

20010737

厚生科学研究費補助金
エイズ対策研究事業

HIV 感染予防に関する研究

平成 13 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 竹森 利忠

平成 14 年 3 月

平成13年度厚生科学研究費補助金(エイズ対策研究事業)
「HIV感染予防に関する研究」班 報告書目次

I.	平成13年度研究組織	1
II.	総括研究報告	2-18
	HIV感染予防に関する研究		
	主任研究者： 竹森 利忠 (感染研・免疫部)		
III.	分担研究報告		
1.	免疫不全発症阻止に関する研究	19-27
	竹森 利忠 (感染研・免疫部)		
	大竹かおり (感染研・免疫部)		
2.	SIV感染と宿主応答における糖鎖の意義に関する研究	28-33
	森 一泰 (感染研・エイズ研究センター)		
	杉本 智恵 (感染研・エイズ研究センター)		
3.	エイズDNAワクチン及び併用ワクチン/マカクサルエイズモデル における検討	34-37
	俣野 哲郎 (感染研・エイズ研究センター)		
4.	SHIVを用いた弱毒生ワクチンに関する研究 ～HIV-1 Envの糖鎖 欠損による弱毒化と効果的な抗体誘導の試み～	38-44
	速水 正憲 (京大ウイルス研・エイズ研究施設)		
5.	新規ワクチンの手法に関する研究	45-47
	狩野 宗英 (感染研・エイズ研究センター)		
6.	HIVに対する新世代DNAワクチンに関する研究	48-51
	奥田 研爾 (横浜市大医・細菌学)		
7.	酵母VLP出芽系の応用と麻疹ウィルスベクターを用いたワクチ ンへの試み	52-56
	森川 裕子 (北里大北里生命科学研)		
	横田 恭子 (国立感染研・免疫部)		
	中山 哲夫 (北里大北里生命科学研)		
8.	ウィルス様中空粒子(VLP)を用いたHIV経口ワクチンの開発に関 する研究	57-61
	保富 康宏 (三重大医・生体防御医学)		
9.	HIV-1特異的CD8 T細胞によるHIV-1感染細胞の認識	62-68
	滝口 雅史 (熊本大医・エイズ研究センター)		
10.	ケモカインレセプターを介したHIV感染予防に関する研究	69-76
	杉村 和久 (鹿児島大工・生体工学)		
	伊東 祐二 (鹿児島大工・生体工学)		
	橋口 周平 (鹿児島大工・生体工学)		
	中島 敏博 (財・化学及血清療法研究所)		

11.	細胞性免疫誘導型エイズワクチンに関する研究 水落 次男 (東海大工・生命科学) 小島 直也 (東海大工・生命科学) 中田 宗宏 (東海大工・生命科学)	77-84
12.	HIV脳炎の発症病理に関する研究 佐多徹太郎 (感染研・感染病理部) 中島 典子 (感染研・感染病理部) 佐藤 由子 (感染研・感染病理部)	85-87
13.	サルエイズ脳炎発症モデルに関する研究 向井鎌三郎 (感染研・筑波霊長類センター) 佐多徹太郎 (感染研・感染病理部) 小松原博文 (感染研・筑波霊長類センター) 菊池 俊彦 (感染研・筑波霊長類センター)	88-101
14.	HIV-1持続感染成立機序と阻止に関する研究 神奈木真理 (東京医科歯科大院・免疫治療学)	102-105
15.	エイズ日和見感染発症阻止のための免疫学的・細菌学的研究 牧野 正彦 (感染研・ハンセン病研究センター)	106-108
16.	SHIV病原性に関する研究 阪井 弘治 (感染研・エイズ研究センター)	109-113
17.	HIV感染実験モデルの作製 吉木 敬 (北大医院・病態分子病理)	114-115
18.	レトロウイルスgag抗原上の感染防御エピトープとウイルス感染 初期過程を制御する宿主遺伝子に関する研究 宮澤 正顕 (近畿大医・免疫学) 河原(辻)佐智代 (近畿大医・免疫学) 金成 安慶 (近畿大医・免疫学) 菅原 大輔 (近畿大医・免疫学)	116-122
19.	HIVに対するペプチドワクチン作製のための基礎研究 小笠原一誠 (滋賀大医・病理学)	123-125
20.	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(II) 高橋 秀実 (日本医大・微生物免疫学) 高橋めぐみ (日本医大・微生物免疫学) 中川 洋子 (日本医大・微生物免疫学)		126-131
21.	抗原提示とT細胞活性化に関する研究 笠井 道之 (感染研・細菌血液製剤部)	132-144
IV.	研究成果の刊行に関する一覧表	145-158

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）HIV 感染予防に関する研究班

平成 13 年度研究組織

- 主任研究者： 竹森 利忠（国立感染症研究所・免疫部・部長）
- 分担研究者： 森 一泰（国立感染症研究所・エイズ研究センター・主任研究員）
- 俣野 哲朗（東大院医・微生物学講座・助教授）
- 速水 正憲（京大ウイルス研・エイズ研究施設・感染病態研究領域・教授）
- 狩野 宗英（国立感染症研究所・エイズ研究センター・研究員）
- 奥田 研爾（横浜市大医・細菌学教室・教授）
- 森川 裕子（北里大生命科学研・ウイルス感染制御Ⅱ・教授）
- 保富 康宏（三重大医・生体防御医学講座・助教授）
- 滝口 雅文（熊本大医・エイズ研究センター・ウイルス制御分野・教授）
- 杉村 和久（鹿児島大工・生体工学科・教授）
- 水落 次男（東海大工・生命科学科・教授）
- 佐多徹太郎（国立感染症研究所・感染病理部・部長）
- 向井鎌三郎（国立感染症研究所・筑波霊長類センター・室長）
- 神奈木真理（東京医科歯科大院・免疫治療学分野・教授）
- 牧野 正彦（国立感染症研究所・ハンセン病研究センター・部長）
- 阪井 弘治（国立感染症研究所・エイズ研究センター・研究員）
- 吉木 敬（北大院医・病態分子病理・教授）
- 宮澤 正顯（近畿大医・免疫学教室・教授）
- 小笠原一誠（滋賀大医・病理学教室・教授）
- 高橋 秀実（日本医大・微生物免疫学教室・教授）
- 笠井 道之（国立感染症研究所・細菌血液製剤部・主任研究官）

HIV 感染予防に関する研究

主任研究者 竹森 利忠 国立感染症研究所・免疫部長

研究要旨

本研究班は HIV 感染予防に関する手段を確立すること、HIV 感染に伴う主要病因を明らかにし、その予防に有用となる手段を確率する事を目的として、研究を行った。平成 13 年度には以下の進展があった。

1. 感染予防に関する手段の構築

(1) 感染マカクサルエイズモデルにおいて優れた感染・AIDS 発症阻止効果を示す SHIV の env, nef を欠損させたプロウィルス DNA と SIVgag 発現センダイウィルスベクター (sev) を併用したワクチンシステムにおける防御メカニズムが明らかにされた。更にこのシステムの安全性を高めるために、プロウィルス DNA から一般のプロモーター (CMV) 制御による DNA ワクチンへ構築を変え、接種回数をそれぞれ 1 回に減少しても十分な効果が発揮されることが示唆された。またこのシステムで HIV-1 Tat 発現 sev の効果を検討したが、その感染防御能は sev-gag と比較して劣ることが示唆された。

(2) Env gp120 の 5 個のアスパラギン結合型糖鎖を欠損した SIVmac(delta 5G) は親株と同等の感染性を有するが、感染後ウィルス産生は急激に減少し潜伏感染の状態に維持される。delta 5G 感染サルへ感染した親株のウィルスは速やかに排除される。この防御反応は Env に対する中和活性抗体非依存的で複数の抗原に対する CTL に依存する可能性が示唆された。同様に Env 領域の糖鎖を欠損した SHIV は感染性が著明に低下するが、感染により産生される中和活性抗体の量は少なく、免疫反応賦活に大きく作用しないことが示唆された。

(3) HIV env DNA 封入 E 型肝炎ウィルス由来ウィルス空中立粒子 (VLP) が作製され、ネズミに経口投与した所、env 特異的な抗体と細胞傷害性 T 細胞の産生が惹起されることが明らかとなった。一方、酵母由来 gag-VLP は液性免疫反応を誘導するが細胞性免疫は低いことが示唆された。

(4) HIV DNA 多価ワクチンのモデルシステムが検討され、また HIV 侵入阻害抗体分子の検索が行われた。更にリポゾームのアジュバント活性や抗原提示細胞に必要な機能が検討された。また感染防御のためのペプチドワクチンのデザインが考察された。

2. HIV 感染に対する防御反応

(1) Nef 発現による HLA クラス I 抗原の発現減少が HIV-1 特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) のキラー活性を減少させるが、サイトカイン産生能は維持されることが明らかにされた。

(2) HIV 特異的 CTL がペプチド抗原提示 MHC クラス 1 との反応によりアポトーシスとなる可能性があること、CTL が持続感染細胞に対して MHC-1 拘束、非拘束性にウイルス抑制効果を示す可能性が推察された。

(3) ウイルス感染防御には CD4, CD8 陽性 T 細胞への複数のエピトープが必要であることが示され、中和抗体産生の速度と質を決定する宿主因子が存在する可能性が示唆された。

(4) その他抗酸菌日和見感染に対する DC 活性化の要因が細胞壁にあることが示唆され、抗原提示細胞によるペプチド提示のプロセスが解析された。

3. HIV 感染に伴う主要病因の解明

(1) HIV_{nef} 発現における免疫不全発症の要因を明らかにするための解析システムが作製された。

(2) 従来困難であった剖検組織において HIV mRNA 陽性細胞を検出することを可能にする技術を確立し、これを用いて小児剖検 40 例の解析から末期リンパ節における HIV mRNA 陽性細胞 T 細胞の表現型を明らかにした。

(3) サル脳炎易発症性の SIV の構造が解析され、また SIV-HIV キメラウイルスの病原性獲得が解析された。

(4) 病因解明に役立つ HIV 感染ラットの開発が継続された。

A. 研究目的

本研究は HIV 感染予防に関する手段を確立すること、また HIV 感染に伴う主要病因を明らかにし、その予防に有用となる手段を確立することを目的とする。またこれらの技術の改良、開発に必要となる情報、材料、技術の整備に有用となる基礎的研究をこなう。このため、(1) 感染防御に関する手段の構築、(2) HIV 感染に対する防御反応、(3) HIV 感染に伴う主要病因の解明についての研究を行った。

B. 研究方法

(1) ナイーブ対照群、DNA のみ接種群、SeV-Gag のみ接種群、DNA/SeV-Gag プライム・ブースト接種群のサルにおいて、SHIV 感染防御レベルと特異的 T リンパ球レベルとの相関を解析した。さらに、より安全な DNA ワクチンとして、一般的なプロモーターにより Env・Nef 以外の SHIV 抗原を発現する DNA を作成し、これを用いたプライム・ブ

ースト接種サルにおける特異的 T リンパ球レベルを測定した (俣野)。

(2) 我々の DNA+組換えセンダイウイルス (SeV) ベクターによる併用エイズワクチンシステムにおけるブーストに HIV-1 Tat を発現する組換え SeV (SeV-Tat) を用い、その防御免疫誘導能をマカクサルエイズモデルにより解析した。SeV-Tat ブースト群、DNA 単独接種群、および SeV-Gag ブースト群における細胞性免疫誘導効果および感染防御効果 (末梢血 CD4 数、血漿中 RNA 量) を比較した (狩野)。

(3) 糖鎖変異ウイルス D5G 感染ザルは D5G 感染を制御し、さらに SIV_{mac239} 感染に対する防御免疫を誘導していた。糖鎖変異により Env 蛋白の免疫原性が変化したことが原因のひとつである可能性が考えられたので、D5G Env 蛋白でサルを免疫し SIV_{mac239} に対する防御免疫を調べた。野生株 Env 蛋白

で免疫したサルは SIVmac239 に対して感染制御を示したが、D5G Env 蛋白免疫では有意な効果は見られなかった。この結果は糖鎖の欠失変異はウイルスの病原性を低下させる効果が大きいことを示唆した (森)。

(4) 7 種類の糖鎖欠損 SHIV 株を作製し、ヒト及びサル細胞での増殖能を調べ、SHIV 接種サル血清や単クローン抗体を用いて被中和能を解析した。また、サル感染実験を行い、血清ウイルス量と抗 HIV-1 抗体価の測定、SHIV に対する中和抗体価の決定を行った (速水)。

(5) HIVenv エピトープ組み込み E 型肝炎ウイルス (HEV) 様中空粒子 (rHIVenv-HEV/VLP) をマウスに経口投与し、液性免疫・細胞性免疫誘導について粘膜非粘膜における IgA/IgG 抗体産生能および CTL 活性を免疫学的方法で測定した (保富)。

(6) アクチンに点変異をもつ酵母細胞 (約 20 株) を用いて、HIV Gag 蛋白を発現させた。Gag 蛋白の細胞内局在は蛍光抗体染色により、Gag 蛋白の膜結合は membrane flotation 法により調べた。これらの Gag 発現酵母細胞の細胞壁を除去し、VLP の形成出芽を調べた。VLP 量は western blot で簡易定量した。さらに、野生型酵母細胞から出芽した VLP の免疫原性をマウスで検討した (森川)。

(7) HIV の clade A, B, C, E の感染防御抗原をコードする DNA 18 コをヒト型コドン化したヒト型化コドン多価ワクチンを構築した。このワクチンは従来のワクチンより免疫原性が強く、組み換え HIV ワクチニアウイルスのチャレンジにも強い抵抗性を示した。更に、多価ワクチンとしての効果も観察され、より実用的な HIV ワクチンとしての可能性

が示唆された。また、ワクチニアウイルスベクターワクチンも構築した (奥田)。

(8) M5-DPPE で被覆したリポソームの構成成分を迅速に同時定量できる手法を HPLC を用いて確立した。また、M5-DPPE を用いて作製した脂質フィルムから作製したリポソームを凍結乾燥し、この凍結乾燥粉末に BSA を含む PBS を加えることで抗原を封入した人工糖脂質被覆再水和リポソームを作製した。この再水和リポソームでマウスを免疫し、DTH 反応を指標としてリポソームの細胞性免疫誘導能を解析した (水落・小島)。

(9) ヒト一本鎖抗体ファージライブラリーを作製した。これを用いて、マグネットビーズと CCR5 陽性細胞を用いた細胞表面パンニング法、および CCR5 の細胞外第 2 ループの R168-C178 ペプチドを用いたプラスチックプレート法により、HIV-1 感染を阻害するヒト抗体ファージクローンの単離を試みた (杉村)。

(10) インフルエンザウイルス NP366-374 をリポソームに入れて、抗 CD40 抗体と共に MHC class I, class II ノックアウトマウスの鼻腔に投与した。その後、A/Aichi/2/68 を接種し、肺内でのインフルエンザウイルスの活性を MDCK 細胞を使用して測定した。また、B6 マウスの鼻腔にリポソーム封入 NP366-374 と分泌型 TGFb レセプターを同時に投与した後、感染実験を行った (小笠原)。

(11) NL-432、NL-432 の Nef 欠損株である NL-X h、NL-432 の Nef 蛋白の 1 アミノ酸を置換した NL-M20A の 3 種類のウイルスを、末梢血リンパ球から分離した CD4T 細胞に感染させ、フローサイトメトリーで p24 と HLA クラス I 抗原の発現を測定した。また、これ

らの感染細胞に対するCTLの細胞傷害活性及びサイトカイン産生能を測定し、解析した(滝口)。

(12) 試験管内 HIV-1 持続感染系の作成のため抗原特異的 CD4⁺T 細胞クローンを作成し、HIV-1 株への感染性を調べた。また、HIV-1 感染者 CD8⁺T 細胞の持続感染細胞に対する抑制効果が、Nef の MHC-I 発現抑制効果に影響されるかどうかを調べるため、Nef 温存あるいは欠損 HIV-1 株を持続感染させた PBMC を標的として解析した。ウイルス産生量は HIV-1p24-ELISA 法により定量した(神奈木)。

(13) HIV 初感染時急速に CTL 数が減少する機序を追跡する過程で、活性化状態にある HIV 特異的 CTL を浮遊ペプチド抗原により再刺激すると急速にアポトーシスに陥る現象を発見した。このアポトーシスは、従来とは異なり Fas 及び TNFR 非依存性であり、TCR を介するシグナルが下流の MAP kinase から caspase のカスケードを介して伝達され、cyclosporin A によって抑制されることを見出した(高橋)。

(14) 新規ワクシニアウイルス発現ベクターを構築しこれに SIV gag 遺伝子断片及びフレンド白血病ウイルス MA 蛋白質遺伝子断片を挿入し、ミニ遺伝子発現ウイルスを作成した。後者については、マウスの感染防御実験により、MA 蛋白質全長に強い感染防御能を認め、この蛋白質上の複数の抗原エpiteープの協調作用が示唆された。フレンドウイルス感染時に中和抗体産生を制御する宿主遺伝子 Rfv-3 を第 15 染色体テロメア寄り 5Mbp の範囲にマップした。この領域をカバーする細菌人工染色体クローンの組を特定し、遺伝子同定のためのトランスジェニックマウス作成に

着手した(宮澤)。

(15) アルマジロ肝臓内らい菌を物理的に抽出し、bead beader で細胞膜・細胞質に分画した。健常人末梢単球より、サイトカインを用い DC を誘導した。DC の菌分画の取り込みは、細胞表面残存抗原をトリパンプルーで処理し、プロセッシングは、ククロキンをを用い FACS で測定した。各分画の抗原性は、抗原と CD40L 抗原を DC パルスによる IL-12p70 産生、DC 刺激 CD4⁺・CD8⁺ 陽性 T 細胞の IFN- γ 、細胞内パーフォリン産生で半定量化した(牧野)。

(16) H2-DMb 鎖の細胞質領域に DsRed を結合したキメラタンパク質(DM-DsRed)をコードするベクターをマウス由来マクロファージ様細胞株へ導入し、DM-DsRed を恒常的に発現する細胞株を得た。共焦点レーザー顕微鏡による観察から、DM-DsRed は lysosome 様で、クラス II 分子、インバリアント鎖および CD80 分子などが存在する細胞内小胞に局在することが判明した(笠井)。

(17) HIV_{nef} および EGFP を組み込んだアデノウイルスを作製した。このウイルスをアデノウイルス受容体と OVA 特異的 TcR を共発現するトランスジェニックマウス T 細胞に感染させ、感染後の細胞表面 CD4、CD3、H-2 および細胞内の HIV_{nef} の発現を FACS にて解析した。ウイルスの感染効率は EGFP 組み込みアデノウイルス感染後の EGFP 陽性細胞の頻度を参考にした(竹森)。

(18) in situ hybrAT-CSA 法を開発した。これを用いて、ヒト HIV 感染症剖検例のリンパ節切片を対象に HIV mRNA を調べ、同時に免疫組織化学で P24 抗原、組織切片からの PCR を行った。またサル免疫不全ウイルス実験感

染サル剖検例についても同様に検討した（佐多）。

(19) エイズ脳炎を発症した2頭のサルの脳炎組織から培養により樹立したモノサイト系細胞株(BM1, BM5)の産生するSIVbm5に続き、SIVbm1の全塩基配列を決定した。SIVbm5には認められた既知のMφ指向性特異的突然変異がSIVbm1には全くみられなかった。しかし、SIVbm1, SIVbm5共にGMCSF分化モノサイト、骨髄およびアストロサイトへの感染・増殖が確認され、両SIV共に脳炎発症に必要と思われる表現型を持っていた(向井)。

(20) 強病原性SHIV-C2/1と非病原性SHIV-89.6間の組換えクローン8種を作製した。DNAは293T細胞にトランスフェクトし、ウイルスを回収した。組換えウイルスの感染性及び力価はM8166細胞を用いて試験した。また、弱病原性SHIV-89.6P clone64分子クローンのゲノム全長の塩基配列を決定し、SHIV-89.6、SHIV-C2/1、及びSHIV-KB9(強病原性)と比較解析した(阪井)。

(21) ヒトCXCR4、CCR5、cyclin T1、CIITA cDNAをH-2Kdプロモーターの発現ベクターへ、CD4 cDNAをヒトCD4プロモーターの発現ベクターへ導入した。各発現ユニットを組み合わせてpUC/CXCR4/CyclinT1、pUC/CyclinT1/CCR5、pUC/CIITA/CD4を作製した。invitroで遺伝子発現を確認の上、ラット受精卵へのマイクロインジェクションを開始した(吉木)。

C. 研究結果・考察

1. 感染予防のためのワクチン開発のための基礎研究

これまで国内外において、マカクサルエイズ

モデルでの発症を防御する手法の開発が第一段階の目標として、多くのワクチン開発研究がなされた。1999年DNAワクチンprimeとboosterワクチンのcombination regimenによるワクチン効果が報告され、ついで2000-2001年にかけて本研究班俣野グループおよびアメリカの数グループが各々独自のワクチン手法を開発して、SHIV感染マカクサルモデルにおける急性エイズ発症防御に初めて成功した。しかし、SIV感染慢性エイズモデルにおける防御効果は確立されておらず、感染・発症防御にkeyとなる免疫防御のメカニズムは解明されていない。さらに安全性の確保に関わる研究も必要とされている。

本年度マカクサル急性エイズモデルにおいて優れた感染・発症防御効果を示すDNAとセンドライウイルス(SeV)ベクターとの併用エイズワクチン(DNA/SeVプライム・ブースト法)システムの完成度を高める目的で、ワクチン接種サルに誘導されるウイルス特異的細胞性免疫の解析のため、pseudotypeウイルスを用いた抗原刺激によるウイルス特異的Tリンパ球レベルの定量法を確立し、ウイルス特異的Tリンパ球レベルと感染防御レベルとの相関について検討した。この結果、感染防御における特異的CD8陽性Tリンパ球の迅速な2次反応の重要性を確認した(俣野)。一方、当初用いたプロウイルスタイプのDNAワクチンにかわり、CMVプロモーターで同じ抗原を発現するタイプのもの(CMV-SIVGP)を用い、さらに、接種回数をprime1回・booster1回に減らした手法を試みた。この結果、この安全性を高めたシステムにおいても、良好な特異的細胞性免疫誘導効果があることが確認された(俣野)。またSeVベクターbooster効果についてtat組み込みウイルスの効果が検討され、gag組み込みウイルス効果に劣る事が明らかとなった(狩

野)。

ウイルス感染予防に最も有効とされる弱毒生ワクチンは、HIV 感染においては病原性復帰変異株出現の可能性が否定できず、実用化困難と考えられている。本研究班速水グループは、これまでに、SIV をベースにして HIV-1 の env 遺伝子をもつ SHIV はサルに感染し、HIV-1 に対する免疫を誘導すること、また弱毒 SHIV 感染による免疫ザルは病原性 SHIV の攻撃接種に対して抵抗性を示すことを明らかにし、遺伝子改変で弱毒化した SHIV を将来的にヒト用弱毒生ワクチンとして開発することを目的とし研究を行なっている。もちろん、SHIV を用いるこのプロジェクトにおいても安全性の評価が重要なポイントとなる。

エイズウイルス膜蛋白の 50 %を構成する糖鎖のウイルスの病原性、宿主免疫応答における役割の解明は重要である。Desrosiers らは糖鎖数が減少したウイルスを感染させると宿主にそのウイルスに対する中和抗体が産生され、特に V1-V2 領域の 5 個の糖鎖付加部位に変異を加えたウイルスは宿主から感染制御されることを報告した。この報告から、糖鎖欠損ウイルスが弱毒生ワクチンとして有効である可能性が考えられた。

本年度速水グループは、糖鎖欠損ウイルスの感染増殖と免疫誘導能への関与を検討する目的で、SHIV の HIV-1env 部分の V1,V2,V3 の糖鎖結合部位の欠損 SHIV 変異株を作成し、培養 PBMC での増殖能及び被中和化能及びサルにおける増殖能と免疫誘導能を調べた。この結果、親株ウイルス感染サルで産生された抗 env 抗体は糖鎖欠損ウイルスに対し強い中和活性を有するが、糖鎖欠損ウイルス env に対して産生された抗体の親株ウイルス env に対する中和活性は極めて低いことが明らか

となった(速水)。

本研究班森等のグループはこれまでに、独自に SIVmac239 の Env gp120 に存在するすべての N-glycosylation sites に変異を導入してウイルス増殖能への影響を調べ、最大数の糖鎖の減少でウイルス増殖能に影響を与えない 5 箇所の糖鎖を欠失した SIVmac239 変異ウイルス delta5G (D5G)を作成し、サルへの感染実験を行った。D5G は C 末側に 2 個の糖鎖付加部位があり Desrosiers らの変異ウイルスとは構造が異なる。このウイルスはエイズを発症させる親株ウイルスと同等の初期感染を起こすが、慢性期における持続的な感染は制御された。免疫応答については慢性期の感染制御には CTL の重要性が明らかとなったが、初期感染制御については中和抗体が誘導される個体、細胞性免疫誘導される個体が見られ共通する機序は確認できなかった。

本年度 Env 蛋白の感染制御免疫誘導能を調べる目的で、D5G または 親株ウイルス Env 蛋白でサルを免疫し、親株ウイルスに対する防御免疫効果を測定した。親株ウイルス Env 蛋白は有効な感染制御効果を示したが、D5G 蛋白による免疫では感染防御は得られず、これらの解析から D5G 感染における初期感染制御が糖鎖欠失変異蛋白の免疫原性とは無関係であることが示唆された。

ウイルス様中空粒子(VLP)は遺伝情報を持たず、ウイルスとしての立体構造が保存されているため、細胞性免疫反応と液性免疫反応の両者が誘導できる可能性があり、安全なワクチンとして期待される。保富等はこれまでに、経口感染を示す E 型肝炎ウイルス(HEV)の VLP は経口投与にて本来のウイルスと同様に消化管内および全身的に免疫反応を示すことを確認した。さらに本年度、HEVVLP に

プラスミド DNA が封入可能であること、細胞に封入遺伝子をトランスフェクト出来ることを *in vitro* で確認した。また HEVVLP 内部に HIVenv DNA を封入し経口投与し、粘膜、非粘膜免疫組織に HIVenv 特異的な液性免疫のみならず細胞性免疫が惹起されることを明らかにした。HIV 感染経路から粘膜免疫の誘導が重要であることが指摘され、液性免疫、細胞性免疫の両者を誘導する粘膜ワクチンの必要性が考えられている。本方法が有用な粘膜活性ワクチンとして発展する事を期待する。

また森川等のグループは酵母スフェロプラスト細胞から出芽するベクターウイルス free の GagVLP 産生系を確立した。酵母スフェロプラスト細胞からの VLP 産生系は他に報告がなく、この系での酵母の genetics を利用したウイルス出芽に関わる宿主因子の機能解析が可能となる。本年度、ウイルス粒子の出芽はアクチンの構造に関与することを明らかにした。また GagVLP が有力なワクチンとなるか否か共同研究者がネズミモデルシステムを用いて検討したが、細胞性免疫の賦活が弱いことが示唆された。

その他この領域では多重連結された DNA ワクチン効果が検討され (奥田)、ワクチンアジュバントの開発のためリポゾームの簡便作製法が開発され (水落)、完全ヒト抗体のライブラリーを用い、HIV-1 の感染を阻害するが CCR5 の機能を阻害しない抗体作製の試みが進行し (杉村)、更にペプチドワクチンに関する研究 (小笠原)、組織適合性抗原による外来性ペプチド運搬の研究 (笠井) が行なわれた。

2. 抗ウイルス免疫反応に関する研究

HIV-1 ワクチンとしては、強い HIV-1 増殖の

抑制を可能とする CTL の誘導が望ましく、このため HIV-1 エピトープを明らかにすることが必要である。一方、感染者において HIV-1 は CTL の監視から逃れ、あるいはウイルス認識時における CTL の機能不全が誘発され、体内で増殖し、最終的に CD4 陽性 T 細胞の減少を伴う持続感染状態となる。例えば、CTL の細胞傷害性能は、HIV-1Nef による HLA クラス I の細胞表面の発現低下に伴い損なわれることが試験管内の実験から示唆され、また CTL が感染後に急速に消失する現象も報告されている。試験管内の実験では、HIVgag や HIV-V3 ペプチドによる CTL の活性低下や HIVgp120 分子による CTL のアポトーシスを原因とする報告があるが、実態は不明である。本研究では、HIV-1 の CTL からの逃避機構を解明し、逃避機構の解除を可能とする免疫誘導方法の開発を目標とする。

滝口等のグループはこれまでに、リバーシムノジェネテックス法により、多くの CTL エピトープを明らかにした。本年度は 6 種類のサブタイプ E のエピトープを同定した。HIV の生体からの排除には、CTL による HIV-1 感染細胞の排除と産生されるサイトカインによる増殖抑制が重要であるが、これに関し、HIVnef による HLA クラス I の細胞表面の発現低下は、CTL の細胞傷害活性を強く低下させるが、サイトカイン産生能の低下はわずかである事を明らかにした。

高橋等のグループは、試験管内で、静止状態の HIV-V3 特異的 CTL がクラス I MHC 分子に結合した V3 ペプチドによる刺激で不応答状態 (anergy) に陥ることを見い出し、本年度 CTL は anergy に陥る際 TNF- α , IFN- γ を初めとする大量のサイトカインを放出するとともに自己回復のための因子を産生することを見いだした。今後、この現象の生体内での検

証が必要とされる。

有効な感染防御のためには、宿主体内で感染細胞の排除に働く複数のエフェクター機構を活性化することが必要である。HIV 感染では特に CD4 陽性 T リンパ球活性化の重要性が間接証拠により示唆されているが、直接的な検証はない。宮澤のグループはマウスレトロウイルス感染系を用いて、gag 遺伝子産物上の感染防御性エピトープの同定を試み、これまでの解析から MA 蛋白質上の抗体認識エピトープと複数の CD4 陽性 T 細胞認識エピトープの協調作用が重要と予想される。本年度中和抗体産生を制御する宿主遺伝子について遺伝子座の微細マッピングと BAC contig 作成が行なわれた。今後ウイルス中和抗体産生を制御する新規宿主遺伝子が同定され、そのヒトホモログが見出されれば、新たな HIV 感染抵抗性決定因子として治療方針と予後の決定に貢献する可能性がある。

その他、持続感染抑制に組織適合性抗原非依存性に働く CTL が重要である可能性が推察され（神奈木）、HIV-1 感染者の日和見感染として重要な位置を占める抗酸菌感染症において細胞性免疫を誘導する分子が抗酸菌膜に存在すること（牧野）が明らかにされた。

3. ウイルス感染に伴う病態の発症

抗 HIV ワクチンあるいは抗 HIV 薬の開発と評価のために、非ヒト霊長類実験動物を対象に、SIVmac239 をベースにして、HIV-1 の env 遺伝子を挿入したキメラウイルス SHIV を用いた感染系が広く用いられている。作製された組換えウイルスクローンは、通常、病原性を持たず、サルで継代を繰り返すことにより病原性を獲得していく。本研究班阪井グループは、非病原性 SHIV-89.6 から感染研で樹立された強毒性の SHIV-C2/I を用いてウイルス

感染による病原性獲得機構の解明を目指す。本年度この分子クローン KS661 を確立し、このクローンはサルに病原性を示すことを証明し、安定した実験用 SHIV の大量供給に道を開いた。またゲノムの全シーケンスを親株等と比較することにより、env 遺伝子 C2 および V3 に挿入された変異が病原性発現に関与する可能性が推察され、病原性発現に関わる領域を同定するため、SHIV-C2/I KS661 と SHIV-89.6 間の種々の組換えウイルスが作製された（阪井）。

エイズ脳炎の発症について、HIV に感染した単球・マクロファージ系細胞が脳組織内に侵入することにより発症する可能性が考えられている。本研究向井グループは、HIV 脳炎と痴呆症の発症機構の解明とその発症予防を目的として、エイズ脳炎を発症した 2 頭のカンクイザルの脳組織より脳灰白質直下の小血管周囲に認められるエイズウイルス陽性単球・マクロファージによく類似した CD4 陰性で単球様細胞株 BMI, BM5 を世界で初めて樹立した。細胞株由来 SIVbm5 と SIVbml はその感染・増殖について共通した表現系を有するが、ウイルスの全塩基配列を解析すると、SIVbm5 には既知の Mφ 指向性特異的 point mutation 変異が認められるが SIVbm には認められないことが明らかにされた。さらにクローン SIV のエイズ脳炎の易発症性を検討する目的で、SIVbml および SIVbm5 の全長感染性ウイルスクローンを含む野生型 SIVmac239 とのキメラ感染性クローンを作製した（向井）。

その他、ウイルス感染に伴う病態の発症を病理学的に解析する敏感なシステムが確立され、小児エイズリンパ組織におけるウイルス感染細胞の局在が解析され（佐多）、HIVnef による免疫不全発症を個体レベルで解析する目的でマウスモデルシステムが確立された

(竹森)。

4. 小動物モデルの開発

HIV 感染者は依然として増加を続けており、近年開発されてきた抗ウイルス剤の効果は一時的で、根本的な解決には遠い。したがって、根治的な新しい感染・発症阻止法の早期開発が望まれ、その開発には、安定的に供給される *in vivo* のモデル系が必要であるが、サルを用いた感染モデルシステムは大型動物のための制約があり、SCID-hu マウスのモデルシステムは、その作製が煩雑である。そこで HIV 感染やエイズの発症に対する有効な感染予防や発症阻止法の開発に必要な安定供給できる HIV 感染小動物モデル系の樹立を目的に、HIV 感染受容体であるヒト CD4 および CXCR4/CCR5 さらに HIV 活性化因子であるヒト cyclin T1 や MHC class II 転写活性化遺伝子 (CIITA) をラット細胞に導入し、感染性ウイルスを産生する HIV 感染に成功した。上記 4 種類のヒト遺伝子を同時に発現するトランスジェニックラット用の発現コンストラクトの作製し、ラット受精卵へのマイクロインジェクションを開始した (吉木)。

5. 倫理面への配慮 (研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究方法による研究

現段階ではサルを用いた基礎実験レベルの計画であるので、ヒトについての倫理的問題はない。なおサルの感染実験にあたっては、実験動物学会の動物実験指針やウイルス研究所サル飼育・実験指針に基づいて行っており、また個々の実験については当研究所霊長類委員会の承認を受けてから実施している。

全ての動物実験は、国立感染症研究所動物実験委員会の審査をうけ、その承諾を得てから開始する (平成 14 年度については審査中)。

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。

D. 結論

強いワクチン効果が得られる DNA ワクチン/センダイウイルスベクター併用接種システムの免疫反応が解析され、安全性についての改善が行われた。また、SIV, HIV ウイルス糖鎖に対する免疫防御反応の重要性が明らかにされた。HEV-VLP を用いたワクチンの有用性が示唆されるとともに、その他新しい技術を用いたワクチン開発が進行した。基礎研究において HIV 感染における CTL の機能不全の要因が検討され、新たな知見を得た。HIV 感染病態の発症について、SIV SHIV モデルを用いたウイルス感染による病原性獲得の要因が検討され、env 領域の変異が重要である可能性が推察された。一方、HIV 感染と病態発症解明のための新しい病理学的診断法や HIV nef 依存性免疫不全発症の要因の解明のための新しいシステムが確立された。

E. 研究発表

(1) 国内総説発表

総説発表

[杉村 和久]

1. 杉村和久、吉満正明、御手洗睦和、新村靖彦. HIV-1 エントリーインヒビター. 臨床免疫, 35 (5), 594-604, 2001
2. 伊東祐二、中島敏博、奥園剛、源島龍、濱崎隆之、上原一芳、小沢政之、橋口周平、杉村和久. フェージライブラリによる抗体エンジニアリング. 生化学, 73, p671, 2001
3. 山本真紀、橋口周平、中島敏博、柿田実里、伊東祐二、高津聖志、富永明、杉村和久.

IL-5 レセプターに特異的に結合するヒト scFv 抗体ファージクローンの単離. アレルギー, 50, 9-10, p979, 2001

4. 橋口周平、吉永圭介、吉原智樹、中島敏博、伊東祐二、杉村和久. 可溶性 FcεRIα 鎖に結合するヒト一本鎖抗体の単離とその評価. 第 51 回日本アレルギー学会総会号, 50, P979, 2001

5. 吉永圭介、橋口周平、吉原智樹、伊東祐二、杉村和久. 可溶性 FcεRIα 鎖に結合するヒト一本鎖抗体の単離とそのシグナル阻害活性. Proc.Jap.Soc.Immunol., 31, p38, 2001

6. 木村葵、伊東祐二、末次加奈、山下早希子、橋口周平、杉村和久. 補助刺激分子 CD 86、CD 28 に特異的に結合するヒト一本鎖抗体ファージクローンの単離. Proc.Jap.Soc.Immunol., 31, p298, 2001

7. 奥菌剛、宇都倫史、橋口周平、伊東祐二、杉村和久. TNF シグナリングを阻害する TNFR1 特異的ヒト一本鎖抗体の単離. Proc.Jap.Soc.Immunol., 31, P61, 2001

8. 新村靖彦、崔学柱、橋口周平、伊東祐二、杉村和久. cell-panning を用いた CCR5 に結合するヒト scFv 抗体ファージクローンの探索. Proc.Jap.Soc.Immunol., 31, P24, 2001

[宮澤 正顯]

1. 宮澤正顯. 自己抗原の分子相同性組織培養工学, 27, 175-179, 2001

2. 宮澤正顯. 看護実践に役立つ基礎医学の現状とこれから: 免疫学看護, in press, 2002

[高橋 秀実]

1. 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, 73-76, 2001

2. 高橋秀実. HIV 感染症の病態: 免疫学的側面から 治療学, 35, 123-128, 2001

3. 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, 21-28, 2001

[小笠原一誠]

1. 小笠原一誠. ペプチドワクチン, 臨床免疫, 36, 650-656, 2001

2. 小笠原一誠. リンパ球の制御による疾患治療は可能になるか? 臨床病理, 49, 1225-1232, 2001

(2) 海外論文発表

(本研究に関わる主なもの)

[竹森 利忠]

1. Takasuka N., Enami M., Itamura S. and Takemori T. Intranasal inoculation of a recombinant influenza virus containing exogenous nucleotides in the NS segment induces mucosal immune response against the exogenous gene product in mice. Vaccine in press, 2002

Vaccine in press, 2002

2. Shimoda, M., Nakamura, T., Takahashi, Y., Asanuma, H., Tamura, S., Kurata, T., Mizuochi, T., Azuma, N., Kanno, C., and Takemori, T. Isotype-specific selection of high-affinity memory B cells in nasal-associated lymphoid tissue. J. Exp. Med., 194, 1597-1607, 2001

J. Exp. Med., 194, 1597-1607, 2001

3. Takahashi, Y., Ohta, H., Takemori, T. Fas is required for clonal selection in germinal centers and the subsequent establishment of the memory B cell repertoire. Immunity, 14, 181-192, 2001

4. Yoshizawa, I., Soda, Y., Mizuochi, T., Yasuda, S., Rizvi, A. Tahir, Mizuochi, T., Takemori, T., Tsunetsugu-Yokota, Y.

Enhancement of mucosal immune response against HIV-1 Gag by DNA immunization. Vaccine, 19, 2995-3003, 2001

5. Kodama, M., Hayashi, R., Nishizumi, H., Nagawa, F., Takemori, T. and Sakano H. The PU.1 and NF-EM5 binding motifs in the Igk3' enhancer are responsible for directing somatic

hypermutations to the intrinsic hotspots in the transgenic V_k gene. *Int. Immunol.*, 13, 1415-1422, 2001

[本多 三男]

1. Ymaguchi, K., Honda M., Ikigai, H., Hata, Y., Shimamura, T. Inhibitory effects of (-)-epigallocatechin gallate on the life cycle of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *Antiviral Res.*, 53, 19-34, 2002

2. Chujoh, Y., Matsuo, K., Yoshizaki, H., Nakasatomi, T., Someya, K., Okamoto, Y., Naganawa, S., Haga, S., Yoshikura, H., Yamazaki, A., Yamazaki, S. and Honda, M. Cross-Clade neutralizing antibody production against human immunodeficiency virus type 1 clade E and B' strains by recombinant mycobacterium bovis BCG-Based candidate vaccine. *Vaccine*, 20, 797-804, 2001

3. Goto, H., Hironori, T., Smeya, K., Yanagida, M., Honda, M., Yamanaka, N., Kiyono, H. HIV mucosal vaccine: nasal immunization with rBCG-V3J1 induces a long term V3J1 peptide-specific neutralizing immunity in Th1- and Th2-deficient conditions. *J. Immunol.*, 167, 5862-5867, 2001

4. Ryu, T., Ikeda, M., Okazaki, Y., Tokuda, H., Yoshino, N., Honda, M., Kimura, S., Miura, Y. Myelodysplasia associated with acquired immunodeficiency syndrome. *Intern Med.*, 40, 795-801, 2001

5. 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 Res. Hum. Retro.*, 20, 759-763, 2001

6. Hara, T., Yoshino, N., Takayama, N.,

Minmitani, M., Naganawa, S., Ohkubo, H., Takizawa, M., Izumi, Y., Kantake, M., Suzuki, S., Takano, M., Kita, T., Totani, R., Nagai, Y., Honda, M., Nakasone, T. Presence of multiple HIV type 1 subtypes among mothers and children in Japan. *AIDS Res. Hum. Retro.*, 10, 569-575, 2001

[森 一泰]

1. 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. *J. Virology*, 75, 4023-4028, 2001

2. Villinger, F., Brice G. T., Mayne A. F., Bostik P., Mori K., June C. H., and Ansari, A. Adoptive transfer of SIV naïve autologous CD4+ cells to macaques chronically infected with SIV is sufficient to induce long term non progressor status. *Blood*, 99, 590-599, 2002

[俣野 哲朗]

1. Matano T., Kano M, Nakamura H, Takeda A, Nagai Y. Rapid appearance of secondary immune responses and protection from acute CD4 depletion after a highly pathogenic immunodeficiency virus challenge in macaques vaccinated with a DNA-prime/Sendai viral vector-boost regimen. *Journal of Virology*, 75, 11891-11896, 2001

2. Nakamura H, Takeda A, Matano T. Postbinding fusion function contributed by a chimeric murine leukemia virus envelope protein. *Archives of Virology*, 146, 953-961, 2001

[狩野 宗英]

1. Matano T, Kano M., Nakamura H, Takeda H, Nagai Y. Rapid appearance of secondary immune

responses and protection from acute CD4 depletion after a highly pathogenic immunodeficiency virus challenge in macaques vaccinated with a DNA-prime/Sendai viral vector-boost regimen. *Journal of Virology*, 75, 11891-11896, 2001

[速水 正憲]

1. Kozyrev, I. L., Miura, T., Haga, T., Kuwata, T., Hayami, M. Construction of SIV/HIV-1 chimeric viruses having the IL-5 gene and determination of their ability to replicate and produce IL-5.

Archives of Virology, 146, 1051-1062, 2001

2. Kozyrev, I. L., Ibuki, K., Shimada, T., Kuwata, T., Takamura, T., Hayami, M., Miura, T. Characterization of less pathogenic infectious molecular clones derived from acute-pathogenic SHIV-89.6P stock virus *Virology*, 28, 26-13, 2001

3. Kwofie, T., Haga, T., Iida, T., Hayami, M., Miura, T. Cytokine kinetics in the plasma of monkeys infected with pathogenic and nonpathogenic simian and human immunodeficiency chimeric viruses at an early stage of infection. *Microbiology and Immunology*, 45, 399-402, 2001

4. Iida T., Kita M., Kuwata T., Miura T., Ibuki K., Ui M., Hayami M., Imanishi J. Apoptosis induced by in vitro infection with simian-human immunodeficiency chimeric virus in macaque and human peripheral blood mononuclear cells *AIDS Research and Human Retroviruses*, 17, 1387-1393, 2001

[保富 康宏]

1. Uno-Furuta, S., Tamaki, S., Takebe, Y., Takamura, S., Kamei, A., Kim, G., Kuromatsu, I., Kaito, M., Adachi, Y. and Yasutomi, Y. Induction of virus-specific cytotoxic T lymphocytes by *in vivo* electric administration of peptides. *Vaccin*, 19, 2190-2196, 2001

2. Iwanami, N., Niwa, A., Yasutomi, Y., Tabata, N., and Miyazawa, M. Role of natural killer cells in resistance against Friend retrovirus-induced leukemia. *J.Virol.*, 75, 3152-3163, 2001

3. Mori, K., Yasutomi, Y., Ohgimoto, S., Nakasone, T., Takamura, S., Shioda, T. and Nagai, Y. Quintuple deglycosylated mutant of simian immunodeficiency virus SIVmac239 in rhesus macaques: Robust primary replication, tightly contained chronic infection and elicitation of potent immunity against the parental wild -type strain. *J.Virol.*, 75, 4023-4028, 2001

4. Kuromatsu, I., Matsuo, K., Takamura, S., Kim, G., Takebe, Y., Kawamura, J and Yasutomi, Y. Induction of effective antitumor immune responses by using DNA of an α Ag from mycobacteria. *Cancer Gene Ther*, 8, 483-490, 2001

5. Niikura, M., Takamura, S., Kim, G., Kawai, S., Saijo, M., Morikawa, S., Kurane, I., Tian-Cheng Li, Takeda, N. and Yasutomi, Y. Chimeric recombinant hepatitis E virus -like particles as an oral vaccine vehicle presenting foreign epitopes. *Virolog.*, in press, 2002

6. Imanaka-Yoshida, K., Hiroe, M., Yasutomi, Y., Maki, S., Tsuchiya, T., Noda, N., Toyozaki, T., Nishikawa, T., Ishiyama, S., Sakakura, T. and Yoshida, T. Tenascin-C is a Useful Marker for Disease Activity in Myocarditis. *J.Pathol*, in press, 2002

[森川 裕子]

1. Yuko Morikawa, Ayako Kinoshita, Toshiyuki Goto, Hiroshi Tomoda, and Kouichi Sano. Membrane relocation but not tight binding of human immunodeficiency virus type 1 Gag particles myristoylated in *Escherichia coli*. *Virology*, 283, 343-352, 2001

[奥田 研爾]

1. KQ Xin, M Urabe, J Yang, K Nomiya, H Mizukami, K Hamajima, H Nomiya, T Saito, M Imai, J Monahan, K Okuda, K Ozawa, K Okuda. A novel recombinant adeno-associated virus vaccine-induced a long-term humoral immune response to human immunodeficiency virus. *Human Gene Ther*, 12, 1047-1061, 2001

[滝口 雅文]

1. Masanori Matsui, Sanae Machida, Hiroko Tomiyama, Masafumi Takiguchi, Toshitaka Akatsuka. Introduction of tapasin gene restores surface expression of HLA class I molecules, but not antigen presentation of an HIV envelope peptide in a hepatoma cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 285, 508-517, 2001

2. Mohammad S. Hossain, Hiroko Tomiyama, Takabumi Inagawa, Busarawan Sriwanthana, Shinichi Oka Masafumi Takiguchi. HLA-A*3303-Restricted CTL Recognition for Novel Epitopes Derived from the Highly Variable Region of the HIV-1 Env Protein. *AIDS*, 15, 2199-2201, 2001

3. Katsuhiko Fukada, Hiroko Tomiyama, Chantapong Wasi, Tomoko Matsuda, Shigeru Kusagawa, Hironori Sato, Shinichi Oka, Yutaka Takebe, Masafumi Takiguchi. Cytotoxic T Cell Recognition of HIV-1 Cross-Clade and Clade-Specific Epitopes in HIV-1-infected Thais and Japanese. *AIDS*, in press, 2002

4. Katsuhiko Fukada, Yuji Sobao, Hiroko Tomiyama, Shinichi Oka, Masafumi Takiguchi. Functional Expression of the Chemokine Receptor CCR5 on Virus Epitope-Specific Memory and Effector CD8⁺ T Cells. *J.Immunol.*, in press, 2002

[杉村 和久]

1. M. Kaji, M. Ikari, S. Hashiguchi, Y. Ito, R. Matsumoto, T. Yoshimura, J. Kuratsu, and K. Sugimura. Peptide Mimics of Monocyte

Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) with an Antagonistic Activity. *J. Biochem*, 129, 577-583, 2001

2. M.Kawamura, T. Naito, M. Ueno, T. Akagi, K. Hiraishi, I. Takai, M. Makino, T. Serizawa, K. Sugimura, M. Akashi, M. Baba. Induction of mucosal IgA following intravaginal administration of inactivated HIV-1-capturing nanospheres in mice. *J. Med. Virol.*, in press, 2002

3. K. Sugimura, S. Hashiguchi, T Nakashima, Y. Ito Human single chain Fv fragments directed to human immunoligand/receptor molecules from the phage display libraries Phage display Technologies: Directed protein evolution. Ed:Cambridge Health Tech Institute Third Annual , 9-10, 2001

4. Sugimura K., Ikari M., Matsumoto R., Kaji M., Hashiguchi S., to, Y., Kuratsu J., Yoshimura T., Nakashima, T. Peptide mimics of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) with an antagonistic activity. *Scandinavian Journal of Immunology*, 54, 105, 2001

5. Hashiguchi S, Nitani A, Nakashima T, Ito Y, Sugimura K. Human FcεRI-specific human single chain Fv (scFv) antibody. *Scandinavian Journal of Immunology*, 54, P103, 2001

6. K. Sugimura, R. Gejima, T. Nakashima, S. Hashiguchi, Y. Ito, S. Okuhata, N. Nishimoto, K. Yoshizaki. Anti-IL-6 antibody-binding motif peptides inhibiting the signaling of human IL-6 to human IL-6 receptor but not murine IL-6 receptor. *Scandinavian Journal of Immunology*, 54, P105, 2001

7. K. Sugimura, M. Ikari, R. Matsumoto, M. Kaji, S. Hashiguchi, Y. Ito, J. Kuratsu, T. Yoshimura, T. Nakashima, T. Peptide mimic of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) with an antagonistic activity. *Scandinavian Journal of Immunology*, 54, P105, 2001

[水落 次男]

1. Shimizu, Y., Nakata, M., Matsunuma, J., Mizuochi, T. Simultaneous quantification of components of neoglycolipid-coated liposomes using high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *J. Chromatogr. B*, 745, 127-133, 2001
2. Yoshizawa, I., Soda, Y., Mizuochi, T., Yasuda, S., Rizvi, T. A., Mizuochi, T., Takemori, T., Yokota-Tsunetsugu, Y. Enhancement of mucosal immune response against HIV-1 gag by DNA immunization. *Vaccine*, 19, 2995-3003, 2001
3. Mizuochi, T., Pastore, Y., Shikata, K., Kuroki, A., Kikuchi, S., Fulpius, T., Nakata, M., Fossati-Jimack, L., Reininger, L., Matsushita, M., Fujita, T., Izui, S. Role of Galactosylation in the Renal Pathogenicity of Murine IgG3 Monoclonal Cryoglobulins. *Blood*, 97, 3537-3543, 2001
4. Kenjo, A., Takahashi, M., Matsushita, M., Endo, Y., Nakata, M., Mizuochi, T., Fujita, T. Cloning and characterization of novel ficolins from the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*. *J. Biol. Chem.*, 276, 19959-19965, 2001
5. Shimizu, Y., Nakata, M., Kuroda, Y., Tsutsumi, F., Kojima, N., Mizuochi, T. Rapid and simple preparation of *N*-linked oligosaccharides by cellulose column chromatography. *Carbohydr. Res.*, 332, 381-388, 2001
6. Tang, W., Seino K., Ito, M., Konishi, T., Senda, H., Makuuchi, M., Kojima, N., Mizuochi, T. Requirement of ceramide for adhesion of *Helicobacter pylori* to glycosphingolipids. *FEBS Lett*, 504, 31-35, 2001
7. Sekine, H., Kenjo, A., Azumi, K., Ohi, G., Takahashi, M., Kasukawa, R., Ichikawa, N., Nakata, M., Mizuochi, T., Matsushita, M., Endo, Y., Fujita, T. An Ancient lectin-dependent complement system in an Ascidian: Novel lectin

isolated from the plasma of the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*. *J. Immunol.*, 167, 4504-4510, 2001

8. Kuroda, Y., Nakata, M., Hirose, S., Shirai, T., Iwamoto, M., Izui, S., Kojima, N., Mizuochi, T. Abnormal IgG galactosylation occurs independently of the development of arthritis in MRL-*lpr/lpr* mice. *Pathol. Int.*, in press, 2002
9. Kuroda, Y., Nakata, M., Nose M., Kojima N., Mizuochi, T. Abnormal IgG galactosylation and arthritis in MRL-*Fas^{lpr}* or MRL-*FasL^{gid}* mice are under the control of the MRL genetic background. *FEBS Lett.*, 507, 210-214, 2001
10. Kuroki, A., Kuroda, Y., Kikuchi, S., Lajaunias, F., Fulpius, T., Pastore, V., Liliane Fossati-Jimack, L., Reininger, L., Toda, T., Nakata, M., Kojima, N., Mizuochi, T., Izui, S. Level of Galactosylation Determines Cryoglobulin Activity of Murine IgG3 Monoclonal Rheumatoid Factor. *Blood*, in press, 2002

[佐多徹太郎]

1. 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 a 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 Retroviruses*, 17, 649-655, 2001
2. Aidoo S, Ampofo WK, Brandful JAM, Nuvor SV, Ansah JK, Nii-Trebi N, Barnor JS, Apeagyuei F, Sata T, Ofori-Adjei D, Ishikawa K. Suitability of a rapid immunochromatographic test for detection of antibodies to human immunodeficiency virus in Ghana, West Africa. *J Clin Microbiol*, 39, 2572-2575, 2001
3. Nuvor SV, Katano H, Ampofo WK, Barnor

JS, Sata T. Higher prevalence of antibodies to human herpesvirus 8 in HIV-infected individuals than in the general population in Ghana, West Africa. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, 20, 362-364, 2001

4. Ishikawa K, Janssen W, Banor JS, Shiino T, Piedade J, Sata T, Ampofo WK, Brandful JAM, Koyanagi Y, Yamamoto N, Canas-Ferreira WF, Adu-Sarkodie Y, Kurata T. Phylogenetic analysis of HIV type 2 in Ghana and Guinea-Bissau, West Africa. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 17, 1661-1663, 2001

5. Meng YX, Sata T, Stamey FR, Voevodin A, Katano H, Koizumi H, Deleon M, De Cristofano MA, Galimberti R, Pellett PE. Molecular characterization of human herpesvirus 8 strains from Japan, Argentina, and Kuwait. *J Gen Virol.*, 82, 499-506, 2001

6. Suda T, Katano H, Delsol G, Kakiuchi C, Nakamura T, Shiota M, Sata T, Higashihara M, Mori S. HHV-8 infection status of AIDS-unrelated and AIDS-associated multicentric Castleman's Disease. *Pathol Int.*, 75, 671-679, 2001

[向井 鏖三郎]

1. Takano J., Narita, T., Fujimoto, K., Mukai, R., Yamada, A. Detection of B-virus infection in cynomolgus monkeys by ELISA using sinian agent 8 as alternative antigen. *Exp. Anim.*, 50, 345-347, 2001

2. Uda, A., Tanabayashi, K., Mukai, R., Yachi, M., and Yamada, A. CD3 polymorphism in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J. Med. Primatol.*, 30, 141-147, 2001

3. Tanabayashi, K., Mukai, R., and Yamada, A. Detection of B virus antibody in monkey sera using glycoprotein D expressed in mammalian cells. *J. Clin. Microbiol.*, 39, 3025-3030, 2001

4. Misumi, S., Takamune, N., Ido, Y., Hayashi,

S., Endo, M., Mukai, R., Tachibana, K., Umeda, M., Shoji, S. Evidence as a HIV-1 self-defense vaccine of cyclic chimeric dodecapeptide wrapped from undecapeptidyl arch of extracellular loop 2 in both CCR5 and CXCR4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 285, 13095-13163, 2001

[神奈木 真理]

1. S. Hanabuchi, T. Ohashi, Y. Koya, H. Kato, Hasegawa, F. Takemura, T. Masuda, M. Kannagi. Regression of human T cell leukemia virus type 1 (HTLV-I)-associated lymphomas in a rat model: Peptide-induced T-cell immunity. *J. Natl. Cancer Inst.*, 93, 1775-1783, 2001

2. M. Kannagi, S. Hanabuchi, T. Ohashi, Hasegawa, T. Masuda. Host defense Mechanisms against HTLV-I-induced T cell lymphomas in a rat model. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 17 (Suppl. 1), S14, 2001

[牧野 正彦]

1. Nomaguchi, H., Jahan, N., Mandal, B. C., Yogi, Y., Kawatsu, K., Yoshizawa, Y., Okamura, H., Makino, M. IL-12 and IL-18 synergistically induce the bactericidal activity of murine peritoneal cells against *M. leprae*. *Jpn. J. Leprosy*, 70, 113-119, 2001

2. Umemura, M., Hirose, K., Wajjwaiku, W., Nishimura, H., Matsuguchi, T., Gotoh, Y., Takahashi, M., Makino, M., Yoshikai, Y. Impaired IL-15 production associated with susceptibility of murine AIDS to mycobacterial infection. *J. Leukoc. Biol.*, 69, 138-148, 2001

3. Makino, M., Utsunomiya, A., Maeda, Y., Shimokubo, S., Izumo, S., Baba, M. Association of CD40 ligand expression on HTLV-I-infected T cells and maturation of dendritic cells. *Scand. J. Immunol.* 54, 574-581, 2001

4. Kawamura, M., Naito, T., Ueno, M., Akagi,

T., Hiraishi, K., Takai, I., Makino, M., Serizawa, T., Sugimura, K., Akashi, M., Baba, M. Induction of mucosal immunity following intravaginal administration of inactivated HIV-1-capturing nanospheres in mice. *J. Med. Microbiology*. in press, 2002

[阪井 弘治]

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. *Microbes and Infection*, 3, 1093-1099, 2001

[吉木 敬]

1. Nakamaru Y, Ishizu A, Ikeda H, Sugaya T, Fugo K, Higuchi M, Yamazaki H, Yoshiki T. Immunological hyperresponsiveness in HTLV-I LTR-env-pX transgenic rats: A prototype animal model for collagen vascular and HTLV-I-related inflammatory diseases. *Pathobiology*, 69, 11-18, 2001

2. Sugaya T, Ishizu A, Ikeda H, Nakamaru Y, Fugo K, Higuchi M, Yamazaki H, Imai K, Yoshiki T. Clonotypic Analysis of T Cells Accumulating at Arthritic Lesions in HTLV-I env-pX Transgenic Rats. *Experimental and Molecular Pathology*, 72, 56-61, 2002

[宮澤 正顯]

1. Norimasa Iwanami, Atsuko Niwa, Yasuhiro Yasutomi, Nobutada Tabata, and Masaaki Miyazawa. Role of natural killer cells in resistance against Friend retrovirus-induced leukemia. *Journal of Virology*, 75, 3152-3163, 2001

[高橋 秀実]

1. Nakajima, Y., Takahashi, M., Norose, Y., Ogawa, R., Takahashi, H. Induction of apoptosis

in mice thymocytes by tetracaine. *Biomedical Res.*, 21, 297-303, 2001

2. Takahashi, M., Nakagawa, Y., Berzofsky, J., Takahashi, H. Counter-regulation of cytolytic activity and cytokine production in human immunodeficiency virus (HIV)-1-specific murine cytotoxic T lymphocytes by free antigenic peptide. *Int. Immunol.*, 13, 43-51, 2001

3. Watari, E., Shinya, E., Kurane, S., Takahashi, H., Effect of cyclosporin A on cell fusion in monkey kidney cell line persistently infected with measles virus. *Intervirology*, 44, 209-211, 2001

4. 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 protein in transgenic mice liver. *J. Biol. Chem.*, 276, 12140-12146, 2001

5. Hirota, K., Nagata, K., Norose, Y., Futagami, S., nakagawa, Y., Senpuku, H., Kobayashi, M., Takahashi, H. Identification of an antigenic epitope in *Helicobacter pylori* urease that induces neutralizing antibody production. *Infect. Immunol.*, 69, 6597-6603, 2001

6. Hamada, H., Hiroi, T., Nishiyama, Y., Takahashi, H., Masunaga, Y., Hachimura, S., Kaminogawa, H., Iwanaga, T., Kiyono, H., Yamamoto, H., Ishikawa, H. Identification of multiple isolated lymphoid follicles on the antimesenteric wall of the mouse small intestine. *J. Immunol.*, 168, in press, 2002

7. Nishiyama, Y., Hamada, H., Yamamoto, H., Nanno, M., Takahashi, H., Ishikawa, H. Homeostatic regulation of intestinal villous epithelia by B lymphocytes. *J. Immunol.*, 168, in press, 2002

[小笠原一誠]

1. Iwabuchi, K., Iwabuchi, C., Tone, S., Itoh, D.,