

20010730

平成13年度 厚生科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

薬剤耐性のモニタリングに関する技術開発研究

研究報告書

班 長 杉 浦 亘

国立感染症研究所

エイズ研究センター

目次

I. 総括研究報告書

1. 薬剤耐性のモニタリングに関する技術開発研究 1
国立感染症研究所 エイズ研究センター 杉浦 亙

II. 分担報告書

2. 血漿中および細胞内薬剤濃度と治療効果の関連の検討 5
慶応大学医学部微生物学 加藤 真吾
3. 新しいプロテアーゼ阻害剤カレトラ®の血中濃度測定法の確立およびその動態 8
国立名古屋病院臨床研究部 金田 次弘
共同研究者 中井 正彦
共同研究者 宇佐 美好子
4. 抗 HIV 薬の薬効に係わるヒト遺伝子群の多型の解析に関する研究 12
東京大学医科学研究所先端医療研究センター 北村 義浩
5. 抗 HIV 薬の生体内濃度測定法の開発ならびに薬剤濃度と
臨床的有效性及び有害事象との相関性の解析 14
~プロテアーゼ阻害剤 6 剤とエファビレンツの血中濃度同時測定法の開発~
国立国際医療センターエイズ治療研究開発センター 平林 義弘
6. HAART の最適化に関する臨床研究 16
熊本大学エイズ学研究センター 松下 修三

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 21

I. 総括研究報告書

平成 13 年度厚生科学研究費補助金エイズ対策研究事業

総括研究報告書

「薬剤耐性のモニタリングに関する技術開発研究」

主任研究者 杉浦 亙

国立感染症研究所エイズ研究センター

研究概要

この研究班は薬剤耐性検査（遺伝子検査、感受性検査）、薬剤血中濃度測定、そして遺伝子診断を統合した治療モニタリングシステムを構築運用し、個々の患者に適切な治療プロトコルを提供することを目的とする。目的実現のために、治療薬剤血中濃度測定と薬剤耐性検査の評価の検討、細胞内薬剤濃度の測定技術の開発とその臨床的意義の検討、簡易薬剤濃度測定検査技術を開発とその有用性の評価、そして薬剤の有効性を修飾するヒト遺伝子多型の解析を実施した。本年度は薬剤耐性検査と血中濃度測定を合わせて評価することにより、サルヴェージ療法を成功に導くことができる可能性を示した。また細胞内薬剤濃度測定、宿主因子の解析に関しては若干の研究進展が見られ、次年度以降の発展が期待された。

分担研究者

加藤真吾 慶応大学医学部
微生物免疫学教室 助手
金田次弘 国立名古屋病院臨床検査部
研究員
北村義浩 東京大学医科学研究所
先端医療研究センター感染症分野
助教授
平林義弘 国立国際医療センター
エイズ治療研究開発センター
室長
松下修三 熊本大学エイズ学研究センター
病態制御分野
教授

検査技術を開発とその有用性の評価。(4) 薬剤の有効性を修飾するヒト遺伝子多型の解析。この4項を6名の班員で分担し、その研究成果を融合させシステムを完成させる。

B.研究方法

本年度は目的を遂行するのに必要な解析方法の確立を目指す。薬剤耐性検査法、血中濃度測定法に関してはすでに技術的に確立しており、臨床現場における運用とその意義に関して検討をする。簡易測定系に関しては、既存のプロトコルの簡略化と全く新しい検査技術開発の二本立てで研究を進める。細胞内薬剤濃度測定に関しては技術的可能性を *in vitro* でシミュレーションし検討をする。宿主因子の解析に関しては、倫理委員会への申請と健常人ボランティアの検体を用いた解析手法と条件設定を実施する。尚、各項の詳細に関しては分担研究報告書を参照のこと。

A.研究目的

多剤併用療法は 1995 年以来先進諸国の HIV-1 感染症の標準的な治療として定着しているが、治療の成功率は高くはなく、およそ 40% 近い患者が初回治療に失敗するとされている。治療の転帰に影響する因子としては服薬アドヒアランス、治療薬剤に対する耐性獲得などが挙げられる。この約半数近い初回治療脱落症例、そしてその後多剤耐性に陥っている症例を救済することは重要な課題である。この研究班では薬剤耐性検査（遺伝子検査、感受性検査）、薬剤血中濃度測定、そして遺伝子診断を統合した治療モニタリングシステムを構築運用し、個々の患者に適切な治療プロトコルを提供することを目的とする。

この目的を達成するために研究班では4つの課題を取り上げる。(1) 治療薬剤血中濃度測定と薬剤耐性検査の評価の検討。

(2) 細胞内薬剤濃度の測定技術の開発とその臨床的意義の検討。(3) 簡易薬剤濃度測定

C.研究結果

以下各項について担当研究者と平成 13 年度の成果を含めて記す。

(1) 治療薬剤血中濃度測定と薬剤耐性検査の評価の検討（松下修三、金田次弘）。

今日、薬剤耐性検査が治療の適否を判断する検査として用いられているが、現状では薬剤耐性検査はあくまでも変更薬剤選択の指標であり、検査結果から薬剤変更のタイミングを計ることは出来ない。これは耐性検査の臨床的閾値、すなわちどのような耐性変異が入れば薬剤を交換する必要があるのか、あるいは何倍耐性であれば薬剤は使用できないのかという基本的な情報がまだ不足していることによる。近年薬剤耐性検査の臨床的閾値を評価するために薬剤血中濃度を考慮した

inhibitory quotient(IQ)という概念が提唱されている。これは薬剤の C_{trough} 値を薬剤の EC_{50} (実際には *in vitro* での IC_{50} 値が代用される) で割った値である。IQ 値が高ければ高いほど薬剤の臨床的な効果は期待され、逆に 1 を下回ると薬剤の効果は限定され、薬剤耐性ウイルスの出現などを来す事となる。研究班では治療における血中濃度測定と IQ の有用性の検討を行った。

平成 13 年度はサルヴェージ療法が成功した症例において、ロピナビルの血中濃度とプロテアーゼ阻害剤耐性変異との関連を検討した。その結果 IQ 値が高い薬剤を選択することによりサルヴェージ療法を成功に導く可能性が示唆された。カレトラ服用後の血中ロピナビル濃度は 2-4 時間で C_{max} に到達するが (健康人でのデータ)、trough 値と服薬後 2 時間 (C_{max}) の濃度に大きな変動は無いことが明らかになった。同様の傾向はサキナビル+リトナビル併用療法におけるサキナビル血中濃度においても認められ、リトナビルを含むダブルプロテアーゼ療法では 1 点の血中濃度測定値で十分 IQ を判断できることが明らかになった。

(2) 細胞内薬剤濃度の測定技術の開発とその臨床的意義の検討 (加藤真吾)

抗 HIV-1 治療薬剤の主要な作用部位は感染宿主細胞内である。このことから有効薬剤濃度の決定にあたっては血中の濃度よりも、むしろ細胞内の濃度の方が治療の転機、副作用、あるいは薬剤耐性ウイルス誘導などの事象と明確な相関が認められる可能性が期待される。また薬剤の細胞内濃度の維持には細胞膜上の機能タンパク分子、細胞質内の代謝酵素などの宿主因子が絡んでくるため、(4) 項のヒト遺伝子多形解析とその評価にもこの研究は密接に関連してくる。

現在核酸系逆転写酵素阻害剤 AZT、d4T、プロテアーゼ阻害剤 nelfinavir を対象に測定法の開発を行っている。平成 13 年度は AZT、d4T に関してはリン酸が付与された化合物の合成、入手を行った。Nelfinavir に関しては *in vitro* で正常ヒト末梢血単核球を用いたシミュレーションを試みた。さらに、細胞内の薬剤濃度を評価するためにはヒト末梢血単核球を用いて有効薬剤濃度 (IC_{50} , IC_{90}) を正確に求める必要があり、その測定系の構築も行った。

(3) 簡易薬剤濃度測定検査技術の開発 (平林義弘、金田次弘)

抗 HIV-1 薬剤血中濃度の測定は前述のように薬剤耐性検査を評価する上で必要

な検査である。プロドラッグである核酸系逆転写酵素阻害剤以外の 2 剤、プロテアーゼ阻害剤、非核酸系逆転写酵素阻害剤が血中濃度測定の対象となるが、いずれも HPLC を用いた濃度測定が行われている。HPLC を用いた濃度測定方法は完成された手技であるが、問題点として測定条件が薬剤毎に異なっており統一されていないことが挙げられる。現在用いられているプロトコルでは薬剤毎個別に濃度測定を行う必要があり、病院の臨床検査室で実施するには負担が大きすぎる。このことから一括して薬剤濃度を測定することが出来れば血中濃度測定はより身近な検査となり日常の診療により活用されると期待される。平成 13 年度は 6 種類の PI とその代表的な活性代謝産物 2 種類、そして efavirenz の同一測定が可能な測定系の構築がなされた。

(4) 薬剤の有効性を修飾するヒト遺伝子多型の解析 (北村義浩、杉浦互)

薬剤の吸収代謝には種々の代謝酵素、膜タンパク分子が関与している。近年ヒトゲノム解析の進展に伴い、これらのたんぱく質をコードする遺伝子の特定部位に点変異が存在し (single nucleotide polymorphism: SNP)、特定の点変異と特定の薬剤の薬効が密接に関連していることが明らかになりつつある。研究班ではプロテアーゼ阻害剤の吸収、排泄に関与する ATP-binding cassette 遺伝子群を中心に SNP 解析を行い、血中あるいは細胞内薬剤濃度との関連を検討することを計画している。平成 13 年度は SNP 解析手法を確立した。

D. 考察

薬剤耐性検査と薬剤血中濃度測定法はすでに基本的な技術は完成しており、残された課題は検査の普及と活用である。これには検査手順の簡略化とコスト削減そして 2 つの検査を合わせて使用することが、適切な治療薬剤の選択に有効であることを実証していくことが必要であろう。細胞内薬物濃度に関しては今年度の研究結果からプロテアーゼ阻害剤濃度を測定することは可能と思われる。逆転写酵素阻害剤の濃度測定は次年度以降の課題である。宿主因子に関しては解析手技の確立を行なった。解析は塩基配列解析と snap shot による SNP 解析を組み合わせて行うこととした。宿主因子と治療の転帰との関与、そしてこのような遺伝子検査を実施する臨床的な意義に関しては次年度以降の課題である。

E. 結論

薬剤耐性検査と薬剤血中濃度測定が至適

治療の選択に有用であることが明らかになった。今後さらに2つの検査を組み合わせることで治療の評価を行い、検査の有用性の証拠を蓄積することが重要であろう。両検査に加えて宿主因子の解析は将来的に個々の患者の体質に合った薬剤選択を可能にすると期待される。

E. 研究発表

1. 論文発表

杉浦 互

HIVの薬剤耐性

BIO Clinica Vol.16(13) pp.47-51.2001

2. 守谷研二、杉浦 互

抗HIV薬剤耐性検査の方法と解釈

Modern Physician 2001

3. Earl PL; Sugiura W; Montefiori DC; Broder CC; Lee SA; Wild C; Lifson; J Moss B

Immunogenicity and protective efficacy of oligomeric human immunodeficiency virus type 1 gp 140

J Virol. Vol.75 :645-653. 2001

4. L Myint, Z Matsuda, Y Yokomaku, K Matsuo, T Iwasaki, K Yamada and W Sugiura

Contribution of accumulated Gag and protease mutations towards recovery of the fitness and the virus particle formation in the protease inhibitor-resistant HIV-1 with D30N and L90M.

Antiviral Therapy Vol.6 s-1 :55. 2001

5. Y Yokomaku, Z Matsuda, W Sugiura, M Matsuda, K Sakai, and Y Nagai

Phenotypic analysis of HIV-1 protease by virus-like particle ELAIZA.

Antiviral Therapy Vol.6 s-1 :13. 2001

6. Wataru Sugiura

Effect of introduction of highly active antiretroviral treatment and the changes in patterns of drug-resistant HIV-1 in Japan.

J Infect Chemother Vol.7 :127-132. 2001

7. Wataru Sugiura, Zene Matsuda, Yoshiyuki Yokomaku, Kurt Hertogs, Brendan Larder, Tsuyoshi Oishi, Aiko Okano, Teiichirou Shiino, Masashi Tatsumi, Masakazu Matsuda, Hanae Abumi, Noboru Takata, Satoshi Shirahata, Kaneo Yamada,

Hiroshi Yoshikura, and Yoshiyuki Nagai
Interference Between D30N and L90M in Selection and Development of Protease Inhibitor Resistant Human Immunodeficiency Virus Type-1.
Antimicrobial Agents & Chemotherapy (in press) 2002

学会発表

1. Yoshiyuki Yokomaku, Koya Ariyoshi, Hideka Miura, Sachiko Tateishi, Ai Tachikawa, Aikichi Iwamoto, Wataru Sugiura, Yoshiyuki Nagai, Zene Matsuda
GENERATION OF TAILORED CTL TARGETS WITH VSV-PSEUDOTYPED HIV-1

An update of HIV-1 CTL assay. Bangkok. 2001

2. L Myint, Z Matsuda, Y Yokomaku, K Matsuo, T Iwasaki, K Yamada and W Sugiura

Contribution of accumulated Gag and protease mutations towards recovery of the fitness and the virus particle formation in the protease inhibitor-resistant HIV-1 with D30N and L90M.

5th International Workshop on HIV Drug Resistance & treatment Strategies. Arizona. 2001

3. Y Yokomaku, Z Matsuda, W Sugiura, M Matsuda, K Sakai, and Y Nagai

Phenotypic analysis of HIV-1 protease by virus-like particle ELAIZA.

5th International Workshop on HIV Drug Resistance & treatment Strategies. Arizona. 2001

4. 杉浦 互

プロテアーゼ阻害剤耐性 HIV-1 におけるフィットネスの回復と gag 領域の変異の役割解析
第4回白馬シンポジウム 長野 2001

5. L Myint, Z Matsuda, Y Yokomaku, K Matsuo, T Iwasaki, K Yamada, W Sugiura Importance of gag and protease mutations in fitness recovery of the HIV-1 with D30N and L90M protease mutations.

第49回日本ウイルス学会 大阪 2001

6. 杉浦 互

overview 「HIV (診断・治療)」

第49回日本ウイルス学会 大阪 2001

7. 杉浦 互
HIV-1 薬剤耐性検査の現状
衛生微生物技術協議会第 22 回研究会
徳島 2001
8. 松田昌和、千葉智子、岡野愛子、鏡 英恵、
松田善衛、横幕能行、杉浦 互
相同組み換えによる患者由来 HIV-1 の再構築
と薬剤感受性検査
第 15 回日本エイズ学会 東京 2001
9. 千葉智子、松田善衛、横幕能行、滝沢万理、
本多三男、松田昌和、岡野愛子、鏡 英恵、杉
浦 互
ヒト T 細胞由来の新たな HIV-1 感染宿主細胞
株の樹立と薬剤感受性検査への応用
第 15 回日本エイズ学会 東京 2001
10. Lay Myint, Koya Ariyoshi, Wattana
Auwanit, Panita Pathipvanith, Hua Yan,
Masakazu Matsuda, Kaneo Yamada,
Wataru Sugiura
A novel MS-PCR assay for the detection of
M41L and K70R AZT resistant mutations
in subtype E HIV-1
第 15 回日本エイズ学会 東京 2001
11. 岡野愛子、松田昌和、鏡 英恵、千葉智子、
山田兼雄、杉浦 互
AMPLICORE MONITOR™ Test を用いた
HIV-1、C 型肝炎ウイルス (HCV) RNA の同
時定量法の可能性について検討
第 15 回日本エイズ学会 東京 2001
12. 高田 昇、藤井輝久、西村 裕、杉浦 互
抗 HIV 薬剤耐性検査の遺伝子型と表現型検
査の比較
第 15 回日本エイズ学会 東京 2001
13. W. Sugiura, M. Matsuda, H. Miura,
K. Yamada, K. Ariyoshi
Variation and Prevalence of non-subtype B
infection in Japan and their genotypic
patterns related to anti-retrovirus therapy
failure.
第 2 回熊本エイズセミナー 熊本 2001
14. Yoshiyuki Yokomaku, koya Ariyoshi,
Hideka Miura, Sachiko Tateishi,
Ai (kawana) Tachikawa, Aikichi Iwamoto,
Wataru Sugiura, Zene Matsuda
Rapid generation of tailored target cells for
CTL assay.
第 2 回熊本エイズセミナー 熊本 2001
15. L. Myint, K. Ariyoshi, A. J. Frater, M.
Matsuda, A. Okano, T. Chiba, H. Abumi, K.
Yamada,
W. Sugiura.
Detection of M41L and K70R AZT resistant
mutations in subtype E HIV-1 by
Mutagenically Separated PCR.
6th International Congress in AIDS in
ASIA and the Pacific. Australia. 2001
16. W. Sugiura, M. Matsuda, H. Miura, K.
Yamada and K. Ariyoshi
Genotypes related to nelfinavir resistance
in subtype E infection differ from subtype B
in Japan.
6th International Congress in AIDS in
ASIA and the Pacific. Australia. 2001
17. W. Sugiura, M. Matsuda, H. Miura, K.
Ariyoshi, K. Yamada
Unique Drug Resistant Mutation Pattern
Found in Subtype-E HIV-1 Infected
Patients.
13th Joint Scientific Meeting of the AIDS
Panels. Kumamoto. 2001

II.分担研究報告書

「血漿中および細胞内薬剤濃度と治療効果の関連の検討」

分担研究者 加藤 真吾

慶応義塾大学医学部微生物学・免疫学教室助手

研究要旨

細胞内ネルフィナビル濃度を HPLC によって測定する方法を確立した。この方法を用いて PBMC へのネルフィナビルの取り込みを調べたところ、取り込みが 37°C で 1 分以内に終了しており、定常状態における濃度が細胞外液の 300 倍に達していることがわかった。この結果は抗 HIV-1 治療における薬剤モニタリングにおいて細胞内薬剤濃度を測定することの重要性を示唆している。

A. 研究目的

HIV-1 治療における薬剤モニタリングのためにプロテアーゼ (PI) の血中濃度が測定されるようになってきた。しかし、血中の PI のほとんどは血漿タンパク質と結合してことと、PI の主要な作用部位が細胞内であることを考えると、細胞内 PI 濃度を測定することがより重要であると考えられる。そこで本研究では、PI の一つであるネルフィナビル(NFV) に焦点を絞り、HPLC による定量法を確立するとともに、健常人由来の末梢血単核細胞 (PBMC) への取り込み速度を決定することを目的とした。

B. 研究方法

PBMC の調製は Ficoll-Paque を用いて取扱説明書通り行った。

細胞内 NFV 蓄積の実験は以下のようにして行った。1 × 10⁶ 個の PBMC を 200 μl の無血清培地 (VP-SFM, GibcoBRL) に懸濁し、NFV を 10 μM になるように添加してから 1、2、5、10 分後に 4°C で 15 秒間遠心して細胞を沈殿させた。この沈殿を 500 μl の PBS で洗浄した後、200 μl の PBS で再懸濁し、界面活性剤を加えて細胞を溶解した後に 2 nmol の SQV を内標準として加え、さらに 200 μl の 0.1 N のアンモニア水溶液を加えた後に、400 μl の酢酸エチル/アセトニトリル (90/10, V/V) を加えて 10 秒間攪拌し、有機相を分取して遠心濃縮器 (MV-100, TOMY) で乾留した。この抽出物を 400 μl の移動相 [25 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 3.4) /アセトニトリド/メタノール、60/32.5/7.5 (V/V/V)] に溶解した。

プロテアーゼ阻害剤の定量は HPLC (日本分光) を用いて行った。ポンプは 880-PU 型、サンプルインジェクターは 200 μl のループを装着した Pheodyne Model 7125、分光検出器は 870-UV 型、データ処理は 801-SC 型システムコントローラを用いた。

C. 研究成果

NFV と SQV がうまく分離して溶出されるかを調べるために、1 nmol の NFV と 1 nmol の SQV の混合液 200 μl を HPLC に注入した (図 1)。NFV と SQV のピークをそれぞれ矢印で示す。両者は完全に

分離されて溶出された。同様な実験を 3 回繰り返したときのピーク面積比は、0.756、0.762、0.775 で、平均値は 0.764 であった。次に、PBMC からの抽出物のピークによって NFV と SQV の検出が邪魔されないかを調べるために、5 × 10⁵ 個の PBMC に 2 nmol の NFV と 2 nmol の SQV を添加してすぐに抽出操作を行い、抽出物の半量を HPLC に注入した (図 2)。NFV と SQV のピークの位置は細胞成分由来の多くのピークから十分離れていた。同様な実験を 3 回繰り返したときの SQV に対する NFV のピーク面積比は、0.722、0.764、0.789 で、平均値は 0.758 であった。この値は、PBMC からの抽出操作を加えなで得られた値 0.764 と一致していたことから、PBMC が存在した場合の SQV と NFV の抽出効率 は同じであり、したがって SQV と NFV はお互いに細胞内濃度測定のための内標準として用いることができることがわかった。

NFV の細胞内濃度の測定法が確立したので、次に、NFV が存在する培養液中での PBMC による NFV の取り込みの速度論を調べた。図 3 は NFV を培養液に添加する前の PBMC 抽出物の HPLC 溶出パターンである。内部標準として用いた SQV のピークは検出されるが、NFV のピークの出現が予想される位置の吸光度は平坦であった。図 4 は、10 μM の NFV が存在する培養液で 1 × 10⁵ 個の PBMC を 1 分間処理し、洗浄後、抽出操作を行い、抽出物の半分を HPLC に注入したときの溶出パターンである。明瞭な NFV のピークが認められた。このピーク面積は 2 分、5 分、10 分処理した PBMC を用いてもほとんど変わらなかった (図 5)。すなわち、PBMC による NFV の取り込みは 1 分間以内に定常状態に達していることと考えられる。NFV のピーク面積と内部標準である SQV のピーク面積の比から NFV のモル数を求め、リンパ球の平均直径を 10 μm と仮定すると、細胞内 NFV 濃度は 3.18 mM と計算された。すなわち、細胞内 NFV は細胞外の約 300 倍に濃縮されていた。

D. 考察

細胞内の PI の動態は図 6 に示すように influx transporter と efflux transporter、さらに細胞内の

結合部位によって制御されていると考えられる。efflux transporterとしてP-glycoproteinとMRP1が同定されているが、PIのinflux transporterと細胞内結合部位についてはまったくわかっていない。PBMCにおいて細胞内NFV濃度は細胞外に比べて約300倍高かったことは、influx transporterと細胞内結合部位が細胞内のPIの蓄積に大きく関与していることを示している。

今回得られた結果から、in vivoにおいて、血中NFV濃度よりもはるかに高い濃度のNFVが作用部位である細胞内に存在している可能性がある。このことは、抗HIV-1治療における薬剤モニタリングにおいて細胞内のPI濃度を調べるのが重要であることを示唆している。

今後、PI排出の速度論や、実際の患者PBMC中のPI濃度の測定を行う予定である。

E. 結論

細胞内ネルフィナビル濃度をHPLCによって測定する方法を確立した。PBMCへのネルフィナビルの取り込みは1分以内に終了しており、定常状態における濃度は細胞外液の300倍に達していた。この結果は抗HIV-1治療における薬剤モニタリングにおいて細胞内薬剤濃度を測定することの重要性を示唆している。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. Yoshii T, Kuji N, Kato S, Saito Y, Hanabusa H, Sueoka K, and Yoshimura Y. Buoyant density measurement of human immunodeficiency virus type 1 in silane-coated density gradient media. 11th World congress of Human Reproduction. 2001, July, Lausanne, Switzerland.

2. 田中宏明、久慈直昭、吉井毅、寺西貴英、佐藤健二、谷垣礼子、末岡浩、齊藤有紀、加藤真吾、吉村泰典、野澤志朗「迅速 nested RT-PCR法を用いた非凍結・洗浄 HIV感染者精子による人工授精・体外受精実用化の試み」第53回日本産科婦人科学会学術講演会（2001年5月、札幌）

3. 花房秀次、大田みお、田上尚道、加藤真吾「HIV感染者の肝炎対策」第15回日本エイズ学会学術集会（2001年11月、東京）

4. 田上尚道、齊藤有紀、田中理恵、花房秀次、加藤真吾「感染個体内におけるHIV-1 RNA-DNA hybridの生物学的役割」第15回日本エイズ学会学術集会（2001年11月、東京）

5. 花房秀次、加藤真吾、兼子智、鈴木美奈、高桑好一、田上尚道、田中憲一「改良Swim up法によるHIV陽性男性の精液からのHIV除去と体外授精の臨床実施成績」第15回日本エイズ学会学術集会（2001年11月、東京）

6. 齊藤有紀、花房秀次、加藤真吾「単一ビリオンの迅速検出法」第15回日本エイズ学会学術集会（2001年11月、東京）

7. 加藤真吾、田中理恵、齊藤有紀、松本智子、高野八百子、田上尚道、根岸昌功、花房秀次「PBMCを被感染細胞とするHIV-1薬剤感受性試験」第15回日本エイズ学会学術集会（2001年11月、東京）

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図1. NFVとSQVのHPLC溶出パターン

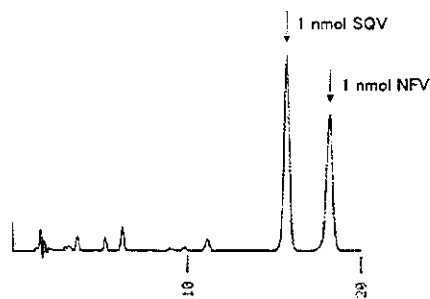


図2. NFVとSQVを添加したPBMCからの抽出物のHPLC溶出パターン

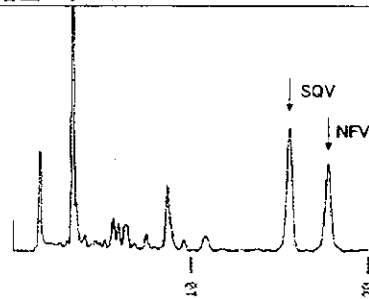


図3. NFVを培養液に添加する前のPBMCからの抽出物のHPLC溶出パターン

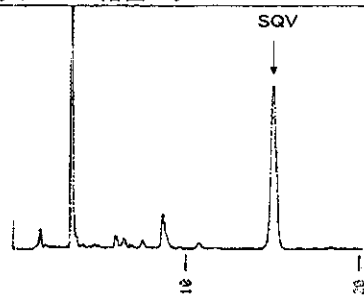


図4. NFVを培養液に添加し37°Cで1分間処理後のPBMCからの抽出物のHPLC溶出パターン

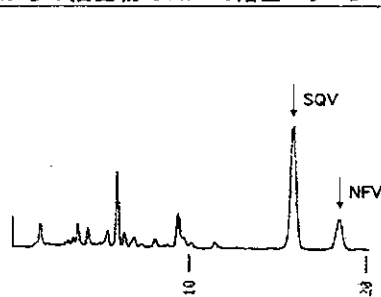


図5. PBMCによるNFV取り込みの速度論

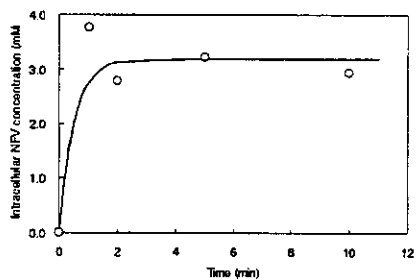
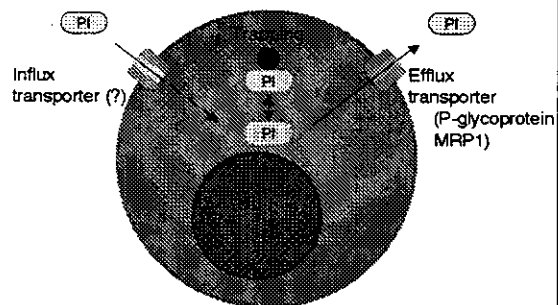


図6. PIの細胞動態



厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
分担研究報告書

新しいプロテアーゼ阻害剤カレトラ®の血中濃度測定法の確立およびその動態

分担研究者 金田次弘
共同研究者 中井正彦、宇佐美好子
国立名古屋病院臨床研究部

研究要旨

新しいプロテアーゼ阻害剤カレトラの臨床的評価を行うために lopinavir (LPV) と ritonavir (RTV) の血中濃度同時測定を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法で確立した。さらに日本人での体内薬物動態を知るため健常人において投与試験を行った。その結果、承認時外国人データに比べ高い血中濃度推移を示した。また吸収には個人差が認められた。

A. 研究目的

カレトラは主有効成分である lopinavir (LPV) と、その代謝を阻害する ritonavir (RTV) を配合した新しいプロテアーゼ阻害剤であり、複雑な体内動態が予想されるが、日本人に関する投与試験データはない。そこで国内でのカレトラの臨床的な評価を行うため、LPV と RTV の高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による同時測定法の確立を試みるとともに、健常人においてカレトラの投与試験を実施した。

B. 研究方法

I. 血中濃度測定法

アボット社の報告¹⁾をもとに、当院の HPLC にて LPV と RTV の同時測定法を以下に示す方法で検討した。

a. 抽出方法

血漿0.5mlに、内部標準物質

(5S,8S,10S,11S)-9-hydroxy-2-cyclopropyl-5-(1-methylethyl)-1-[2-(1-methylethyl)-4-thiazolyl]-3,6-dioxo-8,11-bis(phenyl-methyl)-2,4,7,12-tetraazatridecan-13-oic acid, 5-thiazolylmethyl ester) (I.S.)を含む酢酸エチル、n-ヘキサン 1対1溶液2 ml、および0.5M Na₂CO₃ 1 mlを加え混和後、遠心分離した。有機層を分取、ドライアップした後、移動相100μlに溶解し、25μlをHPLCにインジェクションした。

b. HPLC 条件

ポンプ：Waters 510 HPLC Pump

検出器：Waters 484 Tunable Absorbance Detector

カラム：Waters Radial-Pak Cartridge type 8NVC18 4μ (8.100)

流速：1.5ml/min

カラム温度：室温

検出波長：205nm

移動相：CH₃CN:CH₃OH:0.01M tetramethyl-ammonium perchlorate in 0.1% trifluoro-acetic acid (50:5:45 V/V/V)

定量：薬物濃度は内部標準物質に対するピーク高さ比から求めた。

II. 健常人被験者の抽出条件および採血時間

健常人における LPV と RTV の経時的な血中濃度変化を測定するためにボランティアを募った。被験者として本人より直接同意を得られた者を対象とした。貧血の者、薬物代謝に影響を及ぼすと思われる食品の常用者、薬物を服用中の者は除外した。

空腹時にカレトラの通常一回服用量である3カプセル(LPV 400 mg、RTV 100 mg)を服用後1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 30 時間後に採血を行った。可能な場合18時間後にも採血し、LPV と RTV の血中濃度を測定した。

C. 研究結果

I. 血中濃度測定法

a. 溶出時間

図1は HPLC による同時測定のカロマトグラムである。図中の下段はフリー血清、上段はフリー血清に薬物および I.S. を添加して測定したものである。溶出時間は、RTV が 7.1 分、I.S. が 8.9 分、LPV が 11.2 分であった。

b. 直線性の検討

ピーク高さ比と添加量の直線性を LPV、RTV それぞれで検討した結果を図2、3に示す。LPV、RTV ともに良好な直線性が得られた。

c. 再現性の検討

LPV の期待値 4.755、2.778、0.951 μg/ml に対して、測定値は 4.774±0.078、2.452±0.062、0.959±0.014 (n=5)であり、それぞれの変動係数(CV)は 1.640、2.547、1.489%であった。また、RTV では期待値 0.855、0.428、0.171 μg/ml に対して、測定値は 0.851±0.012、0.457±0.014、0.198±0.009 (n=5)であり、CV は 1.436、3.044、4.482%であった。両薬物ともに、再現性においても良好な結果が得られた。

II. 健常人における薬物動態

ボランティアは女性2名、男性4名の計6名、年齢は35歳から52歳であった。1名のみ、事前検査時に GPT の低度上昇がみられた。

6例のカレトラ服用後の LPV と RTV の血中濃度の

時間推移を図4に、LPVの解析結果の詳細を表1に示す。LPVのTmaxは平均(3.33±0.82)時間で、6例中5例で服用後3から4時間であった。1例は2時間であった。Cmaxは平均(6.86±2.12) µg/mlであり、最高例と最低例の間に2倍以上の差が認められた。台形法により求めたAUCの12時間および24時間値の平均は、(56.95±19.23) および (79.77±30.36) µg·hr/mlであった(表1)。副作用として2名の被験者に下痢症状が発現した。

D. 考察

LPVの消失はRTVにより阻害される。従って、LPVの体内動態を知るためにはRTVの動態を知る必要があり、両者の同時測定は不可欠であると考えられた。その点で今回確立したHPLC法は有用である。

この同時測定法を用い、健常人6名についてカレトラの空腹時服用における薬物動態を検討し、Tmax、Cmax、AUCの値を得た。それぞれを、カレトラ承認時の外国人データ²⁾と比較すると、Tmaxは外国人データ3.5±0.9とほぼ同等であったが、Cmaxは外国人データの5.5±2.0と比べやや高かった。これは、日本人と外国人の体格差によるものであると考えられた。24時間値AUCも、Cmaxと同様外国人データ57±28に比べやや高い値となった。

E. 結論

健常人、空腹時服用におけるLPVの血中濃度推移からTmax、Cmax、AUCを求めたところ、CmaxとAUCについては、カレトラ承認時の外国人データに比べやや高い値が得られた。このことは、薬物の体内動態に人種差が存在することを示すものであり、日本人に関する投与データの必要性を示唆する。

今後は、空腹時服用の症例数を増やすとともに、摂食後服用、連続服用下での薬物動態の検討も行って各種パラメーターを求め、投与量の検討とカレトラ服用HIV-1感染症患者の血中濃度データの評価に利用したいと考えている。

F. 参考文献

1) Simultaneous determination of lopinavir and ritonavir in biological samples using reversed-phase high-performance liquid chromatography with either UV or tandem mass spectrometric quantitation : Raymond Wieboldt *et al.*, J. Chromatogr. B (in press)

2) ダイナボット株式会社、医薬品インタビューフォーム・カレトラソフトカプセル・リキッド

G. 研究協力者

国立名古屋病院・内科 内海眞、山中克郎、間宮均人、同・薬剤科 鷺坂昌史、大木剛、長岡宏一、伊藤洋貴、竹田信也

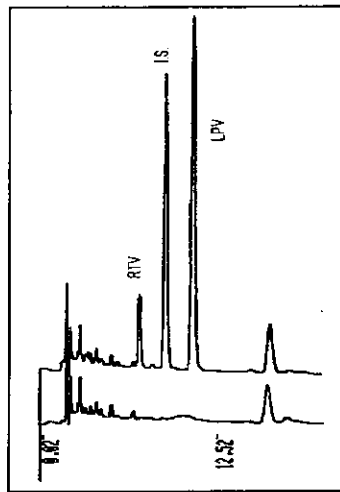


図1 対象薬物のクロマトグラム

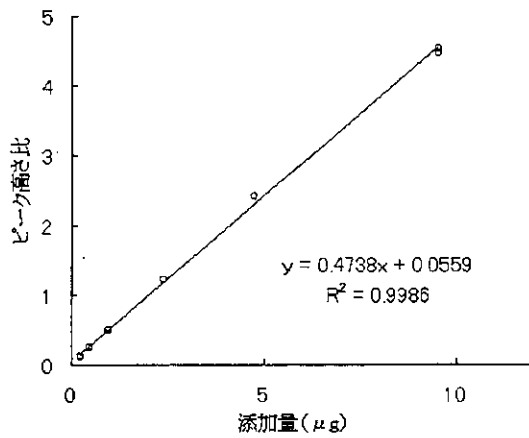


図2 LPVの直線性

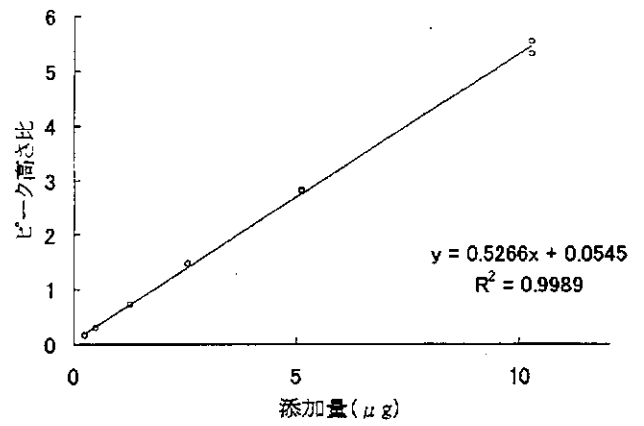


図3 RTVの直線性

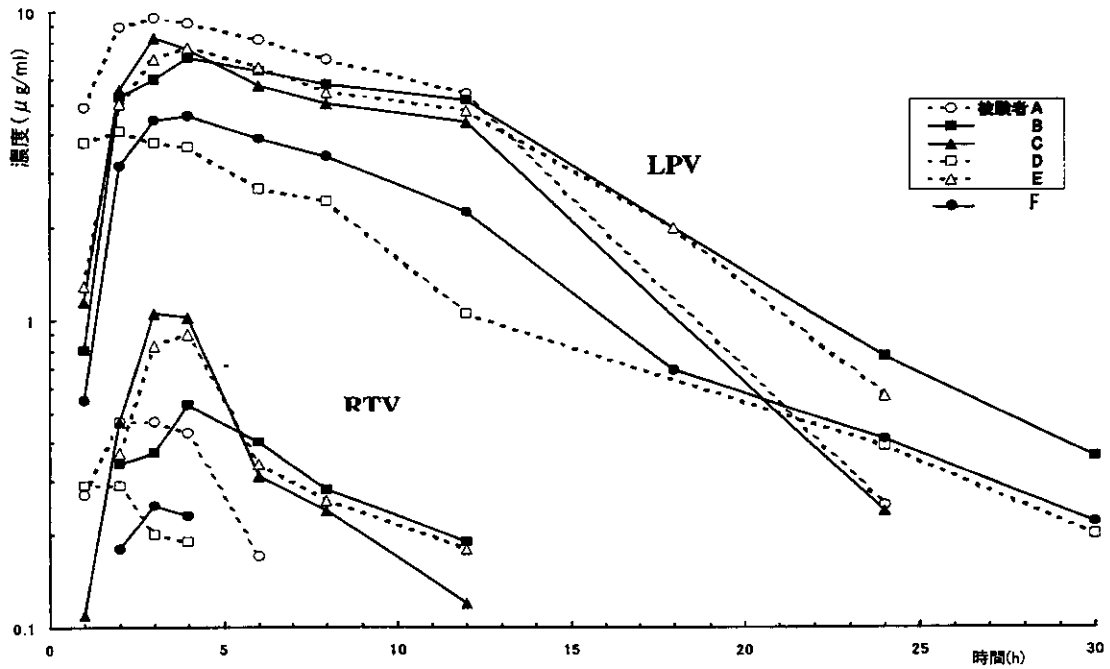


図4 LPVとRTVの血中濃度推移

表1 薬物動態パラメーター

L P V	T max	C max	AUC ($\mu\text{g} \cdot \text{hr}/\text{ml}$)		副作用
	(hr)	($\mu\text{g}/\text{ml}$)	0→12	0→24	
被験者 A	3.0	9.51	84.9	118.8	
B	4.0	7.12	63.3	98.7	下痢
C	3.0	8.22	61.5	89.1	
D	2.0	4.06	31.6	40.3	下痢
E	4.0	7.66	61.9	84.5	
F	4.0	4.59	38.5	47.2	
mean	3.33	6.86	56.95	79.77	
S. D.	0.82	2.12	19.23	30.36	

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
分担研究報告書

「抗 HIV 薬の薬効に係わるヒト遺伝子群の多型の解析に関する研究」
分担研究者 北村義浩
東京大学医科学研究所先端医療研究センター 感染症分野助教授

研究要旨

抗ヒト免疫不全ウイルス薬の吸収・代謝、細胞内外の輸送に係わるタンパク質をコードする遺伝情報の個体差としての点変異（single nucleotide polymorphism: SNP）と薬効が密接に関連していると予想される。SNP タイピング手法として SNaPshot 法を用いて CD209L 遺伝子（エキソン 6 とイントロン 6）を対象としたモデル解析を行ったところ、SNP の箇所によってはタイピングプライマーの向きが正確なタイピングに重要であることが分かった。平成 13 年度はこの SNaPshot 法による SNP タイピングシステムを確立した。

A. 研究目的

抗ヒト免疫不全ウイルス（HIV）薬の吸収・代謝には種々の代謝酵素、膜タンパク質分子が関与している。つまりこれらのタンパク質をコードする遺伝子が抗 HIV 薬の効果・副作用を修飾していることになる。これら遺伝子には遺伝情報の個体差、つまり遺伝子の多型が存在する。或る特定の遺伝子の特定部位の点変異（単塩基多型、single nucleotide polymorphism: SNP）と特定の抗 HIV 薬の副作用の有無とその程度、および薬効とが密接に関連していると予想されている。したがって、抗 HIV の薬効を修飾する遺伝子群の多型を解析すれば、HIV 感染者に対する薬効、副作用などを推定したり、投与する薬剤を選択したりする時に役立つはずである。本研究課題は様々な遺伝子の多型が抗 HIV 薬の効果、副作用にどのような影響を及ぼすかを調べることを目的としている。

B. 研究方法

まず平成 13 年度は SNP を安価に、容易に、正確にタイピングする手法を確立することを目的とした。そこで我々は、SNaPshot 法を第一の候補としてシステムを構築することにした。この手法の特徴は、既存の塩基配列決定機器を利用でき、しかも従来の塩基配列決定法に比べて安価に行える点である。まず、SNP 部位を含むゲノム領域を PCR で増幅し、その産物を鋳型として SNP 部位の隣接塩基まで相補的なプライマー（以下タイピングプライマーと記載する）をアニールさせ蛍光ジヌクレオチド存在下で 1 塩基だけの伸長反応を行って、タイピングプライマーに取り込ませる。次にこの取り込まれた蛍光色を従来型の蛍光塩基配列決定機器で読みとることで、SNP 部の塩基をヘテロ/ホモ接合性を含めタイピングする。これが SNaPshot 法の

原理である。HIV のエンベロープタンパク質と結合することが知られている CD209L タンパク質をコードする CD209L 遺伝子のエキソン 6 とイントロン 6 に存在する 2 箇所の SNP（以下、それぞれを eSNP, iSNP と記載する）を対象としてシステムを検証した。この 2 点を含む 1012bp のゲノム領域を PCR で増幅した。この PCR 産物を鋳型とし、eSNP、iSNP を順向きまたは逆向きのタイピングプライマーでタイピングした。

C. 研究結果

eSNP については、タイピングに用いたタイピングプライマーが順向きであっても逆向きであっても同じようにヘテロ接合体の遺伝型を正確にタイピングできた。一方 iSNP については順向きのタイピングプライマーでは正確にタイピングできなかったが逆向きタイピングプライマーでは正確にタイピングできた。おそらく鋳型となる PCR 産物の 2 次構造が重要であるのだろう。

D. 考察

SNaPshot 法を用いてタイピングをする場合、SNP の箇所によってはタイピングプライマーの向きが正確なタイピングに重要であることが分かった。事前にどちら向きのタイピングプライマーが正確にタイピングできるかを予測できないので、タイピングプライマーは順向きのもの・逆向きのもの、両方とも試すべきである。今後は今回確立した SNaPshot 法を用いて、抗 HIV 薬の細胞内外の輸送に関与する膜タンパク質をコードする ABC トランスポーター遺伝子群の SNP を解析し、遺伝型と薬効との間の関連を調べる予定である。

E. 結論

SNPをタイピングするSNaPshotシステムの問題点を明らかにし、解決する手段を提示できた。SNaPshot法を確立できた。

F. 研究発表

なし

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
分担研究報告書

「抗 HIV 薬の生体内濃度測定法の開発ならびに薬剤濃度と臨床的有効性及び有害事象との相関性の解析」 ～プロテアーゼ阻害剤 6 剤とエファビレンツの血中濃度同時測定法の開発～

分担研究者 平林義弘

国立国際医療センター エイズ治療研究開発センター治療開発室長

〔研究要旨〕臨床応用されている 6 種類のプロテアーゼ阻害剤とエファビレンツ、およびそれらの活性代謝体の血中濃度を同時に測定できる、高速液体クロマトグラフィーによる一斉分析系を開発した。本法は、定量性、感度、正確性および再現性に優れていた。また手技も容易で、比較的短時間で測定可能であった。今後、本法の臨床応用が期待される。

A. 研究目的

プロテアーゼ阻害剤(PI)やエファビレンツ(EFV)などの抗 HIV 薬の体内動態には、代謝酵素の遺伝的差異や併用薬剤による代謝の修飾により、大きな個人差が報告されている。したがって、薬剤の有効性を確保し副作用の発現を軽減するためには、症例ごとに血中薬剤濃度を測定し、投薬量を調節することが望まれている。

しかし現行の血中濃度測定法は、手技が煩雑であるうえ測定条件が薬剤ごとに異なっているため、これを診療施設で随時行なうことは困難である。

そこで本研究では、臨床応用されている PI 全種類と EFV の血中濃度を同時に測定でき、しかも多数の検体を短時間で測定できるような、簡便な測定法を開発することを目的としている。

B. 研究方法

薬剤：アンブレナビル(APV)、インジナビル(IDV)、ロピナビル(LPV)、サキナビル(SQV)、ネルフィナビル(NFV)、リトナビル(RTV)の PI 6 剤と EFV、および体内で生成されるこれらの代謝体で抗ウイルス活性を持つもの(AM)は、いずれも各製薬会社より化成精製品の分与を受けた。また日和見感染症の治療薬などの各種薬剤は、Sigma 社および和光純薬より試薬を購入した。

血漿：健常人もしくは当センター受診中の服薬患者から、インフォームドコンセント（後述）を得て採血し、血漿を得た。

血漿の前処理：薬剤を既知の濃度で添加した健常人血漿もしくは服薬患者血漿を、水酸化アンモニウム水溶液でアルカリ化した後、酢酸エチル/アセトニトリル混合液にて液相抽出した。窒素ガスを用いて加温下で乾固させ、分析まで 4℃で保存した。分析時にはこれを移動相に溶解し、ノルマルヘキサンにて洗浄して使用した。

高速液体クロマトグラフィー：逆相系でフェニルカラムを使用した。移動相には、イオンペアを含有するリン酸ナトリウム緩衝液とアセトニトリルを用いて、濃度勾配をつけた。検出は各薬剤の吸収特性に基づき、212nm ほか 3 波長を使用した。

倫理面への配慮：研究対象者には、研究の目的と方法、予想される結果と不利益、本研究への参加に同意しない場合も不利な扱いを受けないこと、その他人権保護に関する必要事項などについて、事前に十分に説明し、自由意志による同意を得た。また本研究の全体を通して、プライバシーの流出防止などの人権保護に十分配慮した。

C. 研究結果

各薬剤は、クロマトグラム上でそれぞれ独立したピークを形成した。これらは、3 種類の波長を切り替えることによって、ヒト血漿由来の夾雑ピークと明瞭に分離された。さらに服薬患者血漿において、非活性代謝体および各種併用薬剤のピークとも分離された。

薬剤を添加した健常人血漿を用いて作成した検量線は、50 ng/ml から 15 μg/ml の範囲で、ほとんどの薬剤で $r^2 > 0.99$ であった（一部は $r^2 > 0.98$ ）。真度および精度を併せて考慮した定量下限は、APV の AM(M2)のみ 100 ng/ml、他のすべての薬剤で 50 ng/ml であり、これは服薬患者のトラフ血中濃度の概ね 1/100-1/10 に相当した。

本法の同時再現性および日差再現性は、各薬剤ともそれぞれ CV < 9.1% および CV < 11.3% であった。また、逆転写酵素阻害剤や日和見感染症の治療薬など HIV 患者に高頻度に投与される薬剤 33 種類について検討したところ、いずれも各 PI、EFV および AM とはクロマトグラム上で分離され、本法による測定の障害とはならないことが示された。

本法による臨床検体の測定は、複数の検体を同時に処理し測定する場合、前処理も含めて 1 検体あたり 2 時間程度で終了することができた。検体数が多いほど、さらに短縮することが可能であった。

D. 考察

患者ごとに血中薬剤濃度を測定して投薬量を調節する“テーラーメイドの”医療を行なうには、病院で日常検査として血中濃度を随時測定できるような、簡便で迅速な測定法の確立が不可欠であ

る。この目的には、現行の煩雑な個別分析よりも、多種類の薬剤を同時に測定できる一斉分析が適していると考えられる。特に近年の多剤併用療法では、そのメリットが大きい。

本研究では、現在臨床応用されている6種類のPIに加えて、非核酸系逆転写酵素阻害剤のEFVも含めた、血中濃度の一斉分析系を開発することができた。

本法で特筆すべき点は、投与した薬剤と共に、そのAMも同時に測定できる点である。例えばNFVのAM(M8)は、*in vitro*で未変化体とほぼ同等の抗ウイルス活性を示し、また患者の血中濃度はしばしば未変化体に匹敵することが知られている。このような場合、NFVの血中濃度は、未変化体とM8の両者で検討する方が合理的であると考えられる。これまで、各薬剤のAMも含めた同時測定法は報告されておらず、本法は大きな意義を持つと思われる。

本法は定量性、感度、正確性および再現性に優れていた。手技も容易で、比較的短時間で測定可能であった。本法は、臨床応用に十分耐え得るものと期待される。

今後、本法のさらなる評価および改良を進めるとともに、本法を用いて、血中濃度と臨床的有効性および副作用の発現との相関の解析を行なう計画である。

E. 結論

PI 6剤とEFVとそのAMの血中濃度を同時に測定できる、一斉分析系を開発した。本法は、定量性、感度、正確性に優れており、手技も容易であるので、今後、本法の臨床応用が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

M. Tanaka, C. Yasuoka, I. Genka, N. Tachikawa, Y. Kikuchi, K. Teruya, A. Yasuoka, Y.

Hirabayashi, S. Kimura and S. Oka. Sustained cytomegalovirus-specific CD4+ T cell response associated with prevention of recurrence of cytomegalovirus retinitis without secondary prophylaxis after highly active antiretroviral therapy in patients with AIDS. AIDS Research and Human Retroviruses. 17, 1749-1756, 2001.

2. 学会発表

土屋亮人、松岡佐織、高橋由紀子、蜂谷敦子、田中真理、井田節子、源河いくみ、照屋勝治、立川夏夫、菊池嘉、安岡彰、平林義弘、木村哲、岡慎一。プロテアーゼ阻害剤未治療患者におけるNelfinavir108週までの継続率と耐性変異の出現。第15回日本エイズ学会学術集会。2001年11月、東京。

田中真理、平林義弘、岡慎一。CMV網膜炎発症エイズ患者におけるHAARTによる免疫再構築後のCMV特異的CD4+T細胞の反応性。第15回日本エイズ学会学術集会。2001年11月、東京。

井田節子、立川夏夫、蜂谷敦子、松岡佐織、田中真理、土屋亮人、高橋由紀子、平林義弘、木村哲、岡慎一。血中プロウイルス量の推移の検討。第15回日本エイズ学会学術集会。2001年11月、東京。
蜂谷敦子、高橋由紀子、松岡佐織、田中真理、土屋亮人、平林義弘、井田節子、巽正志、木村哲、岡慎一。3剤併用療法をそのまま評価する新しい薬剤耐性検査法の開発。第15回日本エイズ学会学術集会。2001年11月、東京。

G. 知的所有権の取得状況

なし。

H. 研究協力者

土屋亮人、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）。

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
分担研究報告書

「HAART の最適化に関する臨床研究」

分担研究者 松下修三

熊本大学エイズ学研究センター 教授

研究要旨 強力な抗ウイルス剤の多剤併用療法（highly active antiretroviral therapy; HAART）の導入で長期間にわたりウイルスの増殖抑制が得られるようになった。一方多剤耐性変異株が出現し治療効果が不十分となった症例も増加している。治療効果に影響する因子としては服薬 adherence が最も重要であるが、抗ウイルス剤の組み合わせや薬剤量がそれぞれの症例に最適かどうか大きな問題であり、薬剤血中濃度測定は重要な判断材料である。我々は臨床試験段階からプロテアーゼ阻害剤（protease inhibitor; PI）を用い、多剤耐性となった2症例について、Lopinavir (LPV)の血中濃度を調べ、その耐性変異と治療の有効性を検討した。症例は複数の耐性変異をもっていたがIC₅₀の100倍以上の血中濃度が得られ、3rd salvage 療法は成功した。LPV 使用中の他の症例について、トラフ値と服薬後2時間の血中濃度を調べ、有効濃度について検討した。さらに Ritonavir (RTV)と Saquinavir (SQV)の併用を軸とする HAART にて長期間良好な経過の4症例について SQV の steady state pharmacokinetics (PK)を検討した。その結果、steady state ではほぼ安定した薬剤濃度が得られることがわかり、その他の症例でもトラフ値と服薬後2時間の薬剤血中濃度間に有意差はなく、これらの RTV を含む double PI 療法の場合 PI の血中濃度は1ポイントでもチェック可能であることがわかった。

A. 研究目的

HAART の導入で長期間にわたりウイルスの増殖抑制が得られる症例が増加した。一方多剤耐性の変異株が出現するなど、治療効果の低下がみられる症例も出現してきている。その原因の一つとして、用いられている抗ウイルス剤の組み合わせや薬剤量がその症例に最適でない可能性がある。治療に用いている薬剤の血中濃度と耐性変異を検索することにより薬剤の組み合わせや量が適切かどうか服薬が遵守されているかどうかを明らかにできる。またウイルスの薬剤耐性度はIC₅₀を求めることにより比較可能であるが、薬剤血中濃度との比率から in vivo での有効性のデータを蓄積していくことができる。

B. 研究方法

耐性変異検査；患者末梢血単核球より DNA を分離し、nested-PCR にて逆転写酵素(RT)

とプロテアーゼ(PR)部位を増幅。ABI PRISM377 auto-sequencer にて direct sequencing をおこない、そのエレクトロフェログラムより、耐性変異株の出現を推定する。プロテアーゼ阻害剤の血中濃度測定；外来通院時及び入院時に採血された EDTA 加血より血漿を分離した（2ポイント；服薬前及び薬剤服薬後2時間）（5ポイント PK；服薬前及び薬剤服薬後1，2，4，8時間）。-80°Cに凍結保存した各時期のサンプルからアセトニトリルやメタノールなどをもちいて薬剤分画を抽出し、HPLC にて LPV 及び SQV を定量した。

（倫理面への配慮）

本研究を行うに当たり各症例には研究の概要を説明し同意を得た上で採血し、解析した。なお本研究の倫理的・科学的妥当性は熊本大学病院の先進医療審査委員会で審査され、了承されている。