

20026635

厚生労働科学研究費補助金

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」

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 杉浦 亙

平成15年3月

# 目 次

I.	<b>総括研究報告書</b>		
	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.	<b>分担研究報告書</b>		
1.	薬剤耐性のモニタリングに関する技術開発研究	7	
	国立感染症研究所 エイズ研究センター		杉浦 亙
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	13	
	慶応義塾大学医学部		加藤真吾
3.	HPLC を用いない抗 HIV 薬の血中濃度と治療効果の関連の検討 ～カレトラRとエファビレンツの血中濃度同時測定法の 確立およびその臨床的有用性～	20	
	国立名古屋病院 臨床研究センター 国立名古屋病院 薬剤科		金田次弘・宇佐美好子 大木 剛
4.	HPLC を用いない抗 HIV 薬の血中濃度と治療効果の関連の検討 ～ロピナビルの日本人健常人での体内動態と食事の影響について～	28	
	国立名古屋病院 臨床研究センター 国立名古屋病院 薬剤科		金田次弘・宇佐美好子 大木 剛・中井正彦・鷺阪昌史
5.	ヒト免疫不全ウイルスの薬物治療に関わるヒト遺伝子多型の解析に関する研究	37	
	東京大学医科学研究所 先端医療研究センター		北村義浩
6.	長期間のプロテアーゼ阻害剤 2 剤併用療法における薬物動態の変化	40	
	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
7.	HAART の最適化に関する臨床研究	42	
	熊本大学エイズ学研究センター		松下修三
III.	<b>研究成果の刊行に関する一覧表</b>	45	

# I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金 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 互

国立感染症研究所 エイズ研究センター 第2研究グループ長

#### 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、サルブエーシ療法を成功に導くことができる可能性を示した。さらに血中濃度をモニタリングによる至適薬剤濃度の維持が副作用の軽減に有効であることを示した。細胞内薬剤濃度測定に関しては細胞内プロテアーゼ濃度測定手技を完成させ、プロテアーゼが細胞内で高濃度に存在することを明らかにした。宿主因子の解析に関しては ABCB1、ABCC4、そして CD209L の SNP について解析を進めた。研究は順調に進行しており、次年度はベッドサイドへの技術の還元を目指している。

#### A. 研究目的

HIV-1 感染症における多剤併用療法は 1995 年以来先進諸国において標準的な治療として定着しているが、そ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以下 4 つの研究を進める

- 1) 治療薬剤血中濃度測定と薬剤耐性検査の評価の検討：血中薬物濃度測定技術は HPLC を用いた手法が一般化している。この課題では HIV-1 感染症治療現場における血中濃度測定の意義を至適治療の実現という点から検討する。
- 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：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とから細胞内薬剤濃度測定法の開発を試み、細胞内薬剤濃度と治療効果、副作用、そして薬剤耐性ウイルス誘導との関連を明らかにする
- 3) 簡易薬剤血中濃度測定検査技術の開発と

その有用性の評価：薬剤血中濃度測定を治療現場で定着させていくためには手技が簡便で迅速な評価系が必要と思われる。この課題では新たな測定方法の開発を試みる

4) 薬剤の有効性を修飾するヒト遺伝子多型の解析：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。この研究では SNP と薬剤濃度、そして治療効果との関連を明らかにする。

## B. 研究方法

1) 治療薬剤血中濃度測定と薬剤耐性検査の評価の検討：

薬剤血中濃度測定を実施した症例において、治療効果、副作用との関連を解析し、その意義について検討した。プロテアーゼ阻害剤、非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤使用症例を対象に解析を行った。

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：

末梢血単核球 (PBMC), MT-2, HPB-(a) 細胞におけるプロテアーゼ阻害剤、非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤の細胞内濃度測定を試みた。約  $2 \times 10^6$  個の PBMC を 1 ml の無血清培地に懸濁、各薬剤を  $10 \mu\text{M}$  あるいは  $100 \mu\text{M}$  になるように添加し、20-30 分後に 15,000 rpm、 $4^\circ\text{C}$  で 15 秒間遠心後、沈殿した細胞にエタノールを加えて攪拌し、15,000 rpm、 $4^\circ\text{C}$  で 5 分間遠心後上清を捨て、残りの細胞液中の薬剤濃度を測定した。薬剤排出実験では、細胞を薬剤に暴露後  $4^\circ\text{C}$  PBS で洗浄、改めて無血清培地に再懸濁。経時的に細胞内濃度測

定を行った。

3) 簡易薬剤血中濃度測定検査技術を開発とその有用性の評価：

2 つの方法を考案し、構築の検討を行っている。

(i) 抗プロテアーゼ阻害剤抗体の作成とそれを用いた ELISA 定量系の構築：ロピナビルの抗原性を高めるため Friedel-Crafts 型反応を用いてカルボキシル基を導入し、その後ハブテンと結合させて感作抗原として使用する。(ii) *in vitro* プロテアーゼ活性測定系を用いたプロテアーゼ阻害剤血中濃度測定系の構築。*In vitro* translation を用いたプロテアーゼ活性測定系を構築し、血中にプロテアーゼ阻害剤濃度の定量への応用を検討する。

4) 抗 HIV-1 薬剤の有効性を修飾するヒト遺伝子多型の解析。

MDR-1 イントロン内の 3 箇所の 1 塩基多型 (SNP)、T2136C、G2677T/A、C3435T について遺伝子多型の解析を行った。HIV-1 感染病態との関連を調べるために CD209L 遺伝子の 5 カ所の SNP と 1 カ所の反復回数多型 (VNTR) をについて遺伝子多型の解析を行った。3~ $5 \times 10^6$  個の PBMC よりゲノム DNA を抽出し、それを鋳型に個 SNP ポイント毎に周辺領域約 1.0Kb を含めた標的遺伝子断片を PCR で増幅した。各 SNP ポイントの型判定は SNP ポイントの一塩基上流が 3' 端に一致する様に設計した検出プローブを用いた。検出プローブを増幅した標的遺伝子断片に結合させた後、ddNTP を加えた一塩基伸長反応を行い、取り込まれた ddNTP のパターンから遺伝子多型の判定を行った。

(倫理面への配慮)

研究の倫理的・科学的妥当性については施設

毎の倫理委員会で審査承認されている。患者に研究の必要性和意義について十分に説明し、書面にて同意を得ている。被検者やその家族が社会的不利益を被ることがないように検査検体の匿名性を確保している。

### C. 研究結果

#### 1) 治療薬剤血中濃度測定と薬剤耐性検査の評価の検討

##### (i) カレトラ血中濃度測定の意義

カレトラ服用後の血中ロピナビル濃度は解析の結果、定常状態ではトラフ値と  $C_{max}$  に大きな変動が無いことが明らかになった。ロピナビル血中濃度は一点のみの測定で評価できることが示唆された。ロピナビルを用いてサルヴェージ療法が成功した症例では、ロピナビルの血中濃度と薬剤耐性レベルとの関連を検討した結果“トラフ値÷IC50”の値が高い症例においてサルヴェージ療法が成功する可能性が示唆された。

##### (ii) サキナビル+リトナビル併用療法での血中濃度測定の意義

DHHS の治療ガイドラインではリトナビル (400mg) + サキナビル (400mg) の併用が推奨されているが、我々はサキナビルの量を増やし、毒性の強いリトナビルの量を減らしたりトナビル (100~400mg) + サキナビル (800~1000mg) による併用療法をサキナビル血中濃度測定を行いながら9名の患者に実施した。この療法では定常状態で  $C_{max}$  は48時間、トラフ値は服薬直前ではなく、むしろ服約後1~2時間後であることがわかった。9例中8例はサキナビルのトラフ濃度を6ヶ月おきに測定しながら治療が進められた。その結果これらの症例では、サキナビルトラフ値の症例平均値は、 $2070 \pm 1317$  ng/ml で、目標血中濃度レベルより 1Log 高い値に維持さ

れていた。また副作用は観察されず、耐性変異の出現も認められなかった。薬剤血中濃度測定を行いながらリトナビルとサキナビルの投与量を決定し、サキナビルトラフ値を  $2070 \pm 1317$  の範囲でコントロールすることにより、良好な臨床効果が得られたと考えられた。

##### (iii) エファビレンツ血中濃度測定の意義 (症例報告)

副作用が出現したカレトラとエファビレンツ併用患者において血中濃度測定結果に基づく服薬量の調整を行った。副作用出現時。エファビレンツ血中濃度は約 16 g/ml と一般的な血中濃度の4倍以上に達していたことから、エファビレンツ過量摂取を疑い服用量を2/3に減量した。その結果副作用症状も消退した。血中濃度測定が有効であったと思われる。

#### 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

健常人 PBMC (n=3) における PI と NNRTI の細胞内濃度を調べたところ、有意な個人差は認められなかった。細胞内の濃度を測定し、PBMC の平均体積を用いて計算した結果、細胞内では薬物が濃縮されていることが明らかになった。薬剤によって濃縮の度合いは異なり、PBMC では、ネルフィナビルが327倍、エファビレンツが101倍、サキナビルが60.5倍、リトナビルが16.1倍、インジナビルが15.8倍、アンブレナビルが1.14倍、ネビラピンが1倍以下であった。細胞に取り込まれた薬物の排泄動態を明らかにするために、薬剤暴露後細胞を薬剤無添加の培地に移し経時的に細胞内薬剤濃度を追跡した。その結果細胞内の薬剤は5分以内にほぼ排泄されたが、一部は24時間後も細胞内に残留していることが明らかになった。

### 3)簡易薬剤濃度測定検査技術の開発

従来 HPLC による血中濃度測定方法は薬剤毎に異なるプロトコルが使用されていたが、病院等の検査室でも実施がしやすいようにプロテアーゼ阻害剤6種類と代表的な活性代謝産物2種類さらに非核酸系逆転写酵素阻害剤エファビレンツの合計9剤の同一測定が可能な統一プロトコルを構築した。抗ロピナビル抗体作成は、Friedel-Crafts 型反応による特定部位へのカルボキシル基の導入が困難であるため、ランダムに導入する方法への変更を検討している。In vitro translation を用いたプロテアーゼ活性測定系のコンストラクトを作成した。この系の感度と精度に関して検討を行っている。

### 4)薬剤の有効性を修飾するヒト遺伝子多型の解析

MDR-1 遺伝子の SNP 解析を健常人25名および同意の取れた感染者32名について MDR-1 イントロン内の3箇所の SNP 解析を終了した。現在抗 HIV-1 療法転帰と MDR-1 多型との関連について検討を行っている。CD209L の SNP および VNTR 解析を115人(59人の HIV 感染者と56人の非感染者)の日本人について行った。この結果を基にハプロタイプ解析を行った結果13種のハプロタイプが存在することが明らかになった。59人の HIV 感染者について5カ所の SNP の遺伝型と HIV RNA 量、CD4 細胞数の関係を調べた。その結果イントロン5の SNP と CD4 細胞数の動態に統計的に有意に高い傾向が認められた ( $p=0.0069$ )。

### D. 考察

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、課題は検査の普及と活用である。新たな検査を普及させるには検査結果が治療を進めていく上で有用な情報である

ことと、多くの施設で実施できるように検査手順の簡略化、そして患者への経済的負担を増やすことが無い様に低コスト化が不可欠である。まず、薬剤血中濃度測定の有効性という点に関しては我々の結果から明白である。検査手順の簡略化については現在ある HPLC による測定プロトコルの簡略化を目指すだけではなく、今までとは全く異なる方法の開発も必要である。このことから我々は HPLC を用いない2つの方法の可能性検討している。いずれの方法も実現できれば検査の大幅な軽減、迅速化、そして低コスト化が実現されると期待される。細胞内薬剤(プロテアーゼ阻害剤)濃度の測定は、方法論としては一応の完成を見たが、まだ細部の条件設定が必要であると考えられる。得られた結果を見る限りにおいて、細胞内でプロテアーゼ阻害剤は明らかに濃縮されており、この現象は従来考えられていたような薬物取り込みが濃度勾配によって能動的に行われるという考え方では説明が困難である。細胞内に薬物を吸着する因子の存在、受動的な取り込みポンプの存在が示唆された。核酸系逆転写酵素阻害剤の細胞内濃度測定は次年度以降の課題である。プロテアーゼ阻害剤に関しては次年度は臨床検体を用いての検討を計画している。宿主因子解析に関しては MDR-1 の解析が進行しつつある。現在は症例数を増やしつつある。今後、血中濃度測定との併用そして細胞内薬物濃度測定実験で用いている細胞などについても遺伝子多型解析を行い、結果を結びつけていく必要がある。

### E. 自己評価

#### 1) 達成度

我々は実際の症例検討から薬剤血中濃度測定による薬剤量の調節の有効性と重要性を

明らかにした。このような成果は今後血中濃度測定を普及させていく上で大変有用である。基礎的研究では細胞内血中濃度測定の基礎的な解析と検討が終了し、より詳細な解析と実際の臨床検体の測定を試みる段階までに到達した。簡易測定系の構築は幾つかのプロトタイプが開発が進行しており研究は順調に推移している。SNP 解析は倫理委員会の承認、患者の同意などの倫理問題があるため解析可能なサンプル確保に予想外の時間を費やすことになり研究は遅れ気味ではあるが、それでも解析総症例数は数十名に達している。このように我々の研究は概ね順調に進展し、研究班の目標に着実に到達しつつある。加えてこの研究班では異なる施設間、そして基礎研究と臨床研究の連携と統合を目指しているが、この点に関しても分担研究者間の研究協力が極めて旨く機能をしており、成功している。

## 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

HIV 感染症の治療の目標は長期にわたる良好な治療効果を得ることである。しかしながら、世界的にも副作用や耐性変異の出現のために1-2年のうちに治療変更せざるを得ない症例が多い。我々の研究班が取り上げている研究は何れも至適治療プロトコルの実現を目指すものであり、その社会的な意義は高いと思われる。

今日わが国では米国のガイドラインがそのまま適用されているが、そこに示されたものに必ずしも科学的な根拠があるわけではない。たとえば DHHS の治療ガイドラインの薬剤量 {リトナビル (400mg) + サキナビル (400mg) BID} は十分な臨床試験の根拠があつて提唱されたものではない。したがって今回我々が試みたモニタリングデータに基

づいた薬剤量の調整の試みは、薬剤濃度測定の有効性を議論するうえで学術的に重要な論拠である。そして今後の治療の最適化を実現させていく上での意義は大きいと考えられる。近年明らかにされた MDR-1 等の遺伝子多型の存在は薬物代謝、薬物毒性、副作用などの表現型が人種により異なることを示しており、日本人における遺伝子多型の把握は重要な命題である。

今まで、薬剤血中濃度に関する研究は多数行われてきたが薬剤が作用する細胞内濃度と治療効果、薬剤耐性ウイルスとの関連はあまり議論されていない。また薬剤の細胞内取り込みと排泄に関しては MDR-1 研究が主であり、詳細な検討は多くない。今回我々の研究成果はその意味においても先駆的なものであり学術的に意義が高い。また今まで報告されてきた細胞内薬剤濃度測定方法は RI 標識薬剤を用いて行われており、患者における応用は不可能であった。この点を解決し患者における解析を実現させるため、我々は細胞内からの新たな薬剤抽出法を検討し、非 RI による測定系の確立に成功した。このような技術的な打開はこれからこの分野の研究を進展させていく上で大きな意義を持っている。

## 3) 今後の展望

我々が取り組んでいる研究は今後大きく二つの方向に発展していく可能性を秘めている。一つは実用的な技術としての展開である。血中ならびに細胞内薬剤濃度測定の治療現場での普及と定着、そしてそれに基づく質の高い治療の提供という HIV-1 感染者たちに直接に恩恵をもたらす展開である。

二つ目は薬物動態に関する基礎的研究、そして創薬研究への展開である。我々の研究により得られる細胞内薬物代謝および薬物代謝に関連した遺伝子多型の解析結果に細胞内



におけるウイルス複製メカニズムの解析を加えることにより、抗ウイルス作用に關与する新たな知見、未知の細胞内因子の発見につながる可能性が期待される。これは新たな作用機転による薬剤が開発できる可能性を示しており、新しい創薬戦略の提供と製薬産業の発展に寄与することが期待される。

#### F. 結論

プロテアーゼ阻害剤と非核酸系逆転写酵素阻害剤使用に薬剤血中濃度測定が至適治療の実現に有用であることが治療効果と副作用軽減の点から明らかになった。細胞内薬剤濃度技術が完成した。簡易血中濃度測定系の構築は基本的な戦略が決定したが、実際の系の構築は現在まだ進行中である。ヒトゲノム解析は解析症例数を増やし、データを蓄積しつつある。このように研究は着実に進んでいる。

#### G. 研究発表

各分担研究報告書 参照

#### H. 知的所有権の出願・取得状況

該当なし

## II. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金 エイズ対策研究事業  
分担研究報告書

「薬剤耐性のモニタリングに関する技術開発研究」

分担研究者 杉浦 互

国立感染症研究所 エイズ研究センター 第2研究グループ長

研究要旨

薬剤耐性 HIV-1 が出現する機序の解明を目的に、細胞内プロテアーゼ濃度の測定およびプロテアーゼの排泄ポンプの一つである p-glycoprotein の遺伝子多型について解析を行った。解析の結果、細胞内に取り込まれたプロテアーゼは細胞外の濃度よりも高く、細胞内で濃縮されている事実が明らかになった。また薬剤の種類、細胞の種類により細胞内への取り込みと濃度に差があることも明らかになった。ABCB1(p-gp)の SNP 解析は snap shot 法を用いて行い、既知の3箇所の SNP についてその遺伝子型を解析した。

A. 研究目的

多剤併用療法が一般的な治療方法として普及するに従い薬剤耐性ウイルスが治療を妨げる新たな脅威として問題となっている。初回治療に脱落する症例は実に 30%から 40%にも達するとされており、その原因の多くを薬剤耐性 HIV-1 の出現が占めている。一度何れかの薬剤に対して耐性を獲得すると交叉耐性のために、その後の治療選択には大きな制約を受ける。このようなことから薬剤耐性 HIV-1 の誘導と出現を如何に抑えるかということが重要な課題となっている。薬剤耐性の出現を引き起こす種々の因子のなかでも特に治療薬剤の血中濃度を十分に維持させることが重要である。この研究では薬剤血中濃度、細胞内濃度測定を行うと共に、薬剤の排泄代謝に関与する宿主因子の遺伝型と薬剤濃度の関連を探り、至適治療の実現を目標とする。

B. 方法

(1) T 細胞株におけるプロテアーゼ阻害剤の濃度測定

解析対象として我々が独自に開発した HPB-M(a)/LTR-Luc 細胞の親株細胞である HPB-M(a)と一般的に HIV-1 感染実験の際に宿主

細胞として使用される MT-2 細胞を用いた。1x10<sup>6</sup> の細胞を 20, 10, 5, 2.5 uM のプロテアーゼ阻害剤 (saquinavir, nelfinavir, indinavir, amprenavir, lopinavir) に 20 分間暴露した。細胞外の残留薬剤を取り除くため水冷 PBS で洗浄後、分担研究者加藤により考案された手技に則り細胞を粉碎し細胞内に吸収された薬剤の抽出を行った。抽出後 HPLC (Waters C18 カラム使用) にて薬剤量を測定した。

(2) ABCB1 遺伝子の SNP 解析

ABCB1 には exon 内に 3 箇所の SNP (T1236C, G2677T/A, C3435T) があることが明らかにされている。それぞれの SNP について snap-shot 法を用いて遺伝子型の同定を行った。末梢血単核球 1x10<sup>6</sup> 個よりゲノム DNA を市販されているフィルター法による抽出キットを用いて行った。抽出ゲノムを鋳型に目的の SNP を含む約 1.0Kb の遺伝子断片を PCR にて増幅した。SNP 直前の塩基まで結合する 20bps 前後のプロープを設計し、Taq で DNA 伸長反応を行った際に取り込まれる ddNTP の種類により SNP パターンの判定を行った。

(倫理面への配慮)

研究の倫理的・科学的妥当性については施設毎の倫理委員会で審査承認されている。患者に研究の必要性和意義について十分に説明し、書面にて同意を得ている。被検者やその家族が社会的不利益を被ることがないように検査検体の匿名性を確保している。

### C. 結果

(1) T細胞株におけるプロテアーゼ阻害剤の濃度測定(図1)

5つの薬剤について細胞内濃度の測定を試みた。図1に示すように何れの薬剤も培養液中の濃度に比例して細胞内濃度の上昇が認められた。上昇勾配をみると amprenavir, saquinavir, indinavir のように比較的勾配の緩やかな薬剤と、nelfinavir と lopinavir のように勾配の急峻な薬剤の二群に分けられることが明らかになった。ほとんどの薬剤で HPB-M(a) と MT-2 とでほぼ同じ値を呈したが、lopinavir のみ二つの細胞で有意の差が認められた。また nelfinavir のみ他の薬剤と異なり 10 $\mu$ M より濃度を挙げると急激に薬剤の量が増加することが明らかになった。この原因については現在解析中である。

(2) ABCB1 遺伝子の SNP 解析 (図2)

同意の取れた健康人9名およびHIV-1感染者27名についてABCB1のSNP解析を行った。健康人、感染者における T1236C, G2677T/A, C3445T の多型分布を比較したが、いずれにおいてもでは SNP 分布に有意な差は認められなかった。

### D. 考察

細胞内におけるプロテアーゼ阻害剤を測定した結果、幾つかの事実が明らかになった。一つは薬剤により細胞内への取り込みに差があるということである。Amprenavir, saquinavir, indinavir のように細胞内濃度の低い薬物と、nelfinavir や lopinavir のように高いものが認められたが、何がこのような差を作り出しているか現状では明らかではない。可能性として考えられるのは細胞膜の透過性の違い、細胞内で薬剤と結合するタンパクとの親和性の差、あ

るいは排泄ポンプ (p-gp) との親和性の差などがある。今後このような因子について検討を加え細胞内におけるプロテアーゼ阻害剤の動態に付いて解析をして行く予定である。二つ目に細胞種による薬剤濃度の差があることである。今回対象とした2つの細胞株はヒトT細胞由来の株であり、ほとんどの薬剤でほぼ一致した細胞内濃度を認めたが、lopinavir では 10 $\mu$ M, 20 $\mu$ M の二点で細胞による違いを認めた。T細胞においてもこのような差がある事から、レポーター細胞としてよく用いられている Hela 細胞との比較を検討している。3つ目は nelfinavir で認められた高い薬剤濃度における急激な細胞内への蓄積である。このようなことがなぜ起こるのか細胞毒性の可能性も含めて解析して行く予定である。ABCB1 の SNP 解析に関してはまだ症例数も少ないことから現時点では明確な結論を導き出すところまでは達していない。今後さらに症例数を増やしていくことと、血中濃度あるいは細胞内濃度等の客観的なパラメーターを加えて検討することが必要であると考えられた。

### E. 結論

細胞内プロテアーゼ濃度の測定を行った。薬剤排泄ポンプのひとつである ABCB1 (p-gp) の3箇所SNPについてSnapshotを用いた解析を行った。

### F. 健康危険情報

該当なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1) Fumihiko Yagyu, Yusei Ikeda, Koya Ariyoshi, Wataru Sugiura, Som-Arch Wongkhomthong, Michiaki Matsuda, Hiroshi Ushijima

Differentiation of Subtype B and E of Human Immunodeficiency Virus type 1 by Polymerase chain reaction Using novel env gene primers.

Journal of Virological Methods 2002,

101:11-20

2) Aiko Okano, Masakazu Matsuda, Tomoko Chiba, Kenji Moriya, Kaneo Yamada and Wataru Sugiura

Discordant Movement of CD4-Positive T-Cell Count in HIV-1 Infected Patients with HARRT Failure.

Jpn. J. Infect. Dis., 2002, 55 : 62-65

3) Lay Myint, Koya Ariyoshi, Hua Yan, Alexander J. Frater, Wattana Auwanit, Panita Pathipvanith, Kaneo Yamada, Masakazu Matsuda, Tomoko Chiba, Kazunori Fujita, Myra McClure, Jonathan N.Weber, and Wataru Sugiura

Mutagenically Separated PCR Assay for Rapid Detection of M41L and K70R Zidovudine Resistance Mutations in CRF01\_AE ( Subtype E ) Human Immunodeficiency Virus Type 1.

Antimicrobial Agents & Chemotherapy, 2002, Vol.46 : 3861-3868

4) Noriko Kobayashi, Hitomi Taguchi-Nakamura, Mieko Goto, Tetsuya Nakamura, Koichiro Nakamura, Wataru Sugiura, Aikichi Iwamoto and Yoshihiro Kitamura

Polymorphisms and Haplotypes of the CD209L Gene and Their Association with the Clinical Courses of HIV-Positive Japanese Patients.

Jpn. J. Infect. Dis., 2002, Vol.55 : 131-133

5) L Myint, M Matsuda, Z Matsuda, Y Yokomaku, T Chiba, A Okano, and W Sugiura

HIV-1 Gag cleavage site mutations and non-cleavage site mutations are closely related in viral fitness recovery process.

Antiviral Therapy 2002, Vol.7; S63

6) K Ariyoshi, M Matsuda, H Miura, K Yamada, NS Hellmann, and W Sugiura

Unique drug resistant mutation patterns found in HIV-1 CRF01\_AE (subtype E) with antiretroviral treatment failure.

Antiviral Therapy 2002, Vol.7; S150

7) Mutsunori Iga, Zene Matsuda, Akihiko Okayama, Wataru Sugiura, Seiichi Hashida, Kazuhiro Morishita, Yoshiyuki Nagai, Hirohito Tsubouchi

Rapid Phenotypic assay for human immunodeficiency virus type 1 protease using in vitro translation.

Journal of Virological Methods 2002, 106:25-37

8) 杉浦 互

HIV のゲノムと薬剤耐性

現代医療 Vo.34, No.5:153-159, 2002

9) 杉浦 互

HIV 診断技術と薬物治療の発展

ウイルス 第52巻 :83-87 2002

## 2. 学会発表

1) L Myint, M Matsuda, Z Matsuda, Y Yokomaku, T Chiba, A Okano, K Yamada, W Sugiura

HIV-1 gag cleavage site mutations and non-cleavage site mutations are closely related in viral fitness recovery process

XI International HIV Drug Resistance Workshop. Jul.2-5, Seville-Spain

2) K Ariyoshi, M Matsuda, H Miura, K Yamada, NS Hellmann, W Sugiura

Unique Drug Resistant Mutation Patterns Found in HIV-1 CRF01\_AE(subtype E) with Anti-Retroviral Treatment Failure.

XI International HIV Drug Resistance Workshop. Jul.2-5, Seville-Spain

- 3) W. Sugiura, F Ren, M. Matsuda, T. Chiba, M.Kakizawa, H. Tanaka.  
Sequential Linking Analyses Of Within-Host Drug Resistance Evolution by Reconstructing The Serial Phylogenetic Tree Of HIV-1 Protease Under HAART  
Third HIV DRP Symposium Antiviral Drug Resistance. Dec, 8-11, Virginia, USA. 2002
- 4) 杉浦 互  
薬剤耐性 HIV-1 における gag の関与と薬剤耐性検査におけるその意義  
第 5 回 白馬シンポジウム・最新エイズ研究 2002・白馬
- 5) 杉浦 互、松田昌和、千葉智子、岡野愛子、守谷研二、山田兼雄、山本直樹  
多剤併用療法の導入による抗 HIV-1 薬剤耐性変異の動向  
第 50 回日本ウイルス学会 2002 年 10 月 16-18 日、札幌
- 6) 杉浦 互  
プロテアーゼ阻害剤耐性 HIV-1 で見られるプロテアーゼ領域外変異とその働き  
第 16 回日本エイズ学会学術集会 2002 年 11 月 28-30 日、名古屋
- 7) 松田昌和、千葉智子、岡野愛子、守谷研二、富田康浩、佐藤裕徳、杉浦 互  
相同組換えによる患者由来 CRF01\_AE の再構築とその解析  
第 16 回日本エイズ学会学術集会 2002 年 11 月 28-30 日、名古屋
- 8) 千葉智子、滝澤万里、松田昌和、松田善衛、横幕能行、岡野愛子、守谷研二、山田兼雄、本多三男、杉浦 互  
ヒト T 細胞株を用いた新たな HIV-1 薬剤感受性検査法の確立の試み  
第 16 回日本エイズ学会学術集会 2002 年 11 月 28-30 日、名古屋
- 9) 田中理恵、松田昌和、杉浦 互、花房秀次、根岸昌功、加藤真吾  
ジェノタイプ法とフェノタイプ法による抗レトロウイルス薬に対する HIV-1 の薬剤感受性検査結果の比較  
第 16 回日本エイズ学会学術集会 2002 年 11 月 28-30 日、名古屋
- 10) 岡野愛子、松田昌和、千葉智子、守谷研二、山田兼雄、杉浦 互  
多剤併用療法導入後の本邦における抗 HIV-1 薬剤耐性変異の動向  
第 16 回日本エイズ学会学術集会 2002 年 11 月 28-30 日、名古屋
- 11) 須藤弘二、西澤雅子、嶋 貴子、近藤真規子、向出雅一、蜂谷敦子、岡 慎一、加藤真吾、伊藤章、宇宿秀三、野口有三、相楽裕子、杉浦 互、今井光信  
同一患者検体を用いた薬剤体制感受性検査結果の比較  
第 16 回日本エイズ学会学術集会 2002 年 11 月 28-30 日、名古屋
- 12) 林 公一、戸谷良三、喜多恒和、稲葉憲之、井村総一、大場 悟、葛西建郎、北村勝彦、杉浦 互、高野政志、谷口晴記、外川正生、早川 智、塚原優己、箕浦茂樹、保田仁介、和田裕一、大久保秀夫、長縄 聡、吉野直人  
HIV 母子感染予防の臨床的研究 (1) この 3 年間における妊婦 HIV 抗体検査率の動向について  
第 16 回日本エイズ学会学術集会 2002 年 11 月 28-30 日、名古屋
- 13) 和田裕一、戸谷良三、喜多恒和、稲葉憲之、井村総一、大場 悟、葛西建郎、北村勝彦、杉浦 互、高野政志、谷口晴記、塚原優己、外川正生、早川 智、林 公一、箕浦茂樹、保田仁介、大久保秀夫、長縄 聡、吉野直人  
HIV 母子感染予防の臨床的研究 (2) 産婦人科領域からの全国調査成績

第16回日本エイズ学会学術集会 2002年11月  
28-30日、名古屋

14) 外川正生、戸谷良三、喜多恒和、稲葉憲之、  
井村総一、大場 悟、葛西建郎、北村勝彦、杉浦  
互、高野政志、谷口晴記、塚原優己、林 公一、  
箕浦茂樹、保田仁介、和田裕一、大久保秀夫、  
長縄 聡、吉野直人、早川 智

HIV 母子感染予防の臨床的研究 (3) 小児科領  
域からの全国調査

第16回日本エイズ学会学術集会 2002年11月  
28-30日、名古屋

15) 塚原優己、戸谷良三、喜多恒和、稲葉憲之、  
井村総一、大場 悟、葛西建郎、北村勝彦、杉浦  
互、高野政志、谷口晴記、外川正生、早川 智、  
林 公一、箕浦茂樹、保田仁介、大久保秀夫、長  
縄 聡、吉野直人

HIV 母子感染予防の臨床的研究 (4) HIV 母子  
感染予防対策の普及を目的としたマニュアルの  
改訂

第16回日本エイズ学会学術集会 2002年11月  
28-30日、名古屋

図1 HPB-M(a)とMT-2細胞における細胞内薬剤量の比較

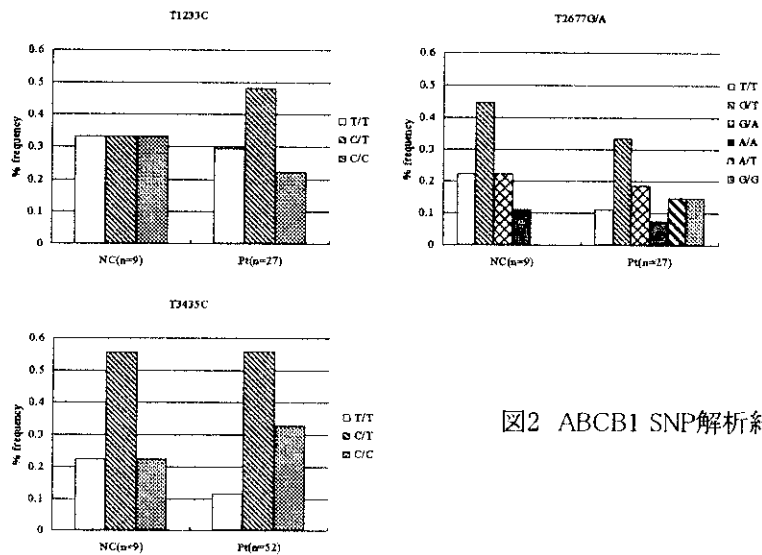
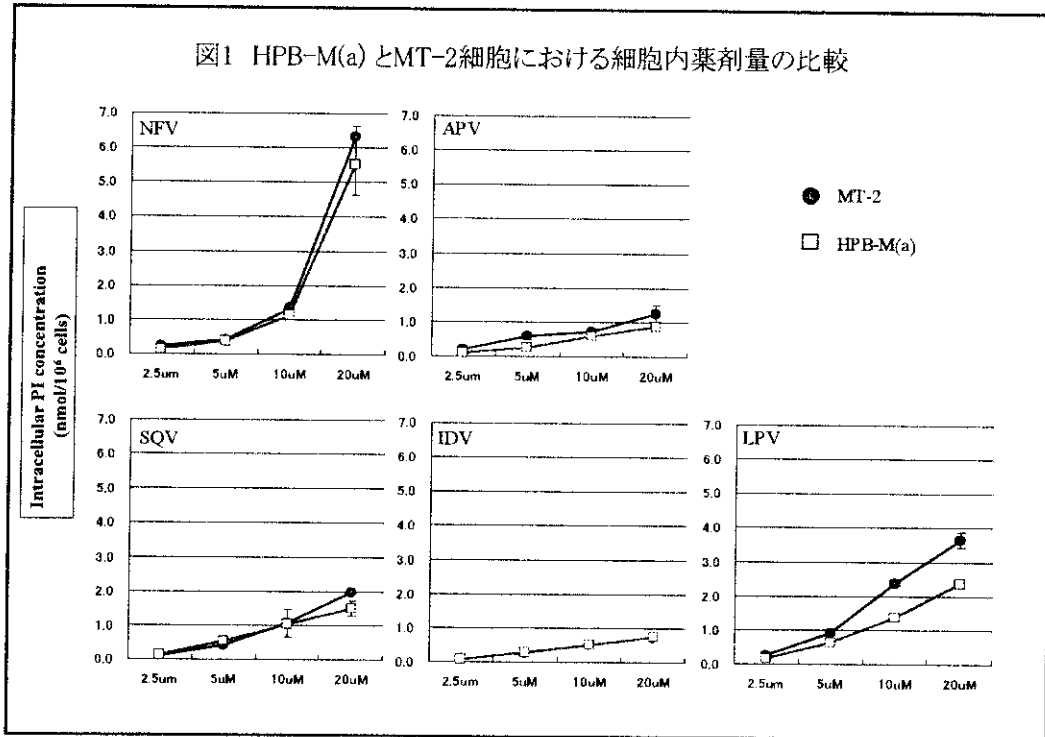


図2 ABCB1 SNP解析結果



厚生労働科学研究費補助金 エイズ対策研究事業  
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

抗レトロウイルス薬(6種類のプロテアーゼ阻害薬、2種類の非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害薬および AZT とそのリン酸化物)の細胞内濃度を HPLC によって測定する簡便な方法を確立した。この方法を用いて末梢血単核球における薬剤の挙動を研究した結果、多くの抗 HIV 薬が細胞内で濃縮されること、その濃縮比が薬剤によって大きく異なること、薬剤間相互作用があることが示された。また、細胞内の薬剤が抗ウイルス作用をもつことも示された。これらの結果から、細胞内薬剤濃度の測定は抗 HIV 薬の開発や薬物モニタリングの臨床的応用において重要な意味があることが示唆された。

A. 研究目的

HIV-1 治療における薬剤モニタリングにおいて、抗 HIV 薬が実際に働いている細胞内における濃度を測定し、その臨床的意味を知ることが重要である。そこで、末梢血単核細胞 (PBMC) におけるプロテアーゼ阻害薬 (PI)、ヌクレオシド系逆転写酵素阻害薬 (NRTI) 及び非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害薬 (NNRTI) の細胞内濃度を測定する方法を確立し、この方法を用いて細胞外薬剤濃度との関連、血漿タンパクとの結合の影響、薬剤間の相互作用を調べた。また、PI に関しては細胞内の薬剤が抗ウイルス作用をもつかどうかを調べた。

B. 研究方法

PBMC の調製は健常人末梢血より Ficoll-Paque を用いて取扱説明書通りに行った。この PBMC を抗 CD3 抗体で刺激し IL-2 存在下で培養した。

細胞内への薬剤の取り込み及びその抽出は以下のようにして行った。休止期あるいは増殖期にある約  $2 \times 10^6$  個の PBMC を 1 ml の無血清培地 (VP-SFM, GibcoBRL) に懸濁し、薬剤を  $10 \mu\text{M}$  あるいは  $100 \mu\text{M}$  になるように添加し、所定の時間後に 15,000 rpm、 $4^\circ\text{C}$  で 15 秒間遠心して細胞を沈殿させた。この沈殿を  $500 \mu\text{l}$  の氷冷 PBS で同様に洗浄した後、 $150 \mu\text{l}$  の PBS で再懸濁し、その内の  $100 \mu\text{l}$  に  $150 \mu\text{l}$  のエタノールを加えて攪拌し、15,000 rpm、 $4^\circ\text{C}$  で 5 分間遠心して上清をとった。残りの細胞液を用いて細胞濃度を測定

した。細胞内薬剤の排出実験は、薬剤で処理し氷冷 PBS で洗浄した PBMC を薬剤無添加の無血清培地に再懸濁し、所定の時間後に 15,000 rpm、 $4^\circ\text{C}$  で 15 秒間遠心して細胞を沈殿させた後、同様の抽出操作を行った。

薬剤の定量は HPLC (日本分光) を用い、製薬会社から提供された各薬剤の標準品を対照にして行った。HPLC のポンプは 880-PU 型、サンプルインジェクターは  $200 \mu\text{l}$  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。

休止期及び増殖期にある PBMC を血球計算盤に入れ、その顕微鏡撮影像からこれらの平均直径を測定し、細胞を球体と仮定することによって体積を算出した。

HIV-1 LAI 株に恒常的に感染した MOLT-4 細胞を段階的濃度の薬剤で前処理し、薬剤を含まない培地を加えたマイクロプレートに移し 24 時間培養後、p24 濃度を測定し、細胞内に取り込まれた薬剤の 50% 阻害濃度を決定した。

C. 研究成果

3 人の健常人由来 PBMC における PI と NNRTI の細胞内濃度を調べたところ、休止期及び増殖期のどちらの PBMC でも個人差は認められなかった。

抗 HIV 薬の多くは細胞内で濃縮された (図 1)。PBMC の平均体積を用いて計算した見かけの濃縮比は薬剤によって大きく異なり、休止期の PBMC では、NFV が 327 倍、EFV が

101 倍、SQV が 60.5 倍、RTV が 16.1 倍、IDV が 15.8 倍、APV が 1.14 倍、NVP が 1 倍以下であった。増殖期の PBMC でもほぼ同様の濃縮比であった。

培地中にヒト血漿を加えると休止期及び増殖期の PBMC ともに細胞内薬剤濃度は低下した (図 2)。休止期の PBMC における細胞内薬剤濃度の低下は遊離薬剤の減少と一致していたが、増殖期の PBMC における細胞内薬剤濃度の減少はそれよりも小さかった。これは増殖期の細胞が血漿タンパクと結合した薬剤の一部を取り込むことができることを示唆している。

RTV を共存させると、SQV の細胞内濃度が増加した。また、細胞外 SQV 濃度が 50  $\mu\text{M}$  以上になると RTV の細胞内濃度が増加した (図 3)。このことは細胞内濃度に関して薬剤間で相互作用があることを示している。

薬剤でいったん処理した細胞を薬剤無添加の培地に移すと、細胞内に取り込まれた薬剤はその大部分が 5 分以内に排出されるが、一部は 24 時間後も細胞内に残留した (図 4)。この残留薬剤に抗ウイルス活性があるかどうかを、HIV-1 を恒常的に産生する MOLT-4/LAI 細胞を使って調べたところ、SQV、RTV、NFV、LPV において、培地中に薬剤を加えたときと比べて 5 分の 1 以上の抗ウイルス作用があることが示された (図 5)。

AZT は休止期の PBMC には取り込まれなかった。増殖期の PBMC には取り込まれ、細胞内濃度は細胞外濃度に比例していたが、一リン酸化物の濃度は比例せず、飽和する傾向があった (図 6)。

#### D. 考察

細胞内の PI の動態は influx transporter と efflux transporter、さらに細胞内の結合因子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 と細胞内結合因子についてはまったく分かっていない。

今回実験に用いた 3 人の健康人由来 PBMC では薬剤の細胞内取り込みに個人差が認められなかったが、例数を増やすと取り込みに大きな差がある個人が見つかる可能性がある。その場合、PI の efflux transporter である P-glycoprotein や MRP1 の遺伝子上の差異を調べる予定である。薬剤の細胞内取り込みの

遺伝的要因を明らかにすることができれば、個人個人に合った治療薬の選択が遺伝子検査によって判定できるようになることが期待される。

今回検討した薬剤の多くで、細胞内における見かけの薬剤濃度が各薬剤の溶解度を超えていた。このことは細胞内における薬剤は溶解状態ではなく、なんらかの細胞因子と結合して存在しているか、結晶状態で存在していることを示唆している。

PI と NNRTI のほとんどは細胞内で濃縮されており、その濃縮比は薬剤によって大きく異なっていた。また、細胞内に存在する薬剤は抗 HIV 活性があることが実証された。これらのことは非常に重要な意味をもつ。第一に、今までの抗 HIV 薬の薬物動態は血中濃度の測定によって評価されてきたが、細胞内濃度測定を加味しなければ臨床的に意味のある薬物動態が得られないことを示唆している。第二に、細胞内に薬剤が長期に滞留し抗ウイルス作用があることは、服薬の間隔を血中濃度の変化だけで決めることに疑問があることを意味する。第三に、抗 HIV 薬の開発において、細胞内に取り込まれやすいように化学構造を設計することが重要であることを示している。このことは今まであまり注目されてこなかったように思う。第四に、HIV-1 の薬剤耐性をフェノタイプで調べる場合、使っている細胞の薬剤の取り込みやすさによって阻害濃度が大きく異なってしまうことが予見される。血漿タンパクとの結合率とも合わせ、研究室間でフェノタイプによる検査結果の比較を行う場合はこの点に留意することが必要である。

#### E. 結論

抗 HIV 薬の細胞内濃度を測定する簡単な方法を確立した。この方法によって、多くの抗 HIV 薬が細胞内で濃縮されること、その濃縮比が薬剤によって大きく異なること、細胞内濃度に対して薬剤間で相互作用があることが示された。また、細胞内の薬剤が抗ウイルス作用をもつことが分かった。これらの結果から、細胞内薬剤濃度の測定は抗 HIV 薬の開発や薬物モニタリングの臨床的応用において重要な意味があると考えられる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Kato, S., Saito, Y., Tanaka, R.,

Hiraishi, Y., Kitamura, N., Matsumoto, T., Hanabusa, H., Kamakura, M., Ikeda, Y., Negishi, M. (submitted) Differential prevalence of HIV-1 subtype B and CRF01\_AE among different sexual transmission groups in Tokyo, Japan, as revealed by subtype-specific PCR. AIDS.

## 2. 学会発表

1) Shingo Kato, Hisamichi Tagami, Yuki Saito, Rie Tanaka, Hideji Hanabusa. HIV-1 RNA-DNA hybrid in peripheral blood mononuclear cells of infected individuals. XIV International AIDS Conference, Abstract ThPeB7039. 2002, July 7-12, Barcelona, Spain.

2) Rie Tanaka, Yuki Saito, Hideji Hanabusa, Shingo Kato. Drug susceptibility assay using peripheral blood mononuclear cells as target cells. XIV International AIDS Conference, Abstract B10191. 2002, July 7-12, Barcelona, Spain.

3) Yuki Saito, Rie Tanaka, Hideji Hanabusa, Shingo Kato. A rapid procedure to detect a single copy of HIV-1 virion RNA. XIV International AIDS Conference, Abstract B10226. 2002, July 7-12, Barcelona, Spain.

4) Naoyuki Kuji, Tuyoshi Yoshii, Shingo Kato, Hironori Asada, Kou Sueoka, Yasunori Yoshimura. Sedimentation Kinetics of HIV-1 in two gradient media. 50th Annual Meeting of the American Society. 2002, October 12-17, Seattle, USA.

5) 田中雄大、久慈直昭、吉井毅、佐藤健二、谷垣礼子、浅田弘法、末岡浩、加藤真吾、吉村泰典、野澤志朗「Silane-coated colloide media 密度勾配における HIV-1 ウイルスの沈降動態」第 54 回日本産科婦人科学会 (2002 年 4 月 6-9 日、東京)

6) 谷垣礼子、末岡浩、佐藤健二、中林章、田島博人、橋場剛士、浅田弘法、久慈直昭、吉村泰典、加藤真吾「マウス造精機能障害モデルにおける c-kit の役割」第 47 回日本不妊学会学術講演 (2002 年 10 月 2-4 日、

岐阜)

7) 中林章、末岡浩、佐藤健二、田島博人、松田紀子、橋場剛士、浅田弘法、久慈直昭、吉村泰典、加藤真吾「重複型遺伝子型を有する Duchenne 型筋ジストロフィーに対する出生前・着床前診断へのアプローチ」第 20 回日本受精着床学会 (2002 年 10 月 4-5 日、岐阜)

8) 田島博人、末岡浩、中林章、佐藤健二、橋場剛士、浅田弘法、久慈直昭、吉村泰典、加藤真吾「1 塩基挿入および点変異型筋ジストロフィーの着床前診断における精度上の問題点」(2002 年 10 月 4-5 日、岐阜)

9) 加藤真吾、齊藤有紀、杉田香代子、小林芳夫「PFGE と inverse PCR による MRSA の分子型別判定の比較」第 76 回日本感染症学会総会学術講演会 (2002 年 4 月 11-12 日、東京)

10) 加藤真吾、谷合佐緒里、田中理恵、根岸昌功、花房秀次、杉浦互「HPLC による抗 HIV 薬細胞濃度測定」第 16 回日本エイズ学会学術集会 (2002 年 11 月 28-30 日、名古屋)

11) 田中理恵、松田昌和、杉浦互、花房秀次、根岸昌功、加藤真吾「ジェノタイプ法とフェノタイプ法による抗レトロウイルス薬に対する HIV-1 の薬剤感受性検査結果の比較」第 16 回日本エイズ学会学術集会 (2002 年 11 月 28-30 日、名古屋)

12) 須藤弘二、西澤雅子、嶋貴子、近藤真規子、向出雅一、蜂谷敦子、岡慎一、加藤真吾、伊藤章、宇宿修三、野口有三、相良裕子、杉浦互、今井光信「同一患者検体を用いた薬剤耐性検査結果の比較」第 16 回日本エイズ学会学術集会 (2002 年 11 月 28-30 日、名古屋)

13) 花房秀次、大田美緒、和田郁子、加藤真吾  
「HIV/HCV 感染者における Hit early and hard の有効性」  
第 16 回日本エイズ学会学術集会 (2002 年 11 月 28-30 日、名古屋)

14) 花房秀次、加藤真吾、兼子智、高桑好一、鈴木美奈、久慈直昭、吉村泰典、田中憲一  
「改良 Swim up 法による HIV 除去精子を用いた体外授精の臨床成績」  
第 16 回日本エイズ学会学術集会 (2002 年 11 月 28-30 日、名古屋)

15) 神野正雄、酒井謙、近藤憲一、井上保、山井礼子、小池麻耶、岩下光利、中村幸雄、花房秀次、兼子智、加藤真吾  
「夫 HIV 陽性、妻 HIV 陰性の夫婦に対する洗浄精子 ICSI による本邦最初の妊娠例」  
第 324 回日本産科婦人科学会東京地方部会例会 (2002 年 12 月 21 日、東京)

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

1. 発明の名称: HIV-1 プロウイルス DNA の定量法および診断キット. 特許権者: 東京都港区三田 2 丁目 15 番 45 号 学校法人慶応義塾. 発明者: 加藤真吾、平石佳之、杉田哲佳. 出願番号: 平成 10 年特許願第 340303 号. 出願年月日: 平成 10 年 11 月 30 日. 特許番号: 特願第 3334086 号. 登録年月日: 平成 14 年 8 月 2 日

2. 発明の名称: HIV-1 のサブタイプ決定法. 特許権者: 東京都港区三田 2 丁目 15 番 45 号 学校法人慶応義塾. 発明者: 加藤真吾、小林芳夫、平石佳之、清水香代子、杉田哲佳. 出願番号: 特願 2000-023581. 出願年月日: 平成 12 年 2 月 1 日. 特許番号: 特願第 3351773 号. 登録年月日: 平成 14 年 9 月 20 日

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし