

氏名(国籍)	孫 賓 蓮 (中 国)
学位の種類	博 士 (医 学)
学位記番号	博 甲 第 3192 号
学位授与年月日	平成 15 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	Analysis of Early Stage of Infection with Cell-free Human T-cell Leukemia Virus Type 1 (無細胞系におけるヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型の感染初期段階の解析)
主 査	筑波大学教授 榊 正 幸 博士 (医学)
副 査	筑波大学助教授 医学博士 清 水 徹
副 査	筑波大学併任助教授 理学博士 木 山 亮 一 (産業技術総合研究所 主任研究員)
副 査	筑波大学講師 博士 (医学) 長谷川 雄 一

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

### (目的)

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) は、成人 T 細胞白血病 (ATL), HTLV-1 関連脊髄症 (HAM/TSP) や 葡萄膜炎などの原因ウイルスである事が分かっているが、これらの発症機構は不明である。従来、HTLV-1 の感染は、感染細胞と標的細胞が共存しないと感染しないことから、主に細胞接着を介したものであると言われてきた。ウイルスの感染と増殖は、HTLV-1 関連疾患発症を理解する為に重要なステップであるが、良い無細胞感染系が無い為に、HTLV-1 ウイルスの感染や増殖機構は良く分かっていなかった。そこで、私達は、感染効率の良い無細胞感染系を樹立し、HTLV-1 の感染初期段階について明らかにする事を目的とした。

### (材料と方法)

#### 1. 材料

ウイルス産生細胞：c77 (ネコ腎臓細胞株), MT-2, ATL-1K (ヒト T 細胞株)。

標的細胞：Molt4, Jurkat, Hut78 (ヒト T 細胞株), 293T (ヒト腎臓細胞株), EL4, Rlm1 (マウス T 細胞株)。

#### 2. 方法

A. 高感染率ウイルスの準備と感染実験：ウイルス産生細胞 c77 細胞の培養上清を回収し、低い遠心力で細胞や debris を除いてから、4℃で 10 万 g 2 時間遠心した。その沈殿を培地で suspend し、RNase-free DNase I で 37℃ 1 時間処理してから、直ぐに標的細胞へ感染させた。

B. PCR-Southern blot 及び RT-PCR：感染後 24 時間培養し、細胞を溶解し、これを template として PCR を行い、細胞中のウイルス DNA を検出した。或いは、感染後 1 ヶ月間培養して、毎日一部の細胞を回収して DNA を抽出し、PCR でウイルス DNA を検出した。また、感染細胞から RNA を抽出して RT-PCR を行い、ウイルス遺伝子の発現を検出した。

C. 定量 PCR：ABI7700 で TaqMan probe を用いて高感度の定量 PCR システムを樹立し、細胞中のウイルス DNA 量を定量した。細胞数を補正する為に、ヒト  $\beta$ -グロビン遺伝子量も定量した。

D. ウイルスの標的細胞への吸着・侵入の検出：ウイルスと標的細胞を 4℃ 或いは 37℃ で 30 分間 incubate し、

細胞を洗浄した後に溶解し、ウイルスの gag 蛋白質 p19 を ELISA 法で検出した。

E. Neuraminidase 処理：ウイルスや細胞を Neuraminidase で 37℃ 1 時間処理してから、ウイルスの細胞への吸着や侵入を検出した。また、感染後 20 時間培養してから、細胞溶解液中のウイルス DNA を定量 PCR で検出した。

#### (結果)

1. 遠心処理で濃縮したウイルスを用いて効率の良い無細胞 HTLV-1 感染系を樹立した。
2. 無細胞感染系において、HTLV-1 が、ヒト培養細胞よりマウス培養細胞により高効率で侵入した。
3. 感染した細胞中のウイルス DNA は、ヒト培養細胞では長期にわたって存在したが、マウス細胞中では、より早く減少した。
4. 感染した細胞中における HTLV-1 ウイルス遺伝子の発現を検出する事が出来た。
5. ウイルスを Neuraminidase で処理する事により、無細胞感染系における HTLV-1 の感染が促進された。

#### (考察・結論)

本研究において樹立した高効率の無細胞 HTLV-1 感染系は、従来ほとんど不可能であった HTLV-1 ウイルスの細胞への感染の初期過程や増殖機構の研究に有用であると考えられる。また、これまで感染効率が極めて悪いと考えられていたマウスの細胞にも、効率良く HTLV-1 ウイルスが侵入する事を明らかにした。HTLV-1 のヒト細胞とマウス細胞での感染性や増殖性の違いを利用して、ウイルス感染や増殖に必要な因子を同定する事も可能であると考えられる。更に HTLV-1 ウイルスを Neuraminidase 処理すると感染が促進される事から、HTLV-1 感染者において Neuraminidase を産生する微生物やウイルスの重複感染が起こる事によって、HTLV-1 ウイルスの増殖が促進される可能性がある。

### 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、HTLV-1 ウイルスの高効率な無細胞感染系を樹立した研究であり、従来ほとんど不可能であった HTLV-1 ウイルスの細胞への感染初期過程の研究への道を切り開いたものとして高く評価できる。また、ウイルス粒子の Neuraminidase 処理により、HTLV-1 ウイルスの細胞への感染が促進される事を明らかにしており、HTLV-1 関連疾患の発症機構を研究する上で重要な示唆を与える研究成果であると考えられる。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。