

臨床研究の進歩 合併症の治療と対策

## 免疫再構築症候群への対応

古西 満<sup>1</sup> 宇野健司<sup>1</sup> 善本英一郎<sup>2</sup>

## Management of immune reconstitution inflammatory syndrome

<sup>1</sup>Mitsuru Konishi, <sup>1</sup>Kenji Uno, <sup>2</sup>Eiichiro Yoshimoto<sup>1</sup>Center for Infectious Diseases, Nara Medical University<sup>2</sup>Division of Infection Control, Nara Kohsei-kai Hospital

## Abstract

While antiretroviral therapy (ART) in HIV-infected patients results in dramatic reductions in HIV viral load and subsequent improvements in CD4 cell count, part of patients experience clinical deterioration as a direct consequence of rapid and dysregulated restoration of antigen-specific immune responses. This is termed "immune reconstitution inflammatory syndrome (IRIS)." Because there is no single agreed upon definition for IRIS, the diagnosis of IRIS is clinical. Several studies have demonstrated that lower CD4 cell count and higher viral load at the initiation of ART increase the risk of developing IRIS. Management of IRIS consists of appropriate treatment for the diseases of IRIS, control of the excessive inflammation (NSAIDs or corticosteroids), and interrupting ART.

**Key words:** immune reconstitution inflammatory syndrome, antiretroviral therapy, risk factor, management

## はじめに

有効な抗 HIV 治療を開始すると、1-2 週間でウイルス量は 90% 以上減少し、その後 8-12 週間は減少を続けて定常状態となる。このウイルス量の減少とは逆に単球、マクロファージ、NK 細胞の機能は回復し、CD4 陽性細胞数も増加してくる。

この時期には、既に治療した感染症の再発やそれまで臨床的に明らかでなかった感染症の発症などを認めることがある。これは、免疫系の再構築が体内に存在する病原体などの抗原に対する免疫応答を誘導して起こると考えられ、免

疫再構築症候群 (immune reconstitution inflammatory syndrome: IRIS) と呼ばれている。

しかし、IRIS に関する十分なエビデンスはまだ集積されていないため、本稿では、現時点で考えられている IRIS の臨床的概念、発症リスク、対処法などについて解説する。

## 1. IRIS の診断と臨床分類

IRIS の診断基準はいまだに確立していないが、Shelburne ら<sup>1)</sup>の提案は IRIS の概念を理解するうえで有用である (表 1)。現時点では高度の免疫不全がある HIV 感染者に新規の抗 HIV 治療を開始、もしくは効果不十分な治療を有効な抗

<sup>1</sup>奈良県立医科大学感染症センター <sup>2</sup>奈良厚生会病院 感染制御室

表1 Shelburneらによる免疫再構築症候群 (IRIS) の  
診断基準(文献<sup>1)</sup>より引用)

1) HIV(+)
2) HAARTを行っている ・ HIV-RNA量の減少 ・ CD4陽性細胞の増加(HIV-RNA量の減少より遅れてもよい)
3) 炎症過程に矛盾しない臨床症候がある
4) 以下の臨床経過を除外 ・ 既に診断された日和見感染症で予測される経過 ・ 新たに診断される日和見感染症として予測される経過 ・ 薬剤の副作用

表2 免疫再構築症候群 (IRIS) の臨床分類(文献<sup>2)</sup>より改変)

分類	対象となる抗原	実例
感染症(顕在化型)	増殖している病原体	クリプトコッカス髄膜炎の顕在化
感染症(矛盾悪化型)	死滅している病原体	治療後のニューモシスチス肺炎の悪化
自己免疫	宿主の抗原	Graves病
悪性腫瘍	腫瘍/発癌病原体	Kaposi肉腫
その他の炎症	様々	サルコイドーシス

HIV治療に変更した後、数カ月以内に日和見感染症などの疾患が発症、再発、再増悪した場合にはIRISとして対応することが妥当であると考えている。診断する際には、少なくとも開始した抗HIV治療が有効であることを確認し(血中HIV-RNA量の低下)、使用中の抗HIV薬などの副作用を除外する必要がある。

IRISの多くは日和見感染症の病原体が抗原となっているが、宿主の抗原(自己免疫)や腫瘍/発癌病原体の抗原(悪性腫瘍)などに免疫応答を生じることもある。感染症のIRISには、診断がされていない未治療の感染症が抗HIV治療後に顕在化する場合(顕在化型)と、治療によって改善・治癒していた感染症が抗HIV治療後に再増悪・再発する場合(矛盾悪化型)とがある(表2)<sup>2)</sup>。

## 2. IRISの疫学

確立した診断基準がなく、大規模な疫学調査が行われていないため、正確なIRISの発症率はわかっていない。これまでの比較的規模の大きな後向き調査では、抗HIV治療を受けた患者の17-25%に発症すると報告されている。南ア

フリカにおけるナイーブ症例423例の前向き調査では44例(10.4%)にIRISを発症し、発症率は100人年あたり25.1例であったと報告している<sup>3)</sup>。我が国の調査では、抗HIV治療を受けた2,018例中176例(8.7%)にIRISを発症していたが、施設別の発症率は2.0-15.4%と差異があり<sup>4)</sup>、IRISの発症率には症例背景や各施設の治療方針などの違いが影響すると考えられる。

IRISとして発症する疾患も各報告によって様々である。例えば、前述の南アフリカでの調査では結核症、帯状疱疹、単純ヘルペス、クリプトコッカス髄膜炎などの順に多く認められている<sup>3)</sup>。ところが、我が国の調査では帯状疱疹、非結核性抗酸菌症、サイトメガロウイルス感染症、ニューモシスチス肺炎、結核症、Kaposi肉腫、進行性多巣性白質脳症などの順となっている<sup>4)</sup>。

## 3. IRIS発症の危険因子

IRIS発症の危険因子についても様々な報告があり、いまだに明確な結論は得られていない。

これまでに抗HIV治療開始時のCD4陽性細胞数低値やHIV-RNA量高値が危険因子である

ことは指摘されている。著者らも抗 HIV 治療開始時に CD4 陽性細胞数 50/ $\mu$ L 未満の症例では odds 比が 5.78 (95% CI: 2.38-14.08,  $p < 0.001$ ), HIV-RNA 量 10 万コピー/mL 以上の症例では odds 比が 3.10 (95% CI: 1.38-6.93,  $p < 0.05$ ) となることを報告している<sup>5)</sup>。

また、抗 HIV 治療によって HIV-RNA 量が急速に低下することが危険因子の一つであるとの指摘もみられる。2008 年発売されたインテグラーゼ阻害薬 raltegravir (RAL) は強力な抗 HIV 効果を示し、非核酸系逆転写酵素阻害薬 efavirenz (EFV) を用いた抗 HIV 治療に比べ有意に早く HIV-RNA 量 50 コピー/mL 未満を達成している。ところが、IRIS の発症率は RAL を用いた抗 HIV 治療が 6%、EFV を用いた抗 HIV 治療が 4% と有意差はなく<sup>6)</sup>、HIV-RNA 量の急速な低下と IRIS 発症には関連がない可能性も考えられる。

Manabe ら<sup>7)</sup> は、ritonavir (RTV) を併用するプロテアーゼ阻害薬治療 (boosted PI) が IRIS 発症に関連すると報告している。PI は、*in vitro* で T 細胞の増殖やアポトーシスに影響することやマクロファージからの炎症性サイトカイン産生を誘導することが認められる。そのため、PI は HIV 増殖抑制とは別の機序で IRIS 発症に関与する可能性が推測されている。

#### 4. IRIS への対処法

IRIS を回避するための方法や IRIS を発症したときの対応もいまだに確立していない。したがって、以下にはこれまでの経験から考えられる対処法について述べる (表 3)。

##### a. 抗 HIV 治療開始前

IRIS の疾患は事前に把握しにくいこともあるので、抗 HIV 治療開始前には日和見合併症の有無を注意深く評価する。免疫不全が進行した症例、特に CD4 陽性細胞数が 50/ $\mu$ L 未満の症例では、眼底検査、胸部 X 線写真、血液検査 ( $\beta$ -D グルカン、クリプトコッカス抗原、サイトメガロウイルス抗原など)、可能ならば脳 MRI などをスクリーニングしておく。

また、CD4 陽性細胞数 50/ $\mu$ L 未満の症例には

表 3 免疫再構築症候群 (IRIS) への対処法

抗 HIV 治療前
1. 顕在化していない日和見合併症の評価 ・気がついていない合併症がないかを確認 (例えば、眼底検査、CMV 抗原検査など)
2. 対象となる日和見感染症の予防 ・ニューモシスチス肺炎、MAC 感染症など
3. 発症した日和見感染症の十分な治療
IRIS 発症時
1. IRIS の疾患に対する治療
2. 過剰な炎症のコントロール ・NSAIDs ・副腎皮質ステロイド薬
3. 最終手段として抗 HIV 治療の中止

非結核性抗酸菌症、200/ $\mu$ L 未満の症例にはニューモシスチス肺炎に対する予防を開始する。照屋ら<sup>8)</sup> は、予防の徹底によって非結核性抗酸菌症の IRIS 発症が減少したことを報告している。

日和見合併症の治療後いつから抗 HIV 治療を開始するかについても結論は出ていない。IRIS を回避するには体内の病原体抗原量を十分に減らしてから抗 HIV 治療を開始することが望ましいが、抗 HIV 治療開始を遅らせることでほかの日和見合併症を発症するリスクがあり、悩ましい問題である。我が国では日和見感染症の治療を行ってから抗 HIV 治療を開始する傾向があるが、欧米では早期に抗 HIV 治療を導入することを推奨する傾向にある。

##### b. IRIS 発症時

IRIS を発症しても有効な抗 HIV 治療をできるかぎり継続することが基本である。

IRIS への対応には、疾患自体の治療と過剰な炎症のコントロールとがある。疾患が感染症のときは病原体の増殖がなければ、抗微生物薬を投与しないという考えもある。しかし、実際に病原体の増殖がないことを証明するのは難しく、IRIS が軽症である場合を除けば抗微生物薬の開始・追加・変更が必要であると考えられる。炎症をコントロールする方法には、NSAIDs や副腎皮質ステロイド薬の投与がある。副腎皮質ステロイド薬は、臓器障害が重篤、または生命の危機がある場合で他の方法が無効なときに考慮

する。一般にプレドニゾン1mg/kg/日(最大投与量60-80mg/日)で開始し、週から月単位で減量することが多い。

また、IRISのために抗HIV治療を中止することもあるが、その基準も決まっていない。現時点では、抗HIV治療の継続が生命を脅かす場合や副腎皮質ステロイド薬が無効な場合などに抗HIV治療の中止を考慮している。

## おわりに

IRISは患者の治療計画を妨げることから、発症を予防できることが望ましい。しかし、いまだに確実な診断ができないためにIRISの研究はなかなか進展しない状況にある。今後の研究成果によって効果的、かつ安全性の高い抗HIV治療が可能になることが望まれる。

## ■ 文 献

- 1) Shelburne SA, et al: Immune reconstitution inflammatory syndrome: more answers, more questions. *J Antimicrob Chemother* 57: 167-170, 2006.
- 2) Dhasmana DJ, et al: Immune reconstitution inflammatory syndrome in HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy: Pathogenesis, clinical manifestations and management. *Drugs* 68: 191-208, 2008.
- 3) Murdoch DM, et al: Incidence and risk factors for the immune reconstitution inflammatory syndrome in HIV patients in South Africa: a prospective study. *AIDS* 22: 601-610, 2008.
- 4) 古西 満ほか: 免疫再構築症候群の発症状況調査. 厚生労働科学研究エイズ対策事業「HAART時代の日和見合併症に関する研究」平成15年度報告書, p82-87, 2004.
- 5) 古西 満ほか: 免疫再構築症候群に関する調査および情報提供. 厚生労働科学研究エイズ対策事業「重篤な日和見感染症と最適治療に関する研究」平成20年度報告書, p53-60, 2009.
- 6) Lennox JL, et al: Safety and efficacy of raltegravir-based versus efavirenz-based combination therapy in treatment-naïve patients with HIV-1 infection: a multicentre, double-blind randomized controlled trial. *Lancet* 374: 796-806, 2009.
- 7) Manabe YC, et al: Immune reconstitution inflammatory syndrome: Risk factors and treatment implications. *J Acquir Immune Defic Syndr* 46: 456-462, 2007.
- 8) 照屋勝治ほか: HIV感染者における免疫再構築症候群(サイトメガロウイルス網膜炎)発症予防に関する研究. 厚生労働科学研究エイズ対策事業「重篤な日和見感染症と最適治療に関する研究」平成19年度報告書, p34-38, 2008.



別刷

# HIV感染症と AIDS の治療

---

VOL. **1** No. **1**

---

2010.5



# HIV感染者における骨代謝異常

*Osteoporosis/osteopenia in HIV-infected patients*

奈良県立医科大学感染症センター非常勤講師／助教\*  
エクセディクリニック産業医

古西 満, 宇野 健司\*  
Mitsuru Konishi Kenji Uno

## Summary

欧米では、HIV感染者に骨代謝異常(骨粗鬆症／骨量減少症)が高頻度で見られる。わが国では骨代謝マーカーで骨吸収が亢進している症例が多く、将来的には骨代謝異常の頻度が欧米レベルに達する可能性がある。

骨量減少の危険因子には、性別、年齢、喫煙・飲酒、運動不足、副腎皮質ホルモン薬使用などがある。加えて、抗HIV治療が骨代謝異常の要因である可能性がある。抗HIV薬のなかではプロテアーゼ阻害薬との関連性を指摘する報告が多いが、否定的な意見もあり、結論は出ていない。

HIV感染者の骨粗鬆症の治療は、生活指導を行ったうえで、現時点では薬物療法はビスフォスフォネート製剤が第一選択薬となる。

### Key words

- 骨粗鬆症
- 骨量
- 骨代謝マーカー
- HIV感染症
- 抗HIV薬

## はじめに

わが国においても骨粗鬆症が国民の健康状態を悪化させ、社会的負担を増大させることが指摘されている。たとえば、大腿骨頸部骨折は年間12万件以上発症していると推定され、そのうち約10%の症例は1年以内に死亡し、約30%の症例は日常生活動作能力が低下している<sup>1)</sup>。そのため、すべての年齢を通じて骨の健康を保持することが必要である。

HIV (human immunodeficiency virus) 感染者は有効な抗HIV治療を受けることが可能となり、その予後は著明に改善している<sup>2)</sup>。そのため、HIV感染者の高齢化に関わる課題が注目されてきており、骨粗鬆症はその1つでもある。また、HIV感染者では骨代謝異常の頻度が高いことも報告されており、HIV感染者の診療経過中には骨粗鬆症に対して注意する必要がある。

そこで、本稿ではHIV感染者における骨代謝異常(骨粗鬆症／骨量減少症)の現状をわれわれの検討データを交えながら紹介するとともに、診断や予防・治療について概説する。

## 骨粗鬆症の概念

2000年に、アメリカの国立衛生研究所(National Institutes of Health; NIH)で骨粗鬆症のコンセンサス会議が行われている。そこでは、骨粗鬆症の考え方が従来の骨密度を中心とするものから、骨折発生に関わる危険因子全体を含めるものへと改められている。

NIHコンセンサス会議では、骨粗鬆症の定義につい

て「骨強度の低下を特徴とし、骨折リスクが増大しやすくなる骨格疾患」としている<sup>3)</sup>。そして、骨強度低下要因は骨密度と微細構造だけではなく、“骨質”(骨代謝回転, 微細損傷の集積, 骨組織のミネラル化など)が関与することが強調されている。

## 骨粗鬆症の診断

骨粗鬆症の診断時には、①医療面接、②身体診察、③骨量測定、④胸・腰椎 X線撮影、⑤血液・尿検査(骨代謝マーカー測定を含む)を実施する。低骨量をきたす疾患や続発性骨粗鬆症を除外した後に脆弱性骨折の

有無に分類して骨評価を行い、正常・骨量減少・骨粗鬆症を診断する<sup>4)</sup>。

骨量測定法には、二重エネルギー X線吸収(dual-energy X-ray absorptiometry; DXA)法、一重エネルギー X線吸収(single energy X-ray absorptiometry; SXA)法、MD(microdensitometry)法、定量的CT(quantitative computed tomography; QCT)法、定量的超音波(quantitative ultrasound; QUS)法などがある(表1)。DXA法は、異なるエネルギーレベルをもつ X線の透過率差を利用して骨量を測定する方法である。測定対象骨は、腰椎、大腿骨、橈骨、踵骨および全身骨である。測定精度が高いうえ測定時間が短く、

表1. 骨量測定法とその特徴

測定法	測定対象骨	特徴
二重エネルギー X線吸収法 (DXA法)	腰椎、大腿骨、橈骨、踵骨、全身骨	精度が高い 測定時間が短い 骨量測定の標準法である
一重エネルギー X線吸収法 (SXA法)	橈骨、踵骨	精度が高い 測定時間が短い
Microdensitometry 法 (MD法)	第二中手骨	多数例のスクリーニングに適している 微量な骨量変化を正確に測定できない
定量的CT法 (QCT法)	腰椎、橈骨、脛骨	三次元骨密度を算出できる 被曝量が多い 感度は高いが精度が低い
定量的超音波法 (QUS法)	踵骨、脛骨、指骨	被曝の問題がない 測定時間が短い 装置が安価である 測定精度は低い

表2. 骨代謝マーカーの種類

測定意義	測定検体	検査項目
骨形成マーカー	血清	骨型アルカリフォスファターゼ(BAP) I型プロコラーゲン架橋N-プロペプチド(PINP) I型プロコラーゲン架橋C-プロペプチド(PICP) オステオカルシン(OC)
骨吸収マーカー	血清	I型コラーゲン架橋N-テロペプチド(NTX) I型コラーゲン架橋C-テロペプチド(CTX) 酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ5b分画(TRACP 5b)
	尿	I型コラーゲン架橋N-テロペプチド(NTX) I型コラーゲン架橋C-テロペプチド(CTX) デオキシピリジノリン(DPD) 遊離型DPD 総DPD

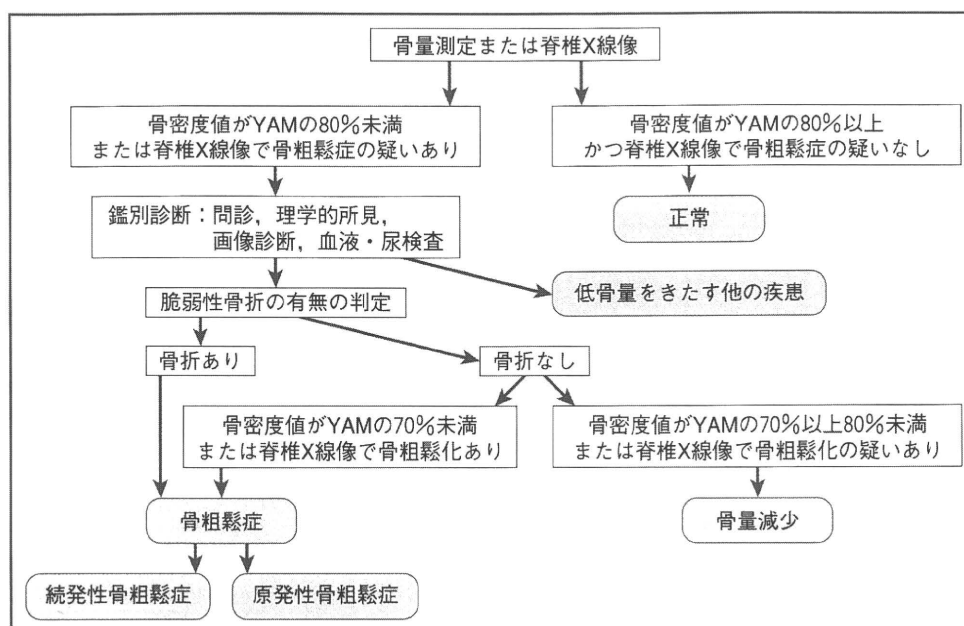


図1. 骨粗鬆症の診断手順

YAM：若年成人(20～44歳)の平均値

(折茂 肇,他:原発性骨粗鬆症の診断基準(2000年度改訂版),日骨代謝会誌 18:76-82,2001を一部改変)

放射線被曝量もわずかであることから、腰椎DXA法は骨量測定の標準方法に位置づけられている。

骨代謝マーカーとは、古い骨が破骨細胞によって除去され(骨吸収)、そこに新しい骨が形成される(骨形成)両状態を評価するバイオマーカーである。前者は骨吸収マーカー、後者は骨形成マーカーと呼ばれる(表2)。骨吸収が亢進している症例では、近い将来の骨密度低下が大きいだけでなく骨折の危険性も高いと判断される<sup>5)</sup>。したがって、骨代謝マーカーは薬物治療に踏み切るかどうかの判断や骨吸収抑制薬の選択に対する判断材料として役立つ。

わが国での骨粗鬆症の診断基準は、脊椎X線像で脆弱性骨折を認めるか、認めない場合には骨密度値がYAM(若年成人(20～44歳)の平均値)の70%未満とされている。骨粗鬆症には、原発性骨粗鬆症と続発性骨粗鬆症があるので鑑別が必要である。また、脆弱性骨折がなく、骨密度値がYAMの70%以上80%未満の場合は骨量減少と診断する(図1)。なお、わが国の診断基準値となっているYAMの70%の骨密度値は、国際的な基準値であるTスコアでの-2.5SDにほぼ一致する。

## HIV感染者における骨代謝異常の頻度

われわれは、39名のHIV感染者(平均年齢41.0歳、男性36例：女性3例)を対象にDXA法で骨量測定を行うとともに、骨代謝マーカー(血清骨型アルカリフォスファターゼ(BAP)と尿中デオキシピリジノリン(DPD))を測定した。その結果、骨粗鬆症は1名(2.6%)、骨量減少は9名(23.1%)であった。また、尿中DPD値は20名(51.3%)でカットオフ値よりも高値であり、骨吸収が亢進していた<sup>6)</sup>(図2)。抗HIV治療中の27名と未治療の12名での骨密度は $88.6 \pm 10.9\%$ と $94.8 \pm 9.2\%$ であり、抗HIV治療中の症例で骨密度が低い傾向が認められた( $p=0.09$ )。

高濱ら<sup>7)</sup>は、抗HIV治療を導入した男性患者46名で同様の検討を行い、DXA法による骨密度低下は9名(20.0%)、尿中DPD値の高値は22名(47.8%)に認めたと報告している。対象設定が若干異なっているが、われわれの結果と類似している。

Cazanaveら<sup>8)</sup>によるHIV感染者492名(年齢中間値43歳、男性73%)のコホート研究では、骨量減少が男性で54.6%、女性で51.1%、骨粗鬆症が男性で33.7%、

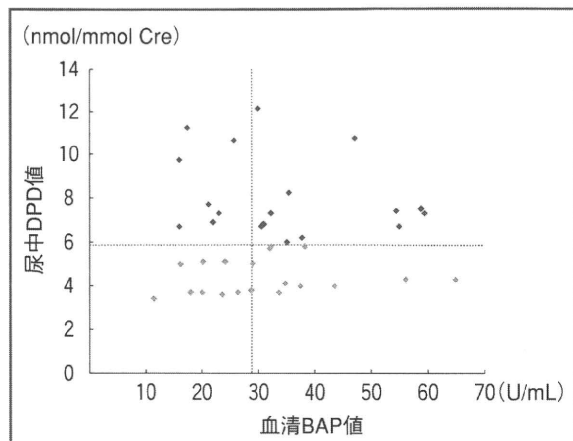


図2. HIV感染者39名の骨代謝マーカー

女性で8.3%に認めたと報告している。また、メタアナリシスでは884名のHIV感染者の67%で骨量減少、15%で骨粗鬆症を認め、HIV非感染者と比較すると骨量減少のオッズ比は6.4、骨粗鬆症のオッズ比は3.7であったことが記されている<sup>9)</sup>。

このように、海外の報告ではHIV感染者の半数以上に骨粗鬆症/骨量減少を認めており、わが国の現状とは差がある。その原因は明らかではないが、骨代謝マーカーの結果をみるとわが国でもHIV感染者の半数で骨吸収が亢進しており、将来的には骨粗鬆症/骨量減少の発症が欧米レベルに達する可能性はあるため、今後の動向に注意が必要である。

### 骨粗鬆症の成因と危険因子

成人の骨密度は、少年期から思春期にかけて獲得される骨密度(骨量頂値)と成人以降の骨密度の喪失速度によって決定される。骨リモデリングは、休止期の骨表面に骨質の劣化などを感知して破骨細胞が誘導されることから始まり、数週間の骨吸収期後に骨芽細胞が誘導され、数ヶ月にわたって骨形成が行われる。破骨細胞は、単球・マクロファージ系の血球細胞から分化した骨でのみ形成される骨吸収活性をもつ細胞である。破骨細胞への終末分化には、骨芽細胞や骨髄ストローマ細胞が産生するサイトカインであるRANKL(receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand)が必須とされている。われわれも、HIV感染者の血清RANKL濃度と尿中DPD値には有意な正の相関があることを確認し

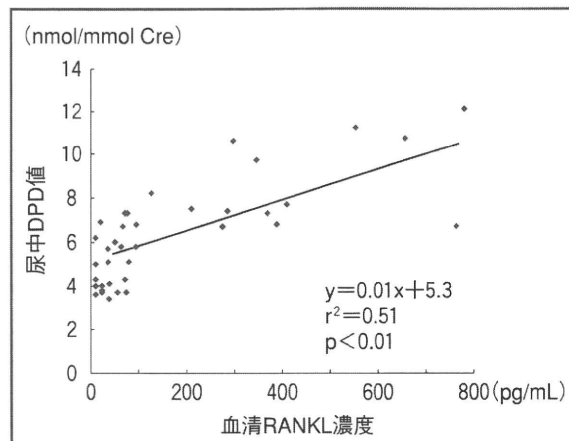


図3. HIV感染者における血清RANKL濃度と尿中DPD値との関係

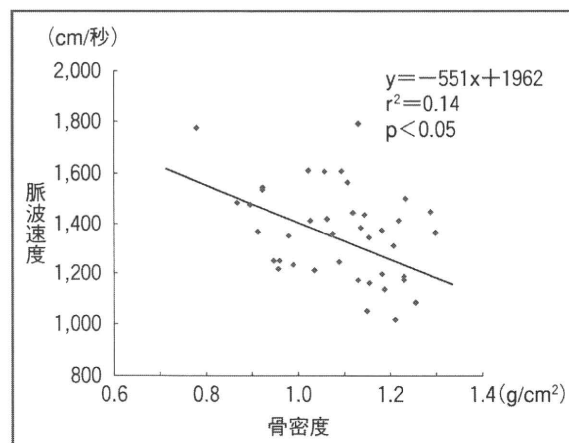


図4. HIV感染者における骨密度と脈波速度(arterial stiffness)との関係

ており<sup>9)</sup>(図3)、HIV感染者の骨代謝異常を考える際にもRANKLは重要な因子の1つである。一方、骨芽細胞は間葉系の幹細胞から分化し、I型コラーゲンを主体とする基質蛋白質の合成と細胞外基質へのミネラルの沈着に関わる。骨芽細胞の機能や分化は、副甲状腺ホルモンや局所性サイトカイン、交感神経を介する支配などを受けている。

骨量減少の危険因子には、性別、年齢、低BMI(body mass index)、喫煙・飲酒、運動不足、副腎皮質ホルモン薬使用などがあり、HIV感染者においてもこれらは危険因子となる。しかし、HIV感染者では前述したように骨代謝異常の頻度が高く、抗HIV治療との関連

表 3. 骨粗鬆症治療薬と推奨度

分類	薬剤名	骨密度増加	椎体骨折予防	非椎体骨折予防	総合評価
ビスフォスフォネート製剤	アレンドロン酸	A	A	A	A
	リセドロン酸	A	A	A	A
	エチドロン酸	A	B	B	B
選択的エストロゲン受容体モジュレーター (SERM)	ラロキシフェン塩酸塩	A	A	B	A
活性型ビタミンD <sub>3</sub> 製剤	アルファカルシドールなど	B	B	B	B
カルシトニン製剤	エルカトニンなど	B	B	C	B
ビタミンK <sub>2</sub> 製剤	メナテトレノン	B	B	B	B
女性ホルモン製剤	エストリオールなど	A	A	A	C
カルシウム製剤	リン酸水素カルシウムなど	C	C	C	C

A：強く推奨，B：推奨，C：勧めるだけの根拠が不明確，D：推奨不可

(文献4)より一部改変)

が検討されている。メタアナリシスでは、抗HIV治療例は未治療例に比べ、2.5倍の骨量減少リスクがある<sup>9)</sup>と報告している。また、SMART (Strategies for Management of Anti-Retroviral Therapy) 試験でも抗HIV治療継続例のほうが中断例に比べ、骨量減少がより顕著であった<sup>10)</sup>ことが示されている。抗HIV薬では、プロテアーゼ阻害薬と骨量減少との関連を指摘する報告が多いが<sup>11)</sup>否定する論文もあり<sup>12)</sup>、いまだに結論には至っていない。

最近の臨床・疫学的研究では、骨粗鬆症と心血管疾患(動脈硬化)の関連性を指摘する報告が相次ぎ、この関連性を「骨血管相関」と呼んでいる。われわれは、動脈硬化の指標として脈波速度(arterial stiffness)を用いて骨密度との関連性を調べ、有意な負の相関を認めたことから<sup>13)</sup>(図4)、HIV感染者においても「骨血管相関」が存在することを明らかにしている。今後、HIV感染者の骨代謝異常と動脈硬化は関連づけて診療する視点をもつ必要があると考える。

## 骨粗鬆症の治療と予防

骨粗鬆症の治療を行う場合には、カルシウム、ビタミンD、ビタミンKなどを食事(サプリメント)でしっかり摂取することや運動量を増やすこと、禁煙や飲酒量を制限することなど生活指導を欠かすことはできない。

一般的に、①脆弱性既存骨折がない場合で(1)骨密度がYAM 70%未満、(2)YAM 70~80%で閉経後女性、(3)YAM 70~80%の50歳以上の男性で過度の飲酒・現在の喫煙・大腿骨頸部骨折の家族歴のいずれか1つを有する例、②脆弱性既存骨折がある場合(男女とも50歳以上)に薬物治療を開始する<sup>4)</sup>。選択すべき治療薬は表3に示す薬剤があるが、効果および有害事象を加味した総合評価について、『骨粗鬆症の予防と治療ガイドラン2006年版』<sup>4)</sup>では推奨グレードを設定している。現在、モノクローナル抗ヒトRANKL抗体(デノスマブ)が開発治験中であるが、良好な治療成績が得られており、骨粗鬆症の治療戦略に新たに加わる薬剤として期待される。

HIV感染者の骨粗鬆症の薬物治療としては、ビスフォスフォネート製剤が最もよく検討され効果も確認されているので<sup>14)</sup>、第一選択薬となる。他の薬剤についてはHIV感染者に特化した検討がなく、現時点では使用に関する推奨を決めることは不可能である。また、骨粗鬆症のために抗HIV治療を変更することに関してもいまだ十分なデータがなく、治療方針として推奨はされていない。これらの課題については、今後の研究成果を待つ必要がある。

## 文献

- 1) Committee for Osteoporosis Treatment of The Japanese Orthopaedic Association. Nationwide survey of hip frac-

- tures in Japan. *J Orthop Sci* **9**: 1-5, 2004
- 2) Lohse N, Hansen AB, Pedersen G, et al: Survival of persons with and without HIV infection in Denmark, 1995-2005. *Ann Intern Med* **146**: 87-95, 2007
  - 3) NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy: Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *JAMA* **285**: 785-795, 2001
  - 4) 骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン作成委員会: 骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン2006年版. 東京, ライフサイエンス出版, 2006
  - 5) Garnero P, Sornay-Rendu E, Claustrat B, et al: Biochemical markers of bone turnover, endogenous hormones and the risk of fractures in postmenopausal women; the OFELY study. *J Bone Miner Res* **15**: 1526-1536, 2000
  - 6) Konishi M, Takahashi K, Yoshimoto E, et al: Association between osteopenia/osteoporosis and the serum RANKL in HIV-infected patients. *AIDS* **19**: 1240-1241, 2005
  - 7) 高濱宗一郎, 山本政弘, 南 留美, 他: 当院におけるHAART導入患者での骨粗鬆症の評価. *日エイズ会誌* **9**: 493, 2007
  - 8) Cazanave C, Dupon M, Lavignolle-Aurillac V, et al: Reduced bone mineral density in HIV-infected patients: prevalence and associated factors. *AIDS* **22**: 395-402, 2008
  - 9) Brown TT, Qaqish RB: Antiretroviral therapy and the prevalence of osteopenia and osteoporosis; a meta-analytic review. *AIDS* **20**: 2165-2174, 2006
  - 10) Grund B, Peng G, Gibert CL, et al: Continuous antiretroviral therapy decreases bone mineral density. *AIDS* **23**: 1519-1529, 2009
  - 11) Duvivier C, Kolta S, Assoumou L, et al: Greater decrease in bone mineral density with protease inhibitor regimens compared with nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor regimens in HIV-1 infected naïve patients. *AIDS* **23**: 817-824, 2009
  - 12) Mondy K, Yarasheski K, Powderly WG, et al: Longitudinal evolution of bone mineral density and bone markers in human immunodeficiency virus-infected individuals. *Clin Infect Dis* **36**: 482-490, 2003
  - 13) 古西 満, 善本英一郎, 宇野健司, 他: HIV感染者において「骨血管相関」は存在するか. *日エイズ会誌* **8**: 370, 2006
  - 14) McComsey GA, Kendall MA, Tebas P, et al: Alendronate with calcium and vitamin D supplementation is safe and effective for the treatment of decreased bone mineral density in HIV. *AIDS* **21**: 2473-2482, 2007



## HIV感染者の薬疹に関する臨床的検討

治田匡平\*<sup>†1</sup>, 古西 満<sup>2</sup>, 乾比砂野<sup>1</sup>, 生駒貴世子<sup>3</sup>, 森田幸子<sup>1</sup>, 北 啓二<sup>1</sup>, 宇野雅之<sup>1</sup>

奈良県立医科大学附属病院薬剤部<sup>†1</sup>, 奈良県立医科大学感染症センター<sup>2</sup>, 奈良県立五條病院薬剤部<sup>3</sup>

### Clinical Assessment of Adverse Drug Eruption in HIV-Infected Patients

Kyohei Haruta\*<sup>†1</sup>, Mitsuru Konishi<sup>2</sup>, Hisano Inui<sup>1</sup>, Kiyoko Ikoma<sup>3</sup>, Sachiko Morita<sup>1</sup>, Hiroji Kita<sup>1</sup>, Masayuki Uno<sup>1</sup>

Department of Pharmacy, Nara Medical University Hospital<sup>†1</sup>, Center for Infectious Diseases, Nara Medical University<sup>2</sup>,  
Department of Pharmacy, Nara Prefectural Gojo Hospital<sup>3</sup>

〔受付：2009年6月1日 受理：2009年10月21日〕

human immunodeficiency virus (以下, HIV) 感染者に発症した薬疹の臨床像を解析した。1990～2008年に奈良県立医科大学附属病院を受診したHIV感染者121名のうち, 28名 (23.1%) に36件の薬疹を認めた。原因薬剤はnevirapineなどの抗HIV薬が15件, sulfamethoxazole/trimethoprimが7件などであった。薬疹の性状は丘疹紅斑が23件 (63.9%) と最も多かったが, 重症の薬疹も3件 (8.3%) にみられた。発熱や搔痒感が随伴症状として多く, 13件 (36.1%) で肝機能異常を認めた。服薬から薬疹の出現までの期間は, 80.6%が14日以内であった。薬疹への処置として, 被疑薬の中止が80.6%, 副腎皮質ホルモン薬の全身投与が13.9%の症例に行われた。HIV感染者は薬疹の発症頻度が高く, 服薬支援をする際にHIV感染者の薬疹について理解しておく必要があると考えた。

キーワード—human immunodeficiency virus (HIV) 感染症, 薬疹, アドヒアランス, 服薬指導

### 緒言

human immunodeficiency virus (以下, HIV) 感染症に対する治療は進歩し, HIV感染者の予後は著明に改善してきている<sup>1,2)</sup>。2009年9月現在, 我が国で市販されている抗HIV薬には核酸系逆転写酵素阻害薬, 非核酸系逆転写酵素阻害薬, プロテアーゼ阻害薬, インテグラーゼ阻害薬, CCR5拮抗薬の5クラス20種以上の薬剤が存在する。また, HIV感染者は抗HIV治療だけでなく, 日和見感染症などの合併症に対しても様々な薬剤を使用する機会が多い。薬剤師は, HIV感染者の薬物治療を効果的かつ安全に行うために適切な服薬指導・支援を行うことが必要である。そのためには, 薬剤の作用機序, 薬物動態, 薬物相互作用を理解するとともに, 副作用について十分に把握する必要がある。抗HIV薬は軽微なものも含めると副作用の多い薬剤であり, しかも, HIV感染者は副作用の発現率が高い<sup>3)</sup>ことも指摘されている。従って, 副作用の発生状況を把握することは, HIV感染者の診療を支援していくうえで重要である。そこで今回, 我々は副作用のなかでも服薬中止となる症例が多く, 容姿への影

響のため患者に不評であった薬疹に焦点を絞って, その状況を分析したので報告する。

### 対象と方法

1990～2008年に奈良県立医科大学附属病院 (以下, 当院) を受診したHIV感染者121名のうち, 薬疹と臨床診断した症例について診療録の記載を基に, その臨床像, 対応を分析した。薬疹の診断は, 薬剤服用と発疹出現との病歴, 被疑薬中止によって発疹が消失すること, 再投与による再発, パッチテスト結果, 皮膚科医の意見などを総合的に判断して行った。121名の初診時年齢は平均38.8歳 (18～72歳), 性別は男性107名・女性14名であり, HIV感染リスクは血液製剤35名・異性間性的接触46名・同性間性的接触39名・不明1名であった。

### 結果

薬疹は, 28例 (23.1%) で36件認められた。複数回の薬疹を認めた症例は6例 (2件: 4例, 3件: 2例) であった。薬疹発症時の年齢は平均38.5歳 (20～67歳) であり, 男性が22例 (男性HIV感染者の20.6%), 女性が6

† 奈良県橿原市四条町840 ; 840, Shijo-cho, Kashihara-shi, Nara, 634-8522 Japan



例（女性HIV感染者の42.9%）であった。HIV感染リスク別では、血液製剤7例（20.0%）・異性間性的接触13例（28.3%）・同性間性的接触8例（20.5%）であった。薬疹発症時に入院中の症例は11件、外来通院中の症例は25件であった。外来通院中の症例のうち6件は薬疹のため入院した。

薬疹の原因薬剤は抗HIV薬が15件、sulfamethoxazole/trimethoprim（以下、ST）が7件、dapstoneが4件、抗菌薬が4件などであった。抗HIV薬では、nevirapine（以下、NVP）が4件、efavirenz（以下、EFV）・tenofovir（以下、TDF）がそれぞれ3件などであった。造影剤や市販の健康補助食品による薬疹も認めた（図1）。

薬疹の性状は、丘疹紅斑が23件（63.9%）と最も多かった。ほかに、多形紅斑が6件、紅皮症・粘膜皮膚眼症候群が各々2件、蕁麻疹・光線過敏症・中毒性表皮壊死症が各1件であった（表1）。3件（8.3%）は重症に分類される薬疹（粘膜皮膚眼症候群・中毒性表皮壊死症）に該当し、被疑薬はabacavir, dapstone, carbamazepineであった。発症部位は顔や体幹、四肢に重複して発症していたが、男女間でその分布に差はなかった（表2）。随伴症状は、掻痒感を伴った症例が24件（66.7%）、発熱を認めた症例が20件（55.6%）であった。臨床検査値異常は、肝機能異常が13件（36.1%）、c-reactive protein（CRP）上昇が7件（19.4%）、腎機能異常・白血球減少が各5件（13.9%）などであった（図2）。肝機能異常の有無による薬疹の性状に大きな差は認められなかったが、重症型の薬疹、またはSTによる薬疹が認められた症例では、全例で肝機能異常が認められた。肝機能異常の程度は、肝逸脱酵素値が200IU/L未満の中等度までであった。

被疑薬の服用開始から薬疹の出現までの日数は図3の通りで、中央値が8.5日であった。29件（80.6%）は14日以内に出現していた。服薬後1・2日目に出現した5件は造影剤や抗菌薬などが被疑薬であり、いずれも軽症型の薬疹であった。最も症例数の多かったSTによる薬疹は、服薬後7日目から16日目に出現していた。

薬疹発症時に被疑薬を中止したのは全36件のうち29件（80.6%）で、抗HIV薬の中止は15件中11件（73.3%）であった。治療的処置として、抗アレルギー薬の服用は17件（47.2%）、副腎皮質ステロイド薬や抗ヒスタミン薬などの外用薬塗布は11件（30.6%）、副腎皮質ステロイド薬の全身投与は5件（13.9%）、グリチルリチン酸の注射は3件（8.3%）に実施されていた。12件（33.3%）では、特に処置を行わずに経過観察であった。

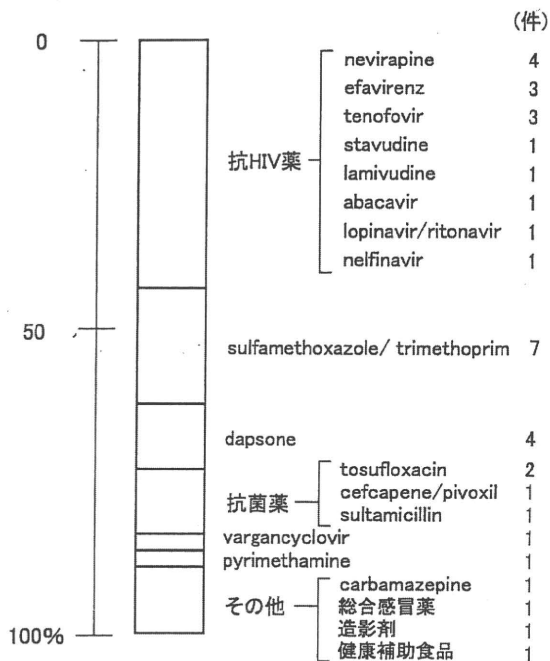


図1 薬疹の被疑薬の内訳

表1 薬疹の臨床形態とその頻度

臨床形態	件数	頻度 (%)
丘疹紅斑	23	63.9
多形紅斑	6	16.7
紅皮症	2	5.6
粘膜皮膚眼症候群	2	5.6
蕁麻疹	1	2.8
光線過敏症	1	2.8
中毒性表皮壊死症	1	2.8

表2 薬疹の発症部位

部位	男性 (30件)	女性 (6件)
顔	25	4
体幹	29	6
上肢	30	6
下肢	11	2

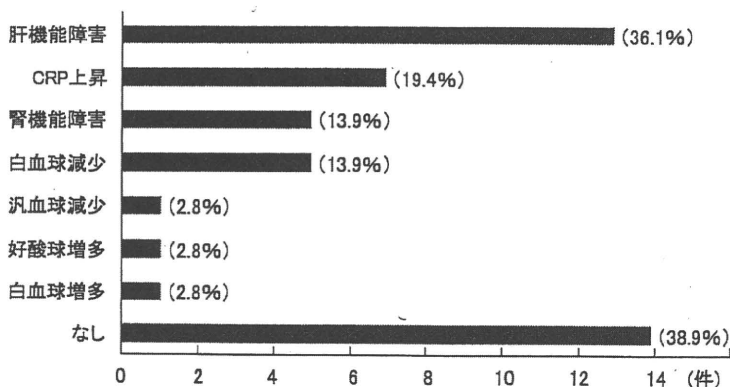


図2 薬疹発症時に認めた臨床検査値異常

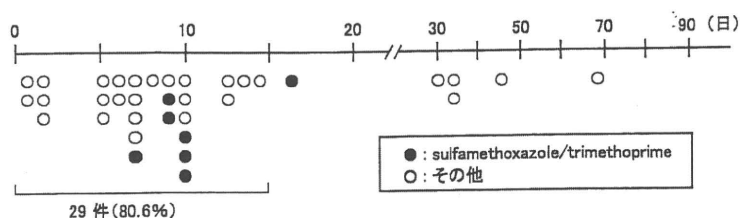


図3 被疑薬投与から薬疹出現までの日数

## 考察

HIV感染症の予後は強力な抗HIV療法（highly active antiretroviral therapy：以下HAART）によって劇的に改善<sup>1,2)</sup>，HIV感染症はコントロール可能な慢性疾患となっている。しかし，根治療法は未だ存在せず，抗HIV薬を生服し続ける必要がある。そのうえ，HAART成功の重要な鍵が高いアドヒアランスの維持である<sup>4)</sup>ことは，新薬が発売され，治療薬の選択肢が広がった今日でも変わらない。

アドヒアランスの低下は様々な要因によって起こる<sup>5)</sup>が，多くの患者にとって抗HIV薬の副作用が大きなマイナス因子となっていると考えられる。薬疹は，消化器症状などと同様に自覚症状として認識でき，発熱や搔痒感などの苦痛な症状を伴うこともある。また，薬疹は患者の容姿に変化をもたらすため，アドヒアランスの低下につながりやすい。そのため，HIV感染者における薬疹の発症状況などを把握しておくことは意義があると考えられる。

今回の検討では当院における薬疹の発症頻度は，HIV感染者の23%に認められた。Smithら<sup>6)</sup>はHIV感染者974名を46ヵ月間観察したところ201名に283回の薬疹を認め，Heller<sup>7)</sup>はHIV感染者の約20%で薬疹を発症すると述べており，当院の発症頻度と類似している。我が国では，赤城ら<sup>8)</sup>の報告でHIV感染者の薬疹発症率が13.4%で，非HIV感染者の3.9%に比べ有意に高率であることが指摘されている。HIV感染者で薬疹の発症率が高い原因は解明されていないが，HIV感染者では残存するリンパ球が非常に活性化していること，免疫系の調節機能に障害を来していること，human herpesvirus 6 (HHV-6)などのウイルス再活性化が起こっていることなどが関連していると推察されている<sup>9)</sup>。

今回の検討では，被疑薬と薬疹の性状や発症部位，発症時期に関連は認められなかった。また，薬疹の発症に年齢やHIV感染リスクの偏りは認められないが，女性のほうが男性よりも発症率が高い傾向を示している。症例数が少なく，統計学的な有意差も認めていないことから，HIV感染者の薬疹発症率に性差が存在するのかが今後の検討を待つ必要があると考えられる。薬疹の発症時期は80%

の症例が服薬開始から14日以内であり，薬剤開始後2週間は薬疹の発症に留意すべきである。薬疹の性状は多くが丘疹紅斑などの軽症から中等度のものであったが，粘膜皮膚眼症候群のような重症型の薬疹も認められたことから，迅速な診断，かつ被疑薬の中止といった適切な処置をすることにより，肝機能異常などのほかの随伴症状の重症化を抑えることが可能であると考えられる。

薬疹の被疑薬にはST，NVP，EFVなど，従来から薬疹の頻度が高いものだけでなく様々な薬剤があり，なかでも市販の健康補助食品による薬疹は教訓的であったと考える。この商品は免疫力強化を謳い文句に販売されている健康補助食品で，配糖体抽出エキス・アガリクスを主とする多彩な成分を含む製品である。神代ら<sup>10)</sup>は，主に消化器疾患をもつ451名に健康補助食品の摂取状況をアンケート調査し，72.3%の患者で摂取経験があると報告している。しかも，多くの患者は主治医に相談せず，他人の勧めやテレビ・雑誌の情報で服用を開始している。従って，医療機関からの投薬内容だけでなく，患者各自で入手可能なサプリメント，健康補助食品や漢方薬などについても服用状況を把握し，適切な指導を行うことが重要である。

薬疹の対処は被疑薬の中止が基本となるが，EFVなどは継続しながら消褪することもあるため，薬疹発症時には専門医の診察を受けることが必要である。今回の検討でも，抗HIV薬の薬疹では15件中4件で薬剤を継続投与できた。また，抗HIV薬を変更する場合も，基本的にはキードラッグとバックボンドラッグの組み合わせとし，耐性の可能性がない薬剤を選択した。今回の検討では，薬剤耐性のために薬剤を選択できない症例はなかった。

HIV感染者は薬疹の発症リスクが高く，時に重篤になることもある。薬剤師がHIV感染者の薬疹について理解し，患者に薬疹の発症しやすい時期，具体的な症状や随伴症状，自己判断による休業・再開の危険性などを事前に十分説明し，症状が認められた場合には医師や薬剤師へ相談するように連絡先などの対処方法を指導することで，薬疹発症時に患者が慌てることなく適切に対応できるようになる。その結果，薬疹に対する不安を排除することができればアドヒアランスが向上し，HIV感染者の予後改善につながると思う。

## 引用文献

- 1) N. Lohse, A.B. Hansen *et al.* : Survival of persons with and without HIV infection in Denmark, *Ann. Intern. Med.*, 146, 87-95 (2007).

- 2) K. Bhaskaran, O. Hamouda *et al.* : Changes in the risk of death after HIV seroconversion compared with mortality in the general population, *JAMA*, **300**, 51-59 (2008).
- 3) E. Phillips, S. Mallal : Drug hypersensitivity in HIV, *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, **7**, 324-330 (2007).
- 4) V.D. Lima, R. Harrigan *et al.* : Differential impact of adherence on long-term treatment response among naive HIV-infected individuals, *AIDS*, **22**, 2371-2380 (2008).
- 5) M. Lazo, S.J. Gange *et al.* : Patterns and predictors of changes in adherence to highly active antiretroviral therapy : longitudinal study of men and women, *Clin. Infect. Dis.*, **45**, 1377-1385 (2007).
- 6) K.J. Smith, H.G. Skelton *et al.* : Increased drug reactions in HIV-1-positive patients : a possible explanation based on patterns of immune dysregulation seen in HIV-1 disease, *Clin. Exper. Dermatol.*, **22**, 118-123 (1997).
- 7) H.M. Heller : Adverse cutaneous drug reactions in patients with human immunodeficiency virus-1 infection, *Clin. Dermatol.*, **18**, 485-489 (2000).
- 8) 赤城久美子, 林さなえほか : HIV感染者の皮膚病変 224例の臨床的検討, *日本皮膚科学会雑誌*, **110**, 9-17 (2000).
- 9) G. Todd : Adverse cutaneous drug eruptions and HIV : a clinician's global perspective, *Dermatol. Clin.*, **24**, 459-472 (2006).
- 10) 神代龍吉, 古賀郁利子ほか : 消化器病患者における健康食品の摂取状況, *肝臓*, **44**, 435-442 (2003).

## HIV-1 Vpr induces TLR4/MyD88-mediated IL-6 production and reactivates viral production from latency

Shigeki Hoshino,<sup>\*,†</sup> Mitsuru Konishi,<sup>‡</sup> Masako Mori,<sup>§</sup> Mari Shimura,<sup>\*</sup> Chiaki Nishitani,<sup>||</sup> Yoshio Kuroki,<sup>||</sup> Yoshio Koyanagi,<sup>¶</sup> Shigeyuki Kano,<sup>\*,†</sup> Hiroyuki Itabe,<sup>\*\*</sup> and Yukihito Ishizaka<sup>\*,1</sup>

<sup>\*</sup>Research Institute, International Medical Center of Japan, Tokyo, Japan; <sup>†</sup>Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba, Japan; <sup>‡</sup>Center for Infectious Diseases, Nara Medical University, Nara, Japan; <sup>§</sup>Laboratory of Glyco-Organic Chemistry, The Noguchi Institute, Tokyo, Japan; <sup>||</sup>Department of Biochemistry, Sapporo Medical University School of Medicine, Hokkaido, Japan; <sup>¶</sup>Laboratory of Viral Pathogenesis, Institute for Virus Research, Kyoto University, Kyoto, Japan; and <sup>\*\*</sup>Department of Biological Chemistry, School of Pharmacy, Showa University, Tokyo, Japan

RECEIVED AUGUST 11, 2009; REVISED DECEMBER 10, 2009; ACCEPTED JANUARY 21, 2010. DOI: 10.1189/jlb.0809547

### ABSTRACT

Vpr, a HIV-1 accessory protein, was believed to be present in the plasma of HIV-1-positive patients, and our previous work demonstrated the presence of plasma Vpr in 20 out of 52 patients. Interestingly, our data revealed that patients' viral titer was correlated with the level of Vpr detected in their plasma. Here, we first show that rVpr, when incubated with human monocytes or MDMs, caused viral production from latently infected cells, and IL-6 was identified as a responsible factor. The induction of IL-6 by rVpr was dependent on signaling through TLR4 and its adaptor molecule, MyD88. We next provide evidence that rVpr induced the formation of OxPC and that a mAb against OxPC blocked rVpr-induced IL-6 production with the concomitant attenuation of MAPK activation. Moreover, the addition of NAC, a scavenger of ROS, abrogated the rVpr-induced formation of OxPC, the phosphorylation of C/EBP- $\beta$ , a substrate of MAPK, and IL-6 production. As rIL-6 reactivated viral replication in latently infected cells, our data indicate that rVpr-induced oxidative stress triggers cell-based innate immune responses and reactivates viral production in latently infected cells via IL-6 production. Our results suggest that Vpr should

be monitored based on the viral titer, and they provide the rationale for the development of novel, anti-AIDS therapeutics targeting Vpr. *J. Leukoc. Biol.* **87**: 1133–1143; 2010.

### Introduction

The complete eradication of HIV-1 from infected patients remains problematic, although the use of HAART has improved the prognosis of patients who are HIV-positive [1]. A major obstacle to total viral eradication is the persistence of viral reservoirs [2, 3] from which reactivation of viral production can be initiated in response to exogenous factors such as cytokines [4, 5], ultraviolet irradiation [6], and DNA damage [6]. As infected macrophages are a major component of viral reservoirs [7–9], clarifying the mechanism of the reactivation of viral replication in latently infected macrophages is important.

Vpr, an accessory gene encoded by the HIV-1 genome, has at least two activities that up-regulate viral replication in macrophages. First, Vpr is required for the primary viral infection of resting macrophages and was shown to contribute to the translocation of the preintegration complex from the cytoplasm to the nucleus [10]. Second, Vpr is present in the plasma of infected patients, and exogenously added Vpr can induce viral reproduction in latently infected cells [11, 12]. Recently, we analyzed the level of Vpr in the plasma of HIV-1-positive individuals and detected the protein in 20 out of 52 patients examined [13]. Our data also revealed that the detection of Vpr was coupled with a high copy number of HIV-1 RNA [13], implying that Vpr functions as a positive regulator of viral replication *in vivo*.

In addition to viral production, mitochondrial dysfunction is a particularly important property of Vpr in AIDS pathogenesis

Abbreviations: ACTB= $\beta$ -actin, ALLN=N-acetyl-L-leucyl-L-leucyl-L-norleucinal, ANT=adenine nucleotide translocator, CBB=Coomassie brilliant blue, CM=conditioned medium,  $\Delta$ C12=C-terminal-most 12 aa, H5N1=avian influenza virus, HAART=highly active antiretroviral therapy, HIF-1=hypoxia-inducible factor-1, IKK=I $\kappa$ B kinase, LAL=Limulus amoebocyte lysate, LSC=laser-scanning cytometer, MDM=monocyte-derived macrophage, MMP=mitochondrial membrane potential, NAC=N-acetyl-cysteine, OxPC=oxidized phosphatidylcholine(s), PFA=paraformaldehyde, qPCR=quantitative PCR, RIPA=radioimmunoprecipitation assay, ROS=reactive oxygen species, SARS-CoV=severe acute respiratory syndrome-coronavirus, siRNA=small interfering RNA, SS=sodium salicylate, TRIF=Toll/IL-1R domain-containing adaptor-inducing IFN- $\beta$ , Vpr=viral protein R, WB=Western blot

The online version of this paper, found at [www.jleukbio.org](http://www.jleukbio.org), includes supplemental information.

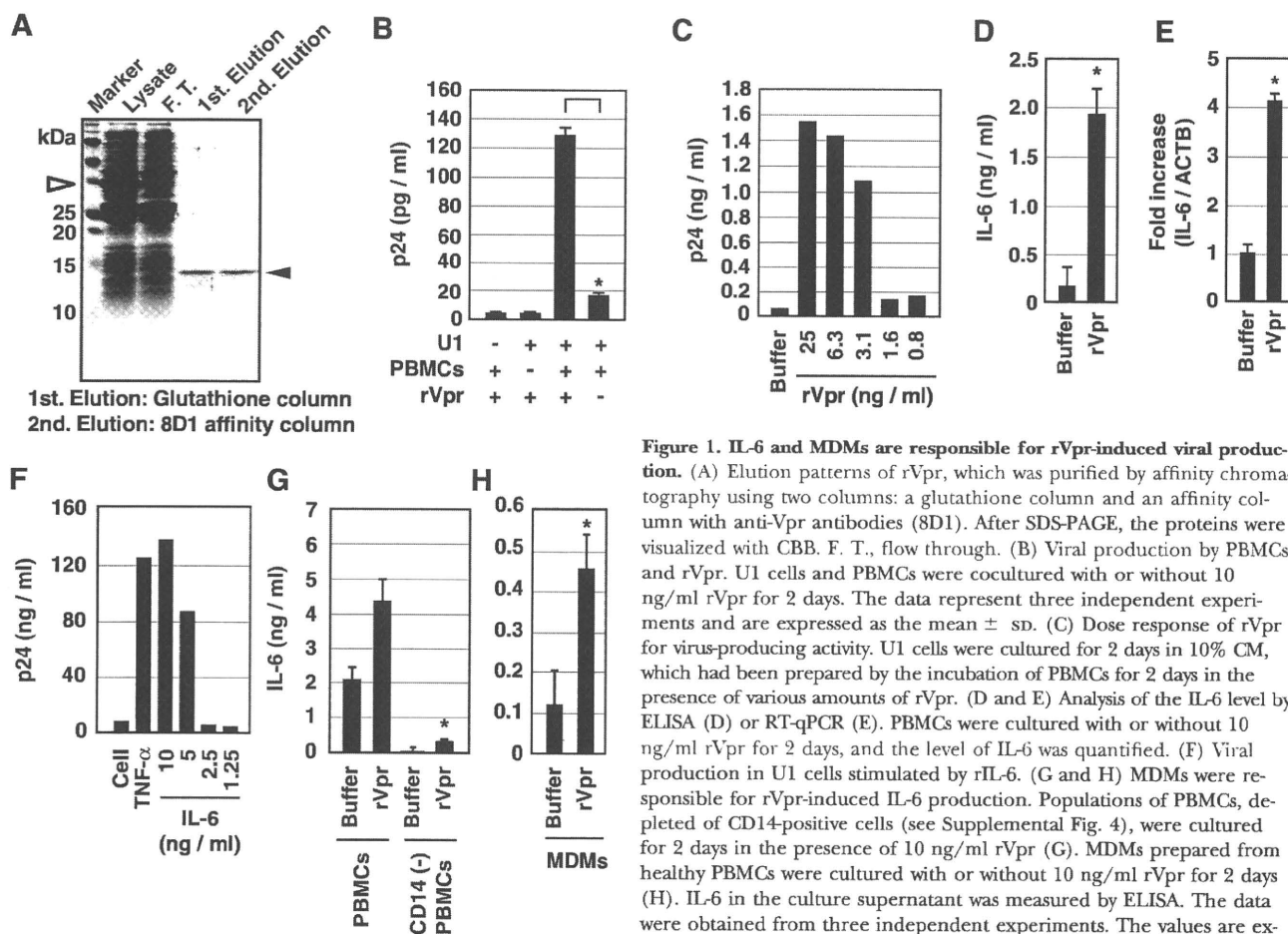
1. Correspondence: Research Institute, International Medical Center of Japan, 1-21-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8655, Japan. E-mail: [zakay@ri.imcj.go.jp](mailto:zakay@ri.imcj.go.jp)

[14]. Exogenous Vpr induces apoptosis in T cells and neurons as a result of its toxic effects on mitochondria [15, 16], and we found recently that even small amounts of Vpr attenuated neurite outgrowth by inducing mitochondrial dysfunction [17]. It is well accepted that HIV-1-positive patients suffer from functional defects of the CNS [18]. Additionally, Deshmane et al. [19] demonstrated recently that HIF-1, a biomarker of oxidative stress, was expressed in the brain tissue of patients with HIV-1-associated dementia. Additional experiments involving the expression of Vpr in human microglial cells revealed that Vpr generated ROS with concomitant HIF-1 expression. These observations suggest that mitochondrial dysfunction as well as oxidative stress as a result of Vpr comprise the molecular basis for AIDS-associated clinical symptoms [20, 21].

TLRs, which are involved in the first line of defense against pathogens and microorganisms in macrophages and dendritic cells [22, 23], function as pattern-recognition receptors and recognize pathogen-associated molecules. To date, 13 TLR family members have been identified, and their modulation induces the production of various inflammatory cytokines, chemokines, and IFNs [22, 23]. Of these, TLR2 and TLR4 recognize proteins derived from microorganisms; TLR2 recognizes the hemagglutinin protein of the measles virus, and TLR4 recognizes the envelope proteins of respiratory syncytial virus and mouse mammary tumor virus [22, 23]. TLR4 uses four adaptor proteins for intracellular signaling (TRIF-related adaptor molecule, TRIF, Mal, and MyD88), which activate MyD88-dependent and -independent pathways differentially in response to various pathogens [22, 23]. Cytokine production, reflecting the activation of effector molecules involved in innate immunity, is stimulated by the NF- $\kappa$ B and MAPK signaling pathways [24], which activate downstream transcription factors such as NF- $\kappa$ B, c-Jun, C/EBP- $\beta$ , and CREB [24–26].

Recently, oxidative stress was shown to be linked to innate immunity [27]. OxPC, formed from phospholipids in response to oxidative stress, were identified originally in atherosclerotic lesions. Imai et al. [27] showed recently that OxPC was formed during infection with SARS-CoV or H5N1 and that it induced TLR4-mediated IL-6 production. Furthermore, E06, a mAb against OxPC, ameliorated pathological changes in lung tissue, implying that OxPC formation is a critical factor responsible for the severe clinical course caused by these viruses [27]. Importantly, recent observations have suggested that oxidative stress is involved in a variety of pathological conditions, including diabetes mellitus [28] and neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease [29] and Parkinson's disease

[27]. Importantly, recent observations have suggested that oxidative stress is involved in a variety of pathological conditions, including diabetes mellitus [28] and neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease [29] and Parkinson's disease



**Figure 1. IL-6 and MDMs are responsible for rVpr-induced viral production.** (A) Elution patterns of rVpr, which was purified by affinity chromatography using two columns: a glutathione column and an affinity column with anti-Vpr antibodies (8D1). After SDS-PAGE, the proteins were visualized with CBB. F. T., flow through. (B) Viral production by PBMCs and rVpr. U1 cells and PBMCs were cocultured with or without 10 ng/ml rVpr for 2 days. The data represent three independent experiments and are expressed as the mean  $\pm$  sd. (C) Dose response of rVpr for virus-producing activity. U1 cells were cultured for 2 days in 10% CM, which had been prepared by the incubation of PBMCs for 2 days in the presence of various amounts of rVpr. (D and E) Analysis of the IL-6 level by ELISA (D) or RT-qPCR (E). PBMCs were cultured with or without 10 ng/ml rVpr for 2 days, and the level of IL-6 was quantified. (F) Viral production in U1 cells stimulated by rIL-6. (G and H) MDMs were responsible for rVpr-induced IL-6 production. Populations of PBMCs, depleted of CD14-positive cells (see Supplemental Fig. 4), were cultured for 2 days in the presence of 10 ng/ml rVpr (G). MDMs prepared from healthy PBMCs were cultured with or without 10 ng/ml rVpr for 2 days (H). IL-6 in the culture supernatant was measured by ELISA. The data were obtained from three independent experiments. The values are expressed as the mean  $\pm$  sd. \*,  $P < 0.05$ .

[30]. It is therefore important to clarify the possible link between the inappropriate activation of innate immune responses and the development of intractable human diseases.

Here, we show that rVpr induced the formation of OxPC in MDMs and that this induction was blocked by the addition of NAC, a scavenger of ROS. An analysis of signaling cascades revealed that rVpr activated the TLR4/MyD88 pathway and consequently modulated the NF- $\kappa$ B and MAPK pathways as a downstream effect. Interestingly, an antibody against OxPC (DLH3) attenuated rVpr-induced IL-6 production and the phosphorylation of C/EBP- $\beta$ , suggesting that the formation of OxPC is involved as a pan upstream event in Vpr-induced IL-6 production. Along with evidence that rVpr, added exogenously at a concentration comparable with that observed in patient plasma, reactivated viral reproduction via IL-6 production, we propose that the monitoring of Vpr in the context of clinical outcome is important for understanding the mechanism of recurrent viral production in patients; moreover, our data provide the rationale for the development of novel anti-AIDS therapeutics targeting Vpr.

## MATERIALS AND METHODS

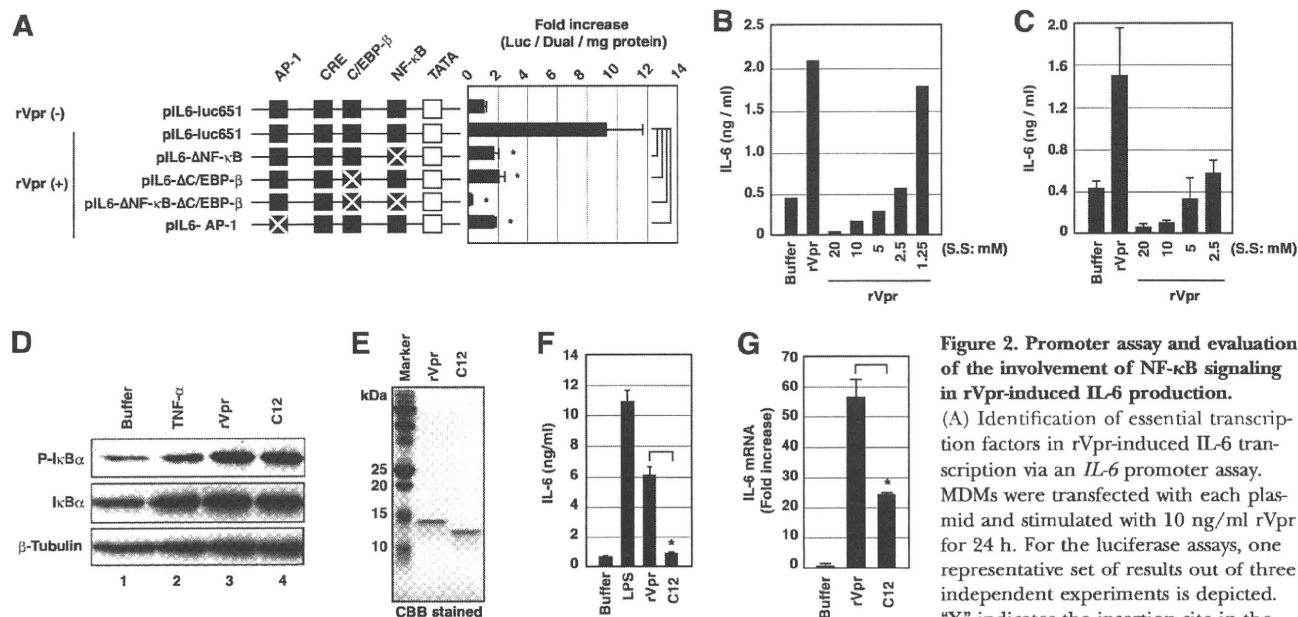
### Cells and chemicals

Peripheral blood was donated by healthy humans who worked within the institute and gave informed consent. The ethics committee of the institute

approved the current project designed to clarify the role of Vpr in AIDS development. Mononuclear cells (PBMCs) were prepared from the peripheral blood by using Lymphoprep (Axis-Shield, Dundee Technology Park, Dundee, Scotland), and then monocytes were isolated from the PBMCs via CD14-negative selection using a magnetic cell sorting (MACS) system (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). For preparation of MDMs, recovered monocytes were cultured for 4 days with M-CSF (50 ng/ml; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). In the CD14-depletion experiment, PBMCs were treated with magnetic beads conjugated with anti-CD14 antibody (Miltenyi Biotec). Human U1 cells [4], a monocytic cell line of HIV-1 latently infected cells, were provided by National Institutes of Health AIDS (Germantown, MD, USA). The PBMCs, MDMs, and U1 cells were cultured in RPMI 1640 containing 10% FCS at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. In the complementation experiment of C/EBP- $\beta$ , THP-1 was cultured in IMDM with 10% FCS at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. To investigate any indirect effects of Vpr against latently infected cells, we performed coculture experiments. For these, the U1 cells and PBMCs were cultured using a noncontact cell coculture insert system (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA) in RPMI 1640 with 10% FCS at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. The calpain I inhibitor ALLN, the p38 MAPK inhibitor 4-(4-fluorophenyl)-2-(4-hydroxyphenyl)-5-(4-pyridyl)-1H-imidazole (SB202190), and the IKK inhibitor SS were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

### Purification of rVpr

rVpr and  $\Delta$ C12, a deletion mutant of the C-terminal 12 aa of rVpr, were expressed as a GST fusion protein in BL21-CodonPlus (DE3; Stratagene, La Jolla, CA, USA) and purified using a two-step affinity chromatography method with glutathione and anti-Vpr antibody beads, as described previously [13]. Briefly, GST-Vpr was first bound to a glutathione column,



**Figure 2. Promoter assay and evaluation of the involvement of NF- $\kappa$ B signaling in rVpr-induced IL-6 production.**

(A) Identification of essential transcription factors in rVpr-induced IL-6 transcription via an *IL-6* promoter assay. MDMs were transfected with each plasmid and stimulated with 10 ng/ml rVpr for 24 h. For the luciferase assays, one representative set of results out of three independent experiments is depicted. "X" indicates the insertion site in the mutant. CRE, cAMP response element.

(B and C) Evaluation of the role of NF- $\kappa$ B in rVpr-induced IL-6 production. PBMCs (B) and MDMs (C) were pretreated with SS (1.25–20 mM) for 30 min and then cultured with or without 10 ng/ml rVpr for 2 days. PBMCs and MDMs were treated for 2 days before analysis by ELISA. The data shown in B were obtained from a single sample, whereas those shown in C were obtained from triplicate experiments for each sample. (D)  $\Delta$ C12-induced I $\kappa$ B- $\alpha$  phosphorylation. MDMs were treated with or without stimulators (10 ng/ml TNF- $\alpha$ , rVpr, or  $\Delta$ C12) for 40 min. Phosphorylated I $\kappa$ B- $\alpha$  (P-I $\kappa$ B- $\alpha$ ) and total I $\kappa$ B- $\alpha$  were analyzed by WB.  $\beta$ -Tubulin was used as a loading control. (E) Purity of rVpr and  $\Delta$ C12. The electrophoretic patterns of the purified proteins were visualized by CBB staining. (F and G) IL-6 was assayed after the treatment of cells with rVpr and  $\Delta$ C12 at 10 ng/ml for 2 days prior to ELISA (F) and for 3 h prior to RT-qPCR (G). IL-6 production was tested in MDMs. The data were obtained from three independent experiments. The values are expressed as the mean  $\pm$  SD. \*,  $P < 0.05$ .



and Vpr proteins were cleaved from GST using PreScission (GE Healthcare, Milwaukee, WI, USA) and eluted with buffer [20 mM phosphate buffer (pH 7.6), 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM PMSF, 0.1% Triton X-100]. The eluted rVpr was then applied to an affinity column containing two kinds of mAb against rVpr (8D1 and C217). After washing the column thoroughly using buffer prepared with pyrogen-free distilled water, the rVpr proteins were eluted with 100 mM HEPES (pH 2.5). The eluate containing rVpr or  $\Delta$ C12 (see Fig. 2E) was neutralized immediately by 1 M HEPES (pH 7.6). As LPS could have contaminated the purified rVpr solution, we tested for the presence of LPS using a highly sensitive LPS assay with LAL, the detection limit of which was 0.001 EU/ml (Endospey kit and Toxicolor DIA kit, Seikagaku Corp., Tokyo, Japan; Supplemental Fig. 1A). rVpr, purified by an affinity column chromatography with 8D1, contained no detectable LPS (Supplemental Fig. 1A). We also confirmed that the purified rVpr solution did not inhibit the detection of LPS (data not shown). The activity of rVpr was abolished completely with heat for 5 min (boiling at 100°C). In contrast, the activity of LPS was partially restored (Supplemental Fig. 1B).

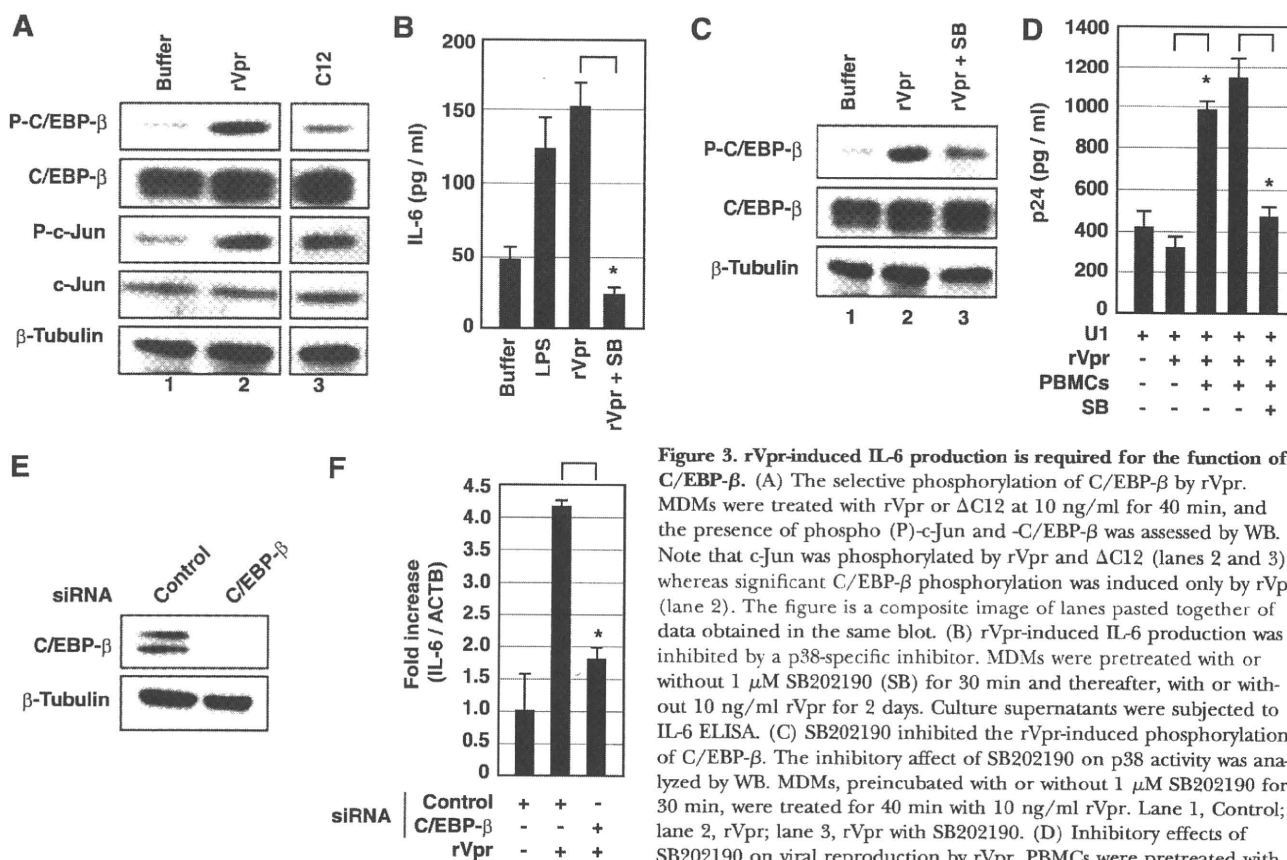
### Detection of IL-6 and p24

Cells were cultured for 2 days with rVpr (10 ng/ml) or LPS (10 pg/ml; Sigma Chemical Co.). We analyzed IL-6 and p24, a HIV-1 capsid protein, in the culture supernatants using IL-6 (Endogen, Pierce, Rockford, IL, USA) and p24 (ZeptoMetrix, Buffalo, NY, USA) ELISA kits, respectively. The cells were cultured with stimuli for 3 h, and then, the mRNA for RT-

qPCR was prepared using an RNeasy Mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). The RT reaction was performed using a ReverTra Ace qPCR RT kit (Toyobo, Osaka, Japan) following the manufacturer's instructions. The qPCR was performed using ABI prism 7000 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems).

### Protein array and WB analyses

The PBMCs were cultured with or without rVpr for 2 days, and the culture supernatants were analyzed using a protein array system (TranSignal Human Cytokine Antibody Array 1.0, Panomics, Redwood City, CA, USA). Various cytokines and chemokines were identified using specific antibodies plotted on membranes. To detect the phosphorylation of I $\kappa$ B- $\alpha$ , the MDMs were pretreated with ALLN (150  $\mu$ M; Sigma Chemical Co.) for 2 h and then treated with rVpr for 40 min. To analyze the phosphorylation of C/EBP- $\beta$  and c-jun, the MDMs were exposed to rVpr for 40 min. The MDMs were then lysed with RIPA buffer [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 1% Nonidet P-40, protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland), 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 1 mM Na<sub>2</sub>VO<sub>4</sub>, 5 mM pixels per inch, and 50 mM NaF], and the cell lysates were subjected to SDS-PAGE. For these experiments, we used antibodies against phosphorylated I $\kappa$ B- $\alpha$ , C/EBP- $\beta$ , and c-jun, their regular forms (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), and  $\beta$ -tubulin (NeoMarkers, Lab Vision, Fremont, CA, USA).



**Figure 3. rVpr-induced IL-6 production is required for the function of C/EBP- $\beta$ .** (A) The selective phosphorylation of C/EBP- $\beta$  by rVpr.

MDMs were treated with rVpr or  $\Delta$ C12 at 10 ng/ml for 40 min, and the presence of phospho (P)-c-Jun and -C/EBP- $\beta$  was assessed by WB. Note that c-Jun was phosphorylated by rVpr and  $\Delta$ C12 (lanes 2 and 3), whereas significant C/EBP- $\beta$  phosphorylation was induced only by rVpr (lane 2). The figure is a composite image of lanes pasted together of data obtained in the same blot. (B) rVpr-induced IL-6 production was inhibited by a p38-specific inhibitor. MDMs were pretreated with or without 1  $\mu$ M SB202190 (SB) for 30 min and thereafter, with or without 10 ng/ml rVpr for 2 days. Culture supernatants were subjected to IL-6 ELISA. (C) SB202190 inhibited the rVpr-induced phosphorylation of C/EBP- $\beta$ . The inhibitory affect of SB202190 on p38 activity was analyzed by WB. MDMs, preincubated with or without 1  $\mu$ M SB202190 for 30 min, were treated for 40 min with 10 ng/ml rVpr. Lane 1, Control; lane 2, rVpr; lane 3, rVpr with SB202190. (D) Inhibitory effects of SB202190 on viral reproduction by rVpr. PBMCs were pretreated with SB202190 for 1 h and then cocultured with PBMCs and 10 ng/ml rVpr. (E and F) C/EBP- $\beta$  is crucial for rVpr-induced IL-6 production. WB was performed on MDMs that had been transfected with C/EBP- $\beta$  siRNA. Endogenous C/EBP- $\beta$  expression was down-regulated efficiently (lane 2; E).  $\beta$ -Tubulin was included as a loading control. The activity of rVpr (10 ng/ml for 40 min) was examined in these cells by RT-qPCR (F). The level of IL-6 mRNA was normalized to ACTB. The data were obtained from three independent experiments. The values are expressed as the mean  $\pm$  SD. \*,  $P < 0.05$ .

## Blocking experiments

The PBMCs were treated with rVpr for 2 days, and the collected culture supernatants were treated with anti-IL-6 antibody (R&D Systems) or control mouse IgG (Sigma Chemical Co.). The U1 cells were cultured in RPMI 1640 containing 10% antibody-treated culture supernatant of PBMCs, which were treated with rVpr for an additional 2 days, and the culture supernatants were analyzed for virus production using p24 ELISA. For blocking experiments, PBMCs were pretreated with 8D1 or control IgG for 30 min and then cultured for 2 days in the absence or presence of rVpr (10 ng/ml). Thereafter, culture supernatants were harvested, and IL-6 concentration was analyzed by ELISA. To determine the involvement of TLRs with rVpr-induced IL-6 production, we pretreated the MDMs with anti-TLR2 (Abcam, Cambridge, MA, USA) and anti-TLR4 (Abcam) antibodies for 20 min and then treated the MDMs with rVpr for 3 h. Subsequently, we measured the level of IL-6 mRNA expression using RT-qPCR.

## Inhibitor experiments

The PBMCs and MDMs were pretreated with SS (1.25–20 mM) or SB202190 (1  $\mu$ M) for 30 min before the addition of rVpr. After 2 days, the culture supernatants were collected and analyzed for IL-6 concentration using an IL-6 ELISA. To test the effects on rVpr-induced virus reproduction, the PBMCs were pretreated with SB202190 (1  $\mu$ M) for 1 h and then exposed to rVpr overnight. Subsequently, the U1 cells were cocultured with SB202190 and treated with rVpr PBMCs for 2 additional days. The virus concentrations were analyzed in the culture supernatants using the p24 ELISA. NAC (20 mM; Sigma Chemical Co.) [31], a scavenger of ROS, was added to MDMs for 30 min; then, rVpr was treated for 2 days (ELISA) or for 40 min (WB) with NAC. The culture media or the cell lysates were subjected to analysis of IL-6 by ELISA or phosphorylation of I $\kappa$ B- $\alpha$ , c-jun, and C/EBP- $\beta$  by WB.

## Promoter assay

We measured the transcriptional activity of the IL-6 promoter using the following reporter plasmids: pIL6-luc651, pIL6- $\Delta$ NF- $\kappa$ B, pIL6- $\Delta$ C/EBP- $\beta$ , pIL6- $\Delta$ NF- $\kappa$ B- $\Delta$ C/EBP- $\beta$ , and pIL6- $\Delta$ AP-1 [32]. Each reporter construct had been mutated to exclude one or two transcription factor-binding sites and to encode firefly luciferase as the reporter gene. Dr. Oliver Eickelberg (University of Giessen, Germany) kindly provided these reporter plasmids. The MDMs ( $5 \times 10^5$  cells) were cotransfected with 2  $\mu$ g each pIL6-luc651 and their mutant plasmid DNA, with 0.5  $\mu$ g *Renilla reniformis* luciferase expression plasmid DNA as an internal control (pGL4.73; Promega, Madison, WI, USA). Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was used for transfecting the plasmids into the MDMs. The following day, the MDMs were treated with rVpr for 24 h, and luciferase activity was measured using PicaGene (Toyo Ink, Tokyo, Japan). The luciferase activities in the cell lysates were normalized using the protein concentration measured with a bicinchoninic acid protein assay kit (Thermo Scientific, Fremont, CA, USA).

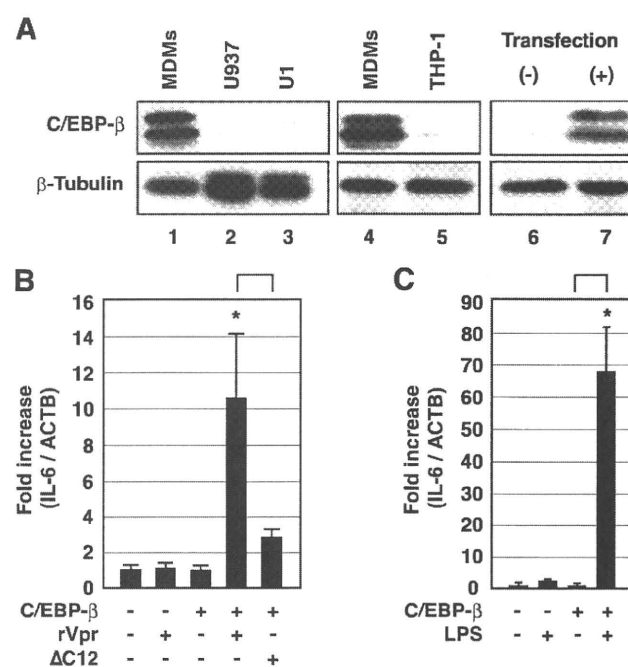
## RNA interference and complementation experiments

siRNAs were used to block C/EBP- $\beta$ , MyD88, and TLR4 expression (C/EBP- $\beta$ ; Ambion, Foster City, CA, USA; MyD88 and TLR4, Dharmacon, Fremont, CA, USA). Sequences of each siRNA were C/EBP- $\beta$ : 5'-CCCACGUGUAAACUGU-CAGCt-3', 5'-CCAACCGCACAUGCAGAUgt-3', and 5'-GCCCGUCGGUAA-UUUUAAUt-3'; MyD88: 5'-CGACUGAAGUUGUGUGUGU-3', 5'-GCUAGU-GAGCUCUAUCGAAA-3', 5'-GCAUAUGCCUGAGCGUUUC-3', and 5'-GCAC-CUGUGUCGGUCUAU-3'; and TLR4: 5'-UGGUGGAAGUUGAACGAU-3', 5'-GUUUAGAAGUCCAUCGUUU-3', 5'-CAUUGAAGAAUCCGAUUA-3', and 5'-GGAAAUGGUGUAGCCGUU-3'. As control, a mixture of three irrelevant siRNAs with nontargeting sequences was used [Silencer Negative Control Nos. 1–3 siRNA (Catalog No. 1: AM4611, No. 2: AM4613, No. 3: AM4615); Ambion]. Each control sequence was a nondisclosure by the manufacturer's policy.

The MDMs were transfected with 100 pmoles siRNA molecules using Lipofectamine 2000 and were cultured for 2 days before the cell lysates were pre-

pared using RIPA buffer. To confirm the effects of the siRNAs, the protein expression levels of endogenous C/EBP- $\beta$  and MyD88 were examined using antibodies specific for  $\alpha$ -C/EBP- $\beta$  and  $\alpha$ -MyD88 (Cell Signaling Technology). The repression of TLR4 was confirmed by determining the mRNA expression level and immunostaining. The primer sequences used for RT-PCR detection of TLR4 were 5'-CGGATGGCAACATTAGAAATTAGT-3' (forward) and 5'-TGATTGAGACTGTA-ATCAAGAACC-3' (reverse). To confirm the knockdown of endogenous TLR4, immunostaining was performed using an antibody against TLR4 (HTA125; Abcam). The MDMs transfected with TLR4 siRNA were washed once with cold PBS and incubated with PBS containing 10% FCS, 0.5% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, and 1 mM PMSF for 10 min at 4°C. Subsequently, the MDMs were washed with cold PBS and treated for 1 h at 4°C using 1  $\mu$ g  $\alpha$ -TLR4 antibody (Abcam) diluted with PBS containing 0.2% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> and 3% BSA. After 1 h, the MDMs were washed three times with cold PBS and fixed with 0.5% PFA for 15 min. Subsequently, TLR4 was detected using  $\alpha$ -mouse IgG-Alexa-546 (Invitrogen) as the secondary antibody.

In the C/EBP- $\beta$  complementation experiment, the C/EBP- $\beta$  cDNA was cloned using macrophages obtained from healthy volunteers and then inserted into an expression plasmid. The THP-1 cells were transfected with 2.5  $\mu$ g C/EBP- $\beta$  expression plasmid using 2  $\mu$ l Lipofectamine 2000 in 500  $\mu$ l Opti-MEM. After 2 days, the cells were collected and lysed with RIPA buffer. The lysate was analyzed to determine the expression level of exogenous C/EBP- $\beta$  by WB analysis. The transfectant was stimulated with rVpr or LPS for 3 h. We then prepared RT-qPCR samples using a RNA extraction kit (Qia-Gen). The IL-6 expression level was analyzed using a RT-qPCR system.



**Figure 4. C/EBP- $\beta$  is essential for rVpr-induced IL-6 production.**

(A) Weak expression of endogenous C/EBP- $\beta$  in leukemic cells. WB was performed using MDMs and U1, U937, or THP-1 cells (lanes 1–5) and THP-1 cells transfected with exogenous C/EBP- $\beta$  cDNA (lanes 6 and 7).  $\beta$ -Tubulin was included as a loading control. (B) The response to rVpr was restored by C/EBP- $\beta$ . After transfection with C/EBP- $\beta$  cDNA, THP-1 cells were cultured with rVpr or  $\Delta$ C12 at 10 ng/ml, and IL-6 mRNA expression was analyzed. (C) LPS activated THP-1 cells dramatically after the introduction of C/EBP- $\beta$  cDNA. LPS was added for 3 h at 10 ng/ml, and IL-6 mRNA expression was analyzed by RT-qPCR. The data were obtained from three independent experiments. The values are expressed as the mean  $\pm$  sd. \*,  $P < 0.05$ .