

氏名(本籍) 石田 憲正(兵庫県)

学位の種類 博士(医学)

学位記番号 博士第498号

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位授与年月日 平成17年3月25日

学位論文題目 Pathogenic Potentials of gC-negative Syncytial Mutants from Persistently HSV-1-infected T cells of Rabbit

(T細胞に持続感染した単純ヘルペスウイルスの変異と毒性)

審査委員

主査 教授 小笠原 一誠

副査 教授 堀池 喜八郎

副査 教授 田中 俊宏

論文内容要旨

※整理番号	502	(ふりがな) 氏名	いしだ よしまさ 石田 憲正
学位論文題目	Pathogenic Potentials of gC-negative Syncytial Mutants from Persistently HSV-1-infected T cells of Rabbit. (T細胞に感染した単純ヘルペスウイルスの変異と毒性)		
<p><目的> 単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) は初感染に続いて知覚神経節の神経細胞に潜伏感染し、回帰発症を繰り返す事が特徴として知られているが、白血病細胞にも持続感染することが報告されている。我々は家兎由来の T 細胞株に HSV-1 を感染させて持続感染細胞株を樹立することができた。この HSV-1 持続感染 T 細胞株を感染後 2 年に渡り、維持すると、巨細胞の形成が観察され、産生されるウイルスに変異が出現する事が示唆されたので、今回、持続感染中に生じた変異ウイルスはどのような性状を持ち、どのような毒力を持つか調べた。</p> <p><方法> ブラック純化によってストック・ウイルスから、単一のクローンを分離し、これを親株として、T 細胞株に感染させ、変異株出現の有無を調べた。その結果出現した変異株を任意に 4 つ選び、それぞれ i2,i7,i10,i11 と名付けた。</p> <p>1. 変異ウイルスの性状の解析 a. 免疫染色；抗 gB/gC マウス単クローン抗体を用いた。b. 変異株の gB/gC 遺伝子の DNA 塩基配列の決定；HSV-1gB/gC 遺伝子断片を PCR によって増幅して行った。2. 変異ウイルスの毒力の解析。a. ウイルス感染後の生 T 細胞数の比較；HTLV-1 でトランスフォームされた家兎 CD8+T 細胞株 B761.KB042 にウイルスを感染後、5 日目に生細胞数を算出して比較した。b. ウイルス複製能の比較；T 細胞株 B 7 6 1 にウイルスを感染後、6 日間のウイルス価の変動を、Vero 細胞を用いて調べた。c. 補体感受性；ウイルスに家兎の新鮮血清または、非働化処理をした血清を加え、37℃において、60 分間反応させた後、ウイルスの力価を測定した。d. 脳炎発症能の有無；家兎にウイルスを静注して決定した。e. ウイルスの体内伝播；ウイルスを家兎に静注後、感染から 3 日目、6 日目、8 日目に各臓器から DNA を抽出してウイルスゲノムの存在を PCR を用いて調べた。</p> <p><結果> 持続感染中にどのような変異ウイルスが生じるか調べるために、ブラック純化した単一のクローンウイルスを T 細胞に感染させて、持続感染系を樹立した。この培養上清を Vero 細胞に感染させると、正常なウイルスでは見られないシンシチウムの形成が確認されたので、変異ウイルスが持続感染中に新たに出現した事が示された。この系で出現した 4 つの変異株 i2,i7,i10,i11 に対して、抗 gB/gC 抗体を用いて免疫染色を行うと、gB は調べた全ての変異株で陽性であったが、gC については変異株 i2,i7 で陰性となっていた。シンシチウム形成と gC 陰性の性状から、gB/gC の遺伝子に変異があることが示唆された。そこで、gB/gC 遺伝子の塩基配列及びアミノ酸配列を決定した結果、gB 遺伝子については、変異株 i7 において点変異が認められた。また、gC 遺伝子については、調べた全ての変異株に点変異、挿入の変異が認められ、その結果、変異株 i2,i7 ではアミノ酸配列においてストップ・コドンが生じており、完全な gC タンパク質が欠失していることが解った。変異ウイルスの毒力を評価する為に、in vitro において、ウイルス感染後の T 細胞の生細胞数を調べると、変異株の生細胞数が親株と比べて低下し、また、ウイルスの複製能も変異株の方が速くかつ強く起こっていた。in vivo では、家兎にウイルスを静注すると、親株と、変異株の混合液となっている持続感染 T 細胞培養上清は脳炎を発症したが、単離した変異株は脳炎を発症しなかった。補体感受性においては、変異株が補体によって不活化される事が明らかになった。ウイルスの体内伝播は、親株は感染三日目には副腎から、六日目には胸臓から、八日目には他の脊髄からウイルスゲノムが検出された。変異株は、八日目に副腎から検出されたのみで、他の臓器からは検出されなかった。</p> <p><考察> HSV-1 を T 細胞に感染させ、持続感染系が樹立するとウイルス変異株が新たに出現し、その中には gC 陰性のものが現れるようになる。糖蛋白 gC には、HSV が補体により不活化されるのを防ぐ働きがある事が知られており、この補体の働きにより in vivo では gC 陰性の変異株は毒力が発揮できないのではないかと考えられている。しかし、今回の実験で変異株の混合液となっている持続感染 T 細胞培養上清を静注した兎の脳炎組織から gC 陰性の変異株が分離された。この変異株の性状を調べると in vitro では毒力を増していたが、in vivo では毒力を発揮しなかった。この現象は HSV 個々のウイルスで侵襲性がないものでも、混合すると互いに補完しあって病原性を発揮するというコンプリメンテーションによって説明されると考えられた。我々が樹立した持続感染系はこのコンプリメンテーションという現象を解析するのに有用なシステムになりうると考えられる。</p> <p><結論> HSV-1 持続感染 T 細胞株では、持続感染中にウイルス変異株が新たに出現して優勢となり、変異が gB/gC 遺伝子に認められた。また、持続感染中に生じたウイルス変異株では in vitro の毒力が増強したが、in vivo の毒力の増強は認められなかった。単独では毒力を発揮しなかった変異株も、混合感染すると、コンプリメンテーションにより毒力を発揮しうることを明らかにした。</p>			

(備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	502	氏名	石田 憲正
<p>(学位論文審査の結果の要旨)</p> <p>試問内容は以下の通りである。</p> <ol style="list-style-type: none">1) ヘルペス脳炎発症時のHSVの伝播経路について。2) コンプリメンテーション説の妥当性について。3) 変異ウイルスの臨床的意義について。4) 近交系家兎B/Jas系の易感染性のメカニズムについて。5) ウイルス感染症に対する本研究の意義について。 <p>以上の質問に対し、適切な解答が得られた。</p>			
<p>(平成17年 2 月 3 日)</p>			