

平成12年度  
厚生科学研究費補助金エイズ対策研究事業

## HIV感染症の治療に関する研究

—研究報告書—

(1/2)

平成13年3月

主任研究者 岡 慎一

### HIV感染症の治療に関する研究班

研究者名	分 担	所 属	職 名
岡 慎一	主任研究者	国立国際医療センターエイズ治療研究開発センター	部 長
下山 孝	分担研究者	兵庫医科大学第四内科	教 授
満屋 裕明	分担研究者	熊本大学医学部第二内科	教 授
滝口 雅文	分担研究者	熊本大学エイズ学研究センターウイルス制御	教 授
松下 修三	分担研究者	熊本大学エイズ学研究センター病態制御	教 授
桑原 健	分担研究者	国立大阪病院薬剤科	製剤主任
西村 浩一	分担研究者	京都大学大学院医学系研究科	講 師
太田 康男	分担研究者	東京大学医学部附属病院感染症内科	助 手
中村 哲也	分担研究者	東京大学医科学研究所附属病院感染症内科	助教授
安岡 彰	分担研究者	国立国際医療センターエイズ治療研究開発センター	医 長
松岡 雅雄	分担研究者	京都大学ウイルス研究所附属エイズ研究 施設感染免疫	教 授

目 次

I. 総括研究報告	
HIV感染症の治療に関する研究(治療ガイドラインを含む) .....	9
主任研究者: 岡 慎一(国立国際医療センター 部長)	
II. 分担研究報告	
1. Apheresis 療法の臨床応用: HIV感染症患者に対するアダカラムを用いた単球・顆粒球 吸着療法の効果に関する臨床研究 .....	15
分担研究者: 下山 孝(兵庫医科大学第4内科)	
研究協力者: 澤田康史 <sup>1</sup> 、白阪琢磨 <sup>2</sup> 、安岡 彰 <sup>3</sup> 、立川夏夫 <sup>3</sup> ( <sup>1</sup> 兵庫医科大学第4内科、 <sup>2</sup> 国立大阪病院臨床検査部 ウイルス治療、 <sup>3</sup> 国立国際医療センター病院 エイズ治療・研究開発センター)	
2. 新規CCR5 antagonist / SPIRO-DIKETOPIPERAZINE DERIVATIVES の 抗HIV活性の検討 .....	21
分担研究者: 満屋 裕明(熊本大学医学部免疫病態学内科学第二)	
3. 治療の有効性の評価法の開発に関わる臨床研究 .....	23
分担研究者: 滝口雅文(熊本大学エイズ学研究センター・ウイルス制御分野・教授)	
研究協力者: 富山宏子(熊本大学エイズ学研究センター・ウイルス制御分野・助手)	
4. サルベージ療法に関する臨床研究 .....	29
分担研究者: 松下修三(熊本大学エイズ学研究センター)	
5. プロテアーゼ阻害薬の血中濃度測定に関する臨床研究 .....	40
分担研究者: 兼原 健(国立大阪病院 薬剤部)	
研究協力者: 高田寛治 <sup>1</sup> 、白阪琢磨 <sup>2</sup> 、上平朝子 <sup>2</sup> 、吉野宗広 <sup>3</sup> 、西野 隆 <sup>4</sup> 、平林義 弘 <sup>5</sup> 、土屋亮人 <sup>5</sup> 、寺門浩之 <sup>6</sup> 、鈴木 晃 <sup>7</sup> 、味澤 篤 <sup>8</sup> 、今村顕史 <sup>8</sup> 、山 元泰之 <sup>9</sup> 、中村哲也 <sup>10</sup> ( <sup>1</sup> 京都薬科大学 薬物動態学教室、 <sup>2</sup> 国立大阪病 院 総合内科、 <sup>3</sup> 国立大阪病院 薬剤部、 <sup>4</sup> 国立九州医療センター 薬 剤部、 <sup>5</sup> 国立国際医療センター エイズ治療研究開発センター、 <sup>6</sup> 国立 国際医療センター薬剤部、 <sup>7</sup> 国立名古屋病院 薬剤部、 <sup>8</sup> 都立駒込病院 感染症内科、 <sup>9</sup> 東京医科大学病院 臨床病理科、 <sup>10</sup> 東京大学医科学研 究所 感染免疫内科)	
6. HIV/AIDS患者における疾患特異的な健康関連QoL評価尺度である the Multidimensional Quality of Life Questionnaire for HIV/AIDS(MQoL-HIV) 日本語版の信頼性と妥当性に関する研究 .....	60
分担研究者: 西村浩一(京都大学大学院医学研究科呼吸器病態学講師)	
研究協力者: 渡辺 恵、石原美和(国立国際医療センターエイズ治療研究開発セン ター)	

7. HIV の治療成績の評価及び治療ガイドラインの作成 .....	66
分担研究者：太田康男（東京大学）	
8. 新薬による治療－プロテアーゼ阻害剤から非核酸系逆転写酵素阻害剤へのスイッチの有効性－ .....	80
分担研究者：安岡 彰、岡 慎一(国立国際医療センター エイズ治療・研究開発センター)	
研究協力者：照屋勝治、源河いくみ、立川夏夫、菊池 嘉 (国立国際医療センター エイズ治療・研究開発センター)	
98. 国際臨床検討への参加に関する研究 .....	83
分担研究者：中村哲也（東京大学医科学研究所）	
研究協力者：岩本愛吉（東京大学医科学研究所）	
10. プロテアーゼ阻害剤治療失敗例における Abacavir / Efavirenz / Amprenavir によるサルベージ治療成績の検討 .....	84
分担研究者：岡 慎一、安岡 彰 (国立国際医療センターエイズ治療・研究開発センター)	
研究協力者：照屋勝治、北沢貴利、塚田訓久、中島由紀子、矢崎博久、山本善彦、源河いくみ、立川夏夫、菊池 嘉(国立国際医療センターエイズ治療・研究開発センター)	
11. 新規抗HIV薬の開発に関する臨床研究 .....	90
分担研究者：松岡雅雄（京都大学ウイルス研究所感染免疫研究領域）	
12. エファビレンツの長期投与成績と副作用について .....	95
分担研究者：岡 慎一 (国立国際医療センター、エイズ治療・研究開発センター)	
研究協力者：源河いくみ、安岡 彰 (国立国際医療センター、エイズ治療・研究開発センター)	

# I. 総括研究報告

## 総括研究報告書

### HIV 感染症の治療に関する研究（治療ガイドラインを含む）

主任研究者：岡 慎一（国立国際医療センター 部長）

#### 研究要旨

HIV感染症に対する治療は進歩したとはいえ、耐性ウイルスや予期せぬ副作用の出現など新たな問題点が出てきている。これらの問題点を克服し、よりよい治療法を確立していくため、本研究は4部門 (in vitro, ex vivo, in vivo, evaluation)よりなる。in vitroでは新薬の開発(臨床試験に近いもの)、ex vivoでは薬剤血中濃度測定、免疫能判定法の開発、in vivoでは種々の新しい治療の試みがなされ、evaluationでは、患者のQoLが改善されたことを確認し、新しい治療法をガイドラインに盛り込んでいく。

#### 分担研究者

満屋裕明：熊本大学第2内科教授

松岡雅雄：京大ウイルス研感染免疫教授

滝口雅文：熊本大学エイズ学研究センター教授

桑原 健：国立大阪病院薬剤科製剤主任

下山 孝：兵庫医大第4内科教授

中村哲也：東大医科研感染免疫内科助教授

安岡 彰：国立国際医療センター医長

松下修三：熊本大学エイズ学研究センター教授

西村浩一：京都大学呼吸器内科講師

太田康男：東京大学感染症内科助手

以上10名

## A. 研究目的

HIV感染症に対する治療は進歩したとはいえ、完成されたといえる段階ではない。本研究の目的は、現在の治療法をさらに改善し、よりよい治療法を確立していくことにある。この目的の達成のため、本研究は4部門（*in vitro*, *ex vivo*, *in vivo*, *evaluation*）よりなる。*in vitro*では新薬の開発（臨床試験に近いもの）、*ex vivo*では血中濃度測定、CTL判定法の開発、*in vivo*では種々の新しい治療の試みがなされ、*evaluation*では治療効果の評価系を確立し、治療により患者のQoLが改善されたことを確認する。そして最終的には本研究で確認されたそれらの成果を、従来からの治療ガイドラインに付記し実際の臨床現場において具体的に必要な情報を盛り込んだ包括的なものとしていく。本研究の目的が達成されることによりHIV治療に関する医療福祉の向上に寄与する。いえる。

## B. 研究方法

*in vitro* 新規抗HIV薬として2つの薬剤を開発した。1つは、CCR5 antagonistで、もう1つは4'位に置換を持つNRTIである。CCR5 antagonistは、125IラベルしたChemokineを用いたbinding assay およびCa<sup>2+</sup> assayにより、CCR5と結合能のある化学物のスクリーニングを行った。さらにその中からagonist作用のないものを選択し、抗HIV活性を検討した。その結果、抗HIV活性を持つCCR5 antagonistとしてMYSM compoundを発見した（満屋）。

NRTIは、従来は3'位に置換が必要であると考えられていた。この概念を変え、4'位にエチニール基を導入したNRTIを合成し、抗HIV効果などについて検討した（松岡）。

*ex vivo* 免疫能の判定方法としてCTLの測定方法をテトラマー-を用いて開発した。HLA-A24, B-35, A-11拘束性のエピトープを有する11種類のテトラマーを作成した。これと、患者PBMCを反応させHIV-1特異的CD8細胞をフローサイトメーターを用いて定量的に解析した。さらに細かくCTLを調べるために、このテトラマー陽性CD8分画をソーティングし、CD28 CD45RAについても解析を加えた（滝口）。

NFV, RTV/SQV, EFVについてHPLCを用い血中濃度を測定し、米国でのデータと比較した。また、全国どの施設からでも薬剤血中濃度が測定できる

ようHomePageをもちいたオーダーリングシステムを開発した（桑原）。

*in vivo* G1カラムを用いapheresis療法を試行した。apheresisは、1分30mlの速度で1回1時間、週1回、8回行った。治療前後でのCD4, VLや各種サイトカインの産性能について検討した（下山）。

国立国際医療センター、国立大阪病院、東大医科研の2施設がIL-2国際臨床試験に参加したが、日本における臨床治験との違いについて検討した（中村）。

国立国際医療センターでの既存薬を用いた治療として、PI-HAARTの副作用としてのlipodystrophyとそれを回避するためのNNRTI-HAARTへのswitch療法の成績がまとめられた（安岡）。

salvage療法をいかにうまく行うかについての解析を行った。salvage療法の成否を判定するマーカーとして、ウイルスプールの指標と考えられるprovirus量を測定した（松下）。

*evaluation* QoL調査のためMQoL-HIV(米国)を許可を得て翻訳し、ACC及び全国ブロック拠点病院に通院する約400名の横断的調査を行った（西村）。

ガイドラインは、昨年度までの岩本班のものを基本とし、米国で今年度改訂された部分について書き加えていく（太田）。

### （倫理面への配慮）

apheresis療法、IL-2国際臨床試験、QoL調査、Lipodystrophy調査は、国立国際医療センターもしくは国立大阪病院の倫理委員会/受託審査委員会の承認を得た。国立国際医療センターにおける臨床研究は、すべて文書による同意を得ている。また、すべての研究結果において、個人が特定できるような情報は省いた。

## C. 研究結果

*in vitro* MYSM compoundはR5ウイルスに対し抗HIV効果を示し、X4ウイルスに対しては抑制効果を示さなかった。この物質は、現在臨床応用されている各種薬剤に耐性を示すR5ウイルスに対しても野生株と同等の抗HIV効果を示した。さらに、CXCR4 antagonistであるAMD-3100と併用することによりR5ウイルスとX4ウイルスの混在した状態あるいはdual tropicなウイルスに対して相加もしくは相乗効果を示した（満屋）。

4位にエチニール基を導入した核酸アナログは、臨床分離株や薬剤耐性ウイルスすべてに抗ウイルス効果を示した。これら物質は、耐酸性であり、経口吸収時に安定であった。作用機序はヌクレオチド競合阻害であった（松岡）。

ex vivo テトラマーによる解析によりフロサイトメーターを用い定量的にCTLの解析が可能となった。現在までに作成したテトラマーで日本人の80%をカバーできる。これらテトラマーを用いて解析したところ、慢性期のHIV患者ではCD28-CD45RA-のCD8細胞の増加が見られた。HAART療法にて血中のVLが検出限界以下になるとこの分画のHIV特異的CD8細胞は低下することより、HIV-1特異的CD28-CD45RA-CD8細胞はHIV抗原を認識して増加している活性型のeffector T細胞と考えられた。また、慢性期のHIV患者ではCD28-CD45RA+のHIV-1特異的CD8細胞で、細胞内パーフォリンの低下が見られた。これは、慢性HIV患者ではCTL活性が低下している可能性を示した（滝口）。

薬剤血中濃度測定にてRTV/SQV, NFVを検討した。この結果、日本人においては、SQV, NFV共にトランプ値は白人に比べ有意に高い値であった。治療有効例と無効例の比較では血中濃度に差はなかった。EFVの血中濃度は、ふらつき等の副作用のある患者群において高かった（桑原）。

in vivo apheresis療法を行った6例において、当初期待されたCD4増加、VL低下、Th1/TH2バランスの改善などは得られなかった。1例に一時的なLDHの軽度上昇を見た。このため、この臨床試験は、今年度で中止することとした（下山）。

IL-2の国際共同臨床試験に参加することに起因する問題として、1) 契約（患者への報酬の支払いを含む）締結の難しさ、2) Clinical Research Coordinator(CRC)の設置の必要性、3) 英文和訳の作業、4) site visit（治験施設のquality control）5) 年数回世界各国で開かれるsteering meetingへの参加等があげられた。（中村）。

PI-HAARTは強力な抗HIV効果から治療効果は十分であったが、lipodystrophyという新しい問題点を生み出した。Lipodystrophyの出現頻度やその内容は、白人での結果とほぼ同等であった。代謝異常としてはTG, TC, C-peptid, 尿酸の増加が見られた。PIの投与期間が最もこの副作用の出現に関連していた。このため、NNTRI-HAARTへのswitch

を行う患者が少なくないが、抗HIV効果は維持された。TGの改善を見たが、その他の因子については今後の経過を見る必要があった（安岡）。

salvage 療法を必要とした患者を解析すると、HAARTのpotencyと増殖してきたウイルスの薬剤耐性、服薬率と副作用の4つが大きく関与していた。先の2つは、HAARTによってもウイルスの増殖がon goingであることを意味している。ウイルスプールを見る指標としてprovirus量を検討したところ、治療成功例やLTNPではprovirus量も非常に低いことがわかった。このことから、provirus量にも治療成功のためのset pointのある可能性が示唆された（松下）。

evaluation HIV患者における疾患特異的な健康関連QoL評価尺度としてMQoL-HIV（米国）の日本語版を作成した。全国の378名の患者からの結果では、ほぼ正規分布に近い結果が得られ、この質問票の妥当性が示された。クローンバッハa係数においても、性的機能の項目以外は評価に値する結果が得られた。また、MQoLの低下に最も関連していたのは鬱の指標であった。一般的なQoL尺度であるNHQを用いCOPDとの比較を行うと、HIV患者では社会的孤立が非常に大きくQoLの低下に関連していることがわかった（西村）。

[抗HIV治療ガイドラインversion 2.0]を基に、今回改訂すべき点について検討した。治療開始薬剤については、変更点はないが、開始時期については、2001年2月改訂の米国ガイドラインで大きく変わっていたため、今回改訂のポイントとなる。しかし、現実的には、開始時期についてのエビデンスは米国においても確認されていない（太田）。

## D. 考察

in vitro 今年度開発された新薬は、従来までの薬剤とは全く異なったコンセプトで見つけだされてきたものであり、耐性パターンなどが全く異なっていることから新薬として期待される。早急なphase I studyが期待される。

ex vivo治療効果は従来CD4数やVLのみでなされてきた。しかし今後、新しい免疫療法などの応用を考えると、CTLなどの免疫系の評価が不可欠となる。その点、テトラマーを用いたCTLの解析法は新しい手法として期待される。薬剤血中濃度測定系の確立は、新規性というよりは、社会的意義が大きい。薬剤血中濃度の欧米人との違いを



SNPsで関連づけできればおもしろい。

*in vivo* apheresisの臨床試験は今年でうち切ることとした。来年度は、新しい免疫賦括療法の試みとして、初感染患者に対する計画的治療中断療法(STI)を独自のprotocolにて実施し、この治療によりCTLが回復されるかどうかについても検証していきたい。米国での臨床試験の行い方は、今後の日本での臨床試験のレベルをあげていくためには非常に参考になる。特に、CRCの設置など今後日本で始まるゲノム医療において不可欠になると思われる。国際医療センターでの既存薬での治療成績を出していくことは、経験の少ない医師が治療を行う時、有効性・安全性を知る上で非常に有用な資料となる。また、その治療成績は、Johns Hopkinsなどの国際的な医療機関と比べても遜色はなかった。また、*provirus*定量によるウイルスプールとそのset pointの確立は、治療を成功させる上で非常に重要な治療マーカーとなる可能性がある。

*evaluation* 副作用のLipodystrophyやQoLの研究は、アジア人としてはn(対象患者数)のまとまった初めてのものであり国際的にも重要な結果である。QoLについては、継続調査を行うと共に、新しい尺度の開発にも取り組む必要がある。

## E. 結論

*in vitro* 今回報告した薬剤は、1つはCCR5 antagonistであり、CXCR4 antagonistと併用することにより完璧なウイルス抑制を見た。もう1つは4'位に置換を持つNRTIで従来薬と交差耐性はなかった。

*ex vivo* テトラマーによるフローサイトメーターを用いたCTL解析法の開発は、CTLが定量的に解析できる点、日本人の80%以上をカバーできる点が特記される。また、HIVを認識するeffector細胞は、CD28-CD45RA-CD8+細胞であることがわかった。薬剤血中濃度測定にてNFVやRTV/SQVの日本人での血中濃度が得られ、共に欧米人よりもトラフ値の高いことがわかった。

*in vivo* apheresis療法の臨床応用は、6例に試みたが、残念ながら現時点では有効性を示す結果は得られなかった。IL-2を用いた国際共同臨床試験への参加が、今年度スタートした。国際臨床試験に参加するに当たっての問題点を整理し、今後の参考資料とした。既存薬を用いた治療として、

国際医療センターでの治療成績がまとめられた。*salvage*療法の場合、後手に回ると良い結果が得られないことからその判定をもう一步踏み込んで、ウイルスプールの指標と考えられる*provirus*量による判定を考案した。

*evaluation* 今年度は、MQoL-HIV(米国)を許可を得て翻訳し、全国規模で約400名の調査を行った。ガイドラインは、昨年度までの岩本班のものを基本とし版を重ねていくが、今年度版を6月までには完成させたい。

以上、1年目としての目標は達成された。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

業績一覧参照

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

## II. 分担研究報告

## 1

## Apheresis 療法の臨床応用： HIV 感染症患者に対するアダカラムを用いた単球・顆粒球吸着療法の 効果に関する臨床研究

分担研究者：下山 孝（兵庫医科大学第4内科）

研究協力者：澤田康史<sup>1</sup>、白阪琢磨<sup>2</sup>、安岡 彰<sup>3</sup>、立川夏夫<sup>3</sup>（<sup>1</sup>兵庫医科大学第4内科、<sup>2</sup>国立大阪病院臨床検査部 ウイルス治療、<sup>3</sup>国立国際医療センター病院 エイズ治療・研究開発センター）

### 研究要旨

イタリアの HAART 治療に十分反応しない HIV 感染患者の単球・顆粒球吸着療法 (Monocyte- Granulocytapheresis : 以下 M-GCAP) の治験で、M-GCAP が HIV ウイルス量を減らし、CD4陽性T細胞数を上昇させる治療効果を持っていることが報告された。今回、日本でM-GCAPがイタリアの治験結果と同様の効果があるか確かめるために、HAART 治療の効果の少ない HIV 感染患者に M-GCAP を施行した。また、本研究は preliminary study として施行し、HIV ウイルス量と CD4 陽性 T 細胞数の変化を経時的に測定し、本治療の安全性を併せて検討した。文章と口頭で本研究の主旨を説明し、Informed consent を得た 6 名の HIV 感染患者に対し、週に 1 回を計 8 回 (8 週間) の M-GCAP を HAART 治療を併用しながら開始した。HIV 感染患者末梢血単核球中の HIV-DNA 量は、M-GCAP 治療をした 6 例中 1 例に低下を認めた。また、CD4 陽性細胞は M-GCAP 治療をした 6 例全例に上昇しなかった。

このように、症例数 6 例と少数ではあるが、全例イタリアの治験で見られたような HIV ウイルス量の減少や、CD4 陽性 T 細胞数の増加は認められず、現プロトコルでは M-GCAP が HAART 治療の効果の少ない HIV 感染患者に対する一つの補助治療となる可能性は少ないものと結論した。

### A. 研究の目的

本研究の目的は、単球・顆粒球吸着療法 (Monocyte- granulocytapheresis : M-GCAP) <sup>1, 2</sup>が、HAART 治療に十分反応しない HIV 感染患者の HIV ウイルス量を下げた、CD4 陽性 T 細胞数を上昇させる治療効果を持っているかを探ることである。

### B. 研究方法

#### 1. 対象患者の選択・除外基準

##### a. 選択基準

- (1) HIV-1 抗体陽性患者。
- (2) 抗 HIV 療法の有無は特に規定しない。抗 HIV 療法を行っている患者については、4 週以上治療内容の変更が無く、研究参加中も原則として抗 HIV 療法の内容を変更せずに参加することに同意した患者。

- (3) CD4陽性Tリンパ球数が300個/mL未満の患者。  
血漿中の HIV-RNA 量は特に規定しない。

#### b. 除外基準

- (1) 12歳以下、76歳以上の患者。
- (2) 妊娠中または妊娠の可能性のある患者。または授乳中の患者。
- (3) 重篤な心血管系疾患を有する患者（発症6ヶ月以内の急性心筋梗塞、重篤な不整脈や心不全、脳梗塞や脳出血等の脳血管障害）。
- (4) 収縮期血圧が80mmHg以下の低血圧患者。  
重篤な感染症を合併している患者、および一時的な顆粒球減少が合併感染症を悪化させる可能性がある患者。
- (5) 以下の合併症を有する患者は臨床症状を十分観察、注意の上、主治医が適用可否を決定する。（肝臓疾患・腎臓疾患・呼吸器疾患・代謝性疾患・神経筋疾患・血液疾患）。
- (6) 悪性腫瘍で現在加療中である患者。
- (7) 過去に体外循環治療によって重篤な有害事象が出現した患者。
- (8) 治療実施にあたって危険があるアレルギー素因がある患者。
- (9) 抗凝固剤（ヘパリン、メシル酸ナファモスタット）に対し過敏症の既往歴がある患者。
- (10) 低栄養、脱水、発熱、重篤な貧血（ヘモグロビン値 8.5g/dl 以下）、凝固系の強度亢進がある患者は前処置の上、症状改善後は実施可能とする。
- (11) 本治療開始前4週間以内にステロイド療法、化学療法または他の研究的治療を受けた患者。
- (12) 本治療開始前4週間以内にG-CSF, GM-CSF, インターフェロン、ペントキシフィリン等の免疫調節効果がある治療を受けた患者。
- (13) 治療開始前3ヶ月以内に他の臨床試験に参加または現在他の臨床試験に参加している患者。
- (14) 顆粒球数が1000個/ $\mu$ l以下の患者。
- (15) 血小板数が10万/ $\mu$ l以下の患者。
- (16) その他担当医師が本治療の対象として不適当と判断した患者。

#### 2. 単球・顆粒球吸着療法（M-GCAP）の治療方法：

特殊加工した直径約2mmの酢酸セルロースビーズ220gを充填したアダカラム(直径6cm x長さ20cm)を用い、そのカラムの中をヘパリンで抗凝

固化したHIV感染患者の静脈血を流速30ml/分のスピードで1時間体外循環させる。その間にHIV感染患者の白血球、特にHIV感染単球と感染CD4陽性T細胞を含めた白血球を体外に選択的に除去する。本治療を、HIV感染患者に対して施行した。

#### 3. 倫理面への配慮

説明と同意、または治療中止の申し出について説明を担当する医師は、患者に口頭と文章で治療の内容を説明し、説明から同意までの経緯をすべて調査表と入院カルテに記載する。患者が治療の内容をよく理解し、同意したことを確認した場合のみ、同意書に同意した日付、本人の署名、捺印をお願いする。患者が未成年の場合は、本人と本人の法的に認められた親権者の両方が治療の内容をよく理解し、同意したことを確認した場合のみ同意書に同意した日付、本人の署名、捺印をお願いする。本治療は患者さん主導であることを伝え、いついかなる理由においても患者さんの意志で本治療の継続を止めることができることを説明した。

#### C. 研究結果

本年度の研究結果は、平成12年12月16日に主任研究者、分担研究者、研究協力者で検討された。

##### 1) 患者背景 (Table 1)

登録患者6名中6名とも男性で、女性はいなかった。平均年齢は39.3才(28~54才)で、すべての患者が過去平均21.2カ月(17カ月~25カ月)間HAART治療を継続して受け、M-GCAP開始前のCD4幼生T細胞数は300個/mL未満であった。HIVRNA量は症例によって異なり、少ないものでは50copies/mLであったが、多いものでは32,000copies/mLであった。

##### 2) HIV量とCD4陽性T細胞の変動(図1~6)

6症例すべての経過を図1~6に示した。

①症例I-1は、M-GCAP開始前よりHIVRNA量は極めて高く、治療開始3と4週目、8週目、終了8週目において一時HIVRNA量は治療開始時と比べ減少を認めた。しかし、治療終了8週目で13000copies/mLとまだウイルス量は高いままであった。もう少し経過を見たら治療前より少ないウイルス量で長期に経過するかが判るものと思われた。しかし、CD4陽性T細胞数は治療期間中また、治療終了後においても増加することなく、CD4陽性T細胞の増加には至らなかった。

②症例I-2はもともとHIVRNA量は高くなく、治

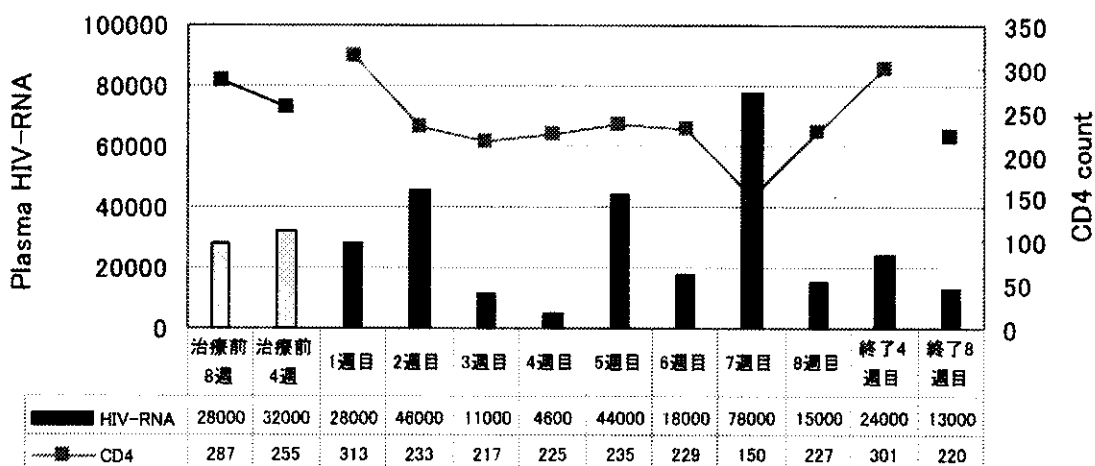
療開始3週目反対にHIVRNA量の増加を認めた。その後HIVRNA量は4週目、8週目で減少したが、治療終了4週間後と8週間後には治療前値よりさらに増加した。CD4陽性T細胞数は、HIVRNA量

が減った治療開始8週目に373個/mLまで増加したが、治療終了後すぐ73~175個/mLまで減少し、継続したCD4陽性T細胞の増加には至らなかった。

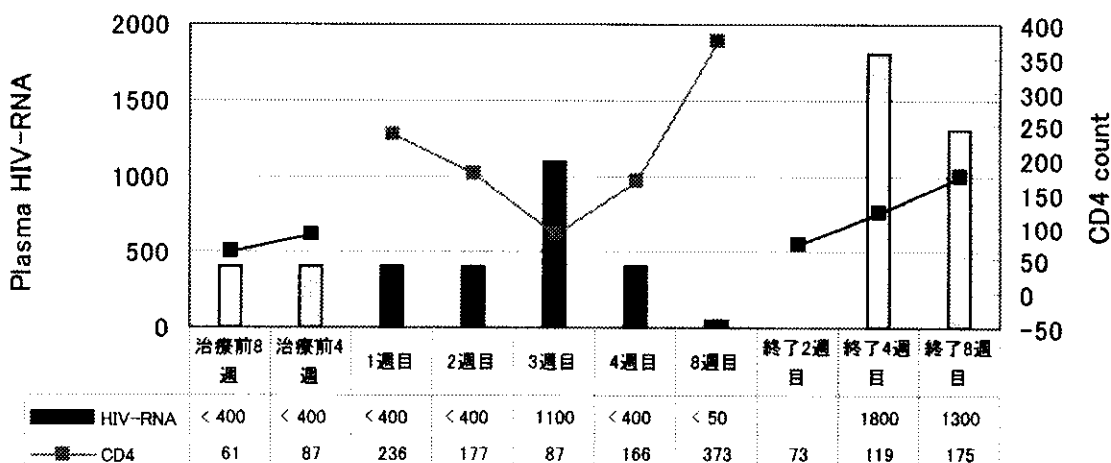
患者背景

c	I-1	I-2	I-3	I-4	O-1	O-2
性別	男性(31歳)	男性(54歳)	男性(40歳)	男性(48歳)	男性(35歳)	男性(28歳)
感染経路	血液製剤	異性間性交渉	同性間性交渉	同性間性交渉		
日和見感染症	AIDS カリニ肺炎 非定型抗酸菌症 CMV網膜炎	AIDS カンジダ外耳炎/ 中耳炎	AIDS CMV腸炎 カリニ肺炎	AIDS カンジダ食道炎	AIDS カリニ肺炎	AIDS 結核性腹膜炎
当院で開始したHAART	d4T/3TC/SQV/RTV	d4T/3TC/SQV/RTV	AZT/3TC/IDV	ddC/IDV	d4T/3TC/NFV	d4T/3TC/NFV
開始日	1998/3/1	1998/7/2	1998/12/28	1997/2/18	1999/1	1999/3
開始前CD4	80/μL	10/μL	18/μL	8/μL	5/μL	45/μL
開始前HIVRNA	13000copies/mL	25000copies/mL	370000copies/mL	250000copies/mL	51000copies/mL	42000copies/mL
7ダラム施行時のHAART	d4T/3TC/SQV/RTV	d4T/3TC/NFV	d4T/3TC/ddI/SQV/RTV/HUS	ABC/EFV/APV	d4T/3TC/NFV/ABC	d4T/3TC/NFV
7ダラム導入前データ	2000/3/17	2000/3/17	2000/5/17	2000/6/17	2000/5/30	2000/7/28
CD4数	255/μL	61/μL	297/μL	179/μL	81/μL	181/μL
HIVRNA量	32000copies/mL	400copies/mL未満	3900copies/mL	400copies/mL未満	50copies/mL未満	52copies/mL
7ダラム治療開始日	2000/4/8	2000/5/11	2000/6/7	2000/7/4	2000/6/2	2000/7/28

症例：I-1



症例：I-2



③症例I-3は、治療中と治療終了後とも、HIVRNA量、CD4陽性T細胞数に大きな変化はなかった。

④症例I-4は、HIVRNA量は治療1週目に減少し、一旦4週目で再上昇を認めたが、8週目で再び減少し、治療終了後も継続的にHIVRNA量は少ないままである。しかし、CD4陽性T細胞数は、治療中も治療終了後においても大きな変化はなかった。

⑤⑥症例O-1とO-2は、どちらも治療中、治療終了後とも、HIVRNA量、CD4陽性T細胞数に大きな変化は認めなかった。

### 3) 有害事象 (図7)

6症例中1例(症例I-2)において、第2回目の治療終了後よりLDHの上昇を認めた。治療は自覚症状はなく継続可能であった。悪性腫瘍を考え画像診断等を行ったが、特に異常所見を認めなかった。M-GCAPを終了約2週間後の7月19日、LDH

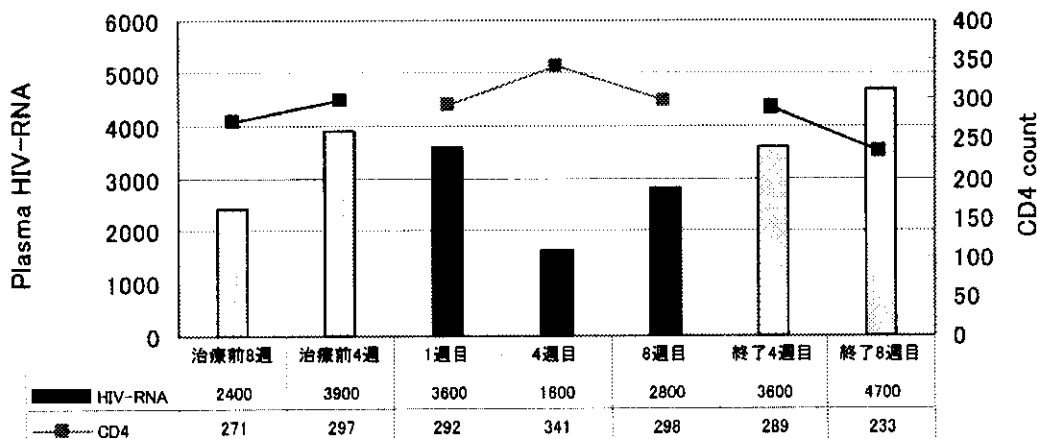
は660以上に上昇したが、さらに経過を観察したところ何の治療を加えることなく9月14日386まで自然に改善した。

### D. 考察

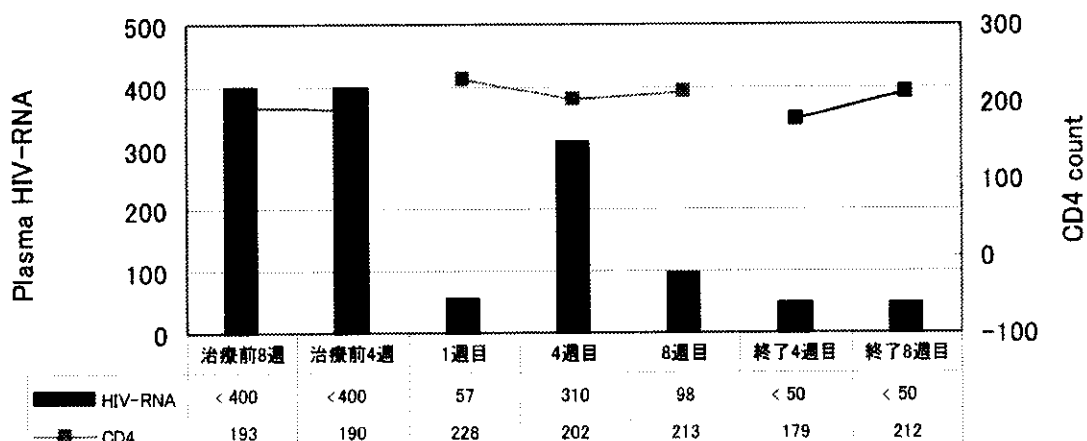
M-GCAP治療併用群でHIV感染患者6例中1例にのみHIVRNA量が低下したことは、少数のHIV感染患者ではあるがM-GCAPが何かのインパクトを与える治療であることを意味する。しかし、HIVRNA量低下治療患者が6例中1例とあまりにも少ないこと、また、全例でCD4陽性T細胞の増加を認めなかったことを考え合わせると、現行のプロトコールではさらなる結果を期待することはできないと言える。

今回まるで効果がないような結果であったが、抗ウイルス治療や他の併用治療と体外循環治療のタイミングをうまく考慮するプロトコールにより、抗ウイルス治療や他の併用治療の効力をもっと引き出せるはずである。つまり、HIV併用治療の一

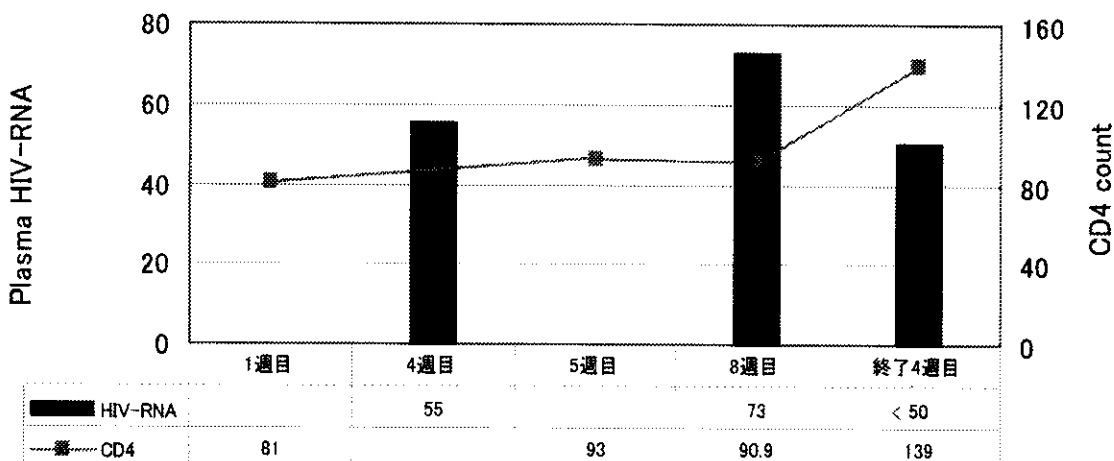
症例:I-3



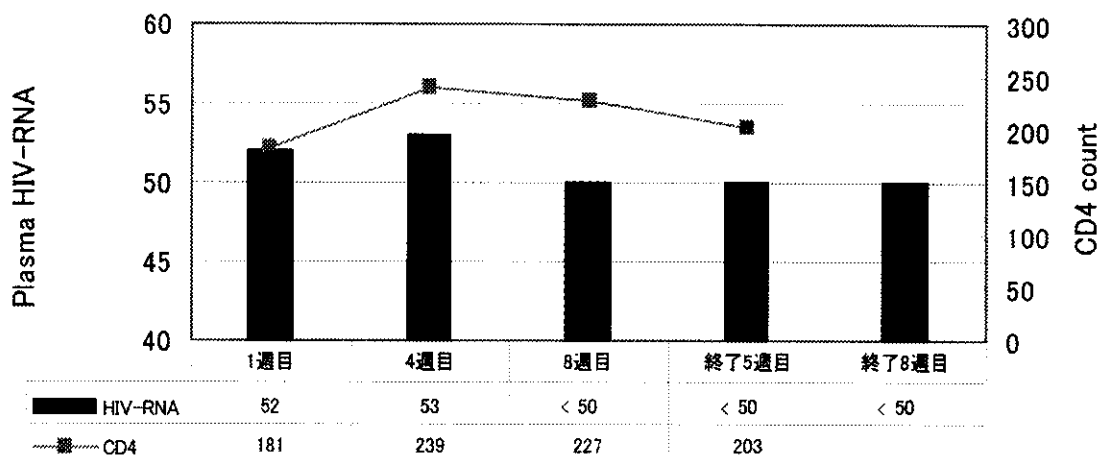
症例:I-4



症例：O-1



症例：O-2

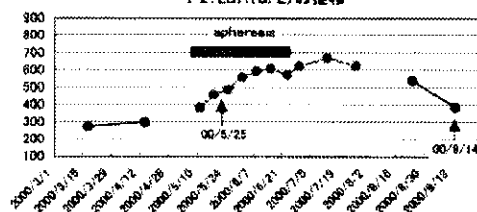


有害事象

症例	I-1	I-2	I-3	I-4	O-1	O-2
有害事象の有無	無	有	無	無	無	無

症例	症状・所見	程度	発現日	apheresisの 施行状況	処置内容	転移及び 子の確認日	備考
I-2	LDH上昇	軽度	2000/5/25	継続	なし	2000/9/14経 快 LDH:386 まで改善	悪性疾患を 考えて鑑別 診断では特 に異常無し

I-2: LDH(U/L)の推移



つのオプションとしてM-GCAPが育つ可能性はまだある。

## E. 結論

現行のプロトコールにおいて重篤な有害事象はなかったが、HAART治療にアダカラムを用いたM-GCAPを併用しても、治療後HIVRNA量の減少やCD4陽性Tリンパ球数の上昇は（1症例のHIVRNA量減少を除き）認められなかった。

## F. 健康危険情報

1症例にLDHの上昇（図7）を認めたが、特に経過観察のみで自然に改善した。また、本有害事象によって、治療が中断・中止されることはなかった。

## G. 研究発表

### ①論文発表

1. 澤田康史、大西国夫、福永 健、長瀬和子、福井 信、山村 誠、谷田憲俊、里見匡迪、下山 孝  
ビーズを用いた白血球系細胞除去療法—潰瘍性大腸炎治療における顆粒球吸着療法の有効性メカニズムについて（接着分子、Mac-1とLECAM-1の変動より）、日本アフエレーシス学会雑誌、2000、19:14-16
2. 澤田康史、大西国夫、福永 健、江頭明盛、近野真嗣、長瀬和子、下山 孝(2000)(手技の解説)顆粒球吸着による潰瘍性大腸炎治療機器（アダカラム）、臨床消化器内科、2000、15:1803-1806
3. 長瀬和子、澤田康史、大西国夫、福永 健、下山 孝 白血球系細胞除去療法に関する有害事象 潰瘍性大腸炎に対する体外循環治療における赤血球損失率の検討 日本アフエレーシス学会雑誌、2000、19:51-55.
4. 福永 健、澤田康史、下山 孝 白血球除去療法—炎症性疾患への適応と現状、医学のあゆみ、2000、193、192-193

### ②学会発表

1. 澤田康史 潰瘍性大腸炎に対する白血球系細胞吸着・除去療法。（教育講演）第48回日本輸血学会総会、2000、5.27、神戸。
2. 澤田康史(2000)炎症性腸疾患に対する白血球系細胞吸着・除去療法。（井上學術奨励賞受賞基調講演）第20回日本アフエレーシス学会学術大会、6.10、千葉。
3. 長瀬和子、澤田康史、江頭明盛、福永 健、大

西国夫、近野真嗣、下山 孝(2000)フィルター法白血球系細胞除去療法における補体と血液凝固に関する因子の変動についての検討、第20回日本アフエレーシス学会学術大会、6.10、千葉。Sawada, K., Satomi, M., Shimoyama, T. and Muto, T Therapeutic leukocytapheresis in ulcerative colitis. (Workshop) 8th Congress of the World Apheresis Association, 2000, 7.25, Perth, Western Australia.

4. Sawada, K., Muto, T. and Shimoyama T. Multicentre trial of leukocytapheresis by filter method for ulcerative colitis. Applications of Leukocyte Filtration, 2000, 7.7, London, UK
5. Sawada, K Problems of apheresis (Roundtable discussion) 8th Congress of the World Apheresis Association, 2000, 7.25, Perth, Western Australia
6. Sawada, K Extracorporeal Cytapheresis-an Active Immunomodulation Therapy for IBD. (Symposium) The third Symposium on "Helicobacter meets Inflammatory Bowel Disease" 2000, 8.26-27, Ikaho
7. 澤田康史 潰瘍性大腸炎に対する白血球系細胞除去療法。（会長シンポジウム）第19回日本アフエレーシス学会関西地方会、2000、12.2、倉敷。

## 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



## 2

## 新規 CCR5 antagonist / SPIRO-DIKETOPIPERAZINE DERIVATIVES の抗 HIV 活性の検討

分担研究者：満屋裕明（熊本大学医学部免疫病態学内科学第二）

## 研究要旨

多剤併用療法(HAART)に対する耐性株による治療不応例が多く見られてきている中で、これら耐性株にも有効な新たな抗HIV薬としてケモカインレセプター阻害剤の研究、開発が進められている。我々は今回の研究にて抗CCR5作用のある化合物(MYSM compound)を見いだした。それらは既存の抗HIV薬に対する耐性株に対しても強力な抗HIV作用を維持していた。さらにCXCR4 antagonistと併用することによりCCR5 antagonistは全く抑制効果のないとされるX4ウイルスが混在している状態、あるいは効果の弱いとされるdual tropicウイルスに対しても強力な抑制効果を示すことを明らかにした。さらに現在までに我々は当初のlead compoundと比べて抗HIV活性を大きく改善させ、かつ優れた薬理学的動態を持つ化合物を複数見いだしている。

## A. 研究目的

現在HIV感染症に対する治療は逆転写酵素阻害剤(RTI)とプロテアーゼ阻害剤(PI)による多剤併用療法(HAART)が主流となり、臨床的に効果を上げているが、一方で耐性株の出現などで治療不応例も多く見られてきている。そのため既存の薬剤と作用の異なる新しいクラスの抗HIV薬としてケモカインレセプター阻害剤が注目を集めている。今回、我々は強力に臨床応用可能なCCR5 antagonistの開発を目的に研究を行った。

## B. 研究方法

CCR5 発現細胞及び 125I ラベルした chemokine を用いた binding assay 及び Ca<sup>2+</sup> assay を用いて CCR5 結合能のある化合物のスクリーニングを行った。さらにその中から agonist 作用のないものを選択して、抗HIV活性の有無を検討した。抗HIV活性については MAGI-CCR5 細胞を用いる MAGI assay および PBM を用いる p24 assay で評価を行った。

(倫理面への配慮)

本研究においては抗HIV活性の測定に献血由来

のヒト単核球 (buffy coat) を用いたが、個人の遺伝情報などを取得する目的での実験は一切行っていない。

## C. 研究結果

B. に示したスクリーニングにより MYSM03 その他の CCR5 antagonist を見出した。これら MYSM compound は R5 ウイルスに対して抗HIV作用を示し、X4 ウイルスに対しては抑制効果を示さなかった。さらに MYSM compound は現在臨床応用されている各種の抗HIV薬に耐性を示す R5 ウイルスに対しても野生株と同様の強い抗HIV作用を維持していた。

さらに MYSM03 と CXCR4 antagonist である AMD-3100 とを併用することによる抗HIV-1活性を検討した。その結果 MYSM03 と AMD-3100 を併用することにより R5 ウイルスと X4 ウイルスの混在した状態、あるいは CXCR4, CCR5 両者をコレセプターとして用いることのできる dual tropic ウイルス (HIV-1 89.6) に対して相加効果～相乗効果を得られることが明らかとなった。さらに既存の抗HIV薬である RTI, PRI に対しては明らかな拮

抗作用を示さなかった。

現在、MYSM03などのprototypeの化合物の抗ウイルス効果や毒性、経口吸収能などを改善した化合物の研究、開発を進めており、すでにきわめて高い活性を有し、かつ薬理的動態に優れた化合物を複数見いだしつつある。

#### D. 考察

今回検討を行ったCCR5 antagonistはin vitroにおいて各種のR5ウイルスを抑制し、既存のRTIおよびPRIとは交差耐性を示さないと考えられる。

一方今回のin vitroでの検討でCCR5 antagonistはCXCR4 antagonistとの併用で一部のウイルスに対しては相乗効果を示し、RTI、PRIとの併用でも明らかな拮抗作用は認めなかったことから、今後CCR5 antagonistの臨床応用を考える際にはCXCR4 antagonistあるいはRTI、PRIとの併用療法が積極的に進められると考えられる。

#### E. 結論

この研究は既存の抗HIV薬と作用機序の異なるCCR5 antagonistの臨床応用の可能性を広げるものである。これら新しい作用機序の抗HIV薬が臨床応用されることにより現在の抗ウイルス療法における問題点である耐性ウイルスの出現に対する解決法の1つとなり得ると考える。今後は抗HIV活性に加え薬理的動態に優れた化合物の開発をさらに続け、臨床試験、臨床応用を目指す。一方これらの薬剤を投与した場合の生体側の受ける影響(免疫系など)についても検討する。

#### F. 健康危険情報

該当無し

#### G. 研究発表

##### ①論文発表

1. Kavlick, M. F., and H. Mitsuya 2001. The emergence of drug resistant HIV-1 variants and its impact on antiretroviral therapy of HIV-1 infection. *The Art of Antiretroviral Therapy*. (in press).
2. Kosalaraksa, P., M. F. Kavlick, V. Maroun, R. Le, and H. Mitsuya 1999. Comparative fitness of multidideoxynucleoside-resistant human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in an In vitro competitive HIV-1 replication assay *J Virol*. 73:5356-63.
3. Mitsuya, H., and J. Erickson 1999. Discovery and

development of antiretroviral therapeutics for HIV infection. *Textbook of AIDS medicine*:751-780.

4. Ohru, H., S. Kohgo, K. Kitano, S. Sakata, E. Kodama, K. Yoshimura, M. Matsuoka, S. Shigeta, and H. Mitsuya 2000. Syntheses of 4'-C-Ethynyl-beta-D-arabino- and 4'-C-Ethynyl-2'-deoxy- beta-D-ribo-pentofuranosylpyrimidines and -purines and Evaluation of Their Anti-HIV Activity *J Med Chem*. 43:4516-4525.
5. Sei, S., Q. E. Yang, D. O'Neill, K. Yoshimura, K. Nagashima, and H. Mitsuya 2000. Identification of a key target sequence to block human immunodeficiency virus type 1 replication within the gag-pol transframe domain *J Virol*. 74:4621-33.
6. Uchida, H., E. N. Kodama, K. Yoshimura, Y. Maeda, P. Kosalaraksa, V. Maroun, Y. L. Qiu, J. Zemlicka, and H. Mitsuya 1999. In vitro anti-human immunodeficiency virus activities of Z- and E- methylenecyclopropane nucleoside analogues and their phosphoro-L- alaninate diesters *Antimicrob Agents Chemother*. 43:1487-90.
7. Yoshimura, K., R. Feldman, E. Kodama, M. F. Kavlick, Y. L. Qiu, J. Zemlicka, and H. Mitsuya 1999. In vitro induction of human immunodeficiency virus type 1 variants resistant to phosphoralaninate prodrugs of Z-methylenecyclopropane nucleoside analogues *Antimicrob Agents Chemother*. 43:2479-83.
8. Yoshimura, K., R. Kato, K. Yusa, M. F. Kavlick, V. Maroun, A. Nguyen, T. Mimoto, T. Ueno, M. Shintani, J. Falloon, H. Masur, H. Hayashi, J. Erickson, and H. Mitsuya 1999. JE-2147: a dipeptide protease inhibitor (PI) that potently inhibits multi-PI-resistant HIV-1 *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:8675-80.

##### ②学会発表

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

## 3

## 治療の有効性の評価法の開発に関わる臨床研究

分担研究者：滝口雅文（熊本大学エイズ学研究センター・ウイルス制御分野・教授）

研究協力者：富山宏子（熊本大学エイズ学研究センター・ウイルス制御分野・助手）

## 研究要旨

3種類のHLAクラスI分子 (HLA-A\*2402, HLA-A\*1101, HLA-B\*3501) と11種類のHIV-1 CTLエピトープを用いてテトラマーを作製した。これらのテトラマーを用いて、HIV-1特異的CD8 T細胞をflowcytometryで検出する方法を確立した。これらのテトラマーによって、80%以上の日本人HIV-1感染者のHIV-1特異的CD8 T細胞の解析が可能となった。CD8, CD28, CD45RAに対する抗体とテトラマーを用いた4-color flowcytometry analysis によって、慢性HIV-1感染症の患者では、CD28-CD45RA- (memory/effector) の分画のHIV-1特異的CD8 T細胞の増加が見られた。HAART療法によってHIV-1 RNA量が低下して患者では、この増加がみられなくなった事により、HIV-1特異的CD28-CD45RA- CD8+ T細胞は、体内でHIV-1エピトープに反応しているCD8 T細胞と考えられた。一方、CD28CD45RA各分画のCD8 T細胞のパーフォリン発現を調べたところ、総CD8 T細胞、HIV-1特異的CD8 T細胞ともに、CD28-CD45RA+の分画でパーフォリン発現の低下がみられた。

## A. 研究目的

現在おこなわれているHAART療法では、HIV-1に対する細胞性免疫能は改善しておらず、HAART耐性ウイルスが生じるとこれを完全には排除できないと考えられている。そこで、HAART療法はもとより、今後おこなわれると考える様々な治療法によって、患者の細胞性免疫能の改善を、正確にかつ安易に評価するシステムの開発が必須である。しかし最も重要な細胞性免疫の一つである細胞傷害性T細胞 (CTL) は、<sup>51</sup>Crで標識した標的細胞の傷害を調べる機能的なアッセイによって測定するために、アイソトープが使える施設でしか調べることができない。さらに機能的なアッセイであり、また材料が標準化されていないために、必ずしも信頼度が高い、安定したデータが得られるわけでもない。

エピトープペプチドとHLAクラスI分子複合体を4つ結合させたテトラマーを用いて、抗原特異的CD8T細胞 (CTL) をフローサイトメトリーで解析する事により、大量のサンプルを安定的に、正確に測定することが可能となる。今研究では、テトラマーを用いるアッセイ法を確立し、これを用いて様々な治療の有効性を検討する。

## B. 研究方法

1) HIV-1 epitope peptide-HLA class I tetramerの作製

6種類のHIV-1 epitopeに対するHLA-B\*3501 tetramers, 2種類のHIV-1 epitopeに対するHLA-A\*1101 tetramers, 3種類のHIV-1 epitopeに対するHLA-A\*2402 tetramerを作製した (表1)。

表1. HIV-1-specific CTL epitopes used for tetramer synthesis

Epitope	HLA	HIV protein	Position	Sequence
Pol-313-9	A*1101	pol	313-321	AIFQSSMTK
Nef-84-9	A*1101	nef	84-92	AVDLSHFLK
SF2-Env584-9	A*2402	env	584-592	RYLRDQQLL
SF2-Gag28-9	A*2402	gag	28-36	KYKCLKHIVW
SF2-Nef138-10	A*2402	nef	138-147	RYPLTFGWCF
HIV-B35-SF2-4	B*3501	pol	273-282	VPLDKDFRKY
HIV-B35-SF2-6	B*3501	nef	75-85	RPQVPLRPMTY
HIV-B35-SF2-24	B*3501	pol	448-456	IPLTEEAEI
HIV-B35-SF2-25	B*3501	pol	587-595	EPIVGAETF
HIV-B35-SF2-33	B*3501	env	77-85	DPNPQEVVL
HIV-B35-SF2-8	B*3501	nef	72-80	FPVRPQVPL

表3. CD28 and CD45RA expression in HIV-1-specific CD8<sup>+</sup> T cells isolated from chronically HIV-1 infected individuals

Subjects	Cells	n	Percentage of each fraction			
			CD28 <sup>+</sup> CD45RA <sup>-</sup>	CD28 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup>	CD28 <sup>-</sup> CD45RA <sup>-</sup>	CD28 <sup>-</sup> CD45RA <sup>+</sup>
healthy control	total CD8 <sup>+</sup>	7	25.8±9.4	27.9±5.6	12.6±4.9	33.4±8.9
HIV-1 seropositive	total CD8 <sup>+</sup>	10	11.7±9.7	15.1±6.9	37.6±15.7	35.8±15.0
HIV-1 seropositive	tetramer CD8 <sup>+</sup>	10	7.6±4.8	14.1±11.2	47.4±18.8	30.9±18.8

