

AIDS ウイルス感染個体における CD8 陽性細胞 の役割に関する研究

坪田 大¹ Norman L. LETVIN²

1. 札幌医科大学耳鼻咽喉科学講座 (主任 形浦昭克 教授)

2. Harvard Medical School, New England Regional Primate Research Center

Studies of CD8⁺ Lymphocytes of AIDS Virus-Infected Individuals

Hiroshi TSUBOTA¹ and Norman L. LETVIN²

1. Department of Otorhinolaryngology (Chief: Prof. A. KATAURA)

2. Harvard Medical School, New England Regional Primate Research Center

ABSTRACT The roles and characteristics of CD8⁺ lymphocytes of naturally HIV-1-infected humans and SIV_{mac}-infected rhesus monkeys were investigated. In this series of experiments, we showed that CD8⁺ lymphocytes, with the phenotype of CTL, inhibit virus replication in autologous CD4⁺ cells in vitro.

The virus inhibitory cell population requires time for generation. The cells do not express NK-associated antigens, and are thought to be class I MHC-restricted. Their surface phenotype is CD29 rather than CD45R. Their virus inhibitory function requires cell-to-cell contact via the CD11a molecule and some of the epitopes of the CD8 molecule.

Interestingly, in the course of our study, we revealed that CD8⁺CD4⁻ lymphocyte lines established from AIDS virus-infected individuals not only showed CTL activity, but also could harbor AIDS virus.

(Received January 18, 1991 and accepted February 4, 1991)

Key Words: AIDS virus infection, CD8⁺ lymphocyte, Cytotoxic lymphocyte, MHC restriction, Cell-to-cell contact

1 緒 言

後天性免疫不全症候群 (AIDS) は、ごく最近になってその存在が明らかとなり、医学的にも社会的にも大きな問題に発展し関心を集めている疾患である。すでにその原因ウイルスとして、ヒトレンテウイルスに分類される HIV-1 が分離され^{1,2)}、そのレセプターが CD4 分子であることも明らかにされている^{3,4)}。さらに第二の AIDS ウイルスである、HIV-2 も発見されている⁵⁾。

HIV-1 および HIV-2 は、ヒトから分離されたレンテウイルスであるが、他の霊長類からも、数種類の性質の極めて類似したレトロウイルスが分離され、SIV と命名されている⁶⁾。

HIV-1 はヒトの他にはチンパンジーにのみ感染が認められており、また今までのところ、実験的に HIV-1 の接種をうけたチンパンジーのなかからヒト AIDS 類

似の免疫不全症を発症したという報告は無い⁷⁾。

しかし、SIV のうち、アカゲザルから分離された SIV_{mac} は、感染をうけたサルに、皮膚の発赤、リンパ節腫大、呼吸器系、消化管、中枢神経系の日和見感染等を生じ死に至るといふ、極めてヒト AIDS に似た病態を生じさせることが知られ⁸⁾、ヒト AIDS の有用な動物モデルとして注目され、かつ利用されている。

AIDS に関して、その病態を理解する事が、治療の上からも予防の上からも、非常に重要な事は、他の感染症と同様、論を待たないであろう。特に、AIDS の本質が、宿主の免疫機構の崩壊にあるだけに、その過程で、宿主の免疫系が AIDS ウイルスの感染に対し、どう反応していくのかは、大いに興味のもたれるところである。

すでにヒト HIV-1 感染無症候性キャリアーにおいて、その末梢血中の CD8 陽性細胞が、自己 CD4 陽性細胞

での HIV-1 の複製を阻害する事が報告されている⁹⁾。同様の現象は、SIV_{mac} 感染アカゲザルにおいてもみとめられている¹⁰⁾。これらのことから、CD8 陽性細胞が AIDS ウイルス感染宿主の免疫反応において重要な役割を果たしていることが、容易に想像される。

今回我々は、このような CD8 陽性細胞の動態を明らかにする目的で、以下の実験をデザインし、いくつかの示唆に富む結果を得た。

2 実験方法

2.1 リンパ球の分離と培養

末梢血リンパ球 (PBL) は、実験的に SIV_{mac} に感染させられたアカゲザル、および HIV-1 感染無症候性キャリアーのヒトより得た。ヘパリン加静脈血から Ficoll-Diatrizoate 比重遠沈法によって PBL を分離し、10% ウシ胎児血清 (FCS) 加 RPMI1640 培養液中に再浮遊し、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の ConA によって 3~4 日間刺激した後 ConA を除いて以下の実験に用いた。これらの細胞を以後 2 U/ml の IL-2 (E. I. DuPont, USA) の存在下に維持した。

2.2 CD8 陽性細胞の除去

CD8 陽性細胞は、パンニング法によって、ConA 刺激後の全 PBL から除去した。

ConA 刺激 PBL 分画をまず $1 \times 10^7/\text{ml}$ の濃度で、腹水にして終濃度 1:100 のマウス抗 CD8 モノクローナル抗体 (MoAb) と、4°C にて 40 分間インキュベートした。続いて 1% FCS 加 PBS にて 2 回洗浄した後、 $0.5 \times 10^7/\text{ml}$ の濃度で 1% FCS 加リン酸緩衝液 (PBS) に再浮遊した。別に用意した、10 μg のウサギ抗マウス IgG 抗体でコーティングされ、1% FCS 加 PBS でプレインキュベートされた 10 cm 径のプラスチック・ディッシュに、上記の細胞浮遊液 3 ml を入れた。4°C で 90 分間のインキュベートの後、非附着細胞を採取して洗浄のうえ、CD8 陽性細胞除去リンパ球分画として用いた。必要に応じて附着細胞をシリンジの内筒でこすりとり、CD8 陽性細胞分画として用いた。

2.3 逆転写酵素活性 (RT 活性) の測定

細胞培養上清中の RT 活性は既述のようにして測定した¹¹⁾。

2.4 NK 細胞の末梢血単核球からの除去

NK 細胞は、Antibody-dependent complement lysis により除去した。

NK 細胞関連抗原を認識する抗体として、抗 CD56 (抗 NKH-1, J. Ritz) と抗 CD16 (抗 Leu11b, Becton-Dickinson, USA) を用いた。補体はウサギ補体

(Pel-Freeze, USA) を用いた。細胞と抗体との比は、抗 NKH-1 (3B8) の腹水を用いた場合、1:200 希釈の腹水に対し細胞 $2 \times 10^7/\text{ml}$ の割合いで、抗 Leu11b では、細胞 1×10^6 個に対し免疫グロブリン量 1 μg になるように調製して用いた。

2.5 リンパ球サブセットの分離

リンパ球サブセットの分離は Complement lysis とパンニング法との組み合わせによった。

まず 3 ないし 4 日間 ConA によって刺激したヒトあるいはアカゲザルの PBL から CD4 陽性細胞を、マウス抗 CD4MoAb19Thy5D7 (S. Schlossman) と、ウサギ補体とを用いた Complement Lysis により除去した。続いて、こうして得た CD8 陽性細胞濃縮分画を、パンニング法によって、2H4 (CD45R) 陽性細胞分画と、同陰性分画とに分離した。

最終的に分離されたサブセット中の 2H4 陽性細胞の割合は、同陽性細胞分画中に 80% 以上、同陰性細胞分画中に 10% 以下であった。

2.6 フローサイトメトリー

各リンパ球サブセットの抗原発現を、フローサイトメトリーにて解析した。

すなわち、1 サンプルあたり 1×10^6 個の細胞に対し 50 μl の、腹水にして 1:200 ないし 1:1000 の希釈のマウス MoAb を加え、4°C で 45 分間インキュベートの後、PBL で 1 回洗浄した。次に、FITC 結合ヤギ抗マウス IgG 抗体を 2 次抗体として加え、さらに 4°C で 45 分間インキュベートした。1 次抗体の isotype が IgM の場合は、2 次抗体として FITC 結合ヤギ抗マウス IgM 抗体を用いた。単染色であれば、細胞をここで PBS にて 1 回洗浄し、1% ホルマリン加 PBS に再浮遊して、EPICS-CS (Coulter, USA) にてその蛍光強度を測定した。二重染色の場合は、洗浄後の細胞に Phycoerythrin 結合マウス MoAb を加えインキュベートした。

2.7 細胞間接触の阻止

細胞間接触の阻止には以下の MoAb、抗 CD8 (21Thy2D3, 7Pt3F9, 7Pt4F12, 1mono2E7, S. Schlossman, 6B7, 6F7, C. Morimoto, MT122, P. Rieber) 抗 CD2 (3Pt2H9, S. Schlossman) 抗 CD11a (2F12, J. Ritz) 抗 CD11b (904, S. Schlossman) ネガティブコントロール (5E5C) を用いた。

2.8 細胞傷害性リンパ球 (CTL) line の樹立

SIV 感染アカゲザルの末梢リンパ球より、SIV を発現した HTLV-1 トランスフォーム細胞を作製し、これを刺激源として CTL line を樹立した。

比重遠沈法により分離した PBL を 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の PHA

で3日間刺激し、 $50 \mu\text{g/ml}$ のMMCにて 37°C で45分間処理を行った、同数のHTLV-1産生細胞とともに培養、約3週間の後にトランスフォーム細胞を得た。このトランスフォーム細胞をさらにSIVに感染させ、SIV発現HTLV-1トランスフォーム細胞とした。

次に、同じアカゲザルより得た新鮮なPBLを、MMC処理とUV照射を受けた同数のSIV発現HTLV-1トランスフォーム細胞とともに 4 U/ml のIL-2を含む15%FCS加RPMI1640培養液中に培養し、一週間ごとに同じ処理をしたSIV発現細胞を追加した。約5週目から、刺激に用いているSIV発現細胞に対する細胞傷害性を ^{51}Cr リリース法によって測定し、CTL lineを選択した。それらのlineを、MMC処理およびUV照射を行った刺激細胞により10日ごとに刺激することで、3カ月以上、細胞傷害性を保ったままで維持し得た。

2.9 免疫電子顕微鏡法

検鏡に用いた細胞は、 3×10^6 個を、はじめマウス抗CD4あるいは抗CD8MoAbとインキュベートし、その後、Auでラベルしたウサギ抗マウスIgG抗体を2次抗体として加えた。2次抗体の希釈はゲラチン加PBSで行った。1%Glutaraldehyde加cocadylate bufferにて一晚固定の後1%Osmium tetroxideの固定を行い、エポキシレジンに包埋した。標本を薄切後、UranylacetateとLead citrateにより染色し、JOEL100S型電子顕微鏡にて加速電圧60 kVで観察した。

3 成績

3.1 自己CD8陽性細胞による、SIVキャリアーアカゲザル末梢CD4陽性細胞からのSIV複製の抑制

SIVキャリアーであるアカゲザルのPBLを3日間ConAで刺激しIL-2存在下の*in vitro*の培養の場合、培養上清中のRT活性は殆どみとめられないか、あってもわずかであった。しかし、パンニング法によってそれらの細胞からCD8陽性細胞を除去した後は、多くの例で著しいRT活性の増大、従ってSIV複製の増加がみられた。この実験におけるCD8陽性細胞除去の意義を確かめるため、いったんパンニング・プレートに付着したCD8陽性細胞を回収し、CD8陽性細胞を除去した自己の末梢血単核球に再添加して培養を行うと、その培養上清中のRT活性は、全単核球分画と同レベルであった。これら一連の実験は、SIVキャリアーのアカゲザルのPBL中CD8陽性細胞自体に、自己の末梢CD4陽性細胞からのSIV複製を抑制する、何らかの働

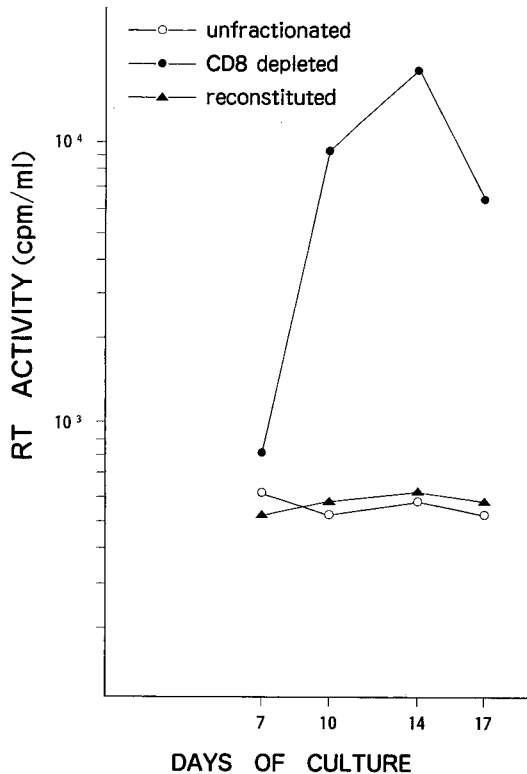


Fig. 1 Inhibition of the generation of RT activity in CD8⁺ cell-depleted PBL from SIV_{mac}-infected rhesus monkeys by autologous CD8⁺ lymphocytes. ConA activated PBL were left unfractionated or CD8⁺ cells were depleted by panning and they were maintained in IL-2-supplemented medium. 5×10^6 autologous CD8⁺ lymphocytes were added back to 5×10^6 CD8⁺ cell-depleted cells. RT activity was monitored as an indication of virus replication. The horizontal scale indicates the days after the preparation of PBL from the monkey.

きが備わっていることを示している (Fig. 1)。

3.2 SIV複製を抑制するCD8陽性細胞の末梢血中への出現の経時的变化

SIVキャリアーの末梢血中に含まれるSIV複製抑制性CD8陽性細胞が、SIV感染後いつから出現するのかをprospectiveに追跡した。

SIV慢性感染H9細胞の培養上清の1mlを皮下注射された4匹のアカゲザルから定期的な静脈血採血で得たPBLをConAにて3日間刺激した後、パンニング法

によってCD8陽性細胞を取除き、IL-2存在下に維持して、その培養上清中のRT活性を測定した。同時に、ConAで刺激されたPBLの一部を、そのままIL-2存在下に培養し、その上清中のRT活性を測定した(Table 1)。

ウイルス接種13日目までは、#161のサルを除き、CD8陽性細胞除去分画、非除去分画の培養上清中におけるRT活性には、大きな差はみとめられなかった。しかし、30日目では#179、#244の2匹においてもその差が開き始め、60日目では全てのサルにおいてSIV複製抑制性CD8陽性細胞の存在が認められた。

Table 1 Time required for generation of CD8⁺ cell population that inhibits AIDS virus replication after virus inoculation

animal	days after inoculation			
	13	30	60	90
#129	1.7*	2.0	4.2	8.0
#161	20.6	5.3	14.6	27.2
#179	2.6	5.3	10.9	25.5
#244	1.2	14.2	8.2	12.3

* Ratio calculated as follows

Peak RT activity (cpm/ml) of CD8⁺ cell depleted culture supernatant
 Peak RT activity (cpm/ml) of unfractionated PBL culture supernatant
 (modified from reference 12)

Table 2a Virus replication in PBL of SIV_{mac}-infected Rhesus Monkeys after elimination of NK-associated antigen expressing cells

treated with complement and	positive cells*		RT activity		
	before treatment	after treatment	day 11	day 17	day 24
	%		cpm/ml × 10 ⁻³		
# 161					
5E5C†	2	1	0.66	0.46	0.70
anti-CD8	54	3	0.94	1.94	42.29
anti-CD16	4	<1	0.47	0.74	0.23
anti-CD56	5	<1	0.79	0.48	0.50
# 179					
5E5C	1	1	0.66	0.63	0.48
anti-CD8	36	1	1.12	9.12	6.23
anti-CD16	5	<1	0.44	0.54	0.56
anti-CD56	5	<1	0.63	0.56	0.43

* determined by flow cytometric analysis

† negative control antibody

Table 2b Virus replication in PBL of HIV-infected humans after elimination of NK-associated antigen expressing cells

treated with complement and	positive cell*		RT activity		
	before treatment	after treatment	day 11	day 17	day 21
	%		cpm/ml × 10 ⁻³		
Volunteer #28					
5E5C†	1	1	0.41	0.58	0.50
anti-CD8	28	4	1.26	6.29	6.82
anti-CD16	9	<1	0.46	0.25	0.16
anti-CD56	17	<1	0.61	0.81	0.14
Volunteer #34					
5E5C	1	2	0.44	0.48	0.29
anti-CD8	35	2	11.13	10.06	3.63
anti-CD16	7	2	0.40	0.28	0.22
anti-CD56	9	<1	0.39	0.39	0.37

* determined by flow cytometric analysis

† negative control antibody

3・3 末梢血単核球のNK細胞と、HIVあるいはSIVの複製の抑制

末梢血中のCD8陽性細胞はいくつかの異なるサブセットからなる。それらのうち、いわゆるNK細胞がウイルス抑制現象に関わっているのか否かを検討した。

実験は単純に、ConA刺激PBLからNK関連抗原発現細胞を除去することで行われた。すなわち、HIVあるいはSIVキャリアーから準備したConA刺激全PBL分画から、抗CD56あるいは抗CD16抗体を用いたAntibody-dependent complement lysisによって特定の細胞群を除去してからの、培養上清中のRT活性の変化を観察した。陽性コントロールとして抗CD8抗体(7Pt3F9)、陰性コントロールとしてネガティブ抗体(5E5C)での処理を行い、Table 2の結果を得た。

この実験結果より、ヒトにおいてもサルにおいても、少なくともこうしたin vitroの系では、いわゆるNK細胞は、ウイルス複製の抑制に関与していないことが示された。

3・4 ウイルス抑制現象のClass I拘束性

CD8陽性細胞によるウイルス複製の抑制が免疫学的機序によるものであるとすれば、MHC拘束性の有無が重要な性質の一つとなる。

アカゲザルのMHC phenotypeの決定に適用できるような抗血清は現在開発されていないため、1-dimensional isoelectric focusing electrophoresisをその目的のために行った。互いにClass Iのサブユニットを共有しない3匹のSIV感染キャリアーであるアカゲザルを選択し、このうちの1匹#434からPBLを採取して、ConA刺激とCD8陽性細胞の除去後、培養系に移した。この細胞群にたいし、自己および他の2匹からパンニング法によって準備したConA刺激後のCD8陽性

細胞をそれぞれ加え、それぞれの培養上清中のRT活性を測定した(Table 3)。

まず、CD8陽性細胞の除去により、#434のPBLから、容易にSIVの複製が得られた。このウイルスの複製は、自己のCD8陽性細胞を加えることで抑制された。別に、#51、#291の2匹から得られたCD8陽性細胞をそれぞれCD8陽性細胞を除去した#434のPBLに加えたが、ウイルスの複製は阻害されなかった。#51、#291の2匹とも、自己の細胞の組み合わせでは、CD8陽性細胞がSIVの複製を抑制することはあらかじめ確かめられていた。従ってこの結果は、CD8陽性細胞のもつSIV複製抑制機能が、自己、非自己の違いにより影響されることを示している。CD8分子のナチュラル・リガンドは、Class I分子であり、そのClass Iのprofileがこれら3匹の間で全く共有されていない点から、この現象がClass I拘束性をもつことが推測された。

3・5 CD8陽性細胞の特定のサブセットとSIV/HIVの複製の抑制

つづいて、こうしたウイルス抑制機能がウイルス感染個体の末梢CD8陽性細胞に、一律に備わっているのか、特定の分画のみに存在するのかを、検討した。

CD8陽性細胞を分画することのできる抗原には何種類かが知られている。

試みに、抗2H4抗体(抗CD45R)と抗4B4抗体(抗CD29)を用い、二重染色を行ったところ、ヒトCD8陽性PBLもアカゲザルCD8陽性PBLもともに、それぞれほぼ相補的な二つのサブポピュレーション、CD29⁻CD45R⁺とCD29⁺CD45R⁻との二つに分けられることが示された。しかもヒトにおいては、S6F1抗原の発現がCD8陽性細胞上で、CD29⁺CD45R⁻のサブポピュレーション上に集積されることが示された(Fig. 2a, b)。S6F1は、LFA-1のエピトープの一つであり、CTLのエフェクター細胞に発現が強いことが証明されている¹³⁾。

この性質をもとに、まずComplement lysisを行って、HIVキャリアーのConA刺激PBLからCD8陽性細胞濃縮分画を得、次いで抗2H4抗体を用いたパンニングにより、CD8⁺CD29⁻CD45R⁺および、CD8⁺CD29⁺CD45R⁻の二つの分画を得た。これらをそれぞれ自己のCD8陽性細胞除去PBLに加えて培養した。Table 4のごとく、ウイルス複製は、CD29⁺CD45R⁻細胞の加えられた系では完全に抑制され、逆に、CD29⁻CD45R⁺細胞の加えられた系では、全く阻害されなかった。

SIVキャリアーのアカゲザルにおいても、同様の結果が得られた。

Table 3 Class I-mismatched CD8⁺ cells did not inhibit SIV replication in vitro

CD8 ⁺ cell-depleted lymphocyte of #434		RT activity (cpm/ml)		
		day 7	day 10	day 14
cultured	alone	5510	9234	396
with CD8 ⁺ cell of	#434	417	223	243
	# 51	2160	2272	258
	#249	1318	6716	426

* 0.5×10⁶CD8⁺ cell-depleted lymphocytes prepared from SIV-infected rhesus monkey #434 were cultured alone or reconstituted with the same number of CD8⁺ cells of each SIV-infected monkey as indicated (modified from reference 12)

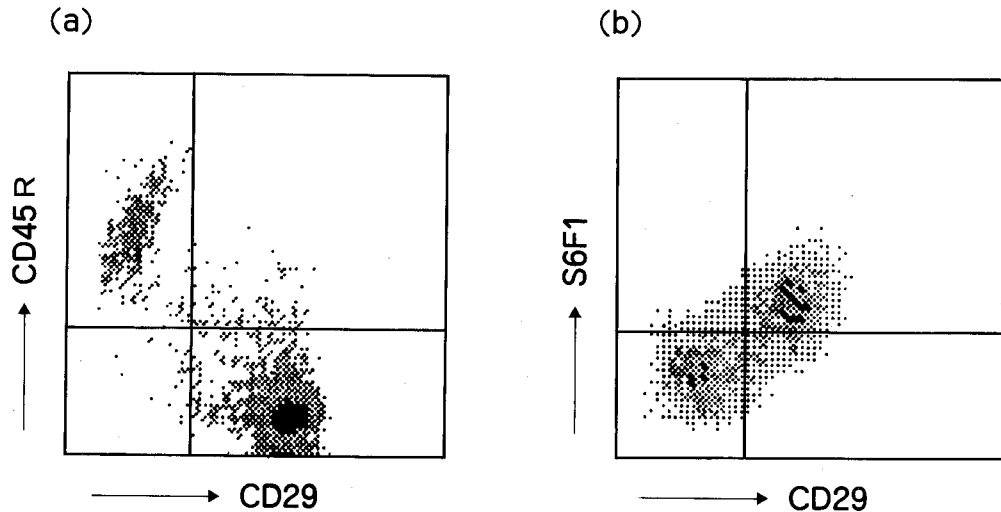
CD8⁺ human PBL

Fig. 2 Flow cytometric analysis of antigen expression on subsets of CD8⁺ human PBL. CD8⁺ cells were enriched by the panning method, then they were depleted of residual CD4⁺ cells by antibody dependent complement lysis. Cells were reacted with described antibodies. The horizontal axis indicates red fluorescence and the vertical axis indicates green fluorescence.

Table 4 CD8⁺CD29⁺CD45R⁻, but not CD8⁺CD29⁻CD45R⁺, lymphocytes inhibit AIDS virus replication in naturally infected autologous CD4⁺ lymphocytes

subset of CD8 ⁺ cells added to CD4 ⁺ cell culture [†]	peak RT activity (cpm/ml)*	
	HIV seropositive human	SIV seropositive rhesus monkey
none	74305	17566
all	8249	4006
CD29 ⁺ CD45R ⁻	903	229
CD29 ⁻ CD45R ⁺	37261	6446

* peak RT activity was observed within 14~21 days of culture

[†] 0.5×10⁶CD8⁺ cell depleted lymphocytes were cultured alone or reconstituted with 0.5×10⁶ cells of a subset of autologous CD8⁺ lymphocytes (modified from reference 12)

3・6 CD8 陽性細胞によるウイルス抑制における細胞間接触の重要性

HIV/SIV 抑制における MHC 拘束性の存在の可能性は、当然、この現象における細胞間接触の重要性を示唆するが、我々は、さらに他の方法によって、そのウイルス抑制への関与を追究した。

細胞間接触を妨げることによって CTL 活性を阻止することが知られている、抗 LFA-1 抗体を用い、HIV キャリアーの ConA 刺激全 PBL 分画を、腹水にして

1:100 希釈の同抗体存在下に、IL-2 加培養液中に培養したところ、高い RT 活性が検出された (Fig. 3a)。また、SIV キャリアーのサルおよび HIV キャリアーのヒトの ConA 刺激全 PBL を、いくつかの異なる抗 CD8 抗体の存在下に培養すると、特定の抗体でのみ RT 活性の上昇がみとめられ、他の抗体では変化は認められなかった (Fig. 3b)。

これらのことは、ウイルス抑制の発現にはまず、LFA-1 分子を介した細胞間接触が必要であり、同時に、その

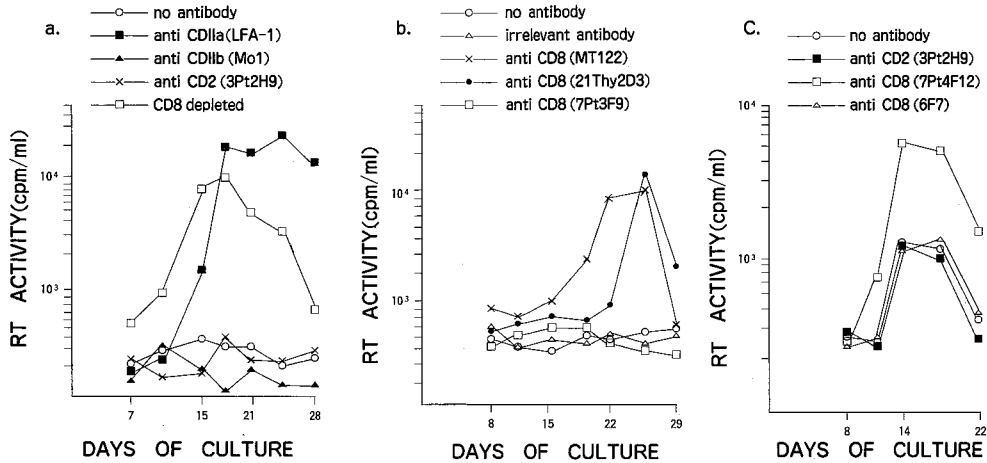


Fig. 3 Virus replication is facilitated in PBL of an HIV-1-infected human (a, b) or an SIV_{mac}-infected rhesus monkey (c) by the addition of indicated antibodies. Human PBL cultured in the presence of other anti-CD8 MoAb (7Pt4F12, 6F7, 1Mono2E7) and monkey PBL cultured in the presence of another anti-CD8 MoAb (7Pt3F9) did not generate RT activity (data not shown). (modified from reference12)

CD8陽性細胞上のCD8分子の特定の部分、ないしエピトープが細胞間接触に関わっていることを示唆している。

3.7 SIV特異的CTL lineにおけるSIVの発現

SIV感染個体におけるCD8陽性細胞の役割を調べるための別の方法として、代表的CD8陽性細胞群であるCTLのCell lineの樹立を試みた。そのために、反復する抗原刺激によって特定のクローンを拡大させる方法を用いた。

樹立されたlineは、自己由来のSIV感染トランスフォーム細胞に対して細胞傷害性を有し、自己のSIV非感染トランスフォーム細胞やアロ由来のSIV感染トランスフォーム細胞に対しては、キラー活性を示さなかった。またそれらのphenotypeはCD2⁺CD4⁻CD8⁺CD56⁻であった。

いくつかのCTL lineの培養上清を試みに調べてみたところ、うち二つにおいて高いRT活性が見出された。そこでこれらの細胞を、抗SIVサル血清で染色すると、細胞質に強い染色性が見とめられた。さらにそのうちの一つT127-10を、抗CD8抗体とAu標識2次抗体とを用いて、免疫電顕法にて観察すると、CD8抗原を有する細胞表面からSIVがbuddingしており、また細胞質内にも、完全なウイルス粒子が含まれているのがみとめられた。

以上の事実より、SIV特異的な細胞傷害性を有するCD8陽性細胞が、同時にSIVに感染し、そのreservoirとなりうる事が明らかとされた。

3.8 HIV/SIV感染個体より得られた末梢CD8陽性

細胞におけるHIV/SIVの感染

こうした、CD8陽性細胞におけるSIVあるいはHIVの感染が、レクチンで刺激しただけのPBLの培養系においてもみとめられるのか否かを、検討した。

SIVキャリアーのアカゲザルあるいはHIVキャリアーのヒト静脈血よりPBLを分離し、10 μg/mlのConAで3日間刺激した後、IL-2加培養液中に維持した。そして、間接蛍光抗体法によってCD4、CD8抗原の発現のパーセンテージ、培養上清中のRT活性をモニターした (Fig. 4a, b)。

サルにおいてもヒトにおいても、培養10~18日目までにまづ一つのRT活性のピークがみとめられた。これらは一般に、CD8陽性細胞除去PBLにおけるピークよりも遅く現れ、活性も低かった。この時点では、培養細胞全体はその50%以上がCD4陽性であった。

ついで、サルでは42~45日、ヒトでは84~100日目に、数例で第二のピークがみとめられた。

この時点では、培養細胞全体は80%以上のCD8陽性細胞と、1%以下のCD4陽性細胞からなっていた。そこでこの第二のピークにおいて、間接蛍光抗体法を用いて、ヒトPBLのp24抗原発現を調べると17%で陽性であった。

同時に抗CD8抗体を用いた免疫電子顕微鏡法を行い、CD8陽性細胞の表面からのHIVのbuddingが観察された (結果を呈示せず)。

これらのことから、ヒトおよびアカゲザルの末梢CD8陽性リンパ球が、HIVあるいはSIVのreservoirとなり得ることが示された。

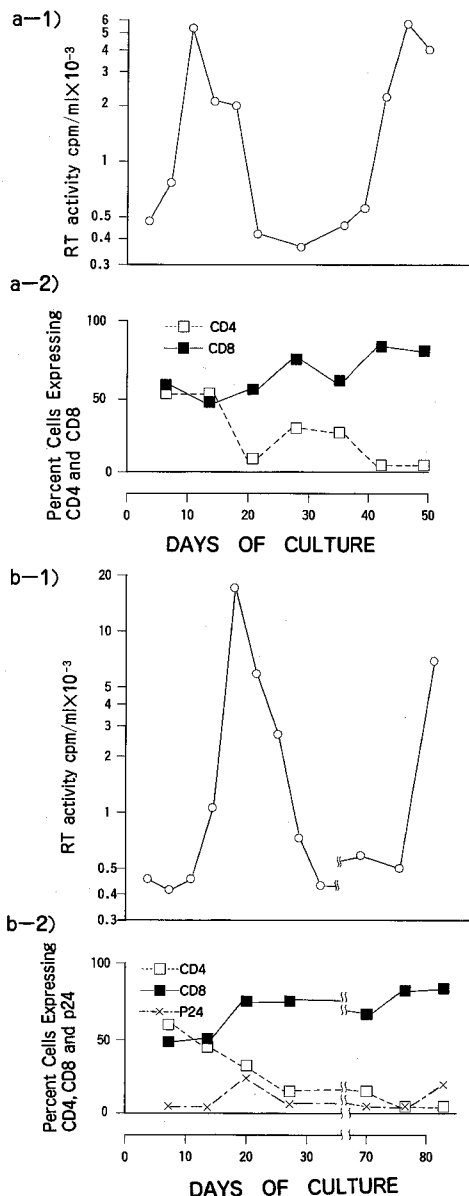


Fig. 4 Kinetics of phenotypic change of lymphocyte and generation of RT activity in a lymphocyte line of an SIV-infected rhesus monkey and an HIV-1-infected human. PBL were obtained from healthy virus-infected individuals, ConA stimulated, then maintained in IL-2 supplemented medium. Cells were placed on slides weekly for phenotypic analysis by indirect immunofluorescence. Expression of an HIV-1 core antigen p24 was also analyzed by indirect immunofluorescence. (modified from reference 14)

4 考 察

AIDSは、免疫担当細胞が直接ウイルス感染の標的となる特異な性格を持っているが、感染症である以上、それに対する宿主の免疫応答が何らかの形で進行しているはずである。特にウイルス感染から発症までの期間が非常に長いことから、ウイルス自体にそうした性質が備わっているのみならず、宿主側にも、免疫系を介したある種の調節力が存在していると考えられる。

我々は今回、CD8陽性細胞が、HIV/SIV感染系においてどのような役割を果たしているのかを追究するために、いくつかの実験を行った。

CD8陽性細胞が、自己のCD4陽性細胞におけるHIVの複製を抑制する能力を有していることが、HIVキャリアーの末梢血リンパ球において見出された。

実験をモデル化するため、SIV感染アカゲザルにおけるCD8陽性細胞のウイルス抑制能を調べ、HIV/ヒト系と非常に類似した結果が得られたので、SIV/アカゲザルの系にみとめられた現象を、HIV/ヒトの系に応用することができるものと判断した。

CD8陽性細胞のウイルス抑制能が本来から備わった(すなわち抗原非特異的と考えられる)ものか、あるいはその発現に、ウイルス感染から一定の期間を要する(すなわち、ある特定の細胞集団の量的増大を必要とする—従って抗原特異性が考えられる)ものかを、4匹のアカゲザルを用い、prospectiveに観察した。その結果、ウイルス抑制性CD8陽性細胞の出現までには2—4週が費やされることがわかった。

さらに、NK細胞とウイルス抑制細胞との関係を、培養系からNK関連抗原発現細胞を取除くという方法で調べたところ、ウイルス抑制細胞の主体は、少なくともNK関連抗原を持ってはいないことが示された。

これら二つの実験結果は、ウイルス抑制細胞が、抗原特異的なクローンの拡大によって生じてくる可能性を強く示唆した。そのため続いてそのClass I拘束性の有無が検討の対象となった。

Class I拘束性について、こうした系で直接検討するのは困難であった。なぜならば、アカゲザルもヒトと同じくoutbredなコロニーであり、Class Iのprofileの完全に一致した二つの個体を用いてそれらの関係を比較することは容易ではないからである。

今回の我々の実験では、allogeneicの系では、CD8陽性細胞によるウイルスの抑制が働かないことから、この現象におけるClass I拘束性の存在が示唆された。Class II拘束性の可能性もこの実験結果より否定される

ものではないが、ウイルス抑制細胞の主体がCD8陽性細胞である以上、Class I拘束性を考えるほうがより合理的であると考えられる。

こうしたCD8陽性細胞が、phenotypeのうえから区別されないかという試みにおいては、ウイルス抑制性細胞のそれは、ヒトにおいてCD8⁺CD29⁺CD45R⁻S6F1⁺、サルにおいてCD8⁺CD29⁺CD45R⁻であった。

CD29はインテグリンのメンバーであり¹⁵⁾、S6F1は、CD11aのエピトープのひとつであることから、細胞間接触とウイルス抑制現象との関係が次に検討された。

単核球細胞分画が抗CD11a抗体の存在下に、または特定の抗CD8抗体の存在下に培養された時に、高いRT活性が培養上清中に見出された。これは、それらの抗体によってCD8陽性細胞の活性化が非特異的に阻害されるために生ずる現象ではなく、抗体によって、特定のエピトープを介した細胞間の接触が妨げられて、ウイルス抑制現象が破綻したものと考えられた。

CD3分子のperturbationによって誘導される細胞カルシウムイオン濃度の上昇を強力に抑制して細胞の活性化を阻害すると考えられている抗CD8抗体6F7が、今回の実験系では全くウイルスの抑制に影響を与えなかったことは、その根拠の一つである。

以上のような、ウイルス複製を抑制するCD8陽性細胞の性質は、いわゆる古典的CTLのそれと、非常に良く類似しており、少なくともphenotypeの上からは、ウイルス抑制CD8陽性細胞は古典的CTLと同一の群に属すると言いうことができる。

しかし、最近では、CD8陽性細胞から分泌されウイルスを抑制する、可溶性因子の存在を示唆する報告などもみられるもの¹⁶⁾、ウイルス抑制のメカニズムの詳細は未だ不明である。

臨床的には、比較的前後良好なHIV感染症の一型であるDiffuse Infiltrative CD8 Lymphocytosis Syndromeにおいては、CD8⁺CD29⁺細胞が非常に優位であるという報告があり¹⁷⁾、今回の我々の実験との関連が興味深い。

これらの実験の間にもみとめられた、CD4⁻CD8⁺細胞におけるウイルス感染の事実も興味深いものである。感染を認めたものの一つは、CTL活性を有したCD8陽性細胞であり、もう一つは、中・長期培養をした末梢のCD8陽性細胞であった。

これらの細胞に、どのようにHIV/SIVが侵入したかは今回の検索では明らかにはならなかった。こうした感染が、HIV/SIVキャリアーの体内で、すでに成立していた可能性も考えられるが、PCR法を用いた検索で

は、HIV-1キャリアーの末梢血中CD8陽性細胞分画に、HIVのゲノムは見出されなかったとされている¹⁸⁾。従って、CD8陽性細胞へのウイルスの侵入は*in vitro*において生じたと考えるべきかも知れない。レクチンで刺激されたPBLは、高い頻度でCD4⁺CD8⁺細胞を含んでいることが知られ¹⁹⁾、この分画がウイルス感染CD4⁻CD8⁺細胞の起源になった可能性も考えられる。もちろんCD4分子を介さないウイルス感染の成立の可能性も否定されてはいない。

こうした事実は、特に、HIV感染者のPBLを、*in vitro*で処理した後、再びその体内に戻してやろうとする治療上の試みに対しては、一つの警鐘となるであろう。

これら一連の実験により、HIV/SIVの感染から宿主を防衛するという面と、それ自身がウイルスのreservoirたりうるとする面との一見相反するCD8陽性細胞の二つの性格がより明らかとなり、HIV/SIV感染の病態の複雑さを示唆していると考えられた。

要 約

SIV/HIVに感染したアカゲザルおよびヒトの末梢CD8陽性細胞の性質を検討したところ

- 1) CD8陽性細胞は、自己の末梢CD4陽性細胞におけるSIV/HIVの複製を抑制した。
- 2) それらCD8陽性細胞の出現には、ウイルス感染後およそ4週間を要した。
- 3) NK関連抗原陽性細胞にはウイルスを抑制する能力はなかった。
- 4) CD8陽性細胞のウイルス抑制機能はclass I拘束性を持つと考えられた。
- 5) ウイルス抑制機能はCD8⁺CD29⁺CD45R⁻のサブpopulationにのみ存在した。
- 6) ウイルス抑制機能の発現には、LFA-1およびCD8分子の特定のエピトープを介する細胞間接触が必要と考えられた。
- 7) 2)~6)の性質は古典的CTLのそれに一致していたが、ウイルス抑制のメカニズムそのものは不明であった。
- 8) さらに、SIV特異的なCTLやウイルスキャリアーPBLの長期培養系において、CD4⁻CD8⁺細胞中でのSIV/HIVの複製がみられた。

謝 辞

御校閲頂いた本学耳鼻咽喉科学講座形浦昭克教授、並びに本学病理学第1講座菊地浩吉教授に深謝いたし

ます。

文 献

1. Barre-Sinouiri, F., Cherman, J. C., Rev, F., Nugeyre, M. T., Charmaret, S., Gruets, J., Dauguet, C., Axley-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W. and Montagnier, L.: Isolation of a T-lymphotropic lentivirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Science** **220**, 868-871 (1983).
2. Levy, J. A., Hoffman, A. D., Kramer, S. A., Landis, J. A., Shimabukuro, J. S. and Oshiro, L. S.: Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. **Science** **225**, 840-842 (1984).
3. Dalgleish, A. G., Beverley, P. C. L., Clapham, P. R., Crawford, M. F., Greaves, M. F. and Weiss, R. A.: The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. **Nature** **312**, 763-767 (1984).
4. Klatzmann, D., Champagne, E., Chamaret, S., Gruest, J., Guetard, D., Hercend, T., Gluckman, C. and Montagnier, L.: T lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. **Nature** **312**, 767-768 (1984).
5. Clavel, F., Mansinho, K., Chawaret, S., Guetard, D., Favier, V., Nina, J., Santos-Ferreira, M. O., Champalimand, J. L. and Montagnier L.: Human immunodeficiency virus 2 infection associated with AIDS in west Africa. **N. Eng. J. Med.** **316**, 1180-1185 (1987).
6. Chakrabarti, L., Guyaderm, M., Alizon, M., Daniel, M. D., Desrosiers R. C., Toillais, P. and Sonigo, P.: Sequence of simian immunodeficiency virus from macaque and its relationship to other human and simian retroviruses. **Nature** **328**, 543-547 (1987).
7. Desrosiers, R. C. and Letvin, N. L.: Animal models for acquired immunodeficiency syndrome. **Rev. Infect. Dis.** **9**, 438-446 (1987).
8. Letvin, N. L., Daniel, M. D., Sehgal, P. K., Desrosiers, R. C., Hunt, L. M., Waldron, L. M., MacKey, J. J., Schmidt, D. K., Chalifoux, L. V. and King, N. W.: Induction of AIDS-like disease in macaque monkeys with T-cell tropic retrovirus STLV-III. **Science** **230**, 71-73 (1985).
9. Walker, C. M., Moody, D. J., Stites, D. P. and Levy, J. A.: CD8⁺ lymphocytes can control HIV infection *in vitro* by suppressing virus replication. **Science** **234**, 1563-1566 (1986).
10. Kannagi, M., Chalifoux, L. V., Lord, C. I. and Letvin, N. L.: Suppression of simian immunodeficiency virus replication *in vitro* by CD8⁺ lymphocytes. **J. Immunol.** **140**, 2237-2242 (1988).
11. Kannagi, M., Yetz, J. M. and Letvin, N. L.: In vitro growth characteristics of simian T-lymphotropic virus type III. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **82**, 7053-7057 (1985).
12. Tsubota, H., Lord, C. I., Watkins, D. I., Morimoto, C. and Letvin, N. L.: A cytotoxic T lymphocyte inhibits acquired immunodeficiency syndrome virus replication in peripheral blood lymphocytes. **J. Exp. Med.** **169**, 1421-1434 (1989).
13. Morimoto, C., Rudd, C. E., Letvin, N. L., Schlossman, S. F.: A novel epitope of the LFA-1 antigen which can distinguish killer effector and suppressor cells in human CD8 cells. **Nature** **330**, 479-482 (1987).
14. Tsubota, H., Ringler, D. J., Kannagi, M., King, N. W., Solomon, K. R., MacKey, J. J., Walsh, D. G. and Letvin, N. L.: CD8⁺CD4⁻ lymphocyte line can harbor the AIDS virus *in vitro*. **J. Immunol.** **143**, 858-863 (1989).
15. Rudd, C. E., Morimoto, C., Wong, L. L. and Schlossman, S. F.: The subdivision of the T4 (CD4) subset on the basis of the differential expression on L-C/T200 antigens. **J. Exp. Med.** **166**, 1758-1773 (1987).
16. Brinchmann, J. E., Gaudernack, G. and Vartdal, F.: CD8⁺ T cells inhibit HIV replication in naturally infected CD4⁺ T cells. Evidence for a soluble inhibitor. **J. Immunol.** **144**, 2961-2966 (1990).
17. Itescu, S., Brancato, L. J., Buxbaum, J., Gregersen, P. K., Rizk, C. C., Croxson, T. S., Solomon, G. E. and Winchester, R.: A diffuse infiltrative CD8 lymphocytosis syndrome in human immunodeficiency virus (HIV) infection: a host immune response associated with HLA-DR5. **Ann. Intern. Med.** **112**, 3-10 (1980).
18. Schnittman, S. M., Miltiadis, C., Psallionpos, H., Lane, C., Thompson, L., Baseler, M., Massar, F., Fox, C. H., Salzman, N. P. and Fauci, A.: The reservoir for HIV-1 in human peripheral blood is a T cell that maintain expression of CD4. **Science** **245**, 305-308 (1989).
19. Blue, M. L., Daley, J. F., Levine, H. and Schlossman, S. F.: Co-expression of T4 and T8

on peripheral blood T cells demonstrated by two-color fluorescence flow cytometry. **J. Immunol.** **134**, 2281-2286 (1985).

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学耳鼻咽喉科学講座 坪田 大