

## 第5回 ECC 山口メモリアルエイズ研究奨励賞受賞研究

## HIV 感染における細胞性免疫応答の解析

### Analysis of Cellular Immune Response on HIV Infection

立川 (川名) 愛

Ai KAWANA-TACHIKAWA

東京大学医科学研究所先端医療研究センター感染症分野

Division of Infectious Diseases, The Institute of Medical Science,  
The University of Tokyo Advanced Clinical Research Center

日本エイズ学会誌 7 : 103-109, 2005

本稿では筆者が行ってきた HIV 感染における細胞性免疫応答についての研究に関して、1) HIV 感染における CTL エスケープ変異ウイルスの出現と伝播、2) CTL エスケープのメカニズム、3) センダイウイルスベクターを使った HIV 特異的 CD8 陽性 T 細胞の検出系の確立と高効率の抗原提示法の開発、に分けて述べる。

#### 1) HIV 感染における CTL エスケープ変異ウイルスの出現と伝播

HIV 感染においてウイルスのコントロールに細胞性免疫応答が重要な役割を担っていることが多くの研究から明らかになってきた<sup>1)</sup>。しかしながらその一方で、HIV は細胞性免疫応答の主役である細胞傷害性 T 細胞 (CTL) による攻撃から逃れることも明らかになってきた<sup>2-4)</sup>。CTL は細胞表面の MHC class I 分子により提示されている 10 アミノ酸前後のペプチド (エピトープ) を認識する。HIV は変異を起こしやすいウイルスであり、エピトープとして提示され得る部位にアミノ酸変化を伴う変異を生じると CTL により認識されなくなる、あるいはされにくくなる場合がある。そこで私は HIV 感染者の末梢血中の HIV に関して、エピトープ部位のアミノ酸変化に注目して研究を行った。

私はまず HLA (ヒトの MHC)-B35 によって提示される CTL エピトープに関して解析を行った。HLA-B35 は病気の進行を促進する HLA として知られており、日本人におけるアレル頻度は約 8% である。10 名の HLA-B35 陽性 (血液製剤による感染 5 名, 性行為による感染 5 名), 16 名の HLA-B35 陰性 (血液製剤による感染 6 名, 性行為による感染 10 名) の HIV-1 感染者の血清を用いて, Shiga らに

よって同定された 9 カ所の HLA-B35 拘束性 HIV-1 CTL エピトープ<sup>5)</sup>と、その近傍の塩基配列を決定し、アミノ酸配列を解析した。HLA-B35 陽性感染者 (1 名を除く) に関しては約 1 年間隔の 2 時点で、HLA-B35 陰性感染者 16 名は 1 時点について解析を行った。エピトープ同定に使用された SF2 株のアミノ酸配列と比較した結果 3 カ所のエピトープで HLA-B35 陽性感染者に特異的に見られるアミノ酸変化が存在することが明らかとなった<sup>6)</sup>。Pol 由来の B35-SF2-4 (VPLDKDFRKY) の 6 番目のアスパラギン酸 (D) からグルタミン酸 (E) への変化 (SF2-4-D6E), 同じく Pol 由来の B35-14 (NPDIVIYQY) の 3 番目の D から E への変化 (14-D3E), Nef 由来の B35-SF2-6 の 11 番目のタイロシン (Y) からフェニルアラニン (F) への変化 (SF2-6-Y11F) は HLA-B35 陰性感染者に比べて HLA-B35 陽性者において有意に高頻度に出現していた (表 1)。B35-SF2-4 に関しては HLA-B35 陽性感染者では解析した 19 配列のうち 15 配列 (79%) が SF2-4-D6E であるのに対して HLA-B35 陰性感染者では 16 配列のうち 3 配列 (19%) であり、有意差が認められた ( $p < 0.001$ ; Fisher's exact test)。同様に B35-14 に関しても D3E の頻度は HLA-B35 陽性感染者では 14/19 (74%) であるのに対して、HLA-B35 陰性感染者では 2/16 (13%,  $p < 0.001$ ) のみであった。また、B35-SF2-6-Y11F のアミノ酸変化も HLA-B35 陽性感染者で有意に高頻度に見られた (74% vs 0%,  $p < 0.0001$ )。これらの結果から HLA-B35 陽性感染者体内では B35-SF2-4-D6E, B35-14-D3E, SF2-6-Y11F を持つウイルスが優位に増殖しやすく、これらは CTL からのエスケープ変異であることが推測される。

また、私は HLA-A24 によって提示される CTL エピトープ<sup>6)</sup>に関してサブタイプ B の HIV 感染者について同様の解析を行った。HLA-A24 は日本人に非常に多い HLA 型で、アレル頻度が約 35%, すなわち日本人の 6~7 割が HLA-A24 を有する。一部のエピトープでは HLA-B35 の

著者連絡先: 〒108-8639 東京都港区白金台 4-6-1 東京大学医科学研究所先端医療研究センター感染症分野  
Fax: 03-5449-5427

2005 年 5 月 17 日受付

場合と同様に HLA-A24 陽性感染者で高頻度に見られる特定のアミノ酸があることが明らかになった<sup>7)</sup>。特に Nef138-10 (RYPLTFGWCF) では 2 番目のタイロシン (Y) がフェニルアラニン (F) への変異 (Nef138-2F) が高頻度に認め

られ、HLA-A24 陽性感染者における出現頻度は 93% であった (表 2)。データベース上の HIV サブタイプ B における Nef138-2F の出現頻度は約 30% であり、HLA-A24 陽性感染者で見られた出現頻度に比べて著しく低かった。さ

表 1 HIV 感染者末梢血中の HLA-B35 に提示される HIV CTL エピトープ部位のアミノ酸配列

HLA-B35陽性			HLA-B35陰性		
B35-SF2-4	B35-14	B35-SF2-6	B35-SF2-4	B35-14	B35-SF2-6
VPLDKDFRKY	NPDIVIYQY	RPQVPLRPMTY	VPLDKDFRKY	NPDIVIYQY	RPQVPLRPMTY
P1	-----E----- -----E-----	--E----- -----V-----F	P16	-----	T-----
P2	-----E----- -----Q-----	--E----- -----K-----F	p17	-----	-----
P4	-----	-----F	P18	-----	-----
P10	-----E----- I-----E-----	--E----- -----M-----F	P20	-----	-----M-----
P5	-----	--E-----F	P24	I-----	-----
P6	-----E----- -----PE-----	--E----- -----E-----F	P25	-----	-----
P7	-----E----- -----E-----	--E----- -----E-----F	P27	---EE-----	--E-----K-----
P13	-----E----- -----E-----	--E----- -----E-----F	P35	--S-----	-----I-----
P31	-----E----- -----E-----	--E----- -----E-----	P36	-----	-----ND
P32	-----E----- -----E-----	---L----- -----E-----F	P38	-----	-----
			P39	-----	-----
			P40	-----E-----	--E-----ND
			P42	I-----	-----
			P43	---E-----	--N-----
			P44	-----	---M-----
			P45	-----E-----	-----I-----ND

表 2 HIV 感染者末梢血中の HLA-A24 に提示される HIV CTL エピトープ Nef138-10 のアミノ酸配列

<血液製剤による感染>		<性行為による感染>	
HLA-A24陽性	HLA-A24陰性	HLA-A24陽性	HLA-A24陰性
RYPLTFGWCF	RYPLTFGWCF	RYPLTFGWCF	RYPLTFGWCF
J041 -F-----	J037 -----	J006 -F-----	J025 ----C-----
J033 -F-----Y	J035 -----	J007 -F--C-----	J023 -Y/W/F-----
J031 -F-----	J031 -----	J009 -F-----	J021 -----
J030 -F--C-----	J041 -----	J010 -F-----	J018 -Y/F--C-----
J034 -F-----	J032 -----	J012 -F-----	J017 -Y/F-----
J038 ----C-----	J030 ----C-----	J013 -F-----	J016 -----
J005 -F-----	J040 -----	J016 ----C-----	J015 -F-----
J029 -F-----	J033 -----	J017 -F--C-----	J012 -----
J037 -F-----	J029 -----	J018 -F-----	J011 -F-----
J035 -F-----	J034 -----	J021 -F-----	J010 -----
J036 -F-----	J039 ----C-----	J023 -F-----	J009 -F-----
	J006 ----C-----	J024 -F-----	J008 -F-----
		J025 -F-----	J007 -F-----
		J026 ----C-----	J005 -F-----
			J003 -----
			J002 -----

らに感染経路別にみると、血液製剤による感染者においては HLA-A24 陽性者では 11 例中 10 例で 2F であったのに対して HLA-A24 陰性者においては全く見られなかった (図 2A)。この頻度の差は有意であった ( $p < 0.01$ ) ことから、Nef138-2F を持つ HIV は CTL からのエスケープ変異ウイルスであり、HLA-A24 陽性感染者では選択され、優位に増殖していることが示唆された。

それに対して性行為による感染者においては HLA-A24 陽性者では 12/14 で 2F であったのに対して HLA-A24 陰性者においては 9/16 が 2F であり (表 2)、有意な差は見られなかった。この結果と 1) 血液製剤は主に米国で製造されており、米国で 1980 年代に流行していた HIV に汚染されていた、2) 日本人集団における HLA-A24 のアレル頻度は 30% 以上であるのに対して米国人集団においては人種を問わず 10% 以下である、3) 性行為による感染は日本国内でのものであり、日本国内で流行している HIV に感染した、ということを考えあわせると「日本人集団では Nef138-2F を持つ CTL エスケープ変異ウイルスが流行しており、HLA-A24 陰性者は既に Nef138-2F の配列を持つウイルスに感染した」と考えられる。

また Nef138-2F であった感染者に関して経時的に調べると Nef138-2F は HLA-A24 陽性感染者体内では維持されるのに対して (data not shown), HLA-A24 陰性感染者体内では数カ月～数年のうちに消失することが明らかになった (表 3)。この結果から Nef138-2F を持つ HIV は野生型の HIV に比べて HLA-A24 を持つ個体でのみ優位に増殖できることが示唆される。すなわち Nef138-2F は HIV の増殖にとって負の影響を及ぼす変異であり、CTL による選択圧のない HLA-A24 陰性感染者体内ではもともとごく少数存在していた、あるいは復帰変異により新たに生じた Nef138-10 の 2 番目のアミノ酸が Y である HIV に取って代わられると考えられる。

## 2) CTL からのエスケープのメカニズム

CTL による選択圧からのエスケープのメカニズムは多

岐に及ぶ。細胞内で合成されたタンパク質はその一部がプロテアソームなどによるプロセッシングを受けペプチド断片となる。そして TAP と呼ばれるアミノ酸トランスポーターを介して粗面小胞体へと輸送され、さらにアミノペプチダーゼによって N 末端の数アミノ酸が切断され MHC class I 分子に提示され得る長さのペプチドになる。そして MHC class I 分子を構成する heavy chain,  $\beta 2$  ミクログロブリン ( $\beta 2m$ ) と出会い MHC class I/ペプチド複合体を形成し細胞表面へと輸送され、CTL の T 細胞レセプターによって認識される。この過程のどこか 1 カ所にでも不具合が生じれば HIV 感染細胞は CTL による攻撃から逃れることができる。

そこで私は Nef138-10 におけるエスケープのメカニズムについて、Nef138-2F とともに HLA-A24 陽性感染者で見られた Nef138-5C, Nef138-2F5C に関して検討を行った<sup>8)</sup>。私たちはまず Nef138-10 とその変異ペプチドの HLA-A24 分子との結合能を調べた。その結果 Nef138-2F は Nef138-10 と比較して結合能に大きな差異は見られなかったが、Nef138-5C, Nef138-2F5C の結合能は Nef138-10, Nef138-2F に比して低いことがわかった。また 5 名の HIV 感染者の末梢血単核球 (PBMC) を用いてそれぞれのペプチドに対して反応する T 細胞の頻度を ELISPOT assay にて定量した。5 名中 4 名で Nef138-2F に対する IFN $\gamma$  産生細胞が最も高頻度に存在した。さらに 50% の IFN $\gamma$  産生細胞を検出できるペプチド濃度 ( $1/2_{max}$ ) を決定したところ、3 名は Nef138-10 と Nef138-2F はほぼ同様の濃度であり、2 名では Nef138-2F の方が 1,000 倍以上低濃度であることがわかった (図 1)。それに対して Nef138-5C, Nef138-2F5C では IFN $\gamma$  産生を引き起こすには  $1\mu M$  以上の高いペプチド濃度が必要であることがわかった。以上の結果から Nef138-5C, Nef138-2F5C は HLA-A24 分子との結合能の低下によるエスケープ変異体であることが示唆された。また Nef138-2F は感染者 PBMC 中の特異的 CD8 陽性 T 細胞によって Nef138-10 と同等あるいはそれ以上に認識され得ることから、HLA-A24 分子に抗原提示されてから CD8 陽性

表 3 HLA-A24 陰性 HIV 感染者における Nef138-10 の経時的変化

症例1		症例2	
	RYPLTFGWCF (%)		RYPLTFGWCF (%)
1996	-F--C----- (91)	1998	-F----- (92)
	----C----- (9)		-F-----R-- (8)
1997	-F--C----- (57)	1999	----- (100)
	----C----- (43)		
1998	-F--C----- (20)	2003	----- (100)
	----C----- (80)		

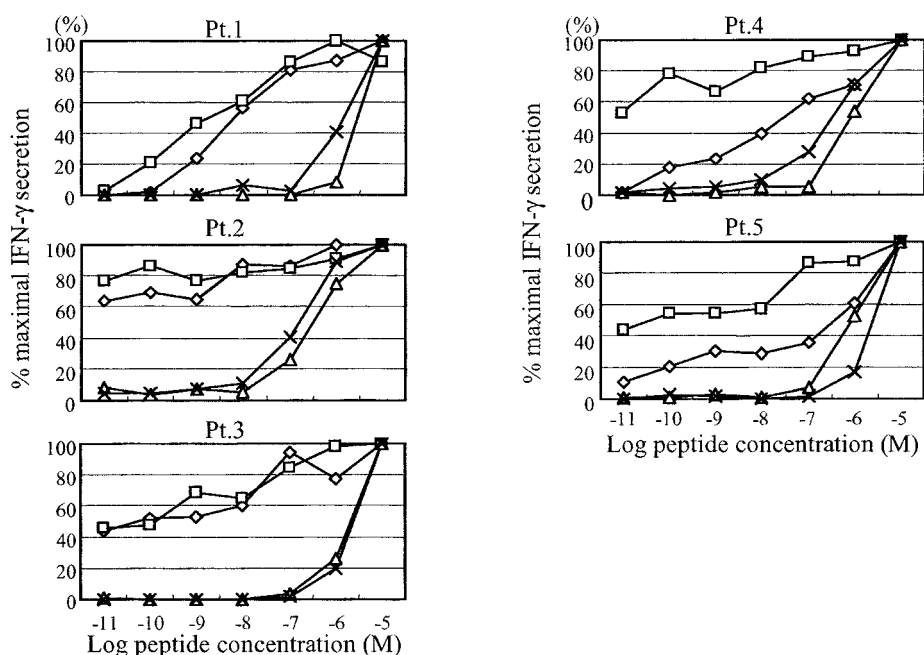


図 1 Nef138-10 とその変異ペプチドに対する HIV 感染者 CD8 陽性 T 細胞の反応性。10 倍段階希釈 ( $10^{-11}$ ~ $10^{-5}$  M) した Nef138-10 ( $\diamond$ ) と変異ペプチド Nef138-2F ( $\square$ ), Nef138-5C ( $\triangle$ ), Nef138-2F5C ( $\times$ ) を用いて ELISPOT assay の結果を示す。各ペプチドにおいて最大のスポット数を 100% とし、各希釈段階でのスポット数を%で表した。

T 細胞に認識される過程においては Nef138-10 との間に差異はないと考えられる。

そこで私たちは Nef138-2F に関して細胞内で Nef タンパク質として発現してから HLA-A24 分子に抗原提示されるまでの過程において Nef138-10 と違いがあるか検討するために、Nef138-10 あるいは Nef138-2F の配列を持つ Nef タンパク質を発現するセンダイウイルス (SeV) を作製しその感染細胞を標的細胞として Nef138-10 特異的な CTL による細胞傷害活性を調べた。Nef138 における 2F の変異はほとんどの場合で -1 番目のアミノ酸 (エピトープの N 末端側の隣のアミノ酸) の変異を伴うため (イソロイシン (I) からスレオニン (T)), -1 位が I で 2 位が Y の Nef (-1 I2Y) と、-1 位が T で 2 位が F の Nef (-1 T2F) を用いた。CTL は Nef138-2F をペプチドとして作用させた標的細胞は Nef138-10 と同様に傷害することができる 2 つのクローンを用いた (図 2 A)。その結果 Nef138-2F の配列を持つ Nef を発現する標的細胞は Nef138-10 特異的な CTL による認識が低下していることが明らかになった (図 2 B)。このことから Nef138-2F は HLA-A24 分子に提示されるまでの細胞内の過程に起因する抗原提示量の低下により CTL からエスケープしていると考えられる。

### 3) センダイウイルスベクターを使った HIV 特異的 CD8 陽性 T 細胞の検出系の確立と高効率の抗原提示法の開発

近年の新しい免疫学的解析法の進歩により抗原特異的な T 細胞の検出・解析が可能になり、上述したように HIV のコントロールには細胞性免疫が重要であることが明らかになってきた。特に MHC class I テトラマーは有用であることが知られている<sup>9)</sup>。MHC class I テトラマーは抗原ペプチドを提示した MHC class I 分子を多量体化し蛍光標識したもので、フローサイトメーターを用いてその抗原ペプチド特異的な CD8 陽性 T 細胞を高感度に検出できる。MHC class I テトラマーを用いた解析によって HIV 感染急性期では HIV 特異的な CD8 陽性 T 細胞は全 CD8 陽性 T 細胞中の 10% 以上にのぼることなどが明らかになってきた<sup>10,11)</sup>。

MHC class I 分子は多様性に富む重鎖,  $\beta 2m$ , 抗原ペプチド (MHC class I/ペプチド複合体) からなっている。一般的に MHC class I テトラマーの作製は大腸菌による発現系を用いて行われているが、試験管内での巻き戻し (refolding) の過程が必要でその効率は個々の MHC class I/ペプチド複合体により異なり、効率の悪い場合がある。そこで私は真核細胞による発現系を用いて効率の良い MHC class

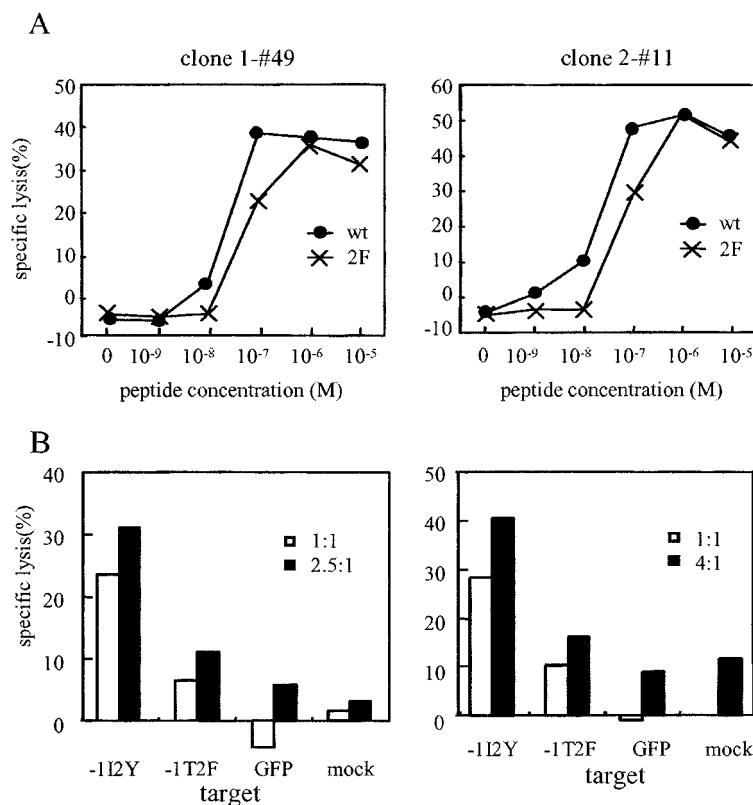


図 2 Nef138-10 特異的な CTL クローンによる Nef 発現細胞の認識。10 倍段階希釈 ( $10^{-9}$ ~ $10^{-5}$  M) した Nef138-10 あるいは Nef138-2F をパルスした HLA-A24 陽性 T 細胞を標的細胞として (A), Nef(-1I2Y), Nef(-1T2F) を発現する SeV 感染細胞を標的細胞として用いた場合 (B) の  $^{51}\text{Cr}$  release assay の結果を示す。

I テトラマーの作製法の開発を試みた<sup>12)</sup>。その際、発現量が高く、大量の高力価ウイルスの調整が容易なセンダイウイルスベクター (SeV) を用いた。

まず私はヒトの MHC クラス I 分子の重鎖である HLA-A\*2402 細胞外領域の C 末端にビオチン付加配列 (BSP) とヒスチジンタグを持つ融合タンパク質 (A24-BSP<sub>His</sub>) (図 3 A) を発現する SeV を作製した。次いで、HLA-A\*2402 によって提示される HIV-1Nef タンパク質由来のエピトープ (Nef138-10) をリンカーを介して N 末端に付加した  $\beta$ 2m (Nef138- $\beta$ 2m) (図 3 B) を発現する SeV を作製した。これら 2 種類の SeV を重感染させることによって、その感染細胞培養上清に A24-BSP<sub>His</sub> と Nef138- $\beta$ 2m からなる複合体 (A24/Nef138- $\beta$ 2m) が分泌された。A24/Nef138- $\beta$ 2m を精製、ビオチン付加することによって、streptavidin-PE を用いて A24/Nef138- $\beta$ 2m 4 量体 (テトラマー) を作製することに成功した。A24/Nef138- $\beta$ 2m テトラマーを用いて HLA-A24 陽性 HIV-1 感染者の末梢血単核球 (PBMC) を染色したところ、Nef138-10 特異的な CD8 陽性 T 細胞

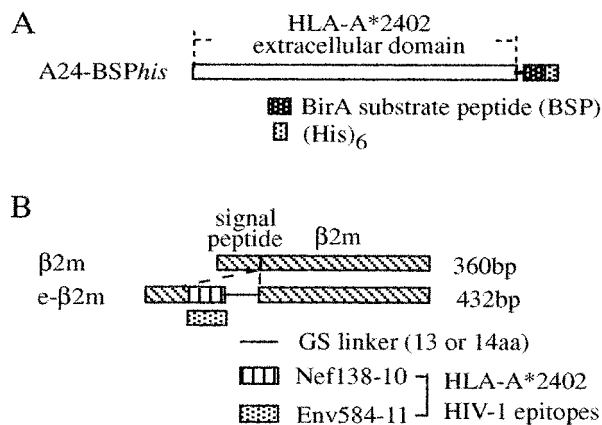


図 3 A24-BSP<sub>His</sub> (A), エピトープ融合  $\beta$ 2m (e- $\beta$ 2m) の構造。

を高感度に検出することが可能であり、汎用されている大腸菌発現系を用いて作製されたテトラマーと同等の感度であった (図 4)。

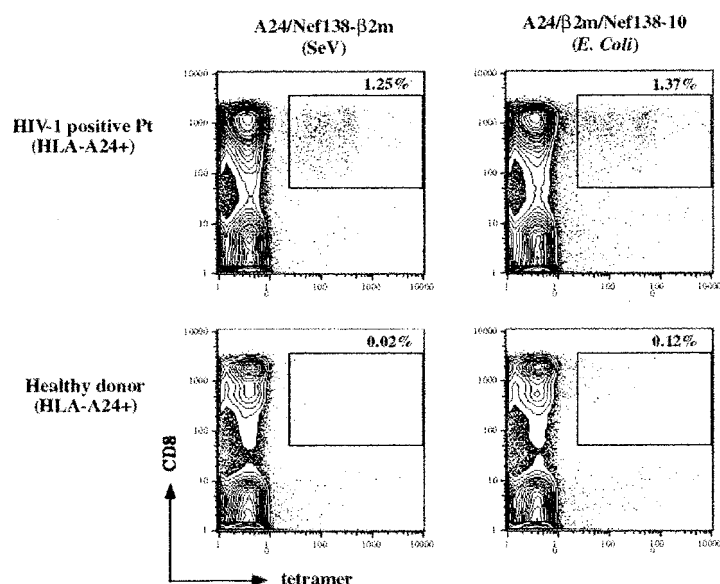


図 4 A24/Nef138-β2m テトラマーによる HIV-1 感染者 PBMC の染色。

さらに Nef138-β2m を発現する SeV を用いて細胞表面上の HLA-A24 分子による抗原提示を増強することを試みた。Nef138-β2m を発現する SeV 感染細胞培養上清をパルスした HLA-A24 陽性細胞を標的細胞として、Nef138-10 特異的な CTL クローンによる細胞傷害活性を測定した。その際、対照として HLA-A\*2402 拘束性の他の HIV-1 Env タンパク質由来のエピトープ (Env584-11) を融合した β2m (Env584-β2m) を発現する SeV 感染細胞培養上清を用いてコントロールとした。その結果、Nef138-10 特異的な CTL クローンは Env584-β2m をパルスした標的細胞に対して細胞傷害活性を示さず、Nef138-β2m をパルスした細胞特異的に傷害した。また、その傷害活性は飽和濃度の Nef138-10 ペプチドをパルスした場合とほぼ同等であった (図 5 A)。このことから Nef138-β2m は細胞外から可溶型分子として細胞にパルスした場合 MHC クラス I 分子によって提示され、特異的な CTL によって認識され得ることが明らかになった。さらに Nef138-β2m を発現する SeV を HLA-A24 陽性の標的細胞に感染させ同様の実験を行ったところ、Nef138-β2m 発現 SeV 感染細胞が Nef138-10 特異的な CTL クローンによって特異的に傷害された (図 5 B)。

このように MHC クラス I を発現する SeV ベクターを用いて 1) 抗原特異的な CD8 陽性 T 細胞を高感度に検出できるテトラマーの作製が、2) エピトープを融合した β2m を細胞外からパルス、もしくは、3) 感染性ベクターとして用いることにより細胞表面の MHC クラス I 分子上にそのエピトープを提示することが可能であることが明らかになった。以上から、このベクター系は解析法としてばかり

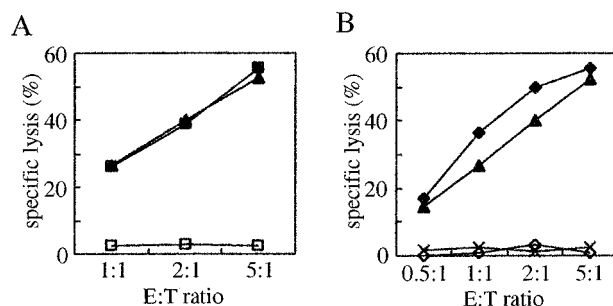


図 5 可溶型 e-β2m, 及び e-β2m/SeV 感染による抗原提示。標的細胞として Nef138-β2m/SeV (■), Env584-β2m/SeV (□) 感染細胞培養上清をパルス (A), あるいは Nef138-β2m/SeV (◆), Env584-β2m/SeV (◇), 野生型 SeV (×) を感染 (B) させた HLA-A24 陽性 T 細胞を用いた Nef138-β2m 特異的な CTL クローンによる <sup>51</sup>Cr release assay の結果を示す。▲は Nef138-10 ペプチドをパルスした標的細胞を示す。

でなく、HIV 特異的な CD8 陽性 T 細胞を賦活化する免疫治療を目的とした遺伝子治療ベクターとして用いることができる可能性があることが示された。

### 終わりに

ワクチンの開発が急務である HIV 感染症において、HIV 感染に対する細胞性免疫応答の研究は重要である。特に CTL エスケープの研究は感染個体での CTL の動きを知る糸口を与えてくれるだけでなく、ワクチンにおける抗原の

選択に関して有用な知見を与えてくれる。集団における HLA という遺伝的背景を考慮しながらさらに研究が進められていくべきであろう。また、安全で効果的な遺伝子導入法の開発も待たれており、SeV ベクターを含むウイルスベクターのさらなる研究の発展が期待される。

**謝辞**：この度は第 5 回 ECC 山口メモリアルエイズ研究奨励賞を受賞させていただきありがとうございました。今までご指導いただいた岩本愛吉先生および諸先生方、並びに本賞の選考にあられた木村哲先生をはじめ選考委員の先生方に厚く御礼申し上げます。微力ではありますが今後とも臨床に近い立場での HIV 研究に関わっていただきたいと思います。

## 文 献

- 1) McMichael AJ, Rowland-Jones SL : Cellular immune responses to HIV. *Nature* 410 : 980-987, 2001.
- 2) Phillips RE, Rowland-Jones S, Nixon DF, Gotch FM, Edwards JP, Ogunlesi AO, Elvin JG, Rothbard JA, Bangham CR, Rizza CR, *et al.* : Human immunodeficiency virus genetic variation that can escape cytotoxic T cell recognition. *Nature* 354 : 453-459, 1991.
- 3) Borrow P, Lewicki H, Wei X, Horwitz MS, Peffer N, Meyers H, Nelson JA, Gairin JE, Hahn BH, Oldstone MB, Shaw GM : Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. *Nat Med* 3 : 205-211, 1997.
- 4) Goulder PJ, Phillips RE, Colbert RA, McAdam S, Ogg G, Nowak MA, Giangrande P, Luzzi G, Morgan B, Edwards A, McMichael AJ, Rowland-Jones S : Late escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response associated with progression to AIDS. *Nat Med* 3 : 212-217, 1997.
- 5) Shiga H, Shioda T, Tomiyama H, Takamiya Y, Oka S, Kimura S, Yamaguchi Y, Gojoubori T, Rammensee HG, Miwa K, Takiguchi M : Identification of multiple HIV-1 cytotoxic T-cell epitopes presented by human leukocyte antigen B35 molecules. *AIDS* 10 : 1075-1083, 1996.
- 6) Kawana A, Tomiyama H, Takiguchi M, Shioda T, Nakamura T, Iwamoto A : Accumulation of specific amino acid substitutions in HLA-B35-restricted human immunodeficiency virus type 1 cytotoxic T lymphocyte epitopes. *AIDS Res Hum Retroviruses* 15 : 1099-1107, 1999.
- 7) Ikeda-Moore Y, Tomiyama H, Miwa K, Oka S, Iwamoto A, Kaneko Y, Takiguchi M : Identification and characterization of multiple HLA-A24-restricted HIV-1 CTL epitopes : strong epitopes are derived from V regions of HIV-1. *J Immunol* 159 : 6242-6252, 1997.
- 8) Furutsuki T, Hosoya N, Kawana-Tachikawa A, Tomizawa M, Odawara T, Goto M, Kitamura Y, Nakamura T, Kelleher AD, Cooper DA, Iwamoto A : Frequent transmission of cytotoxic-T-lymphocyte escape mutants of human immunodeficiency virus type 1 in the highly HLA-A24-positive Japanese population. *J Virol* 78 : 8437-8445, 2004.
- 9) Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, Barouch DH, McHeyzer-Williams MG, Bell JI, McMichael AJ, Davis MM : Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 274 : 94-96, 1996.
- 10) Kuroda MJ, Schmitz JE, Charini WA, Nickerson CE, Lifton MA, Lord CI, Forman MA, Letvin NL : Emergence of CTL coincides with clearance of virus during primary simian immunodeficiency virus infection in rhesus monkeys. *J Immunol* 162 : 5127-5133, 1999.
- 11) Wilson JD, Ogg GS, Allen RL, Davis C, Shaunak S, Downie J, Dyer W, Workman C, Sullivan S, McMichael AJ, Rowland-Jones SL : Direct visualization of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes during primary infection. *AIDS* 14 : 225-233, 2000.
- 12) Kawana-Tachikawa A, Tomizawa M, Nunoya J, Shioda T, Kato A, Nakayama EE, Nakamura T, Nagai Y, Iwamoto A : An efficient and versatile mammalian viral vector system for major histocompatibility complex class I/peptide complexes. *J Virol* 76 : 11982-11988, 2002.