

20020642

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

平成十四年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 竹森 利忠

平成15年3月

平成14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14年度研究組織	1
II	総括研究報告	2-7
	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	8-14
	竹森 利忠（感染研・免疫部）	
	藤猪 英樹（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	15-22
	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	23-26
	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～テトラサイクリン 依存性に増殖する弱毒生ワクチンの開発～	27-32
	速水 正憲（京大ウイルス研・エイズ研究施設）	
5	ウイルス様中空粒子(VLP)を用いたHIV経口ワクチンの開発に関 する研究	33-37
	保富 康宏（三重大医・生体防御医学）	
6	エンドソーム経路輸送蛋白質を欠損させた酵母株におけるHIV及 びSIV Gagの粒子形成	38-41
	森川 裕子（北里大北里生命科学研）	
7	HIVに対する新世代DNAワクチンに関する研究	42-48
	奥田 研爾（横浜市大医・細菌学）	
8	細胞性免疫誘導型エイズワクチン開発の為にCTL誘導因子の解 明	49-55
	滝口 雅文（熊本大医・エイズ研究センター）	
9	HIV-1エントリーインヒビターの研究開発	56-67
	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）	
	馬場 昌範（鹿児島大学医・難治性ウイルス疾患研究センター）	
10	細胞性免疫誘導型エイズワクチンに関する研究	68-79
	小島 直也（東海大工・生命科学）	
	中田 宗宏（東海大工・生命科学）	

11	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） 岩田奈織子（感染研・感染病理部） 佐藤 由子（感染研・感染病理部）	80-82
12	サルエイズ脳炎発症モデルに関する研究 向井鏡三郎（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） 菊池 俊彦（感染研・筑波霊長類センター） 石川 智美（感染研・筑波霊長類センター）	83-91
13	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・医歯学総合研究科）	92-95
14	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）	96-99
15	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）	100-104
16	HIV感染実験モデルの作製 吉木 敬（北大医・病態分子病理）	105-106
17	マウス及ヒトレトロウィルス感染に対する免疫学的抵抗性を 支配する宿主遺伝子の解析と、 <i>gag</i> 遺伝子産物上の感染防御エピ トープに関する研究 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） 河俣 浩之（近畿大医・免疫学） Mario Clerici, Daria Trabottoni（ミラノ大医・免疫学）	107-115
18	ヒト乳汁中マクロファージを介したHIV伝播の可能性 高橋 秀実（日本医大・微生物免疫学）	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（滋賀医大・病理学第二）	123-126
20	HIVワクチンのモルモットを用いた実用化研究 本多 三男（感染研・エイズ研究センター）	127-130
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・血液 安全性研究部）	131-135
IV	研究成果の刊行に関する一覧表	137-149
V	論文別刷	150-594

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 14 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・教授）
	保富 康宏（三重大医・生体防御医学講座・助教授）
	森川 裕子（北里大生命科学研・ウイルス感染制御Ⅱ・教授）
	奥田 研爾（横浜市大医・細菌学教室・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）
	小島 直也（東海大工・生命化学科・助教授）
	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）
	高橋 秀実（日本医大・微生物免疫学教室・教授）
	小笠原一誠（滋賀大医・病理学教室・教授）
	本多 三男（国立感染症研究所・エイズ研究センター・グループ長）
	笠井 道之（国立感染症研究所・血液・安全性研究部・主任研究官）

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
総括研究報告書

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

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構築する事を目的として研究を行なった。

その結果、感染予防に関する研究において、複製能のない DNA とセンダイウイルス(SeV)ヘ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) システムを開発しマカクサルエイスマデルでの急性発症を防御することに成功した。さらにマカクサルエイスマデルで糖鎖を欠損した SIVmac の潜伏感染は親株ウイルスの感染を抑制し、この効果は主として T 細胞に依存することを明らかにした。またこの系では外皮蛋白の免疫は T 細胞を介した防御効果を誘導することか明らかにされた。その他 SHIV 生ワクチン安全性確保のための技術開発が行われ、また HIVenv DNA 封入 E 型肝炎ウイルス由来ウイルス空中立粒子(VLP)の経口投与により粘膜および全身に 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か明らかとなった。また HIVDNA 多価ワクチンのモデルシステムが検討され、また CCR5 を介した HIV 侵入の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、また感染防御のための樹状細胞集団が解析された。

HIV 感染に対する防御反応に関する研究においては、HIV-1 特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) のキラー活性は、標的細胞との反応で特定の範囲の親和性が必要である可能性か明らかにされた。またウイルス感染で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か示唆され、そのホモログは HIV 感染においても作用する可能性か推察された。その他 HIV 感染でアロ特異的 CD 8 陽性細胞が感染防御に関与する可能性か推察され、またライ菌細胞壁構成クリスタリン、カ抗原提示細胞の機能を抑制する可能性か示唆され、母乳中に DC サインを有する樹状細胞に分化するマクロファージの存在か確かめられた。

HIV 感染に伴う主要病因の解明に関し、HIVnef 発現により抗原特異的な成熟 T 細胞の応答が昂進する可能性が示唆され、サル脳炎易発症性の SIV の病原性獲得が外皮タンパク質遺伝子変異に関連することか推察された。また感染サルリンパ節において胚中心濾胞樹状細胞にウイルスが捕獲される可能性か推察され、また病因解明に役立つ HIV 感染ラットの開発が行われた。

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) HIV_{nef} および YFP を組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 T 細胞受容体を発現するトランスジェニックマウスより得た T 細胞に感染させ培養し、OVA で刺激後の表現型、増殖、サイトカイン産生能を計測した (竹森)。

(2) ナイーブ対照群とともに、DNA プラスミドのみ接種群、SeV-Gag のみ接種群、および安全性を高めた DNA プラスミド接種 6 週後に経鼻から SeV-Gag を接種したプライム・ブースト接種群のサルを SHIV89 6PD を感染させ、感染後 80 週にかけて血漿中ウイルス量、CD 4 陽性 T 細胞数を計測した (俣野)。

(3) pJW4303 ヘクターに SIV_{mac239} または糖鎖変異株 D5G を組み込んだプラスミドをアカゲサルを免疫し、28 週後に SIV_{mac239} を接種し防御免疫及び SIV_{mac239} に特異的な T 細胞の産生と中和抗体の産生を免疫学的方法を用いて調べた。(森)。

(4) SIV_{mac239} 株プロモーター領域に pTet-On を挿入したキメラウイルスを作製し Hela に遺伝子を導入し培養上清中の SIV_{p27} を測定することによりウイルス産生量を検討

した。産生されたウイルスをリンパ球系 M8166 細胞株に加え PCR によるウイルス検出を行った (速水)。

(5) HIV_{env} エピトープ組み込み E 型肝炎ウイルス (HEV) 様中空粒子 (rHIV_{env}-HEV/VLP) 及び HIV_{env} を封入した HEV/VLP を作製し、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) HIV の clade A, B, C, E の多価感染防御抗原エピトープとヘルパーエピトープを結合させた多価 DNA プラスミドを構築した。この DNA プラスミドをネスミに筋注後、HIV_{env} 組み込みワクチニアウイルスをチャレンシし 5 日後の卵巣中のウイルス量を測定した (奥田)。

(7) 異なった量の HIV_{gag} 組み込みリコンビナント BCG をモルモットに免疫し免疫反応を解析した (本多)。

(8) 原虫 *Leishmania major* 可溶性タンパク質を M5-DPPE で被覆したりポソームに封入し、ネスミに 2 回投与後感染させ、感染抑制効果を原虫の足珈に投与し解析した。また投与による抗原特異的な T 細胞のサイトカイン産生レベルを測定した (小島)。

(9) ヒト一本鎖抗体ファージライブラリーを用いて、マグネトヒースと 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 ループの合成ペプチドを用いたプラスチックプレート法により、抗 CCR5 ヒト抗体ファージクローンの単離を試みた (杉村)。

(10) マウス骨髄細胞を GM-CSF 存在下で培

養し確立された樹状細胞の形質と機能を解析した（小笠原）。

(11) HIV-1Pol448-456 由来ペプチドに特異的に HLA-B*3501 拘束性の CTL クローンである CTL589 及び CTL55 を確立した。これらクローンの細胞障害活性を HLA-B*3501 を発現する標的細胞を用いて解析した（滝口）。

(12) 試験管内でアロ特異的依存性 CD 8 T 細胞株を樹立し、HIV-1 感染細胞と長期培養しウイルス産生に対する抑制効果を解析した（神奈木）。

(13) フレント白血病ウイルス感染後の中和抗体産生を制御する非 MHC 遺伝子を第 15 染色体テロメア寄り 5Mbp の範囲にマッピングした。ハノククロスマウスで染色体乗り換え部位を厳密に決定すると共に、この領域とシンテニーのあるヒト染色体領域内における HIV-1 感染者と HIV-1 暴露非感染者間での多型性の有無を検討した（宮澤）。

(14) 出産後 3-6 日の正常経産婦より母乳を採取し、マクロファージを精製しその性状を明らかにすると共に樹状細胞への分化誘導を試みた（高橋）。

(15) 変異によりエントソーム経路に異常を有する酵母細胞に、HIVGag 蛋白を発現させ、Gag 蛋白の細胞内局在、Gag 蛋白の膜結合および、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（森川）。

(16) アルマシ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。分画物について感染者血清と反応するタンパク質のアミノ酸配列を解析し alphacrystallin (ACR) を同定した。健常人末梢単球より、サイトカインを用い DC を誘導し

ACR との反応による機能と性状を解析した（牧野）。

(17) 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) をコートするヘ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りキメラタンパク質の局在を観察し、に対する抗体を用い細胞内分画を行い細胞内小胞の性状と内容物質を検討した（笠井）。

(18) SIVsmE543 感染カニクイサルリンパ節におけるウイルス DNA をレーザーマイクロダイセクション法を用いて解析した。またサル胎児から神経幹細胞を分離し培養した。この培養系を用い GFP 遺伝子か nef の代わりに導入され VSVG で包まれたシュートウイルスを感染させた（佐多）。

(19) エイス脳炎を発症した 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 と SIVbm1 の全塩基配列を決定した。これらのクローンの env 領域に相当する DNA 断片を得て親株 env 領域に組換えウイルスを作製し、マクロファージおよびアストロサイトへの感染・増殖を確認した（向井）。

(20) 強病原性 SHIV-C2/1 と非病原性 SHIV-896 間の組換えクローン 6 種を作製し 293T 細胞にトランスフェクトし、ウイルスを回収した。組換えウイルスをカニクイザル末梢血、カニクイザルおよびヒト T 細胞に感染させた（阪井）。

(21) ヒト CXCR4、CCR5、cyclinT1、CIITA cDNA を H-2Kd プロモーターの発現ヘクターへ、CD4 cDNA をヒト CD4 プロモーターの発現ヘクターへ導入した。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し産仔を得て導入遺伝子の確認を行った(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。

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)ヘ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)システムの安全性を高める目的で、当初用いたプロウイルスタイプの DNA ワクチンにかわり、複製能のない 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、また複製能のない F 欠損型 SeV ヘクターを用い接種回数を prime 1 回・booster 1 回に減らした。この結果、この安全性を高めたシステムにおいても、良好な感染・発症防御効果をあげることが確認された(俣野)。

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、今後さらに研究の継続が必要とされる。

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。速水班員グループは、これまでに、SIV をヘースにして 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ている。本年度このシステムの安全性を高める目的で、テトラサイクリン依存性に転写活性を制御するシステムを作製した(速水)。

糖鎖変異ウイルス D5G 感染ザルは D5G 感染を制御し、さらに SIVmac239 感染に対する防御免疫を誘導する。糖鎖変異により Env 蛋白の免疫原性が変化したことか原因のひとつである可能性が考えら、D5G Env 蛋白でサルを免疫し SIVmac239 に対する防御免疫を調べた。その結果野生株 Env 蛋白で免疫したサルでは高頻度で SIVmac239 に対して特異的な CD 4、CD 8 陽性 T 細胞が誘導され感染制御を示したか、D5G Env 蛋白免疫ではこれらの細胞の顕著な増加はなく有意な効果は見られなかった。(森)。

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)及び HIVenv を封入した HEV/VLP を作製し、マウスに経口投与したところ、両者の投与で血清中に HIVenv 特異的 IgA および IgG 抗体が、糞便中で IgA IgG 抗体が認められた。また脾臓、腸間膜リンパ節、パイエル板において特異的キラー T 細胞の産生が認められた(保富)。

その他この領域では多重連結された DNA ワクチン効果か検討され(奥田)、ワクチンアシュハントの開発のためリポゾームの簡便作製法が開発され(小島)、完全ヒト抗体のラ

イブラリーを用い、HIV-1 の感染を阻害するか CCR5 の機能を阻害しない抗体作製の試みか進行し（杉村）、更に樹状細胞に関する研究（小笠原）、組織適合性抗原による外来性ペプチト運搬の研究（笠井）か行なわれた。

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 の誘導か望ましく、このため HIV-1 エピトープを明らかにすることか必要である。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 の機能不全か誘発され、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。CTL の細胞傷害機能の障害は、HIV-1Nef による HLA クラス I の細胞表面の発現低下、ウイルス変異に伴う抗原提示プロセスの低下、あるいは HIVgag や HIV-V3 ペプチトによる 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と考えられる。

滝口等のグループは HIV-1Pol448-456 由来ペプチトに特異的て HLA-B*3501 拘束性の CTL クローンである CTL589 及び CTL55 を確立し細胞障害活性を解析した。この結果 HLA-B*3501 を発現する標的細胞に対して強い親和性を有する CTL クローンの細胞障害活性は低くなる事を明らかにし、この結果は CTL の細胞障害活性には T 細胞受容体の適切な範囲の親和性か必要である可能性を示唆する。この原因か不応答と細胞死のどちらに依存するか興味深い。

これまで母乳に T 細胞か存在することか報告されているか、高橋等のグループは、母乳中に樹状細胞に分化可能なマクロファージかいることを明らかにし、分化した細胞が HIV を捕獲する DC サインを発現することから、母子感染の一翼を担うのではないかと推論し

た。

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か必要である。HIV 感染では特に CD4 および CD 8 陽性 T リンパ球活性化の重要性か示唆されているか、中和抗体による防御の役割に関しては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、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を行ない対応する遺伝子の存在を明らかにした。さらにそのヒトホモログか存在し、HIV 感染抵抗性決定因子として作用する可能性を明らかにした。

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 か重要である可能性か推察され（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か抗酸菌膜に存在すること（牧野）か明らかにされた。

3 ウイルス感染に伴う病態の発症

森川等のグループは酵母の 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を行い、前期エントゾームから後期エントゾームへの輸送に関わるタンパク質 Pep12 か、ウイルス gag の切断分解を伴う粒子の出芽に必要である可能性か示唆された（森川）。

これまでの報告からネズミおよびヒト T 細胞において HIVnef の機能発現は基本的に等しい可能性か推察される。HIVnef による免疫不全発症の機構は不明か多いか、この問題に関して本研究班で、HIVnef を正常なマウス T 細胞に発現させると、nef 発現により抗原刺激に対応する T 細胞の機能が昂進する可能性を明らかにした（竹森）。

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と考えられている。本研究班において、エイズ脳炎を発症した2頭のカニクイサルの脳組織より樹立した単球様細胞株由来ウイルスは M ϕ 指向性特異的 point mutation を有しこの領域がエイズ脳炎の易発症性に関与する可能性を明らかにした(向井)。

ウイルス感染により免疫学的組織胚中心の破壊がおり免疫不全へと移行する。本研究班において、胚中心の破壊が構成細胞である濾胞樹状細胞に蓄積するウイルス粒子が関与する可能性が推察された(佐多)。

その他、非病原性 SHIV-896 から感染研で樹立された強毒性の SHIV-C2/1 を用いてウイルス感染による病原性獲得機構の解析(阪井)が行われた。

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か、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。そこで本研究班では、安定供給できる HIV 感染小動物モデル系の樹立を行い、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) を発現するラットが確立された(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15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/センダイウイルスヘクター併用接種システムの安全性についての改善が行われ、この改善においてもエイズ急性発症モデルにおいて強いワクチン効果が示された。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。基礎研究においてウイルス感染中和抗体産生に関わる因子が同定され、この因子の多型性と HIV 感染発症との相関が推察された。一方、モデルシステムにおいて、HIV_{nef} による、抗原刺激成熟 T 細胞における機能異常が始めて観察され、その他脳炎発症におけるウイルス変異の役割等が解析された。

E 研究発表
業績一覧参照

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 藤猪 英樹 国立感染症研究所・免疫部研究員

研究要旨

全ての T 細胞に OVA 特異的 T 細胞受容体を発現するトランスジェニックマウス (DO11.10 Tg) に全ての T 細胞にアテノウイルス受容体を発現するトランスジェニックマウスを掛け合わせ、両者を発現するトランスジェニックマウス (DO11.10 × CAR Tg) を作製した。このマウスより T 細胞を精製し抗 CD3 抗体で刺激し細胞を活性化し nef 遺伝子組み込みアテノウイルスを感染させた。この結果、T 細胞に効率よくアテノウイルスヘクターが感染し、感染後 nef を発現した T 細胞が CD4 発現を低下させることを確認した。Nef 発現、非発現 T 細胞両者とも *in vitro* で抗原提示細胞の存在下で OVA による抗原刺激を与えることにより二次反応が誘導されるか、この反応において、nef 発現細胞では nef 非発現細胞に比へて増殖が遅くなることか明らかとなった。刺激後に産生されるサイトカインについて、nef 発現 T 細胞では刺激する抗原量が低い場合には IFN- γ 産生量の増加か、高い場合には IFN- γ 、IL-4 の量が減少することか認められた。これらの結果は、HIVnef 発現により T 細胞受容体を介した刺激に対応する機能発現に何らかの異常が誘導される可能性が示唆された。

A 研究目的

HIVnef はウイルス感染後の病態発症の主要要因の一つとして考えられている。HIVnef 発現により 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、HIVnef は感染細胞の免疫系からの逃避とウイルス産生増加に関わることか予想されるが、病原性誘導の機序は明かでない。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 細胞減少をはしめとする AIDS 様症状が誘導され死亡することか報告され、nef 分子自身か *in vivo* で病原性発症に関与することか示唆された。しかしこの系では nef の発現が幼若 T 細胞より誘導されており、通常の感染での nef 発現の状態とは大きく隔た

りかある。

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* で検討することか重要であると考え、nef 組み込みアテノウイルスを用いた系の開発を行った。この系では Coxsackie/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テ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。

B 研究方法

1 Nef 遺伝子組み込みアデノウイルス (AdCA-nef-IRES-EGFP) 作成の手段には Tong-Chen らの提供する A Simplified System for Rapid Generation of Recombinant Adenoviruses を用いた。アデノウイルス作成過程では、E1E3 遺伝子をもつ野生株の出現が問題になるが、E1E3 非発現 HeLa 細胞を用いて野生株の混入かないことを確認した。

2 CD4⁺ T 細胞の調整 CD4⁺ T 細胞は、DO11.10 TCR transgenic (Tg) マウスと、Coxsackie/Adenovirus Receptor (CAR) Tg マウスをかけあわせた double Tg マウスの脾臓より、磁気ヒーズを用いたカラム分離法によりネガティブに調整した。

3 ウイルスの感染と nef 発現細胞の分離 精製した CD4⁺ T 細胞を抗マウス TCR- β 抗体と抗マウス CD28 抗体を固相化した 24 穴プレートにまき、MOI20 において 2 時間感染させた。そのまま 2 日間培養し、GFP の発現と CD4 の発現量を指標に FACS を用いて nef 発現細胞と nef 非発現細胞とに分離した。分離した細胞の nef 発現は Western blot と細胞内染色にて確認した。

4 細胞増殖試験とサイトカイン産生測定 新たに調整した正常マウスの γ 線照射脾細胞に OVA₃₂₃₋₃₃₉ ペプチドをパルスし、分離した nef 導入細胞と nef 非導入細胞を加え、経日的に [³H] Thymidine の取込みをシンチレーションカウンターにて測定した。また培養上清中の IFN- γ と IL-4 を ELISA にて測定した。

C 研究結果

アデノウイルスヘクターに nef 遺伝子を挿入し pShuttle nef EGFP を作成した。導入遺伝子の発現指標として IRES シークエンスの下流

に EGFP 遺伝子を挿入し、またプロモーターに Chicken beta-actin promoter (CA) を用いた (図 1)。pShuttle nef EGFP を HeLa 細胞に導入し、抗 nef 抗体を用いて Western Blot により nef 蛋白の発現を確認し、作成プラスミドが機能することを確認した (図 2)。シャトルヘクターでの発現を確認後、pShuttle nef EGFP と E1E3 を除くアデノウイルス遺伝子を持つ pAdEasy を BJ5181 大腸菌に co-transformation することと相同組換えにより pAdnefEGFP を得た次に pAdnefEGFP を制限酵素処理で直線化し、E1E3 遺伝子を持つ 293 細胞にリポフェクタミンにより transfection し、リコンヒナントウイルス AdnefEGFP を得た。AdnefEGFP の発現確認はシャトルヘクターでの発現と同様、HeLa 細胞を用いて確認した (図 2)。

精製 CD4⁺ T 細胞に AdnefEGFP を MOI 20 の条件下で、抗 CD3 抗体による刺激を与えながら感染させた。感染 2 日後の細胞内の EGFP の発現を FACS を用いて解析すると、約 60 % の細胞で発現が認められ、さらに、EGFP の発現細胞では CD4 発現レベルが顕著に低下することが明らかとなった。HIVnef 発現により CD4 発現レベルが抑制することは既に知られていることから、これらの結果は、我々の条件下で高率に nef 組み込みアデノウイルスが T 細胞に感染し、CD4 の発現を抑制する事が示唆された。CD4 の発現を低下する細胞での nef の発現を確認する目的で、nef に対する抗体で細胞内を染色し、FACS を用いて解析すると、CD4 の発現を抑制する T 細胞 (CD4^{lo}) のみか抗 nef 抗体で染色された。さらに CD4 陽性、弱陽性の 2 群を FACS を用いて精製し抗 nef 抗体を用いて Western Blot を行なうと、CD4 弱陽性 T 細胞群に強い nef の発現が確認された (図 3)。CD4 発現パターン以外に細胞表面の活性化マーカー等の発現を解析したか nef 発現細胞と非発

現細胞との間に差は認められなかった (図 4)。

Nef 発現 T 細胞の抗原刺激による反応を検討する目的で、nef 発現 T 細胞 (CD4 弱陽性) および非発現細胞 (CD4 陽性) を、脾臓より精製した樹状細胞とともに 0.1 μ M, 1.0 μ M 及び 10 μ M の異なった量の OVA ペプチド存在下で培養した。刺激後の細胞の増殖をトリチウムチミシンの取込みをめやすに計測すると、両者とも経日的な増殖がみられたか、OVA 0.1 μ M 及び 1.0 μ M の濃度で nef 発現細胞では nef 非発現細胞に比べて増殖のピークが遅いことか明らかとなった (図 5)。同一条件下で各細胞が培養上清中に産生する IFN- γ 、IL-4 の量を測定すると、OVA 0.1 μ M 濃度では nef 発現細胞は nef 非発現細胞より多量の IFN γ を産生するか、IL-4 産生量は同等であることか示唆された。OVA 1.0 μ M 及び 10 μ M の刺激では nef 発現細胞から産生されるそれらのサイトカインレベルは非発現細胞と比較して低い傾向にある事が観察された (図 6)。

D 考察

HIV 病原性に nef が関与することか輸血後感染者のコホートやサルを用いた SIV 感染実験から示唆されている。また、細胞株を対照に行われた解析から、nef 発現により CD4 抗原、MHC class I の発現低下、細胞骨格分子の再構成、T cell hypersensitivity、Fas- and TNF-mediated apoptosis の誘導等が報告され免疫機能の異常が誘導される可能性が推察されている。しかし、実際の生体内でこれらの異常が誘導されるか否か不明である。さらに nef を強制発現したトランスジェニックマウスにおいて免疫反応の異常が認められたか、この場合 nef の発現は胸腺内 T 細胞より誘導されており、この結果が成熟細胞で nef を発現した場合においても同様に認められるか否か明

らかでない。

我々は、基本的な nef の機能はヒトおよびマウス T 細胞で等しく発現されるという仮説の基に、nef 組み込みアテノウイルスヘクターをウイルス受容体を発現する T 細胞に感染し、その細胞での高率な nef 蛋白質の発現に成功した。T 細胞株を対照とした解析からこれまでに、nef 発現により抗 CD3 抗体による T 細胞抗原受容体刺激の結果誘導されるシグナルの域値が高まり過剰反応になる可能性が推察されている。我々の結果は、抗原特異的反応において nef 発現により T 細胞抗原受容体を介したシグナルが遅延する可能性が示唆された。また興味あることに低濃度の抗原刺激では nef 発現により T 細胞の IFN γ 産生量が非発現細胞より増加し、Th1/Th2 シフトに何らかの影響を及ぼす可能性も考慮される。

E 結論

Nef を発現させることによって細胞増殖に差異がみられたことから、nef の発現が抗原提示細胞による抗原刺激に依存する細胞増殖とサイトカイン産生に何らかの影響を与えることか示唆された。今後、この増殖の差異が nef 発現による CD4 の発現量に依存するか否かを、CD4 発現低下に関わる領域の nef 変異体を導入したアテノウイルスヘクターを作成して検討を行う予定である。さらにサイトカイン産生の詳細なプロファイルを確認し細胞の分化への影響を検討すると共に、生体内での nef 陽性細胞、陰性細胞両者の動態を検討することか今後の課題である。

F 研究発表

1 論文発表

- 1) Toyama, H, Okada, S, Hatano, M, Takahashi, Y, Takeda, N, Ichii, H, Takemori, T, Kuroda, Y and Tokuhisa, T Generation of

memory B cells independent of germinal center formation *Immunity* 17. 329-339, 2002

2) Tsunetsugu-Yokota, Y, Tamura, H, Tachibana, M, Ogata, K, Honda, M and Takemori, T Selective expansion of perforin-positive CD8⁺ T cells by immature dendritic cells infected with live Bacillus Calmette-Guérin mycobacteria *J. Leuk. Biol.* 72. 115-124, 2002

3) Toda, M, Kasai, M, Hosokawa, H, Nakano, N, Taniguchi, Y, Inouye, S, Kaminogawa, S, Takemori, T and Sakaguchi, M DNA vaccine using invariant chain gene for delivery of CD4⁺ T cell epitope peptide derived from Japanese cedar pollen allergen inhibits allergen-specific IgE response *Eur. J. Immunol* 32. 1631-1639, 2002

4) Takasuka, N, Enami, M, 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* 20: 1579-1585, 2002

5) Judge AD, Zhang X, Fujii H, Surh CD, Sprent J Interleukin 15 Controls both Proliferation and Survival of a Subset of Memory-Phenotype CD8 (+) T Cells *J Exp Med.* 7;196.935-46, 2002

6) Sasamura T, Nakamura S, Iida Y, Fujii H, Murata J, Saiki I, Nojima H, Kuraishi Y Morphine analgesia suppresses tumor growth and metastasis in a mouse model of cancer pain produced by orthotopic tumor inoculation *Eur J Pharmacol. Apr* 26;441.185-91, 2002

7) Zhang X, Fujii H, Kishimoto H, LeRoy E, Surh CD, Sprent J Aging leads to disturbed homeostasis of memory phenotype CD8(+) cells *J Exp Med.*195.283-93, 2002

2 学会発表

[第 32 回日本免疫学会総会、東京]

1) 高橋宜聖、稲嶺絢子、吉岡絵美、薄井正義、Wang Yatao、須田貴司、安達貴弘、鏝田武志、竹森利忠「Regulatory molecules for the maintenance of memory B cells」

2) 稲嶺絢子、高橋宜聖、手塚克成、竹森利忠、安部良「AILIM/ICOS による抗原特異的 B 細胞産生・分化の制御」

3) 横田 (恒次) 恭子、磯貝まや、立川 (川名) 愛、岩本愛吉、竹森利忠、Brigitte Autran。「HIV-1 感染者の CD8 陽性 T 細胞の機能に関する解析」

4) 橋本修一、竹森利忠「記憶 B 細胞に特異的に発現する細胞表面分子の探索」

5) 藤猪英樹、Jonathan Sprent 「クラス II 拘束性に起こる急性 GVHD における CD4⁺T 細胞の傷害機能」

6) 桑原一彦、藤村睦、高橋宜聖、竹森利忠、阪口雅弘「B 細胞特異的 GANP 欠損マウスにおける B 細胞分化異常」

7) Y, Takahashi, E, Shimanuki, E, Yoshioka, S, Hashimoto, Y, Wang, T, Suda, T, Takemori “Regulatory molecules for the maintenance of memory B cells”

8) T, Takemori, Y, Takahashi, J, Inamine, S, Hashimoto, R, Abe “Requirement of p21ras in B cell response”

図 1 nef発現ベクターの構築

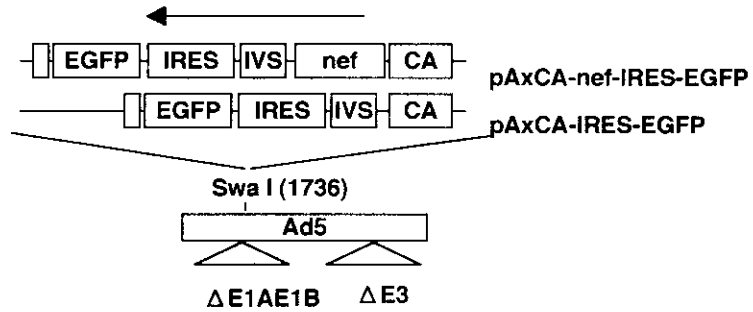


図 2 HeLa細胞を用いたShuttle Vector、AdCA-Nef-IRES-EGFPの発現確認

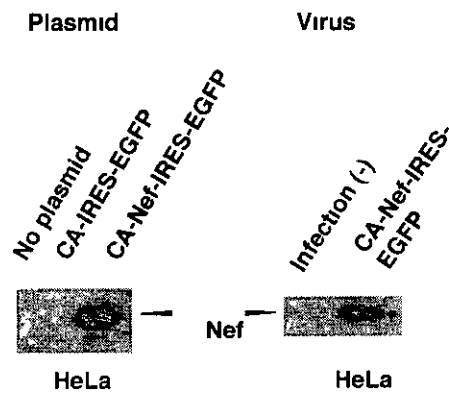


図3 nef組み込みアデノウイルス感染によるT細胞でのnef発現とCD4の発現抑制

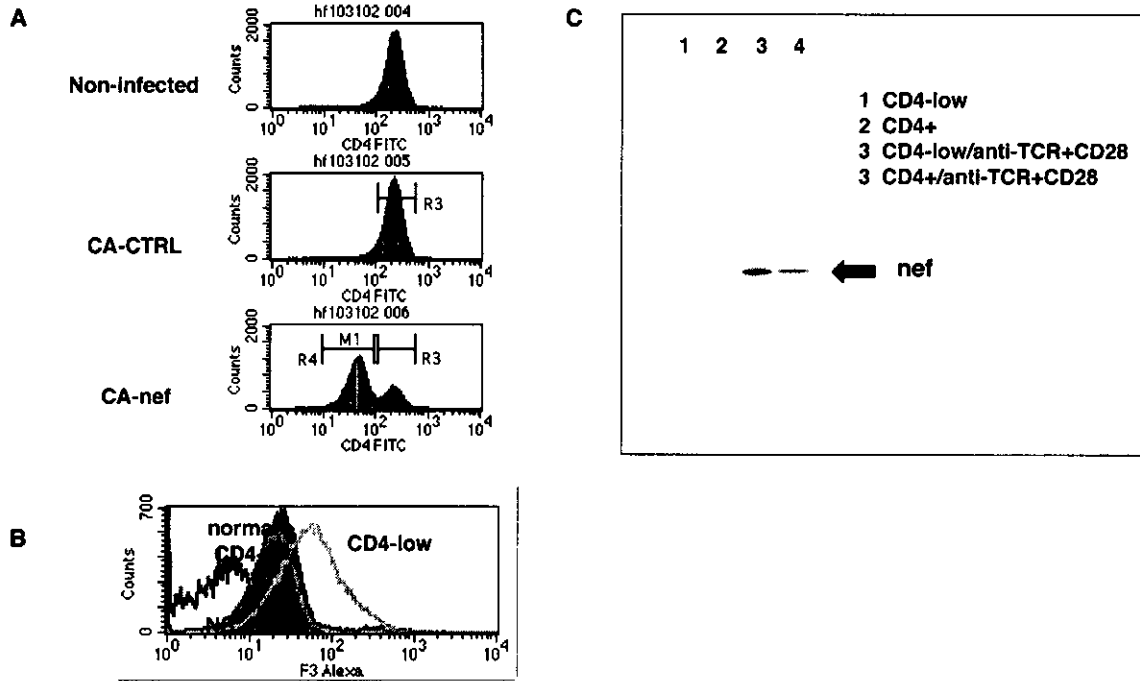


図4 nef発現、非発現T細胞表面抗原発現パターン

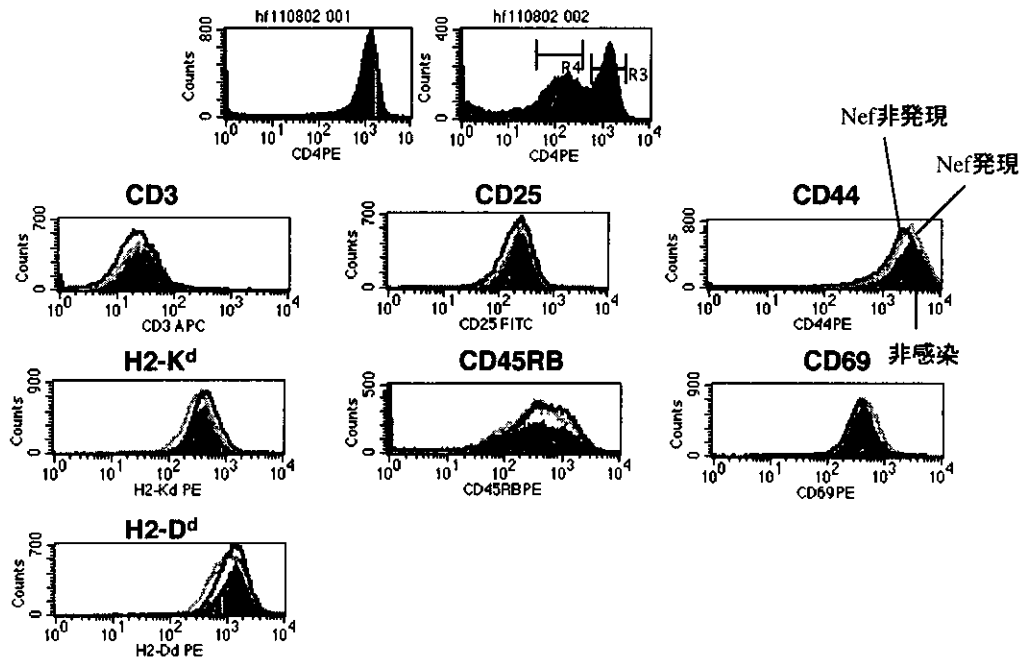


図5 OVAを用いた抗原特異的刺激による増殖反応におけるnefの影響

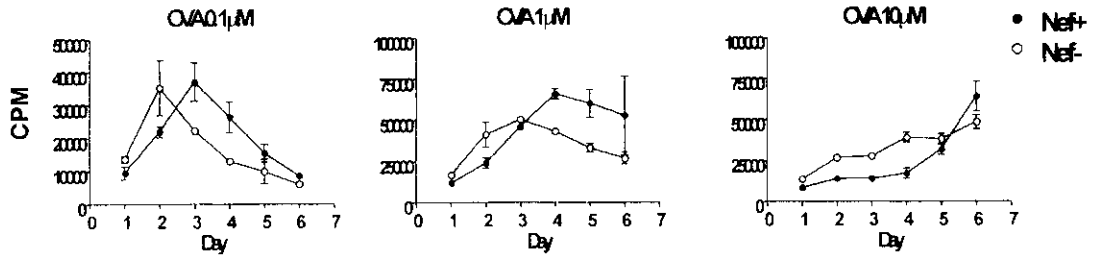
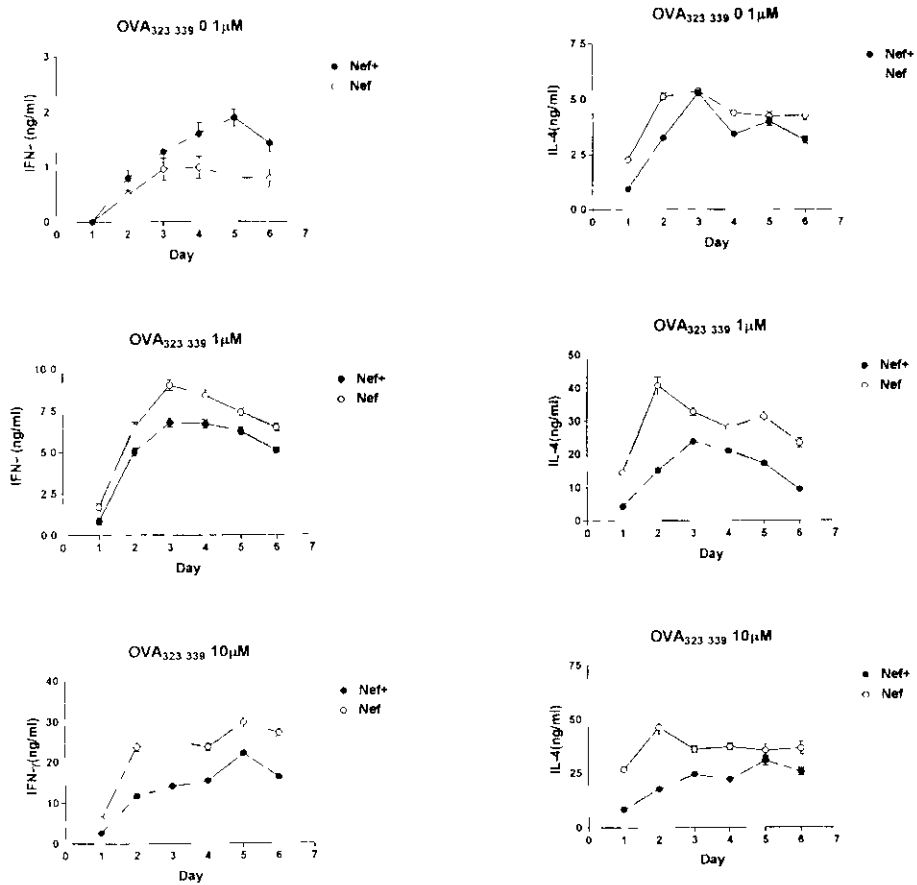


図6 OVAを用いた抗原特異的刺激によるサイトカイン産生におけるnefの影響



SIV 感染と宿主応答における糖鎖の意義に関する研究 Env エイスワクチンへの糖鎖欠失変異の効果

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(d-5G)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、感染ザルには感染防御免疫が誘導されていた。防御免疫が d-5G Env 蛋白の免疫原性に起因するのか検討するために DNA Prime-Boost 法によりサルを Env 蛋白で免疫し SIVmac239 感染に対する感染防御効果を調べた。予想に反し d-5G Env 免疫群は vector コントロール群と同様な viral load を示したが、野生株 Env 免疫群では初期感染の低下とその後の感染制御が観察された。Env 免疫による Env 特異的免疫応答の解析から野生株 Env 免疫群では d-5G Env 免疫群と比較して高頻度の特異的 CD8+ T 細胞、特異的 CD4+ T 細胞が誘導されていた。糖鎖欠失 Env 免疫による d5-G、SIVmac239 に対する中和抗体の誘導は見られなかった。中和されやすい SIV を用いた assay では野生株 Env 免疫群は d-5G Env 免疫群と比べ高い中和抗体が誘導されていた。感染後の宿主応答としては d-5G Env 免疫群において感染防御に negative な現象が観察された。末梢血中のメモリーCD4+細胞の減少、微弱な CTL 誘導。これらの結果は糖鎖欠失 Env を用いたワクチン開発に問題を提起した。むしろ野生株の Env が単独でも有効な免疫を誘導することができる可能性が示された。さらに、糖鎖は抗原提示等のステップで免疫誘導に positive な効果があるのではないかと推察された。d5-G 感染による感染制御については今後 d5-G のウイルスの性質について焦点を当て解析を進める必要がある。

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пит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。このような宿主応答、あるいはウイルス感染における糖鎖の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(d-5G)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。d-5G 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 をチャレンジ接種したがウイルス感染は防御された。これらの結果は 5 個の糖鎖欠失がウイルスの性質に変化を与え、特に宿主応答が変化することにより感染宿主がエイズウイルス感染を制御できるようになったことを意味する。前年度我々は感染ウイルス量の測定、末梢リンハ球サブセットの

解析、SIV に対する抗体 ELISA 等の解析から予想に反し wt-Env 免疫群が Δ5G Env 免疫群と比較してより有効な免疫を誘導することを報告した。今年度は Δ5G Env 免疫群、wt-Env 免疫群にはどのような宿主応答の違いがあったのか。細胞性免疫、液性免疫解析を中心に詳細な解析を行った。

B 研究方法

アカケサル

ミャンマー原産の育成サル、オス、2才 体重 2kg、Bウイルス SRV SILV、SIV に対する抗体が陰性、培養リンハ球における 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 組み換えワクチニア Boost 法による

Env 蛋白免疫

DNA ワクチン用に開発された pJW4303 ヘクターに SIVmac239 または Δ5G の gp120 の蛋白コート DNA 導入した Plasmid (pJWSUmac, pJWSU macΔ5G) または pJW4303 ヘクター 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 SIV mac239 または Δ5G の gp160 を発現する組み換えワクチニアまたはワクチニアヘクター(WR株) 5×10^6 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 (Δ5G) を用いた。Δ5G は SIVmac239DNA 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 2-1 日後の培養上清を種ウイルスとしてアカケザル培養リンハ球を用い

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 (CytT/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'-GGACCAAGGCCTAATAAAA(C)-3') and TaqMan probe 1272F (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

フローサイトメトリーによる末梢血リンハ球の細胞表面抗原の解析

血中のリンハ球サブセット (CD3+, CD4+, CD8+, CD16+, CD20+ CD29+リンハ球)の割合についてそれぞれの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測機によりリンハ球数を測定し 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。

Env ヘフチト ELISA

SIVmac239 Env をカハ-する 72 個の 13 mer overlapping 25mer ヘフチトを用いて、まず 10 ヘフチトずつをプールした 7 pooled ヘフチトをヘフチト ELISA 用プレート () に固定し 100 倍希釈した血漿を用いて ELISA 抗体価を測定した。次に抗体価が高い pooled ヘフチトについて個々のヘノ

チドを用いて ELISA 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は SIVmac239、Δ5G、マクロファージ指向性ウイルス、“MERT”、(4個のアミノ酸置換 M, E, R, T を持つ SIVmac239 の Env 変異ウイルス) を用いた。

ELISPOT assay による末梢血中の SIV 特異的 CD4+ T 細胞または CD8+ T 細胞の頻度の測定

サルから末梢リンパ球を分離後、抗 CD4 抗体結合磁気ビーズまたは抗 CD8 抗体結合磁気ビーズを用いて末梢リンパ球中の CD4+ T 細胞または CD8+ T 細胞を除き、SIV 抗原により刺激し活性化された T 細胞が産生する IFN- γ を免疫学的に染色し SIV 抗原により活性化された T 細胞の頻度を算出した。抗原刺激の方法としては wt-Env と Δ5G Env の比較には Env SU を発現する組換えセンダイウイルスを BLC L に感染させ、psolaren UV 処理によりウイルス、細胞を不活性化したものを用いた。Env SU 以外の SIV タンパクについては全 SIV タンパクをカバーする over-lapping peptides を用いた。ヘプチドを用いる場合は末梢リンパ球に直接パルスして抗原刺激を行った。

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 免疫ザルにおける SIVmac239 感染

Env 免疫開始から 28 週後、vaccinia boost から 7 週後に SIVmac239 を静脈内接種した。図 1 に示さ

れるように d-5G Env 接種群の viral load は vector control 群と同程度であった。ところが wt-Env 免疫群では初期感染のピークは 1 log 低下し、さらに 20 週以降は測定感度以下となった。

細胞性免疫

当研究で用いた DNA prime vaccinia boost 法は細胞性免疫の誘導において優れた方法であるが、我々は IFN- γ ELISPOT assay により Env タンパク免疫により誘導された Env 特異的 CD4+, CD8+ 細胞の頻度を測定した。

図 2, 図 3 に示されるように wt-Env を免疫された 4 頭では末梢血中に高頻度の Env 特異的 CD8+ (CTL), Env 特異的 CD4+ (HTL) が vaccinia boost 後に検出され、感染後 4 日においても高頻度が維持されていた。対照的に d5G Env 免疫群では Env 特異的 CD8+, Env 特異的 CD4+ いずれも低頻度であった。

免疫による Env 抗体の誘導

中和抗体はウイルス感染の制御に重要である。また、中和抗体に対する escape mutant が糖鎖付加を伴うアミノ酸置換が多数報告されている。我々も d-5G 感染ザルに d-5G に対する抗体が誘導されていることを報告した。d5-G Env 免疫により d5-G に対する中和抗体の誘導が期待されたが、図 4 に示されるように中和抗体は誘導されなかった。また wt-Env 免疫によっても SIVmac239 に対する中和抗体は誘導されなかった。中和されやすいマクロファージ指向性 SIV(MERT) に対する測定では wt-Env 免疫群は d5G Env 免疫群と比へ高い中和抗体が誘導されていた。

CD4+CD29^{high} (メモリー-CD4+ T 細胞)