

図6 HIV プロモーター活性を抑制する天然の化合物
 本研究において HIV プロモーター活性を抑制する可能性のある化合物の比較によって明らかとなった共通の分子構造を Basic structure A 及び B で示した。

14. アラキドン酸修飾したヒト単球 U937 細胞株の HIV-1 感染性

研究協力者 天野 富美夫 (国立感染症研究所細胞化学部主任研究官)

研究要旨 HIV-1 の感染における宿主要因として、これらの細胞の膜脂質組成が如何なる影響をもたらすのか、また、外部から投与した脂肪酸が HIV-1 の感染予防に効果をもたらす可能性はあるのか、という点をアラキドン酸で修飾したヒト単球系細胞株 U937 を用いて検討した。アラキドン酸修飾により膜脂質のアラキドン酸含量が増加し、細胞膜表面の HIV-1 感染のレセプターである CD4 及び Co-receptor の CXCR4 が発現低下した。さらに、HIV-1 の感染に対して、ウイルス感染直後の細胞への結合量のみでなく、感染細胞の培養中の経時的なウイルス産生量も低下した。細胞質内ホスホリパーゼ A2(PLA2)の阻害剤によってアラキドン酸修飾による CXCR4 の発現低下が抑制されたことから、PLA2 による膜リン脂質代謝を介したレセプターの down-regulation が示唆された。

A. 研究目的

報告者の最近の研究によって、HIV-1 の細胞への感染のレセプターとして作用する CD4 および co-receptor として作用する CXCR4 が、多価不飽和脂肪酸のアラキドン酸あるいはエイコサペンタエン酸の投与によってヒト単球系細胞株 U937 の細胞表面から減少することが見い出された。本年度の研究においては、この点についてさらに研究を進め、HIV-1 の単球およびマクロファージへの感染に対して、これらの細胞の膜脂質修飾が如何なる影響をもたらすのか、また、外部から投与した脂肪酸が HIV-1 の感染予防に効果をもたらす可能性はあるのか、ということについて、アラキドン酸を用いて検討することを目的にした。

B. 研究方法

(1) 細胞培養と脂肪酸修飾

ヒト単球系細胞株、U937 細胞を F12 培地に 10% FBS を添加した培地中で、プラスチックフラスコ(T-25, Falcon #3108)内、CO₂ インキュベーター(5% CO₂, 37°C)で培養した。継代は毎週 2 回、細胞を 1/10 に希釈して行った。また、細胞膜脂質のアラ

キドン酸修飾は、300 mM のアラキドン酸-ウシ血清アルブミン結合体(AA-BSA)を 5x10⁶ cells/dish/10 ml に添加して 37°C、18 時間培養して行った。

また、細胞質内ホスホリパーゼ A2(PLA2)の阻害剤の特異的な阻害剤の一つ、AACOCF₃ を用いた実験では、あらかじめジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解した AACOCF₃ を終濃度 10 mM となるように細胞培養系に添加して 37°C、15 分間加熱し、その後 300 mM AA-BSA を添加して 37°C、18 時間培養した。

さらに、AA-BSA 修飾した細胞内における CXCR4 の発現低下の持続性を評価する実験では、300 mM AA-BSA を添加して 37°C、18 時間培養した U937 細胞を培地で 6 回洗浄した後、新鮮な培地 (AA-BSA を含まない) を加えて再び 37°C で培養し、経時的に 6 時間後まで細胞を採取し、CXCR4 の発現量を FACScan で調べた。

(2) HIV-1 の感染

HIV-1 NDK を 100 TCID₅₀ から希釈列を作り 1/100 まで 5 段階変化させ、AA-BSA で修飾した U937 細胞 5x10⁵ cells に対して 2 μl 添加し、37°C、1 時間、感染させた。その後、培地で 3 回、遠心しながら洗浄し、最後に 5 ml の培地に

懸濁してT-25 フラスコ中で培養した。培養上清は週に2回ずつ交換し、14日目まで培養を続けた。その間、培養上清を回収し、HIV-1の抗原であるp24を定量した。p24の定量はアボット社のp24 EIAキットによって行った。

また、HIV-1の感染による細胞への結合は、上記の方法に準じ、添加直後、あるいは37℃、1時間、感染させて加温した後、細胞を洗浄して、細胞に吸着・結合したHIV-1を可溶化剤によって細胞を溶解した後に回収し、そのp24量を定量して求めた。

(3) FACScanによるレセプターの検出

HIV-1の感染に関与するといわれているレセプター、CD4、CXCR4、CCR5の細胞表面における分布を、AA-BSAで修飾したU937細胞を用いて調べた。それぞれ、300 mMのAA-BSAを添加して37℃、18時間、培養した細胞 5×10^5 cellsを緩衝液A(0.2% BSA + 0.1% NaN_3 in PBS(-))で洗浄後、モノクローナル抗CD4、PE-抗CXCR4、FITC-抗CCR5抗体と4℃、30分間反応させた。再び緩衝液Aで洗浄後、CD4結合体はFITC-抗マウスIgGと反応させた。それぞれをPIを加えて反応させ、PIに非染色の細胞を生細胞として選別し、PEもしくはFITCの蛍光をFACScanで検出した。

(倫理面への配慮)

本研究では実験材料として培養系細胞株および樹立されたHIV-1NDKウイルス株のみを用いており、患者、感染者あるいは健常者の臨床材料は一切用いていない。従って倫理面の問題はない。

C. 研究結果

- (1) U937細胞のアラキドン酸修飾の膜脂質組成およびレセプター発現に及ぼす影響
従来の結果と同様に、300mMのAA-BSA添加によってU937細胞の総脂質組成に対するアラキドン酸の割合は6.45%から12.01%に上昇し、約2倍の変化が起こることが示された。また、細胞表面のレセプター発現に対しては、前回と同様、CD4を少し減少させCXCR4を激減させたが、CCR5には変化がなかった(結果は図示せず。)。以上の結果は、細胞に障害性を与えることなく細胞膜脂質のアラキドン酸含量を修飾・改変し、その結果として細胞表面の

CD4、CXCR4の発現低下を再現性よく誘導する条件が設定できたことを示す。

(2) AA-BSA修飾したU937細胞におけるHIV-1産生

AA-BSAを300 μ Mで添加して37℃、18時間、加温したU937細胞からのHIV-1産生は、HIV-1NDKを異なるTCIDで加えて37℃、1時間、感染させた後の培養において、すべての点で対照群よりも低下していた。図1の結果は11日目のp24産生を示す。これらの結果から、アラキドン酸修飾によってHIV-1のU937細胞内での増殖が抑制されたことが示唆された。

さらに、AA-BSA修飾細胞から産生されたHIV-1を培養7日目に回収し濃縮してヒトTリンパ球系細胞株、MT-2に感染させた結果、対照のAA-BSA非添加群のU937細胞から産生されたウイルスに比べ、AA-BSA細胞由来のHIV-1は、MT-2細胞への感染力価が低いだけでなく、感染に伴うMT-2細胞の細胞融合(Syncytium形成)能も低下していた(結果は図示せず)。

(3) アラキドン酸修飾したU937細胞へのHIV-1の結合

アラキドン酸修飾したU937細胞に対してHIV-1を感染させ、その結合活性の変化を調べた。結合反応は、HIV-1NDKを添加直後(○)、および37℃、1時間、加温した後(■)の2点で調べ、それぞれの細胞を洗浄した後に回収されたHIV-1量をp24で定量した。その結果、アラキドン酸修飾によってすべての点で結合量が低下したのみでなく、加温後と添加直後の差として求めた、“Specific Binding”量に特に大きな差が現れた。また、その差は低い濃度のHIV-1を添加した場合に顕著であり、高濃度ではその差が縮まった。これらの結果は、アラキドン酸修飾によってCD4、CXCR4のようなHIV-1の結合部位がdown-regulationされた結果、安定な結合が出来なくなったことを示唆する。

- (4) アラキドン酸修飾したU937細胞表面において低下したCXCR4の発現の回復
AA-BSA添加による細胞膜脂質のアラキドン酸修飾の変化がどの程度持続するかを調べた。その結果、一旦AA-BSAを添加して37℃、18時間、加温したU937細胞は、洗浄後、再び新鮮な(AA-BSAを含まない)培地中で加温して培養しても、CXCR4の

発現の低下は直ぐには回復をせず、2時間までは全く回復せず、6時間でも一部分回復したにとどまった。この結果は、一旦アラキドン酸修飾した細胞は、高濃度のアラキドン酸を培地から除去してもしばらくはその影響が持続し、CXCR4の発現低下が継続することを示す。

- (5) アラキドン酸修飾した U937 細胞表面の CXCR4 の発現低下に対するホスホリパーゼの関与の可能性
アラキドン酸修飾によって低下する細胞表面の CXCR4 の発現がどのような機構によって調節されているのかを調べるため、細胞内ホスホリパーゼ A2(PLA2)の特異的阻害剤である AACOCF3 を添加した。その結果、AA-BSA とほぼ同時に添加した AACOCF3 は PLA2 を阻害する濃度 (10mM) で、部分的に CXCR4 の発現低下を抑制した。また、脂質組成を分析した結果、AACOCF3 は AA-BSA によるアラキドン酸含量の上昇を 1/3 に抑制した。これらの結果は、AA-BSA 修飾が単に細胞内の中性脂質を増加させることによって CXCR4 の発現低下を誘導するのではなく、むしろ膜リン脂質からの PLA2 による脂肪酸の遊離を伴い、積極的に膜脂質代謝を活性化することによって、細胞膜中に存在する CXCR4 の発現を抑制している可能性を示唆する。

D. 考察

HIV-1 感染者および患者数は、わが国においても増加を続けており、届け出数から推定される感染者の総数は数千人にのぼると言われている。このような状況下で、HIV の感染阻止ならびに AIDS の発症予防に向けた研究はますます重要になっている。現在 AIDS 治療薬として用いられている薬剤の併用療法によって米国の AIDS 患者の増加の割合が低下しているという事態があるにしても、特効薬というまでには至っておらず、なお、有効な治療法や発症予防法に向けての研究が待たれる。

本研究は、食事中的脂肪酸の有効な摂取による HIV-1 の感染阻害ならびに AIDS の発症予防法を開発することを一つの目的としている。これは、報告者が行った研究の中で偶然見いだした「多価不飽和脂肪酸によるヒト単球系細胞株

U937 細胞表面の HIV-1 のレセプター CD4、co-receptor CXCR4 の発現低下」を研究の背景としている。本年度の研究では、これらのレセプター、コレセプターの発現低下にとどまらず、実際に HIV-1 の細胞への結合が低下するか、および HIV-1 感染による細胞内でのウイルス増殖が抑制されるか、また、産生されたウイルスの感染性に変化は見られるか否か、に焦点を当てた。さらに、アラキドン酸修飾による CXCR4 の発現低下が持続するか否かを調べ、また、CXCR4 の発現低下を誘導する機構についても研究を行った。

その結果、C. 研究結果で述べたように、膜脂質脂肪酸のアラキドン酸修飾による変化が単球における HIV-1 感染をウイルス結合量の低下 (図 2) および細胞からのウイルス産生の抑制 (図 1) を実際に起こすことを示した。さらに産生されたウイルスがヒト T リンパ球系細胞株、MT-2 に対する感染力価を低下させていることも明らかになった。これらの結果は、アラキドン酸修飾による膜脂質変化が、宿主細胞のレセプター群の性状を変化させるだけではなく、実際に感染の低下と増殖阻害を引き起こすことを示すものである。

このほか、アラキドン酸修飾による CXCR4 の発現低下が、一回の修飾ののち、培地からアラキドン酸を除いても少なくとも 6 時間は持続することを示した (図 3)。この結果は、今後脂肪酸修飾によって HIV 感染ならびに AIDS の発症予防を行うときに、一過性の脂肪酸添加でも有効である可能性を示唆し、応用する際の利点になることを期待させる。また、このようなアラキドン酸の効果がどのような機構によって誘導されるのかを調べるため、PLA2 の特異的な阻害剤の AACOCF3 をアラキドン酸とともに添加した結果、CXCR4 の発現低下を一部分阻害した (図 4) ことから、細胞膜脂質代謝変化が関与していることが示唆された。この結果は、あらかじめ [¹⁴C]arachidonic acid で標識した U937 細胞からのアラキドン酸遊離が AA-BSA によって強く誘導された結果ともつながる。以上の結果を考えあわせると、CXCR4 が存在する細胞膜のドメインにアラキドン酸含有リン脂質が存在して CXCR4 の細胞膜表面への分布を調節しており、HIV-1 と CD4、CXCR4 が安定な結合体を形成して細胞に感染する際に膜脂質のこのドメインが重要な役割を果たしている可能性を示唆する。

脂肪酸修飾を用いた膜脂質変化による HIV-

1 感染の宿主要因の変化を通じて HIV-1 感染阻止あるいは AIDS の発症予防法の開発を行う研究は世界的にも他に例がなく、本研究がその先駆けである。今後、アラキドン酸以外の脂肪酸およびその構造類縁物質についても同様の検討を行い、脂肪酸修飾の至適条件やレセプター発現低下のさらに詳細な機構明らかにしながら、HIV 患者・感染者への有効な適用法を目指して研究を発展・継続させていきたい。

E. 結論

アラキドン酸修飾によりヒト単球系細胞株 U937 の細胞膜表面の HIV-1 感染のレセプターである CD4 及び Co-receptor の CXCR4 が発現低下し、ウイルス感染直後の細胞への結合量のみでなく培養中の経時的なウイルス産生量も低下した。また、このアラキドン酸修飾は再現性よく起こるだけではなく、一回の修飾によって CXCR4 の発現低下を持続させることが示された。アラキドン酸修飾による CXCR4 発現抑制の作用機作として、細胞質内ホスホリパーゼ A2 の関与による膜脂質代謝を介したレセプターの down-regulation が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ishii, Y., Sonezaki, S., Iwasaki, Y., Miyata, Y., Akita, K., Kato, Y., Amano, F.: Regulatory role of C-terminal residue of SulA for its degradation by Lon protease in *Escherichia coli*. J. Biochem. (Tokyo), in press.
- 2) Karahashi, H., and Amano, F.: Changes of caspase activities involved in apoptosis of a macrophage-like cell line J774.1/JA-4 treated with LPS and cycloheximide. Biol. Pharm. Bull. 23, (2000) 140-144.
- 3) Karahashi, H., and Amano, F.: LPS-induced signals in activation of a caspase-3-like protease, a key enzyme regulating apoptotic cell damage to a macrophage-like cell line, J774.1, in the presence of cycloheximide. J. Leukocyte Biol., 66, (1999) 689-696.
- 4) Tanaka, Y., Otsuji, A., and Amano, F.:

Suppression of prostaglandin synthesis by arachidonic acid or eicosapentaenoic acid in a macrophage-like cell line, RAW 264.7, treated with LPS. Biol. Pharm. Bull., 22, (1999) 1052-1057.

- 5) Moriishi, K., Inoue, S., Koura M., Amano, F.: Inhibition of Listeriolysin O-induced hemolysis by bovine lactoferrin. Biol. Pharm. Bull., 22, (1999) 1167-1172.
 - 6) Sugita-Konishi, Y., Hara-Kudo, Y., Amano, F., Okubo, T., Aoi, N., Iwaki, M., and Kumagai, S.: Epigallocatechin gallate and gallic acid in green tea catechins inhibit extracellular release of Vero toxins from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Biochim. Biophys. Acta, 1472, (1999) 42-50.
 - 7) Ishii, R., Saito, K., Horie, M., Shibano, T., Kitanaka, S., and Amano, F.: Inhibitory effects of hydrolyzable tannins from *Melastoma dodecandrum* Lour. on nitric oxide production by a murine macrophage-like cell line, RAW264.7, activated with lipopolysaccharide and interferon- γ . Biol. Pharm. Bull., 22, (1999) 647-653.
 - 8) Ohki, K., Amano, F., Yamamoto, S., and Kohashi, O.: Suppressive effects of serum on the LPS-induced production of nitric oxide and TNF- α by a macrophage-like cell line, WEHI-3, are dependent on the structure of polysaccharide chains in LPS. Immunol. Cell Biol., 77, (1999) 143-152.
2. 学会発表
- 1) 唐橋久恵、天野富美夫：サルモネラ感染で誘導されるマクロファージ系細胞株 J774.1 のアポトーシス。第 72 回日本生化学会大会、1999 年 10 月、横浜。
 - 2) 天野富美夫、唐橋久恵、石井克幸、小西良子、中村明子、倉田毅：サルモネラ (*Salmonella typhimurium*, STM) の増殖期の違いによるマクロファージに対する感染性及びマウスに対する病原性の差に関する研究。第 72 回日本細菌学会総会、1999 年 4 月、東京。

G 知的所有権の取得状況
該当無し。

図1. アラキドン酸修飾したU937細胞におけるHIV-1の産生

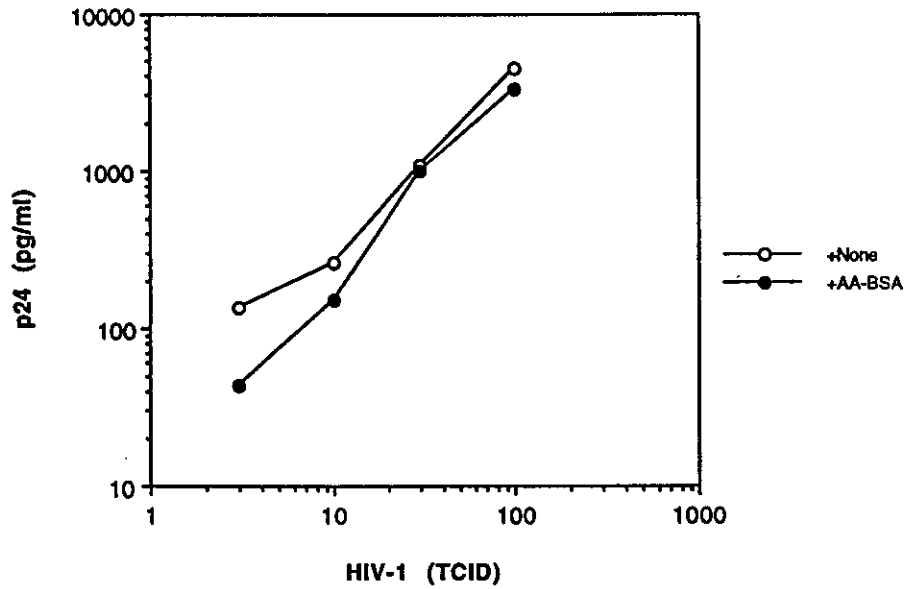


図2. アラキドン酸修飾したU937細胞へのHIV-1の結合

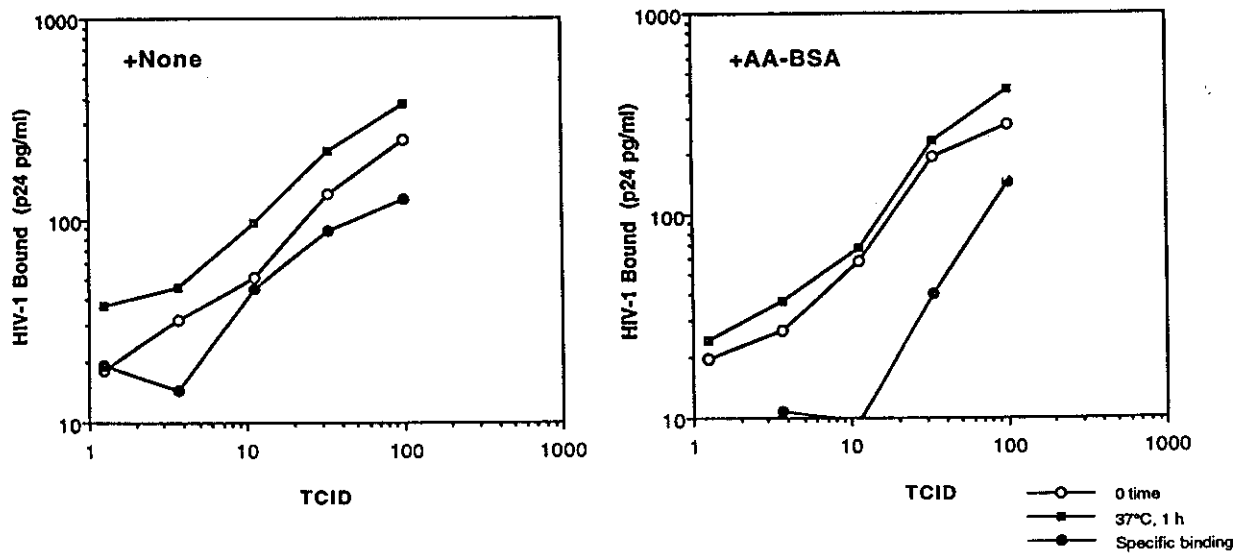


図3. アラキドン酸修飾したU937細胞表面において低下したCXCR4の発現の回復

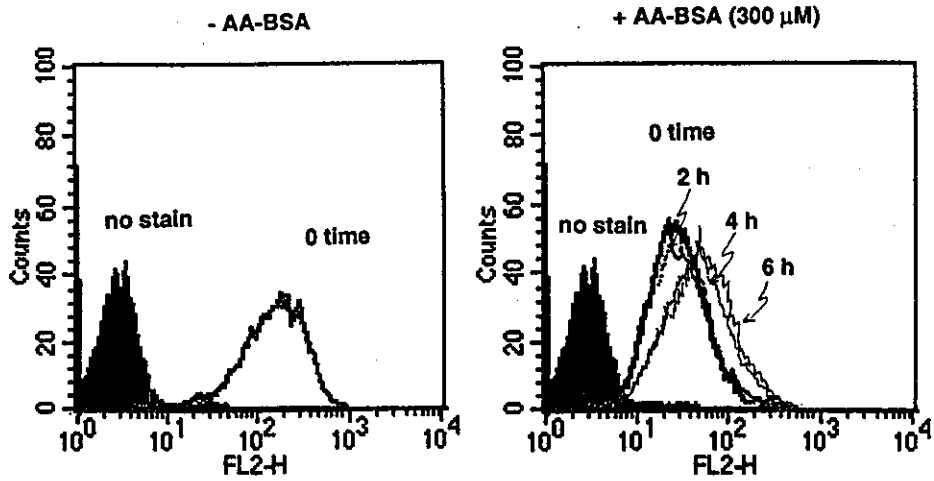


図4. アラキドン酸修飾したU937細胞表面のCXCR4の発現低下に対するホスホリパーゼの関与の可能性

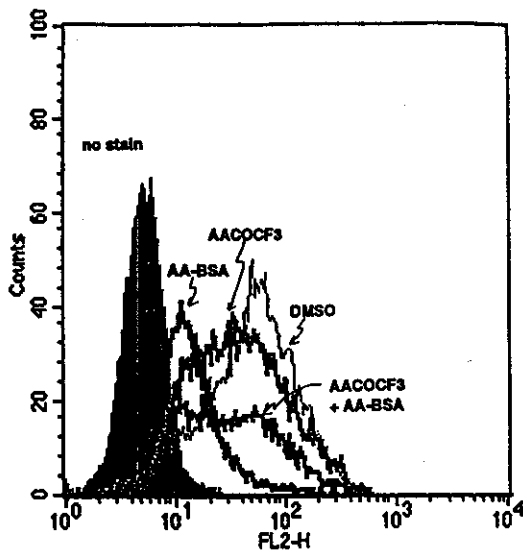
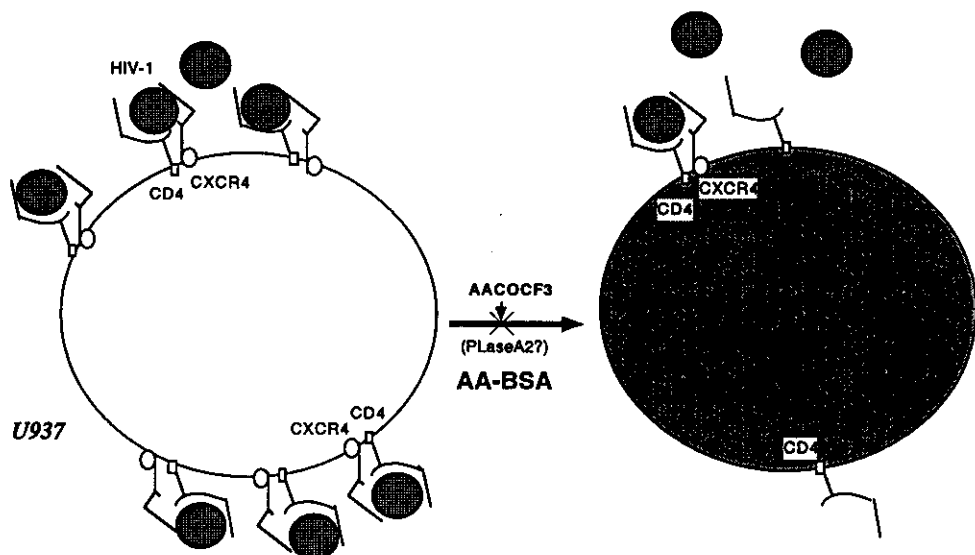


図5. アラキドン酸修飾によるヒト単球系細胞株U937のCD4, CXCR4の発現抑制と HIV-1 感染性の低下 (モデル図)



15. HIV-1 持続感染細胞に対する宿主免疫

研究協力者 神奈木 真理 (東京医科歯科大学医学系研究科免疫治療学教授)

研究要旨 強力な抗ウイルス剤の併用療法HAART は生体内 HIV-1 量を減少させるが、長期追跡研究の結果では持続感染細胞は根絶できないことが判明している。この治療抵抗性の持続感染細胞はメモリーT細胞であることが示唆されており、HIV-1 根絶のあらたな治療目標と位置付けられる。しかし、生体内でのこれらの細胞の HIV-1 維持メカニズムは不明である。また、CTL を含む宿主の CD8 陽性リンパ球は HIV-1 抑制作用を持つことが知られているが、これらの宿主免疫に対する持続感染細胞の感受性についても分かっていない。本研究ではこれらの点を試験管内で説明するため、2種類の方法で HIV-1 持続感染実験系の作成を試みた。一つは HIV-1 に持続感染した HTLV-I-不死化 T 細胞株を用いたもので、この細胞株は CD8+細胞に対して感受性であることが分かり、MHC-I の一致を必要としない細胞障害機序を介することが分かった。もう一つの実験系として抗原特異的 T 細胞株を作成した。この細胞は抗原特異的に活性化されるが抗原不在下では静止期にはいり、より生理的条件に近いと思われる。この細胞に HIV-1 を感染させ静止期に移行させたところ、T細胞親和性 HIV-1 産生を維持するが、マクロファージ親和性 HIV-1 の産生は一過性が低値に留まった。今後、これらの細胞を用いて、持続感染におけるウイルス産生の調節機序と、前述の実験系で認められた CD8+細胞の HIV-1 抑制機能への感受性を解明したい。

A. 研究目的

生体内の HIV-1 持続感染細胞は現行の抗 AIDS 治療薬に抵抗性であり新たな治療標的である。これらの細胞はメモリーT細胞であることが示唆されているがその詳細は不明である。本研究の目的は、持続感染細胞における HIV-1 潜伏機序と宿主免疫との関係を解明することである。

B. 研究方法

- 1) 持続感染細胞として、IL-2 依存性 T 細胞株 ILT-KK (HTLV-I 感染) に HIV-1/LAI を感染させた ILT-KK/LAI を用い、無症候 HIV-1 キャリア (AC) 由来 CD8 陽性 T 細胞の HIV-1 産生抑制効果を調べた。HIV-1 産生量は ELISA 法による上清中 HIV-1 p24 量の測定で行った。感染細胞死は Annexin 5 と HIV-1 抗原を 2 色で染色後 FACS で検出した。
- 2) これとは別に、健常人末梢血単核球(PBMC) を Raji 細胞で刺激し allo-抗原特異的に増殖する T 細胞株を樹立した。このような T 細胞株に HIV-1 (NL4-3, NFN-SX) を感染させ、HIV-1 感受性と細胞数変化を経時的

に調べた。

(倫理面への配慮)

本研究に用いた末梢血の採取に当たり供血者の理解を得、守秘義務を固守する。

C. 研究成果

- 1) ILT-KK/LAI 細胞株実験系について
 - i) AC 由来 CD8 陽性細胞は、HIV-1 持続感染 T 細胞株 ILT-KK/LAI の HIV-1 産生を抑制した(図 1)。この際、CD8+細胞が ILT-KK と全く MHC-I の一致しない場合でも 30 倍以上の CD8+細胞があれば HIV-1 産生は抑制された。また、この活性は健常人 CD8+細胞にも弱いながら認められた。
 - ii) FACS を用いた解析の結果、この CD8+細胞による ILT-KK/LAI の HIV-1 産生抑制は ILT-KK/LAI 細胞死を伴うことが分かった。
- 2) 抗原特異的 T 細胞株実験系について
 - i) 次に、より生理的な機能性 T 細胞における HIV-1 持続感染系を得るため、健常人 PBMC 由来のアロ特異的 T 細胞株を作成した。この細胞株は抗原特異的に増殖し抗

原不在下では静止期に入った。

- ii) これらの T 細胞株に T 細胞親和性 HIV-1 (NL4-3) および マクロファージ親和性 HIV-1 (NFN-SX) を感染させ、HIV 感受性を調べた。その結果、これらの T 細胞株は両 HIV-1 株に感受性であったが、NFN-SX 感染では HIV-1 産生は一過性であり、NL4-3 感染では抗原不在下でも 6 週間は HIV-1 を産生することが分かった。

今後、これらの抗原特異的 T 細胞に持続感染している HIV-1 に対する CD8+ 細胞の影響を解析したい。

D. 考察

HIV-1 持続感染細胞を 2 種類用意した。一つは IL-2 依存性 HTLV-I 感染細胞株、もう一つは IL-2 依存性抗原特異的 T 細胞株である。前者を用いて AC の CD8 陽性 T 細胞は CTL 活性以外に細胞傷害を伴う HIV-1 抑制活性を持つことを示した。後者の抗原特異的 T 細胞系は持続感染機序を解明する上で必要である。本実験で得られた系は未だ改良の余地があるが、抗原特異的に活性化され抗原不在下では静止期にはいる点でメモリー T 細胞に類似し、今後試験管内の疑似持続感染系として期待される。

E. 結論

- i) ILT-KK/LAI を用いた実験では、AC の CD8 陽性細胞が HIV-1 持続感染細胞の傷害を伴い HIV-1 産生を抑制することが分かった。これには MHC 拘束を受けないものが含まれ、HIV-1 特異的キラー T 細胞以外にも HIV-1 持続感染細胞を傷害する CD8+ 細胞集団が存在することが分かった。この観察が一般化できるかどうかは、もう一方の機能性 T 細胞への HIV-1 持続感染系で確かめる必要がある。
- ii) アロ特異的 T 細胞株は試験管内で HIV-1 に感受性を示し、特に T 細胞親和性 HIV-1 株に感染した場合は静止期にあっても持続的に HIV-1 を産生することが分かった。

F. 研究発表

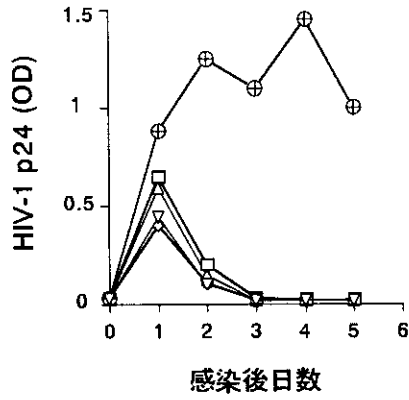
1. 論文発表

- i) T. Ohashi, M. Kubo, H. Kato, A. Iwamoto, H. Takahashi, M. Fujii, and M. Kannagi. Role of class I major histocompatibility complex-restricted and unrestricted suppression of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication by CD8+ T lymphocytes. *J. Gen. Virol.* 80:209-216, 1999.
- ii) T. Ohashi, S. Hanabuchi, H. Kato, Y. Koya, F. Takemura, K. Hirokawa, T. Yoshiki, Y. Tanaka, M. Fujii, and M. Kannagi. Induction of ATL-like lymphoproliferative disease and its inhibition by adoptive immunotherapy in T-cell deficient nude rats inoculated with syngenic HTLV-I-immortalized cells. *J. Virol.* 73:6031-6040, 1999.
- iii) T. Tsukahara, M. Kannagi, T. Ohashi, H. Kato, M. Arai, G. Nunez, Y. Iwanaga, N. Yamamoto, K. Ohtani, M. Nakamura, and M. Fujii. Induction of Bcl-xL expression by HTLV-I Tax through NF- κ B in apoptosis-resistant T-cell transfectants with Tax. *J. Virol.*, 73: 7981-7987, 1999.

2. 学会発表

- i) 劉 慧寧、久保誠、大橋貴、増田貴夫、神奈木真理、抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞クローンにおける HIV 持続感染. 第 13 回日本エイズ学会、東京、1999、12 月
- ii) 久保 誠、増田貴夫、大橋貴、岩本愛吉、八木田秀雄、奥村康、神奈木真理、持続感染細胞に対する CD8 陽性 T 細胞の介在する HIV 抑制活性. 第 13 回日本エイズ学会、東京、1999、12 月
- iii) 鶴谷直美、久保誠、山本直樹、神奈木真理、増田貴夫、ヒト抹消血由来マクロファージ感染系における HIV-1 インテグラーゼの役割. 第 47 回ウイルス学会、横浜、1999、11 月
- iv) 神奈木真理. HTLV-I リンパ腫瘍と免疫. 日本癌学会ミニシンポジウム、京都、1999、12 月

図 1



HIV-1持続感染ILT-KK/LAI細胞株からのHIV-1産生は、MHC-Iの一致、不一致にかかわらずAC-CD8陽性細胞により抑制された。グラフは混合培養上清中のHIV-1産生量を経時的に示す。

- ILT-KK/LAIのみ
- +AC-CD8 (MHC-I一致)
- ◇— +AC-CD8 (MHC-I一致)
- △- +AC-CD8 (MHC-I不一致)
- ▽- +AC-CD8 (MHC-I不一致)

16. 粘膜を介した抗 HIV 免疫反応の誘導と その感染防御効果に関する研究

分担研究者 横田 恭子 (国立感染症研究所免疫部感染免疫室長)
研究協力者 吉澤いづみ (免疫部・エイズリサーチレジデント)
早田 陽子 (東海大工学部)
保田 幸子 (国立感染症研究所免疫部研究員)
水落 利明 (国立感染症研究所細菌・血液製剤部室長)

研究要旨 粘膜を介した抗 HIV ワクチン開発のための基礎的研究として、マウスをモデルとし、HIV-1 gag に対する粘膜免疫誘導機構について解析した。恒常的に Gag p24 を発現するマウス細胞株を樹立し、上部粘膜リンパ組織を中心に種々の粘膜組織での Gag 特異的な細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の活性および粘膜分泌液中の抗 p24 IgA 抗体を測定した。その結果、HIV-1 Gag を発現するベクター DNA を筋肉内に注射すると、それだけでは免疫効果はわずかであるが、その後鼻粘膜に Gag 蛋白抗原をコレラトキシンと共に 2 回追加免疫することにより誘導される抗体および CTL 活性は、最初に免疫した DNA の Gag 発現に依存してより高くなることが明らかとなった。従って、全身性の DNA 免疫により粘膜面の CTL 活性を増強することが可能であると考えられた。

A. 研究目的

これまで主として HIV の外被蛋白 (env) を標的として抗 HIV ワクチン開発の試みがなされてきた。しかしながら、env は variation が大きく患者由来のウイルスには有効性が低いこと、感染者の CTL の多くは gag に反応し、gag に対する免疫応答が病気の進行と強く関連していることから、最近では比較的 variation の少ない gag/pol 領域が注目されている。しかも、ウイルス侵入の最初の段階での感染防御のためには、粘膜における免疫応答が重要となる。しかしながら、ワクチンによる粘膜面での細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の誘導とその抗 HIV 効果に関する研究は、まだこれから解明すべき点が多い。そこで粘膜面に有効な抗 HIV 免疫を誘導する技術の開発とそのメカニズムの解析、さらには粘膜免疫による感染防御効果について明らかにすることを目的とした。

B. 材料と方法

1. マウスおよび細胞等
BALB/c マウスの雌 7-8 週令を用いた。COS 細胞、NIH3T3/BALB は 10%FBS 含有 DMEM で培養した。Gag p24 を発現するワクシニアウイルスは感染研・感染病理部、小島朝人博士より供与いただいた。これを $1-2 \times 10^7$ PFU、2 回静注してマウスに感染させた。組換え Gag p24 蛋白は大腸菌より調整し、アフィニティーカラムで純化した。
2. プラスミド DNA
DNA ワクチン用に EF-1 α プロモーターとプラストサイジン薬剤耐性遺伝子を含むベクター (pEF-BOS-bst; 感染研・巽正志博士より) を用いて pEF-148 を構築した。pEF-148 は pNL432 の HIV-1 gag と protease の遺伝子の下流に、gag/pol mRNA の核外輸送を高めるためにサル type D retrovirus の constitutive transporting element (CTE) をつないだ遺伝子 (テキサス大学 T. A. Rizvi 博士より供与) を含有している。

3. 免疫

DNA は PBS/ bupivacane に溶かしてマウス一匹あたり 100-50 μg を 2 週間毎に 5 回筋肉注射した。5 回の免疫終了後 5 日目の脾臓細胞の CTL 活性を測定した。これらのマウスに追加免疫として鼻から p24 蛋白 (5 μg) をコレラトキシン (2 μg) をアジュバントとして 3 週間あけて 2 回投与した。組み換えマウス IL-12 (PeproTecEC) は 6 回目 7 回目の DNA 免疫時にマウス一匹あたり 1 μg を筋肉内に投与した。

4. エライザ法による抗 p24 抗体価の測定

精製 p24 抗原を 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度にコートした Maxisorp ELISA plate (Nunc) を 5% スキムミルク/PBS/0.05% Tween 20 で 2 時間ブロッキングし、洗浄後適度に希釈した検体を加えて室温で 2 時間反応させた。更に洗浄後、IgG サブクラス毎に認識するビオチン標識ラット抗マウス IgG(1, 2a, 2b)モノクローナル抗体で 1 時間、次いで 2000 倍に希釈したストレプトアビジン HRP を加えて 30 分インキュベートした。発色には O-Phenylene Diaminedihydrochloride, OPD (Sigma) を用い、OD490 の吸光度を測定した。IgA 抗体の測定には HRP 標識ヤギ抗マウス IgA(α) を 2000 倍に希釈し、感度を高めるために TMB + 基質(DAKO)を用いて測定した。

5. CTL assay

免疫後のマウスの脾臓細胞、鼻腔内リンパ組織(NALT)および所属リンパ節の細胞を採取し、脾臓細胞はナイロンウールカラムで T 細胞を純化した。一部の脾臓細胞は 3000 rad 照射して抗原提示細胞(APC)として用い、精製した組み換え p24 を 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように加えて 5 日間培養した。回収した T 細胞に ^{51}Cr 標識した NIH3T3 トランスフェクタント(NIH3T3 EF148-2 あるいは NIH3T3 EF-BOS control)を標的細胞として加え、4 時間培養後の培養上清中の chromium release を測定した。% killing は $(\text{sample cpm} - \text{background cpm}) / (\text{total lysis cpm} - \text{background cpm}) \times 100$ であらわした。

C. 研究結果

1. DNA の筋肉投与によるプライミング効果
昨年 gene gun あるいは筋肉注射 (筋注) で DNA を投与するのみでは抗 Gag 抗体

の産生は低レベルであるが、p24 抗原(30 μg)を完全フロイントアジュバント(CFA)と混合して foot pad に投与すると、Gag 発現 DNA を投与した群が対照群と比較して血清中の抗 p24 抗体価は 2-3 倍程度高くなることを明らかにした。これらの抗 p24 抗体を IgG のサブクラス毎にみると、IgG2a は筋肉注射で Gag 発現 DNA を投与した群でのみ有為に上昇していた。従って DNA によるプライミング効果は、CFA により強力な Th2 型の免疫反応が誘導されるにもかかわらず、最初の筋注により Th1 型の免疫反応へとシフトしやすくなることが示唆された。そこでマウスに DNA (pEF-148 あるいは pEF-BOS-bst) を bupivacane と混合して筋肉内に 2 週間毎に 5 回投与した。血清中の抗 p24 抗体価を測定すると、pEF-148 および pEF-BOS-bst 投与群ともに IgG 抗体がわずかに上昇していた (図 1A)。いうまでもなく、筋注は全身性の免疫反応を誘導するが、粘膜分泌液中 (膣洗浄液) の抗 p24 IgA 抗体の有意な上昇は認められなかった (図 1B)。

DNA の投与が粘膜免疫系にも有効であるかどうかを確認するために、最後の DNA 免疫から 7 日後に p24 抗原 5 μg を 2 μg のコレラトキシンをアジュバントとして混合し、鼻から 3 週あけて 2 回投与した。この免疫法では、血清および粘膜面における軽度の抗体産生を誘導することがわかっている。血清および膣洗浄液を経時的に採取して、抗 p24 抗体価を測定したところ、図 1A に示す様に、Gag 発現 DNA 投与群 (Gag/CT) では血清中の抗 p24 IgG 抗体価は対照 DNA 投与群 (EF/CT) と比較してそれほど高い値を示さなかった。一方、粘膜分泌液 (膣および鼻洗浄液) では個体差はあるものの Gag 発現 DNA 投与群でより高い抗 p24 IgA 抗体を産生することが明らかとなった (図 1B)。

2. HIV-1 gag 特異的 CTL 活性

Gag に対する抗体は免疫反応が誘導されているという指標ではあるが、CTL 活性が誘導されることが HIV の感染防御には重要である。前年度 Gag を恒常的に発現する NIH3T3/BALB トランスフェクタントを作成し、Gag 特異的 CTL を測定する系を確立した。この細胞を標的細胞として DNA 免疫による CTL 活性の誘導性について解析した。DNA 免疫後の脾細胞をエフェクター細胞として Gag 特異的 CTL 活性

を測定すると、対照 DNA 投与群と比較して明らかな細胞傷害性を示した (図 2A)。しかしながら、Gag 発現ワクシニアウイルスの感染で誘導される Gag 特異的 CTL と比較すると (図 2B)、DNA 免疫群の方が CTL 活性は低い。

次に、DNA 免疫後に p24 抗原とコレラトキシンによる粘膜免疫を追加したマウスの各組織における Gag 特異的 CTL 活性を測定した。図 3 に示すように、脾細胞 (A) および NALT リンパ球 (B) で Gag 特異的 CTL が誘導されており、その活性は Gag 発現 DNA でプライムした群が対照 DNA でプライムした群の約 2 倍であった。また、鼻粘膜組織の所属リンパ節 (後頸部リンパ節) でも低いながら CTL 活性を認めた (data not shown)。

3. IL-12 による DNA プライミング効果の増強

DNA の筋注では筋細胞(myocyte)に DNA が導入されて遺伝子発現し、近傍の樹状細胞がその抗原を取り込んで抗原提示されて免疫反応が誘導されると考えられている。樹状細胞は IL-12 を産生して Th1 型の免疫を誘導することが知られているが、用いる抗原や投与方法によりその効果は様々である。我々の系で DNA プライミングにより増強される粘膜面での免疫応答が IL-12 によってどのように修飾されるか検討するため、5 回の DNA 筋注後、更に IL-12 とともに DNA を 2 回追加して筋注した。これらのマウスにも p24 抗原とコレラトキシンによる粘膜免疫を同様に行い、抗体反応や CTL 活性への影響を解析した。DNA プライミングの時に IL-12 が大量に存在すると、追加粘膜免疫での血清中の IgG 抗体産生は Gag 発現 DNA 免疫群で顕著に増強したが (図 4A)、粘膜面での IgA 抗体産生はむしろ抑制された (図 4B)。しかもこの時の Gag 特異的 CTL 活性は NALT でわずかに認められたが、脾細胞や所属リンパ節では活性がなかった。従って全身性の DNA プライミング時に樹状細胞の機能を高める IL-12 が存在すると、全身性免疫応答が Th2 優位の免疫に偏り、粘膜免疫応答はむしろ抑制されることが示唆された。

D. 考察

DNA 免疫は、その調整の容易さや保存の簡便さを考えると、特に低開発国でのワクチン開発にむけて魅力的な技術である。しかしな

がら、DNA 免疫によりプライミングはされても、それだけでは強い免疫応答が誘導されないことが多い。その原因の一つとしては、我々の用いた Gag 発現ベクターではマウスでの Gag 発現レベルがまだまだ低いことがあげられる。最近では gag/pol 領域の遺伝子配列に存在する Inhibitory Sequence(INH)に変異をいれ、更にウイルス遺伝子のコドンの人で高度に発現する遺伝子のコドンに変換した DNA が作成され、Gag の発現効率がかなり高いベクターが開発されている。このような DNA を用いることにより、免疫回数を減らして十分な免疫効果を得ることが可能であろう。

DNA の筋注が Th1 型の免疫反応を誘導することは以前から知られていた。我々の系で本来強力な Th2 型の免疫を誘導する CFA を用いてブースターしても、最初の DNA 筋注の効果で IgG2a が産生されていた。DNA 筋注によりなぜ Th1 型の免疫が誘導されやすいのかは明らかではないが、DNA 筋注法は投与する DNA がかなり多いため、DNA に存在するいわゆる CpG モチーフが大量にとりこまれることが Th1 型の免疫誘導に関与していると思われる。一方、樹状細胞の機能を高める目的で IL-12 を DNA と同時に筋注投与すると、かえって Th2 型の免疫反応にシフトしやすくなった。また DNA を金粒子の形で皮内に投与する gene gun 法では、皮下に豊富に存在するランゲルハンス細胞が DNA を直接取り込むと考えられている。したがって投与部位の樹状細胞の存在は、本来 Th2 型免疫反応を優位に誘導する役割を果たしていることが示唆された。この点に関しては更に検討する必要がある。

HIV の初期感染防御における CTL の重要性を考えると、DNA 筋注により Th1 型の免疫を誘導することによって、粘膜面への免疫効果を高める prime-booster の手法はワクチンとして応用できる可能性が大きい。

E. 結論

HIV-1 gag を発現する DNA を用い、筋注による DNA 免疫の効果について解析した結果、DNA 筋注は全身性に Th1 型の免疫を誘導しやすくし、ひき続いて粘膜面に蛋白抗原でブースター免疫することにより、粘膜面の抗体および CTL の誘導を増強する効果があることが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Tsunetsugu-Yokota, Y., Kato, T., Yasuda, S., Matsuda, Z., Suzuki, Y., Koyanagi, Y., Yamamoto, N., Akagawa, K., Cho, M.W. and Takemori, T. : Transcriptional regulation of HIV-1 LTR during antigen-dependent activation of primary T cells by dendritic cells J. Leukocyte Biol., in press, 2000.
- (2) Izumi Yoshizawa, Yoko Soda, Toshiaki Mizuochi, Sachiko Yasuda, Tuguo Mizuochi, Tahir A. Rizvi, Toshitada Takemori and Yasuko Tsunetsugu-Yokota: Mucosal Immune response against HIV-1 gag enhanced by DNA immunization, 2000, in preparation.

学会発表

- 1) 吉澤いづみ、早田陽子、保田幸子、加藤珠実、水落次男、竹森利忠、水落利明、横田(恒次)恭子。HIV-1 gag の経鼻免疫による液性及び細胞性免疫応答の誘導。第29回日本免疫学会、京都、平成11年12月。
- 2) 早田陽子、吉澤いづみ、保田幸子、加藤珠実、水落次男、横田(恒次)恭子。HIV-1 gag 発現 DNA による免疫応答の解析。第13回日本エイズ学会、東京、平成11年12月。
- 3) Y. T. YOKOTA, I. YOSHIZAWA, Y. SOUDA, T. MIZUOCHI, S. YASUDA, T. KATO, T. A. RIZVI, T. MIZUOCHI & T. TAKEMORI: Analysis of mucosal immunity to HIV-1 gag enhanced by gag-expressing DNA in mice. 7th Conference on Retrovirus and Opportunistic Infections, San Francisco, CA, USA, 2000年1月。

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

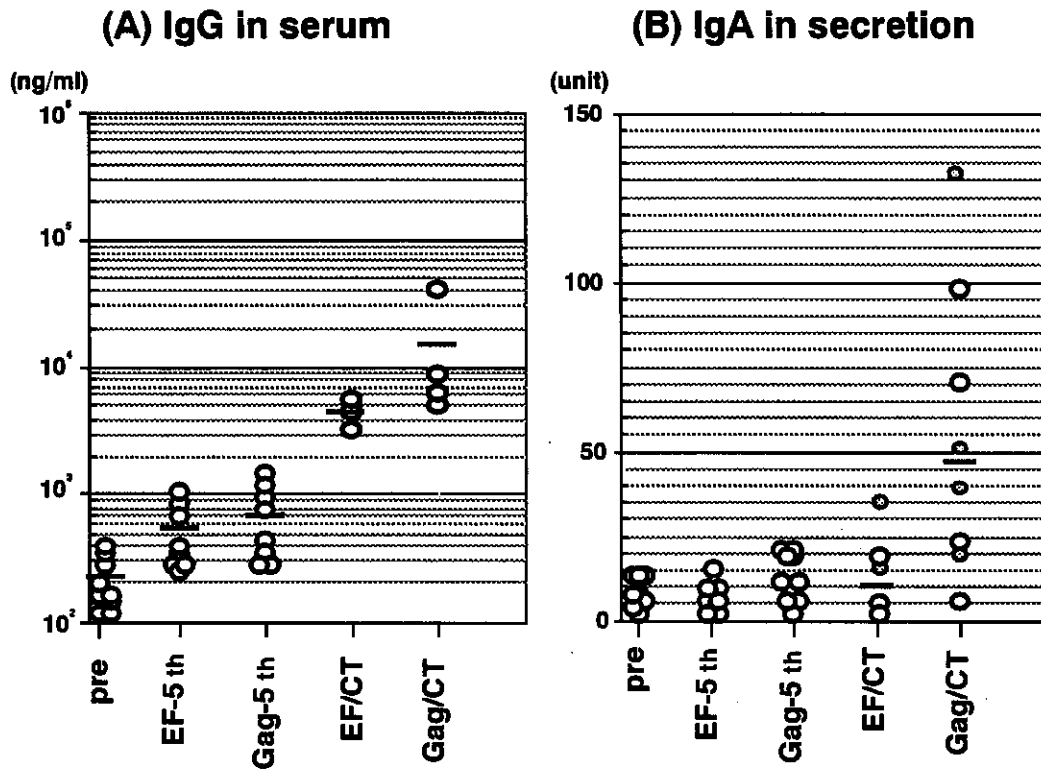


図1 DNA筋注 - 鼻粘膜p24蛋白ブースター免疫による血清中および粘膜分泌液中のp24特異的抗体産生Gag発現DNAを2週おきに5回筋注し、その後p24とコレラトキシンで鼻粘膜に3週間隔で2回ブースター免疫したBALB/cマウスの血清(A)および腔洗浄液あるいは鼻洗浄液中(B)のp24特異的抗体価をエライザで測定した。IgG抗体蛋白量はp24特異的モノクローナル抗体をスタンダードとし、IgA抗体は吸光度が0.2となる希釈倍率をunitとして算出した。

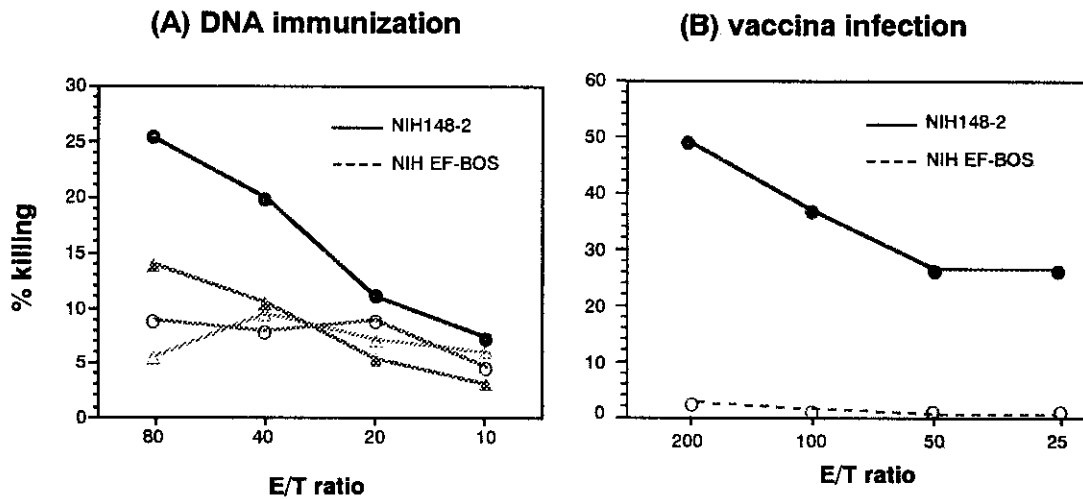


図2 DNA免疫あるいはvacciniaウイルス感染による脾細胞のCTL活性の比較

(A) Gag発現DNA(EF-148:●○)あるいは空ベクター(EF-BOS-bst:▲△)を5回免疫後あるいは(B)ワクシニアウイルス感染後7日目に脾臓T細胞をとりだし、in vitroで刺激した。培養5日目のT細胞をエフェクターとし、Gag発現NIH3T3/BALBトランスフェクタント(NIH148-2:実線)あるいは空ベクタートランスフェクタント(NIH EF-BOS:点線)を標的細胞としてクロミウムリリース法でCTL活性を測定した。

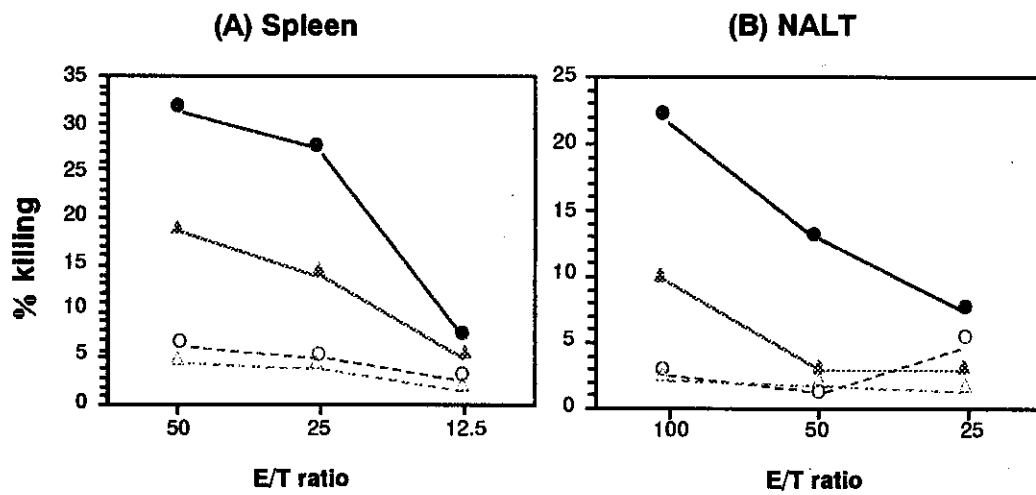


図3 DNA筋注一鼻粘膜p24ブースター免疫により誘導されるCTL活性

図1の如く免疫したマウスの脾臓T細胞(A)あるいは鼻リンパ組織(NALT)細胞(B)のCTL活性を図2同様測定した。●○; EF-148免疫群、▲△; EF-BOS免疫群で、実線はNIH148-2、点線はNIH EF-BOS細胞を標的としたときの細胞傷害性である。

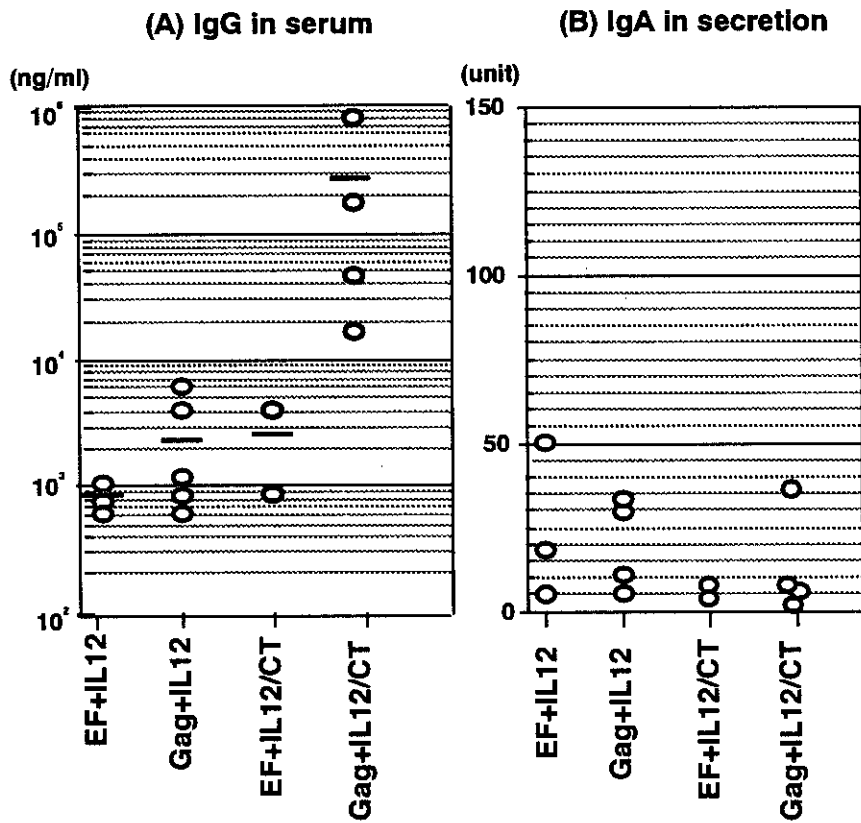


図4 DNA 筋注 - 鼻粘膜p24蛋白ブースター免疫のプライミング時におけるIL-12の効果

Gag発現DNAを2週おきに5回筋注し、更に2回DNAと同時にIL-12 (1 μ g)を追加し、その後p24とコレラトキシンで鼻粘膜に3週間隔で2回ブースター免疫したBALB/cマウスの血清(A)および腔洗浄液(B)中のp24特異的抗体価をエライザで測定した。

17. 急性感染期における HIV-1 感染による免疫破壊機構

分担研究者 小柳 義夫 (東北大学微生物学教授)
共同研究者 鈴木 陽一 (エイズ予防財団非常勤研究員)
武内 寛明 (東北大学微生物学大学院)

研究要旨 HIV-1 感染症においては、初感染から持続感染に至る感染初期と中期、そして発病時である後期とでは、分離されてくる HIV-1 の特性は異なっていることが知られている。しかし、HIV-1 が新たに個体に伝播される初感染時に、本当はどのようなウイルスが存在しているのか十分な解析はなされていない。このウイルスの本態を明らかにすることは、治療ならびに予防法の開発にとっても必要不可欠である。本研究では、3名の HIV-1 抗体陰性者ならびに2名の抗体陽転者の PBMC から、限界希釈法を用いて同一個人より多くの HIV-1 を分離し、それらの性状解析をおこなった。感染実験の結果から、得られた分離株はその多くがマクロファージ指向性であり、さらに Th1 型の CD4 陽性 T 細胞においても高い増殖性を示すことが明らかとなった。一方、抗体陽転後も高ウイルス血症が持続した感染者からの分離株は Th2 型 CD4 陽性 T 細胞で増殖性が高く、そしてこれらの分離株はすべて T 細胞株指向性 HIV-1 を含んでいた。同一感染者由来の分離株でも、その env 領域には多様性がみられ、急性感染期においてもウイルスの変異性は高く、T 細胞株指向性 HIV-1 への変化もすでにこの時期に起こりうることを示された。また、ひとりの抗体陰性者からの分離株は、non-stimulated PBMC culture においても増殖可能なウイルスを含んでおり、このウイルスは生体内における HIV-1 の最初の標的細胞であると報告されている非活性化 CD4 陽性 T 細胞に対しても感染を成立できるウイルスであると考えられる。本研究で得られた初感染時の HIV-1 に関する知見は、どのようにしてウイルスが伝播し、そして個体に感染を成立させるのかといった疑問を解決するひとつの手掛かりになるものと考えられる。

A. 研究目的

新たな個体に human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) が、なぜたやすく感染するのか、それが疑問である。生体は速やかに強力な免疫反応を誘導し、ウイルスを排除しようとするにもかかわらず、ウイルスは除去されない。この初感染時のウイルスは何らかの特性を有しているのであろうか。この問いに答えるために、急性感染期の HIV-1 感染者からウイルスを分離し、それらのウイルス学的な特異性を明らかにし、初感染成立のメカニズム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) 急性感染者からの HIV-1 の分離

米国ロサンゼルス Cedars-Sinai 病院外来を受診した 3 名の HIV-1 抗体陰性者

(CS-1 ~ CS-3) ならびに 2 名の抗体陽転者 (CS-4; 陽転後 6 ヶ月, CS-6; 陽転後 10 ヶ月, 表 1) の末梢血リンパ球 (peripheral blood mononuclear cells; PBMC) と健常人由来の PBMC を co-culture し、bulk virus を分離した。次に 96 well plate を用いて、p24^{gag} 抗原量で 1 ng に相当する bulk virus 溶液から、3 倍希釈系列を各感染者あたり 10 系列調製し、健常人由来の PBMC を各 well に加え培養した。2 週間後、培養上清中の p24^{gag} 抗原量が陽性と判定された最後の感染細胞を、もう一度健常人由来の PBMC と co-culture し、最終的に各感染者からそれぞれ 10 分離株を得た。

2) CD4 陽性細胞の培養

健常人由来の PBMC から DYNABEADS 法によって CD4 陽性 T 細胞を分離し、OKT3 抗体を固相化したプレート上で IL-2 存在下で 8 日間培養したものを primary

CD4⁺ T cell とし, IL-2 と IL-12 を含む培地で 8 日間培養したものを Th1-type cell とした. また CD4 陽性 T 細胞からさらに CD45RA 陽性 T 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-type cell とし, 以降の感染実験に用いた. PHA-PBMC は, PBMC を PHA にて 3 日間刺激したものであり, monocyte-derived macrophages (MDM) は PBMC から附着法にて分離し, 5 日間培養したものである.

3) *env* V1, V2 ならびに V3 領域の塩基配列の比較

各ウイルス分離株を感染させた PBMC から DNA を抽出し, nested PCR 法によってエンベロープの V1 から V3 領域までを含む約 780 bp の領域をそれぞれ増幅し, pGEM-T vector にクローニング後, 各 PCR product の塩基配列を決定した.

4) Non-stimulated PBMC culture を用いた感染実験

p24^{ant} 抗原量で 1 ng に相当する各ウイルス分離株を, 健常人末梢血から分離した PBMC (2×10⁵ 細胞) に感染させ, 10% のヒト AB 型血清を含む培地で培養し, 感染後のウイルスの増殖性を検討した.

5) 感染性 HIV-1 分子クローンの作製

ウイルス感染細胞の DNA を template とし, Taq DNA polymerase を用いて HIV-1 proviral DNA の 5' U3 領域から packaging signal の領域までを, また rTth DNA polymerase を用いて primer binding site から 3' U5 領域までを PCR 法によって増幅し, それぞれの PCR フラグメントを pGEM-T ベクターならびにコスミドベクターにクローニングした. これらの PCR フラグメントを, 多くの HIV-1 株がユニークに有している BssH II サイトに挿入し, near-full length HIV-1 分子クローンを得た (図 3).

C. 研究結果

1) 急性感染者からの HIV-1 分離株の各 CD4 陽性細胞における増殖性

限界希釈法を用いて急性期の感染者から得られた 50 の分離株のうち, 実験に供することのできた 34 分離株のほとんどが PHA-PBMC, MDM および primary CD4⁺ T cell culture で高い増殖性を示した (表 2). さらにこれらの分離株のうち 30 ウイルスは IL-4 で誘導した Th2-type cell よ

りも IL-12 で誘導した Th1-type cell で高い増殖性を示した (表 2). 一方, HIV-1 抗体陽転後も持続的高ウイルス血症がみられた抗体陽転者 CS-4 (表 1) からの分離株は, Th2-type cell で増殖性が高く, さらにこれらの分離株には MT-4 で増殖することのできるウイルス, すなわち T 細胞株指向性 HIV-1 が 10 分離株中 9 株も含まれることが明らかとなった (表 2).

2) 同一感染者からのウイルス間における *env* V1, V2 および V3 領域の多様性

これまでの知見から, *env* 領域は細胞毎のウイルス増殖性を決定するという事実はよく知られている. 実際我々は, JR-CSF と NL4-3 のキメラウイルスを用いた実験より, Th1-type cell と Th2-type cell におけるウイルスの増殖性は, それぞれのウイルスの *env*, その中でも V3 領域が決定することを報告している (J. Virol., 73: 316, 1999). そこで, 本実験において得られた分離株についてもその *env* V1 から V3 領域までの塩基配列を比較検討したが, Th1-type cell または Th2-type cell における増殖性と明らかに相関性を見いだせるような配列上のモチーフは確認されなかった. しかしながら, 感染者 CS-1, CS-3, CS-4 ならびに CS-6 には, *env* 領域が 10% 以上異なる少なくとも 2 種類のウイルスが感染していることが明らかになった (図 1).

3) ウイルス分離株の non-stimulated PBMC における増殖性

この急性感染期由来の我々の HIV-1 分離株すべてを, IL-2 やマイトジェンなどで刺激しない健常人由来の PBMC (non-stimulated PBMC) に感染させ, その増殖性を検討した. その結果, ひとりの抗体陰性者 CS-2 から得られた 3 分離株 (#2-2, #2-9 および #2-10) は 28 日間にわたり増殖が可能であることがわかった (図 2). さらに, ウイルス感染から 28 日後に潜伏感染したウイルスを回収するために PHA 刺激した PBMC を各培養系に加えたところ, PHA-PBMC 添加前はウイルスが検出できなかったにもかかわらず, 添加後は CS-2 から得られた 1 分離株 (#2-6) からも感染性ウイルスが検出された (図 2). なお, この non-stimulated PBMC culture においては, 培養 7 日後に 99.19% の細胞が G0 もしくは G1 期の非分裂細胞であった (図 2).

4) 急性期由来の感染性 HIV-1 分子クローンの作製