

サイトメガロウイルス感染症を発症した 日本人エイズ患者に対するバルガンシクロビルの 効果および安全性についての評価

平野 淳*^{1,2}, 奥村直哉^{1,2}, 久高祐一¹, 寺畑奈美¹, 高橋昌明^{1,2}, 坂野和英¹
横幕能行², 安岡 彰³, 間宮均人², 濱口元洋², 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
長崎大学医学部歯学部附属病院感染制御教育センター³

The Efficacy and Safety of Valganciclovir in Japanese AIDS Patients Coinfected with Cytomegalovirus

Atsushi Hirano*^{1,2}, Naoya Okumura^{1,2}, Yuichi Kudaka¹, Nami Terahata¹, Masaaki Takahashi^{1,2},
Kazuhide Banno¹, Yoshiyuki Yokomaku², Akira Yasuoka³, Naoto Mamiya²,
Motohiro Hamaguchi², Tsuguhiro Kaneda²

Department of Pharmacy¹, Clinical Research Center², National Hospital Organization Nagoya Medical Center,
Infection Control and Education Center, Nagasaki University Hospital of Medicine and Dentistry³

〔受付：2007年3月28日 受理：2007年5月9日〕

サイトメガロウイルス（以下、CMV）感染症を発症した日本人エイズ患者に対するバルガンシクロビル（以下、VGC）の効果および安全性について検討した。2004年11月～2006年10月までにVGCが投与された患者11例を対象とした。CMV抗原陰性化率は100%（11/11例）であり、CMV感染症に対してVGCは有効であった。しかし、維持療法中に5例の患者でVGCの投与が中止された。中止理由としては、白血球減少が3例、ヘモグロビン減少が1例、汎血球減少が1例であった。また、VGC投与前後の検査値の比較において白血球数のみが有意に減少した。VGC中止群5例のうち2例でCMV抗原の再燃が認められ、VGCの再投与により陰性化した。一方、VGC継続群6例中1例でもCMV抗原の再燃が認められ、VGCの増量により陰性化した。CMV感染症に対してVGCを使用する場合には、投与患者の臨床検査値に注意を払い、患者個々の状態に応じて投与を行うことが重要である。

キーワード—エイズ, サイトメガロウイルス (CMV), バルガンシクロビル (VGC), 効果, 安全性

緒言

サイトメガロウイルス(以下、CMV)感染症は、CMVの初感染あるいは再活性化などにより様々な部位に発症し、その部位は網膜・腸・肺・脳など多彩である。免疫機能が低下しているエイズ患者においても比較的好くみられる日和見感染症の1つであり、とりわけ網膜炎の頻度が高い¹⁾。

エイズ患者に対するCMV網膜炎の治療には、ガンシクロビルの経口製剤や静注用製剤、ホスカルネットが用いられる。しかし、静注用製剤では入院期間が長期に及ぶことになり、また、ガンシクロビル経口製剤は吸収率

が悪く、1日3回の服用が必要となる。

バルガンシクロビル（以下、VGC）は、ガンシクロビルのプロドラッグで1日1～2回投与が可能な経口製剤であり、生物学的利用率も約60%とガンシクロビル経口製剤の約6%と比べて約10倍高い。海外治験においても初回治療効果がガンシクロビル静注用製剤とほぼ同等であることが報告されている^{2,3)}。しかし、国内における治験は全く実施されておらず、日本人エイズ患者に対するデータは十分でない。今回、日本人エイズ患者のCMV感染症に対するVGCの効果および安全性について検討したので報告する。

† 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

方法

2004年11月～2006年10月に名古屋医療センター（以下、当センター）でCMV感染症に対してVGCが投与された日本人エイズ患者11例を対象とした。調査項目は年齢、合併症、併用薬、CD4細胞数、白血球（以下、WBC）数、血清ヘモグロビン（以下、Hb）量、血小板数、血清クレアチニン（以下、Cr）値、CMV抗原陽性細胞数（C10、C11）、投与日数とした。VGCの効果についてはCMV抗原の陰性化をもって有効と判定した。統計解析はt検定を用いて、危険率5%をもって有意な差とした。

結果

表1に対象となった11例の患者背景を示した。年齢の中央値は46歳で、CD4細胞数の最大値は149細胞/ μ Lであり、すべての症例で免疫機能が低下していた。WBC数、Hb量は低い傾向にあったが、血小板数およびCr値はほぼ正常値であった。また、すべての症例でCMV抗原は陽性であった。

合併症としてはニューモシスチス肺炎が7例と多く、次いで食道カンジダ症が2例、悪性リンパ腫、結核、クリプトコッカス症がそれぞれ1例ずつみられた。併用薬としては、ニューモシスチス肺炎の予防および治療目的でST合剤あるいはペンタミジンが全例で使用されていた。また、抗HIV薬については、VGCとの相互作用が認められているジドブジン、ジダノシン、ザルシタピンは投与されていなかった（表2）。

対象患者11例はVGCの初期治療（1,800mg/2 \times 1）を15日間行った後に維持療法（900mg/1 \times 1）へ移行し、最終的に全症例でCMV抗原が陰性化した。しかし、維持療法中に5例の患者でVGCの投与が中止された。投与中止の理由は、WBC減少（3例）、Hb減少（1例）、汎血球減少（1例）であった。また、投与中止5例中2例では中止後7日目および22日目でCMV抗原の再燃を認めたが、中止理由となった有害事象の改善を認めたためVGCを再投与したところ、陰性化した。

一方、維持療法継続中の6例中5例はCMV抗原の陰性化を維持することができたが、1例は投与開始後140日目でCMV抗原の再燃を認め、VGCの増量により再度陰性化した。

VGCの継続群6例と中止群5例とで年齢、CD4細胞数、WBC数、Hb量、血小板数、Cr値、CMV抗原について検討を行ったが、両群の間で有意な差は認められな

表1 患者背景

	中央値（最小～最大）
年齢（歳）	46（34～61）
CD4細胞数（細胞/ μ L）	24（6～149）
WBC数（/mL）	3,900（1,700～12,600）
Hb量（g/dL）	10.2（6.1～14.0）
血小板数（ $\times 10^4$ /mL）	20.6（8.2～39.1）
Cr値（mg/dL）	0.72（0.64～1.16）
CMV抗原陽性細胞数C10/C11	22（5～987）/42（2～813）

表2 対象患者の合併症、抗HIV薬および併用薬

患者番号	合併症	抗HIV薬	併用薬
1	悪性リンパ腫、食道カンジダ症	d4T, 3TC, LPV/r	ST合剤
2	なし	d4T, 3TC, EFV	ペンタミジン吸入
3	ニューモシスチス肺炎	d4T, 3TC, LPV/r	ST合剤
4	ニューモシスチス肺炎	TDF, 3TC, EFV	ST合剤
5	ニューモシスチス肺炎	TDF, FTC, EFV	ペンタミジン点滴静注
6	結核	TDF, FTC, FPV	ペンタミジン吸入
7	ニューモシスチス肺炎	ABC, 3TC, LPV/r	ST合剤
8	ニューモシスチス肺炎	TDF, FTC, EFV	ST合剤
9	クリプトコッカス症	ABC, 3TC, EFV	ST合剤
10	ニューモシスチス肺炎	TDF, FTC, EFV	ST合剤
11	ニューモシスチス肺炎、食道カンジダ症	TDF, FTC, EFV	ST合剤

d4T：サニルブジン、3TC：ラミブジン、TDF：テノホビルジソプロキシル、FTC：エムトリシタピン、ABC：アバカビル、EFV：エファビレンツ、LPV/r：ロピナビル/リトナビル、FPV：ホスアプレナビル、ST合剤：スルファメトキサゾール・トリメトプリム

表3 バルガンシクロビル継続群と中止群の比較（平均値）

	継続群（n=6）	中止群（n=5）	p値
年齢（歳）	51（34～60）	38（35～61）	0.65
CD4細胞数（細胞/ μ L）	25（14～149）	24（6～26）	0.33
WBC数（/mL）	3,600（1,700～7,400）	4,600（1,800～12,600）	0.35
Hb量（g/dL）	9.9（6.1～11.2）	10.3（7.9～13.3）	0.84
血小板数（ $\times 10^4$ /mL）	14.8（8.2～23.4）	21.1（12.2～39.1）	0.34
Cr値（mg/dL）	0.8（0.64～1.16）	0.7（0.66～0.76）	0.15
CMV抗原陽性細胞数C10/C11	14（5～987）/29.5（2～813）	41（5～71）/43（6～84）	0.36/0.40
投与日数（日）	105.5（42～680）	42（35～58）	<0.001

かった（表3）。

次に、WBC数、Hb量、血小板数、Cr値についてVGC投与前、投与2、4週後の変化について検討したところ、WBC数では投与前の値と比較して投与2、4週後で有意な減少が認められた（ $p < 0.05$ ）。ほかの3項目については投与前と2、4週後で有意な差は認められなかった（図1）。

考察

VGCは、ガンシクロビル経口製剤に比べて生物学的利用率が高く吸収が良好であるため、エイズ患者に対する

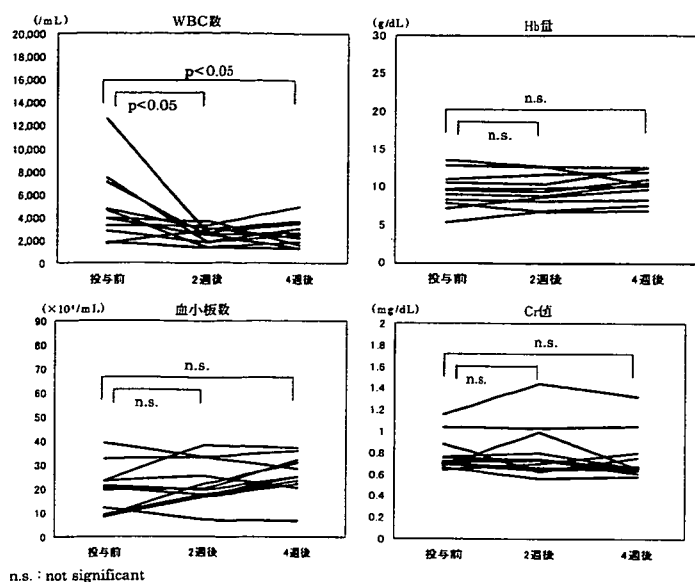


図1 バルガンシクロビル投与前後の検査値の比較

CMV網膜炎の治療剤の第一選択薬として推奨されている⁴⁾。しかし、海外での臨床試験において下痢、悪心、嘔吐、白血球減少、貧血、骨髄抑制、腎不全等の有害事象が報告⁵⁾されていることから、日本人エイズ患者に対して使用する場合にも十分に注意が必要である。

今回、当センターでVGCを投与された日本人エイズ患者11例を対象にVGCの有効性について検討を行った。対象患者の維持療法移行後のCMV抗原の陰性化率は100% (11例/11例)であった。このことから、日本人エイズ患者のCMV感染症に対してもVGCの効果が認められた。VGCは、ガンシクロビルに比べて投与量、投与回数を少なくできるうえ、注射剤と同等の効果が得られることから患者のquality of life (QOL)を向上させる点で有用性は高い。

次に、安全性に関する評価であるが、有害事象で投与中止となった症例が11例中5例と約半数にみられ、維持療法を継続するうえでの問題点が明らかとなった。中止理由は、WBC減少が3例、Hb減少が1例、汎血球減少が1例で、腎機能の悪化や下痢、嘔吐などはみられなかった。また、VGC投与前後の検査値でもWBC数のみが投与2、4週後で有意に減少したことから、VGCの投与に際してはWBC減少に特に注意する必要があると考える。

また、エイズ患者では数種類の抗HIV薬と併用投与されることが多いため、VGCの副作用増強が認められているジドブジン、ジダノシン、ザルシタピンとの併用投与は避けるべきである。

エイズ患者のCMV網膜炎に対するVGC維持療法の期間は、CD4細胞数の回復後6ヵ月間継続して行う必要があるといわれる^{6,7)}。実際、投与中止となった5例中2例で中止後7日目および22日目にCMV抗原の再燃が認められ、日本人エイズ患者においてもVGC維持療法を継続して行う必要性が示唆された。また、VGC継続群のなかの1例でCMV抗原の再燃が認められたことから、維持療法におけるVGCの投与量が少ない可能性も示唆された。しかし、すべての再燃例においてVGCの再投与あるいは増量によりCMV抗原は陰性化したことから、臨床検査値の悪化等の有害事象が発生した場合には、一時的にVGCの投与中止を検討することも必要であると考えられる。

日本人エイズ患者のCMV感染症に対してVGCを使用する場合には、投与患者の臨床検査値、特にWBC減少に注意を払い、患者個々の状態に応じて投与を行うことが重要である。

引用文献

- 1) 厚生労働省/国立感染症研究所感染症情報センター：感染症の話, 2003年第15週号, 2003年4月7日~13日.
<http://idsc.nih.go.jp/idwr/kansen/index.html>, 2007年3月1日アクセス.
- 2) R.B. Freeman: Valganciclovir: oral prevention and treatment of cytomegalovirus in the immunocompromised host, *Expert Opin. Pharmacother.*, **5**, 2007-2016 (2004).
- 3) D.F. Martin, J.S. Madero *et al.*: A controlled trial of valganciclovir as induction therapy for cytomegalovirus retinitis, *N. Engl. J. Med.*, **346**, 1119-1126 (2002).
- 4) C.A. Benson, J.E. Kaplan *et al.*: Treating opportunistic infections among HIV-exposed and infected children, recommendations from CDC, the National Institutes of Health, and the Infectious Diseases Society of America, *MMWR Recomm. Rep.*, **53**, 1-112 (2004).
- 5) J. Lalezari, J. Lindley *et al.*: A safety study of oral valganciclovir maintenance treatment of cytomegalovirus retinitis, *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, **30**, 392-400 (2002).
- 6) F.J. Torriani, W.R. Freeman *et al.*: CMV retinitis recurs after stopping treatment in virological and immunological failures of potent antiretroviral therapy, *AIDS*, **14**, 173-180 (2000).
- 7) M. Jouan, M. Saves *et al.*: Discontinuation of maintenance therapy for cytomegalovirus retinitis in HIV-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy, *AIDS*, **15**, 23-31 (2001).

Determination of Plasma Tenofovir Concentrations Using a Conventional LC-MS Method

Masaaki TAKAHASHI,^{a,b} Yuichi KUDAKA,^a Naoya OKUMURA,^{a,b} Atsushi HIRANO,^{a,b} Kazuhide BANNO,^a and Tsuguhiko KANEDA^{*b}

^a Department of Pharmacy, National Hospital Organization Nagoya Medical Center (Tokai Area Central Hospital for AIDS Treatment and Research); and ^b Clinical Research Center, National Hospital Organization Nagoya Medical Center (Tokai Area Central Hospital for AIDS Treatment and Research); 4-1-1 Sannomaru, Naka-ku, Nagoya, Aichi 460-0001, Japan.

Received April 3, 2007; accepted July 3, 2007; published online July 6, 2007

The quantification of tenofovir, a nucleoside reverse transcriptase inhibitor prescribed once daily, in human plasma is important due to a recent increase in its use. HPLC, however, can not easily detect and quantify tenofovir because of interfering peaks. Therefore, we developed a rapid and conventional LC-MS method, validated by estimating the precision and accuracy for inter- and intraday analysis in the concentration range of 0.019–1.567 µg/ml. The calibration curve was linear in the described concentration range. Average accuracy ranged from 95.9 to 100.7%. Relative standard deviations of both inter- and intraday assays were less than 11.6%. Recovery of tenofovir was more than 80.2%. This novel method provides a conventional, accurate and precise way to determine tenofovir in human plasma samples.

Key words human immunodeficiency virus (HIV)-1; LC-MS; therapeutic drug monitoring; tenofovir

Tenofovir is one of the nucleoside reverse transcriptase inhibitors used to treat human immunodeficiency virus (HIV)-1. Tenofovir can be administered once-daily at a dose of 300 mg in combination with other antiretroviral drugs.^{1,2)} The advantage of once-daily dosing is a reduction in patient drug load. Also, tenofovir appeared to be well tolerated with low rates of drug-related therapy discontinuation in several clinical trials.^{3,4)} Thus, tenofovir use is expected to increase. However, some drug interactions with tenofovir and coadministered drugs have been reported.^{4–7)} Furthermore, tenofovir has been associated with renal impairment.^{8–10)}

Recently, several determination methods for plasma tenofovir using high-performance liquid chromatography (HPLC)^{11–13)} or liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS-MS),^{14,15)} have been reported. HPLC methods, however, are procedurally complicated, such as solid-phase drug extraction and derivatization with chloroacetaldehyde. Also, when using the LC-MS-MS method the MS-MS detector needs to be delicately set. In addition, LC-MS-MS equipment is very expensive. We aimed, therefore, to develop a conventional procedure for determining tenofovir using liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS).

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and Reagents Tenofovir was supplied by Gilead Sciences (Foster City, CA, U.S.A.). The internal standard, atenolol, was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, U.S.A.). Acetonitrile (Kanto Chemical, Tokyo, Japan) was HPLC grade. Water was deionized and osmosed using a Milli-Q[®] system (Millipore Corp., Bedford, MA, U.S.A.). All other chemicals and solvents were of analytical grade.

Equipment A Waters Alliance 2695 HPLC and a Micromass ZQ-2000 MS (Waters Assoc., Milford, MA, U.S.A.), controlled with MassLynx version 4.0 software, were used for detection. The analytical column was a SunFire C₁₈ col-

umn (3.5 µm, 2.1×50 mm, Waters), protected by a SunFire C₁₈ Guard Column.

Chromatographic and Mass Spectrometric Conditions The mobile phase was a mixture of 0.3% trifluoroacetic acid (A), 100% acetonitrile (B) and 100 mM ammonium acetate (C). An isocratic mobile phase consisting of A–B–C (95 : 0 : 5) was used during the first 3 min of the run, followed by a linear gradient elution consisting of A–B–C (45 : 50 : 5) for the next 5 min. Then, the system was reequilibrated for an additional 12 min using the initial conditions. The flow rate of the mobile phase was 0.2 ml/min, the column temperature was 40 °C and the amount of injected sample was 5 µl.

The mass spectrometer was operated in positive ion electrospray mode. The capillary sprayer voltage was 3.5 kV and the sample cone voltage was 30 V for both tenofovir and atenolol. The source temperature was 120 °C and the desolvation temperature was 350 °C. The desolvation and cone gas flow-rates were set to 600 and 50 l/h, respectively. The acquisition mass range is *m/z* 100–700 at 0.5 s per scan with a 0.1 s interscan delay. All mass spectra are acquired in centroid mode.

Quantitative analysis, carried out in Selected-ion recording (SIR) mode, detected tenofovir at *m/z* 288, and the internal standard (IS), atenolol, at *m/z* 267, all in the form of ions. The quantitation calculations were performed using analytical software, MassLynx version 4.0 (Waters).

Standard Solutions Stock solutions of tenofovir and atenolol were prepared by dissolving accurately weighed amounts of each reference compound in water/ethanol (50 : 50, v/v) to yield concentrations of 188.0 µg/ml for tenofovir, and 48.1 µg/ml for atenolol. These stock solutions were stored at –80 °C and thawed on the day of analysis. The stock solution was diluted in drug-free plasma to yield tenofovir concentrations of 0.019, 0.094, 0.313, 0.940 and 1.567 µg/ml.

Sample Preparation Twenty microliters of IS solution (atenolol 48.1 µg/ml) and 200 µl of 1 N HCl were added to a 500 µl plasma sample prepared from peripheral blood antico-

* To whom correspondence should be addressed. e-mail: kanedat@nnh.hosp.go.jp

agulated with heparin. After vortexing briefly, 2 ml of 100% acetonitrile was added to the mixture. The mixture was vortexed again and then centrifuged at 3500 *g* for 5 min. The upper layer was separated and evaporated dry. The dried material was then dissolved in 100 μ l of a mobile phase solution and centrifuged at 13000 *g* for 5 min. Lastly, 5 μ l of the upper solution was injected into the LC-MS system. The institutional review board of National Hospital Organization Nagoya Medical Center approved this study and each subject provided written informed consent.

Validation Inter- and intraday precision values using this method were estimated by assaying control plasma containing five different concentrations of tenofovir five times on the same day and on three separate days to obtain the relative standard deviation (RSD). Accuracy was determined as the percentage of the nominal concentration. To assess the absolute recoveries of tenofovir extracted from plasma, the peak area ratios of the analytes to the internal standard were compared with those obtained from the mobile phase having the same concentration. The mean recoveries were determined in three replicates.

RESULTS

LC-MS Chromatograms Figures 1A and B show selected-ion recording chromatograms obtained from a spiked

plasma sample containing 0.94 μ g/ml of tenofovir and 1.85 μ g/ml of atenolol (IS). Under the described chromatographic conditions, retention times were 4.4 min for tenofovir and 9.9 min for atenolol. Figures 1C and D show chromatograms obtained from a blank plasma sample. Assays performed on drug-free human plasma succeeded to show no interfering peaks during the interested intervals of the retention times. Figure 1D is the expanded figure of a circled part of Fig. 1B. These peaks did not affect on the quantification of IS. Figures 1E and F show chromatogram of a plasma sample from an HIV-1-infected patient treated with tenofovir. There were no interfering peaks affecting quantification of tenofovir in this chromatogram. Anticoagulants of heparin, EDTA and ACD did not hinder the selected-ion recording chromatograms for tenofovir and atenolol.

Validation: Linearity, Precision, Accuracy and Recovery Calibration curves of tenofovir appeared linear in the concentration range of 0.019 to 1.567 μ g/ml with a correlation of 1.000.

Precision, accuracy, and recovery of our LC-MS method are shown in Table 1. The selected concentration of tenofovir covers the expected plasma concentrations found in the patients. The RSDs calculated for tenofovir in the inter- and intraday assays ranged from 1.5 to 11.3%, which are similar to or much lower than previously reported values.^{11–16} Accuracies ranged from 95.9 to 102.7%. Recoveries from plasma

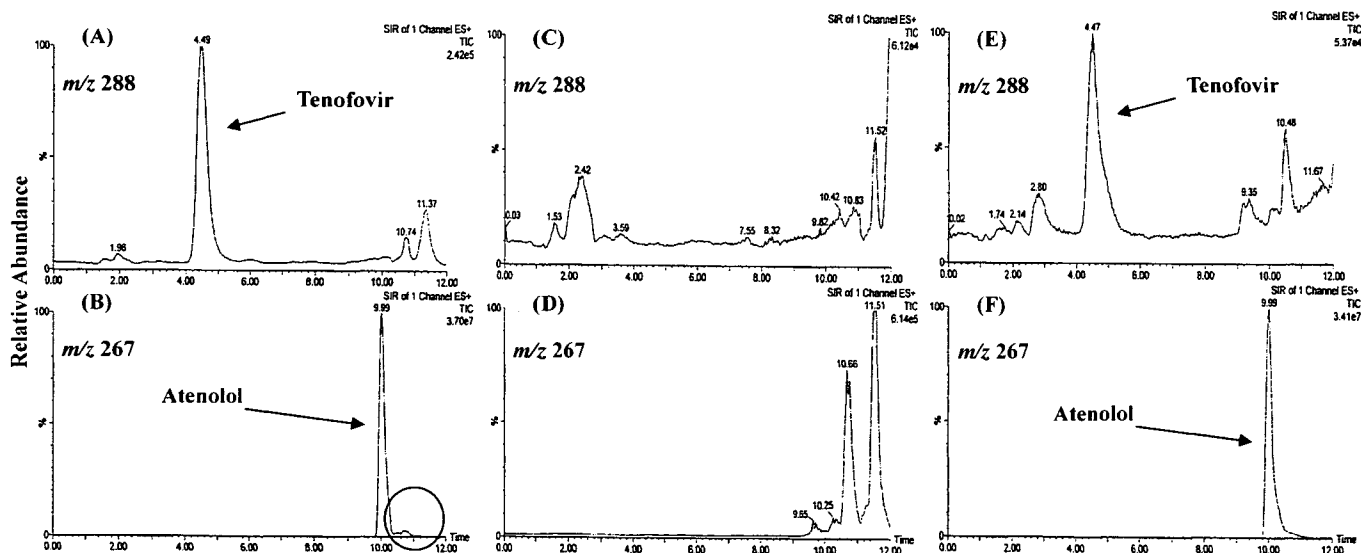


Fig. 1. Selected-Ion Recording Chromatograms for Tenofovir and Atenolol

(A) and (B) were obtained from a spiked plasma containing 0.94 μ g/ml of tenofovir and 1.85 μ g/ml of atenolol (IS). (C) and (D) were obtained from a blank plasma sample. (E) and (F) were obtained from a plasma sample from an HIV-1-infected patient with tenofovir. (A), (C) and (E) were monitored with *m/z* 288. (B), (D) and (F) were monitored with *m/z* 267. (D) is the expanded figure of a circled part of (B).

Table 1. Intraday and Interday Precision and Accuracy for Tenofovir

Expected (μ g/ml)	Intraday (<i>n</i> =5)		Interday (<i>n</i> =3)		Accuracy (%)	Recovery (%)
	Measured (μ g/ml)	RSD (%)	Measured (μ g/ml)	RSD (%)		
0.019	0.019 \pm 0.002	10.0	0.020 \pm 0.002	11.3	102.7 \pm 11.6	80.2 \pm 9.4
0.094	0.095 \pm 0.007	7.4	0.092 \pm 0.005	5.7	98.2 \pm 5.7	95.2 \pm 10.4
0.313	0.313 \pm 0.012	4.0	0.300 \pm 0.016	5.2	95.9 \pm 5.0	92.2 \pm 10.4
0.940	0.921 \pm 0.039	4.3	0.931 \pm 0.054	5.8	99.1 \pm 5.7	86.1 \pm 7.4
1.567	1.570 \pm 0.024	1.5	1.578 \pm 0.045	2.8	100.7 \pm 2.9	91.1 \pm 6.2

RSD, relative standard deviation.

Table 2. Plasma Tenofovir Concentrations after the Oral Administration of 300 mg of Tenofovir to an HIV-1-Infected Patient

Time (h)	Tenofovir concentration ($\mu\text{g/ml}$)
0	0.073
4	0.316
6	0.162
12	0.106
23	0.052

ranged from 80.2 to 95.2%. These results indicate this method achieves a high degree of reproducibility and accuracy.

Tenofovir Concentrations in Plasma Plasma tenofovir concentrations in an HIV-1-infected patient are shown in Table 2. The patient received oral administration of 300 mg tenofovir daily. These concentrations were similar to those reported previously.^{11,12,17)}

DISCUSSION

Prior to this study we tried to determine tenofovir plasma concentrations using a previously described HPLC method.¹²⁾ However, we could not identify and quantify tenofovir peaks on chromatograms of plasma sample due to interfering peaks. Thus, we developed a more sensitive method. Until now there have been some methodological reports for the determination of tenofovir using LC-MS-MS.^{14,15)} However, these methods have several disadvantages in terms of cost performance, time consumption and essential equipment; for example, the authors used expensive disposable cartridges at the solid-phase drug extraction and/or the setting of the LC-MS-MS equipment.

To avoid such disadvantages we decided to use a LC-MS method. Validation showed our method was successful in measuring plasma tenofovir with high precision and satisfactory RSD values. The tenofovir calibration curve was linear in the concentration range of 0.019 to 1.567 $\mu\text{g/ml}$ and the average accuracy ranged from 95.9 to 100.7%. Both inter- and intraday RSDs for tenofovir were less than 11.6%, which is similar to or much lower than previously reported values.^{11–16)} Recovery of tenofovir was more than 80.2%. These results indicate our newly developed method achieves a high degree of reproducibility and accuracy. As plasma concentrations of tenofovir are expected in the 0.05 to 0.40 $\mu\text{g/ml}$

range when tenofovir is administered at the recommended dose,^{4,17)} our method successfully covers this region with good precision and accuracy. Actually, plasma tenofovir concentrations after oral administration of 300 mg to an HIV-1-infected patient were in this range.

This conventional LC-MS method can provide a routine clinical application, and permits management of drug interactions and toxicity.

Acknowledgements This study was supported in part by a Health Science Research Grant for Research on HIV/AIDS from the Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan (H13-AIDS-001 and H16-AIDS-002 to TK).

REFERENCES

- 1) Fung H. B., Stone E. A., Piacenti F. J., *Clin. Ther.*, **24**, 1515–1548 (2002).
- 2) Kumar A., *Drugs*, **63**, 1597–1608 (2003).
- 3) Barditch-Crovo P., Deeks S. G., Collier A., Safrin S., Coakley D. F., Miller M., Kearney B. P., Coleman R. L., Lamy P. D., Kahn J. O., McGowan I., Lietman P. S., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **45**, 2733–2739 (2001).
- 4) Product information, VIREAD[®] (tenofovir disoproxil fumarates), Foster City, CA: Gilead Sciences, 2006.
- 5) Droste J. A., Kearney B. P., Hekster Y. A., Burger D. M., *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, **41**, 37–43 (2006).
- 6) Kearney B. P., Sayre J. R., Flaherty J. F., Chen S. S., Kaul S., Cheng A. K., *J. Clin. Pharmacol.*, **45**, 1360–1367 (2005).
- 7) Taburet A. M., Piketty C., Chazallon C., Vincent I., Gerard L., Calvez V., Clavel F., Aboulker J. P., Girard P. M., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **48**, 2091–2096 (2004).
- 8) Zimmermann A. E., Pizzoferrato T., Bedford J., Morris A., Hoffman R., Braden G., *Clin. Infect. Dis.*, **42**, 283–290 (2006).
- 9) Murphy M. D., O'Hearn M., Chou S., *Clin. Infect. Dis.*, **36**, 1082–1085 (2003).
- 10) Winston J. A., Shepp D. H., *Clin. Infect. Dis.*, **42**, 1657–1658 (2006).
- 11) Sparidans R. W., Crommentuyn K. M. L., Schellens J. H. M., Beijnen J. H., *J. Chromatogr. B*, **791**, 227–233 (2003).
- 12) Sentenac S., Fernandez C., Thuillier A., Lechat P., Aymard G., *J. Chromatogr. B*, **793**, 317–324 (2003).
- 13) Jullien V., Treluyer J.-M., Pons G., Rey E., *J. Chromatogr. B*, **785**, 377–381 (2003).
- 14) Delahunty T., Bushman L., Fletcher C. V., *J. Chromatogr. B*, **830**, 6–12 (2006).
- 15) Bezy V., Morin P., Couerbe P., Leleu G., Agrofoglio L., *J. Chromatogr. B*, **821**, 132–143 (2005).
- 16) Rezk N. L., Crutchley R. D., Kashuba A. D. M., *J. Chromatogr. B*, **822**, 201–208 (2005).
- 17) Droste J. A. H., Verweij-van Wissen C. P. W. G. M., Kearney B. P., Buffels R., van Horssen P. J., Hekster Y. A., Burger D. M., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **49**, 680–684 (2005).

The Validation of Plasma Darunavir Concentrations Determined by the HPLC Method for Protease Inhibitors

Masaaki TAKAHASHI,^{a,b} Yuichi KUDAKA,^{a,b} Naoya OKUMURA,^{a,b} Atsushi HIRANO,^{a,b} Kazuhide BANNO,^a and Tsuguhiro KANEDA^{*.b}

^a Department of Pharmacy, National Hospital Organization Nagoya Medical Center (Tokai Area Central Hospital for AIDS Treatment and Research); and ^b Clinical Research Center, National Hospital Organization Nagoya Medical Center (Tokai Area Central Hospital for AIDS Treatment and Research); 4-1-1 Sannomaru, Naka-ku, Nagoya, Aichi 460-0001, Japan.

Received June 6, 2007; accepted July 13, 2007; published online July 17, 2007

Darunavir (DRV) is a new protease inhibitor used to treat human immunodeficiency virus (HIV) type-1. The aim of this study was to validate the determination of plasma DRV concentrations using the HPLC method, a simple procedure for simultaneous determination of seven HIV protease inhibitors and efavirenz. The calibration curve was linear (range of 0.13 to 10.36 $\mu\text{g/ml}$). The average accuracy ranged from 100.7 to 105.6%. Both the interday and intraday coefficients of variation were less than 6.7%, which was similar to or much lower than previously reported values by the LC/MS/MS method. It is concluded that HPLC can be used to determine plasma DRV concentrations and routinely in the clinical setting; thus, this HPLC method enables further study of DRV pharmacokinetics in conventional hospital laboratories.

Key words darunavir; human immunodeficiency virus type-1; HPLC; therapeutic drug monitoring

Darunavir (DRV), a new protease inhibitor (PI), is used to treat human immunodeficiency virus (HIV) type-1. According to *in vitro* experiments, DRV was active against HIV-1 with PI resistance mutations and against PI resistant clinical isolates.^{1–4} This drug is expected to be effective in antiretroviral treatment-experienced patients, such as those possessing HIV-1 strains which are resistant to more than one PI.^{5–8}

Bouche *et al.* recently determined plasma DRV concentrations using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC/MS/MS).⁹ However, as LC/MS/MS equipment is very expensive and unavailable in conventional hospital laboratories, development of alternate methods is necessary.

We have already developed a simple HPLC method for simultaneous quantitative determination of seven HIV protease inhibitors and efavirenz.¹⁰ We expect DRV can be measured using this method because amprenavir, whose chemical structure is quite similar to DRV, was successfully measured.

In this study we aimed to validate the measurement of plasma DRV concentrations using the HPLC method. This is the first report where plasma DRV concentration has been measured using this HPLC method.

MATERIALS AND METHODS

Standard Solutions and Chemicals DRV was supplied by Tibotec Pharmaceuticals Ltd. (Eastgate Village, Eastgate, Little Island, Co Cork, Ireland). The internal standard (IS), 6,7-dimethyl-2,3-di(2-pyridyl)-quinoxaline, was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, U.S.A.). Stock solutions of DRV and IS were prepared by dissolving accurately weighed amounts of each reference compound in water/ethanol (50 : 50, v/v) to yield concentrations of 259 $\mu\text{g/ml}$ for DRV, and 588 $\mu\text{g/ml}$ for IS. These stock solutions were stored at -80°C and thawed until the day of analysis. The stock solution was diluted in drug-free plasma to yield concentrations of 0.13, 1.30, 2.59, 5.18 and 10.36 $\mu\text{g/ml}$ for DRV. All other chemicals and solvents were of analytical grade and have been described in our previous report.¹⁰

Chromatography The HPLC system consisted of a Waters pump (model 515), a 717 plus autosampler, and a 2487 dual λ absorbance detector coupled to the EmpowerTM software (Waters, Milford MA, U.S.A.). The analytical column was a Radial-Pak Nova-Pak C₁₈ column (4 μm , 8 \times 100 mm, Waters) protected by Guard-Pak Inserts Nova-Pak C₁₈ precolumn. Absorbance was measured at 205 nm and separations were performed at 30 $^\circ\text{C}$. The mobile phase consisted of 39% 50 mM phosphate buffer (pH 5.9), 22% methanol and 39% acetonitrile. The assay run time was 30 min with a flow rate of 1.8 ml/min. Drugs were quantified by measuring the peak areas under the chromatograms. The other equipment and methodology used in this study have been described in our previous report.¹⁰

Sample Preparation Two milliliters of ethyl acetate/*n*-hexane (50 : 50, v/v) containing the IS (3.55 $\mu\text{g/ml}$) and 1 ml of 0.5 M sodium carbonate were added to a 500 μl plasma sample. The mixture was vortexed and then centrifuged at 3500 $\times g$ for 5 min. The organic layer was separated and evaporated dry. The dried material was then dissolved in 100 μl of a mobile phase solution and centrifuged at 13000 $\times g$ for 5 min. Lastly, 25 μl of the upper solution was injected into the HPLC column.

The institutional review board of National Hospital Organization Nagoya Medical Center approved this study and plasma samples were prepared from patients after obtaining written informed consent.

Validation Intraday and interday precision values using this method were estimated by assaying control plasma containing five different concentrations of DRV five times on the same day and on three separate days to obtain the coefficient of variation (CV). Accuracy was determined as the percentage of the nominal concentration. Drug recovery from plasma was evaluated by analyzing triplicate samples with or without extraction.

* To whom correspondence should be addressed. e-mail: kanedat@nnh.hosp.go.jp

RESULTS

Chromatograms of Plasma Sample Figure 1A shows the chromatogram of a spiked plasma sample containing 5.18 $\mu\text{g/ml}$ of DRV. Under the described chromatographic conditions, retention times were 3.8 min for DRV and 5.0 min for IS. Because the chemical structure of DRV is closely related to amprenavir (Fig. 1A), DRV retention time was similar to that of amprenavir in our previous report.¹⁰ At a detection wavelength of 205 nm, the assay performed on drug-free human plasma succeeded to show no interfering peaks during the interested retention time intervals (Fig. 1B).

Figure 2A shows a chromatogram of a plasma sample from an HIV-1-infected patient treated with atazanavir, rito-

navir, abacavir and lamivudine. Figure 2B shows a chromatogram of a plasma sample from an HIV-1-infected patient treated with lopinavir, ritonavir, tenofovir and zidovudine. There are no interfering peaks affecting on the quantification of DRV in these chromatograms.

Validation: Linearity, Precision, Accuracy and Recovery Calibration curve of DRV appeared linear in the concentration range of 0.13 to 10.36 $\mu\text{g/ml}$ with a correlation of 1.000.

Precision, accuracy and recovery for DRV are shown in Table 1. The selected concentration of DRV covers the expected plasma concentrations found in patients. The CVs calculated for DRV in the inter- and intraday assays ranged from

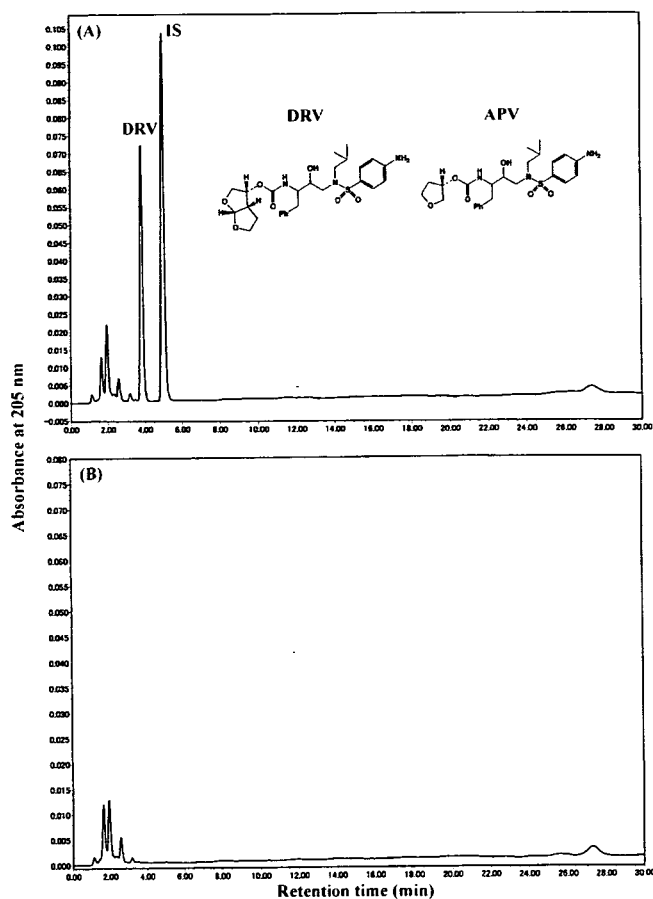


Fig. 1. Chromatograms Obtained after Extraction of (A) Spiked Plasma Sample Containing 5.18 $\mu\text{g/ml}$ of DRV and (B) Drug-Free Human Plasma Sample from a Healthy Volunteer

DRV, darunavir; APV, amprenavir; IS, internal standard.

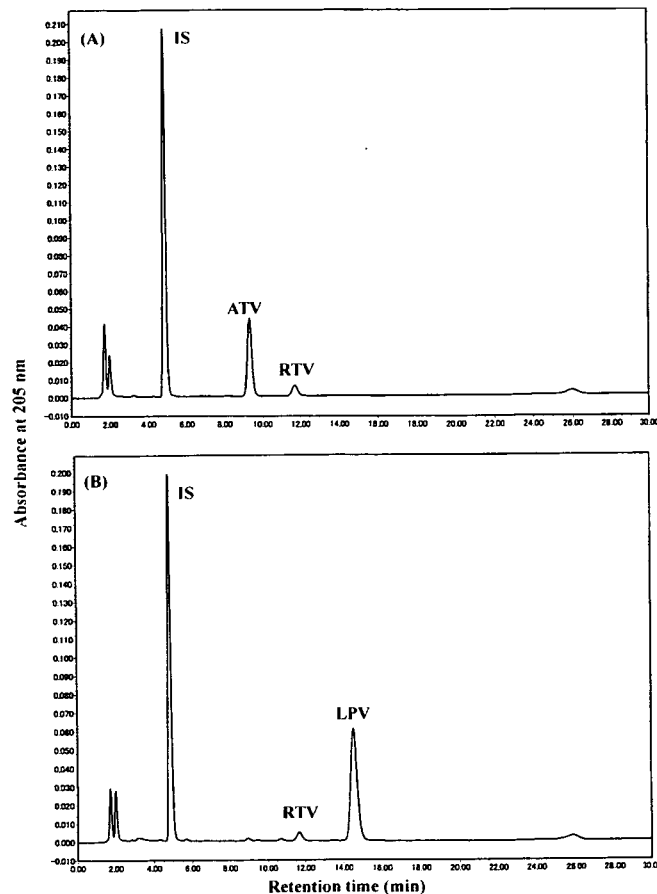


Fig. 2. Chromatograms Obtained after Extraction of a Plasma Sample from an HIV-1-Infected Patient (A) Treated with Atazanavir, Abacavir, Lamivudine and Ritonavir, and (B) Treated with Lopinavir, Ritonavir, Tenofovir and Zidovudine

IS, internal standard; ATV, atazanavir; RTV, ritonavir; LPV, lopinavir.

Table 1. Intraday and Interday Precision, Accuracy and Recovery for Darunavir

Expected ($\mu\text{g/ml}$)	Intraday ($n=5$)		Interday ($n=15$)		Accuracy (%)	Recovery (%)
	Measured ($\mu\text{g/ml}$)	CV (%)	Measured ($\mu\text{g/ml}$)	CV (%)		
0.13	0.13 \pm 0.01	6.7	0.14 \pm 0.01	4.3	105.6 \pm 4.6	90.7 \pm 3.6
1.30	1.36 \pm 0.08	6.2	1.35 \pm 0.07	4.9	103.5 \pm 5.0	88.0 \pm 4.6
2.59	2.67 \pm 0.12	4.5	2.62 \pm 0.08	3.1	101.1 \pm 3.2	95.8 \pm 2.2
5.18	5.18 \pm 0.10	2.0	5.22 \pm 0.28	5.4	100.8 \pm 5.5	88.9 \pm 7.0
10.36	10.41 \pm 0.13	1.3	10.43 \pm 0.15	1.4	100.7 \pm 1.4	100.9 \pm 2.1

CV, coefficient of variation.

1.3 to 6.7%, which were similar to or much lower than previously reported values.^{11,12} Accuracies ranged from 100.7 to 105.6%. Recoveries from plasma ranged from 88.0 to 100.9%. Mean extraction recovery of the IS was 80.4%.

DISCUSSION

In this study we demonstrated the determination of plasma DRV concentrations was possible using the HPLC method previously established in our laboratory for simultaneous detection of seven PIs. We validated the determination method using a concentration range between 0.13 and 10.36 $\mu\text{g/ml}$. The resulting HPLC method achieved reproducibility and accuracy for DRV detection.

Because the chemical structure of DRV is closely related to amprenavir, DRV retention time was similar to that of amprenavir in this study. DRV is expected to use in "salvage" therapy because this drug possesses low cross-resistance rates in patients who failed to respond to treatment with other PIs containing amprenavir. In another word, co-administration of DRV and amprenavir is not generally expected. Therefore, the similar retention times do not cause any problems in a practical use of the HPLC system.

The plasma DRV concentration was expected in the 2.8 to 5.8 $\mu\text{g/ml}$ range when DRV was administered at the recommended dose with low-dose ritonavir.¹¹ Our HPLC method successfully covered this region with both precision and accuracy.

In conclusion, our HPLC method can be routinely applied in the clinical setting and enables the study of DRV pharmacokinetics in conventional hospital laboratories.

Acknowledgements This study was supported in part by a Health Science Research Grant for Research on HIV/AIDS from the Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan

(H13-AIDS-001 and H16-AIDS-002 to TK). Janssen Pharmaceutical K.K. also provided funding for this study.

REFERENCES

- 1) Koh Y., Nakata H., Maeda K., Ogata H., Bilcer G., Devasamudram T., Kincaid J. F., Boross P., Wang Y. F., Tie Y., Volarath P., Gaddis L., Harrison R. W., Weber I. T., Ghosh A. K., Mitsuya H., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **47**, 3123—3129 (2003).
- 2) Meyer S. D., Azijn H., Surleraux D., Jochmans D., Tahri A., Pauwels R., Wigerinck P., de Bethune M. P., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **49**, 2314—2321 (2004).
- 3) Tie Y., Boross P. I., Wang Y. F., Gaddis L., Hussain A. K., Leshchenko S., Ghosh A. K., Louis J. M., Harrison R. W., Weber I. T., *J. Mol. Biol.*, **338**, 341—352 (2004).
- 4) King N. M., Prabu-Jeyabalan M., Nalivaika E. A., Wigerinck P., de Bethune M. P., Schiffer C. A., *J. Virol.*, **78**, 12012—12021 (2004).
- 5) Poveda E., Blanco F., Garcia-Gasco P., Alcolea A., Briz V., Soriano V., *AIDS*, **20**, 1558—1560 (2006).
- 6) Kovalevsky A. Y., Tie Y., Liu F., Boross P. I., Wang Y. F., Leshchenko S., Ghosh A. K., Harrison R. W., Weber I. T., *J. Med. Chem.*, **49**, 1379—1387 (2006).
- 7) Katlama C., Esposito R., Gatell J. M., Goffard J. C., Grinsztejn B., Pozniak A., Rockstroh J., Stoehr A., Vetter N., Yeni P., Parys W., Vangeneugden T., *AIDS*, **21**, 395—402 (2007).
- 8) Clotet B., Bellos N., Molina J. M., Cooper D., Goffard J. C., Lazzarin A., Wohrmann A., Katlama C., Wilkin T., Haubrich R., Cohen C., Farthing C., Jayaweera D., Markowitz M., Ruane P., Spinosa-Guzman S., Lefebvre E., *Lancet*, **369**, 1169—1178 (2007).
- 9) Bouche M. P., Michielsens L., Piot M., Timmerman P., Presented at the 17th International Mass Spectrometry Conference, Abstract Tup-042, Prague, Czech Republic, on August 27—September 1, 2006.
- 10) Takahashi M., Yoshida M., Oki T., Okumura N., Suzuki T., Kaneda T., *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 1286—1290 (2005).
- 11) Sekar V. J., Lefebvre E., De Paepe E., De Marez T., De Pauw M., Parys W., Hoetelmans R. M., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **51**, 958—961 (2007).
- 12) Sekar V. J., Kestens D., Spinosa-Guzman S., De Pauw M., De Paepe E., Vangeneugden T., Lefebvre E., Hoetelmans R. M., *J. Clin. Pharmacol.*, **47**, 479—484 (2007).

リアルタイム PCR 法による *Pneumocystis jirovecii* 迅速定量法の確立

小柏 均¹⁾ 永井 裕美²⁾ 近藤 恭子²⁾ 加堂 真由²⁾ 伊部 史朗²⁾
一三武二郎^{1,2)} 玉村 和規¹⁾ 間宮 均人^{2,3)} 金田 次弘²⁾

Diagnostic utility of real-time PCR assay of *Pneumocystis jirovecii*

Hitoshi OGASHIWA¹⁾ Hiromi NAGAI²⁾ Kyoko KONDO²⁾ Mayu KADO²⁾ Shiro IBE²⁾
Takejiro KAZUMI^{1,2)} Kazunori TAMAMURA¹⁾ Naoto MAMIYA^{2,3)} Tsuguhiro KANEDA²⁾

1) Department of Research Laboratory, National Hospital Organization Nagoya Medical Center (4-1-1, Sannomaru, Naka-ku, Nagoya, Aichi, 〒460-0001, Japan) 2) Clinical Research Center, National Hospital Organization Nagoya Medical Center
3) Department of Internal Medicine National Hospital Organization Nagoya Medical Center

Summary

Pneumocystis jirovecii formerly designated as *Pneumocystis carinii f. sp. Hominis* causes pneumonia in immunocompromised patients leading to fatal outcomes in some cases. Pneumocystis pneumonia (PCP) is well-known as AIDS defining disease constituting about percent of AIDS cases. Typical PCP cases are readily diagnosed by conventional staining methods such as Grocott's methenamine silver staining or immunofluorescence staining. However, less severe cases of PCP which harbor relatively small numbers of the pathogens escape detections by means of these microscopic enumerations of the microbes at times. Usefulness of qualitative PCR for detection of this atypical fungal pathogen is well documented. On the other hand, it is reported that immunocompromised patient with apparent absence of PCP or immunocompetent subjects with chronic pulmonary diseases are colonized with this pathogen compromising its specificity as diagnostic utility. Staining methods require expertise; therefore unskilled technicians tend to fail spotting the pathogens which is not the case with PCR. Various species of *Pneumocystis* organism are known with each species being host specific. Detection of *Pneumocystis jirovecii* by PCR has been shown valuable and real-time PCR assay for *Pneumocystis carinii f. sp. carinii* has been developed to facilitate animal model experiments. Using real-time PCR, we successfully performed qualitative measurement of DNA for *Pneumocystis jirovecii* in the respiratory samples providing a rapid and qualitative method without constraints of individual variation in order to detect of the human fungal pathogen based on a multiple major surface glycoprotein gene family.

キーワード

リアルタイム PCR 法 HIV 日和見感染 ニューモシスチス肺炎 経時的定量法

以前までニューモシスチス肺炎の病原体は *Pneumocystis carinii* (*P. carinii*) と呼ばれ、この病原体が引き起こす肺炎はカリニ肺炎と総称されていた。しかし、最近になって遺伝子解析によりヒト寄生型と、ヒト以外のサルやマウスなどの動物寄生型に区別されてきている。ヒトに寄生する菌名は *Pneumocystis jirovecii* (*P. jirovecii*)、ヒト以外の動物に寄生する菌名は *P. carinii* と改名された。また、分類も以前までは治療薬や生活史などから原虫類とされていたが、遺

伝子塩基配列や細胞壁の構造が真菌に近いことが明らかになり、最近になって真菌に再分類されたが、人工培養ができないなど未だに不明な点が多い菌種である¹⁻⁴⁾。

P. jirovecii は acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) における日和見感染の代表的な病原体で重篤なニューモシスチス肺炎を発症させる。実際、ニューモシスチス肺炎は AIDS 拠点病院である当院においても AIDS 死因の第 1 位であり、今後 AIDS

1) 国立病院機構名古屋医療センター研究検査科 (〒460-0001 愛知県名古屋市中区三の丸 4-1-1) 2) 同臨床研究センター 3) 同内科 (平成 19 年 8 月 27 日受付・平成 19 年 10 月 1 日受理)

患者の増加に伴い、臨床の現場においてその対策の重要性がさらに高まってくると予測される。従来のニューモシスチス肺炎の確定診断は患者呼吸器材料から病原体を証明することであり、グロコット染色、トルイジンブルー O 染色、ギムザ染色、蛍光抗体染色等の特殊染色にて顕微鏡法で肉眼的に病原体を検出することであった^{1,5,6)}。しかし、顕微鏡による病原体の証明は検体中に菌量が多い場合では有効だが、菌量が少ない材料では検出に限界がある。特にギムザ染色は特異的な染色法ではないため、かなり経験を積まないと容易に見落としてしまう可能性がある⁵⁾。また、われわれ検査技師は検査科内配置替えがあり担当技師の異動がある。熟練者が異動した後、次の担当者が習熟するまでには相当の時間を要するため、その期間、診断率が低下することが十分に考えられる。加えて、顕微鏡による病原体の証明は感度が低いため検査者によって結果が異なることがあり、診断性に欠ける検査法である。そこで、確実にニューモシスチス肺炎を診断できる検査法の開発が待たれている。

I 目 的

顕微鏡による病原体の検出法は感度が低いため、近年、感度の高い PCR 法が利用されてきている^{5,6)}。しかし、従来の PCR 法は定性的判定であり、HIV 感染患者ではニューモシスチス肺炎と考えるににくい症例においても陽性となる場合がある⁶⁾。それは従来の PCR 法ではその病原体量を測定できないため、*P. jirovecii* が活動状態(感染症の発症)であるか否かを明確にすることは困難であった。そこで、筆者らは *P. jirovecii* 量を定量化することにより臨床状態の鑑別化を試みてきた。本研究では major surface glycoprotein (MSG) 遺伝子を定量領域に用いたリアルタイム PCR 法による *P. jirovecii* 迅速定量法を確立し、迅速確定診断法を開発することを目的とした。また、重篤なニューモシスチス肺炎では標準的な 21 日間の治療では改善しない症例もあり、治療薬による副作用を考慮しつつ、いつまで治療をすべきかの指標が重要になる。このような場合には *P. jirovecii* MSG コピー数のモニターが治療上有効と考えられ、経時的に用いる定量リアルタイム PCR 診断法の臨床的有用性についても

報告する。

II 材料・方法および対象

1. 材料・方法

1) 材料からの DNA 抽出

ニューモシスチス肺炎が疑われた患者から得た呼吸器材料を喀痰溶解剤で約 30 分間室温にて攪拌し完全に溶解した。ここで、溶解不十分の場合は溶解時間を延長し、完全に粘性を溶解することが重要である⁵⁾。溶解後、沈査を phosphate buffered saline (PBS) で 2 回洗浄し、洗浄後、沈査を 1,670×g で 15 分間遠心し、沈査を回収した。その沈査 200 μ l から DNA 抽出を行った。筆者らは市販されている商業キット (QIAamp DNA Mini Kit : キアゲン) を用いた。抽出した DNA は総量 50 μ l になるように蒸留水で溶解した。

2) 標準物質の作成

ニューモシスチス肺炎確定患者(蛍光染色法強陽性)の気管支洗浄液から、DNA を抽出し、PCR により *P. jirovecii* MSG 遺伝子領域 (1024 bp) を増幅した。PCR 反応液の組成は 500 nM F-Pc-Std プライマー (フォワード, 5'-CTT CGA GGA AAG CTG AGT GA-3'), 500 nM R-Pc-Std プライマー (リバース, 5'-ACT CTT TCC TGT CCT ACC CT-3'), 1×LA Taq Buffer, 各 2.5 mM dNTP, 1 U LA Taq, 2.5 mM MgCl₂, 蒸留水, サンプル DNA 溶液で全量は 50 μ l に調整した。温度条件はまず 96°C で 1 分間加熱し、95°C 1 分 : 65°C 1 分 : 72°C 1 分を 42 サイクル行い、最終伸長反応を 72°C で 10 分間行った。その後、大腸菌用クローニングベクターである pUC 118 へ組み込んで環状 DNA を作製し、それを標準 DNA 物質 (スタンダード) とした。

3) リアルタイム PCR のプライマーおよびプローブ

プライマーは Huang らが *P. jirovecii* 特異性が高いと報告した MSG プライマー (JKK 14, 15, 17) を参考にし⁷⁻¹⁰⁾、新たに設計した。各プライマーは F-PC-oga プライマー (フォワード, 5'-TGG GTT ACA CAG ACA TCG ACA CA-3'), R-PC-oga プライマー (リバース, 5'-TGC ACC GCC TCG TTG AT-3') を用いた。プローブは汎用度が高く、標的配列の特異的検出に優れた TaqMan プローブを用いた。TaqMan

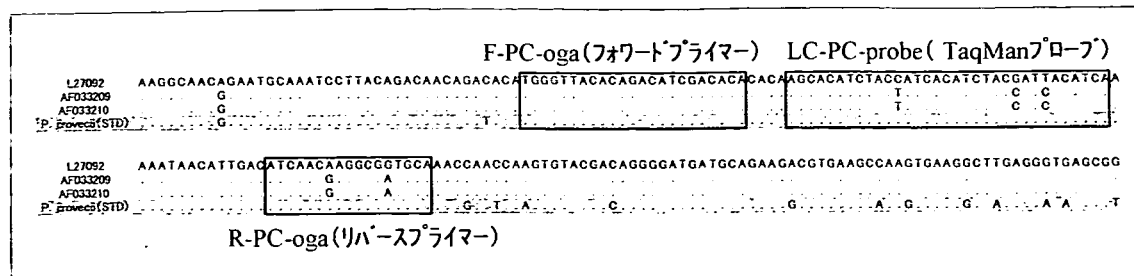


図1 プライマー・プローブ設定箇所

プライマーは、*P. jirovecii* 特異性が高いMSGプライマーを参考にし新たに設計した。マザーシーケンスとして多用されているL27092, AF033209, AF033210と比較し、変異が比較的に少ない箇所にTaqManプローブを設定した。

プローブ(LC-PC-probe: 5'-AGC ACA TCT ACC ATC ACA TCT ACG ATT ACA TCA-3')はマザーシーケンスとして多用されているL27092, AF033209, AF033210と比較し、変異が比較的に少ない箇所に独自に設定した(図1)。

4) リアルタイムPCR

リアルタイムPCRの基本的条件はわれわれが以前に報告した条件を用いた^{11,12)}。調整したスタンダードの希釈系列を作製し、定量の標準物質とした。反応液の組成は1×LightCycler-FastStart酵素液(ロシュ), 400nM TaqManプローブ, 500nM フォワードプライマー, 500nM リバースプライマー, 4mM MgCl₂, サンプルDNA溶液は2μlを使用し、全量は20μlに調整した。DNAの増幅・定量にはLightCycler(ロシュ)を用いた。温度条件は、まず95℃で10分間予備加温し、その後、95℃10秒間:60℃30

秒間を45サイクル行った。60℃の伸長反応時にTaqManプローブが分解されることにより発生する蛍光シグナルをリアルタイムに検出していき、最後に40℃で30秒間冷却した。全行程は約1時間であった(図2)。

2. 対象

肺炎が疑われたHIV感染患者14例、基礎疾患を持ち日和見感染肺炎が疑われた非HIV感染患者13例、および比較対照として健康者(当院職員)3例の計30例の各呼吸器材料(喀痰、気管支洗浄液、口腔うがい液、気管支内チューブ)からDNAを抽出し、リアルタイムPCR法により*P. jirovecii*のMSG遺伝子を増幅・定量した。同時に蛍光染色法での*P. jirovecii*の検出も行った(表1)。また、1例のHIV感染患者についてはニューモシスチス肺炎発症から終焉までの約2か月間経時的に喀痰を材料に用いてリアルタイムPCR法による定量測定を実施した。

III 結果

1. 検量線

図3に今回得られた蛍光強度曲線と検量線を示した。蛍光強度曲線のグラフは縦軸が蛍光強度、横軸がサイクル数を示している。コピー数の高い順に蛍光強度曲線が早く立ち上がり、10¹~10¹⁰コピーの範囲で良好な検量線を得ることができた。濃度既知の標準DNA物質の希釈系列を用いて作製した検量線(Crossing Point vs log濃度)を利用し、サンプルのCrossing Point(CP)からコピー数を算出する。ここでのCPとは各検体を用いて測定した際に一定の蛍光強度を発するまでにかかったPCRサイクル数である。

反応液組成	容量	終濃度
DNA溶液(サンプル)	2μl	
10pmol/μl フォワードプライマー	1μl	500nM
10pmol/μl リバースプライマー	1μl	500nM
4pmol/μl TaqMan プローブ	2μl	400nM
10×Buffer 酵素液	2μl	1×
25mM MgCl ₂	3.2μl	4mM
PCR グレード滅菌処理水	8.8μl	
計	20μl	

PCR 条件	45 サイクル
95℃: 10分	↓
95℃: 10秒	
60℃: 30秒	
40℃: 30秒	
計	55分

図2 リアルタイムPCRの反応液組成とPCR条件

表1 対象症例

症例	材料	HIV 感染	蛍光染色法陽性	背景
1	気管支洗淨液	●	○	HIV ニューモシチス肺炎疑い
2	気管支洗淨液	●	○	HIV ニューモシチス肺炎疑い
3	喀痰	●	○	HIV ニューモシチス肺炎疑い
4	喀痰	●	○	HIV ニューモシチス肺炎疑い
5	喀痰	●	○	HIV ニューモシチス肺炎疑いなし
6	喀痰	●	○	HIV ニューモシチス肺炎疑い
7	喀痰	●	○	HIV ニューモシチス肺炎疑いなし
8	喀痰	●	○	HIV ニューモシチス肺炎疑いなし
9	喀痰	●	○	HIV ニューモシチス肺炎疑いなし
10	喀痰	●	○	HIV ニューモシチス肺炎疑い
11	喀痰	●	○	HIV ニューモシチス肺炎疑いなし
12	喀痰	●	○	HIV ニューモシチス肺炎疑い
13	喀痰	●	○	HIV ニューモシチス肺炎疑い
14	喀痰	●	○	HIV ニューモシチス肺炎疑い
15	喀痰	●	○	糖尿病, 肺線維症, 間質性肺炎
16	気管支洗淨液	●	○	血管腫, ステロイド長期使用 間質性肺炎
17	気管支洗淨液	●	○	悪性リンパ腫, 間質性肺炎
18	気管支洗淨液	●	○	肺癌, 糖尿病
19	気管支洗淨液	●	○	全身性エリテマトーデス
20	気管支洗淨液	●	○	前立腺腫, 重症肺炎
21	喀痰	●	○	成人T細胞性白血病, 骨髓移植
22	気管支洗淨液	●	○	悪性リンパ腫
23	うがい液	●	○	全身性エリテマトーデス: 長期ステロイド投与
24	気管支内チューブ	●	○	急性リンパ性白血病
25	気管支洗淨液	●	○	強皮症, 血管炎: 長期ステロイド投与
26	気管支洗淨液	●	○	糖尿病, 間質性肺炎 (ニューモシチス肺炎除外のため)
27	喀痰	●	○	糖尿病, 間質性肺炎 (ニューモシチス肺炎除外のため)
28	喀痰	●	○	健常人(対照検体1)
29	喀痰	●	○	健常人(対照検体2)
30	喀痰	●	○	健常人(対照検体3)

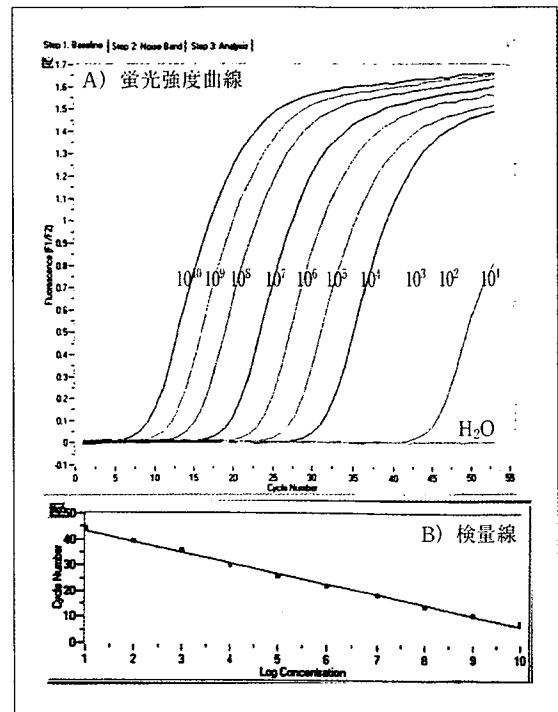


図3 蛍光強度曲線および検量線

A) 増幅中の蛍光強度曲線: 縦軸が蛍光強度, 横軸がサイクル数である。コピー数の高い順に蛍光強度が上昇し始め, 陰性コントロール(H₂O)では50サイクルを超えても蛍光強度は上昇しなかった。
 B) 検量線: 10¹~10¹⁰ コピーの範囲で良好な検量線が得られた。

表2 定量再現性

n=15	STD	STD	STD	STD	STD	STD	STD	STD
	100,000,000	10,000,000	1,000,000	100,000	10,000	1,000	100	10
1	98,130,000	9,034,000	960,300	95,370	10,330	961	92	19
2	107,100,000	9,493,000	958,000	104,200	10,720	1,039	113	13
3	97,420,000	9,442,000	1,017,000	94,160	10,110	891	95	15
4	99,970,000	9,275,000	927,500	96,690	9,669	967	103	18
5	100,500,000	9,269,000	1,018,000	103,800	9,715	928	108	16
6	106,700,000	10,420,000	1,145,000	97,280	9,858	936	109	15
7	108,700,000	8,871,000	1,069,000	101,900	10,160	945	111	13
8	111,700,000	9,544,000	977,200	98,990	9,455	1,006	110	9
9	105,400,000	10,020,000	1,036,000	109,100	10,180	962	105	8
10	111,900,000	9,397,000	1,031,000	102,700	9,499	943	94	11
11	125,800,000	9,911,000	1,010,000	100,000	9,025	938	89	11
12	115,550,000	10,070,000	1,036,000	98,090	11,900	1,054	95	19
13	124,500,000	9,468,000	934,600	92,300	9,055	932	116	12
14	130,300,000	9,522,000	965,800	97,130	8,932	959	103	12
15	107,900,000	8,795,000	1,045,000	101,500	8,942	919	107	15
Mean	110,104,667	9,502,067	1,008,693	99,547	9,837	959	103	14
SD	10161842	450542	57013	4400	791	44	8	3
CV(%)	9.2	4.7	5.6	4.4	8.0	4.6	7.8	21.4
Accueacy(%)	110	95	101	100	98	96	103	140

STD: 標準 DNA 物質, SD: 標準偏差, CV: 変動係数。

2. 再現性

スタンダードを用いて再現性・正確性の検討(N=15)を行った結果を表2に示した。スタンダード 10^8 MSG コピーでは Mean: 110.104.667 MSG コピー(回収率 110%), 10^7 MSG コピーでは Mean: 9.502.067 MSG コピー(95%), 10^6 MSG コピーでは Mean: 1.008.693 MSG コピー(101%), 10^5 MSG コピーでは Mean: 99.547 MSG コピー(100%), 10^4 MSG コピーでは Mean: 9.837 MSG コピー(98%), 10^3 MSG コピーでは: Mean 959 MSG コピー(96%), 10^2 MSG コピーでは Mean: 103 MSG コピー(103%), 10^1 MSG コピーでは Mean: 14 MSG コピー(140%)と良好な結果を得ることができ、十分な精度での定量が可能であった。変動係数(CV%)は 4.4~21.4% であり、低濃度(10^1 MSG コピー)にて高い傾向を認め、 10 コピーが検出限界と思われた。

3. 症例および対照検体

表3, 図4に示したように対象とした全30症例中, 蛍光染色法陽性が8例(HIV感染4例, 非HIV感染4例), リアルタイムPCR法陽性が14例(HIV感染7例, 非HIV感染7例), 蛍光染色法陰性でリアルタイムPCR法のみ陽性となった症例が6例(HIV感染3例, 非HIV感染3例)であった。今回定量測定した臨床的に日和見感染肺炎が疑われた27例においてHIV感染患者5例と非HIV感染患者7例でニューモシスチス肺炎の確定診断を得ることができた。蛍光染色法で陽性の症例はすべてニューモシスチス肺炎の確定診断という結果であったが, 病原体量が少ない傾向にある非HIV感染患者⁹⁾では蛍光染色法陰性でリアルタイムPCR法のみで検出可能であった症例があり, 低コピーでもリアルタイムPCR法で陽性であればほぼニューモシスチス肺炎と考えられる結果であった。染色法のみでの診断には限界があると思われた。

一方, HIV感染患者では臨床上, ニューモシスチス肺炎と考えるにくい症例においても, 従来の定性PCR法では陽性となる場合があり⁹⁾, 診断において鑑別が困難であったが, リアルタイムPCR法ではニューモシスチス肺炎を発症したHIV感染患者では病原体量が格段に多く高コピー(S1, 2, 3, 6, 14: $3.7 \times 10^4 \sim 1.8 \times 10^8$ コピー/ μg DNA)となり, リアルタイムPCR法陽性でも低コピー(S7, 8: $2.6 \times 10^3, 2.4 \times 10^3$

表3 測定結果

症例	蛍光染色法 陽性	リアルタイム PCR法	MSG コピー/ μg DNA	HIV 感染	ニューモシス チス肺炎診断
1	○	○	2.3×10^7	●	◎
2	○	○	7.6×10^7	●	◎
3	○	○	1.2×10^5	●	◎
4		nd		●	
5		nd		●	
6		○	3.7×10^4	●	◎
7		○	2.6×10^3	●	
8		○	2.4×10^3	●	
9		nd		●	
10		nd		●	
11		nd		●	
12		nd		●	
13		nd		●	
14	○	○	1.8×10^8	●	◎
15	○	○	1.0×10^4		◎
16		nd			
17		○	2.0×10^3		◎
18	○	○	8.3×10^3		◎
19		○	3.8×10^3		◎
20		nd			
21	○	○	3.0×10^4		◎
22		○	3.2×10^3		◎
23		nd			
24		nd			
25	○	○	2.3×10^4		◎
26		nd			
27		nd			
28		nd			
29		nd			
30		nd			

nd: 感度以下。

コピー/ μg DNA)は陰性と判定することができるようになった。対照として定量測定した健常者3例はともに感度以下であった(S28~30)。

4. 経時的定量測定

治療マーカーとしてリアルタイムPCR法が有効であった症例を図5に示した。7月28日, 1例のHIV感染患者が重症肺炎を発症, 臨床所見よりニューモシスチス肺炎が疑われ喀痰を採取後ただちに定量リアルタイムPCR(day1)を実施した。その結果 1.4×10^4 コピー/ μg DNA と高コピーであったためニューモシスチス肺炎と確定診断, 治療を開始した(day1)。投薬後, 肺炎症状は改善傾向に向かったが1か月後に肺炎症状が悪化した。細菌性肺炎を疑うもニューモシスチス肺炎の再発が否定できず, 再び喀痰を採取し定量リアルタイムPCRを実施した。その結果,

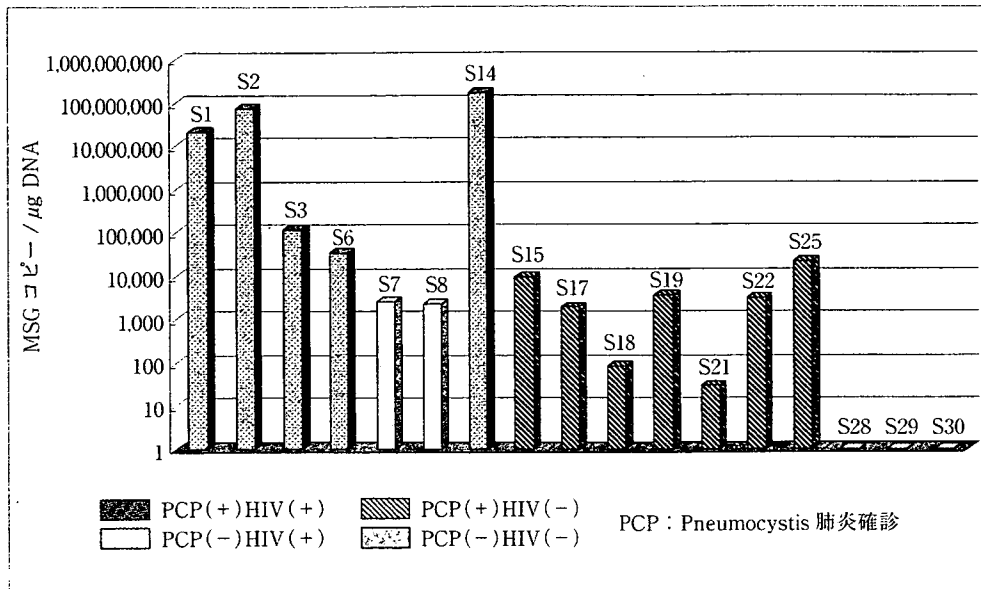


図4 リアルタイムPCR法陽性症例の比較

HIV 感染患者 5 例 (S1, 2, 3, 6, 14), 非 HIV 感染患者 7 例 (S15, 17, 18, 19, 21, 22, 25) でニューモシスチス肺炎の確定診断が得られた。HIV 感染患者においては、ニューモシスチス肺炎を発症した場合、 $3.7 \times 10^4 \sim 1.8 \times 10^8$ コピー/ $\mu\text{g DNA}$ と高値となり、一方、ニューモシスチス肺炎と考えるにくい症例 (S7, 8) では $2.6 \times 10^3 \sim 2.4 \times 10^4$ コピー/ $\mu\text{g DNA}$ と比較的低値を示した。従来の定性 PCR 法で陽性を示し診断が困難であった HIV 感染患者では、リアルタイム PCR 法で定量することにより陽性であっても 10^4 コピー/ $\mu\text{g DNA}$ 以下はニューモシスチス肺炎を否定できると思われた。非 HIV 感染患者の場合ニューモシスチス肺炎発症例では $3.0 \times 10^1 \sim 2.3 \times 10^4$ コピー/ $\mu\text{g DNA}$ と病原体量が少ない傾向にあり、リアルタイム PCR 法で陽性であれば、ニューモシスチス肺炎が発症したと考えられる結果であった。健常者 3 例 (S28, 29, 30) ではともに感度以下であった。

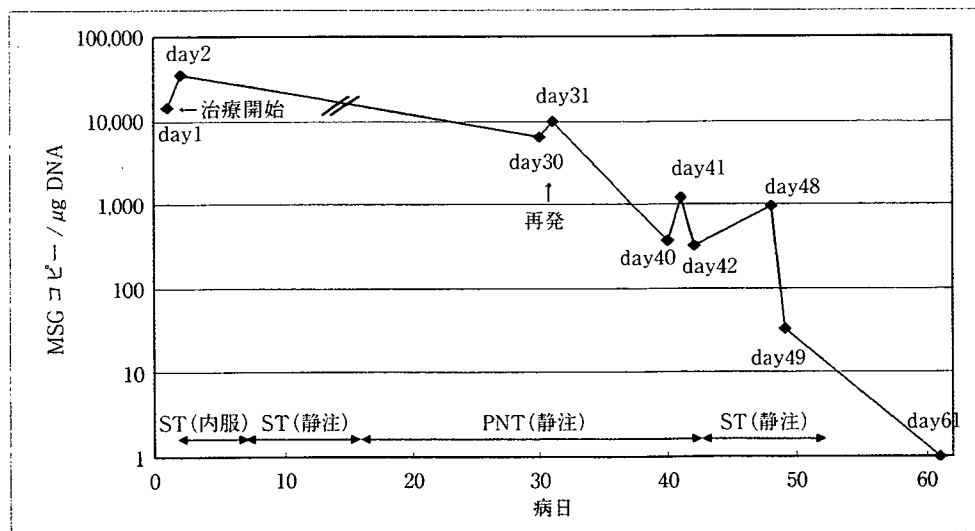


図5 経時的測定結果

1 例の HIV 感染患者におけるニューモシスチス肺炎発症から終焉までの喀痰中の *P. jirovecii* MSG コピー数を経時的に定量し、その変動を示した。Day 1 (14,000 コピー/ $\mu\text{g DNA}$) 後に治療を開始したが、day 2 ではコピー数の増加 (36,000 コピー/ $\mu\text{g DNA}$) を認めた。治療開始 1 か月後に再発 (day 30, 31: 6,300 コピー、9,800 コピー/ $\mu\text{g DNA}$) し、投薬の延長を行った。その後、肺炎症状の軽減とともにコピー数は減少傾向 (Day 40, 41, 42, 48, 49: 380, 1,200, 330, 960, 34 コピー/ $\mu\text{g DNA}$) を示し、day 61 では感度以下となった。

ST : Sulfamethoxazole/Trimethoprim, PNT : Pentamidine.

9.8×10³ コピー/μg DNA と高コピーであった(day 31)のでニューモシスチス肺炎の再発と診断し、投薬の延長を行った。その後、症状の改善とともに定量値も減少した。ニューモシスチス肺炎が終焉に向かうにつれて *P. jirovecii* 量の減少傾向が認められ、最終的には感度以下(day 61)となった。抗 *P. jirovecii* 薬投与後(発症後)、経時的に喀痰を採取し、リアルタイム PCR 法で定量することによって病原体量の消長を確認することが可能であった。

このことから、今回の症例のように重篤なニューモシスチス肺炎では標準的な 21 日間での治療では改善しない例もあり、臨床経過中に経時的に菌量を定量することによって再発、薬剤耐性菌発生の場合に薬剤の変更、投薬の延長、投与量の増加などの迅速対応が可能であると考えられた。

IV 考 察

本研究で確立した定量 PCR 法は DNA 抽出後、約 1 時間で結果が得られる迅速性に優れた検査法であり、*P. jirovecii* MSG コピー数はニューモシスチス肺炎の成立の有無を判断するための重要なパラメーターとして有用であると思われる。経時的に病原体量を定量測定することによって、再発した場合の迅速診断への有効性が期待でき、薬剤耐性化など治療効果の判定の重要な指標になるとと思われる。

HIV 感染症例ではニューモシスチス肺炎を発症していれば病原体量が多量に存在することが今回の研究で証明され、良質な喀痰からほぼ確実に診断できることが確認できた。肺胞内 *P. jirovecii* 菌量が少ない傾向にある非 HIV 感染症例⁶⁾では低コピーでもリアルタイム PCR 法で陽性であればほぼニューモシスチス肺炎と考えられたが、その閾値設定を今後検討していく必要がある。本研究により、HIV 感染の有無によって層別化したうえで測定値を解釈することによりかなり確実にニューモシスチス肺炎を診断することができることがわかった。また、今回は HIV 感染の有無に着目して研究を行ったが、各検体種別での結果の解釈とカットオフ値をどの値に設定するかは今後、国立病院機構政策医療共同研究施設を含め全国から検体を集めて症例数を増やすことにより解決できると筆者らは考えている。また、今回の研

究では経験しなかったが、蛍光染色法で陽性かつリアルタイム PCR 法で陰性(感度以下)となる場合が考えられ、そのような時はプライマーやプローブが検体に合っていない、PCR 阻害物質の存在、DNA 抽出時の操作ミス等も考慮する必要があると思われる。

以上、筆者らが確立したリアルタイム PCR 法による検査法がニューモシスチス肺炎において診断、治療に有効であることを述べてきた。今後、検体数を増やすことでさらに精度を増していくことが期待でき、診断を飛躍的に向上させていくことが可能かと思われる。

V 今後の課題

重症例では患者侵襲の大きい生検、気管支洗浄などの採取が懸念され低侵襲的な喀痰に頼らざるをえない。しかし、喀痰が採れない患者や良質な喀痰が採取できない場合もあり、今後、口腔洗浄液、誘導痰を材料に用いた診断の可能性を検討する必要がある¹³⁾。非侵襲的方法での診断の可能性とその限界を知ることは適正な診断手順を確立するのに不可欠であると思われる。

本論文の要旨は第 18 回日本エイズ学会において一般演題として発表した。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究に長期にわたりご協力頂きました大勢の医師および技師の皆様へ深謝します。なお、本研究は平成 16~18 年度国立病院機構政策医療共同臨床研究(主任研究者: 間宮均人)の助成を受けた。

文献

- 1) 後藤美江子: *Pneumocystis sp.* の直接塗抹標本を用いた迅速染色法検査, 臨床と微生物 2004; 31(増刊号): 554-558.
- 2) 吉田幸雄: ニューモシスチス カリニ, 図説人体寄生虫学 第 6 版, 72-82, 南山堂, 2002
- 3) James R. Stringer: *Pneumocystis carinii* What Is It Exactly? Clinical Microbiology reviews 1996; 9: 489-498.
- 4) 藤田絢一郎: 所属不明原虫類 ニューモシスチス, 臨床検査学講座 医動物学, 91-92, 医歯薬出版, 2003
- 5) 北田一博, 中村義一: *Pneumocystis carinii*, 臨床検査 1993; 37(2): 154-157.
- 6) 安岡 彰: 診断・治療と遺伝子検査 微生物の検出・同定…細菌, 真菌・*Pneumocystis carinii*, 臨床と微生物 1999; 26(増刊号): 614-617.
- 7) Sheng N. Huang, Steven H. Fischer: Development of a PCR

- Assay for Diagnosis of *Pneumocystis carinii* Pneumonia Based on Amplification of the Multicopy Major surface Glycoprotein Gene Family. *DIAGN MICROBIOL INFECT DIS* 1999 ; 35 : 27-32.
- 8) A. E Wakefield *et al.* : Detection of *Pneumocystis carinii* with DNA Amplification. *THE LANCET* 1990 ; 336 : 451-453.
 - 9) QIN MEL, Ross E. Turner : Characterization of Major Surface Glycoprotein Gene of Human *Pneumocystis carinii* and High-Level Expression of a Conserved Region. *Infection and Immunity* 1998 ; 66 : 4268-4273.
 - 10) Geetha Kutty *et al.* : Characterization of the expression site of the major surface glycoprotein of human-derive pneumocystis carinii. *Molecular Microbiology* 2001 ; 42 (1) : 183-193.
 - 11) Kaoru Wada *et al.* : Delayed HIV-1 Infection of CD4⁺ T Lymphocytes from Therapy-Naïve Patients Demonstrated by Quantification of HIV-1 DNA Copy Numbers. *Microbiol Immunol* 2004 ; 48 (10) : 767-772.
 - 12) Hiromi Nagai *et al.* : New estimation method for highly sensitive quantitation of human immunodeficiency virus type 1 DNA and its application. *Journal of Virological Methods* 2005 ; 124 : 157-165
 - 13) Steven Fischer, Vee J Gill : The Use of Oral Washes to Diagnose *Pneumocystis carinii* Pneumonia : A Blinded Prospective Study Using a Polymerase Chain Reaction-Based Detection System. *The Journal of Infection Diseases* 2001 ; 184 : 1485-1488.

第 20 回日本エイズ学会シンポジウム記録

感染女性の妊娠・出産・育児支援

Medical and Social Problems of Supporting HIV Infected Pregnant Women and Their Families

塚原 優己^{1),10)}, 相楽 裕子^{2),10)}, 喜多 恒和^{3),10)}, 嶋 貴子^{4),5),10)},矢永由里子^{6),10)}, 外川 正生^{7),10)}, 大金 美和^{8),10)}, 稲葉 憲之^{9),10)}Yuki TSUKAHARA^{1),10)}, Hiroko SAGARA^{2),10)}, Tsunekazu KITA^{3),10)}, Takako SHIMA^{4),5),10)},Yuriko YANAGA^{6),10)}, Masao TOGAWA^{7),10)}, Miwa OGANE^{8),10)}, Noriyuki INABA^{9),10)}¹⁾ 国立成育医療センター周産期診療部産科,²⁾ 横浜市立市民病院感染症部,³⁾ 帝京大学医学部産婦人科,⁴⁾ 神奈川県衛生研究所微生物部,⁵⁾ 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科政策科学分野,⁶⁾ 財団法人エイズ予防財団研修・研究部,⁷⁾ 大阪市立総合医療センター小児救急科,⁸⁾ 国立国際医療センターエイズ治療・研究開発センター,⁹⁾ 獨協医科大学産婦人科,¹⁰⁾ 平成 18 年度厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業

「周産期・小児・生殖医療における HIV 感染対策に関する集学的研究」班 (主任研究者: 稲葉憲之)

シンポジウムの趣旨

塚原優己, 相楽裕子

わが国では既に HIV 母子感染の予防対策が確立しており、全国各地の産婦人科施設で実施されている。また妊婦 HIV 検査も、妊娠初期ルチン検査の一環として高率 (約 95%) に行われるようになった。このように妊娠中の HIV 検査が広く一般に周知されている状況下、新たに妊婦スクリーニング検査における偽陽性と検査陽性妊婦への対応が問題となっている。また、母子感染予防対策では経膈分娩の妥当性も議論の対象となってきた。児は既に就学期から思春期にあり、感染児・非感染児ともにその育成に関しては様々な問題を抱えている。一方で感染者の社会生活が改善したなか、妊娠・出産を望む感染者も少なくはない。

自然感染率約 20~30% といわれる母子感染に関し、わが国では極めて有効な感染予防対策が既に講じられており、完遂すれば母子感染はほぼ回避可能といえよう。喜多恒和先生に、わが国における HIV 感染妊娠の現状につき、厚労省研究班の調査結果について、国外で検討され始めた経膈分娩の可能性と、わが国が帝王切開分娩を推奨することの妥当性を含めて概説をお願いした。

著者連絡先: 塚原優己 (〒157-8535 東京都世田谷区大蔵 2-10-1 国立成育医療センター 周産期診療部産科)

2007 年 5 月 25 日受付

母子感染予防対策を講じるためには妊娠中の HIV 感染の診断が必須であり、その意味からも妊娠中の HIV スクリーニング検査が求められる。妊婦 HIV スクリーニング検査実施率が上昇するとともに偽陽性の発生数も増加している。わが国における妊婦 HIV スクリーニング検査実施率の推移と、同検査での偽陽性発生状況およびその改善策について、嶋貴子先生から研究班の成果をもとに提示していただいた。

また、突然 HIV スクリーニング検査結果陽性と伝えられた妊娠女性の動揺は計り知れない。一般産科施設で行なうスクリーニング検査陽性の結果報告に際しての問題、確認検査で感染が判明した妊婦への告知に際しての問題について、その対策も含め矢永由里子先生に紹介していただいた。

母子感染を回避できた児の育成過程では、親の HIV 感染が重大問題である。様々の理由から母子感染を来たした感染児にとって、問題は更に重たくかつ複雑多岐に渡る。HIV 感染母体から出生した児の育成にかかわる問題を外川正生先生に整理していただいた。感染児では孤児の問題・社会の受け入れに関わる問題点、非感染児ではフォローアップデータの解析から示された問題点を明示していただいた。

感染者の生活の質が向上した現在、治療中の感染女性が妊娠する例も増加している。通常妊娠には性的接触が必要

であり、感染女性はパートナーへの感染回避とのジレンマに悩まされる。感染女性の妊娠・出産・育児に対する考え方と医療側の支援の問題点と対策について、大金美和先生から紹介していただいた。

1. HIV 感染妊娠と母子感染予防対策の現状

喜多恒和

われわれはわが国における HIV 感染妊娠の現状を把握するために、平成 10 年度より毎年診療所を除く約 1,600～1,800 の産婦人科を標榜する病院を対象に全国調査を実施し、平成 17 年度までに 380 例の HIV 感染妊娠の臨床的・ウイルス学的情報を解析した。さらに小児科全国調査の結果と照合することにより、わが国において報告された HIV 感染妊娠総数は 468 例であることがわかった。日本人感染妊娠の増加が認められるが、抗ウイルス療法と選択的帝王切開術 (ECS) により、母子感染率は 0.6% にまで抑制可能であった。

本邦において現在推奨されている HIV 母子感染予防対策は、①妊娠早期の HIV スクリーニング検査による感染の診断、② HAART による抗ウイルス療法、③陣痛発来前の ECS による分娩、④帝切時の AZT 点滴投与、⑤出生児への AZT シロップの予防投与および ⑥児への人工栄養である。上記①②については母体の健康を維持し、母子感染を予防する上で不可欠であり、⑥についても本邦の経済状況から十分可能である。しかし④および⑤の効果については、それぞれ単独の効果を証明する報告はみあたらない。HAART による血中ウイルス量の良好なコントロールが可能な現在、④の効果や必要性は低いと考えられる。また⑤については児の副作用を考慮すると省略したい項目である。ただ③については、2005 年の Cochrane Database では、抗ウイルス療法が行われていないか AZT 単独療法の妊婦に限っては ECS が母子感染予防に有効であるが、ウイルス量が低い妊婦ではその有用性は不明であるとしている。しかし 2005 年ヨーロッパの 1983 例もの大規模な前方視的コホート研究により、HAART によってウイルス量が測定感度以下となった 560 例においても、ECS は経膈分娩や緊急帝切と比べて母子感染予防に有用であったと報告されている。一方 2006 年のインドの報告では、AZT 単独療法の 222 例の母子感染率は ECS174 例で 1.1%、経膈分娩 48 例では 2.1% で差は無かったとしており、ランダム化やインフォームド・チョイスによる前方視的臨床試験が必要であろう。しかし帝切を行うことによる合併症を含めた医療事情、経済事情、少子化などを考慮すると、本邦において現時点では選択的帝王切開術を推奨する意義は十分存在すると考えられる。

2. スクリーニング検査偽陽性の現状と対策

嶋 貴子

現在、日本全国での年間分娩数は約 115 万件で、そのうち妊娠初期の HIV スクリーニング検査の実施率は 90% 以上と報告されており、妊婦健診における“HIV 検査”が健診の一項目として広く実施されてきている。しかし一方で、妊婦集団における HIV スクリーニング検査の偽陽性の問題や、現場における対応の問題が指摘されている。本シンポジウムでは、妊婦 HIV スクリーニング検査実施率の全国病院および診療所調査の結果 (厚労省分担研究「妊婦 HIV 検査実施率の全国調査と検査普及のための啓発に関する研究 (分担研究者: 国立病院機構仙台医療センター和田裕一)」) 班の調査結果) と、これまで実態が調査されていなかった妊婦集団における偽陽性の出現状況についてのアンケート調査結果と前方視的調査結果の報告および今後の課題等を提示した。

平成 17 年度の全国病院調査による妊婦 HIV スクリーニング検査実施率の全国平均は 94.7% となっており、地域別でも一番実施率の低い九州地域で 81.3% であり、実施率が高い関東・甲信越地方との差が縮まってきている。また平成 18 年度の全国病院・診療所調査速報においても実施率は 90.5% と、平成 15 年度の 80.8% から 9.7 ポイント増加しており、一般診療所においても HIV スクリーニング検査が普及・定着していることがわかった。

妊婦の HIV 検査結果に関しては、全国のエイズ拠点病院、一般産科施設に行ったアンケート調査の結果から、妊婦における HIV 陽性率は拠点病院で 0.01%、一般病院で 0.003%、偽陽性率は拠点病院で 0.1%、一般病院で 0.08% となり、陽性的中率はそれぞれ 10.3%、3.8% と低率であった。また、妊婦健診受診者について前方視的調査を実施したところ、調査集団の陽性率は 0.02%、スクリーニング検査の偽陽性率は 0.27% となり、陽性的中率は 7.7% であった。HIV スクリーニング検査の偽陽性率は PA 法や EIA 法が約 0.3% であるのに対し、妊婦集団の HIV 陽性率が 0.02% と低率であることから、妊婦スクリーニング検査の陽性例のほとんどが偽陽性によるものであることがわかった。

妊婦健診時の HIV スクリーニング検査の陽性結果を受診者に通知することは、被検者に非常に大きな心理的重圧を与えることとなる。検査の立場からは、スクリーニング検査において、偽陽性をできるだけ除外するシステムの構築を急ぐとともに、産科施設においては、HIV 検査施行時の受診者への説明・同意の充実、スクリーニング検査が陽性の場合、偽陽性である可能性についても十分認識して、検査結果や確認検査の必要性について説明を行う等、スク

リーニング検査陽性例への対応の整備が急務と思われた。

3. 妊婦 HIV 検査陽性への対応の問題点

矢永由里子

(1) 調査結果について

妊婦への HIV スクリーニング検査の普及が9割を越した現在、その検査体制の質が問われている。妊婦にとっての HIV 検査体験については、電話相談や医療従事者から妊婦の混乱と衝撃が語られるが、その報告は単発的で検査の全体像を把握する機会が無かった。今回母子感染の研究班において、HIV スクリーニングで陽性と出た妊婦を紹介されてきた医師や看護師を中心に、妊婦の検査経験について聞き取り調査を行い、その結果報告と検査体制の提言をシンポジウムで行った。調査からは、検査についての課題が一連の流れとして見えてきた。まず、①検査実施機関の課題として、(1)検査の説明不足(2)検査を実施する担当者の検査についての誤解・知識不足(スクリーニング検査の結果を最終結果と誤解する；HIV感染を「エイズ」と受け止める；・妊婦検査に偽陽性が多いことを知らない)

(3) HIV への偏見という点が判明した。②このような対応を受けた妊婦は、(1)心身へのストレスの加重(感染や胎児への不安感が極度に強まる)(2)夫婦関係へのマイナスの影響(夫へ不信感が高まる場合もある)(3)過去の性行為に対する自責感や罪悪感(4)両親や夫も巻き込んだのパンニック状態(5)特に外国人妊婦の場合、言葉による障害などで混乱が深刻化などの経験をしていた。③よって、このような妊婦を受け入れた被紹介医は、単に確認検査対応というよりも、(1)精神的に非常に不安定になった妊婦や家族への対応(2)妊婦検査についての再教育(「検査とは」を最初から説明)が求められる結果になり、妊婦のスクリーニング検査経験へのフォローも含めた検査対応となっており各医師の負担感も大きかった。

一方、確認検査で HIV 陽性が確定した妊婦は、出産に関する課題に直面する。母子感染を低率に抑えることが可能になった現在、「出産」が妊婦にとって極自然な選択になってきたが、その選択を決意するまでのプロセスは、一旦「産む」ことを決めた後には医療体制(助産師の支援も含めて)が整備されている状況と比較すれば、孤立した状況にあると言える。また、出産が整備されてきていると言っても、HIV 偏見が強い地方では妊婦が都市部まで定期健診から出産まで長期間に渡る受診を余儀なくされたケースもあり、妊娠・出産の支援体制も万全とは言い難い。

(2) 今後の対応について

スクリーニング陽性妊婦を受け入れた医療者からは、今後の対応として、検査実施機関に検査を十分に理解したうえで妊婦への検査説明を望む声が多かった。今後は時間

的な制限のある検査実施者の検査理解を促す資料や「忙しい対応の中でもこれだけは必ず妊婦に検査前に伝えて欲しい」という内容の情報提供が必要であろう。特に外国人妊婦に対しては、母国語で検査の基礎知識を提供する機会をどのように作っていくかが重要で、多言語の検査のちらしなどが求められる。一方、受け入れ機関では、妊婦や家族の動揺や混乱に対応できるスタッフの存在が求められており、医師と役割分担しながら妊婦のメンタル面の支援ができる体制作りも今後重要であろう。

(3) まとめ

本調査を通し、改めて妊婦検査体制については「誰のための検査か」という原点を確認することの重要性を痛感した。この原点を踏まえることで、今後の検査の具体的な改善策は自ずと明白になるであろう。また、妊婦検査を HIV 感染の有無を確認するだけではなく、性感染症を含めた予防の貴重な機会としても捉えることが可能ではないだろうか。今後、検査への幅広い対応が求められているように思える。

4. 感染妊婦から出生した児の成育に関わる問題点

外川正生

【感染妊婦から出生した児の現状】

平成17年度厚労科研「周産期・小児・生殖医療における HIV 感染対策に関する集学的研究」(稲葉班)分担研究「HIV 感染妊婦より出生した児の実態調査とその解析および HIV 感染妊婦とその出生児に関するデータベースの構築」班が、全国小児科施設への郵送アンケートによって、通算7年目になる HIV 感染妊婦から出生した児の実態調査を行った。回収率は一次アンケートが53.1%、二次アンケートが65.8%であり、22例の新規報告を得た。過去の報告と合わせ小児科調査による出生児の累計は270例となり、感染41例、非感染188例、未確定・不明41例であった。HIV 母子感染(MTCT)予防対策は1996年以降十分に機能し、母児への抗ウイルス薬療法(ART)、予定帝王切開分娩、断乳の全てを行った例では0.7%(1/140)とMTCTは殆ど「elimination」されていた。しかし、1例において妊娠前から母体感染事実が把握されていたにもかかわらず、MTCT 予防対策実施不十分から母子感染が成立した。

【非感染児の状況と問題点】

非感染の診断は、生後4-6カ月までに血清(漿)中 HIV の高感度 PCR 法によって実質上可能である。ART が児に及ぼす乳児期早期の問題として、貧血があり、ART の選択・投与期間が論議される一方、治療として輸血・エリスロポイエチン投与・鉄剤投与が試みられている。ART の関与が明らかではないが、今後とも発生頻度をモニターする必要があるものとして、口蓋裂・合指症などの奇形、精