

我が国の HIV-1 感染血友病患者における HIV-1 V3 領域 型特異的抗体に関する研究

—その同定ならびに抗体力価と臨床像との関連—

奈良県立医科大学第2内科学教室

山中 貴世

STUDIES ON THE IDENTIFICATION OF TYPE-SPECIFIC ANTIBODY AGAINST HIV-1 V3 LOOP, AND ITS CLINICAL SIGNIFICANCE IN HIV-1- INFECTED JAPANESE HEMOPHILIACS

TAKAYO YAMANAKA

Second Department of Internal Medicine, Nara Medical University

Received November 30, 1995

Abstract: The V3-domain within gp120 of HIV-1 elicits virus neutralizing antibodies (Ab). In North American-European strains of HIV-1, the GPGR-motif of V3-loop is conserved, whereas in African strains this motif is substituted by GP (or L) GQ. Therefore, a linear amino acid sequence including these motifs is called the principal neutralizing determinant (PND). However, the correlation between clinical stage of HIV-1-infected individuals and anti-PND Ab titers has not yet been well investigated.

In this paper, I established that a high frequency (44%) of anti-PND Ab against HIV-1 MN strain was observed in 93 seropositive Japanese hemophiliacs using a panel of PND-peptides and an enzyme-linked immunosorbent assay. The cDNA sequence analysis of V3-domain of HIV-1 isolated from patient sera also revealed that the high-responder against PNDMN-peptide well conserved the original sequence. Further, based on the determination of anti-PNDMN Ab (MN-Ab) titer during the past 10 years, 35 HIV-1-infected Japanese hemophiliacs with a well-characterized natural history were categorized. Group 1: MN-Ab was consistently negative (<20). Group 2: MN-Ab titer was within 20-100. Group 3: MN-Ab titer was initially high, but decreased later. Group 4: MN-Ab titer was kept high (>100). Patients of group 1 were further divided into two subgroups based on CD4-positive cell count; namely, subgroup 1a and subgroup 1b. Without exception, the patients belonging to groups 1a, 2, and 3 showed a consistent decrease in CD-4 positive cell counts and a progression to HIV-1-induced disease. Virus isolation test was frequently positive (65-69.4%). In contrast, the patients of group 4 remained asymptomatic carriers. Virus isolation was also less frequent (16.0%). In addition, a marked increase in serum IgA levels was found in many patients of groups 1a, 2, and 3, but this was not seen in any patients of group 4. These results indicate that a high level of anti-PNDMN Ab titer in sera well reflects retardation of the disease progression.

Index Terms

HIV-1, V3-loop, principal neutralizing determinant, anti-PNDMN-antibody, hemophiliacs

結 言

後天性免疫不全症候群(Acquired Immunodeficiency Syndrome : AIDS)の主な原因ウイルスである HIV-1 の被膜(env)糖蛋白質 gp 120 はアミノ酸残基約 480 個からなるポリペプチドで、分子内に多数の糖側鎖を有しているため総計 120 kDa の分子質量を示す。また、分子内に 18 個の半システイン残基が存在することから 9 個のジスルフィド結合が形成され、複雑なループ構造を呈している。このことから gp 120 は I~V の不変領域(conserved region)と V1~V5 の高度可変領域(hypervariable region)とに区分されるが¹⁾、特に V3 ループドメインは、(1)主要中和領域(principal neutralizing determinant : PND)を有する^{2)~12)}、(2)細胞障害性 T リンパ球(CTL)の class I 主要組織適合抗原基とヘルパー T リンパ球認識部位に対するエピトープを有する、(3)マクロファージとマイクログリアとに対する親和性(tropism)の主要決定因子となる^{13)~15)}、などの重要な機能を担っている。現在までに 1,000 以上の V3 ループドメインの変異株が同定されているが¹⁶⁾、これらは PND 領域に見られる一定のアミノ酸配列から大別すると Gly-Pro-Gly-Arg[GPGR]構造を有する北米・ヨーロッパ型と Gly-Pro(Leu)-Gly-Gln[GP(L)GQ]構造を有するアフリカ・タイ型とに分類される。

一方、Berman ら¹⁷⁾は、この PND III B に対して作成されたマウスモノクローナル抗体がチンパンジーにおける HIV-1 の細胞への感染を *in vitro* で阻止すると報告していることから、高力価抗 PND 抗体を有する HIV-1 感染患者では AIDS 発症を遅延させることが期待される。また、将来、非感染性 PND を抗原としたワクチンにより対応する HIV-1 感染を防止しうることが想定される。既に著者ら¹⁸⁾は、奈良県立医科大学で観察中の血友病患者 44 名における、代表的な 7 種類の HIV-1 変異株の PND 部分の合成ペプチド(それぞれ 15 アミノ酸残基)を作成し、これを固相化した酵素免疫測定法(enzyme-linked immunosorbent assay : ELISA)を確立した。この方法を用い抗 PND 抗体の種類を同定したところ、HIV-1 MN 株に対する抗体(抗 PND MN 抗体)が高頻度(45.5%)に検出されることを認めている。

本研究の目的は、かかる型特異的抗 PND MN 抗体が本邦血友病患者に普遍的に検出されるかどうかを明らか

にすること、さらに長期間患者の natural history がよく保存されている血友病症例でこれら抗 PND 抗体の推移が患者の病状・AIDS 発症と密接に関連するかを疫学的、免疫学および分子生物学的手法を用いて明らかにすることである。これらの研究成果は将来エイズワクチン開発に重要な基礎資料を提供するものと考えられる。

対象と方法

1. 被検血清

抗 PND 抗体の種類同定のために、奈良県立医科大学小児科・第二内科で観察中の血友病 A 患者 91 例、厚生省 HIV 感染者発症予防・治療に関する研究班の Natural History(NH)委員会で集積された全国の血友病 A 患者 79 例の計 170 例から 1 検体ずつ無作為に抽出した -80°C 凍結保存血清を用いた。これらのうち、従来の Western blotting 法による確認試験で HIV-1 抗体陽性例は 93 例、HIV-1 抗体陰性例は 77 例であった。対照群として 20 歳から 45 歳までの HIV-1 抗体陰性の健常人血清 49 例と自己免疫疾患例血清 31 例(SLE 14 例、Sjögren 症候群 8 例、進行性全身性硬化症 5 例、多発性筋炎 2 例、慢性リウマチ 1 例および MCTD 1 例)を用いた。これら自己免疫疾患例血清は全例、本学皮膚科宮川幸子助教授から御患与戴いた。

次に、患者の臨床像と抗 PND 抗体との関係を調べるため、HIV-1 抗体陽性血友病患者のうち、過去 10 年間の患者 natural history が良く把握されている 35 症例から経時的に採取され、-80°C で凍結保存されていた血清、延べ 347 検体を用いた。その内訳は、奈良県立医科大学の観察例(血友病 A 患者 24 例 248 検体、血友病 B 2 例 15 検体)、東京医科大学臨床病理学教室の観察例(血友病 A 4 例 40 検体、血友病 B 2 例 10 検体)、聖マリアンナ医科大学小児科の観察例(血友病 A 3 例 34 検体)であった。

2. V3 ループ内 PND 領域の合成ペプチドの作成

Merrifield¹⁹⁾の固相法によりそれぞれ全長 15 アミノ酸残基からなる合成ペプチドを 7 種類作成した。精製した合成ペプチドはいずれも C8 カラムによる逆相高速液体クロマトグラフィーで単一のピークを示し、その純度検定は Applied Biosystems 470 A protein sequencer で行なった。これら合成ペプチドの種類は GPGR 構造を有する北米・ヨーロッパ型 5 種(III B, MN, RF, SC, WMJ-2)と GP(L)GQ 構造を有するアフリカ・タイ型 2 種

(Af1. con, Af2. con)との計7種であった(Table 1).

3. PND ペプチド-ELISA

PND ペプチド-ELISA はすでに報告したが¹⁸⁾, その方法を簡単に述べると, 7種類の合成 PND ペプチドを最終濃度 2 µg/ml になるようにコーティング緩衝液(0.1 M NaHCO₃, pH 9.6)で希釈し, Nunc 社(Denmark)製 ELISA 用マイクロプレートに 50 µl ずつ加え, 4°C で一昼夜放置し, ペプチドをプレートに固相化した. 次に, 洗浄緩衝液(0.1% Tween 20 加磷酸緩衝液, PBS-T pH 7.4)各々 200 µl でプレートを5回洗浄後, ブロッキング緩衝液(3% ウシ血清アルブミン加 PBS, BSA-PBS)200 µl を各ウェルに加え, 37°C, 120 分間インキュベートし, 未反応部分をブロックした. この後, さらに上記洗浄緩衝液で5回洗浄し, PBS で20倍希釈した被検血清を 50 µl ずつ2ウェルに加え, 4°C で一昼夜反応させた. 再度, 洗浄緩衝液で5回洗浄後, 2,000 倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ヒト IgG 抗体(生化学工業)50 µl を各ウェルに加え, 37°C, 120 分間インキュベートした. さらに洗浄緩衝液で5回洗浄後, 50 µl の発色液(5 mg の *p*-nitrophenyl-phosphate を 5 ml の基質緩衝液 10% -diethanolamine, 0.5 mM MgCl₂, 0.02% NaN₃, pH 9.6 で溶解)を各ウェルに加え, 正確に 10 分間室温にて遮光放置後, 25 µl の反応停止液(3 M NaOH)を加え, 呈色反応を停止した. このプレートをマイクロプレートリーダー MTP-32(コロナ社)を用い, 405 nm の吸光度で比色した. 同時に, 被検血清による非特異的発色を測定するため PND 合成ペプチドを固相化していない別のプレートを用い, 上記と同様の操作を加え吸光度を測定した. 特異的発色はこの結果から非特異的発色の吸光度を差し引いて求めた.

4. 患者血清から分離した HIV-1 の V3 ループドメイン領域の cDNA 解析によるアミノ酸配列決定

NH 委員会が集積した HIV-1 感染者から同定した 6 症例を既報の如く²⁰⁾, 血清中から RNA を抽出し, cDNA に変換後, nested PCR で DNA を増幅し, クローニング

後, 塩基配列を決定する方法で検討した. Boom ら²¹⁾の方法に準じ, 被検血清 50 µl を guanidinium thiocyanate と RNAase inhibitor を含む液中でシリカゲルに吸着させ, 遠心・洗浄後, 沈渣を RNAase inhibitor と DNAase 加溶解液とで一旦溶解し, 逆転写酵素にて cDNA に転換させ, まず HIV-1 V3-C2 ドメインをカバーする 2 つのプライマー: EA 1(TGTACACATGGAATTAGGCC-AGTA)と D(AAATTTCCCCTCCACAATTAA-AACTG)で 1st-PCR を行なった. 次いでその内側の 2 つのプライマー: EB(GCCGGATCCTCAACTCAACTGCTGTAAAT)と EC 1(GCTCTGCAGTCAAATTTCTGGGTCCCCTCCTGAGG)で 2nd-PCR を行った. 最終的に 370 bp の塩基配列を増幅し, この後 PCR 産物は BamHI を用い, 大腸菌 plasmid pUEXYI に組み込んでクローニングし, 自動 sequencer で発現クローンの DNA 配列解析を行った²²⁾.

5. 抗 PND MN 抗体力価測定法

抗 PND MN 抗体(以下 MN 抗体)力価測定は既報¹⁸⁾のごとく, MN ペプチドを固相化した Nunc 社製マイクロプレートに連続希釈した被検血清を添加し, 上記 PND ペプチド-ELISA を行い, それぞれの吸光度を求め, その値が予め測定しておいた cut-off 値(0.254 at 405 nm)と X 軸上で交わる点の被検血清希釈倍率を MN 抗体力価とした. この結果, 原血清希釈 20 倍以下は陰性と判定した.

6. 各種 HIV マーカー

HIV マーカーとして, 末梢血中の CD 4 陽性細胞数と CD 8 陽性細胞数とをフローサイトメトリー法で, また, 血清 IgG, IgA および IgM 値はビークレットネフェロメトリー法で測定した.

7. ウイルス分離

患者から採取した 10 ml のヘパリン加新鮮全血から Ficoll-Conray 法にて, 末梢血単核球分画を分離し, 同様に分離した正常人末梢血 PHA 刺激単核球と PHA 刺激条件下で共に培養した. HIV-1 ウイルスの分離測定は

Table 1. Sequences of synthetic peptides used in anti-PND antibody ELISA

Peptide name	Clinical strain	Amino acid sequence
IIIB	HIVIIIB	³⁰⁸ EIQRGPGRAFVTIGK ³¹²
MN	HIVMN	RIHIGPGRFYTTKN
RF	HIVRF	SITKGPGRVIYATGQ
SC	HIVSC	SIHIGPGRFYATGD
WMJ-2	HIVWMJ-2	SLSIGPGRFRTREI
Af1. con	HIVAf1. con	SIRIGPGQAFYATGD
Af2. con	HIVAf2. con	VGPIGLGQALYTTTRI

HIV-1 P 24 抗原の測定を ELISA で行い、半定量は被検
 単核球分画の最終希釈度による感染度の変化で表した²⁰⁾。
 上記長期観察 HIV-1 感染血友病 35 例の中で、異なっ

た時期に少なくとも 3 回以上ウイルス分離検査が施行さ
 れている 24 症例について検討した。

8. Western blotting 解析

Table 2. Average absorbance of anti-PND antibodies in sera with hemophilia A, autoimmune disease and in healthy individuals

HIV-1 Ab	Hemophilia A		Autoimmune diseases	control
	Positive (n=93)	Negative (n=77)	Negative (n=31)	Negative (n=49)
IIB	0.051±0.077	-0.008±0.044	-0.034±0.046	-0.016±0.043
MN	0.260±0.238	-0.016±0.063	0.001±0.060	-0.002±0.069
RF	0.032±0.090	0.016±0.063	-0.020±0.045	-0.017±0.047
SC	0.043±0.067	0.001±0.055	-0.035±0.046	-0.018±0.056
WMJ-2	0.005±0.065	-0.024±0.050	-0.053±0.073	-0.042±0.076
Af1.con	0.052±0.083	0.024±0.059	-0.041±0.072	0.035±0.047
Af2.con	0.072±0.096	0.026±0.070	-0.010±0.064	0.048±0.055
Average				-0.002±0.064
Cut off value (M+4SD)				0.254

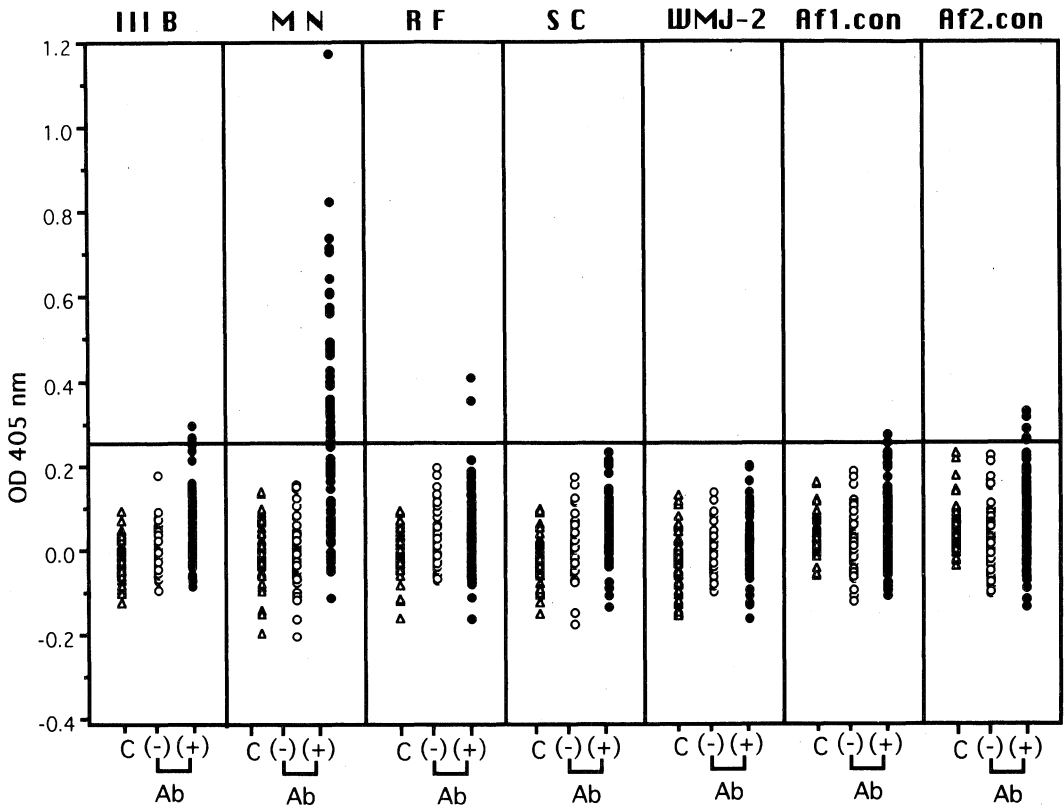


Fig. 1. Actual optical density (OD) at 405nm of anti-PND antibodies against a panel of PND-peptides. OD was measured with an enzyme-linked immunosorbent assay as described in Materials and Methods. C : normal sera control. Ab(-) : hemophilic sera with seronegative reaction to HIV-1. Ab(+): hemophilic sera with seropositive reaction to HIV-1.

Sanofi 社(France)製 Lav Blot I キットを用いた。このキットは HIV-1 を構成する env 蛋白質(gp 160, gp 120 および gp 41), gag 蛋白質(p 55, p 40, p 25 および p 18), pol 蛋白質(p 68, p 52 および p 34)の各エピトープに

対する抗体の検出が可能である。また、本検査は MN 抗体力価の推移により分類した後述の Group 1~4 と亜型を含めた 5 群の患者から代表例を 2 例ずつ選び施行した。

Table 3. Polyclonal analysis of amino acid sequences deduced from nucleotide sequences of the HIV-1 env V3 region

(A) High responder of anti-PNDMN antibody		
NH 20	3: VE INCTPRNNNTRKSIHI	GPGR AFYTTGEIIGNIRQAHC
	1:
	1:G.....
NH 54	4: VKIHCIRPNNNTRKGIHI	GPGR AFYTTGQIIGDIRQAHC
	1:V.....
NH 16	1: VE INCI R PGN NTRKSIHI	GPGR AFYATGEITGNIRQAHC
	1:
	1:
	1:D.I.....
	1:D.....
(B) Low responder of anti-PNDMN antibody		
NH 18	1: VKINCTRPYNNTRKSIHI	GPGR AFFATGEIIGNIRQAHC
	1:
	1:D.....
	1:
	1:Y..ES.....Y..
NH 249	1: CTRPNNNTRKSIINI	GPGR AFYTTGEIIGDIRLAYC
	1:
	1:
	1:G.....
	1:G.....
NH 227	1: VE INCTRPHNNTRKSIHI	GPGG AFYIAGQIIGDIRQAHC
NH 11	1: CTRPSMKTRKGIHI	GWKR IMYATGEIKGDIRQAHC

Table 4. Hemophilia A patients died of AIDS during Nov 1986-Jan 1995 at Nara Medical University Hospital and its related hospitals

No.	Case	Date on death	Complications	Anti-MN Ab titer
1.	A-111	Nov 1986	PCP* susp. +Dementia	ND**
2.	A-142	Mar 1988	PCP	ND
3.	A- 32	Jan 1989	PCP+Choroiditis by CMV	<20
4.	A-164	Aug 1989	Candidiasis	<20
5.	A-141	Nov 1989	PCP	<20
6.	A- 12	Sep 1990	PCP	<20
7.	A- 94	Nov 1990	Aspergillosis	<20
8.	A-136	Aug 1992	PCP susp.	<20
9.	A- 28	May 1992	PCP	<20
10.	A- 17	Sep 1993	IP*** by CMV	
11.	A- 15	Dec 1994	Bacterial pneumonia	44
12.	A- 88	Jan 1995	ND	ND

PCP* : Pneumocystis carinii pneumonia
 ND** : not determined
 IP*** : Interstitial pneumonia

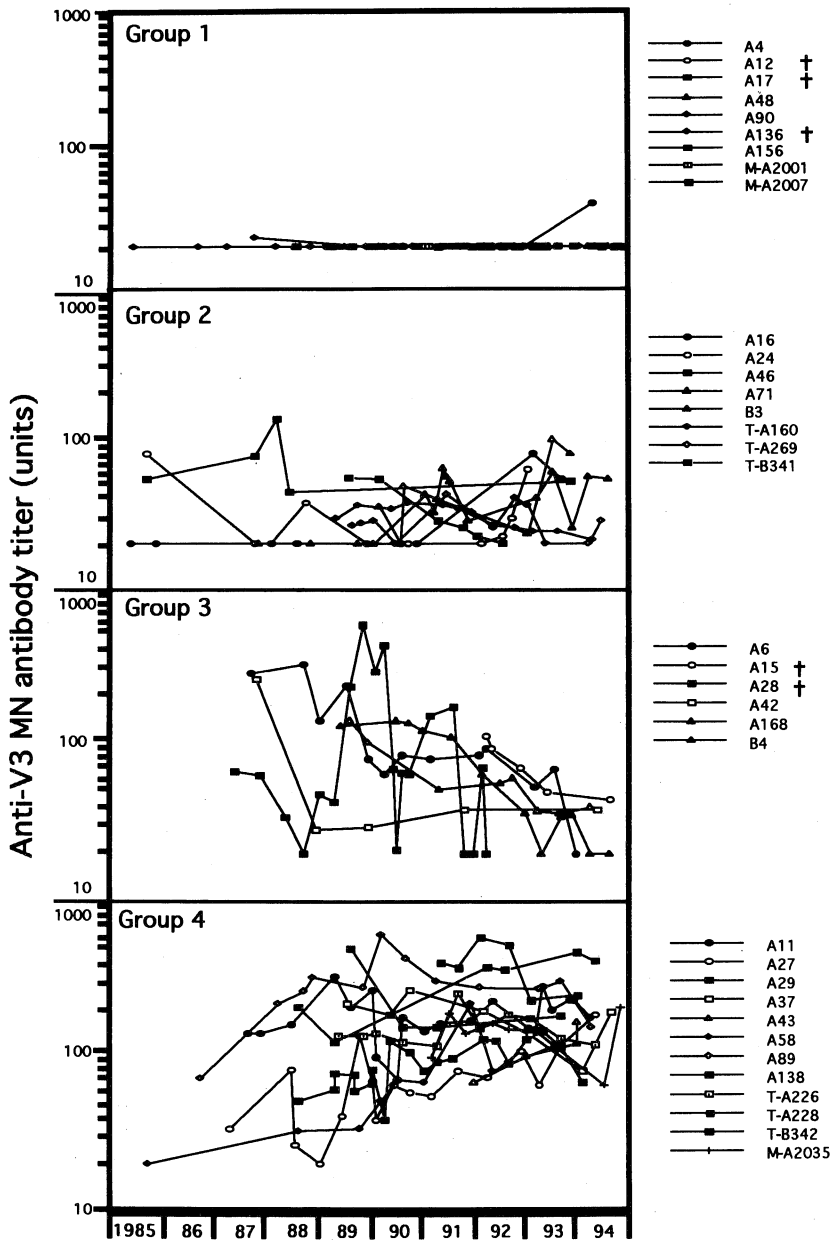


Fig. 2. Serial anti-V3 MN antibody titer of 35 HIV-1-infected Japanese hemophiliacs over the past 10 years. 35 HIV-1-infected Japanese hemophiliacs with a well-characterized natural history were categorized according to anti-PNDMN Ab(MN-Ab) titers. Group 1 : MN-Ab titer was negative. Group 2 : MN-Ab titer was within 20-100. Group 3 : MN-Ab titer was initially high, but decreased later. Group 4 : MN-Ab titer was kept high over ca 100.

結 果

1. 本邦血友病患者血清中の抗 PND 抗体の種類

血友病 A 患者血清計 170 検体, 自己免疫疾患患者血清 31 検体および健常人血清(対照)49 検体の上記 7 種類の合成 PND ペプチド-ELISA の結果を平均値(M)±1 SD で示した(Table 2). 対照群血清の合成 PND ペプチドに対する吸光度の総平均値は -0.002 ± 0.064 であった。また, これら対照群 PND ペプチド-ELISA 系で HIV-1 抗体陰性患者の血清抗 PND 抗体が陰性と判定できる値

(cut-off 値)は $M+4SD$ であった。この判定基準によると, HIV-1 抗体陽性の血友病 A 患者血清 93 検体中, 抗 PND III B 抗体の陽性は 3 例(3.2%), 抗 PND MN 抗体の陽性は 41 例(44%), 抗 PND RF 抗体の陽性は 2 例(2.2%), 抗 PND Af1.con 抗体の陽性は 1 例(1.1%), 抗 PND Af2.con 抗体の陽性は 5 例(5.4%)であった。他の 2 種類のペプチド(SC と WMJ-2)に対する抗 PND 抗体は全例陰性(0%)であった。自己免疫疾患患者血清はこれら PND ペプチドとほとんど反応せず, 全例抗 PND 抗体は陰性であった。すなわち, 本邦 HIV-1 感染血友病

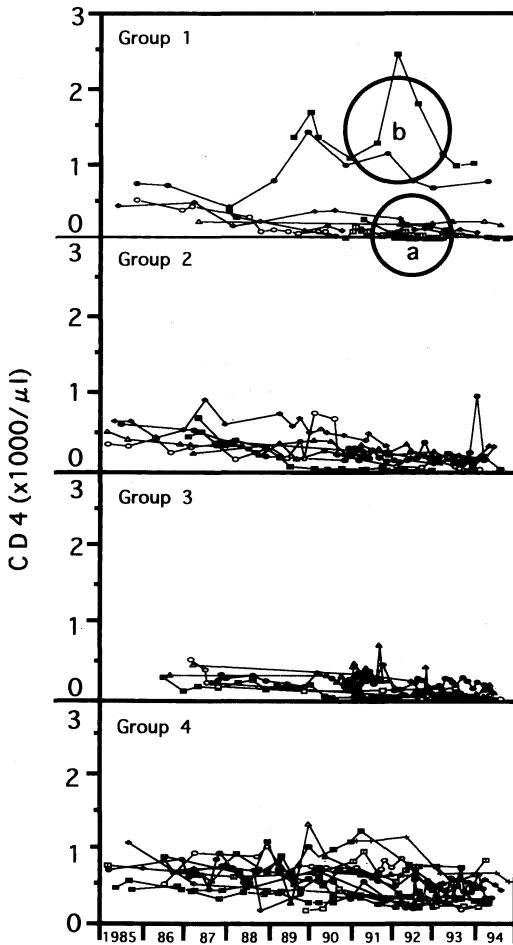


Fig. 3. CD4-positive cell count during the past 10 years. Patients of group 1 were divided into two subgroups based on CD4-positive cell count ; namely, subgroup 1a with marked decrease in its cell count and subgroup 1b with normal ranges of cell counts.

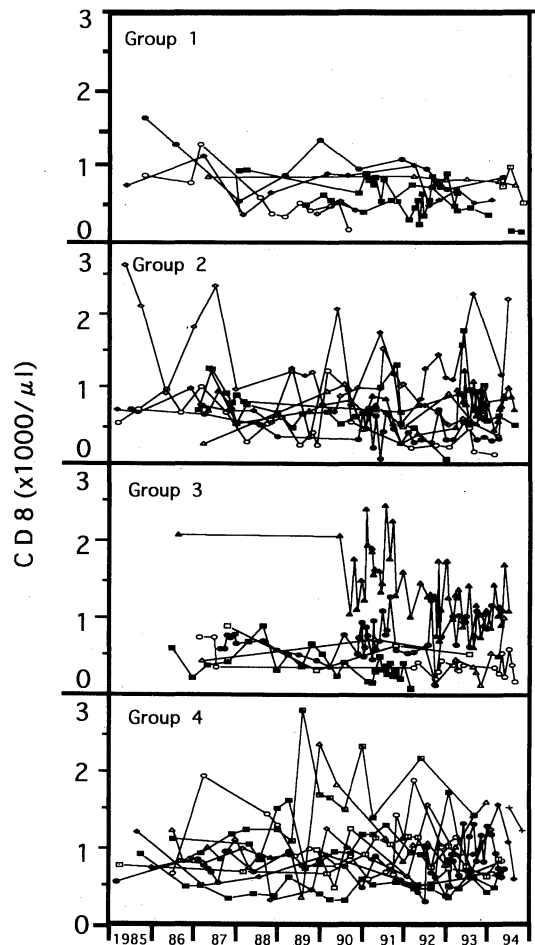


Fig. 4. CD8-positive cell count during the past 10 years. No particular finding was found in patients of group 1-4.

患者は圧倒的優位に MN 抗体を有した. これら検体の吸光度実測値を示した(Fig. 1).

2. HIV-1 V3 ループドメインの cDNA 配列 (Table 3)

血清中の MN 抗体力価と分離ウイルスの genotype との関連性を調べるため, 患者血清を用い HIV-1 V3 領域のアミノ酸配列の解析を行った. 吸光度 405 nm での OD 値が 0.450 以上の高反応を示す 3 症例 (high responder 型: 症例 NH 2, NH 54 および NH 16) では, GPGR を中心とする中和領域のアミノ酸配列が HIV-1 MN の original sequence (RIHIGPGRAFYTTKN) をよく保

っていた. 一方, OD 値が 0.450 以下の低反応を示す 4 症例 (low responder 型: 症例 NH 18, NH 249, NH 227 および NH 11) のうち, NH 227 では GPGR 構造の Arg (R) が Gly (G) に, NH 11 ではこの配列が Gly-Trp-Lys-Arg (GWKR) に置き変わっていた. NH 18 と NH 249 ではこの部位に変異は見られなかったが, その近傍のアミノ酸が変異していた.

3. AIDS 発症で死亡した血友病 A 患者の MN 抗体力価

1986 年 11 月から 1995 年 1 月までに奈良県立医科大学と関連病院とで AIDS 発症し, その合併症で死亡した

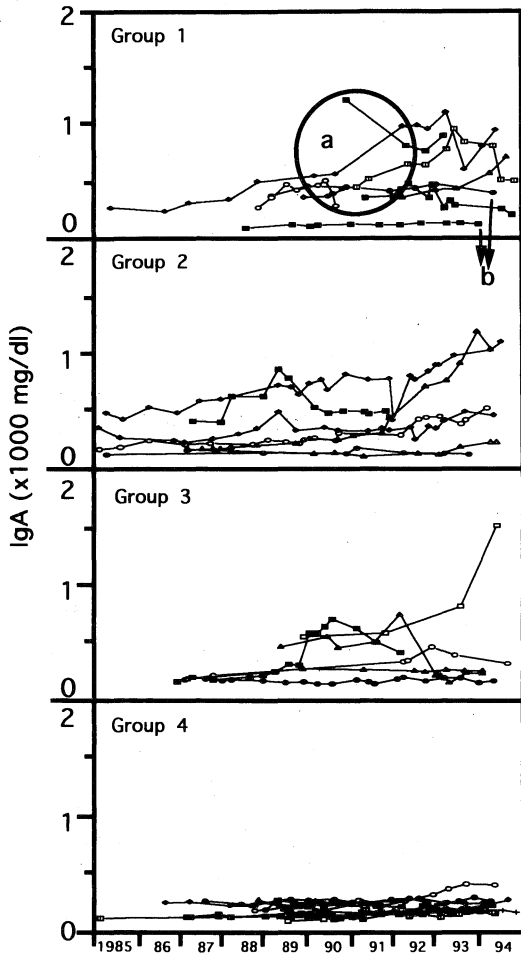


Fig. 5. Serum-IgA level during the past 10 years. The marked increase in serum IgA levels was found in many patients of groups 1a, 2 and 3, but this was not seen in most patients of group 4.

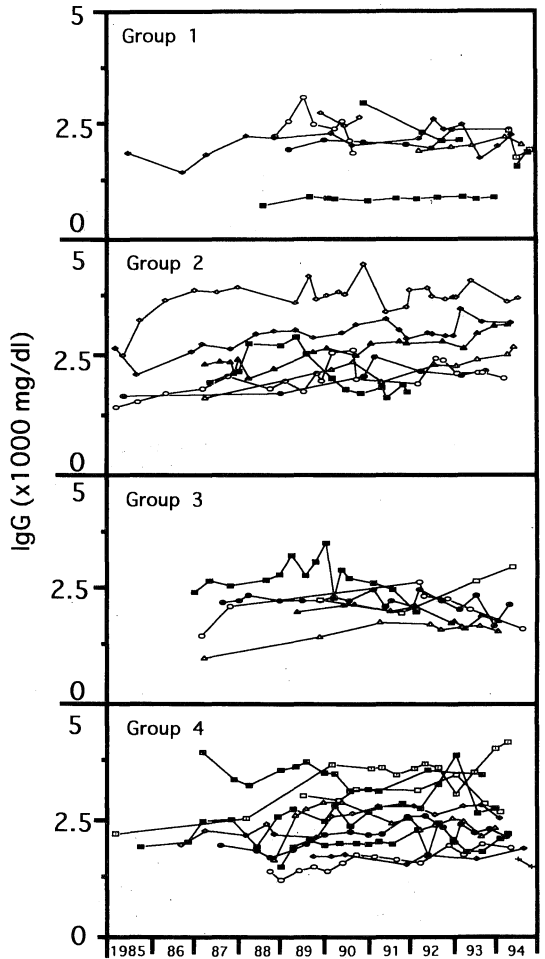


Fig. 6. Serum-IgG level during the past 10 years. In most patients of group 1-4 showed a higher level of serum IgG than normal individuals.

血友病患者 12 症例の内訳と、その主な合併症を示した (Table 4)。このうち 8 症例は死亡前 1 か月以内の血清 MN 抗体力価はいずれも 20 倍以下と陰性であった。死亡 4 か月前に測定した 1 例(A-15)の MN 抗体力価は 44 倍と低値であった。

4. MN 抗体力価の推移を基盤とした患者分類 (Fig. 2)

HIV-1 抗体陽性血友病患者で natural history が良く把握されている 35 症例の過去 10 年間の MN 抗体力価

を測定し、その推移により患者を 4 群に分類出来る。

Group 1: MN 抗体力価が観察期間中はほぼ一定して 20 倍以下(陰性)の症例。この群に分類される 9 例中 3 例は AIDS を発症し、既に死亡している。

Group 2: MN 抗体力価が観察期間中 20 倍から 100 倍の間を変動している症例。この群は 8 例で、うち 6 例は CDC 3~4 群、すなわち AIDS と診断されているが、何れも現在加療中である。

Group 3: MN 抗体価は観察当初 100 倍以上の高力価

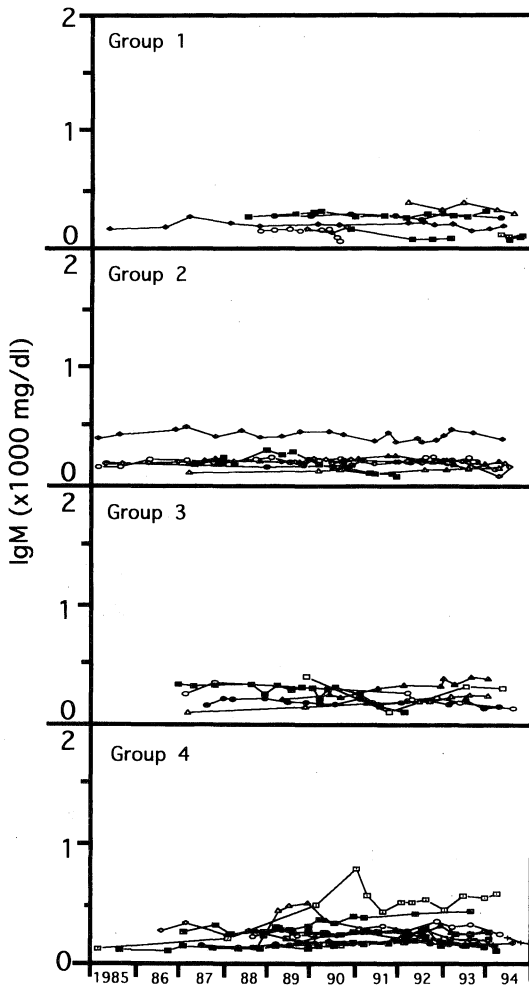


Fig. 7. Serum-IgM level during the past 10 years. No particular finding was found in patients of group 1-4.

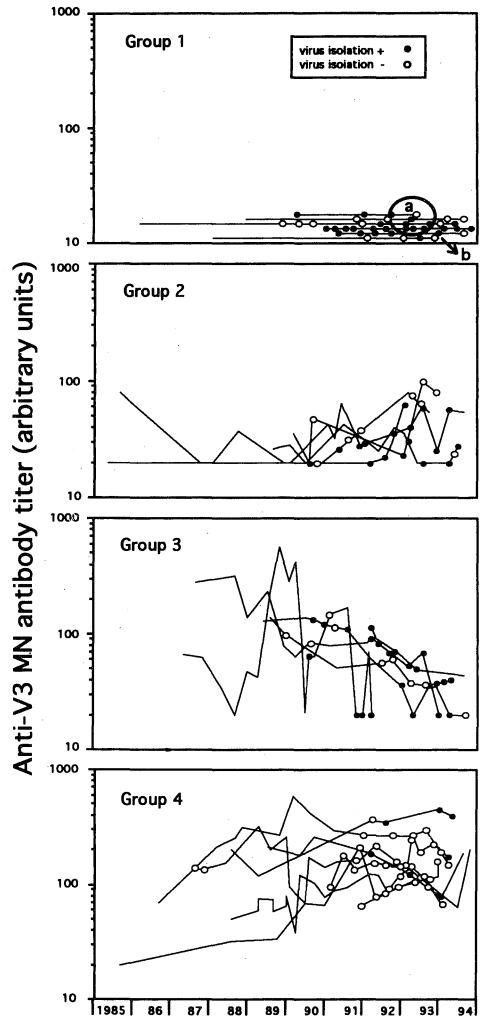


Fig. 8. Virus isolation test results versus anti-V3 MN antibody titers. Lines indicate anti-V3 MN antibody titer in patients of groups 1-4. Open circles indicate negative results, and the closed circles positive results on virus isolation test.

であったが、年余にわたり徐々にその抗体価が減少してきている症例で、この群の6例中2例は既にAIDSを発症して死亡している。4例は何れもCDC 3-4群である。

Group 4: MN抗体価が観察期間を通じて常に100倍以上の高力価を維持しているか、当初は比較的低力価であったが、徐々に100倍以上に上昇してきている症例。この群の12例全例は現在CDC 2群の無症候性キャリア(AC)の状態である。

5. 各種 HIV マーカーの変動

a) CD4 および CD8 陽性細胞数

Group 1はCD4陽性細胞数の推移で2亜型に分類された。すなわち、9例中7例は観察期間中のCD4陽性細胞数の減少は速やかで、これを subgroup 1aとした。また、残り2例はこの間ほとんどCD4陽性細胞数は正常範囲を保っており、これを subgroup 1bとした。Group 2とGroup 3では共にCD4陽性細胞数はGroup 1aと同様に急速に減少していた。しかし、Group 4ではこの減少はほとんど見られないか、または、非常に緩徐であった(Fig. 3)。一方、CD8陽性細胞数は各群内での変動が大きく、変動の程度は各群間で著しい差はみられなかった(Fig. 4)。

b) 血清免疫グロブリン値

血清IgA値はGroup 1a, 2および3の症例など病期進行例の多くで経過と共に顕著な上昇がみられたが、病状安定型のGroup 1bの1例やGroup 4の全例では血清IgA値の上昇は全く観察されなかった(Fig. 5)。一方、血清IgG値とIgM値に関しては観察期間を通じて各群間に明らかな相違はみられなかった(Fig. 6, Fig. 7)。

6. ウイルス分離(Fig. 8)

Group 1aの5症例ではウイルス分離検査36回中25回陽性(69.4%)、Group 1bでは4回中1回(25%)、陽性、Group 2では26回中17回(65.3%)、Group 3では31回中22回(71.0%)陽性であった。しかしながら、Group 4では44回中7回(16.0%)のみが陽性であった。

7. Western blotting 解析

Subgroupを含めた5群につき、各2症例ずつの計10症例に対して経時的Western blotting解析を施行した。Group 1aの2症例(A12とA17)はそれぞれ1990年と1993年とにAIDSを発症して死亡した例で、両症例とも全般的に各抗体の反応性は弱く、A12では全観察期間を通じてp18抗体が完全欠失し、A17ではp25とp18抗体とが完全欠失していた。そのほかgp160, gp120, p

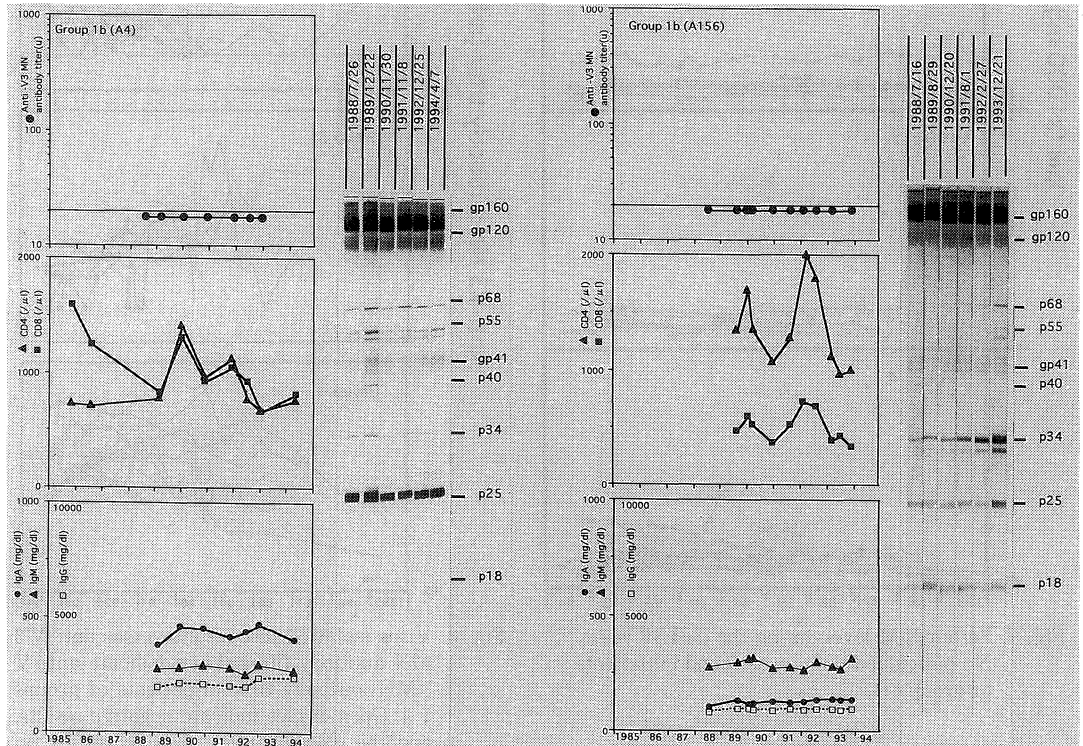


Fig. 9. Western blotting analysis of hemophilic patients of A12 and A17 who belong to group 1a.

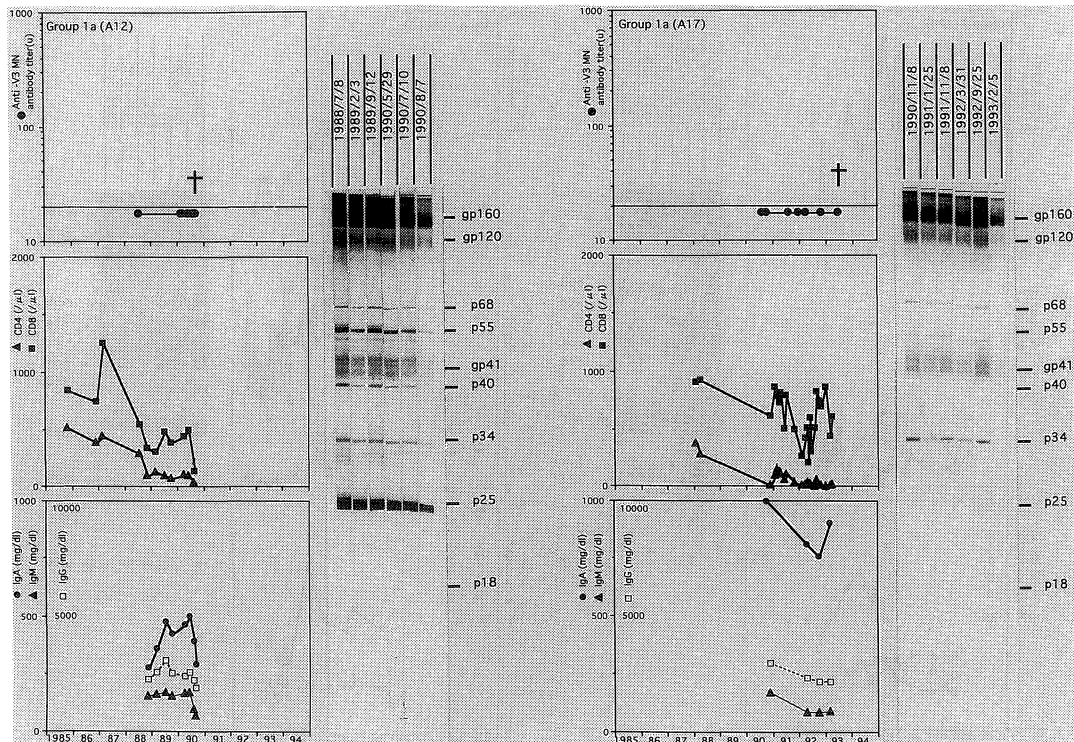


Fig. 10. Western blotting analysis of hemophilic patients of A4 and A156 who belong to group 1b.

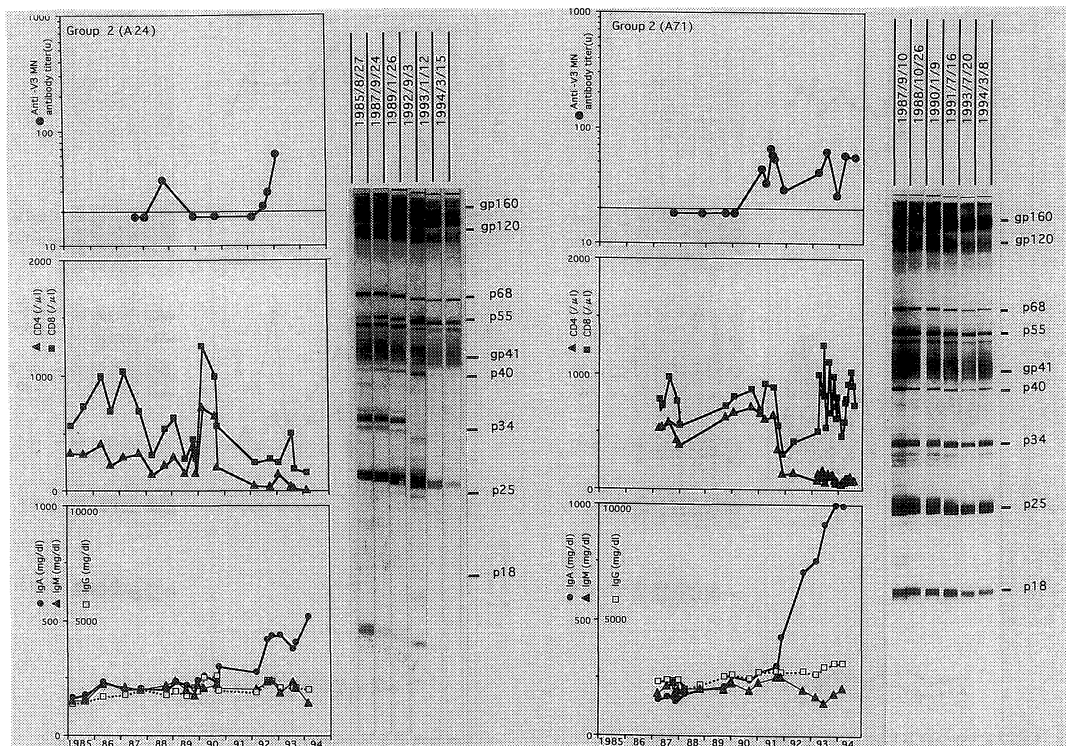


Fig. 11. Western blotting analysis of hemophilic patients of A24 and A71 who belong to group 2.

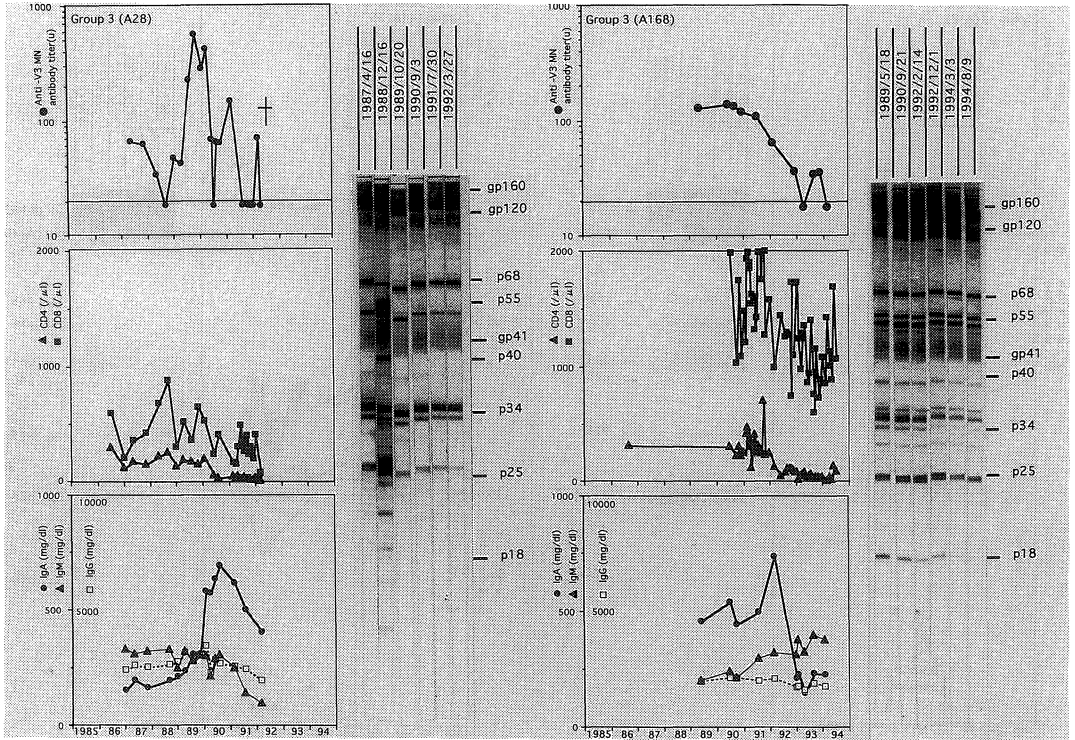


Fig. 12. Western blotting analysis of hemophilic patients of A28 and A168 who belong to group 3.

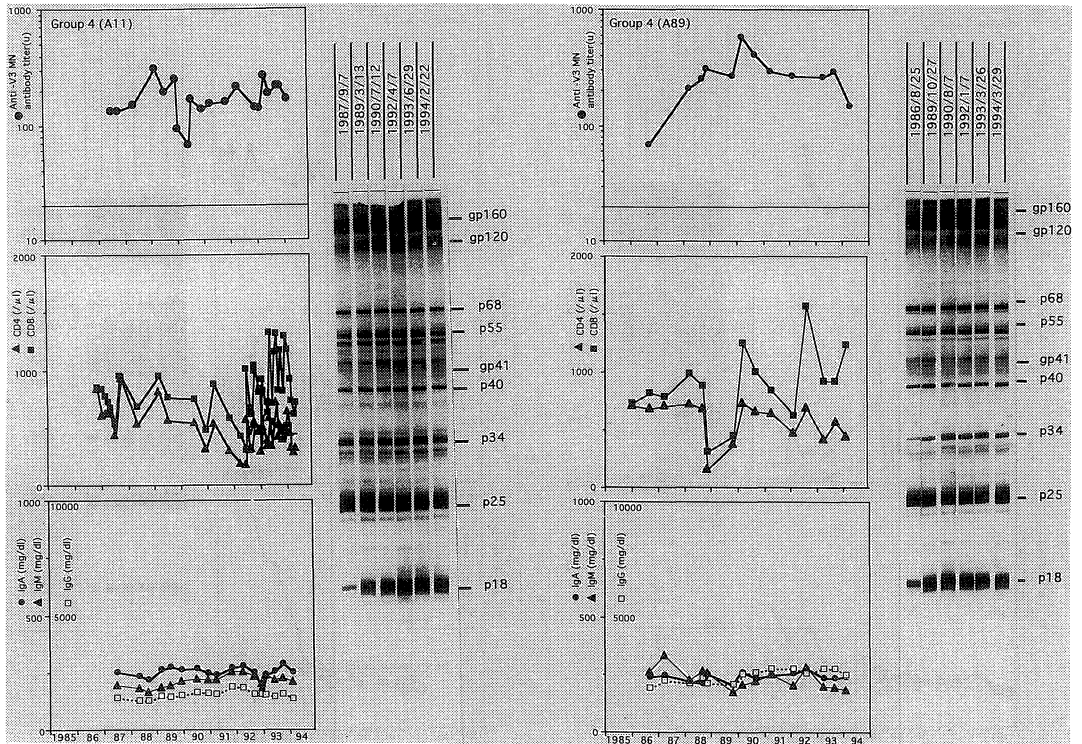


Fig. 13. Western blotting analysis of hemophilic patients of A11 and A89 who belong to group 4.

55, gp 41, p 34 および p 25 に対する抗体の反応性は全期間を通じて全般的に弱く、その程度は両症例共に死亡する数か月前より顕著となった(Fig. 9).

Group 1 b の 2 症例(A 4 と A 156)は CD 4 陽性細胞数がほぼ正常範囲内で AC の状態であるが、A 4 では gp 160, gp 120 および p 25 抗体は存在するものの、p 18 を含む他の抗体は一部あるいは全般的に欠失していた。A 156 ではほぼ全てのエピトープに対する抗体が存在しているものの、反応の全般的な減弱がみられた(Fig. 10). Group 2 の 2 症例(A 24 と A 71)は共に AIDS 発症例であった。A 24 では p 18 に対する抗体は全期間を通じて欠失していたが、p 25 抗体は比較的最近まで存在していた。A 71 ではほぼ全てのエピトープに対する抗体が認められるが、1991 年以降、全般的に抗体反応性はやや減弱してきた(Fig. 11). Group 3 の 2 症例(A 28 と A 168)は共に AIDS 発症例で、A 28 は 1992 年に死亡した。この症例は p 18 抗体が観察期間中ほとんど欠失していた。また、p 25 抗体も 1989 年から急激に反応低下を示した。A 168 では 1994 年以降、p 18 抗体はほぼ完全欠失し、p 40, p 34 および p 25 抗体の反応性は低下傾向を示したが、他の抗体反応は比較的よく保たれていた(Fig. 12). Group 4 の 2 症例(A 11 と A 89)は AC で、特徴的な所見は MN 抗体と HIV-1 各エピトープに対する抗体反応性が過去 8~9 年間ほとんど不変のまま強く保たれていることであった(Fig. 13).

考 察

すでに石本ら¹⁸⁾は本学附属病院で観察中の HIV-1 感染血友病患者における MN 抗体陽性率が 44 例中 20 例(45.5%)と高頻度であることを報告した。次いで、著者はまず、この頻度は本邦の他の血友病センターで観察中の血友病 A 患者においても 93 例中 41 例(44%)と同程度であること、そして、これらの頻度は既報の石本ら¹⁸⁾の報告とほとんど変わらないことを示した。一方、HIV-1 非感染血友病患者 77 例や自己免疫疾患患者 31 例からは MN 抗体は 1 例も検出されなかったことから、今回著者の測定した MN 抗体は、HIV-1 感染血友病患者において極めて特異性の高いものであることが確認された。上記 HIV-1 感染患者 93 例中、MN 抗体以外の抗 PND 抗体陽性例の頻度は III B が 3 例(3.2%)、RF が 2 例(2.2%)、Af 1. con が 1 例(1.1%)、Af 2. con が 5 例(5.4%)で、SC, WMJ-2 合成ペプチドに対する抗 PND 抗体は全く検出されなかった(0%)。この事実は、1985 年以前に本邦で使用されていた非加熱 VIII または第 IX 因子濃縮製剤の大半が米国からの輸入によるものであり、また、米

国あるいはヨーロッパで分離されたウイルス株は MN 株と III B 株とが圧倒的に多いというウイルス分離疫学的結果²⁰⁾を一部反映しているものと考えられる。この現象は本邦のみならず、既に米国⁸⁾、タンザニア⁸⁾およびオランダ⁸⁾等の HIV 感染特定モデル地区の HIV-1 感染非血友病患者集団でも報告されている。しかし、これら MN 抗体の HIV-1 ウイルス中和能については報告者によってその成績が大きく異なっており、MN 抗体の年余に渡る経時的推移と患者の臨床像として種々の HIV マーカーについて言及した研究はなかった。

一般に、HIV-1 の V3 領域は変異性が高く、一旦、型特異的抗 PND 抗体が生じても、その間にウイルス株の変異が起これ、この抗 PND 抗体がもはや中和活性を発揮出来ないという。いわゆる escaping 現象が生ずると考えられて来ている。実際著者が今回、MN 抗体との関連性を検索し得た症例では、PND MN ペプチドと強反応を示すいわゆる high-responder 型症例では GPGR を中心とした V3 ループ領域のアミノ酸配列は original の V3(MN)配列を極めて忠実に保っていた。しかし、PND MN ペプチドと弱反応を示す low-responder 型では GPGR とその近傍のアミノ酸配列とが変異し、V3(MN)配列の基本構造が変化していた。

本学附属病院と関連病院とでは、1986 年から 1995 年までの 11 年間に AIDS 発症で死亡した 12 例の血友病患者を経験している。MN 抗体力価測定が可能であった 9 症例中 8 例は死亡前 1 か月以内の MN 抗体価はいずれも 20 倍以下と陰性であった。残る 1 例は死亡約 4 か月前に測定した MN 抗体価は 44 倍と低値であった。AIDS 末期では液性および細胞性免疫能の低下を伴うため、これらの所見のみでは MN 抗体の存在が AIDS 発症に何らかの作用を及ぼしているとは判断し難い、そこで本研究の標的を MN 抗体価測定を基盤にした臨床疫学的アプローチに置いた。

この目的のため、東京医科大学、聖マリアンナ医科大学および奈良県立医科大学などが国の主な血友病センターで加療を受けている HIV-1 感染血友病患者のうち、特に過去 10 年間の患者 natural history が良く把握されている 35 例を抽出し、MN 抗体の推移のほか、臨床症状、各種 HIV マーカー、ウイルス分離および Western blotting 解析と包括的検討を行った。本邦血友病患者の多くは主要な血友病センターで止血治療を受けていること、HIV-1 の感染源が数種類の輸入血液製剤に限られ、また、その感染時期が 1985 年以前にはほぼ限定されること²³⁾²⁴⁾などから欧米の HIV-1 感染非血友病集団とは異なった homogenous target population と位置づけられ

た。したがって、各種 HIV マーカーの変化を比較検討するに適したモデル集団と考えられた。

まず、これら 35 例の本邦 HIV-1 感染血友病患者はその MN 抗体価の推移により大きく 4 群に分類された。Group 1 は MN 抗体価がほぼ一定して 20 倍以下の抗体陰性を示している群、Group 2 は MN 抗体価が 20 倍から 100 倍以下の低力価を変動している群、Group 3 は MN 抗体価は観察当初 100 倍以上の高力価であったが年余にわたり徐々に低下してきている群、Group 4 は MN 抗体価が常に 100 倍以上の高力価を維持しているか、最近になり 100 倍以上に上昇してきている群である。さらに Group 1 は CD 4 陽性細胞数の著しい低下を示す major subgroup 1a とこの低下がなく病期も AC のまま安定している minor subgroup 1b とに分けられた。Group 1a, 2 および 3 に属する 21 例のうちそのほとんどは CD 4 陽性細胞数の低下と病状の進行とは明らかで、日和見感染を合併し、うち 5 例は既に死亡している。一方、MN 抗体が高力価を維持している Group 4 の 12 例は全てが AC の状態である。また、血清 IgG 値と IgM 値とは各 Group 間で特に明確な差異は認められなかったが、血清 IgA 値は病状進行群の Group 1a, 2 および 3 に属する症例の多くで顕著な上昇を示した。しかし、Group 4 に属する AC 症例では他の HIV マーカー同様、血清 IgA 値もほぼ正常範囲内を維持している。このような血清 IgA 値の著しい差異については現在明確な説明が困難であるが、Janoff ら²⁵⁾は患者血清 IgA が HIV-1 の逆転写酵素活性の増大についてはウイルスの感染増殖に大きく関与する成績を示している。ウイルス分離率結果についても Group 4 では 15.9% で、Group 1a, 2 および 3 での分離率 65%~69.4% と比較して明らかに低値である。

一方、AIDS 発症遅延をもたらす要因については、その多くは抗体を含む液性および細胞性の HIV 感染中和能によると推定されてきたが、前者のうち、被膜(env)蛋白質に対する抗体 gp 41²⁶⁾ および p 25 抗体²⁷⁾ が一定の中和能を有していることについては比較的早期から指摘され、また最近では p 18 (または p 17) 抗体^{28)~30)} も注目されてきている。このような抗体の出現と MN 抗体との関連を調べる目的で各群間の代表例各 2 症例の経時的 Western blotting 解析を行った。Group 4 の患者血清では観察期間中 gp 160 から p 18 に至る全てのエピトープに一定の強い抗体反応性を保っていた。しかし、Group 1a, 2 および 3 の患者血清では抗体反応性は gp 160 と gp 120 とを除き全般的に減弱しているか、あるいは過去数年の間に徐々に減弱傾向にあり、一部には欠落もみられた。これらの中では特に p 18, p 25, p 34 および gp 41 の

抗体反応性の減弱や欠落が顕著であった。しかし、p 25 抗体に関しては、強い抗体反応性は存在するものの病状の進行している症例 A 12, A 24, A 71 および A 168 が存在すること、逆に抗体反応性は弱いものの、病状進行のみられない症例 A 156 の存在が確認された。また、p 18 抗体に関しても、やはり強い抗体反応性を示すものの病状が進行している症例 A 71, そして、抗体反応はほとんどないか著しく減弱しているが AC の状態に留まっている Group 1b の症例 A 4 と A 15 など、やはり病期との間に一定の相関を見出すことはできなかった。

HIV-1 易変異性の問題のほか V 3 ループ領域以外の V 2 ループ領域³¹⁾ や gp 41³²⁾ などに対するモノクローナル抗体にも中和活性がみられることなどから、従来 HIV-1 感染を防止ないし AIDS 発症を遅延する有効な免疫療法の標的エピトープを特定することが困難であるのが実情であるが、著者が血友病という homogenous target population について解析した結果からは、明らかに高力価 MN 抗体を維持している症例では AIDS 発症が遅延していた。以上の成績から、これら高力価 MN 抗体の維持がその中和作用によって HIV-1 MN の分化・増殖を阻止しているものと考え、本研究の成果は今後 HIV-1 感染血友病患者の AIDS 発症予防ワクチンの開発に重要な示唆を与える新しい知見である。

結 語

1. HIV-1 の V 3 ループ領域由来合成ペプチドを用いた抗 PND 抗体測定用 ELISA を用いることによって、本邦血友病患者は HIV-1 変異株の一つである MN 株に対して極めて高いモノクロナリティーを有していることを確認した。

2. 1985 年から 1994 年にかけての natural history がよく把握されている 35 例の血友病患者の MN 抗体価測定と各種 HIV マーカーとを比較検討し、これらの患者を MN 抗体価推移により 4 群に分類した。さらに Group 1 は CD 4 陽性細胞数によって 2 亜型 1a と 1b とに分類された。Group 1a, 2 および 3 に属する症例では病状は急速に進行し、日和見感染や AIDS 関連死が見られ、また、ウイルス分離陽性結果も頻回に認められた。Group 1b の 2 症例は MN 抗体が陰性にもかかわらず AC の状態であった。Group 4 の症例は高力価 MN 抗体を年余にわたって維持しており、病状の安定と低頻度ウイルス分離陽性の所見が認められた。

3. Group 1a, 2 および 3 の症例では、血清 IgA 値が病状の進行と共に顕著に上昇したが、Group 4 の症例では IgA 値は正常範囲内であった。

4. Western blotting 法で観察される HIV-1 各エピトープに対する抗体反応は、Group 4 以外の症例では gp 41, p 34, p 25 および p 18 に対する反応性が減弱あるいは欠乏している症例が多かったが、病状との相関はみられなかった。

5. 血友病 A 患者から分離された HIV-1 V3 ループ領域のアミノ酸配列は、抗 MN 抗体が高反応性を示した症例においては、GPGR 構造を中心とした基本構造がよく保たれていたが、低反応性を示した症例ではこの部位の変異が確認された。

6. 以上から、本研究の成果は将来 HIV-1 感染血友病患者の AIDS 発症予防ワクチンの開発に重要な示唆を与える新知見である。

本稿を終えるにあたり御指導、御校閲を賜った本学内科学第 2 講座成田亘啓教授ならびに御検閲、御助言を賜りました本学小児科学講座吉岡 章教授、細菌学講座喜多英二教授に深く感謝を捧げるとともに、直接御指導、御教示戴いた輸血部藤村吉博助教授に心から感謝致します。さらに HIV-1 分離とウイルス cDNA 配列の決定を行って戴いた国立予防衛生研究所エイズセンター本多三男博士、自己免疫疾患症例の血清を御恵与戴いた本学皮膚科学講座宮川幸子助教授に感謝致します。また、実験の遂行に当たってお世話戴いた石本盛治氏をはじめとする輸血部諸兄姉に御礼申し上げます。

文 献

- Leonard, C. K., Spellman, M. W., Riddle, L., Harris, R. J., Thomas, J. N. and Gregory, T. J. : *J. Biol. Chem.* 265 : 10373-10382, 1990.
- Matsushita, S., Robert-Guroff, M., Rusche, J. R., Koito, A., Hattori, T., Hoshino, H., Javaherian, K., Takatsuki, K. and Putney, S. : *J. Virol.* 62 : 2107-2114, 1988.
- Javaherian, K., Langlois, A. J., McDanal, C., Ross, K. L., Eckler, K. I., Jellis, C. L., Profy, A. T., Rusche, J. R., Bolognesi, D. P., Putney, S. D. and Matthews, T. J. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86 : 6768-6772, 1989.
- Profy, A. T., Salinas, P. A., Eckler, L. I., Dunlop, N. M., Nara, P. L. and Putney, S. D. : *J. Virol.* 144 : 4641-4647, 1990.
- Emini, E. A., Schleif, W. A., Nunberg, J. H., Conley, A. J., Eda, Y., Tokiyoshi, S., Putney, S. D., Matsushita, S., Cobb, K. E., Jett, C. M., Edciberg, J. W. and Murthy, K. K. : *Nature* 355 : 728-730, 1992.
- Zwart, G., Back, N. K. T., Ramautarsing, C., Valk, M., Hoek, L. V. D. and Goudsmith, J. : *AIDS Res. Hum. Retr.* 10 : 245-251, 1994.
- Zwart, G., Wolfs, T. F. W., Valk, M., Hoek, L. V. D., Kuiked, C. L. and Goudsriht, J. : *AIDS Res. Hum. Retr.* 8 : 1897-1908, 1992.
- Warren, R. Q., Anderson, S. A., Nkya, W. M. M., Shao, J. F., Hendrix, C. W., Melcher, G. P., Redfield, R. R. and Kennedy, R. C. : *J. Virol.* 66 : 5210-5215, 1992.
- Devash, Y., Matthews, T. J., Drummond, J. E., Javaherian, K., Waters, D. J., Arthur, L. O., Blattner, W. A. and Rusche, J. R. : *AIDS Res. Hum. Retr.* 6 : 307-316, 1990.
- Hwang, S. S., Boyle, T. J., Lyerly, H. K. and Cullen, B. R. : *Science* 253 : 71-74, 1991.
- LaRosa, G. J., Davide, J. P., Weinhold, K., Waterbury, J. A., Profy, A. T., Lewis, J. A., Langlois, A. J., Dreesman, G. R., Boswell, R. N., Shaddock, P., Holley, L. H., Karplus, M., Bolognesi, D. P., Matthews, T. J., Emini, E. A. and Putney, S. D. : *Science* 249 : 932-935, 1990.
- Shioda, T., Levy, J. A. and Cheng-Mayer, C. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 : 9434-9438, 1992.
- Westervelt, P., Trowbridge, D. B., Epstein, L. G., Brumberg, B. M., Li, Y., Hahn, B. H., Shaw, G. M., Price, R. W. and Ratner, L. : *J. Virol.* 62 : 2577-2582, 1992.
- Chesebro, B., Nishio, J., Perryman, S., Cann, A., O'Brien, W., Chen, I. S. Y. and Wehrly, K. : *J. Virol.* 65 : 5782-5789, 1991.
- Sharpless, N. E., O'Brien, W., Verdin, E., Kufta, C. V., Chen, I. R. and Dubois-darco, M. : *J. Virol.* 66 : 2588-2593, 1992.
- 武部 豊 : *実験医学* 11 : 130-135, 1993.
- Berman, P. W., Gregory, T. J., Riddle, L., Nakamura, G. R., Champe, M. A., Porter, J. P., Wurm, F. M., Hershberg, R. D., Cobb, E. K. and Eichberg, J. W. : *Nature* 345 : 622-625, 1990.
- 石本誠治, 藤村吉博, 山中貴世, 下山丈人, 西田幸世, 松岡弘樹, 西川 潔, 吉岡 章, 成田亘啓, 本多三男, 福島誉子, 渡辺くほみ, 三間屋純一, 目黒

- 嵩, 山田兼雄: 臨床血液 36 : 193-199, 1994.
- 19) Merrifield, R. B. : J. Am. Chem. Soc. 85 : 2149-2154, 1963.
- 20) 本多三男, 渡辺くほみ, 中宗根正, 吉崎ひとみ, 山本伸二, 岡本ゆかり, 福島誉子, 北村勝彦: 厚生省平成4年度 HIV 感染者発症予防・治療に関する研究班研究報告書. p143-151, 1991.
- 21) Boom, R., Sol, C. E. A., Salimans, M. M. M., Jansen, C. L., Dillen, P. M. E. W. V. and Noordaa, J. V. D. : J. Clin. Microbiol. 28 : 495-503. 1990.
- 22) Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. : Molecular cloning. 2nd edition, Vol. 1 and 2, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- 23) Iizuka, A., Nagao, T., Shohji, H., Nitta, A., Yoshihara, N. and Matsushashi, T. : Brit. J. Hemat. 65 : 249-250, 1987.
- 24) 三間屋純一: 小児科診療 27 : 1129-1139, 1993.
- 25) Janoff, E. D., Wahl, S. M., Thomas, K. and Smith, P. D. : J. Inf. D. 172 : 855-858, 1995.
- 26) Francini, G., Robert-guroff, M., Aldovini, A., Kan, N. C. and Wong-staal, F. : Blood 69 : 437-441, 1987.
- 27) Lange, J. M. A., Paul, D. A., Huisman, H. G., Wolf, F. D., Berg, H. V. D., Coutinho, R. A., Danner, S. A. and Noordaa, J. V. D. : Br. Med. J. 293 : 1459-1462, 1986.
- 28) Lange, J. M. A., Wolf, F. D., Krone, W. J. A., Danner, S. A., Coutinho, R. A. and Goudsmit, J. : AIDS 1 : 155-159, 1987.
- 29) Kageyama, S. and Kitamura, T. : Int. J. STD & AIDS 1 : 129-131, 1990.
- 30) Kageyara, S., Katsumoto, T., Ismail, S. I., Shimmen, T., Taniguchi, K., Sasao, F., Gao, M., Wakamiya, N., Tsuchie, H., Ueda, S. and Kurimura, T. : Working conference on AIDS sponsored by the Japan-United States cooperative medical science program (CMSP) p33 (Abstract), 1995.
- 31) Fung, M. S. C., Sun, C. R. Y., Gordon, W. L., Liou, R. S., Chang, T. W., Sun, W. N. C., Daar, E. S. and HO, D. D. : J. Virol. 66 : 848-856, 1992.
- 32) Purtscher, M., Trkola, A., Gruber, G., Buchacher, A., Predl, R., Steindl, F., Tauer, C., Berger, R., Barrett, N., Jungbauer, A. and Katinger, H. : AIDS Res. Hum. Retr. 10 : 1651-1658, 1994.