

21. エイズ研究センター

センター長 山本直樹

概要

1981年にエイズのはじめての症例が報告されて以来、2003年末現在世界のHIV感染者(累積数)は6,000万人以上に達している。さらに年間約480万人の新規感染者が発生し、290万人が死亡していると予測されている。欧米での新たな発生はすでにピークを越えていて、その増加の大部分(85%)はアフリカとアジアにおける流行によるものである。とりわけインド、中国、東南アジア諸国など我が国をとりまくアジア地域での流行の激化が危惧されている。一方、日本国内では、厚生労働省エイズ動向委員会報告によると、2003年末現在HIV感染者報告総数は、5,780名(男4,194名、女1,586名)、エイズ患者の届出総数は2,892名(男2,487名、女405名)である。HIVの年間報告数は1996年以降増加傾向が続いており、昨年度(2003年)は過去最高の新規感染者数640(男573、女67)を記録した。異性間(28%)および同性間の性接触(56%)による感染が主体となっている。我が国におけるHIV感染者数の実態を正確に把握することは難しいが、厚生労働省「HIV感染症の疫学」班報告によれば、約16,000人という予測がなされている。

新しい抗HIV剤が次々に開発、認可され、特に、いくつかの逆転写酵素阻害剤とプロテアーゼ阻害剤の多剤併用によるHAARTの効果には著しいものがある。しかし、HAARTをもってしても、体内からウイルスを完全に駆逐することは今のところ不可能であり、ウイルスとの共存関係をいかにうまく保持するかが重要である。さらに多剤併用療法が標準的なエイズ治療法として普及するにつれ、薬剤耐性の獲得による治療困難症例の増加が大きな問題となっている。このような状況の下、当センターでは、多数の症例に対し、疑問症例及びスクリーニング陽性例の確認試験、薬剤耐性遺伝子検査を行うとともに、新しい検査法の開発と地方レベルへの技術の普及をはかってきた。また生検、剖検例の病理検査を行い臨床現場での診断及び治療に役立てられている。HIVを分子生物学的手法によって解析し、その特性などを解明することにより、エイズワクチン開発などの応用に向けた多角的な基礎研究を展開している。中でも、DNAワクチン-SeVベクター、BCG-ワクチンによるプライムブーストの系、さらに糖鎖変異を導入した弱毒性SIVが優れた感染防御効果を持つことを明らかにし、注目されている。またアジアに流行するHIV-1

株に関する研究が進展し、多様で複雑な組換え型ウイルスが出現していることを明らかにした。

このように我が国を含むアジアにおけるHIVの危機的な流行状況を考えた場合、疫学的、分子疫学的調査研究、HIV-1ヴァリアントの構造とそのウイルス学的、免疫学的性質の解明、またそれら基礎研究に基づく、ワクチンを含む感染予防・発症阻止技術の開発、新しい細胞側因子の探索による新規薬剤の開発など、その制圧に向けた重要且つ緊急性の高い課題への取り組みをさらに強力に押し進める必要があると考えられる。これらの業務の遂行と、研究水準の一層の向上をはかっているところである。

当センターはまた、国際協力機構(JICA)のエイズプロジェクト等にも積極的に協力し、「タイNIH機能向上プロジェクト」と「ザンビア国エイズ及び結核対策プロジェクト」を推進している。また、JICAとの協力によりアジア、アフリカ諸国等からの研修員を対象にHIV診断技術講習を実施しており、多数の研修員を指導してきた。このように、当センターの活動は一層国際的な展開をみせている(表1)。一方、厚生労働省、文部科学省、HS財団等の研究費による班研究等にも多数参加した(表2)。

人事では、神奈川県衛生研究所、西澤雅子博士が研究員として第2研究グループ研究員に採用(平成15年4月1日付)、狩野宗英研究員が主任研究員に昇任(4月1日付)、5月1日横幕能行研究員(第2研究グループ)が千葉大学に出向(5月1日付)、藤野真之博士が第2研究グループ研究員に採用(平成16年1月1日付)、有吉紅也主任研究員が復帰(3月1日付)、吉原なみ子第二室長が定年退職した(3月31日付)。さらに、俣野哲朗助教授(東京大学)の併任が認められた(4月1日付)。

当センターの運営に当たっては倉田毅所長、佐多徹太郎感染病理部長、岡部信彦感染症情報センター長、竹森利忠免疫部長、小室勝利前血液・安全性研究部長および山口一成血液・安全性研究部長、寺尾恵治筑波医学実験用霊長類センター長等多くの方の協力を得た。

研究の場に関しては改善がみられたものの、研究スペースの確保と統合は依然として最重要課題のひとつとなっている。

エイズ研究センター

表1. 国際協力への参加状況

所属	氏名	期間	要請先	要件・目的		
センター長	山本		JICA	ザンビア国エイズ及び結核対策プロジェクト(国内委員会委員長)		
			JICA	タイ NIH 機能向上プロジェクト(国内委員会委員)		
		H15.7.23	JICA	ベトナムエイズ対策技術研修		
		H15.12.10-14	日米医学協力研究会	第8回汎太平洋新興感染症国際会議出席		
		H16.2.2-4	WHO	HIV-1 予防ワクチンの開発と評価における進展及び関連事項についての WHO-UNAIDS 審議会出席		
		H16.3.7-11	日米医学協力研究会	第16回日米エイズ会議出席		
第一研究グループ	本多	H15.8.1-3	JST	タイエイズワクチン Workshop 出席		
		H15.9.9-10	JST	タイエイズワクチン Symposium 出席		
		H15.10.27-12.5	JICA	第1回 HIV 感染者のケアとマネジメントのための高度診断技術コース 講師		
		H15.12.9-14	日米医学協力研究会	第8回汎太平洋新興感染症国際会議エイズ部会出席		
		H16.3.7-11	日米医学協力研究会	第16回日米エイズ会議出席		
	仲宗根	H15.10.27-12.5	JICA	第1回 HIV 感染者のケアとマネジメントのための高度診断技術コース 講師		
第二研究グループ	杉浦	H15.10.27-12.5	JICA	第1回 HIV 感染者のケアとマネジメントのための高度診断技術コース 講師		
		H15.11.10-11.15	JICA	タイ NIH 機能向上プロジェクト短期専門家		
		有吉	H14.9- H16.2	JICA	タイ国立衛生研究所(JICA 長期専門家派遣)	
		西澤	H15.10.27-12.5	JICA	第1回 HIV 感染者のケアとマネジメントのための高度診断技術コース 講師	
第一室	武部	H15. 6.22- 6.27	文部科学省	科研費基盤研究(A-2) 海外学術研究に基づく共同研究 タイ・ミャンマーにおけるエイズ流行に関する分子疫学的調査研究のため(タイ、ミャンマー)		
		H15. 9.12- 9.14	厚生労働省	国際医療協力研究委託費「台湾における HIV-1 感染症の分子疫学と薬剤耐性変異のモニタリングと耐性変異解析のための共同研究のため」(台湾)		
		H15.10. 2-10.8	文部科学省	科研費基盤研究(A-2) ミャンマーにおけるエイズ流行に関する分子疫学的調査研究のため(ミャンマー)		
		H15.10.27-12.5	JICA	第1回 HIV 感染者のケアとマネジメントのための高度診断技術コース 講師		
		H15.12.8-12.13	日米医学協力委員会	第8回汎太平洋新興感染症国際会議への参加および研究発表(バングラディシュ)		
		H16.2.2-2.14	厚生労働省	エイズ対策研究事業 第11回国際レトロウイルス・日和見感染症会議出席と米国における共同研究者との研究打合せのため(米国)		
		H16.3.7-3.12	日米医学協力委員会 エイズ専門部会	第16回日米エイズ会議出席(米国)		
		H16.3.27-3.31	エイズ予防財団	海外委託研究事業に基づく共同研究 タイ・ミャンマーにおけるエイズ流行とその背景にある宿主要因に関する分子疫学的調査研究のため(タイ・ミャンマー)		
			椎野	H15.10.27-12.5	JICA	第1回 HIV 感染者のケアとマネジメントのための高度診断技術コース 講師
			草川	H15.9.12-9.14	文部科学省	特定領域研究2「新規 HIV-1 組換えウイルスの探索とその病因論の展開」に関する分子疫学的調査研究のため(台湾)
		H15.10.27-12.5	JICA	第1回 HIV 感染者のケアとマネジメントのための高度診断技術コース 講師		
第二室	吉原	H15.7.7	JICA	ワクチン予防対策集団研修コース(於:熊本) 講師		
		H15.7.23	JICA	ベトナムエイズ対策技術研修 講師		
		H15.10.9-21	JICA	感染症対策技術集団研修コース(於:エジプト) 短期専門家		
		H15.10.27-12.5	JICA	第1回 HIV 感染者のケアとマネジメントのための高度診断技術コース 講師		

エイズ研究センター

所属	氏名	期間	要請先	要件・目的
		H15.11.7-11.9	JICA	AIDS/ATL 対策集団研修コース(於:熊本) 講師
		H15.11.30-12.12	JICA	カンボジア国結核対策プロジェクト(於:カンボジア) 短期専門家
	阪井	H15.10.27-12.5	JICA	第1回 HIV 感染者のケアとマネジメントのための高度診断技術コース 講師
	鈴木	H15.10.27-12.5	JICA	第1回 HIV 感染者のケアとマネジメントのための高度診断技術コース 講師
第三室	松田	H15.7.25	JICA	ベトナムエイズ対策技術研修講師「Molecular Biology of HIV-1」
		H15.10.27-12.5	JICA	第1回 HIV 感染者のケアとマネジメントのための高度診断技術コース 講師
	森	H15.10.27-12.5	JICA	第1回 HIV 感染者のケアとマネジメントのための高度診断技術コース 講師
	石川	H15.10.27-12.5	JICA	第1回 HIV 感染者のケアとマネジメントのための高度診断技術コース 講師
		H15.11.10	JICA	南アジア HIV/AIDS 対策モデル(HIV 感染診断検査技術)
	駒野	H15.10.27-12.5	JICA	第1回 HIV 感染者のケアとマネジメントのための高度診断技術コース 講師

表2. 厚生労働科学研究等への参加状況

所属	氏名	要請機関	課題
センター長	山本	厚生労働省 HS 財団 文部科学省	エイズ対策研究事業「エイズ対策研究事業の企画と評価に関する研究」主任研究者 創薬等ヒューマンサイエンス総合研究推進事業・国際研究 Grant 事業「細胞性免疫誘導型 プライムブーストエイズワクチンの臨床評価系の確立」主任研究者 特定領域研究・感染と宿主応答「HIV 感染ライフサイクルに必須な細胞因子の同定および新 しい抗 HIV 薬の標的探索」研究代表者
第一研究 グループ	本多	厚生労働省 厚生労働省 HS 財団 HS 財団	創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業「HIV 構造遺伝子と HIV 制御遺伝子のコンビネー ションワクチンの開発に関する研究」主任研究者 創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業「エイズ治療薬開発のためのサル評価スクリーニ ング系の開発とその応用」(主任研究者:永井美之 富山県衛生研究所) 創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業:第5分野健康保持増進・予防医薬品の開発に関 する研究「レクチン機能を利用した血管における生体防御システムの解明と創薬への応 用」(主任研究者:若宮伸隆 旭川医科大)
	仲宗根	厚生労働省 HS 財団	創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業「小動物モデルを用いた抗エイズ薬評価スクリー ニング系の開発」(主任研究者:辻本元 東京大学) エイズ対策研究事業「HIV 感染予防に関する研究」(主任研究者:佐多徹太郎 感染病理部) 創薬等ヒューマンサイエンス総合研究推進事業 エイズ医薬品等開発推進事業・国際研究 Grant 事業「リコンビナントタイプ HIV ワクチンの標的集団の解析とパイロットプロダクション の可能性の検討」主任研究者
		JST 厚生労働省	研究情報データベース事業(運用支援)「HIV 感染症統合データベースの構築」代表研究者 エイズ対策研究事業「日本の HIV-1 の遺伝子・分子生物学的解析(集団的解析)」(主任研 究者:佐藤裕徳 遺伝子解析室)
		厚生労働省	創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業「HIV 構造遺伝子と HIV 制御遺伝子のコンビネー ションワクチンの開発に関する研究」(主任研究者:本多三男)
第二研究 グループ	杉浦	医薬品機構 厚生労働省 厚生労働省	「テーラーメイド治療を目指した HIV 治療法の開発」(主任研究者:岡慎一 国立国際医療セ ンター) エイズ対策研究事業「薬剤耐性のモニタリングに関する技術開発研究」主任研究者 創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業「HIV-1 の遺伝子発現とウイルス増殖を制御する 新たな治療薬開発のための研究」主任研究者

所属	氏名	要請機関	課題
----	----	------	----

エイズ研究センター

		厚生労働省	エイズ対策研究事業「HIV 検査体制の構築に関する研究」(主任研究者:今井光信 神奈川県衛生研究所)
		厚生労働省	エイズ対策研究事業「計算機を活用した HIV の薬剤耐性評価」(主任研究者:星野忠次 千葉大学大学院薬学研究部)
		厚生労働省	エイズ対策研究事業「HIV 感染症の医療体制の整備に関する研究」(主任研究者:木村 哲 国立国際医療センター)
	有 吉	厚生労働省	エイズ対策研究事業「アジア・太平洋地域における HIV 感染症の疫学に関する研究」(主任研究者:武部 豊)
		HS 財団	創薬等ヒューマンサイエンス総合研究推進事業 国際研究 Grant 事業「HIV 特異的免疫療法開発に関する基礎的研究」(主任研究者:岩本愛吉 東京大学医科学研究所先端医療研究センター)
第一室	武 部	厚生労働省	エイズ対策研究事業「アジア・太平洋地域における HIV 感染症の疫学に関する研究」主任研究者
		厚生労働省	国際医療協力研究委託費「開発途上国における HIV 感染者に対する多剤併用(HAART)療法の薬剤感受性試験及びモニタリングシステム構築に関する研究」(主任研究者:岡慎一 国立国際医療センター)
		文部科学省	基盤研究(A)(2)「アジアにおけるエイズ流行とその背景にある宿主要因に関する分子疫学的調査研究」研究代表者
		文部科学省	特定領域研究(2)・感染と宿主応答「新規 HIV-1 組換えウイルスの探索とその病因論の展開」研究代表者
		HS 財団	創薬等ヒューマンサイエンス総合研究推進事業 国際研究 Grant 事業「HIV 亜種解析による HIV ワクチンの開発」(研究代表者:石川晃一)
第二室	吉 原	厚生労働省	エイズ対策研究事業「HIV 検査体制の構築に関する研究班」(主任研究者:今井光信 神奈川県衛生研究所)
		厚生労働省	医薬安全研究事業「医療用具関係の国際ハーモナイゼーションに関する研究」(主任研究者:土屋利江 国立医薬品食品衛生研究所)
		厚生労働省	エイズ対策研究事業「アジア太平洋地域における国際人口移動から見た危機管理としての HIV 感染症対策に関する研究」(主任研究者:石川信克 財団法人結核予防会結核研究所)
	巽	厚生労働省	エイズ対策研究事業「HIV およびその関連ウイルスの増殖機構および増殖制御に関する研究」(主任研究者:佐藤裕徳 遺伝子解析)
		HS 財団	創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業 「新規 HIV 感染価測定細胞株に基づく迅速簡便な実用的薬剤耐性試験法の確立」主任研究者
		厚生労働省	国際医療協力研究事業 「HIV-1 ガーナ株の薬剤感受性試験とモニタリング法の構築」(主任研究者:岡 慎一 国立国際医療センター)
第三室	松 田	厚生労働省	エイズ対策研究事業「HIV 及びその関連ウイルスの増殖機構及び増殖制御に関する研究」(主任研究者:佐藤裕徳 遺伝子解析室)
		JST	重点研究支援事業「プロテオーム解析(プロテオミクス)による感染症の研究」(総括責任者:西島正弘 細胞化学部)
		厚生労働省	創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業「HIV-1 の遺伝子発現とウイルス増殖を制御する新たな治療薬開発のための研究」(主任研究者:杉浦互)
	森	文部科学省	特定領域研究・感染と宿主応答「感染防御免疫を誘導する糖鎖変異エイズウイルスの初期感染機序の解析」研究代表者
		厚生労働省	エイズ対策研究事業「HIV 感染予防に関する研究」(主任研究者:佐多徹太郎 感染病理部)
		厚生労働省	創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業 エイズ医薬品等開発研究「エイズ治療開発のためのサル評価スクリーニング系の開発とその応用」(主任研究者:永井美之 富山衛生研究所)
		HS 財団	創薬等ヒューマンサイエンス総合研究推進事業 エイズ医薬品等開発研究・国際研究 Grant 事業「HIV 抵抗性を決定する新規宿主遺伝子の同定によるワクチン戦略の開発」(主任研究者:宮澤正顕 近畿大学医学部)
	石 川	HS 財団	創薬等ヒューマンサイエンス総合研究推進事業 国際研究 Grant 事業「HIV 亜種解析による HIV ワクチンの開発」主任研究者
	駒 野	厚生労働省	エイズ対策研究事業「HIV 及びその関連ウイルスの増殖機構及び増殖制御に関する研究」(主任研究者:佐藤裕徳 遺伝子解析室)

研究業績

I. エイズワクチンの開発

エイズワクチンの開発はその社会的なプライオリティの高さにも関わらず、現在のところ実用化のメドが全く立たない状態にある。しかし、感染者の解析や、生ワクチン等を用いた動物モデルの解析からワクチン開発は可能であると予測されている。

本年度は最初の Phase III Trial である Vax Gen の Recombinant Envelope タンパクを抗原にしたワクチンの結果が明らかとなり、中和抗体主導型ワクチンの困難さがヒト臨床試行の結果からも明らかになった。従って、ワクチン開発の方向性は細胞性免疫主導型ワクチンの開発に向けられており、世界で約 30 に近い Human Trial が行われている。しかし、絶対的ワクチン評価動物モデルが欠落していることから候補ワクチンのワクチン効果の評価が極めて難しい状態にある。ここでは安全性とワクチン効果を示す日本で独自に開発できるワクチン開発を行い、前臨床から臨床レベルの開発研究に向けて検討中である。

1. プロトタイプ予防ワクチンの開発

プロトタイプワクチンとして HIV-1 CRF01_AE Gag 全領域を組み込んだパイロットプロダクションワクチンを作成した。また、この prime-boost ワクチンの概念に基づいた SIV ワクチン効果は、病原性 SHIV KS-661c を用いたサルエイズモデルを用いて確認され、長期にわたってウイルス血症をコントロールすることが明らかにされている。免疫誘導能に関しては SIV Gag、HIV-1 CRF01_AE Gag さらに、HIV-1 Clade B Gag を用いて感染防御が期待でき、細胞性免疫のレベルを誘導することができることを明らかにした。安全性については昨年度完了したサル及びマウス、モルモットのデータを病理学的、分子生物学的に解析し、安全性、安定性及び環境汚染に関する検討事項について解析し、前臨床レベルでの課題点をクリアした。さらに、タイ国とワクチン臨床開発における共同研究を行うための一連の特許に関して共有することになった。タイ FDA の Seed Lot Approval の申請書類の編集を行い、パイロットプロダクションのデータを加えると終了するところまで来た。

(1) CRF01_AE 型 (Subtype E) HIVgag を発現する組み換えワクチンの評価

当研究室で作成した組み換えワクチン rBCG/HIVgagE 及び rDIs/HIVgagE による prime-boost 効果を解析した。3 群のカニクイザルに、rBCG/HIVgagE 0.01、0.03 及び 0.1mg を priming として皮内接種後、すべての群に rDIs/HIVgagE 10^7 PFU を boosting として 2 回皮内接種した。

HIVgag 特異的な細胞性免疫の誘導効果を IFN- γ ELISPOT により解析した結果、rBCG 0.1mg 接種群では、rDIs による boost 後、 10^6 PBMC あたり 200~600 spot forming cell (SFC) が認められたが、0.01 及び 0.03 mg 接種群では 100~200 SFC しか認められなかった。よって、接種量を rBCG 0.1mg + rDIs 10^7 PFU とする prime-boost 系で有効な細胞性免疫を誘導できることが認められた。

[泉泰之、網康至 (動物管理室)、松尾和浩、仲宗根正、山本直樹、本多三男]

(2) SIV gag 全遺伝子を組み込んだ組み換え型 BCG (rBCG-SIVGag) の免疫誘導能の解析

rBCG-SIVGag をモルモットに 0.1 mg 皮内接種 1 回または 80 mg 経口投与 2 回のいずれかで免疫し、125 週間における免疫反応について解析した。IFN γ 、IL-10、IL-12、TGF- β の抗原特異的な発現亢進を Real-time RT-PCR 法を用いて解析した結果、皮内接種群および経口投与群の PBMC、脾細胞において、PPD および Gag 特異的な IFN γ mRNA の発現亢進が観察された。その詳細を解析するため、PBMC、脾細胞を CD4 陽性細胞群、CD8 陽性細胞群に分離後、Real-time RT-PCR を行なったところ、CD4 陽性細胞群で顕著な PPD および Gag 特異的な IFN γ mRNA の発現亢進が検出された。また、両免疫群で Gag 特異的な血清 IgG 抗体の産生が観察された。その抗体価は非常に高く、免疫後 50、100、125 週において同等のレベルに維持されていた。0.1 mg 皮内接種のみで 2 年 6 ヶ月にわたり Gag 特異的免疫反応が維持されていたことは大変興味深い。これらの結果は、rBCG-SIVGag はウイルス抗原特異的な免疫反応を長期にわたり誘導・維持できることを示す。

[川原守、本多三男]

(3) HIV-1 CRF01_AE 92TH022 株をベースにした候補ワクチン構築

HIV-1 CRF01_AE のコンセンサスに極めて近い配列を持つ 92TH022 株をベースに、gag 及び env 遺伝子を組み込んだ BCG と DIs を構築した。BCG については、gag 及び env それぞれ、DIs については gag 遺伝子発現株が得られた。Env の発現は、シグナルペプチド部分を除いた gp120 が最も顕著であった。gag と env の両方を組み込んだ BCG を構築中である。

[松尾和浩、浜野隆一、堀端重男、本多三男]

(4) HIV-1 V3 エピトープを分泌発現する組み換え BCG 及び DIs ワクチンの免疫誘導能

BCG と DIs の組み合わせによる抗体産生増強を目指し、HIV-1 CRF01_AE の V3 エピトープ (12mer)- α 抗原融合蛋

白質を分泌発現する組み換え BCG と DIs の prime-boost 法を検討した。DIs を 2 回 boost されたマウスでは、 α 抗原に対する細胞性免疫の増強が見られたが、V3 ペプチドに対する抗体価は、BCG 単独接種の場合と差がなく、DIs boost による抗体産生増強は認められなかった。[松尾和浩, 浜野隆一, Kruavon Balachandra (NIH・Thai), 本多三男]

(5) 複製欠損型ワクチニアウイルス DIs 株と modified vaccinia virus Ankara (MVA) 株のウイルス学的、免疫学特性の比較

HIV 候補ワクチンとして開発が進められている SIV gag pol 遺伝子を組み込んだ複製欠損型ワクチニアウイルス DIs 株 (rDIsSIVgag/pol) と MVA 株 (MVA239SIVgag/pol) のウイルス学、免疫学的特性の比較を行った。各種の細胞株に対する感受性を比較した場合、MVASIV239gag/pol は鶏胚初代細胞、BHK-21 細胞及び CV-1 細胞での感受性が認められたが、rDIsSIVgag/pol は鶏初代細胞のみでしか感受性が確認できなかった。しかしながら、組み込んだ SIV 抗原は非感受性細胞においても MVASIV239gag/pol と比肩するレベル発現していることが確認できた。免疫原性の比較では、rDIsSIVgag/pol、MVASIV239gag/pol の単回投与群マウスに誘導された SIV gag 特異的 IFN- γ 産生細胞数の発現頻度には有意差が認められず、2 回投与群マウスでは単回投与群より高い SIV gag 特異的 IFN- γ 産生細胞数が確認できた。以上の結果から、DIs 株は MVA と比較して安全性が高く、外来抗原の発現レベルと免疫原性のレベルでも比肩できるベクターとして臨床応用できる可能性が示唆できた。

[染谷健二, 松尾和浩, 山本直樹, 本多三男]

2. 第 2 世代ワクチンの開発

HIV ワクチン開発はその時のサイエンスのニーズに対応することが要求されている。防御免疫誘導能と安全性を兼ね備えたワクチンの開発が HIV ワクチンの実用化には必須となるのでワクチンの発現と免疫誘導の関連を明らかにし、CCR5 ウイルスを防御できるワクチン開発を以下の方法で試みる。

- 1) R5 ウイルスのサルエイズモデル系の開発とワクチン評価への応用。
- 2) これまで問題とされてきた組換え BCG ワクチンのコードンの至適化のワクチン開発への応用。
- 3) コドンの至適化によって得られた免疫誘導の促進が防御免疫の誘導能にどのようにつながるかの解析。
- 4) prime-boost regimen による免疫誘導能の効果と防御免疫誘導が必ずしも一致しない理由の解析。例えば先天性免疫の活性化を考慮に入れたワクチン開発が R5 ウイルスの感染防御につながるか、否か。
- 5) 絶対的な HIV 感染動物モデルの開発のメドが世界的レベルでもたてられない現状での対応策として少人数

の Human Trial による免疫誘導の特性とそのレベルの解析の必要性の検討。
等について研究を進める。

(1) HIV-1 subtypeC をターゲットにした候補ワクチン構築

世界的に最も重要と考えられる HIV-1 subtypeC に対する候補ワクチン構築を開始した。ザンビアの HIV-1 感染者由来の subtypeC 分子クローンをベースに、DB26 株の gag 遺伝子を PCR 法で増幅し、BCG での発現ベクターとワクチニア DIs のトランスファーベクターにクローニングした。続いて、Gag 高発現株のスクリーニングを行う。

[松尾和浩, 原敬志, 堀端重男, 巽正志, 本多三男]

(2) rDIsSIVGag の経鼻免疫による粘膜免疫誘導

rDIsSIVGag を経鼻免疫し抗原特異的免疫応答を誘導できるか検討した。経鼻免疫を行なったマウスでは SIVp27 特異抗体が血清、糞抽出液、膣洗浄液中で検出された。p27 特異抗体産生細胞は、脾臓、パイエル板、粘膜固有層リンパ球でも ELISPOT 法で検出された。細胞性免疫応答は、CD4 陽性 T 細胞に Gag で特異的な刺激を加えることにより Th1/ Th2 サイトカインが産生され、Gag 刺激による IFN- γ 産生 CD8 細胞も誘導されていた。この免疫応答は約 1 年後でも維持されていた。

[吉野直人, 兼清優, 染谷健二, 松尾和浩, 山本直樹, 本多三男]

(3) rDIs と rMVA との経鼻免疫による免疫能の比較

rDIsSIVGag と rMVASIVGag を経鼻免疫し抗原特異的免疫応答を比較した。粘膜免疫系では rMVA を用いた方が p27 特異的 IgA 抗体産生量が多かったが、全身免疫系では p27 特異的 IgG、脾臓での特異的サイトカイン産生ともに rDIsSIVGag が強く誘導していた。

[吉野直人, 兼清優, 染谷健二, 松尾和浩, 山本直樹, 本多三男]

(4) rDIsSIVGag の皮内接種による粘膜免疫誘導

rDIsSIVGag を皮内免疫し抗原特異的免疫応答を粘膜組織で誘導できるか検討した。皮内免疫を行なったマウスでは SIVp27 特異抗体が血清、糞抽出液、膣洗浄液中で検出された。p27 特異抗体産生細胞は、脾臓、パイエル板、粘膜固有層リンパ球でも ELISPOT 法で検出された。細胞性免疫応答は、CD4 陽性 T 細胞に Gag で特異的な刺激を加えることにより Th1/ Th2 サイトカインが産生された。非働化した rDIs では、これらの免疫応答は非常に弱くなっていた。

[吉野直人, 兼清優, 染谷健二, 松尾和浩, 山本直樹, 本多三男]

(5) 非ヒト霊長類モデルにおける C4/V3 ペプチドの連続免疫法による免疫誘導

近年、HIV 感染における主要な感染防御免疫として液性免疫の重要性が明らかになり、ウイルス中和抗体を誘導するワクチン開発の妥当性も明らかとなった。しかし従来の液性免疫指向型ワクチンではウイルスを広範に中和する抗体を誘導することは困難であり、新たな液性免疫指向型ワクチンの開発が期待されている。本研究では交差反応性のウイルス中和抗体を誘導することを目的として、非ヒト霊長類モデルにおいて、ヘテロ C4/V3 ペプチドの連続免疫による免疫誘導の検討を行った。結果、免疫 4 週目でいずれのサルにおいても血清中抗 V3 IgG 抗体が上昇し、複数の V3 に対して強い交差結合性を示した。また免疫 36 週目においても交差性抗 V3 抗体価は高いレベルで維持された。また、血清は *in vitro* においても中和活性を示すことが期待され、今後予定する SHIV のチャレンジ実験によって、防御免疫についても検討する。

[兼清優、吉野直人、網康至(動物管理室)、矢野明(科学院)、西澤俊樹(科学院)、山本直樹、本多三男]

(6) コドン改変 SIV gag 遺伝子包含組換え BCG と組換え DIs によるカニクイサルの免疫誘導

前年までの成果から、組換え BCG において導入遺伝子のコドンマイコバクテリアに最適化することで、外来抗原の発現を著しく上昇させることがわかった。また、小動物においても、外来抗原の免疫誘導能を高める傾向の結果を得た。そこで、この戦略を用いて SIV Gag を標的とした組換え BCG を作製し、カニクイサルにおいて防御免疫を誘導できるか検討した。コドン改変/非改変組換え BCG は、既に有効性が示されている組換え DIs との組み合わせによる prime-boost regimen で免疫し、免疫応答を比較した。コドン改変型 BCG 投与群では、接種 4 週以降から Gag 特異的 IFN- γ 産生細胞が多数誘導され、また組換え DIs の接種によって免疫応答は飛躍的に増強された。一方、非改変型 BCG 投与群では、接種 4 週以降で Gag 特異的 IFN- γ 産生細胞はみられるものの、組換え DIs による免疫増強は顕著にはみられなかった。これらのことより、コドン改変型 BCG の初回免疫抗原としての適性が明らかとなり、今後予定するチャレンジ実験における防御免疫評価の結果が期待される。

[兼清優、網康至(動物管理室)、松尾和浩、染谷健二、須崎百合子(動物管理室)、山本直樹、本多三男]

(7) 合成プロモーター (PSFJ) を用いた組み換えワクシニア DIs 株の再構築と評価

本研究の目的は、HIV Gag-pol 遺伝子を発現する rDIs/HIV Gag-pol 株のワクチン効果の増強を図ることである。そこで、強力な発現を行う合成プロモーター:PSFJ を用いて、強力に発現する rDIs/HIV-Gag pol 株

を再構築し、小動物を用いて評価検討する。

現在、PSFJ プロモーター下流に HIV および SIV の構造遺伝子 Gag-pol 遺伝子を発現する rDIs/HIV-Gag pol 株を再構築している。今後は、エイズ小動物モデルを用いて免疫応答を検討する。

[岡村智崇、松尾和浩、志田壽利(北海道大学)、本多三男]

(8) マウスモデル及びサルモデルを用いた DNA プライム・リコンビナント DIs ブーストワクチンレジメンの評価

DNA ワクチンとリコンビナント DIs (rDIs)を用いたプライム・ブーストワクチンレジメンをマウス及びサルモデルを用いて評価した。DNA ワクチンまたは rDIs 単独に比べ、プライム・ブーストで免疫したマウスにはコードする SIV 抗原に特異的な強い Th1 型の細胞性免疫応答が誘導されており、防御免疫応答を評価するために接種した SIV 抗原をコードする致死性強毒ワクチニアウイルスの増殖を抑制することが明らかになった。同ワクチンレジメンを用いたサルモデルによる評価でもマウスモデル同様にプライム・ブーストで免疫した試験群は DNA ワクチン、rDIs 単独試験群に比べて強い Th1 型細胞性免疫応答が誘導されており、防御効果を確認するために接種した強毒性 SHIV の増殖を抑制できることが明らかになった。以上の結果から、HIV 候補ワクチンを開発する上で、本プライム・ブーストワクチンレジメンが有効であることが示唆された。

[染谷健二、忻克勤(横浜市立大)、松尾和浩、網康至、仲宗根正、泉泰之、奥田研爾(横浜市立大)、山本直樹、本多三男]

(9) BCG 由来 α 抗原と SIV 由来 Gag 抗原を発現する組換えワクシニアウイルス DIs 株の構築

本研究室では rBCG-Gag/prime、rDIsGag/boost のワクチンレジメンに従って免疫を行うことにより小動物及びサルにおいて Gag に対する特異的な免疫能を誘導することに成功した。今回、BCG 由来 α 抗原と SIV 由来 gag 抗原をワクシニア DIs 株で発現させたものを boost に用いることでさらに効果的で特異的な免疫機能を増強し、より高いウイルス感染防御能を得ることを目的とし、二種類の抗原を同時に発現する組換えワクシニアウイルス DIsGag- α 株の構築を行った。BCG 由来 α 抗原と SIV 由来 gag という組合せでその両方の遺伝子を単一の DIs 組換え用ベクターにクローニングし、rDIs-LacZ 感染 chick embryo fibroblast (CEF) 初代培養細胞にトランスフェクション後、X-gal 含有寒天培地上で組み換えウイルスを選択した。クローニングしたウイルスについて CEF での発現を現在確認中であり、発現株が得られ次第マウスでの免疫応答を解析する予定である。

[堀端重男、松尾和浩、本多三男]

3. rDIs/SIVgag の治療ワクチンとしての効果の解析

幸いエイズ研究センターではHIVの遺伝子を組み込んでも親株の性質としてのほ乳類細胞での増殖欠損能を保持する性質を持つ組換えワクシニアウイルス株DIsHIVを作製し、種々の細胞株で明らかにした。このことはHIV感染症が免疫不全状態を来すことから治療用ワクチンのベクターとして安全性の面で不都合であり、使用可能となることを示唆している。即ちこれまで報告された細菌性及びウイルス性ベクターの中で治療用ワクチンへの応用が安全性の面で最も優れていることが明らかにされた。本年度の研究で感染ザルを用いた治療用ワクチン開発の検討を行い目的とするCD8反応の完全な回復を得ることができることが可能となり、治療用ワクチン開発の糸口を見つけることができた。当研究室で作成した組み換えワクチンrDIs/SIVgagを、SHIV感染ザルに接種し、治療ワクチンとしての効果を解析する目的として、カニクイザルにSHIV C2/1 KS661cを 2000TCID₅₀経直腸接種し、viremia後にrDIs/SIVgag 10⁸ PFUを 2 回皮内接種した。SIVgag特異的な細胞性免疫の誘導効果をIFN- γ ELISPOTにより解析した結果、rDIs/SIVgagの初回接種後には、4頭中2頭が10⁶ PBMCあたり200 spot forming cell (SFC)以上を示し、2回接種後では、4頭中4頭が200SFC以上を示し、そのうち3頭は、500~700SFCを示し、感染ザルについても高い細胞性免疫が誘導されることが認められた。しかし、同時に測定したCD4陽性リンパ球数の回復は認められなかった。ウイルス量に関しては、現在解析中である。

[泉泰之、網康至(動物管理室)、松尾和浩、仲宗根正、山本直樹、本多三男]

4. HIV 亜種解析による HIV ワクチンの開発

昨年度に続き各種サブタイプのアクセサリ-遺伝子機能の解析を目的として各 HIV-1 サブタイプの vif 発現ベクターを構築してサブタイプ間での差異を検討している。これまでに10数種類の vif 発現ベクターの構築を行った。各サブタイプクローンより vif 発現ベクターを構築して感染効率の違いを検討したところ、予想に反し、検討した全ての Vif クローンにおいて欧米型である標準株(NL4-3; サブタイプ B)と同等以上(〜3倍程度)の感染性増強作用が観察された。この事はワクチン開発において標準株のみでなく種々のサブタイプ株をも視野に入れるべきであるという我々の提唱を異なる側面から支持する貴重な実験データであると考えられた。

[石川晃一、明里宏文(霊長類センター)、徳永研三(感染病理部)]

5. 各種のアジュバントを用いたワクチンの開発研究

HIV ワクチン開発において粘膜免疫誘導が可能であれば、HIVの主な侵入門である生殖器粘膜での感染阻止が期待される。そこで、SIVgag 蛋白、SIVgagDNA、HIVenvDNA と各種アジュバントを用いたマウス動物実験を行った。接種経路は経鼻および経膺で行い、免疫後の血清中および膺洗浄液中の特異的 IgG と IgA の検出を行った。その結果、M3- DPPE 被覆リポソームおよび PolyIC を用いた場合が最も抗体反応が良く長期間にわたり抗体が維持されていた。今後さらに中和活性の解析や ELISPOT 法による細胞性免疫能の解析を行うとともにサルを用いた感染防御試験を行いたい。

[石川晃一、明里宏文(霊長類センター)、佐多徳太郎(感染病理部)]

6. Env エイズワクチンデザインにおける糖鎖修飾の重要性

エイズウイルスの膜表面のスパイクタンパク(Env)は多数の糖鎖に覆われている。この構造はエイズウイルス感染における有効な免疫誘導障害の原因と考えられている。我々はサルエイズモデルの系を利用し病原性の SIVmac239 gp120 に存在する N 結合型糖鎖5個を欠失した変異ウイルス Δ 5G が宿主応答により感染が制御され、さらに SIVmac239 に対する防御免疫が誘導されることを報告した。SIVmac239 と Δ 5Gの違いは Env タンパクのみであり、ウイルスの抗原性の違いがこのようなウイルス感染制御の違いの原因となるならば、Env タンパクに対する宿主応答に大きな違いがあることになる。そこで Env タンパクが誘導する免疫について SIVmac239 と Δ 5G 感染に対する効果を調べた。アカゲザル8頭を用い、それぞれ4頭に SIVmac239 gp120 または Δ 5G gp120 を発現する DNA ワクチンで免疫し、次 SIVmac239 gp160 または Δ 5G gp160 を発現するワクシニアで Boost した。Boost 後8週に SIVmac239 (wt) Env 免疫群2頭、 Δ 5G Env 免疫群2頭に SIVmac239 または Δ 5G を静脈内接種した。まず SIVmac239 感染では、初期感染のピーク viral load は wt Env 免疫群に比べ Δ 5G Env 免疫群がわずかに低かった。初期感染後の viral load の最低値 (set point) では wt Env 免疫群が Δ 5G Env 免疫群より低値を示した。この結果は前年度の結果と一致した。 Δ 5G 感染では、同一群内の2頭で、初期感染のピーク viral load が異なったが wt Env 免疫群と Δ 5G Env 免疫群の違いはなかったが SIVmac239 感染と比較すると1/10から1/100であった。viral load は感染後6週には検出限界以下となった。 Δ 5G 感染に対する Env の感染防御効果には糖鎖欠失の有無は関係しなかったが、Env 免疫は SIVmac239 感染と比較して Δ 5G 感染を強く抑制した。

[杉本智恵、森 一泰]

7. 組換えセンダイウイルスベクターエイズワクチン開発のための基礎研究

HIV-1 のアクセサリ蛋白の一つである Nef は、MHC クラス I 分子および CD4 分子の細胞表面からの発現抑制や、T リンパ球の活性化などの作用があり、HIV-1 感染の病原性に深く関わりとされている。Nef の病原性に与える影響を検討することを目的として、野生型 Nef と変異 Nef を発現する組換え SeV を作製し、培養細胞実験およびマカクサルモデルにおいて、主に MHC クラス I 分子の発現抑制作用および抗原特異的細胞性免疫反応の解析を行っている。

[狩野宗英、俣野哲朗 (東大・医・微生物学)]

II. HIV 感染症の治療

1. 薬剤耐性 HIV の遺伝子解析

今日、抗 HIV-1 治療薬剤はヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤が 7 種類、非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤 3 種類、プロテアーゼ阻害剤 7 種類の合計 17 種類の薬剤がある。これらの薬剤を組み合わせた Highly Active Anti-Retroviral Therapy (HAART) の導入により AIDS による死亡率は顕著に低下した。しかしその一方で、治療薬剤に反応しなくなる薬剤耐性ウイルスの出現がいずれの薬剤についても報告され、治療を進めるうえでの大きな障害として問題となっている。薬剤耐性変異ウイルスの有無を判定することは適切な治療を進めるうえで重要かつ緊急な研究課題であり、我々は平成 8 年度より薬剤耐性検査を開始し 7 年を経過している。当初 10 施設の協力で開始した追跡調査も平成 15 年度は 64 施設になり、解析を行った検体は 2003 年 12 月の時点で累積 5561 検体、1156 症例に達している。我々の調査からは薬剤耐性症例数は年々増加の傾向を示しており、また耐性を獲得した症例の中では多剤耐性化が進んでいることが明らかになった。最近では治療を受けている症例だけでなく、新規感染者にも耐性変異を獲得している症例が認められるようになってきており、今後更なる疫学調査と症例に追跡調査が必要と思われる。

[杉浦 互、松田昌和、千葉智子、西澤雅子、柿澤淳子、山田兼雄 (聖マリアンナ医)]

2. ウイルスの増殖活性が低下したプロテアーゼ阻害剤耐性 HIV-1 の病態解析

プロテアーゼ阻害剤耐性を獲得した HIV-1 は往々にして増殖能力が低下していることが知られている。我々は、この増殖能力の低下の機序について解析を行ってきた。その結果、プロテアーゼの基質である Gag に集積されて

くる切断部位変異 (cleavage site mutation CSM) と CSM 以外の部位に集積してくる変異 (non-CSM) が共同してウイルスの増殖能力の回復に作用することを明らかにした。さらに、HIV-1 の増殖能力の低下が宿主細胞内での粒子形成にどのような影響を及ぼしているかを形態学的、組織学的に解析した。その結果、共焦点顕微鏡による HIV-1 感染細胞の観察から増殖能力の低下したウイルスでは細胞内における gag タンパクの輸送が障害され、Gag が長く細胞内に貯留していることを明らかにした。また電子顕微鏡による観察からは出芽したウイルス粒子の多くが未成熟なことを明らかにした。

[Lay Myint、杉浦 互、佐藤裕徳 (遺伝子解析室)、富田康浩 (遺伝子解析室)]

3. 相同組み換えによる患者由来ウイルス再構築のためのベクターの作成

患者生体内の HIV-1 の性質や薬剤感受性などを把握するためには HIV-1 を回収し in vitro で解析することが不可欠である。採血後数日を経ってしまったような条件の良くない血液検体からもウイルスを効率よく回収するために、相同組み換えを利用した HIV-1 再構築技術の開発を行った。昨年までに HXB2 を基本骨格に、pol 遺伝子を欠損させたもの (HRV3) と pol 遺伝子に加えて、gag の p6 から p24 までも併せて欠損させたもの (HRV5) を作成した。また CRF_01_AE の感染性クローンである NH1 株を元に HXB2 同様に HRV3E と HRV5E を作成した。それぞれのベクターによる組み換え効率を評価した結果 HRV3、HRV5、HRV3E そして HRV5E それぞれ遺伝子導入後逆転写酵素活性ピーク達成までの日数は HRV3 で 18.4 日、HRV5 で 16.4 日目にピークが観察され、親株 HXB2 より約 1 週間の遅延が認められた。また NH1 ベクターの場合も HRV3E で 23.9 日 HRV5E では 24.3 日と親株 NH1 より約 1 週間の遅延が認められた。より効率よく速やかに組み替え体を得ることを目的に組み替えポイントの変更、挿入する患者由来遺伝子の大きさなどの検討を行った。さらに効率よく組み替えウイルスを作成するために宿主細胞の検討を行った。その結果、M8166 細胞を用いることにより組み換え HIV-1 を高い力価で得られることを明らかにした。さらに組み換え HIV-1 ベクター自体も改良を加え、全 gag と全 pol 遺伝子を組み込むことができるようにした。

[松田昌和、千葉智子、三浦秀佳、杉浦 互]

4. HIV-1 感染力価を迅速に測定する T 細胞系のレポーター細胞株 MaRBLE cell の樹立と実用化

感染性の HIV-1 を用いて薬剤感受性検査を行うには、感度の高い感染宿主細胞が必須である。我々は平成 14 年度までにヒト T 細胞由来の細胞株 HPB-M(a)細胞に

LTR 制御のレポーター遺伝子 (EGFP、RFP、firefly luciferase) および CMV 制御の renilla luciferase を組み込み、HIV-1 の発現量を定量する新たな細胞株 MaRBLE cell の樹立に成功した。RFP を発する細胞数および firefly luciferase 活性は p24 抗原量で評価したウイルス量と相関した。CMV 制御の renilla luciferase は測定系に投入された細胞数を補正する目的で導入し、実際 renilla luciferase 活性は細胞数と高い相関を示し、renilla luciferase 活性を測定することにより細胞数の補正と細胞毒性を評価することに成功した。この細胞を用いて再現性の高い薬剤感受性検査を完成させた。

[千葉智子、三浦秀佳、滝沢真理、松田昌和、松田善衛、本多三男、杉浦 互]

5. AZT 耐性 CRF01_AE (サブタイプ E) HIV-1 ウイルスの簡便検出法の開発

近年、発展途上国では WHO の “3 by 5” Initiative を受けて特許の制約のない抗 HIV-1 薬剤が用いられるようになってきている。代表的な薬剤の組み合わせは d 4 T+3TC + nevirapine であり、タイ王国においてもこの組み合わせによる合剤が産生され、多くの HIV-1 感染者に投与されつつある。治療薬剤の普及は同時に薬剤耐性 HIV-1 の出現頻度を高めることになり、今新たな課題として問題となっている。我々は将来この地域において薬剤耐性 HIV-1 症例が増加することを念頭に簡易薬剤耐性 HIV-1 検出系を開発した。まず東南アジアに流行する CRF01_AE の AZT 耐性変異である M41L および K70R 変異を特異的かつ簡便・敏速に検出する PCR 法を開発したが、平成 15 年度は同じ手法を用いて新たに 3TC 耐性変異 M184V/I を検出する方法を確立した。この方法では患者血清中耐性変異株の割合が 10%程度であっても検出可能であり、また従来のシーケンス法と高い一致率を示した。今後耐性株の流行モニタリングに寄与することが期待される。

[レイ・ミント、有吉紅也、松田昌和、千葉智子、杉浦 互、シリバン・サンアルン (タイ NIH)、パニータ・パチャーバニッチ (タイ、ランバン病院)]

6. CRF01_AE (サブタイプ E) HIV-1 ウイルスのプロテアーゼの結晶構造解析

HIV 感染者の 90%以上が生活する発展途上国ではサブタイプ B は必ずしも主流な流行株ではなく、むしろそれ以外のサブタイプが流行の大半を占めている。発展途上国では抗 HIV 薬剤は経済的な理由からほとんど使用されていない。しかしながら近年 generic medicine の使用が認められ、薬剤治療が行われるようになると、発展途上国においても薬剤耐性ウイルスの問題が浮上してきた。今まで薬剤耐性研究はサブタイプ B を中心に行われてき

が、サブタイプ B の研究を中心に得られてきた薬剤耐性に関する知見がそのまま non-B にも当てはめることができるのか明確ではない。我々は昨年、サブタイプ E では nelfinavir に対する耐性変異が異なっており、サブタイプ E では D30N を取る確率は低く、代わりに N88S が獲得されることを明らかにした。平成 15 年度はなぜ CRF01_AE では D30N が獲得されないのかそのメカニズムを構造科学的に明らかにするためにプロテアーゼの精製と結晶化に取り組んでいる。

[柿澤淳子、松田昌和、千葉智子、杉浦 互、セリア・シッファー (Univ. Massachusetts)]

7. 薬剤耐性 HIV-1 の分子進化解析

薬剤耐性変異が生体内でどのように選択進化していくか解明することは薬剤耐性の病態を理解するうえで重要である。共同研究者の田中博らは同一個体から採取したウイルスの連続サンプルから、HIV などの病原性ウイルスの宿主内での進化プロセスを推測できる新しい計算方法「Sequential-linking アルゴリズム」を開発した。この方法では中立進化的な分子系統樹解析法と異なり、宿主との相互作用による正の淘汰進化の効果 (多様化及び加速進化) を評価でき、ウイルス進化によく認められる準種の絶滅や復帰変異も扱えることが可能である。この方法をプロテアーゼ耐性変異の進化解析に適応した結果、HIV-1 配列の間の系統関係を示しただけではなく、薬剤耐性の宿主内進化、薬剤治療との相関、治療により正の淘汰進化が働いた箇所の同定が可能であった。

[杉浦 互、松田昌和、千葉智子、柿澤淳子、田中博 (東京医科歯科情報)、任鳳蓉 (東京医科歯科情報)]

8. 新たなインテグラーゼ阻害薬剤の開発

薬剤耐性を獲得したために治療困難に陥った症例を救済するためには新たな治療薬剤、あるいは今までとはまったく異なる作用機序をもつ薬剤を開発する必要がある。この研究では既存のプロテアーゼ阻害剤に対して耐性を獲得したウイルスを標的にして感受性のある阻害物質、あるいは増殖能力の低下したウイルスを選択できるような阻害物質の開発と、新たに遺伝子組み込み酵素を標的にしたウイルス阻害物質の開発を目指し、合成化合物ライブラリーのスクリーニングを行なった。平成 15 年度は 12000 個の化合物ライブラリーより複数のインテグラーゼ阻害剤候補物質を見出した。その中で今まで報告されてきた diketo acid とは異なる化合物を見出した。これはカルバゾールを基本骨格にもつ低分子化合物であり、strand transfer 阻害活性を呈した。

[巖華、杉浦 互、松田善衛、横幕能行、田中晴雄 (北里大学)、千葉治美 (北里大学)、野村伸彦 (富山化学工業株式会社総合研究所)]

9. 細胞内におけるプロテアーゼ阻害剤の薬物動態解析研究

治療薬剤血中濃度測定は適切な治療を行なうために有用だと考えられ、多くの研究が成されてきた。一方、薬物の直接の作用部位である細胞内における薬物の濃度、代謝などは明らかにされていない。平成 15 年度は細胞種の違いによる細胞内濃度、代謝の相違について検討を加えた。解析した細胞は HIV-1 本来の宿主である CD4 陽性 T 細胞と本来の宿主ではないが頻りに用いられている HeLa 細胞である。まず 5 種類の PI(NFV、SQV、LPV、RTV、IDV) を各々 2.5 μ M の濃度で培地中に添加して HPB-M(a) に 20 分間取り込ませた後、細胞から PI をメタノールで抽出し、HPLC にて抽出液中の PI 濃度を測定し、細胞内濃度に換算した。その結果 HPB-M(a) 細胞内に NFV は約 134.4 倍、SQV は約 92.6 倍、LPV は約 11.9 倍、RTV は約 11.8 倍濃縮された。IDV の細胞内濃度は 3.1 μ M で、細胞内への濃縮はほとんど認められなかった。また培地中 NFV 濃度を 10 μ M とし HeLa 細胞と HPB-M(a) に各々 20 分間取り込ませた場合 HeLa 細胞内の NFV 濃度は約 180 μ M で、HPB-M(a) の約 880 μ M に比べ 1/5 程度の細胞内濃度だった。今後他の PI の細胞内濃度についても比較し両細胞における薬剤の取り込みについて検討する。

[西澤雅子、岡野愛子、杉浦 互、加藤真吾 (慶応大学)]

10. CRF01_AE 家族内感染例-NH3-に見出された高度薬剤耐性の獲得機構

HIV-1 の治療に用いられている抗ウイルス剤は逆転写酵素 (RT) やプロテアーゼ (PR) の阻害剤であり、投与を続けることにより耐性ウイルス株が生じることが問題となっている。これらの酵素については、すでに個々のアミノ酸残基の置換の耐性への貢献度に関して多くの知見が蓄積しているが、実際の患者では複数のアミノ酸置換が組み合わせて耐性が獲得されている場合が多く、複製中に生じる塩基置換から完成された耐性株へ至る進化過程については必ずしも明確ではない。最近我々は、家族内感染例 (NH) の中で HAART 治療歴のある NH3 と呼ばれる患者から、多くの NRTI に高度に耐性を持つ逆転写酵素 (RT) 領域の配列を得た。この RT の特異な耐性は、活性部位の大きな挿入配列と点突然変異 (M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y) によって獲得されている。このように複雑な変異構造を持つ酵素の進化過程を知るため、薬剤投与前後の検体の血漿および PBMC 分画から HIV-1 の RT 領域の配列クローンを多数採取し、その変異を塩基配列と薬剤耐性の両面から観察した。HAART 実施後に得られた検体の血漿分画からは、上記の複数の点突然変異を持つ RT のみが検出された。一方、同じ検

体の PBMC 分画からは、L210W, T215Y のみを変異した配列および、M41L, Ins69, T69I のみを持つ配列が発見された。RT 領域の遺伝子配列の進化的解析から、このウイルスが PBMC 分画から得られた 2 つの配列に近縁なウイルス同士の組換えで発生したことが示唆された。これらの配列変異を持つウイルスの実際の薬剤感受性を計る目的で変異ウイルス株を作成したところ、部分的に変異したウイルスも若干の耐性を獲得していることが明らかとなった。そこで、部分的に変異のある RT 領域に、さらに遺伝的マーカーとして制限酵素 SmaI 切断部位の変異を加えた感染性クローンを作成し、これらのウイルスを用いた *in vitro* 共感染実験を行うことで、どのような薬剤濃度環境・ウイルス負荷条件で高度耐性変異への進化が生じるかを確かめている。

[椎野禎一郎、佐藤裕徳 (遺伝子解析室)]

III. HIV の分子疫学研究

1. HIV-1 CRF08_BC 感染性分子クローンの樹立とその性状の解析

2000 年に雲南省において収集した CRF08_BC 分離株 HH040 の 5' LTR から pbs までの約 800 bp および pbs から 3' LTR までの約 9000 bp を結合させて得たクローンから、PBMC に感染しウイルスを産生する 2 種類の感染性分子クローン NX4 と NX22 を得た。いずれのクローンも PBMC への感染性を有するが、NX22 の方がより早い kinetics でより多くのウイルスを産生した。いずれのクローンも CXCR4 は使用せず CCR5 のみを使用した。この性質は、分離株 HH040 と一致していた。また 2 つのクローンの NP2 への感染性を比較すると、PBMC の場合は逆に NX4 の方がより強い細胞変性を伴って良く増殖することが分かった。gp160 および gp120 の血清学的交差性をみると、CRF08_BC とサブタイプ C の間では血清学的に交差性があるものの、サブタイプ B との間では交差性が低いことが示唆された。本研究で得られた感染性分子クローンは、中国における HIV-1 の流行株のウイルス学的研究および将来のワクチン開発のために有用な分子クローンであると考えられる。

[草川 茂、楊 栄閣、武部 豊]

2. HIV-1 サブタイプ B' の感染性分子クローンの樹立

東南アジアにおいて見出される HIV-1 サブタイプ B は、系統進化的に欧米において流行しているサブタイプ B と区別され、サブタイプ B' と分類される。サブタイプ B' は、タイにおいては感染者数が減少しているものの、ミャンマーにおいては代表的な流行株であり、また中国内陸部の新興流行はサブタイプ B' によるものと報告されており、アジアにおける HIV-1 流行を考える上で重要な

サブタイプである。PCR を用いた増幅技術を用いて、研究試薬として重要なサブタイプ B' の感染性分子クローン (B106.22) を樹立した。B106.22 は PHA 刺激 PBMC において、これまでに当研究室で作製してきたいずれのクローンよりもより早くかつより多量のウイルスを産生した。しかしながら、M-CSF で誘導したマクロファージへの感染性は認めなかった。B106.22 は CXCR4、CCR5 のいずれを発現させた細胞でも強い細胞変性を伴ってよく増殖し、両方を coreceptor として使用する X4/R5 ウイルスであることが分かった。この性質は、分離株 B106 と一致する。coreceptor usage に関係があるとされる V3 ループのアミノ酸配列を見たところ、総電荷は 6 で、6-8 位のアスパラギン結合型糖鎖付加部位 (NNT) は保存されていた。本研究で得られたクローン B106.22 は、サブタイプ B' 特異的なウイルス学的性質の解析にとって重要なクローンであると考えられる。また、ミャンマーや中国雲南省において見出されるサブタイプ間組換え体の多くはサブタイプ B' の領域を含んでおり、組換え体の出現機構の解析への応用も期待される。

[草川 茂、今村裕子、武部 豊]

3. HIV-1 サブタイプ C が持つ稀な CXCR4 利用能を決定する V3 ループ内の責任アミノ酸残基の同定

HIV-1 サブタイプ C 株のほとんどは CCR5 を coreceptor として利用し CXCR4 を利用しないが、これまでサブタイプ C の coreceptor 利用の分子メカニズムについては明らかにされていない。本研究では、両方を coreceptor として利用する分離株 96USNG31 を用いて HIV-1 サブタイプ C の coreceptor 利用能を決定する遺伝子領域の特定を試みた。その結果、他のサブタイプ同様、env 遺伝子の V3 領域の置換によって coreceptor 利用能の変換が起ることを確認した。96USNG31.4 の V3 領域のアミノ酸配列を CCR5 利用性の IndieC1 と比較したところ、3ヶ所に coreceptor 利用能決定に関与する可能性がある塩基性アミノ酸への置換 (21Y→H、23T→H、32Q→K) が見い出された。これらのアミノ酸の点変異体を作製し coreceptor 利用能を検討したところ、23T→H、32Q→K 単独の変異体は CCR5 のみを利用できるのに対し、21Y→H、23T→H の 2ヶ所を同時に置換した変異体は CXCR4 と CCR5 両方の利用能を有していた。HIV-1 サブタイプ C の coreceptor 利用能は env 遺伝子の V3 領域のアミノ酸配列によって決定され、CXCR4 利用能の獲得には 21 番目のヒスチジンへの置換、あるいは塩基性アミノ酸数の増加による総電荷の増加が重要であると推定された。

[上原理恵子、草川 茂、加藤佳代子、武部 豊]

4. 逆転写遺伝子領域を用いた HIV-1 遺伝子組換えの *in vitro* 組換え点の微細マッピング

遺伝子組換えは HIV-1 が高度のゲノム多様性を生み出す重要な要因である。我々はすでに、分布する HIV-1 株の 10-30% が組換えウイルスであるミャンマーにおいて、フィールド株に見出された多数の組換え体を比較し、組換え点のあるものが相互に共有されていること可能性を示唆した。組換えの検出には相互に異なる変異サイトの存在が不可欠であるが、フィールド株には都合の良い変異サイトが少なく HIV-1 の組換えの起きるゲノム上の位置を遺伝学的に解析するには限界がある。ウイルスゲノムの組換えの機構を知るためには、*in vitro* の感染系で使える遺伝子マーカーを多数持ったウイルスの開発が不可欠である。また、配列レベルでの解析を容易にするためには組換えを観察するゲノム領域は短いほうが良いが、1 回の塩基配列解析で解析可能な領域で交叉が起きる確率は、低いことが予測される。そのため、必要に応じて組換えを起こしたウイルスのみを的確に選択できる系が要求される。そこで我々は、疫学的調査で高い組換え頻度が観察されている逆転写酵素領域 (RT 領域) に注目し、マーカー遺伝子として制限酵素切断サイトに同義置換変異を導入した。さらに、RT の抗ウイルス剤耐性変異の組み合わせを応用して、400bp 弱の領域に組換えが生じた時のみ次代のウイルスが採取できるような系を構築した。こうした組換え HIV-1 を用いて、さまざまな条件下での組換えのパターンを観察している。

[椎野禎一郎、保科佳美、武部豊]

5. アジアにおける新規組換えウイルス新生地点での HIV-1 共感染の高頻度検出

われわれは先の研究によって、アジアの一部地域 (中国雲南省西部-ミャンマー中部地域) に、新しいタイプの組み換えウイルスが新生している極めて特殊な地点の存在することを見い出したが、組み換えウイルス新生の前提として、異なる系統の HIV-1 株の共感染が、この地点では高頻度に起っていることが予測される。そこでわれわれは、共感染例の検索と個体内 HIV-1 準種の解析を行うために、TA クローニング技術を用いて、感染者個体内に存在するウイルスゲノムのクローナル解析を行った。その結果、5-10% 以上に共感染が見られること、共感染しているウイルスはさらに多様な組換え構造をもつものも含まれ、HIV-1 組み換えの nascent なプロセスが明らかとなった。これら地域のハイリスク感染者が、多系統の HIV-1 株に多重に感染する機会をもっていること、また生物学的に重要なことであるが、これらの例では重 (スーパー) 感染を阻害するメカニズムが作動していないことが示唆される。これらの知見は、とりわけ将来のワクチン戦略を考えられる上で重要な意味があると考えられる。HIV-1 組換えの発生とその選択・淘汰・定着の過程は、これまでほとんど解明が進んでいない分野であ

り、現在長期的なフォローアップ研究が進行中である。
[Xiaojie Li, 保科佳美, Yanling Ma, Chaojung Yang, Qianqiu Wang, 椎野禎一郎, 草川 茂, Xueshan Xia, Kunlong Ben (中国科学院、昆明動物学研究所), Min Thwe, Tin Aung, Kay Thi Aye, Khin Yi Oo, Hlat Htut Lwin (ミャンマー保健省 AIDS/STD 予防対策プログラム), 武部豊]

6. 中国南西部（雲南省）における HIV-1 流行の分子疫学

中国における HIV 流行の第 2 の波は性的ルートによる HIV 感染の拡大であり、特に今後危惧される一般集団への侵淫の前触れとなると言う意味でその解析の疫学的意義は大きい。われわれは、中国で最初の HIV 流行が起った雲南省における性的ルートによる感染者に関して解析を行った結果、先行する注射薬物乱用者 (IDU) の流行に強く影響されていることを明らかにした。1997 年以前は特にサブタイプ B' が、2000 年以降は CRF07_BC および CRF08_BC が優勢なウイルス種となっている。タイの流行に由来するウイルス株 (CRF01_AE) が流行の主体となっている他の東南アジア諸国や、上海など中国沿海部とは著しい差異であり、流行形成のメカニズムの違いを示唆するものである。

[Xiaojie Li, Yanling Ma, Chaojung Yang, Qianqiu Wang, 保科佳美, 横田侑子, 今村裕子, 草川 茂, Xueshan Xia, Kunlong Ben (中国科学院、昆明動物学研究所), 武部豊]

IV. HIV-1 感染性クローン樹立法ならびに各種研究技術の確立

1. HIV-1 感染性クローン樹立法の確立

著明な多様性を呈する HIV-1 をその特性を保持したまま迅速に感染性クローンを樹立することを目的に方法論の改良を引き続き試みている。本年は HIV-1 全長ゲノムを安定に保持するクローニングベクターの開発と、クローニング戦略の改良により従来の方法論よりも格段に迅速に感染性クローンを樹立することが可能になり、この戦略を感染爆発が現在進行しているアフリカ Zambia および Ghana 由来のウイルスに応用し多数の感染性クローンを樹立することが出来た。

[巽 正志]

(1) HIV-1 ゲノムクローニングベクターの構築

HIV-1 全長ゲノムは両端に LTR をもつことや宿主大腸菌に Toxic な配列があるなどから、High copy 数のプラスミドでは欠損を起しやすく極めて不安定であることが知られている。そこで HIV-1 ゲノムをより安定に保持するプラスミドベクターの構築が迅速な感染性クローン樹立

の前提条件になると考え、copy 数がより少ない pBR322 を基本骨格に様々なクローニングベクターに由来する MCS とそれをより HIV-1 に特化した制限酵素部位をもつ、青白選別可能なクローニングベクター pMT シリーズ 5 種を構築し、pMT1 ベクターを用いて様々な HIV-1 全長ゲノムを安定に保持することが判った。

[巽 正志]

(2) Half and Half クローニング戦略による Full-genome クローン樹立の効率化

当初、完全長 DNA クローン作製は、5'-LTR から PBS までを予め pBR322 ベースの Cloning Vector pMT1 に組み込み、PBS 領域に保存されている Kas I 部位から 3'-LTR の PolyA signal 下流までを Not I 部位を付け加えた Primer で一気に増幅した 9.0 Kbp に及ぶ Long Amplicon を制限酵素処理精製後組み込む方法であった。しかしながら全長クローン取得率は低かった。そこで HIV Database から Vpr および Vif 領域における Rare cutter 制限酵素を選定し、その塩基配列を含む Primer で Vpr および Vif 下流領域を増幅し pMT1 に組み込み、しかる後に Vpr および Vif 上流領域を増幅した断片を酵素処理後組み込む Half & Half 戦略を用いて全長クローンを効率的に得ることができた。この Half & Half Strategy の効率を確認するため、NL4-3 株感染 MAGIC-5A ゲノムを鋳型に Vpr 領域の EcoR I site を用いた Primer で再構築した NL4-3 クローン感染性クローン樹立効率を確かめたところ全長クローン中約 10% となった。

[巽 正志]

(3) Zambia 由来 HIV-1 subtype C 感染性分子クローンの樹立と解析

UNAIDS によれば 2003 年末までに全世界での HIV 感染者総数は 4,200 万人にも及び、その多くは開発途上国に集積しており、なかでも subtype C 感染者が最も多いとされる。一方 HIV 研究は欧米に流布する subtype B を中心になされ、HIV 解析用各種研究試薬も subtype B 以外はほとんど整備されていない現状にある。しかしながら、subtype B は世界の流行全体からみれば minor な subtype である。そこで subtype non-B に対する解析用研究試薬整備を目的に、その開発基盤となる感染性分子クローンの樹立を目指して研究を進めている。我々は先の 1998 年にインド人患者由来ウイルスより subtype C の感染性クローン pIndie-C1 の世界に先駆けての樹立を報告したが、subtype C でもインド大陸で流行する株はアフリカでのその 1 亜株とされている。そこで感染爆発が進行しているサブサハラアフリカで流行しているウイルスの感染性分子クローン樹立を試みた。2002 年に Zambia で分離されたウイルスを「HIV Trapping System」で Long PCR Amplicon 組み込みを Half & Half Strategy に改良することにより 8 名の患者から効率的に 9 クローンの感染性ク

ローンを樹立し得た。その全塩基配列を決定し、近隣結合法によって分子系統樹を作成しその帰属を決定し、その感染性を検討したところ 1) 全てのクローンは全長にわたりアフリカ型 subtype C にクラスターされ 2) 全てのクローンは MAGIC5A や NP2 細胞など不死化細胞のみならず、PBMC でも増殖した。感染者総数が最も多いサブサハラアフリカで流行する subtype C の純粋な感染性分子クローンの複数分離に世界に先駆けて成功した。これらのクローンはワクチン開発等ウイルス学的解析に資するものと期待される。

[原 敬志、市山浩二(Zambia 大学教育病院)、Francis Kasolo(Zambia 大学教育病院)、照沼 裕(日本バイオセラピー研究所)、本多三男、山本直樹、巽正志]

(4) Ghana で流行する HIV-1 の感染性クローンの樹立

Ghana 国に多剤併用療法を導入するにあたり、現地で現在流行している HIV-1 subtype の特性を把握し、より現地のウイルスに則した薬剤感受性試験法開発のための分子基盤としての感染性クローンの樹立を試みた。Ghana 25 検体からの樹立概要を述べる。本年 7 月 28 日から 29 日にかけて首都 Accra 近郊で採取した患者 EDTA 附加血液はおよそ 2 日間の空輸のち搬入され直ちにリンパ球分離の上 Donor PBMC あるいは MAGIC5A 細胞との Coculture でウイルス分離を試みた。その分離効率は Donor PBMC との Coculture で 12/25、MAGIC-5A 細胞との Coculture で 16/25 であった。分離ウイルス株感染 MAGIC-5A 細胞ゲノムを鋳型に簡易 subtyping 法である gag 領域を標的とした Heteroduplex Mobility Analysis によりその subtype を推測したところ、subtype A 7/18, AG Recombinant 6/18, subtype G 2/18, 判定不能 3/18 であった。MAGIC-5A 細胞と Long PCR を用いた「HIV Trapping System」で HIV-1 genome の Vpr および Vif 領域に多くの HIV-1 で保存されている部位を Primer に用いて構築する Half and Half Strategy をとることにより、Ghana 由来 subtype A 6 クローン、AG Recombinants 7 クローンおよび世界に先駆けて subtype G 2 クローンの樹立に成功した。現在その特性付けをしている。

[木ノ本正信、徳永研二、N. Nii-Trebi (野口記念医学研究所、ガーナ)、佐多徹太郎 (感染病理部)、巽正志]

2. HIV-1 感染価迅速測定細胞 MAGIC-5/SEAP の樹立と薬剤耐性試験法への応用

新規 HIV 感染価測定細胞株 MAGIC-5/SEAP 細胞を樹立し薬剤耐性試験法に応用した。この新規細胞株は、HIV-1 感染により誘導される培養上澄中の SEAP 酵素活性を、化学発光基質を添加するだけで HIV 感染を検出可能であり、各種抗 HIV 薬に対する薬剤耐性を迅速簡便高感度にて測定できた。より臨床像に則した 3 剤併用薬剤耐性試験「All-in-One Assay」を開発し多検体処理が可

能となる標準化を達成した。またこの迅速測定法に用いる細胞株の管理の標準化を行い、JST 委託事業により薬剤耐性 Phenotype 試験法の実用化にむけ体制を整えつつある。さらに HIV-1 Full-Genome 感染性クローンの効率的な樹立法を確立し、より進化した GenoPhenotyping 法への道筋を開拓し、今後の薬剤耐性試験の臨床検査実用化が視野に入ってきた。

[橋本 修(三菱化学 BCL)、石子博昭(三菱化学 BCL)、蜂谷敦子(国立国際医療センター)、岡 慎一(国立国際医療センター)、巽正志]

3. アンプリコア HIV-1 モニター-v1.5 のコントロールサーベイ

アンプリコア HIV-1 モニターの測定精度を明らかにし、施設間での測定値を是正する目的で 1 年に 1 回コントロールサーベイを実施した。参加施設は 38 施設(標準法が 30 施設、高感度法が 29 施設)であった。ルーチンで HIV ウイルス量を測定している施設のほぼ全施設が参加したことになる。82%の施設に何らかの問題が認められた。2000 年から毎年精度管理調査を実施しているが新しく参加した施設および過去に参加した施設でも新人が検査を担当するなど施設間の条件も毎年異なり、機器の保守・点検と共に取扱説明書の再チェックなど、常識と思われることが忘れられていることがわかった。

[吉原なみ子、坂本優子、今井光信(神奈川県衛生研究所)]

4. 血液凝固因子製剤中の PCR による HIV-1 遺伝子検出

1979 年から 1994 年までに製造された凝固因子製剤で、入手可能であったについて HIV-1 gag 領域を nested PCR で増幅し、電気泳動で HIV-1 遺伝子の検出を行った。入手出来た第 VIII 因子製剤、15 製品、304 ロットのうち、HIV-1 が検出されたのは 1984 年以前に製造された 4 製品、43 ロットであり、すべて海外で製造された製品であった。1985 年以降の製品には見つからなかった。なお、50 ロット中 37 ロット(74%)に HIV-1 遺伝子が高率に検出された製品があった。また、第 IX 因子製剤、12 製品、76 ロットのうち、2 製品、6 ロットに HIV-1 遺伝子が検出された。これらはすべて 1985 年以前に海外で製造された製品であった。

[吉原なみ子、福嶋浩一]

5. コラーゲンスポンジを用いたバイオヒト皮膚モデルにおける HIV-1 検出法の検討

コラーゲンスポンジと正常ヒト皮膚繊維芽細胞から作成したバイオヒト皮膚モデルを用いて、バイオヒト皮膚モデル製品の HIV 汚染時の HIV-1 検出を検討した。皮膚モデルに OM10.1 を 10^{1-5} 個接種後 HIV-1 p24 抗原検出及び RT-PCR による HIV-1 検出を行った。細胞増殖率は 10^5 個

接種では3日目から、 10^{1-4} 個接種では6日目より急速に低下した。HIV-1 p24 抗原は 10^3 個接種以下では検出できなかったが、RT-PCRは3日目には全例でHIV-1を検出できた。以上よりこのヒト皮膚モデルはHIV-1 検出に応用できるが、少量の感染細胞汚染時はRT-PCRなど高度のウイルス検出法を採用すべきであろう。

[鈴木寿子、土屋利江（国立医薬品食品衛生研究所）、吉原なみ子]

6. 逆転写酵素活性（RT）高感度測定法を用いた薬剤耐性 HIV-RT 定量法の開発

1) 米国疾病予防制御センター（CDC）の山本・Heneineらが開発した逆転写酵素（RT）活性高感度測定系（Amp-RT）を改良し、より簡便な測定系を完成させる。2) さらに同系にて薬剤耐性 HIV-RT を測定モニター可能なシステムを開発する。3) しかるのちに実際に HIV-1 感染者血漿中の RT あるいは薬剤耐性 RT を測定モニターし、治療効果や病態進行の新たな指標としての意義を明らかにする。4) また、同システムの薬剤感受性テストとしての可能性も明らかにする。以上を目的として昨年度までに、Amp-RT/TaqMan 測定系を確立し、測定限界値は 0.8 copy/□であることを確認した。しかしながら培養上清は正確に測定可能であるにも係わらず、血漿サンプルがうまく測定できない問題が生じていた。本年度はその問題点を解決した。すなわち抗凝固剤としてヘパリンが使用されている場合に測定感度が低下し、ヘパリン以外の抗凝固剤では測定に影響がないことを確認した。HIV/AIDS の動物モデル・SHIV/サル系の系で血漿中 RT 活性を測定したところ、セットポイント期ではウイルス RNA 量と相関するものの、感染初期ではウイルス RNA 量に比し RT 活性が低いことが確認された。さらに同じサルにおいて髄液中のウイルスについて同様の低下が確認された。以上より、RT 活性/ウイルスコピー数はウイルスの defectiveness の指標である可能性が推測されることから、病態進行の新たな指標となることが示唆された。

[仲宗根正、本多三男、Walid Heneine（米国 CDC）]

7. HIV 感染症統合データベースの開発と運用

エイズワクチン開発に重要な情報をデータベース(DB)化して公開（一部制限）し、HIV 関連研究者に活用してもらうことを目的として HIV 感染症統合データベース（略名：HIV-DB、URL：<https://aids.nih.go.jp>）を構築し、運用している。

本 DB では、国立感染症研究所・エイズ研究センターにおいて1989年から解析中の日本およびタイ国 HIV 感染者からのウイルス分離結果、遺伝子配列、蛋白構造情報などのウイルス遺伝子生物学的情報に加えて、臨床デー

タを時系列に管理・検索可能となる統合 DB を構築し WEB 上で提供する。

DB 内容は、平成 16 年 3 月末現在、DDBJ の HIV 遺伝子 DB（100,017 件）に加えて、提供 HIV 感染者 572、ウイルス分離解析数 3217、C2V3 遺伝子解析数 361、V3 部蛋白構造解析数 361(PDB 形式)、対応臨床データ（生年、性別、CD4 細胞数、ウイルス量、薬剤履歴、その他）からなる。主機能は、DDBJ の HIV 遺伝子データに対する遺伝子相同性検索、遺伝子系統樹解析、genosubtyping、独自の division 作成機能、V3 部蛋白 3 次元構造の閲覧機能、臨床データ検索機能である。

本 DB は、研究情報データベース化事業の 1 つとして国立感染症研究所と科学技術振興事業団と共同で開発され、平成 14 年 10 月に WEB 公開された。

[仲宗根正、科学技術振興機構]

V. HIV ライフサイクルと宿主因子の研究

1. ヒト免疫不全ウイルス（HIV-1）トランスメンブレンタンパク質の構造・機能関連

HIV-1 エンベロープタンパク質のサブユニットである gp41 は HIV-1 の感染に際しての膜融合に必須である。膜融合の過程は完全には明らかにされておらず、膜貫通部分の寄与については不明な点が多い。HIV-1gp41 の膜貫通部分には各クレード間でよく保存されたヘリックスヘリックス間相互作用モチーフと推定される GXXXG（G：グリシン）配列が存在するが、グリシンに変異を導入しても膜融合能の低下はみられない。しかし膜貫通部分を GpA などの異種膜貫通部分と置換すると膜融合能の著明な低下がみられ、gp41 膜貫通部分の変異に対する可塑性が無限ではないことがわかった。異種膜貫通部分置換体において解析を進めた結果、タンパク質の発現、輸送、CD4 結合能に著変は認められず CD4 受容体結合後の過程における障害が示唆された。膜融合過程の解析はあらたな HIV-1 複製阻害剤の開発につながる可能性をもっている。

[宮内浩典、駒野淳、松田善衛]

2. プロテオーム解析（プロテオミクス）によるヒト免疫不全ウイルス（HIV-1）感染および AIDS 発症に関与する宿主因子の解析

近年 HIV-1 感染、AIDS 発症への抵抗因子の形で宿主因子の関与が注目されている。われわれは 2 次元電気泳動法と質量分析法を組み合わせたプロテオミクスの手法を用いて HIV-1 複製に影響を与える宿主タンパク質の同定を試みている。いくつかのタグを付加した HIV-1 ウイルスタンパク質を発現する T 細胞株を確立し、それぞれのタンパク質と相互作用をする宿主因子を免疫共沈降後

の質量分析によって同定することを計画している。これらの宿主因子の同定は HIV-1 遺伝子産物の機能解明に寄与するだけでなく、新たなウイルス増殖阻害手段の開発に役立つと考えられる。

[松田善衛、駒野淳、宮内浩典、清水佐紀、山本直樹]

3. 霊長類レンチウイルス複製初期過程の分子機序の解明

細胞内に侵入する病原微生物の一部は、Arp2/3 複合体を活性化することにより、感染を拡大させることが知られている。Arp2/3 複合体は細胞膜直下に存在する密なアクチン網の一部を構成しており、細胞の運動や endocytosis など、形態変化に伴うアクチン細胞骨格の再構成を制御している。我々は、Arp2/3 複合体の活性を阻害することにより、HIV-1 のみならず、SIV 感染の効率が低下することを見出した。さらにワクシニアウイルスも感染に Arp2/3 複合体の機能が重要であることが判明した。一方、HSV-1、MLV、Adenovirus などの感染には Arp2/3 複合体非依存的であることが示唆された。以上より、霊長類レンチウイルスが効率良く細胞に感染を成立させるためには、Arp2/3 複合体の機能依存的なアクチン新生鎖合成を伴う細胞骨格の再構成が重要であることが示唆された。

[駒野淳、宮内浩典、松田善衛]

VI. HIV 感染動物モデルの開発に関する研究

1. サルモデル

(1) Cell-associated virus 経粘膜感染によるサル・エイズモデル開発

HIV 感染症における感染源として Cell-associated virus の重要性はいくつか報告されているにも係らず、既存のサル/エイズモデルを始め、全ての動物モデルは Cell free virus のみを用いている。感染源としての Cell-associated virus の重要性を確認すると共に、Cell-associated virus 経粘膜感染によるサル・エイズモデルを確立し、ワクチン評価や HIV 粘膜感染機序解明に資することを目的として今年度は次の実験を行った。HIV 感染症の動物モデル・SHIV/カニクイサルエイズモデルを用いた。SHIV 感染細胞を培養液中に浮遊させ経直腸的に接種する方法では感染しないことが判明している。そこで、培養液の代わりにサル自己血液を用い、血液そのもの、あるいは血漿に SHIV 感染細胞を浮遊させ、より精液環境に近い感染源を作成し、それを経直腸的にカニクイサルに接種した。接種後、ウイルスの感染を血中ウイルス量でモニターし、病原性について血中 CD4 細胞数の推移で判定した。その結果、2頭のサルとも SHIV 感染細胞の経直腸的接種により感染が成立し、感染後の血中ウイルス動態と CD4 細

胞数動態は、Cell Free SHIV 経直腸感染後の動態と同様であった。すなわち、これまでの報告と異なり、Cell-associated virus 経粘膜感染は成立し得る系である事が判明した。Cell-associated virus 経粘膜感染によるサル/エイズモデルは、既存のモデルに比べてよりヒトに近い動物モデルであると考えられることから、感染機序や病態の解明が進み効果的なワクチン開発に貢献すると考えられる。次年度は、至適投与量を決定し、本モデルを確立する予定である。

[仲宗根正、兼清優、吉野直人、山本直樹、本多三男、網康至（動物管理室）]

(2) マカクザルに異なった病態を惹起する病原性 SHIV の比較解析

SHIV-89.6P clone64 (Clone64) ウイルスは、接種ザルに強度のウイルス血症を起こすにも拘わらず、強毒性 SHIV-C2/1 KS661 (C2/1) とは異なり、感染初期の CD4 陽性細胞の減少は一過性に止まり、3 年以上の経過観察でもエイズ様症状は引き起こさない。本研究では、昨年度に引き続き、Clone64 が惹起する特異的病態の原因となるウイルス側の遺伝的要因を明らかにするために、C2/1 との間で 5'側・3'側の半分ずつを組換えたウイルスを作製してアカゲザルに接種、病態を観察した。その結果、5'半分 Clone64+3'半分 C2/1 型組換ウイルス接種ザルは 4 頭中 3 頭が発症したのに対し、逆の組合せの組換ウイルスの場合 4 頭中 2 頭が発症した。後者発症ザル中のウイルスの部分シーケンスにより、Env gp41 の 2 カ所のアミノ酸が Clone64 型から C2/1 型に変異していることが確認された。サル接種試験の結果を総合すると、Env gp41 内の特定部位が病原性発現に関与している可能性が考えられる。

[阪井弘治、篠原克明（バイオセーフティ管理室）、Iouri L. Kozyrev（京都大学ウイルス研究所）、三浦智行（京都大学ウイルス研究所）]

(3) 糖鎖欠失 SIVmac239 変異株のアカゲザル感染における感染防御免疫の解析

SIVmac239 のエンベロープタンパク gp120 に付加されている 22 個の N-結合型糖鎖のうち 5 個を欠失した Δ5G を作製し、アカゲザルへの感染実験を行い、ウイルス感染の状態と宿主免疫応答の解析を行った。Δ5G は感染初期には SIVmac239 と同等のウイルス増殖をするが、感染後 8 週目までに血中ウイルス量は検出限界以下に速やかに低下し、そのレベルを維持している。このような Δ5G の感染制御の原因を解明するため、Δ5G 感染ザルに誘導された感染防御に関する免疫応答を解析した。中和抗体価を測定した結果、Δ5G に対する中和抗体価は 2 頭のサルで高く、別の 2 頭では中一低、残りの 1 頭では全く検出できなかった。SIVmac239 に対する中和抗体はどのサルでも検出できなかった。さらに細胞性免疫誘導を調べ

るため、IFN- γ ELISPOT assay によりウイルス特異的 CD4+ T 細胞と CD8+ T 細胞を測定した結果、中和抗体が高かった 2 頭は両ウイルス特異的 T 細胞誘導が低く、中和抗体が中〜低のサルではウイルス特異的 T 細胞誘導は中〜高、中和抗体が全く検出されなかったサルは非常に高いウイルス特異的 T 細胞誘導が検出された。これらの結果から 5 頭の $\Delta 5G$ 感染ザルにおける中和抗体とウイルス特異的 T 細胞誘導の強さは有意に逆相関することが示された ($r=0.97$, $p<0.01$)。すなわち $\Delta 5G$ の感染防御において、中和抗体とウイルス特異的 T 細胞どちらの免疫誘導が主体となるかは個体ごとによりことなり、さらに個体の中で両免疫誘導のバランスがとれていることが明らかになった。これらの結果から、Env の糖鎖欠失は免疫原性を上昇させる作用があるというよりはむしろウイルスの感染様式の変化などウイルス学的性質の変化を引き起こし、これが弱毒化に関与すると考えられた。

[杉本智恵、森 一泰]

(4) 糖鎖欠失 Env と中和抗体感受性、細胞指向性および CD4 非依存性との関連

糖鎖欠失 SIVmac239 変異株、 $\Delta 5G$ はアカゲザル感染で弱毒ウイルスの性質を示すことを明らかにした。これまでの研究では Env の糖鎖欠失は中和抗体感受性と関連しており、糖鎖欠失ウイルスの弱毒化は宿主における中和抗体誘導の結果であると考えられている。しかし、 $\Delta 5G$ 感染ザルに誘導された免疫応答の解析では糖鎖欠失に特異的な免疫誘導は検出されなかったことから、 $\Delta 5G$ の感染制御には糖鎖欠失によるウイルス学的性質の変化が関与しているのではないかと考えた。そこで、 $\Delta 5G$ のウイルス学的性質を明らかにするため、細胞指向性、中和抗体感受性、CD4 非依存的細胞融合能を解析した。これまでの研究において、T 細胞指向性である SIVmac239 はほとんど中和されず、マクロファージではほとんど増殖しないことが明らかである。また SIVmac239 Env の細胞融合には CD4 との結合が不可欠である。それに対して、 $\Delta 5G$ は $\Delta 5G$ 感染ザル血漿で中和されたこと、T 細胞では SIVmac239 と同等に増殖し、さらにマクロファージでの増殖性も獲得したこと、部分的ではあるが CD4 が存在しなくても CCR5 のみで細胞融合が起こることが示された (CD4 非依存性)。このような性質の変化は $\Delta 5G$ の 5 つの糖鎖欠失のどれが関与しているのかを調べるため、 $\Delta 5G$ 関連の 1〜4 個の糖鎖欠失を持つ SIV を使い、中和抗体感受性とマクロファージ指向性を調べた。その結果、V1/V2 領域の 1 つの糖鎖欠失が $\Delta 5G$ の性状変化に最も重要であることが示された。これらの結果から、 $\Delta 5G$ は SIVmac239 とは異なる組織または細胞に感染する可能性が示唆された。

[杉本智恵、森 一泰]

(5) 感染後早期治療ザルに誘導された gag 特異的 CD4+T

細胞のエピトープと MHC II allele の決定

同一の MHC haplotype を持つ 2 頭の SIV/SHIV-RT 感染ザルから gag 特異的 CD4+T 細胞を分離した。それぞれの細胞は共通する gag peptide による抗原刺激により分離されたがその epitope は異なっていた。アカゲザル Mm9703 から分離された細胞のエピトープは gag262-271 :YRRWIQLGLQ (10 アミノ酸)で、アカゲザル Mm9429 から分離された細胞のエピトープは gag261-272:YRRWIQLGLQK (12 アミノ酸)であった。同一 MHC haplotype に共通して存在する 2 種の DR alleles (DRB*w2002, DRB*w2501) を 293T 細胞に発現し gag peptide の抗原提示能を上記 CD4+T 細胞の活性化を指標に調べた。DRB*w2501 は Mm9703 から分離された CD4+T 細胞を gag ペプチド特異的に活性化したが、Mm9429 から分離された細胞は活性化されなかった。もう一方の allele DRB*w2002 はいずれの CD4+T 細胞を活性化しなかった。Mm9703 から分離された CD4+T 細胞は DRB*w2501 に提示される gag262-271 により抗原刺激を受けることが明らかとなった。Mm9429 から分離された CD4+T 細胞は R90-120 MHC haplotype B を持つすべての BLCL により gag ペプチド特異的に抗原刺激を受けることから、DRB*w2501 を発現する 293T 細胞が抗原提示できない理由としてふたつの可能性が推測される。R90-120 MHC haplotype B に存在する別の MHC II allele が抗原提示する。DRB*w2501 が抗原提示に働くが BLCL には存在し 293T 細胞には存在しない細胞因子を必要とする。また、この 2 種の CD4+T 細胞は抗原刺激後の安定性が異なることから分化等の違いがあることも推測された。

[杉本智恵、森 一泰]

2. マウス・モルモットモデル

(1) hu-PBL-NOD scid マウスを用いた R5 ウイルス感染モデルの構築と検討

本研究室では NOD scid マウスを用い、腹腔内にヒト PBL を移植する hu-PBL-NOD scid マウスモデルについて HIV-1 感染系の構築を行ってきた。現在に至るまで HIV-1 野生株 MNp を用いた X4-tropic ウイルスの感染系をすでに確立しており、今回は R5 ウイルスである JRCSF を用いた感染系の構築を行った。結果、ヒト細胞を移植後 R5 ウイルスを腹腔内摂取したマウスの組織からウイルスが分離され、ヒト同様に CD4 陽性細胞の減少、さらには血漿中ウイルス RNA 量の増加といった現象が見られた。さらには血漿中ウイルス RNA 量を指標とした HIV に対する中和能の評価が可能となる摂取時の至適ウイルス力価を検討中である。

[堀端重男、網康至 (動物管理室)、本多三男]

(2) HIV ワクチン開発の為のモルモットの解析

モルモットの Kurloff cell を含む細胞集団は NK 活性を

有しさらに BCG 投与群ではその機能が增加した事を昨年報告した。ヒト、マウスのNK細胞は高濃度IL-2でNK活性が増加する。しかしモルモットにおいてその報告はない。そこで我々は、モルモット脾臓細胞に human-r-IL2 1000U を添加しNK活性を測定した。その結果、コントロール群と比較し r-IL2 添加群では有意に増加した。またこのアジアロ GM1 も陽性の事からモルモットNK細胞と考えられる。

[滝澤万里、千葉丈(東京理科大)、芳賀伸治(細菌部)、本多三男]

(3) マウス HIV 感染モデルを用いた HIV 感染症治療法の開発

1996年の多剤併用療法の導入は HIV-1 感染者の QOL の改善を達成したが、薬剤の副作用、薬剤耐性ウイルスの出現等のために薬剤治療から脱落する症例も多く報告され問題となっている。このような症例を救済するために宿主の免疫機能を賦活化する免疫療法の開発が期待されている。本研究は NOD-SCID common γ 鎖ノックアウト SCID マウスの脾臓にヒト末梢血リンパ球 (PBL) を移植した hu-PBL-SCID マウス/HIV 感染モデルを構築し、抗原曝露樹状細胞による抗原特異的免疫誘導方法の探索と、その抗 HIV-1 感染症免疫療法としての応用を目的とした。樹状細胞(DC)を効率よく得るためにヒト PBMC からの CD14 陽性細胞の精製や培養方法の検討を行い、最終的に純度の高い DC を得ることに成功した。現在 DC の抗原提示能について解析を行っており、今後予め抗原に曝露させた DC を hu-PBL SCID マウスに接種し標的ウイルスに対する強い特異的免疫応答の誘導を試みる。

[濱武牧子、西澤雅子、本多三男、松田昌和、巖馬華、杉浦 互、木村廣光(成育医療センター)]

(4) マウス HIV 感染モデルを用いた HIV-1 遺伝子発現とウイルス増殖を制御する新たな治療薬開発研究

多剤併用療法(HAART)導入により、HIV-1 感染患者の予後は大幅に改善され大きな成果を上げてきたが、その一方で既存の薬剤に対する薬剤耐性ウイルスの出現が新たな問題となっている。このため、既存の薬剤とは作用機所の異なる抗 HIV-1 薬剤の開発は HIV-1 感染症治療の幅を広げ、既存の薬物でコントロールができなかった難治症例に福音となるだけでなく、新薬の作用機序を解明することにより今まで知られていなかった HIV-1 病態の新たな側面が明らかにされる可能性が期待される。また創薬研究に刺激を与えて更なる新薬の開発に結びついていくことも期待される。本研究では新規 HIV-1 治療薬の候補化合物についてマウス HIV-1 感染モデルを用いて in vitro での HIV-1 増殖抑制効果を評価しヒトへの応用の可能性を探る。マウス HIV-1 感染モデルの構築を目的として HIV-1 JR-CSF 株を hu-PBL SCID マウス腹腔内にチャレンジし、感染をマウス血中 HIV-1RNA コピー数測定

とマウス脾臓から採取した PBMC の共培養により確認した。さらにこのマウス HIV-1 感染実験モデルに既存の抗 HIV-1 薬を経口投与しマウス血中 HIV-1RNA コピー数測定を行いコピー数低下を確認した。今後この系を用いて新規抗 HIV-1 薬剤の評価を行っていく予定である。

[西澤雅子、濱武牧子、巖馬華、三浦秀佳、千葉智子、杉浦 互、野村伸彦(富山化学工業株式会社総合研究所)]

VII. 日本および他の諸国における臨床ウイルス株の分離とその病態解析

1. わが国における HIV 抗体陽性者からのウイルス分離とその特性解析

1988年より HIV 抗体陽性者からのウイルス分離を行っており、平成 15 年度の検体数は 155 検体 (hemophilia : 125 検体・その他の感染 : 30 検体、陽性検体 : 21) あった。2004年6月時点で 4049 検体 (hemophilia : 2875 検体・その他の感染 : 1174 検体、陽性検体 : 852) に達した。これらのサンプルは血漿成分、細胞成分、それら DNA/RNA および分離臨床株として、レトロスペクティブな解析のためにセットで保管されており、国内の研究者の要望に応じて分与されている。その結果は抗エイズワクチンの開発および感染者の治療指針の確立のための資料として役立てられている。

[仲宗根正、滝澤万里、染谷健二、川原守、原敬志、吉野直人、浜野隆一、本多三男]

2. タイ北部およびバンコクにおける HIV 陽性検体の gag p17 sequence 解析

CTL 活性を持つ HIV 陰性麻薬常習者から発見した特異的な Gag p17 配列を持つ遺伝子がタイで実際に circulating しているかを検討する為にタイ北部における HIV 陽性麻薬常習者および性感染患者、バンコクにおける母子感染検体、74名を用いて sequence 解析を行った。タイ北部で 1名、バンコクで 2名の合計 3名 (4.05%) を発見し、この type の virus が実際に circulating している事が証明された。これらの遺伝子を持ちながらも seroconvert しない患者は、この type に感染し何らかの機構により seroconversion を免れ、CTL 活性を獲得したと考えられる。

[浜野隆一、野内英樹(結核研究所)、Pathom Sawanpanyalert (NIH・Thai)、Paijit Warachit (NIH・Thai)、Tawee Chotpitayasunondh (Queen Sirikit National Institute of Child Health)、Warunee Punpanich (Rajavithi Hospital)、松尾和浩、原敬志、本多三男]

3. 垂直感染 HIV における防御因子としての IL-16

タイ国北部地域の HIV 陽性患者コホートにおいて、58 組の母子感染検体を検索し、母親・臍帯血の IL-16 level は垂直感染成立グループよりも非成立グループの方が有意に低い結果となった。このことから、IL-16 が HIV の垂直感染の防御因子と成りうる可能性が示唆された。更に *in vitro* で IL-16 がウイルス増殖にどのように関与しているのかを検討した。IL-16 を前処理した PHS-blast に CBMC より分離した母親由来の HIV を感作し、37°C で 2 週間培養し、培養上清中の p24 抗原量を測定したところ IL-16 は濃度依存的に HIV の増殖を抑制する結果となった。このことから、IL-16 は垂直感染 HIV 防御の因子の 1 つである可能性が示唆された。今後、児由来の HIV においても、同様の assay にて、IL-16 のウイルス増殖への関与を検討し、母子感染機構を明らかにしたいと考えている。

[原敬志、仲宗根正、浜野隆一、早川 智 (日大・医学部)、Tawee Chotpitayasunondh (Queen Sirikit National Institute of Child Health)、Paijit Warachit (Ministry of Public Health)、本多三男]

4. 母子感染 HIV の分子生物学的表現型の解析

タイ国北部地域の HIV 陽性患者コホートにおいて、母子感染検体を検索し、60 ペアの感染妊婦/胎児・臍帯血の解析を行った結果、臍帯静脈血中のウイルス検出率は垂直感染率より有意に高く、またいずれのペアにおいても、母親個体内 HIV は polyclonal な傾向であるのに対し、臍帯血内 HIV はほぼ monoclonal か oligoclonal であった。このことから母親体内の polyclonal HIV から選択的に monoclonal HIV が児体内へ移行したか、もしくは母親個体内の virus が polyclonal に感染した後、児体内で M-tropic virus のみ選択的に polyclonal に増殖していることが示唆された。

[服部真一郎、原敬志、浜野隆一、松尾和浩、本多三男]

5. 北タイにおける HIV コホート研究

国際協力事業団の協力、タイ国立衛生研究所・ランパン病院との共同で、平成 12 年 7 月よりタイ北部に位置するランパン病院にて HIV 感染者および配偶者を対象にしたコホート研究を運営している。コホートに参加した感染者 765 名の平成 15 年 10 月 1 日時点の生存調査を行ったところ、728 名 (96.3%) について追跡データが得られ、252 名が死亡し死亡率は 20.2/person-year-observation であった。死亡リスク因子解析によるとコホート参加時の臨床症状・CD4 値・ウイルス量との間に独立した関連が見られた。同コホートは、宿主遺伝子・宿主免疫・ウイルス学等の基礎研究や日和見感染などの臨床研究の基盤として役立っている。また、日・タイ共同研究を促進し、数多くのタイ人研究者育成に貢献している。

[パニータ・パチパニッチ (ランパン県病院)、有吉紅也、アーチャウィン・ロジャナビバット (タイ国立衛生研究所)、パトム・サワンパンヤラート (タイ国立衛生研究所)]

6. 北タイにおける宿主遺伝子多型とエイズ進行に関する研究

欧米より宿主遺伝子多型とエイズ進行に関連した数多くの研究が報告されているが、アジア人を対象にした研究は数少ない。我々は、北タイランパン県病院 HIV 外来を受診した女性未治療感染者 222 名を対象に、宿主遺伝子多型 { IL4 - C589T, CCR2 64I, CCR5-P1, RANTES-G403A, RANTES-C28G, RANTES - Int1.1, RANTES-3'UTR } を PCR-RFLP 法にて調べ、コホート参加時のウイルス量・CD4+細胞値および生存率と比較検討した。その結果、IL-4-589T を有する患者群が有意に低いウイルス量と高い CD4+細胞値を持つこと、また、RANTES-28G を有する患者群が有意により長く生存していることが判明した。異なる遺伝子背景を有する宿主集団で過去の報告と同様の結果が確認されたことは意義深い。

[ヌアンジャン・ウイチュクチンダ (タイ国立衛生研究所)、有吉紅也、中山恵美 (大阪大学微生物学研究所)、塩田達雄 (大阪大学微生物学研究所)]

7. 北タイに流行する HIV-1 株の分子疫学的研究

タイにおける HIV 流行は CRF01_AE (サブタイプ E) が主で流行初期に存在したサブタイプ B の頻度は減少したと考えられている。本研究では北タイランパン病院を受診する感染者の gag/pol 領域クローニング・シーケンス解析を進める中で、CRF01_AE Gag の中に 100 から 550bp のサブタイプ B フラグメントが組み込まれた 2 種類の新型組み換えウイルスが見つかった。さらに 1 症例については、その配偶者にも同一の組み換えパターンが認められ、このウイルスが性的接触により伝播したことが示唆された。この研究結果は、サブタイプ B が短いフラグメントとしてタイに存続していることを示し、今後のワクチン開発を進めてゆくにあたって重要な意義を持つ。

[ヌアンジャン・ウイチュクチンダ (タイ国立衛生研究所)、ワタナ・アウワニット (タイ国立衛生研究所)、有吉紅也、椎野禎一郎]

8. 北タイにおける HLA と HIV 感染との研究

細胞障害性 T 細胞 (CTL) によるウイルス認識を拘束する HLA (クラス I) は、感染した宿主個人・集団に増殖・拡大する HIV の進化の方向を決定するのに非常に大

きな影響を与えている。我々は、北タイランパン病院コホートに参加した 451 名の感染者、103 名の暴露されたが抗 HIV 抗体陰性の配偶者 (ESN) および 100 名の輸血ドナーの HLA アリールを決定し、HIV 伝播・エイズ進行との関連を検討した。その結果、ESN に特有な HLA アリールは認められなかったが、HLA クラス IA と B 双方の遺伝子座がホモ接合体の感染者は、それ以外の感染者に比べ有意に高いウイルス量であること、欧米の研究結果同様に B*57 を有する感染者は有意に低いウイルス量であること、さらに夫と HLA B 遺伝子座が同一である妻においてウイルス量が非常に高いことが判明した。以上の結果は、北タイにおいても HLA が HIV の進化に重要な影響を与えていることを示す。

[ヌアンジャン・ウィチュクチンダ (タイ国立衛生研究所)、松見達也 (湧永製薬)、有吉紅也]

9. 北タイ HIV 感染者および HIV 抗体陰性配偶者における HIV 特異的細胞性免疫の研究

HIV-1 特異的細胞障害性 T 細胞 (CTL) は、感染者のウイルス体内増殖を抑制する主要な宿主免疫のひとつと考えられている。HIV 感染およびエイズ進行抑制に有効に作用する CTL 活性を分子レベルで解明するためには、それぞれの宿主が有する CTL が認識するウイルス部位 (エピトープ) を分子レベルで同定することが必須である。そこで、我々はランパン病院コホートに参加する長期生存者と暴露されたが抗 HIV 抗体陰性配偶者を対象に、ペプチドを用いて CTL エピトープマッピングを行っている。その結果、これまでに報告されていない新たな CTL エピトープが複数見つかると共に、感染者が認識する CTL エピトープと抗体陰性者が認識する CTL エピトープとの間に差があることが判明してきた。

[ブサラワン・シーワンタナ (タイ国立衛生研究所)、田中真理、有吉紅也]

10. 北タイエイズ患者における中枢神経系ウイルス感染症に関する研究

先進国におけるエイズ患者の間で中枢神経系のウイルス感染症は脳内の悪性リンパ腫・進行性多巣性白質脳症・CMV 脳炎を起し問題となっているが、発展途上国におけるそれらの現状はよくわかっていない。我々は北タイランパン病院でクリプトコッカス髄膜炎疑いにより髄液検査を行った患者 140 名の髄液を調べ、EBV, CMV, JCV ウイルスを PCR 法によって検出した。その結果 EBV, CMV, JCV ウイルス DNA がそれぞれ 22.1%, 11.4%, 0.1% の頻度で見つかった。タイ国内に CT スキャンが普及しているにもかかわらず中枢神経悪性リンパ腫の患者の頻度は稀である。我々の研究結果は、抗エイズ薬が普及し患者の生存率が改善されると悪性リンパ腫の症例が

増える可能性があることを示唆しており、今後も続けて調査を行う必要がある。

[アーチャウィン・ロジヤナビバット (タイ国立衛生研究所)、パニータ・パチツパニッチ (ランパン病院)、有吉紅也、三浦聡之 (東大医科学研究所)、岩本愛吉 (東大医科学研究所)]

11. タイ流行株 HIV-1 (CRF01_AE) の抗エイズ薬耐性変異に関する研究

タイ政府が生産開始したジェネリック薬 GPOvir (d4T/3TC/nevirapine 合剤) の普及に伴い、耐性 HIV-1 株の流行が憂慮されるが、タイ流行株 CRF01_AE における薬剤耐性変異はまだよくわかっていない。我々は、北タイランパン病院にてウイルス量から判断して GPOvir 耐性を獲得したと思われる症例の血漿中 RNA の pol 遺伝子シーケンス解析を行い耐性変異の頻度を調べた。これまで 44 症例について調べた結果、最も頻度の高い耐性変異は M184I/V、続いて Y181C であった。サブタイプ B に多い K103N 変異の頻度は少なかった。これらの結果をもとに、変異分離型 PCR (MS-PCR) の原理を応用した GPOvir 耐性ウイルス簡便・迅速検出法の開発を試みている。この方法は、従来のシーケンス法と比べ安価で、高度な機材を要しないことから、今後発展途上国における耐性株の流行モニタリングに寄与することが期待される。

[シリパン・センアローン (タイ国立衛生研究所)、ワタナ・オウワニット (タイ国立衛生研究所)、パニータ・パチツパニッチ (ランパン病院)、レイ・ミント、有吉紅也、松田昌和、杉浦互]

12. カンボジアの新規結核患者における輸血関連ウイルスの陽性率

2003 年 1 月中にカンボジア全 24 州で発生したすべての新規結核患者 (2244 例) について、輸血関連ウイルス 5 項目 (HIV-1/2 抗体、HBs 抗原、TP 抗体、HCV 抗体、HTLV-1 抗体) の感染状況を調査、また HIV-1 に関して分子系統樹解析を行いその感染ルートを検討した。各項目の陽性率の全国平均は HBsAg : 10.2%、TP : 20.4%、HCV : 9.8%、HIV : 11.8%、HTLV-1 : 0.0%、全ての項目が陰性だったものは 56.6% となった。州別ではタイとの国境ゲートがある Pailin が 33.3% と最も高く、他に 20% 以上の高値を示した地域は首都 Phnom Penh が 33.4%、タイ側の国際港・Sihanoukville Port 周辺地域の Kompong Som で 32.4%、Krong Kep で 25.0%、またタイ国境ゲートの港がある Koh Kong の 22.7% が順にあげられ、カンボジアにおける HIV-1 の感染ルートはタイからの影響が強いことが示唆された。また HIV 陽性検体 239 例の gag および env 領域のシーケンスの結果より、CRF01_AE が 228

例、サブタイプ B が 9 例、CRF02_AG が 1 例、gag 領域でサブタイプ B、env 領域で CRF01AE とサブタイプが一致せず重感染等が疑われる例が 1 例あった。今回サブタイプ B に分類されたグループは、env 領域で全例ベトナムの B のグループとクレイドを形成しており、タイ B のクレイドとは離れて分類された。

[坂本優子、吉原なみ子]

13. カンボジアのプノンペンにおける結核患者における輸血関連ウイルスに関する疫学的調査

2003 年 12 月にカンボジアの首都プノンペンの結核患者 500 例において輸血関連ウイルス 5 項目 (HIV-1/2 抗体、HBs 抗原、TP 抗体、HCV 抗体、HTLV-1 抗体) の感染状況を調査した。各項目の陽性率は HBsAg : 12.6%、TP : 12.0%、HCV : 10.2%、HIV : 33.6%、HTLV-1 : 0.0%、全ての項目が陰性だったものは 46.4% となり、同年 1 月に実施した全国調査におけるプノンペンの結果と同様の傾向を示す結果となった。首都プノンペンはタイ国境付近と並び HIV が全国的に最も高い地域であるため、カンボジアの HIV の流行の鍵を握る地域として今後も継続的な調査観察が必要である。

[坂本優子、吉原なみ子]

14. ベニンにおける輸血関連ウイルスに関する疫学的調査

2003 年にベニンの血液センターに集められた初回献血者 500 人の血漿において、輸血関連ウイルス 5 項目 (HIV-1/2 抗体、HBs 抗原、TP 抗体、HCV 抗体、HTLV-1 抗体) の感染状況を調査した。それぞれの陽性率は HIV-1/2 : 1.2%、HBsAg : 4.8%、HTLV-1 : 0.0%、HCV : 6.6%、TP : 1.0% であった。同検体は事前に現地でも検査が行われていたが、現地での検査においては偽陰性や偽陽性が非常に多く、安全な血液の供給のためには感度・精度の高い検査法の導入、技術指導、精度管理の必要性が強く示唆された。また HIV-1 陽性検体 4 例中、RT-PCR によりバンドが検出された 1 例について gag 及び env 領域の塩基配列を決定、分子系統樹解析を行った結果、CRF02_AG に分類された。

[坂本優子、吉原なみ子]

15. マダガスカルにおける輸血関連ウイルスに関する疫学的調査

2003 年にマダガスカルの血液センターに集められた初回献血者 500 人の血漿において、輸血関連ウイルス 5 項目 (HIV-1/2 抗体、HBs 抗原、TP 抗体、HCV 抗体、HTLV-1 抗体) の感染状況を調査した。それぞれの陽性率は HIV-1/2 : 0.2%、HBsAg : 3.8%、HTLV-1 : 0.0%、

HCV : 6.0%、TP : 12.6% であった。マダガスカルについては 1999 年にも同調査を行っているが、HIV の陽性率は前回同様に他のアフリカ諸国と比べて低く保たれており、海に囲まれた島国という環境が HIV の侵入を抑えている事がうかがえた。同検体は事前に現地でも検査が行われていたが、現地での検査においては偽陰性や偽陽性が多く、安全な血液の供給のためには感度・精度の高い検査法の導入、技術指導、精度管理の必要性が強く示唆された。

[坂本優子、吉原なみ子]

16. ガーナにおける B 型肝炎に関する研究

ガーナとの HIV 研究の過程で、アフリカにおける肝炎ウイルスの存在も明らかになり、G 型肝炎および TTV の遺伝子解析を行い報告するとともに健常者での高 C 型肝炎罹患率も判明してきた。そこで本年度は B 型肝炎に注目して、そのサブタイプ解析を進行中である。現在ゲノタイプ E が多数検出され、少数であるがゲノタイプ A も検出されている。1 部に関しては全遺伝子配列を決定した。

[石川晃一、ガーナ野口研究所、阿部賢治 (感染病理部)]

VIII. 検査業務

1. 依頼検査

(1)診断薬 (キット) 実施状況	2 キット
(2)HIV 感染確認	2 検体

2. WHO Reference Panel による精度管理

WHO の collaborating center である National Reference Laboratory (NRL) の Anti-HIV Quality Assessment Program による精度管理が実施された。

NRL から 2 回、各 10 検体のパネル血清が配布され、Genedia HIV-1/2 MIXT PA (PA)、Genscreen HIV1/2 (ELISA)、DAINASCREEN HIV-1/2 (ICA)、LAV BLOT 1(WesternBlot) kit を用いて検討した結果、1 回目は HIV-1 陽性 8 検体、陰性 2 検体、2 回目は HIV-1 陽性 5 検体、陰性 5 検体であった。

これらの結果は全て NRL の結果と一致した。

[鈴木寿子、福嶋浩一、吉原なみ子]

発表業績一覧

I. 誌上発表

1. 欧文発表

- 1) Kaizu M, Ami Y, Nakasone T, Sasaki Y, Izumi Y, Sato H, Takahashi E, Sakai K, Shinohara K, Nakanishi K, Honda M: Higher levels of IL-18 circulate during primary infection of monkeys with a pathogenic SHIV than with a nonpathogenic SHIV. *Virology* 313: 8-12, 2003.
- 2) Takizawa M, Chiba J, Haga S, Asano T, Yamamoto N, Honda M: Fractionation of guinea pig leukocyte by flow cytometry using a novel MIL4/SSC parameter. *Cytometry Research* 13: 25-32, 2003.
- 3) Izumi Y, Ami Y, Matsuo K, Someya K, Sata T, Yamamoto N, Honda M: Intravenous inoculation of replication-deficient recombinant vaccinia virus DIs expressing Simian Immunodeficiency virus gag controls highly pathogenic Simian-human immunodeficiency virus in monkeys. *J Virol* 77: 13248-13256, 2003.
- 4) Assawawitoontip S, Puthavathana P, Pattanapanyasat K, Sukpanichnant S, Thammataksin S, Honda M, Warachit P: Lymphocyte and NK cell subpopulations in HIV seronegative Thais. *Asian Pac J Allergy Immunol* 21: 95-103, 2003.
- 5) Snoeck J, Kantor R, Shafer RW, Derdelinckx I, Carvalho AP, Wynhoven B, Soares MA, Cane P, Clarke J, Pillay C, Sirvichayakul S, Ariyoshi K, Holguin A, Grossman Z, Rodrigues R, Bouzas MB, Cahn P, Brigido LF, Soriano V, Sugiura W, Phanuphak P, Morris L, Weber J, Pillay D, Tanuri A, Harrigan PR, Camacho R, Schapiro JM, Katzenstein D, Vandamme AM: Evaluation of five interpretation algorithms for the prediction of drug susceptibility in non-B subtype. *Antiviral Ther* 8: S111, 2003.
- 6) Sugiura W, Shimada K, Matsuda M, Chiba T, Myint L, Okano A, Yamada K: Novel genotyping assay for human immunodeficiency virus type-1 drug resistance using enzyme linked mini- sequence assay. *J Clin Microbiol* 41: 4971-4979, 2003.
- 7) Ariyoshi K, Berry N, Cham F, Jaffar S, Schim van der Loeff M, Jobe O, N'Gom PT, Larsen O, Andersson S, Aaby P, Whittle H: Quantification of Human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) provirus load in a rural West African population: no enhancement of human immunodeficiency virus type 2 pathogenesis, but HTLV-I provirus load relates to mortality. *J Infect Dis* 188: 1648-1651, 2003.
- 8) Schim van der Loeff MF, Hansmann A, Awasana AA, Ota MO, O'Donovan D, Sarge-Njie R, Ariyoshi K, Milligan P, Whittle H: Survival of HIV-1 and HIV-2 perinatally infected children in The Gambia. *AIDS* 17: 2389-2394, 2003.
- 9) Ariyoshi K, Matsuda M, Miura H, Tateishi S, Yamada K, Sugiura W: Patterns of point mutations associated with antiretroviral drug treatment failure in CRF01_AE (subtype E) infection differ from subtype B infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 33: 336-342, 2003.
- 10) Alabi AS, Jaffar S, Ariyoshi K, Blanchard T, Schim van der Loeff M, Awasana AA, Corrah T, Sabally S, Sarge-Njie R, Cham-Jallow F, Jaye A, Berry N, Whittle H: Plasma viral load, CD4 cell percentage, HLA and survival of HIV-1, HIV-2, and dually infected Gambian patients. *AIDS* 17: 1513-1520, 2003.
- 11) Takeda A, Igarashi H, Nakamura H, Kano M, Iida A, Hirata T, Hasegawa M, Nagai Y, Matano T. Protective efficacy of an AIDS vaccine, a single DNA-prime followed by a single booster with a recombinant replication-defective Sendai virus vector in a macaque AIDS model. *J Virology* 77: 9710-9715, 2003.
- 12) Matsuoka-Aizawa S, Sato H, Hachiya A, Tsuchiya K, Takebe Y, Gatanaga H, Kimura S, Oka S: Isolation and molecular characterization of a Nelfinavir (NFV)-resistant human immunodeficiency virus type 1 that exhibits NFV-dependent enhancement of replication. *J Virol* 77 (1): 318-327, 2003.
- 13) Yang R, Kusagawa S, Zhang C, Xia X, Ben K, Takebe Y: Identification and characterization of new class of HIV-1 recombinants comprised of two circulating recombinant forms, CRF07_BC and CRF08_BC, in China. *J Virol* 77 (1): 685-695, 2003.
- 14) Motomura K, Kusagawa S, Lwin HH, Thwe M, Kato K, Ohishi K, Yamamoto N, Zaw M, Nagatake T, Takebe Y: Different subtype distribution in the two cities in Myanmar: evidence for independent clusters of HIV-1 transmission. *AIDS* 17 (4): 14-17, 2003.
- 15) Kaizu M, Sato H, Ami Y, Isumi Y, Nakasone T, Tomita Y, Someya K, Takebe Y, Kitamura K, Tochikubo O, Honda M: Infection of macaques with an R5-tropic SHIV bearing a chimeric envelope carrying subtype E V3 loop among subtype B framework. *Arch Virol* 148 (5): 973-988, 2003.
- 16) Takebe Y, Motomura K, Tatsumi M, Lwin HH, Zaw M, Kusagawa K: High prevalence of diverse forms of intersubtype recombinants in Central Myanmar: geographical hot spot of extensive recombination. *AIDS* 17: 2077-2087, 2003.
- 17) Kusagawa S, Imamura Y, Yasuoka A, Hoshino H, Oka S, Takebe Y: Identification of HIV-2 subtype B transmission in East Asia. *AIDS Res Hum Retroviruses* 19 (11): 1045-1049, 2003.

- 18) Suzuki S, Sugauchi F, Orito E, Kato H, Usuda S, Siransy L, Arita I, Sakamoto Y, Yoshihara N, El-Gohary A, Ueda R, Mizokami M: Distribution of hepatitis B virus (HBV) genotypes among HBV carriers in the Cote d'Ivoire: complete genome sequence and phylogenetic relatedness of HBV genotype E. *J Med Virol* 69: 459-465, 2003.
- 19) Sugauchi F, Orito E, Kato H, Suzuki S, Kawakita S, Sakamoto Y, Fukushima K, Akiba T, Yoshihara N, Ueda R, Mizokami M: Genotype, serotype, and phylogenetic characterization of the complete genome sequence of hepatitis B virus isolates from Malawian chronic carriers of the virus. *J Med Virol* 69: 33-40, 2003.
- 20) Sakamoto T, Ushijima H, Okitsu S, Suzuki E, Sakai K, Morikawa S, Müller WEG: Establishment of an HIV cell-cell fusion assay by using two genetically modified HeLa cell lines and reporter gene. *J Virol Methods* 114: 159-166, 2003.
- 21) Hachiya A, Matsuoka-Aizawa S, Tsuchiya K, Gatanaga H, Kimura S, Tatsumi M Oka S: "All-in-One Assay", a direct phenotypic anti-human immunodeficiency virus type 1 drug resistance assay for three-drug combination therapies that takes into consideration in vivo drug concentrations. *J Virol Methods* 111:43-53, 2003,
- 22) Sugimoto C, Tadakuma K, Otani I, Moritoyo T, Akari H, Ono F, Yoshikawa Y, Sata T, Izumo S, Mori K: *Nef* gene is required for robust productive infection of simian immunodeficiency virus in T-cell-rich paracortex in lymph nodes. *J Virol* 77: 4169-4180, 2003.
- 23) Xing HQ, Moritoyo T, Mori K, Tadakuma K, Sugimoto C, Ono F, Hayakawa H, Izumo S: Simian immunodeficiency virus encephalitis in the white matter and degeneration of the cerebral cortex occur independently in simian immunodeficiency virus-infected monkey. *J Neurovirol* 9:508-518, 2003.
- 24) Villinger F, Mayne AF, Bostik P, Mori K, Jensen PE, Ahmed R, Ansari A: Evidence for antibody mediated enhancement of SIVgag antigen processing and cross presentation in SIV infected rhesus macaques. *J Virol* 77: 10-24, 2003.
- 25) Kennedy G, Komano J, Sugden B: Epstein-Barr virus provides a survival factor to Burkitt's lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(24): 14269-14274, 2003.
- 26) Fukushi M, Higuchi M, Oie M, Tetsuka T, Kasolo F, Ichiyama K, Yamamoto N, Katano H, Sata T, Fujii M: Latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus interacts with human myeloid cell nuclear differentiation antigen induced by interferon alpha. *Virus Genes* 27: 237-247, 2003.
- 27) Dewan MZ, Terashima K, Taruishi M, Hasegawa H, Ito M, Tanaka Y, Mori N, Sata T, Koyanagi Y, Maeda M, Kubuki Y, Okayama A, Fujii M, Yamamoto N: Rapid tumor formation of human T-cell leukemia virus type 1-infected cell lines in novel NOD-SCID/gammac(null) mice: suppression by an inhibitor against NF-kappaB. *J Virol* 77:5286-5294, 2003.
- 28) Mori N, Sato H, Hayashibara T, Senba M, Geleziunas R, Wada A, Hirayama T, Yamamoto N: Helicobacter pylori induces matrix metalloproteinase-9 through activation of nuclear factor kappaB. *Gastroenterology* 124: 983-992, 2003.
- 29) Handema R, Terunuma H, Kasolo F, Kasai H, Sichone M, Yamashita A, Deng X, Mulundu G, Ichiyama K, Munkanta M, Yokota T, Wakasugi N, Tezuka F, Yamamoto N, Ito M: Prevalence of drug-resistance-associated mutations in antiretroviral drug-naive Zambians infected with subtype C HIV-1. *AIDS Res Hum Retroviruses* 19:151-160, 2003.
- 30) Ichiyama K, Yokoyama-Kumakura S, Tanaka Y, Tanaka R, Hirose K, Bannai K, Edamatsu T, Yanaka M, Niitani Y, Miyano-Kurosaki N, Takaku H, Koyanagi Y, Yamamoto N: A duodenally absorbable CXC chemokine receptor 4 antagonist, KRH-1636, exhibits a potent and selective anti-HIV-1 activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 4185-4190, 2003.
- 31) Miura Y, Misawa N, Kawano Y, Okada H, Inagaki Y, Yamamoto N, Ito M, Yagita H, Okumura K, Mizusawa H, Koyanagi Y: Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand induces neuronal death in a murine model of HIV central nervous system infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 2777-2782, 2003.
- 32) Yoshida A, Tanaka R, Murakami T, Takahashi Y, Koyanagi Y, Nakamura M, Ito M, Yamamoto N, Tanaka Y: Induction of protective immune responses against R5 human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection in hu-PBL-SCID mice by intrasplenic immunization with HIV-1-pulsed dendritic cells: possible involvement of a novel factor of human CD4(+) T-cell origin. *J Virol* 77: 8719-8728, 2003.
- 33) Mori N, Krensky AM, Geleziunas R, Wada A, Hirayama T, Sasakawa C, Yamamoto N: Helicobacter pylori induces RANTES through activation of NF-kappa B. *Infect Immun* 71: 3748-3756, 2003.
- 34) Mori N, Morishita M, Tsukazaki T, Yamamoto N: Repression of Smad-dependent transforming growth factor-beta signaling by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 through nuclear factor-kappaB. *Int J Cancer* 105: 661-668, 2003.
- 35) Shuda M, Kondoh N, Imazeki N, Tanaka K, Okada T,

- Mori K, Hada A, Arai M, Wakatsuki T, Matsubara O, Yamamoto N, Yamamoto M: Activation of the ATF6, XBP1 and grp78 genes in human hepatocellular carcinoma: a possible involvement of the ER stress pathway in hepatocarcinogenesis. *J Hepatol* 38: 605-614, 2003.
- 36) Nitta T, Chiba A, Yamashita A, Rowe M, Israel A, Reth M, Yamamoto N, Yamaoka S: NF- κ B is required for cell death induction by latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus. *Cell Signal* 15: 423-433, 2003.
- 37) Suzuki Y, Misawa N, Sato C, Ebina H, Masuda T, Yamamoto N, Koyanagi Y: Quantitative analysis of human immunodeficiency virus type 1 DNA dynamics by real-time PCR: integration efficiency in stimulated and unstimulated peripheral blood mononuclear cells. *Virus Genes* 27: 177-188, 2003.
- 38) Saito N, Courtois G, Chiba A, Yamamoto N, Nitta T, Hironaka N, Rowe M, Yamaoka S: Two C-terminus activation regions of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 activate NF- κ B through distinct signaling pathways in fibroblast cell lines. *J Biol Chem* 278: 46565-46575, 2003.
- 39) Nowell MA, Richards PJ, Horiuchi S, Yamamoto N, Rose-John S, Topley N, Williams AS, Jones SA: Soluble IL-6 receptor governs IL-6 activity in experimental arthritis: blockade of arthritis severity by soluble glycoprotein 130. *J Immunol* 171: 3202-3209, 2003.
- 40) Tamamura H, Hori A, Kanzaki N, Hiramatsu K, Mizumoto M, Nakashima H, Yamamoto N, Otaka A, Fujii N: T140 analogs as CXCR4 antagonists identified as anti-metastatic agents in the treatment of breast cancer. *FEBS Lett*, 550: 79-83, 2003.
- 41) Saitoh T, Nakayama M, Nakano H, Yagita H, Yamamoto N, Yamaoka S: TWEAK induces NF- κ B p100 processing and long lasting NF- κ B activation. *J Biol Chem* 278:36005-36012, 2003.
- 42) Baba S, Takahashi K, Koyanagi Y, Yamamoto N, Takaku H, Gorelick RJ, Kawai G: Role of the zinc fingers of HIV-1 nucleocapsid protein in maturation of genomic RNA. *J Biochem (Tokyo)* 134: 637-639, 2003.
- 43) Gzyl J, Bolesta E, Wierzbicki A, Kmiecik D, Naito T, Kaneko Y, Honda M, Komuro K, Kozbor D: Effect of partial and complete variable loop deletions of the Human Immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein and the breadth of gp160-specific immune responses. *Virology* 318: 493-506, 2004.
- 44) Nakasone T, Hara T, Yoshino N, Honda M: Update on HIV/AIDS in Japan, 2003, (Lu Y, Essex M eds), *AIDS in ASIA*, Kluwer, p73-p81, 2004.
- 45) Matsuo K, Puthavathana P, Promkhatkaew D, Balachandra K, Ruxrungtham K, Hamano T, Sutthent R, Sittisombut N, Butraporn R, Sriwanthana B, Boonlong J, Izumi Y, Yamazaki S, Yamamoto N, Warachit P, Honda M: Japan's Collaboration with Thailand in the Development of HIV/AIDS Vaccine, (Lu Y, Essex M eds), *AIDS in ASIA*, Kluwer, p561-p569, 2004.
- 46) Hamano T, Sawanpanyalert P, Yanai H, Piyaworawong S, Hara T, Sapsutthipas S, Phromjai J, Yamazaki S, Yamamoto N, Warachit P, Honda M, Matsuo K: Determination of HIV-1 CRF01_AE gag p17 and env-V3 consensus sequences for HIV/AIDS vaccine design. *AIDS Res Hum Retroviruses* 20: 337-340, 2004.
- 47) Takizawa M, Chiba J, Haga S, Asano T, Yamamoto N, Honda M: The normalization of guinea pig leukocyte fractions and lymphocyte subsets in blood and lymphoid tissues using a flow cytometric procedure. *Experimental Animals* 53: 321-329, 2004.
- 48) Someya K, Xin K Q, Matsuo K, Okuda K, Yamamoto N, Honda M: A consecutive prime-boost vaccination of mice with simian immunodeficiency virus (SIV) gag/pol DNA and recombinant vaccinia virus strain DIs elicits effective anti-SIV immunity. *J Virol* 78: 9842-9853, 2004.
- 49) Takeda S, Shiosaki K, Kaneda Y, Nakasone T, Yoshizaki H, Someya K, Konno Y, Eda Y, Kino Y, Yamamoto N, Honda M: Hemagglutinating virus of Japan (HVJ) protein is efficient for induction of CD4⁺ T-cell response by a hepatitis B core particle-based HIV vaccine. *Clin Immunol* 112: 92-105, 2004.
- 50) Dewan Z, Watanabe M, Terashima K, Aoki M, Sata T, Honda M, Ito M, Yamaoka S, Watanabe T, Horie R, Yamamoto N: Prompt tumor formation and maintenance of constitutive NF- κ B activity of multiple myeloma cells in NOD/SCID γ^{null} mice. *Cancer Sci* 95: 564-568, 2004.
- 51) Yamakami K, Honda M, Takei M, Nakasone T, Ami Y, Kitamura N, Nishinarita S, Sawada S, Horie T: Early bone marrow hematopoietic defect in SHIV C2/1-infected macaques and relevance to advance of disease. *J Virol* 78: 10906-10910, 2004.
- 52) Myint L, Matsuda M, Matsuda Z, Yokomaku Y, Chiba T, Okano A, Yamada K, Sugiura W: Gag non-cleavage site mutations contribute to full recovery of viral fitness in protease inhibitor-resistant human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 444-452, 2004.
- 53) Yokomaku Y, Miura H, Tomiyama H, Kawana-Tachikawa A, Takiguchi M, Kojima A, Nagai Y, Iwamoto A, Matsuda Z, Ariyoshi K: Impaired processing

- and presentation of cytotoxic-T-lymphocyte (CTL) epitopes are major escape mechanisms from CTL immune pressure in human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 78: 1324-1332, 2004.
- 54) Saeng-Aroon S, Wichukchinda N, Myint L, Pathipvanich P, Ariyoshi K, Rojanawiwat A, Matsuda M, Sawanpanyalert P, Sugiura W, Auwanit W. Study of antiretroviral drug-resistant HIV-1 genotypes in northern Thailand: role of mutagenically separated polymerase chain reaction as a tool for monitoring zidovudine-resistant HIV-1 in resource-limited settings. *J Acquir Immune Defic Syndr* 36: 1051-1056, 2004.
- 55) Takamura S, Niikura M, Li T-C, Takeda N, Kusagawa S, Takebe Y, Miyamura T, Yasutomi Y: DNA vaccine-encapsulated virus-like particles derived from an orally transmissible virus stimulates mucosal and systemic immune responses by oral administration. *Gene Ther* 11: 628-635, 2004.
- 56) Takebe Y, Kusagawa S, Motomura K: Molecular epidemiology of HIV: Tracking AIDS Pandemic. *Pediatr Int* 46: 236-244, 2004.
- 57) Arita I, Nakane M, Kojima K, Yoshihara N, El-Gohary A: Role of a sentinel surveillance system in the context of global surveillance of infectious diseases. *Lancet Infect Dis* 5: 172-177, 2004.
- 58) Harada T, Tatsumi M, Takahashi H, Sata T, Kurata T, Kojima A: Specific reactions between purified HIV-1 particles and CD4+ cell membrane fragments in a cell-free system of virus fusion or entry. *Microbes Infection* 6: 421 - 428, 2004.
- 59) Suzuki J, Ikeda T, Kuroyama H, Seki S, Kasai M, Utsuyama M, Tatsumi M, Uematsu H, Hirokawa K: Regulation of osteoclastogenesis by three human RANKL isoforms expressed in NIH3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 314: 1021-1027, 2004.
- 60) Kuroyama H, Ikeda T, Kasai M, Yamasaki S, Tatsumi M, Utsuyama M, Saito T, Hirokawa K: Identification of a novel isoform of ZAP-70, truncated ZAP kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 315: 935- 941, 2004.
- 61) Matano T, Kobayashi M, Igarashi H, Takeda A, Nakamura H, Kano M, Sugimoto C, Mori K, Iida A, Hirata T, Hasegawa M, Yuasa T, Miyazawa M, Takahashi Y, Yasunami M, Kimura A, O'Connor DH, Watkins DI, Nagai Y: Cytotoxic T lymphocyte based control of simian immunodeficiency virus replication in a preclinical AIDS vaccine trial. *J Exp Med* 199: 1709-1718, 2004.
- 62) Lun W-H, Takeda A, Nakamura H, Kano M, Mori K, Sata T, Nagai Y, Matano T: Loss of virus-specific CD4+ T cells with increases in viral loads in the chronic phase after vaccine-based partial control of primary simian immunodeficiency virus replication in macaques. *J Gen Virol* 85: 1955-1963, 2004.
- 63) Ansari AA, Mayne AE, Onlamoon N, Pattanapanyasat K, Mori K, Villinger F: Use of recombinant cytokines for optimized induction of antiviral immunity against SIV in the nonhuman primate model of human AIDS. *Immunol Res* 29: 1-18, 2004.
- 64) Barnor JS, Kurosaki N, Yamaguchi K, Sakamoto A, Ishikawa K, Inagaki Y, Yamamoto N, Osei-Kwasi M, Ofori-Adjei D, Takaku H: Intracellular expression of anti sense RNA transcripts complementary to the human immunodeficiency virus type-1 vif gene inhibits viral replication in infected T-lymphoblastoid cells. *BBRC* 320: 544-550, 2004.
2. 和文発表
- 1) 松尾和浩：エイズワクチン研究の新展開。化学と生物。41: 731-737, 2003.
- 2) 杉浦 互：HIV の薬剤耐性研究の現状と今後の課題。現代医療。35 (6): 113-118,2003.
- 3) 杉浦 互：日本における薬剤耐性 HIV-1 の現状。臨床とウイルス。31 (4): 272-282, 2003.
- 4) 金田次弘, 加藤真吾, 山元泰之, 千葉智子, 杉浦 互：抗 HIV 療法のモニタリング。日本エイズ学会誌。5: 109-112,2003.
- 5) 有吉紅也：タイにおける取り組みと日本の協力。日本エイズ学会誌。3: 194-196, 2003.
- 6) 有吉紅也：東南アジアにおける HIV・エイズ対策の取り組み -タイは HIV・エイズ対策に成功したのか-。臨床とウイルス。31: 283-291, 2003.
- 7) 武部 豊 (分担執筆)：エイズの話「感染症の事典」朝倉書店, 東京, 2003, in press.
- 8) 武部 豊 (分担執筆)：HIV-1 の組換え型流行株 (CRF)。<特集>内科キーワード 2003。内科 91(6), 2003.
- 9) 武部 豊：「第10回国際レトロウイルス・日和見感染症会議」学会印象記 「臨床と微生物」30 (4): 407 (071)。近代出版, 東京, 2003.
- 10) 武部 豊：HIV-1 感染症への分子疫学的アプローチ。総説。特集「エイズ」。臨床とウイルス 31 (4): 251-263。日本臨床ウイルス学会, 東京, 2003.
- 11) 武部 豊：後天性免疫不全症候群 (エイズ) の分子予防医学。「分子予防環境医学- 生命科学研究の予防・環境医学への統合」(松島綱治 編集)各論2) 感染症。(分担) pp. 170-186。医学書院, 東京, 2003.
- 12) 武部 豊, 馬 艶玲, 楊 朝軍：中国におけるエイズ流行：迫り来る巨大危機とその分子疫学 特集・

中国におけるエイズ対策の現状. 日中医学 18 (4): 14-20 (財) 日中医学協会, 東京, 2003.

- 13) 吉原なみ子: Vita.HIV 感染症の初期診断からステージ診断まで, ビー・エム・エル, 2003.
- 14) 仲宗根正, 原敬志, 染谷健二, 池尾一穂, 五條堀孝, 山本直樹, 本多三男: HIV 感染症統合データベースの開発. 日本エイズ学会誌. 6: 42-49, 2004.
- 15) 武部 豊: ケモカインと HIV 感染をめぐる研究の最前線. 「サイトカイン・ケモカインのすべて- 基礎から最新情報まで-」 (笠松新平・松島綱治編集) 第2章. 日本医学館, 東京, 2004, in press.
- 16) 吉原なみ子: 輸血感染症に関する検査法, 輸血学 遠山博編 中外医学社, 2004.
- 17) 吉原なみ子 (監修): 流行感染症の脅威 最新情報とその対策-エイズ, 肝炎, ATL, 梅毒, クラミジア, SARS, インフルエンザ, 結核- 臨床病理レビュー, 特集 129 号, 2004.

II. 学会発表

1. 国際学会

- 1) Nakasone T, Yamamoto N, Izumi Y, Matsuo K, Ami Y, Yamazaki S, Honda M: Prime-boost vaccination with recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin and vaccinia strain DIs elicits protective immunity against pathogenic SHIV infection in macaques. 10th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Feb 10-14, 2003, Boston, USA.
- 2) Nakasone T, Izumi Y, Matsuo K, Ami Y, Someya K, Kanekiyo M, Hamano T, Horibata S, Yoshino N, Hara T, Takizawa M, Kawahara M, Kaizu M, Hamatake M, Sakai K, Shinohara K, Yamazaki S, Yamamoto N, Honda M: Prime-boost vaccination with recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin and vaccinia strain DIs elicits protective immunity against pathogenic SHIV infection in macaques. Japan-U.S. Cooperative Medical Science Program 14th Joint Meeting of AIDS Panel, Mar. 5-7, 2003, Okinawa.
- 3) Kozyrev IL, Miura T, Sakai K, Takahashi E, Shinohara K, Suzuki H, Ibuki K, Hayami M: Comparative analysis of acute pathogenic and less pathogenic SHIV molecular clones. Japan-U.S. Cooperative Medical Science Program, 15th Joint Meeting of AIDS Panel, Mar. 4-7, 2003, Ginowan, Japan.
- 4) Miyauchi K, Komano J, Yokomaku Y, Matsuda Z: The role of the membrane spanning domain of HIV-1 TM in membrane fusion. Retroviruses Cold Spring Harbor Laboratory, May 20-25, 2003, Cold Spring Harbor NY, USA.
- 5) Myint L, Matsuda M, Chiba T, Yan H, Kakizawa J, Okano A, Hamatake M, Nishizawa M, Sugiura W: Analysis of virion morphology and assembly process in protease inhibitor resistant HIV-1. 12th International HIV Drug Resistance Workshop. Jun.10-14, 2003, Cabo SanLucas, Mexico.
- 6) Kantor R, Shafer RW, Carvalho AP, Wynhoven B, Soares MA, Cane P, Clarke J, Snoeck J, Pillay C, Sirivichayukul S, Ariyoshi K, Holguin A, Grossman Z, Rodrigues R, Bouzas MB, Cahn P, Brigido LF, Soriano V, Sugiura W, Phanuphak P, Morris L, Vandamme A-M, Weber J, Pillay D, Tan A, Katzenstein D: Nucleic acid differences between HIV-1 non-B and reverse transcriptase and protease sequences at drug resistance positions. 12th International HIV Drug Resistance Workshop. Jun.10-14, 2003, Cabo SanLucas, Mexico.
- 7) Snoeck J, Kantor R, Shafer RW, Derdelinckx I, Carvalho AP, Wynhoven B, Soares MA, Cane P, Clarke J, Pillay C, Sirivichayukul S, Ariyoshi K, Holguin A, Grossman Z, Rodrigues R, Bouzas MB, Cahn P, Brigido LF, Soriano V, Sugiura W, Phanuphak P, Morris L, Weber J, Pillay D, Tanuri A, Harrigan PR, Camacho R, Schapiro JM, Katzenstein D, Vandamme AM: Evaluation of five interpretation algorithms for the prediction of drug susceptibility in non-B subtype. 12th International HIV Drug Resistance Workshop. Jun.10-14, 2003, Cabo SanLucas, Mexico.
- 8) Totani R, Hayashi K, Hasuo S, Kita T, Takahashi S, Yoshino N, Wada Y, Togawa M, Tsukahara Y: HIV mother-to-child vertical infection in Japan: A national co-operative study report. 23th Annual Meeting of the Society for Reproductive Immunology, Jun. 18-22, 2003, New Haven, USA.
- 9) Hayashi K, Kita T, Hasuo Y, Totani R, Yoshino N, Wada Y, Hayakawa S, Tsukahara Y, Takano M, Taniguchi H, Minoura S, Inaba N: The clinical assessment of maternal HIV testing in early pregnancy to prevent mother to child transmission in Japan. 23th Annual Meeting of the Society for Reproductive Immunology, Jun. 18-22, 2003, New Haven, USA.
- 10) Ibuki K, Enose Y, Miyake A, Suzuki H, Takahashi M, Horiuchi R, Saito N, Nakasone T, Ami Y, Izumi Y, Honda M, Takahashi H, Miura T, Hayami M: Analysis of viral expansion and immune reaction at early phase of acute pathogenic SHIV intrarectal infection in macaques. 21th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, Oct. 22-25, 2003, Seattle, USA.
- 11) Suzuki H, Suzuki M, Ibuki K, Masuda K, Minato N,

- Kawamoto H, Nakasone T, Honda M, Hayami M, Miura T: The effects of pathogenic SHIV infection on the thymus and intrathymic T cell progenitor in rhesus monkeys. 21th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, Oct. 22-25, 2003, Seattle, USA.
- 12) Kozyrev IL, Miura T, Sakai K, Takahashi E, Shinohara K, Suzuki H, Ibuki K, Hayami M: Comparative analysis of acute pathogenic and less pathogenic SHIV molecular clones. 21st Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, Oct. 22-25, 2003, Seattle, USA.
 - 13) Sugimoto C, Shioda T, Yasutomi Y, Yamamoto N, Nagai Y, Mori K: Properties of a quintuple deglycosylated SIVmac239 mutant as a novel attenuated SIV. 21th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, Oct. 2003, Seattle, USA.
 - 14) Sugimoto C, Ohgimoto S, Kusakawa S, Takebe Y, Shioda T, Nagai Y, Mori K: Influence of deglycosylation on efficacy of Env based vaccine. 21th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, Oct. 2003, Seattle, USA.
 - 15) Yan H, Chiba T, Nomura N, Kitamura Y, Nishizawa M, Matsuda M, Yamamoto N, Sugiura W: Discovery of novel small-molecule HIV-1 integrase inhibitory compounds. 4th HIV DRP Symposium Antiviral Drug Resistance, Dec.7-10, 2003, Virginia, USA.
 - 16) Kantor R, Shafer RW, Efron B, Carvalho AP, WynhoveB n, Soares MA, Cane P, Clarke J, Snoeck J, Sirivichayakul S, Ariyoshi K, Holguin A, Pillay C, Rudich H, Rodrigues R, Bouzas MB, Cahn P, Brigido LF, Grossman Z, Morris L, Soriano V, Sugiura W, Phanuphak P, Vandamme AM Weber J, Pillay D, Tanuri A, Harrigan PR, Camacho R, Schapiro JM, Katzenstein D: HIV-1 subtype-related differences in genotypic evolution: Analysis of subtypes B and C reverse transcriptase and protease sequences. 11th Conference on Retrovirus and Opportunistic Infections. Feb.8-11, 2004, Sanfrancisco, USA.
 - 17) Takebe Y, Yang R, Kusagawa S, Zhang C, Xia X, Ben K: Identification of new class of HIV-1 recombinants comprised of two circulating recombinant forms, CRF07_BC and CRF08_BC, in China. 10th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Feb. 10-14, 2004, Boston, USA.
 - 18) Someya K, Matsuo M, Sata T, Yamamoto N, Honda M: Abortive virus production of vaccinia DIs-Gag recombinant in mammalian cells results in efficient immune induction as a safe immunodeficiency virus vaccine candidate. 15th Joint Scientific Meeting of the AIDS Panels, US-Japan CMSP, Mar. 8-10, 2004, Nashville, USA.
 - 19) Honda M, Nakasone T, Ami Y, Izumi Y, Matsuo K, Kawahara M, Someya K, Takizawa M, Hara T, Horibata S, Kanekiyo M, Yamamoto N: A prime-boost vaccine with recombinant Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin and a non-replicating vaccinia virus recombinant: elicitation of long-lasting and positive immunity and safety study. 15th Joint Scientific Meeting of the AIDS Panels, US-Japan CMSP, Mar. 8-10, 2004, Nashville, USA.
 - 20) Takebe Y, Yokota Y, Kusagawa S, Imamura Y, Uehara R, Ma Y, Yang C, Li X, Li X, Yamamuro M, Thwe M, Aung T, Oo KY, Lwin HH: Precise mapping of recombination breakpoints of HIV-1 unique recombinant forms circulating in Myanmar: *in vivo* sequence preference for recombination and the biological implications. 16th Joint Scientific Meeting of the AIDS Panels, U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program, Mar. 8-11, 2004, Nashville, USA.
- ## 2. 国内学会
- 1) 三浦智行, 阪井弘治, 篠原克明, 高橋栄治, ユーリ・コズレフ, 鈴木元, 伊吹謙太郎, 速水正憲: 感染性分子クローンウイルスによるヒト/サル免疫不全ウイルスの比較病態解析. 第135回日本獣医学会学術集会, 2003年3月30-4月1日, 東京.
 - 2) 武部豊, 草川茂, 安岡彰, 岡慎一: HIV-2 感染国内症例の同定とその解析. 第77回日本感染症学会, 2003年4月17-18日, 福岡.
 - 3) 武部豊, 楊栄閣, 今村裕子, 本村和嗣, 草川茂, Kunlong Ben: 中国における HIV 流行はいかにして形成されたか: 流行のエピセンターとしての中国南西部(雲南省). 第77回日本感染症学会, 2003年4月17-18日, 福岡.
 - 4) 永井慎也, 坂本優子, 吉原なみ子, 高浜洋一, 浜口行雄: マダガスカル及びタンザニアにおける輸血関連ウイルスの感染状況及び現地の検査精度. 第51回日本輸血学会学術総会, 2003年5月, 福岡.
 - 5) 林 公一, 喜多恒和, 和田裕一, 外川正生, 北村勝彦, 谷口晴紀, 塚原優己, 箕浦茂樹, 阿部史朗, 佐久本薫, 高野政志, 蓮尾泰之, 早川 智, 井村総一, 大場 悟, 葛西健郎, 高山直秀, 宮澤廣文, 吉野直人, 稲葉憲之, 戸谷良造: 4年間(1999-2002)における妊婦 HIV 抗体検査実施率の経時的変化とその地域差について. 第21回日本産婦人科感染症研究会, 2003年6月14日, 宇都宮.
 - 6) 外川正生, 井村総一, 大場 悟, 葛西健郎, 高山直秀, 宮澤廣文, 喜多恒和, 和田裕一, 塚原優己, 北村勝彦, 谷口晴紀, 林公一, 箕浦茂樹, 阿部史朗,

- 佐久本薫, 高野政志, 蓮尾泰之, 早川 智, 吉野直人, 稲葉憲之, 戸谷良造: わが国における HIV 母子感染の実態- 小児科領域の全国調査から-. 第 21 回日本産婦人科感染症研究会, 2003 年 6 月 14 日, 宇都宮.
- 7) 駒野淳: Cytoskeletal Support of Viral Life Cycle, 日本レトロウイルス研究会夏期セミナー, 2003 年 6 月 27-29 日, 菅平.
 - 8) 武部豊: アジアにおける HIV 流行の分子疫学- 新たな HIV-1 組換えウイルスについて. 平成 15 年度 微生物生物技術協議会第 24 回研究会 シンポジウム「HIV」, 2003 年 7 月 11 日, 福岡.
 - 9) 杉浦 互, 駒野 淳, Lay Myint: HIV-1 複製サイクル初期あるいは後期過程における宿主細胞因子の機能的, 形態学的解析. 第 6 回 白馬シンポジウム, 2003 年 8 月 1 日, 長野県北安曇郡白馬村.
 - 10) 駒野淳: New Host Factor Involved in the Early Phase of HIV-1's Life Cycle, HIV. 白馬シンポジウム, 2003 年 8 月 1 日, 白馬.
 - 11) 伊吹謙太郎, 榎瀬良美, 三宅在子, 鈴木元, 高橋めぐみ, 堀内励生, 斉藤尚紀, 仲宗根正, 本多三男, 高橋秀美, 速水正憲, 三浦智行: 強毒 SHIV の経直腸感染初期における腸管粘膜免疫細胞の動態. 第 136 回日本獣医学会, 2003 年 10 月 3-5 日, 青森.
 - 12) 鈴木元, 鈴木麻貴子, 三宅在子, 伊吹謙太郎, 増田恭子, 伊川友活, 河本宏, 仲宗根正, 本多三男, 速水正憲, 三浦智行: 強毒サル/ヒト免疫不全キメラウイルス感染初期における胸腺組織及び胸腺内 T 前駆細胞の解析. 第 136 回日本獣医学会, 2003 年 10 月 3-5 日, 青森.
 - 13) 伊吹謙太郎, 榎瀬良美, 三宅在子, 鈴木元, 高橋めぐみ, 堀内励生, 斉藤尚紀, 仲宗根正, 本多三男, 高橋秀美, 速水正憲, 三浦智行: 強毒 SHIV の経直腸感染初期における腸管粘膜免疫細胞の動態. 第 51 回日本ウイルス学会, 2003 年 10 月 27-29 日, 京都.
 - 14) 鈴木元, 鈴木麻貴子, 三宅在子, 伊吹謙太郎, 増田恭子, 伊川友活, 河本宏, 仲宗根正, 本多三男, 速水正憲, 三浦智行: 強毒サル/ヒト免疫不全キメラウイルス感染初期における胸腺組織及び胸腺内 T 前駆細胞の解析. 第 51 回日本ウイルス学会, 2003 年 10 月 27-29 日, 京都.
 - 15) 杉浦 互, Lay Myint, 駒野 淳, 松田昌和, 松田善衛, 西澤雅子: 薬剤耐性 HIV-1 における粒子形成過程の形態学的解析. 第 51 回日本ウイルス学会学術集会, 2003 年 10 月 27-29 日, 京都.
 - 16) 横幕能行, ジラワン・シーサワット, ブサラワン・シーワンタナ, 松田善衛, 有吉紅也: タイ流行株臨床検体由来 gag-pol 発現 CTL 標的細胞パネル作成の試み. 第 51 回日本ウイルス学会学術集会, 2003 年 10 月, 京都.
 - 17) 武部豊, 横田侑子, 上原理恵子, 今村裕子, 草川茂: HIV-1 遺伝子組換えの特異点: *in vivo* 組換え点の微細マッピング. 第 51 回日本ウイルス学会, 2003 年 10 月 27-29 日, 京都.
 - 18) 武部豊, 今村裕子, 草川茂: HIV-1 サブタイプ B' の起源に関する進化的解析. 第 51 回日本ウイルス学会, 2003 年 10 月 27-29 日, 京都.
 - 19) 草川茂, 楊栄閣, 武部豊: HIV-1 CRF08_BC 感染性分子クローンの樹立とその性状の解析. 第 51 回日本ウイルス学会, 2003 年 10 月 27-29 日, 京都.
 - 20) 三浦智行, ユーリ・コズレフ, 阪井弘治, 篠原克明, 高橋栄治, 鈴木元, 伊吹謙太郎, 速水正憲: サル/ヒト免疫不全キメラウイルス感染性クローンにおける塩基置換と病原性との関連. 第 51 回日本ウイルス学会学術集会・総会, 2003 年 10 月 27-29 日, 京都.
 - 21) 駒野淳, 宮内浩典, 松田善衛, 山本直樹: ヒト免疫不全ウイルス感染の初期過程における Arp2/3 複合体の重要性. 第 51 回日本ウイルス学会, 2003 年 10 月 27-29 日, 京都.
 - 22) 宮内浩典, 駒野淳, 松田善衛: 膜融合に対する HIV-1gp41 膜貫通領域の寄与-融合後期過程への寄与-. 第 51 回日本ウイルス学会, 2003 年 10 月 27-29 日, 京都.
 - 23) 清水佐紀, 吉仲由之, 木村竜一郎, 宮内浩典, 駒野淳, 松田善衛, 山本直樹: HIV-1 慢性感染細胞におけるプロテオーム解析. 第 51 回日本ウイルス学会, 2003 年 10 月 27-29 日, 京都.
 - 24) 石川晃一: Inhibition of HIV-1 replication using a single-transcriptional unit that expresses decoy and siRNAs in cells. 第 51 回日本ウイルス学会, 2003 年 10 月 27-29 日, 京都.
 - 25) 武部豊: アジアにおけるエイズ危機- 流行形成のメカニズムを探る-. 合同学術集会ワークショップ「基礎と臨床の調和と融合」- 「日本の AIDS, 世界の AIDS」, 2003 年 10 月 30 日, 横浜.
 - 26) 吉原なみ子: 世界のエイズ, 日本のエイズ HIV 感染診断技術の進歩. 第 52 回日本感染症学会東日本地方会, 2003 年 10 月 30 日, 横浜.
 - 27) 吉野直人, 兼清優, 染谷健二, 松尾和浩, 網康至, 佐藤成大, 山本直樹, 本多三男: リコンビナント DIs ワクチンの経粘膜接種への応用. 第 17 回日本エイズ学会総会, 2003 年 11 月 27-29 日, 神戸.
 - 28) 外川正生, 大場悟, 葛西健郎, 井村総一, 塚原優己, 喜多恒和, 稲葉淳一, 北村勝彦, 高野政志, 谷口晴紀, 長縄聰, 林公一, 蓮尾泰之, 箕浦茂樹, 和田裕一, 吉野直人, 戸谷良造, 稲葉憲之: わが国における HIV 母子感染の現状(1) 全国小児科施設への調査結果. 第 17 回日本エイズ学会総会, 2003 年 11 月 27-29 日, 神戸.

- 29) 和田裕一, 喜多恒和, 稲葉淳一, 井村総一, 大場悟, 葛西健郎, 北村勝彦, 高野政志, 谷口晴紀, 塚原優己, 外川正生, 長縄聰, 林公一, 早川智, 蓮尾泰之, 箕浦茂樹, 吉野直人, 戸谷良造, 稲葉憲之: わが国における HIV 母子感染の現状(2) 全国産婦人科施設への調査結果. 第 17 回日本エイズ学会総会, 2003 年 11 月 27-29 日, 神戸.
- 30) 塚原優己, 喜多恒和, 稲葉淳一, 井村総一, 大場悟, 葛西健郎, 北村勝彦, 高野政志, 谷口晴紀, 外川正生, 長縄聰, 林公一, 蓮尾泰之, 早川智, 箕浦茂樹, 和田裕一, 吉野直人, 戸谷良造, 稲葉憲之: わが国における HIV 母子感染の現状(3) HIV 感染妊婦の動向と将来予測. 第 17 回日本エイズ学会総会, 2003 年 11 月 27-29 日, 神戸.
- 31) 林公一, 喜多恒和, 稲葉淳一, 井村総一, 大場悟, 葛西健郎, 北村勝彦, 高野政志, 谷口晴紀, 外川正生, 長縄聰, 塚原優己, 蓮尾泰之, 箕浦茂樹, 和田裕一, 吉野直人, 戸谷良造, 稲葉憲之: わが国における HIV 母子感染の現状(4) 妊婦 HIV 抗体検査実施率の推移. 第 17 回日本エイズ学会総会, 2003 年 11 月 27-29 日, 神戸.
- 32) 浜野隆一, 岡本尚, 野内英樹, 日比悠里名, 高橋なを子, 原敬志, 山本直樹, 山崎修道, 本多三男, 松尾和浩: Gag p17 遺伝子変異による HIV-1 CRF01_AE 複製の制御. 第 17 回日本エイズ学会総会, 2003 年 11 月 27-29 日, 神戸.
- 33) 松尾和浩: タイにおけるエイズワクチンの臨床開発に向けた取り組み. 第 17 回日本エイズ学会学術集会シンポジウム, 2003 年 11 月 27-29 日, 神戸.
- 34) 滝澤万里, 村上利夫, 江田康幸, 前田敏宏, 本多三男: ヒトモノクローナル抗体 KD-247 における中和メカニズム. 第 17 回日本エイズ学会総会, 2003 年 11 月 27-29 日, 神戸.
- 35) 村上利夫, 前田敏宏, 本多三男, 松下修三: ヒト化抗 HIV-1 モノクローナル抗体 (KD-247) 治療対象症例選択法の開発. 第 17 回日本エイズ学会総会, 2003 年 11 月 27-29 日, 神戸.
- 36) 横幕能行, 松田善衛, 千葉智子, 巖馬華, 松田昌和, 杉浦 互: 抗 HIV-1 新規候補薬剤検索のための多検体処理可能なスクリーニングシステム構築. 第 17 回日本エイズ学会学術集会, 2003 年 11 月 27-29 日, 神戸.
- 37) 古賀一郎, 小田原 隆, 細谷紀章, 後藤美江子, 中村哲也, 松田昌和, 杉浦 互, 岩本愛吉: HAART 下で良好な経過中, 梅毒発症とともに抗 HIV 血症を呈した症例. 第 17 回日本エイズ学会学術集会 2003 年 11 月 27-29 日, 神戸.
- 38) 松田昌和, 千葉智子, 佐藤裕徳, 巖馬華, Lay Myint, 柿澤淳子, 浜武牧子, 植田知幸, 西澤雅子, 杉浦 互: 相同組み換えを用いた CRF01_AE 薬剤感受性の解析. 第 17 回日本エイズ学会学術集会, 2003 年 11 月 27-29 日, 神戸.
- 39) 植田知幸, 有吉紅也, 三浦秀佳, 松田昌和, 千葉智子, 巖馬華, Lay Myint, 柿澤淳子, 浜武牧子, 西澤雅子, 杉浦 互: CRF01_AE 感染症例に見出された新たな薬剤耐性獲得機序. 第 17 回日本エイズ学会学術集会, 2003 年 11 月 27-29 日, 神戸.
- 40) 大出裕高, 星野忠次, 杉浦 互: HIV-1 protease 阻害剤耐性の分子動力的解析. 第 17 回日本エイズ学会学術集会・シンポジウム, 2003 年 11 月 27-29 日, 神戸.
- 41) 杉浦 互: HIV-1 治療における薬剤耐性の影響とその対策. 第 17 回日本エイズ学会学術集会・シンポジウム, 2003 年 11 月 27-29 日, 神戸.
- 42) 武部豊, 今村裕子, 草川茂: HIV-1 サブタイプ B' の起源とアジアにおける流行拡大に果たす役割. 第 17 回日本エイズ学会, 2003 年 11 月 27-29 日, 神戸.
- 43) 武部豊, Ma Yanling, Yang Chaojun, 今村裕子, 横田侑子, 上原理恵子, 草川茂, Yang Rongge, Ben Kunlong: 中国におけるエイズ流行の巨大危機とその形成のメカニズム. 第 17 回日本エイズ学会, 2003 年 11 月 27-29 日, 神戸.
- 44) 吉原なみ子, 坂本優子, 福嶋浩一, 今井光信, 林邦彦, 井戸深雪: 全施設を対象にした HIVRNA 定量のコントロールサーベイおよびアンケート調査の検討. 第 17 回日本エイズ学会総会, 2003 年 11 月 27-29 日, 神戸.
- 45) 鈴木寿子, 土屋利江, 吉原なみ子: コラーゲンスポンジを用いたバイオヒト皮膚モデルにおける HIV-1 検出法の検討. 第 17 回日本エイズ学会総会, 2003 年 11 月 27-29 日, 神戸.
- 46) 坂本優子, 宮地峰輝, 香川孝司, 高浜洋一, 浜口行雄, 野内英樹, 田村深雪, 小野崎郁史, 吉原なみ子: カンボディアの新規結核患者における輸血関連ウイルスの陽性率. 第 17 回日本エイズ学会総会, 2003 年 11 月 27-29 日, 神戸.
- 47) Kozyrev IL, 阪井弘治, 高橋栄治, 篠原克明, 鈴木元, 伊吹謙太郎, 速水正憲, 三浦智行: Genetic analysis of acute pathogenic and less pathogenic SHIV molecular clones to determine the responsive site for in vivo pathogenicity. 第 17 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2003 年 11 月 27-29 日, 神戸.
- 48) 杉本智恵, 保富康宏, 塩田達雄, 山本直樹, 永井美之, 森 一泰: 糖鎖欠損変異 SIV の新規 attenuated virus としての性質. 第 17 回日本エイズ学会, 2003 年 11 月 27-29 日, 神戸.
- 49) 森 一泰, 杉本智恵, 中山英美, 塩田達雄, 草川茂, 武部豊, 保富康宏, 永井美之: Env エイズワクチンにおける糖鎖の重要性. 第 17 回日本エイズ学会, 2003 年 11 月 27-29 日, 神戸.

- 50) Hagiwara Y, Dohi T, Yoshino N, McGhee JR, Fujihashi K: Nontoxic CT (E112K) Mutated In The COOH-Terminal KDEL Of The A Subunit Elicits Mucosal Adjuvant Activity Without Intracellular Trafficking. 第33回日本免疫学会, 2003年12月8-10日, 福岡.
- 51) 駒野淳, 宮内浩典, 松田善衛, 山本直樹: ウイルス感染初期過程における Arp2/3 複合体の重要性. 第26回日本分子生物学会年会, 2003年12月10-13日, 神戸.
- 52) 宮内浩典, 駒野淳, 松田善衛: HIV-1 エンベロープタンパク質膜貫通領域 (membrane spanning domain, MSD) の膜融合後期過程への寄与. 第26回日本分子生物学会年会, 2003年12月10-13日, 神戸.
- 53) 吉野直人: HIV/AIDS ワクチンの開発. 第82回もりおか生物科学の集い, 2004年1月31日, 盛岡.
- 54) 松井良輔, 菅井隆弘, 千葉晴美, 塩見和朗, 山口裕一, 増間碌郎, 供田 洋, 千葉智子, 杉浦 互, 大村智, 田中晴雄: 糸菌状の生産する HIV-1 インテグラーゼ阻害物質の単離と生物活性. 第124回日本薬学会, 2004年3月