

HLA-A24を有する患者の一部について、患者の末梢血単核球由来の遺伝子型を決定した

HIV感染血友病者は、HIVで汚染した濃縮血液製剤によって感染したが、この場合は欧米で採血された原料血漿からの直接感染である。一方、性感染の場合は国内での流行HIV株によって感染した可能性が高い。そこで、HLA-A24を有する血友病者と性感染者の配列を比較し、ついでHLA-A24を持たない血友病者と性感染者の配列を比較することにより、流行ウイルスの特徴が検出できるのではないかと考えた。さらに、HLA-A24の頻度が少ない白人の場合の例として、国際共同研究としてシトニーの病院 (David Cooper教授) から検体を入手し、解析を行った。

(倫理面への配慮)

HLAの遺伝子タイピングなど、ヒトゲノムに関する研究については、医科学研究所倫理審査委員会に申請し、承認を受けた。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患者に説明し、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

HLA-A24の遺伝子型を解析した患者では、全員がHLA-A*2402であった。これまでの報告とおり、HLA-A24を持つ日本人の遺伝子型はHLA-A*2402が圧倒的に多いと考えられた。HLA-A*2402によって拘束を受けるCTLエピトープは、滝口らによって多数確定されているが、本研究では、HLA-A24によって拘束されるnef内のCTLエピトープ (nef138-10 RYPLTFGWCF) に注目した。HLA-A24陽性の血友病者及び性感染者 (計25例) に野生型のnef138-10の配列を持つ患者はいなかった。92% (23/25) の患者で2番目のYがFに変異していた (2F)。一方、HLA-A24陰性の患者の場合、血友病者で2Fの変異を持つ者はなかった (0/12) が、性感染者の47% (8/17) に存在した。HLA-A24陰性の血友

病者と性感染者を比較すると、有意差を持って性感染者に変異型が多かった。

約19%がA24を発現する白人性感染者 (オーストラリア) の検体では、日本人血友病者と同じ傾向を示した。

D 考察

HLA-A24によって拘束されるCTLエピトープの一つ、nef138-10 RYPLTFGWCFを解析したところ、2番残基のチロシン (Y) がフェニルアラニン (F) に変異しているウイルス (2F) が、HLA-A24陽性の感染個体の中で増殖しやすい傾向を持ち、その変異ウイルスが日本人性感染者に感染していることがわかった。このことは、2F変異ウイルスがエスケープ変異体であることを示唆するとともに、性感染としてこの変異体が国内で流行していることを示唆している。エスケープ機構の解明とワクチン作製のために重要な結果である。

E 結論

日本人のように遺伝的背景が均質な集団の中では、頻度の高いHLA型によって選択を受けた変異HIVが流行していることが示唆された。

F 健康危険情報

該当しない。

G 研究発表

1 論文発表

(発表誌名巻号 頁 発行年等も記入)

- 1 Sakuragi, J, Iwamoto, A, and Shioda, T
Dissociation of genome dimerization from packaging functions and virion maturation of human immunodeficiency virus type 1 J Virol 76 959-967, 2002
- 2 Ohmine, T, Katsube, T, Tsuzaki, Y, Kazui, M, Kobayashi, N, Komai, T, Hagiwara, M, Nishigaki, T, Iwamoto, A, Kimura, T, Kashiwase, H, and Yamashita, M
Anti HIV-1 activities

- and pharmacokinetics of new arylpiperazinyl fluoroquinolones
Bioorganic & Medical Chemistry Letters 12 739-742, 2002
- 3 Takahashi, T, Endo, T, Nakamura, T, Sakashita, H, Kimura, K, Ohnishi, K, Kitamura, Y, and Iwamoto, A Dihydrofolate reductase gene polymorphisms in *Pneumocystis carinii* sp *hominis* in Japan J Med Microbiol 51 510-515, 2002
 - 4 Nakayama, E E, Meyer, L, Iwamoto, A, Persoz, A, Nagai, Y, Rouzioux, C, Delfraissy, J F, SEROCO Study Group, Debre, P, McIlroy, D, Theodorou, I, and Shioda, T Protective effect of IL4 -589T polymorphism on HIV-1 disease progression Relationship with viral load J Infect Dis 185 1183-1186, 2002
 - 5 Tobiume, M, Takahoko, M, Yamada, T, Iwamoto, A, and Matsuda, M Inefficient enhancement of viral infectivity and CD4 downregulation by Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nef from Japanese long-term nonprogressors J Virol 76 5959-5965, 2002
 - 6 Koibuchi, T, Takahashi, T, Nakamura, T, Suzuki, M, Minamoto, F, Oyaizu, N, Yazawa, K, Mikami, Y, and Iwamoto, A The first isolation of *Nocardia nova* from an HIV-1 infected individual in Japan J Infect Chemother 8 358-360, 2002
 - 7 Kobayashi, N, Taguchi Nakamura, H, Goto, M, Nakamura, T, Nakamura, K, Sugiura, W, Iwamoto, A, and Kitamura, Y Polymorphisms and haplotypes of the CD209L gene and their association with the clinical courses of HIV-positive Japanese patients Jpn J Infect Dis 55 131-133, 2002
 - 8 Kawana-Tachikawa, A, Tomizawa, M, Nunoya, J, Shioda, T, Kato, A, Nakayama, E E, Nakamura, T, Nagai, Y, and Iwamoto, A An efficient and versatile mammalian viral vector system for MHC class I/peptide complexes J Virol 76 11982-11988, 2002
 - 9 Yamada, T, Kaji, N, Odawara, T, Chiba, J, Iwamoto, A, and Kitamura, Y Proline 78 is crucial for human immunodeficiency virus type 1 Nef to down-regulate class I human leukocyte antigen J Virol 77 1589-1594, 2003
 - 10 Endo, T, Miura, T, Koibuchi, T, Nakamura, H, Takahashi, T, Odawara, T, Goto, M, Ajisawa, A, Iwamoto, A, and Nakamura, T Molecular analysis of human herpesvirus 8 using single nucleotide polymorphisms in open reading frame 26 J Clin Microbiol In press
 - 11 Miura, T, Goto, M, Hosoya, N, Odawara, T, Kitamura, Y, Nakamura, T, and Iwamoto, A Depletion of mitochondrial DNA in HIV 1 infected patients and its amelioration by antiretroviral therapy J Med Virol In press
- H 知的財産権の出願 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

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-1 のマイナーなコレセプターである CCR2B の 64 番目のバリン(V)がイソロイシン(I)に置換した多型 CCR2 64I は、ヨーロッパおよびアメリカの HIV-1 感染者のコホートにおいてエイズ発症の遅延と相関することが報告されているが、64 番目がバリンでもイソロイシンでも HIV-1 コレセプター活性もケモカインレセプター活性も違いがなく、そのエイズ発症遅延の分子機構は明らかではなかった。我々は CCR2 遺伝子から alternative splicing によって産生され C 末端の細胞質内領域のみ CCR2B と異なり、主に細胞質に局在する CCR2A に着目し、バリンとイソロイシンの違いを検討した。その結果、バリンからイソロイシンに置換すると細胞質内で CCR2A の安定性が増し、ヘテロオリゴマー形成による CCR5 の細胞表面発現の抑制が強まることが明らかになった。この CCR5 の細胞表面発現の抑制がエイズ病態遅延と相関する理由と考えられる。またタイ国ランハンの HIV-1 感染者のコホートにおいてこの CCR2 64I の多型と血中ウイルス量との関係を検討したところ、逆転写酵素阻害剤を投与された感染者群においてのみ、CCR2 64I を持つ感染者は持たない感染者と比較してウイルス量が有意に低下していることが明らかになった。従って、この多型が逆転写酵素阻害剤による治療効果にも影響する可能性が示唆される。

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。また、HIV-1 感染感受性自体にも個人差が存在する。本研究は病態進行や HIV-1 感染感受性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。

HIV-1 のマイナーなコレセプターである CCR2B の 64 番目のバリン(V)がイソロイシン(I)に置換した多型 CCR2 64I は、ヨーロッパおよびアメリカの HIV-1 感染者のコホートにおいてエイズ発症の遅延と相関し、アジア

人種では HIV-1 の感染感受性にも影響するが、64 番目がバリンでもイソロイシンでも HIV-1 コレセプター活性もケモカインレセプター活性も違いがなく、そのエイズ発症遅延の分子機構は明らかではなかった。そこで本年度はその分子機構の解明を試みた。また、この多型のアジア人種のエイズ病態における役割をさらに詳しく解析するために、タイ国ランパン県に新たに設立された HIV-1 感染者コホートにおいて、この CCR2 64I と血清中のウイルス量との関連を検討することも目的とした。

B 研究方法

CCR5 ならびに CCR2A を発現するセンダイ

ウイルスを常法に従って作成した。細胞表面の CCR5 の発現はフローサイトメトリー法で測定した。また、タイ国ランバン県で設立されたコホートの HIV-1 感染者 489 名の末梢血より抽出した DNA から、PCR-RFLP 法で CCR2 の遺伝子型を決定した。血清中の HIV-1 量は市販のキットで HIV-1RNA 量を定量した。

(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か特定できないようにして扱った。ランバンにおける HIV-1 感染者のコホート研究はタイ国政府の倫理委員会から 1999 年 12 月に承認を得た。

C 研究結果

CCR2 64I は、疫学的研究からエイズ病態に影響することは明らかだが、その分子機構は明らかではない。CCR2B の 64 番目のアミノ酸をハリンからイソロイシンに置換しても HIV-1 コレセプター活性もケモカインレセプター活性も変化しない。我々は CCR2 遺伝子から alternative splicing によって産生され、C 末端の細胞質内領域のみ CCR2B と異なり、主に細胞質に局在する CCR2A に着目した。CCR2A を発現させたところ、バリンの CCR2A よりイソロイシンの CCR2A の方が細胞内でより安定であった。CCR5 と共発現させたところとちらの CCR2A も CCR5 とヘテロオリゴマーを形成したが、バリンの

CCR2A よりイソロイシンの CCR2A の方が CCR5 の細胞表面発現を強く阻害した。従って、バリンからイソロイシンに置換すると細胞質内で CCR2A の安定性が増し、細胞表面に向かおうとする CCR5 との間でヘテロオリゴマーが形成されて CCR5 の細胞表面発現が低下するものと考えられる。

ランバンコホートの HIV-1 感染者 489 名の CCR2 の遺伝子型を決定したところ 18 名が CCR2 64I のホモ接合、131 名がヘテロ接合であり、残りの 340 名が CCR2 64I を持っていなかった。血中ウイルス量との関連を調べると CCR2 64I を持たない感染者では平均 5.02 log copy、持つ感染者では 4.79 で CCR2 64I を持つ感染者で平均ウイルス量かわずかではあるが有意に低いことが明らかになった ($P=0.01$)。489 名中 144 名が逆転写酵素阻害剤の治療を受けていたが、治療群と未治療群に分けたところ、治療群においてのみ、CCR2 64I を持つ感染者の平均ウイルス量 (4.09) が持たない感染者 (4.67) よりも有意に低下していた ($P=0.002$)。

D 考察

CCR2 64I は、アメリカおよびヨーロッパの HIV-1 感染者のコホート研究から AIDS 病態進行の遅延と明らかに相関するが、その分子機構は明らかではなかった。今回の我々の研究結果から、CCR2 遺伝子から alternative splicing によって産生され主に細胞質に局在する CCR2A の 64 番目のアミノ酸がバリンからイソロイシンに置換すると細胞質内で CCR2A の安定性が増し、細胞表面に向かおうとする

CCR5 との間でヘテロオリゴマーが形成され、CCR5 の細胞表面への発現が抑制されることが明らかになった。HIV-1 の主要なコレセプター CCR5 の細胞表面への発現が低下するために CCR2 64I を持つ感染者体内では HIV-1 の複製が低下し、そのことによってエイズ病態進行が遅延するもの、と考えられる。

ランパンの HIV-1 感染者のコホートでは、治療群でのみ、CCR2 64I を持つ感染者の血清中の平均ウイルス量が持たない感染者よりも有意に低下していた。このことから、CCR2 64I は逆転写酵素阻害剤による治療効果に影響する可能性が考えられる。現在、このコホートの HIV-1 感染者をさらに追跡している。

E 結論

CCR2 64I のエイズ病態遅延効果は、ハリンからイソロイシンに置換することにより細胞質内で CCR2A の安定性が増し、ヘテロオリゴマー形成による CCR5 の細胞表面発現の抑制が強まるためであることが明らかになった。

タイ国ランパンの HIV-1 感染者のコホートにおいて CCR2 の遺伝子型を決定したところ、多型 CCR2 64I は逆転写酵素阻害剤による治療効果にも影響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 Dissociation of genomic dimerization from packaging functions and virion maturation of human immunodeficiency virus type 1 Jun-ichi Sakuragi, Aikichi Iwamoto, and Tatsuo Shioda. J Virol 76 959-967, 2002

2 Genetic analysis of HIV-1 discordant couples in Thailand Association of CCR2 64I homozygosity with HIV-1 negative status Suda Louisirrotchanakul, Huanliang Liu, Anuvat Roongpisuthipong, Emi E Nakayama, Yutaka Takebe, Tatsuo Shioda and Chantapong Wasu J AIDS 29, 314-315, 2002

3 Protective effect of IL4 -589T polymorphism on HIV-1 disease progression Relationship with viral load Emi E Nakayama, Laurence Meyer, Aikichi Iwamoto, Anne Persoz, Yoshiyuki Nagai, Christine Rouzioux, Jean-Francois Delfraissy, SEROCO Study Group, Patrice Debre, Dorian McIlroy, Ioannis Theodorou and Tatsuo Shioda. J Infectious Diseases 185, 1183-1186, 2002

4 Maximal HIV-1 replication in alveolar macrophages during tuberculosis requires both lymphocyte contact and cytokines Yoshihiko Hoshino, Koh Nakata, Satomi Hoshino, Yoshihiro Honda, Doris Tse, Tatsuo Shioda, William N Rom, Michael Weiden J Exp Med 195, 495-505, 2002

5 Induction of HIV-1-Specific Neutralizing Antibodies in Mice Vaccinated with a

Recombinant Sendai Virus Vector Munehide Kano, Tetsuo Matano, Atsushi Kato, Tatsuo Shioda and Yoshiyuki Nagai Jpn J Infect Dis 55, 59-60, 2002

6 An efficient and versatile mammalian viral vector system for major histocompatibility complex class I/peptide complexes Kawana-Tachikawa A, Tomizawa M, Nunoya J, Shioda T, Kato A, Nakayama EE, Nakamura T, Nagai Y, and Iwamoto A J Virol 76 11982-11988, 2002

7 Murakami N, Ye Y, Kawanishi M, Aoki S, Kudo N, Yoshida M, Nakayama EE, Shioda T, Kobayashi M New Rev-transport inhibitor with anti-HIV activity from Valeriana Radix Bioorg Med Chem Lett ,12 2807-2810 2002

8 Relationship between dimerization and packaging of HIV-1 genome RNA, a possible role of dimerization in genome packaging Jun-ichi Sakuragi, Shigeharu Ueda, Aikichi Iwamoto, and Tatsuo Shioda J Virol In press

2 学会発表

1 Protective effect of IL4 -589T polymorphism on HIV-1 disease progression Relationship with viral load Emi E Nakayama, Laurence Meyer, Aikichi Iwamoto, Anne Persoz, Yoshiyuki Nagai, Christine Rouzioux, Jean-Francois Delfraissy,

SEROCO Study Group, Patrice Debre, Dorian McIlroy, Ioannis Theodorou and Tatsuo Shioda 9 th International Conference on Retrovirues and Opportunistic Infections (Seattle, USA) 324-W

2 HIV-1 ゲノム二量体化及びパッケージングに関する解析。櫻木淳一、塩田達雄。第50回日本ウイルス学会学術集会（札幌）。1aA09。

3 Study of Genetic Mechanisms of HIV-1 Transmission and AIDS Pathogenesis in Thailand Nuanjun Ruchusatsawat, Emi E Nakayama, Archawin Rojanawiwat Panita Pathipvanich, Wattana Auwanit, Suthon Vongsheree, Kunito Yoshike, Koya Ariyoshi, Tatsuo Shioda and Pathom Sawanpanyalert 第16回日本エイズ学会学術集会（名古屋） 233。

4 Env エイズワクチンへの糖鎖欠失変異の効果。森一泰、杉本智恵、保富康宏 草川茂 武部豊、中山英美、塩田達雄、永井美之。第15回日本エイズ学会学術集会（名古屋）。250。

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

長期未発症者での発症遅延機序に関する研究

分担研究者 昭 昭 裕 山梨大学医学部微生物学講座 講師

研究協力者 山下篤哉、とう学文、葛西宏武（山梨大）、加藤真吾、斎藤有紀（慶応大）、小田原史知（旭化成）、渡辺慎哉、伊藤恵美（東大医科研）、三間屋純一（静岡こども病院）、花房秀次（荻窪病院）、酒井道生、白幡聡（産業医大）、藤井輝久（広島大）、石川正明（東北大）、岡慎一（国際医療センター）、高橋義夫（大館市立病院）、他田純一（佐世保市立病院）、三浦琢磨（芳賀赤十字病院）、松田重三（帝京大）、岩本愛吉（東大医科研）、伊藤正彦（山梨大）

研究要旨

HIV-1感染長期未発症者のエイズ発症遅延機序を明らかにするために宿主側とウイルス側の要因を検討している。検討対象はHIV-1感染長期未発症者、未治療未発症だかCD4数か低下し始めた感染者、発症して抗HIV薬で治療中の患者、非感染者の4群とした。ウイルス側の要因について、感染者末梢血中でのHIV-1ウイルス量を4種類の方法で測定して比較した。その結果、長期未発症者群では抗HIV-1治療群に比へて血漿中のHIV-1 RNA量は高かったに対して、血漿中の逆転写酵素活性や末梢血単核球中のHIV-1の二重鎖DNA量は低値であった。未治療未発症CD4数低下開始群ではいずれのHIV-1量も高値であった。これは、長期未発症者では体内でHIV-1が産生されているか、その感染性が低いか、感染細胞が破壊されているかの可能性を示している。また、宿主側の遺伝的要因を検討するため、Herpesvirus saimiriを用いて感染者由来のT細胞株を樹立した。その結果、442株樹立に成功し、それら細胞株の中にHIV-1の細胞内増殖を抑制または亢進する液性因子を出すものか認められたか、長期未発症者では抑制または亢進する液性因子を出す株の割合か抗HIV-1治療群や非感染者群に比へて有意に少なかった。

A 研究目的

我々は HIV-1 感染長期未発症者について検討をすることによりエイズ発症遅延の要因を明らかにすることを研究目的としている。本年度は、ウイルス側の要因

を検討するために病期の異なる感染者群

の末梢血中での HIV-1 ウイルス量を 4 種類の方法で測定して比較検討した。また、宿主遺伝子の要因を検討するため、トランスクリプトーム解析のための細胞を準

備するとともに、各群の患者由来の T 細胞株を樹立し、その性状解析を行った。

B 研究方法

現時点での検討対象は日本人の HIV-1 感染長期未発症者 19 例、未治療未発症たか CD4 数が低下し始めた感染者 9 例、エイズが発症して抗 HIV 薬で治療中の患者 (CD4 数 200-500 / μ l) 15 例、非感染者 6 例の 4 群とした。長期未発症の定義は感染後 16 年以上未治療未発症で CD4 数が 500 / μ l 以上で安定していることとした。

まず、末梢血中のウイルス定量は、血漿中 HIV-1 RNA 量 (Roche)、血漿中逆転写酵素活性 (旭化成)、末梢血単核球 (PBMC) 中 RNA-DNA hybrid 量、PBMC 中二重鎖 DNA 量の 4 種類のウイルス量について測定した。

また、検討の対象者由来の T 細胞株を樹立するため、Herpesvirus saimiri (HVS) を感染させて T 細胞を不死化させた。樹立した T 細胞株の培養上清中の HIV-1 複製抑制能を測定するため、vesicular stomatitis virus G タンパクを HIV-1 のエンペロープタンパクの代わりに使った VSV-G HIV-1 pseudotype virus の系を用いた。感染効率は、NL-Luc を用いて luciferase 活性により検討した。また、培養上清中の IFN γ 、TNF α 、および TNF β 量は、R&D 社の ELISA キットを用いて定量した。

(倫理面への配慮)

この研究は、関与する大学や病院の倫理委員会の承認を受けた後、参加者に十分に説明し、インフォームドコンセントを得ておこなっている。

C 研究結果

HIV-1 感染各群でウイルス量を比較した (図 1)。HIV-1 RNA 量は未治療未発症 CD4 低下群、抗 HIV 薬治療群、長期未発症群の順で高かった。しかし、長期未発症群であっても測定検出限界以下の 50 copies/ml 以下の症例は 3 例 (20%) しか認められず、長期未発症群であっても HIV-1 RNA が比較的高く検出された。また、末梢血単核球 (PBMC) 中での RNA-DNA hybrid 量は未治療未発症 CD4 低下群で検出される症例が多かったか、長期未発症者群と抗 HIV 薬治療患者ではほとんどの症例で検出できなかった。また、PBMC 中の二重鎖 DNA 量は抗 HIV 薬治療群、未治療未発症 CD4 低下群、長期未発症群の順で高かった。

次に、宿主発症遅延因子について検討するために、まず、これらの検体から Herpesvirus saimiri により 442 株の株化 T 細胞を確立した。その内訳は非感染者群から 55 株、長期未発症群から 135 株、未治療未発症 CD4 低下群から 66 株、抗 HIV 薬治療群から 186 株であった。それぞれの患者群で樹立した細胞株に占める CD4 陽性 T 細胞株と CD8 陽性 T 細胞株の割合は、非感染者群で 0/667/0/292、長期未発症群で 0/708/0/27、未治療未発症 CD4 低

下群で 0 838/0 135、抗 HIV 薬治療群で 0 647/0 304 であった。

さらに、これらの株化 T 細胞に対して、VSV-G HIV-1 pseudotype virus の系で luciferase 活性で感染効率を測定することで、HIV-1 が細胞に侵入した後のウイルス複製に影響を及ぼす液性因子が各群のとれくらいの細胞株で産生されているかを検討した。Luciferase 活性をコントロールの活性の 30%以下に抑制する複製抑制能の高い液性因子を産生する T 細胞株の割合は長期未発症者の群では他の群に比べて有意に低かった (図 2)。また、luciferase 活性がコントロールの活性の 200%以上に亢進する複製亢進能の高い液性因子を産生する T 細胞株の割合は非感染群で有意に高く、長期未発症群と未治療未発症 CD4 低下群で有意に低かった (図 2)。

これらの HIV-1 複製抑制性や亢進性を持つ液性因子として、それぞれ IFN- γ や TNF α /TNF β が考えられるので、IFN γ の量と HIV-1 複製抑制活性、また、TNF α または TNF β と HIV-1 複製亢進活性の間に明らかな相関性はみられなかった。

D 考察

今回は病期の異なる感染者群の末梢血中での HIV-1 ウイルス量を 4 種類の方法で測定して他の群と比較すると、長期未発症群の血漿中の HIV-1 RNA 量は比較的高いか、PBMC 中の二重鎖 DNA 量は低かった。このことは、長期未発症者では血漿

中にウイルス粒子は放出されているか、T 細胞への新たな感染か効率良く行われていないか、感染を受けた細胞かより効率的に破壊されている可能性が示唆された。更に、長期未発症群ではその血漿中のウイルス粒子の逆転写酵素活性か他の群に比へ低いことから、不完全なウイルス粒子が多く産生されているという可能性も考えられる。この点について、現在さらに詳細な検討を続けている。

次に、宿主因子の検討のため、各群の患者末梢血から Herpesvirus saimiri を用いて T 細胞株を樹立した。長期未発症群ではより高率に HIV-1 複製抑制活性をもつ T 細胞株が分離されると予想していたか、実際には抑制活性を持つ細胞株も亢進活性を持つ細胞株も分離率は健常人などと比へて有意に低かった。このことが長期未発症者の末梢血での *in vivo* の状態を反映しているものかどうかは検討が必要である。しかし、抑制活性や亢進活性か IFN γ 、TNF α 、TNF β などの因子では説明できないので、未知の因子を含めてその他の因子の検索を開始している。

さらに、長期未発症群の T リンパ球でのトランスクリプトーム解析も続けている (詳細は共同研究者の渡辺慎哉先生の報告を参照)。

病院での倫理委員会などの問題で検体採取が遅れている施設もあるか、同一検体のフォローアップを含め、今後さらに詳しい検討を続けていく予定である。

E 結論

HIV-1感染長期未発症者のエイズ発症の遅延の要因について、ウイルス側についての検索では、感染性の不完全な粒子が多く産生されている可能性が示唆される結果を得た。現在、ウイルスの直接的な感染性を測定することが課題である。また、宿主側の要因についての検索では、HIV-1感染抑制および亢進する液性因子を産生するT細胞株を得ることが出来た。現在、各々の液性因子が何であるかの検討を続けている。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

1 論文発表

Chintu, C , Mudenda, V , Lucas, S , Nunn, A , Lishimpi, K , Maswahu, D , Kasolo, F , Mwaba, P , Bhat, G , Terunuma, H , Zumla, A Lung diseases at necropsy in African children dying from respiratory illnesses a descriptive necropsy study Lancet 360 985-990, 2002

Lishimpi, K , Kasolo, F , Chintu, C , Mwaba, P , Mudenda, V , Maswahu, D , Terunuma, H , Fletcher, H , Nunn, A , Lucas, S , Zumla, A Identification of *Pneumocystis carinii* DNA in oropharyngeal mouth washes from AIDS children dying of respiratory

illnesses AIDS 16 932-934, 2002

Kasolo, F , Lishimpi, K , Chintu, C , Mwaba, P , Mudenda, V , Maswahu, D , Terunuma, H , Fletcher, H , Nunn, A , Lucas, S , Zumla, A Identification of *Pneumocystis carinii* DNA by polymerase chain reaction in necropsy lung samples from children dying of respiratory tract illnesses J Pediatrics 140 367-369, 2002

Mitarai, S , Habeenzu, C , Lubasi, D , Kafwambulula, L M , Kasolo, F C , Ichiyama, K , Terunuma, H , Ito, M , Shishido, H , Numazaki, Y Drug susceptibilities and clinical manifestations of *Mycobacterium Tuberculosis* in Zambia Jpn J Trop Med Hyg 30 23-28, 2002

Handema, R , Terunuma, H , Kasolo, F , Kasai, H , Sichone, M , Yamashita, A , Deng, X , Mulundu, G , Ichiyama, K , Munkanta, M , Yokota, T , Wakasugi, N , Tezuka, F , Yamamoto, N , Ito, M Prevalence of drug-resistance-associated mutations in antiretroviral-drug-naïve Zambians infected with subtype C HIV-1 AIDS Research and Human Retroviruses 19 151-160, 2003

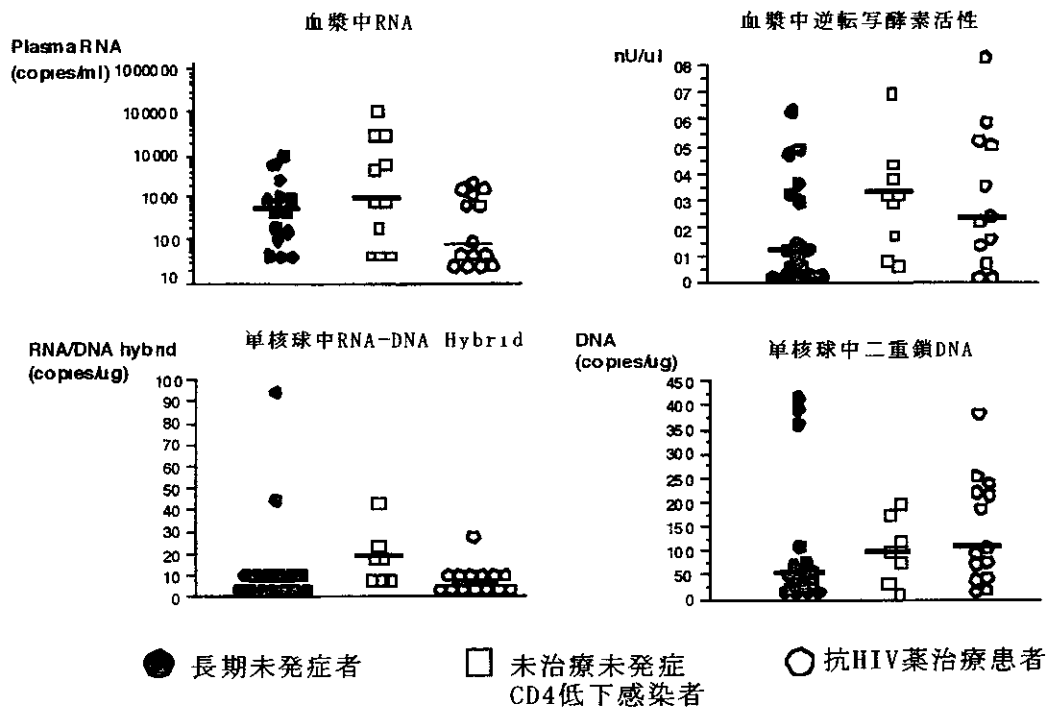


図1 HIV感染者各群における末梢血中のウイルス量

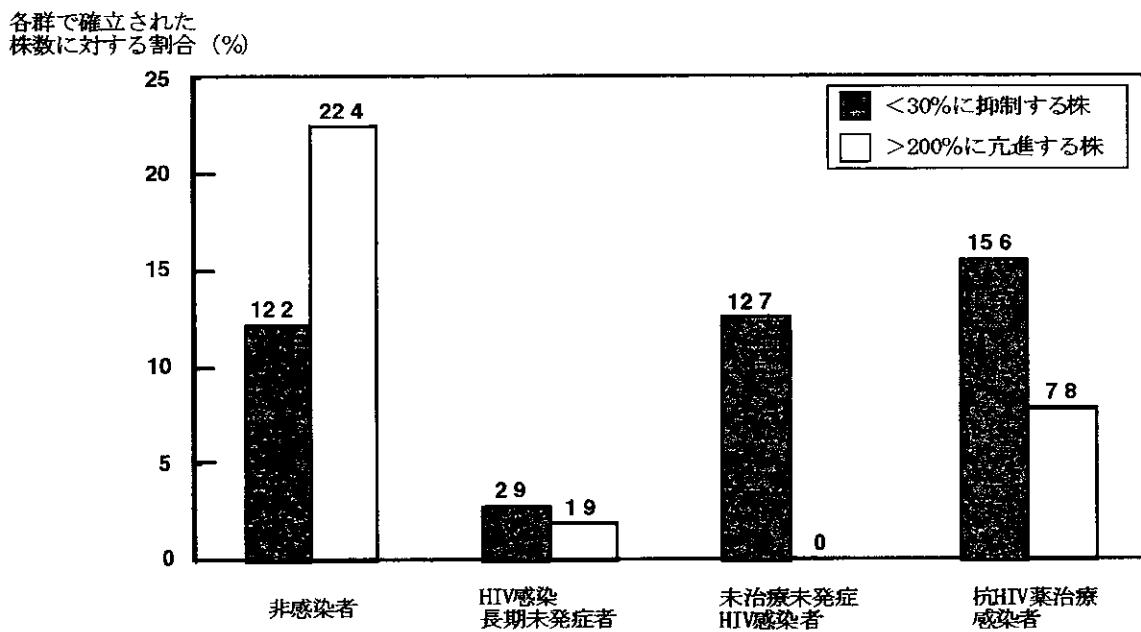


図2 HIV-1 感染各群における HIV-1 感染を抑制または亢進する培養上清を産生する T 細胞株数の割合

HIV 感染症の病態に関わる免疫応答の研究

分担研究者 横田 恭子 国立感染症研究所・免疫部・第一室長

研究要旨 慢性的に HIV に感染している患者由来の樹状細胞を分化誘導して yeast VLP やアデノウイルスヘクター感染により HIV 抗原を提示させ、機能的な HIV 特異的 T 細胞頻度や動態と感染者の病態について解析した。VLP を抗原とした Gag 特異的 CD4 陽性 T 細胞の頻度は病気の進行にほとんど関係していないように思われたか、特に進行のおそい未治療感染者群で Gag/Pol あるいは Nef 特異的 CD8 陽性 T 細胞が安定して高頻度に存在する傾向にあることが明らかとなった。このような機能的 CD8 陽性 T 細胞の頻度が高いことか、体内ウイルスの増殖とのバランスを保つ上で重要な要素であると考えられた。

A 研究目的

HIV 慢性感染者の中には、感染しても長期に未発症の人(LTNP)や進行の遅い人と早い人が存在する。これらの感染者の血中には HIV 特異的T細胞が一定数存在するか、その機能は種々のレベルで障害されていることか示されてきた。一方、抗ウイルス療法によっても完全にウイルスを排除することが困難であることか明白となり、個人か本来有する免疫機能を高めてウイルスの増殖を阻止することの重要性が再認識されている。本研究では、HIV に感染しても進行度の異なる感染者において、HIV 特異的 T 細胞の量的あるいは質的な違いと病態との関係を明らかにし、診断治療に役立てることとした。

B 材料と方法

1 研究対象

東大医科研に登録された HAART 治療中あるいは未治療の HIV 感染者20人および感染研の健常人有志を対象とした。

(倫理面への配慮) 健常人および HIV 感染者の PBMC の利用に関しては、感染研および東大医科学研究所の倫理委員会に研究計画の承認を受けた上で、本人の承諾のもとに提供された検体(血液)を用いた。

2 細胞

末梢血単核細胞をファイコール密度勾配法で分離し PBMC を得た。PBMC より抗 CD14 標識磁気ビーズを用いて MACS で単球を分画し、GM-CSF と IL4 の存在下に7—8日培養して樹状細胞(DC)を分化誘導した。CD14 陰性細胞はいったん凍結保存した。

3 HIV-1 抗原

Yeast 由来 Gag 粒子(VLP)とその対照となる Yeast 培養液 (CS)は北里大学・森川裕子教授より、Gag/Pol 発現アデノウイルス(Ax GP) と Rev 発現アデノウイルスは東大医科研岩本愛吉教授より供与いただいた。Nef 発現アデノウイルス(Ax Nef)は NL432 の Nef 遺伝子を PCR で増幅して作成し、対照となる空ウイルス(Ax control)とともに 293 細胞で増殖させて超遠心で精製した。

4 FACS 解析

細胞は 0.5% BSA/PBS、0.01% NaN₃ (SB)に浮遊させ、細胞表面抗原を染色した後 4% paraformaldehyde で固定し、0.5%サポニン含有 SB で permeabilize した。更に細胞内染色抗体を反応させ、FACSscalibur で解析した。細胞表面抗原に対する蛍光標識抗体は Coulter-Immunotech 社の製品を、FITC-perforin 抗体は BD-Pharmingen 社より購入した。MHC-Nef peptide complex は東大医科研川名愛先生より供与を受けた。

5 エリスポント

PBMC (1×10^5 /well)あるいは DC (1×10^4 /well)とT細胞(1×10^5 /well)を抗原存在下に抗 IFN- γ (Mabtech)をコートした membrane filter plate (Millipore) 上で培養し、40 時間後にプレートを洗浄後、ヒオチン化抗 IFN- γ (Mabtech)抗体を 37 度で 2 時間反応させ、次に HRP 標識した streptavidine を反応させた。AEC 発色後、実体顕微鏡下にスポットを数えた。

C 研究結果

HIV 感染者由来の樹状細胞を抗原提示細胞として VLP(北里大学、森川裕子教授より供与)あるいはアデノウイルスヘクターで発現させた Gag/Pol および Nef を認識する機能的な HIV 特異的 T 細胞の頻度と病態の関係について解析した。VLP をとりこんだ樹状細胞は成熟して Gag 特異的 CD4 陽性 T 細胞の反応を強く誘導し、アデノウイルス感染樹状細胞では HIV 特異的 CD8陽性 T 細胞の活性化を誘導する。この方法によりこれまでに検討した HIV 感染者 20 人の解析結果を1) HAART によりウイルスの増殖がよく制御されている人 2) HAART にもかかわらずウイルスの増殖が抑制できていない人 (HAART 不全) 3) 進行のおそい未治療の感染者の3群に分類してまとめた(表1)。VLPに対する反応性は健常人と比較して HIV 感染者で有意に高かったか、CD4陽性 T 細胞の Gag に対する反応が全く誘導されない感染者は全てのグループに1人ずつ合計3名存在し、反応の強さもグループ間の差を認めなかった。それに対し、Gag/Pol 特異的 CD8は未治療者で特に高い傾向があった。これらの感染者のうち HAART が有効な PN20、HAART 不全の PN6 と未治療群の PP4 では、半年の間を経て2回解析している(図1)。その結果、未治療の PP4 では HIV 特異的な CD8が安定して PN20 や PN6 よりも高い頻度で存在していること、PN6 はプロテアーゼ耐性ウイルスが半年の間に増殖を続け、非特異的なT細胞の反応は強くなっているか、HIV 特異的な反応は PP4 に比較して弱いままであることか明らかとなった。

Nefに対する反応性を弱いながらも有する PN17 の Nef 特異的 CD8 陽性T細胞か、エフェクターに分化する機能的記憶T細胞であるかどうかを検討するため、

Nef 発現アデノウイルス感染 DC と PBMC を一週間培養して perform の発現を FACS で解析した(図2)。CD8/SSC gate の高さから判断して CD8 陽性T細胞はある程度活性化されている(上段のパネル)にもかかわらず、perforin 産生は全く誘導されず、かえって Nef 特異的 CD8 陽性T細胞は減少する傾向にあることか明らかとなった。

D 考察

HIV に反応する特異的 T 細胞は病気の進行度にかかわらず存在している。しかしながら、HIV 特異的な CD4 陽性 T 細胞と比較して機能的 CD8陽性 T 細胞の頻度はより病態に即していると考えられ、特に進行の遅い未治療者においてはウイルスの増殖にある程度対応していると考えられた。HAART 治療者でウイルス量が検出限界以下に抑えられている感染者では HIV 特異的 CD8 陽性T細胞が低い傾向にあるか、耐性ウイルスが増加している患者では、HIV 特異的な CD8陽性T細胞がウイルスに対応して増加しておらず、CD8 陽性T細胞が十分機能していないと考えられた。

NefはMHC class Iの発現を低下させ、それによって感染T細胞がCTLからエスケープすると考えられている。一方、Nefに対するCTLはHIV感染者で高頻度に存在することか知られている。今回の解析でも Gag 特異的 CD8陽性 T 細胞よりは少ないものの Nef に反応する CD8陽性 T 細胞が高頻度に存在する感染者もあり、生体内での Nef の MHC class I 発現低下作用の意義について更に検討を要する。

E 結論

感染者由来の分化させた樹状細胞を用いて、機能的な HIV 特異的 T 細胞と感染者の病態について解析した。VLPを用いた Gag 特異的 CD4 陽性 T 細胞の頻度は病気の進行にほとんど関係していないように思われたか、特に進行の遅い未治療感染者で Gag/Pol あるいは Nef特異的 CD8 陽性 T 細胞が安定して高頻度に存在する傾向にあることか明らかとなった。このような機能的 CD8 陽性 T 細胞が高頻度に存在することか、ウイルスの増殖とのバランスを保つ上で重要な要素で

あると考えられた。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

1 論文発表

(1) 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 Leu Biol, 72 115-124, 2002

(2) Harada, T, Tsunetsugu-Yokota, Y, Koyanagi, Y, Sata, T, Kurata, T and Kojima, A Role of nucleotide sequences in the V3 region in efficient replication of CCR5-utilizing human Immunodeficiency virus type 1 in macrophages Virology, 299 192-203, 2002

(3) Sun, Y, Samri, A, Alatrakchi, N, Blanc, C, Iglesias, E, Yokota, Y, Carcelam, G, Debre, P, Autran, B HIV-1-specific CD8 T cells from LTNPs are preferentially differentiated in memory T cells with low perforin content J Virol, in revision, 2003

(4) Yoshizawa, I, Mizuochi, T, Ogata, A, Murakami, M, Yagata, H, Takahashi, Y, Takemori, T, and Tsunetsugu-Yokota, Y Studies on the generation and maintenance of mucosal CTL against human immunodeficiency virus type-1 Gag in mice AIDS Res Hum Retro, in revision, 2003

(5) Tsunetsugu-Yokota, Y, Morikawa, Y, Isogai, M, Kawana-Tachikawa, A, Odawara, T, Nakamura, T, Grassi, F, Autran, B, Iwamoto, A Yeast-derived HIV type-1 p55gag virus-like particles activated DCs and induce perforin expression in Gag-specific CD8⁺ T cells by cross-presentation of DCs submit for publication

2 学会発表

(1) Maya Isogai, Kaori Ohtaki, Yasuko Tsunetsugu-Yokota Effect of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Nef expression by adenovirus vector on monocyte-derived dendritic cells and macrophages 11th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages 2002, 新潟, 平成 14 年 6 月。

(2) Murakami, M, Yoshizawa, I, Tsunetsugu-Yokota, Y Evaluation and characterization of mucosal CTL response against HIV-1 Gag 11th International Congress of Mucosal Immunology, Orland, Florida, USA, June, 2002

(3) 横田 (恒次) 恭子, 森川裕子, 磯貝まや, 細谷紀彰, 立川 (川名) 愛, 小田原隆, 中村哲也, 岩本愛吉, Brigitte Autran. 樹状細胞による HIV-1 Gag 抗原提示と Gag 特異的 T 細胞の活性化に関する解析。第 50 回日本ウイルス学会総会、札幌、

平成 14 年 10 月。

(4) 磯貝まや, 大竹かおり, 藤井陽一, 竹森利忠, 横田 (恒次) 恭子。HIV-1 Nef の発現が抗原提示細胞の機能に及ぼす影響の解析。第 50 回日本ウイルス学会総会、札幌、平成 14 年 10 月。

(5) 原田貴之, 横田恭子, 小柳義夫, 佐多徹太郎, 倉田毅, 小島朝人。HIV-1 R5 ウイルスの M トロピズムにおける V3 ヌクレオチド配列の役割。第 50 回日本ウイルス学会総会、札幌、平成 14 年 10 月。

(6) 志田寿利, 田中勇悦, 横田恭子。HIV RNA の輸送因子 CRM1 の末梢リンパ球における発現制御。第 16 回日本エイズ学会、名古屋、平成 14 年 11 月。

(7) 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。第 32 回日本免疫学会総会、東京、平成 14 年 12 月。

H 知的所有権の取得状況

なし

表1 HIV感染者の病態とHIV特異的免疫反応

code	CD4	VL	therapy	CS	VLP	Ax control	Ax GP/rev	Ax Nef
P1	819	<50	AZT/ddC	293	930	17	700	84
PP3	853	<50	HAART	40	260	7	1100	27
PN5	592	<50	HAART	ND	ND	257	343	220
PN20	557	<50	HAART	0	0	3	83	33
PN17	489	<50	HAART	60	460	30	393	200
PN14	374	84	HAART	73	217	173	707	760
P4	581	88	HAART	ND	ND	37	287	ND
PP2	480	110	HAART	20	110	130	630	127
PN15	816	140	HAART	156	360	113	737	217
PN12	397	220	HAART	45	190	120	158	233
PN24	457	290	HAART	0	0	20	333	53
PN8	418	2200	HAART	77	2810	50	4905	1505
PN1	670	5000	HAART	0	695	0	117	17
PN22	451	8100	HAART	7	160	50	1193	57
PN4	314	56000	HAART	ND	ND	550	990	717
PN6	486	150000	HAART	250	763	415	690	713
P2	285	3300	no	20	508	37	287	63
PP4	547	5400	no	30	440	90	2300	224
PN2	535	61000	no	0	0	20	3213	ND
PN26	339	86000	no	80	320	7	2333	2667

VL 血中ウイルスRNA量 (copies/ml)

CS (control supernatant)およびVLP (yeast viral like particle) DCにこれらの抗原をパルスして抗原提示細胞とし 10⁶個のPBMC中のIFN- γ を産生するT細胞数をエリスホト解析した。

Ax control Ax GP/rev Ax NefそれぞれDCにコントロールアデノウイルス Gag/Pol発現アデノウイルス + Rev発現ウイルス Nef発現アデノウイルスに感染させて抗原提示細胞とし 10⁶個のPBMC中のIFN- γ を産生するT細胞数をエリスホト解析した

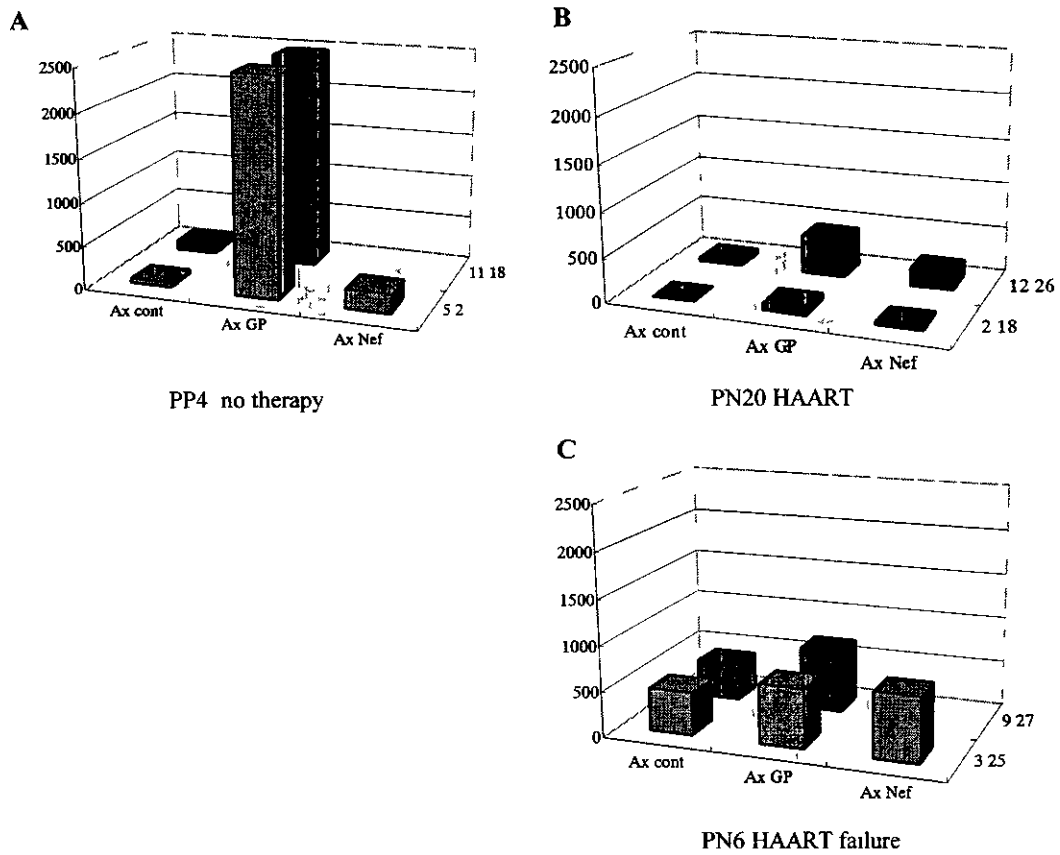


図1 HIV特異的CD8⁺T細胞の動態。約6ヶ月に渡って経過を観察できた患者のHIV特異的T細胞頻度をIFN- γ エリスポット解析した (10^6 PBMC中)。対象は A PP4 未治療 B PN20 HAART C PN6 HAART failures (表1参照)である。

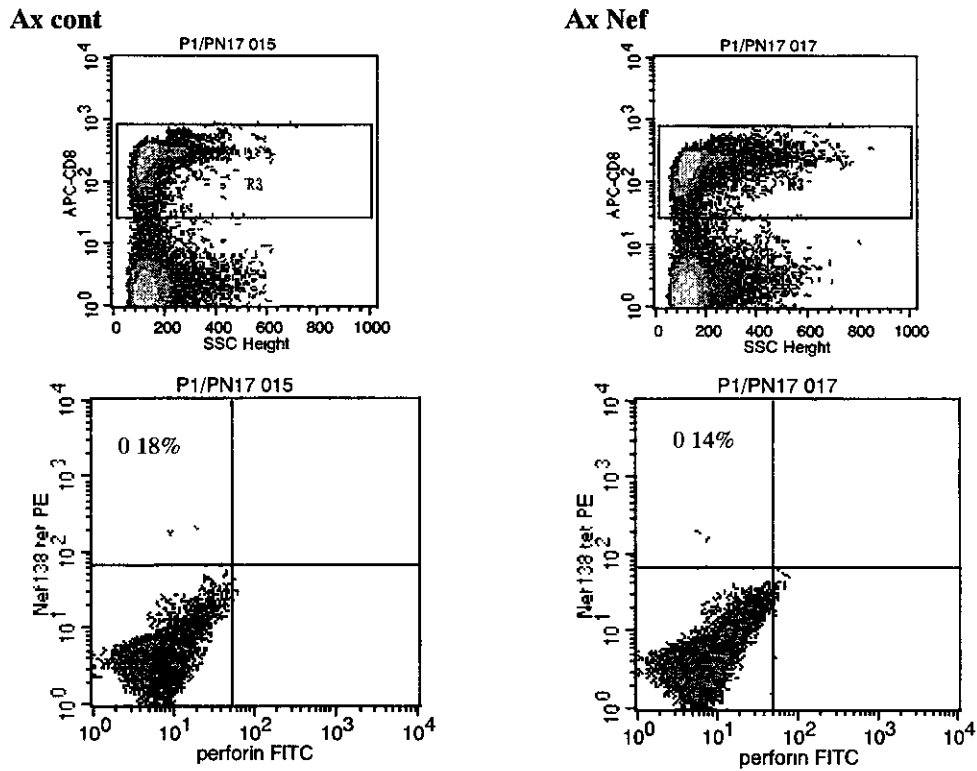


図2 進行感染者のCD8⁺T細胞は活性化されない

単球由来DCにNef発現アデノウイルス（右）あるいはNefを発現しないコントロールアデノウイルス（左）を感染させ、翌日PBMCと共培養した。一週間後にMHC-Nef peptide complex (Nef tetramer)と細胞内perforinの発現をFACSで解析した。上段のパネルはCD8のゲートを示す。下段のパネルの%はNef特異的CD8陽性T細胞頻度を表す。

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

分担研究報告書

HIV 感染症の病態と宿主の免疫応答の研究

分担研究者 松下修三 熊本大学エイズ学研究センター 教授

研究要旨

我々は昨年までに自己の分離株に対する中和抗体の存在下にウイルスのリバウンドが認められた症例を解析し、*m vivo* での中和エスケープには V1/V2 や V3 などの可変部位ばかりではなく、C3 領域の変異が影響することを示した。しかし、C3 領域はリニアエピトープを形成しないと考えられることから、この中和エスケープには何らかの立体構造を認識する抗体の関与が考えられた。そこで我々は gp120 の立体構造を認識して中和する単クローン抗体を 15 種類準備し、HAART 前のウイルス(pMOK10)及びリバウンド時のウイルス(rMOK10)に対する中和能を検討した。さらにこれらの V3/C3 領域を更に組換えた rMOKV3/C3、rMOKC3 の中和を詳細に検討した。これらの検討から V3 の立体構造を認識する単クローン抗体の一つ、2442 が C3 及び V3/C3 のアミノ酸変化にて中和感受性が変わることがわかった。この研究は *m vivo* での中和抗体からのエスケープがリニアエピトープの多様性によってではなく、定常部位の変位による中和エピトープの立体構造変化によっておこることを示した。

A 研究目的

抗ウイルス剤多剤併用療法 (HAART) にて治療中の症例の残存ウイルスの性質とそれに対する宿主の免疫応答を調べ、発症阻止を目指した免疫療法を開発するのが、本研究の目的である。本年は臨床株の中和抵抗性に関する gp120 の C3 領域の関与について報告する。

B 研究方法

HAART 開始時及びリバウンド時の血漿より RT-PCR にて HIV-gp120 を増幅し、多クローン解析にてアミノ酸配列を決定し系統樹解析を行った。リバウンド前後の gp120 のアミノ酸配列をもつ組み換えウイルスを複数作成し患者血漿から精製した IgG を用いて、MAGI-CCR5 細胞の系でそれぞれのウイルスに対する中和活性を測定した。さらに中和感受性ウイルスと中和抵抗性ウイルスクローンよりリコンビナントエンベロープを作製し、中和抵抗性変化に関連する部位を同定した。gp120 の立体構造エピトープに反応し、感染を中和する単クローン抗体 15 種類を用い HAART 開始前とリバウンドウイルス及びそれらのキメラウイルスに対する中和活性を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究を行うに当たり各症例には研究の概要を説明し同意を得た上で採血し、解析した。なお本研究の倫理的・科学的妥当性は熊本大学付属病院の先進医療審査委員会にて審査され、了承されている。

C 研究結果

我々は昨年までに自己の分離株に対する中和抗体をもつ症例で、HAART にて長期に亘りウイルス血症の抑制がみられた中で、ウイルスのリバウンドが認められた 3 症例を解析し、*m vivo* での中和エスケープには V1/V2 や V3 などの可変部位ばかりではなく、定常部位である C3 領域の変異が影響することを示した。しかし、C3 領域に対応する合成ペプチドに反応する抗体は検出されず、C3 領域はリニアエピトープを形成しないと考えられることから、この中和エスケープには何らかの立体構造を認識する抗体の関与が考えられた。我々は gp120 の立体構造を認識して中和する単クローン抗体として、CD4 結合部位に対する抗体、gp120 が CD4 に結合後に出現するエピトープに対する抗体、さらに V3 を含んだ立体構造を認識する抗体など 15 種類の単クローン抗体を準備し、HAART 前のウ

ウイルス (pMOK10) 及びリバウンド時のウイルス (rMOK10) に対する中和能を検討した。さらにこれらの組換えウイルスの V3/C3 領域を更に組換えた rMOKV3/C3 (pMOK10 の V3/C3 のみリバウンド型)、rMOKC3 (pMOK10 の C3 のみリバウンド型) の中和を詳細に検討した。これらの中で V3 の立体構造を認識する単クローン抗体の一つ、2442 が C3 及び V3/C3 のアミノ酸変化にて中和感受性が変わることがわかった。2442 の中和は HIV 感染症例の中和抗体とは逆に HAART 開始前のウイルスが中和抵抗性であり、V3/C3 及び C3 がリバウンド型となると中和感受性が増加した。一方、他の V3 の立体構造を認識する単クローン抗体 2182 やリニアエピトープと認識する 477-52D はリバウンドウイルス (pMOK10) のみ感受性で他は全て抵抗性であり、V3 に反応しておこるウイルス感染の中和には V3/C3 以外の中和抵抗性を与える領域があると考えられた。我々はさらに V1/V2 を組み替えたウイルス (rMOKV1/V2) について検討したところ、pMOK10 と同等に中和抵抗性であったことから、down-stream C3 または V4 に 477-52D や 2182 に対する中和抵抗性に関連する領域があると考えられた。

D 考察

これらの結果は単一エピトープに対する中和抗体の中和活性がエピトープ以外のアミノ酸の変化に伴う gp120 の立体構造変化の影響をうけることを意味し、ワクチン開発などに重要な意味をもつものである。一方、抗体の反応性は維持されていることから中和抵抗性のメカニズムの研究に関してはさらに Biacore などを用いて検討していることである。

E 結論

我々は gp120 の C3 領域が *in vivo* における中和抗体からのエスケープに関与することを証明するとともに、V3 を含んだ立体構造エピトープに対する抗体にウイルスが中和抵抗性となるメカニズムを明らかにした。

F 健康危険情報

特になし

G 研究発表

(論文発表)

1) Koto A, Kameyama Y, Cheng-Mayer C,

Matsushita S Susceptibility of mink (*Mustela vison*)-derived cells to replication by human immunodeficiency virus type-1 J Virol, 2003 (in press)

- 2) Koto, A, Shigekane, H, and Matsushita, S Ability of small animal cells to support the postintegration phase of human immunodeficiency virus type-1 replication Virology, 305 181-191, 2003
- 3) Wang, FX, Kimura, T, Nishihara, K, Yoshimura, K, Koto, A, and Matsushita, S Emergence of autologous neutralization-resistant variants from preexisting human immunodeficiency virus (HIV) quasi species during virus rebound in HIV type 1-infected patients undergoing highly active antiretroviral therapy J Infect Dis 185 608-17, 2002
- 4) Matsushita S, Kimura T, Wang FX, Kim JR, Koto A, and Yoshimura K Reconstitution of autologous isolate neutralizing antibodies under HAART and emergence of neutralization escape mutants *in vivo* XIV International AIDS Conference 2002 (ed Monduzzi Editore), 159-167, 2002
- 5) Matsushita, S, and Kimura, T Advance in treatment strategy and immune reconstruction against HIV-1 infection Microbiol Immunol 46 231-9, 2002
- 6) Kimura, T, Yoshimura, K, Nishihara, K, Maeda, Y, Matsumi, S, Koto, A, and Matsushita, S Reconstitution of spontaneous neutralizing antibody response against autologous human immunodeficiency virus during highly active antiretroviral therapy J Infect Dis 185 53-60, 2002

(国際学会発表)

- 1) Matsushita S, Wang FX, Kimura T, Nishihara K, Yoshimura K, Koto A HIV quasispecies and neutralization escape *in vivo* 14th Joint AIDS Panels Meeting, March 19-21, 2002, Seattle, U S A
- 2) Matsushita S, Kimura T, Wang FX, Kim J, Koto A, Yoshimura K Reconstitution of autologous isolate neutralizing antibody under HAART and emergence of neutralization escape mutants *in vivo* XIV International AIDS Conference 2002 7 7-12, Barcelona, Spain
- 3) Yoshimura K, Wang FX, Kimura T, Koto A, Matsushita S Detecting the residual

replication level to potentiate HAART regimen for a salvage therapy XIV International AIDS Conference 2002 7 7-12, Barcelona, Spain

- 4) Kimura T, Yoshimura K, Koito A, Matsushita S Antibody-mediated neutralization against dual tropic viruses depends on coreceptor usages XIV International AIDS Conference 2002 7 7-12, Barcelona, Spain
- 5) 吉村和久、木村哲也、小糸 厚、松下修三 HIV 感染症治療の最適化に関する研究 p-DNA と T-cell turnover の測定 第 16 回日本エイズ学会学術集会 総会 2002 11 28-11 30 名古屋
- 6) 松下修三 HIV 感染症治療の最適化を目的としたプロテアーゼ阻害剤の血中濃度測定 第 16 回日本エイズ学会学術集会 総会 2002 11 28-11 30 名古屋
- 7) 木村哲也、吉村和久、小糸 厚、松下修三 Dual tropic virus に対する中和抗体活性と coreceptor usage 第 16 回日本エイズ学会学術集会 総会 2002 11 28-11 30 名古屋

H 知的所有権の出願・取得状況

(予定を含む)

なし