

200000554A

厚生科学研究費補助金
エイズ対策研究事業

エイズ発症阻止に関する研究

平成12年度 総括・分担研究報告書

平成13年3月

主任研究者 岩本愛吉

研究課題：エイズ発症阻止に関する研究

課題番号：1の(11)の②の(イ)

主任研究者：所属施設 東京大学
氏名 岩本愛吉
分担研究者：所属施設 大阪大学
氏名 塩田達雄
所属施設 山梨医科大学
氏名 照沼 裕
所属施設 国立感染症研究所
氏名 横田恭子
所属施設 熊本大学
氏名 松下修三
所属施設 琉球大学
氏名 田中勇悦
所属施設 東京大学
氏名 小柳津直樹
所属施設 北海道大学
氏名 志田壽利
所属施設 東京医科歯科大学
氏名 山本直樹
所属施設 東北大学
氏名 小柳義夫
所属施設 国立国際医療センター
氏名 石坂幸人
所属施設 東京大学
氏名 渡邊慎哉
所属施設 東京大学
氏名 渡邊俊樹

1. 研究目的

以下の4本の柱を中心にエイズ発症阻止の研究を行う。(1)HIV感染症の病態、治療効果及び副作用の発現等に関わるゲノム多型性の研究。(2)HIV感染症における免疫応答とリンパ球破壊に関する研究。(3)HIVの増殖に関わる新しい宿主因子の発見と新しい治療標的開発のための基礎研究。(4)ウイルスゲノム発現機構の解析

2. 研究方法

ゲノム多型性の研究では、倫理面への配慮を十二分に行った上で、患者本人からインフォームド・コンセントを得る。インフォームドコンセントを得られた患者の染色体DNAをPCR法などにより増幅し、多型性の研究を行う。HIV感染者の免疫応答とリンパ球破壊に関する研究においては、患者末梢血単核球などを用いて、培養、フローサイトメトリーなどにより機能解析を行う。自己のHIVに対する中和抗体を持つ患者から、中和抗体を精製し、エスケープ変異体との関連を研究する。

新しい宿主因子の発見と治療標的開発の研究では、定量的PCR法により、HIV増殖中間体の定量系を確立する。CXCR4の阻害薬として可能性のある物質のCXCR4結合能、培養によるHIV抑制能、動物を用いた経口吸収試験などを行う。また、Vprを誘導的に発現する細胞を樹立し、Vprの阻害効果の可能性を持つ物質をスクリーニングする。HIVトランスジェニックマウスを用いて、ウイルス遺伝子発現とLTR部分のメチル化の関係について解析を行う。DNAマイクロアレイに関して独自の技術的な開発を行い、ウイルス感染に際して変動する遺伝子発現の研究を行うための基礎的技術の開発を行う。

(倫理面への配慮)

東京大学医科学研究所で診療を受ける患者に関するゲノム研究については、「宿主及び寄生体の両面から見たHIV感染症の研究」として東京大学医科学研究所倫理審査委員会の承認を得た。長期未発症者(LTNP)に関するゲノム研究に関しては、主たる研究の場となる山梨医科大学倫理審査委員会の承認を受け、患者の主治医によってイ

ンフォームド・コンセントがえられる手はずである。塩田達雄のグループが行うゲノム研究については既に医科学研究所の承認を得ているが、研究者が大阪大学微生物学研究所に栄転したため、大阪大学の倫理審査委員会での手続き中である。

3. 研究結果及び考察

4本の柱にしたがって記載する。

- (1) ゲノム多型性の研究では、プロテアーゼ阻害薬の代謝において最も重要な役割を果たす CIP3A4 遺伝子に SNP そのものが存在するかどうか、検索するために時間がとられた(岩本)。しかし、CCR5 遺伝子、IL-4 遺伝子の SNP に関して知見が得られた(塩田)。HIV のコレセプターである CCR5 の発現が減少し、病態進行が遅延する可能性のある遺伝子多型が2つ見つかった。第1は、フレームシフトにより細胞質内領域の51アミノ酸を欠く CCR5 893(-)多型で、CCR5 の発現に関してドミナントネガティブに働く。CCR5 893(-)を片方の染色体に持つ者の CD4 陽性細胞では、CCR5 の発現が少なく R5 ウイルスの増殖が低下する。第2は、フランスとの共同研究で HIV 感染者 428 名 (SEROCO Cohort) を解析した。その結果、IL4 のプロモーター領域-589 位の C から T への多型 (IL4-589T) を持つ HIV 感染者ではエイズ発症が遅延する、ことがわかった。IL4-589T 多型は、IL4 プロモーター活性が高く、CCR5 の発現がダウンレギュレーションされている可能性がある。フランス人では、IL4-589T の頻度が日本人より少ない。(塩田)
- (2) 免疫応答とリンパ球破壊の研究では、3 症例について HAART 開始時とリバウンド増殖したウイルスの関係を系統樹解析すると、いずれもリバウンドウイルスは HAART 開始時のウイルス準種から選択されてきたものであった。症例 1 について詳しく解析した結果、env 遺伝子 C3 の変化がリバウンドウイルスの中和抵抗性に関与していた(松下)。
- (3) HIV の増殖および新しい宿主因子と治療標的の研究では、HIV の感染前期過程のアッセイ系を確立し、以下のことを見出した。① HIV 侵入後の逆転写反応では strong-stop DNA 合成は S 期において活発である。② 2LTR DNA の形成 (核内移行) は細胞周期に依存しない。③ Full-length DNA 合成とインテグレーションには感染後 6 時間を要する。④ 活性化されていない末梢血単核球では、HIV の逆転写反応が遅滞して

いるが、インテグレーション効率はさほど阻害されていない(小柳)。経口投与可能な抗 CXCR4 阻害薬として期待できる KRX-1120 とその誘導体は、T 細胞株と正常末梢リンパ球を用いた X4 タイプ HIV 感染に対し、強い阻害効果を示した(山本)。活性化 PBMC に HIV を感染させる系で、

OX40 ligand (OX40L、別名 gp34) を発現する細胞を添加すると β ケモカインの産生が増加し、M-tropic HIV の増殖が協力的に抑制された(田中)。ランダムペプチドライブラリーから Vpr に結合するペプチド (VAP-1 ; Vpr associating peptide) を同定した。リコンビナント Vpr とビオチン化 VAP-1 との結合能を検出する系を構築し、さらに、このシステムを用いて、80 種の海洋生物抽出物から、Vpr と VAP-1 の結合を阻害する検体を2種同定した(石坂)。

- (4) ウイルスゲノム発現の研究では、ウイルス感染に伴う細胞の転写応答を解析するためのマイクロアレイ法の開発するためオリゴ DNA を市販のスライドガラス上に効率良く固相化する方法を開発した。均質なマイクロアレイを一度に84枚作製できるマイクロアレイ作製装置およびプログラムソフトウェアを開発した(渡邊慎哉)。HIV トランスジェニック・マウス (HIV-Tg) の脾臓細胞を用いた実験により、① LPS 刺激による HIV の発現誘導は細胞周期依存的であること、② その際 LTR 上の部位特異的 CpG 脱メチル化が伴うこと、③ 2ヶ所の特異的脱メチル化部位が CREB/ATF ファミリーの結合配列に相同性を有していること、④ これらの配列には CpG のメチル化の有無に関わらず結合する共通のタンパク質が存在し、それは既知の CREB/ATF ファミリー転写因子とは異なること、⑤ この部位には非メチル化配列特異的に複数の核内因子が結合しうること、を明らかにした(渡邊俊樹)。

4. 評価

1) 達成度について

3年計画の1年目として、(1)ゲノム多型性の研究では、倫理面での配慮に注意し、不可欠な手続きを進めた。このため一部の研究では、研究の開始が次年度に持ち越されることになったが、やむを得ない過程であると考えている。

(2)免疫応答とリンパ球破壊に関する研究では、HIV 中和抗体の標的が通常予想される env 遺伝子 V3 領域ではなく C3 領域が重要であるとの結果が得られ興味深い。(3)HIV の増殖中間

体の新しいアッセイ法が開発できた。抗 CXCR4 活性を持つ新規物質は有望であり、抗 Vpr 活性のある物質をスクリーニングする系と可能性のある物質に関して予備的な結果が得られた。(4)DNA マイクロアレイの新しい系がほぼ完成できた。次年度からこの系を用いた共同研究が盛んになることを期待している。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

IL4 や CCR5 の多型が HIV 感染症の予後に関連する事がわかり、新たな治療戦略開発に貢献する可能性がある。OX40L-OX40 の情報伝達系により、HIV 増殖制御が始めて明らかにされた。HIV-1 の細胞内増殖をアッセイする系により、様々な薬剤の効果や宿主因子の関与が検討可能となった。内服可能な CXCR4 阻害薬が抗 HIV 活性を有することを示した成果は、学術的、国際的、社会的意義の高いものであると考える。

3) 今後の展望について

ゲノム研究では、倫理面でのハードルがクリアされたこと、ヒトゲノムセンターからの新たな SNP 情報が増加していることなどから、加速度的に研究の展開が期待される。マイクロアレイに関する技術的な問題が解決されつつあり、2 年度以降、この技術を用いた研究の展開が期待できる。HIV に対する細胞性免疫の研究を強化する必要がある。

5. 結論

3 年計画の 1 年目として順調に滑り出せたのではないかと考えている。ゲノム研究での倫理面の配慮などに時間がかかったが、必要なステップであり、今後症例を増やすためには協力を得られる施設および患者を増やす必要がある。

6. 研究発表

1) 国内

評価委員会での発表に備えて欧文論文発表だけをまとめたので、本年度はそれのみ報告致します。国内での学会発表もたくさんございます。

2) 海外

原著論文による発表 71 件

主な論文発表

1. Nakayama, E.E., Hoshino, Y., Xin, X., Liu, H., Goto, M., Watanabe, N., Taguchi, H., Hitani, A., Kawana-Tachikawa, A., Fukushima, M., Yamada, K., Sugiura, W., Oka, S., Sato, H., Takebe, Ajisawa, A., Y., Nakamura,

T., Nagai, Y., Iwamoto, A., and Shioda, T. Polymorphism in the IL-4 promoter affects acquisition of HIV-1 syncytium inducing (SI) phenotype. *J. Virol.* 74:5452-5459, 2000.

2. Koibuchi, T., Hitani, A. Nakamura, T., Nojiri, N., Nakajima, K., Jyuji, T., and Iwamoto, A. Predominance of genotype A HBV in HBV-HIV-1 dually positive population as compared to HIV-1-negative counterpart in Japan. *J. Med. Virol.* In press.
3. Shioda, T., Nakayama, E.E., Tanaka, Y., Xin, X., Liu, H., Kawana-Tachikawa, A., Kato, A., Sakai, Y., Nagai, Y., and Iwamoto, A. A naturally occurring deletional mutation in the C-terminal cytoplasmic tail of CCR5 affects surface trafficking of CC5. *J. Virol.* In press.
4. Watanabe, N., Tomizawa, M., Tachikawa-Kawana, A., Goto, M., Ajisawa, A., Nakamura, T., and Iwamoto, A. Quantitative and qualitative abnormalities in HIV-1-specific T cells. *AIDS.* In Press.
5. Jun-ichi Sakuragi, Tatsuo Shioda and Antonito T. Panganiban. Duplication of the primary encapsidation and dimer linkage region of HIV-1 RNA results in the appearance of monomeric RNA in virions. *J. Virol.* In press.
6. A quintuple deglycosylation mutant of SIVmac239 in rhesus macaques. Robust primary replication, tightly contained chronic infection and elicitation of potent immunity against the parental wild type strain. Kazuyasu Mari, Yasuhiro Yasutomi, Shinji Ohgimoto, Tadashi Nakasone, Shiki Takamura, Tatsuo Shioda, and Yoshiyuki Nagai. *J. Virol.* In press.
7. Handema, R., Terunuma, H., Kasolo, F., Kasai, H., Sichone, M., Mulundu, G., Deng, X., Ichiyama, K., Mitarai, S., Honda, M., Yamamoto, N., Ito, M.: Emergence of new HIV-1 subtypes other than subtype C among antenatal women in Lusaka, Zambia. *AIDS Research and Human Retroviruses* (in press)
8. Deng, X., Terunuma, H., Handema, R., Sakamoto, M., Kitamura, T., Ito, M.,

- Akahane, Y.: Higher prevalence and viral load of TT virus in saliva than in the corresponding serum: another possible transmission route and replication site of TT virus. *J Medical Virology* 62: 531-537, 2000.
9. Maeda Y., Foda M., S. Matsushita, S. Harada: 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(4), 1787-1793. 2000.
 10. Momoi Y, Ichiyama K, Chowdhury IH, Koyanagi Y, Yamamoto N: Pertussis toxin enhances human immunodeficiency virus type 1 replication. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.*, 16:373-9, 2000
 11. Ryo A, Suzuki Y, Arai M, Kondoh N, Wakatsuki T, Hada A, Shuda M, Tanaka K, Sato C, Yamamoto M, Yamamoto N. Identification and characterization of differentially expressed mRNAs in HIV type 1-infected human T cells. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 16:995-1005, 2000
 12. Tsurutani N, Kubo M, Maeda Y, Ohashi T, Yamamoto N, Kannagi M, Masuda T: Identification of critical amino acid residues in human immunodeficiency virus type 1 IN required for efficient proviral DNA formation at steps prior to integration in dividing and nondividing cells. *J. Virol.* 74:4795-806, 2000
 13. Fujii M, Iwai K, Oie M, Fukushi M, Yamamoto N, Kannagi M, Mori N.: Activation of oncogenic transcription factor AP-1 in T cells infected with human T cell leukemia virus type 1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.*, 16:1603-6, 2000
 14. Kusagawa S, Takebe Y, Yang R, Motomura K, Ampofo W, Brandful J, Koyanagi Y, Yamamoto N, Sata T, Ishikawa K, Nagai Y, Tatsumi M.: Isolation and characterization of Full-length molecular DNA clone of Ghanaian HIV-1 intersubtype A/G Recombinant (CRF02-AG) which is replication-competent in restricted host-range. *AIDS Res. Hum. Retrov.*, in press.
 15. Iwai K, Mori N, Oie M, Yamamoto N, Fujii M.: Human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein activates transcription through AP-1 site by inducing DNA binding activity in T cells. *Virol.*, in press.
 16. Miura Y, Misawa N, Maeda N, Inagaki Y, Tanaka Y, Ito M, Kayagaki N, Yamamoto N, Yagita H, Mizusawa H, Koyanagi Y. Critical contribution of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) to apoptosis of human CD4⁺ T cells in HIV-1-infected hu-PBL-NOD-SCID mice. *J. Exp. Med.* in press.
- 主な海外学会発表
1. Watanabe, N., Tomizawa, M., Tachikawa-Kawana, A., Goto, M., Ajisawa, A., Nakamura, T., and Iwamoto, A. Qualitative and quantitative abnormalities in HIV-1-specific T cells. Keystone Symposia on New biological approaches to HIV-1 infection based on new insights into HIV biology. Keystone, Colorado, U.S.A. April 4-10, 2000.
 2. Shioda, T., Nakayama, E.E., Tanaka, Y., Xin, X., Liu, H., Kawana-Tachikawa, A., Kato, A., Sakai, Y., Nagai, Y., and Iwamoto, A. A Naturally occurring deletional mutation in the C-terminal cytoplasmic tail of CCR5 affects intracellular transport of CCR5. 2000 International Meeting of the Institute of Human Virology. Baltimore, Maryland, U.S.A. September 10-15, 2000.
 3. Koibuchi, T., Nakamura, T., Nojiri, N., Nakajima, K., Juji, T., and Iwamoto, A. Shifting in genotype trends of hepatitis B virus in Japan. IDSA2000. New Orleans, LA, U.S.A. September 7-10, 2000.
 4. Liu, H., Nakayama, E.E., Xin, X., Kawana-Tachikawa, A., Goto, M., Taguchi, H., Yamada, T., Takebe, Y., Nakamura, T., Nagai, Y., Iwamoto, A., and Shioda, T. Psequence variation in an 8.1-kb region of the human CCR5 gene. 8th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Chicago, Illinois, U.S.A. February 4-8, 2001.

7. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

4件 全て渡邊慎哉

- a. 発明の名称：試料チップ作製用分注針の洗淨方法
願書番号：特願 2000-53109 号
- b. 発明の名称：ポリヌクレオチドマイクロアレイの作製方法、作製装置ならびにポリヌクレオチドマイクロアレイ
願書番号：特願 2000-139926 号
- c. 発明の名称：試料チップ作製方法
願書番号：特願 2000-147606 号
- d. 発明の名称：核酸標識方法および核酸標識用キット
願書番号：特願 2000-254172 号

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

分担研究報告書

HIV 感染者の病態と治療効果に関する研究

分担研究者 岩本愛吉 東京大学医科学研究所 教授

研究要旨

プロテアーゼ阻害薬（PI）は、現在の抗 HIV 治療薬の中で重要な位置を占めている。現在 HIV 感染者の治療に用いられている PI は、チトクローム P450 分子により代謝されるため、遺伝子多型に基づくチトクローム P450 分子の機能上の変化は HIV 感染症の治療、副作用発現等に多大な関連をもつ可能性がある。本研究においては、抗 HIV 治療薬の代謝に関与するチトクローム P450 分子に関する遺伝子多型を解析し、治療効果や副作用発現率との関連を解析する。CYP3A4 に関しては、調べた範囲で有意な多型を確認できなかった。CYP2C19 に関しては、多型と治療効果に関連を見出し、さらに多くの患者に関するデータを蓄積する必要があると思われた。

A. 研究目的

プロテアーゼ阻害薬（PI）の代謝はチトクローム P450、中でも CYP3A4 の役割が大きい。CYP3A4 遺伝子に多型性（SNP）があれば、PI 代謝に大きく関与する可能性がある。そこで、その多型性を検索した。CYP2C19 はネルフィナビル（NFV）の代謝に関与する。CYP2C19 には、2 種類の SNP が存在し、その多型性は NFV の代謝産物（M8 と呼ばれる）の産生に影響する。M8 も抗ウイルス作用を持つことが知られているが、その抗ウイルス活性は NFV そのものより低い。そこで、日本人 HIV 感染者における CYP2C19 の SNP について検討し、NFV 血中濃度、臨床的な抗ウイルス効果などを比較した。

B. 研究方法

CYP3A4 遺伝子については、健常人の染色体 DNA を発表されている塩基配列に基づくプライマーにより、PCR 増幅し、塩基配列の決定を行い比較した。

CYP2C19 遺伝子については、(1)第 4 エクソンに存在する G→A 多型により異常なスプライシングが生じ、CYP2C19 遺伝子産物が欠質する多型（m2）と、(2)第 5 エクソンに存在する G→A 多型によって生じる終止コドンのため CYP2C19 遺伝子産物が欠質する多型（m1）が知られている。m2 多型では BamHI 切断部位、M1 多型では SmaI 切断部位が野生型には存在するが、変異型では切断部位がないため、PCR 増幅の後、これらの制限酵素で切断されるか否かで野生型か変異型かを判定した。

（倫理面への配慮）

遺伝子研究については、医科学研究所倫理審査委員会に申請し、承認を受けた。健常人については、インフォームド・コンセントを得た後、匿名のサンプルにつき検索を行った。HIV 感染者における多型性研究においては、倫理審査委員会で承認を得た同意書に従って研究の趣旨を説明し、文書によるインフォームドコンセントを得た。

C. 研究結果

CYP3A4 遺伝子については多型性情報がなく、本研究を始めた時点では医科学研究所の SNP センターもデータを持っていなかったため、健常者の染色体 DNA を用いて独自に SNP の存在を発見することを試みた。(1)プロモーター及び第 1 エクソン領域 (n=38)、第 3 エクソン (n=10)、第 6 エクソン (n=10)、第 12 エクソン (n=10)、第 13 エクソン (n=10) では多型性を見出せなかった。第 2 イントロンの中に 10 人中 4 人の頻度で塩基の欠失を見出したが、イントロンでもあり、HIV 感染者の解析は行わなかった。

CYP2C19 遺伝子の多型は、30 人中 (1)wt/wt, 13 人、(2)wt/m2, 4 人、(3)wt/m1, 6 人、(4)m1/m2, 2 人、(5)m1/m1, 5 人であった。m1/m2 あるいは m1/m1 の遺伝子型を持つ者は、予測されたように M8 の血中濃度が非常に低かった。副作用の有無と CYP2C19 遺伝子の多型には相関関係がなかった。変異型のみを持つ患者では HIV RNA が全員検出限界以下であった。一方、CYP2C19 遺伝子の多型に関して野生型をホモあるいはヘテロで持つ患者 23 名中 8 名が HIV RNA ≥ 50 とウイルス増殖抑制が不十分であった。この 8 名の中には、服薬不十分な症例が含まれているが、少なくとも 3 名に関しては服薬遵守の良い患者であった。

D. 考察

SNP の検索は、単一の研究室では極めて厳しい。医科学研究所の SNP センター機能が稼動し始め、日本人の SNP 情報が得られるようになってきた。その情報を十分に活

用し、今後の研究を進める事によって HIV 感染症の治療やエイズ発症阻止に重要な SNP を発見する効率を上げることが可能となった。

CYP2C19 に関しては遺伝子多型が治療効果に影響する事が示唆されたが、症例が少ないため、さらなる解析を要する。

E. 結語

検索した範囲内で CYP3A4 遺伝子には第 2 イントロン内に存在する一部欠損以外に SNP を発見できなかった。CYP2C19 の多型性は NFV の治療効果に関与している可能性がある。

F. 健康危険情報

該当しない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Katano, H., Suda, T., Morishita, Y., Yamamoto, K., Hoshino, Y., Nakamura, K., Tachikawa, N., Sata, T., Hamaguchi, H., Iwamoto, A., and Mori, S. Human herpesvirus 8-associated solid lymphomas that occur in AIDS patients take anaplastic large cell morphology. *Modern Pathology* 13:77-85, 2000.
2. Aoki, Y., Tosato, G., Nambu, Y., Iwamoto, A., and Yarchoan R. Detection of vascular endothelial growth factor in AIDS-related primary effusion lymphomas. *Blood* 95:1109-1110, 2000.
3. He, L., Terunuma, H., Hanabusa, H., Iwamoto, A., Oka, S., Tanabe, F., Chiba, N., Kurimoto, M., Ikeda, M., Okamura, H., Dai, J., Iwatani, Y., Ishida, T., and Ito, M. Interleukin

- 18 and interleukin 1 β production is decreased in HIV type 1-seropositive hemophiliacs but not in HIV type 1-seropositive nonhemophiliacs. *AIDS Research and Human Retroviruses* 16:345-353, 2000.
4. Katano, H., Iwasaki, T., Baba, N., Terai, M., Mori, S., Iwamoto, A., Kurata, T., and Sata, T. Identification of antigenic proteins encoded by human herpes virus 8 and the seroprevalence in the general population and among patients with and without Kaposi's sarcoma. *J. Virol.* 74:3478-3485, 2000.
 5. Yamada, T., and Iwamoto, A. Comparison of proviral accessory genes between long-term non-progressors and progressors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Arch. Virol.* 145:1021-1027, 2000.
 6. Taguchi, H., Yamada, T., Takahashi, T., Gotoh, M., Nakamura, T., and Iwamoto, A. Seroprevalence of parvovirus B19 among HIV-1-positives in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 53:21, 2000.
 7. Wu, X., Okada, N., Goto, M., Iwamoto, A., and Okada, H. The IgM antibody level against ganglioside GM2 correlates to the disease status of HIV-1-infected patients. *Microbiol. Immunol.* 44:405-410, 2000.
 8. Nakayama, E.E., Wasi, C., Ajisawa, A., Iwamoto, A., and Shioda, T. A new polymorphism in the promoter region of the human interleukin-16 (IL-16) gene. *Genes and Immunity* 1: 293-294, 2000.
 9. Nakayama, E.E., Hoshino, Y., Xin, X., Liu, H., Goto, M., Watanabe, N., Taguchi, H., Hitani, A., Kawana-Tachikawa, A., Fukushima, M., Yamada, K., Sugiura, W., Oka, S., Sato, H., Takebe, Ajisawa, A., Y., Nakamura, T., Nagai, Y., Iwamoto, A., and Shioda, T. Polymorphism in the IL-4 promoter affects acquisition of HIV-1 syncytium inducing (SI) phenotype. *J. Virol.* 74:5452-5459, 2000.
 10. Hosoya, N., Takahashi, T., Wada, M., Endo, T., Nakamura, T., Sakashita, H., Kimura, K., Ohnishi, K., Nakamura, Y., Mizuochi, T., and Iwamoto, A. Genotyping of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* isolates in Japan based on nucleotide sequence variations in internal transcribed spacer regions of rRNA genes. *Microbiol. Immunol.* 44:591-596, 2000.
 11. Yoshida, S., Yusa, N., Sato, N., Goto, M., and Iwamoto, A. Some problems found in HIV-1 RNA quantification. *J. Clin. Pathol.* 53:645-646, 2000.
 12. Aoki, Y., Yarchoan R., Braun, J., Iwamoto, A., and Tosato, G. Viral and cellular cytokines in AIDS-related malignant lymphomatous effusion. *Blood* 96:1599-1601, 2000.
 13. Miyashita, N., Niki, Y., Iwamoto, A., Yasuoka, A., Oka, S., Kawata, K., Ito, A., Tomono, K., Kohno, S., and Matsushima, T. Seroprevalence of antibodies to Chlamydia spp. In human immunodeficiency virus-infected subjects in Japan. *Microbiol. Immunol.* 44:781-785, 2000.
 14. Watanabe, T., Nakamura, K.,

- Wakugawa, M., Kato, A., Nagai, Y., Shioda, T., Iwamoto, A., and Tamaki, K. Antibodies to Molluscum contagiosum virus in the general population and susceptible patients. *Arch. Dermatol.* 136:1518-1522, 2000.
15. Takahashi, T., Hosoya, N., Endo, T., Nakamura, T., Sakashita, H., Kimura, K., Ohnishi, K., Nakamura, Y., and Iwamoto, A. Relationship between mutations in dihydropteroate synthase of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* isolates in Japan and resistance to sulfonamide therapy. *J. Clin. Microbiol.* 38:3161-3164, 2000.
 16. Takahashi, T., Nakamura, Y., and Iwamoto, A. Desensitization to fluconazole in an AIDS patient. *Annals Pharmacotherapy.* In press.
 17. Koibuchi, T., Hitani, A., Nakamura, T., Nojiri, N., Nakajima, K., Jyuji, T., and Iwamoto, A. Predominance of genotype A HBV in HBV-HIV-1 dually positive population as compared to HIV-1-negative counterpart in Japan. *J. Med. Virol.* In press.
 18. Shioda, T., Nakayama, E.E., Tanaka, Y., Xin, X., Liu, H., Kawana-Tachikawa, A., Kato, A., Sakai, Y., Nagai, Y., and Iwamoto, A. A naturally occurring deletional mutation in the C-terminal cytoplasmic tail of CCR5 affects surface trafficking of CC5. *J. Virol.* In press.
 19. Ikegawa, M., Yuan, J., Matsumoto, K., Herrmann, S., Iwamoto, A., Nakamura, A., Matsushita, S., Kimura, T., Honjo, T., and Tashiro, K. Elevated SDF-1 protein levels in HIV-1 infected individuals. *AIDS Research and Human Retroviruses.* In press.
 20. Watanabe, N., Tomizawa, M., Tachikawa-Kawana, A., Goto, M., Ajisawa, A., Nakamura, T., and Iwamoto, A. Quantitative and qualitative abnormalities in HIV-1-specific T cells. *AIDS.* In Press.
2. 学会発表
1. Liu, H., Chao, D., Nakayama, E.E., Taguchi, H., Goto, M., Xin, X., Takebe, Y., Wasi, C., Ma, J., Liang, W., Theodorou, I., Magierowska, M., Krishnamoorthy, R., Chaventre, A., French ALT and Immunoco study groups, Debre, P., Nakamura, T., Nagai, Y., Iwamoto, A., and Shioda, T. Polymorphism in RANTES chemokine promoter affects HIV-1 disease progression in Japanese and distributes differently in Asians, Africans and Caucasians. 7th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. San Francisco, California, U.S.A. January 30 – February 2, 2000.
 2. Watanabe, N., Tomizawa, M., Tachikawa-Kawana, A., Goto, M., Ajisawa, A., Nakamura, T., and Iwamoto, A. Qualitative and quantitative abnormalities in HIV-1-specific T cells. Keystone Symposia on New biological approaches to HIV-1 infection based on new insights into HIV biology. Keystone, Colorado, U.S.A. April 4-10, 2000.
 3. Shioda, T., Nakayama, E.E., Tanaka, Y., Xin, X., Liu, H., Kawana-Tachikawa, A., Kato, A., Sakai, Y., Nagai, Y., and Iwamoto, A.

- A Naturally occurring deletional mutation in the C-terminal cytoplasmic tail of CCR5 affects intracellular transport of CCR5. 2000 International Meeting of the Institute of Human Virology. Baltimore, Maryland, U.S.A. September 10-15, 2000.
4. Koibuchi, T., Nakamura, T., Nojiri, N., Nakajima, K., Juji, T., and Iwamoto, A. Shifting in genotype trends of hepatitis B virus in Japan. IDSA2000. New Orleans, LA, U.S.A. September 7-10, 2000.
 5. Liu, H., Nakayama, E.E., Xin, X, Kawana-Tachikawa, A., Goto, M., Taguchi, H., Yamada, T., Takebe, Y., Nakamura, T., Nagai, Y., Iwamoto, A., and Shioda, T. Psequence variation in an 8.1-kb region of the human CCR5 gene. 8th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Chicago, Illinois, U.S.A. February 4-8, 2001.
- H. 知的所有権の出願、登録状況
1. 特許取得 なし
 2. 実用新案登録 なし
 3. その他 なし

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

分担研究報告書

HIV 感染症の病態とヒトゲノム多型性に関する研究

分担研究者 塩田 達雄（大阪大学微生物病研究所教授）

要旨

HIV 感染症の病態進行は感染者ごとに大きく異なる。病態進行の違いを決定する宿主側の因子を明らかにすることを目的として HIV 感染者ならびに非感染者の IL4 および CCR5 遺伝子を解析し、以下の知見を得た。(A) IL4 は HIV-1 のコレセプター CCR5 の発現を低下させる。IL4 プロモーター内-589 位の C から T への多型は IL4 プロモーター活性を上昇させることが報告されている。この IL4-589T の AIDS 病態進行に及ぼす影響を検討する目的で、フランス SEROCO Cohort の感染時期の特定できる HIV-1 感染者 427 名の IL4 プロモーター領域を解析した。その結果 IL4-589T を持つ HIV-1 感染者では AIDS 発症が遅延することが明らかになった。(B) CCR5 893(-) はアジア人種特異的に見いだされる CCR5 のコーディング領域内の多型で、フレームシフトにより C 末端細胞質内領域の 51 アミノ酸の全てを欠く。CCR5 893(-) の HIV-1 感染に及ぼす影響を検討する目的で、CCR5 ならびに CCR5 893(-) を発現するセンダイウイルスを作製した。その結果、CCR5 893(-) は ER から先への細胞表面への輸送が効率良く進行せずに野生型 CCR5 の発現も阻害すること、ならびに CCR5 893(-) を一本の染色体に持つドナーの CD4 陽性細胞上の CCR5 の発現は他のドナーと比較して著しく低下すること、が明らかになった。

A. 研究目的

HIV 感染症の病態進行は感染者ごとに大きく異なる。病態進行の違いを決定する宿主側の因子を明らかにすることを目的とする。このような因子が明らかにできれば、各 HIV-1 感染者の予後予測に役立つだけでなく、その因子を標的とした新しい HIV-1 制御の戦略を提示できると考えている。本年度は以下の 2 点を具体的な研究目的とした。(A) IL4 は Th2 型の代表的なサイトカインで、HIV 感染症においては、HIV の主要なコレセプター CCR5 の発現を低下させる一方で、もう一つの主要なコレセプター CXCR4 の発現を増強し、また HIV の LTR からの転写を促進する。従って、IL4 は HIV 感染者体内で、R5 型 HIV の増殖を阻害する一方で、X4 型 HIV の増殖を促進する、と考え

られる。また、IL4 のプロモーター内には、翻訳

開始点から上流に数えて 589 番目の位置に C から T への点変異の多型が存在することが知られており、この多型 IL4 -589T は、IL4 プロモーター活性を上昇させ、血中 IgE の上昇と関連することが報告されている。本研究は、IL4-589T の AIDS 病態進行に及ぼす影響を検討することを目的とした。(B) CCR5 の coding 領域の 893 番目の塩基 C を欠く CCR5 893(-) はフレームシフトにより、C 末端細胞内領域の 51 アミノ酸すべてを欠き、日本人および中国人に特異的に認められる。本研究は CCR5-893(-) の HIV-1 感染に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

(A) フランス SEROCO Cohort は、パリおよびその近郊の 17 の病院が把握する HIV-1 感染者 1516 名からなる。そのうち感染時期が特定でき、かつ臨床経過が詳細に記載されていた 427 名について、末梢血リンパ球由来の DNA から IL-4 プロモーター部分を PCR 法で増幅し、制限酵素 *Ava*II で切断したパターンを比較して各検体の遺伝子型を判定した。AIDS 発症の診断は 1993 年に制定された AIDS 発症診断基準に従った。また、治療による攪乱を最小限にするため、プロテアーゼ阻害剤がフランスにおいて使用されるようになった 1996 年以前のデータのみを使用した。

(B) CCR5 893(-) を持つ CCR5 と野生型 CCR5 とを常法に従ってセンダイウイルスベクターならびにワクチニアウイルスベクターを用いて発現させ、ベータガラクトシダーゼの発現を指標として細胞融合を定量してマクロファージ指向性 HIV-1 のコレセプター活性を比較した。野生型ならびに変異 CCR5 の細胞内局在は共焦点レーザー顕微鏡で観察した。HIV-1 非感染者の CD4 陽性細胞上の CCR5 の発現は CCR5 に対する単クローン抗体を用いたフローサイトメトリー法により解析した。

(倫理面への配慮)

HIV-1 感染者ならびに非感染者の検体を使用するにあたって、検体の提供者には遺伝子解析を行うことを含めて十分に説明を行い、書面による同意を得られた場合のみを解析の対象とし、検体は匿名化して個人情報が特定できないようにして扱った。

C. 研究結果

(A) フランス SEROCO Cohort の感染時期の特定された HIV-1 感染者 427 名ならびに HIV-1 非

感染者 86 名の IL4 プロモーター領域を PCR-RFLP 法で解析した。その結果、フランスにおける IL4-589T の頻度は HIV-1 感染者、非感染者とも約 15% で日本人より少ないことが明らかになった。Kaplan-Meyer 分析を行うと、IL4-589T を片側あるいは両側の染色体に持つ HIV-1 感染者 112 名では、IL4-589T を持たない感染者と比べて有意に AIDS 発症が遅延することが明らかになった。解析した 427 名の HIV-1 感染者のうち 70 名が同様に病態進行の遅延と強く相関する CCR5 の 32 塩基欠損を片側の染色体に有していたが、IL4-589T の AIDS 発症遅延効果は、CCR5 の 32 塩基欠損の影響を補正しても有意に認められた。

(B) CCR5-893(-) の HIV-1 感染に及ぼす影響を検討する目的で、この変異を持つ CCR5 と野生型 CCR5 とをセンダイウイルスベクターならびにワクチニアウイルスベクターを用いて発現させ、R5 型 HIV-1 のコレセプター活性を比較した。その結果、どちらのウイルスベクターで発現させた場合でも CCR5-893(-) の発現細胞ではマクロファージ指向性 HIV-1 による細胞融合活性が野生型 CCR5 の発現細胞と比べ約 10 分の 1 に低下していた。CCR5 の発現量を検討したところ、CCR5-893(-) の発現細胞では mRNA 量、細胞質内の CCR5 量ともに野生型の CCR5 と同程度に検出されたが、その分布はカルネキシン陽性の小胞体に遍在し、細胞表面への発現は野生型の 10 分の 1 程度に低下していた。HIV-1 非感染者の末梢血 CD4 陽性細胞を分離し、細胞表面の CCR5 量を比較したところ、CCR5-893(-) を片側の染色体にもつ個体では、活性化 CD4 細胞のマーカーである HLA のクラ

ス II DR 抗原陽性細胞においても陰性細胞においても CCR5 量が少ないこと、HIV-1 を感染させても CCR5-893(-) のリンパ球では R5 型 HIV-1 の増殖も低いことが明らかになった。さらに CCR5-893(-) を持つ CCR5 と野生型の CCR5 とを同時に発現させたところ、CCR5-893(-) を持つ CCR5 は野生型の CCR5 の細胞表面への発現を阻害することが、明らかになった。

D. 考察

(A) 前述のとおり IL4 は CCR5 の発現を低下させことによって R5 型 HIV-1 の増殖を抑制する。このことから IL4 のプロモーター活性を上昇させる多型 IL4-589T が、AIDS 病態進行の遅延と相関するもの、と考えられる。しかし、IL4 は R5 型 HIV-1 の増殖を抑制するものの、一方で X4 型 HIV-1 の増殖をむしろ促進する。IL4-589T が病態進行の促進ではなく遅延と相関したことから、X4 型 HIV-1 の病態進行における役割は R5 型 HIV-1 よりも小さい可能性が考えられる。今後は IL4 の遺伝子型、病態進行と併せて、感染者体内の HIV-1 のコレセプター使用域の経時変化を加えた 3 者の関係を解析する必要がある。

(B) CCR5 893(-) は粗面小胞体から先への細胞表面への輸送が効率良く進行せずに野生型 CCR5 の発現も阻害すること、CCR5 893(-) を一本の染色体に持つ HIV-1 非感染者の CD4 陽性細胞上の CCR5 の発現は他の HIV-1 非感染者と比較して著しく低下しており、R5 型 HIV-1 の増殖も低下すること、が明らかになった。以上の結果から CCR5-893(-) は、欧米人特異的に見られる CCR5 デルタ 32 と同様に、この多型

を両方の染色体に持つ個体では HIV-1 感染に抵抗性を示し、片側に持つ個体でも病態進行が遅延する可能性が考えられる。

E. 結論

IL4 プロモーター活性を上昇させる 1 塩基の多型 IL4-589T は、フランス SEROCO Cohort において AIDS 発症の遅延と相関していた。また、CCR5 893(-) は粗面小胞体から先への細胞表面への輸送が効率良く進行せずに野生型 CCR5 の発現も阻害すること、CCR5 893(-) を一本の染色体に持つ HIV-1 非感染者の CD4 陽性細胞上の CCR5 の発現は他の HIV-1 非感染者と比較して著しく低下しており、R5 型 HIV-1 の増殖も低下すること、が明らかになった。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

① A new polymorphism in promoter region of human interleukin 16 gene. Emi E. Nakayama, Chantapong Wasi, Atsushi Ajisawa, Aikichi Iwamoto, and Tatsuo Shioda. *Genes and Immunity*. 1, 293-294, 2000.

② Polymorphism in IL-4 promoter affects acquisition of human immunodeficiency virus type 1 syncytium inducing phenotype. Emi E. Nakayama, Yoshihiko Hoshino, Xiaomi Xin, Huanliang Liu, Mieko Goto, Nobukazu Watanabe, Hitomi Taguchi, Akihiro Hitani,

Ai Kawana-Tachikawa, Masao Fukushima, Kaneo Yamada, Wataru Sugiura, Shin-ichi Oka, Atsushi Ajisawa, Hironori Sato, Yutaka Takebe, Tetsuya Nakamura, Yoshiyuki Nagai, Aikichi Iwamoto, and Tatsuo Shioda. *J. Virol.* 74, 5452-5459, 2000.

③ Crystal structure of recombinant native SDF-1 α with additional mutagenesis studies. An attempt for more comprehensive interpretation of accumulated structure-activity relationship data. Yukano Ohnishi, Toshiya Senda, Narayanasamy Nandhagopal, Keisuke Sugimoto, Tatsuo Shioda, Yoshiyuki Nagai, and Yukio Mitsui. *J. Interferon and Cytokine Research.* 20, 691-700, 2000.

④ Antibodies to molluscum contagiosum virus in the general population and susceptible patients. Taakahiro Watanabe, Koichiro Nakamura, Motoshi Wakunaga, Atushi Kato, Yoshuyuki Nagai, Tatsuo Shioda, Aikichi Iwamoto, and Kunihiro Tamaki. *Archives of Dermatology*, 136, 1518-1522, 2000.

⑤ Duplication of the primary encapsidation and dimer linkage region of HIV-1 RNA results in the appearance of monomeric RNA in virions. Jun-ichi Sakuragi, Tatsuo Shioda and Antonito T. Panganiban. *J. Virol.* In press.

⑥ Naturally occurring deletional mutation in the C-terminal cytoplasmic tail of CCR5 affects surface trafficking of CCR5. Tatsuo Shioda, Emi E. Nakayama, Yuetsu Tanaka, Xiaomi Xin, Huanliang Liu, Ai Kawana-Tachikawa, Atsushi Kato, Yuko Sakai, Yoshiyuki Nagai, and Aikichi Iwamoto. *J. Virol.* In press.

⑦ Solid-phase synthesis of peptides having difficult sequences: Synthesis of peptides related to the HIV-V3 region for immunological studies. Kiyoshi Nokihara, Saya Shimizu, Ruediger Pipkorn, Tadashi Yasuhara, and Tatsuo Shioda. *Peptide Science.* In press.

⑧ A quintuple deglycosylation mutant of SIVmac239 in rhesus macaques. Robust primary replication, tightly contained chronic infection and elicitation of potent immunity against the parental wild type strain. Kazuyasu Mari, Yasuhiro Yasutomi, Shinji Ohgimoto, Tadashi Nakasone, Shiki Takamura, Tatsuo Shioda, and Yoshiyuki Nagai. *J. Virol.* In press.

2. 学会発表

① HIV-1 粒子内 RNA の取り込み及び二量体化に関する解析。櫻木淳一、岩本愛吉、塩田達雄。第 48 回日本ウイルス学会学術集会(津)。13amA01。

② HIV 核酸蛋白質複合体の解析と分離の試み。
櫻木淳一、塩田達雄。第 23 回日本分子生物学
会年会（神戸）。3PA-109。

③ CCR5 遺伝子多型の解析。劉 煥亮、中山
英美、辛 小蜜、立川 愛、後藤美江子、田
口仁美、山田武司、武部豊、中村哲也、永井
美之、岩本愛吉、塩田達雄。第 14 回日本エ
イズ学会学術集会（京都）。W5-1a。

④ Naturally occurring deletional
mutation in the C-terminal cytoplasmic
tail of CCR5 affects surface trafficking of
CCR5. Tatsuo Shioda, Emi E. Nakayama,
Yuetsu Tanaka, Xiaomi Xin, Huanliang Liu,
Ai Kawana-Tachikawa, Atsushi Kato, Yuko
Sakai, Yoshiyuki Nagai, and Aikichi

Iwamoto. 2000 International Meeting of the
Institute of Human Virology (Baltimore,
USA). 61.

⑤ Sequence Variation in an 8.1-kb Region
of the Human CCR5 Gene. H. Liu, E. E.
Nakayama, X. Xin, A. Kawana-Tachikawa, M.
Goto, H. Taguchi, T. Yamada, Y. Takebe, T.
Nakamura, Y. Nagai, A. Iwamoto, and T.
Shioda 8 th International Conference on
Retrovirues and Opportunistic Infections
(Chicago, USA). 45.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得
該当なし。
2. 実用新案登録
該当なし。

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

分担研究報告書

ヒトゲノム多型性を中心とした長期未発症者の研究

分担研究者 照沼 裕 山梨医科大学微生物学講座・講師

研究要旨

日本の HIV-1 感染血友病患者の中には 16 年以上未治療で無症状という長期未発症者が 59 名確認されている。これは確認されている日本の HIV-1 感染血友病患者の約 4 % にあたる。しかし、この長期未発症がどのような要因によるのかは解明されていない。我々はこの長期未発症者群と HIV 感染発症群・HIV 非感染血友病群・HIV 非感染非血友病健康群の間で、DNA microarray を使った mRNA の発現とヒトゲノム多型性の関連や HIV-1 の分離とその性状などを比較することで、長期未発症を誘導するために重要な因子（宿主側の因子やウイルス側の因子など）を明らかにすることを目的とし、研究を開始している。

A. 研究目的

日本の HIV-1 感染血友病患者の中には 16 年以上未治療で無症状という長期未発症者が 59 名確認されている。これは日本の HIV-1 感染血友病患者の約 4 % にあたる。しかし、この長期未発症がどのような要因によるのかは解明されていない。この研究では、これらの長期未発症者を HIV 感染発症群・HIV 非感染血友病群・HIV 非感染非血友病健康群などと比較することで、長期未発症を誘導するために重要な因子（宿主側の因子やウイルス側の因子など）を明らかにすることを目的としている。

B. 研究方法

未知の宿主発症遅延因子の検索とそのヒトゲノム多型性の検討：未知の宿主の発症遅延因子を検討するために、末梢血単核球を分離

培養し、mRNA を抽出して、発現している遺伝子を DNA microarray で検討する。さらに、絞り込まれた遺伝子について mRNA の発現を質的・量的に検討し、その遺伝子発現の調節領域について DNA の遺伝子解析を行い、発症遅延に関わる未知の宿主因子とそのヒトゲノム多型性について検討する。

既知の宿主発症遅延関連ゲノム多型性の長期未発症者での頻度：これまでに宿主の発症遅延に関わる遺伝子として報告されている CCR5 のプロモーター領域の点変異と翻訳領域の $\Delta 32$ 、CCD2 の 64I、SDF-1 の 3' A、RANTES -28G、IL-4 -589T、CX3 CR1、マンノース結合タンパク質などのゲノム多型について、日本の長期未発症者での頻度を検討する。

長期未発症者からの HIV-1 の臨床分離株の樹立とその性状の解析：これまでの我々の研

究では長期未発症者の多くが3桁台の血漿 HIV-1 RNA のコピー数を示している。これらの長期未発症者から HIV-1 を培養分離し、その性状に特徴がないかを解析する。

Mitogen や HIV-1 臨床分離株による末梢血の免疫応答性の検討：これまで我々は長期未発症者の多くが mitogen 刺激により高い IL-12 および IFN- γ 産生能を有していることを報告してきた。今回はさらに、PHA や HIV 抗原による CD4 陽性 T 細胞や CD8 陽性 T 細胞での IFN- γ 産生細胞の割合をフローサイトメーターにて測定し、ゲノム多型性との関連を検討する。

(倫理面への配慮)

ミレニアム・プロジェクトに対して厚生省より出された「遺伝子解析研究に付随する倫理問題等に対応するための指針」に準じ、指針の基準を満たすように改編された倫理審査委員会に指針を満たす研究計画を提出し審査を受け、学長より研究計画の承認を受けた。

C. 研究結果

上記のような手続きで研究計画の承認を受けた後、昨年度までの調査で把握されていた長期未発症者 59 例の主治医にこれまでの経過を連絡し、院内での倫理委員会での承認・所属施設長からの研究協力許可書・主治医の研究協力承諾書・検体提供者のインフォームド・コンセントなどが必要なことを連絡し、研究への協力を岩本愛吉先生（東大医科研）、三間屋純一先生（静岡県立こども病院）と照沼の連名で書面にてお願いした。現在、お願いした 21 施設中 16 施設（76%）から試料の

提供可能、3 施設（14%）から提供不可能との回答を得た。2 施設（10%）からは未回答である。提供可能な施設で長期未発症者 50 症例（85%）をフォローしており、今後、各施設で試料の提供について患者の意志確認が行われる。

未知の宿主発症遅延因子の検索とそのヒトゲノム多型性の検討：現在、東大医科研の渡辺慎哉先生と共同で、患者の負担を減らすために、2-3 ml の少量の血液から T リンパ球を増やし、mRNA を抽出し、DNA microarray で mRNA の発現パターンを解析する手法を検討中である。

既知の宿主発症遅延関連ゲノム多型性の長期未発症者での頻度：HIV の発症に関わる既知のゲノム多型について、日本の長期未発症者での頻度を検討している。

長期未発症者からの HIV-1 の臨床分離株の樹立とその性状の解析：まず、簡便で分離率の良い HIV-1 の分離方法を検討するため、HAART 治療中の患者末梢血単核球を PHA にて直接刺激して培養し、その上清中に産生されるウイルスを p24 抗原により検出した。検討した 15 人からの延べ 18 検体を用いての HIV-1 の分離率は 50% で、分離成功例ではウイルス量が高い傾向が認められた (Mann-Whitney の U 検定： $p = 0.15$)。しかし、血漿 HIV-1 RNA 量が 220, 440, 680 copies/ml と少ない場合や CD4 数が 8, 11, 80 cells/ μ l と少ない場合でも分離可能である例も認められた。現在、MAGIC-5 細胞や CD8 陽性細胞を除去した CD4 陽性末梢血単核球などを用いてのウイルス分離率も検討中である。

Mitogen や HIV-1 臨床分離株による末梢血の免疫応答性の検討：現在、IFN- γ 産生細胞の割合をフローサイトメーターにて測定している。

D. 考察

この研究は感染時期や人種が均一な 16 年以上未治療で無症候という貴重な検体を対象としており、方法もこれまでに試されていない方法を試みる。従って、この研究から未知の発症遅延因子を解明することでエイズの発症を阻止する新たな治療法や検査法の開発につながることを期待される。

また、個人情報の保護に十分に配慮しながら研究を継続している。

E. 結論

長期未発症者をその対照群と比較検討することで、長期未発症を誘導するために重要な因子（宿主側の因子やウイルス側の因子など）を明らかにすることを目的とし、研究を開始している。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) He, L., Terunuma, H., Tanabe, F., Hanabusa, H., Iwamoto, A., Oka, S., Chiba, N., Kurimoto, M., Ikeda, M., Okamura, H., Ito, M.: IL-18 and IL-1 β productions are decreased in HIV-1-seropositive haemophiliacs but not in HIV-1-seropositive non-haemophiliacs. *AIDS Research and Human Retroviruses* 16:

345-353, 2000.

2) Handema, R., Terunuma, H., Kasolo, F., Kasai, H., Sichone, M., Mulundu, G., Deng, X., Ichiyama, K., Mitarai, S., Honda, M., Yamamoto, N., Ito, M.: Emergence of new HIV-1 subtypes other than subtype C among antenatal women in Lusaka, Zambia. *AIDS Research and Human Retroviruses* (in press)

3) Owada, T., Motomura, T., Miyashita-Ogawa, Y., Kawada-Homma, M., Onishi, M., Matondo, P., Terunuma, H., Numazaki, Y., Yamashita, S., Yamamoto, N.: Antibody masking renders HIV-1 resistant to the cationic membrane filtration through alteration of its electrostatic character. *J. Virological Methods* (in press)

4) Deng, X., Terunuma, H., Handema, R., Sakamoto, M., Kitamura, T., Ito, M., Akahane, Y.: Higher prevalence and viral load of TT virus in saliva than in the corresponding serum: another possible transmission route and replication site of TT virus. *J. Medical Virology* 62: 531-537, 2000.

5) Dai, J.H., Iwatani, Y., Ishida, T., Terunuma, H., Kasai, H., Iwakura, Y., Fujiwara, H., Ito, M.: Glycyrrhizin enhances IL-12 production in peritoneal macrophages. *Immunology* (in press)

6) 三間屋純一, 立浪忍, 瀧正志, 山元泰之, 花房秀次, 藤村吉博, 照沼裕, 加藤真吾, 吉田孝人: 本邦における HIV 感染長期未発症者

の実態. 日本エイズ学会誌 2: 89-95, 2000.

2. 学会発表

1) Terunuma, H., Matondo, P., Kimura, K. et al.: A prospective study of Glycyrrhizin administration in asymptomatic patients infected with HIV-1 in Lusaka, Zambia. XIII International AIDS Conference, July 2000, Durban.

2) Bhat, G., Ahmed, Y., Terunuma, H. et al.: Evaluation of tuberculosis score charts as a diagnostic tool in children with high prevalence of HIV infection. XIII International AIDS Conference, July 2000, Durban.

3) Mimaya, J., Tatsunami, S., Taki, M. et al.: Condition of HIV-infected long term non-progressors in Japan. XIII International AIDS Conference, July 2000, Durban.

4) 照沼裕, Xuewen Deng, Ray Handema 他: HIV-1 長期未発症者での宿主因子の検討 -特にケモカインレセプターの遺伝子多型を中心として. 第 14 回日本エイズ学会学術集会, 2000 年 11 月, 京都。

5) 立浪忍, 三間屋純一, 滝正志 他: 発症予防治療班 1999 年度調査における LTNP の検索とその retrospective analysis. 第 14 回日本エイズ学会学術集会, 2000 年 11 月, 京都。

6) 照沼裕, 木村一史, 御手洗聡 他: ザンビアでの HIV-1 感染無症候者における Glycyrrhizin の経口投与での効果の検討. 第 14 回日本エイズ学会学術集会, 2000 年 11 月,

京都。

7) Xuewen Deng, 照沼裕, 葛西宏威 他: ザンビアでの HIV 感染者と非感染者における TT ウイルス (N22) の検出率の検討率の検討. 第 14 回日本エイズ学会学術集会, 2000 年 11 月, 京都。