

- K., Inubushi, R., Shimano, R., Kawamura, M., Akari, H., Koyama, H. and Adachi, A.: Producer cell-dependent requirement of the Nef protein for efficient entry of HIV-1 into cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 250: 565-568, 1998.
11. Kiyokawa, E., Hashimoto, Y., Kobayashi, S., Sugimura, H., Kurata, T. and Matsuda, M.: Activation of Rac1 by a Crk SH3-binding protein, DOCK180. *Genes Develop* 12: 3331-3336, 1998
 12. Ogawa-Goto, K., Arao, Y., Ito, Y., Ogawa, T., Abe, T., Kurata, T., Irie, S. and Akanuma, H.: Binding of human cytomegalovirus to sulfated glucuronyl glycosphingolipids and their inhibitory effects on the infection. *J. Gen. Virol.* 79: 2533-2541, 1998.
 13. Takasaka, N., Tajima, M., Okinaga, K., Satoh, Y., Hoshikawa, Y., Katsumoto, T., Kurata, T. and Sairenji, T.: Productive infection of Epstein-Barr virus (EBV) in EBV-genome positive epithelial cell lines (GT38 and GT39) derived from gastric tissues. *Virology* 247: 152-159, 1998.
 14. Yoshikawa, T., Suzuki, K., Ihira, M., Furukawa, H., Suga, S., Iwasaki, T., Kurata, T., Asonuma, K., Tanaka, K. and Asano, Y.: Human herpesvirus 6 latently infects mononuclear cells but not liver tissue. *J. Clin. Pathol.* 52: 65-67, 1999.
 15. Lu, Y., Nerurkar, V.R., Dashwood, W., Woodward, C.L., Aban, S., Shikuma, C.M., Grandinetti, A., Chang, H., Nguyen, H.T., Wu, A., Yamamura, Y., Boto, W.O., Merriwether, A., Kurata, T., Detels, R. and Yanagihara, R.: Genotype and Allele Frequency of a 32-Base Pair Deletion Mutation in the CCR5 Gene in Various Ethnic Groups: Absence of Mutation among Asians and Pacific Islanders. (in press)

4. エイズ剖検例各臓器組織における HIV-1 env 領域の性状と HIV 脳症

分担研究者： 佐多 徹太郎（国立感染症研究所エイズ研究センター）

研究協力者： 櫻井 範子、寺井 政憲、佐藤 由子、倉田 毅（国立感染症研究所）

研究要旨 本邦エイズ剖検例 36 例の脳、リンパ節、脾臓（他肝臓、腎臓）から DNA を抽出し、nested PCR 法で HIV-1envC2V3 領域を増幅し、うち 14 例（HIV 脳症 5 例、脳日和見感染症 4 例および脳病変のない例 5 例）について各臓器中の HIVenv クローンの塩基配列（各例ごと 38-60 クローン、計 658 クローン）を系統樹解析した。各臓器由来の HIVenv クローンは、全体として比較的均一な集団、脳由来クローンがひとつの集団を形成し他臓器由来クローンと異なるもの、およびその中間の性状を示す 3 種類が認められた。HIV 脳症例の各臓器由来および脳由来クローンは比較的均一な集団を形成した。塩基配列から推定した V3 領域アミノ酸配列は、塩基配列と同様 3 種類に分けられた。脳症例では他臓器由来クローンと比較すると均一な集団を形成した。V3 領域のアミノ酸配列で比較すると、脳症由来クローンは M 型が多く T 型が混在する例があった。非脳症例のうち 3/14 では脳からも HIVenv が増幅でき、脳由来クローンが他臓器由来クローンと異なる集団を形成し、かつ T 型が多く認められた。非脳症例でも脳から HIVDNA が検出されたが T 型 2 例、M 型 1 例で、他臓器由来クローンは M 型が多く、脳内に隔離したクローンの存在が考えられた。HIV 脳症はエイズ末期に発症することから、個体内のクローンと類似する HIV によると考えられた。

A. 研究目的

本邦エイズ剖検例のうち、臨床的には 60-70% に何らかの中樞神経症状が認められエイズ脳症が疑われるが、病理組織学的にエイズ脳症に特徴的な多核巨細胞(multinucleated giant cell: MGC)が検出できるエイズ脳症例は約 30%である。エイズ脳症例では、大脳白質や基底核の小血管周囲に単球・マクロファージが認められ、ときに多核巨細胞が認められる。これらの細胞には HIV 抗原が免疫組織化学的に証明されることが多い。また稀であるが、白質の脱髄を伴う高度な脳症も認められる。何故エイズ脳症が同じ免疫不全症候群を呈する患者のうち一部に発症するのかはいまだ不明であり、またその神経症状発現機構についても不明なことが多い。それには、感染 HIV の性状を明らかにすることがまず必要であるが、剖検例の各臓器由来 HIV クローンについて解析した報告は少ない。

そのため昨年度に引き続き、本邦エイズ脳症剖検例について病態とウイルスの性状との関連を解析する目的で、脳由来ウイルスとリンパ節やほかの臓器由来ウイルスの V3 領域について検討した。検討症例は計 36 例で、うち脳から HIV-1env 領域が増幅できた計 12 例の最低 3 臓器由来の塩基配列について、系統樹解析が終了したので、過去の途中報告を含めて、まとめて報告する。

B. 研究方法

1) エイズ剖検例：エイズ剖検例のうち、脳凍

結保存組織のある 36 例を対象とし、nested PCR 法で HIV-1envC2V3 領域を増幅した。脳組織から増幅できた例のうち、最低 3 種他臓器からも増幅できた例を系統樹解析の対象とした。対象症例は HIV 脳症 5 例で、脳日和見感染症および腫瘍 4 例、脳病変のない 5 例である。エイズ脳症例の脳病理組織所見では、特徴的な多核巨細胞が脳白質を中心とした小血管周囲に認められ、これらの細胞には HIVp24 抗原が検出された。他の例にはエイズ脳症の組織学的所見はなく、進行性多巣性白質脳症(PML)およびサイトメガロウイルス脳炎を各 1 例、脳悪性リンパ腫 2 例を認めた。

2) PCR：剖検例の各臓器組織から常法により抽出した DNA を用い、二種類の nested PCR により HIV-1 gp120 の V3 を含む領域(HIV-1envC2V3)を増幅した。対象臓器組織は脳とリンパ節、脾臓の 3 臓器であり、リンパ節や脾臓が得られなかった例では腎臓や肝臓組織を用いた。PCR 増幅の際には DNA を含まない陰性対照を常に同時に増幅した。

3) 塩基配列の解析：PCR 産物は pGEM-T vector を用いて TA cloning し、T7 と Sp6 プライマーと dye terminator cycle sequencing kit を用いて両方向の sequence 反応を行い、ABI373S autosequencer で塩基配列を求めた。各 20 クローンの塩基配列を解析し、不確かな塩基配列は解析の対象外とした。各個体の系統樹解析に用いたクローンは、各臓器由来のクローンのうち、異なる塩基配列を選択し、他 2 種の臓器由来のクローンをまと

めて解析した。Boost strap value 80%以上でクラスターと考えた。各クローンの配列について脳組織由来クローンと他臓器由来クローンとの gross divergence を計算した。さらに各塩基配列から推定できる V3 領域のアミノ酸配列を求め、異なるクローンの配列を選択した後、V3 領域のアミノ酸配列を系統樹解析した。各アミノ酸配列をアライメントし、25 番目のアミノ酸の性状により、macrophage(M)指向性型と T 細胞指向性(T)型の二種に大別し、それぞれの頻度を求めた。コンピューターソフトは Sequence Navigator, FACTULA, DNASIS, Clustal W, PHYLIP package を用いた。

C. 研究結果

1) PCR による HIV-1envC2V3 領域の増幅

36 例のうち、臨床的にも病理学的にもエイズ脳症と診断された症例は 12 例(33%)であり、そのうち 9 例(75%)が陽性となった(表 1)。非エイズ脳症例のうち、10 例(28%)には悪性リンパ腫や PML 等の疾患の合併が脳に認められ、うち 5 例(50%)に陽性となった。病理組織学になんら脳病変を伴わないエイズ剖検例の脳 14 例(39%)ではうち 3 例(21%)にのみ陽性となった。したがって、エイズ剖検例の脳から PCR で検出できるのはエイズ脳症か脳に腫瘍ないし感染症が認められる例がほとんど(14/17;82%)を占めていた。エイズ脳症例でも増幅できなかつたのは、PCR の材料とした組織が脳の前頭葉のごく一部(約 200 mg)で、剖検時にはエイズ脳症が不明のまま、無作為的サンプリングを行った結果であろう。

2) HIV-1envC2V3 領域の塩基配列

PCR 産物を TA-cloning の後、661 クローンについて塩基配列を解析した。各臓器由来の配列を比較し、その中で同じ配列を省き代表的配列を得た後、個々の症例から得られた臓器代表配列全てを系統樹解析に用いた。

各例の 3 臓器から増幅できた HIV 脳症 5 例、脳日和見感染症 4 例、脳病変のない 3 例(表 2)について、系統樹解析を行ったところ、脳由来クローンが他臓器由来クローンと系統樹上どの位置に来るかそしてクラスターを形成するかどうかで、mixed type, intermediate type, isolated type の 3 種類に分類した(図 1)。HIV 脳症 5 例では、4 例が mixed type で、1 例が intermediate type に分類された。しかし、脳日和見感染症および腫瘍 4 例では、isolated type が 3 例、そして有意なクラスターではないが、mixed type に分類できる isolated & mixed type が 1 例、そして脳病変の

ない 3 例では、isolated & mixed type が 1 例および isolated type が 2 例であった。HIV 脳症例では、個体内 HIV は比較的均一なクローンが増殖し脳にも存在していること、HIV 脳症のない例では、脳由来クローンは一つのクラスターに属し、他の臓器由来クローンとは異なることが判明した。なお、増幅できたクローンはすべて HIV-1 subtype B に分類された。

3) HIVenvV3 領域のアミノ酸配列

各臓器代表塩基配列から V3 領域のアミノ酸配列を求め、その頻度を求め、さらに代表的配列のみ(計 149 クローン)を各例ごとに、同様に系統樹解析に用いた。さらにその配列をアライメントした。塩基配列と同様に 3 種類に分類できた。HIV 脳症例の塩基配列の解析では isolated type であった例は mixed type に分類され、M 型であった(図 2)。その結果、HIV 脳症 5 例の脳由来クローンは個体内のクローンと類似していること、および M 型が 4 例、中間型が 1 例、M 型ないし T 型が 1 例であった。脳日和見感染症および腫瘍 4 例では、逆に isolated type が 3 例、intermediated type が 1 例で、M 型および T 型は各 2 例であった。脳病変のない 3 例では、mixed, intermediated, isolated type が各 1 例で、M 型 1 例、T 型 2 例であった。

D. 考察

HIV の外皮糖蛋白である gp120 の V3 領域は中和抗体の標的であり、また細胞への感染に重要なレセプター(CD4)ないし補助レセプター(CXCR4 や CCR5)にも関与していることが明らかにされている。エイズ脳症由来のウイルスは PBMC や単球・マクロファージ由来培養細胞に感染するが、T 細胞株には感染しないので、NSI/macrophage 指向性ウイルス(M 型; R5 virus)と考えられている。一方、末梢血由来のウイルスは PBMC や T 細胞株に感染し、増殖はより早くしかも感染細胞の融合による合胞体(syncytium)を形成することから、SI/T lymphocyte 指向性ウイルス(T 型; X4 virus)とよばれる。gp120 の V3 領域ではシステイン間の結合による Loop が形成され、これを構成するアミノ酸は NSI (M)ないし SI (T)型によって異なり、NSI 型の V3 領域は陰性荷電(酸性アミノ酸)をもつものが多く、SI 型では陽性荷電(塩基性アミノ酸)を持つものが多いとされている。エイズ脳症由来のウイルスは NSI 型とされ、病理所見として特徴的な macrophage 由来の多核巨細胞(MGC)の出現とこの細胞内でのウイルス抗原の検出という所見とほぼ一致する。しかし、NSI/Macrophage

型であっても、MGC がみられるように、合胞体形成能を示しており、in vivo と in vitro での所見は必ずしも同じではない。さらに、脳からの分離株の中には PBMC や T 細胞株での増殖を示すことも稀に報告されている。

エイズ脳症例では PCR 陽性となる頻度が高く(75%)、エイズ脳症の無い例では頻度が低い(21%)ことから、脳症例の脳から増幅できたウイルスの配列は大部分脳由来と考えられる。しかし、脳症のない例から得られた配列は NSI(M)型と SI(T)型であり、脳日和見感染ないし腫瘍例の半数は T 型であった。これらの症例における他の臓器由来のウイルスは NSI/Macrophage 型がほとんどであることから、感染早期に脳内に隔離されたウイルスの持続感染の存在が示唆された。と同時に、脳に M 型が多い例では、他臓器には T 型が見られ、脳と他の臓器では増殖しているウイルスの性状に差異が認められた。これらの症例は生存期間が延長すると脳症を発症する可能性も考えられる。エイズ脳症例では死亡前 2-6 カ月に臨床的に脳症が疑われていた。剖検時の脳から得られた NSI / Macrophage 型および SI/T cell 型ウイルスは他の臓器由来のウイルスと V3 領域の配列が同じであったことは、類似するウイルスが末期には脳にも出現していると考えられる。エイズ脳症は病理学的に白質血管周囲の多核マクロファージ(MGC)が特徴であることから、他の臓器由来のウイルスが脳内に感染しやすくなるような脳血管系の異常を伴っている可能性が考えられる。

E. 結論

エイズ剖検例では脳症の有無にかかわらず、NSI/Macrophage(M)型ウイルスが優位であった。非エイズ脳症例でウイルスが検出できた例では、脳由来クローンは他の臓器由来のクローンと異なるクラスターを形成し、細胞指向性にも差異があることから、感染早期に脳内に持続感染したウイルスないし脳症発症前期にある可能性を示唆した。エイズ脳症例の脳由来クローンはほぼ均一なポピュレーションを示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ayisi NK, Wiredu EK, Sata T, Nyadedzor C, Tsiagbe VK, Newman M, Cofie CN, Taniguchi K.: T-lymphocytopenia, opportunistic infections and pathological findings in Ghanaian AIDS patients and their sexual partners. *East Afr Med J* 74:784-791, 1997.
- 2) Brandful JAM, Ampofo WK, Janssens W, Adu-

Sarkodie Y, Apeagyei F, Anyomi F, Aidoo S, Yamamoto N, Ishikawa K, Sata T, Kurata T.: Genetic and phylogenetic analysis of HIV-1 strains from southern Ghana. *AIDS Res Human Retrovirol* 14: 815-818, 1998.

- 3) Yasuda S, Iwasaki M, Oka S, Naganawa S, Nakasone T, Honda M, Sata T, Kojima A, Matsuda S, Takemori T, Tsunetsugu-Yokota Y.: Detection of HIV-Gag p24-specific antibodies in sera and saliva of HIV-1-infected adults and in sera of infants born to HIV-1-infected mothers. *Microbiol Immunol* 41; 305-311, 1998.
- 4) 佐多徹太郎：新しい腫瘍ウイルス HHV8。医学のあゆみ。184; 138-139,1998.
- 5) 佐多徹太郎：カポシ肉腫と HHV8。皮膚科診療プラクティス。本田まり子編。文光堂。1998, pp205-207.
- 6) 佐多徹太郎、喜納奈緒、寺井政憲：HIV と HPV。病理と臨床 16:832-836, 1998.
- 7) 佐多徹太郎：HIV 感染者にみられる悪性腫瘍。化学療法の領域 14;2163-2169, 1998.
- 8) 佐多徹太郎：ヒトヘルペスウイルス 8 型と関連病変。日本ウイルス学会総会シンポジウム。1998 年 10 月、東京。

学会発表

- 1) 佐多徹太郎、寺井政憲、倉田毅：エイズ剖検例の HIV-1 V3 領域の解析。第 12 回日本エイズ学会総会。1998 年 12 月、東京。
- 2) 片野晴隆、倉田毅、佐多徹太郎、森茂郎：AIDS 合併カポシ肉腫患者における HHV8 ORF59 の解析。第 12 回日本エイズ学会総会。1998 年 12 月、東京。
- 3) 寺井政憲、高木実、佐多徹太郎：HIV 感染者の口腔における HPV 感染。第 12 回日本エイズ学会総会。1998 年 12 月、東京。
- 4) 柏瀬光寿、永田洋一、山内康行、佐藤由子、岩崎琢也、佐多徹太郎、望月學、岩本愛吉、白井正彦、倉田毅：AIDS 患者におけるサイトメガロウイルス網膜炎の眼病理組織学的検討。第 12 回日本エイズ学会総会。1998 年 12 月、東京。
- 5) 石川晃一、Brandful J, 櫻井範子、Barnor J, Ampofo W, 佐多徹太郎、山本直樹、倉田毅：ガーナにおける HIV サブタイプの解析。第 12 回日本エイズ学会総会。1998 年 12 月、東京。
- 6) 向井鐘三郎、佐多徹太郎、宇田晶彦、村山裕一、小松原博文、毒島孝治、小野文子、森一泰、倉田毅、山田章雄：サル脳炎組織由来 SIV 持続感染細胞株の樹立とそのエイズ脳症における役割。第 12 回日本エイズ学会総会。1998 年 12 月、東京。
- 7) 多田隈圭、大谷功、小野文子、山田章雄、佐多徹太郎、森一泰、森豊隆志、出雲周二、納光弘：Differential localization of SIV in lymph nodes in mokeys infected with nef+ and nef mutant of SIV. 第 12 回日本エイズ学会総会。1998 年 12 月、東京。

表 1

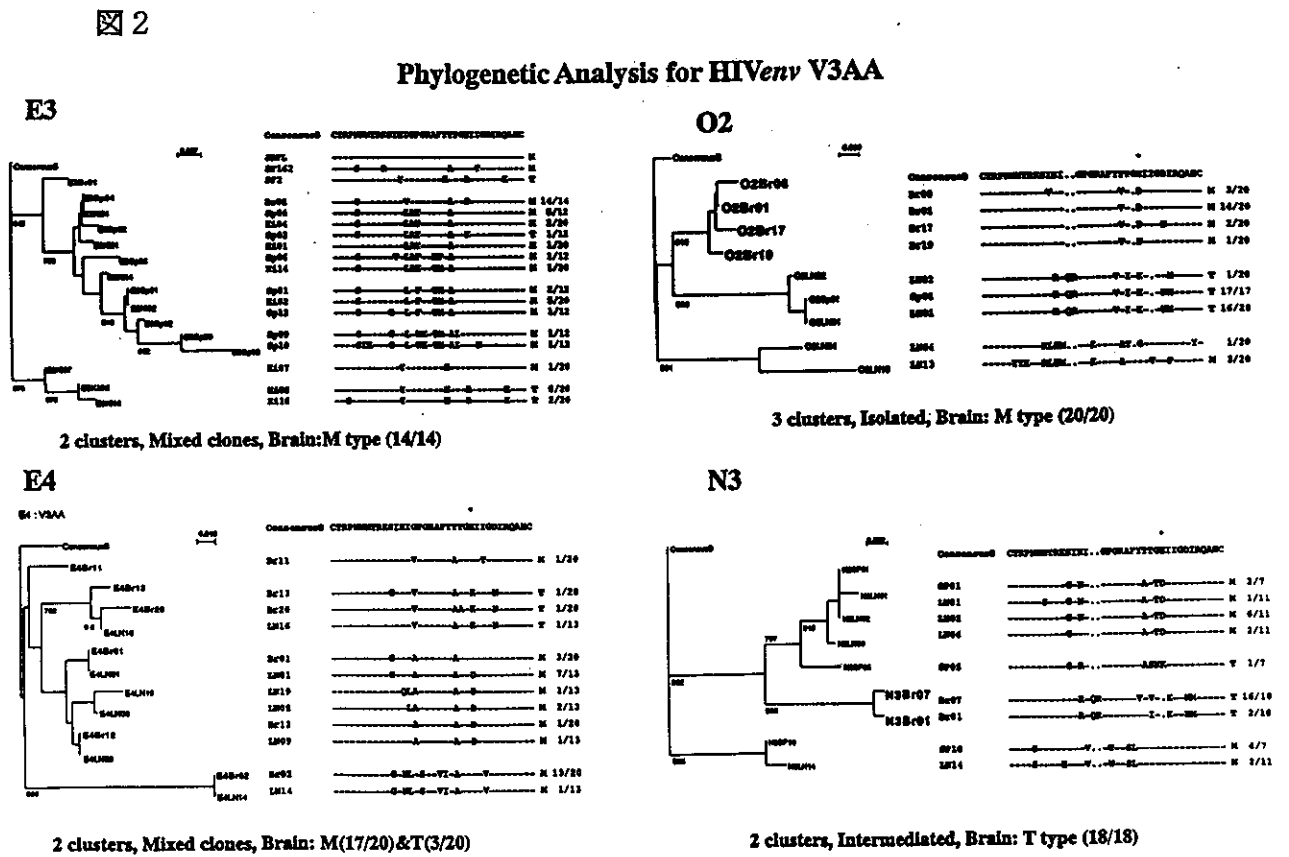
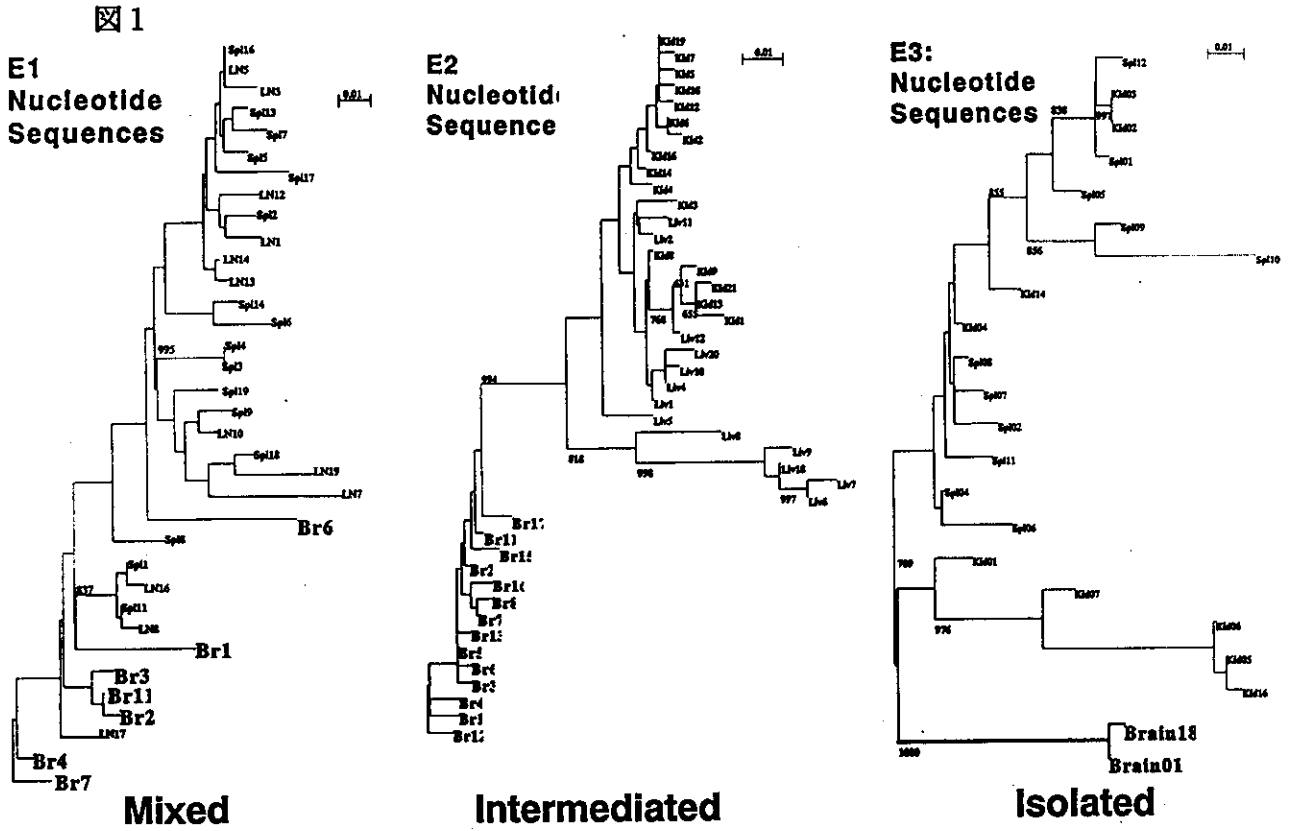
**HIV-1env - PCR Amplification
in AIDS Autopsy Cases (36 Cases)**

Cases	Group	N=36	PCR
HIV encephalitis	E	12	9 (75%)
AIDS	Tumor or Other Infection	O	5 (50%)
	-	N	3 (21%)

表 2

Cases and Specimens for Sequencing Analysis

Cases	Age/Sex	MGC In Brain	Other Brain Lesions	Examined Organ	Examined Clones
E1	62M	+	-	Brain, LN, Spleen	38
E2	29M	+	-	Brain, Liver, Kidney	57
E3	32M	+	-	Brain, Kidney, Spleen	46
E4	25M	+	-	Brain, LN, Spleen	33
E5	42M	+	-	Brain, LN, Spleen	52
O1	39M	-	ML	Brain, LN, Spleen	54
O2	43M	-	PML	Brain, LN, Spleen	57
O3	37F	-	CMV	Brain, LN, Spleen	54
O4	47M	-	ML	Brain, LN, Spleen	56
N1	42F	-	-	Brain, Kidney, Spleen	37
N2	44M	-	-	Brain, LN, Spleen	48
N3	35M	-	-	Brain, Spleen, PBMC	60



5. HIV 感染の診断におけるウィンドウ期間の短縮

分担研究者 石川 栄治 (宮崎医科大学医学部第一生化学講座教授)

研究要旨 1) 抗 HIV-1 p17 IgG, IgM 抗体の高感度免疫複合体転移測定法を開発して、19 例の HIV-1 セロコンバージョン血清パネルをテストした結果、3 例において抗 p17 IgG, IgM 抗体が HIV-1 p24 抗原、RNA より早く検出され、2 例において早い検出が予想されたので、抗 p17 IgG, IgM の HIV-1 p24 抗原、RNA より早期の検出が現象としてより確実となった。2) 12 例の HIV-1 セロコンバージョン血清パネルをテストしたところ、10 例においては、免疫複合体転移測定法による HIV-1 p24 抗原の検出と RT-PCR による HIV-1 RNA の検出は同時で、2 例では p24 抗原の検出の方が RNA の検出より早い傾向にあった。3) HIV-2 gp36 合成ペプチドを抗原とする免疫複合体転移測定法を開発して、HIV-2 のみに感染した 19 例の血清をテストした結果、2 例において HIV-2 p26 抗原によるウエスタンブロットがより高感度であったことを除けば、すべての血清においてすべての HIV-2 抗原によるウエスタンブロットより免疫複合体転移測定法が高感度であった。また HIV-1 p17, p24, 逆転写酵素 3 者の組合せで HIV-2 感染の診断が可能なることもわかった。

A. 研究目的

抗 HIV-1 IgG 及び IgM 抗体 と p24 抗原を測定するための新しい超高感度測定法 (免疫複合体転移測定法) を開発したので、その有用性を検討することを目的として、ウィンドウ期間の短縮に重点をおいた。さらに、抗 HIV-2 IgG の新しい超高感度測定法を開発中であるので、その結果も、報告する。

7 年度は、免疫複合体転移測定法により、p24 抗原と抗 p17 IgG 抗体、抗逆転写酵素 IgG 抗体を同時に検出して、従来法による場合と比べて HIV-1 感染診断のウィンドウ期間を約 2 週間短縮した。8 年度は、測定法を更に高感度化した結果、p24 抗原が血中に現れる前に、抗 p17 IgG 抗体を検出できる場合のあることがわかり、抗 HIV 抗体を超高感度で検出すれば、ウィンドウ期間を更に短縮できる可能性のあることがわかった。9 年度は、IgG 抗体より早期に血中に現れるといわれる IgM 抗体を検出する免疫複合体転移測定法を開発し、これと RT-PCR によりセロコンバージョン血清パネルをテストした。その結果、p24 抗原と RNA の検出が殆ど同時期であること、また一部の血清パネルでは、IgG 抗体や IgM 抗体が p24 抗原や RNA より早期に検出され、更にウィンドウ期間の短縮が可能なることが示された。そこで、本年度は、さらに多くのセロコンバージョン血清パネルで、p24 抗原と RNA の検出時期やより早期の IgG 抗体や IgM 抗体の検出について、検討した。また、抗 HIV-1 IgG と同様に、抗 HIV-2 IgG の超高感度測定法を開発中であり、その結果を報告する。

B. 研究方法

1) アフィニティー精製ウサギ抗 2,4-ジニトロフェニル基 IgG、アフィニティー精製ウサギ抗 (ヒト IgG γ -鎖) IgG、モノクローナル・マウス抗 (ヒト IgM) IgG1 およびストレプトアビジン-ビオチン化ウシ血清アルブミン不溶化ポリスチレンビーズの調製

アフィニティー精製ウサギ抗 2,4-ジニトロフェニル基 IgG 50 μ g/ml を含む緩衝液 A (0.1 mol/l リン酸ナトリウム緩衝液, pH 7.5) に着色ポリスチレンビーズ (直径 3.2 mm, イムノケミカル) を浸し、4℃一夜放置、緩衝液 A で洗浄後、0.1 mol/l NaCl を含む緩衝液 B (0.1% ウシ血清アルブミン、1 mmol/l MgCl₂, 0.1% Na₃N を含む 10 mmol/l リン酸ナトリウム緩衝液, pH 7.0) 中、4℃で保存。

アフィニティー精製ウサギ抗 (ヒト IgG γ -鎖) IgG 100 μ g/ml およびモノクローナル・マウス抗 (ヒト IgM) IgG1 10 μ g/ml を含む緩衝液 A に白色ポリスチレンビーズ (直径 3.2 mm, イムノケミカル) を浸し、4℃一夜放置、緩衝液 A で洗浄後、緩衝液 B (0.1 mol/l NaCl) 中、4℃で保存。

ビオチン化ウシ血清アルブミン 100 μ g/ml を含む緩衝液 A に白色ポリスチレンビーズ (直径 3.2 mm, イムノケミカル) を浸し、4℃一夜放置、緩衝液 A で洗浄後、ストレプトアビジン 100 μ g/ml を含む緩衝液 A に浸し、4℃一夜放置、緩衝液 A で洗浄後、緩衝液 B (0.1 mol/l NaCl) 中、4℃で保存。

2) HIV-1 リコンビナント蛋白質 (Hashida, S., et al., J. Clin. Lab. Anal. 7: 353-364, 1993; J. Clin. Lab. Anal. 8: 86-95, 1994)

リコンビナント p17 (rp17)、リコンビナント

p24 (rp24) は、それぞれの cDNA を導入したプラスミドベクターにより形質転換した大腸菌を用いて産生させ、精製した。用いたリコンビナントプロウイルスクローンは NY5 (Genbank accession number HIVNL43) と LAV 由来の cDNA を組みこんだ pNL4-3 である。尚、rp17、rp24 の塩基配列は、NY5 由来である。

3) 2,4-ジニトロフェニル化ウシ血清アルブミン-rp17 結合物の調製 (Hashida, S., et al., J. Clin. Lab. Anal. 7: 353-364, 1993)

2,4-ジニトロフェニル化ウシ血清アルブミンに導入したマレイミド基と rp17 に導入したチオール基とを反応。

4) rp17- β -D-ガラクトシダーゼ結合物の調製 (Hashida, S., et al., J. Clin. Lab. Anal. 7: 353-364, 1993)

β -D-ガラクトシダーゼに導入したマレイミド基と rp17 に導入したチオール基とを反応。

5) 抗 HIV-1 p17 IgG の免疫複合体転移測定法 (Ishikawa, S., et al., J. Clin. Lab. Anal. 11: 244-250, 1997, Hashida, S., et al., J. Clin. Lab. Anal. 12: 98-107, 1998)

血清 100 μ l を rp17- β -D-ガラクトシダーゼ結合物 100 fmol、2,4-ジニトロフェニル化ウシ血清アルブミン-rp17 結合物 100 fmol および β -D-ガラクトシダーゼ・ムテイン 50 μ g を含む緩衝液 B (0.9 mol/l NaCl) 50 μ l と室温で 30 分インキュベート。反応液に、アフィニティー精製抗 2,4-ジニトロフェニル基 IgG 不溶化着色ポリスチレンビーズ (直径 3.2 mm) 2 個を加え、振盪 (180 振盪/分) しながら室温で 1 時間インキュベート。着色ポリスチレンビーズを 2 回緩衝液 B (0.1 mol/l NaCl) で洗浄後、 ϵ -N-2,4-ジニトロフェニル-L-リジン, 1 mmol/l を含む緩衝液 B (0.1 mol/l NaCl) 150 μ l およびアフィニティー精製ウサギ抗 (ヒト IgG γ -鎖) IgG 不溶化白色ポリスチレンビーズ (直径 3.2 mm) 2 個とともに振盪 (180 振盪/分) しながら室温で 1 時間インキュベート。最後の白色ポリスチレンビーズを 2 回洗浄。結合した β -D-ガラクトシダーゼ活性を 30 $^{\circ}$ C、2 時間、4-methylumbelliferyl- β -D-galactoside とインキュベートして、蛍光法により測定。蛍光強度は、10-8 mol/l 4-methylumbelliferone のそれを 100 として測定。

6) 抗 HIV-1 p17 IgM の免疫複合体転移測定法 (Hashida, S., et al., J. Clin. Lab. Anal. 12: 329-336, 1998.)

血清 100 μ l を rp17- β -D-ガラクトシダーゼ結合物 100 fmol、2,4-ジニトロフェニル化ウシ血

清アルブミン-rp17 結合物 100 fmol および β -D-ガラクトシダーゼ・ムテイン 50 μ g を含む緩衝液 B (0.9 mol/l NaCl) 50 μ l と室温で 30 分インキュベート。反応液に、アフィニティー精製抗 2,4-ジニトロフェニル基 IgG 不溶化着色ポリスチレンビーズ (直径 3.2 mm) 2 個を加え、振盪 (180 振盪/分) しながら室温で 1 時間インキュベート。着色ポリスチレンビーズを 2 回洗浄後、 ϵ -N-2,4-ジニトロフェニル-L-リジン, 1 mmol/l を含む緩衝液 B (0.1 mol/l NaCl) 150 μ l およびモノクローナル・マウス抗 (ヒト IgM) IgG1 不溶化白色ポリスチレンビーズ (直径 3.2 mm) 2 個とともに振盪 (180 振盪/分) しながら室温で 1 時間インキュベート。最後の白色ポリスチレンビーズを 2 回洗浄。結合した β -D-ガラクトシダーゼ活性を 30 $^{\circ}$ C、2 時間、4-methylumbelliferyl- β -D-galactoside とインキュベートして、蛍光法により測定。蛍光強度は、10-8 mol/l 4-methylumbelliferone のそれを 100 として測定。

7) 2,4-ジニトロフェニル化ビオチン化ウシ血清アルブミン-アフィニティー精製抗 p24 Fab' 結合物の調製 (Hashida, S., et al., J. Clin. Lab. Anal. 10: 302-307, 1996)

2,4-ジニトロフェニル化ビオチン化ウシ血清アルブミンに導入したマレイミド基とアフィニティー精製抗 p24 Fab' のチオール基とを反応。

8) モノクローナル・マウス抗 p24 Fab'- β -D-ガラクトシダーゼ結合物の調製 (Hashida, S., et al., J. Clin. Lab. Anal. 10: 302-307, 1996)

β -D-ガラクトシダーゼに導入したマレイミド基とモノクローナル・マウス抗 p24 Fab' のチオール基とを反応。

9) HIV-1 p24 抗原の 2 点結合免疫複合体転移測定法 (Hashida, S., et al., J. Clin. Lab. Anal. 12: 115-120, 1998.)

血清 50 μ l とモノクローナル・マウス抗 p24 Fab'- β -D-ガラクトシダーゼ結合物 5 fmol、2,4-ジニトロフェニル化ビオチン化ウシ血清アルブミン-アフィニティー精製抗 p24 Fab' 結合物 100 fmol および非特異ウサギ F(ab')₂ 0.1 mg を含む緩衝液 B (0.53 mol/l NaCl) 100 μ l を室温で 16 時間インキュベート。反応液に、アフィニティー精製抗 2,4-ジニトロフェニル基 IgG 不溶化着色ポリスチレンビーズ (直径 3.2 mm) 2 個を加え、振盪 (180 振盪/分) しながら室温で 2 時間インキュベート。着色ポリスチレンビーズを 2 回洗浄後、 ϵ -N-2,4-ジニトロフェニル-L-リジン, 1 mmol/l を含む緩衝液 B (0.1 mol/l NaCl) 150 μ l およびストレプトアビジン-ビオチン化ウシ

血清アルブミン 不溶化白色ポリスチレンビーズ (直径 3.2 mm) 2個とともに振盪 (180 振盪/分) しながら室温で 2 時間インキュベート。着色ポリスチレンビーズを除去した後、白色ポリスチレンビーズを 2 回緩衝液 B (0.1 mol/l NaCl) で洗浄。結合した β -D-ガラクトシダーゼ活性を 30℃、20 時間、4-methyl-umbelliferyl- β -D-galactoside とインキュベートして、蛍光法により測定。蛍光強度は、 10^{-8} mol/l 4-methylumbelliferone のそれを 100 として測定。

10) HIV-1 RNA の PCR 法による測定 (アンプリコア HIV-1 モニター, ロッシュ社)

1: HIV-1 RNA の抽出

血清 200 μ l にチオシアン酸グアニジン、ジチオスレイトール、既知量の定量標準 RNA を含む溶解緩衝液 600 μ l を加え、よく混和後、室温で 10 分間インキュベート。反応液に、イソプロパノール 800 μ l を加え、よく混和後、室温、12,500 xg 以上で、15 分間遠心。沈殿を洗浄後、検体希釈液 400 μ l を加え、よく混和 (HIV-1 RNA 溶液)。

2: 逆転写反応による HIV-1 RNA からの cDNA 合成とポリメラーゼ連鎖反応による DNA の増幅

上記 HIV-1-RNA 溶液 50 μ l にピオチン化プライマー、dATP, dCTP, dGTP, dUTP 及び Tth DNA ポリメラーゼを含むモニターマスターミックス 50 μ l を加え、サーマルサイクラーにセットし、(1)ピオチン化プライマーの RNA へのアニーリング、50℃、2 分、(2) Tth DNA ポリメラーゼの逆転写活性による cDNA の合成、60℃、30 分、続いて、(3) 熱変性、90-95℃、10 秒、(4) ピオチン化プライマーの cDNA へのアニーリング、55-60℃、10 秒、(5) Tth DNA ポリメラーゼの DNA ポリメラーゼ活性による相補鎖 DNA の伸長、72℃、10 秒。(3)~(5) を 30 サイクル。PCR 反応液に水酸化ナトリウムを含む変性試薬 100 μ l を加え、一本鎖 DNA にアルカリ変性。

3: 増幅 DNA のハイブリダイゼーション法による検出

本鎖 DNA 溶液 25 μ l とハイブリダイゼーション緩衝液 100 μ l との混合液を、HIV-1 DNA プローブ不溶化マイクロウエルおよび定量標準用 DNA プローブ不溶化マイクロウエルに加え、37℃で 1 時間ハイブリダイゼーション。マイクロウエルを 5 回洗浄後、アビジン-ペルオキシダーゼ溶液 100 μ l を加え、37℃で 15 分間インキュベート。5 回洗浄後、

基質溶液 100 μ l を加え、結合したペルオキシダーゼ活性を室温で 15 分間インキュベート、反応停止溶液 100 μ l を加え、比色法 (450 nm) により測定。

11) HIV-2 gp36(585-611)合成ペプチド

27 個のアミノ酸からなる合成ペプチド HIV-2 env gp36(585-611)(H2N-Tyr585-Leu-Gln-Asp-Gln-Ala-Arg-Leu-Asn-Ser-Trp-Gly-Cys-Ala-Phe-Arg-Gln-Val-Cys-His-Thr-Thr-Val-Pro-Trp-Val-Asn611-CooH)は Chiron Technologies Pty.社より入手した。

12) 2,4-ジニトロフェニル化ウシ血清アルブミン-HIV-2 gp36(585-611)合成ペプチド結合物の調製

2,4-ジニトロフェニル化ウシ血清アルブミン (0.18 mg, 2.8 nmol)に導入したマレイミド基を含む緩衝液 C (5 mmol/l EDTA を含む 0.1 mol/l リン酸ナトリウム緩衝液, pH 6.0) 0.45 ml と HIV-2 gp36(585-611)合成ペプチド (0.089 mg, 28 nmol) のチオール基を含む緩衝液 C, 0.05 ml とを 30℃、1 時間、インキュベート。0.1 mol/l N-エチルマレイミドを含む緩衝液 C, 0.01 ml と 30℃、10 分間、インキュベート後、セファデックス G-50 を用いた遠心カラム法により過剰の合成ペプチドを除去、2,4-ジニトロフェニル化ウシ血清アルブミン-HIV-2 gp36(585-611)合成ペプチド結合物を得た。2,4-ジニトロフェニル化ウシ血清アルブミン 1 分子当り 4.0 分子の合成ペプチドが結合していた。

13) HIV-2 gp36(585-611)合成ペプチド- β -D-ガラクトシダーゼ結合物の調製

β -D-ガラクトシダーゼ (0.5 mg, 1.0 nmol) に導入したマレイミド基を含む緩衝液 C, 0.45 ml と HIV-2 gp36(585-611)合成ペプチド (0.032 mg, 10 nmol) のチオール基を含む緩衝液 C, 0.05 ml とを 30℃、1 時間、インキュベート。0.1 mol/l N-エチルマレイミドを含む緩衝液 C, 0.01 ml と 30℃、10 分間、インキュベート後、セファデックス G-50 を用いた遠心カラム法により過剰の合成ペプチドを除去、HIV-2 gp36(585-611)合成ペプチド- β -D-ガラクトシダーゼ結合物を得た。 β -D-ガラクトシダーゼ 1 分子当り 3.3 分子の合成ペプチドが結合していた。

14) 抗 HIV-2 gp36 IgG の免疫複合体転移測定法

血清 10 μ l を HIV-2 gp36(585-611)合成ペプチド- β -D-ガラクトシダーゼ結合物 100 fmol、2,4-ジニトロフェニル化ウシ血清アルブミン-HIV-2 gp36(585-611)合成ペプチド結合物 300 fmol および β -D-ガラクトシダーゼ・ムテイン 50 μ g を含む緩衝液 B (0.4 mol/l NaCl) 140 μ l と室温で 2 時間までインキュベート。反応液に、アフィニティー精製抗 2,4-ジニトロフェニル基 IgG 不溶

化着色ポリスチレンビーズ (直径 3.2 mm) 2個を加え、振盪 (210 振盪/分) しながら室温で2時間までインキュベート。着色ポリスチレンビーズを2回緩衝液 B (0.1 mol/l NaCl) で洗浄後、 ϵ N-2,4-ジニトロフェニル-L-リジン, 1 mmol/l を含む緩衝液 B (0.1 mol/l NaCl) 150 μ l およびアフィニティー精製ウサギ抗 (ヒト IgG γ -鎖) IgG 不溶化白色ポリスチレンビーズ (直径 3.2 mm) 2個とともに振盪 (210 振盪/分) しながら室温で2時間までインキュベート。最後の白色ポリスチレンビーズを2回洗浄。結合した β -D-ガラクトシダーゼ活性を 30 $^{\circ}$ C、1 時間、4-methylumbelliferyl- β -D-galactoside とインキュベートして、蛍光法により測定。蛍光強度は、10-8 mol/l 4-methylumbelliferone のそれを 100 として測定。

15) リコンビナント HIV-1 p17, p24 及び 逆転写酵素(RT)を用いた抗 HIV-2 IgG の免疫複合体転移測定法 (Ishikawa, S., et al., J. Clin. Lab. Anal. 11: 244-250, 1997, Hashida, S., et al., J. Clin. Lab. Anal. 12: 1998, in Press)

血清 10 μ l をリコンビナント HIV-1 プロテイン- β -D-ガラクトシダーゼ結合物 100 fmol、2,4-ジニトロフェニル化ウシ血清アルブミン-リコンビナント HIV-1 プロテイン結合物 100 fmol および β -D-ガラクトシダーゼ・ムテイン 50 μ g を含む緩衝液 B (0.4 mol/l NaCl) 140 μ l と室温でインキュベート。反応液に、アフィニティー精製抗 2,4-ジニトロフェニル基 IgG 不溶化着色ポリスチレンビーズ (直径 3.2 mm) 2個を加え、振盪 (210 振盪/分) しながら室温でインキュベート。着色ポリスチレンビーズを2回緩衝液 B (0.1 mol/l NaCl) で洗浄後、 ϵ N-2,4-ジニトロフェニル-L-リジン, 1 mmol/l を含む緩衝液 B (0.1 mol/l NaCl) 150 μ l およびアフィニティー精製ウサギ抗 (ヒト IgG γ -鎖) IgG 不溶化白色ポリスチレンビーズ (直径 3.2 mm) 2個とともに振盪 (210 振盪/分) しながら室温でインキュベート。最後の白色ポリスチレンビーズを2回洗浄。結合した β -D-ガラクトシダーゼ活性を 30 $^{\circ}$ C、4-methylumbelliferyl- β -D-galactoside とインキュベートして、蛍光法により測定。蛍光強度は、10-8 mol/l 4-methylumbelliferone のそれを 100 として測定。それぞれの抗体測定系のインキュベート時間は、p17 は 0.5、1、1、1 時間、p24 は 0.5、1、1、1 時間、RT は 2、1、1、1 時間。

16) HIV-1 セロコンバージョン血清パネル、HIV-1 及び 2 感染者血清、HIV 非感染者血清
HIV-1 セロコンバージョン血清パネル は、1

種を BCP 社、6 種を NABI 社、12 種を BBI 社から入手した。HIV-2 のみに感染した血清は、19 種を BBI 社から入手した。他の血清は、79 名の HIV-1 感染者 (無症候感染者 50 名、ARC 患者 9 名、AIDS 患者 20 名) と 100 名の HIV-1 非感染者から無作為に採取した。HIV-1 陽性と陰性はゼラチン粒子凝集法 (フジレビオ) により確認した。

17) その他の免疫測定法

従来法として、ELISA (HIV-1/2, 第三世代、アボット社)、ゼラチン粒子凝集法 (HIV-1, フジレビオ社) とウエスタンブロット法 (HIV-1, オルソ社, HIV-2, サノフィー社) を用いた。

C. 研究結果

1) 抗 HIV-1 p17 IgG 抗体、抗 HIV-1 p17 IgM 抗体、HIV-1 p24 抗原、HIV-1 RNA の検出によるウィンドウ期間の短縮

昨年度は免疫複合体転移測定法による抗 HIV-1 p17 IgG 抗体、抗 HIV-1 p17 IgM 抗体の検出に必要な時間を短縮すると同時に、検出を高感度化した結果、HIV-1 セロコンバージョン血清パネルの 1 例で HIV-1 p24 抗原より早期に抗 HIV-1 p17 IgG、IgM 抗体を検出した。

本年度は、血清パネル数を増やしてテストした。19 例のセロコンバージョン血清パネルのうち、3 例 (パネル E, X, 6240) で p24 抗原より早期に抗 p17 IgG、IgM 抗体が検出された (表 1、図 1)。さらに、2 例 (パネル SV-0161, SV-0241) で、より早期の血清サンプルがあれば、抗 p17 IgG、IgM 抗体が p24 抗原より早く検出されることが予想された (表 1、図 2)。以上のように、セロコンバージョン血清パネルの例数を増やすことにより、p24 抗原、RNA より早期の抗 HIV-1 p17 IgG、IgM 抗体の検出がより確実となった。

上記抗 HIV-1 p17 IgG、IgM 抗体と同様に、テストに用いる血清量を増やし、十分に振盪することにより HIV-1 p24 抗原の免疫複合体転移測定法を高感度化した。これによる p24 抗原の検出と RT-PCR による RNA の検出の比較をした。19 例のセロコンバージョン血清パネルのうち、凍結融解をしていない新鮮な 12 例の血清パネルで比較をした結果、10 例では p24 抗原と RNA は同時に検出され (表 1、図 3)、2 例 (パネル E, P) では RNA の検出が少し遅れる傾向にあった。このように、免疫複合体転移測定法による p24 抗原の検出と RT-PCR による RNA の検出が同時であることが、一層確実となった。

2) 抗 HIV-2 env gp36 IgG 抗体免疫複合体転移測定法の開発

HIV-2 感染の診断を可能にするために、HIV-2 env gp36(585-611)合成ペプチドを用いた免疫複合体転移測定法を開発し、以下のような基礎的検討を行った。

2-1 抗 HIV-2 env gp36 IgG 抗体免疫複合体転移測定法における免疫反応の時間経過

2-1-1 免疫複合体の形成に要する時間

HIV-2 のみに感染した血清と 2,4-ジニトロフェニル化ウシ血清アルブミン-gp36(585-611)合成ペプチド結合物、gp36(585-611)合成ペプチド- β -D-ガラクトシダーゼ結合物を同時に 0~2 時間インキュベートし、ついで、アフィニティー精製抗 2,4-ジニトロフェニル基 IgG 不溶化着色ポリスチレンビーズ、2 個と 1 時間インキュベート、洗浄後着色ポリスチレンビーズをアフィニティー精製ウサギ抗 (ヒト IgG γ -鎖) IgG 抗体不溶化白色ポリスチレンビーズ、2 個と ϵ -N-2,4-ジニトロフェニル-L-リジン溶液中で 1 時間インキュベートし、白色ポリスチレンビーズに結合した β -D-ガラクトシダーゼ活性を測定した (図 4A)。その結果、0.5 時間でほぼピークに達し、1.5 時間で最高になった。つまり、抗 HIV-2 env gp36 IgG 抗体と上記 2 種の標識体との免疫複合体の形成の完結には約 1 時間で十分であることがわかった。

2-1-2 免疫複合体をトラップするのに要する時間

HIV-2 のみに感染した血清と 2,4-ジニトロフェニル化ウシ血清アルブミン-gp36(585-611)合成ペプチド結合物、gp36(585-611)合成ペプチド- β -D-ガラクトシダーゼ結合物を同時に 1 時間インキュベート、アフィニティー精製抗 2,4-ジニトロフェニル基 IgG 抗体不溶化着色ポリスチレンビーズ、2 個と 0~2 時間インキュベート、洗浄後着色ポリスチレンビーズを ϵ -N-2,4-ジニトロフェニル-L-リジン溶液中でアフィニティー精製ウサギ抗 (ヒト IgG γ -鎖) IgG 抗体 2 個と 1 時間インキュベート、白色ポリスチレンビーズに結合した β -D-ガラクトシダーゼ活性を測定した (図 4B)。アフィニティー精製ウサギ抗 (ヒト IgG γ -鎖) IgG 抗体不溶化白色ポリスチレンビーズに結合した活性は 0.5 時間で最高にした。

2-1-3 免疫複合体を転移させるのに要する時間

HIV-2 のみに感染した血清サンプルと 2,4-ジニトロフェニル化ウシ血清アルブミン-gp36(585-611)合成ペプチド結合物、gp36(585-611)合成ペプチド- β -D-ガラクトシダーゼ結合

物を同時に 1 時間インキュベート、アフィニティー精製抗 2,4-ジニトロフェニル基 IgG 抗体不溶化着色ポリスチレンビーズ、2 個と 0.5 時間インキュベート、洗浄後着色ポリスチレンビーズを ϵ -N-2,4-ジニトロフェニル-L-リジン溶液中でアフィニティー精製ウサギ抗 (ヒト IgG γ -鎖) IgG 抗体 2 個と 0~4 時間インキュベートして、白色ポリスチレンビーズに結合した β -D-ガラクトシダーゼ活性を測定した (図 4C)。アフィニティー精製ウサギ抗 (ヒト IgG γ -鎖) IgG 抗体不溶化白色ポリスチレンビーズに結合した活性は約 2 時間で殆どピークに達し、以後微増した。つまり、抗 HIV-2 env gp36 IgG 抗体と上記 2 種の標識体との免疫複合体の転移には約 2 時間が必要であることがわかった。

2-2 抗 HIV-2 env gp36 IgG 抗体を検出する免疫複合体転移測定法の特異性

抗 HIV-2 env gp36 IgG 抗体を検出する免疫複合体転移測定法の特異性を次のようにテストした。19 例の HIV-2 のみに感染した血清および 15 例の HIV-1 感染者血清と 2,4-ジニトロフェニル化ウシ血清アルブミン-gp36(585-611)合成ペプチド結合物、gp36(585-611)合成ペプチド- β -D-ガラクトシダーゼ結合物とを同時に 1 時間インキュベート、ついでアフィニティー精製抗 2,4-ジニトロフェニル基 IgG 抗体不溶化着色ポリスチレンビーズ、2 個と 0.5 時間インキュベート。洗浄後の着色ポリスチレンビーズを ϵ -N-2,4-ジニトロフェニル-L-リジン溶液中でアフィニティー精製抗 (ヒト IgG γ -鎖) IgG 抗体を不溶化した白色ポリスチレンビーズ、2 個と 2 時間インキュベートし、それぞれの感染者血清での値を比較した。

表 2 に示したように、抗 HIV-2 env gp36 IgG 抗体の免疫複合体転移測定法は HIV-1 感染者血清と反応せず、特異性が確認された。

2-3 抗 HIV-2 env gp36 IgG 抗体を検出する免疫複合体転移測定法とウエスタンブロット法の比較

19 例の HIV-2 のみに感染した血清を、HIV-2 ウエスタンブロット法 (サノフィー社) を用い、それぞれのバンドの検出最大希釈倍率を決定するとともに、HIV-2 gp36 合成ペプチドを用いる抗 HIV-2 env gp36 IgG 抗体の免疫複合体転移測定法によりテストして、結果を比較した。

表 3 に示したように、免疫複合体転移測定法によるカットオフ値は 275 以上であり、2 例の血清で HIV-2 p26 のバンドが免疫複合体転移測定法より高感度に検出されたが、それ以外は全

ての血清において、全ての HIV-2 抗原によるウエスタンブロットより免疫複合体転移測定法の方がより高感度であった。

2-4 リコンビナント HIV-1 p17, p24 及び逆転写酵素(RT) を用いる免疫複合体転移測定法による抗 HIV-2 IgG 抗体の検出

19 例の HIV-2 のみに感染した血清を、HIV-2 gp36 合成ペプチドを用いる抗 HIV-2 env gp36 IgG 抗体の免疫複合体転移測定法と HIV-1 p17, p24 及び RT リコンビナント蛋白を用いる免疫複合体転移測定法によりテストして、結果を比較した。

表 2 に示したように、HIV-2 gp36 合成ペプチドと HIV-1 p24 を用いる免疫複合体転移測定法とは、ほぼ同感度であったが、HIV-1 p17, RT では、1 例が陰性あるいは陰性に近い値であった。また、リコンビナント HIV-1 p17, p24, RT の組み合わせを用いる免疫複合体転移測定法により、HIV-2 感染の診断ができることもわかった。

D. 考 察

19 例のセロコンバージョン血清パネルのうち、3 例で抗 p17 IgG 抗体、抗 p17 IgM 抗体が p24 抗原、RNA より早期に検出され、2 例でその傾向が示されたが、さらに例数を増やし検討を進めていく計画である。

p24 抗原は、12 例のセロコンバージョン血清パネルで RNA と同時あるいは RNA より早期に検出されたが、検出条件や方法を更に詳しく検討し直して、一層高感度化したうえで、抗 p17 IgG 抗体、抗 p17 IgM 抗体が p24 抗原、RNA より早期に検出されたサンプルで、最も早期に抗体が検出された時期やさらにそれ以前に p24 抗原が検出できるか検討する。

HIV-2 の感染の診断に HIV-2 gp36 合成ペプチド用いる免疫複合体転移測定法が有効であることが示されたが、カットオフ値の最低値が 2.75 であるので、例数を増やしていくと、偽陰性がでる可能性がある。抗 HIV-1 抗体の免疫複合体転移測定法で示されたように、合成ペプチドよりリコンビナント蛋白を用いる方がより高いカットオフ値を得る可能性が高い。そこで、HIV-2 についても、リコンビナント HIV-2 p16, p26, RT を調製し、それを用いた免疫複合体転移測定法を開発する必要があり、計画中である。

E. 結 論

1) 免疫複合体転移測定法により 19 例の HIV-1 seroconversion serum panels をテストしたところ、

3 例において抗 p17 IgG、IgM 抗体が HIV-1 p24 抗原、RNA より早く検出され、2 例において早い検出が予想されたので、抗 p17 IgG、IgM の HIV-1 p24 抗原、RNA より早期の検出が現象としてより確実となった。

2) 12 例の HIV-1 seroconversion serum panels をテストした結果、10 例においては、免疫複合体転移測定法による HIV-1 p24 抗原の検出と RT-PCR による HIV-1 RNA の検出は同時で、2 例では p24 抗原の検出の方が RNA の検出より早い傾向にあった。

3) 27 個のアミノ酸からなる HIV-2 gp36 合成ペプチドを抗原とする免疫複合体転移測定法を開発し、HIV-2 のみに感染した 19 例の血清をテストした。2 例において HIV-2 p26 抗原によるウエスタンブロットがより高感度であったことを除けば、すべての血清においてすべての HIV-2 抗原によるウエスタンブロットより免疫複合体転移測定法が高感度であった。また、リコンビナント HIV-1 p24 を用いる免疫複合体転移測定法と同等の感度であり、リコンビナント HIV-1 p17、逆転写酵素を用いた免疫複合体転移測定法より高感度であったが、HIV-1 p17、p24、逆転写酵素 3 者の組合せで HIV-2 感染の診断が可能なることもわかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Hashida, S., Ishikawa, S., Hashinaka, K., Nishikata, I., Oka, S. and Ishikawa, E. : Immune complex transfer enzyme immunoassay for antibody IgG to HIV-1 gp41 antigen using synthetic peptides as antigens. *J. Clin. Lab. Anal.* 12: 197-204, 1998.
2. Hashida, S., Ishikawa, S., Nishikata, I., Hashinaka, K., Oka, S. and Ishikawa, E. : Immune complex transfer enzyme immunoassay for antibody IgM to HIV-1 p17 antigen. *J. Clin. Lab. Anal.* 12: 329-336, 1998.

2. 学会発表

1. Ishikawa, E. : Shortening of the window period in diagnosis of HIV infection. France-Japan AIDS Research Meeting. December 4 and 5, 1998, Tokyo.
2. 橋田誠一、石川節子、橋中一也、西片一朗、石川栄治 : 超高感度免疫複合体転移測定法を用いた抗原及び抗体検出による HIV-1 感染の早期診断. 第 12 回日本エイズ学会総会, 1998 年 12 月 1, 2 日, 東京.

表1-1 種々の方法によるセロコンバージョン血清パネルのテスト結果

セロコンバージョン血清 パネル 番号	最初の 血清 採取日 からの 日数	カットオフインデックス				
		免疫複合 体転移 測定法による 抗p17 IgG の検出	免疫複合 体転移 測定法による 抗p17 IgM の検出	免疫複合 体転移 測定法による p24抗原 の検出	RT-PCR による RNA の検出	従来ELISA (HIV-1/HIV-2 第三世代, アボット)による 抗HIV抗体の検出
1 (Panel E) (PRB 905)	0	4.7	3.8	0.3	<0.1	0.3
	7	21.7	30.4	0.2	<0.1	0.3
	21	16.3	22.4	0.2	<0.1	0.2
	35	3.0	2.4	0.3	<0.1	0.3
	42	2.0	1.0	0.3	<0.1	0.3
	49	1.7	0.8	0.3	<0.1	0.2
	63	1.6	0.6	0.2	<0.1	0.2
	84	1.4	0.5	677.4	0.4	0.2
	91	1.4	0.8	8,706.7	412.5	0.8
	126	22,253.4	553.9	44.6	1.4	4.6
2 (Panel 6240) (BCPI)	0	26.5	1.7	0.2	<0.1	
	2	18.5	0.0	0.2	<0.1	
	7	12.8	0.3	0.1	<0.1	
	9	11.5	0.1	0.1	<0.1	
	14	7.2	0.1	0.1	<0.1	
	16	8.1	6.5	0.3	<0.1	
	21	12.2	0.2	24.6	23.2	
	23	5.1	0.2	311.0	188.4	
	28	2.1	0.2	5,186.2	1,255.1	
	30	17.6	9.5	7,859.2	1,237.2	
	36	2,815.4	1,434.5	1,071.4	361.6	
	45	179,104.0	18,908.5	182.2	31.8	
	53	146,818.3	11,961.9	98.5	23.4	
3 (Panel X) (PRB 924)	0	11.8	20.4	0.2	<0.1	
	2	20.5	23.4	0.2	<0.1	
	8	25.8	15.8	0.3	<0.1	
	10	19.7	27.5	0.2	<0.1	
	26	8.9	14.6	2,635.2	168.0	
	33	9,386.8	4,127.8	591.5	39.9	
	35	36,165.3	11,197.2	103.4	14.8	
	40	64,908.2	20,370.5	118.4	6.4	

表1-2 種々の方法によるセロコンバージョン血清パネルのテスト結果

セロコンバージョン血清パネル番号	最初の血清採取日からの日数	カットオフインデックス				
		免疫複合体転移測定法による抗p17 IgGの検出	免疫複合体転移測定法による抗p17 IgMの検出	免疫複合体転移測定法によるp24抗原の検出	RT-PCRによるRNAの検出	従来ELISA (HIV-1/HIV-2 第三世代, アボット)による抗HIV抗体の検出
4 (SV-0161)	0	20.4	2.4	358.4		0.2
	4	4.4	0.6	1,171.2		0.2
	7	21.3	2.9	2,217.2		0.5
	11	2,446.0	159.7	3,575.2		5.2
	15		498.7	100.9		2.8
	18		410.1	34.1		2.1
5 (SV-0241)	0	21.3	0.5	28.7	53.8	0.2
	6	23.1	0.3	5,753.7	3,750.0	0.2
	8	5.9	0.3	2,357.7	1,250.0	0.3
	14	2,249.3	164.5	153.6	150.0	7.4
	16		712.0	48.4	43.8	6.0
	21		2,965.6	1.8	4.9	5.6
	23		3,061.9	0.7	1.9	4.2
	23					
6 (Panel P) (PRB 916)	0	0.1	0.3	0.2	<0.1	0.2
	4	0.2	0.3	0.2	<0.1	0.2
	9	0.1	0.3	12.3	1.2	0.3
	15	0.2	0.3	4,185.5	259.5	0.4
	30	1,773.9	404.0	56.5	14.9	2.9
	35		335.4	34.7	14.1	2.9
	35					
7 (SV-0211)	0	1.1	0.3	1,012.9	187.5	0.2
	2	4.4	0.3	6,648.7	825.0	0.4
	13	15,253.4	462.4	3,146.7	1,625.0	6.3
	15		527.2	1,241.0	475.0	6.2
	20		352.5	93.1	325.0	3.7
	22		375.8	84.7	11.0	3.3
	22					
8 (Panel W) (PRB 923)	0	0.4	0.5	0.9	<0.1	0.2
	7	0.2	0.3	1.0	<0.1	0.2
	12	0.2	0.5	0.7	<0.1	0.2
	14	0.2	0.6	0.9	<0.1	0.2
	28	0.2	0.5	0.9	<0.1	0.2
	30	0.3	0.3	0.9	<0.1	0.2
	35	0.2	0.5	29.2	9.7	0.2
	37	0.1	0.5	317.8	99.4	0.2
	47	0.5	1.4	8,626.7	1,615.7	0.7
	84	5,585.3	92.6	21.9	235.7	2.9
	86	5,668.1	83.5	17.0	118.2	2.7
	145	5,826.7	27.2	26.2	44.3	5.6
	161	5,753.9	17.4	68.1	49.8	6.3
	161					

表1-3 種々の方法によるセロコンバージョン血清パネルのテスト結果

セロコンバージョン血清パネル番号	最初の血清採取日からの日数	カットオフインデックス				
		免疫複合体転移測定法による抗p17 IgGの検出	免疫複合体転移測定法による抗p17 IgMの検出	免疫複合体転移測定法によるp24抗原の検出	RT-PCRによるRNAの検出	従来ELISA (HIV-1/HIV-2 第三世代, アボット)による抗HIV抗体の検出
9 (Panel Y) (PRB 925)	0	1.4	0.2	0.4	<0.1	
	10	1.3	0.2	0.2	<0.1	
	18	0.8	0.2	0.2	<0.1	
	22	1.2	0.1	0.2	<0.1	
	44	952.8	859.2	354.4	196.6	
	49	5,012.5	1,349.9	162.4	213.7	
10 (Panel Z) (PRB 926)	0	0.9	0.3	0.6	<0.1	0.2
	2	0.9	0.2	3.1	1.8	0.2
	7	0.6	0.3	802.9	674.0	0.3
	9	0.6	0.3	4,965.3	779.6	0.3
	27	2,255.4	200.5	106.2	124.7	4.7
	32		153.0	117.0	143.2	3.4
11 (Panel AF) (PRB 931)	0	0.9	0.3	0.0	<0.1	0.3
	2	0.2	0.3	0.0	<0.1	0.2
	7	0.4	0.3	0.0	<0.1	0.2
	9	0.1	0.3	0.1	<0.1	0.2
	15	0.3	0.3	57.4	28.8	0.2
	28	43.3	2.1	658.1	1,259.8	4.0
	33	343.8	127.7	398.9	524.5	5.3
	35	1,549.8	400.5	185.2	332.8	5.7
	42	13,064.1	886.7	115.1	491.5	5.9
12 (Panel AJ) (PRB 935)	0	0.9	0.8	0.2	<0.1	0.2
	10	0.9	1.0	0.4	<0.1	0.3
	16	0.9	1.0	0.2	<0.1	0.3
	21	1.0	1.0	0.2	<0.1	0.2
	24	0.8	0.8	4.7	4.6	0.2
	28	0.9	0.8	999.0	436.5	0.2
	43	7,646.9	341.0	748.2	285.6	2.4
13 (Panel AR) (PRB 942)	0	6.3	0.5	0.4	<0.1	
	2	5.2	0.6	0.3	<0.1	
	9	7.3	0.6	9.1	12.3	
	14	10.9	0.5	776.1	1,098.5	

表1-4 種々の方法によるセロコンバージョン血清パネルのテスト結果

セロコンバージョン血清パネル番号	最初の血清採取日からの日数	カットオフインデックス				
		免疫複合体転移測定法による抗p17 IgGの検出	免疫複合体転移測定法による抗p17 IgMの検出	免疫複合体転移測定法によるp24抗原の検出	RT-PCRによるRNAの検出	従来ELISA (HIV-1/HIV-2 第三世代, アボット)による抗HIV抗体の検出
14 (SV-0031)	0	0.3	0.5	0.3		0.2
	4	0.6	0.5	0.3		0.2
	7	0.9	0.8	0.2		0.3
	12	0.4	0.5	0.3		0.2
	19	0.6	0.5	0.3		0.4
	26	1.2	1.0	0.6		0.3
	28	0.3	0.6	0.5		0.3
	46	48.1	0.8	5,365.7		4.2
	48	16.4	1.0	6,807.2		5.0
	53	410.2	46.9	6,580.2		2.9
	55		166.2	5,471.2		1.9
	60		387.0	1,091.5		2.4
	62		476.6	594.7		2.8
	67		430.4	440.8		3.7
15 (SV-0051)	0	0.9	0.3	244.7		0.4
	6	0.6	0.3	3,339.3		1.4
	8	54.7	6.7	1,870.7		4.4
	15	20,210.6	2,112.6	228.3		4.0
	27		518.2	9.6		3.5
16 (SV-0111)	0	9.3	0.5	7,575.2		0.3
	1	35.6	0.5	8,083.2		0.5
	7	228.0	7.0	4,731.2		4.8
	15	6,293.4	948.8	479.5		3.7
	19		627.2	158.4		3.0
	21		521.8	167.3		3.2
	26		534.2	74.5		3.3
17 (Panel J)	0	0.9	0.3	0.1		0.3
	14	0.1	0.3	1,032.7		0.4
	26	3,428.2	265.3	48.0		2.3
	28		448.8	20.3		2.3
	32		408.5	7.0		2.8
	35		350.2	8.0		2.9
	40		262.6	4.4		3.7

表1-5 種々の方法によるセロコンバージョン血清パネルのテスト結果

セロコンバージョン血清パネル番号	最初の血清採取日からの日数	カットオフインデックス				
		免疫複合体転移測定法による抗p17 IgGの検出	免疫複合体転移測定法による抗p17 IgMの検出	免疫複合体転移測定法によるp24抗原の検出	RT-PCRによるRNAの検出	従来ELISA (HIV-1/HIV-2 第三世代, アボット)による抗HIV抗体の検出
18	0	0.2	0.3	2.0		0.3
(Panel K)	6	0.9	0.5	3.8		0.3
(PRB 911 M)	8	1.6	0.5	7.2		0.4
	13	3,148.3	426.1	10.5		0.7
	20		2,117.6	2.0		1.4
	29		636.0	0.9		1.4
	33		385.6	0.5		2.1
	36		286.2	0.7		2.7
19	0	1.1	0.3	501.8		0.3
(Panel S)	9	514.2	220.0	88.8		4.2
(PRB 919)	11		657.6	28.7		3.5
カットオフ値		0.7	1.5	5.0	800	0.1

テスト法	使用した血清量 (μ l)	インキュベーション時間			
		免疫複合体形成	免疫複合体の抗2,4-ジニトロフェニル基IgG不溶化固相へのトラップ	免疫複合体の抗Ig IgG不溶化固相あるいはストレプトアビジン不溶化固相への転移	β -D-ガラクトシダーゼ活性の測定
免疫複合体転移測定法					
抗p17 IgG	100	0.5	1	1	2
抗p17 IgM	100	0.5	1	1	2
p24抗原	50	16	2	2	20
従来ELISA	150	—	—	—	—
RT-PCR	200	—	—	—	—

表 2. HIV-2 gp36 (585-611)合成ペプチド及びHIV-1リコンビナント蛋白を用いた免疫複合体転移測定法の特異性

免疫複合体転移測定法による抗HIV IgG抗体の検出 (カットオフインデックス)				
血清番号	免疫複合体転移測定法に用いた抗原			
	HIV-2 gp36 合成ペプチド	HIV-1リコンビナント蛋白 p17	p24	RT
HIV-1のみに感染した血清				
1	0.4	6992730.0	10357184.0	13243915.6
2	0.4	195127.3	3625184.0	3921693.3
3	1.0	1962605.0	4155184.0	1979471.1
4	0.4	23707730.0	1760684.0	4359471.1
5	0.4	55702.3	3282.8	692637.8
6	0.6	1206214.8	3142184.0	1880026.7
7	0.3	24816.1	3981.8	1134415.6
8	0.5	10676.1	8031184.0	4530026.7
9	0.4	123477.3	2189.8	353804.4
10	0.3	907214.8	40811.8	696193.3
11	0.3	414.1	6331.8	712248.9
12	0.4	53389.8	40231.8	370304.4
13	0.3	74814.8	41041.8	35903.2
14	0.4	399.1	1214.3	1868360.0
15	0.4	966089.8	7522.8	460693.3
HIV-2のみに感染した血清				
1	166434.1	671.7	3325.0	130.5
2	147380.4	121381.4	12308.2	210.9
3	17926.9	50231.4	362080.0	439.3
4	15976.9	2.2	131680.0	137.2
5	13748.4	66106.4	192180.0	17.4
6	10598.4	60.2	547580.0	110104.8
7	10434.1	1551.2	112315.2	1535.1
8	10205.5	19.5	2737.6	174.7
9	3503.4	278243.9	105385.2	942.0
10	3131.2	78.9	332.4	20.7
11	3045.5	660.3	2583.0	487.5
12	2404.8	2601.9	443680.0	192.4
13	1880.5	30.1	1571.6	2390.7
14	1863.4	168443.9	128.4	87.5
15	1826.6	493.9	610.0	4275.7
16	1201.2	1724.9	65800.0	3124.7
17	1033.1	410493.9	1087980.0	83582.6
18	497.2	246606.4	737380.0	0.8
19	274.6	85881.4	37300.0	5755.4

血清 10 μ l を HIV-2 gp36(585-611)合成ペプチド- β -D-ガラクトシダーゼ結合物、2,4-ジニトロフェニル化ウシ血清アルブミン-HIV-2 gp36(585-611)合成ペプチド結合物 1 および β -D-ガラクトシダーゼ・ムテインと室温で1時間インキュベート。アフィニティー精製抗2,4-ジニトロフェニル基 IgG 不溶化着色ポリスチレンビーズを加え、振盪 (210 振盪/分) しながら室温で0.5時間インキュベート。洗浄後、 ϵ -N-2,4-ジニトロフェニル-L-リジンおよびアフィニティー精製ウサギ抗 (ヒトIgG γ -鎖) IgG 不溶化白色ポリスチレンビーズとともに振盪しながら室温で1時間までインキュベート。最後に結合した β -D-ガラクトシダーゼ活性を30 $^{\circ}$ C、1時間、蛍光法により測定。HIV-1リコンビナント蛋白に対するIgG抗体も同様に行う。それぞれの抗体測定系のインキュベート時間は、p17は0.5、1、1、1時間、p24は0.5、1、1、1時間、RTは2、1、1、1時間。カットオフ値はそれぞれ50例の非感染血清の最高値で割った値とした。それぞれの最高値は HIV-2 gp36は1.4、HIV-1p17は0.4、p24は0.5、RTは0.9であった。

表 3. HIV-2のみに感染した血清のHIV-2 gp36 (585-611)合成ペプチドを用いた免疫複合体転移測定法による抗HIV-2 gp36 IgG抗体の検出とウエスタンブロット法の比較

HIV-2 のみに 感染した 血清 番号	免疫複合体転移 測定法による 抗p36 IgG の検出	カットオフインデックス							
		p16	p26	ウエスタンブロット法					
				p34	gp36	p56	p68	gp105	gp140
1	166434.1	1.0	10.0	30.0	3.0	0.3	0.3	100.0	10.0
2	147380.4	10.0	100.0	30.0	10.0	100.0	100.0	30.0	10.0
3	17926.9	0.3	300.0	10.0	0.3	10.0	10.0	30.0	3.0
4	15976.9	0.3	10.0	100.0	3.0	10.0	30.0	30.0	10.0
5	13748.4	0.3	300.0	10.0	3.0	10.0	10.0	30.0	10.0
6	10598.4	0.3	10000.0	10.0	3.0	10.0	100.0	300.0	10.0
7	10434.1	0.3	30.0	1.0	0.3	1.0	1.0	10.0	3.0
8	10205.5	1.0	1.0	1.0	0.3	0.3	1.0	30.0	3.0
9	3503.4	0.3	3000.0	100.0	0.3	0.3	0.3	10.0	0.3
10	3131.2	1.0	10.0	1.0	0.3	3.0	10.0	100.0	3.0
11	3045.5	0.3	300.0	3.0	0.3	0.3	3.0	10.0	3.0
12	2404.8	0.3	300.0	30.0	0.3	30.0	100.0	30.0	10.0
13	1880.5	10.0	100.0	10.0	1.0	1.0	100.0	100.0	10.0
14	1863.4	1.0	1.0	1000.0	10.0	10.0	100.0	10.0	10.0
15	1826.6	10.0	10.0	10.0	1.0	100.0	300.0	10.0	10.0
16	1201.2	0.3	30.0	0.3	0.3	10.0	30.0	10.0	0.3
17	1033.1	10.0	10000.0	30.0	1.0	10.0	10.0	10.0	3.0
18	497.2	0.3	300.0	0.3	0.3	0.3	3.0	10.0	0.3
19	274.6	0.3	30000.0	100.0	30.0	100.0	100.0	30.0	10.0

免疫複合体転移測定法；血清 10 μ l を HIV-2 gp36(585-611)合成ペプチド- β -D-ガラクトシダーゼ結合物、2,4-ジニトロフェニル化ウシ血清アルブミン-HIV-2 gp36(585-611)合成ペプチド結合物1および β -D-ガラクトシダーゼ・ムテインと室温で1時間インキュベート。アフィニティー精製抗2,4-ジニトロフェニル基 IgG 不溶化着色ポリスチレンビーズを加え、振盪（210 振盪/分）しながら室温で0.5時間インキュベート。洗浄後、 ϵ -N-2,4-ジニトロフェニル-L-リジンおよびアフィニティー精製ウサギ抗（ヒトIgG γ -鎖）IgG 不溶化白色ポリスチレンビーズとともに振盪しながら室温で1時間までインキュベート。最後に結合した β -D-ガラクトシダーゼ活性を30 $^{\circ}$ C、1時間、蛍光法により測定。カットオフ値は、50例の非感染血清の最高値(1.4)で割った値とした。

ウエスタンブロット法；血清 20 μ l を用い取り扱い説明書に従った。カットオフ値は、非感染者血清での希釈したとき、それぞれのバンドが陰性となる時点の希釈倍率とした。

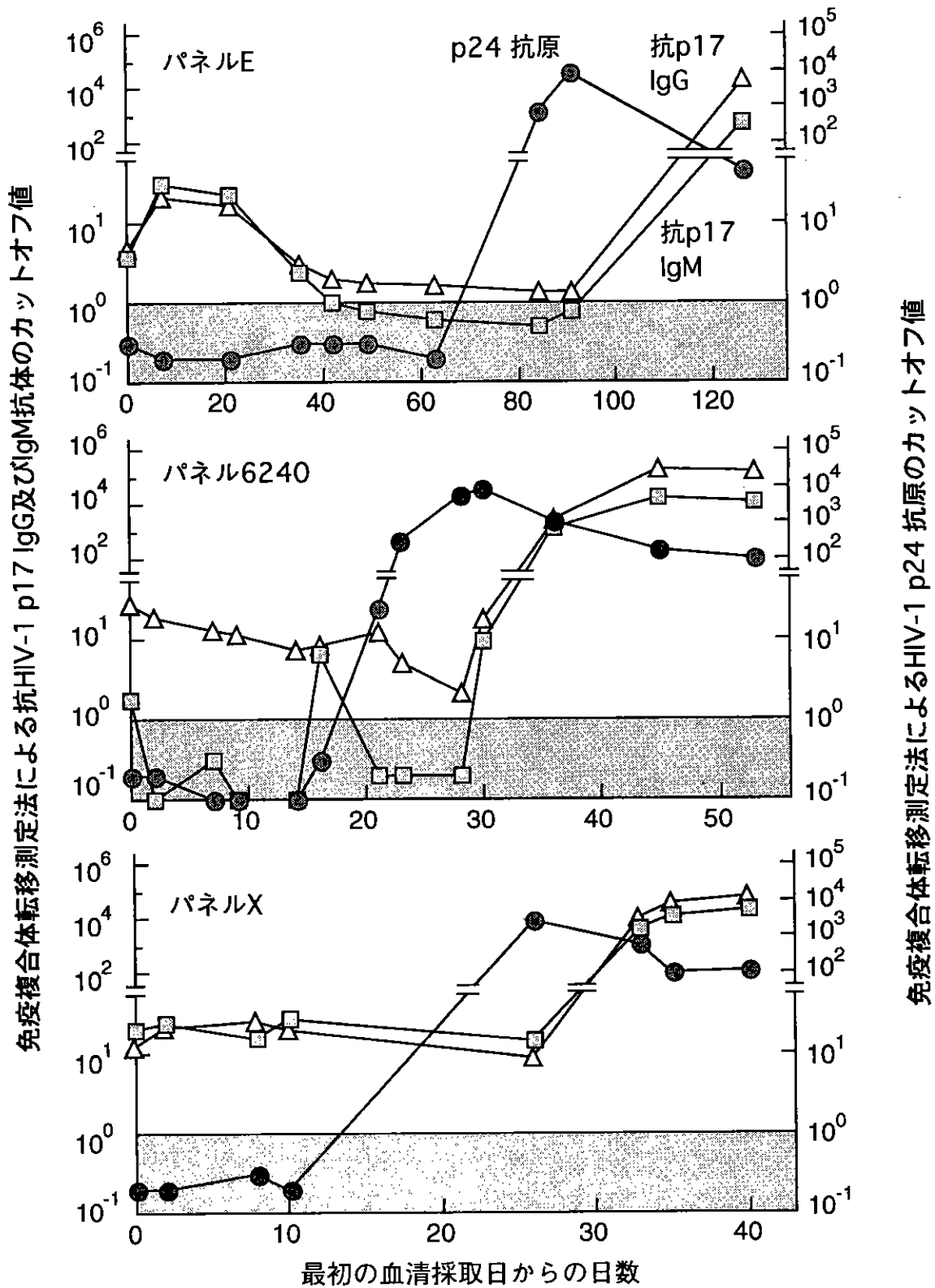


図1. HIV-1セロコンバージョン血清パネルの免疫複合体転移測定法による抗HIV-1 p17 IgG及びIgM抗体の検出時期とHIV-1p24抗原の検出時期の比較