血友病患者の免疫複合体および抗カルジオリピン抗体

—HIV-1感染との関連について—

松田 重三¹⁾ 川杉 和夫¹⁾ 風間 睦美¹⁾

木下 忠俊¹⁾ 安部 英²⁾

帝京大学第一内科¹⁾, 帝京大学²⁾

(平成2年11月13日受付)

CLINICAL SIGNIFICANCE OF HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE-1 (HIV-1) IN TERMS OF THE POSITIVITY OF IMMUNE COMPLEX AND ANTI CARDIOLIPIN ANTIBODY IN HEMOPHILIACS

Juzo Matsuda, Kazuo Kawasaki, Mutsuyoshi Kazama, Tadatosh Kinoshita and Takeshi Abe

Department of Medicine, Teikyo University School of Medicine, Tokyo

To clarify whether the HIV-1 infection could invite a certain immunological alteration to the infected patients, we investigated the positivity rates of immune complex (IC) (Clq-IgG, C3b-IgG) and anticardiolipin antibody (ACA) in the sera of 81 hemophiliacs with or without HIV-1 seroconversion.

The Clq-IgG IC was found positive in 28 of 38 hemophiliacs with HIV-1 infection (74%) and 26 of 34 without HIV-1 infection, and the C3b-IgG IC in 18% of both groups.

The ACA positivity was detected in 26 of 47 HIV-1 positive (53%) and 14 of 39 HIV-1 negative (47%).

Thus the incidences of serological IC and ACA were so high in those hemophiliacs regardless of their HIV-1 status that it was suggested that the majority of hemophiliacs might generally develop immunological alterations to a certain extent.

Though the causes of these deviations in hemophiliacs remain to be clarified, such elements may be involved there as autoantibody cross-reacting with major histocompatibility complex (MHC) class II antigen and cytotoxic T-lymphocyte to HIV-1, which both are invited by HIV-1 infections, as well as alloantigen specific to MHC class II antigen due to repeated infusion of antihemophilic agents.

I. はじめに

acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) は, human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1)¹⁾の感染によって生ずる, 重篤な細胞性免疫不全症であり, 多くは日和見感染症や Kaposi 肉腫などの悪性腫瘍を合併して死に至る²⁾³⁾.

最近 AIDS に, これら日和見感染症や悪性腫瘍の合併のみならず, 特発性血小板減少性紫斑病 (idiopathic thrombocytopenic purpura, ITP) や, 全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus, SLE) に類似した病態が合併することが注目されつつある⁴⁾⁻⁶⁾.

この要因の一つとして, HIV-1が何らかの機序

により, 自己免疫監視機構の乱れをもらす結果生じると推察されているが, 未だ不明のままである.

我々は, HIV-1に感染した血友病患者を対象に, SLE や ITP などの自己免疫性疾患でしばしば出現する免疫複合体, およびカルジオリピン抗体を検索し, HIV-1の免疫異常への関与の可能性を検討した.

II. 対象ならびに方法

1. 対象

対象は, 当内科で治療を受けている血友病患者 81名 (うち抗 HIV-1抗体陽性47例).

通常の方法で滅菌試験管に採血後血清を分離し, 検査に供するまで-80℃にて保存した.

2. 方法

1) 免疫複合体

血清中の免疫複合体の測定は、ELISA を応用した測定試薬(免疫複合体 C1q-IgG, および C3d-IgG クラレ, MBL)を使用し、添付の指示書通りに実施した。

2) 抗カルジオリピン抗体

Harris らの方法⁷⁾を一部改変して実施した。すなわち、96穴マイクロプレート (Linbro, USA) の各穴に、エタノールに溶解したカルジオリピン (50 μ g/ml) (Sigma, USA) 30 μ l を入れ、4℃で一晩放置し、エタノールを蒸発させた。PBS(pH 7.3)で3回洗浄後10%adult bovine serum (ABS) (Filtron, USA) 加 PBS 75 μ l を添加して blocking 操作を行なった後、再び PBS で3回洗浄した。これに10%ABS/PBS に50倍希釈した患者血清を50 μ l 添加し、室温で3時間反応させた。その後 PBS で3回洗浄し、さらに10%ABS/PBS にて100倍に希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗ヒト IgG やぎ抗血清 (Tago, USA) 50 μ l を添加した。60分反応後、PBS で3回洗浄し、diethanolamine 緩衝液に溶解した P-nitrophenyl phosphate を添加、コントロールの OD (405) が一定の値になった時点で3N NaOH の反応を停止した。

なお本法では、常に陽性および陰性の reference serum を同時に測定して特異性を確認するとともに、さらに安全を期して同時に検査した陰性コントロール血清5例の OD 平均値 $\pm$ 4SD 以上を示す場合を、抗カルジオリピン抗体陽性とした。

III. 結 果

1. 免疫複合体

免疫複合体を測定しえた38例の抗 HIV-1抗体陽性患者のうち、C1q-IgG 免疫複合体は28例 (74%) に、34例の抗体陰性者においては、26例 (76%) に検出された (Table 1)。

また、C3d-IgG 免疫複合体は、抗 HIV-1抗体陽性者で7例 (18%) が、また陰性者では6例 (18%) が陽性であり、いずれの免疫複合体も、抗 HIV-1抗体の有無に関係なく一定の率で検出された。

Table 1 Positivity of Immune Complex in The Sera of Hemophiliacs

Anti HIV-1 Antibody	Immune Complex				Total
	C ₁ q-IgG		C ₃ d-IgG		
	Positive	Negative	Positive	Negative	
Positive	28(74%)	10(26%)	7(18%)	31(82%)	38
Negative	26(76%)	8(24%)	6(18%)	28(82%)	34
Total	54(75%)	18(25%)	13(18%)	59(82%)	72

Both Immune Complex Positive: 10 Cases

(HIV-1 Positive 5)
(HIV-1 Negative 5)

Table 2 Positivity of Anti Cardiolipin Antibody in The Sera of Hemophiliacs

Anti HIV-1 Antibody	Anti Cardiolipin Antibody		Total
	Positive	Negative	
Positive	26(55%)	21(45%)	47
Negative	14(36%)	25(64%)	39
Total	40(47%)	46(53%)	86

2. 抗カルジオリピン抗体

抗カルジオリピン抗体は、抗 HIV-1抗体陽性者47例中26例 (55%)、陰性者39例中14例 (47%) に陽性で (Table 2)、前者群での検出率が若干高い傾向が見られた。

3. CD4/CD8リンパ球比との相関

患者の CD4/CD8リンパ球の比を、0.2より0.2きざみで1.2およびそれ以上に分けて、免疫複合体 (Fig. 1) および抗カルジオリピン抗体 (Fig. 2) 出現頻度との連関をみた。

表2, 3に示すごとく、免疫複合体、抗カルジオリピン抗体いずれも、その出現率に CD4/CD8リンパ球比との一定の関係は見られなかった。

4. 免疫複合体と抗カルジオリピン抗体との相関

免疫複合体と抗カルジオリピン抗体を同時に測定しえた症例は64例であったが、抗 HIV-1抗体陽性者で、免疫複合体、抗カルジオリピン抗体両者が陽性の者は、38例中16例 (42%) 存在した。一方抗 HIV-1抗体陰性者では、27例中9例 (33%) が陽性で、抗 HIV-1抗体陽性者群に、両者の出現率が高い傾向にあった。

n=64

CD4/CD8 LYMPHOCYTE RATIO	IMMUNE COMPLEX (C1q-IgG & C3d-IgG)	
	POSITIVE	NEGATIVE
~0.2	●●●●●	●●
~0.4	●●●●●●●●●●	●●●
~0.6	●●●○○○	●
~0.8	●●●●●○○○○	●
~1.0	○○○○	●●○
~1.2	●○	
1.2<	●●○○○○○○○	●○○○
TOTAL	50	14

ANTI HIV-1 ANTIBODY ● : POSITIVE ○ : NEGATIVE

Fig. 1 Positivity of immune complex in the sera of hemophiliacs assorted with CD4/CD8 lymphocyte ratio

n=78

CD4/CD8 LYMPHOCYTE RATIO	ANTI CARDIOLIPIN ANTIBODY	
	POSITIVE	NEGATIVE
~0.2	●●●●○	●●●●●
~0.4	●●●●●●	●●●●○○
~0.6	●●●●○	●●
~0.8	●●●●○	●●○○○○
~1.0	●●○○	●○○
~1.2	○	●○○○
1.2<	○○○○○○○	●●●○○○○○○○
TOTAL	35	43

ANTI HIV-1 ANTIBODY ● : POSITIVE ○ : NEGATIVE

Fig. 2 Positivity of anti cardiolipin antibody in the sera of hemophiliacs assorted with CD4/CD8 lymphocyte ratio

IV. 考 察

レトロウイルスの一種である HIV-1は、T リンパ球のうちとりわけ CD4リンパ球に特異的に感染する。これはとりもなおさず HIV-1の表面にある gp 120がリンパ球上の CD4レセプターとの反応性を有するからであり、このことから soluble CD4蛋白を患者に投与して、HIV-1上の CD4レセプターとの結合部位をブロックし、CD4リンパ球への感染の悪循環を断つ治療法も考案されている⁸⁾⁹⁾。

さて、HIV-1に感染した CD4リンパ球は、一定期間を経てつぎつぎに破壊され、これがくり返さ

れて最終的には CD4リンパ球は壊滅し、重篤な細胞性免疫不全状態におちいる。

この過程で、日和見感染あるいは悪性腫瘍を合併して AIDS となるが、一部の患者において、検査上あるいは臨床 ITP や SLE に類似した病態が生じることが知られるようになった^{4)~6)}。

すなわち、血小板減少、ループスアンチコアグラント、抗核抗体あるいは抗 DNA 抗体などの出現であり、中には SLE の診断基準に完全に合致した HIV-1感染者も報告されている⁶⁾。

今回我々は血友病患者を対象に、ITP や SLE でしばしば出現する免疫複合体や抗カルジオリピン抗体を検索し、HIV-1の asymptomatic carrier (AC) における免疫異常の有無を検索した。

免疫複合体検出には、従来の方法に比べて非特異反応が非常に少ないモノクローナル抗体を使用する方法¹⁰⁾¹¹⁾を使用した。が、血友病患者の75%に C1q-IgG が、また18%に C3d-IgG 免疫複合体が検出され、正常人の陽性率¹⁰⁾¹¹⁾に比し有意に高率であった。しかし、HIV-1陽性者と陰性者との間には明らかな差異はなかった。

一方、抗カルジオリピン抗体陽性率は、患者全体で47%であり、しかも抗 HIV-1抗体陽性者群(55%)は陰性者群(36%)に比し陽性率は高かった。また、免疫複合体と抗カルジオリピン抗体両者が陽性の率は、抗 HIV-1抗体陽性群(42%)が陰性群(33%)に比し高い傾向を示した。

このように、今回の検討では血友病患者における免疫複合体および抗カルジオリピン抗体の出現率は、Brien ら¹²⁾、Intrator ら⁴⁾、Bernard ら¹³⁾の報告に比し高かったが、Panzer ら¹⁴⁾、Stimmler ら¹⁵⁾とほぼ一致する成績であった。

この検出率の違いの原因は不明であるが、血友病と男性同性愛者、麻薬静注常習者などの検索対象の相違、あるいは HIV-1感染症の stage や人種の違いなどとともに、使用した検査方法の特異性や感度の微妙な差異などが考えられよう。

また HIV-1感染者に若干この傾向が強かったものの、予期に反して抗 HIV-1抗体陰性者においても高率に検出され、HIV-1陽性者のみならず陰性者においても免疫異常がもたらされていること

が分った。

この要因は不明であるが、以下のごとく考えることも出来よう。

すなわち HIV-1 のエンベロップと major histocompatibility complex (MHC) クラス II との間の構造上に類似があり、これによって免疫不全がもたらされる可能性である¹⁶⁾¹⁷⁾。

つまり MHC クラス II 類似抗原を有する HIV-1 感染により、MHC クラス II 抗原に対する交差反応性自己抗体と cytotoxic T cell (CTL) とが誘導される。これによって、MHC クラス II 抗原保有細胞の機能が抑制される可能性があろう。

さらにこの抗体に対する抗 idiotypic 抗体ないし抗 idiotypic CTL も誘導されよう。

これらは CD4 リンパ球機能を障害し、この結果 CD4 リンパ球と MHC クラス II 抗原陽性の抗原提示細胞との正常な interaction は障害され、よって免疫監視機構は破綻を来す。そしてついには自己抗体産生を許容し、これがまたさらなる免疫不全招来に加担することになる。

一方、HIV-1 非感染血友病患者に見られた一連の異常所見は、抗 MHC 抗体に起因すると考えられる¹⁸⁾¹⁹⁾。

すなわち、血友病患者は、止血のためにヒト血漿由来の第 VIII あるいは第 IX 因子補充療法を反復するが、この抗血友病製剤中に混入したリンパ球などが保有するアロ抗原が免疫原となり、抗 MHC クラス II 抗体が誘導され、先に述べた機序により免疫監視機構の乱れが生じる可能性がある。

実際抗 HIV-1 抗体陰性者においても CD4 リンパ球が著減している例が少なからず見られること、また減少していなくとも、遅延型皮膚過敏反応や、その他種々の免疫機能が低下している例が多いこと²⁰⁾、さらにはモノクローナル抗体精製あるいはリコンビナント第 VIII 因子製剤投与により、これらの異常が改善される傾向が見られること²¹⁾なども、この推察を支持しよう。

今回は、免疫複合体と抗カルジオリピン抗体のみを測定するにとどまったが、HIV-1 感染者では、抗核抗体、ループスアンチコアグラント、抗リンパ球抗体、抗血小板抗体、抗平滑筋抗体、抗コラ

ゲン抗体などの自己抗体が高率に検出されており⁶⁾²²⁾²³⁾、HIV-1 感染症は、今後自己免疫疾患と同等で語られる可能性も否定できない。

もっとも、免疫複合体あるいは抗カルジオリピン抗体が検出された我々の症例で、これに原因すると考えられる臨床症状や、その他の検査異常が見られた患者は皆無であった。

SLE の診断基準に合致した例⁶⁾などの報告もあるが、多くは無症状であり、従って HIV-1 感染者における自己抗体の出現そのものには、現時点では臨床的意義は少ないものの、今後 HIV-1 の知見が蓄積されるにつれ、臨床的に重要な病態をもたらすファクターとなる可能性もあろう。

V. まとめ

HIV-1 の感染が、患者に免疫異常をもたらす可能性を探る目的で、血友病患者 81 例(うち抗 HIV-1 抗体陽性者 47 例)を対象に、血清中の免疫複合体 (C1q-IgG, C3b-IgG) と抗カルジオリピン抗体を検索した。

その結果 C1q-IgG 免疫複合体は、抗 HIV-1 抗体陽性者 38 例中 28 例 (74%) に、また陰性者 34 例中 26 例 (76%) に検出された。また C3d-IgG は抗 HIV-1 抗体陽性者 7 例 (18%) に、また陰性者には 6 例 (18%) に検出された。

一方抗カルジオリピン抗体は、抗 HIV-1 抗体陽性者 47 例中 26 例 (55%)、陰性者 39 例中 14 例 (47%) に陽性であった。

このように、免疫複合体および抗カルジオリピン抗体は血友病患者に高率に検出され、抗 HIV-1 抗体の有無に関わりなく、本患者には免疫異常が存在することが推察された。

この要因には、HIV-1 感染による major histocompatibility complex (MHC) クラス II 抗原に対する交差反応性自己抗体と cytotoxic T-lymphocyte の誘導、およびくり返し輸注する抗血友病製剤中のアロ抗原による MHC クラス II 抗原に対する抗体産生などが考えられるが、現時点では不明である。

文 献

- 1) Coffin, J., et al.: Human immunodeficiency virus. Science, 232: 697, 1986.

- 2) Gottlieb, M.S., et al.: Pneumocystis carinii pneumonia and nocardiosis in previously healthy homosexual men; evidence of a new acquired immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.*, 305: 1425—1431, 1981.
- 3) CDC: Revision of the CDC surveillance case definition for acquired immunodeficiency syndrome. *M.M.W.R.*, 36: 1—6, 1987.
- 4) Walsh, C., et al.: On the mechanism of thrombocytopenic purpura in sexually active homosexual men. *N. Engl. J. Med.*, 311: 635—639, 1984.
- 5) Intrator, L., et al.: Anticardiolipin antibodies in HIV infected patients with or without thrombocytopenic purpura. *Br. J. Haematol.*, 67: 269—270, 1988.
- 6) Kipleman, R.G., et al.: Association of human immunodeficiency virus infection and autoimmune phenomena. *Am. J. Med.*, 84: 82—88, 1988.
- 7) Harris, E.N.: Solid phase anti-cardiolipin revisited. *Am. J. Med.*, 85: 599—601, 1988.
- 8) Denn, K.C., et al.: A soluble form of CD4(Tj4) protein inhibits AIDS virus infection. *Nature*, 331: 82—86, 1988.
- 9) Trauneker, A., et al.: Highly efficient neutralization of HIV with recombinant CD4-immunoglobulin molecules. *Nature*, 339: 68—73, 1989.
- 10) Reckel, R.P., et al.: The detection of circulating immune complexes containing Clq and IgG using a new rapid serum ELISA test system. *Diagnostic Immunol.*, 2: 228—237, 1984.
- 11) Antes, U., et al.: Detection of Clq-bearing immune complexes by a monoclonal anti-Clq ELISA system. *J. Immunol. Methods*, 102: 149—156, 1987.
- 12) Brien, W., et al.: Antiphospholipid antibodies in haemophiliacs. *Brit. J. Haematol.*, 67: 270, 1988.
- 13) Bernard, C., et al.: Determination of anti-cardiolipin and other antibodies in HIV-1-infected patients. *J. A.I.D.S.*, 3: 536—539, 1990.
- 14) Panzer, S., et al.: Anticardiolipin antibodies are elevated in HIV-1 infected haemophiliacs but do not predict for disease progression. *Thrombo. Haemost.*, 61: 81—85, 1989.
- 15) Stimmler, M.M., et al.: Anticardiolipin antibodies in acquired immunodeficiency syndrome. *Arch. Intern. Med.*, 149: 1833—1835, 1989.
- 16) Ziegler, J.L., et al.: Hypothesis; AIDS is an autoimmune disease directed at the immune system and triggered by a lymphotropic retrovirus. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 41: 305—313, 1986.
- 17) Chirmule, N., et al.: Inhibitory influences of envelope glycoproteins of HIV-1 on normal immune responses. *J. A.I.D.S.*, 1: 425—430, 1988.
- 18) Hoffman, G.W., et al.: AIDS is an autoimmune disease caused by HIV plus allogeneic cells. *Vth. Intern. Conf. A.I.D.S.*, (Abst.): 613, 1989.
- 19) 松本孝夫: 自己免疫病としてのエイズ. *エイズジャーナル*, 2: 125—129, 1989.
- 20) 松田重三: 血友病と免疫異常. *臨床血液*, 26: 1050—1058, 1985.
- 21) Hay, C.R.M.: Clotting Factor Concentrates and Immune Function. Symposium IX. New Plasma Derived Products for Hemophilia. XIX International Congress of World Federation of Hemophilia, 1990.
- 22) Tomar, R.H., et al.: Cellular target of antilymphocyte antibodies in AIDS and LAS. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 37: 37—47, 1985.
- 23) Berman, A., et al.: Autoantibodies in human immunodeficiency syndrome (HIV) infection with musculoskeletal involvement. *Arthritis Rheum.*, 31: 44, 1988.