

2) tetramer を用いた HIV-1 抗原特異的 T 細胞の検出

作製した tetramer は、それぞれ特異的な CTL クローンを用いて、その特異性を確認した。慢性 HIV-1 感染者の末梢血単核球 (PBMC) を、抗 CD8 抗体と tetramer で染色して HIV-1 特異的 CD8 T 細胞の数を flowcytometry で測定した。さらに、HIV-1 に感染していない健康人の末梢血 PBMC を、抗 CD8 抗体と tetramer で染色して、バックグランドレベルを調べた。

3) tetramer を用いた HIV-1 抗原特異的 T 細胞の解析

CD28 および CD45RA の発現を調べる事により、末梢 CD8 T 細胞の分化状態 (na_ve T 細胞: CD28+CD45RA-, memory T 細胞: CD28+CD45RA-, memory/effector T 細胞: CD28-CD45RA-, terminal effector T 細胞: CD28-CD45RA+) が明らかにできる。そこで、

HIV-1 特異的 CD8+ T 細胞 (Tetramer+CD8+ T 細胞) 上の CD28 および CD45RA の発現を、4-color flowcytometry analysis によって解析し、どのような分化状態になっているかを解析する。さらにビーズによって CD8+ T 細胞を分離し、この分離した CD8+ T 細胞を、抗 CD28 抗体、抗 CD45RA 抗体、抗パーフォリン抗体とテトラマーを用いて染色し、各 CD28

CD45RA 分画のパーフォリンの発現を調べた。

(倫理面への配慮)

患者の血液の使用については、インフォームドコンセントをおこない承諾を得た。また研究発表において、各個人が特定できないようにした。

C. 研究結果

1) テトラマーを用いた慢性 HIV-1 感染症患者の PBMC 中の HIV-1 特異的 CD8 T 細胞の測定:

表1に掲げた11種類のエピトープペプチドを用いて、テトラマーを作製した。それぞれのテトラマーの特異性は、特異的 CTL クローンを用いて確認した。FITC 標識抗 CD8 抗体と PE 標識テトラマーを用いて HIV-1 非感染者 PBMC を染色し、テトラマーの非特異的結合を調べたところ、総 CD8 T 細胞の 0.01 ~ 0.03% であった。各テトラマー結合 CD8 T 細胞の数は、各 HIV-1 感染者によって異なっており、1% をこえるものもあった (表2)。このよ

うに11種類のエピトープ特異的 CD8 T 細胞を、テトラマーを用いて flowcytometry で検出する方法を確立した。

2) HIV-1 特異的 CD8 T 細胞の CD28CD45RA phenotype 解析:

HIV-1 に感染していない人と HIV-1 慢性感染者の PBMC を、抗 CD8、抗 CD28 および抗 CD45RA 抗体で染色し、比較した。その結果、HIV-1 感染者は非感染者と比べて、memory/effector (CD28-CD45RA-) 分画が増加していた (表3)。HIV-1 特異的 CD8 (tetramers+CD8+) T 細胞の CD28CD45RA phenotype の解析をおこなった所、CD28-CD45RA- および CD28-CD45RA+ の effector T 細胞の増加がみられた (図1)。特に CD28-CD45RA- phenotype をもった分画の増加は著しかった (表3)。

3) HAART 療法後の HIV-1 特異的 CD8 T 細胞の変化:

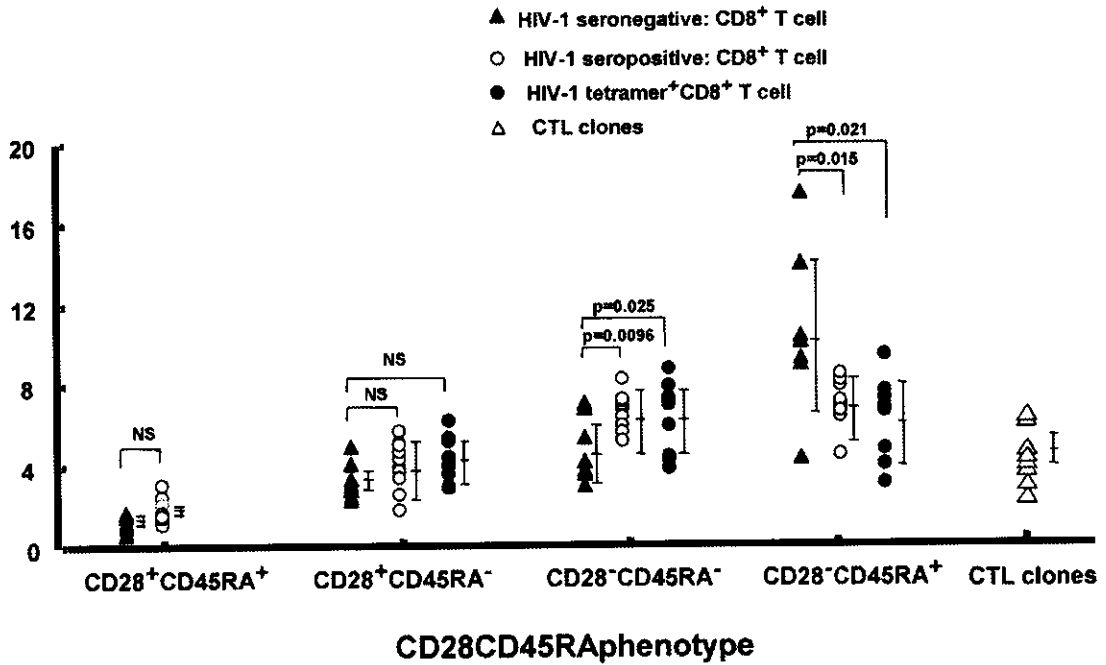
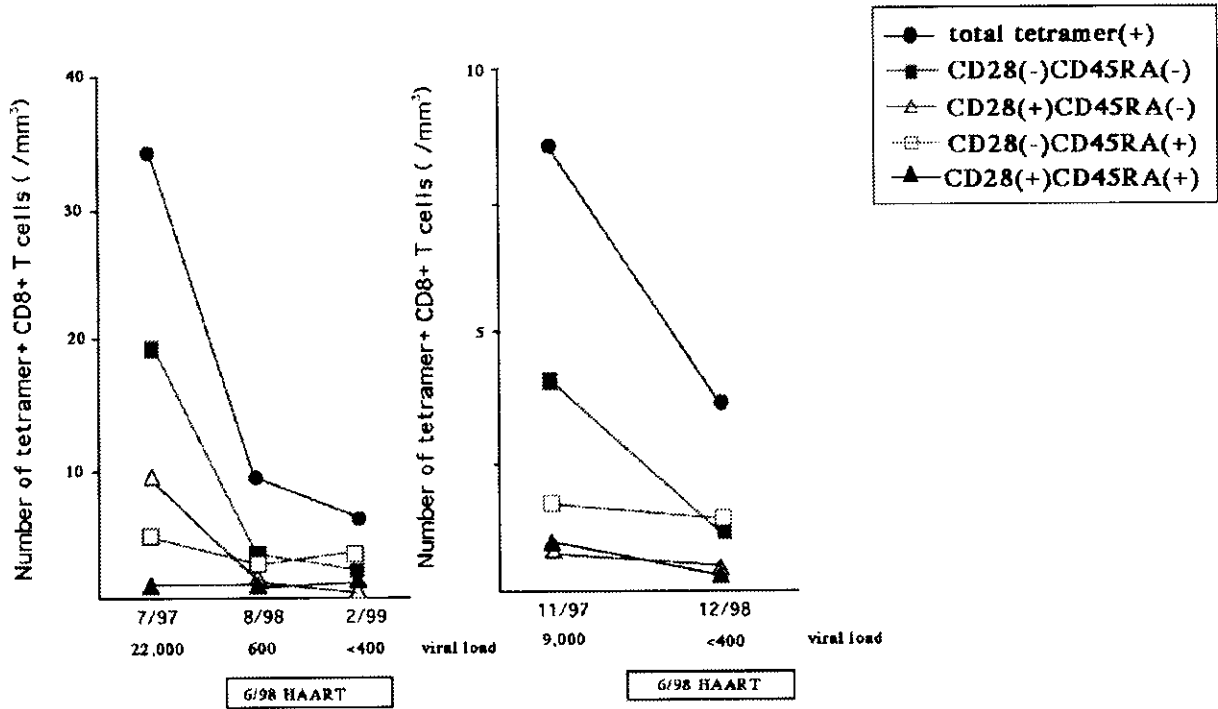
HAART 療法後著しく HIV-1 RNA 量が低下した2人の患者の HIV-1 特異的 CD8 T 細胞の数を、tetramer を用いて調べた。HAART 療法後、HIV-1 RNA 量の低下に比例して、HIV-1 特異的 CD8 T 細胞の数は低下した (図2)。この低下は増加していた CD28-CD45RA- 分画の低下によるものであった (図2)。

4) HIV-1 特異的 CD8 T 細胞の CD28CD45RA 各分画でのパーフォリンの発現:

HIV-1 非感染者の CD8 T 細胞の各 CD28CD45RA 分画でのパーフォリンの発現を調べたところ、CD28+CD45RA+ 分画ではほとんど発現していなかった。また他の分画では CD28-CD45RA+ < CD28-CD45RA- < CD28-CD45RA+ の順に発現が増強した。一方 HIV-1 慢性感染者では、HIV-1 非感染者と比べてところ、CD8 T 細胞の CD28-CD45RA+ 分画でパーフォリンの発現の低下が見られた。この分画のパーフォリン低下は、テトラマーを用いて検出した HIV-1 特異的 CD8 T 細胞ではより強く見られた。(図3)

D. 考察

11 種類の HIV-1 CTL エピトープを結合させた tetramer を作製し、すべての tetramer が、それぞれのエピトープ特異的な T 細胞に結合する事を明らかにした上で、これらの tetramer を用いて、HIV-



1 慢性感染者の末梢血中にエピトープ特異的 CD8 T細胞を検出できる事を示した。tetramerを用いた HIV-1 特異的 CD8 T細胞の検出は、欧米では主に HLA-A2 (A*0201) tetramerを用いておこなわれている。日本人では3種類(A*0201, A*0206, A*0207)の HLA-A2 がほぼ均等にあり、それぞれ人口の約 10%程度しか持っておらず、A*0201 tetramerを用いた解析は必ずしも効率的でない。

今回我々は A*2402, A*1101, B*3501 tetramer を作製したが、それぞれ日本人の約 65%, 40%, 20% がもっており。これによって 8 割以上の日本人の HIV-1 感染者の解析が可能となった。

HIV-1 慢性感染者では、総 CD8 T細胞の 1~数%にテトラマーが結合する事が明らかになった。この事は今回検出できていない他のエピトープに対する特異的 CD8 T細胞が、この数倍存在すると推定される事から、AIDSを発症していない慢性感染症の患者では、おおよそ 10%程度の CD8 T細胞が HIV-1 特異的 CD8 T細胞であると考えられる。これらの HIV-1 特異的 CD8 T細胞では、CD28-CD45RA-の分画が増加しており、この分画の CD8 T細胞は HIV-1 蛋白と反応して増加する effector CTL を考えられる。実際 HAART 療法によって血中 HIV-1 RNA が低下した患者では、この分画の HIV-1 特異的 CD8 T細胞が大幅に低下した。

HIV-1 特異的 CD8 T細胞中、CD28-CD45RA+ 分画でパーフォリン低下が見られた。CD28-CD45RA+ 分画の CD8 T細胞は、CTL 活性をもった effector CTL と考えられるので、この分画のパーフォリン低下は、これらの CD8 T細胞の細胞傷害活性の低下を意味している。このような CD8 T細胞の出現は、多量の HIV-1 蛋白が発現している患者のリンパ節などで、特異的 CD8 T細胞が HIV 抗原を認識してパーフォリンを分泌させた結果なのか、それとも何らかの機序でパーフォリン産生が低下した結果であり、これが CTL が HIV-1 排除をできない原因なのかまだ明らかでない。

HIV-1 特異的 CD8 T細胞は同時に、INF- γ , IL-2 などのインターロイキンやケモカインを分泌し、HIV-1 の増殖を阻害する。よって、これらの HIV-1 特異的 CD8 T細胞を体内に維持する事は、AIDS 発症阻害のためきわめて重要となる。しかしながら、HAART 療法などによって、HIV-1 が大幅に低下すると、逆に HIV-1 特異的 CD8 T細胞も低下する事から、今後どのようにして、あるレベル以上の HIV-1 特異的 CD8 T細胞を維持するか検討し、ま

た HIV-1 の排除に有効な HIV-1 特異的 CD8 T細胞の種類を明らかにする必要がある。これらの事を明らかにする事により、各治療の有効性をより正確に評価する方法の開発が可能となる。

E. 結論

3 種類の HLA クラス I 分子、11 種類の HIV-1 エピトープに対するテトラマーを用いて、HIV-1 特異的 CD8 T細胞をフローサイトメトリーを用いて検出する方法を開発した。これらのテトラマーは、日本人の HIV-1 感染者において、HIV-1 特異的 CD8 T細胞を検出するのに適したものであった。慢性 HIV-1 感染者では、CD28-CD45RA- のフェノタイプをもった memory/effector 分画の HIV-1 特異的 CD8 T細胞が増加しており、この分画は HAART 療法により低下する事により体内で HIV-1 エピトープに反応して増加した活性型 CD8 T細胞と考えられた。また、慢性の HIV-1 感染者では CD28-CD45RA+ の effector 分画の CD8+ T細胞で、パーフォリンの著しい低下がみられ、AIDS 発症との関連が示唆された。

G. 研究発表

①論文発表

- 1 Takiguchi, M., T. Matsuda, H. Tomiyama, and K. Miwa: Analysis of three HLA-A*3303 binding peptide anchors using an HLA-A*3303 stabilization assay. *Tissue Antigens*. 55: 296-302, 2000.
- 2 Tomiyama, H., S. Oka, G. S. Ogg, S. Ida, A. J. McMichael and M. Takiguchi: Expansion of HIV-1-specific CD28-CD45RA-CD8+ T cells in chronically HIV-1 infected individuals. *AIDS*. 14: 2049-2051, 2000.
- 3 Tomiyama, H., N. Yamada, H. Komatsu, K. Hirayama, and M. Takiguchi: A single CTL clone can recognize a naturally processed HIV-1 epitope presented by two different HLA class I molecules. *Eur. J. Immunol.* 30: 2521-2530, 2000.
- 4 Maenaka, K., T. Maenaka, H. Tomiyama, M. Takiguchi, D. I. Stuart and E. Y. Jones: Nonstandard peptide binding revealed by crystal structures of HLA-B*5101 complexed with HIV immunodominant epitopes. *J. Immunol.* 165: 3268-3274, 2000.
- 5 Takiguchi, M., T. Matsuda and H. Tomiyama: Polarity of the P1 anchor residue determines peptide binding specificity between HLA-A*3101 and HLA-A*3303. *Tissue Antigens*. 56: 501-506, 2000.

②学会発表

- 1 Tomiyama, H., S. Oka., G. S. Ogg., S. Ida., A. J. McMichael., M. Takiguchi: Expansion of HIV-1 specific CD28-CD45RA- CD8+ T cells in chronically HIV-1 infected individuals. Keystone Symposium "Novel biological approaches to HIV-1 infection based on new insights into HIV biology" (Keystone, Colorado, USA) April 4-10, 2000.
- 2 Fukada, K., H. Tomiyama, K. Miwa, Yutaro Kaneko, S. Oka, Y. Takebe, C. Wasi, and M. Takiguchi. CTL recognition for HLA-A*1101 -restricted HIV-1 cross-clade epitopes. Keystone Symposium "Novel biological approaches to HIV-1 infection based on new insights into HIV biology" (Keystone, Colorado, USA) April 4-10, 2000
- 3 Takiguchi. M: Visual identification and characterization of epitope-specific CD8+ T cells in patients with HIV-1 infection and hepatitis. The 7th Meeting of Transplantation/Immunoregulation 21. "Monitoring and Regulation of Antigen Specific Immune Response" (Tokyo, Japan) October 21, 2000.
- 4 Takiguchi. M: HIV-1 specific CD8+ T cells in patients with chronic HIV-1 infection. 1st International Seminar on Immunology "Pathogenesis and Regulation of Immunological Refractory Disease" (Tokyo, Japan) November 17, 2000.
- 5 富山宏子、山田尚之、小松陽樹、平山和雄、滝口雅文 (2000) 単一CTLクローンによる2つの異なるHLA-Class I分子により提示されるエピトープの分子認識 第30回日本免疫学会総会・学術集会 (仙台) 平成12年11月14日～16日
- 6 富山宏子、岡慎一、滝口雅文 (2000) 慢性HIV-1感染者血中のテトラマー陽性CD8+ T細胞のperforinの発現 第14回日本エイズ学会学術集会・総会 (京都) 平成12年11月28日～30日
- 7 深田勝彦、富山宏子、岡慎一、武部豊、滝口雅文 (2000) HIV-1 cross-clade CTLエピトープの同定 第14回日本エイズ学会学術集会・総会 (京都) 平成12年11月28日～30日

4

サルベージ療法に関する臨床研究

分担研究者；松下修三 熊本大学エイズ学研究センター

研究要旨

強力な抗ウイルス剤の多剤併用療法(hightly active anti-retroviral therapy; HAART)の導入により長期間に亘り、ウイルスの増殖抑制が可能な症例が増加したが、治療経過中に様々な理由でHAARTの有効性が不十分と考えられる症例が見られる。これらの症例でウイルス学的な治療失敗にはHAARTのpotencyと増殖してきたウイルスの薬剤耐性変異、非ウイルス学的には服薬アドヒアランスと毒性/不耐用の4つの因子が重要な役割を果たしていると考えられた。これらの中ではHAARTのpotencyの問題は各症例のウイルスプール(proviral pool, viral burden)に対して相対的なもののため、これまで必ずしも評価が十分でなかった。それぞれの症例における感染細胞のプールや、HAARTがその症例に対してpotentであるかどうかの指標、またresidual replicationの指標として高感度のプロウイルスDNAの定量系を確立した。これらの指標をもちいて、サルベージ/強化療法のプログラムを作成しプロスペクティブな研究を開始する予定である。

A. 研究目的

強力な抗ウイルス剤の多剤併用療法(hightly active anti-retroviral therapy; HAART)の導入により長期間に亘り、ウイルスの増殖抑制が可能な症例が増加したが、治療経過中に様々な理由でHAARTの有効性が不十分な症例が見られる。これらの症例に対しては増殖してきたウイルスの耐性プロフィールを参考としてサルベージ療法として交叉耐性のない新薬を軸とした組み合わせが選択されて一定の成果をあげてきたが、経過が長期になるにつれて有効性が低下し、治療が行き詰っている症例も稀ではない。今回我々はサルベージ療法が必要であった症例を検討し、治療不十分となる理由が大きくわけて4つの要因によることを特定し、その分析にもとづいてサルベージ治療を行い、一定の成果を得た。また分析の中からそれぞれの症例における感染細胞のプールやHAARTがその症例に対してpotentであるかどうかの指標、またresidual replication 指標として高感度のプロウイルスDNA

の定量系の確立を目的として研究を進めた。

B. 研究方法

約50例のHIV感染症例の臨床経過を検討し、治療薬変更が必要となってくる要因について調べた。プロウイルスDNA(proviral DNA; pDNA)の定量；末梢血単核球を分離精製しDNAを抽出した後、LTR領域に設定したprimerを用いて1st PCRを行う。得られた増幅産物をtemplateにして2nd PCRをReal time PCR法を用いて行った。我々の確立したこの新しいプロウイルス定量系を用いて、上記感染症例のプロウイルス量を測定し、臨床経過やHIV RNA量、CD4数、CD8数などの相関を検討した。

C. 研究結果

サルベージ療法を必要とした数例の症例を検討をすると、ウイルス学的な治療失敗にはHAARTのpotencyと増殖してきたウイルスの薬剤耐性変

異、非ウイルス学的には服薬アドヒアランスと毒性/不耐用の4つの因子が重要な役割を果たしていると考えられた。これらの中ではHAARTのpotencyの問題は各症例のウイルスプール(proviral pool, viral burden)に対して相対的なもののため、これまで必ずしも評価が十分でなかったことが明らかとなった。HIV RNA量の無治療時の値(セットポイント)は一応の指標になるものの、HAART下にどの位ウイルスプールを減少させているかについての指標が不足していると考えられ、プロウイルスDNA(pDNA)の測定系を作製した。LTRにプライマーを設定し、1回PCRを行い、増幅産物を鋳型に、2nd PCRを前述したReal time PCR法を用いて行った。測定感度は、3コピー/106 PBMCであった。約50症例のpDNAを測定し、HIV RNA量、CD4数、CD8数との相関を検討したところ、CD8実数とpDNAとの間に、正の相関が見られた。しかし、症例ごとに見ると、HIV RNA量が測定感度以下(<50コピー/ml)にもかかわらず、pDNAが高かったり、逆にpDNAが低いのにHIV RNA量が多い症例も見られた。このような症例の説明のためには、CTLの関与や液性免疫および耐性ウイルスの出現の検討などが、今後必要であると考えられる。さらにこのpDNA測定系をふまえ、サルベージ/強化療法の手順(案)を作成した。この案はこれまでの敗戦処理的な後手にまわったサルベージ療法ではなく、よりpotentで完全なウイルスの増殖抑制を目指すために計画であり、研究の趣旨に同意していただける主治医と患者さんの協力を得て、現在のHAARTをこれからどのように考えていくべきかの提言を各症例ごとに行うものである。

D. 考察

今回の検討でHAARTの失敗の要因がおおまかに4つに分数できることが明らかとなり、各症例について、検討を加えていくときにわかりやすくなった。しかし多くの症例ではこれらが複雑に組み合わされているため、解析が困難な症例も存在する。従来のサルベージ療法のガイドラインは選択肢が増えた一方、非常にわかりにくく、一般論としてのガイドラインは成立しないことが明らかである。理論的には交叉耐性のない新しい組み合わせを用いても失敗する例がみられ、多くの場合はpotencyに対する評価が不足していたためと考えられる。今回の我々の提案はここをクリアーし、従来の治療失敗の基準に入らない例についてもより

効果的な治療を提言することにより治療失敗を防ぐ目的をもっている。pDNAの高感度で安定した測定系の確立のために時間がかかり、本年度はフローチャートによるサルベージ/強化療法のプロプログラムを開始するに至っていない。各症例や主治医への説明と同意書及び提言をまとめる手順について最終的な打ちあわせを岡班長と行い、協力症例をあつめる予定である。

また、本研究で開発した系で測定するpDNAは増殖可能なウイルスの非組込み型を同時に測定しているだけでなく、増殖可能でない欠陥ウイルスのDNAも加わっている。これらの比率は症例によってどう異なるかの研究がさらに必要である。

E. 結論

本研究はHAART下における病態を考える上で情報が不十分であった感染細胞/プロウイルスDNAの量を測定し、HAARTのpotencyやresidual replicationの指標としてプロスペクティブスタディをめざしたものである。pDNAについては海外ではD.HoやL. Perrinらの研究が散見されるが、このような形の研究はなく、本研究から様々な示唆が得られるものと思われる。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

①論文発表

- 1 Y. Maeda, Foda M., S. Matsushita, S. Harada: Involvement of both V2 and V3 region of CCR5-tropic human immunodeficiency virus type-1 envelope for reduced sensitivity to macrophage inflammatory protein 1 α . *J. Virol.*74(4), 1787-1793. (2000)
- 2 S. Matsushita: Current status and future issues in the treatment of HIV infection. *Int. J. Hematol.* 20-27, 2000
- 3 Tugarinov V, Zvi A, Levy R, Hayek Y, Matsushita S, Anglister J: NMR structure of an anti gp-120 antibody complex with a V3-peptide reveals a surface important for co-receptor binding. *Structure* 8, 385-395, 2000.
- 4 Murakami T, Nakajima N, Nakamura T, Hara A, Uyama E, Mita S, Matsushita S, Uchino M: Parkinsonian symptoms as an initial manifestation in a Japanese patient with acquired immunodeficiency syndrome and toxoplasma infection. *Internal Medicine* 39, 1111-1114, 2000.

- 5 Ikegawa M, Matsumoto K, Herrmann S, Iwamoto A, Nakamura T, Matsushita S, Nakamura T, Honjo T, Tashiro K: Elevated plasma SDF-1 protein level in the progression of HIV-1 infection/AIDS. AIDS Res.Hum.Retrov. (in press)

②学会発表

- 1 Tetsuya Kimura, Shuzo Matsushita, et al: Autologous isolate neutralizing antibodies in plasma from HIV-1 infected patients on highly active antiretroviral therapy. XIII International AIDS Con-

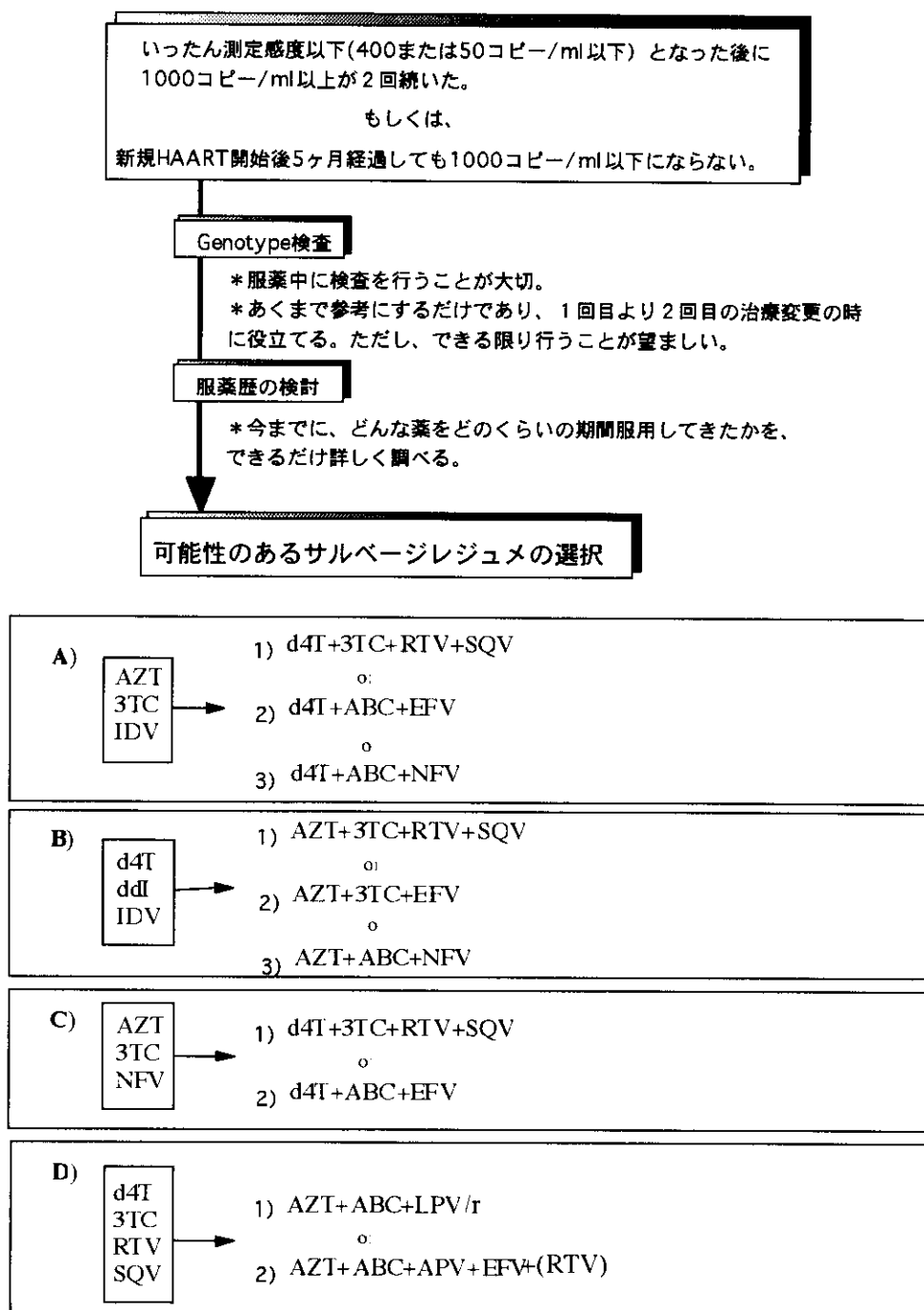
ference. 2000.7.9-14, Durban, South Africa.

- 2 小糸厚、重兼弘法、松下修三: マウス細胞における HIV-1 増殖抑制機構の解析. 第48回日本ウイルス学会学術集会.1999.10.12-14.
3 木村哲也、吉村和久、前田洋助、小糸厚、松下修三: HAART 療法前後の抗 HIV-1 中和抗体. 第14回日本エイズ学会総会.1999.11.28-30.

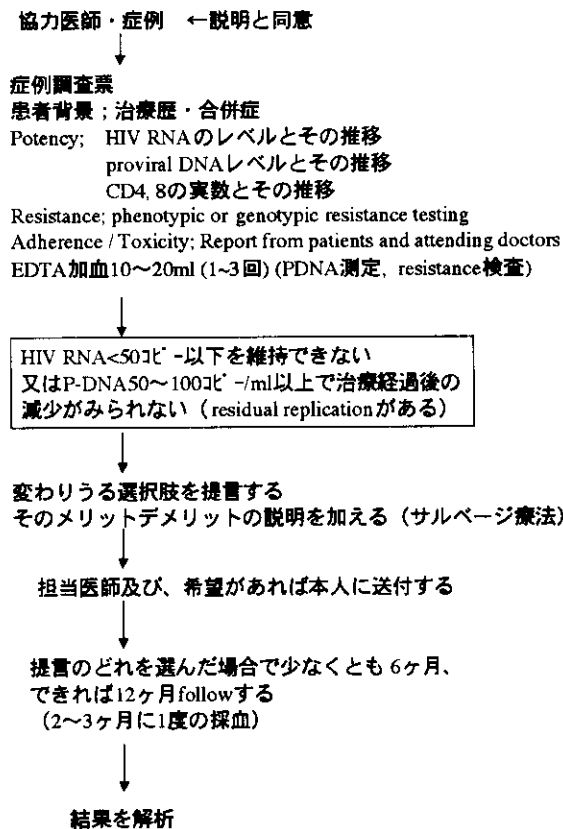
H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

きちんと100~90%薬が飲んでいる（飲み忘れが月に2回以下）場合。



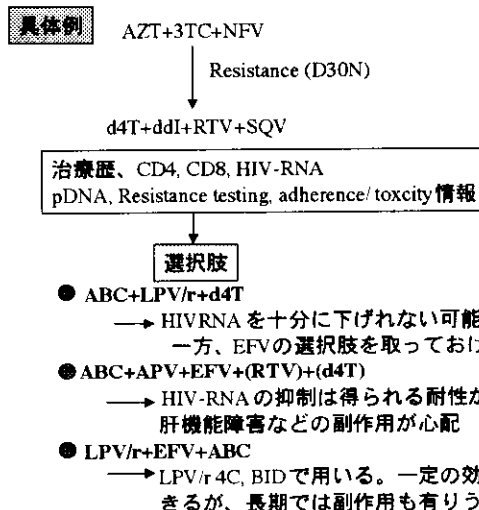
サルベージ／強化療法選択のための手順



現在治療失敗の基準に入っても治療不十分かどうかの判定が必要。その上で同じ治療を継続する選択肢も含めた提言を行う

治療失敗 ← サルベージ療法
 治療不十分 ← 強化療法
 (D. Ho ; 現行の3剤療法は不十分、LPV/r+TFV+3TC+EFV)

1. 3NRTI
2. 2NRTI+PI
3. 2NRTI+2PI
4. 2NRTI+NNRTI
5. 2NRTI+(1~2)PI+NNRTI
6. MDRT など



pDNA 測定結果

| ID | day | pg/ug | cell数/ug | pDNA(c/10 ⁶ PBMC) |
|-------|----------|--------|----------|------------------------------|
| KNAGA | 1/19/01 | 1421.6 | 173713 | 1879 |
| MMO | 12/22/00 | 1327.4 | 298802 | 1017 |
| mKNA | 12/22/00 | 1307 | 377855 | 791 |
| MOK | 10/6/00 | 1043.1 | 329355 | 727 |
| MFU | 1/19/01 | 226.1 | 123611 | 419 |
| YIS | 1/5/01 | 549 | 382694 | 332 |
| YKI | 12/15/00 | 377.3 | 269141 | 321 |
| YIS | 10/13/00 | 402 | 301136 | 308 |
| KKGO | 9/28/00 | 505 | 465608 | 249 |
| KKGO | 9/18/00 | 513 | 483400 | 244 |
| YFU | 2/4/00 | 150 | 149256 | 230 |
| MOK | 1/10/01 | 496.9 | 509066 | 225 |
| KNAGA | 8/4/00 | 176.4 | 185170 | 214 |
| NSI | 10/13/00 | 299.4 | 328476 | 209 |
| MOKW | 9/6/00 | 175 | 216360 | 186 |
| KKGO | 11/10/00 | 192 | 260673 | 169 |
| KNI | 10/13/00 | 196.1 | 271025 | 167 |
| KSU | 1/26/01 | 74.6 | 112122 | 153 |
| KoYA | 11/24/00 | 207.3 | 330553 | 144 |
| KSU | 1/12/01 | 137.5 | 241346 | 132 |
| NSI | 1/12/01 | 305 | 541356 | 130 |
| MOKW | 1/10/01 | 295.4 | 532727 | 128 |
| YSA | 1/26/01 | 57.1 | 111831 | 117 |
| AMI | 12/25/98 | 85.4 | 172446 | 116 |
| YKA | 12/8/00 | 169.3 | 347622 | 111 |
| TNA | 12/15/00 | 166.9 | 345952 | 110 |
| YTA | 10/13/00 | 112.8 | 277399 | 93 |
| SYO | 11/10/00 | 133.3 | 336230 | 91 |
| KKGO | 1/5/01 | 101 | 369843 | 90 |
| MIS | 1/26/01 | 43.5 | 150414 | 67 |
| YTA | 1/5/01 | 111.5 | 387437 | 66 |
| ASA | 11/10/00 | 86.3 | 322722 | 62 |
| TaNI | 12/1/00 | 82.9 | 343192 | 56 |
| TTU | 11/24/00 | 64 | 314366 | 47 |
| YUS | 11/10/00 | 50.5 | 261413 | 45 |
| MIK | 10/27/00 | 57.9 | 294774 | 44 |
| MNI | 11/24/00 | 53.3 | 302777 | 41 |
| MAI | 10/6/00 | 47.63 | 296697 | 37 |
| TNI | 7/21/00 | 44.9 | 353494 | 30 |
| YTA | 6/26/98 | 12.8 | 108643 | 27 |
| HAK | 10/13/00 | 29.5 | 321153 | 21 |
| MHI | 11/24/00 | 30.1 | 338735 | 20 |
| YFU | 2/2/01 | 8.7 | 113962 | 18 |
| oSTA | 12/15/00 | 25.5 | 411070 | 14 |
| YAK | 11/24/00 | 101.3 | - | 14 |
| AMI | 8/5/00 | 11 | 186352 | 13 |
| JIN | 12/1/00 | 13.2 | 292474 | 10 |
| HTU | 2/2/01 | 6.46 | 155918 | 9.5 |
| KYO | 12/18/98 | 8.02 | 126397 | 8.2 |
| YFU | 8/5/00 | 13.9 | - | 2 |
| KFU | 11/17/00 | 10.95 | - | 2 |
| KYO | 12/8/00 | 1.87 | 273648 | 1.6 |
| HTU | 11/17/00 | 0.92 | 252590 | 0.8 |
| TSU | 2/2/01 | 0.42 | 158932 | 0.6 |
| TUE | 12/15/00 | 0.03 | 358667 | 0.02 |
| KOK | 12/15/00 | 0.01 | 313783 | 0.01 |
| KYO | 8/5/00 | 0 | 183769 | 0 |
| KOK | 11/17/00 | 0 | 243363 | 0 |
| TIW | 10/06/00 | 0 | 222162 | 0 |

Adherence

| <u>Adherence</u> | <u>Virologic failure</u> |
|------------------|--------------------------|
| ≥95% | 22% |
| 80 - 95% | 61% |
| <80% | 80% |

Peterson, Ann Intern Med, 2000

Antiretroviral Treatment "Failure"

| | First | Second-third | Many |
|---------|------------------|----------------|---------------------------|
| Options | Many | Some | Few |
| Goals | RNA | RNA/CD4 | CD4 |
| Action | Modify or Switch | Wait or Switch | Wait, interrupt or switch |

Virologic failure

Q: How low must HIV RNA levels be maintained to sustain viral suppression?

A. Below the level of detection
 B. As low as is needed to maintain suppression

Q: How low is "low"?

A. <50c/ml?
 B. <200c/ml?
 C. <400c/ml?

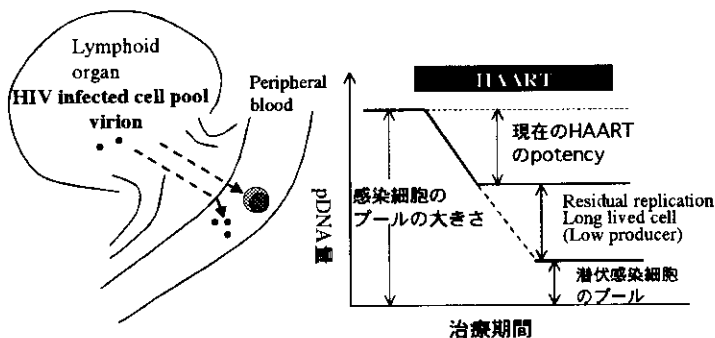
Wait or Switch?

| | <u>Wait</u> | <u>Switch</u> |
|--------------------------|-------------|---------------|
| Clinical scenario | | |
| Low CD4 | | X |
| High CD4/no regimen | X | |
| Mod CD4/maybe regimen | | guess |

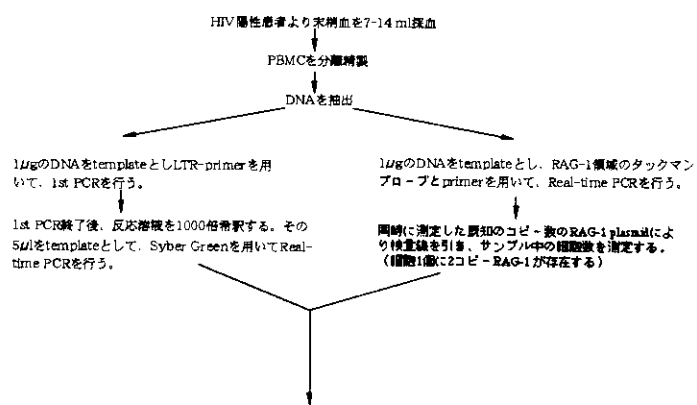
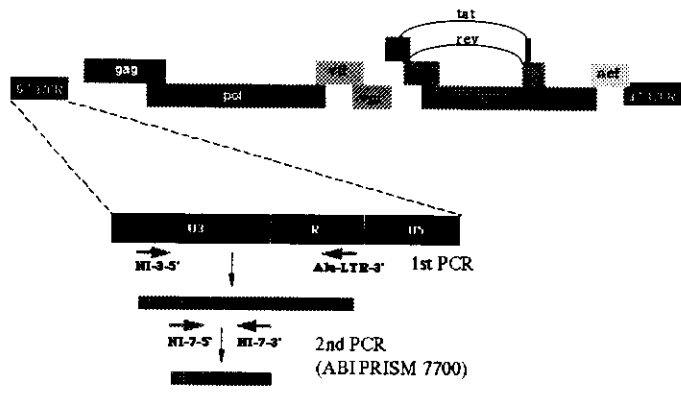
Treatment Failure: Opportunities

- * Strategies: STI
- * Combinations: Triple PI, Dual NNRTI
- * Exploit drug "Hypersusceptibility"
- * Exploit drug "fitness"
- * Intergrated resistance and PK approach
- * Elucidation of mechanisms of failure

Proviral DNAの定量の意義 (仮説)



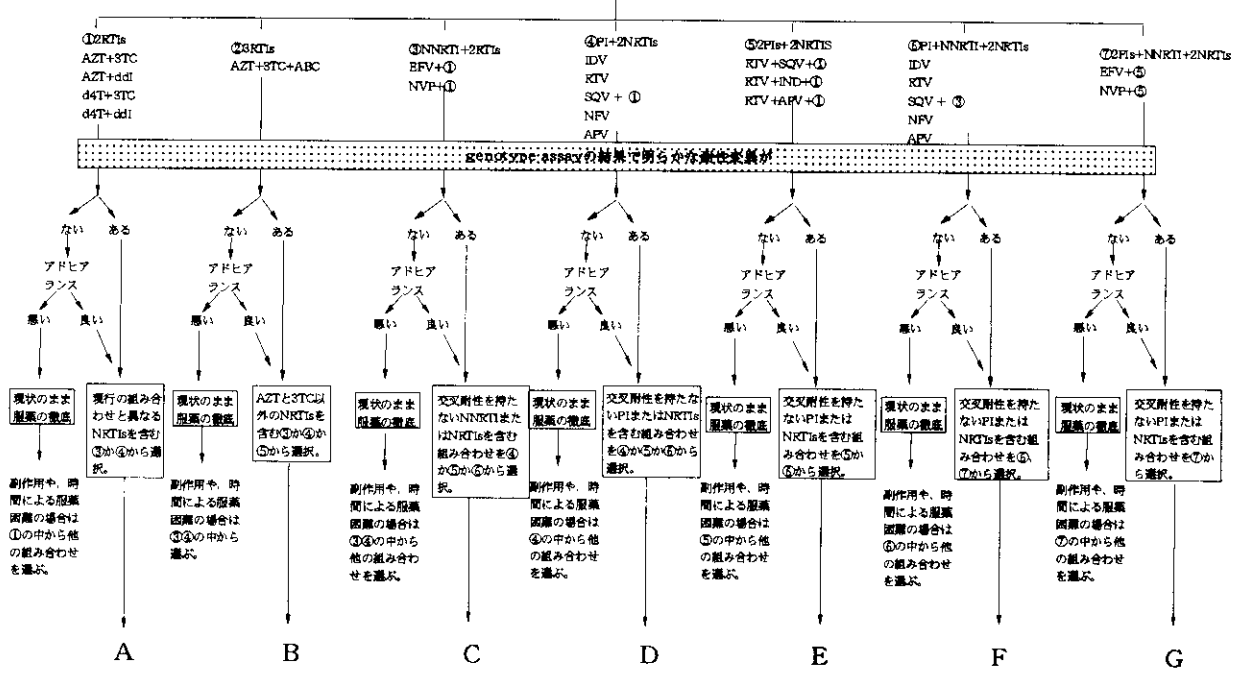
HIV-RNA: viral replication
 (viral production from major compartment)
 Proviral DNA: size of HIV infection cell pool
 or residual replication



測定した1μg中のLTRコピー数を、複製数を除いて、PBMC 10⁶個当たりのproviralコピー数を算出する。

薬剤変更フローチャート

- 1) VLが5000 (or 10000) copies/ml以上になった。
- 2) 2回 (or 3回) 続けて前回検査のVL値を上回った。
- 3) その他

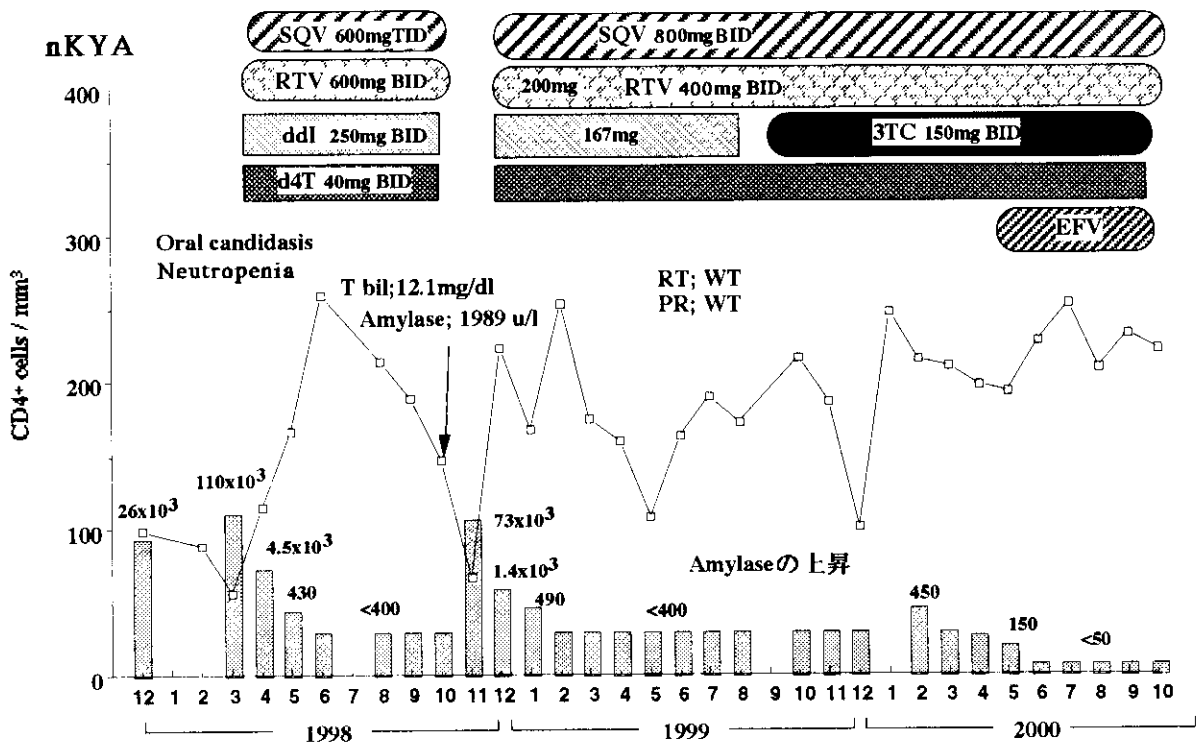
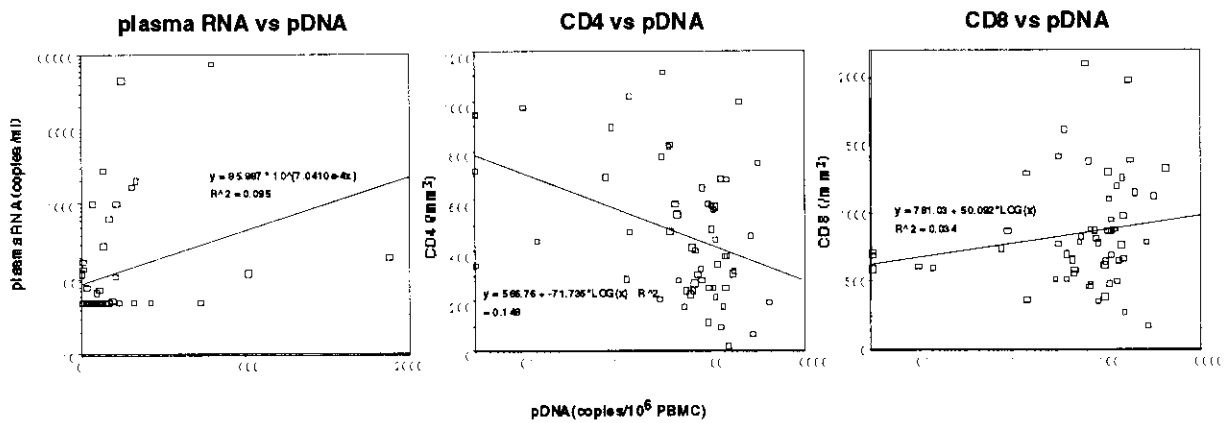


Virologic failure

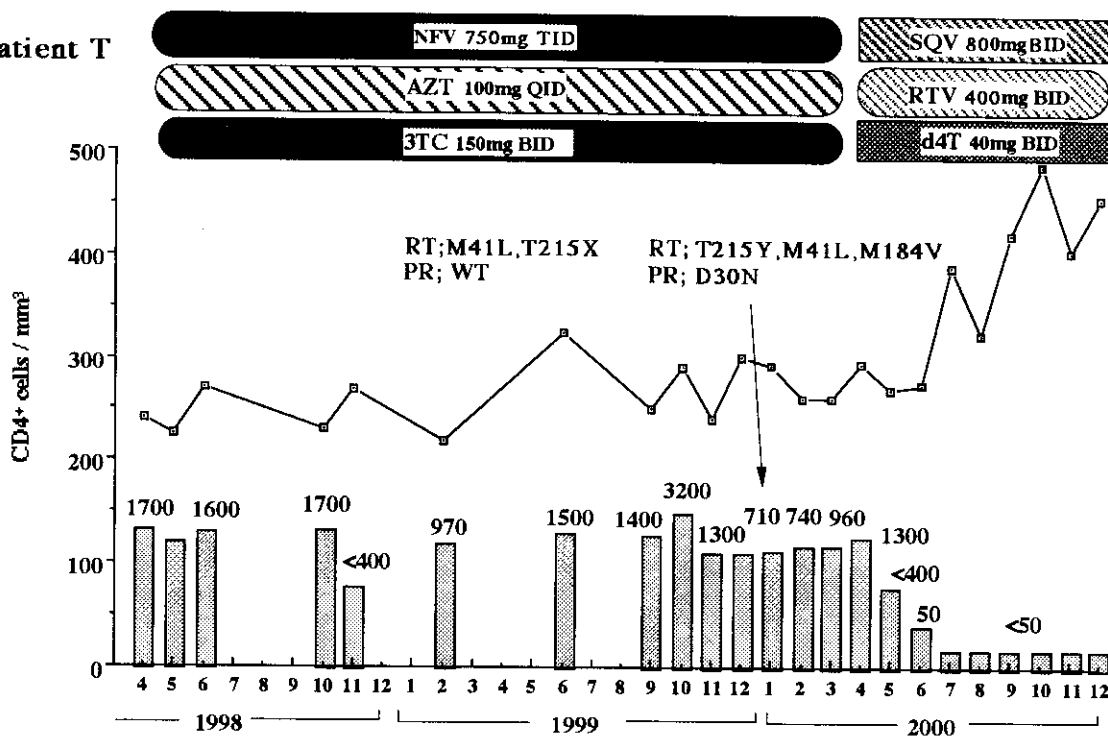
- 1) HAART開始後のHIV-RNAのレベル
4~8 weekで1/10以下にならない
4~6 monthで400(50)コピー/ml以下にならない
- 2) 一旦検出感度以下となったHIV-RNAの再上昇
2回以上検出できた場合
最低値の3X以上の上昇
- 3) CD4陽性細胞数の減少(2回以上)、臨床症状の悪化

Therapeutic failure

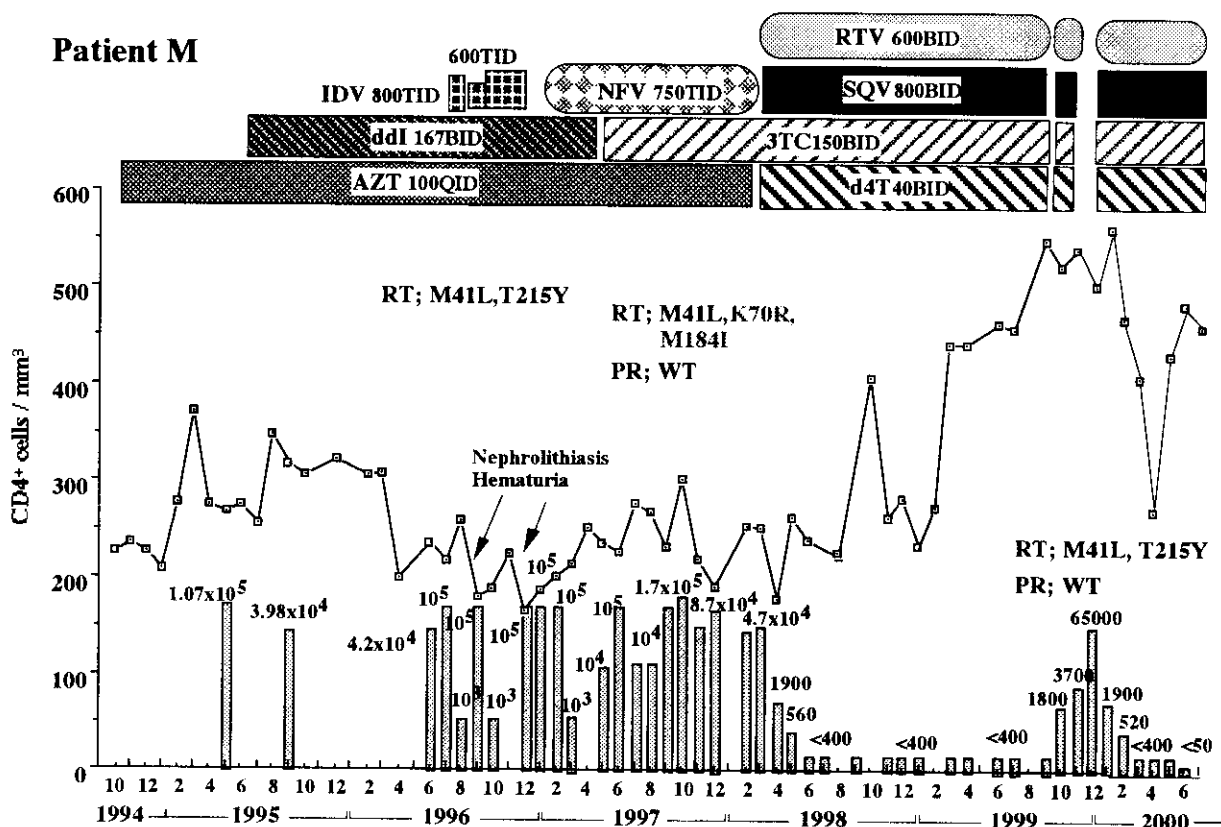
1. Virologic failure; Resistance
Low potency
2. Non-virologic failure; Poor adherence
Intolerance/ toxicity
(LDS etc)

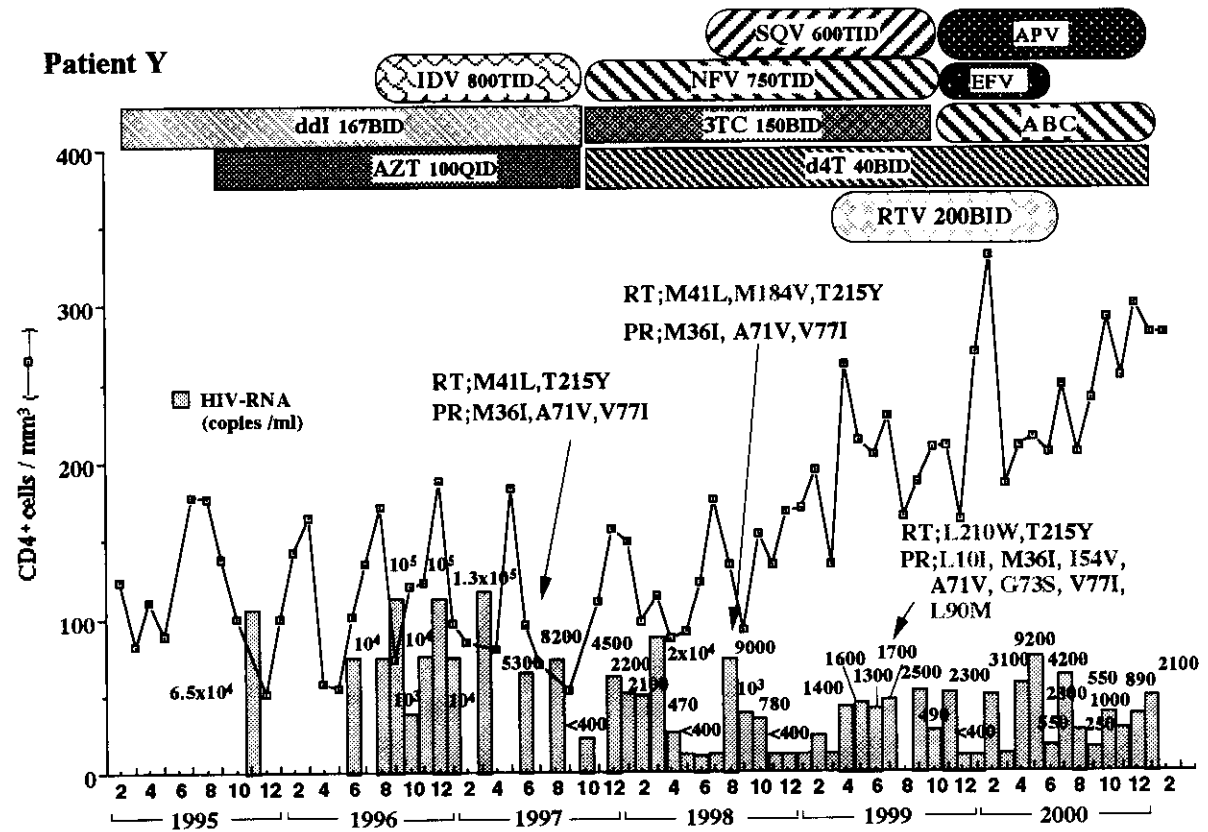
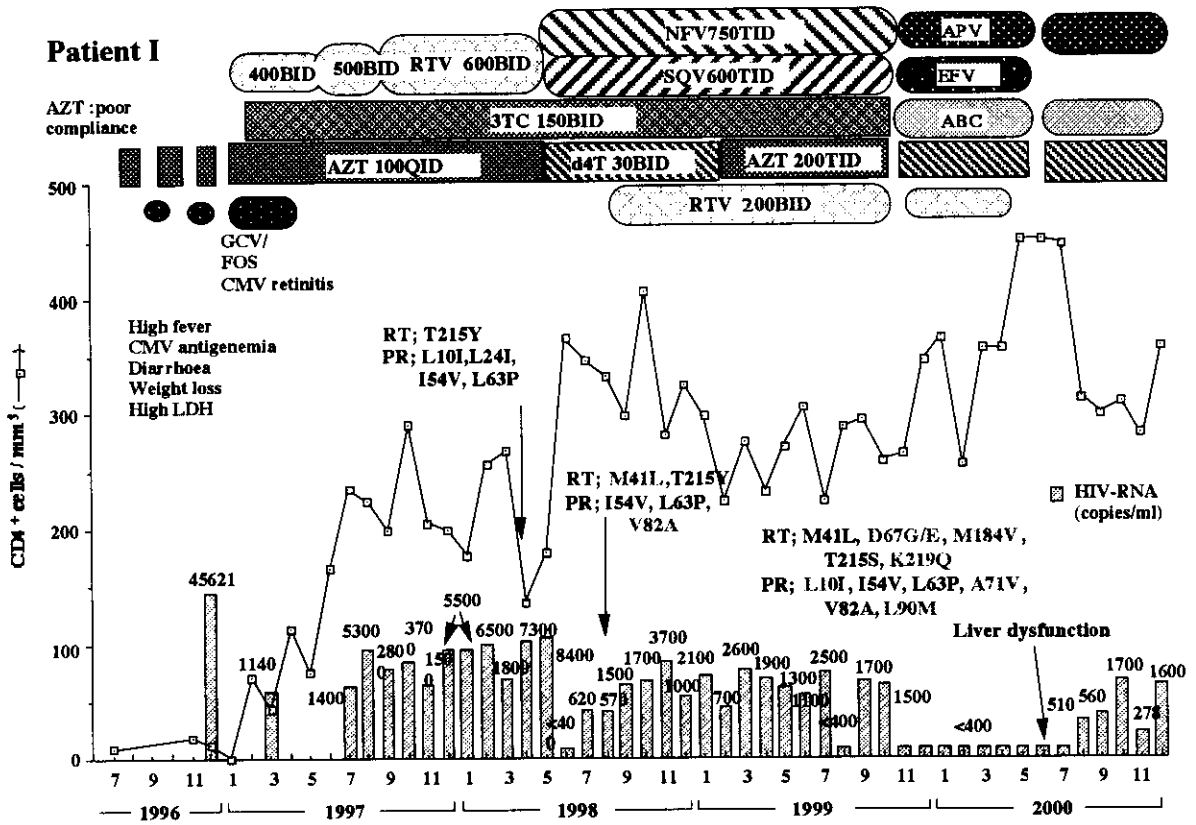


Patient T

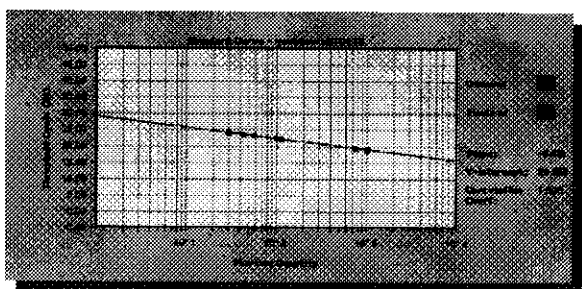
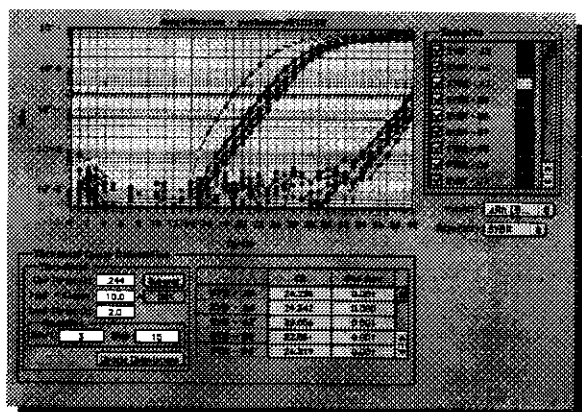


Patient M

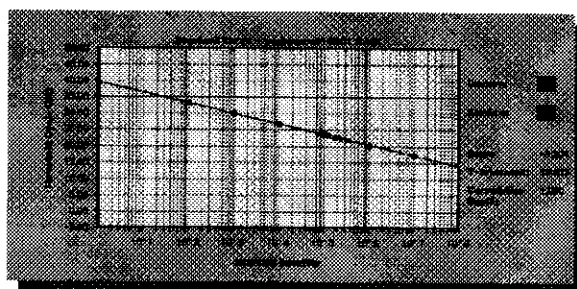
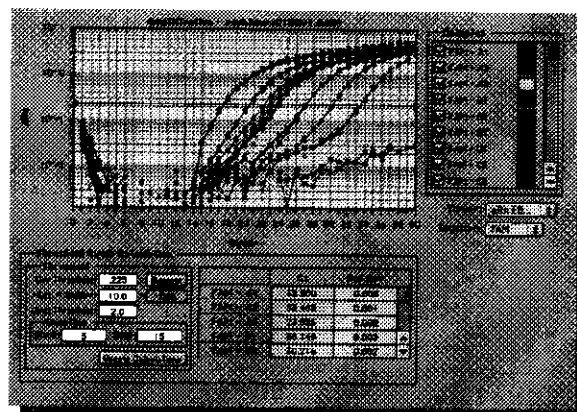




pDNA 測定



細胞数測定



まとめ

- 我々はサルベージ療法が必要であった症例を検討し、治療不十分となる理由が大きくわけてlow potency, resistance, poor adherence, intolerance / toxicityの4つの要因によることを特定し、その分析にもとづいてサルベージ治療を行い、一定の成果を得た。
- それぞれの症例における感染細胞のプールの大きさや、HAARTがその症例に対してpotentであるかどうか、またvesidual replicationの指標として、高感度のプロウイルスDNA (pDNA) の定量系を確立した。
- このpDNA測定系の結果をふまえ、サルベージ/強化療法の手順(案)を作成した。この案は、従来のものよりpotentで完全なウイルスの増殖抑制を目指すため、研究の趣旨に同意していただける主治医と患者さんの協力を得て、HAARTをこれからどのように考えていくべきかの提言を各症例ごとに行う予定である。

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

分担研究者：衆原 健(国立大阪病院 薬剤部)

研究協力者：高田寛治¹、白阪琢磨²、上平朝子²、吉野宗広³、西野 隆⁴、平林義弘⁵、土屋亮人⁵、寺門浩之⁶、鈴木 晃⁷、味澤 篤⁸、今村顕史⁸、山元泰之⁹、中村哲也¹⁰(¹京都薬科大学薬物動態学教室、²国立大阪病院 総合内科、³国立大阪病院 薬剤部、⁴国立九州医療センター 薬剤部、⁵国立国際医療センター エイズ治療研究開発センター、⁶国立国際医療センター薬剤部、⁷国立名古屋病院 薬剤部、⁸都立駒込病院 感染症内科、⁹東京医科大学病院 臨床病理科、¹⁰東京大学医科学研究所 感染免疫内科)

研究要旨

本研究班はプロテアーゼ阻害剤の2剤併用療法を中心に薬物動態を検討し、日本人HIV感染症患者における、抗HIV薬の血中濃度の推移について確認することで、血中濃度測定のポイントを明らかにし、治療効果に反映することを目的とする。まず第一に、抗HIV薬の血中濃度を測定する際の採血ポイント、採血時間、調査項目等を検討しプロトコルの作成を行った。対象患者数の少ない状況の中で、国内多施設共同で行う臨床試験のプロトコルが作成できたこと、並びに、全国規模での調査が可能となる体制を整備できたことは、データの収集体制として満足できるものと思われる。また、全国の各医療機関からデータを収集するために、ホームページを立ち上げ、血中濃度測定のための検査体制の整備を行った。臨床から血中濃度測定への容易なアクセス方法を実現したことで、薬物治療に必要な患者情報が増え、より質の高い薬物療法が提供可能となり、研究班でそのデータを収集することが可能となった。

A. 研究目的

抗HIV薬の中でも、プロテアーゼ阻害剤(PI)、非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤(NNRTI)はHIV感染症に対する治療薬として近年広く使われ、めざましい予後の改善をもたらした薬剤である。最近、プロテアーゼ阻害剤は2剤を用いた、いわゆるダブルプロテアーゼ阻害剤の治療が行われている。この治療法の臨床成績や薬の体内での動きは、主に海外から報告されたもので、日本人でのデータが少ないことが問題になっている。また、最近承認されたNNRTIは厚生省の迅速審査の関係か

ら、日本人での薬物動態に関する情報は少ない。本研究ではこれらを含む抗HIV薬の新しい投与方法について薬物動態を検討し、日本人HIV感染症患者における、抗HIV薬の血中濃度の推移について確認することで、血中濃度測定ポイントを明らかにし、治療効果に反映することを目的とする。さらに、各薬剤の血中濃度を測定する方法にも検討を加え、測定系の確立を目指すこととする。本研究班では基本的にPIを対象とするが、可能な限りNNRTIについても検討することとする。

B. 研究方法

1. 抗HIV薬の血中濃度（2剤併用療法を含む）を測定する際の採血ポイント、採血時間、調査項目等を検討しプロトコルの作成を行う。なお、本プロトコルの実施にあたっては、試験参加各施設で承認を得ることとした。また、臨床試験に参加する患者に対しては説明文書を用いて十分な説明を行い、同意を得た上で実施することとした。

2. 全国でのデータを集積するために、ホームページを立ち上げ、血中濃度測定のための検査体制の整備を行う。なお、治療の一環として血中濃度を測定した結果等、個人のプライバシーには十分注意を払うと共に、データの一部が医学論文などに公表されることがあるが、氏名、住所等の個人情報公表されることのない旨口頭で患者に伝え、了承の得られなかった場合は、報告様式にその旨記載し、研究班ではデータの使用を行わないこととした。同意の取得についてはカルテに記載することとした。

3. すでに測定されている各施設のデータを収集・解析する。

4. 測定系の確立のため調査を行う。

C. 研究結果

1. 抗HIV薬の血中濃度測定に関する臨床研究実施計画書

別添1のとおり実施計画書を作成した。

平成13年度中に各施設での承認を得て、測定を開始する予定である。

2. ホームページの立ち上げと、血中濃度測定のための検査体制の整備。

別添2のとおりホームページ並びに運用方法、結果報告様式等を作成した。

3. 本研究班で収集した薬物血中濃度関係のデータについては別添3のとおり。

D. 考察

対象患者数の少ない状況の中で、国内多施設共同で行う臨床試験のプロトコルが作成できたこと、並びに、全国規模での調査が可能となる体制を整備できたことは、データの収集体制として満足できるものと思われる。また、臨床から血中濃度測定への容易なアクセス方法を実現したことで、薬物治療に必要な患者情報が増え、より質の高い薬物療法が提供可能となり、研究班でそのデータを

収集することが可能となった。

NFVの薬物血中濃度について、日本人は欧米人に比べ高い傾向にあったことが、日本での臨床成績にどの様に影響するかについて、今後の臨床経過を観察したい。また、PM群の臨床経過にも注目すべきであろう。RTV/SQV併用療法においても日本人の血中濃度は高く推移している。今後多くの症例を収集し、臨床経過と共に評価・解析する必要がある。EFVに発現する精神神経系の副作用は、血中濃度に影響されているとの結果が得られた。血中濃度が高いために、投与方法を変更した症例や投与量を変更した症例について、データを収集し、その対応策について検討する必要がある。

E. 結論

今年度作成したプロトコルをもとに臨床データを収集し、日本人における薬物動態を検討し、臨床へのフィードバックを行うこととする。また、来年度には、薬物血中濃度を臨床応用するための情報提供を目的にセミナーの開催を検討したい。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

①論文発表

・ 桑原健：薬物動態と抗HIV療法。治療学，印刷中。

②学会発表

・ 桑原健，他。東京：第13回日本エイズ学会総会；12月，1999。抄録番号195。

・ 桑原健。京都：第14回日本エイズ学会総会；11月，2000。抄録番号W6-1B。

・ 桑原健。京都：第10回日本病院薬学会；10月，2000。抄録番号。

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

(別添1) 抗HIV薬の血中濃度測定に関する
臨床研究実施計画書(案)

1. 目的及び期待される成果

抗HIV薬の中でも、プロテアーゼ阻害剤(PI)、非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤(NNRTI)はHIV感染症に対する治療薬として近年広く使われ、めざましい予後の改善をもたらした薬剤である。最近、プロテアーゼ阻害剤は2剤を用いた、いわゆるダブルプロテアーゼ阻害剤の治療が行われている。この治療法の臨床成績や薬の体内での動きは、主に海外から報告されたもので、日本人でのデータが少ないことが問題になっている。また、最近承認されたNNRTIは厚生省の迅速審査の関係から、日本人での薬物動態に関する情報は少ない。本研究ではこれらを含む抗HIV薬の新しい投与方法について、主に投薬前の最低血中濃度と投薬後の最高血中濃度の薬物動態を中心に調査し、研究することを目的とする。

2. 検討対象薬と1回投与量

A群：NNRTIの併用を行わず下記PIを投与中の患者

- ①リトナビル 400mg (RTV) + サキナビル-ハードカプセル 400mg (SQV-HG)
- ②リトナビル 400mg (RTV) + サキナビル-ソフトカプセル 400mg (SQV-SG)
- ③リトナビル 400mg (RTV) + インジナビル 400mg (IDV)
- ④ネルフィナビル 1250mg (NFV) 1日2回投与処方
- ⑤ネルフィナビル 1250mg (NFV) + リトナビル 100mg (RTV)
- ⑥カレトラ 3Cap (ロピナビル 300mg (LPV) + リトナビル 100mg (RTV))

B群：PIの併用を行わず下記NNRTIを投与中の患者

- ①エファビレンツ 600mg (EFV)
- ②ネビラピン 200mg (NVP)

C群：PIにNNRTIを併用している患者

3. 患者選択基準

- ①年齢：20歳以上
- ②性別：不問
- ③入院または外来患者
- ④RTVを含む組み合わせの場合は服薬開始後、2ヶ月以上経過している患者。
その他の薬剤は服薬開始後、2週間以上経過している患者とするが、血中濃度測定時に重大な副作用の発現していないことを確認すること。
- ⑤CD4、HIV-RNA コピー数は問わない
- ⑥採血日前1週間の服薬率が100%と見込まれる患者

4. 除外基準：

- ① PI、NNRTI 以外に、採血日から2週間前までに薬物血中濃度に影響する薬物（別表）を併用していた者
- ② 著明な吸収障害、嘔気・嘔吐を伴う者
- ③ 妊婦、授乳中の女性
- ④ 重度の肝機能障害を有する者、若しくは血中総ビリルビン値が 2.5mg/dl 以上、若しくは AST/ALT/ALP のいずれかが正常範囲の上限値の 5 倍以上の者
- ⑤ 重度の腎機能障害を有する者、若しくは血中クレアチニン値が正常範囲の上限値の 2 倍以上、若しくは BUN が正常範囲の上限の 3 倍以上の者

5. 目標症例数

各薬剤群 6 例（平成 13 年 4 月 1 日～平成 14 年 3 月 31 日）

6. 方法

① 患者への説明

説明文書を渡し、本研究についての参加同意を文書で得る（別紙）。

② 投与方法

ア. 投与間隔を 12 時間とし、原則として食後服用とする組み合わせ

リトナビル 400mg (RTV) + サキナビル-ハードカプセル 400mg (SQV-HG)

リトナビル 400mg (RTV) + サキナビル-ソフトカプセル 400mg (SQV-SG)

リトナビル 400mg (RTV) + インジナビル 400mg (IDV)

ネルフィナビル 1250mg (NFV) 1 日 2 回投与処方

ネルフィナビル 1250mg (NFV) 1 日 2 回 + リトナビル 100mg (RTV)

ロピナビル 3Cap (LPV)

ネビラピン 200mg (NVP)

イ. 投与間隔を 24 時間とする組み合わせ

エファビレンツ 600mg (EFV)

ウ. 組み合わせる薬剤の投与方法に準じて適宜変更

PI + NNRTI 併用（例：APV + RTV、NVP）

③ 採血

採血量は 1 薬剤あたり全血 1 回 3ml。

採血点は原則として、服薬直前、1、2、4、6、(12) 時間後（2 回目の服薬直前値）とする。EFV は服薬直前、1、(4)、(6)、12、(24) 時間とする。なお、() 内の時間については可能な限り採血することとする。

④ 患者背景の把握

A. 患者ケースカードへの記載

採血を施行した時点での患者に関する情報を、できる限り詳細に把握するよう、患者ケースカードに記載する。患者番号は各施設名の後に対象薬剤と連番を記入する。

なお、臨床検査結果については各施設での検査報告書を添付することも可能とする。

例：国立大阪 - RTV+SQVSC - 1

B.患者背景

イニシャル、年齢、性別、身長、体重、(外国人の場合は国籍)、
病態分類、感染経路、既往歴、合併症、現病歴

C.併用薬

採血日から2週間前までの期間に併用していた薬剤は、その名称、投与方法、投与量、
投与開始日、投与終了日、継続の有無を記載する。

D.自覚、他覚症状と理学的検査

自覚症状、体重、体温、Performance status、身体所見

E 臨床検査を行う際の注意

患者背景の解析のため臨床検査項目(患者ケースカードに記載)の検査を行う。
臨床検査項目のための血液検査については原則として、第一回目の血中濃度測定の採
血時に行うこととする。他のウイルス学的検査項目については、血中濃度測定日に最
も近い時点でのデータを記載する。

F.臨床検査及び血漿中薬物濃度測定

血液一般検査(赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、白血球数、白血球分画、血小板)

血液生化学検査(アルブミン、AST、ALT、ALP、LDH、総コレステロール、中性脂肪、

総ビリルビン、直接型ビリルビン、BUN、クレアチニン、Na、K、CL、血糖、CRP)

尿検査(尿糖、蛋白、潜血)

血中PI,NNRTI濃度測定(事務局で記入)

G.免疫学的パラメーター

CD4陽性細胞数、CD8陽性細胞数、CD4/CD8比

H.ウイルス学的パラメーター

HIV-RNAコピー数(PCR法により測定する)

I.服薬状況

採血前1週間の服薬状況について確認

J.患者記録用紙

服用時の食事の内容等を記録するために、患者自身が記入する記録用紙(別紙)
を配布し確認を行う

なお、入院患者の場合は可能な限り、服薬時摂取カロリー等を記入する。

⑤検体処理

ヘパリン入り採血管に採取。採血量は1薬剤あたり全血1回3ml。

遠心分離で(10℃以下、3000回転で10分間)した後、得られた血漿を分注(1.0ml以
上)し、-20℃以下の冷凍庫にて凍結保存する。

⑥測定方法及び測定施設

HPLCにて測定。(株)BML総合研究所(埼玉県川越市)に依頼する。

⑦検体回収:適宜、各地区のBML支店に連絡し、回収を依頼する。