

2

新規抗 HIV 薬の開発に関する臨床研究

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）

研究要旨

我々は、新規逆転写酵素(reverse transcriptase: RT)阻害剤の開発とウイルス複製阻害における新しい分子標的の解析を目的として研究を行っている。昨年度、4'-ethynyl-nucleoside (4'-E-dN)が今まで報告のある主な薬剤耐性 HIV (AZT、ddI、ddC、d4T、3TC 耐性株) や多剤併用療法 (HAART) 施行後問題となってきた多剤耐性 HIV 複製を野生株同様に阻害することを報告した。今年度は4'-E-dNに対して HIV がどのように耐性化するのかを検討した。4'-E-deoxyadenosine (4'-E-dA)存在下で培養を続けたところ、I142V/T165R/M184V変異がRT領域に導入されていた。このうち T165R/M184V は RT 活性中心に面して存在し、4'-ethynyl 基に対して steric conflict を起こし、耐性化することが考えられた。

RT以外の標的としてウイルスの細胞融合を阻害するgp41由来ペプチドについても解析を行った。今年度解析した gp41 由来のペプチド N36 は N および C 末端側それぞれの heptad repeat (HR) が結合することを阻害し、結果としてウイルスの細胞進入を阻害すると考えられている。そこでこの仮説を検証するために N36 耐性ウイルスの分離を試みた。N36 耐性ウイルスは C 末端側の HR を形成するアミノ酸に変異が導入されていた。C 末端側の HR の誘導体である T-20 は N 末端側の HR に変異を有することが既に報告されている。これらの実験結果は現在提唱されている gp41 を介した細胞融合機構を強く裏付ける結果となった。また、耐性ウイルスで置換されたアミノ酸は HR において重要な役割を果たしていることが予想され、これらアミノ酸を標的として小分子化合物の開発に役立つと考えられる。

これら2つの研究成果からウイルス生理学的機能を薬剤耐性という観点から解析することで今後の薬剤開発標的の決定に重要な情報を供したと考えられた。

A. 研究目的

不治の病と考えられた後天性免疫不全症候群 (acquired immunodeficiency syndrome: AIDS) は、逆転写酵素 (reverse transcriptase: RT) 阻害剤とプロテアーゼ阻害剤の併用による多剤併用療法 (highly active anti-retroviral therapy: HAART) の著しい効果によりコントロール可能な疾患へと変貌しつつある。しかし、現時点では HAART によっても完全なヒト免疫不全症ウイルス(HIV)の駆逐は不可能であるばかりでなく、HAART 中にも持続する僅かなウイルス複製が薬剤耐性を付与しているという報告がある。耐性ウイルスの制圧には、新規の RT 阻害剤やプロテアーゼ阻害剤の開発および新しい分子標的に対する薬剤の開発が必要不可欠である。

我々は以下の2点に関して新規薬剤の開発を試みた。まず、有効性が広く認められている核酸系 RT 阻害剤 (NRT 阻害剤) に関して薬剤耐性ウイルスに対してもその抗ウイルス活性を保持しうる薬剤のデザイン、合成を試みた。その結果 4'-ethynyl-2'-deoxynucleoside (4'-E-dN) が現在まで報告されたあらゆる薬剤耐性ウイルス複製を強力に阻害することを昨年度報告した。今年度は 4'-E-dN に対し、HIV がどのように耐性化するかを明らかとし、既存の薬剤との耐性機序と比較することでさらなる耐性ウイルスを制圧しうる薬剤分子設計に役立たせること、ウイルス進入を阻害する HIV gp41 由来ペプチドに対する耐性機序を解明し、ウイルス学的には細胞進入機序の更なる解明、耐性化から融合に必須なアミノ酸部位を同定することで HIV 細胞融合阻害剤の小分子化合物化に役立たせることを研究目的とした。

B. 研究方法

1. 培養細胞と使用したウイルス

細胞には、MT-4細胞と HeLa CD4/LTR-beta-Gal 細胞(MAGI細胞)を使用した。各々の細胞は、それぞれ 10% 牛胎児血清添加 RPMI 培地または同添加 DMEM 培地を用いた。抗生物質としてストレプトマイシンとペニシリンを培地に添加したが、MAGI 細胞を維持するときのみ、上記抗生剤に変えて G418 とハイグロマイシンを使用した。

ウイルスには実験室株である HIV-1_{LAI} はベルギー、ルーベン大学の Erik De Clercq 博士より分与された。NRT 阻害剤耐性ウイルスクローンは、全

長の HIV-1 cDNA を組替えたプラスミド pNL101 を用いて作製した。このプラスミドに含まれている RT コード領域をプラスミド pTZNX にサブクローニングし、site directed mutagenesis 法にて変異を導入した。目的の変異が導入された DNA 断片を pNL101 に戻し、感染性ウイルスを Cos-7 細胞に遺伝子導入して作製した。ペプチド耐性ウイルスも同様に pSL301 に gp41 領域をサブクローニングした後に site directed mutagenesis を行い、DNA 断片を pNL101 に組み替え、感染性ウイルスを Cos-7 細胞に遺伝子導入によって作製した。

2. ウイルス効果を測定する方法

1) MTT 法

MTT 法には MT-4 細胞を使用した。細胞にウイルスを曝露するとほぼ同時に適当量に希釈した薬剤を加え、5 日間培養を続けた。その後、MTT 試薬 (7.5 mg/ml) を加え、3 時間さらに培養を続けた。ここに酸性化プロパノールを加え、生じたフォルマザンを可溶化し、その吸光度をプレートリーダーで測定した。

2) MAGI 法

アッセイの前日に MAGI 細胞を 96 well plate に移し、MTT 法と同様にアッセイを行った。培養 2 日後に培地を除き、X-Gal を加え、一時間インキュベートした後、青く染色された細胞を感染成立細胞として顕微鏡下で測定した。

3. 薬剤耐性株の誘導

薬剤に対する耐性変異を誘導するために MT-2 細胞と HIV-1_{LAI} を用いた。EC50 の濃度から開始し、ウイルス感染によって多数のシンシチウムが観察されるようになったらその上清を回収し、2 倍濃度の薬剤を加えた新しい MT-2 細胞に回収した上清を加え、培養を続けることで耐性を誘導した。

4. ウイルス複製能の検討

耐性変異がウイルス複製に及ぼす影響を検討した。MT-2 細胞を用いて耐性ウイルスを 50 MAGI Unit (50 MU; 50 個の MAGI 細胞に感染しうるウイルス量) 加え、野生型ウイルス、pNL101 と比較した。経時的に上製を回収し、その上製中に含まれる p24 量を p24 ELISA kit を用いて測定し、複製能の指標にして用いた。

C. 結果

1. NRTI 4'-E-dN 耐性機序の解明

1) 4'-E-dN耐性ウイルスの誘導と塩基配列の決定

Dose escalating 法にて 4'-methyl-2'-deoxycytidine (4'-Me-dC)、4'-ethynyl-2'-deoxyadenosine (4'-E-dA)、4'-ethynyl-2'-deoxycytidine (4'-E-dC)、4'-ethynyl-2'-deoxydiaminopurine (4'-E-dDAP) に対する耐性ウイルスを誘導した。薬剤濃度はそれぞれのEC50から始めた。4'-Me-dCは、passage 8にて1 μ Mでも複製できるウイルスが出現してきた (Figure 1)。このRT領域塩基配列を調べたところ165番目のスレオニン(T)がイソロイシン(I)に、184番目のメチオニン(M)がイソロイシン(I)に置換(T165I/M184I)されていた。4'-Me-dCはM184I/Vに対してその抗ウイルス効果が減弱することを昨年報告したが、その結果と一致した。4'-E-dC、4'-E-dDAP、4'-E-dAに対してもT165I/M184I変異がRT領域に導入されたが、その効果減弱は認められなかった。4'-E-dCと4'-E-dDAPに関してはこの状態がpassage 50まで続き、耐性株の誘導はできなかった。一方4'-E-dAを使用したウイルスはこの後、I142V変異を導入していた。しかし、薬剤濃度を上昇させるとその複製はとまり、この変異が耐性化に大きな影響を及ぼしていないことが示唆された。その後M184IからI84Vに変化したが、耐性度は大きく変化しなかった。その後passage 50にてT165IからI65Rに変異したところで耐性度が上昇した。このままpassage

58まで培養をつづけ、得られたウイルスをHIV-1_{III_B}/4'-E-dArP 58とした。

2) 耐性度の検討

HIV-1_{III_B}/4'-E-dArP 58をMAGI法にてアッセイしたところ、Table 1に示したように4'-E-dAに対して約80倍の耐性を示した。4'-E-dCや4'-E-dDAPおよび3TCに対しても交叉耐性を示した。しかし、AZTには交叉耐性を示さなかった。

3) 感染性クローンをを用いた検討

今回得られたアミノ酸置換はI142V、T165I、T165R、M184Vであるが、このアミノ酸変異のうち、どのアミノ酸変異が耐性を付与したのかを検討するためにそれらのおのおののアミノ酸変異をpNL101にsite directed mutagenesis法を用いて導入し、その耐性度を測定した。その結果これらアミノ酸変異を単独で導入した場合、ほとんど4'-E-dAに対する感受性に変化は見られないか、もしくはごくわずかであった (Table 2)。次にこれらのアミノ酸を2つ以上組み合わせさせた場合の薬剤感受性を検討したところ、T165RとM184Vが組み合わせられたときに耐性度が上昇していた (Table 2)。また、I142V/M184Vの変異体は感染性を有していなかった。これらのことから、耐性に直接関与するアミノ酸はT165RとM184Vであり、I142Vはこれらの変異によって変化したRTの立体構造を補正するものと考えられた。

Table 1. 4'-E-dA 耐性株の薬剤感受性

Compound	Virus		
	III _B	4'-E-dA ^R /P58	SI ¹
	μ M		
AZT	0.032 \pm 0.02	0.014 \pm 0.003	0.4
3-TC	0.27 \pm 0.13	>100	>370
4'-E-dC	0.0016 \pm 0.00012	0.011 \pm 0.01	7
4'-E-dA	0.0086 \pm 0.0046	0.68 \pm 0.4	80
4'-E-dDAP	0.0017 \pm 0.0006	0.075 \pm 0.034	43
4'-E-dG	0.014 \pm 0.0058	0.27 \pm 0.19	20

抗HIV 活性はMAGI法を用いて測定した。
1; selective index, NL_{WT} EC₅₀との比較した。

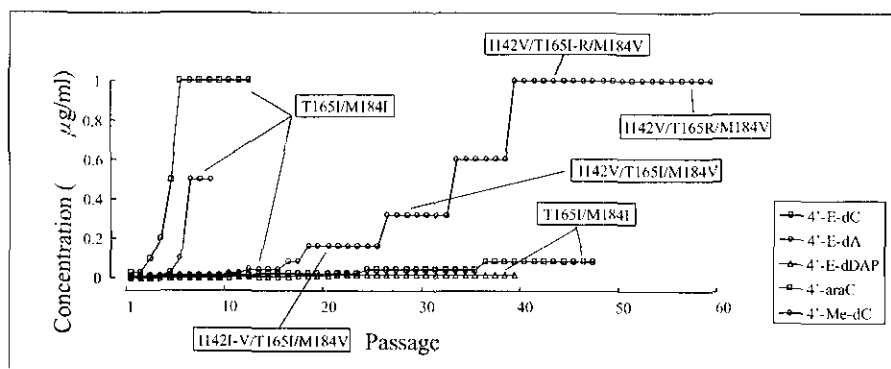


Figure 1. 耐性HIV誘導のプロファイルとアミノ酸置換状況

Table 2. 感染性クローンにおける薬剤感受性

Compound	HIV variants						
	NL _{WT}	I142V	T165I	T165R	M184V	T165I M184V	T165R M184V
						μ M	
AZT	0.029	0.047 (1.6)	0.023 (1)	0.027 (0.9)	0.014 (0.5)	0.021 (0.6)	0.04 (1.4)
3-TC	0.28	0.36 (1.3)	0.25 (1)	0.29 (1)	> 100 (> 360)	> 100 (> 360)	> 100 (> 360)
DDI	3.2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4'-E-dC	0.00092	0.0028 (3)	0.00092 (1)	0.0018 (1.5)	0.0029 (3.2)	0.0021 (2.5)	0.0068 (5.5)
4'-E-dA	0.015	0.019 (1.2)	0.0088 (0.6)	0.029 (1.8)	0.03 (2)	0.065 (3.8)	0.21 (13)
4'-E-dDAP	0.0034	0.0055 (1.6)	0.0029 (0.7)	0.0065 (1.7)	0.0048 (1.4)	0.0069 (1.8)	0.058 (15)
4'-E-dG	0.013	0.028 (2.2)	0.013 (1.1)	0.024 (1.9)	0.029 (2.2)	0.089 (9)	0.24 (18)

抗HIV 活性は MAGI 法を用いて測定した。かっこの中にはNL_{WT} EC₅₀との比較を示した。

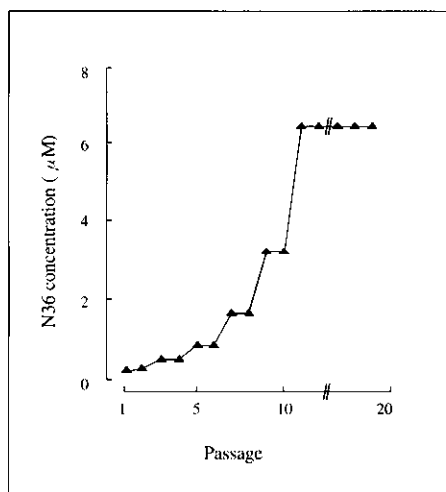


Figure 2. N36 耐性ウイルスを得るのに要したN36濃度および継代数
Dose escalating 法にてN36を0.1から6.4 μMまで上昇させ、耐性ウイルスを得た。

A					
	N127K		AAT → AAR		
	E138Q		GAA → SAA		
B					
	AAT	→	AAG	6 clone	
		→	AAA	3 clone	9/11
	GAA	→	CAA	3 clone	3/11
C					
	NL43		WMEDREINNYTSLIHSLIE EQ QEKNEQELL		
	NL43^R		----- K ----- Q -----		

Figure 3. HIV gp41の塩基配列の変化
A)アミノ酸置換部位とその塩基配列の変化を示した。B)変異の割合をクローン化して検討した。
C) C34におけるアミノ酸置換を示す。

Table 3. 耐性誘導後（培養継代 19 代目）に分離されたウイルスの薬剤感受性

virus	EC ₅₀ * (μ M)		
	N36	ddC	DS5000
NL4-3	0.13	0.45	0.090
NL4-3 ^R	1.2	0.41	0.082

* EC₅₀; 50% antivirally effective concentration
Dose escalating法にてN36を0.1 μ Mから6.4 μ Mまで増加させ、6.4 μ Mでの
escape variantをNL4-3^Rとした。薬剤感受性はMAGI法で測定した。

2. N36 耐性ウイルス

1) 耐性誘導と塩基配列決定

N36 を $0.1 \mu\text{M}$ 存在下から培養を開始し、dose escalating 法を用いて $6.4 \mu\text{M}$ まで上昇させ、この濃度で複製してくるウイルスを N36^R とした (19 passage; Figure 2)。

N36^R の gp41 領域塩基配列を決定したところ N127K と E138Q の 2 つの変異が導入されていた (Figure 3)。N127K は LosAlamos HIV sequence Database でも報告のない新しいアミノ酸置換であった。E138Q に関しては上記 database でわずかながらこの置換を有している株が報告されており、polymorphism であることが予想された。

2) 耐性度の検討

上記のとおり、MAGI 法によって N36^R に対する耐性度を検討した。N127K および E138Q に注目し、NL43_{N127K}、NL43_{E138Q}、NL43_{N127K/E138Q} の組み換えウイルスを作製して、各ウイルスにおける ddC、DS5000 および N36 に対する感受性を MAGI assay にて検討した (Table 3)。その結果、ddC および DS5000 に対して各ウイルスにおける感受性に変化は見られなかったが、N36 に対しては NL43_{N127K} で 4.6 倍、NL43_{E138Q} で 2.9 倍、NL43_{N127K/E138Q} で 3.1 倍の感受性の低下が確認された。

3) N36 耐性組み換えウイルスにおける複製速度の検討

N127K、E138Q および N127K/E138Q 変異がウイルスの複製に及ぼす影響を調べるために MT-4 細胞に 50 MAGI ニットの各ウイルスを加えて経時的に上清を回収し、p24 の量を測定してウイルスの複製速度を調べた (Figure 4)。その結果、NL4-3 および、各組み換えウイルスにおける p24 の産生量から複製速度は NL4-3、NL4-3_{C34Q}、NL4-3_{C34KQ}、NL4-3_{C34K} の順で速いことが示された。しかし、各ウイルスにおける p24 の産生量には大きな差がないことから、これらのアミノ酸置換はウイルスの複製速度に大きな影響を及ぼさないと考えられた。

4) gp41 立体構造の解析

ペプチド同士がどのように結合しているかを N36 および結合する相手側である C34 を混合してその立体構造を Spring 8 にて解析した。その結果、野生株の C34 との結合でみられた 3 回転軸が N127K および E138Q アミノ酸置換が導入された C34 (C34-N127K/E138Q) との結合では消失しており (Figure 5)、結果には示さないが結合の強さを

表す Tm 値も野生型の C34 より C34-N127K/E138Q のほうが高かった。このことは C34-N127K/E138Q が N36 (gp41 の N 末端側 HR を意味する) とより強く結合することを意味し、C 末端側 HR が N 末端側 HR と、ペプチドである N36 より高い親和性を示すと予想された。

D. 考察

本年は、薬剤耐性 HIV を制圧するために以下の 2 つの研究を行った。まず、今まで報告のある主な薬剤耐性株に対しても強い抗ウイルス効果を維持し、さらに高度耐性化した臨床分離株に対してもその効果を維持していた 4'-E-dN の作用機序および耐性機序を解明した。また、新規複製阻害標的として gp41 を介した細胞融合を抑制するペプチド N36 に関して同様に作用および耐性機序を解析した。

4'-E-dN の作用機序として昨年度、NRT 阻害剤として作用していることを示したが、これらの薬剤が何故、現在までに報告されている主な耐性株に対して強い抗ウイルス効果を示せるのかについては未解決のままであった。今まで開発されてきた、または臨床応用されている薬剤はすべて 3' 位の置換や変更であり、HIV がこれらの薬剤に対して耐性化するためにはこれらの核酸誘導体を DNA 伸長中に取り込まないようにすることが必要である。事実、アミノ酸コドン 65、74、151、184 等は この 3' 位認識に重要な働きをしており、これらの変異によって耐性化がもたらされることが明らかにされている。しかしながら、今回我々の同定した 4'-E-dN は 4' 位置換のみで 3' 位の置換や変更はなく、3' 位認識部位の変異によっても、HIV は 4'-E-dN を正常スクレオシドと区別することができないはずである。そのため耐性株に対しても野生株と同様の感受性を保持できるものと考えられた。このことを裏付けるように 3' 位認識部位ではなく酵素活性中心近傍にアミノ酸置換が導入されており、さらにそのアミノ酸の立体構造の予測から 3-TC などで見られた steric hindrance による耐性化と考えられた。この耐性機序の解明からさらにより耐性化しにくいドラッグデザインも可能になると予想される。

次に HIV の細胞融合の機序が HIV 外皮蛋白質である gp41 の N 末端側および C 末端側が相互結合して起こるという従来仮説を、gp41 N 末端側のペ

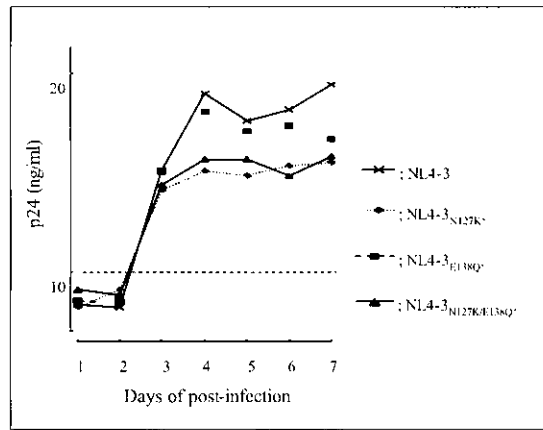


Figure 4. NL_{4,3} および各組み換えウイルスのp24 量の推移
ウイルス複製能をp24 産生によって検討した。

Table 4. pNL4-3 based infectious clones における薬剤感受性

virus	EC ₅₀ * (μ M)		
	N36	ddC	DS5000
NL4-3	0.09	0.45	0.080
NL4-3 _{N127K}	0.41 (x 4.6)**	0.38	0.095
NL4-3 _{E138Q}	0.26 (x 2.9)	0.41	0.077
NL4-3 _{N127K/E138Q}	0.28 (x 3.1)	0.43	0.079

* EC₅₀; 50% antivirally effective concentration

** 括弧の中に野生株のEC₅₀との比を示す

NL4-3を野生株として用いた。

NL4-3及び各組み換えウイルスの薬剤に対する感受性をMAGI法にて検討した。

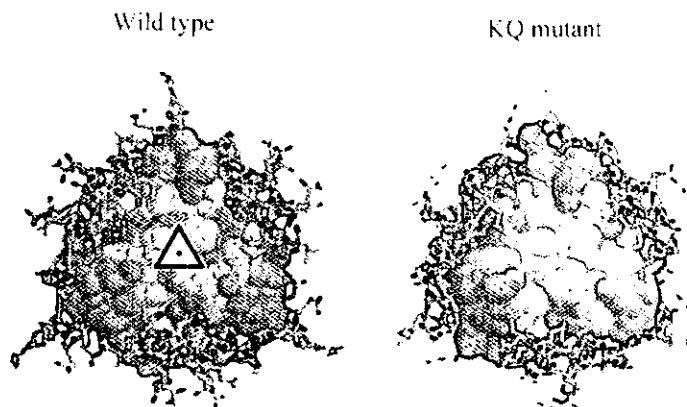


Figure 5. N36/C34KQ complex の模式図
3 回回転軸の消滅が認められた。

プチド、N36に対する耐性機序を解明することから検証した。その結果、N36に対する耐性ウイルスではN127KまたはN127K/E138Qといった二つのアミノ酸変異がC末端側に入っていた。それらの変異を導入した感染性クローンHIV-1は、N36に対して約3~5倍の耐性度を示し、N36に対する耐性度は比較的小さいものであった。この理由として以下のことが考えられた。HIV gp41はウイルスが細胞に侵入するとき、および、感染細胞がシンシチウムを形成してウイルスが細胞-細胞間で拡がる時に機能する。MAGI assayは、ウイルスが細胞に侵入し、Tatが発現するまでのsingle round ウイルス複製を評価する方法なので、シンシチウムを形成するときの細胞-細胞の融合に関しては評価することができない。そのため耐性度が比較的小さく評価されたと考えられた。複数回分の複製サイクルを評価することができれば耐性度は更に大きくなる可能性が考えられる。さらに HIV-1 gp41 C末端側由来ペプチドであるT-20は強力な抗HIV効果を示し、現在米国にて臨床治験が進められ良好な成績を取めているが、T-20に対してもHIV-1は耐性化することが報告されている。このHIV-1はgp41 N末端側36番目のアミノ酸グリシンがセリン、38番目のアミノ酸バリンがメチオニンに置換されている(HIV-1_{G36S/G38V})が、やはり5倍程度の耐性度しか示さない。事実、T-20を投与したHIV感染患者からは、このG36S/V38M変異株が分離後もT-20の効果が持続することも報告されている。今回分離された耐性ウイルスもT-20と同様に、N36に対してin vivoでは大きな耐性を示さない可能性がある。逆にいえば、HIVの耐性化を起しにくく新規薬剤開発の標的として有望であることが予想される。

今回は二つのアミノ酸変異が認められ、これらの変異体のN36に対する感受性を検討した結果、N127K変異ウイルス、E138Q変異ウイルスの順で感受性が低下していた。このことから、N127K変異がN36に対する耐性を付与し、E138Q変異がウイルスの複製速度を上げることに関与し、そして、二つの変異が入ることで複製速度が野生株並の耐性ウイルスが現れるという仮説を立てた。しかし、培養上清中のp24の量を測定した結果、各組み換えウイルスにおける複製速度に大きな差は認められなかった。HIV Sequence Database (Los Alamos national laboratory; Los Alamos, NM)を調べた結果、

gp41の138番目のアミノ酸がQである臨床分離株の存在が報告されており、polymorphismとして存在していると考えられ、E138Q変異ウイルスは耐性やウイルス複製に対して大きな役割を果たしていないと考えられた。

gp41 C末端由来ペプチド、T-20の耐性ウイルスにはgp41 N末端側に_{G36S/G38V}という二つの変異が導入されること、今回gp41 N末端由来ペプチド、N36の耐性ウイルスでgp41 C末端側にN127K/E138Qという、やはり二つの変異が導入されたことから、HIVのgp41を介した膜融合はN末端側およびC末端側の結合によって引き起こされるという今まで提唱されてきた融合機序を強く支持する結果となった。今後、N36に対するさらなる耐性株の誘導や、N36と直接結合するC末端側ペプチドC34に対する耐性、およびgp41の立体構造の解明などが進めば、HIVの細胞融合の解明がいつそう進むことが予想される。また、N36やT-20は現時点ではペプチドであるため製剤化など問題点が残っているが、耐性化してもその耐性度の低さから、今後有望な標的の一つとして挙げられるであろう。

以上、今年度は以前から標的とされていたRTと新規であるgp41に関して新しい阻害剤を用いてその作用機序や耐性機序を解析したのみならず、ウイルス学的にも新たな知見を得た。

E. 結論

本研究によって、耐性ウイルスに効果を示すRTI (4'-ethynyl deoxyadenosine, 4'-E-dA) に対する耐性機序がsteric hindranceによること、新規治療標的HIVエンベロープタンパクgp41由来ペプチドの耐性メカニズムから進入ステップの詳細な解明および新規薬剤開発の標的となりうることを示すことができた。これら2つの研究成果から薬剤耐性からみたウイルス生理学的機能を解析することで今後の薬剤開発標的の決定に重要な情報を供したと考えられた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

著書

1. 児玉栄一、松岡雅雄、満屋裕明:ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤「ウイルス感染症との戦い」医薬ジャーナル社 322-332.

①論文発表

1. 児玉栄一、大類洋、茂田士郎、満屋裕明、松岡雅雄：4'-Ethyne nucleosides; 多剤耐性HIVに著効する新規nucleoside reverse transcriptase inhibitor(NRTI)、第14回日本エイズ学会、京都、2000年11月28-30日
2. K. Kitano, S. Sakata, S. Kohgo, M. Matsuoka, E. Kodama, H. Mitsuya and H. Ohrai. Synthesis of 4'-ethynyl-purine nucleosides possessing anti-HIV activity. Nucleic Acids Symposium Series No 44 (第27回 核酸化学シンポジウム)
3. E. Kodama, H. Ohrai, H. Gatanaga, S. Shigeta, M. Matsuoka and H. Mitsuya. 4'-Ethyne Nucleoside Analogs: Potent Inhibitors Active against Multi-Drug Resistant Variants In Vitro Eighth International Antiviral Symposium and Workshop. Nov 19-21, 2000, Kagoshima, Japan.
4. E. Kodama, H. Ohrai, H. Gatanaga, S. Shigeta, M. Matsuoka and H. Mitsuya. 4'-Ethyne Nucleoside Analogs: Potent Inhibitors Active against Multi-Drug Resistant Variants In Vitro 8th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Feb 4-8, 2001. Chicago, IL.
5. 児玉栄一、満屋裕明、松岡雅雄：新規の核酸系逆転写酵素阻害剤(4'-ethynyl nucleoside)に対するHIV-1の耐性化機序の解明：日本エイズ学会、東京、2001年11月
6. 行木大輔、児玉栄一、松岡雅雄：HIV-1 gp41 N末端由来のペプチドN36に対する耐性化機序の解明：日本エイズ学会、東京、2001年11月

H. 知的財産権の出願・登録状況

4'-C-エチニルプリンヌクレオシド化合物、整理番号 YP2000-008、特許願 2000-137982
抗HIV剤、整理番号 29B01JP、特許願 2001-297963

Ex vivo

3

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： 栗原 健（国立大阪病院 薬剤部）

研究協力者： 高田寛治¹、芝田信人¹、白阪琢磨²、上平朝子²、吉野宗宏³、西野 隆⁴、平林義弘⁵、照屋勝治⁵、土屋亮人⁵、寺門浩之⁶、鷺坂昌史⁷、山元泰之⁸、中村哲也⁹、味澤 篤¹⁰、今村顕史¹⁰、安藤 恵¹¹（¹京都薬科大学薬物動態学教室、²国立大阪病院免疫感染症科、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東京医科大学病院臨床病理科、⁹東京大学医科学研究所感染免疫内科、¹⁰東京都立駒込病院感染症内科、¹¹東京都立駒込病院薬剤科）

研究要旨

①平成12年度に作成したプロトコールは国立大阪病院、国立国際医療センターの2施設で承認され臨床試験を開始した。

②研究班のホームページを開設し、平成13年7月から運用を開始した。研究班での測定件数は269検体で、内訳はSQV:43、RTV:100、IDV:31、EFV:47、APV:11、LPV:37件であった。

③EFVの血中濃度について検討した結果、当院の薬物血中濃度測定値(12h)は国内第I相試験に比べ、高い傾向が認められた。精神神経系副作用が認められた群は血中濃度が高い傾向を示した。EFV服薬中断後に耐性ウイルスが出現した症例について検討した結果、耐性HIV株が出現した症例の平均値(13,200nM:n=3)は、耐性を獲得しなかった症例の血中濃度の平均値(5,711nM:n=3)に比べ高値であった。プラバスタチンとNFV、EFVを併用した症例について検討した。ラットを用いてSQVの体内動態に及ぼすエタノールの影響について薬物動態学的検討を行った結果、経口投与実験では、エタノール処理による血漿中SQV濃度の顕著な低下が観察された。IDV/RTV療法について検討した。IDV/RTV(800mg/100mg)では、RTVによる副作用は軽減されるが、CmaxがIDV単独投与よりも高値となり、腎結石および腎障害が生じやすい傾向が認められた。IDV/RTV(400mg/100mg)の有用性が示唆された。

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限られている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調査・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。また、研究班のホームページを開設し、国内のデータを広く収集する。血中濃度に関連するデータを収集・解析し臨床への応用を検討する。

B. 研究方法

1. 抗HIV薬の血中濃度測定ポイントに関する研究

平成12年度に作成したプロトコールについて国立大阪病院、国立国際医療センターの2施設で承認を得、臨床試験を開始した。

今年度までに収集されたデータのうち、国立国際医療センターで収集されたRTV+SQV、都立駒込病院で収集されたRTV+IDVのデータ解析を行った。(京都薬科大学)

2. 研究班のホームページ (HP) について

研究班のHPは平成13年7月から運用を開始した。システムは次の通り。血中濃度測定を希望する医師は氏名、所属施設等をHPに入力しID、パスワードを取得する。測定希望薬剤名、本数等を入力し送信すると、(株)BMLより測定依頼伝票、採決管等が送付される。研究班事務局からは調査用紙等が送付される。医師は患者血液を採取後検体を(株)BMLに送る。同時に調査用紙を研究班事務局に郵送。結果は(株)BMLより医師・研究班事務局あて郵送される(図3)。

3. プラバスタチンが抗HIV薬の血中濃度に及ぼす影響

Protease Inhibitor(PI)やEfavirenz(EFV)の投与による副作用として、高コレステロール血症等が知られている。これら副作用の軽減を目的に、HMG-CoA還元酵素阻害剤が選択されるケースが見られる。HMG-CoAのうち Simvastatin、Atorvastatin は Cytochrome P450 の分子種である CYP3A4 で代謝を受けることから、PIと併用した場合、本剤の血中濃度が上昇し、横紋筋融解症等の副作用が発現する可能性が高く、併用することは危険であるが、唯一、Pravastatin(Pv)はCYP3A4で代謝を受けにくいとされており、高コレステロール血症の第一選択薬とされている。Pvが抗HIV薬の血中濃度に及ぼす影響について、日本人でのデータはなく、そ

の臨床効果に及ぼす影響は不明である。Pvと抗HIV薬の血中濃度を測定することにより、その影響を確認した。(国立大阪)

4. EFVによる精神神経系の副作用と薬物血中濃度との関係

平成11年10月から平成13年5月まで国立大阪病院を受診し、EFVを投薬された患者50例について、原則として服薬12時間後に採血し、同時に副作用を観察した。また、患者の体重と副作用との関連についても調査を行った。

5. 非ヌクレオシド核酸系逆転写酵素阻害剤の使用例における耐性獲得についての臨床的検討

NNRTI耐性HIVは出現しやすいことが知られている。我々はNNRTI(特にEFV)の副作用により、全ての抗HIV薬を一度に中断後、本剤に耐性のウイルスが出現していた症例を経験した。EFVは血中濃度の半減期が長いことが知られているが、服薬中断後に耐性ウイルスが出現した症例では、血中濃度の減少が遷延し、耐性を獲得しやすい環境になっていたのではないかと推測されたため、NNRTI関連薬剤耐性変異HIV株の出現した要因について検討した。(国立大阪)

6. IDV/RTV療法の臨床と血中濃度

副作用などでIDV/RTVの投与量を変更する必要があるHIV感染者を対象に、IDV/RTVの薬物血中濃度を測定測定(HPLC法)。CD4細胞数、HIV-RNA量、副作用、経過等は診療録より調査し検討を行った。(都立駒込)

C. 研究結果

1. 抗HIV薬の血中濃度測定ポイントに関する研究

都立駒込病院のデータ構造(図1)について、投与後のどの時点での測定値がAUC0-5と相関するか検討した結果、投与2時間目のデータが最もよいことが、AUC0-5を予測するのにトラフを含めた2ポイントを使用する場合何時間目の測定値がよいかについて検討した結果、トラフ値と投与2時間目のデータを使用する場合が最もよい予測性を与えることが判明した。

$$AUC0-5 = 1.59 \times TL + 2.76 \times C(2) + 6.26$$

同様に国立国際医療センターで得られたRTV+SQVについて検討した結果、トラフ値と投与4時間目のデータを使用する場合が最もよい予測性を与えることが判明した。

$$AUC0-8 = 2.34 \times TL + 4.79 \times C(4) + 2.55$$

図1

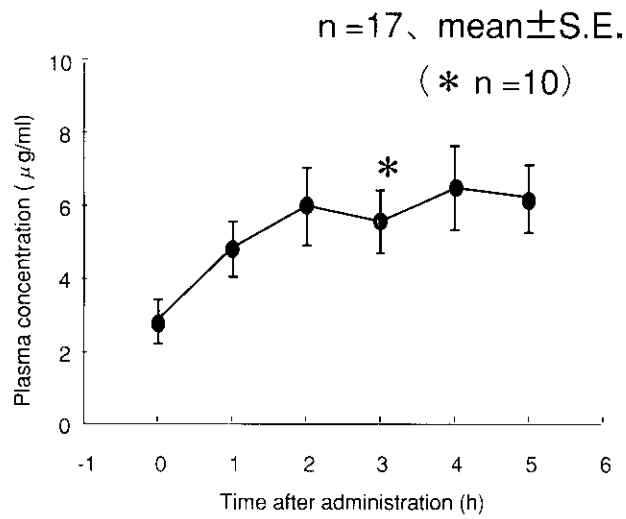


図2 2ポイント重回帰式の予測性

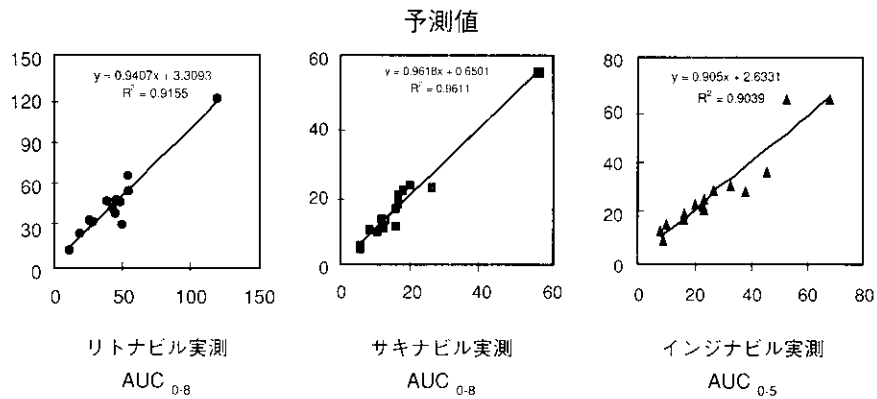


図3 依頼から結果報告までの流れ

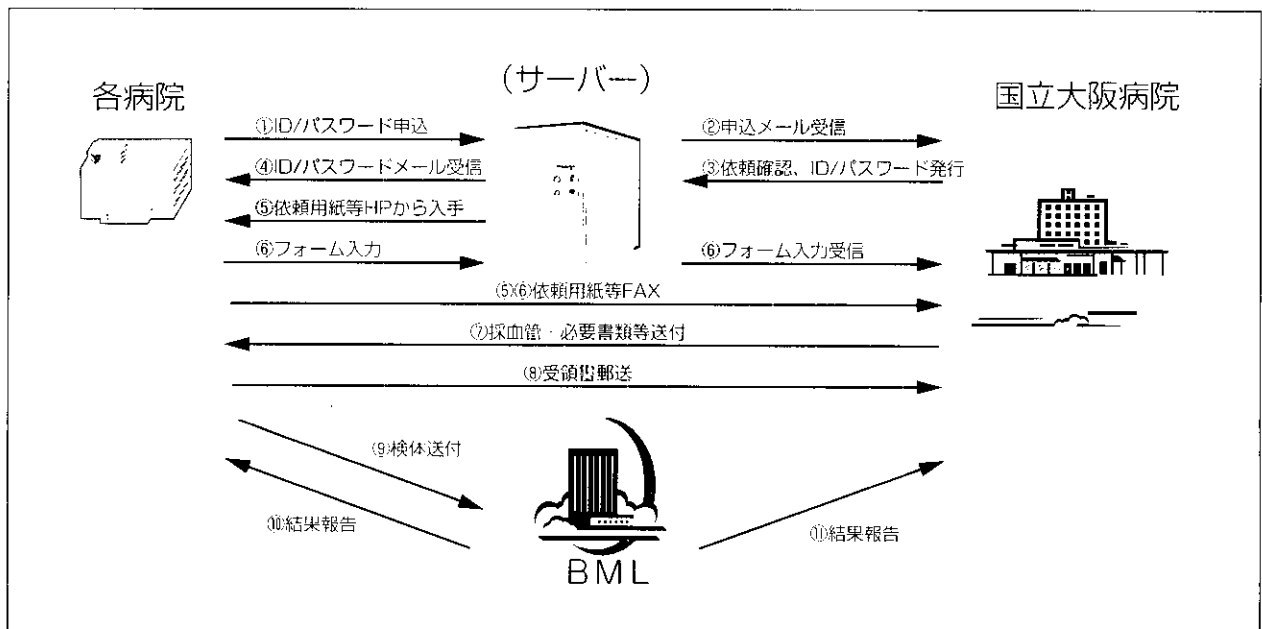


図4 国内データ(12h)との比較

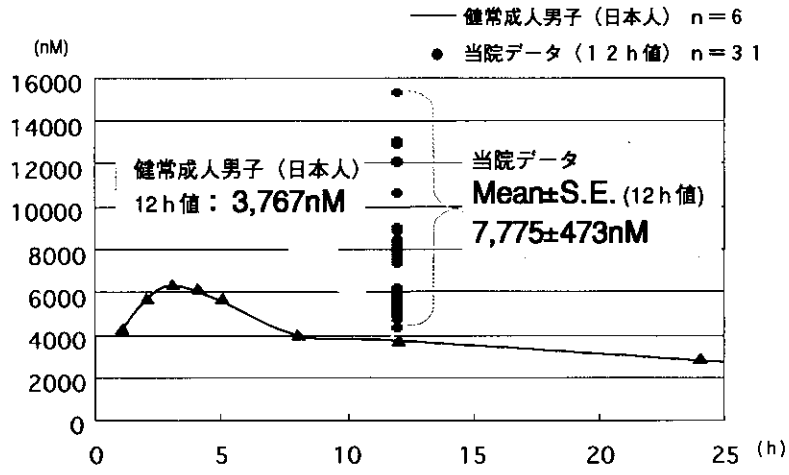


図5 測定時副作用(+)血中濃度

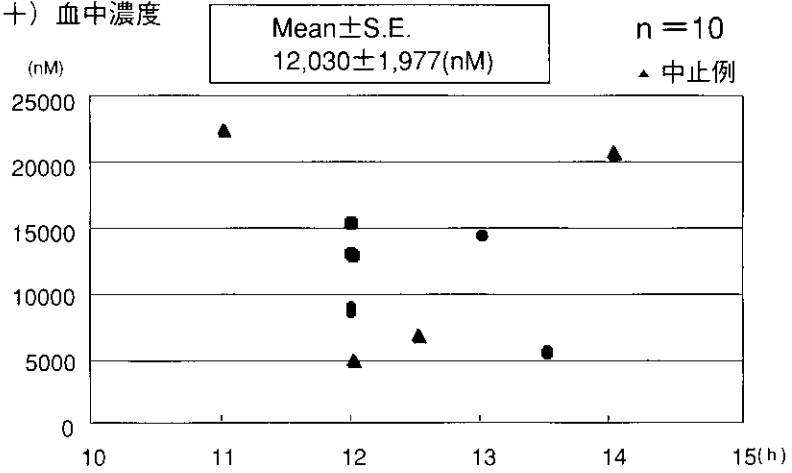


図6 測定時副作用(-)血中濃度

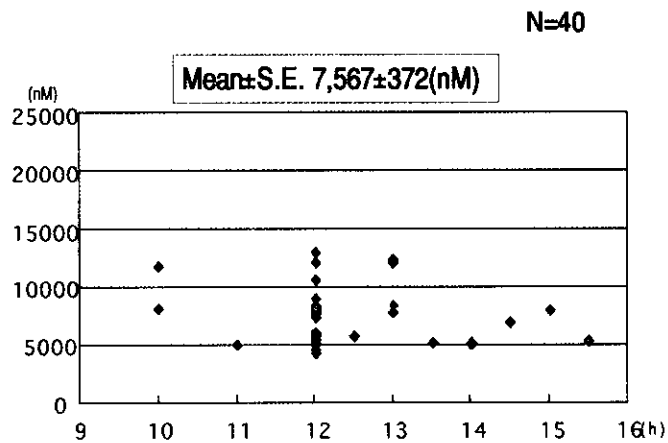
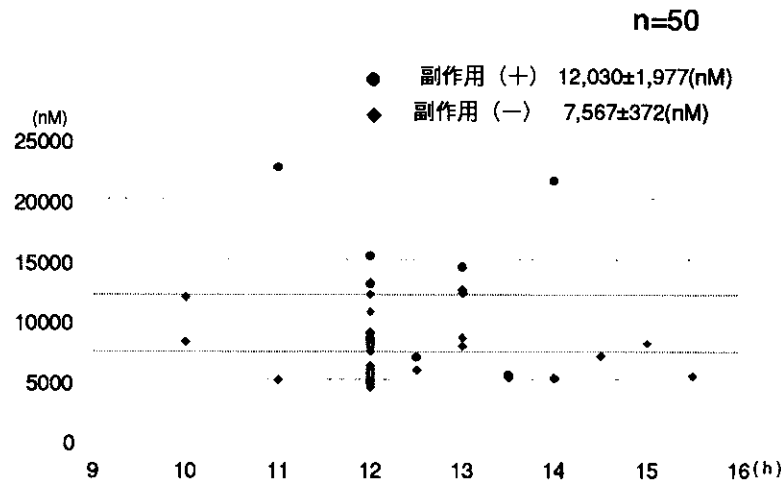


図7 EFV血中濃度



(表1)

インジナビル								
目的変数	AUC ₀₋₈ 変数増加法					定数項	R ²	P-値
STEP	C(2)	C(5)	C(1)	C(4)	TL			
1	3.39					6.88	0.934	0.0000
2	1.81	2.00				3.92	0.959	0.0000
3	0.70	2.27	1.78			0.34	0.986	0.0000
4	0.30	1.77	1.96	0.72		0.33	0.975	0.0000
5	0.01	0.55	2.05	1.54	0.98	1.08	0.989	0.0000

数値は回帰係数を示す

(表2)

インジナビル								
目的変数	AUC ₀₋₈ 変数増加法					定数項	R ²	P-値
STEP	TL	C(1)	C(2)	C(4)	C(5)			
1	4.99					13.31	0.783	0.0002
2	3.04	2.92				4.62	0.912	0.0000
3	1.59		2.76			6.26	0.951	0.0000
4	1.99			2.40		6.10	0.939	0.0000
5	0.31				3.67	3.57	0.933	0.0000

数値は回帰係数を示す

(表3) EFVの副作用による中断および変更例における血中濃度を検討 (n=13)

全薬中断歴有り n=6		EFV服薬中の血中濃度の平均
EFV耐性獲得の有無		
耐性 (n=3)		13200 nM (n=2)
耐性なし (n=3)		5711 nM (n=3)
HAART中断なしでEFVのみ他剤へ変更 n=7		EFV服薬中の血中濃度の平均
EFV耐性獲得の有無		
耐性なし (n=7)		11458 nM (n=6)

(表4)

副作用による全薬中断歴のある症例薬剤中止時の肝機能障害の程度 (n=6)

	EFV服薬中の血中濃度	中止時の肝機能 GOT GPT
耐性例 (n=3)	未測定	正常
	14800 nM	162 149
	11600 nM 以上	106 157
耐性なし (n=3)	6194 nM	正常
	5812 nM	95 149
	5129 nM	正常

$$\text{AUC}_{0-8} = 2.76 \times \text{TL} + 4.75 \times \text{C}(4) + 0.01$$

また、今回の結果について2ポイント重回帰式の予測性を検討した結果、いずれの回帰も高度な予測性を示していた(図2)。(京都薬科大学)

2. 研究班のホームページ(HP)について

HPの運用状況は、平成14年1月末現在、アクセス数400、パスワード取得者数50名。平成13年4月～平成13年12月までに当研究班が(株)BMLに委託し測定した件数は269検体で、内訳はSQV:43、RTV:100、IDV:31、EFV:47、APV:11、LPV:37件であった。

3. プラバスタチンが抗HIV薬の血中濃度に及ぼす影響

① PvとNFVを併用した症例のCmaxは、2h値に比べ4h値が高く、吸収の増大が認められた。Pvの国内臨床試験でCmaxは6.4±2.0ng/mlであり、本症例では9.5ng/mlと高値であったが、筋肉痛・CPK上昇等、横紋筋融解症を示唆する症状はなかった。海外での報告では、PI併用によってPvの血中濃度は低下するとされているが、本症例では逆の結果を経験した。

② PvとEFVの併用前後を比較した症例でEFV血中濃度はPv併用後低下していたものの、Pvの血中濃度は国内臨床試験の結果とほぼ同等であった。PvとEFVを併用した症例において、EFV血中濃度に変化は認められなかったが、Pv投与2時間後のPv血中濃度は国内臨床試験の結果を下回る症例を見た。(国立大阪)

4. EFVによる精神神経系の副作用と薬物血中濃度との関係

当院で測定した結果を国内第I相試験と比較した。国内データにおける服用後12時間後の平均血中濃度は3,767nMであったのに対し、当院のデータは、平均7,775nMであり、国内データに比べ高い傾向が認められた。

採血時、精神神経系副作用を認めた10例の血中濃度は図5のとおり。図中の▲印は、精神神経系副作用のために中止した症例の血中濃度を示す。副作用が認められた群の平均血中濃度は、12,030±1,977nMであった。

採血時、精神神経系副作用を認めなかった40例の血中濃度は図6のとおり。副作用を認めなかった群の平均血中濃度は7,567±372nMであった。2群をまとめた結果は図7のとおり。両群について検定(Unpaired-t-test)を行った結果、副作用が認められた群の血中濃度は認められなかった群に比べ、

有意に高い傾向が認められた(P=0.0472)。体重と薬物血中濃度の関係について調査・検討を行った結果、現時点で明らかな相関は認められなかった。(国立大阪)

5. 非ヌクレオシド核酸系逆転写酵素阻害剤の使用例における耐性獲得についての臨床的検討

EFVの副作用による中断および変更例における血中濃度を検討(n=13)したところ、

全薬中断歴有り(n=6)群で耐性を獲得した症例におけるEFV服用中の血中濃度の平均値は13200nM(n=2)であった。耐性を獲得しなかった症例の血中濃度の平均値は5711nM(n=3)であった(表3)。

HAARTの中断を行わずEFVのみ他剤へ変更した群(n=7)では全症例にEFVの耐性は見られず、EFV服用中の血中濃度の平均値は11,458nM(n=2)であった。

EFVの副作用による全薬中断歴のある症例(n=6)について、薬剤中止時の肝機能障害の程度を調査した結果は表4のとおり。(国立大阪)

6. IDV/RTV療法の臨床と血中濃度

IDV/RTV(400mg/400mg)は、IDV単独投与に比較してCmin増加、Cmax低下がみられ、投与法の改善と腎結石などの副作用軽減が期待できたが、消化器症状などのRTVの副作用で継続困難例が多かった。IDV/RTV(800mg/100mg)では、RTVによる副作用は軽減されたが、CmaxがIDV単独投与よりも高値となり、腎結石および腎障害が生じやすい。IDV/RTV(400mg/100mg)の有用性が示唆された。(都立駒込)

D. 考察

1. 抗HIV薬の血中濃度測定ポイントに関する研究

今回算出した予測式を用いることにより、数少ない測定データから、各薬物のAUCを推定することが可能となり、薬物の効果判定や至適な血中濃度の推定が可能となった。また、この計算式は他の測定ポイントにも応用でき、モニタリング結果を有効に活用できるものと考えられる。(京都薬科大学)

2. 研究班のホームページ(HP)について

HPを開設したことによって国内の医師が容易に血中濃度を測定することが可能となっただけでなく、症例数が少ない日本人の血中濃度データを幅広く収集することが可能となった。

3. プラスタチンが抗HIV薬の血中濃度に及ぼす影響

PIの併用によりPvの血中濃度が上昇したことは、Pvの代謝にP-450の関与は少ないとされているものの、何らかの影響があったことが推測される。当院でNFV服用中の患者にPvを追加投与したところ、2日後に筋肉痛が発現し、投与中止した症例があったことから、Pvの併用には注意する必要があると思われる。また、EFVとPvについては、両剤が互いの血中濃度に影響を及ぼす可能性のあることが示唆された。今後さらに症例を追加し検討することとする。(国立大阪)

4. EFVによる精神神経系の副作用と薬物血中濃度との関係

当院の薬物血中濃度測定値(12h)は国内第I相試験に比べ、高い傾向が認められたことから、国内第I相試験結果には問題があるものと思われる。薬物血中濃度測定時点で精神神経系副作用が認められた群と認められなかった群において有意差が認められたことから、血中濃度が副作用に何らかの影響を与えているものと思われる。海外での報告でも同様の傾向が認められていることから、今後さらに症例を蓄積し検討することとする。薬物血中濃度と体重以外の要因についても、今後さらに検討を加える。

5. 非ヌクレオシド核酸系逆転写酵素阻害剤の使用例における耐性獲得についての臨床的検討

EFVの血中濃度の半減期は、約40-76時間と長い。従って薬剤中止後にNNRTI関連の耐性ウイルスが出現した症例は、内服中止後の血中濃度の減少が、るやかに経過し、薬剤耐性HIV株が出現しやすい環境となったのではないかと推測された。また、中止時に中等度の肝機能障害のあった例では、EFVの血中濃度が低下せず遷延した可能性が考えられ、薬剤耐性HIV株が出現しやすい環境への関連が疑われた。いずれも今後、引き続き検討が必要であると考えられる。EFV服薬中の血中濃度が高値を示した症例では、EFVを中止する場合は併用している二剤の逆転写酵素阻害剤を続け、さらにEFV中止後にNFVなど有効で強力な抗HIV薬を併用するのが望ましいと考える。適切な投与期間についての明らかなevidenceはないが、EFVの血中濃度の半減期から、約一週間程度で良いのではないかと推測されるが、今後も検討が必要と考える。

6. IDV/RTV療法の臨床と血中濃度

IDV/RTV併用投与においては、個体差が大きく、安全な投与のために血中濃度の測定が望ましい。(都立駒込)

E. 結論

プロトコールをもとに、今後さら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、血中濃度測定を臨床に応用することが出来るよう、情報の整理とマニュアル化を進めていきたい。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

①学会発表

1. 吉野宗宏, 他. 東京: 第15回日本エイズ学会総会; 11月. 2001. 抄録番号 158.
2. 柴原健, 他. 東京: 第15回日本エイズ学会総会; 11月. 2001. 抄録番号 159.
3. 木村恵介, 他. 東京: 第15回日本エイズ学会総会; 11月. 2001. 抄録番号 160.
4. 上平朝子, 他. 東京: 第15回日本エイズ学会総会; 11月. 2001. 抄録番号 008.
5. 柴原健. 仙台: 第56回国立病院療養所総合医学会; 11月. 2001. シンポジウム、HIV-1感染症/エイズ治療遂行のためのモニターリング・システムの構築の進展、プロテアーゼ阻害剤血中濃度測定の臨床的意義

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

4

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¹、岡 慎一² (1 熊本大学エイズ学研究センター・ウイルス制御分野・助手、² 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)

研究要旨

15 種類の HIV-1 CTL エピトープと 6 種類の HLA クラス I 抗原を用いて、15 種類の HLA クラス I テトラマーを作製した。これらのテトラマーを用いて、4 人の HAART+ IL2 療法をうけている患者末梢血中の HIV-1 特異的 CD8 T 細胞の数を測定した。4 人とも IL2 投与中に、少なくとも 1 つのエピトープに対する CD8 T 細胞の数の上昇が見られた。この HIV-1 特異的 CD8 T 細胞の数の上昇は、IL2 投与後に HIV-1 ウイルス量の上昇が見られた患者で高く見られた。このことから HIV-1 特異的 CD8 T 細胞の数の上昇は、IL2 投与により HIV-1 感染細胞が活性化され、それにより HIV-1 の複製が亢進して、T 細胞への HIV-1 エピトープの提示が高まった結果と考えられた。

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、⁵¹Cr 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 CD8 T 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った。昨年、本研究でテトラマーを用いるアッセイ法を確立したが、これを用いて HAART 療法および HAART+ IL2 療法における患者末梢血中の HIV-1 特異的 CD8 T 細胞の数を測定する事により、細胞性免疫能の評価を試みた。

B. 研究方法

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

15 種類の HIV-1 epitope と 6 種類の HLA クラス I 分子を用いて、15 種類の HLA クラス I tetramer を作成した (表 1)。

表 1. 本研究でのテトラマー作製に使われた HIV-1 エピトープペプチドと HLA クラス I 抗原

Epitope	HLA	HIV protein	Position	Sequence
Pol313-321	A*1101	pol	313-321	AIFQSSMTK
Nef84-92	A*1101	nef	84-92	AVDLSHFLK
SF2-Env584-592	A*2402	env	584-592	RYLRDQQLL
SF2-Gag28-36	A*2402	gag	28-36	KYKCLKHIVW
SF2-Env679-687	A*2402	env	679-687	WYIKIFIMI
SF2-Nef138-147	A*2402	nef	138-147	RYPLTFGWCF
Gag77-85	A*0201	gag	77-85	SLYNTVATL
Pol476-484	A*0201	pol	476-484	ILKEPVHGV
Gag77-85	A*0206	gag	77-85	SLYNTVATL
Pol476-484	A*0206	pol	476-484	ILKEPVHGV
SF2-Pol283-290	B*5101	pol	283-290	TAFTIPSI
HIV-B35-SF2-4	B*3501	pol	273-282	VPLDKDFRKY
HIV-B35-SF2-6	B*3501	nef	75-85	RPQVPLRPMTY
HIV-B35-SF2-25	B*3501	pol	587-595	EPIVGAETF
HIV-B35-SF2-33	B*3501	env	77-85	DPNPQEVVL

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 クローンあるいは CTL 細胞株を用いて、その特異性を確認した。HAART+ IL2 あるいは HAART 療法患者の末梢血単核球 (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。

3) HAART+ IL2 療法患者の治療法

末梢血中 CD4 T 細胞が $300/\mu\text{l}$ 以上の患者から HAART+ IL2 療法患者 4 名を選んだ。またコントロールとして 2 名の HAART 患者を選んだ (表 2)。治療は 6-8 週間おきに 3 クール IL2 (1.5×10^7 IU) を 5 日間投与した。また末梢血中の CD4 T 細胞数、CD8 T 細胞数および HIV-1 ウイルス量を測定した。

(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書面にて承諾を得た。

さらに、国立国際医療センターの倫理委員会での承認を得た。

C. 研究結果

1) 15 種類の HIV-1 特異的テトラマーの作製：

表 1 に掲げた 15 種類の HIV-1 エピトープおよび 6 種類の HLA クラス I 分子を用いたテトラマーを作製し、その特異性をそれぞれのエピトープに特異的な CTL クローンあるいは細胞株を用いて測定し、テトラマーの特異性を確認した。

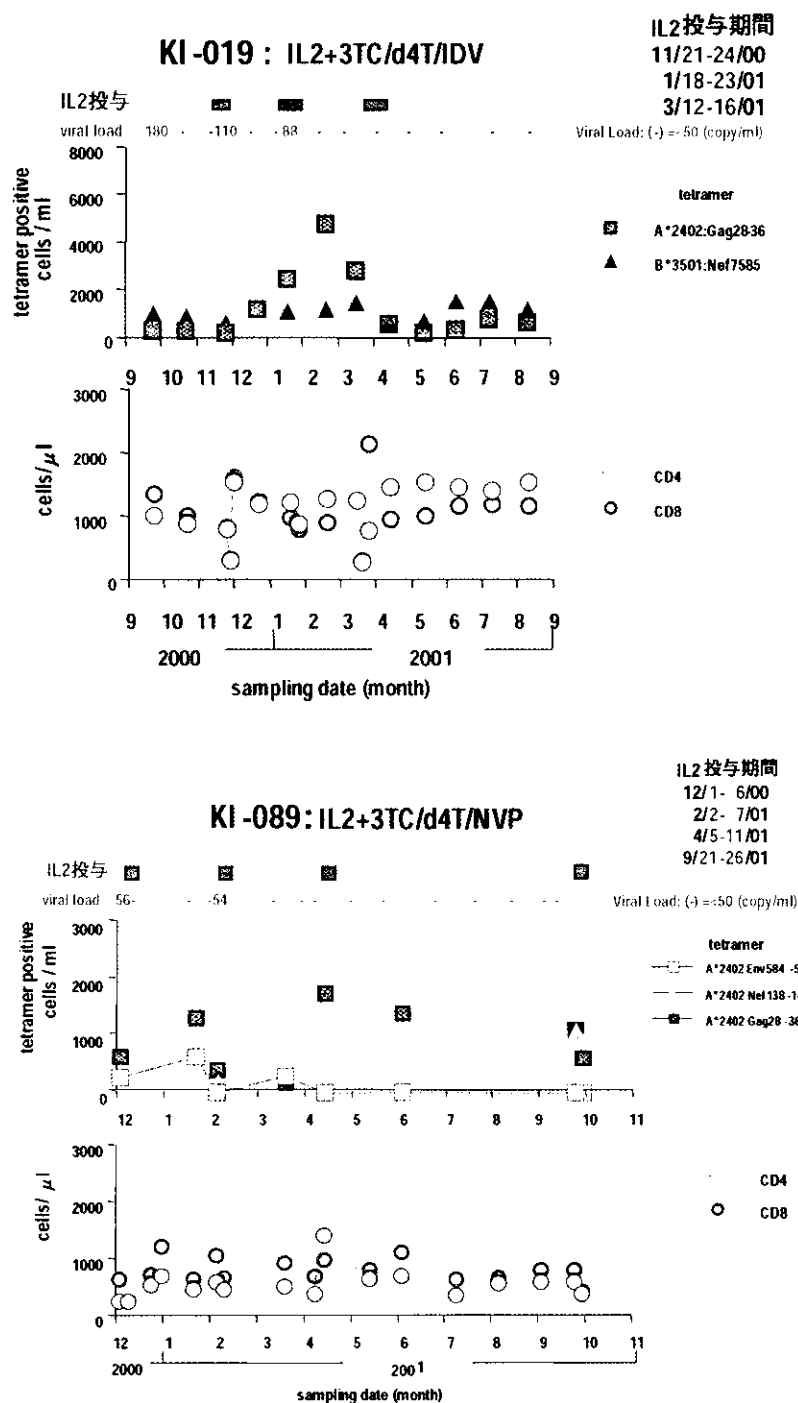
2) HAART+ IL2 療法患者での HIV-1 特異的 CD8 T 細胞の変動：

KI-019 は、1 回目の IL2 投与後から A*2402-Gag28-9 エピトープに対する CD8 T 細胞の数が上昇し、2 回目の IL2 投与後に最大数に達した。一方、B*3501-Nef75-85 に対する CD8 T 細胞の変動は見られなかった。この患者では、1, 2 回目の IL-2 投与後に血中ウイルス量の増加が見られた (図 1)。

KI-089 では、A*2402-Nef138-147 および A*2402-Gag28-36 に対する CD8 T 細胞の数は IL-2 投与後上昇した。一方、A*2402-Env584-592 に対する CD8 T 細胞の変動は見られなかった (図 1)。

KI-090 では、IL-2 投与前から見られた A*2402-

図 1



Nef138-147 に対する CD8 T 細胞の数の高値は IL2 投与後維持されたが、約 1/2 に減少した。一方、A*2402-Gag28-36 に対する CD8 T 細胞数は、IL-2 投与後低値ながら約 3 倍まで上昇したが、IL-2 終了後 2 ヶ月で治療前の値に戻った (図 2)。

KI-028 では、A*2402-Env584-592 および A*2402-Nef138-147 に対する CD8 T 細胞の数は、軽度の上昇を示した (図 2)。

以上の 4 名の HAART+ IL2 治療患者では、すべての CD4 T 細胞の値の上昇が見られたが、CD8 T 細胞の上昇は見られず、その変動は少なかった。

3) HAART 患者の HIV-1 特異的 CD8 T 細胞の変動:

KI-080 では、経過中の A*1101-Pol313-321 に対する CD8 T 細胞数の軽度上昇が見られたが、A*1101-Nef84-92 に対しての CD8 T 細胞数の上昇は見られなかった。また、KI-088 では A*0206-Gag77-85 および A*0206-Pol476-483 に対する CD8 T 細胞数の上昇は見られなかった。

D. 考察

4 人の HAART+ IL2 療法患者で、少なくとも 1 つの HIV-1 エピトープに対する CD8 T 細胞の数の上