HTLV-1 と HIV-1 との混合感染例での HIV-1 中和抗体と RT 抑制抗体

井 上 雅 広^{1*,4*}・清 美 達^{1*,4*}・新 宮 世 三^{2*}
柏 木 征三郎^{3*}・J. George Bekesi^{4*}・横 山 三 男^{1*}

Jpn. J. Clin. Immun., 11(3): 263~267, 1988.

**Neutralizing activity against HIV-1 and inhibitory antibody to
HIV-1 reverse transcriptase in the sera of HTLV-1 carriers and
coinfected hemophilia with HTLV-1 and HIV-1**

Masahiro Inoue^{1*,4*}, Yoshitatsu Sei^{1*,4*}, Toshimitsu Shingu^{2*},
Seizaburo Kashiwagi^{3*}, J. George Bekesi^{4*} and Mitchel M. Yokoyama^{1*}

^{1*} *Department of Immunology, Kurume University School of Medicine*

^{2*} *Nichinan Hospital, Miyazaki*

^{3*} *Department of Internal Medicine, Kyushu University*

^{4*} *Mount Sinai Medical Center, New York*

[Summary]

The presence of neutralizing antibody activity (NAb) against HIV-1 and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory antibody (RTIAb) were tested in the sera of 72 HTLV-1 carriers and 61 healthy controls living in Nichinan District, Miyazaki. One of 72 HTLV-1 carriers, a patient with hemophilia, was found to be HIV-1 Ab positive, while all 61 control individuals were HIV-1 Ab (-). Two out of 71 HIV-1 (-) but HTLV-1 carriers and the HIV-1 (+) and HTLV-1 (+) hemophiliac patient had strong RTIAb, while all controls were RTIAb (-). Although the HTLV-1/HIV-1 co-infected hemophiliac patient had strong NAb, while all of 71 HIV-1 (-) but HTLV-1 carriers had no NAb. Overall results suggested that some antigenic determinants of HIV-1 RT which effect the enzyme activity may be weakly cross-reactive to some anti-HTLV-1 antibody. However, the RTIAb (+) sera had no NAb capacity against HIV-1, implying that HIV-RTIAb may not support neutralization against HIV-1 *in vivo*. The results also suggest that the exposure of HTLV-1 may not contribute to NAb against HIV-1 in HIV-1 infected individuals.

^{1*} 久留米大学免疫学 ^{2*} 宮崎県立日南病院小児科 ^{3*} 九州大学第1内科 ^{4*} ニューヨーク・マウントサイナイ大学病院 (63・2・26 受付)

Key words : HTLV-1,
HIV-1,
中和抗体,
RT 抑制抗体

【概 要】

宮崎県日南市で調査した HTLV-1 キャリアー 72 名と同地区での年齢および性別のマッチした健常人 61 名のコントロール血清中の HIV-1 に対する中和抗体 (NAb) ならびに HIV-1 逆転写酵素に対する抑制抗体 (RTIAb) について検索した。キャリアーのなかの 1 例は、血友病患者で HIV 抗体が陽性であった (HTLV-1 と HIV-1 の混合感染例)。健常人コントロール血清はすべて HIV-1 抗体が陰性であった。HTLV-1 キャリアー 72 名のうちの 2 例および混合感染していた血友病患者の血清中には高力価の RTIAb が検出された。すべてのコントロール血清 RTIAb が陰性であった。さらに、この血友病患者の血清中には高力価の NAb が検出されたが、他の HTLV-1 キャリアー (HIV-1 抗体は陰性) 71 名では検出されなかった。これらの結果から、HIV-1 の RT の酵素活性を左右する抗原決定基には抗 HTLV-1 抗体と弱く交叉反応する部分があると考えられる。しかしながら、RTIAb が陽性の血清には HIV-1 に対する NAb の活性がないことから、HIV-RTIAb は、*in vivo* で HIV-1 を中和する能力はないと思われる。また、これらの結果は、HTLV-1 の感染は、HIV-1 感染者に存在する HIV-1 中和抗体の産生を誘導しないと考えられた。

I. はじめに

逆転写酵素 (reverse transcriptase; RT) の活性を測定することは、レトロウイルスを同定するために重要であり¹⁾、human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) の同定にも適用されている。Laurence ら²⁾は、AIDS 患者を含む HIV-1 感染者の血清中に RT の活性を抑制する抗体を発見し、この抗体の存否が患者の予後を左右する可能性のあることを報告した。われわれは、human T-cell leukemia virus-1, (HTLV-1) キャリアーの血清中に HIV-1 の RT 活性を抑制する抗体 RT inhibitory antibody (RTIAb) が存在する可能性を指摘した。しかし、これらの RTIAb (+) 血清中からは、HIV-1 に対するウイルス中和活性は検出できなかった。また、HTLV-1 キャリアーの血清中に存在する抗 HTLV-1 抗体が、HIV-1 に対する中和抗体としての作用を示さないことは、HTLV-1 の先行感染が HIV-1 に対して感染防御的には作動しないことを推測させた。これらの結果をもとに、HTLV-1 と HIV-1 の混合感染での HTLV-1 感染がもたらす免疫学的な影響について考察した。

II. 対象と方法

1. 対 象

HTLV-1 抗体陽性者 72 例 (宮崎県日南市の 53 例および佐賀県呼子町の 19 例) を対象とした。また、同地域からの年齢ならびに性別分布が一致した健常人 61 例をコントロールとした。HTLV-1 抗体陽性者 72 例のうち、

4 例は成人 T 細胞白血病 (ATL) 患者、1 例は血友病患者で、残りの 67 例は健康なウイルス・キャリアーであった。

2. HTLV-1 抗体および HIV 抗体の測定

HTLV-1 抗体の測定は、MT-2 細胞を用いた日沼法³⁾に準じて行った。HIV 抗体の測定は、ELISA 法およびウエスタン・ブロット (WB) 法^{4,5)}で行った。

3. HIV 逆転写酵素に対する抑制抗体 (RTIAb) の測定法

HIV-RT は、HIV 産生 H9-IIIb cell line (NIH の Dr. M. Robert Guroff より供与) の培養上清を 30% ポリエチレングリコール (MW 8,000) および 4 M NaCl を 10:5:1 の比で混合した後、冷室に一晩放置してから 3,000 rpm で 30 分間遠心した。遠心後、細胞のペレットを Buffer A (0.25 M KCl, 0.25% Triton X-100 加 50 mM Tris-HCl, pH 7.5) に浮遊させて RT 溶解液とした。RT 溶解液は、冷解凍を 3 回繰り返した後に使用した。RT 活性の測定は、Sarin らの方法⁶⁾に準じて行った。すなわち、50 μ M Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM Dithiothreitol (DTT), 5 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 0.01% Triton X-100 に、template・primer として、10 μ g/ml poly (rA)・oligo (dT)・12~18、さらに基質として ³H-deoxythymidine triphosphate を加えて反応混合液とした。この反応混合液 30 μ l と 10% の被検血清を含有する RT 溶解液 20 μ l (血清の最終濃度が 4%) を 37°C で 1 時間インキュベ-

トした。酵素反応は、イースト tRNA 50 μ g, ついで 1 mM sodiumpyrophosphate 加 10% trichloroacetic acid (TCA) 2 ml を加えて停止した。ついで検体は、0.45 μ m のミリポアフィルターを通した後、乾燥してからシンチレーション液に浮遊させ、ペータ・シンチレーションカウンターで放射能の活性を測定した。RT 活性を抑制した血清に対しては、さらにプロテイン A アガロース・アフィニティーカラムを使用し、IgG 分画を分離した後、RT 抑制効果の有無を測定し、抗体による抑制であることを確認した。

4. HIV 感染に対する血清のウイルス中和活性 (NAb) の測定法

血清は 56°C, 30 分間で非働化した後、HIV と 30 分間、室温で反応させた。ついで、あらかじめ 2 μ g/ml の polybrene で 30 分間処理した H9 (非感染) 細胞 (5×10^4 /ml) と細胞 1 個あたりウイルス粒子が 1×10^3 の割合で混合し、10% 非働化胎児ウシ血清加 RPMI-1640 に浮遊し、96 well のマイクロプレート内で培養した。64 時間培養の後に、1 μ Ci- 3 H-thymidine で細胞をラベルし、ラベル 8 時間後に回収し、放射能の活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。この結果を標準化するため、次に示す中和指数 (NI) を使用した。NI = (検体 cpm - 最小 cpm) / (最大 cpm - 最小 cpm)。最大 cpm はコントロール血清と培養した非感染 H9 から得られ、最小 cpm はコントロール血清と培養した感染 H9 細胞から得られた。中和指数 (NI) とその他のパラメーター (細胞数, gag 蛋白陽性細胞率および培養上清 RT 活性) は有意な相関関係を示した。H9 細胞の DNA 合成を測定することは血清のウイルス中和活性を測定する有用な手段として使用できることを確認した。また、対照群の NI + 2 SD (NI = 0.2) の値を境界値 (cut-off point) と定め、中和抗体活性の有無を判定した。

III. 結 果

ELISA および WB 法によって、血清中の抗 HIV-1 抗体の有無を検査した結果、HTLV-1 抗体陽性者 72 例のうち、健康キャリアー 67 名および ATL 患者 4 名の血清は HIV-1 抗体が陰性であったが、1983 年 2 月より HTLV-1 および HIV-1 の混合感染が確認されている血友病患者 1 名⁷⁾の血清は、ELISA および WB 法で、HTLV-1 および HIV-1 のいずれのウイルスに対しても抗体陽性であった (図 1)。HTLV-1 抗体が陰性である 61 例はすべて HIV-1 抗体も陰性であった。

HIV-1 に対する中和抗体の活性は、HTLV-1 と HIV-

図 1 HIV に対する RTIAb を示した HTLV-1 キャリアー 3 例の HIV-1 ウェスタン・ブロットの結果

1; HIV 抗体陽性者血清 (陽性コントロール), 2; 健康人血清 (陰性コントロール), 3; RTIAb 陽性で HTLV-1 陽性の健康人血清, 4; RTIAb 陰性で HTLV-1 陽性の健康人血清, 5; RTIAb 陽性で HTLV-1 陽性の血友病患者の血清

1 の混合感染が認められた上記の血友病患者以外は、HTLV-1 抗体陽性者 71 例および陰性者 61 例のすべてが陰性であった (表 1)。

HIV-RT に対する抑制効果は、HTLV-1 抗体陽性の健康人キャリアー 2 例および血友病患者 1 例の血清中に存在することが確認された。HTLV-III B-RT に対する抑制率 (%) は、それぞれ 72%, 65%, 72% であり、3 例とも強い抑制を示した。また、プロテイン A カラムで、IgG 分画を除去した後の抑制率は、それぞれ 0%, 13%, 2% であり、3 例すべてに抑制効果の著明な低下を示した (表 2)。さらに、これらの血清の RT 活性の抑制効果は、血清を 56°C, 30 分で非働化後も消退せず、安定であった。これらのことから、この抑制効果は、RT に対する抗体による影響であることが強く示唆された。

表 1 HTLV-1 キャリアー群の抗 HIV-RTIAb と NAb の出現率

検 体	HIV-1 Ab	HIV-1 RTIAb	HIV-1 NAb
コントロール群	0/61 (0%)	0/61 (0%)	0/61 (0%)
キャリアー群	1/72 (1.4%)	3/72 (4.2%)	1/72 (1.4%)

表 2 HTLV-1 陽性者 3 例の血清が示した HIV-RT に対する抑制効果

	HTLV-1 抗体	HIV-1 抗体	HTLV-III B-RT*	
			前**	後**
健常人 (コントロール)	—	—	162 (0)	163 (0)
HTLV-1 キャリアー 1	+	—	46 (72)	172 (0)
HTLV-2 キャリアー 2	+	—	58 (65)	141 (13)
血友病患者	+	+	45 (72)	159 (2)

*HIV(III B)-RT の活性は $^3\text{H-TdR}$ 取り込み量: $\times 10^3\text{cpm}$ (抑制率: %) で示した。

**プロテイン A カラム処理

IV. 考 察

ヒト T 細胞白血病ウイルス (HTLV-1 および -2) および HIV-1 は、

- 1) それぞれの患者の成熟した CD 4 陽性 T 細胞から分離される、
- 2) *In vitro* で成熟した T 細胞に感染し、多核巨細胞を形成する、
- 3) 生化学的にきわめて類似の RT を保有する、
- 4) それらのウイルスには共通抗原が存在する、
- 5) 同じ分子量のコア蛋白をもつ、
- 6) 核酸の配列に類似した部分がある、
- 7) 遺伝子の 3' 末端に Px 部分をもつ

など多くの共通点が存在する⁸⁾。また、多数の AIDS 患者の血清中には、HTLV-1 および -2 と交叉反応を示す抗体が存在する⁹⁾。しかしながら、われわれの結果では、HIV-1 と HTLV-1 の混合感染を認めた血友病患者を除いて、HTLV-1 キャリアー 71 例の全例が HIV-1 に対するウイルス中和抗体の活性は陰性であった。すなわち、HIV-1 と HTLV-1 は、レトロウイルスの系統発生図の上では、同一の接点から派生してきたウイルスであり、多くの生化学的な類似点や、いくつかの共通抗原をもっているにもかかわらず、抗 HTLV-1 血清で HIV-1 を中和できないという結果であった。もし、サルからヒト、あるいはヒトからヒトへのウイルスの感染過程で、ウイルス自身の防衛手段として、ヒトの免疫監視機構から逃れるために変異が起こり、その監視機構を逃れた変異株が現在の HTLV-1 や HIV-1 に進化してきたという仮説をたてるならば、われわれの今回の結果は、この仮説

を支持する一助となるかもしれない。

ウイルス中和抗体の活性に加えて、RT 活性に対する抑制抗体 (RTIAb) の存在が AIDS 患者の予後と正の相関を示すことが報告されている²⁾。また、Sei ら⁹⁾の結果によれば、AIDS 患者で血清中に RTIAb をもっている患者は、ほとんどすべてが高い HIV-1 中和抗体の活性をもっている。しかし、CD 4 陽性 T 細胞である H9 細胞を用いた感染実験系では、HIV-1 に対する RTIAb 活性を示した HTLV-1 のキャリアー 2 例は、いずれもウイルス中和抗体の活性を示さなかった。したがって、AIDS での RTIAb の存在と良好な予後あるいは高い中和抗体活性との関係については、RTIAb の陽性群では、微弱な免疫原性しか示さない抗原に対しても抗体を作る能力をもつ患者群と一致することから、単なる関連現象であるかもしれない。しかし、もし生体内で RTIAb が作用しているとするならば、RT の局在がウイルスおよび感染細胞の内部であるため、抗体の可変部のある断片のみが拡散して、標的となる RT と結合する作用機序が考えられよう。ところが、B 細胞や単球・マクロファージなどのように細胞表面に Fc リセプターをもつ細胞群では、receptor-mediated endocytosis によって取り込まれ、これらの感染細胞内で RT に作用し、ウイルスの増殖を抑制している可能性も考えられる。とくに、単球・マクロファージは、HIV-1 の増殖細胞群と考えられており、このような機序から、RTIAb は HIV-1 の感染を防御する担い手として重要な因子であるといえよう。

Bartholomew ら¹⁰⁾が報告した HTLV-1 と HIV-1 の混合感染と HIV-1 の単独感染を調査した結果によれば、T4/T8 比、T4 陽性細胞の減少など免疫学的な指標は、

HIV-1 単独感染と HTLV-1 と HIV-1 との混合感染とは統計学的な有意差は認められていない。しかしながら、混合感染例では、HTLV-1 のキャリアーに悪性腫瘍の発生率が高いと報告している。

それゆえ、ことに本邦では、ここで示した血友病患者のように、HIV-1 および HTLV-1 の混合感染は、いずれの病態を表現するにしても重大な問題である。HTLV-1 キャリアー群に HIV-1 に対するウイルス中和抗体がまったく見出せなかった結果から、HTLV-1 と HIV-1 の混合感染は、いずれのウイルスの感染経路を改善するものではないと考えられる。

これまでに、HTLV-1 感染者の血清中には、HIV-1 の

コア (core) 蛋白 p24 などと交叉反応を示す症例が報告されているにもかかわらず、われわれは、HTLV-1 単独感染者 71 例のすべての血清が HIV-1 に対する中和活性を欠如していることを示した。また、それら 71 例中のうち、2 例の血清が HIV-1 の逆転写酵素活性を強く抑制することを示した。これらの結果から、HTLV-1 単独感染者のなかには、血清中に HIV-1 の逆転写酵素を抑制する抗体の存在することを示唆した。さらに、HTLV-1 と HIV-1 の混合感染を認めた血友病患者では、HIV-1 に対する強い中和抗体活性と逆転写酵素活性とをもつ症例として報告した。

文 献

- 1) Gallo, R.C. : Human T-cell leukemia (lymphotropic) retroviruses and causative role in T-cell malignancies and acquired immune deficiency syndrom. *Cancer*, 55 : 2317~2323, 1985.
- 2) Laurence, J., Saunders, A., Kulkosky, J. : Characterization and clinical association of antibody inhibitory to HIV reverse transcriptase activity. *Science*, 235 : 1501~1504, 1987.
- 3) Hinuma, Y., Nagata, K., Hanaoka, M. et al. : Adult T-cell leukemia : Antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78 : 6476~6480, 1981.
- 4) Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. : Electro-phoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose : Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76 : 4350~4354, 1979.
- 5) Johnson, D.A., Gaustsh, J.W., Sportsman, J.R. et al. : Improved technique utilizing nonfat dry milk for analysis of proteins and nucleic acids transferred to nitrocellulose. *Gene Anal. Tech.*, 1 : 3~8, 1983.
- 6) Sarin, P.S., Taguchi, Y., Sun, D. et al. : Inhibition of HTLV-III/LAV replication by foscanat. *Biochem. Pharmacol.*, 34 : 4075~4079, 1985.
- 7) Shingu, T., Yamamoto, K., Kwashiwagi, S. et al. : A case of hemophilia A with seroconversion to human T-lymphotropic virus III. *Kurume Med. J.*, 32 : 297~300, 1985.
- 8) Samuel, B., Gallo, R.A. : Pathogenic retrovirus (HTLV-III) linked to AIDS. *N. Engl. J. Med.*, 311 : 1292~1297, 1984.
- 9) Sei, Y., Petrella, R.J., Yokoyama, M.M. et al. : The existence of an inhibitory factors against HIV-reverse transcriptase in sera from AIDS and ARC patient. IIIrd International Conference on Aids. (Abstracts, pp. 183)
- 10) Bartholomew, C., Saxinger, W.C., Clark, J.W. et al. : Transmission of HTLV-I an HIV among homosexual men in trinidad. *JAMA*, 257 : 2604~2608, 1987.