

human $\beta 2$ M gene and HIV-1 DNA (*Gag*) were simultaneously amplified in the same tubes used for pre-quantification PCR. The first round of PCR consisted of 20 cycles of amplification. Subsequently, TaqMan PCR was used to determine the copy numbers of the pre-amplified human $\beta 2$ M gene and HIV-1 DNA. The copy number of HIV-1 DNA was calculated as the copy number per 10^6 cells (relative amount) using the amplification efficiency of human $\beta 2$ M. The copy number of HIV-1 DNA contained in $CD4^+$ T lymphocytes in 1 ml of blood was determined as an absolute amount. The absolute amount of HIV-1 DNA was calculated using the following formula:

$$\text{Absolute amount (copies/ml)} = \text{Relative amount (copies}/10^6 \text{ CD4}^+ \text{ lymphocytes)} \times \text{CD4 cell count } (\mu\text{l})/1000.$$

Statistical analysis

For statistical analysis, the Wilcoxon signed-rank test was used for intergroup comparisons and the Spearman rank test was used for correlation analysis. All analyses were conducted with a significance level of 5%.

Results

The general characteristics of the 61 patients included in the study are presented in Table 1. $CD4^+$ lymphocytes were isolated from peripheral blood, and HIV-1 DNA contained in these isolated cells was quantified using the method described above. The distributions of values for relative and absolute amounts of HIV-1 DNA in $CD4^+$ lymphocytes are shown in Figure 1. The absolute amounts were generally lower than the relative ones. However, both relative and absolute amounts exhibited

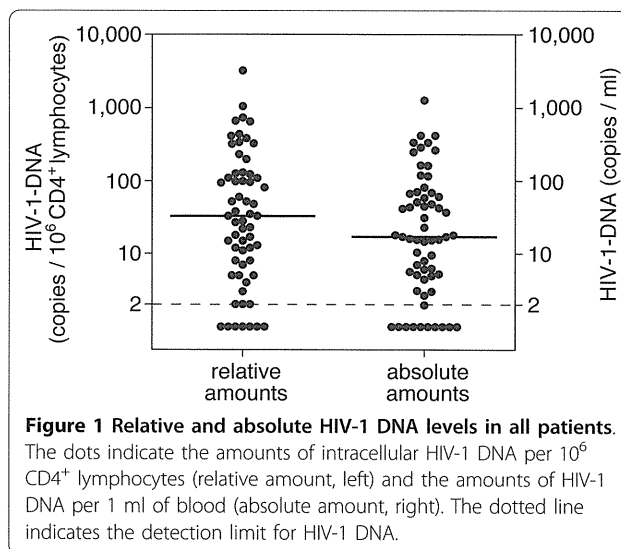


Figure 1 Relative and absolute HIV-1 DNA levels in all patients. The dots indicate the amounts of intracellular HIV-1 DNA per 10^6 $CD4^+$ lymphocytes (relative amount, left) and the amounts of HIV-1 DNA per 1 ml of blood (absolute amount, right). The dotted line indicates the detection limit for HIV-1 DNA.

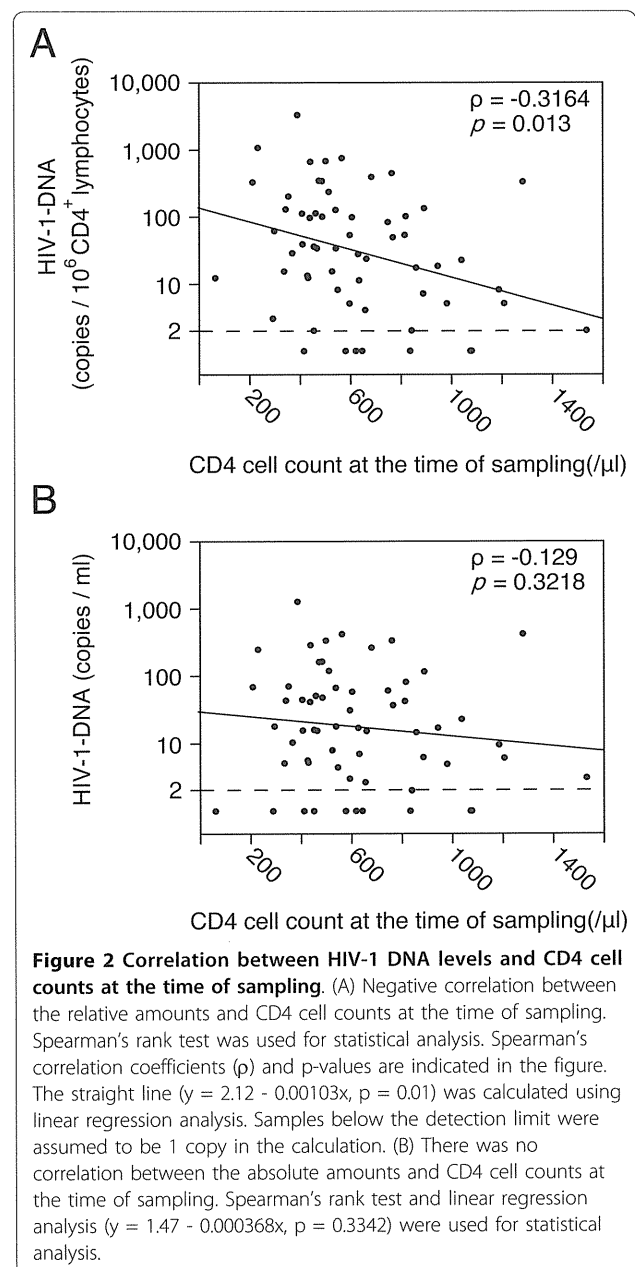
a similar distribution. Seven patients (11%) had values below the detection limit (2 copies/ 10^6 $CD4^+$ lymphocytes) when relative amounts were assessed, whereas 10 patients (16%) had values below the detection limit (2 copies/ml) when absolute amounts were assessed.

The correlation between the amounts of HIV-1 DNA and $CD4$ cell counts at the time of sampling was examined using Spearman's rank test (Figure 2). A significant negative correlation was noted between the relative amounts of HIV-1 DNA and $CD4$ cell counts (Spearman's $\rho = -0.3164$, $p = 0.013$). This indicates that the latently infected cells may be diluted with newly generated T lymphocytes after the introduction of ART.

Table 1 Demographic and clinical characteristics of HIV-1-infected patients

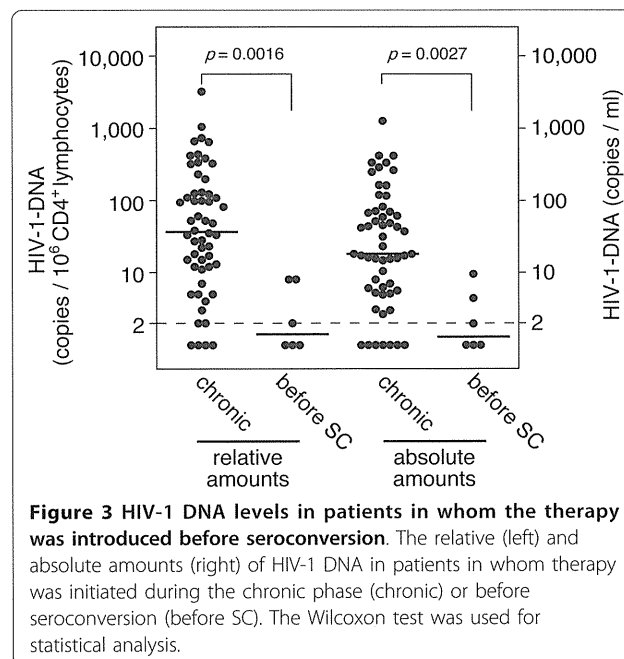
Characteristic	Absolute value	
Number of participants	61	
Number of male participants, (%)	56	(92%)
Age (y), median [IQR]	43	[35-48]
Route of transmission, (%)		
homosexual	46	(76%)
heterosexual	13	(21%)
blood products	2	(3%)
Nationality, (%)		
Japanese	61	(100%)
Nadir $CD4$ cell count (μl), median [IQR]*	175	[54-256]
Pre-ART VL (copies/ml), median [IQR]*	85500	[41500-322500]
Current $CD4$ cell count (μl), median [IQR]	569	[442-818]
Current ART regimen, no. (%)		
PI-based	32	(52%)
NNRTI-based	25	(41%)
3-NRTI	4	(7%)
Duration of VL suppression (days), median [IQR]	2205	[784-2737]

* Data are unavailable for seven (11%) patients. IQR, interquartile range; VL, viral load; ART, antiretroviral therapy; PI, protease inhibitor; NNRTI, non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor; NRTI, nucleoside reverse transcriptase inhibitor.



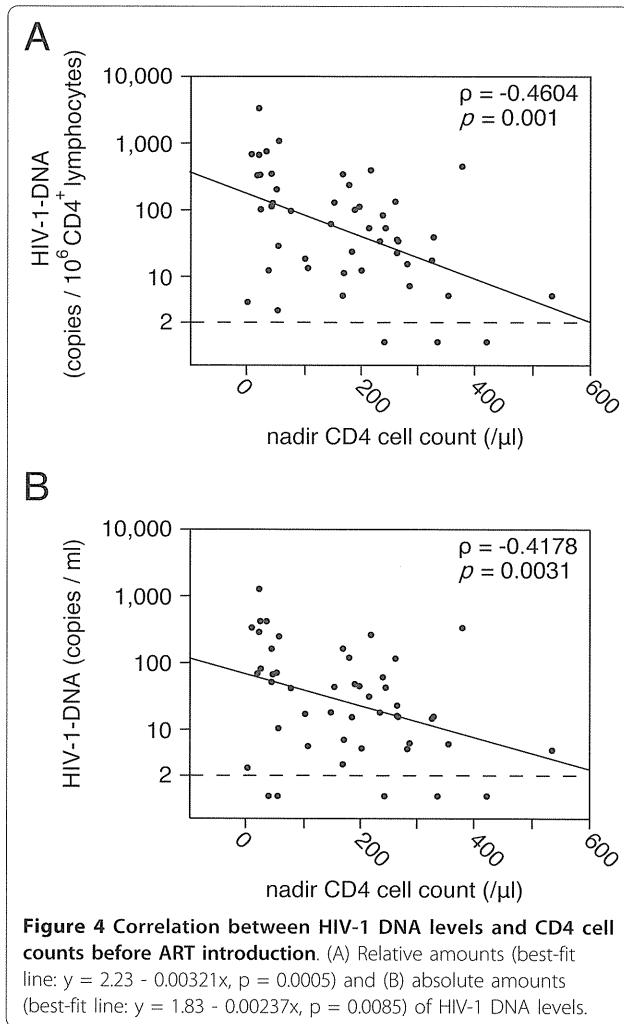
However, there was no significant correlation between the absolute amounts of HIV-1 DNA calculated as copy numbers in 1 ml of blood and CD4 cell counts at this time point (Figure 2B).

The patients were divided into 2 groups depending on when ART was introduced: 6 patients in whom ART was introduced before positive seroconversion, as shown by Western blotting (before-SC group), and 55 patients in whom ART was introduced in the chronic phase (chronic group). The two groups were compared to determine the association between the amounts of HIV-1 DNA and the timing of ART introduction (Figure 3).



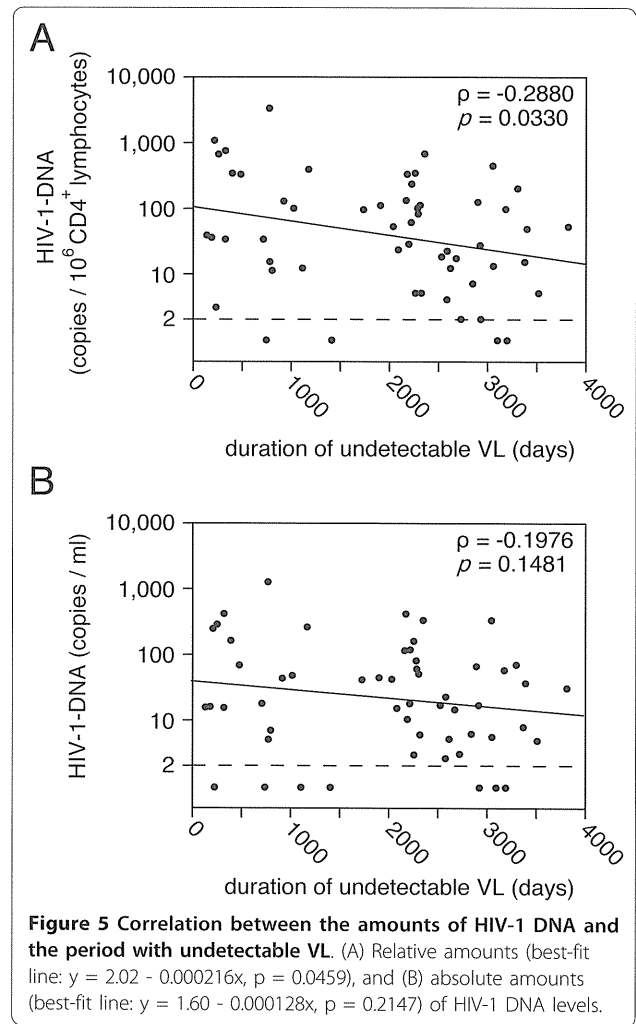
In the before-SC group, for which therapy was initiated before seroconversion, HIV-1 DNA was not detected in half of the patients (three patients) (i.e., below the detection limit of 2 copies/ 10^6 CD4⁺ lymphocytes). In the chronic group, HIV-1 DNA was not detected in 4 of 55 patients (7%). Comparison of the amounts of HIV-1 DNA between these two groups demonstrated that the relative and absolute amounts were lower in the before-SC group than in the chronic group ($p = 0.016$ and $p = 0.0027$, respectively). Subsequently, we examined the correlation between the CD4 cell counts immediately before the initiation of ART (nadir CD4 cell counts) and the amounts of HIV-1 DNA. We analyzed nadir CD4 cell counts in 48 patients in whom ART was initiated in the chronic phase; nadir CD4 cell counts in 7 patients were unavailable at the time of the study. As shown in Figure 4, both the relative and absolute amounts negatively correlated with nadir CD4 cell counts. No significant correlation was noted between the amounts of HIV-1 DNA and the VLs immediately before the introduction of ART (relative: Spearman's $\rho = 0.2192$, $p = 0.1344$; absolute: Spearman's $\rho = 0.2471$, $p = 0.0904$). Collectively, these observations indicate that the amounts of cellular HIV-1 DNA in HIV-1-infected patients during ART correlated with the time when therapy was initiated. Moreover, the amounts of cellular HIV-1 DNA were maintained at lower levels, particularly in patients in whom ART was initiated earlier after HIV-1 infection.

We next investigated the association between the amount of HIV-1 DNA and the current ART regimen.



The 61 patients were divided into 3 groups according to the antiretroviral drugs they received: protease inhibitor-based regimen (PI group, $n = 32$), non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor-based regimen (NNRTI group, $n = 25$), and 3-nucleoside reverse transcriptase inhibitor regimen (3NRTI group, $n = 4$). Amongst the three groups, the HIV-1 DNA levels were highest in the 3NRTI group. However, no significant differences were observed in either the relative or absolute amounts of HIV-1 DNA among the three groups (Wilcoxon signed-rank test, relative: $p = 0.3325$, absolute: $p = 0.4091$). Median HIV-1 DNA levels in the PI group (relative: 50 copies/ 10^6 CD4⁺ lymphocytes; absolute: 25 copies/ml) were similar to those in the NNRTI group (relative: 23 copies/ 10^6 CD4⁺ lymphocytes; absolute: 17 copies/ml).

Finally, the amounts of HIV-1 DNA and the duration of ART were examined. The duration of ART was defined as the period during which VL was maintained below the detection limit. The relative amounts of HIV-1 DNA showed a significant negative correlation with



the duration of undetectable VLs (Figure 5A). A regression analysis, conducted based on the assumption that the amounts of HIV-1 DNA in patients with their VLs below the detection limit were 1 copy/ 10^6 CD4⁺ lymphocytes, provided a straight line, as shown in Figure 5A ($p = 0.0459$). The half-life of HIV-1 DNA calculated from the regression line was about 1,400 days (47 months). As shown in Figure 5B, there was no correlation between the absolute amounts of HIV-1 DNA and the duration of undetectable VLs. In addition, the half-life of HIV-1 DNA was extended to about 2,300 days (78 months; $p = 0.215$). The duration of ART and the CD4 cell counts at the time of sampling were moderately correlated (data not shown, Spearman's $\rho = 0.400$, $p = 0.001$), suggesting that the CD4 cell counts increased as the duration of ART increased.

Discussion

In this study, the amounts of cellular HIV-1 DNA in peripheral CD4⁺ lymphocytes were measured in patients

with VLs continuously maintained by ART below the detection limit using a novel, highly sensitive method [8]. Collectively, the data presented here indicate that while the viral replication was favorably suppressed with anti-HIV drugs for a prolonged period, HIV-1 DNA can be quantified in about 90% of these patients. This is similar to the detection limits previously reported [9,10].

In addition to the nested PCR methods, quantifying HIV-1 DNA in isolated CD4⁺ lymphocytes contributed to improved sensitivity of the assay because these cells are the major reservoir of PBMC, and their use increases the population containing HIV-1 DNA [1]. However, purification of CD4⁺ lymphocytes eliminates minor viral reservoir cells, such as monocytes, from the analysis. The amounts of HIV-1 DNA in monocytes in patients with HIV-1-associated dementia are higher than those in HIV-1-infected patients without dementia [11,12]. Furthermore, ultra-deep pyrosequencing has shown that there is high HIV-1 heterogeneity in monocytes compared with CD4⁺ lymphocytes, suggesting a possible source of viral diversity [13]. Whilst these observations highlight the importance of examining monocyte reservoirs, we used only the CD4⁺ lymphocyte population rather than PBMC to improve the sensitivity of cellular HIV-1 DNA detection in this study.

The amount of cellular HIV-1 DNA in CD4⁺ lymphocytes is generally calculated as the copy number per 1 million CD4⁺ lymphocytes or per 1 µg of total DNA. In this study, the values calculated using this method were defined as the relative amounts. As reported previously, a negative correlation was noted between the relative amounts of HIV-1 DNA and CD4 cell counts at the time of sampling [6,14], and the duration of therapy [15-18]. These results indicate that HIV-1-uninfected CD4⁺ lymphocytes may be newly generated during ART, which could dilute the amounts of latently infected cells. Thus, an examination of the relative amounts may result in an underestimation of the amounts of HIV-1 DNA, and may not correctly reflect the viral reservoir of an HIV-1-infected patient's body. The relative amounts were corrected for the CD4 cell counts at the time of sampling, and were also analyzed as copy number in CD4⁺ lymphocytes in 1 ml of blood (absolute amounts). After this correction, there was no negative correlation between the amounts of HIV-1 DNA and CD4 cell counts at the time of sampling. Thus, it seemed appropriate to examine absolute amounts as well as relative amounts of HIV-1 DNA in CD4⁺ lymphocytes to determine the effect of ART on viral reservoir size.

A negative correlation between the relative amounts of HIV-1 DNA and the duration of ART was noted in this study. A regression analysis demonstrated that the amounts of cellular HIV-1 DNA were halved when VLs

were suppressed below the detection limit for about 47 months. This half-life was almost equivalent to that of latently infected cells previously reported by Siliciano et al. (about 44 months) [2]. In this previous report, the half-life was calculated by counting latently infected cells per 1 million CD4⁺ lymphocytes for 7 years, and the researchers concluded that it took 73.4 years to eliminate all latently infected cells. However, the possible dilution of latently infected cells with newly generated CD4⁺ lymphocytes was not addressed. As indicated in this study, there was no correlation between the absolute amounts and duration of therapy, and the half-life was extended to about 78 months. Although the accuracy of the half-life calculated here is limited by the fact that this study is not a longitudinal study, previous reports of the time required for ART to eliminate HIV-1 from patients' bodies are likely to be underestimates.

In addition to the decline rate of latently infected cells in the CD4⁺ lymphocyte reservoir, the decline rate of cellular HIV-1 DNA in PBMC has also been investigated. Longitudinal studies involving patients undergoing long-term ART have shown that the amount of cellular HIV-1 DNA in PBMC decreased by 2.5-3.0 copies/10⁶ PBMC in the first year within initiating ART [16,18,19]; this was followed by a milder decrease and levels reached a plateau after about 80 weeks [20,21] or 3 years [18]. These results resemble the decline in the absolute amounts of cellular HIV-1 DNA rather than the relative amounts seen in the present study, although the comparison between the amounts of HIV-1 DNA in PBMC and relative and absolute amounts of HIV-1 DNA in CD4⁺ lymphocytes was not performed in this study.

No differences were observed in the amount of HIV-1 DNA between the PI and NNRTI groups in this study. In a previous observational study, the amounts of HIV-1 DNA in the PI and NNRTI groups showed no significant differences using the Kruskal-Wallis test [22]. However, in this previous study, subjects with high levels of HIV-1 DNA were more common in the NNRTI group than in the PI group, suggesting the possibility that PI treatment may have a greater impact on viral reservoir than NNRTI. These two previous studies, however, did not conclusively address the effects of anti-HIV drugs on viral reservoir because they were not randomized controlled studies. Nevertheless, the use of drugs that exert a beneficial effect on the clearance of HIV-1 DNA might reduce the half-life of latently infected cells. Recently, Buzón et al. reported that intensification of ART treatment with raltegravir, an HIV-1 integrase inhibitor, in patients on standard ART led to a transient increase in 2-LTR circles [23]. This suggests that ongoing viral replication persists despite suppressive ART, and that raltegravir prevents linear HIV-1 DNA

from integrating into chromatin, followed by conversion of linear DNA to 2-LTR circles. The continual replenishment of viral reservoirs by ongoing viral replication is thought to be a mechanism responsible for the longevity of viral reservoir. Further studies are required to determine whether raltegravir can reduce the half-life of the viral reservoir by arresting ongoing viral replication that seems to occur during ART.

In agreement with previous reports [24,25], this study demonstrates that the amounts of HIV-1 DNA are maintained at low levels in patients in whom ART was initiated before the production of anti-HIV antibody. Previous reports that examined the impact of 1 year of ART showed that ART reduces the cellular HIV-1 DNA level more effectively when initiated during the acute rather than the chronic phase of HIV-1 infection. Given these observations, our results indicate that this effect could continue for a prolonged period because our patients received long-term ART (median = approximately 6 years). It should be noted that six patients in whom therapy was initiated before seroconversion required the introduction of ART to alleviate the symptoms of acute HIV infection. Most of these patients had more severe symptoms than patients with usual acute HIV infection. Thus, it is unlikely that the amounts of HIV-1 DNA were maintained at low levels by low viral replication. In addition to these observations, the CD4 cell counts before the introduction of ART were negatively correlated with the amounts of HIV-1 DNA. Pre-ART VLs also tended to correlate with the amounts of HIV-1 DNA, but without statistical significance. This suggests that the latently infected cells might be established early after infection [26,27] and increase gradually during an asymptomatic period. In support of this, several studies have followed asymptomatic carriers with stable VLs for a long time and shown a gradual increase in cellular HIV-1 DNA [28] and an increase in the amount of HIV-1 DNA together with the progression of immunodeficiency [29,30].

The amounts of HIV-1 DNA were significantly lower, in patients in whom ART was introduced before seroconversion. Because HIV-1 DNA could not be detected in three of the six patients of the before-SC group, this study cannot demonstrate the actual suppression level of cellular HIV-1 DNA in these patients. Moreover, these results need to be interpreted carefully in light of some conflicting results on the amount of HIV-1 DNA in patients treated with ART during the acute phase [31,32], and negative results about the potential clinical usefulness of estimation of the HIV-1 DNA level [33-36]. The present study is limited by its small cohort size (especially the before-SC group), and blood samples were obtained from patients enrolled at two centers, resulting in a cross-sectional study design. Therefore, further longitudinal studies are required to confirm our

preliminary findings from a small cohort of patients. In the future, we hope to develop a more sensitive analysis method to determine the effects of ART intervention in the acute phase of HIV-1 infection by examining the relationship between the amounts of cellular HIV-1 DNA and long-term course of ART.

Conclusions

Here, we analyzed samples from 61 patients to examine the significance of the amounts of HIV-1 DNA. The amounts of HIV-1 DNA were correlated with the timing of ART introduction, but not with the duration of ART. In addition, CD4⁺ T lymphocytes, newly generated by ART, diluted latently infected cells, indicating that the relative amounts of cellular HIV-1 DNA might be underestimated. In addition to analysis of the relative amount, quantifying the absolute amount of cellular HIV-1 DNA would be helpful in providing an accurate measure of HIV-1 DNA in CD4⁺ T lymphocytes.

Acknowledgements and Funding

We are thankful to all the patients who participated in this study. This work was supported by Grants-in-Aid for AIDS research from the Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan to DW (No. H20-AIDS-015) and TK (No. H18-AIDS-010).

Author details

¹AIDS Medical Center, National Hospital Organization Osaka National Hospital, Osaka, Japan. ²Clinical Research Center, National Hospital Organization Nagoya Medical Center, Nagoya, Japan. ³Internal Medicine, Clinical Research Institute, National Hospital Organization Kyushu Medical Center, Fukuoka, Japan. ⁴College of Pharmacy, Kinjo Gakuin University, Nagoya, Japan.

Authors' contributions

TK and TS participated in the study design and coordination; SI and DW carried out the experiments; TS, TU, DW, RM, AS, KY, HY, HB, YO, TT, DK, YN, and MY managed the patients and collected the data; DW and YN wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 16 December 2010 Accepted: 24 May 2011

Published: 24 May 2011

References

- Finzi D, Hermankova M, Pierson T, Carruth LM, Buck C, Chaisson RE, Quinn TC, Chadwick K, Margolick J, Brookmeyer R, Gallant J, Markowitz M, Ho DD, Richman DD, Siliciano RF: Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science* 1997, **278**(5341):1295-1300.
- Siliciano JD, Kajdas J, Finzi D, Quinn TC, Chadwick K, Margolick JB, Kovacs C, Gange SJ, Siliciano RF: Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4⁺ T cells. *Nat Med* 2003, **9**(6):727-728.
- Chun TW, Carruth L, Finzi D, Shen X, DiGiuseppe JA, Taylor H, Hermankova M, Chadwick K, Margolick J, Quinn TC, Kuo YH, Brookmeyer R, Zeiger MA, Barditch-Crovo P, Siliciano RF: Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature* 1997, **387**(6629):183-188.
- Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents: Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. Department of Health and Human Services; 2009.

5. Koelsch KK, Liu L, Haubrich R, May S, Havlir D, Gunthard HF, Ignacio CC, Campos-Soto P, Little SJ, Shafer R, Robbins GK, D'Aquila RT, Kawano Y, Young K, Dao P, Spina CA, Richman DD, Wong JK: **Dynamics of total, linear nonintegrated, and integrated HIV-1 DNA in vivo and in vitro.** *J Infect Dis* 2008, **197**(3):411-419.
6. Chomont N, El-Far M, Ancuta P, Trautmann L, Procopio FA, Yassine-Diab B, Boucher G, Boulassel MR, Ghattas G, Brechley JM, Schacker TW, Hill BJ, Douek DC, Routy JP, Haddad EK, Sekaly RP: **HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation.** *Nat Med* 2009, **15**(8):893-900.
7. Wada K, Nagai H, Hagiwara T, Ibe S, Utsumi M, Kaneda T: **Delayed HIV-1 infection of CD4+ T lymphocytes from therapy-naive patients demonstrated by quantification of HIV-1 DNA copy numbers.** *Microbiol Immunol* 2004, **48**(10):767-772.
8. Nagai H, Wada K, Morishita T, Utsumi M, Nishiyama Y, Kaneda T: **New estimation method for highly sensitive quantitation of human immunodeficiency virus type 1 DNA and its application.** *J Virol Methods* 2005, **124**(1-2):157-165.
9. Kondo M, Sudo K, Tanaka R, Sano T, Sagara H, Iwamuro S, Takebe Y, Imai M, Kato S: **Quantitation of HIV-1 group M proviral DNA using TaqMan MGB real-time PCR.** *J Virol Methods* 2009, **157**(2):141-146.
10. Kabamba-Mukadi B, Henrivaux P, Ruelle J, Delferriere N, Bodeus M, Goubau P: **Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) proviral DNA load in purified CD4+ cells by LightCycler real-time PCR.** *BMC Infect Dis* 2005, **5**(1):15.
11. Redel L, Le Douce V, Cherrier T, Marban C, Janossy A, Aunis D, Van Lint C, Rohr O, Schwartz C: **HIV-1 regulation of latency in the monocyte-macrophage lineage and in CD4+ T lymphocytes.** *J Leukoc Biol* 2010, **87**(4):575-588.
12. Valcour VG, Shiramizu BT, Shikuma CM: **HIV DNA in circulating monocytes as a mechanism to dementia and other HIV complications.** *J Leukoc Biol* 2010, **87**(4):621-626.
13. Rozera G, Abbate I, Bruselles A, Vlasi C, D'Offizi G, Narciso P, Chillemi G, Prosperi M, Ippolito G, Capobianchi MR: **Massively parallel pyrosequencing highlights minority variants in the HIV-1 env quasispecies deriving from lymphomonocyte sub-populations.** *Retrovirology* 2009, **6**:15.
14. Marchetti G, Gori A, Casabianca A, Magnani M, Franzetti F, Clerici M, Perno CF, Monforte A, Galli M, Meroni L: **Comparative analysis of T-cell turnover and homeostatic parameters in HIV-infected patients with discordant immune-virological responses to HAART.** *AIDS* 2006, **20**(13):1727-1736.
15. Sarmati L, Parisi SG, Nicastrì E, d'Ettoire G, Palmisano L, Andreotti M, Andreoni C, Giuliano M, Gatti F, Boldrin C, Palu G, Vullo V, Vella S, Andreoni M: **Association between cellular human immunodeficiency virus DNA level and immunological parameters in patients with undetectable plasma viremia level during highly active antiretroviral therapy.** *J Clin Microbiol* 2005, **43**(12):6183-6185.
16. Izopet J, Salama G, Pasquier C, Sandres K, Marchou B, Massip P, Puel J: **Decay of HIV-1 DNA in patients receiving suppressive antiretroviral therapy.** *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1998, **19**(5):478-483.
17. Ibanez A, Puig T, Elias J, Clotet B, Ruiz L, Martinez MA: **Quantification of integrated and total HIV-1 DNA after long-term highly active antiretroviral therapy in HIV-1-infected patients.** *AIDS* 1999, **13**(9):1045-1049.
18. Viard JP, Burgard M, Hubert JB, Aaron L, Rabian C, Pertuiset N, Lourenco M, Rothschild C, Rouzioux C: **Impact of 5 years of maximally successful highly active antiretroviral therapy on CD4 cell count and HIV-1 DNA level.** *AIDS* 2004, **18**(1):45-49.
19. Burgard M, Izopet J, Dumon B, Tamalet C, Descamps D, Ruffault A, Vabret A, Bargues G, Mouroux M, Pellegrin I, Ivanoff S, Guisthau O, Calvez V, Seigneurin JM, Rouzioux C: **HIV RNA and HIV DNA in peripheral blood mononuclear cells are consistent markers for estimating viral load in patients undergoing long-term potent treatment.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 2000, **16**(18):1939-1947.
20. Saitoh A, Hsia K, Fenton T, Powell CA, Christopherson C, Fletcher CV, Starr SE, Spector SA: **Persistence of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 DNA in peripheral blood despite prolonged suppression of plasma HIV-1 RNA in children.** *J Infect Dis* 2002, **185**(10):1409-1416.
21. Furtado MR, Callaway DS, Phair JP, Kunstman KJ, Stanton JL, Macken CA, Perelson AS, Wolinsky SM: **Persistence of HIV-1 transcription in peripheral blood mononuclear cells in patients receiving potent antiretroviral therapy.** *N Engl J Med* 1999, **340**(21):1614-1622.
22. Nicastrì E, Palmisano L, Sarmati L, D'Ettoire G, Parisi S, Andreotti M, Buonomini A, Pirillo FM, Narciso P, Bellagamba R, Vullo V, Montano M, Di Perri G, Andreoni M: **HIV-1 residual viremia and proviral DNA in patients with suppressed plasma viral load (<400 HIV-RNA cp/ml) during different antiretroviral regimens.** *Curr HIV Res* 2008, **6**(3):261-266.
23. Buzon MJ, Massanella M, Llibre JM, Esteve A, Dahl V, Puertas MC, Gatell JM, Domingo P, Paredes R, Sharkey M, Palmer S, Stevenson M, Clotet B, Blanco J, Martinez-Picado J: **HIV-1 replication and immune dynamics are affected by raltegravir intensification of HAART-suppressed subjects.** *Nat Med* 2010, **16**(4):460-465.
24. Ngo-Giang-Huong N, Deveau C, Da Silva I, Pellegrin I, Venet A, Harzic M, Sinet M, Delfraissy JF, Meyer L, Goujard C, Rouzioux C: **Proviral HIV-1 DNA in subjects followed since primary HIV-1 infection who suppress plasma viral load after one year of highly active antiretroviral therapy.** *AIDS* 2001, **15**(6):665-673.
25. Andreoni M, Parisi SG, Sarmati L, Nicastrì E, Ercoli L, Mancino G, Sotgiu G, Mannazzu M, Trevenzoli M, Tridente G, Concia E, Aceti A: **Cellular proviral HIV-DNA decline and viral isolation in naive subjects with <5000 copies/ml of HIV-RNA and >500 × 10(6)/l CD4 cells treated with highly active antiretroviral therapy.** *AIDS* 2000, **14**(1):23-29.
26. Chun TW, Engel D, Berrey MM, Shea T, Corey L, Fauci AS: **Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4(+) T cells during primary HIV-1 infection.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, **95**(15):8869-8873.
27. Schacker T, Little S, Connick E, Gebhard-Mitchell K, Zhang ZQ, Krieger J, Pryor J, Havlir D, Wong JK, Richman D, Corey L, Haase AT: **Rapid accumulation of human immunodeficiency virus (HIV) in lymphatic tissue reservoirs during acute and early HIV infection: implications for timing of antiretroviral therapy.** *J Infect Dis* 2000, **181**(1):354-357.
28. Pasternak AO, Jurriaans S, Bakker M, Berkhout B, Lukashov VV: **Steady increase in cellular HIV-1 load during the asymptomatic phase of untreated infection despite stable plasma viremia.** *AIDS* 2010, **24**(11):1641-1649.
29. Minga AK, Anglaret X, d'Aquin Toni T, Chaix ML, Dohoun L, Abo Y, Coulibaly A, Duvignac J, Gabillard D, Rouet F, Rouzioux C: **HIV-1 DNA in peripheral blood mononuclear cells is strongly associated with HIV-1 disease progression in recently infected West African adults.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 2008, **48**(3):350-354.
30. Rouzioux C, Hubert JB, Burgard M, Deveau C, Goujard C, Bary M, Sereni D, Viard JP, Delfraissy JF, Meyer L: **Early levels of HIV-1 DNA in peripheral blood mononuclear cells are predictive of disease progression independently of HIV-1 RNA levels and CD4+ T cell counts.** *J Infect Dis* 2005, **192**(1):46-55.
31. Riva E, Pistello M, Narciso P, D'Offizi G, Isola P, Galati V, Turriziani O, Tozzi V, Vincenzi L, Dianzani F, Antonelli G: **Decay of HIV type 1 DNA and development of drug-resistant mutants in patients with primary HIV type 1 infection receiving highly active antiretroviral therapy.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 2001, **17**(17):1599-1604.
32. Zaunders JJ, Cunningham PH, Kelleher AD, Kaufmann GR, Jaramillo AB, Wright R, Smith D, Grey P, Vizzard J, Carr A, Cooper DA: **Potent antiretroviral therapy of primary human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection: partial normalization of T lymphocyte subsets and limited reduction of HIV-1 DNA despite clearance of plasma viremia.** *J Infect Dis* 1999, **180**(2):320-329.
33. Carr JM, Cheney KM, Coolen C, Davis A, Shaw D, Ferguson W, Chang G, Higgins G, Burrell C, Li P: **Development of methods for coordinate measurement of total cell-associated and integrated human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) DNA forms in routine clinical samples: levels are not associated with clinical parameters, but low levels of integrated HIV-1 DNA may be prognostic for continued successful therapy.** *J Clin Microbiol* 2007, **45**(4):1288-1297.
34. Rozera G, Abbate I, Bruselles A, Bartolini B, D'Offizi G, Nicastrì E, Tommasi C, Capobianchi MR: **Comparison of real-time PCR methods for measurement of HIV-1 proviral DNA.** *J Virol Methods* 2010, **164**(1-2):135-138.
35. Torti C, Quiros-Roldan ME, Cologni G, Nichelatti M, Ceresoli F, Pinti M, Nasi M, Cossarizza A, Lapadula G, Costarelli S, Manca N, Gargiulo F, Magoni M, Carosi G: **Plasma HIV load and proviral DNA decreases after**

two standard antiretroviral regimens in HIV-positive patients naive to antiretrovirals. *Curr HIV Res* 2008, **6**(1):43-48.

36. Goicoechea M, Smith DM, Liu L, May S, Tenorio AR, Ignacio CC, Landay A, Haubrich R: Determinants of CD4+ T cell recovery during suppressive antiretroviral therapy: association of immune activation, T cell maturation markers, and cellular HIV-1 DNA. *J Infect Dis* 2006, **194**(1):29-37.

Pre-publication history

The pre-publication history for this paper can be accessed here:
<http://www.biomedcentral.com/1471-2334/11/146/prepub>

doi:10.1186/1471-2334-11-146

Cite this article as: Watanabe *et al.*: Cellular HIV-1 DNA levels in patients receiving antiretroviral therapy strongly correlate with therapy initiation timing but not with therapy duration. *BMC Infectious Diseases* 2011 **11**:146.

**Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



研究ノート

抗 HIV 治療が酸化ストレス / 抗酸化力に与える影響

古西 満¹⁾, 宇野 健司¹⁾, 善本英一郎^{1),2)}, 治田 匡平³⁾, 片浪 雄一¹⁾,
 忽那 賢志¹⁾, 小川 拓¹⁾, 中川 智代¹⁾, 笠原 敬¹⁾,
 前田 光一¹⁾, 三笠 桂一¹⁾

¹⁾ 奈良県立医科大学感染症センター, ²⁾ 奈良厚生会病院感染制御室,

³⁾ 奈良県立医科大学附属病院薬剤部

目的: 抗 HIV 治療 (antiretroviral therapy : ART) が HIV 感染者の予後を改善させた一方で, 血管障害や骨代謝異常などの合併症が問題となっている。酸化ストレスはこれらの発症機序の一つと考えられている。そこで, ART が酸化ストレス度・抗酸化力に与える影響について検討する。

対象・方法: 新規に ART を開始した HIV 感染者 12 名を対象とした。FRAS4 (Free Radical Analytical System 4) を用いて ART 前と 1 ヶ月, 3 ヶ月, 6 ヶ月後に血漿の d-ROMs test (酸化ストレス度) と BAP test (抗酸化力) を実施した。また酸化ストレス度 / 抗酸化力バランスの指標として「修正比」を算出した。

結果: ART は免疫学的, ウイルス学的に有効であった。抗酸化力は 1 ヶ月, 3 ヶ月後に有意に低下し, 酸化ストレス度は 6 ヶ月後に有意に増加した。修正比は ART 後いずれの時期も治療前に比べ, 有意に低下していた。

結論: ART 後 1~3 ヶ月後は抗酸化力が低下, その後に酸化ストレス度が増加することで, ART は酸化ストレスに影響していることが示唆された。

キーワード: HIV 感染症, 抗 HIV 治療, 酸化ストレス

日本エイズ学会誌 13 : 105-108, 2011

諸 言

抗 HIV 治療 (antiretroviral therapy : ART) の進歩が HIV 感染者の予後を著明に改善している¹⁾。その一方で, 長期経過に伴う合併症^{2,3)} が臨床的課題の一つとなり, その発症機序に ART も影響している可能性がある^{4,5)}。

そこで, 今回我々は ART が酸化ストレスに与える影響を明らかにする。新規に ART を開始した HIV 感染者を対象として, 酸化ストレス度・抗酸化力を経時的に測定している。小規模な研究ではあるが, 興味深い結果が得られたので, 報告する。

対象と方法

対象は, 新規に ART を開始した HIV 感染者 12 名であった。平均年齢は 38.5 歳 (26~63 歳), 性別は男性 9 名・女性 3 名であった。AIDS 症例は 1 名のみで, 喫煙者は 5 名であった。ART 開始前の CD4 陽性細胞数は平均 212.9 ± 84.9/μl, logHIV-RNA は 4.6 ± 0.17 コピー/ml であった。ART は, tenofovir (TDF)/emtricitabine (FTC) + fosampre-

navir (FPV) + ritonavir (RTV) が 4 名, abacavir (ABC)/lamivudine (3TC) + atazanavir (ATV) + RTV, stavudine (d4T) + 3TC + lopinavir (LPV)/RTV が 各 2 名, TDF/FTC + ATV + RTV, ABC/3TC + FPV + RTV, ABC/3TC + ATV, TDF/FTC + efavirenz (EFV) が各 1 名であった。

酸化ストレス度・抗酸化力の評価は, 活性酸素・フリーラジカル自動分析装置 FRAS4 (Free Radical Analytical System 4; ウィスマー社, イタリア)⁶⁾ で行なった。ART 開始前と開始後 1 ヶ月, 3 ヶ月, 6 ヶ月に血漿を採取し, 酸化ストレス度は d-ROMs (Reactive Oxygen Metabolites) test, 抗酸化力は BAP (Biological Antioxidant Potential) test を用いて測定した。d-ROMs 値は 301 U.CARR 以上で酸化ストレス度が高く, BAP 値は 2200 μmol/L 以下で抗酸化力の低下と判定した。また酸化ストレス度と抗酸化力のバランスを評価する指標として修正比 (d-ROMs 値 ÷ BAP 値 ÷ 7.541)⁹⁾ を算出し, 修正比が 1 以上であれば抗酸化力が大きく, 1 未満であれば酸化ストレス度が大きいと評価した。

統計学的検討には, paired t 検定を用い, p < 0.05 の場合に統計学的に有意差があると判定した。

結 果

行なった ART は免疫学的, ウイルス学的に有効であっ

著者連絡先: 古西 満 (〒634-8522 奈良県橿原市四条町 840 奈良県立医科大学感染症センター)

2010 年 1 月 17 日受付; 2011 年 4 月 21 日受理

た。CD4 陽性細胞数は全症例で増加し、ART 後 6ヵ月の平均値は $329.8 \pm 100.1/\mu\text{l}$ であった。HIV-RNA 量も全症例で減少し、ART 後 6ヵ月では 9 例が 40 コピー/ml 未満となった。抗酸化力は ART 1ヵ月、3ヵ月後に有意に低下し (図 1)、酸化ストレス度は ART 後 6ヵ月に有意に増加した (図 2)。修正比は ART 前に比べ ART 後、有意に低下していた (図 3)。抗酸化力、酸化ストレス度、修正比は、ART の薬剤の違いや喫煙の有無による明らかな差異を認めなかった。

考 察

酸素は生命活動に必要なエネルギー産生に重要な役割を果たしているが、一部は代謝の過程で活性酸素種 (Reactive Oxygen Species : ROS) となる。通常、ROS は活性酸素消去酵素や低分子抗酸化物により除去され、生体は ROS による傷害から保護されている。しかし、このバランスが破綻するとさまざまな疾患の病態に影響することが知られている。そこで、今回我々は酸化ストレス度と抗酸化力を簡便に測定できる FRAS4 を用いて、ART 前後の酸化ストレスを評価した。FRAS4 では酸化ストレス度は生体内の ROS を直接測定するのではなく、その副産物であるヒドロペルオキシド濃度を呈色反応で測定する。抗酸化力は、血漿中の抗酸化物質が ROS の酸化反応を止める還元能として三価鉄が二価鉄に変化する脱色レベルで測定している。近年では、FRAS4 はさまざまな疾患や病態における酸化ストレスの検討に利用されている^{10, 11)}。

ART が HIV 感染者の予後を改善させた¹⁾一方で、血管障害や骨代謝異常などの長期経過に伴う合併症が問題となっている^{2, 3)}。これらの合併症は HIV 感染自体だけでなく、ART の影響も受けていると考えられている^{4, 5)}。また、酸化ストレスが血管障害や骨代謝異常の発症機序に関わることも指摘されている^{6, 7)}。さらに、ART を受けている HIV 感染者の方が未治療の HIV 感染者に比べて、酸化ストレスが高いという報告もある¹²⁾。そこで、今回 ART が酸化ストレスに与える影響について治療開始前後で検討した。その結果、ART 開始 1ヵ月・3ヵ月後は抗酸化力が低下し、6ヵ月後は酸化ストレス度が増加することで、酸化ストレスが高くなっていることが明らかになった。ART 開始初期には薬剤自体もしくは薬物代謝酵素誘導などが影響して抗酸化物質が減少するが、ホメオスタシス機構でその後回復してくるのではないかと推察される。一方、ART による酸化ストレス度の増加は、核酸系逆転写酵素阻害薬のミトコンドリア障害が指摘されている¹³⁾。しかし、今回の検討では検討症例数が少ないこともあり、ART の薬剤、喫煙の有無によって酸化ストレスには差は見出せていない。ART と酸化ストレスとの関連はまだ十分には解明さ

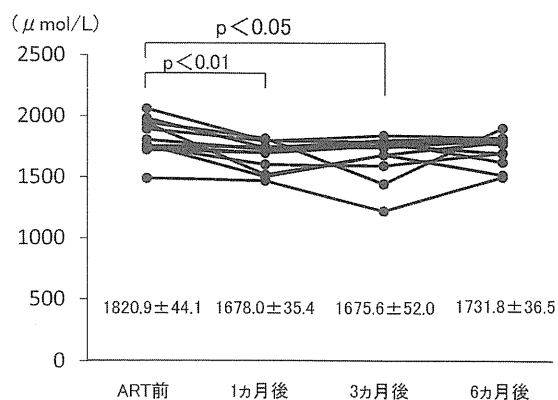


図 1 抗 HIV 治療 (ART) 前後の抗酸化力 (BAP test) の推移

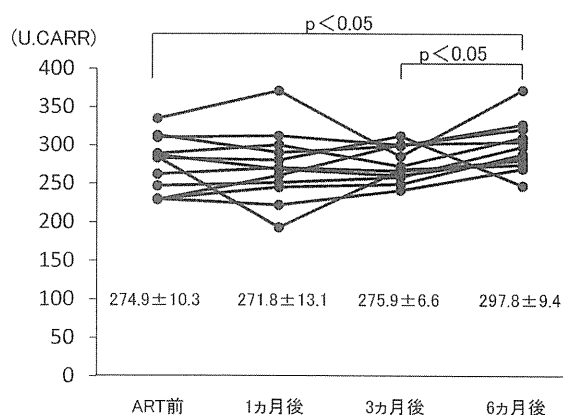


図 2 抗 HIV 治療 (ART) 前後の酸化ストレス度 (d-ROMs test) の推移

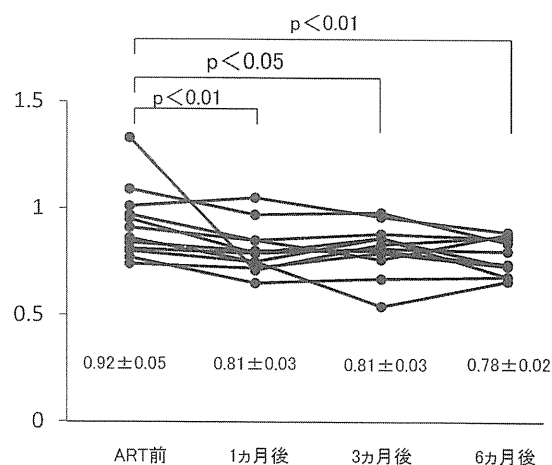


図 3 抗 HIV 治療 (ART) 前後の修正比の推移

れておらず、今後の研究成果を待つ必要がある。

文 献

- 1) Quinn TC : HIV epidemiology and the effects of antiviral therapy on long-term consequence. *AIDS* 22 : S7-12, 2008.
- 2) Blanco F, San Román J, Vispo E, López M, Salto A, Abad V, Soriano V : Management of metabolic complications and cardiovascular risk in HIV-infected patients. *AID Rev* 12 : 231-241, 2010.
- 3) Mansky KC : Aging, human immunodeficiency virus, and bone health. *Clin Interv Aging* 5 : 285-292, 2010.
- 4) Hsue PY, Hunt PW, Schnell A, Kalapus SC, Hoh R, Ganz P, Martin JN, Deeks SG : Role of viral replication, antiretroviral therapy, and immunodeficiency in HIV-associated atherosclerosis. *AIDS* 23 : 1059-1067, 2009.
- 5) Borderi M, Gibellini D, Vescina F, De Crignis E, Cimatti L, Biagetti C, Tampellini L, Re MC : Metabolic bone disease in HIV infection. *AIDS* 23 : 1297-1310, 2009.
- 6) Vogiatzi G, Tousoulis A, Stefanadis C : The role of oxidative stress in atherosclerosis. *Hellenic J Cardiol* 50 : 402-409, 2009.
- 7) Sontakke AN, Tare RS : A duality in the roles of reactive oxygen species with respect to bone metabolism. *Clin Chim Acta* 318 : 145-148, 2002.
- 8) Cesaron MR, Belcaro G, Carratelli M, Conelli U, De Sanctis MT, Incandela L, Barsotti A, Terranova R, Nicolaidis A : A simple test to monitor oxidative stress. *Int Angiol* 18 : 127-130, 1999.
- 9) 永田勝太郎, 長谷川拓也, 広門靖正, 喜山克彦, 大槻千佳 : 生活習慣病と酸化ストレス防御系. *心身医* 48 : 177-183, 2008.
- 10) Gerardi G, Usberti M, Martini G, Albertini A, Sugherini L, Pompella A, Di LD : Plasma total antioxidant capacity in hemodialyzed patients and its relationships to other biomarkers of oxidative stress and lipid peroxidation. *Clin Chem Lab Med* 40 : 104-110, 2002.
- 11) Komatsu F, Kudoh H, Kagawa Y : Evaluation of oxidative stress and effectiveness of low-dose glucocorticoid therapy on exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *J Gerontol* 62 : 459-464, 2007.
- 12) Mandas A, Iorio EL, Congiu MG, Balestrieri C, Mereu A, Cau D, Dessi S, Curreli N : Oxidative imbalance in HIV-1 infected patients treated with antiretroviral therapy. *J Biomed Biotechnol* 2009 : 749575 Epub 2009 Oct 26.
- 13) Day BJ, Lewis W : Oxidative stress in NRTI-induced toxicity : Evidence from clinical experience and experiments in vitro and in vivo. *Cardiovasc Toxicol* 4 : 207-216, 2004.

Influence of Antiretroviral Therapy on Oxidative Profile in HIV-infected Patients

Mitsuru KONISHI¹⁾, Kenji UNO¹⁾, Eiichiro YOSHIMOTO^{1), 2)}, Kyohei HARUTA³⁾,
Yuichi KATANAMI¹⁾, Satoshi KUTSUNA¹⁾, Taku OGAWA¹⁾, Chiyo NAKAGAWA¹⁾,
Kei KASAHARA¹⁾, Koichi MAEDA¹⁾ and Keiichi MIKASA¹⁾

¹⁾ Center for Infectious Diseases, Nara Medical University

²⁾ Division of Infection Control, Nara Kohseikai Hospital

³⁾ Department of Pharmacy, Nara Medical University Hospital

Objectives : Antiretroviral therapy (ART) has improved the long-term prognosis for patients with human immunodeficiency virus (HIV) infection. Nowadays medical management of HIV infection is no longer focused solely on opportunistic diseases, but also includes the atherosclerosis and osteoporosis. Therefore, we aim to assess the influence of ART on oxidative balance in HIV-infected patients.

Subjectives and Methods : Twenty HIV-infected patients, who initiated ART newly, were enrolled. To assess plasma total oxidative and antioxidant levels, we utilized the d-ROMs and BAP test using FRAS4 before ART, on 1, 3, and 6 months after starting ART. Modified BAP/d-ROMs ratio was used for the oxidative balance marker.

Results : Our ART showed immunological and virological effect. Antioxidant level was significantly lower on 1 and 3 months after ART ($p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively). Oxidative level significantly increased on 6 months after ART ($p < 0.05$). Modified BAP/d-ROMs ratio significantly decreased after ART compared to before ART ($p < 0.01$ or $p < 0.05$).

Conclusions : Our results indicate that ART may affect oxidative stress in HIV-infected patients.

Key words : HIV infection, antiretroviral therapy, oxidative stress

HIV 感染者の骨血管相関に関する検討

¹⁾ 奈良県立医科大学感染症センター, ²⁾ 奈良厚生会病院感染制御室古西 満¹⁾ 宇野 健司¹⁾ 善本英一郎²⁾
笠原 敬¹⁾ 前田 光一¹⁾ 三笠 桂一¹⁾

(平成 22 年 12 月 27 日受付)

(平成 23 年 4 月 6 日受理)

Key words: human immunodeficiency virus, osteoporosis, atherosclerosis

序 文

HIV (human immunodeficiency virus) 感染者の予後が改善することで, 長期経過に伴う合併症が診療上の重要な課題となってきた。なかでも骨代謝異常や血管障害が注目されている合併症である¹⁾²⁾。従来から閉経後女性や高齢者では, 骨代謝異常と血管障害との間に関連性が指摘され³⁾, 骨血管相関と呼ばれている。そこで, 我々は HIV 感染者において骨血管相関が認められるのかを明らかにする目的で若干の検討を行ったので, 報告する。

対象と方法

研究協力の同意が得られた HIV 感染者 44 名を対象とした。対象の平均年齢 40.9 (24~65) 歳, 性別は男性 39 名・女性 5 名であった。18 名が AIDS (acquired immunodeficiency syndrome) であり, 37 名が抗 HIV 治療を受けていた。CD4 陽性細胞数は平均 356 (1~828)/ μ L, HIV-RNA 量は 32 名が検出限界未満であった。

骨塩量は dual X-ray absorptiometry (DXA) を用いて, 腰椎で測定した。血管障害の指標として FORM PWV/ABI (コーリン社) を用いて脈波速度 (brachial-ankle pulse wave velocity: baPWV) を測定した。baPWV は高値であるほど動脈の硬化が強くなり, 1,600 cm/秒以上で動脈硬化があると判定した。

なお, 本研究は臨床的な評価の一環として行った検査結果を後方視的に集計したものであるが, 集計に際しては患者から同意を取得した。

結 果

骨塩量の平均は 1.09 (0.779~1.299) g/cm³ であり, 日本骨粗鬆症学会ガイドラインの診断基準では 1 名が骨粗鬆症, 8 名が骨減少症に該当した。baPWV の平

均は 1,376.1 (1,015~1,811) cm/秒であり, 6 名が動脈硬化に該当した。骨塩量と baPWV との間に有意な負の相関を認めた (Fig. 1)。

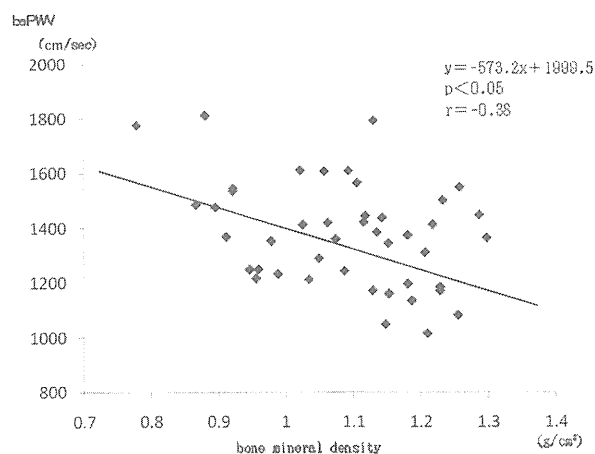
考 察

以前から閉経後女性や高齢者では疫学的に骨血管相関がみられる³⁾ことが認識されている。また, 近年では骨代謝に関わる因子が血管障害にも作用し, 逆に血管障害に関与する因子が骨代謝にも影響することが明らかになっている。例えば, 破骨細胞を分化誘導し, 骨吸収を促す RANKL (receptor activator of nuclear factor κ B ligand) が, 血管平滑筋細胞の石灰化を促進することが示されている⁴⁾。このように分子生物学的にも骨血管相関の存在が裏付けられつつある。

一方で, HIV 感染者は非感染者に比べ骨粗鬆症や動脈硬化の発症頻度が高いと報告されている¹⁾²⁾⁵⁾。し

Fig. 1 Relationship between bone mineral density (BMD) and brachial-ankle pulse wave velocity (baPWV).

BMD correlates significantly negatively with baPWV.



別刷請求先: (〒634-8522) 奈良県橿原市四条町 840

奈良県立医科大学感染症センター 古西 満

かし、これまで HIV 感染者において骨血管相関が認められるかどうかという視点からの解析はない。今回の検討では、骨塩量と baPWV との間に弱いながらも有意な負の相関を認め、HIV 感染者には骨血管相関が存在している。

有効な抗 HIV 治療によって HIV 感染者の予後が改善し、先進国では HIV 感染者の高齢化が指摘されている⁶⁾。また、Deeks⁷⁾は HIV 感染者では高齢化と関連する疾患をより早期に発症することを指摘している。その原因は明確とはなっていないが、HIV 感染に伴う炎症や免疫障害、抗 HIV 薬の影響などの多彩な要因を推察している。そのため、HIV 感染者の長期的な診療では骨血管相関をはじめとした高齢者にみられる合併症が重要な課題になると考えられる。骨代謝異常、血管障害と分けて対応するのではなく、総合的にとらえる視点も必要である。また、共通の発症機序を見出すことが有効な対策に結びつく可能性があり、この分野における分子生物学的な研究がさらに発展することが期待される。

文 献

- 1) Borderi M, Gibellini D, Vescini F, De Crignis E, Cimatti L, Biagetti C, *et al.* : Metabolic bone disease in HIV infection. *AIDS* 2009 ; 23 : 1297—310.
- 2) Hsue PY, Hunt PW, Schnell A, Kalapus SC, Hoh R, Ganz P, *et al.* : Role of viral replication, antiretroviral therapy, and immunodeficiency in HIV-associated atherosclerosis. *AIDS* 2009 ; 23 : 1059—67.
- 3) Shaffer JR, Kammerer CM, Rainwater DL, O'Leary DH, Bruder JM, Bauer RL, *et al.* : Decreased bone mineral density is correlated with increased subclinical atherosclerosis in older, but not younger, Mexican American women and men : The San Antonio family osteoporosis study. *Calcif Tissue Int* 2007 ; 81 : 430—41.
- 4) Panizo S, Cardus A, Encinas M, Parisi E, Valcheva P, López-Ongil S, *et al.* : RANKL increases vascular smooth muscle cell calcification through a RANK-BMP4-dependent pathway. *Circ Res* 2009 ; 104 : 1041—8.
- 5) Triant VA, Lee H, Hadigan C, Grinspoon SK : Increased acute myocardial infarction rates and cardiovascular risk factors among patients with HIV disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2007 ; 92 : 2506—12.
- 6) Luther VP, Wilkin AM : HIV infection in older adults. *Clin Geriatr Med* 2007 ; 23 : 567—83.
- 7) Deeks SG : Immune dysfunction, inflammation, and accelerated aging in patients on antiretroviral therapy. *Top HIV Med* 2009 ; 17 : 118—23.

Correlation between Osteoporosis and Atherosclerosis in those with HIV-infection

Mitsuru KONISHI¹⁾, Kenji UNO¹⁾, Eiichiro YOSHIMOTO²⁾, Kei KASAHARA¹⁾,
Koichi MAEDA¹⁾ & Keiichi MIKASA¹⁾

¹⁾Center for Infectious Diseases, Nara Medical University, ²⁾Division of Infection Control, Nara Kohseikai Hospital

[J.J.A. Inf. D. 85 : 384~385, 2011]

ラルテグラビルの選択理由に関する検討

奈良県立医科大学附属病院薬剤部*，奈良県立医科大学感染症センター**

治田 匡平*，古西 満**，宇野 健司**，松島 紫乃*，今中比砂野*，森田 幸子*，
北 啓二*，宇野 雅之*

諸言

Human immunodeficiency virus (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¹⁾²⁾。わが国では，1997 年頃から核酸系逆転写酵素阻害薬 (nucleoside reverse transcriptase inhibitor ; NRTI) と非核酸系逆転写酵素阻害薬 (non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor ; NNRTI)，プロテアーゼ阻害薬 (protease inhibitor ; PI) を組み合わせた強力な抗 HIV 治療 (antiretroviral therapy ; ART) が可能となり，HIV 感染症は不治の病から慢性疾患へと変化している。一方で HIV の薬剤耐性を防ぎ，ART の有効性を保つためには，良好なアドヒアランスの維持が重要である。しかし，ART を受けた HIV 感染者の 48% で何らかの副作用があり，37% で生活に支障をきたしていると報告され³⁾，服薬継続が困難となる HIV 感染者も少なくない。

インテグラーゼ阻害薬 (integrase strand transfer inhibitor ; INSTI) のラルテグラビル (raltegravir ; RAL) は，優れた HIV 増殖抑制に加え，副作用・薬物相互作用が少ないという特徴があり，わが国の抗 HIV 治療ガイドラインでも推奨薬の 1 つに加えられている⁴⁾。しかし，わが国では一部の診療施設を除けば RAL の使用経験はまだ少なく，RAL をどのように使用するとよいのかは十分に評価されていない。そこで，われわれは RAL の

使用法を考える一助とするために，その選択理由と，その達成状況などを検討したので，報告する。

I. 対象と方法

2010 年 9 月時点で奈良県立医科大学附属病院において ART を受けている HIV 感染者 74 名のうち，RAL を服用している 23 名を対象とした。対象者の平均年齢は 45 歳 (33～72 歳)，性別は男性 19 名，女性 4 名であった。

RAL の選択理由とその達成状況およびウイルス学的効果と安全性について，診療録によって後方視的に評価した。

II. 結果

RAL は 3 例が初回治療，20 例が治療変更で使用されていた。初回治療例では治療前の CD4 陽性細胞数は平均 $71/\mu\text{L}$ ，HIV-RNA 量は平均 9.8×10^3 コピー/mL で，併用薬はすべてテノホビル/エムトリシタピン (tenofovir/emtricitabine ; TDF/FTC) であった。治療変更例では変更前の CD4 陽性細胞数は平均 $303/\mu\text{L}$ ，HIV-RNA 量は 10 名で検出限界未満となっていた。併用薬は TDF/FTC 7 名，アバカビル/ラミブジン (abacavir/lamivudine ; ABC/3TC) 6 名などであった (表 1)。



Kyohei Haruta (主査)，Mitsuru Konishi (客員教授)，Kenji Uno (助教)，Shino Matsushima，Hisano Imanaka，Sachiko Morita (次長)，Hiroji Kita (次長)，Masayuki Uno (部長)



表 1. RAL 服用症例の概要

	初回治療例	治療変更例
症例数	3	20
平均年齢(歳)	42.6 (36 ~ 54)	48.3 (33 ~ 72)
性別 (男性/女性)	3 / 0	16 / 4
RAL 投与前 CD4 ⁺ 数 (/μL)	71 (19 ~ 136)	303 (5 ~ 883)
RAL 投与前 HIV-RNA 量		
< 40 (コピー/mL)	—	10
40 ~ 1,000	—	4
1,000 ~ 10,000	2	2
≥ 10,000	1	4
併用した抗 HIV 薬		
TDF/FTC	3	7
ABC/3TC	—	6
DRV+RTV+ETR	—	1
DRV+RTV+d4T	—	1
DRV+RTV+TDF/FTC	—	1
LPV/RTV+ETR	—	1
LPV/RTV+AZT	—	1
LPV/RTV+3TC	—	1
TDF+3TC+ETR	—	1

表 2. 回避しなかった副作用

	初回治療例	治療変更例
脂質代謝異常	1	8
精神神経症状	—	2
消化器症状	1	—
肝・腎機能障害	—	1
失調歩行	—	1
薬疹	—	1

RAL の選択理由は、副作用回避が初回治療例 2 名と治療変更例 13 名の 15 名 (65%) と最も多かった。ほかには相互作用回避が初回治療例 1 名、治療変更例 3 名の 4 名 (17%)、サルベージ療法が治療変更例 3 名 (13%)、治療効果不十分が治療変更例の 1 名 (4%) であった。回避したい副作用は、大半が PI 使用による脂質代謝異常であり、次いでエファビレンツ (efavirenz ; EFV) による精神神経症状であった (表 2)。相互作用を配慮した薬剤はリファブチン (rifabutin ; RBT) が 2 名、抗癌薬が 1 名、プロトンポンプ阻害薬が 1 名であった。

回避しなかった副作用は RAL を選択することで治療変更例では改善し、初回治療例では発

症しなかった。特に、脂質代謝異常のため治療を変更した症例は、ロピナビル/リトナビル (lopinavir/ritonavir ; LPV/RTV) (5 名)、ホスアンプレナビル (fosamprenavir ; FPV) + RTV (2 名)、アタザナビル (atazanavir ; ATV) + RTV (1 名) を平均 29.8 (7 ~ 56) ヶ月服用していた。中性脂肪値、総コレステロール値はこれらの薬剤の投与開始後に有意な上昇を示し、RAL へ変更後に有意な低下を認めた (図 1)。しかもベザフィブラート (bezafibrate) を服用していた 4 名は、RAL への変更後に中止することが可能となった。相互作用を回避しなかった症例も、合併症治療と ART を順調に継続することができた。

初回治療例は、3 名とも平均 3.6 (2 ~ 6) ヶ月で HIV-RNA 量が検出限界未満となった。治療変更例で変更時すでに HIV-RNA 量が検出限界未満であった 10 名のうち 1 名に若干のウイルス量の上昇を認めたが、4 ヶ月目以降は再び検出限界未満となり、ほかの 9 名は検出限界未満を持続した。変更時に HIV-RNA 量を検出していた 10 名は、治療変更後平均 4.1 (1 ~ 12) ヶ月で検出限界未満となった (図 2)。

RALを含むARTの開始後に認められた有害事象は、服薬期間平均13.5(2~37)ヵ月に9件であった(表3)。発疹が3件と最も多かったが、免疫再構築症候群以外はいずれの有害事象も軽微で、全症例で服薬を中止する必要はなかった。

Ⅲ. 考察

CD4陽性細胞数500/ μ L以上を維持できたHIV感染者では、非感染者と同じ生命予後を得ることができるという報告⁵⁾が出ているように、ARTの

進歩には著しいものがある。これは新規の抗HIV薬が影響しているが、ARTの成功には良好なアドヒアランスの維持が重要であることに変わりはない。抗HIV薬の服薬を阻害する因子には、服薬のタイミングの困難さや食事との関係、服薬を人に知られたくない気持ち、副作用、薬の管理方法、日常生活のなかでの服薬の困難さなどが指摘されている⁶⁾。2008年に発売されたRALは服薬阻害因子が少ない薬剤であると考えられるので、われわれはRALの選択理由とその達成度、ウイルス学的治療効果および安全性を検討することでRALの臨床的役割を評価してみた。

今回の検討では、RALの選択理由はほかの抗HIV薬の副作用を回避することが最も多く、その目的は十分に達成されていた。特に、PIによる脂質代謝異常はRALへの変更によって有意な改善が認められた。これまでの臨床試験でも、RALはPIやEFVに比べ脂質代謝への影響が有意に少な

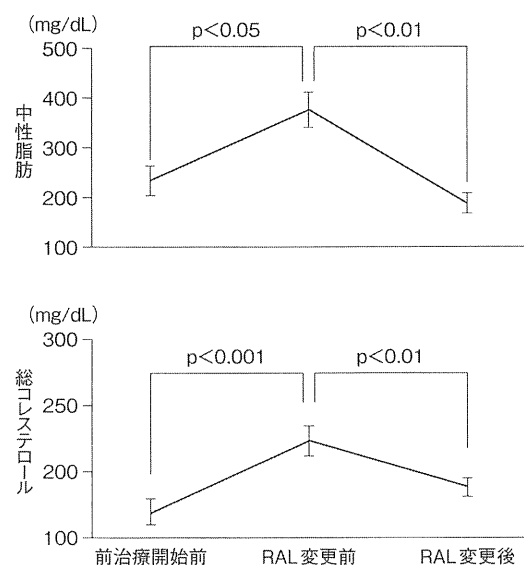


図1. RALへの変更による血清脂質値への影響

表3. RALを含む抗HIV療法後に認められた有害事象

有害事象の内容	発生件数(件)
発疹	3
嘔気・嘔吐	1
下痢	1
皮膚瘙痒感	1
不眠	1
脱毛	1
免疫再構築症候群	1

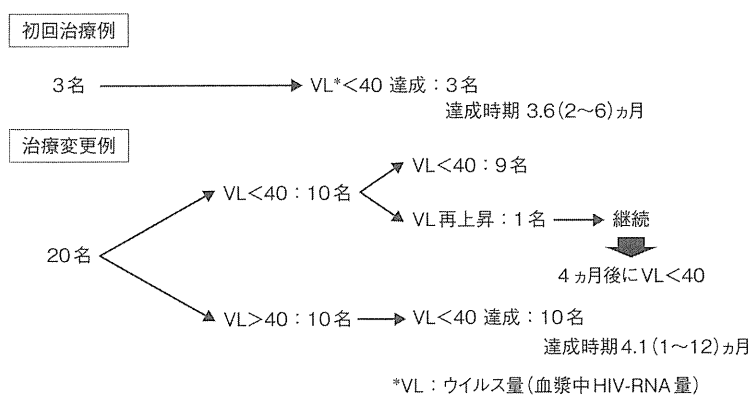


図2. RALへの変更によるウイルス学的治療効果の経過



い⁷⁾-⁹⁾ことが報告されている。HIV感染者は動脈硬化のリスクが高い¹⁰⁾ことも指摘されており、この点からも脂質代謝異常への対応が重要であると考える。

HIV感染者は免疫不全による日和見合併症や非AIDS関連悪性腫瘍などの発症リスクが高く¹¹⁾¹²⁾、その治療や予防をARTと並行して実施する必要に迫られることがある。RALはウリジンジホスフェイト グルクロノシルトランスフェラーゼ 1A1 (uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1A1; UGT1A1) で代謝され、チトクローム P450 に影響しないため、UGT1A1 の強力な誘導作用をもつリファンピシン (rifampicin) 以外とは薬物相互作用がない。今回も RBT や抗癌薬などとの併用治療を行ったが、問題なく治療を遂行できている。したがって、合併症治療・予防が必要などときには使用薬剤に配慮しながら、RAL の選択が必要なこともある。

われわれの検討では、サルベージ療法として3名、治療効果不十分として1名にRALを含むARTに変更し、いずれの症例も良好な経過を示している。3クラスの薬剤耐性を有する治療失敗症例を対象としたBENCHMRK試験¹³⁾でも、最適基礎療法にRALを併用することが有用であると報告されている。しかし、サルベージ療法を行う場合には、2剤以上の有効な薬剤を使用する必要があり、安易なRALのみの追加投与は避けるべきである。

また、サルベージ療法の症例を含めた全症例でHIV-RNA量は検出限界未満を達成し、RALを含むARTのウイルス学的治療効果は良好であった。RALのウイルス学的治療効果について、STARTMAK試験⁹⁾など主要な臨床試験でも従来のキードラッグとの非劣性が示されている。その一方で、SWITCHMRK試験⁷⁾のサブ解析では、LPV/RTVの使用以前にはほかの治療歴がある場合や以前のARTによるウイルス学的失敗がある場合には、RALのウイルス学的治療効果が劣ると指摘されている。また、RALはジェネティック・バ

リアが低いという指摘もあり¹⁴⁾、RALを選択する際には併用する抗HIV薬の耐性状況や良好なアドヒアランスの維持に注意を払う必要がある。

今回の検討では、RAL使用中に9件の有害事象があったが、頻度の高い頭痛や肝逸脱酵素上昇は認めなかった。いずれもRAL使用后早期に出現し、免疫再構築症候群を除くと症状は軽微で、いずれもARTを継続できた。したがって、RALの忍容性は高いが、使用症例数も限られ、長期服用経験も乏しいため、安全性に関しては未知の副作用も含め今後も注意深く観察していく必要があると考える。

以上から、従来の抗HIV薬による副作用や合併症治療薬との薬物相互作用がある場合には、RALは最適な薬剤であると考えられる。また、良好なアドヒアランスの維持が治療成功の鍵であるARTにおいて、RALは服薬阻害因子を少なくできるメリットがある。しかし、安易なRALの選択は治療失敗を招くリスクもあるため、薬剤耐性変異の有無や過去の治療歴を考慮するとともに、良好なアドヒアランスが維持できるようにサポートする体制を構築することが重要である。

文 献

- 1) Lohse N, Hansen AB, Pedersen G, et al : Survival of persons with and without HIV infection in Denmark. *Ann Intern Med* 146 : 87-95, 2007
- 2) Zwahlen M, Harris R, May M, et al : Mortality of HIV-infected patients starting potent antiretroviral therapy : comparison with the general population in nine industrialized countries. *Int J Epidemiol* 38 : 1624-1633, 2009
- 3) 桑原 健, 畝井浩子, 佐藤麻希, 他 : 抗HIV薬の服薬に関するアンケート調査結果. *日本エイズ学会誌* 12 : 373, 2010
- 4) 鯉淵智彦, 小田原隆, 白阪琢磨 : 抗HIV治療ガイドライン. 平成22年度厚生労働科学研究費補助金エイズ対策事業 HIV感染症及びその合併症の課題を克服する研究班, 2011
- 5) Lewden C, Chene G, Morlat C, et al : HIV-infected adults with a CD4 cell count greater than 500 cells/mm³ on long-term combination antiretroviral therapy reach same mortality rates as the general population. *J Acquir Immune Defic Syndr* 46 : 72-77, 2007



- 6) 白阪琢磨, 青木理恵子, 伊賀陽子, 他 : HIV 診療における外来チーム医療マニュアル (改訂第2版). 平成 21 年度厚生労働科学研究費補助金エイズ対策事業 HIV 感染症及びその合併症の課題を克服する研究班, 2010
- 7) Eron JJ, Young B, Cooper DA, et al : Switch to a raltegravir-based regimen versus continuation of a lopinavir-ritonavir-based regimen in stable HIV-infected patients with suppressed viraemia (SWITCHMRK 1 and 2) : two multicentre, double-blind, randomised controlled trials. *Lancet* 375 : 396-407, 2010
- 8) Martinez E, Larrousse M, Llibre JM, et al : Substitution of raltegravir for ritonavir-boosted protease inhibitors in HIV-infected patients : the SPIRAL study. *AIDS* 24 : 1697-1707, 2010
- 9) Lennox JL, DeJesus E, Berger DS, et al : Raltegravir versus Efavirenz regimens in treatment-naïve HIV-infected patients : 96-week efficacy, durability, subgroup, safety, and metabolic analyses. *J Acquir Immune Defic Syndr* 55 : 39-48, 2010
- 10) Hsue PY, Hunt PW, Schnell A, et al : Role of viral replication, antiretroviral therapy, and immunod-
 efficiency in HIV-associated atherosclerosis. *AIDS* 23 : 1059-1067, 2009
- 11) Long JL, Engels EA, Moore RD, et al : Incidence and outcomes of malignancy in the HAART era in an urban cohort of HIV-infected individuals. *AIDS* 22 : 489-496, 2008
- 12) Patel P, Hanson DL, Sullivan PS, et al : Incidence of types of cancer among HIV-infected persons compared with the general population in the United States, 1992-2003. *Ann Intern Med* 148 : 728-736, 2008
- 13) Steigbigel RT, Cooper DA, Teppler H, et al : Long-term efficacy and safety of Raltegravir combined with optimized background therapy in treatment-experienced patients with drug-resistant HIV infection : Week 96 results of the BENCHMRK 1 and 2 Phase III trials. *Clin Infect Dis* 50 : 605-612, 2010
- 14) Llibre JM, Schapiro JM, Clotet B : Clinical implications of genotypic resistance to the newer anti-retroviral drugs in HIV-1-infected patients with virological failure. *Clin Infect Dis* 50 : 872-881, 2010

□ III. 診断の進歩

8. QFTの新しい展開

国立病院機構東京病院呼吸器疾患センター 外来診療部長 永井英明

key words tuberculosis, interferon-gamma release assays, QuantiFERON®-TB, ELISpot, T-SPOT®.TB

動 向

従来、結核感染の診断はツベルクリン反応（ツ反）によって行われてきた。この方法はBCG未接種者においては感度、特異度ともに高く、基本的には優れた方法である。しかし、ツ反には「BCG接種に影響される」、「プースター効果が認められる」、「非結核性抗酸菌感染との交差反応がある」、「判定のための再受診が必要」、「ツ反の接種技術や判定技術の差が指摘されている」など多数の問題がある。特に、BCG接種に積極的に取り組んできたわが国では、その影響が非常に大きい。これらツ反の問題点を解決する新しい結核診断法としてインターフェロン γ 応答測定法 interferon-gamma release assays (IGRAs) が開発された。

IGRAsは結核菌由来抗原の刺激に対するリンパ球のインターフェロン γ (IFN- γ) 産生能を測定することによって結核感染の診断を行う方法である。2001年、クオンティフェロン®-TB アッセイとして登場した本法¹⁾は、第1世代ではリンパ球の刺激抗原としてPPDが用いられたため、BCG接種を受けている人でも陽性となり、わが国では認可されなかった。その後、刺激抗原として結核菌由来の特異抗原が用いられるようになり、わが国でも感度、特異度とも良好であることが確

認され、認可された（第2世代といわれたクオンティフェロン®-TB-2G: QFT-2G²⁾。QFT-2Gは広く用いられるようになったが、決められた時間内に検体処理を行わなければならない、時間の制約があった。これを解決したものが第3世代といわれるクオンティフェロン®-TB ゴールド (QFT-G) である³⁾。特異抗原を含んだ採血管に直接採血することにより、時間の制約を解決した。現在、わが国ではQFT-2GとQFT-Gが使用できる。その他に、欧米では用いられているが、わが国でようやく臨床試験が始まったT-SPOT®.TB (T-Spot) がある³⁾。T-SpotはQFTよりも感度が良好といわれ、今後わが国での承認を期待したい。

海外ではQFT検査の商品名が異なり、わが国の名称と紛らわしいので注意が必要である。海外ではQFT-2GはQuantiFERON®-TB Goldであり、QFT-GはQuantiFERON®-TB Gold In-Tubeである。

A. IGRAの原理

IGRAは被験者の血液あるいは精製したリンパ球に刺激抗原を加えて、リンパ球（エフェクターT細胞）のIFN- γ の産生量を測定することによ

表1 測定結果の判定

(IFN _E -IFN _N) あるいは (IFN _C -IFN _N)	判定	解釈
0.35IU/ml以上	陽性	結核感染を疑う
0.1IU/ml以上～0.35IU/ml未満	判定保留	感染リスクの度合いを考慮し、総合的に判定する
0.1IU/ml未満	陰性	結核感染していない

IFN_E: ESAT-6添加検体のIFN- γ 濃度, IFN_C: CFP-10添加検体のIFN- γ 濃度, IFN_N: 陰性コントロール添加検体のIFN- γ 濃度, IFN_M: 陽性コントロール添加検体のIFN- γ 濃度

注: (IFN_E-IFN_N) および (IFN_C-IFN_N) が共に0.35 IU/ml未満であっても, (IFN_M-IFN_N) の値が0.5 IU/ml未満の場合は「判定不可」とする。

て結核感染の有無を判定する方法である。

刺激抗原として, 結核菌由来の特異抗原 early secreted antigenic target 6 (ESAT-6) と culture filtrate protein 10 (CFP-10) が用いられている。ヒト型結核菌の遺伝子配列の中でBCGとは異なる領域が同定され, その異なる領域から産生される結核菌特異蛋白ESAT-6とCFP-10が, ヒト型結核菌感染に対して特異的な刺激抗原となりうる事が認められた。したがって, IGRAの結果はBCG接種の影響および多くの非結核性抗酸菌感染の影響を受けない。

B. QFT-2G

QFT-2Gは, 全血を用いてESAT-6とCFP-10の刺激による末梢血リンパ球のIFN- γ 産生能を測定する検査法で, わが国では2006年1月に健康保険適用となった。

ヘパリン入りの採血管で, 血液を5ml採血する。血液の抗原刺激は採血から12時間以内までに行わなければならないが, 細胞性免疫応答の割合は時間の経過により減少するため, 採血後, すみやかに処理を始めたほうがよい。検体を4分割し, 刺激抗原ESAT-6, 刺激抗原CFP-10, 陰性コントロール, 陽性コントロールを滴下し, 1分間混合する。この状態で37°C, 16～20時間(18時間推奨) 静置培養した後に, 上清(血漿)を採取

する。この上清中のIFN- γ 濃度をELISA法を用いて測定する。測定結果の判定は表1に従って行う。

C. QFT-G

QFT-2Gはツ反に代わる検査法として, 汎用されるようになってきた。しかし, QFT-2Gは採血後, 12時間以内に抗原刺激を行わなければならないという制限がある。したがって, 検査会社までの距離によっては検査を行うことのできない施設も存在する。

このようなQFT-2Gの制約を克服しうる検査法としてQFT-Gが開発された。QFT-Gでは採血管の中にすでに刺激抗原が含まれており, 採血後直ちに抗原刺激が始まるので, 培養器があればその施設で処理が可能になる。専用の1ml用採血管は陰性コントロール, 陽性コントロール, 抗原の3本である。抗原はESAT-6, CFP-10に, 新たに結核菌特異抗原TB7.7が加わり, 3種類である。37°Cで16～24時間培養後に, 遠沈し上清を採取する。この状態で冷蔵庫に2カ月保存できると言われている。IFN- γ 濃度の測定と結果判定基準はQFT-2Gと同様である。

簡便さから今後はQFT-2GからQFT-Gへ替わっていくであろう。