

D. 考 察

HIV 感染者において抗原特異的な T 細胞の動態を解析することにより、病態の診断ならびに予後の予測や治療的ワクチン投与前後の患者の免疫機能を評価するために重要な情報を得ることができる。臨床現場においては、その多くはペプチドを抗原としたエリスポット法であり、解析した T 細胞のそれ以上の詳細な情報は得られない。一方、ペプチド MHC 複合体による HIV 特異的な T 細胞の FACS 解析は、T 細胞の多くの表面抗原マーカーと組み合わせて多重染色ファックスに応用され、T 細胞の分化や活性化度の評価に役立っているが、使える抗原や HLA 型が限られているという欠点がある。本研究で作製した組換えレンチウイルスは、感染してゲノムに取り込まれさえすれば、細胞の HLA や抗原の種類を問わず生きたままその IFN- γ promoter 活性を測定できるという点で新しい診断評価方法として有用性は高い。この方法を用いれば、HIV に限らず、様々なウイルス感染に対する特異的な T 細胞の同定と分画が容易となり、更にワクチン抗原による抗原特異的 T 細胞の頻度や性状について *in vitro* の評価系としても利用と思われる。ただし、恐らく VSV のエンベロープを用いているために、意図する抗原特異的な反応以外の T 細胞活性化も誘導されるので、その点に注意しながら感度と特異性のバランスにおいて更に条件検討が必要である。

E. 結 論

種々の抗原刺激に反応する抗原特異的な T 細胞を HLA に制限されず幅広く解析するため、IFN- γ の promoter の下流に蛍光色素あるいは β -lactamase をつないで、T 細胞受容体刺激で誘導される IFN- γ promoter の活性を検出する組換えレンチウイルスベクターシステムを構築した。初期培養細胞でも増殖期にある T 細胞はいうまでもなく、組換えレンチウイルスはある程度活性化された T 細胞にも効率よく感染した。特に IFN- γ の promoter 制御下での β -lactamase の活性の測定は高感度であり、FACS を用いた多重染色解析にも応用可能である。従って、このシステムはワクチンやウイルス感染における抗原特異的な T 細胞の活性

化を IFN- γ promoter 活性測定により評価する新しい試みであり、更に最適化してその実用化を計りたい。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 横田 (恒次) 恭子 : HIV はどのように免疫系を破壊するのか? 特集 HIV と免疫、日本エイズ学会誌 7:171-179, 2005

2. 学会発表

1) Yamamoto T, Isogai M, Inoue J-I, Tsunetsugu-Yokota Y: Inhibition of HIV-1 replication in primary macrophage by a Nef-specific short hairpin RNA expressing lentivirus vector. Seventh International Congress on AIDS in Asia and the Pacific, Kobe, July, 2005.

2) 山本拓也、井上純一郎、横田 (恒次) 恭子 : HIV-1 nef 発現を抑制する shRNA 発現システムの構築とマクロファージにおける Nef の機能解析. 第 53 回日本ウイルス学会総会 (横浜) 平成 17 年 11 月

3) 横田 (恒次) 恭子、高木弘隆、山本拓也、大島正道、水谷哲也、森川茂 : VeroE6 における SARS-CoV の増殖とアポトーシスに関する解析. 第 53 回日本ウイルス学会総会 (横浜) 平成 17 年 11 月

4) Yamamoto T, Tachikawa-Kawana A, Iwamoto A, Autran B, Tsunetsugu-Yokota Y: Characterization of virus-specific T cell activation in human by a potent antigen-presenting activity of dendritic cells: an evaluation *in vitro* for the vaccine development. 第35回日本免疫学会 (横浜) 平成17年12月

H. 知的所有権の取得状況

なし

12. CTLによる防御免疫の評価系に関する研究

分担研究者 横幕 能行 国立病院機構名古屋医療センター内科

研究要旨 タイ流行株において、CTL epitope 領域のアミノ酸変異が CTL 認識に与える影響と感染者の臨床経過との関連を明らかにするため、タイ・ランパンコホートの 12 名の感染者の、複数の時点で採血された検体中の供与を受け、タイ流行株由来 gag-pol 発現 CTL 標的細胞作成用 construct 構築を試みた。テンプレートとして患者 PBMC から分離、調整したウイルスストックから抽出した RNA を用いることにより、従来の provirus を用いた場合よりも効率よく感染性を有するクローンを得る事ができた。今後、作成した約 20 クローンをを用いて標的細胞を作成、タイにおいて CTL assay を行い、新規を含む CTL epitope の評価が行われる予定である。

A. 研究目的

HIV-1 が細胞障害性 T リンパ球 (CTL) による防御免疫から逃避する機構を解析することは、CTL 誘導型ワクチンの抗原選定に重要な知見を与える。

我々は、新規 HIV-1 ベクターを用いた臨床検体由来 Gag 発現 CTL 標的細胞作成系を確立した。本法により作成した標的細胞を使用して CTL assay を行うことにより、HIV-1 の CTL 認識からの逃避機構としては、epitope 領域のアミノ酸変異によっておこる細胞内の抗原プロセッシングから細胞表面の HLA による抗原提示に至る過程の障害の頻度が高いことを示した。しかも、それらの変異がウイルスの複製に影響を与えず、逃避変異が蓄積していく可能性があることを明らかにした。また、CTL epitope の評価には、HIV-1 抗原を細胞内で実際の感染に近い状態で発現させることが重要であることを示した。

これまで、我々は HIV-1 Gag 中の CTL epitope である HLA-A*0201 拘束性 SLYNTVATL および A*2402 拘束性 KYKLVHIVW について詳細な検討を行ってきた。しかしながら、これまでの様々な知見の蓄積から、HLA-A*0201 拘束性 SLYNTVATL 特異的 CTL は慢性期に現れ、ウイルス複製の制御や予後の改善には寄与しないことが明らかになった。また、日本人で高頻度にみられる HLA-A*2402 拘束性 epitope である KYKLVHIVW では、感染初期に強い CTL 活性

が誘導されるが早期に逃避することや、日本の流行株では CTL 認識から逃避するアミノ酸変異が蓄積されていることが強く推測された。これらの理由から、これまで検討してきた二つの CTL epitope については、逃避変異がおこりにくく、ウイルス複製制御に寄与するといったワクチン抗原に求められる条件を満たしていないと考えられた。

そこで、有効な CTL 誘導型ワクチンに用いる epitope の検討のためには、新規 epitope の同定、さらに臨床経過に沿った解析により、epitope 領域のアミノ酸変異やそれがもたらす CTL 認識の変化が感染者の予後に与える影響をも解析する必要があると考えた。そこで、長崎大学熱帯医学研究所吉博士と共同で、(1) タイ流行株をサンプルとして使用、(2) 検索範囲をこれまでの Gag のみから Pol まで拡大して新規 CTL epitope を検索、(3) 臨床経過が明らかなタイ流行株感染者由来 Gag-Pol 発現標的細胞の作成、(4) CTL assay 実施、という計画を立て、研究を継続してきた。

本研究においては、未解析もしくは新規に同定された epitope の CTL assay による評価を詳細に行うため、タイ流行株由来 gag-pol 発現標的細胞パネルの作成を目標とし、効率よくタイ流行株由来 gag-pol をクローニングできるシステムを構築した。

これまでの結果から、クローニング手技は確立されたものの、我々の標的細胞作成システムには必須条件である感染性を有するクローン

が得られる効率が低いことが深刻な問題であった。そこで、今年度は、感染性を有するクローン確立の効率を向上させ、標的細胞パネルの充実を目指すこととした。

また、タイにおける新規 CTL epitope 検索領域として Gag が優先されることとなり、gag 発現標的細胞ライブラリーの充実も並行して行うこととなった。そこで、これまで gag-pol 全長をクローニングしたものから、gag 領域のみを既存の pCTLpac に簡易に移動し、標的細胞作成に使用できるシステムの構築を試みた。

B. 研究方法

1) 使用患者検体とテンプレート調整

タイのランパンディケアセンター通院中の HIV 感染者から得られた検体を使用した。CTL 活性とアミノ酸変異による CTL 認識からの逃避が臨床経過に与える影響を評価することも考慮し、臨床経過が明らかな 12 人を選択し、経過観察期間中の複数のポイントで得られた計 19 検体を使用した。

感染者 PBMC からウイルス分離を行い、得られたウイルスストックからウイルス RNA を抽出し、テンプレートとして使用した。

2) クローニングとインサート確認

RT-PCR 法により gag-pol 領域を増幅、Gateway system により我々が作成したプラスミドである pCTLpacGW (図 1-a) にクローニングした。制限酵素による確認に加え、クローニング領域両端と gag-pol 移行領域の 3 点で sequencing を行い、pCTLpacGW に gag-pol 領域がクローニングされたことを確認した。

3) 感染性の確認

その後、pCTLpacGW を VSV-G 発現プラスミド(pVSV-G)と 293-T 細胞に cotransfection することにより VSV pseudotype HIV-1 を作成。国立感染症研究所 異博士より 供与いただいた Hela4.5nEGFP を用いて、EBV transformed B cell (B-LCLs) を用いた標的細胞作成に十分な感染性を有するか確認した。これまでの clade B HIV-1 での検討から、25%以上の感染細胞が認められたものを陽性とし、標的細胞パネル作成用クローンとして選択した。

4) InFusion system を用いた gag の移動

制限酵素を利用して gag をクローニングす

るのに用いていたプラスミドである pCTLpac (図 1-d) を使用した。pCTLpac の gag 両端に作成した Sbf I および Not I で切断、gag 領域を欠失させることにより直鎖化した。クローニングされた gag-pol 領域を鋳型とし、直鎖化した pCTLpac の 5'、3'の両断端 13 塩基を付与するように設計されたプライマーを用いて、gag 領域を増幅した。直鎖化した pCTLpac と PCR 産物を Invitrogen 社の InFusion system の組換え用酵素と混合し室温で 30 分反応させ、大腸菌をトランスフォームすることによりクローニングした。

(倫理面への配慮) 用いたタイランパンコホートの臨床検体は有吉教授より提供された。採取施設においてインフォームドコンセントが得て採取されたもののみを使用した。

C. 研究結果

1) 有感染性 gag-pol クローン確立効率 (表)

1 検体から 2 から 6 クローンを確立。制限酵素による確認で、gag-pol 領域のクローニングが成功したと考えられた 90 検体については、さらに sequencing を行った。クローニング両端の塩基配列などに明らかな問題のない 74 検体を感染性確認実験に使用した。そのうち、51 検体について感染性の確認を行ったところ、11 検体 (19.6%) で再現性をもって陽性を示した。また、9 検体 (17.6%) で 10% から 25% の感染性を示した。

これまでに provirus をテンプレートとして作成した 135 の gag-pol クローンについても同様の確認作業を行い、感染性の再評価を行った。130 検体を対象に行ったところ、6 検体 (4.6%) で陽性、7 検体 (5.4%) で 10% から 25% の感染性を示した。

明らかにウイルスストックから増幅した gag-pol を用いた方が、効率よく感染性をゆうするクローンを得ることができた。

2) InFusion system による gag の移動 (図 2-b)

InFusion system を応用することにより、PCR 産物を制限酵素を用いることなく、直接 pCTLpac にクローニングが可能であった。Sbf I、Not I 以外の組み合わせを用いて、さまざまな長さの断片で試みたが、全長が長くなるほど効率が低下した。また、長さばかりではなく、

pCTLpac を直鎖状にするのに用いる制限酵素の組み合わせによっても、効率が異なる場合があった。また、*gag-pol* 全長をふくむ領域でも試みたが、非常に効率が低い、もしくは予期せぬプラスミドの欠失が高頻度におこった。すでに sequencing を行い、*gag* 領域には stop codon を有しないことが確認されている 5 検体について感染性を確認したが、いずれも陽性を示した。

D. 考 察

Gateway system によるクローニングを行うためには、両端に 25 塩基からなる attachment sequence を付与する必要がある。PCR の効率には影響を与えないとされているが、本研究においては、*gag-pol* の増幅は 3 段階で行い、attachment sequence を付与している。増幅効率の悪さから、当初、*gag-pol* の増幅のテンプレートとして、provirus を使用していた。その場合、インサートに問題がなかった 130 検体で再評価したが、陽性となったものは 6 検体(4.6%)であった。今回、実際に活発に複製をしているウイルスの RNA を鋳型として用いることにより、感染性を有するクローン分離の効率をあげることができるのではないかと考え試みた結果、約 20%のクローンが陽性であった。ウイルス分離の労力は大きく、分離中に変異が生じる可能性が有るなどの問題はあるが、provirus からのクローンとあわせて様々なアミノ酸配列パターンを有する計 17 クローンが得られた。残りのクローンについても感染性の有無の検索が進んでおり、最終的には約 20 クローンの標的細胞パネル作成ができる見込みである。タイにおける新規 Gag epitope 検索も進んでおり、今後、得られたクローンを用いて標的細胞を作成し、epitope の評価が行われる予定である。

Pol 中の epitope が病期進行阻止に関与する報告もみられるが、本研究で作成した標的細胞パネルにより、有力なワクチン抗原の候補が発見された場合、即座に CTL assay により Pol CTL epitope の細胞内発現時の評価が可能である。

また、今回、クローン確立の効率向上により、同一感染者の複数時点で採取された検体からそれぞれクローンを得ることができた。今後、日本国内の興味のある症例についても同様の

方法で臨床経過に沿って *gag-pol* のクローニングを行う予定である。

現在、タイで進行中のオーバーラッピングペプチドを用いた新規 CTL epitope 検索は、*gag* について実験が行われている。これまで *gag-pol* としては感染性を有しなかったクローン中にも、Gag 中の新規 CTL epitope 領域の可能性のある部分には興味のあるアミノ酸変異を含むものがある。今回、pCTLpac を用い、InFusion system を応用することで、Gateway system では必須であった attachment sequence の挿入等なしに、*gag* 領域を容易に移動できることがわかった。しかしながら、protease が一部 HXB2 とキメラになることなどから、Gag の processing への影響等について更に詳細な検討が必要である。

Gateway system では、BP, LR と称される 2 段階の反応を連続して一本のチューブ内で行うことが可能で、非常に簡便である。当初、subtype B 由来の *gag-pol* 使用時は問題は生じなかったが、タイ流行株を用いると高率にプラスミドの欠失が生じたことから、結局、2 段階反応を行ってクローニングを行わざるを得なくなった。2 段階反応を要する場合、特に 1 検体から複数のクローンを得ようとすると、労力が非常に大きくなる (図 2-a)。

InFusion system を用いて *gag-pol* 領域への応用も試みたが、プラスミドの欠失等が高頻度起こりクローニング効率も低かった。InFusion system によって *gag-pol* 領域のクローニングが可能になれば、Gateway system を用いる場合よりもはるかに容易になることから、現在、クローニング領域や制限酵素の組み合わせの変更等行い検討を重ねている。

E. 結 論

タイ流行株 Gag および Pol 中の CTL epitope 領域のアミノ酸変異が CTL 認識に与える影響を解析するための標的細胞パネルを作成した。現在約 20 クローンからなり、さらに様々な変異を有するクローンを作成し、充実をはかる予定である。タイにおいて作成された標的細胞を用いて CTL assay が行われる予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

本研究に直接関係のある発表はなし

H. 知的所有権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

1 3. 神経幹細胞を用いた HIV 感染動態の解明

分担研究者 中島 典子 国立感染症研究所染病理部

研究協力者 岩田奈織子 (国立感染研・感染病理)

研究要旨 神経・グリア細胞における HIV の感染動態を解明することを目的として HIV 脳症の動物モデルである SIV 脳症の病態をサル胎児脳前駆細胞 (BPC:brain progenitor cell) 由来の培養系およびマイクログリア培養系を用いて解析した。神経・グリア細胞からのみなる BPC 由来の培養系では神経向性な SIV17/E-Fr が、SIVmac239/316E と比較して高かった。一方 SIVmac239/316E はマイクログリア細胞培養系で SIV17/E-Fr と比較して非常に高い感染性を示した。SIV17SN は、SIVmac239/316E の env を SIV17/E-Fr の env (sphI/NheI) と組換えたウイルスであり、SIV1mac239/316E の tat を持つ。神経・グリア細胞培養系への感染性は SIV17/E-Fr と相違なかったが、マイクログリア細胞培養系への感染性は SIV17/E-Fr より高く、SIVmac239/316E よりも低かった。マイクログリア細胞では SIV 感染によりケモカインが誘導されることがわかった。また SIV が感染している神経・グリア細胞培養系に非感染のマイクログリア細胞を添加すると SIV17/E-Fr が感染していた場合はマイクログリア添加後まもなく培養上清中の SIVp27 抗原量が倍増した。SIVmac239/316E が感染していた場合は、マイクログリア添加後しばらくして培養上清中の SIVp27 抗原量が増加し始め、最終的には SIV17/E-Fr が感染していた場合よりも p27 抗原量が高くなった。神経・グリア細胞に感染していた微量なウイルスがマイクログリアに感染後増幅したと考えられた。神経・グリア細胞がウイルスのリザーバーとなっていることが示唆された。

A. 研究目的

HIV 脳症及び AIDS 痴呆は多剤併用療法 (HARRT) の導入後も発症しており、患者の QOL 低下の一因となっている。脳症の発症を予防するためには、その病態を解明しなくてはならない。HIV は脳内の細胞の中で、主にマイクログリア、マクروفージで増殖し、これらの感染細胞が分泌するサイトカインやケモカインが神経・グリア細胞に作用し HIV 脳症の病態を作り出していると考えられている。in vitro の培養系で脳症の病態を解析する際、ヒトの細胞を使用することは倫理上の制約があり困難である。また神経・グリア細胞向性の HIV クローンが明らかにされていないことなどから、本研究では HIV 脳症の動物モデルである SIV 脳症の病態をサル胎児脳前駆細胞由来の神経・グリア細胞培養系およびマイクログリア培養系を用いて解析することを試みている。本研究の本年度の目的は、神経・グリア細胞培養系およびマイクログリア細胞培養系、それぞれについて、

また両細胞間での SIV の感染動態を解析すること、さらにケモカイン等の産生を明らかにすることである。

B. 研究方法

1. サル胎児脳前駆細胞 (BPCs) 由来の培養系およびマイクログリア細胞培養系

在胎 8-11 週のカニクイザルの胎児脳を摘出後、細切し、2分の1を EGF (上皮増殖因子)、FGF-2 (線維芽細胞増殖因子) を含む無血清培地で培養し、BPCs を選択培養した (Neurosphere 法)。培地から増殖因子を取り除き、血清を添加し、増殖継代した BPCs を poly-O をコートしたプレートに接着することにより分化誘導した。細切した残りの2分の1の脳組織をナイロンメッシュに通した後、PBS 中で遠心 (1000rpm、5分) した。10%FBS/DMEM に再浮遊し、 7.5×10^6 cells/20ml で培養した。2週間後に浮遊してくる細胞を回収し、24 ウェルプレートにまき (2×10^5 cells/well)、2 時間後に

接着していない細胞を取り除き、MCSF(10 U/ml)添加10%FCS/DMEM中で培養した。

マイクログリア細胞として培養した細胞はCD68陽性細胞であることを免疫組織化学で確認した。

2. SIV17/E-Fr、SIV17SN、SIVmac239/316Eの感染

各SIV株のBPCs由来の神経・グリア細胞培養系およびマイクログリア細胞培養系における感染動態を解析するために、SIV p27抗原量で100ないし200 ng相当量感染させ、培養上清中のSIV p27抗原量の経時的な変化および細胞変性の有無の相違を比較した。すなわち、4日ごとに培養上清を回収保存し、PBSで1回洗った後、新しい培地に交換した。回収保存した上清中のSIV p27抗原量をELISA(COULTER SIV CORE ANTIGEN ASSAY)で測定し、経時的な変化を解析した。用いた3種類のSIV株(SIV17/E-Fr、SIV17SN、SIVmac239/316E)のbackboneはSIVmac239であり、envとtat領域が異なる(図1)。

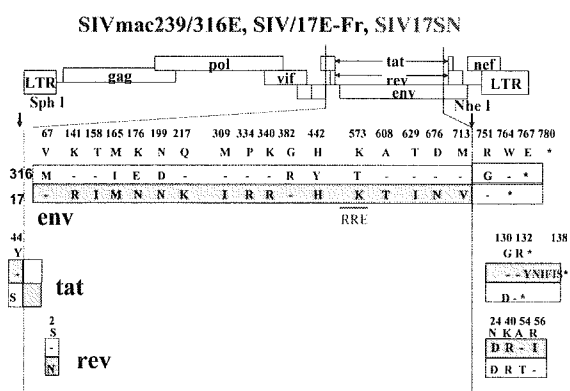


図1. SIV株のアミノ酸配列

3. SIV感染マイクログリア細胞に誘導されるケモカインの測定

SIV感染後3日目のマイクログリア細胞からRNAを抽出し逆転写反応によりcDNAにした。各ケモカインのプライマーを用いてPCRを行った。PCR産物を精製した後、TAクローニングによりスタンダードとするプラスミドを得た。スタンダード系列とともにcDNAサンプルの定量PCRをABI PRISM 7900 HT Sequence

Detection Systemにて行った(サンプル25 μl、45サイクル、95°C 15分、94°C 15秒、60°C 60秒)。得られたサンプルのDNAのコピー数を、GAPDHのコピー数を基準として標準化した。

SIV感染後の培養上清中のケモカインIP-10/CXCL10量とSIV p27抗原量を各々ELISA(Quantikine® Human IP-10 Immunoassay、Coulter SIV core antigen assay)で測定し、経時的な変化を解析した。

4. SIV感染神経・グリア細胞培養系へのマイクログリア添加

あらかじめSIV17/E-Fr、SIVmac239/316を感染させた神経・グリア細胞培養系に感染26日目にマイクログリアを添加した。添加あるなしでその後の培養上清中のp27量の変化を測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては、当研究所動物実験委員会の許可のもとに行った。

C. 研究結果

1. 神経・グリア細胞培養系におけるSIV感染

神経・グリア細胞培養系にSIV17/E-FrとSIVmac239/316をSIVp27量で100 ng相当感染させ、感染後、経時的に培養上清中のSIVp27抗原量を測定した。図2Aに示したように、神経・グリア培養系ではSIV17/E-Frの感染性がSIVmac239/316と比較して顕著に高いことが確認された。同様に神経・グリア細胞培養系におけるSIV17/E-FrとSIV17SNの感染性の違いを調べた。SIV17/E-FrとSIV17SNをSIVp27量で100 ng、200 ng相当感染させ、感染後、経時的に培養上清中のSIVp27抗原量を測定した。両者とも接種量にかかわらず、感染後3週間目から増殖しはじめた。はじめはSIV17SNの方が優位であったが、SIV17/E-Frは上昇し続け、最終的にp27量がSIV17SNよりも高値となった(図2B)。以上より神経・グリア細胞における感染性にenvが17型であることが重要であるといえる。

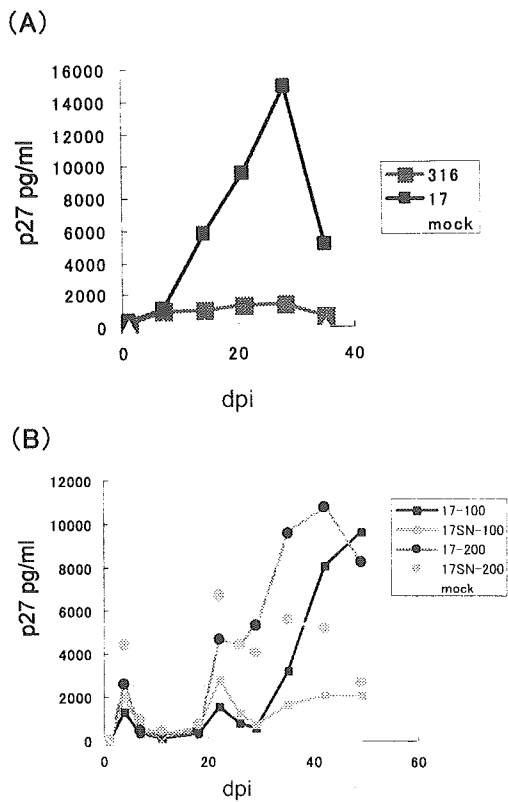


図 2. 神経・グリア細胞における SIV 感染
 (A) SIV17/E-Fr, SIVmac239/316 感染
 (接種量: 100 ng of SIV p27)
 (B) SIV17/E-Fr, SIV17SN 感染
 (接種量: 100 ng or 200 ng of SIV p27)

2. ミクログリア細胞培養系におけるSIV感染

ミクログリアへの感染性を 3 種の SIV で調べた。SIV17/E-Fr, SIV17SN, SIVmac239/316 を SIVp27 量で 100 ng 相当感染させ、感染後、経時的に培養上清中の SIVp27 抗原量を測定した。図 3A に示したように、感染性は SIVmac239/316, SIV17SN, SIV17/E-Fr の順に高かった。また、神経・グリア細胞への感染 (図 2A, B) と比較して培養上清中の p27 量は 30~100 倍にも達した。さらに SIV 感染によりミクログリア細胞に細胞変性が観察された (図 3B)。SIVmac239/316 感染時で 3 日後、SIV17SN 感染時で 8 日後、SIV17/E-Fr 感染時で 15 日後から変性像が観察された。SIVmac239/316 感染 19 日目には変性した細胞は消失し、細胞数が減少していた。SIV17/E-Fr 感染 19 日目の細胞を固定して SIVp27 抗原を免疫組織化学で蛍光染色したところ、Gag 蛋白が細胞質に検出された (図 3C)。

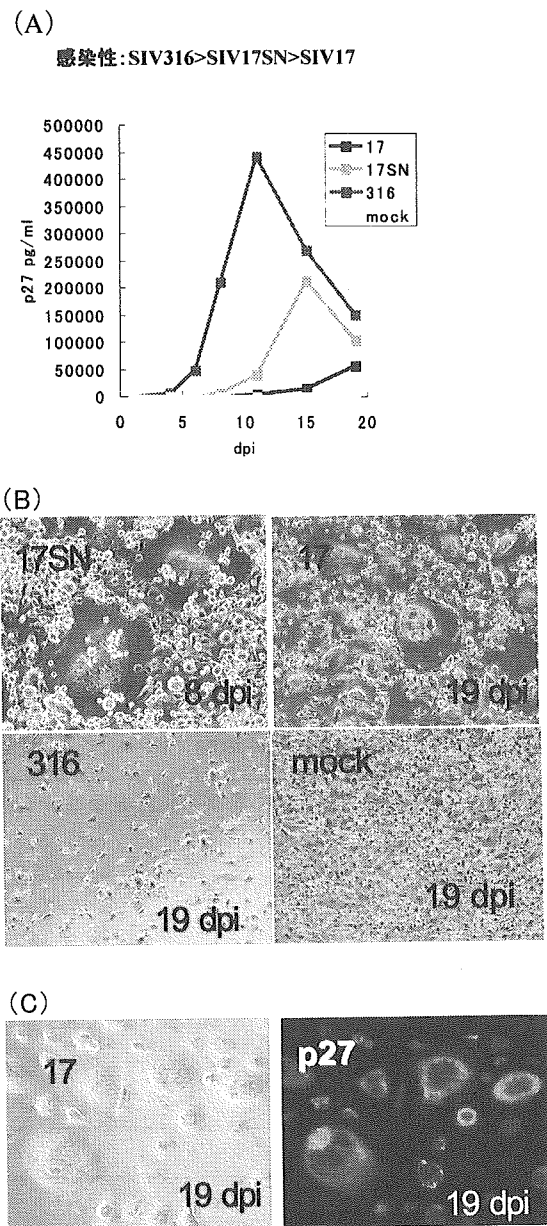


図 3. ミクログリアにおける SIV 感染
 (A) ミクログリアにおける各 SIV 株の増殖
 (B) SIV 感染によるミクログリア細胞の細胞変性像
 (C) SIV17 感染 19 日目の SIVp27 抗原の免疫組織化学

3. SIV 感染により誘導されるケモカイン

SIV 感染後 3 日目のミクログリア細胞中の β ケモカイン (MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, IL-10) の mRNA 量を定量 RT-PCR 法で測定した。横軸にケモカインを縦軸に非感染ミクログリア細胞と比較して何倍に増加しているかを示したものが図 4 である。SIV 感染により各 mRNA が誘導されたことがわかった。

SIV 感染ミクログリア上清中の

IP-10/CXCL10 と SIV p27 量の経時的変化を ELISA 法で測定した。図 5 に示したように、感染後 10 日間に SIVmac239/316、SIV17SN の感染で IP-10 が分泌されることが確認された。IP-10 は p27 量とほぼ連動しており、p27 よりも感染早期に上昇がみられる傾向があった。SIVmac239/316 感染で SIV17SN 感染の約 20 倍の SIVp27 抗原量が産生されたが、IP-10 は SIVmac239/316 感染で SIV17SN 感染の 1~1.5 倍の相違であった。

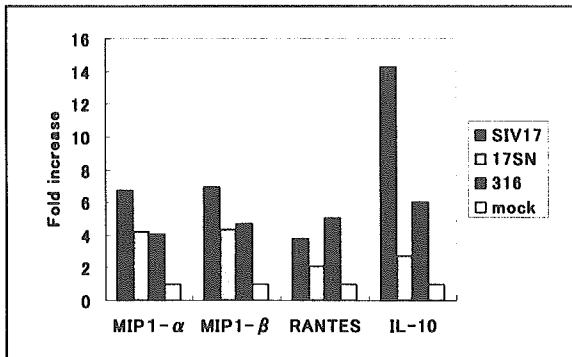
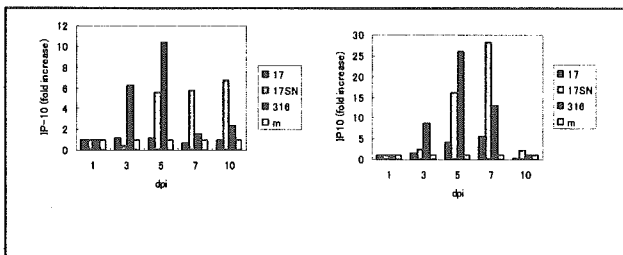
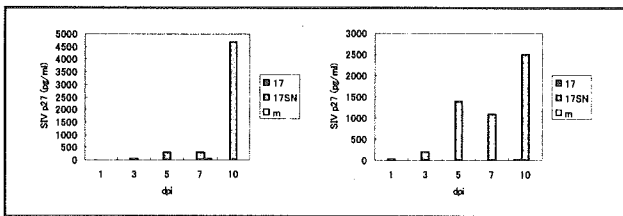


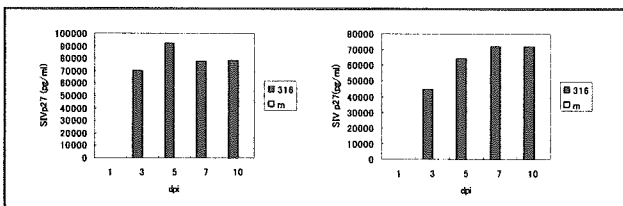
図 4. SIV 感染マイクログリアに誘導された β ケモカインの mRNA 量



IP-10 の経時的変化



SIV17SN 感染後 SIVp27 の経時的変化



SIVmac239/316E 感染後 SIVp27 の経時的変化

図 5. SIV 感染マイクログリア培養上清中の IP-10 および SIV p27 量の変化

4. SIV 感染神経・グリア細胞培養系へのマイクログリア添加

あらかじめ SIV17/E-Fr、SIVmac239/316 を感染させた神経・グリア細胞培養系に感染 26 日目にマイクログリアを添加した。添加あるなしでその後の培養上清中の p27 量の変化を測定した。図 6 に示すように SIV17/E-Fr を接種した神経・グリア細胞培養系ではマイクログリア添加後まもなく p27 量が再上昇しはじめた (添加後 21 日目に最高値)。神経・グリア細胞に感染性の低かった SIVmac239/316 はマイクログリア添加によつての SIV17/E-Fr の場合より遅れたが、添加後 41 日目に p27 値が最高値を示した。この値は SIV17/E-Fr の場合のおよそ 8 倍も高かった。

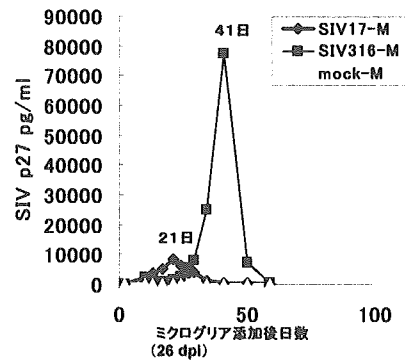


図 6. SIV 感染神経・グリア細胞培養系へのマイクログリア細胞添加による培養上清中の SIV p27 量の変化

D. 考 察

中枢神経系において、SIV は主にマクロファージ・マイクログリアで増殖し、これらの細胞が分泌するウイルス蛋白やサイトカイン・ケモカインが神経・グリア細胞にアポトーシスを誘導し、脳症を引き起こすと考えられている。剖検脳組織の神経・グリア細胞からは、ウイルス核酸が検出されるが、神経・グリア細胞にウイルスが感染することが脳症に必須であるかどうかについては明らかではない。我々はマクロファージ・マイクログリアが混在しない、神経・グリア細胞からのみなるサル胎仔 progenitor cells 由来神経・グリア細胞培養系を確立し、微量ながらある種の SIV 株が神経・グリア細胞で productive な感染をすることを示した。また、マイクログリア培養系での感染性はこの数十倍

にも及ぶことを示した。ミクログリア培養系では SIV 感染により細胞変性が観察された。また、種々のケモカインが誘導されていることが確認できた。今回測定したケモカインは SIV 脳炎サルや HIV 脳症患者の脊髄液や脳組織で値が高いという報告がすでにあり、我々の確立した *in vitro* 培養系でも確認できたといえる。SIV 感染により神経・グリア細胞に誘導されるケモカインの分析は今後の課題である。また、SIV 感染によりミクログリアに誘導されたケモカインがウイルスフリーの状態に神経・グリア細胞にどのような影響を及ぼすかについても解析しなくてはならない。脳症の病態の本態がサイトカインやケモカインであるならば、脳症を引き起こす引き金となる因子を決定することが重要であると考えられる。本研究では、神経・グリア細胞に潜伏感染あるいは *restricted infection* している SIV がミクログリアに感染し、増幅されるかどうか解析した。その結果、神経向性の弱い SIV 株でもマクロファージ向性が強ければ、ミクログリアに感染後、増幅されることがわかった。すなわち、生体内では隣接しているミクログリアや血管周囲マクロファージに神経・グリア細胞の微量な SIV が感染し、増幅産生されることが予測され、神経・グリア細胞がウイルスのリザーバーとなっている可能性が示唆された。神経・グリア細胞がウイルスのリザーバー、あるいは隠れ家になっていること以外にウイルスが神経・グリア細胞に感染することの意味はあるのだろうか。これには SIV 感染による神経・グリア細胞の機能障害等を評価する系を確立することが必要である。マクロファージ・ミクログリアが感染するだけで、神経・グリア細胞にはウイルスが感染しなくても神経・グリア細胞に同様な障害がおけるといわれているが、我々の培養系を用いて明らかにしたいと考えている。

E. 結論

SIV はミクログリア細胞以外に神経・グリア細胞培養系においても感染増殖することが明らかにされた。神経・グリア細胞培養系を神経細胞とグリア細胞にわけて解析していないため、神経細胞での動態については不明である。しかしながらマクロファージ・ミクログリア系

細胞が存在しない神経前駆細胞由来の培養系において SIV が微量ながら *productive* な感染をすることは確認できた。そして今年度の研究により、神経・グリア細胞に感染したウイルスがここに潜伏し、ミクログリア細胞と共培養することでミクログリアに *transfer* されることがわかった。すなわち、生体内で神経・グリア細胞がウイルスのリザーバーになりうることが示唆された。また、SIV 感染ミクログリアに MIP-1 α 、MIP-1 β 、RANTES、IL-10、IP-10 などのケモカインが誘導されることがわかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 中島典子、岩田奈織子、吉田洋明、佐多徹太郎：サル免疫不全ウイルス (SIV) の神経グリア細胞およびミクログリア細胞における感染動態. 第 53 回日本ウイルス学会(横浜)2005.11
- 2) 原正幸、中島典子、佐多徹太郎、向井鎌三郎：SRV/D の組織分布と感染源についての解析. 第 53 回日本ウイルス学会(横浜)2005.11

H. 知的所有権の出願・登録状況

特になし

1 4. 粘膜組織における CD8 α ⁺CD4⁺T細胞を介した HIV 感染拡大の可能性

分担研究者 高橋 秀実 日本医科大学微生物学免疫学教室 教授

研究要旨 粘膜内において樹状細胞群により捕捉・保持された HIV/SIV は、次なる標的である CD4 分子陽性 T 細胞群に伝播される。こうした CD4 陽性 T 細胞群としては、従来の CD4 陽性 T 細胞 (Single Positive T cells: SPT) のみならず、粘膜組織由来の CD8 α 分子を発現した CD4 陽性 T (double-positive T lymphocytes: DPT) 細胞や CD4 陽性 NKT 細胞などが相当し、その中で CXCR4 や CCR5 などのウイルス侵入門戸が存在する場合に HIV/SIV に感受性を有すると考えられる。我々は本研究において、Herpes Virus Saimiri (HVS) を用いてサル末梢血より、doubling time が酷似した SIVmac239 に対する感受性を有した CD4 陽性 SPT 細胞と CD8 α 分子を発現した DPT 細胞株数株を樹立することに成功した。これらの SIV 感受性 T 細胞株を用いて、ウイルスに対する感受性ならびに細胞内におけるウイルス複製能を細胞培養液中の p27 抗原及び逆転写酵素活性を指標として追跡したところ、SIV 感受性には殆ど差違を認めなかったものの、SPT 細胞に比べ DPT 細胞内においてウイルスの複製効率が亢進していること、そして複製開始時期が感染早期より開始されることが明らかとなり、これら DPT 細胞が感染の拡大に関与することが示唆された。以上の事実は、今後 HIV/SIV の治療を進める上で、粘膜組織内におけるウイルス感染 DPT 細胞を感染早期より制御することの重要性を強く示唆している。

A. 研究目的

これまでの分泌型 IgA を多量に含有し粘膜免疫を反映すると考えられる母乳中細胞の研究から、母乳中における HIV 感受性のある CD4 陽性細胞の大多数は DC-SIGN を発現した樹状細胞であり、樹状細胞が HIV を最初に捕捉する細胞群であることが判明した。またこうした樹状細胞は、HIV 感染に伴い Nef 蛋白の作用により HIV 関連ペプチド抗原を提示する個体特異的なクラス I MHC 分子のみならず、糖脂質抗原を提示する種特異的な CD1a 分子や CD1d 分子の発現が低下するため、HIV 感染樹状細胞は、クラス I MHC 分子拘束性キラー T 細胞のみならず NKT 細胞を含む CD1 分子拘束性の T 細胞群の監視からも逃れ、長期に亘り粘膜組織内で HIV を保持する可能性が判明した。また、こうした HIV 感染樹状細胞は自身が棲息する粘膜組織内において、これまで HIV の最大の標的と考えられてきた CD4 陽性 T 細胞のみならず、粘膜組織内に局在する CD4 陽性 NKT 細胞あるいは CD8 α 分子を発現した CD4 陽性 T

(double-positive T lymphocytes: DPT) 細胞にも感染する可能性がある。今回サルにおいて末梢血中の 2-5% がこうした DPT 細胞であることに着目し、これら CD8 α 分子陽性粘膜由来 DPT 細胞の SIV 感受性ならびにウイルス増殖性を、末梢血中の CD4 陽性 T (single-positive T lymphocytes: SPT) 細胞と比較検討し、粘膜免疫システム内での感染拡大のメカニズムを探った。

B. 研究方法

総計 4 頭のアカゲザル末梢血より単核球を分離採取し、10 μ g/ml の PHA で 3 日間培養後 Herpes Virus Saimiri (C-488 株) を添加しそのまま 6-8 週間培養を続け不死化した T 細胞ラインを得た。そのラインより CD4 陽性 T 細胞株を分離し、さらに限界希釈法を用いて CD8 α 分子陽性 DPT 細胞クローンと CD4 陽性 SPT 細胞クローンを樹立した。そのクローン群より発育増殖程度がほぼ同程度の細胞株を用いて実験を進めた。これら細胞株にケモカインレセプ

ターならびに Bob 及び Bonzo の発現を確認した後、SIVmac239 株を感染させ、P27 抗原の産生と逆転写酵素活性を指標として細胞内におけるウイルスの増殖量ならびに増殖開始時間などを比較検討した。また、感染に伴い DPT と SPT のどちらの細胞群が死滅しやすいかを培養後の生存細胞数を指標として追跡した。

C. 研究結果

1) HVS で transform した T 細胞ラインより、限界希釈法を用いて図 1 に示すような同程度の増殖能を有する 4 個の細胞株 CD8 α 分子陽性 DPT 細胞クローン (135-1, 136-1) と CD4 陽性 SPT 細胞クローン (133, 135-1-3) を樹立した。

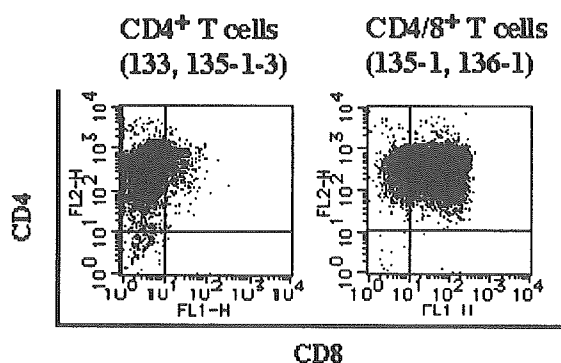


図1. HVS により樹立した T 細胞株

2) これらの細胞株の表面には全て CD4 分子とともにウイルスの侵入門戸であるケモカインレセプター CXCR4 と CCR5 が発現しており、同時にサル特有のケモカインレセプターである Bob と Bonzo の mRNA が細胞内に検出されたが、それぞれの発現量はほぼ同程度であり、細胞間による差は認めなかった (図 2A)。そこで、これらの樹立株に SIVmac239 を moi 1 で 2 時間感染させ、p27Core 抗原量を追跡したところ、陽性コントロール (C8166) よりは低いものの DPT と SPT 細胞との間に侵入効率の差は認めなかった。

3) 次に、細胞内におけるウイルスの複製効率の差を検討する目的で、SIVmac239 を感染させ (moi 0.05 あるいは 0.5)、4 日間培養した上清中の p27 抗原量と逆転写酵素活性を比較検討したところ、培養上清中のウイルス量は DPT 細胞の方が SPT 細胞に比べ圧倒的に放出量の多いことが観察された (図 3)。またこの

ことは、細胞内におけるウイルス由来の Nef 遺伝子発現量を半定量的 PCR 法を用いても確認された (図 4)。以上の実験結果より、SIVmac239 は感染後 SPT 細胞に比較し DPT 細胞の方で効率的に複製することが判明した。

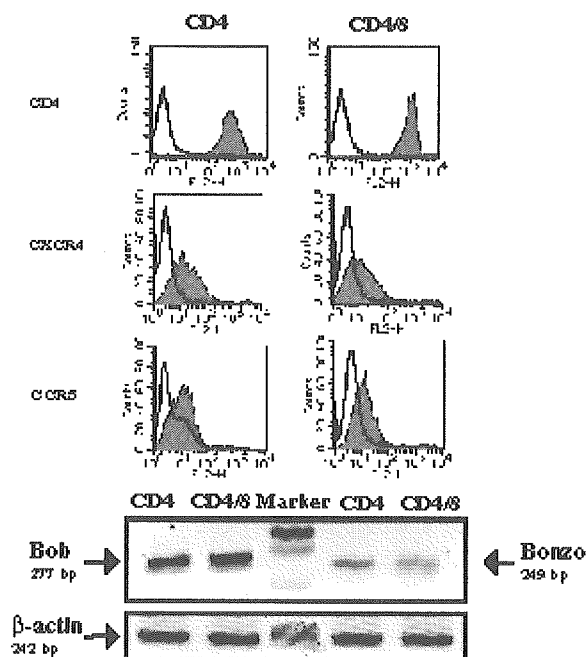


図2. 樹立 T 細胞株表面の CD4 及びケモカインレセプターの発現

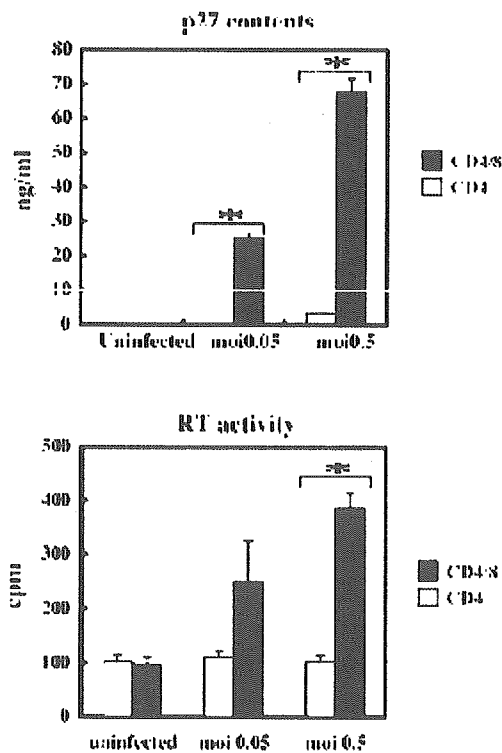


図3. 感染 T 細胞培養上清中のウイルス量及び逆転写酵素活性

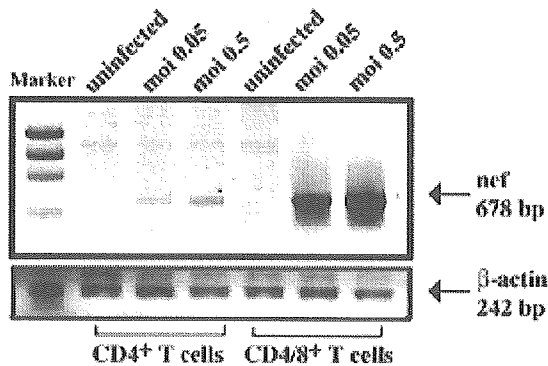


図4. 感染T細胞内における細胞内のウイルス由来 Nef 遺伝子発現量

4) 上記の結果に基づき、感染後ウイルス由来の逆転写産物の出現時期を R/U5 領域の発現を指標として経時的に追跡したところ、SPT 細胞に比較し DPT 細胞内でより早期から逆転写産物が検出された (図 5)。このことは、ウイルス複製開始時期が DPT 細胞内の方が早く、その結果ウイルス全体の複製時期が早いなることを示している。

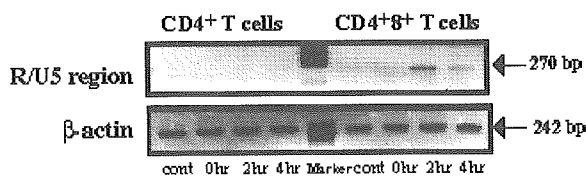


図5. 感染T細胞内における細胞内の逆転写産物発現時期

5) 最後に、感染後の生細胞数を比較検討したところ、SPT 細胞に比較し DPT 細胞の方がウイルス感染に伴い死滅しやすいことが判明した (図 6)。このことは、ウイルス感染に伴い CD4 陽性 T 細胞の元である DPT 細胞の枯渇が惹起されやすいことを示唆しており、この DPT 細胞の枯渇が末梢における CD4 陽性 T 細胞数減少の一因であることを物語っている。

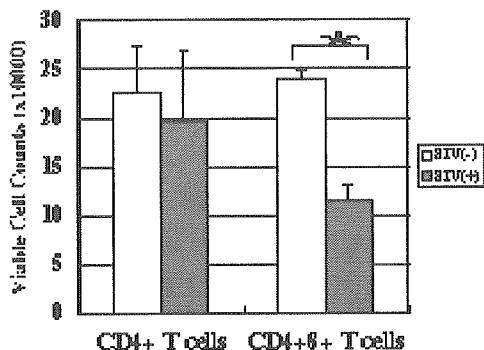


図6. 感染T細胞の残存細胞数の比較

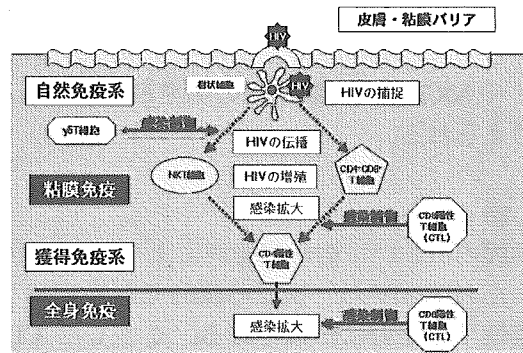


図7. HIV の粘膜組織における感染拡大のメカニズム (高橋 仮説)

D. 考 察

以上の結果より、外界から粘膜内に侵入した HIV/SIV は、図 7 に示したように、まず樹状細胞群に捕捉された後粘膜内に局在する CD4 陽性 T 細胞群に感染するものと推測される。こうした CD4 陽性 T 細胞群としては、従来のヘルパー T 細胞としての機能を有する CD4 陽性 T 細胞 (SPT) の他に、その前駆細胞である DPT 細胞ならびに樹状細胞と同様自然免疫系に属する NKT 細胞が存在する。今回の実験により、SPT 細胞に比べ DPT 細胞内においてウイルスの複製効率が高いことが判明したが、粘膜においては感染初期において DPT 細胞の比率が高いことから、この DPT 細胞が感染拡大に関与する可能性が考えられる。従って今後は、感染早期における DPT 細胞内でのウイルス複製抑制法を開発することが、新たな治療方策を提示するものと推測される。そして、このことにより DPT 細胞数の減少を抑制することで、感染防御実行部隊である末梢血中のヘルパー T 細胞も増加するものと推察される。また、preliminary な実験では後者の NKT 細胞においても HIV/SIV の複製が亢進しており、感染 NKT 細胞による感染拡大が誘発されることを観察している。粘膜組織内における HIV/SIV 感染 DPT 細胞あるいは NKT 細胞が感染拡大の鍵を握るならば、今後は粘膜組織におけるウイルスの感染拡大を制御するため、従来のように CTL の標的である感染 CD4 陽性 SPT 細胞のみを標的とするのではなく、ウイルス感染 DPT や NKT 細胞、樹状細胞を制御するような方策をワクチン開発も含め検討することが重要であろう。そのためには、クラス I MHC 分子のみ

ならず CD1 分子を発現した感染樹状細胞を制御するような免疫賦活法を開発するとともに、DPT や NKT 細胞の制御法の開発が急務であると考えられる。

E. 結論

粘膜内において樹状細胞群により捕捉・保持された HIV/SIV は、次なる標的である CD4 分子陽性 T 細胞群に伝播される。こうした CD4 陽性 T 細胞群には全て CXCR4 や CCR5 などのウイルス侵入門戸が存在するため、従来の CD4 陽性 SPT 細胞のみならず、DPT 細胞や CD4 陽性 NKT 細胞が感染の標的となる。今回、SPT 細胞と DPT 細胞の HIV/SIV 感受性には殆ど差違を認めなかったものの、DPT 細胞内においてウイルスの複製効率が亢進していることが明らかとなり、この DPT 細胞が感染の拡大に関与することが示唆された。以上の事実は、粘膜組織内における感染 DPT 細胞制御法開発の重要性を強く物語っている。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Satomi M, Shimizu M, Shinya E, Watari E, Owaki A, Hidaka C, Ichikawa M, Takeshita T, Takahashi H: Transmission of macrophage-tropic HIV-1 by breast milk macrophages via DC-SIGN. *J Infect Dis* 2005, 191:174-181.
- 2) Saito N, Takahashi M, Akahata W, Ido E, Hidaka C, Ibuki K, Miura T, Hayamai M, Takahashi H: Analysis of evolutionary conservation in CD1d molecules among primates. *Tissue Antigens* 2005, 66:674-682.
- 3) Takahashi M, Ido E, Uesaka H, Fukushima T, Ibuki K, Miura T, Hayami H, Takahashi H: Comparison of susceptibility to SIVmac239 infection between CD4⁺ and CD4⁺8⁺ T cells. *Arch Virol* 2005, 150:1517-1528.
- 4) Enomoto Y, Sugita M, Matsunaga I, Naka T, Sato A, Kawashima T, Shimizu K, Takahashi H, Norose Y, Yano I: Temperature-dependent biosynthesis of glucose monomycolate and its recognition by CD1-restricted T cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005, 337:452-456.
- 5) 高橋秀実: 自然免疫と獲得免疫の基礎: 樹状細胞を介したウイルス特異的キラー T 細胞の誘導. *最新医学* 60:556-565, 2005.
- 6) 高橋秀実: HIV/AIDS の病態進行とワクチン開発の進歩. *日本エイズ学会誌* 7:83-92, 2005.
- 7) 高橋秀実: 腸管における innate immunity. *無菌生物* 35:21-25, 2005.
- 8) 高橋秀実: 自然免疫システムと HIV. *日本エイズ学会誌* 7:556-565, 2005.
- 9) 高橋秀実: 癌の免疫療法: 丸山ワクチンの作用機序に関する一考察. *日本医科大学医学会誌* 2:1-2, 2006.
- 10) 高橋秀実: 免疫システムの新たな実態: 基本免疫と獲得免疫. *日本感染症学会雑誌* 2006. (印刷中)

2. 学会発表

- 1) 高橋秀実: 新たなる未病への挑戦 - 現代免疫学的視点からみた疾病の本態に関する洞察. 第 11 回日本未病システム学会総会 (大宮) 2005 年 1 月
- 2) 高橋秀実: 腸管における innate immunity. 第 38 回日本無菌生物ノートバイオロジー学会総会 (大阪) 2005 年 1 月
- 3) 高橋秀実: 免疫学の最新情報: 新たな医学をめざして. 平成 16 年度自己治癒力研究会総会 (東京) 2005 年 2 月
- 4) 高橋秀実: 粘膜免疫とアレルギー. 第 16 回多摩小児アレルギー臨床懇話会 (多摩) 2005 年 3 月
- 5) 高橋秀実: 免疫システムの新たな実態: 基本免疫と獲得免疫. 第 79 回日本感染症学会総会 (名古屋) 2005 年 4 月
- 6) 高橋秀実: 脂質と粘膜免疫. 第 12 回関東 Lipid Artery 研究会 (東京) 2005 年 5 月
- 7) Takahashi, H: Fetal-maternal transmission of macrophage-tropic HIV-1 by breast milk macrophages via DC-SIGN. 7th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific. July, 2005, Kobe, Japan.
- 8) Norose, Y., Owaki, a., Shinya, E., Kumagai, Y., Takahashi, H.: Effective application of RAPD method to DNA typing analysis of *Pseudomonas aeruginosa*. 第 73 回日本医科大学医学会総会 (東京) 2005 年 9 月

- 9) 高橋秀実: 癌の免疫療法・丸山ワクチンの作用機序に関する一考察. 日本NPO丸山ワクチンと癌を考える会シンポジウム(東京) 2005年9月
- 10) 高橋めぐみ、高橋秀実: SIV感染に対するCD4陽性T細胞とCD4/8陽性T細胞の感受性の相違. 文科省特定領域研究「サルを用いた感染症研究」の現状と今後を考える会議(京都) 2005年9月
- 11) 高橋秀実: 霊長類におけるCD1d分子の保存性とSIV/HIV感受性. 文科省特定領域研究「サルを用いた感染症研究」の現状と今後を考える会議(京都) 2005年9月
- 12) 飯泉 匡、山西慎吾、清水真澄、渡邊恵理、長田久美子、熊谷善博、高橋秀実: *Helicobacter pylori* 由来 urease の酵素活性を増強させる特異的抗体. 第47回日本消化器病学会大会(神戸) 2005年10月
- 13) Takahashi H: Endogenously expressed HIV-1 nef down-regulates not only class I MHC but also CD1a molecules: A new target for vaccine development. Japan-US Cooperative Medical Science Program: The 18th Joint Scientific Meeting of AIDS. Hanoi, Vietnam, November, 2005.
- 14) Takahashi H: Fetal-maternal transmission of macrophage-tropic HIV-1 captured by breast milk macrophages. The 17th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim. November, 2005 (Hanoi, Vietnam).
- 15) 高橋秀実、里見操緒、清水真澄、新谷英滋、渡理英二、大脇敦子、日高千鶴乃、市川雅男、竹下俊行: 母乳中マクロファージを介したレトロウイルスの感染伝播のメカニズム: R5-type HIV-1 をモデルとして. 第53回日本ウイルス学会総会(横浜) 2005年11月
- 16) 高橋めぐみ、渡理英二、新谷英滋、高橋秀実: 麻疹ウイルス変異株の持続感染に関与する宿主因子. 第53回日本ウイルス学会総会(横浜) 2005年11月
- 17) 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違. (熊本) 第19回日本エイズ学会総会 2005年12月
- 18) 里見操緒、清水真澄、新谷英滋、渡理英二、大脇敦子、八木幸恵、渡邊嘉之、日高千鶴乃、市川雅男、竹下俊行、高橋秀実: 初乳中マクロファージ上の DC-SIGN を介した HIV-1 感染伝播の可能性. 第19回日本エイズ学会総会(熊本) 2005年12月
- 19) 新谷英滋、大脇敦子、清水真澄、渡邊恵理、小宮暢子、日高千鶴乃、高橋秀実: HIV-1 Nef down-regulates surface expression of CD1a molecules in immature dendritic cells: analysis of interaction between CD1a cytoplasmic tail and HIV-1 Nef. 第19回日本エイズ学会総会(熊本) 2005年12月
- 20) 日高千鶴乃、渡邊恵理、清水真澄、山西慎吾、里見操緒、樋口智江、高橋めぐみ、新谷英滋、高橋秀実: Th2 優位の環境下における NKT 細胞を介した X4-type HIV-1 の感染拡大. 第19回日本エイズ学会総会(熊本) 2005年12月
- 21) 中川洋子、菊地浩人、樋口智江、清水真澄、高橋秀実: HIV 外被糖蛋白 gp160 に特異的な細胞傷害性 T 細胞の認識特異性に関する研究(2). 第35回日本免疫学会総会(横浜) 2005年12月
- 22) 山西慎吾、飯泉 匡、渡邊恵理、清水真澄、渡邊嘉之、樋口智江、野呂瀬嘉彦、熊谷善博、高橋秀実: ピロリ菌ウレアーゼによる B 細胞活性化作用. 第35回日本免疫学会総会(横浜) 2005年12月
- 23) 渡理英二、渡邊恵理、清水真澄、小宮暢子、中川洋子、高橋秀実: 高感度 Granzyme B 活性測定法によるインフルエンザウイルス抗原特異的 CTL 応答の解析. 第35回日本免疫学会総会(横浜) 2005年12月
- 24) Shinya E, Owaki A, Shimizu M, Watanabe E, Yamanishi S, Satomi M, Hidaka C, Watari E, Takahashi H: HIV-1 Nef down-regulates the surface expression of CD1a molecules as well as class I MHC in immature dendritic cells. 第35回日本免疫学会総会(横浜) 2005年12月
- 25) Kumagai Y, Iizumi T, Yamanishi S, Nagata K, Kamiya S, Hirota K, Watanabe E, Sakamoto C,

- Takahashi H: Augmentation of *Helicobacter pylori* urease activity by its specific IgG antibody: implications for bacterial colonization enhancement.第35回日本免疫学会総会(横浜)2005年12月
- 26) Takahashi H, Satomi M, Shimizu M, Shinya E, Watari E, Owaki A, Hidaka C, Yagi Y, Ichikawa M, Takeshita T: Transmission of macrophage-tropic HIV-1 by breast milk macrophages via DC-SIGN.第35回日本免疫学会総会(横浜)2005年12月
- 27) 若林あや子、中川洋子、清水真澄、西山康祐、守屋慶一、高橋秀実: 経口免疫による腫瘍抑制のメカニズム: *ex vivo* における特異的 CTL の動態解析. 第35回日本免疫学会総会(横浜)2005年12月
- 28) 高橋秀実: 漢方薬でエイズウイルスの持続感染は制御できるか. 第5回東京大学実践漢方セミナー(東京)2005年12月
- 29) 園部一成、野呂瀬嘉彦、高橋秀実: RAPD法を用いた最近 DNA 型別解析と使用プライマーに関する検討.第17回日本臨床微生物学会総会(横浜)2006年1月

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。