



Title	HIVキャリア血中におけるp17抗原・抗体系に関する研究
Author(s)	谷口, 克巳
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/40404">https://hdl.handle.net/11094/40404</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> >大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	谷 口 克 巳
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 3 2 6 2 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 9 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	HIV キャリア血中における p17 抗原・抗体系に関する研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 栗 村 敬
	(副査) 教 授 網 野 信 行    教 授 吉 崎 和 幸

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【目的】

ヒト免疫不全ウイルス (HIV) の Gag 蛋白のひとつであり、マトリック蛋白である p17 抗原に対する抗 p17 抗体は、抗 p24 抗体よりも早く HIV 感染者の血中から消失し、AIDS 発症のサロゲートマーカーのひとつとして有用であると報告されている。また、HIV 感染者の血中の抗 p17 抗体が HIV を中和することも報告されている。一方、抗 p17 単クローン抗体については多くの報告があるが、抗 p17 単クローン抗体が試験管内で HIV を中和することも報告されている。しかし単クローン抗体による p17 抗原の測定および Env 領域の塩基配列の相同性が 80% 以下の場合に異なるサブタイプとされる HIV-1 サブタイプ間の反応性の差異を検討した報告はなされていない。本研究では、組換え p17 抗原から作製した抗 p17 単クローン抗体の性状と、これらの抗体を用いた ELISA 法 (以下本法) を確立し、その有用性について検討した。

#### 【方法】

p17 抗原は、HIV-1 サブタイプ B に属する NL4-3 株由来の組換え p17 抗原蛋白を使用した。単クローン抗体の作製には p17 抗原をマウスの背部筋肉内に接種し、常法に従い、脾臓細胞とマウスミエローマ細胞 (NS-1) と電気融合し、ハイブリドーマの培養上清をラジオイムノアッセイによりスクリーニングした後、クローニングを行った。マウス腹水から抗体を精製し、一つの抗体をマイクロプレートの固相に、一方をペルオキシダーゼで酵素標識抗体を作製し ELISA 法を確立した。日本人 HIV キャリア血液から、末梢血単核細胞を分画し、HIV 非感染者末梢血単核細胞と混合培養して得られた 456 例の上清と CDC の分類でステージ II~IV に属する HIV キャリア血漿の 20 検体を測定した。p24 抗原測定は市販の EIA キットを用い、抗 p17 抗体および抗 p24 抗体測定には組換え抗原をマイクロプレートに固相化し酵素標識抗ヒト IgG 抗体による ELISA 法により測定した。単クローン抗体の認識部位はマルチピンペプチド合成キットを使用し、エピトープを解析した。

#### 【成績】

単クローン抗体 A144 を固相抗体に、C415 を酵素標識抗体に使用した ELISA の基礎的検討を行ったところ、測定範囲は 10~640 pg/ml であった。また本法での測定内再現性の変動係数 CV (%) は 3.3~7.4%、測定間再現性の変動係数は 3.2~7.8% であった。ウイルス培養上清 4 検体の希釈測定を行った結果、いずれも原点を通る良好な結果であり、添加回収試験では既知濃度の 3 検体について行ったところ 87.0~105.6% の結果が得られた。本法は p17 抗原測

定系として満足できる性能であった。

HIV 感染者末梢血単核細胞の培養上清サンプルの p17 抗原および p24 抗原測定を行った結果、陽性および陰性であった一致例は 456 例中 442 例の 96.9%、p17 抗原陽性 p24 抗原陰性が 9 例の 2.0%、p17 抗原陰性 p24 抗原陽性が 5 例の 1.1% であった。この結果から、本法を p24 抗原と併用することにより、少なくとも培養上清からのウイルス分離確認率が上昇することが明らかとなった。p24 抗原陽性 p17 抗原陰性例について検討し、サブタイプ A から E までのウイルス培養上清中の p17 および p24 抗原を測定した結果、p17 抗原 ELISA では、サブタイプ A、B については陽性であるが、C、D、E については陰性であった。また Liu らに供与された各単クローン抗体 5 クローンを、本法に使用して検討を行ったが同様の結果が得られた。

CDC の分類で II～IV に属する HIV キャリア血漿 20 検体について p17 抗原と p24 抗原 EIA さらに抗 p17 抗体と p24 抗体の測定を行なった結果、p17 抗原陽性・抗 p17 抗体陽性例 2 例、p17 抗原陰性・抗 p17 抗体陽性例 14 例、p17 抗原陰性・抗 p17 抗体陰性例 4 例であった。一方 p24 抗原陽性・抗 p24 抗体陰性例 2 例、p24 抗原陰性・抗 p24 抗体陽性例 15 例、p24 抗原陰性・抗 p24 抗体陰性例 3 例であった。このことから p17 抗原・抗体が同時に検出されることが明らかになった。

単クローン抗体のエピトープ解析の結果、A144、C415 の認識部位はそれぞれ第 10 番アミノ酸、第 100 番アミノ酸を中心とする部分であった。また Liu らにより供与された抗 p17 単クローン抗体 5 クローンも同時にエピトープ解析したところ、p17 抗原の第 12-第 29、第 53-第 87、第 87-第 115 番アミノ酸を認識する抗体であった。

#### 【総括】

HIV-1 p17 抗原・抗体を検出する ELISA 法を開発し、HIV キャリアの血中における抗原・抗体の存在様式を検討した。本法での血中抗原および抗体測定から、p17 抗原・抗体が同時に検出されることを明らかにした。さらに HIV 感染者の末梢血単核細胞培養上清における p24 抗原との検出一致率は 96.9% であり、p24 抗原 EIA との併用で分離確認率が上昇することが示された。また本 ELISA 法では HIV-1 のサブタイプ A、B が検出可能であるが、他のサブタイプ C、D、E を検出できないことから、サブタイプにより p17 蛋白の構造が異なるためであろうと推察された。

### 論文審査の結果の要旨

本研究は、HIV-1 の p17 抗原および抗体を検出するために、2 種の単クローン抗体を用いた ELISA 法を確立し、HIV キャリア血中の抗原・抗体ならびに、HIV キャリアの末梢血単核細胞培養上清中の抗原測定に応用し、さらに HIV-1 サブタイプ間の差異について検討したものである。その結果、HIV キャリア血中での抗原と抗体が同時に検出される場合があることを明らかにし、さらに日本人 HIV キャリアの末梢血単核細胞培養上清中における p24 抗原と p17 抗原の検出一致率は 96.9% であり、p24 抗原 EIA と併用することにより分離確認率が上昇することを明らかにした。また、本 ELISA は HIV-1 のサブタイプ A、B は検出するが、C、D、E は検出できず、使用した抗体の認識部位近傍でのアミノ酸配列の違いはサブタイプ間では認められず、各サブタイプでの p17 抗原全領域のアミノ酸配列の差異により p17 蛋白のアミノ酸ペプチド部分の第 1-32 および第 85-116 の立体構造が異なる可能性が示唆された。

以上の論文内容は、p17 抗原測定を可能にし、HIV 感染症の臨床診断における有用性のみならず、p17 抗原・抗体の存在様式および p17 抗原ワクチンを考える上での有用性を見いだしたものであり、本研究は学位授与に値すると認められる。