

- Krawczynski, K.Z., Alter, H., Koonin, E., Gallagher, M., Alter, M., Hadziyannis, S., Karayiannis, P., Fung, K., Nakatsuji, Y., Shih, J.W.K., Young, L., Piatak, M., Jr., Hoover, C., Fernandez, J., Chen, S., Zou, J.C., Morris, T., Hyams, K.C., Ismay, S., Lifson, J.D., Hess, G., Fong, S.K.H., Thomas, H., Bradley, D., Margolis, H., and Kim, J.P. 1996. Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent. *Science* **271**: 505–508.
- 13) Liu, H.F., Teng, C.W., Fukuda, Y., Nakano, I., Hayashi, K., Takamatsu, J., Goubau, P., and Toyoda, H. 2003. A novel subtype of GB virus C/hepatitis G virus genotype I detected uniquely in patients with hemophilia in Japan. *J. Med. Virol.* **71**: 385–390.
- 14) Moriyama, M., Zi-Yi, Z., Longren, W., Xueqing, W., Ohshiro, S., Iwasaki, H., Ichijima, S., Iwaguchi, K., Matsu-mura, H., Sugitani, M., Komiyama, K., and Arakawa, Y. 2001. Clinico-epidemiological study of GBV-C/HGV infection in Tokyo metropolitan, and Nanjing and Yanbian cities in the People's Republic of China. *Hepatol. Res.* **21**: 268–279.
- 15) Muerhoff, A.S., Simons, J.N., Leary, T.P., Erker, J.C., Chalmers, M.L., Pilot-Matias, T.J., Dawson, G.J., Desai, S.M., and Mushahwar, I.K. 1996. Sequence heterogeneity within the 5'-terminal region of the hepatitis GB virus C genome and evidence for genotypes. *J. Hepatol.* **25**: 379–384.
- 16) Naito, H., Win, K.M., and Abe, K. 1999. Identification of a novel genotype of hepatitis G virus in Southeast Asia. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 1217–1220.
- 17) Ozdarendeli, A., Toroman, Z.A., Kalkan, A., Kilic, S.S., Ozden, M., and Doymaz, M.Z. 2005. Prevalence and genotypes of hepatitis G virus among hemodialysis patients in Eastern Anatolia, Turkey. *Med. Princ. Pract.* **14**: 102–106.
- 18) Quiros-Roldan, E., Maroto, M.C., Torti, C., Moretti, F., Casari, S., Pan, A., and Carosi, G. 2002. No evidence of beneficial effect of GV virus type C infection on the course of HIV infection. *AIDS* **16**: 1430–1431.
- 19) Ryt-Hansen, R., Katzenstein, T.L., Gerstoft, J., and Eugen-Olsen, J. 2006. No influence of GB virus C on disease progression in a Danish cohort of HIV-infected men. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **22**: 496–498.
- 20) Simons, J.N., Leary, T.P., Dawson, G.J., Pilot-Matias, T.J., Muerhoff, A.S., Schlauder, G.G., Desai, S.M., and Mushahwar, I.K. 1995. Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis. *Nat. Med.* **1**: 564–569.
- 21) Souza, I.E., Zhang, W., Diaz, R.S., Chaloner, K., Klinzman, D., and Stapleton, J.T. 2006. Effect of GB virus C on response to antiretroviral therapy in HIV-infected Brazilians. *HIV Med.* **7**: 25–31.
- 22) Tillmann, H.L., Heiken, H., Knapik-Botor, A., Heringlake, S., Ockenga, J., Wilber, J., Goergen, B., Detmer, J., McMorrow, M., Stoll, M., Schmidt, R.E., and Manns, M. 2001. Infection with GB virus C and reduced mortality among HIV-infected patients. *N. Engl. J. Med.* **345**: 715–724.
- 23) Toyoda, H., Takahashi, I., Fukuda, Y., Hayakawa, T., and Takamatsu, J. 2000. Comparison of characteristics between patients with GB virus C/hepatitis G virus (GBV-C/HGV) RNA and those with GBV-C/HGV E2-antibody in patients with hemophilia. *J. Med. Virol.* **60**: 34–38.
- 24) Tucker, T.J., Smuts, H., Eickhaus, P., Robson, S.C., and Kirsch, R.E. 1999. Molecular characterization of the 5' non-coding region of South African GBV-C/HGV isolates: major deletion and evidence for a fourth genotype. *J. Med. Virol.* **59**: 52–59.
- 25) Xiang, J., George, S.L., Wunschmann, S., Chang, Q., Klinzman, D., and Stapleton, J.T. 2004. Inhibition of HIV-1 replication by GB virus C infection through increases in RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , and SDF-1. *Lancet* **363**: 2040–2046.
- 26) Xiang, J., Wunschmann, S., Diekema, D.J., Klinzman, D., Patrick, K.D., George, S.L., and Stapleton, J.T. 2001. Effect of coinfection with GB virus C on survival among patients with HIV infection. *N. Engl. J. Med.* **345**: 707–714.
- 27) Yu, M.L., Chuang, W.L., Wang, L.Y., Dai, C.Y., Chiou, S.S., Sung, M.H., Chang, C.S., Shen, S.C., Wang, C.S., Chang, T.T., and Chang, W.Y. 2000. Status and natural course of GB virus C/hepatitis G virus infection among high-risk groups and volunteer blood donors in Taiwan. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **15**: 1404–1410.
- 28) Zhu, W.F., Yin, L.M., Li, P., Huang, J., and Zhuang, H. 2003. Pathogenicity of GB virus C on virus hepatitis and hemodialysis patients. *World J. Gastroenterol.* **9**: 1739–1742.

## 総説

## エイズ・HIV 感染症患者の診療と今後の課題

濱口元洋\*

## はじめに

HIV 感染症はますます増え続けており、2005 年末には世界で4,030万人の感染者がいると推定されている<sup>1)</sup>。日本においても例にもれず、血液製剤による HIV 感染以外で10,000人を越えた。名古屋を中心とする東海地方も HIV 感染症患者が増加しており、今尚“いきなりエイズ”で病院に受診される患者も増えている。我々はそういった患者に良質の医療を提供するとともに、一方で新規 HIV 感染症患者の発生を予防しなければならない。医療の提供や予防対策の実践は、現存する医療および予防体制の中で行わざるを得ない。現存する医療および予防体制を、より効果的な予防対策の実践のために絶えず改善し続ける必要がある。

本稿では現存する医療および予防体制にどのような問題が存在するかを明らかにするとともに、それらの問題を解決するにはどのような対応策が必要かを研究し、提言する。

HIV 感染症患者の増大はブロック拠点病院への患者集中というかたちとなって現れている。ブロック内の拠点病院の診療体制のさらなる整備を図るための具体策を見出すことが、結果として患者の偏りが是正されると期待される。

## 研究方法

- 1) ブロック拠点病院である国立病院機構名古屋医療センターの患者動向解析と問題点の抽出

愛知、岐阜、三重の3県の患者の多くは名古屋医療センターを受診しているが、静岡県ではいくつかの拠点病院を中心に HIV 診療が行われている。したがって、名古屋医療センターの患者動向は上記3県の患者動向を代表すると考えられる。そこで、平成17年度の名古屋医療センターの患者動向を、新規患者の年次推移、感染経路別内訳、国籍別内訳、性年齢別内訳、エイズ発症者の割合、診断の経緯、新規患者の薬剤耐性ウイルスの保有率、などの観点から解析する。

- 2) 知的障害もしくは身体障害を伴った HIV 感染症患者の施設入所に関する実態調査

中枢神経系の合併症にて認知障害、知的障害を発症した HIV 感染症患者の障害者施設への入所は非常に難しく、入所拒否の事例がたびたび認められている。そこで、それらの患者ならびに家族から実体を調査し、その解決方法につき検討する。

- 3) ブロック内の拠点病院および協力病院との連携

東海4県の45拠点病院と各県で定められた総計69協力病院の計119病院におけるこれまでの HIV 感染症患者の診療実績と名古屋医療センターへの紹介など連携について詳細に検討する。

## 研究結果

- 1) 東海ブロック拠点病院である国立病院機構名古屋医療センターの患者動向解析と問題点の抽出

\* 国立病院機構名古屋医療センター  
臨床研究センター止血血栓研究部長  
(はまぐち もとひろ)

1994年に最初の HIV 感染症患者の診療を開始してから、2005年12月31日までに総計466名の患者が国立病院機構名古屋医療センターを受診した。毎年の新規患者数は図1に示すように年々増加し、2005年は過去最高の86名が来院した。ここ2年間で171名となり、総数の1/3強となる。東海地方では HIV 感染症患者は確実に増加していると結論付けられる。

感染経路別では、同性間性的接触による感染が最も多く223名を数える。両性間性的接触による28名を加えると、男性同性間の感染が251名(62%)を占める(表1)。2005年の男性新規患者80名のうち76%の61名が同性間性的接触(両性間も含む)によるものであり、同性間性的接触による感染はますます増加している。

国籍別では97名(20.8%)が外国籍患者で、南米、東南アジア、アフリカの順で多かった(表2)。オーバーステイとなっている患者もいるが、最近の企業の外国人雇用により、社会保険

を持つ外国人患者がほとんどであった。

年齢別では20代、30代がもっとも多いが、50代以上の患者も72名(15.5%)存在し、2005年は22%と増えている。最高齢患者は73歳であった。性別では、男性407名(87.3%)、女性59名(12.7%)で、2005年は男性80名(93.0%)であった(図2)。女性59名のうち外国籍患者は37名(62.7%)を占めた。

2004年、2005年の新規患者171例のうち、初診時 AIDS 発症者は46名(27%)であり、50歳以上の症例に絞ってみると34人中18例、53%と非常に高率であり、50歳以上の患者が、症状が出現するまで病院や保健所での HIV 抗体検査を受けていないという実体が浮かび上がる。

一方で HIV 感染症の最初の診断をどこで受けたか、という診断の経緯を調査した結果では、病院および医院において主治医の判断で HIV 抗体検査をする場合がほとんどであり、HIV 感染症を念頭にして診療すべき事態となってい

図1 年次別新規患者数

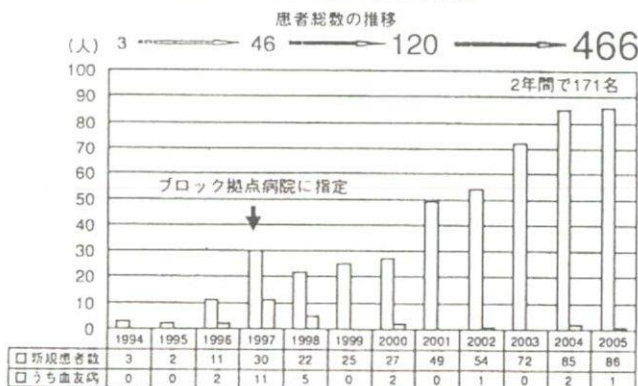


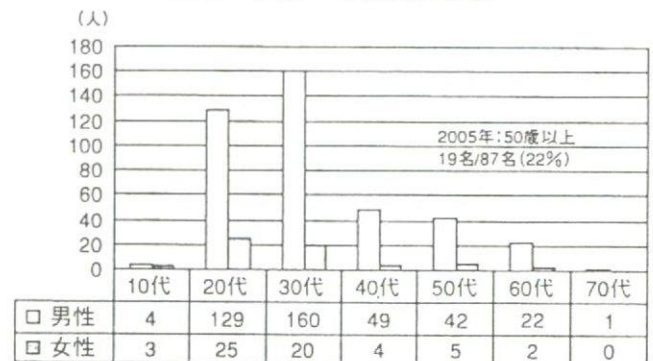
表1 感染経路

感染経路	計	男	女
血液製剤	24	24	0
同性間性的接触	223	223	0
異性間性的接触	128	73	55
両性間性的接触	28	28	0
麻薬	7	5	2
不明	55	54	1
その他	1	0	1
計	466	407	59

表2 国籍別患者数

国籍	計	男	女
日本	369	347	22
東アジア	4	3	1
東南・南アジア	18	8	10
北米	4	4	0
南米	51	33	18
アフリカ	18	12	6
ロシア	2	0	2
計	466	407	59

図2 性別・年齢別患者数



る。しかし、血液センターでの献血時に HIV 感染症が判明する症例が2004年4例、2005年5例と増加しており、献血の場における対策が重要な課題となってきた。

現在、名古屋医療センターでは HIV 感染症診療には HIV 診療チームという体制をとっている。医師3名（感染症科医師2名、血液内科医師1名）、コーディネーターナース2名、薬剤師3名にエイズ予防財団から派遣のカウンセラー1名、情報担当官1名で構成される。HIV 診療には精神的な問題を抱える患者が多く、カウンセリングは最も重要な要素である。各 HIV 診療拠点病院でこのようなチーム体制はほとんどとれておらず、カウンセラーも常駐しない現状では患者のトータルケアという点からするとまだまだ不十分と言わざるを得ない。

HIV 感染症・エイズ患者に対する薬物療法 (HAART: highly active anti-retrovirus therapy) は年々新規薬剤の開発・販売がなされ、患者にとって QOL の観点からかなりよくなりつつある。1日1回法で、且つ、1日4錠でよい組み合わせもできるようになった。しかしながら、HIV を排除できる、治療できる状況ではなく、患者側からすると飲み疲れという精神的な問題、薬剤そのものによる副作用の問題が深刻となる。

1999年以降、名古屋医療センターを受診した新規患者を対象に、治療前の薬剤耐性ウイルス

保有率を検討した。V118I の変異を Major なウイルス耐性変異と見なさない傾向が最近あり、それを考慮した検出頻度では、ここ7年間で平均5.9%の耐性ウイルス保有率であった(図4)。つまり、薬剤服用が十分なされないので、ウイルスが薬剤耐性遺伝子変異を起こし、他の人にそのウイルスを感染させるという事態が続いているのである。

以上、名古屋医療センターの患者動向を解析したが、その結果から次の問題点を抽出することができる。

- ① 患者数の増加、特に男性同性愛者 (MSM: Men who have Sex with Men) の増加が顕著で、彼らに対する予防啓発の徹底が必要である。特に50歳以上の症例に対する予防啓発をどのようにしていくかが急務である。
- ② 外国籍患者が依然として多く、彼らに対する診療上のサポートが必要である。
- ③ 初診時に AIDS と診断される症例が多く、早期診断が求められる。
- ④ 病院や医院で診断される症例が多く、医療従事者に対するより一層の情報提供が重要である。一方で献血での HIV 感染症患者の判明率が増加しており大きな問題となりつつある。
- ⑤ 薬剤耐性ウイルスを保有する新規患者は平均5.9%の出現率であり、注意が必要である。

図3 2004、05年新規患者の初診時 CD4 数

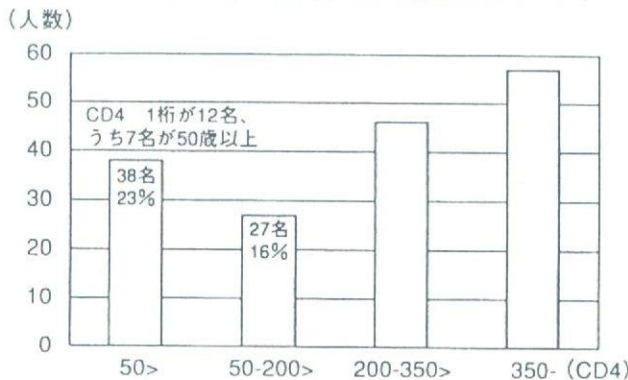
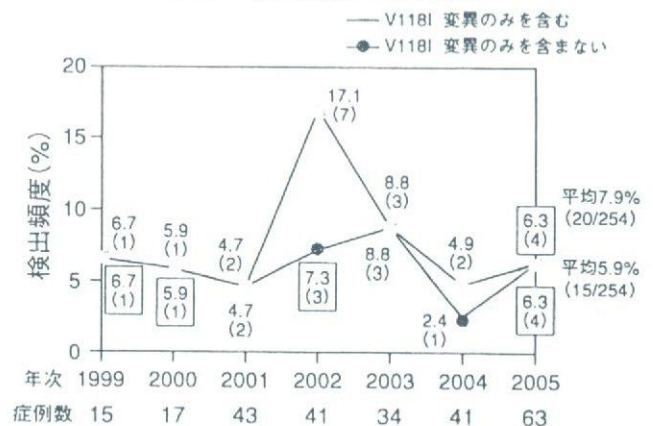


図4 検出頻度の年次推移



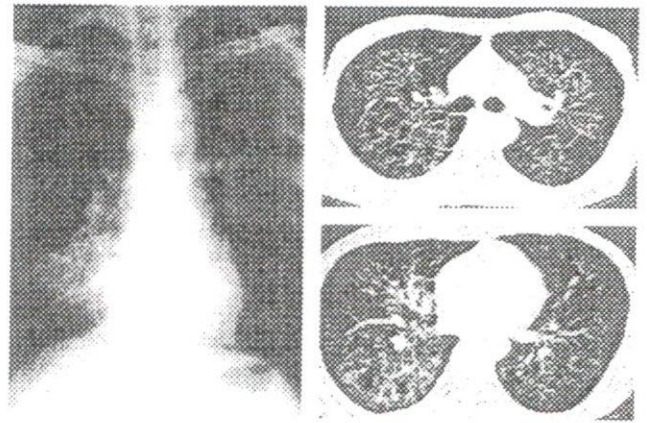
## 2) HIV/AIDS 感染者の症例

最近経験した症例の中で、日常よく経験するも注意が必要な症例について報告する。

症例 1：28歳、男性。国籍はナイジェリア。主訴：右頸部リンパ節腫脹（径5×8 cm大）。現病歴：右頸部のリンパ節が腫れてきた。どんどん大きくなり、近くの病院受診。そこで、自分は HIV 感染の可能性があると話され、HIV-2 陽性と判明し、悪性リンパ腫の合併を疑われ、当院紹介受診となる。検査所見：HIV-1/2 Ab (+)、HIV-1 RNA = 50 > copy/mL、CD 4 = 241/uL、WBC3,900、RBC454×10<sup>4</sup>、Hb12.3g/dL、Plts34.6×10<sup>4</sup>、IL-2 R = 3,116 U/mL、AST/ALT = 42/31、LDH = 414、CRP = 5.77、TPHA = 80 >、HBsAg (-)、HBsAb (-)、HCV-Ab (-)。HIV-2 の Western Blot (WB) 陽性。右頸部リンパ節の生検を依頼。結果は広範な乾酪壊死巣を伴う肉芽腫性病変によって占められ、悪性リンパ腫の所見は認められなかった。Ziehl-Neelsen 染色にて陽性桿菌が1個確認され、リンパ節の結核 PCR 結果が陽性より結核性リンパ節炎と診断した。INH、RFP、EB 投与にてリンパ節腫脹軽快した。HIV 感染症患者では、最近、結核に罹患する症例が増えてきている。それも肺結核というのではなく、結核性リンパ節炎や粟粒結核のかたちとなる場合が多い。

症例 2：42歳、男性。主訴：発熱、呼吸困難。現病歴：食思不振、るいそう著明（58kgから48kgへ）。39℃の発熱と呼吸困難を来たしたため、近医受診。WBC13,200、CRP = 4.6。白血球分画でリンパ芽球を認めるとのことで、白血病を疑われ、当院血液内科紹介受診となる。25年のMSM 歴あり。初診時検査所見：WBC12,300 (blast 0%)、RBC322×10<sup>4</sup>、Hb8.7g/dL、Plts 53.4×10<sup>4</sup>、AST/ALT = 46/21、LDH = 472、RPR (+)、TPHA (+)、HBsAg (-)、HCV-Ab (-)、HIV-1/2 Ab (+)、HIV-1 RNA = 1.9

図5 症例2の胸部 X-P、胸部 CT 写真



×10<sup>5</sup>、CD 4 = 515/uL、βD-glucan = 503 pg/mL、HIV-1 WB (+)、クラミジア IgA、IgG = (+)。CD 4 はその後すぐに200以下と低下した。胸部写真、胸部 CT を示す (図5)。ニューモシステイス肺炎と診断し、バクタ12T+PSL 60mg (3日間) 内服などにて軽快した。ウイルス疾患時には異型リンパ球が出現することもあり、白血病と考えられる場合もある。ニューモシステイス肺炎は高頻度に合併する疾患で (以前はカリニー肺炎と呼んでいた)、間質性肺炎像を認め、CT での診断が比較的容易である。βD-glucan が高値となるのが特徴である。

症例 3：37歳、男性。主訴：頭痛、嘔気。現病歴：献血に行き、検査にて HIV 陽性と判明する (HIV-20pool NAT)。HIV 抗体 (PA 法) は陰性。当院紹介受診するが、その後激しい頭痛出現し、緊急外来受診し入院となる。初診時検査：WBC3,500、RBC423×10<sup>4</sup>、Hb13.5g/dL、Plts19.8×10<sup>4</sup>、CRP0.18、AST/ALT = 22/29、HIV-1 RNA = 1.4×10<sup>5</sup>、CD 4 = 210/uL、HIV-1/2 Ab (+)、HBsAg (-)、HBsAb (-)、HCV-Ab (-)、HIV-1 (WB) はまだ陰性であった。髄液検査で細胞数2,400と単核球増加が認められ、急性期 HIV ウイルス性髄膜炎と診断した。名古屋医療センターの新規 HIV 患者の中で以前に激しい頭痛のため病院を受診し、無菌性髄膜炎と診断され、入院治療を受けたが、その時に HIV 感染症については検査さ

れなかった症例が何例か認められている。髄膜炎の原因の1つに HIV を念頭に入れるべきである。

### 3) 知的障害もしくは身体障害を伴った HIV 感染症患者の施設入所に関する実態調査

AIDS を発症した患者の中には、HIV 脳症、PML (進行性多巣性白質脳症)、トキソプラズマ脳症など中枢神経障害を呈し、認知障害を伴う症例が多く認められてきている。これらの患者は長期入院治療を余儀なくされるが、一旦、病状が安定してしまうと、医学的には急性期病院で入院治療を行う適応ではなく、慢性期医療のための療養型病床もしくは障害者入所施設、あるいは介護施設への入所が適応となる。しかし、現実には HIV 感染症を有するためにこれらの施設への入所が極めて困難で、急性期病院で長期入院となっている症例が増えてきている。

3カ月を超える長期入院患者は東海ブロックでは12名に上り、その疾患は脳悪性リンパ腫、HIV 脳症、PML、トキソプラズマ脳症、ニューモシスティス肺炎などである。

今後も障害者、介護施設への情報伝達と啓発を引き続き行っていかなければならない。

### 4) ブロック内の拠点病院および協力病院との連携

2005年4月に東海ブロック拠点病院にアンケート調査を実施した。回答率は全45施設中32施設(71%)であった。

まだまだ拠点病院においても診療体制が確立されていない施設も5施設あり、そういった施設は拠点病院からはずれたいと意向を示した。一方、自施設で積極的に HIV 感染症患者を診療する施設が18施設あった。患者はある一定の施設に集中しており、東海ブロックではブロック拠点病院である名古屋医療センターへの集中が顕著である。

ブロック拠点病院で行う講演会、連絡協議会だけでは不十分であるので、個別の医師、看護

師などを対象とした研修プログラムを作成し、研修を積極的に受け入れる。さらには、出張的に拠点病院においてケーススタディなどの症例検討会、講演会を開催し、各拠点病院の HIV 診療の充実を図りたい。そして名古屋医療センターと拠点病院や協力病院あるいは診療所とのあらたな連携と役割分担を探る必要がある。

### 考 察

1994年に最初の HIV 感染症患者の診療を始めてから、2005年12月31日までに総数466名に上る患者が名古屋医療センターを受診した。新規患者は毎年増加しており、昨年(2005年)は86名の患者があらたに受診した。東京、大阪に次いで名古屋は3番目に HIV 感染症患者の多い地域である。2005年の集計による患者の感染経路別内訳は、ほとんどが性感染によるもの、中でも男性同性間性的接触によるものももっとも多く、両性間性的接触によるものを合わせると62%となる。そして、この傾向は年々高まっており、昨年1年間を見ても男性同性間性的接触による感染経路が76%となっている。さらに感染経路不明の患者の多くは男性同性間の性的接触によるものと推定されるし、異性間性的接触と表明した患者の一部は同性間による可能性も考えられる。すなわち、患者のほぼ80%にあたる相当な数が男性同性間性的接触による感染と推測されるのである。

このことから感染予防対策は、特に男性同性間の感染予防が重点的に行われるべきであり、現在、市川誠一名古屋市立大学教授による「男性同性間の HIV 感染予防対策とその推進に関する研究」が進められている<sup>2)</sup>が、市川班との情報交換や共同研究が必要な時期に来ている。また、エイズ発症で初めて HIV 感染が判明する患者数が多いため、HIV 抗体検査の一層の普及は急務の課題である。名古屋市において栄中心部のビル内で、2004年7月から休日エイズ抗体無料即日検査が月2回始まり、1日50名を超える盛況振りである。そこから2005年12月までに6名の HIV 感染症患

者が見つかっている。

名古屋医療センターには外国籍患者が比較的多い。東海地方の大企業で働く出稼ぎの外国人が増えているのである。名古屋では南米、東南アジア、アフリカの順で多く、ブラジル以外の諸国の患者の中にはオーバーステイで、医療費支払い上の問題が存在する。また、言葉や日本での生活上の問題に対する支援も必要になるし、母国の医療事情を知ることも帰国の際に重要となる。NGOや通訳者の確保の問題が依然山積である。

名古屋医療センターの HIV 感染症患者の年齢分布では、20代、30代の性的にアクティブな年齢層が大半を占めるが、50歳代以上の年齢層にも感染が拡大していることが認められる。最近50歳以上の“いきなりエイズ”がエイズ発症者の53%を占めている。その理由として、この年齢層に HIV 関連情報が十分行き渡っていないのと、この年齢層の人々が HIV 抗体検査を受けにくい環境が存在すると考えられる。今後の対策としては、HIV 関連情報を若い人のみならずすべての人々に発信する努力をすることと、HIV 抗体検査体制の改善が必要となる。

HIV 抗体検査環境の改善に関して、病院・医院における HIV 抗体検査の無料化の実現を対策として提言したい。無料抗体検査を保健所のみに限定する必然性もないし、献血の際の検査を HIV の検査に利用する頻度も少なくなるであろう。現在は、献血が NAT 検査の導入により、より早期に HIV 感染結果が判明することを期待し、献血に出かけるケースが増えている。

HIV 感染症と初めて診断された機関を調査した結果、約60%が病院・医院であった。医院にエイズ患者が初診で行くということがあたりまえの時代になってきている。その実状を考えると、一般医療者に対して HIV 関連情報を十分に提供し、医師の知識を高める必要がある。医学生のと時から大学教育の場でエイズ教育の充実化がさらに要求される。

名古屋医療センター臨床研究センターでの調査で、治療前の患者で薬剤耐性ウイルスを有する患

者の割合はここ7年の平均では5.9%となった。耐性ウイルスによる感染は、再び HIV 感染症を致死的な疾患にする可能性があるもので、しっかりと感染予防に取り組まなければならない。一方で、治療前のナイーブ患者の耐性検査を普及させ、治療中の患者に対して性生活上の注意の徹底を喚起している。

最近、中枢神経系の合併症の治療と抗 HIV 治療の進歩により、中枢神経系の後遺症の一つである認知障害を有する HIV 感染症患者が増えてきている。また、高齢者の HIV 感染症が脳血管障害を合併して、身体障害のみならず認知障害を合併するケースもある。家庭でケアできるケースはまれであり、身寄りがなかったり、家族も同時に病弱であったりすると患者は障害者施設あるいは介護施設、療養型医療施設に入所しなければならない。残念ながら、現状では上記施設への入所は極めて困難となっている。最大の理由は、HIV 感染症を有するからである。これらの施設では HIV 感染症に関する過度な恐怖と知識不足が原因で診療拒否、入所拒否が起こっていると推測される。我々はこうしたケースを改善するために、また、関連施設の理解を獲得するために施設への情報提供と啓発を粘り強く実施していかなければならない。

現状では上記のような認知障害を有する HIV 感染症/AIDS 患者は、急性期の病院（名古屋医療センターなど）で長期間の入院を余儀なくされる。3カ月ごとに病院間を転院している症例も存在する。長期入院は、病院の平均在院日数の短縮の弊害となり、利益を減少させ病院の負担となる。また、患者の病院間転院移動は患者自身の負担となる。

東海ブロックの拠点病院および協力病院の HIV 診療実績を検討すると、静岡県ではかなり経験豊富な拠点病院がそれぞれの地域に点在しており、ブロック拠点病院である名古屋医療センターとの薬剤耐性検査など連携も深い。最近、三重県でも患者が増加しており、それぞれの拠点病院で入院診療が行われている。HAARTについて、

日和見感染症の治療などにつき連携しながら治療がなされている。岐阜県はまだ HIV 感染症患者が少ないものの、地域での診療体制が確立されてきている。愛知県では、名古屋市から遠い三河地方の拠点病院では HIV 感染症患者の増加の問題が起こってきており、少ないスタッフでやりくりされている実情がある。一方、名古屋市の拠点病院は名古屋医療センターへの患者の集中に拍車をかけている。ただ、エイズ治療に関すれば、北米の結果からセンター病院と経験数の少ない病院との間の治療成績ではかなり生存率の差が生じており、今後、拠点病院の治療の均てん化を目指すのか、センター病院志向にした方がよいのか検討すべきでもある。それでも、拠点病院との連携は不可欠であり、あらたな連携と役割分担を探る必要がある。ブロック拠点病院で行う講演会、連絡協議会だけでは不十分であるので、個別の医師、看

護師などを対象とした研修プログラムを作成し、研修を積極的に受け入れる。さらには、出前出張的に拠点病院においてケーススタディなどの症例検討会、講演会を開催し、HIV 診療の充実を図るようにしていかなければならない。

## 結 論

名古屋医療センターの患者動向解析と患者の入院長期化の問題さらには今後の拠点病院、協力病院との連携強化について問題点を上げ、対策について提言した。

## 〔文 献〕

- 1) HIV/AIDS 最新情報 (2005年末現在)。UNAIDS 年報。
- 2) 男性同性間の HIV 感染予防対策とその推進に関する研究。市川誠一。厚生労働科学研究費補助金エイズ対策事業平成16年度総括・分担研究報告書。



いかに治療すべきか

## HIV 感染症 治療 の 現 況

濱 口 元 洋\*

### 内 容 紹 介

HIV感染症はますます増え続けており、HIV感染症患者の増大はブロック拠点病院への患者集中というかたちとなって現れている。1994年に最初のHIV感染症患者の診療を始めてから、2006年4月中旬までに総数506名に上る患者が名古屋医療センターを受診した。新規患者は毎年増加しており、昨年（2005年）は86名の患者があらたに受診した。東京、大阪に次いで名古屋は3番目にHIV感染症患者の多い地域である。本稿では名古屋医療センターにおけるHIV感染症患者の診療の現状とHIV治療の最近の進歩、様々な問題点、さらにHIV感染の早期発見・感染予防につながる活動、さらには針刺し事故時の対応について紹介する。

### は じ め に

HIV感染症はますます増え続けており、2005

年末には世界で4,030万人の感染者がいると推定されている<sup>1)</sup>。日本においても例にもれず、血液製剤による薬害HIV感染以外で10,000人を越えた。名古屋を中心とする東海地方もHIV感染症患者が増加しており、今尚“いきなりエイズ”で病院に受診される患者も増えている。我々はそういった患者に良質の医療を提供するとともに、一方で新規HIV感染症患者の発生を予防しなければならない。

本稿ではHIV感染症患者の動向と治療の現況について述べる。また、医療従事者の針刺し事故時の対応についても簡単に触れたい。

### HIV感染症患者の動向

1) 東海ブロック拠点病院である国立病院機構名古屋医療センターの患者動向

1994年に最初のHIV感染症患者の診療を開始してから、2005年12月31日までに総計466名の患者が国立病院機構名古屋医療センターを受診した。毎年の新規患者数は図1に示すように年々増加し、2005年は過去最高の86名が来院した。ここ2年間で171名となり、総数の1/3強となる。東海地方ではHIV感染症患者は確実に増加していると結論付けられる（2006年は4月中旬時点で40名の新規患者が来院し、総数506名

— Key words —

HIV, HAART, 針刺し事故

\* Motohiro Hamaguchi :

国立病院機構名古屋医療センター、  
臨床研究センター止血血栓研究部長

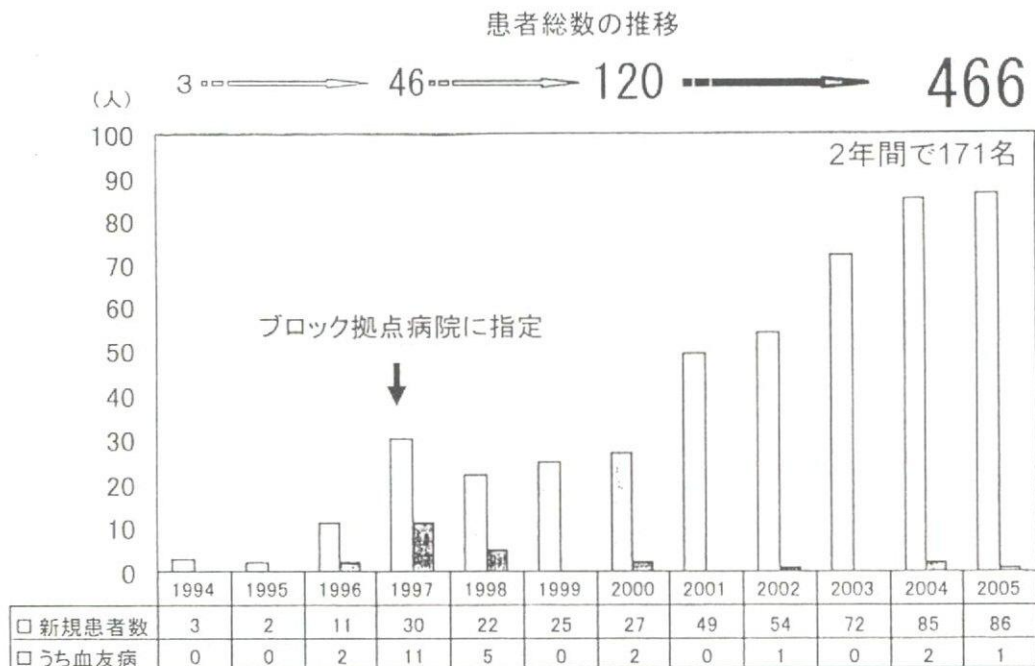


図1 年次別新規患者数

表1 感染経路

感染経路	計	男	女
血液製剤	24	24	0
同性間性的接触	223	223	0
異性間性的接触	128	73	55
両性間性的接触	28	28	0
麻薬	7	5	2
不明	55	54	1
その他	1	0	1
計	466	407	59

表2 国籍別患者数

国籍	計	男	女
日本	369	347	22
東アジア	4	3	1
東南・南アジア	18	8	10
北米	4	4	0
南米	51	33	18
アフリカ	18	12	6
ロシア	2	0	2
計	466	407	59

となった)。

感染経路別では、同性間性的接触による感染が最も多く223名を数える。両性間性的接触による28名を加えると、男性同性間の感染が251名(62%)を占める(表1)。2005年の男性新規患者80名のうち76%の61名が同性間性的接触(両性間も含む)によるものであり、同性間性的接触による感染はますます増加している。

国籍別では97名(20.8%)が外国籍患者で、南米、東南アジア、アフリカの順で多かった(表2)。オーバーステイとなっている患者もいる

が、最近では企業の外国人雇用により、社会保険を持つ外国人患者がほとんどであった。

年齢別では20代、30代がもっとも多いが、50代以上の患者も72名(15.5%)存在し、2005年は22%と増えている。最高齢患者は73歳であった。性別では、男性407名(87.3%)、女性59名(12.7%)で、2005年は男性80名(93.0%)であった(図2)。女性59名のうち外国籍患者は37名(62.7%)を占めた。

2004年、2005年の新規患者171例のうち、初診時AIDS発症者は46名(27%)であり、50歳以上の症例に絞ってみると34人中18例、53%とひじょうに高率であり、50歳以上の患者は、症状

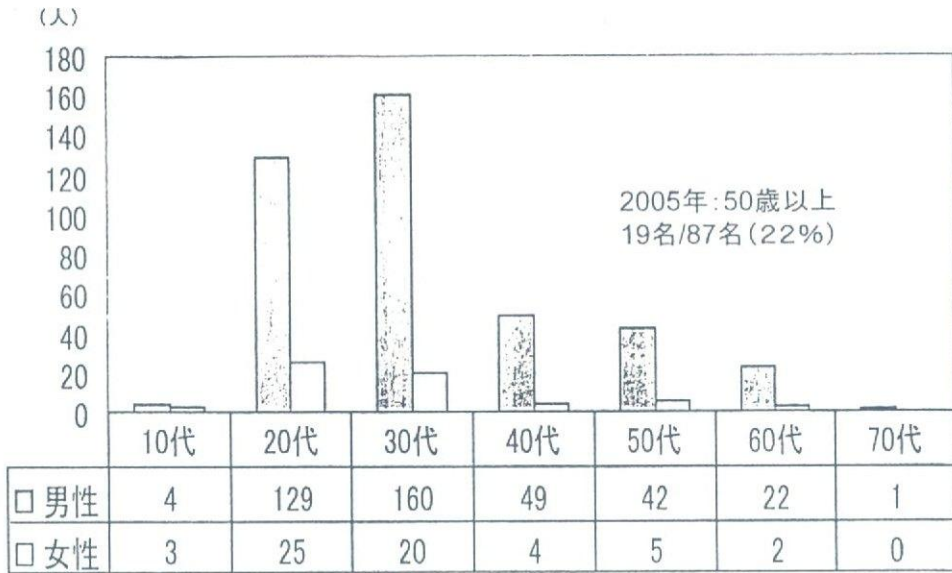


図2 性別・年齢別患者数

表3 HIV抗体検査を実施すべき患者

- 1 梅毒など性感染症が判明した時
- 2 急性A型またはB型肝炎が疑われる時
- 3 肛門の疾患（コンジローマなど）
- 4 慢性の発熱，リンパ節腫脹（伝染性単核球症様症状）
- 5 慢性の下痢，著明な体重減少
- 6 検査所見でZTTが著明に高値を示す場合  
(HIV感染症ではポリクローナルガンマグロブリン血症となる)
- 7 汎血球減少症の場合
- 8 無菌性髄膜炎が疑われる時
- 9 徐々に進行する呼吸困難（ニューモシスティス肺炎）
- 10 口腔内に白苔（カンジダ）が認められる時
- 11 帯状疱疹（若年者で広範囲）

が出現するまで病院や保健所でのHIV抗体検査を受けていないという実体が浮かび上がる。

一方でHIV感染症の最初の診断をどこで受けたか，という診断の経緯を調査した結果では，病院および医院において主治医の判断でHIV抗体検査をする場合がほとんどであり，HIV感染症を念頭にして診療すべき事態となっている。どんな場合にHIV抗体検査を行うべきかを表3に提示する。

## 2) HIV感染者/AIDSの症例

最近経験した症例の中で，日常よく経験するも注意が必要な症例について報告する。

症例1： 28歳，男性。国籍はナイジェリア。主訴：右頸部リンパ節腫脹（径5×8cm大）。現病歴：右頸部のリンパ節が腫れてきた。どんどん大きくなり，近くの病院受診。そこで，自分はHIV感染の可能性があると話され，HIV-2陽性と判明し，悪性リンパ腫の合併を疑われ，

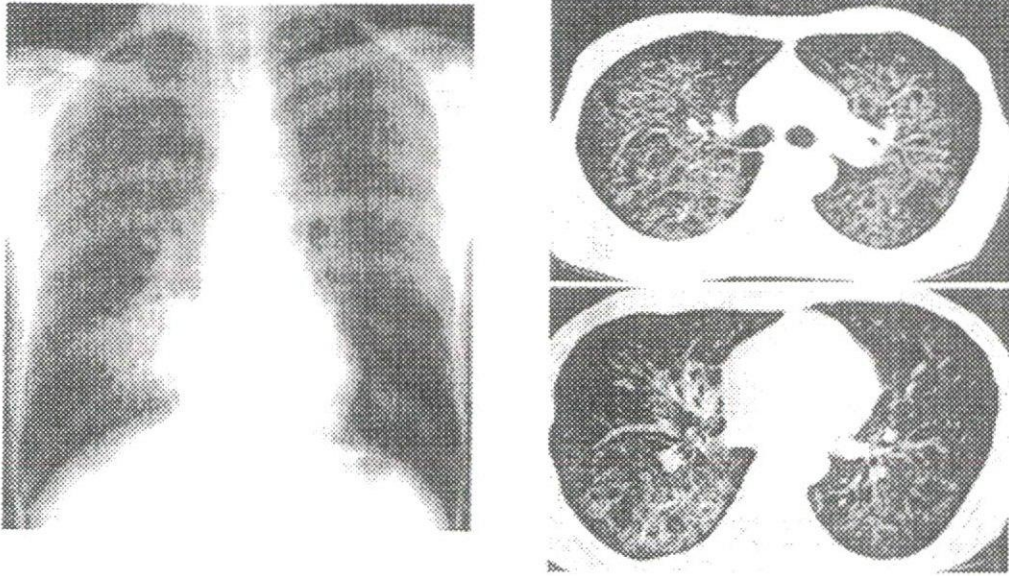


図3 症例2の胸部X-P, 胸部CT写真

当院紹介受診となる。検査所見：HIV-1/2Ab (+), HIV-1RNA = 50 > copy/mL, CD4 = 241/uL, WBC 3,900, RBC  $454 \times 10^4$ , Hb 12.3g/dL, Plts  $34.6 \times 10^4$ , IL-2R = 3,116 U/mL, AST/ALT = 42/31, LDH = 414, CRP = 5.77, TPHA = 80 >, HBsAg (-), HBsAb (-), HCV-Ab (-). HIV-2のWestern Blot (WB) 陽性。右頸部リンパ節の生検を依頼。結果は広範な乾酪壊死巣を伴う肉芽腫性病変によって占められ、悪性リンパ腫の所見は認められなかった。Ziehl-Neelsen染色にて陽性桿菌が1個確認され、リンパ節の結核PCR結果が陽性より結核性リンパ節炎と診断した。INH, RFP, EB投与にてリンパ節腫脹軽快した。HIV感染症患者では、最近、結核に罹患する症例が増えてきている。それも肺結核というのではなく、結核性リンパ節炎や粟粒結核のかたちとなる場合が多い。

症例2：42歳、男性。主訴：発熱、呼吸困難。現病歴：食思不振、るいそう著明(58kgから48kgへ)。39℃の発熱と呼吸困難を来たしたため、近医受診。WBC 13,200, CRP = 4.6。白血球分画でリンパ芽球を認めるとのことで、白血病を疑われ、当院血液内科紹介受診となる。

25年のMSM (Men who have sex with men) 歴あり。初診時検査所見：WBC 12,300 (blast 0%), RBC  $322 \times 10^4$ , Hb 8.7 g/dL, Plts  $53.4 \times 10^4$ , AST/ALT = 46/21, LDH = 472, RPR (+), TPHA (+), HBsAg (-), HCV-Ab (-), HIV-1/2Ab (+), HIV-1RNA =  $1.9 \times 10^5$ , CD4 = 68/uL,  $\beta$  D-glucan = 503 pg/mL, HIV-1 WB (+), クラミジアIgA, IgG = (+)。胸部写真、胸部CTを示す(図3)。ニューモシスティス肺炎と診断し、パクタ12T + PSL60mg (3日間) 内服などにて軽快した。ウイルス疾患時には異型リンパ球が出現することもあり、伝染性単核球症または白血病と考えられる場合もある。ニューモシスティス肺炎は高頻度に合併する疾患で(以前はカリニー肺炎と呼んでいた)、間質性肺炎像を認め、CTでの診断が比較的容易である。 $\beta$  D-glucanが高値となるのが特徴である。

症例3：37歳、男性。主訴：頭痛、嘔気。現病歴：献血に行き、検査にてHIV陽性と判明する(HIV-20 pool NAT)。HIV抗体(PA法)は陰性。当院紹介受診するが、その後激しい頭痛出現し、緊急外来受診し入院となる。初診時検査：WBC 3,500, RBC  $423 \times 10^4$ , Hb

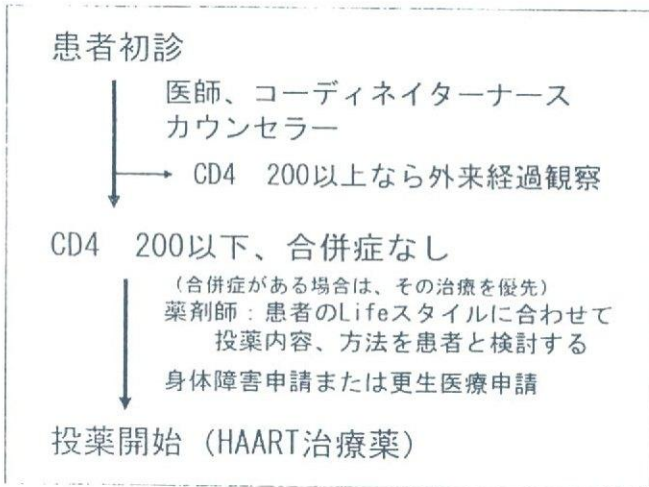


図4 抗HIV療法までの流れ

13.5g/dL, Plts  $19.8 \times 10^4$ , CRP 0.18, AST/ALT = 22/29, HIV-1 RNA =  $1.4 \times 10^5$ , CD4 = 210/uL, HIV-1/2Ab(+), HBsAg(-), HBsAb(-), HCV-Ab(-), HIV-1(WB)はまだ陰性であった。髄液検査で細胞数2,400と単核球増加が認められ、急性期HIVウイルス性髄膜炎と診断した。名古屋医療センターの新規HIV患者の中で以前に激しい頭痛のため病院を受診し、無菌性髄膜炎と診断され、入院治療を受けたが、その時にHIV感染症については検査されなかった症例が何例か認められている。髄膜炎の原因の1つにHIVを念頭に入れるべきである。

## HIV感染症の治療

HIV感染症・エイズ患者に対する薬物療法(HAART: highly active anti-retrovirus therapy)は年々新規薬剤の開発・販売がなされ、患者にとってQOLの観点からもかなりよくなりつつある。抗HIV療法は、この数年で大きな進歩を遂げた。プロテアーゼ阻害剤の登場によって、HAARTが可能となったためである。これまで、“Hit HIV early and hard”を合言葉に早期から強力な治療でHIVの増殖を抑止する方法が取られ、米国をはじめとした先進工業国では

1996年ごろからAIDSによる死亡数とAIDS関連日和見感染症の発現頻度の著しい減少をみた。しかし、早期に治療を始めてもHIVを完全には除去できないことがわかるとともに、治療をある程度遅らせても免疫系の再構築が十分可能であることが明らかにされ、治療開始時期を遅らせる傾向となっている。よって名古屋医療センターでは図4に示す流れで抗HIV治療を開始している。

HIVが判明したらすぐに治療をしなければならないと思われている医師もまだ多く、最近の治療事情をよく理解して頂く必要がある。さらに、AIDSになっている患者に対しても、まず合併症の治療が優先され、免疫再構築症候群の問題があり、抗HIV療法はそれらが解決される時期に始めるのが通常である。

HIV治療薬にはNRTI(核酸系逆転写酵素阻害薬: AZT(レトロビル), 3TC(エビビル), ABC(ザリアジェン), TDF(ピリアード)など), NNRTI(非核酸系逆転写酵素阻害薬: NFV(ピラセプト), EFV(ストックリン)など), そしてPI(プロテアーゼ阻害薬)(LPV/r(カレトラ), ATV(レイアタッツ), RTV(ノービア), FAPV(レクシヴァ)など)の3種類がある。

Key drugとしてNNRTIまたはPIから1剤を選択し(注: ATVまたはFAPVを使用時はRTVをブーストとして追加する), それにNRTI2剤を加えた3剤併用療法が推奨されている。AZT+3TC+EFV, ABC+3TC+EFV, TDF+3TC+ATV/r, AZT+3TC+LPV/rなどの組合せが使用される。最近ではAZTと3TCの合剤(COM: コンビビル)やABCと3TCの合剤(EPZ: エプジコム)なども登場し、錠剤の1日服用数が軽減できるようになった。

## 針刺し事故時の対応

医療従事者にとって針刺し事故は重大な問題である。したがってここに針刺し事故時の対応

表4 針刺し事故時の対応

## 職業的暴露を受けた医療従事者用チャート

質問 暴露した部位は何処ですか？

- |                      |                    |
|----------------------|--------------------|
| (1) 針刺し・切創事故で部位は皮下組織 | → 「針刺し・切創チャート」へ進む。 |
| (2) 粘膜               | → 「粘膜・皮膚チャート」へ進む。  |
| (3) 傷（損傷のある）皮膚       |                    |
| (4) 正常な皮膚            | → 予防内服必要なし。        |

## 針刺し・切創チャート

■「暴露源の状態」を以下のどれかに区別してください。

- (1) 暴露源患者のHIV抗体陽性が確認されている。 → この場合は以下のClass1, Class2に区別してください。  
 Class1: 「無症候性HIV感染者」や「血中HIV-RNA量が1500コピー/mL未満」  
 Class2: 「AIDS発症者」や「急性感染者」や「血中HIV-RNA量が高値」
- (2) 暴露源患者のHIV抗体の状態が不明または未確定。  
 (3) 暴露源検体の由来患者が不明（誰の検体か分からない）。  
 (4) 暴露源患者のHIV抗体陰性が確認されている。

■「暴露の軽傷、重傷」を区別してください。

暴露が軽傷とは、以下などの例である。

- ・非中空針による浅い傷

暴露が重傷とは、以下などの例である。

- ・太い中空針による針刺し
- ・肉眼で血液付着が確認できる針・器具による針刺し・切創
- ・血管に刺入された針による針刺し
- ・深い針刺し

→ 表5 を参照

## 粘膜・皮膚チャート

■皮膚暴露に関しては、正常ではない皮膚（皮膚炎、擦過傷、開放創など）への暴露の場合のみ、予防内服の検討が必要であり、フォローアップが必要です。

■「暴露源の状態」を以下のどれかに区別してください。

- (1) 暴露源患者のHIV抗体陽性が確認されている。 → この場合は以下のClass1, Class2に区別してください。  
 Class1: 「無症候性HIV感染者」や「血中HIV-RNA量が1500コピー/mL未満」  
 Class2: 「AIDS発症者」や「急性感染者」や「血中HIV-RNA量が高値」
- (2) 暴露源患者のHIV抗体の状態が不明または未確定。  
 (3) 暴露源検体の由来患者が不明（誰の検体か分からない）。  
 (4) 暴露源患者のHIV抗体陰性が確認されている。

■「暴露検体量の少量、多量」を区別してください。

暴露検体量が少量とは、「2-3滴の体液」などの例である。

暴露検体量が多量とは、「噴き出した体液」などの例である。

→ 表6 を参照

表5 経皮的HIV暴露時の感染予防

■「暴露源の状態」と「暴露の軽傷、重傷」で以下の表に従い判断してください。

	軽 傷	重 傷
HIV感染者 (Class1)	2剤併用を勧める。	3剤併用を勧める。
HIV感染者 (Class2)	3剤併用を勧める。	
暴露源患者の HIV抗体不明	通常予防内服は不必要。 (HIV陽性が考えられる場合には2剤併用を考慮する。HIV陰性が判明したら中止)	
暴露源患者 が不明	通常予防内服は不必要。 (HIV陽性が考えられる場合には2剤併用を考慮する)	
HIV抗体陰性	予防不要。	

表6 粘膜および正常でない皮膚へのHIV暴露時の感染予防

■「暴露源の状態」と「暴露検体量の少量、多量」で以下の表に従い判断してください。

	少 量	多 量
HIV感染者 (Class1)	2剤併用を勧める。	2剤併用を勧める。
HIV感染者 (Class2)	2剤併用を勧める。	3剤併用を勧める。
暴露源患者の HIV抗体不明	通常予防内服は不必要。 (HIV陽性が考えられる場合には2剤併用を考慮する。HIV陰性が判明したら中止)	
暴露源患者 が不明	通常予防内服は不必要。 (HIV陽性が考えられる場合には2剤併用を考慮する)	
HIV抗体陰性	予防不要。	

・「2剤」の日安は、AZT+3TCまたはd4T+3TC（こちらの組合せが短期的には内服しやすい）。

・「3剤」の日安は、AZT+3TC+LPV/rまたはd4T+3TC+LPV/r。LPV/rはNFVでも良い。

・内服に関して熟知し、自己決定可能なら、内服開始。

・30分以内に責任者と相談できない場合は、1回目の内服を開始する。

・30分以内に責任者と相談できた場合は、責任者と相談し内服するかどうか決定する。

についてまとめる<sup>2)</sup>（表4、5）。

## 考 察

1994年に最初のHIV感染症患者の診療を始めてから、2006年4月中旬までに総数506名に上る患者が名古屋医療センターを受診した。新規

患者は毎年増加しており、昨年（2005年）は86名の患者があらたに受診した。東京、大阪に次いで名古屋は3番目にHIV感染症患者の多い地域である。2005年の集計による患者の感染経路別内訳は、ほとんどが性感染によるもの、中でも男性同性間性的接触によるものがもっとも多

く、両性間性的接触によるものを合わせると62%となる。そして、この傾向は年々高まっており、昨年1年間を見てみると男性同性間性的接触による感染経路が76%となっている。さらに感染経路不明の患者の多くは男性同性間の性的接触によるものと推定されるし、異性間性的接触と表明した患者の一部は同性間による可能性も考えられる。すなわち、患者のほぼ80%にあたる相当な数が男性同性間性的接触による感染と推測されるのである。

このことから感染予防対策は、特に男性同性間の感染予防が重点的に行われるべきであり、現在、市川誠一名古屋市立大学教授による「男性同性間のHIV感染予防対策とその推進に関する研究」が進められている<sup>3)</sup>。また、エイズ発症で初めてHIV感染が判明する患者数が多いため、HIV抗体検査の一層の普及は急務の課題である。名古屋市において栄中心部のビル内で、2004年7月から休日エイズ抗体無料即日検査が月2回始まり、1日50名を超える盛況振りである。そこから2005年12月までに6名のHIV感染症患者が見つかった。

名古屋医療センターには外国籍患者が比較的多い。東海地方の大企業で働く出稼ぎの外国人が増えているのである。名古屋では南米、東南アジア、アフリカの順で多く、ブラジル以外の諸国の患者の中にはオーバーステイで、医療費支払い上の問題が存在する。また、言葉や日本での生活上の問題に対する支援も必要になるし、母国の医療事情を知ることも帰国の際に重要となる。NGOや通訳者の確保の問題が以前山積である。

名古屋医療センターのHIV感染症患者の年齢分布では、20代、30代の性的にアクティブな年

齢層が大半を占めるが、50歳代以上の年齢層にも感染が拡大していることが認められる。最近50歳以上の“いきなりエイズ”がエイズ発症者の53%を占めている。その理由として、この年齢層にHIV関連情報が十分行き渡っていないのと、この年齢層の人々がHIV抗体検査を受けにくい環境が存在すると考えられる。今後の対策としては、HIV関連情報を若い人のみならずすべての人々に発信する努力をすることと、HIV抗体検査体制の改善が必要となる。

HIV抗体検査環境の改善に関して、病院・医院におけるHIV抗体検査の無料化の実現を対策として提言したい。無料抗体検査を保健所のみ限定する必然性もないし、献血の際の検査をHIVの検査に利用する頻度も少なくなるであろう。

HIV感染症と初めて診断された機関を調査した結果、約60%が病院・医院であった。医院にエイズ患者が初診で行くということがあたりまえの時代になってきている。その実状を考えると、一般医療者に対してHIV関連情報を十分に提供し、医師の知識を高める必要がある。医学生のと時から大学教育の場でエイズ教育の充実化がさらに要求される。

#### 文 献

- 1) HIV/AIDS最新情報 (2005年末現在). UNAIDS年報.
- 2) HIV感染症とその合併症「診断と治療ハンドブック」照屋勝治.
- 3) 男性同性間のHIV感染予防対策とその推進に関する研究. 市川誠一. 厚生労働科学研究費補助金エイズ対策事業平成16年度総括・分担研究報告書.



# Altered HIV-1 Gag Protein Interactions with Cyclophilin A (CypA) on the Acquisition of H219Q and H219P Substitutions in the CypA Binding Loop\*

Received for publication, May 31, 2005, and in revised form, November 7, 2005. Published, JBC Papers in Press, November 7, 2005. DOI 10.1074/jbc.M505920200

Hiroyuki Gatanaga<sup>†1</sup>, Debananda Das<sup>‡</sup>, Yasuhiro Suzuki<sup>†5</sup>, Damaris D. Yeh<sup>‡</sup>, Khaja A. Hussain<sup>¶</sup>, Arun K. Ghosh<sup>¶</sup>, and Hiroaki Mitsuya<sup>†5,2</sup>

From the <sup>†</sup>Experimental Retrovirology Section, HIV and AIDS Malignancy Branch, NCI, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20892, the <sup>‡</sup>Departments of Hematology and Infectious Diseases, Kumamoto University School of Medicine, Kumamoto 860, Japan, and the <sup>¶</sup>Department of Chemistry, University of Illinois, Chicago, Illinois 60607

HIV-1 Gag protein interaction with cyclophilin A (CypA) is critical for viral fitness. Among the amino acid substitutions identified in Gag noncleavage sites in HIV-1 variants resistant to protease inhibitors, H219Q (Gatanaga, H., Suzuki, Y., Tsang, H., Yoshimura, K., Kavlick, M. F., Nagashima, K., Gorelick, R. J., Mardy, S., Tang, C., Summers, M. F., and Mitsuya, H. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 5952–5961) and H219P substitutions in the viral CypA binding loop confer the greatest replication advantage to HIV-1. These substitutions represent polymorphic amino acid residues. We found that the replication advantage conferred by these substitutions was far greater in CypA-rich MT-2 and H9 cells than in Jurkat cells and peripheral blood mononuclear cells (PBM), both of which contained less CypA. High intracellular CypA content in H9 and MT-2 cells, resulting in excessive CypA levels in virions, limited wild-type HIV-1 (HIV-1<sub>WT</sub>) replication and H219Q introduction into HIV-1 (HIV-1<sub>H219Q</sub>), reduced CypA incorporation of HIV-1, and potentiated viral replication. H219Q introduction also restored the otherwise compromised replication of HIV-1<sub>P222A</sub> in PBM, although the CypA content in HIV-1<sub>H219Q/P222A</sub> was comparable with that in HIV-1<sub>P222A</sub>, suggesting that H219Q affected the conformation of the CypA-binding motif, rendering HIV-1 replicative in a low CypA environment. Structural modeling analyses revealed that although hydrogen bonds are lost with H219Q and H219P substitutions, no significant distortion of the CypA binding loop of Gag occurred. The loop conformation of HIV-1<sub>P222A</sub> was found highly distorted, although H219Q introduction to HIV-1<sub>P222A</sub> restored the conformation of the loop close to that of HIV-1<sub>WT</sub>. The present data suggested that the effect of CypA on HIV-1 replicative ability is bimodal (both high and low CypA content limits HIV-1 replication), that the conformation of the CypA binding region of Gag is important for viral fitness, and that the function of CypA is to maintain the conformation.

Combination antiretroviral therapy has brought about improved quality of life and extended survival in patients with HIV-1 infection. However, the emergence of HIV-1 variants resistant to anti-HIV-1 therapeutic agents, including reverse transcriptase inhibitors and protease inhibitors (PIs), has limited the efficacy of chemotherapy (1). HIV-1 develops resistance mainly by substituting amino acids in the target viral enzyme or component; however, recent studies have revealed that certain polymorphic amino acid residues also contribute to the viral resistance (2, 3). We recently found that multiple amino acid substitutions emerged in noncleavage sites of the Gag protein, which were associated with the development of HIV-1 resistance against PIs (4). Among such amino acid substitutions, H219Q, occurring in the cyclophilin A (CypA) binding loop in the p24 Gag protein, conferred the greatest replication advantage on HIV-1 (4). CypA binds to p24 Gag protein, resulting in the packaging of ~200 copies of CypA into each HIV-1 virion (5, 6), and is thought to perform an essential role early in the HIV-1 replication cycle (7, 8), perhaps by destabilizing the capsid (p24 Gag protein) shell during viral entry and uncoating (9) and/or by performing an additional chaperon function, facilitating correct capsid condensation during viral maturation (10, 11).

In the present study, we asked how H219Q and H219P substitutions occurring within the viral CypA binding loop conferred replication advantage to HIV-1, and we examined whether these substitutions affected the conformation and interaction of p24 Gag protein and CypA during HIV-1 propagation in various host cells. We also attempted to better understand the functional role of CypA in HIV-1 replication. To that end, we determined the virological and biochemical properties of a variety of recombinant infectious clones and their CypA contents. We also carried out molecular modeling analyses of the wild-type and mutated p24 Gag complex with CypA. The data demonstrate that both H219Q and H219P enhance HIV-1 replication by reducing viral CypA contents in daughter virions as produced in CypA-rich cells, but not in cells that has a low CypA content. We suggest that the effect of CypA on HIV-1 replicative ability is bimodal, both high and low contents of CypA limit HIV-1 replication. The data also suggest that the conformation of p24 Gag is strongly correlated with viral fitness.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Antiviral Agents**—Three PIs, KNI-272, JE-2147, and UIC-94003, were synthesized as described previously (12–16). Three newly synthesized PIs, UIC-00041, UIC-00142, and UIC-00145 (Fig. 1), were also

\* This work was supported in part by the Intramural Research Program of the NCI, Center for Cancer Research, National Institutes of Health, in part by National Institutes of Health Grant GM 53386 (to A. K. G.), in part by Research for the Future Program Grant JSPS-RFTF 97L00705 from the Japan Society for the Promotion of Science (to H. M.), a grant-in-aid for scientific research (priority areas) from the Ministry of Education (to H. M.), a grant from the Culture, Sports, Sciences, and Technology of Japan (Monbu-Kagakusho) (to H. M.), and a grant for the promotion of AIDS research from the Ministry of Health Welfare and Labor of Japan (Kosei-Rohdoshu) (to H. M.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

<sup>1</sup> Present address: AIDS Clinical Center, International Medical Center of Japan, Tokyo 162-8655, Japan.

<sup>2</sup> To whom correspondence should be addressed: Experimental Retrovirology Section, HIV and AIDS Malignancy Branch, NCI, National Institutes of Health, Bldg. 10, Rm. 5A11, 9000 Rockville Pike, Bethesda, MD 20892. Tel.: 301-496-9238; Fax: 301-402-0709; E-mail: hmitsuya@helix.nih.gov.

<sup>3</sup> The abbreviations used are: HIV-1, human immunodeficiency virus, type 1; PBM, peripheral blood mononuclear cell; CHRA, competitive HIV-1 replication assay; CypA, cyclophilin A; PI, protease inhibitor; PHA, phytohemagglutinin; CsA, cyclosporin A; CA, capsid; WT, wild type.

## Mutations in Cyclophilin A Binding Loop of p24

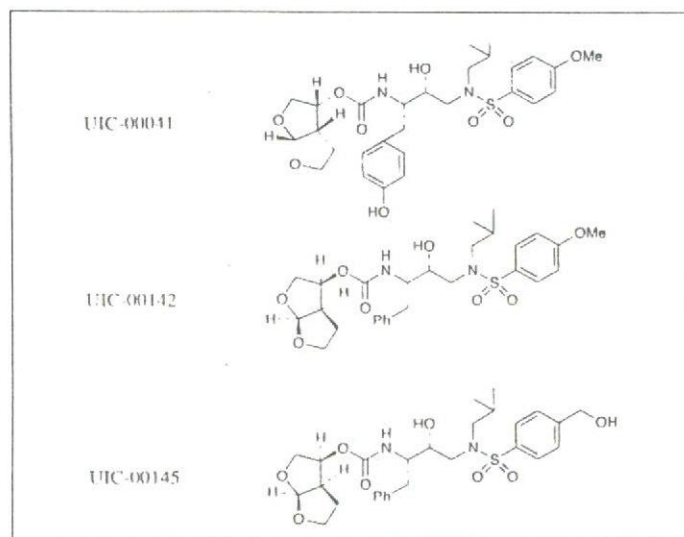


FIGURE 1. Structures of UIC-00041, UIC-00142, and UIC-00145.

synthesized by Ghosh and Hussain,<sup>4</sup> and the procedures for the synthesis will be published elsewhere.

**Generation of HIV-1 Variants Resistant to PIs**—The wild-type infectious clone, HIV-1<sub>WT</sub>, produced by COS-7 cells transfected with pHIV-1<sub>NI4.3</sub> was propagated in human CD4<sup>+</sup> MT-2 or H9 cells in the presence of increasing concentrations of an antiretroviral agent as described previously (4, 14, 16). Briefly, MT-2 or H9 cells ( $5 \times 10^6$ ) were exposed to wild-type HIV-1<sub>NI4.3</sub> and cultured in the presence of each PI at initial concentrations of 0.0005–0.03  $\mu\text{M}$ . When the virus began to propagate in the presence of the drug, the drug concentration was increased. This selection was carried out for a total of 27–80 passages. For the generation of JE-2147-resistant virus, an infectious clone carrying I84V substitution in the protease (HIV-1<sub>I84V</sub>) was employed instead of HIV-1<sub>WT</sub> (14). Proviral DNA in the lysates of HIV-1-infected cells of the last passage was sequenced as indicated (4).

**Generation of Recombinant HIV-1 Clones**—To generate HIV-1 clones carrying the desired mutations, the site-directed mutagenesis was performed, and the mutation-containing genomic fragments thus obtained were introduced to pHIV-1<sub>NI.Sma</sub> as described previously (4). An infectious clone containing P222A mutation in Gag was generated using a plasmid kindly provided by Drs. D. Braaten and J. Luban (5). Each recombinant plasmid was transfected into COS-7 cells, and the obtained infectious virions were harvested 48 h after transfection and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until use (4).

**Replication Kinetic Assay**—MT-2, H9, Jurkat cells ( $10^6$ ), or phytohemagglutinin-stimulated peripheral blood mononuclear cells (PHA-PBM:  $5 \times 10^6$ ) were exposed to each infectious virus preparation (500 blue-cell-forming units defined in the MAGI assay) (17) for 12 h, washed twice with phosphate-buffered saline, and cultured in 5 ml of complete medium in the presence or absence of cyclosporin A (CsA). Culture supernatants (200  $\mu\text{l}$ ) were harvested every other day or every 4 days, and p24 Gag amounts were determined using a commercially available radioimmunoassay kit (PerkinElmer Life Sciences). An enzyme-linked immunosorbent assay kit (Beckman Instruments, Fullerton, CA) was also used for the determination of p24 Gag amounts as needed.

**Competitive HIV-1 Replication Assay Using PHA-PBM**—In order to compare the replication rates of infectious HIV-1 clones, the competi-

tive HIV-1 replication assay (CHRA) was performed as described previously (18) with some modifications. In brief, PHA-PBMs ( $5 \times 10^6$ ) were exposed to various mixtures of the paired infectious clones to be examined for their replicative ability and were cultured for the indicated times. Every 7 days, the supernatants of the virus co-culture were transferred to freshly prepared uninfected PHA-PBM cultures. DNA purified from the cells harvested at each passage was subjected to direct DNA sequencing of the HIV-1 genome, and viral population changes were evaluated based on relative peak heights in the electropherogram (18).

**Western Blot Analysis**—For the analysis of cellular CypA contents, MT-2 cells, H9 cells, Jurkat cells, or PHA-PBMs were lysed with lysis buffer (4), and the amounts of lysates were normalized with cell numbers or total protein contents using a bicinchoninic acid protein assay kit (Pierce). For the analysis of virion-associated CypA, the culture supernatants of chronically HIV-1-infected H9 or Jurkat cells were centrifuged and passed through a 0.22- $\mu\text{m}$  pore-size filter to remove cellular debris; the filtrates were normalized with p24 contents measured with radioimmunoassay and were ultracentrifuged to pellet virions (4). The pelleted virions were lysed in lysis buffer. The resultant samples were processed with SDS-polyacrylamide gradient gels, and CypA was visualized by SuperSignalWestPico (Pierce) using anti-CypA antiserum (Biomol, Plymouth Meeting, PA). An anti-p24 Gag antiserum (Advanced Biotechnologies, Inc., Columbia, MD) served as a control to ensure that appropriate amounts of the samples were loaded. The signal density of CypA and p24 Gag was analyzed on a Windows computer by using the ImageJ Program (developed at National Institutes of Health, rsb.info.nih.gov/ij/) as published previously (19).

**Molecular Modeling of the p24<sub>CA151</sub>-CypA Complex with p24 Amino Acid Substitutions**—The crystal structure of human CypA that was bound to the amino-terminal domain of p24 Gag (capsid residues 1–151 (CA<sub>151</sub>), Protein Data Bank code 1AK4) (9) was analyzed to determine the changes with H219Q or H219P substitution. There were two CA-CypA complexes in the structure. Chain A of CypA and chain D of CA form one complex and were retained for the calculation. Identical results should be obtained with the other complex (chain B of CypA and chain C of CA) because the conformations of both CypA and CA in these complexes are quite similar. Structural modifications, visualization, and analysis were performed utilizing the Maestro interface from Schrödinger (Maestro 7.0, Schrödinger, LLC, New York). OPLS2003 force field (20) as implemented in MacroModel 9.0 (MacroModel, version 9.0, Schrödinger, LLC, New York) was used for minimizing mutated structures and for carrying out molecular dynamics calculations. OPLS2003 uses an enhanced version of the widely used OPLS-AA force field and has improved parameters for peptides. It was verified that the force field had high quality bond stretching, bending, and torsional parameters. Charges were taken from the force field. Molecular dynamics calculations were carried out on the wild-type complex and on the mutated structures. The structures were initially minimized for 2500 iterations. A constant temperature of 300 K and SHAKE constraints for bonds to hydrogens were used. The GB/SA continuum solvation model, with water as the solvent, was used (21). While calculating nonbonded interactions, cut-off distances of 8 and 20 Å were used for van der Waals and electrostatic interactions, respectively. Using a time step of 2 fs, the structures were equilibrated for 20 ps, and the simulation was carried out for 1 ns. Structures were monitored at intervals of every 50 ps. Calculations were carried out on an SGI Origin 3400 computer platform. For the wild type and for each mutant structure, 1-ns molecular dynamics calculation takes about 11 days under the stated conditions on this high performance computational platform.

<sup>4</sup> A. K. Ghosh and K. A. Hussain, personal communication.

TABLE 1

## Amino acid substitutions identified in the protease and p24 Gag protein of HIV-1 variants selected against PI

Amino acid substitutions listed are based on the amino acid sequences deduced from the nucleotide sequence of the protease-encoding and the entire Gag-encoding genes of each HIV-1 selected against an indicated PI.

PI	Strain	Cell	Passage	Amino acid substitutions identified in	
				Protease	p24
KNI-272	HIV-1 <sub>NL4-3</sub> <sup>PI</sup>	MT-2	27	V32I/M46I/V82I/I84V	H219Q
KNI-272	HIV-1 <sub>1AI</sub>	H9	55	V32I/L33F/K45I/F53L/A71V/I84V	H219Q
APV	HIV-1 <sub>NL4-3</sub> <sup>PI</sup>	MT-2	31	L10F/V32I/M46I/I54M/A71V/I84V	H219Q
JE-2147	HIV-1 <sub>NL4-3/184V</sub> <sup>PI</sup>	MT-2	33	M46I/I47V/V82I/I84V	H219Q
UIC-94003	HIV-1 <sub>NL4-3</sub> <sup>PI</sup>	MT-2	62	L10F/A28S/M46I/I50V/A71V	Q199H/H219Q
UIC-00041	HIV-1 <sub>NL4-3</sub>	MT-2	73	K43I/L63P/V82I	M200I/H219P
UIC-00142	HIV-1 <sub>NL4-3</sub>	MT-2	84	L10F/V32I/M46I/I84V	H219Q
UIC-00145	HIV-1 <sub>NL4-3</sub>	MT-2	80	L10F/V32I/M46I/I47A/K55N	H219Q

<sup>PI</sup> PI-resistant HIV-1 variants described previously (4) are shown.

## RESULTS

**Amino Acid Substitutions Identified in p24 Gag Protein in HIV-1 Variants Resistant to PI**—We have reported previously that several amino acid substitutions were seen in common in the Gag protein at noncleavage sites among HIV-1 variants that acquired *in vitro* a high multitude of resistance to PIs such as APV, JE-2147, KNI-272, and UIC-94003 (4). In an attempt to corroborate and extend our previous observations and to determine how often such amino acid substitutions develop in the Gag protein, we examined four more HIV-1 variants that were selected *in vitro* against various PIs, including three novel PIs, UIC-00041, UIC-00142, and UIC-00145. Table 1 depicts the properties of eight PI-resistant HIV-1 variants (including four HIV-1 variants reported previously). Seven of the eight variants were selected against PIs in MT-2 cells, although one variant was selected in H9 cells. The strains used were HIV-1<sub>NL4-3</sub> and HIV-1<sub>1AI</sub>, and 3–6-amino acid substitutions were identified in the protease. It was noted that all eight variants had in common an amino acid substitution at position 219 in p24 Gag protein, seven variants had H219Q substitution and one had H219P substitution. The His<sup>219</sup> residue is located within the CypA binding loop and is thought to play a role in the p24 Gag interactions with CypA through a hydrogen bond and hydrophobic contact(s) (9). It is worth noting that when HIV-1<sub>NL4-3</sub> was propagated in the absence of PI in MT-2 cells, the virus also acquired H219Q, V218M, or A224V mutation by passage 10 (4). It should be noted that two amino acids, Val<sup>218</sup> and Ala<sup>224</sup>, are also located within the CypA binding loop of the p24 Gag protein and are also known to interact with CypA through hydrophobic contacts (9). These data, taken together, strongly suggest that the amino acids interacting with CypA, in particular His<sup>219</sup>, are prone to undergo substitutions under certain circumstances and are associated with viral replication fitness. Indeed, in the HIV Sequence Compendium 2000 (22), of 88 different HIV-1 strains, 65 had histidine at the position 219, whereas 13 had glutamine, and 4 had proline at the position 219, indicating that both Gln<sup>219</sup> and Pro<sup>219</sup> represent polymorphic amino acid residues. Hence, the present data suggest that these two polymorphic amino acids are associated with viral fitness and possibly to the acquisition of resistance to certain PIs.

**Effects of Gag Mutations at Position 219 on HIV-1 Replication**—In order to examine the effects of the Gag mutation at position 219 on HIV-1 replication, we generated two infectious HIV-1 clones, HIV-1<sub>H219Q</sub> and HIV-1<sub>H219P</sub>, and we assessed their virologic properties. In MT-2 cells, HIV-1<sub>H219Q</sub> rapidly replicated compared with the wild-type HIV-1<sub>WT(His-219)</sub> (Fig. 2A), in agreement with our previous observation (4). HIV-1<sub>H219Q</sub> also replicated more rapidly than HIV-1<sub>WT</sub> in H9 cells (Fig. 2B). HIV-1<sub>H219P</sub> replicated as rapidly as HIV-1<sub>H219Q</sub>, suggesting that the amino acid at position 219 is critical for the replication fitness of HIV-1. When we examined the fitness of the three infectious clones (HIV-1<sub>WT</sub>, HIV-1<sub>H219Q</sub>, and HIV-1<sub>H219P</sub>) in CD4<sup>+</sup> Jurkat cells and

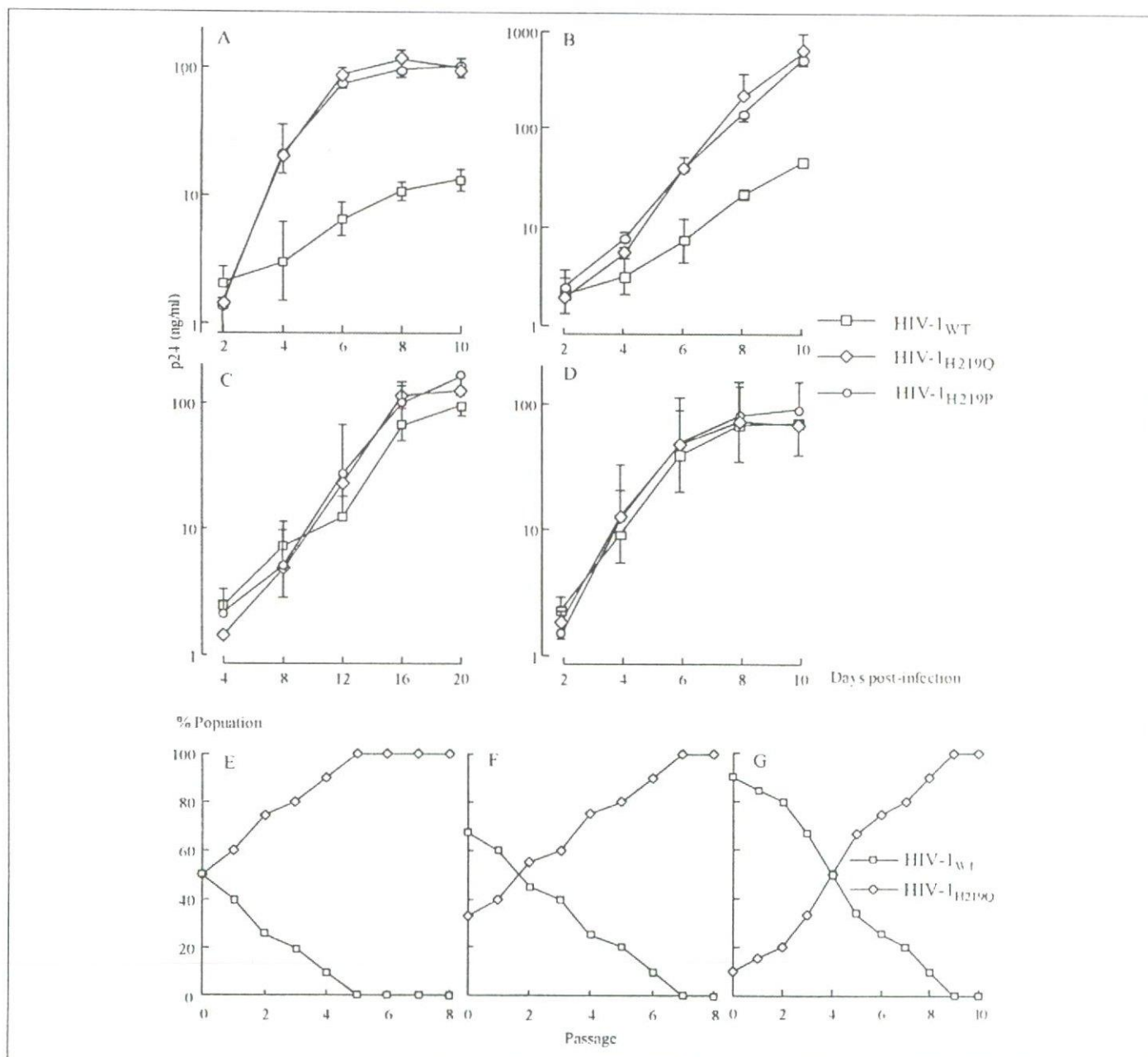
PHA-PBM, there was no significant difference seen in their replication fitness (Fig. 2, C and D).

**Competitive HIV-1 Replication Assays for H219Q Mutation in PHA-PBM**—As shown above, although HIV-1<sub>H219Q</sub> exhibited a greater replication capability when propagated in MT-2 and H9 cells compared with HIV-1<sub>WT</sub>, there was no apparent difference in the replication profiles of HIV-1<sub>H219Q</sub> and HIV-1<sub>WT</sub> as propagated in PHA-PBM (Fig. 2, A, B and D). In order to evaluate the possible biological relevance of the replication kinetic data generated by using immortalized and long term cultured MT-2 and H9 cells, we conducted a modified competitive HIV-1 replication assay (CHRA) (18), in which freshly prepared PHA-PBM served as host cells. HIV-1<sub>H219Q</sub> readily and uniformly overgrew HIV-1<sub>WT</sub> in CHRA regardless of three different ratios of paired clones used in the assay (Fig. 2, E–G). These data indicated that the H219Q substitution conferred replication advantages on HIV-1 when propagated in immortalized CD4<sup>+</sup> T cells as well as PHA-PBM. It should be noted, however, that the replication advantage of HIV-1 acquired with the H219Q substitution was limited in PHA-PBM and was detected only when assessed with CHRA.

**MT-2 and H9 Cells Contain Greater Amounts of CypA**—The Gag mutations H219Q and H219P conferred significant replication advantage on HIV-1 as propagated in MT-2 cells and H9 cells, but such advantage was limited in PHA-PBM. Considering that His<sup>219</sup> is located within the CypA binding loop and that HIV-1 replication is known to be affected by intracellular CypA contents (6, 7), we examined intracellular CypA content in each cell preparation by using Western blot analysis. As shown in Fig. 3, A and B, the CypA contents in 10<sup>4</sup> MT-2 (relative density, 100%) and 10<sup>4</sup> H9 cells (79.6%) appeared to be greater than those in 5 × 10<sup>4</sup> Jurkat cells (55.4%) and 5 × 10<sup>4</sup> PHA-PBM (42.9%), suggesting that MT-2 and H9 cells contained 6–12 times as much CypA per cell as Jurkat cells and PHA-PBM. As normalized with total cellular protein amounts, the CypA content in 1 μg of MT-2 and H9 cellular protein preparations was comparable with that in 2–4 μg of Jurkat protein preparations and that in 4 μg of PHA-PBM protein, suggesting that the former two cell preparations contained 2–4-fold greater amounts of CypA per cellular protein than the latter two cell preparations. These data showed that MT-2 and H9 cells have greater CypA amounts than Jurkat T cells and PHA-PBM.

**Decreased CypA Incorporation into HIV-1<sub>H219Q</sub> Virions**—Considering that the data from crystal structure analyses by Gamble *et al.* (9) of p24 Gag protein complexed with CypA showing that His<sup>219</sup> binds to Asn<sup>71</sup> and Gln<sup>111</sup> of CypA through a hydrogen bond and hydrophobic contact(s), respectively, we postulated that H219Q and H219P substitutions cancel or weaken such hydrogen bonds, resulting in the reduction of p24 binding to CypA and of CypA incorporation into daughter virions, leading to increased HIV-1 replication in CypA-rich MT-2 and H9 cells. We then examined the virion-associated CypA amounts in

## Mutations in Cyclophilin A Binding Loop of p24



**FIGURE 2. Replication kinetics of HIV-1<sub>WT</sub>, HIV-1<sub>H219Q</sub>, and HIV-1<sub>H219P</sub>.** MT-2 cells, H9 cells, Jurkat cells, and PHA-PBM (A–D, respectively) were exposed to each HIV-1 clone and cultured for the indicated numbers of passage. Virus replication was monitored by measuring the amounts of p24 Gag protein produced in the culture supernatants. The data shown represent geometric means ( $\pm 1.5$  D.) of three independent experiments. Replication profiles of HIV-1<sub>WT</sub> and HIV-1<sub>H219Q</sub> in PHA-PBM were examined using CHRA (E–G). Two infectious HIV-1 clones to be compared for their fitness were mixed and propagated in PHA-PBM. The cell-free supernatant was transferred to fresh PHA-PBM every 7 days. The ratios of HIV-1<sub>WT</sub> and HIV-1<sub>H219Q</sub> at the initiation of the assay were 50:50, 67:33, and 90:10 (E–G, respectively). High molecular weight DNA extracted from infected cells at the end of each passage was subjected to nucleotide sequencing, and the proportions of His and Gln at position 219 in Gag protein were determined.

three infectious HIV-1 clones containing HIV-1<sub>WT</sub>, HIV-1<sub>H219Q</sub>, and HIV-1<sub>H219P</sub>, employing Western blotting analysis using anti-p24 Gag and anti-CypA antisera. The culture supernatants of chronically HIV-1-infected H9 cells were prepared to contain the same amount of p24. The virions in each supernatant thus prepared were pelleted by ultracentrifugation and subsequently subjected to SDS-PAGE. Direct sequencing of cellular DNA confirmed that no unintended mutations developed during the culture. As shown in Fig. 3C-1–3, the experiment was performed three times. Percent densities of the CypA signal relative to each p24 Gag signal (making each signal 100%) were 11.1, 7.38, and 6.01% (Fig. 3C-1); 6.99, 4.99, and 4.71% (Fig. 3C-2), and 18.1, 12.0, and 11.2% (Fig. 3C-3) for HIV-1<sub>WT</sub>/H9, HIV-1<sub>H219Q</sub>/H9, and HIV-1<sub>H219P</sub>/H9, respectively.

These data demonstrated that H219Q and H219P substitutions increased HIV-1 replication in CypA-rich cells, which was associated with the substantial reduction of CypA incorporation into daughter virions.

**p24 Gag Binding to CypA Affects HIV-1 Replication Kinetics**—Yin *et al.* (23) have reported that the addition of CsA (0.5  $\mu$ M) reduces CypA incorporation into daughter virions and increases replication rates of HIV-1<sub>NI.A.4</sub> in H9 cells, suggesting that excessively high intracellular CypA contents may reduce HIV-1 replication rates. We then examined the effects of CsA on the replication rates of HIV-1<sub>WT</sub> (Fig. 4, A–D) and HIV-1<sub>H219Q</sub> (Fig. 4, E–H) in four different cell preparations.

In MT-2 and H9 cells, 0.5  $\mu$ M CsA increased the replication rate of HIV-1<sub>WT</sub>, whereas at a higher concentration (2.5  $\mu$ M) its replication rate