

た。また、現在HIVの臨床現場で問題となっているHIV感染者のB型肝炎ウイルス（HBV）の重複感染を防ぐため、「抗HIV薬によるHBV感染予防効果の解析」を行った。

## B. 研究方法

「テノホビルによる腎障害早期発見のためのマーカー検索」

以下の5つのパラメーターのうち、3つ以上が異常値となった場合、尿細管障害有り、と診断した：尿中 $\beta$ 2ミクログロブリン（b2M）、尿中 $\alpha$ 1ミクログロブリン（a1M）、尿中Nアセチル $\beta$ Dグルコサミナーゼ（NAG）、尿中リン排泄率（FEip）、尿中尿酸排泄率（FEua）。5つのパラメーターそれぞれの感度・得意度曲線のarea under the curves（AUC）を比較した。

「抗HIV薬によるHBV感染予防効果の解析」

B型肝炎ウイルス（HBV）ワクチンを受けていない男性同性愛者（MSM）のHBV感染状況について保存血清を用いて血清学的に評価した。最も古い保存血清でHBs抗原・HBs抗体・HBc抗体のすべてが陰性、すなわちHBVへの曝露を受けていないと考えられるMSMについて、最も新しい保存血清を同様にHBV感染について血清学的に評価した。HBV血清マーカーのいずれか一つでも陽転していた場合、すべての保存血清を評価し、感染時点を決定した。最初にHBVマーカーのいずれかが陽転化した血清の採取日を感染日として統計学的に解析した。HBs抗原陽性の血清があった場合、HBV-DNAのラミブジン耐性変異（rtM204V/I）を調べた。

（倫理面への配慮）

国立国際医療研究センターの倫理委員会において承認を得た。患者の理解と協力を得るため、研究の必要性和意義について十分に説明し、それぞれの施設の倫理規定に従い同意書に自筆のサインを得た。サインされた同意文書はカルテに綴じ込み保存した。また、研究への参加の同意・不同意に関わらず、診療上の不利益は被らないように配慮した。個人情報保護のため、個人を特定できるような情報は外部には出さないこととした。

## C. 研究結果

「テノホビルによる腎障害早期発見のためのマーカー検索」

テノホビル内服中の190人中、19人（10%）で尿細管障害が認められた。5つのパラメーターの感

度・得意度曲線のAUCは、b2M 0.970（95%CI 0.947-0.992）、a1M 0.968（0.944-0.992）、NAG 0.901（0.828-0.974）、FEip 0.757（0.607-0.907）、FEua 0.762（0.653-0.872）であった。b2Mとa1MのAUCには統計的な有意差はなく、これらは他の3つのパラメーターのAUCよりも大きかった。

「抗HIV薬によるHBV感染予防効果の解析」

1434人のHBVワクチンを受けていないMSMのHIV感染者の最も古い保存血清を調べたところ、354人（24.7%）がHBs抗原・HBs抗体・HBc抗体のいずれも陰性でHBV未曝露状態と考えられた。そのHBV未曝露状態と考えられる354人の最も新しい保存血清を調べたところ、43人（12.1%）でいずれかのHBV血清マーカーが陽転化しており、HBVの曝露を受けたと考えられた。陽転化した患者の保存血清を解析し、可能な限り正確にHBVに曝露した年月日を同定し、抗HBV作用のある抗HIV薬を投与されているか否かで治療状態を分類し、それぞれの治療状態でのHBV曝露頻度を比較した。抗HIV療法を受けていない期間のHBV曝露は30件、抗HBV作用のある薬剤を含まない抗HIV療法を受けている期間のHBV曝露は6件、ラミブジンを含む抗HIV療法を受けている期間のHBV曝露は7件、テノホビルを含む抗HIV療法を受けている期間はHBV曝露は認められなかった。ラミブジンまたはテノホビルを含む治療を受けている期間のHBV曝露頻度（0.669/100 person-year）は、抗HIV療法を受けていない期間（6.726/100 person-year）や、抗HBV作用のある薬剤を含まない抗HIV療法を受けている期間（5.263/100 person-year）のHBV曝露頻度に比較し、有意に低かった。HBs抗原陽性の保存血清が見つかった患者のHBV遺伝子型を調べたところ genotype Aが最も多かった（76.5%）。ラミブジン耐性変異は、ラミブジンを含む治療を受けている期間に感染したHBV（50.0%）に、他のHBV（7.1%）よりも高頻度に認められた。

## D. 考察

テノホビル投与中の尿細管障害のモニタリングマーカーとして適切なパラメーターは、b2Mとa1Mであると考えられた。

抗HBV作用のあるラミブジンやテノホビルを含む抗HIV療法は、新たなHBV感染を防ぐ作用があると考えられた。ただし、ラミブジンによるHBV感染予防作用は、ラミブジン耐性変異を持つHBVに対しては無効であると思われた。

## E. 結論

テノホビル投与中の尿細管障害の感度・得意度曲線のAUCは、b2Mとa1Mが最大であり、テノホビル投与中には、これらのうち一方を測定することが適切であると考えられた。抗HBV作用のある薬剤を含む抗HIV療法は、HBV感染予防効果があり、この点でも早期抗HIV療法の導入が推奨される。

## F. 研究発表

### 1. 原著論文

- 1) Nishijima T, Gatanaga H, Komatsu H, Takano M, Ogane M, Ikeda K, Oka S. High Prevalence of Illicit Drug Use in Men Who Have Sex with Men with HIV-1 Infection in Japan. *PLoS One*. 2013;8(12):e81960.
- 2) Mizushima D, Tanuma J, Kanaya F, Nishijima T, Gatanaga H, Lam NT, Dung NT, Kinh NV, Kikuchi Y, Oka S. WHO antiretroviral therapy guidelines 2010 and impact of tenofovir on chronic kidney disease in Vietnamese HIV-infected patients. *PLoS One*. 2013;8(11):e79885.
- 3) Nishijima T, Hamada Y, Watanabe K, Komatsu H, Kinai E, Tsukada K, Teruya K, Gatanaga H, Kikuchi Y, Oka S. Ritonavir-boosted darunavir is rarely associated with nephrolithiasis compared with ritonavir-boosted atazanavir in HIV-infected patients. *PLoS One*. 2013;8(10):e77268.
- 4) Watanabe K, Murakoshi H, Tamura Y, Koyanagi M, Chikata T, Gatanaga H, Oka S, Takiguchi M. Identification of cross-clade CTL epitopes in HIV-1 clade A/E-infected individuals by using the clade B overlapping peptides. *Microbes Infect*. 2013;15(13):874-86.
- 5) Nishijima T, Gatanaga H, Shimbo T, Komatsu H, Endo T, Horiba M, Koga M, Naito T, Itoda I, Tei M, Fujii T, Takada K, Yamamoto M, Miyakawa T, Tanabe Y, Mitsuya H, Oka S; SPARE study team. Switching tenofovir/emtricitabine plus lopinavir/r to raltegravir plus Darunavir/r in patients with suppressed viral load did not result in improvement of renal function but could sustain viral suppression: a randomized multicenter trial. *PLoS One*. 2013;8(8):e73639.
- 6) Nishijima T, Gatanaga H, Komatsu H, Takano M, Ogane M, Ikeda K, Oka S. Illicit drug use is a significant risk factor for loss to follow up in patients with HIV-1 infection at a large urban HIV clinic in Tokyo. *PLoS One*. 2013;8(8):e72310.
- 7) Tanuma J, Sano K, Teruya K, Watanabe K, Aoki T, Honda H, Yazaki H, Tsukada K, Gatanaga H, Kikuchi Y, Oka S. Pharmacokinetics of rifabutin in Japanese HIV-infected patients with or without antiretroviral therapy. *PLoS One*. 2013;8(8):e70611.
- 8) Tsuchiya K, Ode H, Hayashida T, Kakizawa J, Sato H, Oka S, Gatanaga H. Arginine insertion and loss of N-linked glycosylation site in HIV-1 envelope V3 region confer CXCR4-tropism. *Sci Rep*. 2013;3:2389.
- 9) Iijima K, Okudaira N, Tamura M, Doi A, Saito Y, Shimura M, Goto M, Matsunaga A, Kawamura YI, Otsubo T, Dohi T, Hoshino S, Kano S, Hagiwara S, Tanuma J, Gatanaga H, Baba M, Iguchi T, Yanagita M, Oka S, Okamura T, Ishizaka Y. Viral protein R of human immunodeficiency virus type-1 induces retrotransposition of long interspersed element-1. *Retrovirology*. 2013;10:83.
- 10) Hamada Y, Nagata N, Shimbo T, Igari T, Nakashima R, Asayama N, Nishimura S, Yazaki H, Teruya K, Gatanaga H, Kikuchi Y, Akiyama J, Ohmagari N, Uemura N, Oka S. Assessment of antigenemia assay for the diagnosis of cytomegalovirus gastrointestinal diseases in HIV-infected patients. *AIDS Patient Care STDS*. 2013;27(7):387-91.
- 11) Motozono C, Miles JJ, Hasan Z, Gatanaga H, Meribe SC, Price DA, Oka S, Sewell AK, Ueno T. CD8(+) T cell cross-reactivity profiles and HIV-1 immune escape towards an HLA-B35-restricted immunodominant Nef epitope. *PLoS One*. 2013;8(6):e66152.
- 12) Gatanaga H, Murakoshi H, Hachiya A, Hayashida T, Chikata T, Ode H, Tsuchiya K, Sugiura W, Takiguchi M, Oka S. Naturally selected rilpivirine-resistant HIV-1 variants by host cellular immunity. *Clin Infect Dis*. 2013;57(7):1051-5.
- 13) Mizushima D, Nishijima T, Gatanaga H, Tsukada K, Teruya K, Kikuchi Y, Oka S. Preemptive therapy prevents cytomegalovirus end-organ disease in treatment-naïve patients with advanced HIV-1 infection in the HAART era. *PLoS One*. 2013;8(5):e65348.
- 14) Nishijima T, Komatsu H, Teruya K, Tanuma J, Tsukada K, Gatanaga H, Kikuchi Y, Oka S. Once-daily darunavir/ritonavir and abacavir/lamivudine versus tenofovir/emtricitabine for treatment-naïve patients with a baseline viral load of more than 100 000copies/ml. *AIDS*. 2013;27(5):839-42.
- 15) Yanagisawa K, Tanuma J, Hagiwara S, Gatanaga H, Kikuchi Y, Oka S. Epstein-Barr viral load in cerebrospinal fluid as a diagnostic marker of central nervous system involvement of AIDS-related lymphoma. *Intern Med*. 2013;52(9):955-9.
- 16) Nishijima T, Takano M, Ishisaka M, Komatsu H, Gatanaga H, Kikuchi Y, Endo T, Horiba M, Kaneda S, Uchiumi H, Koibuchi T, Naito T, Yoshida M, Tachikawa N, Ueda M, Yokomaku Y, Fujii T, Higasa S, Takada K, Yamamoto M, Matsushita S, Tateyama M, Tanabe Y, Mitsuya H, Oka S; Epcicom-Truvada study team. Abacavir/lamivudine versus tenofovir/emtricitabine with atazanavir/ritonavir for treatment-naïve Japanese patients with HIV-

- 1 infection: a randomized multicenter trial. *Intern Med.* 2013;52(7):735-44.
- 17) Shindo T, Nishijima T, Teruya K, Mizushima D, Gatanaga H, Oka S. Combination of high-dose dexamethasone and antiretroviral therapy rapidly improved and induced long-term remission of HIV-related thrombocytopenic purpura. *J Infect Chemother.* 2013 Dec;19(6):1170-2.
- 18) Gatanaga H, Hayashida T, Tanuma J, Oka S. Prophylactic effect of antiretroviral therapy on hepatitis B virus infection. *Clin Infect Dis.* 2013;56(12):1812-9.
- 19) Lee JH, Hachiya A, Shin SK, Lee J, Gatanaga H, Oka S, Kirby KA, Ong YT, Sarafianos SG, Folk WR, Yoo W, Hong SP, Kim SO. Restriction fragment mass polymorphism (RFMP) analysis based on MALDI-TOF mass spectrometry for detecting antiretroviral resistance in HIV-1 infected patients. *Clin Microbiol Infect.* 2013;19(6):E263-70.
- 20) Nishijima T, Shimbo T, Komatsu H, Takano M, Tanuma J, Tsukada K, Teruya K, Gatanaga H, Kikuchi Y, Oka S. Urinary beta-2 microglobulin and alpha-1 microglobulin are useful screening markers for tenofovir-induced kidney tubulopathy in patients with HIV-1 infection: a diagnostic accuracy study. *J Infect Chemother.* 2013;19(5):850-7.
- 21) Hamada Y, Nagata N, Honda H, Teruya K, Gatanaga H, Kikuchi Y, Oka S. Idiopathic oropharyngeal and esophageal ulcers related to HIV infection successfully treated with antiretroviral therapy alone. *Intern Med.* 2013;52(3):393-5.
- 22) Yagita Y, Kuse N, Kuroki K, Gatanaga H, Carlson JM, Chikata T, Brumme ZL, Murakoshi H, Akahoshi T, Pfeifer N, Mallal S, John M, Ose T, Matsubara H, Kanda R, Fukunaga Y, Honda K, Kawashima Y, Ariumi Y, Oka S, Maenaka K, Takiguchi M. Distinct HIV-1 escape patterns selected by cytotoxic T cells with identical epitope specificity. *J Virol.* 2013;87(4):2253-63.

#### G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## 抗HIV薬の毒性メカニズムの解明

研究分担者

**太田 康男** 帝京大学医学部 内科学講座 感染症内科 教授

研究協力者

**北沢 貴利** 帝京大学医学部 内科学講座 感染症内科 講師

**古賀 一郎** 帝京大学医学部 内科学講座 感染症内科 助教

**若林 義賢** 東京大学医学部 感染症内科

帝京大学医学部 内科学講座 感染症内科

### 研究要旨

HIV感染者は、健常人と比較すると、骨密度が低下することが認識されつつある。その危険因子として、抗HIV治療によりもたらされた患者の高齢化に加え、HIV感染自体も骨密度への低下に寄与している可能性が報告されている。さらに近年、一部の抗HIV薬により骨代謝障害がもたらされる可能性も示唆されている。しかしながら、その分子メカニズムの詳細は全く不明である。本研究は、HIV感染者における骨代謝異常に焦点をあて、以下の2つの点から研究を行った。臨床的解析として、第一に、帝京大学医学附属病院に通院中で6か月以上cARTを行っているHIV患者を対象に、経時的にDXA法を用いて骨密度を測定し、骨密度の変化を観察した。第二に、HIV患者において、骨代謝の調節因子の一つであるビタミンD濃度を測定した。基礎的解析としては、骨芽細胞に焦点をあて、抗HIV薬による骨形成やその他の機能変化への影響に関する基礎研究を行った。

臨床的解析では、6か月以上cARTを行っているHIV患者を2-3年間観察した限りでは、大部分の症例で骨密度低下の進展は認めなかった。またビタミンD濃度については、25-OH-D濃度で判断すると、約40%の症例で20ng/ml未満であり、ビタミンD欠乏と判断された。基礎研究では、抗HIV薬のRTVを添加した骨芽細胞において、コントロール細胞および他の抗HIV薬を添加した細胞に比べ、分化抑制がみられることが示され、RTVが骨密度低下の機序に関与する可能性が示唆された。

### A. 研究目的

HIV感染に対する抗ウイルス治療は、血液中のHIVウイルス量を減少させ、日和見疾患の合併率を下げ、生命予後に大きな改善をもたらした。その一方で、近年HIV感染者は、健常人と比較すると、骨密度が低下することが認識されつつある。その結果、HIV患者において骨折のリスクが高まっていることが報告されている。実際、当院に通院中のHIV患者の中で、骨折を認めた症例も存在する。このことは、HIV感染者の高齢化を考えると、ADL低下の重大な要因として今後ますます懸念される。さらに、抗HIV薬によって骨密度低下作用がもたらされる可能性も示唆されている。

HIV感染症患者における骨密度の低下や骨折に関する報告のほとんどは、欧米を中心とする海外からのものであり、国内はもとよりアジアからの報告も

乏しい。我々は日本人のHIV患者の骨密度の解析を行い、以下の点を平成23-24年度の研究成果として報告した。

1) 腰椎の骨密度で判断すると、約47%が骨減少症、約7%が骨粗鬆症であり、大腿骨頸部で判断すると、約61%が骨減少症、約13%が骨粗鬆症と診断された。骨密度が正常であったのは、わずか約26%であった。

2) 腰椎と比較すると、大腿骨頸部で測定した骨密度の低下の割合が高かった。

3) 骨密度低下のハイリスク群として、40歳以上、身長170cm以下、体重60kg以下、10年を超えるcARTがあげられた。

今回我々は、骨密度低下の詳細な推移を明らかにするため、6か月以上cARTを行っているHIV患者を対象に、経時的にDXA法を用いて骨密度を測定し、骨密度の変化を観察した。さらにHIV感染症患者で

は、ビタミンD濃度が低下していることが、欧米から報告されている。ビタミンDは、骨代謝を調節する因子の一つであるため、25-OH-Dと活性型ビタミンDである1,25-Dの濃度の測定を行った。

また基礎研究においては、各HIV薬が、骨吸収・骨形成機能に細胞レベルで変化をもたらしているか否か、さらに変化をもたらしている場合、その分子メカニズムを明らかにすることを目的として研究を行っている。平成23年度の研究においては、破骨細胞に対する各HIV薬の影響の解析を試みた。しかしながら、種々の抗HIV薬を添加した破骨細胞において、TRAP5b活性をはじめとする破骨細胞への影響は認められなかった。平成24年度の研究では、骨芽細胞に焦点を当て、各HIV薬の影響の解析を試みた。その結果、RTVでは他の抗HIV薬に比べ、骨芽細胞の分化が抑制されることが示された。今年度は、前年度の研究結果をさらに発展させ、RTVによる骨芽細胞の分化抑制の分子機序の解明を行った。

## B. 研究方法

### (臨床研究)

帝京大学医学部附属病院通院中の日本人男性のHIV感染症患者のうち、最初の骨密度測定時に6か月以上のcARTを行っており、その後1年毎に最低3回以上の骨密度を測定した28症例を対象とした。骨密度は、dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) scanを用いて測定し、すべての患者について同一の機器 (Discovery SL, Hologic, USA) を使用した。骨密度の測定は、第二、第三、第四腰椎および両側大腿骨頸部で行った。骨密度からT-scoreを算出し、WHO分類に従って、 $-1.0 > T\text{-score} > -2.5$ を骨減少症、 $T\text{-score} \leq -2.5$ を骨粗鬆症と診断した。1年毎に骨密度を測定し、その推移を検討した。

25-OH-Dと1,25-Dの濃度は、ともにRIA2抗体法を用いて測定した。51症例を対象にビタミンD測定を行った。

### (基礎研究)

#### 1. 抗HIV薬の骨芽細胞分化への影響

マウス由来の骨芽細胞の細胞分離株であるMC3T3-L1細胞を抗HIV薬 (RTV, RAL, ABC, EFV, TFV, TPV) を添加した分化培地 (DMEMにAscorbic acid 1%, Hydrocortisone 0.2%,  $\beta$ -glycero-phosphate 2%を添加) と共に96wellプレートに分注した。抗HIV薬の濃度は、成人が1回1錠内服した際のCmax付近の濃度とした。添加8日目にALP活性と総タンパク

量の測定を行った。ALP活性測定にはTakara TRACP/ALP assay kit (MK301) を使用した。総タンパク量はDC protein assay kitを用い、Lowry法に基づき測定した。ALP活性と総タンパク量の比を求め、抗HIV薬によるALP活性の変化を測定した。

#### 2. PIの骨芽細胞分化への影響

上述1と同様に行った。PIは、DRV, ATV, LPVを使用した。またブースト量RTVを加えたDRV/r, ATV/r, LPV/rも合わせて検証した。

#### 3. 種々の濃度のRTVによるALP活性

上述1と同様に行った。0、0.1、0.5、1、5、10 $\mu$ l/ml (1のMax) の濃度のRTVを添加した。

#### 4. RTVによる骨化抑制

MC3T3-L1細胞を分化培地あるいは分化培地に10 $\mu$ l/mlの濃度のRTVを添加して、28日後にカルシウム沈着の変化をアリザリンレッド染色を用いて観察した。

### (倫理面への配慮)

臨床研究においては、帝京大学医学部倫理委員会の承認を得た後、対象患者全員から文章による同意を得た後に施行した。またデータの管理は、すべて匿名化して行った。基礎研究に関しては、今年度の研究内容においては、特に配慮すべきことはない。

## C. 研究結果

### (臨床研究)

対象の28症例は、27歳から70歳であり、年齢中央値は40.0歳、cART導入期間の中央値は、3.0年であった。初回測定から最終測定までの骨密度の観察期間は、中央値2.8年であった。Key drugとしては、PI24例、non-PI4例であった。またNRTIの内訳は、ABC/3TC12例、TDF/FTC14例、その他2例であった。より低い方のT-scoreで、正常、骨減少症、骨粗鬆症を分類すると、観察開始時においては、それぞれ10名 (36%)、15名 (54%)、3名 (11%) であった (図1)。観察終了時の診断別割合は、正常10名 (36%)、骨減少症15名 (54%)、骨粗鬆症3名 (11%) と観察開始時と同じであった。ただし、2名は正常から骨減少症に、逆に2名は骨減少症から正常に変化していた。また観察期間中の腰椎、右大腿骨頸部、左大腿骨頸部のT-scoreの変化の中央値は、それぞれ0、0、-0.1であり変化がなかった。

ビタミンD測定では、対象症例51名のうち40名はcART導入後であり、11名はcART naïve患者であった。cARTの平均継続域間の中央値は2.4年、年齢中央値は40.0歳であった。eGFRの中央値は79.4ml/minであり、骨身度は18名が正常、29名が骨減少症、4名が骨粗鬆症であった。25-OH-Dと1,25-Dの濃度の中央値は、それぞれ21.5ng/ml, 51.0pg/mlであった。25-OH-Dが20 ng/ml未満の欠乏は、20名(39.2%)、20 ng/ml以上30 ng/ml未満の不足は、22名(43.1%)であった(図2)。一方、1,25-Dの濃度については明確な基準はないが、25 pg/ml未満を不足とすると、2名(3.9%)が不足と判断された。また25-OH-Dと1,25-Dの濃度の間には相関が認められた。

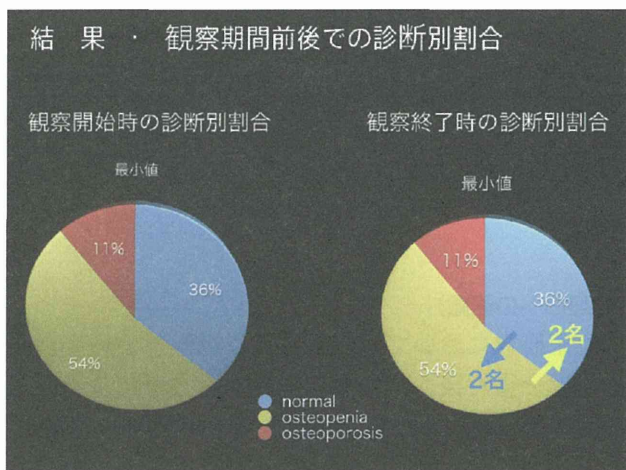


図1 観察期間前後での骨粗鬆症・骨減少症の割合

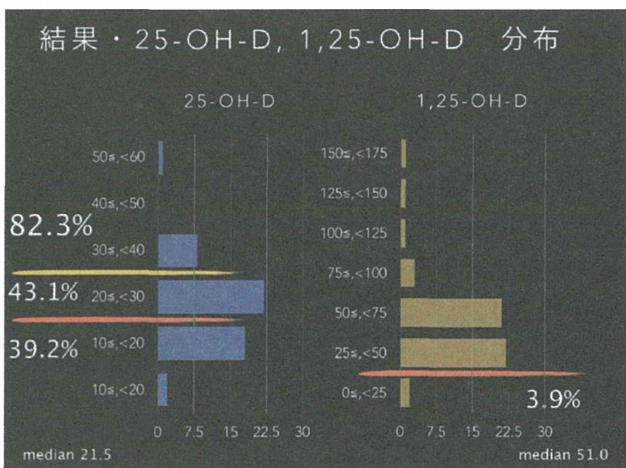


図2 日本人HIV患者のビタミンDの濃度

(基礎研究)

まず骨芽細胞の分化が抗HIV薬で抑制されるか検討を行った。骨芽前駆細胞であるMC3T3-E1細胞を、抗HIV薬を溶解しているcontrol溶媒を添加した分化培地、もしくは抗HIV薬を添加した分化培地にて培養した後、添加8日目のALP活性を測定した。RTVを添加した細胞ではcontrolの細胞に比べALP活性が低下していたが、他の抗HIV薬やcontrol細胞でのALP活性には明らかな差は認められなかった(図3)。またRTV以外のPIで分化抑制性が認められるかに関して、ALP活性を指標に検討を行った。DRV, ATV, LPVを添加した細胞では、ALP活性の低下は認められなかった(図4)。またブースト量RTVを加えた

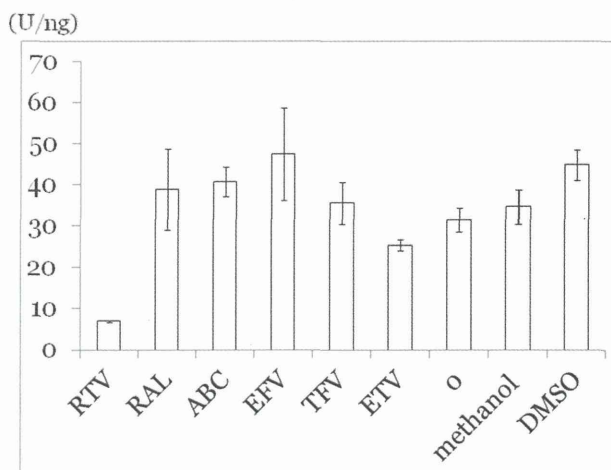


図3 抗HIV薬の骨芽細胞分化への影響 (ALP/総タンパク量)

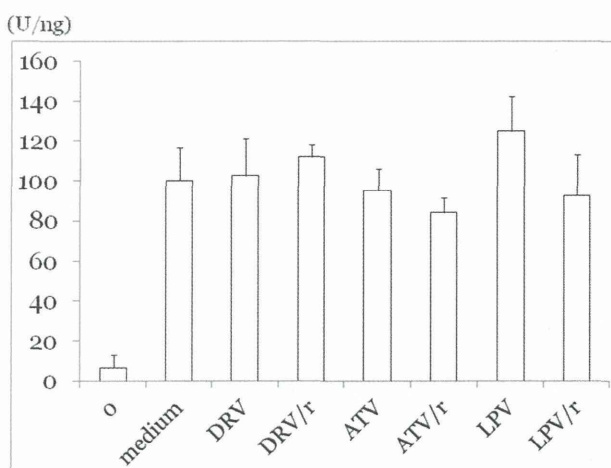


図4 PIの骨芽細胞分化への影響 (ALP/総タンパク量)

DRV/r, ATV/r, LPV/rを添加した細胞においても、ALP活性の低下は認められなかった。以上から、RTVでは他の抗HIV薬に比べ、骨芽細胞の分化が抑制されることが示された。さらに種々の濃度のRTV, すなわち0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 $\mu$ l/ml (1のMax)の濃度のRTVを加えた細胞でALP活性を検討したが、濃度依存性にALP活性の低下が認められ、高濃度、すなわち5, 10 $\mu$ l/mlのRTV添加により、ALP活性は強く抑制された(図5)。

MC3T3-L1細胞を分化培地あるいは分化培地に10 $\mu$ l/mlの濃度のRTVを添加して、28日後にカルシウム沈着の変化をアリザリンレッド染色を用いて観察した。RTV添加により、骨化の著明な抑制が確認された(図6)。

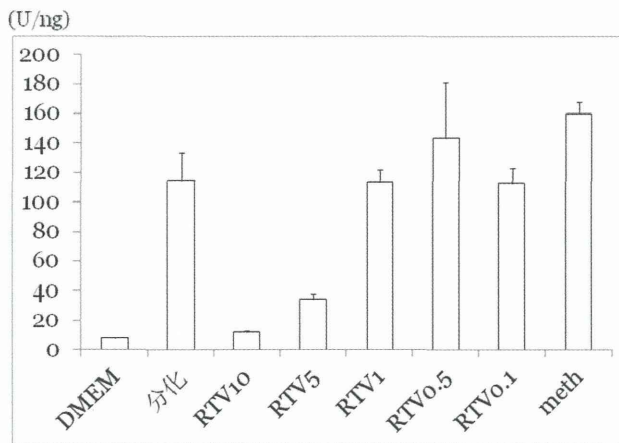


図5 RTV濃度依存性のALP活性の低下 (ALP/総タンパク量)

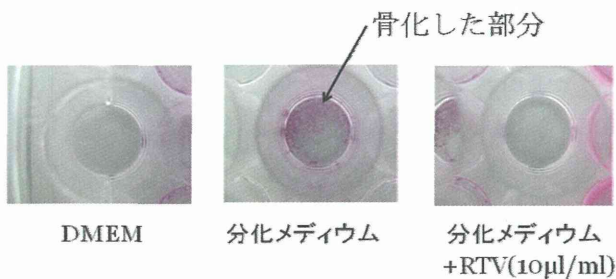


図6 RTVによる骨化の抑制

## D. 考察

### (臨床研究)

前年度の研究をさらに発展させ、6か月以上cARTを行っているHIV患者を対象に、経時的にDXA法を用いて骨密度を測定し、骨密度の変化を観察した。また骨代謝の調節因子の一つであるビタミンD濃度を測定した。6か月以上cARTを行っているHIV患者を2-3年間観察した限りでは、大部分の症例で骨身度低下の進展は認めなかった。

またビタミンD濃度については、25-OH-D濃度で判断すると、約40%の症例で20ng/ml未満であり、ビタミンD欠乏と判断された。今回得られた知見は、今後HIV患者の骨密度低下を予防する治療を行う上で、大いに参考になる結果であると考えられる。

### (基礎研究)

種々の抗HIV薬が骨の各構造においてpharmacokineticsが異なるのか、あるいは長管骨や扁平骨など部位の異なる骨によってpharmacokineticsが異なるのかなどの点は明らかとなっていない。骨への作用を検討する上で抗HIV薬の適正な濃度において検討することが重要ではあるが、現時点では骨でのpharmacokineticsの情報がないため、今回の検討では抗HIV薬の血清でのCmaxを基準として、いくつかの濃度で検討した。

RTVの処理により骨芽細胞の分化が抑制されることが、ALP活性の低下をもって確認された。骨芽細胞は類骨を形成し、そこにリン酸カルシウムを沈着させるが、沈着に際して骨芽細胞表面に存在するALPが重要な役割を担っており、ALP活性は骨芽細胞の分化マーカーとして使用できることがわかっている。今回の解析結果は、プロテアーゼ阻害薬のブースター効果を期待して併用されることの多いRTVに、骨芽細胞の分化の抑制作用がみられることが*in vitro*の系で確認されたということであり、このことがプロテアーゼ阻害薬をキードラッグとしたcARTにおいて、骨密度の低下を認めた際の骨密度の低下を説明する一因なのか興味深い結果と考える。

RTV以外の他のプロテアーゼ阻害薬、逆転写酵素阻害薬、インテグラーゼ阻害薬では、ALP活性の低下は認められなかった。RTVはプロテアーゼ阻害薬のブースターの効果を期待して、現在でも未治療の第一選択薬の中に含まれるプロテアーゼ阻害薬であるが、ブースト量RTVを加えたDRV/r, ATV/r, LPV/rでもALP活性の低下は認められなかった。従って、今回我々の基礎的研究で得られた知見を、臨床的知見に結び付けるのはさらなる検討が必要であると考えられる。

## E. 結論

6か月以上cARTを行っているHIV患者を2-3年間観察した限りでは、大部分の症例で骨身度低下の進展は認めなかった。一方ビタミンD濃度については、約80%の症例でビタミンD不足あるいは欠乏と判断された。

高濃度のRTVが骨芽細胞の分化を抑制することを確認した。ただし、現在ブーストとして使用されているRTVの濃度では、骨芽細胞の分化は抑制されなかった。

## F. 健康危険情報

総括研究報告書参照

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Koga I, Yoshino Y, Kitazawa T, Kurahashi I, Ota Y. Prevalence and risk factors for loss of bone mineral density in male Japanese patients with HIV. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 62: e25-7: 2013.
- 2) Abe K, Yamamoto T, Ishii T, Kuyama Y, Koga I, Ota Y. Duodenal Mycobacterium genavense infection in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Endoscopy*. 45 S2 :e27-8: 2013.
- 3) Yoshino Y, Kitazawa T, Ikeda M, Tatsuno K, Yanagimoto S, Okugawa S, Yotsuyanagi H, Ota Y. Clostridium difficile flagellin stimulates toll-like receptor 5, and toxin B promotes flagellin-induced chemokine production via TLR5. *Life Sci*. 92: 211-217; 2013.
- 4) Kitazawa T, Yoshino Y, Tatsuno K, Ota Y, Yotsuyanagi H. Changes in the mean platelet volume levels after bloodstream infection have prognostic value. *Intern Med*. 52: 1487-93: 2013.
- 5) Kitazawa T, Yoshino Y, Koga I, Isono A, Yamamoto T, Kuyama Y, Ota Y. Incidence of Clostridium difficile-associated diarrhea in patients using proton pump inhibitors: A Japanese study. *Open Journal of Gastroenterology*, 3; 276-280: 2013.
- 6) Tsuchiya N, Pathipvanich P, Rojanawiwat A, Wichukchinda N, Koga I, Koga M, Auwanit W, Kilgore PE, Ariyoshi K, Sawanpanyalert P. Chronic hepatitis B and C co-infection increased all-cause mortality in HAART-naïve HIV patients in northern Thailand. *Epidemiol Infect*. 141(9):1840-8. 2013

### 2. 学会発表

- 1) Ichiro Koga, Kazunori Seo, Yusuke Yoshino, Takatoshi Kitazawa, Yasuo Ota. Prevalence and risk

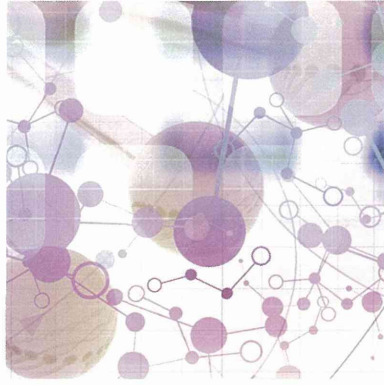
factors for osteopenia and osteoporosis in male Japanese HIV patients. 2nd Joint Meeting of the International Bone and Mineral society and The Japanese Society for Bone and Mineral Research, 28 May-1 June. 2013, Kobe, Japan.

- 2) 古賀一郎、妹尾和憲、吉野友祐、北沢貴利、太田康男. Key drug に maraviroc と darunavir を併用した症例と darunavir のみの使用例の投与開始後12ヶ月の治療効果の比較. 第27回日本エイズ学会学術集会、2013年11月20-22日、熊本.
- 3) 古賀一郎、妹尾和憲、吉野友祐、北沢貴利、太田康男. 日本人男性HIV感染症患者における25-hydroxyvitamin Dの評価と1,25-dihydroxyvitamin Dとの相関. 第27回日本エイズ学会学術集会、2013年11月20-22日、熊本.
- 4) 古賀一郎、妹尾和憲、吉野友祐、北沢貴利、太田康男. cARTにて治療中の日本人男性HIV感染者における骨密度の経時的変化の解析. 第27回日本エイズ学会学術集会、2013年11月20-22日、熊本.
- 5) 服部純子、蜂谷敦子、瀧永博之、渡邊大、長島真美、貞升健志、近藤真規子、南留美、吉田繁、森治代、内田和江、椎野禎一郎、加藤真吾、千葉仁志、伊藤俊広、佐藤武幸、上田敦久、石ヶ坪良明、古賀一郎、太田康男、山元泰之、福武勝幸、古賀道子、岩本愛吉、西澤雅子、岡慎一、松田昌和、林田庸絵、横幕能行、上田幹夫、大家正義、田邊嘉也、白阪琢磨、小島洋子、藤井輝久、高田昇、高田清式、山本政弘、松下修三、藤田次郎、健山正男、杉浦互. 新規HIV/AIDS診断奨励における薬剤耐性HIVの動向. 第27回日本エイズ学会学術集会、2013年11月20-22日、熊本.

## H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし





## 抗HIV薬の耐性メカニズムの研究

研究分担者

**杉浦 亙** (独) 国立病院機構名古屋医療センター 臨床研究センター  
感染・免疫研究部 部長

研究協力者

**松岡 和弘** (独) 国立病院機構名古屋医療センター 臨床研究センター  
感染・免疫研究部 流動研究員

**根本 理子** (独) 国立病院機構名古屋医療センター 臨床研究センター  
感染・免疫研究部 流動研究員

### 研究要旨

抗HIV薬剤耐性獲得機序を理解するために (a) RT阻害剤耐性を評価できる新規 *in vitro* アッセイを構築し NNRTI耐性変異を持つ臨床検体 11 例の評価を行い、新規アッセイの有用性を確認した。(b) HIV-2感染が疑われた28症例の精査を実施し、一部の抗HIV薬に自然耐性を有する HIV-2感染症の治療方針決定において、血清学的精査および遺伝子学的精査による HIV-1/HIV-2の識別が重要である事を示した。

### A. 研究目的

抗HIV薬剤耐性は近年の優れた薬剤の登場により以前ほどは問題にならなくなっているが、それでも治療に難渋するレベルの薬剤耐性症例が治療を受けている患者の2%程度いるとされる。また、薬剤耐性 HIVによる新たな感染が新規に HIV/AIDSと診断される症例の10%を占めており、初回治療を導入する際の薬剤耐性検査の重要性が増している。また、本邦で HIV/AIDS症例が初めて確認されてからおよそ30年、抗HIV療法が導入されてからおよそ20年経ち、宿主免疫によるある種の淘汰そして抗HIV薬による選択等の影響を受けて感受性株あるいは野性株とされるウイルスは変貌しつつある。それに伴い、かつては薬剤耐性変異では無かったものの、反対に薬剤耐性変異とされていたものが再評価されつつある。また、インテグラーゼを標的とした新たな薬剤も登場してきており、このことから、薬剤耐性の理解を更新していくことが求められる。本研究では酵素学的技術を応用した新しい逆転写酵素阻害剤の薬剤耐性検査技術の実用化、インテグラーゼ阻害剤ラルテグラビルの薬剤耐性獲得機序の解明、さらに近年日本でも報告が散見される HIV-2の感染が疑われた症例の精査を行った。

### B. 研究方法

#### a. HIV-1 臨床分離株を用いた NNRTI に対する交差耐性変異に関する酵素学的な解析

31種類の HIV-1 臨床分離株より *in vitro* 転写の鋳型 DNA を調製した。RTの発現にはコムギ無細胞蛋白質合成系を用いた。薬剤感受性は、RTの酵素活性を指標とする *in-house* 薬剤感受性解析法を (1) 活用して、Efavirenz[EFV]、Etravirine[ETR]、Raltegravir[RPV]に対する薬剤耐性度を比較した。酵素学的な手法[DNA-dependent DNA polymerase 活性 (DdDp assay)、RNA-dependent DNA polymerase 活性 (RdDp assay)]とウイルス学的な手法[phenotypic assay]を活用し、薬剤感受性の精査解析を実施した。

#### b. HIV-2 感染疑い症例の精査

ウエスタンブロット法により HIV-1/HIV-2の重複感染が疑われた22症例と HIV-2の単独感染が疑われた6症例について、血清学的精査および遺伝子学的精査を実施した。HIV-1/2重複感染疑義症例は全て HIV-1感染が確定済みである症例を対象とした。血清学的精査は、ゼラチン粒子凝集法のセロディア HIV-1/2とイムノブロット法のペプチラブ1,2を用いた。遺伝子学的精査は、当院で確立した定量 RT-PCR法を用いた *in house* 血中 HIV-2 RNA 検出法およ

び末梢血単核球DNAからのHIV-2遺伝子検出法を用いた。

### C. 研究結果

#### a. HIV-1 臨床分離株を用いたNNRTIに対する交差耐性変異に関する酵素学的な解析

31症例の臨床検体由来RTについて、EFV、ETR、RPVに対する薬剤耐性度を評価した結果、25症例については既知の薬剤耐性レベルと概ね一致した。6症例の臨床検体由来のK103NをもつRT (K103N RT)

は、RPVに対して低い耐性を示した。一般的に、ETRとRPVはK103N RTに対して薬剤感受性を示すことが報告されている。RPVに対して低い耐性を示すグループ（4症例）とRPV感受性のグループ（2症例）に分類することができた。さらに、RPVに対して低い耐性を示すグループは、共通の変異（K103N, I135L, V179I, G196E, Q197K, T286A, A288G）を保持していた（図2）。精査解析の結果、これらK103N RTはDdDp assayではRPVに対して薬剤耐性を示す一方でRdDp assayとphenotypic assayではRPVに対して薬剤感受性が観察された。

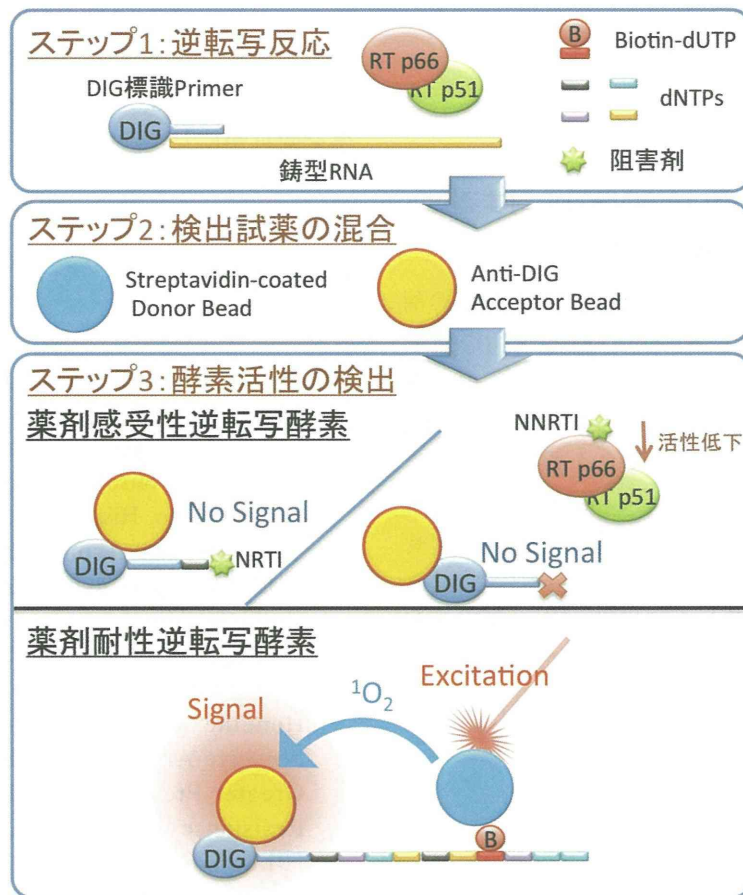


図1 AlphaScreenを用いたRTのDNAポリメラーゼ活性の検出法

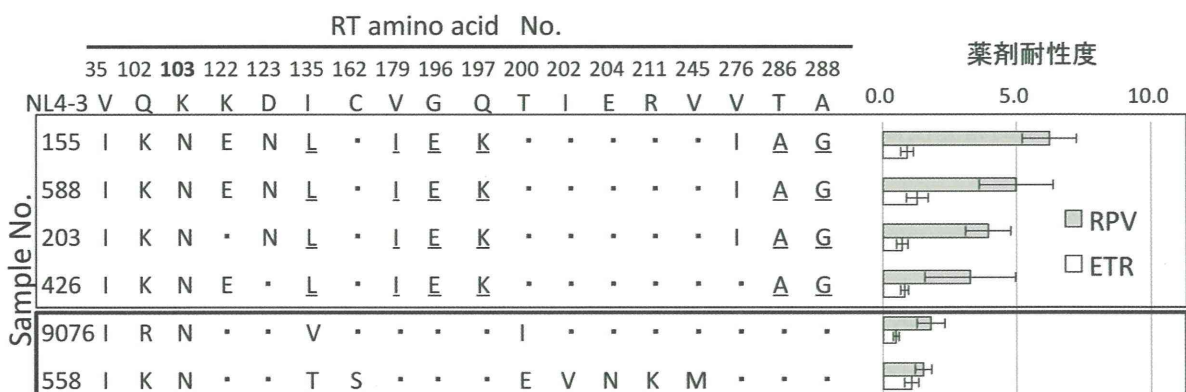


図2 臨床検体由来K103N RTは2グループに分けることができる