

Env were detected extensively for SHIV_{MD14}, but weakly or at the background level for the other SHIVs, by RC25 monoclonal antibody. GP160 Env was detected moderately for SHIV-TH09V3 and SHIV_{MD14}, and weakly for SHIV-KH005V3, by a rabbit antiserum raised against the consensus V3 sequence of NSI HIV-1 E from Thailand [11, 15].

In vitro replication of SHIVs in human and macaque PBMCs

The SHIV stocks were evaluated for their replication in human PBMCs by monitoring RT activity (Fig. 2A). SHIV_{MD14} showed the most extensive replication kinetics. SHIV-TH09V3 replicated more slowly, but reached a similar

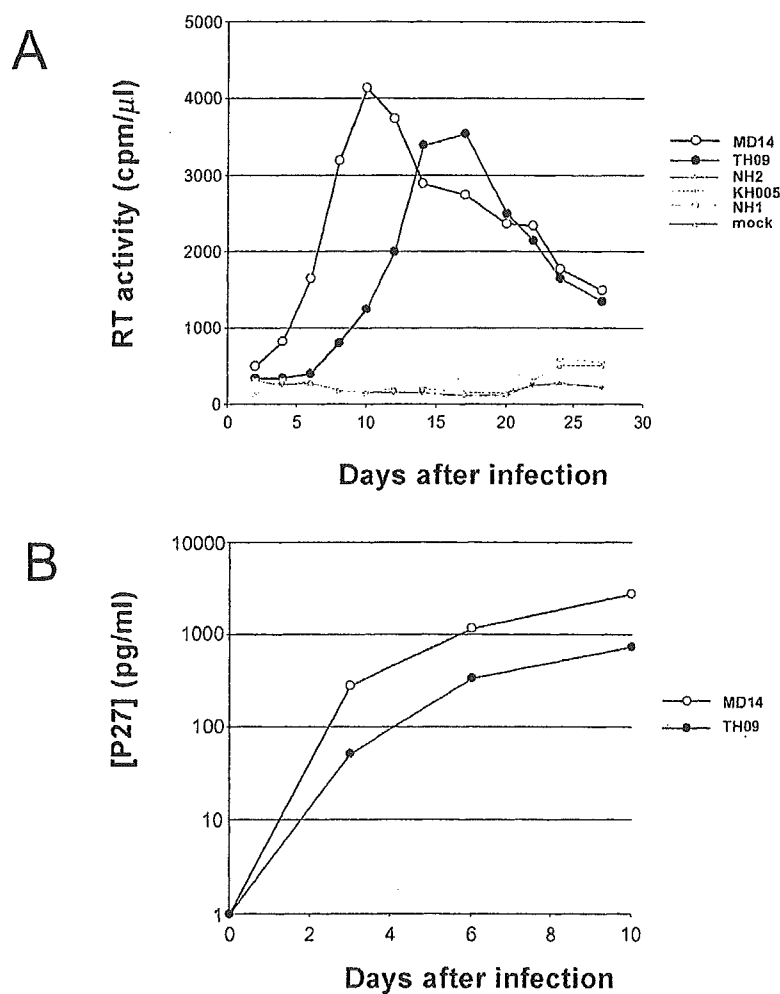


Fig. 2. *In vitro* replication of the SHIV stocks generated by transfecting HeLa cells with the recombinant plasmid DNAs. **A.** PHA-stimulated human PBMCs were infected with the SHIV stocks containing equal amounts of RT activities, followed by RT activity analysis for monitoring SHIVs replication. **B.** ConA-stimulated pig-tailed macaque PBMCs were infected with SHIV_{MD14} and SHIV-TH09V3 stocks, followed by quantifying P27 Gag production

peak height. However, the other three V3-chimera SHIVs did not replicate substantially.

The SHIV stocks were also studied for their replication in PBMCs of two pig-tailed macaques. Only the same two SHIVs, SHIV_{MD14} and SHIV-TH09V3, but no others replicated (data not shown).

Propagation of SHIV-TH09V3 for in vivo inoculation

Since only SHIV-TH09V3, out of the four V3-chimera SHIVs, replicated in human and macaque PBMCs, we selected SHIV-TH09V3 for *in vivo* infection of macaques.

For preparation of inoculum to pig-tailed macaques, ConA-stimulated PBMCs of a pig-tailed macaque were infected with the SHIV-TH09V3 stock and cultivated. P27 Gag accumulated up to 744 pg/ml in the culture supernatant on 10th day after infection (Fig. 2B). The virus titer of this inoculum was 600 TCID₅₀/ml, as determined by coculture with M8166 cells. Parallel infection with SHIV_{MD14} resulted in 4-fold greater concentration of P27 Gag (Fig. 2B) and in 67-fold greater virus titer.

For preparation of inoculum to cynomolgus macaques, ConA-stimulated splenic mononuclear cells of a cynomolgus macaque were infected with the SHIV-TH09V3 stock. P27 Gag accumulated up to 61 ng/ml (data not shown). The virus titer of this inoculum was 2000 TCID₅₀/ml. Parallel SHIV_{MD14} infection resulted in 2.6-fold greater concentration of P27 Gag and in 100-fold greater virus titer.

SHIV-TH09V3 infection of pig-tailed macaques

Two pig-tailed macaques (Pt-3944, Pt-3938) were intravenously inoculated with 800 TCID₅₀, corresponding to 1 ng of P27 Gag, of the SHIV-TH09V3 inoculum propagated in pig-tailed macaque PBMCs. For Pt-3944, plasma vRNA load peaked at 2.5×10^7 copies/ml on postinoculation day (PID) 14, followed by a gradual decrease down to 1.2×10^3 copies/ml on PID 40 (Fig. 3A). Pt-3944 showed plasma P27 Gag antigenemia with a peak of about 200 pg/ml on PID 14 (Fig. 3B). Virus was isolated from this macaque PBMCs on PID 11 by coculture with M8166 cells, but not from its plasma. For Pt-3938, plasma vRNA load peaked at 4.5×10^4 copies/ml on PID 10, followed by fluctuations in range between 10^3 to 3×10^4 copies/ml up to PID 25 (Fig. 3A). Pt-3938 showed subtle peak of plasma antigenemia (51 pg/ml) on PID 16 (Fig. 3B). Virus was not isolated from this macaque.

Absolute counts of both CD4- and CD8-positive T-lymphocytes in peripheral blood of these two macaques decreased transiently during primary viremia (Fig. 3C).

Pt-3944 became seroconverted as detected by a conventional Western blot kit (Fig. 3D). P25 Gag protein band became faintly positive on PID 21, and then was apparently positive from PID 28 to PID 40, a day of autopsy. GP160 Env protein

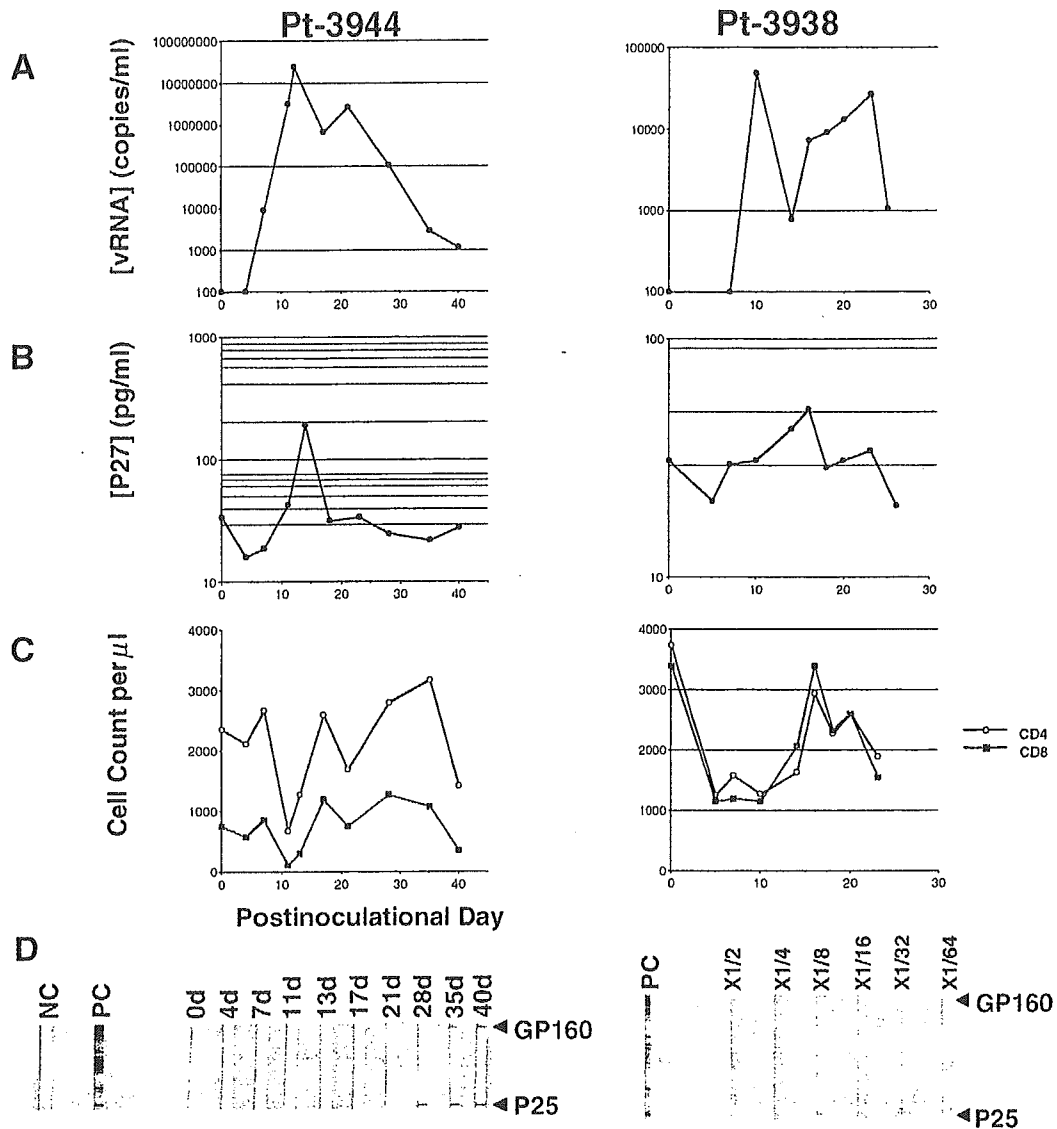


Fig. 3. *In vivo* infection of pig-tailed macaques with SHIV-TH09V3. Two pig-tailed macaques (Pt-3944, Pt-3938) inoculated with SHIV-TH09V3 were monitored for plasma vRNA load (A), plasma P27 Gag antigenemia (B), absolute counts of CD4- and CD8-positive T-lymphocytes in peripheral blood (C) and seroconversion (D). For seroconversion analysis, Western blot kit for HIV-1 (LAV BLOT 1) was used. NC and PC, internal negative and positive control of the kit, respectively. Major bands (GP160 and P25) on the strips are indicated. Serial dilutions of PID27-plasma of Pt-3938, as primary antibodies, were applied for confirming the banding specificity. Biologically infectious virus was isolated by coculture with M8166 cells only from PID 11-PBMCs of Pt-3944

band became faintly positive on PID28, and apparent from PID 35 to 40. For Pt-3938, P25 Gag protein band was faintly detectable on PID 23 and 27, an autopsy day. GP160 Env protein band became faintly detectable on PID 27. In order to confirm the specificity of the two faint bands detected for Pt-3938, the plasma of

PID 27 was serially diluted as primary antibodies. Overloading clarified the two bands, consolidating the banding specificity (Fig. 3D).

SHIV-TH09V3 infection of cynomolgus macaques

Two cynomolgus macaques (Cy-256, Cy-329) were intravenously inoculated with 10000 TCID₅₀ of the SHIV-TH09V3 inoculum propagated in cynomolgus macaque splenic mononuclear cells. Plasma vRNA load of Cy-256 and Cy-329 peaked on PID 7 at 3.6×10^7 and 4.0×10^6 copies/ml respectively, followed by a continuous decline down to undetectable level on PID 28 (Fig. 4A). Plasma P27 Gag antigenemia for these two macaques was under detectable level thoroughly.

For Cy-256, viruses were isolated from plasma of PID 11, and from PBMCs of PID 14, 18 and 28. For Cy-329, viruses were isolated from plasma of PID 7 and 11, and from PBMCs of PID 11, 14 and 18.

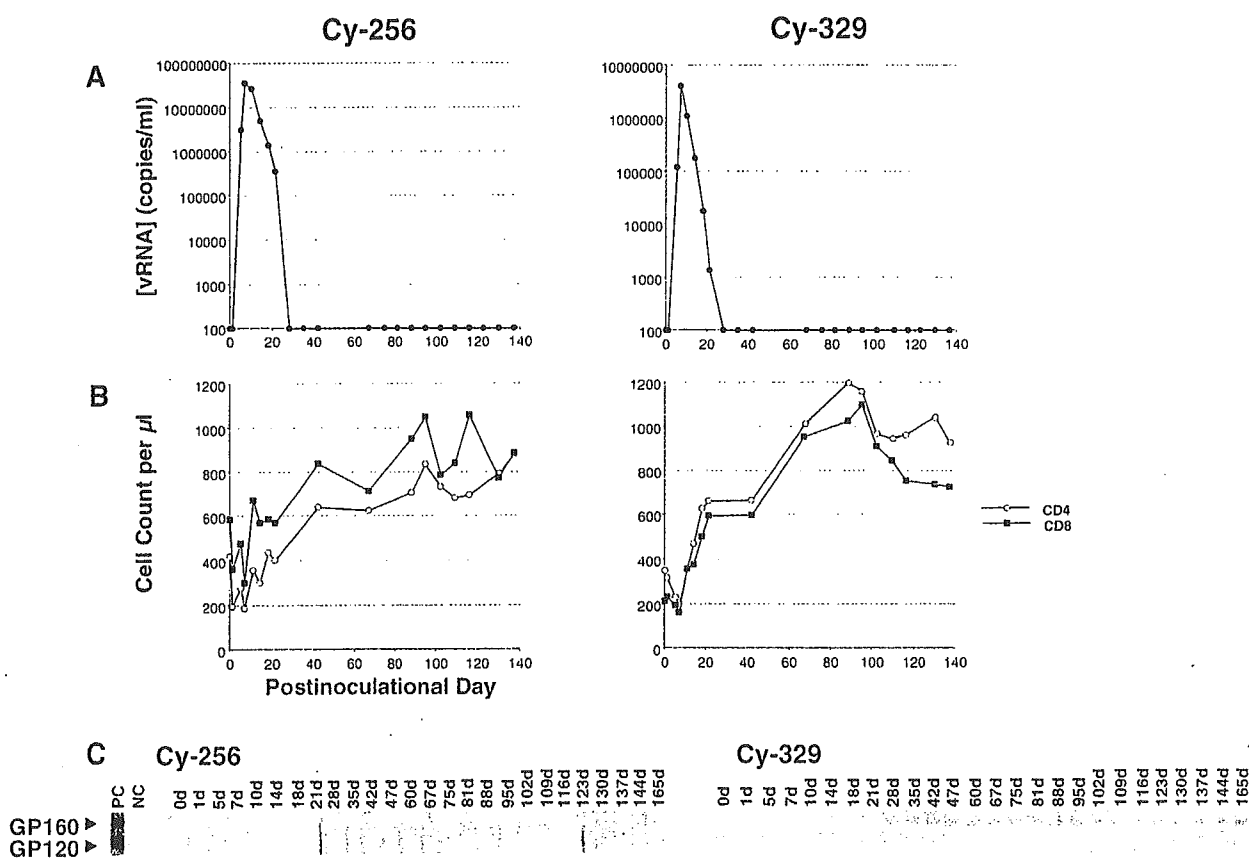


Fig. 4. *In vivo* infection of cynomolgus macaques with SHIV-TH09V3. Two cynomolgus macaques (Cy-256, Cy-329) inoculated with SHIV-TH09V3 were monitored for plasma vRNA load (A), absolute counts of CD4- and CD8-positive T-lymphocytes in peripheral blood (B) and seroconversion (C). Plasma P27 Gag antigenemia was not detected at all the time points monitored. Biologically infectious viruses were isolated from; PID 11-plasma and PID 14, 18, 28-PBMCs of Cy-256; PID 7, 11-plasma and PID 11, 14, 18-PBMCs of Cy-329

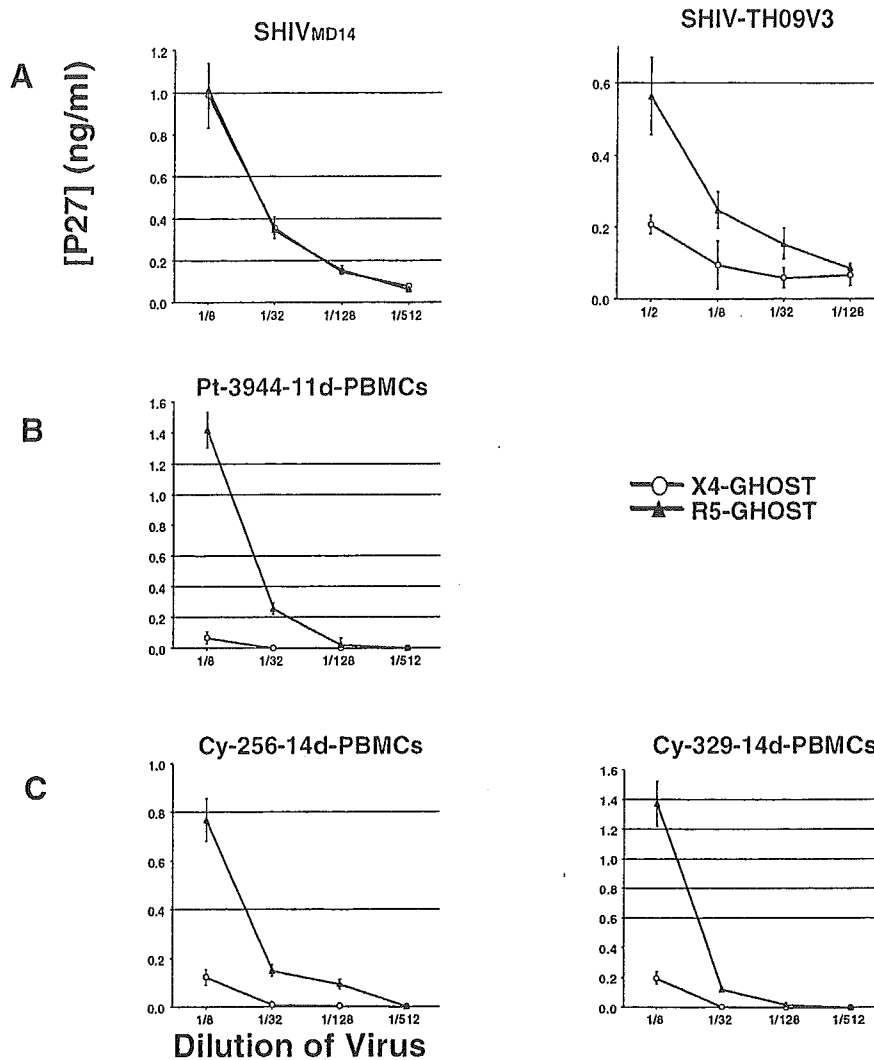


Fig. 5. Coreceptor usage analysis by GHOST cells assay. **A.** SHIV_{MD14} and SHIV-TH09V3 propagated in human PBMCs were verified for their coreceptor usage. **B.** Isolated virus from PID 11-PBMCs of Pt-3944 (infected with SHIV-TH09V3) was analyzed. **C.** Isolated viruses from PID 14-PBMCs of Cy-256 and Cy-329 (both infected with SHIV-TH09V3) were analyzed. Isolated viruses (**B** and **C**) were prepared by coculture with M8166 cells. All the data shown here (**A**, **B** and **C**) are the representatives of three (or more) independent experiments done in triplicate

Absolute counts of both CD4- and CD8-positive T-lymphocytes in peripheral blood of the two macaques showed gradually increasing trends (Fig. 4B).

The two macaques became seroconverted for GP160 Env on PID 28 and thereafter (Fig. 4C).

Coreceptor usage in vitro and after isolation from macaques

SHIV_{MD14} and SHIV-TH09V3 were verified for their coreceptor usage by GHOST cells assay [2, 30]. SHIV_{MD14} prepared in human PBMCs replicated equally in

GHOST-X4 and GHOST-R5 cells as measured by P27 Gag production in the culture supernatants. In contrast, SHIV-TH09V3 prepared in the same human PBMCs replicated more extensively in GHOST-R5 cells than GHOST-X4 cells, indicating R5-tropic phenotype (Fig. 5A).

We also verified the coreceptor usage of the isolated viruses from macaques by coculture with M8166 cells. The isolate from PID 11-PBMCs of Pt-3944 showed R5-tropic phenotype (Fig. 5B). The isolates from PID 14-PBMCs of both Cy-256 and Cy-329, were also R5-tropic (Fig. 5C).

Discussion

In this study, we established SHIV-TH09V3, a V3-chimera clone carrying subtype E NSI V3 [11, 15] substituted into SHIV_{MD14} backbone [26] bearing a subtype B envelope. SHIV-TH09V3 replicated in pig-tailed macaque PBMCs and cynomolgus macaque splenic mononuclear cells as well as in human PBMCs. Additionally, SHIV-TH09V3 infected both pig-tailed and cynomolgus macaques. In contrast to X4/R5-dual tropic phenotype of the parental SHIV_{MD14}, SHIV-TH09V3 was R5-tropic *in vitro* and after isolation from macaques.

Attempting to construct subtype E V3-chimera SHIV clones, we initially selected the four subtype E V3 sequences (Fig. 1A), which were previously used for constructing subtype E V3-chimera HIV-1 clones with a backbone of subtype B HIV-1 [24]. In that study, all the V3-chimera HIV-1 clones infected human PBMCs and showed the phenotypes conferred from the respective V3 sequences in terms of NSI/SI and X4/R5 coreceptor usage. These results suggested reliability on the strategy of constructing V3-chimera virus clones for evaluating V3-governed phenotypes.

In this study, only SHIV-TH09V3, out of the four V3-chimeras, replicated in human and macaque PBMCs although all the four clones produced equal amount of RT activity in the culture supernatants of the transfected HeLa cells as the parental SHIV_{MD14} did. Further study of profiles of viral proteins produced by these SHIVs in HeLa cells confirmed that Env and Gag proteins were produced evenly all through the SHIVs (Fig. 1C). Additionally, successful V3 replacement was confirmed not only by DNA sequencing but also by differentially specific immunoreactivity of Env protein bands by NH1 patient antiserum (Fig. 1C) and by the two V3-targeted antibodies (Fig. 1D). Taken together, these results imply that any of the V3 replacements do not prevent production of major structural proteins nor makeup of SHIV virions containing RT activity, but that the combination of V3 and SHIV_{MD14} backbone allowed only SHIV-TH09V3 to replicate in human and macaque PBMCs.

All the pig-tailed and cynomolgus macaques studied here were infected by intravenous inoculation with SHIV-TH09V3. Direct comparison of infectious aspects between the two macaque species is limited because the amount of viral inoculation was more in the cynomolgus macaques than in the pig-tailed macaques. Nevertheless, species differences of infectious aspects can be pointed out. The two cynomolgus macaques allowed virus isolation at several time points from both

PBMCs and plasma. But only one of the two pig-tailed macaques allowed virus isolation at a sole time point only from PBMCs. In contrast, P27 Gag antigenemia in plasma was detected only in the pig-tailed macaques but not in the cynomolgus macaques. As for vRNA viremia after the peak, the cynomolgus macaques showed a continuous decline down to undetectable level, while the pig-tailed macaques rather showed fluctuations after the peak (Fig. 3 and Fig. 4). It remains to be known why this discrepancy, higher antigenemia and more extended post-peak vRNA viremia but lower virus isolation for the pig-tailed macaques than the cynomolgus macaques, occurred. Another point was that absolute counts of both CD4- and CD8-positive T-lymphocytes in peripheral blood of the two cynomolgus macaques showed gradually increasing trends (Fig. 4B). Studying activation markers expressed on these cells may give clues for reasoning this increase.

GHOST cells assay revealed that SHIV-TH09V3 maintained R5-tropic phenotype both *in vitro* and after isolation from macaques. In contrast, SHIV_{MD14} was X4/R5-dual tropic *in vitro* (Fig. 5A). In a preliminary experiment, another cynomolgus macaque was inoculated with SHIV_{MD14} and the isolated viruses were X4/R5-dual tropic (data not shown). These results indicate that the V3 sequences, only the initial difference between SHIV-TH09V3 and SHIV_{MD14}, decide the coreceptor usage both *in vitro* and after isolation from macaques. The notion that V3 loops determine coreceptor usage in a relatively independent manner [6, 8, 24, 29, 32] is supported here even in a SHIV backbone.

There are totally 9 amino acids substituted in V3 sequences between SHIV-TH09V3 and SHIV_{MD14} (Fig. 1A). Both SHIVs hold the "R5-usage consensus motif in V3 domain", 11-S/GXXXGPGXXXXXXXXXE/D-25, suggested by cross-subtype analysis including subtype E [33]. SHIV_{MD14} bears a whole envelope of HIV-1_{DH12}, except minor differences at the both ends [26]. HIV-1_{DH12} is X4/R5-dual tropic, dictating its coreceptor usage phenotype to SHIV_{MD14} [27]. Recently, N-glycosylation site in HIV-1_{DH12} V3 was suggested to be critical for R5-usage ability [20]. The N-glycosylation motif in V3 (Fig. 1A) is also conserved in SHIV-TH09V3, being consistent with the maintained R5 usage.

So far, two SHIV clones carrying an envelope of subtype E HIV-1 have been reported. SHIV_{9466.33} [16], bearing an envelope of SI T cell tropic clinical isolate from Thailand, infected baboons. Since SI T cell tropic phenotype is mostly accompanied with X4-tropic phenotype [12], SHIV_{9466.33} can be predicted either X4-tropic or X4/R5-dual tropic. SHIV-E-CAR [13], bearing an envelope of HIV-1 clinical isolate from Central African Republic, infected rhesus macaques progressively becoming pathogenic after animal-to-animal passages while maintaining X4-tropic phenotype. Compared with the two non-R5-tropic SHIVs, SHIV-TH09V3 may serve as an R5-tropic subtype E HIV-1 model in a V3-targeted study. We are also pleased that SHIV-TH09V3 carries the consensus V3 sequence of subtype E NSI HIV-1 from Thailand [11, 15], reasoning itself as a representative virus model. Additionally, infection of macaques with SHIV-TH09V3 and SHIV_{MD14} will serve a unique animal model for focusing on difference of the outcome caused by the different V3 sequences in connection with coreceptor usage.

Acknowledgement

We thank Malcolm A Martin for supply of pMD14, Susan Zolla-Pazner for GHOST cells, and Naoki Yamamoto for reviewing the manuscript.

References

1. Bogers W MJM, Cheng-Mayer C, Montelao RC (2000) Developments in preclinical vaccine efficacy models. *AIDS* 14 (Suppl 3): S141–S151
2. Cecilia D, KewalRamani VN, O’Leary J, Volsky B, Nyambi P, Burda S, Xu S, Littman DR, Zolla-Pazner S (1998) Neutralization profiles of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates in the context of coreceptor usage. *J Virol* 72: 6988–6996
3. Chan SY, Speck RF, Power C, Gaffen SL, Chesebro B, Goldsmith MA (1999) V3 recombinants indicate a central role for CCR5 as a coreceptor in tissue infection by human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 73: 2350–2358
4. Chen Z, Huang Y, Zhao X, Skulsky E, Lin D, Ip J, Gettie A, Ho DD (2000) Enhanced infectivity of an R5-tropic simian/human immunodeficiency virus carrying human immunodeficiency virus type 1 subtype C envelope after serial passages in pig-tailed macaques (*Macaca nemestrina*). *J Virol* 74: 6501–6510
5. Cho MW, Lee MK, Carney MC, Berson JF, Doms RW, Martin MA (1998) Identification of determinants on a dualtropic human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein that confer usage of CXCR4. *J Virol* 72: 2509–2515
6. Choe H, Farzan M, Sun Y, Sullivan N, Rollins B, Ponath PD, Wu L, Mackay CR, LaRosa G, Newman W, Gerard N, Gerard C, Sodroski J (1996) The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* 85: 1135–1148
7. Clapham PR, Weiss RA, Dalgleish AG, Exley M, Whitby D, Hogg N (1987) Human immunodeficiency virus infection of monocytic and T-lymphocytic cells: receptor modulation and differentiation induced by phorbol ester. *Virology* 158(1): 44–51
8. Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Cara A, Gallo RC, Lusso P (1996) The V3 domain of the HIV-1 gp120 envelope glycoprotein is critical for chemokine-mediated blockade of infection. *Nat Med* 11: 1244–1247
9. De Jong JJ, De Ronde A, Keulen W, Tersmette M, Goudsmit J (1992) Minimal requirements for the human immunodeficiency virus type 1 V3 domain to support the syncytium-inducing phenotype: analysis by single amino acid substitution. *J Virol* 66: 6777–6780
10. De Jong JJ, Goudsmit J, Keulen W, Klaver B, Krone W, Tersmette M, de Ronde A (1992) Human immunodeficiency virus type 1 clones chimeric for the envelope V3 domain differ in syncytium formation and replication capacity. *J Virol* 66: 757–765
11. De Wolf F, Hogervorst E, Goudsmit J, Fenyo EM, Rubsamen-Waigmann H, Holmes H, Galvao-Castro B, Karita E, Wasi C, Sempala SDK, Baan E, Zorgdrager F, Lukashov V, Osmanov S, Kuiken C, Cornelissen M AND The WHO Network for HIV Isolation and Characterization (1994) Syncytium-inducing and non-syncytium-inducing capacity of human immunodeficiency virus type 1 subtypes other than B: phenotypic and genotypic characteristics. *AIDS Res Hum Retrovir* 10: 1387–1400
12. Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA (1996) HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272: 872–877
13. Himathongkham S, Halpin NS, Li J, Stout MW, Miller CJ, Luciw PA (2000) Simian-human immunodeficiency virus containing a human immunodeficiency virus type 1 subtype-E envelope gene: persistent infection, CD4(+) T-cell depletion, and mucosal membrane transmission in macaques. *J Virol* 74: 7851–7860

14. Ho SN, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK, Pease LR (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77: 51–59
15. Ichimura H, Kliks SC, Visrutaratna S, Ou CY, Kalish ML, Levy JA (1994) Biological, serological, and genetic characterization of HIV-1 subtype E isolates from northern Thailand. *AIDS Res Hum Retrovir* 10: 263–269
16. Klinger JM, Himathongkham S, Legg H, Luciw PA, Barnett SW (1998) Infection of baboons with a simian immunodeficiency virus/HIV-1 chimeric virus constructed with an HIV-1 Thai subtype E envelope. *AIDS* 12: 849–857
17. Kuwata T, Takemura T, Takehisa J, Miura T, Hayami M (2002) Infection of macaques with chimeric simian and human immunodeficiency viruses containing Env from subtype E. *Arch Virol* 147(6): 1121–1132
18. Nathanson N, Hirsch VM, Mathieson BJ (1999) The role of nonhuman primates in the development of an AIDS vaccine. *AIDS* 13 (Suppl A): S113–S120
19. Ndung'u T, Lu Y, Renjifo B, Touzjian N, Kushner N, Pena-Cruz V, Novitsky VA, Lee TH, Essex M (2001) Infectious simian/human immunodeficiency virus with human immunodeficiency virus type 1 subtype C from an African isolate: rhesus macaque model. *J Virol* 75: 11417–114125
20. Ogert RA, Lee MK, Ross W, Buckler-White A, Martin MA, Cho MW (2001) N-linked glycosylation sites adjacent to and within the V1/V2 and the V3 loops of dualtropic human immunodeficiency virus type 1 isolate DH12 gp120 affect coreceptor usage and cellular tropism. *J Virol* 75: 5998–6006
21. Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, Carr JK, Foley B, Funkhouser RK, Gao F, Hahn BH, Kuiken C, Learn GH, Leitner T, McCutchan F, Osmanov S, Peeters M, Pieniazek D, Salminen M, Wolinsky S and Korber B (1999) HIV Molecular Immunology Database 1999, Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM, pp. IV-55–65
22. Sasaki Y, Ami Y, Nakasone T, Shinohara K, Takahashi E, Ando S, Someya K, Suzuki Y, Honda M (2000) Induction of CD95 ligand expression on T lymphocytes and B lymphocytes and its contribution to apoptosis of CD95-up-regulated CD4⁺ T lymphocytes in macaques by infection with a pathogenic simian/human immunodeficiency virus. *Clin Exp Immunol* 122: 381–389
23. Sato H, Shiino T, Kodaka N, Taniguchi K, Tomita Y, Kato K, Miyakuni T, Takebe Y (1999) Evolution and biological characterization of human immunodeficiency virus type 1 subtype E gp120 V3 sequences following horizontal and vertical virus transmission in a single family. *J Virol* 73: 3551–3559
24. Sato H, Kato K, Takebe Y (1999) Functional complementation of the envelope hypervariable V3 loop of human immunodeficiency virus type 1 subtype B by the subtype E V3 loop. *Virology* 257: 491–501
25. Sharpless NE, O'Brien WA, Verdin E, Kufta CV, Chen IS, Dubois-Dalcq M (1992) Human immunodeficiency virus type 1 tropism for brain microglial cells is determined by a region of the env glycoprotein that also controls macrophage tropism. *J Virol* 66: 2588–2593
26. Shibata R, Maldarelli F, Siemon C, Matano T, Parta M, Miller G, Fredrickson T, Martin MA (1997) Infection and pathogenicity of chimeric simian-human immunodeficiency viruses in macaques: determinants of high virus loads and CD4 cell killing. *J Infect Dis* 176: 362–373
27. Shibata R, Hoggan MD, Broscius C, Englund G, Theodore TS, Buckler-White A, Arthur LO, Israel Z, Schultz A, Lane HC, Martin MA (1995) Isolation and characterization of a syncytium-inducing, macrophage/T-cell line-tropic human immunodeficiency virus type 1 isolate that readily infects chimpanzee cells *in vitro* and *in vivo*. *J Virol* 69: 4453–4462

28. Shioda T, Levy JA, Cheng-Mayer C (1992) Small amino acid changes in the V3 hypervariable region of gp120 can affect the T-cell-line and macrophage tropism of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 9434–9438
29. Speck RF, Wehrly K, Platt EJ, Atchison RE, Charo IF, Kabat D, Chesebro B, Goldsmith MA (1997) Selective employment of chemokine receptors as human immunodeficiency virus type 1 coreceptors determined by individual amino acids within the envelope V3 loop. *J Virol* 71: 7136–7139
30. Trkola A, Ketas T, Kewalramani VN, Endorf F, Binley JM, Katinger H, Robinson J, Littman DR, Moore JP (1998) Neutralization sensitivity of human immunodeficiency virus type 1 primary isolates to antibodies and CD4-based reagents is independent of coreceptor usage. *J Virol* 72: 1876–1885
31. Westervelt P, Trowbridge DB, Epstein LG, Blumberg BM, Li Y, Hahn BH, Shaw GM, Price RW, Ratner L (1992) Macrophage tropism determinants of human immunodeficiency virus type 1 *in vivo*. *J Virol* 66: 2577–2582
32. Willey RL, Smith DH, Lasky LA, Theodore TS, Earl PL, Moss B, Capon DJ, Martin MA (1988) *In vitro* mutagenesis identifies a region within the envelope gene of the human immunodeficiency virus that is critical for infectivity. *J Virol* 62: 139–147
33. Xiao L, Owen SM, Goldman I, Lal AA, deJong JJ, Goudsmit J, Lal RB (1998) CCR5 coreceptor usage of non-syncytium-inducing primary HIV-1 is independent of phylogenetically distinct global HIV-1 isolates: delineation of consensus motif in the V3 domain that predicts CCR-5 usage. *Virology* 240: 83–92
34. Yu XF, Wang Z, Beyrer C, Celentano DD, Khamboonruang C, Allen E, Nelson K (1995) Phenotypic and genotypic characteristics of human immunodeficiency virus type 1 from patients with AIDS in northern Thailand. *J Virol* 69: 4649–4655

Author's address: Dr. Mitsuo Honda, AIDS Research Center, National Institute of Infectious Diseases, Shinjuku, Tokyo 162-8640, Japan; e-mail: mhonda@nih.go.jp

原 著

メタロエンドペプチダーゼ-F の HIV に及ぼす影響

長 縄 聰^{1),2)}, 泉 泰之²⁾, 高橋 清実³⁾, 佐藤 成大³⁾, 藤崎 茂巳⁴⁾,
藤崎 恭大⁴⁾, 三谷 満昭⁴⁾, 網 康至²⁾, 中村 正彦⁵⁾, 本多 三男²⁾,
仲宗根 正²⁾, 朽久保 修¹⁾, 北村 勝彦¹⁾

¹⁾横浜市立大学医学部公衆衛生学教室

²⁾国立感染症研究所

³⁾岩手医科大学細菌学教室

⁴⁾酵素医学研究所

⁵⁾大阪大学蛋白質研究所

目的：消炎酵素製剤として臨床使用されている Pronase の主要成分であるメタロエンドペプチダーゼ-F (Metalloendopeptidase-F, MEP-F) の *in vitro* における HIV-1 感染に対する影響を解析する。

方法：HIV-1/LAI 及び AD8 株を種々の濃度の MEP-F で処理し正常ヒト末梢血単核球 (PBMC) PHA 幼若化細胞 (PHA-blast) を標的細胞として中和活性を検討した。更に, MEP-F の存在下で HIV 感染細胞の p24 抗原産生について検討した。また, MEP-F の標的細胞に及ぼす影響について FACS 解析を試みた。

結果：HIV-1 を MEP-F で処理することにより正常ヒト PHA-blast に対する感染力の低下が認められた。また, PHA-blast に HIV-1/LAI を感染させ MEP-F 存在下で培養したところ, p24 抗原産生が強く抑制された。更に, PBMC を MEP-F で処理し, HIV-1/LAI を感染させた場合, p24 抗原産生が抑制された。正常ヒト PBMC 表面マーカーに対する MEP-F の影響を FACS で解析すると, MEP-F 処理により CD3 陽性 T 細胞で CD4, CXCR4 発現細胞数の低下が認められた。

結論：MEP-F は HIV-1 及び宿主細胞表面のウイルスレセプターに作用し, 抗 HIV-1 作用をもたらす可能性が示唆された。

キーワード：メタロエンドペプチダーゼ-F, 抗 HIV 作用, 消炎酵素製剤

日本エイズ学会誌 5 : 1-7, 2003

はじめに

Highly Active Anti-retrovirus Therapy (HAART) の導入は欧米をはじめとした先進国では HIV 診療に画期的な変化をもたらした。その一方で, サハラ砂漠以南アフリカ諸国, 東南アジア地域, 東欧圏などの途上国や経済的, 政治的危機に直面している国々では感染者は治療の恩恵に浴せぬまま HIV は爆発的流行を続けている。こうした現状の中で流行予防の効果的施策の実施が急務である。更に, 薬剤単価が高額かつ耐性ウイルスの出現が避けられない HAART の持つ負の側面を補う意味において新たな治療法の開発が早急に求められている。

HIV 感染症において, 種々の炎症性刺激は病期の進行に寄与しており, *in vitro* の刺激においてもウイルス感染の増幅や感染細胞からのウイルス産生の増加が明らかとなっている¹⁻³⁾。従って, 抗炎症物質による HIV 産生のコントロールが期待される。本研究では, 藤崎らにより 1963 年に開発され, 慢性副鼻腔炎, 関節炎, 術後及び外傷後の腫脹緩解などに広く臨床使用されている消炎酵素製剤 Pronase の主要成分である Metalloendopeptidase-F (MEP-F) の *in vitro* における HIV に及ぼす影響について検討を試みた。MEP-F は以下の点を勘案し選択した：1) MEP-F は高純度・高力価の亜鉛結合エンドペプチダーゼで, Pronase 製剤原料から容易に調製できる, 2) 慢性肝炎・肝硬変患者を対象に Pronase の多施設二重盲検プラセボ対照比較試験が行われ, 肝機能及び肝生検像の有意な改善効果が報告されている⁴⁻⁶⁾, 3) MEP-F 製剤の内服により C 型肝炎患者で血中 HCV RNA コピー数の低下と肝機能改善効果が観察されている⁷⁻⁹⁾。

今回の研究では, 正常ヒト末梢血単核球 (PBMC) に MEP-F を作用させると用量に依存して HIV 感染に關与

著者連絡先：北村勝彦 (〒236-0004 横浜市金沢区福浦 3-9
横浜市立大学医学部公衆衛生学教室)
Fax : 045-787-2609, E-mail : hiko@med.yokohama-cu.ac.jp

2002 年 6 月 24 日受付 ; 2002 年 10 月 15 日受理

る細胞表面マーカー CD4, CXCR4, CCR5 及び CD62L の発現量の低下が認められた。更に、PBMC 及び PHA 幼若化細胞 (PHA-blast) を用いた *in vitro* 感染系で、MEP-F により HIV-1 の産生が抑制されるという興味深い知見が得られたので報告する。

材料と方法

1) ウイルス : HIV-1/LAI 株及び AD8 株を用いた¹⁰⁾。

2) PBMC 及び PHA-Blast : PBMC は経静脈的に採血した健康人全血よりリンホセパール (IBL Co., Ltd.) を用いて分離した。分離した PBMC を 0.1% Phytohemagglutinin-P (PHA) (DIFCO Co., Ltd.) 含有培養液 (RPMI 1640 : 10% FBS) において 37°C で 3 日間培養して幼若化し、PHA-Blast として実験に供した。

3) MEP-F : MEP-F は Pronase 原末から精製・調製した。本酵素は Zn 結合メタロエンドペプチダーゼで、SDS-PAGE (分子量約 43,000) 及び逆相 HPLC で単一ピークを示す。本試験では 1.97×10^6 units/g チロシン力価の標品を用いた。

4) 抗 HIV-1 活性 : PBMC または PHA-Blast 浮遊液 100 μ l ($1.5 \sim 2 \times 10^6$ cells) に、HIV-1 ウイルス (LAI または AD 8,100 TCID₅₀) 溶液を 100 μ l 加え、37°C で 1 時間インキュベートした。インキュベーション後、細胞を PBS (-) でよく洗浄し、培養液 (RPMI1640 : 10%FBS, IL-2, ME-2 含有) 1 ml を加え培養を開始した。実験系により下記の処理を施して 37°C で 5 日間培養後、HIV-1p24 抗原量を測定し、対照の p24 抗原量を 100% とした時の割合から ID₅₀ を算出した。

① HIV-1/LAI または AD8 (100 TCID₅₀) 溶液 100 μ l に MEP-F を添加し 37°C で 1 時間インキュベートした後、PHA-blast に感染させ、細胞を洗浄後、培養液中で培養した。

② PHA-blast に HIV-1/LAI を感染させ、細胞を PBS (-) で洗浄後、MEP-F を添加した培養液中で培養した。

③ PHA-blast に HIV-1/LAI を感染させ、細胞を PBS (-) で洗浄後、MEP-F を添加し 37°C で 1 時間インキュベートし、細胞を洗浄後、培養液中で培養した。

④ PBMC に MEP-F を添加し 37°C で 1 時間インキュベートした後、細胞を PBS (-) で洗浄し、その後 HIV-1/LAI を感染させ、細胞を洗浄後、PHA を含む培養液中で培養した。

5) 正常ヒト PBMC 及び PHA-blast 表面マーカーの FACS 解析 : 正常ヒト PBMC 及び PHA-blast 浮遊液 (10⁶ cells/ml PBS) に MEP-F を添加し、37°C で 1 時間インキュベートした。細胞を PBS (-) で洗浄後、FITC, PE もしくは PreCP で標識した抗ヒト CD3, CD4, CD8, CD14, CD20, CD21, CD62L, CXCR4 あるいは CCR5 抗体 (Pharmingen 社, Coulter 社, Becton Dickinson 社) で染

色・固定後、FACS で解析した。

結 果

MEP-F の抗 HIV 作用

今回用いた HIV-1/LAI 株は MOLT-4 細胞¹⁰⁾ で継代培養し、NP-2 細胞でコレセプターが CXCR4 であり CCR5 を介していないこと (T-tropic) を確認した。この HIV/LAI 株は、正常ヒト PBMC に感染させた後に PHA 幼若化を行った培養系で増殖能 (p24 抗原産生) を示した。また env/V3 領域の遺伝子配列を確認したところ、報告¹⁰⁾ と比べ変異は無かった (unpublished data)。

4 ロットの PHA-blast を MEP-F 添加培養液中で 4 日間培養後、Alamar Blue (ALM 社) を添加し、琥珀酸テトラゾリウムレダクターゼ活性を指標として細胞障害活性を測定した¹¹⁾。10 μ g/ml 未満の MEP-F 濃度では PHA-blast への細胞障害作用は認められなかった。

1) HIV の不活化

MEP-F で 1 時間処理した HIV-1/LAI を 3 ロットの PHA-blast に感染させ、5 日間培養後に感染力価を測定した。MEP-F で処理した LAI では感染力の低下が見られた (それぞれ ID₅₀ = 6920, 5750 及び 1860 ng/ml) (図 1)。ま

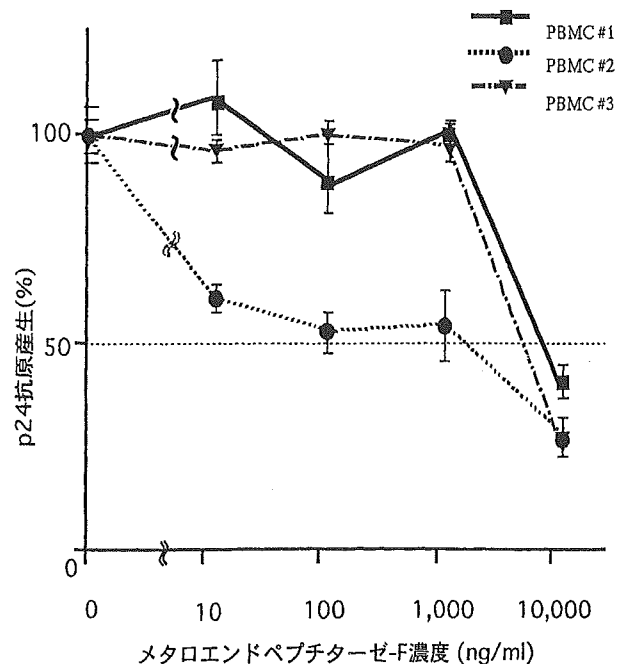


図 1 メタロエンドペプチダーゼ-F による HIV の不活化 HIV-1/LAI を MEP-F で 1 時間処理した後、3 ロットの PHA-blast に感染させ 5 日間培養した (方法の項参照)。無処理対照ウイルスの p24 抗原産生量に対する割合を表示した。

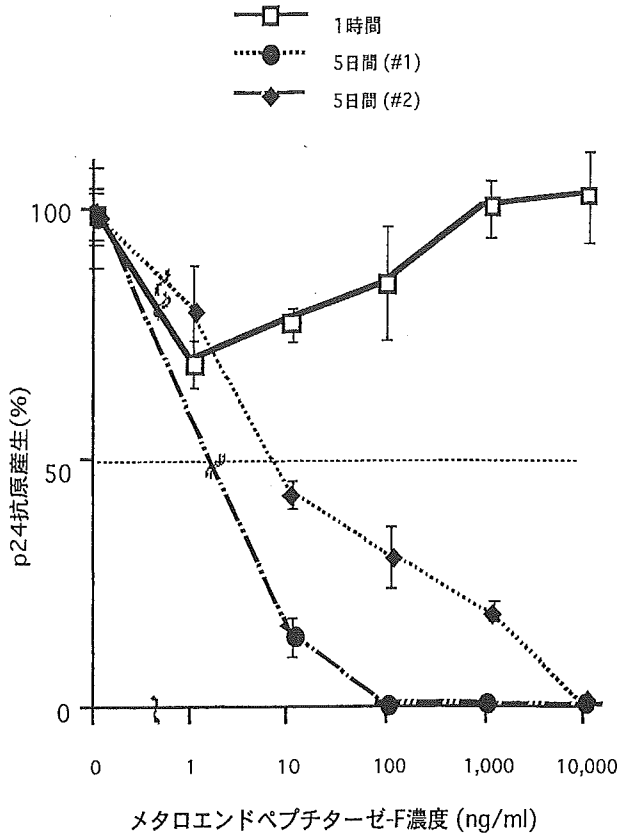


図 2 メタロエンドペプチダーゼ-F による p24 抗原産生量の抑制
HIV-1/LAI 感染 PHA-blast を下記条件下で処理・培養後、p24 抗原産生量を測定した：(1)MEP-F 存在下で 5 日間培養した (PHA-blast #1 および #2)，(2)MEP-F で 1 時間処理後、細胞を洗浄して 5 日間培養した。対照 PHA-blast における p24 抗原産生量に対する割合を表示した。

た、同様に MEP-F で処理した HIV-1/AD8 株 (M-tropic) でも感染力の低下 ($ID_{50}=6670\sim 10,000$ ng/ml) が認められた。

2) In vitro での HIV-1/LAI(p24) 産生に対する影響

2 ロットの PHA-blast に HIV-1/LAI を感染させた後、MEP-F 添加培養液で 5 日間培養し、p24 産生量を測定した。MEP-F 濃度に依存して p24 産生の抑制が認められ、10 ng/ml でそれぞれ 85% 及び 54% の抑制であった ($ID_{50}\leq 10$ 及び 7.2 ng/ml) (図 2)。

また、HIV-1/LAI 感染 PHA-blast に MEP-F を添加し 1 時間インキュベーション後、細胞を洗浄、培養したところ p24 抗原産生量には影響が見られなかった (図 2)。

PBMC を MEP-F で 1 時間処理し、HIV-1/LAI を感染させ PHA を含む培養液で培養すると、MEP-F 処理により p

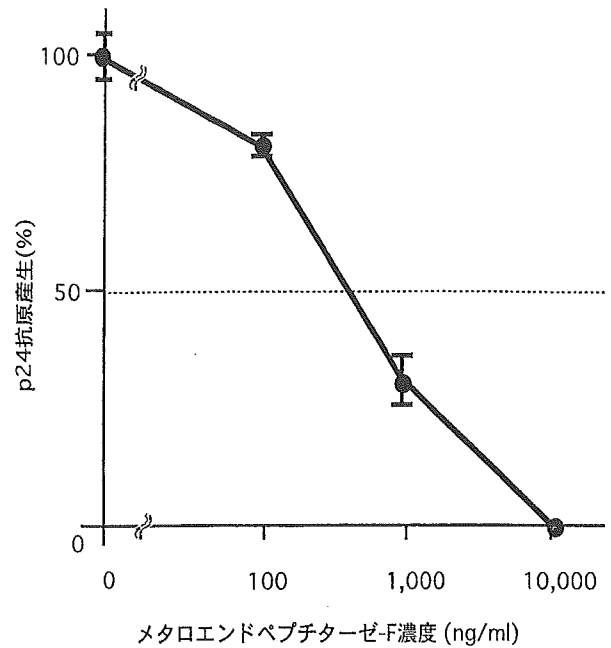


図 3 メタロエンドペプチダーゼ-F による p24 抗原産生量の抑制

PBMC を MEP-F で 1 時間処理後細胞を洗浄し、HIV-1/LAI 株を感染させた後、PHA を含む培養液中で培養した。対照 PBMC の PHA-blast における p24 抗原産生量に対する割合を表示した。

24 抗原産生が抑制された ($ID_{50}=239$ ng/ml) (図 3)。

一方、PBMC に HIV/AD8 株を感染後、PHA 幼若化を行った同様の培養系では、培養終了後に p24 抗原の産生は認められなかった。

PBMC 及び PHA-blast 細胞表面マーカーに対する影響

正常ヒト PBMC 表面マーカーに対する MEP-F の影響を FACS で解析したところ、MEP-F 処理 (10 µg/ml, 1 時間) により CD3 陽性 T 細胞で CD4, CXCR 4 及び CCR5 発現細胞、CD14 陽性 M 細胞で CD4, CD62L, CCR 5 及び CD14 発現細胞ならびに CD20 陽性 B 細胞で CD62 L 発現細胞数の低下が認められた (図 4)。また、CD3 陽性 CD62L 及び CD20 陽性 CD21 発現細胞数は減少しないが、CD62L 及び CD21 発現量の顕著な低下 (約 1/10) が観察された。一方、CD3, CD8 及び CD20 発現細胞数への MEP-F の影響は検出されなかった。興味深いことに、幾分低濃度の MEP-F (100 ng/ml) で CD14 陽性 CCR5 細胞及び CD3 陽性 CCR5 発現細胞数の低下が認められた (表 1)。

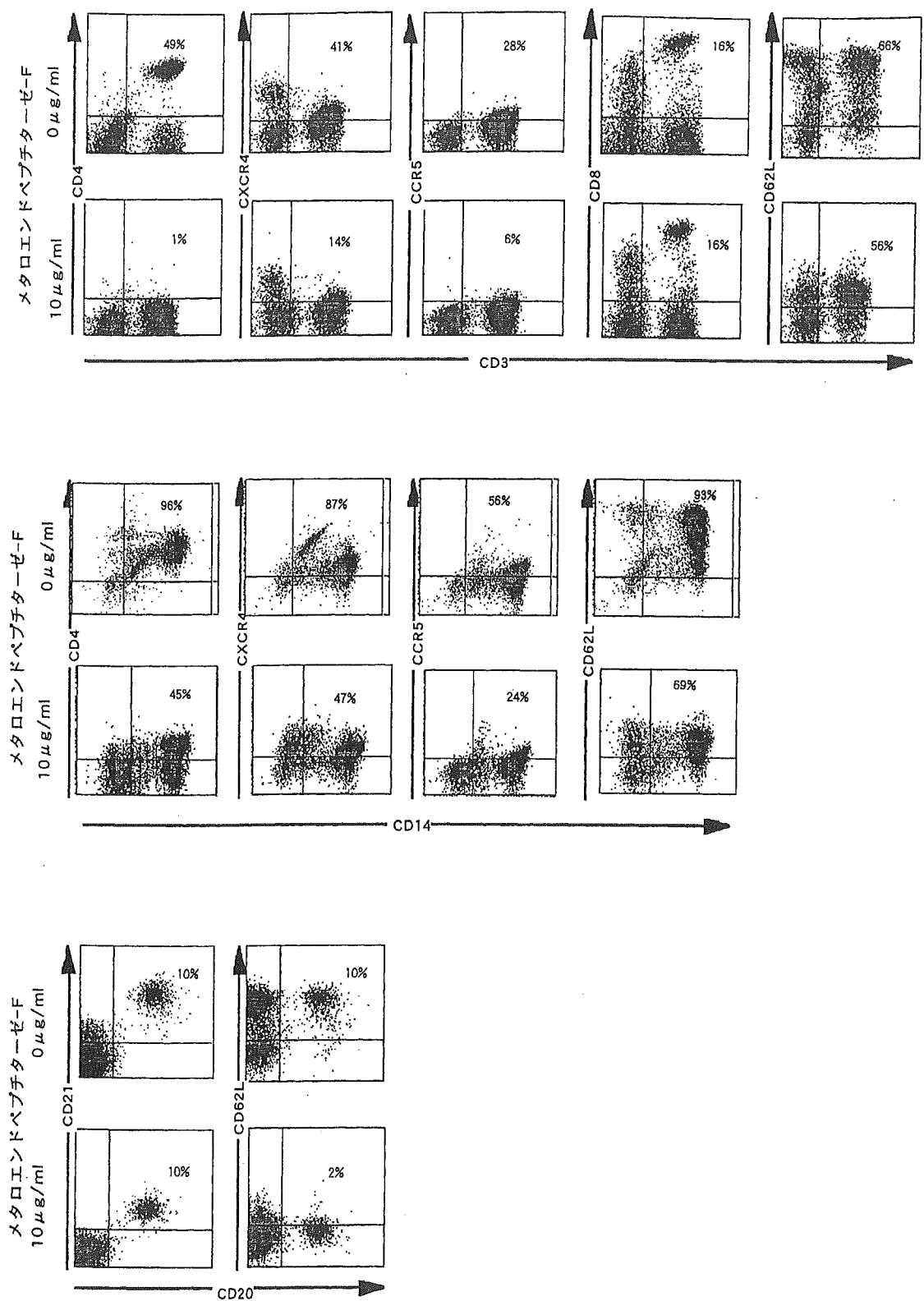


図 4 メタロエンドペプチダーゼ-F 処理における細胞表面マーカーへの影響
 正常ヒト PBMC を MEP-F (10 μg/ml) で 1 時間処理した後、種々の細胞表面マーカーの発現量を FACS で解析した。

表 1 メタロエンドペプチダーゼ-F 処理による細胞表面マーカーへの影響

MEP-F ($\mu\text{g/ml}$)		表面抗原陽性細胞 (%)											
10	T-cell	CD3	67	CD4	1	CD8	16	CD62L	56	CXCR4	14	CCR5	6
1	CD3 (+)		71		52		18		67		42		22
0.1			71		53		17		67		34		18
0.01			72		53		16		68		36		20
0			68		49		16		66		41		28
10	Monocyte	CD14	78	CD4	40	CD62L	69	CXCR4	47	CCR5	24		
1	CD14 (+)		86		83		83		60		37		
0.1			98		97		95		83		40		
0.01			94		92		95		81		50		
0			97		95		93		87		56		
10	B-cell	CD20	11	CD21	10	CD62L	2						
1	CD20 (+)		11		11		10						
0.1			11		11		11						
0.01			11		11		11						
0			11		10		10						

正常ヒト PBMC を種々濃度の MEP-F で 1 時間処理後、各表面抗原陽性細胞数を FACS で解析した。

考 察

我々は HIV 感染症をひとつの炎症性疾患としてとらえ宿主の抗炎症免疫能を有効に活用しうる抗 HIV 活性を有する物質の探索を行っているが、今回用いた MEP-F は消炎酵素製剤 Pronase に含まれる Zn 依存性エンドペプチダーゼで、血中で $\alpha 2$ マクログロブリン ($\alpha 2\text{MG}$) 複合体を形成し biological response modifier (BRM) として肝炎ウイルスに対する宿主の免疫応答能の増強をもたらす可能性が推定されている⁹⁾。最近、Lee-Huang らはヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG) 製剤中の *in vitro* 抗 HIV-1 活性物質を単離し、lysozyme 及び RNase を同定している¹²⁾。これら酵素の抗 HIV-1 作用はその加水分解活性に起因するとしても、その作用機序の詳細は不明である。

今回の実験で、正常ヒト PBMC に MEP-F を作用させると高濃度 (10 $\mu\text{g/ml}$) で CD4, CXCR4, CCR5 及び CD62L 発現細胞数あるいは発現量の低下が認められた。正常ヒト PBMC 及び PHA-blast を用いた *in vitro* 感染系で、HIV-1 感染に関与するこれら細胞表面マーカーの変化が検出されない低濃度の MEP-F (それぞれ $\text{ID}_{50}=239 \text{ ng/ml}$ 及び $<10\sim 7.2 \text{ ng/ml}$) によって HIV-1/LAI (p24) 産生が抑制された。抗 HIV-1 作用機序として蛋白溶解活性による、1) ウイルス表面上の結合部位 (gp120/41) の破壊、2) 細胞表面上のウイルスレセプター、コレセプター、接着因子の破壊による HIV-1 の宿主細胞への侵入の抑制が考えられる。高濃度の MEP-F による HIV-1 の不活化及び PBMC での CD4, CXCR4, CCR5 及び CD62L 発現量の低下の結

果から、抗 HIV-1 作用の一部にこれら機序の関与が示唆される。しかし、低濃度での抗 HIV-1 作用は説明されない。100 ng/ml で見られた CCR5 発現量の低下は、使用した HIV-1/LAI 株のコレセプターは CXCR4 であることが確認されているので抗 HIV-1 活性に寄与する可能性は低い。低濃度の MEP-F で実際には膜抗原の分子内切断が起こっているが、今回用いた各抗表面マーカー抗体が膜表面に残存する抗原の認識エピトープを検出するために FACS 分析で変化として捕捉されていないことが考えられる。切断膜抗原の分子サイズの確認を含め詳細な検討が今後必要であろう。また、PHA-blast に HIV-1 を感染後、細胞内に侵入しないで膜表面に付着しているウイルスを MEP-F が取り除く結果、侵入ウイルス数が減少し p24 抗原産生が抑制される可能性がある。PHA-blast に HIV-1 を感染後 MEP-F で 1 時間処理した場合の p24 抗原産生は無処置対照と差がなかったため、少なくとも初期感染ではこの可能性は低いと思われる。

MEP-F が宿主細胞表面上の抗原またはレセプターを修飾・刺激し、1) ウイルス侵入のステップを阻害する、2) 細胞内でのウイルス複製を阻害することが考えられる。一般に、細胞表面抗原やレセプターの調節は遺伝子発現レベル及び細胞表面での種々の修飾により行われる。膜抗原の修飾やサイトカインネットワークの制御には Zn 依存性 Matrix metalloproteinases (MMPs) が関与するものと考えられている¹³⁾。また、Factor Xa は休止期 T 細胞上のプロテアーゼレセプター (EPR-1) を介して T 細胞レセプター/CD3 による活性化を共刺激することが知られている¹⁴⁾。MEP-F は MMPs や factor Xa などの内因性プロテアーゼ

と類似的作用によりリンパ球の活性化・機能に何らかの影響を及ぼす可能性が推定される。PBMC中のT細胞はプロテアーゼ- α 2MG複合体レセプターを持たないが、単球・マクロファージはレセプターを介して活性化される可能性がある^{15,16}。上記可能性を含めて低濃度MEP-Fの抗HIV-1作用のメカニズムを解明する必要がある。

今後の研究課題としてMEP-Fの*in vivo*での抗HIV-1作用に関心が持たれる。一般に、プロテアーゼは血中阻害因子、主に α 2MGと複合体を形成し、2種類のレセプター(スキャベンジング及びシグナル伝達G蛋白共役レセプター)を介して間葉系細胞特にマクロファージ、樹状細胞、リポサイト、平滑筋細胞や滑膜線維芽細胞に作用し、慢性炎症局所で組織修復や病態制御に関わっている¹⁵⁻¹⁷。MEP-FはBRMとしてサイトカインネットワークの制御や細胞障害活性の亢進など宿主の免疫系をコントロールすることで抗HIV作用を示すことも可能性として否定できない。

HAARTにより、AIDSによる死亡者数の減少が先進国では報告されている。しかし、薬剤耐性ウイルスが出現し、その多くが交叉耐性を示すため、治療抵抗となる症例が増えてきている。しかも耐性を獲得したウイルスが伝播し、初感染にも関わらず耐性ウイルス株を保有する感染者が増加してきている。また、我が国ではHIV感染者のHCV多重感染も大きな問題となっている。今回の*in vitro*実験からHIV酵素を標的としたHAARTとは異なるMEP-Fの抗HIV-1作用が明らかとなり、その作用機序の可能性について論じた。

文 献

- Vicenzi E, Biswas P, Mengozzi M, Poli G : Role of pro-inflammatory cytokines and beta-chemokines in controlling HIV replication. *J Leukoc Biol*, 62(1) : 34-40, 1997.
- Montaner LJ, Herbein G, Gordon S : Regulation of macrophage activation and HIV replication. *Adv Exp Med Biol*, 374 : 47-56, 1995.
- Locati M, Murphy PM : Chemokines and chemokine receptors : biology and clinical relevance in inflammation and AIDS. *Annu Rev Med* 50 : 425-440, 1999.
- 小泉岳夫, 鈴木宏, 藤沢洵, 瀧野辰朗, 河田肇, 平山千里, 奥村恂, 谷川久一 : 慢性肝炎に対するPronase投与の有効性について—用量別効果の検討—. *肝胆膵* 12 : 305-314, 1986.
- 平山千里, 鈴木宏, 藤沢洵, 瀧野辰朗, 小泉岳夫, 奥村恂, 谷川久一, 小川暢也 : 多施設二重盲検試験による慢性肝炎に対するPronaseの臨床効果. *肝胆膵* 14 : 991-1000, 1987.
- 太田康幸, 平山千里, 鈴木宏, 藤沢洵, 瀧野辰朗, 小泉岳夫, 奥村恂, 谷川久一, 小川暢也 : 慢性活動性肝炎の肝生検像に及ぼすPronase投与の効果—二重盲検三群比較法による—. *肝胆膵* 15 : 819-831, 1987.
- 藤崎茂巳, 中村正彦, 富岡親憲, 藤崎隆司 : C型肝炎へのメタロエンドペプチダーゼ(MEP)の治療経験. *医学と薬学* 39 : 1179-1185, 1998.
- 藤崎茂巳, 藤崎恭太, 中村正彦 : C型肝炎へのメタロエンドペプチダーゼF(MEP-F)の治療経験—肝機能とTGF- β およびIL-6, IL-10, IL-12の挙動—. *医学と薬学* 45 : 625-632, 2001.
- 藤崎茂巳, 藤崎隆司, 吉田淳一, 藤崎恭太, 三谷満昭, 中村正彦, 大岳望 : 慢性肝疾患に対するメタロエンドペプチダーゼ-Fの薬理作用. *Jap J Antibiotics* 53 : 135-156, 2000.
- Potts BJ, Maury W, Martin MA : Replication of HIV-1 in primary monocyte cultures. *Virology* 175 : 456-476, 1990.
- Mosmann T : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65(1-2), 55-63, 1983
- Lee-Huang S, Huang PL, Sun Y, Huang PL, Kung H-F, Blithe DL, Chen H-C : Lysozyme and RNases as anti-HIV components in β -core preparations of human chorionic gonadotropin. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 : 2678-2681, 1999.
- Hooper NM, Karren EH, Turner AJ : Membrane protein secretase. *Biochem J* 321 : 265-279, 1997.
- Trucco M, Stassi G : Educating effector T cells. *Nature* 380 : 284-285, 1996.
- Chu CT, Pizzo SV : α 2-Macroglobulin, complement, and biologic defense : Antigens, growth factors, microbial proteases, and receptor ligation. *Lab Invest* 71 : 792-812, 1994.
- Misra UK, Pizzo SV : Ligation of the α 2M signaling receptor with receptor-recognized forms of α 2-Macroglobulin initiates protein and DNA synthesis in macrophages—The effect of intracellular calcium—. *Biochim Biophys Acta* 1401 : 121-128, 1998.
- Misra UK, Gonzalez-Gronow M, Gawdi M, Pizzo SV : Up-regulation of the α 2-Macroglobulin signaling receptor on rheumatoid synovial fibroblasts. *J Biol Chem* 272 : 497-502, 1997.

The Effect of Metalloendopeptidase-F on HIV-1

Satoshi NAGANAWA^{1,2)}, Yasuyuki IZUMI²⁾, Kiyomi TAKAHASHI³⁾, Shigehiro SATO³⁾,
Shigemi FUJISAKI⁴⁾, Yasuhiro FUJISAKI⁴⁾, Mitsuaki MITANI⁴⁾, Yasushi AMI²⁾,
Masahiko NAKAMURA⁵⁾, Mitsuo HONDA²⁾, Osamu TOCHIKUBO¹⁾
and Katsuhiko KITAMURA¹⁾

¹⁾ Department of Public Health,

Yokohama City University School of Medicine, Yokohama, Japan

²⁾ National Institute of Infectious Disease, Tokyo, Japan

³⁾ Department of Bacteriology, Iwate Medical College, Morioka, Japan

⁴⁾ Institute of Enzyme Research, Osaka, Japan

⁵⁾ Institute of Protein Research, Osaka University, Osaka, Japan

Objective : To study the effect of Metalloendopeptidase-F (MEP-F), a major active ingredient of the anti-inflammatory drug Pronase, on HIV-1 in vitro.

Materials and Methods : HIV-1/LAI and AD8 stock viruses were treated with various concentrations of MEP-F and then incubated in PHA-activated normal human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) for 5 days. PBMC or PHA-blast cells were treated with MEP-F either before or after infection with HIV-1. The cells were cultured for 5 days after infection. HIV-1 replication was evaluated by p24 antigen measurement using ELISA.

The effect of MEP-F on cell surface antigens was analyzed by fluorescence-activated cell sorter (FACS).

Results : Treatment of HIV-1/LAI and AD8 with MEP-F resulted in a decreased viral infectivity. When PHA-blast cells infected with HIV/LAI were cultured in the presence of MEP-F, a dose-related inhibition of HIV-1 p24 production was observed. Furthermore, when PBMC were treated with MEP-F prior to infection with HIV-1/LAI and then cultured in the medium with PHA added, the production of HIV-1 p24 antigen was significantly reduced. FACS analysis of cell-surface markers on MEP-F-treated PBMC revealed a remarkable decline of CD4 and CXCR4 levels expressed on CD3⁺ T cells.

Conclusion : It is suggested that MEP-F is effective against HIV-1 infection by acting on the surface proteins of both the virus and the host cell.

Key words : Metalloendopeptidase-F, anti-HIV effect, anti-inflammatory drug

アメリカ生殖免疫学会に参加して (エール大学)

林 公 一
(国立下関病院産婦人科)

本邦におけるH I V感染者の数は年々その数を増し、献血者によるH I V抗体陽性率は、平成14年の報告では10万人の献血者に対して1.41人の陽性者を認めており、15年前の約10倍に上昇している。このことは、潜在的なH I V感染者の増加を表しており、新たな感染者増加へとリンクしていると思われる。しかし、この現実とは裏腹に、一般人のH I V抗体検査の受診率は低く、その上H I Vに対する意識も決して高いとは言えないため、将来的な感染爆発に対しては、どうしても悲観的にならざるを得ない。特にH I V感染症を、母子感染の観点から考慮すると、次世代へ負の遺産を残すことになるため、妊婦の抗体検査については、一層重要な問題と考えられる。従来、H I Vによる母子感染率は、無治療群では約28%であったが、今日、適切な管理下であれば約2%までコントロールすることが可能である。このため、H I V母子感染予防に対しては、妊娠早期におけるH I V/A I D S診断が重要で、そのためには妊婦H I V抗体検査が不可欠となる。しかし、現状では、妊婦H I V抗体検査の実施状況は地域によって異なり、実施率も決して高率とは言えず、今後、H I Vによる母子感染の増加が十分に考えられる。本邦においては、H I V感染症に関しては、政策医療に組み込まれており、様々な研究班によるリサーチが進められている。我々の研究班も、H I Vによる母子感染予防に関する疫学調査班*として、全国産婦人科標榜施設を対象にアンケート調査(1999~2002)を行ない、H I V母子感染症例や妊婦H I V抗体検査受診率の動向について国内の学会・研究会等にて調査研究報告を行ってきた。この度、アメリカ生殖免疫学会(American Society for Reproductive Immunology: ASRI)より我々の研究班へH I V母子感染について日本の現状報告をして欲しいとの依頼があり、代表として私が発表報告することになった。発表の場は、エール大学医学部で開催されたA S R IのThe 23rd Annual Meeting(6.17~6.21/2003)で、以下の演題について発表を行った。

「The clinical assessment of maternal HIV testing in early pregnancy to prevent mother to child transmission in Japan」

(日本におけるH I V母子感染予防のための妊婦H I V検査の臨床的評価)

発表内容の概略は以下の通りである。

我々(H I V母子感染予防の臨床的研究グループ)は、H I Vによる母子感染予防を目的としH I V感染妊婦の状況やその出生児について定期的に全国調査を行っている。今回の発表では、本邦における妊婦H I V抗体検査実施率の現状について経時的検討を行い、全国平均と地域格差の問題を中心に報告を行った。発表内容としては、全国産婦人科標榜病院(個人診療所は除く)1600~1700施設を対象に、平成11年から平成14年までに質問形式によるアンケート調査を行ない整理・検討したデータを中心に紹介した。本年度のアンケート調査では、全国分娩数に対する補足率は36.5%、抗体検査補足率は40.2%であった。その結果、本邦における妊婦のH I V抗体検査実施率は全国平均で85.0%(平成13年度:82.6%、平成12年度:79.7%平成11年度:73.2%)であり、年々改善されていることが判明した。しかしながら、ブロッ

別に見ると、全国平均を上回っているのは、関東・甲信越ブロック、東海・北陸ブロックのみで、その他の北海道・東北ブロック、近畿ブロック、中国・四国ブロック、九州・沖縄ブロックでは平均に達していない。特に、中国・四国ブロックと九州・沖縄ブロックでは全国平均と比較して20～30ポイントの差が認められており、著明な地域差が依然として存在することが判明した。また、H I V抗体検査陽性妊婦は、30症例認められ、妊婦10万人に対して8.5人の割合でH I V陽性妊婦が認められることになる。ここ数年、H I V陽性妊婦の数に変動は認められないものの、今後、増加する可能性が示唆された。妊婦におけるH I V抗体検査実施率は、地域におけるH I V/A I D S患者数に関連しており、地域差が認められるのには、医療関係者や一般人の意識の強弱と関係が深いと思われる。また、地域（自治体等）より費用援助の認められるところでは、高い実施率が認められていることより、公的費用援助との関係も示唆される。これらのことより、今後、妊婦H I V抗体検査実施率を効率的に向上させるためには、地域におけるH I VやA I D Sに対する関心を高めるべく、医療関係者や一般人への情報提供や啓蒙活動を地道に続けることが重要である。その上、行政面からも費用援助が認められれば、さらに効果的であると思われる。

発表後、様々な質問を受けたが、概ね日本におけるH I V感染者数の少なさに多くの出席者が驚いていたようであった。H I V感染症の多発する東南アジアに属する国としては、世界の目には不思議に映るのかもしれない。H I V/A I D Sに関する情報は、今やインターネットを通じて瞬時にして全世界に発信され、多くの研究者や医療関係者が知ることになる。ただし、これらの情報のほとんどが基礎的・治験的研究データに限られ、それぞれの国や地域の実情に関する情報は極端に少ないと言える。今回の発表もH I V/A I D S医療に関する日本の実情がほとんど世界に発信されていないため、A S R Iから依頼があったものと思われる。

エイズを始め多くの疾患は、その国や地域の様々な状況によって同一疾患でもその管理方法は大きく異なるものである。幸いにして、日本は経済的にも恵まれ、情報を得ることも比較的容易である。しかしながら、我々はすばらしい環境を与えられているにもかかわらず、本邦特有の実情に関して情報発信が遅れているため、世界的に評価を受けると誤解される面が多々あるのは事実である。今後、基本的データのみならず、我が国独自の臨床データの情報発信に努めていかなければならないと思われる。この研究発表により、本邦におけるH I V母子感染の現状を世界へ向けて情報発信を行うと同時に、世界標準と対比し再評価を行ない、今後のエイズ対策事業、特に母子感染予防対策の一助としたいと考えている。

*厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究推進事業） H12.4～H14.3

「妊産婦のS T D及びH I V陽性率と妊婦のS T D及びH I Vの出生児に与える影響に関する研究」班
主任研究者：田中憲一（新潟大学医学部産婦人科教授）

分担研究課題：「H I V母子感染予防の臨床的研究」

分担責任研究者：戸谷良造（国立名古屋病院産婦人科医長）

CLOSE UP

クローズ・アップ

実験法

最新の ELISPOT 法

早川 智 李 静雅 鈴木 (唐崎) 美喜 梶田賢司 山本樹生 本多三男

はじめに

ELISPOT 法はプレート上に固相化された免疫細胞が産生する抗体分子やサイトカインを染色し、個々の細胞レベルで検出する技術である。本法は1984年 Tarkowski らにより自己抗体 (RF) 産生細胞の定量法として開発された¹⁾。発表後数年間はほとんど無視されていたが、'90年代半ばより免疫細胞が分泌するサイトカインの定量法として多くの報告がなされるようになった^{2)~5)}。血清や腹水、培養液中のサイトカインの定量には ELISA が最も一般的な技術である。しかし、サイトカインはきわめて少量でその活性があり、また不安定なことが多い。RNA レベルではノーザンブロットや RT-PCR によってスクリーニングできるが、mRNA レベルとタンパク質レベルが必ずしも相関しないことがある。サイトカインを個々の細胞のレベルで検出する技術としてはフローサイトメトリー (FCM) と ELISPOT がある。近年 momensin や brefeldin A により細胞内輸送を止めることにより FCM で細胞内サイトカインを測定する方法が開発された。phycoerythrin (PE) 抗体と fluorescein isothiocyanate (FITC) 抗体を組み合わせることにより IFN-

γ /IL-4 産生細胞 (Th1/Th2 細胞比) の定量など、複数のサイトカインを同時に測定できる点が ELISPOT より優れている [現在 ELISPOT の発色には DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride) が用いられているが、複数の抗体と発色剤の組み合わせにより免疫組織化学や FCM 同様に二重染色できる可能性がある]。しかし、染色法や FCM の設定に若干の熟練を要し、ELISPOT プレートのように検体の保存ができない。また FCM では、PMA や ionomycin など非特異的刺戟に対するサイトカイン産生を検出するが、ELISPOT 法ではプレート上に抗原をコートし IFN- γ や抗体産生を検出することにより特異的な免疫応答を検出できる。さらに異なったエピトープを有する一連の 20 mer ペプチド (64 種) をプレートにプロットして、IFN- γ 産生を指標に被検者 (被検動物) の T 細胞の反応性を検討する ELISPOT array が開発されている⁶⁾。

原理

ELISPOT 法の原理を図 1 に示す。あらかじめ抗体や抗原を 96 穴 ELISA プレートやニトロセルロース膜に固相化し、ここに測定する細胞を一定数まいてから

Recent advances and clinical application of ELISPOT assay

Satoshi Hayakawa^{1) 3)} /Jonga Li^{2) 3)} /Miki Suzuki-Karasaki¹⁾ /Kenji Sugita^{1) 3)} /Tatsuo Yamamoto¹⁾ /Mitsuo Honda³⁾ :
Department of Obstetrics Synecology, Nihon University School of Medicine¹⁾ /Nihon University School of Pharmacy²⁾ /AIDS
Research center, National Institute of Infections Diseases³⁾ (日本大学医学部産婦人科学教室¹⁾ /日本大学薬学部²⁾ /国立感染症研究所エイズ研究センター第1グループ³⁾) E-mail: satoshih@med.nihon-u.ac.jp