

氏 名	三宅 あり子
学位(専攻分野)	博士 (人間・環境学)
学位記番号	人 博 第 276 号
学位授与の日付	平成 17 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	人間・環境学研究科 人間・環境学専攻
学位論文題目	Virological analysis in various tissues of simian / human immunodeficiency virus-infected macaque monkeys (SIV/HIV-1 キメラウイルス感染ザルの各種臓器におけるウイルス学的解析)
論文調査委員	(主 査) 教授 速水正憲 教授 津田謹輔 教授 船橋新太郎 助教授 三浦智行

論文内容の要旨

エイズの病原ウイルスであるヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1) の感染者は全世界において今なお増え続けており、現在、その感染・増殖を抑えるための効果的な治療法の開発が望まれている。そのためには、個体レベルでのウイルス動態を詳細に知ることが重要である。しかし、ヒトにおいては末梢血での経時的解析は可能であるが、各種臓器における解析は不可能である。その為の動物モデルが必要であるが、HIV-1 はヒト以外にはチンパンジーにしか感染しないため、アカゲザル等の実験用動物を用いての解析は不可能である。そこで、HIV-1 に近縁でサルに感染し、エイズ様疾患を発症するサル免疫不全ウイルス (SIV) と HIV-1 とのキメラウイルス (SHIV) が作製されている。SHIV も SIV と同様にサルに感染し、エイズ様疾患を起こすことから、SHIV/サル感染系は HIV-1 感染の動物モデルとして現在広く用いられている。本研究においては、ウイルス感染後各時期におけるウイルス動態を個体レベルで明らかにすることを目的とした。それにあたって、上記感染系を用い、ウイルス接種後各時期の感染ザルより各種臓器を採取し、それら臓器におけるウイルスの定量、遺伝子解析、およびウイルス感染の主要な標的細胞である CD4 陽性細胞のポピュレーション解析を行った。ウイルスの定量にあたっては、定量遺伝子増幅法 (PCR) によるプロウイルス DNA の定量に加え、感染性を持つウイルスのみを検出・定量できるブラックアッセイ法を新たに導入することで、ウイルスの感染部位と実際の増殖部位との相違を明らかにした。

Part I では、感染により脳炎を伴うエイズを発症する特徴を持つ SHIV を静脈内接種し、感染初期 (接種 6 週後) とエイズ発症期の各種臓器におけるウイルス動態の解析を行った。感染初期においては、末梢血単核細胞 (PBMC) とリンパ節や脾臓等のリンパ系組織において同程度のウイルス感染・増殖が見られた。一方、エイズ発症期においては、リンパ系組織においてのみウイルス量の顕著な増加が見られ、特に腸間膜リンパ節において最も高値の感染性ウイルスが検出された。よって、エイズ発症にあたっては、PBMC よりもリンパ系組織、特に腸管に付属する腸間膜リンパ節におけるウイルス増殖の関与が大きいことが推察された。一方、脳においては感染初期にウイルスの感染は確認されたものの増殖は見られず、脳炎症状の見られたエイズ発症期においてのみウイルスの増殖が確認された。また、エイズ発症期に得られた感染性ウイルスの env 遺伝子の解析を行ったところ、リンパ系組織より得られた感染性ウイルスにはアミノ酸変異が数カ所見られたのに対し、脳より得られた感染性ウイルスには変異が見られなかった。このことから、ウイルスは感染初期に脳へ侵入するが活発な増殖や遺伝的変異は起こらない状態で保存され、エイズ発症期に増殖を開始し脳炎を併発するものと考えられた。

上記の如く、感染初期の各種臓器におけるウイルス動態の相違が示されたことから、Part II においては、より早期の SHIV 接種後 4 週以内での解析を行った。接種は HIV-1 の主要な感染経路である粘膜 (直腸) より行った。接種 3 日後には、直腸のみならず各種リンパ系、非リンパ系組織においてウイルスの感染が確認され、ウイルスは粘膜感染後急速に全身に拡散することが示された。リンパ系組織においては、接種後 1—2 週間の間に急激なウイルス増殖が見られたが、その後、プロウイルス DNA 量は高い値で維持されていたにもかかわらず、感染性ウイルス量は激減した。よって、これらリンパ系組織においてはウイルス増殖のピーク後は潜伏感染状態にあるウイルスの割合が増加することが示された。一方、腸管におい

ては、プロウイルス DNA はリンパ系組織と同程度に検出されたにも関わらず、感染性ウイルスは実験期間を通してほとんど検出されなかった。このことから、腸管においてウイルスは感染直後より潜伏状態となり、ほとんど増殖しない可能性が考えられた。以上の結果は、ウイルスは感染初期に全身に拡散するが、その後の増殖、潜伏化の時期は各臓器で異なることを示している。また、HIV-1 感染の主要な標的細胞である CD4 陽性細胞のポピュレーション解析を行ったところ、腸管と胸腺においては CD4CD8 両陽性細胞が多く存在し、それらの細胞は CD4 単陽性細胞の減少に先立って減少し始めることが示された。このことから、これらの臓器においては一般に考えられている CD4 単陽性細胞のみならず、未成熟な CD4CD8 両陽性細胞をウイルスは標的としていることが考えられた。

本研究で得られた成果は、末梢血からは得ることのできない個体内部でのウイルス動態を明らかにするものであり、体内のウイルス供給部位を標的とした治療戦略を立てる上で、重要な知見と考えられる。

論文審査の結果の要旨

エイズは今なお世界的な問題であり、その病原ウイルスであるヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1) の感染と増殖を抑える効果的な治療法の開発が望まれている。そのためには、ウイルスの感染機序および病原性に関する詳細な解析が必要であるが、遺伝子・細胞レベルでの研究は精力的に行われて知見も蓄積しているのに対し、個体レベルでの研究は少なく不明な点が多い。本研究においては、個体レベルでのウイルス動態を解析するため、サル免疫不全ウイルス (SIV) と HIV-1 とのキメラウイルス (SHIV) とアカゲザルとの感染モデル系を用いている。ウイルス感染後の経時的な解析は、ヒトにおいては末梢血を用いたものに限られるが、本研究はウイルス接種後に経時的に剖検することにより、全身臓器における解析を可能としている。ウイルスの定量にあたっては一般的に用いられている定量 PCR 法によるプロウイルス DNA の定量に加えて、申請者はブラックアッセイ法を新たに導入している。定量 PCR 法では感染したウイルスを定量できるが、感染したウイルスが増殖して感染性ウイルスを産生しているかを知ることができず、ブラックアッセイ法はそれを可能にしている。感染性ウイルスの産生を定量することがウイルスの体内拡散を考える上で重要とする申請者の考えは、妥当である。

Part I においては、感染初期とエイズ発症期におけるウイルス動態の相違を明らかにすることを目的としている。各時期の各種臓器におけるウイルス量を比較した結果、エイズ発症期に、末梢血単核細胞 (PBMC) よりもリンパ節、特に腸管に付属する腸間膜リンパ節におけるウイルス増殖の重要性を示す結果を得ている。このことは、全身臓器のウイルス量を比較することにより初めて得ることのできた知見と言える。一方、脳内のウイルス定量とブラックアッセイ法により得られた感染性ウイルスクローンについての遺伝子解析により、脳においてウイルスは感染初期に侵入するが、活発な増殖や遺伝的変異は起こらない状態で保存され、エイズ発症期に増殖を開始することを示唆する知見を得ている。HIV-1 感染においてはエイズ発症期に併発するエイズ脳症が知られているが、その原因ウイルスについては感染初期由来とする説と感染後期由来とする説とに分かれている。本研究の知見はその議論に一つの結論を提示するものと考えられる。Part II においては、より早期の SHIV 接種後 4 週以内での解析を行っている。その接種は、HIV-1 感染の実状により近づけるため、HIV-1 の主要な感染経路である粘膜より行われた。接種 3 日後の解析では各種リンパ系と非リンパ系組織におけるウイルスの感染が確認され、ウイルスは粘膜感染後、急速に全身に拡散することが示された。また、各臓器でのプロウイルス DNA 量と感染性ウイルス量との比較により、リンパ系組織においては盛んなウイルス増殖期を経て潜伏感染状態となるが、腸管においてはウイルスが感染直後より潜伏状態となりほとんど増殖しないことを示す知見を得ている。以上の結果は、ウイルスは感染初期に全身に拡散するが、その後の増殖と潜伏化の時期は各臓器で異なることを示している。これらの臓器における HIV-1 感染の主要な標的細胞である CD4 陽性細胞の動態の解析により、腸管と胸腺における未分化な CD4CD8 両陽性細胞が CD4 単陽性細胞に先駆けて減少し始めることが示されている。このことから、これらの臓器において一般に考えられている CD4 単陽性細胞のみならず、未成熟な CD4CD8 両陽性細胞がウイルスの感染標的細胞となっていることが考えられた。

以上、申請者は本学位論文において、HIV-1 感染モデルとしてサルを扱える利点を最大限に生かし、個体レベルでのウイルス動態の解析を行った。本研究で得られた結果は全身臓器のウイルス動態を比較することで初めて得られた知見である。また、Part II ではヒトでは感染時期を特定できないことから不可能である感染直後に注目して解析を行い、新たな知見を

得ている。さらに、新たなウイルス定量法を導入することで、各種臓器において単にウイルスが存在しているという事実のみならず、ウイルスが増殖しているのか潜伏状態にあるのかを明確に提示している点も評価される。本研究で得られた成果は、末梢血からは得ることのできない個体内部でのウイルス動態を明らかにするものであり、体内のウイルス供給部位を標的とした治療戦略を立てる上で、重要な知見となると考えられる。本論文の内容に関して、Part I に関する論文は国際学術誌（Archives of Virology 誌）に掲載されており、その価値は当該分野の研究者にも高く評価されている。また、Part II に関しては第15回国際エイズ学会で口頭発表の機会を与えられる程、高く評価されており、その論文も国際学術誌に既に投稿されている。本論文は、人間および環境の問題を総合的に考察し、現在人類の直面している困難な諸問題の根本的解決に資する創造的研究を目指す人間・環境学専攻自然環境論講座にふさわしい内容を備えたものと言える。

よって本論文は博士（人間・環境学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成17年1月25日、論文内容とそれに関した事項について試問を行った結果、合格と認めた。