

図1 連鎖不平衡解析の概念と計算

連鎖平衡はD値 ($D = P_{ab} - P_{AB} - P_{aB} \times P_{Ab}$) により判定する。
 $D = 0$: 連鎖平衡、 $D > 0$ または < 0 の時、連鎖不平衡とする。
 proteaseのX座において野生A:変異aが9:1の割合で、gagのY座において野生B:変異bが9:1がそれぞれ観察されたとき、下図理論値のようであればXとYは独立しており、一方観察値のような数字が得られた場合はXとYは連結しているとするとする。

		Gag Y	
		B	b
Protease X	A	81	9
	a	9	1
理想値		n=1 00	

		Gag Y	
		B	b
Protease X	A	81	9
	a	9	1
観察値		n=1 00	

$$D = \frac{1}{100} \times \frac{81}{100} - \frac{9}{100} \times \frac{9}{100} = 0$$

$$D = \frac{10}{100} \times \frac{90}{100} - \frac{0}{100} \times \frac{0}{100} = 0.09$$

表1 SubtypeB (N=132) におけるProteaseの薬剤耐性変異に対するpr55^{Gag}の変異

Protease mutation	gag mutation										
	MA (p17)	CA (p24)	p7	p1	p6						
D30N (8)		R264K ^H	N315T ^H		M423L ^H			R452K ^H	P453L ^H	S473P ^H	S498L ^H
									P453V ^H		
M46I (19)	A83M ^H	S165M ^H	P255A ^H	E260D ^H	T280V ^H						
M4Q (9)	A120G ^H	E203D ^H	T239S ^H	I247V ^H	E260D ^H						
V82A (15)	A120G ^H	E203D ^H	T239S ^H	V323I ^H				T469K ^H			
L90M (29)	V71I ^H	A83M ^H	Y132F ^H					L449V ^H	S491I ^H		
L10I (30)	Y132F ^H							L449V ^H			
L10F (6)								L449P ^H			
L10F (7)	Q65H ^H							G466R ^H			
K20R (7)	V71I ^H										
L24I (6)	A120G ^H	E203D ^H	I247V ^H	V362I ^H				L483M ^H			
L33F (8)	A120G ^H	E203D ^H	I247V ^H								
M36I (43)	R76K ^H										
F53L (6)	Y132F ^H	S176A ^H									
I54V (16)	A120G ^H	E203D ^H	T239S ^H								
A71T (9)	V71I ^H	L268M ^H						S498I ^H			
A71V (32)	A83M ^H	S176A ^H								I437V ^H	
V77I (56)		P255A ^H									K481E ^H
N88D (7)	Q69K ^H	R264K ^H	L268M ^H	N315T ^H							R452K ^H
											P453L ^H
											S498L ^H

* : p<0. 01

** : p<0. 001

下線 : Mutation in cleavage site

図2 症例経過図

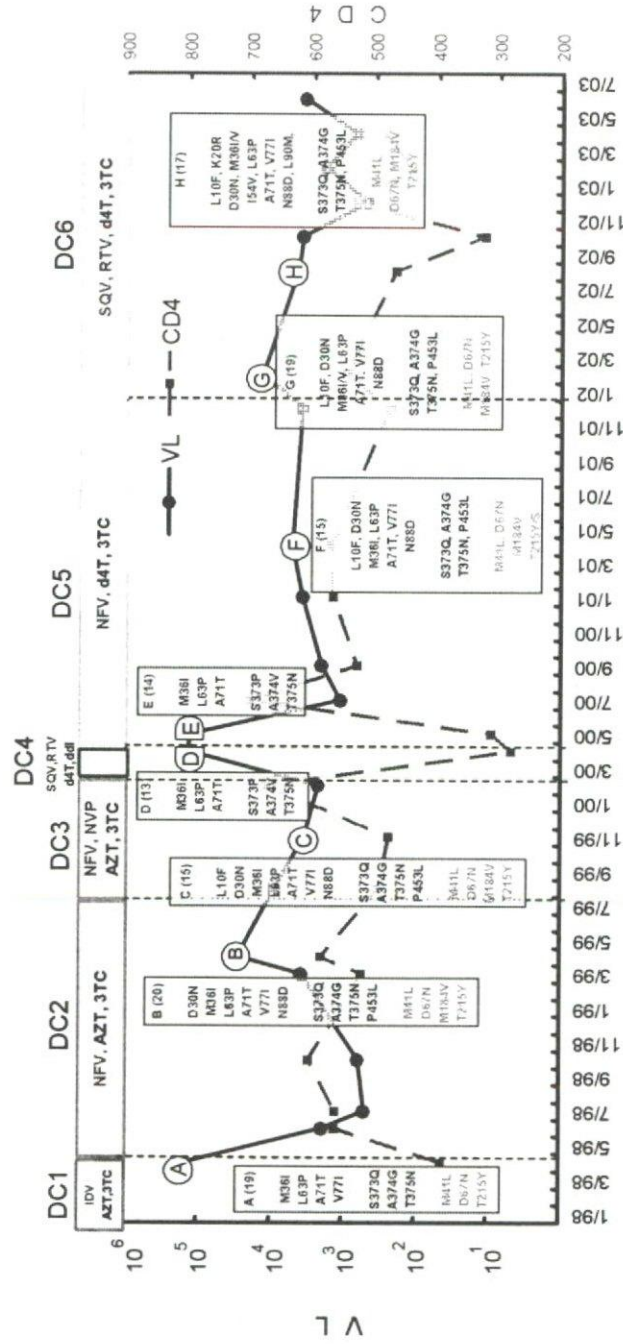
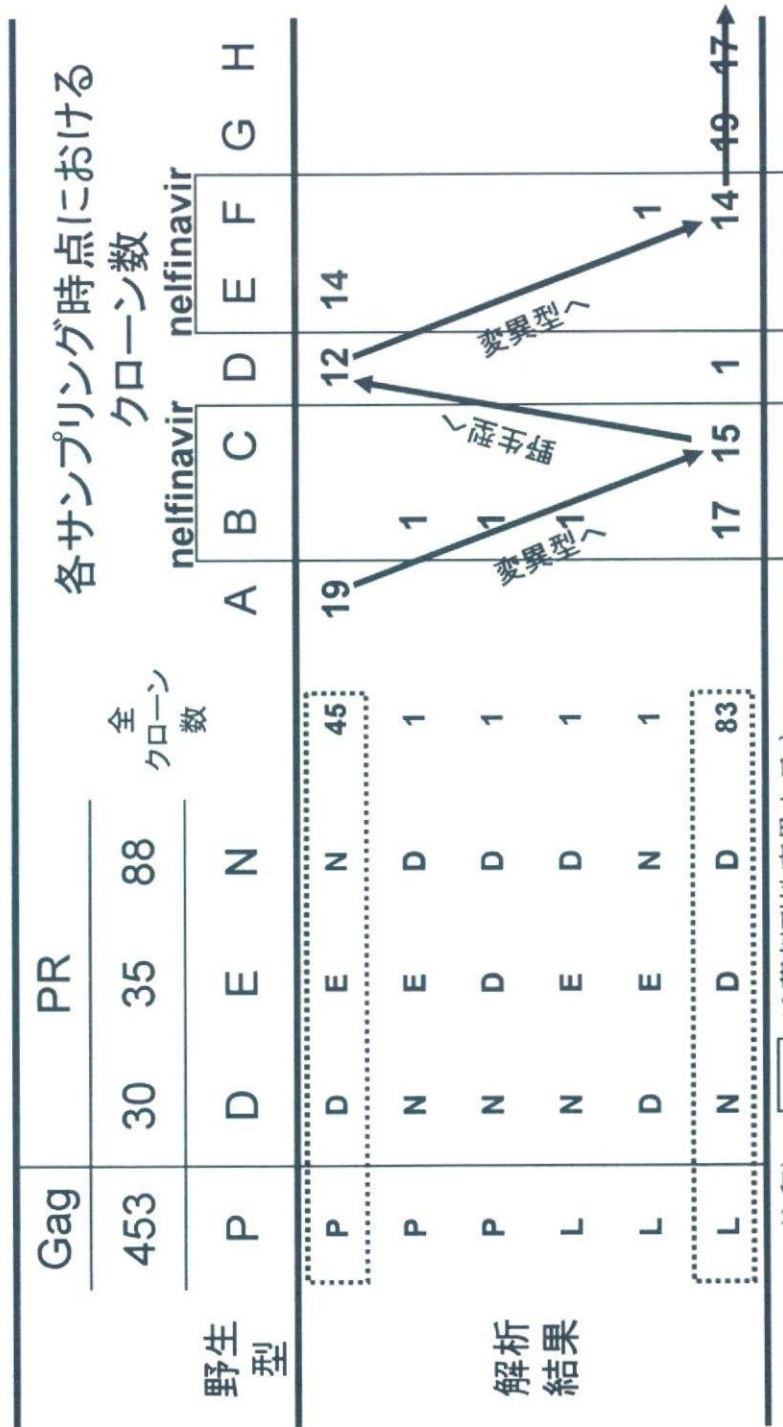


図3. 薬剤耐性獲得におけるGag とproteaseの相互干渉と連鎖

P453L、D30N、E35D、N88Dは連鎖している



注釈) は薬剤耐性変異を示す。

分担研究者 金田次弘 国立病院機構名古屋医療センター臨床研究センター 血液免疫研究部 部長
研究協力者 伊部史朗 国立病院機構名古屋医療センター臨床研究センター血液免疫研究部 研究員
研究協力者 藤崎誠一郎 国立病院機構名古屋医療センター臨床研究センター血液免疫研究部 研究員
研究協力者 藤崎彩恵子 国立病院機構名古屋医療センター臨床研究センター血液免疫研究部 研究員
研究協力者 重見麗 国立病院機構名古屋医療センター臨床研究センター血液免疫研究部 研究員
研究協力者 服部純子 国立病院機構名古屋医療センター臨床研究センター血液免疫研究部 研究員
研究協力者 村瀬泰之 名古屋大学大学院工学研究科 大学院生
研究協力者 山根隆 名古屋大学大学院工学研究科 教授

研究要旨：昨年度の研究により、未治療患者由来プロテアーゼ (PR) 阻害剤耐性HIV-1のgag+PRに組換えたウイルスは、親株の野性型HIV-1であるHXB2株よりも優れた複製能を示すことを明らかにした。また、これら耐性ウイルスのgag蛋白質には、耐性ウイルスに特異的な9つのアミノ酸変異 (p17:119-A挿入, p24:H87Q, M96I, G116T, p2: T12S/N, p7:R7K/N, E21V/A, D48E, p6^{gag}:E12A) が存在していた。本年度は、これらのアミノ酸変異のうち、p24(キャプシド)のサイクロフィリンA結合領域内に位置するH87Q変異に着目した研究を行った。ウイルス競争培養実験を行った結果、H87Q変異を野性型に戻した耐性ウイルスは複製能が低下することが明らかになった。この結果は、H87Q変異が耐性ウイルスの複製能向上に関与していることを示した。一方、ピアコアを用いた蛋白質相互作用解析の結果、未治療患者由来PR阻害剤耐性ウイルスのキャプシドは、サイクロフィリンAとの結合能が低下していることが明らかになった。これらの結果から、キャプシドとサイクロフィリンAとの結合力の低下が耐性ウイルスの複製能向上に関与する可能性が示唆された。

A. 研究目的

H16、H17年度の研究から、未治療患者由来プロテアーゼ (PR) 阻害剤耐性HIV-1のgag+PRに組換えたウイルスは、親株の野性型HIV-1であるHXB2株よりも優れた複製能を示すことを明らかにした。この耐性ウイルスの野性型ウイルスを凌ぐ複製能はgag遺伝子に起因していた。Gag蛋白質に惹起したアミノ酸変異を検索した結果、耐性ウイルスに特異的な9つのアミノ酸変異 (p17:119-A挿入, p24:H87Q, M96I, G116T, p2: T12S/N, p7:R7K/N, E21V/A, D48E, p6^{gag}:E12A) を見出し、これらのアミ

ノ酸変異がウイルス複製能向上に関連していると推測した。本年度は、それらの候補アミノ酸変異のうち、p24(キャプシド)内のサイクロフィリンA結合部位に位置するH87Q変異に着目し、①H87Q変異が耐性ウイルスの複製能向上に関与しているか否かを調べ、②耐性ウイルスのキャプシド蛋白質とサイクロフィリンAとの相互作用に変化が生じているか否かを調べるために、両蛋白質を発現・精製し、相互作用解析を行った。また、③耐性ウイルスがgag遺伝子以外においてもウイルス複製能を向上させる遺伝子変異を獲得した

可能性を調べるために、未治療患者由来PR阻害剤耐性ウイルスのゲノムRNAの塩基配列をほぼ全長にわたり決定し、gag以外の8つのウイルス蛋白質内についてもアミノ酸変異を検索した。

B. 研究方法

組換えHIV-1の作成：HIV-1 HXB2株の感染性クローンを基礎とし、未治療患者由来M46I変異型PR阻害剤耐性HIV-1のgag+pol遺伝子に組換えたTN1を作製し、さらに、キャプシド内のH87Q変異を野性型のアミノ酸に戻したTN1・CA_{87H}を作成した。未治療患者由来L90M変異型PR阻害剤耐性HIV-1についても同様にTN5、TN5・CA_{87H}を作製した。

ウイルス複製能の比較：組換えウイルスの複製能の比較は、競争培養実験法を用いて調べた。2種類のウイルスをそれぞれ50 CCID₅₀の感染価にてMT4細胞に接種し、薬剤の無い条件下で4日間隔にて継代培養した。各継代のウイルス存在率は定量的一塩基多型検出法で決定した。

キャプシドとサイクロフィリンAの相互作用解析：野性型ウイルスと未治療患者由来PR阻害剤耐性ウイルスのキャプシド、及び、ヒトサイクロフィリンAを無細胞蛋白質合成系(RTS500, Roche)により発現させ、HisタグまたはGSTタグを利用したアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。キャプシドとサイクロフィリンAの相互作用解析はプラズモン共鳴測定装置であるピアコア(Biacore Japan)を用いて解析した。

ウイルスゲノムの塩基配列の決定：精製したウイルスRNAを用い、RT-nested PCRにて、gag遺伝子からnef遺伝子を含むほぼ完全長のcDNAを増幅した。増幅産物の塩基配列を決定後、9つのウイルス遺伝子(gag, pol, vif, vpr, vpu, tat, rev, env, nef)の塩基配列をアミノ酸配列に変換し、アミノ酸変異を解析した。

C. 研究結果

①キャプシドのコードン87を野性型に戻したTN1・CA_{87H}やTN5・CA_{87H}をそれぞれ、元の組換え耐性ウイルスと共培養し、複製能を評価した。その結果、TN1・CA_{87H}とTN5・CA_{87H}の存在率は共に、継代数が進むに連れて減少し、対するTN1とTN5の存在率が上昇した(図1)。7継代時には、TN1・CA_{87H}とTN5・CA_{87H}の存在率は10%以下にまで減少した。これらの結果から、H87Q変異がTN1とTN5の複製能向上に寄与していることが明らかとなった。

②キャプシドとサイクロフィリンAの相互作用解析：まず、野性型HIV-1であるHXB2のキャプシドN末端ドメインをリガンドとして固定化し、サイクロフィリンAをアナライトとして得られたセンサーグラムを図2Aに示した。サイクロフィリンA濃度の増加に従ってレスポンスも増加し、キャプシドとサイクロフィリンAの相互作用が検出された。算出されたK_D値は53.2±0.3 μMであった。

次に、未治療患者由来プロテアーゼ阻害剤耐性HIV-1(M46IまたはL90M変異型)のキャプシドN末端ドメインをリガンドとして固定化し、同様にサイクロフィリンAとの相互作用を検出した。その結果、サイクロフィリンA濃度の増加に従ったレスポンスの増加は検出されたものの、得られたレスポンスはいずれも低いものであった(図2B, C)。M46I変異型ウイルス(TN1)のキャプシドを用いて算出したK_D値は89.2±1.8 μMであり、L90M変異型ウイルス(TN5)のキャプシドを用いて算出したK_D値は68.3±2.6 μMであった。

③未治療患者由来PR阻害剤耐性ウイルスのゲノムRNA解析：解析したいずれの耐性ウイルスにおいても、蛋白質産生に大きな影響を及ぼすストップコドンやフレームシフトを生ずる変異は9つのウイルス遺伝子内に存在しなかった。Gag蛋白質以外のウイルス蛋白質にも耐性ウイルス特異的なアミノ酸変異が検出された。その中で特に興

味深い変異として、nef蛋白質内の切断部位に位置したアミノ酸変異(図3A)と、tat蛋白質のglutamine-rich domain内部に生じた多数のプロリンへの置換が挙げられる(図3B)。

D. 考察

未治療患者由来PR阻害剤耐性HIV-1に共通に検出された特異的なアミノ酸変異のうち、サイクロフィリンA結合部位に位置するキャプシドのH87Q変異に着目し、この変異を野性型に戻した組換え耐性ウイルスを用いて、H87Q変異が耐性ウイルスの複製能向上に寄与していることを明らかにした。HIV-1の複製にはサイクロフィリンAが必須であるが、H87Q変異によってキャプシドとサイクロフィリンAとの結合に変化が生じ、その結果、ウイルス複製能が向上している可能性が考えられる。

相互作用解析の結果、未治療患者由来PR阻害剤耐性ウイルスのキャプシドは、野性型ウイルスのキャプシドよりも、サイクロフィリンAへの結合力が弱いことが明らかになった。野性型キャプシドと変異型キャプシドの分子モデリングを実施し、立体構造を推定した結果、両者のN末端ドメイン構造に大きな違いは無かった。そのため、サイクロフィリンA結合領域に位置するアミノ酸変異が結合に重要な変化を与えていると判断した。耐性ウイルスのキャプシドのサイクロフィリンA結合領域には、V86A、H87Q変異が存在していた。野性型キャプシドのアミノ酸残基 86V と 87H は、サイクロフィリンAと原子レベルで3つの相互作用を形成しているが、変異型キャプシドでは、これらの相互作用が失われた可能性が考えられる。

ゲノムRNAの遺伝子解析結果から、gagに加え、nefやtatなどのウイルス蛋白質にも興味深いアミノ酸変異が生じており、ゲノム全体に惹起した遺伝子変異によって薬剤耐性HIV-1の複製能が向

上している可能性も考えられる。

E. 結論

未治療患者由来PR阻害剤耐性ウイルスのgag蛋白質内に見出された9つの特異的なアミノ酸変異のうち、サイクロフィリンA結合領域内に位置するH87Q変異に着目した研究を行った。H87Q変異を野性型に戻した組換え耐性ウイルスは複製能が低下した。この結果は、H87Q変異が耐性ウイルス複製能向上に寄与していることを示している。未治療患者由来PR阻害剤耐性ウイルスのキャプシドは、野性型ウイルスのキャプシドと比較して、サイクロフィリンAへの結合力が低下していた。これらの結果から、キャプシドとサイクロフィリンAとの結合力の低下により耐性ウイルスの複製能が向上する可能性が推測された。また、耐性ウイルスのゲノム解析の結果、gag以外の蛋白質にも興味深いアミノ酸変異が生じており、ゲノム全体に惹起した遺伝子変異によって薬剤耐性HIV-1の複製能が向上している可能性も考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Quantitative SNP-Detection Method for Estimating HIV-1 Replicative Fitness: Application to Protease Inhibitor-Resistant Viruses.
S. Ibe, S. Fujisaki, S. Fujisaki, T. Morishita and T. Kaneda
Microbiology and Immunology 50 (10), 765-772, 2006.

2. 学会発表

- 1) Characterization of protease inhibitor-resistant HIV-1 in therapy-naïve individuals.
S. Ibe, U. Shigemi, S. Fujisaki, S. Fujisaki,

J. Hattori, N. Mamiya, M. Hamaguchi, T. Kaneda.

16th International AIDS Conference Toronto Canada Aug. 13-18, 2006.

- 2) Clinical and molecular studies of HIV-infected patients in Nagoya, Japan.

T. Kaneda, S. Ibe, H. Nagai, J. Hattori, S. Fujisaki, S. Fujisaki, M. Kado, K. Kondo, N. Mamiya, and M. Hamaguchi

2nd German Japanese HIV Symposium (平成 18 年 11 月-2006).

- 3) 薬剤耐性 HIV-1・キャプシドとヒト・サイクロフィリン A の相互作用。

伊部史朗、村瀬泰之、山根 隆、金田次弘

第 54 回日本ウイルス学会学術集会 (平成 18 年 11 月-2006)。

- 4) 定量的一塩基多型検出法を用いた HIV-1 競争培養実験法の確立とその応用。

伊部史朗、藤崎彩恵子、藤崎誠一郎、金田次弘

第 54 回日本ウイルス学会学術集会 (平成 18 年 11 月-2006)。

- 5) 2003-2005 年の新規 HIV-1 感染者における薬剤耐性頻度の動向。

藤野真之、瀧永博之、吉田 繁、千葉仁志、伊藤俊広、浅黄 司、松田昌和、岡 慎一、近藤真規子、今井光信、貞升健志、長島真美、伊部史朗、金田次弘、濱口元洋、上田幹夫、正兼亜季、大家正義、渡辺香奈子、白阪琢磨、森 治代、小島洋子、中桐逸博、高田 昇、木村昭郎、南 留美、山本政弘、健山正男、藤田次郎、杉浦 互

第 20 回日本エイズ学会総会 (平成 18 年 11 月-2006)。

- 6) 過去 6 年間の未治療 HIV-1 感染患者に見出された薬剤耐性ウイルスの検出率とウイルスの

特徴。

伊部史朗、藤崎誠一郎、重見 麗、服部純子、横幕能行、間宮均人、濱口元洋、金田次弘
第 20 回日本エイズ学会総会 (平成 18 年 11 月-2006)。

G. 知的所有権の出願・登録状況

なし

図1 キャプシドのH87Q変異を野生型に戻した組換え耐性 HIV-1の複製能の解析

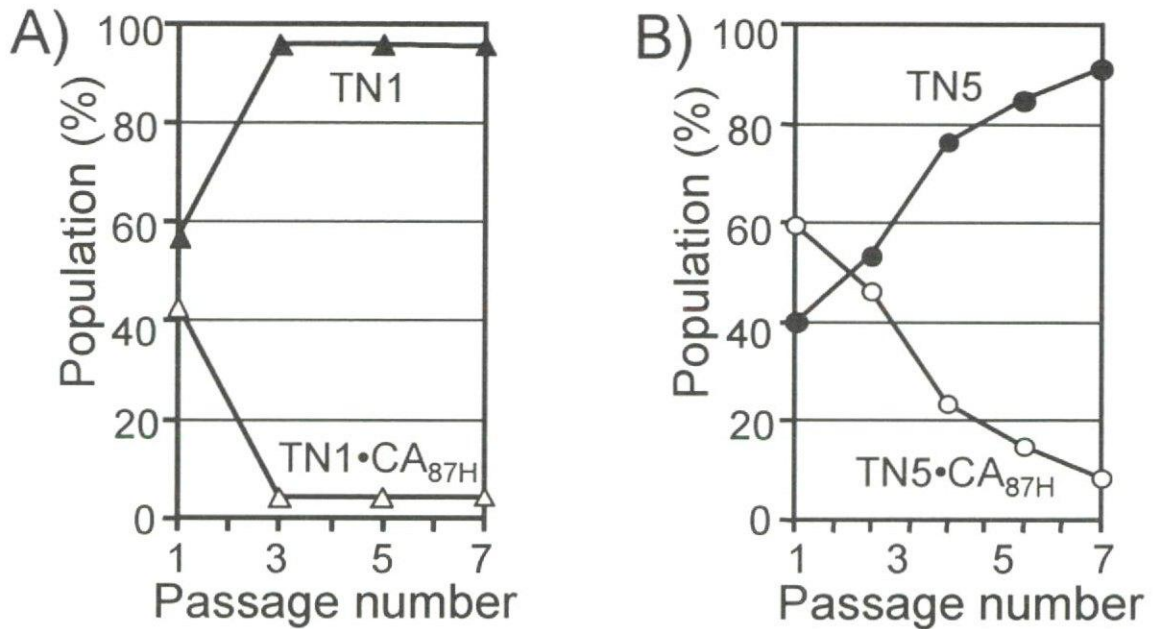
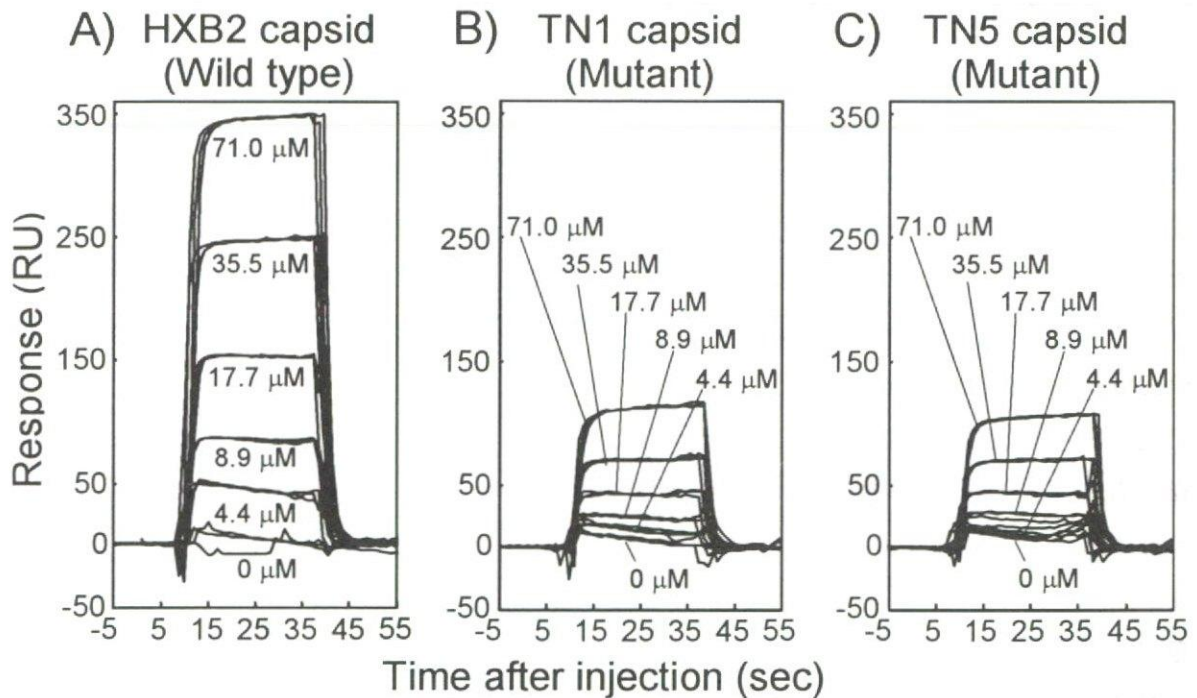


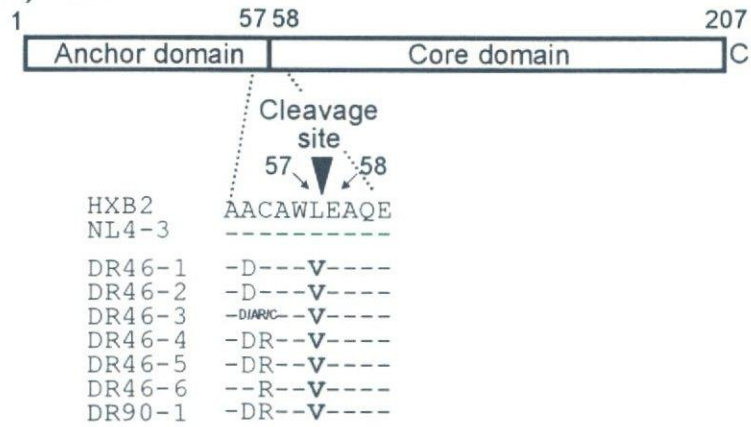
図2 キャプシド／サイクロフィリンA相互作用の解析



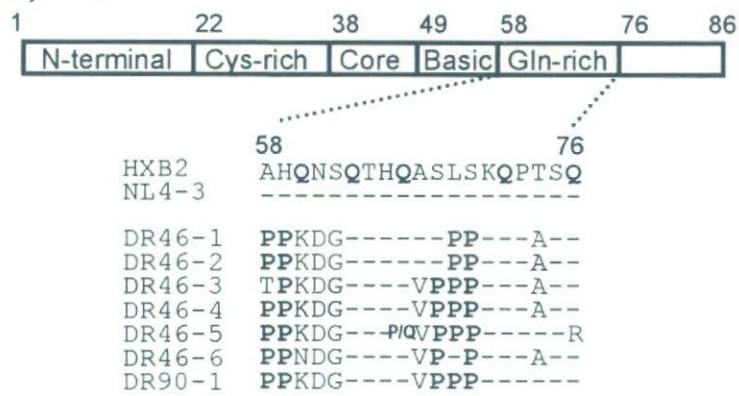
His₆-GST融合キャプシドN末端ドメインをリガンドとして固定化し、His₆-MBP融合サイクロフィリンAをアナライトとして測定した。

図3 Nef, tat蛋白質内の興味あるアミノ酸変異

A) Nef



B) Tat



「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

HIV 治療において薬物血中濃度モニタリング (TDM) は治療の最適化および服薬アドヒアランスの評価のために重要である。本研究では、採取が簡単で感染リスクの低い唾液を血液の代わりに TDM の対象材料として利用できるかどうかを、4 種類の抗 HIV 薬 (EFV、LPV、AZT、3TC) の血漿濃度と唾液濃度を LC-MS/MS を用いて決定することによって検討した。薬剤の唾液中における蛋白結合率は脂溶性に関係なく比較的低い値を示した。すべての薬剤で血漿濃度と唾液濃度の間に相関があったが、濃度比は薬剤によって異なっており、脂溶性の高い EFV では唾液濃度は血漿濃度の約 1/70 しかなかった。唾液中薬剤濃度の時間変化パターンは血中濃度変化から予想されるものとほぼ一致していた。以上の結果は、唾液を用いて TDM を実施することが可能であることが示唆しているが、それをもとに血中濃度を推定するためには、唾液濃度に影響を与える因子を今後詳細に検討する必要がある。

A. 研究目的

抗 HIV 治療において薬物血中濃度モニタリング (TDM) が治療の最適化および服薬アドヒアランスの評価のために有効であることが明らかになってきた。一般に TDM のためには血漿が用いられているが、血液の採取は不便で感染リスクを伴うという問題がある。一方、唾液の採取は非侵襲的であり、簡単、安価で、感染リスクが低く、自宅で行うことも可能である。このような特徴は特に小児に対して大きなメリットがある。したがって、TDM の対象材料として唾液を血液の代わりに用いることができれば、TDM の実施がはるかに容易になり、抗 HIV 治療の維持、管理に役立つと考えられる。しかし、血漿中と唾液中における抗 HIV 薬濃度の関係については今までほとんど研究が行われてこなかった。そこで本研究では、抗 HIV 治療を受けている HIV 感染者を対象に、抗 HIV 薬の唾液濃度と血液濃度の関係、及び服薬後の唾液濃度の時間変化を調べ、唾液を用いた TDM の実行可能性を検討した。

B. 研究方法

慶応大学病院、荻窪病院、大阪医療センターで抗 HIV 治療を受けている患者 7 人を対象とした。そのうちの 2 人の患者からは経時的に採取した唾液を用いて唾液中薬物動態を調べた。すなわち、患者 A (TDF+3TC+ATVr 服用、CD4 数 305、VL<50) からは服用直前と服薬 2、6、12 時間後に、患者 B (TDF+3TC+LPVr、CD4 数 186、VL<50) からは服用直前と服薬 2、4、6、12 時間後に唾液を採取した。血液採取はクエン酸ナトリウムを抗凝固剤と

して用い、Ficoll-Paque を用いて血漿を分離した。唾液の採取はオーラルテスター唾液採取キット (トクヤマデンタル) を用いて行った。血漿及び唾液中の非結合型 (遊離) 薬剤の分画はセントリフリー限外濾過ユニット (ミリポア) を用いて行った。

検体中の抗 HIV 薬濃度を測定するために、まず検体 20 μ L に 80 μ L のメタノールを加えてよく混合し、14,000 rpm で 1 分間遠心して上清を採取し、減圧加熱遠心乾燥器で乾燥した後、20 μ L の LC 初期移動相に溶解した。抽出液中の抗 HIV 薬 (AZT、3TC、EFV、ATV、LPV) の定量は慶応義塾大学医学部中央機器管理部所有の LC-MS/MS (Agilent 社製 1100 Series G1376A キャピラリ LC と Applied Bio Systems 社製 API QSTAR PULSAR i) を用いて行った。LC への注入量は 2 μ L、流速は 10 μ L/min とし、移動相は 5 mM 酢酸アンモニウム (pH 7.0) をベースとして、AZT と 3TC に対しては 10 分間でメタノール濃度 5%~45% の勾配をかけ、EFV、ATV、及び LPV に対しては 50%~90% の勾配をかけた。内部定量標準としては、AZT と 3TC に対しては 1 μ M クロロアデノシン、EFV、ATV、及び LPV に対しては 0.1 μ M サキナビルを用いた。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。各薬剤の量はクロマトグラム上の対象薬剤ピークと内部標準薬ピークの面積比から算出した。

(倫理面への配慮)

本研究を実施するに当たり各 HIV-1 感染者に研究の概要と意義を説明し同意を得た上で血液と唾液を採取した。

C. 研究成果

健常人の血漿と唾液に各種抗 HIV 薬 (EFV、LPV、AZT、3TC) を 2.5 μM になるように加え、それらの限外ろ過液中の薬剤濃度を測定することによって蛋白結合率を求めた。その結果、血漿と唾液中の蛋白結合率はそれぞれ EFV が 99.6% と 72.0%、LPV が 98.4% と 65.3%、AZT が 45.9% と 47.9%、そして 3TC が 47.9% と 72.4% であった。すなわち、血漿中の蛋白結合率は脂溶性の高い EFV と LPV が高く、脂溶性の低い AZT と 3TC が低い傾向があった。一方、唾液中の蛋白結合率は脂溶性に関係なく比較的低い値であった。

次に、抗 HIV 療法を受けている患者の血漿と唾液を用いて、それぞれの全薬剤濃度と遊離薬剤濃度を求めた。EFV は血漿全薬剤濃度、血漿遊離薬剤濃度、及び唾液全薬剤濃度の間に有意な相関が認められた (表 1)。AZT は 2 症例のみのデータであるが、血漿全薬剤濃度、血漿遊離薬剤濃度、唾液全薬剤濃度、及び唾液遊離薬剤濃度のすべてで関係があった (表 2) 一方、3TC は血漿全薬剤濃度と唾液全薬剤濃度の間にのみ有意な相関が認められた (表 3)。濃度そのものを比較すると、EFV では、唾液全薬剤濃度は血漿全薬剤濃度より低く、血漿遊離薬剤濃度より高かった。AZT では、唾液全薬剤濃度は血漿薬剤濃度とほぼ同じであった。3TC では、唾液濃度が血漿濃度の 1/5 程度であった。EFV は唾液濃度が血漿濃度の 1/70 程度しかなかったが、血漿中の遊離薬剤濃度と比較すると約 8 倍高かった。

抗 HIV 薬服用後の唾液中薬剤濃度の時間変化を調べた。患者 A では、3TC の最高値は 6 時間後で 0.40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、ATV の最高値は 12 時間後で 0.17 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった (図 1)。患者 B では、3TC の最高値は 2 時間後で 0.40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、LPV の最高値は 2 時間後で 0.10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった (図 2)。これらの唾液中薬剤濃度の時間変化パターンは血中濃度変化から予想されるものとほぼ一致していた。ただし、プロテアーゼ阻害薬に関しては、唾液中薬剤濃度は血漿全薬剤濃度ではなく、血漿蛋白結合率から推定される血漿遊離薬剤濃度に近かった。

D. 考察

非ヌクレオシド逆転写酵素阻害薬である EFV とプロテアーゼ阻害薬である LPV は血漿蛋白結合率が非常に高く、ヌクレオシド逆転写酵素阻害薬である AZT と 3TC は血漿蛋白結合率が低いことが知られている。これらの薬剤の唾液中蛋白結合率を調べたところ、いずれも低レベルであることが分かった。血漿中における EFV と LPV の主な結合タンパク質はそれぞれアルブミンと α_1 -酸性糖タンパク質であり、これらのタンパク質が唾液中にほとんど存在しないことから、以上の結果は予想通

りであった。

抗 HIV 治療を受けていた患者を対象に、EFV、AZT、および 3TC の血漿中と唾液中の薬剤濃度を調べた結果、いずれの薬剤も両者の間に相関が認められたが、濃度そのものは 3 者の間で大きく異なっていた。すなわち、AZT は血漿濃度と唾液濃度がほぼ同じであったが、3TC は唾液濃度が血漿濃度の 1/5 程度、EFV は唾液濃度が血漿濃度の 1/70 程度しかなかったが、血漿中の遊離薬剤濃度と比較すると約 8 倍高かった。EFV の血漿濃度と唾液濃度の関係は、血漿中に存在する薬剤のうち遊離薬剤のみが細胞膜を通過して唾液腺房に貯蔵され、そこで濃縮された後に唾液として分泌されると考えると説明がつく。

唾液濃度と血漿濃度の間に相関があったこと、さらに唾液中の薬物動態が血漿中のそれと類似していたことから、唾液を用いて TDM を実施することは可能であることが示唆された。しかし一方では、唾液中薬剤濃度と血漿中薬剤濃度が一致しないことが明らかになった。したがって、両者の比が同一患者でほぼ一定であることが実証されなければ、唾液濃度から血漿濃度を推定することは困難であるということになる。唾液を用いた TDM の実行可能性を検証するためには、今後、唾液中薬剤濃度に対する、唾液の採取方法、飲食、バイオリズムなどの影響を詳細に検討する必要がある。

E. 結論

抗 HIV 薬の唾液濃度と血中濃度との間に有意な相関があることが示されたが、両者は必ずしも一致していなかった。この結果は唾液を用いて TDM を実施できる可能性を示唆しているが、その実用化のためには、唾液濃度に影響を与える因子を詳細に検討する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kato, S., Hanabusa, H., Kaneko, S., Takakuwa, K., Suzuki, M., Kuji, N., Jinno, M., Tanaka, R., Kojima, K., Iwashita, M., Yoshimura, Y., and Tanaka, K. (2006) 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 20(7):967-973.
2. Hamatake, M., Nishizawa, M., Yamamoto, N., Kato, S., and Sugiura, W. A simple competitive RT-PCR assay for quantitation of HIV-1 subtype B and non-B RNA in plasma. J. Virol. Methods (in press)

2. 学会発表

1. Shingo Kato, Rie Tanaka, Hideji Hanabusa, Ei Kinai, Masayoshi Negishi. Quantification of intracellular efavirenz in HIV-1-infected patients by LC-MS/MS. XVI International AIDS Conference. 2006, August 13-18, Toronto, Canada.

2. 浜武牧子、浦野恵美子、花房秀次、加藤真吾、Tee Kok Keng、武部豊、山本直樹、駒野淳「血友病患者におけるエイズ長期未発症例における高力価中和抗体の存在と標的部位の同定」第20回日本エイズ学会学術集会(2006年11月30日-12月2日、東京)

3. 木内英、岩室紳也、近藤真規子、今井光信、花房秀次、加藤真吾「母子感染予防におけるAZT血中濃度」第20回日本エイズ学会学術集会(2006年11月30日-12月2日、東京)

4. 田中理恵、加藤真吾、井土美由紀、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20回日本エイズ学会学術集会(2006年11月30日-12月2日、東京)

5. 須藤弘二、田中理恵、近藤真規子、今井光信、加藤真吾「HIV感染者PBMC中プロウイルスのmultiplex nested PCRによる構造解析」第20回日本エイズ学会学術集会(2006年11月30日-12月2日、東京)

6. 花房秀次、木内英、太田未緒、和田育子、

小島賢一、加藤真吾「血友病HIV/HCV肝炎の現状とPEG IFN治療の課題」第20回日本エイズ学会学術集会(2006年11月30日-12月2日、東京)

7. 加藤真吾、田中理恵、栗原健、田上正、前田憲昭「唾液を用いた抗HIV薬の薬物動態の検討」第20回日本エイズ学会学術集会(2006年11月30日-12月2日、東京)

8. 西澤雅子、加藤真吾、三浦秀佳、山本直樹、杉浦互「細胞内における抗HIV薬(プロテアーゼ阻害剤)の薬剤濃度のモニタリング」第20回日本エイズ学会学術集会(2006年11月30日-12月2日、東京)

9. 田上正、北川善政、連利隆、池田正一、加藤真吾、田中理恵、前田憲昭「唾液中のHIV DNAの定量」第20回日本エイズ学会学術集会(2006年11月30日-12月2日、東京)

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

表1. 患者検体におけるEFV濃度(μM)

患者	全血漿	遊離血漿	全唾液	遊離唾液
1	0.15	0.0011	0.0042	BDL
2	4.89	0.0068	0.0926	0.0040
3	2.08	0.0028	0.0141	0.0030
4	2.48	0.0049	0.0248	0.0034
5	0.84	0.0026	0.0135	0.0011

表2. 患者検体におけるAZT濃度(μM)

患者	全血漿	遊離血漿	全唾液	遊離唾液
1	NA	NA	NA	NA
2	NA	NA	NA	NA
3	0.21	0.140	0.31	0.215
4	0.10	0.076	0.13	0.077
5	NA	NA	NA	NA

表3. 患者検体における3TC濃度(μM)

患者	全血漿	遊離血漿	全唾液	遊離唾液
1	NA	NA	NA	NA
2	3.0	2.3	0.66	0.42
3	3.6	1.7	0.88	0.36
4	2.2	1.7	0.21	0.10
5	2.9	2.2	0.41	0.14

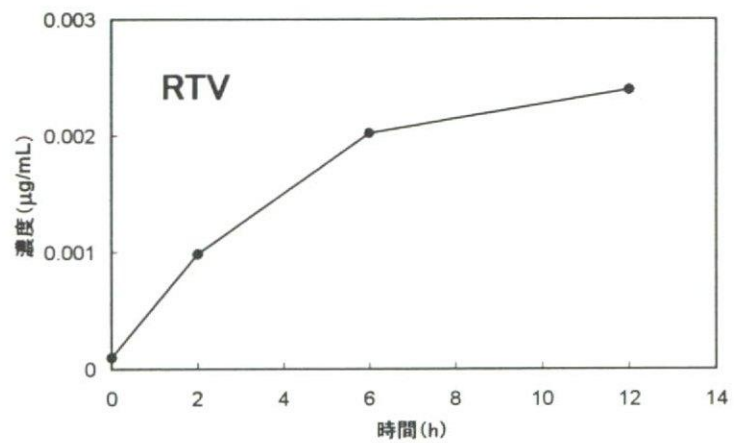
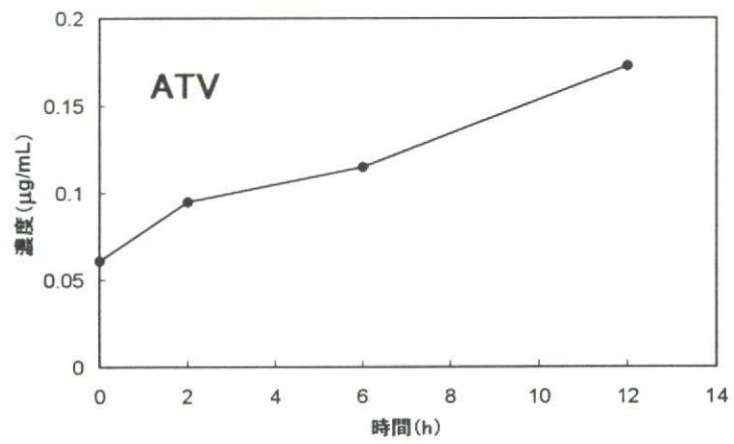
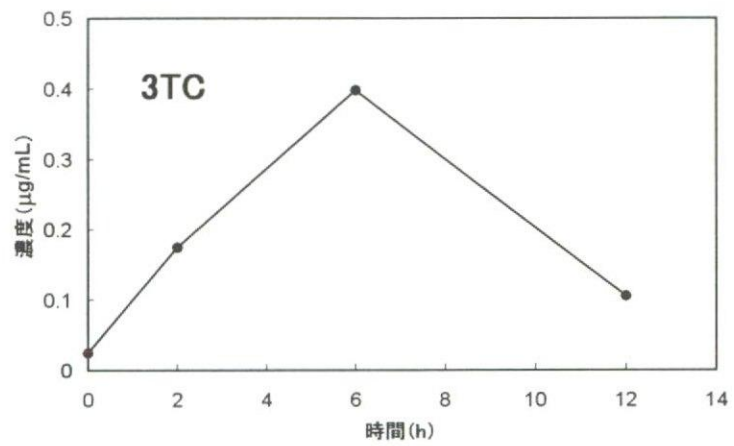


図1. 患者Aの唾液中薬物動態

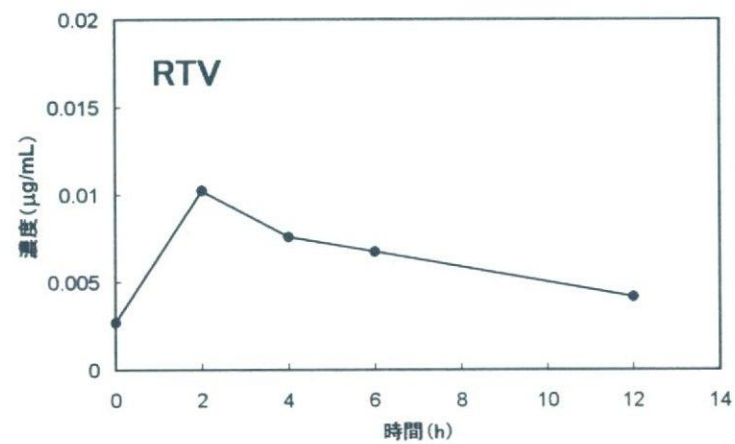
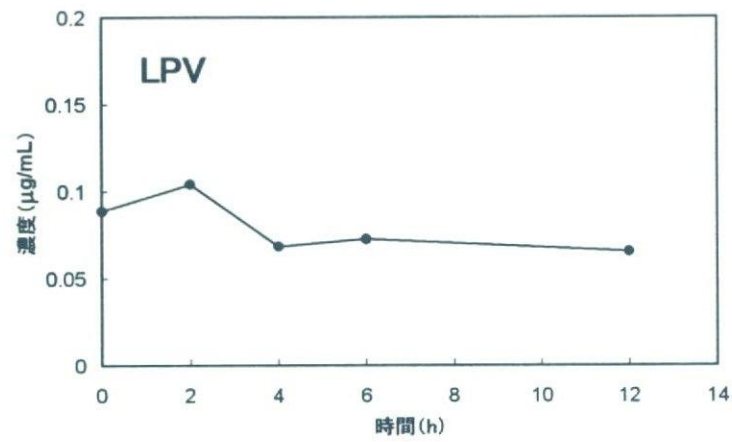
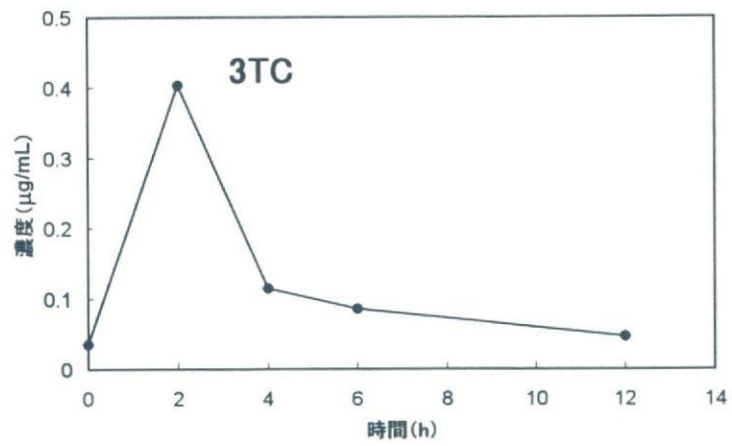


図2. 患者Bの唾液中薬物動態

研究要旨

新規の核酸系逆転写酵素阻害薬 tenofovir disoproxil fumarate (TDF)は、既存の抗 HIV 薬に耐性となった HIV に対しても有効性が期待されるが、重篤な腎障害を起こすことがあり注意が必要である。TDF による腎障害は尿細管障害を主体とするため、血清 creatinine 値のフォローだけでは発見が遅れる可能性が高い。尿細管障害の鋭敏なマーカーである尿中の B2-microglobulin (U-b2MG)を TDF 内服患者 70 人と、TDF を含まない抗 HIV 療法を受けている患者 90 人で比較したところ、TDF 内服患者で有意に高かった ($p < 0.0001$)。血清 creatinine 値には両群間で差が無かったため、U-b2MG は TDF による腎障害の早期マーカーとして有用と考えられる。TDF 内服患者で U-b2MG 値と他の様々な因子との相関を解析したところ、プロテアーゼ阻害薬であるカレトラ (LPVr) との併用と患者の低体重が、U-b2MG が高値となる危険因子であることが判明した。LPVr 併用と低体重はいずれも、TDF の血中濃度を上げるため、尿細管障害を起こしやすくしていると考えられる。

A. 研究目的

U-b2MG の TDF による腎障害の早期マーカーとしての有用性を解析する。また、TDF による腎障害の危険因子を探る。

B. 研究方法

TDF 内服患者と、TDF を含まない抗 HIV 療法を受けている患者で、血清 creatinine 値と U-b2MG 値を横断的に比較する。様々なパラメータを解析し、U-b2MG 値との相関を解析する。(倫理面への配慮)

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。

C. 研究結果

TDF 内服患者 70 人と、TDF を含まない抗 HIV 療法を受けている患者 90 人の血清 creatinine 値と U-b2MG 値を横断的に測定した。両群の間に、血清 creatinine 値と Cockcroft-Gault の式から計算される creatinine clearance には有意な差は認められなかったが、U-b2MG は TDF 内服患者で

有意に高かった ($p < 0.0001$) (図 1)。TDF 内服患者を、LPVr 併用群、LPVr 以外のリトナビル (RTV) 併用群、RTV 非併用群の 3 群に分類したところ、LPVr 併用群は他の 2 群に対して、有意に U-b2MG 値が高かった ($p = 0.0007$, $p = 0.026$) (図 2)。TDF 内服患者の年齢、体重、CD4 細胞数、TDF 投与期間、LPVr 併用、について、U-b2MG 値に対して多変量解析を行ったところ、LPVr 併用 ($F = 0.394$) の次に、体重が強い負の相関 ($F = -0.305$) を持っていた。実際に、LPVr 併用群で U-b2MG を体重に対してプロットしてみたところ、有意な負の相関 ($p = 0.0029$) が認められた (図 3)。LPVr 非併用群 (LPVr 以外の RTV 併用群 + RTV 非併用群) でも同様の傾向が見られたが、有意ではなかった。

D. 考察

LPVr 併用は、AUC で 32% 血中 TDF 濃度を上昇させることが知られており、また、低体重も TDF 濃度を上げると推察される。TDF 濃度が上昇することが、尿細管障害を起こしやすくしている可能性が考えられる。

E. 結論

U-b2MG は、TDF による腎障害のマーカーとして、血清 creatinine 値より鋭敏であると言える。また、LPVr の併用と患者の低体重は、TDF による腎障害の危険因子であると考えられる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Matusoka-Aizawa S, Gatanaga H, Sato H, Koike K, Kimura S, Oka S. Cooperative contribution of gag substitutions to nelfinavir-dependent enhancement of precursor cleavage and replication of human immunodeficiency virus type-1. *Antiviral Res* 2006; 70:51-59.

Gatanaga H, Tachikawa N, Kikuchi Y, Teruya K, Genka I, Honda M, Tanuma J, Yazaki H, Ueda A, Kimura S, Oka S. Urinary beta2-microglobulin as a possible sensitive marker for renal injury caused by tenofovir disoproxil fumarate. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2006; 22:744-748.

Ghosh AK, Sridhar PR, Leshchenko S, Hussain AK, Li J, Kovalevsky AY, Walters DE, Wedekind JE, Grum-Tokars V, Das D, Koh Y, Maeda K, Gatanaga H, Weber IT, Mitsuya H. Structure-based design of novel HIV-1 protease inhibitors to combat drug resistance. *J Med Chem* 2006; 49:5252-5261.

Abe Y, Matsubara D, Gatanaga H, Oka S, Kimura S, Sasao Y, Sautoh K, Fujii T, Sato Y, Sata T, Katano H. Distinct expression of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded proteins in Kaposi's

sarcoma and multicentric Castleman's disease. *Pethol Int* 2006; 56:617-624.

Gatanaga H, Yazaki H, Tanuma J, Honda M, Genka I, Teruya K, Tachikawa N, Kikuchi Y, Oka S. HLA-Cw8 primarily associated with hypersensitivities to nevirapine. *AIDS* 2007; 21:264-265.

Gatanaga H, Ibe S, Matsuda M, Yoshida S, Asagi T, Kondo M, Sadamasu K, Tsukada H, Masakane A, Mori H, Takata N, Minami R, Tateyama M, Koike T, Itoh T, Imai M, Nagashima M, Gejyo F, Ueda M, Hamaguchi M, Kojima Y, Shirasaka T, Kimura A, Yamamoto M, Fujita J, Oka S, Sugiura W. Drug-resistant HIV-1 prevalence in patients newly diagnosed with HIV/AIDS in Japan. *Antiviral Res* (in press)

Yamanaka H, Gatanaga H, Kosalaraksa P, Matsuoka-Aizawa S, Takahashi T, Kimura S, Oka S. Novel mutation of human DNA polymerase gamma associated with mitochondrial toxicity induced by anti-human immunodeficiency virus treatment. *J Infect Dis* (in press)

2. 学会発表

Yamanaka H, Gatanaga H, Kosalaraksa P, Matsuoka S, Kimura S, Oka S. A novel active site mutation of human DNA polymerase gamma associated with nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NRTI)-induced mitochondrial toxicity. The 16th International AIDS Conference. Toronto, Canada. August, 2006.

湯永博之、蜂谷敦子、岡慎一、木村哲. HIV-1 の polymorphism と非核酸系逆転写酵素阻害薬

(NNRTI)に対する耐性変異の出現 内科学会
総会 2006年4月

本田美和子、矢崎博久、田沼順子、源河いくみ、
瀧永博之、照屋勝治、立川夏夫、菊池嘉、木村
哲、岡慎一。重篤な血栓性血小板減少性紫斑病
を契機にHIV感染が判明し、血漿交換と抗HIV
治療薬導入によって救命しえた一例 日本感
染症学会総会 2006年4月

立川夏夫、菊池嘉、照屋勝治、源河いくみ、瀧
永博之、本田美和子、矢崎博久、田沼順子、上
田晃弘、岡慎一、木村哲。AIDSに伴う悪性リン
パ腫に対して免疫療法を試みた1例 日本感
染症学会総会 2006年4月

瀧永博之、菊池嘉、立川夏夫、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。2003-2005年に新規に診断された
未治療 HIV-1 感染者における HIV-1 薬剤耐性
変異、及びB・C型肝炎マーカー 日本感染症
学会総会 2006年4月

瀧永博之、山中ひかる、Pope Kosalaraksa、松
岡佐織、高橋孝雄、木村哲、岡慎一。抗 HIV
療法によるミトコンドリア毒性と関連するヒ
ト DNA polymerase γ の新規遺伝子変異 第
7回熊本エイズセミナー 2006年9月

瀧永博之。シンポジウム「より良い HAART
に向けて」副作用回避に向けた SNPs 解析、遺
伝子解析 日本エイズ学会総会 2006年12月

矢崎博久、近江恭子、松村次郎、神村麻穂子、
渡辺恒二、渡辺珠代、本田元人、中村匡宏、阿
部泰尚、田沼順子、本田美和子、源河いくみ、
瀧永博之、照屋勝治、立川夏夫、菊池嘉、岡慎
一。当院での新規抗 HIV 薬の変遷と d4T 投与
者の経過について 日本エイズ学会総会

2006年12月

神村麻穂子、渡辺恒二、中村匡宏、近江恭子、
松村次郎、渡辺珠代、本田元人、阿部泰尚、矢
崎博久、田沼順子、本田美和子、瀧永博之、源
河いくみ、照屋勝治、立川夏夫、菊池嘉、岡慎
一。Atazanavir を key drug とした HAART
の2年間の治療効果について 日本エイズ学会
総会 2006年12月

立川夏夫、渡辺恒二、神村麻穂子、中村匡宏、
近江恭子、松村次郎、渡辺珠代、本田元人、阿
部泰尚、矢崎博久、田沼順子、本田美和子、瀧
永博之、源河いくみ、照屋勝治、菊池嘉、岡慎
一。HIV/HCV 合併血友病症例での Interferon
を含む抗 HCV 治療失敗後の経過 日本エイズ
学会総会 2006年12月

渡辺珠代、安岡彰、近江恭子、松村次郎、神村
麻穂子、渡辺恒二、本田元人、中村匡宏、阿部
泰尚、田沼順子、矢崎博久、本田美和子、源河
いくみ、瀧永博之、照屋勝治、立川夏夫、菊池
嘉、岡慎一。当院における HIV 日和見合併症
の動向 日本エイズ学会総会 2006年12月

源河いくみ、田沼順子、阿部泰尚、神村麻穂子、
渡辺恒二、渡辺珠代、近江恭子、松村次郎、本
田元人、中村匡宏、矢崎博久、本田美和子、瀧
永博之、照屋勝治、立川夏夫、菊池嘉、岡慎一。
自家末梢血幹細胞移植術を施行した難治性
HIV 関連悪性リンパ腫の2例 日本エイズ学
会総会 2006年12月

源河いくみ、田沼順子、阿部泰尚、神村麻穂子、
渡辺恒二、渡辺珠代、近江恭子、松村次郎、本
田元人、中村匡宏、矢崎博久、本田美和子、瀧
永博之、照屋勝治、立川夏夫、菊池嘉、岡慎一。
自家末梢血幹細胞移植術を施行した難治性
HIV 関連悪性リンパ腫の2例 日本エイズ学
会総会 2006年12月

阿部泰尚、神村麻穂子、近江恭子、渡辺恒二、松村次郎、渡辺珠代、本田元人、中村匡宏、矢崎博久、田沼順子、本田美和子、源河いくみ、瀧永博之、照屋勝治、立川夏夫、菊池嘉、岡慎一。当センターの HIV 感染者における脳トキソプラズマ症例の検討 日本エイズ学会総会 2006 年 12 月

本田元人、近江恭子、松村次郎、神村麻穂子、渡辺恒二、渡辺珠代、中村匡宏、阿部泰尚、矢崎博久、田沼順子、本田美和子、源河いくみ、瀧永博之、照屋勝治、立川夏夫、菊池嘉、岡慎一。AIDS に合併した進行性多巣性白質脳症 11 例の臨床的検討 日本エイズ学会総会 2006 年 12 月

藤野真之、瀧永博之、吉田繁、千葉仁志、伊藤俊広、浅黄司、松田昌和、岡慎一、近藤真規子、今井光信、貞升健志、長島真美、伊部史朗、金田次弘、浜口元洋、上田幹夫、正兼亜季、大家正義、渡辺香奈子、白阪琢磨、森治代、小島洋子、中桐逸博、高田昇、木村昭郎、南留美、山本政弘、健山正男、藤田次郎、杉浦互。2003-2005 年の新規 HIV-1 感染者における薬剤耐性頻度の動向 日本エイズ学会総会 2006 年 12 月

蜂谷敦子、瀧永博之、児玉栄一、松岡雅雄、滝口雅文、岡慎一。NRTI を含む治療中に誘導された新しいネビラピン(NVP)耐性変異 日本エイズ学会総会 2006 年 12 月

藤崎誠一郎、藤崎彩恵子、伊部史朗、浅黄司、吉田繁、正兼亜季、大家正泰、渡辺香奈子、瀧永博之、松田昌和、貞升健志、岡田清美、近藤真規子、秦真美、溝上泰司、森治代、南留美、杉浦互、金田次弘。HIV-1 遺伝子型薬剤耐性検査のバリデーション 日本エイズ学会総会 2006 年 12 月

林田庸総、瀧永博之、菊池嘉、岡慎一。Efavirenz の血中濃度に関わる cytochrome P450 2B6 の遺伝子多型についての日本人とザンビア人の比較 日本エイズ学会総会 2006 年 12 月

本田美和子、近江恭子、松村次郎、渡辺恒二、神村麻穂子、渡辺珠代、本田元人、中村匡宏、阿部泰尚、矢崎博久、田沼順子、源河いくみ、瀧永博之、照屋勝治、立川夏夫、菊池嘉、岡慎一。Predictors for the initial CD4 decline after antiretroviral treatment interruption in the SMART study 日本エイズ学会総会 2006 年 12 月

照屋勝治、近江恭子、松村次郎、神村麻穂子、渡辺恒二、渡辺珠代、本田元人、中村匡宏、阿部泰尚、矢崎博久、田沼順子、本田美和子、瀧永博之、源河いくみ、立川夏夫、菊池嘉、岡慎一。Lopinavir (LPV/r)を含んだ HAART の長期成績に関する検討 日本エイズ学会総会 2006 年 12 月

渡辺恒二、神村麻穂子、中村匡宏、近江恭子、松村次郎、渡辺珠代、本田元人、阿部泰尚、矢崎博久、田沼順子、本田美和子、瀧永博之、源河いくみ、照屋勝治、立川夏夫、菊池嘉、岡慎一。結核性胸膜炎に結核性脊椎炎・流注膿瘍を合併した HIV 感染者の一例 日本エイズ学会総会 2006 年 12 月

田沼順子、近江恭子、松村次郎、神村麻穂子、渡辺恒二、渡辺珠代、本田元人、中村匡宏、阿部泰尚、矢崎博久、本田美和子、源河いくみ、瀧永博之、照屋勝治、立川夏夫、菊池嘉、岡慎一。当センターの HIV 感染者における非定型抗酸菌症例の検討 日本エイズ学会総会 2006 年 12 月