

中の患者について測定し、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。

「アタザナビル内服に伴う腎結石の頻度の解析」

リトナビルでブーストされたアタザナビルを内服した患者と、それ以外のプロテアーゼ阻害薬を内服した患者で、後方視的に腎結石の頻度を解析した。

「マラビロク感受性変化の解析」

長期に無治療で経過の追えた症例で、CCR5-tropicからCXCR4-tropicへとtropismのシフトが見られるかをEnv V3領域の変化を追跡することにより解析した。得られたV3領域を組み換えプラスミドに組み込み、CCR5とCXCR4のそれぞれを発現させた細胞のcell fusionアッセイによりtropismを判定し、tropismシフトの原因となる変異を追求した。

「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) の有無を調べた。

(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、研究の必要性と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」

503人の日本人感染者の抗HIV療法導入後の腎機能を後方視的に解析し、低体重がリスク因子として重要であることを明らかにし、アバカビル投与群と比較してテノホビル投与群では有意にeGFRが低下することを報告した。更に、低体重とは独立した因子

として、尿細管トランスポーター遺伝子ABCC2の二つSNP (-24, 1249) が関与している可能性を示した。また、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では、測定した5つのパラメーターのうち、感度・得意度曲線のAUCは、b2Mとa1Mが最も大きかった。

「アタザナビル内服に伴う腎結石の頻度の解析」

アタザナビル内服群の腎結石の頻度は1,000人年で23.7件であり、それ以外のプロテアーゼ阻害薬の内服群の2.2件に比較し、統計的に有意に高頻度だった。また、アタザナビル内服群で一度腎結石を生じた18人で、その後もアタザナビルの投与を継続したところ、6人で腎結石の再発が生じた。

「マラビロク感受性変化の解析」

血友病のslow progressorの一例を解析し、CCR5-tropicからCXCR4-tropicへとフェノタイプのシフトを伴う一アミノ酸の挿入と欠失から成るユニークなEnv V3領域の変化を同定した。

「抗HIV薬によるHBV感染予防効果の解析」

1,434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のHBV曝露は0件であった。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

テノホビルの投与は、特に低体重の患者にとって、アバカビルよりも腎機能が低下しやすく、これらの患者にテノホビルを投与する際には丁寧なフォローが必要と思われた。また、ABCC2のSNP (-24, 1249)を持つ患者はテノホビルによる腎障害を生じやすい傾向にあり、テーラーメイド治療に役立つ可能性があると考えられる。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。

アタザナビルは、以前から腎機能低下との関連が報告されていたが、腎結石が生じることがそのメカニズムの一つであると推察された。

一アミノ酸の挿入と欠失を伴うV3領域のユニークな変化がトロピズムの変化をもたらすことを発見した。これにより、トロピズムの判定に寄与するものと期待された。

抗HBV作用のあるラミブジンやテノホビルを含む抗HIV療法の、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、特に低体重の患者に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。アタザナビルは他のプロテアーゼ阻害薬も腎結石を生じやすいことが明らかとなった。トロピズムの変化を伴うV3領域の特徴的な変異の組み合わせを同定した。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

原著論文

- 1) Watanabe K, Gatanaga H, Escueta-de Cadiz A, Tanuma J, Nozaki T, Oka S. Amebiasis in HIV-1-infected Japanese men: clinical features and response to therapy. *PLoS Negl Trop Dis*. 5(9):e1318, 2011.
- 2) Nishijima T, Komatsu H, Gatanaga H, Aoki T, Watanabe K, Kinai E, Honda H, Tanuma J, Yazaki H, Tsukada K, Honda M, Teruya K, Kikuchi Y, Oka S. Impact of small body weight on tenofovir-associated renal dysfunction in HIV-infected patients: a retrospective cohort study of Japanese patients. *PLoS One* 6(7):e22661, 2011.
- 3) Nakamura H, Teruya K, Takano M, Tsukada K, Tanuma J, Yazaki H, Honda H, Honda M, Gatanaga H, Kikuchi Y, Oka S. Clinical symptoms and courses of primary HIV-1 infection in recent years in Japan. *Intern Med*. 50(2):95-101, 2011.
- 4) Akahoshi T, Chikata T, Tamura Y, Gatanaga H, Oka S, Takiguchi M. Selection and accumulation of an HIV-1 escape mutant by three types of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes recognizing wild-type and/or escape mutant epitopes. *J Virol*. 86(4):1971-1981, 2012.
- 5) Nishijima T, Tsukada K, Teruya K, Gatanaga H, Kikuchi Y, Oka S. Efficacy and safety of once-daily ritonavir-boosted darunavir plus abacavir/lamivudine for treatment-naïve patients: a pilot study. *AIDS* 26(5):649-651, 2012.
- 6) Hayashida T, Gatanaga H, Takahashi Y, Negishi F, Kikuchi Y, Oka S. Trends in early and late diagnosis of HIV-1 infections in Tokyoites from 2002 to 2010. *Int J Infect Dis*. 16(3):e172-177, 2012.
- 7) Nishijima T, Gatanaga H, Komatsu H, Tsukada K, Shimbo T, Aoki T, Watanabe K, Kinai E, Honda H, Tanuma J, Yazaki H, Honda M, Teruya K, Kikuchi Y, Oka S. Renal function declines more in tenofovir than abacavir-based antiretroviral therapy in low-body weight treatment-naïve patients with HIV infection. *PLoS One*. 7(1):e29977, 2012.
- 8) Hasan Z, Carlson JM, Gatanaga H, Le AQ, Brumme CJ, Oka S, Brumme ZL, Ueno T. Minor contribution of HLA class I-associated selective pressure to the variability of HIV-1 accessory protein Vpu. *Biochemical Biophysical Research Communications* 2012 Vol.421 (291-295)
- 9) Naruto T, Gatanaga H, Nelson G, Sakai K, Carrington M, Oka S, Takiguchi M. HLA class I-mediated control of HIV-1 in the Japanese population, in which the protective HLA-B*57 and HLA-B*27 alleles are absent. *Journal of Virology* 86(19):10870-10872, 2012.
- 10) Hamada Y, Nishijima T, Watanabe K, Komatsu H, Tsukada K, Teruya K, Gatanaga H, Kikuchi Y, Oka S. High incidence of renal stones among HIV-infected patients on ritonavir-boosted atazanavir than in those receiving other protease inhibitor-containing antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis*. 55(11):1262-1269, 2012.
- 11) Nishijima T, Komatsu H, Higasa K, Takano M, Tsuchiya K, Hayashida T, Oka S, Gatanaga H. Single nucleotide polymorphisms in ABCC2 associated with tenofovir-induced kidney tubular dysfunction in Japanese patients with HIV-1 infection: a pharmacogenetic study. *Clin Infect Dis*. 55(11):1558-1567, 2012.
- 12) Matthews PC, Koyanagi M, Kloverpris HN, Harndahl M, Stryhn A, Akahoshi T, Gatanaga H,

- Oka S, Juarez Molina C, Valenzuela Ponce H, Avila Rios S, Cole D, Carlson J, Payne RP, Ogwu A, Bere A, Ndung'u T, Gounder K, Chen F, Riddell L, Luzzi G, Shapiro R, Brander C, Walker B, Sewell AK, Reyes Teran G, Heckerman D, Hunter E, Buus S, Takiguchi M, Gpulder PJ. Differential clade-specific HLA-B*3501 association with HIV-1 disease outcome is linked to immunogenicity of a single Gag epitope. *J Virol.* 86(19):12643-12654, 2012.
- 13) Nishijima T, Yazaki H, Hinoshita F, Tasato D, Hoshimoto K, Teruya K, Gatanaga H, Kikuchi Y, Oka S. Drug-induced acute interstitial nephritis mimicking acute tubular necrosis after initiation of tenofovir-containing antiretroviral therapy in patient with HIV-1 infection. *Intern Med.* 51(17):2469-2471, 2012.
- 14) Kinai E, Hosokawa S, Gomibuchi H, Gatanaga H, Kikuchi Y, Oka S. Blunted fetal growth by tenofovir in late pregnancy. *AIDS* 26(16):2119-2120, 2012.
- 15) 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.* 8(12):e81960, 2013.
- 16) 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.* 8(11):e79885, 2013.
- 17) 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.* 8(10):e77268, 2013.
- 18) 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.* 15(13):874-86, 2013.
- 19) 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.* 8(8):e73639, 2013.
- 20) 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.* 8(8):e72310, 2013.
- 21) 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.* 8(8):e70611, 2013.
- 22) 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.* 3:2389, 2013.
- 23) 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.* 10:83, 2013.
- 24) 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.* 27(7):387-391, 2013.
- 25) 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.* 8(6):e66152, 2013.
- 26) 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.* 57(7):1051-1055, 2013.
- 27) 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.* 8(5):e65348, 2013.
- 28) 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.* 27(5):839-842, 2013.
- 29) 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.* 52(9):955-959, 2013.
- 30) 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; Epzicom-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.* 52(7):735-744, 2013.
- 31) 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.* 19(6):1170-1172, 2013.
- 32) Gatanaga H, Hayashida T, Tanuma J, Oka S. Prophylactic effect of antiretroviral therapy on hepatitis B virus infection. *Clin Infect Dis.* 56(12):1812-1819, 2013.
- 33) 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.* 19(6):E263-270, 2013.
- 34) 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.* 19(5):850-857, 2013.
- 35) 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.* 52(3):393-395, 2013.
- 36) 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.* 87(4):2253-2263, 2013.

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の日本人HIV患者を対象に、骨密度低下の割合および骨密度低下のハイリスク群の同定を検討した。さらに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。さらに、破骨細胞および骨芽細胞に焦点をあて、抗HIV薬による骨形成骨吸収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、日本人HIV感染症患者の60%以上に骨密度の低下を認め、腰椎に比し、大腿骨頸部で有意に骨密度の低下していた。骨密度低下のハイリスク群としては、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。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。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。そこで、まず日本人HIV患者の骨密度低下の割合を明らかにし、骨密度低下のハイリスク群の同定を試みた。さらに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た。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。平成24-25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。

B. 研究方法

(臨床研究)

2010年から2012年にかけて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40名について、腰椎および大腿骨頸部の骨密度を測定した。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。年齢、身長、体重、cART継続期間の項目ごとにグループ分けをし、骨密度減少のハイリスクグループの同定を試みた。各群の比較は、まずKruskal Wallis testを行い、 $p < 0.05$ とされた場合に、Dunn testで検定を実施した。

さらに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、1年毎に骨密度を測定し、その推移を検討した。

また51症例を対象にビタミンD測定を行った。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。

(基礎研究)

1. 抗HIV薬が破骨細胞に与える影響およびその分子機序

マウス由来の破骨細胞の前駆細胞としてRAW264.7細胞を用い、RANKLを添加し破骨細胞に分化させた。対象薬剤としてTDF、ABC、DRV、RTV、EFV、ETV、RALを選択した。各 $30\mu\text{M}$ を24時間処理した後、上清および細胞の可溶化液を抽出した。TRAP5b活性をELISA法にて測定した。

2. 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%, β -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。さらにPIに着目し、上述と同様の検討を行った。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. RTVの骨芽細胞分化への影響

RTVについては、0、0.1、0.5、1、5、 $10\mu\text{l/ml}$ (1のMax) の濃度で添加し、同様の検討を行った。RTVによる骨化抑性を検討するため、MC3T3-L1細胞を分化培地あるいは分化培地に $10\mu\text{l/ml}$ 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。

4. 骨芽細胞前駆細胞のRANKL発現への影響

骨芽細胞前駆細胞であるMC3T3-E1細胞を用い、抗HIV薬で刺激後、RANKL発現量をウエスタンブロット (WB) 法、ELISA法で測定した。対象薬剤は前実験と同様に、RTV, ABC, EFV, ETV, TFV, RALとした。WBによる解析では、各HIV薬の濃度を前述のCmaxを中心に、1/10、1/2、1、2倍の濃度とし、48時間処理した。ELISA法の解析では、抗HIV薬の濃度は前述のCmaxとし、24時間、48時間処理後に上清を、48時間処理後に可溶液を回収した。RANKLの測定は、Quantikine Mouse TRANCE/RANK Ligand/ TNFSF1 Immunoassay (R&D) を用いた。

(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、特に配慮すべきことはない。

C. 研究結果

(臨床研究)

腰椎での骨密度で判断すると、30例中14例(47%)が骨減少症、2例(7%)が骨粗鬆症であった(表1)。大腿骨頸部で判断すると、31例中19例(61%)が骨減少症、4例(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8例(26%)であった。腰椎、大腿骨頸部の骨密度の中央値のT-scoreは、-0.8および-1.2であり、腰椎に比べ、大腿骨頸部の骨密度は、有意に低下していた(図1)。年齢が増加するに従い、腰椎および大腿骨頸部の骨密度はともに低下した。低下の程度は、大腿骨頸部でより顕著であった。また低身長者ほど骨密度は低下する傾向にあった。また低体重者ほど骨密度は低下していた。これらはともに大腿骨頸部でより顕著であった。さらにcARTの期間が長いほど骨密度の低下が認められた(data not shown)。

経時的な骨密度の推移を検討した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2)。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

表1 帝京大学医学部附属病院通院中のHIV患者の骨密度の比較(腰椎、大腿骨頸部)

The prevalence of Osteopenia and osteoporosis in two different sites and numbers(%) of corresponding participants						
		by T-score of Lumbar spines		by T-score of Femoral necks		
Normal		>-1.0	14(46.7)	>-1.0	8(25.8)	
Osteopenia		≤-1.0	14(46.7)	≤-1.0	19(61.2)	
Osteoporosis		<-2.5	2(6.7)	<-2.5	4(12.9)	

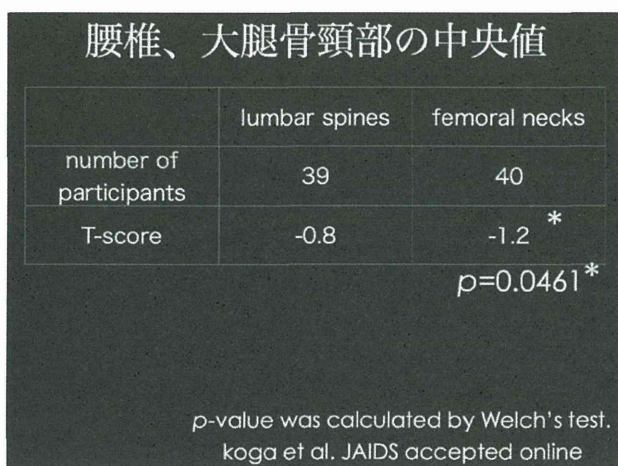


図1 腰椎および大腿骨頸部の骨密度の中央値

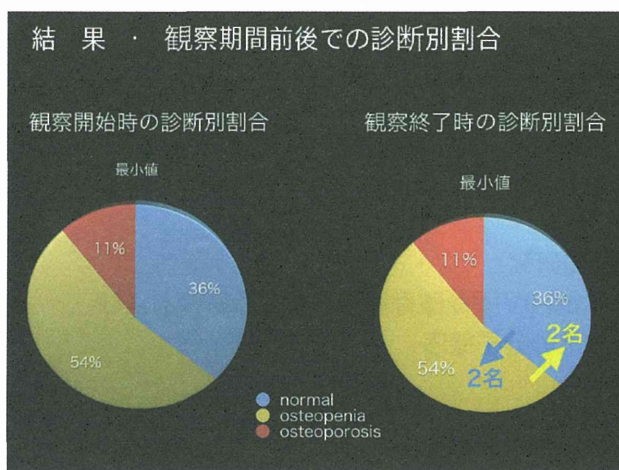


図2 観察期間前後での骨粗鬆症・骨減少症の割合

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3)。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。

(基礎研究)

破骨細胞に分化させたRAW264.7細胞に対して各HIV薬を処理し、細胞可溶化液のTRAP5bの活性を解析したが、Controlと比較して明らかな活性の亢進は認められなかった。抗HIV薬の処理後の培養上清のTRAP5bの活性化についてもcontrolに比べ亢進は認められなかった (data not shown)。

次に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4)。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活性を指標にして行った。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5)。またブースト量RTVを加えた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, 10μl/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, 10μl/mlのRTV添加により、ALP活性は強く抑制された(図6)。

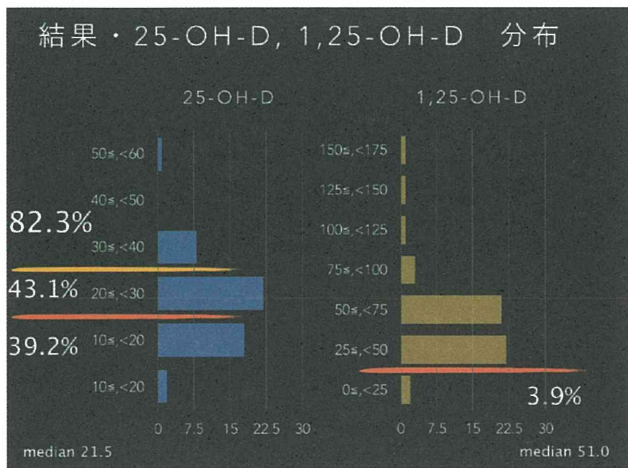


図3 日本人HIV患者のビタミンDの濃度

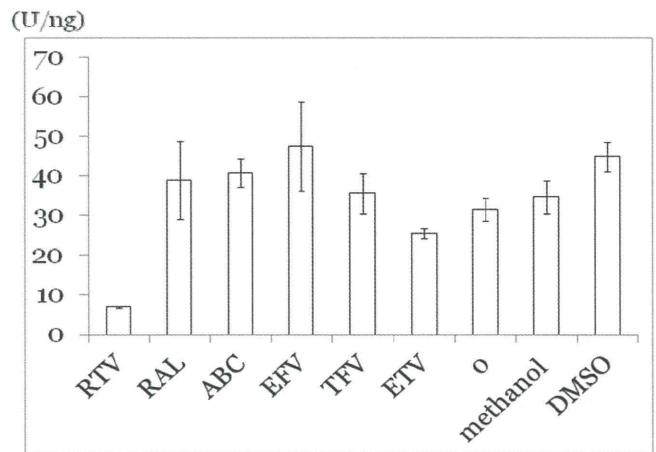


図4 抗HIV薬の骨芽細胞分化への影響 (ALP/総タンパク量)

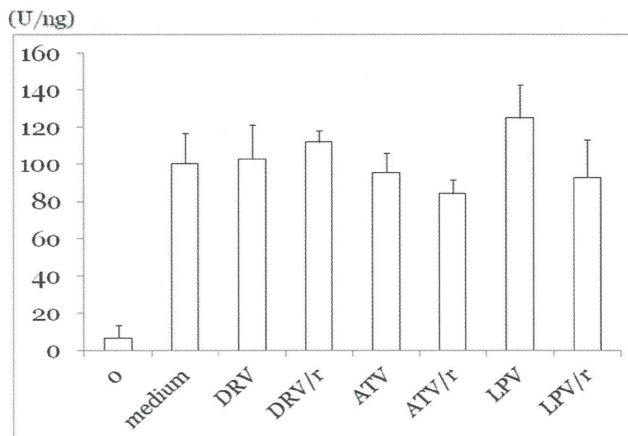


図5 PIの骨芽細胞分化への影響 (ALP/総タンパク量)

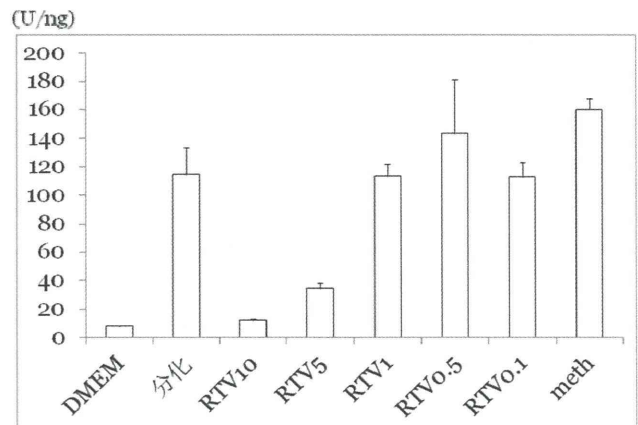


図6 RTV濃度依存性のALP活性の低下 (ALP/総タンパク量)

MC3T3-L1細胞を分化培地あるいは分化培地に10 μ 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、骨化の著明な抑性が確認された(図7)。

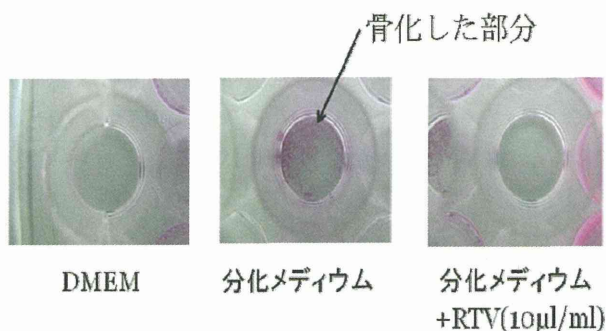


図7 RTVによる骨化の抑性

最後に骨芽細胞がRANKLの発現、放出に対して抗HIV薬が影響を与えるかについて検討した。骨芽前駆細胞であるMC3T3-E1細胞に、抗HIV薬もしくはcontrolの溶媒を添加した後に、細胞を可溶化し、WB法で細胞内のRANKLの発現量を比較した。RTVを含めたいずれの抗HIV薬においても、RANKLの発現にはcontrolと明らかな差を認めなかった(data not shown)。またELISA法を用いて、上清、可溶液中のRANKLの検出を試みたが、ともに検出感度以下であった。

D. 考察

(臨床研究)

日本人HIV感染症患者の骨密度の測定を行った結果、60%以上に骨密度の低下を認めた。また腰椎に比し、大腿骨頸部で有意に骨密度の低下が認められた。今回の解析で、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。今後、特にこれらのハイリスク群を中心とした骨密度の定期観察ならび骨折予防が望まれる。

また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。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。その結果、我々が検討した限りでは、抗HIV薬が破骨細胞に与える影響は認めなかった。

一方、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。

E. 結論

日本人HIV感染症患者の60%以上に骨密度の低下を認め、腰椎に比し、大腿骨頸部で有意に骨密度の低下していた。骨密度低下のハイリスク群としては、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。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。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) Kogure H, Tsujino T, Yamamoto K, Mizuno S, Yashima Y, Yagioka H, Kawakubo K, Sasaki T, Nakai Y, Hirano K, Sasahira N, Isayama H, Tada M, Kawabe T, Omata M, Harada S, Ota Y, Koike K. Fever-based antibiotic therapy for acute cholangitis following successful endoscopic biliary drainage. *J Gastroenterol*. 46: 1411-7, 2011.
- 2) Atsukawa Y, Kawakami S, Asahara M, Ishigaki S, Tanaka T, Ono Y, Nishiya H, Fujisaki R, Koga I, Ota Y, Miyazawa Y. The usefulness of changing focus during examination using Gram staining as initial diagnostic clue for infective tuberculosis. *Infect Chemother*. 17: 571-4. 2011
- 3) Yoshino Y, Kitazawa T, Kamimura M, Tatsuno K, Ota Y, Yotsuyanagi H. Pseudomonas putida bacteremia in adult patients: five case reports and a review of the literature. *J Infect Chemother*. 17: 278-82. 2011.
- 4) Nagai R, Saito R, Koyano S, Okamura N, Yokota H, Kitazawa T, Moriya K. Evaluation of multiplex PCR using dual-priming oligonucleotide for the detection of vanA and vanB in vancomycin-resistant enterococci. *Clin Chem Lab Med*. 49:751-2, 2011.
- 5) Nukui Y, Hatakeyama S, Kitazawa T, Mahira T, Shintani Y, Moriya K. Pandemic 2009 influenza A (H1N1) virus among Japanese healthcare workers: seroprevalence and risk factors. *Infect Control. Hosp Epidemiol*. 33:58-62, 2012.
- 6) Yoshino Y, Kitazawa T, Ikeda M, Tatsuno K, Yanagimoto S, Okugawa S, Ota Y, Yotsuyanagi H. Clinical features of Bacteroides bacteremia and their association with colorectal carcinoma. *Infection*. 40: 63-7: 2012.
- 7) Yoshino Y, Seo K, Koga I, Matsunaga N, Kitazawa T, Takamori Y, Ota Y. Liver abscess with a markedly high level of carbohydrate antigen 19-9. *Gastroenterol Res*, 5 : 205-207, 2012.
- 8) Kitazawa T, Yanagimoto S, Tatsuno K, Fukushima A, Okugawa S, and Ota Y. Serum Cholesterol Levels at the Onset of Bloodstream Infection Have Prognostic Value. *Advances Infect Dis*. 2: 100-105, 2012.
- 9) Yoshino Y, Okugawa S, Kitazawa T, Koga I, Kimura S, Makita E, Seo K, Matsunaga N. and Ota Y. Infective endocarditis due to Enterobacter cloacae resistant to third- and fourth-generation cephalosporins. *J Microbiol Immunol Infect*. S1684-1182 (12), 2012.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) 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.

2. 学会発表

- 1) 古賀一郎、吉野友祐、松永直久、北沢貴利、太田康男。当院通院中のHIV感染症患者における骨密度低下のリスク因子と経時的な変化についての考察。第25回日本エイズ学会学術集会、2011年11月30-12月2日、東京。
- 2) 古賀一郎、吉野友祐、松永直久、北沢貴利、太田康男。Rifabutin associated uveitisと診断した日本人HIV感染症患者の一例。第25回日本エイズ学会学術集会、2011年11月30-12月2日、東京。
- 3) 服部純子、椎野禎一郎、瀧永博之、林田庸総、吉田繁、千葉仁志、小池隆夫、佐々木悟、伊藤俊広、内田和江、原孝、佐藤武幸、上田敦久、石ヶ坪良明、近藤真規子、今井光信、長島真美、