

厚生労働科学研究費補助金  
創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業

課題番号 H13-創薬009

エイズ治療薬開発のための  
サル評価スクリーニング系の開発とその応用

平成15年度 総括・分担研究報告書

平成16年 3月

主任研究者

永井美之

(富山県衛生研究所・所長)

## 研究組織

研究者名	分担	所属	役職
永井美之	主任	富山県衛生研究所	所長
森一泰	分担	国立感染症研究所・霊長類センター	主任研究官
俣野哲朗	分担	東京大学大学院医学系研究科	助教授
宮澤正顕	分担	近畿大学医学部 免疫学教室	教授
木村彰方	分担	東京医科歯科大学難治疾患研究所	教授
保富康宏	分担	三重大学医学部生体防御医学講座	助教授
本多三男	分担	国立感染症研究所・エイズ研究センター	グループ長

## 目次

### I. 総括研究報告書

1. 総括研究報告書 .....1  
主任研究者：永井 美之 (富山県衛生研究所・所長)

### II. 分担研究報告書

1. サルエイズモデルの問題点の検討とワクチン開発への応用 .....17  
分担研究者：永井 美之 (富山県衛生研究所・所長)
2. 糖鎖変異 SIV 感染により誘導されるエイズワクチンに対する感染防御免疫に関する研究 .....23  
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)
3. 抗原発現ベクター投与により誘導されるウイルス特異的細胞性免疫の解析 .....33  
分担研究者：俣野哲朗 (東京大学大学院・医学系研究科生物学講座)
4. CD4 陽性 T細胞ワクチンを用いた SIV 感染予防と治療実験のためのサルの MHC class II 遺伝子の同定 .....39  
分担研究者：宮澤正顕 (近畿大学医学部・免疫学教室)
5. サルの MHC class I 抗原の解析と応用 .....47  
分担研究者：木村彰方 (東京医科歯科大学・難治疾患研究所)
6. サルエイズウイルス認識エピトープと MHC の同定・解析 .....61  
分担研究者：保富康宏 (三重大学医学部・生体防御医学)
7. リコンビナントベクターを用いた SIV 抗原の特異的免疫誘導法に関する研究 .....73  
分担研究者：本多三男 (国立感染症研究所・エイズ研究センター)

### III. 業績一覧 .....83

# I. 総括研究報告書

エイズ治療薬開発のためのサル評価スクリーニング系の開発とその応用

主任研究者 永井 美之 富山県衛生研究所

研究要旨：HIV の予防治療を目的とした候補物質の評価にはサル評価系の確立が望まれており、そのためにサルの遺伝的バックグラウンドを揃えた均一なサルの確保とその使用が要求されるようになってきた。さらに HIV/AIDS の病因の主体が生体の免疫機能破壊にあることからその HIV/AIDS 候補物質の評価には免疫能の詳細な解析が望まれており、それらの解析方法が急速に進展しつつある。このような科学的 HIV/AIDS 研究の進歩に伴い、サル評価系の開発が極めて緊急な課題の一つになっている。本研究では以下のように、遺伝的バックグラウンドを明らかにしたサルにおける評価系の開発を行い、そのサルを用いたワクチンの開発研究に資する。プロジェクトの最終年度にあたり、HIV 感染のコントロールに直結する免疫学的パラメーターの特性を明らかにするために、赤毛サル主要組織適合抗原（MHC）との関連性を以下のように追及した。

- 1) 木村、宮澤らはサル MHC の解析の研究を行った。アカゲザルコロニーとして静岡実験動物センター（奄美大島）の、主に中国産サルコロニーを対象にし、インド産アカゲザルの MHC クラス I 及びクラス II 抗原解析法を参考にして、中国産サルの MHC クラス I 及びクラス II 抗原解析法を確立した。さらに、サルコロニー約 10 群の MHC の class I 抗原、class II 抗原を明らかにした。
- 2) さらに、ウイルス特異的免疫誘導とその防御免疫に関連した中国産アカゲサル MHC に関する解析において、遺伝的なバックグラウンドが雑多な奄美大島のアカゲザル集団を用いて防御免疫誘導能の違いを検討し、1) で得られた MHC との関連性を検討した。その結果感染防御との関連性を示唆する新しい細胞障害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocytes, CTLs) MHC class I 候補エピトープ (IL-10) 及びヘルパー T 細胞 (helper T lymphocytes, HTL s) MHC class II 候補エピトープを検出した。一方、上記のサル群の中に Mamu-A\*08 陽性ザルが高率に検出され、MHC class I - P9CD エピトープを同定した。ワクチン抗原としての P9CD エピトープペプチドは高いキラー活性を誘導したが、ヘルパーエピトープなしでは防御能を誘導できず、キラー活性の質の問題が提起された。
- 3) 俣野らの研究では R90-120 アカゲ子孫サルにおける MHC ハプロタイプの解析（木村・宮澤）及びワクチン接種により誘導される CTL エピトープの検索を行い、R90-120 の有する

1つのMHCハプロタイプ(90-120-Ia)由来のMHCクラスIに拘束されると考えられるSIV Gag CTL エピトープ(Gag207-216)を同定した。次に、ワクチン接種サル6頭を用いてSIVmac239 チャレンジ実験を行い、MHCハプロタイプ90-120-Iaを有する3頭においてSIV複製が制御されることを示し、さらにCTLエスケープの解析を加えることにより、Gag207-216特異的CTLのSIV複製制御への関与を明らかにした。

- 4) 森、保富らは糖鎖欠失SIVmac239変異株 $\Delta$ 5Gはアカゲザル感染において、感染ピークはSIVmac239と同等であるにもかかわらず、その後急速にウイルス増殖は検出限界以下に抑えられ、長期間その低レベルを維持すること、さらに、 $\Delta$ 5G感染によって誘導された感染防御免疫を解析し、病原性を $\Delta$ Nef感染と比較すると $\Delta$ 5Gは低病原性であることが示された。これらのことから糖鎖欠失ウイルスは弱毒生ワクチンの基礎として利用できる可能性が示唆された。また、蛋白合成阻害剤を用いた抗原提示の解析により、 $\Delta$ 5GのEnv蛋白は野生株と比較して、大量に提示されることが示唆された。

## A. 研究目的

中国産アカゲサルを用いてMHCクラスIクラスII抗原の解析方を開発する。

新規に開発されたSIV生ワクチン、DNAワクチン、センダイウイルスワクチン、組換えBCGワクチンとの免疫によって得られる防御免疫エピトープをサルMHCレベルで解析することにより次世代のワクチン開発系及び評価系を日本で確立する。

## B. 研究方法

### 1) アカゲサル MHC 解析法の確立に関する研究 (木村、宮澤)

(1) アカゲザル MHC クラス I 抗原遺伝子群の解析：これまでにワクチン接種実験に用いられたアカゲザル及びその血縁アカゲザル由来の B リンパ芽球様細胞あるいは末梢血顆粒球より、total RNA 及びゲノム DNA を抽出した。抽出した total RNA から

ランダムプライマー(6 mer)を用いて cDNA を作製し、これをテンプレートとして、アカゲザル MHC クラス I 遺伝子である Mamu-A 及び Mamu-B を、それぞれに特異的なプライマーを用いて RT-PCR 法によって増幅した。ついで、クローン化した Mamu 遺伝子をレファレンスとした RSCA 法を用いて、アカゲザル個体の MHC クラス I 遺伝子ハプロタイプを解析した。さらに、特定の雄ザル (R90-120) の子孫ザルで SIVgag で免疫された個体について、MHC ハプロタイプと SIVgag207-216 抗原ペプチドに対する免疫応答性の関連を検討した。一方、ゲノム DNA を用いて、アカゲザル MIC 遺伝子を増幅し、ヒト MICA 遺伝子をリファレンスとした RSCA 解析を行うことで、アカゲザル MIC 遺伝子群の多型を検討した。さらに、ヒト HLA 領域にマップされているマイクロサテライト

マーカーを用いて、アカゲザルの個体識別及び MHC ハプロタイプ構造解析が可能か否かを検討した。

(2) ヒト KIR 領域ゲノム多様性の検討: MHC クラス I 遺伝子は T 細胞への抗原提示分子であると同時に、NK 細胞レセプターの一類である抑制性あるいは活性化 KIR ファミリーのリガンドともなる。例えば、HLA-C は抑制性 KIR のリガンドとなり、HLA-Bw4 は活性化 KIR のリガンドとなる。また、上記の MHC 遺伝子群は NK 細胞活性化レセプターである NKG2D のリガンドとなることが知られている。このことは MHC 領域遺伝子群が NK 細胞レセプター遺伝子群と機能的に密接な関連を有することを示し、さらには MHC による免疫制御機構においても NK 細胞が関与することを強く示唆する。そこで、ヒト KIR ファミリーのハプロタイプ構成を RSCA 法によって解析する手法の開発を試みた。具体的には、KIR ファミリー間で相関性の高い D2 ドメインを特異的に増幅するプライマーをデザインした。ついで、ランダムに選択した日本人集団及び CEPH ファミリーより得られたゲノム DNA から増幅した D2 ドメインファミリーとリファレンスとの RSCA パターンを検討した。

(3) 感染抵抗性の有無や免疫応答能が既にある程度解析されているアカゲザル個体と、それらの親個体、および今後実験に用いられる予定の個体群を解析対象とした。これら複数の個体から樹立された B リンパ芽

球株 (BLCL) より総 RNA を抽出後、オリゴ dT プライマーを用いて高忠実度の逆転写反応を行い、cDNA を得た。次いで各細胞株由来 cDNA をテンプレートとし、既知のアカゲザル MHC class II 対立遺伝子の塩基配列情報を参考にして設計した DQA, DQB, および DRB 対立遺伝子群に特異的なプライマーペアを用いて、各 class II cDNA 断片の増幅を行った。この際、DRB 遺伝子については、その cDNA 全長を増幅した。得られた PCR 産物はアガロースゲル電気泳動でそのサイズを確認するとともに、プライマー中に設置した制限酵素部位を用いて pUC19 プラスミドへのクローニングを行い、各クローンの塩基配列を決定した。

DRB については、同一染色体上に複数の遺伝子座が存在し、ハプロタイプを形成していることが知られている。そこで、各個体で発現する DRB 対立遺伝子の数を明らかにし、同時に親子関係の明確な個体間での DRB 対立遺伝子共有の状況を明らかにするため、exon 2 の増幅産物について変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法 (Denaturing gradient gel electrophoresis: DGGE) による解析を行った。この目的のために 3' 側に GC クランプを付加した DRB exon 2 特異的なプライマーペアを設計し、PCR 反応および電気泳動の条件を検討して、多数個体の検体を同時解析できる実験方法を確立した。さらに、DGGE ゲルから各バンドを切り出して TOPO-TA プラスミドベクターにクロ

ーニングし、バンド毎の塩基配列の決定を行った。

## 2) Δ5G プラスミド組み込み DNA ワクチンの開発とマウスによる評価 (保富)

野生型 SIVenv(WT)および SIV5Genv(Δ5G)をプラスミド(pJW)に組み込み DNA ワクチンを作製した。DNA ワクチンを BALB/C x C57BL/6 F1 (CB6F1)マウス筋肉内に electroporation 法を用いて筋肉内に1週間隔で3回免疫した。免疫マウスの脾細胞の CD8+細胞をを in vitro で SIVenv および SIV Δ5Genv 組み込みワクシニアウイルスで刺激した後 ELISPOT assay にてインターフェロンγ(IFN-γ)産製細胞を測定した。

## 3) HIV エイズサルモデルを用いたワクチン効果の判定 (森、俣野、本多)

### (1) SIV 感染ザル

Δ5G 感染ザル 5 頭、Δ nef 感染ザル 3 頭、SIVmac239 感染ザル 5 頭から定期的に採血をし、血漿ならびに末梢血単核球(PBMC)を以下に示す中和抗体誘導、細胞性免疫誘導、ELISA 抗体測定の解析に用いた。抗 SIV ELISA 抗体価の測定は SIV lysate 固相化プレートを用いて定法により ELISA を行った。ペプチド ELISA による抗 Env 抗体エпитープの解析は、Env 全領域をカバーする 72 本のオーバーラッピングペプチドを個々に 96 ウェル Immobilizer-ELISA プレートに固相化して行った。

(2) ウイルス特異的細胞性免疫の解析は IFN-γ ELISPOT アッセイにより行った。SIV 各タンパクの発現は、Gag/Pol

と Nef は組み換えワクシニアウイルス、Env gp120 は組み換えセンダイウイルスを用い、Tat/Rev/Vif/Vpr/Vpx はオーバーラッピングペプチドの混合ペプチドを抗原とした。autologous BLCL 細胞にこれらの組み換えウイルスまたはペプチドを感染またはパルスし、ソラレン-紫外線処理して不活化することにより抗原提示細胞とした。

解析対象としては、交配用雄親アカゲサル R90-120 由来の雄アカゲサル 11 頭 (R90-120 の子 5 頭、R90-120 の子 R94-027 の子 6 頭)を用いた。MHC クラス I(MHC-I)の解析は分担研究者の木村に、MHC-II の解析は分担研究者の宮澤に依頼した。R90-120 由来のアカゲサル 9 頭に、DNA/SeV-Gag ワクチン接種を行い、誘導される SIV Gag CTL エピトープを検索した。DNA ワクチンプラットフォームとしては、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーターにより SIVmac239 の Env・Nef 以外の抗原を発現する DNA を筋注し、ブーストとしては、DNA ワクチン接種後 6 週目に SeV-Gag を経鼻接種した。抗原特異的 T リンパ球の測定は、抗原刺激後誘導されるインターフェロンγ(IFN-γ)の細胞内染色による検出により行った。SIVmac239 Gag エピトープ検索においては、Gag (510 アミノ酸) overlapping 15-mer peptide panel によるスクリーニングを行い、さらに短いペプチドを用



いて、IFN- $\gamma$ 誘導を引き起こすペプチドエピトープを同定した。

上記ワクチン接種アカゲサル 9 頭のうちの 6 頭及び非ワクチン接種アカゲサル 2 頭に対して、SIV チャレンジ実験を行った。チャレンジとしては、SeV-Gag プースト後 13 週目に 1000 TCID<sub>50</sub> の SIVmac239 を静注した。

さらに、組換え BCG においては、Gag 抗原を増幅させるために、BCG のコドンの至適化による影響を検討した。アッセイ系の構築のしやすさから、まず p24 抗原遺伝子を標的にした。次に SIV の whole Gag 遺伝子を標的にして至適化を検討した。

### C. 研究成果

HIV を始めとした種々の難治性感染症を有効に迅速にコントロールするには MHC class I, class II あるいはマイナーな組織適合抗原の明らかになったサルを用いて、その病原体の免疫成立の解析さらには防御免疫に直結した免疫学的な解析データを得ることが重要である。本年度の研究で奄美大島のアカゲザルコロニーを用いて以下の成果が得られた。

#### 1) アカゲサル MHC 解析法の確立と防御免疫誘導能との関連についての研究 (木村、俣野、宮澤)

(1) Mamu-A 及び Mamu-B 遺伝子 cDNA をアカゲザル個体より増幅し、第 2 及び第 3 エクソン多型の RSCA パターンを解析し、個体毎に異なる遺伝子数を有することが判明した。1 ハプロタイプあたり、Mamu-A

遺伝子は 1~3 個、Mamu-B 遺伝子は 1~5 個発現すると推定される。また、ある個体(R90-120)に着目した RSCA パターン解析を行った。R90-120 は、その子孫の RSCA パターンを比較することで、a ハプロタイプ(Mamu-A 遺伝子が 3 個、Mamu-B 遺伝子が 4 個)と b ハプロタイプ(Mamu-A 遺伝子が 2 個、Mamu-B 遺伝子が 5 個)を有していると推定された。

(2) R90-120 の子孫で SIVgeg207-216 ペプチドへの免疫応答が既知の個体の RSCA パターンを解析すると、免疫応答を示した個体はいずれも a ハプロタイプを有するのに対し、免疫応答を示さなかった個体は b ハプロタイプを有していた。そこで、R90-120 およびその子孫個体の Mamu-A および Mamu-B 遺伝子の full-length cDNA をクローニングし、得られたクローンについて RSCA パターンを検討した。ついで、R90-120 が本来有している Mamu-A あるいは Mamu-B の RSCA パターンと一致したクローンの配列を決定した。その結果、a ハプロタイプでは 3 種の Mamu-A と 3 種の Mamu-B、b ハプロタイプでは 2 種の Mamu-A と 4 種の Mamu-B の配列が判明した。a, b ハプロタイプとも各 1 種の Mamu-B アリルの配列が決定できなかったが、それらは RSCA パターンから発現量が低いと予想されるものであった。配列が決定できた Mamu アリルについて、抗原ペプチド結合に関わる B ポケット、F ポケット構造をヒト HLA 分子の構造を参考に推定した。

R90-120 の子孫で SIVgag ワクチン接種後に SIVmac239 の感染実験で感染防御が成立した個体では、(1) 残存する SIV ウイルスには SIVgag の 216 番目に Leu→Ser 変異が生じていること、(2) SIVgag207-216 (INEEAADWD<sup>Q</sup>) 抗原ペプチドに対する CTL 反応を示すこと、(3) 1 アミノ酸変異 SIVgag207-216 (INEEAADWD<sup>S</sup>) に対する CTL 反応が生じないとされた。これらのことから、SIVgag207-216 の 216 位が抗原ペプチドの 9 番位 (P9) に対応すると考えられる。一般に MHC 分子への結合では 2 番位 (P2) のアミノ酸残基が重要であるが、SIVgag207-216 について言えば、P2 は酸性アミノ酸残基である Glu (IN<sup>Q</sup>EEAADWDL) となっている。一方、P2 に対応する MHC 側は B ポケットであるが、配列が決定された Mamu アリルで a ハプロタイプに属し、かつ B ポケットの 45 位に塩基性アミノ酸 Lys(K) が存在するのは Mamu-A (120-a-1) のみであるため、このアリルが SIVgag207-216 への免疫応答性を規定するものと推定された。

さらに、感染防御が成立した別の 1 頭では、前記とは異なる SIVmac 変異体 (377 位の Ile→Thr) が出現し、SIVgag367-381 抗原ペプチドにへの CTL 反応を認めたが、この個体では R90-120 に由来しない f ハプロタイプを有していた。このことは、感染防御の成立、出現する SIV ウイルス変異体、ペプチドエピトープへの CTL 反応の三者がいずれも MHC ハプロタイプと直接

的に関連することを示す。

- (3) R90-120 由来のアカゲサル、CTL エピトープ Gag207-216 は、R90-120-1a ハプロタイプ由来の MHC-I によって拘束されていると考えられた。ワクチン接種サルの中の 6 頭 (ハプロタイプ a - 3 頭、ハプロタイプ b - 1 頭、ハプロタイプ c - 2 頭)、及び対照群としてワクチン非接種サル 2 頭 (ハプロタイプ a - 1 頭、ハプロタイプ c - 1 頭) に対して行った。対照群 2 頭の血漿中 SIV RNA コピー数は、チャレンジ後 1.5 週目にピークとなり、その後の set-point 期には  $10^4$  代- $10^6$  代の値を維持して、典型的な SIVmac239 感染パターンを示した。ワクチン接種サルのうち、ハプロタイプ a を有し、Gag207-216 エピトープ特異的 CTL 反応を呈した 3 頭においては、感染初期の setpoint 期において SIV 複製が制御された。一方、ワクチン接種サルのうち、ハプロタイプ a を有さない 3 頭 (ハプロタイプ b - 1 頭、ハプロタイプ c - 2 頭) では、ハプロタイプを有する 1 頭 R01-008 のみ SIV 複製制御を示したものの、残りの 2 頭は SIV 複製を制御できず、対照群と同様のウイルス量を示した。チャレンジ後 5 週目の血漿中 SIV の gag 領域の塩基配列解析で、ハプロタイプ a を有する 3 頭に認められた変異は、共通のアミノ酸変異 (L216→S) を有し、Gag207-216 特異的 CTL に対するエスケープ変異であることが明らかとなった。
- (4) ミャンマー系の親個体 6 頭とその子孫 49 頭、および非ミャンマー (ラオス) 系

親個体 6 頭とその子孫 14 頭で発現する DRB および DQA 対立遺伝子型を、ほぼ網羅的に同定した。R209 と R222 には共通のバンドが 2 本見えるが、これらは祖父である R90-120 に由来するハプロタイプ DRB1\*1007-DRBZ26137 に対応するものである。一方、R211, R68, R69 には別の共通バンドが見られるが、これらは祖父である R90-10 に由来するハプロタイプ DRB1\*0316-R95014DR03 に対応する。

## 2) $\Delta$ 5G プラスミド組み込み DNA ワクチンの開発とマウスによる評価 (保富)

HIV 特異的免疫反応：免疫マウスに SIV env WT および  $\Delta$ 5G 組み込みワクシニアウイルスを接種したところ  $\Delta$ 5G 免疫マウスがいずれのウイルスに対しても *in vivo* で WT 免疫に比べ高い抗ウイルス効果を誘導した。免疫マウスの脾細胞からの CD8<sup>+</sup>細胞をを組み換えワクシニアウイルスで刺激し  $\gamma$ -IFN 産生細胞を ELISPOT assay で調べたところ  $\Delta$ 5G 免疫マウス細胞を  $\Delta$ 5G 組み込みワクシニアウイルスで刺激した時が最も高い値を示した。しかしながら SIV env に対する抗体産生は両免疫群に差は無く、中和活性も示さなかった。免疫マウスの脾細胞から特異的 CTL を誘導する際に、免疫、*in vitro* での刺激、標的細胞の標識にそれぞれ WT と  $\Delta$ 5G を用い全ての組み合わせにおいて CTL の誘導を試みたところ、免疫、刺激、標的のいずれにおいても  $\Delta$ 5G は WT に比べ高い CTL 活性を示した。

この活性誘導が抗原提示に差にもとづく

かどうかを調べた。CTL の標的細胞に組み替えワクシニアウイルスを種々の MOI にて感染したところ  $\Delta$ 5G では野生株 env に比べ約 3 倍の提示がされているのではないかと考えられた。これらのことから抗原提示が  $\Delta$ 5G と WT で異なるのではないかと考え、種々の抑制剤を用いて標的細胞を処理し、CTL 誘導に対する影響を見たところ両者に違いが認められた。

## 3) HIV エイズサルモデルを用いたワクチン効果の判定 (森、本多)

- (1)  $\Delta$ 5G 感染ザルにおける免疫誘導の解析：液性免疫と細胞性免疫の関係、これまで  $\Delta$ 5G 感染ザルにおける感染防御免疫誘導の性質を調べてきたが、上述の結果から中和抗体価が高いサルは細胞性免疫が検出されず、中和抗体が検出されなかったサルでは細胞性免疫の誘導が顕著であることが明らかになった。
- (2)  $\Delta$ 5G のウイルス学的特性の変化の解析：抗 Env 抗体エピトープ解析から見た糖鎖欠失による Env 構造変化の解析を検討し、 $\Delta$ 5G 感染と SIVmac239 感染では、7 つのドメインに抗体の反応が集中して見られた。そのうちの 5 つが gp41 に存在し、残りの 2 つは gp120 の V1V2 領域に存在した。gp41 に抗体ドメインが多く存在することは、糖鎖の付加と関連するのかもしれない (gp41 には 4 か所しか N-結合型糖鎖結合部位が存在しない)。 $\Delta$ 5G 感染では V1V2 領域に対する抗体反応性の上昇が見られ、新しいエピトープが出現した。この

部分は $\Delta 5G$ の5カ所の糖鎖欠失のうちの2カ所を含んだ。さらに $\Delta 5G$ 感染では糖鎖欠失導入とは直接関係しないgp41の3つの抗体反応ドメインに対する反応性が低下した。これらの結果から、gp120の糖鎖欠失はEnv全体の構造変化を引き起こすことが示唆された。また、中和抗体の誘導、認識には5つの糖鎖欠失の2, 3, 5番目が重要であることが明らかになった。さらに、 $\Delta 5G$ と $\Delta nef$ の病原性の比較を行い、 $\Delta 5G$ 感染実験の結果から、 $\Delta 5G$ は $\Delta nef$ より感染レベルが明らかに低いことが示された。

(3) rBCGにおけるマイコバクテリアコドン至適化による*in vivo*での免疫誘導能発現の増幅について検討し、野生型のGagを発現する組換えBCGはコドンを至適化したGag発現BCGに比べると約40倍のp24抗原の増幅が認められ、*in vitro*における外来性抗原の発現がコドンの至適化によって著明に増幅することが明らかとなった。1mg相当菌量すなわち $5 \times 10^7$  cfuBCG-Tokyo株あたりのp24抗原の産生量はコドンの至適化によって約40倍の増幅が認められ、産生量は約207ngとなった。さらに、コドン至適化BCG0.1mg免疫マウスの免疫持続能を解析すると実験に用いた少なくとも6ヶ月まではElispot活性が400台を維持することから免疫持続能に優れたワクチン抗原となることが示唆された。しかし、抗体産生能は低いことがわかった。

#### D. 考察

HIVワクチン開発のみならずHIV感染者の治療をみざす上で、遺伝的バックグラウンドの明らかになったサルを用いた研究で解析が可能となったことは意義深い。本研究では幸いこれまで困難であった中国産アカゲザルのMHCの解析法を確立し、その成果をもとに奄美大島産アカゲサルコロニーを解析し、SIV感染の防御免疫エピトープとの相関を明らかにすることができた。

アカゲザルでは個体ごとに遺伝子数が異なるため、免疫応答性の解析が複雑化することが推定されたが、俣野らによるSIVgag免疫実験とSIVmac感染実験の結果と木村らのMHCハプロタイプ解析結果を総合すると、SIVのエスケープ変異体の出現ならびに特定のSIVgagエピトープへの免疫応答性は特定のMHCハプロタイプと共分離することが示された(図2)。また、少なくともSIVgag207-216に対するR90-120由来の高応答性ハプロタイプ(Mamu-Aが3種、Mau-Bが4種)と低応答性ハプロタイプ(Mamu-Aが2種、Mau-Bが5種)には遺伝子数の大きな違いはないことから、このエピトープへの反応は遺伝子数ではなく、特定のハプロタイプ上の特定のMHCクラスI分子によって担われることが強く示唆される。RSCAパターンによる個体識別は、このエピトープに対する反応性を示すハプロタイプを有する個体を簡便に選択可能とする方法であると考えられる。SIVチャレンジ実験においては、ハプロタイプa由来のMHCによって規定されるエ

ピトープ特異的 T リンパ球の SIV 複製制御への関与が示唆され、Gag207-216 特異的 CTL がその候補となった。

チャレンジ後 5 週目のウイルス塩基配列解析では、ハプロタイプ a を有するワクチン接種サル3頭においては、Gag207-216 特異的 CTL に対するエスケープ変異ウイルスしか認められなかったことから、血漿中より SIV RNA が検出できなくなる直前の時点（5 週目）において、野生型 SIV はすでに排除されており、その排除（つまり SIV 複製制御）において Gag207-216 特異的 CTL が重要な役割を担っていることが明らかとなった。

「ワクチン誘導 CTL による HIV/SIV 複製制御は可能か」という重要課題に対しては、これまで、答が得られていなかった。本研究は、ワクチン誘導 CTL による SIV 複製制御の可能性を世界に先駆けて証明するものである。今回、親サル 1 頭の子孫サルに絞った解析を行ったが、その第一段階の研究だけでも、HIV 感染における宿主防御免疫機構の解明において重要な知見が得られたわけである。このことは、サルエイズモデルにおける MHC・エピトープ情報の重要性を強調している。

我が国で SIV 感染実験などに用いられているアカゲザル約 75 頭の MHC class II 遺伝子型とその発現多重性を網羅的に解析し、マンマー系のアカゲザルでは、一染色体あたり最大 3 つの DRB 対立遺伝子発現が観察された。また、少数のオス親が交配に用いられているため、同一のクラス II ハプロタイプを共

有する個体の数も多く、免疫学的解析に適した個体群を比較的容易に選択できると考えられた。これに対して、ラオス系の個体群では、一染色体あたり最大で 6 つの対立遺伝子が発現する複雑なハプロタイプ構成が見られ、未登録の対立遺伝子型も頻繁に見出された。

エイズウイルスの免疫回避機構は様々あり、その中のひとつが env に存在する糖鎖であると考えられている。我々を含め糖鎖除去ウイルスを接種したアカゲザルはいずれも発病や病原性を示さず、糖鎖は病態に大きく影響していると考えられている。初期の発表では糖鎖を除去することにより中和抗体を効率よく誘導できると考えられていたが、我々の実験では抗体産生については影響がないと報告した。実際本実験におけるマウスでの解析においても抗体の産生には糖鎖の影響は認められなかった。しかしながら CTL の誘導には大きく関わり、特に in vivo での免疫、in vitro での刺激、標的細胞に対する細胞障害性のいずれもが、糖鎖除去により上昇を示した。この現象を解明すべく種々のタンパク合成阻害剤を用いた系では  $\Delta 5G$  と WT 間での差異が認められ、抗原提示経路の違い、依存性の差を示したが、これがどのような質的差によるかはさらに検討する余地がある。このことは env のタンパク合成にも関与していると考えられ、糖鎖を取り除くことで、おそらく、細胞膜近傍で早期に env タンパクの成熟が行われることが抗原提示に影響していると示唆された。糖鎖欠失ウイルス  $\Delta 5G$  も感染ザルで初期には激しく増殖するが感染後 8 週までに感染制御

された。しかし、感染防御には必ずしも中和抗体が関与しているという結果は得られなかった。興味深い点は5頭の $\Delta 5G$ 感染ザルにおける中和抗体とウイルス特異的 T 細胞誘導は高い確率で逆相関することが見いだされた。すなわち $\Delta 5G$ の感染防御において、中和抗体とウイルス特異的 T 細胞どちらの免疫誘導が主体となるかは個体ごとにことなり、さらに個体の中で両免疫誘導のバランスがとれていることが明らかになった。

また、本研究の結果から $\Delta 5G$  Env は糖鎖欠失により構造および機能に大きな変化が生じていることが示唆された。V1/V2 領域の 2 カ所の糖鎖欠失は新たな抗体エпитープを誘導し、さらに中和抗体誘導にも関与していることが示され、糖鎖欠失がこの部位の立体構造変化を引き起こした可能性が示唆された。通常 V1/V2 領域はコレセプターである CCR5 との結合ドメインを覆い隠しているが、この部位に構造変化が起こったならば、CD4 非依存的に感染が成立することが可能となるかもしれない。 $\Delta 5G$  は 5 つの糖鎖欠失により SIVmac239 とは明らかに異なる性質に変化したことが示された。また、 $\Delta 5G$  感染と $\Delta nef$  感染の比較から、 $\Delta 5G$  の病原性はきわめて低いことが示された。特に、 $\Delta 5G$  感染ザルで長期間にわたり非常に低く抑えられている viral load と ELISPOT アッセイによって検出される慢性感染におけるウイルス特異的 T 細胞誘導が低レベルで持続していることが感染制御に重要なファクターであると考えられた。

本研究において、BCG の組換え技術を用い

て外来性抗原の発現が著明に上昇することを *in vitro* 及び *in vivo* のレベルで明らかにした。

BCG ワクチンの組換え技術は 1987 年 Bloom のグループによる HIV 遺伝子の発現によって可能となったが、多大な努力にもかかわらず、実用化に至っていない。その主な原因の一つは外来性抗原の発現が難しいことである。その発現の増強のための組換え BCG の技術の改良が行われ、プロモーターエンハンサーの改良、高発現型 BCG の開発、組換え遺伝子の選択が検討された。

今回コドンの至適化により、p24 抗原遺伝子の発現を顕著に増強させることができる組換え技術を開発することができた。本技術の開発により組換え BCG のワクチンの実用化への可能性ができた。これまでコドンの至適化によりウイルス性ワクチンの改良が成功裏に行われており、DNA ワクチンや一部のワクシニアワクチンなどでその効果が既に明らかにされている。DNA ワクチンの場合 *in vitro* における抗原発現は 10 倍から 50 倍の免疫増殖が認められていることから本研究における組換え BCG の発現の増殖は DNA ワクチンの場合と匹敵するレベルであると予想される。

既に本研究グループでは野生型の組換え BCG をプライミング抗原に用いワクシニアをブースターに用いたプライムブーストワクチンを作製した。この研究の成果を応用した第 2 世代ワクチンとしてのプライムブーストワクチンの開発が期待される。具体的には SIV Gag の抗原を至適化した組換え BCG-SIV Gag の開発が行われ、類似の外来性抗原の発現が

認められている。単独投与群及び、プライムブースト群の防御免疫効果を詳細に検討することにより、BCG をベースにした HIV ワクチン開発の実用化を検討する予定である。

## E. 結論

「エイズ治療薬開発のためのサル評価スクリーニング系の開発とその応用」の研究班で効果的なサルを用いたワクチンの開発を目的とした評価系の確立を行い、以下のような成果が得られた。

- 1) R90-120 の有する 1 つの MHC ハプロタイプ(90-120-Ia)由来の MHC-I に拘束されると考えられる SIV Gag CTL エピトープ (Gag207-216)を同定した。また、90-120-Ia を有する 3 頭において SIV 複製が制御されることが示され、Gag207-216 特異的 CTL の SIV 複製制御への関与が明らかとなった。
- 2)アカゲザルの MHC クラス I 領域遺伝子群のハプロタイプ構成を簡便に検出する個体識別法として、RSCA 解析に基づくクラス I 高精度タイピング、MIC タイピング及びマイクロサテライトタイピングシステムを開発した。また、このシステムを用いることで、DNA プライム-センダイベクターブースト法により、SIV 免疫が成立した個体に出現する SIVmac のエスケープ変異体や特定の SIVgag エピトープへの免疫応答性が、MHC ハプロタイプによって規定されることが証明された。
- 3) 我が国で SIV 感染実験に用いられてい

るアカゲザル個体、およびそれらの親個体と今後実験に利用予定の個体群が発現する MHC class II 対立遺伝子を網羅的に同定し、親子関係から予想されるハプロタイプ構成を明らかにした。

- 4) SIV env の糖鎖を取り除くと感染細胞での発現が膜表面に近づき、そのことにより抗原提示が亢進し強い細胞性免疫の誘導が亢進する。
- 5) Env 糖鎖の欠失は免疫原性の向上に関与しているというよりは、ウイルス学的性質の変化に大きな影響を与え、結果として Δ5G は弱毒化したと考えられた。Δ5G は Env 糖鎖欠失と中和抗体感受性、CD4 非依存感染、標的細胞との関連を調べるために有用なウイルスである。また attenuated virus として、感染宿主における中和抗体と細胞性免疫誘導の制御メカニズムを解析し、エイズウイルス感染制御に重要な免疫誘導の性質を明らかにするためにも重要である。
- 6) 組換えワクチンの実用化研究を主にベクターの改良による HIV 抗原の発現の状況に焦点をあてて行った。その結果これまで不可能であった組換え BCG のコドンの至適化による HIV p24 抗原の発現を *in vitro* 及び *in vivo* で著明に増強することができた。この成果により組換え BCG ワクチンの実用化への道を開くことができた。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 論文発表

- 1) Takeda, A., Igarashi, H., Nakamura, H., Kano, M., Iida, A., Hirata, T., Hasegawa, M., Nagai, Y., and Matano, T. Protective efficacy of an AIDS vaccine, a single DNA-prime followed by a single booster with a recombinant replication-defective Sendai virus vector, in a macaque AIDS model. *J. Virol.* 77:9710-9715, 2003.
- 2) Matano, T., Kano, M., Takeda, A., Nakamura, H., Nomura, N., Furuta, Y., Shioda, T., and Nagai, Y. No significant enhancement of protection by Tat-expressing Sendai viral vector-booster in a macaque AIDS model. *AIDS* 17:1392-1394, 2003.
- 3) Xing, H. Q., Moritoyo, T., Mori, K., Tadakuma, K., Sugimoto, C., Ono, F., Hayakawa, H. & Izumo, S. (2003) Simian immunodeficiency virus encephalitis in the white matter and degeneration of the cerebral cortex occur independently in simian immunodeficiency virus-infected monkey. *J Neurovirol* in press.
- 4) Sugimoto, C., Tadakuma, K., Otani, I., Moritoyo, T., Akari, H., Ono, F., Yoshikawa, Y., Sata, T., Izumo, S. & Mori, K. (2003) *Nef* gene is required for robust productive infection of Simian Immunodeficiency Virus in T-cell-rich paracortex in lymph nodes. *J Virol*,77:4169-
- 5) 森一泰, 永井美之 糖鎖と AIDS ウイルス *Molecular Medicine* 2003, 40:1062-69.
- 6) Villinger, F., Mayne A. F., Bostik P., Mori, K., Jensen P. E., Ahmed R. & Ansari, A. (2003) Evidence for antibody mediated enhancement of SIVgag antigen processing and cross presentation in SIV infected rhesus macaques. *J Virol* 77, 10-24.
- 7) Matano, T. Recent advances in AIDS vaccine preclinical trials: challenges against the chronic disease. *Current Topics in Virology*, in press.
- 8) Takeda, A., Nakamura, H., and Matano, T. Evaluation of simian immunodeficiency virus-specific immune responses induced by a defective proviral DNA vaccine in macaques. *Jpn. J. Infect. Dis.* 56:172-173, 2003.
- 9) Okamoto K, Makino S, Yoshikawa Y, Takaki A, Nagatsuka Y, Ota M, Tamiya G, Kimura A, Bahram S, Inoko H: Identification of IkBL as the second MHC-linked susceptibility locus for Rheumatoid Arthritis. *Am. J. Hum. Genet.* 2003; 72: 303-312
- 10) Shao W, Yasunami M, Takahashi M, Shibata H, Hamaguchi K, Sakata T, Ota M, Katsuyama Y, Inoko H, Kimura A: Analysis of HLA-B polymorphism in insulin dependent diabetes mellitus in Japanese. *MHC.* 2003; 9: 163-169.
- 11) Sugahara, D., S. Tsuji-Kawahara, and M. Miyazawa. Identification of a protective CD4<sup>+</sup> T-cell epitope in the p15<sup>gag</sup> of Friend murine leukemia virus and the role of the MA protein targeting to the plasma membrane for its immunogenicity. *J. Virol.* in revision, 2004.
- 12) Uno-Furuta, S., Matsuo, K., Kim, G., Tamaki, S., Takamura, S., Kamei, A., Kuromatsu, I., Kaito, M.,



- Matsuura, Y., Miyamura, T., Adachi, Y., and Yasutomi, Y. Immunization with recombinant bacillus Calmette-Guerin (BCG)-hepatitis C virus (HCV) elicits HCV-specific cytotoxic T lymphocytes in mice. *Vaccine* 2003;21:3149-3156.
- 13) Takamura, S., Niikura, M., Li, T.C., Takeda, N., Kusagawa, S., Takebe, Y., Miyamura, T., and Yasutomi, Y. DNA vaccine-encapsulated virus-like particles from an orally transmissible virus stimulates immune responses by oral administration. *Gene Ther.* in press
- 14) Hayashi, T., Yasutomi, Y., Hasegawa, K., Sasaki, Y. and Onodera, T. Interleukin-4-expressing plasmid inhibits reovirus type-2-triggered autoimmune insulinitis in DBA/1J suckling mice. *Int. J. Exp. Path.* 2003;84:101-106.
- 15) Nishikubo, K., Murata, Y., Tamaki, S., Sugama, K., Imanaka-Yoshida, K., Yuda, N., Kai, M., Takamura, S., Sebald, W., Adachi, Y. and Yasutomi, Y. A single administration of interleukin-4 antagonistic mutant DNA inhibits allergic airway inflammation in a mouse model of asthma. *Gene Ther.* 2003; 10:2119-2125.
- 16) Sakaue G, Hiroi T, Nakagawa Y, Someya K, Iwatani K, Sawa Y, Takahashi H, Honda M, Kunisawa J, Kiyono H. HIV mucosal vaccine: nasal immunization with gp160-encapsulated hemagglutinating virus of Japan-liposome induces antigen-specific CTLs and neutralizing antibody responses. *J Immunol.* 2003 170(1):495-502.
- 17) Kanekiyo, M., K. Matsuo, M. Hamatake, T. Hamano, T. Ohsu, S. Matsumoto, T. Yamada, S. Yamazaki, A. Hasegawa, N. Yamamoto, and M. Honda. (2004) Codon Optimization of the HIV Gene in *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin Recombinant Elicits Effective Virus-Specific Immunity. Submitted.
- 18) Kaizu M., Sato H., Ami Y., Izumi Y., Nakasone T., Tomita Y., Someya K., Takebe Y., Kitamura K., Tochikubo O. and Honda M. Infection of macaques with an R5-tropic SHIV bearing a chimeric envelope carrying subtype E V3 loop among subtype B framework. *Arch. Virol* (2003) 148:973-988.
- 19) Kaizu M., Ami Y., Nakasone T., Sasaki Y., Izumi Y., Sato H., Takahashi E., Sakai K., Shinohara K., Nakanishi K. and Honda M. Higher levels of IL-18 circulate during primary infection of monkeys with a pathogenic SHIV than with a nonpathogenic SHIV. *Virology* 313:8-12 2003.
- 20) Takizawa M, Chiba J, Haga S, Asano T, Yamamoto N, Honda M. Fractionation of guinea pig leukocyte by flow cytometry using a novel MIL4/SSC parameter. *Cytometry Research*, 13(1):25-32, 2003.
- 21) Izumi Y., Ami Y., Matsuo K., Someya K., Sata T., Yamamoto N., and Honda M. Intravenous inoculation of replication-deficient recombinant Vaccinia DIs expressing SIV Gag controls highly pathogenic SHIV in monkeys. *J. Virol.* 2003.

- 77(24) :13248-13256.
- 22) Assawawitoontip S, Puthavathana P, Pattanapanyasat K, Sukpanichnant S, Thammataksin S, Honda M, Warachit P. Lymphocyte and NK cell subpopulations in HIV seronegative Thais. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2003 Jun;21(2):95-103.
- 23) Hamano, T, P. Sawanpanyalert, H. Yanai, S. Piyaworawong, T. Hara, S. Sapsutthipas, J. Phromjai, S. Yamazaki, N. Yamamoto, P. Warachit, M. Honda and K. Matsuo. Determination of HIV-1 CRF01\_AE gag p17 and env-V3 consensus sequences for HIV/AIDS vaccine design. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 20 (3):337-340, 2004.
- 24) Gzyl J, Bolesta E, Wierzbicki A, Kmiecik D, Naito T, Kaneko Y, Honda M, Komuro K, Kozbor D. 2004. Effect of partial and complete variable loop deletions of the Human Immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein and the breadth of gp160-specific immune responses. *Virology* 318:493-506.
- 25) Matsuo K, Puthavathana P, Promkhatkaew D, Balachandra K, Ruxrungham K, Hamano T, Sutthent R, Sittisombut N, Butraporn R, Sriwanthana B, Boonlong J, Izumi Y, Yamazaki S, Yamamoto N, Warachit P and Honda M. (2004) Japan's Collaboration with Thailand in the Development of an HIV/AIDS Vaccine. *AIDS in ASIA* in press.
- 26) Takizawa M, Chiba J, Haga S, Asano T, Yamamoto N, Honda M. 2004. The normalization of guinea pig leukocyte fractions and lymphocyte subsets in blood and lymphoid tissues using a flow cytometric procedure. *Experimental Animals* in press.
- 学会発表.
- 1) Sugimoto, C., Shioda, T., Yasutomi, Y., Yamamoto, N., Nagai, Y. & Mori K. (2003) Properties of a quintuple deglycosylated SIVmac239 mutant as a novel attenuated SIV. 21th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS. (Seattle, WA, USA)
- 2) Sugimoto, C., Ohgimoto, S., Kusakawa, S., Takebe, Y., Shioda, T. Nagai, Y. & Mori K. (2003) Influence of deglycosylation on efficacy of Env-based vaccine. 21th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS. (Seattle, WA, USA)
- 3) 杉本知恵、保富康宏、塩田達雄、山本直樹、永井美之、森一泰 2003. 糖鎖欠失 SIV の新規 attenuated virus としての性質 第 17 回日本エイズ学会学術集会 (神戸)
- 4) 森一泰、杉本知恵、中山英美、塩田達雄、草川茂、武部豊、保富康宏、永井美之 2003. Env エイズワクチンへの糖鎖の重要性 第 17 回日本エイズ学会学術集会 (神戸)
- 5) Matano, T., Lun, W., Kano, M., Takeda, A., H. Nakamura, H., Mori, K., Sata, T., and Nagai, Y. Longitudinal analysis of vaccinated macaques after partial control of primary SIVmac239 infections. The 10th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections,

- Chicago, USA, 2/13/2003.
- 6) 俣野哲朗. HIV ワクチンの展望. 第 26 回日本医学会総会、福岡、4/5/2003.
  - 7) Matano, T. Cytotoxic T lymphocyte-based pressure against immunodeficiency virus infections in a macaque AIDS model. 第 76 回日本生化学会大会、横浜、10/16/2003.
  - 8) 小林政博、五十嵐博子、武田明子、野本明男、俣野哲朗. SIV Gag における CTL エピトープの同定. 第 51 回日本ウイルス学会学術集会、京都、10/28/2003.
  - 9) 俣野哲朗、五十嵐博子、武田明子、小林政博、飯田章博、永井美之. Gag 特異的 CTL 誘導ワクチンによる SIV 複製抑制効果. 第 51 回日本ウイルス学会学術集会、京都、10/29/2003.
  - 10) 俣野哲朗. 慢性エイズモデルにおける Gag 特異的 CTL 誘導ワクチンの効果. 第 17 回日本エイズ学会学術集会、神戸、11/28/2003.
  - 11) Matano, T., Kobayashi, M., Igarashi, H., Takeda, A., Sugiura, W., Mori, K., Kano, M., Iida, A., Hasegawa, M., Miyazawa, M., Yasunami, M., Kimura, A., O'Connor, D., Watkins, D., and Nagai, Y. Containment of simian immunodeficiency virus replication in rhesus macaques by vaccine-induced cytotoxic T lymphocytes. The 11th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, San Francisco, USA, 2/11/2004.
  - 12) Yasuhiro Yasutomi 2003. Oral administration of mucosal HIV vaccine by using virus-like particles derived from orally transmissible virus. Nobel Forum "Virus-Cell Interaction. Structure to Function." (Karolinska Institute
  - 13) Miyazawa, M. Genetic basis for resistance against retroviral infections: mouse models to gene chips. Thai NIH, Lampang Hospital, Milano University, Kinki University Joint Meeting on Resistance to HIV Infection and Disease Progression. Nonthaburi, Thailand. October 13-14, 2003.
  - 14) 小川達也、湯浅貴恵、松村治雄、宮澤正顯. マウスレトロウイルス感染初期における NK 細胞の活性化機構. 第 33 回日本免疫学会総会・学術集会 (福岡). 2003 年 12 月 8 - 10 日. 日本免疫学会総会・学術集会記録 33:145, 2003.
  - 15) 河俣浩之、河原 (辻) 佐智代、宮澤正顯. マウスレトロウイルスの持続感染を制御する宿主因子. 第 33 回日本免疫学会総会・学術集会 (福岡). 2003 年 12 月 8 - 10 日. 日本免疫学会総会・学術集会記録 33:298, 2003.
  - 16) 菅原大輔、河原 (辻) 佐智代、宮澤正顯. マウスレトロウイルス Gag-蛋白上の感染防御エピトープの同定. 第 33 回日本免疫学会総会・学術集会 (福岡). 2003 年 12 月 8 - 10 日. 日本免疫学会総会・学術集会記録 33:298, 2003.
  - 17) Yumiko Tanaka, Michio Yasunami, Akinori Kimura: Analysis of polymorphisms in the MHC class I genes from rhesus macaques. 第 12 回日本組織適合性学会大会、軽井沢、平成 15 年 9 月

- 18) Michio Yasunami, Hiroki Shibata, Megumi Takahashi, Masao Ota, Yoshihiko Katsuyama, Hidetoshi Inoko, Akinori Kimura: Linkage disequilibrium of genes in the HLA region. 第 12 回日本組織適合性学会大会、軽井沢、平成 15 年 9 月
- 19) Hiroki Shibata, Michio Yasunami, Akinori Kimura: Functional analysis of the NFKBIL1 gene product, I kappa B-like (IKBL) protein. 第 12 回日本組織適合性学会大会、軽井沢、平成 15 年 9 月
- 20) M. Honda. A Summary of the Five-year Thailand-Japan Cooperative Project for Preclinical Development of HIV-1 Clade E Vaccine with Equal Partnership. Japan-U.S. Cooperative Medical Science Program 14th Joint Meeting of AIDS Panel (March 5-7, 2003, Okinawa)
- 21) Nakasone T, Izumi Y, Matsuo K, Ami Y, Someya K, Kanekiyo M, Hamano T, Horibata S, Yoshino N, Hara T, Takizawa M, Kawahara M, Kaizu M, Hamatake M, Sakai K, Shinohara K, Yamazaki S, Yamamoto N, Honda M. Prime-boost vaccination with recombinant Mycobacterium bovis bacillus Calmette Guérin in and vaccinia strain DIs elicits protective immunity against pathogenic SHIV infection in macaques. Japan-U.S. Cooperative Medical Science Program 14th Joint Meeting of AIDS Panel (March 5-7, 2003, Okinawa)
- 22) 吉野直人、兼清優、染谷健二、松尾和浩、網康至、佐藤成大、山本直樹、本多三男 リコンビナント DIs ワクチンの経粘膜接種への応用 第 17 回日本エイズ学会総会 (11/27-29, 2003, 神戸)
- 23) 浜野隆一、岡本尚、野内英樹、日比悠里名、高橋なを子、原敬志、山本直樹、山崎修道、本多三男、松尾和浩 Gag p17 遺伝子変異による HIV-1 CRF01\_AE 複製の制御 第 17 回日本エイズ学会総会 (11/27-29, 2003, 神戸)
- 24) 滝澤万里、村上利夫、江田康幸、前田敏宏、本多三男 ヒトモノクローナル抗体 KD-247 における中和メカニズム 第 17 回日本エイズ学会総会 (11/27-29, 2003, 神戸)
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)
- 1) 特許取得  
Miyazawa M. and M. Clerici. Marker Genes (HIV 曝露非感染状態と相関する遺伝的マーカーとその応用)。英国特許出願 (UK Patent Applied, October 16, 2002: No. 0223982.0)
- 2) 実用新案登録 無し
- 3) その他 無し