症 例

抗 HIV-1抗体が最近陽性化した血友病 B 患者の 1 例

長 尾 大 本 多 康次郎

神奈川県立こども医療センター

吉 原 なみ子 中 永 和 枝

国立予防衛生研究所

(平成 3 年 8 月15日受付)

DELAYED HIV-1 SEROCONVERSION IN A HEMOPHILIA B PATIENT IN JAPAN

Takeshi Nagao¹⁾, Kojiro Honda¹⁾, Namiko Yoshihara²⁾ and Kazue Nakanaga²⁾

¹⁾Kanagawa Children's Medical Center

²⁾National Institute of Health, Japan

This is a case report of a hemophilia B patient who became seropositive for HIV-1 more than 3 and a half years after switching to heat-treated prothrombin complex concentrates. This 17 year old boy has been treated in our institution since 1973, when he was a year of age. He became HIV-1 seropositive for the first time in July, 1990. Because of the delayed HIV seroconversion, we studied his serum samples stored separately, using RNA-PCR (polymerase chain reaction) method. All of his serum samples tested were positive for RNA sequences of HIV, and the earliest positive sample was obtained in August of 1985. In Japan, prothrombin complex concentrates were switched to heat-treated ones, in January, 1986. Therefore, we conclude that this is a case of hemophilia who seroconverted after a prolonged window period, showing that silent infection is also possible in hemophilia patients at risk as well as in homosexual men, although the incidence must be low (less than 1%).

序 言

これまで陰性であった抗 HIV-1抗体が、最近になって陽性化した血友病 B 患者の 1 例を報告する¹⁾²⁾。

凍結保存してあった血清について、RNA-PCR (polymerase chain reaction) 法で検索したところ、この抗体の陽性化は、加熱処理血液製剤によるものではなく、以前に使用した非加熱処理製剤によるものと考えられた。このように長い window period を示す silent infection (いわゆる silent AIDS) の例は、男性同性愛者においてかなりの報告があるが、血友病では極めて稀なことであると考えられる。

症 例

症例は、17歳の血友病 B の患児である。1973年、1歳のときに、我々のセンターを受診し、重症血

友病 B と診断された。以後、主としてアメリカから輸入された、各種の乾燥人血液凝固第IX因子複合体、即ち、prothrombin complex concentrate (略して PCC と呼ぶ) で治療を受けている。当時は、このような第IX因子製剤は、当然加熱処理されていなかった。1973年に、Konyne, PPSB など で治療を開始したところ、1978年10月に、第IX因子に対する IgG 抗体すなわちインヒビターが出現していることが判明した。インヒビター値は、46 Bethesda 単位で、high responder であった。このため、第IX因子に対する抗体の自然低下を期待して、極力 PCC の投与を抑えることとした。しかし、1980年 6 月、活性化 PCC の一つである、FEIBA (Factor Eight Inhibitor Bypassing Activity の略) の治験が開始された。治験の経過中に、血友病 B のインヒビター症例の止血にも

FEIBA が有効であることが判明したので、主として、FEIBA での治療を開始した。しかし、認可された FEIBA が非常に高価であることも関係するが、1983年9月からは、PCC のバイパス効果を期待し、かつ、免疫学的寛容の誘導を期待して、出血に際しては PCC を積極的に使用することとした。PCC の積極的投与により、関節出血などは十分止血が行われ、関節障害の程度も軽く済んでいる。インヒビター値は、当初は最高300Bethesda 単位まで上昇した。しかし、免疫学的寛容導入療法が或る程度効果があったのか、現在では10~20 Bethesda 単位まで低下している。一方、1986年1月、我が国の PCC は、全て加熱処理製剤に切り替えられた。

表1の上段に示したように、本患児の抗 HIV-1 抗体（以下、HIV 抗体と略す）は、1980年7月から調べられており、1989年9月迄、ずっと陰性であった。ところが、1990年7月、はじめて HIV 抗体陽性となった。そこで、以下に述べる検討を行った。また、1990年7月以後の検索では、HIV 抗体は常に陽性である。臨床的には現在、asymptomatic carrier (G-II) に相当する状態である。

方 法

国立予防衛生研究所にて、1980年以後の血清について、HIV 抗体を、PA 法、ELISA 法、蛍光抗体法、Western blot 法などで再検討した³⁾。また、HIV 抗原 (p24抗原) についても検討した。

更に、別途冷凍保存してあった患児血清について、RNA-PCR 法にて検討した。詳細は他に譲るが、primer および probe として、gag(SK38, 39, 19)を用いた^{4)~6)}。血清（血漿）10 μ l より proteinase-K, SDS を用いて抽出した RNA に

reverse-transcriptase (逆転写酵素) を作用させ、cDNA を合成させた後、Taq polymerase を加えて PCR (polymerase chain reaction) を行った。RNA-PCR を行った後のサンプルは、³²P 末端標識 probe とハイブリダイズさせ (liquid hybridization 法)、15%ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った後、オートラジオグラフィにて目的 DNA の検出を行った。

対照として、過去3年の間に得られた、HIV 抗体陽性の血友病患者16人 (39検体)、常に HIV 抗体陰性の血友病患者29人 (43検体) の血清についても、同様に検討した。これらはいずれも、検体番号により at random に検査されたものであり、HIV 抗体の結果とは、後になって照合した。

成 績

表1の上段に示した HIV 抗体の消長は、再度確認された。表1の中段に示したように、HIV 抗原 (P24抗原) は、常に陰性であった。

RNA-PCR 法の結果は、表1の下段に示した通りで、1985年8月の検体から、常に陽性である。しかも、血清検体より感度が低いかもしれないクエン酸採血の血漿検体では、1980年8月以後1985年7月までの5検体中4検体が、RNA-PCR 法で陽性であった。

同じ方法で測定した対照例の結果を表2に示した。即ち、HIV 抗体陽性の血友病患者16人の、過去3年間の血清39検体は、38検体が陽性であった。一方、この患児を除く29人の常に HIV 抗体陰性の血友病患者では、43検体全て、RNA-PCR 法でも陽性ではなかった。

この症例の免疫学的諸検査は、殆ど全て、正常範囲内であった。図1に、CD4陽性リンパ球数と、CD4/CD8比の経過を示した。CD4陽性リンパ球数

表1 血清中の抗 HIV-1 抗体・HIV 抗原 (p 24)・HIV-1 genome の経過

	'80/7	'83/10	'85/8	'86/3	'86/7	'87/3	'87/7	'88/1	'89/3	'89/9	'90/7
抗 HIV-1 抗体	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+
HIV-1 抗原	—	NT*	—	—	NT	—	—	—	NT	—	—
HIV-1 genome**	NT	NT	+	+	+	+	NT	+	+	+	+

* NT: 検査せず

** RNA-PCR 法と liquid hybridization 法で検出した。

図1 CD4陽性リンパ球数およびCD4/CD8比の変化とHIV-1抗体の消長

は、1986年以後ほとんど常に600/ μ lと700/ μ lの間で変動している(1989年3月のみ450/ μ l)。然るに、CD4/CD8比は、1989年3月には1.08であったものが、抗体陽転の直前の1989年9月には、0.38と急激に低下しており、その後低値を続けている。

考 察

本症例は、加熱処理血液製剤に切り替わってから少なくとも3年半以上経ってから、HIV抗体が陽性化した血友病B患児である。

この際考えられる可能性として、

- 1) 最近、誤って非加熱処理製剤を使用した。
- 2) 加熱処理製剤でもHIV感染の危険がある。
- 3) 1986年1月以前に使用された非加熱処理製剤からの感染によるものである。

などの可能性が考えられる。しかしながら、常に血液製剤の有効期限をチェックするような注意深いご家族であるので、1)の誤って非加熱製剤を使用したという可能性は否定的である。また、本患児において、凝固因子製剤以外のリスク・ファクターは考えられない。

HIV抗体陽性の血友病患者の検討では、表2に示したように、その血清中に殆ど常に、HIV遺伝子RNAの少なくとも一部が証明されている。しかし、HIV抗体陰性の血友病患者では、そのようなことはなく、RNA-PCR法では陰性である。一方、この患児では、1985年8月以後の全ての血清が、RNA-PCR法で陽性となっている。

RNA-PCR法は非常に鋭敏であり、擬陽性・汚染の問題に注意をする必要がある。即ち、一緒に

検査した他の陽性検体からの汚染に注意する必要がある。また、採血時に投与された血液製剤中のHIV遺伝子(加熱処理後も、感染性は無いであろうが、HIVのRNAが凝固因子製剤中に証明されることがあると言われている)のcarry overの可能性も考えられる。しかし、表2に示した我々の血友病患児の成績は、番号のみで検査され、結果のみを後で照合したものである。従って、HIV抗体陽性者のみが陽性であり、HIV抗体陰性者はRNA-PCR法でも常に陰性であるという結果は、逆に、これらの汚染・carry overなどの可能性を否定する結果と思われる。一方、本患児の血清検体は、1985年8月以後常に、RNA-PCR法で陽性である。即ち、遅くとも、1985年8月には、本患児はHIVに感染していたと考えられる。

これらのことから、この患児は、3年半以上の長いwindow periodを持つsilent HIV infection(いわゆるsilent AIDS)の症例であろうと考えられる。即ち、1985年8月以前に投与された非加熱処理製剤によってもたらされたHIV感染が、最近になって、抗体陽性化した例と思われる。

血友病患者におけるsilent infectionについては、最近DNA-PCR法を用いた検討がなされている(表3)⁷⁾⁸⁾。例えば、Gibbonsらは、HIV抗体陰性の血友病患者57人について検討し、1人のみが、一過性にDNA-PCR法で陽性であったと報告している。我が国では、HIV感染者発症予防・治療に関する研究班の山田兼雄班長が多施設のデータ

表2 血友病患者保存血清からのRNA-PCR法によるHIV-1 genomeの検出

	被検患者数 (検体数)	RNA-PCR陽性患者数 (陽性検体数)
抗HIV-1抗体陽性血友病患者	16人 (39検体)	16人 (38検体)
抗HIV-1抗体陰性血友病患者	29人 (43検体)	0人 (0検体)

表3 HIV-1のSilent Infectionに関する検討
—感染の機会が多かったにもかかわらず抗HIV-1抗体陰性の血友病患者のDNA-PCR法による検討—

Gibbons, J., et al : 57例中1例が一過性に陽性
Yamada, K., et al : 53例全例陰性

を集計した所、53人の HIV 抗体陰性の血友病患者全員が、DNA-PCR 法で陰性であったと報告している。このように、頻度は非常に低いものと思われるが、本症例は、血友病患者においても、男性同性愛者と同様に、silent infection があり得ることを示した症例と考えられる。

即ち、1989年、Imagawa らは、男性同性愛者の前方視的検討において、HIV 抗体陰性の133人中31人(23%)において、何等かの形でウイルスを証明し、しかもその内27人はその後36カ月以上も HIV 抗体陰性を続けたことを報告して衝撃を与えた⁹⁾。即ち、silent infection が長期間続く例が、高率に見られると言うわけである。

一方、Hewlett らによると、HIV 抗体陽性の血友病患者の sex partner 27人の内、5人が HIV 抗体陽性であるが、11人は、抗体陰性でありながら、DNA-PCR 法で陽性であり、その女性の子供1人がやはり陽性であったと報告している¹⁰⁾。このように、性行為に依る感染には、silent infection の率はかなり高いと思われる。しかし、血友病患者では、先程述べた様に、1%以下と、その率は低いと思われる。しかし、本症例は、血友病のような感染様式でも silent infection が存在し得ることを示した重要な症例と思われる。

本症例が、何故長期間の window period を示したのかは不明である。しかし、HIV 抗体陽性化する直前に、それまで正常であった CD4/CD8比が、図1に示したように急激に低下している事実が、今後へのヒントになり得るかもしれない。例えば、Ludlam らは以前に、HIV を含んだ非加熱処理血液製剤を投与された血友病 A 患者33人中15人のみが抗体陽性化し、残りの18人は陰性のままであったと報告しているが、HIV 抗体陽性化した人達は、その血液製剤が投与される以前から、CD4/CD8比が、陰性の人達よりも有意に低値であったという¹¹⁾。ウイルスの変異と共に、CD8の関与が今後の重要な検討課題になると考える。

むすび

最近 HIV 抗体が陽性化した血友病 B の症例を

報告した。RNA-PCR 法により、その感染はかつて使用された非加熱処理凝固因子製剤によるものであり、3年半以上の window period を示す silent infection の例と考えられた。血友病では、silent infection が証明された第1例と考えられる。これを基に考えると、加熱処理製剤に切り替えてから、1986年頃に HIV 抗体が陽性化したとされる例も、この window period が長い症例であった可能性が強いのではないかと推定される。

文 献

- 1) Natao, T., et al.: Delayed HIV-1 seroconversion in a hemophilia B patient in Japan. *Blood (Letter)* 78: 1893—1894, 1991.
- 2) 長尾 大, 他: 抗 HIV-1 抗体が最近陽性化した血友病 B 患者の1例. *日輸血会誌*, 37: 267, 1991.
- 3) 吉原なみ子: 最近の AIDS 検査. *病理と臨床*, 12: 1474—1479, 1989.
- 4) 中永和枝, 吉原なみ子: HIV の多様性について. *臨床検査*, 33: 1797—1798, 1989.
- 5) 中永和枝, 他: PCR 法を応用した血漿材料からの HIV-1 遺伝子検出. *日輸血会誌*, 37: 270, 1991.
- 6) Innis, M.A., et al., eds.: *PCR protocols. A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, 1990.
- 7) Gibbons, J., et al.: Silent infections with human immunodeficiency virus type 1 are highly unlikely in multitransfused seronegative hemophiliacs. *Blood*, 76: 1924—1926, 1990.
- 8) 山田 兼雄: 抗 HIV 抗体陰性例の PCR-Silent AIDS の検索のために一厚生省平成元年度 HIV 感染者発症予防・治療に関する研究班研究報告書, 山田兼雄 編, 1990, p. 1.
- 9) Imagawa, D.T., et al.: Human immunodeficiency virus type 1 infection in homosexual men who remain seronegative for prolonged periods. *N. Engl. J. Med.*, 320: 1458—1462, 1989.
- 10) Hewlett, I.K., et al.: Assessment by gene amplification and serological markers of transmission of HIV-1 from hemophiliacs to their sexual partners and secondarily to their children. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. (United States)*, 3: 714—720, 1990.
- 11) Ludlam, C.A., et al.: Human T-lymphotropic virus type III (HTLV-III) infection in seronegative haemophiliacs after transfusion of factor VIII. *Lancet*, ii: 233—236, 1985.