

月 23 日～25 日

- 7) 富山宏子、松田智子、徳永美知代、滝口雅

文 (2001) 抗原特異的 CD8 T 細胞の分化.

第 31 回日本免疫学会 (大阪) 平成 13 年

12 月 11 日～13 日

- 8) Ueno, T., Tomiyama, H., Takiguchi, M.: A

single T cell receptor-mediated recognition of an identical peptide in the context of multiple HLA molecules. XIII International Congress of Histocompatibility & Immunogenetics.

(Seattle, Washington, USA) May 18-22, 2002.

- 9) Fukada, K., Tomiyama, H., Wasi, C.,

Matsuda, T., Kusagawa, S., Sato, H., Oka, S., Takebe, Y., Takiguchi, M.: Cytotoxic T cell recognition of HIV-1 cross-clade and clade-specific Epitopes in HIV-1-infected Thais and Japanese. XIV International AIDS Conference. (Barcelona, Spain) July 7-12, 2002.

- 10) Tomiyama, H., Akari, H., Adachi, A.,

Takiguchi, M.: Different effects of Nef-mediated HLA-class I down-regulation on HIV-1-specific CD8⁺ T cell cytolytic activity and cytokine production. XIV International AIDS Conference. (Barcelona, Spain) July 7-12, 2002.

- 11) 滝口雅文 (2002) HLA テトラマーによる

抗原特異的 CD8 T 細胞の解析. 第 11 回日

本組織適合性学会大会 (埼玉) 平成 14 年 9

- 12) 上野貴将、富山宏子、藤原守、滝口雅文

(2002) HIV による免疫逃避機構の新たな可能性. 第 50 回日本ウイルス学会学術集会

(札幌) 平成 14 年 10 月 16 日～18 日

- 13) 滝口雅文 (2002) HIV-1 特異的 CD8 T 細胞

からの HIV-1 逃避機序. 第 16 回日本エイズ学会 (名古屋) 平成 14 年 11 月 28 日～30

日

- 14) 藤原守、富山宏子、滝口雅文 (2002) TCR

からのシグナルを介した HIV-1 特異的 CTL clone の各種サイトカインの産性能の差異. 第 32 回日本免疫学会総会 (東京) 平成 14

年 12 月 4 日～6 日

- 15) 上野貴将、滝口雅文 (2002) エピトープ

ペプチド・HLA 四量体 (HLA テトラマー) を用いた HIV 特異的 T 細胞の解析. 第

25 回日本分子生物学会年会 (横浜) 平成 14

年 12 月 11 日～14

- 16) Ueno, T., Tomiyama, H., Fujiwara, M.,

- Takiguchi, M.: HIV-specific cytotoxic T lymphocyte clone unable to kill HIV-infected cells shows increased binding capacity to peptide-HLA complex. The Second International AIDS Society Conference on HIV Pathogenesis and Treatment (Paris, France) July 13-16, 2003.
- 17) Satoh, M., Takamiya, Y., Oka, S., Tokunaga, K., Takiguchi, M.: Identification of HIV-1 CD8 T cell epitopes presented by HLA-A*2601. 7th Asia-Oceania Hitocompatibility Workshop and Conference (Karuizawa, Japan) September 16 - 19, 2003.
- 18) Fujiwara, M., Tomiyama, H., Takiguchi, M.: Effect of Nef-mediated HLA class I down-regulation on ability of HIV-1-specific CD8+ T cells to suppress HIV-1 replication. 7th Asia-Oceania Hitocompatibility Workshop and Conference (Karuizawa, Japan) September 16 - 19, 2003.
- 19) Takiguchi, M.: HIV-1 escape from HIV-1-specific CD8 T cells in individuals with HIV-1 infection. 7th Asia-Oceania Hitocompatibility Workshop and Conference (Karuizawa, Japan) September 16 - 19, 2003.
- 20) 上野貴将、富山宏子、岡慎一、滝口雅文
 (2003)HIV感染細胞に不応答性を示す HIV エピトープ特異的 CD8 T 細胞の ex vivo 解析. 第 51 回日本ウイルス学会 (京都) 平成 15 年 10 月 27 日～29 日
- 21) 上野貴将 (2003) HIV のヒト細胞傷害性 T 細胞からの逃避機構. 第 17 回日本エイズ学会 (神戸) 平成 15 年 11 月 27 日～29 日
- 22) 佐藤愛美、高宮裕児、岡慎一、滝口雅文
 (2003) HLA-A*2601 に提示される HIV-1 CD8 T 細胞のエピトープ同定. 第 17 回日本エイズ学会 (神戸) 平成 15 年 11 月 27 日～29 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

Table 1. Killing of HLA-A*3303-restricted CTL clones for CIR-A*3303 infected with HIV-1 recombinant vaccinia.

CTL clone	Percent lysis									
	C1R peptide(+)	C1R peptide(-)	C1R-A*3303 peptide(+)	C1R-A*3303 peptide(-)	C1R WT	C1R rVV	C1R-A*3303 WT	C1R-A*3303 rVV		
SF2-Pol 60-70-2	18.2	1.9	69.4	3.6	1.4	2.5	2.6	26.5		
SF2-Pol 594-602-1	2.5	4.2	80.6	0.0	4.6	1.0	0.0	35.4		
SF2-Pol 934-943-3	0.0	0.8	54.0	1.8	-2.5	-2.4	2.0	24.3		
SF2-Gag 144-152-3	2.9	2.1	81.2	0.9	-4.5	-3.3	1.1	18.9		
SF2-Gag 298-307-2	1.0	0.3	84.0	1.6	4.8	-0.4	-3.6	3.0		
SF2-Nef 192-200-5	2.8	0.0	44.1	-2.0	6.0	1.5	5.6	-2.6		

Fig-1. Recognition of HLA-B*3303-restricted, HIV-1-specific CTL clones for target cells infected with recombinant HIV-1 cladeE and cladeB vaccinia

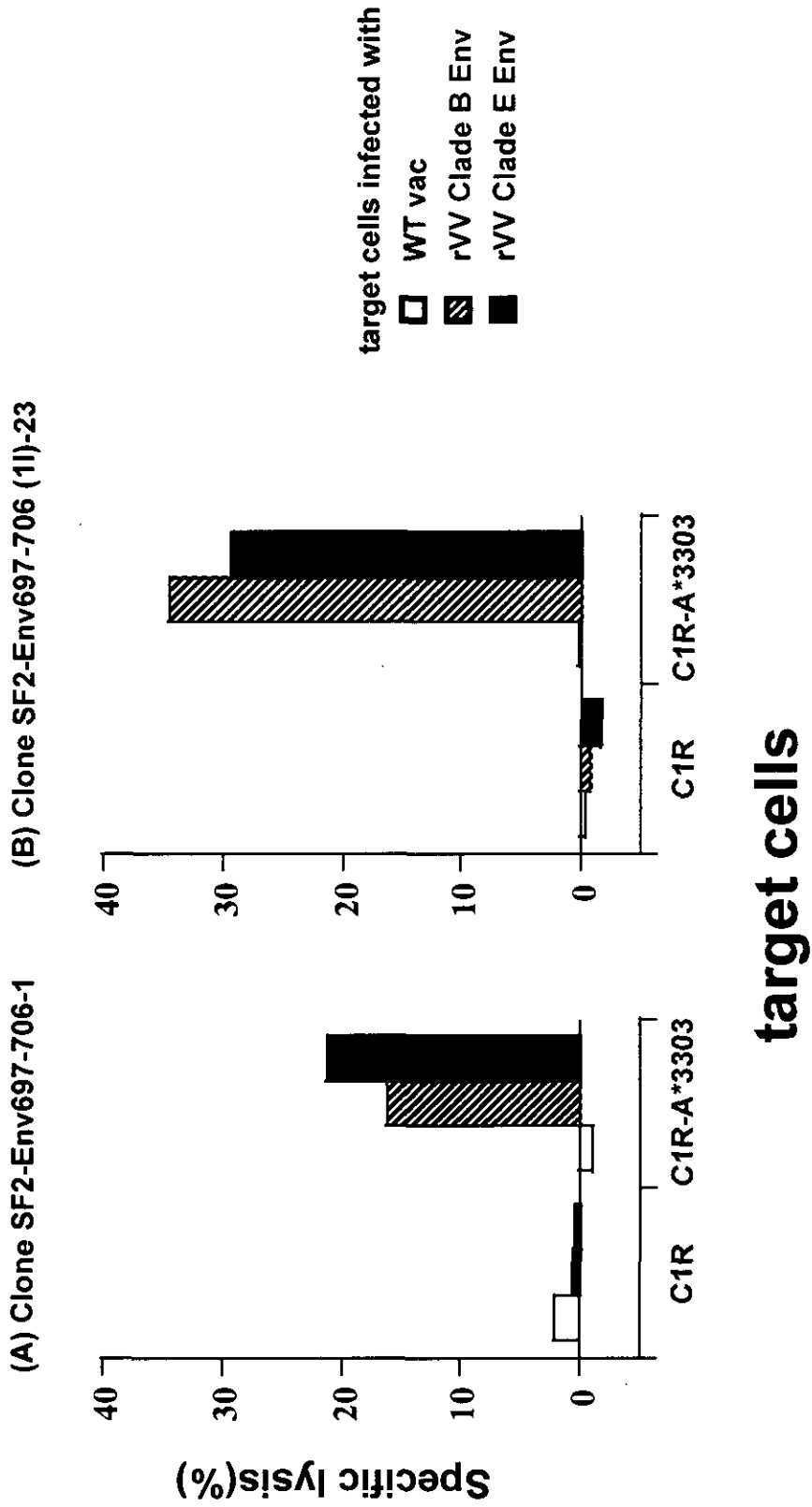
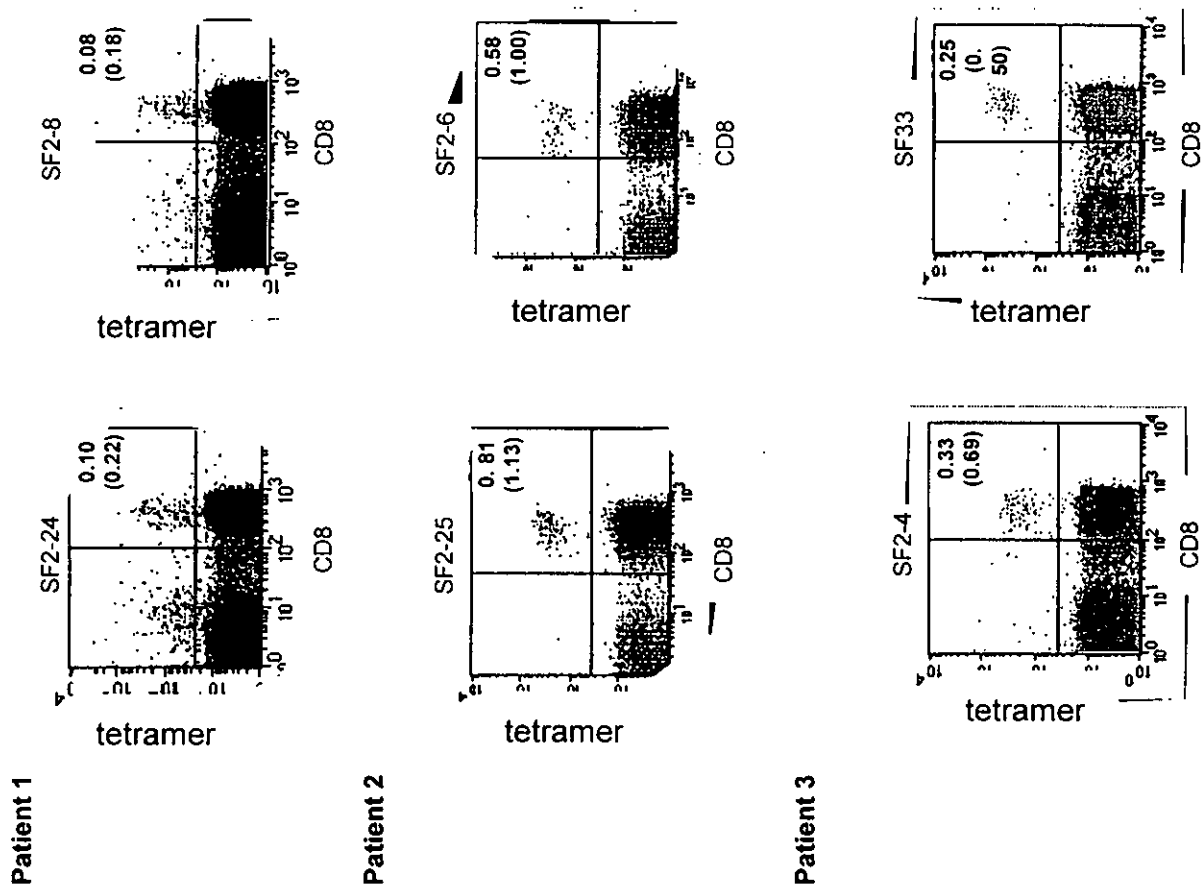


Fig-2. Examples of detection of HIV-1-specific CD8⁺T cells in PBMC of HIV-1 infected individuals using tetramers



厚生労働科学研究費補助金（倉庫等ヒューマンサイエンス総合研究事業）

分担研究報告書

サル CTL 活性の測定解析に関する研究

分担研究者 山本 博 富山医科薬科大学 生命科学実験センター助教授

研究要旨

エイズ予防及び治療効果を示すワクチン開発において、細胞性免疫が重要と考えられている。これらの細胞性免疫においては、抗原特異性の細胞障害性リンパ球 (CTL) が誘導されることが重要であり、また、腫瘍細胞及びウイルス感染細胞を障害する Natural Killer (NK) 細胞も大きな役割を担うと考えられている。候補ワクチンの細胞性免疫誘導能を調べるため、これまでは主として functional assay による CTL 活性及び NK 活性を測定した。各免疫接種種において特異的 CTL 誘導能の検討を行なった結果、免疫接種種ガルのすべてに強い CTL 活性を誘導する免疫方法は見られなかった。しかしながら、組み換え BCG ワクチンで免疫 (prime) した後、組み換えワクチニア (rWDIs 株) で追加免疫を行なう事により細胞性免疫が誘導できた。つまり、今回の免疫群のうち村山組み合わせ免疫群 (rBCG/ rW DIs SIVmac gag 免疫群) では、強い CTL 活性の誘導がみられた。

A. 研究目的

細胞障害性リンパ球 (CTL) を誘導できる HIV ワクチン開発のための基礎研究を行なった。組み換えワクチニア及び組み換え BCG エイズワクチン候補を用いてサルに種々の組み合わせで免疫を行ない、エイズウイルス (SIV, HIV) 特異的 CTL 誘導能の検討を行なった。候補ワクチンの CTL 誘導能はエイズワクチン開発の基礎研究としては必須の部分である。

1. 各種候補ワクチンのサルにおける抗原特異的細胞性免疫の誘導の検討

- 1) rW HIV-1. subtype B gag (以下 Rvv MRC gag) をカニクイザル (以下 Mf) に接種し、CTL 誘導能の検討を行なう。
- 2) rW DIs SIV mac gag (以下 rW gag) と rBCG SIV mac gag (以下 rBCG gag) ワクチンをカニクイザルに接種し、特異的 CTL 誘導能の検討を行なう。
- 3) rW DIs SIV mac gag-pol (以下 rW gag-pol) と rBCG SIV mac gag-pol (以下 rBCG gag-pol) を組み合わせてカニクイザルに接種し、CTL 誘導能の検討を行なう。
- 4) rW DIs HIV subtype E gag (以下 rW E-gag) と rBCG HIV subtype E gag (以下 rBCG E-gag) を組み合わせてカニクイザルに接種し、CTL 誘導能の検討を行なう。
- 5) HIV 候補ワクチンの一つとして、DNA (SIVgag-pol DNA, HIV 89.6 env DNA, IL-2 DNA) と rW DIs SIVmac gag-pol を組み合わせてカニクイザルに接種し、CTL

誘導能の検討を行なう。

2. 誘導された CTL について検討

誘導された CTL の MHC リストリクション、エピトープの解析及び同定について検討する。

B. 研究方法

1. rW HIV-1 subtype B gag 領域を含む rW (DIs 株) を作製し、カニクイザル (Mf) 2頭に接種した。接種後、2、5、8、14、16週目の末梢血リンパ球 (PBMC) 及び剖検時 (免疫後16週目) の脾臓中リンパ球を in vitro において抗原特異的二次刺激を5日毎に2回行ない、5日～1週間後に gag 特異的 CTL 活性を⁵¹Cr release 法により調べた (Fig1)。

2. SIV mac239 の whole gag 領域を含む rBCG (東京株) 及び rW (DIs 株) を作製し、カニクイザル (Mf) を3群に分けて接種した。3群の免疫は以下の組み合わせで行なった。

- 1) 村山組み合わせ群：組み合わせ接種群 (静脈接種 (I.V.) 2頭 経口投与2頭) の後に、rW gag 接種 (I.V. 4頭) したもの4頭、及び rW gag 免疫 (I.V. 2頭) 後に rBCG gag 接種 (I.V. 2頭) コントロール2頭の4頭の2通りで免疫したサル合計8頭の内、5頭については、rW gag で boost 免疫し SHIV 強毒株 (SHIV C2/1) を challenge、4週間後に剖検し、gag 特異的 CTL 活性を調べた。また、この組み合わせ群の残りの3頭 (Mf 3605, Mf 3606, Mf 3978) については、rW gag で Boost、その PBMC を分離し gag 特異的 CTL

活性を調べた(Fig 2)。

- 2) 筑波A群:皮内接種(I.D.)群は次の様に行なった。
(rW gag, rW gag-pol 1頭, rBCG gag, rBCG gag-pol 5頭 及びコントロール2頭)の合計8頭を用いた。(Fig3)
- 3) 筑波B群:rW gag 及びrW gag-pol を静脈内接種した(I.V.群)4頭とコントロール2頭の群である。接種後PBMCのgag特異的CTL活性を調べた(Fig4)。

3. SIVmac 239のgag-pol領域を含むrBCG(東京株)及びrW(DIs株)を作製し、前述のカニクイザル(Mf)筑波A群、B群を組み合わせて接種した。

1) rW gag-pol 免疫(静脈接種)及びrBCG gag-pol 免疫(皮内接種)群:rWgag-pol/rBCG gag-pol 6頭 およびコントロール4頭(合計10頭)は接種後PBMCを分離してin vitroにおいて抗原の二次刺激を行ない、gag または gag-pol 特異的CTL活性を調べた。免疫スケジュールは、既出の筑波A群及び筑波B群免疫スケジュールに追加して示した(Fig3.4)。

4. HIV-1 subtype E のgag領域を含むrBCG(東京株)及びrW(DIs株)を作製し、カニクイザル(Mf)9頭に組み合わせて皮内投与した。接種後PBMCを分離し、in vitroにおいて抗原の二次刺激を行ない、PBMCにおけるHIV subtype E gag 特異的CTL活性を調べた(Fig5)。

5. DNA候補ワクチン松尾らにより、SIV gag-pol DNA, HIV 89.6 env DNA, IL-2 DNA を作製した。これらをカニクイザル9頭と接種した(Fig6)。接種後PBMCを分離し、in vitroにおいて抗原の二次刺激を2回行ない、PBMCにおけるSIVgag-pol 及びHIV env 特異的CTL活性を調べた。

(倫理面への配慮)

倫理面の問題なし。

理由:本実験に用いたサルは国立感染症研の倫理委員会において実験が承認されており、本分担研究者はこれらサル血液を分与されて実験に用いたことより問題なしと判断した。

C. 研究結果

1. rW MRC gag 接種後、2、5、8、14、16週の

PBMC 及び剖検時(16週目)の脾臓のリンパ球におけるgag 特異的CTL活性は、いずれのサルにも強いCTL活性は見られなかった(Table 1)。

2. 村山組み合わせ群(rBCG/rW DIs SIV mac gag 免疫群)では2頭にCTL活性が見られた(Table 2)。これらの1頭でSIV mac gag peptideに反応が見られた(Table 5)。また、組み合わせ群のうち3頭(MF3605, 3606, 3978)については、3度目の追加免疫を行なったところ、MF3606にCTL活性が見られた(Table 2)。筑波A群については強いCTL活性は見られなかった。筑波B群では2頭にCTL活性が見られたが、gag peptides に対しては強い反応を示すものはなかった(Table 3, Table 4)。

3. SIV gag-pol 組み合わせ群(rW gag-pol/rBCG gag-pol 免疫群)では、MF040サルにおいてgag-pol に対するCTL活性が誘導されている可能性が見られるが、それ以外に強いCTL活性は見られなかった(Table 3.4)。

4. HIV-E-gag 群(rW E-gag/rBCG E-gag 免疫群)では、特に強いHIV-1 subtype E のgag 特異的CTLは誘導されていなかった(Table 6)。

5. DNA ワクチン接種群(SIV gag-pol DNA, HIV 89.6 env DNA, IL-2 DNA 免疫群)では、コントロールDNAを免疫接種したサルに比べて、特に強いCTL活性は見られなかった(Table 7a 7b)。また、DNAを3回接種後にRv Dis SIVmac gag-polを2回接種した群も、コントロール群に比べて、強いCTL活性は見られなかった(Table 7a 7b)。

D. 考察

各免疫接種群において特異的CTL誘導能の検討を行なった結果、免疫接種ザルのすべてに強いCTL活性を誘導する免疫方法は見られなかった。しかし、一部のサルには抗原特異的CTL活性がみられたことより、MHCクラスIの違いにより抗原特異的CTLが強く誘導される場合のあることが考えられた。一方、別の異なる免疫方法、特にDNAとワクシニアの組み合わせ免疫は強い抗体産生を誘導するという他の研究グループの報告もあることから、DNA ワクチン接種群については、rW接種後のCTL活性の誘導が期待される。

いずれにせよ、さらに強い CTL 活性を誘導できる組み換えワクチン及び免疫方法の検討が必要と考えられた。

E. 結論

・エイズの予防及び治療効果を示すワクチン開発において、細胞性免疫が重要と考えられている。これらの細胞性免疫においては、抗原特異性の細胞障害性リンパ球 (CTL) が誘導されることが重要であり、また、腫瘍細胞及びウイルス感染細胞を障害する Natural Killer (NK) 細胞も大きな役割をすると考えられている。候補ワクチンの細胞性免疫誘導能を調べるため、これまでは主として functional assay による CTL 活性及び NK 活性を測定した。

・今後は、ワクチン接種したサルにおいて抗原が認識されていることをまず確認する為 (ワクチンの免疫状況の確認)、CTL 活性の測定のみならず、INF- γ の測定 (産生細胞の確認のための、ICS 及び ELISpot assay) 及び抗原特異性の proliferation assay を平行して行ない、組み換えワクチン construct のサルにおける CTL 誘導能と共にサルのリンパ球にワクチン抗原が認識されている事を確認する事が必要と思われた。

・これらの assay により、ワクチン接種に対する体液性の反応に合わせて抗原特異的な細胞性の反応を検出し、CTL 活性に加えて、抗原特異的な認識を確認することにより、ワクチン開発における組み換えワクチンの construct 作製や免疫方法の参考となると考えられる。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 原著

・ O'Connor DH, Allen TM, Vogel TU, Jing P, DeSouza IP., Dodds E., Dunphy EJ., Melsaether C., Mothe B., Yamamoto H., Horton H., Wilson n., Hughes AL., and Watkins DI. Acute Phase cytotoxic T lymphocyte escape is a hallmark of simian immunodeficiency virus infection. *Nature Medicine* 8(5), 493-499, 2002

2) 総説

・山本博, 上坂浩美: サルとエイズワクチン—エイズワクチン開発における最近の進展: 宮城県獣医師会会報 第54巻3号, 77-86, 平成13年7月

3) その他

・ Yamamoto, H, Katsuyama, K, Ohsu, T, Matsuo, K, Ami, Y, Shinohara, K, Takahashi, E, Suzaki, Y, Sasaki, Y, and Honda, M: Induction of gag specific CTL activity in Cynomolgus Monkeys vaccinated with Rbcg (Tokyo strain)-and Rvv (Dis strain) SIVmac gag. *Exp. Anim.* 50(3), 232 (S36), 2001

2. 学会発表

・山本博, 勝山一輝, 大洲竹晃, 松尾和浩, 網 康至, 篠原克明, 高橋栄治, 須崎百合子, 佐々木裕子, 本多三男: rBCG SIVmac gag および rW Dis SIVmac gag 接種マウスにおける gag 特異的 CTL の誘導 第48回日本実験動物学会総会 2001, 5, 横浜

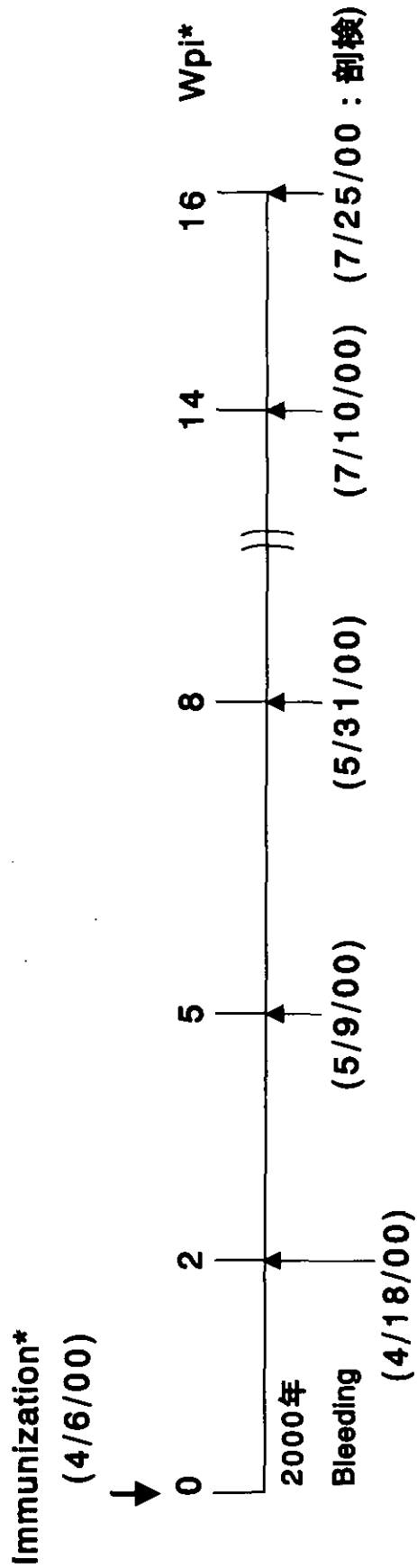
・ O'Connor DH, Allen TM, Vogel TU, Jing P, DeSouza IP., Dodds E., Yamamoto H., Dunphy EJ, Melsaether C., Mothe B., Hughes AL, and Watkins DI. Acute Cytotoxic T-Lymphocyte Escape is a Hallmark of Simian Immunodeficiency Virus Infection. XIV International AIDS conference, TuorA1179, p346, Barcelona Spain July 7-12, 2002

・山本博, 坂上浩美, 勝山一輝, 染谷健二, 松尾和浩, 本多三男: サルエイズ動物モデルを用いた組み換えエイズワクチンの基礎研究 第135回日本獣医学会学術集会 2003, 3, 東京

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 |

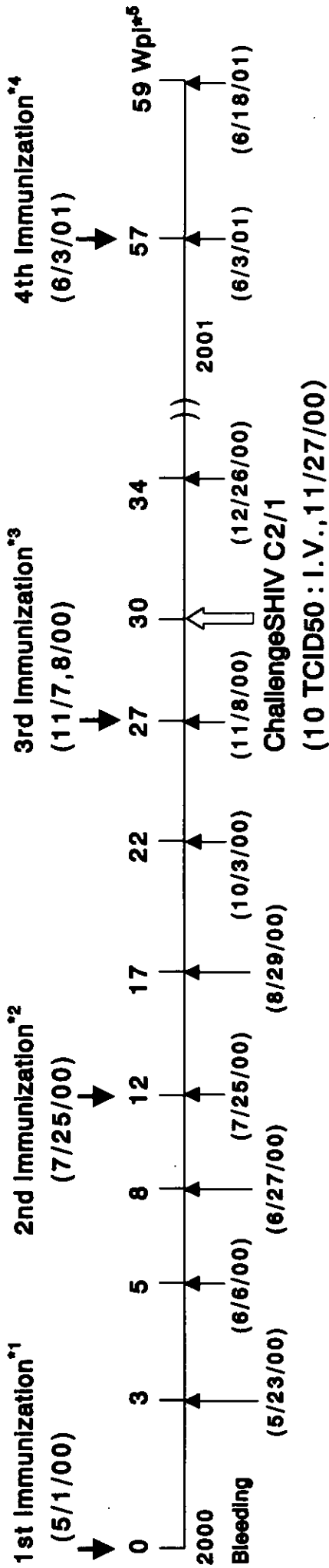
Fig1 : rVV-HIV-1 subtype B gag



Animal No.	Immunization
Mf4367	rVV-HIV-1 subtype B gag
Mf4368	rVV-HIV-1 subtype B gag

*** : Weeks post immunization or challenge.

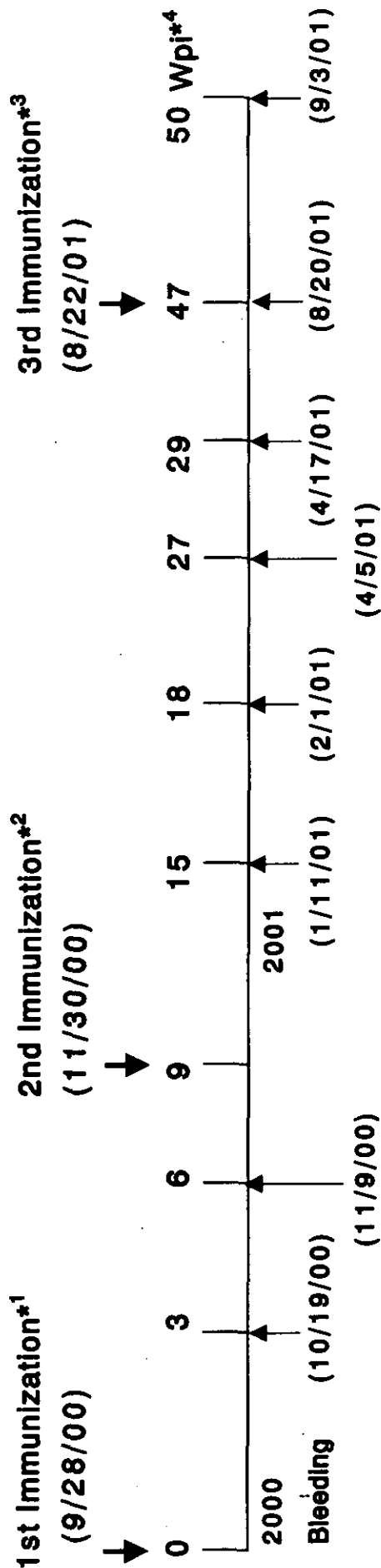
Fig2 rBCG & rDIs : Protocol



Animal No.	Immunization				
	2 years ago	*1 : 1st (5/1/00)	*2 : 2nd (7/25/00)	*3 : 3rd (11/7,8/00)	*4 : 4th (6/3/01)
Mf3605	BCG	rBCG-SIVmacgag Oral 80mg (X2)	rDis-SIVmac gag I.V. 10 ⁸ U	rDis-SIVmac gag	rDis-SIVmac gag I.V.
Mf3606	BCG	rBCG-SIVmacgag Oral 80mg (X2)	rDis-SIVmac gag I.V. 10 ⁸ U	rDis-SIVmac gag	rDis-SIVmac gag I.V.
Mf3617	BCG	rBCG-SIVmacgag I.V. 5mg	rDis-SIVmac gag I.V. 10 ⁸ U	rDis-SIVmac gag	12/26/00 に剖検
Mf3618	BCG	rBCG-SIVmacgag I.V. 5mg	rDis-SIVmac gag I.V. 10 ⁸ U	rDis-SIVmac gag	12/26/00 に剖検
Mf3975	BCG	rDis-lacZ I.V. 10 ⁸ U	rBCG-pSO246	rDis-lacZ	12/26/00 に剖検
Mf3976	BCG	rDis-SIVmac gag I.V. 10 ⁸ U	rBCG-SIVmacgag	8/29/00 以前に死亡	
Mf3977	BCG	rDis-SIVmac gag I.V. 10 ⁸ U	rBCG-SIVmacgag	rDis-SIVmac gag I.V. 10 ⁸ U	12/26/00 に剖検
Mf3978	BCG	rBCG-pSO246 Oral 80mg (X2)	rDis-lacZ I.V. 10 ⁸ U	rDis-lacZ	rDis-lacZ I.V.
Mf2623	BCG			rDis-SIVmacgag, pol	12/26/00 に剖検

*5 : Weeks post immunization or challenge.

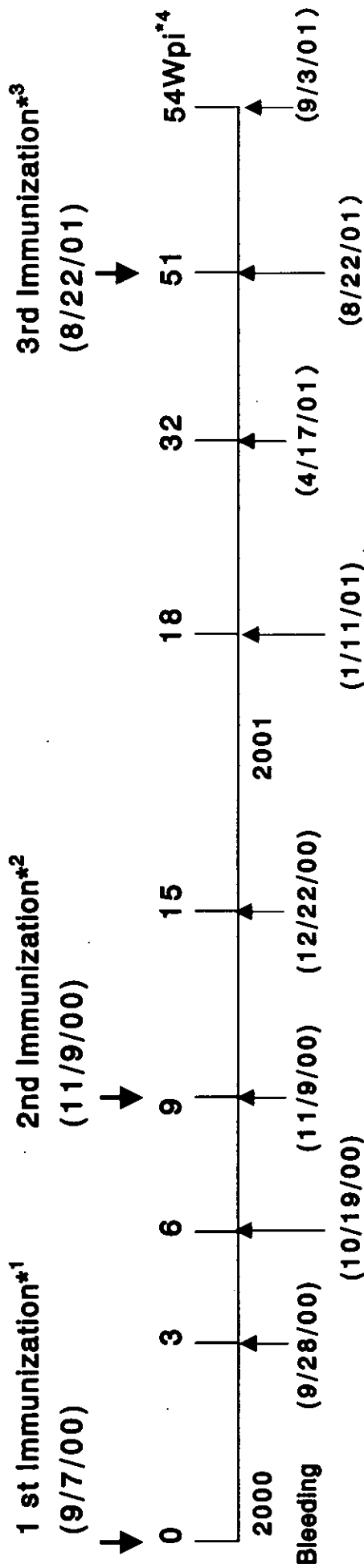
Fig3 SIVgag-pol(1) : Protocol



Animal No.	Immunization		
	*1 : 1st (9/28/00)	*2 : 2nd (11/30/00)	*3 : 3rd (8/22/01)
Mf008	rBCG/SIVmacgag (i.d./10mg)	rBCG/SIVmacgag-pol (i.d./10mg)	rDIs/SIVmacgag-pol (i.v. 10 ⁹ PFU)
Mf010	rBCG/SIVmacgag (i.d./10mg)	rBCG/SIVmacgag-pol (i.d./10mg)	rDIs/SIVmacgag-pol (i.v. 10 ⁹ PFU)
Mf029	rBCG/SIVmacgag (i.d./10mg)	rBCG/SIVmacgag-pol (i.d./10mg)	rDIs/SIVmacgag-pol (i.v. 10 ⁹ PFU)
Mf046	rBCG/SIVmacgag (i.d./10mg)	rBCG/SIVmacgag-pol (i.d./10mg)	rDIs/SIVmacgag-pol (i.v. 10 ⁹ PFU)
Mf085	rDIs/SIVmacgag (i.v. 10 ⁸ PFU)	rDIs/SIVmacgag-pol (i.v. 10 ⁹ PFU)	rBCG/SIVmacgag-pol (i.d./10mg)
Mf090	rBCG/pSO246 (i.d./10mg)	rBCG/pSO246 (i.d./10mg)	rDIs/LacZ (i.v. 10 ⁹ PFU)
Mf091	rBCG/pSO246 (i.d./10mg)	rBCG/pSO246 (i.d./10mg)	rDIs/LacZ (i.v. 10 ⁹ PFU)
Mf093	rBCG/SIVmacgag (i.d./10mg)	rBCG/SIVmacgag-pol (i.d./10mg)	rDIs/LacZ (i.v. 10 ⁹ PFU)

*4 : Weeks post immunization.

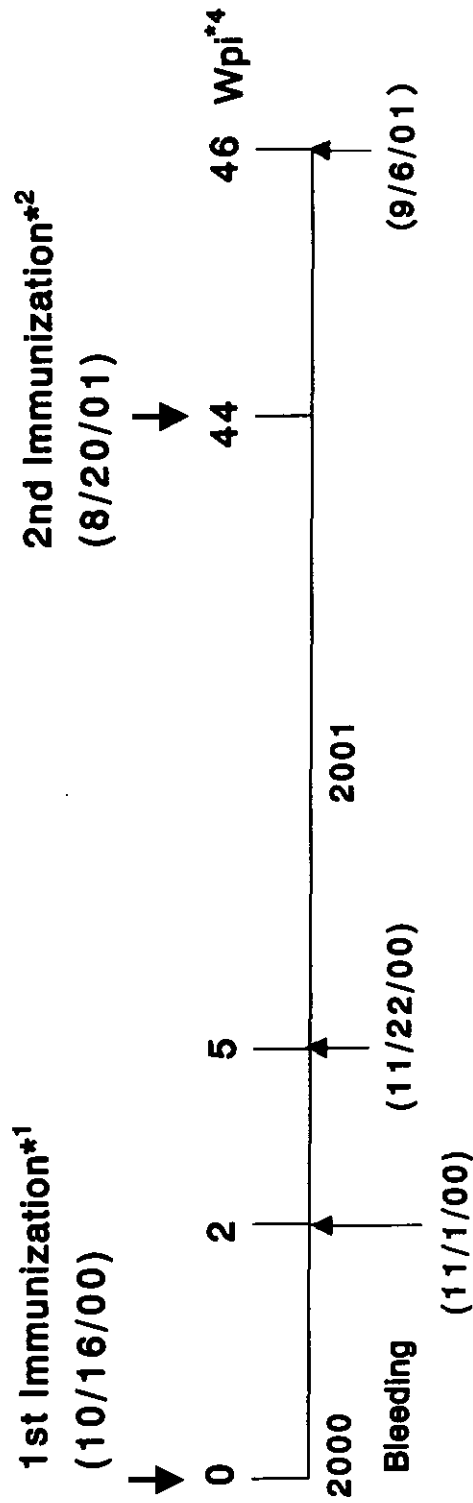
Fig4 SIVgag-pol(2) : Protocol



Animal No.	Immunization		
	*1 : 1st (9/7/00)	*2 : 2nd (11/9/00)	*3 : 3rd (8/22/01)
Mf001	rDis-SIVmac gag (i.v. 10 ⁸ PFU)	rDis/SIVmacgag-pol (i.v. 10 ⁹ PFU)	rBCG/pSO246 (i.d./10mg)
Mf006	rDis/LacZ (i.v. 10 ⁸ PFU)	rDis/LacZ (i.v. 10 ⁹ PFU)	rBCG/pSO246 (i.d./10mg)
Mf033	rDis/LacZ (i.v. 10 ⁸ PFU)	rDis/LacZ (i.v. 10 ⁹ PFU)	rBCG/SIVmacgag-pol (i.d./10mg)
Mf036	rDis-SIVmac gag (i.v. 10 ⁸ PFU)	rDis/SIVmacgag-pol (i.v. 10 ⁹ PFU)	rBCG/SIVmacgag-pol (i.d./10mg)
Mf040	rDis-SIVmac gag (i.v. 10 ⁸ PFU)	rDis/SIVmacgag-pol (i.v. 10 ⁹ PFU)	rBCG/SIVmacgag-pol (i.d./10mg)
Mf042	rDis-SIVmac gag (i.v. 10 ⁸ PFU)	rDis/SIVmacgag-pol (i.v. 10 ⁹ PFU)	rBCG/SIVmacgag-pol (i.d./10mg)

*4 : Weeks post immunization or challenge.

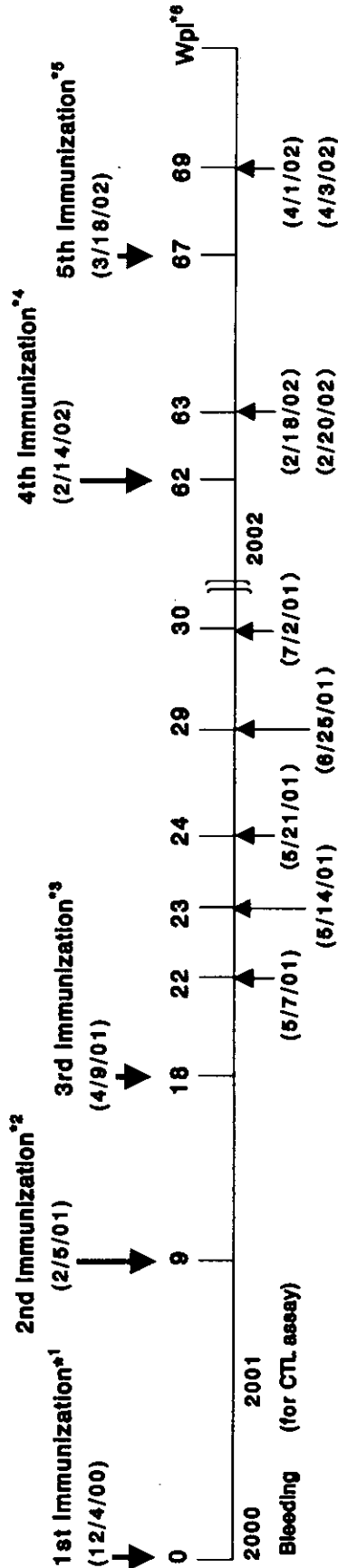
Fig5 HIV-E-gag : Protocol



Animal No.	Immunization	
	*1 : 1st(10/16/00)	*2 : 2nd(8/20/01)
Mf# 31-009	rBCG/HIV-E-gag (0.1mg,i.d.)	rDis/HIV-E-gag (10 ⁹ PFU,i.d.)
Mf# 32-059	rBCG/HIV-E-gag (80mg,oral)	rDis/HIV-E-gag (10 ⁹ PFU,i.d.)
Mf# 33-051	rDis/LacZ (10 ⁹ PFU,i.d.)	rDis/HIV-E-gag (10 ⁹ PFU,i.d.)
Mf# 35-106	rBCG/HIV-E-gag (0.1mg,i.d.)	rBCG/HIV-E-gag (0.1mg,i.d.)
Mf# 36-019	rDis/HIV-E-gag (10 ⁹ PFU,i.d.)	rBCG/HIV-E-gag (0.1mg,i.d.)
Mf# 37-075	rDis/HIV-E-gag (10 ⁹ PFU,i.d.)	rDis/LacZ (10 ⁹ PFU,i.d.)
Mf# 38-004	rBCG/pSo246 (80mg,oral)	rDis/LacZ (10 ⁹ PFU,i.d.)
Mf# 39-064	rBCG/pSo246 (0.1mg,i.d.)	rDis/LacZ (10 ⁹ PFU,i.d.)
Mf# 40-009	rBCG/HIV-E-gag (80mg,oral)	rDis/HIV-E-gag (10 ⁹ PFU,i.d.)

*4 : Weeks post immunization .

Fig6 DNA vaccine : Protocol



Animal No.	Immunization (Route:i.D.&I.M.)			Immunization (Route:i.D.)	
	*1:1st (12/4/00)	*2:2nd(2/5/01)	*3:3rd(4/9/01)	*4:4th(2/14/02)	*5:5th (3/18/02)
MfB- 899	Control DNA(6mg)	Same quantity of 1st time	Same quantity of 1st time	rVV-Dis-SIVgag pol(10 ⁷ PFU)	Same quantity of 4th time
MfB- 900	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA(各2.5mg)+IL-2 DNA(1mg)	"	"	rVV-Dis-SIVgag pol(10 ⁷ PFU)	"
MfB- 901	Control DNA(6mg)	"	"	rVV-Dis-lacZ(10 ⁷ PFU)	"
MfB- 902	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA(各2.5mg)+IL-2 DNA(1mg)	"	"	rVV-Dis-SIVgag pol(10 ⁷ PFU)	"
MfB- 903	Control DNA(6mg)	"	"	rVV-Dis-lacZ(10 ⁷ PFU)	"
MfB- 904	Control DNA(6mg)	"	"	rVV-Dis-SIVgag pol(10 ⁷ PFU)	"
MfB- 905	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA(各2.5mg)+IL-2 DNA(1mg)	"	"	rVV-Dis-SIVgag pol(10 ⁷ PFU)	"
MfB- 906	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA(各2.5mg)+IL-2 DNA(1mg)	"	"		
MfB- 907	Control DNA(6mg)	"	"	rVV-Dis-lacZ(10 ⁷ PFU)	"
MfB- 908	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA(各2.5mg)+IL-2 DNA(1mg)	"	"		
MfB- 909	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA(各2.5mg)+IL-2 DNA(1mg)	"	"		
MfB- 910	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA(各2.5mg)+IL-2 DNA(1mg)	"	"		
MfB- 911	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA(各2.5mg)+IL-2 DNA(1mg)	"	"	rVV-Dis-SIVgag pol(10 ⁷ PFU)	"
MfB- 912	Control DNA(6mg)	"	"	rVV-Dis-lacZ(10 ⁷ PFU)	"
MfB- 913	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA(各2.5mg)+IL-2 DNA(1mg)	"	"	rVV-Dis-SIVgag pol(10 ⁷ PFU)	"
MfB- 914	Control DNA(6mg)	"	"	rVV-Dis-lacZ(10 ⁷ PFU)	"
MfB- 915	Control DNA(6mg)	"	"		
MfB- 917	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA(各2.5mg)+IL-2 DNA(1mg)	"	"	rVV-Dis-SIVgag pol(10 ⁷ PFU)	"
MfB- 918	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA(各2.5mg)+IL-2 DNA(1mg)	"	"	rVV-Dis-lacZ(10 ⁷ PFU)	"
MfB- 919	Control DNA(6mg)	"	"	rVV-Dis-lacZ(10 ⁷ PFU)	"
MfB- 921	Control DNA(6mg)	"	"	rVV-Dis-SIVgag pol(10 ⁷ PFU)	"
MfB- 922	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA(各2.5mg)+IL-2 DNA(1mg)	"	"		
MfB- 924	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA(各2.5mg)+IL-2 DNA(1mg)	"	"	rVV-Dis-SIVgag pol(10 ⁷ PFU)	"
MfB- 925	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA(各2.5mg)+IL-2 DNA(1mg)	"	"	rVV-Dis-SIVgag pol(10 ⁷ PFU)	"

*6 : Weeks post immunization .

Fig7 rBCG/rVV-DIs SIVmacgag組み合わせ免疫群

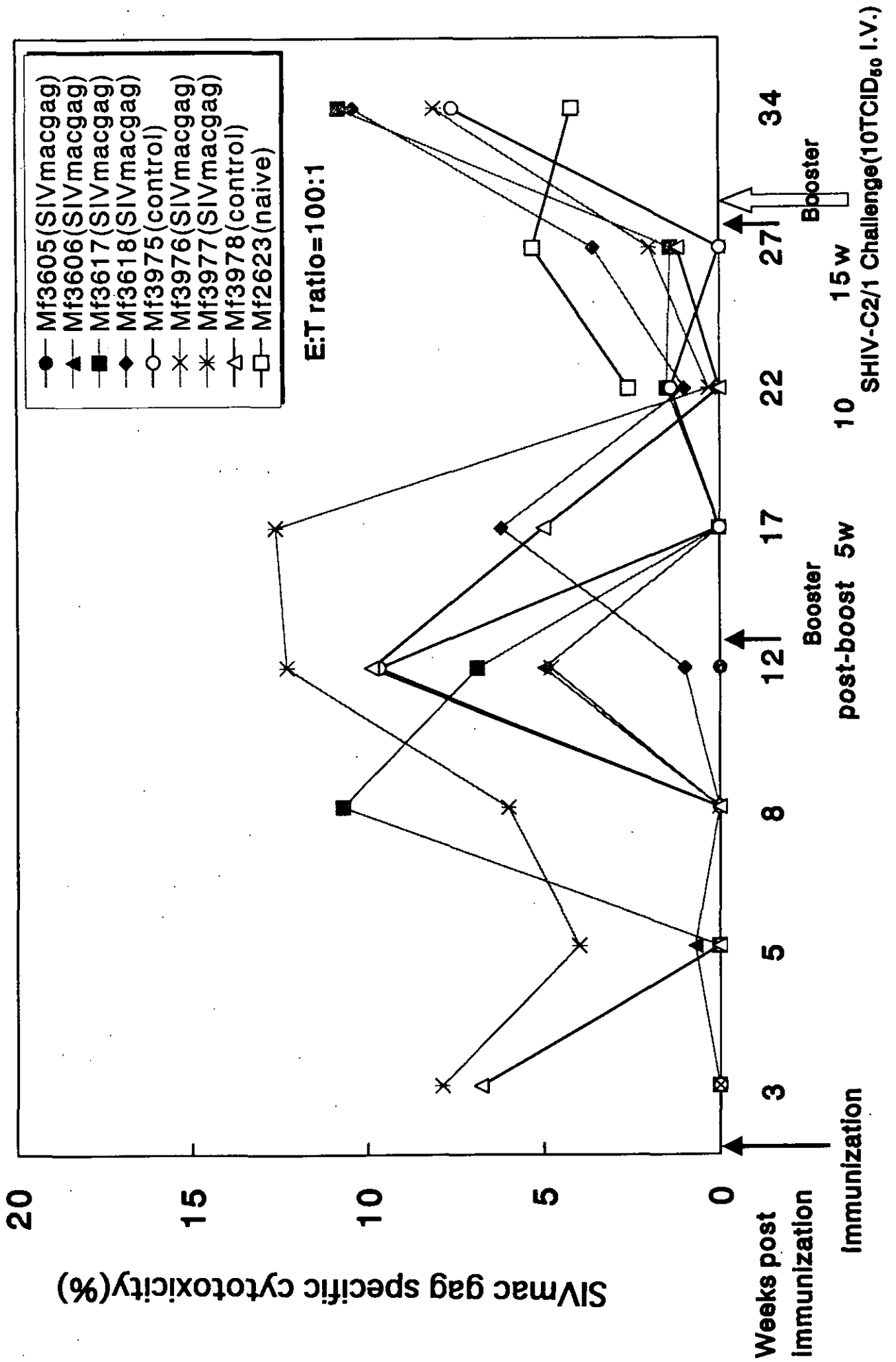


Fig8 rBCG/ rVV-DIs SIVmac gag免疫 Mf群

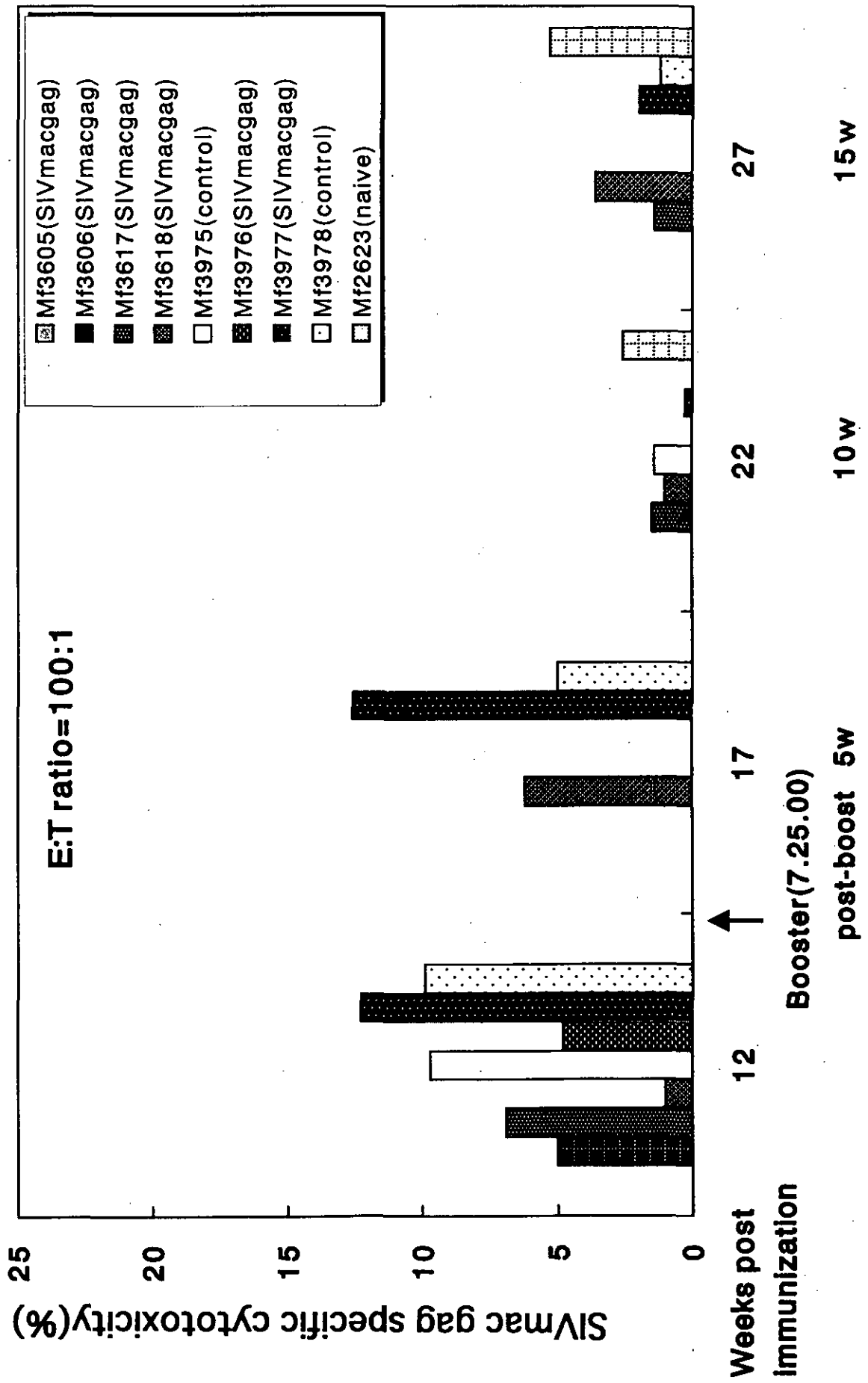


Fig9 Specific cytotoxicity of Antigen stimulated PBMC from rVV DIs/ rBCG SIVmac gag immunized cynomolgus Monkey (Mf3977, Bleeding 7/25/01(12wpi)).

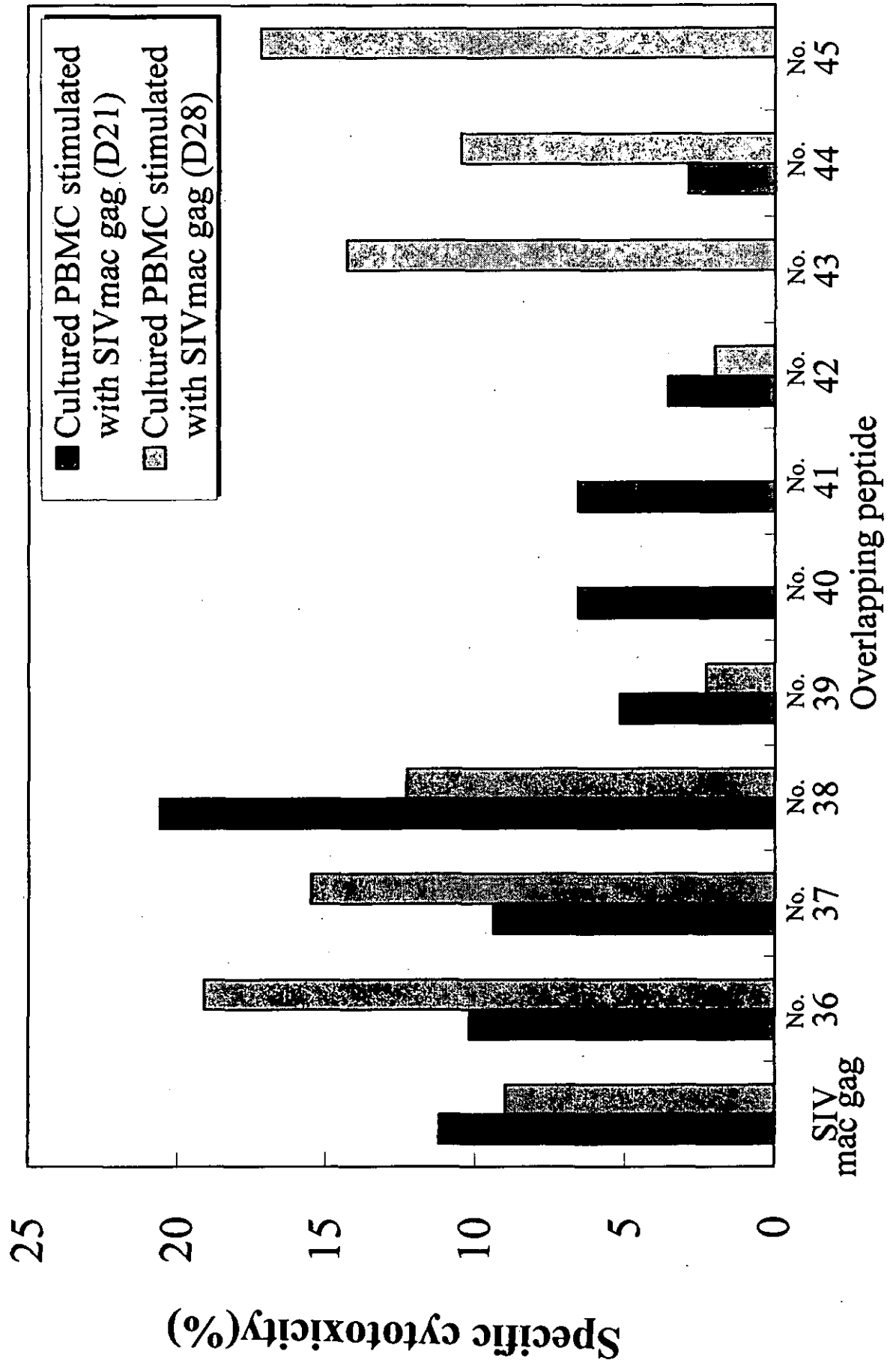


Table1 rVV-HIV-1 Subtype B gag免疫Mf群
HIV-1 gag specific cytotoxicity %(E:T ratio=100:1)

Monkey No.	Immunization weeks post immunization 採血日 Assay日	1st(4/6/00)										
		2	5	8	14	16						
		4.18.00	5.9.00	5.31.00	7.10.00	7.25.00						
		D15	D17	D8	D14	D8	D14	D14	D13*1	D13*2		
		(MRC gag) (mo gag) (MRC gag) (mo gag) (mo gag) (mo gag) (mo gag) (mo gag) (mo gag) (mo gag) (MRC gag)										
Mf4367	rVV-HIV-1 subtype B gag	0.0	0.0	0.9	2.4	6.6	4.0	0.0	0.0	2.0	0.0	0.0
Mf4368	rVV-HIV-1 subtype B gag	0.0	1.7	0.0	0.0	8.9	0.0	10.8	2.9	11.6	7.4	7.4

*1: PBMC *2: Spleen

Table2 rBCG/rDIs組み合わせ群 rBCG/rDIs SIVmacgag免疫群
SIVmac gag specific cytotoxicity %(E:T ratio=100:1)

Monkey No.	Immunization weeks post immunization	1st(5/1/00)					2nd(7/25/01)					3rd(11/7,8/00)					4th(6/3/01)			
		3	5	8	12	17	22	27	34	59	3	5	8	12	17	22	27	34	57	59
Mf3605	rBCG/pSO-SIV gag(1st) & rVV-DIs-SIV gag(2nd,3rd,4th)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.0	8.2
Mf3606	rBCG/pSO-SIV gag(1st) & rVV-DIs-SIV gag(2nd,3rd,4th)	0.0	0.7	0.0	5.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	13.8	0.6
Mf3617	rBCG/pSO-SIV gag(1st) & rVV-DIs-SIV gag(2nd,3rd)	0.0	0.0	10.7	6.9	0.0	0.0	1.5	10.8	0.0	1.4	10.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Mf3618	rBCG/pSO-SIV gag(1st) & rVV-DIs-SIV gag(2nd,3rd)	0.0	0.0	0.0	0.0	6.2	0.0	0.0	10.4	0.0	3.6	10.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Mf3976	rVV-DIs-SIVmac gag(1st) & rBCG/pSO-SIV gag(2nd)	0.0	0.0	0.0	4.8	死亡	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Mf3977	rVV-DIs-SIVmac gag(1st,3rd) & rBCG/pSO-SIV gag(2nd)	7.9	4.0	6.0	12.3	12.6	0.3	2.0	8.1	0.0	2.0	8.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Mf3975	rVV-DIs-lacZ(1st,3rd) & rBCG/pSO246(2nd)	0.0	0.0	0.0	9.7	0.0	1.4	0.0	7.6	0.0	0.0	7.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Mf3978	rBCG/pSO246(1st) & rVV-DIs-LacZ(2nd,3rd,4th)	6.8	0.0	0.0	9.9	5.0	0.0	0.0	4.2	0.0	1.2	7.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4
Mf2623	na_ve & rVV-DIs-SIVmac gag-pol(3rd)						2.6	5.3	4.2											

*:11/27/00にchallenge後、4週目で剖検

Table3 筑波A群 rBCG SIVmac gag(gag-pol)免疫(S.C.)群
SIVmacgag(gag-pol) specific cytotoxicity %(E:T ratio=100:1)

Monkey No.	Immunization	1st(9/28/00)			2nd(11/30/00)			3rd(8/22/01)		
		weeks post immunization	3	6	18	18	47	50		
	採血日	10.19.00	11.9.00	2.1.01	8.20.01	9.3.01				
Mf008	rBCG/SIVgag(1st) & rVV-DIs-SIV gag-pol(3rd)	6.1	3.0	0.0	0.0	0.0				
	rBCG/SIVgag-pol(2nd)									
Mf010	rBCG/SIVgag(1st) & rVV-DIs-SIV gag-pol(3rd)	0.0	0.9	5.3	4.8	0.0				
	rBCG/SIVgag-pol(2nd)									
Mf029	rBCG/SIVgag(1st)	0.0	5.0	0.7	0.0					
	rBCG/SIVgag-pol(2nd)									
Mf046	rBCG/SIVgag(1st) & rVV-DIs-SIV gag-pol(3rd)	0.0	5.8	0.0	0.0	1.7				
	rBCG/SIVgag-pol(2nd)									
Mf085	rVV-DIs-SIV gag(1st)	4.3	0.0	0.4		1.5 ^{*1}				
	rVV-DIs-SIV gag-pol(2nd) & rBCG/SIVgag-pol(3rd)									
Mf093	rBCG/SIVgag(1st)	0.0	2.1	0.5	0.0					
	rBCG/SIVgag-pol(2nd)									
Mf090	rBCG/pSO246(1st,2nd) & rVV-DIs-lacZ(3rd)	0.0	6.8	0.0	0.0	0.0				
Mf091	rBCG/pSO246(1st,2nd) & rVV-DIs-lacZ(3rd)	3.1	0.0	7.0	0.0	7.7				

*1;E:T ratio=25:1