

厚生労働科学研究研究費補助金

エイズ対策研究事業

HIV-1遺伝子を広域に持つ新規SHIVとサルを用いた
エイズ治療薬開発の研究

平成15-17年度 総合研究報告書

主任研究者 井戸 栄治
(京都大学ウイルス研究所 特任助教授)

平成18年 (2006年) 3月

目 次

I. 総合研究報告		
「HIV-1遺伝子を広域に持つ新規SHIVとサルを用いたエイズ治療薬開発の研究」	-----	1
主任研究者 井戸 栄治		
分担研究者 伊吹 謙太郎		
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	13
III. 研究成果の刊行物・別刷	-----	16

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

総合研究報告書

「HIV-1 遺伝子を広域に持つ新規 SHIV とサルを用いたエイズ治療薬開発の研究」

（課題番号：H15-エイズ-002）

主任研究者 井戸 栄治 京都大学ウイルス研究所 特任助教授

分担研究者 伊吹 謙太郎 京都大学ウイルス研究所 助手

研究要旨

本研究では、前臨床の基礎研究として、人に近い動物であるサルを用いてエイズ治療法を実験的に開拓する系を確立することを目的とした。人への治療法として提示するためには、薬剤の標的がエイズの病原ウイルス HIV-1 そのものであることが望ましい。ところが HIV-1 は、ヒト以外にはチンパンジーなど一部の例外を除いて、通常の医学実験用のサルには感染しない。そこで我々は、HIV に類似のサルウイルス(SIV)と HIV-1 とのキメラウイルス(SHIV)を作成し、これと比較的入手の容易なアカゲサルを用いてエイズの病態を研究できる系を生みだそうとしたのである。従来サル感染実験に使用される SHIV と言えば、主に env 遺伝子とその周辺付属遺伝子のみが HIV-1 由来で、その他は SIV 由来であるものに限定されていた。しかし、これでは人への治療薬の効果判定に適してはいない。なぜなら、市販されているウイルス複製阻害剤の中には、NNRTI のように HIV-1 の pol 遺伝子産物を特異的に標的としているものも多いからである。そこで我々は、pol 遺伝子が HIV-1 由来である一連の新規 SHIV を作成し、そのサル感染実験を行うことにした。本研究では 3 年間に、1) HIV-1 の protease (PR) を持つ SHIV(SHIV-pr)のサル感染実験と PR 阻害剤の効果判定、2) HIV-1 の reverse transcriptase (RT) と integrase (INT)を持つ SHIV(SHIV-rti) のサル感染実験、3) HIV-1 の pol (PR, RT, INT) を持つ SHIV(SHIV-prti) のサル感染実験、4) pol の RT と INT 領域及び env を HIV-1 由来にした SHIV(SHIV-rti/3rn) のサル感染実験、5) SHIV の持続感染に与える IL-15 の治療効果の検討、等の研究を主に行った。その結果、pol 遺伝子領域を HIV-1 由来とする新規 SHIV とサルを用いる新しいモデル系が完成し、それにより薬剤の in vivo 評価ができる道が開けた。

A. 研究目的

エイズ治療については、この数年の間に HAART 療法などが開発され、光明が見えたかに思えた。しかし、この療法では確かに延命はできるものの、高価な薬剤を大量に摂取し続けねばならず、副作用の問題や投薬を止めれば新たにウイルスが再増殖し始め、しかも通常の薬剤では抑えることができないという多剤耐性株の出現の問題、さらには治療中の免疫系再構築の間に既存の日和見感染症が悪化するいわゆる免疫再構築症候群などの問題が指摘されている。治療薬自体の開発が押し進められるべきであることは言うまでもないが、種々の治療薬の最適な組み合わせの探索を始めとして、他の抗ウイルス活性物質あるいは免疫システム自体を活性化する薬剤との併用など、従来試みられていない実験的療法の開拓が強く要望されている。しかしながら、人

を対象としてそのような治療効果が保証されない、場合によっては症状増悪のリスクが否定できない実験的治療を安易に試みることは倫理的に許されない。そこで本研究では、先ず、前臨床の基礎研究として、人に近い動物であるサルを用いてエイズ治療法を実験的に開拓する系を確立することを目的とする。次にその系を用いて、種々の薬剤や新たな治療法の効果判定を行い、人のためのより良い治療法を提示することを最終目標とする。

B. 研究方法

pol 遺伝子が HIV-1 由来である一連の新規 SHIV (以下の 1-3) をフルゲノムで作成し、トランスフェクション後得られたウイルスを用いて、それらのサル感染実験を行うことにした。本研究では 3 年間に、モデル系確立に関しては、1) HIV-1 の protease (PR) を持つ SHIV(SHIV-pr)のサル感染実験と PR 阻害

剤の効果判定、2) HIV-1 の reverse transcriptase (RT) と integrase (INT) を持つ SHIV(SHIV-rti) のサル感染実験、3) HIV-1 の pol (PR, RT, INT) を持つ SHIV(SHIV-prti) のサル感染実験、4) pol の RT と INT 領域及び env を HIV-1 由来にした SHIV(SHIV-rti/3rn) のサル感染実験、また従来試みられてない新しい薬剤の評価については、5) SHIV の持続感染に与える IL-15 の治療効果の検討、等の研究を主に行った。なおウイルス感染の成立は、血中の viral RNA load の測定、ウイルス分離、抗体応答の有無などで判定した。また CD4/8 比も追跡した。

(倫理面への配慮)

本研究では、治療薬開発にサルを用いている。従って差し当たって人権上の問題は該当しない。実験動物としてサルを使用する点については、動物愛護の配慮を怠ることなく主任研究者の所属する京都大学ウイルス研究所のサルの飼育と使用に関する委員会(通称「霊長類委員会」)に定める規定・指針に則して研究を行っている。

C. 研究結果

1) HIV-1 の protease (PR) を持つ SHIV(SHIV-pr) のサル感染実験と PR 阻害剤の効果判定

SHIV-pr をアカゲザルに静脈内接種すると、血中ウイルス量は接種後 2 週目で 10^5 copies/ml 程度にまで上がり、その後 $10^3 \sim 10^4$ copies/ml と低いながら半年以上の長期に渡りウイルスを産生し続けた。このサルからウイルスを含む血漿を新たなサルに接種し、4 代まで継代したところ、ウイルス量も安定して 10^5 copies/ml 程度の持続感染状態になることが判った。次に、これらのサルに PR 阻害薬カレトラ(ロピナビル/リトナビル)の中身を水に懸濁して 4 週間毎日経口投与(1カプセル分/日/頭)したところ、試みた 3 頭いずれも血中ウイルス量が検出限界(10^3 copies/ml)あるいはそれ以下に減少した。薬剤投与を停止すると、血中ウイルス量は直ちに元のレベルあるいはそれ以上に戻り、ウイルス分離もできた。投与前後でウイルス遺伝子に顕著な変異は認められなかった。

2) HIV-1 の reverse transcriptase (RT) と integrase (INT) を持つ SHIV(SHIV-rti) のサル感染実験

SHIV-rti を 2 頭のアカゲザルに静脈内接種した結果、共にウイルス分離・抗体反応が見

られ、感染が成立した。血中ウイルス量は 10^{3-4} copies/ml と高くはなかったが、ウイルス分離が一時中断の後再開し続けた。

3) HIV-1 の pol (PR, RT, INT) を持つ SHIV(SHIV-prti) のサル感染実験

サル細胞で馴化の後、増殖能の向上したものを 2 頭のアカゲザルに静脈内接種した結果、両頭よりウイルスが分離され、弱い抗体反応も見られ、感染は成立したものと考えられる。ただし、接種してまだ 3 ヶ月程度しか経過していないので、今後の経過が注目される。

4) pol の RT と INT 領域及び env を HIV-1 由来にした SHIV(SHIV-rti/3rn) のサル感染実験

SHIV-rti/3rn は、SIVmac のゲノムに HIV-1 の RT と INT 遺伝子および ENV 遺伝子を組み込んだキメラウイルスである。このプロウイルスプラスミドを培養細胞にトランスフェクションすると、感染性のウイルスが産生される。しかしこのウイルスは、ヒト由来の細胞株ではよく増殖するもののサル由来の細胞株(HSC-F)では増殖が極めて弱かった。そこで、サル細胞への adaptation をねらって HSC-F で 26 週間継代を続けることにした。その結果、HSC-F ならびにアカゲザル PBMC において明らかな増殖能の向上が見られたので、この継代ウイルスを 3 頭のアカゲザルに iv 接種したところ、いずれのサルにおいても接種後 1 週目に血中ウイルス量が $10^5 \sim 10^6$ copies/ml のピークに到達し、2 週目からは抗体応答も認められ、ウイルス分離、PCR の成績からも感染の成立は明らかであった。サル細胞への馴化に際し、どのような変異が生じたかを解析した結果、継代前と後のウイルスではゲノム全体に渡って全部で 11 ヶ所(Gag の MA と CA、Pol の INT、gp120 に 4 ヶ所、gp41 に 3 ヶ所、他に PBS に 1 ヶ所)の変異(PBS を除いてアミノ酸の置換を伴う変異)が認められたが、この内 Gag の CA (p27) 領域と gp41 領域の内一つ、都合 2 ヶ所の変異が最もサル細胞における増殖能向上に寄与していることが判明した。

5) SHIV の持続感染に与える IL-15 の治療効果の検討

エイズ治療においてウイルスの持つ各酵素に対する種々の阻害剤の目覚ましい成果については言うまでもない。しかし、治療効果が保証されない新しい薬剤や物質となるとヒトへの試用の前にどうしても動物レベルでの評価が必須と考えられる。そうした物質の一つとして免疫系の特に innate の免疫系を活性化することで注目されているサイトカインの一つ、IL-15 のエイズウイルスに対する影響を調べ

た。ヒト精製 IL-15 は、in vitro でヒト並びにアカゲザル PBMC の培養液中に添加 (25ng/ml) すると、24 時間以内に K562 細胞を標的とした NK 活性を顕著に上昇させ、しかもこの NK 活性の昂進は in vitro では少なくとも 4 日程度は持続することが分かった。そこで SHIV89.6p が持続感染しているアカゲザル 2 頭に、IL-15 を 1 回当たり 5 μ g、隔日で 4 回血中に投与したところ、2 頭共に一過的な NK 活性の上昇が見られ、内 1 頭では血中ウイルス量が one order 減少することを観察した。

D. 考察

SHIV-pr 感染サルのカレトラ投与実験において、ウイルス量が顕著に下がったことは、本研究で作成した一連の SHIV とサルを用いて、PR 阻害剤を始めとする種々の抗ウイルス薬剤について経口投与での in vivo 評価が現実的に可能であることを示している。ほぼ 1ヶ月間の薬剤投与前後において PR 領域含めて周辺遺伝子に顕著な変異が認められなかったことは、耐性変異がこの期間では殆ど生じないことを示唆しており、今後より長期の薬剤投与実験など様々な実験計画の可能性が考えられた。

SHIV-rti さらには SHIV-prti がサルに感染することが確かめられたことは、これら新規 SHIV が PR や RT 阻害剤を組み合わせた HAART 治療の検証に使用できることを示唆しており、まず継代による安定化が必要と考えられた。RT 阻害剤は水溶性も高く、経口投与も PR 阻害剤よりは容易に行なえるものと考えられる。

SHIV-rti/3rn のサル細胞への adaptation において critical な変異が同定され、その分子クローンが得られたことは、同ウイルスが現時点で世界的に見ても最も HIV-1 の領域を広く持つ SHIV であることから意義が大きいと思われる。またその主要な変異が HIV-1 に代えた RT や INT 領域ではなく CA 並びに env 領域であったことは、CA の変異が PIC (pre-integration complex) 全体の整合性を保つ上で必須の変化であったとも考えられ、後者の役割と共に興味深い知見であると考えている。

IL-15 による NK 活性の増強効果はサルでは初めて示されたものである。IL-15 の血中投与により、1 頭ではあったがウイルス量を下げた効果があったことは、今後こうした新しい治療法の可能性が示唆された意義は大きい。

E. 結論

エイズ治療薬の多くが標的とする pol 遺伝子を HIV-1 由来とした SHIV を作成し、それとサルを用いた新しい動物モデル系を確立するという第一の目的に関しては、かなり達成されたのではないかと考えている。また現在 HIV-1 の領域が最も広い SHIV の分子クローンが得られた意義も大きいと思われる。ウイルス宿主域という種の壁を超える要因の解明に寄与すると考えられるからである。薬剤処理に関しては、PR 阻害剤であるカレトラ剤の効果を実証できたことは大きな成果であるが、その他の開発中の薬剤等の検証にまで着手できなかったことは悔やまれる。また新しいエイズ治療法として NK 活性を昂進する IL-15 の可能性が浮かびあがったことも一つの成果と考えられるが、これももっと様々な治療法の検討ができなかったことが不満として残っている。ただし、限られた人力と予算の中で、以上の点をすべて遂行することは至難であり、全体としての研究の達成度はまずまずだったのではと自己評価している。

当初、望むらくは HIV-1 由来の領域がなるだけ広いものをと期待した。が、現時点では env 領域も置換すると感染初期はよいとして、サル個体内で持続感染するのが難しく、今後薬剤評価のためと HIV-1 領域拡大の努力は一応別個の研究と割り切るべきであると考えている。

幸い pol 領域が HIV-1 由来の SHIV がサルに感染することが確かめられたので、今後はこれらの安定化を図ること、そしてそれを利用した実験的治療法の開拓をより積極的に進める予定である。またサルを使える最大の利点は、ヒトに対しては絶対に不可能な研究ができることである。以上のことを念頭に置いて、可能であれば何らかの研究助成を受けて次の研究を行いたいと考えている。

1) INT 阻害剤など新規薬剤の in vivo 評価

将来 NNRTI のように HIV-1 特異的な新規薬剤が続々と開発作成されるものと思われる。そうした薬剤の HAART レベルの評価には、本研究で開発した SHIV とサルの系はうってつけである。

2) HAART 中断後に再び活発なウイルス産生をする臓器の解明

薬剤処理中にウイルスがどこに潜んでいるのか、治療中断後にウイルスが活発に動き出したり耐性ウイルスが生産されるのはどこの臓器なのか、などの疑問を解明することは本疾病の根治療法を探る上で重要な問題である。新規 SHIV と薬剤の系はこうした研究に利用

できる。

F. 健康危険情報

該当するものはない。

G. 研究発表

主任研究者 井戸栄治

1. 論文発表

- 1) Akiyama, H., Ido, E., Akahata, W., Kuwata, T., Miura, T., 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 of human immunodeficiency virus type 1. *J. Gen. Virol.*, 84(Pt 7):1663-9, 2003.
- 2) Yoshimura, K., Ido, E., Akiyama, H., Kimura, T., Aoki, M., Suzuki, H., Mitsuya, H., Hayami, M., Matsushita, S. The impact of highly active antiretroviral therapy by the oral route on the CD8 subset in monkeys infected chronically with SHIV 89.6P. *J. Virol. Methods.* 112(1-2):121-8, 2003.
- 3) Enose, Y., Miyake, A., Ido, E., Hayami, M. Infection of a chimeric simian and human immunodeficiency virus with CCR5-specific HIV-1 envelope to Rhesus macaques. *J. Vet. Med. Sci.*, 65(2):283-6, 2003.
- 4) Ndemi, N., Habakkuk, Y., Takehisa, J., Takemura, T., Kobayashi, E., Ngansop, C., Songok, E., Miura, T., Ido, E., Hayami, M., Kaptue, L., 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):435-9, 2003.
- 5) Akahata, W., Ido, E., Hayami, M. Mutational analysis of two zinc-finger motifs in the nucleocapsid protein of simian immunodeficiency virus mac239. *J. Gen. Virol.*, 84(Pt 6):1641-8, 2003.
- 6) Akahata, W., Ido, E., Akiyama, H., Uesaka, H., Enose, Y., Horiuchi, R., Kuwata, T., Goto, T., Takahashi, H., Hayami, M. DNA vaccination of macaques by a full-genome simian/human immunodeficiency virus type 1 plasmid chimera that produces non-infectious virus particles. *J. Gen. Virol.*, 84(Pt 8):2237-44, 2003.
- 7) Kita, K., Ndemi, N., Ekwilanga, M., Ido, E., Kazadi, R., Bikandou, B., Takehisa, J., Takemura, T., Kageyama, S., Tanaka, J., Parra, H. J., Hayami, M., Ichimura, H.: Genetic diversity of HIV type 1 in Likasi, southeast of the Democratic Republic of Congo. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.*, 20(12):1352-7, 2004.
- 8) Ndemi, N., Takehisa, J., Zekeng, L., Kobayashi, E., Ngansop, C., Songok, E. M., Kageyama, S., Takemura, T., Ido, E., Hayami, M., Kaptue, L., Ichimura, H.: Genetic diversity of HIV type 1 in rural eastern Cameroon. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.*, 37(5):1641-1650, 2004.
- 9) Iida, T., Kuwata, T., Ui, M., Suzuki, H., Miura, T., Ibuki, K., Takahashi, H., Yamamoto, T., Imanishi, J., Hayami, M., Kita, M.: Augmentation of antigen-specific cytokine responses in the early phase of vaccination with a live-attenuated simian/human immunodeficiency chimeric virus expressing IFN- γ . *Arch. Virol.*, 149:743-757. 2004.
- 10) 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., Hayami, M.: Protective effects of nef-deleted SHIV or that having IFN- γ against disease induced with a pathogenic virus early after vaccination. *Arch. Virol.*, 149:1705-1720, 2004.

- 11) Takahashi, M., Ido, E., Uesaka, H., Fukushima, T., Ibuki, K., Miura, T., Hayami, M., Takahashi, H.: Comparison of susceptibility to SIVmac239 infection in CD4⁺ and CD4⁺8⁺ T cells. *Arch. Virol.*, 150:1517-28, 2005.
- 12) Horiuchi, R., Akahata, W., Kuwata, T., Enose, Y., Ido, E., Suzuki, H., Miyake, A., Saito, N., Ibuki, K., Goto, T., Miura, T., Hayami, M.: DNA vaccination of macaques by a full-genome SHIV plasmid that has an IL-2 gene and produces non-infectious virus particles. *Vaccine*, in press.
- 13) Takemura, T., Ekwilanga, M., Bikandou, B., Ido, E., Yamaguchi-Kabata, Y., Ohkura, S., Harada, H., Takehisa, J., Ichimura, H., Parra, H.J., Nende, M., Mubwo, E., Sepole, M., Hayami, M., Miura, T.: A novel SIV from black mangabey (*Lophocebus aterrimus*) in Democratic Republic of Congo. *J. Gen. Virol.*, 86(7):1967-71, 2005.
- 14) Saito, N., Takahashi, M., Akahata, W., Ido, E., Hidaka, C., Ibuki, K., Miura, T., Hayami, M., Takahashi, H.: Analysis of evolutionary conservation in CD1d molecules among primates. *Tissue Antigens.*, 66(6):674-82, 2005.
2. 学会発表
- 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. *AIDS Vaccine Conference 2003*, New York, Sep 18-21, 2003.
- Akiyama, H., Ido, E., Ibuki, K., Miura, T., Hayami, M.: Construction and in vivo infection of a novel simian/human immunodeficiency chimeric virus containing the reverse transcriptase, integrase and the 3' half of the genomic region of HIV-1. *21th Annual Symposium on Nonhuman Primate models for AIDS*, Seattle, October 22-25, 2003.
- 秋山尚志, 井戸栄治, 大倉定之, 鈴木元, 伊吹謙太郎, 石松美沙, 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、日本ウイルス学会、京都、2003 年 10 月 27 日-29 日
- 竹村太地郎, 井戸栄治, 大倉定之, 原田礼忠, NDEMBI Nicase, 武久盾, 市村宏, 山口由美, 速水正憲, 三浦智行: コンゴ民主共和国に生息するブラックマンガベイ *Cercocebus atterimus* からの SIV の分離と遺伝子解析、日本ウイルス学会、京都、2003 年 10 月 27 日-29 日
- デンビニケース, 武久盾, 竹村太地郎, 井戸栄治, 小林永治, 速水正憲, 市村宏: Emergence of new forms of human immunodeficiency virus type 1 in Cameroon, 日本ウイルス学会、京都、2003 年 10 月 27 日-29 日
- 堀内励生, 井戸栄治, 赤畑渉, 榎瀬良美, 伊吹謙太郎, 三浦智行, 後藤俊幸, 高橋秀実, 速水正憲: DNA vaccination of macaques by full-sized SHIV plasmids that produce non-infectious virus particles, *The 10th East Asian Joint Symposium on Biomedical Research (東アジアシンポジウム)*, 京都、2003 年 11 月 18-19 日
- 石松美沙, 井戸栄治, 秋山尚志, 三浦智行, 伊吹謙太郎, 速水正憲: サルの SHIV 感染に対する IL-15 投与効果の解析、日本エイズ学会、神戸、2003 年 11 月 27 日-29 日
- 井戸栄治, 竹村太地郎, 武久盾, Bikandou Blaise, 秋山尚志, 池田幹雄, Henri-Joseph Parra, 市村宏, 速水正憲: コンゴ共和国におけるピグミー族の HIV 保有状況、日本エイズ学会、神戸、2003 年 11 月 27 日-29 日
- Saito, N., Takahashi, M., Akahata, W., Ido, E., Hidaka, C., Ibuki, K., Miura, T., Hayami, M., Takahashi, H.: Evolutional conversation of the CD1d molecules among primates. *Symposium on protective immunity against HIV/SIV and development of MHC-defined rhesus macaques*, Miyazaki, July 19-20, 2004.
- 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-

- infections virus particles. Symposium on protective immunity against HIV/SIV and development of MHC-defined rhesus macaques, Miyazaki, July 19-20, 2004.
- 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, Hyogo, August 30-September 2, 2004.
- 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 年 9 月 10-12 日
- 竹村太地郎、井戸栄治、大倉定之、原田礼忠、Bikandou Blaise、Ekwalinga Michel、Ndembi Nicase、武久盾、市村宏、山口由美、速水正憲、三浦智行：中央アフリカ地域に生息するブラックマンガベイにおける新規 SIV (SIVbkm) の解析、第 138 回日本獣医学会、札幌、2004 年 9 月 10-12 日
- 堀内励生、井戸栄治、赤畑渉、榎瀬良美、伊吹謙太郎、後藤俊幸、高橋秀実、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 ワクチンのサルにおける感染防御効果、第 52 回日本ウイルス学会、横浜、2004 年 11 月 21-23 日
- 齋藤尚紀、高橋めぐみ、赤畑渉、井戸栄治、清水真澄、日高千鶴乃、新谷英滋、伊吹謙太郎、三浦智行、速水正憲、高橋秀実：種々の霊長類における CD1d 分子の解析：SIV/HIV 感受性との関連の可能性、第 52 回日本ウイルス学会、横浜、2004 年 11 月 21-23 日
- Ido, E., Horiuchi, R., Akahata, W., Hayami, M.: Development of DNA vaccination using full-sized SHIV plasmids that produce non-infectious virus particles. 40th Anniversary of US-Japan Cooperative Medical Science Program, 17th Joint Meeting of AIDS Panels, Kyoto, December 8-9, 2004.
- 鈴木元、井戸栄治、伊吹謙太郎、速水正憲、三浦智行：HIV-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 年 12 月 9-11 日
- 秋山尚志、井戸栄治、石松美沙、三浦智行、速水正憲：HIV-1 の逆転写酵素、インテグラーゼおよびゲノムの 3' 側遺伝子を有する新規 SHIV のサルにおける感染・増殖能、第 18 回日本エイズ学会、静岡、2004 年 12 月 9-11 日
- 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 年 12 月 9-11 日
- 原田礼忠、竹村太地郎、井戸栄治、Bikandou Blaise、市村宏、速水正憲、Henri Jopseph Parra：中央アフリカ地域における HIV-1 の多様性の拡大と新しい組み換えウイルス群の出現、第 18 回日本エイズ学会、静岡、2004 年 12 月 9-11 日
- Akiyama, H., Ido, E., Miura, T., Hayami, M.: Construction and characterization of a new simian/human immunodeficiency chimeric virus (SHIV) having the reverse transcriptase, integrase and the 3' half of HIV-1 genome and its monkey-cell-adapted mutants. The XXII Symposium of the International Association for Comparative Research on Leukemia and Related Diseases, July 2-5, 2005, Heidelberg, Germany
- Ido, E., Akiyama, H., Suzuki, H., Ibuki, K., Ishimatsu, M., Miura, T., Hayami, M.: Generation of novel SHIVs having HIV-1-driven Pol gene and their potential usefulness in AIDS studies. Seventh International Congress on AIDS in Asia and the Pacific, Kobe, July 1-5, 2005.
- Ishimatsu, M., Ido, E., Suzuki, H., Akiyama, H., Miura, T., Hayami, M.: Generation of a novel SHIV that possesses HIV-1-derived protease gene and its infection to macaque monkeys: a useful tool for in vivo efficacy tests towards HIV protease inhibitors. 23rd annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, September 21-24, 2005, Oregon.

- Saito, N., Takahashi, M., Akahata, W., Ido, E., Hidaka, C., Ibuki, K., Miura, T., Hayami, M., Takahashi, H.: Evolutional conservation of the CD1d molecules among primates. 23rd annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, September 21-24, 2005, Oregon
- 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. Seventh International Congress on AIDS in Asia and the Pacific, Kobe, July 1-5, 2005.
- 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, Tenth International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim, November 16-17, 2005, Hanoi, Vietnam
- 石松美沙、井戸栄治、鈴木元、秋山尚志、三浦智行、速水正憲：SIVmac に HIV-1 のプロテアーゼ (PR) 遺伝子を組み込んだ SHIV-pr 感染アカゲザルにおける PR 阻害剤投与実験とその遺伝子変異解析、第 53 回日本ウイルス学会、2005 年 11 月 20 日～22 日、横浜
- 秋山尚志、井戸栄治、三浦智行、速水正憲：HIV-1 の逆転写酵素、インテグラーゼ及び 3' 側遺伝子をもつ SHIV のサル細胞馴化機序の解析、第 53 回日本ウイルス学会、2005 年 11 月 20 日～22 日、横浜
- 井戸栄治、石松美沙、秋山尚志、三浦智行、速水正憲：逆転写酵素とインテグラーゼ遺伝子が HIV-1 由来の SHIV-rti のサル感染実験、第 19 回日本エイズ学会、2005 年 12 月 1 日～3 日、熊本
- 高橋秀実、高橋めぐみ、斉藤尚紀、守屋慶一、上坂浩実、福島達伸、井戸栄治、伊吹謙太郎、三浦智行、速水正憲：サル CD4+T 細胞と CD4+CD8+T 細胞の SIVmac239 に対する感受性の差異、第 19 回日本エイズ学会、2005 年 12 月 1 日～3 日、熊本
- 分担研究者 伊吹謙太郎
- 1) Shimada, T., Suzuki, H., Motohara, M., Kuwata, T., Ibuki, K., Ui, M., Iida, T., Fukumoto, M., Miura, T., Hayami, M. Comparative histopathological studies in the early stages of acute pathogenic and nonpathogenic SHIV-infected lymphoid organs. *Virology*, 306:334-46, 2003.
- 2) Iida, T., Kuwata, T., Ui, M., Suzuki, H., Miura, T., Ibuki, K., Takahashi, H., Yamamoto, T., Imanishi, J., Hayami, M., Kita, M.: Augmentation of antigen-specific cytokine responses in the early phase of vaccination with a live-attenuated simian/human immunodeficiency chimeric virus expressing IFN- γ . *Arch. Virol.*, 149:743-757. 2004.
- 3) 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., Hayami, M.: Protective effects of nef-deleted SHIV or that having IFN- γ against disease induced with a pathogenic virus early after vaccination. *Arch. Virol.*, 149:1705-1720, 2004.
- 4) Shimizu, Y., Miyazaki, Y., Ibuki, K., Suzuki, H., Kaneyasu, K., Goto, Y., Hayami, M., Miura, T., Haga, T.: Induction of immune response in macaque monkeys infected with simian-human immunodeficiency virus having the TNF-alpha gene at an early stage of infection. *Virology*, 343(2):151-61, 2005.
- 5) Horiuchi, R., Akahata, W., Kuwata, T., Enose, Y., Ido, E., Suzuki, H., Miyake, A., Saito, N., Ibuki, K., Goto, T., Miura, T., Hayami, M.: DNA vaccination of macaques by a full-genome SHIV plasmid that has an IL-2 gene and produces non-infectious virus particles. *Vaccine*, in press.
- 6) Saito, N., Takahashi, M., Akahata, W., Ido, E., Hidaka, C., Ibuki, K., Miura, T., Hayami, M., Takahashi, H.: Analysis of evolutionary conservation in CD1d

- molecules among primates. *Tissue Antigens.*, 66(6):674-82, 2005.
- 7) Miyake, A., Ibuki, K., Suzuki, H., Horiuchi, R., Saito, N., Motohara, M., Hayami, M., Miura, T.: Early virological events in various tissues of newborn monkeys after intrarectal infection with pathogenic simian human immunodeficiency virus. *J. Med. Primatol.*, 34(5-6):294-302, 2005.
- 8) Kaneyasu, K., Kita, M., Ohkura, S., Yamamoto, T., Ibuki, K., Enose, Y., Sato, A., Kodama, M., 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 monkeys. *Microbiol. Immunol.*, 49(12):1083-94, 2005.
- 9) Suzuki, H., Motohara, M., Miyake, A., Ibuki, K., Fukazawa, Y., Inaba, K., Masuda, K., Minato, N., Kawamoto, H., Hayami, M., Miura, T.: Intrathymic effect of acute pathogenic SHIV infection on T-lineage cells in newborn macaques. *Microbiol. Immunol.*, 49(7):667-79, 2005.
- 10) Miyake, A., Ibuki, K., Enose, Y., Suzuki, H., Horiuchi, R., Motohara, M., Saito, N., Nakasone, T., Honda, M., Watanabe, T., Miura, T., Hayami, M.: Rapid dissemination of a pathogenic simian/human immunodeficiency virus to systemic organs and active replication in lymphoid tissues following intrarectal infection. *J. Gen. Virol.*, in press.
2. 学会発表
- Miyake, A., Ibuki, K., Enose, Y., Hayami, M.: Virological and immunological analysis of early phase of rectal infection of pathogenic SHIV in macaques, U.S-Japan Cooperative Medical Science Program, Okinawa, March 5-7, 2003.
- Kozyrev L. I., Miura, T., Sakai, K., Takahashi, E., Shinohara, K., Suzuki, H., Ibuki, K., Hayami, M.: Comparative analysis of acute pathogenic and less pathogenic SHIV molecular clone, U.S-Japan Cooperative Medical Science Program, Okinawa, March 5-7, 2003.
- Hayami, M., Ibuki, K., Miyake, A., Horiuchi, R., Saito, N., Suzuki, H., Nakasone, T., Honda, M., Miura, T.: Analysis of gut-associated lymphoid tissues (GALT) at early phase of acute pathogenic SHIV intrarectal infection in macaques. The Awaji International Forum on Infection and immunity, Awajishima, August 25-28, 2003.
- Hayami, M., Miyake, A., Ibuki, K., Enose, Y., Suzuki, H., Horiuchi, R., Saito, N., Nakasone, T., Honda, M., Miura, T.: Early virological events in various tissues after intrarectal infection with pathogenic SHIV. The Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awajishima, August 25-28, 2003.
- Suzuki, H., Suzuki, M., Miyake, A., Ibuki, K., Masuda, K., Minato, N., Kawamoto, H., Nakasone, T., Honda, M., Miura, T., Hayami, M.: The effects of pathogenic SHIV infection on the thymus and intrathymic T cell progenitor in rhesus monkeys. The Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awajishima, August 25-28, 2003.
- 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. AIDS Vaccine Conference 2003, New York, Sep 18-21, 2003.
- Hayami, M., Miura, T., Ibuki, K., Kozyrev I.: Development of ANTI-HIV-1 attenuated vaccines using gene-modified SHIV having HIV-1env. 11th International Conference "AIDS, Cancer and related Problems", St. Petersburg, October 6-10, 2003.
- Kozyrev I., Miura, T., Sakai, K., Takahashi, E., Shinohara, K., Suzuki, H., Boltovets, P., Ibuki, K., Hayami, M.: Comparative analysis of acute pathogenic and less pathogenic molecular of SHIV. 11th International Conference "AIDS, Cancer and related Problems", St. Petersburg, October 6-10, 2003.

- Kozyrev L. I., Miura, T., Sakai, K., Takahashi, E., Shinohara, K., Suzuki, H., Ibuki, K., Hayami, M.: Comparative analysis of acute pathogenic and less pathogenic SHIV molocular clones. 21th Annual Symposium on Nonhuman Primate models for AIDS. Seattle, October 22-25, 2003.
- Suzuki, H., Suzuki, M., Ibuki, K., Masuda, K., Minato, N., Kawamoto, H., Nakasone, T., Honda, M., Hayami, M., Miura, T.: The effects of pathogenic SHIV infection on the thymus and intrathymic T cell progenitor in thesus monkeys. 21th Annual Symposium on Nonhuman Primate models for AIDS, Seattle, October 22-25, 2003.
- Ibuki, K., Enose, Y., Miyake, A., Suzuki, H., Takahashi, M., Horiuchi, R., Saito, N., Nakasone, Y., Ami, Y., Izumi, Y., Honda, M., Takahashi, H., Miura, T., Hayami, M.: Analysis of viral expansion and immune reaction at early phase of acute pathogenic SHIV intrarectal infection in macaques. 21th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, Seattle, October 22-25, 2003.
- Akiyama, H., Ido, E., Ibuki, K., Miura, T., Hayami, M.: Construction and in vivo infection of a novel simian/human immunodeficiency chimeric virus containing the reverse transcriptase, integrase and the 3' half of the genomic region of HIV-1. 21th Annual Symposium on Nonhuman Primate models for AIDS, Seattle, October 22-25, 2003.
- 三浦智行、阪井弘治、篠原克明、高橋栄治、ユーリ・コズレフ、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強毒・弱毒分子クローンの塩基配列と増殖能との関連、第 135 回日本獣医学会、東京、2003 年 3 月 30 日～4 月 1 日
- 鈴木元、鈴木麻貴子、三宅在子、伊吹謙太郎、増田恭子、伊川友活、河本宏、仲宗根正、本多三男、速水正憲、三浦智行：強毒サル/ヒト免疫不全キメラウイルス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 136 回日本獣医学会、青森、2003 年 10 月 3 日～5 日
- 伊吹謙太郎、榎瀬良美、三宅在子、鈴木元、高橋めぐみ、堀内励生、齊藤尚紀、仲宗根正、本多三男、高橋秀実、速水正憲、三浦智行：強毒 SHIV の経直腸感染初期における腸管粘膜免疫細胞の動態、第 136 回日本獣医学会、青森、2003 年 10 月 3 日～5 日
- 堀内励生、伊吹謙太郎、榎瀬良美、三宅在子、鈴木元、高橋めぐみ、齊藤尚紀、仲宗根正、本多三男、高橋秀実、速水正憲、三浦智行：強毒 SHIV のアカゲザル経直腸感染初期における腸管粘膜免疫応答の解析、日本ウイルス学会、京都、2003 年 10 月 27 日-29 日
- 秋山尚志、井戸栄治、大倉定之、鈴木元、伊吹謙太郎、石松美沙、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、日本ウイルス学会、京都、2003 年 10 月 27 日-29 日
- 三宅在子、伊吹謙太郎、榎瀬良美、鈴木元、堀内励生、齊藤尚紀、仲宗根正、本多三男、速水正憲、三浦智行：病原性 SHIV の粘膜感染初期におけるウイルス動態の解析、日本ウイルス学会、京都、2003 年 10 月 27 日-29 日
- 宮崎恭行、桑田岳夫、榎瀬良美、風田川妙、伊吹謙太郎、速水正憲：SHIV 持感染サルにおけるマクロファージブロッカー（カラギーナン）投与による影響、日本ウイルス学会、京都、2003 年 10 月 27 日-29 日
- 三浦智行、コズレフユーリ、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、日本ウイルス学会、京都、2003 年 10 月 27 日-29 日
- 濱野章子、石田尚臣、伊吹謙太郎、三浦智行、速水正憲、渡邊俊樹：潜伏化した強毒 SHIV 感染アカゲザル個体を用いた in vivo における SHIV-LTR のメチル化解析、日本ウイルス学会、京都、2003 年 10 月 27 日-29 日
- 堀内励生、井戸栄治、赤畑渉、榎瀬良美、伊吹謙太郎、三浦智行、後藤俊幸、高橋秀実、速水正憲：DNA vaccination of macaques by full-sized SHIV plasmids that produce non-infectious virus particles, The 10th East Asian Joint Symposium on Biomedical Research (東アジアシンポジウム)、京都、2003 年 11 月 18-19 日
- 齋藤尚紀、高橋めぐみ、赤畑渉、清水真澄、日高千鶴乃、新谷英滋、伊吹謙太郎、三浦智行、速水正憲、高橋秀実：SIV/SHIV 接種ザルにおける NKT 細胞の動態解析に向けて：サル CD1d 分子の解析と発現：日本エイズ学会、神戸、2003 年 11 月 27 日-29 日

- 清水佑也、宮崎恭行、鈴木元、伊吹謙太郎、三浦智行、速水正憲、芳賀猛：TNF- α 遺伝子組み込み SHIV 感染ザルにおける細胞死と免疫応答、日本エイズ学会、神戸、2003 年 11 月 27 日-29 日
- Iouri Kozyrev、阪井弘治、高橋栄治、篠原克明、鈴木元、伊吹謙太郎、速水正憲：Genetic analysis of acute pathogenic and less pathogenic SHIV molecular clones to determine the responsive for in vivo pathogenicity、日本エイズ学会、神戸、2003 年 11 月 27 日-29 日
- 石松美沙、井戸栄治、秋山尚志、三浦智行、伊吹謙太郎、速水正憲：サルの SHIV 感染に対する IL-15 投与効果の解析、日本エイズ学会、神戸、2003 年 11 月 27 日-29 日
- 清水佑也、宮崎恭行、兼安健太郎、鈴木元、伊吹謙太郎、後藤義孝、三浦智行、速水正憲、芳賀猛：TNF- α 遺伝子組み込み SHIV 感染ザルにおける細胞死と免疫応答、第 50 回日本実験動物学会、長崎、2004 年 5 月 29-31 日
- 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. XVth International AIDS Conference, Bangkok, Thailand, July 11-16, 2004.
- Saito, N., Takahashi, M., Akahata, W., Ido, E., Hidaka, C., Ibuki, K., Miura, T., Hayami, M., Takahashi, H.: Evolutional conversation of the CD1d molecules among primates. Symposium on protective immunity against HIV/SIV and development of MHC-defined rhesus macaques, Miyazaki, July 19-20, 2004.
- 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-infections virus particles. Symposium on protective immunity against HIV/SIV and development of MHC-defined rhesus macaques, Miyazaki, July 19-20, 2004.
- Haga, T., Shimizu, Y., Miyazaki, Y., Ibuki, K., Kaneyasu, K., Suzuki, H., Goto, Y., Miura, T., Hayami, M.: Induction of immune response in macaque monkeys infected with SHIV having TNF- α gene. Symposium on protective immunity against HIV/SIV and development of MHC-defined rhesus macaques, Miyazaki, July 19-20, 2004.
- 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- γ administration against a pathogenic SHIV challenge in rhesus monkeys. The Awaji International Forum on Infection and Immunity, Hyogo, August 30-September 2, 2004.
- Ibuki, K., Miyake, A., Horiuchi, R., Saitou, N., Suzuki, H., Motohara, M., Inaba, K., Miura, T., Hayami, M.: The effects of low-pathogenic SHIV intrarectal infection on immune cell population of the intestinal tract in comparison to acute-pathogenic SHIV infection. The Awaji International Forum on Infection and Immunity, Hyogo, August 30-September 2, 2004.
- 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, Hyogo, August 30-September 2, 2004.
- 伊吹謙太郎、三宅在子、堀内励生、齊藤尚紀、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 年 9 月 10-12 日
- 清水祐也、宮崎恭行、兼安健太郎、鈴木元、伊吹謙太郎、後藤義孝、三浦智行、速水正憲、芳賀猛：TNF- α 遺伝子組み込み SHIV 感染ザルに認められた感染早期の効果的な免疫誘導、第 138 回日本獣医学会、札幌、2004 年 9 月 10-12 日
- 伊吹謙太郎：病原性 SHIV 感染初期の腸管免疫の解析、第 20 回日本獣医畜産大学学術交流会、京都、2004 年 9 月 19 日

元原麻貴子、伊吹謙太郎、三宅在子、鈴木元、稲葉一寿、増田恭子、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 年 11 月 21-23 日

堀内励生、井戸栄治、赤畑渉、榎瀬良美、伊吹謙太郎、後藤俊幸、高橋秀実、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 ワクチンのサルにおける感染防御効果、第 52 回日本ウイルス学会、横浜、2004 年 11 月 21-23 日

齋藤尚紀、高橋めぐみ、赤畑渉、井戸栄治、清水真澄、日高千鶴乃、新谷英滋、伊吹謙太郎、三浦智行、速水正憲、高橋秀実：種々の霊長類における CD1d 分子の解析：SIV/HIV 感受性との関連の可能性、第 52 回日本ウイルス学会、横浜、2004 年 11 月 21-23 日

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 年 11 月 21-23 日

兼安健太郎、大倉定之、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 年 11 月 21-23 日

Ibuki, K., Miyake, A., Horiuchi, R., Saitou, N., Suzuki, H., Motohara, M., Inaba, K., Miura, T., Hayami, M.: The effect of low-pathogenic SHIV intrarectal infection on immune cell population of the intestinal tract in comparison to acute-pathogenic SHIV infection. 40th Anniversary of US-Japan Cooperative Medical Science Program, 17th Joint Meeting of AIDS Panels, Kyoto, December 8-9, 2004.

Kaneyasu, K., Okura, S., Kira, 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. 40th Anniversary of US-Japan Cooperative Medical Science Program, 17th Joint Meeting of AIDS Panels, Kyoto, December 8-9, 2004.

鈴木元、井戸栄治、伊吹謙太郎、速水正憲、三浦智行：HIV-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 年 12 月 9-11 日

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 年 12 月 9-11 日

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：弱毒 SHIV 分子クローンのサル経直腸感染初期における腸管粘膜免疫の解析、第 18 回日本エイズ学会、静岡、2004 年 12 月 9-11 日

Haga, T., Shimizu, Y., Miyazaki, Y., Ibuki, K., Kaneyasu, K., Suzuki, H., Goto, Y., Miura, T., Hyami, M.: Induction of immune response in macaque monkeys infected with simian-human immunodeficiency virus having the TNF-alpha gene early stage of infection. Keystone Symposium, July 23-28, 2005, San Francisco

Motohara, M., Ibuki, K., Miyake, A., Fukazawa, Y., Inaba, K., Suzuki, H., Masuda, K., Minato, N., Kawamoto, H., Nakasone, T., Honda, M., Hayami, M., Miura, T.: Impaired T cell differentiation in the thymus at the early stages of acute pathogenic SHIV infection in monkeys in comparison to low pathogenic SHIV infection. 23rd annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, September 21-24, 2005, Oregon

Ibuki, K., Miyake, A., Horiuchi, R., Saitou, N., Suzuki, H., Motohara, M., Fukazawa, Y., Inaba, K., Miura, T., Hayami, M.: The effects of low-pathogenic SHIV intrarectal infection on immune cell population of the intestinal tract in comparison to acute-pathogenic SHIV infection. 23rd annual

Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, September 21-24, 2005, Oregon

Saito, N., Takahashi, M., Akahata, W., Ido, E., Hidaka, C., Ibuki, K., Miura, T., Hayami, M., Takahashi, H. : Evolutional conservation of the CD1d molecules among primates. 23rd annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, September 21-24, 2005, Oregon

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, Tenth International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim, November 16-17, 2005, Hanoi, Vietnam

清水祐也、宮崎恭行、伊吹謙太郎、後藤義孝、三浦智行、速水正憲、芳賀猛 : TNF- α 遺伝子挿入 SHIV 感染アカゲサルにおける効果的な免疫応答、第 23 回九州実験動物研究総会、2005 年 11 月 19 日～20 日、佐賀

稲葉一寿、深澤嘉拍、堀内励生、三宅在子、松田健太、松山めぐみ、姫野愛、伊吹謙太郎、速水正憲、三浦智行 : 強毒 SHIV の経粘膜・経静脈感染アカゲザルの感染病態および腸病変の比較解析、第 53 回日本ウイルス学会、2005 年 11 月 20 日～22 日、横浜

三宅在子、石田尚志、深澤嘉拍、伊吹謙太郎、三浦智行、速水正憲、渡邊俊樹 : SHIV 感染サル検体を用いた感染初期および後期におけるプロウイルス LTR 上のヒストン化学修飾状態の解析、第 53 回日本ウイルス学会、2005 年 11 月 20 日～22 日、横浜

三宅在子、石田尚臣、深澤嘉拍、伊吹謙太郎、三浦智行、速水正憲、渡邊俊樹 : SHIV 感染サル検体を用いたプロウイルス LTR 上のヒストン化学修飾状態の解析、第 28 回日本分子生物学会年会、2005 年 12

月 7 日～10 日、福岡

深澤嘉拍、三宅在子、伊吹謙太郎、鈴木元、堀内励生、斉藤尚紀、元原麻貴子、稲葉一寿、姫野愛、渡邊俊樹、三浦智行、速水正憲 : 強毒、弱毒 SHIV 粘膜感染初期の全身臓器におけるウイルス動態の解析、第 19 回日本エイズ学会、2005 年 12 月 1 日～3 日、熊本

兼安健太郎、伊吹謙太郎、大倉定之、姫野愛、喜多正和、山本俊郎、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 19 回日本エイズ学会、2005 年 12 月 1 日～3 日、熊本

元原麻貴子、伊吹謙太郎、三宅在子、深澤嘉拍、稲葉一寿、鈴木元、増田恭子、河本宏、仲宗根正、本多三男、速水正憲、三浦智行 : 強毒・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 19 回日本エイズ学会、2005 年 12 月 1 日～3 日、熊本

高橋秀実、高橋めぐみ、斉藤尚紀、守屋慶一、上坂浩実、福島達伸、井戸栄治、伊吹謙太郎、三浦智行、速水正憲 : サル CD4+T 細胞と CD4+CD8+T 細胞の SIVmac239 に対する感受性の差異、第 19 回日本エイズ学会、2005 年 12 月 1 日～3 日、熊本

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）
今のところなし。

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Akiyama, H., <u>Ido, E.</u> , Akahata, W., Kuwata, T., Miura, T., 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 of human immuno-deficiency virus type 1.	J.Gen.Virol.	84(7)	1663-9	2003
Yoshimura, K., <u>Ido, E.</u> , Akiyama, H., Kimura, T., Aoki, M., Suzuki, H., Mitsuya, H., Hayami, M., Matsushita, S.	The impact of highly active antiretroviral therapy by the oral route on the CD8 subset in monkeys infected chronically with SHIV 89.6P.	J.Virol.Me thods.	112(1-2)	121-8	2003
Enose, Y., Miyake, A., <u>Ido, E.</u> , Hayami, M.	Infection of a chimeric simian and human immuno-deficiency virus with CCR5-specific HIV-1 envelope to Rhesus macaques.	J.Vet.Med. Sci.	65(2)	283-6	2003
Akahata, W., <u>Ido, E.</u> , Hayami, M.	Mutational analysis of two zinc-finger motifs in the nucleocapsid protein of simian immunodeficiency virus mac239.	J.Gen. Virol.	84(6)	1641-8	2003
Shimada, T., Suzuki, H., Motohara, M., Kuwata, T., <u>Ibuki, K.</u> , Ui, M., Iida, T., Fukumoto, M., Miura, T., Hayami, M.	Comparative histopathological studies in the early stages of acute pathogenic and non-pathogenic SHIV-infected lymphoid organs.	Virology	306	334-46	2003
Iida, T., Kuwata, T., Ui, M., Suzuki, H., Miura, T., <u>Ibuki, K.</u> , Takahashi, H., Yamamoto, T., Imanishi, J., Hayami, M., Kita, M.	Augmentation of antigen-specific cytokine responses in the early phase of vaccination with a live-attenuated simian/human immuno-deficiency chimeric virus expressing IFN- γ .	Arch. Virol.	149	743-757	2004

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., Hayami, M.	Protective effects of nef-deleted SHIV or that having IFN- γ against disease induced with a pathogenic virus early after vaccination.	Arch. Virol.	149	1705-1720	2004
Takahashi, M., Ido, E., Uesaka, H., Fukushima, T., Ibuki, K., Miura, T., Hayami, M., Takahashi, H.	Comparison of susceptibility to SIVmac239 infection in CD4 ⁺ and CD4 ⁺ 8 ⁺ T cells.	Arch. Virol.	150	1517-28	2005
Horiuchi, R., Akahata, W., Kuwata, T., Enose, Y., Ido, E., Suzuki, H., Miyake, A., Saito, N., Ibuki, K., Goto, T., Miura, T., Hayami, M.	DNA vaccination of macaques by a full-genome SHIV plasmid that has an IL-2 gene and produces non-infectious virus particles.	Vaccine	In press		2006
Takemura, T., Ekwilanga, M., Bikandou, B., Ido, E., Yamaguchi-Kabata, Y., Ohkura, S., Harada, H., Takehisa, J., Ichimura, H., Parra, H.J., Nende, M., Mubwo, E., Sepole, M., Hayami, M., Miura, T.	A novel SIV from black mangabey (<i>Lophocebus aterrimus</i>) in Democratic Republic of Congo.	J. Gen. Virol.	86(7)	1967-71	2005

Saito, N., Takahashi, M., Akahata, W., <u>Ido</u> , E., Hidaka, C., Ibuki, K., Miura, T., Hayami, M., Takahashi, H.	Analysis of evolutionary conservation in CD1d molecules among primates.	Tissue Antigens	66(6)	674-82	2005
Shimizu, Y., Miyazaki, Y., <u>Ibuki, K.</u> , Suzuki, H., Kaneyasu, K., Goto, Y., Hayami, M., Miura, T., Haga, T.	Induction of immune response in macaque monkeys infected with simian-human immunodeficiency virus having the TNF-alpha gene at an early stage of infection.	Virology	343(2)	151-61	2005
Miyake, A., <u>Ibuki, K.</u> , Suzuki, H., Horiuchi, R., Saito, N., Motohara, M., Hayami, M., Miura, T.	Early virological events in various tissues of newborn monkeys after intrarectal infection with pathogenic simian human immunodeficiency virus.	J. Med. Primatol	34(5-6)	294-302	2005
Kaneyasu, K., Kita, M., Ohkura, S., Yamamoto, T., <u>Ibuki, K.</u> , Enose, Y., Sato, A., Kodama, M., 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 monkeys.	Microbiol. Immunol.	49(12)	1083-94	2005
Suzuki, H., Motohara, M., Miyake, A., <u>Ibuki, K.</u> , Fukazawa, Y., Inaba, K., Masuda, K., Minato, N., Kawamoto, H., Hayami, M., Miura, T.	Intrathymic effect of acute pathogenic SHIV infection on T-lineage cells in newborn macaques.	Microbiol. Immunol.	49(7)	667-79	2005
Miyake, A., <u>Ibuki, K.</u> , Enose, Y., Suzuki, H., Horiuchi, R., Motohara, M., Saito, N., Nakasone, T., Honda, M., Watanabe, T., Miura, T., Hayami, M.	Rapid dissemination of a pathogenic simian/human immunodeficiency virus to systemic organs and active replication in lymphoid tissues following intrarectal infection.	J. Gen. Virol.	In press		2006

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 of human immunodeficiency virus type 1

Hisashi Akiyama, Eiji Ido, Wataru Akahata, Takeo Kuwata, Tomoyuki Miura and Masanori Hayami

Correspondence

Eiji Ido

eido@virus.kyoto-u.ac.jp

Institute for Virus Research, Laboratory of Viral Pathogenesis, Kyoto University,
53 Shogoin-kawaharacho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan

A new simian/human immunodeficiency virus (SHIV) chimera with the reverse transcriptase (RT)-encoding region of *pol*, in addition to the 3' region encoding *vpr*, *vpu*, *tat*, *rev*, *env* and *nef* of HIV-1, on an SIV_{mac} (SIV from a macaque monkey) background was constructed. This new SHIV chimera, named SHIVrt/3rn, could replicate in monkey peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) as well as in the human and monkey CD4⁺ T-cell lines M8166 and HSC-F. Since SHIVrt/3rn contains the RT gene of HIV-1, replication of the virus in M8166 cells was inhibited by an HIV-1-specific non-nucleoside RT inhibitor, MKC-442, with a sensitivity similar to that of HIV-1. To investigate the replication competence of SHIVrt/3rn *in vivo*, two rhesus monkeys were inoculated intravenously with the virus. At 2 to 4 weeks post-inoculation (p.i.), plasma viral RNA loads of both monkeys showed a peak value of more than 10⁴ copies ml⁻¹. Infectious virus was isolated from the PBMCs of one monkey at 2 and 3 weeks p.i. and from the other at 4 weeks p.i. Moreover, proviral DNA was detected constantly throughout the observation period, starting from 3 weeks p.i. An antibody response, detected first at 3 weeks p.i., was maintained at high titres. These results indicate that SHIVrt/3rn can infect and replicate *in vivo*. SHIVrt/3rn, having part of HIV-1 *pol* in addition to the 3' part of the HIV-1 genome is genetically more close to HIV-1 than any of the other monkey-infecting SHIVs reported previously.

Received 20 September 2002

Accepted 25 February 2003

INTRODUCTION

To clarify the pathogenesis of AIDS and to develop therapeutic and preventive measures, it is necessary to establish an animal model for the infection of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), the causative agent of AIDS. However, there is a crucial obstacle: HIV-1 can infect only a limited range of primates other than humans, such as chimpanzees (Fultz *et al.*, 1986; Gajdusek *et al.*, 1985). The HIV-1/chimpanzee system has provided the closest model for HIV-1 infection in humans. However, such animals are not suitable for experimental use. One of the reasons for this is that HIV-1 infection hardly induces AIDS-like symptoms in infected chimpanzees (Novembre *et al.*, 1997). Besides, the chimpanzee is an endangered species and is expensive to acquire and care for. As an alternative, simian immunodeficiency virus (SIV) and macaque monkeys have been used as an animal model for AIDS. SIV_{mac} isolated from rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) can infect Asian macaque monkeys persistently and induce a fatal disease very similar to human AIDS

(Letvin *et al.*, 1985). SIV_{mac239} (Naidu *et al.*, 1988), a pathogenic molecular clone of SIV_{mac}, made this model useful for analysing not only the infectivity and immunogenicity but also the pathogenicity of HIV-related viruses. For instance, studies with this model demonstrated the importance of the SIV *nef* gene for its pathogenesis *in vivo* (Kestler *et al.*, 1991) and that gene-deleted live-attenuated SIV vaccines provided the most effective protection against challenge infection with pathogenic SIVs (Daniel *et al.*, 1992). Moreover, Veazey *et al.* (1998) showed the importance of the gastrointestinal tract as a target organ using the SIV/monkey model.

SIV is genetically similar, but not identical, to HIV-1. The findings obtained from the SIV/monkey system cannot be applied directly to the case of HIV-1 infection in humans. Therefore, to develop a better animal model, we previously generated simian/human immunodeficiency chimeric viruses (SHIVs) that can infect monkeys. These SHIVs possessed the 3' half of several HIV-1-derived genes, including the *env* gene, using the SIV genome as a backbone

(Kuwata *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1992; Shibata *et al.*, 1991). The SHIVs containing the *env* gene of HIV-1 were shown to be useful for evaluating the efficacy of anti-HIV-1 vaccine candidates targeting Env proteins by using them as challenge viruses for vaccinated monkeys (Ui *et al.*, 1999). Although these SHIVs were shown to be non-pathogenic (Hayami *et al.*, 1999), pathogenic SHIVs were also developed by animal passage, starting from initially non-pathogenic SHIVs (Joag *et al.*, 1996, 1997; Reimann *et al.*, 1996). Using the SHIV/monkey system, Harouse *et al.* (1999) demonstrated the role of co-receptor usage of HIV-1 Env for pathogenesis. Thus, SHIV/monkey systems have been valuable tools for understanding, at least, in part, the biological properties of HIV-1 and for developing HIV vaccines.

Most of the SHIVs reported to date, including the SHIVs generated by our group, had the 3' half of the HIV-1 genome on an SIV backbone. For instance, one of the SHIVs generated by us, which was termed NM-3rn, possessed *vpr*, *vpu*, *tat*, *rev*, *env* and *nef* of HIV-1 (Kuwata *et al.*, 1995). These findings naturally lead us to the following question: to what extent can we replace SIV genes with those of HIV-1 without losing their infectivity to monkeys? The answer to this question may help to develop a better animal model for AIDS, one that ultimately mimics HIV-1 infection in humans.

We have been trying to construct a new SHIV chimera that has a broader HIV-1-derived region by the addition of various regions of the 5' part of HIV-1, including *pol*, to the previously reported SHIV containing the 3' half of HIV-1. Here, we report that we succeeded in constructing a new SHIV chimera, one which contains the reverse transcriptase (RT)-encoding region (*rt* region) of *pol*, in addition to the 3' half of the HIV-1 genome, and that this virus was able to infect and replicate in monkey peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and in macaque monkeys *in vivo*. This newly constructed SHIV has more of the HIV-1 genome, such as *rt*, *vpr*, *vpu*, *tat*, *rev*, *env* and *nef*, than any of the SHIVs reported so far.

METHODS

DNA constructs. Infectious molecular clones of HIV-1 (pNL432) (Adachi *et al.*, 1986) and SIV_{mac239} (pMA239) (Naidu *et al.*, 1988; Shibata *et al.*, 1991) were used as parent proviral DNAs. To generate chimeric junctions at the N- and C-terminal ends of the *rt* gene, we utilized PCR-based site-directed mutagenesis. We first introduced a *Dra*I site near the C-terminal end of the protease gene of pMA239 (SIV_{mac}); pNL432 (HIV-1) already possesses this site at the corresponding position (nt 2540). The following oligonucleotide primer was used: MAPR-R, 5'-CTTTAGCTATGGGAAAATTTAAAGACATCCCAGAGCTG-3'; this primer was designed to create a *Dra*I site (shown in boldface letters), without alteration to the amino acid sequence (letters underlined represent the mutated nucleotide).

Next, we introduced an *Xba*I site near the N-terminal end of the integrase gene for both HIV-1 and SIV_{mac} by PCR-based site-directed mutagenesis. For HIV-1, the following oligonucleotide primer was used: NLRT-R, 5'-TTCCATCTAGAAATAGTACTTTCCTGATCCAGC-3'. For SIV_{mac}, the oligonucleotide primer MAIN-F, 5'-CTCTTCTAGAAAGATAGAGCCAGCACAAAGAAG-3', was used; these primers were

designed to create an *Xba*I site into the respective sequences (nt 4232 for HIV-1 and nt 4786 for SIV_{mac}) without alteration to the amino acid sequences (letters in boldface represent the *Xba*I site and letters underlined represent the mutated nucleotides).

With the restriction sites at the junctions of the protease/RT and RT/integrase genes, two retrovirus sequences, SIV_{mac} and HIV-1, were reassembled by conventional molecular recombinant techniques to produce a chimeric *pol* gene. The *Spe*I (nt 2026 in pMA239, *gag*) to *Nsp*V (nt 6131 in pMA239, *vif*) fragment of this chimeric gene was then inserted into the corresponding position of an HIV-1 *env*-possessing SHIV plasmid, pNM-3rn (Kuwata *et al.*, 1995), to generate a novel full-genome plasmid, termed pSHIVrt/3rn.

Cell cultures. M8166 is a subclone of C8166 (Clapham *et al.*, 1987), a CD4⁺ human T-cell line. HSC-F is a cynomolgus monkey CD4⁺ T-cell line from a foetal splenocyte that was immortalized by infection with herpesvirus saimiri subtype C (Akari *et al.*, 1996). M8166 and HSC-F cells were maintained in RPMI 1640 medium containing 10% heat-inactivated foetal bovine serum (FBS). PBMCs of healthy rhesus monkeys were separated from heparinized whole blood by Percoll density-gradient centrifugation, stimulated with 25 µg concanavalin A ml⁻¹ for 24 h and maintained in RPMI 1640 medium containing 10% FBS and 400 units recombinant IL-2 ml⁻¹, as described previously (Kuwata *et al.*, 1995).

Transfection and infection. For generating infectious virus particles from a full-genome plasmid DNA, 5 µg pSHIVrt/3rn was introduced into 1.5 × 10⁶ M8166 cells using the DEAE-dextran method (Naidu *et al.*, 1988). Culture medium was changed every 3 days and the supernatant was filtered (0.45 µm pore size) and stored at -80 °C. Virion-associated RT activity was measured as described previously (Willey *et al.*, 1988). The supernatant with the highest RT activity was used as virus stock. To determine the virus infectivity of the stocks, the TCID₅₀ was calculated using M8166 cells, as described previously (Igarashi *et al.*, 1994). The virus inoculum used for *in vitro* infection was adjusted to contain a certain amount of RT units (typically 3–4 × 10⁵ RT units) by adding the appropriate volume of the medium to the virus stock. M8166 cells, HSC-F cells or monkey PBMCs (1 × 10⁶ cells per well) were infected with a virus and cultured in a 96-well plate. The culture supernatant was harvested every 3 days and its RT activity was monitored.

Effect of an RT inhibitor on virus replication. MKC-442 is a non-nucleoside-type RT inhibitor (Yuasa *et al.*, 1993) that inhibits the RT activity of HIV-1 specifically, but not that of SIV. The ability of MKC-442 to block virus replication was examined. MKC-442 was diluted from a 2 mM stock solution with the culture medium and used at 200 and 20 nM.

Inoculation of monkeys. All animals were housed in a P3-level monkey storage facility and were treated in accordance with regulations approved by the Committee for Experimental Use of Nonhuman Primates in the Institute for Virus Research, Kyoto University, Japan. To investigate the replication competence of SHIVrt/3rn *in vivo*, two female adult rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) were inoculated intravenously with the virus stock of SHIVrt/3rn containing 1 × 10⁵ TCID₅₀ per monkey. After inoculation, blood samples were collected periodically from the inoculated monkeys and were separated into plasma and PBMCs. Then, plasma viral RNA loads, proviral DNA and CD4⁺ cells were analysed. Virus isolation was attempted as described below.

Virus isolation. We attempted to isolate infectious virus from the PBMCs of inoculated monkeys as follows. Serially threefold diluted PBMCs were co-cultured with 2.5 × 10⁵ M8166 cells for 4 weeks in RPMI 1640 containing 10% of FBS in a 48-well plate. Virus recovery was judged by the cytopathic effect (CPE) of syncytia formation and a rise in RT activity of the culture supernatants.

Detection of proviral DNA in PBMCs. Proviral DNA in PBMCs of inoculated monkeys was detected with nested DNA PCR, as described previously (Igarashi *et al.*, 1996). The primers used in this study were designed to amplify the V3 region of HIV-1 (NL432) *env* specifically, which is present in the SHIVrt/3rn genome.

Determination of plasma viral RNA loads. Plasma viral RNA loads after inoculation were determined by quantitative RT-PCR, as described previously (Kozyrev *et al.*, 2002).

Titration of antibody. Antibody titres of the monkey plasma after inoculation with SHIVrt/3rn were measured by particle agglutination according to the instructions of the manufacturer (Serodia HIV-1/2, Fujirebio).

CD4⁺ cell kinetics. After two rhesus monkeys were inoculated with SHIVrt/3rn, PBMCs were isolated from the animals and CD4⁺ cell numbers in the PBMCs were calculated, as described previously (Ui *et al.*, 1999).

RESULTS

Construction of SHIV

Most of the SHIVs constructed to date have only the *env* gene and the adjacent accessory genes of HIV-1. In this study, a new type of SHIV containing not only *env* but also a part of *pol* of HIV-1 was constructed. The parental molecular clone of the SHIV was NM-3rn (Kuwata *et al.*, 1995), which contains the genes from *vpr* to *nef* from HIV-1; the rest of the genes were from SIV_{mac}. We replaced the *rt* region of *pol* of SIV_{mac} with that of HIV-1. The newly constructed SHIV was designated SHIVrt/3rn (Fig. 1).

Replication of SHIVrt/3rn *in vitro*

To obtain infectious virions, we transfected M8166 cells, a CD4⁺ human T-cell line, with the full-genome plasmid of SHIVrt/3rn and measured virion-associated RT activity released in culture supernatants. To confirm whether the

supernatant fractions with RT activity contain infectious virions, we inoculated the supernatants of the transfected cell culture onto M8166 cells. As a control, we used NM-3rn, which possesses HIV-1-derived genes from *vpr* to *env* on an SIV_{mac} background. It should be noted that *nef* of NM-3rn is from SIV_{mac}, while *nef* of NM-3rn is from HIV-1. In the present study, we compared the replication of SHIVrt/3rn with that of NM-3rn because this virus has been used in our laboratory and because the replication profiles of NM-3rn and NM-3rn do not differ from each other *in vitro* (Kuwata *et al.*, 1995). After infection, SHIVrt/3rn, as well as NM-3rn, induced CPE in the infected M8166 cells. An increase in RT activity in the culture supernatant was also apparent (data not shown). Together, these data indicate that pSHIVrt/3rn was capable of producing infectious virions.

To investigate the virus growth kinetics of SHIVrt/3rn, we infected M8166 cells, a monkey CD4⁺ T-cell line (HSC-F), and monkey PBMCs with the virus and monitored RT activity in culture supernatants (Fig. 2). In M8166 cells, the

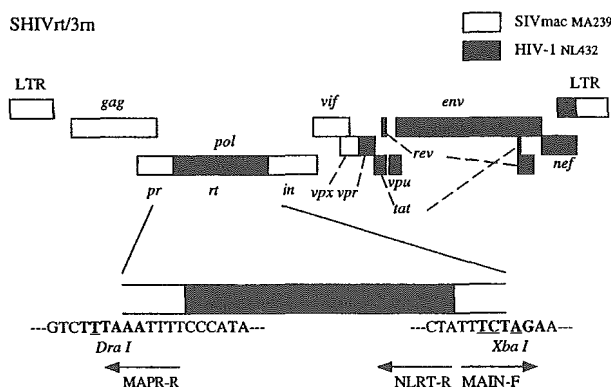


Fig. 1. Genomic structures of the newly constructed SHIVrt/3rn. Solid and open boxes represent sequences derived from HIV-1 (NL432) and SIV_{mac} (MA239), respectively. Boldface letters represent the introduced *DraI* and *XbaI* sites and underlined letters are the mutated nucleotides. Arrows indicate the directions of the primers used.

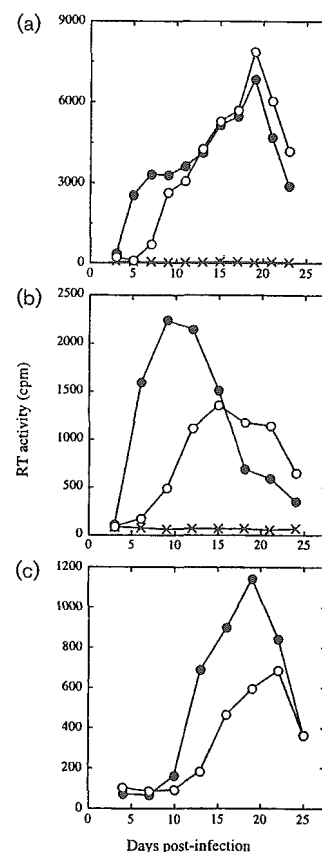


Fig. 2. Replication of chimeric viruses in (a) a human CD4⁺ cell line M8166, (b) a monkey CD4⁺ cell line HSC-F and (c) PBMCs from a rhesus monkey. Cell-free virus stocks from M8166 cells transfected with the respective chimeric DNA clones were infected and virion-associated RT activity in the culture supernatants was monitored every 2 or 3 days. ○, SHIVrt/3rn; ●, NM-3rn; ×, mock infection.