

200500076A

厚生労働科学研究費補助金

国際医学協力研究事業

HIV 感染症における免疫応答の解析と

その臨床応用に関する研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山本 直樹

平成18年3月

目 次

I. 総括研究報告書	1
HIV 感染症における免疫応答の解析とその臨床応用に関する研究 山本直樹 (国立感染症研究所エイズ研究センター長)	1
II. 分担研究報告書	9
1. クロスクレイド HIV ワクチンの研究 山本直樹 (国立感染症研究所エイズ研究センター長)	9
2. ワクチンによる SHIV 複製制御の長期解析 俣野哲朗 (東京大学医科学研究所教授)	15
3. HIV のコントロールに寄与する中和抗体の検出とその効果的な誘導 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長)	20
4. 粘膜組織における HIV の感染拡大および制御機構の解明 高橋秀実 (日本医科大学微生物学免疫学教室教授)	25
5. アジアにおけるエイズ流行制圧を目的とするワクチンおよび他の 新規治療技術開発へ向けた分子疫学研究 武部 豊 (国立感染症研究所エイズ研究センター第一室長)	31
6. 新規の CCR5 阻害剤 AK602 (AVC) の作用機序解明と構造学的解析 満屋裕明 (熊本大学医学薬学研究部教授)	37
7. HIV-CTL エピトープが CTL 認識を回避する分子機構 岩本愛吉 (東京大学医科学研究所附属病院長)	42
8. 樹状細胞を用いた抗 HIV-1 感染防御免疫応答の誘導 田中勇悦 (琉球大学医学部免疫学分野教授)	45
9. 免疫賦活療法により誘導された CTL からの HIV の逃避 岡 慎一 (国立国際医療センターエイズ治療研究開発センター部長)	49
10. 薬剤耐性 HIV の進化・選択における gag-pol の相互干渉 杉浦 互 (国立感染症研究所エイズ研究センター第二研究グループ長)	52
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	59
IV. 研究成果の刊行物・別刷	67

1. 総括研究報告書

HIV 感染症における免疫応答の解析とその臨床応用に関する研究
主任研究者 山本 直樹 国立感染症研究所エイズ研究センター長

研究要旨

本研究では、アジアのエイズを中心とした問題に効果的に立ち向かうため基礎的、臨床的、疫学的立場から研究を行い、その方策について検討した。とくにエイズ/HIV 感染のワクチン開発とウイルスの耐性発現に対応できる薬剤の開発に焦点をおいて研究を行った。ワクチンについては、DNA/Sendai prime-boost ワクチンの実用化をめざしたサルにおける有効かつ安全な開発研究、アジアで主に伝播しているクレイド B ウイルスの Env 蛋白解析とワクチン抗原として有用な HIV の同定、その効果のワクシニア DIs 及び BCG 東京株をベクターとして用いた検討を行った。さらにクロスクレイド Env ワクチンの研究で V3-tip アミノ酸配列が GPGR を示すクレイド B の Env ペプチドの連続投与実験を行い、広域のウイルスを中和する抗体を得た。また、自然免疫系の役割を解明するため、それぞれの細胞群をヒトおよび primate としてのサルの組織や血液、初乳より分離・採取しそれぞれの HIV 感受性、感染細胞の制御能、そして粘膜における CTL の誘導・活性化能などを検討した。また DC の前駆体である単球の CCR5 または CXCR4 をプレートに固相化した特異的単クローン抗体で架橋することにより、Th1 を優位に誘導する機能的 DC の分化に成功した。さらにアジアにおけるエイズ流行の分子疫学的研究、重感染に際するウイルス間の相互作用、ウイルスの個体内進化の解析およびそれによるワクチン開発戦略の考察を行った。一方、治療薬・薬剤耐性・免疫病態の研究では、新規の CCR5 阻害剤 AVC の抗 HIV-1 作用発現の分子レベルでの機序の解明と構造生物学的解析を進めた。薬剤耐性症例検体を用い、非サブタイプ B において Gag-protease 間にどのような相互干渉があるかを調べ、薬剤耐性の選択・進化機序について考察を加えた。HLA-A24 によって拘束される HIV-CTL エピトープが CTL 認識を回避する分子機構を明らかにすることを試みた。同様に、急性期 HIV 患者に対し、計画的治療中断療法（S T I）を行い、誘導された CTL から HIV がどのように逃避するのかを解析した。

分担研究者

俣野哲朗（東京大学医科学研究所教授）

本多三男（国立感染症研究所エイズ研究センター
第一研究グループ長）

高橋秀実（日本医科大学微生物学免疫学教室
教授）

武部 豊（国立感染症研究所エイズ研究センター
第一室長）

満屋裕明（熊本大学医学薬学研究部教授）

岩本愛吉（東京大学医科学研究所附属病院院長）

田中勇悦（琉球大学医学部免疫学分野教授）

岡 慎一（国立国際医療センターエイズ治療研究
開発センター部長）

杉浦 互（国立感染症研究所エイズ研究センター
第二研究グループ長）

A. 研究目的

エイズ陽性者数の世界分布は、2004 年末現在、約 4000 万人と予想されている。とくにそのうちの約 3000 万人はアフリカ、東南アジアそして南米に存在、特にアフリカ南部は 2500 万人と最も流行が激しく、この地域では国民の平均寿命は 30-40 年と短縮している。今後さらに、中国、インドそしてロシアは近い将来、その流行の激化が予想される。このようにアジアには巨大な人口を抱える国が多いことから、HIV 陽

性率が低くても感染者数は非常に大きくなり、現在のアジアのエイズの状況は感染爆発寸前と言える。一方、わが国でも厚生労働省のエイズ発生動向調査によれば、HIV/AIDS 報告者数は増加傾向が続き、感染経路は大半が性感染である。1999 年以降、男性同性愛者間の感染による感染者数が異性間感染を大きく引き離すように急増し始めた。また、HIV 感染者の若年化傾向も顕著になってきた。

本研究では、日米が共同で研究を進め、アジア諸国の研究者とともに、エイズの予防と治療について分子生物学、遺伝子工学レベルの研究の推進をおこなうことを目的とする。

B. 研究方法

1. HIV 感染症の予防に関する研究

- 1) DNA ワクチンあるいはセンダイウイルス (SeV) ベクターワクチン接種により、SHIV89.6P 複製制御が認められた 3 頭のサル の長期解析を行う。血漿中ウイルス量、ウイルス特異的 CTL レベル、中和抗体レベル、プロウイルスゲノム塩基配列などを経時的に解析する (俣野)。
- 2) アジアで主に伝搬しているクレイド B ウイルスの Env 蛋白の解析とワクチン抗原として有用な HIV の同定を行う。さらに、Env 蛋白遺伝子を修飾しワクチンベクターに組み込んだ後、能動免疫による交差反応性中和抗体検出を試みる。また、Env 抗原ワクチンを連続投与法によってブースター免疫し、効果的な誘導法として機能するか否かをワクシニア DIs 及び BCG 東京株をベクターに用いて検討する (本多)。
- 3) V3-tip アミノ酸配列が GPGR を示すクレイド B のクロスクレイド Env ワクチンの連続投与実験を行い、中和抗体の産生につき検討した (山本)。
- 4) IgA を大量に含み粘膜組織の特性を反映すると推測される初乳より分離・採取しそれぞれの HIV 感受性、感染細胞の制御能、そして粘膜における CTL の誘導・活性化能などを検討した (高橋)。
- 5) DC 培養は定法に従った。単球の CCR5 および CXCR4 架橋には、プラスチックプレートに固相化した自家製特異的単クローン抗体 (抗 CCR5 T312、および抗 CXCR4 A120) を用いた。この場合は、IL-4 のみ添加の条件も検討した (田中)。
- 6) アジアにおけるエイズ流行を標的とするワ

クチン開発のための基盤となるアジア型 HIV 流行株の全塩基配列データベースの拡充と感染性分子クローンなどの基盤的研究試薬の整備を行う。さらに多重感染あるいはスーパーインフェクションに際する incoming virus と resident virus 間の相互作用、ウイルスの個体内進化の解析およびそれによるワクチン開発戦略の考察を行う (武部)。

2. 治療・HAART 耐性・免疫病態に関する研究

- 1) 新規の CCR5 阻害剤 AK602 (aplaviroc, AVC) の抗 HIV-1 作用発現の分子レベルでの機序の解明と AVC がケモカイン-ケモカイン受容体相互作用に及ぼす影響について構造学的解析を進める (満屋)。
- 2) 耐性変異 HIV-1 が感染者体内で進化。選択にあたり、Gag と protease の間に相互干渉があることが知られている。そこで薬剤耐性を獲得し、かつ詳細な治療歴があきらかな症例検体を用い、非サブタイプ B において Gag-protease 間にどのような相互干渉があるかを調べ、薬剤耐性の選択・進化機序について考察する (杉浦)。
- 3) HLA-A24 によって拘束される HIV-CTL エピトープが CTL 認識を回避する分子機構を明らかにする (岩本)。
- 4) 免疫賦活療法として、急性期 HIV 患者に対し、計画的治療中断療法 (STI) を行ってきたが、この治療により、一部の患者においては、CTL が誘導されるものの、その持続期間は限られていた。今回は、誘導された CTL から HIV はどのように逃避していったのかを解析する。方法は、経時的な検体を用い、CTL エピトープの遺伝子解析を行っていく (岡)。

(倫理面への配慮)

本研究に臨床材料が使用される場合には、血液など臨床材料提供者の個人情報が出漏りしないよう厳格にプライバシーを保護する。研究はすべて unlinked anonymous の手法によって行われる。研究方法による研究対象者に対する不利益について充分の説明を加え、起こりえる危険性の排除に可能なかぎりの方策をとる。またアジア各国エイズ研究機関との共同研究に関しては各国政府所轄機関の指示する倫理規程に従って遂行される。臨床材料の保存・使用に際しては、インフォームドコンセントを得ることとし、

ヒトゲノム研究に関しては研究者の所属する機関の承認を得る。本研究の成果をヒトに応用する場合には、研究対象者の安全性に細心の注意を払い、研究担当者の所属する機関の IRB の承認を得る。動物を用いる実験に関しては、動物愛護の精神に則って研究を行う。AVC の第 3 相臨床試験は米国食品医薬品局の監察の下に実施されており高い倫理性が保持されている。AVC の抗 HIV-1 作用発現の分子レベルでの機序解明等はヒト細胞を使用するものの、全て試験管内、または小動物を使うものでヒトへの直接の関連はない。STI 研究については、平成 13 年に、「急性期 HIV 患者に対する Structured Treatment Interruptions」というタイトルで、国立国際医療センター倫理委員会の承認を得ている（平成 13 年 6 月 8 日開催(受付番号 10)）今回は、その研究の一環として保存検体を用いるため、研究対象者に対する不利益はない。

C. 研究結果

1. HIV 感染症の予防に関する研究

慢性エイズモデルにおける CTL のウイルス複製抑制機序解明の一助とする目的で、急性エイズモデルにおける CTL のウイルス複製抑制機序を解析し、慢性エイズモデルと比較検討した。今年度は、DNA/SeV-Gag ワクチン接種により SHIV89.6P 複製制御に至った 3 頭の長期解析を行い、いずれの 3 頭とも、SHIV89.6P チャレンジ後約 2 年までの観察期間中、ウイルス血症は検出下限以下で、ウイルス複製制御は維持された。チャレンジ後約 1 年の時点のプロウイルスの塩基配列の解析では、優位となる変異は認められず、野生型の塩基配列が優位のままであった（俣野）。SIV gag を組込んだワクチンの免疫を行いウイルス血症をコントロールできる免疫グループを作成した。さらにウイルスのコントロールが不可能なベクター接種群と比較するとウイルスのコントロールが可能な群では細胞性免疫の誘導が有意に高かった。液性免疫の指標としての抗 SIV gag IgG 抗体価はワクチン免疫とともに上昇した。しかし、ベクターコントロール群では抗体価は上昇しなかった。さらに、env 抗体価を解析すると、チャレンジに用いた SHIV の HIV 部分に対する抗体価はベクターコン

トロール群でも検出されたがワクチン接種群では有意に高い抗体価が得られた。特記すべきことは防御能を示すサル群では免疫抗原として SIV gag のみを組込んだにもかかわらず、チャレンジに用いたウイルスに対して中和力価が誘導されたことである（本多）。クロスクレイド HIV ワクチン開発の第一歩として中和抗体を能動免疫で誘導することを試み、これまで抗原性が弱く有効な抗体産生が困難であると言われてきた HIV-1 V3 チップ部分の中和抗体エピトープに対する抗体産生が可能になることを明らかにすることができた。即ち、V3 チップ GPGR エピトープのフランキング領域の異なる野生株由来のペプチドを連続投与すると狭い V3 チップをハイアフィニティで認識できるクロスリアクティブな抗体を産生させるということである（山本）。

初乳に着目し、その中に含有される細胞群の実体を研究した。その結果、初乳中の細胞の主体は、脂肪粒を多量に含有した CD14 分子陽性のマクロファージ群 (BrMMΦ) であり、その中に CD4 陽性の T リンパ球は殆ど認められないことを確認した。そして、この CD14 陽性 BrMMΦ は、樹状細胞活性化の指標である CD83 分子が発現しており、樹状細胞への分化因子である GM-CSF を産生・分泌し、IL-4 の添加により容易に樹状突起ならびに CD1 分子を発現した樹状細胞群へ分化することを見出した。またこの CD4 陽性 BrMMΦ の表面にはケモカインレセプターが発現しており、R5-type HIV-1 に対する強い感受性が確認されたものの、こうした高い感受性ならびにウイルス産生能を有するマクロファージ群の感染伝播能は、それよりもウイルス複製能の低い樹状細胞に比べ遙かに低く、感染伝播力の強さは樹状細胞上に発現した HIV-1 捕捉レセプターである DC-SIGN の量に依存することを見出した（高橋）。

免疫応答誘導に用いるための活性の高い DC の分化培養方法を研究する中で、新たな試みとして CCR5 及び CXCR4 分子の架橋の効果を検討した。ケモカイン受容体を架橋された単球は、大量の M-CSF を産生し、他にも RANTES, MIP-1α/β などの β ケモカインを産生した。予想通り、他のサイトカインを加える必要なく、

通常の培地のみでこの架橋単球は食作用のあるマクロファージに分化した。

さらに CCR5 または CXCR4 を架橋、または DC を IFN- β で成熟させて免疫誘導機能を比較した。架橋培養 DC は、非架橋培養 DC と比較し、*in vitro* でナイーブアロ CD4+T 細胞の Th1 への誘導活性が強かった (田中)。

アジアにおけるエイズ制圧に向けた新規技術開発のための基盤的研究ツールの拡充・整備に向けた国際的な研究貢献を目指し、国内外の共同研究者との共同研究によって、次の 3 つの柱からなる研究を進めた: 1) アジア型 HIV-1 流行株の系統的分離、2) 新たに分離されたアジア型 HIV-1 流行株の全ゲノム塩基配列の決定による国際的 HIV データベース拡充への貢献、3) ウイルス学研究のための基本研究ツールの一つであるアジア型 HIV-1 ヴァリアントの感染性分子クローンの樹立とその性状の解析。これらの研究活動によって、今年度、近年感染者の増加傾向が著しいマレーシアに出現した新型の組換え型流行株 (circulating recombinant form, CRF) を分離・同定し、その全塩基配列を決定した (武部)。

2. 治療・HAART 耐性・免疫病態に関する研究

AVC が CCR5 の細胞外ドメインと上部膜貫通ドメインで形成され疎水性ポケットに結合し、その結合様式は他の構造を有する CCR5 阻害剤 (SCH-C, TAK-779) といくつかの点で異なっていることを見い出した。更に CCR5 の AVC 結合ポケットの一部 (第 4-5 膜貫通ドメイン近傍) に HIV 感染に重要でありながら、ケモカイン作用へはほとんど影響しない領域があることを明らかにし、HIV 感染のみに重要な構造をターゲットとした低分子化合物をデザインすることで、ケモカインレセプターの生理的作用を阻害しない抗 HIV 薬のモデリングが可能である事を示した (満屋)。プロテアーゼ阻害剤耐性の獲得機構を理解することを目的にプロテアーゼ阻害剤耐性変異と Gag 変異間の連鎖不平衡解析を行った。その結果 Gag 基質領域にプロテアーゼ阻害剤耐性変異と連鎖した 3 つの変異 (Y132F, L449V, R452K) があることが新たに明らかにされた。今回の解析よりプロテアーゼ阻害剤耐性変異と

gag 領域の配列には密接な関連があることが改めて確認された。薬剤耐性の評価を正確に行うためには gag の変異についても考慮する必要があると示唆された (杉浦)。日本人に高頻度な HLA-A24 陽性者において *nef* 遺伝子内の CTL エピトープ Nef138-10 に着目し、選択圧存在下 (HLA-A24 陽性者) におけるエスケープ変異体の出現速度および選択圧非存在下 (HLA-A24 陰性者) における復帰変異体の出現速度について検討した。その結果、HLA-A24 による選択圧の無い環境において、変異体 Nef138(Y2F) から野生型が優勢となるまでには年余の長時間を要することが判明した。逆に、HLA-A24 陽性急性感染者 3 症例全てにおいて、調べたものも早期のサンプルにおいてすでに Nef138(Y2F) 変異体のみが検出されたため、HLA-A24 の選択圧によりエスケープ変異体が出現するまでに要する期間についてはさらなる検討が必要と考えられた (岩本)。免疫賦活を目的とした急性期 HIV 感染者に対する計画的治療中断療法 (STI 療法) が終了した。一部の患者においては、一時的にウイルス抑制を示す患者が見られ CTL も誘導できていた。しかし、2 年間の経過観察にて CTL からの escape mutant が出現していた。この治験は、今後の治療ワクチンを考える上で、エピトープの重要性を示唆する結果であった (岡)。

D. 考察

DNA プライム・SeV-Gag ベクターブーストワクチン接種により SHIV89.6P 複製制御に至った 3 頭の長期解析を行い、長期の SHIV89.6P 複製制御が可能であることが明らかとなった。また、チャレンジ後 1 年を経過した時点のプロウイルスにおいても変異の蓄積が進展せず、野生型のウイルスが優位のままとされており、ウイルス複製が極めて低いレベルに抑えられていた可能性が示唆された。HIV 感染はコントロールが難しいとされる慢性ウイルス感染症ではあるが顕著なウイルス血症を伴うことからそのコントロールが可能かもしれないと議論されている。その意味で抗原特異的な細胞性免疫の誘導とともに効果的な中和抗体の誘導が可能であれば完全防御を目標にできる感染症と考えられる。本

研究では HIV 感染の特性を考慮に入れて極めて安全なベクターを用いたワクチンの能動免疫による細胞性及び液性免疫の誘導を試み、防御免疫の誘導の確立にむけたワクチン免疫の最適化も検討した。今回、特にこれまで明らかでなかった液性免疫の関与を細胞性免疫誘導ワクチンの防御免疫との関連性について明らかにすることができた。HIV 感染症が進行性の免疫不全症を主な病態とすることから極めて安全性に富むワクチンの開発の実用化が重要な因子となる。その意味で免疫不全状態になっても安全であることが確立されているワクチンベクターを検索し、BCG-Tokyo 株とワクシニアウイルス DI_s 株を用いたワクチンの開発を行った。変則的ではあるが抗 gag 抗体は中和機能を有するのではないかと一部伝えられていることから、その可能性も完全に否定できないが env の中和抗体と比較してその中和力価は有意に弱いので抗 gag 抗体がこの実験系で存在するかどうかを含めて今後の検討課題とした。これに関し、HIV ウイルスの多様性が広がっているが、細胞性免疫については gag 抗原を標的に用いるとクレイドを超えて有意に反応することが明らかにされている。しかし、細胞性免疫のみでウイルス感染をコントロールすることは有効ではあるが効果が限られており、細胞性免疫に中和抗体の誘導を可能に出来るワクチンの開発が大きなプロジェクトの一つとして捉えられ始めている。本研究ではクロスクレイド HIV ワクチン開発の第一歩として中和抗体を能動免疫で誘導することを試み、これまで抗原性が弱く有効な抗体産生が困難であると言われてきた HIV-1 V3 チップ部分の中和抗体エピトープに対する抗体産生が可能になることを明らかにすることができた。即ち、V3 チップ GPGR エピトープのフランキンギン領域の異なる野生株由来のペプチドを連続投与すると狭い V3 チップをハイアフィニティで認識できるクロスリアクティブな抗体を産生させることができることを見いだした。今後、種々のクレイドの env 領域の遺伝子構造とタンパク構造を検討することによりクロスクレイド中和抗体産生の可能性を検討する。

HIV の持続感染および感染拡大の場合は血液中ではなく粘膜組織ではないかとの新たな視点に

立ち、粘膜組織における HIV の感染拡大のメカニズムとその制御法を探る目的で、粘膜免疫を反映する分泌型 IgA を多量に含有する生直後に分泌される初乳に着目し、その中に含有される細胞群の実体を研究した。得られた事実から、粘膜組織における HIV-1 の感染標的が従来考えられていたような T リンパ球群ではなく、CD4 陽性の樹状細胞群であり、樹状細胞からの感染伝播力はその表面に発現している HIV-1 の捕捉レセプターである DC-SIGN の発現量によって規定されることを示唆している。

ワクチン研究で抗原提示細胞の解析は免疫原とその発現ベクターの選択、などとともにきわめて重要である。未だ十分に確立されていないヒトの機能的 DC の培養方法とそれを用いて抗原特異的免疫誘導について研究を行ない、Th1 の誘導機能的 DC の新たな分化誘導方法を見いだした。実際にこの新規 DC が HIV-1 感染抑制免疫応答を誘導できるかどうか、感染実験で検討する必要がある。

疫学研究において新たに分離された新型流行株は、国際的 HIV sequence database より 33 番目の CRF - CRF33_01B - として正式承認された。また中国における最も主要な流行株の一つである CRF08_BC の感染分子クローンの分離に成功した。分離ウイルス株のパネル、全塩基配列情報、感染性分子クローンはいずれも我が国を含むアジア地域を標的とするワクチン開発・ウイルス学研究的基礎的研究ツールとして重要であると考えられる。また、アジア地域における分子疫学研究は本研究の基盤となっているが、その研究成果を礎として、アジア地域における流行の成立に関する理解を深める一方、またこの地域における爆発的エイズ流行の原因となっているアジア地域固有のウイルス株の構造とその性質を明らかにすることは、とりわけこの地域を標的とするワクチン戦略を考える上で極めて重要と考える。

AIDS に対する化学療法では薬剤耐性 HIV に対する治療法の確立が最も重要な問題の一つとなって久しい。平成 16 年度までに AVC が多剤耐性株を含む R5-HIV-1 の感染・増殖を試験管内で強力に抑制、動物モデル (NOG-SCID マウス) の系でも強力な抗ウイルス活性を発揮する一方

で、ケモカイン (RANTES) の CCR5 への結合にはわずかしかな影響を与えず、RANTES の CCR5 を介した生理的作用を部分的にしか阻害しないこと、AVC のこのような特徴を構造学的に解析するために CCR5 と CCR5 阻害剤の結合モデルの構築を進めていることを報告した。これらの研究から我々は AVC が CCR5 の細胞外ドメインと上部膜貫通ドメインで形成される疎水性ポケットに結合し、その結合様式は他の構造を有する CCR5 阻害剤 (SCH-C, TAK-779) といくつかの点で異なっていることを見出した。更に CCR5 の AVC 結合ポケットの一部 (第 4-5 膜貫通ドメイン近傍) に HIV 感染に重要でありながら、ケモカイン作用へはほとんど影響しない領域があることを明らかにし、HIV 感染のみに重要な構造をターゲットとした低分子化合物をデザインすることで、ケモカインレセプターの生理的作用を阻害しない抗 HIV 薬のモデリングが可能である事を示した。さらに今回のプロテアーゼの薬剤耐性変異と gag の変異間の相互干渉を網羅的に調査した結果、プロテアーゼ阻害剤耐性獲得に伴って、pr55Gag タンパク質の基質領域に変異が生じることが改めて確認された。またそれ以外の領域においてもプロテアーゼ阻害剤耐性と連鎖するアミノ酸変異が生じることが明らかにされ、プロテアーゼ阻害剤耐性変異の獲得機序の理解には gag 領域の解析も行うことが必要であると考えられた。薬剤耐性研究に関しては、新たに得られた AVC は構造学的データから、より特異的・選択的な薬剤のデザインを図るといふ最近の分子標的のアプローチに即した研究といえる。今回の研究成果がより新しい、免疫系を含む生体への影響の少ない抗 HIV 作用に特化した新しい治療薬の同定、開発へとつながる可能性は高いと評価してよいと思われる。またプロテアーゼ阻害剤耐性変異と gag 領域の配列には密接な関連があることが改めて確認された。薬剤耐性の評価を正確に行うためには gag の変異についても考慮する必要が強く示唆された。

実際の感染者の臨床的解析も行った。急性感染期の A24 陽性症例 3 例を調べたが、3 例ともすでに Nef138(Y2F)変異を有していた。日本人には HLA-A24 陽性者が多いため、Virus donor の中で選択された変異体に感染したのか、

Nef138(Y2F)の変異が急速に選択されるのかについては結論を得られなかった。A24 陰性で Nef138(Y2F)に関する選択圧が働いていないと考えられる慢性感染期の症例 2 例において経過とともに CTL エピトープの復帰変異を追及したところ、*nef* 遺伝子内の Nef138-10 CTL エピトープにおいては復帰変異に年余の時間がかかることが判明した。免疫賦活療法により、一時的に確かに CTL は誘導できていた。しかし、2 年間の経過観察にて CTL からの escape mutant が出現していた。このことは、抗 HIV 薬を単剤で治療していたときと同じ結果であった。この治験は、今後の治療ワクチンを考える上で、エピトープ質および数の重要性を示唆する結果であった。免疫賦活を目的とした急性期 HIV 感染者に対する計画的治療中断療法 (STI 療法) が終了した。一部の患者においては、一時的にウイルス抑制を示す患者が見られ CTL も誘導できていたが、長期未発症者への誘導は不可能であった。

E. 結論

エイズは地球規模の感染症であり、Human security に対する大きな脅威となっている。しかしこれは、単独の国家や国際機関で対処できる問題ではない。また、医学的な問題としてだけでなく、社会政治的、あるいは経済的なコンテキストの中で包括的に捉えられなければならない。分担研究者は活発な研究を展開し、各自の計画をおおむね達成し、国際的にも評価に耐える成果を挙げた。今後、これらの研究活動をさらに促進し、各研究課題の相補性を高め、アジアにおけるエイズ対策研究の総合的発展をめざす。また、将来大きく発展する可能性のある研究と若手研究者の発掘、さらには問題点の洗い出しなどを通じて、今後のアジアのエイズ対策研究のさらなる発展に努める。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 論文発表

各分担研究者の項を参照のこと

2. 学会発表

各分担研究者の項を参照のこと

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- 1) 特願 2005-55064 (平成 17 年 2 月 28 日出願)「RNA 干渉ポリヌクレオチド混合物の設計方法、RNA 干渉ポリヌクレオチド混合物の設計装置、RNA 干渉ポリヌクレオチド混合物の作製方法、RNA 干渉ポリヌクレオチド混合物の設計プログラム、及び RNA 干渉ポリヌクレオチド混合物」(武部)
- 2) 特願 2000-137975 整理番号 YP2000-007 (平

成 12 年)「4'-C-エチニルピリミジンヌクレオシド化合物」(満屋)

- 3) 特願 2001-079611 整理番号 ONP3741 (平成 13 年)「トリアザスピロ [5, 5] ウンデカン誘導体を有効成分とする HIV 感染の予防および/または治療剤」(満屋)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

II. 分担研究報告書

クロスクレイド HIV ワクチンの研究

分担研究者：山本直樹（国立感染症研究所エイズ研究センター長）

研究要旨：HIV ウイルスの多様性が広がっているが、細胞性免疫については gag 抗原を標的に用いるとクレイドを超えて有意に反応することが明らかにされている。しかし、細胞性免疫のみでウイルス感染をコントロールすることは有効ではあるが効果が限られており、細胞性免疫に中和抗体の誘導を可能に出来るワクチンの開発が大きなプロジェクトの一つとして捉えられ始めている。本研究ではクロスクレイド HIV ワクチン開発の第一歩として中和抗体を能動免疫で誘導することを試み、これまで抗原性が弱く有効な抗体産生が困難であると言われてきた HIV-1 V3 チップ部分の中和抗体エピトープに対する抗体産生が可能になることを明らかにすることができた。即ち、V3 チップ GPGR エピトープのフランキンク領域の異なる野生株由来のペプチドを連続投与すると狭い V3 チップをハイアフィニティで認識できるクロスリアクティブな抗体を産生させることができることを見いだした。今後、種々のクレイドの env 領域の遺伝子構造とタンパク構造を検討することによりクロスクレイド中和抗体産生の可能性を検討する。

A. 研究目的

現在 HIV ワクチン開発の主な標的は細胞性免疫誘導であり、その実用化によって HIV 感染症の病態進行を抑え、HIV 発症の間をできるだけ長期化させることを目的にしている。つまり、発症予防ワクチンの開発がその目的となっている。これまでの SIV サルエイズモデルを用いた研究ではその効果が得られているが、細胞性免疫特に CTL エスケープが容易におきることから、細胞性免疫及び液性免疫のコンビネーションによるワクチン開発に研究の目的がシフトしつつある。さらに効果的な中和抗体を用いた受動免疫により、感染を完全に防御できることが明らかとなり、中和抗体ワクチンの開発が始まっているが、現在のところ全くメドがたっていない。これまでの我々のグループの基礎研究をもとにすると、HIV

の効果的な中和抗体の産生には中和エピトープが抗原としては認識されにくい特性を持っていることが明らかである。さらに、V3 等のコアの中和エピトープはウイルスの内部に存在することから表面部分に顔を出していない狭いエピトープの部分に高親和性の結合抗体を作成できればこれまで中和が難しいと言われてきた野生株 HIV の感染をコントロールできる中和抗体の産生が可能になると予測される。そのために本研究では、日本に伝搬しているクレイド B HIV 株を分離し、その遺伝子配列情報をもとにして6種類の V3 ペプチドを作成し、マウスに連続免疫を行うことで、狭いコア部分を標的としたフランキンク部分のアミノ酸配列にこだわらない高親和性抗体産生の可能性と、その方法の確立の可能性を検討する。

B. 研究方法

1. 日本で伝搬したクレイド B ウイルス V3 中和エピトープの遺伝子配列の解析とその情報に基づく V3 ペプチド抗原の選別

これまで感染研・エイズ研究センターで蓄積された約 6000 株のクレイド B ウイルスの V3 部分の遺伝子情報と Loss Alamos の遺伝子バンクの情報を参考にしながら GPGR 部分を保存し、フランキング部分が異なる V3 配列を検討し 6 種類選別した。

2. 6 種類のペプチドとアッセイ用の配列の異なる V3 ペプチドを同様に合成し、免疫抗原及びアッセイ抗原として用いる。
3. 抗原用に選別した 6 種類の V3 抗原をそれぞれ KLH に結合させ免疫抗原を準備する。さらに、フロイントのアジュバントとエマルジョンを作成し、BALB/c 及び C57/BL マウスに免疫し、単独ペプチドの連続投与と 6 種類のペプチドの各々の連続免疫したグループで結合抗体価及び中和抗体価を古典的な中和アッセイ法で検討する。
4. 結合抗体及び中和抗体の産生をモニターしモノクローナル抗体がクロスリアクティブに反応できるかどうかを検討する。
5. モノクローナル抗体を作成しクロスリアクティブな中和抗体産生株を単離する。
6. モノクローナル抗体の結合抗体能、中和抗体能を検討した後 CDR 遺伝子を分離し、ヒト型化モノクローナル抗体を作成する。
7. 得られたヒト型化抗体を種々の臨床ウイルス株に反応させ、ウイルス感染の中和プロファイルを作成する。

(倫理面への配慮)

サル及び動物実験については全ての各研

究者の研究施設における倫理規定に従って研究を行う。感染研における臨床サンプルの取扱いについては感染研の倫理規定に従って研究を行うが、既に医学研究倫理審査会の承認を得ている。また、動物実験に関しては動物の倫理問題を含めて実験計画が動物実験委員会で検討されるので全ての動物実験は動物実験委員会の承認を得て行う。さらに、ワクチンの構築等に関しては倫理問題も加味して、科学技術庁、感染研の組換え DNA 安全委員会の承認が得られておりそれに従って遂行する。

C. 研究結果

1. 図 1A に示すように 6 種のペプチドを選別し、KLH 結合ペプチド抗原を連続投与し、マウスに免疫した。
2. 免疫すると図 1B に示すように免疫に用いるペプチドのみでなくヘテロのペプチドにも全て結合できる交差反応性のポリクローナル抗体が産生されることを明らかにした。
3. 一方、単一の結合 V3 ペプチド抗原で免疫したマウスは免疫抗原ペプチドには強く反応できるが他の種のヘテロのペプチドには全く反応できない (図 1C)。
4. 従って 6 種のペプチド連続免疫投与によるマウスポリクローナル血清を用いて中和反応を見るとクロスリアクティブな活性が認められた (図 1D)。
5. そのマウスの脾臓細胞を使ってクロスリアクティブなモノクローナル抗体を作成し、同様の性質を有するヒト型化抗体を作成することができた (図 2)。

D. 考察

これまで、頻回免疫によっても作成が困難とされてきた HIV 中和抗体エピトープに対する中和抗体を連続免疫法を開発することによって可能にした。これまで能動免疫

によつては有効な HIV 中和抗体作成は困難であったがこの方法を用いることによつてそのバリアを超えることができた。この方法によつて産生される中和抗体は実質的には V3 チップの3つのアミノ酸 PGR を認識する極めて狭いエピトープに結合する高親和性中和抗体でありそのような性質の中和抗体の産生はクロスリアクティブな中和抗体の作成法として捉えることができた。そのモノクローナル抗体及びヒト型化抗体を作成し、受動免疫によるウイルスコントロールの可能性について検討中である。前実験ではサルに受動免疫を行うと濃度に依存して SHIV の感染をコントロールすることができた。このことから連続免疫法による中和抗体産生の重要性が示された。今後、種々のクレイドの envelope の解析を行うとともに中和能との関連性を明らかにすることによりクロスクレイドの中和抗体指向型ワクチンの開発の手がかりを探る。

E. 結論

能動免疫によつてこれまで不可能であった臨床株に対するクロスリアクティブ中和抗体の産生を可能にした。今後種々のクレイドの envelope 情報の解析を行うことによりクロスクレイドの中和抗体指向型ワクチンの可能性について検討する。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Someya, K., Y. Ami, T. Nakasone, Y. Izumi, K. Matsuo, S. Horibata, K. Q. Xin, H. Yamamoto, K. Okuda, N. Yamamoto and M. Honda: Induction of Positive Cellular and Humoral Immune Responses by a Prime-Boost Vaccine Encoded with Simian Immunodeficiency Virus gag/pol. *J Immunol.* 176:1784-1795, 2006.
- 2) Someya, K., D. Cecilia, Y. Ami, T. Nakasone, K. Matsuo, S. Burda, H. Yamamoto, N. Yoshino, M. Kaizu, S. Ando, K. Okuda, S. Zolla-Pazner, S. Yamazaki, N. Yamamoto and M. Honda: Vaccination of Rhesus Macaques with Recombinant Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin Env V3 Elicits Neutralizing Antibody-Mediated Protection against Simian-Human Immunodeficiency Virus with a Homologous but Not a Heterologous V3 Motif. *J Virol.* 79:1452-1462, 2005.
- 3) Kanekiyo, M., K. Matsuo, M. Hamatake, T. Hamano, T. Ohsu, S. Matsumoto, T. Yamada, S. Yamazaki, A. Hasegawa, N. Yamamoto and M. Honda: Mycobacterial codon optimization enhances antigen expression and virus-specific immune responses in recombinant Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guerin expressing human immunodeficiency virus type 1 Gag. *J Virol.* 79:8716-8723, 2005.
- 4) Eda Y, Takizawa M, Murakami T, Maeda H, Kimachi K, Yonemura H, Koyanagi S, Shiosaki K, Higuchi H, Makizumi K, Nakashima T, Osatomi K, Tokiyoshi S, Matsushita S, Zolla-Pazner S, Yamamoto N, Honda M. Sequential immunization with V3 peptides from primary HIV-1 produces cross-neutralizing antibodies against primary isolates with matching narrow neutralization sequence motif. *J. Virol.* in press, 2006.
- 5) Eda Y, Murakami T, Ami Y, Nakasone T, Takizawa M, Someya K, Kaizu M, Izumi Y, Yoshino N, Matsushita S, Higuchi H, Matsui H, Shinohara K, Takeuchi H, Koyanagi Y, Yamamoto, Honda M. Anti-V3 humanized antibody KD-247 effectively suppresses *ex vivo* generation of human immunodeficiency virus type 1 and affords sterile protection of monkeys against a heterologous simian/human immunodeficiency virus infection. *J. Virol.* in press, 2006

2. 学会発表

- 1) 清水佐紀, 駒野淳, 浦野恵美子, 二橋悠子, 宮内浩典, 磯貝まや, 松田善衛, 納富香子, 小野木利成, 武部豊, 山本直樹: HIV-1 感染細胞における Tat を介した P-TEFb の活性化を抑制する細胞内因子の解析. 第53回日本ウイルス学会学術集会・総会, 横浜, 2005. 11. 20-22.
- 2) 久保嘉直, 吉居廣朗, 田中勇悦, 佐藤裕徳, 山本直樹: HIV-1 の細胞内侵入におけるエズリンの関与. 第53回日本ウイルス学会学術集会・総会, 横浜, 2005. 11. 20-22.
- 3) 渡辺哲, 寺嶋一夫, 太田信頼, 矢島美彩子, 塩沢容子, 渡邊健, 清水則夫, 本多三男, 山本直樹: NOG マウスで確立された全身性 HIV-1 感染系. 第53回日本ウイルス学会学術集会・総会, 横浜, 2005. 11. 20-22.
- 4) 斉暁華, 小屋美博, 斉藤達哉, 清水佐紀, 斉藤愛記, 大庭賢二, 山本昇司, 山本直樹: Mechanism of HIV-1 induction in J22-HL-60 cells after co-culture with MOLT-4 cell. 第19回日本エイズ学会学術集会・総会, 熊本, 2005. 12. 1-3.
- 5) 駒野淳, 宮内浩典, Lay Myint, 二橋悠子, 浦野恵美子, 松田善衛, 千葉智子, 三浦秀佳, 杉浦互, 山本直樹: Rapid propagation of low-fitness drug resistant mutants of HIV-1 by a-1 frameshift enhancer sparsomycin. 第19回日本エイズ学会学術集会・総会, 熊本, 2005. 12. 1-3.
- 6) 吉野直人, 兼清優, 萩原由加利, 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 ワクチンの経皮接種による粘膜免疫誘導. 第19回日本エイズ学会学術集会・総会, 熊本, 2005. 12. 1-3.
- 7) 渡辺哲, 寺嶋一夫, 太田信頼, 堀端重男, 清水則夫, 本多三男, 山本直樹: NOG マウスを利用した HIV-1 慢性感染実験系の確立. 第19回日本エイズ学会学術集会・総会, 熊本, 2005. 12. 1-3.
- 8) 吉田篤司, 大隈和, 田中礼子, 山本直樹, 田中勇悦: 不活化 HIV-1 感作樹状細胞免疫と CXCR4 アンタゴニスト投与による R5 および X4 HIV-1 感染防御. 第19回日本エイズ学会学術集会・総会, 熊本, 2005. 12. 1-3.
- 9) 田中勇悦, 吉田篤司, 大隈和, 田中礼子, 山本直樹: HIV-1 感染防御を目的とする単球のマニピュレーション: 単球の CXCR4, CCR5 架橋を介する HIV-1 受容体の発現抑制と HIV-1 免疫誘導樹状細胞の分化培養. 第19回日本エイズ学会学術集会・総会, 熊本, 2005. 12. 1-3.
- 10) 村上努, 篠田知宏, 内藤幸美, 宮内浩典, 磯貝まや, 駒野淳, 松田善衛, Eric Freed, 山本直樹: マトリックス蛋白質変異が HIV-1 感染前期過程や結合宿主因子に与える影響. 第28回日本分子生物学会学術集会・総会, 福岡, 2005. 12. 7-12.

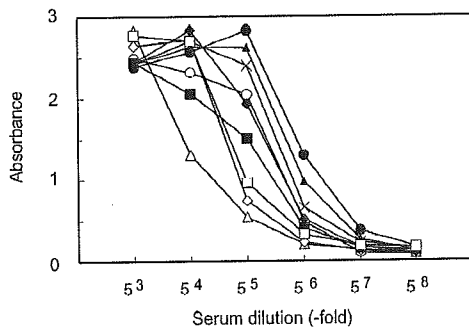
G. 知的財産権の出願・登録状況

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。

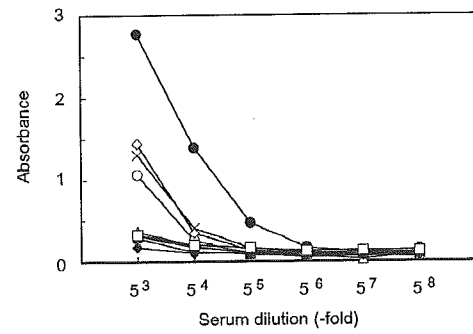
A

Peptide Code	HIV Strain Derived	Amino Acid Sequence
SP1	MN	YNKRRKRIHIGPGRAFVYTKNC
SP17	NI18	N-T---TT---VY---GE-
SP11	NI54	N-T--G-RV-----I-A-EK-
SP14	RF/HAT	N-T--S-TK----VI-A-GQ-
SP12	NI53	N-TK-A-RV----TL-A-RR-
SP13		GPGRAFPGPRAFPGPRAFC
SP6	NI61	N-T--G-R-----V-A-GK-
SP9	NI23	N-T--S-P-----GE-
SP10	NI63	N-T-RG-R-----A-DK-

B



C



D

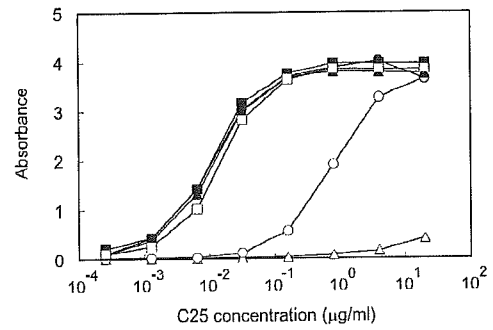


Fig. 1

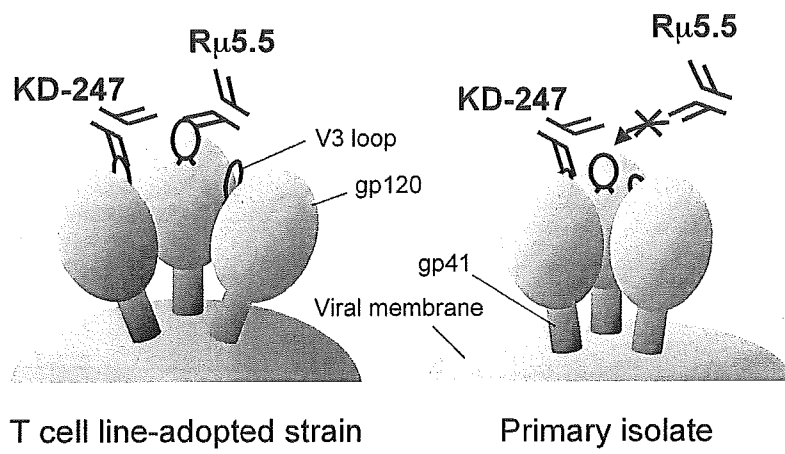


Fig. 2

厚生労働科学研究費補助金（国際医学協力研究事業）
分担研究報告書

ワクチンによる SHIV 複製制御の長期解析

分担研究者 俣野 哲朗 東京大学医科学研究所教授

研究要旨

HIV 感染症では、感染後に宿主獲得免疫反応が誘導されるにもかかわらず慢性持続感染が成立し、ウイルス血症が持続してエイズ発症にいたる。獲得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おり、HIV 感染初期に CTL による血中ウイルス量の低下がみられるが、HIV 複製の制御には至らず慢性持続感染が成立する。この慢性持続感染成立を阻止するエイズワクチン開発のための動物モデルとしては、サル免疫不全ウイルス (SIV) 感染サルエイズモデルが最適と考えられている。この慢性エイズモデルでは、ワクチンによる CTL 誘導がウイルス複製制御に直結するわけではない。我々はこれまで、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) ワクチン接種サルへの SIVmac239 チャレンジ実験を行い、ワクチンによる SIV 複製制御の可能性を初めて示すことに成功し、CTL による SIV 複製制御機序の解析を進めている。一方、急性エイズモデルとして知られているサルヒト免疫不全ウイルス SHIV89.6P 感染モデルでは、ワクチンによる CTL 誘導がウイルス複製制御に比較的容易に直結する。そこで本研究では、慢性エイズモデルにおける CTL のウイルス複製抑制機序解明の一助とする目的で、急性エイズモデルにおける CTL のウイルス複製抑制機序を解析し、慢性エイズモデルと比較検討することとした。今年度は、DNA/SeV-Gag ワクチン接種により SHIV89.6P 複製制御に至った 3 頭の長期解析を行い、長期の SHIV89.6P 複製制御が可能であること、およびチャレンジ後 1 年を経過した時点のプロウイルスにおいても変異の蓄積が進展せず、野生型のウイルスが優位のままとまっていることを明らかにした。

A. 研究目的

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、宿主獲得
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。

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、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、この急性エイズモ
デルでは、ワクチンによる CTL 誘導がウイ
ルス複製制御に容易に直結するため、CTL
誘導ワクチンの評価には適切ではなく、サ
ル免疫不全ウイルス (SIV) 感染慢性エイズ
モデルでの評価が重要と考えられるようにな
った。実際、同じワクチン手法を用いた
研究にて、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、元来宿主獲得免疫が制御できな
い慢性 HIV 持続感染症の制御の難しさがあ
らためて認識された。

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・Gag 発現センダイウイルス(SeV-Gag)
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。さら

に、DNA プライム・SeV-Gag ベクターブー
ストワクチン接種サルへの SIVmac239 チャ
レンジ実験を行い、ワクチンによる SIV 複
製制御の可能性を初めて示すことに成功し、
CTL による SIV 複製制御機序の解析を進め
ている。

本研究では、慢性エイズモデルにおける
CTL のウイルス複製抑制機序解明の一助と
する目的で、急性エイズモデルにおける
CTL のウイルス複製抑制機序を解析し、慢
性エイズモデルと比較検討することとした。
今年度は、DNA プライム・SeV-Gag ベクタ
ーブーストワクチン接種により SHIV89.6P
複製制御に至った 3 頭の長期解析を行った。

B. 研究方法

DNA プライム・非複製型 SeV-Gag ベクタ
ーブーストワクチン接種後 SHIV89.6P チャ
レンジ実験を行ったアカゲサル 3 頭の長期
解析を行った。いずれもチャレンジ後のセ
ットポイント期以降、ウイルス複製は制御
され、ウイルス血症は検出下限以下であっ
た。チャレンジ後約 1 年の時点のリンパ球
から DNA を抽出し、プロウイルスゲノム全
領域をいくつかの断片にわけて PCR にて増
幅して、その塩基配列を調べた。

(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、医薬基盤研究所および東
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開始
した。

C. 研究結果

いずれの3頭とも、SHIV89.6P チャレンジ後約2年までの観察期間中、ウイルス血症は検出下限以下で、ウイルス複製制御は維持された。チャレンジ後約1年の時点のプロウイルスの塩基配列の解析では、優位となる変異は認められず、野生型の塩基配列が優位のままであった。

D. 考察

ワクチンによる長期のSHIV89.6P複製制御は可能であることが確認できた。プロウイルスで変異が認められなかったことから、このSHIV89.6P複製制御においては、ウイルス複製が極めて低いレベルに抑えられていた可能性が高い。

E. 結論

DNAプライム・SeV-Gagベクターブーストワクチン接種によりSHIV89.6P複製制御に至った3頭の長期解析を行い、長期のSHIV89.6P複製制御が可能であることが明らかとなった。また、チャレンジ後1年を経過した時点のプロウイルスにおいても変異の蓄積が進展せず、野生型のウイルスが優位のままとなっており、ウイルス複製が極めて低いレベルに抑えられていた可能性が示唆された。

G. 研究発表

1 論文発表

(1) Kato, M., Igarashi, H., Takeda, A., Sasaki, Y., Nakamura, H., Kano, M., Sata, T., Iida, A., Hasegawa, M., Horie, S., Higashihara, E.,

Nagai, Y., and 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* 23:3166-3173, 2005.

(2) Kawada, M., Igarashi, H., Takeda, A., Tsukamoto, T., Yamamoto, H., Dohki, S., Takiguchi, M., and Matano, T. Involvement of multiple epitope-specific cytotoxic T-lymphocyte responses in vaccine-based control of simian immunodeficiency virus replication in rhesus macaques. *J. Virol.* 80:1949-1958, 2006.

2 学会発表

(1) Kawada, M., Kobayashi, M., Yamamoto, H., Igarashi, H., Takeda, A., and Matano, T. Long-term analysis of rhesus macaques that showed prophylactic vaccine-based control of SIVmac239 replication. 7th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific, MoA03, Kobe, Japan, 7/4/2005.

(2) Matano, T. Contribution of vaccine-induced cellular immune responses to viral suppression: analysis in macaque AIDS models. 7th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific, MoS18-02, Kobe, Japan, 7/4/2005.

(3) Matano, T., Kawada, M., Yamamoto, H., Igarashi, H., and Takeda, A. Long-term control of simian-human immunodeficiency virus 89.6P replication in a preclinical trial of CTL-based AIDS vaccines. The International