

II. 分担研究報告書

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

主任研究者 永井美之 富山県衛生研究所 所長

研究要旨：HIV 予防治療を目的とした候補物質の評価にはサルの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集団の確保と利用が要求される時期になっている。さらに HIV/AIDS の病因の主体は生体の免疫機能の破壊であることから、HIV/AIDS 候補物質の免疫能に対する影響の詳細な解析が望まれている。それらの解析方法も世界的に急速に進展しつつある。したがって、エイズ治療薬開発のためのサルにおける評価系の改良と強化が緊急な課題の一つになっている。それに応えるべくサル MHC（組織適合抗原）の解析データをもとにしたサル評価系の開発を検討し、最も重要なプライオリティとなっている HIV ワクチン開発における外来性抗原のエピトープの同定、発現の増幅と防御免疫誘導にいたる相関について明らかにする。

A. 研究目的

種々の有効なエイズ治療薬が開発されているが HIV 感染者が増加し続けていることから HIV 感染をコントロールするには新しい抗エイズ物質の開発が重要な課題となる。そのためには基盤技術の開発、特にサルを用いた評価系の開発とその系を用いた候補物質の評価がある。このプロジェクトではこれまで、小動物やサルを用いた HIV 感染系の開発を行ってきたが今回それらの成果に基づき、さらに候補薬の臨床応用のために必須と考えられるサルを用いた基盤技術の開発を行い、それらを用いて候補物質の開発研究を行うことを目的とする。

それらの研究を効果的にするためにこれまで不明な点が多かったサルの MHC（組織適合抗原）の解析を行い、評価系の均一化を計る。そのためにヒトの MHC の解析を行っている宮沢、木村研究員による解析が有効となる。木村、宮澤らは既にその解析を始めており、新しい MHC の存在があきらかになっている。それらの研究を発展させて免疫学的に抗原と免疫能の誘導が明らかにできるサル系の開発が期待できる。

サルの細胞性免疫能の解析法が一定化していないことから新しい抗エイズ物質の開発にはその定量化を計ることが必要と考えられる。その研究を保富研究員が行う。

つくばの P3 サル HIV エイズ研究施設において森、俣野、本多らはサルを用いた HIV 感染評価系の開発を行う。

B. 研究方法

これまでアカゲザルの MHC の解析方法はインド産のアカゲザルを用いて確立されつつある。しかし、前実験で中国産のアカゲザルを適用すると、インド産アカゲザルでの解析法を充分応用できないことが明らかになった。インド産アカゲザルを入手することが現時点では極めて厳しい状況にあることを考えて、中国産アカゲザルの MHC を明らかにすることにより、エイズ治療薬開発のための遺伝的なバックグラウンドと、そのためのサルを用いた評価スクリーニング系を開発する方法を検討した。その解析はこれまで用いられたアカゲザルのゲノム遺伝子配列決定法を参考にしている。

1) 評価モデルとして用いられるサル HIV/AIDS モデルの MHC の解析を行った。これまで明らかにされているアカゲザルを用いた MHC クラス I 及びクラス II 抗原の情報をもとにしてアカゲザルの遺伝的バックグラウンドを明らかにする。しかし、これまでに登録されたサルの MHC はほとんどインド産アカゲザルによるもののみであってその報告範囲も極めて狭いものであった。従って、サルの MHC と病原体の感染あるいは感染免疫の相関を明らかにするには極めて不十分なものであり、今後解決すべき課題になっている。

る。まずこの点に関して日本でアカゲザルあるいはカニクイサルも含めて MHC の解明を行い、エイズ医薬品の開発に応用できるように整備する。

2) 具体的な防御能を示すリコンビナントワクチンの免疫誘導能の防御免疫に至るまでの解析を行った。サルの遺伝的均一化を計りながら、種々の HIV 感染や HIV 遺伝子を組込んだ免疫原に関するサルの評価系を開発する。具体的にはサルの細胞性免疫を中心として、例えばヘルパー機能の誘導、キラー細胞活性の誘導、遅延型反応の発現と、ウイルスの感染によるサルへの病態発現との関連性を明らかにする。

(倫理面への配慮)

国立感染症研究所内に設置された動物実験委員会の承認を得て行われた。

C 研究結果

1) 中国産アカゲザルの MHC class I, II 抗原の同定法の開発とその応用
アカゲザルを SIV Gag 抗原を組込んだ DNA 及びセンダイウイルスベクターよりなるプライムブーストワクチンで免疫すると Gag 特異的 CTL が接種した 8 頭全てに認められた。SIVmac239 感染によるチャレンジ実験を行うと 3 頭は SIV の複製を抑制できなかったが、残り 5 頭は SIV のウイルス量がコントロールされ、セットポイントが検出限界以下になった。この中の 3 頭は上記の方法によって同定

された MHC にリンクしていると推測され、同一エピトープを認識する特異的な CTL が誘導されており、その CTL によるウイルスの産生のコントロールが行われると予測されるがその後ウイルスのエスケープミュータントが現れた。そのミュータントウイルスは増殖能が著しく障害手いたために、サル体内のウイルスコピー数が検出限界以下に低下したと予測された。

- 2) 評価モデルとして用いられるサル HIV/AIDS モデルの MHC の解析については、中国産アカゲザルを用いた MHC class I, II 抗原の RSCA 解析法によりアカゲザルに MIC I, II, III の遺伝子群が存在することを明らかにした。HLA 領域内のマイクロサテライトマーカーを検索し、class I 領域あるいは近傍の C244, C12A TNF- α のマーカー、さらに class II 領域あるいは近傍の D6S1701, D6S1560, D6S291 のマーカーの存在が判明し MHC パプロタイプの構成に有用であることが明らかになった。
- 3) 具体的な防御能を示すリコンビナントワクチンの免疫誘導能の防御免疫に至るまでの解析については以下の研究を行った。
 - ①サルエイズモデルにおける Non-progresser の同定とその解析
 - ②エイズウイルスの糖鎖のウイルス感染、免疫応答に関する研究
 - ③DNA-センダイウイルスプライムブーストワクチンによるエイズ発症予防効果

の誘導

④組換え BCG ワクチンの免疫能を増幅させる目的でマイコバクテリアコドンの至適化を行い、その効果を明らかにすることができた。この成果を用いて組換え BCG 単独ワクチンあるいはこれまでのプライムブーストワクチンの免疫増強作用について検討する可能性が得られた。

これまで間接的な証拠から推測されていた SIV 感染防御における CTL や CD4 陽性 T リンパ球等の役割が MHC とエピトープのレベルで実証された。ワクチン開発の方向性決定に対して重要な貢献を行えると共に、予め MHC 遺伝子型の明らかなアカゲザルを感染実験に使用出来るようになり、実験群個体数の大幅な縮小及びそれによる動物資源の保護が実現できると示唆された。

D 考察

HIV ワクチン開発の抱える大きな問題点の一つに作製した候補ワクチンのワクチン効果を評価できる完全な動物モデルが無いことが挙げられる。さらにその開発の方向性、目処が全く無い。その大きな原因は御存知のように HIV ウイルスがサルに感染して病原性を示す実質的な HIV サルモデルがないからである。すなわちワクチン投与によって誘導される HIV 特異的な T 細胞、B 細胞などによるウイルス特異的免疫の評価が防御免疫に直結した評価に至らないことによる。そのことをカバーする目的で病原性の SHIV というキメラウイルスによってワクチン効果をみるサルモデ

ル系と、野生型 SIV による効果判定系が使用されている。この2つの系の特徴は病原性を示すサルエイズモデルとして捉える事ができるが、その感染病態をみると SIV のモデルの場合は主に HIV と同様の CCR5 レセプターを介してヒト、サルに感染する。しかし SHIV は今評価に用いられている SHIV89.6P の場合主に CXCR4 を介して感染することが in vivo で示唆されている。従って、HIV の感染を担う RS ウイルスとは異なった性質を有することが予測される。その感染病態を推測すると以下の点が指摘される。

- 1) 上記のコレセプターの違いによる SHIV ウイルス感染はワクチンに誘導されている免疫効果によってコントロールされ易いのではないか。従ってワクチン効果を過大視することにつながるのではないか。
- 2) HIV ワクチン開発のこれまでの苦い経験から細胞性免疫主導型ワクチンの開発、特に CTL 誘導型ワクチンの開発が行われているが、このワクチン効果を SHIV89.6P で評価するのは CD4 陽性 T ヘルパー細胞を急激に異常に減少させることから CD8 陽性 T 細胞の免疫を評価するのは妥当では無い可能性がある。
- 3) このチャレンジウイルスは免疫系によってコントロールされ易く、意外な事に液性免疫によってもコントロールされ易いウイルスである。従ってこのチャレンジウイルスによってワクチン効果を示した候補ワクチンはチャレンジウイルス特異的なホモログスウイルスに対する中和抗

体の産生と強く結びついている可能性があり、そのことは実際の HIV に対するワクチン効果とは異なっている可能性を示唆している。

最近のレポートで CTL 志向型ワクチンのエスケープが明らかにされ、そのサルモデルによる持続がウイルスチャレンジへの防御が30週過ぎると次第に消失してくることから、ワクチンの効果の持続性がさらなる重要な課題として捉えられ始めている。

E. 結論

日本における遺伝的バックグラウンドが明らかでないサルを同定解析し、そのサルを用いた医薬品の開発あるいは病態の解析が必要となってきた。本プロジェクトの初年度にあたり、米国での Mamu-A*01, 及び 02 のコロニーとは異ったコロニーである Mamu-A*08 の遺伝的バックグラウンドを持つサルを高率に有するサルコロニーを同定した。今後さらにクラス I のみならず、クラス II 抗原や MIC 抗原などについても明らかにすることによって、遺伝的バックグラウンドの明らかになったサルコロニーを用いてエイズ医薬品、ワクチン開発に資することにより欧米で開発されつつあるエイズワクチンとのデータの比較を行うことが可能になり、エイズ対策に寄与することができる。

F 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1) 論文発表

- 1) Matano, T., Kano, M., 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, AIDS 17:1392-1394, 2003.
- 2) 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.
- 3) 森一泰、永井美之 糖鎖と AIDS ウイルス Molecular Medicine 2003, 40:1062-69.

2) 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) 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.
- 4) 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.
- 5) 杉本智恵、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・総会 (神戸)
- 6) 森一泰、杉本智恵、中山英美、塩田達雄、草川茂、武部豊、保富康宏、永井美之 (2003) Env エイズワクチンにおける糖鎖の重要性。第 17 回日本エイズ学会学術集会・総会 (神戸)

- 7) 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.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含
む。）

- 1) 特許取得 無し
- 2) 実用新案登録 無し
- 3) その他 無し

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）
分担研究報告書

糖鎖変異 SIV 感染により誘導されるエイズウイルスに対する感染防御免疫に関する研究

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 主任研究官

研究要旨：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。本研究では $\Delta 5G$ 感染によって宿主に誘導された感染防御免疫を解析することによって、エイズウイルス感染制御に重要な役割を果たす免疫誘導を明らかにすることを目的とした。 $\Delta 5G$ 感染ザルにおける液性免疫誘導と細胞性免疫誘導を解析した結果、5 頭の $\Delta 5G$ 感染ザルはすべて同じように感染が制御されるにもかかわらず、それぞれが異なる免疫誘導のパターンを示した。このことから糖鎖欠失は免疫原性の向上に寄与しているのではなく、弱毒化に関与していることが示された。興味深いことは $\Delta 5G$ 感染ザルにおける中和抗体誘導と細胞性免疫誘導に逆相関が見られたことである。両免疫誘導の制御機構はウイルス感染防御免疫を理解する上で鍵となる現象であることが示唆された。さらに本研究では $\Delta 5G$ の弱毒化に関わるウイルス学的性質の変化として糖鎖欠失による Env の構造変化、中和抗体認識に関与する糖鎖欠失部位を明らかにした。また、 $\Delta 5G$ の病原性を Δnef 感染と比較し、 $\Delta 5G$ は低病原性であることが示された。以上の結果を総合して、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。

A. 研究目的

サル/SIV 感染モデルはヒトにおける HIV の感染病態と多くの共通点があるので、エイズの予防法や治療法を開発する上での評価系として、またエイズ病態を解明する動物モデル系として重要である。我々はエイズウイルスのエンベロープタンパク (Env) に多数存在する N-結合型糖鎖に着目し、糖鎖欠失 SIV の作製、アカゲザルへの感染実験を通して、ウイルスの感染性、免疫原性、ならびに宿主に対する病原性に Env 糖鎖が果たす役割を調べている。

SIVmac239 gp120 の 23 カ所の N-結合型糖鎖付加部位のうち 5 カ所に変異を導入し糖鎖を欠失させた変異 SIV 株 $\Delta 5G$ は *in vitro* での増殖性は SIVmac239 と同等である。 $\Delta 5G$ をアカゲザルに接種すると、急性感染期では SIVmac239 と同等のウイルス増殖を示すにも関わらず、その後速やかに血中ウイルス量は検出限界以下にまで抑制され、長期間にわたって極めて低レベルに維持されること、さらに $\Delta 5G$ 感染ザルに SIVmac239 をチャレンジ

感染させると、ほぼ完全にその感染を防御することをこれまでに報告してきた。 $\Delta 5G$ はこのように弱毒ウイルスとしての性質があることが示唆されたことから、本研究では第一に $\Delta 5G$ 初期感染防御に関与する免疫応答ならびに SIVmac239 チャレンジ感染防御に関与する免疫応答を解析することにより、エイズウイルス感染防御と宿主免疫誘導の関連を明らかにすることを試みた。第二に $\Delta 5G$ の Env 糖鎖欠失がウイルス学的性質にどのような変化を与えているのかを解析することにより、弱毒化のメカニズムを明らかにすることを試みた。第三に $\Delta 5G$ の病原性を弱毒ウイルスの代表株である Δnef と比較し、糖鎖欠失ウイルスの弱毒生ワクチンとしての応用の可能性を検証した。

B. 研究方法

1. SIV 感染ザル

$\Delta 5G$ 感染ザル 5 頭、 Δnef 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 抗体測定解析に用いた。なお、本研究の動物実験はすべて「国立感染症研究所動物実験指針」に基づいて行われた。本指針は「動物の愛護及び管理に関する法律」「実験動物の使用及び保管等に関する基準」等に基づき、また「国立感染症研究所における動物実験の基本原則」に則って適正な動物実験を行うことを目的としているため、動物倫理に対する問題はない。

2. 抗 SIV ELISA 抗体価の測定

SIV lysate 固相化プレートを用いて定法により ELISA を行った。感染ザル IgG をプレートに添加し、室温 1 時間反応させた後、洗浄し、POD 標識抗サル IgG 抗体を加えて、37°C 30 分間インキュベートした。洗浄後、*o*-フェニレンジアミン溶液を加えて発色させ、停止液として 2N-硫酸を加えた。490nm で吸光度を測定した。

3. ペプチド ELISA による抗 Env 抗体エピトープの解析

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た。100 倍希釈した感染 8 週後のサル血漿をサンプルとし、上記 ELISA と同様にアッセイを行った。

4. 中和抗体価の測定

中和抗体価の測定は Tat 反応性 LTR 制御下で SEAP (分泌型アルカリフォスファターゼ) を発現する CEMx174SIV-SEAP 細胞を用いて行った。段階希釈した血漿をウイルスと混ぜて室温 1 時間インキュベートした後、CEMx174SIV-SEAP 細胞を加えて 3 日間培養した。培養上清中に分泌される SEAP 活性を測定した。

5. ウイルス特異的細胞性免疫の解析

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。また感染ザル PBMC はマグネットビーズを用いることにより、CD4+ T 細胞と CD8+ T 細胞に分けた。抗原提示 BLCL と CD4+ T 細胞または CD8+ T 細胞を一晩混合培養し、定法により IFN- γ 産生細胞を検出・算定した。

C. 研究結果

1. Δ 5G 感染ザルにおける免疫誘導の解析

アカゲザルにおける Δ 5G 感染のピーク (感染後 2 週) は SIVmac239 感染と同等であるにもかかわらず、感染後 8 週までにウイルス増殖は検出限界以下まで急激に抑えられる。このような Δ 5G の初期感染防御に対する宿主免疫応答を明らかにするため、中和抗体誘導と細胞性免疫誘導を解析した。

a) 中和抗体誘導の解析

Δ 5G 感染ザル血漿から IgG を精製し、中和抗体価を測定した。 Δ 5G に対する中和抗体は 5 頭中 4 頭で検出された。しかしその抗体価は個体ごとに大きく異なっていた。Mm07 はひじょうに高い中和抗体価が感染後 16 週で見られその後低下した。Mm22 は比較的高い中和抗体価が維持されていた。Mm12 は中程度、Mm23 は低い中和抗体価が持続して検出された。しかし、Mm26 は全く中和抗体が検出されなかった。さらに SIVmac239 に対する中和抗体価も調べたがはいずれのサルにおいてもほとんど検出されなかった。

b) 細胞性免疫の解析

Δ 5G 感染ザルにおけるウイルス特異的 CD8+ T 細胞ならびに CD4+ T 細胞誘導を IFN- γ ELISPOT アッセイにより検討した (図 2)。中和抗体と同様、誘導レベルは個体ごとに異なっていた。Mm07 と Mm22 は特異的 CD8+ T 細胞、CD4+ T 細胞とも初感染期は低いレベルであった。他の 3 頭は感染後 1~3 週までにウイルス特異的 CD4+ T 細胞 (図 2 右)、2~6 週までにウイルス特異的 CD8+ T 細胞 (図 2 左) が検出された。誘導レベルは Mm26 が最も高いウイルス特異的 T 細胞誘導が見られ、Mm12, Mm23 は中程度であった。

c) 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。そこで両免疫誘導の相関を調べた。感染後約 1 年 (38 または 57 週) の間の中和抗体価の平均値を縦軸に、細胞性免疫誘導の平均値 (同一期間に検出されたウイルス特異的 IFN- γ 産生 CD4+ T 細胞と CD8+ T 細胞の合計値の平均) を横軸に各 $\Delta 5G$ 感染ザルの免疫誘導をプロットした。 $\Delta 5G$ 感染ザルにおける免疫応答は中和抗体誘導と細胞性免疫誘導が逆相関の関係にあった。中和抗体と IFN- γ 産生 CD4+ T 細胞または CD8+ T 細胞のみについても同様の逆相関が見られた。このような相関は感染の後期には見られなかった。また感染初期でも抗 SIV virion ELISA 抗体価と細胞性免疫の間にはいかなる相関も見られなかった。

2. $\Delta 5G$ のウイルス学的特性の変化の解析

a) 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

Env は標的細胞との相互作用 (ウイルスレセプター、標的細胞表面レセプターとの結合等) に重要である。糖鎖欠失によってウイルス側の結合部位が変化し、標的細胞との相互作用が変化した可能性が推測された。そこで Env の構造変化を調べる目的で $\Delta 5G$ 感染ザルに誘導された抗 Env 抗体の認識エピトープの解析を行い、SIVmac239 感染ザルと比較した。感染早期に出現する抗体は接種したウイルス粒子を反映するものであると考えられるので、感染後 8 週の血漿を使用した。

結果を図 4 に示す。 $\Delta 5G$ 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 か所の糖鎖欠失のうちの 2 か所を含んだ。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。

b) 中和抗体認識に関与する糖鎖欠失の解析

SIVmac239 感染ザルでは中和抗体はほとんど検出されないことがこれまでの研究から明らかにされている。 $\Delta 5G$ 感染ザルでは誘導レベルには違いがあったが、5 頭中 4 頭で中和抗体が誘導されたことから、糖鎖欠失は中和抗体誘導に関与していると考えられる。そこで $\Delta 5G$ の 5 つの糖鎖欠失のどれが中和抗体誘導、認識に関与しているのかを調べるため、中和抗体の高かった $\Delta 5G$ 感染ザル 2 頭、SIVmac239 感染ザル 1 頭の血漿から精製した IgG を用い、図 5 に示す 12 種の 1~5 の糖鎖欠失変異 SIV に対する中和能を調べた。

前述したように $\Delta 5G$ 感染ザル IgG は $\Delta 5G$ を中和するが、SIVmac239 は中和できなかった。 $\Delta 5G$ 感染ザル IgG は 1 か所の糖鎖欠失を持つ 5 つのウイルス ($\Delta 1G-1 \sim -5$) のうち、 $\Delta 1G-2, -3, -5$ を中和し、これら 3 か所の欠失を持つ $\Delta 3G-235$ は $\Delta 5G$ と同等に中和した。これらの結果から、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。

2. $\Delta 5G$ と Δnef の病原性の比較

$\Delta 5G$ 感染実験の結果から $\Delta 5G$ は新規の弱毒 SIV 株であることが示された。そこでこれまでもっともよく研究されている弱毒 SIV である Δnef と病原性を比較し、結果の概略を表 1 にまとめた。

まず、viral load を比較した。 $\Delta 5G$ は SIVmac239 と感染ピークは同等のウイルス増殖を示したが、 Δnef のピークはほぼ 10 分の 1 であった。セットポイントは $\Delta 5G$ 、 Δnef とも検出限界以下に低下するが、その後 $\Delta 5G$ 感染はそのレベルを維持するにもかかわらず、 Δnef 感染では上昇と下降を繰り返し、平均として約 8000 コピー/ml の viral RNA が検出された。 5×10^5 PBMC 中の viral DNA も $\Delta 5G$ は Δnef より低かった。これらの結果から、 $\Delta 5G$ は Δnef より感染レベルが明らかに低いことが示された。

次に、メモリー CD4+ T 細胞とナイーブ CD4+ T 細胞の推移をフローサイトメトリーによって解析した。メモリーとナイーブのマーカーとして CD29 を利用した。大まかに CD29^{low} はナイーブに、CD29^{high} はメモリーに相当し、CD4+CD29^{high} の低下は AIDS 発症に関連することがわかっている。Δ5G 感染ではどちらの population とも低下が見られなかった。Δnef 感染では AIDS 発症のマーカーとなる CD4+CD29^{high} の低下は見られなかったが、CD4+CD29^{low} が徐々に低下した。CD4+CD29^{low} の低下と Δnef の慢性感染レベルと関連していると考えられた。

慢性感染期のウイルス特異的 CD4+ T 細胞と CD8+ T 細胞を IFN-γ ELISPOT アッセイで調べた。Δ5G 感染ではウイルス特異的 CD4+ T 細胞、CD8+ T 細胞とも検出可能であったが、低レベルで維持されていた。これは Δ5G の低い慢性感染レベルによるウイルス抗原の低下が原因であると考えられ、新たなエイズウイルス感染防御のマーカーになると考えられる。それに対して、Δnef 感染ザルではウイルス特異的 CD4+ T 細胞の上昇を伴わない CD8+ T 細胞の激しい上昇が見られた。

表1 病原性の比較

Virus infection		Δ5G	Δnef	SIVmac 239
Plasma viral RNA	peak	6.4x10 ⁶	1.0x10 ⁶	8.8x10 ⁶
	Set-point	<1000	<1000	2.0x10 ⁴
	chronic	<1000	8000	2.0x10 ⁵
Viral DNA	chronic	6	27	nd
CD4+CD29 ^{high}		→	→	↓
CD4+CD29 ^{low}		→	↓	
SIV specific CD8+ T cell in chronic		↓	↑	nd
SIV specific CD4+ T cells in chronic		↓	↓	nd

D. 考察

エイズウイルスの Env に多数存在する糖鎖の役割のひとつは感染宿主における抗体誘導からの回避に作用することであると考えられている。実際、こ

れまでの研究において Env 糖鎖欠失 SIV は感染ザルの中和抗体誘導を上昇させ、これにより糖鎖欠失ウイルスが感染制御されることが報告されている。我々の作製した糖鎖欠失ウイルス Δ5G 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 Δ5G 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ことである。すなわち Δ5G 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よりことなり、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。このような免疫誘導の逆相関は SIVmac239 感染でも見られるが、両免疫誘導ともレベルが低いので有意ではない。Δ5G は attenuated virus であるため高い相関性を示したと考えられる。また抗 SIV virion ELISA 抗体価とウイルス特異的 T 細胞誘導との逆相関は見られなかったため、中和抗体とウイルス特異的 T 細胞のバランスは従来の Th1/Th2 theory とも異なると考えられ、中和活性を有するよりアフィニティーの高い抗体生成へのセレクションと細胞性免疫誘導が相互作用しているのではないかと考えられる。

また、本研究の結果から Δ5G 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。Δ5G 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。

Δ5G 感染と Δnef 感染の比較から、Δ5G の病原性はきわめて低いことが示された。特に、Δ5G 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は感染制御に重要なファクターであると考えられた。それに対して、Δnef

感染で見られたウイルス特異的 CD4+ T 細胞の上昇を伴わない、CD8+ T 細胞の激しい上昇は持続感染による免疫系の破綻を意味するのかもしれない。

E. 結論

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 非依存的感染、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。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

1. Xing HQ, Moritoyo T, Mori K, Tadakuma K, Sugimoto C, Ono F, Hayakawa H, Izumo S. Simian immunodeficiency virus encephalitis in the white matter and degeneration of the cerebral cortex occur independently in simian immunodeficiency virus-infected monkey. *J Neurovirol.* 2003,9:508-18.
2. Sugimoto C, Tadakuma K, Otani I, Moritoyo T, Akari H, Ono F, Yoshikawa Y, Sata T, Izumo S, Mori K. *nef* gene is required for robust productive infection by simian immunodeficiency virus of T-cell-rich paracortex in lymph nodes. *J Virol.* 2003, 77:4169-80.
3. Villinger F, Mayne AE, Bostik P, Mori K, Jensen PE, Ahmed R, Ansari AA. Evidence for antibody-mediated enhancement of simian immunodeficiency virus (SIV) Gag antigen processing and cross presentation in SIV-infected rhesus macaques. *J Virol.* 2003, 77:10-24.

4. 森一泰、永井美之 糖鎖と AIDS ウイルス *Molecular Medicine* 2003, 40:1062-69.

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. 杉本智恵、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・総会 (神戸)
4. 森一泰、杉本智恵、中山英美、塩田達雄、草川茂、武部豊、保富康宏、永井美之 (2003) Env エイズワクチンにおける糖鎖の重要性。第 17 回日本エイズ学会学術集会・総会 (神戸)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他
特になし

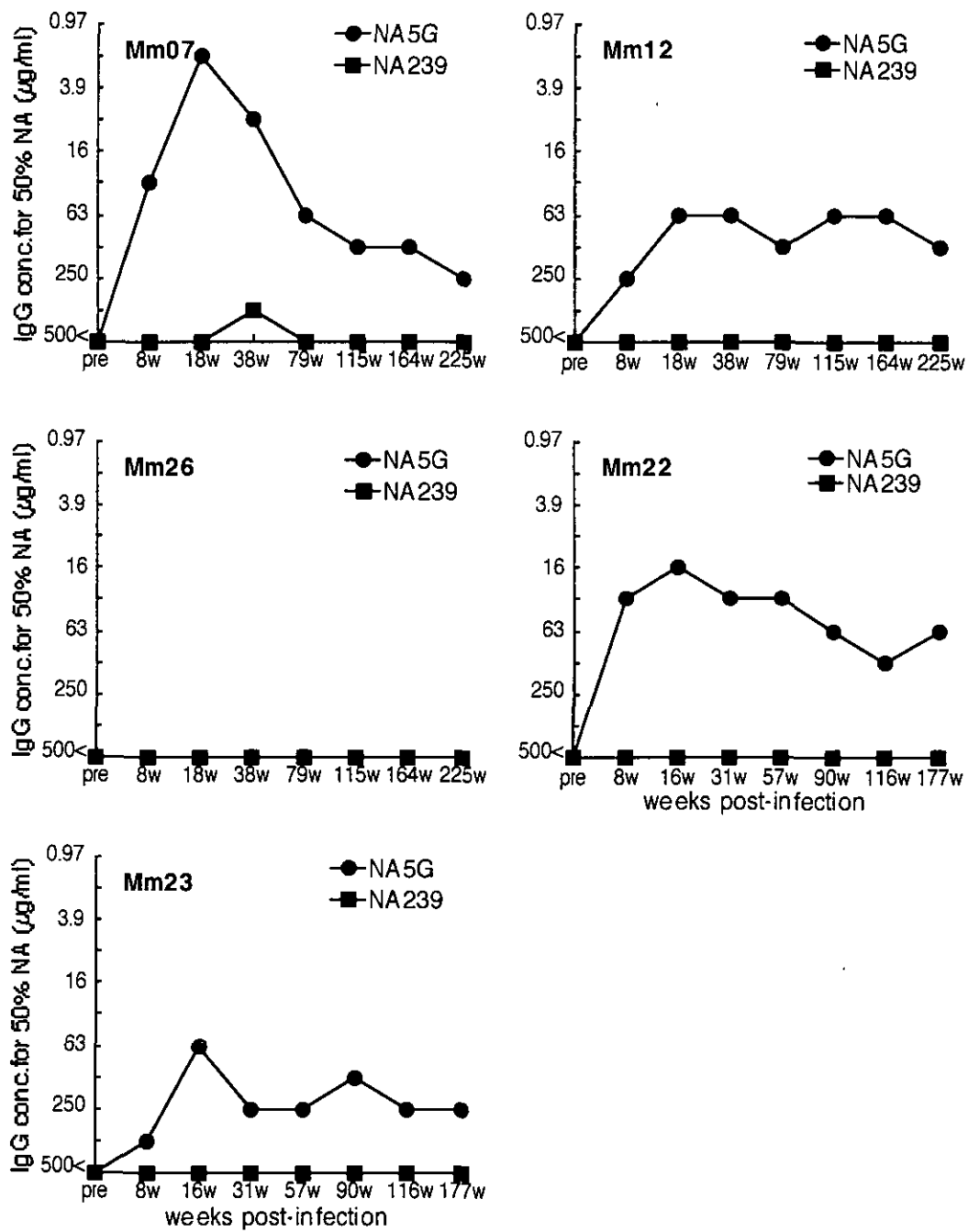


図 1. Δ 5G感染ザルにおける中和抗体誘導

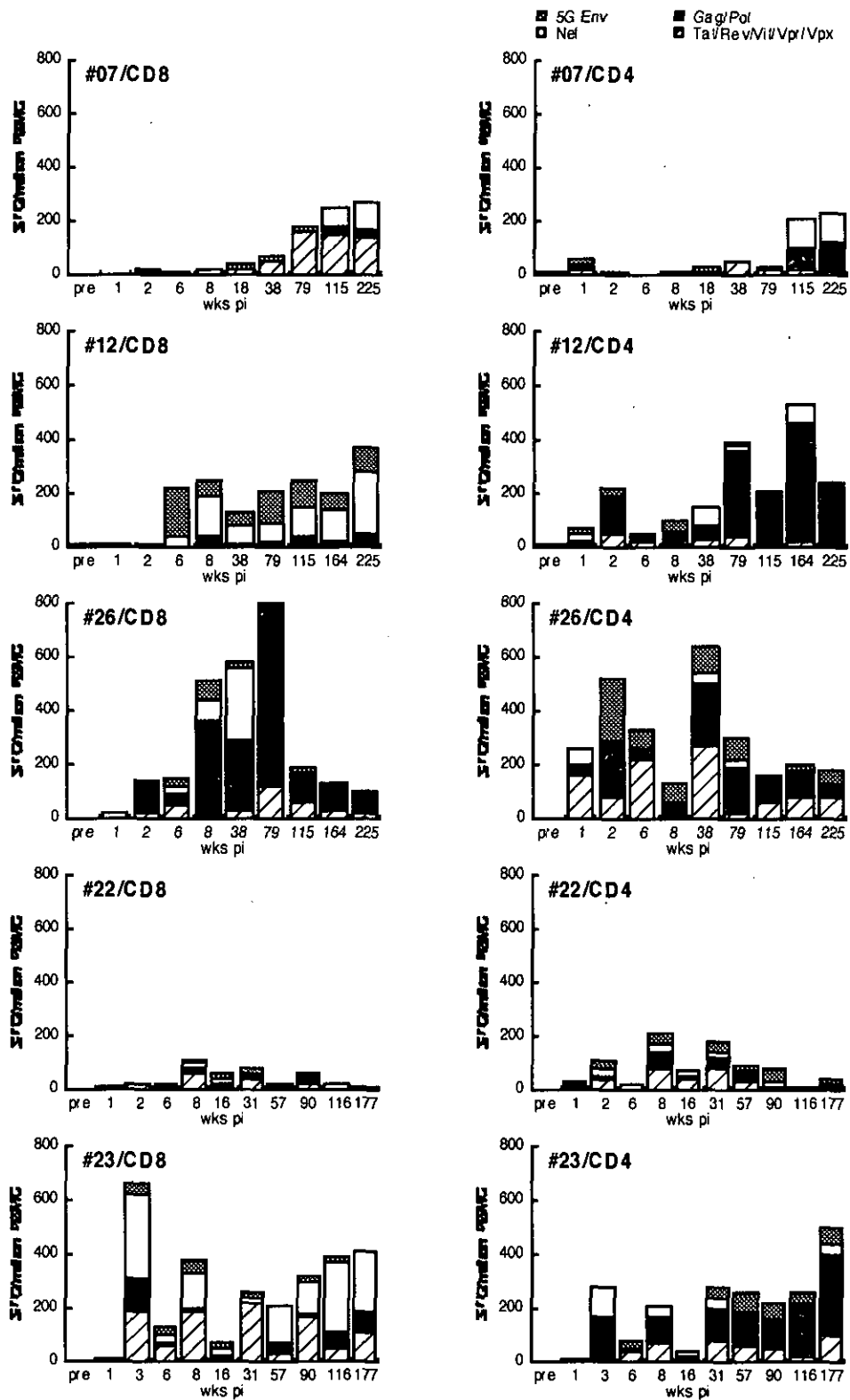


図 2. IFN- γ ELISPOT アッセイによる Δ 5G 感染ザルに誘導されたウイルス特異的 T 細胞

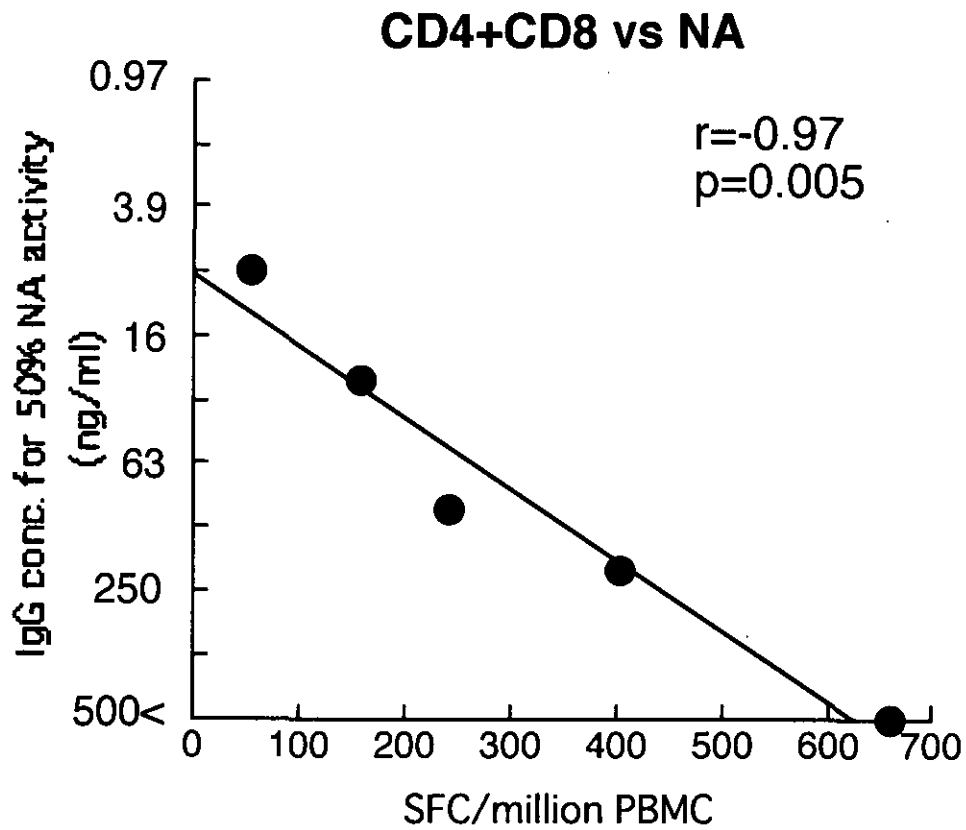


図 3. 中和抗体と細胞性免疫の相関性

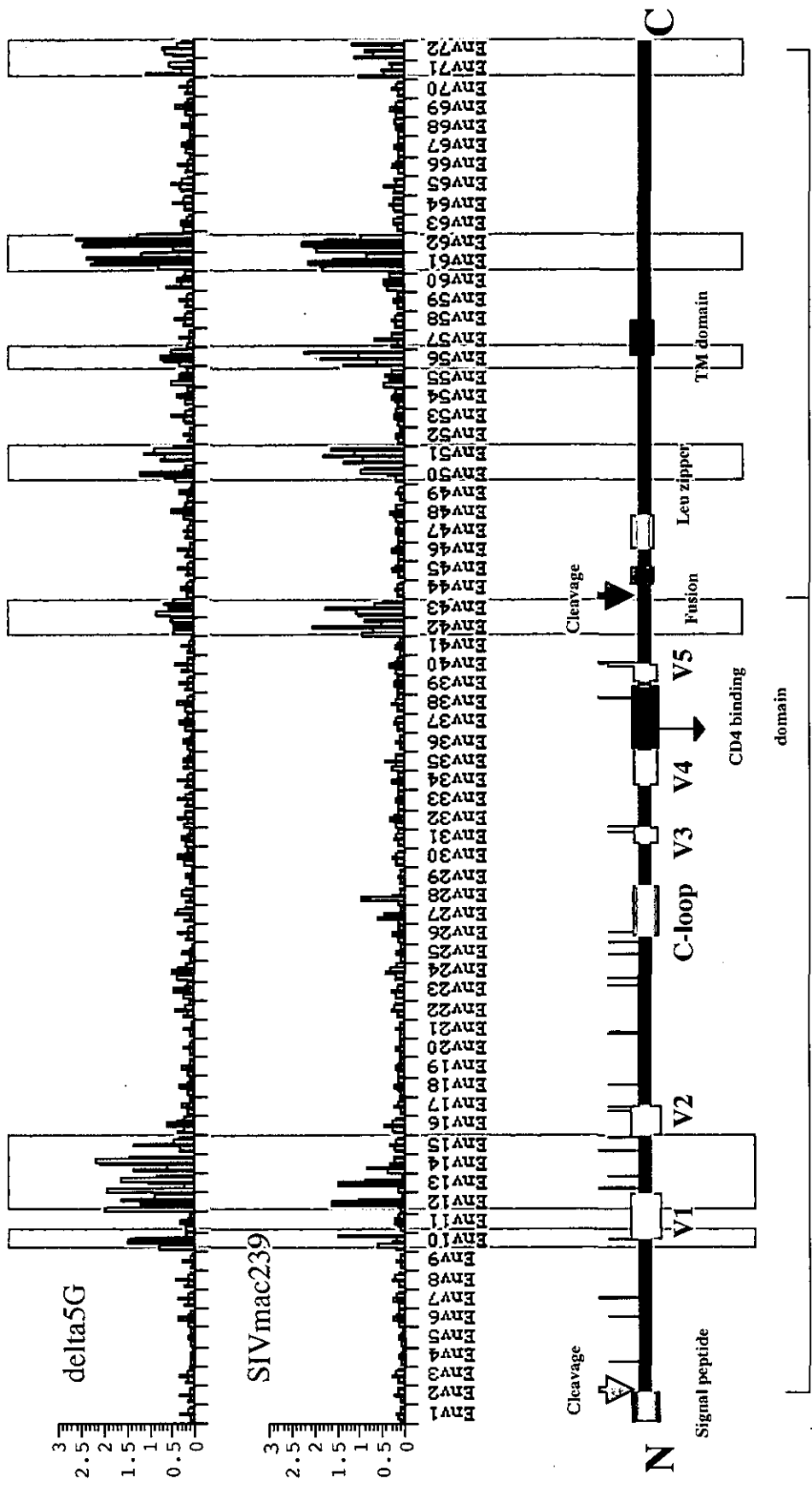


図4 Env ペプタイド ELISA による抗体エピソードの比較
 横軸に ELISA プレートに固相化した 72 本の Env オーバーラッピングペプチド、縦軸にそれぞれのペプチドに対する抗体反応性を ELISA における 490nm の吸光度を示した。7 カ所の抗体反応ドメイン (ブルー枠) が存在した。下段にはペプチド番号と対応するように Env の構造を示した。

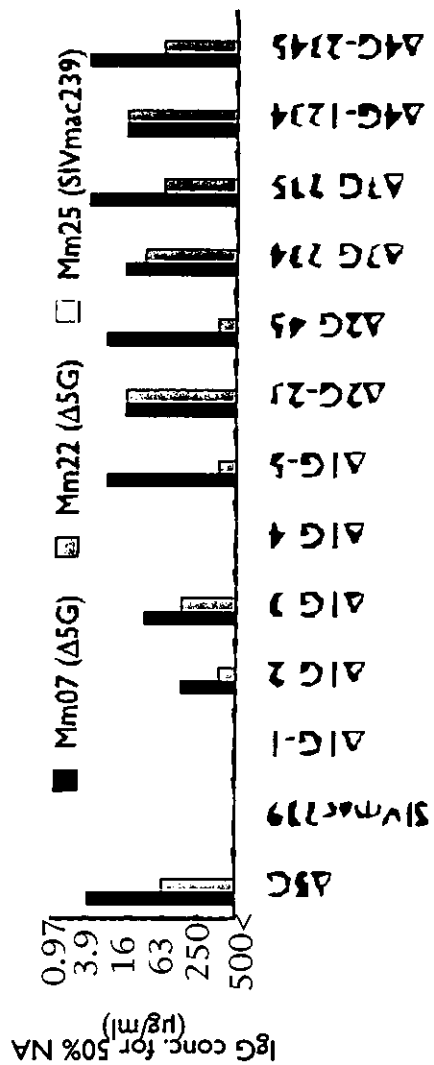
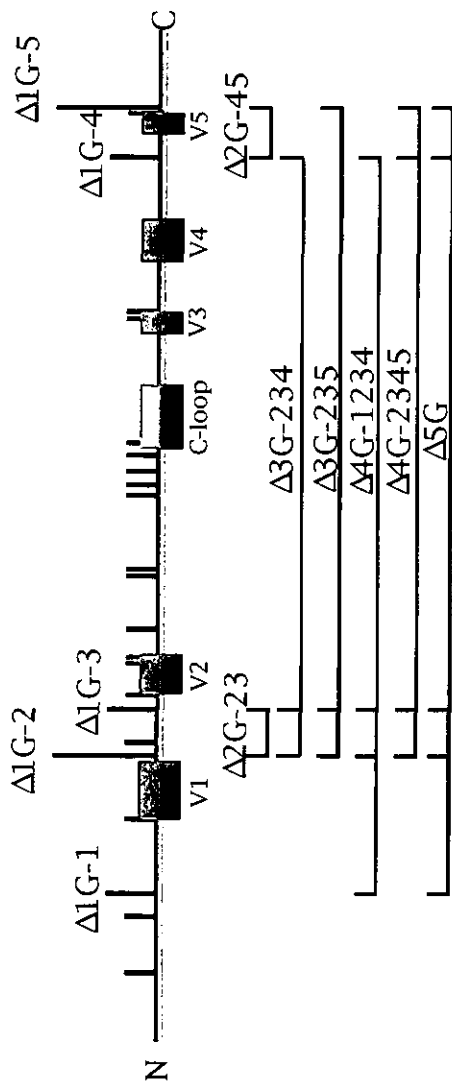


図5 糖鎖欠失と中和抗体による認識

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）
分担研究報告書

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

分担研究者 俣野 哲朗 東京大学大学院医学系研究科微生物学講座助教授

研究要旨

エイズ発症阻止を目的とした抗エイズ薬開発研究において、エイズ発症機序・宿主防御免疫機構の解明は最重要課題であるが、そのためには動物モデルを用いた宿主レベルでの解析が必要である。さらに、抗エイズ薬評価過程においても、前臨床試験としての動物モデルでの解析は必要不可欠である。しかし、現状で最適のエイズモデルとされているサル免疫不全ウイルス(SIV)感染サルモデルは、エイズ発症に密接に関与するサル宿主因子の情報不足のため、その解析・評価に十分なレベルに達していない。そこで我々は、抗エイズ薬開発のための解析・評価系としてのサルエイズモデルの確立を目的として、サル宿主因子及びそのエイズ発症への関与についての解析を行うこととした。第一に解析する宿主因子としては、HIV 感染制御に中心的役割を担っている細胞性免疫に関連して最も重要と考えられる組織適合性抗原(MHC)を選択した。本研究では、分担研究者の木村・宮澤らの解析により MHC ハプロタイプの明らかになった 1 頭の親サル R90-120 の子孫サルを対象を絞って解析を進め、我々の開発した DNA プライム/Gag 発現センダイウイルスベクターブースト(DNA/SeV-Gag)ワクチン接種実験及び SIV チャレンジ実験を行って、MHC とそれに規定されるエピトープ特異的 CD8 陽性 T リンパ球(CTL)反応の SIV 複製制御への関与について検討した。まず、エピトープ検索システムを樹立し、R90-120 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(90-120-1a)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 90-120-1a 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。本研究は、個体レベルでのワクチン誘導 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とともに、MHC・エピトープ情報の確立したサルエイズモデルの重要性・必要性を示している。

A. 研究目的

エイズ発症阻止を目的とした抗エイズ薬の開発には、(1)エイズ発症機序・防御免疫機構の解明、(2)新規エイズ発症阻止手法(ワクチン・治療薬)の開発、(3)新規手法の評価、の 3 つの過程が必要である。(1)のエイズ発症機序・防御免疫機構の解明には、細胞レベルだけでなく個体レベルでの研究が必須であり、動物モデルにおける解析が重要な役割を担っている。さらに、(3)の評価過程においても、前臨床試験としての動物モデルでの解析は必要不可欠である。しかし、現状で最適のエイズモデルとされているサル免疫不全ウイルス(SIV)感染サルモデルは、ウイルス複製・エイズ発症に密接に関与する宿主因子の情報不足のため、エイズ発症機序の解析あるいは抗エイズ薬の評価に十分なレベルに達していない。そこで我々は、抗エイズ薬開発のための解

析・評価系としてのサルエイズモデルの確立を目的として、サル宿主因子及びそのエイズ発症への関与についての解析を行うこととした。

HIV 複製制御においては、ウイルス特異的細胞傷害性 T リンパ球(CTL)をはじめとする細胞性免疫が中心的役割を果たしていると考えられている。そこで本研究では、第一に解析するサル宿主因子として、細胞性免疫の解析の最も基本となる組織適合性抗原(MHC)を選択し、MHC 遺伝子多型と MHC 拘束性 SIV エピトープの検索及びエピトープ特異的 T リンパ球の SIV 複製制御への関与についての解析を開始した。この 3 年間は、第一段階として、交配用親アカゲサルを 1 頭選択し、その親サル由来のアカゲサルを対象を絞って研究を進めることとした。具体的には、我々の開発した DNA プライム/Gag 発現センダイウイルスベクターブースト

(DNA/SeV-Gag)ワクチン接種実験及び SIV チャレンジ実験を行って、MHC とそれに規定されるエピトープ特異的 CTL 反応の SIV 複製制御への関与について検討した。

B. 研究方法

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 ワクチンプライムとしては、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- γ 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 ブースト後 13 週目に 1000 TCID₅₀ の SIVmac239 を静注した。

チャレンジ後、末梢血液中のリンパ球数測定、血漿中 SIV RNA コピー数定量などを行った。さらに、5 週目の血漿中 SIV RNA gag 領域を RT-PCR にて増幅し (数クローンについて) 塩基配列を調べた。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は、倫理面も含めて、国立感染症研究所動物実験委員会の審査を受け、その承諾を得てから、国立感染症研究所筑波霊長類センターにて開始した。

C. 研究結果

分担研究者の木村・宮澤の解析により、本研究に使用した R90-120 子孫アカゲサルの MHC-I および MHC-II ハプロタイプパターンが明らかとなった (表 1)。全 11 頭のうち、R90-120 の一方の MHC ハプロタイプ (MHC-I: 90-120-Ia, MHC-II: 90-120-IIa; ハプロタイプ a と記載する) を有するサル

が 6 頭、もう一方の MHC ハプロタイプ (MHC-I: 90-120-Ib, MHC-II: 90-120-IIb; ハプロタイプ b と記載する) を有するサルが 2 頭、R90-120 由来の MHC ハプロタイプを有しない (ハプロタイプ c と記載する) サルが 3 頭であった (平成 13-15 年度)。

この R90-120 由来のアカゲサルのうち、9 頭 (ハプロタイプ a - 5 頭、ハプロタイプ b - 2 頭、ハプロタイプ c - 2 頭) に対し、DNA/SeV-Gag ワクチン接種を行った。SIVmac239 Gag エピトープ検索法を樹立し、この手法を用いて、いくつかの SIV Gag CTL エピトープ領域を明らかにした。その中で、特に高いレベルの CTL 誘導が認められたエピトープ Gag207-216 を同定した。このエピトープ特異的 CTL は、ワクチン接種サル 9 頭のうち、ハプロタイプ a を有する 5 頭にのみ共通に認められたが、残りの 4 頭には認められなかった。したがって、この CTL エピトープ Gag207-216 は、R90-120-Ia 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 (平成 13-14 年度)。

SIVmac239 チャレンジ実験は、ワクチン接種サルのうちの 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 (図 1)。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、血漿中 SIV RNA コピー数がピーク時においても 10^6 を下回り、その後の set-point 期には検出下限以下で、対照群と比較して極めて低い値を示した。つまり、この 3 頭では、感染初期の setpoint 期において SIV 複製が制御された (図 1)。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) の中では、ハプロタイプ c 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 (図 1) (平成 15 年度)。

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は、SIV 複製制御を示したサル 4 頭の中に、1 箇所のアミノ酸変異が認められた。このうち、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) で、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 (平成 15 年度)。

D. 考察

我々が日本で使用しうる東南アジア系（中国系等）アカゲサル SIV 感染モデルは、欧米で主に使用されているインド系アカゲサル感染モデルと比較して、ウイルス量・発症経過等の点でよりヒト HIV-1 感染症に近いモデルであることが示唆されている。本研究は、この東南アジア系アカゲサルの宿主因子の解析を世界に先駆けて行うものであり、その成果は最も優れたエイズモデルの確立に直結すると期待される。

木村・宮澤による MHC の解析結果から、我々の用いたサルの MHC 遺伝子型は、インド系アカゲサルのもものと比較して異なっているものが多いことが明らかとなった。そこで、MHC に規定されるエピトープについても、今回同定されたような新たなものが今後次々と同定されると考えられる。エピトープ特異的 CTL の違いによるウイルス複製制御能の違いについては指摘されていることから、東南アジア系アカゲサルを用いた独自のエイズモデルにおいて、新たに同定したエピトープ特異的 CTL のウイルス複製制御能を検討していくことは極めて重要である。

SIV チャレンジ実験においては、まず、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、wild-type 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。

HIV 複製抑制における CTL の重要性が指摘されて以来、CTL 誘導型エイズワクチン開発研究が精力的に進められてきた。しかし、「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、答が得られていなかった。このような状況下において、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示している。

E. 結論

1 頭の親サル R90-120 の子孫サル 11 頭について、DNA/SeV-Gag ワクチン接種実験及び SIV チャレンジ実験を行って、MHC とそれに規定されるエピトープ特異的 CTL 反応の SIV 複製制御への関与について検討した。エピトープ検索システムを樹立し、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。ワクチン接種サルに対する SIVmac239 チャレンジ実験では、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が示され、さらに Gag207-216 特異的 CTL の SIV 複製制御への関与が明らかとなった。本研究は、個体レベルでのワクチン誘導 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とともに、MHC・エピトープ情報の確立したサルエイズモデルの重要性・必要性を示している。

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表

1 論文発表

- (1) Matano, T., Kano, M., Nakamura, H., Takeda, A., and Nagai, Y. Rapid appearance of secondary immune responses and protection from acute CD4 depletion after a highly pathogenic immunodeficiency virus challenge in macaques vaccinated with a DNA-prime/Sendai viral vector-boost regimen. *J. Virol.* 75:11891-11896, 2001.
- (2) Kano, M., Matano, T., Kato, A., Nakamura, H., Takeda, A., Suzuki, Y., Ami, Y., Terao, K., and Nagai, Y. Primary replication of a recombinant Sendai viral vector in macaques. *J. Gen. Virol.* 83:1377-1386, 2002.
- (3) Kano, M., Matano, T., Kato, A., Shioda, T., and Nagai, Y. Induction of HIV-1-specific neutralizing antibodies in mice vaccinated with a recombinant Sendai virus vector. *Jpn. J. Infect. Dis.* 55:59-60, 2002.
- (4) Matano, T. Recent advances in AIDS vaccine preclinical trials: challenges against the chronic disease. *Current Topics in Virology* 2:179-185, 2002.
- (5) Matano, T., Kano, M., Takeda, A., Nakamura, H., Nomura, N., Furuta, Y., Shioda, T., and Nagai, Y. No significant enhancement of