

Non-stimulated PBMC culture で高い増殖性を示す CS-2 由来の分離株#2-2 の near-full length HIV-1 分子クローンを、感染細胞由来の DNA を template として PCR 法を用いて作製した (図 3). 得られたクローンは、JR-CSF 同様、p24^{agg} 抗原の高い発現を示した (図 3).

D. 考察

HIV-1 が新しく侵入した個体内では、当然ウイルスに対する速やかな免疫防御反応が発動され、ウイルスの増殖を抑制しようとする。通常、感染後 2 ~ 3 週間にて、CTL を主とする細胞性免疫反応は誘導されるといわれている。しかしながら HIV-1 は何らかの理由によってこの強力な免疫反応から逃れ、結果として新しい個体にウイルスの持続感染を成立させる。ウイルス感染後に誘導される CTL などの細胞性免疫や液性免疫は、感染症の中・後期にみられるものとは異なり、ウイルス増殖に対する抑制効果は強力であることが予想されるため、急性期に増殖できる HIV-1 は免疫機構からの回避能力と細胞への感染性という意味合いにおいて、ある特性を有していると考えられる。急性感染期に存在する HIV-1 について、これまでに報告されているウイルス学的な特徴としては、1) そのほとんどがマクロファージ指向性 HIV-1 である、2) 感染者末梢血中のウイルス遺伝子は非常に均一 (homogenous) であることがあげられる。しかしながら、これらの報告は、感染者から混合培養法により単純に分離されたウイルスをもとに得られた結果であり、主に感染者体内で優位に存在するウイルスの性格のみを反映していると考えられる。そこで本研究においては、HIV-1 抗体陰性期の感染者 (CS-1, CS-2 および CS-3) ならびに抗体陽転後数ヶ月の感染者 (CS-4 および CS-6) の PBMC から HIV-1 を分離し、さらに同一個体から数種のウイルスの分離を可能とするために、限界希釈法を用いて各感染者から最終的に 10 分離株を得た。まずこれらのウイルス分離株について、様々な CD4 陽性細胞における増殖性を検討したところ、得られた分離株はすべて PHA-PBMC で高い増殖性を示し、さらにその多くは初代培養マクロファージ (MDM culture) においても増殖性が高いことが示された (表 2)。これらの結果は、初感染時に優位に分離されてくる HIV-1 はマクロファージ指向性であるというこれまでの知見と一致するものである。また我々は、分子クロー

ン化された HIV-1 株を用いた実験から、マクロファージ指向性 HIV-1 は IL-12 で誘導された Th1-type cell において増殖性が高いのに対し、T 細胞株指向性 HIV-1 は IL-4 で誘導された Th2-type cell において増殖しやすいことを報告している (J. Virol., 71: 465, 1997)。そこで、本実験で得られたウイルス分離株についても Th1-type cell または Th2-type cell における増殖性を検討したところ、34 株中 30 分離株は Th2-type よりも Th1-type cell において、より高い増殖性を示すことが明らかとなった (表 2)。よって、初感染時に増殖しているウイルスはマクロファージ指向性であると同時に Th1 型の CD4 陽性 T 細胞に対しても指向性が強く、感染初期に誘導されると報告されている Th1 型の免疫状態に適した性状を有していることが示された。一方、抗体陽転後も高ウイルス血症の持続がみられた抗体陽転者 CS-4 (表 1) からの分離株については、10 株中 9 分離株が Th1 よりも Th2-type cell で増殖性が高く、さらに興味深いことに、これらの分離株には免疫不全症を発症する前後に出現すると考えられている T 細胞株指向性 HIV-1 が含まれていた (表 2)。これらの感染実験の結果から、急性期の HIV-1 の性状について、1) 感染者体内で実際に増殖しているウイルスにも“Th1 細胞指向性”と“Th2 細胞指向性”が存在し、そのウイルスの優位性によって病状進行が影響される、2) これまで考えられてきた以上に T 細胞株指向性 HIV-1 への変化は感染の早期にすでに起こっているという新たな知見を得ることができた。

次に、この Th1-type cell と Th2-type cell における増殖性の違いは HIV-1 のエンベロップ、特に V3 領域が決定していることをこれまでに報告している (J. Virol., 73: 316, 1999)。そこで各ウイルス分離株の env V1 から V3 領域までの塩基配列を比較したが、Th1-type cell もしくは Th2-type cell における増殖性の違いと相関するような配列上のモチーフは確認することはできなかった。しかしながら、同一感染者からの分離株間において、env V1 から V3 領域までの塩基配列に明らかな多様性がみられ、急性感染期においてもすでにそのウイルス集団は heterogenous であることが示された (図 1)。最近、subtype A または D の HIV-1 に感染した急性期の女性感染者には heterogenous なウイルスが存在するが、男性感染者には homogenous なウイルスが存在するという報告がなされている (Nature Med., 6: 71, 2000)。この報告は、感染者の末梢血中のウイルス遺伝子の多様性を解析したもので

あり、ウイルス分離によるものではない。本研究における検体は CS-3 以外はすべて男性であり、男性においてもウイルス集団は heterogenous であった。この結果の相異については今後の解析が必要である。

最近、HIV-1 が個体に侵入後、最初の標的細胞は非活性化 CD4 陽性 T 細胞であるという報告がなされた (Science, 286: 1353, 1999)。この事実から、HIV-1 が新たな個体に伝播するには、それまで免疫学的に非活性化状態にある細胞群に対してまず感染を成立させる必要があると考えられる。現在までのところ、HIV-1 については非活性化細胞において増殖することのできるウイルスを分離したとの報告はない。しかしながら、本実験においてひとりの抗体陰性者 CS-2 から得られた分離株 (#2-2, #2-6, #2-9 および #2-10) は、活性化状態の非常に低い non-stimulated PBMC culture において増殖することのできるウイルスであることが明らかとなった (図 2)。このように非常にユニークな HIV-1 を分離し、解析することは、急性期における感染成立のメカニズムを解明することにつながる。そして非分裂性細胞にも効率よく感染できる HIV ベクターへの応用という意味においても大変有用である。そこで、現在我々はこのウイルス分離株 (#2-2) の感染性分子クローン (near-full length HIV-1 clone) を作製し (図 3)、現在そのウイルス学的性状の解析をおこなっている。

本研究の結果から、急性感染期における HIV-1 の新たな特性が明らかとなった。このような特徴を有しているがゆえに、HIV-1 は種々の生体側の壁をたやすく乗り越えて標的細胞に感染し、増殖を繰り返していくことができるのであろう。本研究で明らかとなった伝播性ウイルスの特性の解明は、HIV-1 感染成立機構の解明だけでなく、このウイルスに対するワクチン開発をはじめとするウイルス防御法の開発にも有益である。

E. 結論

急性感染者由来のウイルス分離株の多くはマクロファージ指向性かつ Th1-type cell 指向性である。また、この急性期に T 細胞株指向性 HIV-1 はすでに存在しうることがあり、これまで考えられていた以上に heterogenous である。すなわち、抗体陰性期もしくは陽転期においても HIV-1 は非常に変異性が高いことが示された。さらに、ひとりの抗体陰性者からは non-stimulated PBMC culture にお

いても増殖できるウイルスが分離され、新たな個体に感染を成立させる HIV-1 の特性が明らかになりつつある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Suzuki Y, Koyanagi Y, Tanaka Y, Murakami T, Misawa N, Maeda N, Kimura T, Shida H, Hoxie JA, O'Brien WA, 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.
- 2) Murakami T, Zhang T-Y, Koyanagi Y, Tanaka Y, Kim J, Suzuki Y, Minoguchi S, Tamamura H, Waki M, Matsumoto A, Fujii N, Shida H, Hoxie JA, Peiper SC, and Yamamoto N. Inhibitory mechanism of the CXCR4 antagonist T22 against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection. *J Virol*, 73: 7489-7496, 1999.
- 3) Ichiyama K, Ishikawa D, Tanaka Y, Kashiwa T, Koyanagi Y, Handa S, Yamashita A, Fukushi M, Yamamoto N, Taki T. Epitope mapping of rat neutralizing monoclonal antibody against human immunodeficiency virus type-1 by a phage peptide library: comparison with ELISA using synthetic peptides. *Viral Immunol*, 12: 57-66, 1999.
- 4) Maeda N, Koyanagi Y, Misawa N, Miyano-Kurosaki N, Kira J-I and Yamamoto N. Acquisition of HIV-1 resistance by β -chemokine-producing CD4⁺ T cells. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 15: 1453-1460, 1999.
- 5) Takahashi K, Baba S, Chattopadhyay P, Koyanagi Y, Yamamoto N, Takaku H, Kawai G. Structural requirement for the two-step dimerization of human immunodeficiency virus type-1 genome. *RNA*, in press.
- 6) Momoi Y, Ichiyama K, Chowdhury IH, Koyanagi Y, Yamaoto N. Pertussis toxin enhances human immunodeficiency virus-1 replication. *AIDS Res Hum Retroviruses*, in press.

2. 学会発表

- 1) 小柳義夫：HIV 感染における自己免疫機構. 日本医学会総会, 1999.
- 2) 小柳義夫：Immunologic Factors in the Pathogenesis of HIV-1. 日本生体防学会補体シンポジウム合同学術会議, 1999.
- 3) 鈴木陽一, 武内寛明, 山本直樹, 小柳義夫：HIV-1 急性感染期からのウイルス分離とその性状. 第 47 回日本ウイルス学会, 横浜, 1999.
- 4) 小柳義夫, 三浦義治, 三沢尚子, 前田直良, 田中勇悦, 水澤英洋, 山本直樹：HIV-1 感染による脾臓構築リンパ球の破壊様式 (hu-PBL-SCID マウスによる解析). 第 29 回日本免疫学会, 京都, 1999.
- 5) 鈴木陽一, 武内寛明, 山本直樹, 小柳義夫：HIV-1 増殖が細胞分裂を必要としない例. 第 29 回日本免疫学会, 京都, 1999.
- 6) 三浦義治, 三沢尚子, 前田直良, 田中勇悦, 山本直樹, 水澤英洋, 小柳義夫：HIV-1 感染 hu-PBL-NOD-SCID マウスにおける細胞死. 第 13 回日本エイズ学会, 東京, 1999.
- 7) 武内寛明, 鈴木陽一, 山本直樹, 小柳義夫：ウイルス初感染直後に分離された感染性 HIV-1 の遺伝的性状. 第 13 回日本エイズ学会, 東京, 1999.
- 8) 佐藤千尋, 鈴木陽一, 小柳義夫, 山本直樹：リアルタイム PCR を利用した HIV-1 複製過程の解析. 第 13 回日本エイズ学会, 東京, 1999.
- 9) Y. Koyanagi, Y. Miura, N. Misawa, N. Maeda, Y. Tanaka, H. Mizusawa, N. Yamamoto：Model of HIV-1 replication in spleen using hu-PBL-NOD-scid mice. Cold Spring Harbor Meeting, 1999.
- 10) Y. Suzuki, H. Takeuchi, E.S. Daar, N. Yamamoto, Y. Koyanagi：Characterization of HIV-1 isolates from acute retrovirus syndrome. 7th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infection, San Francisco, 2000.

18. エイズカポジ肉腫とヒトヘルペスウイルス 8 に関する研究

分担研究者 佐多 徹太郎 (国立感染症研究所エイズ研究センター室長)
研究協力者 片野 晴隆、佐藤 由子、岩崎 琢也、倉田 毅 (同・感染病理部)

研究要旨 本邦では従来、カポジ肉腫の発生はごく稀であったが、エイズ関連カポジ肉腫はエイズ剖検例の 20%程度と報告され、急速に増加してきた。1994 年にエイズ関連カポジ肉腫組織からヒトヘルペスウイルス 8 型 (HHV8) が発見され、全ての型のカポジ肉腫から高率に HHV8 DNA が検出されている。今回、HHV8 蛋白を GST 融合蛋白として作製し、抗体アッセイ系を開発し血清疫学的研究を行い、エイズカポジ肉腫患者血清で 100%、エイズ同性愛者血清で 65%、エイズ血友病患者血清では 0%という結果を得た。さらに国立感染症研究所血清銀行の一般人血清 1,004 例での HHV8 抗体陽性率は 1.4%であった。またウサギ抗体を作製し、エイズカポジ肉腫のホルマリン固定パラフィン包埋組織において HHV8 関連蛋白の発現を免疫組織化学的に検討した結果、カポジ肉腫の腫瘍細胞である紡錘形細胞と内皮細胞の核内に、HHV8 の潜伏感染時に出現する ORF73 蛋白が多量に発現しており、HHV8 は潜伏感染状態にあること、そしてこの抗体がカポジ肉腫の組織診断に有用であることが判明した。

A. 研究目的

ヒトヘルペスウイルス 8 型 (HHV8) は 1994 年にエイズ関連カポジ肉腫組織から発見された新しいヒト γ 2 ヘルペスウイルスで、腫瘍関連ウイルスと考えられている。カポジ肉腫にはエイズ関連型だけでなく、古典型、アフリカ型、および免疫抑制剤使用による免疫不全型という 4 種のカポジ肉腫が知られ、PCR 法によりその全ての型のカポジ肉腫から 95%以上の頻度で HHV8 DNA が検出されている。さらに心嚢、胸腔、腹腔などの体液腔に腫瘍塊を作らず浮遊した状態で増殖する primary effusion lymphoma (PEL) という特殊な悪性リンパ腫、そして多巣性キャスルマン病 (multicentric Castleman's disease, MCD) もこの HHV8 の感染と関連して発症し、HIV 感染者に発症頻度が高いことが知られている。

エイズの蔓延以前、わが国ではカポジ肉腫の発生はごく稀であった。しかし本邦エイズ関連カポジ肉腫はエイズ剖検例の 20%程度と報告され、急速に増加している。現在までに有効な血清診断法は PEL 細胞株を抗原とする蛍光抗体法以外はなかった。最近報告された ELISA 系は大きなヘルペスウイルスのごく一部の単一蛋白を抗原としたものであり、抗体

検出系としては十分とはいえない。PEL 細胞株から抗原とするウイルス粒子を集めるには多大な労力を要する上、ウイルス粒子を抗原に用いた ELISA では検出感度にも問題がある。我々は遺伝子組換え法を用いたウイルス抗原の作製と、それを用いた ELISA 法の開発を行い、エイズ関連カポジ肉腫患者血清やカポジ肉腫のない HIV 感染者および一般人血清における抗体保有率の検討を行った。またエイズカポジ肉腫から PCR 法で HHV8 の関与が調べられてきたが、ウイルス蛋白の発現といった観点からの報告はない。そこで、今回、ヒトヘルペスウイルス 8 の本邦での侵淫状況を血清学的に調べ、さらにエイズカポジ肉腫における HHV8 の組織内局在について明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

HHV8 の潜伏および増殖に関連するウイルス蛋白を GST 融合蛋白として作製し、抗体アッセイ系を開発した。この融合蛋白を抗原としてウサギ抗体を作製し、エイズカポジ肉腫のホルマリン固定パラフィン包埋組織において HHV8 関連蛋白の発現を免疫組織化学的に

検討した。

1. 組換え抗原の作製

HHV8 は約 170 kbp の DNA をもつ大きなウイルスで、80 以上の ORF が存在することから、TY-1 細胞から cDNA ライブラリーを免疫スクリーニングして得られた情報と BCBL-1 細胞から同様の方法で得られた報告をもとに、14 種類の蛋白を選択した。ORF73 は組換え蛋白作製の都合上、N 末端および C 末端近傍の二種に分けて作製した。それぞれ発表されている塩基配列をもとに、PCR 法で増幅し、大腸菌の GST 融合蛋白発現ベクターである pGEX5X-2 にクローニングした。大腸菌で発現した蛋白は glutathion-Sepharose ビーズにより精製し、SDS-PAGE でサイズを確認し、蛋白濃度を決定した。

2. 抗体測定に有用な抗原の選択

AIDS 患者でカポジ肉腫(KS)を発症した患者血清のうち4検体、HIV 陰性の KS、伝染性単核球症および健康成人の各1例の血清をもちい、まず血清抗体の性状について Western blot 法で検討した。検討に用いた血清は、TY-1 細胞および TPA で刺激した TY-1 細胞を PBS で洗浄後、スポットスライドにスメアを作製し、乾燥後アセトンで固定した細胞を抗原とした蛍光抗体法で、HHV8 に対する抗体の有無を検討した。組換え DNA 法で作製したそれぞれの融合蛋白および TPA で2日間刺激した TY-1 細胞の可溶性抗原を SDS-PAGE で展開し膜に転写した。それぞれの血清を200倍に希釈したのち反応し、2次抗体としてアルカリホスファターゼ標識の抗ヒトγグロブリン抗体を反応させ、BCIP/NBT で発色した。これらにより、どんなウイルス抗原が検出されるかを検討した。

3. HHV8 抗体測定 ELISA 法の開発

上記の検討で得られた抗原の候補を選択し、それぞれ単一蛋白として 96 ウエルプレートに固相化し、20 検体の AIDS-KS、17 検体の HIV+/KS-、健康成人血清、サイトメガロウイルス抗体陽性血清および伝染性単核球症血清を用いて、血清抗体の性状を解析した。それぞれ 2 μg/ml に希釈した蛋白を各ウエルに 50 μl 加えて抗原を固相化した。ウエルの洗浄後、非特異反応を阻止する目的で GST 蛋白を産生する大腸菌の可溶化物を 500 μg/ml の濃度で添加した血清を希釈後、反応した。洗浄後、アルカリホスファターゼ標識の抗ヒトγグロブリン抗体をさらに反応させ、BCIP/NBT

で発色し、405nm の吸光度を測定した。被験血清は希釈により検討した結果、100x 希釈を標準とした。Cut-off 値は健康成人血清の吸光度の 5SD で決定した。

4. 血清

検討に用いた血清は、上記のほか、国立感染症研究所感染症情報センター内に設置されている血清銀行の 1,004 検体、および種々の疾患を有する剖検患者血清計 527 検体を用いた。血清銀行の検体はわが国の感染症サーベイランスに使用されたもので、全国から各年齢層を含み、特に病気の無いヒトから集められたものである。これらの血清検体は前述した ELISA 法でスクリーニングし、陽性検体は前述した感染細胞を用いた蛍光抗体法で再確認した。

5. 抗 HHV8 抗体の作製

作製した GST 融合蛋白を精製後、フロイントアジュバントとともにウサギに免疫し、抗体を作製した。GST カラムで精製後、各抗原を使ったアフィニティカラムで精製した。

6. 免疫組織染色

エイズカポジ肉腫例 24 例と非エイズカポジ肉腫 2 例のホルマリン固定パラフィン包埋組織切片をシランコートスライドに貼り付けた。切片をクエン酸緩衝液でオートクレーブ後に抗体を反応させ、さらに tyramide amplification system でシグナルを増幅後、HRP と DAB で発色した。非カポジ肉腫以外の剖検組織を陰性対照とした。

(倫理面への配慮)

病理解剖組織は診断のために保存されているものであり、より詳細な診断を行う目的で使用し、さらに患者のプライバシーを完全に守るため、個人が特定されないよう配慮し、患者のいかなる個人情報も漏出しないよう細心の注意を払った。結果について守秘義務を守っている。

C. 研究結果

1. 血清抗体検出に有用な HHV8 抗原の選択
蛍光抗体法で AIDS-KS 患者血清は TY-1 細胞の核や細胞質に陽性となった。TPA で刺激した TY-1 細胞を抗原とした Western blot 法では、AIDS-KS 患者血清は多くのサイズのバンドが検出でき、その中には報告されている 222-234kDa の LANA 抗原蛋白や ORF59 蛋白があった。

健康成人血清やサイトメガロウイルス抗体陽性血清や伝染性単核球症の患者血清ではなんらバンドは認められなかった。15種類の組換え GST 融合蛋白のうち、ORF-K8.1, ORF59, ORF65, ORF73 に強い反応が得られた。中でも ORF65 や ORF73 には多くの血清が反応したが、すべての AIDS-KS 患者血清に反応する抗原蛋白はなかった。そこでさらに抗原性が高いと考えられた4種の抗原をもちいた ELISA 系を作り検討した。AIDS-KS 患者血清 21 検体と健康成人血清 17 検体における各抗原に対する反応性は ORF73, ORF-K8.1, ORF65, ORF59 の順で、それぞれの AIDS-KS 患者血清における検出率は 81%, 52.4%, 57.1%, 19%であった。これら4種を全て混合して抗原に用いた場合、全例の血清と反応し、より高感度に HHV8 抗体を検出できることが判明した。

2. 血清銀行における一般人の HHV8 抗体保有率

上記4種の抗原を固相化した ELISA を作製し、血清銀行由来の血清 1,004 検体について HHV8 抗体を測定した。Cut-off 値は前述したように決定し、またプレート間の測定誤差を防ぐ目的で、常に同じ検体を2個同時に測定し、また同じ陽性血清を置き、陰性対照の吸光度との差を勘案し補正值を決定した。そして検体の吸光度と陰性血清の吸光度の差をこの補正值を用いて計算し直し、cut-off 値と比較して判定した。また陽性血清は TY-1 細胞を用いて蛍光抗体法で確認した。その結果 1,004 検体のうち、14 検体が陽性(1.4%)となり、男性では 510 例中 9 例 (1.8%)、女性では 494 例中 5 例(1.0%)が陽性であった。本邦の地域別頻度や年齢分布はその陽性検体数が少ないこともあって結論は不明である。HHV8 陽性検体で IgM 抗体の検出を行ったところ、5 例(35.7%)に陽性で、いずれも 30 才以下の比較的若い年齢層に属していた。

3. HHV8 感染と関連する疾患患者血清での抗体検出率

AIDS-KS 患者血清 24 例、AIDS-PEL 患者血清 1 例、HIV- / KS+患者血清 2 例、KS のない HIV 感染者(HIV+ / KS-)血清 44 例について、同様の ELISA 法で HHV8 抗体の有無とその検出頻度を検討した。その結果、AIDS-KS では 24/24(100%)、AIDS-PEL では 1/1(100%)、HIV- / KS+ では 2/2(100%)、MCD では 3/10(30%)、

HIV+ / KS-では 28/44(63.6%)で陽性となった。HIV+ / KS-患者血清は HIV 感染の危険因子として男性同性愛者が多く含まれている。ちなみに血友病患者血清では全例陰性であった。

4. 種々の疾患患者における HHV8 抗体保有率

種々の患者血清 527 検体のうち 10 検体 (1.89%)に HHV8 抗体陽性検体があった。内訳はさまざまなウイルス感染症 206 検体、血液疾患 52 例、脳神経疾患 71 検体、悪性疾患 116 例、ほか 82 例で、各疾患群のうち、それぞれの疾患での頻度は 0 ないし 13.8%に陽性となった。HHV8 陽性血清は、それぞれ症例数が少ないこともあり、各疾患と HHV8 感染との関連を示唆するものではなかった。ただこれらの患者は比較的年齢層が高かった。

5. エイズカポジ肉腫組織における HHV8 関連蛋白の局在

各抗体を用いてエイズカポジ肉腫組織切片で検討した結果、ORF73 蛋白抗体によりほとんどの紡錘形細胞の核内に陽性シグナルが得られた。また内皮細胞の核にもシグナルがみられた。ほかの抗体ではごく一部の細胞に反応が見られたが、ORF73 に対する反応とは陽性細胞数で全く異なっていた。したがってカポジ肉腫の腫瘍細胞には latent protein が存在し、lytic protein はごくわずかの細胞にのみ発現していると結論できた。すなわちカポジ肉腫では HHV8 は latent infection の状態にあると考えられた。

D. 考察

今回作製した ELISA 法は、組換え DNA 法による部分蛋白 4 種からなるウイルス抗原を用いたもので、その中には lytic protein 3 種、latent protein 1 種を含んでいる。一般にウイルス感染診断に用いられている抗体は初感染時に誘導され持続しているウイルス構成蛋白に対する IgG 抗体である。潜伏感染状態に特有なウイルス抗原が発現するのは、EBV の LMP-1 や EBNA-2 抗体程度で、他のヘルペスウイルスでは不明である。今回の対象である HHV8 は、その潜伏持続感染状態の PEL 細胞株には、AIDS-KS 患者血清を反応させると核内の LANA 抗原がつねに強発現しているという特徴がある。したがって、ウイルス抗体の検出には、ウイルス増殖時に発現する lytic protein (おもにウイルス構成蛋白からなる)

と LANA 抗原のような latent protein の両者を抗原とすることが必須と考えられる。現在までに報告されている有用な抗原蛋白としては、ORF65, ORF-K8.1, ORF59 蛋白であり、いずれも lytic protein で、それぞれ AIDS-KS 患者の血清診断に有用とされている。我々の検討結果でも確かに抗原性が高いと考えられたが、大きなヘルペスウイルスの抗体検出に用いる抗原系が一種の蛋白からなるというのは、やはり不十分といわざるをえない。一方、KS 患者血清抗体の蛍光抗体法による検出には PEL 細胞株の LANA 抗原が診断に用いられているが、これを抗原とした ELISA 系は報告されていない。理由は不明であるが、LANA 抗原をコードする ORF73 のアミノ酸配列はその中央部に疎水性のアミノ酸配列が存在し、組換え DNA 法では作製が困難であるのかもしれない。実際、我々も最初は ORF73 全体(3,489 nt)ないし比較的長い一部を大腸菌で発現しようとしたが、不成功に終わった。ちなみに現在市販されている Advanced Biotechnology 社の HHV8 抗体検出キットの検出率について比較してみると、我々の ELISA 系の方が検出感度は高いという結果となり、前述した戦略が正しいことが証明された。

日本人のカポジ肉腫の発生はごく稀であり、多くの皮膚科医や病理医はいまだ経験がない。わが国に AIDS が蔓延してきた結果、エイズ剖検例の約 20%に KS が合併することが明らかとなった。たしかに HIV 感染の危険因子である男性同性愛者の血清には HHV8 抗体の陽性頻度が高かったが、血友病患者血清はほとんど陰性であった。HIV 感染者以外では、MCD で 30%と高率であったが、一般人では 1.4%とかなり低い結果となった。数は少ないが、陽性者の年齢層として高齢者に多く、IgM 抗体保持者には若年層が目立った。とすれば、HIV 感染のような性感染症がその感染様式として考えやすいが、小児の抗体陽性者の存在を考えると水平感染や垂直感染の存在も否定できない。一般人の抗体保有率については、HIV 感染者以外の本邦カポジ肉腫の発生率が抗体陽性者よりもはるかに少ないといえよう。また最近 HIV 非感染者で免疫抑制剤使用歴のある高齢者にカポジ肉腫発生例を経験したことから、カポジ肉腫の発生には HHV8 感染のみならず、宿主の免疫不全や hCG などのホルモンの分泌といった他の因子が強く関連していると考えられる。

カポジ肉腫組織の腫瘍細胞と考えられている紡錘形細胞に HHV8 の latent protein が存在し、lytic protein がほとんどみられないの

で、HHV8 が血管ないしリンパ管内皮細胞に感染しさらに紡錘形細胞の増殖とともに腫瘍化していくためには latent protein の発現が重要なファクターとなっていると考えられた。EBV の LMP-1 の発現と同様の機序が考えられ、興味深い。また有効な組織診断系を開発できたので、カポジ肉腫の組織診断をより正確に行えるようになった。

特異的で高感度な血清診断法を樹立し、さらに組織診断が可能な抗体を開発できたので、今後は、HIV 感染者血清の seroconversion について検討し、エイズ関連カポジ肉腫の発生における条件を明らかにし、発症予測ないし治療との関連について明らかにしたい。

E 結論

HHV8 の血清診断系を開発し、エイズカポジ肉腫における HHV8 の関与について次の点が明らかとなった。

- 1) エイズカポジ肉腫患者の血清抗体には K8.1, ORF59, ORF65, ORF73 の4種の蛋白に反応する頻度が高いことがわかった。
- 2) 上記4種の蛋白を抗原として ELISA 系を開発し、エイズカポジ肉腫患者血清で 100%、エイズ同性愛者血清で 65%、エイズ血友病患者血清では 0%という結果を得た。
- 3) 国立感染症研究所血清銀行の一般人血清 1,004 例での HHV8 抗体陽性率は 1.4%であった。
- 4) エイズカポジ肉腫の腫瘍細胞である紡錘形細胞と内皮細胞の核内に HHV8 の潜伏感染時に出現する ORF73 蛋白が多量に発現しており、HHV8 は潜伏感染状態にあること、そしてカポジ肉腫の組織診断に有用であることが判明した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Brandful, J.A.M., Apeaygei, F.A., Ampofo, W.K., Adu-Sarkodie, Y., Ansah, J.E., Nuvour, V., Aido, S., Ishikawa, K., Sata, T., Yamamoto, N. and Yamazaki, S.: Relationship between immunological status and prevalence of viral STDs among HIV-1 seropositive patients in Ghana. *Viral Immunology* 12, 131-137, 1999.
2. Katano, H., Sato, Y., Kurata, T., Mori, S., Sata, T.: High expression of HHV-

- 8-encoded ORF73 protein in spindle-shaped tumor cells of Kaposi's sarcoma. *Am J Pathol*, 155, 47-52, 1999.
3. Nakajima, N., Sata, T., Hanaki, K., Kurata, T., Yoshikura, H.: Application of the hybridization AT-tailing (HybrAT) method for detection of human or simian immunodeficiency virus RNA in formalin-fixed and paraffin-embedded cells or tissues. *J Virol Methods*, 81, 169-177, 1999.
 4. Katano, H., Sata, T., Nakamura, T., Suda, T., Tachikawa, N., Nishizumi, H., Sakurada, S., Hayashi, Y., Koike, M., Iwamoto, A., Kurata, T., Mori, S.: Expression and antigenicity of human herpesvirus 8 encoded ORF59 protein in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *J Med Virol*, 59, 346-355, 1999.
 5. Katano, H., Suda, T., Morishita, Y., Yamamoto, K., Hoshino, Y., Nakamura, K., Tachikawa, N., Sata, T., Hamaguchi, H., Iwamoto, A., Mori, S.: HHV-8-associated solid lymphomas occurring in AIDS patients take anaplastic large cell morphology. *Modern Pathol*. 13, 77-85, 2000.
2. 学会発表
1. 片野晴隆、佐藤由子、寺井政憲、馬場信吉、倉田毅、佐多徹太郎：カポジ肉腫におけるHHV8 関連タンパクの発現。第 88 回日本病理学会春期総会、東京、1999 年 4 月。
 2. 柏瀬光寿、山内康之、薄井紀夫、白井正彦、永田洋一、望月学、佐多徹太郎、佐藤由子、岩崎琢也、倉田毅：AIDS 患者におけるサイトメガロウイルス網膜炎の眼病理組織学的検討。第 103 回日本眼科学会総会、1999 年 5 月、千葉。
 3. 佐多徹太郎：HHV8 の感染病理および血清疫学。第 6 回ヘルペス感染症フォーラム、軽井沢、1999 年 8 月。
 4. 片野晴隆、岩崎琢也、馬場信吉、寺井政憲、森茂郎、岩本愛吉、松永泰子、倉田毅、佐多徹太郎：HHV8 の抗原蛋白の同定と日本人における HHV8 の血清疫学。第 47 回日本ウイルス学会総会。1999 年 11 月。
 5. 片野晴隆、佐藤由子、倉田毅、森茂郎、佐多徹太郎：HHV8 関連タンパクのカポジ肉腫 (KS)、原発性体液性リンパ腫 (PEL)、多巣性キャスルマン病(MCD)における発現。第 47 回日本ウイルス学会総会。1999 年 11 月。
 6. 寺井政憲、佐多徹太郎、岡慎一：HIV 感染者の口腔における HPV 感染。第 13 回日本エイズ学会総会。1999 年 12 月。
 7. 片野晴隆、佐藤由子、倉田毅、森茂郎、佐多徹太郎：エイズ患者のカポジ肉腫。第 13 回日本エイズ学会総会。1999 年 12 月。
 8. 佐多徹太郎：HHV8 とカポジ肉腫。日本癌学会シンポジウム。京都。1999 年 12 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
 3. その他：なし

IV. 業績一覽 (1997-2000)

(主任研究者) 倉田 毅

1. Tamura SI, Hatori E, Tsuruhara T, Aizawa C, Kurata T: Suppression of delayed-type hypersensitivity and IgE antibody responses to ovalbumin by intranasal administration of Escherichia coli heat-labile enterotoxin B subunit-conjugated ovalbumin. *Vaccine* 15: 225-229, 1997
2. Asanuma H, Thompson AH, Iwasaki T, Sato Y, Inaba Y, Aizawa C, Kurata T, Tamura SI: Isolation and characterization of mouse nasal-associated lymphoid tissue. *J Immunol Meth* 302: 123-131, 1997
3. Tamura SI, Kurata T: Intranasal immunization for human application. *Mucosal Immunol Update* 5: 8-10, 1997
4. Arao Y, Souchi S, Sato Y, Moriishi E, Ando Y, Yamada M, Pedilla J, Uno F, Nii S, Kurata T: Infection of a human retinal pigment epithelial cell line with human herpesvirus 6 variant A. *J Med Virol* 53: 105-110, 1997
5. Ando Y, Iwasaki T, Sata T, Souchi S, Kurata T, Arao Y: Enhanced cytopathic effect of human cytomegalovirus on a retinal pigment epithelium cell line, K-1034, by serum-free medium. *Arch Virol* 142: 1645-1658, 1997
6. Chiba J, Nakano M, Suzuki Y, Aoyama K, Ohba H, Kobayashi T, Yasuda A, Kojima A, Kurata T: Generation of neutralizing antibody to the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1 by immunizing of mice with an infectious vaccinia virus recombinant. *J Immunol Meth* 207: 53-60, 1997
7. Takahashi H, Tatsumi M, Matsuda M, Nagashima K, Kurata T, Hall WW: The role of topoisomerase I in HIV-1 replication. *Leukemia* 11: Suppl 3: 26-28, 1997
8. Takahashi H, Kurata T, Nagashima K: AIDS dementia and HIV-1 replication. *Neuropathology* 17: 4-10, 1997
9. Asanuma H, Hudson, Thompson A, Iwasaki T, Aizawa C, Kurata T, Tamura SI: Isolation and characterization of mouse nasal associated lymphoid tissue. *Immunol & Cell Biol Suppl* 175: A44, 1997
10. Tamura SI, Iwasaki T, Thompson AH, Asanuma H, Chen Ze, Suzuki Y, Aizawa C, Kurata T: Antibody-forming cells in the nasal-associated lymphoid tissue during primary influenza virus infection. *J Gen Virol* 79: 291-299, 1998
11. Chen Z, Sahashi Y, Matsuo K, Asanuma H, Takahashi H, Iwasaki T, Suzuki Y, Aizawa C, Kurata T: Comparison of the ability of viral protein-expressing plasmid DNAs to protect against influenza. *Vaccine* (in press)
12. Kannagi M, Nakamura T, Akari H, Kuroda MJ, Fujii M, Oka S, Iwamoto A, Kurata T, Higashi D, Harada S: Dual phasic suppression of viral replication following de novo human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection in lymphocytes of asymptomatic HIV-1 carriers. *Leukemia* 11: 545-547, 1997
13. Obara Y, Furuta Y, Takasu T, Suzuki S, Suzuki H, Matsukawa S, Fujioka Y, Takahashi H, Kurata T, Nagashima K: Distribution of Herpes Simplex Virus Types 1 and 2 Genomes in Human Spinal Ganglia Studied by PCR and In Situ Hybridization. *J Med Virol* 52: 136-142, 1997
14. Ota S, Kizaka-Kondoh S, Hashimoto Y, Nishihara H, Nagashima K, Kurata T, Okayama H, Matsuda M: Constitutive association of EGF receptor with the CrkII-23 mutant that inhibits transformation of NRK cells by EGF and TGF- β . *Cell Signal* 10: 283-290, 1998
15. Hashimoto Y, Katayama H, Kiyokawa E, Ota S, Kurata T, Gotoh N, Otsuka N, Shibata M, Matsuda, M: Phosphorylation of CrkII adaptor protein at tyrosine 221 by epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 273: 17186-17191, 1998
16. Brandful JAM, Ampofo WK, Janssens W, Adu-Sarkodie Y, Apeagyei F, Anyomi F, Aidoo S, Yamamoto N, Ishikawa K, Sata T, Kurata T: Genetic and phylogenetic

- analysis of HIV type 1 strains from Southern Ghana. *Aids Res Hum Retrovir* 14: 815-819, 1998
17. Tokunaga K, Kiyokawa E, Nakaya M, Otsuka N, Kojima A, Kurata T, Matsuda M: Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 virion entry by dominant-negative Hck. *J Virol* 72: 6257-6259, 1998
 18. Tokunaga K, Kojima A, Kurata T, Ikuta K, Akari H, Koyama H, Kawamura M, Inubushi R, Shimano R, Adachi A: Enhancement of human immunodeficiency virus type 1 infectivity by Nef is producer cell-dependent. *J Gen. Virol* 79: 2447-2453, 1998
 19. Tokunaga K, Kojima A, Kurata T, Ikuta K, Inubushi R, Shimano R, Kawamura M, Akari H, Koyama H, 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
 20. Kiyokawa E, Hashimoto Y, Kobayashi S, Sugimura H, Kurata T, Matsuda M: Activation of Rac1 by a Crk SH3-binding protein, DOCK180. *Genes Develop* 12: 3331-3336, 1998
 21. Ogawa-Goto K, Arao Y, Ito Y, Ogawa T, Abe T, Kurata T, Irie S, Akanuma H: Binding of human cytomegalovirus to sulfated glucuronyl glycosphingolipids and their inhibitory effects on the infection. *J Gen Virol* 79: 2533-2541, 1998
 22. Takasaka N, Tajima M, Okinaga K, Satoh Y, Hoshikawa Y, Katsumoto T, Kurata T, Sairenji T: Productive infection of Epstein-Barr virus (EBV) in EBV-genome positive epithelial cell lines (GT38 and GT39) derived from gastric tissues. *Virology* 247: 152-159, 1998
 23. Yoshikawa T, Suzuki K, Ihira M, Furukawa H, Suga S, Iwasaki T, Kurata T, Asonuma K, Tanaka K, Asano Y: Human herpesvirus 6 latently infects mononuclear cells but not liver tissue. *J Clin Pathol* 52: 65-67, 1999
 24. Lu Y, Nerurkar VR, Dashwood W, Woodward CL, Aban S, Shikuma CM, Grandinetti A, Chang H, Nguyen HT, Wu A, Yamamura Y, Boto WO, Merriwether A, Kurata T, Detels R, Yanagihara R: Genotype and Allele Frequency of a 32-Base Pair Deletion Mutation in the CCR5 Gene in Various Ethnic Groups: Absence of Mutation among Asians and Pacific Islanders. (in press)

(分担研究者・研究協力者)

岡 慎一

1. Kannagi M, Nakamura T, Akari H, Kuroda MJ, Fujii M, Oka S, Iwamoto A, Kurata T, Higashi D, Harada S: Dual phasic suppression of viral replication following de novo human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) infection in lymphocytes of asymptomatic HIV-1 carriers. *Leukemia suppl* 3, 11: 545-547, 1997
2. Tomiyama H, Miwa K, Shiga H, Moore YI, Oka S, Iwamoto A, Kaneko Y, Takiguchi M: The evidence of presentation of multiple immunodominant HIV-1 cytotoxic T lymphocyte epitope by HLA-B*3501 molecules which are associated with the accelerated progression of AIDS. *J Immunol* 158: 5026-5034, 1997
3. Shioda T, Oka S, Xin X, Liu H, Harukuni R, Kurotani A, Fukushima M, Hansen MK, Shiini T, Takebe Y, Iwamoto A, Nagai Y: In vivo sequence variability of human immunodeficiency virus type 1 envelope gp120: Association of V2 extension with slow disease progression. *J Virol* 71: 4871-4881, 1997
4. Kubo M, Ohashi T, Fujii M, Oka S, Iwamoto A, Harada S, Kannagi M: Abrogation of in vitro suppression of HIV-1 replication mediated by CD8+ T lymphocytes of asymptomatic HIV-1 carriers by staphylococcal enterotoxin B and phorbol esters through induction of TNF-alpha. *J Virol* 71: 7560-7566, 1997
5. Oka S, Nagata Y, Fujino Y, Yasuoka A, Ishihara M, Ikeda K, Iwamoto A, Shimada K, Mochizuki M, Kimura S: CD8+ T lymphocyte counts as an adjunctive predictor of cytomegalovirus retinitis in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Intern Med* 36: 461-465, 1997
6. Ida S, Gatanaga H, Shioda T, Nagai Y, Kobayashi N, Shimada K, Kimura S, Iwamoto A, Oka S: HIV-1 V3 variation dynamics in vivo. Long-term persistence of NS1 genotype and transient presence of SI genotype during the course of progressive AIDS. *AIDS Res Hum Retrovirus* 13: 1597-1609, 1997
7. Ikeda-Moore Y, Tomiyama H, Miwa K, Oka S, Iwamoto A, Kaneko Y, Takiguchi M: Identification and characterization of multiple HLA-A24 restricted HIV-1 CTL epitopes: Strong epitopes are derived from variable regions of HIV-1. *J Immunol* 159: 6242-6252, 1997
8. Ishikawa S, Hashida S, Hashinaka K, Kojima M, Saito A, Takamizawa A, Shinagawa H, Oka S, Shimada K, Ishikawa E: More sensitive immune complex transfer enzyme immunoassay for antibody IgG to p17 of HIV-1 with shorter incubation time for immunoreactions and larger volumes of serum samples. *J Clin Lab Analysis* 11: 244-250, 1997
9. Hoshiono Y, Nagata Y, Gatanaga H, Hosono O, Morimoto C, Tachikawa N, Nomura K, Wakabayashi T, Oka S, Nakamura T, Iwamoto A: Cytomegalovirus (CMV) retinitis and CMV antigenemia as a clue to impaired adrenocortical function in patients with AIDS. *AIDS* 11: 1719-1724, 1997
10. Gatanaga H, Oka S, Ida S, Wakabayashi T, Shioda T, Iwamoto A: Active HIV-1 redistribution and replication in the brain with HIV encephalitis. *Arch Virol* 144: 29-43, 1999
11. Honda M, Yasuoka A, Aoki M, Oka S: A generalized seizure following initiation of nelfinavir in a patient with human immunodeficiency virus type 1 infection: suspected due to interaction between nelfinavir and phenytoin. *Intern Med* 38: 302-303, 1999
12. Tachikawa N, Goto M, Hoshino Y, Gatanaga H, Yasuoka A, Wakabayashi T, Katano Y, Kimura S, Oka S, Iwamoto A: PCR detects *Toxoplasma gondii*, Epstein-Barr virus, and JC virus DNAs in the cerebrospinal fluid in AIDS patients with focal CNS complications. *Intern Med* 38: 556-562, 1999

13. Ishikawa S, Hashinaka K, Hashida S, Oka S, Ishikawa S: Use of indirectly immobilized recombinant p17 antigen for detection of antibodies to HIV-1 by enzyme immunoassay. *J Clin Lab Analysis* 13: 9-18, 1999
14. Tomiyama H, Chujoh Y, Shio K, Oka S, Kaneko Y, Takiguchi M: Cytotoxic T0lymphocyte recognition of HLA-B*5101-restricted HIV-1 Rev epitope which is naturally processes in HIV-1infected cells. *AIDS* 13: 861-863, 1999
15. Tomiyama H, Sakaguchi T, Miwa K, Oka S, Iwamoto A, Kaneko Y, Takiguchi M: Identification of multiple HIV-1 CTL epitopes by HLA-B*5101 molecules. *Hum Immunol* 60: 177-186, 1999
16. Aizawa S, Gatanaga H, Ida S, Sakai A, Tanaka M, Takahashi Y, Hirabayashi Y, Oka S: Clinical benefits of resistance assay for HIV-specific protease inhibitors: when to chek and in whom? *AIDS* 13: 1278-1279, 1999
17. Fukada K, Chujoh Y, Tomiyama H, Miwa K, Kaneko Y, Oka S, Takiguchi M: HLA-A*1101-restricted CTL recognition of HIV-1 Pol protein. *AIDS* 13: 1413-1414, 1999
18. Gatanaga H, Hoshikawa N, Tahara T, Kato T Oka S: Serum thrombopoietin levels correlate with disease progression of AIDS. *AIDS* 13: 1590-1591, 1999
19. Toriyoshi H, Shioda T, Sato H, Sakaguchi M, Eda Y, Tokiyoshi S, Kato K, Nohtomi K, Kusagawa S, Taniguchi K, Shiino T, Kato A, Foongladda S, Oka S, Iwamoto A, Wasi C, Nagai Y, Takebe Y: Sendai virus based production of HIV-1 subtype B and E gp120 and their use for highly sensitive detection of subtype-specific serum antibody. *AIDS Res Hum Retrovirus* 15: 1109-1120, 1999
20. Aizawa S, Ida S, Sakai-Hachiya A, Tanaka M, Takahashi Y, Hirabayahi Y, Sugiura W, Kimura S, Oka S: Intention-to-treat analysis of anti-HIV therapies and incidence of drug resistance after a year of treatment. *Jap J Infect Dis* 52: 129-131, 1999
21. Gatanaga H, Aizawa S, Kikuchi Y, Tachikawa N, Genka I, Yoshizawa S, Yamamoto Y, Yasuoka A, Oka S: Anti-HIV effect of saquinavir combined with ritonavir is limited by previous long-term therapy with protease inhibitors. *AIDS Res Hum Retrovirus* 15: 1493-1498, 1999
22. Tanaka M, Hirabayashi Y, Gatanaga H, Aizawa S, Sakai A, Takahashi Y, Tashiro E, Kohaka T, Oyamada M, Ida S, Oka S: Decrease of IL-2-producing cells butnot TH1 to TH2 shift in moderate and advanced stages of disease in human immunodeficiency virus type-1-infected individuals; direct analyses of intracellular cytokines in CD4+CD8- T cells. *Scand J Immunol* 50: 550-554, 1999
23. Kojima T, Taqchikawa N, Yoshizawa S, Yasuoka C, Yamamoto Y, Genka I, Teruya K, Kikuchi Y, Aoki M, Yasuoka A, Oka S: Hepatitis A virus outbreak; A possible indicator of high risk sexual behaviour among HIV-1 infected homosexual men. *Jap J Infect Dis* 52: 173-174, 1999
24. Tachikawa N, Yoshizawa S, Kikuchi Y, asuoka A Oka S: Saquinavir therapy in patients with the advanced HIV infection and liver cirrhosis. *Jap J Infect Dis* 52: 177-178, 1999
25. Fukada K, Tomiyama H, Chujoh Y, Miwa K, Kaneko Y, Oka S, Takiguchi M: HLA-A*1101-restricted CTL recognition for novel epitope derived from HIV-1 ENV protein. *AIDS* 13: 2597-2599, 1999
26. Yamamoto Y, yauoka A, Tachikawa N, Gatanaga H, Oka S: Mitigation of hepatocellular injury caused by HIV-specific protease inhibitors with glycyrrichin compound in patients co-infected with HCV and HIV. *Jap J Infect Dis* 52: 248-249, 1999
27. Tachikawa N, Yasuoka A, Oka S: Improvement of onychomycosis without antifungal therapy after initiation of highly active anti-retroviral therapy in an

- HIV-infected patient. *Jap J Infect Dis* 52: 245-246, 1999
28. Yoshizawa S, Yasuoka A, Kikuchi Y, Honda M, Gatanaga H, Tachikawa N, Hirabayashi Y, Oka S: A 5-day course of oral desensitization to trimethoprim/sulfamethoxazole (T/S) is successful in patients with human immunodeficiency virus type-1 infection who were previously intolerant to T/S but had no sulfamethoxazole-specific IgE. *Ann Allergy Asthma Immunol* (in press)
 29. Gatanaga H, Yasuoka A, Kikuchi Y, Tachikawa N, Aoki M, Oka S: Influence of prior HIV-1 infection on the development of chronic hepatitis B infection. *Eur J Clin Microbiol Infect* (in press)
 30. Hachiya A, Aizawa S, Tanaka M, Takahashi Y, Ida S, Gatanaga H, Hirabayashi Y, Kojima A, Tatsumi M, Oka S: A rapid and simple phenotypic assay for drug susceptibility of human immunodeficiency virus by using CCR5 expressed HeLa/CD4-positive cells clone 1-10 (Magic 5). *Antimicrob Agent Chemother* (submitted)
 31. Brandful JAM, Apeagyei FA, Ampofo WK, Adu-Sarkodie Y, Ansah JE, Nuvour V, Aido S, Ishikawa K, Sata T, Yamamoto N, Yamazaki S: Relationship between immunological status and prevalence of viral STDs among HIV-1 seropositive patients in Ghana. *Viral Immunology* 12: 131-137, 1999

生田 和良

1. Kameoka M, Kimura T, Zheng YH, Suzuki S, Fujinaga K, Luftig RB, Ikuta K: Protease-defective, gp120-containing human immunodeficiency virus type 1 particles induce apoptosis more efficiently than does wild-type virus or recombinant gp120 protein in healthy donor-derived peripheral blood T cells. *J Clin Microbiol* 35: 41-47, 1997
2. Nakaya T, Iwai S, Fujinaga K, Sato Y, Otsuka E, Ikuta K: Decoy approach using RNA-DNA chimera oligonucleotides to inhibit the regulatory function of human immunodeficiency virus type 1 Rev protein. *Antimicrob Agents Chemother* 41: 319-325, 1997
3. Bahmani MK, Kameoka M, Nakaya T, Fujinaga K, Zhong Q, Takahashi H, Nakano T, Nakai M, Ueda S, Jones IM, Luftig RB, Ikuta K: Production of doughnut-shaped, protease-defective particles from a human T cell clone carrying a provirus with specific mutation in the env, pol, vpr, and nef genes. *AIDS Res Hum Retrov* 13: 523-526, 1997
4. Fujiwara S, Takahashi H, Nakaya T, Nakamura Y, Nakamura K, Ikuta K: Microplate hybridization for Borna disease virus RNA in human peripheral blood mononuclear cells. *Clin Diagn Lab Immunol* 4: 387-391, 1997
5. Nakamura Y, Kameoka M, Tobiume M, Kaya M, Ohki K, Yamada T, Ikuta K: A chain section containing epitopes for cytotoxic T, B and helper T cells within a highly conserved region found in the human immunodeficiency virus type 1 Gag protein. *Vaccine* 15: 489-496, 1997
6. Zhong Q, Nakaya T, Tateno Y, Fujinaga K, Kameoka M, Tateno M, Ikuta K: A clearer distinction between HIV-1 paired isolates from peripheral blood mononuclear cells of asymptomatic carriers with and without CD8+ T-cells at nef rather than env V3 loci. *Vaccine* 15: 497-510, 1997
7. Ohagen A, Luftig RB, Reicin AS, Yin L, Ikuta K, Kimura T, Goff SP, Høglund S: The morphology of the immature HIV-1 virion. *Virology* 228: 112-114, 1997
8. Nakaya T, Iwai S, Fujinaga K, Otsuka E, Ikuta K: Inhibition of HIV-1 replication by targeting the Rev protein. *Leukemia* 11: 134-137, 1997
9. Tokunaga K, Ishimoto A, Ikuta K, Adachi A: Growth ability of auxiliary gene

- mutants of human immunodeficiency virus type 1 and 2 in unstimulated peripheral blood mononuclear cells. *Arch Virol* 142: 177-181, 1997
10. Fujinaga K, Nakaya T, 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
 11. Goto T, Nakai M, Ikuta K: The life cycle of human immunodeficiency virus type 1 (review). *Micron* 29 2/3: 123-138, 1998
 12. Tobiume M, Fujinaga K, Kameoka M, Kimura T, Nakaya T, Yamada T, Ikuta K: Dependence of host cell cycle for activation of HIV-1 gene expression from latency. *J Gen Virol* 79: 1363-1371, 1998
 13. Takahashi A, Ogasawara K, Matsuki N, Fujinaga K, Nakaya T, Ikuta K, Wattana A, Honda M, Fukui Y, Sasazuki T, Iwabuchi K, Onoé K: Development of peptide vaccines inducing production of neutralizing antibodies against HIV-1 viruses in HLA-DQ6 mice. *Vaccine* 16: 1537-1543, 1998
 14. Kameoka M, Wattana A, Suzuki S, Horikoshi H, Khelai-Khlan N, Meguro T, Yamada K, Tanaka Y, Yoshihara K, Luftig RB, 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
 15. Tokunaga K, Kojima A, Kurata T, Ikuta K, Inubushi R, Shimano R, Kawamura M, Akari H, Koyama H, 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
 16. Saadat M, Ikuta K, Yoshida MC: Chromosome aberrations in peripheral blood mononuclear cells infected with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *Chromosome Science* 2: 39-41, 1998
 17. Saadat M, Takahashi H, Bahmani MK, Ikuta K, Yoshida MC: Does human immunodeficiency virus type-1 integrate in chromosomes randomly? *Chromosome Science* 2: 5-8, 1998
 18. Tokunaga K, Kojima A, Kurata T, Ikuta K, Akari H, Koyama H, Kawamura M, Inubushi R, Shimano R, Adachi A: Enhancement of human immunodeficiency virus type 1 infectivity by Nef is producer cell-dependent. *J Gen Virol* 79, 2477-2453, 1998
 19. Inabe K, Ikuta K, 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
 20. Inabe K, Nishizawa M, Tajima S, Ikuta K, 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
 21. Tanaka T, Kameoka M, Ota K, Itaya A, Ikuta K, Yoshihara K: Establishment of persistent infection with HIV-1 abrogates caspase-3-dependent apoptotic signaling pathway in U937 cells. *Experimental Cell Research* 247: 514-524, 1999
 22. Tokunaga K, Ikuta K, Adachi A, Matsuda M, Kurata T, Kojima A: The cellular kinase binding motifs (PxxP and RR) in human immunodeficiency virus type 1 Nef protein are dispensable for producer-dependent enhancement of viral entry. *Virology* 257: 285-289, 1999
 23. Zheng YH, Sentui H, Sugita M, Nakaya T, Kishi M, Hagiwara K, Inoshima Y, Ishihara C, Kono Y, Lu JL, Ikuta K: Replication Ability in vitro and in vivo of equine infectious anemia virus avirulent Japanese strain. *Virology* 266: 129-139, 2000
 24. Bahmani MK, Kameoka M, Goto T, sano K, Luftig RB, Ikuta K: Fusion of uninfected

- T-cells occurs with immature HIV-1 protease-mutant, but not morphologically similar protease inhibitor derived particles. *Virus Res* (in press)
25. Suzuki S, Tobiume, M, Kameoka M, Sato K, Takahashi TA, Mukai T, Ikuta K: Exposure of normal monocyte-derived dendritic cells to human immunodeficiency virus type-1 particles leads to the induction of apoptosis in co-cultured CD4+ as well as CD8+ T cells. *Microbiol Immunol* 44: 111-121, 2000
 26. Auwanit W, Ayuthaya, PIN, Mukai T, Kurata T, Ikuta K: Highly variable sequences at env V3 region of HIV-1 distributing among Thai carriers during 1995 to 1997. *AIDS Res Human Retroviruses* 16: 283-289, 2000

高橋 秀実

1. Yee ST, Abe E, Okada Y, Matsuura Y, Takebe Y, Ogasawara K, Takahashi H, Mizuochi T: A polypeptide encoded within the murine AIDS defective virus stimulates primary proliferation of CD8+ T cells. *Immunol Lett* 55: 93-98, 1997
2. Futagami S, Takahashi H, Norose Y, Kobayashi M: Systemic and local immune responses against *Helicobacter pylori* urease in patients with chronic gastritis: distinct IgA and IgG productive sites. *Gut* 43: 168-175, 1998
3. Chen M, Shirai M, Liu Z, Arichi T, Takahashi H, Nishioka M: Efficient class II MHC presentation of endogenously synthesized structural proteins of hepatitis C virus by EVB-transformed B lymphoblastoid cell lines. *J Virol* 72: 8301-8308, 1998
4. Ohashi, T, Kubo M, Kato H, Iwamoto A, Takahashi H, Fujii M, Kannagi M: Role of class I major histocompatibility complex-restricted and -unrestricted suppression of human immunodeficiency virus type 1 replication CD8+ T lymphocytes. *J Gen Virol* 80: 209-216, 1999
5. Shirai M, Arichi T, Chen M, Nishioka M, Ikeda K, Takahashi H, et al.: T cell recognition of hypervariable region-1 from hepatitis C virus envelope protein with multiple class II MHC molecules in mice and humans: Preferential help for induction of antibodies to the hypervariable region. *J Immunol* 162: 568-576, 1999
6. Terabe M, Hatabu T, Takahashi H, Onodera T, Matsumoto Y: *Leishmania amazonensis* infection in nude mice. *Exp Animals* 42: 119-123, 1999
7. Nakatsuka K, Sugiyama H, Nakagawa Y, Takahashi H: Purification of antigenic peptide from murine hepatoma cells recognized by class-I major histocompatibility complex molecule-restricted cytotoxic T-lymphocytes induced with B7-1-gene transfected hepatoma cell. *J Hepatol* 30: 1119-112-, 1999
8. Chiba M, Takahashi H, Kato K, Nakagawa Y, Fukushima T, Iinuma H, Nerome K: Recombinant vaccinia virus reexpressing an immunodominant epitope of HIV-1 envelope protein within an influenza hemagglutinin cassette predominantly prime epitope-specific CD8+CTL. *Arch Virol* 144: 1469-1485, 1999
9. Mabuchi A, Shimizu M, Kikuchi K, Nakagawa Y, Takahashi H, Kakiuchi T, Yokomuro K: Cultured murineparenchymal liver cells induce differentiation of bone marrow cells to macrophage like cells which present antigen to Th1 clones but inhibit their proliferation by nitric oxide and prostaglandins. *Cell Immunol* 196: 14-22, 1999
10. Takeshita T, Satomi M, Akira S, Nakagawa Y, Takahashi H, Araki T: Preventive effect of monoclonal antibodies to ICAM-1 and LFA-1 on murine spontaneous fetal resorption. *Am J Rep Immunol* (in press)

宮澤 政顕

1. Miyazawa M, Fujisawa R: Restriction of Friend virus-induced erythroid cell

- proliferation by CD4+ T-lymphocytes that recognize a single gp70 epitope. *Leukemia* 11(S3): 227-229, 1997
2. Tsumura H, Miyazawa M, Ogawa S, et al.: Detection of endogenous retrovirus antigens in NOD mouse pancreatic beta-cells. *Lab Anim* 32: 86-94, 1998
 3. Onoyama H, Saitoh Y, Miyazawa M: Tumor imaging. In: Delves. P.J. And I. M. Roitt, eds. *Encyclopedia of Immunology*, 2nd Ed., Academic Press, London: 2431-2435, 1998
 4. Iijima H, Miyazawa M, Sasaki J, et al.: Expression and characterization of a very low density lipoprotein receptor variant lacking the O-linked sugar region generated by alternative splicing. *J Biochem* 124: 747-755, 1998
 5. Sakamoto M, Miyazawa M, Mori S, Fujisawa R: Anti-cytoplasmic autoantibodies reactive with epithelial cells of the salivary gland in sera from patients with Sjogren's syndrome: their disease- and organ-specificities. *J Oral Pathol Med* 28: 20-25, 1999
 6. Okuda H, Adachi M, Miyazawa M, et al.: Protein kinase C α augments anoikis in anchorage-dependent gastric cancer cells. *Oncogene* 18: 5604-5609, 1999
 7. Miyazawa M, Yanai Y, Kurimoto M: Squirrel monkey retrovirus (SMRV) sequence from an SMRV-negative cell line? *J Hepatol* 31: 967-968, 1999
 8. Hashimoto K, Tabata N, Fujisawa R, Matsumura H, Miyazawa M: Induction of microthrombotic thrombocytopenia in normal mice by transferring a platelet-reactive, monoclonal anti-gp70 autoantibody established from MRL/lpr mice: an autoimmune model of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Clin Exp Immunol* 119: 47-56, 2000
 9. Miyazawa M, Tabata N, Fujisawa R, Hashimoto K, Shiwaku H, Takei YA: Roles of endogenous retroviruses and platelets in the development of vascular injury in spontaneous mouse models of autoimmune diseases. *Int J Cardiol* 68: in press, 2000
 10. Tabata N, Miyazawa M, Fujisawa R, Takei YA, Abe H, Hashimoto K: Establishment of monoclonal anti-retroviral gp70 autoantibodies from MRL/lpr lupus mice and induction of glomerular gp70 deposition and pathology by transference into non-autoimmune mice. *J Virol* 74: in press, 2000

松下 修三

1. Morikita T, Maeda Y, Fujii S, Matsushita S, Obaru K, Takatsuki K: The V1/V2 region of human immunodeficiency virus type 1 modulates the sensitivity to neutralization by soluble CD4 and cellular tropism. *AIDS Res Hum Retrov* 13: 1291-1299, 1997
2. Fujii S, Obaru K, Matsushita S, Morikita T, Higuchi H, Fujimoto K, Takatsuki K: Characterization of proviral DNA from an individual with long-term, nonprogressive infection by human immunodeficiency virus type-1 and nonrecoverable virus. *J Acq Immun Def Synd* 15: 427-256, 1997
3. Kiyokawa T, Umemoto T, Watanabe Y, Matsushita S, Shida H: Two distinct pathways for intronless mRNA expression: one related, the other unrelated to human immunodeficiency virus rev and human T cell leukemia virus type 1 rex functions. *Biol Signals* 6: 134-142, 1997
4. Hakata Y, Umemoto T, Matsushita S, Shida H: Involvement of human CRM1 (Exportin 1) in the export and multimerization of the Rex protein of the human T-cell leukemia virus type 1. *J Virol*, 72: 6602-6607, 1998
5. Shoji S, Kazuchika K, Ogata A, Yamataka K, Tachibana K, Mukai R, Uda A, Harano K, Matsushita S, Misumi S: An allisteric drug, o'-o'-bismyristoyl thiamine disulfide, suppresses HIV-1 replication through prevention of nuclear translocation of both

- HIV-1 tat and NF- κ B. *Biochem Biophys Res Commun* 249: 745-753, 1998
6. Wang J, Harada K, Matsushita S, Matsumi S, Zhang Y, Shioda T, Nagai Y, Matsushita K: IL-4 and a glucocorticoid up-regulate CXCR4 expression on human CD4+ T lymphocytes and enhance HIV-1 replication. *J of Leukocyte Biology* 64: 642-649, 1998
 7. Maeda Y, Foda M, Matsushita S, Harada S: Involvement of both V2 and V3 region of CCR5-tropic human immunodeficiency virus type-1 envelope for reduced sensitivity to macrophage inflammatory protein α . *J Virol* 74: 1787-1793, 2000
 8. Matsushita S: Current status and future issues in the treatment of HIV infection. *Int J Hematol* (in press)
 9. Tugarinov V, Zvi A, Levy R, Hayek Y, Matsushita S, Anglister J: NMR structure of an anti gp-120 antibody complex with a V3-peptide reveals a surface important for co-receptor binding. *Structure* (in press)

向井 鏡三郎

1. Fuji Y, Mukai R, Murayama Y, Akari H, Machida M, Mori K, Takasaka M, Murakami K, Yoshikawa Y: Efficacy of 6-chloro-2',3'-dideoxy guanosine (6-Cl-ddG) on an ARC/AIDS rhesus macaque (*Macaca mulatta*) infected with simian immunodeficiency virus. *Exp Anim* 46: 83-87, 1997
2. Igarashi T, Ami Y, Yamamoto H, Shibata R, Kuwata T, Mukai R, Shinohara K, Komatsu T, Adachi A, Hayami M: Protection of monkeys vaccinated with vpr- and/or nef-defective SIV strain mac/HIV-1 chimeric viruses: a potential candidate live-attenuated human AIDS vaccine. *J Gen Virol* 78: 985-989, 1997
3. Murayama Y, Arano A, Mukai R, Shibata H, Matsunaga S, Takahashi H, Yoshikawa Y, Hayami M, Noguchi A: CD4 and CD8 expressions in African green monkey helper T lymphocytes: implication for resistance to SIV infection. *Int Immunol* 9: 843-851, 1997
4. Otani I, Fuji Y, Akari H, Mukai R, Mori K, Ono F, Kojima E, Machida M, Murakami K, Doi K, Yoshikawa Y: Effects of 6-chloro-2',3'-dideoxyguanosine (6-Cl-ddG) in surface lymph nodes of rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) chronically infected with simian immunodeficiency virus (SIVmac239). *J Vet Med Sci* 59: 891-896, 1997
5. Fuji Y, Mukai R, Murayama Y, Akari H, Machida M, Mori K, Takasaka M, Murakami K, Yoshikawa Y: Efficacy of 6-chloro-2',3'-dideoxyguanosine (6-Cl-ddG) on Rhesus macaque chronically infected with simian immunodeficiency virus (SIVmac239). *J Acquir Immun Def Synd Hum Retrovirol* 16: 313-317, 1997
6. Fujii Y, Mukai R, Akari H, Machida M, Mori K, Takasaka M, Kojima E, Murakami K, Yoshikawa Y: Antiviral effects of 6-chloro-2',3'-dideoxyguanosine in rhesus monkey acutely infected with simian immunodeficiency virus. *Antivir. Chem Chemother* 9: 85-92, 1998
7. Akari H, Ono F, Sakakibara I, Murayama Y, Hiyaoka A, Terao K, Otani I, Mukai R, Adachi A, Yoshikawa Y: Simian T cell leukemia virus type I-induced malignant adult T cell leukemia-like disease in a naturally infected African green monkey: implication of CD8+ T cell leukemia. *AIDS Res Hum Retroviruses* 14: 367-371, 1998
8. Shoji S, Furuishi K, Ogata A, Yamataka K, Tachibana K, Mukai R, Uda A, Harano K, Matsushita S, Misumi S: An allosteric drug, o,o'-bismyristoyl thiamine disulfide suppresses HIV-1 replication through prevention of nuclear translocation of both HIV-1 Tat and NF- κ B. *Biochem. Biophys Res Commun* 249: 745-753, 1998
9. Murayama Y, Mukai R, Inoue-Murayama M, Yoshikawa Y: An African green monkey lacking peripheral CD4 lymphocytes that retains helper T cell activity and

- coexists with SIVagm. *Clin Exp Immunol* 117, 504-512, 1999
10. Hirano M, Nakamura S, Okada M, Ueda M, Mukai R: Rapid Discrimination of monkey B virus from human herpes simplex viruses by PCR in the presence of betain. *J Clin Microbiol* 38: 1225-1257, 2000

佐多 徹太郎

1. Matsushima T, Nakamura K, Oka T, Tachikawa N, Sata T, Murayama S, Nukina N, Kanazawa I: Unusual MRI and pathological findings of progressive multifocal leukoencephalopathy complicating adult Wiskott-Aldrich syndrome. *Neurology* 48: 279-282, 1997
2. Kimoto H, Nagaoka H, Adachi Y, Mizuochi T, Azuma T, Yagi T, Sata T, Yonehara S, Tunetusgu-Yokota Y, Taniguchi M, Takemori T: Accumulation of somatic hypermutation and antigen-driven selection in rapidly cycling surface Ig+ germinal center (GC) B cells which occupy GC at a high frequency during the primary antihapten response in mice. *Eur J Immunol* 27: 268-279, 1997
3. Enose Y, Okada M, Ma W, Sata T, Hayami M: Restriction of viral population by intravaginal infection of simian immunodeficiency viruses in macaque monkeys. *Arch Virology* 142: 37-51, 1997
4. Mitsuishi T, Sata T, Matsukura T, Kawashima M: HHV8 is rarely found in Bowen's disease of non-immunosuppressed patients. *Br J Dermatol* 136: 803-804, 1997
5. Mitsuishi T, Sata T, Matsukura T, Iwasaki T, Kawashima M: Presence of mucosal human papillomavirus in Bowen's disease of the hands. *Cancer* 79: 1911-1917, 1997
6. Ando Y, Iwasaki T, Sata T, Souchi S, Kurata T, Arao Y: Enhanced cytopathic effect of human cytomegalovirus on a retinal pigment epithelium cell line, K-1034, by serum-free medium. *Arch Virology* 142: 1645-1658, 1997
7. Ido E, Okada M, Enose Y, Kuwata T, Igarashi T, Sata T, Terao K, Chen J, Hayami M: Infection of an HIV-1/SIVmac chimeric virus having HIV-1env to macaque monkeys via vaginal cavity. *Microbiol & Immunol* 41: 277-280, 1997
8. Tatsumi M, Sata T: Molecular cloning and expression of cynomolgus monkey interferon gamma cDNA. *Int Arch Allergy Immunol* 114: 229-236, 1997
9. Kohno T, Yamada Y, Tsushima H, Sata T, Matsuyama T, Tomonaga M, Kamihira S: Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences are not present in adult T cell leukemia. *Int J Hematol* 66: 391-392, 1997
10. Ayisi NK, Wiredu EK, Sata T, Nyadedzor C, Tsiagbe VK, Newman M, Cofie CN, Taniguchi K: T-lymphocytopenia, opportunistic infections and pathological findings in Ghanaian AIDS patients and their sexual partners. *East Afr Med J* 74: 784-791, 1997
11. Mitsuishi T, Sata T, Iwasaki T, Matsukura T, Manaka I, Nogita T, Ohara K, Kawashima M: Detection of human papillomavirus 16 DNA in erythroplasia of Queyrat with invasion to the urethra. *Br J Dermatol* 138: 188-189, 1998
12. Brandful JAM, Ampofo WK, Janssens W, Adu-Sarkodie Y, Apeagyei F, Anyomi F, Aidoo S, Yamamoto N, Ishikawa K, Sata T, Kurata T.: Genetic and phylogenetic analysis of HIV-1 strains from southern Ghana. *AIDS Res Human Retrovirol* 14: 815-818, 1998
13. Yasuda S, Iwasaki M, Oka S, Naganawa S, Nakasone T, Honda M, Sata T, Kojima A, Matsuda S, Takemori T, Tsunetsugu-Yokota Y.: Detection of HIV-Gag p24-specific antibodies in sera and saliva of HIV-1-infected adults and in sera of infants born to HIV-1-infected mothers. *Microbiol Immunol* 41: 305-311, 1998
14. Katano H, Sato Y, Kurata T, Mori S, Sata T: High expression of HHV-8-encoded