

図2. HIV-1セロコンバージョン血清パネルの免疫複合体転移測定法による抗HIV-1 p17 IgG及びIgM抗体の検出時期とHIV-1p24抗原の検出時期の比較

免疫複合体転移測定法によるp24抗原と抗p17 IgG抗体及びRT-PCRによるRNAのカットオフ値

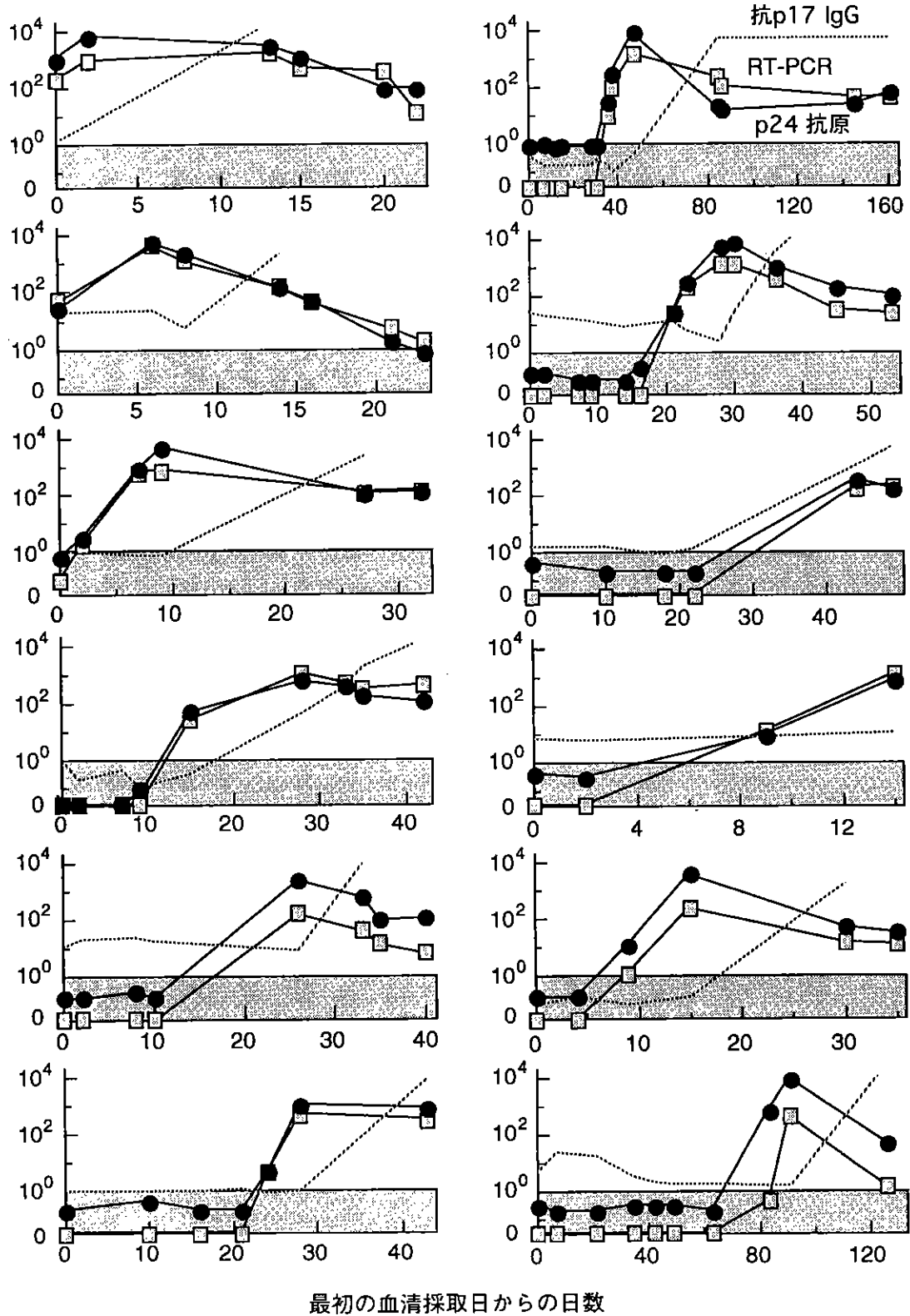


図3. HIV-1セロコンバージョン血清パネルの免疫複合体転移測定法によるHIV-1p24抗原と抗HIV-1 p17 IgG抗体の検出時期とRT-PCRによるHIV-1 RNAの検出時期の比較

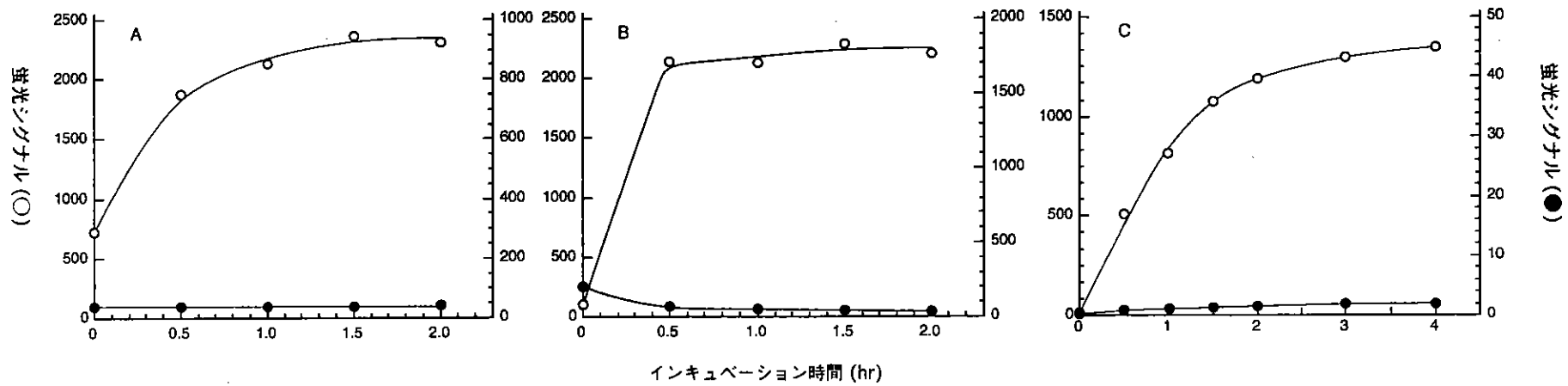


図4 抗HIV-2 gp36IgG抗体の免疫複合体転移測定法における免疫反応の時間経過。

血清サンプル10 μ lをHIV-2 gp36 (585-611) 合成ペプチド- β -D-ガラクトシダーゼ結合物、2,4-ジニトロフェニル化ウシ血清アルブミン-HIV-2 gp36 (585-611) 合成ペプチド結合物と室温でインキュベート (免疫複合体の形成)。続いて反応液に、アフィニティー精製抗2,4-ジニトロフェニル基 IgG 不溶化着色ポリスチレンビーズ2個を加え、振盪 (210 振盪/分) しながら室温でインキュベート (免疫複合体のトラップ)。着色ポリスチレンビーズを洗浄後、 ϵ -N-2,4-ジニトロフェニル-L-リジン溶液、150 μ lとアフィニティー精製ウサギ抗 (ヒトIgG γ -鎖) IgG不溶化白色ポリスチレンビーズと室温で振盪しながらインキュベート (免疫複合体の転移反応)。最後の白色ポリスチレンビーズを洗浄。結合した β -D-ガラクトシダーゼ活性を30 $^{\circ}$ C、1時間測定。血清サンプルはHIV-2のみに感染している血清 (PRF202-02) を非感染者血清で200倍希釈。それぞれのインキュベーション時間は、Aでは、免疫複合体形成；0~2時間、トラップ；20分、Bでは、免疫複合体形成；1時間、トラップ；0~2時間、Cでは、免疫複合体形成；1時間、トラップ；1時間、転移反応；0~4時間とした。白ぬきシンボルはHIV-2のみに感染した血清、黒塗りシンボルは非感染者の血清。

6. HIV-2 遺伝子の高感度検出法の開発と HIV 混合感染の遺伝子診断

分担研究者 石川 晃一（国立感染症研究所エイズ研究センター）

研究要旨 HIV-2 の PCR 法による高感度検出測定系の開発を目的として、特異的プライマーを新たに設計し、検討した。今回新たにデザインした LTR-GAG 領域を増幅するプライマーを用いると高感度に検出でき、90%以上（ガンビアおよびギニアビサウに関しては100%）の感度で HIV-2 遺伝子を検出可能であることが判明した。

A. 研究目的

時間的距離の短縮による活発な人的移動により感染症もこれまでの地域限局的な流行から地球規模の大流行の様相を示している。本邦においては優れた検疫システム等により多くの感染症が水際で阻止されてきている。しかしながら近年の HIV 感染の国内における流行は検疫体制のみでは阻止し得ず、これは東南アジア由来および他地域からの HIV が本邦で流行していることから明らかである。また西アフリカやインドで蔓延している HIV-2 は本邦内における感染は未だ報告はされていないがその実体は明らかでなく、今後侵入する事は十分考えられまたさらに抗原性の異なる HIV の侵入も考えらる。HIV-2 は HIV-1 と比べて、感染後の潜伏期間が長くその病原性も弱いことが最近示唆されている。HIV-2 の生物学的性状（ウイルス遺伝子、蛋白、糖鎖等）や感染宿主側のウイルス動態等を HIV-1 のそれと比較解析することにより病原性をつかさどる機構を解明すれば、HIV-2 のみならず HIV-1 のワクチン開発や治療薬開発につながるものと考えられる。さらに HIV-2 は動物実験（サル、ヒヒ）が可能であることからワクチンや治療薬の効果判定がより人に近い状態で可能となる。そこで未だ十分でない HIV-2 の遺伝子検出系をまず高感度かつ特異的にする事を目的として研究を行った。

B&C. 研究方法と結果

HIV-2 遺伝子の高感度検出法の開発と HIV 混合感染の遺伝子診断

血清学的混合感染が実際どの程度両ウイルスを保持しているのかを明らかにするために、HIV-2 の PCR 法による高感度検出測定系の開発

を目的として、特異的プライマーを新たに設計し、検討した。今回新たにデザインした LTR-GAG 領域を増幅するプライマーを用いると高感度に検出でき、90%以上（ガンビアおよびギニアビサウに関しては100%）の感度で HIV-2 遺伝子を検出可能であることが判明した。さらにガンビアおよび象牙海岸より収集した209検体の血清学的に混合感染と思われるサンプルに関して PCR により検討したところ72%が陽性を示した。これは、これまで報告されているものの中で最も高感度に混合感染を検出する測定系であり、かつ十分な検体数を用いたものである。

D. 考察

今後ここに示した PCR の系を用いる事により HIV-2 診断のみならず HIV-2 の低病原性等の疫学的解析研究にも有用であると考えられる。

F. 研究発表

1. Saito T, Ishikawa K, Osei-kuwasi M, Kaneko T, Brandful J, Nuvor V, Aido S, Ampofo W, Apeagyei F, Ansah J, Adu-Sarkodie Y, Nkrumah F and Abe K. Prevalence of hepatitis G and characterization of viral genome in Ghana. Hepatology Research, In press
2. K Ariyoshi, F Cham, N Berry, E Harding, S Sabally, PT N'Gom, K Ishikawa, T Corrah, R Tedder, H Whittle. Diagnosis of HIV-1/-2 dual infection using dilution analysis of type-specific antibody ϵ AIDS 1998, Vol. 12, No. 18,p2504-2505.
3. Ishikawa K, Fransen K, Ariyoshi K, Nkengasong JN, Janssens W, Heyndrickx L, Whittle H, Diallo MO, Ghys PD, Coulibaly IM, Greenberg AE, Piedade J, Canas-Ferreira W, van der Groen G. Improved detection of HIV-2 proviral DNA in

- dually seroreactive individuals by PCR. AIDS
12: 1419-1425, 1998
4. Brandful J., Ampofo WK., Janssens W., Adu-Sarkodie., Apeagyei E., Anyomi F., Aido S., Yamamoto N., Ishikawa K., Sata T. and Kurata T. Genetic and phylogenetic analysis of HIV-1 strains from southern Ghana. AIDS Res.Hum.Retro. 14, 815-818, 1998

学会発表

1. 石川晃一、James Brandful、桜井範子、Jacob Barnor、William Ampofo、佐多徹太郎、山本直樹、倉田毅：ガーナにおける HIV サブタイプの解析。第 12 回日本エイズ学会（東京），1998
2. K.Ishikawa, K.Fransen, K.Ariyoshi, J.Nkengasong, W.Janssens, L. Heyndrickx, K.Vereecken, H.Whittle M.O. Diallo, PD.Ghys, I-M. Coulibaly, AE.Greenberg, J. Piedade, P. Azinheira, W. Canas-Ferreira, G.van der: IMPROVED DETECTION OF HIV-2 PROVIRAL DNA IN DUALY SEROREACTIVE INDIVIDUALS BY PCR. 第 4 6 回ウイルス学会（東京），1998
3. 有吉紅也、N Berry, F Cham, S Jaffar, 石川晃一、T Corrah, H Wittle: HIV-1/HIV-2 重複感染者抹消血単核細胞中の HIV プロウイルスの定量解析” 日本ウイルス学会第 4 6 回学術集会（東京）

7. HIV-1 粒子吸着による CD4⁺ T 細胞サブセットの活性化とアポトーシス誘導のためのエフェクター活性誘導

分担研究者：生田 和良（北海道大学・免疫研・血清学部門；
大阪大学・微研・ウイルス免疫分野）
共同研究者：堀越 東子、鈴木 聡子、向井 徹
（北海道大学・免疫研・血清学部門）

研究要旨 これまでの研究により、HIV-1 粒子吸着に基づく健常者由来末梢血単核球 T 細胞（PBMC-Ts）のアポトーシス機序を説明できるモデル系として、CD4⁺ T 細胞のサブセット（CD4⁺/CD38⁺）が粒子吸着によりアポトーシス誘導のエフェクター活性を獲得することを示した。すなわち、CD4⁺/CD38⁺分画は粒子吸着を引き金として CD25 と Fas リガンドを発現する。この現象は、ウイルス粒子として臨床分離株や持続感染クローン細胞の産生する非感染性の L-2 粒子を用いて観察されたが、実験室株である LAI（L-2 の親株）では認められなかった。今回、このエフェクター活性獲得機序を探る目的で、L-2 粒子吸着による T 細胞活性化の可能性を検討した。その結果、粒子吸着後 1 時間で既に CD4⁺ T 細胞上の CD25 に明かな発現亢進が、また CD38 にもごくわずかな亢進が認められた。そこで、CD4⁺/CD38⁺と CD4⁺/CD38⁻分画に分けて、HIV-1 の感染実験を行った。その結果、両分画間でウイルス吸着量に差は認められなかったが、感染 11 日後の細胞表面の Env 発現量や培養上清へのウイルス産生量は CD4⁺/CD38⁺分画の方が CD4⁺/CD38⁻分画よりも高かった。以上の結果から、非感染性であってもウイルス粒子の吸着を受けることにより CD38 陽性になった T 細胞はウイルス高産生の細胞へと変化することが示唆された。一方、同様に CD25 陽性となった活性化 T 細胞（CD38⁻）はウイルス低産生の細胞であり、周辺の非感染 T 細胞をアポトーシスに導くエフェクター活性を獲得すると考えられる。

A. 研究目的

HIV-1 感染様式は多様である。感染したウイルスは一旦増殖するが、宿主の免疫応答、特に細胞性免疫により生体から排除される。しかし、その排除は完全ではなく、一部のウイルスは変異誘発により生き残り、生体は長期にわたる無症候性のウイルスキャリアとなる。すなわち、通常 HIV-1 は感染後の複製により宿主細胞を破壊するが、一方で *vpr* のような細胞障害性関連遺伝子の変異により持続/潜伏感染を成立させる。実際、この無症候性キャリアからの分離株が一般的に slow/low で NSI と呼ばれ、AIDS 発症患者からの分離株の rapid/high で SI という性状と比べると、弱毒性である。また、HIV-1 キャリアの血液中に存在するウイルス遺伝子の 99.99% 以上は defective であることも証明されている。しかし、無症候性キャリア期に存在するこのようなウイルスが弱毒性もしくは defective であっても、その後の AIDS 発症へと導く能力は備えていると考えられる。この機序を明らかにすることは AIDS 発症機序、ひいては無症候性キャリア期における発症予防法の開発の上でも重要な課題である。

HIV-1 感染による病態のマーカーと考えられている現象に免疫担当細胞の異常活性化がある。

HIV-1 キャリアの T 細胞において活性化マーカー抗原である CD25 の発現の亢進が観察されている。さらに、他の活性化マーカー抗原である CD38 の発現の亢進も確認されている。

一方、HIV-1 感染による AIDS 病態の主な機序である免疫細胞数の減少は活性化依存的なアポトーシスに依ることが明らかにされている。HIV-1 キャリア内の免疫担当細胞でアポトーシスを引き起こすものは HIV-1 の標的である CD4 陽性 T 細胞のみならず、CD8 陽性細胞にまで及ぶ。しかも、これらは HIV-1 ゲノム陰性の非感染細胞であることも明らかになっている。これまでにこのようなバースタンダーアポトーシス誘導機序は、可溶性 gp120 と gp120 抗体によるレセプター CD4 のクロスリンクにより説明されてきた。また、Tat タンパクによりアポトーシス誘導の重要因子である Fas の亢進が起こることも報告されている。しかし、これらのモデルは CD4⁺ T 細胞以外のアポトーシスは説明できない。私達はこれまでに、健常者由来 PBMC-Ts に HIV-1 粒子吸着を行うことにより、CD4⁺ T 細胞のみならず CD8⁺ T 細胞にもアポトーシスが誘導されることを報告してきた。持続感染クローン細胞 L-2 から産生される L-2 粒子や臨床分離株粒子ではその活性が認められたが、長期間 T

細胞株で維持培養されてきた LAI 株 (L-2 の親株であるにもかかわらず) にはその活性が認められなかった。このアポトーシスは、粒子吸着を受けた T 細胞の一部のサブセット (CD4⁺/CD38⁺) がエフェクター活性を獲得することに基づいている。実際、HIV-1 キャリアの末梢血からこの CD4⁺/CD38⁺ の T 細胞集団を分画し、ウイルス粒子の吸着なしで健常者 T 細胞と共培養したところ、同様のアポトーシスが誘導された。

今回、L-2 を用いて、CD25 や CD38 といった活性化マーカー抗原の異常亢進が粒子吸着によって引き起こされるのかどうかを検討した。また、T 細胞サブセット間における HIV-1 感染・複製効率の差異についても検討した。

B. 材料と方法

1. ウイルスと細胞

HIV-1 の LAI 株に持続感染した MOLT-4 (MOLT-4/LAI) および LAI 感染 MT-4 細胞から樹立した L-2 クローン細胞株の産生するウイルス粒子を用いた。L-2 のプロウイルス DNA 内には *pol protease*, *vpr*, *env gp41*, *nef* に変異が認められ、従って非感染性のドーナツ様粒子として産生される。

2. HIV-1 抗原検出 ELISA

ウイルス粒子量の定量は、HIV-1 Gag p24 抗原 ELISA (Cellular Products Inc.) により行った。

3. PBMC の分画

健常人より Ficoll-Paque (Pharmacia) 遠心にて PBMC を調製し、さらにナイロンウールカラム、CD11b、CD14 抗体を用いたパニングにより PBMC-T を得た。CD4⁺ T 細胞分画は CD8、CD11b、CD14 抗体を用いたパニングにより調製した。CD4⁺/CD38⁺ T 細胞および CD4⁺/CD38⁻ T 細胞は、CD4⁺ T 細胞にさらに CD38 抗体を作用させることにより分画した。

4. HIV-1 粒子吸着

PBMC-T への HIV-1 粒子吸着は、 2×10^6 T 細胞当たり L-2 粒子を p24 抗原検出 ELISA にて 6 および 60 ng の条件で 1 時間および 18 時間行った。

5. HIV-1 感染

CD4⁺/CD38⁺ T 細胞分画と CD4⁺/CD38⁻ T 細胞分画に対して、HIV-1 LAI 株を感染し、両者の

感染効率を比較した。HIV-1 の吸着効率については 1 時間の吸着後、フローサイトメトリー解析にて Env 抗原量により吸着レベルを比較した。その後、3 日ごとに培養液交換を行い、11 日目の細胞の Env 抗原発現レベル (フローサイトメトリー解析) と上清中のウイルス量 (抗原検出 ELISA) を解析することにより、HIV-1 複製効率を比較した。

6. フローサイトメトリー解析

活性化マーカー抗原 CD25 および CD38 の発現はそれぞれの抗体 (Becton-Dickinson) を用いたフローサイトメトリー解析にて検討した。また、HIV-1 Env の発現は患者血清を用いて解析した。

C. 研究結果

1. 不完全 L-2 粒子吸着により認められた CD4⁺ T 細胞の活性化

3 人の健常者ドナーから PBMC-T を調製し、L-2 粒子 (6 および 60 ng) を 1 時間吸着したところ、Env 発現が強く認められた L-2 粒子吸着 60 ng の条件下において、CD25 の発現亢進が顕著に認められた (Figure 1)。この結果は、粒子吸着後 18 時間においてもほぼ同様であったが、18 時間の方が CD25 の発現亢進は顕著であった。一方、CD38 については L-2 粒子吸着による明かな発現亢進は観察できなかった (Figure 1)。

次に、CD25 の発現亢進が認められる細胞の特定化を行うため、PBMC-T 分画に同様に L-2 粒子吸着を行った後、CD25 抗体と CD4 抗体、あるいは CD25 抗体と CD8 抗体を用いた 2 重染色を行い、フローサイトメトリーにて解析した。その結果、CD25 の発現亢進は CD8⁺ T 分画には認められず、CD4⁺ T 分画にのみ認められた。この結果は、CD4⁺ T 細胞分画を調製し、同様に行ったフローサイトメトリー解析においても確認できた (Figure 1)。一方、この CD4⁺ T 分画においては CD38 の発現亢進もわずかに認められた (Figure 1)。CD25 および CD38 とともに、粒子吸着後 18 時間後の方がこの亢進は顕著であった。

この結果を確認するために、CD4⁺/CD38⁻ T 細胞分画を調製し、同様に L-2 粒子吸着を行った。その結果、顕著な CD25 発現亢進が、また、わずかな CD38 発現亢進が確認できた (Figure 1)。

これらの L-2 粒子吸着に基づく CD25 および CD38 発現亢進の程度と、マイトージェンによる活性化の程度を比較するため、PHA で 3 日間刺激した CD4⁺/CD38⁻ T 細胞分画につきフローサイ

トメトリー解析を行った。その結果、ほとんどの細胞が CD25 および CD38 の発現が陽性となった。CD38 抗原の発現はほぼ一様に亢進していたが、CD25 の発現の程度は heterogeneous な発現分布をしていた。

2. CD4⁺/CD38⁺および CD4⁺/CD38⁻ T 細胞分画への HIV-1 感染

HIV-1 感染・複製効率について、CD4⁺/CD38⁺ および CD4⁺/CD38⁻ T 細胞分画間の比較を行った。HIV-1 LAI 株での感染を行った結果、吸着 1 時間での吸着効率に大きな差異は認められなかった。その後、3 日間ごとに培養液の交換を行い、11 日目の HIV-1 Env 抗原の発現をフローサイトメトリーにて解析したところ CD4⁺/CD38⁺ T 細胞分画の方が CD4⁺/CD38⁻ T 細胞分画より強く、また培養上清中のウイルス産生量を抗原検出 ELISA にて解析したところ同様に CD4⁺/CD38⁺ T 細胞分画の方が高かった (Figure 2)。

D. 考察

HIV-1 感染によって引き起こされる AIDS 病態を理解するため、本年度は HIV-1 キャリア内で認められている免疫担当細胞の異常活性化機序を検討した。その結果、非感染性だが、機能性の Env gp120 を表面に持つ L-2 粒子を吸着させた T 細胞に顕著な活性化が認められた。

HIV-1 感染個体内には T 細胞の CD25 陽性細胞数の割合が亢進することが明らかとなっている。さらに、CD38 抗原陽性 T 細胞の割合が上昇する点も HIV-1 感染者のマーカーとなる現象と考えられている。すなわち、CD38 発現の亢進は、抗 HIV-1 療法の治療を受けた個体では正常レベルにまで低下することから、その発現亢進はウイルスの直接作用もしくは間接作用に基づくと考えられる。今回、非感染性ながら細胞への吸着性は野生型の実験室株である LAI 粒子以上の活性を持つ L-2 粒子を用いることにより、CD4⁺ T 細胞においてのみ、CD25 の顕著な発現亢進と CD38 のわずかな発現亢進が認められたが、CD8⁺ T 細胞においては両活性化マーカーの発現に変化は認められなかった。しかし、生体内においては CD8⁺ T 細胞上の CD38 の発現もまた亢進することが報告されており、従って生体内で観察される CD8⁺ T 細胞の CD38 発現亢進の機序は、CD4⁺ T 細胞のものとは異なっている可能性が考えられる。

私達は、HIV-1 粒子吸着を受けた CD4⁺ T 細胞のうちの CD4⁺/CD38⁺ T 細胞サブセットが周辺の

非感染 T 細胞をアポトーシスに導くエフェクター活性を獲得することを報告した。この機能は、L-2 粒子に顕著な効果のあることを見出したが、L-2 分離の親株である LAI 粒子の吸着では同様の効果は観察されなかった。また、今回、L-2 粒子吸着に基づき細胞活性化が認められた。従って、この粒子吸着によって引き起こされる両者の現象には何らかの共通性があると考えられる。

感染性の無い L-2 粒子にバイスタンダーアポトーシス誘導能とともに T 細胞活性化能を見出した。この結果は、defective であっても、AIDS 発症機序に何らかの形で関与していることを強く示唆する。今後、感染性粒子のみならず非感染性または弱毒性粒子によって引き起こされる現象、特に生体内での役割について証明できれば、HIV-1 病態の予防や治療法の開発の前提となると考えられる。

E. 結論

健康人 PBMC 由来の PBMC-T、CD4⁺ T、CD4⁺/CD38⁻ T 細胞分画を調製し、HIV-1 粒子の吸着を行った。その結果、CD4⁺ T 細胞分画のみに CD25 抗原の顕著な発現亢進が、また CD38 抗原のわずかな発現亢進が起こることが明らかとなった。この T 細胞活性化は PHA 刺激により見られるものと異なっていた。また、HIV-1 の感染効率は CD4⁺/CD38⁺ T 細胞分画の方が CD4⁺/CD38⁻分画よりも高かった。これらの結果より、非感染性ウイルス粒子であってもその吸着を受けることにより CD38 陽性になった T 細胞はウイルス高産生の細胞へと変化することが示唆された (Figure 3)。一方、CD25 陽性となった活性化 T 細胞は CD38 陰性のウイルス低産生の細胞であり、周辺の非感染 T 細胞をアポトーシスに導くエフェクター活性を獲得すると考えられる (Figure 3)。

F. 研究発表

1. 論文発表

1998

- 1 Fujinaga, K., Nakaya, T. and Ikuta, K.: Generation of endogenous tumour necrosis factor- α in MOLT-4 cells during the acute replication phase of human immunodeficiency virus type 1 determines the subsequent latent infection. *J. Gen. Virol.* 79, 221-229, 1998
- 2 Goto, T., Nakai, M. and Ikuta, K.: The life cycle of human immunodeficiency virus type 1 (review). *Micron* 29, 2/3, 123-138, 1998

- 3 Tobiume, M., Fujinaga, K., Kameoka, M., Kimura, T., Nakaya, T., Yamada, T. and Ikuta, K.: Dependence of host cell cycle for activation of HIV-1 gene expression from latency. *J. Gen. Virol.* 79, 1363-1371, 1998
 - 4 Takahashi, A., Ogasawara, K., Matsuki, N., Fujinaga, K., Nakaya, T., Ikuta, K., Wattana, A., Honda, M., Fukui, Y., Sasazuki, T., Iwabuchi, K. and Onoé, K.: Development of peptide vaccines inducing production of neutralizing antibodies against HIV-1 viruses in HLA-DQ6 mice. *Vaccine* 16, 1537-1543, 1998
 - 5 Kameoka, M., Wattana, A., Suzuki, S., Horikoshi, H., Khilai-Khiam, N., Meguro, T., Yamada, K., Tanaka, Y., Yoshihara, K., Luftig, R. B. and Ikuta, K.: A specific T-cell subset with CD4⁺/CD38⁻ markers derived from HIV-1 carriers induces apoptosis in healthy donor-derived T-lymphocytes. *Virus Res.* 56, 115-122, 1998
 - 6 Tokunaga, K., Kojima, A., Kurata, T., Ikuta, K., Inubushi, R., Shimano, R., Kawamura, M., Akari, H., Koyama, H. and Adachi, A.: Producer cell-dependent requirement of the Nef protein for efficient entry of HIV-1 into cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 250, 565-568, 1998
 - 7 Saadat, M., Ikuta, K. and Yoshida, M. C.: Chromosome aberrations in peripheral blood mononuclear cells infected with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *Chromosome Science* 2, 39-41, 1998
 - 8 Saadat, M., Takahashi, H., Bahmani, M.K., Ikuta, K. and Yoshida, M.C.: Does human immunodeficiency virus type-1 integrate in chromosomes randomly? *Chromosome Science* 2, 5-8, 1998
 - 9 Tokunaga, K., Kojima, A., Kurata, T., Ikuta, K., Akari, H., Koyama, H., Kawamura, M., Inubushi, R., Shimano, R. and Adachi, A.: Enhancement of human immunodeficiency virus type 1 infectivity by Nef is producer cell-dependent. *J. Gen. Virol.* 79, 2477-2453, 1998
 - 10 Inabe, K., Ikuta, K. and Aida, Y.: Transmission and propagation in cell culture of virus produced by cells transfected with an infectious molecular clone of bovine leukemia virus. *Virology* 245, 53-64, 1998
- 1999
- 1 Inabe, K., Nishizawa, M., Tajima, S., Ikuta, K. and Aida, Y.: The YXXL sequences of a transmembrane protein of bovine leukemia virus are required for viral entry and incorporation of viral envelope protein into virions. *J. Virol.* 73, 1293-1301, 1999
 - 2 Tanaka, T., Kameoka, M., Ota, K., Itaya, A., Ikuta, K. and Yoshihara, K.: Establishment of persistent infection with HIV-1 abrogates caspase-3-dependent apoptotic signaling pathway in U937 cells. *Experimental Cell Research*, in press
2. 学会発表
- 1998
- 1 鈴木聡子、佐藤克明、高橋恒夫、生田和良： HIV-1 吸着により誘導される樹状細胞の T 細胞傷害活性に関する解析。第 46 回日本ウイルス学会 10 月 東京
 - 2 飛梅実、河本聡、鈴木聡子、生田和良： HIV-1 Nef 蛋白質によって誘導される細胞内シグナル伝達経路の解析。第 46 回日本ウイルス学会 10 月 東京
 - 3 河本聡志、Wattana Auwanit、向井徹、生田和良： タイ E 型 HIV-1 の分離とその Nef 蛋白質の血清学的解析。第 12 回日本エイズ学会 12 月 東京
 - 4 堀越東子、Wattana Auwanit、鈴木聡子、向井徹、生田和良： HIV-1 感染における末梢血 CD4⁺T 細胞サブセット(CD38⁺と CD38⁻)間の役割分担。第 12 回日本エイズ学会 12 月 東京
 - 5 鈴木聡子、佐藤克明、高橋恒夫、生田和良： HIV-1 粒子吸着樹状細胞による末梢血 T 細胞の増殖増強と障害。第 28 回日本免疫学会総会 12 月 神戸
 - 6 河本聡志、Wattana Auwanit、高橋宏和、向井徹、生田和良： HIV-1 B 型、E 型 Nef 蛋白質の血清学的解析。第 34 回日本ウイルス学会支部総会 9 月 札幌
 - 7 生田和良： 特別講演 AIDS 病態：長期生存型 HIV 粒子の役割。第 7 回日本臨床化学会北海道支部総会 1 月 札幌

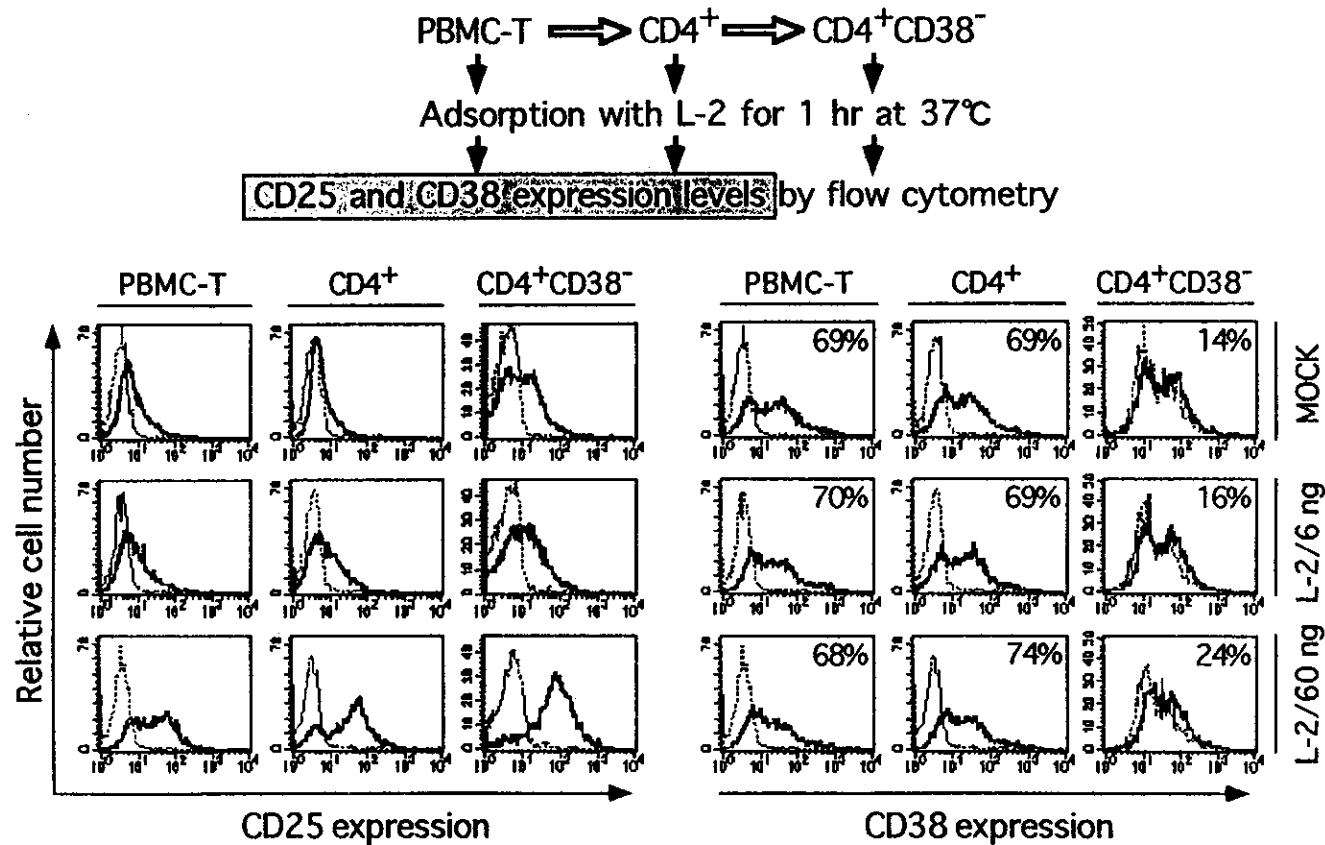
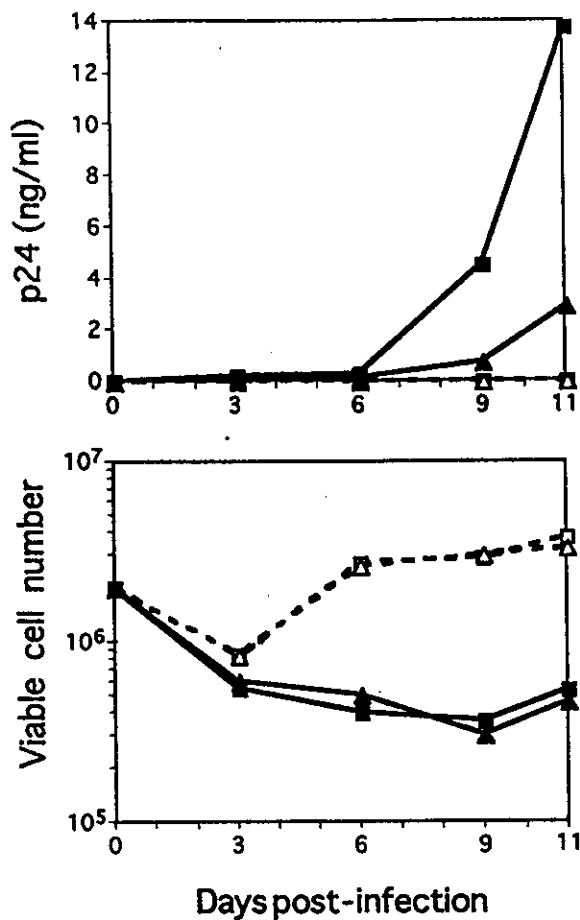


Figure 1 : 非感染性のウイルス粒子 (L-2粒子) 吸着によるCD4⁺ T細胞の活性化。健康人由来末梢血T細胞より、ネガティブセレクションによりCD4⁺ 分画、CD4⁺/CD38⁻ 分画を精製した。T細胞、CD4⁺ 分画T細胞、CD4⁺/CD38⁻ T細胞分画それぞれにL-2粒子を1時間吸着後、Flow cytometryにより細胞表面のCD25、CD38の発現を解析した。その結果、CD4⁺ T細胞において活性化マーカーであるCD25の顕著な発現増強とCD38のわずかな発現増強が認められた。



--□-- CD4⁺CD38⁺/MOCK -△- CD4⁺CD38⁻/MOCK
 —■— CD4⁺CD38⁺/LAI —▲— CD4⁺CD38⁻/LAI

Figure 2 : CD4⁺/CD38⁺、CD4⁺/CD38⁻ 分画のウイルス産生量の比較。健康人由来末梢血T細胞より、ネガティブセレクションによりCD4⁺分画を精製後、さらに、ポジティブセレクションによりCD4⁺/CD38⁺、ネガティブセレクションによりCD4⁺/CD38⁻分画を精製した。CD4⁺/CD38⁺、CD4⁺/CD38⁻分画それぞれにLAIを1時間吸着後、洗浄を行い、その後11日間培養した。培養上清を3日毎に回収し、上清中のp24をELISAにより解析した。その結果、ウイルス産生量はCD4⁺/CD38⁺分画の方がCD4⁺/CD38⁻分画よりも高かった。

Effector to induce apoptosis in bystander T - cells

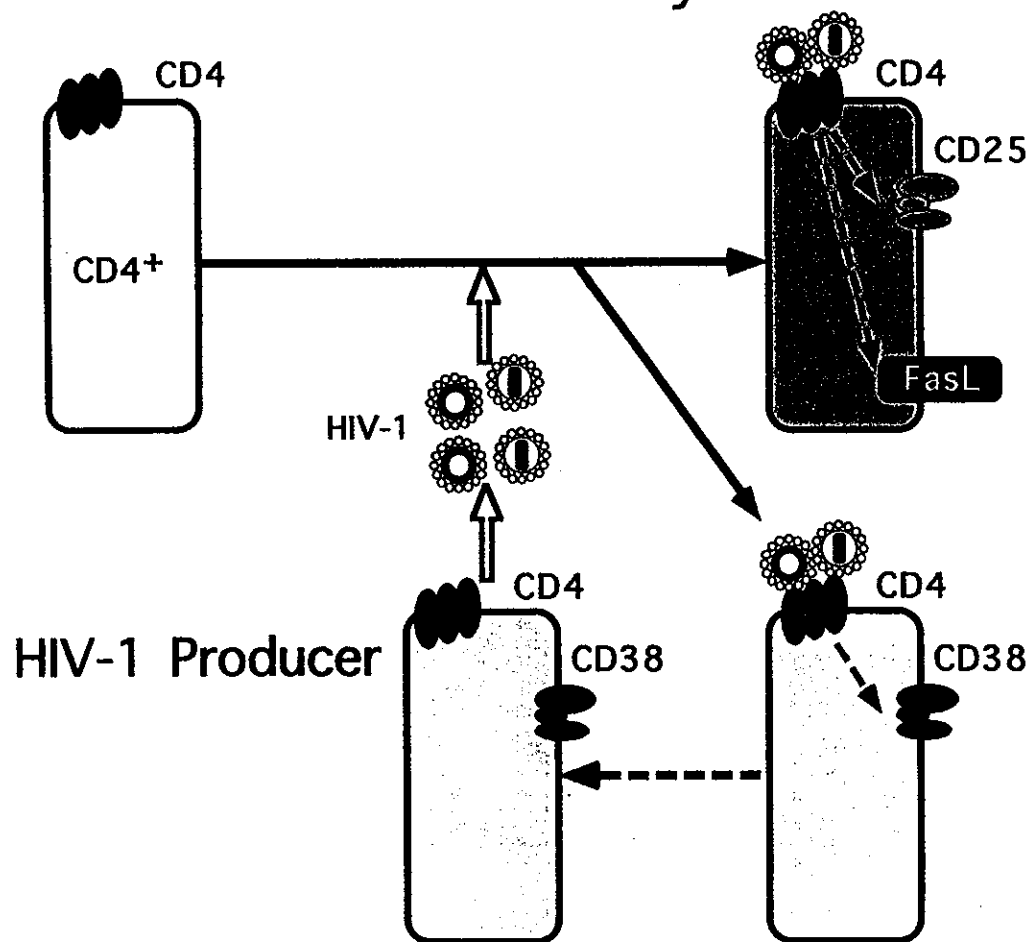


Figure 3 : まとめ。今回、非感染性ウイルス粒子であっても、その吸着を受けることによりCD38陽性になったT細胞はウイルス高産生細胞へと変化することが示唆された。一方、ウイルス吸着によりCD25陽性となった活性化T細胞 (CD4⁺/CD38⁻) は、周辺の非感染T細胞をアポトーシスに導くエフェクター活性を獲得すると考えられる。

8. サイトカインによる HIV-1 臨床分離株増殖の修飾

分担研究者 小柳 義夫 (東京医科歯科大学・微生物学)

共同研究者 鈴木 陽一、前田 直良 (東京医科歯科大学・微生物学)

山本 直樹 (東京医科歯科大学・微生物学・教授)

研究要旨 HIV-1 の主な標的細胞群はヘルパー T (Th) 細胞群であるが、これらの細胞群はその産生するサイトカインのパターンから、Th1, Th2 ならびに Th0 細胞に大別されることが知られている。これまでに我々は、比較的感染初期に分離されるマクロファージ指向性 (M-tropic) HIV-1 は IL-12 刺激 Th1 細胞培養系において、また病状の進行とともに分離される T 細胞株指向性 (T-tropic) HIV-1 は IL-4 刺激 Th2 細胞培養系においてそれぞれ増殖性が高いことを明らかにしてきた。本研究においては、急性感染期、無症候期ならびに AIDS 発症期の HIV-1 感染者より、実際にウイルスを分離し、これら臨床分離株の、サイトカインにより誘導される Th1 または Th2 細胞培養系における増殖性を検討した。その結果、急性感染期の患者より分離したウイルスには IL-12 刺激 Th1 細胞において増殖性が高い分離株が多かったのに対し、無症候期および AIDS 発症期の患者より分離したウイルスについては IL-4 刺激 Th2 細胞培養系でも増殖性の高い分離株が多いことが明らかとなった。発病前の感染者においては、IFN-g などのサイトカインを産生する Th1 型の免疫応答細胞が優位にあるが、病状の進行につれて IL-4 などを産生する Th2 型免疫応答細胞が優位になってくるという臨床免疫学的検討からの報告を考慮すると、今回の結果は、体内でのサイトカインまたは Th 細胞サブセットの変動が、ウイルスの変異を促進しうる大きな要因であるという以前の我々の研究結果を裏付けるものである。

A. 研究目的

Human immunodeficiency virus(HIV)の感染に対して、生体は速やかにサイトカインネットワークを構築し、免疫反応を誘導するが、このネットワークの中心を担うものはヘルパー T 細胞 (Th)群である。これら Th 細胞は、産生するサイトカインのパターンから、Th1, Th2 ならびに Th0 細胞に大別されることが知られているが、これまでに我々は、HIV-1 分離株のなかには、これら Th サブセットに対する住み分けが存在することを明らかにしてきた(J. Virol. 71:465, 1997., J. Virol. 73:316, 1999)。従って本研究においては、実際の HIV-1 感染者から直接分離してきた臨床分離株も、これらサイトカインで誘導された Th サブセット培養系において、異なる増殖性を示すかどうかを明らかにすることを目的として実験をおこなった。

B. 研究方法

1) IL-12 刺激 Th1 細胞および IL-4 刺激 Th2 細胞の培養系

健康人末梢血から Ficoll により peripheral blood mononuclear cell (PBMC) を回収し、DYNABEADS 法を用いて CD4 陽性 T 細胞を分離した。この CD4 陽性 T 細胞を、まず OKT3 抗体を固相化したプレート上で IL-12 を含む培地で 8 日間培養したものを Th1 型細胞、また CD4 陽性 T 細胞から、さらに CD45RA 陽性細胞を分

離し、IL-4 を含む培地で同様に刺激したものを Th2 細胞とし以降の実験に用いた。このそれぞれの培養系における IFN-g(Th1 細胞)あるいは IL-4(Th2 細胞)産生細胞率は、細胞内サイトカイン染色法によって確認した。結果は、IL-12 誘導 Th1 細胞培養系においては IFN-g と IL-4 産生細胞は 96.2%と 4.2%、IL-4 誘導 Th2 細胞培養系におけるそれは 9.7%と 57.7%であった。

2) 急性感染期 HIV-1 感染者からの臨床分離株の分離 (実験 1)

米国 Cedars-Sinai Medical Center に通院している 3 名の抗体陰性期ならびに抗体陽転後 6~9 ヶ月の HIV-1 感染者の末梢血リンパ球(PBMC)を、健康人由来の PBMC と co-culture し、ウイルスを分離した。さらに各患者からのウイルス溶液から、PBMC を用いた限界希釈法によって各 10 分離株を得、以降の実験に用いた。

3) 無症候期ならびに AIDS 発症期 HIV-1 感染者からの臨床分離株の分離 (実験 1)

ガーナ南部の病院施設に通院する 14 名の無症候期ならびに AIDS 発症期の HIV-1 感染者の PBMC を、健康人由来の PBMC と co-culture することによってウイルスを分離した。

4) 標的細胞へのウイルス侵入効率の測定(実験 2)

[4-1] Binding/entry assay

p24gag 抗原量で 200ng に相当する HIV-1JR-CSF と HIV-1NL4-3 を、それぞれ Th1 型細胞と Th2 型細胞とともに 4℃で 1 時間インキュベ

ション後, PBS(-)で2回洗浄し, 細胞表面に吸着したウイルス量を, p24gag ELISAにて測定した(binding assay). また, ウイルスと細胞を37°Cで1時間インキュベーション後, 細胞表面に吸着したウイルスをトリプシンにより除去し, 細胞内から回収できる p24gag 抗原量をもって, ウイルス侵入量とした(entry assay).

[4-2] DNA PCR assay

MOI 0.001 の各ウイルスを細胞に2時間感染させ, 細胞を2回洗浄し, 感染24時間後の細胞内 HIV-1 proviral DNA を PCR 法によって検出した.

[4-3] Single round HIV-1 infection assay

nef 遺伝子領域にルシフェラーゼ遺伝子を置き換え, env 遺伝子に欠失をくわえたため replication incompetent である HIV-1 ベクタープラスミド DNA(pJR-luc, pNL-luc)と, JR-FL あるいは IIIB エンベロープを発現するプラスミド DNA をそれぞれ COS 細胞に co-transfection し, 2日後の培養上清をウイルス溶液として回収した. 次に, p24gag 抗原量で 100 ng に相当するウイルスを, Th1 または Th2 型細胞に2時間感染させ, 2回洗浄したのち, 48時間後の細胞抽出液中のルシフェラーゼ活性を測定した.

C. 研究結果

1) 急性感染期由来の臨床分離株のサイトカイン誘導 Th1 または Th2 型細胞における増殖性 [実験 1]

抗体陰性期ならびに抗体陽転後数カ月の HIV-1 感染者(計6名)からそれぞれ10株ずつの分離株を得たが, 実際に感染実験に用いたのはそのうちの47分離株であった. これらの分離株は p24gag 抗原量で 1 ng に相当するウイルス液を用いて, IL-12 刺激 Th1 細胞培養系および IL-4 刺激 Th2 細胞培養系における増殖性を検討したところ, 22分離株で Th1 または Th2 型細胞培養系における増殖性が確認された(表1). これらの分離株のうち, 1名の感染者(GAM)からの分離株を除くと, 14分離株中11分離株(78.6%)は IL-12 刺激 Th1 細胞培養系で増殖性を示したのに対し, IL-4 刺激 Th2 細胞培養系で増殖性を示したのはわずか3分離株(21.4%)であった. しかしながら, 抗体陽転後も高いウイルス血症を示した感染者 GAM 由来の8分離株については, Th2 型細胞において増殖性が高く, さらにそのうち3分離株については Th1 型細胞においても高い増殖性が確認された(表1).

2) 無症候期または AIDS 発症期由来の分離株のサイトカイン誘導 Th1 または Th2 型細胞

における増殖性 [実験 1]

無症候期または AIDS 発症期の HIV-1 感染者(14名)から臨床分離株を得, p24gag 抗原量で 1ng に相当するウイルス溶液を用いて, IL-12 刺激 Th1 細胞培養系および IL-4 刺激 Th2 細胞培養系における増殖性を検討したところ, すべての分離株は Th2 型細胞において高い増殖性を示し, さらにそのうち8分離株については Th1 型細胞においても増殖性が確認された(表2).

3) Th1 あるいは Th2 型細胞への侵入効率の比較 [実験 2]

JR-CSF などの M-tropic HIV-1 は IL-12 刺激 Th1 細胞において, NL4-3 といった T-tropic HIV-1 よりも増殖性が高く, さらにその増殖性の違いはウイルス側のエンベロープ領域が決定していること報告してきた(J. Virol. 71:465, 1997., J. Virol. 73:316, 1999). 本実験においては, このウイルスのエンベロープ領域の違いが, ウイルスの life cycle のどの段階においてウイルス増殖の違いに寄与しているのかを明らかにすることを目的とした. その結果, IL-12 刺激 Th1 細胞への侵入効率を p24gag 抗原量, またはウイルス DNA 量として検索したところ, その侵入効率はともに T-tropic HIV-1 の方が高かった(図1-A および B). さらに, M-tropic または T-tropic のエンベロープをもつ replication incompetent な HIV-1 を感染させた結果からも, 細胞侵入効率は T-tropic エンベロープをコートされたウイルスで高かった(図1-C). 従って, M-tropic HIV-1 の IL-12 刺激 Th1 細胞における高い増殖性は, ウイルスの細胞侵入以降の段階で主に決定されている可能性が強く示唆された.

D. 考察

HIV-1 感染者においては, 感染初期には IFN-g や IL-2 などのサイトカインを産生する Th1 型の細胞性免疫応答が優位であるが, 病状の進行に伴って IL-4 などを産生する Th2 型の液性免疫応答が優位になると報告され, いわゆる Th サブセットの極性化と感染個人の病態との相関についてこれまでに数多くの議論がなされている(図2). 免疫担当細胞は, サイトカインを媒体としてその防御機構を発揮することから, Th サブセットの変動に伴う生体内サイトカインの変動が, ウイルスの選択的増殖に大きな影響を及ぼすことは容易に想像できる. これまでに我々は, HIV-1 分子クローンをを用いた研究から, M-tropic HIV-1 は IL-12 で誘導される Th1 型 CD4 陽性 T 細胞培養系において, また T-tropic HIV-1 は IL-4 によって誘導される Th2 型 CD4 陽性 T 細胞培養系

においてそれぞれ増殖性が高いことを明らかにしてきた(J. Virol. 71:465, 1997., J. Virol. 73:316, 1999). この以前の我々の結果を, 感染初期には M-tropism を示すウイルスが, 逆に感染中・後期には T-tropism を示すウイルスがそれぞれ優位に分離されてくるという臨床ウイルス学的な検討結果と総合すると, Th サブセットの極性化がウイルスの M-tropism から T-tropism へのシフトを惹起しうるひとつの要因であると考えられることができる(図 2). HIV-1 感染者から直接分離した臨床分離株を用いた今回の結果(実験 1)からも, 急性感染期の患者由来のウイルスと, 無症候期あるいは AIDS 発症期の患者由来のウイルスでは, サイトカインで誘導される Th1 または Th2 細胞培養系における増殖性が異なっていることが示されている. すなわち, 感染初期からのウイルスは Th1 型の細胞を好み(表 1), 逆に中・後期の患者からのウイルスは Th2 型の細胞で増殖しやすいことが示された(表 2). また, 抗体陽転後 6 ヶ月目の一名の感染者(表 1.GAM) 由来のウイルスでは, 他の初期感染者由来のウイルスとは異なり, Th2 型細胞で非常に高い増殖性を示したが, この感染者は抗体陽転後も高いウイルス血症がみられたことから, 体内における"Th2 細胞指向性"ウイルスの存在によって, 感染後の病状が大きく左右されるという可能性も示唆された. しかしながら, これらの分離されたウイルスが, 実際にそれぞれの感染者のなかでその時期, 優位に増殖していたか否かについては, 患者血清中のウイルスの解析などによって, 今後詳しく解明していく必要がある. また, 今回の結果では Th1 細胞指向性=M-tropism, もしくは Th2 細胞指向性=T-tropism という単純な構図にはならなかったことから, 生体内で増殖しているウイルスは, 様々な細胞指向性をもつウイルスが混在していることが予想される.

一方, 以前の我々の研究結果では, IL-12 刺激 Th1 細胞における M-tropic HIV-1 と T-tropic HIV-1 の増殖性の違いは, キメラウイルスを用いた実験から, ウイルスエンベロープ領域の V3 loop が決定していることを明らかにした(J. Virol. 73:316, 1999). V3 loop は細胞側の co-receptor と結合することでウイルスの細胞への侵入を促進することが知られている. 従って, co-receptor の発現量の違いがウイルスの増殖に影響を及ぼしている可能性が考えられたが, M-tropic HIV-1 の co-receptor である CCR5 は確かに Th1 型細胞で高く発現しているものの, T-tropic HIV-1 の co-receptor である CXCR4 も同様に高い発現が確認されている(J. Virol. 73:316, 1999). そこで, 本

研究においては, エンベロープ領域の違いが, 細胞侵入段階でウイルスの増殖性の差異に影響を及ぼしているのか否かについても, 詳しい解析をおこなった(実験 2). その結果, 少なくとも Th1 型細胞への侵入効率は M-tropic よりも T-tropic の方が高いことが明らかとなり, M-tropic HIV-1 の Th1 型細胞における高い増殖性は, その細胞侵入以降の過程で主に決定されている可能性が強く示唆された(図 1). 最近, マクロファージ細胞表面上には CCR5 も CXCR4 も発現しており, 従って M-tropic HIV-1 も T-tropic HIV-1 も侵入できるものの, 最終的には M-tropic HIV-1 だけが選択的に増殖してくるという現象が数多く報告されている. これらの現象はウイルスの細胞指向性が, 細胞表面上の co-receptor の usage だけに依存していないことを示すものであるが, 我々の IL-12 刺激 Th1 細胞における同様の結果は, 一般に病原性が強いといわれる T-tropic HIV-1 に対して, 細胞内に抵抗性因子が存在することを示唆するものであり, この抵抗性因子(機構)を解明することは, 新たな HIV 治療の開発につながっていくものと考えられる.

E. 結論

感染初期に分離されたウイルスと, 中・後期に分離されたウイルスではサイトカインで誘導された Th サブセット培養系における増殖性が異なることが明らかになった. また, M-tropic HIV-1 の IL-12 刺激 Th1 細胞における増殖性の高さは, ウイルスの細胞侵入以降の過程で決定されている可能性が示された.

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Chen J, Ido E, Jin M, Kuwata T, Igarashi T, Mizuno A, Koyanagi Y, Hayami M. Replication of HIV-1, SIVmac and chimeric HIV-1/SIVmac viruses having env genes derived from macrophage-tropic viruses: an indication of different mechanisms of macrophage-tropism in human and monkey cells. J Gen Virol 79: 741-745, 1998.
- 2) Suzuki Y, Koyanagi Y, Tanaka Y, Murakami T, Yamamoto N. Th1 and Th2 preferences of HIV-1 strains. Retroviruses Meeting, Cold Spring Harbor, p54. 1998.
- 3) Murakami T, Lu Z-H, Koyanagi Y, Tamamura H, Waki M, Matsumoto A, Tanaka Y, Hoxie JA, Fujii N, Peiper SC and Yamamoto N. Peptide T22 exerts its anti-HIV activity as an CXCR4 antagonist. Retroviruses Meeting, Cold Spring Harbor, p196. 1998.

- 4) Suzuki Y, Koyanagi Y, Tanaka Y, Murakami T, N, Kimura T, Hoxie JA, O'Brien WA and Yamamoto N. HIV-1 strain dependent preferences in Th1- and Th2-type condition. 12th world AIDS Conference, 1998.
 - 5) Horiuchi S, Ampofo W, Koyanagi Y, Yamashita A, Waki M, Matsumoto A, Yamamoto M, and Yamamoto N. High-level production of alternatively spliced soluble interleukin-6 receptor in serum of patients with adult T-cell leukaemia HTLV-I-associated myelopathy. *Immunology*. 95:360-369, 1998.
 - 6) Suzuki Y, Koyanagi Y, Tanaka Y, Murakami T, Misawa, N, Maeda N, Kimura T, Shida H, Hoxie JA, O'Brien WA and Yamamoto N. Determinant in human immunodeficiency virus type 1 for efficient replication under cytokine induced CD4+ T helper 1 (Th1)- and Th2-type conditions. *J Virol* 73: 316-324, 1999.
 - 7) 鈴木陽一、小柳義夫：CD4+サブセットと HIV 感染. *最新医学* 53: 2007-2011, 1998
 - 8) 小柳義夫：HIV の細胞指向性. *ウイルス* 48: 153-161, 1998.
 - 9) 小柳義夫：CD4+T ヘルパー細胞への HIV 感染. *Annual Review 免疫* 1999. 210-215, 1998.
 - 10) 鈴木陽一、小柳義夫：ケモカインレセプター. *感染炎症免疫*. 28:228-237, 1998.
 - 11) 小柳義夫：AIDS. *脳の科学*. 21:9-10. 1999.
2. 学会発表
- 1) 小柳義夫：免疫環境と HIV 感染. 第 22 回阿蘇シンポジウム, 阿蘇, 1998.
 - 2) 小柳義夫、三沢尚子、下遠野邦忠、山本直樹：HIV-1 5' NON CODING 配列は前期過程におけるウイルス増殖に必須である. 第 46 回日本ウイルス学会, 東京, 1998.
 - 3) Y Koyanagi, Y Suzuki, Y Tanaka, N Yamamoto: Th1 and Th2 preferences of HIV-1 strains. 第 28 回 日本免疫学会総会 シンポジウム, 神戸, 1998.
 - 4) Y. Koyanagi, Cell tropism of HIV-1, 日仏合同エイズ会議, 東京, 1998.
 - 5) Y. Koyanagi, Immunologic factors in the pathogenesis of HIV-1. Takeda シンポジウム, 東京, 1998.
 - 6) Y. Suzuki, Y Koyanagi, Y Tanaka, N Yamamoto: Determinant in human immunodeficiency virus type 1 for efficient replication in cytokine induced CD4+ T helper 1 (Th1)- and Th2-type conditions. 6th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections Chicago, 1998.
 - 7) Y. Suzuki, Y. Koyanagi, Y. Tanaka, T. Murakami, N. Yamamoto: Th1 and Th2 preferences of HIV-1 strains. Cold Spring Harbor Laboratory meeting on Retroviruses, NewYork, 1998.
 - 8) Y. Suzuki, Y. Koyanagi, Y. Tanaka, T. Murakami, T. Kimura, J.A. Hoxie, W.A. O'Brien, N. Yamamoto. HIV-1 strain dependent preferences in Th1- and Th2-type condition. 12th world AIDS Conference, Geneva, 1998.
 - 9) Y. Suzuki, Y. Koyanagi, C. Sato, Y. Tanaka, N. Maeda, N. Misawa, N. Yamamoto. Differential replication ability of HIV-1 isolates from patients with primary infection in cytokines-induced Th1- or Th2-type culture. 第 12 回日本エイズ学会総会, 東京, 1998.
 - 10) 佐藤千尋, 鈴木陽一, 小柳義夫, 山本直樹：HIV-1 Env 蛋白質発現細胞による Th1 細胞でのウイルス増殖の抑制. 第 12 回日本エイズ学会総会, 東京, 1998.
 - 11) 前田直良, 小柳義夫, W.K. Ampofo, 三沢尚子, 鈴木陽一, 山本直樹：異なった Th 環境における HIV-1 臨床分離株の増殖性の差異について. 第 46 回日本ウイルス学会, 東京, 1998.
 - 12) 前田直良, 小柳義夫, W.K. Ampofo, 三沢尚子, 鈴木陽一, 田中勇悦, 山本直樹：同一個人に共存するマクロファージ指向性 HIV-1 と量細胞指向性 HIV-1 のウイルスクローン化. 第 12 回日本エイズ学会総会, 東京, 1998.

[図の説明]

表1. HIV 抗体陽性または抗体陽転後数カ月の急性感染期の患者から分離された臨床分離株の IL-12 刺激 Th1 細胞培養系ならびに IL-4 刺激 Th2 細胞培養系における増殖性. (+++), (++) , (+) は感染 11 日後 (MDM は感染 21 日後) の培養上清中の p24 抗原量濃度がそれぞれ 10 ng/ml 以上, 10 ~ 1 ng/ml, 1ng/ml 以下であったことを示し, (-) は検出感度以下であったことを示す.

表2. 無症候期または AIDS 発症期の患者から分離された臨床分離株の IL-12 刺激 Th1 細胞培養系ならびに IL-4 刺激 Th2 細胞培養系における増殖性. (+++), (++) , (+) は感染 11 日後 (MDM は感染 21 日後) の培養上清中の p24 抗原量濃度がそれぞれ 10 ng/ml 以上, 10 ~ 1 ng/ml, 1ng/ml 以下であったことを示し, (-) は検出感度以下であったことを示す.

図1. M-tropic HIV-1 (JR-CSF) と T-tropic HIV-1 (NL4-3) の IL-12 刺激 Th1 細胞ならびに IL-4 刺激 Th2 細胞への侵入効率. A) p24 抗原量で 200 ng に相当するウイルスを 4 °C で 1 時間細胞とインキュベーション後, 細胞表面に吸着したウイルスの p24 抗原量を測定した結果 (binding assay). また, 同様にして 37 °C で 1 時間細胞とインキュベーションした後, 細胞表面のウイルスをトリプシンで除去し, 細胞内に侵入したウイルスの p24 抗原量を測定した結果 (entry assay). B) 各ウイルス感染 24 時間後の感染細胞中の proviral DNA を PCR 法で検出した. C) *Nef* 領域にルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだ replication incompetent HIV-1 (JR-luc, NL-luc) に M-tropic ENV (JR-FL) または T-tropic ENV (IIIB) をそれぞれコートした pseudo-type virus を各細胞に感染させ, 感染 48 時間後のルシフェラーゼ活性を測定した.

図2. 本研究のまとめ (モデル図).

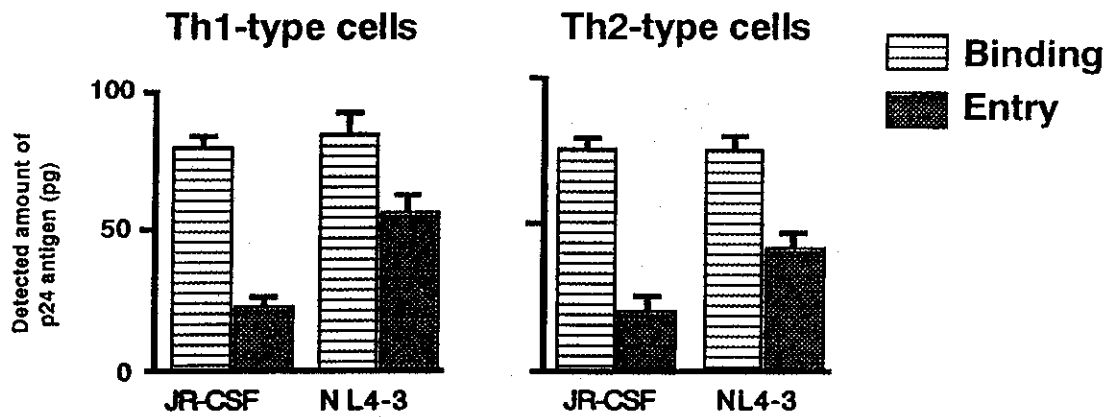
表1. 急性感染期の患者から分離された臨床分離株の IL-12 刺激 Th1 細胞培養系
ならびに IL-4 刺激 Th2 細胞培養系における増殖性.

Stage	Patients	Isolates	PHA-PBMC	MDM	Th1	Th2	
Seronegative patients	BML	1-2	+++	-	+	-	
		1-3	+++	-	+	-	
		1-5	+++	++	+	-	
	GMH	2-2	+++	++	-	+++	
		2-6	+++	++	+	-	
		2-7	+++	++	++	-	
		2-9	+++	++	+	-	
		2-10	+++	++	+	-	
	MEM	3-2	+++	-	-	+	
		3-5	+++	+	+	-	
		3-6	+++	++	+	-	
		3-9	+++	+	+	-	
	Seroconverted patients	GAM	4-1	+++	++	-	+++
			4-3	+++	++	-	+++
			4-4	+++	++	+++	+++
4-5			+++	++	+++	+++	
4-6			+++	++	+++	+++	
4-7			+++	-	-	+++	
4-8			+++	-	-	+++	
4-10			+++	-	-	+++	
HKA		6-1	+++	-	++	-	
		6-7	+++	++	-	+++	
JR-CSF NL4-3			+++	++	+++	-	
			+++	-	+	+++	

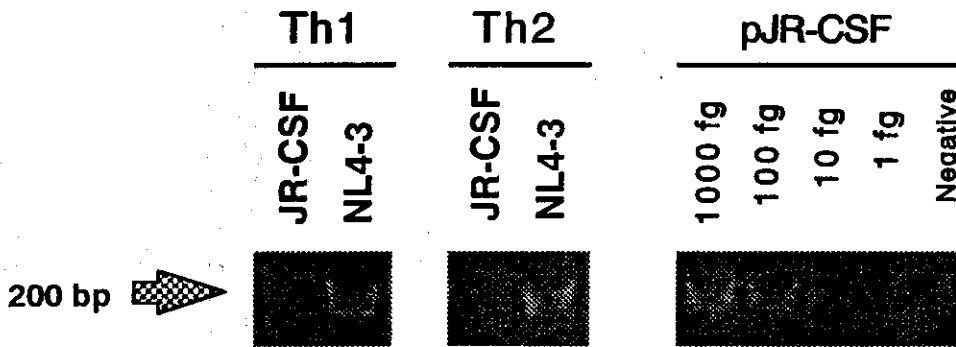
表2. 無症候期または AIDS 発症期の患者から分離された臨床分離株の IL-12 刺激 Th1 細胞培養系ならびに IL-4 刺激 Th2 細胞培養系における増殖性.

Isolates	PHA-PBMC	MDM	Th1	Th2
NJ97-12	++	-	+++	+++
NJ97-23	+++	-	-	+++
NJ97-24	+++	-	+++	+++
NJ97-25	+	-	-	++
NJ97-26	++	-	-	+++
NJ97-27	+++	+	+++	+++
NJ97-33	+++	-	-	+++
NL97-36	+++	+	+++	+++
NJ97-37	-	-	-	+++
NJ97-42	+++	-	++	+++
NJ97-156	+++	+	+++	+++
MHW-1986	+++	+	+++	+++
MHW-1988	+++	+	-	+++
MHW-1992	-	+	+++	+++

A. Binding/entry assay



B. DNA PCR assay



C. Single round HIV-1 infection

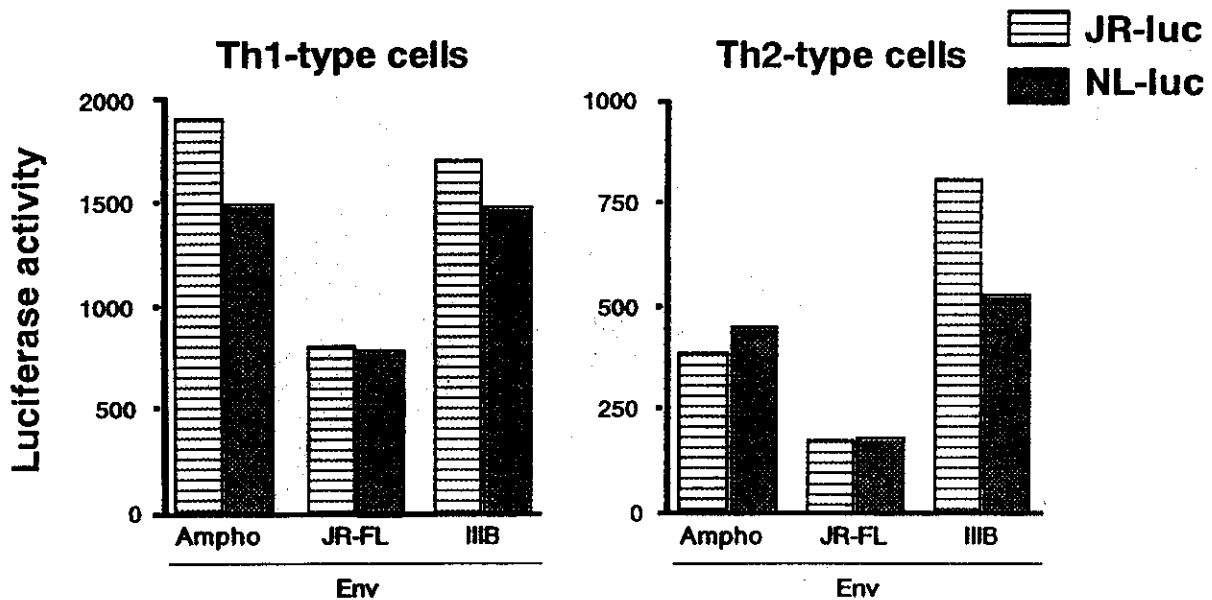


図1. M-tropic HIV-1 と T-tropic HIV-1 の IL-12 刺激 Th1 細胞ならびに IL-4 刺激 Th2 細胞への侵入効率.