

19. エイズ研究センター

センター長 山本直樹

概要

1981年に最初のエイズ患者が報告されてから、20年以上が経過した。2005年末現在、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染者とエイズ患者の数は、全世界で累積6000万人におよぶ。このうち、サハラ砂漠以南のアフリカ諸国が、2940万人と圧倒的に多い。また、2005年の1年間で、あらたにHIVに感染した人の数は、全世界で500万人になり、サハラ砂漠以南のアフリカ諸国が、350万人を占める。しかし新たな感染地域として、アジアでの感染が拡大している。アジアではその感染率はまだ低い、人口の絶対数が多いため、感染者の人数も増えている。インドでは最近南アフリカ共和国を抜いて400万人を超え、世界最大の感染者を擁する国となった。中国では、2000年なかばの感染者数は100万人だが、2010年には1000万人に達する可能性がある。我が国でも2005年度は感染者の数が2年連続で1000人を超えるなど、過去最高の新規感染者数を記録し、今後の感染拡大は大いに警戒すべき状況である。

1995年ごろから始まったHAARTの効果には目覚しいものがあり、感染者に大きな希望を与えている。しかし、そのコスト、慢性毒性、さらには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。さらに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、共存とともにその根絶に向けた研究も重要である。このような状況の下、当センターでは、多数の症例に対し、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、BCG-ワクシニア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化SIVが優れた感染防御効果を持つことを明らかにし、現在米国NIHのワクチン研究センターとの共同研究を進展させている。またアジアに流行するHIV-1株に関する研究が進展し、流行の広がりや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、効率の良い感染性分子クローンの分離法の開発など、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)のアジアやアフリカにおけるエイズプロジェクト等にも積極的に協力してきた。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。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ており、我が国エイズ研究の中核となっている。

人事では、駒野淳第3室研究員が主任研究官に昇任(平成17年4月1日付)、鈴木寿子第2室研究員が第2研究グループに併任(10月1日付)した。

当センターの運営に当たっては宮村達男所長、渡邊治雄副所長、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、山口一成血液・安全性研究部長、寺尾恵治医薬基盤研究所長類医科学研究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第3室の村山から戸山への移転などで多少の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。

業績 調査研究

1. エイズワクチンの開発

1. BCG/DIs プライムブーストワクチン

(1) 液性免疫誘導型ワクチンの開発を目的とした、改変型 HIV-1 Env 抗原発現型組換え BCG の作製

米国 NIH で作製された subtype B HIV-1 由来改変型 gp140 及び gp145 遺伝子を、*Mycobacterium kansasii* 由来 α 抗原遺伝子のプロモーターとシグナルペプチド領域をコードする遺伝子の下流に繋ぎ BCG に形質転換した。得られた株を調べた所、gp140 抗原の分泌が認められた。gp145 も菌体内での発現が認められたが、菌体内では分解産物が主であった。

[松尾和浩、岡村智崇、服部真一郎、Gary J. Nabel(米国 NIH)、山本直樹、本多三男]

(2) 改変型 HIV-1 Env 抗原発現型組換え BCG のマウスでの免疫誘導能の解析

HIV-1 subtype B 由来改変型 gp140 及び gp145 遺伝子をそれぞれ発現する BCG 株を BALB/c マウスの皮下に免疫し、Env V3 特異的抗体の産生を調べた所、いずれも免疫後 4 週以降で特異抗体の上昇が認められた。更に、その組換えワクシニア DIs をブースター免疫すると、HIV-1 MN 株に対する中和能誘導した。その中和活性は、gp140 発現型 BCG 免疫マウス血清の方が、有意に高い値を示した。Gp140 遺伝子は V1V2 領域を欠失しており、その中和抗体産生における重要性が示唆された。

[松尾和浩、服部真一郎、岡村智崇、Gary J. Nabel(米国 NIH)、山本直樹、本多三男]

(3) 組換え BCG-および組換え DIs-HIV/SIV ワクチンのサル評価

前年度までに、組換え BCG と組換え DIs による抗 HIV/SIV 免疫誘導は、カニクイサルにおいてヒト投与量でも可能であること、更に、組換え BCG では、導入 HIV/SIV 遺伝子のコドン使用頻度を BCG 化することが、抗原発現および免疫誘導に非常に有効であることを明らかにした。本年度は、組換え BCG の実用化で最も懸念されている BCG 既往症反応の影響を検討した。サルモデルにおいて結核ワクチンとしての非組換え BCG の先行免疫を行い、続いて組み替え BCG-HIV・DIs-HIV ワクチンを接種すると、組換え BCG 免疫後に重大な副反応は見られず、組換え HIV/SIV 抗原に対する免疫応答が誘

導され、組換え DIs の免疫増強にも影響を与えないことが明らかになった。これらの結果から本レジメンは、BCG 接種歴のあるヒトに応用可能であることが明らかになった。

[兼清優、網康至(動物管理室)、松尾和浩、染谷健二(ウイルス 3 部)、須崎百合子(動物管理室)、吉野直人、山本直樹、本多三男]

(4) HIV-1CRF01_A/Egag を発現する組換え BCG 及び DIs ワクチンの prime-boost 接種による特異免疫誘導の評価

野生型ワクシニアウイルスを雌性マウスに接種すると、一週間以内に接種ウイルスが卵巣に集積する。これを利用し、組換えワクチンと同じ HIV 遺伝子を発現する野生型ワクシニアをワクチン接種後にチャレンジし、卵巣に蓄積する接種ウイルス量の抑制レベルを指標としたワクチン効果の解析がなされている。本研究では、HIV-1CRF01_A/Egag を発現する組換え BCG 及び DIs ワクチン、rBCG/HIVgagA/E+rDIs/HIVgagA/E の prime-boost 接種により、gag に対する免疫が効果的に誘導されていることを確認するために、免疫マウスに、gag を発現する組換え野生型ワクシニア NYCBH をチャレンジし、卵巣中の接種ウイルス量を対照群と比較検討する。以前に行ったプレ実験では、prime-boost 免疫群において卵巣中ウイルス量が軽減される傾向にあったが、今後、組換え NYCBH チャレンジ等の条件を考慮して再検討する。

[泉泰之、山本直樹、本多三男]

(5) 高発現型ワクシニア Promoter を用いたワクシニア DIs の至適化

本研究は、高発現が期待されるワクシニア Promoter (mH5、PSFJ、p7.5) を用いて、SIVGag 抗原発現ワクシニア DIs ワクチンを構築し、最も効率の良い Promoter の選択を検討した。抗原の発現量は、様々な哺乳類細胞株において、mH5 を利用した rDIs ワクチン(rDIs/mH5/Gag) で発現量が高いことが確認された。さらに、マウスを用いた動物実験においても、rDIs/mH5/Gag が誘導した細胞性免疫は、他の Promoter を利用した rDIs の免疫応答よりも有意に優れていることが確認された。本研究の結果、ワクシニア DIs は、mH5 promoter を利用することが、一番適切であることが分かった。

[岡村智崇、松尾和浩、兼清優、堀端重男、泉泰之、染谷健二(ウイルス 3 部)、志田壽利(北海道大学)、山本直樹、本多三男]

(6) HIV 中和抗体誘導能を有する修飾型 HIV Env 発現ワ

クシニア DIIs の開発

安全性が極めて高いクシニア DIIs 株をワクチンベクターに用いて、Env の可変領域を至適化および gp41 を一部 truncate した修飾型 Env (gp140-mu) を発現する組換え DIIs ワクチン (rDIIs/gp140-mu) を構築した。更に、その免疫誘導能を検討すると、BALB/c マウスに 5 回接種し、血清 Env 抗体価並びに中和能を測定すると、抗体価は 1024 ~ 2048 倍の上昇し、またヘテロのウイルスである HIV MN 株、および JRCSF 株に対する中和反応が認められた。現在、誘導された Env 抗体のエピトープの解析を行っている。

[岡村智崇、松尾和浩、杉山高啓、兼清優、堀端重男、染谷健二(ウイルス 3 部)、Gary J. Nabel(米国 NIH)、山本直樹、本多三男]

(7) HIV マルチエピトープ DIIs ワクチンの開発

本研究は、クシニア DIIs をワクチンベクターに用いて、2 つ以上の HIV 抗原を同時に発現する HIV ワクチンの開発を行う。抗原は、サルエイズモデルでの SHIV 攻撃接種を考慮して、SIVGag と HIVEnv を用いて構築し、Western blotting 法によって両抗原の発現を確認した。次に、このワクチンの両抗原の発現力および複製能について検討した。その結果、両抗原をそれぞれ単独で発現する rDIIs とほぼ変わらず、安定したワクチンである事が確認された。現在、小動物モデルを用いて免疫誘導能について検討している。

[岡村智崇、服部真一朗、松尾和浩、染谷健二(ウイルス 3 部)、兼清優、堀端重男、Gary J. Nabel(米国 NIH)、山本直樹、本多三男]

(8) rDIIsSIVgag/pol の経鼻および皮内接種による脳への非移行性

rDIIsSIVgag/pol の経鼻免疫を行ったマウスでのクシニアウイルスベクターの脳への移行の有無を nested-PCR 法で確認した。接種後マウスの嗅球、大脳、小脳を解析した結果、いずれも陰性でありクシニアウイルスベクターの経鼻および皮内接種での脳への移行は確認されなかった。

[吉野直人、兼清優、岡村智崇、染谷健二(ウイルス 3 部)、松尾和浩、山本直樹、本多三男]

2. 修飾型 HIV Env 発現プラスミドによる抗 HIV 抗体の誘導

可変領域を至適化、および gp41 の一部を truncate した修飾型 HIV Env を発現する組換え DNA ワクチン

(1012CMV プロモーターを有する)を用いて、その免疫誘導能についてマウスを用いて検討した。プラスミドを細胞に導入し細胞内での Env タンパクの発現を確認した後、マウスに接種し血清中の抗体価と細胞性免疫の誘導能を評価した。DNA ワクチンによるマウスの免疫誘導は、上記組換え BCG および DIIs 免疫のものに比較して、抗体価、細胞性免疫ともに低いレベルであった。

現在は DNA/DIIs プライムブーストワクチンでのマウスにおける免疫応答を解析中である。

[高橋慎、岡村智崇、千葉丈(東京理科大学)、山本直樹、本多三男]

3. モノクロナール抗体 KD-247 における中和効果

これまで免疫原性が低い中和エピトープに対する効果的な能動免疫法の開発を試み、そのコア領域を高親和性に認識する連続免疫法を確立した。その実用化のために、マウスモノクロナール抗体の CDR 遺伝子を組み込んだ人型化抗体 KD-247 を作成し、その中和能の交差反応性を検討した。Env V3 領域の GPGR エピトープを認識する KD-247 抗体は、T-tropic、M-tropic、TCLA および Primary isolate にかかわらず、高い交差反応中和活性を示した。また、他の V3 領域を認識するモノクロナール抗体である 1006-15D、694/98D、gp41 を認識するモノクロナール抗体 1367-D、C5 を認識するモノクロナール抗体 1331-160 の中和力価と比較検討しても交差反応性に優れていた。しかし、GPGR エピトープを持つサブタイプ B において 20 ウイルス中 8 ウイルスが中和されず、GPGR エピトープを持つサブタイプ E においては 5 ウイルスすべて中和されなかった。これらの事から、KD-247 抗体の中和活性は、V3 コア領域のリニアエピトープ結合能とは違いがあり、活性発現にはさらにその周囲の構造が関与していることが示唆された。今後、中和されたウイルスとされなかったものの V3 シークエンス配列の差のみならず Env 蛋白構造における中和エピトープを比較することにより、中和活性と蛋白構造相関についても検討する。

[滝澤万里、山本直樹、本多三男]

4. 低病原性 SIV 感染、高病原性 SIV に対する感染後早期治療等による誘導される高病原性 SIV に対する感染抑制に関する解析

ウイルスベクター等を用いる prime-boost ワクチンは高頻度の CTL を誘導し慢性感染の抑制、発症遅延効果が確認されているが、その効果は特定 MHC I allele をもつ宿主に限定される。ところが弱毒ウイルス感染により誘導される防御免疫は初期感染に対しても強い抑制効果が

あり宿主 MHC の影響が少ないことからエイズワクチン開発への応用が期待されている。その機序の解明を目的に低病原性 SIV (糖鎖欠失変異 SIV, nef 遺伝子欠損 SIV) 感染ザル 5 頭、病原性 SHIV-RT 感染後早期治療(PEP)ザル 3 頭、病原性 SIV239 感染長期未発症ザル 3 頭に高用量 SIV239 の静脈内接種チャレンジ感染を行った。10/11 頭ではチャレンジ感染による初期感染は検出されなかった。しかし PEP の 1/3 頭では通常の SIV239 感染と同等の初期感染が観察された。PEP 全 3 頭では PEP 後に明らかな細胞性免疫の誘導と維持が確認されたが、感染後 7 年経過したチャレンジ感染 7 日前では、感染抑制があった 2 頭と比べ感染抑制のなかった 1 頭では細胞性免疫はわずかに検出される程度であった。またこのサルのみ PEP 後の抗体誘導が一過性であった。この結果は感染防御における細胞性免疫の重要性、さらに非常に低レベルの SIV 感染と感染抑制と関連する宿主応答の重要性が示唆された。

[杉本智恵、森 一泰]

5. 感染制御ザルから分離された SIV 特異的 CD4 陽性 T 細胞の解析

エイズウイルスに対する防御免疫は弱毒ウイルス感染、感染後早期治療(PEP)により誘導される。これらの感染制御ザルではウイルス特異的 CD4 T 細胞が感染抑制された慢性感染期においても検出されることから感染制御、感染防御における役割が推測される。そこでワクチンによるウイルス特異的 CD4 T 細胞を誘導と感染防御効果の検討を計画している。Nef 遺伝子欠損 SIV 感染ザル (Mm9429)、PEP ザル(Mm9703)から同一の MHC ハプロタイプ (R90-120b) の MHC II allele により抗原提示される Gag 特異的 CD4+T 細胞を分離し、それぞれのエピトープを決定した。エピトープは大部分が重なっていたが両端の 1 アミノ酸だけが異なっていた。今年度はこの 2 種の細胞の性質(メモリー細胞、抗原刺激によるサイトカイン発現、effector 機能、細胞表面 CCR5 発現、SIV 感染性)を調べた。Mm9429 細胞は、central memory, IFN-gamma 高発現、TNF-alpha 高発現、IL-2 中発現、granzyme B 低発現、CCR5 高発現を示し、Mm9703 は effector memory, IFN-gamma 高発現、TNF-alpha 高発現、IL-2 低発現、granzyme B 高発現、CCR5 低発現を示した。まとめると Mm9429 はより central memory 細胞、Mm9703 は effector memory 細胞の性質を示した。エピトープ peptide に対する反応性は Mm9703 細胞は Mm9429 細胞の 1/10 の濃度 (10 nM) で活性化した。いずれの細胞も SIV239 感染に対する感受性を示した。これらの細胞の性質は、SIV 感

染に対する免疫誘導、感染制御における機能として理解されるが、その機能を果たすためには SIV239 感染に対する抵抗性の機序が必要であることが示唆された。

[杉本智恵、森 一泰]

6. 粘膜免疫誘導型 HIV ワクチンの開発

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、昨年度に続き SIVgagDNA、SHIVenvDNA 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膣で行い、免疫後の血清中および膣洗浄液中の特異的 IgG と IgA の検出を行った。その結果、HVJenv ベクターキットやキトサンに高いアジュバント活性を検出した。その結果を受け、6 頭のカニクイサルを用いて感染防御試験を行った。すなわち SHIVenvDNA と HVJenv ベクターを用い 3 回経鼻投与を行った。しかしながら、抗 env 抗体は認められず、施設の使用期間の関係で SHIV を経直腸ルートで攻撃接種を行ったがワクチン候補免疫群でもウイルス量の抑制は認められなかった。理由に関しては、投与 DNA 量および HVJ 量が低かった事が考えられる。現在再度プロトコルを検討中である。またキトサンに関しては分子量、脱アセチル化度等を変化させたアジュバント候補を作成し活性を検討している。

[基盤研筑波霊長類センター、石川晃一、小林丘(協力研究員)]

II. HIV 感染症の治療

1. 自然免疫による HIV 感染修飾の解析：マンノース結合レクチン (MBL) の *in vitro* 抗 HIV 効果の同定

マンノース結合型レクチン(MBL)が *in vitro* で抗 HIV 効果を示すことを明らかにした。天然型 MBL は大量精製が難しいので、MBL の特性を明らかにするために、組換え MBL (Recombinant Mannose Binding Lectin : rMBL) の作成を試みた。そこで、12 種類の rMBL を作成し天然型 MBL と比較検討した。さらに、他の高産生 rMBL を 3 株作成し、3 種類の培地 (IS CHO CD, IS CHO-CD4, IS CHO-V) で、それぞれ培養時間を検討した rMBL を作成した。現在、どの細胞、培地、培養時間が *in vitro* において HIV-1 中和活性の発現にベストであるかを明らかにし、SOP を作成中である。

[滝澤万里、若宮伸隆(旭川医大)、鈴木定彦(北海道大学)、岸雄一郎(扶桑薬品)、堀端重男、山本直樹、本多三男]

2. 抗 HIV-1 療法を受けている HIV/AIDS 患者の薬剤耐性

モニタリング

我々は平成 8 年度より適切な抗 HIV-1 治療実現のための支援事業として、薬剤耐性 HIV-1 検査を実施している。薬剤耐性遺伝子検査の結果は約 3 週間で主治医に報告され、治療薬剤選択の指標として活用されている。平成 17 年度末までに参加した施設は 92 施設、解析を行った検体は平成 17 年 3 月の時点で累積 7396 検体、1659 症例に達している。我々の検査は治療支援としてだけでなく、わが国における薬剤耐性 HIV-1 の動向を把握する上でも貴重な疫学情報となっており、今までの検査結果の集計より、わが国において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を明らかにしてきた。

[松田昌和、三浦秀佳、千葉智子、西澤雅子、柿澤淳子、藤野真之、山本直樹、杉浦 互]

3. 2003-2005 年における新規 HIV/AIDS 診断患者の動向調査

HAART が普及した今日、HIV/AIDS に新たに感染し、治療前にもかかわらず既に薬剤耐性を獲得している症例が世界各国で報告されており、その頻度は 10-20% ともいわれている。日本では、2 年続けて新規 HIV 感染者数およびエイズ患者数の合計が 1000 人を越えて HIV/AIDS の感染拡大が進行しつつあるが、本邦においても新規 HIV/AIDS 診断確定未治療患者への薬剤耐性 HIV の拡大が大きな関心をもたれている。このような背景から、我々は 2003 年から 2005 年にかけて全国の治療拠点病院、衛生研究所等の協力のもとに新規 HIV/AIDS 診断患者を対象に耐性検査を実施した。薬剤耐性検査ではプロテアーゼおよび逆転写酵素領域を、HIV サブタイプには *env* C2/V3 領域を RT-PCR にて増幅し、その配列解析を行った。対象症例は 03 年:267 例、04 年:308 例、05 年:454 例であった。症例は 30-40 歳代の男性が中心で (>90%) 感染経路は同性間性的接触が 65-72% を占めていた。耐性症例の頻度は 2003 年:5.2%、2004 年:4.9%、2005 年:5.9% であった。クラス別に見るとヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤耐性の頻度は 4.1% ; 4.5% ; 4.6% (03;04;05 年) で、M41L、M62A、K65R、D67N、K70R、L74V、M184V、L210W、T215X、K219Q が見られた。非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤では 1.1% ; 1.3% ; 2.2% (03;04;05 年) で、V108I、K103N、L100I、V106A、Y181C、G190A が見られた。同プロテアーゼ阻害剤では 1.5% ; 0.3% ; 1.5% (03;04;05 年) で、耐性変異は、M46I、D30N、V82A が観察された。サブタイプは、いずれの年も 70% 以上が B であり、次いで CRF_01AE であっ

た。また少数ながらサブタイプ A、C、AG、G も観察された。感染経路とサブタイプの関連を見ると、B の半数以上が同性間性的接触であり、これとは対象に他は異性間性的接触であることが明らかになった。

[武田 哲、藤野真之、松田昌和、三浦秀佳、西澤雅子、山本直樹、杉浦 互]

4. hPBMC を用いた感受性検査による逆転写酵素 K65R 変異の Tenofovir 耐性に与える影響の解析

本研究では LAI 株に Tenofovir (TDF) 耐性変異として知られる K65R 変異を導入した LAI/K65R を作製し TDF に対する耐性を hPBMC を用いた感受性検査によって評価した。また K65R に加えて M184V を持つ臨床分離株の TDF 耐性も評価した。K65R 変異を持つ CRF01_AE 株の TDF 耐性も評価しサブタイプ B の結果と比較検討した。その結果 LAI/K65R はリファレンス株の LAI と比較して約 1.7 倍の TDF 耐性を示し、3TC と AZT に対しては感受性だった。サブタイプ B で K65R/M184V を持つ臨床分離株は AZT に対しては 1.1 倍とほぼ感受性だったが 3TC に対しては 300 倍以上の耐性を獲得し TDF に対しては 0.8 倍で感受性を回復した。これらの結果はこれまでに報告されている知見と合致した。CRF01_AE/K65R の臨床分離株は TDF に対する耐性を獲得し、また CRF01_AE で TAM を持つ分離株も TDF に対する耐性を獲得していた。上記の結果から本研究で用いた感受性検査により高感度でこれらの薬剤耐性プロファイルを検出可能である事が示された。

[西澤雅子、藤野真之、松田昌和、三浦秀佳、加藤真吾(慶応大)、山本直樹、杉浦 互、ウルビ パリカ(ピッツバーグ大学)]

5 細胞内におけるプロテアーゼ阻害剤の薬剤濃度のモニタリング

現在薬剤感受性検査には、末梢血単核球、あるいは T 細胞系細胞株や HeLa 細胞を基にしたレポーター細胞が使用されているが HeLa 細胞のような非宿主細胞から構築されたレポーター細胞での薬剤の取り込み・代謝が HIV-1 本来の宿主であるリンパ球系細胞と同等であるか明確ではない。本研究では細胞内への抗 HIV-1 薬の取り込みやその細胞内の濃度に着目し、T 細胞系細胞株の HPB-M(a)、CEM 及び上皮細胞系細胞株の HeLa 細胞における PI の各々の細胞内濃度を HPLC を用いて測定し比較検討した。4 種類のプロテアーゼ阻害剤 (PI)、ネルフィナビル (NFV)、サキナビル (SQV)、ロピナビル (LPV) そしてリトナビル (RTV) を各々 1、2.5、5 及び 10 μ M の

濃度で培地中に添加し各々の細胞に 10 分間取り込ませた後、細胞から PI を抽出し HPLC で細胞内 PI 濃度を測定した。10 μ M の PI 濃度で比較した結果、NFV は HPB-M(a)と CEM の細胞内で約 120~150 倍、HeLa 細胞では約 200 倍に濃縮された。SQV は HPB-M(a)及び CEM 細胞で約 70 倍、HeLa 細胞では約 200 倍であった。LPV では HPB-M(a)と CEM 細胞で約 10 倍、HeLa 細胞で約 45 倍であった。RTV は HPB-M(a)と CEM 細胞で約 10 倍、HeLa 細胞で約 15 倍に濃縮された。NFV、SQV、LPV 及び RTV はどれも培地中の薬剤濃度依存的に細胞内濃度が上昇した。細胞内 PI 濃度は NFV、SQV、LPV において HeLa 細胞の方が T 細胞系の細胞よりも高い傾向が見られた。細胞種によって細胞内の PI 濃度が異なることから、これらの細胞における細胞内への PI の取り込みのメカニズムが異なる可能性が示唆された。

[西澤雅子、三浦秀佳、山本直樹、杉浦 互、加藤真吾(慶応大)]

6. 新規抗 HIV 薬の開発に関する研究

この研究では遺伝子組み込み酵素を標的にした増殖阻害物質の開発を目指し、低分子化合物ライブラリーのスクリーニングを行なった。今までに 12000 個の化合物のスクリーニングを行い、従来とは異なる化合物を複数見出すことに成功した。さらに、抗 HIV-1 活性の認められた化合物のうち幾つかについて、M8166 細胞および SupT1 細胞を用い薬剤耐性誘導を行った。最終的に M8166 細胞では IC₅₀ の 40~128000 倍の耐性ウイルスが誘導され、SupT1 細胞でも 40~5000 倍の耐性ウイルスが誘導された。次に、耐性誘導ウイルスの薬剤感受性試験を行ったところ、MaRBLE cell assay を用いた薬剤感受性試験でそれぞれの薬剤に対して耐性を示した。また SupT1 細胞に野生株 HXB2 を感染させ、候補薬剤存在下で培養し、透過型電子顕微鏡で粒子形態等を観察したところ、薬剤存在下では、粒子のサイズが不均一で、また内部の核構造が明瞭でない未熟な粒子が観察された。この形態はプロテアーゼを欠損したウイルスに見る厚い外皮に囲まれ、内部に核のない像とは異なっており、従来とは異なる阻害機序が強く示唆された。今後、引き続き機序解析を行っていく予定である。

[武田 哲、三浦秀佳、巖 〃、西澤雅子、藤野真之、村田大悟、杉浦 互、田中晴雄(北里大学)、野村伸彦(富山化学研究所)]

7. 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と数理モデル解析

従来の薬剤耐性研究はサブタイプ B を中心に行われてきたが、これにより得られてきた薬剤耐性に関する知見がそのまま non-B サブタイプ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 ではネルフィナビル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。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 HXB2-D25N, NH1-D25N, NH1-D25N/L10F, NH1-D25N/N88S, NH1-D25N/L10F/N88S 各々のプロテアーゼの精製を行い、現在結晶化に入っている。本年度は結晶化に加えて、熱力学的解析を行うために、活性のあるプロテアーゼの作製・生成に取り組んでいる、[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)]

8. タイ流行株 HIV-1 (CRF01_AE) の薬剤耐性スクリーニングとしての MS-PCR の有用性に関する研究

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、途上国で薬剤耐性株のモニターを行うことは難しい。そこで我々は、タイ流行株の GPOvir 耐性変異頻度に関するデータをもとに、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・敏速検出法を開発した。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が、高い検出感度を有することから、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。本年度はランパンコホートで回収された GPOvir 脱落症例について通常の塩基配列解析と MS-PCR による検査を行い、MS-PCR がスクリーニング手法として活用できることを実証した。

[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・パチバニッチ(ランパン病院)、レイミント吉田、有吉紅也、松田昌和、杉浦 互]

9. Single genome sequencing を用いた薬剤耐性 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。中でもプロテアーゼとその基質である Gag タンパク間には相互に干渉しながら進化選択を受けていることが推察されている。本研究ではこれを明らかにするためにプロテアーゼ阻害剤耐性変異を獲得した症例につい

て定期的にサンプルを採取し、Gag 全域とプロエアーゼ約 2.5Kb を Single genome sequencing 法によって増幅・クローニングし解析を進めている。

[杉浦 互、松田昌和、千葉智子、柿澤淳子、田中 博(東京医科歯科大学情報)、任 鳳蓉(東京医科歯科大学情報)、柴田潤子(東京医科歯科大学情報)]

10. HIV クローンを用いた決定木の作成

薬剤治療下における HIV の進化・選択を理解するために決定木(Decision Tree)の作成を試みた。薬剤治療中の 3 症例について血漿中の HIV をクローニングし、系統樹解析を行い、治療薬剤の組み合わせ及びアミノ酸置換をもとに逆転写酵素(RT)とプロテアーゼ(PR)領域について決定木の作成を行った。1 症例あたり 6 ~ 7 サンプル、約 120 クローンについて決定木を作成した。作成した決定木を見ると、PR は 35,74 など薬剤耐性とは関係のないアミノ酸置換が、RT では 181,184,190 など重要な耐性変異がツリーの分岐部に位置していることが明らかになった。今回の 3 症例は使用薬剤の組み合わせが異なるため共通分類ルールを見出せなかったため、今後共通な薬剤の組み合わせのサンプルにより共通する分類ルールを得たいと考えている。

[鈴木寿子、杉浦 互、田中 博(東京医科歯科大学情報)、茂樺 薫(東京医科歯科大学情報)]

11. 薬剤耐性と RNase H 活性の関与に関する研究

大腸菌由来の精製酵素を用いて逆転写酵素活性の酵素的特性を解析する実験系を樹立し、患者由来の薬剤耐性ウイルスを対象とした研究により、NRTI 耐性を誘導する非 RNase H ドメインへの挿入変異・点変異によって RT 活性だけでなく RNase H 活性も減少することが明らかとなった。両酵素活性低下は並行して変化することから、NRTI 耐性獲得と in vivo における選択には逆転写酵素活性の変化が同調する必要があるという可能性が示唆された。薬剤耐性変異ウイルスを発生させる過程における RNase H 活性の関与が明らかとなった。p66 homodimer と p51/p66 heterodimer では RNase H 活性が異なるが polymerase 活性は影響しないことが示された。各酵素活性の独立性の評価と薬剤耐性能との比較により、新たな治療 strategy を提示することが出来るかもしれない。

[二橋悠子、浦野恵美子、宮内浩典、磯貝まや、武部 豊、松田善衛、駒野 淳、佐藤裕徳(遺伝子ゲノム解析センター)]

12. 新たな抗 HIV-1 薬剤の開発

現存する化学療法(HAART 療法)の重大な問題点である薬剤耐性ウイルスの発生を回避するためには、多様な作用機序を持つ薬剤を速やかに同定し、実用化することが求められる。これらは、薬剤耐性ウイルスによる難治症例の治療をも可能にする。現在市場に流通している抗エイズ薬の標的は逆転写酵素、プロテアーゼ、エンペロブタンパク質などである。未だにインテグラーゼは実用化されていない。我々は新たに integrase 阻害剤としてのリード化合物を発見することに着手し、約千種類のペプチドライブラリーから 2 種類同定した。これらは塩野義製薬が副作用のため開発を断念した diketo 構造を持つ integrase 阻害剤とほぼ同じ IC50 を有する非常に強い integrase 阻害活性を持つ。細胞培養レベルでウイルス複製抑制効果を評価するため、非ペプチド化を推進すべく酵素の立体構造をもとに電算機的解析を駆使した integrase—ペプチド相互作用ドメインの解析を行っている。

[駒野 淳、浦野恵美子、二橋悠子、宮内浩典、松田善衛、杉浦 互]

13. 経口投与可能な CXCR4 阻害剤の研究・開発

CXCR4 は HIV-1 の主要なコレセプターの一つであり、そのアンタゴニストは新しい作用機序を有する抗 HIV-1 剤の候補として期待されている。私達は、新規 CXCR4 アンタゴニスト KRH-3166 が経口投与可能で、in vitro、hu-PBL-SCID マウスモデルの両方で高い抗 HIV-1 活性を示すことを見出した。KRH-3153 は活性化 PBMC に対する X4 HIV-1 の増殖を低濃度(EC₅₀: 4 nM)で阻害し、R5 ウイルスとの共感染も R5 阻害剤との併用で完全に抑制した。KRH-3153 と相互作用する CXCR4 のアミノ酸は、Asp171、Asp262、His281、Trp283 と推定された。KRH-3166 をラットに 10 mg/kg で経口投与したときの bioavailability は 17% に達した。hu-PBL-SCID マウスを用いた HIV-1 感染モデルにおいても自由飲水投与によって X4 HIV-1 感染を顕著に阻害した。以上の結果は、KRH-3166 はエイズに対する臨床応用に向けて有望な、経口投与可能な新規 CXCR4 アンタゴニストであることを示している。

[村上 努、田中勇悦(琉球大学)、大隈 和(琉球大学)、熊倉 成((株)クレハ)、広瀬国孝((株)クレハ)、谷中幹郎((株)クレハ)、山本直樹]

III. HIV の分子疫学研究

1. マレーシアに流布する新しいタイプの組換え型流行株 CRF33_01B の発見

我々はマレーシア大学医学部(クアラルンプール市)

との共同研究によって新しいタイプの組換え型流行株 (CRF) を見出した。このウイルス株は CRF01_AE を骨格とし、プロテアーゼ RT 遺伝子部分が短い 2 つのサブタイプ B 断片からなる組換えウイルスであった。注射薬物乱用者 (IDU) の 40% に分布し、また性感染者の中にも数%見出され、またマレー、インド、中国系のいずれにも均しく分布している。昨年 1 月に国際的 HIV データベースより新型の組換え型流行株 CRF33_01B として正式承認された。わが国研究機関から発信される最初の CRF となった。

[Kok Keng Tee, Xiaojie Li, 納富香子, K.P.Ng, Adeeba Karulzamen. (マレーシア大医学部)、武部豊]

2. 中国東北部 (遼寧省) における HIV-1 感染症の分子疫学

中国雲南省や新疆ウイグル自治区、広西チワン族自治区のような中国における HIV 流行のエピセンターの辺縁部の低浸淫地域における HIV 感染症の様相を明らかにするために、そのモデル地域として中国東北部 (遼寧省) を選び、分子疫学研究を行った。その結果、多様な HIV-1 サブタイプと同定した。サブタイプ B' (49)、CRF01_AE (15)、CRF07_BC (8)、CRF08_BC, A1, B (5)、C、G の他に C, G, CRF05_AB, CRF06_cpx (各 1) を見出した。サブタイプ B' は過去の売血経験者 (Former plasma donor, FPD) と輸血による感染者のすべてにおいて見出され、このタイプのウイルスの強いファウンダー効果が示された。IDU には CRF07_BC, CRF08_BC の 2 種の組換え型流行株が見い出された。最も多様なウイルスサブタイプが見い出されたのは異性間接触による感染者で CRF01_AE, B', B, A1, CRF07_BC, CRF08_BC, C, G とさらに新しいタイプの組換えウイルスが見出され、この集団には中国およびアジアの他地域に由来する様々なウイルス群が流入していることが明らかになった。

[X Han, Hong Shang (中国医科大学第一病院エイズ研究センター)、Kok Keng Tee、武部 豊]

3. HIV-1 スーパー感染後にみられる組換えウイルスの急速な出現

昨年、HIV-1 スーパー感染の国内最初の症例を見出したが、経時的検体の組織的解析の結果、スーパー感染が疑われる時点の約 2 ヶ月後にもとのウイルス (resident virus) とスーパー感染したウイルス (superinfecting virus) 間の組換えウイルスが急速に出現し、時間と共にその割合が増加していくことを明らかにした。その様相は領域毎に異なり、nef 領域では最も急速に組換えウイルスに

置換されるのに対し、gag, pol 領域ではその置換速度はよりゆるやかであった。領域ごとの違いの原因は現時点では明らかでない。これらの知見は組換えウイルスの何らかの生物学的優位性を示すものである。

[武部 豊、横田侑子、Xiao-Jie Li、小泉寛和 (熊大エイズ学研究センター)、滝口雅文 (熊大エイズ学研究センター)、岡 慎一 (国立国際医療センターエイズ治療開発センター)]

4. 中国雲南省の HIV-1/HCV 共感染注射薬物乱用者における HCV 遺伝子型に関する分子疫学

中国雲南省の HIV 感染注射者注射薬物乱用者 (IDU) においては HCV 共感染が著しく高く、ほぼ 100% の共感染率を示す。そこで我々は HIV-1 の伝播経路を解析する補完的な手段で、共感染した HCV の遺伝子型に関する分子疫学研究を開始した。その結果、雲南省においては極めて多様な HCV 遺伝子型 (1b, 3a, 3b, 6a に加え経路不明のウイルスサブタイプが検出される) が存在し、中国の他地域と著しく異なる分布パターンを示すこと、特に西部地域は雲南省内の他地域とも異なる HCV 遺伝子型分布を示すことが明らかになった。HIV-1 サブタイプ分布との関連性に関して解析が進行中である。

[Xueshan Xia (昆明理工大)、Kok Keng Tee、武部豊]

5. 家族内感染例 NH3 に見出された高度薬剤耐性の発達機構への組換えの関与

HIV-1 の治療に用いられている抗ウイルス剤への耐性ウイルス株は、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い。耐性変異の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。我々は、RT 領域の様々な変異株に中立遺伝マーカーとして多数の制限酵素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検証している。制限酵素切断部位欠失クローン (NH1-dRS,210W,215Y) と、M41L, D67N, 挿入配列, T69I を持つ感染性クローン (NH1 - 41L, Ins69) を NP2-CD4-CCR5 細胞に共感染したところ、抗ウイルス剤非存在下では Ins69 と 210W の間の連鎖は感染 6 日 ~ 8 日で平衡に達し、組換えウイルスは in vitro では速やかに生成されることが示唆された。感染後 1 2 日以降では薬剤感受性遺伝子型の組換えウイルスが選択的に増加し、野生型ウイルスが高い適応度を持つことがわかった。一方、薬剤存在下では逆に、濃度依存的に多くの耐性変異

を持つ組換えウイルスが選択される様子が観察された。組換え体の遺伝マーカーを解析した結果、RT のこの領域（約 400bp）では組換えの乗換え点の分布は塩基長とほぼ比例関係にあり、組換えが極端に生じにくい領域は存在しなかった。

[椎野禎一郎・保科佳美・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 感染力価を迅速に測定する X4 および R5 に感受性を示す T 細胞系のレポーター細胞株 X4R5MaRBLE cell の樹立と実用化

ヒト T 細胞由来の細胞株 HPB-M(a) 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 の力価を定量する新たな細胞株 X4MaRBLE cell を樹立し薬剤感受性検査および新規薬剤スクリーニングなどに活用してきた。本年度はさらに R5 嗜好性 HIV に対しても感受性を付与するために CMV 制御の CCR5 発現遺伝子を組み込み X4R5MaRBLE cell を完成させた。これにより臨床分離株に対しても精度の高い感受性の評価が可能となった。

[千葉智子、三浦秀佳、滝澤万里、松田昌和、松田善衛、本多三男、杉浦 互]

2 . pseudotype HIV-1 を用いた簡便な薬剤感受性検査法の開発

HIV-1 感染者血液サンプルより HIV-1 を直接回収するのは、時間と費用を要するだけでなく、不可能な場合も多い。特に薬剤耐性を多数集積した増殖能力の低下したウイルスでは回収に失敗することが多いが、実はこのようなウイルスこそ薬剤耐性レベルの評価のため回収が求められているものである。このような背景から、我々は薬剤耐性に関与する遺伝子領域を、組み換えることにより、pseudotype HIV を作製し、簡便に薬剤耐性検査を行う技術の開発を行った。HXB2 を基本骨格に *pol* を *ccdB*、*env* を GFP、*nef* を *luciferase* で置換したベクターを作製した。感染者由来の HIV から *protase* と RT 領域を RT-PCR によって増幅し、In-Fusion PCR kit により簡便かつ迅速に患者由来の *pol* 遺伝子をもつ HIV クローンの作製方法樹立に成功した。VSVG を用いて pseudotype HIV を作製した。MT-2 および 293T 細胞への感染は、pseudotype HIV の感染量依存的な *luciferase* および GFP の発現を示した。また、抗 HIV 薬剤の存在下では、薬剤濃度依存的に発現が低下した。既知の抗 HIV 薬剤に対する耐性変異を持つ

pol 遺伝子を組み換えた pseudotype HIV は、野生型の *pol* 遺伝子より薬剤感受性が低下していた。Pseudotype HIV による簡便かつ高感度な薬剤感受性検査を完成させた。[藤野真之、松田昌和、西澤雅子、武田 哲、山本直樹、杉浦 互]

3 . 競合的 RT-PCR を用いた HIV-1 感染患者血漿中のウイルスコピー数の定量

発展途上国でのモニタリングシステムとして安価な患者血漿中ウイルスの定量の開発・実用化に取り組んだ。共同研究者の加藤等が開発した競合的 RT-PCR による測定法を用いてアンプリコア HIV-1 モニター-ver1.5 でウイルスコピー数を定量した患者検体を測定した結果、アンプリコアの定量値と良好な相関性を示した。しかし、一部の検体で定量結果の乖離も認められたことから、今後より広範囲の viral load を検出できるよう競合的 RT-PCR の系を改良し、また非 B サブタイプにも対応したプライマの開発についても検討を行っている。

[濱武牧子、西澤雅子、柿澤淳子、杉浦 互、加藤真吾(慶応大)]

4 . HIV-1 CRF08_BC 感染性分子クローンの構築とそのウイルス学的性質の解析

地域特異的に流行している HIV-1 サブタイプの感染性分子クローンを樹立することは、そのウイルス学的特性や予防・治療法の研究にとって有用である。既に樹立した 2 つの CRF08_BC 感染性分子クローン HH040NX4、NX22 のうち、前者は NP2/CD4/CCR5 細胞（以下 NP2/R5）でよく増殖し、後者は PHA で刺激した PBMC でよく増殖した。その特性を決定している領域を同定し、これらの組換えにより、分離株同様の細胞でも高い増殖能を有する、研究のツールとして有用な CRF08_BC 感染性分子クローン樹立を試みた。

2 つのクローンに共通な 4 種類の制限酵素認識部位で組換え体を作製し、得られたウイルスの増殖能を検討したところ、いずれの細胞でも *pol* 遺伝子のインテグラーゼ領域以前 (-4351 HXB2) が NX22 由来のクローンが高い増殖能を示した。*vpu* 遺伝子以降 (6189- HXB2) が NX4 由来のクローンで NP2/R5 での増殖が高まったが、PBMC では影響がなかった。*pol* 遺伝子のインテグラーゼから *vpu* 遺伝子の間 (4352 - 6188 HXB2) が NX4 由来のクローンは NP2/R5 でよく増殖するが、PBMC では逆にこの領域が NX22 由来であるクローンがよく増殖した。さらに 3 種類の制限酵素を用いてインテグラーゼから *vpu* 遺伝子の間の領域の組換え体を作製し同様に検

討した。NP2/R5 での増殖能はインテグラーゼの1アミノ酸が NX4 由来であることで高まった。PBMC では、vif 遺伝子の一部 (5221 - 5554 HXB) が NX22 由来のクローンがよく増殖した。これらを併せ持つ組換えクローンは、いずれの細胞においても他のクローンより最も高い増殖能を有していた。

本研究により、分離株同様、いずれの標的細胞においてもよく増殖する、研究のツールとして有用な CRF08_BC 感染性分子クローンが樹立できた。

[草川 茂、武部 豊]

5 HIV-1 サブタイプ B' 感染性分子クローンの樹立とその性状の解析

サブタイプ B' とサブタイプ B' を含むサブタイプ間組換え体は、東南アジア諸国や中国における主要な流行株である。さらに近年、中国河南省や湖北省における HIV-1 流行が、サブタイプ B' によるものであることが報告されるなど、アジアにおける HIV-1 流行において、非常に重要なサブタイプである。本年度、サブタイプ B' 分離株 B106 から感染性分子クローンを樹立し、そのウイルス学的性状の解析を行った。

最初に作製した感染性分子クローン B106_22 は、PBMC や CD4 と CXCR4 あるいは CCR5 を発現させた付着性細胞ではよく増殖するものの、分離株が感染できる T cell line やマクロファージでは増殖できなかった。T cell tropic ウイルスである NL432、マクロファージ tropic ウイルスである AD8 との組換えウイルスの解析により、この原因となる領域は、env V1 から V3 までの領域であることを特定した。新たにこの領域を増幅して得た PCR 産物と置換して得た 12 クローンのうち PBMC に感染性を有するものが9クローンあり、そのうち CCR5 のみをコレセプターとして使用する3クローンだけがマクロファージへの感染性を有していた。残り6クローンは CXCR4 と CCR5 の両方を使用し、PBMC でよく増殖したが、T cell line では3クローンのみが増殖した。T cell line、マクロファージ でよく増殖するクローン間で組換えウイルスの解析から、その指向性は V3 領域によって決定されていた。

一つのサブタイプ B' 分離株から、性質の異なる複数の感染性分子クローンが得られた。これらは、ウイルス学的研究や、予防・治療法開発のための道具として有用であると考えられる。

[草川 茂、武部 豊]

6 感染性クローンの樹立と方法論の改良

著しい多様性を呈する臨床株 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。本年度は HIV-1 全長ゲノム増幅に用いる PCR 酵素及び Primer 設計を考慮したところ従来よりも迅速に多数の感染性クローンを樹立することが可能になった。この方法論を本邦異性間感染で増加傾向が認められる CRF01_AE ウイルスとセンター第2研究グループで収集している薬剤耐性ウイルスに応用し総計 317 個に及ぶ多数の感染性分子クローンを樹立し、その内 87 個のクローンについて全ゲノム塩基配列を決定することが出来た。

[坂本優子、竹川奈穂、巽 正志]

(1) PCR 酵素選別による感染性クローン樹立の効率化

既に「HIV Trapping System」により感染性分子クローンが樹立できるようになったが、より効率的にするため市販されている High Fidelity, High Processivity, High Yield の PCR 酵素数種類を比較検討したところ、Roche 社の Pwo Master が最も高効率な感染性クローン樹立に適していた。しかしながら Pwo Mater によって増幅できない鋳型でも Stratagene 社の Herculase II Fusion DNA polymerase により効率的に Amplicon が得られるケースがあることが判明した。今後とも PCR 酵素の改良は進むものと期待されることから、Long PCR による「HIV Trapping System」はより有効になりうるものと考えられる。

[坂本優子、竹川奈穂、巽 正志]

(2) CRF01_AE 組換え体感染性分子クローンの樹立と解析

本邦では米国由来の subtype B が主に同性間性感染で感染拡大しているが、異性間性感染では CRF01_AE 組換え体が最も多数を占める。しかしながら CRF01_AE 組換え体の感染性分子クローンは限られている。今後も感染拡大の抑制が困難な現情勢から、その解析の基本となる数多くのクローン樹立が望まれる。1993年にタイ国で分離された5臨床株と邦人感染者から分離した1臨床株から総計 66 個の感染性クローンを構築した。各株から 1~2 クローンを選別し総計 6 クローン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たところ、全てのクローンは全長にわたり CRF01_AE にクラスターされた。これらのクローンは今後この組換え体の解析に有用であることが期待される。

[坂本優子、竹川奈穂、巽 正志、西澤雅子、杉浦 互]

(3) 本邦感染者由来 subtype B 感染性分子クローンの樹立

と解析

本邦で主に同性間性感染により感染が拡大している subtype B ウイルスの感染性分子クローンは昨年度報告したが、いまだ十分なクローン数には至っていない。そこで本センター第2研究グループに薬剤耐性試験を依頼された検体から、未治療で Japan Consensus と考えられる4検体を選別し Japan Reference Clone とするべく感染性クローンの樹立を引き続き試みている。「HIV Trapping System」により4検体より総計89クローンを樹立した。そのうち8クローンを選別して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たところ、全てのクローンは全長にわたり subtype B にクラスターされた。これらのクローンは今後の本邦における subtype B 解析に有用であることが期待される。[坂本優子、竹川奈穂、巽 正志、西澤雅子、杉浦 互]

(4) 本邦感染者における感染性分子クローンによる薬剤耐性獲得機序の解析

薬剤耐性ウイルスの出現は HIV 感染症治療において避けられない問題であるが、その耐性獲得の機序については不明な点が依然数多く残されている。高効率な感染性分子クローン樹立法を応用し、同一患者からの継時的なウイルス分離株から全長ゲノムを含んだ感染性分子クローンを複数個解析することにより新たな視野を広げる目的で解析を開始した。本年度は2名の患者から各々3ポイント総計201の感染性クローンを樹立し、そのうち各ポイント10~12クローンを選別し総計71クローンの全塩基配列を決定した。両ウイルスとも CRF01_AE 組換体であり、その pol 領域の薬剤耐性プロフィールは、予め Genotyping 法で予測した耐性変異の様々な組合せの多様性を示すクローンが含まれていた。耐性変異は治療経過に伴って蓄積する傾向が認められ、系統樹解析により各ポイントの一部の耐性ウイルスが生延びて次の Major なグループを形成することがクローンレベルで判明した。今後これらの感染性クローンによる各種薬剤耐性プロファイルを、薬剤治療歴と併せて解析しその耐性機序を解明していく予定である。

[坂本優子、竹川奈穂、巽 正志、松田昌和、西澤雅子、杉浦 互]

(5) Ghana で流行する HIV-1 の感染性クローンの樹立と解析

Ghana 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 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に分子基盤と

しての感染性分子クローンの樹立を試みている。昨年度に引き続き感染性分子クローンが得られなかった3臨床株について新たな Primer Set あるいは増幅酵素を試したところ、効率良く Amplicon が得られ感染性分子クローンが得られた。各株2クローン計8クローン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たところ、Heteroduplex Mobility Analysis(HMA)で subtype A に分類された2クローンは CRF02_AG 組換体であり、HMA は解析する領域を選別することが必要なことが判明した。また今回も昨年度に引き続き CRF02_AG 組換体の RT 領域前半に新たに subtype A が組み合わさったクローンと、さらに env gp120 中間部位に新たに subtype D の領域が組込まれた組換体を得られたことから、ガーナでは既に第2次、あるいは第3次の組換体が流行していることが明らかになった。

[坂本優子、竹川奈穂、巽 正志、徳永研三、N. Nii-Trebi (野口記念医学研究所、ガーナ)、佐多徹太郎(感染病理)]

(6) 各種 subtype/CRF 感染性分子クローンを用いた抗原・抗体同時測定系の感度試験標準パネルの作成

現在、本邦では HIV-1/-2 感染診断の1次スクリーニング検査は、各保健所などで導入されている即日検査に用いられるイムノクロマト法を除いて、ウィンドウ期をより短縮するため抗原・抗体同時測定系が導入されている。各社より各種の検査キットが市販されているが、抗体出現前の抗原陽性期を如何に感度良く検出できるかは多くの場合 Seroconversion Panel を購入して対応しているが、この Panel の由来する HIV-1 subtype は限られており、その数量もまた限度があるなど、その標準抗原が国内外で依然として整備されていない状況である。今回、我々がこれまで樹立してきた各種 subtype/CRF 感染性分子クローンが、これら抗原・抗体同時測定系の感度試験標準パネルとなりうるか、国内で市販されている検査キットを販売している検査会社の協力を得て、その感度測定の標準化を試みている。

[坂本優子、竹川奈穂、巽 正志、水落利明(血液・安全性研究部)]

7 HIV-1 感染価迅速測定細胞 MAGIC-5 と MAGIC-5/SEAP を用いた薬剤耐性試験法の実用化

HIV 感染価測定細胞株 MAGIC-5A 細胞と MAGIC-5/SEAP 細胞を応用した各種抗 HIV 薬に対する薬剤耐性試験法は患者耐性ウイルスの薬剤耐性を迅速簡便高感度にて測定できる。数年に亙りこの試験法の標準

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取り組んできた。この程 JST 評価委員会にて成功認定を受け、今年から実際の臨床応用へ向けて上市する段階になった。今後さらに HIV-1 Full-Genome 感染性クローンの効率的な樹立法と併せて、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より有効となるよう期待される。

[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]

8. エンベロープ膜融合能評価系の構築

新たな抗 HIV-1 薬剤として膜融合阻害剤が開発され臨床使用が開始されているが、他の阻害剤同様耐性株が報告されている。これらの変異体の表現型評価のため、Env による膜融合の定量的評価系の構築を進めている。昨年 T7RNA ポリメラーゼによるレポーター遺伝子の活性化による定量評価系を作成した。この方法は定量性には優れるが膜融合イベントからレポーター遺伝子の活性化までの間に十数時間を要することから膜融合の初期過程の評価には不適當である。この欠点を補うべくマーカー酵素の reconstitution を利用した初期過程解析系を構築中である。

[宮内浩典、松田善衛]

V. HIV ライフサイクルと宿主因子の研究

1. 抗 Vpr 抗体の評価と臨床応用に向けた研究開発

新たに作成した抗 Vpr マウスモノクローナル抗体 4 サンプルと抗 Vpr ウサギ抗血清 2 サンプルの評価を行った。Vpr 発現ベクターを HeLa 細胞と COS7 細胞に導入して Vpr タンパクを発現させ、開発中のこれらの抗体・抗血清の反応性について共焦点レーザー顕微鏡による Vpr タンパクの細胞内局在の染色パターンの観察と SDS-PAGE による解析を行った。その結果抗 Vpr マウスモノクローナル抗体 1 サンプルと抗 Vpr ウサギ抗血清 2 サンプルが Vpr に特異的に反応する事が明らかになった。また Vpr への特異性は低い細胞内で Vpr と同じ局在を示す未知のタンパクと結合する抗 Vpr マウスモノクローナル抗体 1 サンプルを見出し、現在このタンパクを同定中である。このタンパク同定することによって、これまで知られていない Vpr の機能を明らかに出来る可能性が期待される。また Vpr して特異性を持つ抗体・抗血清については、これらを用いて患者由来の血漿サンプル中の Vpr を測定し臨床応用への可能性を検討している。

[西澤雅子、山本直樹、杉浦 互、矢野竹男(オリエンタル酵母工業株式会社)]

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 の増殖能力の低下機序について解析を行った。その結果、プロテアーゼの基質である Gag の切断部位変異とそれ以外の部位に集積してくる変異が共同して増殖能力の回復に作用することを明らかにした。さらに、増殖能力の低下が粒子形成に及ぼす影響を形態学的に解析した。その結果、共焦点顕微鏡での観察からは増殖能力の低下した HIV-1 では細胞内における Gag の輸送が障害され、Gag が長く細胞内に貯留することを明らかにした。この事実は RI 標識した Gag の動態によっても確認された。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。本年度はさらに機序を解明するため Gag の一部を欠損させたクローンを幾つか作成し、細胞内における Gag の動きについて解析を行った。[レイミント吉田、杉浦 互、富田康浩、佐藤裕徳(遺伝子ゲノム解析センター)]

3. エンベロープタンパク質サブユニット gp41 の構造・機能関連

HIV-1 ウイルス感染の初期必須過の一つであるウイルスエンベロープタンパク質による膜融合は主として gp41 部分によって担われている。われわれは gp41 の膜貫通部分(MSD)のエンベロープタンパク質機能への寄与を明らかにするために MSD 全長にわたってアラニン挿入変異体を作成し膜融合を指標に評価を行った。その結果ヘリックス相互作用に関与すると想定される GXXXG モチーフとその下流にある非常によく保存されたアルギニン残基周辺への挿入変異により膜融合が顕著に低下することを明らかにした。エンベロープタンパク質の細胞内分布の解析によりこれらの変異体では Env の細胞内運搬に変化が見られることがわかった。この結果から MSD は Env の細胞内動態および生合成にも寄与することが示唆された。

[宮内浩典、駒野 淳、村上 努、山本直樹、D.M. Engelman (Yale 大学)、松田善衛]

4. LC-MS/MSによるHIV-1複製に関する宿主因子の解析

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。われわれは質量分析法を用いたブ

ロテオミクス的手法を用いて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。我々はFLAGタグを付加したHIV-1ウイルスタンパクMatrixを発現させ、これ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し、現在HIV-1複製への影響を探索中である。これらは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。

[村上 努、篠田知宏、宮内浩典、駒野 淳、高橋信弘(東京農工大)、松田善衛]

5. CXCR4の空間的発現制御に関する研究

HIV-1はCXCR4をレセプターとして細胞に感染する。レセプターの発現動態を制御すれば、ウイルス感染を抑制することが可能となる。我々はCXCR4がどのようなメカニズムで細胞内を輸送され、細胞表面に達するのかを解析した。その結果CXCR4のcytoplasmic domainには、リガンド非依存的に細胞表面から効率的に細胞内へと輸送されるために必要なシグナル配列Ser-Asp/Glu-Serが存在すること、これがリガンド依存的な輸送シグナルと異なることを発見した。本研究はエイズウイルス感染制御法開発に資するだけでなく、CXCR4によるがん細胞の転移メカニズムの解明とその抑止法の開発、CXCR4の遺伝的変異をもつWHIM症候群の病体解明にも大きく貢献することが期待される。

[駒野 淳、貝の瀬由成、青木 徹、浦野恵美子、二橋悠子、宮内浩典、磯貝まや、松田善衛]

6. P-TEFb(CyclinT/CDK9複合体)の活性化を抑制する宿主因子HEXIM1によるHIV-1複製制御

HIV-1の増殖においてTatによるLTRの転写活性化は重要な鍵となる。Tatによる転写開始と転写伸長にはCDK9とcyclinT1からなるP-TEFbが必要であり、Tat依存的な転写はHIV-1の複製を制御する治療の標的のひとつになると考えられている。HEXIM1はP-TEFbと7SKsnRNAの結合させることによってP-TEFbのinhibitorとなることが明らかとなった。そこで我々はP-TEFbの宿主由来の阻害因子であるHEXIM1が培養細胞においてHIV-1の複製にどのような影響を与えるのかを検討した。その結果、HEXIM1の一過性発現系においてHEXIM1はLTRからのTat依存的な転写を阻害した。HEXIM1の発現は細胞増殖に影響を与えなかった。また、HEXIM1を恒常的に発現したCEM, SUP-T1, MOLT-4, Jurkat細胞はGFPのみを発現しているコントロール細胞と比較してウイルス複製を強く抑制した。この抑制はHIV-1に特異的で、HSV-1,

Adenovirus, vaccinia virusの複製には影響を及ぼさなかった。HEXIM1はHIV-1の複製を負に制御する宿主因子であり、エイズ治療において新規の標的となるかもしれない。[清水佐紀、浦野恵美子、二橋悠子、宮内浩典、磯貝まや、松田善衛、納富香子、小野木利成、武部 豊、山本直樹、駒野 淳]

VI. HIV 感染動物モデルの開発に関する研究

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。一昨年までに、2 頭のサルにおいて 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ることを確認している。今回も同じ 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。血液そのものに 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、一昨年の 2 頭と併せると、 4×10^6 個の感染細胞を接種した 4 頭全てと 4×10^5 個の感染細胞を接種した 2 頭全てが感染した。感染が成立した殆どのサルで、典型的なウイルス血症動態と重篤な CD4 細胞消失が確認されたが、 4×10^5 個の感染細胞を接種した 1 頭は一過性のウイルス血症と一過性の CD4 細胞減少が見られたのみであった。 4×10^4 個の感染細胞を接種した 2 頭では感染が成立しなかった。全血に浮遊させる直前の細胞洗浄液中ウイルス量検査の結果から、接種源中に残存する Cell free virus の感染力価は 0.1MID₅₀(50%サル感染量)以下と推定された。以上の結果からこの SHIV 感染細胞のサルへの感染力価、1MID₅₀ は 4×10^5 個と暫定的に評価した。今回確立された 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。

[仲宗根正、兼清優、吉野直人、山本直樹、網康至(動物

管理室)]

2. ヒト PBMC 移植 NOD/SCID マウスを用いたマンノース結合レクチン (MBL) の抗 HIV 効果

自然免疫に影響する液性因子としてケモカインと動物レクチンが知られている。血清中に認められる動物レクチンは、その性状や産生機構の解析が進められ、生物学的に感染症のコントロールにも寄与していることが示唆されてきた。その一つである MBL は、HIV に対するその糖結合特異性から考えて広範な HIV ウイルスのコントロールに寄与する可能性を有している。昨年までの我々の研究により、MBL や種々の組換え MBL の抗 HIV 活性を *in vitro* の PBMC を用いた中和アッセイでの検討を行った結果、各 MBL 産生クローンで HIV 感染抑制活性に差はあるが HIV 感染防御能を確認した。今年度、生体内での MBL の効果を明らかにするために、ヒト PBMC を移植した hu-PBL-NOD/SCID マウスに HIV-1 臨床分離株を腹腔接種する HIV/AIDS 小動物評価系を用いて、MBL の抗 HIV 活性を評価した。組換え MBL は 2-12 株、MO1P05 株の 2 種類を用いて各々をマウスに単回投与した後、血中ウイルス量を測定しウイルス感染に対する防御反応を検討した。その結果、MBL は HIV の中和抗体の受動免疫に比べて、感染を完全に阻止することはできなかったが、明らかにウイルスの増殖を抑制した。従って、*in vitro* の中和実験の結果を加味すると、広範囲の HIV に対し *in vivo* でも機能することが示唆された。今後、さらに HIV 感染モデル動物を用いて抗 HIV 活性の高い組換え MBL 新規株を選別し、組換え MBL の HIV 治療薬としての可能性を探索する。

[堀端重男、網康至(動物管理室)、大谷克城(旭川医科大学)、坂本隆志(扶桑薬品)、岸雄一郎(扶桑薬品)、木佐木博(扶桑薬品)、鈴木定彦(北海道大学)、駒野淳、山本直樹、若宮伸隆(旭川医科大学)、本多三男]

3. ヒト造血幹細胞移植 NOG マウスを用いた HIV-1 感染モデルの開発

NOD/SCID/gamma(c)(null)マウス (NOG マウス) は、ヒト造血幹細胞の生着に優れ、従来 SCID マウスでは困難であったヒト T 細胞を含めた各種ヒトリンパ球の発生が再現できる。このヒト型マウスを用い、HIV-1 感染・エイズ発症の詳細な研究、そして新規抗エイズ薬やワクチン開発に使用可能な新しいモデルマウス開発に取り組んでいる。HIV-1 感染実験により、R5 および X4 HIV-1 に効率よく感染し、感染後 3 ヶ月以上にわたって血中に高いウイルスコピー数が持続する慢性感染系が確立した。

末梢血、脾臓中の CD4 陽性 T 細胞の減少、胸腺細胞の破壊がみられ、なかには HIV-1 特異抗体を産生する個体があった。以上の結果から、ヒト造血幹細胞移植マウスは、エイズ発症機序の研究や新規治療法の開発に応用可能と考えられる。

[渡辺哲、寺嶋一夫、太田信頼、堀端重男、山本直樹、本多三男]

4. 疾患解析モデルとしてのモルモット有用性の確立

感染症研究所では、J 系の確立などモルモットの疾患モデルとしての有用性に着目し、ワクチン効果判定に応用してきた。しかし、解析方法の不備により研究は限られたものになっている。本研究では、免疫反応の解析を可能にするために、フローサイトメーターを用いたはく血球分画の同定法、リンパ球亜型の特性、さらにモルモット特有の細胞室内封入対を有するクローフ細胞の解析をおこない、モルモット NK 細胞の同定法とその細胞の特性を細胞表面マーカーと生物活性から明らかにした。

[滝澤万里、千葉丈(東京理科大学)、山本直樹、本多三男]

5. モルモット BCG 接種モデルを用いた糖脂質抗原に対する免疫応答の解析

BCG 免疫モルモットの PBMC を *in vitro* で BCG または結核菌由来の trehalose 6,6'-dimycolate (TDM) と lipoarabinomannan (LAM) で刺激し、IFN-gamma SFCs を ELISPOT で測定した。BCG 免疫後 1 年のモルモットでは、TDM で刺激した場合、PPD と同様に IFN-gamma SFCs の増加が見られた。しかし、LAM で刺激した場合には IFN-gamma SFCs の明らかな増加は見られなかった。これらのことから、BCG 免疫のコートファクターとしての TDM は、モルモット BCG 免疫において、T 細胞レベルで IFN-gamma を誘導する能力を持っている事を明らかにした。現在 BCG 接種直後より、ELISPOT やリンパ球増殖反応を行い、経時的に TDM と LAM に対する細胞性免疫を観察している。また、結核菌の噴霧感染実験を用いた感染防御能についても検討中である。

[相澤志保子、山本直樹、本多三男]

6. マウス HIV 感染モデルを用いた HIV 感染症治療法の開発

NOD-SCID common 鎖欠損 SCID マウスの脾臓にヒト末梢血リンパ球を移植した hu-PBL-SCID マウス/HIV 感染モデルを構築し、HIV 抗原曝露樹状細胞による特異的免疫能の賦与と感染症免疫療法としての可能性について検討を加えたヒト PBMC の CD14 陽性細胞分画より

高い純度の樹状細胞を誘導し、HIV 抗原に曝露の後、マウス脾臓内に注入した。数週間の間隔で感作を行った後、誘導された特異的細胞性免疫および液性免疫について *in vitro* での評価を行っている。

[濱武牧子、西澤雅子、松田昌和、巖 一、武田 哲、杉浦 互]

7. 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

同一系統の高病原性ウイルス材料より、病原性の異なる2種類の分子クローンSHIV-89.6P clone64 (C164)とSHIV-C2/1 KS661 (C2/1) が得られている。両者共にマカクザルに接種後、強度のウイルス血症を引き起こすが、後者がエイズ様症状を惹起するのに対して、前者は3年以上経過観察してもエイズ様症状は見られない。両ウイルス間に見られる病原性の差を規定するゲノム領域を同定するため、両ウイルス間で種々の組換えウイルスを作製し、それらの性状を培養細胞感染試験、及びマカクザル接種試験にて詳細に調べた。

その結果、pol遺伝子内の変異とenv gp41遺伝子内の変異が病原性に関わっていることが示唆された。両方の変異を持つC2/1は強い病原性を示すが、どちらか一方がC164型になると病原性が弱くなることが明らかになった。また、C164は安定な低病原性を示すが、ここにC2/1型pol遺伝子を導入すると、ウイルス接種ザル中でenv gp41のC164→C2/1型変換が起こり、高病原性を獲得したウイルスが出現することが観察された。C2/1型env gp41は病原性発現に必須と考えられる。なお、親ウイルスのSIVmac239のtRNAプライマー結合部位にはそのtRNA (リジンtRNA)と相補的でない部分が一つあるが、本研究において、種々の組換えSHIVの*in vivo*及び*in vitro*感染時の遺伝子変化を追うと、何れウイルスもリジンtRNAと相補的な塩基に収斂することが明らかになった。

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

8. 糖鎖欠失 SIV (Δ5G) 感染ザルにおける抗体誘導の解析

HIV/SIV の Env(スパイクタンパク)は多数の糖鎖に覆われている。また HIV/SIV 感染では有効な中和抗体が誘導されないが糖鎖の一部を欠失させた変異ウイルスは中和されやすくなる。さらに複数の糖鎖を欠失した糖鎖欠失変異ウイルスは宿主により感染が制御されることから、その原因として有効な中和抗体の誘導が報告された。我々は SIV239 を元に新たに5糖鎖欠失変異ウイルス

(Δ5G) を作成しアカゲザル感染において感染制御されることを見いだした。そこでΔ5G 感染制御における液性免疫の役割について解析した。中和抗体誘導の解析の結果、5頭中4頭にIC50(50%感染阻害)で65~2550倍の中和抗体価が認められたが、感染制御に有効だと考えられるIC90(90%感染阻害)では2頭のみが100~500倍の中和抗体価を示しただけであった。さらに中和抗体が検出されたのは血中ウイルスRNA量がピーク時の1000~10000分の1(100~1000コピー/ml)に低下した感染後8~12週であった。これら結果はΔ5G 感染の初期感染後の抑制における中和抗体の役割を支持しなかった。しかしELISA 抗体誘導の解析からは、Δ5G 感染ザル特異的に糖鎖欠失部位の近傍のリニアエピトープ(V1/V2領域)を認識する抗体がすべてのザルに感染後3~4週をピークに検出された。この抗体はΔ5G ウイルス粒子に結合することが可能であったが、中和抗体ではなかった。しかしΔ5G ウイルス粒子結合能が高かったザルはその後中和抗体誘導がザルであった。以上の結果から、これまでに報告されている知見と同様に、糖鎖はEnvの抗体エピトープを遮蔽しており、それを欠失することによりΔ5G 感染においてΔ5G 特異的抗体が誘導された。しかし中和抗体誘導は個体差が大きく半数以下の個体でのみ誘導されたことから宿主因子等のウイルスの性質以外の因子が関与することが示唆された。糖鎖欠失ウイルスの感染制御には中和抗体誘導以外の機序が推測された。

[杉本智恵、森 一泰]

9. 糖鎖欠失ウイルス (Δ5G) の初期感染の解析

糖鎖欠失 SIV (Δ5G) の弱毒化のメカニズムを解明するため、アカゲザルにおけるΔ5G とその親株であり高病原性の SIV239 の初期感染を比較解析した。免疫染色法による感染組織における感染細胞の同定と各組織から分離したリンパ球中の SIV proviral DNA の定量により、感染後9日目において、SIV239 感染ザルでは腸管粘膜組織、全身性リンパ器官において高い感染が認められた。しかしΔ5G 感染ザルでは腸管以外の組織での感染は低かった。12-14日後、SIV239 感染ザルでは引き続きすべてのリンパ組織で感染が認められたが、Δ5G 感染ザルでは腸管での感染は低下し、全身性リンパ組織での感染も低かった。各組織から分離したリンパ球を用い、flowcytometry により CD4 T 細胞の memory 細胞分化について解析した。初期感染による CCR5+ memory CD4 T 細胞の減少は SIV239 感染で顕著であった。Δ5G 感染でも程度は低い減少が確認された。しかし central memory (CD28+CD95+) CD4 T 細胞の減少は SIV239 感染のみで観察され、Δ5G

感染では維持されていた。以上の結果から、SIV239 感染と比較して、 $\Delta 5G$ 感染では全身性リンパ組織への感染の拡大が低いこと、感染組織である腸管において central memory CD4 T 細胞が維持されていることが示された。central memory CD4 T 細胞はエイズウイルスに対する防御免疫誘導に重要であることから、 $\Delta 5G$ の弱毒化との関連が示唆された。また、これらの原因として $\Delta 5G$ の感染標的 CD4 T 細胞が SIV239 と異なる性質を持つ CD4 T 細胞である可能性が推測された。

[杉本智恵、森 一泰]

10. 新規糖鎖欠失ウイルスの性質とアカゲザルでの感染

糖鎖欠失 SIV ($\Delta 5G$) は *in vitro* におけるウイルス学的性質として、マクロファージ指向性、CD4 非依存性、中和抗体感受性を示す。これらの性質とアカゲザル感染における弱毒化との関連性を調べるため、新たな糖鎖欠失 SIV を作成した。新規の糖鎖欠失 SIV を以下に示す。(1) $\Delta 5G$ -v1: $\Delta 5G$ の 5 箇所の糖鎖欠失のうち 1 箇所 (171 番目のアミノ酸残基の糖鎖欠失を 71 番目のアミノ酸残基の糖鎖欠失に変換) が異なる 5 箇所の糖鎖欠失を持つ。マクロファージ指向性を示さず、 $\Delta 5G$ 中和抗体に対する感受性を示さない。(2) $\Delta 5G$ -v2: $\Delta 5G$ の 5 箇所の糖鎖欠失のうち 1 箇所 (171 番目のアミノ酸残基の糖鎖欠失を 377 番目のアミノ酸残基の糖鎖欠失に変換) が異なる 5 箇所の糖鎖欠失を持つ。マクロファージ指向性は示さないが、 $\Delta 5G$ 中和抗体に対する感受性を示す。(3) $\Delta 3G$ -234: $\Delta 5G$ の 5 箇所の糖鎖欠失のうち 3 箇所の糖鎖欠失のみを持つ。 $\Delta 5G$ と同等のマクロファージ指向性、CD4 非依存性、中和抗体感受性を示す。新たな糖鎖欠失変異 SIV をそれぞれ 3 頭のアカゲザルに静脈内接種した。plasma viral load では、いずれのウイルス感染も感染ピークは感染後 2 週目で、 $10^6 \sim 10^7$ コピー/ml であった。その後の viral load の低下に若干の差があり、 $\Delta 5G$ の低下が最も早く、 $\Delta 3G$ -234 の低下が最も緩やかであった。しかし、少なくとも感染後 20 週までにはどのウイルス感染でもすべてのサルで viral load が 1000 コピー/ml 以下に制御された。この結果から、糖鎖欠失 SIV の感染制御について、糖鎖数は若干の関与が認められたが、ウイルスの性質 (マクロファージ指向性、CD4 非依存性、 $\Delta 5G$ 中和抗体に対する感受性) の関与は確認されなかった。

[杉本智恵、森一泰]

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 17 年度の検体数は 136 検体 (hemophilia: 105・その他の感染: 31) で、そのうち陽性検体は 23 検体 (hemophilia: 14・その他: 9) であった。2006 年 7 月時点で 4,258 検体 (hemophilia: 3,037・その他: 1,221)、そのうち陽性検体は 894 検体 (hemophilia: 629・その他: 265) 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、堀端重男、服部真一郎、本多三男]

2. エイズ長期未発症患者の HIV の遺伝子学的解析

日本の血友病 HIV 感染者の中に十数年もの間 HIV 感染をコントロールし、AIDS を発症しないという超 AIDS 長期未発症患者 (Long-Term non-progressors: LTNPs) が知られている。しかしながら、その機序は解明されていない。本研究ではそのような症候を示す要因、特にウイルス遺伝子に着目し、その要因を特定し HIV/AIDS ワクチンへの応用を検討した。はじめに、HIV 感染時において重要であると考えられる HIV Env V3 領域の遺伝子解析を行った結果、LTNP 群と非 LTNP 群の間には有意差は見られなかった。更に、構造蛋白遺伝子や調節蛋白遺伝子にも広げて遺伝子と生体細胞を用いた免疫応答能の相関を検討する。

[服部真一郎、照沼 裕(日本バイオセラピー研究所)、三間屋純一(静岡県立子ども病院)、山本直樹、本多三男]

VIII. その他

1. HIV 感染症統合データベースの運用

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 18 年 3 月末現在、DDBJ の HIV 遺伝子

DB (135,338 件)に加えて、提供 HIV 感染者 572、ウイルス分離解析数 3,669、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]

2. 高度のゲノム多様性をもつ RNA ウイルスに対する至適 siRNA 設計アルゴリズムの開発

HIV、HCV に代表される RNA ウイルスでは高いゲノム多様性のため、siRNA 配列の選択が容易でない。そこで我々はデータベースに登録されたウイルスゲノムをもとに、ウイルス配列に高度に保存され、かつ siRNA として高い活性が期待され、ヒト遺伝子に対してオフ・ターゲット効果が特に少ないと予想される配列を、網羅的に検索するプログラム (siVirus) を開発した。

[内藤雄樹(東大理)、納富香子、磯貝まや、小野木利成、程久美子(東大理)、西郷 薫(東大理)、武部 豊]

3. 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 B 型肝炎罹患率も判明してきた。そこでこれまでに得られている血清検体より B 型肝炎の分子疫学的解析を行った。その結果 5 検体の全遺伝子配列と 7 検体の S 領域の遺伝子配列を同定した。その結果すべての株はゲノタイプ E で在る事が判明した。

[石川晃一、ガーナ野口研究所]

国際協力関係業務

I. JICA との共催による HIV-1 診断技術講習(平成 17 年 6 月 20 日-7 月 29 日 第 3 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)

世界的に拡大を続けている HIV-1 感染、AIDS 発症の予防のためには、確固とした診断技術に基づいた HIV-1 の蔓延状況の正確な把握が必須である。従来 HIV-1 の感染診断は感染の有無を問う血清学的診断が中心であったが、HIV 感染が長期にわたることやウイルスの変異原

性が高いことから、感染ウイルスの質、量を含めた診断法の重要性が高まりつつある。感染の中心となっている第三世界でも近年では抗ウイルス化学療法が可能となり、PCR 法に基づいた質的診断が重視されるようになってきている。しかしこれらの国の多くではこれらの診断技術がよく確立されていないのが現状である。これらの状況に対応するため当センターでは JICA との共催により第三世界の研修員を対象に HIV-1 の感染診断のための技術講習コースを毎年 1 回開催している。過去 2 フェーズ(各フェーズ 5 年)に渡って血清診断を中心とした研修を行ってきたが、上記の核酸に基づいた診断技術への需要に答えて、平成 15 年度からは「HIV 感染者のケアとマネジメントのための高度診断技術」と名称を改め PCR や塩基配列解析などを重視した研修を行っている。平成 17 年度にはエチオピア、フィジー、ケニア、ラオス、マレーシア、ミャンマー、パプアニューギニア、セーシェル、タンザニア、ヴェトナム、ザンビアの各国 1 名(計 11 名)の研修員を対象に 6 週間にわたって村山分室研修棟を中心として技術研修を行った。研修内容は診断に必要な関連分野の講義、診断技術実習、施設訪問等を組み合わせたもので、実習は小グループ制で行った。また研修時期を神戸で開催された ICAAP に合わせることで研修員達が世界の HIV 感染、AIDS 動向の知見も学べるよう配慮した。研修後の評価では研修員から研修の有用性について高い評価を得た。

[松田善衛、本多三男、仲宗根正、杉浦 互、西澤雅子、藤野真之、武田 哲、武部 豊、椎野禎一郎、草川 茂、巽 正志、阪井弘治、鈴木寿子、石川晃一、森 一泰、村上 努、駒野 淳、山本直樹、杉山和良(バイオセーフティ管理室)、佐多徹太郎(感染病理部)、木村幹男(感染症情報センター)、大山卓昭(感染症情報センター)、岡 慎一(国立国際医療センター)、若杉なおみ(国立国際医療センター)、畢 秀瓊(国立国際医療センター)、増田道明(獨協医科大学)、加藤真吾(慶應義塾大学)、小柳義夫(京都大学)、前村大成(東京都西赤十字血液センター)、吉野直人(岩手医科大学)]

II. その他

1. 創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業外国人研究者招へい(平成 17 年 4 月 23 日-5 月 2 日)[杉浦 互]

2. JICA「熱帯医学研究コース」(長崎熱帯医学研究所)講師(平成 17 年 5 月 23 日)[武部 豊]

3. 結核予防会「アジア地域エイズ専門家研修」講師(平

成 17 年 6 月 3 日) [山本直樹]

4. 「第 4 回アジア・太平洋薬学生会議スタディーツアー」
講師 (平成 17 年 8 月 25 日) [武部 豊]

5. JICA 「ナイジェリアワークショップ」講師(平成 17
年 8 月 30 日-9 月 1 日) [杉浦 互]

研修業務

I. 第 16 回 HIV 検査法 (PCR 法等) 技術研修会 (平成 17 年 10 月 5 日-7 日)

都道府県・政令市・特別区の地方衛生研究所及びエイズ治療の地方ブロック拠点病院等の検査従事者を対象とした HIV 検査法 (PCR 法等) を用いた HIV 感染症の診断技術研修会を行った。全国の地方衛生研究所等への普及と標準化を図り、わが国における検査体制の充実を図ることを目的とする。

[杉浦 互、武部 豊、松田善衛、草川 茂、石川晃一、西澤雅子、藤野真之、武田 哲、松田昌和、山本直樹、今井光信(神奈川県衛生研究所)、加藤真吾(慶應義塾大学)、瀧永博之(国立国際医療センター)]

発表業績一覽

I. 誌上発表

1. 欧文発表

- 1) Watanabe M, Dewan MZ, Okamura T, Sasaki M, Itoh K, Higashihara M, Mizoguchi H, Honda M, Sata T, Watanabe T, Yamamoto N, Umezawa K, Horie R: A novel NF-kappaB inhibitor DHMEQ selectively targets constitutive NF-kappaB activity and induces apoptosis of multiple myeloma cells in vitro and in vivo. *Int J Cancer* 114: 32-38, 2005.
- 2) Wiriyarat W, Sukpanichnant S, Sittisombut N, Balachandra K, Promkhatkaew D, Butraporn R, Suttent R, Boonlong J, Matsuo K, Honda M, Warachit P, Puthavathana P: Specific immune response and pathological findings in BALB/c mice inoculated with recombinant BCG expressing HIV-1 antigen. *Asian Pac J Allergy Immunol* 23: 41-51, 2005.
- 3) Usami O, Xiao P, Ling H, Liu Y, Nakasone T, Hattori T: Properties of anti-gp41 core structure antibodies, which compete with sera of HIV-1-infected patients. *Microbes Infect* 7: 650-657, 2005.
- 4) Dewan MZ, Watanabe M, Ahmed S, Terashima K, Horiuchi S, Sata T, Honda M, Ito M, Watanabe T, Horie R, Yamamoto N: Hodgkin's lymphoma cells are efficiently engrafted and tumor marker CD30 is expressed with constitutive nuclear factor-kappaB activity in unconditioned NOD/SCID/gammac(null) mice. *Cancer Sci* 96: 466-473, 2005.
- 5) Xin KQ, Jounai N, Someya K, Honma K, Mizuguchi H, Naganawa S, Kitamura K, Hayakawa T, Saha S, Takeshita F, Okuda K, Honda M, Klinman DM, Okuda K: Prime-boost vaccination with plasmid DNA and a chimeric adenovirus type 5 vector with type 35 fiber induces protective immunity against HIV. *Gene Ther* 12: 1769-1777, 2005.
- 6) Kanekiyo M, Matsuo K, Hamatake M, Hamano T, Ohsu T, Matsumoto S, Yamada T, Yamazaki S, Hasegawa A, Yamamoto N, Honda M: Mycobacterial codon optimization enhances antigen expression and virus-specific immune responses in recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin expressing human immunodeficiency virus type 1 Gag. *J Virol* 79: 8716-8723, 2005.
- 7) Ami Y, Izumi Y, Matsuo K, Someya K, Kanekiyo M, Horibata S, Yoshino N, Sakai K, Shinohara K, Matsumoto S, Yamada T, Yamazaki S, Yamamoto N, Honda M. Priming-boosting vaccination with recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin and a nonreplicating vaccinia virus recombinant leads to long-lasting and effective immunity. *J Virol* 79: 12871-12879, 2005.
- 8) van Ginkel FW, Jackson RJ, Yoshino N, Hagiwara Y, Metzger DJ, Connell TD, Vu HL, Martin M, Fujihashi K, McGhee JR: Enterotoxin-based mucosal adjuvants alter antigen trafficking and induce inflammatory responses in the nasal tract. *Infect Immun* 73: 6892-6902, 2005.
- 9) Yan H, Mizutani TC, Nomura N, Takakura T, Kitamura Y, Miura H, Nishizawa M, Tatsumi M, Yamamoto N, Sugiura W: A novel small molecular weight compound with a carbazole structure that demonstrates potent human immunodeficiency virus type-1 integrase inhibitory activity. *Antivir Chem Chemother* 16: 363-373, 2005.
- 10) Ueda T, Myint L, Nishizawa M, Matsuda M, Sugiura W: Analysis of interference and co-evolution between protease inhibitor resistant mutations and gag mutations. *Antivir Ther* 10:s116, 2005.

- 11) Hasegawa N, Sugiura W, Matsuda M, Mogushi K, Tanaka H, Ren F: Inference of evolutionary forces driving HIV-1 drug-resistance acquisition under HAART using longitudinal HIV-1 protease gene samples. *Antivir Ther* 10:s114, 2005.
- 12) Shiomi K, Matsui R, Isozaki M, Chiba H, Sugai T, Yamaguchi Y, Masuma R, Tomoda H, Chiba T, Yan H, Kitamura Y, Sugiura W, Omura S, Tanaka H: Fungal phenalenones inhibit HIV-1 integrase. *J Antibiot* 58: 65-68, 2005.
- 13) Ode H, Ota M, Neya S, Hata M, Sugiura W, Hoshino T: Resistant mechanism against nelfinavir of human immunodeficiency virus type 1 proteases. *J Phys Chem B* 109: 564-574, 2005.
- 14) Kantor R, Katzenstein DA, Efron B, Carvalho AP, Wynhoven B, Cane P, Clarke J, Sirivichayakul S, Soares MA, Snoeck J, Pillay C, Rudich H, Rodrigues R, Holguin A, Ariyoshi K, Bouzas MB, Cahn P, Sugiura W, Soriano V, Brigido LF, Grossman Z, Morris L, Vandamme A-M, Tanuri A, Phanuphak P, Weber JN, Pillay D, Harrigan PR, Camacho R, Schapiro JM, Shafer RW: Impact of HIV-1 subtype and antiretroviral therapy on protease and reverse transcriptase genotype : results of a global collaboration. *PLoS Med* 2: 325-337, 2005.
- 15) Kondo M, Shima T, Sudo K, Nishizawa M, Iwamuro S, Okabe T, Takebe Y, Imai M: Identification of attenuated HIV-1 CRF01_AE variant associated with slow disease progression due to gross genetic alterations in the *nef*-LTR sequences. *J Inf Dis* 192: 56-61, 2005.
- 16) Takamura S, Matsuo K, Takebe Y, Yasutomi Y: Ag85B of mycobacteria elicits effective CTL responses through activation of robust Th1 immunity as a novel adjuvant in DNA vaccine. *J Immunol* 175: 2541-2547, 2005.
- 17) Li X-J, Kusagawa S, Xia X, Yang C, Wang Q, Yokota Y, Hoshina Y, Onogi T, Nohtomi K, Imamura Y, Shiino T, Yang R, Yamamoto N, Ben K, Takebe Y: Molecular epidemiology of the heterosexual HIV-1 epidemic in Kunming, Yunnan Province, China, suggests origin from the local IDU epidemic. *AIDS Res Hum Retroviruses* 21 (11): 977-980, 2005.
- 18) Miyauchi K, Komano J, Yokomaku Y, Sugiura W, Yamamoto N, Matsuda Z: Role of the specific amino acid sequence of the membrane-spanning domain of human immunodeficiency virus type 1 in membrane fusion. *J Virol* 79(8): 4720-4729, 2005.
- 19) Komano J, Futahashi Y, Urano E, Miyauchi K, Murakami T, Matsuda Z, Yamamoto N: The interaction of HIV-1 with the host factors. *Jpn J Infect Dis* 58(3): 125-130, 2005.
- 20) Mori K, Sugimoto C, Ohgimoto S, Nakayama E, Shioda T, Kusagawa S, Takebe Y, Kano M, Matano T, Yuasa T, Kitaguchi D, Miyazawa M, Takahashi Y, Yasunami M, Kimura A, Yamamoto N, Suzuki Y, Nagai Y: Influence of glycosylation on the efficacy of an Env-based vaccine against SIV_{mac239} in a macaque AIDS model. *J Virol* 79: 10386-10396, 2005.
- 21) Barnor JS, Miyano-Kurosaki N, Yamaguchi K, Sakamoto A, Ishikawa K, Yamamoto N, Osei-Kwasi M, Ofori-Adjei D, Takaku H: The middle to 3'end of the HIV-1 vif gene sequence is important for vif biological activity and could be used for antisense oligonucleotide targets. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 24: 1745-1761, 2005.
- 22) Yoshida A, Tanaka R, Kodama A, Yamamoto N, Ansari AA, Tanaka Y: Identification of HIV-1 epitopes that induce the synthesis of a R5 HIV-1 suppression factor by human CD4+ T cells isolated from HIV-1 immunized hu-PBL SCID mice. *Clin Dev Immunol* 12(4): 235-242, 2005.
- 23) Dewan MZ, Terunuma H, Ahmed S, Ohba K, Takada M, Tanaka Y, Toi M, Yamamoto N: Natural killer cells in breast cancer cell growth and metastasis in SCID mice. *Biomed Pharmacother* 59 Suppl 2:S375-379. Review, 2005.
- 24) Tamamura H, Esaka A, Ogawa T, Araki T, Ueda S, Wang Z, Trent JO, Tsutsumi H, Masuno H, Nakashima H, Yamamoto N, Peiper SC, Otake A, Fujii N: Structure-activity relationship studies on CXCR4 antagonists having cyclic pentapeptide scaffolds. *Org Biomol Chem* 3(24): 4392-4394, 2005.
- 25) Baba S, Takahashi K, Noguchi S, Takaku H, Koyanagi Y, Yamamoto N, Kawai G: Solution RNA structures of the HIV-1 dimerization initiation site in the kissing-loop and extended-duplex dimers. *J Biochem (Tokyo)* 138(5): 583-592, 2005.
- 26) Barnor JS, Miyano-Kurosaki N, Yamaguchi K, Abumi Y, Ishikawa K, Yamamoto N: Lentiviral-mediated delivery of combined HIV-1 decoy TAR and Vif siRNA as a single RNA molecule that cleaves to inhibit HIV-1 in transduced cells. *Nucleosides Nucleotides Nucleic*

- Acids 24(5-7): 431-434, 2005.
- 27) Zhong Y, Matsuya Y, Nemoto H, Mori M, Saito H, Yamamoto N: Novel phorbol esters exert dichotomous effects on inhibition of HIV-1 infection and activation of latent HIV-1 expression. *Antivir Chem Chemother* 16(5): 303-313, 2005.
 - 28) Chang MO, Yamamoto N, Horiuchi S, Wu YF, Fujimoto M, Yamamoto N: Production and characterization of a monoclonal antibody specific to Nef-associated factor 1 (Naf1)/A20-binding inhibitor of NF-kappaB activation (ABIN-1). *Hybridoma (Larchmt)* 24(5): 248-257, 2005.
 - 29) Munkanta M, Handema R, Kasai H, Gondwe C, Deng X, Yamashita A, Asagi T, Yamamoto N, Ito M, Kasolo F, Terunuma H: Predominance of three NF-kappaB binding sites in the long terminal repeat region of HIV Type 1 subtype C isolates from Zambia. *AIDS Res Hum Retroviruses* 21(10): 901-906, 2005.
 - 30) Ohkura S, Yamashita M, Ishida T, Babu PG, Koyanagi Y, Yamamoto N, Miura T, Hayami M: Phylogenetic heterogeneity of new HTLV type 1 isolates from southern India in subgroup A. *AIDS Res Hum Retroviruses* 21(4): 325-330, 2005.
 - 31) Zhong Y, Yoshinaka Y, Takeda T, Shimizu N, Yoshizaki S, Inagaki Y, Matsuda S, Honda G, Fujii N, Yamamoto N: Highly potent anti-HIV-1 activity isolated from fermented *Polygonum tinctorium* Aiton. *Antiviral Res* 66(2-3): 119-128, 2005.
 - 32) Kuramitsu M, Hashizume C, Yamamoto N, Azuma A, Kamata M, Yamamoto N, Tanaka Y, Aida Y: A novel role for Vpr of human immunodeficiency virus type 1 as a regulator of the splicing of cellular pre-mRNA. *Microbes Infect* 7(9-10): 1150-1160, 2005.
 - 33) Shaku F, Matsuda G, Furuya R, Kamagata C, Igarashi M, Tanaka M, Kanamori M, Nishiyama Y, Yamamoto N, Kawaguchi Y: Development of a monoclonal antibody against Epstein-Barr virus nuclear antigen leader protein (EBNA-LP) that can detect EBNA-LP expressed in P3HR1 cells. *Microbiol Immunol* 49(5): 477-483, 2005.
 - 34) Miura H, Maeda M, Yamamoto N, Yamaoka S: Distinct I kappaB kinase regulation in adult T cell leukemia and HTLV-I-transformed cells. *Exp Cell Res* 308(1): 29-40, 2005.
 - 35) Tamamura H, Araki T, Ueda S, Wang Z, Oishi S, Esaka A, Trent JO, Nakashima H, Yamamoto N, Peiper SC, Otaka A, Fujii N: Identification of novel low molecular weight CXCR4 antagonists by structural tuning of cyclic tetrapeptide scaffolds. *J Med Chem* 48(9): 3280-3289, 2005.
 - 36) Nonaka M, Horie R, Itoh K, Watanabe T, Yamamoto N, Yamaoka S: Aberrant NF-kappaB2/p52 expression in Hodgkin/Reed-Sternberg cells and CD30-transformed rat fibroblasts. *Oncogene* 24(24): 3976-3986, 2005.
 - 37) Okada M, Takemoto Y, Okuno Y, Hashimoto S, Yoshida S, Fukunaga Y, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Muraki Y, Kanamaru N, Takai H, Okada C, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K, Matsumoto M, Kase T, Demello DE, Peiris JS, Chen PJ, Yamamoto N, Yoshinaka Y, Nomura T, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M: The development of vaccines against SARS corona virus in mice and SCID-PBL/hu mice. *Vaccine* 23(17-18): 2269-2272, 2005.
 - 38) Saitoh T, Yamamoto M, Miyagishi M, Taira K, Nakanishi M, Fujita T, Akira S, Yamamoto N, Yamaoka S: A20 is a negative regulator of IFN regulatory factor 3 signaling. *J Immunol* 174(3): 1507-1512, 2005.
 - 39) Tamamura H, Hiramatsu K, Ueda S, Wang Z, Kusano S, Terakubo S, Trent JO, Peiper SC, Yamamoto N, Nakashima H, Otaka A, Fujii N: Stereoselective synthesis of [L-Arg-L/D-3-(2-naphthyl)alanine]-type (E)-alkene dipeptide isosteres and its application to the synthesis and biological evaluation of pseudopeptide analogues of the CXCR4 antagonist FC131. *J Med Chem* 48(2): 380-391, 2005.
 - 40) Dewan MZ, Terashima K, Ahmed S, Ohba K, Taruishi M, Yamamoto N: Mouse serum factor(s) down-modulate the CD4 and CXCR4 molecules on human T cells conferring resistance to HIV infection in NOG mice. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 194(4): 175-180, 2005.
 - 41) Dewan MZ, Uchihara JN, Terashima K, Honda M, Sata T, Ito M, Fujii N, Uozumi K, Tsukasaki K, Tomonaga M, Kubuki Y, Okayama A, Toi M, Mori N, Yamamoto N: Efficient intervention of growth and infiltration of primary adult T-cell leukemia cells by an HIV protease inhibitor, ritonavir. *Blood* 107: 716-724, 2006.
 - 42) Kawahara M, Matsuo K, Honda M: Intradermal and oral immunization with recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the simian immunodeficiency virus Gag protein induces long-lasting, antigen-specific

- immune responses in guinea pigs. Clin Immunol 119: 67-78, 2006.
- 43) Someya K, Ami Y, Nakasone T, Izumi Y, Matsuo K, Horibata S, Xin KQ, Yamamoto H, Okuda K, Yamamoto N, and Honda M. Induction of positive cellular and humoral immune responses by a prime-boost vaccine encoded with simian immunodeficiency virus *gag/pol*. J Immunol 176: 1784-1795, 2006.
- 44) Takizawa M, Chiba J, Haga S, Asano T, Yamazaki T, Yamamoto N, Honda M: Novel two-parameter flow cytometry (MIL4/ SSC followed by MIL4/CT7) allows for identification of five fractions of guinea pig leukocytes in peripheral blood and lymphoid organs. J Immunol Methods 311: 47-56, 2006.
- 45) Miyake A, Ibuki K, Enose Y, Suzuki H, Horiuchi R, Motohara M, Saito N, Nakasone T, Honda M, Watanabe T, Miura T, Hayami M: Rapid dissemination of a pathogenic simian/human immunodeficiency virus to systemic organs and active replication in lymphoid tissues following intrarectal infection. J Gen Virol 87: 1311-1320, 2006.
- 46) Eda Y, Murakami T, Ami Y, Nakasone T, Takizawa M, Someya K, Kaizu M, Izumi Y, Yoshino N, Matsushita S, Higuchi H, Matsui H, Shinohara K, Takeuchi H, Koyanagi Y, Yamamoto N, Honda M: Anti-V3 humanized antibody KD-247 effectively suppresses *ex vivo* generation of human immunodeficiency virus type 1 and affords sterile protection of monkeys against a heterologous simian/human immunodeficiency virus infection. J Virol 80: 5563-5570, 2006.
- 47) Eda Y, Takizawa M, Murakami T, Maeda H, Kimachi K, Yonemura H, Koyanagi S, Shiosaki K, Higuchi H, Makizumi K, Nakashima T, Osatomi K, Tokiyoshi S, Matsushita S, Zolla-Pazner S, Yamamoto N, Honda M: Sequential immunization with V3 peptides from primary HIV-1 produces cross-neutralizing antibodies against primary isolates with matching narrow neutralization sequence motif. J Virol 80: 5552-5562, 2006.
- 48) Misumi S, Nakayama D, Kusaba M, Iiboshi T, Mukai R, Tachibana K, Nakasone T, Umeda M, Shibata H, Endo M, Takamune N, Shoji S: Effects of immunization with CCR5-based cycloimmunogen on simian/HIVSF162P3 challenge. J Immunol 176: 463-471, 2006.
- 49) Motohara M, Ibuki K, Miyake A, Fukazawa Y, Inaba K, Suzuki H, Masuda K, Minato N, Kawamoto H, Nakasone T, Honda M, Hayami M, Miura T: Impaired T-cell differentiation in the thymus at the early stages of acute pathogenic chimeric simian human immunodeficiency virus (SHIV) infection in contrast to less pathogenic SHIV infection. Microbes Infect 8: 1539-1549, 2006.
- 50) Ono S, Kurotaki T, Nakasone T, Honda M, Boon-Long J, Sawanpanyalert P, Kimura K: Cost-effectiveness analysis of antiretroviral drug treatment and HIV-1 vaccination in Thailand. Jpn J Infect Dis 59: 168-173, 2006.
- 51) Snoeck J, Kantor R, Shafer RW, Van Laethem K, Deforche K, Carvalho AP, Wynhoven B, Soares MA, Cane P, Clarke J, Pillay C, Sirivichayakul S, Ariyoshi K, Holguin A, Rudich H, Rodrigues R, Bouzas MB, Brun-Vezinet F, Reid C, Cahn P, Brigo LF, Grossman Z, Soriano V, Sugiura W, Phanuphak P, Morris L, Weber J, Pillay D, Tanuri A, Harrigan RP, Camacho R, Schapiro JM, Katzenstein D, Vandamme A-M: Discordances between interpretation algorithms for genotypic of human immunodeficiency virus are subtype dependent. Antimicrob Agents Chemother 50(2): 694-701, 2006.
- 52) Huy TT, Ishikawa K, Ampofo W, Izumi T, Nakajima A, Ansah J, Tetteh JO, Nii-Trebi N, Aidoo S, Ofori-Adjei D, Sata T, Ushijima H, Abe K.: Characteristics of hepatitis B virus in Ghana: full length genome sequences indicate the endemicity of genotype E in West Africa. J Med Virol 78(2): 178-184, 2006.
- 53) Yamamoto M, Okamoto T, Takeda K, Sato S, Sanjo H, Uematsu S, Saitoh T, Yamamoto N, Sakurai H, Ishii KJ, Yamaoka S, Kawai T, Matsuura Y, Takeuchi O, Akira S: Key function for the Ubc13 E2 ubiquitin-conjugating enzyme in immune receptor signaling. Nat Immunol 7(9): 962-970, 2006.
- 54) Fukuhara T, Hosoya T, Shimizu S, Sumi K, Oshiro T, Yoshinaka Y, Suzuki M, Yamamoto N, Herzenberg LA, Herzenberg LA, Hagiwara M: Utilization of host SR protein kinases and RNA-splicing machinery during viral replication. Proc Natl Acad Sci U S A 103(30): 11329-11333, 2006.
- 55) Dewan MZ, Ahmed S, Iwasaki Y, Ohba K, Toi M, Yamamoto N: Stromal cell-derived factor-1 and CXCR4 receptor interaction in tumor growth and metastasis of

- breast cancer. *Biomed Pharmacother* 60(6): 273-276, 2006.
- 56) Tamamura H, Tsutsumi H, Masuno H, Mizokami S, Hiramatsu K, Wang Z, Trent JO, Nakashima H, Yamamoto N, Peiper SC, Fujii N: Development of a linear type of low molecular weight CXCR4 antagonists based on T140 analogs. *Org Biomol Chem* 4(12): 2354-7, 2006.
- 57) Shigeta S, Mori S, Yamase T, Yamamoto N, Yamamoto N: Anti-RNA virus activity of polyoxometalates. *Biomed Pharmacother* 60(5): 211-219, 2006.
- 58) Tamamura H, Ojida A, Ogawa T, Tsutsumi H, Masuno H, Nakashima H, Yamamoto N, Hamachi I, Fujii N: Identification of a new class of low molecular weight antagonists against the chemokine receptor CXCR4 having the dipicolylamine-zinc(II) complex structure. *J Med Chem* 49(11): 3412-3415, 2006.
- 59) Saitoh T, Tun-Kyi A, Ryo A, Yamamoto M, Finn G, Fujita T, Akira S, Yamamoto N, Lu KP, Yamaoka S: Negative regulation of interferon-regulatory factor 3-dependent innate antiviral response by the prolyl isomerase Pin1. *Nat Immunol* 7(6): 598-605, 2006.
- 60) Richards PJ, Nowell MA, Horiuchi S, McLoughlin RM, Fielding CA, Grau S, Yamamoto N, Ehrmann M, Rose-John S, Williams AS, Topley N, Jones SA: Functional characterization of a soluble gp130 isoform and its therapeutic capacity in an experimental model of inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 54(5): 1662-1672, 2006.
- 61) Nimura F, Zhang LF, Okuma K, Tanaka R, Sunakawa H, Yamamoto N, Tanaka Y: Cross-linking cell surface chemokine receptors leads to isolation, activation, and differentiation of monocytes into potent dendritic cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 231(4): 431-443, 2006.
- 62) Horiuchi S, Yamamoto N, Dewan MZ, Takahashi Y, Yamashita A, Yoshida T, Nowell MA, Richards PJ, Jones SA, Yamamoto N: Human T-cell leukemia virus type-I Tax induces expression of interleukin-6 receptor (IL-6R): Shedding of soluble IL-6R and activation of STAT3 signaling. *Int J Cancer* 119(4): 823-830, 2006.
- 63) Naito Y, Ui-Tei K, Nishikawa T, Takebe Y, Saigo K: siVirus: web-based antiviral siRNA design software for highly divergent viral sequences. *Nucl Acid Res* 2006, in press.
- 64) Takebe Y, Telesnitsky A: Evidence for the acquisition of multidrug resistance by an HIV clinical isolate *via* human sequence transduction. *Virology* 2006, in press.
- 65) Murakami Y, Yamagoe S, Noguchi K, Takebe Y, Uehara Y, Fukazawa H: (2006). Latency-associated nuclear antigen of Kaposi sarcoma virus interacts with Daxx to activate Ets-1-dependent expression of vascular endothelial growth factor receptor genes. *J Biol Chem* 2006, in press.
- 66) Watanabe S, Terashima K, Ohta S, Horibata S, Yajima M, Shiozawa Y, Dewan MZ, Yu Z, Ito M, Morio T, Shimizu N, Honda M, Yamamoto N: Hematopoietic stem cell-engrafted NOD/SCID/IL2R {gamma} null mice develop human lymphoid system and induce long-lasting HIV-1 infection with specific humoral immune responses. *Blood* 2006, in press.
- 67) Yamamoto T, Miyoshi H, Yamamoto N, Yamamoto N, Inoue JI, Tsunetsugu-Yokota Y: Lentivirus vectors expressing short hairpin RNAs against the U3-overlapping region of HIV nef inhibit HIV replication and infectivity in primary macrophages. *Blood* 2006, in press.

2. 和文発表

- 1) 仲宗根正, 山本直樹: ワクチンはまだか! . 感染・炎症・免疫. 35: 2-11, 2005.
- 2) 仲宗根正: 日本伝播 HIV 集団の遺伝子・分子生物学的解析及び分子力学的構造解析. 東北医学雑誌. 117: 27-31, 2005.
- 3) 松尾和浩: ワクチンベクターとしての BCG(総説). 臨床免疫. 43: 659-664, 2005.
- 4) 松尾和浩: エイズワクチン開発研究の進むべき方向(解説). 病原微生物検出情報 (IASR). 26: 117-119, 2005.
- 5) 兼清優, 本多三男: サル類の P3 施設における感染実験. オベリスク. 10: 7-11, 2005.
- 6) 杉浦 互: 抗 HIV-1 薬剤の現状と薬剤開発の新たな展開. ウイルス. 55: 85-94, 2005.
- 7) 西澤雅子, 杉浦 互: HIV-1 の薬剤耐性についての知見. BIO Clinica. 20: 51-57, 2005.
- 8) 杉浦 互: 新規感染者における薬剤耐性 HIV 拡散の危機 ~ Alert for Outbreak of Drug Resistance HIV-1 Newly Infected Population ~ 日本エイズ学会誌. 7: 117-120, 2005.
- 9) 杉浦 互, 瀧永博之, 田宮貞宏, 松田昌和, 松見信太郎, 蜂谷敦子, John Coffin, 満屋裕明: シンポジ

ウム 7. 「薬剤耐性の知見、基礎から臨床へ」を終えて . 日本エイズ学会誌 . 7(3): 180-188, 2005 .

- 10) 武部 豊 : アジアにおける HIV 流行の分子疫学 : 流行はいかにして形成されたか . Confronting HIV 2005 . 28: 5-7, McCann Healthcare Publishing, 2005.
- 11) 山本直樹 , 松田善衛 , 村上努 , 駒野 淳 : AIDS の新たな治療標的を求めて : HIV-1 の宿主因子 . 実験医学 . 23(13): 2068-2073, 2005.
- 12) 石川晃一 , 山本直樹 : HIVワクチン開発の動向 . アニムス . 39: 17-25, 2005.
- 13) 武部 豊 : (分担訳) 「ハリソン内科 第二版」HIV 感染症 : エイズと関連疾患 (Anthony S. Fauci & H. Clifford Lane) . 173: 9-16, メディカル・サイエンス・インターナショナル . 東京 . 2005, in press.

II . 学 会 発 表

1 . 国際学会

- 1) Takebe Y: Precise mapping of recombination breakpoints of HIV-1 recombinants in Asia: Insight into *in vivo* recombination mechanism. 12th International Workshop on HIV Dynamics and Evolution, Apr.23-26, 2005, Cleveland, Ohio, USA.
- 2) Yamamoto N: Human retrovirus infections and their control. German-Japanese Symposium on Emerging and Reemerging Viruses. May 14-17, 2005, Toyama, Japan.
- 3) Miyauchi K, Curran R, Komano J, Murakami T, Yamamoto N, Engelman DM, Matsuda Z: The rotational phase of the localized region of gp41 membrane-spanning domain alpha-helix affected the Env biogenesis. CSH Meeting on Retroviruses, May 24-29, 2005, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- 4) Miyauchi K, Curran R, Komano J, Murakami T, Yamamoto N, Engelman DM, Matsuda Z: The role of the additional glycine residue within a conserved GXXXG motif of the membrane-spanning domain of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). CSH Meeting on Retroviruses, May 24-29, 2005, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- 5) Murakami T, Ablan S, Nagashima K, Komano J, Miyauchi K, Matsuda Z, Freed EO, Yamamoto N: Characterization of HIV-1 matrix mutants-Effects on an early stage of infection. CSH Meeting on Retroviruses, May 24-29, 2005, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- 6) Hasegawa N, Sugiura W, Matsuda M, Mogushi K, Tanaka H, Ren F: Inference of evolutionary forces driving HIV-1 drug -resistance acquisition under HAART using longitudinal HIV-1 protease gene samples. 14th International HIV Drug Resistance Workshop, June 7-11, 2005, Quebec, Canada.
- 7) Ueda T, Myint L, Nishizawa M, Matsuda M, Sugiura W: Analysis of interference and co-evolution between protease inhibitor resistant mutations and gag mutations. 14th International HIV Drug Resistance Workshop, June 7-11, 2005, Quebec, Canada.
- 8) Matsuo K, Izumi Y, Someya K, Ami Y, Promkhatkaew D, Puthavathana P, Warachit P, Yamazaki S, Yamamoto N, Honda M: Update of HIV-1 CRF01_AE recombinant BCG and replication-defective vaccinia virus DIs vaccines. 7th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific, Jul.1-5, 2005, Kobe, Japan.
- 9) Kanekiyo M, Ami Y, Matsuo K, Someya K, Suzaki Y, Yoshino N, Hasegawa A, Yamamoto N, Honda M: Enhanced effects of codon optimization on HIV/SIV gene expression in recombinant BCG in macaques. 7th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific, Jul.1-5, 2005, Kobe, Japan.
- 10) Yoshino N, Kanekiyo M, Okamura T, Someya K, Hagiwara Y, Matsuo K, Ami Y, Yamamoto N, Sato S, Honda M: Intradermal immunization with replication-deficient rDIs induce SIV-specific mucosal immunity. 7th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific, Jul.1-5, 2005, Kobe, Japan.
- 11) Kato S, Tsuji K, Tanaka R, Kinai E, Hanabusa H, Negishi M, Sugiura W: Quantitation of antiretroviral drugs in hair with LC/MS/MS for assessment of medication adherence. 7th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific, July 1-5, 2005, Kobe, Japan.
- 12) Saeng-aroon S, Myint L, Pathipvanich P, Ariyoshi K, Wichukchinda N, Rojanawiwat A, Matsuda M, Sawanpanyalert P, Sugiura W, Auwanit W: Mutagenically-separated PCR as a tool for monitoring lamivudine (GPOvir) resistant CRF01_AE in Thailand(GPOvir). 7th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific, July 1-5, 2005, Kobe, Japan.
- 13) Kozyrev IL, Sakai K, Takahashi E, Shinohara K, Takemura T, Inaba K, Suzuki H, Ibuki K, Hayami M, Miura T: Investigation of acute pathogenesis of simian and human immunodeficiency chimeric virus by comparison of its molecular clones with different

- pathogenic abilities. 23rd Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, Sept.21-24, 2005, Portland, Oregon, USA.
- 14) Sugimoto C, Izumo S, Suzuki Y, Nagai Y, Mori, K: Influence of deglycosylated SIVmac239 on primary infection in lymphatic tissues. 23rd Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, Sept.21-24, 2005, Portland, USA.
 - 15) Mori K, Sugimoto C, Nakayama E, Shioda T, Villinger F, Ansari AA, Yamamoto N: Development of Sendai virus vector system for eliciting epitope specific CD4 T cells. 23rd Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, Sept.21-24, 2005, Portland, USA.
 - 16) Honda M, Matsuo K, Ami Y, Someya K, Kanekiyo M, Izumi Y, Horibata S, Yoshino N, Sakai K, Shinohara K, Matsumoto S, Yamada T, Yamazaki S, Yamamoto N: Recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin(BCG)-based prime/boost vaccine by boosting with a non-replicating vaccinia virus recombinant. The conference Virology Africa 2005, Nov.8-11, 2005, Cape Town, South Africa.
 - 17) Sugiura W, Matsuda M, Kakizawa J, Miura H, Takeda S, Fujino M, Nishizawa M, Yamamoto N: Changes in prevalence and patterns of drug resistant mutations in Japan - Summary of nine years nationwide HIV-1 drug resistance monitoring study from 1996 to 2004. 1st Japan-Germany HIV/AIDS Symposium, Nov.9, 2005, Nagoya, Japan.
 - 18) Tatsumi M: Trapping system of HIV: New systems for construction of infectious molecular clones. 1st Japan-Germany HIV/AIDS Symposium, Nov.9, 2005, Nagoya, Japan.
 - 19) Yamamoto N: Human retrovirus infections and their control. 1st Japan-German HIV/AIDS Symposium, Nov. 9, 2005, Nagoya, Japan.
 - 20) Sugiura W, Matsuda M, Kakizawa J, Miura H, Takeda S, Fujino M, Nishizawa M, Yamamoto N: Changes in prevalence and patterns of drug resistant mutations in JAPAN-Summary of nine years nationwide HIV-1 drug resistance monitoring study (1996-2004) . 6th Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance, Nov.13-16, 2005, Virginia, USA.
 - 21) Takebe Y: Selective advantage of LTR of HIV-1 subtype C over that of subtype B in *in vivo* recombination event. 6th Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance, Nov.13-16, 2005, Chantilly, Virginia, USA.
 - 22) Honda M, Yamamoto N and other AIDS Vaccine Development Group: New collaborative Japan vaccine against HIV/AIDS. 10th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim, Nov.16-17, 2005, Hanoi, Vietnam.
 - 23) Komano J, Futahashi Y, Kainose Y, Urano U, Aoki T, Miyauchi K, Yoshida T, Koyanagi Y, Matsuda Z, Yamamoto N: Identification of SES as an SDF-1alpha-independent internalization motif of HIV-1 co-receptor CXCR4. 10th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim, Nov.16-17, 2005, Hanoi, Vietnam.
 - 24) Sugiura W: Virological and statistical analyses of interference between protease inhibitor resistant mutations and gag mutations. 13th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Feb.5-8, 2006, Denver, USA.
 - 25) Sugiura W: Multi-center nationwide survey of drug resistant HIV-1 in newly diagnosed HIV/AIDS patients in Japan from 2003 to 2004. 13th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Feb.5-8, 2006, Denver, USA.
 - 26) Takebe Y: Selective advantage of HIV-1 subtype C LTR in inter-subtype recombination *in vivo*. 13th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Feb.5-8, 2006, Denver, Co, USA.
 - 27) Takebe Y: Inter-CRF recombinants (ICRs): New class of HIV-1 recombinants and its epidemiological implications. 13th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Feb.5-8, 2006, Denver, Co, USA.
 - 28) Mori K, Sugimoto C, Nagai Y, Yamamoto N: Implication of glycosylation of Env protein for poor immune response against HIV/SIV. "AIDS Symposium" held in Pohang Univ. of Science and Technology. Feb. 8, 2006. Pohang, Korea.
 - 29) Honda M, Matsuo K, Ami Y, Someya K, kanekiyo M, Izumi Y, Horibata S, Yoshino N, Sakai K, Shinohara K, Matsumoto S, Yamada T, Yamazaki S, Yamamoto N: Recombinant *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin(BCG)-based prime/boost vaccine by boosting with a Non-replicating Vaccinia Virus Recombinant. "AIDS Symposium" held in Pohang Univ.

of Science and Technology. Feb. 8, 2006. Pohang, Korea.

- 30) Nakasone T: HIV-1 isolating system and drug-resistant HIV-1 surveillance system in Japan. 中国科学院武漢ウイルス研究所研究交流集会シンポジウム, Mar.23, 2006, 武漢、中国.

2. 国内学会

- 1) 杉浦 互: 日本における薬剤耐性 HIV-1 の動向と対策, 第 62 回岡山 HIV 診療ネットワーク, 2005 年 5 月 31 日, 岡山.
- 2) 駒野 淳: エイズ日和見リンパ腫を標的とした抗ウイルス剤の開発. 2005 年度 日本レトロウイルス研究会夏期セミナー, 2005 年 6 月 3-5 日, 山梨県南都留郡河口湖町.
- 3) 浦野恵美子, 駒野 淳: ウサギ細胞における HIV-1 感染抵抗性. 2005 年度 日本レトロウイルス研究会夏期セミナー, 2005 年 6 月 3-5 日, 山梨県南都留郡河口湖町.
- 4) 吉野直人, 兼清優, 萩原由加利, 染谷健二, 松尾和浩, 網康至, 佐藤成大, 山本直樹, 本多三男: 非複製化ワクシニアウイルスベクター型 HIV/AIDS ワクチンの皮内接種による粘膜組織での抗原特異的免疫応答. 第 563 回岩手医学会, 2005 年 7 月 14 日, 盛岡.
- 5) 本多三男, 兼清優, 松尾和浩, 網康至, 山本直樹: リコンビナントワクチンによるサルエイズモデルのコントロール因子の解析. 「サルを用いた感染症研究の現状と今後」会議, 2005 年 9 月 16-17 日, 京都.
- 6) 杉浦 互: 薬剤耐性の獲得に見る Gag と Protease の共進化, 第 7 回白馬シンポジウム, 2005 年 11 月 3-4 日, 鹿児島.
- 7) 岡村智崇, 志田壽利, 長谷川篤彦, 山本直樹, 本多三男: 高発現型ワクシニア Promoter を用いた高度弱毒化ワクシニア DIs の至適化. 第 53 回日本ウイルス学会学術集会, 2005 年 11 月 20-22 日, 横浜.
- 8) 渡辺哲, 寺嶋一夫, 太田信頼, 矢島美彩子, 塩沢容子, 渡邊健, 清水則夫, 本多三男, 山本直樹: NOG マウスで確立された全身性 HIV-1 感染系. 第 53 回日本ウイルス学会学術集会, 2005 年 11 月 20-22 日, 横浜.
- 9) 杉浦 互: HIV-1 CRF01_AE における Nelfinavir 耐性変異 N88S の耐性化機序の解析. 第 53 回日本ウイルス学会学術集会, 2005 年 11 月 20-22 日, 横浜.
- 10) Myint Lay, 植田知幸, 西澤雅子, 松田昌和, 三浦秀佳, 杉浦 互: プロテアーゼ阻害剤耐性変異と Gag 変異間に見る相互干渉と共進化の解析. 第 53 回日本ウイルス学会学術集会, 2005 年 11 月 20-22 日, 横浜.
- 11) 武部豊, 横田侑子, 小泉寛和, Xi Xiao-Jie, 滝口雅文, 岡慎一: HIV-1 スーパー感染: レジデント・ウイルスとスーパー感染ウイルス間の組換えウイルスの急速な出現とその生物学的意義. 第 53 回日本ウイルス学会, 2005 年 11 月 20-22 日, 横浜.
- 12) 近藤真規子, 嶋貴子, 武部豊, 加藤真吾, 今井光信: Real-time PCR 法を用いた HIV-1 プロウイルス定量法-6 種類の HIV-1 サブタイプとプライマー, プローブの反応性の検討. 第 53 回日本ウイルス学会, 2005 年 11 月 20-22 日, 横浜.
- 13) 草川茂, 武部豊: 広い宿主域と高い増殖能を持つ HIV-1 CRF08_BC 感染性分子クローンの構築. 第 53 回日本ウイルス学会, 2005 年 11 月 20-22 日, 横浜.
- 14) 武部豊, 納富香子, 小野木利成, 西郷薫, 内藤雄樹: バイオインフォマティックスの手法に基づいた抗 HIV-1 至適汎用 siRNA の設計とそれによる HIV-1 増殖阻害効果の評価. 第 53 回日本ウイルス学会, 2005 年 11 月 20-22 日, 横浜.
- 15) 篠田知宏, 村上 努, 宮内浩典, 駒野 淳, 磯貝まや, 松田善衛, 山本直樹: 感染前期過程に欠損を有する変異株を用いた HIV-1 マトリックス蛋白質結合宿主因子の探索. 第 53 回日本ウイルス学会学術集会, 2005 年 11 月 20-22 日, 横浜.
- 16) 清水佐紀, 駒野 淳, 浦野恵美子, 二橋悠子, 宮内浩典, 磯貝まや, 松田善衛, 納富香子, 小野木利成, 武部 豊, 山本直樹: HIV-1 感染細胞における Tat を介した P-TEFb の活性化を抑制する細胞内因子の解析. 第 53 回日本ウイルス学会学術集会, 2005 年 11 月 20-22 日, 横浜.
- 17) 駒野 淳, 二橋悠子, 浦野恵美子, 貝の瀬由成, 青木 徹, 宮内浩典, 磯貝まや, 松田善衛, 山本直樹: The non-tyrosine-based diacidic motif within the cytoplasmic tail regulates the cell surface expression of CXCR4. 第 53 回日本ウイルス学会学術集会, 2005 年 11 月 20-22 日, 横浜.
- 18) 宮内浩典, 駒野 淳, 村上 努, 松田善衛: The function of membrane-spanning domain of HIV-1 gp41 in Env biogenesis. 第 53 回日本ウイルス学会学術集会, 2005 年 11 月 20-22 日, 横浜.
- 19) 宮内浩典, 駒野 淳, 村上 努, 松田善衛: HIV-1

- gp41の膜貫通ヘリックス間相互作用—GXXXGモチーフ変異体の解析. 第53回日本ウイルス学会学術集会, 2005年11月20-22日, 横浜.
- 20) 杉本智恵, 鈴木康夫, 山本直樹, 永井美之, 森一泰: 糖鎖欠損サル免疫不全ウイルスの細胞指向性と初期感染細胞の解析: 低病原性との関連について. 第53回日本ウイルス学会学術集会, 2005年11月20-22日, 横浜.
- 21) 仲宗根正, 高松純樹, 杉浦互, 佐藤裕徳, 山本伸二, Heneine Walid, 山本直樹: HIV-RT 薬剤感受性迅速試験法(半日)の開発. 第19回日本エイズ学会学術集会, 2005年12月1-3日, 熊本.
- 22) 宇佐美修, 肖鵬, 齊藤弘樹, 芦野有悟, 服部俊夫, 三木祐, 佐藤功, 服部真一郎, 仲宗根正, 原敬志: 東北地方のHIV感染患者の臨床症状をウイルス特性. 第19回日本エイズ学会学術集会, 2005年12月1-3日, 熊本.
- 23) 徳永恵一, 中山大介, 三隅将吾, 仲宗根正, 向井録三郎, 橋岡臣, 梅田衛, 柴田英昭, 高宗暢暁, 庄司省三: Human CC5を基にした環状抗原の免疫により得られたカニクイザル抗血清のmacaque CCR5に対する交差反応性の検討. 第19回日本エイズ学会学術集会, 2005年12月1-3日, 熊本.
- 24) 渡辺哲, 寺嶋一夫, 太田信頼, 堀端重男, 清水則夫, 本多三男, 山本直樹: NOGマウスを利用したHIV-1慢性感染実験系の確立. 第19回日本エイズ学会学術集会, 2005年12月1-3日, 熊本.
- 25) 吉野直人, 兼清優, 萩原由加利, 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ワクチンの経皮接種による粘膜免疫誘導. 第19回日本エイズ学会学術集会, 2005年12月1-3日, 熊本.
- 26) 岡村智崇, 松尾和浩, 兼清優, 堀端重男, 長谷川篤彦, 山本直樹, 本多三男: 修飾型HIV Env発現ワクチンによる抗HIV抗体誘導について. 第19回日本エイズ学会学術集会, 2005年12月1-3日, 熊本.
- 27) 村上利夫, 滝澤万里, 前田敏宏, 松下修三, 本多三男: R5臨床分離株を中和可能なヒト化抗HIV-1モノクローナル抗体(KD-247)の開発. 第19回日本エイズ学会学術集会, 2005年12月1-3日, 熊本.
- 28) 太田信頼, 兼清優, 網康至, 相澤志保子, 山本直樹, 奥田研爾, 本多三男: 免疫不全ウイルスの感染における血球細胞の経時的な病的変化の解析. 第19回日本エイズ学会学術集会, 2005年12月1-3日, 熊本.
- 29) 元原麻貴子, 伊吹謙太郎, 三宅在子, 深澤嘉伯, 稲葉一寿, 鈴木元, 増田恭子, 河本宏, 仲宗根正, 本多三男, 速水正憲, 三浦智行: 強毒・弱毒SHIVの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19回日本エイズ学会学術集会, 2005年12月1-3日, 熊本.
- 30) 小池満, 三好洋, 井上靖之, 高橋正知, 山口洋子, 奥瀬千晃, 杉浦互, 中島秀喜: HIV/HIB CoinfectionにおけるHBV耐性の検討. 第19回日本エイズ学会学術集会, 2005年12月1-3日, 熊本.
- 31) 浅黄司, 金田次弘, 伊部史朗, 松田昌和, 吉田繁, 津畑千佳子, 大家正泰, 近藤真規子, 貞升健志, 瀧永博之, 正兼亜季, 佐藤克彦, 奏真美, 溝上康司, 森治代, 南留美, 渡邊香奈子, 岡田清美, 杉浦互: HIV-1薬剤耐性遺伝子検査法に関するアンケート調査. 第19回日本エイズ学会学術集会, 2005年12月1-3日, 熊本.
- 32) 西澤雅子, Urvi Parikh, 藤野真之, 松田昌和, 三浦秀佳, 加藤真吾, 山本直樹, 杉浦互: ヒト末梢血単核球を用いたK65R獲得HIV-1の逆転写酵素阻害剤に対する感受性の解析. 第19回日本エイズ学会学術集会, 2005年12月1-3日, 熊本.
- 33) 石川暢恒, 高田昇, 河部康子, 喜花伸子, 大江昌恵, 大下由美, 畝井浩子, 藤井輝久, 木村昭郎, 杉浦互: 半年以内に感染したと推定されるHIV感染症の9例. 第19回日本エイズ学会学術集会, 2005年12月1-3日, 熊本.
- 34) 杉浦互, 瀧永博之, 吉田繁, 千葉仁志, 浅黄司, 松田昌和, 岡慎一, 近藤真規子, 今井光信, 貞升健志, 長島真美, 伊部史朗, 金田次弘, 浜口元洋, 上田幹夫, 正兼亜季, 大家正義, 渡邊香奈子, 白阪琢磨, 山本善彦, 森治代, 小島洋子, 中桐逸博, 高田昇, 木村昭郎, 南留美, 山本政弘, 健山正男, 藤田次郎: 新規HIV-1感染者における薬剤耐性の頻度に関する全国疫学調査-2003年から2004年にかけての報告-. 第19回日本エイズ学会学術集会, 2005年12月1-3日, 熊本.
- 35) 大出裕高, 杉浦互, 星野忠次: コンピューター・シミュレーションによるCRF01_AE_NH1_N88S HIV-1 PRのNFV耐性機構の解明. 第19回日本エイズ学会学術集会, 2005年12月1-3日, 熊本.
- 36) 加藤真吾, 田中理恵, 根岸昌功, 杉浦互: AZTは血漿中及び細胞内において確かにd4Tに変換される. 第19回日本エイズ学会学術集会, 2005年12月1-3日, 熊本.

- 月 1-3 日, 熊本 .
- 37) 小池 満, 鈴木貴雄, 井上靖之, 山口洋子, 小池淳樹, 杉浦 互, 高橋正知: HIV 関連リンパ腫における自己造血幹細胞採取の経験. 第 19 回日本エイズ学会学術集会, 2005 年 12 月 1-3 日, 熊本 .
- 38) 小池 満, 高橋正知, 井上靖之, 山口洋子, 杉浦 互, 中島秀喜: 当院における新規受診者の検討. 第 19 回日本エイズ学会学術集会, 2005 年 12 月 1-3 日, 熊本 .
- 39) 山元泰之, 山中 晃, 内田泰斗, 尾形享一, 福武勝幸, 杉浦 互: 判定保留 HIV-1 抗体確認検査で確定し得ないとき. 第 19 回日本エイズ学会学術集会, 2005 年 12 月 1-3 日, 熊本 .
- 40) Wataru Sugiura: Changes in prevalence and patterns of drug resistant mutations in Japan-Summary of nationwide HIV-1 drug resistance monitoring study (1996-2004) in Japan. 第 19 回日本エイズ学会学術集会, 2005 年 12 月 1-3 日, 熊本 .
- 41) 杉浦 互, 鴻永博之, 田宮貞宏, 松田昌和, 松見信太郎, 蜂谷敦子, John Coffin, 満屋裕明: シンポジウム 7. 「薬剤耐性の新知見, 基礎から臨床へ」を終えて. 第 19 回日本エイズ学会学術集会, 2005 年 12 月 1-3 日, 熊本 .
- 42) 武部豊, Xi Xiao-Jie, Ma Yanling, Xia Xueshan: HIV-1 遺伝子組換えにおけるサブタイプ C LTR の selective advantage (選択優位性). 第 19 回日本エイズ学会, 2005 年 12 月 1-3 日, 熊本 .
- 43) 武部豊, 横田侑子, 小泉寛和, Xi Xiao-Jie, 滝口雅文, 岡慎一: HIV-1 スーパー感染とウイルスの個体内進化に関する解析. 第 19 回日本エイズ学会, 2005 年 12 月 1-3 日, 熊本 .
- 44) Tee Kok-Keng, Li Xiao-Jie, Nohtomi Kyouko, Pon Chee Keong, Kamarulzaman Adeeba, Ng Kee Peng, Takebe Yutaka: Emergence of new HIV-1 recombinant forms in Malaysia. 第 19 回日本エイズ学会, 2005 年 12 月 1-3 日, 熊本 .
- 45) 近藤真規子, 須藤弘二, 田中里恵, 嶋貴子, 足立拓也, 設楽裕子, 岩室紳也, 向出雅一, 武部豊, 加藤真吾, 今井光信: 各種サブタイプに対応できる real-time PCR 法による HIV-1 プロウイルスの定量法の検討. 第 19 回日本エイズ学会, 2005 年 12 月 1-3 日, 熊本 .
- 46) 駒野 淳, 二橋悠子, 浦野恵美子, 青木 徹, 貝の瀬 由成, 宮内浩典, 磯貝まや, 松田善衛, 山本直樹: Cell surface expression of CXCR4 is regulated by an non-tyrosine-based diacidic motif within the cytoplasmic tail. 第 19 回日本エイズ学会学術集会, 2005 年 12 月 1-3 日, 熊本 .
- 47) 村上 努, 篠田知宏, 内藤幸美, 宮内浩典, 磯貝まや, 駒野 淳, 松田善衛, 山本直樹: HIV-1 マトリックス蛋白質のウイルス感染前期過程における役割. 第 19 回日本エイズ学会学術集会, 2005 年 12 月 1-3 日, 熊本 .
- 48) 駒野淳, 宮内浩典, Lay Myint, 二橋悠子, 浦野恵美子, 松田善衛, 千葉智子, 三浦秀佳, 杉浦 互, 山本直樹: Rapid propagation of low-fitness drug resistant mutants of HIV-1 by a -1 frameshift enhancer sparsomycin. 第 19 回日本エイズ学会学術集会, 2005 年 12 月 1-3 日, 熊本 .
- 49) 清水佐紀, 駒野淳, 浦野恵美子, 二橋悠子, 宮内浩典, 磯貝まや, 松田善衛, 納富香子, 小野木利成, 武部 豊, 山本直樹: T-type cyclin/CDK9 複合体の活性化を抑制する細胞内因子による HIV-1 複製制御. 第 19 回日本エイズ学会学術集会, 2005 年 12 月 1-3 日, 熊本 .
- 50) 杉本智恵, 中山英美, 塩田達雄, 山本直樹, 永井美之, 森 一泰: 糖鎖欠損 SIV の弱毒化のメカニズムの解析. 第 19 回日本エイズ学会学術集会, 2005 年 12 月 1-3 日, 熊本 .
- 51) 森 一泰, 杉本智恵, 中山英美, 塩田達雄, 保富康宏, 山本直樹, 永井美之: ウイルス特異的 CD4+T 細胞免疫誘導のための Sendai virus vector を用いた CD4+T 細胞エピトープ発現系の開発. 第 19 回日本エイズ学会学術集会, 2005 年 12 月 1-3 日, 熊本 .
- 52) 羽生勇一郎, Jacob Barnor, 黒崎直子, 米田和弘, 山口和也, 石川晃一, 山本直樹, David Ofori-Adjei, 高久洋: RNAi 耐性 HIV-1 株に対する第 2 世代の RNAi 製剤. 第 19 回日本エイズ学会学術集会, 2005 年 12 月 1-3 日, 熊本 .
- 53) 村上 努, 篠田知宏, 内藤幸美, 宮内浩典, 磯貝まや, 駒野 淳, 松田善衛, Eric Freed, 山本直樹: マトリックス蛋白質変異が HIV-1 感染前期課程や結合宿主因子に与える影響. 第 28 回日本分子生物学会年会, 2005 年 12 月 7-10 日, 福岡 .
- 54) 宮内浩典, 駒野 淳, 村上 努, 松田善衛: HIV-1 の Env 生合成過程における膜貫通領域の寄与. 第 28 回日本分子生物学会年会, 2005 年 12 月 7-10 日, 福岡 .
- 55) 宮内浩典, 駒野 淳, 村上 努, 松田善衛: HIV-1 gp41 の膜貫通領域に存在する GGXXG 配列の解析 .

第 28 回日本分子生物学会年会，2005 年 12 月 7-10 日，福岡。

- 56) Komano J, Futahashi Y, Kainose Y, Urano E, Aoki T, Miyauchi K, Yoshida Y, Koyanagi Y, Matsuda Z, Yamamoto N : Identification of SDF-1 α -independent internalization motif Ser-asp/Glu-Ser within CXCR4's cytoplasmic tail . 第 28 回日本分子生物学会年会，2005 年 12 月 7-10 日，福岡