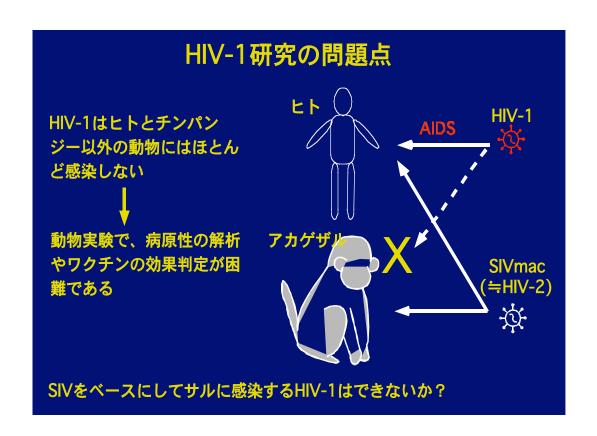
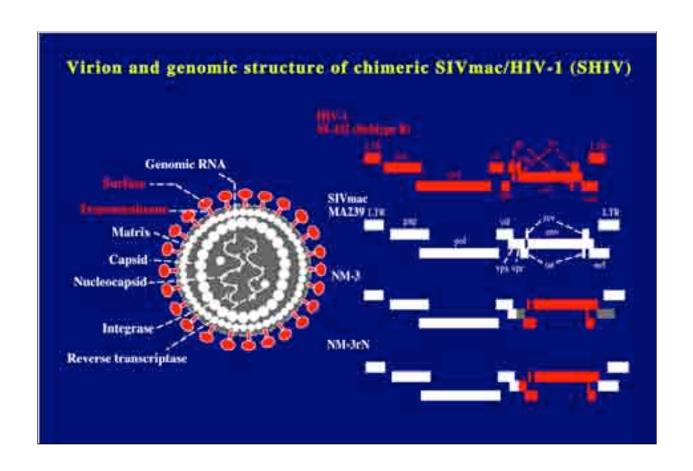
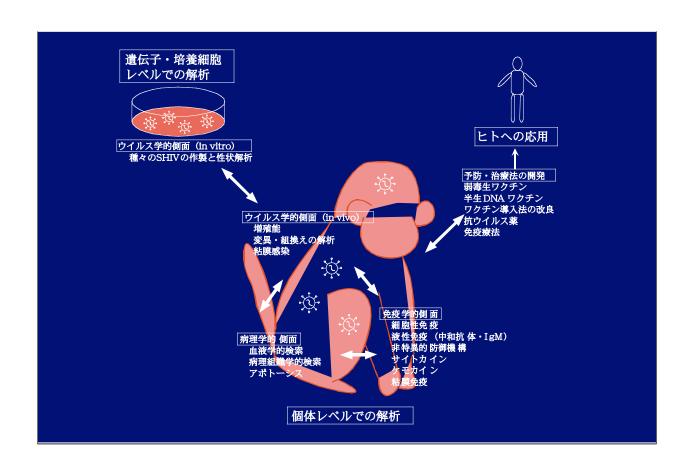
アカゲザルによるエイズ病態モデル



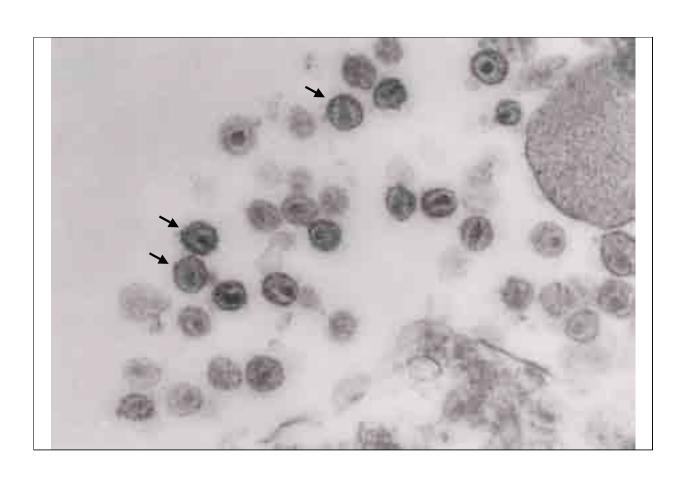
HIV-1研究の問題点の一つに良い動物実験モデル系がないということが挙げられる。すなわち、HIV-1はヒトとチンパンジーにしか感染しないので動物実験での病原性の解析やワクチンの効果判定が困難である。一方、HIV-1に類似のウイルスで、実験動物であるアカゲザルに感染し、エイズを発症させるSIV macが知られている。SIV macは、HIV-2に近縁なのでSIV mac-アカゲザルの実験系はHIV-2のモデルと言え、実際に多くの重要な研究がなされている。しかし、世界的に流行が広がっており、病原性もより強力と考えられているHIV-1の動物モデルはやはり必要である。我々は、SIV macのゲノムの一部をHIV-1のものと入れ換えたウイルスの作製を試みた。



HIV-1とSIVmacのゲノムの一部を入れ換えたウイルス(SHIV)の粒子構造とゲノム構造の模式図。赤がHIV-1、白がSIVmacの遺伝子構造である。ゲノムの前半、後半各々を入れ換えた種々のパターンを作製したが、最初にアカゲザルに感染し、増殖したものはスライドに示したパターン(NM-3, NM-3rN)であった。これらのSHIVは外皮蛋白(env)遺伝子を中心とする領域がHIV-1由来であり、ウイルス粒子の外皮蛋白(左側ウイルス粒子模式図の赤い部分)がHIV-1由来である。我々が作製したNM-3やNM-3rNは、サルに感染し増殖するが、エイズは引き起こさなかった。しかし、米国の研究グループがSHIVをサルで個体継代することにより、感染サルにエイズを引き起こすことに成功したことから、強毒および弱毒SHIVを用いて遺伝子レベル、培養細胞レベル、そして感染個体レベルで統合的にエイズの病態解析ができる条件が整った。



すなわち、SHIVによりHIV-1のenv遺伝子などについて、遺伝子・培養細胞レベルの解析から、アカゲザルを用いた感染個体レベルでの実験病理学的解析や、それらをベースとした予防・治療法開発のための前臨床試験を行うことが可能となったのである。



感染細胞から産生されたSHIVのウイルス粒子の電子顕微鏡写真(京都大学医学部、後藤俊幸助教授提供)。



SHIVの開発は、1992年アムステルダムで開催された国際エイズ会議のトピックとなったが、この時、米国の研究グループの恣意的行為への疑いが同時にScience誌の記事になった。もともと我々の研究グループが先行して開発していたSHIVであるが、論文の審査に時間がかかっていたのに対し、後発の米国のグループの論文の受理が異常に早かったというものである。



筆者本人による撮影

感染実験用サル飼育室。危険な病原体を用いた感染動物実験は、高度に空調管理された飼育・実験設備で行わなければならない。京都大学ウイルス研究所には文部科学大臣によって組換えウイルスの使用について確認されたP3Aレベルのサル感染実験施設があり、実験に使用されるサルは個別にアイソレータ内で飼育されている。また、各実験の妥当性については、研究所内に設置された倫理委員会(霊長類委員会)によって審議されている。

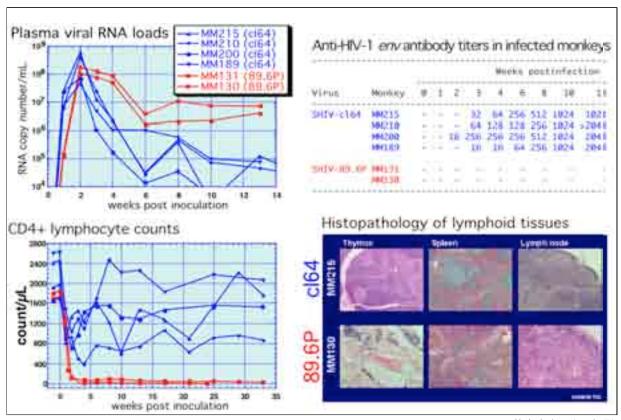


筆者本人による撮影

サル感染実験処置室での内視鏡検査の様子。

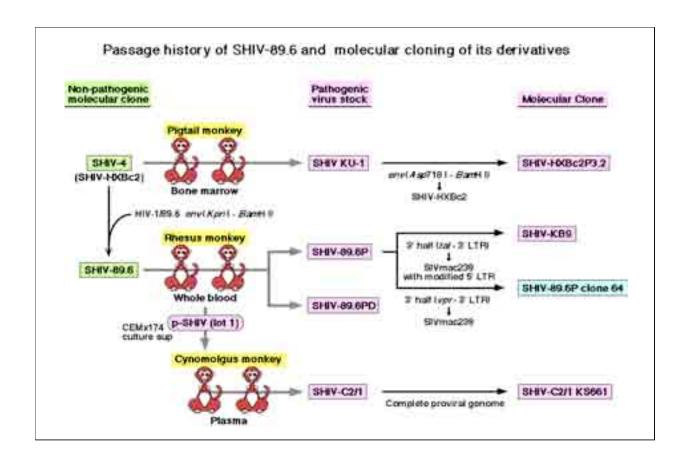
	急性発症型	慢性感染型	非発症型
Peak hight Set point 抗体反応 CD4細胞数 組織病変	10 ⁸ /m1以上 10 ⁶ /m1以上 無し 激減し回復しない 顕著	16 ⁷ ~16 ⁸ /ml 16 ⁵ /ml以下 有り 一週性の減少後回復 弱い	10 ⁷ /ml未満 検出限界以下 有り 殆ど変化無し 殆ど認められず
	00:00° 10TCID50 静脈内接種(10例以上)	MP MP 10 ⁵ TCID ₅₀ 腹腔内 3 回接種(2例)	
		88.68-分子クローン64 18 ² fCID ₅₈ 静脈内接種(2例) 18 ⁵ fCID ₅₈ 静脈内接種(2例)	
	KU-2 10 ⁵ TCID ₅₀ 静脈内接種(1/2例)	KU-2 10 ⁵ TCID ₅₀ 静脈内接種(1/2例)	KU-2 10TCID ₅₀ 静脈内接種(2例)
			10 ⁵ TCID ₅₀ 静脈內接種(5例以上 10 ^{TCID} 50静脈内接種(5例以上)

種々のSHIVの接種実験結果。これまでに我々の研究室で行われた SHIVの感染実験結果を分類すると、非常に病原性の強い急性発症型、慢性経過をたどるもの、そしてほとんど病原性が認められないもの等に分類できる。この中で、急性発症型の89.6P株は、米国の研究グループが、サル個体継代によってはじめて強毒化に成功したSHIVであり、静脈内接種により短期間にエイズを発症することからワクチンや新規治療薬の評価のための攻撃接種用ウイルスとしてよく使われており、エイズのモデルとして考える上でも、その病態については詳細に解析する必要がある。一方、我々が作製したSHIV-NM3rNは、個体継代をしたり、新生仔ザルに接種してもほとんど病気を起こさなかったことから、生ワクチン開発の基礎研究材料として使用している。また、ウイルスの違いによる病態の違いの他、同一のウイルスを用いても、接種ルートや接種量による病態の違いが観察されている。



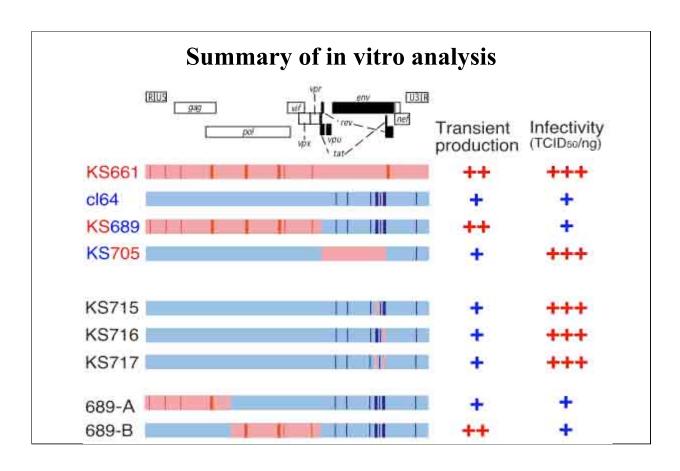
筆者本人による撮影

強毒SHIVと弱毒SHIVの病原性を比較した例を示す。血漿中のウイルス量(左上)、末梢血CD4陽性細胞数(左下)、抗HIV-1抗体価(右上)、病理組織像(右下)である。青で示したcl 64が弱毒SHIV、赤で示した89.6Pが強毒SHIV。接種後2週目までは、強毒/弱毒SHIV共に血漿ウイルス量は同レベルまで上昇し、CD4陽性細胞数の減少が認められる。しかし、その後、強毒SHIVでは高い血漿中ウイルス量が維持され、CD4陽性細胞が枯渇し、ウイルスに対する抗体産生が認められず、胸腺(Thymus)、脾臓(Spleen)、リンパ節(Lymph nods))等の組織が崩壊し、免疫不全となり16~40週程度で日和見感染等で死亡するのに対し、弱毒SHIVではウイルス量が減少し、CD4が回復し、抗体が上昇する。33週目におこなった解剖検査における病理所見でもエイズで死亡した強毒SHIVのようなリンパ系組織の崩壊は認めなかった。

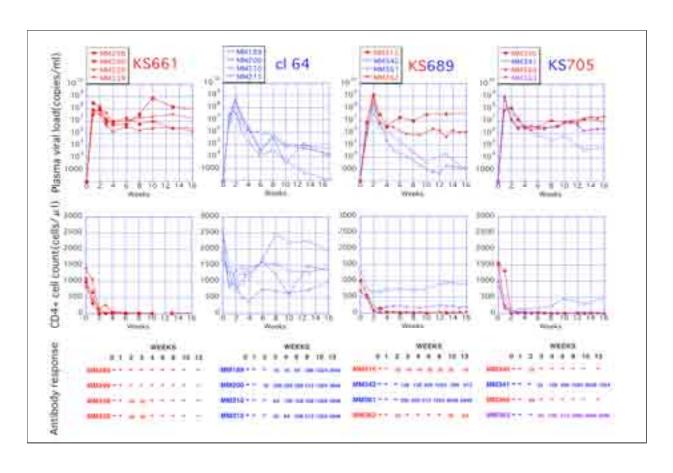


サル個体継代によるウイルスの強毒化と解析に用いたSHIVの由来の説明(国立感染症研究所、阪井弘治博士提供)。米国のハーバード大学の研究グループが89.6というHIV-1の臨床分離株由来の分子クローンのenv遺伝子領域をSIVmacの分子クローンと組合わせることによりSHIV-89.6を作製した。このSHIV-89.6は、アカゲザルに感染はするが非病原性であった。これをアカゲザルで個体継代することにより強毒化に成功したウイルスストックがSHIV-89.6P株である。我々は、SHIV-89.6P株を譲り受け、ゲノムの後半部分をクローニングして、本源のSIVmacに繋いだものを作製した。これが弱毒分子クローンSHIV-cl 64である。一方、国立感染症研究所の研究グループは、アカゲザルで継代途中のウイルスp-SHIV株を譲り受け、カニクイザルで継代することにより強毒ウイルスストックSHIV-C2/1株をとり、そのコンセンサスシークエンスをもとに分子クローンを人為的に作製した。これが強毒分子クローンSHIV-KS661である。我々は、感染研のグループと共同で強毒分子クローンSHIV-KS661と弱毒分子クローンSHIV-cl 64の比較解析を進めている。

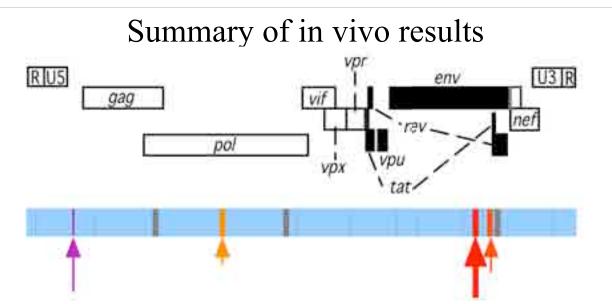
ここで、ストックウイルス(株)と分子クローンの違いについて説明する。エイズウイルスは、非常に変異の激しいウイルスであり、1回の複製でもゲノム中にランダムに数カ所の変異が入る。従って、ウイルスストックは様々な変異を含んだ不均一なゲノム集団となり、ゲノムの塩基配列を一義的に決定できない(ただし、コンセンサス配列を決定することは可能)これに対して、分子クローンは大腸菌のプラスミドベクター上に構築されたプロウイルスDNAであり、基本的には同一種の分子で構成される均一なゲノム集団である。ゲノムの塩基配列は一義的に決定され、ゲノムの組換えはこの分子クローンに対して行う。しかし、この分子クローンから感染性のウイルスを調整し、ウイルス自身の複製サイクルが始まると様々な変異が入りこむので、ウイルス株となる。このスライドのSHIV-89.6は分子クローンであるが、そこから調整した感染性ウイルスをアカゲザルで継代し、変異を蓄積したSHIV-89.6P株はストックウイルスである。そして、SHIV-89.6P株という多様なゲノム集団の中の1つの分子をクローニングしたものがSHIV-cl 64である。同様に、SHIV-C2/1株は、ストックウイルスであるが、そのゲノム集団のコンセンサス配列を決定し、人為的にプラスミド上に構築した分子クローンがSHIV-KS661である。



強毒SHIVと弱毒SHIVの培養細胞レベルでの性状解析の結果。強毒SHIV-KS661は弱毒SHIV-cl 64と比べると、同量のプロウイルスDNAから産生される逆転写酵素活性が数倍高く、抗原量当たりの感染価が数十倍高い。そして、これら強毒/弱毒SHIVのゲノムを部分的に入れ替えたウイルスを調べることにより、抗原量当たりの感染価の増強はenv gp41の2ケ所のアミノ酸変異により規定されており、プロウイルスDNA量当たりのウイルス産生量の増強は、pol遺伝子あるいはvpr遺伝子における変異に起因するものと考えられた。そこで、培養細胞レベルでの性状と感染個体における病原性との関係を調べるために、これら強毒/弱毒SHIVのゲノムを部分的に入れ替えたウイルス(KS689とKS705)をアカゲザルに接種することにした。



サル接種実験の結果。上段が血漿中ウイルス量、中段が末梢血CD4 陽性細胞数、下段が血漿中のHIV-1に対する抗体価。まず、強毒 SHIV-KS661は、静脈内接種により4頭中4頭で、高いウイルス量が 持続し、末梢血中のCD4陽性細胞が枯渇し、ウイルスに対する抗体産 生がほとんど認められないのに対し、弱毒SHIV-d 64は、血漿中ウイ ルス量が抑制され、CD4は一過性の減少の後復活し、高い抗体産生が 認められる。さて、ゲノムの前半部分が強毒SHIV由来のKS689は、4 頭中2頭が強毒型(赤色で示した)、残り2頭が弱毒型(青色で示し た)の病態を呈した。env遺伝子領域を中心とする部分が強毒SHIV由 来のKS705は、4頭中2頭が強毒型(赤色で示した)で、1頭が弱毒 型(青色で示した)の病態を呈し、残り1頭は高いウイルス量の持続 と末梢血CD4陽性細胞の枯渇がありながら、高い抗体産生があるとい うユニークなパターン(紫色で示した)を示した。つまり、強毒/弱 毒SHIVのゲノムを部分的に入れ換えたウイルスは、親株である強毒/ 弱毒SHIVの中間型の病原性を示すという結果となった。この結果は、 感染個体レベルでの病原性に重要な変異は、入れ換えた部分のどちら かに集中してはおらず、各々に存在することを示唆している。これら 病態がわかれた8頭のサルについて、分岐点になっている4週の時点で の血漿中のウイルスの全ゲノムを解析し、そこで起きている変異を調 べた。また、エイズを発症して死亡したサルについて死亡時のウイル スの変異を同様に調べた。



今回比較した強毒/弱毒SHIV分子クローン間の塩基配列の違いは全ゲノム中16ヶ所であったが、それらを部分的に入れ替えたウイルスをサルに接種したところ、各々強毒型と弱毒型の病態を示すものにわかれた。感染サルの4週目の血漿中のウイルスの全ゲノム解析によって、envgp41の1カ所のアミノ酸変異とprimer binding siteの1ケ所の塩基置換がin vivoでの増殖能に必須であると考えられた。さらに、死亡時のサルのウイルス変異解析により逆転写酵素の1ケ所とgp41の他の1ケ所も病原性に関与することが示唆された。

感染サルの4週目の血漿中のウイルスの全ゲノム解析によって、env-gp41の1カ所のアミノ酸変異(赤大矢印)とprimer binding site の1ケ所の塩基置換(紫矢印)が、感染個体レベルでのウイルス増殖に非常に重要であることが示された。さらに、死亡時のサルのウイルス変異解析により逆転写酵素遺伝子の1ケ所のアミノ酸変異(オレンジ矢印)とenv-gp41のもう1ケ所のアミノ酸変異(赤小矢印)が病原性に関与することが示唆された。すなわち、今回比較した強毒/弱毒SHIV分子クローン間の塩基配列の違いは約10,000塩基の全ゲノム中16ヶ所(約0.16%)であったが、このうち真に重要な変異はわずか4箇所であるということを示唆する結果となった。この結果は、培養細胞レベルでの性状解析結果ともほぼ一致する。今後、今回クローズアップされた変異の意義を分子メカニズムのレベルで追究していく予定である。

強毒/弱毒分子クローンウイルスのサル感染実験系を用いることにより、 SHIVの病原性を遺伝子レベル、培養細胞レベルおよび感染個体レベルで統合的に解析することが可能となり、今後エイズの病態解明に寄与するものと期待される。