

設計した。増幅した DNA は、それぞれ制限酵素 *Not* I + *Sse*8387 I、*Sse*8387 I + *Sph* I、*Sph* I + *Eco*R I にて消化し、生じた 3 断片 (3.1 kb、3.3 kb、4.1 kb) 各々を、pUC-18 を改変したプラスミドベクターにクローニングした。そして、そのシーケンスが SHIV-C2/I (カニクイザル血漿標品) ゲノムのダイレクトシーケンスと一致するものを選択し、それらを再構築してプロウイルス型の SHIV-C2/I クローンプラスミド (pKS661) を作製した。

SHIV-C2/I クローンの pKS661 プラスミド DNA を COS7 細胞 (アフリカミドリザル腎臓由来の細胞株) に LIPOFECTAMINE PLUS Reagent (Life Technologies) を用いたリポソーム法にてトランスフェクトし、3 時間後に 10% 牛胎児血清含有 Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM) 培地に交換、48 時間後にウイルスを含む培養上清を採取し、0.45- μ m 孔のフィルターを通して細胞の破片を取り除き、SHIV-C2/I KS661 ウイルスストックとした。感染力価 (TCID₅₀) は、M8166 細胞を用いて測定した。

クローンウイルスのサルでの病原性を検証するために、SHIV-C2/I KS661 ウイルスストックを、カニクイザル及びアカゲザルに、1 頭当り 12,000TCID₅₀ 静脈内接種し、末梢血中の CD4 陽性リンパ球数と CD8 陽性リンパ球数、及び血漿中のウイルス RNA コピー数の経時変化を追った。CD4 陽性リンパ球及び CD8 陽性リンパ球は、サル細胞と反応することが確認されている抗ヒト CD4 モノクローナル抗体及び抗ヒト CD8 モノクローナル抗体 (Becton Dickinson Immunocytometry System) にて染色し、フローサイトメーター (Becton Dickinson Immunocytometry System) にて細胞数を測定した。ウイルス RNA コピー数は、サル血漿より抽出したウイルス RNA の *gag* 領域 (SIVmac239 起源) を RT-PCR により増殖し、その生成物の濃度より算出した。ウイルス RNA の増殖・検出には、TaqMan™ EZ RT-PCR Kit 及び TaqMan™ システム (PE Biosystems) を用いた。

(倫理面への配慮)

サルへのウイルス接種及び採血は苦痛を与えないためにケタラール麻酔下にて行う等、動物実験は、国立感染症研究所の動物実験指針に従って行った。

C. 研究結果

プラスミドベクターにクローニングした PCR 断片 3 種、各々 2~6 クローンのシーケンスを決定した結果、各クローン間にはシーケンスのバラつきが見られた。そこで、既に決定していた、サル血漿材料に含まれる SHIV-C2/I RNA ゲノムのダイレクトシーケンスを基準として、これと一致するものを選抜、プラスミドの再構築に用いた。また、再構築後のプロウイルス型プラスミドクローン (pKS661) のウイルス部分の全シーケンス (10,501bp) も決定し、異同の無いことを確認した。

pKS661 プラスミド DNA をトランスフェクトした COS7 細胞の培養上清中のウイルス感染力価は、M8166 細胞を用いて測定し、 5×10^5 TCID₅₀/ml の値を得た。これは、カニクイザル血漿材料の 6.6×10^2 TCID₅₀/ml を遥かに上回る高力価であった。SHIV-C2/I KS661 クローンウイルスは M8166 細胞等で良好に増殖し、サル血漿 SHIV-C2/I ウイルス感染細胞と同様、強度の合胞体形成が観察できた。

SHIV-C2/I KS661 ウイルスを静脈内接種したサルは、カニクイ及びアカゲ共に、サル血漿 SHIV-C2/I ウイルス標品接種時と同様の症状を呈した (図 4)。即ち、血漿中ウイルス RNA 量の上昇に伴って、CD4 陽性リンパ球数が急激に減少して行き、ウイルス RNA 量がピークに達した 14 日目に、CD4 陽性リンパ球数は末梢血 1 μ l 当り 1 桁台の数値に達し、CD8 陽性リンパ球との比率が逆転した。それ以降、CD4 陽性リンパ球数、及び対 CD8 陽性リンパ球比率が正常時の水準に戻ることはなかった。

D. 考察

本研究で、我々がウイルスの分子クローニングに用いたカニクイザル血漿 SHIV-C2/I 材料は、複数の遺伝子型のウイルスの混合物である (未発表データ)。また、PCR 反応時にエラーが導入される可能性は排除できない。予想通り、PCR にて増幅・クローニングした断片には、複数のシーケンスが含まれていた。ところが、実験設定でゲノムを 3 分割して PCR 増幅を行ったため、どの断片が同一ウイルスゲノムに由来するかを推定するのは不可能であった。そこで、プロウイルスクローンは、我々が既に明らかにしたサル血漿材料に含まれる SHIV-C2/I RNA ゲノムのダイレクトシーケンスを基に、これと同一のシーケンスを持つプラスミド

クローンの構築を行った。このようにして作製したクローンウイルス SHIV-C2/1 KS661 は、カニクイザル及びアカゲザルに静脈内接種すると、ウイルス血症を起こし、CD4 陽性リンパ球の枯渇、対 CD8 陽性リンパ球比率の逆転の症状を呈し、病原性を持つことが証明された。また、従来サル動物実験に供されてきたサル血漿 SHIV-C2/1 ウイルス標品は、高力価を得ることが困難で、 10^3 TCID₅₀/ml の限界を越えることができなかったが、クローンウイルス SHIV-C2/1 KS661 では、トランスフェクション法により 10^5 TCID₅₀/ml を越える高力価ウイルスの調製が容易にできるようになった。

E. 結論

分子クローニングにより遺伝子型の確定した SHIV-C2/1 クローン KS661 を得ることができた。また、このクローンウイルスは、サル血漿 SHIV-C2/1 ウイルス標品と同様、カニクイザル及びアカゲザルに感染し、病原性を示すことが明らかになった。次のステップとして、非病原性の SHIV-89.6 との組み換えウイルスを作製し、それらの比較解析による病原性に関するウイルス遺伝子（領域）の探索を計画している。また、今後、抗 HIV ワクチン等の開発・評価のための標準ウイルスとして、SHIV-C2/1 KS661 を使用する予定である。更に、この分子クローンは他の clade の SHIV の作製に利用できると考えている。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Fujita, M., Sakurai, A., Doi, N., Miyaura, M., Yosida, A., Sakai, K. and Adachi, A. : Analysis of the cell-dependent replication potentials of human immunodeficiency virus type 1 *vif* mutants. *Journal of Virology*, in press, 2001.

2. 学会発表

(1) 阪井弘治、篠原克明、高橋栄治、網康至、佐々木裕子、吉野直人、須崎百合子、仲宗根正、本多三男：カニクイザルに病原性を示す SHIV-C2/1 株の分子クローニング。第 14 回日本エイズ学会、2000 年。

(2) 本多三男、仲宗根正、松尾和浩、大洲竹晃、吉野直人、滝澤万理、浜野隆一、海津雅彦、原敬志、川原守、泉泰之、堀端重男、兼清優、浜武牧子、網康至、篠原克明、佐々木裕子、阪井弘治、高橋栄治、山本博、永井美之、山崎修道：本邦における遺伝子組換えワクチン(リコンビナント AIDS ワクチンの開発状況)。第 14 回日本エイズ学会、2000 年。

(3) Yokomaku, Y., Matsuda, Z., Sugiura, W., Matsuda, M., Sakai, K., and Nagai, Y.: Phenotypic analysis of HIV-1 protease by virus like particle (VLP) ELISA. First HIV Drug Resistance Program, 2000.

SHIV-C2/1 provirus

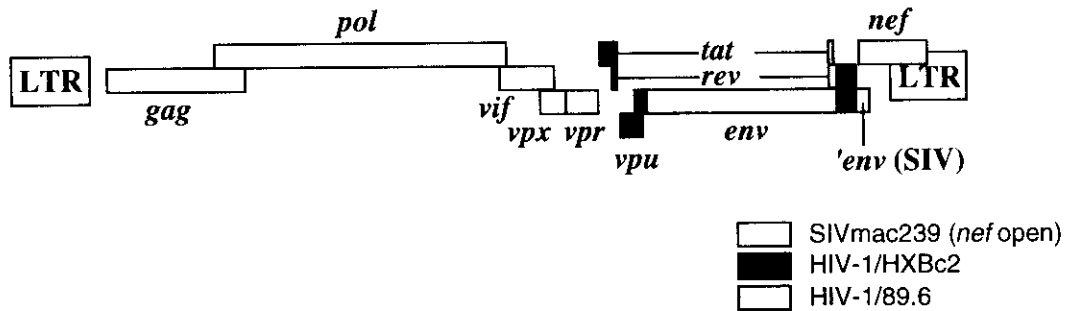


図1 SHIV-C2/1 プロウイルスゲノム地図

病原性 SHIV-C2/1 株は、非病原性親株 SHIV-89.6 を、アカゲザル及びカニクイザルにて継代して得られた。そのゲノム構造は、SIVmac239 のバックボーンに HIV-1 の *tat* から *env* 遺伝子までを置換したものである。HIV 由来領域の内、*env* の大部分は臨床分離株 HIV-1/89.6 に由来し、その他は HIV-1/HXBc2 由来である。

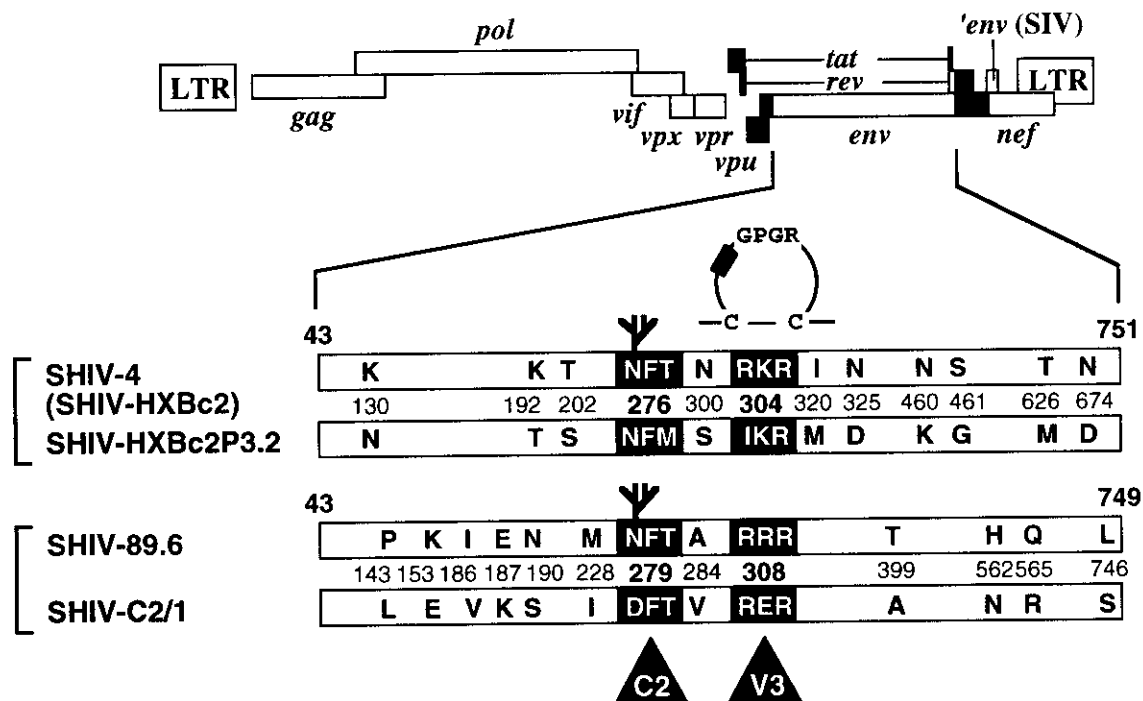


図2 2組の非病原性・病原性 SHIV の比較

非病原性 SHIV-4 由来の病原性 SHIV-HXBc2P3.2 は、*env* 遺伝子の *Kpn* I - *Bam* H I 領域にその病原性がマップされている。この *env* 遺伝子領域について、SHIV-4 と SHIV-HXBc2P3.2、及び SHIV-89.6 と SHIV-C2/1 の 2 組の非病原・病原性ウイルスの共通点を比較検討した。図に示すように、共通する変異が 2 個所に見出された。第一は、C2 領域のアスパラギン結合糖鎖 (SHIV-HXBc2P3.2 では N276、SHIV-C2/1 では N279) が病原性ウイルスでは消失することである。この領域はウイルスレセプターである CD4 との結合に関与することが示されており、その相互作用に変化をもたらす可能性が考えられる。第二は、V3 ループ内の塩基性アミノ酸の一部が全く極性の異なるアミノ酸に変化していることである (SHIV-HXBc2P3.2 では R304I、SHIV-C2/1 では R308E)。V3 領域はコレセプターを介した宿主域の決定に関与していることが知られており、極性変化を伴うアミノ酸変異が宿主域に影響を与えている可能性は十分考えられる。

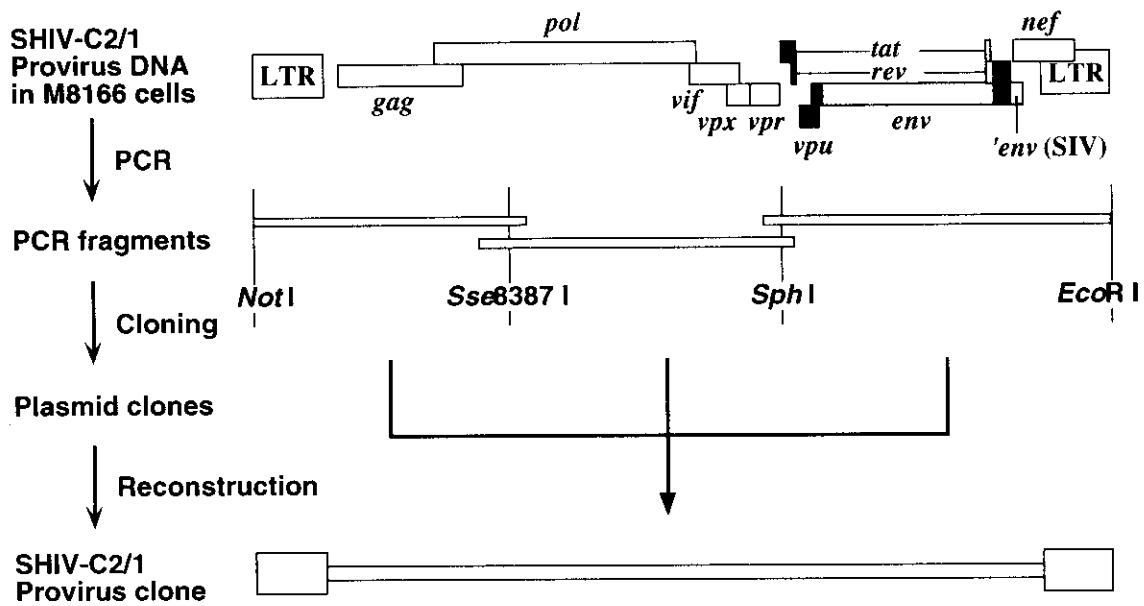


図3 SHIV-C2/1 の分子クローニング

SHIV-C2/1 感染 M8166 細胞より抽出した全細胞 DNA を鋳型とし、PCR 法によりプロウイルスゲノムを増幅した。PCR 産物を、それぞれ制限酵素 *NotI* + *Sse8387I*、*Sse8387I* + *SphI*、*SphI* + *EcoRI* にて消化し、生じた 3 断片 (3.1 kb、3.3 kb、4.1 kb) を pUC-18 を改変したプラスミドベクターにクローニングした。そして、それらを再構築してプロウイルス型の SHIV-C2/1 分子クローンである pKS661 プラスミドを作製した。

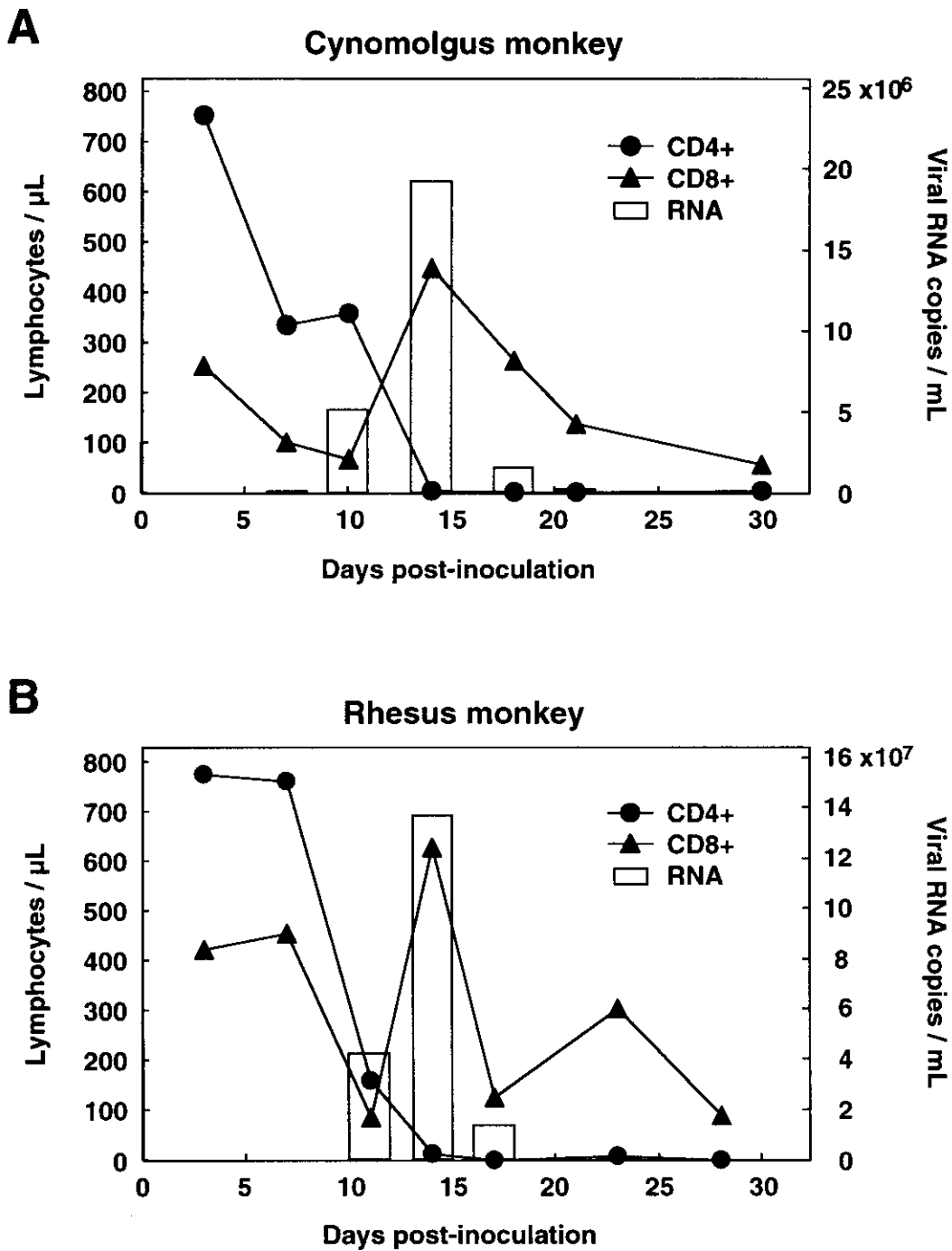


図4 SHIV-C2/1 のサル接種試験

SHIV-C2/1 KS661 ウイルスストックを、カニクイザルおよびアカゲザルに、1頭当たり 12,000TCID₅₀ 静脈内接種し (図の横軸0日)、経時的に末梢血を採取、CD4 陽性リンパ球と CD8 陽性リンパ球の絶対数、及び血漿中のウイルス RNA コピー数を測定した。カニクイ及びアカゲザル共に、サル血漿 SHIV-C2/1 ウイルス標品接種時と同様、血漿中ウイルス RNA 量の上昇に伴って、CD4 陽性リンパ球数が急激に減少し、ウイルス RNA 量がピークに達した 14 日目に、CD4 陽性リンパ球数は末梢血 1 μl 当り 1 桁台の数値に達し、CD8 陽性リンパ球との比率が逆転した。それ以降、CD4 陽性リンパ球数、及び対 CD8 陽性リンパ球比率が正常時の水準に戻ることはなかった。

サルエイズ脳炎発症モデルに関する研究

分担研究者 向井 隼三郎 国立感染研・筑波霊長類センター（室長）
研究協力者 佐多 徹太郎 国立感染研・感染病理部（部長）
小松原 博文 国立感染研・筑波霊長類センター（研究生）
菊池 俊彦 国立感染研・筑波霊長類センター（協力研究員）

研究要旨 SIVmac 239 株を接種した一頭のカニクイザル (Cy 1-1) は、ウイルス接種後 3 年 7 ヶ月目の死亡時には、エイズ脳炎を発症していた。Cy 1-1 死亡時に 2 代目カニクイザル (Cy 1-2) に輸血したところ、輸血後 20 週目に脳炎と肉芽腫様肺炎 (Granulomatous Pneumonia; GP 肺炎) により死亡した。もう一頭の初代カニクイザル (Cy 2-1) はウイルス接種後 3 年 10 ヶ月目に死亡したが、著明な GP 肺炎と肉芽腫様リンパ節炎 (G.Lymphadenitis; GL) が認められたが、脳炎は確認されなかった。Cy 2-1 死亡時に 2 代目カニクイザル (Cy 2-2) に輸血したところ輸血後 63 週目にやはり脳炎と GP 肺炎で死亡した。また、Cy 1-2 と Cy 2-2 の脳組織からモノサイト系 S I V 産生無限増殖細胞株 (BM1, BM5) を初めて樹立した。脳炎組織の病理組織学的解析から、我々は、BM 様細胞が脳血管周囲に形成されることがエイズ脳炎発症のきっかけになるという作業仮説を立てている。今回、BM5 のゲノム中のプロウイルス S I V DNA の全塩基配列を決定した後、BM5 が産生する S I V の RNA、BM5 が由来したカニクイザル Cy 2-2 死亡直前の髄液・血中 S I V の比較解析を行った。その結果、本 BM5 産生 S I V にはマクロファージ (Mφ) 指向性 S I V に特徴的な点突然変異の一部があることが明らかになり、細胞レベルでのサル肺胞 Mφ への感染を試みたところ、BM5 及び BM1 細胞の産生する S I V は共に Mφ に感染し増殖することが明らかになった。今後、細胞レベル、動物個体レベルで、Mφ 指向性と神経組織指向性の差異や BM 細胞の成因とその無限増殖性獲得機序に関して解析を行いたい。

A. 研究目的

世界的なエイズの蔓延とともに最近ではアジア、アフリカ大陸にもその流行がみられ、HIV の感染予防とともにエイズの治療法の開発が待たれている。

最近、開発された新しいプロテアーゼ阻害薬等が HAART (Highly Active Antiretroviral Therapy) 療法により直ちに臨床に用いられているが、エイズウイルスの増殖を一時的に抑制したり、患者の延命を期待できるものしかないのが現状である。また、投薬により、中枢神経系、脳脊髄液中のウイルス量を低下

させる薬剤は AZT と我々の報告した 6-Cl-ddG を含めてもまだ少ない (1-5)。

エイズ脳炎・痴呆症は HIV 感染者のうち約 30% に見られ HIV 感染に特徴的である。従って、サルエイズ脳炎発症モデルの開発とその発症機構の解明は、HIV 感染とその予防にとって重要な意義をもつ。

SIVmac 239 株を接種した 2 頭のカニクイザル (Cy 1-1 と Cy 1-2) では 3 年 7 カ月目と 3 年 10 カ月目に、それぞれ脳炎と、肉芽腫様肺炎 (GP 肺炎) 及びリンパ節炎 (GL) を認め、輸血により in vivo でウイルスの継代

を行ない 2 代目サル 2 頭においても脳炎の発症を確認した (図 1)。

エイズ脳炎発症サル 2 頭の脳組織より、それぞれウイルス産生培養細胞株 (2 株: BM1, BM5) を樹立し、この細胞の特性を明らかにした。BM 細胞 2 株はいずれも M ϕ 様細胞表面抗原及び M ϕ 、モノサイト系エステラーゼを持ち、CD4 陰性で、S I V を産生する無限増殖性細胞である。脳炎組織の病理組織学的解析結果から、我々は、S I V 産生 BM 様細胞が脳血管周囲に形成されることがエイズ脳炎発症のきっかけになるという作業仮説を立てている。

本年度の目的は、BM5 が由来した元のカニクイザル Cy 2-2 死亡直前の髄液・血中 S I V と BM5 が産生する S I V との比較解析を行うことと、BM5 及び BM1 細胞の産生する S I V を M ϕ に感染しその増殖の有無を検討し、サルエイズ脳炎発症機序における M ϕ 指向性の関与の検討を行うことである。

B. 研究方法

使用動物は、カニクイザル 4 頭で、初代カニクイザルには、S I V mac239 株 (TCID₅₀ ~ 5x10⁴) を静脈接種し、2 代目カニクイザルには 5 ml の輸血をおこなうことにより、S I V の接種を行った。

脳組織由来細胞株 BM1, BM5 の培養には通常の RPMI 培地と 6 穴平底プレートを用い、培地は 3 日毎に交換した。また、BM 細胞産生 S I V は培地交換後 3.5 日目に培養上清を回収しウイルスとして使用した。

S I V mac239 株の増殖およびウイルス Titer はの TCID₅₀ は常法に従って CEMx174 細胞株を用いて行った。その他のウイルス (BM S I V) は他の宿主細胞を用いることなく R T (逆転写酵素) 活性を合わせて、宿主細胞に感染させた。また、ウイルス感染は、S I V mac239 と CEMx174 細胞株の組み合わせで、moi 0.3 で感染させ、3 日目毎に培養

上清を回収した後、よく懸濁後半量の培地を細胞ごと交換した。

サル肺胞 M ϕ は Foamy ウイルス、CMV の感染のないアカゲザルの肺の洗浄により得た細胞を、10% ヒト AB 血清、5% FCS を含む RPMI1640 培地と 48 穴プレートを用い、48 日間培養した。CEMx174, M8166 細胞を用いた場合は 35 日間培養した。各種ウイルスの各種宿主細胞における増殖は、培養上清中 S I V の逆転写酵素を測定し、市販のリコンビナント H I V RT を用いて標準化して定量した。また、産生ウイルスのピーク付近や、産生ウイルスの初期の立ち上がりの時期の確認には p27ELISA (p27 core antigen capture assay kit ; Coulter) を用いた。

S I V 遺伝子塩基配列は、独自にデザインしたプライマーによる P C R 産物を T A クローニングし、1 回の P C R 反応あたり、3 ~ 5 クローンの塩基配列を確認して決定した。塩基配列決定に用いた機種は Li-COR Seqencer である。また、BM5 が産生する S I V の R N A ゲノムの塩基配列決定は、R T-PCR 反応以外は同様に行った。

(倫理面への配慮)

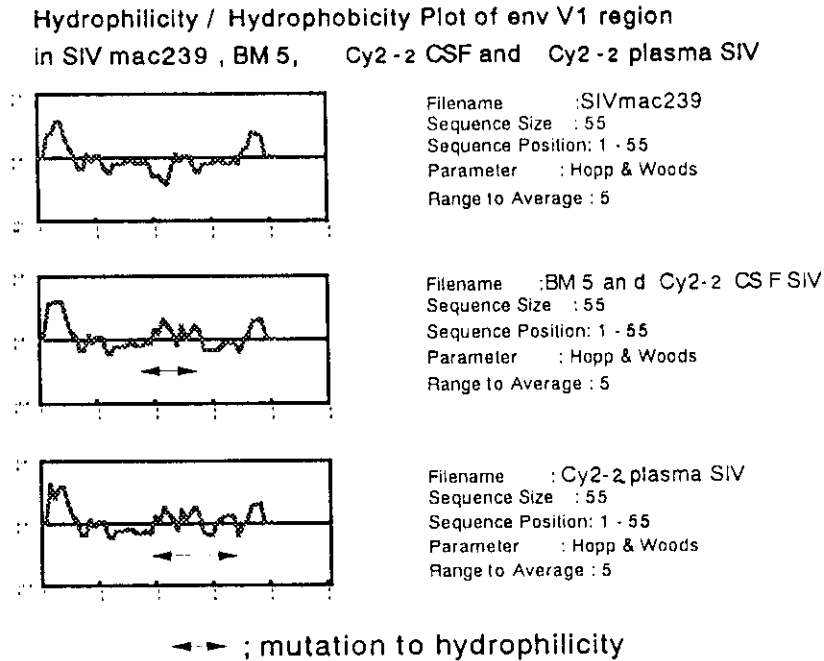
本研究は、国立感染症研究所動物実験委員会による審査の結果承認を受けた。また、研究の実施にあたっては、筑波医学実験用霊長類センター諸内規、作業方式に従って繁殖育成サルを用い、動物に与える苦痛の軽減と排除に勤めた。

C. 研究結果

BM 5 S I V, 髄液中 S I V, 血中 S I V の env 塩基配列の比較

BM 5 細胞が産生する S I V (BM 5 S I V) の全塩基配列を S I V mac239 と比較すると、env に 46 ヶ所の塩基置換と V4 に 21 塩基の in frame deletion が検出された。env 領

図 4



域以外では nef, vif, tat, rev にそれぞれ 14, 7, 3, 5 個の塩基置換がみられた (図 2)。BM5 細胞が由来した元のカニクイザル Cy 2-2 死亡直前の髄液中 S I V の env 領域塩基配列は V4 の 21 塩基 deletion を含めてほとんど BM 5 S I V と同一であったのに対し、Cy 2-2 死亡直前の血中 S I V の env 領域塩基配列は数カ所 (6 / 46) のみが BM 5 S I V と同一変異をもっているのみで、env V1 の 21 塩基の in frame deletion も認められなかった (図 3)。

BM 5 S I V, 髄液中 S I V, 血中 S I V の V1 領域の疎水性への変化

S I V mac239, BM 5 S I V 及び Cy 2-2 髄液中 S I V と Cy 2-2 血中 S I V に関して、env の V1 ~ V5 領域の親水性 / 疎水性解析を行ったところ、V2 ~ V5 領域では

これら 3 種の S I V に差がみられなかったが、V1 領域にのみ差異が認められた。即ち、S I V mac239 においては、V1 領域は疎水性であるのに対して、アミノ酸置換の結果、BM 5 S I V 及び Cy 2-2 髄液中 S I V と Cy 2-2 死亡直前血漿中 S I V の V1 領域はいずれも親水性に変化していることが推測された (図 4)。

BM 5 S I V, 髄液中 S I V のみが M φ / 神経組織指向性塩基置換を持つ

図 3 の遺伝子配列の解析から、BM 5 S I V 及び Cy 2-2 髄液中 S I V が、アカゲザルで M φ 指向性や神経系指向性に必須と言われている塩基配列の一部を保有することが明らかになった。即ち、M φ 指向性特有の 4 カ所の置換 (6803, 7130, 7750, 8323 番目の塩基) に関しては、そのうちの 2 カ所に同一置換

(6803 番目の塩基はG→Aに、7753 番目の塩基はA→Gに) がみられた。また、別のグループが指摘した神経系指向性のS I V17Eの4カ所の置換(6803, 7130, 7533, 7750番目の塩基)に関しては、そのうちの3カ所に同一置換(6803番目の塩基はG→Aに、7533番目の塩基はU→Aに7750番目の塩基はA→Gに7753番目の塩基はA→Gに)がみられた。Cy 2-2死亡直前の末梢血中S I Vの変異は1ヶ所のみであり、Mφ指向性と神経系指向性に特異的な塩基置換ではなかった。これらの解析結果を図5に示す。

BM 5 SIV, BM 1 SIV のみがMφで増殖

BM 5 SIVenvにはMφ指向性特有の4カ所の置換のうちの2カ所に同一置換がみられたことと、脳炎発症カニクイザルの脳組織にはSIV産生Mφ系多核巨細胞が認められたので(5症例)、BM 5 SIV, BM 5細胞株の由来したサル(Cy 2-2)の死亡直前の血漿、BM 1 SIV およびSIVmac239を用いてin vitroでサル肺胞Mφへの感染実験を行った。また、対照宿主細胞としてCEMx174およびM8166細胞株を用いた。

サル肺胞Mφでは親株のS I Vmac239は感染・増殖できなかったが、BM 1 SIVとBM 5 SIVのみの増殖が感染33日目から45日目までみられた(図6下)。一方、CEMx174では親株のSIVmac239, Cy 2-2血漿SIV, BM 5 SIV, BM 1 SIVの用いた4種S I Vすべての増殖がみられた。また、M8166細胞では、SIVmac239とBM 1 SIVのみが感染・増殖可能であった(図6)。用いた宿主細胞における各種S I Vの増殖が混入しているQuasi Species SIVによるものかどうかを調べるため、BM 5 SIVとBM 1 SIVについてCEMx174細胞とMφで増殖したS I Vの全env領域の遺伝子配列をRT-PCRで決定したところ、調べた限りのクローンにおいて、差はなくBMSIVのゲノム塩基配列と同じ配

列を持っていた。M8166細胞で増殖したBM 1 SIVの塩基配列については解析中である。

D. 考察

BM 5 SIV, 髄液中 SIV のみがMφ/神経組織指向性塩基置換を持つ

BM 5 SIV及びBM 5細胞株の由来したサル(Cy 2-2)の死亡直前の髄液中S I Vが、Mφ指向性や神経系指向性に特有の4カ所の変異のうち、2カ所に同一置換を持ち、神経系指向性のS I V17E分子クローンと3カ所に同一置換を持つのに対し、Cy 2-2死亡直前の血漿S I Vでは、S I Vmac239から変化しておらず、別の変異が1ヶ所のみ認められ、Mφ指向性と神経系指向性に特異的な塩基置換はなかった。また、BM 5及びCy 2-2髄液中のS I Vは、V4に21塩基のin frame deletionを持つが、元のカニクイザル死亡直前血漿中S I Vにはこのdeletionは認められなかった。

BM 5 SIV, BM 1 SIV のみがMφで増殖

BM 5 SIVがenv領域に報告されたMφ指向性特有の変異のうちの一部を持っていることと、脳炎を発症したカニクイザルの脳組織にはSIV陽性のMφ系細胞による病巣があることから、BMSIVの肺胞Mφへの感染・増殖性を検討した。

親株のSIVmac239をmoi 0.3になるようにウイルス量を合わせた後、BMSIVの逆転写酵素活性がSIVmac239と同じになるようにウイルス量を合わせてそれぞれの細胞に感染させた。CEMx174を宿主細胞として用いた場合には、SIVmac239, 血漿SIV, BM 5 SIVとBM 1 SIVの用いた4種SIVすべての増殖がみられた。その出現順序はS I Vmac239, 血漿SIV, BM 5 SIV, BM 1 SIVの順であった。S I Vmac239がCEMx174細胞で最も速く出現できた理由はこのウイル

スと細胞の組み合わせで種ウイルスを作成したことによると思われる。M8166細胞では、SIVmac239とBM1SIVのみが感染・増殖可能でありそれぞれ感染9日目と12日日以降に増殖がみられた。肺胞MφではSIVmac239と血漿SIVの増殖はなくBM1SIVとBM5SIVの増殖が感染後33日目から45日目までみられた。以上をまとめてみると、肺胞Mφへの指向性を獲得するには、図4に示したV1領域の親水性への変化ではなく、env領域の2～3個のアミノ酸の置換が重要だと考えられる。また、血中SIVにはBM5SIVのenvV4領域の21塩基のin frame deletionが認められなかったことと、肺胞Mφに感染出来たBM1SIVがenvV4領域に18塩基のin frame deletionを持つことを考えあわせると、このdeletionも肺胞Mφへの指向性を獲得するために必要であるかもしれない。

脳炎組織像の特徴とBM様細胞株の類似点、及びその脳炎発症における役割

組織病理学的解析により、脳炎を発症したカニクイザル脳組織(5症例)では、脳髄膜下にSIVRNA陽性、抗Mφ抗体(HAM56)陽性の多核巨細胞があり、その周辺にはHAM56陽性の組織球の結節性集簇が認められた。また、脳炎が認められなかったCy2-1においては、同様の組織像が肺とリンパ節にみられた。さらに興味深いことには、SIV陽性のMφ系細胞には通常存在しない、増殖性細胞にのみみられるPCNA抗原やKi67抗原が、検出されたことである。一方、BM様細胞株はモノサイト系抗原陽性であり、無限増殖性を獲得し、SIVを持続的に産生し、たとえSIV感染ザルであっても病理学的に典型的脳炎を示した脳組織からでないとは樹立できない。従って、BM様細胞株は脳炎組織の特徴をほとんど備えている。

以上の結果が示唆するエイズ脳症の成因に

対する仮説の1つは、脳炎発症カニクイザルの脳内では、通常ほとんど細胞分裂しないMφがMφ指向性SIVの感染を受け、なんらかの機構で増殖能を獲得し細胞分裂を繰り返しながら、効率よく多量のSIVを脳脊髄液中に放出し、脳症を引き起こしているということである。

今回、BMSIV2株を肺胞Mφに感染させ、その感染・増殖経過を観たがin vitroでのMφの不死化は認められなかった。Mφ系のSIV感染細胞の結節性集簇が脳炎部位のみならず肺やリンパ節にみられることを考慮すると、末梢でMφ指向性を獲得したSIVが終末分化していないモノサイト系細胞に感染し、血流に乗って脳内血管を通過して脳炎を発症する場合と肺やリンパ節炎を引き起こす可能性が考えられる。

E. 結論

1) SIV脳炎発症脳組織から得られたモノサイト系SIV産生無限増殖細胞株(BM1, BM5細胞)の産生するSIV(BMSIV)は髄液中のSIVとほとんど同じ遺伝子配列をもつ。

2) BMSIVはマクロファージ指向性及び神経組織指向性塩基配列をもつ。

3) BMSIVのみが肺胞マクロファージに感染増殖できるので、BM細胞の成因を解明することがエイズ脳炎発症機構の解明になると考えられる。

4) 今後、BMSIVの2nd Receptorの確認、Molecular Cloneの作成とともに、SIV感染サルにおけるBM細胞の出現と脳炎発症を確認する。

F. 研究発表

1. 論文発表

1)Fuji,Y., Mukai,R., Murayama, Y., Akari,H., Machida, M.,Mori, K.,Takasaka,M., Murakami,K.,

and Yoshikawa, Y. : Efficacy of 6-chloro-2',3'-dideoxyguanosine(6-Cl-ddG) on an ARC/AIDS rhesus macaque (*Macaca mulatta*) infected with simian immunodeficiency virus.

Exp. Anim. 46: 83-87, 1997

2) Otani I., Fuji, Y., Akari, H., Mukai, R., Mori K., Ono, F., Kojima, E., Machida, M., Murakami, K., Doi, K., Yoshikawa, Y. : Effect of 6-chloro-2',3'-dideoxy guanosine (6-Cl-ddG) in surface lymph nodes of rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) chronically infected with simian immunodeficiency virus (SIVmac239).

J. Veterinary Med. Sci. 59: 891-896, 1997.

3) Otani I., Fuji, Y., Akari, H., Mukai, R., Mori K., Ono, F., Kojima, E., Machida, M., Murakami, K., Doi, K., Yoshikawa, Y. : Effect of 6-chloro-2',3'-dideoxy guanosine (6-Cl-ddG) in surface lymph nodes of rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) chronically infected with simian immunodeficiency virus (SIVmac239).

J. Veterinary Med. Sci. 59: 891-896, 1997.

4) Fuji, Y., Mukai, R., Murayama, Y., Akari, H., Machida, M., Mori, K., Takasaka, M., Murakami, K., and Yoshikawa, Y. : Efficacy of 6-chloro-2',3'-dideoxyguanosine(6-Cl-ddG) on rhesus macaque chronically infected with simian immunodeficiency virus (SIVmac239). *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr. Hum. Retro-virol.* 16: 313-317, 1997

5) Fuji, Y., Mukai, R., Akari, H., Machida, M., Mori, K., Takasaka, M., Kojima, E., Murakami, K., and Yoshikawa, Y. : Antiviral effect of 6-chloro-2',3'-dideoxy guanosine (6-Cl-ddG) in rhesus monkeys acutely infected with SIV.

Antiviral Chem. & Chemother. 9: 85-92, 1998

6) 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

7) Shimizu N ; Soda Y ; Kanbe K ; Liu HY ; Mukai R ; Kitamura T ; Hoshino H : A putative G protein-coupled receptor, RDC1, is a novel coreceptor for human and simian immunodeficiency viruses.

J. Virol. 74 : 619-626 (2000)

8) Matunaga, S, Mukai, R, Murayama. M. I, Yoshikawa, Y, Murayama, Y: Sequence and functional properties of African green monkey CD4 silencer. *Immunol. Lett.* (Accepted)

2. 学会発表

1) 小松原博文、菊池俊彦、佐多徹太郎、松田基夫、宇田晶彦、山田章雄、向井鐸三郎：中枢神経指向性 SIV の解析

第 14 回日本エイズ学会（京都）2000 年

2) 森一泰、保富康宏、扇本真治、仲宗根正、本多三男、向井鐸三郎、塩田達雄、永井美美之 SIV Env の糖鎖は持続感染、病原性の決定因子である

第 14 回日本エイズ学会（京都）2000 年

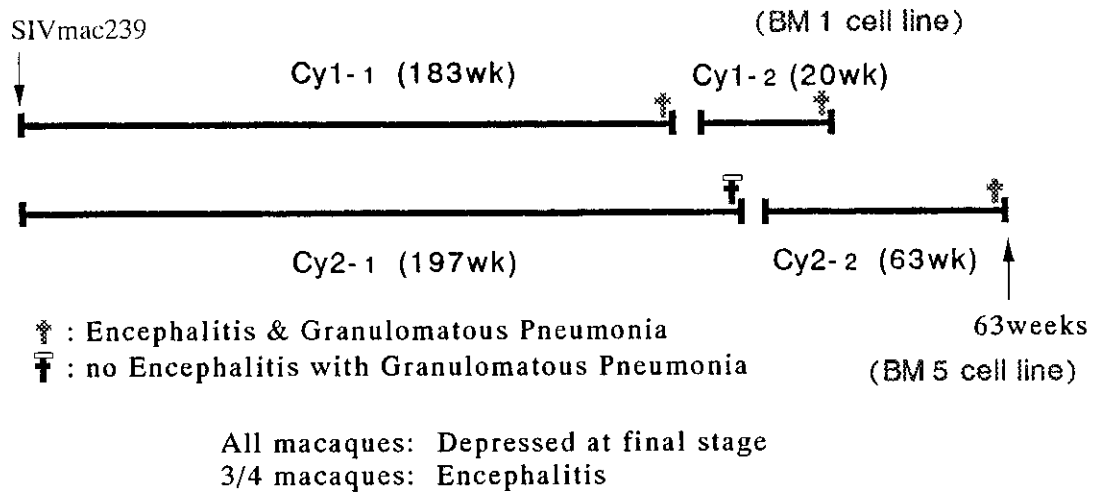
G. 知的所有権の所有状況

1. 特許取得 なし

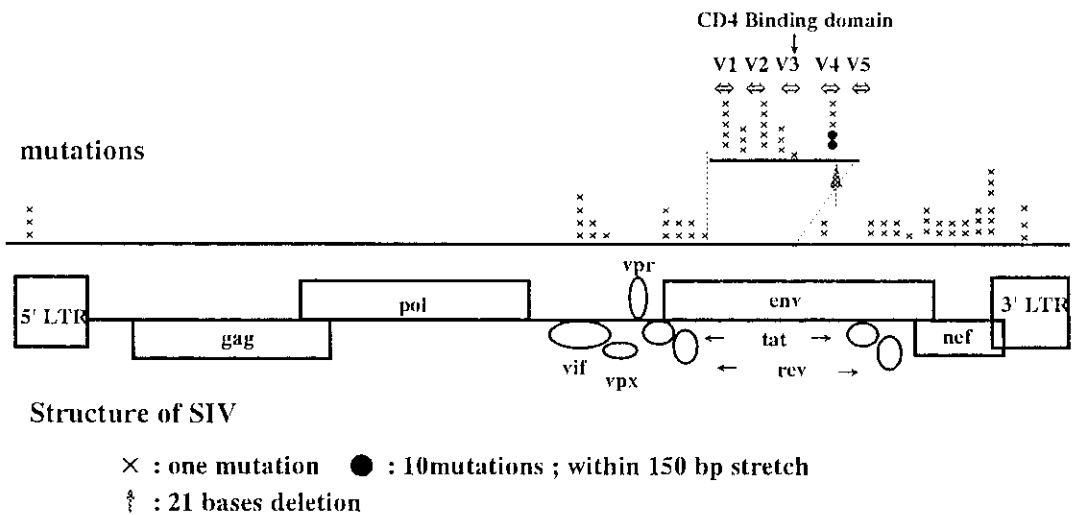
2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

☒ 1 Onset of AIDS Encephalitis in Cynomolgus Monkeys and Passage by Blood Transfusion



☒ 2 Mutations in SIV genomic DNA (BM 5 virus)



3

Homology of SIV env in BM5, CSF and plasma to SIV mac239

SIVmac239	1	MGCLGNQLLIAILLLSVYGIYCTLYVTYFYGVPANRNATIPLFCAIKNRDTWGTQCLPD	60
BM5 SIV	1I.....T.....	60
Cy2-2 CSF SIV 1	1	60
Cy2-2 CSF SIV 2	1	60
Cy2-2 CSF SIV 3	1	60
Cy2-2 CSF SIV 4	1	60
Cy2-2 plasma SIV 1	1	60
Cy2-2 plasma SIV 2	1I.....	60
Cy2-2 plasma SIV 3	1I.....	60

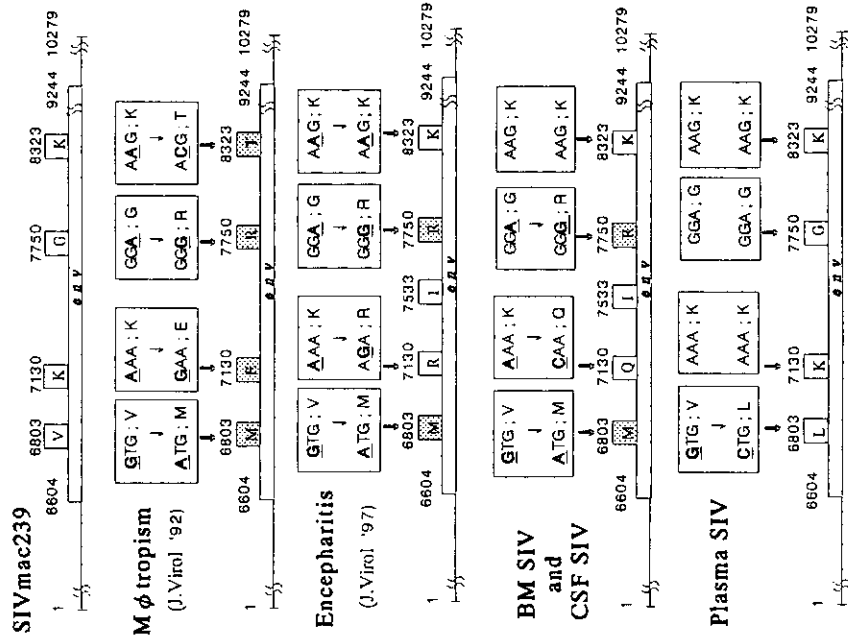
		→	
SIVmac239	61	NGDYSEVALNVTESEFQANNVTTEQALEDVHQLFETSIXPKVLSPLCITHRCNKSETDR	120
BM5 SIV	61M.....K.....	120
Cy2-2 CSF SIV 1	61M.....K.....	120
Cy2-2 CSF SIV 2	61	120
Cy2-2 CSF SIV 3	61M.....D.....K.....	120
Cy2-2 CSF SIV 4	61	120
Cy2-2 plasma SIV 1	61D.....L.....D.....	120
Cy2-2 plasma SIV 2	61D.....L.....D.....	120
Cy2-2 plasma SIV 3	61D.....L.....D.....	120

		V1 ←	
SIVmac239	121	WGLTKSIITTTASTTSTTASAKVDHVNETSSCIAQDNCTGLEQEQMISCKFNMIGLKRDKK	180
BM5 SIV	121P.A.....V.N.....QK.....	180
Cy2-2 CSF SIV 1	121P.A.....V.N.....QK.....	180
Cy2-2 CSF SIV 2	121N.....QK.....	180
Cy2-2 CSF SIV 3	121	180
Cy2-2 CSF SIV 4	121S.....	180
Cy2-2 plasma SIV 1	121P.A.M.....I.....N.....P.R.....Q.....	180
Cy2-2 plasma SIV 2	121P.A.M.....I.....N.....P.R.....Q.....	180
Cy2-2 plasma SIV 3	121	180
		**	
		→	
		V2 ←	
SIVmac239	181	KEYNETWYSADLVCEQGNNTGNESRCYMNHCMTSVIQESCDKHYWDAIRFRYCAPPG	237
BM5 SIV	181I.....SR.....	237
Cy2-2 CSF SIV 1	181I.....R.....	237
Cy2-2 CSF SIV 2	181I.....R.....	237
Cy2-2 CSF SIV 3	181	237
Cy2-2 CSF SIV 4	181	237
Cy2-2 plasma SIV 1	181D..D.....D.....	237
Cy2-2 plasma SIV 2	181D..D.....D.....	237
Cy2-2 plasma SIV 3	181AD.....	237

		→	
		V3 ←	
SIVmac239	262	VSSCTRMHETQTSTWFGNGTRAEHRTYIYWHGRNRTIISLNKYYNLTHKCRPFGNXTV	322
BM5 SIV	262K.....I.....	322
Cy2-2 CSF SIV 1	262K.....I.....	322
Cy2-2 CSF SIV 2	262K.....I.....	322
Cy2-2 CSF SIV 3	262K.....I.....	322
Cy2-2 CSF SIV 4	262KN.....I.....	322
Cy2-2 plasma SIV 1	262M.....	322
Cy2-2 plasma SIV 2	262M.....	322
Cy2-2 plasma SIV 3	262M.....	322

		→	
		V4 ←	
SIVmac239	383	APGGDPPEVTFHWTNCRGEEFLYCKMNFENNVEDRNTANQPKPKHQKRNVPCHIRQIIN	443
BM5 SIV	383R.....EP.....	443
Cy2-2 CSF SIV 1	383R.....EP.....	443
Cy2-2 CSF SIV 2	383R.....EP.....	443
Cy2-2 CSF SIV 3	383R.....EP.....	443
Cy2-2 CSF SIV 4	383R.....N.....EP.....	443
Cy2-2 plasma SIV 1	383P.....	443
Cy2-2 plasma SIV 2	383P.....	443
Cy2-2 plasma SIV 3	383R.....I.....	443
		**	

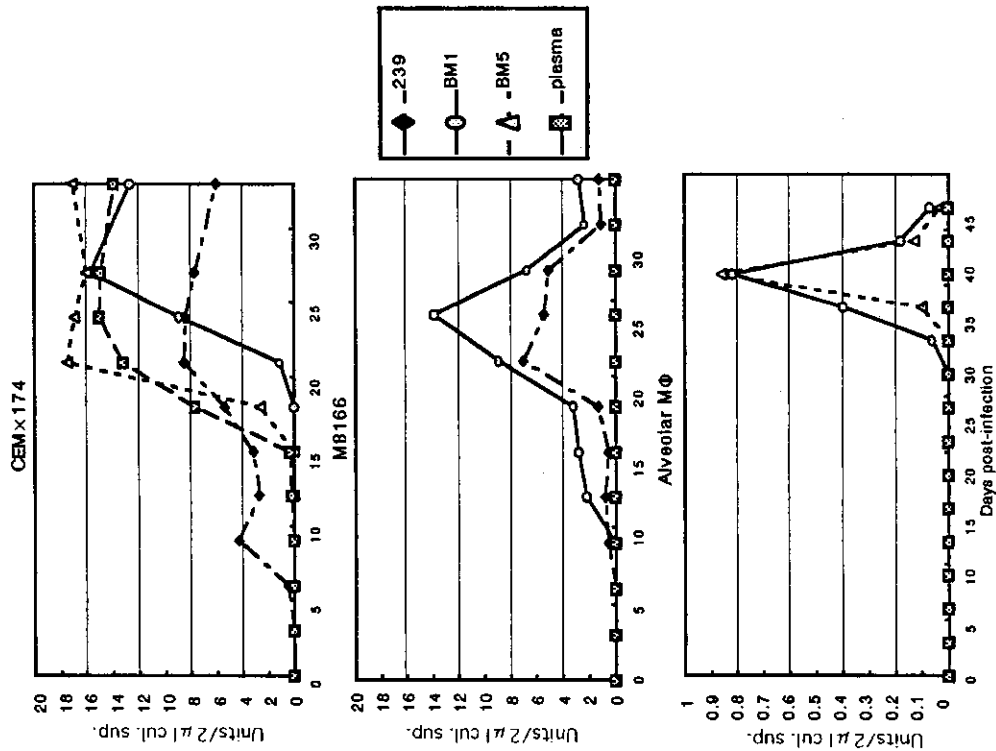
5 Amino acid changes in env region



J. Virol. 66, 2067 '92 : Specific mutations for macrophage-tropism
 J. Virol. 71, 5790 '97 : Neurovirulent molecular clone of SIV17E-CI
 BM 5 SIV : Mutations in SIV BM 5 cell line
 CSF SIV : Mutations in SIV in CSF of Cy2-2 monkey (end point)
 Plasma SIV : Mutations in SIV in plasma of Cy2-2 monkey (end point)

6

Growth kinetics of SIVmac239, BM1, BM5 and plasma SIV on CEM X 174, M8166 and Alveolar Macrophage



HIV 由来浮遊抗原ペプチドによる特異的 CTL のアポトーシス誘導

分担研究者 高橋 秀実 日本医科大学微生物学免疫学教室 教授
 共同研究者 高橋めぐみ 日本医科大学微生物学免疫学教室 助手
 共同研究者 中川 洋子 日本医科大学微生物学免疫学教室 助手

研究要旨

これまで報告者らは HIV 特異的 CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞(CTL)をエピトープペプチドでパルスすると、著明にキラー活性が低下し Anergy に陥ることを報告してきた。今回は、キラー活性の抑制以外に CTL の活性化状態によってはエピトープペプチドの添加により急速にアポトーシスが誘導される場合があること、即ち、ウイルスの破壊産物が生体内において CTL 機能制御のみならずその数的な変動に関与している可能性を見出した。このアポトーシスの誘導は刺激に用いる標的細胞数や刺激を行なうタイミングによって大きな影響を受けること、また Fas ligand や TNF- α は関与しないが免疫抑制剤である Cyclosporin A によって抑制されることが判明した。さらに詳細な実験の結果、エピトープペプチドのうち MHC クラス I 分子や TCR との相互作用に関与するアミノ酸がアポトーシス誘導の鍵を握ることを見出した。本実験系は、ウイルス感染時における CTL の動態を探るうえで有用であり、その実体を明らかにすることでウイルス感染に対する有効な治療及び予防の開発に寄与するものと考えられる。

A.研究目的

HIV の体内制御においては HIV 特異的 CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞(CTL)が重要な役割を演ずることが明らかとなってきた。これまで報告者らは、HIV-V3 ペプチドを CTL にパルスすることによりアポトーシスではなく一時的にキラー活性が抑制されるという一種の麻痺状態が誘導される系をマウスモデルを用いて見出し、キラー活性の抑制に関わるシグナル伝達や機能分子の発現について検討してきた。本研究ではさらに CTL がエピトープペプチドに直接曝された場合、CTL の活性化状態によっては急速にアポトーシスに陥ることを見出し、ウイルスの破壊産物が生体内での CTL 数の変動や機能の制御に関与している可能性を発見した。本研究では、ウイルス感染の有効な治療及び予防法を探るため、こうしたウイルス産物による CTL の破壊を防ぎ、機能低下を速やかに改善させる方策を見出すことを目的とした。

B.研究方法

HIV-1 (IIIB 株)env 蛋白 gp160 を 特異的に認識する CTL Line (LINE-IIIB cells)を標的細胞 (gp160 gene transfected BALB/c 3T3 細胞) の存在、非存在下で培養した後、最小認識ペプチドであるペプチド I-10 (minimal immunodominant epitope; RGPGRAFVTI)で再刺激し、アポトーシス誘導の有無を調べた。ア

ポトーシスの誘導は、処理細胞より断片化した DNA の抽出を行い、アガロース電気泳動法により確認した。さらに CTL をペプチドで再刺激する 1 時間前に各抗体及び阻害剤で処理し、アポトーシス誘導における影響を調べた。また CTL を標的細胞で刺激あるいはその後ペプチドで再刺激した際の表面抗原及び細胞内蛋白質の動態はフローサイトメトリーにより解析した。

C.研究結果

図 1 に示すように、直接エピトープペプチドで刺激した CTL においてはアポトーシスの誘導が認められなかったのに対し、予め標的細胞で刺激された CTL は、エピトープペプチドの再刺激により短時間でアポトーシスに陥ることが観察された。

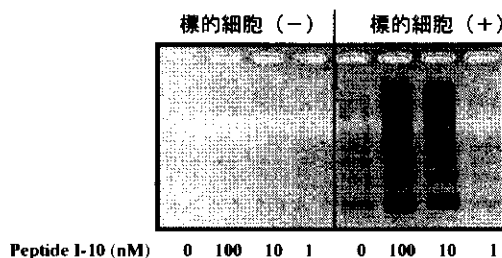


図1 エピトープペプチドの再刺激によるアポトーシスの誘導

標的細胞による刺激、さらにエピトープペプチドによる再刺激を受けた CTL にどのような変化が生じているかを知るために細胞の表面抗原発現の変化を FACS で解析した。標的細胞で刺激すると、IL-2receptor と Fas 抗原の発現が若干増強することが観察されたが、他の表面抗原の発現に変化は見られなかった。またこの際、エピトープペプチドで再刺激してもそれらの発現量が変化することはなかった(図2)。

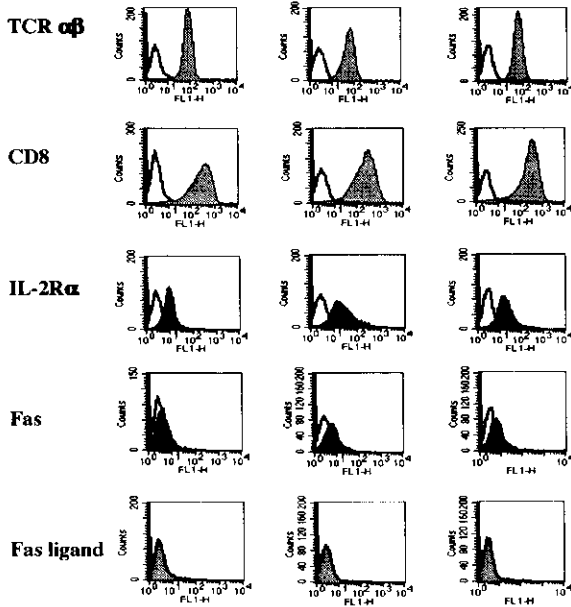


図2 CTLの表面抗原発現の変化

次に刺激する標的細胞数及び CTL を標的細胞で刺激した後、エピトープペプチドで再刺激するまでの時間がアポトーシスの誘導にどのように影響するかを調べた。その結果、標的細胞数が少なくなるほど、またペプチドによる再刺激までの時間が長くなるほどアポトーシスの誘導は減弱されることが示された(図3)。このアポトーシスの誘導は、Fas ligand、TNF- α 及び CD8 に対する抗体あるいは FK506 や Calcineurin Autoinhibitor のような阻害剤では抑制されなかったが(図4)、Caspase 3 inhibitor 及び Cyclosporin A によって著明に抑制されることが観察された(図5)。次に Peptide I-10 の各アミノ酸を他のアミノ酸に置換してアポトーシス誘導に及ぼす影響を検討した。図6に示すように MHC クラス I との相互作用に必須である5番目のアルギニン、7番目のフェニルアラニン、及び TCR との相互作用に重要である8番目のバリンを置換するとアポトーシスの誘導が抑制されることが証明された。

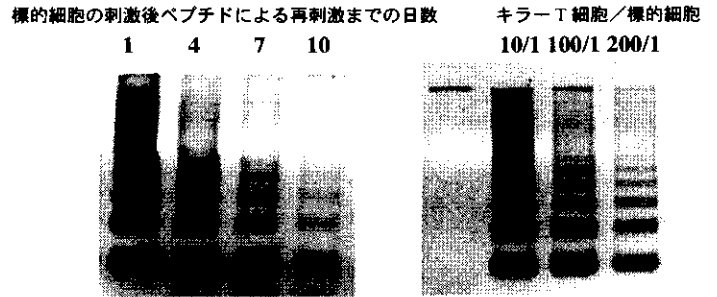


図3 エピトープペプチドの再刺激によるアポトーシス誘導の条件

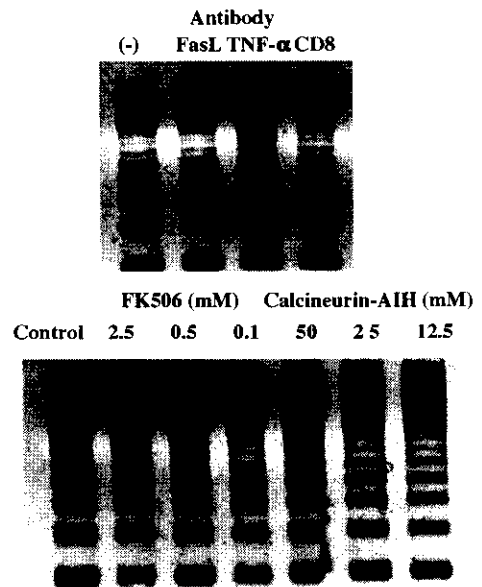


図4 アポトーシス誘導における各抗体及び阻害剤の影響

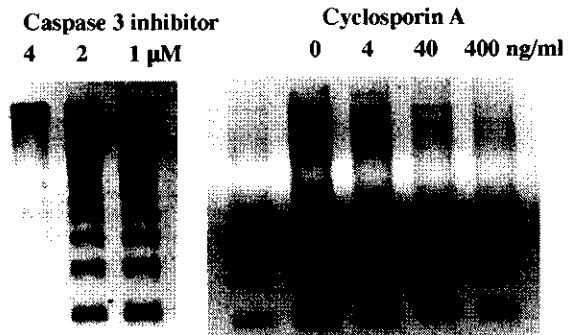


図5 アポトーシス誘導における阻害剤の影響

Peptide I-10

R G P G R A F V T I

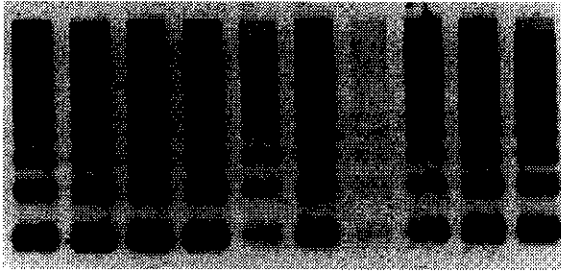


図6 Peptide I-10の置換アミノ酸のアポトーシス誘導に及ぼす影響

D. 考察

CTL が TCR 及び CD8 分子を介して標的細胞上に表出している MHC クラス I 分子及び抗原を認識し、標的細胞を破壊することはよく知られている。また標的細胞を認識することで CTL 自身も活性化され分裂増殖やサイトカインの産生が誘導される。しかしいったん活性化した CTL がどのように制御されるのかは、未知の部分が多い。

報告者らはこれまで静止期にある CTL をエピトープペプチドでパルスすると、顕著にキラー活性が抑制されることを見出し、そのメカニズムの解明を行ってきた。その結果このキラー活性の抑制は、CTL の細胞死によって生ずるのではなく、一過性に細胞傷害性物質の発現が減少することによるもので時間の経過とともにキラー活性は回復することを明らかにした。しかし今回のように CTL が標的細胞で刺激され活性化直後にエピトープペプチドによる刺激を受けると、短時間のうちにアポトーシスが誘導されることが判明した。現在のところ T 細胞の Activation Induced Cell Death (AICD) は、Fas ligand や TNF- α を介するとする報告が多くなされているが、今回見出したアポトーシスは、Caspase 3 inhibitor により抑制されるが、抗 Fas ligand 抗体や、抗 TNF- α 抗体で抑制されることはなかった。しかしながら Cyclosporin A でアポトーシスの誘導が強く抑制されることから Cyclosporin A の標的分子の一つである Calcineurin を介したアポトーシスである可能性が考えられた。そこで同じ Calcineurin を標的とする FK506 あるいは Calcineurin Autoinhibitor によってアポトーシスの誘導が抑制されるかどうか検討したところ、これら阻害剤による影響は全く見られなかった。また結果には示していないが標的細胞で刺激し、24 時間後にエピトープペプチドで再刺激しても Ca^{+} influx が認めら

れなかったことから Calcineurin とは異なる経路を介してアポトーシスが誘導される可能性が示唆された。

標的細胞で再刺激を行ってもこのような短時間のアポトーシスは誘導されなかったことより、活性化した CTL は標的細胞の破壊産物であるエピトープペプチドに曝されると、自身の MHC クラス I 分子あるいは隣接する CTL の MHC クラス I 分子に結合したペプチドを TCR を介して認識し、TCR から直接アポトーシスの実行分子を活性化するシグナルが伝達されている可能性が考えられた。

さらにエピトープペプチドによる再刺激までの時間が長いほど、また刺激する標的細胞数が少ないほどアポトーシスの誘導は減弱することが示されたので、CTL はその活性化の時期及び程度によってアポトーシスからキラー活性の抑制までその機能発現に大きな差異が認められることが判明した。

以上、CTL を短時間のうちにアポトーシスに導く系が確立された。今後は、そのメカニズムを明らかにしていくとともに、このような CTL のアポトーシスを回避するための方策を検討し、感染及び癌に対するより有効な免疫システムを獲得する手がかりを見出していきたい。

E. 結論

標的細胞を認識して活性化した CTL は、早い時期にエピトープペプチドに暴露されると急速にアポトーシスに陥り死滅することが示された。このような標的細胞の破壊産物によるアポトーシスの誘導が生体内の CTL の変動に大きく関与している可能性が示唆された

F. 論文発表

1) Takeshita, T., Satomi, M., Akira, S., Nakagawa, Y., Takahashi, H., Araki, T. (2000) Preventative effect of monoclonal antibodies to ICAM-1 and LFA-1 on murine spontaneous fetal resorption.

Am. J. Rep. Immunol., 43, 180-185.

2) Osono, E., Takahashi, M., Kurihara, S., Ohwada, K., Sakurai, Y., Onoda, N., Takeuchi, M., Yonoshima, H., Hayama, N., Iino, Y., Saji, M., Shikita, R., Takahashi, H., Ohkuni, H. (2000) Effects of "isolating hemodialysis" on prevention of methicillin-resistant Staphylococcus aureus cross-infection in a hemodialysis unit.

Clin. Nephrol., 54, 128-133.

3) Nakagawa, Y., Takeshita, T., Berzofsky, J.A., Takahashi, H. (2000) Analysis of the mechanism for extracellular processing in the presentation of human immunodeficiency virus-1 envelope protein-derived peptide to epitope-specific cytotoxic T lymphocytes. *Immunology*, 101, 76-82.

4) Akahata, W., Ido, E., Shimada, T., Katsuyama, K., Yamamoto, H., Uesaka, H., Ui, M., Kuwata, T., Takahashi, H., Hayami, M. (2000) DNA vaccination of macaques by a full genome HIV-1 plasmid which produces non-infectious virus particles.

Virology, 275, 116-124.

5) Nakajima, Y., Takahashi, M., Norose, Y., Ogawa, R., Takahashi, H. (2000) Induction of apoptosis in mice thymocytes by tetracaine.

Biomedical Res. (in press).

6) Takahashi, M., Nakagawa, Y., Berzofsky, J.A., Takahashi, H. (2001) Counter-regulation of cytolytic activity and cytokine production in human immunodeficiency virus (HIV)-1-specific murine CD8+ cytotoxic T lymphocytes by free antigenic peptide.

Int. Immunol. (in press).

7) Watari, E., Shinya, E., Kurane, S., Takahashi, H. (2001) Effect of cyclosporin A on cell fusion in monkey kidney cell line persistently infected with measles virus.

Intervirology. (in press).

8) Machida, K., Kohara, K., Seike, E., Tone, S., Shibasaki, F., Shimizu, M., Takahashi, H., et al. : Inhibition of cytochrome C release in Fas-mediated signaling pathway by hepatitis C viral proteins in transgenic mice liver.

J. Biol. Chem., (in press).

9) 高橋秀実 : エイズワクチン開発への指標.

Medical Briefs in virus infection.

13(1): 1-11, 2000.

10) 高橋秀実 : ウイルス感染に対する新たなワクチン-DNA ワクチン.

化学と生物, 38(5): 292-300, 2000.

11) 高橋秀実 : HIV エピトープとキラーT細胞.

臨床免疫, 34(2): 204-213, 2000.

12) 高橋秀実 : HIV に対する感染抵抗性とは.

Confronting HIV 2000, 15: 7-9, 2000.

13) 高橋秀実 : ワクチン接種.

免疫学イラストレイティッド (多田 富雄 監

訳)、pp263-272, 2000.

14) 高橋秀実 : 易感染性症候群.

免疫症候群 (矢田純一編集)、pp.537-540, 2000.

15) 高橋秀実 : HIV ワクチン開発の展望 : DNA ワクチンによる細胞性免疫賦活.

カレントセラピー, 19(2): 73-76, 2001.

16) 高橋秀実 : HIV 感染症の病態 2) 免疫学的側面から

治療学, 35(2) (印刷中)

17) 高橋秀実 : 樹状細胞による細胞性免疫の賦活

感染・炎症・免疫, 31(1) (印刷中)

G. 学会発表

1) Takahashi, H., Norose, Y., Nakagawa, Y., Takahashi, M., Sakaguchi, M., Takebe, Y.: Efficient priming of HIV-specific CD8+CTL with dendritic cells presensitized with HIV-DNA plasmid. Japan-US Cooperative Medical Science Program: The 12th Joint Scientific Meeting of AIDS. March 22-24, 2000 (SantaFe, New Mexico, USA).

2) Nakajima, Y., Takahashi, M., Ogawa, R., Takahashi, H. : Induction of apoptosis in mice thymocytes by tetracaine. 12th World Congress of Anesthesiologists. June 4-9, 2000 (Montreal, Canada).

3) Takahashi, H., Uesaka, H., Fukushima, T., Shimizu, M., Ui, M., Hayami, M.: Induction of CTL specific for SHIV-infected CD4+T cells from SHIV-resistant rhesus monkeys. Japan-US Cooperative Medical Science Program: The 13th Joint Scientific Meeting of AIDS. March 21-23, 2001 (Kumamoto, Japan).

4) 高橋秀実 : 細胞性免疫による肝疾患制御の可能性.

第 36 回日本肝臓学会総会.

2000 年 6 月 8-9 日 (福岡) .

5) 高橋秀実 : アレルギーとワクチンの最近の話題 : 身体に内在する防御機構

静岡県医師会平成 12 年度第一回研修会.

2000 年 7 月 8 日 (静岡) .

6) 福島達伸、千葉充、中川洋子、速水正憲、高橋秀実 : 経口インフルエンザワクチン投与による粘膜防御免疫の誘導.

第 48 回日本ウイルス学会総会.

2000 年 10 月 12-14 日 (三重) .

7) 廣田薫、柳衛宏宣、吉田稔、三竿幸子、福澤嘉孝、小林正文、高橋秀実: Helicobacter pylori urease に対する中和抗体とそのエピトープの同定.

第 42 回日本消化器病学会大会.
2000 年 10 月 25-27 日 (神戸).

8) Hirotaka SUGIYAMA, Hironobu YANAGIE, Shun TAKAKU, Hidemi TAKAHASHI: Cellular analysis of cytotoxicity of hepatitis C virus nonstructural protein 2.

第 30 回日本免疫学会総会
2000 年 11 月 14 日~16 日 (仙台).

9) 熊谷善博、澤田信一郎、大脇敦子、高橋秀実: 抗体超可変部へ分子移植したヒト免疫不全ウイルスエピトープを用いた感染制御

第 30 回日本免疫学会総会
2000 年 11 月 14 日~16 日 (仙台).

10) 渡理英二、福島達伸、渡辺くほみ、高橋秀実: Cyclosporin A の麻疹ウイルス持続感染細胞に及ぼす効果

第 30 回日本免疫学会総会
2000 年 11 月 14 日~16 日 (仙台).

11) 西山康裕、石丸薫、高橋秀実、石川博通: $\gamma\delta$ 型上皮細胞間 T 細胞による腸管上皮細胞の再生制御

第 30 回日本免疫学会総会
2000 年 11 月 14 日~16 日 (仙台).

12) 若林あや子、中川洋子、清水真澄、熊谷善博、高橋秀実: OVA に対する免疫寛容における胃液処理の関与

第 30 回日本免疫学会総会
2000 年 11 月 14 日~16 日 (仙台).

13) 高橋めぐみ、中川洋子、新谷英滋、高橋秀実: 浮遊ペプチド抗原によるキラー T 細胞のアポトーシス誘導

第 30 回日本免疫学会総会
2000 年 11 月 14 日~16 日 (仙台).

14) 高橋秀実、廣田薫、野呂瀬嘉彦、長田久美子: Helicobacter pylori urease 特異的中和抗体とそのエピトープ

第 30 回日本免疫学会総会
2000 年 11 月 14 日~16 日 (仙台).

15) 中川洋子、清水真澄、栗林秀樹、高橋秀実: D-アミノ酸を含むエピトープペプチドを特異的に認識するキラー T 細胞の誘導

第 30 回日本免疫学会総会
2000 年 11 月 14 日~16 日 (仙台).

16) 鈴木順一朗、横須賀忠、高瀬完、高橋秀実、荒瀬尚、斉藤隆: TCR β 鎖の CDR3 領域に非依存的な T 細胞の抗原認識

第 30 回日本免疫学会総会
2000 年 11 月 14 日~16 日 (仙台).

17) 上坂浩実、福島達伸、清水真澄、宇井雅弘、速水正憲、高橋秀実: SHIV 感染防御能獲得サルを用いた感染抵抗性の解析: 感染細胞による CTL 誘導の試み.

第 14 回日本エイズ学会総会.
2000 年 11 月 28 日~30 日 (京都).

18) 宇井雅弘、鈴木元、桑田岳夫、榎瀬良美、上坂浩実、宮崎恭行、伊吹謙太朗、高橋秀実、速水正憲: nef 遺伝子欠損 HIV-1/SIVmac キメラウイルス(SHIV)接種アカゲザルにおける抗原性の異なる SHIV89.6P の静脈及び経腔攻撃接種に対する感染防御.

第 14 回日本エイズ学会総会.
2000 年 11 月 28 日~30 日 (京都).

19) 高橋秀実: HIV 感染防御における感染抵抗性の実体: 細胞性免疫の重要性とその賦活.

第 14 回日本エイズ学会総会.
2000 年 11 月 28 日~30 日 (京都).

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yoshizawa I., Soda, Y., Mizuochi, T., Yasuda, S., Rizvi, T. A., Mizuochi, T., Takemori, T. and Tsunetsugu -Yokota Y.	Enhancement of mucosal Immune response against HIV-1 Gag by DNA immunization.	Vaccine	in press		2001
Ibuki, K., Ido, E., Funahashi, S., Miura, T., Hayami, M., Shida, H.	Protective effects to simian immunodeficiency virus agm (SIVagm) infection in cynomolgus monkeys immunized with a recombinant vaccinia virus expressing the SIV agm envelope gene	Vaccine	18	511-516	2000
Haga., T. Kuwata, T., Kozyrev, I., Kwofie, T. B., Hayami, M., Miura, T.	Construction of an SIV/HIV type 1 chimeric virus with the human Interleukin 6 gene and its production of Interleukin 6 in monkey and human cells	AIDS & Human Retro.,	16	577-582	2000
Mori, K., Yasutomi Y., Ohgimoto S., Nakasone T., Takamura S., Shioda T. and Nagai N.	A quintuple deglycosylated mutant of SIV in rhesus macaques. Robust primary replication, tightly contained chronic infection and elicitation of potent immunity against the parental wild-type strain.	Journal of Virology	印刷中		2001
Kano, M., Matano, T., Nakamura, H., Takeda, A., Kato, A., Ariyoshi, K., Mori, K., Sata, T., and Nagai, Y.	Elicitation of protective Immunity against simian immunodeficiency virus infection by a recombinant sendai virus expressing the gag protein.	AIDS	14	1281-1282	2000
Matano, T., Kano, M., Odawara, T., Nakamura, H., Takeda, A., Mori, K., Sata, T., and Nagai, Y	A novel effective DNA vaccine strategy inducing safer confined replication of engineered vaccine virus mediated by foreign receptor	Vaccine	18	3310-3318	2000
H Kato, H Bukawa, E Hagiwara, K-Q Xin, K Hamajima, S Kawamoto, M	Rectal and vaginal immunization with a macromolecular multicomponent peptide vaccine candidate for HIV-1 infection induces HIV-specific	Vaccine	18(13)	1151-1160	2000