



## HAART 下における抗 HIV 免疫再構築に関する臨床研究

分担研究者：松下 修三（熊本大学エイズ学研究センター 病態制御分野 教授）

### 研究要旨

我々は、これまでほとんど行われなかった *in vitro* での R5 ウイルスの逃避ウイルス誘導をなるべく簡便に行うため、CCR5 高発現 T 細胞株である PM1/CCR5 細胞を用い R5 ウイルス(JR-FL)の逃避ウイルス誘導を試みた。その結果、JR-FL 株の gp120-V3 の tip 部位の GPGR が GPER に変異したウイルスが誘導された。そこで、これらの同定された責任部位を site-directed mutagenesis 法により変異アミノ酸を導入したエンベロープを持つ pseudotype ウイルスを作製し、CCR5 高発現細胞株である GHOST-hi5 細胞に感染させて、様々な抗体濃度でルシフェラーゼ活性を測定した (single-round replication assay)。その結果、*in vitro* で誘導されて来た単クローン抗体逃避ウイルスの責任変異部位が gp120-V3 の tip 部位の 1 アミノ酸変異によることが確認された。これらの pseudotype ウイルスを用いて、プロテアーゼ阻害剤 (PI)、核酸系逆転写酵素阻害剤 (NRTI) などや、現在開発が進められている CCR5 阻害剤において逃避ウイルスにおける感受性の違いを測定した。既存の抗 HIV 薬である、PI や RTI に対しては感受性の変化は見られなかったが、CCR5 阻害剤や rsCD4 や抗 CCR5 抗体 (2D7) に対しては、感受性になっていた。また、KD-247 と CCR5 阻害剤の強力な相乗効果が *in vitro* で確認されており、今後臨床応用に向け有力な組み合わせの一つとして期待できる。

#### A. 研究目的

我々は、化血研との共同で HIV のエンベロープ蛋白(gp120)に対する広範囲ウイルス中和抗体(KD-247)を作製し、現在臨床応用に向け準備中である。新規の抗ウイルス剤で問題となるのは、臨床使用時にどのような耐性（もしくは逃避）ウイルスが出現するのかということと、どのような薬剤との組み合わせが有効であるか（もしくは悪影響があるか）ということである。そこで、今回我々は、新規に開発した *in vitro* における中和抗体の耐性誘導システムを用いて、これまで Cell Line では困難であった R5 ウイルスの *in vitro* での中和抗体逃避ウイルスを比

較的簡便に誘導し、*in vivo* での耐性ウイルスの予測を行うことを目的とした。

#### B. 研究方法

KD-247 単クローン抗体存在下に、CCR5 高発現 T 細胞株である PM1/CCR5 細胞を用い *in vitro* R5 ウイルス (JR-FL) の逃避ウイルス誘導を試みた。その結果得られた逃避ウイルスを用いて、抗体の耐性を PM1/CCR5 細胞を用いた MTT assay により判定した。また同時に、得られた逃避ウイルスの各 passage における envelope の sequence を行った。

Sequence の結果から、逃避能付与責任変異部位の特定を行い、site-directed mutagenesis 法により変異アミノ酸を導入したエンベロープを持つ pseudotype ウイルスを作製した。この pseudotype ウイルスを GHOST-hi5 細胞に感染させて、様々な抗体濃度でルシフェラーゼ活性を測定した (single-round replication assay)。また、プロテアーゼ阻害剤(PI)、核酸系逆転写酵素阻害剤(NRTI)などや、現在開発が進められている CCR5 阻害剤において逃避ウイルスにおける感受性の違いを測定した。

#### (倫理面への配慮)

本研究を行うに当たり各症例には研究の概要を説明し同意を得た上で採血し、解析した。なお本研究の倫理的・科学的妥当性は熊本大学病院の先進医療審査委員会で審査され、了承されている。

### C. 研究結果

KD-247 による逃避ウイルス誘導の結果、抗体濃度を  $1\mu\text{g/ml}$  から始めて  $600\mu\text{g/ml}$  (6-passage) まで上げたところで、JR-FL 株の gp120-V3 の tip 部位の-GPGR-が-GPER-に変異したウイルスが認められ、 $1\text{mg/ml}$  (8-passage) まで抗体濃度を上げると、8 割以上のウイルスが-GPGR-から-GPER-に置き換わっていた (図-1、図-2)。抗体濃度を  $2\text{mg/ml}$  まであげてこの後 12-passage まで培養を継続したが tip 部位に変異を持つウイルスの占める割合は変わらなかった。

た。8-passage の上清中のウイルスを用いて、KD-247 に対する感受性を MTT assay で測定すると、野生株の JR-FL の  $\text{IC}_{50}$  が  $6.3\mu\text{g/ml}$  であったのが、8-passage ウイルスは、 $>100\mu\text{g/ml}$  であり、KD-247 の中和に対して完全耐性となっていた (図-3)。この逃避ウイルスは既存の抗 HIV 薬である、プロテアーゼ阻害剤(NFV, IDV, APV, SQV)や核酸系逆転写酵素阻害剤(ddI, 3TC)に対しては感受性の変化は見られなかったが、CCR5 阻害剤(TAK-779, SCH-C, AK-602)、rsCD4 や anti-CCR5 monoclonal 抗体(2D7) に対しては、感受性になっていた (表-1)。これらの傾向は、変異アミノ酸を導入したエンベロープを持つ pseudotype ウイルスによる single-round replication assay においても、同様な結果が確認された。これらのデータから V3-tip に反応する KD-247 に対するエスケープ変異はウイルスの CCR5 阻害剤に対する感受性を増加させる方向に作用すると考えられた。

また、図-4 に示すように CCR5 阻害剤も KD-247 もウイルスの接着から膜融合にいたる過程に働き、しかも、接着側と被接着側の双方に同時に作用することから、併用による相乗効果が期待され、実験を行った。その結果、図-5 に示すように、KD-247 と AK-602 の併用により強力な相乗効果が認められた。この効果は他の CCR5 阻害剤との併用でも確認された。

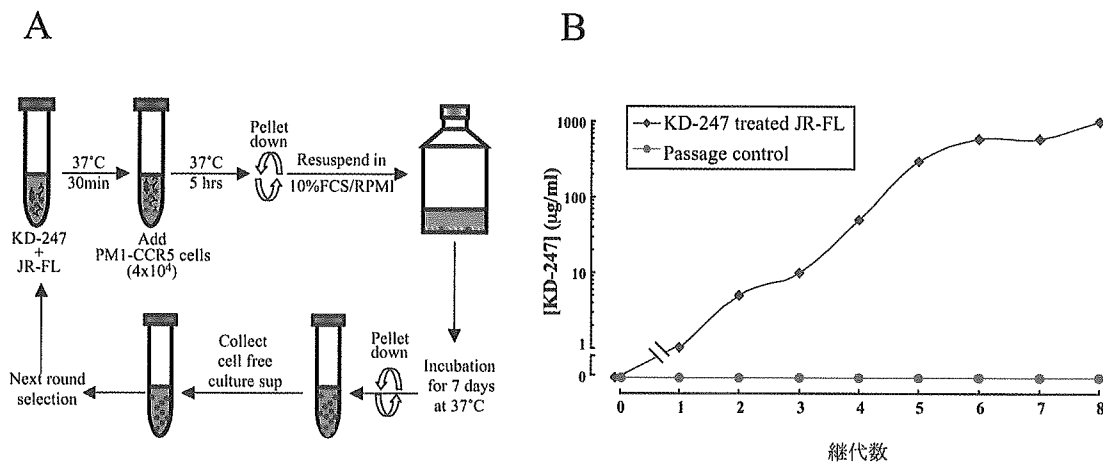


図 1. *In vitro* における KD-247 逃避ウイルスの誘導

(A) CCR5 高発現 PM1 細胞(PM1/CCR5)に KD-247 で前処理した JR-FL を感染させ、5 時間培養後に抗体をワッシュアウトするという実験系で中和逃避ウイルスを誘導した。KD-247 の濃度を徐々に上げながら CPE を指標に継代した。コントロールとして抗体非存在下で JR-FL 株を PM1/CCR5 細胞に同様に継代した。(B) 最終的に 8 passage で KD-247 の濃度が  $1\text{mg/ml}$  まで到達した。

JRFL pre	-CTRPNNTRKSIHI	GP	GRAFYTTGEIIGDIRQAHC-	
<b>In vitro selection with KD-247</b>				
P1(1μg)	-	-	-	DS
P5(300μg)	-	-	-	11/14
P5(300μg)	-	-	-	1/14
P5(300μg)	-	R	-	1/14
P5(300μg)	-	T	-	1/14
P6(600μg)	-	-	-	11/13
P6(600μg)	-	E	-	2/13
P7(600μg)	-	E	-	9/12
P7(600μg)	-	E	T	1/12
P7(600μg)	-	-	-	2/11
P8(1mg)	-	E	-	11/16
P8(1mg)	-	A	E	1/16
P8(1mg)	-	-	-	5/16
<b>No antibody control</b>				
P8(Ab-)	-	-	-	15/16
P8(Ab-)	-	-	R	1/16

図2. 誘導した KD-247 逃避ウイルスの V3 領域のシーケンス  
1-5 passage までは Env V3 シーケンスに変異は見られなかったが、6 passage から V3-tip に G314E のアミノ酸変異が認められ、それ以降は 70% 以上が変異ウイルスに置き換わっていた。

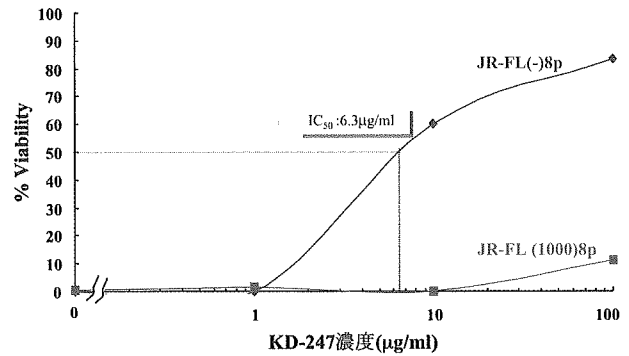


図3. 逃避ウイルスの KD-247 に対する感受性試験  
誘導した KD-247 逃避ウイルス [JR-FL(1000) 8 p] とコントロールウイルス [JR-FL(-) 8 p] を用い MTT assay で KD-247 に対する感受性を調べたところ、逃避ウイルスは KD-247 が 100μg/ml まで上げてても中和しなかった。

表-1. KD-247-逃避ウイルスの各種抗ウイルス剤に対する感受性試験の野生株との比較

Antibody or inhibitor		IC <sub>50</sub> <sup>a</sup>		Fold change
		JR-FL(-)8P	JR-FL(1000)8P	
KD-247	(μg/ml)	6.3	>100	>16
TAK-779	(nM)	210	40	0.19
SCH-C	(nM)	29	7	0.24
AK-602	(nM)	0.53	0.08	0.23
ddI <sup>b</sup>	(μM)	1.9	2.2	1.2
3TC	(μM)	0.32	0.42	1.3
NFV	(μM)	0.045	0.045	1.0
IDV	(μM)	0.028	0.025	0.89
APV	(μM)	0.032	0.021	0.66
SQV	(μM)	0.0038	0.0035	0.92
rsCD4	(μg/ml)	3.7	0.55	0.15
anti-CD4 mAb (RPA-T4)	(μg/ml)	0.01	0.03	3.0
anti-CCR5 mAb (2D7)	(μg/ml)	0.21	0.07	0.33
MIP-1α	(μg/ml)	0.0024	0.0019	0.79
MIP-1β	(μg/ml)	0.28	0.13	0.46
RANTES	(μg/ml)	0.025	0.0035	0.14

<sup>a</sup> PM1-CCR5 cells (2x10<sup>3</sup>) were exposed to 100 TCID<sub>50</sub> of JR-FL(-)8P or JR-FL(1000)8P were cultured in the presence of various concentrations of the mAbs or inhibitors. The IC<sub>50</sub> values were determined by using the MTT assay on day 7 of culture. All assays were conducted in duplicate. The values shown are representatives of two or three separate experiments.

<sup>b</sup> Abbreviations: ddI, didanosine; 3TC, lamivudine; NFV, nelfinavir; IDV, indinavir; APV, amprenavir; SQV, saquinavir;

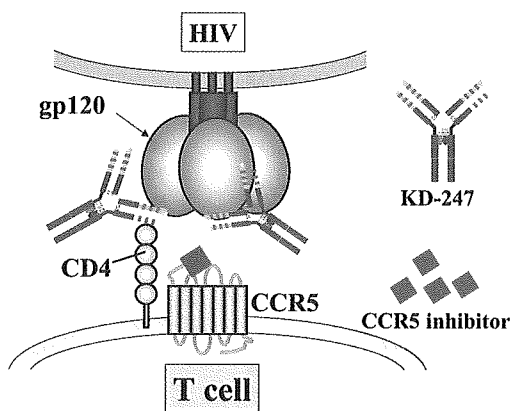


図 4. 抗 gp120 抗体と CCR5 阻害剤の併用による HIV エントリーの阻害の模式図

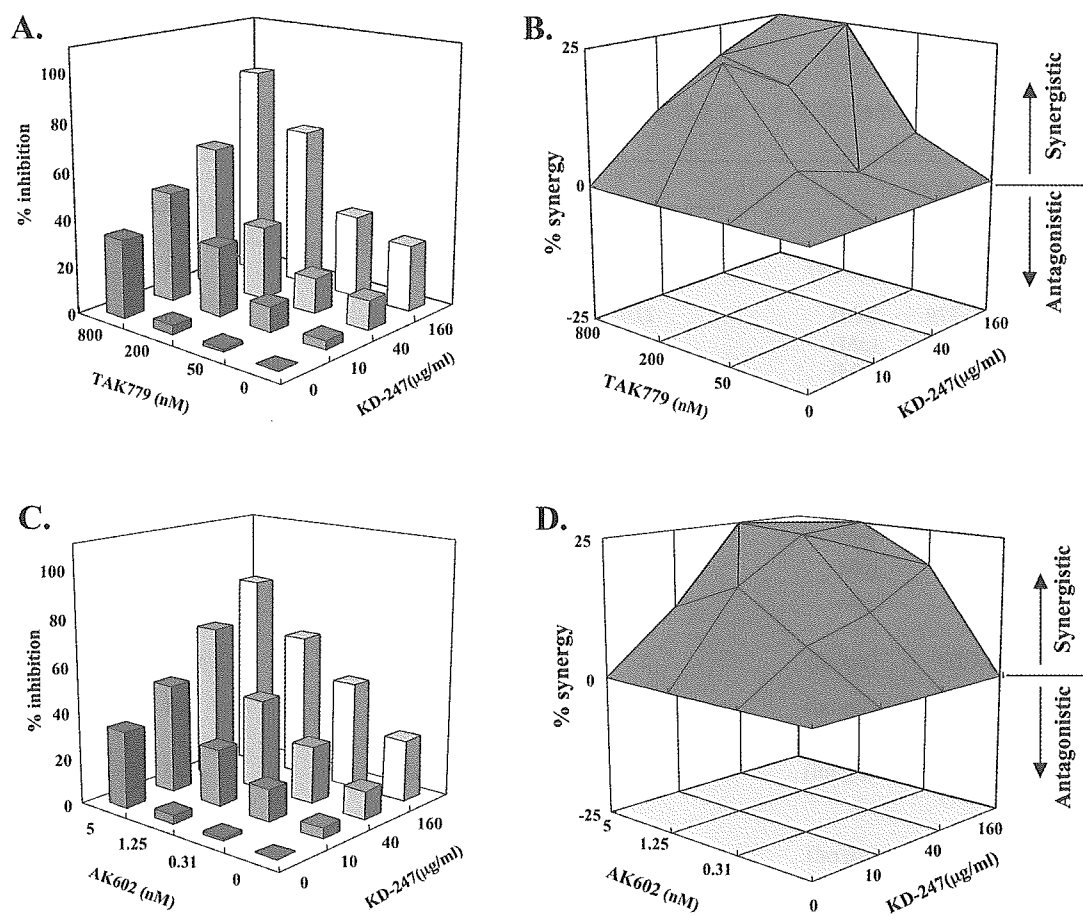


図 5. 中和抗体 (KD-247) と CCR5 阻害剤の併用による JR-FL に対する相乗効果

KD-247 は CCR5 阻害剤の TAK-779(A,B)および、AK-602 (C,D)のいずれの組み合わせでも、強力な相乗効果を示した。

## D. 考察

これまで、抗ウイルス薬の臨床応用に際しては、通常 *in vitro* で耐性誘導実験を行い、*in vivo* で耐性の予測を行って来た。しかし、PBMC を用いた逃避ウイルス誘導は非常に煩雑であり、T 細胞株を用いる時は主に X4 ウイルスを使用していたため、実際の患者で主に見られる R5 ウイルスの逃避予測とは乖離したものになっていた。そこで、我々はなるべく簡便に R5 ウイルスの逃避ウイルス誘導を行うため、PM1/CCR5 細胞を用いて行った。この細胞株は、JR-FL や Ba-L で合胞体形成がみられ、上清中の p24 濃度の測定を行わずに、顕微鏡下にウイルスの増殖の程度が推測できるため、ウイルスの継代の時期の特定が簡便である。この細胞は、R5 臨床分離株に関しても、実験室株と同様の合胞体形成能を持つことが確認されている。これらのことより、この細胞株は抗体の *in vitro* 逃避誘導に有用であると考えられる。すなわち、中和抗体の逃避メカニズムの解明に向けて、簡便にかつ R5 ウイルスで耐性誘導を可能とする *in vitro* のシステムを構築するという目的は達成されたと考える。

また、今回誘導された逃避ウイルスは、これまで *in vitro* では一度も報告されていない 314 番目の G → E の変異であった。この変異は KD-247 に対しては完全に耐性になるが、その他の V3 抗体や CD4i 抗体には逆に感受性となり、V3-tip の変異がその他の gp120 の構造変化をきたす可能性を示しており、ワクチン開発の上でも重要な知見を得られると考えている。

今後の展望としては、十分な抗体量が確保できれば、各種のウイルスによる逃避ウイルス誘導が可能となり、前臨床試験での有用性が予想される。また、臨床分離ウイルスを用いることで、*in vivo* における中和抗体の影響を再現できる可能性がある。

## E. 結論

我々の開発した *in vitro* 中和抗体逃避 R5 ウイルス誘導法は、簡便で且つ有用である。しかも、同じ細胞株を用いた MTT assay により耐性の確認も可能である。また、今回得られた逃避ウイルスは V3-tip が変異しており、tip の変異が gp120 の構造変化をきたす可能性を示唆している。また、この中和抗体と CCR5 阻害剤の強力な相乗効果が *in vitro* で確認され

ており、今後臨床応用に向け有力な組み合わせの一つとして期待している。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 論文発表

1. Matsushita, S., Yoshimura, K., Kimura T., Kamihira, A., Takano, M., Eto, K., Shirasaka, T., Mitsuya, H., Oka, S.: Spontaneous recovery of hemoglobin and neutrophil levels in Japanese patients on a long-term Combivir® containing regimen. *J. Clin.Virol.* 33: 188-193, 2005.
2. Sakaguchi, N., Kimura T., Matsushita, S., Fujimura S., Shibata J., Araki M., Sakamoto T., Minoda S., and Kuwahara K. Generation of high-affinity antibody against T cell- dependent antigen in ganp gene- transgenic mouse. *J. Immunol.* 174: 4485-4494, 2005.

### 国際学会発表

1. Shibata, J., Yoshimura, K., Honda A., Murakami, T., Koito, A., and Matsushita S.: A Role of Mutations in Non-V3 Envelope Regions for Escape from a Broad Neutralizing Anti-V3 Monoclonal Antibody, KD-247, during *in vitro* Selection. 13<sup>th</sup> Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Denver, USA, Feb.4-9, 2006.
2. Yoshimura, K., Shibata, J., Honda A., Murakami, T., Mitsuya, H., Koito, A., and Matsushita S.: Resistance Profile of A Novel Broadly Neutralizing Anti-HIV Monoclonal Antibody, KD-247 That Has Favorable Synergism with Anti-CCR5 Inhibitors *In Vitro*. 13<sup>th</sup> Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Denver, USA, Feb. 4-9, 2006.
3. Matsushita S., Honda A., Shibata, J., Kimura T., Ikeda, T., Koito, A., Yoshimura, K.: HIV-1 proviral DNA dynamics in patients with long-term successful HAART. 2<sup>nd</sup> International Workshop on HIV Persistence during Therapy. 12. 6-9, 2005, Saint Martin, FWI.

4. Matsushita S., Shibata, J., Yoshimura, K., Maeda, Y., Murakami, T., Atsushi Koito, Honda, M., Mitsuya, H., Eda, Y. : Development of broadly reactive neutralizing monoclonal antibody KD247: implication for passive immunotherapy. The cooperative research project on clinical and epidemiological studies of emerging and re-emerging infectious diseases, Aso, Japan, Sep. 15-16, 2005.
  5. Yoshimura K., Shibata, J., Ikeda, T., Honda A., Koito, A., Matsushita, S.: HIV-1 proviral DNA dynamics in patients with long-term successful HAART. International Symposium, The Cooperative research Project on Clinical and Epidemiological Studies of Emerging and Re-emerging Infectious Diseases, 2005. 9.15-16. Kumamoto.
  6. Shibata, J., Yoshimura K., Maeda, Y., Murakami, T., Eda, Y., Koito, A., Matsushita, S.: *In vitro* induction of human immunodeficiency virus type 1 variants resistant to a novel broad neutralizing anti-HIV monoclonal antibody, KD-247. International Symposium, The Cooperative research Project on Clinical and Epidemiological Studies of Emerging and Re-emerging Infectious Diseases, 2005. 9.15-16. Kumamoto.
  7. Ikeda, T., Shibata, J., Honda A., Yoshimura K., Koito, A., Matsushita, S.: Relationship of residual HIV-1 and the integration sites in patients on prolonged and effective HAART. International Symposium, The Cooperative research Project on Clinical and Epidemiological Studies of Emerging and Re-emerging Infectious Diseases, 2005. 9.15-16. Kumamoto.
  8. Yoshimura K., Honda A., Kenai, A., Shibata, J., Koito, A., Matsushita, S.: Proviral DNA and Turnover Levels in Aviremic Long-Term Non-Progressors (LTNPs); A Temporary Goal for Patients under HAART. 7th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific. 2005. 7. 1-5. Kobe.
  9. Matsushita, S., Honda A., Kenai, A., Shibata, J., Koito, A., Yoshimura K.: Long-Term Follow-Up Study for the Change of the Reservoir for HIV-1 on Highly Active Antiretroviral Therapy. 7<sup>th</sup> International Congress on AIDS in Asia and the Pacific. 2005. 7. 1-5. Kobe.
  3. 柴田潤二、吉村和久、前田洋助、村上俊夫、小糸 厚、松下修三：広範囲 HIV-1 中和単クローン抗体の *in vitro* 逃避ウイルスの誘導と解析。第 19 回日本エイズ学会学術集会。2005.12.1-3. 熊本
  4. 池田輝政、柴田潤二、吉村和久、小糸 厚、松下修三：長期間 HAART 有効症例における残存 HIV と integration site の関連性。第 19 回日本エイズ学会学術集会。2005.12.1-3. 熊本
  5. 松下修三：A broadly reactive neutralizing antibody and evolution of escape mutants *in vitro*. 第 8 回白馬シンポジウム in 鹿児島ーエイズ治療の最前線ー。2005.11.3-4. 鹿児島
  6. 柴田潤二、吉村和久、前田洋助、村上利夫、江田康幸、小糸 厚、松下修三：広範囲 HIV-1 単クローン抗体の *in vitro* 逃避ウイルスの誘導と解析。第 8 回白馬シンポジウム in 鹿児島ーエイズ治療の最前線ー。2005.11.3-4. 鹿児島
  7. 柴田潤二、吉村和久、小糸 厚、松下修三：ヒト免疫不全ウイルス 1 型 gp120 の C3 領域変異による抗 V3 中和抗体に対する中和抵抗性の獲得。第 53 回日本ウイルス学会総会、横浜、2005.11.20-22.
  8. 柴田潤二、吉村和久、前田洋助、村上利夫、江田康幸、小糸 厚、松下修三：広範囲 HIV-1 単クローン抗体の *in vitro* 逃避ウイルスの誘導と解析。第 6 回熊本エイズセミナー。2005.9.15. 熊本
- H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）  
なし

#### 国内学会発表

1. 松下修三：シンポジウム-HIV/AIDS の臨床における最近の問題点ーイントロダクションー。第 19 回日本エイズ学会学術集会。2005.12.1-3. 熊本
2. 吉村和久、柴田潤二、池田輝政、小糸 厚、松下修三：HAART により長期間ウイルスが抑制された症例の pDNA の推移。第 19 回日本エイズ学会学術集会。2005.12.1-3. 熊本



## STIによる免疫療法

分担研究者：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）

研究協力者：木村 哲<sup>1</sup>、菊池 嘉<sup>1</sup>、立川 夏夫<sup>1</sup>、照屋 勝治<sup>1</sup>、  
田沼 順子<sup>1</sup>、山中ひかる<sup>1,2</sup>、松岡 佐織<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> 国立国際医療センター エイズ治療・研究開発センター、

<sup>2</sup> (財)エイズ予防財団

### 研究要旨

Structured Treatment Interruptions(以下 STI)は、HAART を計画的に中止・再開し意図的に小規模なウイルス血症をおこし、HIV 特異的免疫の活性化を目的とした治療である。急性期または早期 HIV 感染においては、免疫能低下が進行する以前に実施することで、より有効性が高まるものと推測されている。これまでに海外の報告がいくつかあるが、一定の見解は得られていないため、このたび、当院において急性 HIV 感染者に対する STI を含む治療を実施し、臨床的な効果を検討した。対象は、血清学的・ウイルス学的に急性 HIV 感染と診断された者で、抗 HIV 薬は原則として d4T/3TC/IDV/RTV を使用した。HIV-RNA(viral load: VL)が 50c/ml 未満に達したら 3 週間休薬することとし、最高 5 回休薬(STI)した。ただし、最初の休薬は、治療を 3 ヶ月以上実施し、VL 50c/ml 未満に達して 1 ヶ月経過した後に実施した。最終的に、治療を完全に中止し、CD4 数、VL、HLA-A24 陽性例では HLA-A24 拘束性 CTL の tetramer-binding assay(熊本大学ウイルス制御分野滝口教授)、Nef138-10(epitope)領域のシーケンス(escape variant の有無)、耐性変異(genotype assay)の有無を検査した。

2000 年 11 月～2002 年 12 月の間に、26 名(M:F=24:2)が参加した。多くが、何らかの症状を呈して受診し、HIV 初感染と判明した者であった。治療前平均 CD4 数は 479(49-1156)/ $\mu$ l、VL 5.3(3.3-6.9)log/ml であった。初回治療に要した期間は、平均 178(35-577)日間であった。15 例(58%)が 5 回休薬を含むプロトコールを完遂したが、7 例(27%)は休薬回数が 5 回に満たない時点で、本人の希望や副作用により治療を中断した。4 例は CD4 数が低く治療継続が必要なため、本治療より脱落となった。有害事象としては、下痢 6 例(23%)、尿路結石 5 例(19%)、皮膚乾燥 3 例(12%)、嘔気 2 例(8%)、陥入爪 1 例(4%)、やせ 1 例(4%)が認められたが、治療中断の理由となった副作用は、尿路結石 1 例のみであった。休薬を繰り返しても、一貫して治療への反応は良好であった。

プロトコールを完遂した 15 例について、VL の推移をみると、休薬中のリバウンド VL は、休薬回数を重ねる毎に低下が認められたが、治療を完全に中止した後は、徐々に VL が上昇し、持続的な抑制はみられなかった。慢性感染例の set point(平均 4.418logc/ml)と比較しても、有意な低下はみられなかった。CD4 数は、約 60 週で治療前と同じレベルになった。また、1 例は約 1 年で CD4 数 200 以下となり HAART 再開が必要となった。しかし、治療後 1 年までは 4logc/ml 未満の症例が約半数を占め、初期には比較的 VL が低く抑えられている傾向がみられた。HLA-A24 陽性の 12 名に関して、3 種類の epitope に対する HLA-A24 拘束性 CTL をみたところ、最初の 1 年間は、Nef138-10 特異的 CTL 頻度と血漿中 VL との関連性が示唆されたが、統計学的に有意ではなかった(熊本大学ウイルス制御分野滝口教授)。一方、Nef138-10 領域のシーケンスにて、高頻度に変異(2F)が認められ、CTL からの escape 機序のひとつと考えられた。

このように VL の持続的抑制は得られず、いわゆる long term non-progressor への誘導はできなかったが、一時的な VL 抑制がみられ、Nef138-10 特異的 CTL との関連が示唆された。

## A. 研究目的

HIV 感染症は宿主の CD4 細胞数を減少させ、進行性の免疫不全を引き起こす。しかし多剤併用による強力な抗ウイルス療法：HAART (highly active anti-retroviral therapy) により、その予後は劇的に改善された。

ところが、以前、抗 HIV 療法は、「Hit Early and Hard」といわれ、早くから強力な治療を導入するのがよいとされてきたが、HIV を体内から根絶するのは、事実上不可能で、長期的な副作用が問題となってきたため、最近の治療開始は、より遅らせる傾向にある。CD4 数が 200/μl 以下になると、様々な日和見感染症のリスクが高まることから、CD4 数が 200/μl に達する前に開始すればよく、最近では、少なくとも CD4 数 350/μl 未満になるまで治療開始を待つようになった。

一方、HIV 感染早期においては、HIV に対する特異的な免疫が比較的保たれ、その後急速に失われていくということが分かっている。そのため、HIV 特異免疫、特に HIV 特異的な CD4、が失われるのを防ぐという観点から、このような急性期に治療を導入する有用性も考えられている。しかし、前述のように、自然経過では AIDS 発症まで 10 年位かかる本疾患において、急性期に治療を導入することは、極めて長期間の内服治療を意味し、QOL の低下や長期毒性のリスクなどの問題が生じる。

Structured treatment interruptions (STI) は、HAART を計画的に中止、再開することで、意図的に小規模なウイルス血症を起こし、宿主の免疫系を刺激・活性化させることを狙った治療法である。最初の報告は、1999 年、Liszewics らによる症例報告で、急性期に治療が開始され、肝炎など不測の治療中断を 2 回経たところ、抗 HIV 療法せずともウイルスが長期間抑制できた症例 (The Berlin Patient) である。この報告がきっかけとなり、広く STI に関する研究が進められ、その概念が構築されていった。2000 年 Lori らはサルを使った STI 治療モデルの結果を Science 誌上に報告、また 2000 年 Rosenberg らは、14 例の急性 HIV 患者に STI を行い、うち 8 例の成績を Nature 誌に報告した。その 8 例中 5 例は、5-8.7 ヶ月もの休薬 (3 log c/ml 未満を持続) が達成できたというものであった。

その後多くの研究が重ねられたが、慢性期の HIV 感染症患者に対する STI は、ウイルスの耐性化が進む一方で、予後は改善させないという否定的な結果

が多く、現時点で有用性が疑問視されている。

それに対し、急性期に治療を導入された患者は、HIV 特異的免疫が比較的保持されているため、慢性期の患者に比較して、同法による免疫賦活が有効である可能性が高いといわれている。しかし、現在のところ、一定の見解は得られていない。前述の Rosenberg らは、2004 年に最終的な治療成績を報告したが、いわゆる long term non-progressor (長期未発症者) のような長期間ウイルスを抑制するほどの強力な特異免疫を賦活することは不可能であったと結論づけた。しかし、生涯のウイルス抑制が困難としても、CD4 の減少速度を少しでも遅らせることができれば、患者の QOL は大幅に改善する。また、その免疫賦活方法により得られた知見は、ワクチン開発に大きく貢献するものと考えられる。

HIV 感染症が、急性期に診断されることは多くないが、感染時 50-90% になんらかの急性レトロウイルス症候群の徴候が認められ、症状出現時に患者が医療機関を受診し適切な検査が行われた場合、急性 HIV 感染症の診断が可能である。その場合、感染早期に STI を含めた抗 HIV 療法を行う機会が得られると考えられる。

このような背景から、希望者に対し、急性 HIV 感染症において、早期治療導入と STI による免疫療法を実施するに至った。

## B. 研究方法

実施にあたっては、以下の点を満たすことを条件とした。

(ア) 本研究の実施に関しては、実施施設である国立国際医療センターの倫理委員会の承認を得る。

(イ) 本研究の実施にあたっては、被験者に対し研究目的、研究の背景、研究の方法、人権の保護に関する事項などを文書で説明し、被験者の署名による同意を得る。

また、本研究の実施にあたり、担当医師は被検者に対して下記事項に関して、文書および口頭で十分に説明し、被検者は、十分に時間をかけて実施事項に関して理解した後、自由意思により同意書に署名し担当医師に提出するものとした。担当医師は、被験者が未成年者の場合は保護者もしくは法定保証人にも説明し、保護者もしくは法定保証人からも署名された同意書を得ることとした。

同意書 (被験者への説明文) には、研究の目的、



研究の背景、研究の方法、予想される結果、予想される副作用とそれに対する処置、同意しない場合にも、その後の診療にあたりいかなる不利益も受けないこと、同意した後も、被験者もしくは保護者の自由意思でいつでも同意を撤回できること、被験者の人権保護に関する事項、以上8点について十分な情報を記載した。

●被験対象者

以下の選択基準のすべてを満たし、且つ除外基準のいずれにも該当しない者を、当研究の被検対象とした。

(ア) 選択基準

- ・感染後6ヶ月以内の急性HIV感染症と診断され、本研究への参加を希望する者

(イ) 除外基準

- ・年齢15歳未満の者
- ・活動性の日和見感染症を発症した者
- ・精神科疾患を合併する者
- ・ステロイド剤や免疫抑制剤等を使用している者

●研究実施方法

(ア) 急性 HIV 感染の診断

原則として、6ヶ月以内に以下の急性感染を示唆する症状(\*)があったか、または、感染のリスクが高い行為があった者を対象に、以下の診断基準に従い、急性HIV感染と診断した。

- 1) HIV抗体陰性かつHIV-RNA陽性
  - 2) WBによる確認試験で経時的に陽性バンドの増加を確認
  - 3) 経時的に抗体価の上昇を確認
- 1) -3) のいずれか、あるいは両者を満たす場合。

(\*) 急性感染を示唆する症状

発熱、リンパ節腫張、咽頭炎、発疹、筋肉痛、関節痛、肝脾腫

(イ) 治療内容

【治療導入】

治療は当時のHIV治療ガイドライン(米国保健福祉省)に従い、3剤以上を用いた併用療法を行った。原則として、d4T/3TC/IDV/RTVを用いるが、耐用性を考慮し、他のレジメンへの変更も可能とした。

【STI(休薬)】

3週間の休薬(STI)を計5回挿入した。休薬期間は3週間に固定した。休薬のタイミングは、VLが検出限界以下(50copies/ml)となっているのを確認した時点で行った。ただし、初回の休薬は、抗HIV療法開始後3ヶ月以上経過し、VL50copies/ml未満に達し1ヶ月経過した後、また、CD4数が500/μl以上で安定していることを確認して行った。(図1)

(ウ) 副作用出現時の対応

HAART開始に伴う副作用が見られた場合には、薬物による対症療法にて対処したが、副作用が重篤な場合、治療薬剤の変更や中断を十分検討した。

(エ) 研究の継続中止の決定

本研究の継続が被験者にとって明白な不利益を与えると考えられる場合は、担当医は本研究を中止し、その旨を被験者に口頭または文書で詳細に説明するとともに、研究代表者に連絡するよう徹底した。

また、被験者が本研究継続中に本研究への参加を撤回する意思表示をした際は、担当医は速やかに本研究を中止した。

(オ) 評価項目

STIを含む治療終了後、以下の項目を測定し、その臨床的意義を評価する。

【臨床上的治療効果に関する評価項目】

- CD4数、VL等の検査値の推移
- 薬剤耐性変異出現の有無

【HIV特異免疫の誘導に関する評価】

- HLA-A24陽性者：MHCテトラマーを用いた

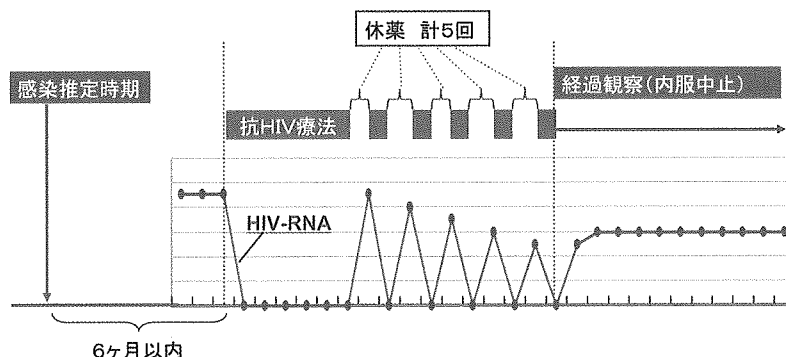


図1. 治療プロトコール概要

HIV-1 特異的 CD8 細胞

(熊本大学ウイルス制御部滝口教授)

- Nef138-10 領域における変異の有無

●研究期間

2000 年 11 月 1 日～2002 年 12 月 31 日の期間内に登録された症例について、18 ヶ月以上の経過観察を行った。

C. 研究結果

●対象者背景

2000 年 11 月 1 日～2002 年 12 月 31 日に当院を受診した初診患者は 432 名、うち 32 名が感染 6 ヶ月以内の急性 HIV 感染と診断された。この 32 例中 26 例が本研究に参加した (図 2・表 1)。

(ア)平均年齢：.....36 (21-56) 歳

(イ)男女比：.....24 対 2

(ウ)治療導入前：

平均 CD4 数： ..... 479 (49-4459) /μl

平均 VL： ..... 5.33 (3.26-6.91) log c/ml

(エ)初回休薬までの治療期間：

平均 .....178 (35-577) 日間

(オ)選択された治療薬：

d4T/3TC/IDV/RTV .....22 例

d4T/3TC/NFV .....2 例

AZT/3TC/EFV .....2 例

(カ)急性レトロウイルス感染症状：

有り .....23 例

無し .....3 例

症状の内容：

発熱 .....23 例

リンパ節腫脹 .....9 例

発疹 .....8 例

下痢 .....7 例

咽頭痛 .....7 例

頭痛 .....5 例

口腔カンジダ症 .....3 例

意識障害 .....2 例

(キ)初感染の診断：

WB バンド増 ..... 17 例

抗体価上昇 ..... 7 例

抗体陰性かつ RNA 陽性 ..... 2 例

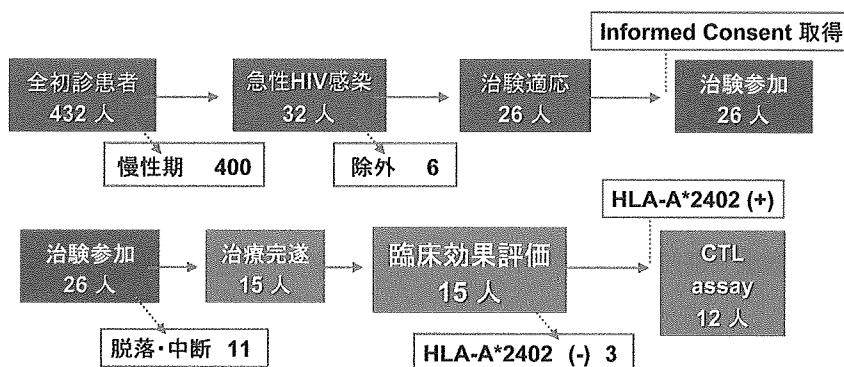


図 2. 研究の流れ (期間：2000 年 11 月 1 日～2002 年 12 月 31 日)

表 1. 背景因子

	n =	完遂 15	中断/脱落 11	P (X <sup>2</sup> 検定)
年齢 平均(range)	34	(21- 56)	36 (25- 50)	.500
性別 (男:女)	14:1		10:1	.677
感染経路	同性間 異性間	14 1	11 0	.577
急性感染診断	WB 他	8 7	9 2	.138
急性感染症状	有 無	15 0	10 1	.423
治療前 CD4	475 ± 204*		351 ± 300*	.00733
治療前 pVL	5.15 ± 0.89*		6.04 ± 0.85*	.00616
HLA-A*2402	12		5	.0792

\* 治療完遂の可否で各因子に差なし

●治療経過

(ア)プロトコール実施状況 (完遂・中断・脱落)

15 例 (58%) が 5 回休薬を含むプロトコールを完遂した (図 2)。その 15 例における総治療期間は平均 462 日間 (322 日～627 日) であった。

7 例 (27%) は休薬回数が 5 回に満たない時点で、本人の希望や副作用により治療を中断した。治療を中断した 7 例のうち 5 例は、嘔気などの軽度な副作用や、服薬遵守の精神的苦痛から、本人が内服継続困難と訴えて、プロトコールを完遂できなかった。初感染患者で CD4 数が比較的高いこと、IDV の副作用対策として大量の飲水を必要としたことなどが、継続内服の動機を低下させたものと考えられる。

残りの 4 例は、CD4 数が低く治療継続が必要なため、休薬することができず、本治験より脱落となった。そのうち、3 例は STI 回数 1 回、1 例は STI 回数 3 回と、最低でも 1 回の STI が実施されていた。

中断・脱落例は、早くから CD4 数が低い傾向にあったが、治療前の VL や急性レトロウイルス感染症状の有無・重症度などには、完遂例と差が認められなかった (表 1)。

(イ)有害事象：

下痢 6 例 (23%)、尿路結石 5 例 (19%)、皮膚乾燥 3 例 (12%)、嘔気 2 例 (8%)、陥入爪 1 例 (4%)、やせ 1 例 (4%)

このうち、治療中断の理由となった副作用は、尿路結石の 1 例のみであった。

(ウ)休薬と HAART の効果・耐性変異の出現の有無

HAART の効果に関しては、休薬回数を重ねても、一貫してウイルス学的に良好な反応が得られ、最終的に治療を終了する直前の VL は、すべての症例で

50copies/ml 未満 (検出限界以下) であった。

本治験に参加したすべての症例において、治療前後における耐性変異の増加はみられなかった。

● STI 含む早期治療介入の効果に関する検討

5 回の STI を含むプロトコールを完遂した 15 例について、その効果を検討した。

(ア)VL と CD4

VL の推移をみると、休薬中のリバウンドは、休薬回数を重ねる毎に低下が認められたが、治療を完全に中止した後は、徐々に VL が上昇し、持続的な VL 抑制はみられなかった (図 3)。また、慢性感染例の set point (平均 4.418log<sub>10</sub>copies/ml) と比較しても、有意差はみられなかった (図 3)。治療終了後 6 ヶ月までは VL が 4log<sub>10</sub>copies/ml 未満の症例が約半数を占めていたが、その後徐々に低下した (図 4)。このように、長期的な VL 抑制効果はなかったが、治療終了後 6 ヶ月から 1 年くらいは、比較的 VL が低く抑えられているようであった。

一方、CD4 数は、約 60 週で治療前と同じレベルになった (図 3)。1 例は、治療終了後約 1 年で CD4 数 200/μl 以下となったため、HAART の再開が必要となった。

(イ)HLA-A24 拘束性 CTL (熊本大学ウイルス制御分野滝口教授)

プロトコールを完遂した 15 例のうち、HLA-A24 陽性の 12 名に関して、3 種類の epitope (Nef138, Gag28, Env584) に対する HLA-A24 拘束性 CTL の頻度を、MHC テトラマーを用いて測定した。

推移する VL のレベルによって、持続的に VL の抑制が得られている 4 例 (図 5-A-①)、治療終了初期は比較的 VL が抑制されているが徐々に増加してゆく 4 例 (図 5-A-②)、治療終了後一貫して VL が

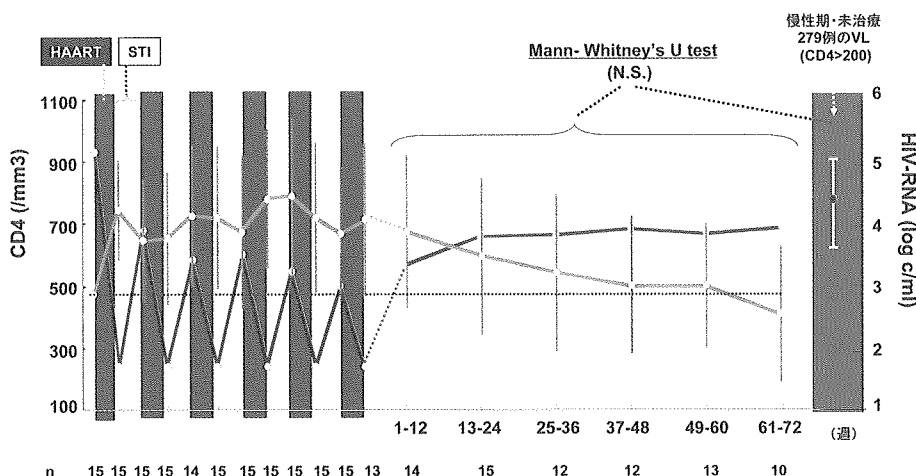


図 3. VL, CD4 の推移

高く推移している 4 例 (図 5-A-③)、に分け、個々の症例において VL と CTL の推移を図に示した。VL の抑制がみられた例では、VL が低い間に CTL がよく誘導されている傾向がみられたが、異なる経過を示す例も認められた。

各 epitope 特異的 CTL と VL の相関関係を、治療終了からの期間に分け、図 5-B に示した。いずれの時期においても、CTL と VL 統計学的に有意な相関関係は認められなかった。しかし、Nef138-10 特異的 CTL は、特に最初の 1 年間は、VL が低い時によく誘導されており、関連が示唆された。

(ウ) Nef138-10 特異的 CTL と Nef138-10 領域の変異

このように、最も VL 抑制に関与している可能性があった CTL epitope は、Nef138-10 であったが、その Nef138-10 領域について、血漿中 HIV-RNA または PBMC 中のプロウイルス DNA を用いて、変異ウイルスの有無をみた。

その結果、N 末端より 2 番目のアミノ酸の、tyrosine から phenylalanine への変異 (以下 2F 変異) が、高頻度に認められた。また、最初から 2F 変異ウイルスが感染したと考えられる例も多くみられた。

2F 変異が出現すると、それに応じて 2F 変異 epitope 特異的 CTL の誘導がみられ、wild type (WT) 特異的 CTL が徐々に減少していくのが観察された。しかし、2F 変異 epitope 特異的 CTL が誘導されていても、VL を抑制しているとみられる症例はほとんどなく、VL 抑制には関与していないものと考えられた。

最終的に、すべての症例において、観察中に 2F 変異ウイルスへの置換がみられ、この変異ウイルスは、生存に有利な escape variant ではないかと考えられた。

\* 以下、VL 抑制のパターンと、CTL および Nef138-10 の 2F 変異の詳細を示す。

【VL 持続抑制例】

(一貫して VL4logc/ml 未満の例)

— 4 例中 2 例で、治療終了後、Nef138-10 特異的 CTL がよく誘導されているのが確認された。その 2 例は、観察期間中、Nef138-10 領域に変異 (2F) が出現し、2F 変異 epitope 特異的 CTL がわずかに増加、WT 特異的 CTL は減少した。

— 残りの 2 例は、治療前から Nef138-10 に 2F 変異が認められており、最初からこの variant に感染したと考えられた。そのため、最初から 2F 変異 epitope 特異的 CTL は認められたが、WT 特異的 CTL は検出されなかった。

【VL 短期抑制例】

(VL が徐々に増加してゆく例)

— 観察期間中、Nef138-10 領域に変異 (2F) が出現した例が 1 例みられた。前述の例と同様に、初期は WT 特異的 CTL が誘導され、後に 2F 変異 epitope 特異的 CTL が出現した。

— また、1 例は、初期の PBMC 中のウイルス由来 DNA において WT であったが、血漿中 RNA では 2F 変異が確認された。CTL に関しては、経時的に WT 特異的 CTL から 2F 変異 epitope 特異的 CTL への population の変化が認められており、最初から WT に感染したものと考えられた。

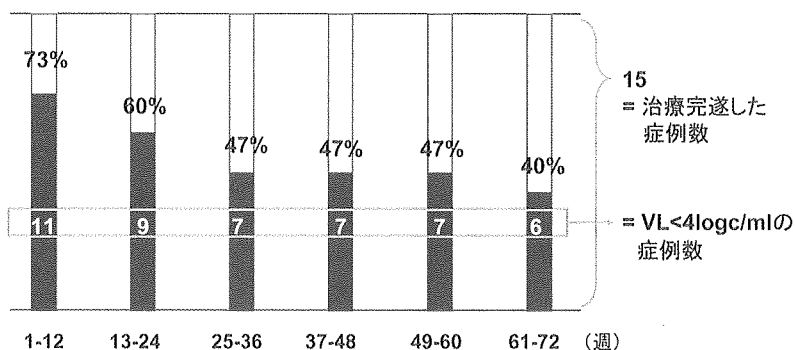
— 残りの 2 例は、今回用いた epitope では、CTL が検出されなかった。調べた限りでは、最初から Nef138-10 領域には 2F 変異が認められた。

【VL 持続高値例】

(一貫して VL4logc/ml 以上の例)

— 3 例は、最初から 2F 変異ウイルスしか検出されず、もともと 2F 変異ウイルスに感染した可能性が高い。そのうち 2 例は変異ウイルスに対する特異的 CTL が検出されたが、1 例は検出されなかった。

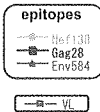
— 残りの 1 例は、最初 6C 変異ウイルス (6 番目のアミノ酸に変異) であったものが、途中で 2F 変異ウイルスに変化するのが確認された。



\* 12週毎のmedianVLで評価

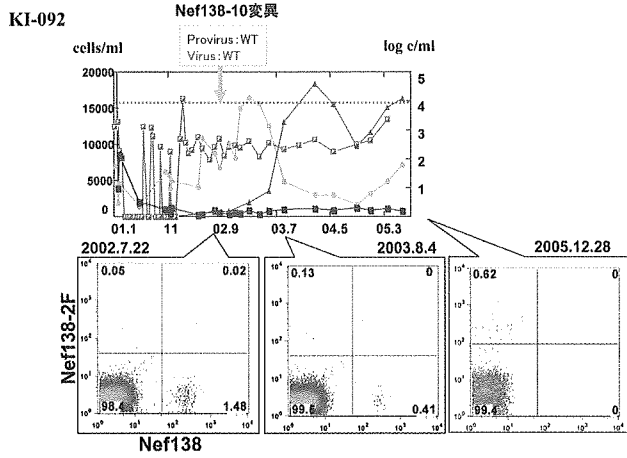
図 4 LV < 4log c/ml の症例

図5-A HLA-A24 拘束性CTL

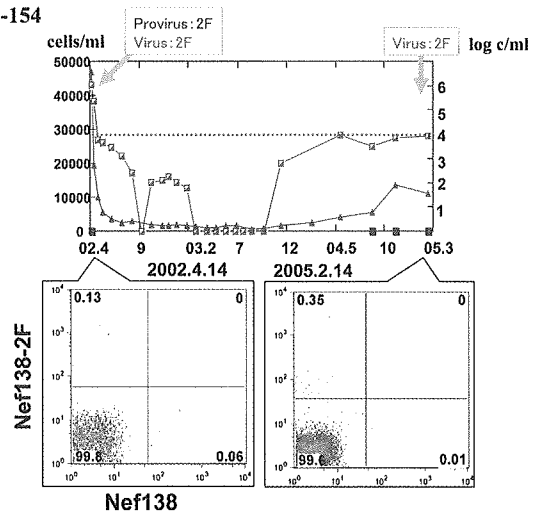


① VL<4 logc/mlに持続的に抑制されている4例

KI-092    KI-158    KI-163    KI-154

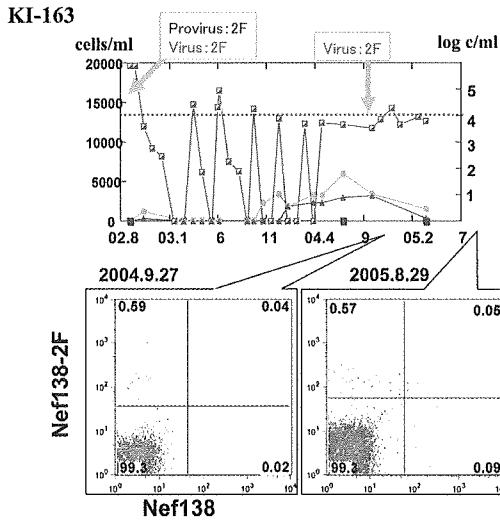


KI-154

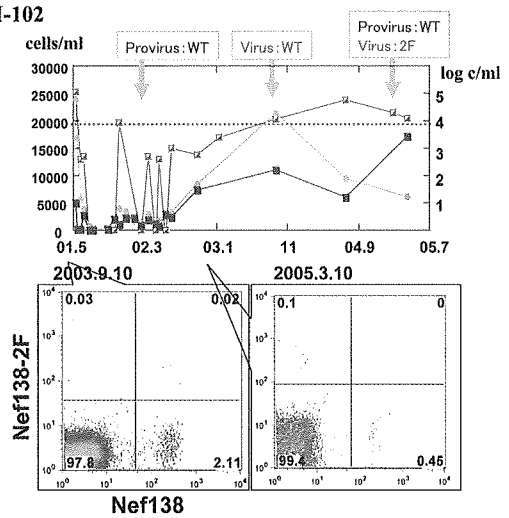


② 除々にVLが上昇していく4例

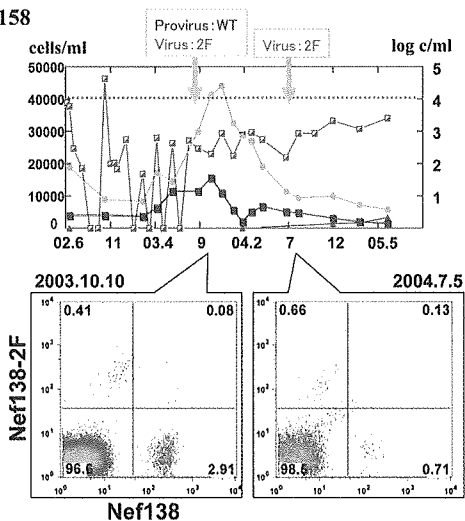
KI-102    KI-126    KI-161    KI-150



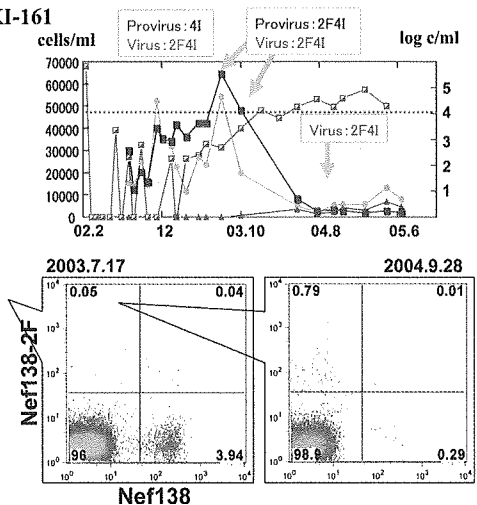
KI-102

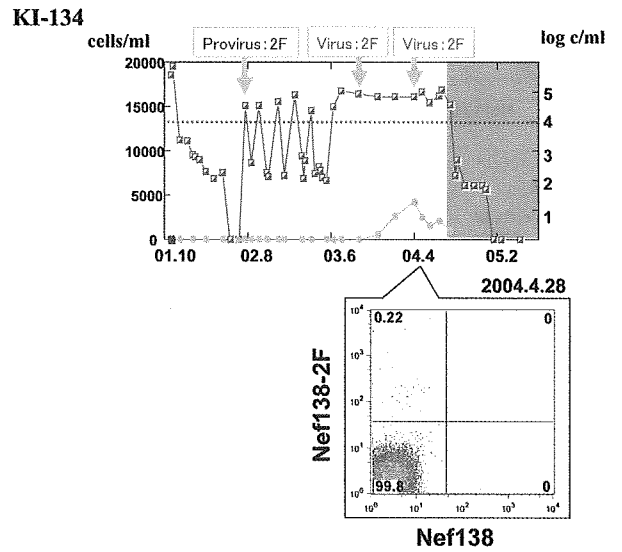
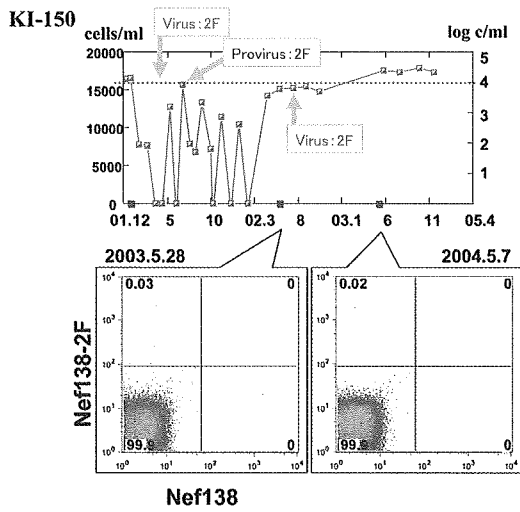
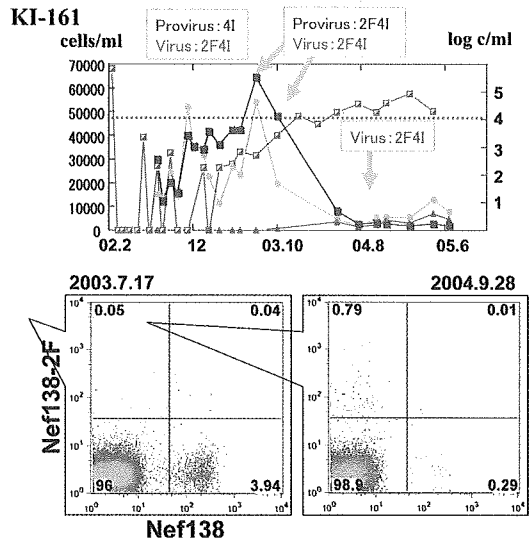
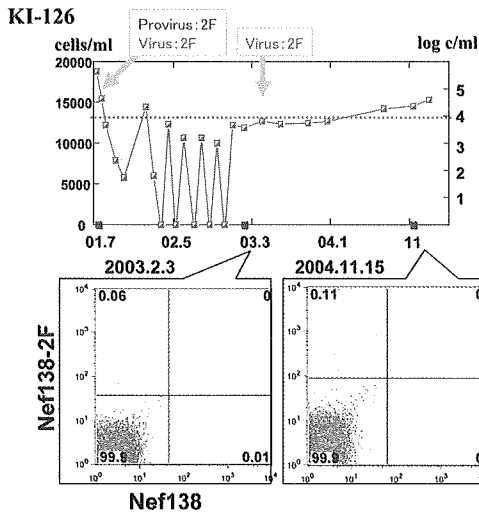


KI-158



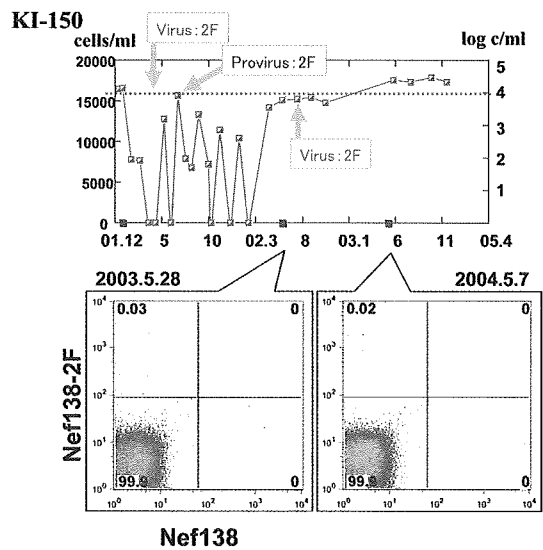
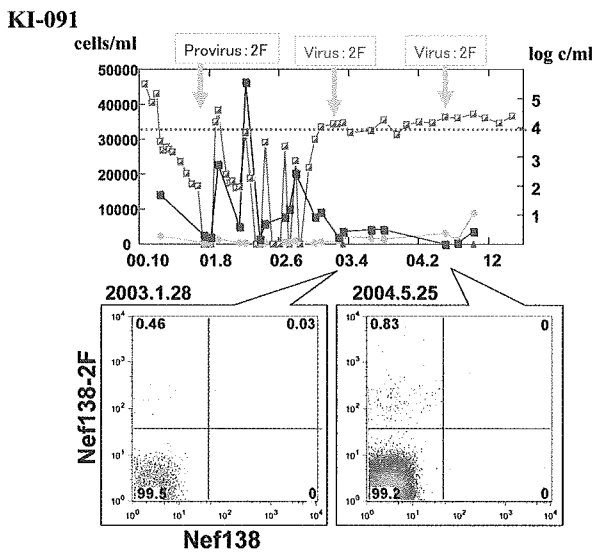
KI-161





③ VLが高く(VL>4log/ml) 推移している4例

KI-091      KI-134      KI-099      KI-144



**VLとの相関**

- ・統計学的に相関なし
- ・Nef138-10がより強い
- ・最初の1年まで

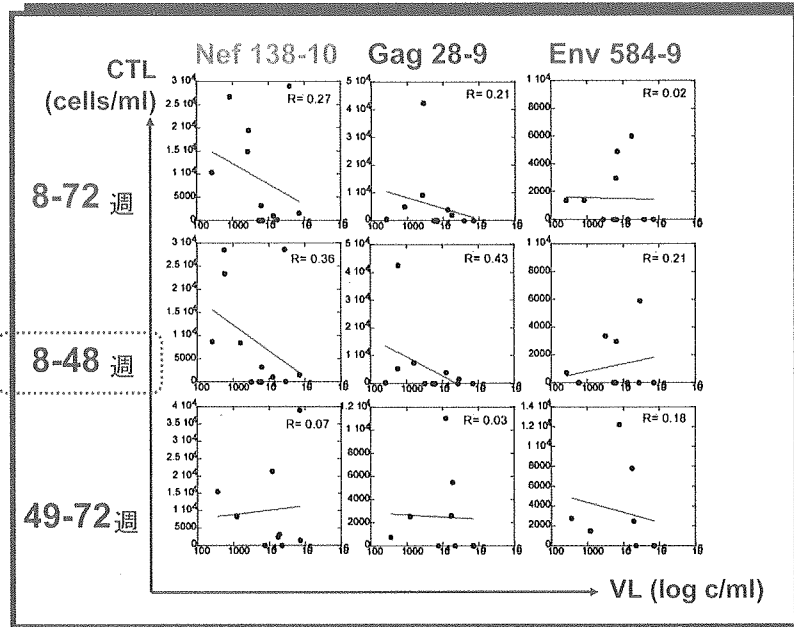


図 5-B HLA-A24 拘束性 CTL

**D. 考察**

このたび、HIV 特異免疫を賦活する治療法として、急性 HIV 感染者に対する計画的治療中断を含む早期治療介入を実施した。

実施にあたり、期間中の急性 HIV 感染者数を正確に把握するに至った。エントリー期間の2年2ヶ月間に、急性 HIV 感染と診断された者は、新患 432 名中 32 名 (約 7.5%) と、非常に高かった。首都圏における深刻な HIV 感染拡大をリアルタイムに反映したものと考えられる。HAART 療法は、HIV 感染者の予後を革命的に改善させたが、内服継続による QOL の低下や莫大な医療コストは、将来的に、更に大きな問題となるであろう。免疫療法によるアプローチは、HIV 特異免疫を惹起させることで、HIV-RNA を抑制し、CD4 数の減少をくいとめることを目標としており、成功すれば、抗 HIV 療法の内服期間を短縮させることによって、副作用軽減、QOL 改善、医療費削減につながると考えられる。

ところで、抗 HIV 療法の基本的な考え方は、いったん HAART を開始したら生涯治療を継続しなければならないというものであり、治療中断に関して、一定のコンセンサスは得られていない。最近、慢性患者において、治療を継続する群と、CD4 値をガイドとして休薬と治療を繰り返す群と、その予後と比較する大規模な国際治験 SMART Study が行われた。休薬の安全性を証明して、副作用軽減、QOL

改善、医療費削減につなげる意図があったものと思われるが、休薬群に有害 event がより多く発生したため、予定よりも早く中止となってしまった。

本治験では、すべての症例において、休薬回数を重ねても一貫して抗 HIV 療法に対する反応は良好で、著しい CD4 の低下もなく、新たな耐性ウイルスの出現もみられなかった。症例数こそ少ないが、SMART Study とは異なり、比較的安全に休薬する方法があるということを証明した結果となった。しかし、本来の治療適応ではない、急性期に治療を導入したということで、治療継続の動機に欠け、主に患者自身の希望や軽度の副作用により、7 例も中断に至ってしまった。急性期の治療は、その意義を明確にし、十分な合意の上で実施しなければ、安易な治療中断につながる恐れがあると考えられる。

最終的に 15 例がプロトコルを完遂し、免疫学的・ウイルス学的な検討の対象となった。

休薬中のリバウンド VL は、休薬回数を重ねる毎に低下が認められたが、治療を完全に中止した後は、徐々に VL が上昇していった。つまり、結果的に当初期待されたような、いわゆる long term non-progressor のような、持続的な VL 抑制効果は得られなかった。また、STI 治療群と、慢性感染例の set point (平均 4.418 log c/ml) と比較しても有意な差はみられなかった。急性 HIV 感染者に対する STI 療法に関して、同じようなプロトコルで行われた研究

はないが、概ね、持続的な VL 抑制効果は得られなかったというこれまでの報告と、同様の結果となった。ところが、治療後 1 年までは 4log<sub>10</sub>/ml 未満の症例が約半数を占め、初期には比較的 VL が低く抑えられている傾向がみられた。この事実は、誘導された HIV 特異免疫が、ある一定期間は有効であることを示している。たとえ、生涯持続するほどの強力な免疫賦活が得られなくとも、その効果の持続期間や、賦活された免疫応答を詳細に検討することは、治療ワクチンの開発において、非常に有益な情報を得ることができると考えられる。

一方、現在、抗 HIV 療法の開始基準は、主に CD4 数 (200/μl) によって定められている。よって、臨床的な観点からは、賦活された免疫によって、CD4 数がどれぐらいの期間維持されるのか、ということが、STI の効果を評価する上で大変重要な指標と考えられる。本治療では、治療期間中は STI をはさんでも CD4 数は緩やかに上昇を続けたが、治療を完全に中止すると、約 1 年間で治療前と同じレベルになった。また、1 例は約 1 年で CD4 数 200 以下となり HAART 再開が必要となった。また、治療後 1 年までは 4log<sub>10</sub>/ml 未満の症例が約半数を占め、以後その割合が急激に低下した。これらの結果から、実質的な CD4 維持効果は、約 1 年間と考えるのが妥当であろう。もちろん、それが STI を挿入することによって得られた免疫賦活効果なのか、純粹に ART のみの効果なのかは、慎重に判断する必要があると考えられる。

プロトコールを完遂した 15 例のうち、HLA-A24 陽性の 12 名に関して、Nef138、Gag28、Env584 と、3 種類の epitope に対する HLA-A24 拘束性 CTL を測定し、HIV 特異免疫の活性化について検討した (熊本大学ウイルス制御分野滝口教授)。その結果、統計学的に有意ではなかったが、最初の 1 年間は Nef138-10 特異的 CTL 頻度と血漿中 VL との関連性が示唆された。つまり、最も VL 抑制に関与している可能性があった CTL epitope は、Nef138-10 であったが、その Nef138-10 領域において、2 番目のアミノ酸の、tyrosine から phenylalanine への変異 (以下 2F 変異) が、高頻度に認められた。最初から 2F 変異ウイルスが感染した例もあれば、経過観察中に 2F 変異ウイルスへの置換がみられた例もあった。2F 変異が出現すると、それに応じて 2F 変異 epitope 特異的 CTL の誘導がみられ、WT 特異的 CTL が減少した。しかし、2F 変異 epitope 特異的 CTL と VL

との関連性は認められなかった。最終的にすべての症例で 2F 変異ウイルスが優位となり、この変異ウイルスは、生存に有利な escape variant ではないかと考えられた。

## E. 結論

急性 HIV 感染者に対する STI を含む早期治療介入の治療を行ったが、持続的な VL 抑制効果は確認できなかった。しかし、治療終了後早期 (約 1 年以内) においては、CD4 数は維持され、VL も比較的抑制されている例が多かった。HLA-A24 陽性者において、3 種類の epitope に対する HLA-A24 拘束性 CTL を測定したところ、治療終了後早期 (約 1 年以内) において、Nef138-10 特異的 CTL 頻度と血漿中 VL との関連性が示唆された。しかし、2F 変異ウイルスが高頻度に検出され、生存に有利な escape variant と考えられた。

本研究により、期間限定的であるが、HIV 感染症に対する免疫療法的アプローチの有用性が示された。今後更に研究を進めていく必要があると考えられる。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

1. 田沼順子、上田晃弘、吉田邦仁子、矢崎博久、本田美和子、湯永博之、源河いくみ、照屋勝治、立川夏夫、菊池 嘉、安岡 彰、岡 慎一、木村 哲。当院における急性 HIV 感染者に対する Structured Treatment Interruptions. 白馬シンポジウム。長野、8 月。2002
2. 田沼順子、上田晃弘、吉田邦仁子、矢崎博久、本田美和子、湯永博之、源河いくみ、照屋勝治、立川夏夫、菊池 嘉、安岡 彰、岡 慎一、木村 哲。当院における急性 HIV 感染者に対する Structured Treatment Interruptions. 第 77 回日本感染症学会総会、福岡、4 月、2003.
3. 田沼順子、上田晃弘、吉田邦仁子、矢崎博久、本田美和子、湯永博之、源河いくみ、照屋勝治、立川夏夫、菊池 嘉、安岡 彰、岡 慎一、木村 哲。当院における急性 HIV 感染者に対する Structured Treatment Interruptions. 第 17 回日本エイズ学会、名古屋、11 月、2003.



4. 田沼順子、恩田順子、原田壮平、福島篤仁、阿部泰尚、横田恭子、上田晃弘、矢崎博久、本田美和子、瀧永博之、源河いくみ、照屋勝治、立川夏夫、菊池 嘉、岡 慎一、木村 哲。当院における急性 HIV 感染者に対する Structured Treatment Interruptions. 第 18 回日本エイズ学会、静岡、12 月、2004.
5. Junko Tanuma, Katsuji Teruya, Mamoru Fujiwara, Masafumi Takiguchi, Shinichi Oka, and Satoshi Kimura. Control of plasma viral load after HAART with 5 series of structured treatment interruptions as an immune stimulatory intervention in primary HIV-1 infection. AIDS Vaccine Conference, Montreal, Canada, Sep, 2005.
6. 田沼順子、恩田順子、阿部泰尚、横田恭子、上田晃弘、矢崎博久、本田美和子、瀧永博之、源河いくみ、照屋勝治、立川夏夫、菊池 嘉、岡慎一、木村 哲。当院における急性 HIV 感染者に対する Structured Treatment Interruptions. 第 19 回日本エイズ学会、熊本、12 月、2005.



## 研究成果の刊行に関する一覧

主任研究者 岡 慎一

1. Tomiyama H, Fujiwara M, Oka S, and Takiguchi M. Epitope-dependent effect of Nef-mediated HLA class I down-regulation on ability of HIV-1-specific CTLs to suppress HIV-1 replication. *J Immunol (Cutting Edge)* 174: 36-40, 2005.
2. Satoh M, Takamiya Y, Oka S, Tokunaga K, and Takiguchi M. Identification and characterization of HIV-1-specific CD8+T cell epitopes presented by HLA-A\*2601. *Vaccine* 23: 3783-3790, 2005.
3. Yamanaka H, Teruya K, Tanaka M, Kikuchi Y, Takahashi T, Kimura S, Oka S, and the HIV/Influenza Vaccine Study Team. Efficacy and immunologic responses to influenza vaccine in HIV-1-infected patients. *JAIDS* 39: 167-173, 2005.
4. Matsushita S, Yoshimura K, Kimura T, Kamihira A, Takano M, Eto K, Shirasaka T, Mitsuya H, and Oka S. Spontaneous recovery of hemoglobin and neutrophil levels in Japanese patients on a long-term Combivir containing regimen. *J Clin Virol* 33: 188-193, 2005.
5. Fujiwara M, Takata H, Oka S, Tomiyama H, and Takiguchi M. Patterns of cytokine production in HIV-1-specific human CD8+ T cells after stimulation with HIV-1-infected CD4+T cells. *J Virol* 79: 12536-12543, 2005.
6. Borghan MA, Oka S, and Takiguchi M. Identification of HLA-A\*3101-restricted cytotoxic T lymphocyte response to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in patients with chronic HIV-1 infection. *Tissue Antigens* 66: 305-313, 2005.
7. Otsuka Y, Fujino T, Mori N, Sekiguchi J, Toyota E, Saruta K, Kikuchi Y, Sakaki Y, Ajisawa A, Otsuka Y, Nagai H, Takahara M, Saka H, Shirasaka T, Yamashita Y, Kiyosuke M, Koga H, Oka S, Kimura S, Mori T, Kuratsuji T, and Kirikae T. Survey of human immunodeficiency virus (HIV)-seropositive patients with Mycobacterial infection in Japan. *J Infect* 51: 364-374, 2005.
8. Hirabayashi Y, Tsuchiya K, Kimura S, and Oka S. Simultaneous determination of six HIV protease inhibitors (amprenavir, indinavir, lopinavir, nelfinavir, ritonavir and saquinavir), the active metabolite of nelfinavir (M8) and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (efavirenz) in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Biomed Chromatogr* 20: 28-36, 2006.
9. Harada S, Nozaki Y, Yagou Y, Hiraga Y, Gatanaga H, Uemura N, Kimura S, and Oka S. A woman who excreted a Tape-like substance. *Clin Infect Dis (Photo Quiz)* 42: 516-517, 572-574, 2006.
10. Kawashima Y, Satoh M, Oka S, and Takiguchi M. Identification and characterization of HIV-1 epitopes presented by HLA-A\*2603: Comparison between HIV-1 epitopes presented by A\*2601 and A\*2603. *Human Immunol* (in the press)
11. Gatanaga H, Tachikawa N, Kikuchi Y, Teruya K, Genka I, Honda M, Tanuma J, Yazaki H, Ueda A, Kimura S, and Oka S. Urinary  $\beta_2$ -microglobulin as a sensitive marker for renal injury by tenofovir disoproxil fumarate. *AIDS Res Hum Retrovirus* (accepted).
12. Matsuoka AS, Gatanaga H, Sato H, Koike K, Kimura S, and Oka S. Cooperative contribution of *Gag* substitutions to nelfinavir-dependent enhancement of precursor cleavage and replication of human immunodeficiency virus type-1. *Antiviral Res* (in the press)
13. Kawado M, Hashimoto S, Yamaguchi T, Oka S, Yoshizaki K, Kimura S, Fukutake K, Higasa S, and