

7. Rinse the slides in PBS (3 min, three times).
8. Dehydrate the slides in absolute ethanol and then store at -20°C until use.

3.1.2. Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissue Sections

1. Place a 4- to 5- μm section onto a slide. Heat the slide to melt the paraffin in a 60°C oven for 15 min and dry at 37°C overnight.
2. Deparaffinize sections in fresh xylene (3 min, three times) and rehydrate in graded (100, 100, 95, 90, and 70%) ethanols and autoclaved water.

3.2. Pretreatment

3.2.1. CD4-Positive T-Lymphocyte Smears

1. Immerse the slides in autoclaved water for 5 min.
2. Immerse the slides in preheated target retrieval solution for 40 min at 95°C , and allow to cool for 20 min.
3. Wash the slides in autoclaved water (1 min, three times).
4. Immerse the slides in methanol containing 0.3% H_2O_2 for 20 min.
5. Wash the slides in autoclaved water for 1 min.
6. Briefly immerse slides in 95% ethanol and allow to air dry.

3.2.2. Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissue Sections

1. Immerse the slides in autoclaved water for 5 min.
2. Immerse the slides in preheated target retrieval solution for 40 min at 95°C and allow to cool for 20 min.
3. Wash the slides in autoclaved water (1 min, three times).
4. Digest sections with proteinase K for 10 min at room temperature (*see Note 3*).
5. Wash the slides in autoclaved water (1 min, three times).
6. Treat the slides with methanol containing 0.3% H_2O_2 for 20 min.
7. Wash the slides in autoclaved water for 1 min.
8. Briefly immerse the slides in 95% ethanol and allow to air-dry.
9. Mark the area of the section with a wax pen.

3.3. Preparation of PNA Probe

1. Dilute FITC-conjugated PNA probe in hybridization solution to a final concentration of between 0.2 and 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
2. Apply 25 μL of hybridization solution containing PNA probe to the marked area of the slide.
3. Carefully apply the cover slip, avoiding the introduction of air bubbles.

3.4. Heat Denaturation

1. Heat the slides at 93°C for 5 min on a hotplate to denature the double-stranded DNA.

3.5. Hybridization

1. Incubate the slides with the PNA probe at 45°C for 60–90 min in a moist chamber.
2. After hybridization, immerse the slides in TBST and gently remove the cover slips.

3. Wash the slides in prewarmed stringent wash solution at 57°C (20 min, twice).
4. Immerse the slides in TBST at room temperature for 5 min.

3.6. PNA Probe Detection by CSA (see Notes 4 and 5; Fig. 1)

1. Incubate HRP-conjugated rabbit anti-FITC antibody (1:500 dilution) for 60 min (see Note 6).
2. Wash the slides in TBST (3 min, three times).
3. Incubate biotinyl-tyramide for 15 min.
4. Wash the slides in TBST (3 min, three times).
5. Incubate HRP-conjugated streptavidin (1:600–800 dilution) for 15 min.
6. Wash the slides in TBST (3 min, three times).
7. Incubate biotinyl-tyramide for 15 min.
8. Wash the slides in TBST (3 min, three times).
9. Incubate 0.5 µg/mL Alexa Fluor 488-labeled streptavidin for 15 min in the absence of light.
10. Wash the slides in TBST in the absence of light (3 min, three times).
11. Immerse the slides in distilled water.
12. Apply DAPI II and mount cover slip.

3.7. Fluorescence Microscopy

The slides were examined under a fluorescence microscope (BX50 and BX-FLA, Olympus Corp., Tokyo, Japan) equipped with appropriate filter sets (61002, Chroma Technology Corp., Rockingham, VT). Photographic images of the fluorescent signals were taken with a CCD camera (SenSys 0400, Photometrics Ltd., Tucson, AZ) and were uploaded to a microcomputer using IPLab software (Scanalytics, Inc., Fairfax, VA). The stored images were merged to reveal various aspects (see Note 7; Fig. 2).

3.8. Subsequent Determination of Phenotypes After PNA-ISH Treatment

We describe here a double staining method by PNA-ISH and IHC methods for the detection of both HIV-1 DNA and a protein in the same cell, respectively. Proteins can be detected with one of two methods with IHC: an indirect method and a labeled streptavidin-biotin (LSAB) method. For the detection of CD4 or HLA-DR molecules, the conventional indirect method was used. On the other hand, the LSAB method that has higher sensitivity than the indirect method was performed to detect the p24 HIV-1 capsid protein.

Fig. 1. (*opposite page*) Schematic representation of the procedures for using the PNA-probe in the ISH method. The hybridized probe was detected by sequential reactions of the following antibodies and reagents: HRP-conjugated anti-FITC antibody, biotinylated tyramide (first amplification), HRP-labeled streptavidin, biotinylated tyramide (second amplification), and streptavidin-conjugated Alexa 488.

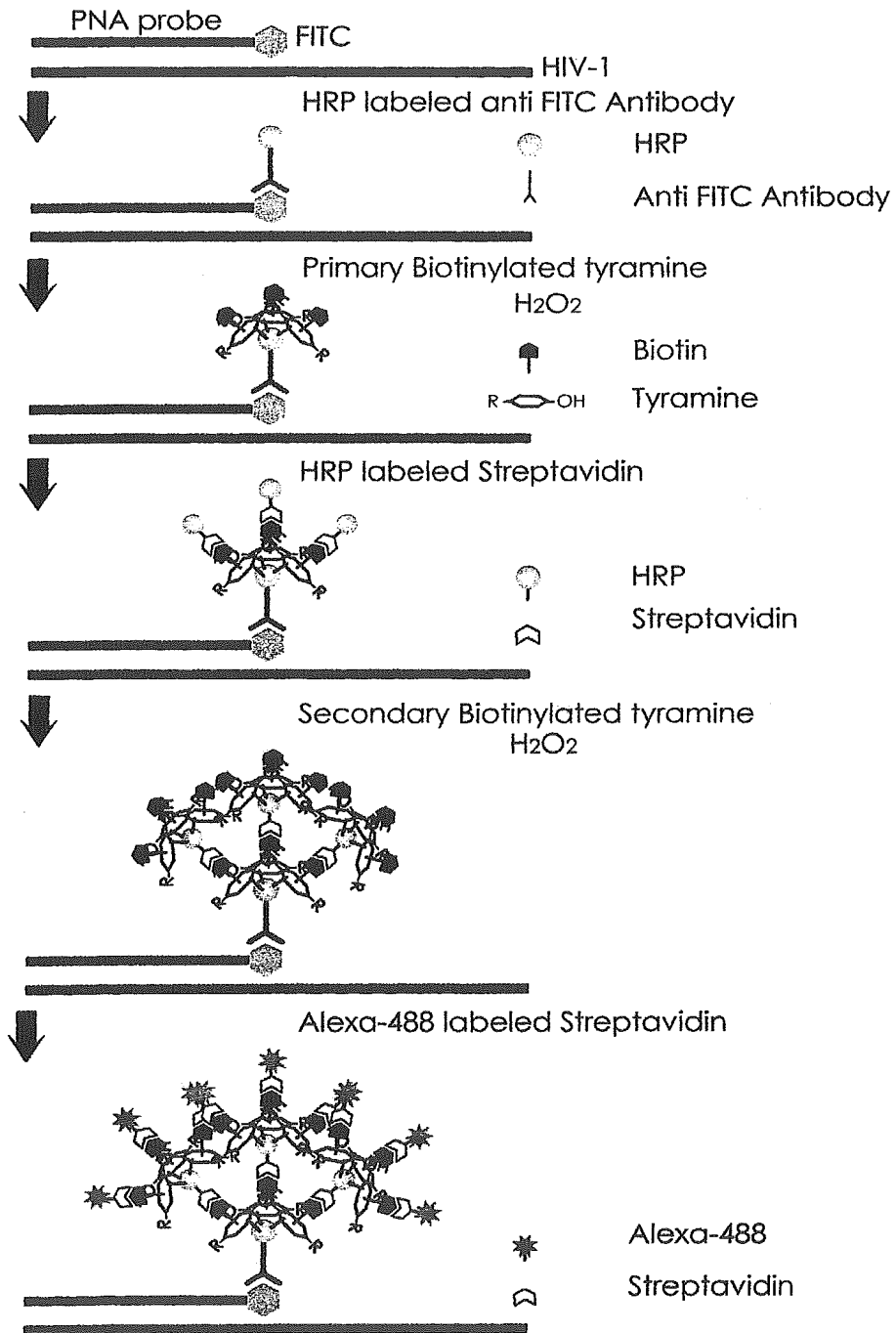


Fig. 1

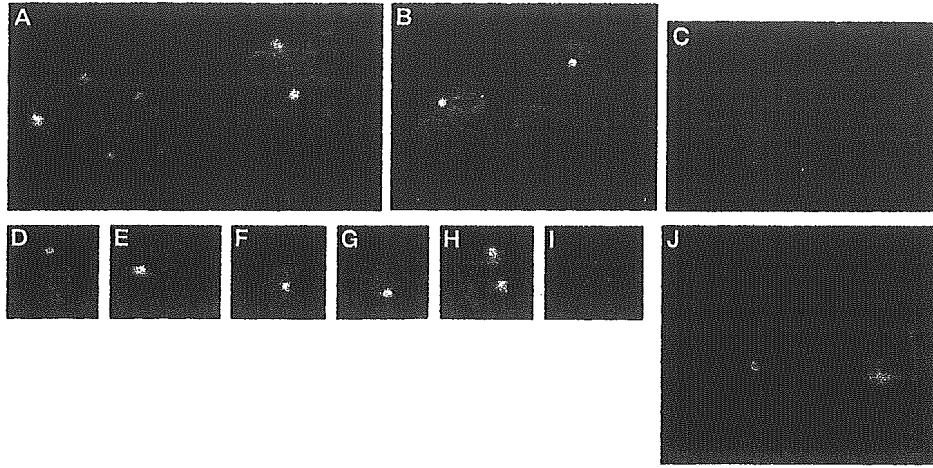


Fig. 2. Detection of HIV-1 provirus by PNA-ISH. Signals detecting HIV-1 proviruses were observed as green dots in a nucleus stained blue by DAPI. (A) MOLT4-III B. One to four proviruses per cell. (B) ACH2. One provirus per cell. (C) Negative control (MOLT4). No provirus. (D-H) CD4-positive T lymphocytes from HIV-1-infected patients. Most provirus-positive cells contained one provirus. Positive cells rarely contained more than two proviruses. (I) Negative control (CD4-positive T lymphocytes from a HIV-1-negative volunteer). No provirus. (J) Paraffin-embedded section of bone marrow from an AIDS patient. Positive cells contained one provirus in a nucleus.

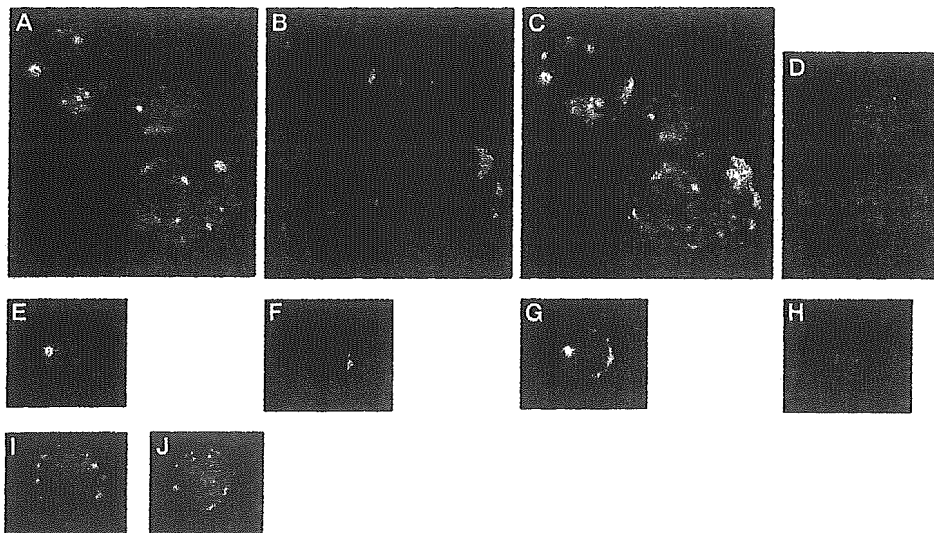


Fig. 3. Subsequent determination of phenotypes after PNA-ISH treatment. Proteins were stained red and localization of the proteins can be observed. (A-C) p24/HIV-1 provirus of MOLT4-III B. (D) Negative control (MOLT4). (E-G) p24/provirus. (H-I) p24/provirus. (J) p24/provirus.

3.8.1. PNA–ISH and IHC (Indirect Method)

1. Follow **steps 1–10** inclusive for PNA Probe Detection by CSA (**Subheading 3.6.**).
2. Incubate with mouse anti-human CD4 monoclonal antibody or mouse anti-human HLA-DR monoclonal antibody at 4°C overnight.
3. Wash in TBST (3 min, three times).
4. Incubate with Alexa Fluor 594-labeled goat anti-mouse IgG antibody for 30 min.
5. Wash in TBST (3 min, three times).
6. Apply DAPI II and mount a cover slip.

3.8.2. PNA–ISH and IHC (LSAB Method)

Biotin blocking of biotinyl-tyramide after PNA–ISH staining is recommended before the reaction with primary antibody for the target protein.

1. Follow **steps 1–10** inclusive for PNA Probe Detection by CSA (**Subheading 3.6.**).
2. Incubate with avidin for 10 min.
3. Wash in TBST (3 min, three times).
4. Incubate with biotin for 10 min.
5. Wash in TBST (3 min, three times).
6. Incubate with mouse monoclonal anti-HIV-1 p24 antibody at 4°C overnight.
7. Wash in TBST (3 min, three times).
8. Incubate with biotinylated goat anti-mouse Ig antibody for 30 min.
9. Wash in TBST (3 min, three times).
10. Incubate with Alexa Fluor 594-labeled streptavidin for 15 min.
11. Wash in TBST (3 min, three times).
12. Apply DAPI II and mount a cover slip.

3.8.3. Fluorescence Microscopy of Double-Stained Sample

The slides were examined under a fluorescence microscope with appropriate filter sets. Photographic images of the fluorescent signals were taken with a CCD camera, and were uploaded to a microcomputer using IPLab software. The stored images were merged to reveal various aspects (**Fig. 3**).

Fig. 3. (continued from opposite page) of CD4-positive T lymphocytes from HIV-1-infected patients. (**H**) Negative control (CD4-positive T lymphocytes from a HIV-1-negative volunteer). (**A,E**) provirus (green) and nucleus (blue) were merged. (**B,F**) p24 (red). p24 HIV-1 capsid proteins were observed in the cytoplasm of HIV-1 provirus positive cells. (**C,G**) provirus (green), p24 (red) and nucleus (blue) were merged. (**I,J**) CD4-positive T lymphocytes from a HIV-1-infected patient; HIV-1 provirus (green) was seen in the cell nucleus. In contrast, CD4 molecules (red) were seen in the outer-membrane (**I**) Membrane-bound or cytoplasmic HLA-DR molecules (red) were detected in HIV-1 provirus positive cells (**J**).

4. Notes

1. The base sequence corresponds to the region from 1379 to 1397 of the HIV-1 gag gene. As the melting temperature of the anti-parallel probe is higher than that of the parallel, the use of anti-parallel type is recommended. PNA probe can be dissolved with DEPC-treated water to a concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, aliquotted, and stored at -20°C . A 0.01% trifluoroacetic acid can be replaced instead of water.
2. Wear gloves throughout the steps until the hybridization step is completed. Use the dry-sterilized glassware equipment and those made by stainless steel (200°C , 2 h). Use autoclaved water (121°C , 15 min) through the hybridization step.
3. To obtain an optimal concentration of proteinase K, treat fixed specimens with three different concentrations between 2 and 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of the enzyme.
4. This amplification method is based on the binding reaction of biotinylated tyramine to a phenol derivatives of a protein by peroxidase. This step sometimes gives nonspecific signals, therefore thorough pretreatment of specimens with methanol containing 0.3% H_2O_2 is essential to diminish the endogenous peroxidase activity. Also, it is important to stain two kinds of negative control to allow the identification of nonspecific signals: (1) HIV-1 DNA negative-specimen with a PNA probe and (2) HIV-1 DNA positive-specimen without a PNA probe (Fig. 1).
5. A single amplification method was successfully applied for HIV-1 RNA detection (16).
6. Considerable amounts of endogenous biotin is contained in liver, kidney, mucosa of digestive tract, and brain. Even in other organs, endogenous biotin becomes exposed through an activation step (see Subheading 3.2.2., steps 2 and 4). A biotin blocking of the endogenous biotin is recommended between the steps of stringent wash and HRP-FITC antibody reaction. Biotin blocking system (DakoCytomation A/S, X0590): (1) Incubate with avidin solution for 10 min, (2) wash in TBST three times for 3 min, (3) Incubate with biotin solution for 10 min, (4) wash in TBST three times for 3 min.
7. To measure the positivity of HIV-1 provirus in the CD4-positive T lymphocytes, we count 500 cells and calculate. The positivity of the HIV-1 provirus among 62 HIV-1-infected patients ranged between 0.3% and 7.9% (average of 2.7).

References

1. Webb, G. C. (2000) Radioactive *In situ* hybridization to animal chromosomes, in *In Situ Hybridization Protocols* (Darby, I. A., eds.), Humana Press, Totowa, NJ, pp. 29–50.
2. Smith, P. D., Fox, C. H., Masur, H., Winter, H. S., and Alling, D. W. (1994) Quantitative analysis of mononuclear cells expressing human immunodeficiency virus type 1 RNA in esophageal mucosa. *J. Exp. Med.* **180**, 1541–1546.
3. Brodie, S. J., Lewinsohn, D. A., Patterson, B. K., et al. (1999) *In vivo* migration and function of transferred HIV-1-specific cytotoxic T cells. *Nat. Med.* **5**, 34–41.

4. Fox, C. H., Kotler, D., Tierney, A., Wilson, C. S., and Fauci, A. S. (1989) Detection of HIV-1 RNA in the lamina propria of patients with AIDS and gastrointestinal disease. *J. Infect. Dis.* **159**, 467–471.
5. Haase, A. T., Retzel, E. F., and Staskus, K. A. (1990) Amplification and detection of lentiviral DNA inside cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 4971–4975.
6. Wittung, P., Nielsen, P. E., Buchardt, O., Egholm, M., and Norden, B. (1994) DNA-like double helix formed by peptide nucleic acid. *Nature* **368**, 561–563.
7. Jensen, K. K., Orum, H., Nielsen, P. E., and Norden, B. (1997) Kinetics for hybridization of peptide nucleic acids (PNA) with DNA and RNA studied with the BIAcore technique. *Biochemistry* **36**, 5072–5077.
8. Nielsen, P. E. (2002) PNA Technology, in *Peptide Nucleic Acids: Methods and Protocols* (Nielsen, P. E., eds.), Humana Press, Totowa, NJ, pp. 3–26.
9. Demidov, V. V., Yavnilovich, M. V., Belotserkovskii, B. P., Frank-Kamenetskii, M. D., and Nielsen, P. E. (1995) Kinetics and mechanism of polyamide ('peptide') nucleic acid binding to duplex DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 2637–2641.
10. Egholm, M., Buchardt, O., Christensen, L., et al. (1993) PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules. *Nature* **365**, 566–568.
11. Williams, B., Stender, H., and Coull, J. M. (2002) PNA Fluorescent *In Situ* Hybridization for Rapid Microbiology and Cytogenetic Analysis, in *Peptide Nucleic Acids: Methods and Protocols* (Nielsen, P. E., eds.), Humana Press, Totowa, NJ, pp. 181–193.
12. Nuovo, G. J. (2000) *In Situ* Localization of PCR-Amplified DNA and cDNA, in *In Situ Hybridization Protocols* (Darby, I. A., eds), Humana Press, Totowa, NJ, pp. 217–238.
13. King, G., Payne, S., Walker, F., and Murray, G. I. (1997) A highly sensitive detection method for immunohistochemistry using biotinylated tyramine. *J. Pathol.* **183**, 237–241.
14. Tani, Y. (1999) PCR in situ amplification and catalyzed signal amplification: approaches of higher sensitive, non-radioactive in situ hybridization. *Acta. Histochem. Cytochem.* **32**, 261–270.
15. Murakami, T., Hagiwara, T., Yamamoto, K., et al. (2001) A novel method for detecting HIV-1 by non-radioactive in situ hybridization: application of a peptide nucleic acid probe and catalysed signal amplification. *J. Pathol.* **194**, 130–135.
16. Nakajima, N., Ionescu, P., Sato, Y., et al. (2003) *In situ* hybridization AT-tailing with catalyzed signal amplification for sensitive and specific in situ detection of human immunodeficiency virus-1 mRNA in formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *Am. J. Pathol.* **162**, 381–389.

特集：アジアのエイズ

インド、エイズ流行におけるリオリेंट

India, Re-Orient in AIDS Epidemic

山本直彦

Naohiko YAMAMOTO

名古屋大学大学院医学系研究科・環境医動物学

Department of Medical Zoology, Nagoya University Graduate School of Medicine

1. はじめに

近年のインド・中国のすさまじい発展の現象は、歴史が再び東に向かっている“リオリेंट（再東方志向）”とも評されている。この言葉を借りるならば、エイズ流行のアジアへの潮流は、まさにこの“リオリेंट（再東方志向）”現象といえる。その中国と並んで、いま最も経済成長率の高い市場として期待されているインドは、東洋と西洋とを共に包み込んでいる人口約10億8,000万人の大国である。その新たな経済大国は、同時にHIV感染者・エイズ患者が年々増加するエイズ大国でもある。このエイズ大国インドで今何が起きているのか、述べてみたい。

2. 拡大するHIV流行の現状

他のアジア諸国同様、インドにおいても国全体のHIV感染率は、アフリカなどにおける他の地域に比べれば低い。しかし、10億8,000万人という極めて大きな人口を抱えているため、国としての陽性率が低くても、多くの人々がHIVに感染している。図1に示すように、インド全体のHIV陽性率は0.9%であるが、感染者数は、陽性率が20%を超えている南アフリカと同程度である。このように陽性率だけでは現実を知ることが困難であり、特定の州や県に広がる地域の流行の深刻さを見えにくくしている。インドの成人の陽性率は1%に満たないが、ナマカル地区やチュラチャンドプール地区をはじめ多くの地区では、成人の陽性率は5%以上である（図2）。人口密度が高く、貧しいウットラ・プラデシュ州やビハール州などの北部での妊婦の州全体の感染率は非常に低い。しかし、これらの州には、インドの総人口の4分の1が暮らしており、比較的小さな感染率の上昇でも、膨大な数の人が新たにHIVに感染したことを意味する。タミールナドゥ州、アンドラプラ

デシュ州、カルナタカ州、マハラシュトラ州では感染の拡大が落ち着いたように見えるが、その他ほとんどの州の感染リスクが高い地域では、感染は依然拡大している。工業化が進んだインド西部及び南部の4つの州（アンドラプラデシュ、カルナタカ、マハラシュトラ及びタミールナドゥ）及び北東部の州（マニプル及びナーガランド）では、妊婦のHIV陽性率が1%以上に達している。

陽性率が高い地域では平均余命の点から見ると、既にアフリカ中央部と同じくらいの犠牲を強いられている。インド南部のアンドラ・プラデッシュ州ではHIVの流行がピークに達すると平均余命が3.8年縮まると予測されている。

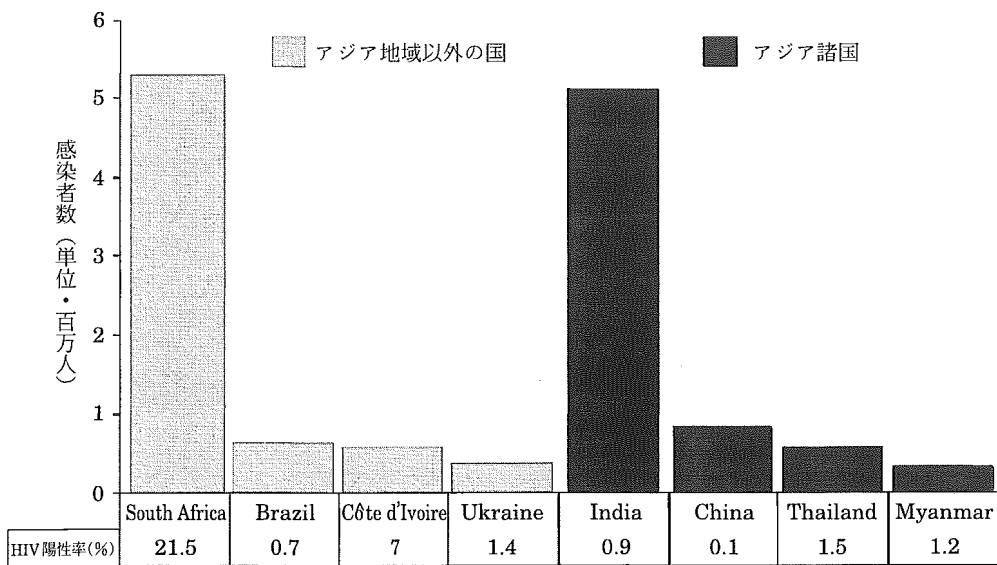
3. 多様な感染様式

インドにおけるHIV流行の原因は、注射器による薬物使用と、商業的なセックスであり、大まかにいって、北東部の州（マニプル及びナーガランド）では注射器による薬物使用が多く、南西部の州（アンドラプラデシュ、カルナタカ、マハラシュトラ、タミールナドゥ）では商業的なセックスによるものが多い。しかし、現実には、そのようなリスク行動の組み合わせによってHIVが広く侵淫している。

インド北東部のいわゆる“ゴールデン・トライアングル（薬物不正取引地帯）”付近に位置するマニプル州では、商業的セックスと注射器による薬物使用の重複傾向が顕著で、IDUが主原因となったHIVの流行が10年間以上続いている。行動動向調査によれば、約20%のセックスワーカーが薬物注射も行っているとされる。その他の地域でもIDU間の流行が広がっており、ナーガランド州では、2000-2003年のHIV陽性率は14%にも達している。注射器による薬物使用はインドの北東部州だけに限らず、南部のタミールナドゥ州でも、2001年、IDUの25%に対して、2003年には39%がHIVに感染していた。タミールナドゥ州のチェンナイ市では、IDUの64%がHIV陽性であった。これらのIDU（その多くは男性であるが）は、HIVを

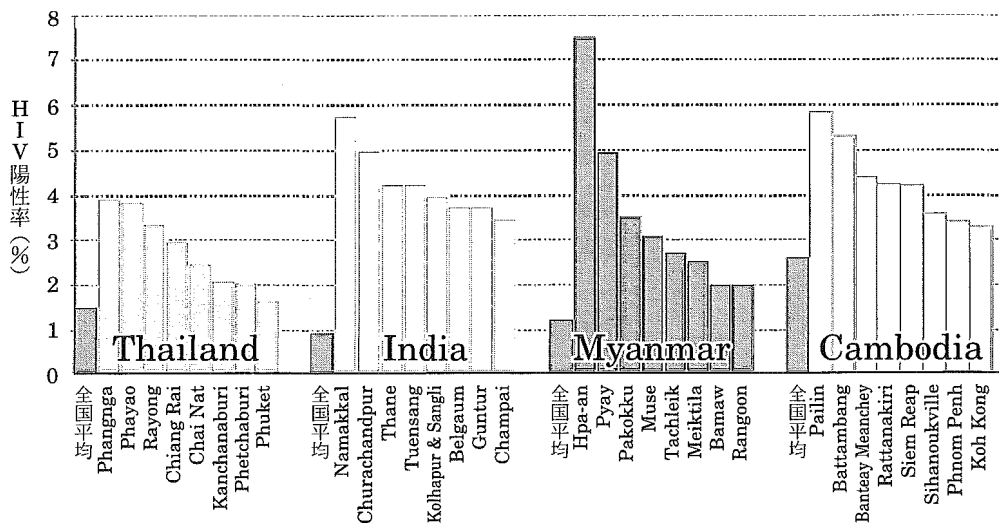
著者連絡先：山本直彦（〒466-8550 名古屋市昭和区鶴舞町65
名古屋大学大学院医学系研究科環境医動物学）
Fax：052-744-2110

2006年2月16日受付



Source: UNAIDS (2004) AIDS Epidemic Update 2004.

図 1 世界各地域における HIV 陽性率



Source: National HIV sero-surveillance data for Cambodia (2002), India and Myanmar (2003), Thailand (2004).

図 2 国の HIV 陽性率と州または県の HIV 陽性率との比較

その性交渉の相手に感染させている可能性があり、女性の感染者数の増加の一因となっている。

商業的なセックスは、ほとんどの地域で HIV 流行の主因となっている。2003 年の調査によれば、カルナタカ州における商業的セックスワーカーの 14%、アンドラプラデシュ州の 19% が HIV に感染していた。特にカルナタカ州のマイソール市ではセックスワーカーの 26% が HIV 陽性であった。ここでは、性交渉の際にコンドームを常用して

いる女性の割合がわずか 14% であり、91% の女性が、パートナーとの定期的なセックスにおいてコンドームを一度も使用したことがないという。既婚女性の新規感染件数のかなりの部分が、セックスワーカーを頻りに利用した夫から感染している。インドでは、女性の HIV 感染経路で最も多いのは、夫だという調査結果が出ている。さらに、女性差別が広く根付いているため、女性は HIV に感染すると家族から見放され、拒否される可能性が非常に高い。

セックスワーカーのなかで、最も HIV に感染しやすいのは、違法に人身売買で国境を越えて取引された女性や少女である。南アジアでは、16歳未満の少女たちが、バンクラデシュとネパールからインドやパキスタンに売られる事が多い。人身売買によって売春を強要されるセックスワーカーは、初めの6カ月間で HIV に感染する可能性が非常に高いことが、調査によって明らかになっている。

人口の移動もインドに特徴的な現象で、HIV 感染への危険性が高まることと複雑に関連している。これは5年間でおよそ5%から10%の人々が、おもに国内を移動しているといわれている。地域の経済発展が急激に進むと、貧富の差が拡大し、多くの国々で地方から都市への大規模な人口移動が起こる。インドでは、国内で頻りに移動している人口集団（商人、船員、契約労働者、トラック運転手など）があり、州から州へと移動を続けている。危険な行為が増えることによって感染率が高まる。例えば、インド南部で2002年に行われた調査では、特定ルートのトラック運転手の HIV 陽性率は16%であった。最大の原因は、トラック運転手がセックスワーカーと接触する割合が高いことにある。調査によれば、タミールナドゥ州のトラック運転手の25%以上がセックスワーカーと接触を持っていた。家族、コミュニティ、そしてそれらに伴う社会的制約から離れた多くの出稼ぎ労働者は、危険な行為を行う機会が増えることになる。労働条件などによって、HIV に感染しやすい状況におかれる移動労働者もいる。例えば、国外で働く家政婦は雇い主に性行為を強要されるリスクがより高い。

このような多様な形態の流行により都市部以外の地域にも HIV が広がっている。カルナタカ及びナーガランドでは、2003年、農村地帯の妊婦の1%以上が、HIV 陽性であるといわれている。

インドの多様な感染様式の中で男性間のセックスも少なからず影響を持っており、相当数の男性が、その他の男性とセックスをすることが確認されている。チェンナイのスラム地区の調査では、6%の男性が他の男性と性交渉を経験していた。男性とセックスをする男性の約7%が HIV 陽性であり、その半数以上が既婚であった。特にインドには、古来ヒジュラと呼ばれるアウトカースト集団がある。ウルドゥー語で「半陰陽、両性具有者」を意味するが、実際には去勢して男性を放棄したり、去勢はせず女装している者が多い。もともとは、子供の誕生や婚礼の祝いの場などに呼ばれ、歌や踊りで祝福するシャーマン的な芸人であったが、地域によっては、宗教的な祭礼には欠かす事のできない存在である。しかし最近では、男性とのセックスによって生計を立てるものが増えてきている。

4. 治療の現状と薬剤耐性の問題

アジア太平洋地域では、自分の HIV 感染の有無を知っている人々は非常に少なく、検査率も世界的な平均と比べるとかなり低い。インドでは、国がカウンセリングと検査を政策として強く奨励しており、ARV (Anti-Retroviral) の拡大を図っている。しかし、インドの HIV 感染者の数は世界第2位であるにもかかわらず、現在 ART を受けられているのは必要としている人々のせいぜい4%である (図3)。

インドには大規模な製薬産業があり、インドの医薬品生産額は約60億ドルで、これは世界第13位(2002年)である。医薬品輸出高は4年間で約1.6倍に増えており、ITと並んで、インドの重要な輸出産業となっている。医薬品の特許には物質特許と製法特許があるが、1970年に成立したインドの特許法では製法特許しか認められていなかった。物質特許のある欧米や日本では特許権を持たない企業が勝手に生産できない薬が、インドでは製法だけ変更して生産が可能であった。こうして安価に作られたジェネリック薬がインドの国内市場で販売されたり、アジア・アフリカで特許法の未整備な国へ輸出された。インドにおける売上高2位の企業シプラはそれまでの他社製品に比べ30分の1程度の価格になるエイズ治療薬(ジェネリック)を国境なき医師団に提供し始めた。

しかし、大量のジェネリック薬の配布は、治療の失敗や中断によって、これら薬剤に対する多剤耐性ウイルスの出現という新たな問題を提起した。しかも、現在広く利用されている薬剤耐性に関するデータはサブタイプBをもとにしたものであり、インドに多いサブタイプCの、いわゆる non-B 型の HIV に基づいたものではなく、サブタイプCにもそのまま有用できるかどうか、明らかではない。そこで、非サブタイプBのデータから導かれたジェノタイプ解析アルゴリズムの必要性が急務と考え、我々は、インドにおいて逆転写酵素阻害剤およびプロテアーゼ阻害剤による治療がおこなわれたサブタイプCの AIDS 患者を対象に解析を試みた。まだ症例数が少ないが、解析が可能であった19例のうち、治療に対し抵抗性を示した2例について、逆転写酵素領域において、T69N, L74I, V106M (サブタイプBではT69D, L74V, V106A) がみられた。このうち、V106Mは2003年、Brennerらによってすでに報告されており (AIDS 17 (1) : F1-5, Jan 3, 2003), 他の2カ所の変異、T69N, L74Iについても、少なくともサブタイプCに特徴的な耐性関連変異である可能性が高い。さらに、D67N と H208Y という新しい部位での変異が、治療に抵抗した2例のみに共通してみられた。これらの変異がサブタイプCのみに見られる特徴的な耐性関連変異であるか

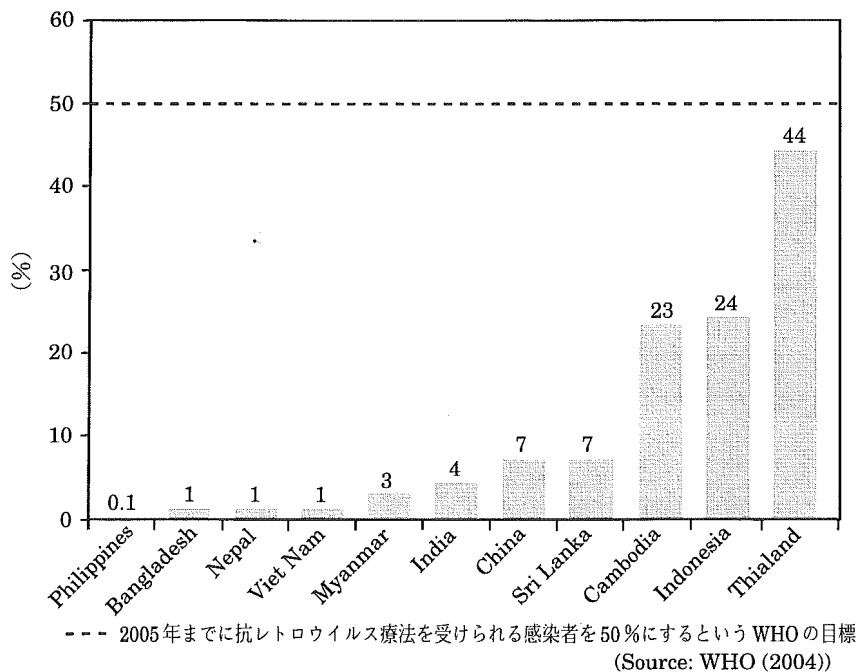


図 3 抗レトロウイルス療法を受けることのできる HIV 感染者の割合 (2004 年)

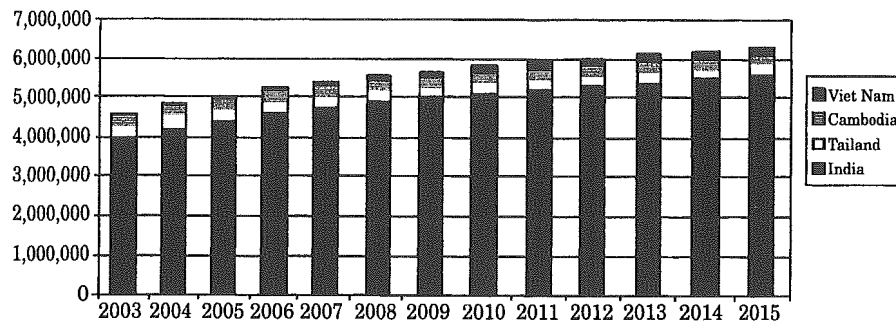
どうかは、今後、phenotype の解析を含め詳細に検討する必要があるが、サブタイプ B をもとにした薬剤耐性に関するデータのみでは、耐性変異が見逃されている可能性がある。

5. 予防対策と国際的支援

インドにおいてもさまざまな予防対策がとられており、西ベンガル州カルカッタのソナーガチ売春地区におけるセックスワーカーを対象としたセーフターセックスプログラムによって、HIV の拡大を食い止めることができた。ソナーガチ地区のコンドーム使用率は 85% にまで上がり、商業的セックスワーカーの HIV 陽性率は、2001 年には、およそ 11% であったが、2004 年には 4% 以下に低下した。それとは対照的に、ムンバイでは、商業的セックスの最中におけるコンドーム使用のキャンペーンも、散発的で断片的なものであったため、女性セックスワーカーの HIV 陽性率は、2000 年の 52% から低下していない。セックスワーカーにおける HIV に関する情報や意識は、特にストリートを拠点に働いている者の中で低い。2001 年にインドの様々な地域で行われた調査では、ストリートを拠点に活動しているセックスワーカーの 30% が、コンドームが HIV 感染を防止することを知らず、他のいくつかの州では、売春施設及びストリートを拠点として活動する者も含めた全セックスワーカーのおよそ半分が、コンドームが HIV 感染を防止することを知らなかった。

アジア地域全体の陽性率が比較的低いにも関わらず、HIV の流行は地域経済に大きな打撃を与えている。アジア開発銀行によれば、現在のように流行が拡大していなかった 2001 年、HIV はすでに 73 億ドルの経済的損失をもたらしていた。エイズがもたらす負担の大半を背負うのは貧しい世帯であり、毎年、エイズによって何百万人もの世帯が貧困に陥っている。ミレニアム開発目標 (MDGs) は、2015 年までに、飢餓に苦しむ人々あるいは 1 日 1 ドル未満で生活している人々を半減させることを世界的な努力としているが、HIV の流行によってその目標が損なわれている。現在のような傾向が続き包括的な対応がとられなければ、図 4 に示すように、インド、カンボジア、タイ、ベトナムでは、2003 年から 2015 年にかけて、毎年平均 560 万人もの貧困層が生まれ、そのうち、88% はインドであるといわれている。

アジアは、エイズに関連する財源が世界的に増加したことによって恩恵をこうむってきたが、流行が加速しているにもかかわらず、エイズへの支出額の伸びは世界の他の国々よりも小さい。このような資金の大半は、2 カ国間援助や、財団、国際機関などから来ることが期待されている。アジア開発銀行は 2004 年、アジア太平洋諸国のエイズとその他の保健プログラムの実施と継続のために、1 億 4,000 万ドルの助成金を貸し出すことを決めた。アメリカ政府のイニシアチブである大統領エイズ救済緊急計画 (PEPFAR) は、インドに対して、ビル・メリンダ・ゲイツ



Source: AUB/UNAIDS Study Series : Paper III

図 4 エイズが貧困に与える影響

基金が6つの州での数年間にわたる HIV 予防推進の支援に2億ドルを提供することを約束している。

6. おわりに

インドの地理的位置と分子疫学的解析により、インドの南西部地域では歴史的に交流が盛んであったアフリカ東部より、東部地域では“ゴールデン・トライアングル”ゾーンのタイ・ミャンマー・中国雲南省から特にトラックドライバーによって、北東部地域では中近東・旧ロシア地域から、それぞれ HIV が伝播していると考えられている。このように東洋と西洋とを共に包み込んでいる人口約10億8,000万人の大国であるインドでは、急激な経済発展が逆に HIV の流行を助長しているように思われる。都市部と農村部での貧富の差の拡大、地方から都市への大規模な人口移動、十分な服薬指導の伴わないジェネリック薬の生産と配布、さらにインドに特徴的なカーストによる差別制度がエイズのミレニアム開発目標 (MDGs) をいっそう困難にさせている。しかし、ここ数年、政治的指導者の多くがアジア太平洋地域におけるエイズの脅威について声を大にし始めており、インドでは、首相を議長として国立エイズ協議会が設立されており、国としての強力な対策の実施を重点的に行っている。インドにおける驚異的な成長を支え、近年急増している中間階級層の活力がエイズへの予防対策と治療開発に向けられることに期待したい。

文 献

- 1) Brenner B *et al.* : AIDS 17 (1) : F1-5, Jan. 3, 2003.
- 2) Go VF *et al.* : High HIV prevalence and risk behaviors in men who have sex with men in Chennai, India. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 35 (3) : 314-319, 2004.
- 3) NACO : Annual Report 2002-2003, 2003-2004. Ministry of Health and Family Welfare. Delhi, 2004.
- 4) NACO : State-wise HIV prevalence (1998-2003). Ministry of Health and Family Welfare. Delhi, 2004.
- 5) National HIV sero-surveillance data for Cambodia (2002), India and Myanmar (2003), and Thailand (2004).
- 6) Reza-Paul SRP *et al.* : An integrated behavioral and biological study among female sex workers in Mysore, India. Abstract no. MP-106. Paper presented to the 16th biennial meeting of the International Society for Sexually Transmitted Disease Research, 10-13 July. Amsterdam, 2005.
- 7) Solomon S *et al.* : A review of the HIV epidemic in India. *AIDS Education and Prevention*, 16 (Supplement A) : 155-169, 2004.
- 8) UNAIDS 2005 AIDS Epidemic Update 2005.
- 9) UNAIDS : A scale-up response to AIDS in Asia and the Pacific, 2005.
- 10) UNAIDS and ADB : Asia Pacific's Opportunity : Investing to Avert and HIV/AIDS Crisis. Bangkok and Manila, 2004.

High Pressure Viral Inactivation and Its Application for Blood Preparations

ウイルスの高圧不活化と血液製剤への利用

大竹 徹

Toru Otake

大阪府立公衆衛生研究所 ウイルス課
大阪市東成区中道1-3-69Division of Virology, Osaka Prefectural Institute of Public Health
1-3-69, Nakamichi, Higashinari-ku, Osaka 537-0025, Japan

Summary

Attempts to inactivate viruses by high pressure treatment have recently attracted increasing attention. Although plant viruses, phages, influenza viruses and herpes viruses are inactivated under a high pressure of several hundred Mpa, it has been reported that polioviruses are not. We therefore here examined the effects of high pressure on HIV-1. While treatment with high hydrostatic pressure successfully inactivated the virus, sensitivity was found to differ with the viral strain, the required pressures ranging from 400 to 650 Mpa. In addition, we examined the effects of pressure generated in a pressure-tight container filled with

water by freezing (freeze pressure generation method, FPGM). As a result, it was revealed that many HIV strains were inactivated under a lower pressure of 200 to 250 Mpa than under high hydrostatic pressure, impairment of functions of viral envelop proteins and reduced reverse transcriptase activities being involved in the mechanism of viral inactivation by FPGM. To facilitate routine application of the high pressure viral inactivation method for detoxication of blood preparations, detailed investigations of the effects of high pressure on active ingredients, such as coagulation, are now necessary.

1. はじめに

数百MPa以上の高圧は種々の細菌を不活化する作用を持つことが古くから知られている。さらに高圧のウイルスへの影響を調べた研究も意外に古くからみられ、1930年代には植物ウイルスやファージが高圧により不活化されることが報告されている¹⁾。1959年にはOvermanらが高圧によりインフルエンザウイルスの感染性が著しく低下すること²⁾、また1990年代に入りNakagamiらがヘルペスウイルス類が300~400MPaの高圧により完全に不活化することを報告している³⁾。また、Silvaらによって高圧によりウイルスが不活化されるだけでなくその抗原性が高まることが報告され⁴⁾、高圧のワクチン製造における有用性が示唆された。一方、非加熱の血液製剤の投与によりエイズウイルス (HIV) が感染したエイズ薬害、あ

るいは検査技術の進歩した現在でも献血時の検査をすり抜け、輸血時にB型肝炎やHIVの感染が起こっている例から分かるように、凝固因子など失活しやすい有効成分を損なうことなくウイルスを不活化する技術の発達が求められている。この総説では著者らが進めてきた高圧のHIVに及ぼす作用に関する研究を中心に、高圧による血液製剤無毒化の可能性について概観したいと思う。

2. 高圧による不活化とウイルスの構造との関連

いくつかのエンベロープを持ったウイルス、つまりインフルエンザウイルス²⁾、サイトメガロウイルス³⁾、水胞性口内炎ウイルス⁴⁾、ヒトヘルペス1型³⁾、ヒト免疫不全ウイルス (HIV)^{5,6)}などが高圧により不活化することが

知られており、エンベロープを持たないポリオウイルスが高压による影響を受けない¹⁾ことから、高压によるウイルスの不活化にはエンベロープの障害が深く関与しているように思える。しかし、エンベロープを持たないタバコモザイクウイルスやある種のバクテリオファージも高压によりその活性が減弱する²⁾ことから、エンベロープのみが高压の標的ではなさそうである。さらにヘルペスウイルス類やHIVでは高压処理によりエンベロープの構造や変化が見られるが、HIVでは後述するようにウイルス構造内部に持つ酵素(逆転写酵素)も高压により大きな影響を受けることもあり、ウイルスの種類により高压の作用点は異なるものと思われる。

3. HIVの増殖の様式

HIVへの高压の影響を述べるにあたって、HIVの増殖の仕方について簡単に説明しておきたい。HIVが細胞に侵入するためには、まずHIVの表面にあるエンベロープ蛋白であるgp120が細胞表面に出ているCD4分子と結合することが必要である。さらに第2のレセプターであるCCR5(マクロファージ)、場合によってCXCR4(T細胞)との反応を経てgp120の構造変化が起こり、エンベロープのgp41が細胞膜に突き刺さることによりウイルスと細胞の融合がおこることが知られている。細胞質に侵入したHIVのRNA遺伝子はウイルスが持つ逆転写酵素によってDNAに変換され、さらにウイルスの持つインテグラーゼにより細胞核の宿主DNAの一部に組み込まれる。HIVが産生されるためにはこの組み込まれたHIV遺伝子が働き、HIVが作られ、細胞外へと放出される。

4. 高水圧によるHIV-1への影響^{5, 6)}

HIV-1の実験室株を用い室温において高水圧による高压処理を行った結果、処理時間10分では400MPa以上の圧力でウイルスの感染性は検出限界以下となり不活化された(図1)。また、より低い圧力である300MPaではHIV-1を完全に不活化させるのに200分を要した。250MPaでは感染性の低下はさらにゆるやかとなり1000分の高压処理でのHIVの感染性は約1/300にまで低下した。さらに200MPaに圧力を下げると1000分の高压処理

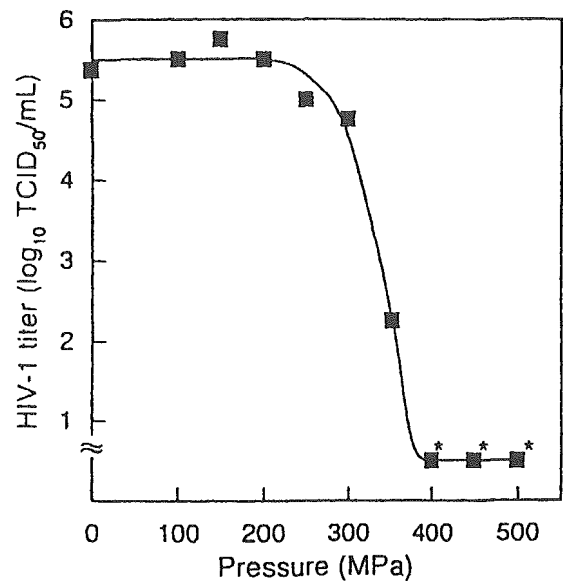


図1. 高压のHIV-1実験室株の感染性に及ぼす影響
★検出限界以下 (log TCID₅₀/mL < 0.5)

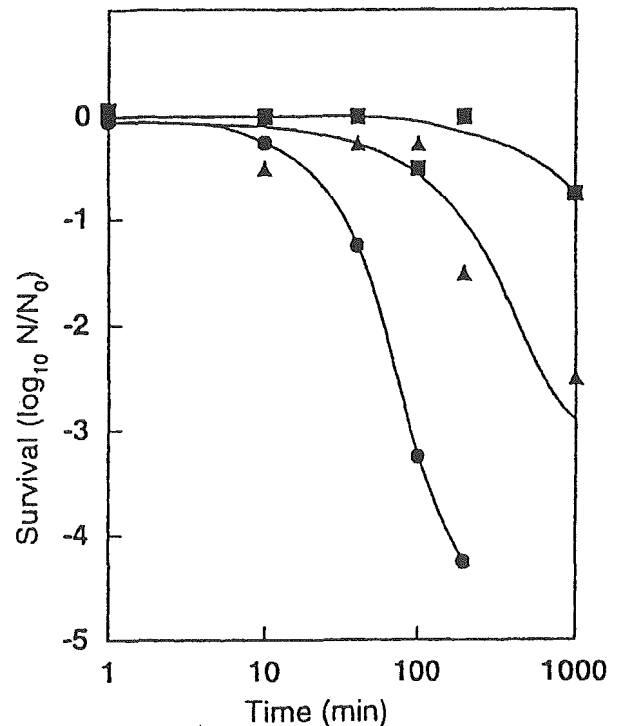


図2. 高压のHIV-1実験室株の感染性に及ぼす影響
(■) 200MPa (▲) 250MPa (●) 300MPa

においてもその感染性は約1/6に低下するにすぎなかった(図2)。

実験室株における結果から、高压によるHIVへの影響が普遍的なものであるかどうかを確かめるためにHIV-1感染者のリンパ球を培養することにより取り出した臨床分離ウイルスについて高压の影響を調べてみた。ところが興味深いことに、ウイルスの株間において高压処理の

感受性に大きな差が見られたのである。図3に示すように、450MPaにて実験室株 (LAI株) は不活化されるのに対して、エイズ発症者および無症候のHIV感染者から分離された2種のウイルス (KK-1、KK-2) は550MPaにおいても完全には不活化されず、不活化にはおそらく650MPa以上の圧力が必要ではないかと推測された。この高圧に対するウイルス株間の感受性の違いがどこからくるのかを検討するために、ウイルスが細胞に侵入した後にウイルスの遺伝子RNAをDNAに変換する際に働く重要な酵素である逆転写酵素活性の測定を試みた。その結果、450MPaにて不活化される実験室株の逆転写酵素はこの圧力において不活化されたが、2種の臨床分離株の逆転写酵素活性はその活性を保っており、不活化されるためには600MPa以上の圧力が必要であろうと思われた。このように高圧によるHIVの感染性の低下はウイルスの増殖に重要な働きをする逆転写酵素活性の低下と深く関連しており、高圧による不活化の要因のひとつに逆転写酵素活性の低下が考えられた。

さらに形態学的にウイルスの変化を捉えるために、高圧処理したHIV-1を電子顕微鏡にて観察した。500MPa、10分間の処理はHIV (LAI株) のエンベロープ構造を断裂させ、またコア内容物を漏出させることが観察された。

これらのことから、高水圧によるHIVの不活化には逆転写活性の失活およびエンベロープ蛋白の変化が関与しているものと考えられた。

5. 凍結昇圧法の応用

コーラの瓶を急いで冷やそうと冷凍庫に入れて爆発させた経験を持つ方は少なからずおられると思う。瓶が割

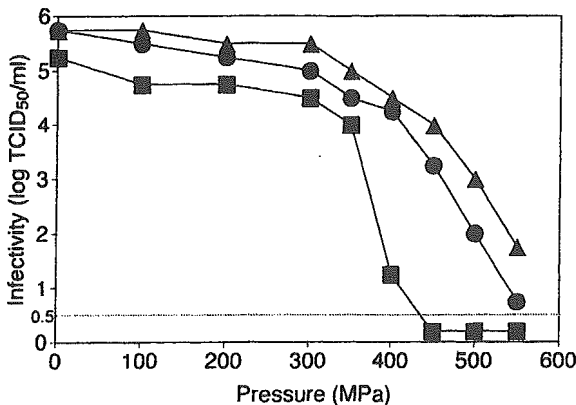


図3. 高圧の種々のHIV-1株の感染性に及ぼす影響 (■) 実験室株 (LAI株) (●) 臨床分離株 (KK-1株) (▲) 臨床分離株 (KK-2株)

れるのは内部の水が凍る時に体積が膨張するからである。もし丈夫な容器で水を凍らせたとしたら数千気圧 (数百MPa) の超高压の発生が予測されるが、この圧力を微生物の不活化に応用する試みが早川らによってなされている。まず250MPa以上の圧力に耐える構造を持つ蓋に圧力計のついたステンレス製で肉厚の容器に水を満たし、空気を抜いた後冷凍庫に入れ冷却した。その結果、-22℃までは圧力がほぼ直線的に上昇し、-10℃で約100MPa、-22℃では約200MPaに達した。これはBridgmanが示した水の相図 (水-氷の平衡曲線) に一致した。-22℃以下では膨張する氷Iと共に収縮する氷IIIが生成され、圧力の上昇は止まると予想されたが圧力は上がり続け、-30℃では250MPaに達した⁹⁾ (図4)。このことは、氷IIIが生成されずに氷Iが生成し続け過冷却現象が起こっていたことを示すものと思われた。早川らはこの現象を「凍結昇圧法」と名付け、酵母や各種細菌への影響を調べているが、-10℃あるいは-20℃処理

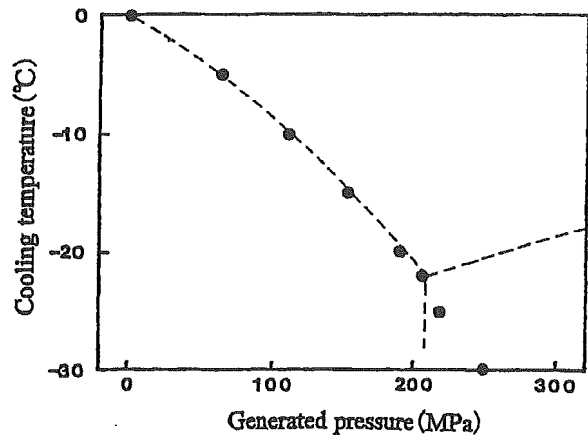


図4. 耐圧容器での凍結昇圧による圧力発生 (●) 実測値、破線はBridgmanが示した水の相図 (水-氷平衡曲線)

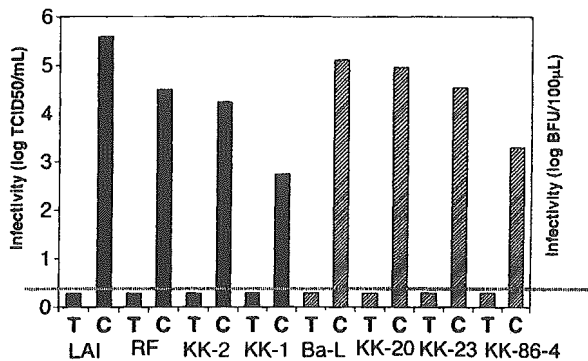


図5. 凍結昇圧法の種々のHIV-1株の感染性に及ぼす影響 (黒カラム) T細胞好性HIV-1株、(斜線カラム) マクロファージ好性HIV-1株、LAI、RF、Ba-Lは実験室株であり、KKシリーズは全て臨床分離株、Tは凍結昇圧処理検体、Cは凍結しただけの対照検体を示す。点線は検出限界を示す

で微生物の不活化が起こることを見出ししている⁹⁾。

著者らはこの凍結昇圧法によるHIV-1への影響を調べてみた¹⁰⁾。その結果、実験室株および臨床分離株、T細胞好性株およびマクロファージ好性株を含む種々のHIVが -20°C ～ -30°C 、つまり200～250MPaの圧力にて完全に不活化することを見出した(図5)。前述の高水圧処理において、不活化に実験室株より高い圧力を要した臨床分離株も凍結昇圧法では完全に不活化されたことから、この方法が優れたウイルス不活化法であることが分かる。

さらに凍結昇圧法によるHIV-1の不活化にはどのような現象が関与しているかを検討した。まずHIV-1のコア蛋白への影響を免疫反応で調べたがコア蛋白の障害は認められなかった。つぎに逆転写酵素活性は -10°C ではほとんど影響は受けないが、ウイルスが完全に不活化される -20°C および -30°C ではその活性は10%程度に低下することが分かった(図6)。

さらにHIV-1のエンベロープ蛋白の機能を調べるために、ウイルスを濃縮しCD4陽性T細胞と反応させウイルスが細胞に結合するかどうかをフローサイトメーターを用いて検討した結果、 -10°C では影響を受けないが、 -20°C ではウイルスが細胞へ結合する機能が失われていた。これらのことから、凍結昇圧法においても、HIVの不活化はウイルスのエンベロープ蛋白の障害および逆転写酵素活性の低下が深く関与していることがうかがわれた。

Hashizumeらは低温域で高圧をかけると微生物の死滅率が飛躍的に増大することを報告しており¹¹⁾、凍結昇圧において、高水圧による高圧処理より低い圧力でウイルスの不活化が起こった理由としては低温域での高圧処理

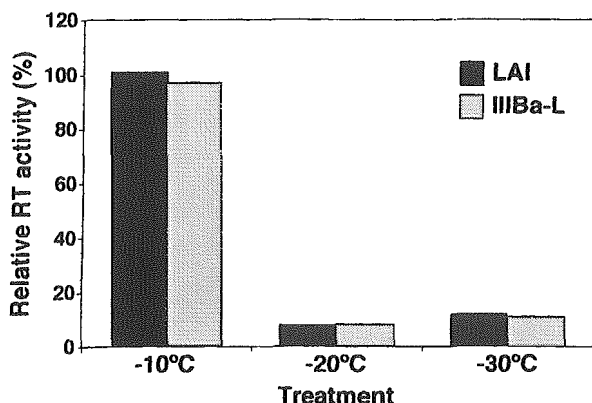


図6. 凍結昇圧法のHIV-1の逆転写酵素活性に及ぼす影響
値は凍結昇圧処理を行ったサンプルと凍らせただけの対照サンプルとの酵素活性の比を示した。LAIはT細胞好性HIV-1株、IIIBa-Lはマクロファージ好性HIV-1株

による未知の影響が関与していることが示唆される。

6. 血液製剤への利用

いうまでもなく血液製剤には凝固因子などの生理活性物質が含まれ、高圧処理によってそれらが損なわれると治療薬という本来の目的を果たすことはできなくなる。血液中の有効成分に対する高圧の影響についてのデータはあまり多くないが、300MPa以上の高水圧処理により血液凝固因子Ⅷの活性が損なわれるが、antithrombinⅢは500MPaの高圧処理においても活性を保っていることが報告されている¹²⁾。また著者らの検討で免疫グロブリンの活性は凍結昇圧処理では失われないことが見出されている¹⁰⁾。これらのことから用途によっては高圧処理の血液製剤への応用が可能であることが示されている。

血液に混入する可能性があるウイルスとしてはHIV、B型およびC型肝炎ウイルス、ヒトT細胞性白血病ウイルス、ウエストナイルウイルスなどがあげられる。これらのウイルスへの高圧の影響はHIVを除いて未知のものであるが、すべて表面にエンベロープを持つウイルスであり、種々の研究報告から高圧により不活化される可能性が高いものと考えられる。

血液製剤の無毒化に高圧を産業ベースで利用するにあたっては、大型の高圧処理装置の開発が必要になってくる。この場合、600～700MPa程度の耐圧構造が必要とされる高水圧装置に比べ、250MPa前後という比較的低い圧力に耐える簡単な構造の装置で高圧を発生させることができる凍結昇圧法がより有利であると考えられる。

7. おわりに

血液製剤に混入する可能性の高いウイルスであるHIVについて、高圧による不活化研究を解説したが、さらに肝炎ウイルスなどへの影響についての研究が待たれるところである。現在、薬剤、フィルター、加熱などによって行われている血液製剤の無毒化技術に加えて高圧処理、特に不活化能力や設備の簡便さで利点が多いと思われる凍結昇圧法を検討してみる価値は高いものと考えられる。

本文で紹介したHIVに関する研究は、日本ハム中央研究所の重久 保先生、福寿園CHA研究センターの早川

潔先生、大阪府立公衆衛生研究所の森 治代先生、川畑拓也先生との共同研究である。

引用文献

- 1) F. Basset, A. Hase, P. Macheborref and P. Monil, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **38**, 248(1938).
- 2) J. R. Overman and A. M. J. Lewis, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **102**, 329-333(1959).
- 3) T. Nakagami, T. Shigehisa, T. Ohmori, S. Taji, A. Hase, T. Kimura and K. Ymanishi, *J. Virol. Methods*, **38**, 255-262(1992).
- 4) J. L. Silva, P. Luan, M. Glaser, E. W. Voss and G. Weber, *J. Virol.*, **66**, 2111-2117(1992).
- 5) T. Nakagami, H. Ohno, T. Shigehisa, T. Otake, H. Mori, T. Kawahata, M. Morimoto and N. Ueba, *Transfusion*, **36**, 475-476 (1996).
- 6) T. Otake, H. Mori, T. Kawahata, Y. Kojima, H. Nishimura, I. Oishi and T. Shigehisa, *Biocontrol. Sci.*, **5**, 127-129(2000).
- 7) P. W. Bridgman, *Proc. Am. Acad. Arts. Sci.*, **47**, 466-558(1912).
- 8) 早川潔, 防菌妨微, **29**, 319-326(2001).
- 9) K. Hayakawa, Y. Ueno, S. Kawamura, T. Kato and R. Hayashi, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **50**, 415-418(1998).
- 10) T. Otake, T. Kawahata, H. Mori, Y. Kojima, I. Oishi and K. Hayakawa, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (in press).
- 11) C. Hashizume, K. Kimura and R. Hayashi, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **59**, 1455-1458(1995).
- 12) 中上辰芳, 重久保, 大森丘, "高圧バイオサイエンス", 功刀滋, 嶋田昇二, 鈴木敦士, 林力丸編, さんえい出版, 1994, pp. 164-171.

PROFILE

大竹 徹

大阪府立公衆衛生研究所ウイルス課
ウイルス課長
医学博士



1948年奈良県生まれ、1971年鳥取大学獣医学科卒、同年大阪府立公衆衛生研究所研究員、1984年同主任研究員、2002年同病理課長、2003年同ウイルス課長、現在に至る。

HPLCによるプロテアーゼ阻害剤アタザナビルの 血中濃度測定法の開発

高橋昌明*^{1,2}, 吉田昌生¹, 大木 剛¹, 奥村直哉¹, 鈴木達男¹, 金田次弘²

独立行政法人国立病院機構名古屋医療センター薬剤科¹, 臨床研究センター²

Determining the Concentration of a New HIV Protease Inhibitor Atazanavir in Plasma Using High-performance Liquid Chromatography

Masaaki Takahashi*^{1,2}, Masao Yoshida¹, Tsuyoshi Oki¹,
Naoya Okumura¹, Tatsuo Suzuki¹, Tsuguhiko Kaneda²

Department of Pharmacy¹, Clinical Research Center², National Hospital Organization Nagoya Medical Center

〔受付：2005年2月15日 受理：2005年3月30日〕

高速液体クロマトグラフィー（以下、HPLC）を用いた新しいHIVプロテアーゼ阻害剤アタザナビル（以下、ATV）の簡便な血漿中濃度測定法を開発した。0.1, 0.5, 1.0, 4.0, 10.0 μ g/mLの各ATV標準スパイク血漿を作製し、HPLCにて測定した。各標準血漿における、日内変動係数（CV%）はそれぞれ10.8, 1.9, 1.1, 0.9, 1.8であり、日間変動係数（CV%）は10.5, 2.3, 1.6, 0.8, 1.4であった。正確性については日内、日間アッセイ合わせて99~104%の範囲内であった。また、0.1~10.0 μ g/mLの範囲において濃度とピーク面積比との間に相関係数1.00と良好な直線関係が得られた。次にHIV感染患者血漿3検体を用いてHPLCにて測定したが、その結果は液体クロマトグラフ・質量分析計（以下、LC-MS）で測定した結果と非常によく一致した。ATVの測定にはHPLCより感度の高いLC-MSの使用が必須といわれていたが、通常のHPLCを用いても再現性および正確性の高い測定系を確立することができた。

キーワード—プロテアーゼ阻害剤, アタザナビル, HPLC, 血中濃度

緒言

平成9年に独立行政法人国立病院機構名古屋医療センター（以下、当センター）は東海地区におけるエイズ治療ブロック拠点病院の指定を受け、それ以降多数のHIV感染患者の治療を行っている。HIV感染症の治療は、プロテアーゼ阻害剤（以下、PI）と逆転写酵素阻害剤による多剤併用療法（以下、HAART：highly active antiretroviral therapy）が主流となっているが、これら薬剤のうち、とりわけPIは食事その他併用薬によりその吸収率に大きな影響を受けることが知られている¹⁻³。HIVの増殖を完全に抑制し、耐性獲得を防止するうえでもPIは高い血中濃度を維持することが望ましい。しかしながら、下痢、嘔気・嘔吐、発疹、高脂血症等の副作用も高頻度に発現することから、PIの血中濃度測定を行い、個々の

患者に最適な投与量を決定することが重要である。当センターでは平成10年よりサキナビル、リトナビル、ネルフィナビル、インジナビルの各PIの血中濃度測定を高速液体クロマトグラフィー（以下、HPLC）により日常業務として行っている⁴。また、平成15年にはロピナビル、リトナビル、エファビレンツの3剤同時測定法⁵を開発し、現在臨床に応用している。今回、新しいPIであるアタザナビル（以下、ATV）についてHPLCによる簡便な血漿中濃度測定法を開発したので報告する。

方法

1. 血漿前処理

0.1, 0.5, 1.0, 4.0, 10.0 μ g/mLのATV標準スパイク血漿を作製し、これらの血漿0.5mLに内部標準物質（以下、IS）を含む酢酸エチル、n-ヘキサン1対1溶液2

† 愛知県名古屋市中区三の丸4-1-1；4-1-1 Sannomaru, Naka-ku, Nagoya-shi, Aichi, 460-0001 Japan

mL, および0.5mol/L炭酸ナトリウム溶液1 mLを加え混和後, 遠心分離し有機層をドライアップした後, 移動相0.1mLに再溶解し25 μ LをHPLCに注入して測定した。

ISには, (5S, 8S, 10S, 11S)-9-hydroxy-2-cyclopropyl-5-(1-methylethyl)-1-[2-(1-methylethyl)-4-thiazoyl]-3, 6-dioxo-8, 11-bis(phenyl-methyl)-2, 4, 7, 12-tetraazatridecan-13-oic acid, 5-thiazolymethyl esterを用いた。

2. HPLC条件

ポンプ: Waters 515 HPLC Pump

検出器: Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector

カラム: Waters Radial-Pak™ Cartridge type 8NVC18 4 μ

流速: 1.8mL/min

カラム温度: 30°C

検出波長: 205nm

移動相: CH₃CN:CH₃OH:0.025mol/L Phosphate Buffer (pH3.0) = (45:10:50 v/v/v)

薬物濃度は内部標準物質に対するピーク面積比から求めた。

結果

図1に(a)ATVスパイク標準血漿, (b)コントロール血漿と(c)HIV感染患者血漿のクロマトグラムを示した。ATVは保持時間が約12分, ISは約29分で溶出した。ATVスパイク標準血漿, HIV感染患者血漿を用いた測定で, ATVのピークは一峰性を示した。一方, コントロール血漿の測定ではATVやISの溶出ピークに相当する保持時間の近傍に夾雑するピークは認められなかった。0.1, 0.5, 1.0, 4.0, 10.0 μ g/mLの各ATVスパイク標準血漿を用いた測定で, 日内変動係数(CV%)はそれぞれ10.8, 1.9, 1.1, 0.9, 1.8, 日間変動係数(CV%)はそれぞれ10.5, 2.3, 1.6, 0.8, 1.4であった(表1)。また, 正確性については日内アッセイで100~104%, 日間アッセイで99~102%の範囲内であった。0.1~10.0 μ g/mLの濃度範囲におけるATVの検量線については相関係数1.00で良好な直線が得られた(図2)。次にHIV感染患者血漿3検体についてHPLCにて測定したところ, 服用直前で0.79 μ g/mL, 服用後2時間で3.08 μ g/mL, 5時間で3.13 μ g/mLの値が得られた。これらの値は液体クロマトグラフ・質量分

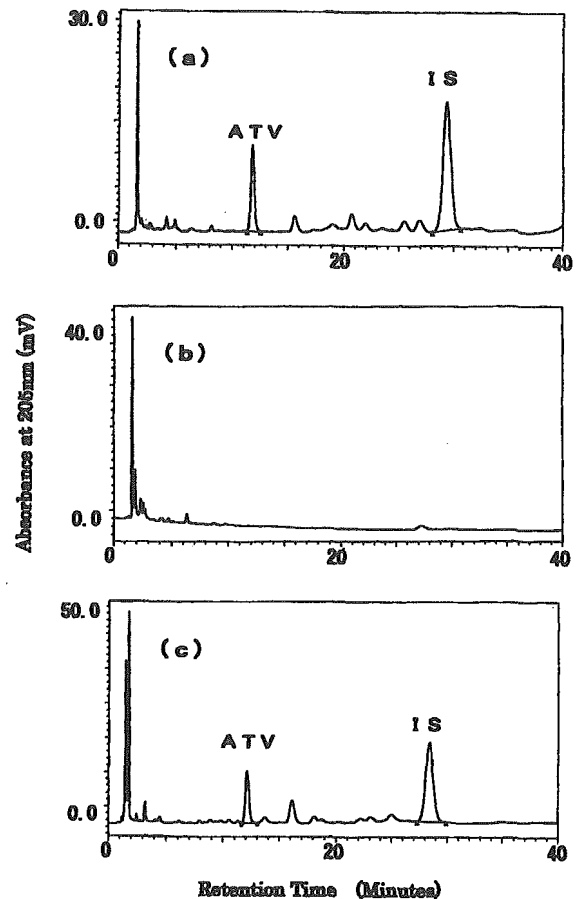


図1 (a)ATV標準スパイク血漿, (b)コントロール血漿, (c) HIV-1感染患者血漿のHPLCクロマトグラム

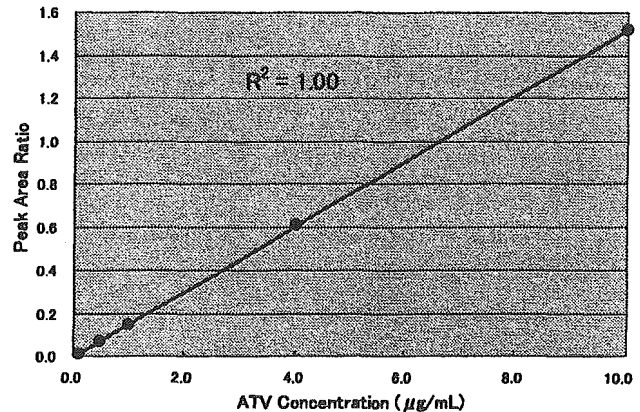


図2 0.1~10.0 μ g/mLの濃度範囲におけるアタザナビルの検量線

表1 アタザナビル測定の日内および日間変動と正確性

アタザナビル	Intraday assay (n=5)			Interday assay (n=15)			
	Expected (μ g/mL)	Measured (μ g/mL)	CV (%)	Accuracy (%)	Measured (μ g/mL)	CV (%)	Accuracy (%)
0.1	0.10 \pm 0.01	0.10 \pm 0.01	10.8	104.2 \pm 11.3	0.10 \pm 0.01	10.5	99.8 \pm 10.5
0.5	0.50 \pm 0.01	0.50 \pm 0.01	1.9	100.1 \pm 1.9	0.50 \pm 0.01	2.3	100.5 \pm 2.3
1.0	1.03 \pm 0.01	1.03 \pm 0.01	1.1	102.6 \pm 1.1	1.02 \pm 0.02	1.6	101.6 \pm 1.7
4.0	4.02 \pm 0.04	4.02 \pm 0.04	0.9	100.5 \pm 0.9	4.01 \pm 0.03	0.8	100.3 \pm 0.8
10.0	10.03 \pm 0.18	10.03 \pm 0.18	1.8	100.3 \pm 1.8	9.94 \pm 0.14	1.4	99.4 \pm 1.4

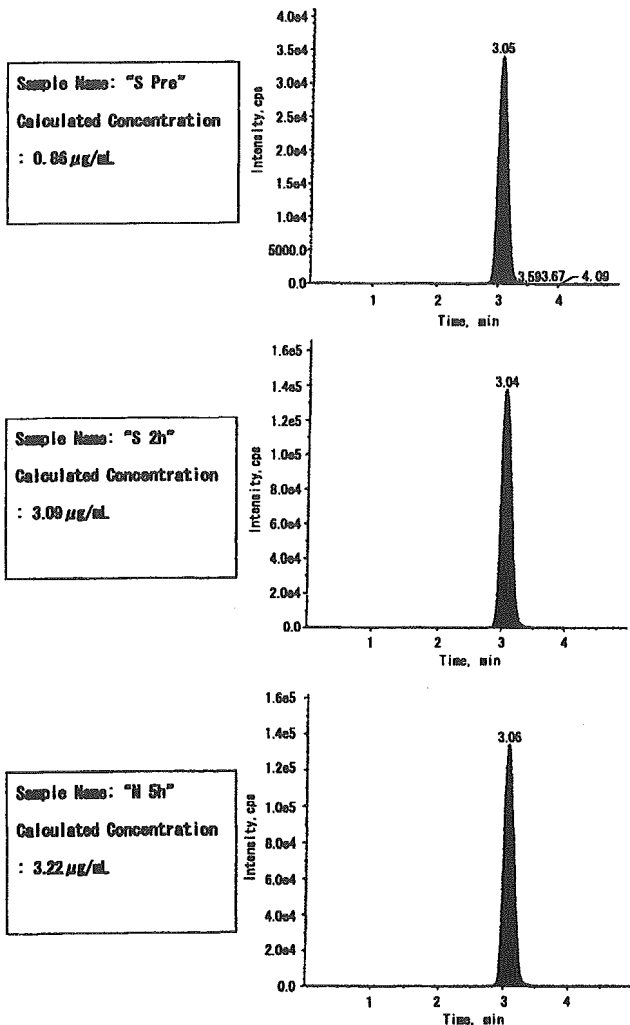


図3 HIV感染患者血漿3検体のLC-MSデータ

析計(以下, LC-MS)にて同一検体を測定した結果と非常によく一致した(図3, 表2)。現在までにATVの血漿中濃度を測定したHIV感染患者のうち, ATV300mg+リトナビル100mgを投与されたブースト症例26例とPIとしてATV400mgを単独投与された症例8例について薬剤服用後の採血時間と血漿中濃度との関係を図4のグラフに示した。服用後3~8時間の測定結果をみると, リトナビルによるATVのブースト効果を定性的ではあるが確認できた。

考察

ATVは日本国内において2004年1月6日に市販された最も新しいHIVプロテアーゼ阻害剤であり, 1日1回投与を最大の特徴としている。そのため, 他のPIに比べて高いアドヒアランスが期待され, HIV感染症の治療法であるHAARTの選択枝の1つとして推奨されている¹⁻³⁾。副作用に関しては, 脂質代謝に対する影響が少ないことが海外の臨床試験で示されている⁷⁾が, PIに特有

表2 HPLCとLC-MSとのデータの比較

検体名	服用時間 (h)	ATV濃度 (µg/mL)	
		LC-MS	HPLC
S Pre	0	0.86	0.79
S 2h	2	3.09	3.08
N 5h	5	3.22	3.13

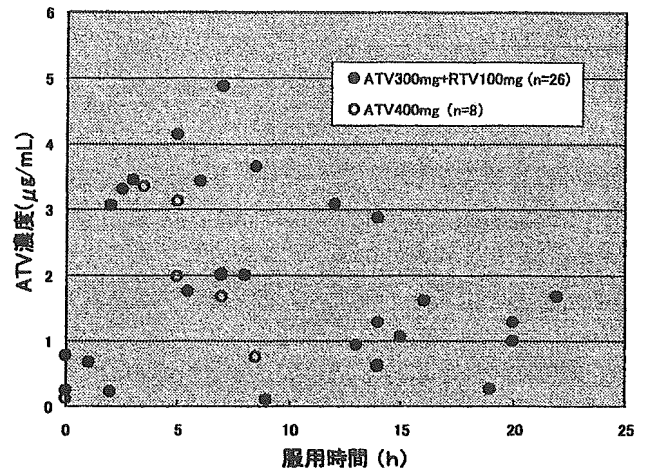


図4 アタザナビル300mg+リトナビル100mg投与患者(●)とアタザナビル400mg投与患者(○)の薬剤服用後の採血時間と血漿中濃度との関係

な肝機能障害, 高血糖等の副作用は報告されている。ATVの血中濃度を測定することは, ウィルスの増殖を効果的に抑制し薬剤耐性獲得を防ぎつつ, これらの副作用の出現を予防する上で重要である。

一般的にPIは水にほとんど溶けないため, 非常に吸収率が悪い。この化学的性質が食事に含まれる脂肪分やその他併用薬などにより吸収率に大きな影響を受け, 患者個々で血中濃度に大きなバラツキが出る1つの要因となっている。この点を改善するためATVは硫酸塩とすることで溶解性を上げるよう工夫されている⁶⁾。今回ATVのHPLC測定条件を確立するにあたって, ロピナビル, リトナビル, エファビレンツの3剤同時測定法⁵⁾と同じ移動相CH₃CN:CH₃OH:0.02mol/L tetramethyl-ammonium perchlorate in 0.2% trifluoroacetic acid=(45:5:50 v/v/v)を用いて測定したところ, ATVはC18カラムにほとんど保持されなかった。そのため, 移動相のみをメシル酸塩であるネルフィナビル用の移動相CH₃CN:CH₃OH:0.025mol/L Phosphate Buffer (pH3.0)=(45:10:50 v/v/v)⁴⁾に変更した。その結果, ATVとISはC18カラムに保持され, ATVは約12分, ISは約29分で溶出された。また, コントロール血漿測定で示されたようにATV, ISの溶出時間付近に夾雑するピークが検出されなかったことから, 血漿中の種々の物質による測定