

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

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

## RESULTS

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

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

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

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

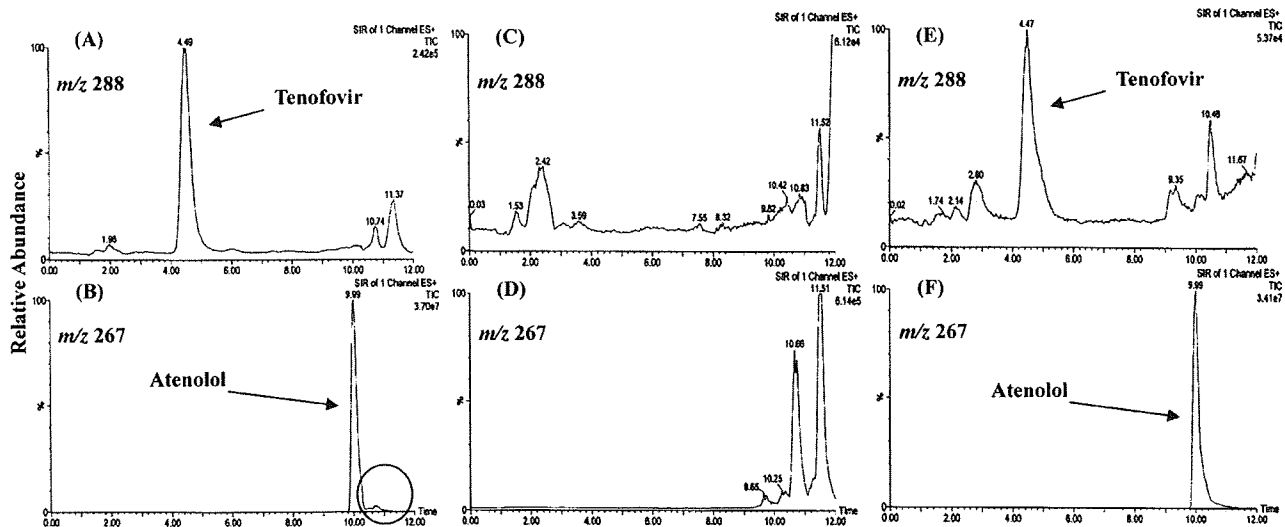


Fig. 1. Selected-Ion Recording Chromatograms for Tenofovir and Atenolol

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

Table 1. Intraday and Interday Precision and Accuracy for Tenofovir

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

RSD, relative standard deviation.

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

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

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

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

## DISCUSSION

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

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

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

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

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

## REFERENCES

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

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

Masaaki TAKAHASHI,<sup>a,b</sup> Yuichi KUDAKA,<sup>a,b</sup> Naoya OKUMURA,<sup>a,b</sup> Atsushi HIRANO,<sup>a,b</sup> Kazuhide BANNO,<sup>a</sup> and Tsuguhiko KANEDA<sup>\*,b</sup>

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

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

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

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

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

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

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

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

### MATERIALS AND METHODS

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

**Chromatography** The HPLC system consisted of a Waters pump (model 515), a 717 plus autosampler, and a 2487 dual  $\lambda$  absorbance detector coupled to the Empower<sup>TM</sup> software (Waters, Milford MA, U.S.A.). The analytical column was a Radial-Pak Nova-Pak C<sub>18</sub> column (4  $\mu\text{m}$ , 8 $\times$ 100 mm, Waters) protected by Guard-Pak Inserts Nova-Pak C<sub>18</sub> precolumn. Absorbance was measured at 205 nm and separations were performed at 30  $^\circ\text{C}$ . The mobile phase consisted of 39% 50 mM phosphate buffer (pH 5.9), 22% methanol and 39% acetonitrile. The assay run time was 30 min with a flow rate of 1.8 ml/min. Drugs were quantified by measuring the peak areas under the chromatograms. The other equipment and methodology used in this study have been described in our previous report.<sup>10</sup>

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

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

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

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

## RESULTS

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

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

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

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

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

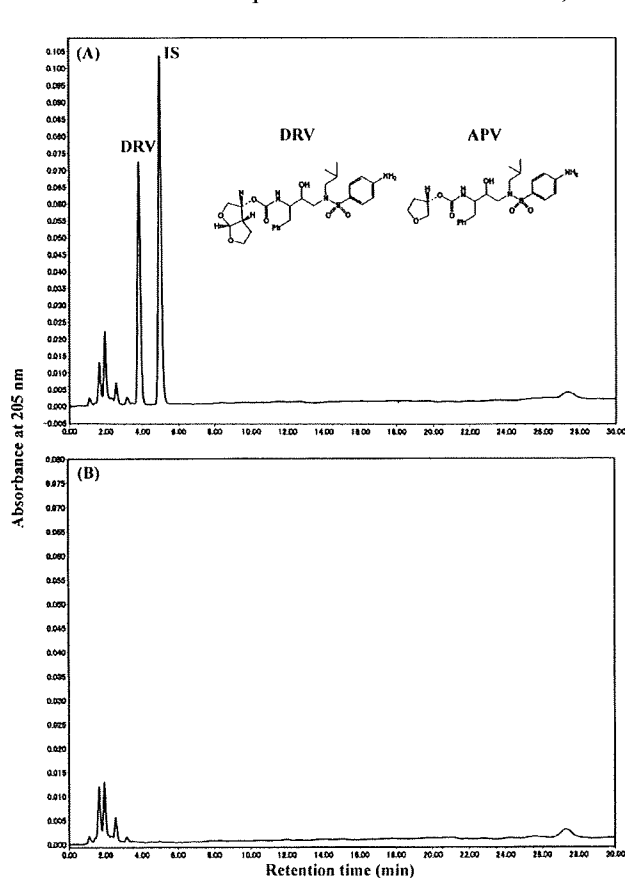


Fig. 1. Chromatograms Obtained after Extraction of (A) Spiked Plasma Sample Containing 5.18  $\mu\text{g/ml}$  of DRV and (B) Drug-Free Human Plasma Sample from a Healthy Volunteer

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

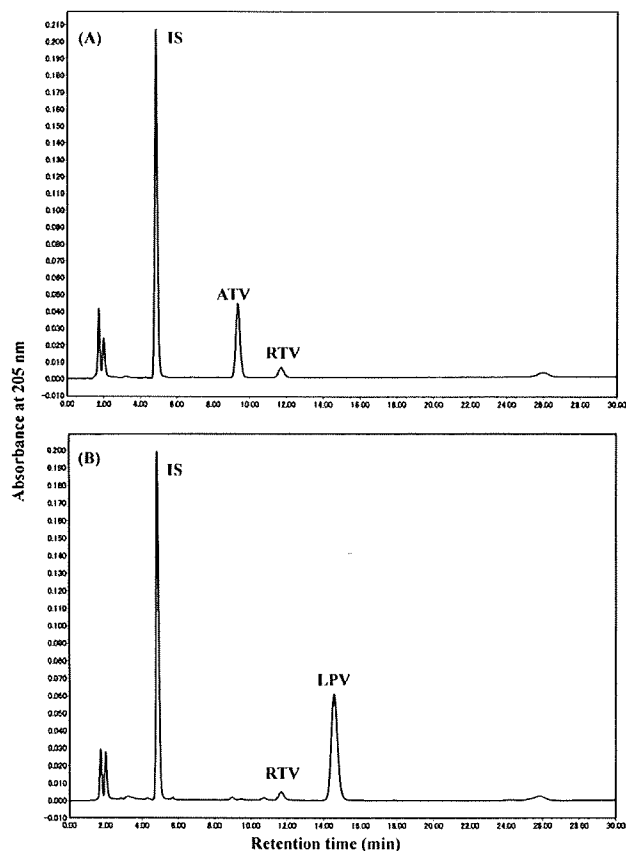


Fig. 2. Chromatograms Obtained after Extraction of a Plasma Sample from an HIV-1-Infected Patient (A) Treated with Atazanavir, Abacavir, Lamivudine and Ritonavir, and (B) Treated with Lopinavir, Ritonavir, Tenofovir and Zidovudine

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

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

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

CV, coefficient of variation.

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

## DISCUSSION

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

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

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

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

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

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

## REFERENCES

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

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

小柏 均<sup>1)</sup> 永井 裕美<sup>2)</sup> 近藤 恭子<sup>2)</sup> 加堂 真由<sup>2)</sup> 伊部 史朗<sup>2)</sup>  
一三武二郎<sup>1,2)</sup> 玉村 和規<sup>1)</sup> 間宮 均人<sup>2,3)</sup> 金田 次弘<sup>2)</sup>

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

Hitoshi OGASHIWA<sup>1)</sup> Hiromi NAGAI<sup>2)</sup> Kyoko KONDO<sup>2)</sup> Mayu KADO<sup>2)</sup> Shiro IBE<sup>2)</sup>  
Takejiro KAZUMI<sup>1,2)</sup> Kazunori TAMAMURA<sup>1)</sup> Naoto MAMIYA<sup>2,3)</sup> Tsuguhiro KANEDA<sup>2)</sup>

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



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

## キーワード

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

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

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

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

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

患者の増加に伴い、臨床の現場においてその対策の重要性がさらに高まってくると予測される。従来のニューモシスチス肺炎の確定診断は患者呼吸器材料から病原体を証明することであり、クロコット染色、トリインブルーO染色、ギムザ染色、蛍光抗体染色等の特殊染色にて顕微鏡法で肉眼的に病原体を検出することであった<sup>1,2)</sup>。しかし、顕微鏡による病原体の証明は検体中に菌量が多い場合には有効だが、菌量が少ない材料では検出に限界がある。特にギムザ染色は特異的な染色法ではないため、かなり経験を積まないと容易に見落としてしまう可能性がある<sup>3)</sup>。また、われわれ検査技師は検査科内配置替えがあり担当技師の異動がある。熟練者が異動した後、次の担当者が習熟するまでには相当の時間を要するため、その期間、診断率が低下することが十分に考えられる。加えて、顕微鏡による病原体の証明は感度が低い検査者によって結果が異なることがあり、診断性に欠ける検査法である。そこで、確実にニューモシスチス肺炎を診断できる検査法の開発が待たれている。

要  
約

## I 目 的

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

報告する。

## II 材料・方法および対象

### 1. 材料・方法

#### 1) 材料からのDNA抽出

ニューモシスチス肺炎が疑われた患者から得た呼吸器材料を喀痰溶解剤で約30分間室温にて攪拌し完全に溶解した。ここで、溶解不十分の場合は溶解時間を延長し、完全に粘性を溶解することが重要である<sup>7)</sup>。溶解後、沈査をphosphate buffered saline(PBS)で2回洗浄し、洗浄後、沈査を1,670×gで15分間遠心し、沈査を回収した。その沈査200 $\mu$ lからDNA抽出を行った。筆者らは市販されている商業キット(QIAamp DNA Mini Kit:キアゲン)を用いた。抽出したDNAは総量50 $\mu$ lになるように蒸留水で溶解した。

#### 2) 標準物質の作成

ニューモシスチス肺炎確定患者(蛍光染色法強陽性)の気管支洗浄液から、DNAを抽出し、PCRにより*P. jirovecii* MSG遺伝子領域(1024bp)を増幅した。PCR反応液の組成は500nM F-Pc-Stdプライマー(フォワード、5'-CTT CGA GGA AAG CTG AGT GA-3')、500nM R-Pc-Stdプライマー(リバーズ、5'-ACT CTT TCC TGT CCT ACC CT-3')、1×LA Taq Buffer、各2.5mM dNTP、1U LA Taq、2.5mM MgCl<sub>2</sub>、蒸留水、サンプルDNA溶液で全量は50 $\mu$ lに調整した。温度条件はまず96℃で1分間加温し、95℃1分:65℃1分:72℃1分を42サイクル行い、最終伸長反応を72℃で10分間行った。その後、大腸菌用クローニングベクターであるpUC118へ組み込んで環状DNAを作製し、それを標準DNA物質(スタンダード)とした。

#### 3) リアルタイムPCRのプライマーおよびプローブ

プライマーはHuangらが*P. jirovecii*特異性が高いと報告したMSGプライマー(JKK14, 15, 17)を参考にし<sup>7-10)</sup>、新たに設計した。各プライマーはF-PCogaプライマー(フォワード、5'-TGG GTT ACA CAG ACA TCG ACA CA-3')、R-PC-ogaプライマー(リバーズ、5'-TGC ACC GCC TCG TTG AT-3')を用いた。プローブは汎用度が高く、標的配列の特異的検出に優れたTaqManプローブを用いた。TaqMan

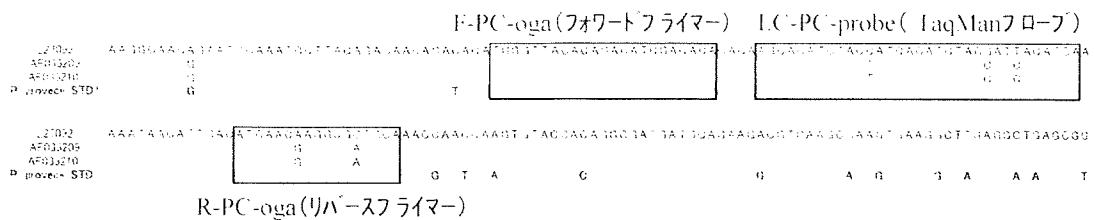


図1 プライマー・プローブ設定箇所

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

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

#### 4) リアルタイムPCR

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

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

#### 2. 対象

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

### III 結果

#### 1. 検量線

図3に今回得られた蛍光強度曲線と検量線を示した。蛍光強度曲線のグラフは縦軸が蛍光強度、横軸がサイクル数を示している。コピー数の高い順に蛍光強度曲線が早く立ち上がり、10<sup>1</sup>~10<sup>10</sup>コピーの範囲で良好な検量線を得ることができた。濃度既知の標準DNA物質の希釈系列を用いて作製した検量線(Crossing Point vs log濃度)を利用し、サンプルのCrossing Point(CP)からコピー数を算出する。ここでのCPとは各検体を用いて測定した際に一定の蛍光強度を発するまでにかかったPCRサイクル数である。

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

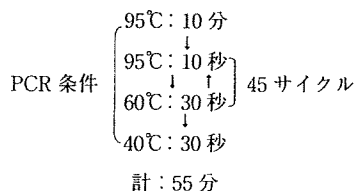


図2 リアルタイムPCRの反応液組成とPCR条件



表 1 対象症例

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

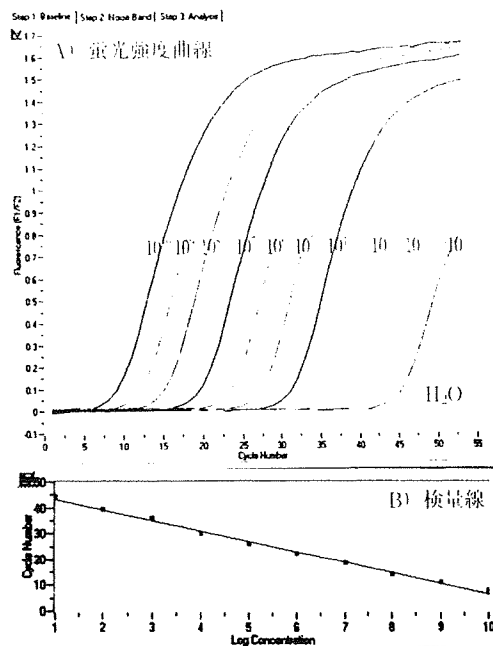


図 3 蛍光強度曲線および検量線

A) 増幅中の蛍光強度曲線: 縦軸が蛍光強度, 横軸がサイクル数である. コピー数の高い順に蛍光強度が上昇し始め, 陰性コントロール(H<sub>2</sub>O)では 50 サイクルを超えても蛍光強度は上昇しなかった.  
B) 検量線: 10<sup>1</sup>~10<sup>10</sup> コピーの範囲で良好な検量線が得られた.

表 2 定量再現性

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

STD: 標準 DNA 物質, SD: 標準偏差, CV: 変動係数.

## 2. 再現性

スタンダードを用いて再現性・正確性の検討(N=15)を行った結果を表2に示した。スタンダード $10^8$ MSGコピーではMean:110,101,667MSGコピー(回収率110%)、 $10^7$ MSGコピーではMean:9,502,067MSGコピー(95%)、 $10^6$ MSGコピーではMean:1,008,693MSGコピー(101%)、 $10^5$ MSGコピーではMean:99,547MSGコピー(100%)、 $10^4$ MSGコピーではMean:9,837MSGコピー(98%)、 $10^3$ MSGコピーではMean:959MSGコピー(96%)、 $10^2$ MSGコピーではMean:103MSGコピー(103%)、 $10^1$ MSGコピーではMean:14MSGコピー(140%)と良好な結果を得ることができ、十分な精度での定量が可能であった。変動係数(CV%)は4.4~21.4%であり、低濃度( $10^1$ MSGコピー)にて高い傾向を認め、 $10$ コピーが検出限界と思われた。

## 3. 症例および対照検体

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

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

表3 測定結果

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

nd: 感度以下。

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

## 4. 経時的定量測定

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

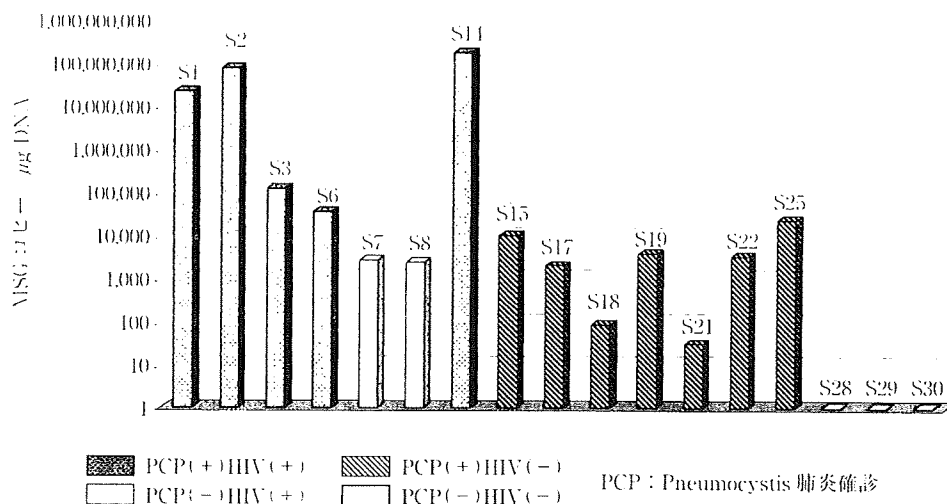


図4 リアルタイムPCR法陽性症例の比較

HIV 感染患者 5 例 (S1, 2, 3, 6, 14)、非 HIV 感染患者 7 例 (S15, 17, 18, 19, 21, 22, 25) でニューモシスチス肺炎の確定診断が得られた。HIV 感染患者においては、ニューモシスチス肺炎を発症した場合、 $3.7 \times 10^4 \sim 1.8 \times 10^8$  コピー/μg DNA と高値となり、一方、ニューモシスチス肺炎と考えにくい症例 (S7, 8) では  $2.6 \times 10^3 \sim 2.1 \times 10^4$  コピー/μg DNA と比較的低値を示した。従来の定性 PCR 法で陽性を示し診断が困難であった HIV 感染患者では、リアルタイム PCR 法で定量することにより陽性であっても  $10^4$  コピー/μg DNA 以下はニューモシスチス肺炎を否定できると思われる。非 HIV 感染患者の場合ニューモシスチス肺炎発症例では  $3.0 \times 10^4 \sim 2.3 \times 10^5$  コピー/μg DNA と病原体量が少ない傾向にあり、リアルタイム PCR 法で陽性であれば、ニューモシスチス肺炎が発症したと考えられる結果であった。健康者 3 例 (S28, 29, 30) ではほとんど感度以下であった。

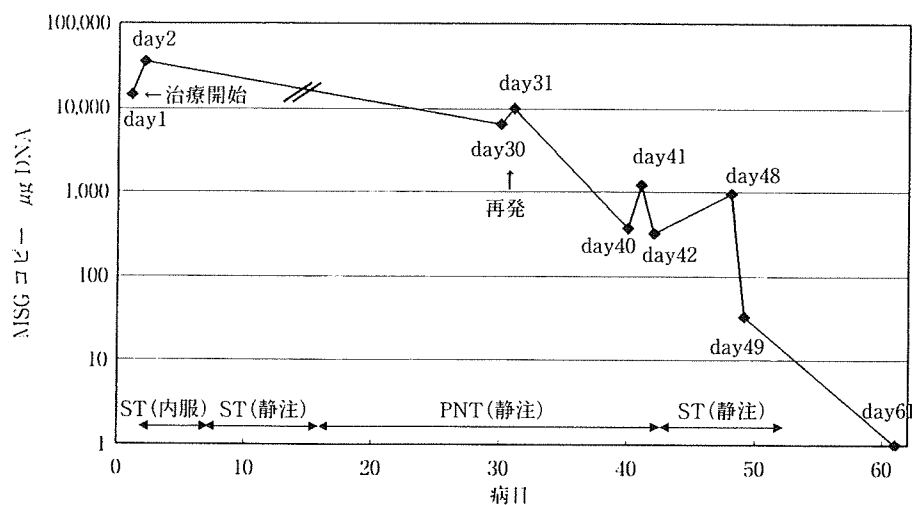


図5 経時的測定結果

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

ST: Sulfamethoxazole/Trimethoprim, PNT: Pentamidine.

9.8×10<sup>4</sup> コピー/μg DNA と高コピーであった(day 31)のでニューモシスチス肺炎の再発と診断し、投薬の延長を行った。その後、症状の改善とともに定量値も減少した。ニューモシスチス肺炎が終焉に向かうにつれて *P. jirovecii* 量の減少傾向が認められ、最終的には感度以下(day 61)となった。抗 *P. jirovecii* 薬投与後(発症後)、経時的に喀痰を採取し、リアルタイム PCR 法で定量することによって病原体量の消長を確認することが可能であった。

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

#### IV 考 察

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

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

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

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

#### V 今後の課題

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

本論文の要旨は第 18 回日本エイズ学会において一般演題として発表した。

#### 謝辞

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

#### 文献

- 1) 後藤美江子: *Pneumocystis sp.* の直接塗抹標本を用いた迅速染色法検査, 臨床と微生物 2004; 31(増刊号): 554-558.
- 2) 吉田幸雄: ニューモシスチス カリニ, 図説人体寄生虫学 第 6 版, 72-82, 南山堂, 2002
- 3) James R, Stringer: *Pneumocystis carinii* What Is It Exactly?, Clinical Microbiology reviews 1996; 9: 489-498.
- 4) 藤田紘一郎: 所属不明原虫類 ニューモシスチス, 臨床検査学講座 医動物学, 91-92, 医歯薬出版, 2003
- 5) 北田一博, 中村義一: *Pneumocystis carinii*, 臨床検査 1993; 37(2): 154-157.
- 6) 安岡 彰: 診断・治療と遺伝子検査 微生物の検出・同定…細菌, 真菌 *Pneumocystis carinii*, 臨床と微生物 1999; 26(増刊号): 614-617.
- 7) Sheng N. Huang, Steven H. Fischer: Development of a PCR

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

## 第20回日本エイズ学会シンポジウム記録

## シンポジウム3 「より良いHAARTに向けて」

### Symposium 3 “Strategies for Better Results of HAART”

## 司会の言葉

司会 東京通信病院 木村 哲

Satoshi KIMURA

国立病院機構大阪医療センター HIV/AIDS 先端医療開発センター 白阪 琢磨

Takuma SHIRASAKA

日本でHAARTが可能になってからほぼ10年になる。HAARTはHIV感染症・エイズの臨床経過を一変させた。患者の生命予後は著しく改善され、かつての「死に至る感染症」は「コントロール可能な慢性感染症」へと変貌を遂げた。

しかし、周知の如く、服薬開始後初期の副作用はもとより、長期服薬中に生じてくる代謝異常や中枢神経系の副作用はアドヒアランスを危うくし、また、HAARTの継続を難しくする。比較的最近まで、服薬の難しさもアドヒアランスを妨げていた。アドヒアランスの低下は耐性ウイルスの出現を招くのみならず、耐性ウイルスの蔓延に繋がる深刻な問題である。耐性検査は何時行い、その結果をどう解釈すべきかを担当医は正しく理解していなければならない。

HAARTは何時、どのような組み合わせで開始するのが理想的なのか、計画的中断療法(STI)に対する評価は現在どうなっているのか、などは今もなお議論の余地がある。HAART開始後、間もなく出現する免疫再構築症候群によ

る重篤な合併症も悩みの種で、場合によってはHAARTを一時、中断しなければならないこともある。それをいかに回避し、コントロールするかも大きな課題である。

「コントロール可能な慢性感染症」が「コントロール可能な慢性感染症」であり続け、あるいは「完治可能な感染症」へと更なる変身を遂げるためには、更なる新規薬や治療ワクチンの開発が鍵を握っているが、現状で活用できる人的、物的資源を有効活用し、「より良いHAARTに向けて」努力することが重要である。新しい製剤が次々と開発され、服薬回数が一日一回で良いもの、服薬個数が1錠で良いものが増えてきた。これらの抗HIV薬を副作用少なく、有効に使用して行くためには、医療従事者チームによる服薬支援、療養支援が欠かせない。

このシンポジウムでは6人の講師にそれぞれの観点から、最先端の情報を提供してもらい、患者・感染者の方々の為に、「より良いHAARTに向けて」我々医療従事者は何をどうすべきか、何ができるのか皆で考えてみたい。

## 初回療法の考え方

白阪 琢磨

国立病院機構大阪医療センター HIV/AIDS 先端医療開発センター

## 1) はじめに

1996年に登場した抗HIV薬の多剤併用療法はHIV感染症の予後を著明に改善した。その強力な効果から Highly active antiretroviral therapy (HAART) と呼ばれ、HIV感染症も慢性疾患と認識できる時代が到来した<sup>1)</sup>。この治療の

著者連絡先：木村 哲 (〒102-8798 東京都千代田区富士見 2-14-23 東京通信病院)

2007年4月2日受付

進歩をもとに米国DHHSが中心となってHIV感染症治療のガイドラインが作成され、わが国でも日本の現状にあったガイドラインが作成されている。新薬の登場と新たな臨床知見も蓄積に伴いガイドラインは年に1~2回改訂されてきた<sup>2-5)</sup>。さて、この10年間で抗HIV療法の考え方には大きく変わった点と変わっていない点がある。前者は治療の開始時期である。1996年当初は「Hit HIV early and Hard」と言われていたが、長期継続が必要な化学療法では短期および長期服用で出現する副作用、薬剤耐性HIV株の出現

など治療の継続が容易でない事が明らかとなり、以前よりは開始前に治療について患者も医療者も十分な時間を掛けるようになった。一方、変わっていない点は、初回療法の重要性和、アドヒアランスの重要性である。

## 2) 初回療法の基本的考え方

HIV 感染症の予後を改善させた HAART は、体内での HIV 増殖を抑える事はできても、体内から HIV を駆逐することはできない。従って、HAART によって病状が改善しても治療を中断してはならない。HIV のウイルス学的特徴に高変異性があるので、薬剤耐性変異が出現しないために指示通りの服薬の実施が必要である。服薬は患者自身が行う行為であり、他律的には継続が困難となり薬剤耐性 HIV 株の出現を招きかねない。指示に従った服薬率の良さを服薬コンプライアンスで表現するが、抗 HIV 薬では、より自律的に服薬する必要があるため服薬アドヒアランス (adherence) と呼ぶことが多い。開始時期の詳細は次項で述べるが、AIDS を発症していなくとも、たとえ無症状でも CD4 陽性 T リンパ球数等の基準に従って、HAART を実施する。

## 3) 開始時期

HAART は後記のガイドラインに従って開始するが、その場合にも、HAART を遅らせる場合の長所と短所を念頭に置いて (表 1)、最終的には患者本人によく説明をし理解を得て治療を開始する事が重要である。この意思決定にも患者自身の主体的参加が望ましい。ガイドラインでは開始時期は、症状の有無と CD4 陽性 T リンパ球数 ( $\mu\text{L}$ ) で 5 つに分けられている。症状がある場合や CD4 陽性 T リンパ球数が 200 以下では早期開始が勧められる。ただ、日和見感染症を合併する場合には他稿で述べられる免疫再構築

症候群発現を避けるため初回療法を遅らせる場合がある。CD4 陽性 T リンパ球数が 200 と 350 の間では治療を行う方向で検討を行う。この場合 CD4 陽性 T リンパ球数が 200 に近い程、早期開始が勧められる。CD4 陽性 T リンパ球数の急速な減少や血中のウイルス量が高値の場合には早期開始が勧める専門家もいる。CD4 陽性 T リンパ球数が 350 以上では治療を開始しないのが一般である。

## 4) 選択薬剤

わが国で承認された抗 HIV 薬は合剤も含めれば 20 種類を超える。初回療法の成否には、服薬アドヒアランスの維持が重要である。長期服用となるので、たとえ効果が優れた薬剤でも服用が困難であれば推奨されない。具体的な組み合わせはガイドラインを参照されたい。ただ、スクレオシド/スクレオチド系逆転写酵素阻害薬には抗 HBV 効果を有する薬剤があり、B 型肝炎の合併患者では抗 HBV 効果も考慮して選択する必要がある。結核など合併症の治療薬を投与している場合には、相互作用にも注意する。EFV は胎児への催奇形性が危惧されており、妊娠初期あるいは妊娠の可能性のある女性には EFV を使用しない。

## 5) 治療の目標

治療効果の指標は血中ウイルス量である。服用薬剤と個人差もあるが、治療開始後、概ね 6 ヶ月までに血中ウイルス量が検出限界値 (50 コピー/mL) 未満となり、その状態を持続する事が治療の目標である。この状態を続ければ、CD4 陽性 T リンパ球数が回復し、キャリアの患者では AIDS 発病のリスクが大きく減少する。AIDS 発病患者でも多くの日和見感染症等の出現や再発を阻止できる。結果として HIV 感染症の進行を抑えられ、免疫能を正常に回復・維持でき、QOL を高めることができる。この目標達成

表 1 開始を遅らせる場合の予想される長所と短所

◆長所
服薬に伴い QOL の低下や副作用の出現を避けられる
治療の選択肢を残せる
不十分な治療となった場合に出現する薬剤耐性 HIV を避けられる
治療について十分理解する時間ができる
治療に伴う疲労の機会が減り、服薬に関わる全体の時間が減る
新規薬剤が出現したり服薬方法の改善が望まれる
◆短所
早期開始では回復できたかも知れない免疫機構の障害が進む可能性がある
AIDS 発病の危険性がある
未治療期間が延びるので二次感染のリスクが増す

のためには、抗 HIV 薬の服薬アドヒアランスの維持が重要である。医療者は服薬アドヒアランスを強調するのみならず、副作用の有無や服用上困難な状況等を聴取し対策を共に考える姿勢が重要である。

6) おわりに

抗 HIV 療法の進歩は目覚ましい。主治医は絶えず新しい情報を入手する事が重要である。抗 HIV 療法はコツをつかめば難しくはないが、初回療法は重要である。最初のうちは治療経験が豊富な医師の助言を求める方が良だろう。新薬の登場が当分は期待されているものの、初回療法に失敗すれば選択薬剤は限られ、服用方法も困難となる事を念頭に置くことが重要である。治療の成功は初回療法の成否にかかっていると一言でも過言ではない。

文 献

- 1) Report of the NIH panel to define principles of therapy of HIV infection. MMWR 47 (RR-5) : 1-41, 1998.
- 2) Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-Infected Adults and Adolescents. Department of Health and Human Services (DHHS). 2006年10月10日.
- 3) Hammer SM *et al.* : Treatment for Adult HIV Infection. Recommendations of the International AIDS Society—USA Panel. JAMA 296 (7) : 827-843, 2006.
- 4) HIV 感染症「治療の手引き」〈第10版〉. HIV 感染症治療研究会. 2006年11月.
- 5) 抗 HIV 治療ガイドライン 平成17年度厚生労働科研究補助金「HIV 感染症の医療体制整備に関する研究班(主任研究者 木村哲)」中村哲也ら, 2006年3月.

治療開始時期から見た HAART の臨床効果

味 澤 篤  
都立駒込病院 感染症科

Highly active antiretroviral therapy (HAART) をいつから開始すべきかは、臨床的に重要な問題である<sup>1)</sup>。種々のガイドラインによると CD4 陽性リンパ球数 (CD4+) が 200/μL 未満あるいは HIV 関連疾患発症後に治療することは異論のないところである。また CD4+ が 350/μL 以上では通常治療は導入しない点も一致している。ガイドラインによって微妙に異なるのは CD4+ が 200-350/μL の場合である。すぐに治療を開始すべきなのか、CD4+ の動きや HIV-RNA をみながら考慮すべきなのか悩ましい問題である。当院の成績を参考にしながら治療開始時期から見た

HAART の臨床効果を考えたい。  
対象および方法：駒込病院で 1997 年から 2001 年 8 月末日までの間に HAART を初回導入し 2006 年 8 月まで経過を終えた 185 例について診療録から年齢、性別、HAART 開始時の CD4+ および HIV-RNA、AIDS 発症の有無および予後について検討を行った。  
結果：全症例 185 例中 19 例が死亡し、166 例が生存していた。表 1 に背景因子を示すが、死亡例の平均年齢が 49.5 歳と、生存例の 40.7 歳に比べ有意 (P<0.05) に高齢であった。また CD4+ が 100 未満の群では 93 例中 13 例死亡し、

表 1 HAART の臨床効果：背景因子

死亡例		生存例	
症例数	19	症例数	166
性別	男性 19 女性 0	性別	男性 139 女性 27
平均年齢	49.5 歳 (22-67)*	平均年齢	40.7 歳 (2-66)
観察期間	中央値 40 ヶ月 (1-84)	観察期間	77.5 ヶ月 (28-106)
HIV-1 RNA (c/mL)	1.20 × 10 <sup>5</sup> (1.1 × 10 <sup>3</sup> -1.5 × 10 <sup>7</sup> )	HIV-1 RNA (c/mL)	1.34 × 10 <sup>5</sup> (1.8 × 10 <sup>3</sup> -7.5 × 10 <sup>6</sup> )
HIV-1 RNA > 100,000	57.9%	HIV-1 RNA > 100,000	54.8%
CD4 中央値 (cells/mm <sup>3</sup> )	62/μL (1-508)	CD4 中央値 (cells/mm <sup>3</sup> )	109/μL (1-869)
CD4 < 200	73.7%	CD4 < 200	61.4%

\* P<0.01



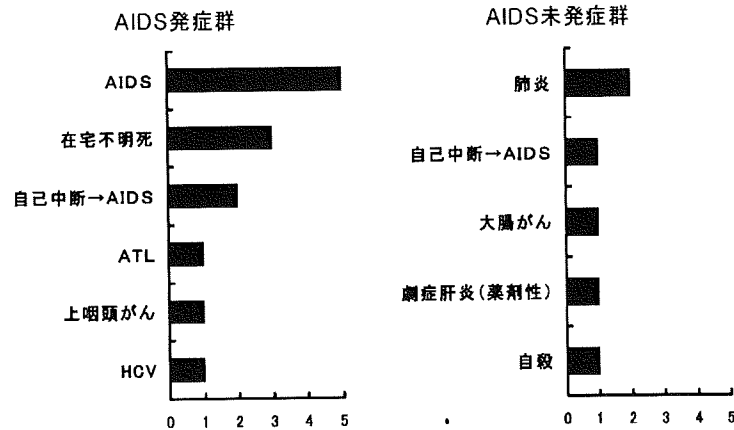


図1 HAART開始後の死因

100以上の群では92例中6例が死亡したが、有意差は認めなかった。HIV-RNAが100,000 copies/ml以上の群では102例中11例が死亡し、未満の群では83例中8例が死亡したが有意差は見られなかった。HAART開始前のAIDS発症の有無でみると、AIDS発症した群では75例中13例が死亡し、AIDS未発症群では110例中6例が死亡し有意差が認められた( $P < 0.05$ )。AIDS発症群での死因はAIDSによるもの5例、在宅不明死3例、自己中断後AIDS発病2例、ATL、上咽頭がんおよびHCV各1例非AIDS群における死因は肺炎2例、自己中断後AIDS発病、大腸がん、抗HIV薬による劇症肝炎および自殺が各1例であった(図1)。なお自殺例ではefavirenzは使用していなかった。考察：HAARTを行う有用性としては、死亡率を減少させ、免疫機能を回復させることであり、一方、副作用、薬剤耐性出現の可能性などが知所となる。またHIV感染者で悪性腫瘍の罹患率が増加するという報告も多く<sup>2,3)</sup>、治療を早期に開始し免疫力を維持することは重要かもしれない。

## 文 献

- 1) Egger M, May M, Chene G, Phillips AN, Ledergerber B, Dabis F, Costagliola D, D'Arminio Monforte A, de Wolf F, Reiss P, Lundgren JD, Justice AC, Staszewski S, Leport C, Hogg RS, Sabin CA, Gill MJ, Salzberger B, Sterne JA : ART Cohort Collaboration. Prognosis of HIV-1-infected patients starting highly active antiretroviral therapy : a collaborative analysis of prospective studies. *Lancet* 360 : 119-129, 2002.
- 2) Cooksley CD, Hwang LY, Waller DK, Ford CE : HIV-related malignancies : community-based study using linkage of cancer registry and HIV registry data. *Int J STD AIDS* 10 : 795-802, 1999.
- 3) Chiao EY, Krown SE : Update on non-acquired immunodeficiency syndrome-defining malignancies. *Curr Opin Oncol* 15 : 389-397, 2003.

## 耐性検査の意義とタイミング

松下 修三

熊本大学エイズ学研究センター 病態制御分野

### 要 約

HAART療法の長期継続が課題となる中で、薬剤耐性検査の意味はますます重要となった。また平成18年4月からは薬剤耐性ジェノタイプ検査が保険収載され、日常臨床においても身近な存在となった。本稿では薬剤耐性の基礎

知識をまとめ、これに基づいた検査のタイミングについて概説する。薬剤耐性検査は原則として薬剤服用中に実施されなければならないが、実際には中断後に耐性検査が行われ、残存する耐性変異が検出される場合もある。このような場合、適正なサルベージ療法の選択には、耐性検査に加えて、薬物服薬

表 1 薬剤耐性検査のポイント

1. 採血時の服薬状況の確認。
2. 薬剤服薬歴の確認。
3. 日常の服薬アドヒアランスの確認。
4. 結果が野生型であっても耐性獲得は否定できない。
5. 現状では HIV-RNA >1000 copies/ml で検出可能である。

表 2 薬剤耐性試験のタイミング

場合	ガイドライン	IAS USA <sup>1</sup>	DHHS <sup>2</sup>	European <sup>3</sup>
急性感染症例		推奨	推奨	推奨
感染事故時の予防投与		—	—	推奨
慢性感染例 (治療開始時)		考慮	推奨	強く考慮
治療失敗時		推奨	推奨	推奨
妊婦		推奨	推奨	推奨
小児		—	—	推奨

1. Hirsch MS, *et al.* : Clin Infect Dis 37 : 113-128, 2003. 2. Available at : <http://www.aidsinfo.nih.gov>. Oct. 2006. 3. Vandamme AM, *et al.* : Antivir Ther 9 : 829-848, 2004.

歴をきちんと把握することが重要である。複雑な薬剤耐性変異が蓄積している場合、次のサルベージ療法を考える上で、参考になるデータベースが公開されている。(Stanford HIV RT and Protease Sequence Database : <http://HIVdb.stanford.edu/>)

### 薬剤耐性の基礎知識

HIV-1 は変異しやすいウイルスである。増殖のサイクル毎に様々な変異ウイルスが出現していると考えられている。抗ウイルス薬はウイルスの増殖を完全に抑えることのできる血中濃度を維持できれば有効性を持続させることができるが、不十分な濃度となると、薬剤に対して抵抗性の変異をもったウイルスの増殖を許してしまう。薬剤耐性ウイルスは抗ウイルス薬存在下でも増殖するが、酵素の反応部位などに変異が入っているために、野生株に比べて薬剤非存在下では増殖性が悪く(フィットネスが劣る)、耐性を誘導した薬剤がなくなると(服薬を中断すると)、野生型に比べて増殖が遅いため、血中から消えたように見えることがある。薬剤耐性はこのように抗 HIV 療法(HAART 療法)に密接に関連した現象であり、そのリスクに関して治療開始時に繰り返し説明されるべきである。すなわち、規

則正しく服薬され、抗ウイルス薬の血中濃度が十分保たれていればウイルスの増殖は押さえられているが、「飲み忘れ」などのためにウイルスの増殖を押さえられない濃度になると、耐性ウイルスが出現する可能性が高くなる。耐性出現を阻止するためには服薬遵守が最も重要だが、薬剤の吸収代謝に及ぼす食事の影響や薬剤相互作用が関係する場合もあり、継続的な服薬指導が重要である。薬剤耐性検査のポイントを表1に示した。

### 薬剤耐性検査のタイミング

表2に薬剤耐性検査のタイミングをまとめた。DHHSなどのガイドラインによると、第1のタイミングは初回治療の決定のときである。欧米では新規感染症例の6~16%になんらかの耐性変異が見つかる。複数の耐性を持つ症例も3~5%存在する。我が国では何らかの耐性が見つかる新規感染症例は5%にすぎないが、今後増加することも予想され、十分な注意が必要である。急性感染症例では、必ずしも治療開始の適応ではないことが多いが、感染早期において耐性変異が見つかりやすいことから、治療開始の予定がない場合であっても、早期の検査が推奨されている。一方、慢性感染症例については、野生型が優位になっていると考

えられ、耐性検査の意義については議論があるが、耐性変異が検出される場合もあり、検査が推奨されている。注意すべきことは耐性試験で「野生型」と判定された場合も体内には耐性ウイルスが潜伏している可能性があることである。この場合、HAART開始後早期に耐性ウイルスの増殖が観察されると考えられる。第2のタイミングは治療失敗時である。HAART開始後、いったん低下したウイルスRNA量が再上昇するとき、もしくは24週以降も測定感度以下に下がらないとき、耐性検査を行う。この場合、きちんと服薬されている事が重要で、服薬が不十分な状態で検査をすると、野生型ばかりが検出され、「耐性なし」と判定される。3番目の適応はHIV陽性の妊婦に対してである。その目的は、抗ウイルス療法でウイルス量を測定感度以下にして、周産期感染のリスクを最大限に低くするところにある。

### 薬剤耐性への対応

薬剤耐性試験で耐性が見つかった場合、2種類以上の感受性のある抗ウイルス薬を組み合わせたサルベージ療法に変える。この場合単純に耐性度の低いものを組み合わせる

というのではなく、治療ガイドラインの代替療法との組み合わせなどを参考に、薬剤相互作用や、副作用の違いなど十分考慮して選ぶ。3TCなどの薬剤はM184Vなどの耐性変異が逆転写酵素に入ると高度耐性となるが、この変異が入ったウイルスはフィットネスが著しく劣ることが知られており、耐性が入った後も、むしろM184Vを維持するように選択圧をかけることを推奨する考え方がある。また、治療歴が長く、複雑な耐性変異をもった症例では、どのようなサルベージ療法が有効かわかりにくい場合がある。このような場合、Stanford大学のデータベースなどを利用して現状の耐性ウイルスに有効な治療法をさがす (<http://HIVdb.stanford.edu>)。

薬剤耐性は起こさないことが最も重要である。もちろんアドヒアランスをよくするための服薬支援を継続的に行うことが最も重要である。服薬している薬剤について食事の影響や他の薬剤との相互作用などを考慮して、繰り返し服薬指導を行う。また、長期にわたる治療経過の中では患者様も様々な問題に直面し、服薬に対する意欲を喪失されることがある。継続的なカウンセリングもまた耐性出現抑制に必要である。

## 副作用回避に向けたSNPs解析、遺伝子解析

湯永 博之

国立国際医療センター エイズ治療・研究開発センター

### 1. efavirenzの血中濃度とcytochrome P450 2B6の遺伝子型

efavirenz (EFV) は少なからずの内服患者において、頭痛、めまい、不眠などの中枢神経系の副作用がみられ、服薬中断の主な理由の一つになっている。これらの副作用はEFVの血中濃度が高い患者ほど出現頻度も高い。EFVは主に肝臓にあるcytochrome P450 2B6 (CYP2B6) により代謝され胆汁中に排泄される。CYP2B6には遺伝子多型があり、日本人では\*1から\*6までが主に認められ、\*6は野生型である\*1と比較し二つのアミノ酸が置換している。この\*6をホモで持つとEFVの血中濃度が著しく高くなることが我々や他の研究者により明らかになった(図1)<sup>1)</sup>。このようなCYP2B6 \*6/\*6保持者は、日本人で4-5%であるが、常用量のEFV (600mg/day) を投与された場合、強い副作用で苦しんでいるか、あるいは、服薬中断に至ることが多いことも明らかになった。

次に我々が取り組んだのは、これらのCYP2B6 \*6/\*6保持者におけるEFV投与量の減量である。CYP2B6 \*6/\*6保

持者のEFV投与量を実際に減量したところ、400mgまでは安全に減量が可能で、また、400mg投与においても高い血中濃度を示した患者については更に200mgまで減量できることが明らかになった。また、多くの症例で、EFV投与量の減量に伴い、自覚症状の著しい改善が認められた。

遺伝子多型は、その種類や頻度が人種によって大きく異なる。以前よりアフリカ系アメリカ人ではEFVの副作用の発生頻度が高いことが知られていた。そこで、我々は、アフリカ人ではCYP2B6 \*6/\*6保持者の割合が多いのではないかと考え、ザンビア人100人のHIV感染者のCYP2B6の遺伝子型とEFVの血中濃度を解析した。予想したとおり、CYP2B6 \*6/\*6保持者の割合は16%と極めて高く、EFVも高濃度であった。ところが、\*6のホモの所有者だけでなく、ヘテロの所有者でも極めて高いEFV濃度を示す患者がおり、これらの患者は、もう一つのEFV高濃度に関与する新しいCYP2B6のアレルを持っていることが明らかになった。

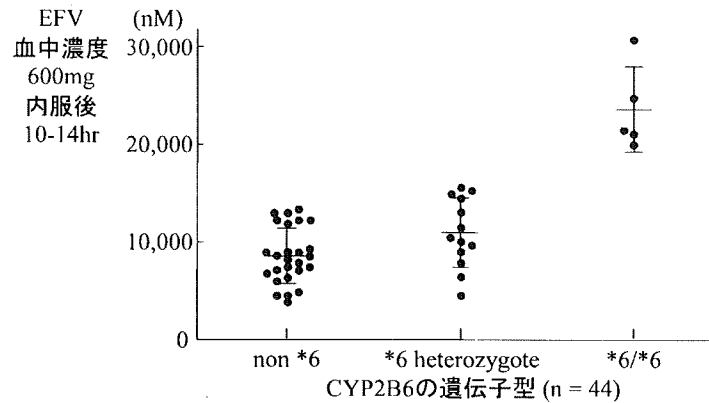


図 1 CYP2B6 の遺伝子型と EFV 常用量内服後 10-14 時間の血中濃度

CYP2B6 \*6/\*6 保持者では、他の遺伝子型保持者に比べ、EFV 血中濃度が極めて高値になる。このような血中濃度の高い患者は、ふらつき、集中力低下などの中枢神経系の副作用に苦しんでいることが多い。

## 2. abacavir, nevirapine に対する過敏症に関連する HLA

抗 HIV 薬に対する薬剤過敏症として特に重要なのは、abacavir (ABC) に対するものと nevirapine (NVP) に対するものである。どちらも、致命的な重症になることもあり、投与後初期に特に注意しなくてはならない。ABC に対する過敏症は投与後 1 週間から 10 日目くらいに起こることが多く、インフルエンザ様の高熱や疲労感を生じ、皮疹を伴うことがある。欧米人では 5-8% に起こると言われ、HLA-B57 保有者で特に多いと言われている。ABC 投与前に HLA を調べ、B57 保有者には ABC の投与を避けるようにしたところ、ABC の過敏症が激減したと報告されている。しかし、日本人には B57 は見られないため、ABC 過敏症を避ける目的で HLA を調べるのは、日本人に対しては意味がない。B57 を保有しない人にも ABC 過敏症は起こるため、頻度は少ないが、ABC 投与後、注意深く経過を観察すべきであろう。

NVP に対する過敏症は、皮疹を生じる場合と肝障害を生じる場合があるが、どちらも致死的になることがあり、再投与は禁忌とされている。イタリアのサルジニア島の住人は、以前より NVP に対する過敏症を生じ易いことが知られていた。HLA を調べたところ、サルジニア島では、

Cw8 と B14 が強くリンクしており、この両者を持つ人が NVP 過敏症を生じた人で多かったと報告されている。我々が日本人で調べたところ、日本人には B14 は見られず、NVP 過敏症を生じた人では、NVP を問題なく内服できた人に比べ、Cw8 の頻度が有意に高かった (42% vs 10%,  $p=0.03$ )<sup>2)</sup>。我々のデータとサルジニア島のデータを合わせて考えると、HLA-Cw8 が NVP 過敏症に直接関与していると考えられる。NVP あるいは NVP の代謝産物が、細胞表面で HLA-Cw8 分子上に提示されているのかもしれない。

## 文 献

- 1) Tsuchiya K, Gatanaga H, Tachikawa N, Teruya K, Kikuchi Y, Yoshino M, Kuwahara T, Shirasaka T, Kimura S, Oka S: Homozygous CYP2B6 \*6 (Q172H and K262R) correlates with high plasma efavirenz concentrations in HIV-1 patients treated with standard efavirenz-containing regimens. *Biochem Biophys Res Commun* 319: 1322-1326, 2004.
- 2) Gatanaga H, Yazaki H, Tanuma J, Honda M, Genka I, Teruya K, Tachikawa N, Kikuchi Y, Oka S: HLA-Cw8 primarily associated with hypersensitivity to nevirapine. *AIDS* 21: 264-265, 2007.