

Tosa, N., Negishi, I., Ogasawara, K., Uede, T., and Onoé, K. Defective development of NK1.1⁺ T cell antigen receptor (TCR) ab⁺ cells in zeta-associated protein (ZAP) null mice with an accumulation of NK1.1⁺CD3⁺NK-like cells in the thymus. *Blood*, 97, 1765-1775, 2001

特許を申請中)

[笠井 道之]

1. Tohiro Ikeda, Michiyuki Kasai, Masanori Utsuyama, Katsuiku Hirokawa. Determination of three isoforms of the receptor activator of Nuclear Factor- κ B ligand and their differential expression in bone and thymus. *Endocrinology*, 142, 1419-1426, 2001

F. 知的所有権の出願・取得状況

1. 森 一泰 : Method and Medicaments for post exposure prophylaxis of an HIV infection USA

国内出願番号 09/988,798 EPC EPC 出願番号 EP 00 938 669.9。

2. 森川裕子 : PCT 国際出願「ウイルス様微粒子及びその製造方法」出願中 (国際出願番号 PCT/JP01/06791、国際出願日平成 13 年 8 月 7 日)

3. 奥田研治 : 「ワクチニア LC16m8 を用いたエイズワクチン」「HIV-1 に対する新世代 DNA ワクチン (ヒト型化コドン多価ワクチン)」

4. 吉木 敬 : 「ヒト免疫不全ウイルスタイプ 1 (HIV-1) ウイルス粒子を産生しうる齧歯類動物細胞」を出願中。

5. 俣野哲朗 : 特許出願中。

6. 阪井弘治 : 「後天性免疫不全症候群の非ヒト霊長類モデル」 特許出願中

「HIV 感染性クローンの樹立法」 特許出願中

7. 高橋秀実 : HIV-P18 特異的 TCR の transgenic mice (千葉大学・齋藤隆教授との共同特許、協和発酵工業が出願人で現在国際

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

免疫不全発症阻止に関する研究

主任研究者 竹森 利忠 国立感染症研究所・免疫部長
研究協力者 大竹かおり 国立感染症研究所・免疫部研究員

研究要旨

HIV 感染症において Nef 蛋白質の発現は病原性発症の重要な因子のひとつである。主な作用として CD4 と MHC Class I 分子の発現抑制、およびウイルス産生増強が報告され、その機序が解明されつつある。しかし、病原性を誘導する機序は明かでない。1998 年、Hanna らにより、Nef 発現トランスジェニック (Tg) マウスでウイルス粒子産生なしに、CD4 T 細胞減少をはじめとする AIDS 様症状が誘導され死亡することが報告され、Nef 分子自身が *in vivo* で病原性発症に関与することが示唆された。しかし、CD4 T 細胞数の減少以外には、Nef が免疫系に与える影響は明らかにされていない。

我々は、Nef が成熟 T 細胞により構築される免疫系に与える影響を *in vivo* で検討することが重要であると考え、Nef 発現リコンビナントアデノウイルスを用いた系の開発を行った。この系では Coxackie/adenovirus receptor (CAR) と共に I-A^d MHC 分子に提示されたトリ ovalbumin (OVA) ペプチド(アミノ酸残基 323-339) を特異的に認識する T 細胞受容体を発現する Tg マウス (CAR/DO10 Tg マウス) より分離した T 細胞に、Nef 発現リコンビナントアデノウイルスを感染させる。感染後 Nef 発現 CD4 T 細胞を BALB/c マウスに移植し、Nef 発現 T 細胞の組織におけるダイナミクスや OVA 刺激による免疫応答を検討することを目的とする。

今年度は、Nef 発現アデノウイルス作製ならびに、CAR/DO10 Tg マウスの作成、また CAR/DO10 Tg マウス脾臓より分離した T 細胞にリコンビナントアデノウイルスを感染させ、感染効率と Nef 発現を検討した。これらの結果、作製したウイルスは CAR/DO10 Tg マウス T 細胞に感染し、機能的 Nef を発現し、CD4 分子発現抑制を誘導することが確認できた。

A. 研究目的

Nef が *in vivo* で免疫応答にどのように関与するか明らかにすることを目的として、Nef 発現リコンビナントアデノウイルスを用いて OVA 特異的 CAR/DO10 Tg マウス T 細胞に *in vitro* で Nef 蛋白質を発現させ、Nef 発現 T 細胞を BALB/c マウスに移植し、その局在と OVA ペプチドによる免疫応答を検討する。

B. 研究方法

1. Nef 発現リコンビナントアデノウイルス作製
ウイルス作製の手段には COS-TPC 法 (TAKARA) を用い作製した。pIRES-EGFP (clonotech) の EcoR I site に HIV-1 NL43 遺伝子より、pBruescript KS (+) にサブクローニング

した nef 遺伝子断片を EcoR I で切断し挿入した (pIRES-nef-EGFP)。次に pIRES-nef-EGFP, pIRES-EGFP の Sac I 断片をそれぞれ klenow polymerase により平滑化し、pAxCAwt の Sma I site に挿入し、pAxCA-Nef-IRES-EGFP と pAxCA-IRES-EGFP を得た。その後、pAxCA-Nef-IRES-EGFP, pAxCA-IRES-EGFP それぞれと、Cos-TPC を 293 細胞に Fugene6 (Roche) を用いて Co-transfection し、細胞内での相同組換えにより、リコンビナントアデノウイルス CA-Nef-IRES-EGFP と CA-IRES-EGFP を得た。

2. 抗体

マウス抗 Nef 単クローン抗体 F3 は藤井博士 (名古屋市立大学 薬学部 生物薬品化学) より分与を受けた。FITC-標識マウス抗 CAR 単クローン抗体 (Rmc B) とビオチン標識マウス TCR 単クローン抗体 KJ-1-26 は中山博士 (千葉大学大学院医学研究科 免疫発生学) より分与を受けた。また解析に APC 標識抗 CD4 抗体 (Bioscience)、PE 標識抗 CD3 抗体 (CALTAG)、APC 標識抗 CD3 抗体 (BD Pharmingen) を用いた。rat 抗マウス CD11b 抗体、CD11c 抗体と B220 抗体標識マイクロビーズは Miltenyi Biotec より購入した。

3. CAR/DO10 Tg マウスの作成

Lck プロモーター下に truncated CAR (coxackie / adenovirus receptor, アミノ酸残基 1-262) を発現した CAR Tg マウスと、I-A^d MHC 分子に提示されたトリ OVA ペプチド 323-339 を特異的に認識する T 細胞受容体を持つ DO11.10 マウスは、中山博士より分与を受けた。CAR Tg マウスと DO11.10 Tg マウスとの交配により CAR/DO10 Tg マウスを得た。マウスのスクリーニングは、5 週齢マウス尻尾より抽出した DNA を template に各プライマー (CAR: CTAAGGAGCTGGAACCTC TCAGC と GAAGCACAGCAGGGAGCGCCAT、

DO10: CAGGAGGGATCCAGTGCCAGC と TGGCTCTACAGTGAGTTTGGT) を用いて PCR により確認した。

4. CAR/DO10 Tg マウスリンパ球の調整

CAR/DO10 Tg マウスより脾臓を摘出し溶血後、抗 B220, 抗 CD11b, と抗 CD11c 抗体標識ビーズと 4 °C にて、15 分間反応させ 0.5% BSA, 0.5mM EDTA HBSS で洗浄後、分離カラム LS (Miltenyi Biotec) を用いてネガティブセレクションにより T 細胞を分離した。

5. マウスリンパ球へのウイルス感染

脾臓細胞または、MACS により分離した T 細胞を 2×10^7 cells /ml になるように 10% FBS 0.1 mM 2-メルカプトエタノール (ME) RPMI1640 に浮遊させ、MOI 20 37 °C の条件で 2 時間ウイルス感染を行なった。感染後 PBS で洗浄し、10% FBS と 0.1mM 2ME を含有する RPMI1640 にて 37 °C で 24 時間培養した。Cos 細胞へは同様に MOI 2, 20, 200 で 5% FBS 含有 DMEM を用いて、感染を行った。

6. 細胞表面染色

感染 24 時間後に感染細胞を回収し、 1×10^6 の細胞を 4 °C にて APC 標識抗 CD4 抗体と PE 標識抗 CD3 抗体で 30 分間反応させた。PBS にて洗浄後、PI (5mg/ml) を添加し、FACS Calibur にて解析した。

7. 細胞内染色

感染 24 時間後、感染細胞を回収し、 1×10^6 の細胞に EMA (5mg/ml) を添加し 4 °C にて 20 分間、UV 照明下で反応後、PBS で洗浄した。2%ホルマリンにて室温で 20 分間固定を行い、PBS で洗浄した。次に Permeabilization Buffer (0.5% Saponin, 2% FBS, 0.05% Na₂N₃) にて洗浄後、4 °C で 30 分間、抗 Nef 単クローン抗体 (2.5 mg/ml) と反応させた。PBS で洗浄後、PE 標識-ヤギ F (ab')₂ 抗マウス IgG₁ 抗

体(0.625mg/ml)と、4℃にて30分間反応させた。PBSにて洗浄後、FACS Caliburにて解析した。

C. 研究結果

1. リコンビナントアデノウィルスの発現確認。

Cos細胞に、CA-nef-IRES-EGFP, CA-IRES-EGFP virusをそれぞれMOI 2, 2, 2で感染させ、24時間後回収し、細胞内染色を行いNef発現を確認した(図1A)。EGFP発現は、MOI 20以上で検出可能であった(図1B)。

2. CAR/DO10 Tg マウス表現型の確認

CAR Tg マウスと DO11.10 Tg マウスの交配により得た CAR/DO10 Tg マウスの T 細胞における CAR, TCR 発現を確認するため、ゲノタイプがそれぞれ CAR⁺/DO10⁺, CAR⁺/DO10⁻, CAR⁻/DO10⁺, CAR⁻/DO10⁻ マウス脾臓よりリンパ球を分離し、APC 標識抗 CD3 抗体、FITC 標識抗 CAR 単クローン抗体、ビオチン標識-KJ-1, PE 標識アビジンにて染色し、FACS-Calibur を用いて解析し、発現を確認した(図2)。

3. リコンビナントウィルス感染 CAR/DO10 Tg マウスリンパ球での Nef 発現確認。

CAR/DO10 Tg マウス脾臓より、抗 B220、抗 CD11b、抗 CD11c 抗体標識マイクロビーズを用い MACS によりネガティブセレクションで T 細胞を分離した。分離した T 細胞に MOI 20 で CA-Nef-IRES-EGFP ウィルスを感染させ、感染 24 時間後に抗 Nef 単クローン抗体を用いて細胞内染色をおこない、FACS Calibur にて解析した。Nef 発現細胞は 30% であった。しかし、EGFP 発現は確認できなかった(図3)。また、CAR/DO10 Tg マウス脾臓より分離したリンパ球に、MOI 20 で CA-Nef-IRES-EGFP ウィルスを感染させ、CD4 発現を検討した。Nef 発現指標である CD4 分

子発現抑制が確認されたが、EGFP 発現は確認されなかった(図4)。また、感染 T 細胞での Class I 分子発現抑制は認められなかった。

D. 考察

今回作製したウィルスが機能的に Nef を発現していることが確認できたが、EGFP の共発現は弱く、感染マーカーとしての利用は難しい。また、MOI 100 までの範囲でウィルス感染を行なったが、細胞内 Nef 発現を指標とした感染効率は 30%程度で殆ど差は見られなかった。移植実験を行うには Nef 発現細胞の選択が必要であり、EGFP 発現の改善と感染効率の上昇が必要である。前者については下流遺伝子の発現効率がより優れた IRES(Novagen)と、T 細胞での発現効率に優れたユビキチンプロモーターに変換したリコンビナントウィルスを作製中であり、後者については OVA ペプチドまたは抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体などによる刺激を加え検討する必要がある。また、組織内での Nef 発現を敏感な系により識別する方法も実験の改善につながり、検討中である。

E. 結論

HIVnef による免疫不全発症機構解明のため CAR/DO10 Tg マウスを対象とし、Nef 発現リコンビナントアデノウィルスを用いたアッセイ系を作製した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Toda, M., Hosokawa, H., Nakano, N., Inouye, S., Kaminogawa, S., Toshitada Takemori, T., and Sakaguchi, N. Inhibition of allergen-specific IgE responses by DNA vaccine using invariant chain gene for delivery of CD4⁺ T cell epitope peptide. *Eur. J. Immunol.* accepted, 2002.

2) Takasuka, H., Enami, K., Kuroda, K., Itamura, Y. and Takemori, T. Intranasal inoculation of a recombinant influenza virus containing the

exogenous nucleotides in the NS segment results in immune response against the exogenous gene product within the respiratory immune system. *Vaccine* in press, 2002

3) Shimoda, M., Nakamura, T., Takahashi, Y., Asanuma, H., Tamura, S., Kurata, T., Azuma, M., Kaneko, C. and Takemori, T. Isotype-specific selection of high-affinity memory cells in the nasal-associated lymphoid tissue (NALT).

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

4) Takahashi, Y. Ohta, H. and 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.

5) Yoshizawa, I., Souda, 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, 19:2995-3003, 2001.

6) 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 hot spots in the transgenic *Vk* gene.

Int. Immunol. 13: 1415-1422, 2001.

7) Hatama, S., Otake, K., Omoto, S., Murase, Y., Ikemoto, K., Mochizuki, M., Takahashi, E., Okuyama, H. and Fujii, Y. Isolation and sequencing of infectious clones of feline foamy virus and a human/feline foamy virus Env chimera. *J. Gen. Virol.*, 82:2999-3004, 2001

8) Hatama, S., Otake, K., Ohta, M., Kobayashi, M., Imakawa, K., Ikemoto, A., Okuyama, H., Mochizuki, M., Miyazawa, T., Tohya, Y., Fujii, Y. and Takahashi, E. Reactivation of feline foamy virus from a chronically infected feline renal cell line by trichostatin A. *Virology*, 283:315-323,

2001

2. 学会発表

[第 31 回日本免疫学会総会、大阪、2001 年]

1) 山本紀一、神山恒夫、小浦美奈子、高橋宜聖、竹森利忠「UV 感受性を示す抗マラリヤ感染防御機構の解析」

2) 井上薫、藤巻秀和、高橋宜聖、竹森利忠、野原恵子「ダイオキシンの脾臓における胚中心形成に及ぼす影響」

3) 外山博近、岡田誠治、武田紳江、市井啓仁、有馬雅史、高橋宜聖、竹森利忠、黒田嘉和、幡野雅彦、徳久剛史「メモリー B 細胞の分化における胚中心の役割」

4) 高橋宜聖、水落次男、幡野雅彦、徳久剛史、竹森利忠「ホメオボックス遺伝子 Hox11 による胚中心クローン選択機構の修飾」

5) 橋本修一、高橋宜聖、竹森利忠「記憶 B 細胞の確立過程に果たす Fas の役割」

6) Kodama, M., Hayashi, R., Nishizumi, H., Nagawa, F., Takemori, T., Sakano, H. Hayashi The PU.1 and NF-EM5 binding motifs in the *Igk3'* -enhancer are responsible for directing somatic hypermutations to the intrinsic hot spots in the transgenic *Vk* gene.

[第 49 回日本ウイルス学会、大阪、2001 年]

1) 横田(恒次)恭子、磯貝まや、大竹かおり、藤井陽一、竹森利忠 「HIV Nef の発現に伴う T 細胞機能分子の変動」

2) 竹尾奈々、村瀬泰規、大本真也、池本敦、奥山治美、大竹かおり、横田恭子、今川和也、横溝祐一、藤井陽一 「フォーミーウイルスを用いたヒツジ IFN-tau 発現と抗 HIV-1 活性の検討」

[8th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infecyions, Chicago, 2001]

Murase, Y., Otake, K., Takeo, N., Hatama, S.,

Okuyama, H., and Fujii, Y. "The nuclear localization of HIV type 1 Nef in a macrophage cell line."

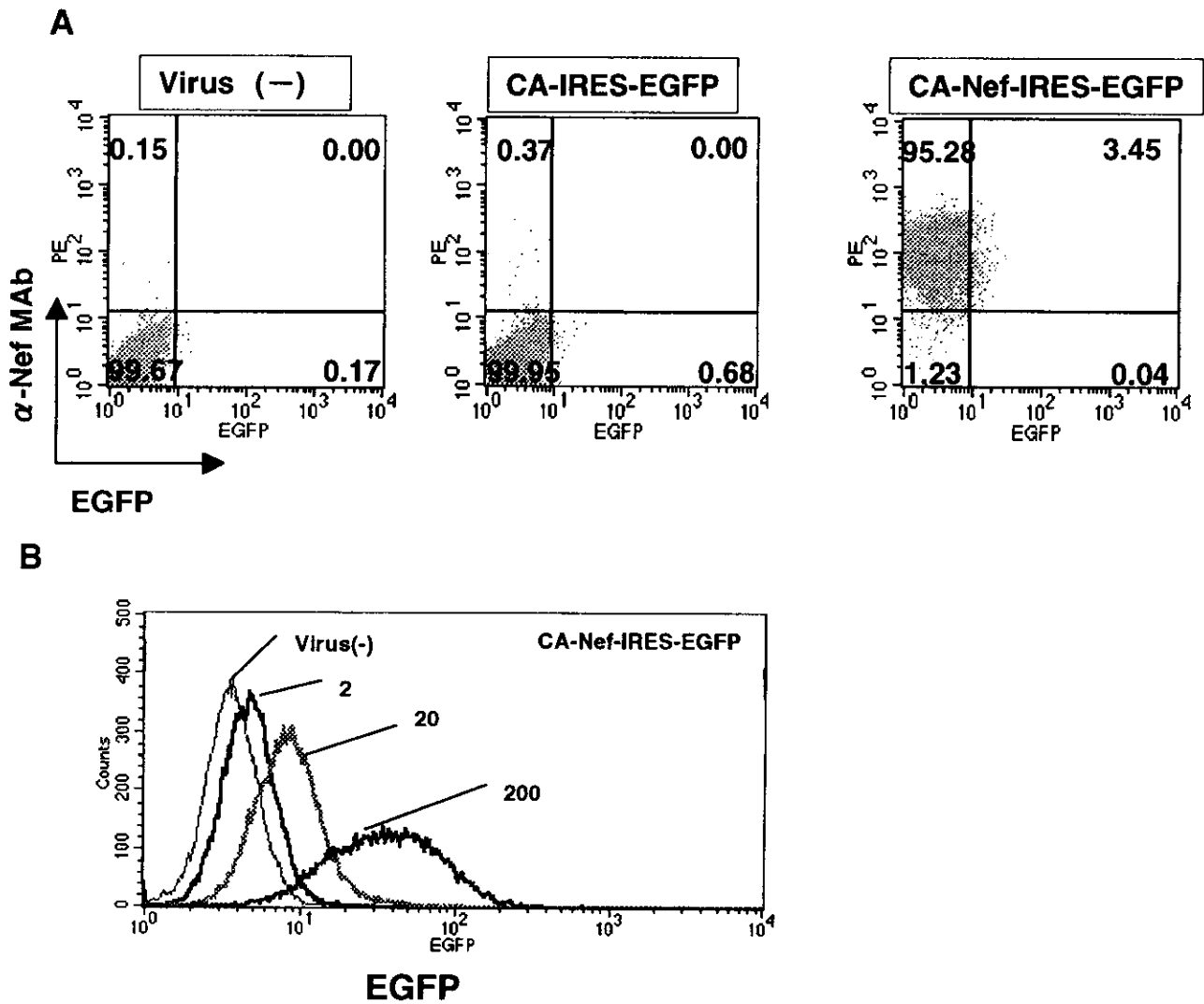


図1: Cos細胞における発現確認

A. CA-Nef-IRES-EGFP、CA-IRES-EGFP virusをMOI 200で、Cos細胞に37°Cで1時間、感染させた。24時間後細胞を回収し抗Nef単クローン抗体、PE標識抗マウスIgG₁抗体、EMAで細胞内染色を行い、FACS Caliburで解析した。数値は%を示す。B. 同サンプルをPI染色のみを行い、EGFPの発現をFACS Caliburで解析した。数値はMOIを示す。

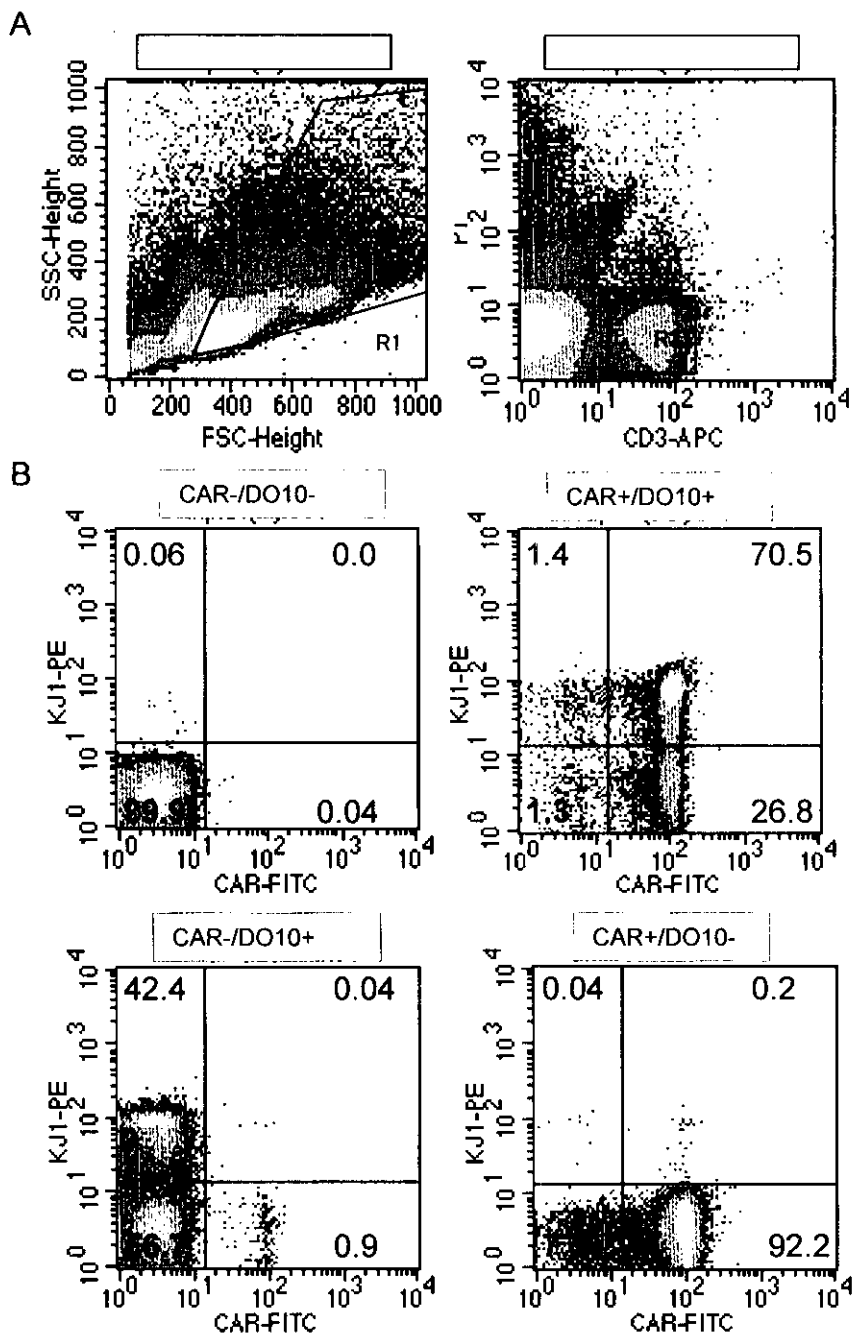


図2: CAR/DO10 Tg マウス Tリンパ球のCAR、TCR発現

遺伝子型が、CAR-/DO10-、CAR-/DO10+、CAR+/DO10-、CAR+/DO10+ Tg マウス脾臓細胞をAPC標識抗CD3抗体、FITC標識抗CAR抗体、ビオチン標識KJ-1-26抗体、PE標識アビジンとPI染色を行いFACS Caliburで解析した。CD3陽性、PI陰性細胞にゲートをかけ、CARとOVAペプチド特異的T細胞受容体の発現を解析した。数値は%を示す。

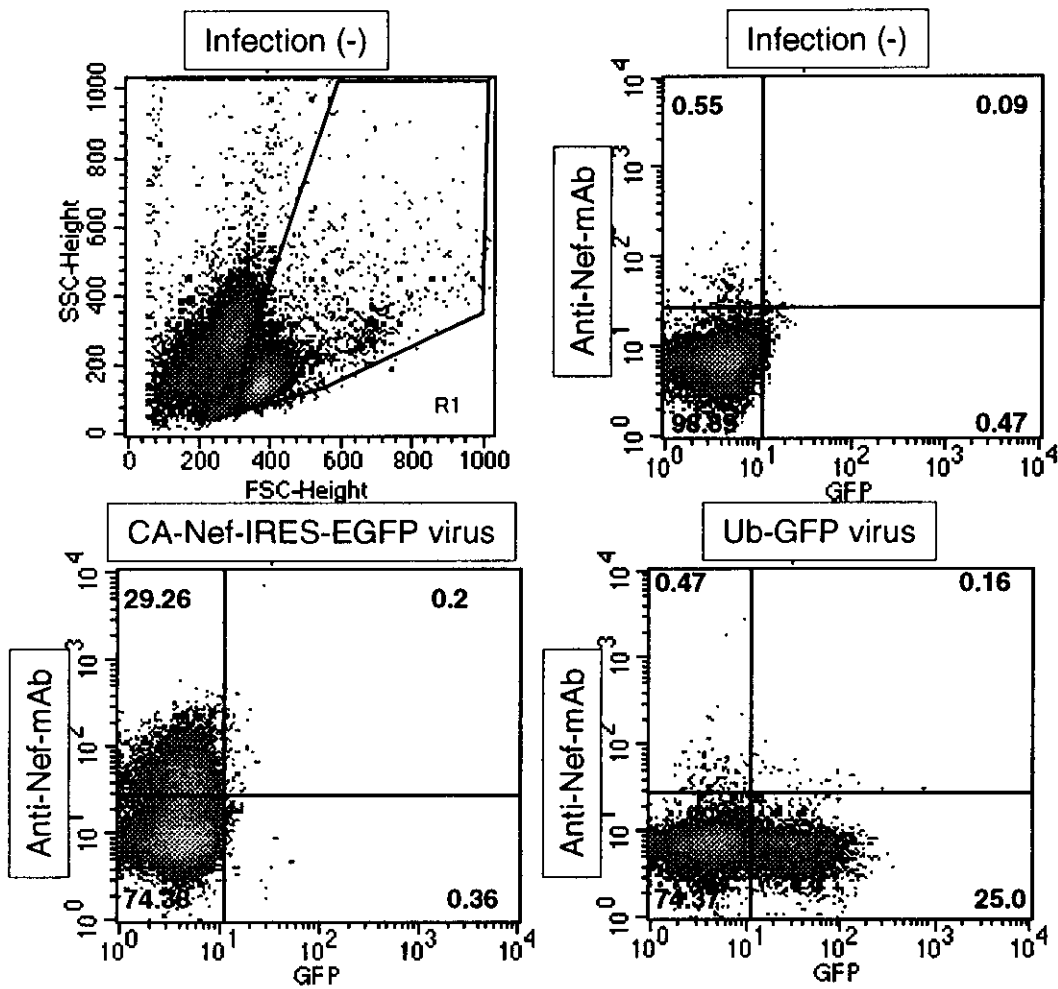


図3: マウスT細胞におけるNef発現

CAR/DO10 Tgマウス脾臓細胞より、ラット抗B220抗体、抗CD11b抗体、抗CD11c抗体標識マイクロビーズを用いてMACSによるネガティブセレクションでT細胞を分離した。T細胞にCA-Nef IRES-EGFP virusまたはUb-GFP virusをMOI 20で37°Cで1時間感染を行い、24時間後に細胞内染色を行い、FACS Caliburを用いて解析した。数値は%を示す。

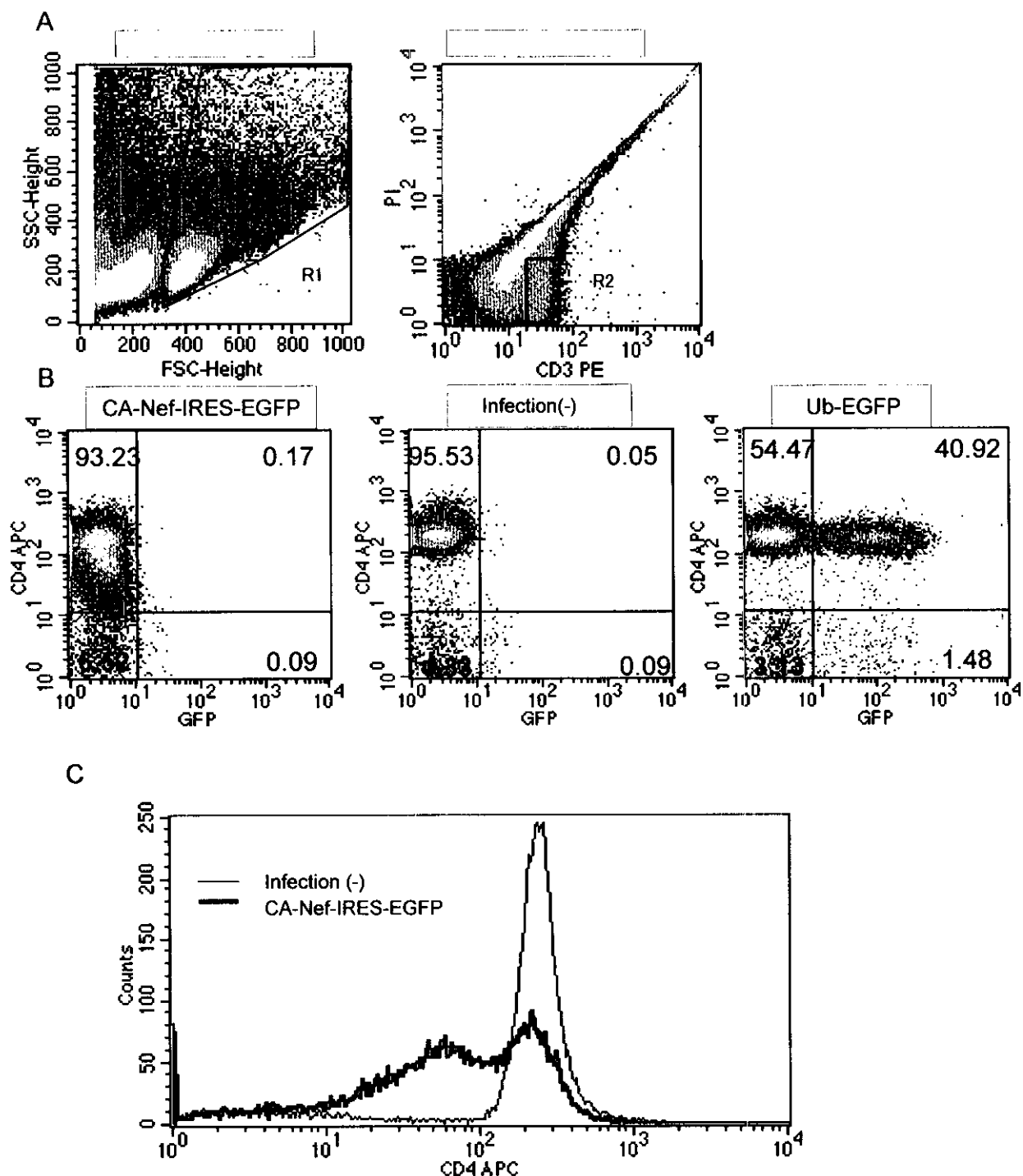


図4: マウスT細胞におけるNef発現によるCD4分子発現抑制

CA-Nef-IRES-EGFP virusまたはUb-GFP virusを、MOI 20でCAR/DO10 Tg マウス脾臓細胞に、37°Cで2時間感染を行った。24時間後PE標識抗CD3抗体、APC標識抗CD4抗体、PIにて細胞表面染色を行いFACS Caliburで解析した。A. CD3陽性、PI陰性細胞にゲートをかけ、B. CD4分子発現とEGFP発現を解析した。数値は%を示す。C. CD4分子発現をヒストグラムで解析した。

SIV 感染と宿主応答における糖鎖の意義に関する研究

分担研究者 森 一泰 国立感染症研究所 主任研究官

研究協力者 杉本智恵 国立感染症研究所 協力研究員

研究要旨： SIVmac239 の Env gp120 の 2 3 個の糖鎖中 5 個 (79, 146, 171, 460, 479) のアスパラギン結合型糖鎖を欠くウイルスΔ5G は初期感染期において SIVmac239 とほぼ同様の増殖能を示したが宿主により感染制御された。さらに感染ザルは SIVmac239 感染を防御した。Δ5G 感染に誘導されたエイズウイルス感染防御に有効な免疫であることから、その性状を明らかにするためにまずΔ5G 感染ザルに誘導された防御免疫がΔ5G Env 蛋白の免疫原性に起因するのか検討した。Env gp120 を発現する DNA ワクチンと Env gp160 を発現するワクシニアを用いた Prime-Boost 法によりサルを免疫後、SIVmac239 を静脈内接種した。サル 12 頭を用い、Δ5G Env 免疫群と野生株 Env 免疫群、Vector コントロール群の 3 群におけるウイルス感染を調べ糖鎖欠失変異の感染防御効果への影響を検討した。初期感染のピークにおいては Vector コントロール群と比べ、野生株 Env 免疫群ではウイルス量は 1/20-1/10 で、Δ5G Env 免疫群では 1/5-1/10 であった。初期感染後の感染抑制については野生株 Env 免疫群では 4 頭すべてにおいて 20 週までに測定感度以下となったがΔ5G Env 免疫群では Vector コントロール群と同様なウイルス感染が見られた。糖鎖欠失変異導入により SIVmac239 に対する感染防御免疫が低下した可能性が示唆される。今後、糖鎖欠失により Env 蛋白内の抗原エピトープの提示に変化が生じたのか検討する必要がある。

A. 研究目的

エイズワクチン開発の困難さの根拠のひとつとして、ウイルス外膜蛋白(Env)に存在する多数の糖鎖が本来は有効であるべき近傍の抗原エピトープを覆い無効にしていることが示唆されている。Env はウイルスの細胞指向性を決定する因子でもあることから糖鎖構造はウイルス感染の標的細胞、組織特異性に影響を与えている可能性も推測される。このような糖鎖がウイルス感染における宿主応答、あるいは感染増殖における役割を理解することはエイズウイルスに対する有効な免疫を誘導する方法あるいはエイズウイルス感染増殖を阻止する方法を開発する上で重要である。我々は SIV Env gp120 上の 2 3 個の糖鎖についての欠失変異体作成とそのウイルス増殖能から総計 5 個の糖鎖を欠くウイルス(Δ5G)を作成

しサルにおける増殖性、病原性、免疫原性を親株(SIVmac239)と比較した。Δ5G は感染後 3 週までの初期感染までは SIVmac239 と同様な感染増殖を示したが、親株と異なりウイルス感染は効率良く制御され感染後 8 週までには検出されなくなった。さらに感染後 1 年に SIVmac239 を再接種したがウイルス感染は防御された。これらの結果は糖鎖が感染宿主がエイズウイルスに対する有効な免疫が誘導することを妨げていることを示唆しているが、その機序については色々な可能性がある。今年度は糖鎖欠失により新たな抗原エピトープが出現し感染宿主にΔ5G、さらに SIVmac239 に対する有効な防御免疫が誘導されたのではないかという可能性について検討した。この仮説に基づき糖鎖欠失(Δ5G Env)の感染防御免疫誘導能について野生株ウイル

ス env 蛋白との比較を行った。

B. 研究方法

アカゲザル

ミャンマー原産の育成ザル、オス、2才、体重 2Kg、Bウイルス、SRV、STLV、SIV に対する抗体が陰性、培養リンパ球における SIV 増殖性に問題がないサルで、1群4頭、3群の合計 12 頭を用いた。

DNA prime 組み換えワクシニア Boost 法による Env 蛋白の免疫法

DNA ワクチン用に開発された pJW4303 ベクターに SIVmac239 または Δ5G の gp120 の蛋白コード DNA 導入した Plasmid (pJWSUmac, pJWSUmacΔ5G) または pJW4303 ベクター 2 mg を 0, 4, 8 週に大腿部左右 2 カ所に筋肉内接種した。21 週に SIVmac239 または Δ5G の gp160 を発現する組み換えワクシニアまたはワクシニアベクター (WR 株) 5×10^7 PFU を大腿部左右 2 カ所に皮内+筋肉内接種した。

ウイルス

SIVmac239 と糖鎖変異体 (delta 5G) を用いた。delta 5G は SIVmac239 DNA を元に env 上の N-glycosylation sites (79, 146, 171, 460, 479 アミノ酸残基) の Asn を Gln に置換することにより作成した。実際の糖鎖の減少は生化学的な方法で確認した。ウイルスストックはウイルス DNA クローンを培養細胞 (SW480 または COS-1) に transfection を行い作成した。Transfection 2—4 日後の培養上清を種ウイルスとしてアカゲザル培養リンパ球を用いてさらに増殖させ感染実験用ウイルスとした。ウイルス量は gag 抗原量については Coulter 社の p27 gag antigen assay kit により、TCID₅₀ はサル CD4 陽性 T 細胞 (CyfT/HVS) を用いて測定した。

ウイルス接種

20 TCID₅₀ の SIVmac239 を免疫開始後 28 週に静脈内接種した。

血しょうウイルス RNA 量の測定

血しょう中のウイルス RNA は Boehringer Mannheim 製キットを用い精製した。ウイルス RNA 量は SIV の gag 遺伝子配列から作成したプライマー: the gag primers, forward primer: 1224F (5'-AATGCAGAGCCCCAAGAAGAC-3'), reverse primer: 1326R (5'-GGACCAAGGCCTAAAAAACCC-3') and TaqMan probe 1272T: (FAM-5'-ACCATGTTATGGCCAAATGCCAGAC-3'-TAMRA) を用い、RT-PCR キット (TaqMan EZ RT-PCR kit) を用いてリアルタイム PCR 法により測定した。

抗 SIV 結合抗体価の測定

SIVmac239 virion lysate を抗原として作成した ELISA プレートを用いて血漿を 100 倍希釈し抗体価を測定した。

中和抗体価の測定

SIV tat 依存性に発現する分泌型アルカリフォスファターゼ遺伝子をレポータ遺伝子として持つ CEMx174 を用いてウイルス感染量を高感度に測定できる系を用いて、血しょう中のウイルス中和抗体価を測定した。中和されるウイルスとして 239/env5G と SIVmac239 を用いた。

フローサイトメトリーによる末梢血リンパ球の細胞表面抗原の解析

血中のリンパ球サブセット (CD3+, CD4+, CD8+, CD16+, CD20+, CD29+リンパ球) の割合についてそれぞれの 2 種類のモノクローナル抗体の組み合わせにより解析した。血中の CD4+ 細胞数は自動血球計算機によりリンパ球数を測定し、フローサイトメトリーの結果を用いて CD4+ 細胞数を算出した。

倫理への配慮

本研究では動物実験が中心であることから、動物実験方法については倫理上、動物愛護の問題の観点か

ら感染研動物実験委員会が定めたルール、ガイドラインに従った。動物実験開始に際しては事前に感染研動物実験委員会による審査・承認を受けた。

C. 研究結果

Env 蛋白免疫による抗 SIV 抗体の誘導

DNA+ワクシニアによる Prime-Boost 法はエイズウイルスに対する特異的な CTL を効率よく誘導することが報告されている。DNA ワクチンによる免疫では抗体の誘導は弱いことが予想されたが、図 1 に示されるように 3 回の免疫による抗体の検出は見られなかった。ところがワクシニアベクターを用いた Env タンパクによる boost 後には抗 SIV 抗体が検出された。

免疫のリンパ球サブセットへの影響

SIV 抗体価の上昇と対応するように末梢血液中の B 細胞数の割合の増加が 24 週にすべての動物に見られた。同時に CD3 T 細胞の割合が減少した。原因のひとつにはワクシニア接種部位に見られた強い炎症が考えられた。炎症部位または近傍のリンパ節への T 細胞の集積が末梢血液中の T 細胞の減少の原因となった可能性も否定できない。その他のリンパ球で免疫により変化は以下のサブセットで見られた。CD4+CD29^{high} (memory CD4 T 細胞) は 1 回目の DNA 接種後に増加が見られたが 2 回目以降は見られなかった。NK 細胞 (CD8+CD16+ cells) の割合は DNA 接種後とワクシニア接種後に見られた。

SIVmac239 感染に対する感染防御効果

SIVmac239 の血中ウイルス RNA 量はコントロール群 (Vector 接種) では感染後 2 週に 10^7 copy/ml 以上のピークが観察された。初期感染後のウイルス感染抑制は弱く 3/4 頭では発症型が、1/4 頭は長期無発症型の viral load のパターンが見られた (図 2)。SIVmac239 Env 免疫群では明らかなウイルス感染に対する抑制効果が見られた。

初期感染のウイルス RNA 量のピークはコントロール群の 1/10 以下であり、感染抑制はさらに続き、2 頭では 8 週までに、残り 2 頭においても 20 週までに測定感度 10^3 copy/ml 以下に減少した (図 2)。ところが糖鎖欠失変異 Env ($\Delta 5G$ Env) 免疫群ではウイルス感染抑制は弱かった。初期感染のピークの値ではコントロール群と比較して 1/5-1/10 に低下したが、その後の感染抑制はコントロール群と同様であった。

感染後の抗 SIV 抗体の変化

Env タンパク免疫群ではウイルス感染後 1 週に抗体価は減少したが 2 週にはコントロール群と比較してより高い抗体価が野生株 Env > $\Delta 5G$ Env の順番で見られた (図 1)。個別別に見ると抗体価が高い個体は低いウイルス量を示していた。感染制御においては野生株 Env 免疫群が $\Delta 5G$ Env の群と比べ強い感染抑制が見られたが、による違いが感染後の抗体価の変化において見られた。SIV 抗体価の変化においても違いが見られた。特に抗体のピークである感染後 4 週以降において野生株 Env 免疫群では抗体価が減少したのに対して $\Delta 5G$ Env 免疫群では高い抗体価が維持された (図 1)。

感染後リンパ球サブセットの変化

感染後の血中リンパ球の割合については B 細胞と T 細胞が感染後大きく変化した。CD3/CD20 の比で見ると感染後 2 週に一時的な大きなピークが見られた。原因は感染後まず T 細胞の割合の増加があり、送られて B 細胞の割合が増加するためである。最も高いピークが見られたのは野生株 Env 免疫群で ウイルス接種後 1 週にピークになり感染後 4 週に最低値となりその後また増加した。それに対して $\Delta 5G$ Env 免疫群では感染後 2 週にピークとなるがその後減少し以降低値を保つ個体とさらに減少する個体が見られた。 $\Delta 5G$ Env 免疫群ではウイルス感染抑制の程度が個体により異なっているが、抑制が弱い

個体は後者であり、CD20+ B 細胞の増加と CD3+ T 細胞の減少が見られた。これらの個体では CD4+、CD8+両細胞が減少していた。

D. 考察

サルを用いた感染実験から糖鎖変異ウイルスΔ5G は初期感染後に感染制御されること、さらに SIVmac239感染に対する防御免疫が獲得されていた。Δ5G は5本の糖鎖欠失以外に変異がないことから、Δ5G 感染により SIVmac239 感染では誘導されない感染防御に有効な免疫が誘導される可能性を検討することを目的に Env タンパクのみを用いてサルを免疫し SIVmac239 に対する防御効果を検討した。結果は明らかにむしろ SIVmac239 の Env がより効果的な防御免疫を誘導することが分かった。すなわち糖鎖の欠失により有効な抗原エпитープが現れるのではなく、むしろ本来有効な抗原エпитープが糖鎖の欠失により隠された可能性を示唆している。この点を確認するためにはサルに誘導された Env に対する免疫についての詳細な解析が必要である。糖鎖の欠失が Env 内の抗原エпитープ (抗体エпитープあるいは helper T 細胞エпитープ) に変化を与えたのか、Env peptides を用いてについて調べる必要がある。今回の結果で特に注目された点はウイルス感染後に見られた末梢リンパ球に見られた変化が野生株 Env とΔ5G Env 免疫群で異なったところである。感染防御が効果的であった個体では CD3 T 細胞の割合はしており、逆に減少した個体で感染抑制が弱いという結果であった。このような CD3 T 細胞の減少はコントロール群でも見られなかった。この現象についても糖鎖欠失変異との関連を明らかにする必要がある。

E. 結論

Δ5G 感染に誘導された宿主免疫がΔ5G Env の免疫原性の違いによるかを調べるために、Env gp120 を発現する DNA ワクチンと Env gp160 を発現するワクシニアを用いた Prime-Boost 法によりサルを免疫し SIVmac239 に対する感染防御効果を調べた。野生株 Env 免疫群ではウイルス量はピークが低下し感染後 20 週までに測定感度以下となったが、Δ5G Env 免疫群ではピーク低下は見られなかったが初期感染後の感染抑制は見られなかった。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

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. Virol.* **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**. 500-599. 2002.

2. 学会発表

1. C. Sugimoto, Y. Yasutomi, N. Saitoh, S. Ohgimoto, Y. Nagai and K. Mori. A quintuple deglycosylation mutant of SIVmac239 in rhesus macaques. Roles of viral specific CD4+ T and CD8+ T cells for containment of infection. 19th annual symposium on nonhuman primate

models for AIDS, November, 2001, San Juan, Puerto Rico

2. K. Mori, K. Tadakuma, I. Otani, T. Sata, T. Moritoyo and S. Izumo. Preferential localization of simian immunodeficiency virus infected cells in B cell region but not in T cell region of lymph nodes in the macaques infected with an attenuated nef deletion mutant. 19th annual symposium on nonhuman primate models for AIDS, November, 2001, San Juan, Puerto Rico

3. 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 is sufficient to induce long term non progressor status. 19th annual symposium on nonhuman primate models for AIDS, November, 2001, San Juan, Puerto Rico

4. 新規 RT inhibitor (GW420867)を用いた感染後早期治療動物モデルの開発と免疫機能の解析, 齋藤紀子, 保富康宏, 杉本智恵, 澤田周三, 洲鎌和茂, Francois Villinger, Aftab Ansari, 山崎修道, 森一泰

日本エイズ学会, 2001年, 東京

5. 糖鎖欠失 SIV(Δ 5G)感染アカゲザルの感染制御に関するウイルス特異的 CD4+および CD4+T細胞の解析 杉本智恵, 保富康宏, 扇本真治, 永井美之, 森一泰, 日本エイズ学会, 2001年, 東京

6. 糖鎖変異 env による感染防御免疫誘導能の検討, 森一泰, 保富康宏, 扇本真治, 武部豊, 齋藤紀子, 杉本智恵, 永井美之, 日本エイズ学会, 2001年, 東京

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

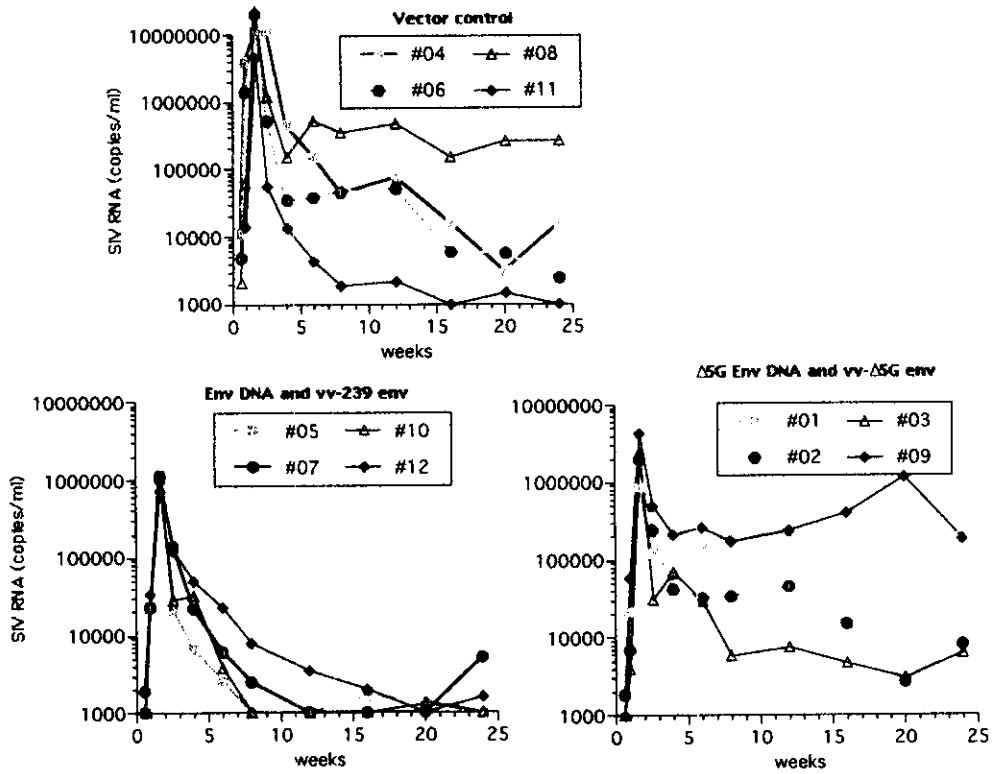
Method and Medicaments for post exposure prophylaxis of an HIV infection USA 国内出願番号 09/988,798

EPC EPC 出願番号 EP 00 938 669.9

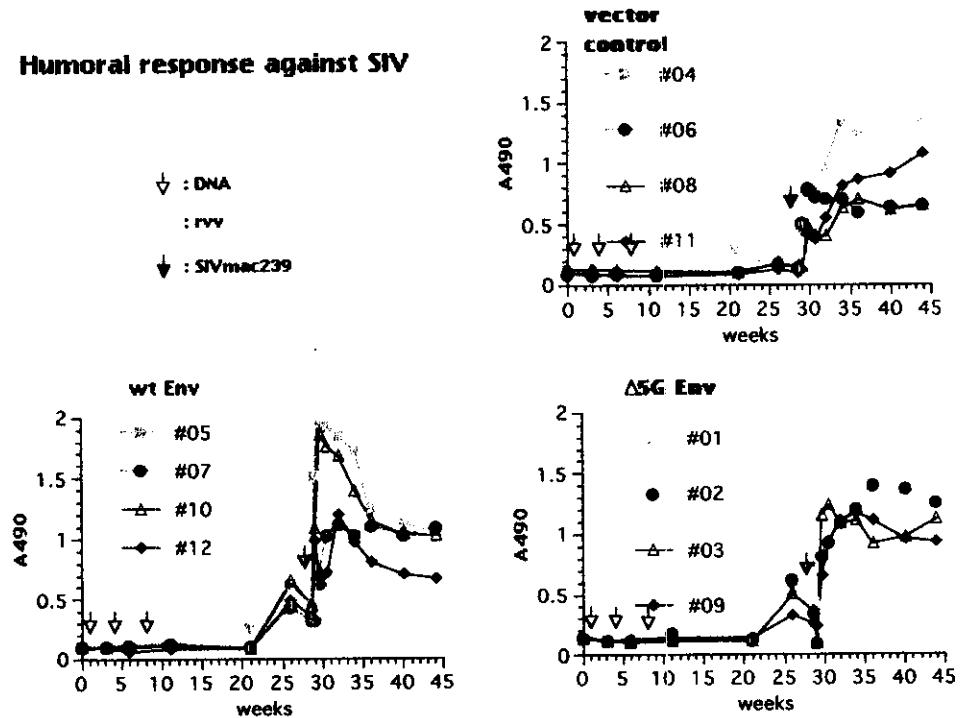
2. 実用新案特許 なし

3. その他 なし

☒ 1 Plasma viral load



☒ 2 Humoral response against SIV



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

分担研究者 俣野 哲朗 東京大学大学院医学系研究科微生物学講座助教授

研究要旨

エイズワクチン開発は世界的レベルの重要課題である。われわれは、エイズ発症を予防するワクチンの開発を目的として、マカクサルエイズモデルにて、ウイルス特異的細胞性免疫誘導型ワクチンについての解析をおこなってきた。本研究において、昨年度は、DNA ワクチンと Gag 発現センダイウイルス(SeV)ベクターワクチンとを併用した DNA/SeV-Gag プライム・ブースト法を開発し、SHIV（サル・ヒト免疫不全ウイルス）感染マカクサル急性エイズモデルにおいて、このシステムによる非常に優れた細胞性免疫誘導効果および感染・発症防御効果を明らかにした。今年度は、このシステムの完成度を高めることを目的として、有効性および安全性の各々について、以下の検討をおこなった。（１）防御免疫機構の解析：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。DNA/SeV-Gag プライム・ブーストワクチンは、急性エイズ発症阻止のみでなく、急性末梢血 CD4 陽性 T リンパ球減少阻止効果を有するが、前者には高レベルの特異的 CD8 陽性 T リンパ球 2 次反応が必要であり、後者にはさらに特異的 CD8 陽性 T リンパ球 2 次反応の早期出現が必要であった。以上より、免疫不全ウイルス感染防御における特異的 CD8 陽性 T リンパ球の迅速な 2 次反応の重要性が明らかとなった。（２）安全性を高める手法についての検討：これまで DNA プライムには、プロウイルスタイプの DNA を用いてきたが、今回、一般のプロモーター(CMV プロモーター)により抗原を発現する DNA を用いた。接種回数も減らし、プライム (DNA) 1 回、ブースト (SeV-Gag) 1 回のみとした。昨年度のプライム・ブースト法と比較して、今回の方法では、DNA プライム後の特異的 T リンパ球誘導レベルは低下したが、ブースト後の特異的 T リンパ球誘導は良好であった。したがって、今回の安全性を高めた手法についても、有効性の点で充分期待しうると考えられた。

A. 研究目的

エイズワクチン開発は世界的レベルの重要課題である。近年、HIV-1 感染防御における宿主細胞性免疫の重要性が指摘されてきていることから、エイズワクチン研究においても、ウイルス特異的細胞性免疫を誘導する手法の開発が期待されている。そこでわれわれは、感染防御の key となる免疫機構を特定し、エイズ発症を予防するワクチンを開発することを目的として、効率よいウイルス特異的細胞性免疫誘導法を検討することとした。

われわれは、これまでに、限局的複製誘導 DNA ワクチンとセンダイウイルス(SeV)ベクターワクチンという 2 つの新規ワクチン手法を開発し、マカクサルエイズモデルに検討してきた。限局的複製誘導 DNA ワクチンシステムは、サル免疫不全ウイルス SIV の env をフレンドマウス白血病ウイルス FMLV の env に組み換えたキメラウイルス FMSIV DNA と FMLV レセプター DNA とを接種するものである。SeV ベクターワクチンとしては、SIV Gag 発現組換え SeV ベクター(SeV-Gag)を用いてきた。さらに、本研究において昨年度、この両者を併用して DNA/SeV-Gag プライム・ブースト法を開発し、SHIV（サル・ヒト免疫不全ウイルス）感染マカクサル急性エイズモデルにおいて、このワクチンシス

テムによる非常に優れた細胞性免疫誘導効果および感染・発症防御効果を明らかにした。

これまでのエイズワクチン研究では、マカクサルモデルにおける発症を防御する手法の開発が第一段階の目標であったが、昨年度から今年度にかけて、われわれを含めた 4 グループが、各々独自のプライム・ブースト法を開発して、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わけである。今年度は、このシステムの完成度を高めることを目的として、有効性および安全性の各々について、検討をおこなうこととした。

有効性の検討においては、防御免疫機構の解析が重要である。しかし、これまではワクチンによる防御効果が不十分であったため、免疫反応と防御レベルとの相関についての解析が不可能であった。今回われわれのシステムにより優れた防御効果が得られたため、この相関について検討した。

安全性を高める手法としては、まず、DNA プライムについて検討した。安全性については、これまでのプロウイルスタイプの DNA を用いる限局的複製誘導 DNA ワクチンは、すでに遺伝子治療用に利用されているレトロウイルスベクターとほぼ同じレベルであり、理論的には臨床応用可能であると考えられる。しかし、さらに今回は、一般的な DNA ワ

クチンと同じレベルの安全性を確保するため、一般的なプロモーターにより抗原を発現する DNA を用い、有効性がどの程度保持されるかを検討した。

B. 研究方法

1 防御レベルの解析： 昨年度、サルモデルにておこなったワクチンによる SHIV89.6PD 感染防御実験において、まず、その感染防御レベルについて解析した。用いた赤毛サルは、ナイーブ対照群（第 1 群）4 頭、限局的複製誘導 DNA ワクチンのみ接種群（第 2 群）3 頭、SeV-Gag のみ接種群（第 3 群）3 頭、DNA/SeV-Gag プライム・ブースト接種群（第 4 群）4 頭の、計 4 群/14 頭である。

2 防御免疫機構の解析： その防御レベルと特異的細胞性免疫反応レベルとの相関について解析した。SHIV 特異的 T リンパ球レベルは、SHIV 特異的刺戟後誘導される細胞内インターフェロナー（IFN- γ ）陽性細胞の検出により測定した。

3 より安全な DNA ワクチンを用いたプライム・ブースト法の解析： 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 として、env・nef 欠損 SHIV プロウイルス DNA の 5'-LTR をサイトメガロウイルス（CMV）プロモーターに、3'-LTR を SV40 polyA に組み換えた CMV-SIVGP DNA を作成した。赤毛サルに、プライムとして CMV-SIVGP DNA ワクチンを 1 回接種後、6 週目にブーストとして SeV-Gag を 1 回経鼻接種し、SHIV 特異的 T リンパ球レベルを測定した。

なお、全ての動物実験は、倫理面も含めて、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した。

C. 研究結果

1 防御レベルの解析： SHIV チャレンジ後 6 ヶ月～1 年間の経過観察をおこなった。末梢血 CD4 陽性 T リンパ球数の変化を図 1 に示す（3 ヶ月までは昨年度報告）。この結果から、チャレンジ後の経過は、以下の 3 群に大別することができた。

防御レベル A（第 1 群 3 頭、第 3 群 1 頭）： 急性（2 週目）の末梢血 CD4 陽性 T リンパ球減少を示し、その後 CD4 陽性 T リンパ球の回復もなく、急性エイズを発症した。

防御レベル B（第 1 群 1 頭、第 2 群 2 頭、第 3 群 2 頭）： 一過性の急性末梢血 CD4 陽性 T リンパ球減少を示したが、その後 CD4 陽性 T リンパ球数の回復がみられ、急性エイズ発症は阻止された。

防御レベル C（第 2 群 1 頭、第 4 群 4 頭）： 急性末梢血 CD4 陽性 T リンパ球減少が阻止され、急性エイズ発症は阻止された。

この 3 群における血漿中ウイルス量（図 2）については以下の相関が得られた。

(i) チャレンジ後 2 週目の急性末梢血 CD4 陽性

T リンパ球減少が阻止された防御レベル C 群のみにおいて、2 週目ピーク時のウイルス量は、対照群（第 1 群）と比較して 100 分の 1 以下に低下していた。

(ii) 急性エイズ発症が阻止された防御レベル B および C 群では、set-point ウイルス量は、防御レベル A 群と比較して低値を示し、6 ヶ月以内に検出限界以下まで低下した。

2 防御免疫機構の解析： 防御レベル C 群では、チャレンジ後 2 週目における末梢血 CD4 陽性 T リンパ球減少が阻止され、2 週目ピーク時のウイルス量の顕著な低下が認められた。したがって、2 週間以内に誘導される免疫反応が重要と考えられた。そこで、チャレンジ後 1 週目と 2 週目における SHIV 特異的 T リンパ球 2 次反応を解析した（図 3）。

防御レベル A 群： SHIV 特異的 T リンパ球 2 次反応は認められなかった。（第 3 群の 1 頭のみ、2 週目に若干の特異的 CD8 陽性 T リンパ球の反応が認められた。）

防御レベル B 群： 第 1 群では、SHIV 特異的 T リンパ球 2 次反応は認められなかった。第 2 群では、1 週目に特異的 CD4 陽性 T リンパ球の 2 次反応が認められたものの、CD8 陽性 T リンパ球の反応は認められず、2 週目になって検出された。第 3 群では、1 週目の 2 次反応は認められず、2 週目になって非常に高レベルの CD8 陽性 T リンパ球反応が認められた。以上のように、様々なパターンが認められたが、CD8 陽性 T リンパ球の 2 次反応が 1 週目には検出されず 2 週目になって出現する点は、ほぼ共通していた。

防御レベル C 群： 1 週目より、SHIV 特異的 CD4 陽性 T リンパ球・CD8 陽性 T リンパ球両者の 2 次反応が認められた。

したがって、防御レベルとチャレンジ後の特異的 T リンパ球反応レベルとについては以下の相関が得られた。

(i) 1 週目より、特異的 CD4 陽性 T リンパ球・CD8 陽性 T リンパ球両者の 2 次反応が認められたサルのみ、ピーク時ウイルス量の顕著な低下が認められ、急性末梢血 CD4 陽性 T リンパ球減少が阻止された。

(ii) 2 週目に高レベルの特異的 CD8 陽性 T リンパ球反応が認められたサルでは、set-point ウイルス量の顕著な低下が認められ、急性エイズ発症が阻止された。

3 より安全な DNA ワクチンを用いたプライム・ブースト法の解析： DNA ワクチン後の SHIV 特異的 T リンパ球誘導は検出限界レベル前後で、昨年度の限局的複製誘導 DNA ワクチンと比較して劣っていた。しかし、ブースト後は高レベルの特異的 T リンパ球が認められた（図 4）。特異的 T リンパ球レベルの個体差は比較的大であった。

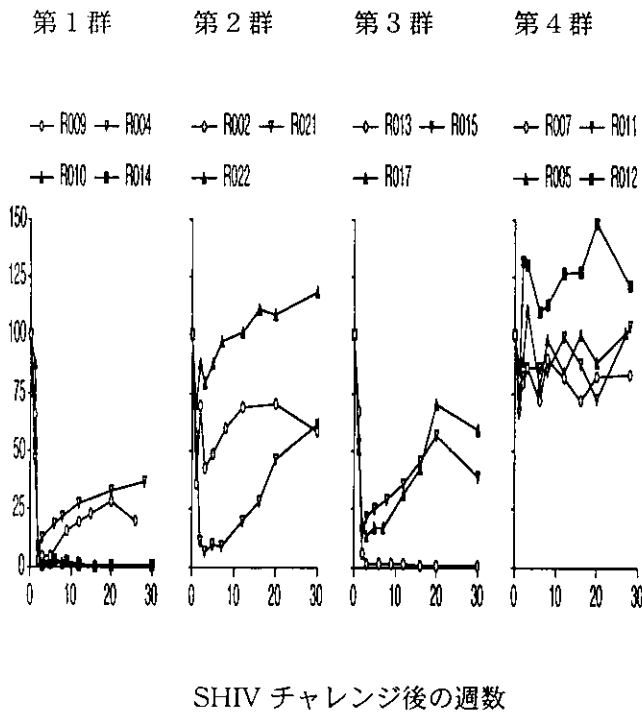


図1 SHIV チャレンジ後の末梢血 CD4 陽性 T リンパ球数 (相対値/チャレンジ時:100)

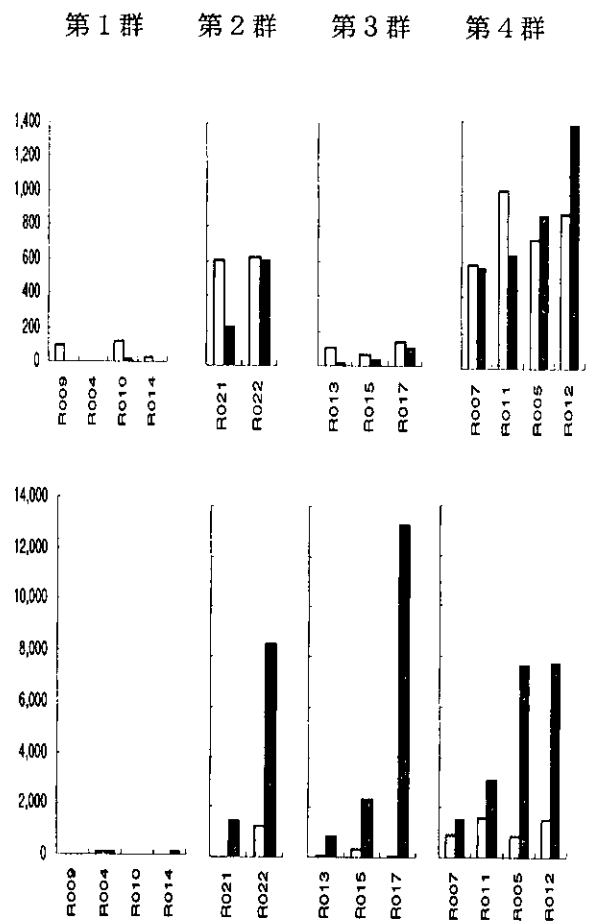


図3 SHIV チャレンジ後の SHIV 特異的 T リンパ球レベル (上段: 第1週, 下段: 第2週。白棒: CD4 陽性 T リンパ球, 黒棒: CD8 陽性 T リンパ球。)

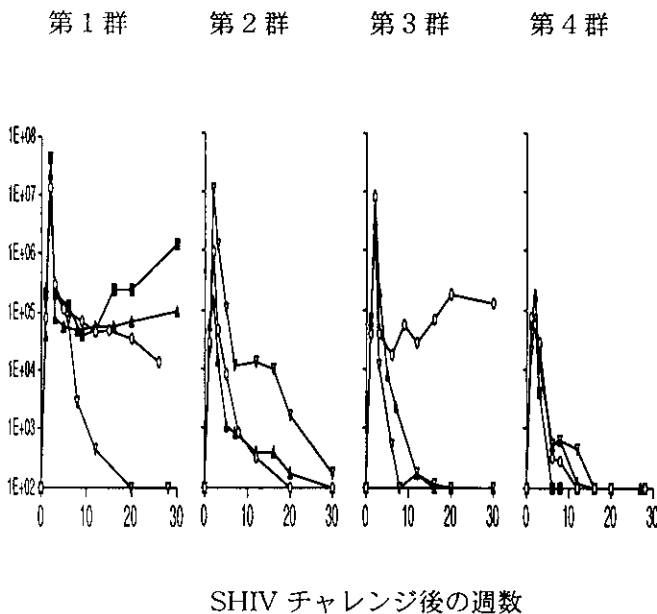


図2 SHIV チャレンジ後の血漿中 SHIV RNA コピー数 (copy/ml)

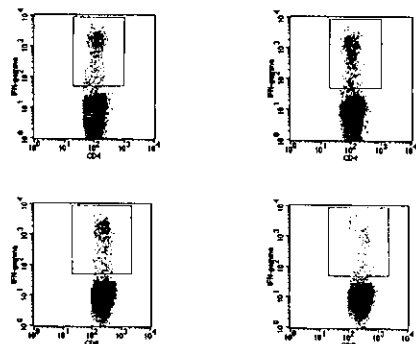


図4 CMV-SIVGP/SeV-Gag による SHIV 特異的 T リンパ球誘導 (第7週、ブースト後1週。左: 赤毛サル R050, 右: 赤毛サル R054。上段: CD4 陽性 T リンパ球, 下段: CD8 陽性 T リンパ球。)

D. 考察

昨年度から今年度にかけて、いくつかの他のグループにおいても、SHIV サルモデルにおける防御効果についての報告がなされたが、これらは全て、上記の B クラスの防御レベルであり、急性エイズ発症阻止には成功したものの、急性末梢血 CD4 陽性 T リンパ球減少阻止効果は充分ではなかった。したがって現在、上記の C クラスの防御レベルに到達しているのは、われわれの DNA/SeV-Gag プライム・ブーストのみである。なお、上記の B クラスの防御レベルについては、われわれの限局的複製誘導 DNA ワクチンのみ (第 2 群) でも到達しており、このシステムが従来の DNA ワクチンより有効であることも確認された。

本研究では、A、B、C の 3 段階の防御レベルが得られたので、防御レベルと特異的細胞性免疫反応との相関について検討することができ、各群の比較、特に B 群と C 群との比較から、以下のような結論が得られた (図 5)。

(i) 急性末梢血 CD4 陽性 T リンパ球減少阻止、およびピーク時ウイルス量の低下には、特異的 CD8 陽性 T リンパ球の 2 次反応が早期 (1 週目) に出現することが必要である。

(ii) 急性エイズ発症阻止、および set-point ウイルス量の低下には、高レベルの特異的 CD8 陽性 T リンパ球の 2 次反応が必要である。

上記の(ii)については、昨年度から今年度にかけての他のグループによる報告においても指摘されている。われわれは、さらに上記の(i)を示すことにより、免疫不全ウイルス感染防御における特異的 CD8 陽性 T リンパ球の迅速な反応の重要性を明らかにした。今後は、チャレンジ前のワクチン誘導免疫とチャレンジ後の 2 次反応との相関についても解析し、この迅速な 2 次反応に必要な免疫機構についての検討をおこなう予定である。

一方、安全性を高める手法の検討も、臨床応用を考えるうえで重要である。今回は、まず、DNA ワクチンの安全性を高めた CMV-SIVGP DNA/SeV-Gag プライム・ブースト法について検討し、その良好な特異的 T リンパ球誘導能を確認した。今後、感染防御効果の検討が必要ではあるが、今回の結果から、この安全性を高めた手法についても、有効性の点で充分期待しうると考えられた。

E. 結論

われわれの開発した DNA/SeV-Gag プライム・ブーストワクチンは、SHIV 感染マカクサルモデルにおいて、非常に優れた防御効果を示し、急性エイズ発症阻止のみでなく、急性末梢血 CD4 陽性 T リンパ球減少阻止効果を有することを確認した。前者の急性エイズ発症阻止には、高レベルの特異的 CD8 陽性 T リンパ球 2 次反応が必要であるが、後者の急性末梢血 CD4 陽性 T リンパ球減少阻止には、特異的 CD8 陽性 T リンパ球 2 次反応の早期出現が必要であり、免疫不全ウイルス感染防御における特異

的 CD8 陽性 T リンパ球の迅速な反応の重要性が明らかとなった。一方、DNA ワクチンの安全性を高めた CMV-SIVGP DNA/SeV-Gag プライム・ブースト法については、その良好な特異的 T リンパ球誘導能が確認できたことから、この安全性を高めた手法についても、有効性の点で充分期待しうると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1 論文発表

(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. *J Virol*, 75:11891-11896, 2001.

2 学会発表

(1) Kano M, Matano T, Kato A, Nakamura H, Takeda A, Suzaki Y, Ami Y, Nagai Y: Primary antigen-expression and cellular immune responses in macaques immunized intranasally with a recombinant Sendai viral vector. 第 2 回熊本エイズセミナー 2001 年 9 月 20 日。

H. 知的所有権

特許申請中。

図 5 感染防御とウイルス特異的免疫との相関

