

エイズ発症予測マーカーとしての抗 p17 抗体の有用性の検討

鳥取大学医学部ウイルス学教室 (主任 栗村 敬教授)

景 山 誠 二

Significance of anti-p17 as an HIV marker to predict the onset of symptoms

Seiji KAGEYAMA

*Department of Virology, Tottori University
School of Medicine, Yonago 683, Japan***ABSTRACT**

Presence or absence of anti-HIV p17 was evaluated by western blot analysis for its usefulness as a marker to estimate the onset of AIDS or ARC. Replication of HIV and decline of anti-HIV immunity have been considered to be causative of the onset of the diseases. Although the isolation of HIV from peripheral blood mononuclear cells is one of the reliable markers but, this can be affected by the use of antiviral drugs, such as Zidovudine.

Determination of anti-p17 is also a useful HIV marker to indicate the development of symptoms. Conversion of anti-p17 positive to negative may occur with the increase in p17 antigen concentration. Two types of comparison have been made: (1) anti-p17 negativity and clinical status, (2) anti-p17 negativity and successful HIV isolation. Anti-p17 negativity correlated with deterioration of clinical status (CDC 2 or 3 to 4) ($p < 0.01$) and successful HIV isolation ($p < 0.05$). After the administration of drugs the result of antibody test did not fluctuate between negative and positive. Therefore, anti-p17 has an advantage in judging the "pre-symptomatic stage" rather than HIV isolation. One case encountered symptomatic stage without negative conversion of anti-p17 and successful HIV isolation. This may imply that decline in some of other anti-HIV immune status may also play an important role in developing symptoms.

(Accepted on August 19, 1989)

発症後4年以内にはほぼ全員が死亡するという致死率の高い²⁾エイズは HIV (human immunodeficiency virus) が主な原因となって引き起こされる⁴⁾⁶⁾¹¹⁾. HIV 感染症の潜伏期は長く、7~8年ともいわれており²⁾, 感染したが発症に到っていない無症候性キャリアが感染者の大部分を占め、HIV キャリア対策の重要課題のひとつに発症予測と発症阻止がある。とも

に発症病理の理解が不可欠であるがいまだにその詳細は不明である。CD4 陽性細胞の死が発症の直接的な原因となる⁵⁾。ただし、CD4 陽性細胞が壊滅的な状況になるのは生体への感染後すぐではなく、多くは長い潜伏期の後である。潜伏期間が長いのは何らかの生体防御機構によって HIV の増殖が制限されるためであるらしく、HIV 増殖能と生体防御能の均衡が崩れ

て発症に到るようである²⁾。したがって、発症予測と発症阻止を達成するにはこの時期をより早く捕らえる必要がある。

一方的な HIV の増殖状況に入ったことを知る方法として HIV の分離があり、35 症例について経時的に分離を試みてきた。発症前後の血液サンプル間では、発症後のサンプルからのほうが分離は容易であった。ウイルス分離よりも容易で安価な抗原抗体系の検討をも行なった。HIV 構成タンパクである gag タンパクのうち p 24 抗原とこれに対する抗体についての報告は多い。発症が近づくと抗原量は増加し、これに相反して抗体価が減少するという¹⁾¹⁰⁾。

p 24 以外の gag タンパクの p 17 に対する抗体価は、抗 p 24 抗体価よりも早くから低下すると報告されている⁹⁾。そこで、HIV 分離の成否と病型の推移のそれぞれを抗 p 17 抗体と比較し、抗 p 17 抗体の消失が病型の悪化や HIV 分離傾向と相関するかどうか検討した。

対象および方法

1. 症例

1987 年 1 月から 1989 年 4 月までの 28 か月の間に日本国内の抗 HIV 抗体陽性者 224 人 590 検体から HIV 分離を試みた。このうち、複数回分離を試行できしかも病型を知りえた 35 人について CDC (Centers for Disease Control) の HIV 感染者病型分類に従って、CDC の 2 または 3 群と 4 群の 2 つに分類した、

経時的に施行された HIV 分離は、感染者ひとりにつき、2 または 3 群で平均 6.0 (標準偏差: 2.9) 回、4 群で平均 6.4 (標準偏差: 4.7) 回であり、その経過観察期間は 2 または 3 群で平均 11.0 (標準偏差: 7.2) か月、4 群で平均 11.4 (標準偏差: 6.7) か月である。

2. HIV 分離

末梢血液中の単核細胞 (PBMC) はフィコール・コンレイ法にて全血から分離した。HIV キャリアから得た PBMC を抗 HIV 抗体陰性健康人由来の PBMC と混合し、0.1 % PHA で刺激し、20 % 牛胎児血清、IL-2、抗ヒト・インターフェロン α 入りの培養液中で 28 日間培養を続けた。HIV 分離の成否は、倒立顕微鏡下で細胞変性効果を確認し、間接蛍光抗体法で細胞内の抗原を検出するという 2 種類の方法をとった。

3. 抗 p 17 抗体の検出

Towbin らの方法¹³⁾によりウエスタン・ブロット法を行った。抗原は破碎、精製した HIV 抗原 (Dupont

社製) を用いた。陽性コントロールストリップ上の p 17, p 24, p 35, gp 41, p 55, p 65, の 6 つの抗原に対応する位置にバンドを 6 本全て確認できた時点で判定を行なった。

結 果

35 症例について経時的に HIV 分離を行ない、臨床病型と比較した。CDC の 2 または 3 群では 19 症例中 9 例 (47 %) で、CDC の 4 群では 16 症例中 10 例 (63 %) で HIV 分離に成功した。病型の進行とともに分離率は上昇するものと考えられる (表 1)。

同様に、35 症例について抗 p 17 抗体の有無の検討を経時的に行なった。経過中に抗 p 17 抗体を欠く症例は、CDC の 4 群に到った症例群に有意に多く ($p < 0.01$) (表 1)、また、HIV 分離の成功症例群に有意に多く ($p < 0.05$) みられた (表 2)。エイズ治療薬として一部で使用されているジドブジンの投与によって HIV 分離は中断したが、抗 p 17 抗体の判定結果は左右されなかった (表 3)。表 4 には経過観察中に発症した 5 症例を示した。5 症例中 4 症例については経過

表 1. 抗 p 17 抗体陰性判定症例数, HIV 分離成功症例数についての発症前後における比較

病 型	抗 p17 抗体陰性判定 症例数 / 検討症例数 (割合)	分離陽性数 / 検討症例数 (割合)
CDC 2or3 群	6/19 (32%)	9/19 (47%)
CDC 4 群	14/16 (88%)	10/16 (63%)
合 計	20/35 (57%)	19/35 (54%)

経過観察中に発症した症例は CDC の 4 群に含めた。また、経過観察中に一度でも分離に成功したものは分離陽性群に、一度でも抗 p 17 抗体が陰性判定を示したものは抗 p 17 抗体陰性症例群に含めた。

*: $p < 0.01$

表 2. 抗 p 17 抗体陰性症例群と HIV 分離成功症例群との比較

HIV 分離	抗 p 17 抗体陰性判定症例数 / 検討症例数 (割合)
HIV 分離陰性群	6/16 (38%)
HIV 分離陽性群	14/19 (74%)

*: $p < 0.05$

表 3. HIV 分離の成否, 抗 p 17 抗体判定結果に与えるジドブジン投与の影響

症例 1					
経過 (月)	0	5	10	15	20
CDC 病型群	4	4	4	4	4
ジドブジン	•	* * *	*		
HIV 分離	+	- -	-		
抗 p 17 抗体	+	+	+	+	

*: ジドブジン投与時期. -: 陰性. +: 陽性.

症例 2					
経過 (月)	0	5	10	15	20
CDC 病型群	2	2	2	2	2
ジドブジン	•	•	•	*	*
HIV 分離	-	-	-	+	-
抗 p 17 抗体	+	+	+	+	+

症例 3					
経過 (月)	0	5	10	15	20
CDC 病型群	2		2		
ジドブジン	•		*		
HIV 分離	+		-		
抗 p 17 抗体	+		+		

症例 4					
経過 (月)	0	5	10	15	20
CDC 病型群	2	2	2	2	2
ジドブジン	•	•	•	•	*
HIV 分離	+	+	+	+	-
抗 p 17 抗体	-	-	-	-	-

観察開始時からすでに抗 p 17 抗体を欠いており, その後も陰性のままであった. 経過観察中に抗 p 17 抗体が陽性から陰性へと明らかに変化した症例は得られていないが, 35 症例中 3 症例については半年以内の短期間に陽性陰性の両方の判定を得た (表 5). 陽性判定を得た時期のバンドはいずれも薄く, この半年間は, 抗体価が下がり始め判定の境界域を上下していたものと考えられる.

考 察

発症予測には HIV の増殖程度をつかむことが重要であり, PBMC からの HIV 分離は HIV 増殖のよいマーカーとなっている. HIV 分離には他に多くの報告があり分離率もさまざまである³⁷⁾が, 分離率には母集団の性質が反映するものと思われる. 本研究では発症前のキャリアから 47%, 発症後のキャリアか

表 4. AIDS 発症例

症例	経過 (月)		0		5		10		15		20	
症例 5	CDC 病型群	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4
	HIV 分離	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	抗 p 17 抗体	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
- : 陰性; + : 陽性.												
症例 6	CDC 病型群	2	2	2	2	2	2	4	4	4	0	0
	HIV 分離	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	抗 p 17 抗体	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
症例 7	CDC 病型群	2	2	2	2	2	4	4	4	0	0	0
	HIV 分離	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	抗 p 17 抗体	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
症例 8	CDC 病型群	2	2	2	2	4	4	4	0	0	0	0
	HIV 分離	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	抗 p 17 抗体	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
症例 9	CDC 病型群	2	2	2	2	4	4	4	0	0	0	0
	HIV 分離	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	抗 p 17 抗体	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ら 63% の割合で分離が成功している。HIV 分離が発症予測のマーカーとなり得ることを示していると考えられる。

HIV の増殖の程度を把握する目的で HIV 分離に代わるマーカーとして抗 p 17 抗体を検討した。発症が

近づくと、また、HIV が分離されるようになると抗 p 17 抗体は陰転することが推定され抗 p 17 抗体もまた発症予測のよいマーカーとなりうることが確認された。

抗 p 17 抗体の陰転化の機構としては、HIV の増殖

表 5. 抗 p 17 抗体価が判定境界領域にあると思われた症例

症例 10						
経過 (月)	0	1	2	3	4	5
CDC 病型群	2	2		2	2	2
HIV 分離	+	+		+	+	+
抗 p 17 抗体	-	+		+	-	+

- : 陰性. + : 陽性.

症例 11						
経過 (月)	0	1	2	3	4	5
CDC 病型群	2	2		2	2	2
HIV 分離	-	-		-	+	+
抗 p 17 抗体	+	+		+	-	+

症例 12						
経過 (月)	0	1	2	3	4	5
CDC 病型群	2	2		2	2	2
HIV 分離	-	-		-	+	+
抗 p 17 抗体	-	-		-	+	-

と並行して HIV 抗原の増加も著しく、増加した p 17 抗原と抗 p 17 抗体が抗原・抗体複合物を作って末梢血液中から消えるものと考えている。p 24 抗原測定の際、その検出率が低いことから、その原因が抗原・抗体複合物の形成にあると考え、解離を試みたが検出率は若干の上昇しか認めなかった⁸⁾。複合物は形成後、血液中よりかなり早く消失していると思われる。詳細なデータは示さなかったが、今回検討した 35 症例の全検体から抗 p 24 抗体が検出されている。無症候性キャリア由来の、抗原や抗原・抗体複合物が検出にくい検体からも容易に抗体は検出されることからみても、発症以前は抗原量がまだ増加しておらず、抗体過剰の状況にあるが、発症が近づくにつれて、増加した抗原と抗原・抗体複合物を作るようになって遊離の抗体は減ってくると思われる。抗体陰性となり抗原過剰時期と思われる時に p 17 抗原が容易に検出できるかどうか興味もたれる。

抗 p 17 抗体が陰転化する時期が発症前のどれくらいかについては、実際に経過観察中に陽性

が陰性となった確実な例が無いことから未確認のままであるが、半年以内に陽性、陰性を繰り返していた 3 例がこの時期に判定の境界領域にあったと考え、今後陰性判定を続けたとすると、抗 p 17 抗体価が減少し始める時期は発症前半年以上であるように思われる。さらには、経過観察中に発症した 5 例のうち陰性判定を得た 4 例はいずれも経過観察開始時に陰性であり、発症の 9 か月以上も前から抗体価が下がり始めていた可能性がある。ただ、抗体価は HIV の増殖の速度に左右されると考えられ、今後の検討を必要とする。

HIV 分離結果はジドブジン投与に鋭敏に反応して分離が中断する。HIV の増殖程度はジドブジンの血中濃度に影響を受けるものと思われ、たとえ HIV 分離に陰性結果を得ていても頻回に分離を試みないと一時的な HIV の増殖抑制しか確認できない可能性もある。したがって、薬剤の長期投与下では抗 p 17 抗体測定も併用し HIV の増殖を抑制し続けていることを確認する必要があると思われる。

以上、HIV 増殖を反映するマーカーとして、抗 p 17 抗体の意義を示したが、発症病理には HIV の増殖と生体防御の両面を考える必要あり、抗 p 17 抗体に中和活性があるという報告¹²⁾からは、抗 p 17 抗体の消失が HIV の増殖を反映するのみではなく生体防御能の低下をもひきおこしているともいえ、抗 p 17 抗体に注目する意義は大きい。

稿を終えるにあたり、終始懇切丁寧なご指導を賜りました鳥取大学医学部ウイルス学教室栗村 敬教授に深謝します。また、教室員の皆様の御協力に心より御礼申し上げます。本論文の要旨の一部は第 36 回日本ウイルス学会総会 (1988 年 11 月, 東京), エイズ研究会第 3 回学術集会 (1989 年 7 月, 松江) にて発表した。

文 献

- 1) Allain J.-P., Laurian Y., Paul D. A., Verroust F., Leuther M., Gazengel C., Senn D., Larriou M.-J. and Bosser C. (1987). Long-term evaluation of HIV antigen and antibodies to p 24 and gp 41 in patients with hemophilia. Potential clinical importance. *N Engl J Med* **317**, 1114-1121.
- 2) Anderson R. M. and Medley G. F. (1988). Epidemiology of HIV infection and AIDS: Incubation and infectious periods, survival and vertical transmission. *AIDS* **2** (Suppl

- 1). S57-S63.
- 3) Andrew C. A., Sullivan J. L., Brettler D. B., Brewster F. E., Forsberg A. D., Scesney S. and Levine P. H., (1987). Isolation of human immunodeficiency virus from hemophiliacs: Correlation with clinical symptoms and immunologic abnormalities. *J Pediatr* **111**, 677.
- 4) Barré-Sinoussi F., Chermann J. C., Rey F., Nugeyre M. T., Chamaret S., Gruest J., Dauguet C., Axler-Blin C., Brun Vezinet F., Rouzioux C., Rozenbaum W., Montagnier L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 868-871.
- 5) Castro B. A., Cheng-Mayer C., Evans L. A. and Levy J. A. (1988). HIV heterogeneity and viral pathogenesis. *AIDS* **2** (Suppl 1). S17-S27.
- 6) Gallo R. C., Salahuddin S. Z., Popovic M., Kaplan M., Haynes B. F., Palker T. J., Redfield R., Oleske J., Safai B., White G., Foster P. and Markham P. D. (1984). Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* **224**, 500-503.
- 7) Gomperts E. D., Feovino P., Evatt B. L., Warfield D., Miller R. and McDougal J. S. (1985). LAV/HTLV-III presence in peripheral blood lymphocytes of seronegative young hemophiliacs. *Blood* **65**, 1549-1552.
- 8) Kageyama S., Yamada O., Mohammad S.-S., Hama S., Hattori N., Asanaka M., Nakayama E., Matsumoto T., Higuchi F., Kawatani T. and Kurimura T. (1988). An improved method for the detection of HIV antigen in the blood of carriers. *J Virol Methods* **22**, 125-131.
- 9) Lange J. M. A., de Wolf F., Krone W. J. A., Panner S. A., Coutinho R. A. and Goudsmit J. (1987). Decline of antibody reactivity to outer viral core protein p17 is an earlier serological marker of disease progression in human immunodeficiency virus infection than anti-p24 decline. *AIDS* **1**, 155-159.
- 10) Lange J. M. A., Paul D. A., Huisman H. G., de Wolf F., van den Berg H., Coutinho R. A., Danner S. A. and van der Noordaa J. (1986). Persistent HIV antigenaemia and decline of HIV core antibodies associated with transition to AIDS. *Br Med J* **293**, 1459-1462.
- 11) Levy J. A., Hoffman A. D., Kramer S. M., Landis J. A., Shimabukuro J. M., Oshiro L. S. (1984). Isolation of lymphocytotropic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science* **225**, 840-842.
- 12) Papsidero L. D., Sheu M. and Ruscetti F. W. (1989). Human immunodeficiency virus type I-neutralizing monoclonal antibodies which react with p17 core protein: Characterization and epitope mapping. *J Virol* **63**, 267-272.
- 13) Towbin H., Staehelin T. and Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacryl amide gel to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**, 4350-4354.