

FIG. 2. Dimerization and packaging efficiencies of various deletion mutants of the U5/L stem-loop. (A) Schematic secondary structure of the HIV-1 U5/L stem-loop. (B) Diagrams of U5/L stem-loop deletion mutants. The lightly shaded lines represent deleted areas of RNA. (C) Representative ImageGauge image of RNA detected by Northern blotting. The positions of dimeric and monomeric viral RNAs are indicated by solid and open arrowheads, respectively. The various temperatures at which aliquots were incubated are indicated for the wild-type (WT) lane. The *D* value and relative packaging efficiency of each mutant are shown below each blot. The packaging efficiencies were calculated from results for the mutants, which do not contain a second copy of E/DLS. The results represent means \pm standard errors from at least three independent experiments. Lane U, unheated sample.

Precise location of DIS/DLS within the U5/L stem-loop. To identify the exact region responsible for RNA-RNA interaction within the U5/L stem-loop region, we constructed a series of U5/L stem-loop deletion mutants, dLA1-BA, dLA2-BA, and dLA3-BA. The U5/L stem-loop could be divided into four parts, the top loop, the upper stem, the PBS loop, and the lower stem (Fig. 2A). The top loop (9 bases; nucleotides [nt] 604 to 612 [the numbering starts at position +1 of the 5' end of the U3 region]) of the U5/L stem-loop was deleted in dLA1-BA, the top loop and half of the upper stem (23 bases; nt 598 to 620) were deleted in dLA2-BA, and the top loop, the entire upper stem, and the PBS loop (85 bases; nt 586 to 670) were deleted in dLA3-BA (Fig. 2B). The virion RNAs from all dLA mutants formed monomeric RNA at room temperature, quite similar to that of DDNBA (Fig. 2C). This indicated that the top loop, the upper stem, and the PBS loop of the U5/L stem-loop do not contribute to RNA-RNA interaction in virions. We next introduced a deletion in the lower stem of the U5/L stem-loop (Fig. 2B). The mutant dLB2-BA lacks 109 bases (nt 578 to 686), corresponding to the top loop, the entire upper stem, the PBS loop, and half of the lower stem. The 19 bases (nt 577 to 585) of the 5' side of the lower stem were deleted in dLB3-BA, and the 26 bases (nt 671 to 696) of the 3' side of the lower stem were deleted in dLB4-BA. The RNA

isolated from dLB2-BA particles showed a profile similar to that of DDNBA (Fig. 2C). The dLB3-BA RNA also formed monomeric RNA, but the amount of monomer tended to be reduced compared to that of DDNBA (Fig. 2C). On the other hand, dLB4-BA RNA showed that the mutations caused severe impairment in monomer formation. These results suggested that the region affecting RNA dimer formation was located in the deleted part of dLB4-BA and that the area absent in dLB3-BA might partially contribute to dimer formation. Therefore, the 11 bases (nt 577 to 587) of the 5' side and the 10 bases (nt 687 to 696) of the 3' side of the lower stem appeared to affect RNA-RNA interaction in the HIV-1 genome.

The RNA profile from dLB3-BA showed that the introduced deletion had an intermediate effect on dimer formation (Fig. 2C). Since the ratio of monomer content to the total RNA of the virion produced from DDNBA varied slightly from experiment to experiment, we developed the following formula to give an index value of the dimer formation ability (*D*) of each mutant, to compare the effects of the mutation of the DLS area more quantitatively: $D = (Mu - W)/(BA - W)$, where *W*, *BA*, and *Mu* represent the ratios of the monomer content to total the RNA of virions produced from the wild type, DDNBA, and each mutant based on the DDNBA con-

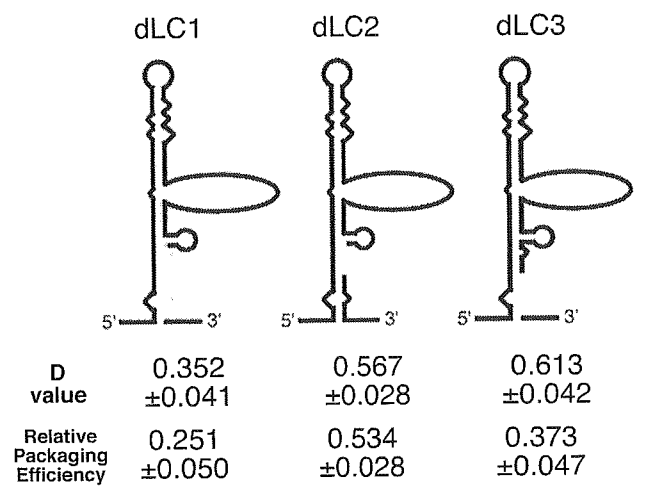


FIG. 3. Dimerization and packaging efficiencies of lower-stem deletion mutants of the U5/L region. Diagrams of deletion mutants are shown. The lightly shaded lines represent deleted areas of RNA. The *D* value and relative packaging efficiency of each mutant is shown below its diagram. The packaging efficiencies were calculated from results for the mutants, which do not contain a second copy of E/DLS. The results represent means ± standard errors from at least three independent experiments.

struct at room temperature. The *D* value of the wild type is 0, and that of DDNBA is 1. When the mutation severely affects dimer formation, the monomeric genome content of the virion is reduced, and *D* becomes close to zero. Thus, the *D* value was expected to represent the magnitude of the effect of the mutation on RNA-RNA interaction in virions. We applied this formula to the results of the dimerization assay of the mutants

dLA1-BA, dLA-2BA, dLA3-BA, dLB1-BA, dLB2-BA, and dLB3-BA. As shown in Fig. 2C, the values for the dLA1-BA, dLA2-BA, and dLA3-BA mutants were close to 1, while that for dLB2-BA was ~0.8 and that for dLB4-BA was ~0.25. The *D* value for dLB3-BA was ~0.6. These results indicate that the formula is useful to show the relative efficiency of the RNA dimerization of each mutant quantitatively.

We also constructed three mutants which contained deletions within the 10 bases of the 5' side of the lower stem to assess the precise location of the DLS/DIS (Fig. 3). The deleted area of dLC1-BA is 10 bases of the 3' side of the lower stem (nt 687 to 696), which is the region deleted from dLB4-BA but still present in dLB2-BA. The upper and lower 5 bases of this area were deleted in dLC2-BA (nt 687 to 691) and dLC3-BA (nt 692 to 696). The RNA profiles of these mutant viruses were compared to those of DDNBA and the wild type, and *D* values were calculated (Fig. 3). The *D* value of the dLC1-BA mutant was ~0.35. This value was slightly higher than that of dLB4-BA but still much lower than that of DDNBA. The *D* values of both the dLC2-BA and dLC3-BA mutants were ~0.6, showing partial inhibition of dimerization. Thus, 10 bases just upstream of the SL1 stem-loop play an important role in mediating RNA-RNA interaction and/or in forming overall structure necessary for dimerization in virions.

Functional areas for RNA dimerization within SL1. The palindromic sequence on the loop of SL1 is believed to be the dimer initiation sequence in vitro. We tried to identify the region within the SL1 stem-loop which is responsible for RNA-RNA interaction in vivo. We constructed five SL1 mutants as derivatives of the pDDNBA construct. The mutants BsS1-BA, BsT2-BA, and BsT6-BA contain a 5-base deletion, a 3-base insertion, and a 4-base insertion, respectively, at the *Bss*HII

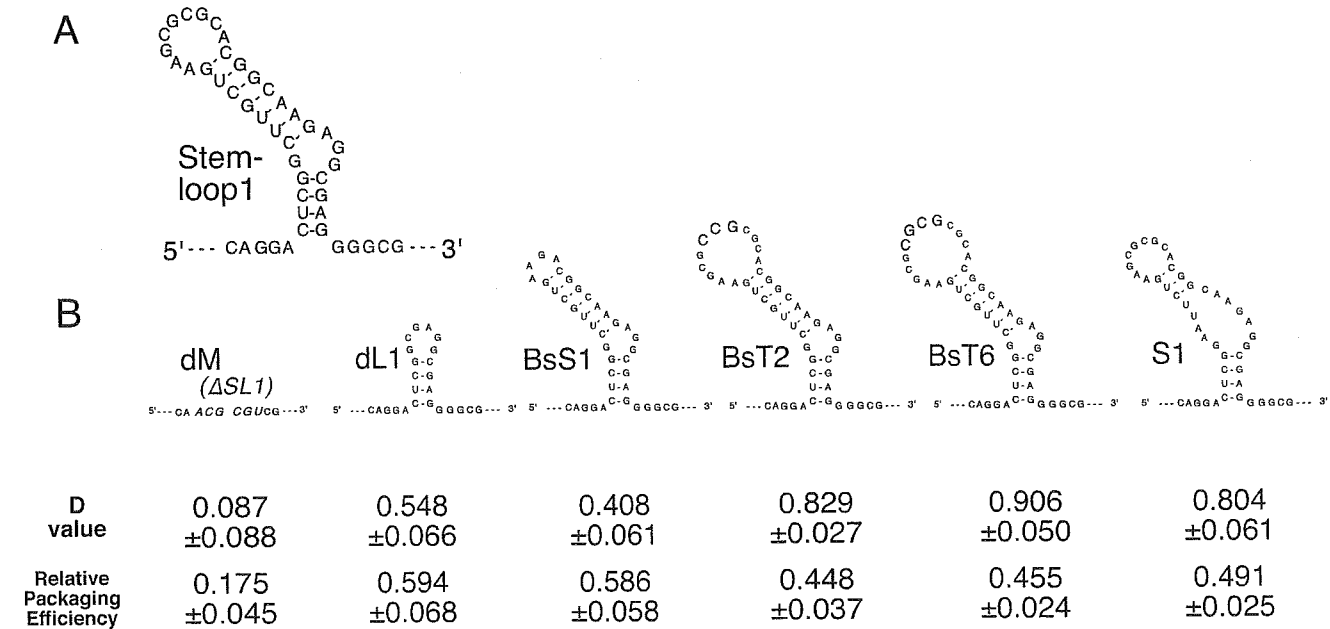


FIG. 4. Dimerization and packaging efficiencies of various SL1 mutants. (A) Schematic secondary structure of HIV-1 SL1 stem-loop. (B) Diagrams of SL1 stem-loop mutants. The inserted bases in BsT2 and BsT6 are indicated in large letters. The *Mlu*I recognition site introduced at the position where SL1 is deleted in the mutant dM is indicated in large italic letters. The *D* value and relative packaging efficiency of each mutant are shown below its diagram. The packaging efficiencies were calculated from results for the mutants, which do not contain a second copy of E/DLS. The results represent means ± standard errors from at least three independent experiments.

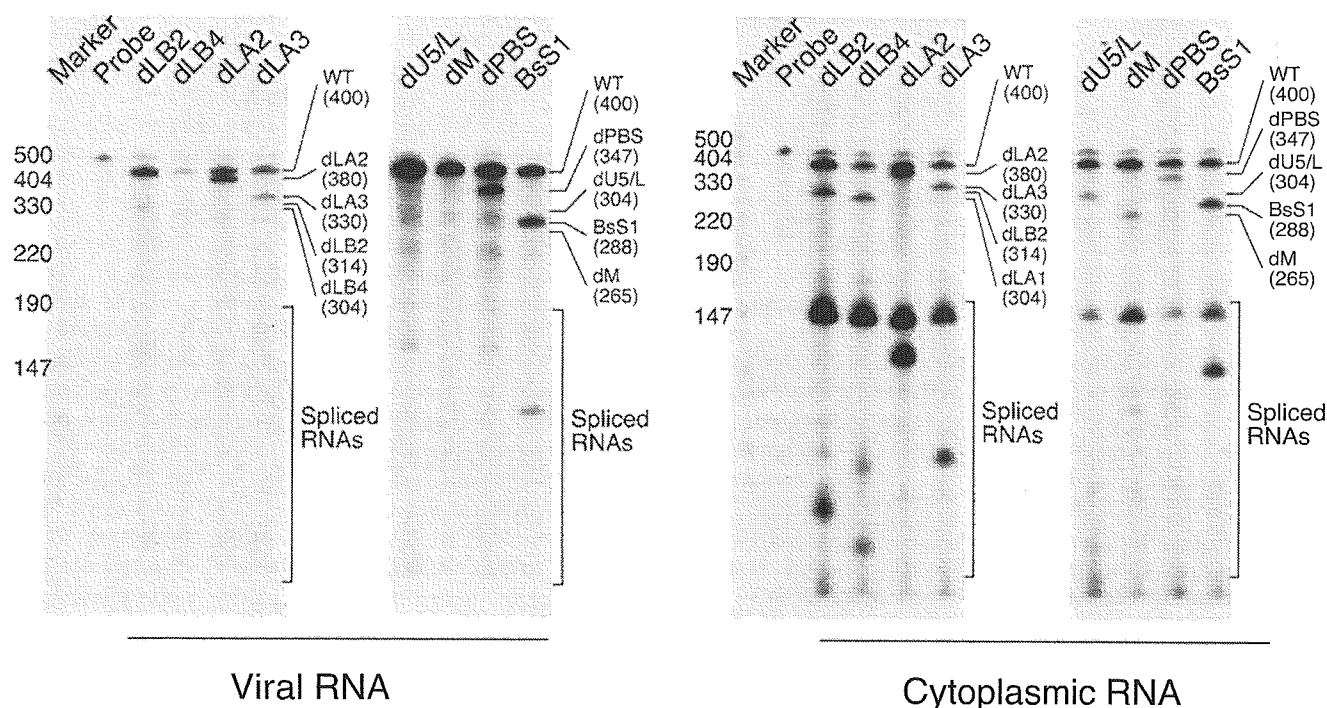


FIG. 5. RNase protection assay measuring packaging efficiencies of pNLN derivatives. The mutants were cotransfected into 293T cells along with the wild-type (WT), pNLN. The cytoplasmic RNA from the transfected cells and the virion RNA were subjected to RNase protection analysis. The probe used was generated from pGEM(600-1000). This probe is complementary to a portion of the 5' untranslated region and the *gag* gene from pNLN and is capable of distinguishing the wild-type and each mutant RNA. The amount of probe loaded on the gel was 1/500 of the amount of probe used in the experiment. The position of each diagnostic band for the viral RNA is indicated on the right of each gel. The numbers in parentheses represent the sizes (in nucleotides) of the protected bands of the mutants.

recognition site in the hairpin loop of SL1 (Fig. 4B). The loop and top stem of the authentic SL1 is deleted in the mutant dL1-BA (21 bases; nt 703 to 723), and the base pairing of the top stem is partially abolished in S1-BA (Fig. 4B). We examined the dimerization efficiencies of the genomic RNAs of these mutants. As shown in Fig. 4B, the *D* value of dM-BA, in which the entire SL1 was deleted, was almost 0, whereas those of dL1-BA and BsS1-BA were ~ 0.5 . These results indicate that the hairpin loop and upper-stem region only partially contribute to dimer formation and that the entire stem-loop formation of the SL1 region is required for mediating RNA-RNA interaction *in vivo*. On the other hand, the ability to form a dimer was not altered by the hairpin loop mutations introduced into BsT2-BA or BsT6-BA (Fig. 4B). This means that enlargement of the hairpin loop does not affect dimerization. The ability to form dimers was also maintained after the upper-stem disruption introduced into the mutant S1-BA. This suggests that the upper-stem formation of SL1 is not required for RNA-RNA interaction.

The encapsidation signal expands to a much larger area than the DIS/DLS. The E/psi site and the DIS/DLS site have been believed to overlap, and they may cooperate during the particle formation process. We tried to find the location of the E/psi site by RNase protection assay using 5'-region deletion mutants that do not contain a second copy of the E/DLS region within their genomes. First, 293T cells were cotransfected with equal amounts of pNLN (the wild type) and a plasmid containing various mutations examined above. The cytoplasmic

RNA was isolated from these cells, and the virion RNA was isolated from the medium as previously described (32); both were subjected to RNase protection analysis with a riboprobe capable of detecting both wild-type and mutant RNAs (Fig. 5). The relative encapsidation efficiencies of the mutants were determined by calculating the ratio of the mutant RNA to the wild-type RNA in the virion relative to the ratio of the two RNAs in the cytoplasm. Quantitation of the unspliced viral RNA in the cytoplasm by RNase protection assay indicated that all mutants expressed similar levels of steady-state cytoplasmic RNA relative to the wild type (Fig. 5 and data not shown). As shown in Fig. 1B and previous reports (33, 34), complete deletion of the R/U5, U5/L, and SL1 stem-loop regions resulted in harsh reduction of packaging efficiency. On the other hand, deletion of the PBS and the upper stem-loop region of U5/L (dLA1, dLA2, and dLA3) did not affect packaging (Fig. 2B). The packaging efficiencies of the mutants dLB2, dLB3, and dLB4 were seriously impaired, showing that the entire lower stem of the U5/L region plays an important role in RNA encapsidation (Fig. 2B). These results indicated that the packaging signal does not completely coincide with the DIS/DLS, since the R/U5 stem-loop and the areas deleted from the mutant dLB2 contributed little to the dimer formation function. The mutant dLC1 showed a significant impairment in packaging, whereas the mutants dLC2 and dLC3 did not (Fig. 3). Top-stem truncation, top-stem corruption, or hairpin loop deletion of the SL1 stem-loop region only partially reduced packaging ability (Fig. 4B). Enlargement of the hair-

pin loop of SL1 also only partially affected encapsidation (Fig. 4B, BsT2 and BsT6).

DISCUSSION

In this work, we used a previously reported system (38) to study the RNA-RNA interaction that occurs in mature HIV-1 virions. This system has several advantages for analyzing the RNA dimerization of HIV in vivo. First, we can see the in vivo dimerization of the mutant of the packaging signal region without affecting the encapsidation ability of RNA. Second, we can limit the area for analyzing dimerization to the 5' leader region. There are several reports suggesting that the area other than the primary 5' DIS/DLS affects retroviral genome dimerization in vivo (39, 43). Even in the reports describing the importance of the primary DIS/DLS site of HIV-1, a significant amount of dimerized genome from the DIS/DLS mutants is usually observed (9, 26, 40). These facts obviously suggest the presence of the secondary or tertiary DLS within viral RNA. Our system facilitates the analysis of the 5' DIS/DLS directly and independently of these secondary or tertiary DLSs.

The first experiment gave clear-cut results (Fig. 1). The R/U5 loop and the PBS were not included in the DIS/DLS, whereas the SL1 and U5/L stem-loop regions played critical roles in genome dimerization. In subsequent experiments, we anatomized the U5/L stem-loop to identify the region responsible for dimer formation. Most of the U5/L stem-loop is not required, and only 10 bases of lower stem play an important role in inducing RNA dimerization. These results are consistent with recent reports suggesting the participation of the U5/L region in RNA dimerization in vivo (27, 40). We also found that the 5' side of the lower stem contributes partially to dimer formation (Fig. 2).

Unexpected results were obtained from the experiments with the SL1 stem-loop. Surprisingly, all SL1 mutants except dM-BA partially or fully retained dimerization activity. The mutant BsS1-BA lacks a palindromic sequence in the hairpin loop, so the initial interaction between the authentic and ecotopic SL1 sequences on the same RNA would be ablated. BsT6-BA has a longer palindromic sequence (10 bases), which could potentially lead to more stable interaction between the two SL1 hairpins intermolecularly while intramolecular loop interaction would still be mediated by 6-base palindromic sequences. BsT2-BA contains an interrupted palindrome that might interfere with stable association between the two hairpins. Based on a previous analysis of mutants containing lesions in the hairpin loop (15, 28), the mutations in BsS1-BA and BsT2-BA would abrogate the homodimer formation of SL1 in vitro. Since it is believed that the palindromic sequence on the top of SL1 initiates dimer formation, BsS1-BA and BsT2-BA were expected to have a lethal defect in dimer formation. Nevertheless, BsT2-BA completely retained the ability to form dimers, and BsS1-BA partially retained the function. BsT6-BA and S1-BA were also unchanged in terms of dimerization. These results suggested that the contributions of the top hairpin loop and upper stem of SL1 to dimer formation are limited. Instead, the entire SL1 stem-loop, or possibly the lower stem of SL1, is required for complete RNA dimerization. In addition, the result for BsT2-BA clearly showed that the palindromic sequence on the hairpin loop of SL1 is not re-

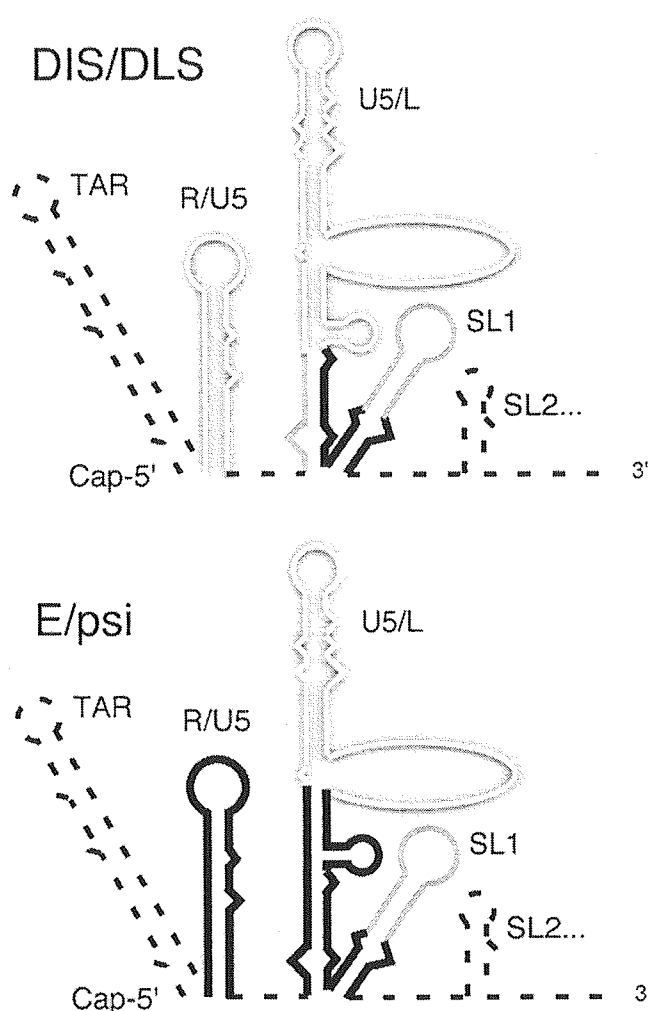


FIG. 6. Functional mapping of the 5' region of HIV-1. The functional maps of RNA dimerization (top) and genome packaging (bottom) are shown separately. The shadowed open lines represent the areas dispensable for each function. The solid bold lines represent the areas essential for each function. The shaded lines represent the areas important for efficient functions. The dashed lines represent the areas not yet analyzed.

quired for RNA-RNA interaction in the virion. In contrast, all SL1 mutations resulted in a reduction of packaging efficiency (Fig. 4B). Even the mutations that did not affect dimerization (BsT2, BsT6, and S1) caused some defect of encapsidation. These results indicate that the hairpin loop and top stem of SL1 are much more important in the generation of a packaging signal than in RNA dimerization. Consistent with this finding, Harrison et al. reported that SL1 stem corruption or loop deletion caused partial packaging and replication defects (20).

We have summarized the results in schematic functional maps (Fig. 6). It should be emphasized that there are parallel interrelations between DIS/DLS and E/psi in some regions presented. For example, complete deletion of SL1 resulted in a marked reduction of both dimerization and encapsidation abilities, whereas a top-stem truncation or top-loop deletion produced only a partial reduction of these two functions (Fig.

4B). Similarly, the mutations introduced in dLB4, dLC1, dLC2, and dLC3 affected, almost in parallel, the magnitudes of the packaging and dimerization functions (Fig. 2 and 3). Moreover, we could not find a region that is functional only for dimerization and not for packaging, whereas we observed regions functional for packaging but not dimerization (e.g., the entire R/U5 stem-loop or the upper region of the U5/L lower stem). In other words, the regions important for dimerization were always important for packaging. Previously, we reported that two E/DLS molecules are required but that dimerized RNA strands do not need to be packaged into HIV-1 virions (37). Taken together, our results strongly suggest that the RNA linkage structures and/or their interaction is required for packaging. We hypothesize that the RNA-packaging event consists of multiple steps and that RNA dimerization is one of the steps. We also assume that E/DLS RNA must be recognized as an intact packaging signal by viral protein only after a secondary or higher structure is formed by two E/DLS molecules. It should be noted, however, that the assumption that in our experimental system the intermolecular and intramolecular dimers are selected equally well for packaging is untested.

It has been suggested that the upper-stem-loop parts of the U5/L region form a relatively complicated structure for the uptake of tRNA primer into the PBS (5, 24). Our results showed that this region is not necessary for dimer formation or the encapsidation of RNA (Fig. 2) and might suggest that the region exists primarily for primer uptake, even though it is located at the center of the E/DLS. We also found that the PBS site itself is required for neither dimerization nor packaging (Fig. 1), and these facts might imply that the primer binding event occurs independently of the packaging-dimerization event.

Our result with the mutants dLB3 and dLB4 (Fig. 2) showed that the contributions to dimerization of each side of the U5/L lower stem were not identical. This suggested that the primary structure rather than the stem structure in this region is important for mediating RNA dimer formation and/or that the lower stem region of the U5/L stem-loop might form differently. In addition, we could not deny the possibility that the large-deletion mutations might change the overall structure of the E/DLS region. The RNA structure model we used in this study was based on the Mfold program and is a relatively simple one (34). There is accumulating evidence that the HIV-1 leader RNA folds into a more complicated secondary, and probably tertiary, structure (4, 12, 21). However, the models currently suggested are based on *in vitro* experiments and/or computational analysis, and the HIV-1 RNA structure *in vivo* is still unclear. As our experiments were performed in an *in vivo* system, our data would thus be one of the clues to unveil the *in vivo* structures of E/DLS. The results of our DIS/DLS analysis contain some discrepancies from other reports using different systems (40). On the other hand, in a recent paper studying packaging signals in the U5/L stem-loop region (8), the regions shown to be necessary for encapsidation were quite similar to those in our results. These facts might also imply the complexity of E/DLS formation and structure *in vivo*.

HIV dimeric RNA is apparently stabilized by the action of NC protein in mature virions (13, 14, 16, 17). While we measured the extent of dimerization of the RNA in mature parti-

cles, the RNA is undoubtedly packaged without the stabilizing effect of free NC protein. It is at least a theoretical possibility that some RNAs are packaged without RNA-RNA interactions but are then converted to dimers by the action of NC when the virus matures. According to this strict approach, our data would suggest that the ability of the E/DLS region to form RNA dimers in mature particles is necessary but not sufficient for packaging.

In conclusion, we have demonstrated that the HIV-1 U5/L and SL1 regions could be a multifunctional domain and suggested that E/DLS dimerization might be an essential step for the genome packaging of HIV-1. As the region we have discussed was necessary but not sufficient for dimerization and/or packaging, more studies are under way to elucidate the minimum region required and sufficient for RNA dimerization of HIV-1 *in vivo*.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Antonito T. Panganiban for helpful discussion and advice and Sayuri Sakuragi for encouragement.

J.-I.S. was supported by The Organization for Pharmaceutical Safety and Research. This work was supported by grants from the Organization for Pharmaceutical Safety and Research; the Human Health Foundation; the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology; and the Ministry of Health, Labour, and Welfare, Japan.

REFERENCES

- Adachi, A., H. E. Gendelman, S. Koenig, T. Folks, R. Willey, A. Rabson, and M. A. Martin. 1986. Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *J. Virol.* **59**:284–291.
- Aldovini, A., and B. D. Walker. 1990. Techniques in HIV research. Stockton Press, New York, N.Y.
- Awang, G., and D. Sen. 1993. Mode of dimerization of HIV-1 genomic RNA. *Biochemistry* **32**:11453–11457.
- Beerens, N., F. Groot, and B. Berkhout. 2001. Initiation of HIV-1 reverse transcription is regulated by a primer activation signal. *J. Biol. Chem.* **276**:31247–31256.
- Beerens, N., B. Klaver, and B. Berkhout. 2000. A structured RNA motif is involved in correct placement of the tRNA(3)(Lys) primer onto the human immunodeficiency virus genome. *J. Virol.* **74**:2227–2238.
- Berkhout, B., and J. L. van Wamel. 1996. Role of the DIS hairpin in replication of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **70**:6723–6732.
- Clever, J., C. Sasseti, and T. G. Parslow. 1995. RNA secondary structure and binding sites for *gag* gene products in the 5' packaging signal of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **69**:2101–2109.
- Clever, J. L., D. Miranda, Jr., and T. G. Parslow. 2002. RNA structure and packaging signals in the 5' leader region of the human immunodeficiency virus type 1 genome. *J. Virol.* **76**:12381–12387.
- Clever, J. L., and T. G. Parslow. 1997. Mutant human immunodeficiency virus type 1 genomes with defects in RNA dimerization or encapsidation. *J. Virol.* **71**:3407–3414.
- Coffin, J. 1984. Genome structure, p. 261–368. *In* R. Weiss, N. Teich, H. Vermus, and J. Coffin (ed.), RNA tumor viruses. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Coffin, J. M. 1979. Structure, replication, and recombination of retrovirus genomes: some unifying hypotheses. *J. Gen. Virol.* **42**:1–26.
- Damgaard, C. K., H. Dyhr-Mikkelsen, and J. Kjems. 1998. Mapping the RNA binding sites for human immunodeficiency virus type-1 *gag* and NC proteins within the complete HIV-1 and -2 untranslated leader regions. *Nucleic Acids Res.* **26**:3667–3676.
- Darlax, J. L., C. Gabus, M. T. Nugeyre, F. Clavel, and F. Barre-Sinoussi. 1990. *cis* elements and *trans*-acting factors involved in the RNA dimerization of the human immunodeficiency virus HIV-1. *J. Mol. Biol.* **216**:689–699.
- De Rocquigny, H., C. Gabus, A. Vincent, M.-C. Fournie-Zaluski, B. Roques, and J.-L. Darlix. 1992. Viral RNA annealing activities of human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein require only peptide domains outside the zinc fingers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:9373–9377.
- Dirac, A. M., H. Huthoff, J. Kjems, and B. Berkhout. 2001. The dimer initiation site hairpin mediates dimerization of the human immunodeficiency virus type 2 RNA genome. *J. Biol. Chem.* **276**:32345–32352.
- Feng, Y. X., S. Campbell, D. Harvin, B. Ehresmann, C. Ehresmann, and A. Rein. 1999. The human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein has

- nucleic acid chaperone activity: possible role in dimerization of genomic RNA and placement of tRNA on the primer binding site. *J. Virol.* **73**:4251–4256.
17. Feng, Y. X., T. D. Copeland, L. E. Henderson, R. J. Gorelick, W. J. Bosche, J. G. Levin, and A. Rein. 1996. HIV-1 nucleocapsid protein induces "maturation" of dimeric retroviral RNA *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:7577–7581.
 18. Graham, F. L., J. Smiley, W. C. Russell, and R. Nairn. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* **36**:59–74.
 19. Greathouse, J., and A. Lever. 1998. Retroviral RNA dimer linkage. *J. Gen. Virol.* **79**:2877–2882.
 20. Harrison, G. P., G. Miele, E. Hunter, and A. M. L. Lever. 1998. Functional analysis of the core human immunodeficiency virus type 1 packaging signal in a permissive cell line. *J. Virol.* **72**:5886–5896.
 21. Huthoff, H., and B. Berkhout. 2001. Two alternating structures of the HIV-1 leader RNA. *RNA* **7**:143–157.
 22. Höglund, S., Å. Öhagen, J. Gonçalves, A. T. Panganiban, and D. Gabuzda. 1997. Ultrastructure of HIV-1 genomic RNA. *Virology* **233**:271–279.
 23. Jones, J. S., R. W. Allan, and H. M. Temin. 1994. One retroviral RNA is sufficient for synthesis of viral DNA. *J. Virol.* **68**:207–216.
 24. Kang, S. M., and C. D. Morrow. 1999. Genetic analysis of a unique human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) with a primer binding site complementary to tRNA^{Met} supports a role for U5-PBS stem-loop RNA structures in initiation of HIV-1 reverse transcription. *J. Virol.* **73**:1818–1827.
 25. Laughrea, M., and L. Jette. 1994. A 19-nucleotide sequence upstream of the 5' major splice donor is part of the dimerization domain of human immunodeficiency virus 1 genomic RNA. *Biochemistry* **33**:13464–13474.
 26. Laughrea, M., L. Jette, J. Mak, L. Kleiman, C. Liang, and M. A. Wainberg. 1997. Mutations in the kissing-loop hairpin of human immunodeficiency virus type 1 reduce viral infectivity as well as genomic RNA packaging and dimerization. *J. Virol.* **71**:3397–3406.
 27. Laughrea, M., N. Shen, L. Jette, J. L. Darlix, L. Kleiman, and M. A. Wainberg. 2001. Role of distal zinc finger of nucleocapsid protein in genomic RNA dimerization of human immunodeficiency virus type 1: no role for the palindrome crowning the R-U5 hairpin. *Virology* **281**:109–116.
 28. Laughrea, M., N. Shen, L. Jette, and M. A. Wainberg. 1999. Variant effects of non-native kissing-loop hairpin palindromes on HIV replication and HIV RNA dimerization: role of stem-loop B in HIV replication and HIV RNA dimerization. *Biochemistry* **38**:226–234.
 29. Lear, A. L., M. Haddrick, and S. Heaphy. 1995. A study of the dimerization of Rous sarcoma virus RNA *in vitro* and *in vivo*. *Virology* **212**:47–57.
 30. Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
 31. Marquet, R., F. Baudin, C. Gabus, J. L. Darlix, M. Mougél, C. Ehresmann, and B. Ehresmann. 1991. Dimerization of human immunodeficiency virus (type 1) RNA: stimulation by cations and possible mechanism. *Nucleic Acids Res.* **19**:2349–2357.
 32. McBride, M. S., and A. T. Panganiban. 1996. The human immunodeficiency virus type 1 encapsidation site is a multipartite RNA element composed of functional hairpin structures. *J. Virol.* **70**:2963–2973.
 33. McBride, M. S., and A. T. Panganiban. 1997. Position dependence of functional hairpins important for human immunodeficiency virus type 1 RNA encapsidation *in vivo*. *J. Virol.* **71**:2050–2058.
 34. McBride, M. S., M. D. Schwartz, and A. T. Panganiban. 1997. Efficient encapsidation of human immunodeficiency virus type 1 vectors and further characterization of *cis* elements required for encapsidation. *J. Virol.* **71**:4544–4554.
 35. Muriaux, D., P. M. Girard, B. Bonnet-Mathoniere, and J. Paoletti. 1995. Dimerization of HIV-1LAI RNA at low ionic strength. An autocomplementary sequence in the 5' leader region is evidenced by an antisense oligonucleotide. *J. Biol. Chem.* **270**:8209–8216.
 36. Paillart, J. C., R. Marquet, E. Skripkin, B. Ehresmann, and C. Ehresmann. 1994. Mutational analysis of the bipartite dimer linkage structure of human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA. *J. Biol. Chem.* **269**:27486–27493.
 37. Sakuragi, J.-I., A. Iwamoto, and T. Shioda. 2002. Dissociation of genome dimerization from packaging functions and virion maturation of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **76**:959–967.
 38. Sakuragi, J.-I., T. Shioda, and A. T. Panganiban. 2001. Duplication of the primary encapsidation and dimer linkage region of HIV-1 RNA results in the appearance of monomeric RNA in virions. *J. Virol.* **75**:2557–2565.
 39. Sakuragi, J.-I., and A. T. Panganiban. 1997. Human immunodeficiency virus type 1 RNA outside the primary encapsidation and dimer linkage region affects RNA dimer stability *in vivo*. *J. Virol.* **71**:3250–3254.
 40. Shen, N., L. Jette, M. A. Wainberg, and M. Laughrea. 2001. Role of stem B, loop B, and nucleotides next to the primer binding site and the kissing-loop domain in human immunodeficiency virus type 1 replication and genomic-RNA dimerization. *J. Virol.* **75**:10543–10549.
 41. Skripkin, E., J. C. Paillart, R. Marquet, B. Ehresmann, and C. Ehresmann. 1994. Identification of the primary site of the human immunodeficiency virus type 1 RNA dimerization *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:4945–4949.
 42. Sundquist, W. L., and S. Heaphy. 1993. Evidence for interstrand quadruplex formation in the dimerization of human immunodeficiency virus 1 genomic RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:3393–3397.
 43. Tchénio, T., and T. Heidmann. 1995. The dimerization/packaging sequence is dispensable for both the formation of high-molecular-weight RNA complexes within retroviral particles and the synthesis of proviruses of normal structure. *J. Virol.* **69**:1079–1084.

15. Xiang J, Wunschmann S, Diekerma DJ, Klinzman D, Patrick KD, George SL, Stapleton JT. **Effect of coinfection with GB virus C on survival among patients with HIV infection.** *N Engl J Med* 2001; 345:707–714.
16. Aractingi S, Uzan S, Dausset J, Carosella ED. **Microchimerism in human diseases.** *Immunol Today* 2000; 21:116–118.
17. European Mode of Delivery Collaboration. **Elective caesarean-section versus vaginal delivery in prevention of vertical HIV-1 transmission: a randomised clinical trial.** *Lancet* 1999; 353:1035–1039.
18. Ryder RW, Nsa W, Hassig SE, Behets F, Rayfield M, Ekungola B, et al. **Perinatal transmission of the human immunodeficiency virus type 1 to infants of seropositive women in Zaire.** *N Engl J Med* 1989; 320:1637–1642.

No significant enhancement of protection by Tat-expressing Sendai viral vector-booster in a macaque AIDS model

Tetsuro Matano^{a,b}, Munehide Kano^b, Akiko Takeda^{a,b}, Hiromi Nakamura^b, Nobuhiko Nomura^c, Yousuke Furuta^c, Tatsuo Shioda^d and Yoshiyuki Nagai^{b,e}

We previously developed a DNA-prime/Gag-expressing Sendai virus (SeV) vector-boost vaccine system, and showed its excellent protective efficacy against a pathogenic SHIV infection in macaques. Alternative antigens may be used instead or together with Gag for the booster. We examined the potential of Tat as the booster antigen in our DNA-prime/SeV-boost system. However, boosting by Tat-expressing SeV induced no significant enhancement of protection against SHIV infections.

Cellular immune responses play a critical role in the control of immunodeficiency virus infections [1]. We previously developed an AIDS vaccine system using an *env* and *nef*-deleted SHIV proviral DNA, which induces SHIV-specific cellular immune responses efficiently [2]. Furthermore, we established a recombinant Sendai virus (SeV) vector-based AIDS vaccine system [3,4]. We combined these two systems to develop a DNA-prime/Gag-expressing SeV (SeV-Gag)-boost vaccine, and showed its excellent protective efficacy against a pathogenic SHIV89.6PD infection in macaques [5]. The DNA-prime/SeV-boost regimen is therefore a promising vaccine delivery system.

Alternative antigens may be used instead or together with Gag for the booster. Recently, the importance of immune responses specific to viral early regulatory proteins such as Tat in the control of immunodeficiency virus infections has been stressed [6], and several kinds of Tat-based AIDS vaccines have been reported to show protective efficacies in macaque AIDS models [7–9]. However, failure in the control of SIV infection by vaccine-induced Tat-specific T-cell

responses was also reported [10]. The efficacies of Tat-based AIDS vaccines may thus be dependent on antigen-delivery systems. In this study, we examined the efficacies of a Tat-expressing SeV (SeV-Tat)-booster in our prime/boost system.

A recombinant SeV-expressing HIV-1_{NL4-3} Tat was constructed and recovered as described [3]. Efficient Tat expression in SeV-Tat-infected CV-1 cells was confirmed by Western blotting using an anti-Tat antibody (data not shown). All the macaque experiments were performed in accordance with the institutional guidelines for laboratory animals. Three rhesus macaques (*Macaca mulatta*) were vaccinated with DNA-prime/SeV-Tat-boost; the animals received the proviral DNA vaccinations for the priming as described [5] and an intranasal inoculation with 1×10^8 infectious units of SeV-Tat for the booster at week 12 after the initial DNA vaccination. SHIV-specific T-cell levels were measured by flow-cytometric analysis of antigen-specific IFN- γ induction as described [5]. All the animals showed the induction of SHIV-specific T cells by DNA vaccinations, and after the booster, the expansion of SHIV-specific T cells, particularly SHIV-specific CD4 T cells (data not shown).

The animals were intravenously challenged with a pathogenic SHIV89.6PD (provided by Y. Lu) [11] at the dose of 10 TCID₅₀ (50% tissue culture infective doses) 14 weeks after the booster. Their protection levels were compared with those in two control groups; one was a naive control group and the other received proviral DNA vaccinations [5] (Fig. 1). In the naive control group, all four animals showed acute depletion of peripheral CD4 T cells, three of them failed to control viraemia and two developed AIDS to be euthanized in 10 months (R010 at week 41 and R014 at week 36). In the second group vaccinated with DNA alone, all three animals showed lower setpoint viral loads and were protected from progression to AIDS, although one of them showed acute CD4 T cell depletion. Similarly, in the DNA/SeV-Tat-vaccinated group, all three macaques controlled viraemia and were protected from disease progression, but one of them showed acute CD4 T cell depletion.

In conclusion, we found no significant differences in protection levels between the DNA-vaccinated and the DNA/SeV-Tat-vaccinated groups. In our previous report [5], all the DNA/SeV-Gag-vaccinated macaques showed reduced levels of peak viral loads during the acute phase of SHIV89.6PD infection and were protected from acute CD4 T cell depletion. In this study, however, DNA/SeV-Tat vaccination failed to consistently protect animals from acute CD4 T cell depletion. Boosting by SeV-Tat alone was thus not so effective in our prime/boost system. These results do not deny the potential of Tat-based AIDS vaccines, but suggest

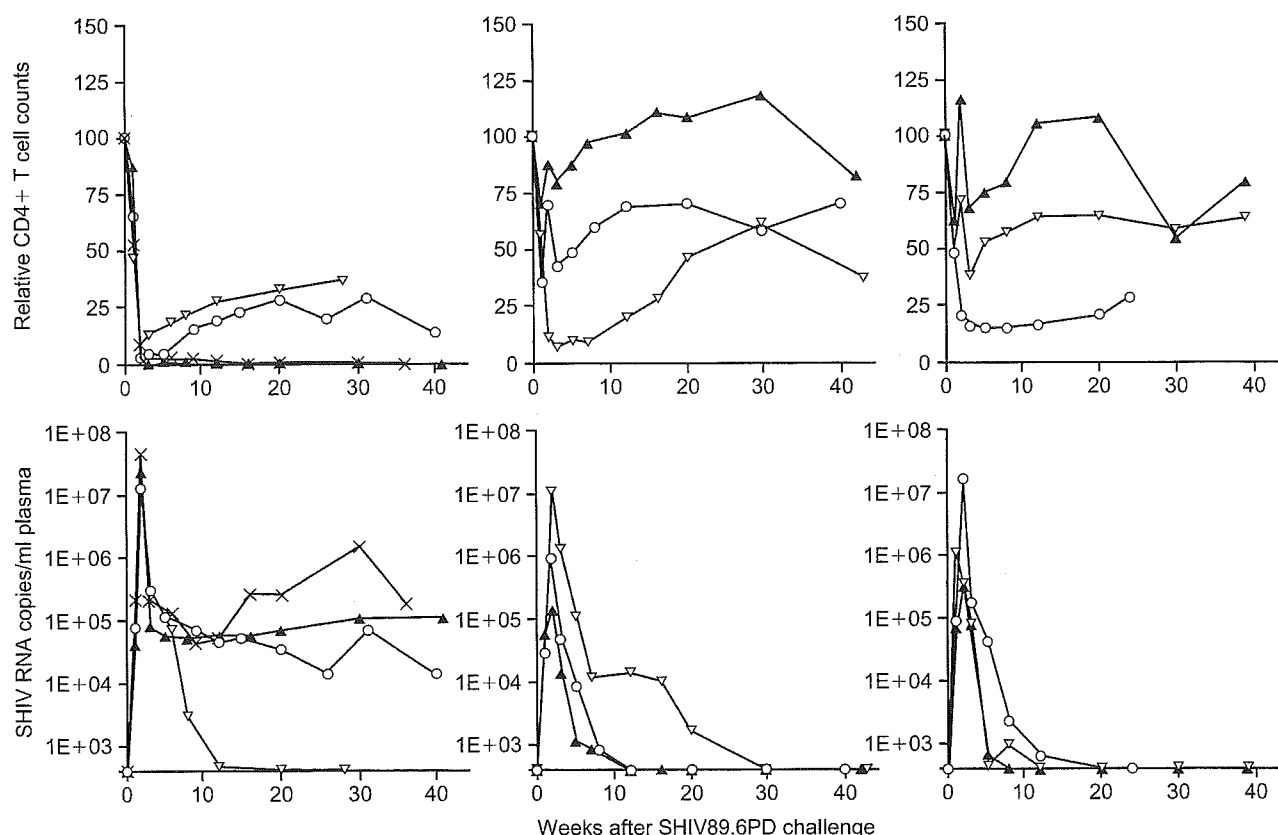


Fig. 1. Protection of vaccinated macaques against SHIV89.6PD challenge. Left panels show the naive control animals: —○— R009; —▽— R004; —▲— R010; —×— R014; middle panels show the macaques vaccinated with DNA alone: —○— R002; —▽— R021; —▲— R022; and right panels show the macaques vaccinated with DNA-prime/Sendai virus (SeV)-Tat-boost: —○— R001; —▽— R003; —▲— R006. Upper panels show changes in relative peripheral CD4 T cell counts. In each animal, the CD4 cell count at the challenge is rated as 100, and the relative values of the CD4 cell counts to that at the challenge are shown. Lower panels show changes in plasma SHIV RNA copy numbers (copies/ml) measured as described [2].

the importance of the careful selection of antigens for the development of an AIDS vaccine.

^aDepartment of Microbiology, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Tokyo, Japan; ^bAIDS Research Center, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan; ^cResearch Laboratories, Toyama Chemical Co., Ltd., Toyama, Japan; ^dDepartment of Viral Infections, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Osaka, Japan; and ^eToyama Institute of Health, Toyama, Japan.

Sponsorship: This work was supported by grants from the Ministry of Health, Labour, and Welfare, by grants from the Human Sciences Foundation, and by a grant from the Ministry of Education and Science in Japan.

Received: 18 December 2002; accepted: 7 January 2003.

DOI: 10.1097/01.aids.0000072665.21517.e4

References

- McMichael A, Hanke T. The quest for an AIDS vaccine: is the CD8+ T-cell approach feasible? *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 283–291.
- Matano T, Kano M, Odawara T, Nakamura H, Takeda A, Mori K, et al. Induction of protective immunity against pathogenic simian immunodeficiency virus by a foreign receptor-dependent replication of an engineered avirulent virus. *Vaccine* 2000; 18:3310–3318.
- Kato A, Kiyotani K, Sakai Y, Yoshida T, Nagai Y. The paramyxovirus, Sendai virus, V protein encodes a luxury function required for viral pathogenesis. *EMBO J* 1997; 16:578–587.
- Kano M, Matano T, Kato T, Nakamura H, Takeda A, Suzuki Y, et al. Primary replication of a recombinant Sendai viral vector in macaques. *J Gen Virol* 2002; 83:1377–1386.
- Matano T, Kano M, Nakamura H, Takeda A, Nagai Y. Rapid appearance of secondary immune responses and protection from acute CD4 depletion after a highly pathogenic immunodeficiency virus challenge in macaques vaccinated with a DNA-prime/Sendai viral vector-boost regimen. *J Virol* 2001; 75:11891–11896.
- Allen TM, O'Connor DH, Jing P, Dzuris JL, Mothe BR, Vogel TU, et al. Tat-specific cytotoxic T lymphocytes select for SIV escape variants during resolution of primary viraemia. *Nature* 2000; 407:386–390.
- Cafaro A, Caputo A, Fracasso C, Maggiorella MT, Goletti D, Baroncelli S, et al. Control of SHIV-89.6P-infection of cynomol-

HLA-B Polymorphism in Japanese HIV-1–Infected Long-Term Surviving Hemophiliacs

MWANSA MUNKANTA,¹ HIROSHI TERUNUMA,² MEGUMI TAKAHASHI,³
HIDEJI HANABUSA,⁴ TAKUMA MIURA,⁵ SHUICHI IKEDA,⁶ MICHIO SAKAI,⁷
TERUHISA FUJII,⁸ YOSHIHIRO TAKAHASHI,⁹ SHIN-ICHI OKA,¹⁰ JUZO MATSUDA,¹¹
MASAAKI ISHIKAWA,¹² MASASHI TAKI,¹³ YOSHIFUMI TAKASHIMA,¹⁴
JUN-ICHI MIMAYA,¹⁴ MASAHIKO ITO,¹ AKINORI KIMURA,³ and MICHIO YASUNAMI³

ABSTRACT

Approximately 30% of patients with hemophilia in Japan were infected with human immunodeficiency virus (HIV) in early 1980s through contaminated blood products. In 1995, a cohort of HIV-infected, asymptomatic patients with hemophilia was set up for follow-up study. Although the patients met the criteria for long-term non-progressor (LTNP) at the entry to the cohort, some of them later developed lymphopenia during five more years of observation. We collected blood samples from 80 long-term survivors; 42 of them did not require antiviral therapy, but the rest were under treatment. Analysis of HLA-B genotype revealed that carriers of known HIV-resistant alleles such as HLA-B*5701, B*5801, and alleles of B27 antigenic group were not increased in frequency, but that HLA-B*1507 was increased in the cohort (6.25% vs. 1.03%, OR = 6.40, $p = 0.039$). We also observed the decrease in carriers of HLA-B*5401 (3.75% vs. 14.95%, OR = 0.22, $p = 0.016$). HLA-B*5401 is a relatively common allele in East Asian populations and belongs to the same B22 antigenic group as B55 and B56 which were reported to associate with rapid progression. Our data indicated that HLA class I is one of the host factors involved in the retardation of HIV disease progression as also reported in the previous studies; however, the alleles associated with this resistance were not the same because of divergent host genetic background.

¹Department of Microbiology, University of Yamanashi, Yamanashi, Japan.

²Biotherapy Institute of Japan, Tokyo, Japan.

³School of Biomedical Science and Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan.

⁴Ogikubo Hospital, Tokyo, Japan.

⁵Haga Red Cross Hospital, Maoka, Japan.

⁶Sasebo City General Hospital, Sasebo, Japan.

⁷University of Occupational and Environmental Health, Kitakyushu, Japan.

⁸Hiroshima University Hospital, Hiroshima, Japan.

⁹Odate Municipal Hospital, Odate, Japan.

¹⁰International Medical Center of Japan, Tokyo, Japan.

¹¹Teikyo University, School of Medicine, Tokyo, Japan.

¹²Tohoku University, Sendai, Japan.

¹³St. Marianna University, Kawasaki, Japan.

¹⁴Shizuoka Children's Hospital, Shizuoka, Japan.

INTRODUCTION

APPROXIMATELY 0.1% of the adult Japanese population is infected with the human immunodeficiency virus (HIV) (1). The number of reported HIV cases, particularly through heterosexual contact, is steadily rising with a doubling of annual cases from the numbers seen in the 1990s to those reported recently (2), but the major source of infection was imported blood products administered to patients with hemophilia at the beginning of the HIV endemic in Japan (3). The first reported cases of AIDS in Japan were noted in patients with hemophilia in 1985. Thereafter a national HIV/AIDS surveillance study was conducted. By 1998, it was reported that 1404 patients with hemophilia were infected with HIV and that 502 among them had died, after developing AIDS (2). Approximately 30% of hemophiliac patients were found to be HIV carriers within the seven years from 1985 when heated plasma concentrates were generally used. In 1995, we set up a cohort of HIV-infected, asymptomatic patients with hemophilia for follow-up study. Upon the entry to the study, it had already been more than 10 years since exposure to the virus for all patients.

In the natural course of HIV infection, initial viremia accompanied by general manifestations such as fever takes place in the acute phase. Then, most of patients recover more or less from peak viremia to certain levels of viral load or "set points," presumably at least in part through the elimination of viral infected cells by cytotoxic T lymphocyte (CTL) response of the host immune system (4). After years of an asymptomatic period, a considerable number of the patients develop AIDS characterized by the deficit and dysfunction of CD4-positive T lymphocytes along with the re-elevation of viral load, if they do not take any anti-viral measures, such as highly active anti-retroviral treatment (HAART). In the latter viremic phase, the viral genome will have accumulated several mutations, some of which are advantageous to escape from host immune surveillance (4). A small part of infected patients maintain low viral loads, high CD4⁺ cell count and remain asymptomatic for seven years or more. These are known as long term non-progressors (LTNP) (5). The presence of slow progressors and LTNP has attracted research interests in general because they may hold the underlying biological mechanisms against HIV disease progression.

CTL responses are HLA class I restricted and most immune evasion mutations tend to take place in the coding sequence of the CTL epitope. The CTL epitopes vary with polymorphisms in the peptide binding groove of HLA class I molecule. Therefore HLA class I polymorphism is one candidate factor which elucidates the individual difference in anti-viral response and clinical features. Indeed, there have been many studies which de-

scribe that some HLA-alleles are associated with resistance to HIV, and that other alleles were associated with susceptibility (5). In the present study, we examined HLA-B polymorphism in the cohort of Japanese patients with hemophilia who had been infected with HIV for 10 years or longer without progression to AIDS.

MATERIALS AND METHODS

Patient samples. All the protocol of the present study was approved by Ethics Reviewing Board of Yamanashi University and the Medical Research Institute of Tokyo Medical and Dental University as well as all hospitals in which the samples were taken. Upon the set-up of the cohort of HIV-infected Japanese patients with hemophilia in 1995, all patients were infected for longer than ten years but asymptomatic without any antiviral measures. Blood samples were collected from 80 well-characterized patients who were selected from the cohort after obtaining written informed consent. At the time of sample collection, 42 of them were still asymptomatic and maintained their CD4⁺ T cells at certain level (no less than 200/mm³), but the rest were under anti-retroviral treatment (HAART) because of development of CD4 reduction less than 200/mm³. Quantification of viral RNA in the plasma was carried out by the Roche Amplicor versions 1.5 assay (Roche Diagnostics, NJ) on the sample collection and will be reported elsewhere in detail. The DNA was prepared from the blood samples by the use of Wizard genomic DNA purification kit (Promega, WI).

HLA-B typing. HLA-B genotype was determined by using Dynal RELI SSO HLA-B typing kit (Dynal Biotech, Oslo, Norway) and Pattern Matching Program (Dynal Biotech) and/or sequence-based typing (SBT) method essentially according to the 13th International HLA Workshop and Congress (IHWG) technical manual published on the IHWG web site (www.ihwc.org). Detailed method of SBT is available on request. In brief, the sequences around exons 2 and 3 were amplified in separate PCR. Amplified DNA was treated with ExoSAP-IT (Amersham Biosciences, NJ) according to the manufacturer's recommendation, and then the sequence was determined by using BigDye Terminator v1.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, CA) and ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Statistical analysis. Frequency of carriers of each allele between patient group and controls were compared. The controls were from random sampling of healthy volunteer ($n = 194$). Odds ratio (OR) was calculated by Woolf's formula (7), for which Haldane's modification was applied upon necessity (8). Statistical significance of the difference in frequencies was evaluated by χ^2 test with Yates' correction (9).

TABLE 1. CARRIERS OF HLA-B ALLELES IN JAPANESE LONG-TERM SURVIVING, HIV-INFECTED HEMOPHILIACS

<i>Allele</i>	<i>HIV-infected hemophiliacs</i> (n = 80) (%)	<i>Controls</i> (n = 194) (%)	<i>Odds ratio</i> ^a	<i>p</i>
B*0702	12.5	11.9	1.06	ns
B*1301	2.5	0.5	4.95	ns
B*1302	1.3	0.0	(7.34)	ns
B*1501	22.5	15.0	1.65	ns
B*1502	0.0	1.6	(0.34)	ns
B*1507	6.3	1.0	6.40	0.039
B*1511	2.5	2.6	0.97	ns
B*1518	2.5	5.2	0.47	ns
B*2704	1.3	0.0	(7.34)	ns
B*2705	0.0	0.5	(0.80)	ns
B*3501	7.5	10.3	0.71	ns
B*3701	1.3	0.0	(7.34)	ns
B*3802	0.0	1.0	(0.48)	ns
B*3901	3.8	4.6	0.80	ns
B*3902	0.0	0.5	(0.80)	ns
B*3904	0.0	0.5	(0.80)	ns
B*4001	12.5	10.3	1.24	ns
B*4002	21.3	11.3	2.11	0.052 (ns)
B*4003	2.5	0.5	4.95	ns
B*4006	6.3	10.8	0.55	ns
B*4402	3.8	0.5	7.52	ns
B*4403	11.3	13.4	0.82	ns
B*4501	0.0	0.5	(0.80)	ns
B*4601	7.5	11.3	0.63	ns
B*4801	2.5	7.7	0.31	ns
B*5101	21.3	11.3	2.11	0.052 (ns)
B*5102	0.0	0.5	(0.80)	ns
B*5201	17.5	27.3	0.56	ns
B*5401	3.8	15.0	0.22	0.016
B*5502	6.3	6.2	1.01	ns
B*5504	0.0	0.5	(0.80)	ns
B*5601	1.3	2.6	0.48	ns
B*5603	1.3	1.0	1.22	ns
B*5801	2.5	1.0	2.46	ns
B*5901	3.8	5.7	0.69	ns
B*6701	6.3	2.1	3.17	ns
Bw4/Bw6				
Bw4	58.8	52.1	1.31	ns
Bw4-80Thr	21.3	15.5	1.48	ns
Bw4-80Ile	45.0	41.8	1.14	ns
Bw6	90.0	87.6	1.27	ns
Supertype				
B7	50.0	54.1	0.84	ns
B27	10.0	19.0	0.47	ns
B44	55.0	42.7	1.63	ns
B58	2.5	1.0	2.46	ns
B62	55.0	50.0	1.22	ns

^aOdds ratio was calculated by Woolf's formula. Value in parenthesis was from Haldane's modification when Woolf's formula was inappropriate. The *p* value was calculated by χ^2 test with Yates' correction.

ns, not significant.

TABLE 2. HLA-B SUPERTYPES AND OUTCOME OF LONG-TERM SURVIVING, HIV-INFECTED HEMOPHILIACS

Supertype	Non-progressors (n = 42) (%)	Patients under HAART (n = 38) (%)	Odds ratio ^a	p
B7	42.9	57.9	0.55	ns
B27	2.4	18.4	0.11	0.044
B44	54.8	55.3	0.98	ns
B58	4.8	0.0	(4.75)	ns
B62	57.1	42.1	1.83	ns

^aSee footnote of Table 1.

RESULTS

Analysis of HLA-B alleles. HLA-B genotype of 80 hemophiliac patients was determined and frequency of carriers of respective alleles was calculated (Table 1). HLA-B*5701, B58 alleles, and B27 alleles that were reported to be associated with resistance to HIV infection in the North American, European and African populations were not found or significantly changed in frequency in our cohort (6,10). Instead, the frequency of HLA-B*1507 carrier was significantly increased in the patients in comparison to the controls (6.25% vs. 1.03%, OR = 6.40, $p = 0.039$). Carriers of HLA-B*4002 and those of HLA-B*5101 were also marginally increased. On the contrary, carriers of HLA-B*5401 were significantly decreased in patients (3.75% vs. 14.95%, OR = 0.22, $p = 0.016$). Bw4 and Bw6 are mutually exclusive public epitopes on most of HLA-B alleles and are shared by a small group of HLA-A alleles. The Ile80 subtype of Bw4 was reported to associate to HIV-resistance presumably via interaction with its receptor on natural killer cells, KIR-3DS1 (11). However, the frequencies of Bw-

public antigens or subtypes of Bw4 were not different between patients and controls (Table 1).

Most HLA class I alleles fall in to several groups called as supertype in terms of their preference in binding to antigen peptide (12). Therefore, the alleles classified to the same HLA supertype are assumed to be roughly equivalent in their function. Among five known HLA-B superotypes, B58 supertype was reported to confer the host resistance to HIV (13). The frequencies of HLA-B superotypes were not different between patients and controls (Table 1).

Can HLA-B predict the long-term prognosis? Although the patients had been so-called non-progressors or slow progressors for more than ten years at the entry of the cohort, some of them developed immune dysfunction and required introduction of HAART to prevent further progression. When we compared the HLA-B alleles and superotypes between patients who had not introduced HAART ($n = 42$) and those who were under HAART ($n = 38$), B27 supertype carrier was more in patients under treatment (Table 2). The alleles of B27 supertype found in the patients were HLA-B*1518,

TABLE 3. HIV LOAD AND HLA-B SUPERTYPE CARRIERS^a

Outcome	HIV load (copies RNA/mL)	Supertype carriers (%)				
		B7	B27	B44	B58	B62
Non-progressors (n = 40) ^b						
<10 ²	9	55.6	0.0	77.8	0.0	55.6
10 ² –10 ³	11	36.4	9.1	54.5	0.0	54.5
10 ³ –10 ⁴	12	50.0	0.0	50.0	8.3	50.0
10 ⁴ <	8	25.0	0.0	50.0	12.5	75.0
Patients under HAART (n = 38)						
<10 ²	23	69.6	8.7	60.9	0.0	34.8
10 ² –10 ³	3	66.7	33.3	0.0	0.0	66.7
10 ³ <	12	33.3	33.3	58.3	0.0	41.7

^aEach outcome group of patients was stratified according to the viral load.^bData was not available for two non-progressors.

B*2704, B*3901 and B*4801, the presence of which may be unfavorable for the host to control virus for extended period (12). When the patients were further classified according to the viral load in the peripheral blood, no HLA supertypes affected of the levels of HIV load after seven to eight years of observation period in both outcome groups (Table 3). Therefore, HLA-B could not predict the long-term prognosis of non-progressors in the present study.

DISCUSSION

The rate of progression from HIV infection to AIDS is controlled by several host and viral factors. Polymorphisms in chemokine and chemokine receptor genes have been repeatedly observed to associate with host resistance, which may affect viral propagation in the host organism through the changes in infectivity (14,15). HLA class I polymorphism is another key factor for host resistance against HIV. Several alleles such as HLA-B*5701, B58 alleles and B27 alleles were demonstrated to be associated with resistance and others such as HLA-B*-0702, B35, B53, and B22 alleles were associated with rapid progression (6,10,16–19). In addition to association of specific alleles, groups of functionally equivalent allele are also associated with the progression of disease and the viral load, which force the viral genome to evolve so as to fit to the prevalent host HLA polymorphism (13). An increase of B27 super type in patients under HAART in comparison to LTNP in the present study appeared to be discrepant with the previous findings in which B27 supertype was associated to resistance. This might be because of difference in observation period after infection of the studies or difference in genetic background of the patient ethnic group.

HLA-B*1507 was associated to long term survival upon HIV infection in our cohort. Although HLA-B*1507 encodes B62 serological antigen, data concerning binding peptide motif for this allele has not been available yet. Therefore, no supertype was designated for HLA-B*1507 (12). Bioinformatics has been applied to infer the supertype for the alleles without peptide binding data, but the results require to be confirmed by experiments (20). Analysis of escape mutations in HLA-B*1507 carriers would be helpful for understanding of the mechanism of resistance against HIV. On the contrary, we observed decreased frequency of HLA-B*5401 in the long-term survivors. LTNP group alone reached to significant level (not listed in the table). HLA-B*5401 were not evaluated in the previous studies with non-Asian ethnic groups, because the frequency of this allele is very low in the population. Because HLA-B*5401 belongs to B22 antigenic group together with B55 and B56

alleles, which were reported associate with rapid progression in MACS and other cohorts, this allele might be unfavorable for the host (18). This would be an important public issue because HLA-B*5401 is the second most prevalent allele in the Japanese, and also highly prevalent in China (21).

We collected samples from the cohort of HIV infected hemophiliac patients under close follow-up by multiple hospitals in Japan for over fifteen years. The number of the samples may not sufficient to reveal the presence of genetic factors with weak to moderate effect. It is not practical to increase the sample size to confirm our results without compromising sampling criteria. As approximately one third of hemophiliac patients who were exposed to contaminated blood products were actually infected with HIV in the early 1980s, there should be a group of hemophiliac patients who were exposed but sero-negative (ESN). Indeed, there were many hepatitis virus type C (HCV) carriers among hemophiliac patients presumably infected through blood products. A study with such ESN patients may provide us some other aspects of information on host-HIV interaction.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported in part by a grant from the Japanese Ministry of Health, Labor and Welfare and Human Frontier Program. Mwansa Munkanta was an exchange program student of the Japan International Cooperation Agency (JICA).

REFERENCES

1. UNAIDS. 2004. UNAIDS 2004 Report on the Global AIDS Epidemic. Available online at www.unaids.org/bangkok2004/report.html
2. Tatsunami, S., K. Fukutake, M. Taki, et al. 2000. Observed decline in the rate of death among Japanese hemophiliacs infected with HIV-1. *Int. J. Hematol.* 72:256–257.
3. Kihara, M., M. Ono-Kihara, M. Feldman, et al. 2003. HIV/AIDS surveillance in Japan, 1984–2000. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 32:S55–S62.
4. Schmitz, J.E., M.J. Kuroda, S. Santra, et al. 1999. Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8⁺ lymphocytes. *Science* 283:857–860.
5. Paroli, M., A. Propato, D. Accapezzato, et al. 2001. The immunology of HIV-infected long-term non-progressors—a current view. *Immunol. Lett.* 79:127–129.
6. Carrington, M., and S.J. O'Brien. 2003. The influence of HLA genotype on AIDS. *Annu. Rev. Med.* 54:535–551.
7. Woolf, B. 1955 On estimating the relation between blood groups and disease. *Ann. Hum. Genet.* 19:251–253.

8. Haldane, J.B.C. 1956. The estimation and significance of the logarithm of a ratio frequencies. *Ann. Hum. Genet.* 20: 309–311.
9. Yates, F. 1934. Contingency tables involving small numbers and the chi-square test. *J. R. Statist. Soc. S1*:217–235.
10. Stephens, H.A.F. 2005 HIV-1 diversity versus HLA class I polymorphism. *Trends Immunol.* 26:41–47.
11. Martin, M.P., X. Gao, J.-H. Lee, et al. 2002. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat. Genet.* 31:429–434.
12. Sette, A., and J. Sidney. 1999. Nine major HLA class I supertypes account for the vast preponderance of HLA-A and -B polymorphism. *Immunogenetics* 50:201–212.
13. Trachtenberg, E., B. Korber, C. Sollars, et al. 2003. Advantage of rare HLA supertype in HIV disease progression. *Nat. Med.* 9:928–935.
14. Smith, M.W., M. Dean, M. Carrington, et al. 1997. Contrasting genetic influence of CCR2 and CCR5 variants on HIV-1 infection and disease progression. *Science* 277:959–965.
15. Winkler, C., W. Modi, M.W. Smith, et al. 1998. Genetic restriction of AIDS pathogenesis by an SDF-1 chemokine gene variant *Science* 279:389–393.
16. Hendel, H., S. Caillat-Zucman, H. Lebeanec, et al. 1999. New class I and II HLA alleles strongly associated with opposite patterns of progression to AIDS. *J. Immunol.* 162: 6942–6946.
17. Carrington, M., G.W. Nelson, M.P. Martin, et al. 1999. HLA and HIV-1: heterozygote advantage and B*35-Cw*04 disadvantage. *Science* 283:1748–1752.
18. Dorak, M.T., J. Tang, S. Tang, et al. 2003. Influence of human leukocyte antigen-B22 alleles on the course of human immunodeficiency virus type 1 infection in 3 cohorts of white men. *J. Infect. Dis.* 188:856–863.
19. Kiepiela, P., A.J. Leslie, I. Honeyborne, et al. 2004. Dominant influence of HLA-B in mediating the potential co-evolution of HIV and HLA. *Nature* 432:769–774.
20. Doytchinova, I.A., P. Guan, and D.R. Flower. 2004. Identifying human MHC supertypes using bioinformatic methods. *J. Immunol.* 172:4314–4323.
21. Tokunaga, K., Y. Ishikawa, A. Ogawa, et al. 1997. Sequence-based association analysis of HLA class I and II alleles in Japanese supports conservation of common haplotypes. *Immunogenetics* 46:199–205.

Address reprint requests to:

Dr. Michio Yasunami

School of Biomedical Science

Tokyo Medical and Dental University

2-3-10 Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku

Tokyo 101-0062, Japan

E-mail: myasunam.tis@tmd.ac.jp

Received May 16, 2005; accepted June 6, 2005.

第18回日本エイズ学会会長シンポジウム記録

HIV 感染症と血友病

—回顧と展望—

三間屋純一¹⁾, 福武 勝幸²⁾, 西田 恭治³⁾, 出河 雅彦³⁾, 徳永 信一⁴⁾花井 十伍⁵⁾, 北村健太郎⁶⁾, 大西 赤人⁷⁾, 草田 央⁸⁾¹⁾ 静岡県立こども病院血液腫瘍科²⁾ 東京医科大学臨床検査医学講座³⁾ 朝日新聞社編集委員⁴⁾ 大阪 HIV 訴訟弁護団⁵⁾ 大阪 HIV 薬害訴訟原告団⁶⁾ 立命館大学先端総合学術研究科⁷⁾ むさしのヘモフィリア友の会⁸⁾ LAP (ライフ・エイズ・プロジェクト)

キーワード: 血友病, HIV 感染, 薬害エイズ, インフォームド・コンセント

日本エイズ学会誌 7: 61-76, 2005

I. はじめに

長年にわたり血友病医療に携わってきた私がエイズ学会お引き受けするにあたり、最も気を配ったのは「薬害エイズ問題」をいかに取り上げればよいかということでした。特に、この問題を取り上げる事により、血友病イコールエイズといった誤った風潮が再度世間に広まり、血友病患者および家族の方にご迷惑を掛けるのでは。しかし、既に多くのマスコミ関係の雑誌や一部医学雑誌において私を含め様々な立場で発言されているが、本当に正しく情報提供されているかは疑問のあるところです。以前より、私自身この問題は一度は医学会の場で取り上げるべきと考えていました。本シンポジウムでは、長年にわたり薬害エイズ問題に関わってこられた方々にそれぞれの立場で発言して戴き、改めて薬害エイズ—HIV 感染症と血友病—を検証することにより、今尚、医療現場で多発している医療事故を防止する手だては、患者家族と医師の理想的な関係は、など医療を取り巻く様々な問題解決の糸口になればと考え、あえてこのようなシンポジウムを企画した次第です。

II. オーバービュー (福武 勝幸)

「HIV 感染症と血友病——回顧と展望」というタイトルのシンポジウムを始める前に、これまでの歴史的な背景として血液製剤が血友病治療として使われてきた経緯を簡単

に紹介する。2003 年 1 月 31 月現在の調査で HIV に感染した血液凝固異常症の患者総数は 1,427 人であり、そのうち既に 572 人もの方々の尊い命を失った。血友病の治療を通じて HIV 感染を起こし、多くの方々に被害を及ぼした事実は、血友病医療にとって大変重大で深刻な問題であるが、この経験を今後の医療全体に生かすための問題整理と提案が今日のテーマである。私は平成 8 年の『日本医事新報』に、シンポジストの一人である西田とともに「輸入血液製剤による HIV 感染に関する一考察」という論文を発表した。三間屋総会長からこのシンポジウム企画の相談を受けて、客観的にこの問題を捉えて将来に生かすため、それぞれの演者の立場で意見を述べていただく機会とすることにした。

まず、血友病 A、血友病 B という非常に似た二つの病気について簡単に説明する。血友病が「出血しやすい」「出血すると止まらなくなってしまう」病気であるということは、おそらく多くの方が御存じだろう。怪我での止血困難、関節の中への自然に出血、また、時に頭蓋内出血を起こして命に関わる重篤な症状を呈する時もある。正常な身体の中では、血液を固める(血液凝固)ことで、出血を防いでいるが、血友病 A は第Ⅷ因子、血友病 B は第Ⅸ因子というタンパク質が生まれつき不足しているため、血液が固まりにくい。そのため止血が上手く行かず、出血症状が現れる。血友病の治療には、多くの人から集めた血液から採り出した第Ⅷ因子、第Ⅸ因子からなる血液製剤を使って、不足した成分を補う治療が必要であった。

一方、HIV 感染症の歴史は 1981 年に米国の男性同性愛者に免疫機能が低下して発生するカリニ肺炎が多発したこ

著者連絡先: 三間屋純一 (〒420-8660 静岡県漆山 860 静岡県立こども病院血液腫瘍科)
Fax: 054-247-6243

2005 年 6 月 6 日受付

とから始まった。翌 1982 年に米国 CDC はこの病態を後天性免疫不全症候群 (AIDS) と命名し、同年、3 人の血友病患者にも発症したことが報告された。そして、1983 年に原因ウイルスとして現在の HIV が発見され、この病態がウイルス感染による疾患であることが確認された。しかし、ウイルスの性質、流行実態、感染者の健康への影響などの詳細が判明するまでにはさらに時間を要した。血友病医療においては、血液製剤の利用について、客観的証拠のない初期の段階から強い悲観論と比較的楽観論とが入り乱れ、その後は続々と発表される当時の最新の知見と以前の知見が混在する形となった。そして、臨床現場から行政に至るまで、初期の判断を合理的に最適化・最新化する作業が円滑には進まなかった。この突然の HIV 感染症の発生と流行の結果、多くの血友病患者が血液凝固因子製剤を介して HIV に感染した。

血友病治療は、古くは新鮮な血液をそのまま輸血する全血輸血によって欠乏している凝固因子を補うことが行なわれた。そして、血漿を使う時代、クリオプレシピテートという初期の第Ⅷ因子製剤を使う時代を経て、1970 年代には、血友病 A は高度第Ⅷ因子濃縮製剤、血友病 B はプロトロンビン複合体が用いられるようになった。これらの製剤には大きな違いがありそれぞれ 1 人の人から得られた血液から作られるのに対して、高度濃縮製剤は何千人何万人という非常に多くの血液を集めて作られた。このため、従来の治療に較べて「感染症」のリスクが高くなった。しかし、他の面では製剤の質は改善され、アレルギー反応などの副作用が少なくなり、家庭治療の普及に貢献した。

1983 年は、肝炎防止のために開発された加熱第Ⅷ因子製剤がアメリカで承認された時期であったが、WFH (世界血友病連盟) の会議などでは、加熱血液製剤とエイズの原因との関連が明確でなかったため、それまでの非加熱製剤を必要に応じて使うこととされた。84 年には HIV 抗体検査が実用化され、エイズという病気を起こす前の感染している患者さんの存在が初めて判り、AIDS 症状のない HIV 感染症という概念が出てきた。84 年には加熱製剤が HIV 感染阻止に有効であることが報告され、85 年には、アメリカで非加熱製剤の製造が中止された。日本では、85 年、86 年にそれぞれ加熱第Ⅷ因子、第Ⅸ因子製剤が承認され、これで血液製剤による新たな HIV 感染の危険がなくなった。

このように、この病気が発生したのが 81 年以前と思われ、実際に日本の血友病患者の感染時期を調べた研究では、一番古い抗体陽性検体は 1979 年、平均的には、1983 年が多くの方の感染時期と考えられている。こうして、1985 年または 86 年までに患者に感染が広がった。感染率としては、1960 年代から 70 年代にかけて生まれた患者が 40% から 50% と高い割合を示している。一方、血液製剤の登場

によって、血友病患者の予後が改善した面もある。重症型血友病 A 患者の出生年別の人数では、クリオプレシピテートが登場した 60 年代の半ばから生存患者の数が増加し、高度濃縮製剤が登場した後、さらに増加しており、新しく生まれてくる患者さんの数は毎年それほど変わらないので、生存患者の数は増えている。同じように、プロトロンビン複合体製剤が登場した後、重症型血友病 B の患者さんの数も明らかに増加した。

薬剤や医療技術の進歩に伴って発生するリスクとベネフィット、この変化を共有し、周知することが今後の患者と医療者の関係における重大なテーマと考える。そして、それに迅速に対応する方策、またそれに対する報道の役割、そして、患者さんと医療者との関係が如何にあるべきかについて、未来へ活かすために展望する。何か事件が起きた時に、どのように危機を乗り越えて行くかを考えておくことが重要である。

人間の持つ知識や技術は年々進歩し、HIV に関する知見も例外ではなく、HIV が問題となり始めた 1980 年代初頭と 2004 年現在の医学的常識の違いには隔世の感がある。血液製剤も進歩を続け、現在は、ヒト血液から作るのではなく、人の遺伝子を動物の細胞に組み込むことによる遺伝子組み換え型製剤が作られ、より安全な製剤となっている。しかし、現在も変異型クロイツフェルトヤコブ病などの将来の予測が困難な危険要素は現れ続けており、過去の血液製剤による HIV 感染症について検証することは、今もなお重要な意義を持っていると考える。

いわゆる「薬害エイズ」と呼ばれる出来事は、民事訴訟として法律的には 1996 年 3 月に国・製薬企業と患者・原告団の和解という形で決着を迎えた。その後、8 年以上が経過し、医療と経済的な保障は一定の目的を達成しているが、それら以外については解決していない問題、新たに浮上した問題も多い。事態の発生以来、様々な立場からの分析や「真相究明」が試みられたが、多くは悲惨な状況に追い込まれた感染者の支援のために感情的とも言える主調が目立ち、その裏返しとして、行政・医師・企業に対しては批判・糾弾の色彩が強くなった。その結果、血友病患者は「官・学・産の癒着」による一方的犠牲者であったという構図が出来上がり、その構図に沿った解釈や分析は「事実」であり、反する解釈や分析は「虚偽」であるとの捉えられ方が一般に定着したように思われる。このような偏向が生じた一つの原因は、この出来事に極めて重要な役割を果たした医療者側からの発言が乏しかったことにある。損害賠償訴訟では、カルテ等の提供やその後の円滑な診療の継続が考慮されたため、国および製薬企業を対象とし、医師は責任追及の直接的対象から外された。それにより、事態解明に最も関わりの深かった多くの医師の沈黙を許容し、結

果的に既成の構図を補強することになった。また、このような受け入れられやすい構図を適切な検証作業もなしに安易に拡大再生産しつつげてきたマスメディア、ジャーナリズムなどの責任でもあると考える。

このシンポジウムは、この20年間にそれぞれ異なった立場で、血友病患者とHIV感染症の問題に関わってきた方々の意見や提言を聞き、また討論することで、この問題から得られた数多くの教訓を未来へ向けて真に役立つものとするための出発点としたい。

文 献

西田恭治, 福武勝幸: 輸入血液製剤によるHIV感染に関する一考察. 日本医事新報, No. 3775, p 53-p 55, 1996.

Ⅲ. 各シンポジストの発表内容

1. 医療の視点から (西田 恭治)

「血友病治療のための輸入血液製剤によるHIV感染」という問題を扱うためには、難しい条件が数多く存在する。その中で最も大きい要素は、事態の発生から既に20年以上の歳月が経過しているということである。当時の状況を冷静に振り返る作業は、相当な困難を要し、当然ながら関係者の記憶は不鮮明になり、また、無意識のうちにその記憶が塗り替えられている場合も容易に想定される。また、この問題を考えるに当たり、理解の幅も人によってかなりの差があると思われる。この機会に何かの結論を出そうとするのではなく、本シンポジウムが、今後の検証作業のための契機となることを願っている。

まず私は、「医療の視点から」として総論的提示を行なう。最初にお断わりしておく点として、今回のシンポジストは、それぞれに「視点」を明示してはいるものの、各分野の代表者という意味ではなく、個人の立場から発言するものである。シンポジストは、年齢や肩書きによってではなく、このシンポジウムの趣旨に沿った方々を選んで依頼した。私自身、この事態が発生した当時は、まだ卒後三年程度の医師だったに過ぎず、必ずしも当時の医師を代表しているわけではないことは明らかである。

血友病患者を襲ったHIV感染は、「薬害」として定着している。当初、私は、この「薬害」という言葉に非常に違和感を抱いた。「薬害」の定義自身は確立してないものの、そもそも短所が皆無の医療行為はあり得ない。従って、これによる被害の根絶は極めて難しいと考える。しかしながら、同時に、過去の不幸な出来事の経緯を冷静に検討し、それを将来に活かして行くことが必要である。

まず、血友病HIV感染に関する反省は、今日では当然のこととなっているインフォームド・コンセントや情報公開などの概念を推し進め、医療者や患者の自覚を促す大きな

契機となった。しかし、同時に、「産・官・学の癒着」という既成の構図の概念が流布し、医師をはじめとする専門家に対する過剰な不信が惹き起こされた。

また、機械的なインフォームド・コンセントや情報公開は、時として医療者の責任回避の手段となっている例も見受けられる。即ち、インフォームド・コンセントという概念は、適切な医療のためには不可欠なものであるが、往々にして誤って用いられる場合も存在する。

医療行為に対する理性的・合理的判断が損なわれるならば、結果としては、患者にとって大きな不利益を招きかねない。また、医療行為は長所と短所を併せ持ち、その取捨は、その時々科学的知見に基づく比較検討によってなされなければならない。過去の医療行為の当否を後年の知識によって判断することは、不適切である。しかしながら、後年の知識を排除し、当時の知見に立ち返って判断するという作業は非常な困難を伴うため、我々の常に苦慮するところである。

1983年前後の血友病とエイズに関わる事実関係、比較衡量について考える。この頃、エイズのウイルス感染は想像されていたけれども、病原体は未発見であり、潜伏期間も短期と推測されていた。ここで、潜伏期間という言葉を用いたが、現在、HIVに関して、このような言葉は使われない。しかし、当時は、エイズがウイルス感染であるとするならば、その潜伏期間は麻疹や風疹のように数週間なのか、数カ月なのか、あるいは年余に及んでしまうのかということが議論の的であった。

我々には、エイズの病原体の感染を確定する方法がなく、患者の発症数によって伝播を類推した。当然の事ながら、当時の発症率は低く、血友病治療においては、止血治療による患者のQOL維持・向上が優先された。つまり、結果的に見れば、当時の知識に基づき、リスクが低く見積もられ過ぎたと言わなければならない。

一方、非加熱濃縮製剤による血友病患者のQOL向上は、既に平均寿命の延長などの実績として現われていた。

加熱製剤はB型肝炎対策として開発されており、エイズ病原体への有効性については、楽観的な期待があったとはいえ、全く不確定なものだった。

米国においてさえ、1983年に加熱製剤が認可された後も、非加熱製剤は並行的に使用されていた。なぜなら、加熱製剤は認可されたものの高価格だったため、十分浸透しなかったからである。不確定な状況下、米国においても、医療従事者は比較衡量に苦慮していたことが窺われる。

しかし日本では、“1983年の認可を機会にアメリカでは加熱製剤に切り替わったのに、本邦では1985年の認可まで二年数カ月の空白が生じ、その間にHIV感染が広がった”という誤った構図が総てのメディアによって喧伝された。

当時、日本の臨床現場における決定は、一“権威者”の号令によるものではなく、海外の疫学的資料や文献、CDC、WFH などの方針に基づいていた。当然の事ながら、処方権は個々の医師が独立して持っているものであり、一“権威者”の号令で日本中の医師が右にならえするような事態はあり得なかったが、一般には、そのような大きな誤解が定着した。

個々の医師による独自の判断が後年から見れば結果的には正しかった例もあったにせよ、より失敗の少ない選択を行なうためには、医学的に広く認められた見解に基づいて判断することのほうが望ましいと考えられる。

1983 年前後における医療側の不備について示す。

新生児、小児、軽症者など、少ない単位数で治療可能な血友病患者に対し、米国では推奨されていたクリオ治療適応を日本の血友病専門医が十分に広めなかったこと。

米国産加熱製剤の治験が 1984 年まで遅れたこと。

加熱第 8 因子製剤の早期治験終了・認可を積極的に提唱しなかったこと（実際には、治験を途中で切り上げたが、より積極的に進められた可能性があった）。

同製剤認可後、旧非加熱製剤の速やかな使用中止、回収を徹底しなかったこと。

加熱第 9 因子製剤の治験を重ねて行なったこと。加熱第 9 因子製剤の治験は 1985 年に始まったが、少なくともその開始時点では、加熱製剤による HIV 不活化の有効性が臨床上也確認されており、それでもなお治験を重ねて行なう必要はなかったと考えられる。

私自身、二十数年前の出来事を振り返ることは非常に困難だが、関係者の証言を見聞きしていても、意識・無意識にかかわらず、後年の知識によって記憶が塗り替えられている例が多々ある。そのような要素を如何に排除し、冷静に客観的に検証するかが大切であると考え。

この問題を踏まえて、日本でもインフォームド・コンセントという概念が重要視されるようになった。しかし、未だに言葉だけが独り歩きしている嫌いがあり、どのようなインフォームド・コンセントが適切なのか、適切なインフォームド・コンセント自体が存在し得るものなのか、私も度々不安を感じている。

インフォームド・コンセントとは、一枚の紙で患者に警告を与えることにより、あたかも医者が免責されるかのように捉えられている面があるのではないだろうか。まず、患者の声に耳を傾けることが必要ではないかと考える。

医療における「展望」を述べる。

「葉害エイズ」においては、国民的な熱狂により、どこかでボタンがかけ違ってしまったと感じる。熱狂は理性的ではなく感情的な産物であり、たとえば、メディアに煽られて一旦燃え上がってしまうと、熱狂自身が権威を持ち、そ

れが人を引っ張って行く。今からでも遅くはないから、過去の出来事に対する合理的な検証こそが、今後の医療全般のために大切である。そして、その検証作業の実行に当たっては、あらゆるイデオロギーや利害が介在してはならず、これまでに行なわれてきたもの以上に地道な作業と謙虚な姿勢が求められる。

また、今後の医療の「展望」のためには、危機に際した際に、機動的かつ有機的に行動し得るシステム作りが重要と考える。我々は、何事かに直面した場合、楽観的なシナリオに頼りがちである。1983 年当時であれば、日本の血友病患者はエイズに感染しにくいのではないかと。1985 年当時であれば、中和抗体が存在して抗体陽性は必ずしも悪い状態を意味しないのではないかと。実際、このような見解も存在したのだが、そういう楽観的な見方に傾きがちな理性を欠いた側面を我々は持っていた。不確定な危機に当たって、如何に行動するかというシステムを作り上げることが非常に大切である。

最後に、私たちの目指すものは、『既成の構図』の踏襲・追認に留まることなく、新たな『血友病治療のための輸入血液製剤による HIV 感染を捉え直す試み』の構築であり、そして、「その最大の目的は、将来の医療に資する材料を導き出す事のみならず、広い分野において不確定な危機状況における行動規範の一助とならん」という点にある。

2. 報道の視点から（出河 雅彦）

報道の役割・使命は言うまでもなく「正しい」情報を伝えることである。しかし、情報量に限りがあれば、眼前で起きている事象の意味を常に正しく評価できるわけではない。

血友病患者の HIV 感染について言えば、① 血友病患者にリスクが迫っている時、社会の注意を喚起するような警告を発することができたか ② 感染被害者の実態を世の中に知らせることができたか ③ 原因説明が求められた時、検証に資する客観的な情報提供ができたか——という三点において、メディアは責任が問われる。②についてはある程度役割を果たしたが、①と③はいずれも不十分であり、時として本質からかけ離れることすらあった、というのが筆者の個人的見解である。

性質が少しずつ明らかになっていく未知の感染症のリスクを評価しながら、それまで有効と考えられてきた治療法継続の可否を判断する。それが、血友病 HIV 問題の一つの特質であった。メディアが①の役割を果たせなかったのは、まさにこの特質ゆえであった。ところが、あまりに悲惨な被害が明らかになった後は、不確実な状況下におけるリスク評価という問題の本質への想像力を欠き、被害の拡大を防ぐための情報提供ができなかったという、自らの

「過去」への反省もあって、虚心に事実と向き合うことなくいたずらに責任者探しに走った面があり、③についても反省すべき点が少なくないと考えている。

血友病患者の HIV 感染被害の発生、拡大は 1970 年代終わりから 80 年代なかばまでの長期間にわたったと考えられる。当時の行政や医療関係者、製薬会社の行動や意思決定を評価するに当たっては、疾病が発見されながらもその性質が不明であった初期の段階と、感染経路や発症のメカニズムがある程度解明された後期の段階とを分けて考える必要がある。それぞれの時代背景や医学研究の進展状況を見無視するわけにはいかないはずである。しかし、血液製剤による HIV 感染問題は、一般には次のように単純化された構図で理解されている。

「リスクを認識しながら製薬会社は自分たちの利益のために販売を続けた」

「医師は製薬会社の利益を守るために患者を犠牲にした」

「厚生省は薬事法に基づく規制権を持っていながら必要な対策を取らなかった」

要は、三者とも危険を承知で血液製剤を供給・使用し続けた、というところである。

このような一般的認識が定着するきっかけの一つとなったのが、民事の HIV 訴訟の和解交渉にあたって裁判所が出した所見である。HIV 感染問題にとって非常に重要な意味を持つ 1983 年（この年、旧厚生省がエイズ研究班を組織した）の状況について裁判所は、「ウイルスで伝播することがほとんど常識となっていた」「国は献血によって濃縮製剤やクリオ製剤を供給すべきだった」「加熱製剤の輸入あるいはアメリカ由来の原料血漿による非加熱製剤の停止の措置をとることが期待された」と述べている。こうした対策が漏れなく実施されていれば、確かに感染被害は相当程度減らすことができたと思われる。

メディアとしては、①エイズ伝播の可能性のある輸入血液製剤の危険性 ②日本が血液製剤原料を海外に依存している実態 ③国内血液を確保するため、当時大量に使われていた FFP（新鮮凍結血漿）の使用抑制 ④献血の増量——などを指摘すべきであった。しかし実際には、こうした報道は皆無と言ってよい。

エイズ研究班の第 1 回会議が開かれた 83 年 6 月から第 2 回会議のあった同年 7 月にかけて、朝日新聞紙上にはエイズの記事が 11 本掲載されたが、血友病患者のリスクにはほとんど触れていない。それ以降も、国内外含めエイズに関するニュースの多くは「ベタ記事」扱いで、ほとんど目につくものではなかった。メディアもまた、迫りつつあったリスクの本質を理解できていなかったわけである。

リスク評価が困難であった 83 年はともかく、その後のエイズ研究の進展状況や海外の血液安全対策に関する追跡

も怠ったことは反省を迫られる点である。

84 年秋には米国の CDC が加熱製剤のエイズウイルス不活化効果についての研究データを公表し、米国の血友病治療ガイドラインに影響を与えた。しかし日本では、「加熱製剤への転換の必要性」を訴える記事は、少なくとも朝日新聞紙上には掲載されていない。

さらに、日本で実際に加熱製剤が認可された 85 年 7 月、朝日新聞は「加熱製剤が異例のスピード審査で承認された」と報じたが、のちに問題となる非加熱製剤の回収の必要性について問題提起することはなかった。

被害の原因説明について報道はどのような役割を果たしたであろうか。

民事の和解交渉が始まった 95 年から、80 年代の政策決定がどのように行なわれたかを究明しようと各メディアは競い合うように記事を書いた。96 年 1 月に就任した菅直人厚生大臣は省内にあった、83 年以降のエイズ関係資料を公表した。厚生省がそれまで「確認できない」と説明していた資料が見つかったことで、「資料隠し」に対する厳しい責任追及がメディアによってなされた。しかし、公表された資料をもとに 83 年当時の状況を冷静に振り返ろうとする報道は極めて限られていた。

厚生省に対する国民の怒りを追い風に検察当局は刑事責任の追及に乗り出し、厚生省の松村明仁・元生物製剤課長、帝京大の安部英・元副学長、旧ミドリ十字の松下廉蔵・元社長ら歴代 3 社長の計 5 人を業務上過失致死罪で起訴した。97 年 3 月から始まった刑事事件の公判は、血友病 HIV の被害拡大のプロセスが解明される場となり、捜査資料や関係者の法廷証言により、多くの新事実が明らかになった。皮肉にも、この刑事裁判を通じて 83 年当時のエイズをめぐる「不確実な状況」と政策決定の困難さが鮮明になったと筆者は考えている。

捜査の結果、メディアが定説のように報じてきた「事実」が覆ってしまった例もある。その代表例は、83 年の汚染血液製剤回収報告に関するものである。

83 年 6 月、アメリカの製薬会社が、供血後にエイズを発症した患者の血液が混ざった製剤を回収すると厚生省に報告したが、当時の厚生省の郡司篤晃・生物課長（松村元課長の前任者）はその事実をエイズ研究班には伝えず隠蔽していた、という「事実」が繰り返し報道されてきた。これが問題視された大きな理由は、一部のエイズ研究班員がメディアに対し、「もし報告してくれていたなら、エイズ対策は進んでいただろう」と話していたからであった。

この回収問題を最初に報じた NHK の特集番組「埋もれたエイズ報告」（94 年放映）は民事の HIV 訴訟の法廷でも証拠採用された。『薬害エイズ裁判史』（2002 年 8 月、東京 HIV 訴訟弁護団編）は法廷での検証場面について、「被告

側がいかに製剤の危険性を承知しながら情報を隠蔽して被害を拡大してきたか」と記述している。

ところが、実際には回収の事実がエイズ研究班に報告されていた。東京地検が厚生省の家宅捜索で研究班会議の録音テープを押収し、98年7月に開かれた松村元課長の公判に提出したことで事実関係が判明した。

メディアはHIV感染者の被害実態については繰り返し報道し、民事訴訟の和解やエイズ治療体制の充実、情報公開制度の導入などに一定の役割を果たした。しかし、83年から85年の重要な時期において、血友病患者に迫っていたリスクについて警告する役割をほとんど果たせなかった。過去を検証する際にも、不確実な状況の下でのリスク評価の困難さを意識することがほとんどなかった。

報道には、ある課題を一般の人々に知ってもらい、それによって物事を前に進める力がある。問題提起をする時点では必ずしも100パーセントの情報を得ることはできないため、不正確な内容とならざるを得ないことが多い。そのこと自身は一概に非難されるべきではないだろう。しかし、「定説」が覆った後も既成のストーリーに疑問を抱かなければ、過去から正しい教訓をくみ取ることはできない。

血液製剤によるHIV感染問題は、リスクの中身がはっきりした後に対策をとったのでは手遅れになることがある、ということを我々に教えた。継続的なリスク評価と対策の見直し、最新の医学研究や海外の規制当局の動向に常に目を光らせることの必要性も示した。

人の健康を脅かす新しい疾病はいまも次々と現れている。不確実な状況であったとしても、後から振り返れば決定的に重要なタイミングを逃してしまったHIV問題の教訓を生かすためには、当時の政策決定過程を、偏見を持たずに見つめ直すことが必要であると考えます。

3. 司法の視点から（徳永 信一）

弁護士の徳永です。大阪HIV訴訟弁護団の一員として、この「薬害エイズ」という問題に関わってきました。そういう立場から、この問題、とりわけ「産・官・学の癒着」構造を中心に司法の視点から採り上げたいと思います。

まず、「薬害エイズ」という言葉を使いますが、先ほど西田先生から御指摘がありましたけれども、色々と問題を含む言葉であることは承知しております。ここでは、社会現象としての意味も含めてこの問題を採り上げようと思うので、あえて「薬害エイズ」という言葉を使わせていただきます。

「産・官・学の癒着」とは何の事を言うのかですが、概ね日本が持つ医療社会の特殊性の象徴という意味合いで捉えられるかと思います。主に次の三点、即ち――

・官僚の天下り（例として、薬務局長だった松下廉蔵が製

薬会社ミドリ十字の社長に収まっていたこと）

・薬価差益（薬を使えば使うほど病院・医者が利益を上げること）

・審議会政治（政策課題につき、御用学者を召集して審議会、委員会等に諮り、予め役人が決めている路線に従った答申を出させ、シナリオ通りに政策を決定していくこと）――このようなものによって、医療政策・医療世界が歪められているのではないかという見方です。

この「産・官・学の癒着」というわかりやすい構造がマスコミによって流布され、それが日本の悪しき利権政治による被害者として捉えられたため、「薬害エイズ」が国民一般に受容され、一気に社会問題化したということがあります。このことは、「産・官・学の癒着」と「薬害エイズ」という言葉のセットによるメリットと私は捉えています。

しかしながら、他方で、この構図の流布により、血液製剤によるHIV感染とは、日本の特殊事情というよりも、実はむしろ世界規模の広がりを持っていて、先進技術・先進医療が孕んでいるグローバルな危険が現実化した問題なのだという視点が忘却されたのではないかという気がしており、この点がマイナスだったと認識しています。

この「産・官・学の癒着」構造を体現する人物として、安部英・元帝京大教授が刑事責任を問われました。御承知のように、安部元教授は、血友病治療の権威者でありました。そして、被害者の遺族によって殺人罪で告訴され、東京地検は業務上過失致死罪で東京地裁に訴追したわけです。この裁判に対する判決が平成13年3月28日に下され、結論は無罪となりました。この判決は、大変大きなインパクトを持って世間に受け止められました。この無罪判決の論理を簡単に説明させていただきます。

まず、業務上過失致死罪における過失責任があるかないかの判断基準を「通常の血友病専門医の注意能力」に置く考え方を採用しました。続いて、先ほど西田先生からも指摘された「比較衡量」の視点を取り入れています。医療は常に危険と隣り合わせであり、必ず副作用を伴うものであるという観点に立てば、危険認識があるというだけで医師の責任を問うわけには行きません。

本件では、非加熱製剤が持っているエイズに感染する危険性と、クリオ製剤が持っている治療上の効能とを比較して、どちらを優先するか。危険性が上回るのであればクリオで治療すべきであったし、クリオの効能がどうしてもダメであれば――たとえ危険性があっても――非加熱製剤による治療が合理性・妥当性を持ってくる場合があるわけです。

そうしてこの「比較衡量」の視点は、とりもなおさず「医療の裁量」という問題になってきます。まさしくエイズに感染する危険性の予見可能性について、高い確率でHIV