

20030579

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15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 杉浦 互

平成16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 互
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 .....	5
	国立感染症研究所 エイズ研究センター	杉浦 互
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 .....	11
	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 ～HPLC を用いないプロテアーゼ阻害剤の血中濃度測定法の確立～ .....	15
	国立名古屋病院 臨床研究センター	金田次弘
	協力研究者：宇佐美好子(国立名古屋病院臨床研究センター)	
4.	エイズ治療薬物の有効性を修飾するヒト遺伝子多型に関する研究 ～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～ .....	21
	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 薬の血中濃度と体内動態に関する研究 .....	23
	国立病院大阪医療センター	白阪琢磨
	協力研究者：高田寛治、芝田信人（京都薬科大学薬物動態学教室）、上平朝子（国立病院大阪医療センター 免疫感染症科）、吉野宗宏、永井聡子（国立病院大阪医療センター薬剤部）、平林義弘、照屋勝治、土屋 亮人(国立国際医療センターエイズ治療研究開発センター)、栗原 健（国立宇多野病院薬剤科）、味澤 篤、今村 顕史（都立駒込病院感染症科）、平島由香(都立駒込病院薬剤科)	
6.	抗 HIV 薬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 ～簡便なエファビレンツのリンパ球内濃度測定法の開発～ .....	34
	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 .....	36
	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> .....	39

# 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

この研究班の目的は薬剤耐性検査（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である。この目的を実現するために、(1)治療薬剤血中濃度測定の至適治療実現における意義、(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)簡易薬剤血中濃度測定検査技術の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という4つの研究テーマに取り組んできた。平成15年度は研究班の最終年度であり、各々のテーマに対して以下の結論を導いた。(1)治療薬剤の血中濃度モニタリングが至適治療の選択と副作用の軽減に有効であることを明らかにした。血中濃度測定検査の普及に貢献した(2)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系を確立した。ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤のリン酸化体の測定系を確立した。(3)簡易測定系を完成させることはできなかったが、将来実現可能な技術開発には成功した。(4)治療の最適化という視点からの宿主因子解析の必要性については現時点では明確な結論を得られなかった。

分担研究者

加藤真吾 慶応大学微生物免疫教室  
助手  
金田次弘 国立名古屋病院 臨床研究センター  
室長  
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  
白阪琢磨 国立病院大阪医療センター  
免疫感染症科  
科長  
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

A.研究目的

HIV-1 感染症における多剤併用療法は 1995 年以來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の 4 つの研究を進める。

(1)治療薬剤血中濃度測定の至適治療実現における意義：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薬剤耐性の克服、副作用の軽減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：

研究班のホームページ作成し、薬剤血中濃度測定検査をホームページを介して受け付けた。測定は(株)BML に委託した。採血した検体を専用の調査用紙とともに(株)BML に送付し、(株)BML では HPLC で薬剤濃度を測定し、結果を主治医に報告した。治療効果、副作用と薬剤血中濃度測定の関連を解析し、その意義について検討した。プロテアーゼ阻害剤 (PI)、非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤 (NNRTI)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-M(a)細胞における PI、NNRTI の細胞内濃度測定を HPLC を用いて試みた。ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤(NRTI)については細胞内における AZT-MP, AZT-DP,AZT-TP の定量を LC-MS/MS を用いて行った。

(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：

*in vitro*プロテアーゼ(PR)活性測定系を用いた PI 血中濃度測定系の構築を試みている。大腸菌で発現精製した PR と gag タンパクの混合液中に患者血清を添加し、gag 切断の阻害率より血清中に含まれている PI 薬剤濃度の評価を行う。

(4)抗 HIV-1 薬剤の有効性を修飾する SNP の解析：

(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と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)血中濃度測定検査：平成 15 年 4 月から 11 月にかけて血中濃度ホームページには通算 1326 回のアクセスがあり、91 名の新たなパスワード取得者があった。血中濃度測定検査は総計 125 検体の測定依頼があった。件数の内訳はサキナビル(SQV):3, リトナビル(RTV):50,エファビレンツ(EFV): 12, アンブレナビル(APV): 4, ロピナビル(LPV): 53, ネルフィナビル(NFV): 3,インジナビル (IDV) : 0 であった。

(ii)治療最適化のための SQV+RTV 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 RTV (400mg) + SQV (400mg) の併用が推奨されているが、我々は SQV の量を増やし、毒性の強い RTV の量を減らした RTV (100~400mg) + SQV (800~1000mg) による併用療法を SQV 血中濃度測定を行いながら 10 名の患者に実施した。この療法では定常状態で Cmax は 4-8 時間、トラフ値は服薬直前ではなく、むしろ服薬後 1-2 時間後であることがわかった。10 例中 8 例は SQV 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、SQV 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 RTV と SQV の投与量を決定し、SQV トラフ値を  $2070 \pm 1317$  ng/ml 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)副作用を抑えるための血中濃度測定の意義：EFV による精神神経系の副作用と EFV 血中濃度の関連を調べた。その結果、副作用を認めなかった群の  $8185 \pm 3175$  nM に対し副作用を認められた群では  $10577 \pm 5813$  nM と有意 ( $p=0.0281$ ) に高い EFV 血中濃度が観察された。IDV/RTV 併用療法患者における腎結石と IDV 血中濃度の相関を調べた結果、腎結石が認められた群では IDV 血中濃度が有意に高い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：

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 分以内に大部分が排泄されたが、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。この残留薬剤の抗 HIV-1 活性について解

析した結果、SQV、RTV、NFV の 3 薬剤では抗 HIV-1 活性が保持されていることが明らかになった。NRTI については AZT の取り込みとリン酸化について解析を行った。その結果、AZT、AZT-MP、AZT-DP は培地濃度が高くなるに連れて濃度が高くなったが、AZT-TP 濃度は変化が認められなかった。

(3)簡易薬剤濃度測定検査技術の開発：

合成 PR、Gag を利用した簡易血中濃度測定系についてはそれぞれを発現するベクターを構築し、現在反応系の成立の可否を検討している。

(4)薬剤の有効性を修飾する SNP 解析：

HIV-1 感染者末梢血より B 細胞株を樹立し、nelfinavir の取り込み排泄動態と MDR1 の SNP パターンの関連を解析した。その結果エクソン 26 上の SNP が T/T の細胞では C/C の細胞よりも細胞内 nelfinavir 半減期が 3 倍短いことが明らかになった。分担研究者松下が報告した RTV 100-400mg+ SQV 800-1000mg の症例について ABCB1、ABCC4 の SNP 解析を行い SNP と血中濃度の関連について検討したが血中濃度と SNP の間には明確な差を認めなかった。

#### 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データが治療を進めていく上で有益であることと、多くの施設で実施できるように検査手順の簡略化や検査体制を構築することが必要である。我々は、薬剤血中濃度測定が至適治療に有効であることを、多数の症例を詳細に解析し、具体的なデータを示すことにより明らかにした。検査体制については研究班の積極的な活動により血中濃度測定のホームページがうまく機能し多くの医師に利用されるようになった。細胞内薬剤濃度の測定は、NNRTI と PI では HPLC を用いたプロトコルが完成した。得られた結果を見る限りにおいて、細

胞内で PI 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受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、能動的な取り込みポンプの存在が示唆された。NRTI の細胞内におけるリン酸化体の定量は LC-MS/MS を使用することにより可能となった。興味深いことに AZTTP の濃度は細胞外の AZT 濃度の影響をほとんど受けず、常に一定の値を示した。これは細胞内における dNTP 量を一定に保つホメオスタシスによるものである可能性が考えられた。MDR-1 の SNP と血中濃度の関連は我々の解析の結果からは明確な結論を出すことはできなかった。

#### E. 結論

我々は症例の積み重ねから薬剤血中濃度測定による薬剤量の調節が薬剤耐性症例の救済と副作用の軽減に有効であることを明らかにした。このような成果は今後治療現場において血中濃度測定が普及していく上で大変有用である。基礎的研究では細胞内濃度測定の基礎的なプロトコルが出来上がった。PI と NNRTI は HPLC で濃度測定を、NRTI は LC-MS/MS を用いて細胞内におけるリン酸化体の濃度を測定する系を確立した。簡易測定系の構築に関しては複数の薬剤を同時に測定するプロトコルを確立したが、HPLC を用いない系に関しては途中で手法を切り替えたこともあり、残念ながらこの3年間の研究では完成させることが出来なかった。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したが最終的に数十名の解析を行うことが出来た。以上、一部達成できなかった目標もあるが、概ね研究班当初の目標を達成したと考えている。さらに、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きたが、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

機能しており研究班終了後も参加分担研究者間での活発な共同研究が期待される。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

各分担研究報告書 参照

#### H. 知的所有権の取得状況

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

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

研究要旨

本研究では、HIV-1の薬剤耐性検査に用いられている細胞株のHPB-M(a)とHeLa細胞について、細胞内のプロテアーゼ阻害剤(PI)の細胞内濃度を測定し、細胞株間の差異について比較検討を行う。HPLCを用いて6種類のPI(NFV、SQV、LPV、RTV、IDV、APV)について細胞内濃度を測定した。その結果、HPB-M(a)ではNFV、SQV、LPVは細胞内で濃縮され蓄積していた。特にNFV、SQVは細胞内で各々100倍、60倍に濃縮されていた。IDV、APVの細胞内への蓄積はあまり認められなかった。またHeLa細胞のNFVの細胞内蓄積はHPB-M(a)の1/3程度であった。

A. 研究背景および目的

現在行われている HIV-1 薬剤耐性検査には、(i)プロテアーゼ遺伝子および逆転写酵素阻害剤の遺伝子配列解析を行って薬剤耐性変異を同定し、遺伝子型から薬剤耐性を推定する遺伝子検査 (genotype 検査) と、(ii)抗 HIV-1 薬剤存在下で細胞株を用いてウイルスを培養し直接ウイルスの薬剤耐性を調べる感受性検査 (phenotype 検査) がある。感受性検査では本来 HIV-1 の宿主ではない上皮系接着細胞 (ex. HeLa) を基に作成されたレポーター細胞が用いられているが、このような細胞での薬剤の取り込み・代謝が HIV-1 本来の宿主であるリンパ球系細胞と同等であるか明確ではない。そこで本研究では細胞内への抗 HIV-1 薬の取り込みやその蓄積量に着目し、T細胞系細胞株の HPB-M(a)と上皮細胞系細胞株の HeLa 細胞における PI の細胞内濃度を HPLC によって測定し、その結果について比較検討を行った。

B. 研究方法

細胞内プロテアーゼ阻害剤濃度測定のプロトコルについて (図 1)

i)HPB-M(a)細胞からの PI 抽出法

1. HPB-M(a) を回収し、Serum Free Medium(SFM)で  $1 \times 10^7/ml$  の細胞懸濁液を調

製する。

2. SFM を 800ul/tube になるように 1.5ml tube に分注する。
3. DMSO に溶解した 0.25uM、0.5uM、1uM、2uM の protease inhibitor 溶液を 10ul ずつ分注する。
4. 細胞懸濁液を 200ul/tube ずつ加える。細胞濃度は  $2 \times 10^6/ml/tube$ 、protease inhibitor の終濃度は 2.5uM、5uM、10uM、20uM となる。
5. 37°Cで反応開始する。反応開始後 1分、3分、5分、10分、20分間培養する。
6. 15000rpm で1分遠心し上清を除く。
7. 細胞を 100ul の ice-cold PBS(-)で懸濁する。この細胞懸濁液を、あらかじめ別のチューブに分注した氷冷 PBS(-)に加え軽く混ぜる。
8. 15000rpm で1分遠心し上清を除く。
9. 細胞を 100ul の氷冷 PBS(-)で懸濁する。
10. これに 150ul の MeOH を加え、数秒攪拌する。
11. 15000 rpm、1分遠心する。
12. 上清を別なチューブ移し、Speed Vac で上清を完全に飛ばす。
13. 残った沈査に HPLC 移動層 100ul 加え数秒攪拌する。
14. 15000 rpm、1分遠心する。
15. 上清を HPLC 用サンプル瓶に移す。このうち

10ul を HPLC に apply し、 $2 \times 10^5$  個あたりの細胞内に取り込まれた PI を測定する。

#### ii) HeLa 細胞からの PI 抽出法

##### 実験前日

1. 実験前日に  $2 \times 10^5/2\text{ml}$  の HeLa 細胞懸濁液を調製し、6 well プレートに 2ml/well でまく。

##### 実験当日

1. 培養液を除き、SFM で 1 回洗う。
2. NFV を 20uM を含む SFM を 2ml 加え、 $37^\circ\text{C}$ 、20 分培養。
3. SFM を除いた後、plate を氷上に置き氷冷 PBS で洗う。
4. PBS を除き、再び 氷冷 PBS で洗い、PBS を除く。
5. 氷冷 PBS を 300ul/well で加え、ピペットマンで細胞を回収。
6. 氷冷 PBS を 200ul/well で加え、ピペットマンで well を洗う。
7. 750ul MeOH を加えて混ぜる。
8. インシュリン注射用シリンジを用いて細胞を破碎する。
9. 15000rpm、1 分、 $4^\circ\text{C}$  で遠心する。
10. 上清を新しいチューブに移し、Speed Vac で上清を完全に飛ばす。
11. 沈査に移動層を 100ul 加えて溶かす。
12. この上清を HPLC 用サンプル瓶に移す。10ul を HPLC に apply して解析する。
13. 1well あたりの正確な細胞数は、蛋白定量により補正する。

#### iii) 細胞内濃度の計算法

1. HPB-M(a) を顕微鏡下で観察し、細胞の直径を測定する。
2. 約 150 個の細胞の直径の平均値を算出し、これに基づいて HPB-M(a) の平均細胞体積を算出した。

3. HeLa 細胞に関してはトリプシン処理を施した後 HPB-M(a) と同様の手法にて平均細胞体積を算出した。
4. この平均細胞体積を基にして細胞内の PI 濃度を算出した。

#### C. 結果 (図 2)

NFV、SQV、LPV、IDV、APV、RTV の 6 種類の PI について、HPB-M(a) 細胞内への取り込みを測定した。その結果、NFV、SQV、LPV は培養液中の濃度が高くなると、それに伴いこれらの薬剤の細胞内濃度も高くなる傾向が見られた。どの薬剤濃度においても、NFV では約 100 倍、SQV では約 60 倍、LPV では約 10 倍に濃縮され HPB-M(a) の細胞内に蓄積していた。一方 IDV では細胞内への濃縮はほとんど見られず、培養液中の IDV 濃度とほぼ同程度の濃度で細胞内に取り込まれていることが明らかになった。APV では細胞内への取り込みはほとんど認められなかった。HPB-M(a) における NFV、SQV、IDV の細胞内濃度の結果は、以前に CEM を用いて解析された結果と良く一致していることが明らかになった (AIDS 2001, Vol. 15, 675-681)。HeLa 細胞との比較では NFV の細胞内蓄積は 4-6 倍低いことが明らかになった。

#### D. 考察

PI の細胞内濃度に関する研究としては、K. Jones らによる放射性同位元素を用いた報告がある (AIDS 2001, Vol. 15, 675-681)。今回用いた HPLC による解析法 (分担研究者 加藤真吾らによる) は、放射性同位元素を用いた解析法とほぼ同程度の感度で細胞内の PI 濃度を測定できることが明らかになった。このような放射性同位元素を用いない測定法は簡便で安価であることから、検査機関等への導入も可能であると考えられる。また、同じ T 細胞系の CEM と HPB-M(a) がほぼ同程度の PI の取り込みを示し

たことから、HPB-M(a)における結果は一般的な T 細胞系における細胞内への PI の蓄積をよく反映しているものと考えられる。また、HeLa 細胞内に蓄積される NFV 濃度は HPB-M(a)よりも 3 倍程度低いことが明らかになった。この事から、PI の細胞内への蓄積は細胞種によって異なる可能性が示唆された。今後は HeLa 細胞における NFV 以外の PI についてもさらに細胞内濃度を解析し、HPB-M(a)との比較検討を行う。

#### F.健康危険情報

なし

#### G.研究発表

##### 1.論文発表

- 1) Lay Myint, Masakazu Matsuda, Zene Matsuda, Yoshiyuki Yokomaku, Tomoko Chiba, Aiko Okano, Kaneo Yamada, Wataru Sugiura: Contribution of Gag Non-Cleavage Site Mutations for full Recovery of Viral Fitness in Protease Inhibitor Resistant HIV-1. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*. 2004, Vol.48, 444-452.
- 2) Koya Ariyoshi, Masakazu Matsuda, Hideka Miura, Sachiko Tateishi, Kaneo Yamada, Wataru Sugiura: Patterns of Point Mutations Associated With Antiretroviral Drug Treatment Failure CRF01\_AE(Subtype E) Infection Differ From Subtype B Infection. *JAIDS*. 2003, Vol.33, 336-342
- 3) J Snoeck, R Kantor, RW Shafer, I Derdelinckx, AP Carvalho, B Wynhoven, MA Soares, P Cane, J Clarke, C Pillay, S Sirivichayakul, K Ariyoshi, A Holguin, Z Grossman, R Rodrigues, MB Bouzas, P Cahn, LF Brigido, V Soriano, W Sugiura, P Phanuphak, L Morris, J Weber, D Pillay, A Tanuri, PR Harrigan, R Camacho, JM Schapiro, D

Katzenstein, AM Vandamme: Evaluation of Five Interpretation Algorithms for the Prediction of Drug Susceptibility in Non-B Subtype. *Antiviral Therapy* 2003, Vol.8, s 111

4) Wataru Sugiura, Kazunori Shimada, Masakazu Matsuda, Tomoko Chiba, Lay Myint, Aiko Okano and Kaneo Yamada: Novel Genotyping Assay for Human Immunodeficiency Virus Type-1 Drug Resisitance Using Enzyme Linked Mini- Sequence Assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003, Vol.41, 4971-4979

5) 杉浦 互: HIV の薬剤耐性研究の現状と今後の課題. *現代医療* No.35 Vol.6:113-118

6) 杉浦 互: 日本における薬剤耐性 HIV-1 の現状. *臨床とウイルス* Vol.31, No.4, 272-282

7) 金田次弘、加藤真吾、山元泰之、千葉智子、杉浦 互: 抗 HIV 療法のモニタリング. *日本エイズ学会誌* Vol.5:109-112

##### 2.学会発表

1) R Kantor, RW Shafer, B Efron, AP Carvalho, B Wynhoven, MA Soares, P Cane, J Clarke, J Snoeck, S Sirivichayakul, K Ariyoshi, A Holguin, C Pillay, H Rudich, R Rodrigues, MB Bouzas, P Cahn, LF Brigido, Z Grossman, L Morris, V Soriano, W Sugiura, P Phanuphak, AM Vandamme J Weber, D Pillay, A Tanuri, PR Harrigan, R Camacho, JM Schapiro, and D Katzenstein: HIV-1 subtype-related differences in genotypic evolution: Analysis of subtypes B and C reverse transcripase and protease sequences. 11th Conference on retrovirus and opportunistic infections. Feb.8-11, 2004, Sanfrancisco, USA

2) H. Yan, T Chiba, N Nomura, Y Kitamura, M Nishizawa, M Matsuda, N Yamamoto, and W Sugiura: Discovery of Novel Small- Molecule HIV-1 Integrase Inhibitory Compounds.

Fourth HIV DRP Symposium ANTIVIRAL DRUG RESISTANCE. Dec.7-10, 2003, Virginia, USA

3) L Myint, M Matsuda, T Chiba, H Yan, J Kakizawa, A Okano, M Hamatake, M Nishizawa, W Sugiura: Analysis of Virion Morphology and Assembly Process in Protease Inhibitor Resistant HIV-1.

XII International HIV Drug Resistance Workshop. Jun.10-14, 2003, Cabo SanLucas, Mexico

4) R Kantor, RW Shafer, AP Carvalho, B Wynhoven, MA Soares, P Cane, J Clarke, J Snoeck, C Pillay, S Sirivichayakul, K Ariyoshi, A Holguin, Z Grossman, R Rodrigues, MB Bouzas, P Cahn, LF Brigido, V Soriano, W Sugiura, P Phanuphak, L Morris, A-M Vandamme, J Weber, D Pillay, A Tan D Katzenstein: Nucleic acid differences between HIV-1 non-B and reverse transcriptase and protease sequences at drug resistance positions. XII International HIV Drug Resistance Workshop. Jun.10-14, 2003, Cabo SanLucas, Mexico

5) J Snoeck, R Kantor, RW Shafer, I Derdelinckx, AP Carvalho, B Wynhoven, MA Soares, P Cane, J Clarke, C Pillay, S Sirivichayakul, K Ariyoshi, A Holguin, Z Grossman, R Rodrigues, MB Bouzas, P Cahn, LF Brigido, V Soriano, W Sugiura, P Phanuphak, L Morris, J Weber, D Pillay, A Tanuri, PR Harrigan, R Camacho, JM Schapiro, D Katzenstein, AM Vandamme: Evaluation of Five Interpretation Algorithms for the Prediction of Drug Susceptibility in Non-B Subtype.

XII International HIV Drug Resistance workshop. Jun.10-14, 2003, Cabo SanLucas, Mexico

6) 松井良輔、菅井隆弘、千葉晴美、塩見和朗、山口裕一、増間 郎、供田 洋、千葉智子、杉浦 互、

大村 智、田中晴雄.糸菌状の生産する HIV-1 インテグラーゼ阻害物質の単離と生物活性.第 124 回 日本薬学会 2004 年 3 月

7) 杉浦 互、駒野 淳、Lay Myint: HIV-1 複製サイクル初期あるいは後期過程における宿主細胞因子の機能的、形態学的解析. 第 6 回 白馬シンポジウム.2003 年 8 月 1 日 長野県北安曇郡白馬村

8) 杉浦 互、Lay Myint、駒野 淳、松田昌和、松田善衛、西澤雅子: 薬剤耐性 HIV-1 における粒子形成過程の形態学的解析.第 51 回日本ウイルス学会学術集会 2003 年 10 月 27 日~29 日 京都

9) 横幕能行、松田善衛、千葉智子、巖 馬華、松田昌和、杉浦 互: 抗 HIV-1 新規候補薬剤検索のための多検体処理可能なスクリーニングシステム構築. 第 17 回 日本エイズ学会学術集会 2003 年 11 月 27 日~11 月 29 日 神戸

10) 古賀一郎、小田原 隆、細谷紀章、後藤美江子、中村哲也、松田昌和、杉浦 互、岩本愛吉  
HAART 下で良好な経過中、梅毒発症とともに抗 HIV 血症を呈した症例. 第 17 回 日本エイズ学会学術集会 2003 年 11 月 27 日~11 月 29 日 神戸

11) 松田昌和、千葉智子、佐藤裕徳、巖 馬華、Lay Myint、柿澤淳子、浜武牧子、植田知幸、西澤雅子、杉浦 互: 相同組み換えを用いた CRF01\_AE 薬剤感受性の解析. 第 17 回 日本エイズ学会学術集会 2003 年 11 月 27 日~11 月 29 日 神戸

12) 植田知幸、有吉紅也、三浦秀佳、松田昌和、千葉智子、巖 馬華、Lay Myint、柿澤淳子、浜武牧子、西澤雅子、杉浦 互: CRF01\_AE 感染症例に見出された新たな薬剤耐性獲得機序.第 17 回 日本エイズ学会学術集会 2003 年 11 月 27 日~11 月 29 日 神戸

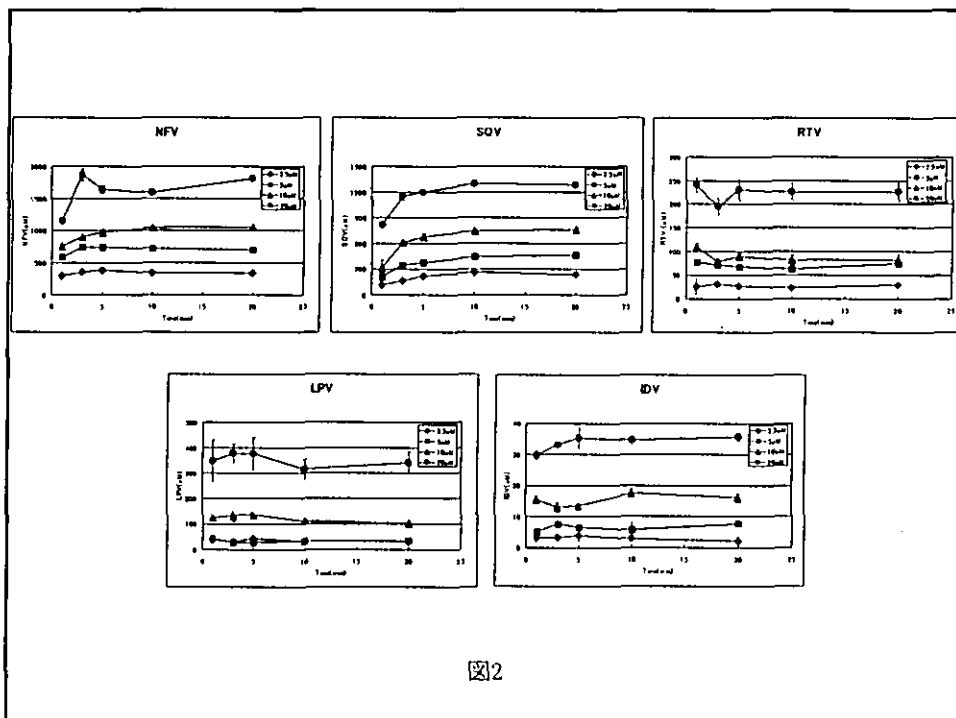
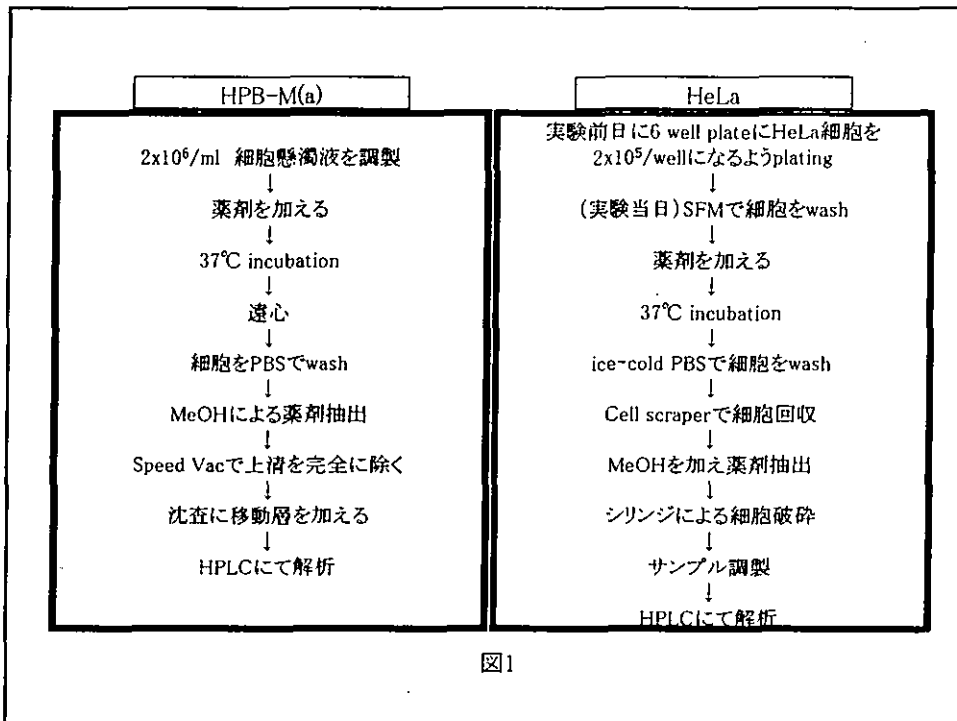
13) 大出裕高、星野忠次、杉浦 互: HIV-1protease 阻害剤耐性の分子動力的解析. 第 17 回 日本エイズ学会学術集会・シンポジウム 2003 年 11 月 27 日~11 月 29 日 神戸

14) 杉浦 互: HIV-1 治療における薬剤耐性の影響と

その対策 第 17 回 日本エイズ学会学術集会・シン  
ポジウム 2003 年 11 月 27 日～11 月 29 日 神戸

G. 知的所有権の取得状況

該当なし



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

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

PIで処理したT細胞株の細胞内に停留する薬剤が抗ウイルス活性をもつことを明らかにした。一方、AZTとそのリン酸化誘導体の細胞内濃度をLC-MS/MSによって測定する方法を確立し、この方法を用いてAZT存在下で培養したT細胞株の細胞内薬剤濃度を測定した。その結果、AZT、AZT-MP、AZT-DPの細胞内濃度は細胞外濃度と平行に変化するが、AZT-TPの細胞内濃度はあまり変わらなかった。このことは血漿中の薬剤濃度を必要以上に高めても抗ウイルス効果は高まらないことを示唆している。また、カレトラを服用中のある患者において、PBMC中のRTV濃度がLPV濃度よりも逆に高かった。この問題について今後多くのカレトラ服用例を対象に検討を重ねる必要がある。

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は、通常測定されている血漿あるいは血清内の薬剤濃度だけでなく、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と考えられる。

本年度は、細胞内のAZTとそのリン酸化誘導体の細胞内濃度をLC-MS/MSによって測定する方法をし、この方法を用いて細胞外AZT濃度との関連を調べた。また、細胞内のPI量とIC<sub>50</sub>との関連を調べることによってPIに関しては細胞内薬剤の抗ウイルス作用を調べた。さらに少数の患者を対象にPBMC中薬剤濃度の測定を行った。

B. 研究方法

PBMCの調製は末梢血からFicoll-Paqueを用いて取扱説明書に従って行った。

薬剤の定量は、HPLC（日本分光）あるいはHPLC（1100 Series、Agilent）と質量分析計（API Qstar Pulsar、Applied Biosystems）を組み合わせたLC-MS/MSによって行った。逆相カラムにはWatersのXTerraを用いた。移動相は20 mMの酢酸アンモニウムを含むアセトニトリルの濃度勾配とした。AZT誘導体を対象とする場合は0.5 mMの水酸化テトラブチルアンモニウムをイオンペアとして用いた。製薬会社から提供されたPIあるいは委託合成AZTリン酸化誘導体を濃度決定のための標準として用いた。

HIV-1 LAI株が持続感染したMOLT-4細胞株を段階的濃度の薬剤を含む培地に懸濁し、そのままか、薬剤を含まない培地で洗浄してから24時間培養した後、培養上清中のp24濃度を測定し、それぞれのIC<sub>50</sub>を求めた。

C. 研究成果

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する（図1）。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。SQV、RTV、NFV及びLPVは細胞内に停留しやすいが、IDVとSQVはほとんど停留しなかった（図2）。次に培地中の薬剤を洗浄除去した後のIC<sub>50</sub>を求めると、SQV、RTV、NFV及びLPVは培地中に薬剤が存在する場合とほぼ同じであったが、IDVとSQVは非常に高くなった（図3）。これらの結果は細胞内に存在する薬剤がウイルスの出芽を抑制する活性をもっていることを示している。

培地中のAZT濃度を1 μM、10 μM、100 μMと変えてMOLT-4細胞を1日間処理し、細胞内のAZTとそのリン酸化誘導体の濃度は、AZT、AZT-MPおよびAZT-DPは培地中の濃度が高くなるほど高くなったが、AZT-TPの濃度はほとんど変化しなかった（図4）。

カレトラを投与されている患者のPBMC中のLPVとRTVの濃度を測定したところ、10<sup>6</sup>個の細胞あたりRTV量が0.45 pmol、LPV量が0.14 pmolと、予想に反してRTV濃度の方がLPV濃度よりも高かった。

D. 考察

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る。この細胞内に存在する薬剤に抗HIV活性があることを実証した。このことは非常に薬理的に重要な意味をもっている。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。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。

AZT、AZT-MP、AZT-DP の細胞内濃度は培地中の AZT 濃度によって大きく変化するが、AZT-TP の濃度はほとんど変化しなかった。このことは、必要量以上の AZT を投与しても、抗ウイルス効果が高まらないだけでなく、副作用を強めてしまう恐れがあることを示唆している。

カレトラを投与されている一人の患者で LPV の細胞内濃度が RTV のそれよりも低かった。これは RTV によって LPV の血中濃度を高めるという RTV 合剤の考え方と逆の結果である。これが一般的な現象であるかどうかを今後症例数を増やして検討する必要がある。

## E. 結論

AZT とそのリン酸化誘導体の細胞内濃度を LS-MS/MS によって測定する方法を確立した。この方法を用いて AZT 存在下で培養した T 細胞株の細胞内薬剤濃度を測定した結果、AZT、AZT-MP、AZT-DP の細胞内濃度は細胞外濃度と平行に変化するが、AZT-TP の細胞内濃度はあまり変わらなかった。細胞内の PI に抗 HIV-1 活性があることを明らかにした。カレトラを服用中のある患者において、PBMC 中の RTV 濃度が LPV 濃度よりも逆に高かった。これらの結果は、細胞内薬剤濃度の測定が抗 HIV 治療のモニタリングや抗 HIV 薬の開発において極めて重要な意義があることを示している。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Tanaka, Y., Kato, S., Tanaka, M., Kuji, N., and Yoshimura, Y. (2003) Structure and expression of the human oocyte-specific histone H1 gene elucidated by direct RT-nested PCR of a single oocyte. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304, 351-357.

2. 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。(2003) 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

初妊娠例。日本産婦人科学東京地方部会誌 52(1), 100-103.

3. 金田次弘、加藤真吾、山元泰之、千葉智子、杉浦亙。(2003) 抗 HIV 療法のモニタリング。日本エイズ学会誌 5(1), 109-112.

4. Kato, S., Saito, Y., Tanaka, R., Hiraishi, Y., Kitamura, N., Matsumoto, T., Hanabusa, H., Kamakura, M., Ikeda, Y., and Negishi, M. 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 Res. Hum. Retroviruses.* 19(11), 1057-1063.

### 2. 学会発表

1. 花房秀次、木内英、田中理恵、太田未緒、和田育子、小島賢一、加藤真吾「2003 年における抗 HIV 療法の有効性と課題」第 17 回日本エイズ学会学術集会 (2003 年 11 月 27-29 日、神戸)

2. 田中理恵、加藤真吾「プロテアーゼ阻害薬の細胞内停留濃度と抗ウイルス効果」第 17 回日本エイズ学会学術集会 (2003 年 11 月 27-29 日、神戸)

3. とう学文、照沼裕、山下篤哉、葛西宏威、加藤真吾、齊藤有紀、小田原史知、高嶋能文、花房秀次、酒井道生、白幡聡、藤井輝久、石川正明、岡慎一、高橋義博、池田柊一、松田重三、伊藤正彦、三間屋純一「エイズ未発症から発症にいたる際のウイルス産生動態」第 17 回日本エイズ学会学術集会 (2003 年 11 月 27-29 日、神戸)

4. 花房秀次、加藤真吾、兼子智、鈴木美奈、高桑好一、久慈直昭、吉村泰典、神野正雄、岩下光利、田中憲一「HIV 除去精子を用いた体外授精の臨床成績と今後の課題」第 17 回日本エイズ学会学術集会 (2003 年 11 月 27-29 日、神戸)

5. 南宮湖、長谷川直樹、田中理恵、築地謙治、根岸昌功、加藤真吾「悪性リンパ腫に対する化学療法施行中に HAART を中断した後、HIV-1 の感受性が回復し再開治療が著効した症例の解析」第 17 回日本エイズ学会学術集会 (2003 年 11 月 27-29 日、神戸)

## 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. 薬剤のPBMCへの取り込みと排出

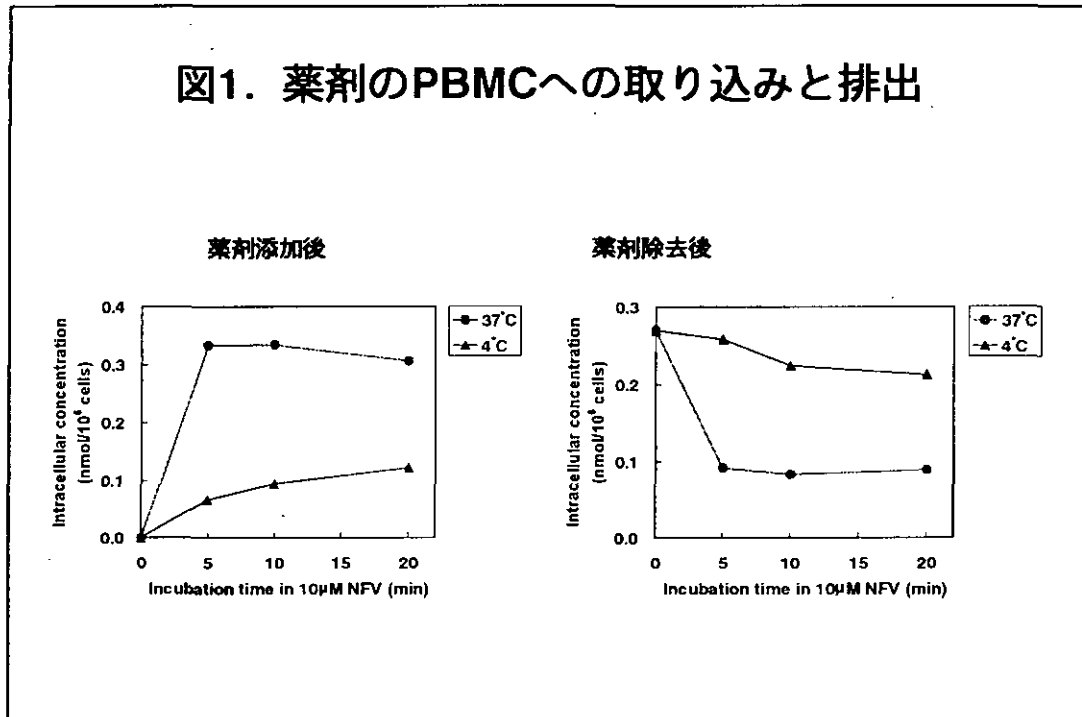


図2. 薬剤の存在下と除去後のMOLT-4/LAI細胞内薬剤濃度

薬剤	濃度 ( $\mu$ M)	細胞内薬剤濃度 (pmol/10 <sup>6</sup> cells)		停留率 (%)
		薬剤存在下	薬剤除去後	
IDV	100	66	3.8	5.8
SQV	10	660	260	39.4
NFV	10	1500	470	31.3
RTV	40	390	92	23.6
APV	100	80	3.2	4.0
LPV	20	220	38	17.3

図3. 薬剤の存在下と除去後の抗HIV薬のIC<sub>50</sub>

薬剤	IC <sub>50</sub> (nmol)		比
	薬剤存在下	薬剤除去後	
IDV	0.088	2.7	31
SQV	0.024	0.015	0.64
NFV	0.028	0.043	1.5
RTV	0.026	0.093	3.6
APV	0.043	2.2	51
LPV	0.013	0.014	1.0

図4. AZTで処理したMOLT-4細胞におけるAZTとそのリン酸化物の細胞内濃度

細胞外AZT濃度	細胞内濃度 (pmol/10 <sup>6</sup> cells)			
	AZT	AZT-MP	AZT-DP	AZT-TP
1 μM	0.42	1.18	0.02	0.28
10 μM	4.17	5.71	0.10	0.29
100 μM	7.22	12.86	0.27	0.26

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

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  
～HPLC を用いないプロテアーゼ阻害剤の血中濃度測定法の確立～  
分担研究者 金田次弘 国立名古屋病院 臨床研究センター 室長  
共同研究者 宇佐美好子 国立名古屋病院 臨床研究センター

研究要旨

HIV-1 プロテアーゼとルシフェラーゼを共発現する DNA コンストラクトを用いた簡易プロテアーゼ阻害剤測定系の構築を目指した。

1. 研究目的

HPLC を用いたロピナビル (LPV)、リトナビル、エファビレンツの血中濃度同時測定法については既に確立し、報告した<sup>1)</sup>。しかし、すべての医療施設が HPLC を有しているわけではない。そのような施設においても血中濃度測定を可能にするため、HIV-1 プロテアーゼとルシフェラーゼを共発現する DNA コンストラクトを用いた簡易プロテアーゼ阻害剤（特に LPV）測定系の構築を試みた。

2. 研究方法

a. DNA コンストラクト

コンストラクトは、HIV gag-pol 遺伝子の p9、p6、PR および RT の一部の配列を含み、N 末端側に His-tag、C 末端側に renilla luciferase をコードする配列がついている（図 1）。プロテアーゼが wild-type のものと、活性中心のアスパラギン酸をアスパラギンに変えた不活性型 (D25N) の 2 種類のコンストラクトを使用した。

b. 測定系の原理

wild-type のコンストラクトをウサギ網状赤血球 lysate を利用した in vitro 転写/翻訳システム中で発現させると、His-tag から renilla luciferase までの完全形のタンパク質が形成される。このタンパク質はプロテアーゼによる自己分解により切断されて luciferase を遊離し、短いタンパク質になる。ロピナビルを同時に加えると、その作用によりプロテアーゼ活性が抑制され、LPV 非存在下の場合にくらべて、もとの完全形として存在する割合が多くなる。このそれぞれを、ポリヒスチジンを結合するプレートに添加すると、N 末端に His-tag を有するタンパク質のみが結合する。LPV 非存在下、あるいは LPV 濃度が低い場合は、プロテアーゼによって完全形タンパク質が分解されてしまうため、このプレートに結合する、His-tag と luciferase の両方を有するタンパク質は少量である。LPV 濃度が高い場合は、完

全形として残るタンパク質が多いため、このプレートに結合する、His-tag と luciferase の両方を有するタンパク質は多くなる。この状態で luciferase 活性を測定すると、LPV 濃度が高い場合は高い luminescence が得られ、LPV 濃度が低い場合は低い luminescence が得られる。一方、コンストラクト D25N を用いた場合、そのプロテアーゼは活性を示さないため、LPV 濃度の高低にかかわらず発現系中には完全形のタンパク質しかなく、したがってこれを同じプレートに添加して luciferase 活性を測定すると、その luminescence に差異はみられない。

c. 測定系

発現には、TNT® Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega) を使用した。TNT® T7 master mix 20  $\mu$ l、1 mM メチオニン 0.5  $\mu$ l、コンストラクト 0.1  $\mu$ g、コントロール血清あるいは LPV 溶液 2  $\mu$ l を含んだ反応液 (total 25  $\mu$ l) を 30°C で 60 分間インキュベーション後、50  $\mu$ l の Milli Q 水を加えて HisGrab plate に添加し、室温で 1 時間静置した。反応液を除去し、PBS・Tween で well を 3 回洗浄後、Dual-Glo™ Luciferase Assay System (Promega) を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。実験は duplicate で行った。

3. 研究結果

a. 血清が測定系に及ぼす影響

患者血漿をそのまま測定に利用することを考え、血清が発現系に与える影響について検討した。血清として臨床検査に使用するコントロール血清を使用した。25  $\mu$ l の発現反応液中 2  $\mu$ l 血清の存在で、コンストラクトの発現は 80-90% 阻害された (表 1)。血清を 56°C で 30 分間非働化して使用した場合、阻害はさらに大きくなり、約 95% 阻害された。したがって、患者血漿をそのまま使用することは困難であり、測定に際しては、HPLC 法で用いた抽出操作により LPV を血漿から抽出することが必要であると

考えられた。

#### b. LPV 溶解溶媒の検討

抽出した LPV を溶解する溶媒について検討を行った。LPV は水に難溶であるが、有機溶媒では発現系そのものに影響を及ぼす可能性がある。LPV を溶解溶媒として、エタノール、ジメチルスルホキシド (DMSO)、アセトニトリル、Triton X-100 を選択し、コンストラクトの発現に与える影響について検討を行った。

エタノールは終濃度 1%まで、DMSO は終濃度 4% までなら発現系に与える影響は少なかった (表 2)。アセトニトリルは、終濃度 1%でコンストラクトの発現を 50%阻害し、Triton X-100 は、終濃度 0.05% で 99%阻害した。この結果から、ロピナビルの溶解に終濃度 1%および 4%エタノール、終濃度 4% DMSO を使用し、以後の検討を行った。

#### c. LPV がプロテアーゼ活性に及ぼす影響

表 3 に、LPV のエタノール溶液使用時の結果について示した。wild-type のコンストラクトを用いた場合、低濃度の LPV は、LPV 非存在下にくらべて luminescence を増加させたが、最も高い濃度では低下させた。これは、高濃度の LPV でプロテアーゼ活性が見かけ上阻害されていないことを示す。一方、プロテアーゼ活性がなく、luminescence が変化しないはずの D25N コンストラクトを用いた場合も、LPV 濃度依存的に luminescence は低下した。

表 4 に、LPV の DMSO 溶液を用いた場合の結果を示した。wild-type、D25N いずれの場合も、LPV 濃度依存的に luminescence は低下していく傾向にあった。

これらの結果が LPV に特異的なのか、他のプロテアーゼ阻害剤でもみられる現象なのかを確かめるため、ネルフィナビル (NFV) を用いて同様の測定を行った。NFV はエタノール (終濃度 4%) に溶解した。その結果を表 5 に示した。wild-type の場合、luminescence は増加したが、実測値は 3 桁と小さく、かつ測定値のばらつきが大きかったことを考えると、評価は困難である。D25N の場合、LPV での結果と同様、luminescence は NFV 濃度依存的に低下した。

これらの結果に関してはその後の追加実験で、プロテアーゼ阻害剤が恐らくはプロテアーゼ部位に結合することによって luminescence の quenching を引き起こしている可能性が示唆された。

#### 4. 考察

本測定系で使用したコンストラクトから発現するタンパク質は基質兼酵素であるため、自己分解を引き起こし、不安定であるという性質を有する。加え

て、発現系が血清や有機溶媒の影響をうけることから、本測定系を血中濃度測定に利用することは困難であると判断した。

現在は、N 末端に His-tag、C 末端に renilla luciferase を有する基質用リコンビナントタンパク質 (図 2) を発現させて HisGrab plate に結合させておき、そこにリコンビナント HIV プロテアーゼと LPV を添加することによって変化する luminescence を測定し、定量する方法について検討している。

#### 5. 参考文献

1) Y. Usami, T. Ohki, M. Nakai, M. Sagisaka, T. Kaneda: A Simple HPLC Method for Simultaneous Determination of Lopinavir, Ritonavir, and Efavirenz. Chem. Pharm. Bull., 51, 715-718 (2003).

#### 6. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) 宇佐美好子、大木剛、中井正彦、鷺坂昌史、金田次弘：ロピナビル/リトナビルおよびエファビレンツの血中濃度同時測定法の確立。医療, in press (2004).

2) T. Oki, Y. Usami, M. Nakai, M. Sagisaka, H. Ito, K. Nagaoka, N. Mamiya, K. Yamanaka, M. Utsumi, T. Kaneda: Pharmacokinetics of Lopinavir After Administration of Kaletra in Healthy Japanese Volunteers. Biol. Pharm. Bull., in press (2004).