

研究課題：HIV の感染予防に関する研究

課題番号：H18-エイズ一般-005

主任研究者：山本 直樹（国立感染症研究所エイズ研究センター センター長）

分担研究者：俣野 哲朗（東京大学医科学研究所 教授）、志田 壽利（北海道大学遺伝子病制御研究所 感染病態分野 教授）、庄司 省三（熊本大学医学薬学研究部 薬学生化学分野 教授）、玉村 啓和（東京医科歯科大学生体材料工学研究所 機能分子部門分子認識分野 教授）、森 一泰（国立感染症研究所エイズ研究センター 主任研究官）、三浦 智行（京都大学ウイルス研究所 感染症モデル研究センター 准教授）、保富 康宏（医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター センター長）、石川 晃一（国立感染症研究所エイズ研究センター 主任研究官）、高橋 秀実（日本医科大学 微生物学免疫学教室 教授）、網 康至（国立感染症研究所動物管理室 主任研究官）

1. 研究目的

HIV感染は依然、拡大を続けており、2010年頃には全世界でHIV感染者の数は8000万人にもものぼると推定されている。このような社会的情勢の中、包括的なエイズ対策において、エイズワクチンの開発は根本的な解決法であり、不可欠である。本研究では、細胞性免疫とともに液性免疫を志向した特異的免疫、さらには自然免疫の概念まで加え、ワクチンによる包括的なHIV感染予防の道を探ることを目的とする。

2. 研究方法

(1) プライムブースト MHC haplotype 90-120-Ia を有するサルに SIVmac239 Gag を主抗原とする DNA/SeV ワクチンを接種した。SIVsmE543 チャレンジ実験では、強い SIVmac239 複製抑制能を有するワクチン誘導 Gag206-216 特異的 CTL の SIVsmE543 に対する反応を調べた。また、Gag206-216 特異的 CTL 等の複数の CTL からのエスケープ変異を含む5つの gag 変異を有する SIVmac239 のチャレンジ実験を行った（俣野）。BCG/DIs および BCG/Ad のワクチン安全性の確認と免疫原性の持続性についてマウスとラットを用いて検討を行った（山本・網）。(2) ベクター開発 新しく開発した *in vitro* ligation による効率的な組換えウイルス作製法を用いて SIV の Gag を発現する m8Δリコンビナントを作製して、ELISPOT 法等により免疫原性をマウスで調べた。また、CD40L 発現ワクシニア (DNA ワクチン) を同時に接種して免疫増強効果を調べた。（志田）。(3) 免疫原デザイン M 細胞 target 分子 (TGDK)、サル CCR5 の undecapeptidyl arch (UPA) 環状抗原、およびアジュバンド分子 CpG-ODN (TLR-9 ligand) をポリエチレングリコール (PEG) 誘導体に共有結合させた multiple antigen を創製した。さらに furin 抵抗性変異導入型組換 gp140 (SIVmac293 由来) を Vero 細胞発現系より調製し、それを multiple antigen に結合させた抗原分子 (Senju vaccine) を創出した。この Senju vaccine の免疫原性の確認を行うためアカゲザル(♀)鼠頸部皮下に注射し、血清、糞便、および膺分泌液中の抗体価をモニターした(庄司)。gp41 の合成ペプチド断片の三量体を人工テンプレート上に構築した分子、コレセプター CXCR4、CCR5 の細胞外ループのみを合成し人工レセプター上に構築した分子、さらに、gp120 の中和抗体のエピトープ領域を環状化した分子を作製し、抗体誘導を検討した。また、小分子の CD4 ミミックを合成し、抗 V3 抗体との併用を試みた(玉村)。(4) 弱毒生ワクチン Δ5G ウイルスの低病原性を決定する 5 カ所の N 結合糖鎖の欠失についてウイルス学的性質の解析に結果から新たに 3 種の糖鎖修飾変異ウイルス Δ3G, Δ5Gver1, Δ5Gver2 を作成した。これらの変異ウイルスの培養細胞での性質、感染ザルでのウイルス感染・増殖での性質、生ワクチンとしての性質の解析を行った(森)。nef 欠失 SHIV 弱毒生ワクチン接種後、早期

に強毒ウイルスを攻撃接種する実験系において、ウイルス動態と免疫細胞動態を経時的に詳細に解析した(三浦)。

(5) アジュバント 抗酸菌 Ag85B : GMP レベルへの生産に成功したリコンビナント Ag85B 蛋白をアジュバントとしリコンビナントエイズ蛋白におけるワクチンのアジュバント効果を検討した。また、Ag85B アジュバントの BCG 感作による影響も検討した(保富)。各種アジュバントおよび DDS 候補と HIV タンパクおよび DNA 発現プラスミッドの組み合わせによりマウス (Balb/c, pIgR KO) に経鼻接種、経肺接種を行い抗体誘導能を検討した。誘導された抗体を用いて HIV の中和活性を各種 HIV-1 サブタイプを用いて測定した。効果が認められたアジュバントおよび DDS 候補の詳細な解析を行い、より持続効果が認められる方法をマウスで確立する。SHIV 等を用いた攻撃接種実験により、アジュバントおよび DDS 候補の効果確認を行う(石川)。(6) 自然免疫 経口免疫法などによる CTL の粘膜内活性化法を追跡するとともに、HIV 感染樹状細胞及び NKT 細胞株を樹立し、それらの制御能を CTL のみならず $\gamma\delta$ T 細胞および CD8 陽性 NKT 細胞をも含めて検討した(高橋)。

(倫理面への配慮)

人材料の取り扱いに関しては、各研究施設の倫理委員会における指針をもとに研究を行う。動物実験は、各施設の諸内規や作業方式に従って、動物愛護の精神で動物に与える苦痛の軽減と排除に勤める。

3. 研究結果

90-120-Ia 陽性ワクチン接種サルへの SIVsmE543 チャレンジ実験では、エピトープ内でなくエピトープ外の変異により、ワクチン誘導 Gag206-216 特異的 CTL が SIVsmE543 に反応しなくなることが判明した。一方、5つの gag 変異を有する SIV チャレンジ実験では、SIV 複製は制御されなかった(俣野)。BCG, DIs, Ad5 に gp140, gp145 を挿入し、中和抗体誘導能などについて引き続き検討した。BCG における異種抗原の発現の改善が見られたほか、ベクターの種類により異なる TCR を持つ CTL が誘導されることがわかった(山本・網)。作成した m8Δ-gag は *in vitro* で効率よく gag 蛋白を発現し、マウスに Gag specific な INF- γ 産生細胞を誘導した。CD40L に免疫増強効果を認めなかった(志田)。TGDK, UPA, CpG-ODN, および gp140 抗原を含む Senju vaccine を創製した。この Senju vaccine の免疫原性の確認をアカゲザル(♀)にて行った結果、接種部位近傍の鼠頸リンパ節の腫脹が観察され、さらに gp140 および UPA に対する抗体の誘導が確認された。また得られた抗血清は SIVmac239 の感染を阻害することが確認された(庄司)。人工テンプレートと gp41 の断片をすでに合成し、三量体を構築中である。単量体を MAP に導入した抗原分子は、実際マウスで免疫し gp41 を認識する抗体が誘導できていることを ELISA で確認した。また、CXCR4, CCR5

の細胞外ループを合成し、テンプレートへ導入中である。また、gp120のエピトープ提示のための環状ペプチドを合成し、マウスで抗体誘導を調べている。さらに、この抗原分子に特異的に結合する抗体を得るため、ファージディスプレイライブラリーから *in vitro* アフィニティー選択を行っている。数種の CD4 ミミックを合成し、抗 V3 抗体の認識を増強させることを確認した (玉村)。新たに作製した糖鎖修飾欠変異ウイルスは中和抗体感受性、細胞指向性の性質が異なる。Δ3G (糖鎖がΔ5G と比べ 2 カ所多いが性質はΔ5G と同じ)、Δ5Gver1 と Δ5Gver2 は共に T 細胞指向性で Δ5G はマクロファージ指向性、Δ5Gver1 中和抗体抵抗性 (SIV239 と同様)、Δ5Gver2 中和抗体感受性 (Δ5G と同様)、しかし感染実験では 3 種類の変異ウイルスは Δ5G と同様のウイルス増殖性と生ワクチンの性質を示した (森)。SHIV の nef 欠失部位に RANTES を組込むことにより、SHIV 特異的な二次免疫応答が増幅されることを明らかにした。(三浦)。Ag85B リコンビナント蛋白によりリコンビナント HIV ワクチンにおいて細胞性面希誘導が期待できるアジュバント効果が認められた (保富)。OVA を用いた経鼻免疫においてキトサン微粒子およびカチオン化キトサンにコレラ毒素を上回る免疫誘導効果を確認した。さらに HIV-1env タンパクを使用した場合においても同様な結果を確認した。さらにカニクイサルを用いた経鼻免疫においてもアジュバント活性を確認した (石川)。経口免疫法による粘膜内 CTL の誘導法を確率するとともに、HIV 感染樹状細胞制御への関与が想定される CD1a 拘束性 CD8+T 細胞株及び、CD1d 拘束性 NKT 細胞株を樹立出来た (高橋)。

4. 考察

とくに HIV の易変異性とウイルス間の高いリコンビネーションの確率から、エイズワクチンの実現にはすくなくならぬ困難が待ち構えている。ただ分担研究者の個々のプロジェクトはそれぞれユニークなものであり、今後のワクチン開発にとって、貴重な研究資料となるであろう。

5. 自己評価

1) 達成度について

多様な HIV に対する CTL 誘導ワクチンの効果を考える際、CTL エピトープ配列だけでなく、エピトープ近傍のアミノ酸配列にも注意を払う必要があることが確認でき、ワクチン実用化の際の重要な知見が得られた。一方、変異 SIV チャレンジ実験結果は、ワクチン誘導 Gag 特異的 CTL の SIV 複製制御効果の確証に結びつく可能性がある点で学術的に重要な知見であるとともに、ワクチン抗原として Gag の有効性を支持する点でワクチン実用化においても重要な知見である (俣野)。BCG, DI, Ad5 への gp140, gp145 の挿入は完了し、動物実験も引き続き順調に推移している。BCG が DNA に代わりうるかという研究も同様である (山本・網)。建物の改修のために、動物実験が遅れたが、作製した m8Δ-gag は期待通りの免疫原性を示し、猿での SIV 感染抑制効果が期待できる (志田)。飲むワクチンへ応用するために創製された Senju vaccine が、中和抗体を誘導する免疫原性を有することを確認されたこと、また、Senju vaccine 創製に関連する特許を出願中であることは評価される (庄司)。4 種の抗体誘導のアプローチそれぞれに対して、人工抗原分子を順調に合成できている。1 種(gp41)についてはすでにマウスで有効性を確認

しており、もう 1 種(gp120)もマウスへの免疫とファージでの抗体作製に取りかかっており、早々に結果が得られると期待される。コレセプターの細胞外ループは効率的な改良法により合成済みであり、今後 MAP に導入後マウスでの評価が可能となった。また、合成した CD4 ミミックにより、gp120 の構造変化を誘起し抗体との反応性を向上させたことは今後の抗体・ワクチン療法において有用な知見を与えられると思われる (玉村)。糖鎖欠失変異によるウイルスの *in vitro* での性質は感染ザルでの感染性、病原性、防御免疫誘導とは無関係であった。この結果はウイルスの糖鎖修飾自身が感染宿主、特に宿主応答において重要な役割を持つ可能性が強く示唆された (森)。RANTES が抗 HIV ワクチンにおける免疫アジュバントの候補になりうることを示唆しており、エイズワクチン開発に向けて一歩前進できたものと考えている。(三浦)。リコンビナント蛋白ワクチンに用いるアジュバントとして Ag85B が有効であることが示唆された。さらにこのアジュバント効果は BCG において増強されることが示された (保富)。HIV-1env タンパクを用いたマウス経鼻免疫においてキトサン誘導体のアジュバント効果が確認された。しかしその誘導体は DNA ワクチン候補との併用による免疫は誘導されなかった。HIV-1 に対する中和活性試験を行うに到らなかった。これらの実績により達成度は 5 段階で 3 程度と考える (石川)。経口免疫法による粘膜内 CTL の誘導法を確立するとともに、HIV に感染した樹状細胞上でクラス I MHC 分子のみならず CD1a, CD1d 分子の発現低下が確認でき、その制御に関わる CD1a 拘束性 CD8+T 細胞株及び、CD1d 拘束性 NKT 細胞株を樹立でき、本年度当初の目的は十分に達成されたと考えられる (高橋)。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

現在、Universal Access プログラムの世界的な推進により、抗レトロウイルス薬の役割に大きな関心が向けられているが、エイズの世界的な蔓延をもっとも効率よく防ぐにはワクチンしかない。本研究班からのユニークな研究が、真の感染予防ワクチン開発につながることを期待される。

3) 今後の展望について

これまでのエイズワクチンの開発では、細胞性免疫誘導を目的とした細胞性免疫志向ワクチンの開発が行われてきた。しかし、将来のエイズ ワクチン開発が目指すものは、他のワクチンの場合と同じように、HIV ウイルスからの感染を防ぐ事である。そのためには、HIV Env 蛋白の極度の多様性と中和抗体などの液性免疫からの逃避機構まで考慮に入れた対応が求められている。

6. 結論

班員の密な協力と情報交換のもと、HIV 感染予防ワクチンの開発研究を総合的に行った。とくにプライムブースト、新規ベクター開発、免疫原デザイン、弱毒生ワクチン、アジュバント、自然免疫の研究を精力的に行い、有用な結果が得られた。

7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

特許 山本直樹 10 件、俣野哲朗 1 件、三浦智行 1 件、庄司省三 2 件、玉村啓和 2 件、保富康宏 4 件、石川晃一 3 件、高橋秀実 5 件。

研究発表

主任研究者

山本直樹

- 1) Ryo A, Tsurutani N, Ohba K, Kimura R, Komano J, Nishi M, Soeda H, Hattori S, Perrem K, Yamamoto M, Chiba J, Mimaya J, Yoshimura K, Matsushita S, Honda M, Yoshimura A, Sawasaki T, Aoki I, Morikawa Y, Yamamoto N. SOCS1 is an inducible host factor during HIV-1 infection and regulates the intracellular trafficking and stability of HIV-1 Gag. PNAS, in press.
- 2) Watanabe S, Terashima K, Ohta S, Horibata S, Yajima M, Shiozawa Y, Dewan MZ, Yu Z, Ito M, Morio T, Shimizu N, Honda M, Yamamoto N. Hematopoietic stem cell-engrafted NOD/SCID/IL2R γ null mice develop human lymphoid system and induce long-lasting HIV-1 infection with specific humoral immune responses. Blood. 2007; 109:212-8.
- 3) Watanabe S, Ohta S, Yajima M, Terashima K, Ito M, Mugishima H, Fujiwara S, Shimizu K, Honda M, Shimizu N, Yamamoto N. Humanized NOD/SCID/IL2R γ (null) mice transplanted with hematopoietic stem cells under nonmyeloablative conditions show prolonged life spans and allow detailed analysis of human immunodeficiency virus type 1 pathogenesis. J Virol. 2007; 81:13259-64.
- 4) Tsurutani N, Yasuda J, Yamamoto N, Choi BI, Kadoki M, Iwakura Y. Nuclear import of the preintegration complex is blocked upon infection by human immunodeficiency virus type 1 in mouse cells. J Virol. 2007 Jan;81(2):677-88.
- 5) Saitoh T, Tun-Kyi A, Ryo A, Yamamoto M, Finn G, Fujita T, Akira S, Yamamoto N, Lu KP, Yamaoka S. Negative regulation of interferon-regulatory factor 3-dependent innate antiviral response by the prolyl isomerase Pin1. Nat Immunol. 2006; 7(6):598-605.

分担研究者

俣野哲朗

- 1) Moriya C, Igarashi H, Takeda A, Tsukamoto T, Kawada M, Yamamoto H, Inoue M, Iida A, Shu T, Hasegawa M, Nagai Y, Matano T. Abrogation of AIDS vaccine-induced cytotoxic T lymphocyte efficacy in vivo due to a change in viral epitope flanking sequences. Microbes Infect, in press.
- 2) Tsukamoto T, Yuasa M, Yamamoto H, Kawada M, Takeda A, Igarashi H, Matano T. Induction of CD8⁺ cells able to suppress CCR5-tropic simian immunodeficiency virus SIVmac239 replication by controlled infection of CXCR4-tropic simian-human immunodeficiency virus in vaccinated rhesus macaques. J Virol. 2007; 81:11640-11649.
- 3) Yamamoto H, Kawada M, Tsukamoto T, Takeda A, Igarashi H, Miyazawa M, Naruse T, Yasunami M, Kimura A, Matano T. Vaccine-based long-term stable control of simian-human immunodeficiency virus 89.6PD replication in rhesus macaques. J Gen Virol, 2007;88(Pt 2):652-9..

志田壽利

- 1) Takayanagi R, Ohashi T, Yamashita E, Kurosaki Y, Tanaka K, Hakata Y, Komoda Y, Ikeda S, Tsunetsugu-Yokota Y, Tanaka Y, Shida H. Enhanced replication of human T-cell leukemia virus type 1 in T cells from transgenic rats expressing human CRM1 that is regulated in a natural manner. J Virol. 2007; 81:5908-5918.
- 2) Kitabatake M, Inoue S, Yasui F, Yokochi S, Arai M, Morita K, Shida H, Kidokoro M, Murai F, Le MQ, Mizuno K, Matsushima K, Kohara M. SARS-CoV spike protein-expressing recombinant vaccinia virus efficiently induces neutralizing antibodies in rabbits pre-immunized with vaccinia virus. Vaccine. 2007; 25:630-637.

庄司省三

- 1) Misumi S, Takamune N, Shoji S. Immunoreactive cycloimmunogen design based on conformational epitopes derived from human immunodeficiency virus type 1 coreceptors: cyclic dodecapeptides mimic undecapeptidyl arches of extracellular loop-2 in chemokine receptor and inhibit human immunodeficiency virus type 1 infection. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets. 2007 ;7(2):141-52.
- 2) Misumi S, Nakayama D, Kusaba M, Iiboshi T, Mukai R, Tachibana K, Nakasone T, Umeda M, Shibata H, Endo M, Takamune N, Shoji S. Effects of Immunization with CCR5-Based Cycloimmunogen on Simian/Human Immunodeficiency Virus SF162P3 Challenge J. Immunol. 2006; 176:463-471.

玉村啓和

- 1) Tsutsumi H, Tanaka T, Ohashi N, Masuno H, Tamamura H, Hiramatsu K, Araki T, Ueda S, Oishi S, Fujii N. The therapeutic potential of the chemokine receptor CXCR4 antagonists as multi-functional agents.

Biopolymers: Peptide Science 2007; 88:279-289.

- 2) Berchiche YA, Chow KY, Lagane B, Leduc M, Percherancier Y, Fujii N, Tamamura H, Bachelier F, Heveker N. Direct assessment of CXCR4 mutant conformations reveals complex link between receptor structure and galphai activation. J. Biol. Chem. 2007; 282:5111-5115.
- 3) Tamamura H, Tanaka T, Tsutsumi H, Nemoto K, Mizokami S, Ohashi N, Oishi S, Fujii N. Versatile use of acid-catalyzed ring-opening of b-aziridinyl-a,b-enoates to stereoselective synthesis of peptidomimetics. Tetrahedron 2007; 63:9243-9254.

森一泰

- 1) Tanaka-Takahashi Y, Yasunami M, Naruse T, Hinohara K, Matano T, Mori K, Miyazawa M, Honda M, Yasutomi Y, Nagai Y, Kimura A. Reference strand-mediated conformation analysis-based typing of multiple alleles in the rhesus macaque MHC class I Mamu-A and Mamu-B loci. Electrophoresis. 2007 Mar;28(6):918-24.

三浦智行

- 1) Ishimatsu M, Suzuki H, Akiyama H, Miura T, Hayami M, Ido E. Construction of a novel SHIV having an HIV-1-derived protease gene and its infection to rhesus macaques: a useful tool for in vivo efficacy tests of protease inhibitors. Microbes Infect. 2007; 9(4):475-82
- 2) Shimizu Y, Inaba K, Kaneyasu K, Ibuki K, Himeno A, Okoba M, Goto Y, Hayami M, Miura T, Haga T. A genetically engineered live-attenuated simian-human immunodeficiency virus that co-expresses the RANTES gene improves the magnitude of cellular immunity in rhesus macaques. Virology, 2007; 361(1):68-79.
- 3) Kuwata T, Kodama M, Sato A, Suzuki H, Miyazaki Y, Miura T, Hayami M. Contribution of monocytes to viral replication in macaques during acute infection with simian immunodeficiency virus. AIDS Res. Hum. Retroviruses, 2007; 23(3):372-80.

保富康宏

- 1) Okabayashi S, Ohno C, Kato M, Nakayama H, Yasutomi Y. Congenital cystic adenomatoid-like malformation in a cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). Vet. Path. 2007 in press.
- 2) Yasutomi Y. Chimeric recombinant hepatitis E virus-like particles presenting foreign epitopes as a novel vector of vaccine by oral administration. Holland CR. Ed. Structure-based viral replication. World Scientific Publishing. 2007 in press.
- 3) Nishikubo K, Imanaka-Yoshida K, Tamaki S, Hiroe M, Yoshida T, Adachi Y, Yasutomi Y. Th1-type immune responses by Toll-like receptor 4 signaling are required for the development of myocarditis in mice with BCG-induced myocarditis. J.Autoimmun. 2007 ; 29:146-153.

石川晃一

- 1) Huy TTT, Ishikawa K, Ampofo W, Izumi K, Nakajima A, Ansah J, Tetteh JO, Nii-Trebi N, Aidoo S, Ofori-Adjei D, Sata T, Ushijima H, Abe K. Characteristic of hepatitis B virus in Ghana: full length genome sequences indicates the endemicity of genotype E in West Africa. J.Med.Virol. 2006; 78:178-184.

高橋秀実

- 1) Takahashi M, Watari E, Shinya E, Shimizu T, Takahashi H. Suppression of virus replication via down-modulation of mitochondrial short chain enoyl-CoA hydratase in human glioblastoma cells. Antiviral Res, 2007; 75:152-158.
- 2) Nakagawa Y, Kikuchi H, Takahashi H. Molecular analysis of TCR and peptide/MHC interaction using P18-I10-derived peptides with a single D-amino acid substitution. Biophys J. 2007;92(7):2570-82.
- 3) Wakabayashi A, Kumagai Y, Watari E, Shimizu M, Utsuyama M, Hirokawa K, Takahashi H. Importance of gastrointestinal ingestion and macromolecular antigens in the vein for oral tolerance induction. Immunology 2006; 119:167-177.

網康至

- 1) Someya K, Xin KQ, Ami Y, Izumi Y, Mizuguchi H, Ohta S, Yamamoto N, Honda M, Okuda K. Chimeric adenovirus type 5/35 vector encoding SIV gag and HIV env genes affords protective immunity against the simian/human immunodeficiency virus in monkeys. Virology. 2007 ;367(2):390-7.
- 2) Hara M, Kikuchi T, Sata T, Nakajima N, Ami Y, Sato Y, Tanaka K, Narita T, Ono F, Akari H, Terao K, Mukai R. Detection of SRV/D shedding in body fluids of cynomolgus macaques and comparison of partial gp70 sequences in SRV/D-T isolates. Virus Genes. 2007; 35:281-8.

研究課題：抗エイズ薬を目指したウイルス糖鎖構造制御による宿主免疫の賦活化・機能化分子の開発

課題番号：H18-エイズ-若手-002

主任研究者：袴田 航（日本大学 生物資源科学部 専任講師）

分担研究者：栗原 正明（国立医薬品食品衛生研究所 有機化学部 室長）、西尾 俊幸（日本大学 生物資源科学部 准教授）

1. 研究目的

エイズは不治の病からコントロール可能な病へ、特別な病から、誰もが感染のリスクを有しうる一般的な病へと変化しつつある。このようなエイズの慢性感染症化は、多剤併用療法の広がりを含め、それら薬剤に対する耐性株の出現速度を増大させる。それ故に、現在唯一の治療法である多剤併用療法を維持する為には、既存の治療標的だけでなく異なる分子標的、作用機序を有する薬剤の登場が必要不可欠であり強く望まれている。現在、実用化または研究段階にあるエイズ治療薬は、核酸系逆転写酵素阻害剤・非核酸系逆転写酵素阻害剤・プロテアーゼ阻害剤・インテグレーション阻害剤・ウイルス侵入阻害薬（gp41 または gp120 への接着分子、CCR5 アンタゴニスト、CXCR4 アンタゴニスト）等がある。本研究では、多剤耐性株の出現および HIV 特異的免疫反応低下に着目した既存の上記作用機序を有する薬剤とは異なる、ウイルス糖鎖構造制御による宿主免疫の賦活化・機能化分子の開発を行い、抗エイズ薬候補化合物を得る事を目的とした。

HIV は他のウイルスエンベロープ糖タンパク質と比較しても非常に多くの N-結合型糖鎖を有するエンベロープ糖タンパク質（gp120）を有している。この糖鎖が HIV の慢性的な持続感染・不十分な感染制御・有効な宿主免疫応答の阻害・有効な中和抗体の誘導阻害等の重要な要因であると推測されている。その原因として、gp120 が非常に多くの N-結合型糖鎖によって覆われ、中和抗体が有効に機能しない（Conformational masking）との報告がなされている。そこで、Conformational masking が解除されるように gp120 糖鎖の構造を制御し、制御された糖鎖を有する gp120 が宿主中和抗体によって捕捉されるようになれば、宿主免疫が賦活化・機能化するのではないかと考え、本研究を計画した。しかしながら、宿主酵素を標的とするばかりでは目的とする結果が得られにくいのご指摘を受け、N-結合型糖鎖の成熟（糖鎖合成、タンパク質輸送、品質管理等）阻害にまで、本研究の阻害概念を拡大し研究を行っている。以上のように、本研究は N-結合型糖鎖成熟阻害という、分子標的および作用機序を有する抗エイズ薬の開発であり、多剤併用療法の維持・発展に資する研究である。

2. 研究方法

HIV エンベロープ糖タンパク質 gp120 の N-結合型糖鎖の構築は、小胞体で開始される。gp120 の N-結合型糖鎖は、始めに小胞体 N-結合型糖鎖プロセッシング酵素により糖鎖のプロセッシングが行われ、正常な糖タンパク質はゴルジ体に輸送される。よって、N-結合型糖鎖プロセッシング酵素阻害またはウイルス糖タンパク質のオルガネラ間の輸送を阻害する事が出来れば、未成熟な糖鎖構造を有する gp120 が構築でき、HIV に目的とする糖鎖を提示させる事が可能となると考えた。更に、宿主細胞のタンパク質の品質管理機構によって、未成熟糖鎖を有するウイルス粒子が感染を持たぬまま、細胞外へ排除される事も期待できる。その結果、制御された糖鎖を有する gp120 に中和抗体が結合し、抗 HIV 活性を発現する事が期待され、更に感染性の失われたウイルスが生産される可能性も併せて期待できる。

そこで、N-結合型糖鎖の構造を制御する化合物、N-結合型糖鎖プロセッシング酵素阻害剤を得るために「*in silico* による論理的かつ高効率な阻害剤分子設計」および「微生物ライブラリからの阻害剤のハイスクリーン（HTS）」の2つの異なる戦略を立案した。

「*in silico* による論理的かつ高効率な阻害剤分子設計」は、近年続々と明らかにされ始めている酵素の立体構造に基づき *in silico* で論理的かつ高効率に阻害剤分子の探索および設計を行う。「微生物ライブラリからの阻害剤の HTS」は現在その活性測定系が十分ではない。N-結合型糖鎖プロセッシング酵素の活性測定には、基質調製にウイルス培養、活性検出に放射性同位体が汎用され HTS には不向きである。そこで、新たな HTS 法の開発を行う。HTS を用いた阻害剤の網羅的探索は、特異な培養条件で培養した放線菌ライブラリからのスクリーニングを行う。

このように、*in silico* 技術および HTS 法を両輪とし、バーチャルライブラリおよび微生物ライブラリから阻害剤の探索・分子設計・阻害剤分子の合成・阻害活性の評価を有機的に連携して研究を実施することにより、高活性化合物を迅速かつ効率的に得る事ができると考えている。

(倫理面への配慮)

本研究は、エイズウイルスの宿主ヒト細胞の糖鎖構築酵素の構造および分子認識情報を基に阻害剤を設計・合成および探索を行う研究であり、標的酵素の構造情報・分子認識情報をのみ用いる為、研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究方法による対象者に対する不利益、危険性の排除や説明と理解、実験動物に対する動物愛護上の配慮等を必要とする研究を含まない。

3. 研究結果

「*in silico* による論理的かつ高効率な阻害剤分子設計」：市販化合物ライブラリを用いたバーチャルスクリーニングにより、濃縮された糖鎖構造制御化合物ライブラリを得、ヒット化合物ライブラリの多変量解析に基づく定量的構造活性相関を行う事により、化合物ライブラリの品質・多様性について検討を行った。更に、Fragment-based drug 設計によりライブラリの拡充を行い、濃縮された糖鎖構造制御化合物ライブラリを得た。これらの構造はこれまでに報告されている阻害剤とは異なる、非常にユニークな骨格を有していた。

「微生物ライブラリからの阻害剤の HTS」：HTS を用いた阻害剤の網羅的探索のために、新たな HTS 法の開発を行い、これまでにない基質を用いる事により、より構造情報が得やすい酵素活性測定法を開発した。更に、特異な培養条件で培養した放線菌ライブラリを対象として、HTS を用いた阻害剤の網羅的探索を行った結果、強力な阻害活性を有する代謝物と特定の特異な培養条件においてのみ阻害剤を生産する放線菌を見いだした。

4. 考察

これまでの研究の結果、市販化合物をライブラリとした *in silico* 阻害剤スクリーニング・阻害剤スクリーニングに適した新規活性測定系の開発、特異な培養系を用いた放線菌ライブラリからの阻害剤スクリーニングによって、抗エイズ薬の候補ライブラリおよび化合物を得た。今後は、細胞レベルでの抗エイズウイルス活性を測定する事により、細胞レベルで効果を有する化合物を得る様、研究を行う。(本活性測定については、国立感染症研究所 エイズ研究センター 武部 豊 博士のご支援を頂く)

このように、*in silico* 技術を用いる事により、IT 技術の進歩を抗エイズ薬開発に活用する事ができる、非常に優れた有意義な方法論を確立したと考えられる。

5. 自己評価

1) 達成度について

本年度迄の大きな目的は、*in silico* および天然のライブラリから、エイズウイルス糖鎖構築酵素阻害剤候補化合物を得る事であり、その目標はほぼ達成された。次年度においては、細胞レベルでの抗エイズウイルス活性が得られるように研究の継続をお願いしたい。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

エイズウイルスの薬剤耐性獲得のスピードは非常に速い。よって、新規な作用機序に基づく新規な抗エイズ薬の開発もスピードが求められている。エイズウイルスの変異速度に対抗するにはコンピュータの情報処理能力を積極的に活用する事が重要である。本研究の研究成果は、IT 技術の進歩を生化学的研究に取り入れるインターフェイスとして先駆的であり学術的意義は高いと考えられる。また、その結果得られる抗エイズ薬は、国際的・社会的必要性が非常に高い。

3) 今後の展望について

本年度迄に、エイズウイルス糖鎖構築酵素阻害剤候補化合物の化合物およびライブラリおよび放線菌を特異な培養条件で培養する事により、阻害剤を得た。このように、*in silico* および天然のライブラリから、エイズウイルス糖鎖構築酵素阻害剤候補化合物を得る事に成功した。本結果を基に、今後は得られた化合物が細胞レベルでの抗エイズウイルス活性を有しているのか、有していた場合は、その構造を最適化し、抗エイズ薬候補化合物を得る予定である。

6. 結論

本研究は、IT 技術を積極的に取り入れる事および特異な微生物培養系を用いる事によって、*in silico* および天然のライブラリからエイズウイルス糖鎖構築酵素阻害剤候補化合物を効率的に得る目的をほぼ終了した。得られた化合物の一部は、これまでの阻害剤とは異なる構造を有しており、かつ、活性部以内の水素結合・疎水結合等の重要な相互作用をふんだんに利用した興味深い構造であった。本方法論、が非常に強力な阻害剤のスクリーニング手法である事を明らかにした。

7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

糖鎖構築酵素の新規な基質特異性に基づく、新規な基質を設計した。現在、その基質を基にした活性測定系を構築している。本新規活性測定法の特許出願を予定している。

また、本研究で得られた化合物に細胞レベルでの抗エイズウイルス活性が認められた場合は、特許の出願を予定している。

研究発表

原著論文による発表（2007年以降の欧文論文のみ記載）

主任研究者

袴田 航

- 1) W. Hakamata, Y. Sato, H. Okuda, S. Honzawa, N. Saito, S. Kishimoto, A. Yamamoto, T. Sugiura, A. Kittaka, M. Kurihara, (2S, 2'R)-Analogue of LG190178 is a major active isomer., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **18**, 120-123 (2008).
- 2) T. Satoh, N. Cowieson, W. Hakamata, H. Ideo, K. Fukushima, M. Kurihara, R. Kato, K. Yamashita, S. Wakatsuki, Structural basis for recognition of high-mannose type glycoproteins by mammalian transport lectin VIP36., *J. Biol. Chem.*, **282**, 28246-28255 (2007).
- 3) H. Chida, A. Nakazawa, H. Akazaki, T. Hirano, K. Suruga, M. Ogawa, T. Satoh, K. Kadokura, S. Yamada, W. Hakamata, K. Isobe, T. Ito, R. Ishii, T. Nishio, K. Kintake, T. Oku, Expression of the algal cytochrome c6 gene in Arabidopsis enhances photosynthesis and growth. *Plant and Cell Physiology*, **48** (7), 948-957 (2007).
- 4) K. Kadokura, Y. Sakamoto, K. Saito, T. Ikegami, T. Hirano, W. Hakamata, T. Oku, T. Nishio, Production of a recombinant chitin oligosaccharide deacetylase from *Vibrio parahaemolyticus* in the culture medium of *Escherichia coli* cells. *Biotechnology Letters*, **29** (8), 1209-1215 (2007).
- 5) K. Kadokura, A. Rokutani, A. Yamamoto, T. Ikegami, T. Sugita, H. Itoi, W. Hakamata, T. Oku, T. Nishio, Purification and characterization of *Vibrio parahaemolyticus* extracellular chitinase and chitin oligosaccharide deacetylase involved in the production of heterodisaccharide from chitin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **75** (2), 357-365 (2007).
- 6) M. Kurihara, Y. Sato, W. Hakamata, H. Okuda, M. Nagano, M. Hama, Y. Demizu, M. Doi, M. Tanaka, H. Suemune, Computational study on helical structures of oligopeptides containing chiral cyclic α , α -Disubstituted α -amino acids. *Peptide Science 2006*, **43**, 88 (2007).
- 7) M. Kurihara, Y. Sato, W. Hakamata, H. Okuda, Y. Demizu, M. Nagano, N. Kawabe, M. Doi, M. Tanaka, H. Suemune, Computational Study on Conformation of Oligopeptides Containing Chiral Cyclic α , α -Disubstituted α -Amino Acids, *Peptides 2006*, 546-547 (2007).
- 8) K. Kadokura, Y. Sakamoto, K. Saito, T. Ikegami, T. Hirano, W. Hakamata, T. Oku, T. Nishio, Production and Secretion of a Recombinant *Vibrio parahaemolyticus* Chitinase by *Escherichia coli*, and Its Purification from the Culture Medium, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **71**, 2848-2851 (2007).

分担研究者

栗原 正明

- 1) W. Hakamata, Y. Sato, H. Okuda, S. Honzawa, N. Saito, S. Kishimoto, A. Yamamoto, T. Sugiura, A. Kittaka, M. Kurihara, (2S,2'R)-Analogue of LG190178 is a major active isomer., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **18**, 120-123 (2008).

- 2) T. Sugiyama, Y. Imamura, M. Kurihara, and A. Kittaka, Recognition of longer duplex DNA by cooperative strand invasion. *Nucleic Acids Symp Ser*, **51**, 269-270 (2007).
- 3) T. Satoh, N. Cowieson, W. Hakamata, H. Ideo, K. Fukushima, M. Kurihara, R. Kato, K. Yamashita, S. Wakatsuki, Structural basis for recognition of high-mannose type glycoproteins by mammalian transport lectin VIP36., *J. Biol. Chem.*, **282**, 28246-28255 (2007).
- 4) M. Tanaka, Y. Demizu, M. Nagano, M. Hama, Y. Yoshida, M. Kurihara, H. Suemune, Lipase-Catalyzed Kinetic Resolution of Cyclic trans-1,2-Diols Bearing a Diester Moiety: Synthetic Application to Chiral Seven-Membered Ring α,α -Disubstituted α -Amino Acid. *J. Org. Chem.*, **72**, 7750-7756 (2007).
- 5) M. Kurihara, Y. Sato, W. Hakamata, H. Okuda, M. nagano, M. Hama, Y. Demizu, M. Doi, M. Tanaka, H. Suemune, Computational study on helical structures of oligopeptides containing chiral cyclic α,α -Disubstituted α -amino acids. *Peptide Science 2006*, **43**, 88 (2007).
- 6) Y. Demizu, M. Tanaka, M. Nagano, M. Kurihara, M. Doi, T. Maruyama, H. Suemune, Controlling 3_{10} -Helix and α -Helix of Short Peptides in the Solid State, *Chem. Pharm. Bull.*, **55**, 840-842 (2007).
- 7) M. Kurihara, Y. Sato, W. Hakamata, H. Okuda, Y. Demizu, M. Nagano, N. Kawabe, M. Doi, M. Tanaka, H. Suemune, Computational Study on Conformation of Oligopeptides Containing Chiral Cyclic α,α -Disubstituted α -Amino Acids, *Peptides 2006*, 546-547 (2007).
- 8) M. Tanaka, M. Nagano, Y. Demizu, K. Anan, M. Kurihara, M. Doi, H. Suemune, Side-chain chiral centers of amino acids and helical-screw handedness of their peptides, *Peptides 2006*, 268-269 (2007).
- 9) Nagano, M., Tanaka, M., Demizu, Y., Kurihara, M., Doi, M., Suemune, H., Secondary Structure of Heteropeptides Using Chiral Cyclic α,α -Disubstituted Amino Acids. *Peptides 2006*, 476-477 (2007).

分担研究者

西尾 俊幸

- 1) H. Chida, A. Nakazawa, H. Akazaki, T. Hirano, K. Suruga, M. Ogawa, T. Satoh, K. Kadokura, S. Yamada, W. Hakamata, K. Isobe, T. Ito, R. Ishii, T. Nishio, K. Kintake, T. Oku, Expression of the algal cytochrome *c6* gene in *Arabidopsis* enhances photosynthesis and growth. *Plant and Cell Physiology*, **48** (7), 948-957 (2007).
- 2) K. Kadokura, Y. Sakamoto, K. Saito, T. Ikegami, T. Hirano, W. Hakamata, T. Oku, T. Nishio, Production of a recombinant chitin oligosaccharide deacetylase from *Vibrio parahaemolyticus* in the culture medium of *Escherichia coli* cells. *Biotechnology Letters*, **29** (8), 1209-1215 (2007).
- 3) K. Kadokura, A. Rokutani, A. Yamamoto, T. Ikegami, T. Sugita, H. Itoi, W. Hakamata, T. Oku, T. Nishio, Purification and characterization of *Vibrio parahaemolyticus* extracellular chitinase and chitin oligosaccharide deacetylase involved in the production of heterodisaccharide from chitin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **75** (2), 357-365 (2007).
- 4) K. Kadokura, Y. Sakamoto, K. Saito, T. Ikegami, T., Hirano, W. Hakamata, T. Oku, T. Nishio Production and Secretion of a Recombinant *Vibrio parahaemolyticus* Chitinase by *Escherichia coli*, and Its Purification from the Culture Medium, , *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **71**, 2848-2851 (2007).

研究課題：HIV に対する粘膜ワクチンの最適化に適う安全性・有効性に優れた粘膜ワクチンアジュバントの開発

課題番号：H19-エイズ-若手-001

主任研究者：吉岡 靖雄（大阪大学臨床医工学融合研究教育センター 特任講師（常勤））

分担研究者：鎌田 春彦（独立行政法人医薬基盤研究所創薬プロテオミクスプロジェクト 主任研究員）、形山 和史（財団法人東京都医学研究機構東京都臨床医学総合研究所花粉症プロジェクト 研究員）

1. 研究目的

HIV に対する多剤併用療法は、感染そのものを防御するものではなく、また薬剤耐性・副作用・費用などの解決すべき問題が多数残されている。従って、HIV 治療・予防における最重要課題は先進国・開発途上国を問わず HIV に対するワクチン開発に他ならない。泌尿生殖器など経粘膜的に感染する HIV の感染経路を考慮した場合、経口・経鼻・経膈投与など経粘膜接種によるワクチン（粘膜ワクチン）は、抗原投与部位の粘膜面のみならず、遠隔の粘膜面、更には脾臓などの全身系免疫組織にも抗原特異的免疫応答が誘導可能なため、HIV 感染制御の点で理想的方法として期待されている。しかし、抗原単独で経粘膜投与だけでは、抗原性の低さなどから効率的に分泌型 IgA 抗体産生・細胞傷害性 T 細胞誘導をはじめとした粘膜免疫応答を誘導することが困難であり、粘膜免疫を強力に誘導することが可能な粘膜ワクチンアジュバントの開発が待望されている。本観点から、強い免疫活性化能を持つサイトカインの、粘膜ワクチンアジュバントへの応用が精力的に試みられているものの、経粘膜投与に伴う消化酵素・pH 変化により瞬時に失活・分解するため、未だ有望な粘膜ワクチンアジュバントに成り得ていない。一方で、我々はこれまで、生理活性タンパク質の失活や分解を抑制し得る水溶性高分子バイオコンジュゲーションシステムをサイトカインに適用することで、生体内安定性に優れたバイオコンジュゲート体の作製を行ってきた。更に、バイオコンジュゲーションの最大の問題点である、致命的な比活性低下やバイオコンジュゲート体の分子的・機能的不均一性に対して、独自のファージ表面提示法を駆使し、活性を保持しつつ全てのリジン残基が他のアミノ酸に置換されたリジン欠損変異体を創製した上で、N 末端部位特異的にバイオコンジュゲーションすることで、問題点を一挙に克服可能であることを示してきた。本研究では、HIV に対する効果的な粘膜ワクチン開発を目標に、独自のファージ表面提示法による機能性サイトカイン創製と部位特異的バイオコンジュゲーションを融合することで、医薬価値の向上したバイオコンジュゲート化サイトカインを創製し、安全性・有効性に優れた粘膜ワクチンアジュバントへの適用を試みる。

2. 研究方法

【免疫方法】BALB/c マウスへの経鼻免疫は、個々のサイトカインあるいはコレラトキシン B サブユニット(CT-B)をニワトリ卵白アルブミン (OVA) と混合して投与することにより行なった。【サンプルの回収方法】最終免疫 7 日後のマウスより血清、鼻腔洗浄液、膈洗浄液および糞便抽出液を回収した。【OVA 特異的抗体産生能の評価】OVA を固相した ELISA プレートに各濃度に調製したサンプルを添加し、2 次抗体として HRP 標識 IgG 抗体、ビオチン標識 IgA 抗体を用い、常法に従った。発色反応後、吸光波長 450 nm、副波長 690 nm における吸光度を測定した。【OVA 特異的サイトカイン産生能の評価】最終免疫 7 日後のマウスから回収した脾細胞と、OVA 溶液を混合し共培養した。培養上清中のサイトカイン産生を ELISPOT アッセイおよび Bio-Plex Multiplex Cytokine アッセイにより評価した。

（倫理面への配慮）

本研究は動物実験を避け得ないが、ヘルシンキ宣言に基づき動物愛護の精神を遵守しつつ、大阪大学の動物実験規程に則り行なった。また組換え DNA 実験は、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に基づき、機関承認実験として承認されている。

3. 研究結果

本年度は、強い免疫活性化能を有する TNF スーパーファミリーサイトカインに焦点を絞り、最も強い粘膜免疫誘導能を有するサイトカインを探索した。更に、次年度以降の部位特異的高分子バイオコンジュゲーションに向けて、全てのリジン残基が他のアミノ酸に置換されたリジン欠損 TNF α 変異体の免疫誘導能に関して評価した。

16 種類の TNF スーパーファミリーサイトカイン (APRIL、BAFF、CD27L、CD30L、CD40L、EDA、GITRL、LIGHT、LT α 、OX40L、TL1A、TNF α 、TRAIL、TRANCE、TWEAK、4-1BBL) を各々 OVA と共に経鼻免疫することで、粘膜免疫誘導能に優れたサイトカインをスクリーニングした。その結果、OVA 単独投与群と比較して、APRIL、TNF α 、TL1A 併用投与群では、血清中の OVA 特異的 IgG 産生の有意な増加が認められた。また、抗体サブクラスの解析から、IgG1 優位な抗体産生を誘導

することが明らかとなった。更に、TNF α 、APRIL、TL1A 併用投与群では、投与部位である鼻腔洗浄液中の OVA 特異的 IgA 産生も増加しており、中でも TL1A による IgA 産生能は CT-B に匹敵する程であった。また、遠隔の粘膜面である膣洗浄液、糞便抽出液中でも同様に、TNF α 、TL1A 併用投与群において、OVA 特異的 IgA の産生が有意に増加していた。以上の結果から、TNF スーパーファミリーサイトカインの中でも、TNF α 、TL1A が優れた粘膜ワクチンアジュバントに成り得る可能性が示された。そこで、バイオコンジュゲート化 TNF α のワクチンアジュバントへの適用を目指し、まず我々がこれまでに創製したリジン欠損 TNF α 変異体の粘膜ワクチンアジュバント能を評価した。リジン欠損 TNF α 変異体は、*in vitro* における比活性が野生型より数倍向上し、全てのリジン残基が他のアミノ酸に置換されている。OVA と共に経鼻免疫することで、粘膜免疫誘導能を評価した結果、リジン欠損 TNF α 変異体は野生型 TNF α と比較して、全身面、粘膜面のいずれにおいても、有意な OVA 特異的 IgG、IgA 産生の増加がみられた。更に、免疫マウスから回収した脾細胞を用いてリジン欠損 TNF α 変異体の免疫誘導特性を解析した結果、IL-2、IL-12、IFN- γ 産生は野生型と同程度であったのに対し、IL-4、IL-5 などの Th2 型サイトカイン産生誘導を有意に増強していることが明らかとなった。

4. 考察

TNF スーパーファミリーサイトカインは強い免疫誘導能を有することが知られており、特に CD40L、LIGHT、OX40L などは、注射によるワクチンにおいて強いアジュバント能を有することが知られている。しかし本結果において、これらサイトカインは全く粘膜免疫誘導能を示さず、TNF α 、TL1A が有望な粘膜ワクチンアジュバントに成り得ることが示された。今後、これらサイトカインの粘膜免疫誘導メカニズムに関して、詳細な検討を進める予定である。現時点では、細胞傷害性 T 細胞の誘導に関する検討は行っていないが、今後 TNF α 、TL1A を含む TNF スーパーファミリーサイトカインに関して、検討を進める予定である。また、リジン欠損 TNF α 変異体が、抗原特異的ヘルパー T 細胞の活性化に伴う Th2 型サイトカイン産生増強に基づく、強い粘膜免疫誘導能を有することが明らかとなった。

5. 自己評価

1) 達成度について

研究計画通り、TNF スーパーファミリーサイトカインのスクリーニング、リジン欠損 TNF α 変異体の機能評価を

行った。以上から、当初の計画通り、順調に成果が得られたものと考えている。平成 20 年度以降に予定している研究に関しても、実験手技・設備・体制は整っていることから、問題なく遂行可能と考えている。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

これまでに、CT-B などの毒素由来蛋白質が、粘膜ワクチンアジュバントとして汎用されてきたが、安全性に問題があり、未だ実用化されていない。本観点から、サイトカインの粘膜ワクチンアジュバントへの応用が期待されているが、粘膜免疫誘導能に関する基礎情報が乏しい。更に、粘膜面に投与されたサイトカインは分解酵素などにより速やかに分解され、十分な効果を発揮できないことから、十分な成果が得られていないのが現状である。以上から、本研究成果及び、次年度以降の研究成果により創製される部位特異的バイオコンジュゲート体は、HIV に対する優れた粘膜ワクチンアジュバントとなり、HIV 根絶に向けたワクチン開発に貢献可能と期待される。

3) 今後の展望について

より有効性・安全性に優れた粘膜ワクチンアジュバントの創製を目指し、リジン欠損 TNF α 変異体に対して、水溶性高分子・ナノ粒子で部位特異的バイオコンジュゲーションしたバイオコンジュゲート化 TNF α の粘膜免疫誘導能を評価する。また、HIV 抗原 gp120 を用いた検討を進める。更に、TL1A に関して、リジン欠損変異体を創製した上で、部位特異的バイオコンジュゲート体の創製を図る。

6. 結論

16種類のTNFスーパーファミリーサイトカインをスクリーニングし、TNF α 、TL1Aが粘膜ワクチンアジュバントとして有望であることを明らかとした。また、リジン欠損TNF α 変異体が野生型と比較して、優れた粘膜ワクチンアジュバントであることを明らかとした。今後は、HIV抗原を用いた検討を進めると共に、リジン欠損TNF α 変異体に対してN末端部位特異的バイオコンジュゲーションすることで、より安全性・有効性に優れた粘膜ワクチンアジュバントの創製を試みる予定である。

7. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

現時点では知的所有権の出願・取得はしていない。現在、TNF スーパーファミリーの粘膜ワクチンアジュバントとしての適用及び、リジン欠損 TNF α 変異体の粘膜ワクチンアジュバントとしての有効性に関して、特許出願可能か検討中である。

研究発表

主任研究者および分担研究者

吉岡靖雄、鎌田春彦、形山和史

口頭発表

海外

- 1) Yoshioka, Y., Morishige, T., Watanabe, H., Tanabe, A., Abe, Y., Mukai, Y., Kamada, H., Okada, N., Nakagawa, S., Tsutsumi, Y. Site-specific PEGylation of a lysine-deficient TNF superfamily with full bioactivity. The 15th Annual Meeting of the International Cytokine Society. October 26-30, 2007, San Francisco, California.
- 2) Nomura, T., Shibata, H., Abe, Y., Minowa, K., Mukai, Y., Yoshioka, Y., Nakagawa, S., Tsunoda, S., Kamada, H., Tsutsumi, Y. Creation of bioactive Lysine-deficient tumor necrosis factor for antitumor therapy. HUPO 6th Annual World Congress. October 6-10, 2007, Seoul, South Korea.

国内

- 3) Kayamuro, H., Kamada, H., Yoshioka, Y., Yoshikawa, T., Katayama, K., Hiroi, T., Tsunoda, S., Tsutsumi, Y. Intranasal immunization with mutant TNF induces antigen specific mucosal and systemic immune responses in mice. 日本免疫学会、2007年、東京.
- 4) 萱室裕之、吉岡靖雄、鎌田春彦、形山和史、阿部康弘、野村鉄也、廣井隆親、吉川友章、角田慎一、堤 康央. 活性増強型 TNF 変異体の粘膜ワクチンアジュバントとしての応用. 日本薬学会、2008年、横浜.

研究課題：HIV-1感染のヒト-ラット種間バリアーの解明

課題番号：H19-エイズ-若手-004

主任研究者：張 隄峰（北海道大学 遺伝子病制御研究所 助教）

1. 研究目的

エイズの根本的な予防と治療法を開発するために、HIV感染小動物モデルはきわめて有用である。特に、ヒトCD4/CCR5等の受容体を発現させるとわずかにHIVの増殖を許すラットは良いモデル系に改良できる可能性を秘める。実際に、ヒトCD4/CCR5を発現するラットT細胞株に、HIV-1 RevのコファクターであるヒトCRM1と、TatのコファクターであるCyclinT1を発現させると、ヒトT細胞株の約1/3のHIV粒子が生産された。このことは粒子生産については、これらの因子を発現させることによりほぼ解決できることを示している。しかし、できた粒子の感染性が低く、侵入過程の効率も低いことが分かった。そこで、本研究の目的はウイルス粒子の感染性と侵入過程に関与しているウイルス性、細胞性因子を同定し、ラット感染モデルの作製に資することである。特に本年度は、①ラット上皮細胞から生産される高感染性と、T細胞からの低感染性のウイルス粒子を比較するための大量生産系の構築、②ラットT細胞由来のウイルスの感染性へのEnvの関与、③侵入過程で働くラット因子のクローニングを試みた。

2. 研究方法

①HIVウイルス粒子を大量収集するため、効率的な複製を支持するラット細胞の構築を行った。ヒトCyclinT1とCRM1を発現するレトロベクターをラット上皮細胞とT細胞株に感染させ、目的遺伝子を発現する細胞株を樹立した。HIV-1感染性クローンをリン酸化カルシウム法またはエレクトロポレーション法で種々の細胞株に導入し、HIV-1の増殖をHIV-1 p24 ELISA法で測定した。

②HIVの感染価を測定するために、indicator細胞(TZM-bl)に感染させ、感染に応じて生産されるルシフェラーゼ又はβ-ガラクトシダーゼ活性を測定した。また、Western blottingによってGagとGタンパク質を検出した。

③侵入過程で働くラット因子をクローニングするために、ラットprimary T細胞から抽出したmRNAを基にレトロベクターcDNAライブラリーを作成し、ヒトHeLa細胞にトランスデュースした。Venusを発現するHIVシュードウイルスを感染させて、Venus細胞をFACS Vantageで集めた。Venus細胞から、ベクター部分に設計したプライマーを用いてラットcDNAを回収した。cDNAの発現コンストラクトを作製し、HeLa細胞にトランスフェクション後、Venusを発現するHIVシュードウイルスの感染阻害効果を調べた。

(論理面への配慮)

遺伝子組み換え実験は北海道大学遺伝子組換え実験等安全管理規程に沿って、許可を得た上、倫理規則を厳守した。HIV-1感染実験はP3実験室で行い、安全の面に十分配慮した。

3. 研究結果

1) HIV粒子の大量生産系の構築

レトロベクターを用いてヒトCyclinT1とCRM1を発現するラット上皮細胞株とT細胞株の構築に成功した。HIV-1DNAクローンを細胞株に導入し、ウイルス生産量を調べたところ、いずれの細胞からも数ng/mlオーダーのGagp24が生産された。この生産量は元の細胞株の百倍以上のウイルス生産量である。質量分析による粒子含有タンパク質の同定には数ugのウイルス粒子が必要だと推計されるために、1lの細胞培養で事足りると計算される。

2) EnvのHIV粒子の感染性への関与

当研究室の初歩的な結果として、ウイルス粒子におけるGagの正常なプロセッシングを観察している。そこで、私はラットT細胞から生産されたHIV粒子は感染性減弱細胞性因子を含むと仮定して実験を進めてきた。しかし、これらはウイルス粒子を大量に調製できていない時点での結果であり、Western blottingはEnvタンパク質の比較的低感度の検出系であることを考慮して、ラットT細胞から生産されたウイルス粒子の感染性へのEnvの関与を再度調べた。もし、ラットT細胞由来のウイルス粒子のEnvの量的機能的な欠損が低感染性の原因であるならば、VSV Gタンパク質に置き換えたウイルス粒子を作製してやればヒト細胞由来のウイルスに匹敵する感染性を示すと予想される。そこで、Env欠損HIV-1とVSV-GをラットT細胞株に導入し、できたシュードウイルスの感染価を調べた。Apobec3が感染性を奪うとの報告が小糸博士から学会発表されている(ウイルス学会2006)ので、ラットApobec3をsiRNAでノックダウンしたラットT細胞も調べた。P24量を基準として同量のウイルスの感染性を測定したところ、ラットT細胞由来のウイルスの感染性は、ヒトT細胞であるMolt4細胞由来のウイルスよりも高い感染性を示し、G蛋白の量と関連していた。さらには、ラットT細胞由来のウイルスの感染性は、感染性HIV-1クローンとG遺伝子を293T細胞に共導入することによって作製したHIVと同等の感染性を示した。これらの事はGでコートされたラットT細胞由来のHIV粒子は十分に感染性を有することを示している。また、Apobec3をノックダウンすることによって、ウイルスの感染性が上昇するとの再現性のある結果を得られなかった。これらの結果から、ラットT細胞で作られるHIV-1粒子の感染性低下はENV蛋白に原因があることが分かった。また、この実験系に於いてラットApobec3は感染性低下の大きな要因ではないと考えられた。

3) HIVの侵入過程で働く阻害因子の同定

レトロベクターを用いてラットcDNAを導入したHIV-1抵抗性のヒト細胞21クローンを得た。そのなかからactin related protein 2/3 complex subunit 1A

と ribosomal protein S23、Ubiquitin-A-52 residue ribosomal protein fusion product の遺伝子を同定した。しかし、見出した遺伝子をさらに分析したところ、HIV-1 感染耐性とは無関係であることが分かった。

4. 考察

以前の当研究室における解析から、ラットT細胞由来のウイルス粒子はゲノムRNAを含み、Gagの正常なプロセッシングが起こっており、構造自体は正常だとみなしていた。しかし、今回、HIV-1 Env蛋白をVSV-Gと入れ替えることより、ウイルス粒子の感染性を完全に回復させられることが分かった。この結果からラットT細胞由来のHIV-1粒子のEnvの機能が低い、もしくは取り込まれたEnvの蛋白量が少いことが考えられる。今後、ラットT細胞における、HIV-1Envの発現及び粒子のAssemblyに関わるEnv自身の性質と宿主因子の同定へと進んでいきたい。関連する細胞因子を同定するために、EnvのPull-down assay を検討し、Env糖鎖合成関連遺伝子に注目したい。

HIVの侵入過程で働く阻害因子をクローニングするために、スクリーニングする細胞を代えることを計画している。また、当研究室は、ヒト細胞と同様の感染効率を示すラットT細胞株も有しているので、侵入効率に関して両極をなすラットT細胞の発現プロファイルをマイクロアレイにより比較し、候補遺伝子をしばる方法も試みたい。

5. 自己評価

1) 達成度について

本年度の研究結果からラットT細胞由来のHIV-1粒子感染性の低い原因の一端が明らかになったが、詳細的な宿主因子の同定までには至っていない。本年度は当研究所の耐震工事の為に引越に時間を取られ、かつ、P3設備の使用制限や、超遠心機を稼働できない中で実験を進めざるをえなかった。しかし、HIV大量発現系の確立とEnvの関与の発見により研究方向が定まったことは次年度の研究の急速な発展につながると考えている。

2) 研究成果の学術的・社会的意義について

本研究で同定された阻害因子/原因因子のノックダウン・トランスジェニックラットを作成することにより、HIV感染ラットモデルの作成につながる。このラットは特別な技術や設備を持たない研究グループでも新しい治療と予防法開発のために広く利用できる。さらに、本ラットは近交系であるために詳細な免疫学的手法が利用でき、かつ発生工学的手法により免疫系遺伝子等を欠損させることを通じて、HIVの複製/発症に関与する因子の同定にも寄与できる。同定された阻害因子がファミリーをなしている可能性も高く、HIVの感染に限らず、他のレンチウイルスの感染抑制への効果も考えられ、げっ歯類がレンチウイルスfreeであることの原因の解明につながる。

3) 今後の展望について

ラットT細胞由来のHIV-1粒子にはEnv蛋白の機能（もしくは発現量）に欠陥がある事が示唆され

た。今後ラットT細胞でHIV-1 Envの発現及び粒子のAssemblyの分析とEnv Pull-down assay, 糖鎖合成関連遺伝子クローニングなどの方法を組み合わせることにより、HIV粒子の感染性減弱因子の同定ができると考えている。また Functional cloningの手法およびマイクロアレイなどの方法よりHIVの侵入過程で働く阻害因子の同定を進める予定である。

6. 結論

ウイルス粒子を詳細に検討するために、HIV-1の効率的な複製を支持するラット細胞株の確立に成功した。ラットT細胞由来ウイルス粒子の感染性低下の原因としてEnvを見出した。

7. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

該当なし

8. 研究発表

なし

研究課題名：HIV 感染とエイズ発症の阻止および治療に関わる基礎研究

課題番号：H18-エイズ一般-011

主任研究者：佐多徹太郎（国立感染症研究所感染病理部・部長）

分担研究者：横田恭子（感染研免疫部・室長）、田中勇悦（琉球大学医学部・教授）、宮澤正顕（近畿大学医学部・教授）、神奈木真理（東京医科歯科大学医学部・教授）、有吉紅也（長崎大学熱帯医学研究所・教授）、塩田達雄（大阪大学微生物病研究所・教授）、石坂幸人（国立国際医療センター研究所・部長）、徳永研三（感染研感染病理部・主任研究官）、高橋秀宗（感染研感染病理部・室長）、岩本愛吉（東大医科研・教授）、小柳義夫（京大ウイルス研・教授）

1. 研究目的

HIV 感染病態の基礎的な解析に焦点をあて、感染防御免疫機構の増強、そして抗 HIV 薬剤やワクチン開発に役立てる。(1) HIV 感染免疫防御機構：樹状細胞の抗原提示能の増強と HIV 感染伝播阻止、T 細胞免疫応答の調節、また HIV 曝露非感染者で強く発現している遺伝子の免疫防御機構、生体分子を標的とした HIV 複製抑制機構の解析、そしてエイズ進行遅延型の感染者に特異的な CTL エピトープの解析と提示効率の評価を行うことにより、HIV 感染予防や免疫治療、ワクチン開発に役立てる。(2) HIV 感染に関わる自然免疫等の宿主因子の解析：アジア人の HIV 感染感受性や病態進行に関与する遺伝子多型、マクロファージ感染に必須な Vpr 機能と自然免疫シグナル伝達、APOBEC3G および HIV-1 Vif 蛋白による宿主の防御機構とウイルスの回避機構、HIV envelope 結合因子を解析し、ウイルスの複製阻害や自然免疫を増強する薬剤や遺伝子治療等の開発に役立てる。(3) HIV 感染病態の解明：慢性感染期における病態を解明するために、少量の末梢血を用いてサイトカインの役割や HIV 特異的 CTL などの細胞機能を解析する。エイズ脳症の発症機序を解明する目的で、神経細胞の障害性と分化能を解析し、関わる因子を探す。また in vitro 培養系においてウイルス感染動態や関与分子の機能を解析し、治療に役立つ知見を見いだす。

2. 研究方法

- (1) HIV 感染免疫防御機構：HIV-1 shRNA 発現および IFN- γ 遠位 promoter による T 細胞活性化モニター用組換えレンチウイルス、GFP 発現 X4 型と DsRed 発現 R5 型 HIV-1 を作製し検討した（横田）。ヒト単球を IL4 と IFN- β 存在下で抗原刺激し成熟 DC を培養し、精製アロ CD8+細胞への刺激活性を見た。OX40/OX40L の発現は FCM で、機能解析には組換え体と強制発現細胞株を用いた（田中）。ゲノム塩基配列比較で、曝露非感染者に特定ハプロタイプが集積していた Rac2 下流イントロンの発現調節機能をルシフェーゼ法で調べた（宮澤）。ヒト末梢血単核球からマクロファージを誘導し、野生型 HIV-1 あるいは pseudotype HIV-1 を感染させ、種々の候補分子や細胞を加え HIV-1 複製への影響を調べた。単球系の HIV-1 転写レポーター細胞株を新たに作成した（神奈木）。CTL エピトープ領域を 15 アミノ酸領域まで同定する。臨床株 gag 発現ベクターの作成を行った（有吉）。
- (2) HIV 感染に関わる自然免疫等の宿主因子の解析：ESN32 名と HIV-1 感染者 36 名について、DNA チップを用いて遺伝子多型 1 万箇所を検討した結果見出された $P < 0.001$ で頻度に差がある多型について、より大規模な集団で検討し直した（塩田）。高度に精製した rVpr をマクロファージの培養系に添加しウイルス感染効率を、また U1 細胞を用いてウイルス再産生機序を解析した（石坂）。サブタイプ B と C の vif 遺伝子間で組換えを行い、Vif 蛋白の抗 APOBEC3G 活性を規定する領域の同定を行った（徳永）。ウイルス粒子コアの成熟、収縮に伴う Gag と envelope の関係変化について、detergent を用いた蔗糖密度勾配法を用いて解析した（高橋）。
- (3) HIV 感染病態の解明：セットポイントの異なる HIV 感染者群の末梢血単核球を PHA で刺激し、上清中に産生された多数のサイトカイン・ケモカインを蛍光マイクロビーズアレイシステムにて測定した（岩本）。マウス神経細胞分化培養系で神経細胞内ミトコンドリアおよび軸索突起伸長の機能評価を行った（小柳）。同一サル胎仔脳から種々の培養細胞系を確立し SIV 感染による影響を解析した（佐多）。

倫理面への配慮

遺伝子組み換え、ないしヒトゲノム・遺伝子に関する研究については法律ない倫理指針を遵守する。海外の材料については当該国における指針を遵守する。臨床材料の提供を受ける場合は、倫理委員会による承認を得る。動物実験は各施設の実験動物委員会の承認をうけ、動物に与える苦痛の軽減と排除に勤める。

3. 研究結果

HIV 感染初期に R5 型が選択的に増殖するのは T 細胞活性化レベルに依存すること、shRNA 発現レンチウイルス導入により DC から CD4+T への HIV 伝播増殖を制御可能であることが示された（横田）。本 DC は R5-HIV-1 に耐性であり、アロ CD4+T よりも CD8+T 細胞を強く刺激した。また、OX40 を細胞表面に発現した。活性化 CD4+T 細胞を OX40L で刺激すると R5 HIV-1 感染に抵抗した（田中）。HIV 曝露非感染者の遺伝的要因として、Rac2 イントロンエンハンサーの機能的多型が同定された（宮澤）。複数の TLR-ligand

がマクロファージの HIV-1 複製を抑制した。この抑制には I 型 IFN 中和抗体で部分的に阻害された。これ以外に、K562 細胞はマクロファージの HIV-1 複製に対し正負両方の効果を示した。K562 細胞の DNA アレイ解析の結果、候補分子が 1 個見つかった (神奈木)。昨年解析した人々とは重複しないランパンの ESN52 名と HIV-1 感染者 181 名について、昨年見出された $P < 0.001$ で頻度に差がある多型 12 箇所のうち 8 箇所について検討し、2 箇所について DNA チップの結果と同様の傾向を認めた (塩田)。76 名のエイズ進行遅延型 HIV 感染者の Gag CTL エピトープ認識パターンに関する 2 年以上に渡る追跡実験、および 114 組の HIV 感染夫婦における全 Gag 領域のシーケンス解析、臨床株由来 Gag 遺伝子を発現する CTL 標的 B リンパ細胞ラインを作製した (有吉)。rVpr 添加によりマクロファージへのウイルス感染効率が数倍上昇し、ATM 阻害剤で抑制された。DSB サイトにウイルス DNA が挿入された。rVpr によるウイルス再産生に IL6 が関与していることを明らかにし p38 に対する阻害剤の添加により Vpr-誘発 IL6mRNA 転写誘導が阻害された (石坂)。サブタイプ B・C キメラ Vif 発現ベクターの作製により、N 末端 28 アミノ酸領域にサブタイプ C 特異的高活性の責任領域が存在することを明らかにした (徳永)。HIV-1 粒子のコア成熟においては酸化により一体となった Gag が収縮していること、envelope が連動していることが判明した。感染実験により、粒子表面の envelope はコアの成熟、収縮に連動して除去されていることが示唆された (高橋)。25 種類のサイトカインのうち高 HIV 群と低 HIV 群で有意差があったのは MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, IL-2R であり、前 3 者ではウイルス量と逆相関を示した (岩本)。HIV 感染マクロファージにより神経組織内の細胞間配位に障害が起こることがわかった。神経細胞分化障害としてラメリポディア形成には異常はないが、樹状突起の成長と軸索突起の極性決定過程が障害された (小柳)。混合培養系でウイルス増殖とケモカイン・サイトカイン・リン酸化蛋白が増加した (佐多)。

4. 考察

それぞれの研究結果により、HIV 感染予防や免疫治療、ワクチン開発、ウイルスの複製阻害や自然免疫を増強する薬剤、遺伝子治療等の開発に治療に役立つ基礎的知見が得られつつある。

5. 自己評価

1) 達成度について

本年度は概ね達成された。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

新知見が得られた。

3) 今後の展望について

本年度に得られた結果をもとにさらに発展させ、感染防御免疫機構の増強、そして抗 HIV 薬剤やワクチン開発に役立てられる。

6. 結論

HIV 増殖抑制により Gag 特異的 CD4+ T 細胞増殖応答が回復した (横田)。IL-4 と IFN- β 培地下で KLH 等の刺激後培養すると 3 日間でユニークな DC が誘導される。この DC の HIV 免疫誘導活性、エイズ抑制効果が期待できる (田中)。HIV 曝露非感染状態を規定する遺伝要因の一つは、Rac2 下流領域のエンハンサー多型である (宮澤)。複数の TLR-ligand がマクロファージの HIV-1 複製を抑制するが、I 型インターフェロンの関与は部分的であった (神奈木)。CRF01_AE 感染における B*57, B*58 と関連する T242 変異とエイズ進行遅延との関係を明らかにした (有吉)。HIV-1 に暴露されながらも感染を免れている人には多型が 12 箇所見出され、うち 2 カ所で DNA チップの結果と一致した (塩田)。Vpr は静止マクロファージに対するウイルス再産生と感染に関与しており、潜伏感染病態を理解するための重要なウイルス蛋白質であることが示唆された (石坂)。HIV-1 サブタイプ C-Vif の高い抗 APOBEC3G 活性は、Vif の APOBEC3G への結合能に関わる N 末領域に規定される (徳永)。コアの成熟が収縮によるものであること、envelope が収縮の影響をうけることが判明した (高橋)。慢性感染期の HIV 感染者で HIV 量の高い感染者と低い感染者の末梢血単核球において PHA 刺激に対する MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES 産生能が有意に異なっていた (岩本)。エイズ脳症の治療薬開発の可能性がでてきた (小柳)。SIV 増殖脳培養細胞系での解析が可能となった (佐多)。

7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定をふくむ)

長嶋和郎、澤洋文、高橋秀宗、前田才恵、特許第 4028440 号、mRNA 安定化機構を阻害して抗因子剤として作用する薬剤のスクリーニング系、平成 19 年 10 月 19 日

Kanari, Y., M. Miyazawa, S. Irie, and M. Clerici, inventors. Method for diagnosis and induction of resistance to virus. International Patent Application PCT/JP2007/068591, filed September 12, 2007. (国際特許出願)

研究発表

主任研究者 (佐多徹太郎)

1. Iwata N, Yoshida H, Tobiume M, Ono F, Shimazaki T, Sata T, Nakajima N.: Simian fetal brain progenitor cells for studying viral neuropathogenesis. *J Neurovirol.* 2007;13(1):11-22.

分担研究者 (下記のほか7編)

横田恭子

1. Yamamoto, T and Tsunetsugu-Yokota, Y. Prospects for the therapeutic application of lentivirus-mediated gene therapy to HIV-1 infection. *Curr. Gene Therapy*, in press

2. Nitahara-Kasahara, Y., Kamata, M., Zhang, X., Muneta, K., Miyamoto, Y., Yamamoto, T., Iijima, S., Yoneda, Y., Tsunetsugu-Yokota, Y., Aida, Y. A novel nuclear import of Vpr promoted by importin alpha is crucial for HIV-1 replication in macrophage. *J. Virol.* 81:5284-5293, 2007

3. Tsunetsugu-Yokota, Y., Ishige, M., Murakami, M.: Attenuated *Salmonella Typhimurium* expressing codon-optimized HIV-1 Gag potentiated Gag-specific CD8+ T cell-response in intestinal mucosa. *Aids Res. Hum. Retro.* 23:278-286, 2007

田中勇悦

1. Okuma K, Tanaka R, Ogura T, Ito M, Kumakura S, Yanaka M, Nishizawa M, Sugiura W, Yamamoto N. and Tanaka Y.: The IL-4-Transgenic hu-PBL-SCID Mice: a Model for Screening of Anti-Viral Drugs and Immunotherapeutic Agents against X4 HIV-1 Viruses. *J Infect Dis*, in press.

2. Takahashi Y, Tanaka R, Yamamoto N, and Tanaka Y.: Enhancement of OX40-induced apoptosis by TNF co-activation in OX40-expressing T cell lines in vitro leading to decreased targets for HIV-1 production. *AIDS Res Hum Retroviruses*, in press.

3. Kubo Y, Yokoyama M, Yoshii H, Mitani C, Tominaga C, Tanaka Y, Sato H, Yamamoto N.: Inhibitory role of CXCR4 glycan in CD4-independent X4-tropic human immunodeficiency virus type 1 infection and its abrogation in CD4-dependent infection. *J Gen Virol.* 88:3139-44, 2007

4. Kondo K, Okuma K, Tanaka R, Zhang LF, Kodama A, Takahashi Y, Yamamoto N, Ansari AA, Tanaka Y. Requirements for the functional expression of OX40 ligand on human activated CD4+ and CD8+ T cells. *Hum Immunol.* 68(7): 563-71. 2007.

宮澤正顯

1. Miyazawa M, Tsuji-Kawahara S, and Kanari Y.: Host genetic factors that control immune responses to retroviral infections. *Vaccine*, in press, 2008.

2. Biasin, M., L. Piacentini, S. Lo Caputo, Y. Kanari, G. Magri, D. Trabattini, V. Naddeo, L. Lopalco, A. Clivio, E. Cesana, F. Fasano, C. Bergamaschi, F. Mazzotta, M. Miyazawa and M. Clerici. APOBEC3G: A possible role in resistance of HIV-exposed seronegative individuals. *J. Infect. Dis.* 195:960-964, 2007.

3. Tanaka-Takahashi, Y., M. Yasunami, T. Naruse, K. Hinohara, T. Matano, K. Mori, M. Miyazawa, M. Honda, Y. Yasutomi, Y. Nagai, and A. Kimura. Reference strand-mediated conformation analysis (RSCA)-based typing of multiple alleles in the rhesus macaque MHC class I Mamu-A and Mamu-B loci. *Electrophoresis* 28:918-924, 2007.

神奈木真理

1. Kubo M, Nishitsuji H, Kurihara K, Hayashi T, Masuda T, Kannagi M. Suppression of human immunodeficiency virus type 1 replication by arginine deiminase of *Mycoplasma arginini*. *J Gen Virol* 2006; 87:1589-93.

2. Nishitsuji H, Kohara M, Kannagi M, Masuda T. Effective suppression of human immunodeficiency virus type 1 through a combination of short- or long-hairpin RNAs targeting essential sequences for retroviral integration. *J Virol* 2006;80:7658-66.

有吉紅也

1. Wichukchinda N, Kitamura Y, Rojanawiwat A, Nakayama EE, Song H, Pathipvanich P, Auwanit W, Sawanpanyalert P, Iwamoto A, Shioda T, Ariyoshi K. The polymorphisms in DC-SIGNR affect susceptibility to HIV type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2007 May;23(5):686-92.

塩田達雄

1. Song, H, Nakayama, EE, Likanonsakul, S, Wasi, C, Iwamoto A, and Shioda T. A three-base-deletion polymorphism in the upstream non-coding region of human interleukin 7 (IL-7) gene could enhance levels of IL-7 expression. *International Journal of Immunogenetics.* 2007;34:107-13.

2. Raphael Lwembe, Washington Ochieng, Annie Panikulam, Charles O. Mongoina, Mary Owens, Yusuke Koizumi, Seiji Kageyama, Naohiko Yamamoto, Tatsuo Shioda, Rachel Musoke, Angel D'Agostino, Elijah M. Songok, Hiroshi Ichimura. Anti-retroviral drug resistance-associated mutations among non-subtype B HIV-1-infected Kenyan children with treatment failure. *J. Med. Virol.* 2007;79:865-72.

3. Masahisa Ohishi, Tatsuo Shioda, and Jun-ichi Sakuragi.: Retro-transduction by virus pseudotyped with

glycoprotein of vesicular stomatitis virus. *Virology*. 2007;362:131-8.

4. Yusuke KOIZUMI, Seiji KAGEYAMA, Yoshihide FUJIYAMA, Michiko MIYASHITA, Raphael LWEMBE, Keiki OGINO, Tatsuo SHIODA, Hiroshi ICHIMURA.: RANTES -28G delays and DC-SIGN -139C enhances AIDS progression in HIV-1-infected Japanese hemophiliacs. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 2007;23:713-9.

5. Nakayama EE, Carpentier W, Costagliola D, Shioda T, Iwamoto A, Debre P, Yoshimura K, Autran B, Matsushita S, Theodorou I: Wild type and H43Y variant of human TRIM5alpha show similar anti-human immunodeficiency virus type 1 activity both in vivo and in vitro. *Immunogenetics*. 2007 ;59:511-5.

6. Song H, Nakayama EE, Yokoyama M, Sato H, Levy JA, Shioda T.: A single amino acid of the human immunodeficiency virus type 2 capsid affects its replication in the presence of cynomolgus monkey and human TRIM5alphas. *J Virol*. 2007;81:7280-5.

7. Sakuragi J, Sakuragi S, Shioda T.: Minimal region sufficient for genome dimerization in the human immunodeficiency virus type 1 virion and its potential roles in the early stages of viral replication. *J Virol*. 2007;81:7985-92.

8. Koh Y, Matsumi S, Das D, Amano M, Davis DA, Li J, Leschenko S, Baldrige A, Shioda T, Yarchoan R, Ghosh AK, Mitsuya H.: Potent inhibition of HIV-1 replication by novel non-peptidyl small molecule inhibitors of protease dimerization. *J Biol Chem*. 2007;282:28709-20.

9. Liu H, Nakayama EE, Theodorou I, Nagai Y, Likanonsakul S, Wasi C, Debre P, Iwamoto A, Shioda T.: Polymorphisms in CCR5 chemokine receptor gene in Japan. *Int J Immunogenet*. 2007;34:325-335.

10. Nuanjun Wichukchinda, Emi E Nakayama, Archawin Rojanawiwat, Panita Pathipvanich, Wattana Auwanit, Suthon Vongsheree, Koya Ariyoshi, Pathom Sawanpanyalert, and Tatsuo Shioda.: Effects of CCR2 and CCR5 polymorphisms on HIV-1 infection in Thai females. *Journal of AIDS*. in press

石坂幸人

1. Hoshino, S., Sun, B., Konishi, M., Shimura, M., Segawa, T., Hagiwara, Y., Koyanagi, Y., Iwamoto, A., Mimaya, J., Terunuma, H., Kano, S. and Ishizaka, Y.: Vpr in plasma of HIV-1-positive patients is correlated with the HIV-1 RNA titers. *AIDS Res. Hum. Retrovir*. 23, 391-397, 2007.

2. Nakai-Murakami, C., Shimura, M., Kinomoto, K., Takizawa, Y., Tokunaga, K., Taguchi, T., Hoshino, S., Miyagawa, K., Sata, T., Kurumizaka, H., Yuo, A. and Ishizaka, Y.: HIV-1 Vpr induces ATM-dependent cellular signal with enhanced homologous recombination. *Oncogene* 26, 477-486, 2007.

徳永研三

1. Kinomoto M, Kanno T, Shimura M, Ishizaka Y, Kojima A, Kurata T, Sata T, Tokunaga K (2007) All APOBEC3 family proteins differentially inhibit LINE-1 retrotransposition. *Nucleic Acids Res*. 35: 2955-2964.

2. Kameoka M, Kitagawa Y, Utachee P, Jinnapat P, Dhepakson P, Isarangkura-Na-Ayuthaya P, Tokunaga K, Sato H, Komano J, Yamamoto N, Oguchi S, Natori Y, Ikuta K (2007) Identification of the suppressive factors for human immunodeficiency virus type-1 replication using the siRNA mini-library directed against host cellular genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 359: 729-734.

高橋秀宗

1. Takahashi, H. Maeda, M. Sawa, H. Hasegawa, H. Moriyama, M. Sata, T. Hall, W.W. and Kurata, T. Dicer and positive charge of proteins decrease the stability of RNA containing the AU-rich element of GM-CSF. *Biochem Biophys Res Commun* 340, 807-814, 2006

岩本愛吉

1. Hosoya, N., Miura, T., Kawana-Tachikawa, A., Shioda, T., Odawara, T., Nakamura, T., Kitamura, Y., Kano, M., Kato, A., Hironaka, T., Hasegawa, M., Nagai, Y., and Iwamoto, A. Comparison between Sendai virus and Adenovirus vectors in induction of HIV-1 genes into human dendritic cells. *J. Medical Virology*, 2007 In press..

小柳義夫

1. Sato K, Aoki J, Misawa N, Daikoku E, Sano K, Tanaka Y, and Koyanagi Y. Modulation of human immunodeficiency virus type 1 infectivity through incorporation of tetraspanin proteins. *J. Virol*. in press.

2. Kitayama H, Miura Y, Ando Y, and Koyanagi Y, Human immunodeficiency virus type-1 vulnerates nascent neuronal cells. *Microbiol Immunol.*, in press.

3. Koyanagi Y, Tanaka Y, Ito M, and Yamamoto N, Humanized mice for human retrovirus infection. *Curr Top Microbiol Immunol*, in press.

4. Yoshida T, Kawano Y, Sato K, Ando Y, Aoki J, Miura Y, Komano J, Tanaka Y, Koyanagi Y. A CD63 mutant inhibits T-cell tropic HIV-1 entry by disrupting CXCR4 trafficking to the plasma membrane. *Traffic*, in press.

5. Kitayama H, Miura Y, Ando Y, Hoshino S, Ishizaka Y, Koyanagi Y. Human immunodeficiency virus type-1 Vpr inhibits axonal outgrowth through induction of mitochondrial dysfunction. *J. Virol*. in press.

研究課題：男性同性間の HIV 感染対策とその評価に関する研究

課題番号：H17-エイズ-004（3年度）

主任研究者：市川 誠一（名古屋市立大学看護学部 教授）

分担研究者：佐藤 未光（ひかりクリニック・院長）、内海 眞（高山厚生病院・院長）、鬼塚 哲郎（京都産業大学・教授）、山本 政弘（国立病院機構九州医療センター・免疫感染症科感染症対策室長）伊藤 俊広（独立行政法人国立病院機構仙台医療センター・内科医長）

1. 研究目的

MSM(Men who have sex with men)における HIV/AIDS は東京や大阪に加え地方都市でも増加している。この現状に対して、本研究では MSM における HIV//STI 拡大を防止するために、仙台、東京、名古屋、大阪、福岡地域でゲイ CBO(地域ボランティア組織)と協働体制を構築し、当事者性のある啓発資材や普及方法を開発し、MSM が利用する商業施設等を介したコミュニティベースの啓発を展開した。

2. 研究方法

対象地域は感染者・患者の報告数が多い大都市(東京、名古屋、大阪)、増加傾向にある地方都市(福岡、仙台)で、ゲイコミュニティの規模、脆弱性の程度、ボランティア活動の規模等によって地域に適した活動を行った。

1)東京地域、2)名古屋地域、3)大阪地域、4)福岡地域、5)東北地域の各地域において同性間の HIV/STI 感染予防啓発の普及促進に関する研究に取り組み、また6)MSM の保健行動を促進する検査、医療の改善に関する研究、7)インターネットによる MSM の行動疫学調査およびインターネット利用層への予防介入、8)啓発プログラム評価調査および新たなニーズ評価調査、9) MSM の HIV 検査受検者の動向調査を実施した。

啓発資材の開発、普及活動は各地域の CBO(Rainbow Ring、Angel Life Nagoya、MASH 大阪、Love Act Fukuoka、THCGV) が担い、啓発プログラムの評価調査、予防・検査行動等の調査は研究者が担当した。調査は、2005 年度にゲイクラブイベント参加者、ゲイバー顧客、ゲイサークル活動参加者、インターネット利用者を対象にした予防行動等の評価調査を実施し、2006 年度には新たに携帯電話を活用した RDS 法による社会的ネットワーク調査、ゲイ商業施設が集積する地域の MSM 人口規模調査、インターネット上での予防介入プログラムを試行し、2007 年度にはエイズ拠点病院受療者の陽性判明時の CD4 数等による受検や受療行動に関する調査、グループレベル予防介入プログラム参加者へのインタビュー調査を追加実施した。

(倫理面への配慮)

調査、啓発等の内容はゲイ CBO と検討し、対象者やゲイコミュニティへの倫理的配慮を持ちつつ研究を進めた。質問紙調査等は研究者所属施設の倫理委員会審査を受けた。

3. 研究結果

1)東京地域(佐藤未光、他)：ゲイバーの商業施設を介したコンドームや啓発資材のアウトリーチ、ハッテン場を対象

とした啓発活動など、コミュニティセンターakta を中心にコミュニティベースの普及活動を展開した。また東京都等の自治体と連携して検査機関の広報を促進した。Living Together 計画は陽性者と協働で進められ、他の地方都市へも普及が図られた。クラブイベント参加者の調査により、新宿二丁目来訪頻度別の啓発プログラムへの接触状況が、来訪頻度の多い群ほどいずれのプログラムの認知度も高く、抗体検査の受検経験や身近な感染者の認知、自身の感染リスクの自認も高いことが示された。予防啓発プログラムと検査行動やリスク自認との間の関連性が示唆された。

2)名古屋地域(内海眞、他)：MSM を対象とした啓発イベント NLGR と HIV 検査会(HIV、HBV、梅毒)を継続実施し、2007 年度は 537 人の受検者数となった。これまで 7 回の HIV 検査会に延べ 2671 名が参加し 69 名が HIV 陽性(2.6%)であった。この 3 年間は保健所・医療機関の従事者との協働による検査体制が進展し、MSM の公的検査機関利用を向上させるための自治体との協力関係が進められた。エイズ拠点病院の受療者の動向調査により、CD4 陽性細胞数 200/ μ l 以下の者は全体の 36%を占め、高齢層、結婚歴を有するものに多い傾向であった。

3)大阪地域(鬼塚哲郎、他)：コミュニティペーパーSaL+ はバー顧客の 64%に認知され、その 1/3 は毎月の利用層であった。ドロップインセンターdista はほぼ順調に運営され、バー顧客の 39%が存在を認知していた。STI 勉強会はノウハウ、人材ともに充実し、参加者インタビューによる評価調査を試行した。人口規模調査から大阪のゲイ商業施設を利用する MSM 人口は 38790 人/年と推定された。予防啓発イベント PLUS+への参加率は、バー顧客調査で 2004 年 14.6%から 2007 年 26.5%に増加した。同イベント会場での調査により来場者の大半はゲイ商業施設利用者であった。HIV 受検率は 36~37%で推移し、コンドーム常用率は 5~10%向上し、当初の目標を達成した。また、大阪市エイズ施策策定に参加し、京都府との連携も進められた。

大阪・土曜日常設 HIV 検査事業での質問紙調査から MSM 受検者は 20%を占め、陽性割合は 4.7%であった。また大阪における MSM を対象にした予防啓発活動が MSM の受検に関する行動に影響を及ぼしている可能性が示された。

4)福岡地域(山本政弘、他)：地方の MSM コミュニティにおいて、コミュニティセンターhaco の存在は目に見える啓発活動の状況を作り出すこととなり、その有効性が示された。このような活動を継続していくことが効果的な予防を行なっていく上で重要と言える。また予防啓発活動においては、MSM 層をさらに細分化し対象を明確にして取り組

むことが必要と考え、ソーシャルネットワーク研究に基づいた MSM コミュニティの層別化を試みた。第 0 層 (CBO 層または予防行動が十分にできる層)、第 1 層 (予防に興味のある層)、第 2 層 (CBO に接点はあるが予防に興味のない層)、第 3 層 (コミュニティに接点はあるが CBO に接点のない層)、第 4 層 (コミュニティとの接点がない hard-to-reach 層) の各層毎に絞った啓発手法を試行した。

5) 東北地域 (伊藤俊広、他) : 仙台のゲイコミュニティに向けた啓発活動の体制作りが少しずつ整備され、安定した活動展開ができるようになった。現在、活動が到達できているコミュニティの範囲は限られており、啓発範囲の拡大や仙台以外の地域への広がりは今後の課題である。

3 年間の普及活動により、HIV に関する意識に変化が見られるが行動変容を促すには至っていない。ゲイコミュニティへの啓発の訴求を図るために、より効果的なプログラムを開発すること、行動変容を支援する環境の構築が必要である。特に地方においては行政の MSM への理解と当事者性のある活動を支援するエイズ対策の構築が求められる。

6) 地方都市部 (市川誠一、他) : 2005、2006 年度に当研究班との連携を調整した地域 (札幌、沖縄、岡山等) に対して本研究班の東京、大阪での啓発資材等を活用し、地域での具体的な対策構築への取り組みを支援した。

7) MSM の保健行動 (長谷川博史、他) : MSM の受検、受療行動の阻害要因をコミュニティ側、保健・医療側について検討し、関連して HIV 陽性者のセクシュアルヘルス向上プログラム (ワークショップ、ハンドブック) 構築を行った。

8) インターネット行動疫学調査 (日高庸晴、他) : REACH Online2005 (有効回答数 5,858 人) に続き、第 2 回目調査を実施した (6401 人の回答)。生涯 HIV 受検割合 42%、過去 1 年受検割合 22%、東京居住者の akta 認知率 29%、愛知居住者の rise 認知率 16%、大阪居住者の dista 認知率 29%、福岡居住者の haco 認知率 35%であった (中間)。

9) 啓発プログラム評価調査 (木村博和、他) : 東京ではクラブイベント参加者への調査 (1100 件)、名古屋では HIV 検査会受検者への質問紙調査 527 件およびエイズ拠点病院受療者の動向調査 540 件、大阪では第 2 回目のバー顧客への質問紙調査 1063 件、コミュニティの社会学的人口調査、大阪・土曜日常設 HIV 検査機関における受検者への質問紙調査 1880 件を実施した。また、CBO の啓発情報等の広がり把握する携帯電話-RDS 調査を東京、大阪、仙台、福岡 (2 年目) で実施した。

4. 考察

ゲイバー等の商業施設とネットワークを構築したコンドーム等の啓発資材アウトリーチ、ハッテン場への啓発活動などコミュニティセンターを中心にしたコミュニティベースの普及活動が各対象地域で展開された。訴求性の高い啓発活動が各 CBO の個々のボランティア精神に依って進められている。MSM コミュニティにおいては、コミュニティセンターのような「啓発活動が目に見える状況を作り出す事業」が有効で、この活動を継続することが効果的な予防を行っていく上で重要と考える。そのためには行政

の MSM への施策と参加が必要不可欠である。HIV 感染者の動向はいずれの地域も MSM における HIV 感染対策が一層重要であることを示している。また本研究班の 5 地域のゲイ CBO と他の地域の MSM とネットワークを形成することは全国の MSM における HIV 感染対策の基盤として必要と考える。

5. 自己評価

1) 達成度について

3 年間の年次計画はほぼ進行した。東京、名古屋、大阪、福岡、仙台の各 CBO は MSM が利用する商業施設等と連携してコンドームや啓発資材のアウトリーチを展開した。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

ゲイ NGO とパートナーシップを構築し、HIV 予防介入事業のプロセス、プログラム、アウトリーチ等の成果を評価する新たな調査 (MSM 人口調査、携帯電話による社会的ネットワーク調査、プログラム参加者のインタビュー調査、エイズ拠点病院受療者の動向調査) を実施した。これらは国際的研究としても意義が高い。

3) 今後の展望について

現在のわが国のエイズ発生動向は、MSM における HIV 感染対策の必要性を示している。MSM における HIV 感染者の増加傾向は今後も続き、全国的に対策が望まれる状況になる。本研究では MSM の現状を最も確に把握しゲイコミュニティに基盤をおく CBO が、研究者と協働しながら感染拡大への対応を担ってきた。HIV/AIDS が増加している現状に対して当研究班の CBO とゲイコミュニティのネットワークによる啓発普及は益々重要であり、そのための研究事業の継続と発展が望まれる。

6. 結論

地域のゲイ CBO は商業施設等を介した予防啓発を継続し、効果的かつ継続的な啓発体制の構築を図った。ゲイ CBO の活動は MSM に訴求力のある啓発資材の開発からコミュニティセンターの運営まで多岐にわたる。コミュニティセンターは地域の活動を定着し、MSM に訴求力のある啓発資材の開発と普及を可能にし、行政との連携を促進している。東京で開発された「Living Together 計画」は陽性者の視点を含めた HIV 感染対策として他の地域にも拡大し、また他の個別施策層にも有用なものとして評価される。

東京、大阪での質問紙調査によれば、啓発資材は主に 20-30 歳代層に訴求し、検査行動、予防行動の促進が示唆された。また、大阪では商業施設集積地域の MSM 人口が推定された。福岡や他の地域で携帯電話を利用した社会的ネットワーク調査が実施され、啓発資材の広がりを通って評価する手法が開発された。また MSM ネット利用層の行動調査により全国の MSM の動向が把握され、ネット上での予防介入プログラムが初めて試行された。

7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

なし。

研究発表

主任研究者

市川誠一

○研究課題に基づく指針・ガイドライン等

- 1) 市川誠一、内海 眞、鬼塚哲郎、木村博和、佐藤 功、佐藤未光、長谷川博史、日高庸晴、山本政弘：男性同性間の HIV 感染対策に関するガイドライン-地方自治体における男性同性間の HIV 感染対策への対応とコミュニティセンターの役割と機能-、(2005 年度)、2006
- 2) Seiichi Ichikawa, et al : Guidelines for HIV/AIDS Prevention and Support for Men Who Have Sex with Men (MSM) / For Local Government Initiatives (FY 2005 edition), Specific Disease Control Division, Health Service Bureau, Ministry of Health Labour and Welfare, Japan, 2007, 3, 1-36.
- 3) 日高庸晴、市川誠一、古谷野淳子、浦尾充子、安尾利彦、木村博和、木原正博：ゲイ・バイセクシュアル男性の健康レポート、財団法人エイズ予防財団・厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究推進事業、2005

○論文

- 1) ○金子典代、市川誠一、辻宏幸、鬼塚哲郎：健康教育ツールを開発しよう、計画③対象者にひびくメッセージをつくらう、保健師ジャーナル、2008、64 巻 1 号、印刷中
- 2) ○市川誠一、張由紀夫、佐藤未光：MSM コミュニティにおけるコミュニティセンターakta の役割と活動、保健医療科学、2007、56 巻 3 号、230-234
- 3) ○金子典代、内海眞、市川誠一。東海地域のゲイ・バイセクシュアル男性の HIV 抗体検査の受検動機と感染予防行動、日本看護研究学会雑誌、2007、30 巻 4 号、37-43
- 4) ○金子典代、市川誠一、辻宏幸、後藤大輔、塩野徳史、鬼塚哲郎：健康教育ツールを開発しよう、計画②ツールを使えるものにするための最後の押さえどころ-MASH 大阪による健康教育資材の紹介、保健師ジャーナル、2007、63 巻 12 号、1142-1149
- 5) ○市川誠一：わが国の男性同性間の HIV 感染対策について-ゲイ NGO の活動を中心に-、日本エイズ学会誌、2007、9 巻 1 号、23-29
- 6) Saman Zamani, Seiichi Ichikawa, Bijan Nassirimanesh, Mohsen Vazirian, Kazuko Ichikawa, Mohammad Mehdi Gouya, Parviz Afshar, Masako Ono-Kihara, Shahrzad Mortazavi Ravari, Masahiro Kihara: Prevalence and correlates of hepatitis C virus infection among injecting drug users in Tehran, International Journal of Drug Policy, 2007, 18, 359- 363
- 7) ○ Hidaka, Y., Ichikawa, S., Koyano, J., Urao, M., Yasuo, T., Kimura H, Ono-Kihara, M., Kihara M: Substance use and sexual behaviours of Japanese men who have sex with men: A nationwide internet survey conducted in Japan, BMC Public Health, 2006, 6: 239-246
- 8) Zamani, S., Kihara, M., Gouya, M. M., Vazilian, M., Ono-Kihara, M., Razzaghi, E. M., and Ichikawa, S.: Prevalence of and factors associated with HIV-1 infection among drug users visiting treatment centers in Teheran, Iran. 2005, AIDS, 19(7), 709-716
- 9) Zamani, S., Kihara, M., Gouya, M. M., Vazilian, M., Nassirimanesh, B., Ono-Kihara, M., Mortazavi, R. S., Safaie A., and Ichikawa, S.: High prevalence of HIV infection associated with incarceration among community-based injecting drug users in Teheran, Iran, 2006, J. of AIDS, 342-3462)

分担研究者

佐藤未光

- 1) ○市川誠一、張由紀夫、佐藤未光：MSM コミュニティにおけるコミュニティセンターakta の役割と活動、保健医療科学、2007、56 巻 3 号、230-234
- 2) ○Seiichi Ichikawa, Mio Sato, Yukio Cho, Junko Araki, Tetsuro Onitsuka, Hiroyuki Tsuji, Sohei Yamada, Makoto Utsumi, Masahiro Yamamoto, Sato Isao: The role and activities of gay community centers spaces in Tokyo, Osaka, Nagoya, and Fukuoka in Japan, 8th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific August, 2007, Sri Lanka

内海 眞

- 1) ○金子典代、内海眞、市川誠一。東海地域のゲイ・バイセクシュアル男性の HIV 抗体検査の受検動機と感染予防行動、日本看護研究学会雑誌、2007、30 巻 4 号、37-43