

クスに顕著な違いは見られなかったが、最も高い増殖キネティックスを示したウイルスは未治療患者由来PR阻害剤耐性HIV-1のgag遺伝子を有するTN46(gag•PR)とTN46(gag)でありday4, day6に於いて、野生型に比べ約2倍のウイルス増殖を示した。HXB2, HXB2(PR<sub>L90M</sub>), TN90(PR), TN90(gag•PR), TN90(gag)の増殖キネティックスを比較した場合にも同様の結果が得られ、最も高い増殖キネティックスを示したウイルスはTN90(gag•PR)とTN90(gag)であった。(図4B)。

#### D. 考察

未治療患者由来PR阻害剤耐性HIV-1のgag•PR遺伝子に組換えたキメラウイルスは、薬剤の無い条件下にもかかわらず、野生型ウイルスであるHXB2より優れた複製能を示した。さらに、このHXB2を上回る複製能は耐性ウイルスのgag遺伝子を組込んだキメラウイルスにも観察された。昨年度、我々は、耐性ウイルスのPR遺伝子に組換えたウイルスはHXB2を上回る複製能を示さないという実験結果を得ており、これらの実験結果を総合して、未治療患者由来PR阻害剤耐性HIV-1のgag•PR遺伝子に組換えたキメラウイルスが有する野生型を凌ぐ複製能はgag遺伝子によってもたらされていると結論づけた。昨年度、未治療患者由来PR阻害剤耐性ウイルスのgag遺伝子の塩基配列を決定してそのアミノ酸配列を解析し、共通に検出される7つの耐性ウイルス特異的変異(p17 119-A挿入、p24 H87Q、p24 M96I、p24 G116T、p2 T12S、p7 D48E、p6<sup>gag</sup> E12A)を検出した。我々は、これらのgag蛋白質のアミノ酸変異がウイルス複製能向上に関与していると考えている。本年度に実施した増殖キネティックス解析でも、他の組換えウイルス

の複製能と比較して、耐性ウイルスのgag遺伝子を有する組換えウイルスが最も高い複製能を示し、競争培養実験結果と一致する結果が得られた。

#### E. 結論

未治療患者由来プロテアーゼ(PR)阻害剤耐性HIV-1のgag•PR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野生型HIV-1より優れた複製能を示した。このHXB2を上回る複製能は、耐性ウイルスのPR遺伝子ではなく、gag遺伝子によってもたらされていた。これらの結果から、未治療患者由来PR阻害剤耐性HIV-1の複製能向上にgag遺伝子内の変異が関与している可能性が示唆された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 高橋昌明、吉田昌生、大木 剛、奥村直哉、鈴木達男、金田次弘  
HPLCによるプロテアーゼ阻害剤アタザナビル血中濃度測定法の開発  
*日本病院薬剤師会雑誌*, 2005, 41, 731-734.
2. 高橋昌明、吉田昌生、大木 剛、奥村直哉、鈴木達男、金田次弘  
カレトラ™投与外来 HIV 感染患者における脂質異常とロピナビル血中濃度の評価  
*日本病院薬剤師会雑誌*, 2005, 41, 873-876.
3. M. Takahashi, M. Yoshida, T. Oki, N. Okumura, T. Suzuki and T. Kaneda  
Conventional HPLC Method Used for Simultaneous Determination of the Seven HIV Protease Inhibitors and Nonnucleoside Reverse Transcription Inhibitor Efavirenz in Human Plasma.  
*Biol. Pharm. Bull.*, 2005, 28, 1286-1290.

## 2. 学会発表

1. 伊部史朗、金田次弘ほか、「未治療患者に検出された薬剤耐性HIV-1のウイルス学的特徴(1)」、第15回抗ウイルス化学療法研究会、屋久島、2005.
2. 伊部史朗、藤崎誠一郎、藤崎彩恵子、金田次弘、「未治療患者由来プロテアーゼ阻害剤耐性HIV-1の複製能解析」、第19回 日本エイズ学会学術集会、熊本、2005.

3. T. Kaneda, S. Ibe et al., Persistence of protease inhibitor-resistant HIV-1 in therapy-naïve patients., 2nd International Workshop on HIV Persistence during Therapy, St. Martin, 2005

- G. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

図1 作成した感染性クローン

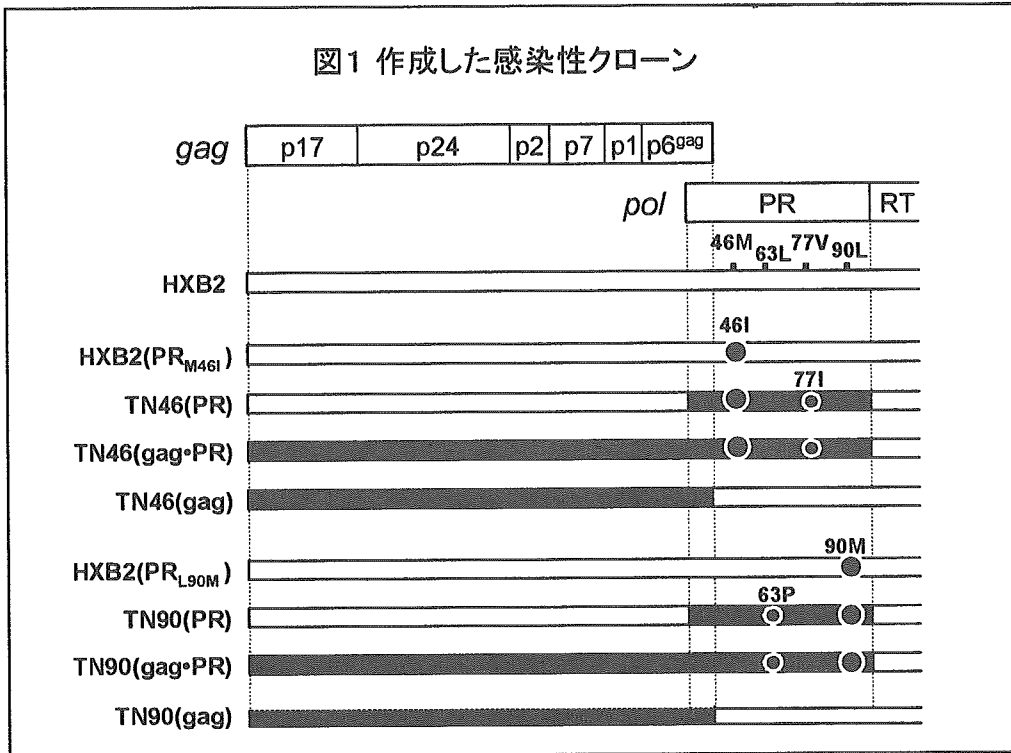


図2 耐性ウイルスの gag と PR に組換えたキメラウイルスの増殖能

A) TN46(gag•PR) vs HXB2 B) TN90(gag•PR) vs HXB2

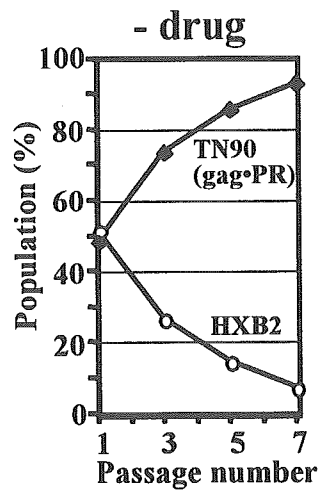
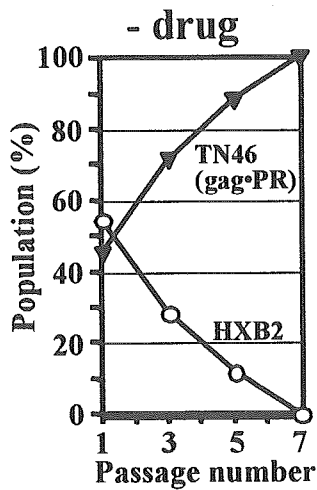


図3 耐性ウイルスの gag に組換えたキメラウイルスの増殖能

A) TN46(gag) vs HXB2

B) TN90(gag) vs HXB2

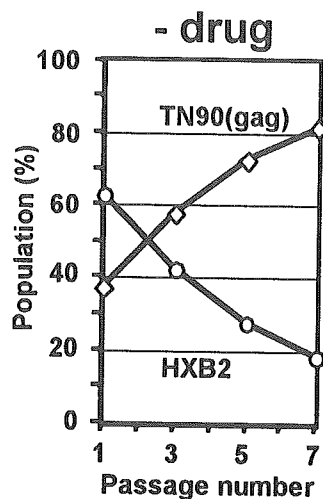
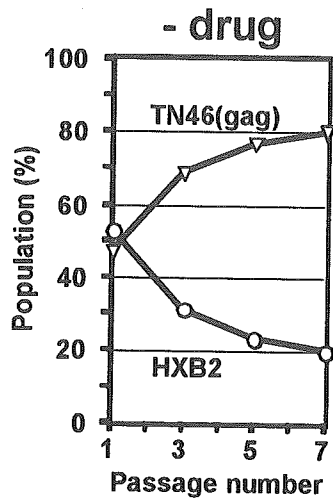
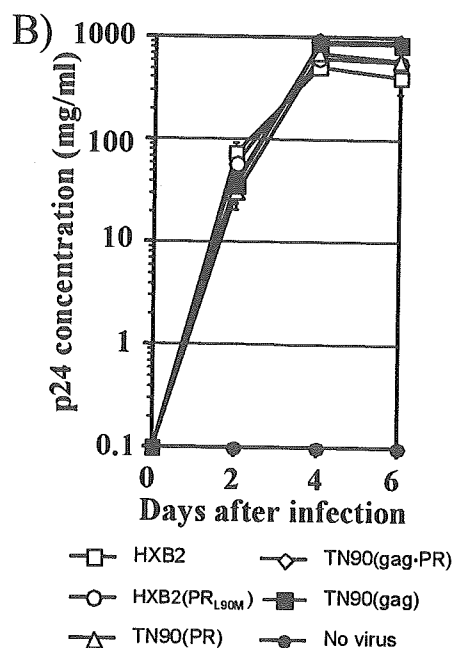
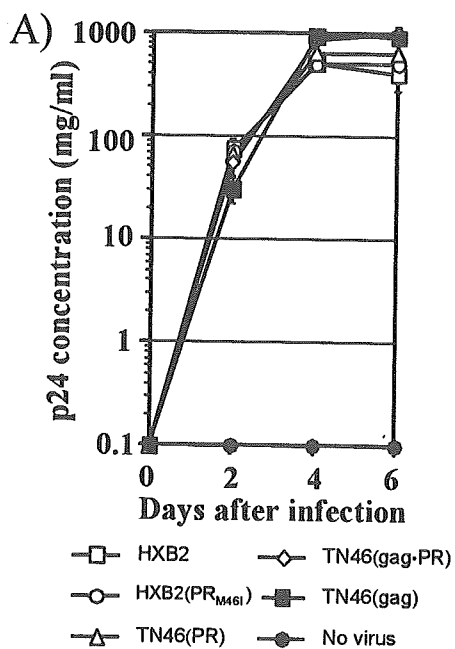


図4 増殖カインेटクス解析



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

エファビレンツ (EFV) は HAART において最も使用頻度の高い薬剤の一つである。その抗 HIV 効果は細胞内において発揮することがわかっているが、薬物動態に関する研究は血漿濃度をもとに行われている。その原因の一つは、細胞内 EFV 濃度の測定法がまだ確立されていないことにある。そこで我々は、末梢血単核球 (PBMC) 中の EFV を細胞の分離操作による影響を受けることなく抽出し、LC-MS/MS によって定量できる方法を開発し、この方法を用いて PBMC 内 EFV の性質を様々な角度から検討した。EFV の細胞への流入速度および細胞からの流出速度は 5 分以内に完了していた。細胞内 EFV 濃度と細胞外 EFV 濃度の間には良好な直線関係があった。血漿濃度 100% での細胞内 EFV 濃度は血漿非存在下に比べて 1/100 まで低下した。平均細胞内 EFV 濃度は細胞外遊離 EFV の約 40 倍濃縮されていた。細胞内 EFV と細胞外血漿濃度の間に相関はなかった ( $R_s=0.21$ ,  $P=0.60$ )。以上の結果は血漿中の全 EFV ではなく遊離 EFV が細胞内に取り込まれていることを示唆しており、EFV の抗 HIV 効果や副作用を検討するためには細胞内濃度を測定することが重要であることを示している。今後、多くの EFV 服用患者の検体を用いて PBMC 内 EFV 濃度と副作用との関係を調べる予定である。

A. 研究目的

エファビレンツ (EFV) は、血中半減期が長く、一日一回投与が可能な非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害薬であり、エイズの多剤併用療法において中心的な役割を果たしている。本剤は細胞内において抗 HIV 効果を発揮することが知られているが、その薬物動態に関する研究は主に血漿濃度をもとに行われている。その原因の一つは、細胞内 EFV 濃度の測定が困難であるため、その決定的な測定法がまだ確立されていないことにある。そこで我々は、末梢血単核球 (PBMC) 中の EFV を細胞の分離操作による影響を受けることなく抽出し、それを LC-MS/MS によって定量する方法を開発した。そして、この方法を用いて、PBMC における EFV の流入と流出速度、培地中濃度と細胞内濃度の関係、および EFV 投与患者の血漿中濃度と PBMC 内濃度の関係を検討した。

B. 研究方法

慶應大学病院と荻窪病院に通院中の EFV 服用患者 7 人を対象とし、血漿内と PBMC 内の EFV 濃度を以下の方法で測定した。

EFV 標準液として万有製薬から供与された粉末 EFV を秤量しメタノールで 0.1  $\mu\text{M}$  に溶解したものをを用いた。内部定量標準液には、プロテアーゼ阻害薬の一種で EFV と脂溶性が類似しており、EFV と併用されることが少ないリトナビル (RTV、ダイ

ナボット社より供与) をメタノールで 0.1  $\mu\text{M}$  に溶解したものをを用いた。

血漿 EFV 濃度測定のための試料は、血漿 20  $\mu\text{l}$  に 80  $\mu\text{l}$  のメタノールを加え、よく攪拌した後、14000 rpm で 1 分遠心して上清を採取し、減圧過熱遠心乾燥機で乾燥させて調製した。PBMC 内 EFV 濃度測定のための試料は、ヘパリン血 1 ml を 800  $\mu\text{l}$  のフィコールパック (ファルマシア) に重層し、1500 rpm、20°C で 10 分遠心して PBMC 層を採取し、100  $\mu\text{l}$  の患者血漿を用いて 2000 rpm、20°C、2 分と 2500 rpm、20°C、2 分で二回洗浄し、800  $\mu\text{l}$  のシリコンオイル (8% n-ヘキサデカン含有) に重層し、14000 rpm、20°C で 1 分遠心して PBMC を瞬間的に血漿から分離し、この PBMC に 100  $\mu\text{l}$  の 80% メタノールを加え、よく攪拌した後、14000 rpm で 1 分遠心して上清を採取し、減圧過熱遠心乾燥機で乾燥させた。その後、どちらの試料も LC-MS/MS の初期移動相 (50% メタノール、5 mM 酢酸アンモニウム、pH 7.0) で溶解し、LC-MS/MS によって EFV を定量した。

EFV 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、キャピラリー 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を用い、イオン検出は陽イオンモードで行った。プリカーサーイオンの検出は 333.1 amu、プロダクトイオンの検出

は 244.0 amu で行った。LC への注入量は 1  $\mu$ l、流速は 10  $\mu$ l/min とした。移動相は 5 mM 酢酸アンモニウム (pH 7.0) をベースとし、10 分間でメタノール濃度 50%~90% の勾配をかけた。得られた EFV と内部標準である RTV のピークの面積比から EFV 量を算出した。

### C. 研究成果

EFV の細胞内への流入速度を調べるために、培養 3 日目の PBMC を 1  $\mu$ M EFV を含む培地に入れて 37°C でインキュベートし、0、5、10、20、60 分後に細胞を採取して EFV 量を測定した。その結果、細胞内への EFV 流入は 5 分以内に完了し、その後 60 分まで一定であった。

次に細胞からの流出速度を調べるために、流入速度の実験と同様に PBMC を 1  $\mu$ M EFV で 1 時間作用させ、4°C あるいは 37°C の薬剤非存在下の培地に移し、0、5、10、20 分後に細胞を採取して EFV 量を測定した。その結果、EFV の流出は 4°C でも 37°C でも 5 分以内に完了することがわかった。

次に、以前 Back ら (J Antimicrob Chemother, 2005) が報告した細胞内 EFV 測定法と我々の方法を、EFV をスパイクした健常人血液と EFV 服用患者 2 人の血液を用いて比較したところ、我々の方法で得られた EFV 量は Back らの方法に比べて 20 倍ほど高い値であった。我々の方法で採取した PBMC を氷冷した PBS で短時間洗浄しても値が変わらなかったことから、我々の方法で高値を示したのは血漿の混入によるものではないと考えられる。

EFV 定量値の希釈直線性を調べた結果、EFV 量とピークの総イオンカウントの間には、1 fmol から 1000 fmol の範囲で  $R^2=0.9998$  の良好な直線性が得られた。

培地中 EFV 濃度と PBMC 内 EFV 濃度の関係を調べると、100 nM から 10  $\mu$ M の濃度領域で良好な直線関係が得られた。培地中 EFV 濃度が 10  $\mu$ M のとき、細胞内 EFV 量は  $10^6$  個の PBMC あたり 100 nmol であった。このデータをもとに PBMC の直径を 8  $\mu$ m と仮定して細胞内濃度を計算すると 400  $\mu$ M となった。この結果は EFV が PBMC 内で約 40 倍濃縮されていることを示している。

次に、血漿 EFV 濃度と PBMC 内 EFV 濃度の関係を調べた (図 1)。培地中の血漿濃度を 0% から 100% まで変化させると、血漿濃度が高くなるにしたがって EFV の細胞内濃度は低下し、血漿濃度 100% では細胞内濃度が血漿非存在下の 1/100 になった。この結果は、血漿タンパクと結合していない遊離 EFV が細胞内に移行できることを反映していると考えられる。

最後に、7 人の EFV 服用患者の血液検体を用いて血漿中と PBMC 内の EFV 濃度を測定した (図 2)。両者の関係は、スピアマンの順位相関係数  $R_s$  が

0.21、 $P$  値は 0.60 であった。すなわち、EFV の血漿濃度と PBMC 内濃度との間には有意な相関が認められなかった。

### D. 考察

患者血液から PBMC を迅速に分離し、細胞内 EFV 濃度を LC/MS-MS によって正確に測定する方法を確立した。細胞からの流出は 5 分以内に完了することがわかった。この速い流出速度は温度を 4°C に下げてもほとんど変化がなかった。Back らの細胞内 EFV 定量法では分離した PBMC から残存血漿を除くために PBMC を氷冷 PBS で洗浄しているが、本研究の結果によると、この操作によって細胞内 EFV が流出してしまう可能性が高い。彼らの方法を用いて求めた細胞内 EFV 濃度が我々の方法の 1/20 であったこともこの推測を支持している。

血漿濃度 100% では細胞内 EFV 濃度は血漿非存在下の 1/100 まで低下した。この結果は、EFV の医薬品インタビューフォームに記載された、EFV の血漿蛋白結合率 99.5% とよく一致している。以上の結果から、細胞内には血漿タンパクと結合していない遊離 EFV が取り込まれていると考えられる。この結果は、Back ら (J Antimicrob Chemother, 2005) が報告した、EFV は蛋白と結合していても細胞内に取り込まれるという主張と相反している。これは、先に述べたように、彼らの細胞内 EFV 濃度測定法に問題があったからではないかと思われる。

患者血液検体において細胞内 EFV と血漿 EFV 濃度の間に関係はなかった ( $R_s=0.21$ 、 $P=0.60$ )。この結果は、EFV の血漿蛋白結合率が患者によって大きく異なっていることを示唆している。

以上のことを薬剤感受性試験との関連で考えてみる。EFV の  $IC_{50}$  の値 1 nM は細胞内濃度に換算すると  $10^6$  個の PBMC あたり 10 nM となり、今回測定した 7 人の患者の PBMC 内濃度はその 10~50 倍の範囲に入っている。この結果は、EFV の細胞内濃度は野生型 HIV を抑えるには十分であるが、薬剤耐性変異の獲得によって  $IC_{50}$  が上がると容易に超えられるものであることを示唆している。

今後、検体数をさらに増やすとともに、患者 PBMC 内 EFV 濃度と副作用との関係を調べる予定である。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

1) Shingo Kato, Hideji Hanabusa, Satoru Kaneko, Koichi Takakuwa, Mina Suzuki, Naoaki Kuji, Masao Jinno, Rie Tanaka, Kenichi Kojima, Mitsutoshi Iwashita, Yasunori Yoshimura, Kenichi Tanaka. Complete removal of HIV-1 RNA and proviral DNA from semen by the swim-up method: Assisted reproduction technique

using spermatozoa free from HIV-1. AIDS, in press.

## 2. 学会発表

1. Shingo Kato, Kenji Tsuiji, Rie Tanaka, Ei Kinai, Hideji Hanabusa, Masayoshi Negishi, Wataru Sugiura. Quantitation of antiretroviral drugs in hair with LC/MS/MS for assessment of medication adherence. Seventh International Congress on AIDS in Asia and the Pacific, SaPA0005. 2005, July 1-5, Kobe, Japan.

2. Motokazu Mukaide, Shingo Kato, Rie Tanaka, Makiko Kondo, Takako Shima, Koji Sudo, Yutaka Takebe, Yumiko Saito, Kazumasa Hikiji, Mitunobu Imai. Quantitation of HIV-1 proviral DNA; real-time PCR methods targeted the LTR, gag and pol. Seventh International Congress on AIDS in Asia and the Pacific, SuPA0025. 2005, July 1-5, Kobe, Japan.

3. Koichi Takakuwa, Katsunori Kashima, Mina Suzuki, Kazuyuki Fujita, Masaki Tamura, Satoru Kaneko, Shingo Kato, Hideji Hanabusa, Kenichi Tanaka. Studies on the IVF-ET for HIV-discordant couples (husband; positive, wife; negative) using sperm washing technique. Seventh International Congress on AIDS in Asia and the Pacific, MoPA0012. 2005, July 1-5, Kobe, Japan.

4. 吉田宏之、久慈直昭、水澤友利、田中雄大、橋場剛士、浅田弘法、岩田壮吉、末岡浩、吉村泰典、野澤志朗、加藤真吾「当院を受診した挙児希望 HIV serodiscordant couple の患者臨床背景と治療成績」第 57 回日本産科婦人科学会 (2005 年 4 月 2-5 日、京都)

5. 田中雄大、久慈直昭、加藤真吾、水澤友利、吉田宏之、岩橋和裕、田中守、浅田弘法、末岡浩、吉村泰典、野澤志朗、小松節子「ヒト卵子特異的 H1 タンパク (osH1) の発現と卵子内精子核膨張化における動態」第 57 回日本産科婦人科学会 (2005 年 4 月 2-5 日、京都)

6. 近藤真規子、嶋貴子、武部豊、加藤信吾、今井光信「Real-time PCR 法を用いた HIV-1 プロウイルス定量法—6 種類の HIV-1 サブタイプとプライマー、プローブの反応性の検討—」第 53 回日本ウイルス学会学術集会 (2005 年 11 月 20-22 日、熊本)

7. 西澤雅子、Urvi Pakikh、藤野真之、松田昌和、三浦秀佳、加藤真吾、山本直樹、杉浦互「ヒト末梢血単核球を用いた K65R 獲得 HIV-1 の逆転写酵素阻害薬に対する感受性の解析」第 19 回日本エイズ学会学術集会 (2005 年 12 月 1-3 日、熊本)

8. 花房秀次、小島賢一、木内英、大田未緒、和田育子、田中理恵、加藤真吾「HIV 感染者の精液所見と性感染防止策」第 19 回日本エイズ学会学術集会 (2005 年 12 月 1-3 日、熊本)

9. 田中理恵、花房秀次、木内英、根岸昌功、加藤真吾「LC-MS/MS による細胞内 EFV 濃度の検討」第 19 回日本エイズ学会学術集会 (2005 年 12 月 1-3 日、熊本)

10. 加藤真吾、田中理恵、根岸昌功、木内英、花房秀次、杉浦互「AZT は血漿中及び細胞内において確かに d4T に変換される」第 19 回日本エイズ学会学術集会 (2005 年 12 月 1-3 日、熊本)

11. 前田憲昭、加藤真吾、田中理恵、池田正一、樋口勝規、柿沢卓、泉福英信、宇佐美雄司「唾液中の HIV-RNA 測定法の評価」第 19 回日本エイズ学会学術集会 (2005 年 12 月 1-3 日、熊本)

12. 木内英、花房秀次、小島賢一、和田育子、大田未緒、加藤真吾、田中理恵、築地謙治「母子感染予防方の改善」第 19 回日本エイズ学会学術集会 (2005 年 12 月 1-3 日、熊本)

13. 加藤真吾、田中理恵、瀬尾麻美、林邦彦、今井光信「HIV-1 RNA 定量キットのコントロールサーベイ」第 19 回日本エイズ学会学術集会 (2005 年 12 月 1-3 日、熊本)

14. 近藤真規子、須藤弘二、田中理恵、嶋貴子、足立拓也、相楽裕子、岩室紳也、向出雅一、武部豊、加藤真吾、今井光信「各種サブタイプに対応できる Real-time PCR による HIV-1 プロウイルスの定量法の検討」第 19 回日本エイズ学会学術集会 (2005 年 12 月 1-3 日、熊本)

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

細胞内薬剤検出法に関する特許出願準備中

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

図1. 血漿濃度と細胞内EFV濃度の関係

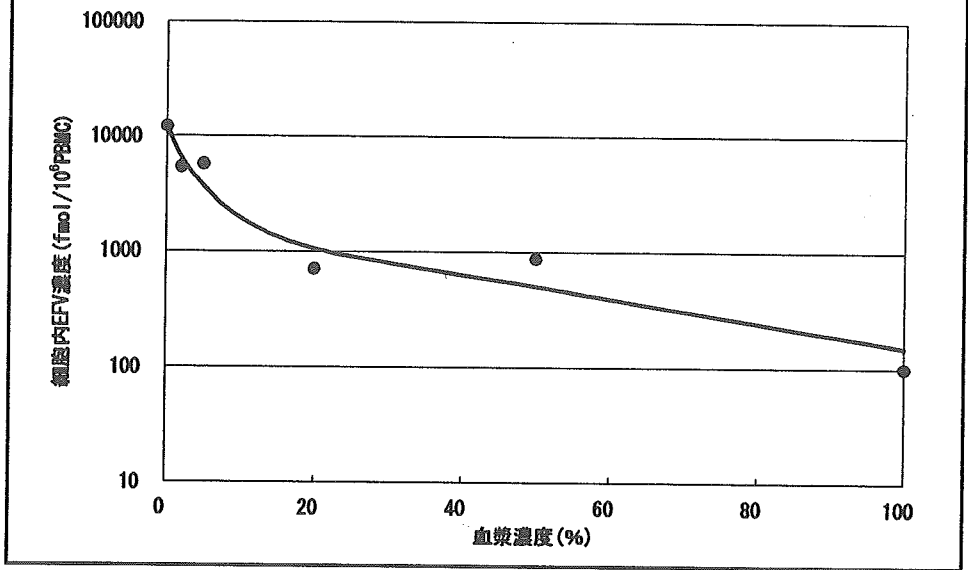
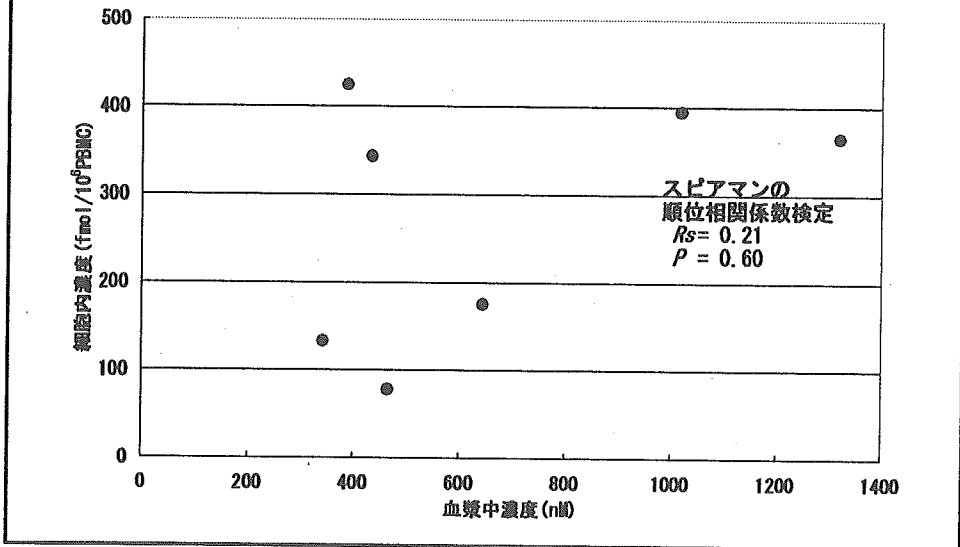


図2. 患者血液検体における血漿および細胞内EFV濃度の比較





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**

HIV-1 逆転写酵素の K103N 変異は最も重要な非核酸系逆転写酵素阻 (Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor :NNRTI) 耐性変異であるが、103 番のアミノ酸には polymorphism がある。未治療感染者由来の HIV-1 の 3.3% に K103R という polymorphism が認められた。R103N は 2 塩基置換が必要で、起こりにくい変異だと考えられる。NNRTI である efavirenz(EFV) でそれぞれ 3 回、耐性変異を誘導したところ、野生株では K103N が 2 回出現したが、K103R を持つ HIV-1 からは一度も認められず、3 回とも V179D が出現した。K103R は耐性変異ではなく、V179D も弱い EFV 耐性(1.6 倍)しか賦与しなかったが、K103R と V179D の両方をもつ HIV-1 は高度な EFV 耐性(10 倍)だった。治療前に存在する polymorphism によって、誘導される耐性変異が異なる可能性を示した。また、polymorphism そのものが耐性をもたらさなくても、他の変異と組み合わせることにより、高度耐性を生じ得ることが示された。

(倫理面への配慮)

**A. 研究目的**

HIV-1 逆転写酵素の K103N 変異は最も重要な NNRTI 耐性変異であるが、103 番のアミノ酸には polymorphism がある。この polymorphism の耐性変異出現への影響を解析する。

研究に参加していただいた患者様からは、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)。

**B. 研究方法**

未治療感染者の HIV-1 逆転写酵素遺伝子を解析し、認められた polymorphism を持つ組換え HIV-1 を作成。野生株の HIV-1 とともに、NNRTI 存在下でそれぞれ培養し、耐性 HIV-1 を誘導。新たに認められた変異を、更に組換え HIV-1 を作成し解析。

**C. 研究結果**

211 人の未治療 HIV-1 感染者由来の 3.3% の HIV-1 に K103R が認められた。R103N は 2 塩基置換が必要で、起こりにくい変異だと考えられる。NNRTI である efavirenz(EFV) でそれぞれ 3 回、耐性変異を誘導したところ、野生株では K103N が

2回出現したが、K103Rを持つHIV-1からは一度も認められず、3回ともV179Dが出現した。K103Rは耐性変異ではなく、V179Dも弱いEFV耐性(1.6倍)しか賦与しなかったが、K103RとV179Dの両方をもつHIV-1は高度なEFV耐性(10倍)だった。

#### D. 考察

polymorphismであるK103RからR103Nは、起こりにくい変異だと思われた。また、K103Rと、それ自身は弱い耐性しかもたらさないV179Dが共存することにより、高度なEFV耐性が生じた。

#### E. 結論

治療前に存在するpolymorphismによって、誘導される耐性変異が異なる可能性を示した。また、polymorphismそのものが耐性をもたらさなくても、他の変異と組み合わせることにより、高度耐性を生じ得ることを示した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

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.

**Gatanaga H**, Hachiya A, Kimura S, Oka S. Mutations other than 103N in human

immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase (RT) emerge from K103R polymorphism under non-nucleoside RT inhibitor pressure. *Virology* (in press)

**Gatanaga H**, Das D, Suzuki Y, Yeh DD, Hussain KA, Ghosh AK, Mitsuya H. Altered HIV-1 gag protein interactions with cyclophilin A (CypA) upon the acquisition of H219Q and H219P substitutions in the CypA binding loop. *J Biol Chem* (in press)

#### 2. 学会発表

潟永博之、山中ひかる、Pope Kosalaraksa、松岡佐織、岡慎一、木村哲. HIV逆転写酵素阻害薬 stavudine (d4T)による高乳酸血症患者に認められた新規 polymerase  $\gamma$  (POLG)変異の意義. 第102回内科学会総会・講演会 大阪. 4月, 2005.

潟永博之、土屋亮人、立川夏夫、照屋勝治、菊池嘉、源河いくみ、本田美和子、矢崎博久、田沼順子、上田晃弘、阿部泰尚、上平朝子、山本善彦、白阪琢磨、木村哲、岡慎一. Cytochrome P450 2B6 \*6/\*6 genotypeのHIV-1感染者に対する efavirenz の減量投与. 第79回感染症学会総会. 名古屋. 4月, 2005.

潟永博之. HIV/AIDSの臨床における最近の問題点: HAARTの長期毒性に関する研究. 第19回エイズ学会学術集会・総会 熊本. 12月, 2005.

瀧永博之. HIV感染症「治療の手引き」  
耐性変異の解釈と意義 Update. 第19  
回エイズ学会学術集会・総会 熊本.  
12月, 2005.

瀧永博之、立川夏夫、菊池嘉、照屋勝  
治、源河いくみ、本田美和子、田沼順  
子、矢崎博久、上田晃弘、阿部泰尚、  
横田恭子、恩田順子、木村哲、岡慎一.  
Tenofovir disoproxil fumarate 投与と尿中  
 $\beta$ 2-microglobulin. 第19エイズ学会学術  
集会・総会 熊本. 12月, 2005.

#### 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。

## 抗 HIV 薬の血中濃度に関する臨床研究

分担研究者 : 栗原健 (独立行政法人国立病院機構 大阪医療センター薬剤科)

研究協力者名 : 高田寛治<sup>1</sup>、杉岡信幸<sup>1</sup>、芝田信人<sup>2</sup>、加藤真吾<sup>3</sup>、上平朝子<sup>4</sup>、  
白阪琢磨<sup>4</sup>、吉野宗宏<sup>5</sup>、永井聡子<sup>5</sup>、平林義弘<sup>6</sup>、照屋勝治<sup>6</sup>、  
林田庸総<sup>6</sup>、中村哲也<sup>7</sup>、味澤篤<sup>8</sup>、今村顕史<sup>8</sup>、平島由香<sup>9</sup>

(<sup>1</sup> 京都薬科大学薬物動態学教室、<sup>2</sup> 同志社女子大学薬学部生物薬剤学教室、<sup>3</sup> 慶應義塾大学医学部微生物学・免疫学教室、<sup>4</sup> 独立行政法人国立病院機構大阪医療センター免疫感染症科、<sup>5</sup> 独立行政法人国立病院機構大阪医療センター薬剤部、<sup>6</sup> 国立国際医療センターエイズ治療研究開発センター、<sup>7</sup> 東京大学医科学研究所感染免疫内科、<sup>8</sup> 東京都立駒込病院感染症内科、<sup>9</sup> 東京都立駒込病院薬剤科)

### 研究要旨

① 研究班が設置したホームページは平成17年11月末現在、通算アクセス数3220、パスワード取得者116名。平成17年4月～平成17年11月までに研究班が(株)BML、(株)第一化学に委託し測定した検体の測定件数は779件、26施設からの利用があった。件数の内訳はTDF:202、ATV:184、RTV:144、EFV:100、LPV:85、FPV:44、NFV:12、APV:7、IDV:1であった。

② フマル酸テノホビル・ジソプロキシル (TDF) の血中濃度を測定し、血中クレアチニン (Cr) 値との関係について検討した結果、Cr値変化量はTDFトラフ値測定症例の80%で上昇し、平均 $0.09 \pm 0.11$ mg/dLの上昇がみられた。

③ 硫酸アタザナビル (ATV) を服用し7日間以上経過した患者67名を対象に、服用直前のトラフ値を測定し、血中濃度トラフ値の検討を行うと共に、ATV血中濃度と総ビリルビン値の関係について検討を行った。ATVのトラフ値は、ATV400群で $259 \pm 285$ ng/mL、ATV300/RTV100群では $833 \pm 604$ ng/mLであり、RTV併用群が高値を示した。ATV血中濃度 850ng/mLを超える群と850ng/mL以下群とを比較したところ、850ng/mLを超える群でT-BIL値に有意な差を認めた。

④ ATV血中濃度が低値を示した患者を対象に、胃酸を測定したところ3例中2例に低酸症を認めた。RTVを加えたところ、良好な血中濃度を得ることが出来た。

### A. 研究目的

プロテアーゼ阻害剤 (PI)、非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤 (NNRTI) は HIV 感染症治療薬として広く使われ、めざましい改善をもたらした薬剤である。しかし、PI や NNRTI の体内動態は、主に海外から報告されたもので、日本人でのデータが限られていることが問題とされている。また、近年発売されている抗 HIV 薬は、すべて希少

疾病用医薬品として迅速承認の対象となっており、国内での治験を行わずに承認されている。本研究ではこれら抗 HIV 薬の薬物動態について調査・検討し、日本人 HIV 感染症患者における抗 HIV 薬の血中濃度の推移について確認し、より適切な治療が行えるよう血中濃度測定に必要なデータを収集することで、抗 HIV 療法の治療効果を高めることを目的とする。また、抗 HIV 薬の組

み合わせは近年、多岐に渡っており、薬剤の組み合わせによる相互作用情報や血中濃度に関する情報は少ないことから、抗 HIV 薬の相互作用情報を収集し、データベースを作成し情報を提供する必要がある。

抗 HIV 薬の血中濃度測定は、HPLC 等高度な専門機器や高度な専門知識を有する人材が必要であることから、一般診療を行う施設での測定が難しい。国内の臨床医が簡便に、かつ無料で血中濃度測定を行えるよう、ホームページを利用した血中濃度測定システムを構築・供給し、抗 HIV 療法の治療効果を高めることを目的とする。

また今年度は、1 日 1 回投与の中心的役割を担う新薬、ATV・TDF を中心に臨床データを収集することを目的とした。

#### 1. 研究班のホームページ (HP) について

研究班のホームページ (図 1) を開設し、国内で HIV 感染症治療を行う医師を対象として血中濃度測定が容易に測定できるシステムを開発し、血中濃度の臨床応用を可能にすると共に、血中濃度のデータを広く収集することを目的とした。

#### 2. フマル酸テノホビル・ジソプロキシル (TDF) の血中濃度とクレアチニンの関係について (大阪医療センター)

TDF が承認され、TDF を含む 1 日 1 回処方 HAART 導入例が増加した。TDF の副作用には重篤な腎機能障害が報告されている。腎機能障害患者に対する投与方法は示されているものの、正常な腎機能患者への影響については情報が不足している。TDF の血中濃度を測定し、血中クレアチニン値 (以下 Cr) との関係について検討した。

#### 3. 硫酸アタザナビル (ATV) の至適血中濃度の検討について (大阪医療センター)

ATV は 1 日 1 回投与が可能なプロテアー

ゼ阻害剤である。本剤は食事や薬物相互作用の影響を受けるため、血中濃度モニタリングが重要である。副作用や耐性獲得を防止するためにも至適領域の血中濃度を維持することが求められる。ATV のトラフ濃度に関する検討を行い、また ATV 血中濃度と総ビリルビン値の関係について検討を行った。

#### 4. ATV の血中濃度と胃酸に関する検討 (都立駒込)

RTV 併用例と非併用例の ATV 血中濃度を調査・検討し、さらに ATV 血中濃度が低値を示した患者を対象に胃酸濃度を測定し検討を加えた。

### B. 研究方法

#### 1. 研究班のホームページ (HP) について

研究班のホームページ (図 1) を利用した血中濃度測定は、平成 13 年 7 月から運用を開始した。システムは次の通り。血中濃度測定を希望する医師は氏名、所属施設等を HP に入力し ID、パスワードを取得する。測定希望薬剤名、本数等を入力し送信すると、(株)BML より測定依頼伝票、採血管等が送付される。研究班事務局からは調査用紙等が送付される。医師は患者血液を採取後検体を(株)BML に送る。同時に調査用紙を研究班事務局に郵送。結果は(株)BML より医師・研究班事務局あて郵送される。ATV は(株)第一化学薬品に委託し測定を行った。

#### 2. フマル酸テノホビル・ジソプロキシル (TDF) の血中濃度とクレアチニンの関係について (大阪医療センター)

2004 年 8 月から 2005 年 10 月までに大阪医療センター免疫感染症科を受診した患者の内、TDF を投与された 55 例 (男性: 55 例、女性: 0 例) を対象とした。なお本研究では、医師がアドヒアランス良好ではな

いと診断した患者並びに、TDF との相互作用の可能性が報告されている薬剤を服用している患者、腎疾患のある患者を対象外とした。対象患者の TDF トラフ値を測定。LPV/r 併用群と ATV/r 併用群について、TDF のトラフ値を比較、さらに投与開始前後の Cr 値変化量 ( $\Delta Cr$ ) を LPV/r 併用群と、ATV/r 併用群について比較・検討した。また、TDF トラフ値と投与開始前後の Cr 値の変化についても検討した。

### 3. 硫酸アタザナビル(ATV)の至適血中濃度の検討について (大阪医療センター)

2004年6月から2005年10月までに大阪医療センター免疫感染症科を受診した患者の内、ATVが投与され、7日以上経過した患者67例(男性:67例、女性:0例)を対象とした。服用直前の血中トラフ値を測定し検討を行った。また、併用された RTV についても同様に検討した。ATV 血中濃度と総ビリルビン値について調査し検討を加えた。

### 4. ATV の血中濃度と胃酸に関する検討 (都立駒込)

都立駒込病院感染症科に通院する患者23例を対象に ATV の血中濃度を測定した。PPI、H2 ブロッカーが投与されている患者、胃切除等の既往のある患者は対象外とした。23例の内訳は ATV/RTV 群(300mg/100mg)が18例、ATV 群(400mg)5例であった。ATV/RTV 群では TDF 併用が11例、TDF 非併用例が7例であった。ATV 群は5例とも TDF の併用は行わなかったが、内3例は RTV 併用に変更した。ATV 血中濃度測定ポイントは、外来患者の場合、投与前、1, 2, 4, (6)とし、入院患者の場合は、投与前、1, 2, 4, 6, 12, 24 とした。胃液 pH 測定は食前・ATV 内服前の胃液を採取した。pH 測定方法は標準 pH 溶液で校正後、pH メーター(型式

:Quattro MP225、メトラー・トレド株式会社製)の電極を試料中に入れて測定を行った。

### C. 研究結果

1. 研究班のホームページ(HP)について  
研究班ホームページの運用状況は、平成17年11月末現在、通算アクセス数3220、パスワード取得者116名。平成17年4月~平成17年11月までに研究班が(株)BML、(株)第一化学に委託し測定した検体の測定件数は779件、26施設の利用があった。件数の内訳は TDF:202、ATV:184、RTV:144、EFV:100、LPV:85、FPV:44、NFV:12、APV:7、IDV:1 であった。今年度研究班を利用した施設は26施設であった(大阪医療センター、石川県立中央病院、愛媛大学病院、大久保病院、荻窪病院、九州医療センター、熊本大学病院、群馬大学病院、公立昭和病院、国立国際医療センター、国立東埼玉病院、慈恵医大病院、順天堂大学病院、市立堺病院、仙台医療センター、東京大学医科学研究所附属病院、東邦大大森病院、都立駒込病院、長崎大学病院、新潟市民病院、新潟大学病院、兵庫医大病院、広島市民病院、広島大学病院、藤枝市立総合病院、北海道大学病院)。血中濃度測定件数の年度別推移と薬剤別血中濃度測定件数の年度別推移は図2、3の通り。

### 2. フマル酸テノホビル・ジソプロキシル(TDF)の血中濃度とクレアチニンの関係について (大阪医療センター)

TDF トラフの平均値(mean $\pm$ SD)は、89.5 $\pm$ 35.8ng/mLであった(図4)。LPV/r 併用群の TDF トラフ値は 109.6 $\pm$ 47.7ng/mL。ATV/r 併用群のトラフ値は 84.6 $\pm$ 32.0ng/mL であった(図5)。Cr 値変化量は TDF トラフ値測定症例の80%で上昇し、平均(mean $\pm$ SD) 0.09 $\pm$ 0.11mg/dL の上昇がみられた(図6)。Cr 値変化量の大きいものほど、

TDFトラフ値は高い傾向が見られた(図7)。

### 3. 硫酸アタザナビル(ATV)の至適血中濃度の検討について(大阪医療センター)

ATVのトラフ値は、ATV400群 259 ± 285ng/mL、ATV300/RTV100群 833 ± 604ng/mLであった(図8)。ATVのトラフ値は、ATV300/RTV100群において、TDF併用群の方が他の併用群に比べ低い傾向を示した(図9)。ATVとRTVの血中濃度に有意な相関を認めた(図10)。ATV血中濃度トラフ値 850ng/mLより低値群と高値群との間で、T-BIL値に有意な差を認めた(図11)。

### 4. ATVの血中濃度と胃酸に関する検討(都立駒込)

RTVを併用した症例(n=18)のATV血中濃度とTDFによる影響は、図12に示すとおりTDF併用群に高い傾向が見られた。ATVの製品概要に示されたデータと今回実施した結果を比較したところ(表1)、その比は、Cmax (ng/mL) 0.96、AUC (ng・hr/mL) 1.81、Cmin (ng/mL) 2.05、Tmax (hr) 2.15、T1/2 (hr) 1.43であった。RTVを併用していない患者(n=5)のデータは図13のとおり。5例中3例(内2例は低酸症患者)に対しRTVを併用したところ、血中濃度は上昇した(図14)。RTV併用例全例と低酸症患者(pH=6.82)を比較したところ、血中濃度の低下が認められた(図15)。

## D. 考察

### 1. 研究班のホームページ(HP)について

今年度、研究班のホームページを利用した血中濃度測定は新薬の登場を受けて増加傾向にあり、測定依頼はTDF・ATVが中心であった。新薬の治療効果を確実にするために、本研究班が提供する血中濃度測定システムは、有用な臨床データの提供を行っ

たものと思われた。複数のPIを組み合わせたHAARTにおける血中濃度の確認等の利用も見られた。臨床医が容易に血中濃度測定にアクセスできたことで、抗HIV療法の治療効果を高め、副作用の軽減に寄与したものと思われた。

### 2. フマル酸テノホビル・ジソプロキシル(TDF)の血中濃度とクレアチニンの関係について(大阪医療センター)

TDFトラフ値と同様、Cr値変化量も上昇傾向を示した。これはTDF血中濃度の測定が腎機能障害を予測する上で重要であることを示すものと思われた。LPV/r併用群、ATV併用群共に、投与前後Cr値変化量に有意な差は認められなかったものの上昇傾向が認められた。また、LPV/r併用群はATV併用群に比べTDF血中濃度トラフ平均値が高値を示したことから、腎機能への影響について、注意深く観察する必要があると思われた。今後、症例を重ね、TDF血中濃度とCr値の変化についてさらに検討を加える必要がある。

### 3. 硫酸アタザナビル(ATV)の至適血中濃度の検討について(大阪医療センター)

今回の研究結果から、日本人におけるATVトラフ値は、海外データと類似しているものと考えられた。海外での報告のとおり、日本人においても、RTVを併用することにより、ATV血中濃度は上昇した。薬剤耐性の獲得を防止するためにも血中濃度をモニタリングし、至適領域を維持することが必要であると思われた。高ビリルビン血症の要因として、ATVがUGTの阻害や、人種による遺伝子多型が影響すると報告されているが、今回の研究でも先行研究と同じく、血中濃度との関係が認められた。また、日本人においても、ATVの血中濃度850ng/mL以下が、T-BIL値に影響を及ぼさ

ない至適濃度であることが示唆された。

#### 4. ATV の血中濃度と胃酸に関する検討 (都立駒込)

TDF を併用すると、ATV の血中濃度は低下することが知られている。本研究では TDF 併用群に ATV 血中濃度が高い傾向が見られた。調査を行った対象群は、ATV 血中濃度の低値を示した患者が中心であったため、一般に見られる薬物動態とは逆の結果を得たものと考えられた。RTV 併用群は ATV400mg 群と比較し、平均 C<sub>min</sub> と AUC は上昇し、C<sub>max</sub> は不変であった。胃液 pH の高かった（低酸）2 例を含む 3 症例に対し、RTV 併用を行ったところ目標トラフレベルに達していた。ATV は pH1.9~3 を境に ATV の溶出は急激に上昇する（表 2）。低酸症患者に ATV を投与した場合、十分な溶出が行われないため、十分な血中濃度が得られない可能性のあることが示唆された。低酸症患者が存在する可能性を考慮し、HAART 未治療患者における開始時であっても RTV 併用が必要であると考えられた。

#### E. 結論

抗 HIV 薬の血中濃度を測定するシステムと、相互作用情報を含む薬剤情報の提供で、より適切で安全な HIV 診療に貢献できたものとする。今年度は新薬の血中濃度について検討した。今後さらに臨床データを蓄積し、日本人における薬物動態を検討し、臨床へのフィードバックを行うことが重要と考える。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

学会発表

○永井聡子, 他. 熊本: 第 19 回日本エイズ学会学術集会・総会; 12 月. 2005. 抄録番号 247

号 247

○吉野宗宏, 他. 熊本: 第 19 回日本エイズ学会学術集会・総会; 12 月. 2005. 抄録番号 152

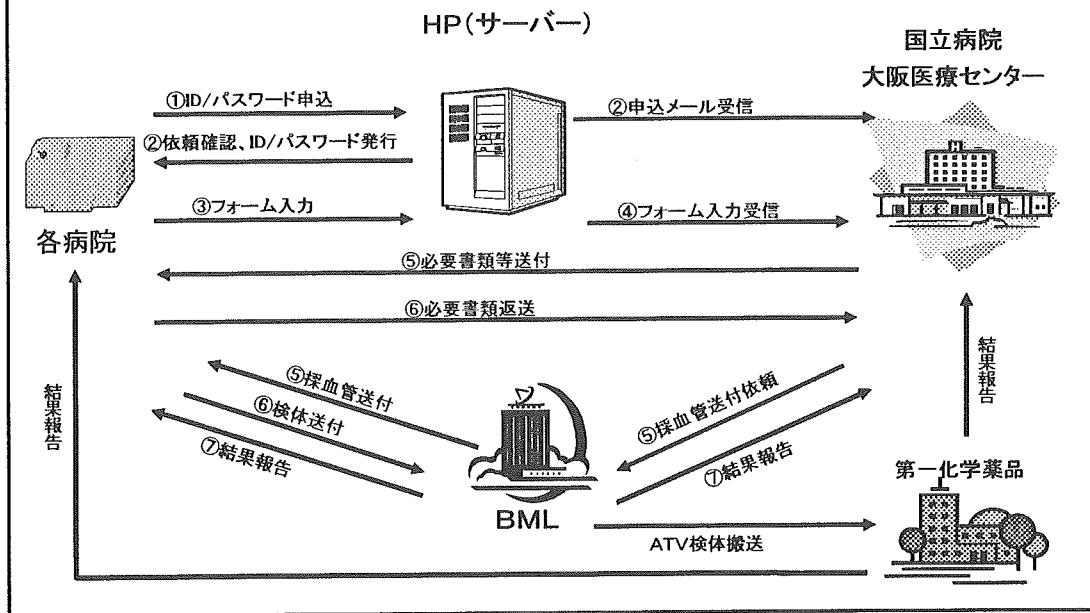
○今村顕史, 他. 熊本: 第 19 回日本エイズ学会学術集会・総会; 12 月. 2005. 抄録番号 157

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

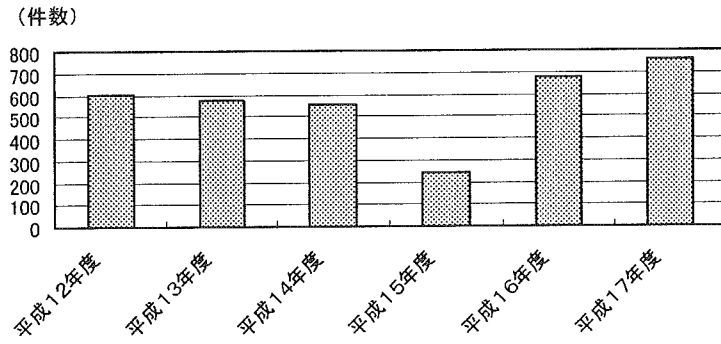
該当なし



(図1) 依頼から結果報告までの流れ



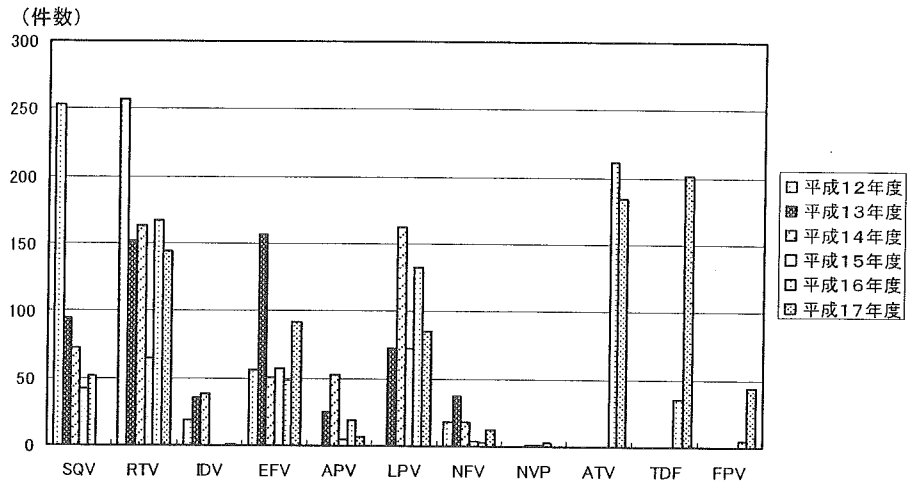
(図2) 血中濃度測定件数の推移



註) 平成17年度は平成17年11月25日までの件数

(図3)

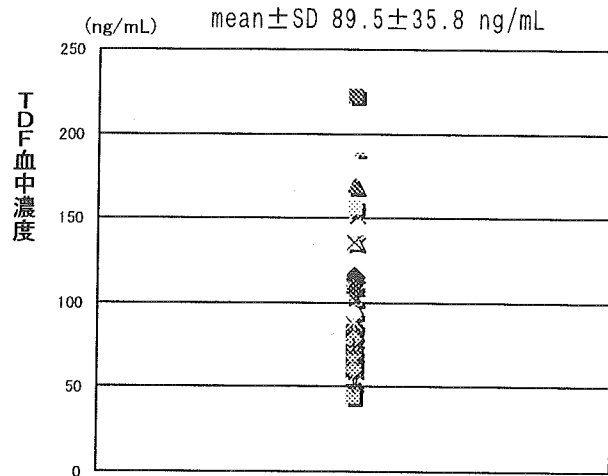
### 薬剤別血中濃度測定件数の推移



註)平成17年度は平成17年11月25日までの件数

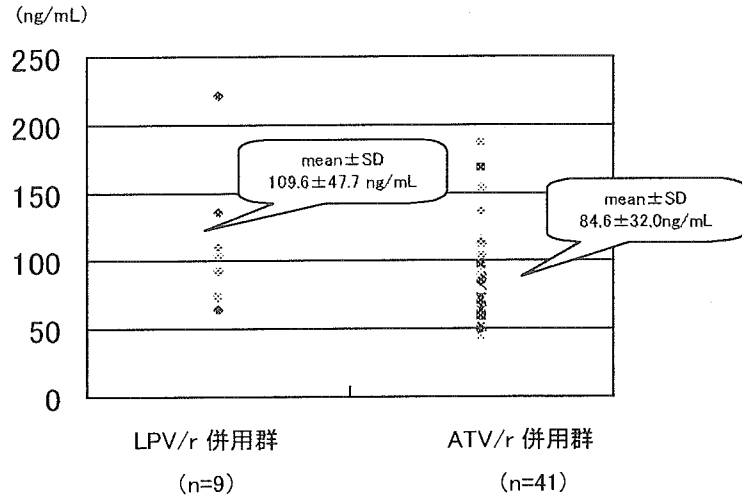
(図4)

### TDF血中濃度 (n=55)



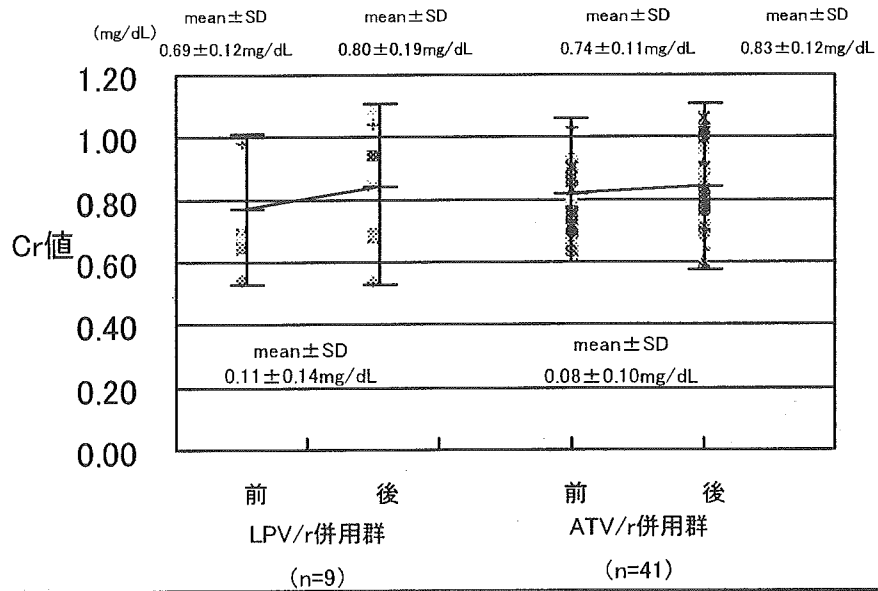
(図5)

### LPV/r 併用群とATV/r 併用群の TDF血中濃度の推移



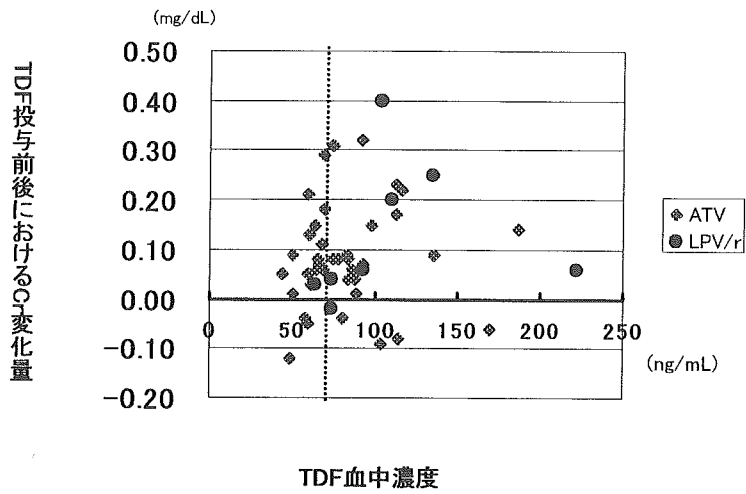
(図6)

### LPV/r 併用群とATV/r 併用群の TDF投与前後におけるCr値と変化量



(図7)

### 血中TDFトラフ濃度と血中Cr変化量との関係



(図8)

### ATV血中濃度

