

200400650A

厚生労働科学研究費補助金
エイズ対策研究事業

HIV 感染予防に関する研究班

平成16年度 総括・分担研究報告書

平成17年3月

主任研究者

佐多 徹太郎

(国立感染症研究所)

平成16年度エイズ対策研究事業
「HIV感染予防に関する研究」班
班員名簿

研究者名	所属機関	職名
佐多徹太郎	国立感染症研究所感染病理部	部長
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
三浦 智行	京都大学ウイルス研究所・感染症モデル研究センター	助教授
本多 三男	国立感染症研究所エイズ研究センター・第一研究グループ	グループ長
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
庄司 省三	熊本大学大学院・医学薬学研究部・薬学生化学分野	教授
向井鎌三郎	国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センター	室長
保富 康宏	三重大学医学部・生体防御医学講座	助教授
神奈木真理	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科・免疫治療学研究室	教授
牧野 正彦	国立感染症研究所・ハンセン病研究センター・病原微生物部	部長
横田 恭子	国立感染症研究所免疫部	室長
横幕 能行	千葉大学医学部附属病院・感染症管理治療部	助手
中島 典子	国立感染症研究所感染病理部	主任研究官
高橋 秀実	日本医科大学医学部・微生物学免疫学教室	教授

目 次

1. HIV 感染予防に関する研究
総括研究報告書（平成 16 年度） 1
主任研究者：佐多 徹太郎（国立感染症研究所感染病理部）

2. プライムブーストワクチンによる誘導免疫の慢性エイズ発症防御効果
に関する研究 5
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）

3. 遺伝子改変 SHIV を用いた弱毒生ワクチンと半生 DNA ワクチンの開発 11
分担研究者：三浦 智行（京都大学ウイルス研究所）

4. BCG と DIs ワクチンの実用化に関する研究 17
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）

5. 糖鎖変異ウイルス感染に対する免疫応答の解析とワクチンへの応用 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）

6. HIV-1 coreceptor の特殊立体構造に対する自己抗体誘導による
HIV-1 感染防止法の開発 31
分担研究者：庄司 省三（熊本大学大学院医学薬学研究部薬学生化学）

7. SAIDS 脳炎発症動物モデルを用いたワクチン開発
（SAIDS ウイルスによる免疫修飾） 37
分担研究者：向井 鏝三郎（国立感染症研究所筑波霊長類センター）

8. α 抗原を用いたワクチンの増強作用に関する研究 45
分担研究者：保富 康宏（三重大学医学部）

9. T細胞機能分子を介する HIV-1 感染防御	5 1
分担研究者：神奈木 真理（東京医科歯科大学医歯学総合研究科）	
10. 樹状細胞の DC-SIGN と感染防御機構	5 5
分担研究者：牧野 正彦（国立感染症研究所病原微生物部）	
11. 強力なワクチン効果を賦与するためのT細胞活性化因子の解析	5 9
分担研究者：横田 恭子（国立感染症研究所免疫部）	
12. CTL による防御免疫の評価系に関する研究	6 5
分担研究者：横幕 能行（千葉大学医学部附属病院）	
13. 神経幹細胞を用いた HIV 感染動態の解明	6 9
分担研究者：中島 典子（国立感染症研究所感染病理部）	
14. HGV のエイズ発症遅延機構の解明に関する研究	7 3
分担研究者：佐多 徹太郎（国立感染症研究所感染病理部）	
15. 母乳細胞による DC-SIGN を介した HIV-1 感染伝播の可能性	8 1
分担研究者：高橋 秀実（日本医科大学微生物学免疫学教室）	

I. 総括研究報告書

1. 総括研究報告書

主任研究者：佐多徹太郎（国立感染症研究所感染病理部・部長）

研究要旨 エイズ克服には HIV 感染の予防に優るものはなく、なかでもワクチン開発が最重要課題である。一方で防御免疫機構やいまだ明らかではない HIV 感染病態の解明は、ワクチン開発のみならず HIV 感染予防にとっても重要な課題となる。本研究班の課題として以下の3つを柱として行った。1) サルを用いた有効かつ安全なワクチン開発研究では、MVA よりも DIs の有効性と安全性に関するデータが得られ、またウイルス複製制御における CTL のエピトープ変異が明らかにされた。強毒及び弱毒 SHIV クロンの病原性の違いについて gp41 上の 1 箇所の変異の重要性が、また感染制御には強い防御免疫との関係が明らかにされた。自己抗体誘導型ワクチンの効果がサル実験で得られた。2) ワクチン免疫による防御機構の解明に関する課題では、HIV 複製抑制シグナルの研究が進み、ほか興味ある結果が得られた。3) いまだあきらかとなっていない HIV 感染病態の解析に関する課題では、クローン化 HGV の HIV-1 感染抑制効果が一部で確認され、神経幹細胞を用いた研究でエントリーの違いが明らかにされた。また HIV-1 の母乳感染機構が明らかにされた。進捗状況には程度の差があるものの、全体としてはほぼ順調に研究が進んだと思われ、来年度の結果に期待できる。

分担研究者名：

俣野哲朗（東京大学大学院医学研究科助教授）
三浦智行（京都大学ウイルス研究所感染症モデル研究センター助教授）
本多三男（国立感染症研究所エイズ研究センター室長）
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）
庄司省三（熊本大学大学院医学薬学研究部教授）
向井鑠三郎（国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センター室長）
保富康宏（三重大学医学部助教授）
神奈木真理（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科教授）
牧野正彦（国立感染症研究所ハンセン病研究センター部長）
横田恭子（国立感染症研究所免疫部室長）
横幕能行（千葉大学医学部附属病院感染症管理治療部助手）
中島典子（国立感染症研究所感染病理部主任研究官）
高橋秀美（日本医科大学医学部微生物学免疫学教授）

A. 研究目的

HAART の開発により HIV 感染者の予後は改善されたが、コンプライアンスやコストそして薬剤耐性などの問題があるため、エイズ克服には HIV 感染の予防に優るものはなく、なかでもワクチン開発が最重要課題である。一方で防御免疫機構やいまだ明らかではない HIV 感染病態の解明はワクチン開発のみならず HIV 感染予防にとって重要な課題である。本研究班ではわが国のサルを用いたエイズワクチン研究者や HIV 感染防御免疫機構や HIV 感染病態研究者による HIV 感染予防を目的とした研究を推進することにより、ヒトでの実用化に耐えるワクチンの開発をめざした研究を行うことを目的とする。

B. 研究方法

1) サルを用いた有効かつ安全なワクチン開発研究：組換え MVA ワクチンと組換え DIs ワクチンについて抗原発現、培養細胞のホストレンジ、免疫原性、安全性を比較検討した（本多）。H16 年度の DNA プライム・Gag 発現 SeV(SeV-Gag) プーストワクチン接種後の SIVmac239 チャレンジ実験にて、感染初期の SIV 複製制御が認められたサルを対象として、

感染慢性期の CTL 解析を行なった (俣野)。強毒及び弱毒 SHIV 分子クローンについて塩基配列の違いと病原性との関係を調べた (三浦)。Env ワクチン接種 SIV 感染サルへの SIVmac239 のチャレンジ感染の解析と $\Delta 5G$ と関連の変異ウイルスと SIVmac239 の細胞指向性、co-receptor usage、中和抗体感受性について調べた (森)。環状ペプチドをサル 3 頭の腹腔内に 2 回免疫し、血清中の HIV-1 効果を調べた。また免疫サルにウイルスを challenge した (庄司)。免疫異常を示す実験に使用されるサルの SRV/D 感染を調べた。(向井)。

2) ワクチン免疫による防御機構の解明: 酵母菌でのリコンビナント a 抗原蛋白の作成を試みた (保富)。CD28 ファミリー分子 (CD28 と ICOS) を介する HIV-1 複製抑制効果についてさらに詳しく解析した (神奈木)。各種抗酸菌の GFP 発現菌株を作成し、DC-SIGN 安定発現細胞株および非発現親株に感染させ、菌体の細胞内移行性、細胞内増殖性の解析を行った (牧野)。ウイルス抗原を提示する樹状細胞と T 細胞の共培養の系において抗原特異的な T 細胞反応の経過を増殖と IFN- γ 産生を指標に解析した (横田)。gag-pol 迅速クローニングシステムを使用し、gag の塩基配列を解析した。env 発現系の開発を目的として Gateway system を改変して tat, rev, env, vpu を含む領域を簡便にクローニング可能なシステム構築した (横幕)。

3) いまだあきらかとなっていない HIV 感染病態の解析: 全長 HGV DNA の改良型を構築し、HGV のウイルス産生の増強を試みた。またこの HGV クローンが有する 5'UTR の IRES 活性を、今回新たに樹立した dual luc reporter IRES assay を用いて比較検討した。ヒトリンパ球を用いた HGV/HIV-1 の共感染実験も行った (佐多)。サル胎児脳から分離培養した神経幹細胞に細胞向性の異なる SIV クローンを感染し、ニューロンやグリアに直接及ぼす影響について調べた (中島)。出産後 6-10 日の初乳を入手し、その中に含有される細胞群を解析し、母乳感染の主体である R5 型 HIV-1 に対する感受性等を追跡した (高橋)。

(倫理面への配慮)

健常人の末梢血単核球、初乳や感染者の検体の利用に関しては研究倫理委員会の承認を受け、インフォームドコンセントを得た上で提供を受けた。動物実験は、各施設の動物実験委員会の審査をうけ、その承認を得た。研究の実施

にあたっては、動物愛護の精神で動物に与える苦痛の軽減と排除に勤めた。以上、関連する医学研究倫理指針を遵守した。

C. 研究結果

1) サルを用いた有効かつ安全なワクチン開発研究: MVA は RK13 細胞以外の細胞株で増殖し SIV の発現が認められたが、組換え DIs ワクチンでは鶏の線維芽細胞のみで増殖し、また増殖を示さないほ乳類細胞の中で強い SIV 抗原を発現した。マウスにおける免疫誘導能では同程度であったが、有意なブースター効果が認められた。組換え BCG ワクチンの有用性をサルで明らかにした (本多)。感染初期の SIV 複製制御が認められたサル 5 頭のうち 3 頭では、ほぼ 2 年間にわたる観察期間中、複製制御は維持された。一方、残りの 2 頭では約 60 週目の時点でウイルス血症が再度認められた。この 2 頭は MHC ハプロタイプ 90120-a を共有する 3 頭のうちの 2 頭であった。慢性期におけるこの 3 頭のウイルスゲノム gag 領域の塩基配列解析では、複製制御を維持した 1 頭には感染初期に選択された CTL エスケープ変異 L216S のみしか認められなかったが、複製制御を維持できなかった 2 頭には少なくとも 2 つ以上のさらなる CTL エスケープ変異の追加が認められた (俣野)。強毒 SHIV-KS661 と弱毒 SHIV-cl 64 のゲノム上の塩基配列の違いは 16 ケ所であったが、このうち感染サル個体における病原性に関わることが示唆されたのは計 4 ケ所であり、中でもウイルスの感染力を数十倍高める env gp41 の 1 ケ所の変異が最も重要と考えられた (三浦)。SIVmac239 長期非発症サル、DNA ワクチンによる感染制御サルの解析から、生ワクチンによる強い防御免疫は感染制御との関連性が見いだされ、また $\Delta 5G$ のどの糖鎖欠失変異がウイルスの細胞指向性、中和抗体感受性に変化を与えることを明らかにした (森)。免疫後 4-6 週目から抗体価の上昇が認められ、11 週目にウイルスを challenge した結果、免疫サルの viral load はコントロールに較べて $2\log\sim 3\log$ の感染防御効果が認められた。免疫血清は clade B の R5 ウイルスのみならず、non-clade B の R5 ウイルスに対しても感染防止効果を示したが、X4 ウイルスに対しては効果がなかった (庄司)。抗体産生低応答サルおよび組織病理学的に異常が認められたサルはいずれも抗 EB ウイルス抗体陽性で且つ SRV/D

の活性化がみられた(向井)。

2) ワクチン免疫による防御機構の解明: 酵母菌でのリコンビナント α 抗原蛋白の作成はコドン改変を行うことで成功し、この蛋白は Th1 タイプの免疫反応を誘導するアジュバント活性を持っていた(保富)。ICOS を介する HIV-1 抑制は抗体添加でも可溶性ナチュラルリガンド (B7h-Fc) 添加でも再現することができた。抑制ステップはウイルス複製初期であるが、HIV-1 レセプター発現変化によるものではない。また、ICOS 下流の HIV-1 抑制につながるシグナルは少なくとも NF κ B 経路を介することが分かった(神奈木)。各種の GFP 標識細菌株により、DC-SIGN を使用しないとされていた *M. avium* も DC-SIGN を介し細胞内へ感染していることが示された。非病原性抗酸菌は利用していなかった(牧野)。樹状細胞と T 細胞の共培養系において抗原特異的な反応を幅広く解析できる IFN- γ 活性検出レンチウイルスベクターを構築し、その実用化の可能性を示した(横田)。92 クローンで gag のほぼ全長の解析が終了し、P24 中に CTL に認識される 15 mer の peptide が複数確認された。新しい CTL epitope を gag 上に同定した 1 ステップで env 発現ベクターにクローニング可能なプラスミド pFG01 を構築し、組み換えた HIV-1 は感染性と増殖性を共にもっていた(横幕)。

3) いまだあきらかとなっていない HIV 感染病態の解析: HGV 5' UTR (ゲノタイプ 3 型) の IRES 活性は HCV 5' UTR に比べて 100 倍程度低いことが判明した。また HGV 複製中間体であるマイナス鎖 RNA を細胞内及び上清中で検出することに成功した。更にヒトリンパ球での HIV-1 感染実験において HGV による HIV-1 複製抑制が観察された(佐多)。サル神経幹細胞に種々の SIV クローンを感染させたところ神経向性の SIV17E-Fr が高い感染性を示し培養上清中に感染性ウイルスが検出された。SIV17E-Fr Δ nef-GFP を感染させると GFP 陽性細胞はアストロサイトやニューロンであった。神経向性はエントリーの段階で決定され、env の表面糖タンパク質に規定されていた(中島)。初乳中の細胞の主体は CD4+CD14+ のマクローファージ型細胞であり、同時に DC-SIGN を発現し、その発現は IL-4 の添加により増強した。そしてこの DC-SIGN 発現細胞は DC-SIGN を介して R5 型 HIV-1 を捕捉・保持することにより感染伝播の主役を演ずることを見出した。胃

酸条件下でも感染力が残ることが判明した(高橋)。

D. 考 察

サルを用いたワクチン開発研究では、本年度、本多による組換え BCG と組換え DIIs によるプライムブーストワクチンについて、後者の有効性と安全性に関する研究結果が得られた。世界では MVA が主流となっているが比較研究により DIIs の方がより安全性の高いデータが得られた。また、組換え BCG については昨年度に米国の研究グループによって BCG 東京株が HIV 感染新生児においても他の株と異なり病原性を示さないことが明らかとなり、ヒト投与量での組換え BCG の安全性に関するデータが発表されている。より至適化されたワクチン候補の開発が進んでいるので来年度の研究に期待したい。俣野による研究結果で、SIV 複製制御を維持できなかった 2 頭では CTL エスケープ変異の蓄積により複製制御が失われたことが示唆された。この結果は今回の実験で観察された SIV 複製制御に複数の CTL が関与していることを意味しており、このメカニズムの解明は CTL 誘導型ワクチン開発に重要なデータとなろう。三浦による SHIV クローンの病原性の違いの解析により、感染個体レベルでの病原性に重要と考えられる過程がわかってきたので今後の病原性分子機構の解明が進むと考えられる。森によるデータは、Viral load が維持されている感染制御サルにおいては防御免疫が維持されていると考えられたが、現在詳細な解析が進んでいるので、最終年度にはこのメカニズムの解明が行われることが期待される。庄司によるユニークな自己抗体型ワクチンとして、本年度に R5 型の HIV-1 の感染を阻止できる特殊抗体の誘導と viral load の抑制が明らかとなったが、今後は経口粘膜免疫ワクチン開発が必要であろう。

アジュバントとしての組換え α 抗原蛋白の作製、HIV 複製抑制シグナルを伝える T 細胞表面分子の解析、DC-SIGN の解析と抗酸菌の重複感染機構、樹状細胞を中心とした抗原特異的反應の解析、臨床 HIV-1 株の CTL 回避機構の課題は程度は異なるものの、それぞれ進み、来年度の結果に期待できる。また、不明の HIV 感染病態の解析では、HGV の解析が進み preliminary ではあるが HIV-1 感染を抑制した。神経幹細胞での解析結果も出てきた。高橋によ

る HIV-1 の母乳感染機構の研究結果にもとづいて、来年度にその感染防止策に関するデータを期待したい。

E. 結 論

MVA との比較において DIs の安全性が有意に優れていることが明らかにされ、さらに BCG 東京株を用いた組換え BCG ワクチンの安全性も明らかとなった。SIV 複製制御において複数のエピトープ特異的 CTL の関与が示され、エイズワクチン開発研究において、複数のエピトープ特異的 CTL を誘導することの重要性が示された。強毒/弱毒 SHIV の比較ゲノム・病態解析は感染個体レベルでの病原性分子機構の解明がワクチン開発に役に立つと思われる。感染制御の機序の解明が生ワクチン以外のワクチン開発には必須である。in vitro の系を用いてワクチン抗原の免疫誘導能の評価およびその効率の改善を種々の点で図ることは種々の感染症対策としても有用になるであろう。

F. 健康危険情報

とくになし。

G. 研究発表

1. 論文発表

各分担研究者の報告書の項を参照。

2. 学会発表

各分担研究者の報告書の項を参照。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

俣野、本多、庄司、保富の各分担研究者の報告書の項を参照。

2. 実用新案登録

なし。

II. 分担研究報告書

2. プライムブーストワクチンによる誘導免疫の慢性エイズ発症防御効果に関する研究

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

研究概要 HIV 感染症では、感染後に誘導される宿主適応免疫反応によってもウイルスが排除されきらず、慢性持続感染が成立することが重大な問題である。この慢性持続感染の成立阻止を目的とした予防エイズワクチンの開発は、国際的最重要課題の一つであり、その開発の方向性を定めるための論理的基盤の確立が急務である。適応免疫系のエフェクターとしては、細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) が HIV 複製抑制に中心的役割を担っていることが知られているが、HIV 感染自然経過においては、CTL が誘導されるにもかかわらず HIV 複製の制御には至らず慢性持続感染が成立する。そこで本研究では、予防エイズワクチン開発のための論理的基盤の確立を目的として、ワクチン誘導 CTL による HIV 複製制御の可能性の検証を行なうこととした。昨年度は、DNA プライム・Gag 発現センダイウイルスベクターブーストワクチン接種サルへのサル免疫不全ウイルス SIV_{mac239} チャレンジ実験を行ない、ワクチン誘導 CTL による SIV 複製制御の可能性を初めて示すことに成功した。さらに今年度は、ワクチン接種により SIV 複製制御が認められたサル 5 頭の長期解析を行なった。このうち 3 頭では、チャレンジ後 2 年の時点においても、血漿中ウイルス量は検出下限以下で、SIV 複製制御は維持されていた。一方、残りの 2 頭では、チャレンジ後約 60 週目の時点でウイルス血症が再出現した。SIV *gag* 領域の塩基配列の解析から、この 2 頭では、複数の CTL エスケープ変異の蓄積により複製制御不能となったことが示され、本実験で観察された SIV 複製制御には、複数のエピトープ特異的 CTL が関与していたと考えられた。本研究は、CTL 誘導ワクチン接種による長期の HIV 複製制御の可能性を初めて示すとともに、エイズワクチンにおいて、有能な複数のエピトープ特異的 CTL を誘導することの重要性を示している。

A. 研究目的

1980 年代前半のエイズ症例の報告以来、HIV 感染者数は増加の一途をたどっており、エイズワクチン開発は国際的最重要課題の一つである。エイズワクチン開発研究が困難を極めている要因として、HIV 感染症が慢性持続感染症であることは重要なポイントである。つまり、自然感染経過において、宿主適応免疫反応が誘導されるにもかかわらずウイルス複製の制御には至らず、ウイルス血症が継続してしまうことが問題である。そのため、予防エイズワクチン開発には、初感染の模倣を基本とする従来のワクチンを超えた新たな視点が必要である。したがって、「どのような免疫誘導が HIV 複製制御につながりうるか」という基本的課題を解決

し、エイズワクチン開発のための論理的基盤を確立することが急務であり、開発への近道である。

1990 年代に、HIV 複製抑制におけるウイルス特異的細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) の重要性が指摘されたことから、CTL 誘導型エイズワクチン開発研究が進展し、2000 年代になって、サルヒトキメラ免疫不全ウイルス (SHIV89.6P) 感染急性エイズモデルでの前臨床試験において、ワクチンによるウイルス複製制御が可能であることが報告された。しかしその後、同じワクチン手法を用いた研究にて、ヒト HIV 感染症をより反映すると考えられるサル免疫不全ウイルス (SIV) 感染サル慢性エイズモデルでのウイルス複製制御は困難である

ことが報告され、元来宿主免疫が制御できない慢性ウイルス持続感染症の制御の難しさがあるため認識されたところである。

我々はこれまで、CTL 誘導を基本とするエイズワクチン開発に主眼をおき、国際的にも有数の CTL 誘導能を有する DNA プライム・センドライウイルス (SeV) ベクターブーストワクチンシステムを開発し、SHIV89.6P 感染サル急性エイズモデルにおける有効性を明らかにしてきた。本研究では、予防エイズワクチン開発のための論理的基盤の確立を目指し、ワクチン誘導 CTL による HIV 複製制御の可能性の検証を行なうことを目的として、SIVmac239 感染サル慢性エイズモデルにおいて、DNA プライム・Gag 発現 SeV (SeV-Gag) ベクターブーストワクチンの SIV 複製抑制効果について解析することとした。

昨年度 (平成 15 年度) は、DNA プライム・SeV-Gag ブーストワクチン接種サル 8 頭への SIVmac239 チャレンジ実験を行ない、そのうち 5 頭において SIV 複製が制御されることを報告した。これら 5 頭では、チャレンジ後約 1 ヶ月という非常に早期に、各々 1 つの CTL エスケープ変異が選択されていた。このうち、主要組織適合性抗原 (MHC) ハプロタイプ 90-120-a を共有するサル 3 頭では、ある共通の CTL エスケープ変異が選択されていた。この変異は、SIV Gag の 216 番目 (Gag216) のロイシンからセリンへのアミノ酸置換に結びつくもので、Gag206-216 特異的 CTL に対するエスケープ変異であった。したがって、これら 3 頭では、Gag206-216 特異的 CTL が野生型 SIV の早期排除に中心的役割を果たし、その結果、この CTL に対するエスケープ変異が選択されたと考えられた。

今年度 (平成 16 年度) は、これら SIV 複製制御が認められたワクチン接種サル 5 頭の長期解析を行ない、ワクチン誘導 CTL による SIV 複製制御の維持の有無について検討した。

B. 研究方法

昨年度報告した DNA プライム・SeV-Gag ブーストワクチン接種後の SIVmac239 チャレン

ジ実験にて、感染初期の SIV 複製制御が認められたアカゲサル 5 頭について、チャレンジ後約 2 年までの長期解析を行なった。まず、経時的に採取した血液より分離した血漿中の SIV RNA コピー数を定量した。また、血漿より抽出した RNA をもとに、nested RT-PCR により SIV gag 領域を含む DNA 断片を増幅し、プラスミドにクローニングした後、その塩基配列を調べた。各サンプルにつき約 10 クローンの塩基配列解析を行なった。血漿中 SIV RNA 量が検出下限以下の場合、血液より分離した末梢血単核球より抽出した DNA をもとに、nested PCR により SIV gag 領域を含む DNA 断片を増幅し、上記と同様にプラスミドにクローニングした後、その塩基配列を調べた。抗原 (ペプチド) 特異的 T リンパ球レベルの測定は、抗原刺激後誘導されるインターフェロン γ の細胞内染色検出により行なった。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は、倫理面も含めて、国立感染症研究所および東京大学大学院医学系研究科の動物実験委員会の審査をうけ、その承認を得てから、筑波霊長類センターにて開始した。また、用いた組換え体等については、第二種使用等拡散防止措置確認申請承認 (大臣確認) 済みである。

C. 研究結果

感染初期の SIV 複製制御が認められたワクチン接種サル 5 頭のうち、3 頭では、チャレンジ後 8 週目以降、血漿中 SIV 量は検出下限以下のままであり、約 2 年目の時点においても、SIV 複製制御は維持されていた (図 1)。一方、残りの 2 頭 (R01-007, R02-012) では、8 週目以降ほぼ 1 年にわたって血漿中 SIV 量は検出下限以下で、SIV 複製制御は維持されていたが、約 60 週目の時点でウイルス血症が再出現し、SIV 複製の制御が不能となった (図 1)。

この 2 頭は、MHC ハプロタイプ 90-120-a を共有するワクチン接種サル 3 頭うちの 2 頭であった。そこで、90-120-a 共有サル 3 頭について、チャレンジ後約 1 年 2 ヶ月の時点の SIV gag 領

域の塩基配列を調べ、約2ヶ月の時点の塩基配列と比較した(表1)。3頭とも、約2ヶ月の時点では、優位となっている変異は、1つのCTLエスケープ変異(Gag216)のみであった。SIV複製制御が維持されたサルR02-003では、約1年2ヶ月の時点でも、優位となっている変異は他になく、Gag216変異のみであった。一方、SIV複製制御が維持できなかったサルR01-007では、約1年2ヶ月の時点で、Gag216変異の他に優位となっている変異が4ヶ所増えていた。このうち2つの変異(Gag244、Gag247)は、Gag 240-250番目付近をエピトープとするCTL(SG#56特異的CTLと呼ぶ)からのエスケープ変異であった。また、別の1つの変異(Gag373)は、Gag 370-380番目付近をエピトープとするCTL(SG#87特異的CTLと呼ぶ)からのエスケープ変異であった。SIV複製制御が維持できなかったサルR02-012でも、約1年2ヶ月の時点で、Gag216変異の他に優位となっている変異が2ヶ所増えていた。このうち1つの変異(Gag244)は、R01-007で認められたのと全く同じCTLエスケープ変異であった。また、もう1つの変異(Gag375)も、R01-007で認められたGag373と同じエピトープ(SG#87)特異的CTLに対するエスケープ変異と考えられた。

D. 考察

昨年度の報告が、慢性エイズモデルにおける初めてのワクチンによるSIV複製制御例であり、今年度の研究は、その長期解析である点で極めて重要である。感染初期のSIV複製制御が認められたサル5頭のうち3頭においては、SIVチャレンジ後2年間が経過した時点においてもSIV複製制御が維持されており、特にSIV gag領域の塩基配列を解析した1頭(R02-003)においては、新たに優位となる変異も認められなかった。この結果は、ワクチン誘導CTLによるHIV複製制御の長期的維持の可能性を示すものである。

一方、SIV複製制御が維持できなかった2頭では、チャレンジ後約1年2ヶ月の時点で、両者とも同じ2つのエピトープ特異的CTLに対

するエスケープ変異が追加されたSIVが優位となっていた。つまり、この2頭では、Gag206-216特異的CTLに加えて、少なくともSG#56特異的CTLおよびSG#87特異的CTLからもエスケープすることにより、SIVは制御を免れ、ウイルス血症の再出現に至ると考えられた。

MHCハプロタイプ90-120-aを共有するワクチン接種サルでは、感染初期に野生型SIVが迅速に排除され、Gag206-216特異的CTLに対するエスケープ変異(Gag216)が一過性に選択された後に制御されたが、本研究結果より、このGag216変異SIVの複製制御には、SG#56特異的CTLおよびSG#87特異的CTLが中心的役割を担っていることが明らかとなった。つまり、このSIV複製制御においては、少なくとも3つの強い選択圧を有するCTL(Gag206-216特異的CTL、SG#56特異的CTLおよびSG#87特異的CTL)が極めて重要であることが示された。したがって、予防ワクチンにより、有能な複数のエピトープ特異的CTLを誘導することができれば、HIV複製制御に至る可能性があると考えられた。

E. 結論

本研究は、HIV複製制御の維持は容易ではないことを示しながらも、CTL誘導ワクチン接種による長期のHIV複製制御の可能性を初めて示すものである。さらに、観察されたSIV複製制御には、複数のエピトープ特異的CTLが関与していることを明らかにした。つまり、エイズワクチンにおいては、有能な複数のエピトープ特異的CTLを誘導することが重要であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Lun WH, Takeda A, Nakamura H, Kano M, Mori K, Sata T, Nagai Y, Matano T. Loss of virus-specific CD4⁺ T cells with increases in viral loads in the chronic phase after vaccine-based partial control of primary simian immunodeficiency virus replication in

macaques. *J Gen Virol* 85:1955-1963, 2004.

- 2) Matano T, Kobayashi M, Igarashi H, Takeda A, Nakamura H, Kano M, Sugimoto C, Mori K, Iida A, Hirata T, Hasegawa M, Yuasa T, Miyazawa M, Takahashi Y, Yasunami M, Kimura A, O'Connor DH, Watkins DI, Nagai Y. Cytotoxic T lymphocyte-based control of simian immunodeficiency virus replication in a preclinical AIDS vaccine trial. *J Exp Med* 199:1709-1718, 2004.
- 3) Kato M, Igarashi H, Takeda A, Horie S, Higashihara E, Matano T. Stimulation of virus-specific T cell responses by dendritic cell vaccination in the chronic phase of simian AIDS models. *Jpn J Infect Dis* 57:220-223, 2004.
- 4) Kato M, Igarashi H, Takeda A, Sasaki Y, Nakamura H, Kano M, Sata T, Iida A, Hasegawa M, Horie S, Higashihara E, Nagai Y, Matano T. Induction of Gag-specific T-cell responses by therapeutic immunization with a Gag-expressing Sendai virus vector in macaques chronically infected with simian-human immunodeficiency virus. *Vaccine*, in press.

2. 学会発表

国際学会

- 1) Matano T, Kobayashi M, Kawada M, Igarashi H, Takeda A, Nakamura H, Kano M, Mori K, Iida A, Hasegawa M, Yuasa T, Miyazawa M, Yasunami M, Kimura A, Nagai Y: Vaccine-induced CTL-based control of SIV replication in a group of rhesus macaques that share an MHC haplotype. XV International AIDS Conference. Bangkok, Thailand, July, 2004.

国内学会

- 1) 俣野哲朗：AIDS ワクチン開発の現状。第 45 回日本臨床ウイルス学会（大阪）2004.6.12.
- 2) 俣野哲朗、小林政博、五十嵐博子、武田明

子：サル免疫不全ウイルス CTL エスケープ変異体の reversion. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会（横浜）2004.11.

- 3) 川田真幹、俣野哲朗：CTL 誘導ワクチンによりサル免疫不全ウイルス複製制御が認められたサルの長期的解析。第 18 回日本エイズ学会学術集会（静岡）2004.12.
- 4) Matano T: CTL-based control of SIV replication. 第 18 回日本エイズ学会学術集会（静岡）2004.12.

G. 知的財産権の出願・登録状況

特許出願：DNA ワクチン、出願番号 2000-291792、公開番号 2001-169784.

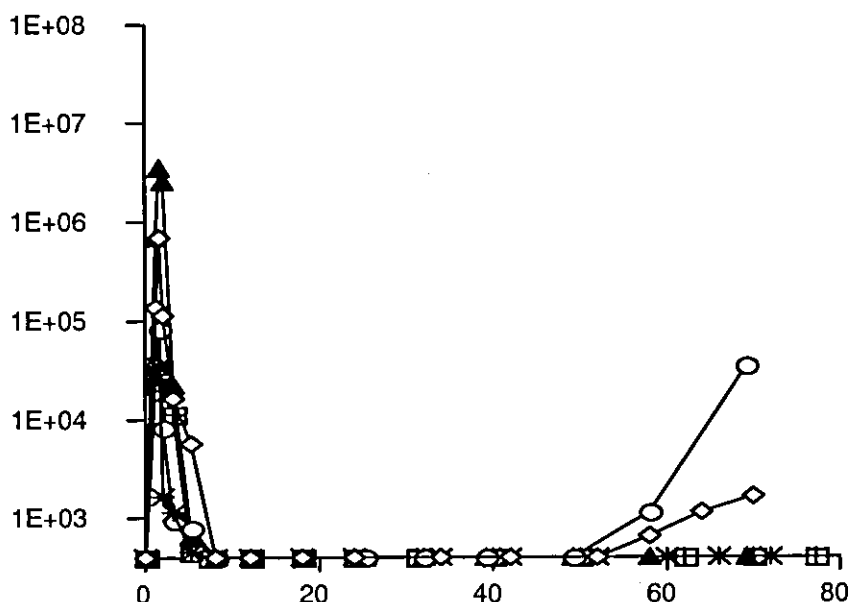


図 1. SIV 複製制御が認められたワクチン接種サル 5 頭の血漿中ウイルス量の経時変化
DNA プライム・SeV-Gag ブーストワクチン接種後の SIV_{mac239} チャレンジ実験(アカゲサル 8 頭)にて、感染初期の SIV 複製制御が認められたサル 5 頭の長期解析結果である。横軸はチャレンジ後の週数、縦軸は血漿中 SIV RNA コピー数 (/ml) を示す。5 頭中 3 頭では SIV 複製制御が維持されたが、2 頭(R01-007、R02-012) では SIV 複製制御が維持できず、約 60 週目の時点でウイルス血症が再出現した。

表 1. MHC ハプロタイプ 90-120-a を共有するワクチン接種サル 3 頭における SIV gag 領域の変異

サル ID	チャレンジ後約 2 ヶ月		チャレンジ後約 1 年 2 ヶ月	
	SIV 複製制御	SIV gag 領域の変異	SIV 複製制御	SIV gag 領域の変異
R02-003	制御	216	制御維持	216
R01-007	制御	216	ウイルス血症 再出現	216 244, 247 312 373
R02-012	制御	216	ウイルス血症 再出現	216 244 375

上記サル 3 頭では、SIV 複製制御が認められ、チャレンジ後 8 週目の血漿中 SIV 量は検出下限以下となった。このうち、サル R02-003 では複製制御が維持されたが、サル R01-007 およびサル R02-012 では複製制御が維持されず、約 60 週目に血漿中 SIV 量が検出可能なレベルにまで上昇した (図 1)。

SIV gag 領域の変異については、血漿中ウイルス RNA あるいは末梢血単核球中プロウイルス DNA の塩基配列解析により調べられ、(野生型の配列が検出されず) 優位となったもののみを示している。記載された番号は、変異により置換が生ずる Gag アミノ酸の番号を示している。

Gag 216 番目のアミノ酸置換、Gag 244 番目のアミノ酸置換、Gag 247 番目のアミノ酸置換、および Gag 373 番目のアミノ酸置換は、CTL エスケープ変異であった。Gag 375 番目のアミノ酸置換も CTL エピトープ領域内の変異であった。

3. 遺伝子改変 SHIV を用いた弱毒生ワクチンと半生 DNA ワクチンの開発

分担研究者 三浦 智行 京都大学ウイルス研究所 助教授

研究要旨 SHIV のゲノム改変と投与法の検討により生ワクチンの強力な感染防御効果を保持しつつ安全性も確保されたヒト用エイズワクチンを開発することを目的とする。本年度は、強毒及び弱毒 SHIV 分子クローンについて比較ゲノム解析とサル感染実験を行い、塩基配列の違いと病原性との関係を明らかにした。強毒 SHIV-KS661 と弱毒 SHIV-cl 64 のゲノム上の塩基配列の違いは 16 ケ所であったが、このうち感染サル個体における病原性に関わることが示唆されたのは、primer binding site (1 ケ所)、逆転写酵素 (1 ケ所) および env gp41 (2 ケ所) の計 4 ケ所であり、中でもウイルスの感染力を数十倍高める env gp41 の 1 ケ所の塩基置換が最も重要と考えられた。本年度の研究により感染個体レベルでの病原性に重要と考えられる過程をいくつかクローズアップ出来たので、今後の病原性分子メカニズム解明のための道が開かれたと考える。

A. 研究目的

SHIV のゲノム改変と投与法の検討により生ワクチンの強力な感染防御効果を保持しつつ安全性も確保されたヒト用エイズワクチンを開発することを目的とする。ワクチンの歴史において特異的及び非特異的防御反応を強力に誘導できる弱毒生ワクチンが最も有効であることが証明されてきたが、HIV では変異による強毒化の可能性から生ワクチンについては危惧視され、殆どその開発は進められていない。SHIV はサルとヒトの両方で増殖可能であり、サルで有効性と安全性を確認できることから、より実用化に近い形でワクチン候補を開発し、また、その過程で SHIV の強毒性・弱毒性についても明らかにする。

B. 研究方法

1) 強毒及び弱毒 SHIV 分子クローンについて比較ゲノム解析を行い、サル感染実験により塩基配列の違いと病原性との関係を明らかにする。

2) 強毒及び弱毒 SHIV 接種サルにおける体内深部組織における感染動態と免疫応答について比較解析し、感染制御に重要な免疫機構を

明らかにする。

3) 半生 DNA ワクチンの投与部位やデリバリー法について検討し、それらの免疫誘導能及び感染防御効果を解析する。

(倫理面への配慮)

以上の研究は、京都大学ウイルス研究所の「サル類を用いる実験のための基本指針」に基づいて霊長類委員会による倫理審査を受けた上で行った。

C. 研究結果

1) 強毒 SHIV-KS661 と弱毒 SHIV-cl 64 のゲノム上の塩基配列の違いは 16 ケ所であり、ゲノム全体に分布していた。強毒クローン KS661 は弱毒クローン 64 と比べると、同量のプロウイルス DNA から産生される逆転写酵素活性が数倍高く、抗原量当たりの感染価が数十倍高い。そして、これら強毒・弱毒クローンのゲノムを部分的に入れ替えたウイルスの解析結果から、抗原量当たりの感染価の増強は env gp41 の 2 ケ所のアミノ酸変異のいずれか一方により規定されており、provirus DNA 当たりのウイルス産生量の増強は、逆転写酵素からインテグラー

ス、vpr にかけてのアミノ酸変異もしくはナンセンス変異にマップされた (Fig. 1)。

これらの変異と感染サルでの病原性との関連を明らかにするため、サル接種実験を行った。まず、強毒クローンは、IV 接種だと 4 頭中 4 頭で、高いウイルス量が持続し、CD4 が枯渇し、抗体産生がほとんど認められないのに対し、弱毒クローンは、ウイルス量が抑制され、CD4 が復活し、高い抗体産生が認められる。さて、5 半分が強毒のクローン (KS689) は、4 頭中 2 頭が強毒型で、2 頭が弱毒型を示した。Env を中心とする部分が強毒のクローン (KS705) は、4 頭中 2 頭が強毒型で、1 頭が弱毒型、1 頭は、高いセットポイント、CD4 の枯渇を示しながら、抗体産生があるというユニークなパターンを示した (Fig. 2)。

これらの病態がわかれたサルについて、分岐点になっている 4 週の時点での血漿中のウイルスの全ゲノムにおける変異を調べた。KS689 では、各々 3 ~ 5 箇所の変異が認められたが、すべてに共通して gp41 のアミノ酸変異が認められた。ここは、弱毒クローンに特異的な変異部位で強毒クローンと同じ塩基に変化していた。強毒型への変異としては、他に 1 頭で 1 ケ所認められたが、他はすべて新たに起こった変異であった。一方、KS705 では、各々 1 ~ 2 箇所と変異が少なく、すべてに共通して primer binding site が変異していた。ここは、強毒クローンに特異的な変異箇所でありやはり強毒クローンと同じ塩基に変化していた。以上の結果は、env gp41 と primer binding site の 2 箇所の変異が *in vivo* でのウイルスの増殖に必須な、suboptimal site であることを示している。しかし、弱毒型の病態を示したサルもこの変異をもっており、他の変異が多い KS689 よりも、変異の少ない KS705 の方が病原性が強かったことから、この変異を獲得するまでの時間の factor が感染個体におけるその後の病態形成に重要であると考えられる。さらに、死亡時のサルのウイルスの全ゲノム変異解析により逆転写酵素の 1 ケ所と gp41 の他の 1 ケ所も病原性に関与することが示唆された (Fig. 3)。

2) アカゲサル腸管上皮内リンパ球 (IEL) と粘膜下組織リンパ球 (LPL) の分離解析法を確立した。また、種々の体内深部組織における、定量的 PCR 法を用いた SHIV プロウイルス量の高感度定量法と、プラーク法による感染性ウイルス量の定量法を確立した。

3) 非感染性粒子を産生する SHIV フルゲノムプラスミドを用いて坐薬により腸管粘膜から免疫刺激を行う新しい DNA ワクチンのデリバリーシステムのサルにおける免疫誘導効果を現在検討中である。

D. 考 察

強毒 SHIV クローンはサルでエイズを引き起こすように至適化されており、急性期の後、ただちに発症期に移行し、接種後半年から 1 年で死亡するが、弱毒クローンは、急性期の後、潜伏期に移行し、3 年以上の経過観察でも血漿中のウイルスは検出限界以下に制御される。このような病原性の大きな違いがウイルスゲノム上のわずかな違いに起因することが明らかとなったことは非常に興味深い。今回クローズアップされたゲノム上の違いが、感染サルにおける病原性の分子メカニズムの解明へと繋がっており、それらの知見に基づく安全で有効なワクチン候補のデザインに役立つものと期待される。また、強毒 SHIV は、ヒトのエイズと異なる病態を示すという見解があるが、今回の結果は、ゲノムのわずかな改変によって、より適した SHIV-サルモデルを構築できる可能性も示している。

E. 結 論

強毒/弱毒 SHIV の比較ゲノム・病態解析により、感染個体レベルでの病原性に重要と考えられる過程をクローズアップすることが出来、今後の病原性分子メカニズム解明のための道が開かれた。また、SHIV 感染サルにおける体内深部組織における感染動態と免疫応答について詳細に解析するための準備が整った。坐薬による半生 DNA ワクチンデリバリーの免疫誘導能と感染防御効果が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Haga, T., Shimizu, Y., Okoba, M., Kumabe, S., Goto, Y., Shinjo, T., Ichimura, H., Kuwata, T., Hayami, M. and Miura, T.: Construction and in vitro properties of chimeric simian and human immunodeficiency virus with the human TNF-alpha gene. *Microbiol. Immunol.* 46: 849-855, 2003.
- 2) Shimada, T., Suzuki, H., Motohara, M., Kuwata, T., Ibuki, K., Ui, M., Iida, T., Fukumoto, M., Miura, T.: Comparative histopathological studies in the early stages of acute pathogenic and nonpathogenic SHIV-infected lymphoid organs. *Virology* 306(2): 334-346, 2003.
- 3) Haga, T., Okoba, M., Yamazaki, N., Kumabe, S., Shimizu, Y., Goto, Y., Kuwata, T., Kozyrev, I.L., Hayami, M. and Miura, T.: Characterization of vpr vector constructed from chimeric simian and human immunodeficiency virus. *J. Vet. Med. Sci.* 65(5), 633-636, 2003.
- 4) Akiyama, H., Ido, E., Akahata, W., Kuwata, T., Miura, T., and Hayami, M.: Construction and in vivo infection of a new simian/human immunodeficiency virus chimera containing the reverse transcriptase gene and the 3' half of the genomic region immunodeficiency virus type 1. *J. Gen. Virol.* 84:1663-1669, 2003.
- 5) Ndembu, N., Habakkuk, Y., Takehisa, J., Takemura, T., Kobayashi, E., Ngansop, C., Songok, E., Miura, T., Ido, E., Hayami, M., Kaptue, L., and Ichimura, H.: HIV type 1 infection in Pygmy hunter gatherers is from contact with bantu rather than from nonhuman primates. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 19(5), 435-439, 2003.
- 6) 喜多正和、榎瀬良美、宇賀神秀樹、横山京子、鈴木 元、桑田岳夫、三浦智行、阪井弘治、高橋栄治、篠原克明、山本俊郎、今西二郎、速水正憲：IFN- γ 遺伝子組込み弱毒 SHIV のワクチン効果. *J. AIDS Res.* 5(2), 86-88, 2003.

- 7) Iida, T., Kuwata, T., Ui, M., Suzuki, H., Miura, T., Ibuki, K., Takahashi, H., Imanishi, J., Hayami, M. and Kita, M.: Augmentation of antigen-specific cytokine responses in the early phase of infection with a live-attenuated simian/human immunodeficiency chimeric virus expressing IFN- γ . *Arch. Virol.* 149: 743-757, 2004.
- 8) Yamaguchi-Kabata Y, Yamashita M, Ohkura S, Hayami M, Miura T: Amino acid variation and evolution of human immunodeficiency virus type 1 gp120 envelope glycoprotein (subtype B) linked with usage of the second receptor. *J Mol Evol* 58:333-340, 2004.
- 9) Enose, Y., Kita, M., Yamamoto, T., Suzuki, H., Miyake, A., Horiuchi, R., Ibuki, K., Kaneyasu, K., Kuwata, T., Takahashi, E., Sakai, K., Shinohara, K., Miura, T., and Hayami, H.: Protective effects of nef-deleted SHIV or that having IFN-gamma against disease induced with a pathogenic virus early after vaccination. *Arch. Virol.* 149: 1705-1720, 2004.

2. 学会発表

国際学会

- 1) Miyake, A., Ibuki, K., Enose, Y., Suzuki, H., Horiuchi, R., Saito, N., Nakasone, T., Honda, M., Miura, T., Hayami, M.: Early virological events in various tissues of adult and newborn macaques after intrarectal infection with pathogenic SHIV. XV international AIDS conference, Bangkok, Jul. 11~16, 2004.
- 2) Sato, A., Kodama, M., Yoshinaga, T., Kawasuji, T., Kiyama, R., Fujishita, T., Masuda, K., Yoshikawa, T., Kuwata, T., Miyazaki, Y., Miura, T., Hayami, M., Fujiwara, T.: Evaluation of an SIV-infected rhesus monkey model via integrase inhibitor. XV international AIDS conference, Bangkok, Jul. 11~16, 2004.
- 3) Ibuki, K., Enose, Y., Miyake, A., Takahashi, M., Suzuki, H., Horiuchi, R., Saitou, N., Nakasone, T., Honda, M., Miura, T., Takahashi, H., Hayami, M.: Analysis of gut-associated lymphoid tissues at early phase of acute

pathogenic SHIV intrarectal infection in macaques. XV international AIDS conference, Bangkok, Jul. 11~16, 2004.

- 4) Horiuchi, R., Ido, E., Akahata, W., Enose, Y., Ibuki, K., Miura, T., Goto, T., Takahashi, H., Hayami, M.: DNA vaccination of macaques by full-sized SHIV plasmids that produce non-infectious virus particles. The Awaji international forum on infection and immunity, Awaji Island, Aug. 30~Sep. 2, 2004.
- 5) Miyake, A., Ibuki, K., Enose, Y., Suzuki, H., Horiuchi, R., Saito, N., Nakasone, T., Honda, M., Miura, T., Hayami, M.: Early virological events in various organs of adult and newborn macaques after intrarectal infection with pathogenic SHIV. 22nd Annual symposium on nonhuman primate models for AIDS, San Antonio, Nov. 3~6, 2004.
- 6) Kaneyasu, K., Okura, S., Kita, M., Yamamoto, T., Ibuki, K., Sato, A., Miura, T., Hayami, M.: Protective efficacy of nonpathogenic nef-deleted SHIV vaccination combined with recombinant IFN-gamma administration against a pathogenic SHIV challenge in Rhesus macaques. 22nd Annual symposium on nonhuman primate models for AIDS, San Antonio, Nov. 3~6, 2004.

国内学会

- 1) 三浦智行、Iouri Kozyrev、阪井弘治、篠原克明、高橋栄治、鈴木 元、伊吹謙太郎、速水正憲：サル／ヒト免疫不全キメラウイルス感染性クローンにおける塩基置換と病原性との関連. 第 137 回日本獣医学会 (藤沢) 2004.4.2-4.
- 2) 鈴木 元、鈴木麻貴子、三宅在子、伊吹謙太郎、増田喬子、湊長 博、河本 宏、仲宗根 正、本多三男、速水正憲、三浦智行：強毒 SHIV の感染初期における胸腺組織及び胸腺内 T 前駆細胞の解析. 第 137 回日本獣医学会 (藤沢) 2004.4.2-4.
- 3) 秋山尚志、井戸栄治、三浦智行、速水正憲：HIV-1 由来の逆転写酵素、インテグラーゼおよび env を含むゲノムの 3'側遺伝子を持

つ新しい SHIV のサル感染実験. 第 138 回日本獣医学会 (札幌) 2004.9.10-12.

- 4) 伊吹謙太郎、三宅在子、堀内励生、齋藤尚紀、鈴木 元、元原麻貴子、稲葉一寿、速水正憲、三浦智行：サル／ヒト免疫不全キメラウイルス(SHIV)弱毒分子クローンのサル経粘膜感染における免疫応答の解析. 第 138 回日本獣医学会 (札幌) 2004.9.10-12.
- 5) 三浦智行:ゲノム改変 SHIV を用いた弱毒生ワクチンと半生 DNA ワクチンの開発. 第 8 回日本ワクチン学会シンポジウム 2 (札幌) 2004.10.9-10.
- 6) 元原麻貴子、伊吹謙太郎、三宅在子、鈴木 元、稲葉一寿、増田喬子、河本 宏、三浦智行、速水正憲：弱毒 SHIV の感染初期における胸腺組織及び胸腺内 T 前駆細胞の解析. 第 52 回日本ウイルス学会 (横浜) 2004.11.21-23.
- 7) 三宅在子、伊吹謙太郎、深澤嘉伯、鈴木 元、堀内励生、齋藤尚紀、元原麻貴子、渡邊俊樹、三浦智行、速水正憲：弱毒 SHIV の粘膜感染初期におけるウイルス動態の解析. 第 52 回日本ウイルス学会 (横浜) 2004.11.21-23.
- 8) 兼安健太郎、大倉定行、喜多正和、山本俊郎、伊吹謙太郎、佐藤彰彦、三浦智行、速水正憲：nef 欠損弱毒 SHIV のワクチン効果に対する rIFN- γ 投与の増強効果. 第 52 回日本ウイルス学会 (横浜) 2004.11.21-23.
- 9) 堀内励生、秋山尚志、伊吹謙太郎、井戸栄治、三浦智行、速水正憲：非感染性粒子を産生する SHIV フルゲノムプラスミドを用いた DNA ワクチンの坐薬投与による感染防御効果. 第 18 回日本エイズ学会 (静岡) 2004.12.9-11.
- 10) 鈴木 元、井戸栄治、伊吹謙太郎、速水正憲、三浦智行：HIV-1 由来プロテアーゼを持つ SHIV のサル継代による感染増殖力の増強. 第 18 回日本エイズ学会 (静岡) 2004.12.9-11.

G. 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

