

20100900/B

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

多様なエイズウイルス株の感染を制御する
宿主応答の同定

平成20年度～22年度 総合研究報告書

研究代表者 森 一泰

平成23(2011)年 3月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

多様なエイズウイルス株の感染を制御する
宿主応答の同定

平成20～22年度 総合研究報告書

研究代表者 森 一泰

平成23（2011）年 3月

目 次

| | |
|----------------------------------|----|
| I. 総合研究報告 | |
| 多様なエイズウイルス株の感染を制御する宿主応答の同定 ----- | 1 |
| 研究代表者：森 一泰（国立感染症研究所・主任研究官） | |
| II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- | 31 |
| III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- | 37 |

I. 総合研究報告書

多様エイズウイルス株の感染を制御する宿主応答の同定

研究代表者 森 一泰（国立感染症研究所 主任研究官）

研究要旨

HIV ワクチン研究の課題である感染を制御する宿主応答は未だに未解明のままとなっている。有効なワクチンが開発された病原体の場合と異なり、大多数の人は HIV の感染を自然に制御することができない。理由の一つは、HIV は免疫細胞に感染し免疫機能に障害を起こすためである。しかし健常人に HIV 抗原を免疫して HIV 感染を抑制する宿主応答を誘導する試みは成功していない。HIV は宿主免疫応答から逃れるための性質を備えているためである。ところが、HIV 感染制御は不可能ではないことを示す例が HIV 感染、SIV 動物モデルで報告されている。低病原性 HIV/SIV 感染により病原性 HIV/SIV 感染を抑制する宿主応答が誘導されることが報告されている。

本研究では、霊長類 SIV 感染エイズ発症モデルを用いて、低病原性糖鎖変異株（生ワクチン）感染ザルに誘導された SIV 感染防御免疫について解析し、HIV ワクチンへの有用性について検討した。感染防御免疫のウイルス多様性に対する有効性を調べるために、HIV-1 サブタイプ間と同等の相違性を持つ SIVsmE543-3 をチャレンジウイルスとして用いた。宿主の遺伝的多様性もワクチン効果に影響することから、実験に用いたアカゲザルの MHC-I、II 遺伝子アレルを決定した。ワクチン効果：ワクチン群の約半数で低レベルの初期感染が検出された。その後すべてのサルで、血中ウイルス量は、感染後 4 週から 10 週まで検出限界以下に抑制された。慢性感染において個体差が認められた。7 頭（感染制御群）では、感染後 80 週以上の期間、感染制御は維持された。しかし 4 頭（非感染制御群）では持続感染が起り、3 頭ではワクチンとチャレンジウイルスとの組換えウイルスが出現し増殖した。感染制御に働く宿主応答：チャレンジウイルスに対する中和抗体は検出されなかった。末梢血中の SIV 特異的 CD8+T 細胞の頻度と多機能性（IFN- γ , TNF- α , IL-2 産生）について細胞内サイトカイン法により調べた。1 機能（IFN- γ 産生細胞）が大半を占め、感染制御群と非感染制御群の間において、多機能性、または SIV 特異的 CD8+T 細胞の頻度における有意な差は認められなかった。CD8+細胞の役割：感染制御における CD8+細胞の重要性は、CD8+細胞 depletion 実験により確認された。さらに、慢性期、感染制御における IL-15 応答性 CD8+細胞（NK 細胞、T 細胞）の重要性が明らかとなった。初期感染抑制の重要性：初期感染の制御は、宿主の遺伝的多型性の影響が少なく、ウイルスの多様性の影響も小さい。ウイルス特異性を認識する細胞性免疫とは異なる感染抑制機序として、ウイルスレセプター結合から出芽までのライフサイクルにおけるウイルス複製阻害が考えられる。感染標的細胞の感染性に影響を与える免疫細胞の機能と感染制御に果たす役割が示唆される。

分担研究者

木村 彰方 東京医科歯科大学
難治疾患研究所 教授
宮澤 正顯 近畿大学医学部 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
岡村 智崇 医薬基盤研究所・霊長類医科学
研究センター 研究員
駒野 淳 国立感染症研究所
エイズ研究センター 主任研究官
中村紳一郎 滋賀医科大学・動物生命科学研究
センター 准教授

A. 研究目的

HIV の発見から 25 年以上が経過し、その間 HIV 感染症の治療、ワクチン開発の研究が行われてきた。抗 HIV 薬については、次々に新たな治療が開発され、服薬により HIV 感染の制御は可能となった。しかし抗 HIV 薬による感染抑制にも拘わらず感染者には HIV 感染を制御する宿主免疫は誘導されない。すなわち HIV 感染症の治癒には、感染制御に必要な免疫機能を与える治療が求められる。HIV ワクチンは、HIV 感染の予防、感染者における感染ウイルス量のレベルを低下させることにより、HIV 感染率を低下させ、感染症の流行を抑制することが期待される。抗 HIV 薬の開発研究においては HIV 複製に関わる HIV タンパクの機能を阻害する薬剤の開発であり、研究開発の戦略を立てることは容易であった。しかし HIV ワクチン研究の課題である感染を制御する宿主応答は未だに未解明のままとなっている。有効なワクチンが開発された病原体の場合と異なり、ヒトは通常 HIV の感染を制御することができない。HIV は免疫組織に感染し免疫機能に障害を起こすことが原因のひとつである。さらに感染ではなく HIV 抗原を用いた免疫によっても HIV 感染を抑制

する宿主応答を誘導することができない。後者は、ワクチン開発は従来の手法がまったく通用しないことを示唆する。

本研究では、HIV 感染制御が大部分の人においても起こるケースとして、動物モデルでの生ワクチンが誘導する防御免疫の解明を研究の目標とした。具体的には、糖鎖欠失変異 SIV が誘導する感染防御を研究の対象とし以下のポイントを課題として研究を行った。

- 1) 糖鎖欠失変異 SIV 生ワクチンにより誘導される防御免疫は流行 HIV に対し有効か。
- 2) 糖鎖欠失変異 SIV 生ワクチンは MHC 等の宿主遺伝的多様性の影響を受けるのか。
- 3) 糖鎖欠失変異 SIV 生ワクチンが誘導する感染防御の機序を明らかにする。
- 4) 糖鎖欠失変異 SIV 生ワクチンが誘導する免疫に関連する免疫組織、免疫細胞は何か。

本研究では、アカゲザルの MHC 遺伝子多型を決定し、糖鎖修飾変異生ワクチンが誘導する宿主応答について、サブタイプが異なる SIV 感染に対する防御効果の検討、感染防御の機序に関する研究を行った。

B. 研究方法

アカゲザル

ビルマ、ラオス原産、国内繁殖施設で育成された SPF(B ウイルス、SRV, STLV, SIV, SVV 抗体陰性)サルを用いた。感染後のウイルス複製動態や免疫応答能が解析されているアカゲザル個体と、今後実験に用いられる予定の個体群を対象とした。これら個体から樹立された B リンパ芽球株より総 RNA を抽出後、オリゴ dT プライマーを用いて高忠実度の逆転写反応を行い、得られた cDNA を以下の解析に用いた。ハプロタイプ構成のゲノム DNA 解析のため、ゲノム DNA も抽出した。(森、木村、宮澤、中村)

MHC クラス I 遺伝子群多型の解析

MHC クラス I 遺伝子群多型の解析: ワクチン開発研究においてワクチン接種と SIV 感染予後との関連がフォローアップされているアカゲザル 170 個体について、Mamu-A 遺伝子および Mamu-B 遺伝子の cDNA をクローニングし、塩基配列を決定した。(木村、森)

MHC class II 遺伝子多型とハプロタイプ構成の解析

各細胞株由来 cDNA をテンプレートとし、DPA, DPB, DQA, DQB 及び DRB 対立遺伝子群に特異的なプライマーペアを用いて、cDNA 全長の PCR 増幅を行った。得られた PCR 産物は、アガロースゲル電気泳動でそのサイズを確認するとともに、プライマー中に設置した制限酵素切断部位を用いて、pUC19 プラスミドへのクローニングを行い、各クローンの塩基配列を決定した。(宮澤、森)

ゲノム DNA のマイクロサテライト解析

アカゲザル各個体のゲノム DNA をテンプレートに、第 6 染色体 MHC 領域の多型性マイクロサテライトマーカーに特異的な蛍光標識プライマーを用いて PCR 反応を行い、得られた増幅断片のサイズを解析することにより、遺伝子型の決定を行った。(宮澤、木村、森)

糖鎖欠失変異ウイルス生ワクチン

Δ 5G SIVsm 系統 8 に分類される SIVmac239 の gp120 には 23 カ所の N 型結合糖鎖付加部位が存在する。その中で 5 カ所 (アミノ酸残基 79,147,179,460,479) の N 型糖鎖付加部位の Asn を Gln に置換し関連する糖鎖を欠失させた。Δ 5Gver1, Δ 5Gver2 Δ 5G の 179 の Gln を Asn に復帰変異させ、代わりに新たに 70 (Δ 5G ver1) または 377 (Δ 5G ver2) の N 型糖鎖付加部位の

Asn を Gln に変異させた。

Δ 3G SIVmac239 の gp120 の N 型糖鎖付加部位の中で 3 カ所 (147,179,460) の Asn を Gln に置換し関連する糖鎖を欠失させた。(森)

チャレンジウイルス

SIVsmE543-3 系統 1 に分類される SIVsm。NIH, Vanessa Hirsch から供与された。アカゲザル培養リンパ球を用いて増殖し感染実験用ウイルスとした。(森)

血漿ウイルス RNA 量の測定

血漿ウイルス RNA は Roche MagnaPure compact を用いて精製した。SIVmac239 と SIVsmE543-3 のウイルス RNA 量は異なる gag 遺伝子配列から作成したプライマー: (forward primer, reverse primer TaqMan probe) によるそれぞれの SIV を特異的に検出するリアルタイム PCR 法により測定した。(森、岡村)

末梢リンパ球中の SIV DNA の塩基配列の決定

末梢リンパ球を用い SIV proviral DNA 全配列をカバーする複数の nested PCR により SIV DNA を増幅し塩基配列を決定した。(森)

SIV 特異的 T 細胞の測定

末梢リンパ球中の SIVmac239、または SIVsmE543-3 特異的 T 細胞の頻度をそれぞれの全ウイルスタンパクをカバーするペプチドを用い反応性を IFN- γ 産生細胞を検出する ELISPOT キット (U-CyTech 社) を用いて測定した。(森)

細胞内サイトカイン染色 (ICS)

PBMC を CD28/CD49d 抗体、SIV pooled peptides、または IL-15 で刺激し、BFA/monensin を添加後、6 時間または一晩培養し、各種の蛍光標識抗体 (CD3, CD4, CD8, CD20, NKG2A, IFN- γ , TNF- α ,

IL-2, CD107a) 染色し FACS ARIA (BD) を用い測定し Flow Jo () を用いて解析した。(森)

中和抗体の測定

SIV の中和抗体を高感度に測定する方法として、SIV Tat 依存的にする発現する分泌型アルカリフォスファターゼ遺伝子を持つ CD4+T 細胞 (SIV-LTR/CEMx174) を用いた。ウイルス (SIVmac239 または SIVsmE543) を補体活性不活化した感染ザル血漿と 37° C, 30 分反応し、中和後に残存した感染性ウイルスを SIV-LTR/CEMx174 により測定した。(森)

CD8+細胞 depletion

SIV 感染制御における CD8+細胞の役割を調べるために CD8+細胞を消失させるために CD8 抗体 (cM-T807) を静脈内接種した。定期的に採血し血中の CD8 細胞数を測定した。(森)

ULBP 遺伝子多型の解析

活性化 NK 細胞レセプターである NKG2D のリガンドとして知られている ULBP1~ULBP4 遺伝子について、アカゲザルにおける多様性を検討した。(木村)

免疫関連遺伝子群の多型解析

SIV/HIV の感染抵抗性に関わると考えられる TIM1, TRIM5a, APOBEC3B, OAS1 遺伝子について、日本人およびインド人集団を対象として、多型と HIV/AIDS との関連性を検討した。(木村)

感染防御・制御と関連する宿主遺伝子の解析

1. phenotype screening によるレンチウイルス抵抗性遺伝子の同定: MT-4 細胞に cDNA ライブラリーをレンチウイルスまたは MLV ベクターにて導入し、GFP 発現を指標に cDNA を発現する細胞を樹立した。この細胞に HIV-1(HXB2 株) を感染させ、

ウイルス感染耐性となって生存してくる細胞から DNA を抽出し、PCR によって導入された cDNA を増幅し核酸配列を決定することによりウイルス感染抵抗性遺伝子候補を同定した。

2. サイトカインプロファイリングによるレンチウイルス抵抗性病態の解析: ヒトサイトカイン/ケモカインキット (#MPXHCYTO60KPMX42; Millipore) を利用し、ヒト細胞への HIV-1 暴露によるサイトカイン発現変動解析を行った。HIV-1 曝露後 3 日目の細胞培養上清を回収し、非感染細胞の培養上清を対照として、サイトカイン含有量を比較した。蛍光シグナルの検出には Luminex 200 system を、データの解析には xPONENT 3.1 software を用いた。(駒野)

糖鎖変異生ワクチン感染ザルの病理学的解析

糖鎖欠損変異 SIV (D5G) を接種の後、高病原性 SIV239 をチャレンジ接種されたアカゲザル 3 頭 (D5G ワクチン感作後 SIV239 チャレンジ感染; Mm0135、Mm0139、Mm0140)、D5G の接種のみが行われたオスのアカゲザル 1 頭 (D5G ワクチン感作; Mm0137) について病理解剖を行った。

1. 病理組織学的解析: 脾臓、鼠径リンパ節、腸間膜リンパ節および小腸をパラホルムアルデヒド固定、パラフィン包埋ブロックを作製し、約 4 μm に薄切した切片を作製、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。

2. 免疫組織化学的解析: 脾臓の CD3、CD4、foxp3、CD20、granzyme B、Ki-67、SIV nef に対する免疫染色像を画像解析した。白脾髄の濾胞と動脈周囲リンパ鞘 (periarteriolar lymphoid sheat; PALS) が確認できる画像を撮影、Image J で解析した。(中村)

エイズ動物モデルとしてのカニクイザルの研究

当センター繁殖育成しているインドネシア産、フィリピン産カニクイザル各 2 頭に、それぞれ

10³TCID₅₀を静脈内に接種を行った。

血漿ウイルス RNA 量および CD4+T 細胞数：

血漿ウイルス RNA 量は、血漿からウイルス RNA を抽出し、SIV_{gag} 特異的 Primer および probe を用いて Real time PCR を行った。CD4+T 細胞数の算定には、フローサイトメーターを用いた。

細胞性免疫の解析：SIV 抗原発現組換えワクシニアウイルスを感染させた自由由来の B-LCL を APC として利用し、採取した血液から分離した PBMC と共培養することで、SIV 特異的 IFN- γ 産生細胞数を測定した。(保富、岡村)

(倫理への配慮)

本研究では動物実験が中心であることから、動物実験方法については倫理上、動物愛護の問題の観点から所属機関、実験実施機関の動物実験委員会が定めたルール、ガイドラインに従った。

C. 研究結果

1. 糖鎖変異生ワクチンが誘導する感染防御免疫に関する研究

4種の糖鎖変異SIV生ワクチンの性質

糖鎖付加部位のアミノ酸置換による糖鎖欠失変異が異なる4種の変異株(図1)を作成した。変異ウイルスは *In vitro* における性質(中和抗体感受性、マクロファージ指向性、CD4非依存性)が異なった。しかし *in vitro* の性質の違いにもかかわらず、感染ザルにおける増殖性は同様で、感染後2週に初期感染はピーク、その後急速に低下し、感染後25週以降は検出限界以下になった。4変異ウイルスとも糖鎖修飾変異により低病原性を獲得した。

感染後40週に各群1頭に SIV_{mac239} (1000 TCID₅₀) を静脈内接種した。ワクチン未接種群では、ピークウイルス量が 10⁷ copies/ml に達する初

期感染を示したが、4種の糖鎖変異ウイルスによる感染を受けた4頭ではチャレンジウイルス感染はほぼ検出限界(10² copies/ml)以下に抑制された。4種の変異ウイルスは生ワクチンの性質を有した。(森)

MHC-I,II 遺伝子群多型の解析

ワクチン実験に用いたアカゲザル18個体について、MHC-I A、B遺伝子、MHC II DR-B遺伝子、DQA, DQB, DPA, DPB 遺伝子を決定した。

MHC-II 遺伝子群についてはハプロタイプを決定した。(木村、宮澤)

表1,2に示されるようにワクチンI-IV群、非ワクチン接種群V & VIIは各群にそれぞれ異なるMHC-I, IIアリルそれらに対応するハプロタイプを持つサルを実験に用いることにより特定のMHC遺伝子による影響を受けないようにした。

(森)

HIV ワクチン開発研究のためのサブタイプが異なるウイルスに対する防御効果の評価

HIV-1は感染地域により複数のサブタイプが流行している。サブタイプ間の違いはGag, Polで8-10%、Tat, Rev, Nef, Vifでは20-30%に達している。ワクチンはこのようなウイルス多様性に対する効果が求められる。つまりワクチンの有効性はサブタイプが異なるウイルス感染に対する感染防御効果から評価される。この目的のために新たな動物モデルを作成した。SIV_{mac239}が属するSIV_{sm}はHIV-1と同様の多様性が知られている。そこで糖鎖変異生ワクチン(系統8)とは異なるチャレンジウイルスとしてSIV_{sm}E543-3(系統1)を用いた。SIV_{sm}E543-3と Δ 5Gの野生株SIV_{mac239}の違いはアジアで感染しているHIV-1主要サブタイプ間の違いとほぼ同じである。

(森)

SIVsmE543-3 に対する糖鎖変異生ワクチンの効果

1000 TCID₅₀ の SIVsmE543 を静脈内接種し糖鎖変異ワクチンの感染制御効果を調べた。初期感染の抑制は、非ワクチン群と比べ 3 log の低下が 3 頭、4 log の低下が 3 頭、5 log の低下（検出限界以下）が 5 頭であった。全 11 頭において初期感染は速やかに制御され、感染後 4-10 週まで血中ウイルス量は検出限界以下となった。その後 7 頭では感染後 80 週以上にわたって血中ウイルス量はほぼ検出限界以下に抑制された（感染制御群）。ところが 4 頭では高いウイルス増殖を示す持続感染が見られ、3 頭では発症した（図 2）。糖鎖変異生ワクチンの SIVsmE543 チャレンジ感染に対する感染防御効果は、初期感染の制御において個体差はなかったが、慢性感染の制御においては個体差が確認された。（森）

非感染制御群における変異ウイルスの出現と持続感染

発症した 3 頭ではワクチンウイルスとチャレンジウイルスとの組み換えウイルスが増殖していた。1 頭ではチャレンジウイルス由来の変異ウイルスが増殖していた。これらのすべての変異ウイルスにおいて Env 遺伝子 gp120 はチャレンジウイルス由来であった。ワクチンウイルスは SIVmac239 gp120 に存在する 23 カ所の N 型糖鎖付加部位の中から 5 カ所または 3 カ所の糖鎖が欠失しているが、組み換えにより SIVsmE543-3 gp120 になったことにより糖鎖付加部位は増加していた。（森）

中和抗体

チャレンジウイルスに対する中和抗体はすべてのワクチン感作ザルにおいて検出されなかった。（森）

細胞性免疫

細胞性免疫の役割を調べるために末梢リンパ球中の SIV 特異的 T 細胞について、複数のサイトカインを同時に産生する多機能性について解析した。IFN- γ 、TNF- α 、IL-2 を産生する SIV 特異的 CD4+T 細胞数、CD8+T 細胞数を細胞内サイトカイン染色（ICS）により調べた。IFN- γ のみを産生する CD8+T 細胞がサイトカイン産生細胞の大半を占めており、感染制御群と非感染制御群の間において、多機能性 CD8+T 細胞数や質に有意な差は認められなかった（図 3 A, B）。

初期感染、初期感染制御、慢性感染制御いずれの場合においても SIV 特異的 T 細胞の頻度と感染抑制との相関は見られなかった（図 3）。（森）

感染制御への CD8+細胞 depletion の影響

HIV/SIV の慢性感染期におけるウイルス感染制御に CD8+細胞が寄与することが明らかにされている。糖鎖変異生ワクチンによる感染制御においても CD8+細胞が寄与していることが推測されるため、CD8 抗体を投与による CD8+細胞 depletion を行った。5 頭では CD8+細胞の消失によりチャレンジウイルス感染が起こり、CD8+細胞の回復に伴いウイルス感染は再び制御された（図 4）。しかし 2 頭では CD8+細胞の消失後もチャレンジウイルス感染は起こらなかった。この結果は、5 頭においては CD8+細胞が慢性感染の感染制御に関わっていることを示す。また影響を受けなかった 2 頭においては初期感染において感染が防御されことを示す。（森）

IL-15 応答性 CD8+細胞

感染制御群にはワクチン感作後において、抗原非存在下で IL-15/IL-7 に応答し IFN- γ を産生する細胞が多い個体がいるのに対し、非感染制御群には、そのような個体がないことが明らかになった。感染制御群のこの IL-15 応答性細胞は、ICS

の結果により、CD8+T 細胞と NK 細胞であることが明らかとなった (図 5)。これらの CD8+細胞を刺激する種々のサイトカインを用い抗原非存在下で ICS を行った。IL-2, IL-7, IL-12, IL-15 では IFN- γ が産生され、このうち IL-15 が最も高く IFN- γ 産生を誘導することが示された (図 6)。

慢性感染期 (45 週) における IL-15 応答性 CD8+細胞の IFN- γ と細胞傷害性に寄与する CD107a の発現細胞数を測定した。個体差はあるものの、感染制御群では、CD8+T 細胞及び NK 細胞に IL-15 誘導性の IFN- γ と CD107a の産生が認められたのに対し、非感染制御群ではほとんど認められなかった (図 7A)。

急性感染期 (10 週) においても同様の結果が得られた。ワクチン接種後において、感染制御群は同様に NK 細胞の IFN- γ 、CD107a の産生細胞数が多い。しかしながら、CD8+T 細胞の IFN- γ 、CD107a の産生は認められるものの、IFN- γ の産生細胞数がチャレンジ後より少ない傾向にあることが明らかになった。(図 7B)。(森)

2. エイズウイルス感染制御との関連性が示唆される宿主遺伝子に関する研究

MHC クラス I 遺伝子群多型の解析

ワクチン実験に用いたアカゲザル 170 個体について、Mamu-A 遺伝子および Mamu-B 遺伝子 cDNA の塩基配列を決定した。その結果、著明な遺伝的多型性が認められた。ことに、観察された 180 アリルのうち約 60% は新規アリルであった。一方、カニクイザルについても 24 個体の Mafa-A 遺伝子および Mara-B 遺伝子 cDNA の塩基配列を決定したところ、観察された 81 アリルのうち約 44% が新規アリルであった。このことから、旧世界ザルの MHC 多様性は従来知られているよりも遥かに大きいと考えられた。

本研究で特記すべきことは、Mafa クラス I アリ

ルと、アカゲザル (Mamu) あるいはブタオザル (Mane) のクラス I アリルとの相同性を検討したところ、Mafa-A では 20 アリルのうち 15% (3 アリル)、Mafa-B では 42 アリルのうち 28.6% (12 アリル) が Mamu あるいは Mane アリルと同一の配列であったことである。このことは MHC クラス I アリルの形成は旧世界ザルの分岐 (約 230 万年前) よりも以前に生じたことを強く示唆する。(木村)

ULBP4 遺伝子多型の解析

ULBP4 遺伝子の多型解析を行ったところ、アカゲザル集団に 16 種類の異なるアリルが検出された。多型の半数以上はアミノ酸置換を伴うものであることから、ULBP4 遺伝子の多様性形成には進化選択圧が存在したものと考えられる。ULBP4 アリルと SIV ワクチン応答性との関連を検討中であるが、現在のところ明確な関連性は得られていない。(木村)

免疫関連遺伝子群の多型解析

SIV/HIV の感染抵抗性に関わると考えられる TIM1, TRIM5a, APOBEC3B, OAS1 遺伝子について、日本人およびインド人集団を対象として、多型と HIV/AIDS との関連性を検討した結果、TIM1 多型および TRIM5a 多型は HIV-1 感染後の AIDS 発症感受性と関連し、OAS1 多型は HIV-1 感染後のウイルス量と関連することが判明した。一方、APOBEC3B 多型は HIV 感染性および AIDS 発症のいずれとも関連を示さなかった。

これとは別に、ワクチン実験アカゲザル個体について TIM1 多型とワクチン効果の関連性を検討したところ、ワクチン接種後の中和抗体産生量が TIM1 多型と有意に関連することが判明した。(木村)

エイズウイルス複製阻害因子の解析

候補遺伝子の中で全長の ORF でウイルス複製を負に制御するものは、CD14, CD63, CD5, HSP40B6, ARHGDIB の 5 種類であった。ORF の C 末端領域によりウイルス複製が負に制御されたものは Brd4, SEC14L1a の 2 種類であった。ウイルス複製配列の初期過程を阻害するものは CD14, CD63, ARHGDIB の 3 種類であった。ウイルス複製の後期課程を阻害するものは HSP40B6, Brd4, SEC14L1a の 3 種類であった。2 種類の cDNA ライブラリーに共通して同定された候補遺伝子は SEC14L1a, Brd4, RIPK2 の 3 種類。片方にしか見出されなかったものは CD14, CD63, ARHGDIB, HSP40B6 の 4 種類であった。生理活性を持つ ORF 位置とウイルスの複製阻害標的的部位、ライブラリーの種類とウイルスの複製阻害標的的部位関係には有意な相関を認めなかった。(駒野)

3. 糖鎖変異生ワクチン感染ザルの病理学的解析

D5G 感染ザルへの SIV239 チャレンジ感染の影響として組織病理解析では、脾臓、リンパ節、小腸粘膜固有層でチャレンジ感染による明らか変化は認められなかった。しかしリンパ節において T 細胞、B 細胞の活性化がチャレンジ感染ザルで見られた。免疫組織化学による解析では、チャレンジ感染ザルで CD3 細胞、CD20 細胞、CD4 細胞、Granzyme B 陽性細胞の減少が認められた。(中村)

4. エイズ動物モデルとしてのカニクイザルの研究

SIVmac239 を接種したインドネシア産およびフィリピン産カニクイザルは、それぞれ 1 頭ずつで非常に高いウイルスピーク ($3\text{-}5 \times 10^7$ copies/ml) と、その後の持続感染 ($10^6\text{-}10^7$ copies/ml) が認められ、CD4+T 細胞数は接種後 40 週から徐々に減少がみられ、接種後 50 週以降エイズ関連症候

群 (ARC) レベルまで低下した。これらのサルでは、SIV 特異的細胞性免疫、Gag 抗体が検出された。(保富、岡村)

D. 考察

糖鎖欠失変異 SIV 生ワクチンにより誘導される防御免疫は流行 HIV に対し有効か？

糖鎖変異生ワクチンの効果を調べるためにチャレンジウイルスとしてワクチンの親株 SIVmac239 を用いた実験では、すべての動物において観察期間 (10 年間 3 頭、2 年間 4 頭) に亘って血中ウイルス量は検出限界以下に抑制された。しかし、感染地域においては、2 種類以上の HIV-1 サブタイプが検出されることから、ワクチンはサブタイプ間の違いを許容する防御免疫を誘導する必要がある。そこで、本研究では、SIVmac239 とはウイルスタンパクのアミノ酸配列において 10-30% の違い (HIV-1 のサブタイプ間の違いとほぼ等しい) を持つ SIVsmE543-3 をチャレンジウイルスとしてワクチン効果を調べた。約半数で一過性の初期感染が検出されたことから、ウイルス特異的免疫の抑制の低下が示唆されるが、すべての個体で感染後 10 週まで検出限界以下に抑制されたことから、当該ワクチンが誘導する防御免疫は HIV 多様性に対し有効であると推測される。実際、SIVsmE543-3 チャレンジ感染ザルで慢性期に増殖したウイルス (3 頭分) によるチャレンジ感染を慢性期においても感染を抑制した 7 頭は感染を制御した。

糖鎖欠失変異 SIV 生ワクチンは MHC 等の宿主遺伝的多様性の影響を受けるのか？

SIVsm543-3 をチャレンジした 11 頭の MHC-I, II アリルとウイルス感染の結果から初期感染を抑制する宿主応答は個体差の違いは見られなかった。しかし慢性期における感染制御の維持において個体差が明らかとなった。MHC-I アリルを見る

と感染制御群と非制御群のそれぞれにおいて共通するアリルが存在していた。この結果は、慢性期の感染抑制の維持に働く宿主免疫は遺伝的多様性を示す遺伝子が深く関わっていることを示唆する。慢性期の感染制御と関連する免疫細胞として IL-15 応答性 CD8+細胞を同定した。この細胞の末梢血における頻度を決定する遺伝子として NK 細胞、エフェクター CD8+T 細胞の機能調節に関わる多型性を示す遺伝子も遺伝的多様性と深く関係することが推測される。現在、ULBP 遺伝子について解析を行っている。この遺伝子を含む多型性を示す免疫関連遺伝子群は、HIV/SIV の感染制御の多様性との関連について今後の研究が必要と考える。免疫応答の個体差を決定する遺伝子的性質の解明は、ワクチンの開発・改良研究、感染症、がん研究への多大な波及効果が予想される。

糖鎖欠失変異 SIV 生ワクチンが誘導する感染防御の機序を明らかにする。

ワクチンが誘導する免疫として獲得免疫について解析を行った。チャレンジウイルスに対する中和抗体は検出されなかった。細胞性免疫については、末梢血中の SIV 特異的 CD8+T 細胞、CD4+T 細胞の頻度について、多機能性を含めて解析を行った。しかし、頻度と慢性感染制御との相関は見られなかった。しかし感染制御における CD8+細胞の重要性は、CD8+細胞 depletion 実験により確認された。さらに慢性期における感染制御について非抗原特異的に IL-15 によりエフェクター機能を発現する CD8+細胞の重要性が明らかとなった。

糖鎖欠失変異 SIV 生ワクチンが誘導する免疫に関連する免疫組織、免疫細胞は何か。

初期感染の抑制は、宿主の遺伝的多型性の影響が少なく、またウイルスの多様性の影響も小さい。ウイルス感染の抑制の機序は、ウイルス特異性を認識する細胞性免疫とは異なることが推測される。感染防御の機序として、感染標的細胞への感

染の抑制、ウイルス複製の障害が考えられる。ウイルス感染の条件となる CD4+T 細胞の活性化を妨げる機能を持つ免疫細胞が SIV 感染制御に働いていることが考えられる。ウイルス感染細胞が存在する小腸粘膜等のエフェクター部位、2 次リンパ組織に感染制御と関連する免疫細胞は存在すると思われる。一方、IL-15 応答性 CD8+細胞は、末梢血に存在することから、全身性リンパ組織に存在すると思われる。今後これらの課題についての研究を行い、糖鎖変異生ワクチンが誘導する感染防御免疫を構成する免疫細胞の性質を明らかにし、HIV ワクチン開発に貢献することが求められる。

E. 結論

糖鎖変異生ワクチンは、サブタイプが異なる SIVsmE543-3 による感染を制御する宿主応答を誘導した。複数の免疫応答、ウイルス感染抑制機序の関与が明らかとなった。感染制御の維持における個体差が明らかとなり、関連する免疫細胞として IL-15 応答性 CD8+細胞（NK 細胞と CD8+T 細胞）が同定された。プライムブーストワクチンでは実現されていない極めて高い初期感染の抑制は、遺伝的多様性、ウイルス多様性の影響も少ないことから、HIV ワクチンに求められる感染防御のメカニズムが働いていると考えられる。

F. 健康危険情報

特に該当する情報はなかった。

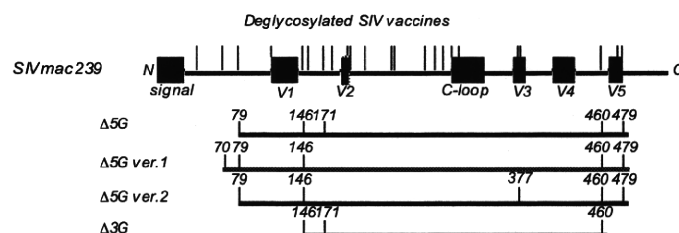


図 1. 4 種類の糖鎖欠失変異株（生ワクチン）

表 1. 当研究に用いたアカゲザルの MHC-I 遺伝子群

| Group | Group I (Δ5G) | | | Group II (Δ5Gver1) | | | Group III (Δ5Gver2) | | |
|----------|----------------|------------|----------|---------------------|----------|------------|-------------------------|------------|----------|
| Animal# | Mm0301 | Mm0409 | Mm0517 | Mm0513 | Mm0511 | Mm0303 | Mm0307* | Mm0512 | Mm0518 |
| A allele | A1*0040102 | A1*10701 | A1*03202 | A1*01807 | A1*10502 | A1*0040102 | A1*02806 | A1*0040102 | A1*01807 |
| | A1*11001 | A1*0560202 | A1*04904 | A1*02603 | | A1*01907 | A1*10502 | A1*05602 | A1*00802 |
| | | | A1*11001 | A2*0103 | A2*0546 | A2*0526 | A2*0511 | | A2*0103 |
| | | | | A4*1403 | | | | | A4*1403 |
| B allele | B*4301 | B*1601N | B*3301N | B*0101 | B*6601 | B*4301 | B*9601N | B*8201N | B*0101 |
| | B*9201N | B*4615N1 | B*0401 | B*0702 | B*1601N | B*6601 | B*6601 | B*4615N2 | B*0702 |
| | B*38N | B*02N | B*6601 | | B*4615N1 | B*9201N | | B*0201 | |
| | B*66N1 | B*6001N | B*3901N | | | | B*2602 | | |
| | B*7301 | B*0201 | | | | | | | |
| Group | Group IV (Δ3G) | | | Group V (SIVmac239) | | | Group VII (SIVsmE543-3) | | |
| Animal# | Mm0304 | Mm0515 | Mm0516 | Mm0608 | Mm0521 | Mm0522 | Mm0309 | Mm0626 | Mm0627 |
| A allele | A1*0560202 | A1*0040102 | A1*03202 | A1*10504 | A1*11201 | A1*0080102 | A1*11101 | A1*02203 | A1*01808 |
| | A2*0503 | A1*05001 | A1*11001 | A1*0560202 | A1*01807 | A1*0080103 | A1*01808 | A1*02603 | A1*03203 |
| | | A2*0511 | | A1*10502 | A1*04301 | A1*10701 | | A2*051504 | A1*10901 |
| | | A4*1403 | | A1*10503 | A2*0103 | A1*11301 | | | |
| B allele | B*7702 | B*4301 | B*3301N | B*0201 | B*0702 | B*0702 | B*3701 | B*0702 | B*1301 |
| | | B*9201N | B*0401 | B*6601 | | B*3901 | B*4301 | B*010102 | B*6601 |
| | | B*0703 | B*38N | | | | B*3602N | B*1703 | B*7002 |
| | | B*3901N | B*66N1 | | | | B*4503N | | B*8201N |
| | | | | | | | B*5102N | | B*8901 |
| | | | | | | | B*9201N | | |
| | | | | | | B*3901N | | | |
| | | | | | | B*2602 | | | |

表 2. 当研究に用いたアカゲザルの MHC-II 遺伝子群とハプロタイプ

| Group | Group I (Δ5G) | | | | | |
|-----------|---------------------|-------------|------------|------------|-----------------|------------|
| Animal# | Mm0301 | | Mm0409 | | Mm0517 | |
| Haplotype | 90030-h | 93006F1-2 | 89002-q | 89075-s2 | NN ^b | 90010-d1 |
| DRB | DRB1*0323 | DRB1*0306 | DRB5*0305 | DRB*W3602 | DRB1*0407 | DRB*W2104 |
| | DRB1*0321 | DRB*W2603 | R170DR08 | DRB3*0410 | DRB1*0409 | DRB*W2603 |
| | | DRB1*07033 | | | | DRB*W606 |
| DQA | DQA1*0104 | DQA1*0105 | DQA1*2404 | DQA1*0108 | DQA1*07 | DQA1*0502 |
| DQB | DQB1*0601 | DQB1*0602 | 89002DQB-q | DQB1*0607 | DQB1*1710 | DQB1*1603 |
| DPA | 90030DPA02 | 9712DPA01 | 89002DPA01 | 9712DPA01 | 9712DPA01 | 0008DPA01 |
| DPB | DPB1*12 | DPB1*190102 | DPB1*06 | 9703DPB01 | DPB1*190102 | 90010DPBd1 |
| Group | Group II (Δ5Gver1) | | | | | |
| Animal# | Mm0513 | | Mm0511 | | Mm0303 | |
| Haplotype | 89002-p | 89018-1 | 90010-d2 | 89002-q | 90030-h | 90014-z |
| DRB | 89002DRB-p1 | DRB1*0310 | DRB*W2104 | R170DR0301 | DRB1*0323 | DRB*W2505 |
| | DRB*W203 | DRB*w602 | DRB*W2604 | R170DR08 | DRB1*0321 | DRB4*0104 |
| | | | DRB*W606 | | | DRB1*0704 |
| DQA | 89002DQA-p | DQA1*2302 | DQA1*0502 | DQA1*2404 | DQA1*0104 | DQA1*0503 |
| DQB | DQB1*1812 | DQB1*1804 | DQB1*1503 | 89002DQB-q | DQB1*0601 | DQB1*2401 |
| DPA | DPA1*0601 | DPA1*0701 | 90030DPA01 | 89002DPA01 | 90030DPA02 | DPA1*0202 |
| DPB | DPB1*04 | DPB1*190102 | DPB1*09 | DPB1*06 | DPB1*12 | DPB1*06 |
| Group | Group III (Δ5Gver2) | | | | | |
| Animal# | Mm0307* | | Mm0512 | | Mm0518 | |
| Haplotype | 90010-d2 | 89075-s | 89075-s2 | 90010-e2 | 89002-p | 90069-1 |
| DRB | DRB*W2104 | DRB*W101 | DRB*W3602 | DRB1*0309 | 89002DRB-p1 | DRB1*0306 |
| | DRB*W2603 | DRB*W3602 | DRB3*0410 | DRB*W2507 | DRB*W203 | DRB1*1003 |
| | DRB*W606 | DRB1*0320 | | | | |
| DQA | DQA1*0502 | DQA1*0108 | DQA1*0108 | DQA1*2601 | 89002DQA-p | DQA1*2602 |
| DQB | DQB1*1503 | DQB1*0607 | DQB1*0607 | DQB1*1801 | DQB1*1812 | DQB1*1811 |
| DPA | 90030DPA01 | 89075DPA01 | 9712DPA01 | 90010DPA-c | DPA1*0601 | DPA1*0601 |
| DPB | DPB1*09 | 89075DPB-s | 9703DPB01 | DPB1*18 | DPB1*04 | DPB1*04 |

| Group | | Group IV ($\Delta 3G$) | | | | |
|-----------|------------|--------------------------|------------|-------------|------------|-------------|
| Animal# | Mm0304 | | Mm0515 | | Mm0516 | |
| Haplotype | 89075-t01 | 89075-s2 | 90030-h | 90088-j | 90010-d1 | 93006F1-2 |
| DRB | DRB1*0320 | DRB*W101 | DRB1*0323 | DRB1*0403 | DRB*W2104 | DRB1*0306 |
| | DRB1*0320 | DRB*W3602 | DRB1*0321 | DRB1*W502 | DRB*W2603 | DRB*W2603 |
| | | DRB3*0410 | | | DRB*W606 | DRB1*07033 |
| DQA | DQA1*0108 | DQA1*0108 | DQA1*0104 | DQA1*03 | DQA1*0502 | DQA1*0105 |
| DQB | | DQB1*0607 | DQB1*0601 | DQB1*1808 | DQB1*1603 | DQB1*0602 |
| DPA | 89075DPA01 | 9712DPA01 | 90030DPA02 | DPA1*0201 | 0008DPA01 | 9712DPA01 |
| DPB | 9703DPB01 | 9703DPB01 | DPB1*12 | DPB1*10 | 90010DPBd1 | DPB1*190102 |
| Group | | Group V (SIVmac239) | | | | |
| Animal# | Mm0608 | | Mm0521 | | Mm0522 | |
| Haplotype | 90010-d2 | 89-075s | 89-002-p | 90120-a | 89-002-q | 90088-j |
| DRB | DRB*W2104 | DRB*W3602 | 89002DRB-p | DRB1*1007 | R170DR03 | DRB1*0403 |
| | DRB*W2604 | DRB3*0410 | DRB*W203 | DRB1*0303 | R170DR08 | DRB*W502 |
| DQA | DQA1*0502 | DQA1*0108 | 89002DQA-p | DQA1*05 | DQA1*2404 | DQA1*03 |
| DQB | DQB1*1503 | DQB1*0607 | DQB1*1812 | DQB1*1801 | 89002DQB-q | DQB1*1808 |
| DPA | 90030DPA01 | 9712DPA01 | DPA1*0601 | 90010DPA-e | 89002DPA01 | DPA1*0201 |
| DPB | DPB1*09 | 9703DPB01 | DPB1*04 | DPB1* | DPB1*06 | DPB1*10 |
| Group | | Group VII (SIVsmE543-3) | | | | |
| Animal# | Mm0309 | | Mm0626 | | Mm0627 | |
| Haplotype | 89002-q | 90120-b01 | 89075-s | 89018-l | 90088-j01 | 90048-2 |
| DRB | DRB5*0305 | DRB*W2002 | DRB*W101 | DRB*W101 | DRB1*0403 | DRB1*0318 |
| | R170DR08 | DRB*W2508 | DRB*W3602 | DRB1*0310 | DRB*W501 | DRB*W604 |
| | | | DRB3*0410 | DRB*W609 | | DRB*W603 |
| DQA | DQA1*2404 | DQA1*0502 | DQA1*0108 | DQA1*2302 | DQA1*03 | DQA1*2404 |
| DQB | 89002DQB-q | DQB1*1603 | DQB1*0607 | DQB1*1804 | DQB1*1808 | DQB1*1502 |
| DPA | 89002DPA01 | 9712DPA01 | 89075DPA01 | DPA1*0701 | DPA1*0201 | DPA1*0401 |
| DPB | DPB1*06 | DPB1*190102 | 89075DPB-s | DPB1*190102 | DPB1*10 | DPB1*13 |

図2. 糖鎖変異生ワクチンの SIVsmE543-3 チャレンジ感染に対する効果

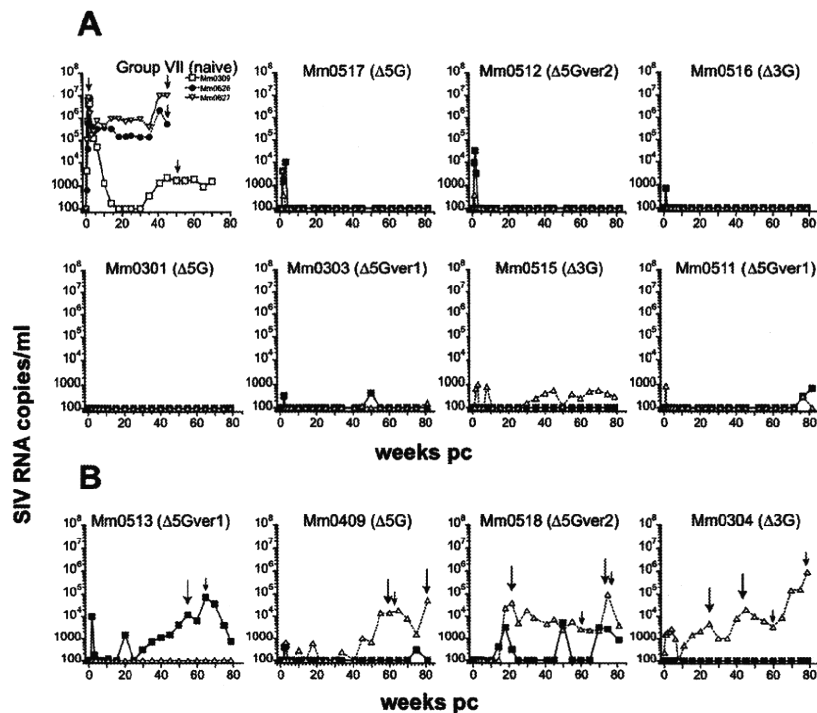


図 3. SIV 特異的 CD8+ T 細胞の多機能性と感染制御

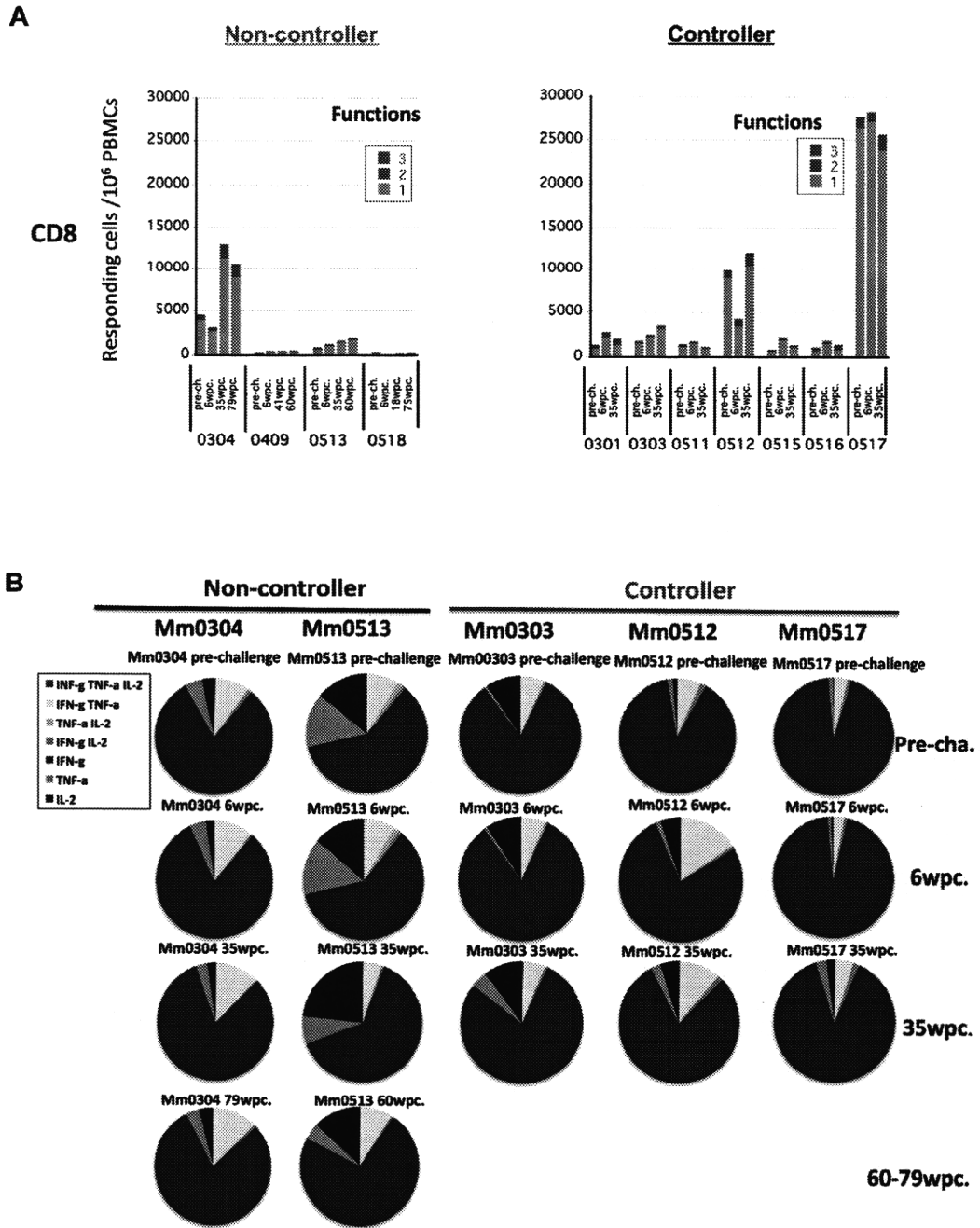


図4 CD8 抗体投与による CD8+ cells depletion の SIV 感染制御への影響

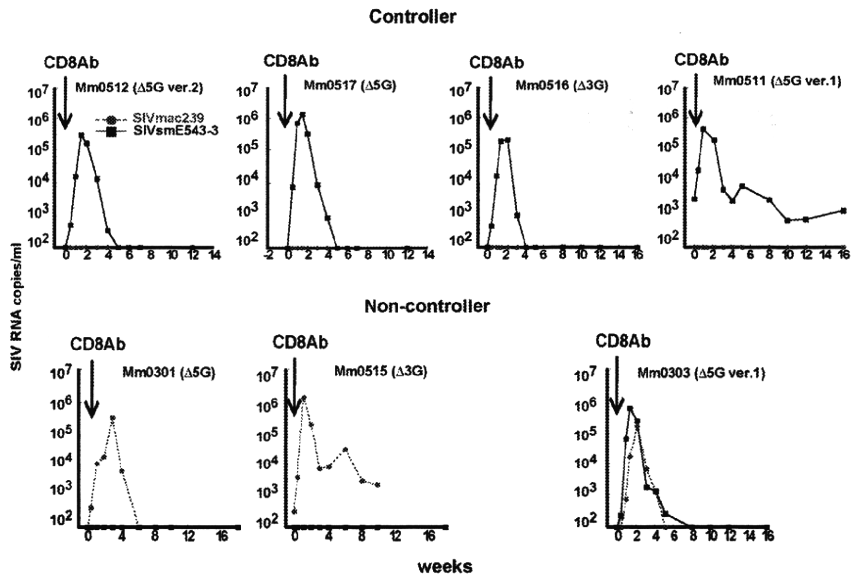


図5. IL-15 応答性 CD8+T 細胞と NK 細胞 (IFN- γ 産生及び CD107a を発現する)

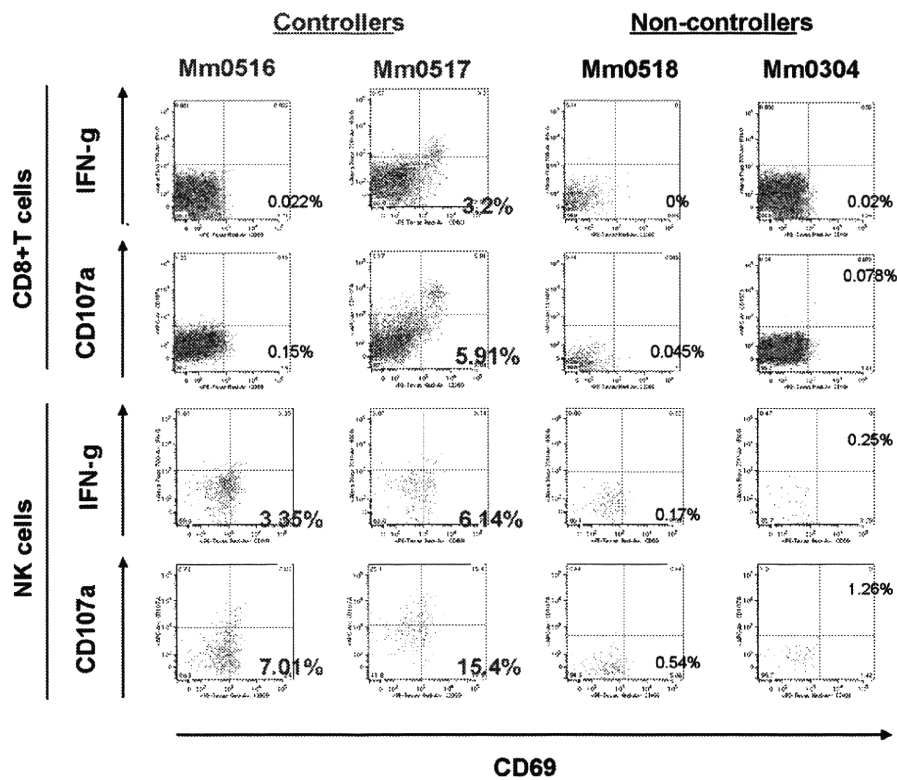


図 6. サイトカイン刺激による CD8+細胞のエフェクター機能発現

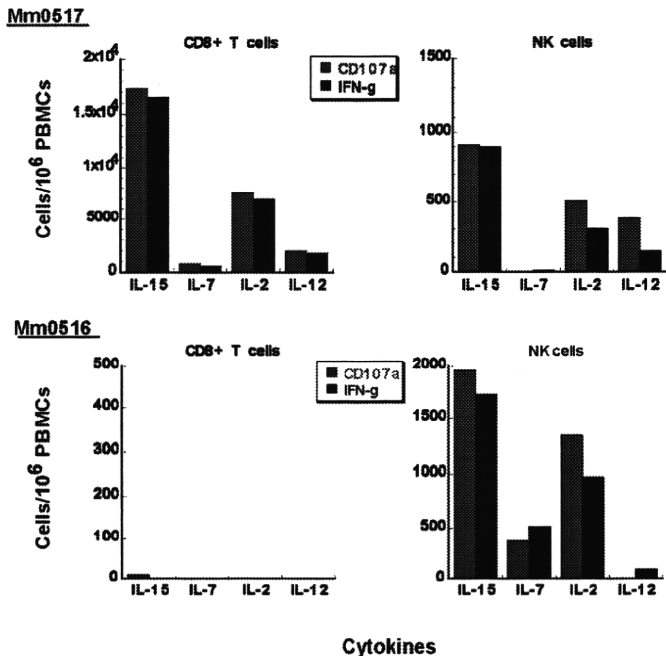
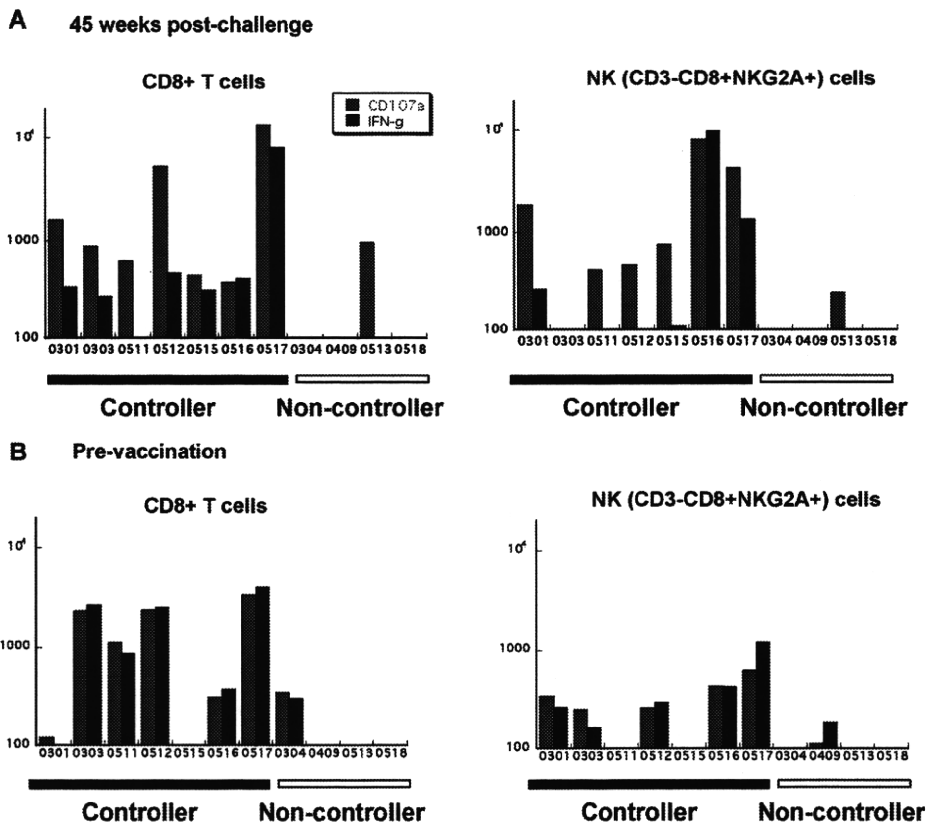


図 7. 糖鎖変異生ワクチン感作サルにおける IL-15 応答性 CD8+細胞



G. 研究報告

論文発表

- 1 Xing, H. Q., Mori, K., Sugimoto, C., Ono, F., Izumo K., Kubota, R., Izumo, S. Impaired Astrocytes and Diffuse Activation of Microglia in the Cerebral Cortex in Simian Immunodeficiency Virus-Infected Macaques Without Simian Immunodeficiency Virus Encephalitis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 67, 600-611, 2008.
- 2 Xing, H. Q., Moritoyo, T., Mori, K., Sugimoto, C., Ono, F., Izumo, S. Expression of proinflammatory cytokines and its relationship with virus infection in the brain of macaques inoculated with macrophage-tropic simian immunodeficiency virus. *Neuropathology.* 29,13-19, 2008.
- 3 Onlamoon, N., Rogers, K., Mayne, A. E., Pattanapanyasat, K., Mori, K., Villinger, F., and Ansari, A.A. Soluble PD-1 rescues the proliferative response of simian immunodeficiency virus-specific CD4 and CD8 T cells during chronic infection. *Immunology.* 124, 277-293. 2008.
- 4 Sugimoto, C., Nakayama E. E., Shioda T., Villinger F., Ansari A.A., Yamamoto N., Suzuki Y., Nagai, Y. and Mori, K. Impact of glycosylation on antigenicity of simian immunodeficiency virus SIV239: induction of rapid V1/V2 specific non-neutralizing antibody and delayed neutralizing antibody following infection with an attenuated deglycosylated Mutant. *J. Gen. Virol.* 89, 554-566, 2008.
- 5 Pereira LE, Onlamoon N, Wang X, Wang R, Li J, Reimann KA, Villinger F, Pattanapanyasat K, Mori K., Ansari AA. Preliminary in vivo efficacy studies of a recombinant rhesus anti-alpha(4)beta(7) monoclonal antibody. *Cell Immunol.* 259,165-176, 2009
- 6 Chie Sugimoto, Satoru Watanabe, Taeko Naruse, Eiji Kajiwara, Teiichiro Shiino, Natsuko Umano, Kayoko Ueda, Hirotaaka Sato, Shinji Ohgimoto, Vanessa Hirsch, Francois Villinger, Aftab A. Ansari, Akinori Kimura, Masaaki Miyazawa, Yasuo Suzuki, Naoki Yamamoto, Yoshiyuki Nagai, Kazuyasu Mori. Protection of macaques with diverse MHC genotypes against a heterologous SIV by vaccination with a deglycosylated live-attenuated SIV. *Plos One.* 5, e11678, 2010.
- 7 Nakajima T, Kimura A: Genetic factors which confer sensitivity to highly active antiretroviral therapy (HAART) in HIV-infected subjects: implication of a benefit of an earlier initiation of HAART in HIV therapy. *Pharmacogenomics* 2008; 9(9): 1347-1351.
- 8 Nakajima T, Ohtani H, Satta Y, Uno Y, Akari H, Ishida T, Kimura A: Natural selection in the TLR-related genes in the course of primate evolution. *Immunogenetics* 2008; 60(12): 727-735.
- 9 Shichi D, Ota M, Katsuyama Y, Inoko H, Naruse T, Kimura A. Complex divergence at a

- microsatellite marker C1_2_5 in lineage of HLA-Cw/-B haplotype. *J Hum Genet.* 2009; 54(4): 224-229.
- 10 Nakajima T, Nakayama EE, Kaur G, Terunuma H, Mimaya J, Ohtani H, Mehra N, Shioda Y, Kimura A. Impact of novel TRIM5alpha variants, Gly110Arg and G176del, on the anti-HIV-1 activity and the susceptibility to HIV-1 infection. *AIDS.* 2009; 23(16): 2091-2100.
 - 11 Nakajima T, Kimura A. Comparative genomics: insight into human health and disease. In *The HLA Complex in Biology and Medicine: a resource book*. (Mehra N, ed), pp566-588, Jaypee Brothers Medical Publishers Ltd., New Delhi, 2010
 - 12 Wichukchinda N, Nakajima T, Saipradit N, Nakayama EE, Ohtani H, Rojanawiwat A, Pathipvanich P, Ariyoshi K, Sawanpanyalert P, Shioda T, Kimura A. TIM1 haplotype may control the disease progression to AIDS in a HIV-1-infected female cohort in Thailand. *AIDS.* 2010; 24(11): 1625-1631.
 - 13 Itaya S, Nakajima T, Kaur G, Terunuma H, Ohtani H, Mehra N, Kimura A. No evidence of an association between the APOBEC3B deletion polymorphism and susceptibility to HIV infection and AIDS in Japanese and Indian populations. *J Infect Dis.* 2010; 202(5): 815-816.
 - 14 Naruse TK, Chen Z, Yanagida R, Yamashita T, Saito Y, Mori K, Akari H, Yasutomi Y, Miyazawa M, Matano T, Kimura A. Diversity of MHC class I genes in Burmese-origin rhesus macaque. *Immunogenetics.* 2010; 62(9): 601-611.
 - 15 Takeda, E., S. Tsuji-Kawahara, M. Sakamoto, M.-A. Langlois, M. S. Neuberger, C. Rada, and M. Miyazawa. Mouse APOBEC3 restricts Friend leukemia virus infection and pathogenesis in vivo. *J. Virol.* 82: 10998-11008, 2008.
 - 16 Matsumoto, T., T. Ajiki, E. Kajiwara, Y. Mita, T. Fujita, H. Morimoto, M. Miyazawa, and Y. Ku. Decreased expression of intestinal chemokine TECK/CCL25 in experimental obstructive jaundice and its reversal following internal biliary drainage. *J. Gastroenterol.* 43: 390-396, 2008.
 - 17 Miyazawa, M., S. Tsuji-Kawahara, and Y. Kanari. Host genetic factors that control immune responses to retrovirus infections. *Vaccine* 26: 2981-2996, 2008.
 - 18 Miyazawa M., L. Lopalco, F. Mazzotta, S. Lo Caputo, F. Veas, and M. Clerici. The "immunologic advantage" of HIV-exposed seronegative individuals. *AIDS* 23:161-175, 2009.
 - 19 Miyazawa, M. and M. Clerici. The 'immunologic advantages' of HIV-exposed seronegative individuals: authors' reply. *AIDS* 23:1612, 2009.
 - 20 Miyazawa, M., S. Tsuji-Kawahara, T. Chikaishi, M. Kato and S. Takamura. Mouse APOBEC3 affects the production of virus-neutralizing antibodies by restricting early retroviral replication, not by altering the B-cell repertoire. *Retrovirology* 6 (Suppl. 2):O9, 2009.
 - 21 Takakuwa, H., T. Maruoka, T. Hata, M. Miyazawa, T. Hata, H. Toshimori, H., and K. Otsuki. Development of a new disinfectant with very strong anti-influenza viral activity: a preliminary report. *Environ. Health Prev.*