

表3.検体採取採血管・抗凝固剤

製品名	施設数
Venogect II (テルモ)	5
Vacutainer (BD)	4
ネオチューブPET(ニプロ)	1
特定/記載なし*1	5

抗凝固剤	施設数
EDTA	9
CPD(Cit.+Phos.+Dex.)	1
特定/記載なし/なし	5

\*1:提出施設による。  
 テルモ:04年04月からγ線照射済み。Code番号の最後に「K」の表示あり。  
 ニプロ:γ線照射済み。  
 BD:γ線照射済み。細菌:10<sup>3</sup>/ml以下。DNA/RNA Free表示無し。

表 3.検体採取採血管・抗凝固剤

表4. 梱包・搬送方法

施設番号	梱包法	搬送法
1	経験なし	記載なし
2	二重感染性材料輸送容器	4°C宅急便/郵便パック
3	発砲スチロール箱	宅急便/郵便パック
4	記載なし	記載なし
5	専用バッグ	交換便(車)
6	外注先に依頼	外注先に依頼
7	記載なし	記載なし
8	記載なし	宅急便
9	経験なし	経験なし
10	二重感染性材料輸送容器	郵便パック
11	経験なし	経験なし
12	検体をビニール袋に入れ、ペーパー材で包む。 更にビニール袋に入れ、クッション封筒に入れる	宅急便 又は持ち込み
13	記載なし	記載なし
14	経験なし	所定の業者
15	記載なし	記載なし

表 4. 梱包・搬送方法

表5:核酸抽出・抽出試薬

抽出遺伝子	RNA 15施設(1施設ではDNA含)
抽出試薬	使用施設
1.Q:Viral RNA M	26.7%
2.R:Hi Pur RNA	26.7%
3.G:スマイテスト	13.3%
4. N:ISOGEN-LS	6.7%
5.フェナル抽出法 1	6.7%
6.Q:Ultra Sens Virus kit	6.7%
7.セハジーン RVR	6.7%
8.R:HIV VL kit	6.7%

凡例 Q:Viral RNA M=<QIAGEN> Viral RNA Mini Kit.  
 R:Hi Pur RNA =<Roche> High Pure Viral RNA Kit.  
 G:スマイテスト=<ゲノムサイエンス研究所> スマイテスト  
 N:ISOGEN=<日本ジーン>ISOGEN-LS  
 セハジーンRVR=<三光純薬>  
 Q:Ultra Sens Virus kit=<QIAGEN>UltraSens Virus Kit  
 R:HIV VL kit=<Roche> HIV monitor Ver1.5 Kit

表5:核酸抽出・抽出試薬

表7. 2nd PCR 試薬

2nd PCR 試薬

Ex.Taq(TK)	TaKaRa	33.3%
LA.Taq(TK)	TaKaRa	13.3%
Ampli Taq.(ABI)	ABI	20.0%
KOD DNA polymerase(TY)	東洋紡	13.3%
Ex.Taq HS(TK)	TaKaRa	6.7%
Taq DNA polymerase(BIO)	Biotech	6.7%
PCR Master Mix	Promega	6.7%

表6.プライマー・RT-1ST PCR

表8. 遺伝子増幅成功率-PCR以外の増幅法

施設番号	遺伝子増幅成功率	PCR以外の遺伝子増幅法
	遺伝子増幅成功(%)	PCR以外の増幅
1	90%	記載なし
2	100%	行っていません。
3	記載なし	記載なし
4	(検出感度1000copies/ml)	記載なし
5	90%	なし
6	90%	記載なし
7	100%(70全検体)	記載なし
8	80%	記載なし
9	100%	記載なし
10	80%	記載なし
11	80%	なし
12	100%(<400除く)	記載なし
13	98%	記載なし
14	86%	記載なし
15	100%	行っていません。

表8. 遺伝子増幅成功率・PCR 以外の増幅法

表9.特異的プライマーの選定

Primerの選定	回答数	回答率
イ)感染研設計	7	46.7%
ロ)独自に設計	2	13.3%
ハ)他からの紹介や文献	1	6.7%
イ)+ハ)	1	6.7%
イ)+ロ)	2	13.3%
イ)+ロ)+ハ)	1	6.7%
記載なし	1	6.7%

表9.特異的プライマーの選定

表10. 独自にプライマーを設計した4施設が基礎とした標準株(塩基配列)

HX2B (K03455/2002?)
解析した臨床検体
subtype Bの共通配列 (Los Alamos National Lab.)
解析集積データを基に

表 10. 独自にプライマーを設計した 4 施設が基礎とした標準株 (塩基配列)

表11.独自にプライマー設計をした3施設の塩基増幅部位

増幅領域	増幅塩基部位	増幅領域	増幅塩基部位	増幅領域	増幅塩基部位
1st PR+RT	2125-3555	1st PR-RT	2020-3792	1st Primerは文献から	
		2nd PR-RT	2039-3622	2nd PR	2136-2633
2nd PR	2148-2569	1st PR-RT	1872-3769	2nd RT	2582-3338
2nd RT	2466-2875	2nd PR-RT	2013-3582	2nd PR-RT	2136-3338
				通常は、2136-3338で増幅	
2nd RT	2707-3132	1st PR-RT	2039-3622		
2nd RT	3009-3389	2nd PR-RT	2135-3339		

表 11.独自にプライマー設計をした 3 施設の塩基増幅部位

表12.ラベリング反応・精製法・シークエンサー

施設番号	ラベリング反応試薬	精製法	シークエンサー
1	Big Dye Terminator v3.1	Dye Ex 2.0 Spin kit	ABI PRISM 310
2	Big Dye Terminator v1.1	CENTRI SEP Spin Columns	ABI PRISM 310
3	Big Dye Terminator v1.1		ABI PRISM 310
4	Big Dye Terminator	CENTRI SEP Spin Columns	ABI 3100 Avant
5	Big Dye Terminator v1.1	CENTRI SEP Spin Columns	ABI PRISM 310
6	Big Dye Terminator v3.1	G-50+Milipore	ABI 3730S
7	Big Dye Terminator v3.1	G-50+Milipore	ABI 3100/3730
8	Big Dye Terminator v1.1	CENTRI SEP Spin Columns	ABI PRISM 310
9	Big Dye Terminator v1.1	エタノール沈殿法	ABI PRISM 310
10	Big Dye Terminator v1.1	エタノール沈殿法	ABI PRISM 310
11	Big Dye Terminator FS	G-50	ABI PRISM 310
12	Big Dye Terminator	エタノール沈殿法	ABI PRISM 310
13	Big Dye Terminator v1.1	エタノール沈殿法	ABI PRISM 310
14	CEA Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start kit*1	エタノール沈殿法	BECKMAN COULTER CEA 8000
15	Big Dye Terminator v3.1	CENTRI SEP Spin Columns	ABI PRISM 310

\*1 BECKMAN COULTER

表 12.ラベリング反応・精製法・シークエンサー

表13.標準パネルの選択・何年版

標準パネル

IAS-USA Panel	73.3%(11/15施設)
Stanford DB	13.3%(2/15施設)
記載なし	13.3%(2/15施設)

耐性検査結果報告書の内容

a,(変異コドンと変異アミノ酸)	46.7%(7/15施設)
a,b(a+耐性化薬剤名)	33.3%(5/15施設)
a,d(+その他)	13.3%(2/15施設)
a,b,d(a+耐性化薬剤名+その他)	6.7%(1/15施設)

その他の記載報告

- Stanfordの解析結果 2施設
- 薬剤名+AA変異部位+変異AAの記載された判定一覧表 1施設

表 13.標準パネルの選択・何年版

**表14.薬剤耐性遺伝子検査業務上の問題**

- ・検査結果の解釈が難しいので判定方法をある程度統一した方が良いのではないか。
- ・増幅困難な検体では、Primerを取替えて増幅する。この場合は、minor populationの可能性があるのではないか。
- ・その検査には意味があるのか？
- ・十分に増幅するmajor population の検査だけをするべきか？
- ・未治療の新規感染者で、感染後の時間経過が比較的短い症例のprovirusを対象とした薬剤耐性変異解析は意義がある？
- ・RT効率が悪いと考えている。何か良い方法があれば知りたい。
- ・数baseの欠失又は挿入変異が混在する場合にアミノ酸決定ができない。
- ・薬剤耐性変異部位でピークが2コあり、耐性変異のピークが小さいとき、どこまでとるべきなのか？がわかりません。

**表 14.薬剤耐性遺伝子検査業務上の問題**

## 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

#### 新規感染者に認めた薬剤耐性HIV-1のウイルス学的解析研究

分担研究者：金田 次弘<sup>\*1</sup>

研究協力者：伊部 史朗<sup>\*2</sup>、澤木 香<sup>\*2</sup>、重見 麗<sup>\*2</sup>

\*1 国立病院機構名古屋医療センター 臨床研究センター 血液免疫研究部 部長、\*2 同 研究員

#### 研究要旨

未治療患者由来プロテアーゼ(PR)阻害剤耐性HIV-1のgag-pol遺伝子に組換えたキメラウイルスは、薬剤の無い条件下で親株のHXB2より優れた増殖能を示した。一方、未治療患者由来PR阻害剤耐性HIV-1のPR遺伝子領域のみを組換えたキメラウイルスは、薬剤の無い条件下で親株HXB2よりも増殖能が劣っていた。これらの結果は、薬剤の無い条件下でのウイルス増殖能を顕著に向上させる遺伝子変異が、未治療患者由来PR阻害剤耐性HIV-1のgag-pol遺伝子のPR領域外に存在することを示唆している。未治療患者由来PR阻害剤耐性HIV-1のgag蛋白質内には、7つの耐性ウイルス特異的なアミノ酸変異が見い出された。これらのアミノ酸変異が耐性ウイルスの増殖能向上に関与している可能性がある。

#### A. 研究目的

多剤併用療法(HAART)施行中に薬剤耐性ウイルスが出現した症例において治療を中断した場合、一般的には、2～13週間のうちに耐性ウイルスは検出されなくなり、野生型ウイルスが主要な準種として置き換わることが知られている。これは、薬剤無し条件下では、耐性ウイルスは野生型ウイルスよりも増殖能が劣ることに起因する。ところが、我々は、1999～2003年に未治療HIV-1感染症患者を対象とした薬剤耐性検査を実施した過程で、プロテアーゼ(PR)阻害剤耐性HIV-1感染症例6例(M46I変異型 4例、L90M変異型 2例)と逆転写酵素(RT)阻害剤耐性HIV-1感染症例11例を経験した。このうち、4例のM46I変異型耐性ウイルス感染症例について、3～13カ月にわたり、PR遺伝子を解析して耐性ウイルスの消長を検索できた。その結果は意外なことに、いずれの症例においても野生型ウイルスは検出されず、耐性ウイルスのみが検出さ

れ続けたという結果であった。感染当初に野生型HIV-1は全く感染せず、耐性ウイルスだけが感染した可能性は高い。しかも、感染後、未治療患者体内で野生型に復帰することなく増殖し続けていた事実から、この耐性ウイルスは、従来常識とは異なり、薬剤の無い条件下でも野生型と同等に増殖できる特性を獲得したウイルスである可能性がある。そこで、我々は、未治療患者に伝播している薬剤耐性HIV-1のウイルス学的特性を解明することを研究目的とした。本年度は、未治療患者由来のPR阻害剤耐性HIV-1を解析対象とし、gag-pol遺伝子内にウイルス増殖能を増強する変異が惹起されているか否かを組換えHIV-1を作成して評価した。同時に、耐性ウイルスのgag蛋白質内に誘導されたアミノ酸変異を検索した。

#### B. 研究方法

##### 1. 組換えHIV-1の作成

HIV-1 HXB2株の感染性クローンを基礎として、以下に示す組換え感染性クローンを作成した(図1)。①インジナビルに対する主要耐性変異であるM46I変異を導入したもの(HXB2・PR<sub>M46I</sub>)、②ネルフィナビルとサキナビルに対する主要耐性変異であるL90M変異を導入したもの(HXB2・PR<sub>L90M</sub>)、③未治療患者由来M46I変異型PR阻害剤耐性HIV-1のPR遺伝子に組換えたもの(HXB2/TN1・PR)、④未治療患者由来L90M変異型PR阻害剤耐性HIV-1のPR遺伝子に組換えたもの(HXB2/TN2・PR)、⑤未治療患者由来M46I変異型PR阻害剤耐性HIV-1のgag-pol遺伝子に組換えたもの(HXB2/TN1・gag-pol)、⑥未治療患者由来L90M変異型PR阻害剤耐性HIV-1のgag-pol遺伝子に組換えたもの(HXB2/TN2・gag-pol)。作成した感染性クローンから組換えウイルスを得た。

## 2. ウイルス増殖能の評価

まず、作成した種々の組換えウイルスと親株であるHXB2を等感染価になるようにMT4細胞培養液に添加し、3-4日の間隔で継代培養した。薬剤存在下でのウイルス増殖能評価の際には、親株であるHXB2のIC<sub>50</sub>(インジナビル終濃度26.4 nM、サキナビル終濃度8.1 nM)になるように薬剤を添加した。培養液上清からRNAを抽出し、RT-nested PCRにてウイルスのgag-pol遺伝子を増幅した。次に共培養した組換えウイルスと親株であるHXB2との塩基配列の違いを利用し、PCR産物を鋳型とした一塩基蛍光ラベリング反応を実施し、蛍光シグナルをGenetic Analyzer (Applied Biosystems)にて検出した。最後に、蛍光シグナルのピーク面積比から、ウイルス存在比を算出し、共培養したウイルスの増殖能の優劣を評価した。

## 3. 未治療患者由来PR阻害剤耐性HIV-1のgag蛋

## 白質内アミノ酸変異の検索

解析に用いることができた5症例(M46I変異型4例、L90M変異型1例、いずれもサブタイプB)について、ウイルスのgag-pol遺伝子をRT-nested PCRにて一続きのDNA断片として増幅した。塩基配列を決定後アミノ酸に変換し変異の有無を検索した。11例の野生型ウイルスによる感染症例(全てサブタイプB)を対照とした。

(倫理面への配慮) 薬剤耐性検査は抗HIV薬を選択する上で、臨床上価値のある検査であることを患者に説明し、同意を得たうえで検体を採取した。検査結果は患者のプライバシーが侵されないように厳重に管理をしている。

## C. 研究結果

### 1. 主要耐性変異M46I、又は、L90Mを導入したウイルスの増殖能

主要耐性変異であるM46I、又は、L90M変異を導入したHXB2のウイルス増殖能を評価した。①HXB2・PR<sub>M46I</sub>とHXB2、②HXB2・PR<sub>L90M</sub>とHXB2を、薬剤存在下、又は、薬剤非存在下で共培養した。①HXB2・PR<sub>M46I</sub>は、インジナビル存在下では2継代目の早期に80%以上を占め、野生型の親株HXB2よりも優れた増殖能を示した。しかし、薬剤非存在下では反対に、8継代目に0%までに減少し、増殖能はHXB2よりも劣っていた(図2A)。②HXB2・PR<sub>L90M</sub>とHXB2の共培養実験でも同様な実験結果が得られた(図2B)。まとめ：主要耐性変異であるM46IやL90Mを保有したウイルスは、薬剤存在下で野生型ウイルスよりも優れた増殖能を示すが、薬剤の無い条件下では野生型ウイルスよりも増殖能が劣っていることを確認した。

### 2. 未治療患者由来PR阻害剤耐性ウイルスのPR遺伝子に組換えたキメラウイルスの増殖能

①HXB2/TN1・PRとHXB2、②HXB2/TN2・PRとHXB2



を薬剤非存在下で共培養した。①HXB2/TN1・PRは、8継代目に10%以下となり、増殖能は親株HXB2よりも劣っていた(図3A)。②HXB2/TN2・PRとHXB2との共培養実験では、HXB2/TN2・PRの増殖能は親株HXB2よりも劣っていたが、その差は小さかった(図3B)。まとめ：未治療患者由来PR阻害剤耐性ウイルスのPR遺伝子領域のみを組換えたキメラウイルスは共に野生型ウイルスより増殖能が劣っていた。

### 3. 未治療患者由来PR阻害剤耐性ウイルスのgag-pol遺伝子に組換えたキメラウイルスの増殖能

①HXB2/TN1・gag-polとHXB2、②HXB2/TN2・gag-polとHXB2を、薬剤存在下、又は、薬剤非存在下で共培養した。①HXB2/TN1・gag-polは、インジナビル存在下で2継代目の早期に90%以上を占め、HXB2よりも優れた増殖能を示した。さらに、薬剤非存在下でも、6継代目に90%以上を占め、HXB2よりも優れた増殖能を示した(図4A)。②HXB2/TN2・gag-polとHXB2との共培養実験でも同様の結果が得られた(図4B)。まとめ：未治療患者由来PR阻害剤耐性ウイルスのgag-pol遺伝子に組換えたキメラウイルスは共に、薬剤存在下だけでなく薬剤の無い条件下においても、野生型ウイルスより増殖能が優れていた。組換えウイルスを用いた実験結果のまとめ：①未治療患者由来PR阻害剤耐性ウイルスのgag-pol遺伝子には、薬剤の無い条件下でも野生型ウイルス以上の増殖能を付与する遺伝子変異が存在する。②そのウイルス増殖能を顕著に向上させる遺伝子変異は、gag-pol遺伝子のPR領域外に存在する。

### 4. 未治療患者由来PR阻害剤耐性HIV-1のgag蛋白質内アミノ酸変異の検索

サブタイプBの共通配列を参照配列としてgag蛋白質内のアミノ酸変異を検索した結果、

12個のアミノ酸変異がPR阻害剤耐性ウイルス全例に検出された。そのうちの7個のアミノ酸変異(p17/120-A挿入、p24/H87Q、p24/M96I、p24/G116T、p2/T12S、p7/D48E、p6<sup>395</sup>/E16A)は、野生型ウイルスには低頻度にしか検出されない耐性ウイルス特異的なアミノ酸変異であり、残りの5個のアミノ酸変異(p17/K30R、p17/Y79F、p17/T84V、p17/K91R、p7/T12I)は、野生型ウイルスにも高頻度に検出される非特異的なアミノ酸変異であった。

### D. 考察

PR内の主要耐性変異の獲得は薬剤存在下でのウイルス増殖能を向上させるが、その代償としてPR本来の機能が低下するため自然界でのウイルス増殖能は低下する。PR阻害剤耐性ウイルスの増殖能向上に関連したアミノ酸変異としては、主要耐性変異獲得後に出現するPR内部のアミノ酸変異が存在する。これらの変異は副次変異と呼ばれ、主要耐性変異の獲得により低下したPRの機能を向上させてウイルス増殖能を補完する働きを持つ。さらに、PR内部に生じるアミノ酸変異以外にも、PRの基質となるgag蛋白質内部のアミノ酸変異もPR阻害剤耐性ウイルスの増殖能向上に関連している。

我々は、まず、HXB2に主要耐性変異であるM46IやL90M変異を導入し、主要耐性変異は薬剤の無い条件下でのウイルス増殖能の低下を引き起こす変異であることを確認した。我々が解析対象とした未治療患者由来PR阻害剤耐性ウイルスは、主要耐性変異であるM46IやL90M変異の他に副次変異であるL63PやV77Iを単独あるいは両方を保有していた。しかしながら、未治療患者由来PR阻害剤耐性ウイルスのPR領域を組換えたキメラウイルスはHXB2よりも増殖能が劣っていたことから、PR内部に存在するアミ

ノ酸変異は未治療患者由来PR阻害剤耐性ウイルスの増殖能を顕著に向上させる変異ではないことは明らかである。一方、未治療患者由来PR阻害剤耐性ウイルスのgag-pol遺伝子を組換えたキメラウイルスは、薬剤の無い条件下でも野生型ウイルスであるHXB2よりも優れた増殖能を示した。即ち、未治療患者由来PR阻害剤耐性ウイルスのgag-pol遺伝子内には薬剤の無い条件下でのウイルス増殖能を顕著に向上させる遺伝子変異が存在し、その変異が存在する領域はPR領域外であると要約できる。

5症例の未治療患者由来PR阻害剤耐性ウイルスgag-pol遺伝子内には、gag蛋白質を薬剤耐性型PRにとってより適した基質に変化させてウイルス増殖能を補完する変異、例えば、A431V(p7/p1切断部位)やL449F変異(p1/p6<sup>395</sup>切断部位)は検出されなかった。一方、耐性ウイルスに特異的な7つのアミノ酸変異が検出されたが、これらの変異はウイルスを用いた実験で示された未治療患者由来PR阻害剤耐性ウイルスの顕著な増殖能向上に関連している可能性のある候補アミノ酸変異と思われる。この中で、p24/H87Q変異に関しては、未治療患者由来PR阻害剤耐性ウイルスの増殖能向上に関連しているという予備実験結果を得ており、次年度は、候補アミノ酸変異と耐性ウイルス増殖能向上との関連性について研究を進展させることが重要であると考えている。また、gag遺伝子だけでなく、未治療患者由来PR阻害剤耐性ウイルスの全ゲノム領域を解析し、耐性ウイルス特異的な遺伝子変異が他の遺伝子内にも存在するかどうかを検討する予定である。

## E. 結論

未治療患者由来PR阻害剤耐性HIV-1のgag-pol遺伝子に組換えたキメラウイルスは、

薬剤の無い条件下で親株のHXB2より優れた増殖能を示した。一方、未治療患者由来PR阻害剤耐性HIV-1のPR遺伝子領域のみを組換えたキメラウイルスは、薬剤の無い条件下で親株HXB2よりも増殖能が劣っていた。これらの結果は、薬剤の無い条件下でのウイルス増殖能を顕著に向上させる遺伝子変異が、gag-pol遺伝子のPR領域外に存在することを示唆している。一方、gag蛋白質内には、7つの耐性ウイルス特異的なアミノ酸変異が見い出されたが、これらのアミノ酸変異が耐性ウイルスの増殖能向上に関与している可能性がある。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 伊部史朗、金田次弘、「未治療HIV-1感染者における薬剤耐性ウイルスの検出頻度とその特徴」、現代医療、36(11)、65-72、2004.

### 2. 学会発表

1. 伊部史朗、金田次弘ほか、「未治療患者に対するHIV-1遺伝子型薬剤耐性検査の意義」、第14回抗ウイルス化学療法研究会、名古屋、2004.
2. 伊部史朗、澤木 香、金田次弘ほか、「未治療患者由来プロテアーゼ阻害剤耐性HIV-1の増殖能解析」、第18回日本エイズ学会学術集会、静岡、2004.
3. 澤木 香、伊部史朗、金田次弘「未治療患者に検出された薬剤耐性HIV-1のgag遺伝子領域内アミノ酸変異の解析」、第18回日本エイズ学会学術集会、静岡、2004.

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図1 組換えHIV-1感染性クローン

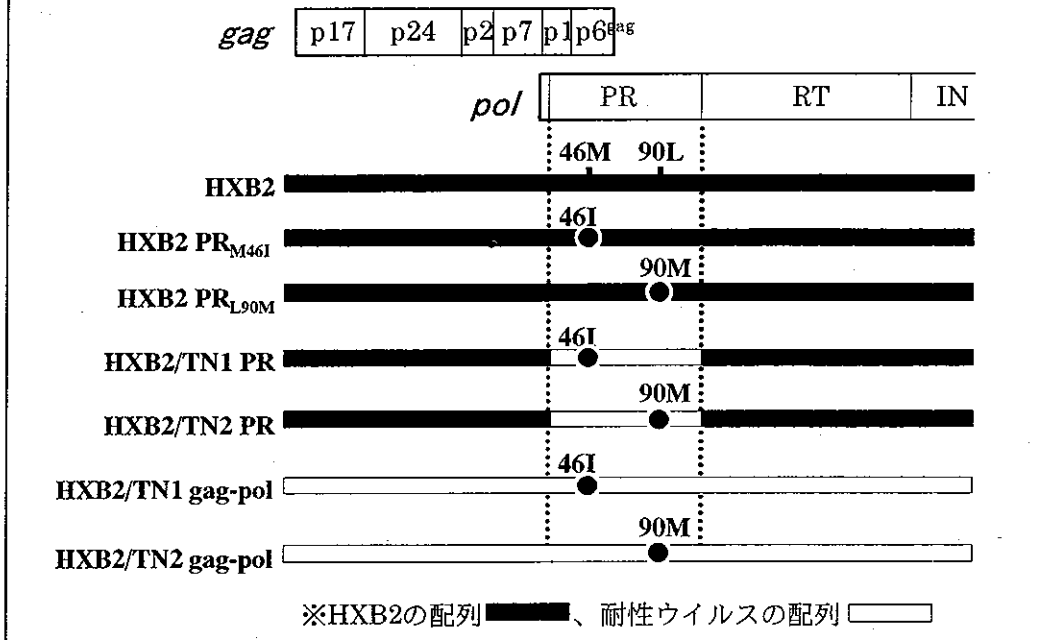


図2 主要耐性変異を導入したウイルスの増殖能

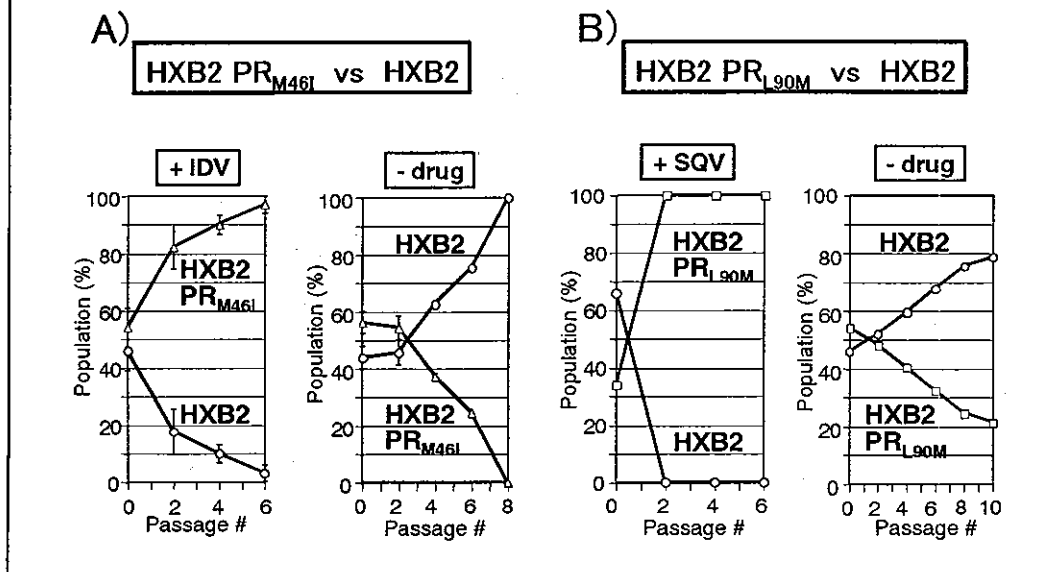
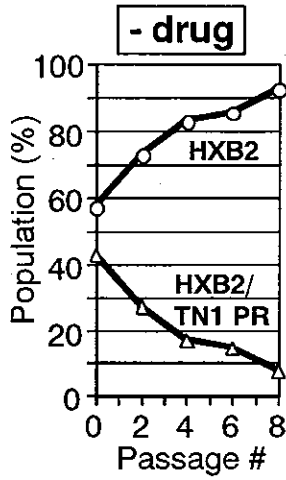


図3 未治療患者由来PR阻害剤耐性ウイルスのPRに組換えたキメラウイルスの増殖能

A)

HXB2/TN1 PR vs HXB2



B)

HXB2/TN2 PR vs HXB2

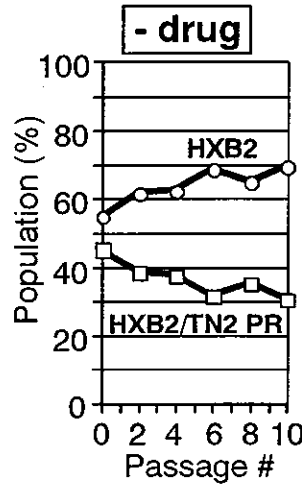
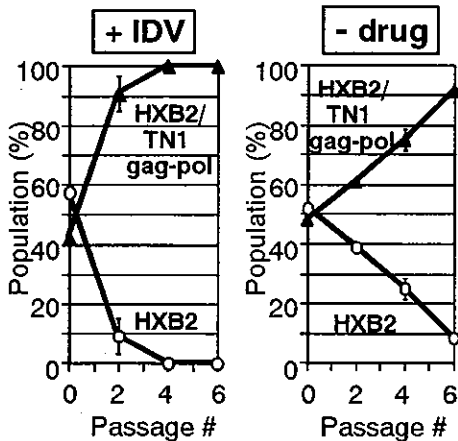


図4 未治療患者由来PR阻害剤耐性ウイルスのgag-polに組換えたキメラウイルスの増殖能

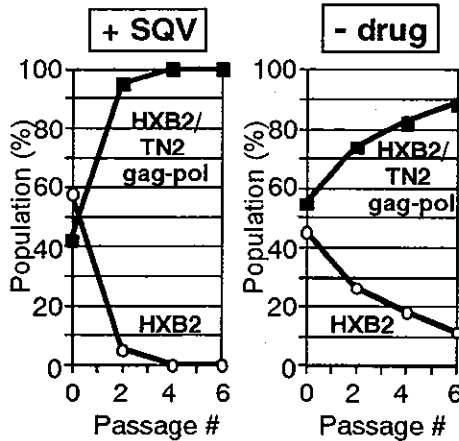
A)

HXB2/TN1 gag-pol vs HXB2



B)

HXB2/TN2 gag-pol vs HXB2



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 療法を受けている患者の PBMC における細胞内薬剤濃度と治療効果及び副作用との関連

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

HAART 療法における治療失敗の原因のひとつとして、服薬アドヒアランスの低さによる薬剤耐性ウイルスの出現や不十分な血中薬剤濃度がある。しかし、服薬アドヒアランスの客観的評価法は確立されていない。そこで、服薬アドヒアランスを客観的に評価するために、毛髪中薬剤濃度を LC/MS/MS を用いて高感度で測定できる方法を開発した。対象薬剤にはロピナビルとネルフィナビルを選択し、内部標準としてサキナビルを用いた。毛髪を患者後頭部から採取し、長さ 2 mm ごとに切断した後、ビーズ式細胞破碎装置で処理し、抽出物中の薬剤を LC/MS/MS で定量した。薬剤回収率は 93% 以上、定量限界は LPV と NFV がそれぞれ 0.67 と 0.08 fmol、測定誤差は約 6% であった。同じ患者から採取された毛髪間には薬剤濃度に有意差はなかった。アドヒアランスが良好な患者では毛髪軸方向に有意な濃度変化はなかったが、薬剤の中断と開始を経験した患者では毛髪内濃度分布が服薬歴と非常によく一致していた。これらの結果は、薬剤は毛髪内でほとんど拡散することなく、実際の服薬歴が毛髪の軸方向に年輪のごとく保持されていることを示している。本研究で開発した方法は服薬アドヒアランスの客観的評価に有効であり、治療失敗の原因解明や忍容性の高い薬剤の選択に重要な情報を提供できるものであると考えられる。

A. 研究目的

AIDS 治療に HAART 療法が導入されて以来、患者の予後が飛躍的に改善された。しかし、治療例の約 30% でウイルス学的あるいは免疫学的失敗が起こっている。その原因のひとつとして、服薬アドヒアランスの低さによる薬剤耐性ウイルスの出現や不十分な血中薬剤濃度があげられている。しかし、服薬アドヒアランスの評価は患者の自己申告に頼っているのが現状であり、客観的評価法は確立されていない。血液薬剤濃度の測定はせいぜい 1~2 日の服薬アドヒアランスしか評価できず、瀕回の採血を必要とするため実用上困難であり、針刺し事故などの危険性もともなう。そこで、服薬アドヒアランスを客観的に評価するために、血中濃度を長期にわたり経時的に保持していると考えられる毛髪中の薬剤濃度を LC/MS/MS を用いて高感度で測定できる方法を開発することにした。対象薬剤としてはプロテアーゼ阻害薬 (PI) の中で現在最も使用頻度の高いロピナビル (LPV) とネルフィナビル (NFV) を選択した。

B. 研究方法

慶應大学病院通院中の LPV 服用患者 1 名 (C3) と NFV 服用患者 2 名 (C16 と C25)、ならびに荻窪病院通院中の LPV と NFV の服用歴のある患者 1 名 (H390) を対象とした。

標準薬剤にはアボットより供与された LPV と日本たばこより供与された NFV を用いた。内部定量標準薬剤には PI の一種であり近年使用頻度の低い、ロシユより供与されたサキナビル (SQV) を用いた。これらの薬剤をメタノールで 0.1  $\mu\text{M}$  に溶解したものを標準液とした。

毛髪は患者の後頭部から採取した。これを長さ 2 mm ごとに切断し、2 ml 遠心チューブに入れ、200  $\mu\text{l}$  のメタノールと径 2 mm のジルコニアビーズを 8 粒加え、さらに内部定量標準として 0.1  $\mu\text{M}$  SQV を 10  $\mu\text{l}$  (1 pmol) 加えた。このチューブをビーズ式細胞破碎装置 (TOMY) で 4,000 rpm、5 分間の処理を、1 分の氷冷を間にはさんで、3 回行った。破碎後、メタノールの上清を採取し、真空遠心器で乾燥させ、LC/MS/MS の移動相 10  $\mu\text{l}$  で溶解した。

毛髪抽出液中の抗 HIV 薬の定量は慶應義塾大学医学部中央機器管理部所有の LC/MS/MS (Agilent、1100 Series G1376A、キャピラリ LC と Applied Bio Systems、API QSTAR PULSAR i) を用いて行った。MS/MS のイオン化はエレクトロスプレーイオン化法とし、イオン検出は陽イオンモードで行った。LC のへの注入量は 1  $\mu\text{l}$  とし、流速は 15  $\mu\text{l}/\text{min}$  とした。移動相は 5 mM 酢酸アンモニウム (pH 7.0) で、12 分間でメタノール濃度 40%~90% の勾配をかけた。

### C. 研究成果

MS/MS において最もシグナルが強く、選択性も高いプリカーサーイオンとプロダクトイオンの組み合わせは、LPV が 629.4 と 447.4 amu、NFV が 568.4 と 330.3 amu、SQV が 671.6 と 570.5 amu であった。プリカーサーイオンは 3 剤ともに親分子にプロトンが付加したものである。

毛髪から抗 HIV 薬を抽出する方法としてトリフルオロ酢酸抽出と乳鉢による破砕法を試したが、前者では薬剤の分解が起こり、後者は操作が複雑であったため、研究方法で述べたような、溶媒をメタノールにしてビーズ式細胞破砕装置で毛髪から薬剤を抽出する方法を採用した。

健常人毛髪抽出液を LC/MS/MS に注入した場合、各標準薬剤が溶出する位置にはまったくピークが観察されなかったが、薬剤服用患者毛髪抽出液を注入した場合は、標準薬剤とまったく同じ溶出位置に単一のピークが観察された。各薬剤回収率は LPV、NFV、SQV がそれぞれ 96.1、94.0、92.8% であった。定量感度を健常人の毛髪抽出物で観察されたノイズレベルの 10 倍とすると、LPV、NFV、SQV はそれぞれ 0.67、0.08、1.03 fmol であった。内部標準の SQV で補正をかけた後の測定誤差は変動係数で LPV、NFV がそれぞれ 6.4、5.2% であった。シグナル強度の用量依存性を 200 から 0.098 fmol までの 2 倍段階希釈において調べると、LPV、NFV、SQV の決定因子 ( $R^2$ ) はそれぞれ 0.998、0.998、0.999 であった。以上の結果から、本研究で開発した方法は回収率、定量感度、定量誤差、定量性のいずれに点でも非常に優れた定量系であるといえる。

次に、患者後頭部から採取した毛髪の間で薬剤濃度に差があるかどうかを、3 本の毛髪の毛根から 2 mm の断片を用いて検討した。LPV 服用患者 (C3) の LPV 濃度はそれぞれ 4.2、4.5、3.9 fmol/ $\mu$ l であった。NFV 服用患者 2 名 (C16、C25) の NFV 濃度はそれぞれ 1.56、1.56、1.25 fmol/ $\mu$ l と 0.62、0.53、0.54 fmol/ $\mu$ l であった。いずれの場合も同じ患者から採取された毛髪間には薬剤濃度に有意差は認められなかった。一方、NFV を服用していた 2 人の患者さんの間では毛髪内薬剤濃度に 2.5 倍程度の差があった。

次に毛髪内薬剤濃度の軸方向の分布を調べるために、アドヒアランスが良好な NFV 服用患者 (C25) の毛髪 1 本 (全長 2 cm) を毛根から 2 mm ずつ切断し、得られた 10 切片すべてについて NFV 濃度を測定した。その結果、多少のばらつきはあるものの、毛髪軸方向の有意な濃度変化はみられなかった (図 1)。

最後に、薬剤の服薬歴が毛髪内薬剤濃度の分布に反映するかどうかを調べるために、LPV の投与を服薬困難のために中断し、その後 NFV を投与し

たがこれも服薬困難のために中止した患者 (H390) の毛髪を検体とした。毛髪内の濃度分布は毛髪の成長速度を 1 ヶ月あたり 1 cm と仮定した場合に服薬歴と非常によく一致していた (図 2 と 3)。この結果から、薬剤は毛髪内でほとんど拡散することなく、実際の服薬歴が軸方向の濃度分布に反映すること考えられる。

### D. 考察

本研究において非常に感度の高い毛髪内抗 HIV 薬定量方法を確立することができた。この方法によって極微量の試料 (毛髪 2 mm 断片) における薬剤定量が可能となった。Bernard らによる毛髪内インジナビルの定量に関する研究では、1 cm<sup>2</sup> 程度の頭皮に生えている毛髪を必要とした。彼らは検出部に分光光度計を用いた HPLC を使っていたために、毛髪内の夾雑物によるノイズのために検出感度を上げることが困難であったと考えられる。本研究では目的のイオン産物のみを選択的に検出する LC/MS/MS を用いたことが検出感度を上げるうえで大きく貢献したと思われる。本研究では、対象薬剤を LPV と NFV としたが、LC/MS/MS の検出条件を変更することで他の抗 HIV 薬の定量も同様に可能であると予想される。ヌクレオシド逆転写酵素阻害薬を対象とした場合、毛髪内においてプロドラッグである未変化体として検出されるのか、それともリン酸化体として検出されるかは興味のある問題である。

一般に毛髪は 1 ヶ月あたり 1~1.5 cm 伸長するといわれている。図 2 と 3 で仮定した毛髪の伸長速度はこの範囲に入っている。毛髪内薬剤濃度の分布が服薬歴にほぼ対応していたというこの結果は、薬剤が毛髪中でほとんど拡散せず、血中薬剤濃度の長期的時間変化を年輪のごとく保持していることを示している。この結果は本研究で開発した方法が服薬アドヒアランスの客観的評価に有効であることを強く示唆するものである。

得られた毛髪内濃度分布を解釈する際に次の点に注意すべきである。それは、一定の濃度分布が得られた場合、服薬アドヒアランスが高くて安定しているのか、低くて安定しているのかを区別できないことである。この問題を解決するためには、100%アドヒアランスを遵守した期間を 1 週間程度、患者と担当医の協力のもとに作ってもらい、その時期の毛髪内濃度に照らし合わせてアドヒアランスを評価することが必要であると思われる。

今回の実験では毛髪間で抗 HIV 薬濃度に差が認められなかった。しかし、毛髪は成長期の後、休止期に入り抜け落ちるという過程をたどる。おそらく休止期の毛髪は薬剤の取り込みが低下していると考えられるため、そのような毛髪は検査対象から除外する必要がある。しかし、毛髪が休止

期にあるかどうかを判定すること簡単ではない。休止期の毛髪の成分に何か変化があることがわかっているならば、その成分を定量することによって休止期の毛髪を特定することが可能かもしれない。そのような判定法が確立するまでは、毛髪を採取する際に毛根がしっかりと頭皮についていることが次善の策かもしれない。本研究では検討していないが、薬剤の安定性はメラニン含有量との相関が強いという報告がある。したがって、脱色していたり、パーマをあてたような毛髪も検査対象としては適当でないかもしれない。一方、シャンプーについては、影響がないとされている。

本研究では薬剤の毛髪内濃度と血中薬剤濃度、ウイルス学的反応や免疫学的反応などとの相関は検討していない。これらの比較研究は毛髪内薬剤濃度測定 of 臨床的意義を明らかにするために重要と考えられる。特に平均的血中濃度と毛髪内濃度との間に高い相関が認められれば、薬剤の変更や投与量の変更の決定に毛髪内薬剤濃度が参考となる可能性がある。

#### E. 結論

抗HIV治療を受けている患者の服薬アドヒアランスを客観的に評価することを目的として、LC/MS/MSを用いてLPVとNFVの毛髪内濃度を測定する方法を確立した。この方法は2mmの毛髪断片を測定対象にでき、約5日間隔のアドヒアランスを評価する能力がある。実際の患者毛髪を用いた実験では、服薬歴と毛髪内薬剤濃度の毛髪軸方向の分布はよく一致していた。本研究で開発した方法が服薬アドヒアランスの客観的評価に有効であり、治療失敗の原因究明や忍容性の高い薬剤の選択において重要な手法になると考えられる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Miyake, A., Enose, Y., Ohkura, S., Suzuki, H., Kuwata, T., Shimada, T., Kato, S., Narayan, O., and Hayami, M. The quantity and diversity of infectious viruses in various tissues of SHIV-induced monkeys at the early and AIDS stages. *Arch. Virol.* 149, 943-955, 2004.

2) Takakuwa, K., Kashima, K., Suzuki, M., Fujita, K., Tamura, M., Kaneko, S., Kato, S., Hanabusa, H., and Tanaka, K. Studies on the IVF-ET for discordant couples where the man

is HIV positive and the woman is negative using sperm washing technique and highly sensitive PCR method. *International Proceedings of IX International Congress of Reproductive Immunology* 11-15, 2004.

##### 2. 学会発表

1. Shingo Kato, Rie Tanaka. Antiretroviral effects of intracellular protease inhibitors. XV International AIDS Conference, Abstract WePeA5669. July 11-16, 2004, Bangkok, Thailand.

2. 木内英、花房秀次、小島賢一、加藤真吾、田中理恵、築地謙治、太田未緒、和田育子。Tenofovir の効果と副作用。第18回日本エイズ学会学術集会、2004年12月9-11日、静岡。

3. 花房秀次、木内英、太田未緒、和田育子、小島賢一、田中理恵、築地謙治、加藤真吾。Atazanavir を含む抗HIV療法の評価。第18回日本エイズ学会学術集会、2004年12月9-11日、静岡。

4. 築地謙治、根岸昌功、長谷川直樹、木内英、花房秀次、杉浦互、加藤真吾。PI服用者における毛髪内PI定量法の検討。第18回日本エイズ学会学術集会、2004年12月9-11日、静岡。

5. 加藤真吾、田中理恵、杉浦互。LC-MS/MSによるAZTの細胞内薬物動態の解析。第18回日本エイズ学会学術集会、2004年12月9-11日、静岡。

6. 向出雅一、加藤真吾、田中理恵、近藤真規子、嶋貴子、須藤弘二、武部豊、今井光信。LTR、gag、pol領域を用いたHIV-1プロウイルス定量法に関する検討。第18回日本エイズ学会学術集会、2004年12月9-11日、静岡。

7. 須藤弘二、嶋貴子、近藤真規子、古谷茂之、瀬尾麻美、加藤真吾、今井光信。HIV RNA測定キットCOBAS TaqMan HIV-1 Test「マニュアル」の基礎的検討。第18回日本エイズ学会学術集会、2004年12月9-11日、静岡。

#### 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. C25における毛髪中薬剤濃度の分布

NFV

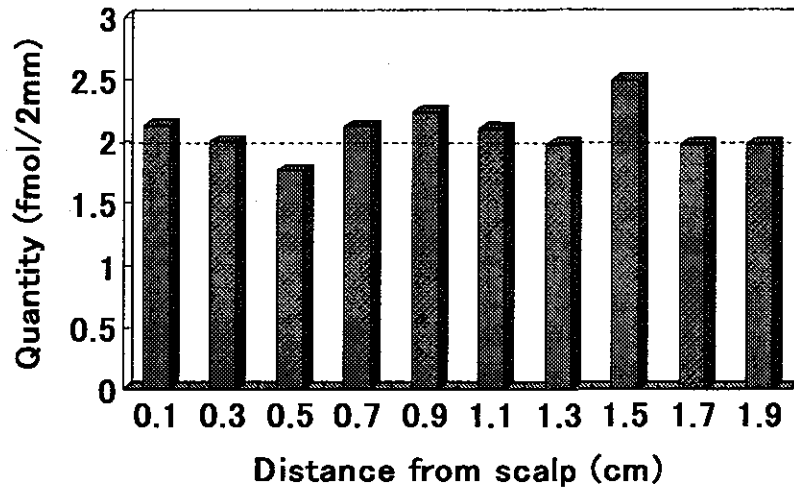


図2. H390における毛髪内LPV濃度

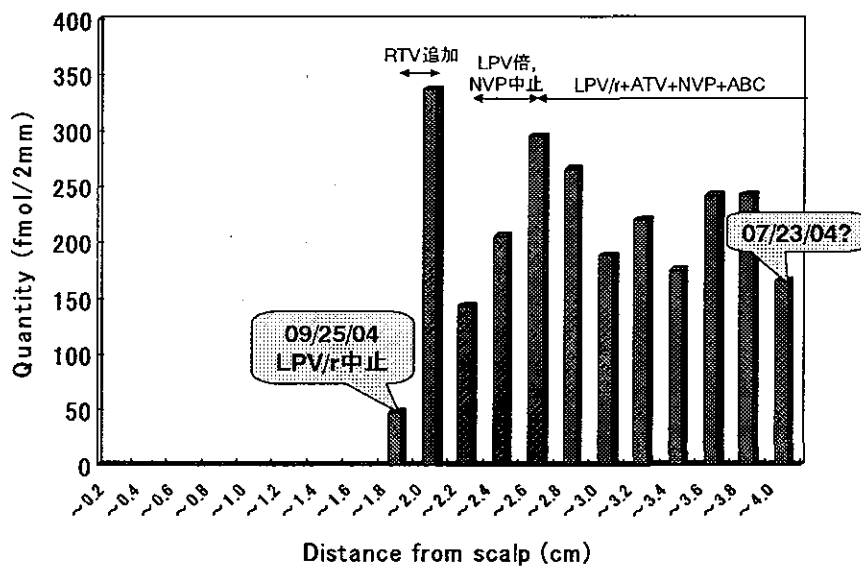
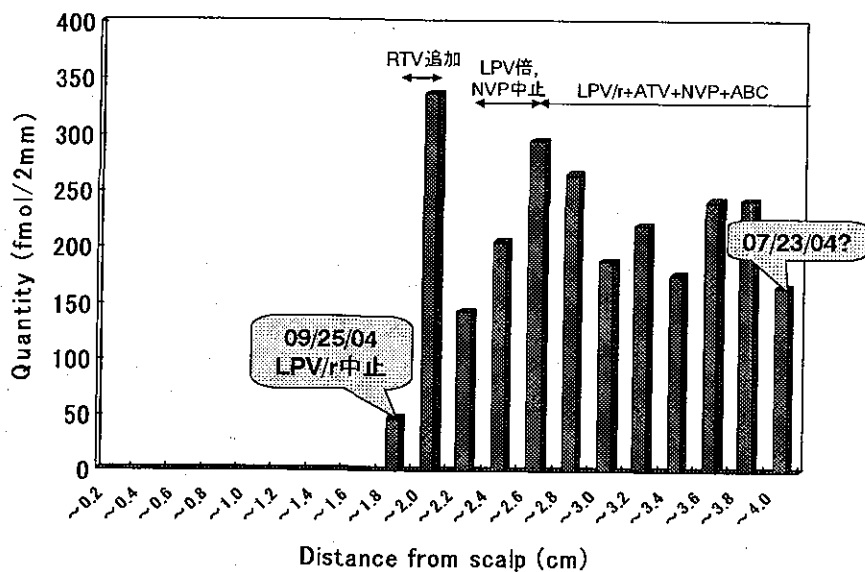




図3. H390における毛髪内LPV濃度



薬剤耐性検査の臨床応用に関する研究

分担研究者 湯永 博之 国立国際医療センターエイズ治療・研究開発センター 医師

**研究要旨**

未治療の HIV-1 感染患者からの臨床分離株 44 株を phenotypic assay にて薬剤感受性を調べたところ、2 株が非核酸系逆転写酵素阻害薬 nevirapine (NVP) に対して高度耐性(69 倍と 310 倍以上)であった。Genotype assay では、既知の NVP 耐性変異は認められなかったが、2 株とも、逆転写酵素の 238 番目のアミノ酸が lysine (K) から serine (S) に変異していた(K238S)。組換え HIV-1 を作成して、増殖能・薬剤感受性を調べたところ、K238S 単独で NVP に対し 4.4 倍耐性となり、既知の NVP 耐性変異と K238S が共存すると、V106A/K238S では 530 倍、V108I/K238S では 56 倍耐性となり、高度な NVP 耐性を獲得することが明らかとなった。K238S が genotype assay で認められた場合には、NVP を key drug とする治療法は不適切であると考えられる。

**A. 研究目的**

臨床的に広く使われている薬剤耐性検査は genotype assay であるが、この assay は既知の耐性変異の有無で HIV-1 の薬剤耐性を推測する。未知の耐性変異が存在した場合には、まったく無力となるため、genotype assay をより有効にするためには、新たな薬剤耐性変異の同定・解析が不可欠である。臨床分離株から新たな薬剤耐性変異を同定し、解析することを目的とする。

**B. 研究方法**

未治療の HIV-1 感染者から臨床株を分離し、phenotypic assay により薬剤感受性を調べる。何らかの薬剤に耐性の株が見つかった場合、genotype assay も行い、

既知の薬剤耐性変異の有無を調べる。既知の耐性変異が認められない場合には、未知の耐性変異が存在する可能性があり、その同定・解析を行う。

(倫理面への配慮)

通常の日常診療以外に採血が生じる患者様からは、すべて文書による同意を得ている。拒否は自由であり、拒否することで、診療面での不利益は生じない。説明文書・同意文書は国立国際医療センターにおける倫理委員会で承認されている(IMCJ-H13-80)。

**C. 研究結果**

未治療の HIV-1 感染患者からの臨床分離株 44 株のうち、2 株が phenotypic assay にて非核酸系逆転写酵素阻害薬 nevirapine (NVP) に対して高度耐性(69

倍と310倍以上)であった(図1、表1)。Genotype assayでは、既知のNVP耐性変異は認められなかったが、2株とも、逆転写酵素の238番目のアミノ酸がlysine(K)からserine(S)に変異していた(K238S)。組換えHIV-1を作成して、増殖能・薬剤感受性を調べたところ、K238S単独でNVPに対し4.4倍耐性となり、既知のNVP耐性変異とK238Sが共存すると、V106A/K238Sでは530倍、V108I/K238Sでは56倍耐性となり、高度なNVP耐性を獲得することが明らかとなった(表2)。

#### D. 考察

K238Sがgenotype assayで認められた場合には、NVPをkey drugとする治療法は不適切であると考えられる。近年、非核酸系逆転写酵素阻害薬耐性に関与する238番目付近のアミノ酸変異が相次いで報告されており、この領域のpolymorphismが治療結果に影響を与える可能性がある。

#### E. 結論

未治療のHIV-1感染患者からの臨床分離株に、新たなNVP耐性変異K238Sを同定した。この変異は、マイナーなpolymorphismと考えられ、NVPを含む抗HIV療法に影響を与えられ、NVPを含む

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Tsuchiya K, Gatanaga H, Tachikawa N, Teruya K, Kikuchi Y, Yoshino M, Kuwahara T, Kimura S, Oka S. Homozygous CYP2B6\*6 (Q172H and K262R) correlates with high plasma efavirenz concentrations in HIV-1 patients treated with standard efavirenz-containing regimens. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 319:1322-6.

Hachiya A, Gatanaga H, Kodama E, Ikeuchi M, Matsuoka M, Harada S, Mitsuya H, Kimura S, Oka S. Novel patterns of nevirapine-resistance-associated mutations of human immunodeficiency virus type 1 in treatment-naïve patients. *Virology* 2004; 327:215-24.

Bi X, Gatanaga H, Tanaka M, Honda M, Ida S, Kimura S, Oka S. Modified Dynabeads method for enumerating CD4+ T-lymphocyte count for widespread use in resource-limited situations. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005; 38:1-4.

##### 2. 学会発表

湯永博之、土屋亮人、中島歩、蜂谷敦子、菊池嘉、岡慎一、木村哲. HIV感染長期未発症者におけるHIVアクセサリ一遺伝子nef, vprの解析. 第101回内科学会総会・講演会 東京. 4月, 2004.

湯永博之. HAART : Once Daily の臨床的意義. 第 18 回エイズ学会学術集会・総会 静岡. 12 月, 2004.

湯永博之. NNRTI 耐性の新知見. 第 18 回エイズ学会学術集会・総会 静岡. 12 月, 2004.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし。

##### 2. 実用新案登録

なし。

##### 3. その他

なし。