

との関係について検討を行うことを目的とした。

### 1. 研究班のホームページ (HP) について

研究班のホームページ (図1) を開設し、国内でHIV感染症治療を行う医師を対象として血中濃度測定が容易に測定できるシステムを開発し、血中濃度の臨床応用を可能にすると共に、血中濃度データを広く収集することを目的とした。

### 2. 相互作用血中濃度検索システムについて

抗HIV薬の組み合わせは近年多岐に渡っているものの、薬剤の組み合わせによる相互作用情報や血中濃度に関する情報は少ない。本研究班では、臨床現場により迅速な情報提供を行うことを目的とし、抗HIV薬の相互作用情報を収集し、データベースを作成し提供してきたが、今年度は相互作用情報提供システムのスタンドアローン版の開発を目的に検討を行った。

### 3. ロピナビル/リトナビル配合剤の剤型変更に伴う血中濃度の変化に関する検討

ロピナビル/リトナビル配合剤 (LPV/r) は他のプロテアーゼ阻害薬に比べ、強力な抗ウイルス効果と高い認容性を持つPIとして、各ガイドラインにおいて初回治療に推奨される薬剤の1つである。2006年10月、添加剤等の変更による製剤的工夫により、ソフトカプセルから錠剤への剤型変更が行われた。LPV/rの1日投与量に変更はないが、服用数が1日6カプセルから4錠と減少、冷所での保管の必要がなくなった。剤型変更に伴う血中濃度の変化と副作用に関する比較・検討を目的に検討を行った。

### 4. 腎関連の通常検査データを使ったフマル酸テノホビルジソプロキシル (TDF)の血中濃度予測

TDF投与中で腎機能障害を持たない患者を対象に、TDF投与後の血中濃度と、TDF投与前後の血中クレアチニン値 (Cr)、血中尿素窒素 (BUN) を測

定し、TDF血中濃度と腎機能の指標となる検査値の関係について調査し、TDF血中濃度を日常診療で使用するGFRとBUNを用いて統計学的に予測することで、腎機能障害早期発見の指標となる数値について検討した。

### 5. HPLCによるダルナビル血中濃度測定法の開発

ダルナビル (DRV) はサルベージ療法における有効性が期待される新しいプロテアーゼ阻害薬である。海外ではDRVの血中濃度測定のためにLC-MS/MSを用いた方法が報告されているが、LC-MS/MSは国内での普及率が低く、専門的な技術操作を必要としている。本研究では、国内で一般的に普及しているHPLCを利用した血中濃度測定法の開発を目的とした。さらに、当該薬剤の開発企業で確立されたDRVの定量法を参考に、LC-MS/MSを利用したアッセイ法を確立しHPLC法との比較検討を行った。

## B. 研究方法

### 1. 研究班のホームページ (HP) について

研究班のホームページ (図1) を利用した血中濃度測定提供システムは次の通り。血中濃度測定を希望する医師は氏名、所属施設等をHPに入力しID、パスワードを取得する。測定希望薬剤名、本数等を入力し送信すると、(株)BMLより測定依頼伝票、採血管等が送付される。研究班事務局からは調査用紙等が送付される。医師は患者血液を採取後検体を(株)BMLに送る。同時に調査用紙を研究班事務局に郵送。結果は(株)BMLより医師・研究班事務局あて郵送される。ATVは(株)BML第一化学薬品に委託し測定を行った。

### 2. 相互作用血中濃度検索システムについて

相互作用データベースの「スタンドアローン版」はFileMaker Proを利用して開発を検討した。

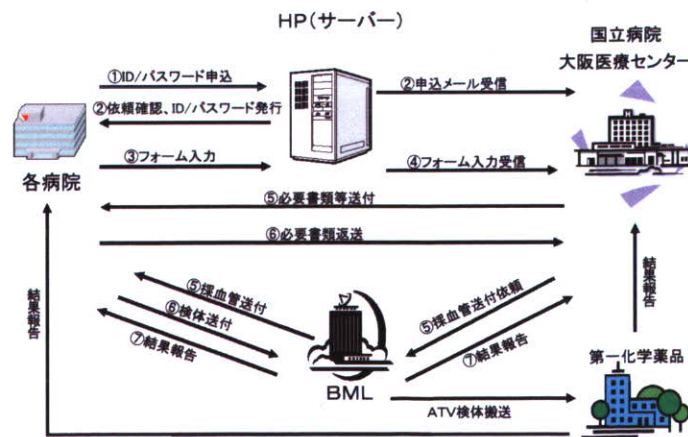


図1 依頼から結果報告までの流れ

### 3. ロピナビル/リトナビル配合剤の剤型変更に伴う血中濃度の変化に関する検討

国立病院機構大阪医療センター免疫感染症科を2004年3月から2006年9月に受診し、ソフトカプセル剤の投与を受け、血中濃度トラフ値の測定を行った56例及び2006年10月から2007年9月に錠剤の投与を受けた60例を対象とした(表1)。LPV/rの血中濃度に影響するNNRTI、PI併用例は除外した。カプセルから錠剤へ変更となり、トラフ値の測定が行われた同一患者21例についても比較検討を行った。また、ソフトカプセルから引き続き服薬を行っていた20例を対象に、剤型変更の印象について聞き取り調査を行った。

### 4. 腎関連の通常検査データを使ったフマル酸テノホビルジソプロキシル (TDF)の血中濃度予測

国立病院機構大阪医療センターに通院し、2005年1月～2006年3月までの期間にTDFの投与を受け、問診により血中濃度測定前1週間の服薬率が100%と見込まれた患者に対し、本研究の趣旨の説明を行い同意を得た51人を対象にTDF血中濃度を測定した。対象となった患者の平均年齢は37.3歳(21.0～72.4歳)、すべて男性であった。ヘパリンナトリウムを添加した試験管に、1回5mLの血液を採取、10℃以下3000回転10分遠心分離し、ポリプロピレン製のスクリーキャップ付きチューブに血漿を2 mL分注、分析開始まで-80℃で凍結保存した。測定はHPLC法を用い、(株)ビー・エム・エル総合研究所で実施した。51人のうち36人は抗HIV療法の初回治療患者であり、15人は治療変更患者であった。PI、NNRTIの投与状況は次の通り。LPV/r 7人、ATV+RTV 34人、ATV 1人、FPV 3人、6人はその他のPI、NNRTIの投薬を受けていた。TDFについては全ての患者が初回投薬であった。TDF血中濃度は、TDF血中濃度が定常状態に達したと思われる投与開始2週間以降、投与直前トラフ値を測定した。同時に血清クレアチニン値(Cr)と血中尿素窒素値(BUN)をTDF投与前と、TDF血中濃度を測定した

表1 患者背景

	ソフトカプセル群	錠剤群
症例数	56例	60例
(男:女)	(53:3)	(58:2)
年齢 (Mean±S.D.)	38.0 ± 10.8	38.2 ± 9.99
TVD	15例	TVD 28例
TDF+3TC	16例	TDF+3TC 13例
ベースドラッグ	Comb 16例	Comb 6例
EZC	4例	EZC 12例
d4T+3TC	3例	d4T+3TC 1例
AZT(400)+3TC	2例	

日に採血した結果について調査を行った。全調査期間を通じて、腎機能不全による治療中断患者はなかった。Crは酵素法でBUNはUV法で測定した。被験者のGFRは、調査したCrと年齢をMDRDの簡易式に代入して算出した。簡易式を日本人に適用するための係数には、日本人の人種係数として使用される0.881を使用した。治療前後のGFRを算出し、治療前後のGRFを、それぞれpre\_GFRとpost\_GFRとし、治療前後のBUNを、それぞれpre\_BUNとpost\_BUNとした。加えて、それぞれの治療前後の差をdif\_GFRとdif\_BUNとして算出した。統計処置を実施する前に、TDF濃度の分布を検証するために、対数正規の確率図を作成した。次に、いくつかの変数は、他の変数との強い相関があり、多重共線性の危険性を認めたために、回帰分析を以下の手順で行った。最初にそれぞれの変数とTDFとの間の単相関を求めた。BUNとCrのうちTDFとの相関が最も強いものをひとつずつ解析の変数の候補として選んだ。さらに、臨床試験での腎の安全性と腎障害の症例報告の乖離から来る急激な変化を予想し、説明変数とTDF濃度との非線形性関係の可能性を検証するために、折れ線回帰法を適応した。説明変数である、post\_GFRには75から5刻みに増加する変数を、dif\_BUNには25から1刻みでの減少する変数を用いて解析変数とした。腎機能の悪化を示す変曲点がこれにより検出されることとなった。重回帰分析は変数選択法で行われ、トレランスは0.01に、TDFには対数分布を仮定した。データは両側p<0.05をもって統計学的に有意とした。

### 5. HPLCによるダルナビル血中濃度測定法の開発

HPLC法とLC-MS/MS法の抽出方法は図2の通り。

## C. 研究結果

### 1. 研究班のホームページ (HP) について

研究班ホームページの運用状況は、平成19年10

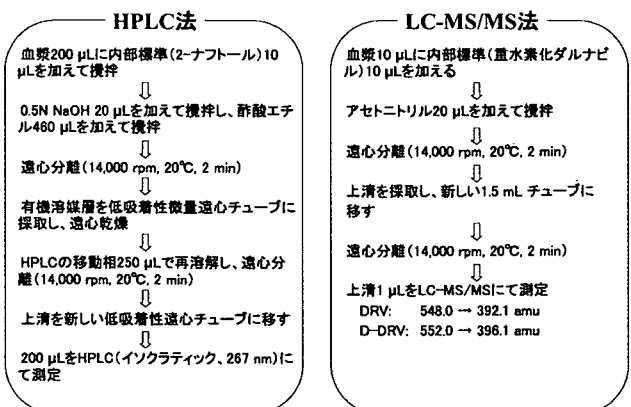


図2 抽出方法

月末現在、通算アクセス数は6746件と、昨年に比べ増加した。パスワード取得者は156名。平成19年4月～平成19年10月末までに研究班が(株)BML、(株)第一化学に委託し測定した検体の測定件数は482件、26施設からの利用があった。件数の内訳はATV:127、RTV:126、LPV:79、EFV:77、TDF:72、NFV:1であった(石川県立中央病院、愛媛大学、大久保病院、鹿児島大学、北里大学、北野病院、九州医療センター、国立国際医療センター、佐久総合病院、慈恵医大、市立旭川病院、仙台医療センター、千葉大学、東京医科大学、都立駒込、長崎医療センター、長崎大学、新潟大学、兵庫医大、広島市民病院、広島大学、松山赤十字病院、三重大学、横浜市大、琉球大学、大阪医療センター)。また、平成18年10月より受託を開始したCYP2B6遺伝子検査の今年度依頼件数は39件(7施設)であった。血中濃度測定件数の年度別推移と薬剤別血中濃度測定件数の年度別推移は図3、4の通り。

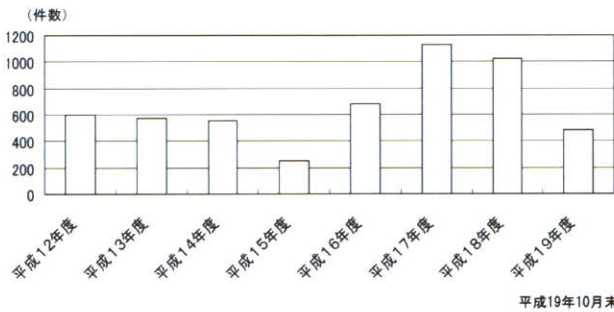


図3 血中濃度測定件数の推移(総数)

## 2. 相互作用血中濃度検索システムについて

平成18年7月、作成したスタンドアローン版(Windows版、Mac版)の公開を行った(図5)。

## 3. ロピナビル/リトナビル配合剤の剤型変更に伴う血中濃度の変化に関する検討

剤型の違いによるトラフ値比較は図6のとおり。ロピナビルのソフトカプセル群の平均トラフ値は $7.18 \pm 3.91$  ( $\mu\text{g/mL}$ )、錠剤群は $5.70 \pm 3.15$  ( $\mu\text{g/mL}$ )であり、錠剤群のトラフ値がソフトカプセル群に比較して有意に低値を示した。また、トラフ値のばらつきは錠剤群の方が小さい傾向が見られた。リトナビルのソフトカプセル群の平均トラフ値は $0.34 \pm 0.33$  ( $\mu\text{g/mL}$ )、錠剤群は $0.25 \pm 0.18$  ( $\mu\text{g/mL}$ )であり、有意ではないもののロピナビルと同様に錠剤群において低値を示す傾向が見られた。投与開始初期における副作用について検討を行った(表2)。ソフ

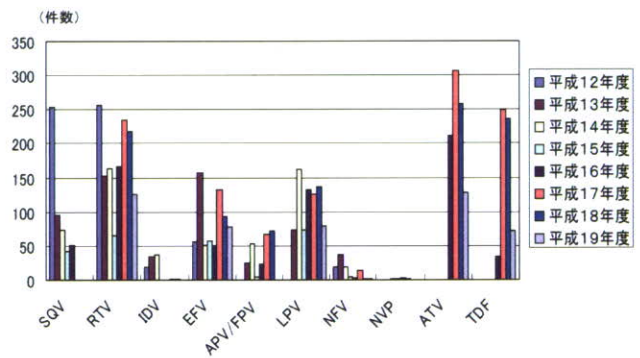


図4 血中濃度測定件数の推移(薬剤別)

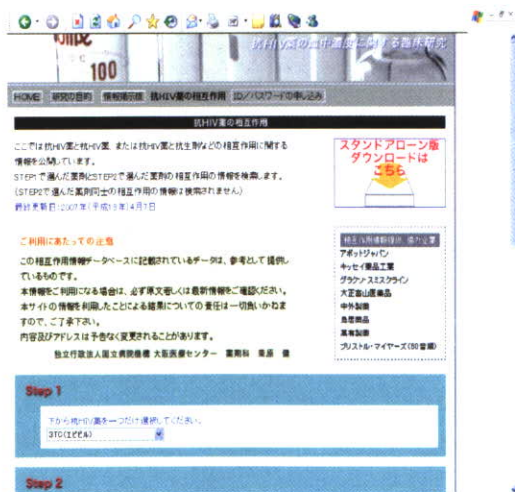


図5

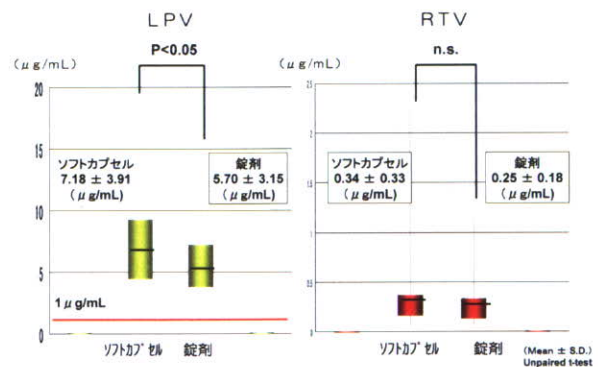


図6 剤型の違いによるトラフ値比較( $\mu\text{g/mL}$ )

表2 開始初期における自覚症状のある副作用比較

	ソフトカプセル群	錠剤群	P値
症例数	56	34	
発現件数	80	31	
下痢	28 (50.0%)	8 (23.5%)	0.012
嘔気	23 (41.1%)	10 (29.4%)	n.s.
食思不振	15 (26.8%)	7 (20.6%)	n.s.
倦怠感	12 (21.4%)	4 (11.8%)	n.s.
頭痛	2 (3.6%)	2 (5.9%)	n.s.

トカプセル群56例、錠剤群34例を対象とした。副作用の発現件数はソフトカプセル群80件、錠剤群31件であった。下痢の発現率はソフトカプセル群50.0%、錠剤群23.5%であり、錠剤群が有意に低値を示した。また、嘔気、食思不振についても有意ではないものの錠剤群において低値を示した。同一患者における剤型変更による血中濃度の比較を行った(図7)。変更前のソフトカプセル服薬時のトラフ値は $8.15 \pm 2.57$  ( $\mu\text{g/mL}$ )、錠剤変更後は $5.02 \pm 2.68$  ( $\mu\text{g/mL}$ )と減少し錠剤群のトラフ値がソフトカプセル群に比較して有意に低値を示した。ソフトカプセル服薬時のリトナビル血中濃度は $0.31 \pm 0.20$  ( $\mu\text{g/mL}$ )、錠剤に変更後は $0.22 \pm 0.13$  ( $\mu\text{g/mL}$ )に減少し、ロピナビルと同様、錠剤群のトラフ値がソ

フトカプセル群に比較して有意ではないものの低値を示した。カプセル製剤から引き続き服薬している同一患者における剤型変更前後の消化器症状の変化を表3に示す。カプセル服薬時に消化器症状が認められた症例は21例中4例であった。錠剤変更後1例に嘔気の軽快を認めたが、他の3例は改善が認められなかった。カプセル製剤から引き続き服薬している20例に対し剤型変更に関する印象を聞いたところ(図8)、19例が変更してよかったとの回答であった。錠剤に変更されてよかった理由としては、冷蔵庫で保存する必要がなくなったという意見が最も多く、次いで食事に関係なく服薬できるようになったとする結果であった。

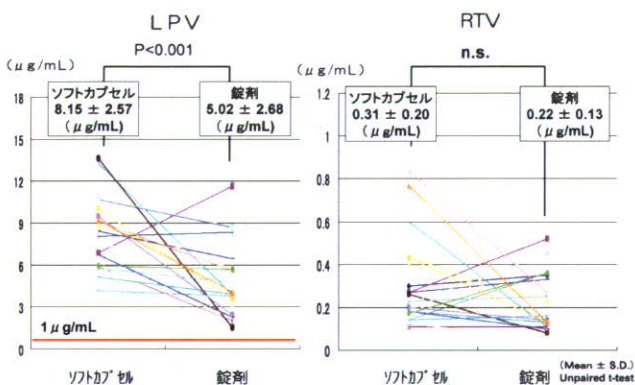


図7 同一患者における剤形の違いによる血中濃度比較 (n=21)

表3 同一患者における剤型変更前後の消化器症状の変化

	持続する強い 消化器症状あり (下痢、嘔気)	なし
ソフトカプセル 服薬時	4例	17例
錠剤変更後	3例	18例

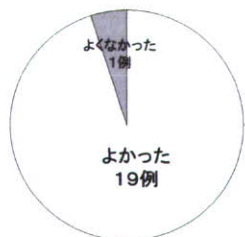
表4 TDF血中濃度(対数)と各変数との単相関

Variables	Average (SD)*	Max	Min	Correlation coefficient**	p-value
TDF log	1.9 (0.2)	2.4	1.6	—	
pre_GFR	114.1 (19.0)	161.6	75.3	-0.24	0.09
post_GFR	105.6 (18.3)	143.4	69.6	<b>-0.33</b>	0.02
dif_GFR	-8.4 (11.9)	36.2	-15.6	-0.13	0.35
pre_BUN	13.2 (4.0)	25.0	6.0	0.01	0.93
post_BUN	13.1 (3.3)	20.0	6.0	0.28	0.04
dif_BUN	0.0 (3.0)	7.0	-7.0	<b>0.30</b>	0.03

\*SD means standard deviation.

\*\*The "Correlation coefficient" means a single correlation coefficient to TDF log

Q、剤型変更の印象はいかがですか?  
(n=20)



**よかった理由**

- 冷蔵庫で保存する必要がなくなった 16例(80%)
- 食事に関係なく服薬できるようになった13例(65%)
- 服薬する個数が少なくなった 6例(30%)
- 副作用が少なくなった 1例(5%)
- 色がよくなった 1例(5%)

図8 剤型変更に関する調査結果

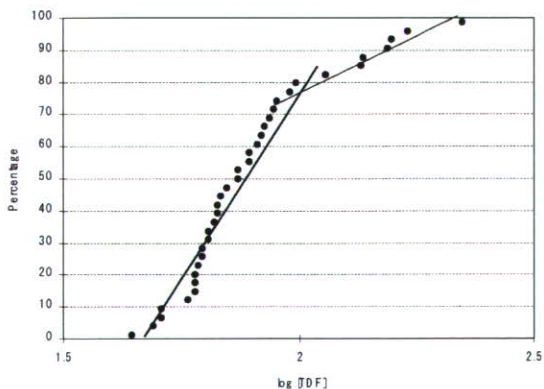


図9 TDF血中濃度(対数)

表5 折れ線重回帰分析結果

Variables	Coefficient	p-value	R <sup>2</sup>
Intercept	1.719	<.0001	
Min (post_GFR -125, 0)	-0.004	0.002	0.129
Max (dif_BUN +3, 0)	0.023	0.003	0.147

#### 4. 腎関連の通常検査データを使ったフマル酸テノホビルジソプロキシル (TDF)の血中濃度予測

対数正規確率グラフで描いたTDF血中濃度は [TDF]=2.0までは線形性を保つが、それ以降は直線から離れる (図9)。ここで排出の環境に変化が生じていることが分かった。折れ線回帰分析を行うための変数候補と、TDF血中濃度との単相関の統計量を表4に示す。変数の中では、post\_GFRとdif\_BUNがTDFとの間に最も強い相関が見られた。折れ線重回帰分析の結果 (表5)は、TDF血中濃度がGFR125 mL/min/1.73m<sup>2</sup> (P=0.002)のポイントと、治療前後のBUNの差が3より大きいと、有意 (P=0.003)な排泄環境の変化を認め相転移を行うことを示した。従って、GFRが125より大きく、とBUNの変化が-3以下であれば、TDF血中濃度は腎機能には影響せず一定の濃度を保つと思われた。しかしながら、

GFR125以下やBUNの変化が-3以上となると、TDF血中濃度は急激に上昇することを示した。図10に予測方程式によるTDF濃度を示す。さらに表6には、過去に腎障害が報告された症例報告のデータを用いて算出した予測TDF濃度を示す。ここに示した症例において計算されたTDF血中濃度は、BUNの変化量を0と仮定しても高値であった。計算により得られた結果はトラフ値であり、ピーク時にはさらに高濃度であったことが推測される。

#### 5. HPLCによるダルナビル血中濃度測定法の開発

HPLC法における選択性について検討した結果は図11の通り。DRVおよび2-ナフトールのピークは十分に分離し、血漿由来の夾雑ピークともに重なりはなかった。3名の個別ブランク血漿を用い、0.1 mg/mL DRV添加血漿を分析したところ良好な再現

表6 過去の症例報告から算出した予測TDF血中濃度 (μg/mL)

	Age	Sex	Initial Cr	Peak Cr	Initial GFR	Bottom GFR	β <sup>2</sup> -pGFR	TDF conc. 'at dBUN=0.	TDF conc. 'at dBUN=5.
Peyriere et al.									
Patient 1	48	Male	0.8	1.1	115	74	-0.22	110.3	127.2
Patient 2	56	Male	0.5	0.9	192	95	-0.28	95.3	110.0
Patient 3	49	Male	0.9	1.1	92	73	-0.21	111.1	128.1
Patient 4	35	Female	0.9	4.0	79	14	-0.04	165.2	190.5
Patient 5	42	Female	0.7	1.5	98	40	-0.12	138.8	160.1
Patient 6	41	Female	0.6	1.0	109	69	-0.20	113.8	131.3
Patient 7	57	Male	1.0	4.3	86	15	-0.04	163.5	188.7
Karras et al.									
Patient 1	55	-	0.9	7.8	92	8	-0.02	172.0	198.4
Patient 2	31	-	0.9	1.7	103	49	-0.14	130.3	150.3
Patient 3	42	-	1.2	2.7	74	28	-0.08	150.5	173.6
Rifkin et al.									
Patient 1	53	Male	1.1	1.8	74	42	-0.12	136.3	157.3
Patient 2	46	Male	1.2	2.1	69	36	-0.11	141.8	163.6
Patient 3	38	Male	1.1	1.7	80	48	-0.14	130.9	151.0
Patient 4	45	Male	1.3	2.6	63	29	-0.08	149.5	172.5
Patient 5	34	Male	1.0	1.6	91	53	-0.15	126.9	146.3
Verhelst et al.									
Verhelst et al.	45	Female	0.9	2.2	74	26	-0.08	152.4	175.8
Creput et al.									
Creput et al.	60	Male	0.8	4.0	103	17	-0.05	162.1	187.0
Gasper et al.									
Gasper et al.	39	Male	0.8	6.6	114	10	-0.03	169.4	195.4
James et al.									
James et al.	54	Male	1.2	3.0	67	23	-0.07	154.9	178.6

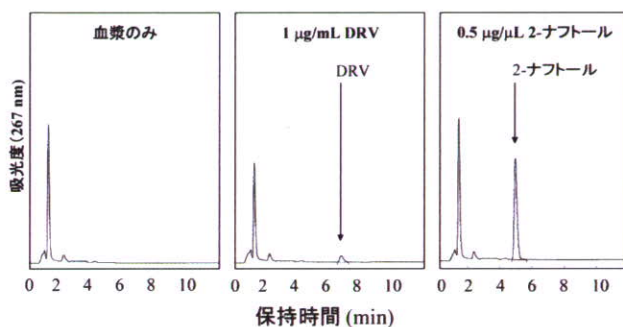


図11 結果 選択性 (HPLC法)

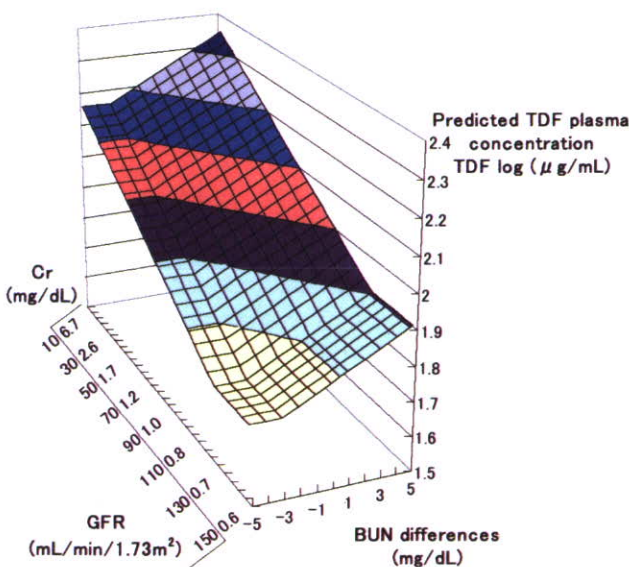


図10 予測方程式によるTDF濃度

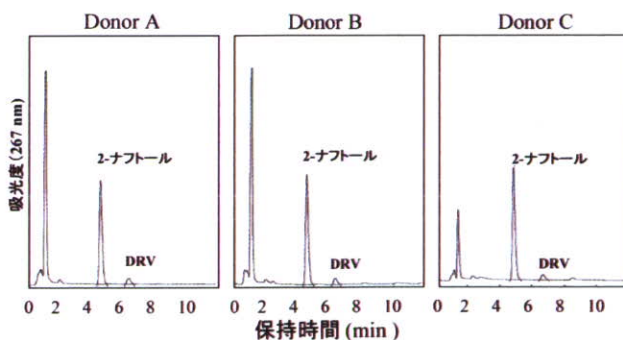


図12 個別血漿再現性 (HPLC法)

性を得た (図12)。HPLC法における直線性を検討したところ、 $y=263903x$ ,  $R^2=0.9998$ と良好な相関を得た (図13)。LC-MS/MS法における選択性について検討した結果は図14の通り。3名の個別ブランク血漿を用い、3.2 ng/mL DRV添加血漿を分析したところ良好な再現性を得た (図15)。LC-MS/MS法における直線性を検討したところ、 $y=0.9587x+0.3471$ ,  $R^2=0.9993$ と良好な相関を得た (図16)。LC-MS/MS法、HPLC法におけるDRV回収率は表7の通り。

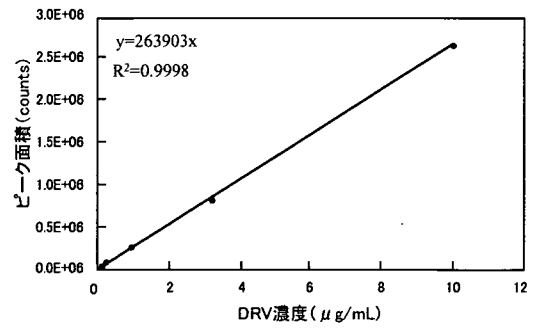


図13 直線性 (HPLC法)

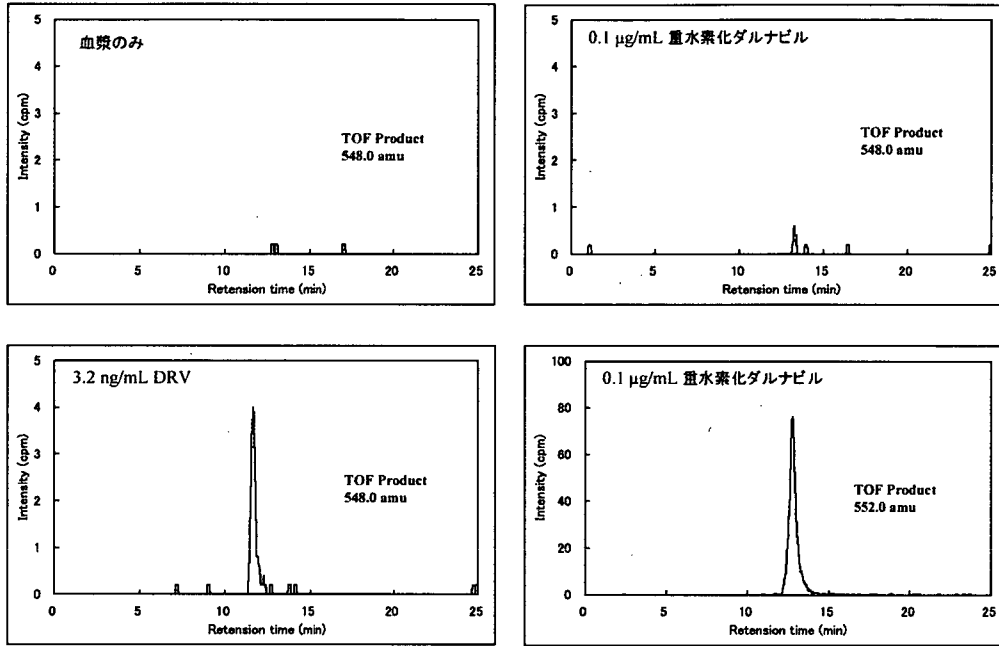


図14 個別血漿再現性 (LC-MS/MS法)

3名の個別ブランク血漿を用い、3.2 ng/mL DRV添加血漿を分析

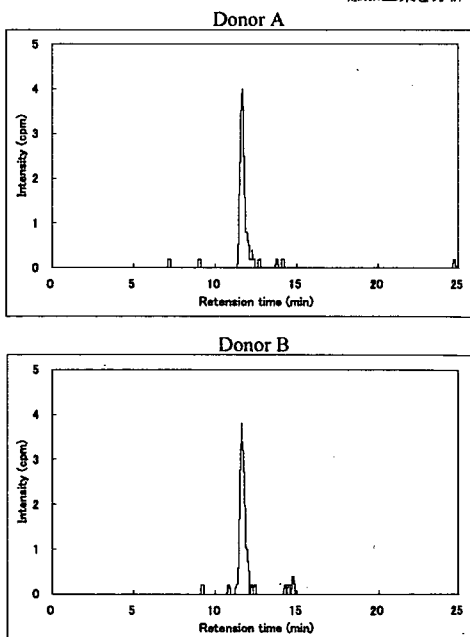


図15 個別血漿再現性 (LC-MS/MS法)

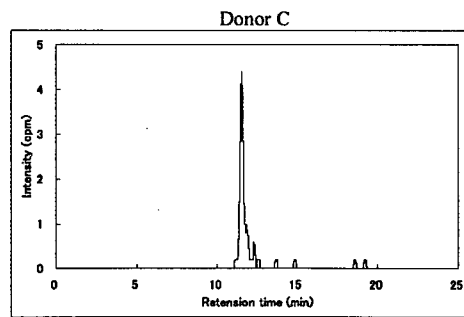


図16 直線性 (LC-MS/MS法)

LC-MS/MS法によるダルナビルの回収率はほぼ約100%であった。LC-MS/MS法では有機溶媒相への抽出操作がないためと考えられた。LC-MS/MS法、HPLC法における同時再現性、日差再現性は表8、9の通り。

**D. 考察**

**1. 研究班のホームページ (HP) について**

今年度、研究班のホームページを利用した血中濃度測定依頼は昨年と同様、TDF・ATVが中心であったことから、治療の中心となった薬剤の効果確認等に貢献できたものと思われた。HPへのアクセス数の増加率は高く、抗HIV薬の血中濃度測定に関する関心の高さが伺えた。新薬の治療効果を確実にするために、本研究班が提供する血中濃度測定システムは、有用な臨床データの提供を行ったものと思われた。臨床医が容易に血中濃度測定にアクセスできたことで、抗HIV療法の治療効果を高め、副作用の軽減に寄与したものと思われた。

**2. 相互作用血中濃度検索システムについて**

抗HIV薬相互作用データベースは、複雑化する抗HIV療法における適正な薬物療法への支援と、副作用を未然に防止する観点から貴重な情報を容易に提供できるシステムである。今回、要望の多かったスタンドアロン版を提供したことで、より一層、抗HIV療法の安全性を高めることが出来た。

**3. ロピナビル/リトナビル配合剤の剤型変更に伴う血中濃度の変化に関する検討**

錠剤群のトラフ値が有意に低値を示した要因として、第1相比較試験の単回投与の血中濃度推移からクリアランスに差異が生じている可能性があると考えられた。食事によるバイオアベイラビリティへの影響が少なくなったため、錠剤は食事の摂取は必須では無くなったが、第1相比較試験において服薬時の食事に含まれる脂肪等、食事の内容によるAUCの差異が認められていることから、今後、食事の内容によるトラフ値の変化についても検討を加える必要があると思われた。ソフトカプセル製剤の下痢の

原因の1つと思われる、ポリオキシリル35ヒマシ油及びオレイン酸が添加剤として用いられなくなったことにより、投与開始初期に発現する消化器症状の軽減を認めたことは、服薬の阻害因子の1つである副作用の軽減に寄与するものであると思われた。服用方法及び保存条件の変更による服薬の負担軽減は、長期服薬におけるアドヒアランスの維持に寄与するものと考えられた。

**4. 腎関連の通常検査データを使ったフマル酸テノホビルジソプロキシル (TDF) の血中濃度予測**

TDFはこれまで実施された臨床試験の中で、明らかな腎機能障害を示す報告はない。しかし、TDFの腎毒性を示唆する散在する症例報告が行われ、近位尿細管でのTDFによる障害について報告されていることから、腎毒性に対する意見には相違が見られる。この状況において、TDFが途中で排泄環境に変化を起こすこととBUN値との関係が強いことは新しい知見である。通常検査で測定されるBUNは、蛋白摂取、生活活動、GFRに影響され、微妙なBUN値の変化を評価することは難しいが、個人変動は治療前後のBUNの差を用いることによって最小限に抑えることが出来た。TDF血中濃度の変動は、薬剤の消化管からの吸収に影響される可能性を考慮しなければならない。TDFとPIとの血中濃度に影響する相互作用は、腎排泄のみでは説明がつかず、腸管での吸収の影響があると考えられている。加えて過去に、脂肪はTDF血中濃度を上昇させるとする報告もされている。このような知見の中で、我々が新しく見出したBUNとの関係はTDF濃度のばらつきを説明するための有力な情報を提供するものと考えられた。

表7 DRV回収率

	HPLC (n=15)		LC-MS/MS (n=15)	
	Average	CV	Average	CV
10ug/mL	80.7%	6.2%	99.0%	5.8%
1ug/mL	75.8%	5.9%	105.0%	2.8%
100ng/mL	78.0%	10.4%	109.0%	4.2%
3.2ng/mL	—	—	91.8%	16.5%

表8 同時再現性

	HPLC (n=5)			LC-MS/MS (n=5)			
	DRV conc. (μg/mL)			DRV conc. (μg/mL)			
	10	1	0.1	10	1	0.1	0.0032
Exp.1	9.6	0.93	0.092	9.2	1.07	0.104	0.0033
Exp.2	9.6	0.94	0.088	9.9	1.13	0.107	0.0028
Exp.3	10.0	0.90	0.093	10.7	1.09	0.107	0.0028
Exp.4	10.1	0.95	0.097	11.9	1.00	0.105	0.0035
Exp.5	10.1	0.90	0.095	11.2	1.06	0.108	0.0031
Average	9.9	0.92	0.093	10.6	1.07	0.106	0.0031
CV	2.4%	2.3%	3.5%	10.0%	4.4%	1.5%	12.9%
RE	-1.3%	-7.7%	-7.0%	5.9%	6.9%	6.2%	-4.3%

表9 日差再現性

	HPLC (n=15)			LC-MS/MS (n=5)			
	DRV conc. (μg/mL)			DRV conc. (μg/mL)			
	10	1	0.1	10	1	0.1	0.0032
1	9.9	0.94	0.097	9.4	1.01	0.098	0.0038
2	9.9	0.92	0.093	10.0	1.06	0.099	0.0028
3	9.7	0.95	0.091	10.6	1.07	0.106	0.0031
Average	9.8	0.94	0.094	10.0	1.05	0.101	0.0032
CV	1.2%	1.3%	3.4%	5.8%	2.8%	4.3%	16.9%
RE	-1.7%	-6.4%	-6.2%	0.2%	4.7%	1.0%	0.4%

TDF血中濃度高値での対数正規曲線の逸脱は、たとえ短時間であったとしてもTDFのpeak時の濃度が腎の排泄能力を超えている可能性を示唆した。表6に示されたTDFトラフ値が高値であったことを考慮すると、これらの症例で報告されたTDF peak値は、さらに高値であったと推測される。図8、表6を基に考えると、TDFの腎での排泄能力には限界があり、排泄環境には変化が生じていると考えることに合理性がある。臨床で実際に使用される状況では、TDF濃度はその限界を超えることは少ないものと思われるが、治療後だけでなく治療前のCrとBUNを含めて定期的に評価することは、臨床現場における副作用防止の観点において、薬剤の安全使用のための指標となった。このように通常の検査から得られる情報をTDF濃度に直接結びつける情報を臨床にフィードバックすることで、TDFを安全に使用し、副作用を未然に防ぐ一つの指標を臨床の場に提供することが出来た。

#### 5. HPLCによるダルナビル血中濃度測定法の開発

LC-MS/MS法はHPLC法に比し、その測定範囲は約30倍低濃度側に広がった。HPLC法、LC-MS/MS法の選択性および再現性はほぼ同程度と考えられた。LC-MS/MS法はHPLC法の評価や、HPLCで測定不可能な低濃度のDRVを定量研究に利用可能である。DRV血中濃度のトラフ値は $3.6 \pm 1.2$ mg/mL(外国人健常人)と報告されている。今回開発したHPLC法によって臨床検体の血中濃度測定は十分可能である。今回開発したHPLC法を用いることで、国内においてHPLCを用いたDRV血中濃度測定が可能となり、HIV診療の医療の質の向上に寄与できるもの思われた。

#### E. 結論

抗HIV薬の血中濃度を測定するシステムと、相互作用情報を含む薬剤情報の提供で、より適切で安全なHIV診療に貢献できたものと考え。今後さらに臨床データを蓄積し、日本人における薬物動態を検討し、臨床へのフィードバックを行うことが重要と考える。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

1. T. Makie, S. Nagai, A. Sasakawa, K. Kawamura, T. Kuwahara, Predicting Tenofovir Concentration on the Basis of Renal Factors Determined by Routine Tests, *American Journal of Therapeutics*, 14, 514-

518 (2007).

2. 矢倉裕輝、吉野宗宏、龍 香織、治川知子、織田幸子、矢嶋敬史郎、谷口智宏、笹川 淳、富成伸次郎、渡邊 大、牧江俊雄、山本善彦、上平朝子、白阪琢磨、榎原 健、ロピナビル/リトナビル合剤の剤型変更に伴う血中濃度及び副作用に関する比較検討、広島：第21回日本エイズ学会学術集会・総会；11月、2007. 抄録番号OS14-105
3. 田中理恵、加藤真吾、榎原 健、杉浦 互、HPLCによるダルナビルの血中濃度測定法の開発、広島：第21回日本エイズ学会学術集会・総会；11月、2007. 抄録番号OS14-103

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし





### 研究要旨

## 東海ブロックにおける薬剤耐性HIVの調査研究

分担研究者 **金田次弘**

国立病院機構名古屋医療センター 臨床研究センター 客員研究員

研究協力者 **服部純子<sup>1</sup>、藤崎誠一郎<sup>2</sup>、伊部史朗<sup>2</sup>、重見麗<sup>2</sup>、伊藤和代<sup>2</sup>、清水香代子<sup>2</sup>、藤崎彩恵子<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>財団法人エイズ予防財団、<sup>2</sup>国立病院機構名古屋医療センター

名古屋医療センターを受診した未治療HIV-1感染患者107例を対象に、薬剤耐性HIV-1の出現頻度、出現した薬剤耐性アミノ酸変異、HIV-1サブタイプを把握することを目的として研究を行なった。その結果、9症例(8.4%)から薬剤耐性HIV-1が検出され、T215リバータント変異(C/D/E/L/S)は12症例(11.2%)から検出された。プロテアーゼ領域ではM46I変異、逆転写酵素領域ではM41L、L210W、K103N、V108I、Y181C変異が検出された。サブタイプについては、Bが99症例、AEが5症例、F、C、ユニークサブタイプBが各1症例であった。

### A. 研究目的

HIV-1感染患者の治療に多剤併用療法(HAART)が用いられるようになり、HIV-1複製を著明に抑制できるようになった。しかし抗HIV-1薬の服用を続ける内に薬剤耐性株が出現してしまう症例もある。また、未治療の感染患者にも薬剤耐性株が検出される例が増加しており、治療開始時の薬剤選択の際に耐性検査の結果が必要になるケースも増えている。我々は、10年間にわたり薬剤耐性HIV-1の出現動向をサーベイしているが、本年度も未治療HIV-1感染患者を対象に薬剤耐性検査とサブタイプの決定を行い、東海地区に蔓延しているHIV-1と薬剤耐性変異の出現動向を把握することを目的とした研究を行なった。

### B. 研究方法

2007年1月から12月の間に名古屋医療センターを受診し、新規登録された未治療HIV-1感染患者を対象として以下の方法で薬剤耐性遺伝子検査を施行した。患者EDTA加血より分離した血漿140μlからウイルスRNAを抽出し、それを鋳型としてRT/nested-PCRによりプロテアーゼ領域(コドン1-99)と逆転写酵素領域(コドン1-240)を含む領域を増幅した。得られた増幅産物の塩基配列をダイレクトシーケエ

ンスで決定し、IAS-USAパネル2006年版を基に薬剤耐性変異の有無を判定した。

薬剤耐性遺伝子検査で得られたpol領域の塩基配列に加え、gag領域及びenv C2/V3領域の塩基配列についても決定し、この3領域についてMEGA v3.1を用いて系統樹解析を行いサブタイプの決定を行なった。

### (倫理面への配慮)

担当医から患者に研究の説明を行い、文書により同意が得られた患者についてのみ検査を行なった。

### C. 研究結果

2007年1月から12月の間に123症例の新規未治療患者が来院し、この内107症例についてサブタイプ決定と薬剤耐性検査を施行できた(87%)。これら107症例の国籍については、日本が92症例、ブラジルが10症例、ペルー、インドネシア、タイ、フィリピン、中国がそれぞれ1症例ずつであった(表1)。感染経路については、MSMが81症例と最も多く、次いで異性間の性的接触が19症例、バイセクシャルが5症例、不明が2症例であった(表1)。

まず、サブタイプについてであるが、サブタイプBが99症例、サブタイプAEが5症例、サブタイプF、

サブタイプC、ユニークサブタイプBが各1症例あった(表2)。

検出された薬剤耐性アミノ酸変異は、プロテアーゼ領域ではM46Iが4例、逆転写酵素領域ではM41Lが2例、K103N、V108I、Y181C、L210Wがそれぞれ1例ずつ検出された。薬剤耐性HIV-1としては、9例検出され、検出率は8.4%であった。また、T215リパータント変異は、12例から検出され、検出率は11.2%であった(表3)。尚、9例の薬剤耐性HIV-1

の内、8例はサブタイプB、1例はY181C変異を有したCRF01\_AEであった。

**D. 考察および結論**

当院における新規感染患者数は毎年増加傾向にあり、2007年は123症例と昨年より20症例以上も増加した。東海地区においては、日本国籍の患者ではサブタイプB HIV-1が97.8% (90/92症例) を占め、サブタイプAEは2症例に留まった。サブタイプAEは、

表1 2007年の新規未治療患者の国籍、感染経路の内訳

国籍		感染経路			
		同性間	異性間	ハゲイカシヤル	不明
日本	92	74	12	5	1
ブラジル	10	6	4	0	0
ペルー	1	1	0	0	0
インドネシア	1	0	1	0	0
タイ	1	0	1	0	0
フィリピン	1	0	1	0	0
中国	1	0	0	0	1
総計	107	81	19	5	2

表2 2007年の新規未治療患者から検出されたHIV-1のサブタイプ

国籍	サブタイプ				
	B	Uni B	AE	C	F
日本	89	1	2	0	0
ブラジル	9	0	0	0	1
ペルー	1	0	0	0	0
インドネシア	0	0	1	0	0
タイ	0	0	1	0	0
フィリピン	0	0	0	1	0
中国	0	0	1	0	0
総計	99	1	5	1	1

表3 2007年の新規未治療患者から検出された薬剤耐性アミノ酸変異

PI耐性アミノ酸変異		T215リパータント変異	
M46I	4	T215C	1
		T215D	3
		T215E	3
		T215E/D	1
		T215L	1
		T215S	3
NRTI耐性アミノ酸変異			
M41L	2		
L210W	1		
NNRTI耐性アミノ酸変異			
K103N	1		
V108I	1		
Y181C	1		

タイ、インドネシア、中国国籍の患者からも1症例ずつされ、サブタイプC（フィリピン）やF（ブラジル）HIV-1は外国籍の患者から検出された。これらのHIV-1は、海外から持ち込まれたものと思われる。

薬剤耐性検査の結果、107症例中9症例（8.4%）から薬剤耐性HIV-1が検出されたが、昨年の10.2%と比べると若干低い頻度であった。また、検出された薬剤耐性アミノ酸変異は、いずれも2006年以前に治療失敗症例、および未治療患者から検出されたものであった。また、T215リバータント変異が11.2%と高い頻度で検出された。この変異は容易に耐性を獲得する状態にあるので、今後とも慎重に追跡する必要があると思われる。

近い将来、インテグラーゼ阻害剤が使用されるようになるが、当然のことながら従来型とは異なる新規薬剤耐性HIV-1の出現が予測される。その準備体制の整備が必要であると思われる。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

- Ibe S, Hattori J, Fujisaki S, Shigemi U, Fujisaki S, Shimizu K, Nakamura K, Kazumi T, Yokomaku Y, Mamiya N, Hamaguchi M and Kaneda T, Trend of Drug-Resistant HIV-1 Emergence among Therapy-Naïve Patients in Nagoya, Japan: an 8-Year Surveillance from 1999 to 2006. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 24: 7-14, 2008
- Takahashi M, Kudaka Y, Okumura N, Hirano A, Banno K and Kaneda T, Pharmacokinetic parameters of lopinavir determined by moment analysis in Japanese HIV-1-infected patients. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 24: 114-115, 2008
- Takahashi M, Kudaka Y, Okumura N, Hirano A, Banno K and Kaneda T, The Validation of Plasma Darunavir Concentrations Determined by the HPLC Method for Protease Inhibitors. *Biol Pharm Bull*. 30: 1947-1949, 2007
- Takahashi M, Kudaka Y, Okumura N, Hirano A, Banno K. and Kaneda T, Determination of Plasma Tenofovir Concentrations using a Conventional LC-MS Method. *Biol Pharm Bull*. 30: 1784-1786, 2007
- 平野 淳、奥村直哉、久高祐一、寺畑奈美、高橋昌明、坂野和英、横幕能行、安岡 彰、間宮均人、濱口元洋、金田次弘：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ピルの効果および安全性についての評価。日本病院薬剤師会雑誌、43: 1397-1399, 2007
- Takahashi M, Ibe S, Kudaka Y, Okumura N, Hirano A, Suzuki T, Mamiya N, Hamaguchi M and Kaneda T, No observable correlation between central nervous system side effects and EFV plasma concentra-

tion in Japanese HIV-1 infected patients treated with EFV containing HAART. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 23: 983-987, 2007

- 藤崎誠一郎、藤崎彩恵子、伊部史朗、浅黄 司、伊藤俊広、吉田 繁、小池隆夫、大家正泰、渡邊香奈子、正兼亜季、上田幹夫、湯永博之、松田昌和、貞升健志、長島真美、岡田清美、近藤真規子、秦 真美、溝上泰司、森 治代、南留美、白阪琢磨、岡 慎一、杉浦 互、金田次弘：日本におけるHIV-1遺伝子型薬剤耐性検査のコントロールサーベイ。日本エイズ学会誌、9: 136-146, 2007
- Fujisaki S, Fujisaki S, Ibe S, Asagi T, Ito T, Yoshida S, Koike T, Oie M, Kondo M, Sadamasu K, Nagashima M, Gatanaga H, Matsuda M, Ueda M, Masakane A, Hata M, Mizogami Y, Mori H, Minami R, Okada K, Watanabe K, Shirasaka T, Oka S, Sugiura W and Kaneda T, Performance and Quality Assurance of Genotypic Drug-Resistance Testing for Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Japan. *Jpn J Infect Dis*. 60: 113-117, 2007
- Senda M, Ito A, Tsuchida A, Hagiwara T, Kaneda T, Nakamura Y, Kasama K, Kiso M, Yoshikawa K, Katagiri Y, Ono Y, Ogiso M, Urano T, Furukawa K, Oshima S, Furukawa K, Identification and expression of a sialyltransferase responsible for the synthesis of disialylgalactosylgaloboside in normal and malignant kidney cells: downregulation of ST6GalNAc VI in renal cancers. *Biochem J*, 402: 459-70, 2007
- 高橋昌明、藤崎誠一郎、伊部史朗、久高祐一、奥村直哉、平野 淳、鈴木達男、横幕能行、間宮均人、濱口元洋、金田次弘：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。新薬と臨床、56: 112-115, 2007
- Hattori J, Okumura N, Yamazaki Y, Uchiyama M, Hamaguchi M, Nishiyama Y and Kaneda T, Beneficial Effect of GB Virus C Co-Infection in Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Individuals. *Microbiol Immunol*. 51: 193-200, 2007

### 2. 学会発表

- Kaneda T, Fujisaki S, Shiino T, Shimizu K, Nakamura K, Hattori J, Fujisaki S, Ibe S, Shigemi U, Hamaguchi M, Mamiya N, Yokomaku Y, Identification of a unique form of subtype B HIV-1 in Nagoya, Japan 4th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention. July 22-25, 2007, Sydney, Australia
- Takahashi M, Ibe S, Kudaka Y, Okumura N, Hirano A, Suzuki T, Mamiya N, Hamaguchi M, Kaneda T, No observable correlation between central nervous system side effects and EFV plasma concentrations in Japanese HIV-1 infected patients treated with EFV containing HAART. 4<sup>th</sup> IAS Conference on

HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention. July 22-25, 2007, Sydney, Australia

3. 平野 敦、久高祐一、寺畑奈美、高橋昌明、坂野和英、横幕能行、安岡 彰、間宮均人、濱口元洋、金田次弘：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の効果および安全性についての評価。第61回国立病院総合医学会、2007年11月16日～17日、名古屋
4. 伊部史朗、服部純子、藤崎誠一郎、重見 麗、藤崎彩恵子、清水香代子、中村和代、一三武二郎、横幕能行、間宮均人、濱口元洋、金田次弘：名古屋地区の未治療HIV-1感染患者における薬剤耐性ウイルスの出現傾向。第61回国立病院総合医学会、2007年11月16日～17日、名古屋
5. 一三武二郎、服部純子、横幕能行、間宮均人、濱口元洋、玉村和規、金田次弘：HIV-1血中ウイルス量のモニタリング：検体数の推移と検査の現状。第61回国立病院総合医学会、2007年11月16日～17日、名古屋
6. 藤崎誠一郎、伊部史朗、服部純子、重見 麗、清水香代子、中村和代、藤崎彩恵子、横幕能行、間宮均人、濱口元洋、金田次弘：名古屋医療センターを受診した未治療患者におけるHIV-1サブタイプの変遷。第61回国立病院総合医学会、2007年11月16日～17日、名古屋
7. 小柏均、近藤恭子、加堂真由、伊部史朗、一三武二郎、玉村和規、間宮均人、金田次弘：MSG geneを用いたReal-time PCR法によるPneumocystis jirovecii迅速定量法の確立。第61回国立病院総合医学会、2007年11月16日～17日、名古屋
8. 久高祐一、高橋昌明、奥村直哉、平野 敦、寺畑奈美、坂野和英、横幕能行、間宮均人、濱口元洋、金田次弘：テノビル服用患者の血中濃度と腎障害との関係。第61回国立病院総合医学会、2007年11月16日～17日、名古屋
9. 奥村直哉、平野 敦、久高祐一、寺畑奈美、高橋昌明、横幕能行、間宮均人、安岡 彰、金田次弘、濱口元洋：名古屋医療センターにおけるFPVの使用経験【第2報】。第21回日本エイズ学会総会、2007年11月28日～30日、広島
10. 星野 伸、村松友佳子、関水匡大、井上孝実、瀧本哲也、美濃和茂、金田次弘、堀部敬三：母子感染予防目的で投与した26例におけるジドブジンシロップ内服による副作用。第21回日本エイズ学会総会、2007年11月28日～30日、広島
11. 高橋昌明、久高祐一、奥村直哉、平野 敦、坂野和英、金田次弘：HPLCを用いたプロテアーゼ阻害剤ダルナビルの血中濃度測定。第21回日本エイズ学会総会、2007年11月28日～30日、広島
12. 久高祐一、高橋昌明、奥村直哉、平野 敦、寺畑奈美、坂野和英、横幕能行、間宮均人、濱口元洋、金田次弘：日本人HIV-1感染患者におけるテノビル血中濃度の腎機能に及ぼす影響。第21回日本エイズ学会総会、2007年11月28日～30日、広島
13. 伊部史朗、岡田清美、近藤恭子、廣部雅美、魚住利樹、加堂真由、和山行正、金田次弘：プロウイルス活動指数測定法の一般検査化のための基礎検討。第21回日本エイズ学会総会、2007年11月28日～30日、広島
14. 金田次弘、藤崎誠一郎、藤崎彩恵子、伊部史朗、服部純子、清水香代子、中村和代、横幕能行、間宮均人、濱口元洋：ウイルス増殖を抑制しているにも拘らず、CD4陽性Tリンパ球の回復が不十分な症例の原因の探索。第21回日本エイズ学会総会、2007年11月28日～30日、広島
15. 服部純子、重見 麗、伊部史朗、奥村直哉、一三武二郎、横幕能行、間宮均人、濱口元洋、金田次弘：薬剤耐性HIV-1の出現と伝播。第21回日本エイズ学会総会、2007年11月28日～30日、広島
16. 伊部史朗、藤崎誠一郎、清水香代子、中村和代、服部純子、重見 麗、藤崎彩恵子、横幕能行、間宮均人、濱口元洋、金田次弘：名古屋地区の未治療患者に検出されたHIV-1の分子疫学解析。第21回日本エイズ学会総会、2007年11月28日～30日、広島
17. 藤崎誠一郎、椎野禎一郎、清水香代子、中村和代、伊部史朗、服部純子、重見 麗、藤崎彩恵子、横幕能行、間宮均人、濱口元洋、金田次弘：名古屋で検出されたユニークサブタイプB HIV-1。第21回日本エイズ学会総会、2007年11月28日～30日、広島
18. 大出裕高、横幕能行、松山 翔、伊部史朗、藤崎誠一郎、間宮均人、濱口元洋、金田次弘、星野忠次：コンピュータ・シミュレーションで薬剤耐性HIV-1に対する薬効の予測は可能か？。第21回日本エイズ学会総会、2007年11月28日～30日、広島
19. 杉浦 互、渦永博之、吉田 繁、千葉仁志、小池隆夫、伊藤俊広、原 孝、佐藤武幸、石ヶ坪良明、上田敦久、近藤真規子、今井光信、貞升健志、長島真美、福武勝幸、山元泰之、田中理恵、加藤信吾、宮崎菜穂子、岩本愛吉、藤野真之、仲宗根正、巽 正志、椎野禎一郎、岡慎一、林田庸総、服部純子、伊部史朗、藤崎誠一郎、金田次弘、濱口元洋、上田幹夫、正兼重季、大家正義、下条文武、田邊嘉也、渡辺香奈子、白阪琢磨、栗原 健、森 治代、小島洋子、中桐逸博、高田 昇、木村昭郎、南 留美、山元政弘、松下修三、健山正男、藤田次郎：2003-2006年の新規HIV-1感染者における薬剤耐性頻度の動向。第21回日本エイズ学会総会、2007年11月28日～30日、広島



## 研究要旨

# 血中、唾液、毛髪中の抗HIV薬定量

## LC-MSによる微量薬剤耐性変異ウイルスの定量

分担研究者 加藤 真吾 慶応義塾大学医学部 微生物学免疫学教室 助教

微量集団の薬剤耐性ウイルスを検出・定量することは、薬剤耐性HIV-1の伝播状況の把握や、サルベージ療法における治療薬の選択などにおいて重要な情報を提供する。そのために近年開発されたallele-specific real-time PCRは感度が高いがいくつかの重大な問題点があった。それを解決するために新しい方法を開発した。その概略は、ウイルスRNAのPCR増幅産物をI型制限酵素AclIで切断し、そのオリゴヌクレオチド断片をLC-MSによって解析するというものである。逆転写酵素のM184V、K103N、T215Yの変異、プロテアーゼのL90M変異について調べた結果、存在比率1/100までの微量変異を検出することが可能であった。この方法は微量薬剤耐性ウイルス集団の治療及び疫学における意味を研究する上で有用であると考えられる。

### A. 研究目的

抗HIV療法において薬剤耐性は重大な問題となっている。一般に薬剤耐性ウイルスの検査は耐性関連遺伝子の塩基配列を決定することによって行われているが、この方法では耐性ウイルスの比率が1/3以上でなければ検出することができない。このような微量集団の薬剤耐性ウイルスを検出・定量することは、薬剤耐性HIV-1の伝播状況の把握や、サルベージ療法における治療薬の選択などにおいて重要な情報を提供すると期待される。Hanceらは2001年にallele-specific real-time PCRを用いて耐性ウイルスを0.1%まで測定することに成功した。その後この技術は、未治療期、母子感染、STIなどの様々な時期における耐性ウイルスの量的変化を研究するために使用されてきた。しかし、この方法には、(i)3通りの点変異を同時に測定できない、(ii)連続した2塩基変異（例えばT215Y）を測定できないという問題があった。そこで、このような問題を解決するために、HIV-1の微量集団を定量する新しい方法を、PCRとクロマトグラフィー・マススペクトロメトリー(LC-MS)を組み合わせることによって開発した。

### B. 研究方法

以下のウイルス培養上清を対象とした。

野生株IIIBと慶応義塾大学病院通院患者一人から分離したK2901株を対象とした。IIIB株は耐性変異をもたず、K2901株は逆転写酵素遺伝子にM41L、K103N、M184V、T215Yの変異を、プロテアーゼ遺伝子にI54V、G73S、V82A、L90Mの変異をもっている。それぞれの株は塩基配列決定と今回の方法によって微量集団が検出されないことを確認した。

まず、それぞれの株の培養上清あるいはそれらの混合液をそれぞれp24抗原量で10 pg（約50,000コピーのウイルスを含む）ずつからQIAamp UltraSens® Virus Kitを用いて60 µLの溶出液でRNAを抽出した。このRNA抽出液6 µLに50 mM ランダムヘキサマーを2 µL、10 mM dNTPsを1 µL加え、65℃で5分変性させた後、氷上で1分以上静置した。この液にSuperScript IIIに添付されている5× first strand bufferを4 µL、0.1 M DTTを1 µL、200 U/ul SuperScript IIIを1 µL、40 U/µL RNasinを1 µL加え、室温で5分、50℃で10分、70℃で15分静置し、cDNAを作成した。1回目のPCRのプレミックスとしてPlatinum Taqに添付されている10× PCR Bufferを5 µL、50 mM MgCl<sub>2</sub>を3 µL、25 mM dNTPsを0.4 µL、20 µM pre\_Fプライ

マーを 0.5  $\mu$ L, 20  $\mu$ M pre\_R プライマーを 0.5  $\mu$ L、蒸留水を 36.4  $\mu$ L, Platinum Taq を 0.2  $\mu$ L 加えて調製した。プライマーの塩基配列は表 1 に示した。cDNA 液 4  $\mu$ L にプレミックスを 46  $\mu$ L 加え、94  $^{\circ}$ C で 2 分変性させ、続けて 94  $^{\circ}$ C で 5 秒、48  $^{\circ}$ C で 10 秒、72  $^{\circ}$ C で 15 秒のサイクルを 5 回繰り返す、さらに 94  $^{\circ}$ C で 5 秒、60  $^{\circ}$ C で 10 秒、72  $^{\circ}$ C で 15 秒のサイクルを 25 回繰り返す、最後に 72  $^{\circ}$ C で 1 分反応させた。2 回目の PCR のプレミックスとして 10  $\times$  PCR Buffer を 5  $\mu$ L, 50 mM MgCl<sub>2</sub> を 3  $\mu$ L, 25 mM dNTPs を 0.4  $\mu$ L, 20  $\mu$ M AcuI\_F プライマーを 5  $\mu$ L, 20  $\mu$ M AcuI\_R プライマーを 5  $\mu$ L、蒸留水を 30.4  $\mu$ L, Platinum Taq を 0.2  $\mu$ L 加えて調製した。このプレミックス 49  $\mu$ L に一回目の PCR 産物を 1  $\mu$ L 加え、94  $^{\circ}$ C で 2 分変性させた。続けて 94  $^{\circ}$ C で 5 秒、60  $^{\circ}$ C で 10 秒、72  $^{\circ}$ C で 15 秒のサイクルを 25 回繰り返す、最後に 72  $^{\circ}$ C で 1 分反応させた。2 回目の PCR 産物を QIAquick PCR Purification Kit を用いて精製し、蒸留水 50  $\mu$ L に溶出した。制限酵素反応のプレミックスとして制限酵素 AcuI に添付されている 10  $\times$  NE Buffer 2 を 10  $\mu$ L, 1.6 mM S-adenosyl methionine を 2.5  $\mu$ L、蒸留水を 65.5  $\mu$ L, AcuI を 2  $\mu$ L 加えて調製した。プレミックス 80  $\mu$ L に精製した PCR 産物を 20  $\mu$ L 加え、37  $^{\circ}$ C で 1 時間、65  $^{\circ}$ C で 20 分静置した。制限酵素処理した試料 90  $\mu$ L に 99.5% エタノールを 360  $\mu$ L 加え、14000 rpm で 2 分遠心した。上清を除き、

80% エタノールを 500  $\mu$ L 加え、12000 rpm で 2 分遠心した。再度上清を除き、真空乾燥機で 5 分乾燥させた。乾燥した DNA に 5 mM 酢酸アンモニウムを 10  $\mu$ L 加えて溶解し、14000 rpm で 2 分遠心し、上清を 9  $\mu$ L とってそのうちの 8  $\mu$ L を LC-MS で分析した。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究成果

本研究で開発した方法の概略は、ウイルス RNA から耐性変異部位だけを特異的プライマーによって RT-PCR で増幅し、これに 2 回目の PCR によって制限酵素 AcuI の認識部位を添加した後、AcuI によって耐性変異を含むオリゴヌクレオチド断片を切り出し、それを LC-MS によって定量するものである。図 1 に野生株 IIB と変異株 H2901 の 1:1 混合物の M184 部位における AcuI 断片の MS スペクトルを示す。野生型の場合はオリゴヌクレオチド ATGGA、M184V 変異株の場合はオリゴヌクレオチド GTGGA が AcuI によって切り出されるはずであるが、実際それぞれの [M-2H]<sup>2+</sup> に対応するピークが 804.0 amu と 812.0 amu に観察された。m/z が 0.5 amu の整数倍大きいところに見えるピークは自然界に存在する同位体によるものである。804.0 amu のピークは何らかの不純物と重なっていたので、この後の実験では 804.5 amu のピークを用いることにした。次に IIB 株と H2901 株の混合比を 1:1、9:1、99:1 と変えて 804.5 amu と 812.0 amu のクロマトグラムを観察した (図 2)。それぞれのピークの高さは最初のウイルスの混合比に従って変化していた。そこで、野生型と変異型のピークの面積比の混合比に対する関係を、逆転写酵素の M184V 変異だけでなく、逆転写酵素の

表 1 プライマーの塩基配列

	プライマー名	配列
PI L90	pre_p90a F	CCY GTC AAC ATA ATY GGA AGA AAT MYG
	pre_p90a R	TTT AAA GTG CAA CCA ATC TGA GTC A
	AcuI_p90a F	CCG CTG AAG AAT YGG AAG AAA YMT G
RT K103	pre_r103c F	CCG CTG AAG AGT GCA ACC AAT CTG AGY CA
	pre_r103c R	TCC CGC AGG GTT AAA AAA GAA
	AcuI_r103c F	CCG CTG AAG CAG GGT TAA AAA AGA A
RT M184	pre_r184a F	ACA AAA TCC AGA CAT AGT TAT CTA TCA ATA C
	pre_r184a R	AGT CAG ATC CTA CAT ACA AAT CAT CCA
	AcuI_r184a F	CCG CTG AAG AGT TAT CTA TCA ATA C
RT I215	pre_r215ab F	CCG CTG AAG GTT GAG GTG GGG ATT Y
	pre_r215ab R	TTT CTG ATG TTT TTT GTC YGG YGT R
	AcuI_r215ab F	CCG CTG AAG GTT GAG GTG GGG ATT Y

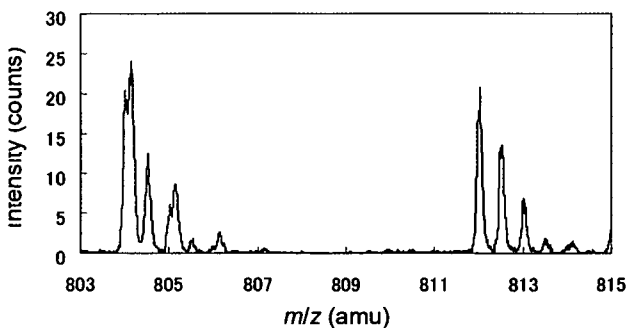


図 1 野生型と M184V 変異株の AcuI 断片の MS スペクトル

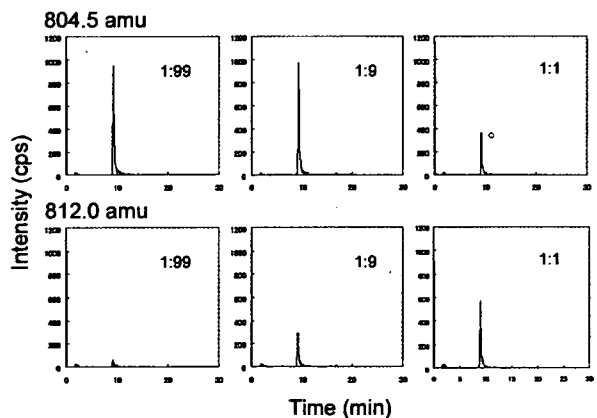


図 2 野生型と M184V 変異株の混合比を変えた時のそれぞれの特異的ピークの変化

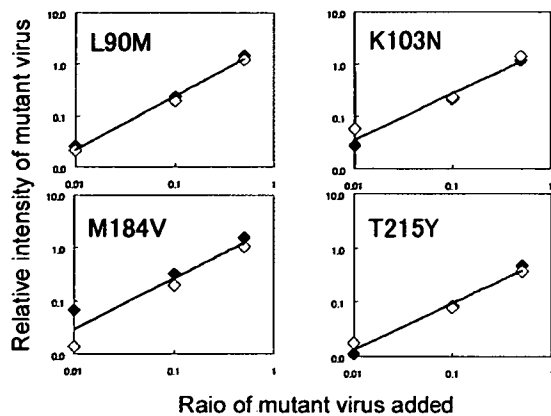


図3 変異株の混合比率に対する特異的ピーク面積の相対比

K103NとT215Yの変異、プロテアーゼのL90M変異についても調べた(図3)。両者の関係はこれら4つの変異すべてに対して良好な直線関係があった。これらの結果は、今回の方法によって存在比率が1/100までの微量変異を検出することが可能であることを示している。

#### D. 考察

PCR増幅産物をI型制限酵素で切断したオリゴヌクレオチド断片をLC-MSによって解析することによって微量薬剤耐性変異ウイルスを検出・定量するという全く新しい分析方法を開発した。この方法は従来のallele-specific real-time PCRが抱えていた問題を解決することができる。特にヌクレオチド系逆転写酵素阻害薬に対する重要な変異であるT215Yをもつウイルスの存在比を測定できるようにした意義は大きい。現在のところ定量可能な微量ウイルス集団の存在比は1/100であるが、酵素AclIの使用量を増やすことによって感度をさらに高めることが可能である。来年度はこの方法を臨床検体に応用し、微量ウイルス集団の治療及び疫学における意味を明らかにする研究を始める予定である。

#### E. 結論

薬剤耐性変異をもつ微量ウイルス集団を1/100の存在比まで検出・定量できる新しい分析方法を開発した。この方法は微量耐性ウイルスの治療及び疫学における意味を明らかにするために有用であると考えられる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- Hamatake, M., Nishizawa, M., Yamamoto, N., Kato, S., and Sugiura, W. (2007) A simple competitive RT-PCR assay for quantitation of HIV-1 subtype B and non-B RNA in plasma. *J. Virol. Methods* 142:113-117.
- Kinai, E., Hanabusa, H., and Kato, S. (2007) Prediction of the efficacy of antiviral therapy for hepatitis C virus infection by an ultrasensitive RTPCR assay. *J. Med. Virol.* 79:1113-1119.
- 今井光信、中瀬克己、小島弘敬、加藤真吾、杉浦 互、榎原 健、白坂琢磨。(2007) HIV検査および検査体制—技術の進歩と今後の課題。日本エイズ学会誌9(3), 202-208.
- Tanaka, R., Hanabusa, H., Kinai, E., Hasegawa, N., Negishi, M., and Kato, S., Intracellular efavirenz levels in peripheral blood mononuclear cells from HIV-infected individuals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52(2):782-785.
- Kuji, N., Yoshii, T., Hamatani, T., Hanabusa, H., Yoshimura, Y., and Kato, S. Buoyant density and sedimentation dynamics of HIV-1 in two density-gradient media for semen processing. *Fertil. Steril.* (in press)

##### 2. 学会発表

- 加藤真吾「教育講演：HIV定量法の進歩とその臨床応用（生殖医療への応用）」第21回日本エイズ学術集会（2007年11月28-30日、広島）
- 花房秀次、小島賢一、加藤真吾、兼子 智、高桑好一、久滋直昭、木内 英、加藤克則、吉村泰典、田中憲一「HIV感染者夫婦の生殖補助医療」第21回日本エイズ学術集会（2007年11月28-30日、広島）
- 木内 英、岩室紳也、近藤真規子、今井光信、花房秀次、加藤真吾「母子感染予防における出生児へのHAARTの安全性の検討」第21回日本エイズ学術集会（2007年11月28-30日、広島）
- 田中理恵、榎原 健、杉浦 互、加藤真吾「HPLCによるダルナビルの血中濃度測定法の開発」第21回日本エイズ学術集会（2007年11月28-30日、広島）
- 須藤弘二、宮崎裕美、佐野貴子、近藤真規子、加藤真吾、今井光信「HIV郵送検査に関する実態調査と検査精度の調査」第21回日本エイズ学術集会（2007年11月28-30日、広島）
- 加藤真吾、田中理恵、井土美由紀、林 邦彦、今井光信「HIV-1 RNA定量キットのコントロールサーベイ」第21回日本エイズ学術集会（2007年11月28-30日、広島）
- 加藤真吾、須藤弘二「LC-MSによる薬剤耐性変異の検出」第21回日本エイズ学術集会（2007年11月28-30日、広島）
- 上西理恵、正兼亜季、近藤真規子、長谷彩希、

廖華南、小野木成美、今井光信、上田幹夫、相良裕子、花房秀次、加藤真吾、草川 茂、武部豊「CRF01とサブタイプB からなる新規組換えウイルス株 (URF) の同定とその公衆衛生学上の意義」第21回日本エイズ学術集会 (2007年11月28-30日、広島)

9. 杉浦 互、湯永博之、吉田 繁、千葉仁志、小池隆夫、伊藤俊広、原 孝、佐藤武幸、石ヶ坪良明、上田敦久、近藤真規子、今井光信、貞升健志、長島真美、福武勝幸、山元泰之、田中理恵、加藤真吾、宮崎菜穂子、岩本愛吉、藤野真之、中曾根正、巽 正志、椎野禎一郎、岡慎一、林田庸総、服部純子、伊部史朗、藤崎誠一郎、金田次弘、浜口元洋、上田幹夫、正兼亜季、大家正義、下条文武、田邊嘉也、渡辺香奈子、白坂琢磨、栗原 健、森 治代、小島洋子、中桐逸博、高田 昇、木村昭郎、南 留美、山本政弘、松下修三、健山正男、藤田次郎「2003-2006年の新規HIV-1感染者における薬剤耐性頻度の動向」第21回日本エイズ学術集会 (2007年11月28-30日、広島)

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし





### 研究要旨

## 耐性遺伝子高感度定量法の開発及び潜在的薬剤耐性発掘調査

分担研究者 **仲宗根 正** 国立感染症研究所・エイズ研究センター・主任研究官

協力研究者 **杉浦 亙<sup>1</sup>、西澤 雅子<sup>1</sup>、Sarah Palmer<sup>2</sup>、Siriphan Saeng-aroon<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>国立感染症研究所・エイズ研究センター、<sup>2</sup>米国NCI、<sup>3</sup>タイ国NIH

未治療HIV感染者の中にも存在が予想されている薬剤耐性HIV、すなわち潜在的薬剤耐性HIV発掘調査を目的として、昨年度より耐性遺伝子超高感度定量法に着手した。今年度は以下の成果を得た。

- ①血漿中全ウイルス中に0.15%以上存在する耐性遺伝子（K103NまたはM184V）であれば検出される系がほぼ確立された。しかしながら、本系は耐性あるいは感受性コントロールの品質に依存する事を確認した。
- ②D67Nの耐性遺伝子検出系開発に着手し、数%以上存在するD67N耐性遺伝子を検出する Allele-Specific Primer ペアを選定した。

### A. 研究目的

薬剤耐性HIVの克服は、HIV感染者の長期生存のためには大きな課題のひとつである。これまで未治療HIV感染者体内には薬剤耐性HIVは存在しない、あるいは極めて少ないと考えられていた。しかし、近年の研究結果から予想より多い可能性が示唆されている。この、未治療HIV感染者体内のいわゆる潜在的薬剤耐性HIVを検出することができれば、効果的な薬剤選択を事前に予測することが可能となり、HIV感染者にとって福音となる。本研究では、未治療HIV感染者の中にも存在が予想されている薬剤耐性HIVの発掘、すなわち潜在的薬剤耐性HIV発掘調査を目的とする。そのため、まず耐性遺伝子超高感度定量法確立を目指した。

### B. 研究方法

協力研究者のPalmerらが2006年に開発した Allele-Specific RT-PCRを用いた耐性遺伝子超高感度定量法を応用した。まずPalmerらの系の再現性をK103N耐性遺伝子で確認した。次に、Palmerらの手法を参考にM184VとD67R耐性遺伝子に対する Allele-Specific Primer ペアをいくつかデザインし、最適なペアを選定した。それぞれの耐性遺伝子を持つ分子クローンを耐性コントロールとし、感受性遺伝子をもつ Wild

株分子クローンを感受性コントロールとした。

現時点では感染者検体を対象としていないため、研究倫理面で配慮すべき工程は本研究には含まれていない。

### C. 研究結果

1. 耐性遺伝子用Primerペアが感受性遺伝子を増幅してしまう割合、これはこの測定系の Background 値であるが、Palmerらの報告とほぼ同じく0.01%以下であった。
2. 血漿中全ウイルス中に0.15%以上存在する耐性遺伝子（K103NまたはM184V）であれば検出される系がほぼ確立されたが。
3. 感受性遺伝子用Primerペアに対応する部分にいくつかの不適合塩基配列があると、増幅効率が低下し、100%感受性クローンであっても、見掛け上。感受性遺伝子コピー数が少なく測定された。すなわち、本系は耐性あるいは感受性コントロールの品質に依存する事を確認した。
4. D67Nの耐性遺伝子検出系開発に着手し、数%以上存在するD67N耐性遺伝子を検出する Allele-Specific Primer ペアを選定できた。

## D. 考察

本系の検出限界は、Palmerらの報告では0.1%、今回の我々の検討では0.15%である。すなわちHIV感染者血漿中600～1,000個のウイルスの中の1個の薬剤耐性ウイルスを検出することが可能である。既存の方法でも数%の検出限界を誇るものはあるが、本法に比較して手間とコストがかかりすぎる。いずれにせよ、本法は既存の方法に比べて高感度で簡便と言えよう。

しかしながら本法にもデメリットが多数存在する。1)目的の耐性遺伝子毎にPrimerを作成しなければならない。2)目的の耐性遺伝子近傍に頻度の高い別の耐性遺伝子が存在する場合、Primerの設定は極めて困難である。3)たとえ良いPrimerが設定されたとしても、それは近傍の別の耐性遺伝子をも含めて設計されている。すなわち2×2以上の組み合わせ数となり、その数字分の測定が必要となる。この事は、場合によっては、既存の方法を凌駕する手間とコストがかかることを意味する。4)同様の理由で、目的の耐性遺伝子近傍に耐性には無関係の非特異的変異が存在する場合、本法は無効である。5)特に感度増強目的でPrimerの3' endにあえてこしらえるミスマッチ配列が、対象のHIV遺伝子にも高頻度で存在する場合は、間違った評価につながる。6)0.1～1%の検出を目指す場合、100～1,000個以上のウイルスを感染者から提供していただく必要がある。すなわち、血漿ウイルス量が数百コピー数/mlで推移している感染者は、そもそも対象にしづらい。

これらのデメリットの中には致命的なものもあるが、その解決策もある。調査対象集団の遺伝子配列を事前にスクリーニングする方法である。一般的なダイレクトシーケンスでメジャーな遺伝子配列を明らかにし、目的の遺伝子近傍の配列が本法のPrimerとほぼ一致する症例を選択すれば、前記の問題はクリアできる。その分、症例数は少なくなるという新たなデメリットも生じるが、得られる結果の精度については充分評価に耐えるものと考えられる。

次年度は、本年度の以上の成果・考察をもとに、実際に潜在的薬剤耐性HIV発掘調査を始めたい。

## E. 結論

- ①血漿中全ウイルス中に0.15%以上存在する耐性遺伝子 (K103NまたはM184V) であれば検出される系がほぼ確立された。しかしながら、本系は耐性あるいは感受性コントロールの品質に依存する事を確認した。
- ②D67Nの耐性遺伝子検出系開発に着手し、数%以上存在するD67N耐性遺伝子を検出するAllele-

Specific Primerペアを選定した。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

初年度につき無し。

### 2. 学会発表

1. 仲宗根正、兼清 優、吉野直人、網康 至、山本直樹：Cell-Associated Virusを用いたHIV/AIDSサル動物モデル。第21回日本エイズ学会 (11/28-30, 2007, 広島)
2. 吉田いづみ、西澤雅子、藤野真之、仲宗根正、岩谷靖雄、長谷川直紀、柴田潤子、杉浦 互、任鳳 蓉、田中博：HIV-1 env 遺伝子の多様性変化。第21回日本エイズ学会 (11/28-30, 2007, 広島)
3. 杉浦 互、湯永博之、吉田 繁、千葉仁志、小池隆夫、伊藤俊広、原 孝、佐藤武幸、石ヶ坪良明、上田敦久、近藤真規子、今井光信、貞升健志、長島真美、福武勝幸、山元泰之、田中理恵、加藤信吾、宮崎菜穂子、岩本愛吉、藤野真之、仲宗根正、巽 正志、椎野禎一郎、岡慎一、林田庸総、服部純子、伊部史朗、藤崎誠一郎、金田次弘、浜口元洋、上田幹夫、正兼亜季、大家正義、下条文武、田邊嘉也、渡辺香奈子、白阪琢磨、乗原 健、森 治代、小島洋子、中桐逸博、高田 昇、木村昭郎、南 留美、山本政弘、松下修三、健山正男、藤田次郎：2003-2006年の新規HIV-1感染者における薬剤耐性頻度の動向。第21回日本エイズ学会 (11/28-30, 2007, 広島)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし



## 研究要旨

# 横浜および近郊における薬剤耐性HIVの調査研究

神奈川県におけるHIV/AIDS診療の現状と、新規感染患者の受診状況  
— 県域有床医療機関を対象としたアンケート調査、及び平成19年当院受診の  
新規感染患者のBEDアッセイ

分担研究者 石ヶ坪良明 横浜市立大学大学院医学研究科 病態制御免疫内科 教授  
研究協力者 上田敦久 横浜市立大学附属病院 リウマチ血液感染症内科

神奈川県有床医療施設を対象としたアンケートを行い、神奈川県域のHIV・AIDS診療の実態調査を行った。具体的には、①診療の拠点病院への集中、②県域の有床医療機関における約570患者の診療実態、③抗HIV療法、外科、産科、歯科診療の実態、等が明らかとなった。又、薬剤耐性HIVの動向把握のための薬剤耐性及びBEDアッセイの体制を構築した。本年度の当院新規者のBEDアッセイ解析の結果、16症例中、最近の感染の可能性を示唆するODn値0.8以下は7人、44%であることが判明した。

## A. 研究目的

本邦におけるHIV感染症の疫学的解析は、主にエイズ発生動向調査への発生届を参考にして行われ推定値や予測値が算出されることが多い。したがって、未報告患者や死亡症例、又、外国人患者の帰国情報を反映せず、さらに発生届は医療機関の所在地の都道府県名でなされるため、実際の患者の居住地とは異なる分布になることが以前より指摘されている。薬剤耐性HIVの動向把握のための調査体制確立のため、まずは神奈川県域のHIV・AIDS診療の実態把握を目的に県域の有床医療機関を対象としたアンケート調査を行った。又、当院での2007年度新規感染患者を対象に薬剤耐性検査及びBEDアッセイを施行し調査体制構築を試みた。

## B. 研究方法

### アンケート調査

2007年10月初旬に神奈川県域の有床医療機関337病院を対象として、HIV感染症の診療実態、医療従事者の診療に関する意識に関するアンケート調査を行った。診療実態の把握のために表1にある質問項目を用意した。

### 薬剤耐性検査及びBEDアッセイ

2007年度に当院を新規感染患者として受診したHIV感染患者23人のうち、研究の内容に同意が得られた16名を対象に薬剤耐性検査及びBEDアッセイを行った。患者血清中のIgGのうちHIV特異的IgGの占める比をCalypte® HIV-1 BED incidence EIA キット (Calypte Biochemical Co., Rockville, MD) を用いて調べた。

表1 アンケート調査質問事項

Q1	あなたの病院は エイズ治療拠点病院ですか。
Q2	あなたの病院は、HIV/AIDS診療の経験がありますか？ 人数をお答えください。
Q3	現在、HIV/AIDS診療を行っていますか？ 人数をお答え下さい。
Q4	あなたの病院では、HIV診療において抗HIV療法をおこなうことは可能ですか？
Q5	あなたの病院では、HIV診療において 歯科診療も可能ですか？
Q6	あなたの病院では、HIV診療において 外科診療は可能ですか？
Q7	あなたの病院では、HIV診療において 産科診療は可能ですか？

**開発及び研究の対象となる個人への不利益及び危険性への配慮**

サンプリングは採血のみであり、多くは他の検査項目と一緒にされる。解析の結果はその患者診療において有用であり、不利益な点はない。情報の扱いには細心の注意が払われる。施設から出る情報は匿名化されたものを用い、個人を特定しうる情報の流出はない。登録に先立って、担当医は患者本人に当院の倫理委員会で承認された説明文書を患者本人に渡し、研究の目的、研究に協力いただいたときの利益と不利益、参加の方法と内容、研究調査研究の適切な運営と情報の保護、研究成果の公表、協力していただくことを説明し、同意のもとに行われた。

**C. 研究結果**

**アンケート調査**

神奈川県域の有床医療機関337施設にアンケートを送り107施設より回答を得た。回答率は32.7%であった。HIV/AIDS診療の経験があると答えた施設は107施設中35施設であり、約30%の医療施設が診療経験を有する実態が判明した。しかしながら、大半の施設(23施設)は5症例以内の経験数であると返答し、50症例以上の診療経験数があると答えた施設は拠点病院の一部4施設のみであった。以前より推測されていた拠点病院間の診療実態の差を具体的に示す結果となった。現在診療を行っている病院は拠点病院15施設とそれ以外の2施設で、総計で約570症例のHIV/AIDS診療実態があることが判明した。又、拠点病院以外の2施設での診療は現在計3症例であり、ほとんどの症例が拠点病院に集中している実態が明らかとなった。さらに拠点病院の中でも現在5症例以上の診療実態があるのは9施設であり、この点からも拠点病院間の診療実態の差が示された。

HIV感染患者の診療内容に関して、HAART導入、歯科診療、外科診療、産科診療の可否に関して質問を行ったところ、HAART療法の導入はすべての拠点病院を含めた26施設で可能と回答があった。歯科診療、外科診療、産科診療はそれぞれ13施設、20施設、10施設が可能との回答があった。

**薬剤耐性検査及びBEDアッセイ**

18症例について薬剤耐性検査は外部検査会社(SRL)及び国立感染症研究所において解析がなされた。臨床上問題となる耐性変異は認めなかった。16症例についてBEDアッセイを行った。最近の感染の可能性を示唆するODn値0.8以下は7人、44%であった。このうち諸検査及び臨床歴より初期HIV

感染であり感染時期が推測しえた症例は1例のみであり、他症例は感染時期の特定はなされていない。検査時のCD4陽性細胞数との相関を図1に示す。ある程度の相関を期待したがその傾向は認めなかった。初期HIV感染症例の感染後5ヶ月目のODn値は0.434と最近の感染に一致した結果であった。

**D. 考察**

回答率32.7%は回答者の氏名を明記していただいた点を考慮すると比較的高い回答率であり、HIV診療に多くの医療関係者が関心を持っていると考えられた。神奈川県におけるHIV/AIDS患者の届出はエイズ発生動向調査の累計で平成19年に1000名を超えたとされるが、本アンケートによって、実際に現在神奈川県域の病院で診療を受けている患者数は600名に満たない実情が判明した点は興味深い。診療内容に関しては、歯科診療、産科診療が難しいとした病院が拠点病院にも複数認められた。神奈川県はHIV患者歯科診療に関しては医師会主導で診療体制の構築を行っており(神奈川HIV歯科診療ネットワーク)、比較的歯科診療を受けやすい状況となっている。一方、産科診療の受け入れ病院が少ない状況は改善すべき点と考えられた。BEDアッセイのODn 0.8のカットオフ値とした場合の感染後平均陽性化日数は155日と報告がある。今回16名と少数が対象であり評価は難しいが、0.8以下であった7名の内にはAIDSを発症している症例が2例含まれており、偽陰性の可能性は否定できないと考えている。今後のデータの蓄積が必要と考えられた。

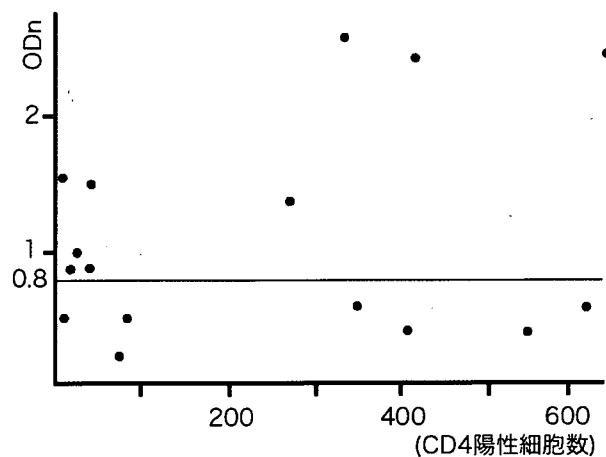


図1 CD4陽性細胞数とOdn値について  
CD4陽性細胞数568/μl Odn0.434のPHI患者以外は  
感染時期不明であった。