

原 著

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

藤崎誠一郎¹⁾, 藤崎彩恵子¹⁾, 伊部 史朗¹⁾, 浅 黄 司²⁾, 伊藤 俊広²⁾, 吉田 繁³⁾,
小池 隆夫⁴⁾, 大家 正泰⁵⁾, 渡邊香奈子⁶⁾, 正兼 亜季⁷⁾, 上田 幹夫⁸⁾, 瀧永 博之⁹⁾,
松田 昌和¹⁰⁾, 貞升 健志¹¹⁾, 長島 真美¹¹⁾, 岡田 清美¹²⁾, 近藤真規子¹³⁾,
秦 眞美¹⁴⁾, 溝上 泰司¹⁵⁾, 森 治代¹⁶⁾, 南 留美¹⁷⁾,
白阪 琢磨¹⁵⁾, 岡 慎一⁹⁾, 杉浦 互¹⁰⁾, 金田 次弘¹⁾

¹⁾ 名古屋医療センター臨床研究センター血液免疫研究部, ²⁾ 仙台医療センター臨床検査科, ³⁾ 北海道大学病院検査部, ⁴⁾ 北海道大学医学部第二内科, ⁵⁾ 新潟大学大学院医歯学総合研究科, ⁶⁾ 新潟保健環境科学研究所, ⁷⁾ 石川県立中央病院中央検査部, ⁸⁾ 石川県立中央病院血液免疫内科, ⁹⁾ 国立国際医療センターエイズ治療・研究開発センター, ¹⁰⁾ 国立感染症研究所エイズ研究センター, ¹¹⁾ 東京都健康安全研究センター微生物部, ¹²⁾ 北里大塚バイオメディカルアッセイ研究所, ¹³⁾ 神奈川県衛生研究所微生物部, ¹⁴⁾ 愛知県衛生研究所微生物部, ¹⁵⁾ 大阪医療センター HIV/AIDS 先端医療開発センター, ¹⁶⁾ 大阪府立公衆衛生研究所ウイルス課, ¹⁷⁾ 九州医療センター免疫感染症科臨床研究部

目的: 日本で HIV-1 遺伝子型薬剤耐性検査を実施しているほとんどの施設は, 国立感染症研究所が開発した方法を参考にした in-house の手法を用いて検査を行っている。しかし, これらの施設が実施している HIV-1 遺伝子型薬剤耐性検査の質は, 今までに評価を受けたことがない。我々は, 日本で薬剤耐性検査を実施している 15 施設について, 検査の精度と信頼性を調べることを目的としてコントロールサーベイを実施した。

材料および方法: HIV-1 遺伝子型薬剤耐性検査を実施している 15 施設で, 2 種類のクローン化薬剤耐性 HIV-1 RNA を用いて薬剤耐性検査を実施し, その検査結果を評価した。

結果: HIV-1 遺伝子型薬剤耐性検査の質は, 正解率が 97.3% と, 非常に高いことが明らかとなった。誤答の原因は, 不適切なプライマーの使用, エレクトロフォレグラムの乱れ及び, 人為的誤りなどであった。

結論: 日本で実施されている HIV-1 遺伝子型薬剤耐性検査の水準は高い事が明らかになった。しかしその水準をより一層向上させるために, 今回明らかになった問題に対して解決法を提案した。

キーワード: AIDS, HIV-1, HIV-1 遺伝子型薬剤耐性検査, コントロールサーベイ

日本エイズ学会誌 9: 136-146, 2007

緒 言

HIV-1 感染症治療において, HAART (highly active anti-retroviral therapy) は, ウイルス複製を強力に抑制し, 長期にわたり血中ウイルス量を検出限度以下に維持することを可能とした^{1,2)}。HAART による治療効果は通常, 血中ウイルス量でモニタリングされている。血中ウイルス量が, 検出限度以下に一旦抑制されたにもかかわらず, 再び増加した場合には, 薬剤耐性 HIV-1 の出現が疑われる^{3,6)}。この場合, 遺伝子型薬剤耐性検査によって, 治療薬剤の標的酵素であるプロテアーゼおよび逆転写酵素のアミノ酸配列を決定し, HIV-1 が薬剤耐性を獲得しているかどうかを鑑別し

ている。同時に, 変更可能な抗 HIV-1 薬を選択するための情報も得ることができる⁷⁻¹¹⁾。最近, 薬剤耐性 HIV-1 が未治療患者からも検出されることから^{12,13)}, HAART 開始前にも本検査の実施が推奨されている。このように, 遺伝子型薬剤耐性検査は治療を最適化するために必須の検査である^{14,15)}。

現在, 日本で HIV-1 遺伝子型薬剤耐性検査を実施しているほとんどの施設は, in-house の手法を用いて検査を行っている。しかし, これらの施設が実施している HIV-1 遺伝子型薬剤耐性検査の質は, 今までに評価を受けたことがない。我々は将来, HIV-1 遺伝子型薬剤耐性検査を標準化することが重要と考え¹⁶⁻¹⁹⁾, 以下の検討を行っている。まず, 各施設で使用している試薬・プライマー・塩基配列解析装置を調査し, 第二段階として, HIV-1 クローンをを用いたコントロールサーベイを実施し, 検査結果の解析を通して改良点を抽出する。第三段階として, 改善された検査条件下で臨床検体を用いたコントロールサーベイを実施し, 本検

著者連絡先: 金田次弘 (〒460-0001 愛知県名古屋市中区三の丸 4-1-1 国立病院機構名古屋医療センター 臨床研究センター血液免疫研究部)
FAX: 052-955-1878

2006年11月14日受付; 2007年3月20日受理

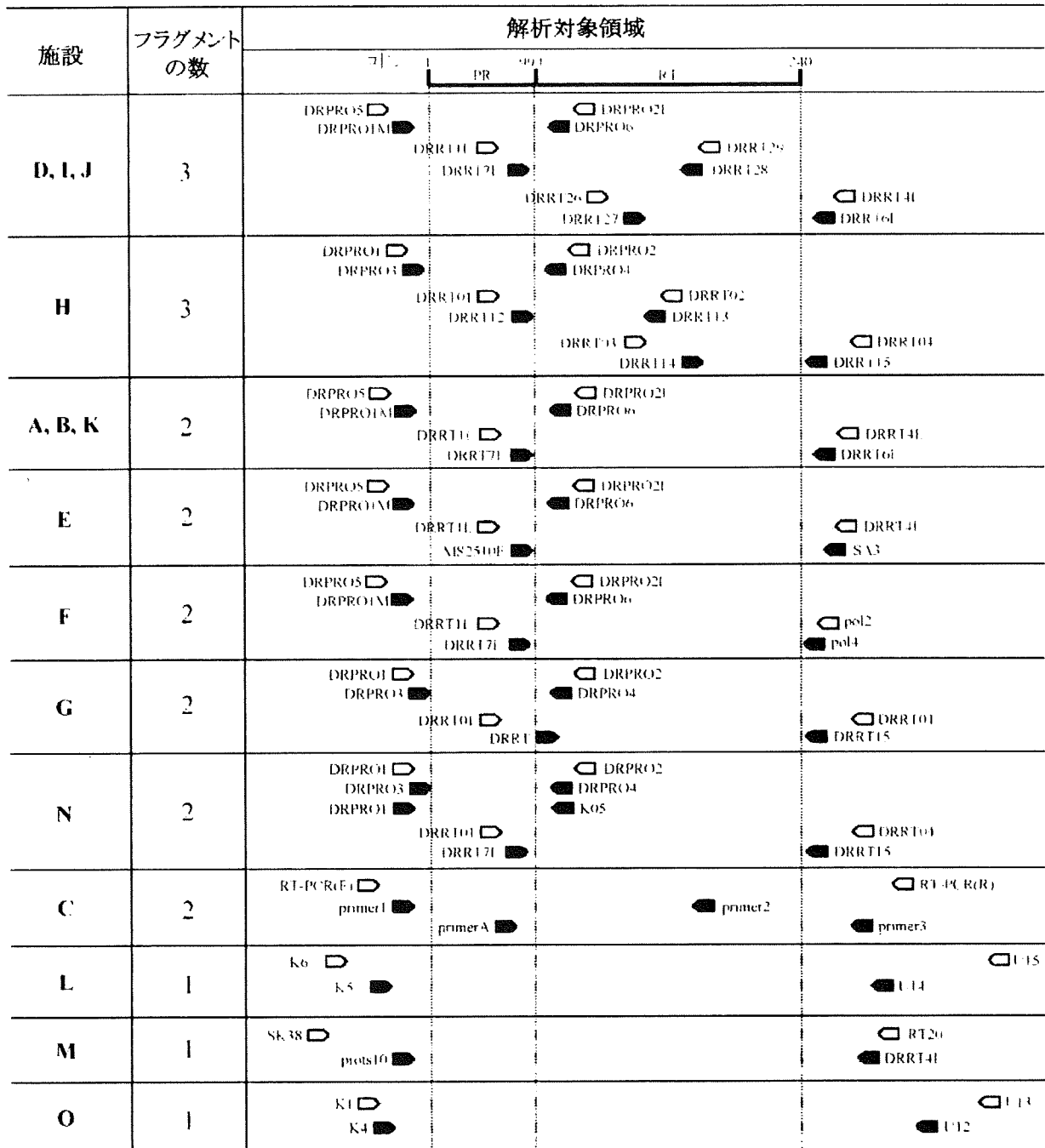


図 1 HIV-1 に対するプライマーの結合位置と、PCR による増幅領域

RT-PCR および、nested PCR に使用されたプライマーをそれぞれ、白および黒の矢印で示した。プライマー名の左に示した A から O のアルファベットは、それらのプライマーを使用した 15 施設を表している。

表 1 各施設で用いられた試薬および塩基配列解析装置

RT-PCR 試薬	施設数
One-step RT-PCR 法	12
・ One Step RT-PCR (TaKaRa)	10
・ SuperScript Onestep RT-PCR for Long Template (Invitrogen)	2
Two-step RT-PCR 法	3
・ RNA PCR Kit (AMV) ver. 3.0 (TaKaRa)/Ex Taq HS (TaKaRa)	1
・ AMV Reverse Transcriptase XL (TOYOBO)/Ampli Taq (Applied Biosystems)	1
・ M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen)/Taq DNA polymerase (Greiner)	1
Nested PCR 試薬	施設数
・ Ex Taq (TaKaRa)	5
・ Ampli Taq (Applied Biosystems)	3
・ LA Taq (TaKaRa)	2
・ KOD polymerase (TOYOBO)	2
・ Ex Taq HS (TaKaRa)	1
・ PCR Master Mix (Promega)	1
・ Taq DNA polymerase (Biotech International)	1
標識試薬	施設数
Big Dye Terminator V1.1 (Applied Biosystems)	8
Big Dye Terminator V3.1 (Applied Biosystems)	5
CEQ Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start kit (Beckman Coulter)	1
Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit (USB)/IRDye™ 800 v2 Terminator Mixes (LI-COR)	1
標識産物の精製試薬	施設数
CENTRI SEP Spin Columns (Applied Biosystems)	5
Sephadex G-50 (GE Healthcare Bio-Sciences)	3
DyeEx 2.0 Spin Kit (QIAGEN)	1
エタノール沈殿法	6
塩基配列解析装置	施設数
ABI PRISM 310 (Applied Biosystems)	10
BECKMAN COULTER CEQ 8000 (Beckman Coulter)	1
LI-COR 4200 IR2 system (LI-COR)	1
ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems)	1
ABI PRISM 3100 Avant (Applied Biosystems)	1
ABI PRISM 3730S (Applied Biosystems)	1

査の標準化に必須の課題の整理を目指している。本論文では現在までに終了した第一段階および、第二段階の結果について報告する。

表 2 コントロールサーベイの結果

(a) クローン #1 の結果

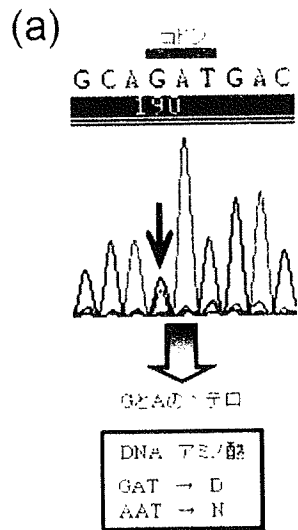
	アミノ酸変異	正解した施設数 (正解率, %)	誤答の内容
PR	V3I	13/15 (86.7)	施設 B は I3V と報告。施設 H は報告無し。 施設 G と H は報告無し。 施設 H は報告無し。 施設 G と H は報告無し。
	E35D	13/15 (86.7)	
	S37N	14/15 (93.3)	
	R41K	13/15 (86.7)	
	L63P*	15/15 (100)	施設 H は報告無し。 施設 A は A71V と報告。施設 G は報告無し。 施設 E と F は D29N および C95W をそれぞれ報告していた。これらはクローン #1 には存在していないアミノ酸変異であった。
	K70R	14/15 (93.3)	
	A71T*	13/15 (86.7)	
	V77I*	15/15 (100)	
Ghost mutations	—		
RT	A62V*	15/15 (100)	施設 C は報告無し。
	S68G	14/15 (93.3)	
	T69V	15/15 (100)	
	V75I*	15/15 (100)	
	F77L*	15/15 (100)	
	F116Y*	15/15 (100)	
	E122K	15/15 (100)	施設 C は報告無し。 施設 C は報告無し。
	Q151M*	15/15 (100)	
	Q197E	14/15 (93.3)	
	R211K	14/15 (93.3)	

(b) クローン #2 の結果

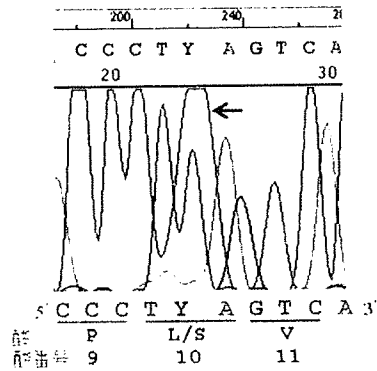
	アミノ酸変異	正解した施設数 (正解率, %)	誤答の内容
PR	V3I	15/15 (100)	施設 F は L10L/S と報告。
	L10I*	14/15 (93.3)	
	I15V	15/15 (100)	
	S37D	15/15 (100)	
	L63P*	15/15 (100)	施設 D は報告無し。 施設 E は E34K を、施設 F は R41K および T96S をそれぞれ報告していた。これらはクローン #2 には存在していないアミノ酸変異であった。
	V77I*	15/15 (100)	
	L90M*	14/15 (93.3)	
	I93L	15/15 (100)	
Ghost mutations	—		
RT	V35T	14/14 (100)	施設 G は使用したプライマーの組み合わせにより V35T を含む領域が解析対象外であった。 施設 G は使用したプライマーの組み合わせにより T39A を含む領域が解析対象外であった。
	T39A	14/14 (100)	
	M41L*	15/15 (100)	施設 K は T69S-SG 挿入変異を、薬剤耐性変異ではないアミノ酸変異として報告していた。 施設 H は使用したプライマーの組み合わせにより E122K を含む領域が解析対象外であった。 施設 H は使用したプライマーの組み合わせにより I135T を含む領域が解析対象外であった。
	K43E	15/15 (100)	
	T69S-SG* insertion	14/15 (93.3)	
	E122K	14/14 (100)	
	I135T	14/14 (100)	
	R172K	15/15 (100)	
	D177E	15/15 (100)	
	G190A*	15/15 (100)	
	Q207H	15/15 (100)	
	L210W*	15/15 (100)	
	R211K	15/15 (100)	
	L214F	15/15 (100)	施設 L は報告無し。 施設 N は、クローン #2 には存在していないアミノ酸変異である I31T を報告していた。
	T215Y*	15/15 (100)	
	K238S	14/15 (93.3)	
	Ghost mutations	—	

*印は薬剤耐性アミノ酸変異

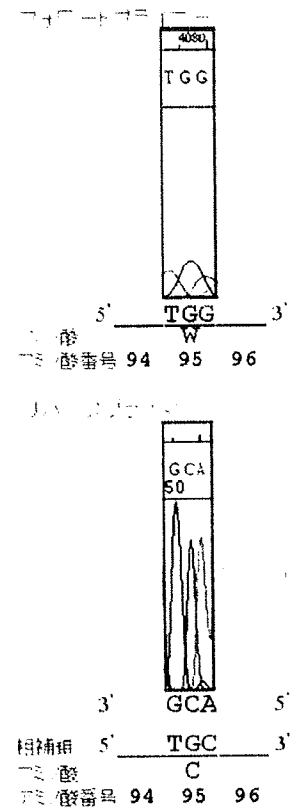
(I)



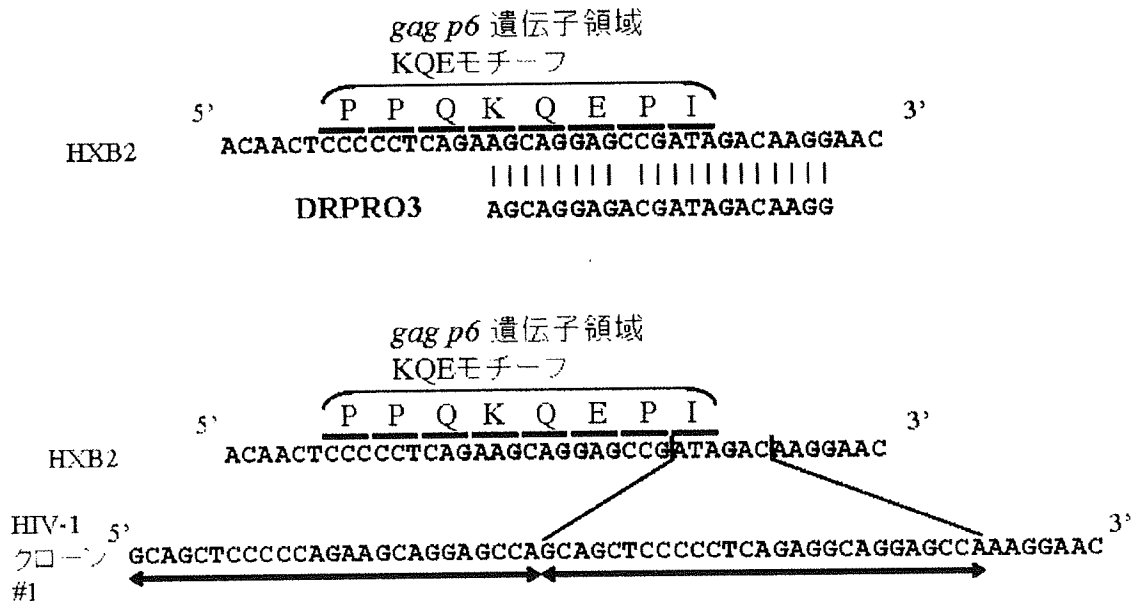
(b)



(II)



(III)



材料および方法

クローン化薬剤耐性 HIV-1 の作製と発現

各施設からの検査結果の正誤を明瞭にするために、単一な RNA ゲノムをもつクローン化薬剤耐性 HIV-1 を 2 種類作製した。まず、多剤耐性 HIV-1 を有する 2 名の患者の血漿検体から HIV-1 RNA を、QIAamp Viral RNA Kit (QIAGEN, CA, USA) を用いて精製した。次に、*gag* (アミノ酸番号 412 番から 500 番)、プロテアーゼ (PR, アミノ酸番号 1 番から 99 番)、逆転写酵素 (RT, アミノ酸番号 1 番から 260 番) の遺伝子領域を含む 1.3kb の DNA 断片を、RT-PCR にて増幅した。RT-PCR は、Superscript One-Step RT-PCR (Invitrogen, CA, USA), K1 (5'-AAG GGC TGT TGG AAA TGT GG-3'), U13 (5'-CCC ACT CAG GAA TCC AGG T-3') プライマーを用いた。Nested PCR は LA Taq (Takara, Shiga, Japan), INF-ApaI (5'-TGC TGG GCC CCT AGG AAA AAG G-3'), INF-NheI (5'-TCT GGC TAG CCC AAT TCA ATT TTC CCA C-3') プライマーを用いて行った。増幅した DNA は ApaI (Takara), NheI (New England Biolabs, MA, USA) で処理し、得られた ApaI-NheI 断片を HXB2 感染性クローンである pSUM9²⁰⁾ (National Cancer Institute, 熊本大学, 満屋教授から供与していただいた) に組み込んだ。次いで、Lipofectamin (Invitrogen) を用いて、作製した感染性クローンを 40% コンフルエントの MT-2 細胞に遺伝子導入した。細胞は 10% 仔ウシ血清を含む RPMI1640 を用いて、5% CO₂ 濃度、37°C で培養した。遺伝子導入の 4 日後、0.2 ml の培養上清を、5×10⁴ 個/4.8 ml の MT-4 細胞に移し、さらに 3 日間培養後、ウイルスを含む培養上清を回収し、-80°C で保存した。

HIV-1 RNA の調製

HIV-1 粒子を超速心 (23,000×g, 1 時間, 4°C) により沈降させ、PBS (-) による洗浄を 2 回行った。次に沈降物を 100 μl の PBS (-) に懸濁し、3 U のデオキシリボスクレアーゼ (Nippon Gene, Tokyo, Japan) を添加して 37°C, 15 分間 DNA 分解処理を行った。その後、23,000×g, 1 時間、4°C の条件下で遠心し、沈降物を PBS (-) で洗浄した。RNA は QIAamp Viral RNA Kit を用いて精製し、2×10⁴ コピー数の HIV-1 RNA を 2 ml PBS (-) に懸濁して -80°C で保存した。凍結した HIV-1 RNA 検体をドライアイスと共に梱包し、15 施設へ送付した。また、HIV-1 RNA のコピー数は Nagai ら²¹⁾ の方法を用いてリアルタイム PCR にて測定した。

HIV-1 遺伝子型薬剤耐性検査

遺伝子型薬剤耐性検査は、国立感染症研究所、国立国際医療センター、HIV/AIDS ブロック拠点病院 8 施設、地方衛生研究所 4 施設、そして民間臨床検査会社 1 施設で実施した。本研究では、HXB2 株または NL4-3 株のアミノ酸配列と、解析したアミノ酸配列を比較し、薬剤耐性アミノ酸変異については International AIDS Society-USA (IAS-USA) panel, version March/April 2005²²⁾ に基づいて定義した。各施設からは、薬剤耐性およびその他のアミノ酸変異を示した検査報告書、使用したプライマーの塩基配列、エレクトロフォレグラム、そして解析した塩基およびアミノ酸配列の報告を受けた。各施設から報告されたアミノ酸変異は名古屋医療センターの解析結果を基準として評価した。

図 2 誤判定を引き起こした 3 つの原因

- (I) (a) ノイズを伴ったエレクトロフォレグラムによって誤判定が引き起こされた例
HIV-1 クローン #1 の PR 遺伝子領域にて、施設 E は本来存在していないアミノ酸 D29N を報告していた。これは、矢印で示した A (緑色) のノイズをシグナルと判定したことにより解析を誤ったためである。
- (b) エレクトロフォレグラム上の巨大ノイズシグナルによって誤判定が引き起こされた例
(II) 不明瞭なエレクトロフォレグラムを解析したことによって誤判定が引き起こされた例
リバースプライマーを用いて得たエレクトロフォレグラムは鮮明であり、アミノ酸番号 95 番は TGC と正確に判断できていた。にも拘わらず、不明瞭なエレクトロフォレグラムを解析し、TGG と誤判断していた (施設 F)。
- (III) 鋳型に対する結合能を欠失していた PCR プライマーを用いたことにより、誤判定が引き起こされた例
Gag 遺伝子の KQE モチーフ領域内に起きた重複により、DRPRO3 プライマーの 3' 側結合部位が欠失していた。重複配列を矢印で示した。

結 果

試薬、プライマー及び塩基配列解析装置の調査

今回の調査の結果、コントロールサーベイに参加した全15施設で使用されている試薬、プライマー及び塩基配列解析装置は施設によってかなり多様であった。図1にプライマーの名称および、PCRにより増幅される遺伝子領域を示した。RT-PCR および nested PCR に使用された試薬、標識試薬、標識産物の精製に用いられた試薬、塩基配列解析装置は表1に示した。

アミノ酸変異検出についての評価

各施設から提出された HIV-1 アミノ酸変異検出結果を表2に示した。HIV-1 クローン #1 に含まれている全アミノ酸変異を正しく検出していた施設は、15施設中8施設であり、#2 については15施設中7施設であった。そこで、アミノ酸変異が誤判定された事例について、使用されたプライマー、エレクトロフォレグラム、および塩基配列・アミノ酸配列のファイルを検査し、誤判定を引き起こした原因を解明した。

HIV-1 クローン #1 の PR 領域には3つの薬剤耐性アミノ酸変異 (L63P, A71T, V77I) と、その他のアミノ酸変異が5つ (V3I, E35D, S37N, R41K, K70R) 存在している (表2 (a))。9施設はこれら8つのアミノ酸変異を正しく報告していたが、残り6施設の報告には誤答があった。具体的には、施設 A は A71T を A71V として、また B は V3I を I3V としてそれぞれ報告していた。これらの施設が提出した DNA およびアミノ酸のファイルでは変異が正しく検出されていることから、この誤答は報告書作成時の人為的誤りと判断した。施設 E と F は、本クローンには存在しないアミノ酸変異 D29N と C95W を報告していた。施設 E の誤答は、エレクトロフォレグラムに出現した高レベルのノイズシグナルが原因であった (図2 (I) (a))。施設 F は、人による編集を経っていない、自動解析による波形データの解析結果を採用し、かつ、正確に解析していたリバースプライマーを用いた解析結果を無視していた (図2 (II))。施設 G と H は、大きく異なるアミノ酸変異を報告した。これは、nested PCR に用いたフォワードプライマー (DRPRO-3) が不適切であったことに起因している (図2 (III))。HIV-1 クローン #1 の gag タンパク質のアミノ酸番号 470 番から 478 番 (KQE モチーフを含む) に相当する塩基配列の重複によって DRPRO3 の結合部位は欠失していた。このことから、DRPRO3 を用いた PCR では HIV-1 クローン #1 の PR 領域の DNA 断片を増幅することは不可能であった。

クローン #1 の RT 領域内には、5つの薬剤耐性アミノ酸変異 (A62V, V75I, F77L, F116Y, Q151M) と、その他5つ

のアミノ酸変異 (S68G, T69V, E122K, Q197E, R211K) が存在している (表2 (a))。14施設はこれらの10アミノ酸変異を正確に報告していた。施設 C は、3つのアミノ酸変異, S68G, Q197E, R211K について、DNA およびアミノ酸配列のファイルでは正しく検出していたにもかかわらず、検査の最終報告書にはこれらの変異を記載していなかった。

HIV-1 クローン #2 の PR 領域には4つの薬剤耐性アミノ酸変異 (L10I, L63P, V77I, L90M) と、その他のアミノ酸変異が4つ (V3I, I15V, S37D, I93L) 存在している (表2 (b))。12施設はこれらのアミノ酸変異を正しく報告していたが、施設 D, E, F の報告には誤答が含まれていた。施設 D は、塩基配列ファイルではアミノ酸番号 90 番のコードン "ATG" を正確に検出していたが、翻訳後のアミノ酸ファイルでは L90M を報告していなかった。施設 E は、クローン #2 に存在しないアミノ酸変異 E34K を報告していた。これはエレクトロフォレグラムに出現した高レベルのノイズシグナルによって引き起こされたものであった。施設 F は、エレクトロフォレグラムが乱れていたことにより、クローン #2 に存在しないアミノ酸変異 R41K, T96S を報告していた。さらに、エレクトロフォレグラムに現れた、巨大なノイズシグナルによりアミノ酸変異 L10I を L10L/S と報告していた (図2 (I) (b))。このピークは、標識反応後の、精製過程で未反応のダイデオキシスクレオチドの除去が不完全であったことに起因していると判断した。

クローン #2 の RT 領域内には、5つの薬剤耐性アミノ酸変異 (M41L, T69S-SG 挿入, G190A, L210W, T215Y) と、その他に11のアミノ酸変異 (V35T, T39A, K43E, E122K, I135T, R172K, D177E, Q207H, R211K, L214F, K238S) が存在している (表2 (b))。10施設はこれら16アミノ酸変異を正確に報告していた。一方、施設 G, H, K, L, N からの報告書に誤りがあった。まず、施設 G と H の誤答についてであるが、使用したプライマーの組み合わせにより施設 G はアミノ酸番号1番から39番の領域を、施設 H はアミノ酸番号122番から135番の領域を増幅することが不可能であった。その結果、施設 G は V35T と T39A、施設 H は E122K と I135T を報告していなかった。よって、施設 G と H の誤答は評価対象外とした。次に、施設 K は、T69S-SG 挿入変異を正しく検出していたが、薬剤耐性ではないアミノ酸変異として報告していた。施設 L は、K238S についてアミノ酸ファイルでは正しく検出しているのに拘わらず報告書に記載していなかった。また、施設 N はクローン #2 の RT 領域内に存在していないアミノ酸変異 I31T を報告しており、この誤答はクローン #1 の PR 領域内で施設 E が起こした誤りと同様であった。

表 3 誤答を引き起こした原因のまとめ

分類	誤答を引き起こした原因
技術的誤り 9 (1.4%)	不適切なプライマーの使用 ノイズを伴ったエレクトロフォレグラム
	報告書への誤記入 6 (1.0%)
人為的誤り 8 (1.3%)	アミノ酸変異を分類する際の誤った判断 1 (0.2%)
	コドンの誤った翻訳 1 (0.2%)
全問題点 17 (2.7%)	

誤答の分類

全体をまとめると、17個の誤答があった(表3)。クローン #1 と #2 を合わせると 42 個のアミノ酸変異が存在し、また、施設 G と H については、クローン #2 の RT 領域で 4 個のアミノ酸変異を評価対象外としていることから、全 15 施設から報告されるべきアミノ酸変異の総数は 626 個である。よって、正解率は 97.3% であり、誤答率は 2.7% であった。誤答を引き起こした原因を分類すると、技術的誤りが 1.4%、人為的誤りが 1.3% であった。人為的誤りは、報告書への誤記入が 1.0%、アミノ酸変異を薬剤耐性変異もしくはその他の変異に分類する際の判断の誤りが 0.2%、コドンを翻訳する際の誤りが 0.2% であった。技術的誤りは、高いノイズを伴ったエレクトロフォレグラムに起因する不正確な解析と、不適切なプライマーの使用が原因であった。

考 察

我々は今回、2 種類 HIV-1 クロノンを試験標本に採用し、コントロールサーベイを実施した。その結果、全検出アミノ酸変異の正答率は 97.3% (609/626) という良好な成績を示した。しかし、改善すべき問題点も明らかになった。アミノ酸変異が誤判定された事例については、該当施設が使用したプライマー、エレクトロフォレグラム、および塩基配列・アミノ酸配列のファイルを精査することで、誤答を引き起こした原因を解明した。その結果、誤答の原因を 3 つに分類することができた。

第一の原因は、使用するプライマーの問題である。Gag p6 内の KQE モチーフが重複した HIV-1 に対しては結合しない、初期に使用されていたプライマー DRPRO3 が現在も 2 施設で使用されていた。この 2 施設では、クローン #1 に含まれているアミノ酸変異とは大きく異なるアミノ

酸変異を報告していた。第二の原因は、ノイズを伴ったエレクトロフォレグラムを判読したことに起因している。これには 3 施設が該当した。第三の原因は、人為的誤りである。報告書作成時の誤記入とコドンの誤った翻訳が 4 施設でみられた。

これら 3 つの原因に対する解決策を以下に示す。

第一の原因は、初期のプライマーから改良したプライマーの情報について、施設間の情報伝達が徹底されていなかったことに起因している。DRPRO3 は 1996 年に国立感染症研究所が開発したプライマーであるが、KQE モチーフに挿入変異の存在が報告^{23,25)} されてからは使用が中止され、新しいプライマーである DRPRO3N の使用に変更されている。したがって、DRPRO3N をプライマーとして用いればこの問題は即解決できる。今後、最新のプライマー情報と塩基配列決定領域内の新規検出変異や挿入、欠失に関する HIV-1 塩基配列情報を少なくとも年に一度は全関係施設に配布する等の、検査水準をバックアップする体制を充実することによりプライマー問題は根絶できると思われる。また、注目すべきことに、施設 C, L, M, O で独自に開発されたプライマーも、国立感染症研究所で開発された最新のプライマーと同様に機能していた。

第二の原因は、明瞭なエレクトロフォレグラムを得ることで克服可能である。そのためには、精製度の高いプライマー、すなわち、HPLC 精製グレードのプライマーの使用が必須である。また、当然のことであるが、新鮮なバッファー、ゲルを用いて塩基配列解析を実施することが重要である。さらに、フォワードプライマーを用いて解析したエレクトロフォレグラムの質が悪く、解析が不正確になる場合には、リバースプライマーも用いて解析を行うことで、塩基配列決定の正確性を高めることができる。

第三の原因克服は、解析を自動化することによって可能である。例えば、我々が使用している DNA 配列解析ソフトウェア SeqScape (Applied Biosystems) では、エレクトロフォレグラムから DNA 配列およびアミノ酸配列を作成し、変異アミノ酸を検出する過程の自動化が可能である。人為的誤りを無くすソフトウェアの普及と充実がこの問題克服に必要なである。

なお、異なる試薬、および塩基配列解析装置の機種の違いが誤りの原因と疑われた事例はなかった。

このように今回、HIV-1 遺伝子型薬剤耐性検査で起こり得る誤りの原因を追究し、それに対する解決法を提案した。各施設に送付した今回のコントロールサーベイの評価に基づいて種々の改善を図ることにより、HIV-1 遺伝子型薬剤耐性検査の精度向上が期待される。次回は、第三段階として臨床検体を用いたコントロールサーベイの実施を計画している。

謝辞：本研究は、厚生労働省エイズ対策事業「薬剤耐性 HIV 発生動向把握のための検査方法・調査体制確立に関する研究」班 (No. H-16-エイズ-002, 杉浦班) の班研究として推進した研究である。藤崎誠一郎、藤崎彩恵子はエイズ予防財団のリサーチレジデントとして本研究に参画した。

文 献

- 1) Hammer SM, Squires KE, Hughes MD, Grimes JM, Demeter LM, Currier JS, Eron JJJr, Feinberg JE, Balfour HHJr, Deyton LR, Chodakewitz JA, Fischl MA : A controlled trial of two nucleoside analogues plus didanosine in persons with human immunodeficiency virus infection and CD4 cell counts of 200 per cubic millimeter or less. AIDS Clinical Trials Group 320 Study Team. *N Engl J Med* 337 : 725-733, 1997.
- 2) Montaner JS, Reiss P, Cooper D, Vella S, Harris M, Conway B, Wainberg MA, Smith D, Robinson P, Hall D, Myers M, Lange JM : A randomized, double-blind trial comparing combinations of nevirapine, didanosine, and zidovudine for HIV-infected patients. *JAMA* 279 : 930-937, 1998.
- 3) Shafer RW, Winters MA, Palmer S, Merigan TC : Multiple concurrent reverse transcriptase and protease mutations and multidrug resistance of HIV-1 isolates from heavily treated patients. *Ann Intern Med* 128 : 906-911, 1998.
- 4) Lucas GM, Chaisson RE, Moore RD : Highly active antiretroviral therapy in a large urban clinic : risk factors for virologic failure and adverse drug reactions. *Ann Intern Med* 131 : 81-87, 1999.
- 5) Perez-Elias MJ, Moreno S, Gutierrez C, Lopez D, Abaira V, Moreno A, Drona F, Casado JL, Antela A, Rodriguez MA : High virological failure rate in HIV patients after switching to a regimen with two nucleoside reverse transcriptase inhibitors plus tenofovir. *AIDS* 19 : 695-698, 2005.
- 6) Zaccarelli M, Tozzi V, Lorenzini P, Trotta MP, Forbici F, Visco-Comandini U, Gori C, Narciso P, Perno CF, Antinori A : Multiple drug class-wide resistance associated with poorer survival after treatment failure in a cohort of HIV-infected patients. *AIDS* 19 : 1081-1089, 2005.
- 7) Durant J, Clevenbergh P, Halfon P, Delgiudice P, Porsin S, Simonet P, Montagne N, Boucher CA, Schapiro JM, Dellamonica P : Drug-resistance genotyping in HIV-1 therapy : the VIRADAPT randomised controlled trial. *Lancet* 353 : 2195-2199, 1999.
- 8) Baxter JD, Mayers DL, Wentworth DN, Neaton JD, Hoover ML, Winters MA, Mannheimer SB, Thompson MA, Abrams DI, Brizz BJ, Ioannidis JP, Merigan TC : A randomized study of antiretroviral management based on plasma genotypic antiretroviral resistance testing in patients failing therapy. CPCRA 046 Study Team for the Terry Bein Community Programs for Clinical Research on AIDS. *AIDS* 14 : F83-93, 2000.
- 9) Cingolani A, Antinori A, Rizzo MG, Murri R, Ammassari A, Baldini F, Di Giambenedetto S, Cauda R, De Luca A : Usefulness of monitoring HIV drug resistance and adherence in individuals failing highly active antiretroviral therapy : a randomized study (ARGENTA). *AIDS* 16 : 369-379, 2002.
- 10) 杉浦互 : HIV-1 の薬剤耐性検査と臨床的意義. *日本臨床* 60 : 703-710, 2002.
- 11) Tural C, Ruiz L, Holtzer C, Schapiro J, Viciano P, Gonzalez J, Domingo P, Boucher C, Rey-Joly C, Clotet B : Clinical utility of HIV-1 genotyping and expert advice : the Havana trial. *AIDS* 16 : 209-218, 2002.
- 12) Ibe S, Hotta N, Takeo U, Tawada Y, Mamiya N, Yamana K, Utsumi M, Kaneda T : Prevalence of drug-resistant human immunodeficiency virus type 1 in therapy-naive patients and usefulness of genotype testing. *Microbiol Immunol* 47 : 499-505, 2003.
- 13) Gatanaga H, Ibe S, Matsuda M, Yoshida S, Asagi T, Kondo M, Sadamasu K, Tsukada H, Masakane A, Mori H, Takata N, Minami R, Tateyama M, Koike T, Itoh T, Imai M, Nagashima M, Gejyo F, Ueda M, Hamaguchi M, Kojima Y, Shirasaka T, Kimura A, Yamamoto M, Fujita J, Oka S, Sugiura W : Drug-resistant HIV-1 prevalence in patients newly diagnosed with HIV/AIDS in Japan. *Antiviral Res* 75 : 75-82, 2007.
- 14) Little SJ, Holte S, Routy JP, Daar ES, Markowitz M, Collier AC, Koup RA, Mellors JW, Connick E, Conway B, Kilby M, Wang L, Whitcomb JM, Hellmann NS, Richman DD : Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV. *N Engl J Med* 347 : 385-394, 2002.
- 15) Grant RM, Hecht FM, Warmerdam M, Liu L, Liegler T, Petropoulos CJ, Hellmann NS, Chesney M, Busch MP, Kahn JO : Time trends in primary HIV-1 drug resistance among recently infected persons. *JAMA* 288 : 181-188, 2002.

- 16) Shafer RW, Hertogs K, Zolopa AR, Warford A, Bloor S, Betts BJ, Merigan TC, Harrigan R, Larder BA : High degree of interlaboratory reproducibility of human immunodeficiency virus type 1 protease and reverse transcriptase sequencing of plasma samples from heavily treated patients. *J Clin Microbiol* 39 : 1522-1529, 2001.
- 17) Huang DD, Eshleman SH, Brambilla DJ, Palumbo PE, Bremer JW : Evaluation of the editing process in human immunodeficiency virus type 1 genotyping. *J Clin Microbiol* 41 : 3265-3272, 2003.
- 18) Sayer DC, Land S, Gizzarelli L, French M, Hales G, Emery S, Christiansen FT, Dax EM : Quality assessment program for genotypic antiretroviral testing improves detection of drug resistance mutations. *J Clin Microbiol* 41 : 227-236, 2003.
- 19) Huang DD, Bremer JW, Brambilla DJ, Palumbo PE, Aldrovandi G, Eshleman S, Brown C, Fiscus S, Frenkel L, Hamdan H, Hart S, Kovacs A, Krogstad P, LaRussa P, Sullivan J, Weinberg A, Zhao YQ ; Pediatric ACTG Sequencing Working Group : Model for assessment of proficiency of human immunodeficiency virus type 1 sequencing-based genotypic antiretroviral assays. *J Clin Microbiol* 43 : 3963-3970, 2005.
- 20) Shirasaka T, Kavlick MF, Ueno T, Gao WY, Kojima E, Alcaide ML, Chokekijchai S, Roy BM, Arnold E, Yarchoan R, Mitsuya H : Emergence of human immunodeficiency virus type 1 variants with resistance to multiple dideoxynucleosides in patients receiving therapy with dideoxynucleosides. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 : 2398-2402, 1995.
- 21) Nagai H, Wada K, Morishita T, Utsumi M, Nishiyama Y, Kaneda T : New estimation method for highly sensitive quantitation of human immunodeficiency virus type 1 DNA and its application. *J Virol Methods* 124 : 157-165, 2005.
- 22) Johnson VA, Brun-Vezinet F, Clotet B, Conway B, Kuritzkes DR, Pillay D, Schapiro J, Telenti A, Richman D : Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1. *Top HIV Med* 13 : 51-57, 2005.
- 23) Peters S, Munoz M, Yerly S, Sanchez-Merino V, Lopez-Galindez C, Perrin L, Larder B, Cmarko D, Fakan S, Meylan P, Telenti A : Resistance to nucleoside analog reverse transcriptase inhibitors mediated by human immunodeficiency virus type 1 p6 protein. *J Virol* 75 : 9644-9653, 2001.
- 24) Kaufmann GR, Suzuki K, Cunningham P, Mukaide M, Kondo M, Imai M, Zaunders J, Cooper DA : Impact of HIV type 1 protease, reverse transcriptase, cleavage site, and p6 mutations on the virological response to quadruple therapy with saquinavir, ritonavir, and two nucleoside analogs. *AIDS Res Hum Retroviruses* 17 : 487-497, 2001.
- 25) Gallego O, de Mendoza C, Corral A, Soriano V : Changes in the human immunodeficiency virus p7-p1-p6 gag gene in drug-naive and pretreated patients. *J Clin Microbiol* 41 : 1245-1247, 2003.

Control Survey of HIV-1 Genotypic Drug-resistance Testing in Japan

Seiichiro FUJISAKI¹, Saeko FUJISAKI¹, Shiro IBE¹, Tsukasa ASAGI², Toshihiro ITOH²,
Shigeru YOSHIDA³, Takao KOIKE⁴, Masayasu OIE⁵, Kanako WATANABE⁶,
Aki MASAKANE⁷, Mikio UEDA⁸, Hiroyuki GATANAGA⁹, Masakazu MATSUDA¹⁰,
Kenji SADAMASU¹¹, Mami NAGASHIMA¹¹, Kiyomi OKADA¹², Makiko KONDO¹³,
Mami HATA¹⁴, Yasushi MIZOGAMI¹⁵, Haruyo MORI¹⁶, Rumi MINAMI¹⁷,
Takuma SHIRASAKA¹⁵, Shinichi OKA⁹, Wataru SUGIURA¹⁰ and Tsuguhiro KANEDA^{1*}

¹National Hospital Organization Nagoya Medical Center, Aichi 460-0001, Japan ; ²Sendai Medical Center, Miyagi 983-8520, Japan ; ³Department of Health Sciences, Hokkaido University School of Medicine, Hokkaido 060-0812, Japan ; ⁴Department of Medicine II, Hokkaido University School of Medicine, Hokkaido 060-8638, Japan ; ⁵Department of Virology, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata 951-8510, Japan ; ⁶Section of Virus, Niigata Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences, Niigata 950-2144, Japan ; ⁷Ishikawa Prefectural Central Hospital (Japanese Foundation for AIDS Prevention), Ishikawa 920-8530 Japan ; ⁸Hematology Immunology, Ishikawa Prefectural Central Hospital, Ishikawa 920-8530 Japan ; ⁹AIDS Clinical Center, International Medical Center of Japan, Tokyo 162-8655 ; ¹⁰AIDS Research Center, ARC, National Institute of Infectious Diseases, NIID, Tokyo 208-0011 ; ¹¹Division of Virology, Department of Microbiology, Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, Tokyo 169-0073 ; ¹²KITASATO-OTSUKA Biomedical Assay Laboratories Co., Ltd., Kanagawa 228-8555, Japan ; ¹³Division of Microbiology, Kanagawa Prefectural Institute of Public Health, Kanagawa 253-0087, Japan ; ¹⁴Department of Microbiology, Aichi Prefectural Institute of Public Health, Aichi 462-8576, Japan ; ¹⁵AIDS Medical Center, National Hospital Organization Osaka National Hospital, Osaka 540-0006, Japan ; ¹⁶Division of Virology, Osaka Prefectural Institute of Public Health, Osaka 537-0025, Japan ; ¹⁷Division of Immunology and Infectious Disease, Clinical Research Institute, National Hospital Organization, Kyushu Medical Center, Fukuoka 810-8563, Japan

* Corresponding Author : Clinical Research Center, National Hospital Organization Nagoya Medical Center, 4-1-1 Sannomaru, Naka-ku, Nagoya, Aichi 460-0001, Japan

Objective : Most laboratories in Japan are performing the HIV-1 genotypic drug-resistance testing with their in-house methods based on the one developed by National Institute of Infectious Diseases. However, the quality of their methods has never been assessed. In this study, we aimed to investigate the accuracy and reliability of the testing performed in 15 laboratories in Japan.

Materials and Methods : We assessed the accuracy and reliability of the in-house testing by sending two standard HIV-1 RNA samples to 15 voluntarily participating laboratories and by analyzing the reported results.

Results : The assessment revealed that the quality of HIV-1 genotypic drug-resistance testing was very high (97.3% accuracy). But there were sources of error, including human errors, poor electrophoregrams, and use of inadequate primers.

Conclusion : We proposed troubleshooting procedures to improve the quality of drug-resistance testing in Japan.

Key words : AIDS, HIV-1, genotypic drug-resistance testing, control survey

No Observable Correlation between Central Nervous System Side Effects and EFV Plasma Concentrations in Japanese HIV Type 1-Infected Patients Treated with EFV Containing HAART

MASAAKI TAKAHASHI,^{1,2} SHIRO IBE,² YUICHI KUDAKA,¹ NAOYA OKUMURA,^{1,2}
ATSUSHI HIRANO,^{1,2} TATSUO SUZUKI,¹ NAOTO MAMIYA,² MOTOHIRO HAMAGUCHI,²
and TSUGUHIRO KANEDA²

ABSTRACT

The present study assessed the relationship between central nervous system (CNS) side effects and plasma concentrations of efavirenz (EFV) in Japanese HIV-1-infected patients. Subjects consisted of 69 HIV-1-infected patients (57 therapy-naive and 12 therapy-experienced patients) being treated using EFV in combination with other antiretroviral agents at the outpatient HIV clinic. Successful virological treatment was achieved in 61 patients. Eight patients discontinued EFV containing therapy because CNS symptoms did not resolve (four patients), EFV-specific mutations were detected (two patients), or skin rash was observed (two patients). Mean EFV plasma concentration for 61 effectively treated patients, measured at 15 h postdosing, was 2.42 $\mu\text{g/ml}$ (range: 0.78–6.82 $\mu\text{g/ml}$). This EFV concentration range contributed to suppressed viral load in these Japanese patients. Adverse CNS effects were observed in 19 patients soon after therapy onset. These effects disappeared within 1 month except for four patients who suffered severe CNS side effects. Mean EFV plasma concentrations were not significantly different between subjects with ($2.45 \pm 1.08 \mu\text{g/ml}$) and without ($2.42 \pm 1.40 \mu\text{g/ml}$) CNS side effects. We concluded no correlation existed between the plasma EFV concentration and the emergence of CNS side effects in Japanese HIV-1-infected patients. Further investigations, enforced with the drug concentration measurement at earlier time points and more appropriate assessment of CNS symptoms, are required.

INTRODUCTION

EFVIRENZ (EFV) IS ONE OF THE NONNUCLEOSIDE REVERSE TRANSCRIPTASE INHIBITORS (NNRTI) used to treat human immunodeficiency virus (HIV)-1-infected patients. This drug can be administered once daily (600 mg dose) in combination with a protease inhibitor and/or nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTI), due to its long half-life, 40–55 h.^{1–4} The advantage of once-daily dosing is a reduction in the patient's overall drug-taking burden. Thus, EFV use is expected to increase for many patients. Treatment success using EFV involves maintaining an effective drug concentration while avoiding both adverse effects and the occurrence of drug-resistant amino acid

mutations such as K103N, Y188L, and G190S.⁵ In fact, EFV plasma concentrations $<1.0 \mu\text{g/ml}$ are reportedly predictive of treatment failure with the development of genotypic resistance in European populations.⁶ Conversely, EFV induces effects on the central nervous system (CNS) such as dizziness, hallucinations (including frequent nightmares), abnormal dreams, and insomnia.^{2,7,8} Marzolini *et al.*⁹ reported central nervous system (CNS) toxicity was 3-fold more frequent in patients with EFV plasma concentrations $>4.0 \mu\text{g/ml}$ than in patients with concentrations of 1.0–4.0 $\mu\text{g/ml}$. Therefore, keeping the drug concentration trough level within 1.0–4.0 $\mu\text{g/ml}$ would likely lead to treatment success in the Japanese population. Measuring plasma concentrations of EFV is desirable in order to monitor

¹Department of Pharmacy and ²Clinical Research Center, National Hospital Organization Nagoya Medical Center (Tokai Area Central Hospital for AIDS Treatment and Research), Nagoya, Japan.

the occurrence of adverse effects and adherence in EFV containing highly active antiretroviral therapy (HAART). However, when the focus is on outpatients, measuring exact EFV trough levels is difficult since patients take this drug in the evening. We, therefore, measured concentrations 15 h after dosing, instead of at the trough levels. This study assessed the relationship between CNS side effects and plasma concentrations of EFV in Japanese HIV-1 infected patients.

MATERIALS AND METHODS

Patients

Subjects consisted of 69 HIV-1 infected patients (57 therapy-naïve patients and 12 therapy-experienced patients) recruited at the Outpatient HIV Clinic of the National Hospital Organization Nagoya Medical Center, Japan, between May 2001 and May 2006. There were 60 men and 9 women, with a mean age of 40 years (range: 24–74 years). The characteristics of these recruited patients are displayed in Table 1. Subjects were treated using EFV (600 mg/day) in combination with other antiretroviral agents. Mean therapy duration was 19 months (range: 1–59 months). Protease inhibitors were administered to five patients (lopinavir/ritonavir: four patients and atazanavir/ritonavir: one patient). Upon initiation of EFV-containing therapy, the mean CD4 cell count was 349 cells/mm³ and the mean viral load was 559,009 copies/ml. Cases with CD4 cell counts <200 cells/mm³ at initiation of therapy were defined as acquired immunodeficiency

syndrome (AIDS), according to the guidelines.¹⁰ Using this definition, 44 patients were AIDS cases. This study was approved by the institutional review board of the National Hospital Organization Nagoya Medical Center, and each subject provided written informed consent.

EFV plasma level and genotypic drug resistance testing

Sampling for the determination of EFV plasma concentrations was performed in the afternoon at the outpatient HIV clinic. As EFV was administered in the evening for all patients, EFV plasma levels were measured at approximately 15 h post-dosing. We assumed EFV trough levels are similar to 15 h post-dosing plasma levels as EFV has a long half-life.^{1,2} EFV plasma concentrations were determined by high-performance liquid chromatography according to our previously described methods.¹¹ We measured EFV plasma concentrations 10 times on average (range: 3–37 times) for therapy-continued patients and 3 times on average (range: 1–6 times) for therapy-discontinued patients. The value of EFV plasma concentration was shown as mean \pm standard deviation (SD). Genotypic drug resistance testing of HIV-1 was performed according to our previously reported methods.^{12,13}

CNS adverse effects

CNS symptoms were assessed using a psychiatric interview and the Symptom Check List-90-Revised (SCL-90-R) questionnaire, a widely used scale in psychopathology.¹⁴ Upon initiation of EFV containing therapy, we thoroughly explained CNS adverse effects of EFV to patients. When the patients consulted a physician on week 4 after initiating therapy, we had an interview with the patients according to the items of the SCL-90-R questionnaire, and evaluated psychological problems and psychopathological symptoms. Afterward, CNS symptom assessment was carried out every month. The SCL-90-R test contains only 90 items and can be completed in just 10–15 min. All the patients answered the 90 items of SCL-90-R completely.

RESULTS

EFV plasma concentrations during therapy

EFV concentrations were measured once a month or at least once every 3 months. The distribution of mean values is shown in Fig. 1. Mean EFV plasma concentration varied from patient to patient (range: 0.78–6.82 μ g/ml) (57 therapy-naïve patients: #1–57 and 12 therapy-experienced patients: #58–69). In this study 61 patients continued EFV-containing therapy and approached successful virological suppression to the detection limit of 50 copies/ml. Unfortunately, three patients had stopped EFV-containing therapy within 2 weeks after therapy was initiated. Discontinuation was due to hallucinations in one patient (#1) and skin rash in two patients (#2 and 3). Three patients discontinued EFV-containing therapy because CNS symptoms did not resolve after the first 1–2 months of therapy (#6, 39, and 47). Two patients with virological failure (>400 copies/ml) changed HAART combination because EFV-specific mutations were detected (#64: G190A and #67: L100I, G190A). Mean EFV plasma concentration for the 61 effectively treated pa-

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF 69 RECRUITED PATIENTS^a

Characteristics	n = 69
Age (years) (mean \pm SD)	40 \pm 11
Sex	
Male (n)	60 (87%)
Female (n)	9 (13%)
Weight (kg) (mean \pm SD)	57 \pm 12
Therapy-naïve (n)	57 (83%)
Therapy-experienced (n)	12 (17%)
Duration of EFV containing therapy (months) (mean \pm SD)	19 \pm 16
CD4 counts (cells/mm ³) (mean \pm SD)	349 \pm 226
HIV-RNA (copies/ml) (mean \pm SD)	559,009 \pm 2,707,415
AIDS diagnosis (n)	44 (64%)
PI coadministration (n)	5 (7%)
Viral failure: >400 copies/ml (n)	2 (3%)
CNS side effects (n)	19 (28%)
Discontinuation ^b (n)	3 (4%)
Drop out ^c (n)	3 (4%)

^aSD, standard deviation; EFV, efavirenz; AIDS, acquired immunodeficiency syndrome; PI, protease inhibitor; CNS, central nervous system.

^bPatients refused EFV-containing therapy because CNS symptoms did not resolve after the first 1–2 months of therapy.

^cThe discontinuation was due to skin rash in two patients and hallucinations in one patient.

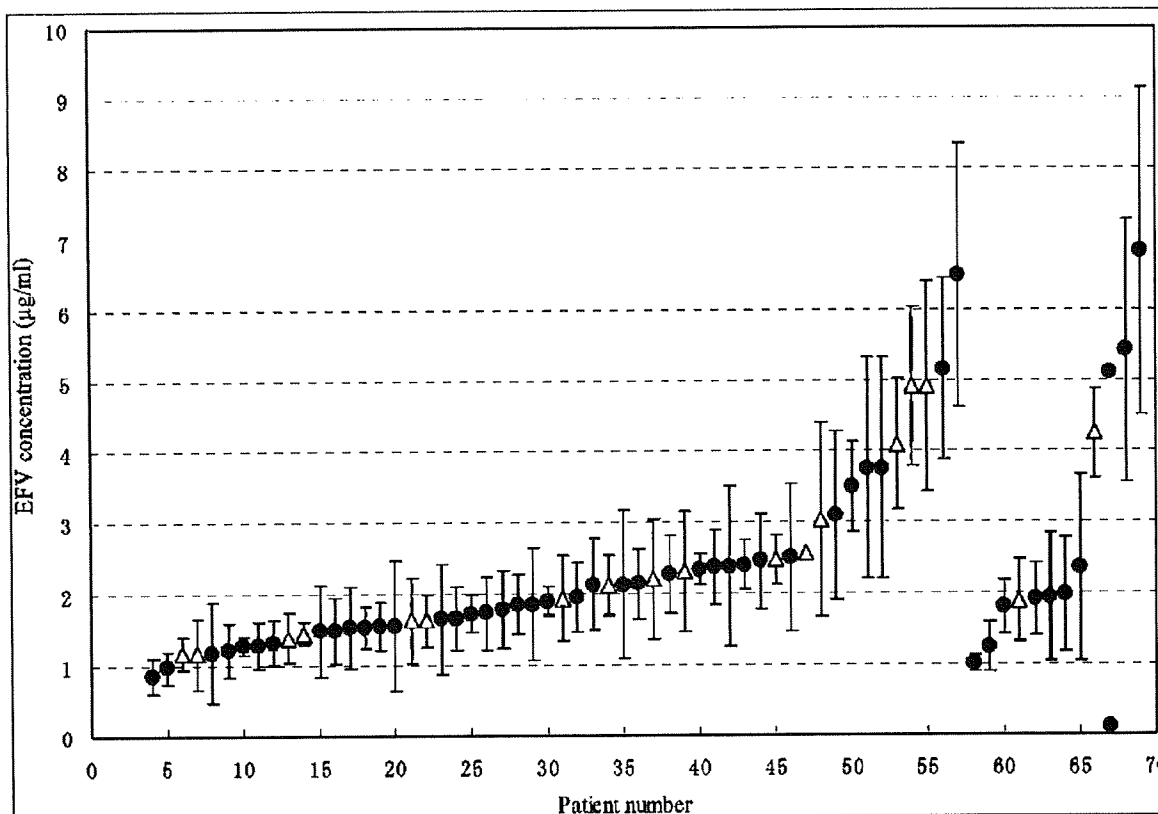


FIG. 1. Distribution of EFV plasma concentrations in 69 recruited patients. Patients #1–57 were therapy naive and #58–69 were therapy experienced. Closed circles, patients without CNS side effect; open triangles, patients with CNS side effect. Patients #6, 39, and 47 discontinued EFV-containing therapy because CNS symptoms did not resolve. Patients #64 and 67 changed HAART combination because EFV-specific mutations were detected. The EFV plasma concentration of patient #47 was measured only once. Measurement of EFV plasma concentration was performed twice on patient #67, as the EFV concentration was 5.1 µg/ml and undetectable (<0.1 µg/ml). The measurement could not be done in patients #1, 2, and 3 because of early drop out from this study.

tients, measured at 15 h postdosing, was 2.42 µg/ml (2.32 ± 1.14 µg/ml for 51 therapy-naïve patients and 2.93 ± 1.94 µg/ml for 10 therapy-experienced patients).

CNS side effects

Adverse CNS effects were observed in 19 patients soon after the onset of therapy. CNS adverse events are shown in Table

2. These adverse events were assessed by a psychiatric interview according to the items of the SCL-90-R questionnaire 4 weeks after initiating therapy. The major adverse events were abnormal dreams (*n* = 9), dizziness (*n* = 4), and nervousness (*n* = 3). These effects disappeared within 1 month except for four patients with severe CNS side effects. Mean EFV plasma concentrations were not significantly different between subjects with (2.45 ± 1.08 µg/ml) and without (2.42 ± 1.40 µg/ml)

TABLE 2. CENTRAL NERVOUS SYSTEM ADVERSE EVENTS (*n* = 69)

Adverse events ^a	n (%)	Patient no.
Abnormal dreams	9 (13.0)	7, 13, 21, 22, 31, 45, 54, 55, 61
Dizziness	4 (5.8)	6, 47, 48, 66
Nervousness	3 (4.3)	14, 39, 53
Difficulty in sleeping	1 (1.4)	34
Loss of libido	1 (1.4)	37
Hallucinations	1 (1.4)	1

^aThese adverse events were assessed by a psychiatric interview according to the items of the SCL-90-R questionnaire 4 weeks after initiating therapy.

TABLE 3. COMPARISON WITH PREVIOUS REPORTS IN TERMS OF CORRELATION BETWEEN EFFICACY OR SIDE EFFECT OCCURRENCE AND EFV PLASMA CONCENTRATION^a

	Langmann et al. ⁶	Marzolini et al. ⁹	Gutierrez et al. ¹⁵	Fumaz et al. ¹⁶	Ours
Patients (n)	33	130	17	60	69
Age (year) [mean ± SD (range)]	NA	(23–74)	40	41 ± 8	40 ± 11 (24–74)
Male (n)	NA	93 (72%)	14 (82%)	45 (75%)	60 (87%)
Female (n)	NA	37 (28%)	3 (18%)	15 (25%)	9 (13%)
Duration of therapy (months) [mean ± SD (range)]	12 (3–40)	NA	18	23 ± 10	19 ± 16 (1–59)
Treatment success (n)	27 (82%)	99 (76%)	13 (76%)	44 (73%)	61 (88%)
With CNS side effect (n)	NA	13 (10%)	10 (59%)	32 (53%)	19 (28%)
Mean EFV plasma level (µg/ml) [mean ± SD (range)]	3.12 ± 2.50	2.19 (median)	4.12 ± 2.51	NA	2.43 ± 1.31
With CNS side effect (µg/ml) [mean ± SD (range)]	NA	NA	5.10 ± 2.15	2.5 ± 1.1	2.45 ± 1.08
Without CNS side effect (µg/ml) [mean ± SD (range)]	NA	NA	2.79 ± 1.31	2.7 ± 0.7	2.42 ± 1.40

^aNA, not available; SD, standard deviation; EFV, efavirenz; CNS, central nervous system.

CNS side effects ($p = 0.503$). Also, there was no association between CNS side effects and EFV plasma concentrations greater than 4.0 µg/ml.

Comparison with previously reported correlations between efficacy or side effect occurrence and EFV plasma concentration

We compared our results with previous reports (Table 3). Langmann *et al.*⁶ and Marzolini *et al.*⁹ reported that treatment failure and CNS side effects were associated with low (<1.0 µg/ml) and high (>4.0 µg/ml) EFV plasma levels, respectively. Also Gutierrez *et al.*¹⁵ reported that patients achieving higher EFV plasma levels were at increased risk of experiencing CNS adverse events. On the other hand, Fumaz *et al.*¹⁶ reported EFV plasma levels were similar in subjects with and without CNS side effects.

In our study, 61 patients with treatment success had an EFV plasma concentration greater than 0.78 µg/ml, similar to previous European findings.⁶ CNS side effects were observed in 19 of 69 patients and the rate of side effect occurrence (28%) was low in comparison with previous trials.^{2,15,16} Mean EFV plasma levels were similar in subjects with (2.45 ± 1.08 µg/ml) and without (2.42 ± 1.40 µg/ml) CNS side effects. In terms of correlation between side effect occurrence and EFV plasma concentration, our results concurred with Fumaz *et al.*¹⁶

DISCUSSION

EFV is an NNRTI drug used in the treatment of HIV-1-infected patients and can be administered once daily due to its long half-life. Therefore, there has been a recent increase in EFV-containing HAART regimens. However, as EFV is associated with CNS adverse effects such as dizziness, hallucinations (including frequent nightmares), abnormal dreams, and insomnia, EFV should be used carefully. This study assessed the relationship between CNS side effects and

plasma EFV concentrations in Japanese HIV-1-infected patients by measuring its concentration at 15 h postdosing. Successful virological suppression was achieved in 61 of the 69 subjects, with viral load suppressed below detectable limits. Mean EFV levels showed extensive variation from 0.78 µg/ml to 6.82 µg/ml. This variation may be explained, in part, by the large interindividual variations in cytochrome P450 2B6 activity, as EFV is a substrate of this enzyme.^{17–19} Actually, as has been reported, homozygous CYP2B6*6 correlates with high plasma EFV concentrations in HIV-1-infected patients.^{20,21} Thus, we should study CYP2B6 genotyping in the future.

In the present study, adverse CNS effects, such as nervousness, abnormal dreams, and insomnia, were observed in 19 patients using EFV. In previous controlled trials, CNS symptoms were observed in 53% of patients receiving EFV and in 25% of patients receiving control regimens.² These symptoms usually appear from day 1 or 2 of therapy, resolving after the first 2–4 weeks, and are reportedly associated with high EFV plasma concentrations (>4.0 µg/ml).⁹ However, the present study could not detect any such clear associations.

Finally, we conclude no correlation existed between the plasma EFV concentration and the emergence of CNS side effects in Japanese HIV-1-infected patients as reported by Fumaz *et al.*¹⁶ in a European population. Recently, however, Clifford *et al.*²² performed a large prospective trial on patients initiating EFV, concluding adverse CNS effect occurrence correlated to EFV plasma concentrations only in the first week after therapy was initiated and not later on. As we assessed CNS symptoms 4 weeks after initiating EFV, we cannot exclude the possibility that there is no correlation between plasma EFV concentration and CNS side effects. To clarify the clinical significance of EFV concentration determination in monitoring of CNS side effects, further investigations enforced with EFV concentration measurements at earlier time points and more appropriate assessment of CNS symptoms on larger subject population are required.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported in part by Health Science Research Grants for Research on HIV/AIDS from the Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan (H13-AIDS-001 and H16-AIDS-002 to T.K., and H15-AIDS-022 to M.H.).

REFERENCES

- Adkins JC and Noble S: Efavirenz. *Drugs* 1998;56:1055-1064.
- Bristol-Myers Squibb Company: Product information. Sustiva (efavirenz). Princeton, NJ, 2003.
- Starr SE, Fletcher CV, Spector SA, Yong FH, Fenton T, Brundage RC, Manion D, Ruiz N, Gersten M, Becker M, McNamara J, Mofenson LM, Purdue I, Siminski S, Graham B, Kornhauser DM, Fiske W, Vincent C, Lischner HW, Dankner WM, and Flynn PM: Combination therapy with efavirenz, nelfinavir, and nucleoside reverse-transcriptase inhibitors in children infected with human immunodeficiency virus type 1. *Pediatric AIDS Clinical Trials Group 382 Team. N Engl J Med* 1999;341:1874-1881.
- Staszewski S, Morales-Ramirez J, Tashima KT, Rachlis A, Skiest D, Stanford J, Stryker R, Johnson P, Labriola DF, Farina D, Manion DJ, and Ruiz NM: Efavirenz plus zidovudine and lamivudine, efavirenz plus indinavir, and indinavir plus zidovudine and lamivudine in the treatment of HIV-1 infection in adults. Study 006 Team. *N Engl J Med* 1999;341:1865-1873.
- Johnson VA, Brun-Vezinet F, Clotet B, Conway B, Kuritzkes DR, Pillay D, Schapiro J, Telenti A, and Richman D: Update of the drug resistance mutations in HIV-1: 2005. *Top HIV Med* 2005;13:51-57.
- Langmann P, Weissbrich B, Desch S, Vath T, Schirmer D, Zilly M, and Klunker H: Efavirenz plasma levels for the prediction of treatment failure in heavily pretreated HIV-1 infected patients. *Eur J Med Res* 2002;7:309-314.
- Nunez M, Gonzalez de Requena D, Gallego L, Jimenez-Nacher I, Gonzalez-Lahoz J, and Soriano V: Higher efavirenz plasma levels correlate with development of insomnia. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2001;28:399-400.
- Gallego L, Barreiro P, del Rio R, Gonzalez de Requena D, Rodriguez-Albarino A, Gonzalez-Lahoz J, and Soriano V: Analyzing sleep abnormalities in HIV-infected patients treated with efavirenz. *Clin Infect Dis* 2004;38:430-432.
- Marzolini C, Telenti A, Decosterd LA, Greub G, Biollaz J, and Buclin T: Efavirenz plasma levels can predict treatment failure and central nervous system side effects in HIV-1-infected patients. *AIDS* 2001;15:71-75.
- The Panel on Clinical Practices for Treatment of HIV Infection convened by the Department of Health and Human Services (DHHS): Published at <http://AIDSinfo.nih.gov>. 7 April 2005.
- Takahashi M, Yoshida M, Oki T, Okumura N, Suzuki T, and Kaneda T: Conventional HPLC method used for simultaneous determination of the seven HIV protease inhibitors and nonnucleoside reverse transcription inhibitor efavirenz in human plasma. *Biol Pharm Bull* 2005;28:1286-1290.
- Ibe S, Hotta N, Takeo U, Tawada Y, Mamiya N, Yamanaka K, Utsumi M, and Kaneda T: Prevalence of drug-resistant human immunodeficiency virus type 1 in therapy-naive patients and usefulness of genotype testing. *Microbiol Immunol* 2003;47:499-505.
- Ibe S, Shibata N, Utsumi M, and Kaneda T: Selection of human immunodeficiency virus type 1 variants with an insertion mutation in the p6(gag) and p6(pol) genes under highly active antiretroviral therapy. *Microbiol Immunol* 2003;47:71-79.
- Starcevic V, Bogojevic G, and Marinkovic J: The SCL-90-R as a screening instrument for severe personality disturbance among outpatients with mood and anxiety disorders. *J Personal Disord* 2000;14:199-207.
- Gutierrez F, Navarro A, Padilla S, Anton R, Masia M, Borrás J, and Martín-Hidalgo A: Prediction of neuropsychiatric adverse events associated with long-term efavirenz therapy, using plasma drug level monitoring. *Clin Infect Dis* 2005;41:1648-1653.
- Fumaz CR, Muñoz-Moreno JA, Molto J, Negro E, Ferrer MJ, Siraera G, Perez-Alvarez N, Gomez G, Burger D, and Clotet B: Long-term neuropsychiatric disorders on efavirenz-based approaches: Quality of life, psychologic issues, and adherence. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005;38:560-565.
- Lang T, Klein K, Fischer J, Nussler AK, Neuhaus P, Hofmann U, Eichelbaum M, Schwab M, and Zanger UM: Extensive genetic polymorphism in the human CYP2B6 gene with impact on expression and function in human liver. *Pharmacogenetics* 2001;15:399-415.
- Stahle L, Moberg L, Svensson JO, and Sonnerborg A: Efavirenz plasma concentrations in HIV-infected patients: Inter- and intraindividual variability and clinical effects. *Ther Drug Monit* 2004;26:267-270.
- Haas DW, Ribaudo HJ, Kim RB, Tierney C, Wilkinson GR, Gulick RM, Clifford DB, Hulgan T, Marzolini C, and Acosta EP: Pharmacogenetics of efavirenz and central nervous system side effects: An Adult AIDS Clinical Trials Group study. *AIDS* 2004;18:2391-2400.
- Tsuchiya K, Gatanaga H, Tachikawa N, Teruya K, Kikuchi Y, Yoshino M, Kuwahara T, Shirasaka T, Kimura S, and Oka S: Homozygous CYP2B6 *6 (Q172H and K262R) correlates with high plasma efavirenz concentrations in HIV-1 patients treated with standard efavirenz-containing regimens. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;319:1322-1326.
- Rotger M, Colombo S, Furrer H, Bleiber G, Buclin T, Lee BL, Keiser O, Biollaz J, Decosterd L, and Telenti A: Swiss HIV Cohort Study: Influence of CYP2B6 polymorphism on plasma and intracellular concentrations and toxicity of efavirenz and nevirapine in HIV-infected patients. *Pharmacogenet Genomics* 2005;15:1-5.
- Clifford DB, Evans S, Yang Y, Acosta EP, Goodkin K, Tashima K, Simpson D, Dorfman D, Ribaudo H, and Gulick RM, the A5097s study team: Impact of efavirenz on neuropsychological performance and symptoms in HIV-infected individuals. *Ann Intern Med* 2005;143:714-721.

Address reprint requests to:

Tsuguhiro Kaneda

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

E-mail: kanedat@nnh.hosp.go.jp

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よ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/μL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/2×1）を15日間行った後に維持療法（900mg/1×1）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/μL）	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（×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：ホスアンプレナビル，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/μL）	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（×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

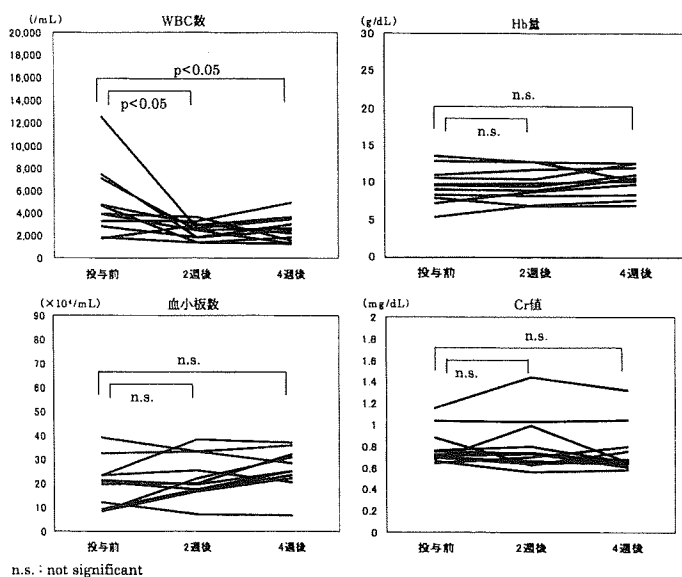


図1 バルガンシクロビル投与前後の検査値の比較

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える。

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 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 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