

図1. MHC ハプロタイプ 90120-a を有するサルにおけるエピトープ特異的 CTL レベル
 アカゲサル R-209 (左上)、R-221 (右上)、R-260 (左下)、R-271 (右下) の SeV-Gag プースト後 2 週
 目の Gag206-216 特異的 CTL レベル、Gag241-249 特異的 CTL レベルおよび Gag367-381 特異的 CTL
 レベル (末梢血単核球 1,000,000 個あたりのインターフェロング陽性 CD8 陽性 T リンパ球数) を示す。

SIV 感染抑制サルにおける SIV 特異的 CD4 陽性 T リンパ球の役割

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：

感染制御ザルの T 細胞エピトープの解析を行い、MHC の違いとエピトープとの関連について解析した。CD4 T 細胞エピトープでは Gag, Env, Nef に複数の MHC により提示されるエピトープが同定された。細胞性免疫によるウイルス感染抑制はエピトープ特異的 T 細胞に対する escape mutant ウイルスの出現により確認することができる。そこで SIVmac239 全領域の変異の解析を行うための方法を確立した。種々の免疫組織を用いたウイルスの変異の解析から変異ウイルスの出現が免疫組織によりことなることが確認された。

A. 研究目的

エイズウイルス感染制御に重要な宿主免疫として細胞性免疫の役割が明らかとなっている。ウイルス特異的細胞障害性 T 細胞(CTL)は感染後早期に誘導されることは、CTL に認識されない escape mutants の出現により証明された。ウイルス特異的 CD4+T 細胞は CTL と前後して誘導されるが、その機能については CTL の誘導、メモリ細胞の形成、中和抗体の誘導等と関連して感染制御における重要性が提唱されているが、実証的な証拠は乏しい。そこで本研究では、エイズウイルス感染制御における CD4+ T 細胞の役割、機能の解明を研究の目的とする。本年度は、感染制御ザルにおけるウイルス特異的 CD4+ T 細胞、CD8+ T 細胞の解析、細胞性免疫の誘導等の宿主応答に対するウイルスの escape についての変異解析法の開発を行った。

B. 研究方法

1. T 細胞エピトープの解析

1) サル感染実験ならびに血液サンプルの採取

アカゲザルに SIVmac239、 Δ NEF, または SHIV-RT を静脈接種し、感染後経時的に血液をクエン酸採血した。血漿は-80℃保存、PBMC は細胞成分から Ficoll Hypaque 密度勾配遠心により分離し、-160℃で保存した。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) 細胞性免疫の解析

免疫組織に存在する T 細胞は、SIV に対して特異的に活性化し SIV 感染制御のための細胞性免疫に主要な役割を持つ。そこで SIV ペプチドにより活性化され IFN-gamma を産生する CD4+T 細胞、CD8+T 細胞を ELISPOT アッセイにより測定した。

3) SIV ペプチド

SIV 全領域をカバーするオーバーラッピングペプチドを用いた。内訳は Gag 62 本、Pol 131 本、Env 72 本、Vif 25 本、Vpr 11 本、Vpx 12 本、Tat 15 本、Rev 12 本、Nef 21 本である。それぞれのタンパクごとに 5~13 本のペプチドを混合して 42 のプールを作り、1 次スクリーニングに使用した。またさらに詳細なエピトープをマップするため、反応が強く見られたいくつかのペプチドについては、細かいペプチドを合成した（シグマジェノシス社）。

4) ELISPOT アッセイ

採血後直ちに分離した PBMC をマグネットビーズ法で、CD4+ T 細胞と CD8+ T 細胞に分けた。1 x 10⁵ 細胞/50 μl RPMI1640-10%FCS と 0.2 μg each ペプチド/50 μl RPMI1640-10%FCS を混合し、抗 IFN-γ 抗体コーティング ELISPOT プレートに入れ、18 時間 37°C で培養した。その後、定法により IFN-γ 産生細胞を検出・算定した。なお、1 次スクリーニングにはペプチドプール、2 次スクリーニングには個々のペプチドを使用した。いくつかの反応が見られたペプチドについては、さらに細かいペプチドによりエピトープ領域を狭めた。

2. CTL および HTL エピトープと感染ザルリンパ球から検出された SIV DNA シークエンズの解析

1) アカゲザル Mm9703

Mm9703 での感染実験の概要と plasma viral RNA load を図 1 に示した。Mm9703 は R-90-120 の子で、MHC ハプロタイプ 90120-b を持つ。SHIV-RT を感染後 8 時間から 28 日目まで、逆転写酵素阻害剤により、感染後早期治療を行った。投薬終了後、一時的に plasma viral load が上昇したが、その後は検出

限界以下に制御されていた。しかし、感染後 200 週以降 viral load の上昇が認められた。この前後で、ウイルス特異的 T 細胞エピトープの解析を行い、Gag 特異的 CD4 T 細胞クローンを 1 株樹立した。その後、PMPA 投与後、樹立した CD4 T 細胞クローンを輸血した。319 週目に SIVmac239 をチャレンジ感染し、その 2 週後に安楽殺した。

2) リンパ球 DNA の抽出

Mm9707 の安楽殺時に末梢血、脾臓、リンパ節（腸管膜およびソケイ）を採取し、定法によりリンパ球を分離した。これらのリンパ球 1~5x10⁶ 個を用い、QIAGEN Blood DNA purification kit により細胞 DNA を抽出した。

3) Nested-PCR による SIV DNA の検出

リンパ球 DNA から図 2 に示す 7 つのオーバーラップする SIV 断片を nested-PCR によって増幅した。すでに報告されているプライマー (Allen, TM et al. Nature 407:386-390 (2000)) を inner primer とし、outer primer を設定した。個々の PCR 産物が単独のシークエンズから増幅されるように、リンパ球 DNA を希釈した。PCR 条件は以下の通りである。1st PCR は 1,5,6 については 94°C 2 分、94°C 15 秒、58°C 30 秒、68°C 1.5 分を 40 サイクル、7 については 94°C 2 分、94°C 15 秒、68°C 1.5 分を 40 サイクル行った。2nd PCR は 1st PCR 溶液の 1/50 を鋳型として、94°C 2 分、94°C 15 秒、58°C 30 秒、68°C 1.5 分を 30 サイクル行った。DNA ポリメラーゼは KOD Plus (東洋紡) を用いた。

4) シークエンシング

それぞれの組織から 10 前後の独立した PCR 産物について、8~10 本のシークエンシングプライマーを用い、断片の両鎖の塩基配列を BigDye Terminator ver. 1.1 kit と ABI PRISM 3100 シークエ

ンサーで決定した。

C. 研究結果

SIV 感染制御と細胞性免疫

通常宿主はエイズウイルス感染を制御することはできない。しかし感染後早期に感染を抑制することができれば感染宿主は長期間感染を制御することができる。例えば逆転写酵素阻害薬を感染後 8 時間、または 24 時間後から 4 週間投薬することにより、感染が制御された実験結果を図 1 に示す。未治療群 3 頭はすべてエイズを発症した。しかし治療群では全 6 頭中 2 頭で一時的あるいは 4 頭で長期間（感染後 6 年）が継続している。

エイズウイルス感染制御と関連するウイルス特異免疫として抗体と細胞性免疫が重要な役割をすることが分かっているが、この感染ザルにおいては有意な中和抗体は誘導されなかった。ところが細胞性免疫が感染制御と関連することが末梢リンパ球中のウイルス特異的 T 細胞の解析から明らかとなった。感染制御が起こらずエイズを発症した 2 頭では、CTL 活性を持つウイルス特異的 CD8+T 細胞の誘導は見られなかった。対照的に短期間の感染制御が見られた未治療ザル (Mm9714) では有意な誘導が起こったが、ウイルス特異的 CD8+T 細胞の減少はウイルス増殖の再活性化とエイズ発症と相関した。一方、ウイルス特異的 CD4+T 細胞の誘導もウイルス感染制御と相関した。治療群では治療休止直後を除き長期間ウイルス増殖は抑制されていた。これらのサルではウイルス特異的 CD8+T 細胞の誘導が見られない個体が半数を占めたが、すべてのサルで継続的なウイルス特異的 CD4+T 細胞が観察された。

MHC と SIV 感染ザルに誘導されたエピトープ特異的 T 細胞

ウイルス特異的 T 細胞は抗原提示において MHC 分子の性質に依存する。また MHC 分子は個体間で異

なることから MHC に原提示される抗原（エピトープ）は異なる。その結果 免疫応答により誘導されるエピトープ特異的 T 細胞は異なる。個体により感染に対して誘導されるウイルス特異的 T 細胞、細胞性免疫は異なる。感染が制御された個体においてどのような細胞性免疫が誘導されるのか理解することはワクチン研究において重要な課題である。そこで SIV 感染が制御されたサルに誘導された SIV 特異的 T 細胞が認識するエピトープと MHC の解析を進めている。表 1 では MHC haplo-type R90-120 を持つアカゲザルに誘導されたエピトープ特異的 T 細胞が認識する peptide pool と誘導された T 細胞の頻度(濃>淡：頻度小)を示す。サル 9703, 9711, 9429 は MHC haplo-type R90-120A を。サル 9701, 9705, 9427 は MHC haplo-type R90-120B を持つ。全体ではウイルス特異 CD4+T 細胞が多種、多数誘導されていた。Gag, Env により多種のエピトープが存在した。表 2 では MHC haplo-type R90-120 以外を持つサルの結果を示した。これらのサルにおいても Gag, Env, Nef, Rev 特異的 CD4+T 細胞の誘導の顕著であった。多数の MHC haplotype で認識される T 細胞エピトープ

CD4+T 細胞((HTL)では Gag と Nef に多数の MHC により認識されるエピトープ:SG25-1, SG26-3, SG30-2, Nef10-3, Nef12-4 が存在した (表 3)。CD8+T 細胞 (CTL)では Tat, Rev, Nef に多数の MHC により認識されるエピトープ:Tat9, Nef9, Nef10, Nef11, Nef14, Rev6-2 が同定された (表 4)。

同一 MHC haplotype を持つサルが共通に誘導されるエピトープ特異的 T 細胞

誘導される時間は異なるが同一 MHC haplotype を持つ 2 頭のサルは 8 エピトープ中 7 エピトープを認識する T 細胞が 2 頭のサルで誘導された (図 4)。

感染ザルリンパ球から検出された SIV DNA シーク

エンズの解析

Mm9703 の安楽殺時（最初の SHIV-RT 感染後 321 週）に採取した末梢血、脾臓、リンパ節（腸管膜およびソケイ）のリンパ球 DNA から SIV DNA を増幅し、塩基配列を決定した。この塩基配列をもとに各ウイルスタンパクのアミノ酸配列に変換した（図 5）。組織ごとに検出された SIV アミノ酸シーケンスを比較した結果、共通する置換が数多く検出されたが、組織特異的な変異も見られた（図 5）。腸管膜リンパ節と末梢血のリンパ球から検出された SIV は類似したアミノ酸置換を伴っていた。同様にソケイリンパ節と脾臓も類似したアミノ酸置換を持つシーケンスが検出された。

慢性感染期の Viral load が高くなっている宿主にさらにウイルスをチャレンジ感染することにより、そのウイルスが重感染するか調べるために、安楽殺 2 週前に SIVmac239 を接種した。最初に感染させた SHIV-RT は SIVmac239 をベースにした組み換えウイルスであるが、感染後約 6 年経っているため上記のような置換を持ち、チャレンジ感染したウイルスと区別できると考えた。そこで変異のないシーケンスが検出されるか調べた（表 5）。その結果、series 1 と 5 の PCR 断片では脾臓からのみ変異のないシーケンスが検出された。Series 6 の PCR 断片では腸管膜リンパ節、ソケイリンパ節でも変異のないシーケンスが検出されたが、脾臓ではその検出率がより高かった。この結果より、脾臓では重感染が起きていることが示唆された。

CTL および HTL エピトープと変異

感染後 200 週間後で、SIV オーバーラッピングペプチドを用いて、ELISPOT アッセイにより CTL および HTL エピトープ領域を決定した。正確なエピトープアミノ酸配列は決定していないが、CTL については Gag297-312、Env772-787、Rev41-53 に、HTL については Gag246-261、Gag262-273、Nef112-

124、Nef136-151 に範囲を絞り込んだ（図 6）。これらのエピトープのうち、Gag262-273 は樹立した CD4+ T 細胞クローンが認識した。

Mm9703 では長期間検出限界以下に制御されていたウイルス感染が急激に上昇したことから、宿主免疫からのエスケープウイルスの出現が考えられた。そこで決定されている CTL および HTL エピトープ領域にアミノ酸置換が起こっているか調べた（図 6）。CTL エピトープについては 3 つすべてでアミノ酸置換が見られた。しかし、Gag297-312 については変異していたシーケンスの検出率は低く、エピトープとして絞り込んだ配列の端なので、CTL エスケープ変異である可能性は低いと考える。Env772-787 と Rev41-53 の変異は出現頻度も高く（まだシーケンスクローン数は少ない）、2 か所に渡る変異も見られたので、エスケープ変異の可能性もあると考えられる。HTL エピトープについては 3 つで変異がなかったが、Nef112-124 には 1 か所の変異が認められ、その変異の出現頻度は高かった。

D. 考察

ウイルス感染制御された状態は同時に新たな感染に対して防御免疫が誘導されていることは、エイズウイルス感染においては弱毒ウイルス感染、感染後早期治療研究から明らかにされている。SIV 感染が制御されている個体におけるウイルス特異的 T 細胞の理解はエイズウイルス感染に対する防御免疫の理解に重要である。今回解析に用いた動物は長期の感染抑制が共通して見られる。免疫機能の状態として血中の CD4+T 細胞のレベルが指標となる。解析に用いた個体においては CD4+T 細胞の減少が少ないことが高いウイルス特異的 CD4 細胞の維持の原因とも推測される。しかし viral load は多くの個体で検出限界以下であることから、なぜ CD4+T 細胞の誘導が維持され、CD8+T 細胞の誘導が弱いのか説明することは難しい。ウイルス感染、増殖のレベル

によりウイルス感染を制御する免疫応答に違いあることも推測される。多種類のエピトープを認識する CD4+T 細胞が誘導されていることは感染制御の結果なのか原因なのか今後の解析が重要となる。

初感染から約 6 年を経過し、plasma viral load が上昇したアカゲザルの末梢血、リンパ節、脾臓のリンパ節に存在する SIV DNA を増幅し、変異を調べた。すべての組織で共通し、ほとんどのクローンで認められる変異も数多く存在したが、組織に特有な変異も見られた。特にソケイリンパ節と腸管膜リンパ節とでは変異が異なり、同じリンパ節といえどもウイルスの感染動態は異なることが示唆された。また CTL および HTL エピトープ変異が見られるか調べた結果、HTL エピトープは CTL エピトープより変異が少ないことが示された。これらの変異が感染制御の破綻と関連する変異であるのか（エスケープ変異であるか）は今後解析する必要がある。

弱毒ウイルスを感染し、感染を制御しているサルに強毒株をチャレンジ感染すると、きわめて強い感染防御が起こることは知られている。しかし、慢性感染期の Viral load が高い宿主では重感染を起こすといわれている。本実験においても重感染を起こすことが、変異していないウイルス DNA シークエンスが検出されたことにより明らかになった。チャレンジしたウイルスはリンパ節や末梢血より脾臓で多く検出された。このことから臓器によって宿主免疫状態は異なることが示唆された。

E. 結論

感染制御の状態で誘導されているウイルス特異的 T 細胞が認識するエピトープを同定した。Escape mutant の解析のためのウイルス遺伝子解析を確立した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

1. Villinger F, Miller R, Mori K, Mayne AE, Bostik P, Sundstrom JB, Sugimoto C, Ansari AA. IL-15 is superior to IL-2 in the generation of long-lived antigen specific memory CD4 and CD8 T cells in rhesus macaques. *Vaccines*, 22, 3510-3521, 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. 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.
4. Ansari AA, Mayne AE, Onlamoon N, Pattanapanyasat K, Mori K, Villinger F. Use of recombinant cytokines for optimized induction of antiviral immunity against SIV in the nonhuman primate model of human AIDS. *Immunol Res*, 29, 1-18, 2004.

学会発表

1. 糖鎖欠損変異 SIV の弱毒化とウイルス学的性質

の変化 杉本智恵、塩田達雄、中山英美、扇本真治、
山本直樹、永井美之、鈴木康夫、森 一泰、日本ウ
イルス学会、2004年、横浜

2. Sugimoto C, Yasutomi Y, Ohgimoto S, Shioda, T,
Yamanoto N, Nagai Y, Mori K. Viral properties of
deglycosylated SIVmac239 mutants: Implication for
Neutralization sensitivity, cell tropism and CD4
independency. 22th annual symposium on nonhuman
primate models for AIDS, 2004, San Antonio, USA.

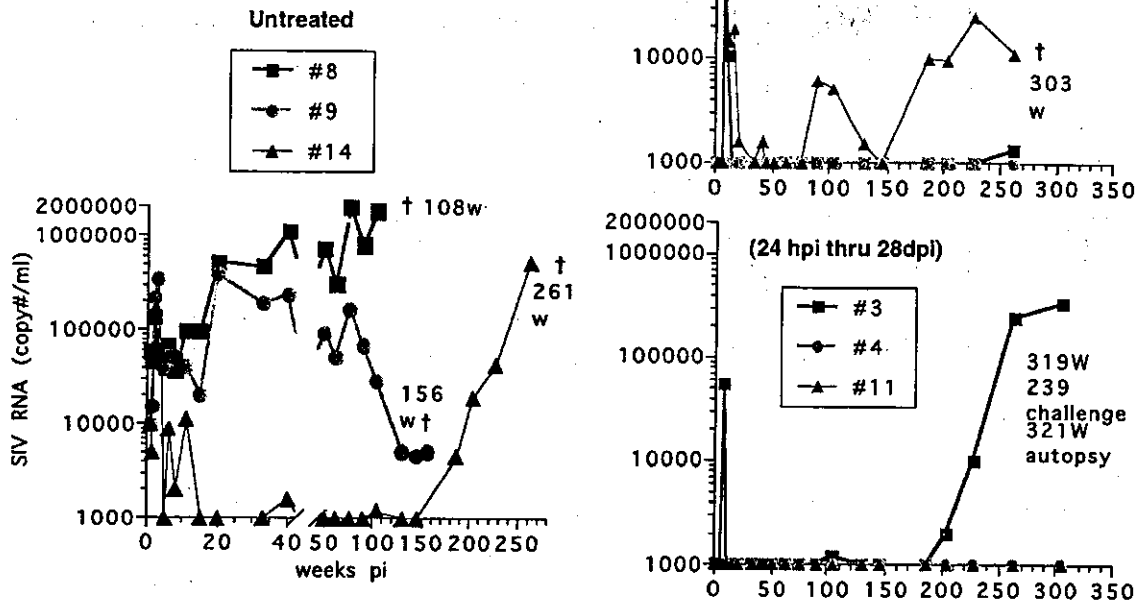
3. Saito N, Sugimoto C, Yamamoto N, Villinger F, Ansari
A, Mori K. Magnitude of SIV specific CD4 T cells
correlated to the control of SHIV-RT infection in the
animals received post-exposure prophylaxis. 22th annual
symposium on nonhuman primate models for AIDS,
2004, San Antonio, USA.

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

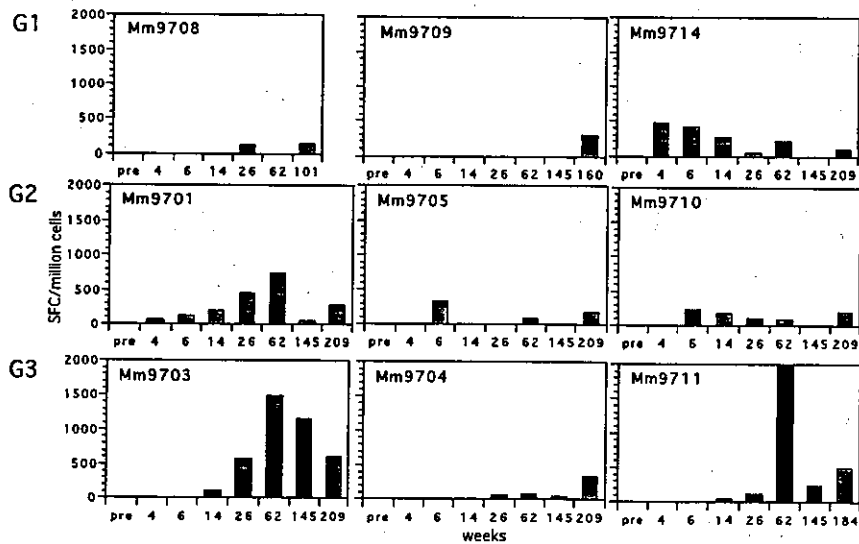
特になし

☒ 1 SHIV-RT RNA in plasma



SIV specific CD8+T cells ■ gag-pol □ env ■ nef

☒ 2



SIV specific CD4+T cells ■ gag-pol □ env ■ nef

☒ 3

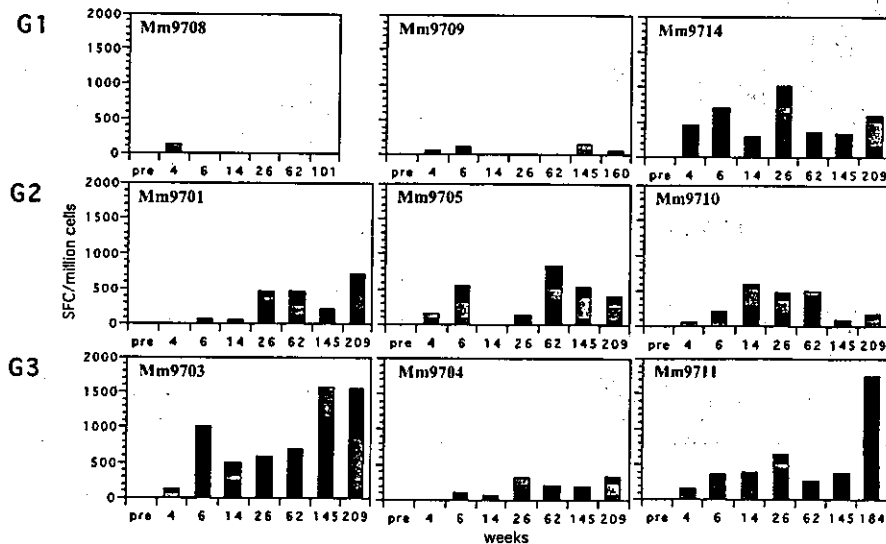


表 1. SIVmac239 epitopes in animals with MHC haplotype 90-120A & E

Helper T cells (CD4)		animal#				
peptide	group	9703	9711	9429	9427	
Gag	G1					NG1
	G2					NG2
	G3					NG3
	G4					NG4
	G5					NG5
	G6					NG6
	G7					NG7
	G8					NG8
Pol	PR					
	RT-1					
	RT-2					
	RT-3					
	RT-4					
	RT-5					
	RT-6					
	Int-1					
	Int-2					
	Int-3					
Env	E-1					
	E-2					
	E-3					
	E-4					
	E-5					
	E-6					
	E-7					
	E-8					
	E-9					
Vif	Vif-1					
	Vif-2					
	Vif-3					
	Vif-4					
Vpr	Vpr-1					
	Vpr-2					
Vpx	Vpx-1					
	Vpx-2					
Tat	T-1					
	T-2					
Rev	R-1					
	R-2					
Nef	N-1					
	N-2					
	N-3					
virus		SIVmac239	Δnet	239	SIVmac239	

CTL (CD8)		animal#				
peptide	group	9703	9711	9429	9427	
Gag	G1					NG1
	G2					NG2
	G3					NG3
	G4					NG4
	G5					NG5
	G6					NG6
	G7					NG7
	G8					NG8
Pol	PR					
	RT-1					
	RT-2					
	RT-3					
	RT-4					
	RT-5					
	RT-6					
	Int-1					
	Int-2					
	Int-3					
Env	E-1					
	E-2					
	E-3					
	E-4					
	E-5					
	E-6					
	E-7					
	E-8					
	E-9					
Vif	Vif-1					
	Vif-2					
	Vif-3					
	Vif-4					
Vpr	Vpr-1					
	Vpr-2					
Vpx	Vpx-1					
	Vpx-2					
Tat	T-1					
	T-2					
Rev	R-1					
	R-2					
Nef	N-1					
	N-2					
	N-3					
virus		SIVmac239	Δnet	239	SIVmac239	

表 2. SIVmac239 epitopes in animals with MHC haplotype except 90-120A & B

Helper T cells (CD4)		animal#			
peptide	group	9414	9413	9404	9415
Gag	NG1				
	NG2				
	NG3				
	NG4				
	NG5				
	NG6				
	NG7				
	NG8				
Pol	PR				
	RT-1				
	RT-2				
	RT-3				
	RT-4				
	RT-5				
	RT-6				
	Int-1				
	Int-2				
	Int-3				
Env	E-1				
	E-2				
	E-3				
	E-4				
	E-5				
	E-6				
	E-7				
	E-8				
	E-9				
Vif	Vif-1				
	Vif-2				
	Vif-3				
	Vif-4				
Vpr	Vpr-1				
	Vpr-2				
Vpx	Vpx-1				
	Vpx-2				
Tat	T-1				
	T-2				
Rev	R-1				
	R-2				
Nef	N-1				
	N-2				
	N-3				
virus		Δnet	SIVmac239	239	

CTL (CD8)		animal#			
peptide	group	9414	9413	9404	9415
Gag	NG1				
	NG2				
	NG3				
	NG4				
	NG5				
	NG6				
	NG7				
	NG8				
Pol	PR				
	RT-1				
	RT-2				
	RT-3				
	RT-4				
	RT-5				
	RT-6				
	Int-1				
	Int-2				
	Int-3				
Env	E-1				
	E-2				
	E-3				
	E-4				
	E-5				
	E-6				
	E-7				
	E-8				
	E-9				
Vif	Vif-1				
	Vif-2				
	Vif-3				
	Vif-4				
Vpr	Vpr-1				
	Vpr-2				
Vpx	Vpx-1				
	Vpx-2				
Tat	T-1				
	T-2				
Rev	R-1				
	R-2				
Nef	N-1				
	N-2				
	N-3				
virus		Δnet	SIVmac239	239	

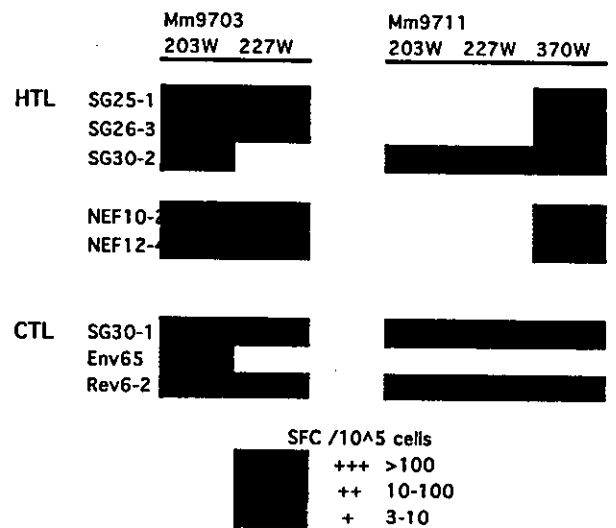
表3 Epitopes

	gene	a.a	peptides	animals			
CTL	Gag	9-28	SGM2	91-36			
				0138			
		33-52	SGM5	91-36			
				0138			
		49-68	SGM7	91-36			
				0138			
		297-312	SG30-1	R90-120A	R90-120B		
				9703, 9711,	9711		
	Vif	17-36	VIF3	89-2			
				0136			
97-118		VIF13	91-36				
			0138				
129-148		VIF17	89-2				
Env	153-172	VIF20	91-36				
			0138				
	325-349	Env28	90-10				
			0002, 0011, 0012				
	409-433	Env28	90-10				
Tat	65-84	Tat9	R90-120B	94-27	90-10		
			9711, 0009	0006	0012		
			94-27	90-10	89-3		
Nef	97-121	Nef9	0005, 0006	0001, 0011	9707		
			R90-120B	94-27	90-10	89-3	
	109-133	Nef10	9703	0005, 0006	0001	9707	
			R90-120B	94-27	89-75	90-30	
	121-145	Nef11	0009	0005	0003	0007	
Rev	41-56	Rev6-2	R90-120B	94-27	90-10	90-30	
			0009	0005, 0006	0002	9712	
			R90-120A	89-75	91-36	90-10	94-27
			9703, 9711, 9705	0003	0138	9715	0006

表4 Epitopes

	gene	a.a	peptides	animals			
HTL	Gag	41-60	SGM6	91-36			
				0138			
		144-163	SGM19	91-36			
				0138			
		246-261	SG25-1	R90-120B	R90-120A	89-74	90-10
				9703, 9794	9427, 97	9414	0012
		259-273	SG26-3	R90-120B	89-74	89-03	90-10
				9703, 9711	9414	9416	0011, 00
				0003			
		300-315	SG30-2	R90-120B	R90-120A		
Vpx	25-44	VPX4	9703, 97	9427			
			353-372	SGM45	91-36		
					0138		
			411-433	SG42	90-10		
					0011, 00		
Rev	18-36	Rev3	91-36				
			0138				
Nef	97-121	Nef9	91-36				
			0138				
	112-127	Nef10-3	R90-120B	R90-120A			
			9703, 97	9427			
	127-142	NEF12-1	89-75				
			0003				
	136-151	Nef12-4	R90-120B	90-88			
			9703, 9711	9704			

图4 2 animals with a common haplotype : R90-12



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

組換えワクチンにより誘導される抗原特異的免疫反応の解析

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 第1研究グループ長

研究要旨. HIV 感染および病態発生の機序から, HIV の制御にはベクターを用いた組換えワクチンが有用であることが推測され, したがって本研究では, HIV 感染に対する防御免疫を誘導することを目的としたワクチンを開発する. 既に前年までの成果として, BCG をベクターに用いた組換えワクチン (rBCG) における導入 HIV 遺伝子のコドンに至適化することで, *in vitro* および *in vivo* における外来抗原発現を飛躍的に増強させることを可能とした. そこで本年度は, より実用に即したワクチン開発として, 標的遺伝子をサルモデルでの評価が可能な SIV *gag* とし, 新たに組換え BCG を作製, またカニクイサルを用いた免疫誘導能の評価を行った. SIV Gag を標的とした場合もコドン至適化によって抗原発現は増強され, サルモデルにおいては, ヒト投与量の rBCG 接種によっても Gag 特異的 IFN γ 産生細胞が誘導され, さらに組換えワクシニアウイルス (rDIs) の追加接種によって Gag 特異的応答は速やかに増幅された. またこれらの免疫応答は, 先行する BCG の接種によって減弱しないことも確認した.

協力研究者.

松尾和浩, 兼清優, 染谷健二, 堀端重男, 泉泰之, 仲宗根正, 山本直樹 (国立感染症研究所エイズ研究センター), 網康至 (国立感染症研究所動物管理室).

A. 研究目的

実用化を目指すワクチンを作製するにあたっては, 効果的であることの他, 安全性や安定性さらには易入手性などが要求される. これらの課題に対応することを目的に, ヒトへの安全性と免疫誘導能に優れたワクチンとしてベクターを用いた組換えワクチンを開発する.

本研究では, とくに BCG の持つ有用性と課題を検討し, HIV ワクチンベクターとして実用化が可能かどうか検討する. さらに上述の要求を満たす他のベクターについても検討する.

結核ワクチンとして広く世界中で使用されている BCG は, 有効性・問題点について既に明らかになっている. また, BCG は HIV ワクチンのベクターとしても約 20 年前より開発が進められてきた. しかし, HIV ワクチンとしてのポテンシャルについては明らかではない. つまり, 導入外来抗原に対する免疫応答は少なくとも数年は持続し, 他のベクターより優れているが, rBCG の単独投与によっては防御免疫の誘導に成功していない. その理由として, 外来抗原の発現レベルが低いことが推測されることから, 導入遺伝子のコドンを改変することで発現レベルの増幅を試みた. 既に我々の研究成果から, rBCG システムへの導入遺伝子コドン

至適化の応用は, モデル抗原レベルでの有用性を明らかなものとしている.

本研究では, 前臨床レベルのワクチン開発として, サルモデルでの評価可能な SIV Gag 抗原を標的とした rBCG を作製し, またヒトへの応用を見据えて, 投与量および BCG の pre-existing 状態での影響について詳細な検討を行う. さらに, 哺乳類細胞では増殖能を欠く, 超弱毒ワクシニアベクターである DIs とのコンビネーションによって, 近年有効性が確立されている prime-boost regimen を応用した免疫方法についても検討する.

B. 研究方法

1. コドン至適化 SIV *gag* 遺伝子の作製. SIV_{mac239} 由来 *gag* 遺伝子の全長約 1.5 kb を, アミノ酸に変異を加えることなく, マイコバクテリアに最適化したコドンに置換したものを化学的に合成した.
2. rBCG/SIV*gag* の作製. SIV_{mac239} 株由来の *gag* 遺伝子およびコドン至適化 *gag* 遺伝子を, それぞれシャトルベクター-pSO246 に導入し, BCG_{Tokyo172} 株へ形質転換し rBCG/SIV*gag* mac (mac239 *gag* 包含) および rBCG/SIV*gag* Opt (コドン改変 *gag* 包含) を作出した.
3. Gag 抗原の発現量の検討. それぞれの rBCG から得られた菌体抽出液中に含まれる Gag 抗原を検出すべく, Western Blot 法および ELISA 法で発現量の検討を行った.
4. *in vivo* の免疫誘導能の評価. カニクイサルを

用いてヒト投与量における rBCG の免疫誘導能の評価を行った。また、哺乳類細胞において増殖能を欠く超弱毒ワクシニアウイルスベクター (rDIs/SIVgag-pol) を追加抗原とした prime-boost regimen についても検討した。Gag 特異的免疫応答は、IFN γ 産生細胞の ELISPOT 法および細胞内 IFN γ 染色法により評価した。

(倫理面への配慮)

すべての動物実験は、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. マイコバクテリアに最適化された gag 遺伝子では、GC%が 68.15%と mac239 由来のもの (46.11%) よりも高く、BCG ゲノムの既知翻訳領域の GC% (64.82%) と近い値となった (図 1 参照)。
2. gag 遺伝子を pSO246 シャトルベクターに導入し、電気穿孔法にて形質転換した結果、rBCG/SIVgag mac および rBCG/SIVgag Opt を得た (図 2a 参照)。薬剤による選択を経て、それぞれのクローン株を樹立した。
3. それぞれのクローン株の菌体抽出液からは、Western Blot 法で約 55 kDa に Gag 特異的なバンドが検出された (図 2b 参照)。また Gag p27 抗原の ELISA 法において、rBCG/SIVgag Opt の菌体抽出液からは rBCG/SIVgag mac に比較して、約 10 倍量にあたる p27 抗原を検出した。
4. カニクイサルにヒト投与量にあたる 0.1 mg または 1/10 量の 0.01 mg の rBCG を皮内接種し、免疫応答の解析を行った。Prime-boost 群では rBCG 接種 30 週後と 61 週後に rDIs を 10^7 pfu 皮内接種した。また各群 2 頭には、抗 BCG の pre-existing immunity の影響を検討するために、rBCG 接種の 52 週前に BCG_{Tokyo172} を接種した (図 3 参照)。いずれの投与群においても、接種後の局所反応は深刻でなく、BCG の pre-existing 個体においても局所反応は acceptable なものであった (図 4 参照)。Gag 特異的 IFN γ 産生細胞は、rBCG/SIVgag Opt の 0.1 mg 投与群では、接種 4 週後から誘導され、30 週後の rDIs の追加接種によって速やかに増強された。他群においては、反応は弱いものであった。さらに、rDIs 接種後に細胞内 IFN γ 染色を実施したところ、rBCG/SIVgag Opt 免疫群では CD4、CD8 陽性 T 細胞の双方で Gag 特異的な誘導が

みられた (図 5 参照)。

D. 考察

HIV/AIDS ワクチンの実用化を考えた場合、ワクチンの安全性および安定性は大きな課題として捉えられる。本研究では、実際に即したワクチン開発をテーマに、既にヒトでの使用実績のある BCG と DIs をベクターとした組換えワクチンの評価を行った。既に、我々の研究から BCG においては外来抗原の発現を 10-50 倍にまで増幅する手段としてコドン最適化を報告してきたが、今回は有力なワクチン標的抗原である Gag に応用し、発現量を約 10 倍に高めることに成功した。さらに、カニクイサルを用いた *in vivo* での評価においても、コドン最適化 rBCG の免疫増強効果を明らかにした。また、ヒトでの重大な懸念事項である抗 BCG の pre-existing immunity の問題も、今回カニクイサルの系においては克服することできた。

Prime-boost regimen を構築する上で、追加抗原として用いた DIs は、過去に新生児を対象とした臨床試験を実施しており、BCG と同様にヒトでの安全性が確立されたベクターであるとともに、rDIs では細胞性免疫を主体とした優れた免疫誘導能があることが報告されている。本研究によって、rBCG の長期免疫持続性と rDIs の細胞性免疫誘導の組み合わせによって、有効性、安全性、安定性、易生産性すべての条件を満たす HIV/AIDS ワクチンを開発する可能性が示唆された。

E. 結論

rBCG と rDIs の人投与可能な prime-boost regimen により細胞性免疫は高頻度に誘導可能であり、初回免疫原の rBCG においてコドンを改変することが、rDIs 接種後の免疫応答を大きく左右することが明らかとなった。強い細胞性免疫応答は生体のウイルス量を抑えると示唆されていることから、このワクチン群での感染実験において、迅速にウイルス感染を制御できるか期待される。

F. 健康危害情報 特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Gzyl J, Bolesta E, Wierzbicki A, Kmiecik D, Naito T, Kaneko Y, Honda M, Komuro K, Kozbor D. 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, 2004.
- 2) Nakasone T, Hara T, Yoshino N, Honda M. Update on HIV/AIDS in Japan, 2003. In *AIDS in ASIA*. Y. Lu and M. Essex ed. Kluwer Academic Publishers London, 73-81, 2004.
 - 3) 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, Honda M. Japan's Collaboration with Thailand in the Development of HIV/AIDS Vaccine. In *AIDS in ASIA*. Y. Lu and M. Essex ed. Kluwer Academic Publishers London, 561-569, 2004.
 - 4) Hamano, T, Sawanpanyalert P, Yanai H, Piyaworawong S, Hara T, Sapsutthipas S, Phromjai J, Yamazaki S, Yamamoto N, Warachit P, Honda M, Matsuo K. 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.
 - 5) Dewan Z, Watanabe M, Terashima K, Aoki M, Sata T, Honda M, Ito M, Yamaoka S, Watanabe T, Horie R, Yamamoto N. Prompt tumor formation and maintenance of constitutive NF- κ B activity of multiple myeloma cells in NOD/SCID γ^{cnull} mice. *Cancer Sci* **95**: 564-568, 2004.
 - 6) Someya K, Xin K Q, Matsuo K, Okuda K, Yamamoto N, Honda M. A consecutive prime-boost vaccination of mice with simian immunodeficiency virus (SIV) *gag/pol* DNA and recombinant vaccinia virus strain DIs elicits effective anti-SIV immunity. *J. Virol.* **78**:9842-9853, 2004.
 - 7) Takeda S, Shiosaki K, Kaneda Y, Nakasatomi T, Yoshizaki H, Someya K, Konno Y, Eda Y, Kino Y, Yamamoto N, Honda M. Hemagglutinating virus of Japan (HVJ) protein is efficient for induction of CD4+ T-cell response by a hepatitis B core particle-based HIV vaccine. *Clin. Immunol.* **112**:92-105, 2004.
 - 8) Yamakami, K, Honda M, Takei M, Ami Y, Nakasone T, Kitamura N, Nishinarita S, Sawada S, Horie T. Early bone marrow hematopoietic defect in SHIV C2/1-infected macaques and relevance to advance of disease. *J. Virol.* **78**:10906-10910, 2004.
 - 9) Yoshino N, Lu FXS, Fujihashi K, Hagiwara Y, Kataoka K, Lu D, Hirst L, Honda M, van Ginkel FW, Takeda Y, Miller CJ, Kiyono H, McGhee JR. A Novel Adjuvant for Mucosal Immunity to HIV-1 gp120 in Nonhuman Primates. *J. Immunol.* **173**:6850-6857, 2004.
 - 10) Someya K, Cecilia D, Ami Y, Nakasone T, Matsuo K, Burda S, Yamamoto H, Yoshino N, Kaizu M, Ando S, Okuda K, Zolla-Pazner S, Yamazaki S, Yamamoto N, Honda M. Vaccination of rhesus macaques with recombinant Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin Env V3 elicits neutralizing antibody-mediated protection against simian-human immunodeficiency virus with a homologous but not a heterologous V3 motif. *J. Virol.* **79**(3):1452-62, 2005.
- ## 2. 学会発表
- 1) Honda M, Yamamoto N. Cooperation for study of HIV-1 infected individuals & collaborative development of an HIV/AIDS vaccine. South Africa-Japan Science and Technology Forum, 1st Session of the Joint S&T Committee between the Republic of South Africa and Japan, May 11-13, Pretoria
 - 2) 吉野直人, 兼清優, 染谷健, 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 ワクチンの皮内接種による粘膜免疫誘導. 第 18 回日本エイズ学会総会. (12/9-11, 2004, 静岡).
 - 3) 泉泰之, 網康至, 松尾和浩, 山本直樹, 本多三男. CRF01_AE Gag を組み込んだ BCG/ワクシニア DIs プライムブーストワクチンのサルを用いた実用化研究. 第 18 回日本エイズ学会総会. (12/9-11, 2004, 静岡).
 - 4) 山上賢治, 武井正美, 網康至, 仲宗根正, 北村登, 三田村巧, 本多三男, 澤田滋正. 病原性 SHIV C2/1 感染カニクイザルにおける早期骨髄幹細胞コロニー形成の障害と病態進行への関連性. 第 18 回日本エイズ学会総会. (12/9-11, 2004, 静岡).
 - 5) 原敬志, 坂本優子, 照沼裕, 仲宗根正, 本多三男, 山本直樹, 巽正志. アフリカ由来 HIV-1

subtype C 感染性分子クローンの樹立と解析.
第 18 回日本エイズ学会総会. (12/9-11, 2004, 静岡).

6) Someya K, Matsuo M, Izumi Y, Ami Y, Nakasone T, Yamamoto N, Honda M. A novel recombinant vaccinia DIs is replication deficient and efficiently elicits virus-specific positive-immunity. 第 18 回日本エイズ学会総会. (12/9-11, 2004, 静岡).

7) 兼清優, 網康至, 松尾和浩, 染谷健二, 須崎百合子, 吉野直人, 長谷川篤彦, 山本直樹, 本多三男. 組換え BCG-および組換え DIs-HIV/SIV ワクチンのサルモデルによる評

価. 第 34 回日本免疫学会総会. (12/1-3, 2004, 札幌).

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特になし.

2. 実用新案登録
特になし.

3. その他
特になし.

別紙 図表

図1. コドン改変および非改変 SIV gag 遺伝子のアライメント

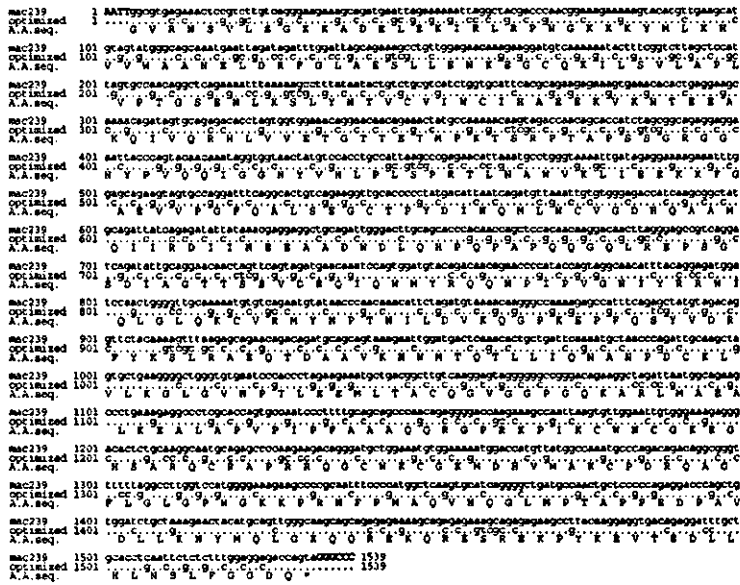


図2. SIV gag 発現プラスミドと形質転換株菌体抽出液のイムノプロット

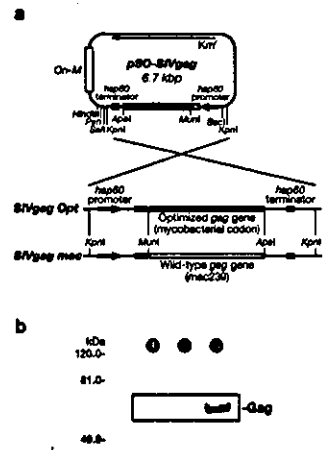


図3. カニクイサル免疫スケジュール

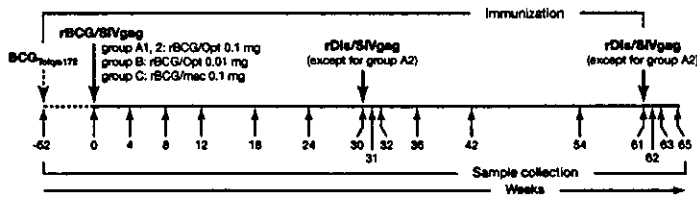


図4. rBCG および rDiS 接種部位の局所反応

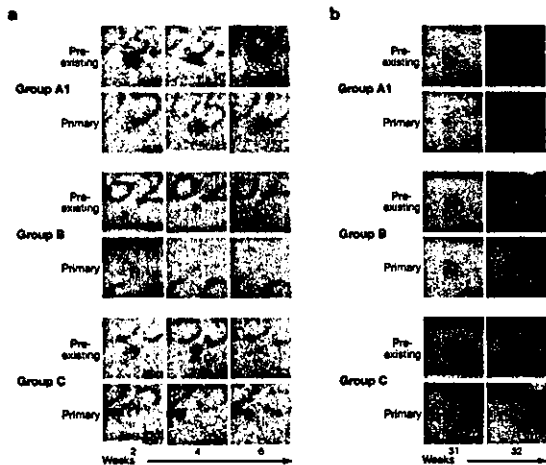
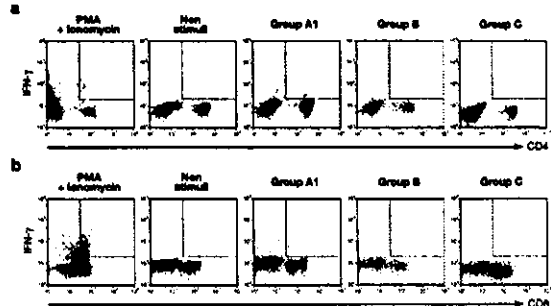


図5. Gag 特異的 IFN-γ 産生 CD4 および CD8 陽性 T 細胞の細胞内サイトカイン染色.



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

実験動物サルにおける MHC クラス I および KIR 遺伝子群を中心とする免疫制御遺伝子の解析
分担研究者 木村 彰方 東京医科歯科大学 難治疾患研究所 教授

研究要旨

RSCA 法を応用したアカゲザル MHC クラス I 遺伝子(Mamu-A 及び Mamu-B)群の多型解析法を開発し、遺伝子重複のために多重コピー化したクラス I 遺伝子のハプロタイプ構成を明らかにするとともに、同法を各個体のハプロタイプのタイピングに適用した。SIV ワクチン実験に供される個体群と繁殖コロニーのブリーダー個体群をあわせて 160 個体のアカゲザルについて、B リンパ芽球様細胞株より抽出した RNA に由来する cDNA を解析したところ、16 種の比較的高頻度に見られるハプロタイプを同定でき、それらを構成する Mamu-A、8 アリル、Mamu-B、16 アリルの塩基配列を明らかにした。さらに、MIC 遺伝子座とマイクロサテライト座位の多型解析から同領域の多様性についての理解を深めるとともに、より迅速かつ確実なタイピング法を開発する基礎を得た。一方、クラス I およびクラス I 様分子は T 細胞に抗原を提示するだけでなく、NK 細胞の機能調節にも関与している。そのため、KIR、ULBP など NK 細胞の認識に関わる遺伝子群について、宿主の感染抵抗性や免疫応答性を規定する遺伝要因の解明に応用可能な多型検出法の開発を目指した。

A. 研究目的

ウイルス感染症の発症や重症化、ワクチンによる予防効果には個体差があることが知られているが、この個体差は病原体への免疫応答性の個体差によるものであり、それは MHC (ヒトでは HLA) や NK レセプターをはじめとする免疫応答関連遺伝子群の多型に起因する。例えば、HIV ウイルス感染後の AIDS 発症は HLA-B35 陽性者では早く HLA-B57 陽性者では遅い。また活性化 NK レセプターである KIR-3DS と Ile80 型の HLA-Bw4 アリルを同時に有する場合は、特に AIDS 発症が遅い。一方、HBV ワクチン接種において、HLA-B*0701, DRB1*0101, DRB1*0803 などの保有者では早期より高い抗体価が得られるが、HLA-*5401, DRB1*0405, DQB1*0401 な

どの保有者では複数回のワクチンでも抗体価が得られない場合がある、などが報告されている。そこで本研究では、ワクチン開発研究に有用な物的基盤とそれについての遺伝的情報資源を整備することを目的として、実験に供されるアカゲザルの集団を対象に、免疫応答の個体差を規定する遺伝的背景を解明する。このため、MHC クラス I 遺伝子群や KIR 遺伝子群など、免疫制御遺伝子群のタイピングシステムを開発し、その多様性を詳細に解析する。

B. 研究方法

1) アカゲザル MHC クラス I 抗原遺伝子群の解析: ワクチン開発研究に利用されるアカゲザル実験個体群の MHC クラス I の型を明確にするため、

これまでに MHC クラス I(Mamu-A および Mamu-B)の cDNA について、クローン化した Mamu 遺伝子をレファレンス鎖とする RSCA を応用した多型解析法を開発してきた。今回、国内で維持されているアカゲザル実験個体群繁殖コロニーのブリーダー27 個体を含め 160 個体に由来する B リンパ芽球様細胞株の total RNA 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 の cDNA 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、前述の RSCA 法を用いて、アカゲザル個体の MHC クラス I 遺伝子多型を解析した。ブリーダーとその子孫の間でのアレルの伝達パターンから、実験個体群に比較的高頻度に伝達されている MHC クラス I ハプロタイプの構成を推定し、それによって各個体のハプロタイプを決定した。また並行して、実験個体群に比較的高頻度に伝達されている MHC クラス I ハプロタイプについて個々のアレルの配列を発見ベクターに単離して、それぞれの塩基配列の明らかにするとともに、プラスミド DNA を精製して単一のアレルの機能解析を目的とする実験の準備をすすめた。

一方、B リンパ芽球様細胞株のゲノム DNA を用いて、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。さらに、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 遺伝子群の多型を解析した。

2) KIR 領域、および ULBP 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環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。また、上記の MIC 遺伝

子群は活性化 KLR 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。また、MHC 領域以外にも NK 細胞レセプターのリガンドとなる分子が知られ、第 6 染色体長腕に位置する ULBP 遺伝子群も MHC クラス I 様分子をコードして NK 細胞の機能調節に関わると考えられる。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した。また、ヒト ULBP 遺伝子群の多型解析のために、同領域のマイクロサテライトマーカー検出法を新たに考案して、ハプロタイプ構造解析が可能か否かを検討した。

(倫理面への配慮)

本研究に関連したヒト遺伝子解析研究は、ヒトゲノム遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守することとし、東京医科歯科大学難治疾患研究所倫理審査委員会の承認を受けている。【研究課題「HIV ウイルス感染防御機構の究明に関わる研究」(平成 13 年 8 月 28 日付)】

C. 研究結果

1) RSCA を応用した Mamu-A および Mamu-B の多型解析法を適用して、繁殖コロニーのブリーダー27 個体を含む 160 個体を解析した。アレルの伝達様式から、単一のブリーダーから複数の実験個体に伝達している MHC クラス I ハプロタイプを 16 種同定した(a、b、c、d、e、f、g、h、j、k、p、r、s、t、u および z)。このうち、ハプロタイプ a とハプロタイプ b は、ブリーダー個体 R90-120 に由来しており、ワクチン接種後の抵抗性とウイルス抗原特異的な CTL 応答性の相違と共分離しすること、抗原特異的な CTL 高応答性即ち感染抵抗性がハプロタイプ a によって規定されることが明らかされたものである(図 1)。こ

うして推定した1ハプロタイプあたりの発現遺伝子の数は、Mamu-A 遺伝子は1~4個、Mamu-B 遺伝子は2~6個であった(表1)。

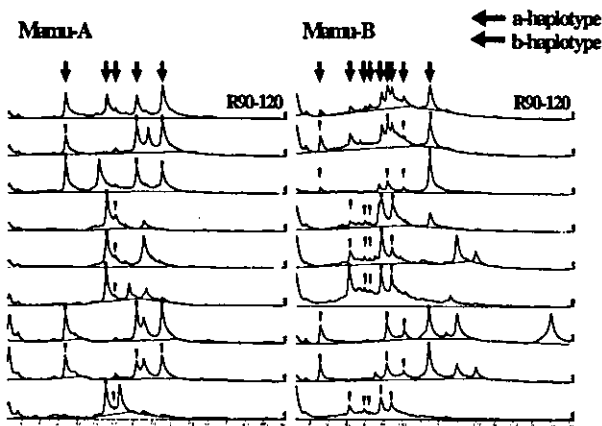


図1 R90-120由来のMHCクラスIハプロタイプの分離

ハプロタイプ	発現している Mamu-A	発現している Mamu-B	由来するプリーダー
a	3	4	R90120MY
b	2	5	R90120MY
c	3	3	R90122MY
d	2	2	R90010MY
e	3	2	R90010MY
f	1	5-6	R90029MY
g	3	5	R90030MY
h	1	2	R90030MY
j	2-3	4	R90088MY
k	4	4-6	R90088MY
p	2-4	4-5	R89002LA
r	2-3	3-4	R89002LA
s	3	6	R91010F1
t	2	4	R91010F1
u	4	2	R9083F2
z	3	3	R9014F1



表1 MHCクラスIハプロタイプの構成

2) 実験個体群に比較的高頻度にみられる MHC クラス I ハプロタイプを構成する個々のアリの配列を順次クローン化し、その塩基配列の明らかにした。これまでに、Mamu-A、8アリル、Mamu-B、16アリの配列を明らかにしたが、このうちハプロタイプ c の Mamu-A、1アリル、Mamu-B、2アリルがハプロタイプ e から単離したものと一致した。ハプロタイプ c とハプロタイプ e では RSCA の泳動像がほぼ一致していることから、繁殖コロニーでの由来は異なるが同一である可能性が高い。これらの由来する R90010MY 個体と R90122MY 個体が血縁関係にあるか、原産地のアカゲザル集団にある程度の頻度で分布するもの

と考えられた。また、公開データベースに登録されているアリルに一致したものは、ハプロタイプ b の Mamu-A、1アリル(Mamu-A*0504)、Mamu-B、2アリル(Mamu-B*36、B*3002)のみであることから、アカゲザル集団ではクラス I 遺伝子の多様性が非常に高いことが想定された。

3) ヒト第6染色体 HLA 領域に存在するマイクロサテライト座位の多型を検出する PCR プライマーのうち、クラス I 領域の C1_2_A と C2_4_4、クラス II 領域側の D6S291 と D6S1701 を用いてアカゲザルのゲノム DNA で多型を検出できる。これらを用いて親子間でのハプロタイプ伝達を決定できるかを検討した。R90-120 のは、

haplotype a: D6S291*208-D6S1701*238

- C1_2_A*240-C2_4_4*348

haplotype b: D6S291*208-D6S1701*255

- C1_2_A*240-C2_4_4*378

を有する。4座位のうち2座位がヘテロ接合であり、ハプロタイプの伝達は検出可能と考えられた(図2)。また、表2に示すように、一部に同一アリルに連鎖するものがあるものの、C1_2_A と C2_4_4 の両者を用いれば、他のクラス I ハプロタイプの伝達を検出可能であった。

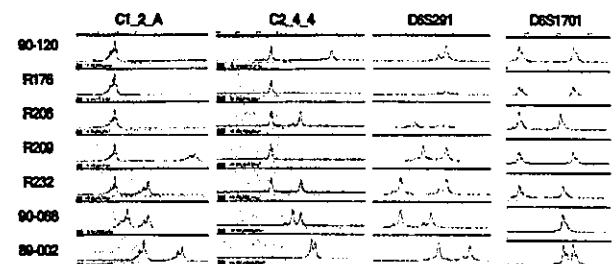


図2 サルMHC領域のマイクロサテライト多型

ハプロタイプ	C1-2-A	C2-4-4
a	*240	*348
b	*240	*378
d	*274	*358
e	*274	*324
p	*254	*370
r	*274	*366
s	*282	*374
t	*240	*362
z	*274	*324

表2 MHCクラスIハプロタイプのマイクロサテライト多型