

図3.日本のHIV-1アミノ酸相同性の推移
1988-93年と1996-98年の比較

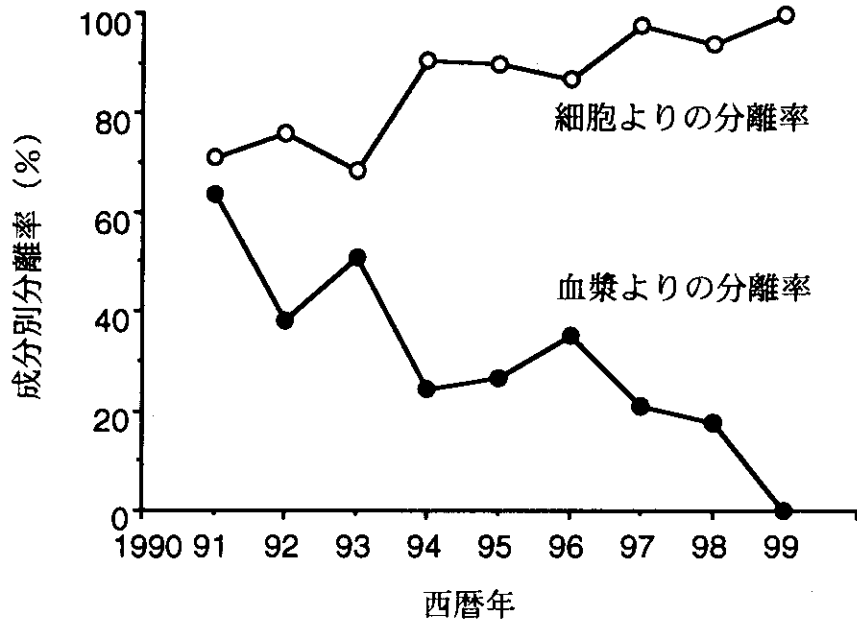
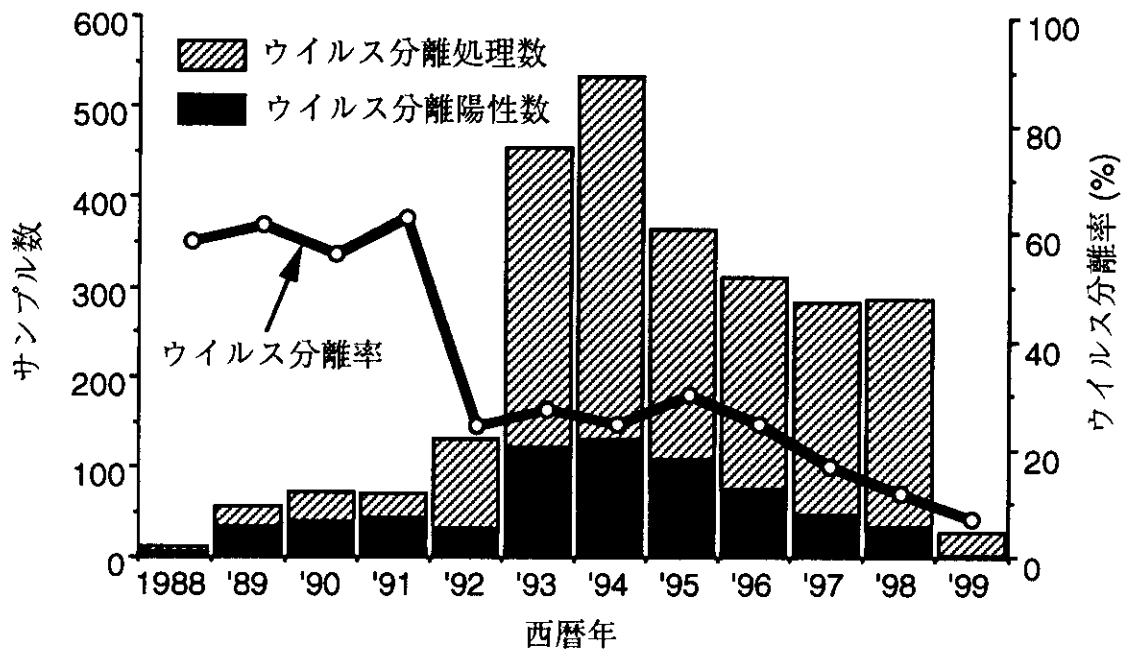


図4. 年次別ウイルス分離処理数、ウイルス分離数および分離率（上図）
 年次別成分別ウイルス分離率（下図）

HIV-1 サブタイプ E 感染性分子クローンの構築

分担研究者 佐藤 裕徳 国立感染症研究所 エイズ研究センター

研究要旨：HIV-1 サブタイプ E は、東南アジア地域で主に異性間性的接触により流行するウイルス株で、経粘膜感染に適応した株かもしれない。サブタイプ E 感染の疫学情報、遺伝子配列情報の急速な蓄積に比し、ウイルスの性質には不明な点が多く残されている。我々は、これまでに、サブタイプ E ウイルスの生物学的性質決定の一環として、gp120 V3 領域の *in vitro* 機能と感染者体内における *in vivo* 進化様式について明らかにしてきた (Sato et al *AIDS* 1997, Sato et al *Virology in press*, Sato et al *J. Virol. in press*)。本研究では、サブタイプ E の転写調節領域および各遺伝子産物の構造と機能の関連をさらに詳細に検討するために、HIV-1 サブタイプ E 感染性分子クローンの構築を試みた。サブタイプ E 初代分離株感染細胞のプロウイルス DNA を出発材料とし、ラムダファージベクターを用いて HIV DNA 陽性ファージを 40 クローン同定した。

A. 研究目的

HIV-1 サブタイプ E は、タイでの流行当初は主に異性間性的接触による経粘膜感染により広がった。この点、主に経血液経路で感染が拡大した HIV-1 サブタイプ B とは異なる環境での感染に適応したウイルス株かもしれない。本研究では、流行当初に分離されたサブタイプ E 株より感染性分子クローンを構築し、標的細胞の詳細な検討、転写調節領域および各遺伝子産物の構造と機能の関連検討などを行う。

B. 研究方法

- 1) 我々の研究室で分離した HIV-1 サブタイプ E 初代分離株 HIV-1_{NH1} および HIV-1_{NH2} (参考文献 5) をクローニングの出発材料とする。HIV-1_{NH1}, HIV-1_{NH2} は病態の異なる家族内感染者 2 名から分離されたウイルスで、gag,env 領域の系統樹解析より同一祖先より進化したウイルスであることがわかっている。一方、HIV-1_{NH1}, HIV-1_{NH2} は生物活性が異なり、それぞれ、SI/CXCR4 および NSI/CCR5 phenotype を示す。
- 2) HIV-1_{NH1}, HIV-1_{NH2} が感染した末梢血単核球より low molecular weight DNA を抽出し、Southern blot 等によりコピー数、クローニング部位を検討し、クローニング戦略を決める。
- 3) ラムダファージライブラリーを作製し、HIV-1_{NH1} の PCR 増幅産物をプローブにして、HIV DNA 陽性組

み換えファージを同定する。

C. 研究結果

- 1) 感染細胞 DNA の Southern blot 等により、HIV-1_{NH1} および HIV-1_{NH2} では Apa I および SpeI site が unique site であることを確認した。
- 2) 感染細胞から low molecular weight DNA (Hirst DNA) を抽出し、SpeI で切断し、9-12kbDNA を精製した後、ZAP Express の SpeI site にクローニングした。その結果、約 5×10^6 pfu の組み換え体ファージライブラリーが得られた。
- 3) Plaque hybridization により現在までに HIV-1_{NH1} のライブラリーから HIV DNA 陽性組み換え体ファージを 40 クローン同定した。(1 positive clone/ 10^4 recombinants)。

D. 考察

一般に、サブタイプ E はサブタイプ B に比べ、末梢血単核球での増殖効率が悪いとされ、一部でクローニングの困難性が指摘されていた。例えば、アラバマ大の Hahn らのグループは、染色体に組み込まれた HIV サブタイプ E プロウイルスを出発材料にし、 2×10^7 個の組み換え体ファージをスクリーニングしてようやく 1 個の非感染性クローンを得ている。同様の手法を用いては、特に NSI/CCR5 株の感染性

クローンの構築は難しいことが予想される。我々は、ウイルスの培養細胞における最適増殖条件を詳細に検討し、また Hirt DNA を出発材料にすることにより、HIV プロウイルス DNA が細胞あたり 1 コピー以上含まれる感染細胞を得ることができた。その結果、HIV DNA 陽性組み換え体が、 $10^4 \sim 10^5$ に 1 個の割合で存在する組み換えファージライブラリーの作製に成功した。

E. 結論

感染条件、出発材料の工夫により、HIV サブタイプ E DNA 陽性組換体を高効率で含むラムダファージライブラリーが得られた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Fukushima Y, Lewis MJ, Monken C, Komuro K, Kusagawa S, Sato H, Takebe Y, Yamazaki S, Hien NT, ANH H, Long HT, Honda M, Hall WW: Identification and molecular characterization of human T lymphotropic virus type II infections in intravenous drug abusers in the former south Vietnam. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 14:537-40, 1998.

2) Kusagawa S, Sato H, Watanabe S, Notomi K, Kato K, Shiino T, Thwe M, Oo KY, Lwin S, Mra R, Kywe B, Yamazaki S, Takebe Y: Genetic and serologic characterization of HIV-1 prevailing in Myanmar (Burma). *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 14:1379-1385, 1998.

3) Kusagawa S, Sato H, Kato K, Nohtomi K, Shiino T, Samrith C, Bun Leng H, Phalla T, and Takebe Y: HIV type 1 *env* subtype E in Cambodia. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 15:91-94, 1999.

4) Sato H, Kato K, Kodaka N, Shiino T, Takebe Y: International Association for the Study of the Liver Functional complementation of the envelope hypervariable V3 loop of human immunodeficiency virus type 1 subtype B by subtype E V3 loop. *Virology in press*

5) Sato H, Shiino T, Kodaka N, Taniguchi K, Tomita Y, 藤篤、岡慎一、江田康幸、時吉幸男、坂井優子、岩

Miyakuni T, and Takebe Y: Evolution and biological characterization of human immunodeficiency virus type 1 subtype E gp120 V3 sequences following horizontal and vertical virus transmission in a single family. *J. Virol. in press*

2. 学会発表

1) 内藤秀夫、佐藤裕徳、武部豊、倉田毅、Zhang DY、阿部賢治：HIV 感染者における HCV および HGV 感染の地理疫学調査、第 87 回日本病理学会総会、1998 年

2) Toda N, Sato H, Takebe Y, Inoue S, Takemori T, Sakaguchi M: Effective induction of immune response to Japanese cedar pollen allergen () in mice by gene gun DNA delivery system. The First Annual Conference on Vaccine Research. Washington DC, USA. May 30- June 1, 1998

3) Sato H, Kato K, Kodaka N, Takebe Y: Coreceptor use and MT2 tropism of HIV-1 chimeric clones having envelope V3 loop of HIV-1 subtype E. 12th World AIDS Conference, Geneva, Switzerland. June 28-July 3, 1998.

4) Takebe Y, Kusagawa S, Sato H, Watanabe S, Nohtomi K, Kato K, Shiino T, Yamazaki S, Min Thwe, Kim Yi Oo, Soe Lwin, Rai Mra, Bo Kywe: Molecular epidemiology of HIV-1 in Myanmar. 12th World AIDS Conference, Geneva, Switzerland. June 28-July 3, 1998.

5) 内藤秀夫、佐藤裕徳、武部豊、倉田毅、Zhang DY、阿部賢治：HIV 感染者における HCV および HGV 感染の分子疫学と新しい HGV ゲノタイプの分離、第 2 回日本肝臓学会大会、1998 年 10 月 16 - 17 日。

6) K Abe, H Naito, T Kurata, H Sato, Y Takebe, DY Zhang: Prevalence of HCV and HGV in patients infected with HIV: isolation of a new HGV genotype.

(American association for the study of liver diseases), Chicago, USA. November 4-10, 1998.

7) 鳥吉英伸、塩田達夫、佐藤裕徳、坂口雅弘、加藤篤、岡慎一、江田康幸、時吉幸男、坂井優子、岩

本愛吉、永井美之、武部豊：センダイウイルスベクターによる HIV-1 サブタイプ E エンベロープ gp120 の大量発現とその血清学的特性の解析、第 46 回日本ウイルス学会総会、1998 年

8) 加藤佳代子、佐藤裕徳、椎野禎一郎、納富香子、芝村佳代、草川茂、Bunyaraksyotin G、Hien NG、Long HT、武部豊、：北部ベトナムの HIV-1 新興流行は HIV-1 サブタイプ E による、第 12 回日本エイズ学会総会、1998 年

9) FUNCTIONAL AND SEROLOGICAL
CHARACTERIZATION OF HIV-1 SUBTYPE E GP120
EXPRESSED BY SENDAI VIRUS VECTOR

鳥吉秀伸、塩田達夫、佐藤裕徳、坂口雅弘、江田康幸、時吉幸男、加藤篤、坂井優子、岩本愛吉、永井美之、武部豊、第 12 回日本エイズ学会総会、1998 年

G. 知的所有権の取得状況

なし

SIV サル感染における *nef* 遺伝子の感染性、免疫機能に及ぼす影響

分担研究者： 森 一泰 国立感染症研究所 主任研究官

共同研究者： 保富康宏 三重大学医学部、生体防御医学

研究要旨

nef 遺伝子の *in vivo* における機能を探る目的で SIV 感染動物におけるウイルス感染とウイルスに対する宿主免疫機能について、*nef* 遺伝子が正常なウイルスと当該遺伝子が欠損したウイルスを用いて解析した。*nef* 遺伝子が欠損したウイルス感染ザルにおいては、ウイルス感染量は約 1/100 以下であったが、サル個体間に顕著な違いが見られた。宿主免疫機能については、*nef* 遺伝子依存的に細胞性免疫の機能低下がウイルス特異ヘルパー T 細胞活性、ウイルス特異細胞障害 T 細胞活性の測定により明らかとなった。*Nef* 遺伝子欠損ウイルス感染ザルにおいては、持続的にウイルスに対する細胞性免疫が維持されていた。一方、*nef* 遺伝子依存的なウイルスに対する抗体産生、中和抗体活性の違いは見られなかった。

A. 研究目的

Nef 遺伝子は霊長類レンチウイルス (SIV, HIV-1, HIV-2) に共通に見られる 27-34 kDa のタンパク質をコードする。*Nef* タンパクはウイルス複製過程の初期に発現され、翻訳後 *myristylation*, リン酸化され、感染細胞の細胞膜の内側に結合する。*Nef* 遺伝子の機能、役割については、特にサルにおける感染モデルによる解析から、高いウイルスの複製に重要であることが報告された。また、ヒトにおけるの感染例、サルエイズ動物モデル研究から *Nef* 遺伝子欠損エイズウイルスの病原性が弱いことが判明したことから、*Nef* 遺伝子が病原性、エイズ発症と関連することが明らかとなった。特に、*Nef* 遺伝子のエイズウイルスに対する免疫機能に対する役割が注目されている。エイズワクチン開発はエイズ研究において最重要課題であるが、既知のワクチン開発手法による膨大な試みは不成功に終わっている。例外は、サルエイズ動物モデルにおいて *Nef* 遺伝子欠損ウイルス感染ザルが性質の異なる種々の病原性 SIV, SHIV 感染に対して抵抗性を示したことであり、このウイルスが少数のサルに病原性を示したことから弱毒生ワクチンに対する安全性が疑問視されている。我々は、強病原性の分子クローン

SIVmac239 と弱病原性で防御免疫を誘導する

SIVmac239 由来の *Nef* 遺伝子欠損ウイルスを用い、サルにおける両ウイルスの感染性、病原性の違いを確認するとともに、エイズワクチンに必要な防御免疫の性質を解明することを目的に *Nef* 遺伝子欠損ウイルス感染ザルに誘導される種々の抗ウイルス免疫反応について、病原性 SIV 感染の場合と比較検討した。

B. 研究方法

ウイルス SIVmac239 *nef* deletion &

SIVmac239 *nef*+ : それぞれのプロウイルス DNA を含むプラスミドを COS1 細胞に DEAE dextran 法によりトランスフェクションを行った。培養上清に含まれるウイルスを PHA により活性化したアカゲザルリンパ球に感染させ増殖しウイルスストックを作製した。TCID₅₀ は細胞株 CEMx174 を用い、p27 *gag* 抗原量は市販のキット (Coulter 社) を用い測定した。

サル 2-5 才のアカゲザル (ミャンマー産) ; SIV, typeD retrovirus, B virus について抗体陰性の健常なサルで、末梢リンパ球培養において SIV 感染性に問題ない個体を用いた。1 群 3 頭にそれぞれ *Nef* 遺伝子欠損ウイルス

(SIVmac239 nef del.)または SIVmac239 を 100 TCID₅₀ 静脈内接種した。

血漿中の SIV RNA 量の測定 SIV RNA は市販のキット (Boehringer-Mannheim 社) を用い精製し、-80℃ 冷凍庫に保存した。SIV RNA の定量は RT-PCR 法により pol sequece を増幅し濃度既知の外部標準 pol RNA を用い測定した。

末梢リンパ球の細胞表面タンパクの解析 血液から末梢リンパ球を分離し、蛍光ラベルされた種々のモノクローナル抗体を用いフローサイトメトリーにより解析した。

抗 SIV 結合抗体価 精製濃縮し、界面活性剤により溶解した SIVmac239 ウイルスを抗原として ELISA プレートを作製した。プレートに結合した血漿中の抗 SIV IgG 抗体は HRP 標識抗サル IgG 抗体を用い測定した。

抗 SIV 中和抗体価 SIV LTR seap (secreted alkaline phosphatase) gene を発現する CEMx174 を用い SIV 感染による tat 依存性の alkaline phosphatase 酵素活性を測定する系により血漿中の中和抗体価を測定した。

血液中の顆粒球数 自動血球計算機 (東亜医用電子) により白血球数を測定した。顆粒球数は大型白血球数、リンパ球数 (単球を含む) は小型白血球数より測定した。

CTL 活性 ⁵¹Cr release assay により末梢リンパ球の CTL 活性を測定した。Target 細胞は実験に用いたサルの末梢リンパ球から B lymphoid blast cell line (BLCL) を作成し、この細胞に SIV gag-pol, or env 遺伝子を発現する recombinant vaccinia virus を感染させて作成した。末梢リンパ球は採血、リンパ球分離後 -80℃ 冷凍庫に保存し、CTL 活性は全サンプルを同時に測定した。

SIV specific proliferation SIV gag-pol, or env epitopes によるリンパ球増殖

(CD4+ T cells が誘導される) は上記の CTL target cells と末梢リンパ球を 4 日間混合培養し 3H Thymidine の取り込みを測定した。

C. 研究結果

SIVmac239 nef del. の感染と病原性 ; SIVmac239 nef+ 感染との比較

SIVmac239 nef deletion の血中ウイルス量は、SIVmac239 nef+ 感染と同様に感染 2 週後に見られた。ピークは、10⁶-10⁷ copy/ml で SIVmac239 nef+ 感染と比較して約 1/10 から 1/100 であった。感染後 6 週には検出限界以下に低下したが、その後 2 頭では 10⁴ copy/ml 以下の持続感染が、1 頭では検出限界以下を維持した。SIVmac239 nef+ 感染では、2 頭は接種後 2, 2.5 年後にエイズを発症し死亡した。これらのサルでは初期感染後血中ウイルス量は感染後 1 6 週に 10³ copy/ml まで低下したがその後上昇し 10⁵-10⁶ copy/ml レベルの持続感染が観察された。1 頭では 26 週までに検出限界以下まで減少し、その後も 10⁴ copy/ml 以下であった。感染後 3 年の観察期間中 CD4 レベルも正常で、長期無発症型の感染例と判断された。リンパ節の病理学的解析では、SIVmac239 nef deletion 感染の 3 頭と長期無発症型の 1 頭では発症性感染に見られるリンパ節の構造変化 (リンパ濾胞の変形、委縮) は見られず、リンパ濾胞の活性化も穏やかであった。

SIV に対する humoral response

血液中 IgG の SIV virion lysate に対する結合活性は、いずれの感染ザルにおいても感染後 4 週から検出された。抗体価は血中ウイルス量に比例した。中和抗体価は、いずれのウイルス感染においても低く (50-300 倍希釈) 最初に検出されたのは感染後 26 週前後であった。血中ウイルス量が初期感染後、検出感度以下になった 2 頭のサルでは、中和抗体価は感染後 63 週まで検出されなかった。

SIV に対する CTL 活性

CTL については、env または、gag, pol 遺伝子産物に対する活性を測定したが、結果は、ほぼ同様であった。ウイルス感染が抑制された感染後 16 週では、SIVmac239 nef del.感染では SIVmac239 nef+感染と比較して有意に高い活性が誘導されていた。慢性感染期においても、CTL 活性はウイルス量と反比例した。ウイルス量が増加した SIVmac239 nef+感染の 2 頭のサルでは、感染後 4 5 週では有意な活性は検出されなかった。ウイルス量の増減が見られた SIVmac239 nef del.の感染においてもウイルス量が高い採血時には、CTL 活性は低かった。

SIV env タンパクに対するリンパ球増殖活性

SIV env タンパクに対するリンパ球増殖活性は、主に CD4+細胞に見られることからウイルス特異的ヘルパー活性を示す。感染に用いられたウイルス間に明らかな違いが見られた。SIVmac239 nef del.の感染では、測定した 3 回とも高く、特にウイルスの持続感染が見られた 1 頭で最も高い活性が見られた。SIVmac239 nef+感染では感染 1 6 週以降のウイルス感染の抑制の有無にかかわらず全 3 頭において SIV env タンパクに対するリンパ球増殖活性は低かった。

血液中の顆粒球とリンパ球の比

ウイルス感染による早期の免疫反応 (innate immunity) では好中球を主要とする顆粒球の増殖、感染組織への遊走反応が起こる。続いてリンパ球の感染組織近傍リンパ組織への遊走と増殖が起こり、ウイルス適応免疫 (adaptive immunity) が誘導される。細胞のサイズの違いから顆粒球は、大型白血球の分画に、リンパ球は小型白血球の分画に分けることができる。この性質を利用して初期感染における血液中の顆粒球とリンパ球比の変動を

調べた。SIVmac239 nef del.感染 SIVmac239 nef+感染とを比較したところ、初期感染のウイルス感染のピーク (感染 2 週後) において両者に違いが見られた。SIVmac239 nef del.感染では顆粒球とリンパ球の比が顕著に高くなった。血中の顆粒球数がリンパ球数に対して 2-3 倍になった。SIVmac239 nef+感染では明らかな変動は見られなかった。

D. 考察

エイズの病態の進行は宿主免疫機能の低下を起因する。主な病状は免疫機能低下による感染症 (日和見感染症) である。サルエイズモデルにおいては分子クローン SIV がエイズに特徴的な日和見感染症を起こすことが証明された。さらに、ウイルスの病原性を決定する nef 遺伝子が同定された。サルエイズモデルによる研究以前の培養細胞を用いての研究からは、nef 遺伝子の役割を知ることはできなかった。動物個体と培養細胞の大きな違いは免疫系の存在であることから nef 遺伝子の役割は、ウイルスに対する免疫反応を抑制し、結果的にウイルス感染を増加することが考えられてきた。本研究では、ウイルス感染の制御に重要な免疫として、抗体産生、中和抗体、CTL、ヘルパー T 細胞、好中球 (ウイルス感染との関連性については報告が少ない) について nef 遺伝子が機能を持つウイルスと nef 遺伝子が欠失しているウイルスを接種されたサルを用いて調べた。まず、抗体によるウイルス感染制御の重要性は否定された。ウイルス感染量に比例した抗体産生の増加は見られたが、抗体産生の増加とウイルス量の抑制の関連性は確認できなかった。中和抗体の結果からは、むしろウイルス感染が制御されている個体において検出されなかった。細胞性免疫については、CTL 活性とウイルス感染量の抑制の相関関係が明らかとなった。病原性の

SIVmac239 nef+感染ザル1頭において長期無発症型の感染が見られた。ウイルス感染が制御されCD4レベルも正常のこのサルでは、慢性感染期にCTL活性の上昇が見られた。逆に、ウイルス量が増加しエイズを発症した2頭のサルでは、CTL活性は低下していた。さらに、SIVmac239 nef del.感染においても低レベルの感染の増減が見られたが、ウイルス量が増加した時点ではCTL活性は低下していた。病態の悪化におけるCTL活性の低下はウイルス特異ヘルパーT細胞の減少に起因するという仮説が提唱されている。エイズウイルスの主要なターゲットであるCD4+細胞がこの活性を持つため、エイズウイルス感染によりエイズウイルス特異ヘルパーT細胞の減少が起こる。エイズ治療による免疫の回復において、エイズウイルスに対する免疫回復の遅延が知られているが、この原因としてエイズウイルス特異ヘルパーT細胞の減少が考えられている。我々の結果では、エイズ関連の疾患が見られなかったSIVmac239 nef del.感染において高い活性が見られた点は仮説と一致した。一方SIVmac239 nef+感染ザル3頭すべてにおいて低く、CTL活性が高い長期無発症型の感染の例においてもヘルパー活性が低かったことは、ウイルス感染の制御、またはCTL活性の維持に高いウイルスが必要という結論は得られなかった。Nef遺伝子機能の役割を考えるうえで、ウイルス特異ヘルパーT細胞の減少の意味を考える必要があると思われる。初期感染のピーク時における顆粒球とリンパ球比がSIVmac239 nef del.感染において有意に高い結果については、いくつかの原因が考えられる。まず、顆粒球の増減の割合とリンパ球の増減の割合が両ウイルス感染において異なる。実際、SIVmac239 nef del.感染では、感染ピークにおける顆粒球の増加がSIVmac239 nef +感染と比べ少し大きい、リンパ球については、感染ピークにより顕著に減少した。このことは、顆粒球、リンパ球の遊走因子である種々のケモカインの産生の

パターンに違いがあることが推測される。顆粒球、リンパ球がそれぞれとadaptive immunityに重要であり、innate immunityによるadaptive immunityの誘導を考えると、細胞性免疫の誘導の違いはinnate immunityの活性化の違いが少なからず影響したためとも推測される。

E. 結論

nef遺伝子のin vivoにおける機能を探る目的でウイルスに対する宿主免疫機能について、nef遺伝子が正常なウイルスと当該遺伝子が欠損したウイルスを用いて解析した。nef遺伝子依存的な細胞性免疫の機能低下が判明した。特にウイルス特異ヘルパーT細胞活性の低下がnef遺伝子が正常なウイルス感染で見られた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fujii Y, Mukai R, Akari H, Machida M, Mori K, Takasaka M, Kojima E, Murakami K and Yoshikawa Y. Antiviral Effects of 6-chloro-2',3'-dideoxyguanosine in rhesus monkeys acutely infected with Simian Immunodeficiency Virus. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*. 1998, 9:85-92.
- 2) Akari H, Mori K, Otani I, Terao K, Ono F, Adachi A and Yoshikawa Y. Induction of MHC-II DR expression on circulating CD8+ lymphocytes in macaques infected with SIVmac239 nef-open but not with its nef-deletion mutant. *AIDS and Human Retroviruses*, 1998, 14: 619-625.
- 3) Isao Otani, Hirofumi Akari, Ki-Hoan Nam, Kazuyasu Mori, Eriko Suzuki, Hiroaki Shibata, Kunio Doi, Keiji Terao, and Yasuhiro Yoshikawa. Phenotypic changes in peripheral blood monocytes of cynomolgus

monkeys acutely infected with simian immunodeficiency virus. *AIDS and Human Retroviruses*, 1998, 14: 1181-1186.

4) Akari H, Adachi A, K.-H. Nam, Mori K, Otani I, Terao K and Yoshikawa Y. Early depletion of peripheral blood CD4+CD8+ T lymphocytes in cynomolgus macaques by SIVmac infection: implication of nef. 1998, In : 12th World AIDS Conference, 69-73. Monduzzi (edit.) International Proceedings Division, Bologna.

5) Ohgimoto S, Shioda T, Mori K, Nakayama E. E, Hu H and Nagai Y. Location-specific, unequal contribution of the N glycans in simian immunodeficiency virus gp120 to viral infectivity and removal of multiple glycans without disturbing infectivity.

J. Virol., 1998; 68: 8365-8370

6) 森 一泰, 特集 エイズとリンパ球「SIV 研究から」, *細胞*, 1999, 31:14-16.

2. 学会発表

1) Kazuyasu Mori, Yasuhiro Yasutomi, Kei Tadakuma, Hirofumi Akari, Isao Otani, Fumiko Ono, Keiji Terao, Yasuhiro Yoshikawa and Akio Yamada. An important role of CTL for low viral load and apathogenesis in animals infected with SIVmac239 nef del. and in a long term non-progressor animal infected with SIVmac239 nef+. 16th annual symposium on nonhuman primate models for AIDS, October, 1998, Atlanta, USA.

2) 森 一泰, 保富康宏, 多田隈圭, 明里宏文, 大谷功, 小野文子, 寺尾恵治, 吉川泰弘, 山田章雄, Comparative analyses on SIV specific immunity in monkeys infected with SIVmac239 or nef deletion mutant. 第12回日本エイズ学会, 1998年, 東京

3) 多田隈圭, 森豊隆志, 出雲周二, 納光弘, 佐多徹太郎, 大谷功, 小野文子, 山田章雄, 森 一泰, Differential localization of SIV in lymph nodes in monkeys infected with nef+ and nef deletion mutant of SIV. 第12回日本エイズ学会, 1998年, 東京

4) 向井鏖三郎, 宇田晶彦, 毒島孝治, 小松原博文, 小野文子, 森 一泰, 山田章雄, 村山裕一, 佐多徹太郎, 倉田毅, サル脳炎組織由来 SIV 持続産生細胞株の樹立とそのエイズ脳症における役割, 第12回日本エイズ学会, 1998年, 東京

G. 知的所有権の取得状況

- | | | |
|----|--------|----|
| 1. | 特許取得 | なし |
| 2. | 実用新案登録 | なし |
| 3. | その他 | なし |

Ⅲ. 研究協力者

HIV-1 E型oligomeric envelope protein gp120-gp41の高次構造と抗原性の解析

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

研究者 杉浦 互 国立感染症研究所エイズ研究センター

要旨

HIV-1E型ウイルスCM235の可溶性エンヴェロープタンパクCM235-gp140を作成した。このCM235-gp140を抗原としてウサギ抗血清の作成を行い、そのウイルス中和能を解析した。さらにマウスを同様に感作し単クローン抗体の作成を試みた。

A.研究目的

我々は今までにIIIB由来のoligomeric envelopeの解析を行ってきた。その結果oligomer構造をとったenvelope(env)はmonomeric envとは一部異なる抗原提示部を持ち、高い抗原性を示すことが明らかになった。

このIIIB-oligomerで誘導された抗血清は強い中和活性を示したが、残念ながら中和できたHIV-1はB型のみであり、最近増加しつつあるE型ウイルスの中和はできなかった。このことから今回は新たにE型ウイルスのenvをもとにoligomerを作成し、その抗原性の解析、B型およびE型envの相違について考察し、果たしてサブクラスの壁を越えて広範に中和活性を示すような抗血清を誘導しうる抗原が可能かどうかについて検討を加えた。

B.研究方法

1. HIV-1 E型ウイルスの可溶性120-41複合体(gp140)とgp120の作成：E型HIV-1の標準株ウイルスであるCM235株のenv遺伝子より可溶性gp140作成するために、CM235-env遺伝子の5'末にNde I, gp41のt膜貫通部直前にstop codonとSal Iをいれ、pVote2タンパク発現ベクターに入れる。このDNAを野生株のワクチニア(vSC60)を感染させたCV-1細胞に導入し、リコンビナントワクチニアウイルスを回収する。CM235-gp120の作成にはgp41の直前にstop codonとSal I siteをいれ、前述gp140同様にしてリコンビナントウイルスを回収する。このようにして作成したリコンビナントワクチニアをBSC-1細胞に感染させ、その培養上清に分泌されたgp140あるいはgp120をlentil lectin affinity columnで回収、さらにSuperdex columnを用いて、単体、2量体の各分画に分離し、以下に述べるウサギおよびマウスの感作抗原及び解析用のタンパクとして使用する。

2. 抗血清およびモノクローナル抗体の作成：ウサギに精製したCM235-gp140あるいはCM235-gp120をRiBiアジュバンドとともに4週間の間隔をあけて3回感作し、抗血清の作成を試みた。さらにマウスに感作することによりモノクローナル抗体の作成を試みた。

3. 抗血清の力価およびスペクトラムの解析
gp160をConcanavalinA(ConA)を介してELISA-plateに固層化し、抗血清の結合能の測定を行った。手技は以下の通りである。ConA (100mg/ml) 100ulを加え2時間室温で反応させる。PBS/TWEEN20で洗浄後、100ug/mlの濃度のgp160を100ul加え、12時間4Cでplateに吸着させる。洗浄後、解析対象である抗血清を加え2時間37Cで反応させる。反応後洗浄し、抗ウサギIgG-HRP標識ヤギ抗体を加え、更に1時間反応させる。反応後洗浄し基質を添加し発色させる。反応後吸光度計で読み取り解析する。ELISAの陽性コントロールとしてはE型HIV-1陽性者血清を用いた。

4. 抗血清の中和抗体の評価：抗血清のウイルス中和能の評価をACTG-プロトコルをもとにしたvirus infectivity reduction assayを用いて行った。すなわち、反応系の抗体の濃度を1mg/mlに固定し、ウイルスを5倍の希釈系列で希釈していくことにより、ウイルスの限界希釈を行い感染性を測定した。この結果を感作前の血清の場合と比較し、何%の感染性が失活したか観察する。ウイルスと抗血清は2時間以上混合し反応させた後にPHA刺激芽球化リンパ球に添加して感染させる。培養は2週間にわたり維持され、2週間目に逆転写酵素活性を測り、Reed-Munch法に基づいてウイルス力価に換算される。

C. 研究結果

1) E型ウイルスの代表株であるCM235株のenvをもとに可溶性gp140およびgp120を発現するリコンビナントワクチニア, vWS1およびvWS2を作成した。このvWS1によって発現されるgp140は2量体を形成することが精製分離の結果、明らかになった。このCM235の2量体は過去に我々が作成したIIIB-gp140と比較して構造が安定しており、その結果2量体分画の回収量が高いことが明らかになった。

2) CM235-140あるいはCM235-120各合成タンパクを抗原として各々2匹のウサギを免疫し、抗血清を作成した (anti-CM235-gp140-1,-2, anti-CM235-gp120-1,2)。ウサギ抗血清のIIIB-140, CM235-140, CM235-120各ウイルスenvへの結合能をELISAにより測定した。その結果はFig.1A,B(抗CM235-gp140),C,D(抗CM235-gp120)に示すように抗CM235-gp140血清は高い力価を示したのに対し、CM235gp120で感作を行った血清は同一条件で感作したにもかかわらず弱い反応しか認められなかった(C,D)。このことからCM235-gp140はCM235-gp120に比べて有意高い抗原性を示すことが明らかになった。高い力価を示した抗gp140血清の結合能をCM235-gp140, CM235-gp120, IIIB-gp140それぞれのenvについて見てみると (Fig.1A,B)、感作原であるCM235-gp140>CM235-gp120>IIIB-gp120の順に強い結合能を示した。このことはE型とB型では多量体の様な高次構造のレベルにおいても共通する抗原領域が少ないことを示唆するものであり、サブタイプを越えて交差性を示すような抗血清を誘導できるサブユニットワクチンを作ることが困難なことを示している。現在CM235-gp140, gp120についてより詳細な解析を行うためにモノクローナル抗体の作成を行っている。

3) 最も高い力価を示した抗gp140血清のウイルス中和能について解析を行った。Fig.2は抗CM235-gp140血清の3種類のE型ウイルス株 (CM235,NH-1,NH-2)そして2種類のB型ウイルス株 (NL4-3, B301593)に対する中和能を示した。図に示すようにCM235,NH-1,NH-2,NL4-3そしてB301593ウイルスに対する中和活性はそれぞれ70%、98%、100%、0%、22%を示した。このことからE型ウイルスの多量体gp140で感作誘導した抗血清はE型のウイルスのみに中和活性を示すことが明らかになった。

D. 考察

我々が取り組んでいるenvタンパクはウイルス感染

成立の際に重要な働きをすることが知られており、また宿主免疫反応の標的となっていることからHIV感染予防のためのワクチンの候補抗原として脚光を浴びてきた。1997年に米国のグループによりこのタンパク質のコアが結晶化され、より多くの事が明らかにされたが、まだその高次構造に関しては不明の点が多く機能と構造変化を含めより多くの研究が必要と思われる。HIV感染者の血清中に誘導される抗体と人工的にenvタンパクを抗原として感作して作りだされた抗血清とは、そのウイルス中和活性に大きな差があり、あきらかに前者の方が強くまたスペクトラムの広い抗血清が誘導される。この両血清の相違の原因にはさまざまな要因が考えられるが、最も重要なのは抗原として作用するenvの構造の差と考えられる。我々はこのことを実証するために過去にIIIB由来のgp140とgp120を用いて解析を行った。結論としてgp140で感作したもののほうが明らかに広範で且つ強い中和活性を示すことを明らかになった。しかしながらそのスペクトラムはHIVが感染することにより誘導されてくる場合と比べて狭く、サブタイプの異なるウイルスの中和はできなかった。このことを踏まえ今年度はE型ウイルス由来の多量体gp140を作成し、その抗血清の力価とスペクトラムを解析した。得られた結論はB型gp140/120の研究と基本的に同じで、gp140の強い抗原性は確認できたが、ウイルスのサブクラスを超えて中和能を発揮することはなかった。

E. 結論

CM235-gp140は中和抗体を誘導しうる優れた抗原であることが明らかになった。しかしながら、誘導された抗血清のウイルス中和スペクトラムはE型ウイルスに限られていた。われわれの今回および過去のgp140解析の結果を見るかぎり一種類の抗原でサブタイプ越えて中和活性を誘導できるような抗原タンパクを見いだすことは困難であり、幅広い型のHIV-1を標的とするには各種envのカクテルを使用することが望ましいと考えられた。

F. 研究発表

1. 論文

Sugiura, W., Broder, C.E., Moss, B. and Earl, P.

Characterization of conformation-dependent anti-gp120 murine monoclonal antibodies produced by immunization with monomeric and oligomeric human immunodeficiency virus type 1 envelope proteins

Virology 1999 Feb 15;254(2):257-67

2.学会発表

杉浦 互

Subtype E oligomeric envelope(CM235-gp140)の作成
とその解析

第46回日本ウイルス学会 10月12-14日

G.知的所有権の取得状況

該当なし

Gag/GFP 融合タンパク導入・発現するヒト B リンパ細胞を標的細胞に用いた HIVGag 特異的細胞障害性 T 細胞(CTL)活性測定を試み

分担研究者 有吉紅也 (国立感染症研究所 エイズ研究センター)

研究協力者 三浦秀佳 松田善衛 (国立感染症研究所 エイズ研究センター)

研究要旨 HIV Gag 特異的細胞障害性 T 細胞(CTL)の患者由来の野生株 Gag タンパクの認識効率を調べる目的で、新しい CTL 活性測定法の開発を試みている。今回既存の gag/GFP 融合タンパクベクターに NcoI 配列を組み入れ、患者由来の gag 遺伝子を直接 gag/GFP 融合タンパク遺伝子上にクローニング出来るベクターを作成した。また gag/GFP 融合タンパクベクターを electroporation によりヒト B リンパ細胞へ導入・発現させ GFP 蛍光発光を標識にして Cellsorter により分離に成功した。この細胞を将来 CTL の標的細胞として活用するために、GFP 蛍光発光の減弱をマーカーとした CTL 実験を行った。その結果、B51CTLepitope 由来の合成ペプチドをパルスした GFP 発現細胞に、⁵¹Cr release assay にて CTL 活性が確認された B51 拘束性の CTL clone を認識・反応させ GFP 蛍光発光の変化を観察したところ、有意な差は認められなかった。GFP 蛍光発光減弱をマーカーとした CTL 活性測定は困難と思われ、現在新たな CTL による細胞障害を示すマーカーの検索中である。

A. 研究目的

HIV は CTL エピトープ領域に変異を来たすことにより、CTL からエスケープすることが知られている。しかし、多くの患者体内で HIV 特異的 CTL 活性が見られるにもかかわらず、その CTL エピトープのアミノ酸配列を保持した HIV が存在している。このことは HIV が CTL からエスケープするのに別の機序が介在することを示唆する。

従来の CTL 活性測定法では、標的細胞の class I 抗原上に HIV 由来の CTL エピトープを提示させるのに、ペプチドを exogenous に加えるか、HIV gene を組み込まれた vaccine を感染させる方法に限られており、患者由来の自己ウイルス株の HIV gene を endogenous に発現させた時の CTL エピトープ提示効率については、まだ知られていない。

そこで、本研究では a)患者由来の自己ウイルス株の gag gene を endogenous に発現させたヒト B リンパ細胞を作成すること、b)この細胞を標的細胞とした簡易的 CTL 活性測定法の開発を目的とした。

B. 研究方法

今回既存の gag/EGFP 融合タンパク遺伝子に患者由来の gag gene を直接クローニングできるように NcoI 配列を組み入れた (図 1)。またプロトタイプ of gag/EGFP 融合タ

ンパクベクターを EBV により不死化された MHC class I A2、B51 患者由来のヒト B 細胞 (A2/B51-B) (岩本愛吉教授よりご供与) に electroporation により導入・発現させ、GFP 蛍光発光する細胞を Cell Sorter (EPICS) により分離することに成功した。

上記の細胞を将来 CTL 活性に活用する為に GFP 蛍光発光減弱を細胞障害のマーカーとした CTL 実験を行った。B51 ペプチド (滝口雅文教授ご供与) でパルスした GFP 発現 A2/B51-B 細胞を標的細胞として、またペプチドでパルスされていない GFP 発現 B51 細胞をコントロールとして用いた。CTL 細胞には滝口雅文教授よりご供与いただいた CTL clone を用い、標的細胞と E:T ratio 20:1 で混合、96-well U-bottom plate 上で標的細胞内の GFP 蛍光発光の減弱を観察した。加えて実験に用いた CTL clone の B51 拘束性の CTL 活性を ⁵¹Cr release assay にて確認した。

一方 MHC class I A2 拘束性の CTL line を作成するために A2 患者の末梢血単核細胞を既存の HIV-1 Gag CTL epitope 領域に相当する合成ペプチド (SLYNTVATL) によって刺激、IL-2 存在下で 2 週間培養した。この line 中の A2 拘束性の Gag CTL 活性を A2 ペプチドでパルスした A2/B51-B 細胞を用いて、⁵¹Cr

release assay にて調べた。

C. 研究結果

GFP 蛍光発光減弱をマーカーとした CTL 実験の結果を、図 2 に示した。B51 CTL clone が加えられた GFP 発光標的細胞を 6 時間後、24 時間後、4 日後に蛍光顕微鏡下で観察したが B51 ペプチドでパルスされた標的細胞とパルスされていない標的細胞との間に GFP 蛍光発光上顕著な差は見られなかった。しかし、2 日後にこの実験に用いた A2/B51-B 細胞を B51 ペプチドでパルス後 E:T ratio 14:1 7:1 で B51 CTL clone と混合させたところ、双方の Ratio においてペプチドでパルスされていないコントロールあるいは HLA unmatched コントロールに比べ有意に高い ^{51}Cr の放出がみられた (図 3a)。

A2 をもった HIV 感染者 2 名から A2 Gag ペプチドで刺激した line 36 個および 20 個を作成、A2 拘束性 GagCTL 活性を ^{51}Cr release assay にて調べたところ、有意な ^{51}Cr の放出はみられなかった (図 3 b)。

D. 考察

今回 electroporation の最適条件を求めることにより Gag/GFP 融合タンパクベクターの導入効率を 0.01% から 1% 以上にまで向上させることに成功した。しかし一度に導入、Sorter により分離して得られる Gag/GFP 発現細胞の数は ~5 万個までと限られており、これらの細胞を使って通常 100 万個以上の細胞を必要とする ^{51}Cr release assay を行うことは困難である。従って少数の標的細胞でも実験が行えるよう GFP による蛍光発光をマーカーにした実験を試みた。しかし CTL 活性が確認された CTL clone の存在下でも GFP 蛍光発光の減弱は見られず、この現象をマーカーとした CTL 活性測定は困難と思われる。CTL の標的細胞障害の機序として perforin 物質放出による標的細胞膜の透過性亢進、アポトーシスの誘導などがあげられている。今後この系を改善させる方向として、a) 各種アポトーシス標識を CTL による細胞障害のマーカーとする、b) 代謝速度の速い GFP を用いる、が考えられる。

今回用いられた A2 ペプチドに対する CTL

活性は、欧米から多くの報告があるが、本邦の HIV 感染者においてこのペプチドに対する CTL 活性の頻度は不明であり今後もさらに検討を進めてゆく必要がある。

E. 結論

従来の GFP による蛍光発光の減弱を細胞障害のマーカーとした CTL 活性測定は困難であり、この実験系を成功させる為には更なる改良を必要とする。

F. 研究発表

該当論文、および学会発表はない。

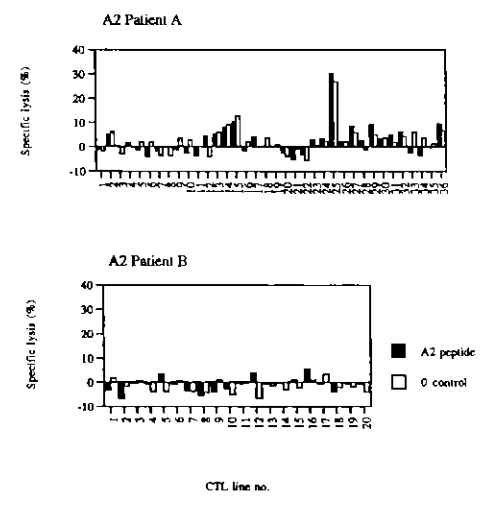
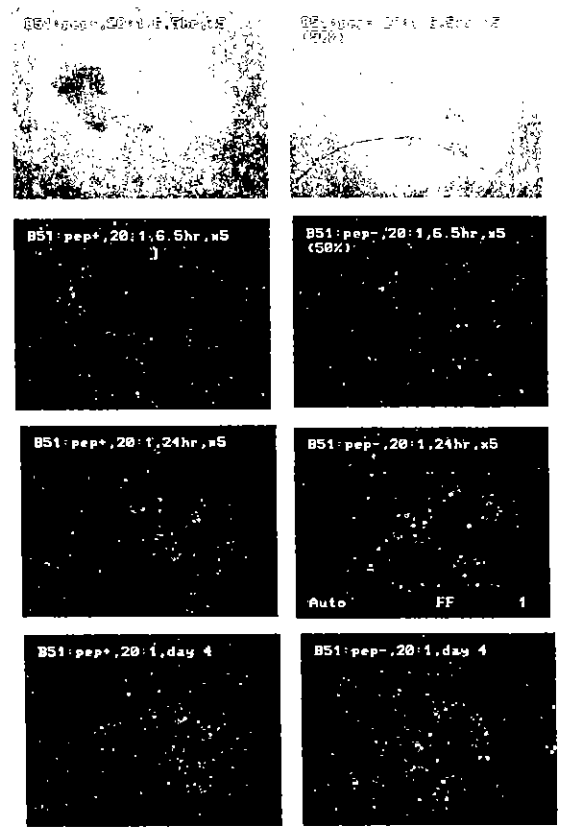
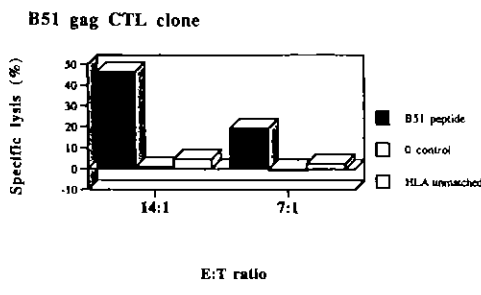
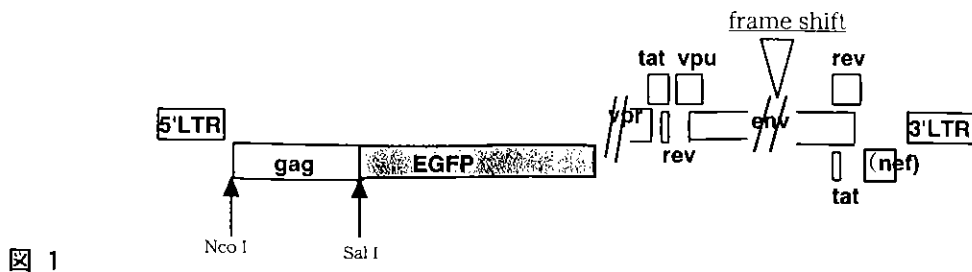


図3
 GFP ベクターを transfect した後、cellsorter で GFP 発光細胞を分離、B51 CTL epitope に相当するペプチド (10 μ M) でパルスした細胞 (左列) またはパルスしていない細胞 (右列) 各 1000 個と B51 拘束性 CTL clone 20,000 個を U-bottom, 96-well plate 上で混合。6.5 時間後の $\times 5$ 倍率、明視野 (1 行)、蛍光視野 (2 行) の写真。24 時間後 (3 行)、4 日後 (4 行)。

図2a 51Cr release assay による B51 拘束性 CTL clone の CTL 実験。
 Y 軸は specific lysis を示す。標的細胞は、B51 CTL epitope に相応する peptide (10 μ M) でパルスされた A2/B51-B 細胞 (B51 peptide), peptide でパルスされていない A2/B51-B 細胞 (0 control), B51 peptide でパルスされた B51 HLA allele を持たないヒト B 細胞 (HLA unmatched)。

図2b 51Cr release assay による A2 拘束性 CTL clone の CTL 実験。
 患者 A と患者 B からそれぞれ 36 個と 20 個の CTL line を作成。その line 中の CTL 活性を測定。標的細胞はペプチドでパルスされた A2/B51-B 細胞 (A2 peptide) とペプチドでパルスされていない 0 control。


IV. 刊行物一覽表

平成 11年 3月 25日

厚生大臣 宮下創平殿

住 所

フリガナ ヤマダアキオ

研究者 氏 名 山田章雄 
(所属施設 国立感染症研究所 筑波医学実験用霊長類センター)平成 10年度厚生科学研究費補助金 (エイズ対策 研究事業) に係る研究事業を完了したので
次のとおり報告する。

研究課題名 (課題番号) : HIV病原性の分子基盤の解明に関する研究 (H-10-エイズ-004)

国庫補助金精算所要額 : 金 60,000,000円也

1. 厚生科学研究費補助金総括研究報告書概要版及びこれを入力したフロッピーディスク
(別添1のとおり)
2. 厚生科学研究費補助金総括研究報告書 (別添2のとおり)
3. 厚生科学研究費補助金分担研究報告書 (別添3のとおり)

4. 研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌名 (雑誌のときは 雑誌名、巻号数、論文名)	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
AIDS Res. Hum. Retroviruses, 14:537-540, Identification and molecular characterization of human T lymphotropic virus type II infections in intravenous drug abusers in the former south Vietnam	1998		Fukushima Y, Lewis MJ, Monken C, Komuro K, Kusagawa S, Sato H, Takebe Y, Yamazaki S, Hien NT, ANH H, Long HT, Honda M, Hall WW
AIDS Res. Hum. Retroviruses 14:1379-1385, Genetic and serologic characterization of HIV-1 prevailing in Myanmar (Burma).	1998		Kusagawa S, Sato H, Watanabe S, Notomi K, Kato K, Shiino T, Thwe M, Oo KY, Lwin S, Mra R, Kywe B, Yamazaki S, Takebe Y
AIDS Res. Hum. Retroviruses 15:91-94, HIV type 1 env subtype E in Cambodia.	1998		Kusagawa S, Sato H, Kato K, Nohtomi K, Shiino T, Samrith C, Bun Leng H, Phalla T, and Takebe Y
Arch. Virol. 143, 85-95, Facilitation of HIV-1 isolation from patients by neuraminidase.	1998		Xiaomi Xin, Tatsuo Shioda, Masao Fukushima, Huiling Hu, Shin-ichi Oka, Aikichi Iwamoto and Yoshiyuki Nagai
Arch. Virol. 143, 851-861, Dissociation of ligand- induced internalization of CXCR-4 from co-receptor activity for HIV-1 Env-mediated membrane fusion.	1998		Huiling Hu, Tatsuo Shioda, Toshiyuki Hori, Chikaya Moriya, Atsushi Kato, Yuko Sakai, Kouji Matsushima, Takashi Uchiyama and Yoshiyuki Nagai.
FEBS letters, 425, 105-111, Large quantity production with extreme convenience of human SDF-1 _α and SDF-1 _β by a Sendai virus vector.	1998		Chikaya Moriya, Tatsuo Shioda, Kei Tashiro, Takashi Nagasawa, Masaya Ikegawa, Yukano Ohnishi, Atsushi Kato, Huiling Hu, Xiaomi Xin, Mohammad K. Hasan, Midori Maekawa, Yutaka Takebe, Yuko Sakai, Tasuku Honjo, and Yoshiyuki Nagai.

FEBS letters, 426, 367-372, Importance of the N-glycan in the V3 loop of HIV-1 envelope protein for CXCR-4- but not CCR-5-dependent fusion.	1998	Emi E. Nakayama, <u>Tatsuo Shioda</u> , Masashi Tatsumi, Xiaomi Xin, Deshan Yu, Shinji Ohgimoto, Atsushi Kato, Yuko Sakai, Yukano Ohnishi and Yoshiyuki Nagai.
Proc. Natl.Acad.Sci.USA. 95, 6331-6336, Anti-HIV-1 and chemotactic activities of human SDF-1_ and SDF-1_ are abolished by CD26/dipeptidyl peptidase IV mediated cleavage	1998	<u>Tatsuo Shioda</u> , Hiroyuki Kato, Yukano Ohnishi, Kei Tashiro, Masaya Ikegawa, Emi E. Nakayama, Huiling Hu, Atsushi Kato, Yuko Sakai, Huanliang Liu, Tasuku Honjo, Akio Nomoto, Aikichi Iwamoto, Chikao Morimoto, and Yoshiyuki Nagai.
FEBS letters. 431, 236-240, Negative regulation of anti-human immunodeficiency virus and chemotactic activity of human stromal cell-derived factor 1_ by CD26/dipeptidyl peptidase IV.	1998	Takashi Ohtsuki, Osamu Hosono, Hiroshi Kobayashi, Yasuhiko Munakata, Akiko Souta, <u>Tatsuo Shioda</u> and Chikao Morimoto.
J. Virol. 72, 8365-8370, Location-specific unequal contribution of the N-glycans in SIV gp120 to viral infectivity and removal of multiple glycans without disturbing infectivity.	1998	Shinji Ohgimoto, <u>Tatsuo Shioda</u> , Kazuyasu Mori, Emi E. Nakayama, Huiling Hu and Yoshiyuki Nagai.
J. Leukoc. Biol. 64, 642-649, IL-4 and a glucocorticoid up-regulate CXCR4 expression on human CD4+ T lymphocytes and enhance HIV-1 replication.	1998	Jianbin Wang, Akihisa Harada, Shuzo Matsushita, Shintaro Matsumi, Yi Zhang, <u>Tatsuo Shioda</u> , Yoshiyuki Nagai, and Kouji Matsushima.
J. Virol. 73. 1868-1877, Factors governing the activity <i>in vitro</i> of ribozymes transcribed by RNA polymerase III	1999	Shiori Koseki, Tsuyoshi Tanabe, Kenzaburo Tani, Shigetaka Asano, <u>Tatsuo Shioda</u> , Yoshiyuki Nagai, Takashi Shimada, Jun Ohkawa, and Kazunari Taira.
Arch. Virol. 144, 29-43, Active late HIV-1 transmission and growth in the brain with HIV encephalitis.	1999	Gatanaga, H., Oka, S., Ida, S., Wakabayashi, T., <u>Shioda, T.</u> , and Iwamoto, A.
Int. Arch. Allergy Immun. 116:40 - 48, Molecular cloning and expression of cynomolgus monkey interleukin-1 beta cDNA..	1998	Totsuka, K., Takakura, H., Hashimoto, O. and Tatsumi, M.
AIDS Res. Hum Retrovir. 14: 31-38, V3 loop of human immunodeficiency virus type 1 reduces cyclin E expression and induces G1 arrest in IL-2-dependent T cells.	1998	Sakaida H, Kawamata S, <u>Hattori T</u> , Uchiyama T
AIDS 12:1557-1559, A decline of anti-DP107 antibody associates with clinical progression.	1998	<u>Hattori T</u> , Komoda H, Pahwa S, Tateyama M, Zhang X, Xu Y, Oguma S, Fukutake K, Uchiyama T.
J. Virol 72:9763-70, T-tropic human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-derived V3 loop peptides directly bind to CXCR-4 and inhibit T-tropic HIV-1 infection.	1998	Sakaida H, Hori T, Yonezawa A, Sato A, Isaka Y, Yoshie O, <u>Hattori T</u> , Uchiyama T.