Human immunodeficiency virus (HIV) 感染者 6 例の HIV 抗体の推移と熱・酸解離処理による HIV 抗原の早期検出

馬場 眞澄・澤田 滋正・川 平 宏*
志田 光正・葉 山 隆・西成田 進
水 間 宏・神田 靖男*・堀江 孝至

Jpn. J. Clin. Immun., 15 (1) : 38~44, 1992.

Detection of HIV antigen on acid and heat treated sera from HIV antibodies positive patients

Masumi Baba, Shigemasa Sawada, Hiroshi Kawahira*,
Mitsumasa Sida, Takashi Hayama, Susumu Nisinarita,
Hiroshi Mizuma, Yasuo Kanda* and Takashi Horie

*Nihon University 1st Department of Internal Medicine,
Blood Transfusion Center of Nihon Univ. Itabashi Hospital

[Summary]

Immunoassays for human immunodeficiency virus (HIV) antigens and for antibodies to HIV core and envelope were done on serial sera from 6 patients (3 hemophiliacs and 3 sexual transmitted patients), who had become seropositive on screening by particle agglutination test.

Antibodies to HIV envelope by ENVACOR EIA assay were detected in all patients and antibodies to HIV core in 4 of 6 patients. By western blot assay, both gp 41 and gp 120 bands were found in all patients, and the p 24 band were detected in 5 of 6 patients. The results of ENVACOR EIA assay were not exactly compatible with those of western blot assay.

The p 24 HIV Ag was positive in only one patient and was negative in 5 patients. But one of 5 negative sera was found to be positive after the treatment of these sera with acid and heat.

These results suggest that detection of HIV-Ag after treatment of sera by acid and heat to dissociate antigen from immune complex was useful for the disease monitoring.

Key words: HIV・core 抗体,
p24 抗原,
抗原抗体複合物,
熱・酸解離処理

【概 要】

ゼラチン粒子凝集法によるスクリーニング検査で陽性と判定された3例の血友病と3例の HIV 感染者の血清を、ENVACOR EIA 法およびウエスタンブロット法を用いて経時的に検査し、HIV 抗体の推移と検査法の相関性を検討した。また酸および熱処理して HIV 抗原の早期検出を試みた。

ENVACOR EIA 法ではエンベロップ抗体は全例に陽性、コア抗体は6例中5例に陽性であった。ウエスタンブロット法でみられる p24 のバンドは5例にみられ、gp 41 と gp 120 のバンドは全例に認められた。ENVACOR EIA 法とウエスタンブロット法の各々のバンドは完全に一致しなかった。HIV 抗原は同性愛者の1例に検出されたが、他の症例は陰性であった。p24 抗原が検出されなかった5例の HIV 感染者の血清を、酸と熱で処理して抗原抗体複合物を解離した後、抗原を測定すると、5例中1例に p24 抗原が検出された。酸と熱で処理するこの方法は HIV の経過を知る有益な方法である。

I. はじめに

後天性免疫不全症 (acquired immunodeficiency syndrome; AIDS) は、1981 年に米国 CDC の morbidity mortality weekly report 誌上に報告された¹⁾。米国 AIDS 患者のほとんどが同性愛者であるが、日本での AIDS 患者は血友病患者が多く、血友病治療剤として使用してきた凝固因子製剤による感染であった²⁾。

しかし最近では、human immunodeficiency virus (HIV) に対する抗体のスクリーニング検査や、凝固因子製剤の熱処理によるウイルスの不活化により、輸血および凝固因子製剤からの HIV 感染は著しく減少してきている反面、男女間の性交渉による感染の増加が年々注目されてきている。

HIV 感染者は、感染数週間後から血清中に HIV 抗体が出現してくる。さらに細胞性免疫の主役を担うヘルパー T (T4) 細胞が破壊されて著しく減少すると、免疫性免疫不全およびそれに伴う液性免疫不全をきたして、日和見感染症か、カポジ肉腫などで代表される悪性腫瘍で死に至る経過をとる³⁾。

HIV 抗原が血中に再び出現することは AIDS related complex (ARC) あるいは full brown AIDS の病期への移行を知るうえで重要であるが、抗原出現の時期を明確に捉えることが困難である。また、感染から ARC, AIDS 進展までの期間やその経過にはいろいろ個人差がみられ、HIV 抗体の推移を検討する

ことの重要性が強調されている。

本論文は、抗体スクリーニング検査で検出された HIV 感染者の血清を、経時的に種々の検査法で検討し臨床病期に照らし合わせて検討した。また HIV 抗原陰性の血清を酸と熱で処理して HIV 抗原の解離を行い、早期検出を試みた。

II. 症例と方法

当院に通院中の血友病 A および B 患者と、AIDS の検査目的で来院した外来患者を対象として HIV 抗体をスクリーニング検査した。さらに、陽性血清を異なる検査方法で検査し、比較した。HIV 抗体の検出方法は、酵素免疫測定法、ゼラチン粒子凝集法、western blot 法を用いた。さらに envelope 抗体と core 抗体を酵素免疫測定法で検査した。HIV 抗原検査は p24 抗原を酵素免疫測定法で検査し、また、酸・熱解離処理後に抗原検査を行った。ウイルスの分離は他施設に依頼した。

1. 酵素免疫測定法 (enzyme immunoassay ; EIA 法)

HTLV-III EIA キット (アボット社、東京) を用いて測定した。緩衝液に浮遊している HIV 抗原ビーズに 10 μ l の被検血清を添加し、40°C, 30 分間反応させた後に洗浄した。これに酵素標識抗体液 (ペルオキシダーゼ標識・抗ヒト IgG 抗体液) 200 μ l を添加して 40°C, 30 分間反応させ、緩衝液で洗浄した後、酵

素反応を停止させ、その上清の波長 492 nm 吸光度を測定した。判定は、陰性および陽性コントロール血清の吸光度から cut off 値を計算し index を求めて判定した。

2. ゼラチン粒子凝集法 (Particle agglutination; PA 法)

セロディア・HIV キット (フジレバイオ社、東京) を用いた。マイクロプレートに被検血清 50 μ l の 2nd 希釈系列を作り、HIV の不活化処理抗原を吸着させたゼラチン粒子と室温で 2 時間反応させた。凝集反応の最終希釈濃度を測定し被検血清の HIV 抗体価とした。

3. Envelope 抗体と core 抗体の酵素免疫測定法

HIV ENVACOR EIA キット (アボット社、東京) を用いて、HIV の envelope 抗体と core 抗体をそれぞれの系で測定した。遺伝子組換えによって合成した envelope 部分構成蛋白と core 部分構成蛋白が付着しているビーズを用いて EIA 法で検査し、% inhibition を求めた。検出される抗体は IgG 抗体である。

4. Western blot 法 (WB 法)

ウェスタンブロットキット (パイオラッド社、東京) を使用した。被検血清を保存しておき、同時に検査した。HIV 構造蛋白をドデシル硫酸ナトリウム処理し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行って HIV 構造蛋白を転写したニトロセルロース膜片を、反応用トレイに浮遊させ、被検血清 20 μ l を加えて一昼夜振盪させながら反応させた。ニトロセルロース膜片を洗浄後、ビオチン標識-抗ヒト IgG 抗体 2 ml を加えて室温で 60 分反応。洗浄後、ペルオキシダーゼ標識アビジン液 2 ml を加えて室温にて 60 分反応させた。洗浄後、7.8 mM 4-クロロ-1-ナフトールを含む 0.02% H₂O₂、0.02% クエン酸緩衝液を加え、5~10 分反応後に緩衝液で洗浄した。呈色反応を停止させ、ニトロセルロース膜を暗所で自然乾燥させた。判定は陰性、弱陽性、強陽性コントロール血清のバンドの濃淡と比較し、-, +, ++ で評価した。gp 41 単独、あるいは p 24 と gp 120 または p 24 と gp 160 のバンドがコントロールのバンドより濃く検出された場合を HIV 抗体陽性者と判定した。

表 1 HIV 抗原抗体複合物の熱・酸解離法

酸解離:

被検血清 (100 μ l) に 0.05 M グリシン塩酸緩衝液 (あるいは 1.0 M クエン酸緩衝液) を混和し、pH を 2.0~2.5 に調整する。

熱解離:

混和後、ただちに 70°C の恒温槽で熱解離 (3 分) する。

pH の調整:

トリス緩衝液を加えて pH を 7.0 前後にもどす。

HIV 抗原の測定:

HIV 抗原を EIA 法で測定。

5. HIV 抗原検査法

HIV 抗原 EIA キット (アボット社、東京) で血清中の HIV 抗原、主として core 抗原 p 24 を EIA のサンドウッチ法で検出した。被検血清 200 μ l を抗 p 24 ヒト抗体が結合しているビーズと室温で 16 時間反応させた後、4~6 ml の緩衝液で 3 回洗浄した。200 μ l の抗 p 24 ウサギ抗体を添加し、40°C 4 時間反応させ洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 抗体 (ヤギ血清) を添加して 40°C、2 時間反応させ、洗浄後酵素反応を行って 492 nm 波長の吸光度を測定した。

6. HIV 抗原抗体複合物の酸・熱による解離法

景山ら⁴⁾の方法を参考にして新たに解離条件を設定した (表 1)。酸解理に用いる緩衝液は 1.0 M クエン酸緩衝液でも可能であったが、解離後に検査用 HIV 抗原ビーズが浮遊する操作上の欠点が認められたため、本実験ではグリシン緩衝液を解離液として使用した。被検血清 100 μ l に 0.05 M グリシン塩酸緩衝液 400 μ l を加え、被検血清が pH 2~2.5 であることを確認した後、70°C、3 分間の熱解離を行った。その後、pH 7 に戻して HIV 抗原を測定した。

7. ウイルス分離

ウイルス分離は、厚生省の研究班の指示に従い、島根大学ウイルス学教室で、その後は国立予防衛生研究所に検査を依頼した。

III. 結 果

酵素免疫測定法 (EIA) とゼラチン粒子凝集法 (PA) で 6 例に HIV 抗体が検出された (表 2)。6 例のうち 3 例は血友病 B 患者で、他の 3 例は AIDS 検査目的で性病科を受診した外来患者であった。HIV 抗体陽性者 6 例の年齢は 23~50 歳、男女比は 5 対 1

表 2 HIV 感染者のプロフィールと CDC 病型分類

Pt	Age	Sex	Diagnosis	CDC	WBC	Lym	CD 4/8
1	46	M	Hemophilia B	II	4,200	2,000	0.45
2	25	M	Hemophilia B	II	3,800	1,600	0.27
3	23	M	Hemophilia B	II	5,200	2,200	0.35
4	50	M	Homosexual	III	6,200	2,100	0.31
5	26	F	Heterosexual	II	6,500	2,200	0.99
6	44	M	Heterosexual	II	3,900	1,400	

WBC, Lym (lymphocyte) は初診時の値 ($/\mu\text{l}$)

であった。感染経路および基礎疾患は、血液凝固製剤によるもの 3 例、同性および異性間性的感染例 3 例 (男性 2 例、女性 1 例) であった。症例 1 は年 1~2 回の出血時に補充療法を受ける軽症血友病 B であり、C 型慢性肝炎が存在した。症例 2 と 3 は幼児期より第 IX 因子製剤の補充療法を開始している血友病 B 兄弟例であり、現在も月 4 回の輸注を行っているが、普通に日常生活を送っている。症例 4 の同性愛者は頻回の海外旅行歴があり、微熱と頸部リンパ腺腫脹が認められた。症例 5 と 6 の異性間性交例は国内感染と考えられた。CDC 病型分類は症例 4 のみ group III であったが、残りの 5 例は group II の無症候性キャリアであった。初診時 CDC 分類 group II である症例 6 は、1 年後には ARC、さらに AIDS へと移考した。

初診時の白血球数は 1,600~2,200 と正常下限であった。CD 4/8 比は 0.27~0.45 であった。

EIA 法による HIV 抗体は全例陽性であり、PA 法

表 3 HIV 感染者の HIV 抗体と抗原の経時的推移と酸・熱解離

Pt #	date Y'M	HIV-Ab		ENVACOR		Western Blot				HIV-Ag	
		EIA	PA	CORE	ENV	p 24	gp 41	gp 120	gp 160	uTx	Tx
1	86' 4	+	4,000 ↑	+	+	+	±	±	+	-	-
	88' 9	+	64×10^4	+	+	#	+	#	#	-	nt
2	89' 3	+	128×10^4	+	+	#	+	+	#	-	nt
	89' 6	+	256×10^4	-	+	#	+	+	#	-	+
	89' 12	+	128×10^4	-	+	#	#	±	#	-	+
	90' 5	+	32×10^4	-	+	#	#	+	#	-	nt
3	87' 5	+	40×10^4	+	+	#	+	+	#	-	nt
	88' 6	+	64×10^4	+	+	#	+	#	#	-	-
	89' 4	+	128×10^4	+	+	#	#	#	#	-	-
	90' 6	+	32×10^4	+	+	#	#	#	#	-	nt
4	86' 4	+	16×10^4	+	+	#	±	+	#	-	-
	88' 7	+	16×10^4	+	+	+	±	+	#	-	-
	89' 7	+	32×10^4	+	+	+	+	+	#	-	-
	90' 4	+	16×10^4	+	+	±	#	+	#	-	-
5	88' 11	+	32×10^4	+	+	+	+	±	#	-	-
	89' 10	+	8×10^4	+	+	+	+	+	#	-	-
	90' 4	+	16×10^4	+	+	+	#	±	#	-	nt
6	89' 12	+	16×10^4	-	+	±	+	±	#	-	-
	90' 3	+	16×10^4	-	+	±	+	±	#	+	nt
	90' 5	+	16×10^4	-	+	+	#	+	#	+	nt

HIV Antibody : EIA=Enzyme immunoassay. PA=Particle agglutination.

ENVACOR EIA : CORE=CORE antibody, ENV=Envelope antibody.

HIV (p 24) Antigen : uTx=untreatment, Tx=acid and heated treatment.

nt=not test

では8万倍以上の高抗体価を示した(表3)。HIV ENVACOR EIAでのenvelope抗体はすべて陽性であったが、core抗体は6例中4例が陽性であった。症例6は検査期間を通してcore抗体は陰性であったが、症例2は初診時のみ陽性でそれ以降陰性化した。

Western blot法(WB法)によるp24, gp41, gp120, gp160の特異バンドの経過を表3に示した。WB法の判定基準からは全例ともHIV抗体陽性者と判断された。しかし、その経過中に検出されるバンドの濃淡に差が認められた。gp41バンドは初回の検査で±が2例、+が4例あったが、経過中に5例が強陽性となった。gp41とgp120のバンドは全例とも次第に濃くなる傾向にあった。5例のp24バンド陽性者のうち1例は経過中に陰性化した。その症例4は初診時+, 2年3ヵ月後+, 4年後±であった。

HIV抗原(p24抗原)が検出されたCDC分類group IIの症例6は、WB法でp24バンドが±または+であったが、ENVACOR法でのcore抗体は陰性であった。無処理血清の抗原検査で陰性であった症例2は、酸・熱解離処理をした血清からp24抗原が検出された。この症例はENVACOR法でcore抗体が陰性であった。また、C1q法による免疫複合物は陽性で、数ヵ月後にリンパ球培養によってウイルスが分離された。

IV. 考 察

日本においてhuman immunodeficiency virus (HIV)感染者は徐々に増加し続けている。厚生省HIV感染者発症予防ならびに治療に関する研究班の平成2年度の集計によると、1,412例のHIV抗体陽性者が報告されており、血液凝固因子製剤による感染1,209例のほか、性的接触によるもの167例が新たに集計されている。また、AIDS患者207名が報告されている⁵⁾。

HIV感染者は、HIV-EIA法あるいはPA法でスクリーニング検査され、その後、確認検査として酵素法による再検査やwestern blot法などが施行される。

HIV抗体陽性者の予後の推測には、リンパ球CD4/8比、CD4細胞の絶対数、 β_2 microglobulin濃度、IgA量、血清ネオプテリン、IL-2レセプター、p24抗体など検査されている⁶⁾。

免疫能を示唆するTリンパ球CD4/8比は、AIDS発症の指標に有用であると考えられており、比0.2~0.5でAIDS発症し死亡した症例が報告されて

いる。また逆に、CD4/8比が低下しているが、まだAIDSを発症していないHIV感染者や血友病患者も多く報告されている⁶⁻⁷⁾。われわれの検討しえた5症例のCD4/8比は0.5以下であったが、AIDSはまだ発症しておらず、CD4/8比の低下のみではAIDS発症の指標とならないことを示している。

一方、CD4/8比とCD4陽性細胞の絶対数を検討したTaylorら⁸⁾の報告によると、CD4陽性細胞の絶対数が300/ μ l以上あってCD4/8比が0.5以上あれば、12ヵ月間の生存率は85~95%と比較的良好の予後を示すが、CD4陽性リンパ球が100/ μ l以下でCD4/8比が0.2以下になると、12ヵ月以内の死亡率は75%と高率であることを報告している。同様に、CD4陽性リンパ球が200/ μ l以下では日和見感染症肺炎の罹患率が高くなる⁹⁾ことが報告され、CD4/8比にCD4陽性細胞絶対数や他の因子を組み込むことで、HIV感染者の予後を予測できると考えられる。

HIV感染者のHIV抗原抗体の推移は、感染後まもなく血中にHIV抗原が出現し、さらに感染者の血清中にenvelope抗体、core抗体の順で抗体が出現してくる。その後、core抗体の出現とともにHIV抗原が血中から検出されなくなることが明らかになっている。また、無症候性キャリアからAIDS related complex (ARC)に、さらにfull brown AIDSに進展すると、core抗体は血中より次第に減少しはじめ、血中には再びHIV抗原や β_2 microglobulinが増加してくるといわれている。したがって、HIV感染者におけるHIV抗原と抗体の推移は疾病の進展とその臨床病期を決定するうえで極めて重要である。また、HIV感染者の自然経過とその抗体の推移を検討することは、AIDS発症過程を明らかにして、その後の治療に役立つと考えられる¹⁰⁾。

本症例のwestern blot法(以下WB法と略す)による検査では6例ともHIV感染者の診断基準を満足していたが、検出されるWBバンドのパターンはさまざまで、半年ごとの経時的検討でもバンドの濃淡に変化がみられた。gp41とgp120のバンドはウイルスのenvelope部分に対する抗体と考えられ、全例とも経過中に次第に濃くなる傾向にあった。ウイルスのcore部分に対する抗体であるp24のバンドは、濃くなる症例が5例あり、逆にgroup III(症例4)の1例では±から±に消失した。WB法におけるバンド消長は多様性であり、group IIからARC, AIDSに移行した症例をバンドの違いから区別することができ

ず、WB 法のバンドから HIV の進展を類推することは困難であると思われる。

Core 抗体 envelope 抗体の観点から、WB 法のバンドの結果と ENVACOR EIA 法の結果と比較すると、必ずしも一致した結果が得られず、2 例に結果の解離が認められた。ENVACOR EIA 法の core 抗体が陰性であった 2 症例のうち、症例 2 の WB 法の p 24 バンドは $\pm$ であり、症例 6 は $\pm$ あるいは $+$ であった。これら検査方法で異なった結果が得られる理由には、検査方法の感度の問題や抗原抗体複合物の存在、さらに検査に用いられる HIV ウイルス抗原と分子生物学的に合成された HIV 抗原の違いによるものなどが示唆される。また WB 法 p 24 バンドは特異性が低く、他のウイルス感染や HLA 抗体の存在により陽性になることが知られている。

Allain ら¹¹⁾や Goudsmit ら¹²⁾によると、envelope 抗体と core 抗体は病態の進行とともに推移し、とくに core 抗体が血中より減少しはじめる頃、HIV 抗原が再び血中より検出されると報告している。HIV 抗原の再出現は、ウイルスが活発化、増殖してウイルス過剰期になると考えられており、HIV 感染者の full brown AIDS への移行を診断する重要な情報となっている。また、吉山¹³⁾は、AIDS 発症 3 ヶ月から HIV 抗原の分離がされて 1 年後に死亡した症例を報告しており、HIV 感染者の症状と細胞変性効果は増

殖量の多い HIV の出現と相関する可能性が示唆されている。われわれが経験した症例 6 も、臨床症状が出現しない CDC 分類 group II の時期から p 24 抗原が検出され、短い経過をとった類似した症例と思われる。

HIV 抗原の検出は、臨床的意義が高いにもかかわらず実際の抗原の検出率は低い。検出率を低下する原因に免疫複合物による抗原の検出が妨げられている可能性が考えられている。Tsiquaye ら¹⁴⁾は、免疫複合物を形成した抗原を蔗糖溶液による超遠心沈澱法によって解離し、抗原を検出したと報告している。われわれは、p 24 抗原の早期検出を試みるため、抗原抗体複合物を酸・熱で処理し抗原と抗体を解離してから p 24 抗原を検査したところ、5 例中 1 例に p 24 抗原を検出した。この症例はその後まもなくリンパ球培養法により HIV ウイルスが同定されたことより、免疫複合物の抗原抗体解離操作は HIV 抗原を早期に検出有益な方法と考えられた。

HIV 抗原の再出現は HIV 感染者の ARC あるいは AIDS への移行を知るマーカーである。免疫複合物の影響で検出されない HIV 抗原を酸・熱処理して感度をあげて検査する方法は、簡便で迅速にできる臨床に有用な方法と思われる。

この研究は厚生省、HIV 感染者発症予防・治療に関する研究班（平成元年度）の助成を受けた。

文 献

- 1) CDC: Kaposi's Sarcoma and pneumocystis pneumonia among homosexual men-New York City and California. MMWR, 30: 305~308, 1981.
- 2) 松本孝夫・高橋浩文: 図説 AIDS—その現状と対策。ライフ, サイエンス (東京), 1978.
- 3) CDC: Update on acquired immunodeficiency syndrome-United States. MMWR, 34: 245~248, 1985.
- 4) 景山誠二・浜 誠治・栗村 敬: 血清前処理による抗体検出感度上昇の条件下での無症候性キャリア血清抗原量の推移。第 1 回エイズ研究会抄録, 1987, 京都.
- 5) HIV 感染者発症予防治療に関する研究班・情報委員会. 平成 2 年 8 月.
- 6) Fahey, J.L., Taylor, J.M.G., Detels, R. et al.: The prognostic value of cellular and serologic markers in infection with human immunodeficiency virus type 1. New Engl. J. Med., 322: 166~172, 1990.
- 7) 池松正次郎: HIV 感染者発症予防ならびに治療に関する研究班, NH 委員会昭和 63 年度報告書, 1988, pp. 3~13.
- 8) Taylon, J. et al.: Prognostically significant classification of immune changes in AIDS with Kaposi's sarcoma. Blood, 67: 665~671, 1986.
- 9) Masur, H. et al.: CD4 counts as predictors of opportunistic pneumonias in human immunodeficiency virus infection. Ann Int. Med., 111: 223~231, 1989.
- 10) 日本のエイズ症例: 塩川優一編, 日本公衆衛生

- 協会, 東京.
- 11) Ahllain, J.P., Laurian, Y., Paul, D.A. et al. : Long term evaluation of HIV antigen and antibodies to p24 and gp41 in patients with hemophilia. *New Engl. J. Med.*, 317 : 1114~1121, 1987.
- 12) Goudsmit, J., Wolf, P., Poul, D.A. et al. : Expression of human immuno-deficiency virus antigen (HIV-Ag) in serum and cerebrospinal fluid during acute and chronic infection. *Lancet*, II : 177~180, 1986.
- 13) 吉山裕規・梶井 正・小林 進・他 : HIV 抗体陽性者からの HIV 分離における抗原検出 EIA の応用. 厚生省昭和 63 年度 HIV 感染者発症予防治療に関する研究班, 厚生省報告書, 1989, pp. 231~236.
- 14) Tsiquaye, K.N., Youle, M., Changes, A.C. : Restriction of sensitivity of HIV1-antigen ELISA by serum anti-core antibody. *AIDS*, 2 : 41~45, 1988.
-