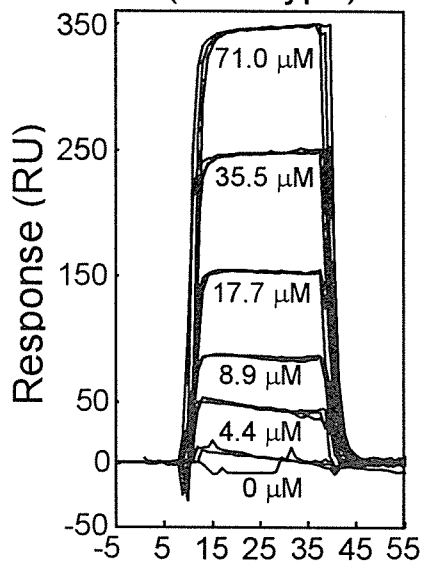
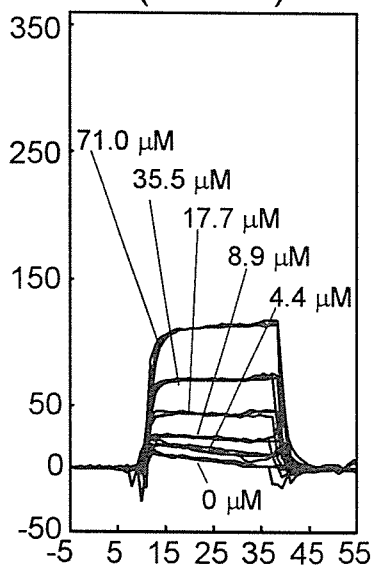


### 図7 キャプシド／サイクロフィリンA相互作用の解析

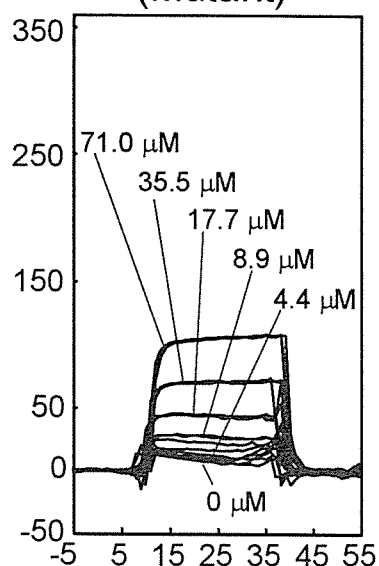
A) HXB2 capsid (Wild type)



B) TN1 capsid (Mutant)



C) TN5 capsid (Mutant)



Time after injection (sec)

His<sub>6</sub>-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、His<sub>6</sub>-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。

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  
～毛髪、唾液、細胞内における抗 HIV 薬定量とその治療上の意義に関する研究～

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

毛髪あるいは唾液を用いて血中薬剤濃度モニタリング（TDM）を実施できるかどうかを検討するために、これらの生体材料から薬剤を抽出、定量する方法を開発した。アドヒアランスが良好な患者では毛髪軸方向に有意な濃度変化はなかったが、薬剤の中断と開始を経験した患者では毛髪内濃度分布が服薬歴と非常によく一致していた。これらの結果は、薬剤は毛髪内でほとんど拡散することなく、実際の服薬歴が毛髪の軸方向に年輪のごとく保持されていることを示している。この結果は、毛髪を用いてアドヒアランスの客観的評価することが可能であることを示している。すべての薬剤で血漿濃度と唾液濃度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詳細に検討する必要がある。細胞内薬剤濃度を正確に測定する方法を確立した。細胞内濃度は血中の全薬剤濃度よりも遊離薬剤濃度に強い相関があることが分かった。この方法は細胞内薬剤濃度が治療効果あるいは副作用とどのような関係があるかを研究するために有力な道具になると考えられる。

### A. 研究目的

HIV 感染症の治療は多剤併用療法の導入によって著しい進歩を遂げた。しかし一方では、薬剤耐性ウイルスの出現や副作用が問題となってきた。その原因として、血中薬剤濃度が不十分であったり高すぎたりすることが考えられる。実際、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有効であることが多くの研究によって示されている。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ため、TDM が HIV 治療において広く利用されているとは言いがたい。一方、毛髪や唾液は、採取が非侵襲的、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新生児に対しては大きなメリットがある。TDM の対象材料として毛髪や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、管理に役立つであろう。そこで本研究では、毛髪あるいは唾液を用いた TDM の実行可能であるかどうかを検討した。

一方、抗 HIV 薬は細胞内のウイルス複製を阻害するのであって、血漿中のウイルス粒子に対してはほとんど阻害効果がない。したがって、体内に

おける抗 HIV 作用は血漿中の薬剤濃度ではなく、細胞内の薬剤濃度と強く関連していると考えられる。しかし、抗 HIV 薬は細胞内の量が非常に少なく、その多くが高い脂溶性をもつため、細胞内濃度を測定することが困難である。そこで最も広く使用されている薬剤の一つである EFV について、細胞内濃度を正確に測定する方法を開発した。

### 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を対象とした。

定量用標準薬剤として LPV（アボット）、NFV（日本たばこ）、SQV（ロシュ）、ATV（ブリストル・マイヤーズ）、EFV（萬有）、3TC（グラクソ・スミスクライン）、クロロアデノシン（シグマ）を用いた。

毛髪は患者の後頭部から採取した。これを長さ 2 mm ごとに切断し、2 ml 遠心チューブに入れ、200  $\mu$ l のメタノールと径 2 mm のジルコニアビーズを 8 粒加え、さらに内部定量標準として 0.1  $\mu$ M SQV を 10  $\mu$ l (1 pmol) 加えた。このチューブをビーズ式細胞破碎装置（TOMY）で 4,000 rpm、5 分間の処理を、1 分の氷冷を間にはさんで、3 回行った。破碎後、メタノールの上清を採取し、真空遠心器で乾燥させ、LC 移動相 20  $\mu$ l に溶解した。

血漿及び唾液は、まず検体 20  $\mu\text{L}$  に 80  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  の LC 初期移動相に溶解した。

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、20  $\mu\text{L}$  の LC 初期移動相に溶解した。

抗 HIV 薬の定量は慶應義塾大学医学部中央機器管理部所有の LC-MS/MS (Agilent 社製 1100 Series G1376A キャピラリー 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  $\mu\text{l}$ 、流速は 10  $\mu\text{l}/\text{min}$  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、NFV、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  $\mu\text{M}$  クロロアデノシン、EFV、ATV、NFV、及び LPV に対しては 0.1  $\mu\text{M}$  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。

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。

(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

### 毛髪内薬剤濃度

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

健常人毛髪抽出液を LC-MS/MS に注入した場合、各標準薬剤が溶出する位置にはまったくピークが観察されなかったが、薬剤服用患者毛髪抽出液を注入した場合は、標準薬剤とまったく同じ溶出位置に単一のピークが観察された。各薬剤回収率

は LPV、NFV、SQV がそれぞれ 96.1、94.0、92.8% であった。定量感度を健常者の毛髪抽出物で観察されたノイズレベルの 10 倍とすると、LPV、NFV、SQV はそれぞれ 0.67、0.08、1.03 fmol であった。内部標準の SQV で補正をかけた後の測定誤差は変動係数で LPV、NFV がそれぞれ 6.4、5.2% であった。シグナル強度の用量依存性を 200 から 0.098 fmol までの 2 倍段階希釈において調べると、LPV、NFV、SQV の決定因子 ( $R^2$ ) はそれぞれ 0.998、0.998、0.999 であった。以上の結果から、本研究で開発した方法は回収率、定量感度、定量誤差、定量性のいずれに点でも非常に優れた定量系であるといえる。

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

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

最後に、薬剤の服薬歴が毛髪内薬剤濃度の分布に反映するかどうかを調べるために、LPV の投与を服薬困難のために中断し、その後 NFV を投与したがこれも服薬困難のために中止した患者 (H390) の毛髪を検体とした。毛髪内の濃度分布は毛髪の成長速度を 1 ヶ月あたり 1 cm と仮定した場合に服薬歴と非常によく一致していた (図 2 と 3)。この結果から、薬剤は毛髪内でほとんど拡散することなく、実際の服薬歴が軸方向の濃度分布に反映すること考えられる。

### 唾液内薬剤濃度

健常人の血漿と唾液に各種抗 HIV 薬 (EFV、LPV、AZT、3TC) を 2.5  $\mu\text{M}$  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  $\mu\text{g/ml}$ 、ATV の最高値は 12 時間後で 0.17  $\mu\text{g/ml}$  であった (図 4)。患者 B では、3TC の最高値は 2 時間後で 0.40  $\mu\text{g/ml}$ 、LPV の最高値は 2 時間後で 0.10  $\mu\text{g/ml}$  であった (図 5)。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。

#### 細胞内薬剤濃度

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  $\mu\text{M}$  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  $\mu\text{M}$  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  $\mu\text{M}$  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  $\mu\text{M}$  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  $\mu\text{m}$  と仮定して細胞内濃度を計算すると 400  $\mu\text{M}$  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 6)。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 7)。両者の関係は、スピアマンの順位相関係数  $R_s$  が 0.76、 $P$  値は 0.0082 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た。

#### D. 考察

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

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

に有効であることを強く示唆するものである。

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

今回の実験では毛髪間で抗HIV薬濃度に差が認められなかった。しかし、毛髪は成長期の後、休止期に入り抜け落ちるといった過程をたどる。おそらく休止期の毛髪は薬剤の取り込みが低下していると考えられるため、そのような毛髪は検査対象から除外する必要がある。しかし、毛髪が休止期にあるかどうかを判定すること簡単ではない。休止期の毛髪の成分に何か変化があることがわかっているならば、その成分を定量することによって休止期の毛髪を特定することが可能かもしれない。そのような判定法が確立するまでは、毛髪を採取する際に毛根がしっかりと頭皮についていることが次善の策かもしれない。本研究では検討していないが、薬剤の安定性はメラニン含有量との相関が強いという報告がある。したがって、脱色していたり、パーマをあてたような毛髪も検査対象としては適当でないかもしれない。一方、シャンプーについては、影響がないとされている。

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

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者の中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。

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分以内で完了することがわかった。この速い流出速度は温度を4℃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と血漿遊離EFV濃度の間に相関があった。この結果は、遊離EFVが細胞内に移行し抗ウイルス活性を発揮していることを示唆している。

## E. 結論

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

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。

細胞内薬剤濃度を従来の方法よりも正確に測定する方法を確立した。この方法は細胞内薬剤濃度が治療効果あるいは副作用とどのような関係があるかを研究するために有力な道具になると考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

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

2. Takakuwa, K., Kashima, K., Suzuki, M., Fujita, K., Tamura, M., Kaneko, S., Kato, S., Hanabusa, H., and Tanaka, K. Studies on the IVF-ET for discordant couples where the man is HIV positive and the woman is negative using sperm washing technique and highly sensitive PCR method. *International Proceedings of IX International Congress of Reproductive Immunology* 11- 15, 2004.

3. 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.

4. 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. Antiretroviral effects of intracellular protease inhibitors. XV International AIDS Conference, Abstract WePeA5669. July 11-16, 2004, Bangkok, Thailand.

2. Shingo Kato, Kenji Tsuji, 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.

3. 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.

4. 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.

5. 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.

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

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

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

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

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

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

12. 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）

13. 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）

14. 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）

15. 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）

16. 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）

17. 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）

18. 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）

19. 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）

20. 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）

21. 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）

22. 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）

23. 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）

24. 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）

25. 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）

26. 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）

27. 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）

28. 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）

29. 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( $\mu\text{M}$ )

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( $\mu\text{M}$ )

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( $\mu\text{M}$ )

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



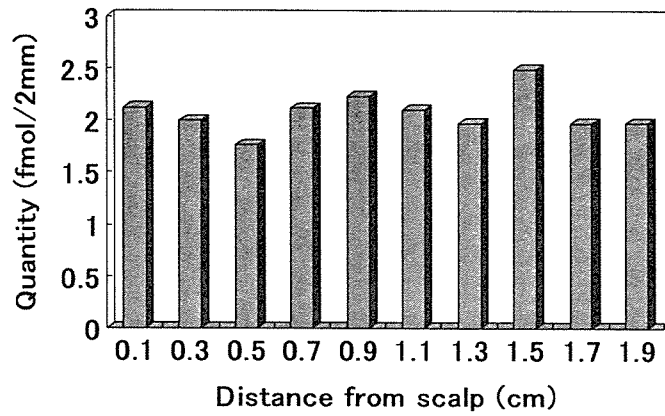


図1. C25における毛髪中薬剤濃度の分布

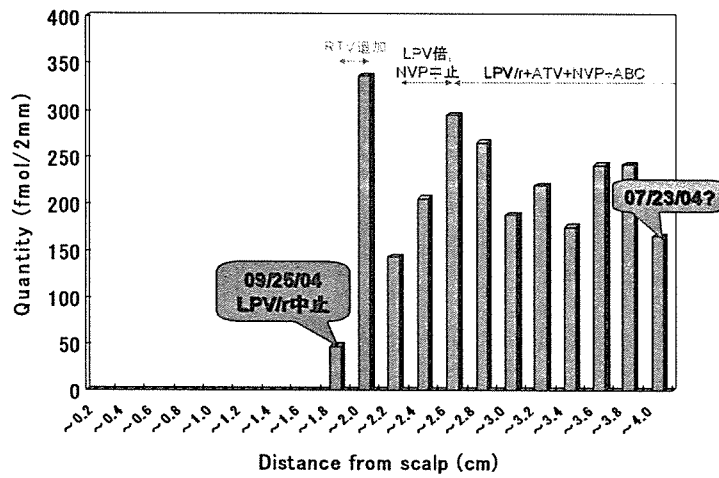


図2. H390における毛髪内LPV濃度

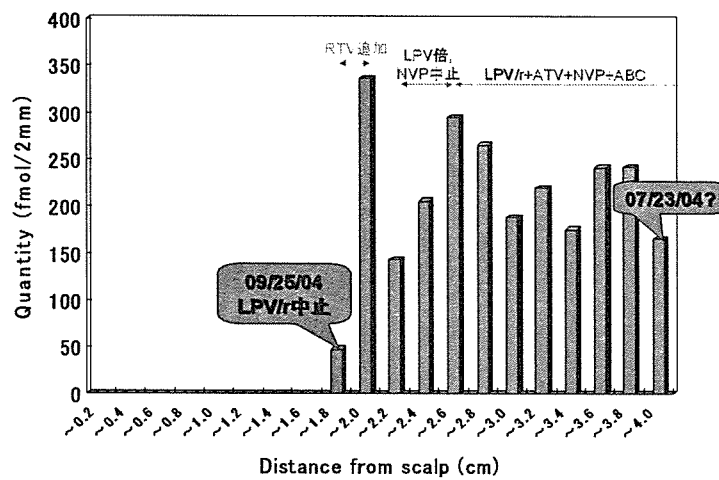


図3. H390における毛髪内LPV濃度

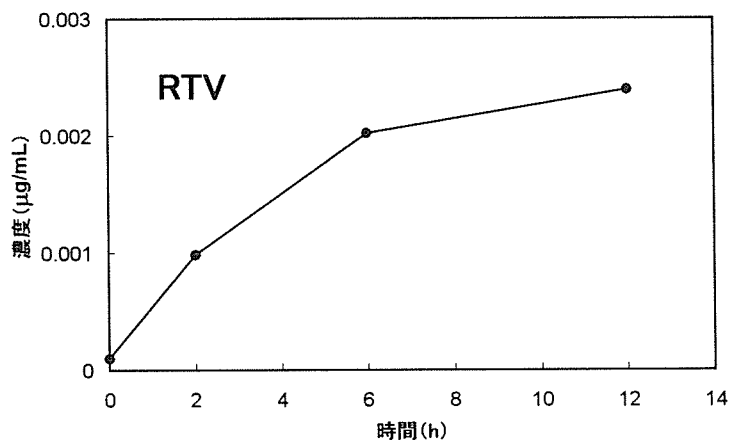
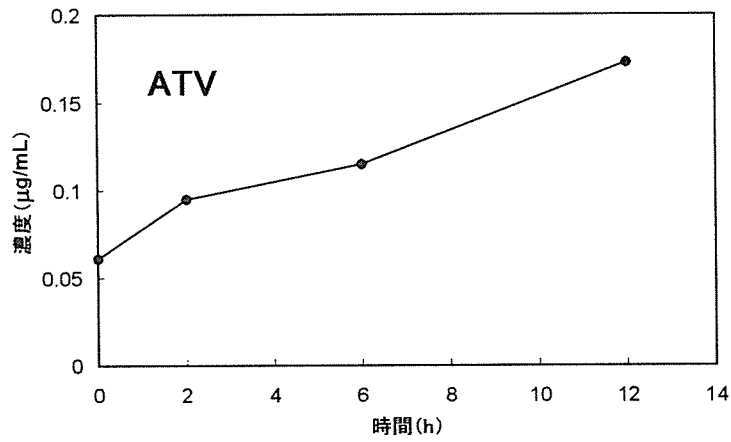
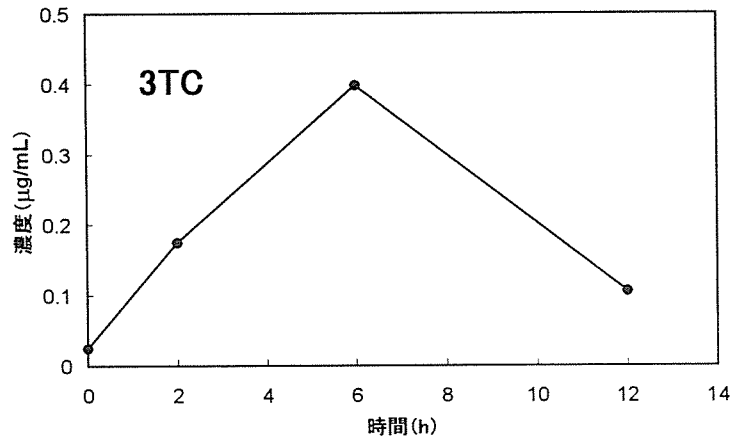


図4. 患者Aの唾液中薬物動態

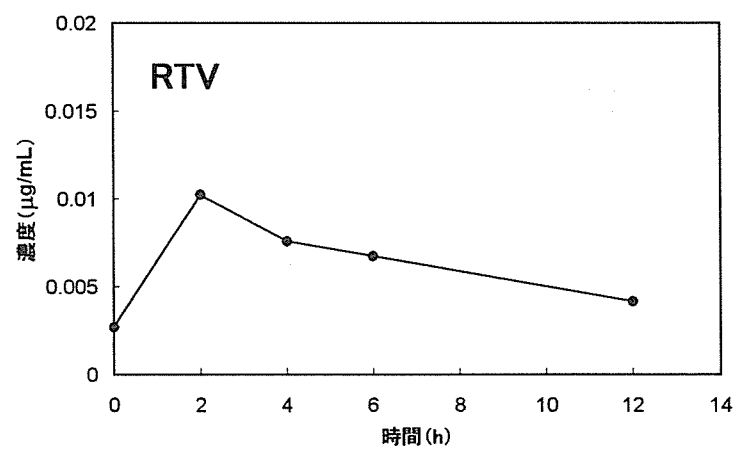
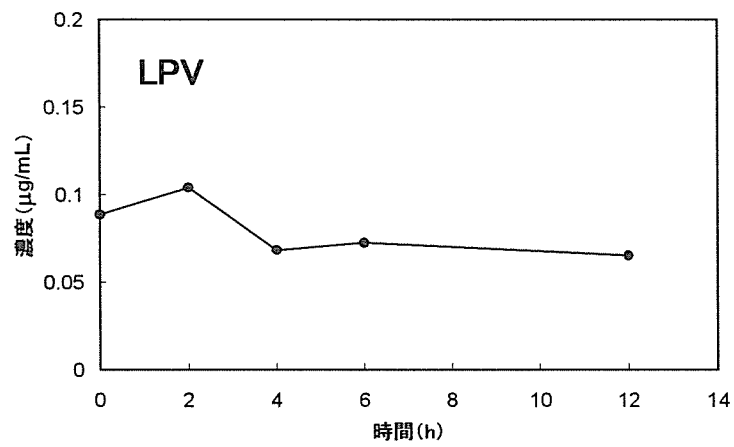
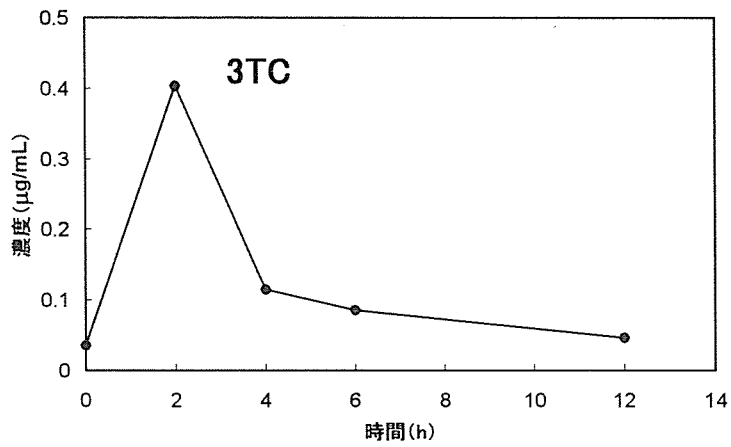


図5. 患者Bの唾液中薬物動態

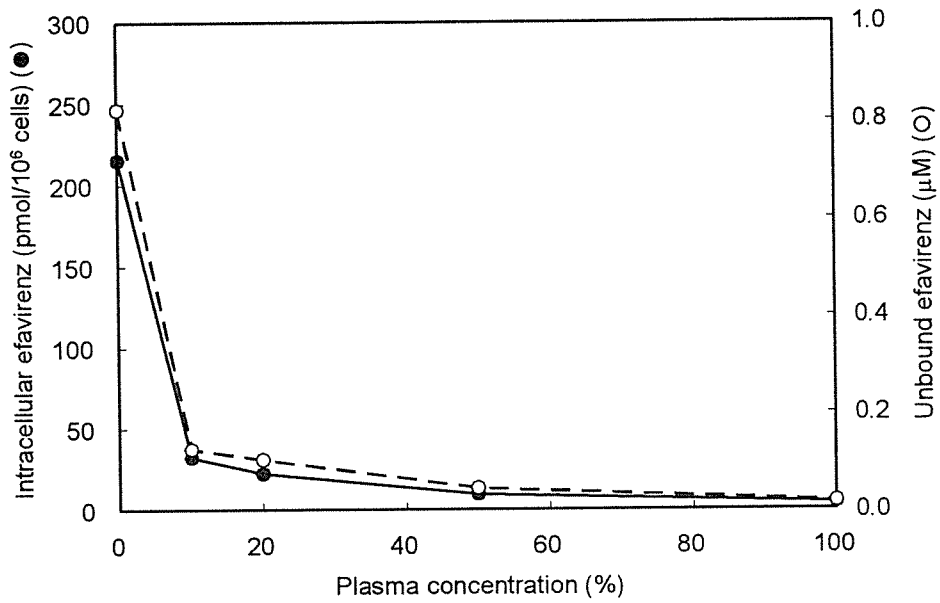


図6. 血漿濃度と細胞内EFV濃度の関係

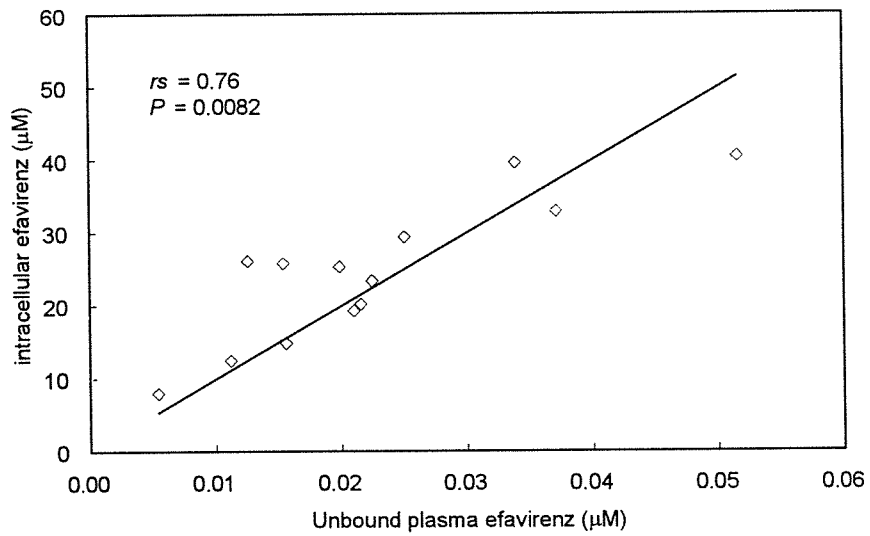


図7. 患者血液検体における血漿および細胞内EFV濃度の比較

## 研究要旨

新たな nevirapine(NVP)耐性変異として、HIV 逆転写酵素の 238 番目のアミノ酸が lysine (K)から serine (S)に置換する変異(K238S)を同定した。K238S 単独で NVP に対し 4.4 倍耐性となり、既知の NVP 耐性変異と K238S が共存すると、V106A/K238S では 530 倍、V108I/K238S では 56 倍耐性となり、高度な NVP 耐性を獲得することが明らかとなった。また、逆転写酵素の K103R と V179D が組み合わさると、efavirenz(EFV)耐性となることを発見した。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。

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。尿中の  $\beta_2$ -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( $p < 0.0001$ )。また、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。

## A. 研究目的

HIV の遺伝子を調べる薬剤耐性検査 (genotypic assay) は、既知の耐性変異の有無で判定されるが、未知の耐性変異に対しては無力である。genotypic assay の臨床応用性を高めるために、新たな耐性変異を同定・解析する。また、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、腎障害を起こすことが問題である。TDF による腎障害の早期マーカーとして、U-b2MG の有用性を解析する。

## B. 研究方法

既知の耐性変異を持たない臨床分離株を phenotypic assay で解析し、薬剤耐性となっているものを探す。その薬剤耐性の原因となる変異を組換え HIV を作成し同定・解析する。Polymorphic な変異である逆転写酵素の K103R を持つ HIV を in vitro で EFV で耐性誘導し、新たな変異パターンが生じるか解析する。

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。

(倫理面への配慮)

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

## C. 研究結果

Genotype assay で既知の耐性変異が認められなかった臨床分離株 44 株のうち、2 株が phenotypic assay にて NVP に対して高度耐性 (69 倍と 310 倍以上)であった (図 1、表 1)。2 株とも、逆転写酵素の K238S を持っていたため、組換え HIV-1 を作成したところ、K238S 単独で NVP に対し 4.4 倍耐性となり、既知の NVP 耐性

変異と K238S が共存すると、V106A/K238S では 530 倍、V108I/K238S では 56 倍耐性となり、高度な NVP 耐性を獲得することが明らかとなった (表 2)。また、逆転写酵素の polymorphic な変異 K103R を持つ HIV-1 から in vitro で EFV で耐性誘導を行ったところ、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。

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 2)。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 3)。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。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 4)。

#### D. 考察

K238S が genotype assay で認められた場合には、NVP を key drug とする治療法は不適切であると考えられる。近年、非核酸系逆転写酵素阻害薬耐性に関与する 238 番目付近のアミノ酸変異が相次いで報告されており、この領域の polymorphism が治療結果に影響を与える可能性がある。また、polymorphism である K103R から R103N は、2 塩基置換が必要であり起こりにくい変異だと思われた。また、K103R と、それ自身は耐性をもたらさない V179D が共存することにより、高度な EFV 耐性が生じた。

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易くしている可能性が考えられる。

#### E. 結論

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

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

Tsuchiya K, Gatanaga H, Tachikawa N, Teruya K, Kikuchi Y, Yoshino M, Kuwahara T, Kimura S, Oka S. Homozygous CYP2B6\*6 (Q172H and K262R) correlates with high plasma efavirenz concentrations in HIV-1 patients treated with standard efavirenz-containing regimens. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 319:1322-1326.

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

327:215-224.

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* 2006; 344:354-362.

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* 2006; 281:1241-1250.

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. *Pathol 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, Matusoka-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

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

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

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

瀧永博之、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.

瀧永博之、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.

瀧永博之. 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.

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.

瀧永博之、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 gamma 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

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

#### 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。

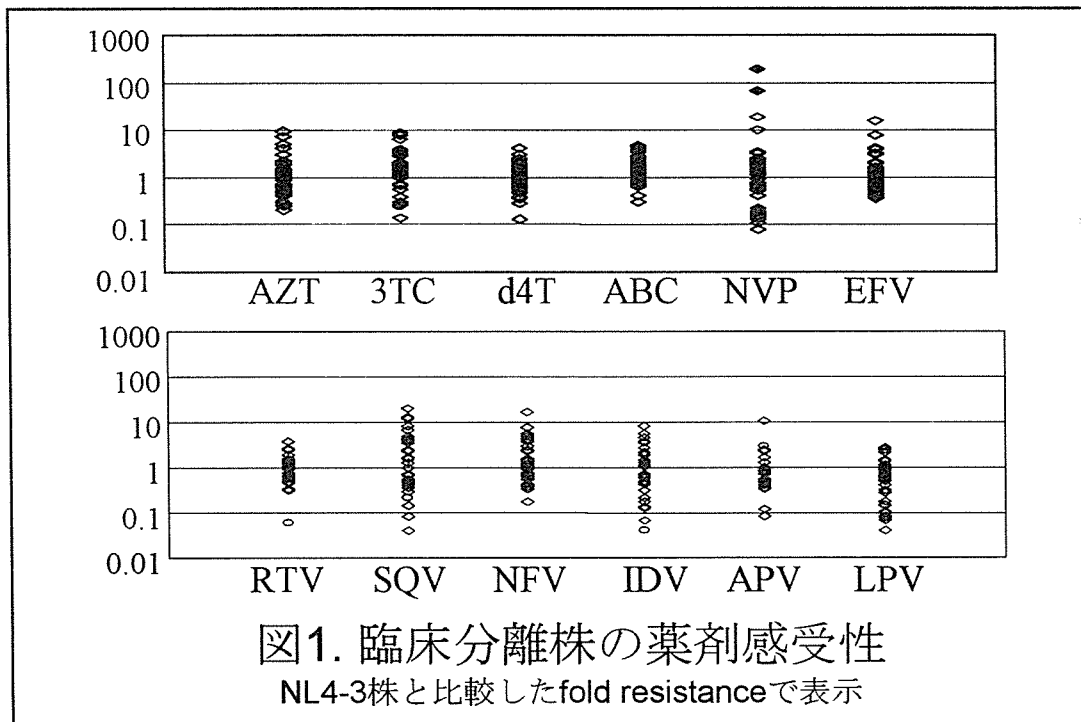


図1. 臨床分離株の薬剤感受性  
NL4-3株と比較したfold resistanceで表示

Fold resistance	NRTI				NNRTI	
	AZT	3TC	d4T	ABC	NVP	EFV
Case 1	1.2	1.8	0.77	2.3	69	4.2
Case 2	3.5	2.4	1.5	2.1	>310	8.8

表 1 . NVP耐性臨床株2株の薬剤感受性

Recombinant HIV-1	Fold resistance	
	NVP	EFV
K102R	1.5	0.77
V106A	97	0.77
V108I	3.8	0.38
K238S	4.4	0.77
V106A/K238S	530	1.5
V108I/K238S	56	0.38
K102R/V106A/K238S	340	0.77

表 2. 組換えHIV-1の薬剤感受性

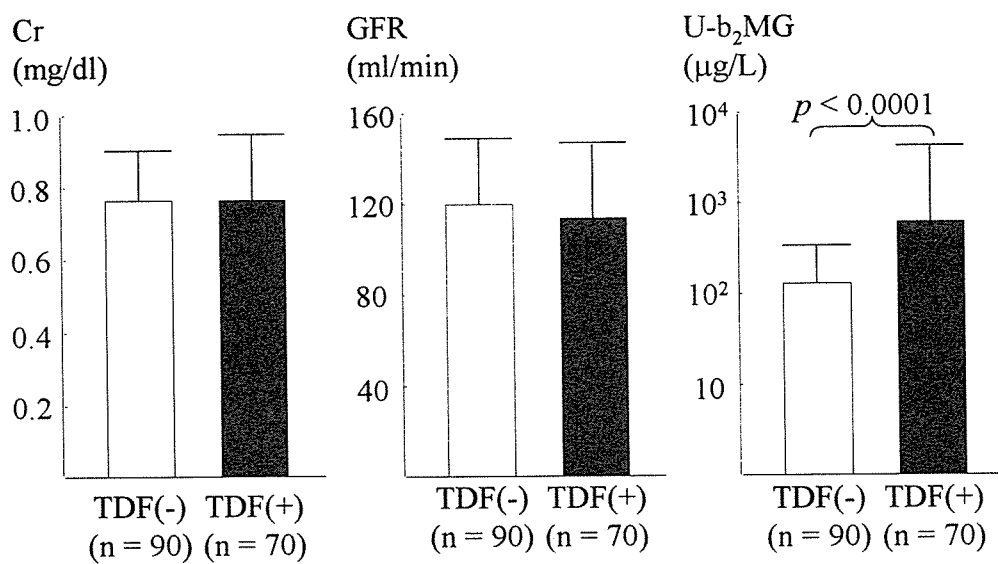


図2. U-b<sub>2</sub>MG & TDF Treatment