-cell of the small intestine significantly from early phase of infection. 24th annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, Oct. 4-7, 2006, Atlanta.

伊吹謙太郎、深澤嘉伯、姫野愛、稲葉一寿、齊藤尚紀、松田健太、松山めぐみ、速水正憲、三浦智行:nef遺伝子欠損サル/ヒト免疫不全キメラウイルス(SHIV)接種による感染防御メカニズムの解析 第54回日本ウイルス学会学術集会、2006年11月19日〜21日、名古屋

稲葉一寿、深澤嘉伯、堀内励生、松田健太、松山めぐみ、姫野愛、齊藤尚紀、中村仁美、伊吹謙太郎、速水正憲、三浦智行:ウイルス血症が抑制されているSHIV感染アカゲザルでも小腸では絨毛萎縮とCD4陽性T細胞の減少が認められる、第54回日本ウイルス学会学術集会、2006年11月19日〜21日、 名古屋

松山めぐみ、堀内励生、深澤嘉伯、稲葉一寿、伊吹謙太郎、速水正憲、三浦智行:強毒SHIV感染サルの全身臓器におけるウイルス変異の解析、第54回日本ウイルス学会学術集会、2006年11月19日~21日、名古屋

清水佑也、稲葉一寿、兼安健太郎、姫野 愛、伊吹謙太郎、三浦智行、速水正憲、芳賀 猛: RANTES 遺伝子組み込みSHIVによる細胞性免疫応答の増強、第54回日本ウイルス学会学術集会、2006年11月 19日~21日、名古屋

Kenta Matsuda: Construction of R5 single tropic and X4 single tropic virus using dual tropic SHIV KS661 as a backbone. 第2回 生命科学研究科・ウイルス研究所 学生フェスティバル Nov. 19, 2006, Kyoto

深澤嘉伯、伊吹謙太郎、齊藤尚紀、姫野愛、稲葉一寿、松田健太、松山めぐみ、元原麻貴子、速水 正憲、三浦智行:nef遺伝子欠損サル/ヒト免疫不全キメラウイルス(SHIV-NI)免疫ザルに対する急 性発症型SHIV攻撃接種早期の全身臓器におけるウイルス動態、第20回日本エイズ学会学術集会、2006 年11月30日-12月2日、東京

松田健太、松山めぐみ、伊吹謙太郎、山口由美、速水正憲、三浦智行: Dual tropic SHIV-KS661を バックボーンとしたR5 single tropic ウイルスとX4 single tropic ウイルスの作製、第20回日本 エイズ学会学術集会、2006年11月30日-12月2日、東京

齊藤尚紀、高橋めぐみ、清水真澄、伊吹謙太郎、速水正憲、三浦智行、高橋秀実:SIV/SHIV 感受性 IL-2 independent アカゲザル細胞株"MT-IL2I"の樹立とその性状解析、第20回日本エイズ学会学 術集会、東京、2006年11月30~12月2日

井戸英治、石松美沙、速水正憲、三浦智行: プロテアーゼ、逆転写酵素、およびインテグラーゼの

各遺伝子がHIV-1 由来である新規 SHIV のサル感染実験、第20回日本エイズ学会学術集会、2006年 11月30日~12月2日、東京

Tomoyuki Miura: Importance of small intestine as a target organ of AIDS ,Virological and immunopathological analysis of systemic lymphoid tissues in SHIV-infected monkeys. 第14回サル類疾病国際ワークショップ、2006年12月6日、つくば

Matsuyama, M., Inaba, K, Fukazawa, Y., Horiuch, R., Ibuki, K., Hayami, M., Miura, T.: Full genome sequence analysis in systemic tissues of acute pathogenic SHIV-infected monkeys. US-Japan Cooperative Medical Science Program 19th Joint Meeting of the AIDS Panels, Dec. 6-7, Kagoshima

附属感染症モデル研究センター 霊長類モデル研究領域

2006年3月で速水正憲教授が退官された。兼安健太郎と鈴木元が博士(医学)を、堀内励生が博士 (人間・環境学)を取得し、兼安は理化学研究所、鈴木は北海道大学、堀内は当教室のポスドクと なった。4月に姫野愛と中村仁美が本学人間・環境学研究科修士課程に入学し、深澤嘉伯が同博士 課程に進学した。また、新里若子が研究補助員として加わった。7月には、ポスドクの堀内がリプ ロセルに就職した。

当研究室の主要研究課題はヒトのレトロウイルス(HIV と HTLV)の病原性を分子レベル・培養 細胞レベル・感染個体レベルで統合的に解析することにより解明し、これらのウイルスによって引 き起こされる疾患の治療と予防の方策を開発することを目的としている。2006年の研究の進展は以 下のとおりである。

1) ウイルス血症が抑制されている SHIV 感染アカゲサルでも小腸では絨毛萎縮と CD4 陽性 T 細胞の減少が認められる

HIV は一般的な実験動物には感染しないため、個体レベルでの詳細な解析は困難である。この 問題を解決するため本研究では、SIV の外被蛋白遺伝子を HIV のものと組み換えたキメラウイルス であり、サルへの感染性を持つ SHIV を用いた。SHIV は経静脈接種サルに対して高レベルのウイル ス血症および全身の CD4 陽性 T 細胞の枯渇といったエイズ様病態を引き起こし、感染サルの多くは 慢性の下痢により衰弱死する。しかし、宿主免疫応答が生じた場合 SHIV は宿主により末梢血レベル では容易に制御されてしまう。実際、我々は、ウイルス接種ルートを静脈から直腸粘膜に変えただ けでも多くのサルで末梢血中のウイルス増殖が抑制され、CD4 陽性 T 細胞の減少の程度も緩和され る、という現象を観察している。しかし、ウイルスを制御していても下痢を呈する個体が認められ ることから、SHIV を制御している感染アカゲサル (LVL: Low Viral Load) でも腸では病変が進行 しているのではないかと考えた。そこで、末梢血データによりLVL とウイルスを制御していない個 体 (HVL: High Viral Load) の2群に分け、腸を含むリンパ系臓器のプロウイルス量の測定および 免疫組織化学的手法を用いた各組織の解析を行った。HVL でのプロウイルス量は各臓器で10³コピー /μg以上の高値を示したが、LVLでは数百コピー程度に留まり、特に腸では数十コピー程度であっ た。空腸の絨毛萎縮の程度を調べたところHVL、LVL共に非感染サルに比べて有意に萎縮していた。 Nef 陽性細胞を検出できたのは HVL の臓器のみで、LVL では検出できなかった。CD4 陽性細胞は HVL 各臓器でほぼ枯渇状態であった。一方、LVL では若干の減少はみられるものの HVL のような枯渇状 態ではなかったが、空腸に関してはHVL と同様に減少していた。末梢血レベルでの感染病態では一 見ウイルスを制御しているように見える個体でも、空腸では病変が進行していることが明らかにな った。これは腸がエイズウイルスの標的臓器として非常に重要な臓器であることと同時に、エイズ ワクチン評価において、末梢血だけでは不十分であり腸を解析する必要性を強く示唆する結果であ ると我々は考えている。(医学研究科・稲葉一寿)

2) 強毒 SHIV 感染サルの全身臓器におけるウイルス変異の解析

HIV の病原性を理解する上で、ウイルスが実際にいつ、どこで産生されるのかを明らかにする ことは重要である。SIV-サルのモデルで、SIV 感染のごく初期において、ウイルスは腸管で爆発的 に増えることが明らかになっているがその他の時期については定かではない。前回、強毒 SHIV クロ ーン KS661 を経直腸感染後, 劇症エイズ様症状を呈したサル1個体において plasma 中のウイルス遺 伝子変異と空腸中のプロウイルスの変異パターンが最も似ていたことを報告した。今回、さらに2 頭のサルを追加し、全身臓器の遺伝子変異の解析を行った。これにより、エイズ期のウイルス産生 の場を明らかにすることを目的とする。SHIV 接種後、劇症エイズ様症状を引き起こしたサル計3頭 を用いた。2 頭は SHIV-C2/1-KS661 を経直腸接種、または経静脈接種し、それぞれ 33 週 (昨年報告) と90週で剖検を行った。残り1頭はSHIV-KS705(弱毒SHIVクローン cl64をバックボーンとし, env 領域を KS661 型に組換えたキメラウイルス)を経静脈接種し、22週で剖検を行った。それぞ れのサルより剖検時に全身臓器を採取し、各臓器と PBMC から抽出したプロウイルス DNA および plasma 中のウイルス RNA について、ウイルスのゲノム全域をカバーするように 500bp-2kbp ずつ増 幅し、ダイレクトシークエンス法により主な変異を検出した。また、ウイルスの変異パターンを臓 器ごとに比較するために、検出された変異をウイルスのオリジナルの配列に導入し、コンセンサス なシークエンスとして系統解析を行った。すべてのサルにおいて、臓器ごとにウイルスの変異パタ ーンは異なっていた。比較的早い時期に剖検を行ったサルでは変異は限られていたのに対し、感染 期間が長いサルにおいてはさらに多くの変異が蓄積されていた。その中で、すべてのサルにおいて 空腸と腸間膜リンパ節のウイルスの変異のパターンが Plasma RNA のものと最も似ていた。今回の解 析により、SHIV 感染後エイズ様症状を引き起こしたサルにおいて主として小腸周辺で産生されたウ イルスが血中に出されるものと考えられる。したがってエイズ期においても小腸周辺が主なウイル ス産生の場となっていることが示唆された。(教務補佐員・松山めぐみ)

3) nef遺伝子欠損サル/ヒト免疫不全キメラウイルス(SHIV-NI)免疫ザルに対する急性発症型 SHIV 攻撃接種後早期の全身臓器におけるウイルス動態

これまでに我々は、SHIV-NI 免疫ザルが攻撃接種ウイルスの増殖を抑制することを報告してき たが、それらは末梢血レベルでの解析であった。本研究では、SHIV-NI 免疫ザルの増殖抑制機序を 深部臓器レベルで明らかにするため、免疫ザルおよび非免疫ザルに急性発症型 SHIV-C2/1-KS661 (KS661)を経粘膜攻撃接種し、早期の全身臓器におけるウイルス動態および CD4 陽性 T 細胞数を比 較検討した。アカゲザルに SHIV-NI を 1x10⁵TCID₅₀静脈内接種し、その 4 週後に KS661 を 2x10⁹TCID₅₀ 経直腸攻撃接種した。攻撃接種 0、2、4 週後にそれぞれ 2~3 頭の剖検を行い、全身臓器における各 ウイルスのプロウイルス DNA 量、感染性ウイルス産生細胞数および CD4 陽性 T 細胞数を解析した。 非免疫ザルでは血漿中ウイルス RNA 量が攻撃接種 2 週後で 10⁸⁻⁹ copies/ml まで上昇し、3 週後に は末梢血中 CD4 陽性 T 細胞が枯渇した。一方、免疫ザルではウイルス RNA 量が検出限界以下に抑制 された個体群(CP 群)と、10⁵ copies/ml 程度に抑制された個体群(PP 群)に別れたが、いずれも 末梢血中 CD4 陽性 T 細胞の減少は見られなかった。CP 群では、全臓器において攻撃接種ウイルスは 検出限界以下であった。PP 群では非免疫ザル群と比較して、末梢リンパ節、脾臓、胸腺においてウ イルス増殖が著しく抑えられたが、腸管では同程度のウイルス増殖が見られた。しかしながら免疫 ザル両群ともに、腸管を含めた全臓器で非免疫ザルのようなCD4 陽性 T 細胞の枯渇は見られなかっ た。CP 群の結果から、SHIV-NI 免疫により粘膜感染に対し完全な感染防御を示す個体が認められた。 また PP 群の結果より、腸管と他のリンパ系組織とはウイルス感受性が異なることが分った。PP 群 と非免疫ザル群の末梢血における 10³⁻⁴ 倍のウイルス RNA 量の差異は、主に腸管以外のリンパ系組織 でのウイルス増殖抑制を反映していると考えられる。(人間・環境学研究科・深澤嘉伯、伊吹謙太郎 助手)

4) Dual tropic SHIV-KS661 をバックボーンとした R5 single tropic ウイルスと X4 single tropic ウイルスの作製

SHIV-KS661 は dual tropic SHIV であり、サル感染個体内において腸管を含む全身の CD4 陽性 細胞を急激に枯渇させる事が確認されている。一方、R5 tropic virus は腸管の CD4 細胞を、X4 tropic virus は胸腺および末梢血中の CD4 陽性細胞をそれぞれ減少させる事が報告されており、ウイルス のセカンドレセプター指向性と病態が密接に関係している事が示唆されるが、その他の因子の関与 を否定できていない。本研究ではKS661のゲノムに最小限の変異を加える事によってセカンドレセ プター指向性を変化させ、セカンドレセプター指向性と病態との相関性を他の因子の関与を排除し た条件で評価出来うるウイルスのモデル作製を目的とした。統計学的に最もレセプター指向性に関 係していると考えられるアミノ酸配列を選定し、SHIV-KS661の env 領域にある V3 ループおよび C4 領域へ、ミスマッチプライマーを用いた PCR 法によって部位特異的変異を加えた。293T 細胞へのト ランスフェクションによって回収したウイルスを、それぞれ GHOST-Parental 細胞、GHOST-X4 細胞、 GHOST-Hi5 細胞へ感染させ、GFP の発現を FACS Calibur および蛍光顕微鏡にて確認した。また、ア カゲザル PBMC での増殖能についても検討した。プレリミナリーなデータではあるが、V3 領域に変 異を導入したウイルスにおいて、GHOST 細胞を用いた系ではセカンドレセプター指向性が変化して いるのが確認出来た。また、統計学的に最もセカンドレセプター親和性に相関のあった C4 領域一カ 所の変異では細胞指向性は変化しない事が確認されたが、この変異が V3 のレセプター指向性に対し てサポーティブに働いている可能性があり、現在検証中である。なお、これらのウイルスはアカゲ ザル PBMC で増殖が確認されており、サルでの実験が可能であると思われる。(人間・環境学研究科・ 松田健太)

5) SIV/SHIV 感受性 IL-2 independent アカゲザル細胞株 "MT-IL2I"の樹立とその性状解 析

Herpesvirus Saimiri (HVS) はサルのTリンパ球を不死化(株化) するウイルスであり、SIV/SHIV 感染実験のツールとして多くのサイミリ細胞株が樹立されてきたが、安定的に培養可能な株は殆ど が IL-2 dependent であった。我々は、IL-2 非添加時における感染実験を可能とするため、IL-2 independent な SIV/SHIV 感受性T細胞株の樹立を試みた。その結果、IL-2 independent の細胞株を 樹立するに至り、その株を"MT-IL2I"と命名した。今回、この細胞株の性状解析を行ない、さらに SIV/SHIV 感受性を従来の IL-2 dependent 株と比較した。アカゲザル PBMC を分離し、IL-2 を含まな い 10%FCS-RPMI 培地に、PHA-p を添加後数日間刺激した培養液 500 μ 1 に 1×10⁷TCID₅₀の HVS ストック 500 μ 1 を加え、さらに 1-2 ヶ月培養を継続した。その結果 IL-2 の添加を必要としない independent な "MT-IL2I" 株が得られた。MT-IL2I の細胞表面マーカーを解析した結果、CD4 の発現が 5 割程度陽性であり、そのうちの 4 割程度が CCR 5 の発現が陽性であった。さらに IL2R α である CD25 が IL-2 dependent 株よりも強く発現していた。この細胞株に SHIV を感染させたところ、感染後 4 ~ 7 日後に CD3 (+) CD4 (+) の分画では CD3/CD4 の発現低下が誘発され、2 週間後にはそれらの 細胞群の大半が消失した。このことは、この分画のウイルスに対する感受性が非常に高いことを示唆している。一方、CD3 (+) CD4 (-) の分画は消失することなく継代が可能であり、proviral DNA も検出されることから、ウイルスが潜伏した状態を維持しているものと考えられる。さらに MT-IL2I は IL-2dependent 株に比べて長期間安定に培養することができることから、*in vitro* での感染実験等に非常に適した細胞株であるものと考えられる。現在、MT-IL2I の IL-2 産生能ならびに限界希釈による CD3 (+) CD4 (+) CD4 (-) 株のクローン化を進めている。(人間・環境学研究科・齊藤尚紀)