

Fig. 3. Competitive growth assay. A) Competitive growth assay for HXB2-PR_{M46I} (closed circles) and wild-type HXB2 (open squares) in the presence (left) or absence (right) of 26.4 nM indinavir. B) Competitive growth assay for HXB2-PR_{L90M} (closed triangles) and wild-type HXB2 (open squares) in the presence (left) or absence (right) of 8.1 nM saquinavir. Data represent means and standard deviations calculated from triplicate measurements.

not severely impact the replicative fitness of HIV-1.

Discussion

HIV-1 can easily mutate through the error-prone reverse-transcription in the replication process. HIV-1 thus generates variants that can escape from the host immune system or can cause resistance against anti-

retroviral drugs. Such variants cannot form major populations in viral quasi-species when acquired mutations cause severe damage to replicative fitness. Drug-resistant HIV-1, however, has been found in 6% of therapy-naïve patients at our hospital (7). Assessment of replicative fitness has thus become important for understanding the survival activity of drug-resistant HIV-1 found in therapy-naïve patients.

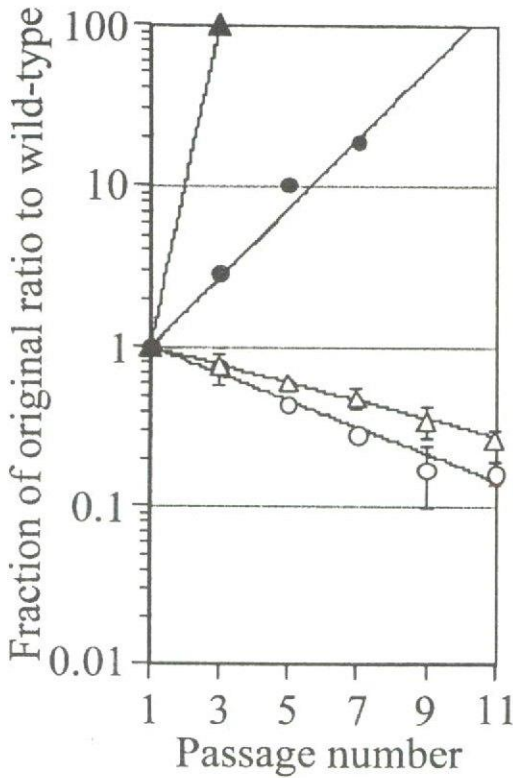


Fig. 4. Relative replicative efficiency of mutant viruses. Logarithm ratios of mutant virus to wild-type virus were plotted against passage numbers in co-culture. Ratios of HXB2-PR_{M46I} in the presence or absence of indinavir are represented as closed or open circles, respectively. Ratios of HXB2-PR_{L90M} in the presence or absence of saquinavir are represented as closed or open triangles, respectively. Data obtained from experiments in the absence of drugs represent means with standard deviations calculated from triplicate experiments.

The most sensitive method for evaluating the replicative fitness of drug-resistant HIV-1 is the competitive growth assay between wild-type and mutant viruses (1, 6). In the process of this assay, cloning methods have generally been used for determining the mix ratio of any 2 viral populations (19). However, the cloning process requires substantial time and labor for transformation, and arbitrary numbers of clones must be chosen from numerous clones for estimation of viral populations. We developed a quantitative SNP-detection method to bypass the ambiguity in the cloning process. Two types of viral genotype can be detected differentially as 2 kinds of peaks on electrophoregrams, and the fluorescence intensities that reflect viral populations are automatically estimated by the Genetic Analyzer. This method, however, possesses a weak point in that observed fluorescence intensity requires normalization, since the fluorescence intensities of the 4 of dye-labeled dideoxynucleotides are unequal. A standard curve

should thus be made for estimation. Once the standard curve is established, the quantitative SNP-detection method we developed offers an easy and conventional method. Labeling and dephosphorylation reactions during the assay require only 2 hr, and no purification of labeled products is necessary. In addition, as running time of capillary electrophoresis requires 20 min, population ratio at 1 time point can be determined within 3 hr. Our method allows manipulation of numerous samples for competitive growth assay.

Using this newly developed method of quantitative SNP-detection, we evaluated the effects of M46I or L90M protease mutations on the replicative fitness of HIV-1. Lower replicative capacities of HXB2-PR_{M46I} and HXB2-PR_{L90M} were identified compared with that of HXB2 in the absence of drugs. In contrast, replicative capacities of these mutants were higher than that of HXB2 in the presence of the relevant drugs. We therefore concluded that acquisition of M46I or L90M mutations enables HIV-1 to survive under pharmacotherapeutic pressure, but sacrifices the replicative fitness of HIV-1 in the absence of drug. Martinez-Picado et al. previously noted that HIV-1 with the L90M mutation exhibits lower replicative fitness than wild-type virus, but found that HIV-1 with the M46I mutation possesses similar replicative fitness to wild-type virus in the absence of drug (12, 13). The present results are consistent with their findings for the L90M mutation, but are at odds with their findings for the M46I mutation. Two possibilities can be considered to explain this discrepancy. First, the genetic background of infectious HIV-1 clones used in these studies may be different, as we used HXB2-based viruses while Martinez-Picado et al. used NL4-3-based viruses. Second, methods for estimating viral populations in co-culture also differed. The SNP-detection method we developed offers the advantage of quantification using PCR products expanded from whole co-existing viruses. In contrast, Martinez-Picado et al. adopted the cloning method, randomly picking 20 clones from numerous clones constructed using a mixture of wild-type and mutated viruses before determining genotypes. This method seems to rely on arbitrary selection of clones. As the database of Stanford University shows an ultra-low prevalence of 0.07% for M46I mutation among HIV-1 isolates from patients untreated with protease inhibitors, this type of HIV-1 mutant does not seem optimally adapted to conditions without drugs. The decreased level of replicative fitness may be associated with reduced levels of catalytic activity in the M46I-mutant protease (4, 18).

We have been studying the prevalence of drug-resistant HIV-1 in therapy-naïve patients (7). Mean preva-

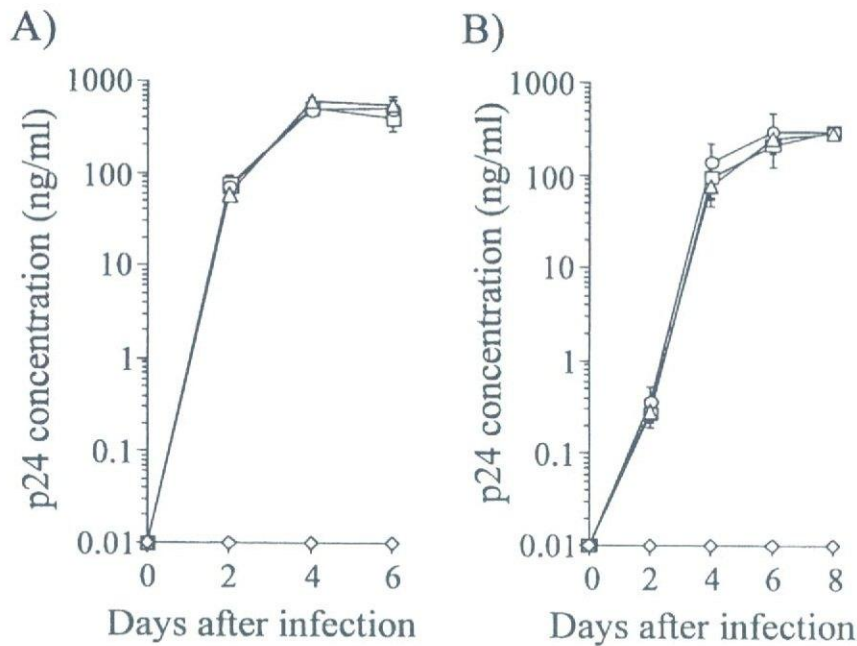


Fig. 5. Viral growth kinetics assay. Wild-type HXB2, HXB2-PR_{M46I} and HXB2-PR_{L90M} were individually inoculated into 2×10^5 MT-4 cells with 100 CCID₅₀ (A) or 10 CCID₅₀ (B). Cells were cultured in 2 ml of culture medium for 8 days. Amounts of p24 in culture supernatants were quantified by enzyme-linked immunosorbent assay at 0, 2, 4, 6 and 8 days. HXB2, HXB2-PR_{M46I}, HXB2-PR_{L90M} and no virus are shown as squares, circles, triangles and diamonds, respectively. Data represent means with standard deviations calculated from triplicate experiments.

lence over the past 6 years has been about 6%, but the epidemic has become a serious problem as antiretroviral drugs cannot be properly selected in such cases unless drug-resistant genotype testing identifies the drug-resistant amino acid mutations before initiation of therapy. About one-third of the pool of drug-resistant HIV-1 cases in our hospital possesses M46I or L90M mutation. Given the present results, we can speculate that these types of drug-resistant viruses restore any reduction in replicative fitness by acquiring other effective mutations in the genome and consequently allowing survival under drug-free conditions such as in therapy-naïve patients. We are now engaged in detecting amino acid mutations responsible for improvements in replicative fitness.

Seiichiro Fujisaki is a research resident of the Japanese Foundation for AIDS Prevention. This study was partly supported by a Health Science Research Grant for Research on HIV/AIDS from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan (No. H-16-AIDS-002 to TK).

References

- 1) Clavel, F., Race, E., and Mammano, F. 2000. HIV drug resistance and viral fitness. *Adv. Pharmacol.* **49**: 41–66.
- 2) Condra, J.H., Holder, D.J., Schleif, W.A., Blahy, O.M., Danovich, R.M., Gabryelski, L.J., Graham, D.J., Laird, D., Quintero, J.C., Rhodes, A., Robbins, H.L., Roth, E., Shivaprakash, M., Yang, T., Chodakewitz, J.A., Deutsch, P.J., Leavitt, R.Y., Massari, F.E., Mellors, J.W., Squires, K.E., Steigbigel, R.T., Tepler, H., and Emini, E.A. 1996. Genetic correlates of *in vivo* viral resistance to indinavir, a human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor. *J. Virol.* **70**: 8270–8276.
- 3) Condra, J.H., Schleif, W.A., Blahy, O.M., Gabryelski, L.J., Graham, D.J., Quintero, J.C., Rhodes, A., Robbins, H.L., Roth, E., Shivaprakash, M., Titus, D., Yang, T., Teplert, H., Squires, K.E., Deutsch, P.J., and Emini, E.A. 1995. *In vivo* emergence of HIV-1 variants resistant to multiple protease inhibitors. *Nature* **374**: 569–571.
- 4) Gulnik, S.V., Suvorov, L.I., Liu, B., Yu, B., Anderson, B., Mitsuya, H., and Erickson, J.W. 1995. Kinetic characterization and cross-resistance patterns of HIV-1 protease mutants selected under drug pressure. *Biochemistry* **34**: 9282–9287.
- 5) Harada, S., Koyanagi, Y., and Yamamoto, N. 1985. Infection of HTLV-III/LAV in HTLV-I-carrying cells MT-2 and MT-4 and application in a plaque assay. *Science* **229**: 563–566.
- 6) Holland, J.J., de la Torre, J.C., Clarke, D.K., and Duarte, E. 1991. Quantitation of relative fitness and great adaptability of clonal populations of RNA viruses. *J. Virol.* **65**: 2960–2967.
- 7) Ibe, S., Hotta, N., Takeo, U., Tawada, Y., Mamiya, N., Yamanaka, K., Utsumi, M., and Kaneda, T. 2003. Prevalence of drug-resistant human immunodeficiency virus type

- I in therapy-naïve patients and usefulness of genotype testing. *Microbiol. Immunol.* **47**: 499–505.
- 8) Ibe, S., Shibata, N., Utsumi, M., and Kaneda, T. 2003. Selection of human immunodeficiency virus type 1 variants with an insertion mutation in the p6^{int} and p6^{ext} genes under highly active antiretroviral therapy. *Microbiol. Immunol.* **47**: 71–79.
 - 9) Jacobsen, H., Hänggi, M., Ott, M., Duncan, I.B., Owen, S., Andreoni, M., Vella, S., and Mous, J. 1996. *In vivo* resistance to a human immunodeficiency virus type 1 proteinase inhibitor: mutations, kinetics, and frequencies. *J. Infect. Dis.* **173**: 1379–1387.
 - 10) Jacobsen, H., Yasargil, K., Winslow, D.L., Craig, J.C., Kröhn, A., Duncan, I.B., and Mous, J. 1995. Characterization of human immunodeficiency virus type 1 mutants with decreased sensitivity to proteinase inhibitor Ro 31-8959. *Virology* **206**: 527–534.
 - 11) Mammano, F., Trouplin, V., Zennou, V., and Clavel, F. 2000. Retracing the evolutionary pathways of human immunodeficiency virus type 1 resistance to protease inhibitors: virus fitness in the absence and in the presence of drug. *J. Virol.* **74**: 8524–8531.
 - 12) Martinez-Picado, J., Savara, A.V., Shi, L., Sutton, L., and D'Aquila, R.T. 2000. Fitness of human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor-selected single mutants. *Virology* **275**: 318–322.
 - 13) Martinez-Picado, J., Savara, A.V., Sutton, L., and D'Aquila, R.T. 1999. Replicative fitness of protease inhibitor-resistant mutants of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **73**: 3744–3752.
 - 14) Maschera, B., Furfine, E., and Blair, E.D. 1995. Analysis of resistance to human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitors by using matched bacterial expression and proviral infection vectors. *J. Virol.* **69**: 5431–5436.
 - 15) Molla, A., Korneyeva, M., Gao, Q., Vasavanonda, S., Schipper, P.J., Mo, H.M., Markowitz, M., Chernyavskiy, T., Niu, P., Lyons, N., Hsu, A., Granneman, G.R., Ho, D.D., Boucher, C.A., Leonard, J.M., Norbeck, D.W., and Kempf, D.J. 1996. Ordered accumulation of mutations in HIV protease confers resistance to ritonavir. *Nat. Med.* **2**: 760–766.
 - 16) Pauwels, R., Balzarini, J., Baba, M., Snoeck, R., Schols, D., Herdewijn, P., Desmyter, J., and De Clercq, E. 1988. Rapid and automated tetrazolium-based colorimetric assay for the detection of anti-HIV compounds. *J. Virol. Methods* **20**: 309–321.
 - 17) Pauwels, R., De Clercq, E., Desmyter, J., Balzarini, J., Goubau, P., Herdewijn, P., Vanderhaeghe, H., and Vandeputte, M. 1987. Sensitive and rapid assay on MT-4 cells for detection of antiviral compounds against the AIDS virus. *J. Virol. Methods* **16**: 171–185.
 - 18) Pazhanisamy, S., Stuver, C.M., Cullinan, A.B., Margolin, N., Rao, B.G., and Livingston, D.J. 1996. Kinetic characterization of human immunodeficiency virus type-1 protease-resistant variants. *J. Biol. Chem.* **271**: 17979–17985.
 - 19) Quiñones-Mateu, M.E., and Arts, E.J. 2002. Fitness of drug resistant HIV-1: methodology and clinical implications. *Drug Resist. Updat.* **5**: 224–233.
 - 20) Schapiro, J.M., Winters, M.A., Stewart, E., Efron, B., Norris, J., Kozal, M.J., and Merigan, T.C. 1996. The effect of high-dose saquinavir on viral load and CD4⁺ T-cell counts in HIV-infected patients. *Ann. Intern. Med.* **124**: 1039–1050.
 - 21) Shirasaka, T., Kavlick, M.F., Ueno, T., Gao, W.Y., Kojima, E., Alcaide, M.L., Chokekijchai, S., Roy, B.M., Arnold, E., Yarchoan, R., and Mitsuya, H. 1995. Emergence of human immunodeficiency virus type 1 variants with resistance to multiple dideoxynucleosides in patients receiving therapy with dideoxynucleosides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**: 2398–2402.
 - 22) Zhang, Y.M., Imamichi, H., Imamichi, T., Lane, H.C., Falloon, J., Vasudevachari, M.B., and Salzman, N.P. 1997. Drug resistance during indinavir therapy is caused by mutations in the protease gene and in its Gag substrate cleavage sites. *J. Virol.* **71**: 6662–6670.

名古屋医療センターにおける 抗HIV療法の変遷とTDMの有効例

高橋昌明*^{1,2}, 奥村直哉^{1,2}, 伊部史朗², 久高祐一¹, 溝口和代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

Effectiveness of Therapeutic Drug Monitoring and Changes in Antiretroviral Regimens in HIV-1 Infected Patients at Nagoya Medical Center

Masaaki Takahashi*^{1,2}, Naoya Okumura^{1,2}, Shiro Ibe², Yuichi Kudaka¹,
Kazuyo Mizoguchi¹, Tatsuo Suzuki¹, Tsuguhiko Kaneda²

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

(受付：2006年2月7日 受理：2006年3月31日)

HIV感染症の治療は、抗HIV薬の開発と多剤併用療法（以下、HAART）によって大きな進歩を遂げた。しかしその一方で、HAARTの長期的実施における副作用や耐性ウイルスの出現などが問題となってきた。こうした変化を反映して、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）での抗HIV薬の使用量も核酸系逆転写酵素阻害薬は全体的に使用量が減少傾向となっている。一方、プロテアーゼ阻害薬や非核酸系逆転写酵素阻害薬は、より強力で、服薬しやすい薬剤の使用が増えていく。また、HAARTにおける抗HIV薬のTDMは、至適治療域の確認、ウイルスの耐性化予防、副作用防止、アドヒアランスの確認などの点において有用と評価できるが、簡便な測定技術がないことや結果解釈の難しさなどからルーチン検査として確立されるには至っていない。当センターではHPLCを用いた簡便な測定法（M. Takahashi *et al.*: *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 1286-1290 (2005))を開発し、現在、臨床応用に供しているが、その実状について報告する。

キーワード—HIV, Therapeutic drug monitoring, 多剤併用療法, 血中濃度

緒言

HIV-1感染症の治療は、抗HIV薬の開発とそれらの薬剤を用いた多剤併用療法（以下、HAART: highly active antiretroviral therapy）によって大きな進歩を遂げ、AIDSの発症率やAIDSによる死亡率は著しく減少した¹⁾。しかしその一方で、長期にわたるHAARTにおいて、耐性ウイルスの出現によりHAARTが無効となる症例もみられるようになった。また、長期治療によるアドヒアランスの低下、ミトコンドリア障害による高乳酸血症やリポジストロフィーなどの慢性毒性の発現などといった問題点も明らかとなった²⁻⁵⁾。

近年、アドヒアランスの改善を目的とした1日1回療法や耐性ウイルスにも有効な新薬の開発など、HAART

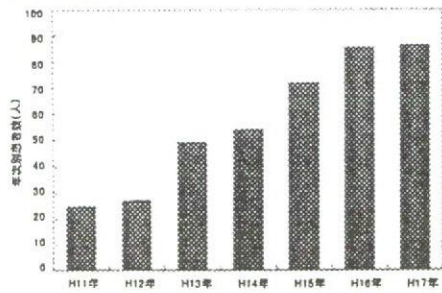
の問題点を改善すべくいくつもの試みが行われている。しかしながら、抗HIV薬のtherapeutic drug monitoring（以下、TDM）に関する研究は未だ始まったばかりであり、様々なデータが蓄積され始めたというのが現状である^{6,7)}。名古屋医療センター（以下、当センター）ではHPLCを用いた簡便な測定法⁸⁾を開発し、現在臨床に応用している。今回、抗HIV薬の使用量およびTDM測定件数の推移について検討を行うとともに、実際に経験した症例を用いてHIV-1感染患者に対するTDMの有用性について検討したので報告する。

対象および方法

平成11～17年における当センター外来を受診したHIV-1感染患者を対象に、抗HIV薬の使用量およびTDMの測

† 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

(A) 新規患者数



(B) 累積患者数

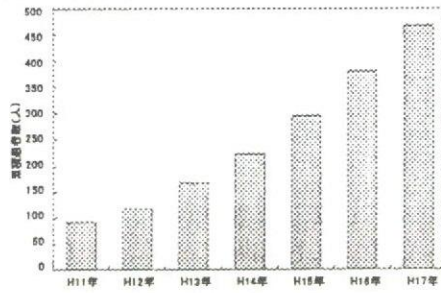


図1 HIV-1感染患者数の年次別推移

定件数の年次別推移を比較検討した。当センターではHPLCを用いた測定法⁹⁾を独自に開発し、すべてのプロテアーゼ阻害薬とエファビレンツ（以下、EFV）の血中濃度を測定している。また、同期間内においてウイルスの薬剤耐性化による治療無効例、薬物濃度に依存する副作用発現例に対してTDMが重要な役割を果たした2症例を選択した。本研究は当センター倫理審査委員会での承認を得ており、また、対象となる患者からは文書による同意を得た。

結果

1. HIV-1感染患者数の年次別推移

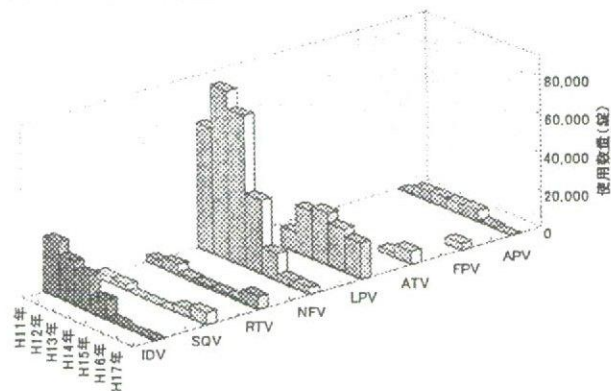
平成11～17年における当センター外来を受診した新規患者数の年次別推移を図1(A)に、また、累積患者数の推移を図1(B)に示した。新規患者数は平成11年の25人から

年々増加し、平成16年で85人、平成17年で86人となり、名古屋地区におけるHIV-1の感染拡大が懸念された。また、累積患者数も平成17年末時点で466人となった。

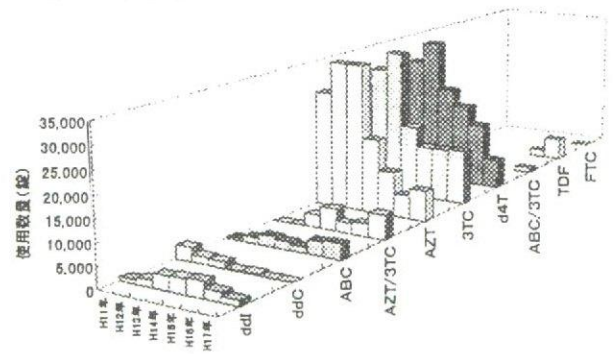
2. 抗HIV薬の使用量

各年における抗HIV薬の使用量の推移を図2に示した。プロテアーゼ阻害薬(A)の中で、インジナビルの使用量は29,880錠(平成11年)をピークに720錠(平成17年)まで減少した。同様にネルフィナビル(以下、NFV)も88,695錠(平成12年)をピークに3,600錠(平成17年)ま

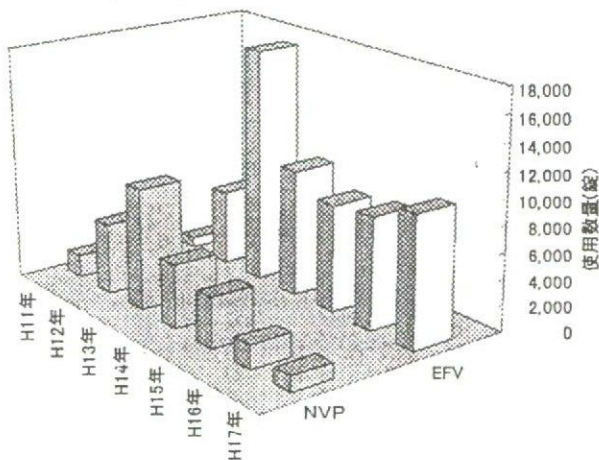
(A) プロテアーゼ阻害薬



(B) 核酸逆転写阻害薬



(C) 非核酸逆転写阻害薬



IDV：インジナビル、SQV：サキナビル、RTV：リトナビル、NFV：ネルフィナビル、LPV：ロビナビル、ATV：アタザナビル、FPV：ホスアンプレナビル、APV：アンプレナビル、AZT：ジドブジン、ddl：ジダノシン、ddC：ザルシタピン、3TC：ラミブジン、d4T：サニルブジン、ABC：アバカビル、TDF：テノホビル、FTC：エムトリシタピン、NVP：ネビラピン、EFV：エファビレンツ

図2 抗HIV薬の使用量の年次別推移

表1 HAARTレジメンの年次別組み合わせ

年	最多のHAARTレジメン	2番目のHAARTレジメン
平成11年	AZT+3TC+NfV	AZT+3TC+IDV
平成12年	d4T+3TC+NfV	AZT+3TC+NfV
平成13年	d4T+3TC+EFV	AZT+3TC+NfV
平成14年	AZT+3TC+LPV/r	AZT+3TC+EFV
平成15年	AZT+3TC+EFV	d4T+3TC+EFV
平成16年	AZT+3TC+EFV	AZT+3TC+LPV/r
平成17年	AZT+3TC+EFV	AZT+3TC+LPV/r

AZT：ジドブジン，3TC：ラミブジン，NfV：ネルフィナビル，
IDV：インジナビル，d4T：サニルブジン，EFV：エファビレンツ，
LPV/r：ロピナビル/リトナビル

で減少した。サキナビルは3,200錠（平成11年）から徐々に減少したが、最近、増加傾向にあり、平成17年では6,700錠であった。リトナビル（以下，r）は6,000錠（平成12年）をピークに1,000～2,000錠で推移した。なお、平成17年に6,840錠と増加したのは、ロピナビル（以下，LPV）やアタザナビルとの併用投与によるものである。一方、平成12年に発売されたLPVは抗HIV活性が強いのが特徴で、毎年20,000～30,000錠と最もよく使用されていた。また、1日1回投与が可能なアタザナビルが7,140錠（平成17年）、ホスアンプレナビルが3,660錠（平成17年）と増加傾向にあった。

核酸系逆転写酵素阻害薬（B）は、全体的に使用量が減少傾向にあった。なかでもジドブジンが38,800錠（平成13年）をピークに7,200錠（平成17年）に、ラミブジンが36,000錠（平成13年）をピークに12,780錠（平成17年）に、サニルブジンが40,080錠（平成13年）をピークに6,840錠（平成17年）へと減少した。

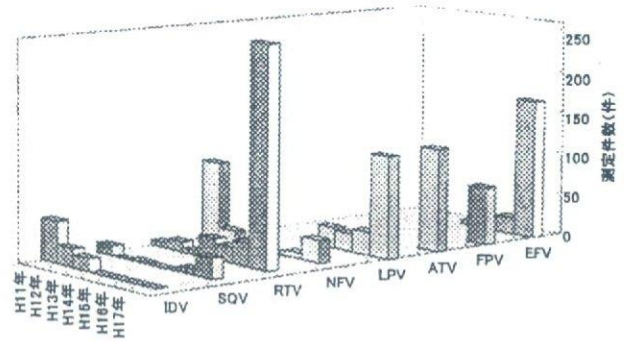
非核酸系逆転写酵素阻害薬（C）では、ネビラピンの使用量が9,300錠（平成13年）をピークに1,200錠（平成17年）まで減少した。代わりに、抗HIV活性が強く1日1回投与のEFVの使用量が17,820～10,080錠（平成13年～平成17年）と増加した。

3. HAARTレジメンの変遷

最も多用されたHAARTレジメンと2番目に多い組み合わせを年次別に表1に示した。ジドブジンやラミブジンを中心とした核酸系逆転写酵素阻害薬の組み合わせには大きな変化はみられなかった。一方、プロテアーゼ阻害薬に関しては、平成14年より抗HIV活性の強いLPVと組み合わせられることが多くなった。非核酸系逆転写酵素阻害薬は、1日1回投与可能なEFVが組み合わせられることが多くなった。

4. TDM測定件数の推移

各年におけるTDM測定件数の推移を図3に示した。測定件数は使用量に比例してLPVが121件（平成17年）、アタザナビルが123件（平成17年）、ホスアンプレナビル



IDV：インジナビル，SQV：サキナビル，RTV：リトナビル，
NfV：ネルフィナビル，LPV：ロピナビル，ATV：アタザナビル，
FPV：ホスアンプレナビル，EFV：エファビレンツ

図3 TDM測定件数の年次別推移

が69件（平成17年）、EFVが166件（平成17年）と増加した。なお、rが260件（平成17年）と急激に増加したのは、LPVやアタザナビルなどの効果を増強するブースト剤として併用投与されることが多いためである。

5. HIV-1感染患者に対するTDM

症例①：34歳，男性。

経過：

平成15年5月21日より、サニルブジン、ラミブジン、NfVの投与を開始した。最大51,000コピーあったウイルス量は、平成17年2月23日時点で350コピーまで減少した。しかしながら、ウイルス量は50コピー（検出限界）以下となることはなかった。また、ウイルスの耐性検査では、プロテアーゼ阻害薬に対する副次耐性アミノ酸変異（L63P，A71T，V77I）が検出されたのみであった。TDM：

NfV（単回投与時Cmin-Cmax：0.9～6.7μg/mL）は2,500mg分2で投与された。NfVの血中濃度（トラフ値）は、2月23日で3.4μg/mL，3月16日で5.2μg/mL，4月13日で4.4μg/mL，5月11日で4.1μg/mL，6月8日で4.4μg/mLとほぼ一定の値を示し、アドヒアランスは良好であった。現在のガイドライン⁹⁾によるとNfVの最低目標血中濃度は0.8μg/mLとなっており、本症例は十分な濃度を有していたが、ウイルス量は50コピー以下にならず、逆に6月8日には780コピー，8月17日には1,100コピーと増加した。4月13日の検体を用いてウイルスの耐性検査を再び行ったところ、NfVに対する主要耐性アミノ酸変異であるD30N変異とサニルブジン、ラミブジンに対する主要耐性アミノ酸変異であるM41L，M184V，T215Yが見つかった。そのため、8月17日にHAARTの組み合わせをジダノシン，アバカビル，アタザナビル，rに変更した（表2）。変更後，10月5日時点でウイルス量は50コピー以下まで減少した。

表2 薬剤耐性ウイルスによる治療無効例の経過 (症例①)

検査実施日	ウイルス量 copies/mL	CD4 細胞数/mm ³	NFV μg/mL	耐性検査			HAART
				PI	NRTI	NNRTI	
平成17.2.23	350	272	3.4	L63P, A71T, V77I	N.D.	N.D.	d4T+3TC +NFV
平成17.3.16	390	260	5.2				↓
平成17.4.13	130	290	4.4	D30N, L63P, A71T, V77I, N88D	M41L, M184V, T215Y	N.D.	↓
平成17.5.11	380	421	4.1				↓
平成17.6.8	780	362	4.4				↓
平成17.8.17	1,100	440					ddI+ABC+ ATV+RTV

PI: プロテアーゼ阻害薬, NRTI: 核酸系逆転写酵素阻害薬, NNRTI: 非核酸系逆転写酵素阻害薬,
NFV: ネルフィナビル, d4T: サニルブジン, 3TC: ラミブジン, ddI: ジダノシン, ABC: アバカビル,
ATV: アタザナビル, RTV: リトナビル, N.D.: not detected

表3 薬物濃度による副作用発現例の経過 (症例②)

検査実施日	ウイルス量 copies/mL	CD4 細胞数/mm ³	EFV μg/mL	LPV μg/mL	患者主訴	HAART
平成14.9.5	<50	300	16.0	6.0	眠気, 胸やけ	d4T+LPV+ RTV+EFV
平成14.9.9	<50	363			眠気, だるさ, 胸 やけ, 集中力低 下, いらいら感	EFV 3カプセル → 2カプセルに 減量
平成14.10.8	<50	284	13.5	8.2		↓
平成14.10.28	<50	425	7.4	8.4		↓
平成14.11.13	<50	328	4.6	4.0	良好. 生活しや すくなった	↓

EFV: エファビレンツ, LPV: ロピナビル, d4T: サニルブジン, RTV: リトナビル

症例②: 39歳, 男性。

経過:

サニルブジン, LPV/r, EFVを服用中。平成13年4月21日よりLPV/r, EFVの併用が開始された。平成13年5月頃より外来服薬指導時に胸やけ, 眠気を訴え始めたが, いずれも軽微なものであり我慢していた。平成14年8月頃から集中力の低下, いらいらが認められた。

TDM:

LPV (単回投与時Cmin-Cmax: 5.5~9.6μg/mL) は800mg分2で, またEFV (単回投与時Cmin-Cmax: 1.0~4.0μg/mL) は600mg分1で投与された。平成14年9月5日時点での血中濃度(トラフ値)は, EFVが16.0μg/mL, LPVが6.0μg/mLであった。Marzoliniら⁹⁾によるとEFVの至適有効治療域は1.0~4.0μg/mLであり, 我々の203例を対象にした研究でも有効治療域下限が1.0μg/mLであった。これらの基礎データを踏まえ主治医と相談の上, 9月9日にEFVを3カプセルから2カプセルに減量した。その後, EFVの血中濃度は, 10月8日で13.5μg/mL, 10月28日で7.4μg/mL, 11月13日で4.6μg/mLと減少した。11月13日の服薬指導時点で眠気, だるさ, 胸やけが減り生活しやすい, また集中力も増してきたとのことであった。なお, この間, ウイルス量は50コピー以下を維持していた(表3)。

考 察

当センターを受診するHIV-1感染患者数は年々増加の一途をたどっている。しかも, 伊部ら¹⁰⁾が報告したように, 名古屋地区では数%の未治療患者から薬剤耐性ウイルスが検出されるようになった。これは, 既治療患者からの薬剤耐性HIV-1の伝播が原因であるが, これら薬剤耐性ウイルスの増加は使用可能なHAARTの組み合わせを限定することとなり, 患者にとっては治療の選択肢が少なくなることを意味する。

薬剤耐性ウイルスの出現や副作用の発現, 服薬の煩雑さ, それに伴うアドヒアランス維持の難しさなどといったHAARTに伴う種々の問題点が認識され, 最近では治療開始時期を遅らせる傾向にある。しかしながら, 早期の

HAART開始によるHIV-1感染症の進行阻止, ウイルス増殖の早期抑制, 免疫能の保持などといった利点も勘案して治療開始時期を決定することが最も重要である。

また近年, HIV-1プロウイルスを有する潜伏感染リザーバーの存在が問題となっており^{11,12)}, HAARTの治療開始時期の決定にはリザーバーをできるだけ小さくする観点を加味することも重要になってきたと思われる。

当センターでの抗HIV療法の変遷をみると, 核酸系逆転写酵素阻害薬の組み合わせには大きな変化が認められなかったが, プロテアーゼ阻害薬や非核酸系逆転写酵素阻害薬は, より強力度で1日の服用回数が少ない薬剤(LPВ, EFV)へと変化してきた。使用量の推移に関しては, 患者数の増加にもかかわらず平成13年をピークに抗HIV薬全般の使用量が減少傾向にあった。これは, 米国ガイドラインの治療に対する考え方の変化を反映しているものと思われる。高乳酸血症やリポジストロフィーなどといったHAARTの副作用や耐性ウイルスの出現が問題となり, 現在ではHIV-1感染が確定されてもただちにHAARTを開始するのではなく, AIDSの臨床症状がない場合, CD4細胞数が350以上であれば経過観察となっている。

HAARTにおける抗HIV薬のTDMは, 簡便で多量の検体を短時間で処理できる測定技術が開発されていなかったことや結果解釈の難しさなどから, ルーチン検査

として確立されるには至っていない。しかしながら、症例①においては、患者のアドヒアランスとウイルスの増殖抑制に必要な最低血中濃度の確認といった意味でTDMは有効であった。すなわち、十分な血中薬物濃度が保たれているにもかかわらずウイルス量が減少しない場合には、ウイルスの薬剤耐性獲得を疑う必要があることが示された。実際、この患者の血中HIV-1の場合、ジダノシン、アバカビル、アタザナビル、rにはまだ薬剤感受性を保持していることが耐性検査の結果判明した。実際、これらの薬剤に変更したところ、10月5日時点でウイルス量が50コピー以下まで減少し、その後50コピー以下を維持している。また、症例②においては、TDMが血中濃度に依存する副作用防止に重要な役割を果たした。EFVは、めまい、ふらつき、悪夢などの中枢神経系の副作用が出やすいことが知られている⁹⁾。その原因としては、EFVが血液-脳関門を通過して脳脊髄液中に移行し神経伝達系に影響を与えるためではないかと考えられている¹³⁾。また、EFVの代謝には、CYP3A4およびCYP2B6が関与し、なかでも2B6はその多型により活性が異なり、その結果、血中濃度が極めて高くなる患者がみられることが報告されている^{14,15)}。症例②においても、EFVは推奨投与量にもかかわらず適治療域上限の4倍以上の高い血中濃度を示した。また、患者は服用開始後1ヵ月で中枢神経系の副作用を訴えていた。TDMを施行することで抗ウイルス効果を保ちつつEFVを減量し、それに伴う副作用を改善することが可能となった。

以上より抗HIV薬のTDMは、HIV-1感染患者の治療を向上させる上で十分に有用と考える。また、いくつかの制限はあるが、血中濃度測定は、薬物動態や薬物相互作用に関する情報を与えるだけでなく、薬剤による副作用の予防や耐性ウイルスの出現防止に役立つものと考えられる。現在、核酸系逆転写酵素阻害薬を除いたプロテアーゼ阻害薬や非核酸系逆転写酵素阻害薬の目標血中濃度値がいくつか報告されている³⁾。TDMを活用する際には、これらの目標値を参考にしつつも性格、薬物治療歴などの患者情報や、ウイルスの特徴、その他の臨床情報も合わせて考慮することが重要であると考えている。

引用文献

- 1) F.J. Palella, K.M. Delaney *et al.*: Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study investigators, *N. Engl. J. Med.*, **338**, 853-860 (1998).
- 2) L. Zhang, B. Ramratnam *et al.*: Quantifying residual HIV-1 replication in patients receiving combination antiretroviral therapy, *N. Engl. J. Med.*, **340**, 1605-1613 (1999).
- 3) Developed by the Panel on Clinical Practices for Treatment of HIV Infection convened by the Department of Health and Human Services (DHHS): Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-infected adults and adolescents, AIDSinfo Web site (<http://AIDSinfo.nih.gov>), 2005, pp. 2-13.
- 4) 木村 哲, 満屋裕明ほか: HIV感染症「治療の手引き」第9版, HIV感染症治療研究会, 東京, 2005, pp. 6-17.
- 5) 岡 慎一, 山本政弘ほか: AIDS治療の新展開, 医学のあゆみ, **213**, 859-941 (2005).
- 6) D. Back, G. Gatti *et al.*: Therapeutic drug monitoring in HIV infection: current status and future directions, *AIDS*, **16**, S5-S37 (2002).
- 7) B.S. Kappelhoff, K.M. Crommentuyn *et al.*: Practical guidelines to interpret plasma concentrations of antiretroviral drugs, *Clin. Pharmacokinet.*, **43**, 845-853 (2004).
- 8) M. Takahashi, M. Yoshida *et al.*: 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.*, **28**, 1286-1290 (2005).
- 9) C. Marzolini, A. Telenti *et al.*: Efavirenz plasma levels can predict treatment failure and central nervous system side effects in HIV-1-infected patients, *AIDS*, **15**, 71-75 (2001).
- 10) S. Ibe, N. Hotta *et al.*: Prevalence of drug-resistant human immunodeficiency virus type 1 in therapy-naive patients and usefulness of genotype testing, *Microbiol. Immunol.*, **47**, 499-505 (2003).
- 11) 金田次弘, 和田かおるほか: プロウィルスDNA量のマーカーとしての意義, 日本臨床, **60**, 694-702 (2002).
- 12) H. Nagai, K. Wada *et al.*: New estimation method for highly sensitive quantitation of human immunodeficiency virus type 1 DNA and its application, *J. Virol. Methods.*, **124**, 157-165 (2005).
- 13) M. Wichers, A. van der Ven *et al.*: Central nervous system symptoms related to the use of efavirenz in HIV-seropositive patients, *Curr. Opin. Psychiatry.*, **15**, 643-647 (2002).
- 14) T. Lang, K. Klein *et al.*: Extensive genetic polymorphism in the human CYP2B6 gene with impact on expression and function in human liver, *Pharmacogenetics*, **11**, 399-415 (2001).
- 15) K. Tsuchiya, H. Gatanaga *et al.*: Homozygous CYP2B6*6 (Q172H and K262) correlates with high plasma efavirenz concentrations in HIV-1 patients treated with standard efavirenz-containing regimens, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **319**, 1322-1326 (2004).

<症例報告>

HIV・HCV重複感染に対する リバビリン併用ペグ・インターフェロン療法により CD4, CD8陽性リンパ球数が減少した1症例

国立病院機構 名古屋医療センター*

高橋 昌明^{1,2}・藤崎 誠一郎²・伊部 史朗²
 久高 祐一¹・奥村 直哉^{1,2}・平野 淳^{1,2}
 鈴木 達男¹・横幕 能行²・間宮 均人²
 濱口 元洋²・金田 次弘²

はじめに

多剤併用療法 (highly active antiretroviral therapy: HAART) 導入後のHIV感染者の死亡原因は、AIDS関連と非AIDS関連が半々で、非AIDS関連死の約9割が慢性HCV感染症によるといわれている¹⁾。HIVとHCVの主な感染経路は血液を媒介するもので、静注薬物使用者や血液製剤による感染例で重複感染が多いのが実状である。HIV・HCV重複感染例におけるHCV治療は、HCV単独感染の標準ガイドラインに従いインターフェロンを基本とし、近年ではリバビリンを併用することが多い。

今回、HAART導入によりHIV-RNA量が検出限界 (50copies/mL) 以下、CD4陽性リンパ球数が200/ μ L以上と良好なコントロールを得たHIV・HCV重複感染患者に対してリバビリン併用ペグ・インターフェロン療法を行ったところ、CD4, CD8陽性リンパ球数が200/ μ L以下まで減少した症例を経験したので報告する。

I 症例提示

【症例】49歳、男性

既往歴：血友病B, C型慢性肝炎

臨床経過：1985年にHIV感染が判明し、91年1月よりジドブジン (AZT, レトロビル[®]) の内服を開始、93年12月からジダノシン (ddI, ヴァイデックス) の内服に変更した。その後、97年4月よりAZT+ラミブジン (3TC, エピビル[®]) +インジナビル (IDV, クリキシバン[®]) の3剤の内服 (HAART) を開始した。2004年9月からAZT+3TC+ロピナビル・リトナビル配合剤 (LPV/r, カレトラ[®]) の組み合わせに変更となった。この間、HIV-RNA量は検出限界以下を維持しており、CD4陽性リンパ球数は平均397/ μ L、CD8陽性リンパ球数は平均910/ μ Lと安定していた。

一方でHCV-RNA量は、04年11月時点で 190×10^4 IU/mL、05年7月時点で 86×10^4 IU/mLと高値を示した。そのため、抗HCV療法と

* 〒460-0001 愛知県名古屋市中区三の丸4-1-1

1：薬剤科 2：臨床研究センター

して、05年8月から06年8月までの1年間、リバビリン併用ペグ・インターフェロン療法を行った。その結果HCV-RNA量は05年10月から陰性となったが、 $68 \times 10^2/\mu\text{L}$ あった白血球数は、最も少ない時で $29 \times 10^3/\mu\text{L}$ まで減少した。なかでもCD4陽性リンパ球数は、05年9月で $315/\mu\text{L}$ 、12月で $194/\mu\text{L}$ 、06年2月で $116/\mu\text{L}$ 、4月で $134/\mu\text{L}$ 、8月で $141/\mu\text{L}$ と、免疫不全状態の指標である $200/\mu\text{L}$ 以下まで減少し、その状態は8カ月にわたり継続した。またCD8陽性リンパ球数も05年9月で $656/\mu\text{L}$ 、12月で $334/\mu\text{L}$ 、06年2月で $171/\mu\text{L}$ 、4月で $176/\mu\text{L}$ 、8月で $137/\mu\text{L}$ まで減少した。なおこの間、赤血球数は $23 \times 10^3/\mu\text{L}$ 以上、血小板数は $9 \times 10^4/\mu\text{L}$ 以上を維持していたが、ヘモグロビン量については 13g/dL から徐々に減少し、06年4月には 10g/dL 以下となった。そのため、エポエチンアルファ（エスポー[®]）12000IUの皮下注射を予防投与も含めて4回行い造血の活性化を促した。その効果は残念ながら判然としなかったが、抗HCV療法終了後、赤血球数、ヘモグロビン量および白血球数は増加し、CD4陽性リンパ球数は06年9月で $389/\mu\text{L}$ 、10月で $291/\mu\text{L}$ に、CD8陽性リンパ球数もそれぞれ $613/\mu\text{L}$ 、 $442/\mu\text{L}$ と増加した（図1）。

なお抗HCV療法を行うにあたり、リバビリンとAZTの併用による副作用と考えられる貧血を防止するため、HAARTの組み合わせを05年8月からテノホビル（TDF、ピリアード[®]）+3TC+LPV/rに変更した。TDF変更後もHIV-RNA量は検出限界以下を維持していた。

一方でTDFには、副作用として重度の腎機能障害が報告¹⁾されている。そこでTDF内服開始後のTDF血中濃度（内服3時間後）と血中クレアチニンの推移について検討した。TDF内服前（05年7月）の血中クレアチニンは 1.1mg/dL であったが、内服後徐々に上昇し、06年4月以降は 1.4mg/dL を超えていた。同様にTDF血中濃度も05年9月での $0.45\mu\text{g/mL}$ から徐々に高くなり、内服1年後の06年9月では

$0.67\mu\text{g/mL}$ となった。通常TDFの最高血中濃度は $0.30\sim 0.38\mu\text{g/mL}$ とされており、本症例では2倍近い高い値を示した（図2）。

II 考 察

HIV・HCV重複感染患者に対する抗HCV療法は、HIV-RNA量が良好にコントロールされ、CD4陽性リンパ球数が $200/\mu\text{L}$ を超える安定した患者を対象に行われている¹⁾。しかしHIV非感染者に比べてHIV・HCV重複感染患者に対しては、インターフェロン投与に伴う白血球数減少やリバビリン投与に伴う貧血などの副作用について特に注意が必要である。なかでもAZTとリバビリンの併用は重度の貧血を起こすことが知られているので²⁾、本症例もリバビリン投与開始時にHAARTの組み合わせをAZTからTDFに変更した。またHIV・HCV重複感染患者では、インターフェロンによるCD4陽性リンパ球数の一時的減少が報告^{3)~5)}されている。本症例においてもリバビリン併用ペグ・インターフェロン療法を開始した直後から白血球数の減少が認められた。なかでもCD4、CD8陽性リンパ球数は免疫不全状態の指標である $200/\mu\text{L}$ 以下まで減少した。本症例ではCD4陽性リンパ球数の減少が緩やかであり日和見感染もみられなかったため、抗HCV療法を継続したが、CD4陽性リンパ球数の減少が重度である場合にはインターフェロンの中止が必要と考える。

一方、リバビリン投与開始時にAZTから変更したTDFについても好中球減少等の副作用が知られており、本症例でもその副作用は顕著に観察された。また本症例では徐々に腎機能が悪化しており、血中クレアチニンの上昇と共にTDF血中濃度も上昇していた。TDFは腎排泄型の薬剤であり、腎機能が悪化すればその代謝も遅延し、血中濃度が上昇すると考えられる。本症例における高いTDF血中濃度と白血球数等の減少との関連は否定できないが、抗HCV療法終了後に再び白血球数が増加

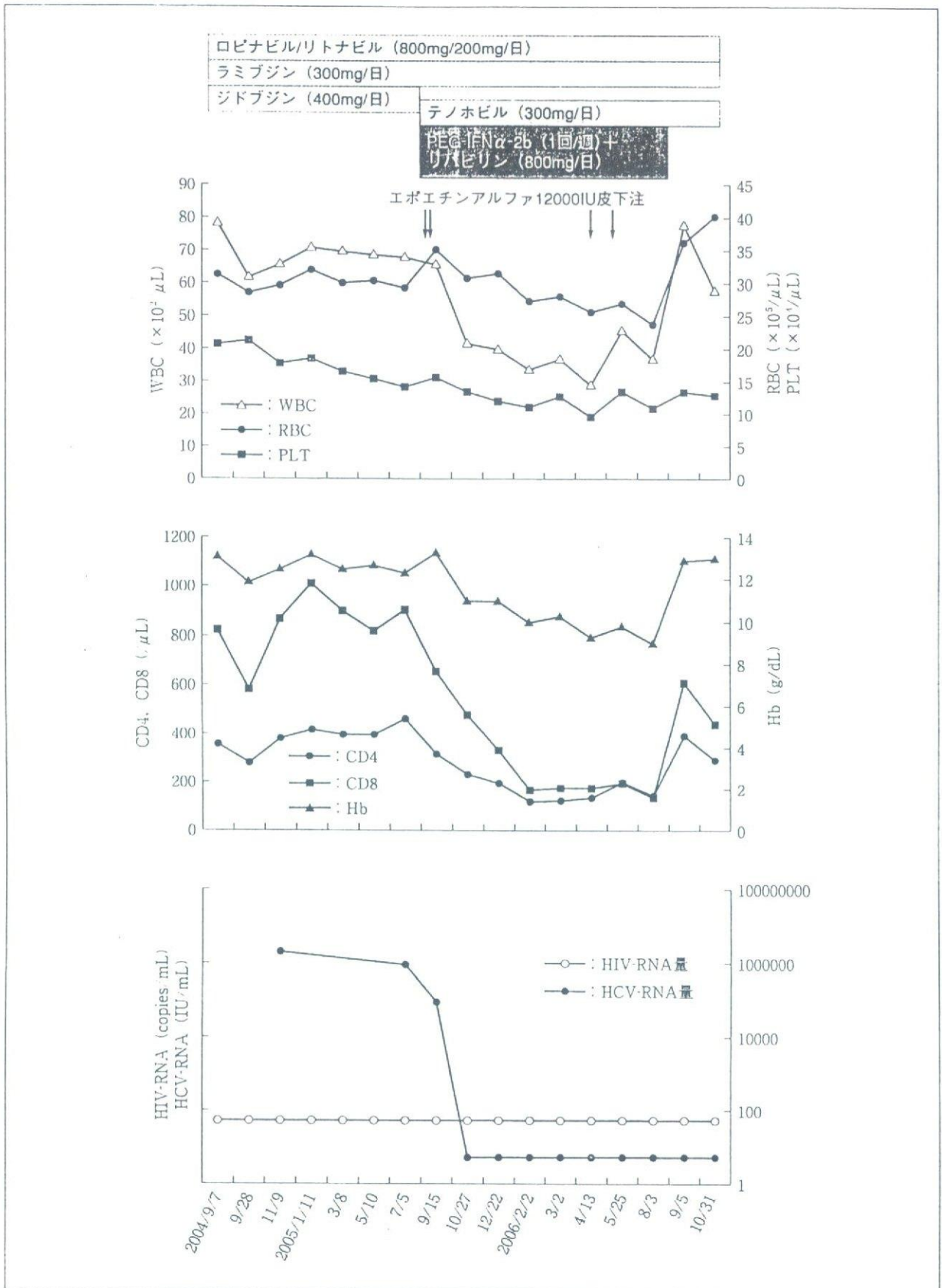


図1 臨床経過

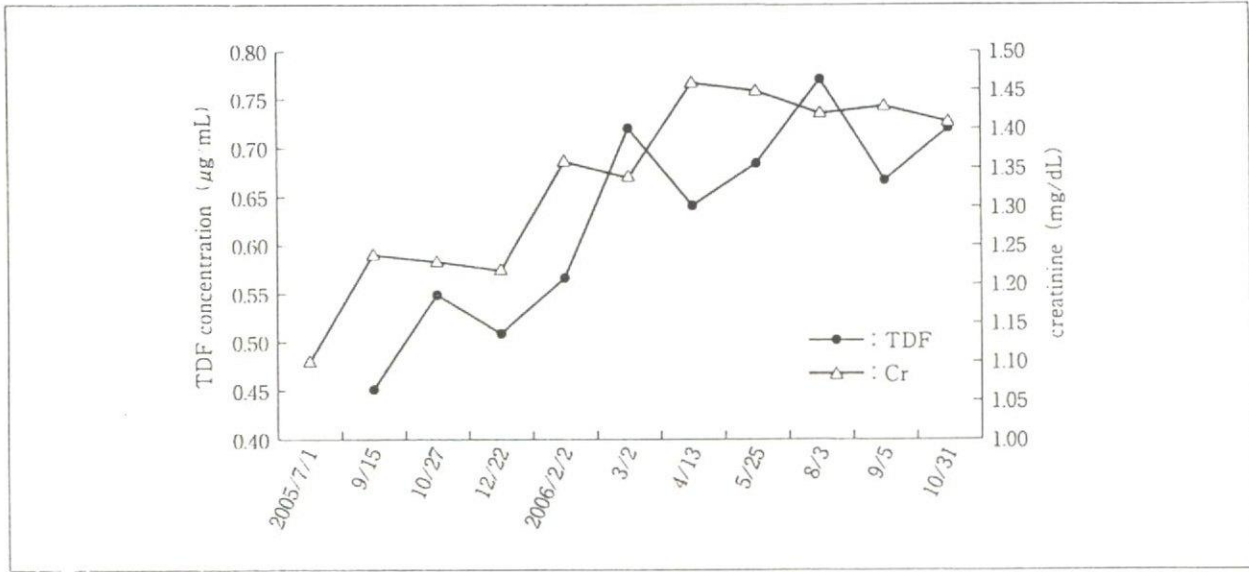


図2 内服3時間後のテノホビル (TDF) 血中濃度と血中クレアチニン (Cr) の推移

したことからTDFの関与は小さいと考える。

HIV・HCV重複感染患者に対して抗HCV療法を行う場合には、日和見感染を予防する上でCD4陽性リンパ球数の減少に十分に注意を払う必要がある。加えてHAARTにおいてTDFを選択した場合には腎機能低下に注意し、腎障害時には投与間隔の調節を考慮することが望ましい。

<謝辞>

本研究は、国立病院機構政策医療共同研究 (エイズ)・「HIV-1増殖抑制後も、CD4陽性Tリンパ球の回復が不十分な症例の原因究明に関する研究」(金田班)の補助を受けた。

参 考 文 献

- 1) HIV感染症治療研究会：HIV感染症「治療の手引き」第10版, p.26. HIV感染症治療研究会事務局, 東京, 2006.
- 2) 小池和彦：AIDS/HIV-1感染症とウィルス肝炎, 医学のあゆみ 213, 886~890, 2005.
- 3) Laguno, M., Murillas, J. et al. : Peginterferon alpha-2b plus ribavirin compared with interferon alpha-2b plus ribavirin for treatment of HIV/HCV co-infected patients, AIDS 18, F27~36, 2004.
- 4) 立浪 忍, 瀧 正志：HIV感染血友病におけるHCV感染について, 日本エイズ学会誌 8, 7~10, 2005.
- 5) Santin, M., Shaw, E. et al. : Efficacy and safety of pegylated interferon-α2b plus ribavirin for the treatment of chronic hepatitis C in HIV-infected patients, AIDS Res. Hum. Retroviruses 22, 315~320, 2006.

Beneficial Effect of GB Virus C Co-Infection in Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Individuals

Junko Hattori^{1,4}, Naoya Okumura^{1,2}, Yumiko Yamazaki¹, Masataka Uchiyama³, Motohiro Hamaguchi¹, Yukihiro Nishiyama⁴, and Tsuguhiro Kaneda^{*,1}

¹Clinical Research Center, ²Department of Pharmacy, ³Department of Research Laboratory, National Hospital Organization Nagoya Medical Center (Tokai Area Central Hospital for AIDS Treatment and Research), Nagoya, Aichi 460-0001, Japan, and ⁴Department of Virology, Nagoya University, Nagoya, Aichi 466-8550, Japan

Received September 25, 2006; in revised form, November 13, 2006. Accepted November 22, 2006

Abstract: Several reports have documented a better prognosis for HIV-1-infected patients co-infected with GBV-C, while other reports have contradicted such findings with the result that this issue remains controversial. We attempted to clarify the complicated status of the effect of GBV-C co-infection on HIV-1-infected patients. GBV-C RNA was detected in 37 samples in 182 HIV-1-infected patients (20.3%) using RT/nested PCR. Of these, 3 were determined to be GBV-C genotype 1, 12 were genotype 2, and the remaining 22 were genotype 3. The GBV-C viral load quantified by real-time PCR ranged from 7.8×10^3 to 3.3×10^6 copies/ml. Weakly negative correlation was observed between GBV-C viral load and HIV-1 viral load in 19 HAART-naïve patients, indicating that a higher GBV-C viral load is associated with a greater suppression of HIV-1 replication. A previously published *in vitro* study suggested that GBV-C infection would induce up-regulation of RANTES, leading to suppression of HIV-1 replication. However, in our present study, the blood RANTES level was significantly lower in the GBV-C co-infected group than in the uninfected group (190–9,959 vs. 264–31,038 pg/ml, $P=0.004$). Our results suggested that a suppression of HIV-1 replication by GBV-C co-infection is not mediated by up-regulated RANTES, and thus call for another as yet unknown factor.

Key words: GBV-C, HIV-1, RANTES, Co-infection

GB virus C (GBV-C) is a single-stranded RNA virus belonging to the Flaviviridae family (10, 12, 20). It is distributed worldwide, and five major genotypes that have been recognized are prevalent in various geographical regions (15, 16, 24). GBV-C is transmitted parenterally, and a high prevalence rate of GBV-C infection is observed among hemophiliacs (22.9–38.6%), hemodialysis patients (10.2–16.4%) and intravenous drug users (IVDU) (32.1–34.9%) (2, 4, 17, 23, 27, 28). GBV-C is also transmitted through sexual contacts (5, 11). For example, 12.5% of homosexual men were determined to be infected with GBV-C in our previous report (6).

Due to its close relationship to hepatitis C virus, also a member of the Flaviviridae family, GBV-C was thought to be the cause of hepatitis in humans at the

time of discovery in 1995 (12). As it became clear that GBV-C by itself is not a causative agent of hepatitis or any other disease, however, studies shifted toward the influence of GBV-C co-infection.

In 2001, two reports that appeared in the New England Journal of Medicine showed a beneficial effect of the GBV-C co-infection in HIV-1 infection in so far as human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected patients who are co-infected with GBV-C had an improved mortality rate (22, 26). In addition, subsequent studies by Xiang et al. and Jung et al. showed that the co-infection with GBV-C resulted in increased cytokine levels including RANTES (CCL5), SDF-1, and MIP-1, whereby HIV-1 replication is inhibited (7).

Abbreviations: ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; GBV-C, GB virus C; HAART, highly active antiretroviral therapy; HIV-1, human immunodeficiency virus type 1; IVDU, intravenous drug users; PBMC, peripheral blood mononuclear cell; PCR, polymerase chain reaction; RANTES, regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted; RT, reverse transcription; VL, viral load.

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

25).

In contrast, several other studies have found no beneficial effect of the GBV-C co-infection and one that showed that an increased mortality rate was observed in GBV-C co-infected individuals (8, 18, 19).

We conducted the present study to clarify the complex status of the effect of GBV-C co-infection on HIV-1-infected patients.

Materials and Methods

Patients. HIV-1-infected patients ($n=182$) who underwent medical examinations at Nagoya Medical Center, Japan, and from whom informed consent was obtained, were enrolled in the study. Of the 182, 151 were male. One hundred forty-three patients were infected with HIV-1 through sexual contacts (78 homosexuals, 53 heterosexuals, and 12 bisexuals). Other routes included via blood or blood products in 13 patients, and IVDU and accidental needle-stick in 1 patient each. One hundred forty-seven patients were Japanese, 19 were from Brazil, 5 from Thailand, 2 each from Peru, America, and Korea, and 1 each from China, Bangladesh, Uganda, Myanmar, and Ukraine.

Samples. Plasma samples of the individuals mentioned above were collected, and stored at -80°C until analyzed. In addition, approximately 1 year after the date of the sample collection, plasma samples were obtained again from the same patients to conduct a follow-up study.

Detection of GBV-C RNA. Purification of RNA from the plasma samples and the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) method to amplify GBV-C RNA were performed as described in our previous report (6). Briefly, RNA was extracted from the thawed samples using a QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Tokyo). The extracted RNA was used in a RT reaction followed by a first-round PCR (RT-PCR) using a Superscript One-Step RT-PCR for long templates (Invitrogen, Tokyo). Subsequently, cDNA was further amplified in a second-round PCR using a TaKaRa LA Taq (TaKaRa Shuzo, Tokyo). The same primers and the parameter settings as in our previous report were used for the RT/nested PCR. The PCR products were detected on a 1.2% agarose gel containing ethidium bromide. The expected size of the PCR product was 252 base pairs.

Determination of nucleotide sequences. PCR products of approximately 250 base pairs in size were purified from the agarose gel using a QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN), and labeled using a BigDye terminator cycle sequencing ready reaction kit (Applied Biosystems, Tokyo). The nucleotide sequences were

determined using an ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Determination of GBV-C genotypes. The obtained nucleotide sequences were compared against the reference sequences of 5 GBV-C genotypes: genotype 1 (accession #U36380), genotype 2 (U44402), genotype 3 (D90601), genotype 4 (AB013188), and genotype 5 (AF131112) in the GenBank of NCBI. The genotype for each GBV-C-positive sample was determined with an UPGMA method using Genetyx-Mac (version 10.1) system (Software Development, Tokyo).

Quantification of plasma GBV-C load. Total RNA from each GBV-C-positive patient was purified from 200 μl plasma samples using Trizol LS Reagent (Gibco BRL Life Technologies, Md., U.S.A.) according to the manufacturer's instructions. The obtained RNA was dissolved in 10 μl DEPC-treated water, and a half of the volume was reverse transcribed by Superscript II RNase H $^{-}$ Reverse Transcriptase (Invitrogen) at 42°C for 50 min. Subsequently, 2 μl of the 20 μl RT reaction mixture was applied to quantify the GBV-C copy numbers in triplicate by real-time PCR using a TaqMan probe. The same primer/probe set was used as in our previous report (6).

Determination of plasma RANTES concentrations. Concentrations of regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted (RANTES) in the plasma samples were measured using the Human RANTES enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Kit (Biosource, Calif., U.S.A.) according to the manufacturer's protocol.

Measurement of plasma HIV-1 viral loads and CD4 cell counts. Plasma HIV-1 viral loads were measured using an Amplicor HIV-1 monitor version 1.5 system (Roche, Tokyo). CD4 cell counts were flow-cytometrically measured by FACSCalibur (Becton Dickinson, Tokyo).

Statistical analysis. The means of GBV-C VL among 3 GBV-C genotypes were compared by the Kruskal-Wallis test. The Mann-Whitney U test was used to compare the means of HIV-1 VL, or RANTES concentration between GBV-C co-infected group and uninfected group. Linear regression analysis was used to evaluate the relationship between GBV-C VL and HIV-1 VL. The significance level was set at 0.05, and all P values were two-sided.

Results

Prevalence of GBV-C Infection among HIV-1-Infected Patients

RT/nested PCR was performed to detect GBV-C RNA from the plasma samples of HIV-1-infected

patients. PCR products of approximately 250 bp were detected in 37 of the 182 samples (20.3%) by agarose gel electrophoresis. The characteristics of these patients are summarized in Table 1.

GBV-C Genotypes

Following the determination of the GBV-C prevalence, the nucleotide sequences of the PCR products were analyzed to classify the 37 samples into the 5 GBV-C genotypes. Of the 37 samples, 22 samples were GBV-C genotype 3, which is abundant in Asia. Twelve were classified as genotype 2 found in Europe and the U.S., and the remaining 3 were genotype 1 found in Africa. None were classified as either genotype 4 or 5 (Fig. 1).

Plasma GBV-C RNA Load

The GBV-C copy number in each of the 37 plasma samples was quantified with a real-time PCR method using a Roche LightCycler. Viral loads ranged from 7.8×10^3 to 3.3×10^6 copies/ml. The distribution of the viral loads among GBV-C genotypes 1, 2 and 3 were 7.3×10^3 – 3.3×10^6 copies/ml (2.4×10^6 copies/ml av.), 7.8×10^3 – 1.4×10^6 copies/ml (3.4×10^5 copies/ml av.),

and 2.1×10^3 – 2.3×10^6 copies/ml (3.0×10^5 copies/ml av.), respectively (Fig. 2). The average viral loads of the 3 genotypes were compared, and it was found that the viral loads among genotype 1 were significantly higher than for the remaining genotypes ($P=0.04$). However, in the follow-up study, the GBV-C viral loads, which ranged from 2.4×10^3 to 5.1×10^6 copies/ml, did not differ among the 3 genotypes ($P=0.57$) (data not shown). Thus, a difference in viral load among genotypes may not exist.

HIV-1 VL among HAART-Naïve Patients and Its Correlation with GBV-C VL

To evaluate the effect of GBV-C co-infection on HIV-1-infected patients, we analyzed the HIV-1 viral load of highly active antiretroviral therapy (HAART)-naïve patients. The HIV-1 viral load for 19 GBV-C-infected and 65 GBV-C-uninfected patients ranged from 7.8×10^3 to 3.2×10^6 copies/ml, and from 4.7×10^2 to 1.1×10^6 copies/ml, respectively, and there was a statistically significant difference between the two groups ($P=0.01$) (Fig. 3). In addition, a weakly inverse correlation was observed between the GBV-C viral load and HIV-1 viral load in 19 HAART-naïve GBV-C-co-infected patients (Fig. 4).

Plasma RANTES Concentrations

Plasma RANTES concentrations of the HAART-naïve HIV-1-infected patients with or without GBV-C viremia were measured using a commercially available ELISA kit. The RANTES concentrations of those who showed a GBV-C viremia ranged from 190 to 9,959 pg/ml (3,856 pg/ml av.). Unexpectedly, in those without GBV-C viremia, the RANTES concentration ranged from 264 to 31,038 pg/ml (9,233 pg/ml av.), which was significantly higher than in those with viremia ($P=0.004$) (Fig. 5A).

In the follow-up study, the number of the patients decreased to 47 (11 GBV-C-co-infected, and 36 GBV-C-uninfected patients) since approximately half of the patients had started receiving HAART. The RANTES concentration in those with GBV-C viremia ranged from 72 to 14,007 pg/ml (5,369 pg/ml av.), and in those without viremia ranged from 241 to 22,670 pg/ml (5,973 pg/ml av.). The RANTES levels of the 2 groups were not significantly different ($P=0.86$) (Fig. 5B).

Discussion

We have performed RT/nested PCR to detect GBV-C RNA in the plasma samples of 182 HIV-1-infected patients, who were seen at the Nagoya Medical Center. The prevalence rate was determined to be 20.3%, and

Table 1. Characteristics of 182 patients with HIV-1 infection, grouped by GBV-C status

GBV-C status	n=182	
	+	-
Mean CD4+ cell count (cells/ml)	376.8	412.3
HAART received	18	80
Mode of HIV-1 transmission		
Sexual contact	31	112
Homosexual	22	56
Heterosexual	7	46
Bisexual	2	10
Blood or blood products	3	10
IVDU	0	1
Needle-stick	0	1
Unknown	3	21
Sex		
Male	34	117
Female	3	28
Nationality		
Japan	33	114
South America	2	19
East Asia	0	7
South/Southeast Asia	2	1
North America	0	2
Africa	0	1
Eastern Europe	0	1

HAART, highly active antiretroviral therapy; IVDU, intravenous drug use.

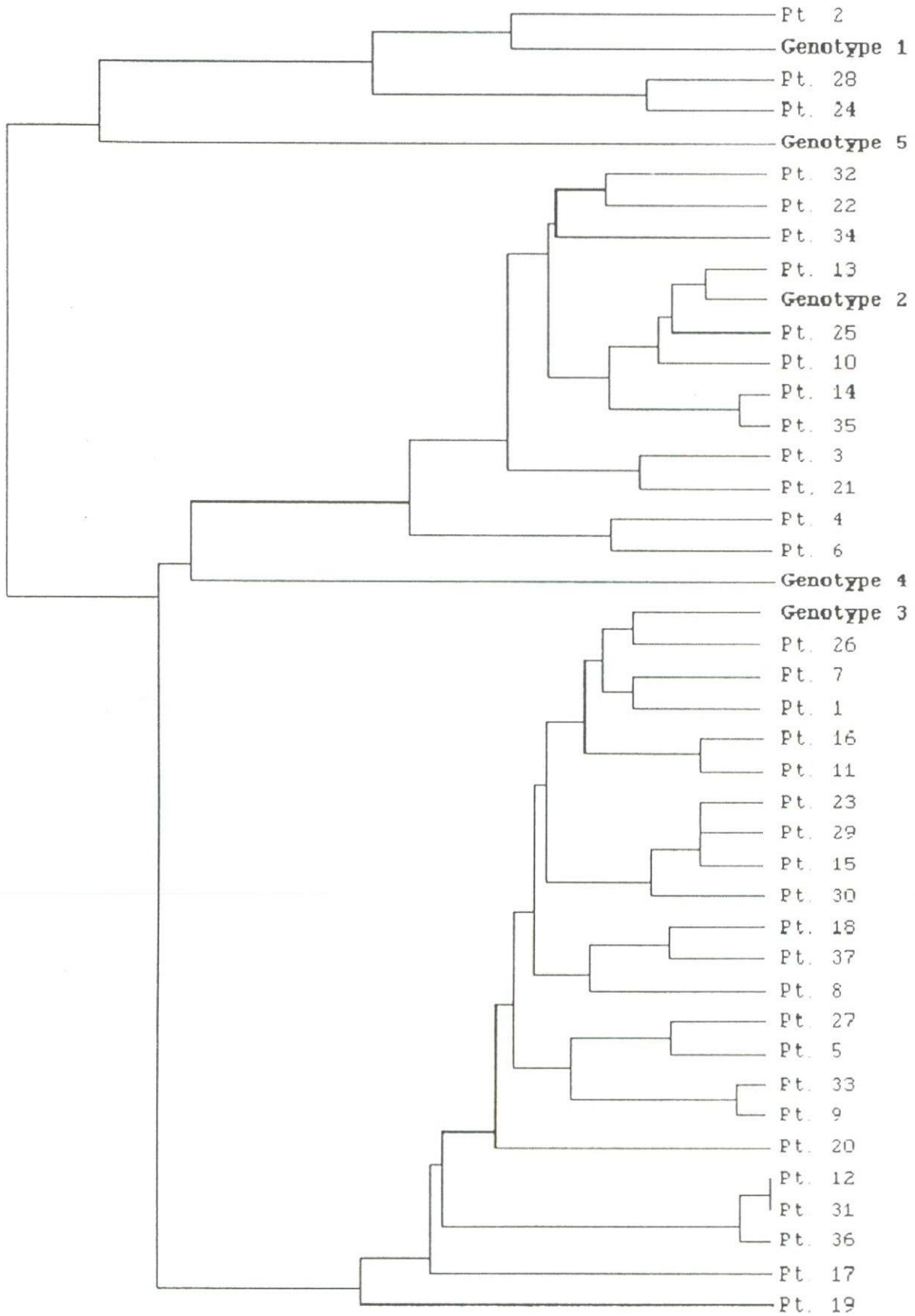


Fig. 1. Phylogenetic tree of GBV-C co-infected patients. The 37 GBV-C-infected patients (Pt.) are numbered 1 through 37. The reference sequences of the 5 GBV-C genotypes are shown in bold letters.

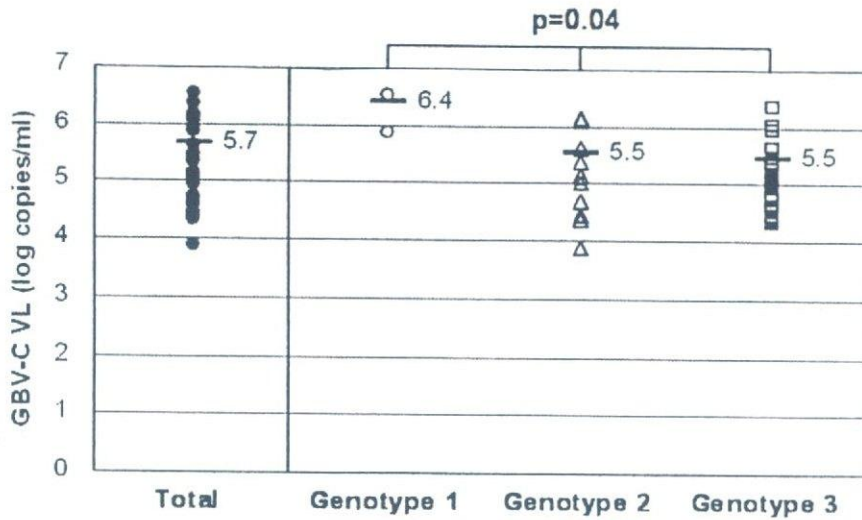


Fig. 2. Distribution of GBV-C viral load among 37 patients (●), and according to the genotypes 1 (○), 2 (△), and 3 (□). The bars indicate the mean viral load.

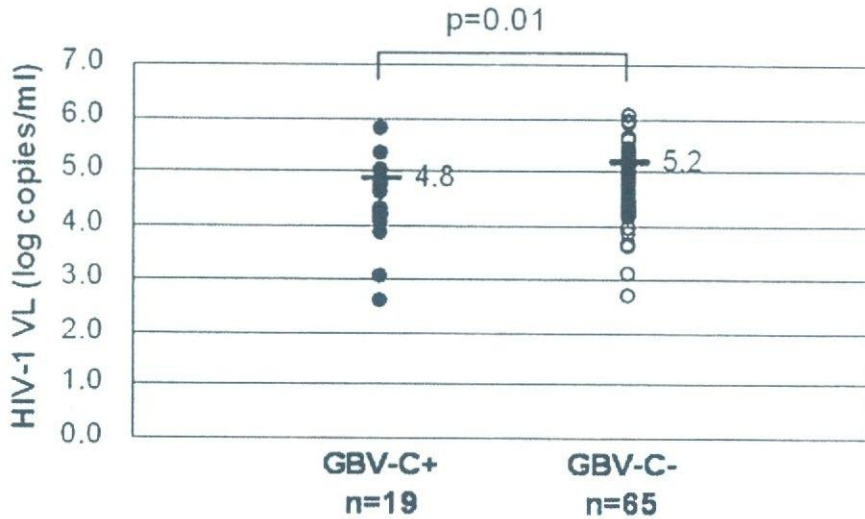


Fig. 3. Distribution of HIV-1 viral load among HAART-naïve GBV-C-co-infected (●) and GBV-C-uninfected (○) patients. The bars indicate the mean viral load.

was similar to the results of HIV-1-infected patients obtained by others (3, 21, 22). This fairly high value seems reasonable as the prevalence seen among homosexual men (12.5%) in our previous report was higher than that of healthy blood donors, and the majority of subjects in this study were infected with HIV-1 through homosexual contacts.

GBV-C genotypic analysis showed that 59.5% (22/37) of the GBV-C-infected individuals were classified as genotype 3, 32.4% (12/37) as genotype 2, and 8.1% (3/37) as genotype 1. None were classified as genotype 4 or 5. Our results agreed with reports by

others in that genotype 3 is prevalent in Japan (1, 14). Two of the 3 individuals with GBV-C genotype 1 were hemophiliacs, agreeing with a previous report by Liu et al. (13).

To study the effect of GBV-C co-infection on HIV-1-infected patients, plasma HIV-1 viral loads of antiretroviral therapy-naïve GBV-C-infected and -uninfected groups were compared. Statistical analysis showed that the HIV-1 viral loads of the GBV-C co-infected group were significantly lower than those of the singly-infected group ($P=0.01$). Consequently, we looked into the relationship between GBV-C viral load and HIV-1 viral

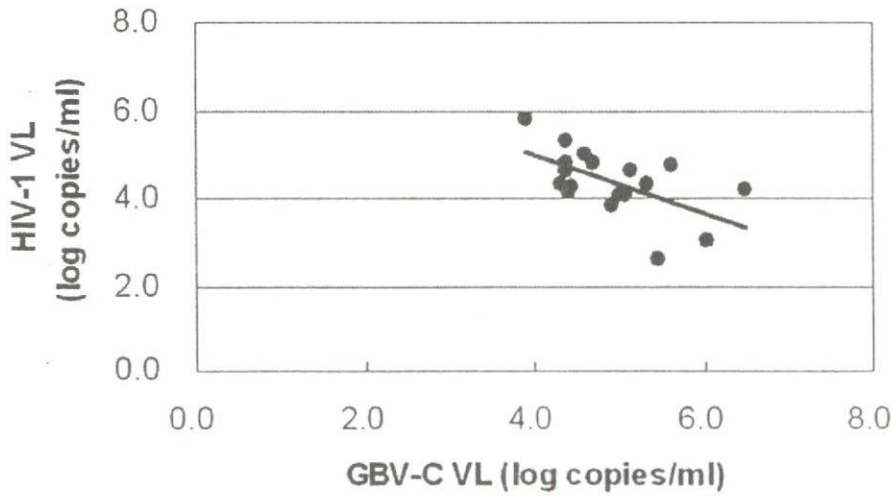


Fig. 4. Correlation between the GBV-C viral load and HIV-1 viral load ($R^2=0.34$).

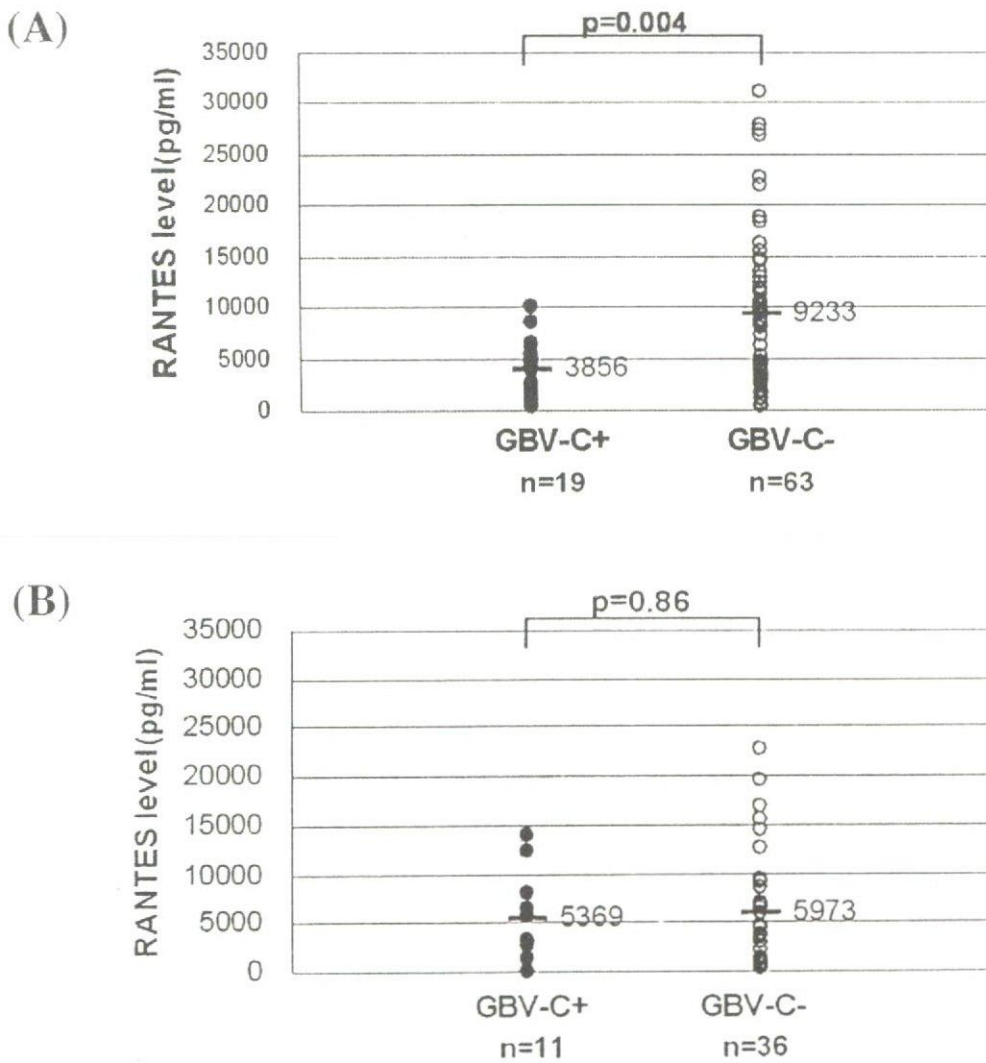


Fig. 5. Distribution of RANTES concentrations among HAART-naïve GBV-C-co-infected (●) and GBV-C-uninfected (○) patients in (A)the initial study, and (B)the follow-up study. The bars represent the mean RANTES concentrations.

load of the same study groups, and observed an inverse correlation in that individuals with higher GBV-C viral loads tended to have lower HIV-1 viral loads ($R^2=0.34$). Although the suppression level shown here was weak and partial, it is clear that the GBV-C infection is associated with the suppression of HIV-1 replication. Our results do not directly support the findings by Xiang et al. (26) or Tillmann et al. (22), but we believe that the HIV-1 replication suppressive effect by GBV-C possibly leads to a better prognosis and a low mortality rate. The question of why some research groups found a beneficial effect of GBV-C co-infection while others did not still remains. The discrepancy may occur from the differences in race, HIV-1 clade, or GBV-C genotype. However, divergent results were observed even when the studies were composed of mostly Caucasian subjects who were presumably infected with HIV-1 subtype B (18, 19, 22, 26). In addition, the differences in GBV-C genotype do not seem to account for the contrasting findings since the HIV-1 VLs between GBV-C genotypes 2 and 3 were similar as observed in the present study. Thus, other reasons may exist for the conflicting observations.

One possible mechanism of the suppression of HIV-1 replication is the inhibition of HIV-1 entry into target cells. As Xiang et al. reported that the co-infection of GBV-C suppressed the HIV-1 replication through up-regulation of RANTES, a natural CCR5 ligand, and also known as CCL5, in an *in vitro* study (25), we assessed the scenario by measuring the RANTES concentration in patients' plasma. In contrast to the *in vitro* study, however, much higher RANTES concentrations were observed in GBV-C-uninfected individuals. In addition, a mean RANTES level of 3,856 pg/ml in HAART-naïve GBV-C-infected patients at the first medical examination increased to 5,369 pg/ml after 1 year, whereas that of 9,233 pg/ml in HAART-naïve GBV-C-uninfected patients decreased to 5,973 pg/ml. This increase in the RANTES level in the GBV-C co-infected group, and in contrast, the decrease in the uninfected group, was unexpected and is inexplicable. Kwofie et al. reported a transient decrease in RANTES level at the early stage of HIV-1 infection in macaques (9). A similar fluctuation in RANTES level might occur in humans as well. Regrettably, we were unable to conclude that the HIV-1 replication was suppressed by up-regulation of RANTES by GBV-C, and the inhibition of HIV-1 replication might be supported through other mechanisms induced by GBV-C co-infection.

We can conclude that GBV-C co-infection affects the clinical status of HIV-1-infected patients, and that the co-infection confers a beneficial effect on the patient.

References

- 1) Abe, K. 2001. GB virus-C/hepatitis G virus. *Jpn. J. Infect. Dis.* **54**: 55–63.
- 2) Anastassopoulou, C.G., Paraskevis, D., Sypsa, V., Psichogiou, M., Katsoulidou, A., Tassopoulos, N., Skoutelis, A., Malliori, M., and Hatzakis, A. 1998. Prevalence patterns and genotypes of GB virus C/hepatitis G virus among imprisoned intravenous drug users. *J. Med. Virol.* **56**: 246–252.
- 3) Antonucci, G., Girardi, E., Cozzi-Lepri, A., Capobianchi, M.R., Morsica, G., Pizzaferrri, P., Ladisa, N., Sighinolfi, L., Chiodera, A., Solmone, M., Lalle, E., Ippo, G., Monforte, A., HepaICoNA Study Group, and ICoNA Study Group. 2005. Response to HAART and GB virus type C coinfection in a cohort of antiretroviral-naïve HIV-infected individuals. *Antivir. Ther.* **10**: 109–117.
- 4) Christensen, P.B., Fisker, N., Mygind, L.H., Krarup, H.B., Wedderkopp, N., Varming, K., and Georgsen, J. 2003. GB virus C epidemiology in Denmark: different routes of transmission in children and low- and high-risk adults. *J. Med. Virol.* **70**: 156–162.
- 5) Frey, S.E., Homan, S.M., Sokol-Anderson, M., Cayco, M.T., Cortorreal, P., Musial, C.E., and Di Bisceglie, A. 2001. Evidence for probable sexual transmission of the hepatitis G virus. *Clin. Infect. Dis.* **34**: 1033–1038.
- 6) Hattori, J., Ibe, S., Nagai, H., Wada, K., Morishita, T., Sato, K., Utsumi, M., and Kaneda, T. 2003. Prevalence of infection and genotypes of GBV-C/HGV among homosexual men. *Microbiol. Immunol.* **47**: 759–763.
- 7) Jung, S., Knauer, O., Donhauser, N., Eichenmüller, M., Helm, M., Fleckenstein, B., and Reil, H. 2005. Inhibition of HIV strains by GB virus C in cell culture can be mediated by CD4 and CD8 T-lymphocyte derived soluble factors. *AIDS* **19**: 1267–1272.
- 8) Kaye, S., Howard, M., Alabi, A., Hansmann, A., Whittle, H., and Schim vander Loeff, M. 2005. No observed effect of GB virus C coinfection on disease progression in a cohort of African women infected with HIV-1 or HIV-2. *Clin. Infect. Dis.* **40**: 876–878.
- 9) Kwofie, T.B., Haga, T., Iida, T., Hayami, M., and Miura, T. 2000. Plasma levels of the chemokine RANTES in macaque monkeys infected with pathogenic and non-pathogenic SIV/HIV-1 chimeric viruses at an early stage of infection. *J. Vet. Med. Sci.* **62**: 1311–1312.
- 10) Leary, T.P., Muerhoff, A.S., Simons, J.N., Pilot-Matias, T.J., Erker, J.C., Chalmers, M.L., Schlauder, G.G., Dawson, G.L., Desai, S.M., and Mushahwar, I.K. 1996. Sequence and genomic organization of GBV-C: a novel member of the Flaviviridae associated with human non-A-E hepatitis. *J. Med. Virol.* **48**: 60–67.
- 11) Lefrere, J.J., Roudot-Thoraval, F., Morand-Joubert, L., Brossard, Y., Parnet-Mathieu, F., Mariotti, M., Agis, F., Rouet, G., Lerable, J., Lefevre, G., Girot, R., and Loiseau, P. 1999. Prevalence of GB virus type C/hepatitis G virus RNA and of anti-E2 in individuals at high or low risk for blood-borne or sexually transmitted viruses: evidence of sexual and parenteral transmission. *Transfusion* **39**: 83–94.
- 12) Linnen, J., Wages, J., Jr., Zhang-Keck, Z.Y., Fry, K.E.,