

Table 4. Adverse events

	Adverse event	Severity	Time of onset (day)	Causal relationship	Outcome
Ciprofloxacin 13.5% (5/37 cases)	Drug-induced skin rash (neck, upper arm, thigh)	Moderate	8	Probable	Resolved 2 days after withdrawal of study medication.
	Soft stool	Mild	8	Possible	Study medication was continued. The symptom was normalized by treatment with an intestinal remedy.
	Diarrhea, melena (hemorrhagic enteritis)	Moderate	5	Probable	Symptoms resolved 6 days after withdrawal of study medication.
	Increased GOT and GPT	Mild	12	Possible	Values were normalized at 12 days after withdrawal of study medication.
	Sensation of chest heat (only on Day 2)	Mild	5	Probable	Study medication was continued. The symptom resolved without additional treatment.
Carbapenem 12.2% (5/41 cases)	Hepatic dysfunction	Mild	4	Possible	Abnormality improved 12 days after withdrawal of study medication.
	Hepatic impairment	Mild	7	Possible	Abnormality improved 16 days after withdrawal of study medication.
	Pseudomembranous enterocolitis	Mild	9	Obvious	Resolved after 3 days of treatment with VCM following withdrawal of study medication.
	Fever and aggravated inflammation	Moderate	5	Possible	Improved 2 days after withdrawal of study medication without additional treatment.
	Increased GOT	Mild	9	Probable	Abnormality occurred at end of treatment and normalized without additional therapy.

Ciprofloxacin vs carbapenem  $p=0.869$  (not significant, chi-square test)

VCM: vancomycin

績は検討されていない。一方、欧米では主に院内肺炎を対象とした IPM/CS 1g 1日 2~3回投与と注射用ニューキノロン系薬 CFX 400mg 1日 2~3回投与との randomized controlled trial (RCT) が実施され、CFX の臨床の有効率は IPM/CS と比較して少なくとも同等以上と報告されている<sup>15,16)</sup>。そこで、今回、わが国における承認用法・用量にて、呼吸器感染症に対する CFX の有用性、臨床的位置づけを明確にすることを目的とし、カルバペネム系薬を対照薬として比較検討した。その結果、両群の有効率は同等であったものの、有効性分類の分布には偏りがみられ、CFX はカルバペネム系薬に比較して早期改善例が多い傾向がみられた。また、早期改善例については両群の背景因子に特記すべき差異はなかった。これはペニシリン系薬またはセフェム系薬投与にて無効の症例が対象であったことから、 $\beta$ -ラクタム系薬に対して耐性または低感受性菌に選択されており、交差耐性により同系統のカルバペネム系薬への感受性が低下していた可能性や、今回十分な検索はなされておらず確定診断された症例はなかったが、 $\beta$ -ラクタム系薬が無効のマイコプラズマ、クラミジア、レジオネラなど非定型病原体が関与した可能性がある。さらに、ニューキノロン系薬は肺組織への移行性、短時間殺菌力に優れていることも大きな要因である。われわれは *P. aeruginosa* による ventilator-associated pneumonia (VAP) 発症モデルに対して、CFX、IPM/CS および第 4 世代セフェム系薬 ceftazidime (CZOP) を投与したところ、CFX は他製剤

に比較して肺組織における薬剤移行が良好であり、その結果、肺組織における生菌数および炎症性変化は、CFX 群が他群に比し有意に少なかったことを報告している<sup>17)</sup>。

また、注射用 CFX の第 1 回特別調査 (2001) では<sup>9)</sup>、臨床分離菌の抗菌薬交差耐性について検討されており、セフェム系薬である CAZ に耐性を示す *P. aeruginosa* のカルバペネム系薬 IPM/CS への耐性率は 41.2%、ニューキノロン系薬 CFX への耐性率は 17.6% と報告しており、明らかに系統の異なる CFX の  $\beta$ -ラクタム系薬との交差耐性は少なく、 $\beta$ -ラクタム系薬前治療例に対する優れた効果が期待される。その結果、 $\beta$ -ラクタム系薬の使用量のコントロールにより、 $\beta$ -ラクタム系薬耐性化の抑制という付加的利点も得られる。最近、異なる作用機序の薬剤を一定期間使用する、つまり、サイクリング療法を行うことで、薬剤耐性化の抑制、耐性菌による感染症・死亡者数を減少させると報告されている<sup>18,19)</sup>。これは未だコンセンサスは得られていないものの、「1 剤に偏らず多様な薬剤を選択する」という院内肺炎診療ガイドライン<sup>2)</sup>を支持するものであり、耐性菌対策という観点からも重要な知見である。われわれが実施した院内肺炎の疫学調査成績では、その治療薬としては、ペニシリン系薬、セフェム系薬に比し、カルバペネム系薬の奏効性が高いとの結果であったことから<sup>9)</sup>、特に、中等症以上、または危険因子を有する院内肺炎に対して、カルバペネム系薬は重要な役割を担うと考えられる。しかしな

がら、一系統の抗菌薬に偏る使用は、耐性化のリスクを増大させてしまう懸念があることから、 $\beta$ -ラクタム系薬と異なる作用機序を有する CPFIX が、カルバペネム系薬と同様の位置づけとして、臨床使用に十分耐えうる結果が得られたことは大きな意義をもつ。

Caldwell らは<sup>20)</sup>、主に院内肺炎を対象とした CPFIX と IPM/CS との無作為比較試験において、医療経済効果に関するサブ解析を行い、CPFIX は IPM/CS に比し、投与後の原因菌残存率が有意に低く、その結果、医療コストも IPM/CS 群に比較し低額であったと報告している。本研究においては、入院日数、抗菌化学療法日数について両群で有意な差はみられなかった理由として、対象疾患、基礎疾患の治療など背景因子が異なり、その他、各施設のさまざまな因子が加わり、正確な評価ができなかったことが考えられる。今後、抗菌薬の経済効果に関しては、対象疾患、診療科を限定し評価していくべきであろう。

また、今回、初期治療にて十分な効果が期待できない呼吸器感染症のみを対象としたが、今後、呼吸器感染症ガイドラインの妥当性の検証も踏まえ、第一選択薬としての注射用ニューキノロン系薬の臨床的位置づけについても評価していくべきと考えられる。

#### IV. 結 語

今回、ペニシリン系薬またはセフェム系薬による初期治療にても効果の得られない呼吸器感染症患者に対して、カルバペネム系薬を対照薬として CPFIX の有用性について検討したところ、カルバペネム系薬と同等の臨床効果が得られ、さらに CPFIX の早期改善効果を示唆する結果が得られた。したがって、CPFIX は  $\beta$ -ラクタム無効の呼吸器感染症治療の 1 つの選択肢として重要な役割を担うものであると考えられた。

#### 謝 辞

症例の登録をいただきました以下の先生方に深謝する。

東北大学病院感染症呼吸器内科 芦野有悟先生、昭和大学医学部第一内科 堀地直也先生、東京医科大学第一内科 大屋敷一馬先生・水野耕介先生、東京慈恵会医科大学呼吸器内科 佐藤哲夫先生、日本大学医学部附属板橋病院内科学講座内科一部 赤柴恒人先生・斉藤修先生・大森千春先生・小林朋子先生、千葉大学大学院医学研究院高齢医学・加齢呼吸器病態制御学 栗山喬之先生、千葉大学医学部附属病院感染症治療管理部 猪狩英俊先生、新潟大学大学院医歯学総合研究科内部環境医学講座 西堀武明先生・田邊嘉也先生、新潟県立がんセンター病院呼吸器内科 小原竜軌先生、済生会新潟第二病院呼吸器内科 伊藤和彦先生・石塚修先生、新潟県立加茂病院 藤森勝也先生、新潟県立新発田病院呼吸器内科 望月博史先生、厚生連長岡中央総合病院呼吸器センター内科 岩島明先生、長岡赤十字病院呼吸器内科 佐藤和弘先生、新田塚医療福祉センター福井総合病院内科 高

橋秀房先生、公立小浜病院内科 坪坂誠司先生、福井心臓血管センター福井循環器病院呼吸器内科 若林聖伸先生、福井社会保険病院内科 門脇麻衣子先生、大阪市立大学大学院医学研究科呼吸器病態制御内科学 平田一人先生、和歌山県立医科大学第三内科 南方良章先生、神戸大学大学院医学系研究科循環呼吸器病態学 西村善博先生、国立療養所長崎病院呼吸器科 田中宏典先生、長崎県済生会病院呼吸器科 飯田桂子先生、長崎百合野病院呼吸器科 増山泰治先生、松浦市民病院内科 岩下徹二先生、三菱長崎造船病院内科 川上かおる先生、長崎北病院呼吸器科 福島千鶴先生、荅北医師会病院呼吸器科 小川和彦先生、肝属郡医師会立病院呼吸器科 是枝快房先生

#### 文 献

- 1) 原 耕平, 河野 茂, 門田淳一, 他: 細菌性肺炎に対する Ciprofloxacin 注射薬の臨床評価—Ceftazidime を対照薬とした第 III 相臨床比較試験—. 日化療会誌 45: 901~922, 1997
- 2) 小林宏行, 河合 伸, 押谷 浩, 他: Ciprofloxacin 注射薬の後期第 II 相臨床試験. 日化療会誌 45: 846~871, 1997
- 3) 相川直樹, 佐々木淳一, 岩井重富, 他: 外科・婦人科領域の重症あるいは難治性感染症における ciprofloxacin 注射薬の臨床的検討. 日化療会誌 45: 936~950, 1997
- 4) Dan M, Torossian K, Weissberg D, et al: The penetration of ciprofloxacin into bronchial mucosa, lung parenchyma, and pleural tissue after intravenous administration. *Eur J Clin Pharmacol* 44: 101~102, 1993
- 5) 山口恵三, 飯沼由嗣, 平湯洋一, 他: 重症感染症臨床分離菌のシプロフロキサシンおよび各種注射用抗菌薬に対する感受性全国サーベイランス シプロキサシン注第 1 回特別調査(2001 年). *Jpn J Antibiotics* 56: 546~573, 2003
- 6) 日本呼吸器学会市中肺炎診療ガイドライン作成委員会: 日本呼吸器学会「呼吸器感染症に関するガイドライン」成人市中肺炎診療の基本的考え方. 日本呼吸器学会, 東京, 2000
- 7) 日本呼吸器学会院内肺炎診療ガイドライン作成委員会: 日本呼吸器学会「呼吸器感染症に関するガイドライン」成人院内肺炎診療の基本的考え方. 日本呼吸器学会, 東京, 2002
- 8) 日本呼吸器学会成人気道感染症診療ガイドライン作成委員会: 日本呼吸器学会「呼吸器感染症に関するガイドライン」成人気道感染症診療の基本的考え方. 日本呼吸器学会, 東京, 2003
- 9) Ohi H, Yanagihara K, Kohno S, et al: Hospital acquired pneumonia in general wards of a Japanese tertiary hospital. *Respirology* 9: 120~124, 2004
- 10) Craven D E, Steger K A: Epidemiology of nosocomial pneumonia: new perspectives on an old disease. *Chest* 108: S1~S16, 1995
- 11) Craven D E: Nosocomial pneumonia in the 1990s: Update of epidemiology and risk factors. *Semin Respir Infect* 5: 157~172, 1990
- 12) Craven D E, Steger K A: Nosocomial pneumonia in mechanically ventilated adult patients: epidemiology

- and prevention in. *Semin Respir Infect* 11: 32~53, 1996
- 13) 小松 方, 木下承皓, 佐藤かおり, 他: 近畿地区における *Escherichia coli* および *Klebsiella* spp. 以外の腸内細菌科からの extended-spectrum  $\beta$ -lactamase 産生菌の分離調査. *日化療会誌* 50: 135~142, 2002
- 14) Hirakata Y, Izumikawa K, Yamaguchi T, et al: Rapid detection and evaluation of clinical characteristics of emerging multiple-drug-resistant gram-negative rods carrying the metallo- $\beta$ -lactamase gene *bla*IMP. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 2006~2011, 1998
- 15) Fink M P, Snyderman D R, Niederman M S, et al: Treatment of severe pneumonia in hospital patients: Results of multicenter, randomized, double-blind trial comparing intravenous ciprofloxacin with imipenem-cilastatin. *Antimicrob Agents Chemother* 38: 547~557, 1994
- 16) Torres A, Bauer T T, Leon-Gil C, et al: Treatment of sever nosocomial pneumonia: a prospective randomised comparison of intravenous ciprofloxacin with imipenem/cilastatin. *Thorax* 55: 1033~1039, 2000
- 17) Kaneko Y, Yanagihara K, Kohno S, et al: Effects of parenterally administered ciprofloxacin in a murine model of pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infection mimicking ventilator-associated pneumonia. *Chemotherapy* 47: 421~429, 2001
- 18) Raymond D P, Pletier S J, Crabtree T D, et al: Impact of a rotating empiric antibiotic schedule on infectious mortality in an intensive care unit. *Crit Care Med* 29: 1101~1108, 2001
- 19) Gruson D, Hilbert G, Vargas F, et al: Strategy of antibiotic rotation: Long-term effect on incidence and susceptibilities of gram-negative bacilli responsible for ventilator-associated pneumonia. *Crit Care Med* 31: 1908~1914, 2003
- 20) Caldwell J W, Singh S, Johnson R H: Clinical and economic evaluation of subsequent infection following intravenous ciprofloxacin or imipenem therapy in hospitalized patients with severe pneumonia. *J Antimicrob Chemother* 43 (Suppl A): 129~134, 1999

## Clinical efficacy of ciprofloxacin in patients with respiratory tract infection refractory to penicillin or cephem: carbapenem-controlled clinical study

Shigeru Kohno<sup>1)</sup>, Katsunori Yanagihara<sup>1)</sup>, Kazunori Tomono<sup>2)</sup>, Shingo Ameshima<sup>3)</sup>,  
Yoshiki Demura<sup>3)</sup>, Takeshi Ishizaki<sup>4)</sup>, Kazuhiro Yamaguchi<sup>5)</sup>, Hideo Watanabe<sup>6)</sup>,  
Hiroki Tsukada<sup>6)</sup>, Eiichi Suzuki<sup>7)</sup> and Fumitake Gejo<sup>6)</sup>

<sup>1)</sup>Division of Molecular and Clinical Microbiology, Department of Molecular Microbiology and Immunology, Nagasaki University Graduate School of Medical Sciences, 1-7-1 Sakamoto, Nagasaki, Japan

<sup>2)</sup>Division of Infection Control, Osaka University Graduate School of Medicine

<sup>3)</sup>Third Department of Internal Medicine and <sup>4)</sup>Department of Fundamental Nursing, School of Nursing, University of Fukui

<sup>5)</sup>Department of Internal Medicine, Keio University, School of Medicine

<sup>6)</sup>Division of Clinical Infection Control and Prevention, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

<sup>7)</sup>General Medicine, Niigata University Medical and Dental Hospital

**Background:** Since an injectable new quinolone, ciprofloxacin (CPF<sub>X</sub>) was approved for clinical use in Japan, it has attracted attention as a new treatment option for infection. The clinical position of CPF<sub>X</sub> has yet to be established, however.

**Objectives:** To clarify the clinical position of CPF<sub>X</sub> in the treatment of respiratory tract infection.

**Patients and Methods:** Patients with pneumonia or exacerbated chronic respiratory tract infection refractory to penicillin or cephem antibacterial agents were randomized to be administered CPF<sub>X</sub> by intravenous infusion (300 mg bid) or carbapenem by intravenous infusion (0.3-0.5 g bid), and the efficacy, safety, duration of hospitalization, and duration of antibacterial therapy were compared between groups.

**Results:** Among 83 patients enrolled in the study, 78 complying with the protocol were evaluated for safety (safety analysis set) and 68 for efficacy (efficacy analysis set). The two groups were similar in age, gender ratio, infection diagnosis and severity, and prior antibacterial therapy. Efficacy was comparable between groups, at 82.7% (24/29 patients) in the CPF<sub>X</sub> group and 71.0% (22/31 patients) in the carbapenem group. The number of patients who improved early and could cease treatment with the study drug was greater in the CPF<sub>X</sub> group ( $p < 0.05$ ). No significant difference was noted between groups in duration of hospitalization or duration of therapy. The incidence of adverse drug reactions (adverse events for which a causal relationship to the study drug could not be ruled out) was 13.5% (5/37 patients) in the CPF<sub>X</sub> group and 12.2% (5/41 patients) in the carbapenem group, and none in either group experienced serious adverse reactions.

**Discussion:** In patients with respiratory tract infection refractory to penicillin or cephem antibiotics, CPF<sub>X</sub> showed at least comparable clinical efficacy to that of carbapenem and achieved a higher early improvement rate. These results suggest that CPF<sub>X</sub> is a viable option for the treatment of respiratory tract infection.

## パルボウイルス B19 感染を契機に発症したと考えられた 成人スチル病の一例

原田 隆<sup>1)</sup>、島岡 雄一<sup>1)</sup>、黒田 毅<sup>2)</sup>、伊藤 聡<sup>1)</sup>、中野 正明<sup>2)</sup>、下条 文武<sup>1)</sup>

Key words: Human parvovirus B19, Arthritis, Adult Still's disease

### はじめに

ヒトパルボウイルス B19(以下 PVB19)感染は感染初期の急性期ウイルス血症に伴うインフルエンザ様症状出現の後、ウイルスの直接作用の結果として貧血や血球貪食症候群生ずることがあり、また免疫的生体反応が関与する時期に発疹や関節症状を始めとして多彩な症状を生ずることがある。さらに感染が引き金となって自己免疫的疾患といわれる病像が発現することもあり、関節リウマチ<sup>1,3)</sup>、SLE<sup>6)</sup>や成人スチル病<sup>4,5)</sup>への関与が疑われている。

今回我々は PVB19 感染を契機に発症したと思われる成人スチル病の一例を経験したので報告する。

### 症 例

患者：15歳女性

主訴：発熱、関節痛、皮疹

既往歴：発熱性発疹性疾患(11歳)

家族歴：母が幼稚園勤務。同園で過去に伝染性紅斑の発症例あり。

現病歴：2002年6月2日より咽頭痛が出現し、6月5日より38~39℃の弛張熱、全身の関節痛、掻痒を伴う浮腫性紅斑を四肢に生じた。

6月7日、某病院皮膚科を受診し、WBC 21580/ $\mu$ l、フェリチン 932.7ng/ml と高値を指摘され、補体価上昇、肝機能障害、発熱、関節痛、筋痛、紅斑などを認められ成人スチル病が疑われた。同日、PSL 内服を20mgより開始したが、改善がないため当科外来紹介受診。

6月19日、PSL80mgまで増量し、症状は改善、消失した。6月28日、PSL70mgに減量したところ、37.2℃の発熱を認め、CRPも上昇したため7月3日、メチルプレドニゾン 500mgによるセミパルス療法を施行した。セミパルス療法を1日施行した時点で、PVB19抗体価がIgG、IgM抗体ともに陽性(IgG 11.5index, IgM

1.1index)(EIA,各<0.8)と判明したため、PSLの減量を急速に行ったが(7/4 60mg, 7/6 50mg, 7/8 45mg)、発熱なくCRPは陰性化した。今後の治療方針決定のため、7月8日同院皮膚科から当科に転院した。

入院時現症(発症時)身長160.5cm、体重58kg 栄養；良、血圧；102/60 mmHg、体温；39.0℃ 台の弛張熱 意識；清明 聴診；心肺に心雑音及びラ音を聴取せず 腹部：圧痛なし 肝、脾；触知せず、リンパ節；触知せず、神経学的所見；異常認めず 両上腕、大腿部内側に境界明瞭な紅斑、全身の関節痛、筋痛あり。

### 検査所見

発症時(下表)、末梢血では白血球 21,580/ $\mu$ l と好中球優位の増加。CRP 30.1 mg/dl、フェリチン 932.7 ng/ml と著明な上昇。抗核抗体 320 倍及び補体価 C3 160 mg/dl と上昇、肝機能障害を認めた。

PVB19抗体はIgG 11.5index, IgM 1.1index といずれも陽性であった。発症時の PVB19 DNA-PCR は未検であった。

### 発症時検査所見 (6/7)

<p>【検査】</p> <p>WBC 21,580/mm<sup>3</sup></p> <p>RBC 457×10<sup>4</sup>/mm<sup>3</sup></p> <p>Hb 13.0 g/dl</p> <p>Ht 38.7%</p> <p>Ht 15.2×10<sup>4</sup>/mm<sup>3</sup></p> <p>【尿検査】</p> <p>尿潜血(3+)</p> <p>尿蛋白(2+)</p> <p>【尿沈渣】</p> <p>赤血球 30-40/FP</p> <p>白血球 30-40/FP</p> <p>扁平上皮 30-40/FP</p> <p>細菌(2+)</p> <p>【骨髓穿刺】</p> <p>hypercellular marrow</p> <p>(NCC 21.2 × 10<sup>4</sup>/cmm)</p>	<p>【生化学】</p> <p>T-P 7.2 g/dl</p> <p>(Alb 52.3%, <math>\gamma</math>-G 15.7%)</p> <p>Cre 0.6 mg/dl</p> <p>BUN 9.1 mg/dl</p> <p>UA 3.8 mg/dl</p> <p>GOT 42 IU/l</p> <p>GPT 15 IU/l</p> <p><math>\gamma</math>-GTP 41 IU/l</p> <p>ALP 218 IU/l</p> <p>AMY 30 IU/l</p> <p>CRP 30.1 mg/dl</p> <p>CK 325 IU/l</p> <p>LDH 241 IU/l</p> <p>Ferritin 932.7 ng/ml</p> <p>Fe 9 <math>\mu</math>g/dl</p>	<p>IgG 1,165 mg/dl</p> <p>IgM 107 mg/dl</p> <p>IgA 246 mg/dl</p> <p>IgE 144 IU/ml</p> <p>C3 160 mg/dl</p> <p>C4 63.2 mg/dl</p> <p>CH50 56 U/ml</p> <p>P-ANCA &lt;1.3 EU</p> <p>ANA 320倍</p> <p>RF 1.1 IU/ml</p> <p>抗Sm &lt;5.0</p> <p>抗dsDNA 5.4 IU/ml</p> <p>パルボウイルスB19抗体</p> <p>IgG 11.5 index, 陽性</p> <p>IgM 1.1 index, 陽性</p>
--	--	---

新潟大学大学院医歯学総合研究科腎臓原病内科学分野 1) 同 医学部保健学科 2)

A CASE OF ADULT STILL'S DISEASE ASSOCIATED WITH ACUTE HUMAN PARVOVIRUS B19 INFECTION

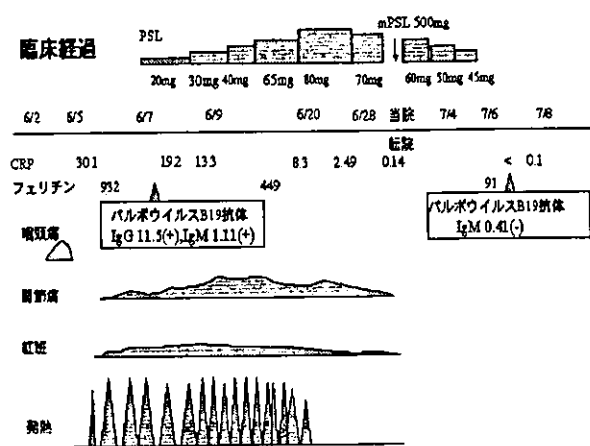
TAKASHI HARADA et al: Div. of Clinical Nephrol. and Rheumatol. Niigata Univ Graduate Sch. of Medical and Dental Sciences

骨髓所見は hypercellular marrow(NCC 21.2 X10<sup>4</sup>/μ l)であった。

### 入院後経過

当院転院時、PSL80mg から45mg まで急速減量後であったが、発熱、関節痛、筋痛、紅斑の再燃はなかった。発症約1ヶ月の経過でPVB19抗体はIgM 0.4indexと陰性化しPVB19の急性感染が発症に関与したことが強く疑われた。PVB19 DNA-PCR は陰性であった。また抗核抗体、肝機能も臨床症状改善とIgM抗体価の低下に伴って正常化した。

その後も順調にPSL減量が行われ、約一年後の現在も再燃なく、外来でPSL10mg内服継続中である。



### 考 察

本例は成人スチル病の分類基準<sup>7)</sup>の内、発熱(≥39度、1週間以上持続)、関節痛(2週間以上持続)典型的皮疹、80%以上の好中球増加を含む白血球増加(≥1万/mm<sup>3</sup>)の大項目全てと肝機能異常の小項目を満たし成人スチル病の確定例と考えられた。PSL80mgの high dose の適応となったが、PVB19のIgG、IgM抗体陽性が認められ、同ウイルスによる急性感染が疑われたため、施行中であったステロイドパルス療法を中止し早急にステロイドの減量が行われた症例である。

PVB19感染は初期の感冒様症状の後、多彩な臨床症状(伝染性紅斑急性多発性関節炎、貧血、血小板減少性紫斑病、無顆粒球症、血球貪食症候群、血管性紫斑病、脳炎、脳症、髄膜炎、横断性脊髄炎、末梢神経炎、急性心筋炎、不整脈、腎障害など)を来すことがあり、この中で関節症状が慢性化する例のあることが報告されている。

Ueno<sup>1)</sup>らは、原因不明の急性多発性関節炎でPVB19 IgG及びIgM抗体陽性、PVB19 DNA陽性の2例を

初めて報告し、我が国の厚生省研究班の報告<sup>2)</sup>では原因不明の急性多発性関節炎67例中9例でPVB19 IgM抗体陽性、その内5例でPVB19 DNA陽性、3例で関節症状が遷延しRAの診断基準を満たした。

Foto<sup>3)</sup>らは関節リウマチ例の骨髓中のPVB19 DNAが9例中5例で陽性であったと報告した。

PVB19と成人スチル病との関連についてはPouchotら<sup>4)</sup>は、成人スチル病例でPVB19 IgG及びIgM抗体陽性の1例を初めて報告し、またGodeauら<sup>5)</sup>は成人スチル病14例中9例でIgG抗体陽性であり、IgM抗体およびPVB19 DNAは陰性であったものの、PVB19と成人スチル病との関連を示唆している。本例では発症約1ヶ月後にはPVB19 IgM抗体陰性化が認められており、成人スチル病の発症に同ウイルスの急性感染が関与したことが強く疑われた症例であった。しかし感染とこれらの関節リウマチ類似疾患の発症の機序についてはいまだ明らかでなく、今後の症例の蓄積や実験モデルの確立が期待されると考えられた。

### 結 語

PVB19 IgM抗体の陰性化を認めた事により、同ウイルス感染を契機に成人スチル病を発症したと考えられた症例を報告した。

### 参 考 文 献

- 1) Ueno Y, et al: Human parvovirus B19 and arthritis, Lancet, vol.341:1280,1993
- 2) 佐々木毅:平成5年度厚生省リウマチ調査研究事業研究報告書:p99-101:1993
- 3) Foto F et al: parvovirus B19-specific DNA in bone marrow from B19 arthropathy patients: evidence for B19 persistence. J infect Dis.167:744-748,1993
- 4) Pouchot J, et al: Adult Still's disease associated with acute human parvovirus B19 infection, Lancet, vol.341:1280-1281,1993
- 5) Godeau B, et al: Is adult Still's disease associated with human parvovirus B19 infection? Lancet, vol.345:59-60,1994
- 6) Saeki T, et al: Human parvovirus B19 infection mimicking systemic lupus erythematosus, Mod Rheumatology 11:308-313:2001
- 7) Yamaguchi M, et al: Preliminary criteria for classification of Adult Still's disease. J Rheumatol 19:424-430,1992

## 経口抗菌薬による市中肺炎の外来治療

新潟大学医学総合研究科臨床感染制御学分野

茂呂 寛、西堀 武明  
塚田 弘樹、下条文 武  
信楽園病院 青木 信樹

### 1. はじめに

肺炎は外来診療において遭遇する機会が多い一方で、現在でも多くの患者の生命を奪う疾患の一つである。特に高齢者では、呼吸器系や循環器系の基礎疾患を有する場合が多く、また各種臓器の生理機能的予備力も低下していることから、より慎重な対応が必要となる。現在我が国には、日本呼吸器学会によるガイドライン<sup>1)</sup>と、日本感染症学会・日本化学療法学会によるガイドラインの二つの市中肺炎ガイドライン<sup>2)</sup>が存在するが、本稿ではそれぞれの内容をふまえ、経口抗菌薬による市中肺炎の外来治療を中心に述べてみたい。

### 2. 市中肺炎の原因微生物

市中肺炎とは、基本的には通常社会生活を送っている健康者を対象に、急性に発症する肺炎であり、原因微生物としては宮下<sup>3)</sup>の報告によると、肺炎球菌が20.5%と第一位であり、以下インフルエンザ菌(11.0%)、マイコプラズマ(9.5%)、肺炎クラミジア(7.5%)の順であった。肺炎の治療にあたっては、これらの高頻度に認められる病原体を原因菌として念頭に置くべきであり、それぞれの特徴を以下に記した。

#### ①肺炎球菌

グラム陽性の双球菌で、市中肺炎の原因菌として最も頻度が高く、重症例や敗血症を伴ったもので治療が遅れた場合は予後不良の場合も少なくない。最近、わが国を含め世界的な規模でペニシリン耐性肺炎球菌(PRSP)が拡大傾向にあり、問題となっている<sup>4)</sup>。また、

本菌はセフェム系薬やマクロライド系薬、テトラサイクリン系薬などにも高度耐性化傾向があるため、その治療薬選択には慎重であるべきである。

最近、およそ15分で結果が判明する肺炎球菌尿中抗原検出キットが応用されるようになり、早急に保険適応となることが望まれる<sup>5)</sup>。

#### ②インフルエンザ菌

グラム陰性桿菌で、一般細菌としては市中肺炎の原因菌として肺炎球菌について頻度が高く、特に慢性気管支炎や気管支拡張症などの基礎疾患を有する患者や、インフルエンザウイルス感染後などの二次感染としての肺炎が多い。 $\beta$ -ラクタマーゼ産生によるペニシリン系薬耐性株に加え、近年 $\beta$ -ラクタマーゼ非産生アンピシリン耐性(BLNAR)株が増加傾向にある<sup>6)</sup>。

#### ③マイコプラズマ

代表的な非定型肺炎原因微生物であり、小児や30~40歳代の若年成人に多く発症する。かつては4年毎の流行周期が明らかであったが、最近ではそのピークが不明瞭となり、毎年、小流行や散発的な発症がみられる。比較的軽症例が多いが、稀に重症例もみられる。

#### ④クラミジア

非定型肺炎の原因微生物で、主に肺炎クラミジアとオウム病クラミジアの2種類がある。前者は軽症例がほとんどで自然治癒傾向もあり、ヒト-ヒト感染で家族内や学級などでの小流行を生じることが知られている<sup>7)</sup>。後者は鳥類の常在菌がヒトに感染するもの

で、重症化することもあるため、ペット飼育歴を含めた問診が重要となる。

後二者による非定型肺炎の場合、我が国で汎用されているβ-ラクタム系抗菌薬が無効であるため、細菌性肺炎との鑑別は大きな意味を持つ

(表1)。日本呼吸器学会のガイドラインは、細菌性肺炎と非定型肺炎との鑑別基準を掲載している点で特徴があり(表2)、この基準を満たしている場合は、後述するマクロライド系薬、テトラサイクリン系薬の使用が推奨されている。意欲的な試みであるが項目の設定法につい

表1 各種抗菌薬の作用機序と病原菌への効果

	細菌	非定型病原菌	
		マイコプラズマ	クラミジア
細胞壁の有無	+	-	-
細胞内寄生	-	-	+
β-ラクタム系薬 (細胞壁合成阻害)	+	-	-
マクロライド系薬 (蛋白合成阻害)	+/-	+	+
テトラサイクリン系薬 (蛋白合成阻害)	+/-	+	+
ニューキノロン系薬 (DNAジャイレース阻害)	+	+	+
ケトライド系薬 (蛋白合成阻害)	+	+	+

表2 細菌性肺炎と非定型肺炎の鑑別

症状・所見	1. 60歳未満 2. 基礎疾患が無いか軽症 3. 肺炎が家庭内、集団内で流行している 4. 頑固な咳がある 5. 比較的徐脈がある 6. 胸部理学所見に乏しい
検査成績	7. 血液検査：末梢血白血球数が正常 8. 胸部X線写真：スリガラス状陰影または skip lesion である 9. グラム染色：原因菌らしいものが無い

全体で9項目中5項目

症状・所見から6項目中3項目を満たしていれば、マイコプラズマ肺炎、クラミジア肺炎が疑われる。

日本呼吸器学会：成人市中肺炎の基本的考え方 より抜粋



ては議論もあり、今後は更なる精度の向上が期待される。

### 3. 抗菌薬の選択

市中肺炎のほとんどの症例では、第一選択薬を決定する時点で原因微生物が確定されていることはなく、耐性の有無や程度を知るにはさらに数日を要することが一般的である。したがって、問診や診察所見、あるいは迅速に得られる限られた検査成績、患者状態、肺炎の程度などから原因微生物を推定して、治療方針を立てねばならない。

抗菌薬の投与経路は感染症の重症度および宿主状態によって決定されるが、日本呼吸器学会のガイドラインに準拠すると、抗菌薬の経口投与は、患者が服薬や十分量の食事が摂取可能な状態で、脱水状態が無いことが前提である。

肺への抗菌薬の移行性は、肝や腎・膵臓などの他の実質臓器に比してやや低いため、肺炎球菌などの一部の耐性菌感染症では安全性に配慮

しつつ、やや高めの投与量を設定することも必要となる。

抗菌薬の選択にあたっては、その特性を充分認識することが必要であり、以下に各種抗菌薬の特徴および用法・用量を述べる。なお、本文中で抗菌薬名は商品名で統一し、一般名と略号は表3にまとめた。

#### ①β-ラクタム系薬

##### 1) ペニシリン系薬

ピクシリン、サワシリンに代表されるペニシリン系薬は汎用されている他のβ-ラクタム系薬に比べて抗菌域が狭いこともあり、近年は使用機会が減少傾向にあるが、溶連菌、肺炎球菌、腸球菌、緑色レンサ球菌等に対しては強い抗菌力を示し、大量投与も可能であることから、起炎菌が不明な時点での経験的治療よりはむしろ、起炎菌を正確に把握できる環境が必要とされる。市中肺炎の原因菌として、前述の通り PRSP、BLNARなど

表3 本文中で取り上げた経口抗菌薬

	商品名	医薬品名	略号	発売年
ペニシリン系薬	ピクシリン	アンピシリン	ABPC	1963
	サワシリン	アモキシシリン	AMPC	1975
	オーグメンチン	クラブラン酸カリウム/アモキシシリン	CVA/AMPC	1985
	ユナシン	トシル酸スルタミシリン	SBTPC	1987
セフェム系薬(第1世代) (第2世代) (第3世代)	ケフラール	セファクロル	CCL	1982
	パンスポリンT	セフォチアムヘキセチル	CTM-HE	1990
	バナン	セフボドキシムプロキセチル	CPDX-PR	1989
	セフゾン	セフジニル	CFDN	1991
	メイアクト	セフジドレンピボキシル	CDTR-PI	1994
	フロモックス	塩酸セフカベンピボキシル	CFPN-PI	1997
ベネム系薬	ファロム	ファロベネムナトリウム	FRPM	1997
マクロライド系薬	クラリス	クラリスロマイシン	CAM	1991
	ジスロマック	アジスロマイシン	AZM	2000
テトラサイクリン系薬	ミノマイシン	塩酸ミノサイクリン	MINO	1971
ニューキノロン系薬	オゼックス	トシル酸トスフロキサシン	TFLX	1990
	スバラ	スバルフロキサシン	SPFX	1993
	クラビット	レボフロキサシン	LVFX	1993
	ガチフロ	ガチフロキサシン	GFLX	2002
ケトライド系薬	ケテック	テリスロマイシン	TEL	2003

が急増しているため、注意を要する。一方、オーグメンチン、ユナシンなどβ-ラクタマーゼ阻害剤と配合したペニシリン系薬は、インフルエンザ菌、黄色ブドウ球菌、モラクセラ・カタラーリスにも、効果が期待される。

## 2) セフェム系薬

第1世代セフェム系薬はケフラルなどに代表され、ブドウ球菌、レンサ球菌に有効であるため、呼吸器感染症よりは皮膚軟部感染症が良い適応となる。パンスポリンTなどの第2世代セフェム系薬は、インフルエンザ菌、モラクセラ菌への有効性が加わっており、慢性気管支炎の増悪期に使用可能である。

第3世代セフェム系薬はバナン、セフゾン、メイアクト、フロモックスなどが主なもので、グラム陰性菌に対する抗菌活性が一段と強化され、臨床的な有用性が高くなったと考えられる。一方、常用量が比較的低用量に設定されていることから、喀痰中の濃度が不十分との指摘もあり<sup>9)</sup>、原因菌に対するMIC値が優れていても、市中肺炎の治療において十分な効果が期待できない場合も予想される。

## 3) ベネム系薬

ベネム系薬として現在使用可能な薬剤はファロムのみであり、グラム陽性菌、グラム陰性菌、嫌気性菌など幅広い抗菌スペクトルを持つ。インフルエンザ菌に対する抗菌活性が若干弱い<sup>9)</sup>が、PRSPに対する抗菌力は、経口β-ラクタム系薬の中では比較的優れている。第3世代セフェム系薬と同様に常用量が低用量であるため、注意を要する。

## ②マクロライド系薬

マクロライド系薬はクラリス、ジスロマックに代表され、グラム陽性菌では黄色ブドウ球菌、化膿レンサ球菌、グラム陰性菌では淋菌、レジオネラ、百日咳菌、モラクセラ菌などに比較的優れた抗菌活性を有している。ただし、近年本邦においては、マクロライド耐性肺炎球菌が急増しており、およそ80%を占め

ているため、呼吸器感染症において経験的に使用する際は、原則としてこれ以上のマクロライド耐性肺炎球菌のこれ以上の増加を避ける意味でも非定型病原微生物の可能性が高い場合に限定された使用が望ましい。

## ③テトラサイクリン系薬

テトラサイクリン系薬はミノマイシンに代表されるが、近年肺炎球菌においてはテトラサイクリン系薬に対して耐性率が進んでいる。インフルエンザ菌に対する活性は比較的良好である。主にβ-ラクタム系薬が無効であるマイコプラズマ、クラミジア、リケッチアなどによる感染症に使用される。

## ④ニューキノロン系薬

ニューキノロン系薬は、グラム陽性菌に対しても抗菌スペクトルが拡大され、従来比較的弱いとされていた肺炎球菌に対する抗菌力も、オゼックス、スバラ、高用量のクラビット、ガチフロではより強力なものとなった。ニューキノロン系薬は組織移行性が極めて良好で、喀痰への移行も優れており、またクラミジア、マイコプラズマ、レジオネラなどにも有効であることから呼吸器感染症に対し、優れた適正を有している<sup>9)</sup>。

## ⑤ケトライド系薬

新たに使用可能となったケトライド系抗菌薬、ケテックは組織移行に優れ、呼吸器感染症の主要病原微生物に対し、幅広いスペクトルを有していることから、呼吸器感染症に高い適性を持っている。特に、近年増加傾向にある耐性肺炎球菌に対する効果が期待されている<sup>10)</sup>。

ただし、前述のニューキノロン系薬と同様、ケテックを無条件に第一選択薬として使用することは、乱用につながる恐れがあり、将来的に耐性菌の出現も危惧される。

優れた薬剤であるが故に、使用する側にとっても、適応菌種、適応疾患、薬物動態に対する十分な理解と、用法・用量の遵守が求められる。

## 3. 抗菌薬の使用期間

市中肺炎の治療では、優れた抗菌薬が数多く臨床応用可能な現在においては、それらが適正

に選択、使用された場合、その治療期間はより短くて十分であると考えられるようになっている。以下に、治療効果判定の基準を述べる。

#### ①臨床症状の軽快

解熱は治療終了を考慮する上で必須条件の一つである。若年成人に発症した肺炎球菌性肺炎では、治療後の平均有熱期間は2.5日とされ、菌血症を伴う場合や高齢者ではさらに長くかかる。また、呼吸困難の軽減と膿性痰の減少も、よい指標となる。一方、咳嗽については、細菌性肺炎でも乾性咳嗽が治療後しばらく残存することがあり (post infectious cough)、必ずしも病勢と一致するわけではなく、咳嗽の消失までの抗菌薬を継続した場合、過剰投与となる可能性がある。

#### ②検査成績の改善

白血球数は通常、細菌性肺炎において増加し、鋭敏な指標となる。CRP 値も同様に病勢とよく相関するが、白血球数に比べてやや遅れて推移し、赤沈の改善はさらに遅れる傾向がある。また、動脈血液ガスの測定によるPaO<sub>2</sub>値、あるいはパルスオキシメーターによるSpO<sub>2</sub>値の測定は、呼吸状態を評価する上で有用である。

#### ③画像所見の改善

胸部X線写真における陰影の改善は、治療効果を判定する上で参考となるが、胸部異常陰影の改善は、通常臨床所見や検査成績にくらべて遅れることが多い。胸部異常陰影の完全な消退は、2週間後の時点で全体の51%、4週間後で67%とする報告もみられる<sup>14)</sup>。高齢者や、COPD、アルコール多飲などの基礎疾患を有する場合は、改善がさらに遷延する。以上より、陰影の完全な消退まで、抗菌薬を使用した場合、過剰投与となる可能性がある。

#### 〈おわりに〉

本稿では限られた紙面の中、各種病原体の特徴と、それに対する抗菌薬の特徴を中心に述べたが、日頃の診療や問診を通じて、宿主である患者の状態をより正しく把握することが肝要である。

今後、各ガイドラインが確かなエビデンスに基づいて設計され、さらには現場からの意見を

反映して、より洗練されていくことが期待される。

#### 【文 献】

- 1) 日本呼吸器学会市中肺炎診療ガイドライン作成委員会：成人市中肺炎の基本的考え方。第1版，2000年
- 2) 日本感染症学会，日本化学療法学会：抗菌薬使用の手引き。第1版，協和企画，2001年
- 3) Miyashita N, Fukano H, Niki Y, et al : Etiology of Community-Acquired Pneumonia Requiring Hospitalization in Japan. Chest, 119 : 1295-1296, 2000
- 4) Flemingham D, Reinert RR, Hirakata Y et al : Increasing prevalence of antimicrobial resistance among isolates of Streptococcus pneumoniae from the PROTEKT surveillance study, and comparative in vitro activity of the ketolide, telithromycin. J Antimicrob Chemother 50 : 25-37, 2003
- 5) 小林隆夫，松本哲哉，館田一博，山口恵三ら：肺炎球菌尿中抗原迅速検出キットの市中肺炎における有用性の検討。感染症誌76 : 995-1002, 2002
- 6) Doern GV, Brueggemann AB, Pierce G, Holley HP Jr, Rauch A. : Antibiotic resistance among clinical isolates of Haemophilus influenzae in the United States in 1994 and 1995 and detection of beta-lactamase-positive strains resistant to amoxicillin-clavulanate : results of a national multicenter surveillance study. Antimicrob Agents Chemother. 41 : 292-7, 1997
- 7) 松島敏春：Chlamydia pneumoniae 呼吸器感染症の臨床像。化学療法の領域12 : 2279-2285, 1996
- 8) 沖津尚弘，井上松久：基礎の立場から～ Pharmacokinetics と Pharmacodynamics に基づいた経口β-ラクタム薬の評価～。化学療法の領域18 : 1287-1297, 2002
- 9) 斎藤厚：レスピラトリーキノロンの適切な使い方。医学のあゆみ209 : 659-664, 2004
- 10) 青木信樹，茂呂寛：テリスロマイシンの呼吸器感染症治療薬における位置づけ。医学のあゆみ209 : 653-658, 2004

11) Mittl RL Jr, Schwab RJ, Duchin JS, et al :  
Radiographic resolution of community-

acquired pneumonia. Am J Respir Crit Care  
Med. 149 : 630-5, 1994.

#### 傷病手当金の申請について

新潟市医師会互助会、新潟県医師会互助  
事業部、新潟県医師会国保に加入しておられ  
る先生が、病気等で入院又は自宅療養され  
た場合、それぞれから給付を受けることが  
できます。そういう場合は速やかに本会事務  
局 (231-4131) 迄ご連絡下さい。申請  
用紙を本会よりお送りいたします。

なお、一定期間を経過しますと給付がう  
けられなくなる場合がありますので、申請  
はお早めをお願いいたします。

#### 胃内視鏡画像読影委員会について

読影を依頼される方は、下記の日程で開  
催いたしますので関係資料をご持参くださ  
い (読影は、毎週木曜日に行われます)。

記

日 時：平成16年12月2日(木) 19:00  
12月9日(木) 19:00  
12月16日(木) 19:00  
12月22日(水) 19:00

会 場：新潟市医師会 4階

中止日：12月30日

#### 第609回 新 潟 医 学 会

新潟医学会を下記の要領によって開催いた  
しますので、何卒多数ご来聴下さいますよう  
ご案内申し上げます。

新潟医学会集会幹事

期 日：平成16年12月11日(土)午後2時から  
会 場：新潟大学医学部 有壬記念館

記

I. 特別講演 (新潟大学医学研究助成)  
(午後2時~2時30分)

座長 相澤 義房 教授 (第一内科)

「心疾患モデル動物を用いた  
不全心筋治療へのアプローチ」  
渡辺 賢一 教授  
(新潟薬科大学 薬学部 臨床薬理学)

II. 特別講演 (午後2時30分~3時10分)

座長 桑野 良三 助教授

(脳研・遺伝子実験部門)

「変異マウスからヒト疾患の病態と遺伝子を  
探る神経変性疾患の治療をめざして」

橘 正芳 教授

(脳研・遺伝子実験部門)

III. シンポジウム(午後3時10分~5時10分)

座長 相澤 義房 教授 (第一内科)

「生活習慣病：臓器病害と治療のEBM」

1. 本県的生活習慣病の検診と対策  
松井 光一 先生 (新潟県成人病予防協会)
2. 肥満  
野本 実 先生 (第三内科)
3. 糖尿病  
鈴木 克典 先生 (済生会第二病院)
4. 高脂血症  
三井田 孝 先生 (検査診断学)
5. 高血圧  
伊藤 正毅 先生 (秋田大学医学部老年科)

# Delayed HIV-1 Infection of CD4<sup>+</sup> T Lymphocytes from Therapy-Naïve Patients Demonstrated by Quantification of HIV-1 DNA Copy Numbers

Kaoru Wada, Hiromi Nagai, Tomoko Hagiwara, Shiro Ibe, Makoto Utsumi, and Tsuguhiro Kaneda\*

*Clinical Research Center, National Hospital Organization Nagoya Medical Center (Tokai Area Central Hospital for AIDS Treatment and Research), Nagoya, Aichi 460-0001, Japan*

Received February 25, 2004; in revised form, June 29, 2004. Accepted July 5, 2004

**Abstract:** Measuring the amount of HIV-1 DNA in infected cells is important to estimate the size of the viral reservoir in patients. However, the clinical impact of the intracellular viral DNA level remains unclear. The present study examines the clinical significance of the HIV-1 DNA level in peripheral CD4<sup>+</sup> T lymphocytes from 21 therapy-naïve patients. HIV-1 DNA levels in purified peripheral CD4<sup>+</sup> T lymphocytes were measured by the real-time PCR method using the Roche LightCycler system that can detect 200 copies/10<sup>6</sup> cells. We detected intracellular HIV-1 DNA in 15 (71.4%) of 21 patients at levels ranging from 270 to 98,120 copies/10<sup>6</sup> CD4<sup>+</sup> cells, with a median of 2,220 copies/10<sup>6</sup> cells. We also found HIV-1 DNA that was below the detection limit in the remaining 6 patients, although 8,800–150,000 copies/ml of HIV-1 RNA was detected in plasma. Circular HIV-1 DNA was not detected in 5 of 6 cases, suggesting that reverse transcription in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes of these cases was not active. Thus, delayed HIV-1 infection of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes was demonstrated in these patients. The level of HIV-1 DNA in peripheral CD4<sup>+</sup> T lymphocytes indicates the clinical status of therapy-naïve patients.

**Key words:** Delayed HIV-1 infection, Therapy-naïve, Real-time PCR, HIV-1 DNA

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) efficiently and continuously replicates itself after inserting its genome into the DNA of host cells. Such active viral replication correlates directly with disease progression and patient survival (11). Therefore, the HIV-1 RNA level in plasma directly reflects viral replication and has become a powerful prognostic tool (14).

Highly active antiretroviral therapy (HAART) that basically includes combinations of nucleoside or non-nucleoside inhibitors of reverse transcriptase (RT) and a protease inhibitor(s) can significantly reduce plasma HIV-1 RNA to below detectable levels. However, even after years of HAART treatment, cells harboring replication-competent HIV-1 can still persist in the blood and lymphoid tissues (3–5, 8, 9, 18, 19). This persistent reservoir of infected cells is the major impediment to HIV-1 eradication. Therefore, it is important to esti-

mate the viral reservoir and to study its dynamics by measuring intracellular HIV-1 DNA levels. However, the clinical significance of intracellular HIV-1 DNA levels remains unclear.

Real-time PCR can treat many samples in a short period, making it useful for studying intracellular HIV-1 persistence (6, 7). In this report, we first validated the real-time PCR method and then successively measured intracellular HIV-1 DNA levels in 21 therapy-naïve patients. We specifically aimed to determine the status of HIV-1 infection in patients carrying a detectable plasma viral load, but whose CD4<sup>+</sup> T lymphocytes were minimally infected.

## Materials and Methods

**Patients.** Twenty-one therapy-naïve HIV-1-infected patients who underwent initial consultation at Nagoya Medical Center, Japan, were enrolled in this study. The

\*Address correspondence to Dr. Tsuguhiro Kaneda, Clinical Research Center, National Hospital Organization Nagoya Medical Center (Tokai Area Central Hospital for AIDS Treatment and Research), Sannomaru 4-1-1, Naka-ku, Nagoya, Aichi 460-0001, Japan. Fax: +81-52-955-1878, E-mail: kanedat@nhh.hosp.go.jp

**Abbreviations:**  $\beta$ 2M,  $\beta_2$ -microglobulin; HAART, highly active antiretroviral therapy; HIV-1, human immunodeficiency virus type 1; RT, reverse transcriptase.

quantification of HIV-1 was performed after informed consent was obtained.

*Measurements of plasma viral load and CD4 cell counts.* Viral load was measured using an Amplicor HIV-1 monitor v1.5 system (Roche Diagnostics, Tokyo). CD4 cell counts were performed by flow cytometry with FACSCalibur (Becton Dickinson, Tokyo) using anti-CD4 antibody (DakoCytomation, Kyoto, Japan).

*Purification of CD4-positive lymphocytes and DNA extraction.* CD4<sup>+</sup> lymphocytes were isolated by Stem-Sep column chromatography (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada). Collected cells were washed and resuspended in phosphate-buffered saline. DNA was extracted using QIAamp DNA Blood Kits (QIAGEN, Tokyo).

*Preparation of HIV-1 DNA and  $\beta$ 2M DNA assay standards.* A standard HIV-1 plasmid (pUC-IIIIB) was constructed by cloning one copy of HIV-1 IIIIB without LTR into pUC118 (TaKaRa, Shiga, Japan). A human  $\beta_2$ -microglobulin ( $\beta$ 2M) standard plasmid (pGEM- $\beta$ 2M) was constructed by cloning one copy of  $\beta$ 2M exon 2 to pGEM-T (Invitrogen, Tokyo).

*Quantification of HIV-1 DNA by real-time PCR.* We designed PCR primers and a TaqMan probe for HIV-1 DNA based on the HIV-1 subtype B consensus sequence (database of Los Alamos National Laboratory). The amplification primers were located in the gag region: forward primer (Gag 1), 5'-CAAGCAGCCATGCAAATGTT-3' and reverse primer (Gag 2), 5'-GCATGCACTGGATGCAATCT-3'. The TaqMan probe has the sequence 5'-FAM-TCCATTCTGCAGCTTCCTCATTGATG-TAMRA-3'. Copy numbers of the  $\beta$ 2M gene were determined using the primers, 5'-CAGCAAGGACTGGTCTTTCTATCTCT-3' and 5'-ACCCCACTTA ACTATCTTGG-3', with the TaqMan probe, 5'-FAM-CACTGAAAAGATGAGTATGCCTGCCGTGT-TAMRA-3'.

Real-time PCR proceeded using an LC Fast Start DNA master mix hybridization probe kit (Roche Diagnostics). The PCR mixtures contained 60 ng of DNA extracts, 2  $\mu$ l of DNA master mix, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, primers (500 nM each) and the TaqMan probe (400 nM) in a total volume of 20  $\mu$ l. Cycling parameters consisted of denaturation for 10 min at 95 C followed by 45 cycles of 10 sec at 95 C and 30 sec at 60 C. The automated LightCycler system performed the amplification, as well as data acquisition and analysis.

*Determination of HIV-1 subtypes and tropisms.* We determined the nucleotide sequence of the V3 region of the env gene to classify the HIV-1 subtype and tropism as described (10, 17).

*Sequencing HIV-1 gag region.* Nucleotides contain-

ing the region amplified by real-time PCR were amplified by nested PCR using the external primers gag03 (5'-AAAACATATAGTATGGGCAA-3') and gag05 (5'-GGGCTATACATTCTTACTAT-3') and the internal primers gag06 (5'-GATAGAGGTAAAAGACACCAA-3') and gag04 (5'-TAGGTGGATTGTTTGTATC-3').

The DNA in both reactions was denatured for 5 min at 95 C followed by 30 cycles of 30 sec at 95 C, 30 sec at 50 C and 1 min at 72 C and a final extension for 7 min at 72 C. The DNA was amplified in a total volume of 50  $\mu$ l containing 1 $\times$  LA Taq buffer (TaKaRa), 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM each dNTP, 400 nM each primer, and 1 U LA Taq DNA polymerase (TaKaRa). Genomic DNA (60 ng) was amplified by the first PCR, and 5  $\mu$ l of this mixture was applied to the nested reaction.

Both sense and antisense strands of PCR products were sequenced directly using BigDye Terminator Sequencing Kits and an ABI PRISM 310 automatic sequencer (Applied Biosystems, Tokyo).

The sequences of the PCR products were deposited in the DNA Data Bank of Japan (accession numbers AB154280 through AB154297).

*Detection of unintegrated circular HIV-1 DNA.* Unintegrated circular HIV-1 DNA was amplified by nested PCR using C1R1 (5'-GACCTCAGGTACCTTTAAGA-3') and C1R2 (5'-GCTTAATACTGACGCTCTCGC-3') primers in the first reaction, and C3R1 (5'-GGGAGC-TTAGATCTTAGCC-3') and C3R2 (5'-CCTTCTAG-CCTCCGCTAGTC-3') primers in the nested reaction.

The conditions and PCR mixture components were identical to those used for HIV-1 gag sequencing, except Taq DNA polymerase (Roche Diagnostics) was substituted for LA Taq polymerase.

## Results

### *Accuracy, Reproducibility and Sensitivity of HIV-1 DNA Quantification Using LightCycler*

Table 1 shows the validation data obtained using latently HIV-1-infected ACH2 cells containing one provirus per cell. The interassay CV% was 7.1, 11.7, 50.7 and 71.9 at 10<sup>4</sup>, 10<sup>3</sup>, 5 and 2 copies, respectively. The accuracy (%) values of the corresponding experiments were 100.4 $\pm$ 7.1, 101.2 $\pm$ 11.9, 101.2 $\pm$ 51.3 and 69.7 $\pm$ 50.1, respectively. The intra-assay reproducibility of HIV-1 copy numbers was determined as shown in Table 1. When pUC-IIIIB standard plasmids were the HIV-1 DNA source instead of ACH2, the accuracy and reproducibility of HIV-1 DNA measurements were identical (data not shown). These results show that quantification of HIV-1 DNA with LightCycler can be performed with high sensitivity and reproducibility. Data were normalized as copies/10<sup>6</sup> cells by measuring copy

Table 1. Accuracy and reproducibility of real-time PCR assay using LightCycler system

HIV-1 DNA (copies/10 <sup>4</sup> cells)	Intra-assay (n=5)			Interassay (n=15)		
	Mean±SD	CV%	Accuracy (%)	Mean±SD	CV%	Accuracy (%)
10,000	9,548±321	5.2	95.5±3.2	10,048±712	7.1	100.4±7.1
1,000	944±48	5.1	94.4±4.8	930±67	7.2	93.0±6.7
100	94±5	4.7	94.0±4.5	101±12	11.7	101.2±11.9
50	49±7	13.0	98.4±4.5	53±7	13.1	106.9±14.0
10	11±1.2	14.0	106.9±12.0	12±3.1	25.9	118.7±30.8
5	4.6±1.8	38.3	91.8±35.2	5.1±2.6	50.7	101.2±51.3
2	1.2±0.5	45.3	58.6±26.6	1.4±1.0	71.9	69.7±50.1

Table 2. HIV-1 DNA level of 21 therapy-naïve HIV-1-infected patients

Patient No.	CD4 cell count (cells/μl)	Plasma HIV-1 RNA (copies/ml)	HIV-1 DNA <sup>a</sup> (copies/10 <sup>6</sup> cells)	Detection of circular HIV-1 DNA	Subtype
1	602	1,200	1,070	-	B
2	298	1,600	270	+ <sup>c</sup>	B
3	388	8,800	<DL <sup>b</sup>	-	B
4	350	13,000	<DL <sup>b</sup>	-	C
5	292	18,000	<DL <sup>b</sup>	-	B
6	295	20,000	2,440	+ <sup>d</sup>	E
7	542	33,000	3,600	-	B
8	329	35,000	<DL <sup>b</sup>	-	B
9	715	44,000	450	+ <sup>d</sup>	B
10	281	50,000	10,800	+ <sup>d</sup>	B
11	441	54,000	1,440	-	B
12	283	70,000	2,220	+ <sup>d</sup>	B
13	330	92,000	300	-	B
14	619	93,000	<DL <sup>b</sup>	-	B
15	116	110,000	15,290	+ <sup>d</sup>	B
16	98	120,000	98,120	+ <sup>c</sup>	B
17	229	150,000	<DL <sup>b</sup>	+ <sup>c</sup>	B
18	527	210,000	1,930	+ <sup>d</sup>	B
19	49	210,000	2,870	+ <sup>d</sup>	B
20	307	250,000	1,620	+ <sup>d</sup>	B
21	21	430,000	33,240	+ <sup>d</sup>	B
Median (range)	307 (21-715)	54,000 (1,200-430,000)	2,220 (<DL-98,120)		

<sup>a</sup> Average values of HIV-1 DNA assayed in duplicate.

<sup>b</sup> Below limits of detection.

<sup>c</sup> 1 and 2LTR circular DNA.

<sup>d</sup> 1LTR circular DNA.

numbers of the β2M gene since two β2M copy numbers correspond to one cell. Since 10<sup>4</sup> cells were usually used in one assay, we defined the lower limit of detection as 200 copies/10<sup>6</sup> cells.

#### Total HIV-1 DNA Copy Numbers in CD4<sup>+</sup> T Lymphocytes from Therapy-Naïve Patients

We determined the intracellular HIV-1 DNA in 21 therapy-naïve HIV-1-infected patients. Fifteen (71.4%) of the 21 patients had HIV-1 DNA levels ranging from 270 to 98,120 copies/10<sup>6</sup> CD4<sup>+</sup> cells, with a median of 2,220 copies/10<sup>6</sup> cells (Table 2). Amounts of HIV-1 DNA were below the limits of detection in the remain-

ing 6 patients (patients 3, 4, 5, 8, 14 and 17).

The HIV-1 subtypes were B (n=19), C (n=1, patient 4) and E (n=1, patient 6).

#### Matching of Primers and TaqMan Probe

To eliminate the possibility that the low HIV-1 copy number was underestimated because of mismatching, we analyzed the nucleotide sequences of HIV-1 DNA from 6 patients containing the same regions as the primers and the TaqMan probe region (Fig. 1). The Gag 1 region corresponding to the forward primer did not contain any mutations in patients 3, 5 and 8 with undetectable levels of HIV-1 DNA. However, we iden-

tified one mutation (C→T) in the center of this region in patients 4, 14 and 17. In the Gag 2 region, all patients had some mutations, however, none of them were located at the 3'-OH end. In the *TaqMan* probe region, we identified no mutations in 4 of 6 patients (4, 8, 14 and 17), and one in the remaining 2 patients (3 and 5). We estimated that these mutations were not critical to the real-time PCR reaction because of their positions. Sequencing the HIV-1 DNA from patients with high levels revealed the same or similar nucleotide mutations. We concluded that the low levels of HIV-1 DNA found in the 6 patients were not false-negative values.

#### Relationship between Intracellular HIV-1 DNA Levels and CD4<sup>+</sup> Cell Count or Plasma Viral Load

A negative relationship was observed between intra-

cellular HIV-1 DNA levels and CD4<sup>+</sup> cell count ( $R=0.483$ ). The tendency was the same ( $P=0.033$ , Kruskal-Wallis test) when the 21 patients were classified into 3 groups (L, <200; IM, 200–350 and H, >350 cells/ $\mu$ l) (Table 3). On the other hand, a positive relationship between intracellular HIV-1 DNA levels and plasma viral load was observed although the association was quite weak ( $R=0.287$ ). The Kruskal-Wallis test showed no correlation between them ( $P=0.125$ ).

#### Detection of Unintegrated Circular HIV-1 DNA

We further investigated whether T lymphocytes from 6 patients were minimally infected with HIV-1 by detecting circular HIV-1 DNAs that are sensitive markers of early HIV-1 infection (2, 12, 13). Figure 2 shows the results of agarose gel electrophoresis. We detected

#### A) HIV-1 DNA level <DL

	Gag 1	TaqMan Probe	Gag 2
B consensus	CAAGCAGCCATGCAAATGTT	AAAAGAGAGC	GATCAATGAGGAAGCTGCAGAATGGGAT
patient 3		A	C
patient 4*	T		C
patient 5		C	G
patient 8			A
patient 14	T		C
patient 17	T	G	A

#### B) HIV-1 DNA level >DL

	Gag 1	TaqMan Probe	Gag 2
B consensus	CAAGCAGCCATGCAAATGTT	AAAAGAGAGC	GATCAATGAGGAAGCTGCAGAATGGGAT
patient 1			G
patient 2		G	A
patient 6**	T		G
patient 9			C
patient 10		A	C
patient 11		A	
patient 12		T	G
patient 13		A	T
patient 15			C
patient 18			G
patient 20			G
patient 21			G

Fig. 1. Nucleotide sequence of amplified region by real-time PCR. Sequences of forward primer (Gag 1), *TaqMan* probe, and reverse primer (Gag 2) used for HIV-1 DNA quantification are boxed. Mutations in these areas are shown by capital letters corresponding to those of mother sequences. \*: subtype C, \*\*: subtype E.

Table 3. Levels of HIV-1 DNA according to CD4<sup>+</sup> cell count or plasma VL category

Categories	No. of patients tested	HIV-1 DNA (copies/10 <sup>6</sup> CD4 <sup>+</sup> cells)
CD4 <sup>+</sup> cell count (cells/ $\mu$ l)		
<200	4	24,270 (2,870–98,120)*
200–350	10	1,920 (<DL–10,800)*
>350	7	1,440 (<DL–3,600)*
Plasma HIV-1 RNA (copies/ml)		
<50,000	9	1,070 (<DL–3,600)**
50,000–100,000	5	1,830 (<DL–10,800)**
>100,000	7	9,080 (<DL–98,120)**

\*:  $P=0.033$ , \*\*:  $P=0.125$  (Kruskal-Wallis test).



one LTR-circular HIV-1 DNA with or without two LTR-circular types in 11 of 15 patients in whom real-time PCR showed that intracellular HIV-1 DNA levels were detectable. However, no circular HIV-1 DNA was detected in the remaining 4 patients who were judged positive by real-time PCR (Table 2). In contrast, as predicted, no circular form HIV-1 DNA was detected among the patients who were judged negative by real-time PCR except patient 17. Circular HIV-1 DNA was detected at a rate of 100% in the group with the highest plasma viral load ( $>10^5$  copies/ml), with the lowest CD4<sup>+</sup> cell count ( $<200$  cells/ $\mu$ l), and with the highest intracellular HIV-1 DNA levels ( $>10^4$  copies/ $10^6$  cells) (Table 4).

## Discussion

We measured HIV-1 DNA copy numbers in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes from 21 therapy-naïve patients using real-

### A) HIV-1 DNA <DL



### B) HIV-1 DNA >DL

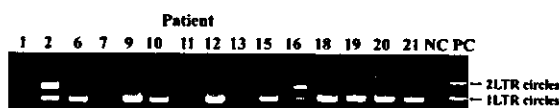


Fig. 2. Detection of unintegrated 1LTR and 2LTR circular HIV-1 DNA in 21 therapy-naïve patients. Molt4 cells were used as negative control (NC) and Molt4-IIIB cells persistently infected with HIV-1 IIIB were used as positive control (PC). Products of PCR electrophoresed in 1% agarose gels were visualized by staining with ethidium bromide.

time PCR with the Roche LightCycler system. The lower limit of detection was 200 copies/ $10^6$  cells. The intracellular HIV-1 DNA copy numbers ranged from below detectable levels to 98,120 copies/ $10^6$  cells. This distribution was similar to those reported by Désiré et al. (7), Andreoni et al. (1) and Riva et al. (15). Although the number of patients studied might be insufficient to statistically determine an association between plasma HIV-1 viral load and levels of HIV-1 DNA, we identified a weak positive relationship. The key point was the demonstration of the presence of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes containing a minimal level of HIV-1 DNA in 6 of 21 therapy-naïve patients despite high levels of viral load ranging from 8,800 to 150,000 copies/ml. Thereupon, we evaluated the tropism of plasma HIV-1 RNA of these viruses by sequencing the *env* V3 region. In all cases, the determined tropism was M-tropic suggesting that viral replication is actively ongoing in target cells of M-tropic HIV-1. In contrast, HIV-1 infection in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes was not widely established. Current belief is that M-tropic HIV-1 predominantly replicates in patients at the first stage of infection, followed by an increase in T-tropic HIV-1 variants as reported by Schuitemarker et al. (16). According to this model, the very low level of HIV-1 DNA in the CD4<sup>+</sup> T lymphocytes found in this study might reflect the infection stage where almost all CD4<sup>+</sup> T lymphocytes remain free from HIV-1. Circular HIV-1 DNA was undetectable in most such patients, supporting this notion because this molecular species of HIV-1 DNA reflects active reverse transcription and replication.

From this viewpoint, the HIV-1 DNA copy number in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes could be a new indicator of the clinical status of HIV-1 infection in therapy-naïve patients. In addition, the delayed HIV-1 infection of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes could provide new insights into anti-HIV-1 therapy. Selective therapy against M-tropic

Table 4. Detection rate of circular HIV-1 DNA in therapy-naïve patients classified as three categories

Categories	Detection rate of circular HIV-1 DNA
CD4 <sup>+</sup> cell count (cells/ $\mu$ l)	
<200	4/4 (100%)
200–350	6/10 (60%)
>350	2/7 (28.6%)
Plasma HIV-1 RNA (copies/ml)	
<50,000	3/9 (33.3%)
50,000–100,000	2/5 (40.0%)
>100,000	7/7 (100%)
Intracellular HIV-1 DNA (copies/ $10^6$ cells)	
<DL	1/6 (16.7%)
200–10,000	7/11 (63.6%)
>10,000	4/4 (100%)

HIV-1 might retard HIV-1 infection of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, delaying or preventing subsequent formation of a lymphocytic HIV-1 reservoir.

This study was partly supported by Health Science Research Grants for HIV/AIDS (H15-AIDS-015 to TK) and Grants for Collaborative Study of National Hospitals for AIDS Treatment (Pub12-2 and Pub14-1 to TK). K. Wada was and H. Nagai is a research resident of the Japanese Foundation for AIDS Prevention.

## References

- 1) Andreoni, M., Parisi, S.G., Sarmati, L., Nicastrì, E., Ercoli, L., Mancino, G., Sotgiu, G., Mannazzu, M., Trevenzoli, M., Tridente, G., Concia, E., and Aceti, A. 2000. Cellular proviral HIV-DNA decline and viral isolation in naïve subjects with <5000 copies/ml of HIV-RNA and >500×10<sup>6</sup>/l CD4 cells treated with highly active antiretroviral therapy. *AIDS* **14**: 23–29.
- 2) Brusswl, A., Mathez, D., Broche-Pierre, S., Lancar, R., Calvez, T., Sonigo, P., and Leibowitch, J. 2003. Longitudinal monitoring of 2-long terminal repeat circles in peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic HIV-1 infection. *AIDS* **17**: 645–652.
- 3) Chun, T.W., Carruth, L., Finzi, D., Shen, X., DiGiuseppe, J.A., Taylor, H., Hermankova, M., Chadwick, K., Margolick, J., Quinn, T.C., Kuo, Y.H., Brookmeyer, R., Zeiger, M.A., Barditch-Crovo, P., and Siliciano, R.F. 1997. Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature* **287**: 183–188.
- 4) Chun, T.W., Stuyver, L., Mizell, S.B., Ehler, L.A., Mican, J.A.M., Baseler, M., Lloyd, A.L., Nowak, M.A., and Fauci, A.S. 1997. Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**: 13193–13197.
- 5) Cone, R.W., Gowland, P., Opravil, M., Grob, P., Ledergerber, B., and the Swiss HIV Cohort Study. 1998. Levels of HIV-infected peripheral blood cells remain stable throughout the natural history of HIV-1 infection. *AIDS* **12**: 2253–2260.
- 6) Damond, F., Descamps, D., Farfara, I., Telles, J.N., Puyeo, S., Campa, P., Leprêtre, A., Matheron, S., Brun-Vezinet, F., and Simon, F. 2001. Quantification of proviral load of human immunodeficiency virus type 2 subtypes A and B using real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 4264–4268.
- 7) Désiré, N., Dehé, A., Schneider, V., Jacomet, C., Goujon, C., Girard, P.M., Rozenbaum, W., and Nicolas, J.C. 2001. Quantification of human immunodeficiency virus type 1 proviral load by a TaqMan real-time PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 1303–1310.
- 8) Finzi, D., Blankson, J., Siliciano, J.D., Margolick, J.B., Chadwick, K., Pierson, T., Smith, K., Lisiewicz, J., Lori, F., Flexner, C., Quinn, T.C., Chaisson, R.E., Rosenberg, E., Walker, B., Gange, S., Gallant, J., and Siliciano, R.F. 1999. Latent infection of CD4<sup>+</sup> T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat. Med.* **5**: 512–517.
- 9) Finzi, D., Hermankova, M., Pierson, T., Carruth, L.M., Buck, C., Chaisson, T.E., Quinn, T.C., Chadwick, K., Margolick, J., Brookmeyer, R., Gallant, J., Markowitz, M., Ho, D.D., Richman, D.D., and Siliciano, R. 1997. Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science* **278**: 1295–1300.
- 10) Leitner, T., Korber, K., Robertson, D., Gao, F., and Hahn, B. 1997. Updated proposal of reference sequences of HIV-1 genetic subtype, p.III-19–24. *In* Korber, B., Hahn, B., Foley, B., Mellors, J.W., Leitner, T., Myers, G., McCutchan, F., and Kuiken, C.L. (eds), *Human retroviruses and AIDS 1997*, Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, N. Mex.
- 11) Mellors, J.W., Rinaldo, C.R., Jr., Gupta, P., White, R.M., Todd, J.A., and Kingsley, L.A. 1996. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* **272**: 1167–1170.
- 12) Nandi, J.S. 1999. Unintegrated viral DNA as marker for human immunodeficiency virus 1 infection *in vivo* and *in vitro*. *Acta Virol.* **43**: 367–372.
- 13) Nicholson, W.J., Shepherd, A.J., and Aw, D.W.J. 1996. Detection of unintegrated HIV type 1 DNA in cell culture and clinical peripheral blood mononuclear cell samples: correlation to diseases stage. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **12**: 315–323.
- 14) Piatak, M., Saag, M.S., Yang, L.C., Clark, S.J., Kappes, J.C., Luk, K.C., Hahn, B.H., Shaw, G.M., and Lifson, J.D. 1993. High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science* **259**: 1749–1754.
- 15) Riva, E., Antonelli, G., Scagnolari, C., Pistello, M., Capobianchi, M.R., Monforte, A.D., Pezzotti, P., and Dianzani, F. 2003. Human immunodeficiency virus (HIV) DNA load and level of immunosuppression in treatment-naïve HIV-1-infected patients. *J. Infect. Dis.* **187**: 1826–1828.
- 16) Schuitemaker, H., Koot, M., Kootstra, N.A., Dercksen, M.W., De Goede, R.E.Y., Van Steenwijk, R.P., Lange, J.M.A., Eeftink Schattenkerk, J.K.M., Miedema, F., and Tersmette, M. 1992. Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: progression of disease is associated with a shift from monocytopathic to T-cell-tropic virus populations. *J. Vir.* **66**: 1354–1360.
- 17) Shioda, T., Levy, J.A., and Cheng-Mayer, C. 1992. Small amino acid changes in the V3 hypervariable region of gp120 can affect the T-cell-line and macrophage tropism of human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**: 9434–9438.
- 18) Wong, J.K., Günthard, H.F., Havlir, D.V., Zhang, Z.Q., Haase, A.T., Ignacio, C.C., Kwork, S., Emini, E., and Richman, D.D. 1997. Reduction of HIV-1 in blood and lymph nodes following potent antiretroviral therapy and the virologic correlates of treatment failure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**: 12574–12579.
- 19) Wong, J.K., Hezareh, M., Günthard, H.F., Havlir, D.V., Ignacio, C.C., Spina, C.A., and Richman, D.D. 1997. Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia. *Science* **278**: 1291–1295.

## Pharmacokinetics of Lopinavir after Administration of Kaletra in Healthy Japanese Volunteers

Tsuyoshi OKI,<sup>a</sup> Yoshiko USAMI,<sup>b</sup> Masahiko NAKAI,<sup>a</sup> Masafumi SAGISAKA,<sup>a</sup> Hirotaka ITO,<sup>a</sup> Koichi NAGAOKA,<sup>a</sup> Naoto MAMIYA,<sup>c</sup> Katsuo YAMANAKA,<sup>c</sup> Makoto UTSUMI,<sup>c</sup> and Tsuguhiro KANEDA<sup>\*,b</sup>

<sup>a</sup> Department of Pharmacy, Nagoya National Hospital (Tokai Area Central Hospital for AIDS Treatment and Research);

<sup>b</sup> Clinical Research Center, Nagoya National Hospital (Tokai Area Central Hospital for AIDS Treatment and Research);

and <sup>c</sup> Department of Internal Medicine, Nagoya National Hospital (Tokai Area Central Hospital for AIDS Treatment and Research); 4-1-1 Sannomaru, Naka-ku, Nagoya, Aichi 460-0001, Japan.

Received July 2, 2003; accepted November 13, 2003

The pharmacokinetic parameters of lopinavir (LPV) were examined by administering Kaletra (LPV+ritonavir) to 8 healthy Japanese volunteers both in the fasting and postprandial conditions. LPV showed a biphasic decline, which was slower in the initial phase and became more rapid in the later phase. The behavior of LPV in the initial phase could be modeled using a one-compartment model with first-order absorption. In the fasting study, calculations based on the pharmacokinetic model revealed that the time to reach the maximum concentration ( $T_{max}$ ), maximum concentration ( $C_{max}$ ), half-life ( $T_{1/2}$ ), lag time, apparent volume of distribution ( $Vd/F$ ) and oral clearance ( $Cl/F$ ) were  $3.2 \pm 1.0$  h,  $6.9 \pm 1.9$   $\mu\text{g/ml}$ ,  $10.0 \pm 3.7$  h,  $0.71 \pm 0.32$  h,  $51.0 \pm 12.4$  l and  $4.2 \pm 2.6$  l/h, respectively. On the other hand, in the postprandial study, the calculated  $T_{max}$ ,  $C_{max}$ ,  $T_{1/2}$ , lag time,  $Vd/F$  and  $Cl/F$  were  $5.6 \pm 2.0$  h,  $7.6 \pm 1.8$   $\mu\text{g/ml}$ ,  $16.7 \pm 7.0$  h,  $2.35 \pm 0.78$  h,  $48.0 \pm 15.9$  l and  $2.1 \pm 0.6$  l/h, respectively. The values for the area under the curve for data collected over a 24-h period ( $AUC_{24h}$ ) in the fasting and postprandial studies were  $86.0 \pm 27.7$  and  $102.1 \pm 31.0$   $\mu\text{g} \cdot \text{h/ml}$ , respectively. The  $T_{1/2}$  had a tendency to be prolonged after food intake, but there were 2 cases with shortened  $T_{1/2}$ . Food intake prolonged the lag time 3-fold and as a result, the postprandial  $T_{max}$  was 2 times longer.

**Key words** lopinavir; ritonavir; pharmacokinetics; human immunodeficiency virus (HIV)-1; fasting study; postprandial study

Kaletra is a co-formulation of two human immunodeficiency virus (HIV) protease inhibitors, lopinavir (LPV) and ritonavir (RTV). LPV is mainly metabolized by cytochrome P-450 (CYP) 3A.<sup>1,2)</sup> On the other hand, RTV inhibits the CYP3A-mediated metabolism of LPV, resulting in higher plasma levels of LPV than when LPV is administered alone, and is followed by a dramatic increase of the area under the plasma concentration *versus* time curve ( $AUC$ ).<sup>1,3)</sup>

Presently in Japan Kaletra is used as a salvage therapy for many HIV-infected patients with multidrug resistance. In spite of the fact that Kaletra was approved for use in December 2000 in Japan, there is no Japanese pharmacokinetic data for the co-administration of LPV with RTV. It is easy to speculate that the pharmacokinetics of LPV co-administered with RTV will be complex since the metabolism of LPV is affected by factors such as concurrent use of antiretroviral compounds, food, body weight, concomitant drug use, *etc.*<sup>4-6)</sup> In this report, we tried to evaluate the pharmacokinetic parameters of LPV. Healthy Japanese volunteers were orally administered a single normal dose of Kaletra soft capsules under both fasting and postprandial conditions in order to measure longitudinally the plasma concentrations of LPV and RTV.

### MATERIALS AND METHODS

**Chemicals** LPV, RTV and the internal standard (IS), (5S,8S,10S,11S)-9-hydroxy-2-cyclopropyl-5-(1-methylethyl)-1-[2-(1-methylethyl)-4-thiazolyl]-3,6-dioxo-8,11-bis(phenylmethyl)-2,4,7,12-tetraazatridecan-13-oic acid, 5-thiazolylmethyl ester, were generously provided by Abbott Laboratories (Abbott Park, IL, U.S.A.). Ethanol, ethyl acetate, *n*-hexane, acetonitrile and methanol were purchased from

Katayama Chemical (Osaka, Japan). Trifluoroacetic acid (TFA) and tetramethylammonium perchlorate were purchased from Tokyo Kasei Kogyo Co., Ltd. (Tokyo, Japan).

**Study Group** Eight healthy Japanese volunteers (2 females and 6 males) aged 28 to 52 years were enrolled in the study (Table 1). None of the subjects were excessively overweight/obese or lean. All volunteers participated in the fasting study and seven of them participated in the postprandial study. Written informed consent was obtained from all volunteers.

**Study Design** Three Kaletra soft capsules (400 mg LPV/100 mg RTV) were administered to volunteers under fasting or postprandial conditions. In the fasting study, the volunteers fasted for at least 12 h before drug administration. The meal for the postprandial study contained approximately 530 kcal and 20 g of lipid. The volunteers consumed the meal in the morning and took the drug 30 min after they finished eating. Blood samples were obtained at 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 18, 24 and 30 h after drug administration. The blood samples were centrifuged at  $2800 \times g$  for 5 min to separate the plasma.

Table 1. Background of Volunteers

Subject	Sex	Age	Weight (kg)
A	M	52	62
B	M	42	57
C	M	43	63
D	M	40	66
E	F	43	59
F	M	28	66
G	M	35	70
H	F	35	51

M, male; F, female.

\* To whom correspondence should be addressed. e-mail: kanedat@nagoya.hosp.go.jp

The plasma samples were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis. The duration between the fasting and postprandial studies was over 1 month.

#### Extraction of LPV and RTV from Plasma Samples

Two milliliters of ethyl acetate/*n*-hexane (50/50, v/v) containing the IS and 1 ml of 0.5 M sodium carbonate were added to 500  $\mu\text{l}$  of the plasma sample. The mixture was vortexed and centrifuged at  $2800\times g$  for 5 min. The clear supernatant was transferred to a clean glass tube, evaporated to dryness and redissolved in a 200  $\mu\text{l}$  mobile phase solution. Then, 500  $\mu\text{l}$  of *n*-hexane was added to the solution, vortexed and centrifuged at  $2800\times g$  for 5 min. Forty microliters of the lower solution was injected into the HPLC.

**Chromatographic Assay of Drugs** The HPLC system consisted of a Waters 510 pump, 484 tunable absorbance detector, 741 data module and WISP 710B auto sample processor. The analytical column was a Radial-Pak Nova-Pak  $\text{C}_{18}$  column (4  $\mu\text{m}$ ,  $8\times 100$  mm, Waters). A Waters Nova-Pak  $\text{C}_{18}$  Guard-Pak Insert precolumn was used to protect the column.

The mobile phase solution was composed of acetonitrile/methanol/0.01 M tetramethylammonium perchlorate in 0.1% TFA (50/5/45, v/v/v) and pumped at a flow rate of 1.5 ml/min. Absorbance was monitored at a wavelength of 205 nm. Drugs were quantified by determining the ratio of the peak area to the IS. The details have been reported in a previous study.<sup>7)</sup>

**Data Analysis** Pharmacokinetic parameters were calculated using a nonlinear least square method program MULTI which was developed by Yamaoka *et al.*<sup>8)</sup> A *t*-test was used to compare the parameters. A *p* value of  $<0.05$  was considered statistically significant.

## RESULTS

Figure 1 shows the plasma concentration profiles of LPV and RTV in the fasting study. In all individuals, LPV appeared in the plasma at 1 h after administration, reached a maximum concentration ( $C_{\text{max}}$ ) between 2 and 4 h, and then gradually decreased. In three cases (subjects A, C and E) the concentrations observed at 30 h were less than the 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  detection limit. The decrease seen from 12 or 18 h was also more rapid in these cases. Similar to LPV, RTV concentrations reached  $C_{\text{max}}$  at 2 to 4 h after administration although concentrations above the detection limit at 1 h were only observed in two of eight individuals. Additionally, the RTV concentrations dropped below the detection limit at 6 h in two cases and at 8 h in one case. The plasma concentration *versus* time curve of RTV also was found to differ extremely from person to person.

Figure 2 shows the plasma concentration profiles of LPV and RTV in the postprandial study. LPV appeared in the plasma at 2 h after drug administration in six out of seven cases. The plasma concentration *versus* time curves of LPV plotted over a 24-h period were shifted to the right by 1–2 h as compared with those seen in the fasting study. However, differing from the fasting study, the plasma concentrations of LPV decreased rapidly after 24 h and were below the 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  detection limit at 30 h after the initial drug administration in all cases. The plasma concentration *versus* time curves of RTV were also shifted to the right by 1–2 h as compared to those seen in the fasting study.

Figure 3 shows the profile of the mean plasma concentration of eight individuals in the fasting and of seven in the postprandial study for each time point. In both the fasting and the postprandial studies, plasma concentrations of LPV showed a biphasic decline. However, these curvatures were completely different from the standard two-compartment model. The decline was slower in the initial phase until 12 h after drug administration and became more rapid in the later phase from 12 h on. To estimate the pharmacokinetic parameters, we used the MULTI program to search for a model to fit the data. The Akaike information criterion (AIC) value<sup>9)</sup> was used as the index for fitting the curve. The fitness for the two-compartment model with first-order absorption was found to be inadequate, especially for the time points obtained later than 12 h after drug administration. A one-compartment model with a first-order absorption did fit the data up until the 12-h time point. Elimination rate constant (*ke*), absorption rate constant (*ka*),  $C_{\text{max}}$ , half-life ( $T_{1/2}$ ), the time to reach  $C_{\text{max}}$  after administration ( $T_{\text{max}}$ ), apparent volume of distribution (*Vd/F*) and oral clearance (*Cl/F*) were calculated using data collected from 0 to 12 h after drug administration. *AUC* was calculated with data collected from 0 to 24 h ( $AUC_{24\text{h}}$ ) by using the trapezoidal method.

Table 2 shows the pharmacokinetic parameters for LPV that were obtained in this study and from previously reported data in American test subjects.<sup>5)</sup> In the fasting study the pharmacokinetic parameters (mean $\pm$ S.D.) were  $T_{\text{max}}=3.2\pm 1.0$  h,  $C_{\text{max}}=6.9\pm 1.9$   $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $T_{1/2}=10.0\pm 3.7$  h, lag time= $0.71\pm 0.32$  h,  $Vd/F=51.0\pm 12.4$  l and  $Cl/F=4.2\pm 2.6$  l/h. The  $AUC_{24\text{h}}$  calculated by the trapezoidal method was  $86.0\pm 27.7$   $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ . On the other hand, in the postprandial study the pharmacokinetic parameters (mean $\pm$ S.D.) were  $T_{\text{max}}=5.6\pm 2.0$  h,  $C_{\text{max}}=7.6\pm 1.8$   $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $T_{1/2}=16.7\pm 7.0$  h, lag time= $2.35\pm 0.78$  h,  $Vd/F=48.0\pm 15.9$  l and  $Cl/F=2.1\pm 0.6$  l/h. The  $AUC_{24\text{h}}$  was  $102.1\pm 31.0$   $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ .

Parameters for each individual in the fasting study were compared with those in the postprandial study (Fig. 4). There were no statistically significant differences in the  $C_{\text{max}}$ ,  $T_{1/2}$ ,  $AUC_{24\text{h}}$  and *Vd/F* between the fasting and the postprandial studies. However, the influence of food intake on  $T_{1/2}$  was unusual. We found that food intake shortened the  $T_{1/2}$  by 3–4 h in two cases, but prolonged it by 4.5–15 h in the five other cases. Food intake prolonged lag time by 0.5–2 h in all cases ( $p=0.001$ ). As a result, the postprandial  $T_{\text{max}}$  was also prolonged by a mean of 2.4 h ( $p=0.039$ ). The *Cl/F* was decreased by food intake except in one case.

Concerning the  $T_{1/2}$ , the fasting and postprandial  $T_{1/2}$  were  $10.0\pm 3.7$  and  $16.7\pm 7.0$  h, respectively. In contrast, the fasting and postprandial  $T_{1/2}$  from Abbott Laboratories were  $2.7\pm 0.6$  and  $3.0\pm 0.6$  h, respectively.<sup>5)</sup> The differences between our data and Abbott's data were statistically significant ( $p=0.001$  in the fasting study and  $p<0.001$  in the postprandial study). As for the *Cl/F*, the differences between our data ( $4.2\pm 2.6$  l/h) and Abbott's data ( $9.0\pm 4.9$  l/h) in the fasting study, and those between our data ( $2.1\pm 0.6$  l/h) and Abbott's data ( $4.6\pm 1.5$  l/h) in the postprandial study were statistically significant ( $p=0.018$  and  $0.0003$ , respectively). There was also a significant difference ( $p=0.016$ ) for the  $AUC_{24\text{h}}$  in the fasting study between our data ( $86.0\pm 27.7$   $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ ) and Abbott's data ( $56.5\pm 27.8$   $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ ).