



抗HIV薬剤血中濃度モニタリング

研究分担者 森原 健 独立行政法人国立病院機構南京都病院薬剤科 科長
 研究協力者 高田 寛治¹、杉岡 信幸¹、芝田 信人²、加藤 真吾³、田中 理恵³、
 上平 朝子⁴、白阪 琢磨⁴、吉野 宗宏⁵、矢倉 裕輝⁵、平林 義弘⁶、
 照屋 勝治⁶、土屋 亮人⁶、林田 庸総⁶、小田 原隆⁷、味澤 篤⁸、
 今村 顕史⁸、牧江 俊雄⁹

¹京都薬科大学薬物動態学教室、²同志社女子大学薬学部生物薬剤学教室、
³慶應義塾大学医学部微生物学・免疫学教室、⁴独立行政法人国立病院機構
 大阪医療センター免疫感染症科、⁵独立行政法人国立病院機構大阪医療セン
 ター薬剤科、⁶国立国際医療センターエイズ治療研究開発センター、
⁷東京大学医科学研究所感染免疫内科、⁸東京都立駒込病院感染症内科、
⁹医薬品医療機器総合機構

①研究班が開設したホームページは平成20年10月末現在、通算アクセス数7648件、パスワード取得者174名。平成20年4月～平成20年10月末までに研究班が(株)BML、(株)積水メディカルに委託し測定した検体の測定件数は638件で、28施設からの利用があった。件数の内訳はRTV:153、ATV:131、LPV:109、EFV:101、TDF:100、FPV:25、DRV:19であった。また、CYP2B6遺伝子検査の今年度依頼件数は5件(3施設)であった。

②開発した相互作用情報提供システムを利用してホームページ上で情報提供を行った。また、情報更新のための調査を実施し、新たに70件の相互作用情報を追加した。

③ATV/rを服薬しATVのトラフ血中濃度が $1.50\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の患者を対象として、RTVブーストを行わないATV400mg投与への変更試験を実施した。対象患者5例のATVトラフ濃度(mean \pm S.D.)は、 $1.95\pm 0.39\mu\text{g}/\text{mL}$ (range:1.54-2.56)であった。変更後4週目、ATVトラフ濃度の平均値は $0.26\pm 0.18\mu\text{g}/\text{mL}$ (range:0.10-0.52)に低下したが、HIV-RNA量は臨床試験を実施した24週間を通じて、全例感度未満を持続した。変更前後で、T-Bil、T-Cholは有意に低下した($p<0.05$)。ATVトラフ濃度が $1.50\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上を示す患者がATV400へ変更した場合の24週間における安全性と有効性が示唆された。T-BilとT-Cholが変更後に有意に低下したことは、黄疸の軽減と患者のQOLの向上につながり、長期服用による副作用発現を未然に防止できたものと考えられた。

A. 研究目的

プロテアーゼ阻害剤(PI)、非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤(NNRTI)はHIV感染症治療薬として広く使われ、めざましい改善をもたらした薬剤である。しかし、PIやNNRTIの体内動態は、主に海外から報告されたもので、日本人でのデータが限られていることが問題とされている。また、近年発売されている抗HIV薬は、すべて希少疾病用医薬品として迅速承認の対象とされており、国内での治験を行わずに承認されている。本研究ではこれら抗HIV薬の薬物動態について調査・検討し、日本人HIV感染症患者における抗HIV薬の血中濃度の推移について確認し、より適切な治療が行えるよう血中濃度測定に必

要なデータを収集することで、抗HIV療法の治療効果を高めることを目的とする。また、抗HIV薬の組み合わせは近年、多岐に渡っており、薬剤の組み合わせによる相互作用情報や血中濃度に関する情報は少ないことから、抗HIV薬の相互作用情報を収集し、データベースを作成し最新の情報を提供する必要がある。

抗HIV薬の血中濃度測定は、HPLCやLC-MS等の高度な専門機器や専門知識を有する人材が必要であることから、一般診療を行う施設での測定が難しい。国内の臨床医が簡便に血中濃度測定を行えるよう、ホームページを利用した血中濃度測定システムを構築・供給し、また、EFV血中濃度に関連する遺伝子

多型検査システムを開発し提供を行うことで抗HIV薬を安全に使用し、治療の効果を高めることを目的とした。

今年度はさらに、ATV/r服用患者を対象に、ATVの血中濃度が高値を示す患者をRTVブーストを行わないATV400mg投与へ変更することにより、有効性を維持しつつ、副作用の軽減を図ることを目的とする臨床試験を実施したので報告する。

1. 研究班のホームページ (HP) について

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

2. 相互作用血中濃度検索システムについて

抗HIV薬の組み合わせは近年多岐に渡っているものの、薬剤の組み合わせによる相互作用情報や血中濃度に関する情報は少ない。本研究班では、臨床現場により迅速な情報提供を行うことを目的とし、抗HIV薬の相互作用情報を収集し、データベースのアップデートを行った。

3. 硫酸アタザナビル血中濃度が高値の患者を対象とした、ATV/r からATV₄₀₀ へのスイッチ臨床試験

硫酸アタザナビル (ATV) は、米国で2003年6月にHIV感染症の治療薬として承認されたプロテアーゼ阻害薬 (PI) であり、1日1回投与が可能なPIとして、米国DHHS (Department of Health and Human Services) のガイドラインでは第一選択薬として推奨されている。ATVのヒトにおける主な代謝経路は、一酸化及び二酸化反応であり、ヒト肝ミクロゾームを用いた

*in vitro*試験から、チトクローム P450の分子種 CYP3A4により代謝を受けることが確認されている。ATVと併用するリトナビル (RTV) は、CYP3A4を強力に阻害することが知られており、少量のRTVを併用することによりPIの効果を増強するブースト療法が一般的となっている。ブーストしないATV 400 mg投与 (ATV₄₀₀) は、RTV 100 mgでブーストしたATV 300 mg投与 (ATV/r) に比べ、トラフレベルの血中濃度 (トラフ濃度) が87%、AUCが51%低下することが報告されている。ATV/rでは症例によってATVの血中濃度の上昇が、Total Bilirubin (T-Bil) の上昇を惹起している可能性が示唆される。RTVは冷蔵保存が必要であることから、患者の利便性に支障があり、RTVの相互作用上の併用注意薬も多く、併用を避けざるを得ない症例も経験する。今回、ATV/r服用患者においてATVのトラフ濃度が高値を示す患者に対し、ATV₄₀₀へ変更することにより、有効性を維持しつつ、副作用の軽減を図ることを目的に臨床試験を実施した。

B. 研究方法

1. 研究班のホームページ (HP) について

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

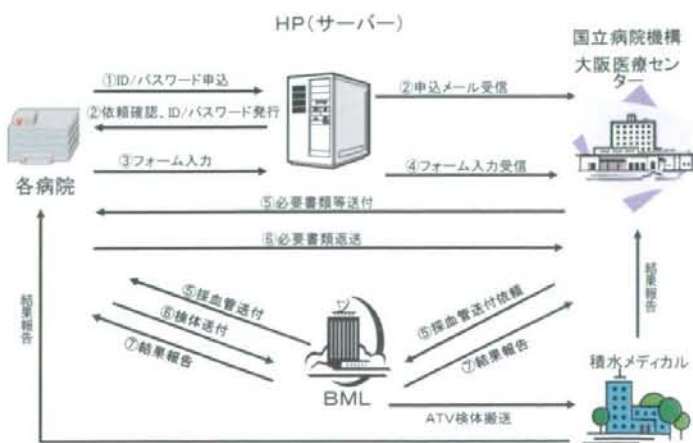


図1 依頼から結果報告までの流れ

2. 相互作用血中濃度検索システムについて

2008年10月までに発表された学会発表・文献等から、抗HIV薬の相互作用に関連するデータを、雑誌・インターネット等を利用し収集した。

3. 硫酸アタザナビルの血中濃度が高値の患者を対象とした、ATV/r からATV₄₀₀へのスイッチ臨床試験

国立病院機構大阪医療センター免疫感染症科に入院し、少なくとも14日間以上、ATV/rを含むHAARTを施行し、ATVのトラフ濃度が1.50mg/mL以上の患者で、問診により血中濃度測定前1週間の服薬率が100%と見込まれた患者に対し本研究の趣旨の説明を行い、試験参加の同意を文書で得た5例を対象とした。併用した核酸系逆転写酵素阻害薬(NRTI)は、全例、アバカビル/ラミブジン合剤(EZC)であった。同意取得後、ATV/r からATV₄₀₀へ変更を行った。対象となった患者の平均年齢(mean±S.D.)は46±12歳(33-63歳)で、すべて男性であった。

なお、テノホビル(TDF)並びにTDF配合剤、プロトンポンプ阻害剤(PPI)、高脂血症剤等、ATV血中濃度に影響を及ぼすと考えられる薬剤の投与を受けている患者は本臨床試験の対象外とした。調査期間は2004年6月1日から2008年5月31日までとした。

血中濃度測定は以下の方法で行った。ヘパリンナトリウムを添加した試験管に、1回5 mLの血液を採取し、10℃以下3000回転10分間遠心分離し、ポリプロピレン製のスクリーキャップ付きチューブに血漿を2mL分注し、分析開始まで-80℃で凍結保存した。測定はHPLC法を用い、株式会社積水メディカルで実施した。

ATV₄₀₀へ変更後4、8、12、16、20、24週目に採血を実施し、ATVのトラフ濃度、HIV-RNA量、T-Bil、T-Cho、TGを測定し、ATV₄₀₀への変更前後の24週間について比較検討を行った。T-Bil、T-Cho、TGについては、変更前後の両群間の変動(%)をDunnettの多重分析法を用いて解析した。

C. 研究結果

1. 研究班のホームページ(HP)について

研究班ホームページの運用状況は、平成20年10月末現在、通算アクセス数7648件、パスワード取得者174名。平成20年4月～平成20年10月末までに研究班が(株)BML、(株)積水メディカルに委託し測定した検体の測定件数は638件、36施設の利用があった(石川県立中央病院、愛媛大学病院、都立大久保病院、大阪市立総合医療センター、大阪府立呼吸器・

アレルギー医療センター、大館市立総合医療センター、沖縄県立中部病院、沖縄南部医療センター、香川大学病院、鹿児島大学病院、亀田総合病院、川崎医大病院、北里大学病院、倉敷中央病院、群馬大学病院、国立国際医療センター戸山病院、国立病院機構大阪医療センター、国立病院機構九州医療センター、国立病院機構千葉医療センター、国立病院機構東京病院、国立病院機構西多賀病院、国立病院機構東埼玉病院、札幌医科大学病院、慈恵医大病院、市立堺病院、聖隷浜松病院、富山大学病院、都立府中病院、長崎大学病院、新潟大学病院、沼津市立病院、広島大学病院、藤枝市立病院、北海道大学病院、横浜市立大学病院、琉球大学病院)。件数の内訳はRTV:153、ATV:131、LPV:109、EFV:101、TDF:100、FPV:25、DRV:19であった。また、CYP2B6遺伝子検査の今年度依頼件数は5件(3施設)であった。血中濃度測定件数の年度別推移と薬剤別血中濃度測定件数の年度別推移は図2-4の通り。

2. 相互作用血中濃度検索システムについて

調査した結果、追加すべきと考えられた相互作用データは70件であった(参考資料1)。

3. 硫酸アタザナビルの血中濃度が高値の患者を対象とした、ATV/r からATV₄₀₀へのスイッチ臨床試験

対象患者の治療変更前後の血中濃度を表1、臨床検査値を表2に示す。ATVトラフ濃度(mean±S.D.)は1.95±0.39μg/mL(range:1.54-2.56)であった。ATV₄₀₀への変更後4週目に、患者のATV血中濃度は0.26±0.18μg/mL(range:0.10-0.52)に低下し、その後24週まではほぼ一定の値を示した。HIV-RNA量は臨床試験を実施した24週間を通じて、全例感度未満を継続していた。変更後のT-Bilの変動(%)において4、20、24週に変更前に比べ有意な低下が認められた(p<0.05)。また、T-Choの変動(%)は12、16、20、24週に有意な低下が認められた(p<0.05)。TGについては変更後4週以降、16週を除き、有意差は認められないものの低下傾向を示した。

D. 考察

1. 研究班のホームページ(HP)について

今年度、研究班に血中濃度測定の依頼があった薬剤は主にEFV、TDF、ATV、LPV、RTVであったことから、国内における治療の中心となった薬剤の効果確認等に貢献できたものと思われた。HPへのアクセス数の増加率は高く、抗HIV薬の血中濃度測定に関する関心の高さが伺えた。新薬の治療効果を確

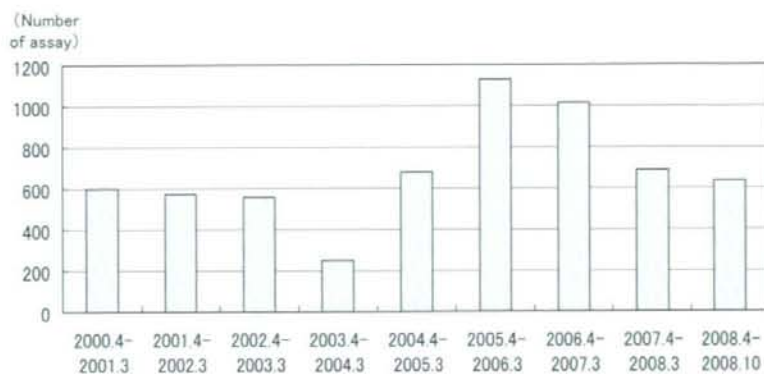


図2 血中濃度測定件数の推移 (総数)

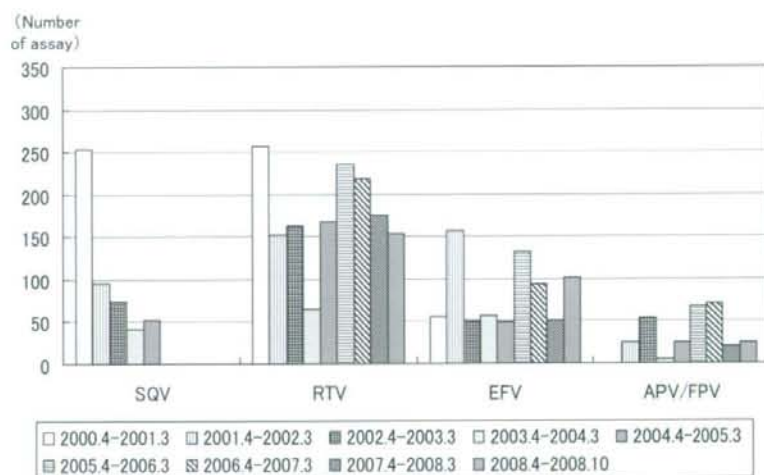


図3 血中濃度測定件数の推移 その1 (薬剤別)

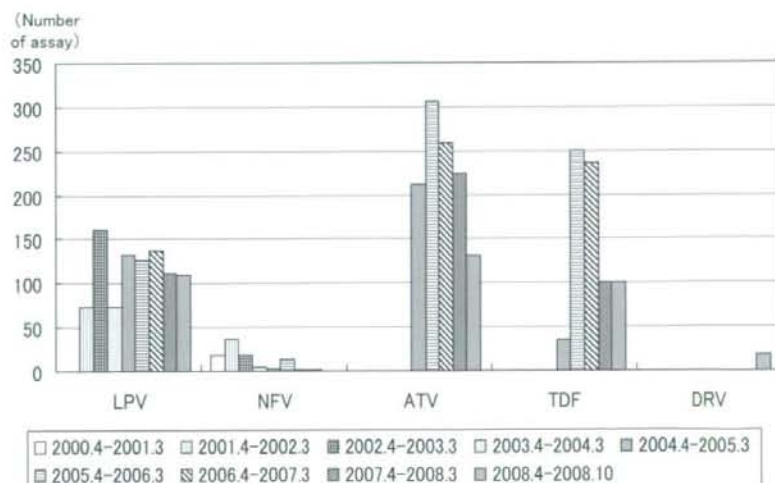


図4 血中濃度測定件数の推移 その2 (薬剤別)

実にするために、本研究班が提供する血中濃度測定システムは、有用な臨床データの提供を行ったものと思われた。臨床医が容易に血中濃度測定にアクセスできたことで、抗HIV療法の治療効果を高め、副作用の軽減に寄与できたものと思われた。

2. 相互作用血中濃度検索システムについて

抗HIV薬相互作用データベースは複雑化する抗HIV療法における適正な薬物療法への支援と、副作用を未然に防止する観点から貴重な情報を容易に提供できるシステムである。今後さらに、薬剤耐性HIV-1の出現や抗HIV薬の種類が増加すると共に、抗HIV薬の相互作用情報は重要な情報となる。新薬の登場や新しい研究結果等について、更にシステムの充実を図り、データのアップデート・メンテナンスを行うことが重要であると思われた。

3. 硫酸アタザナビル血中濃度が高値の患者を対象とした、ATV/r からATV₄₀₀へのスイッチ臨床試験

PIのウイルス学的効果は血中濃度と相関することから、ウイルス学的有効性を考えれば、より高く血中濃度を維持することが出来るATV/rの有効性はATV₄₀₀より勝っていると考えられる。しかし、ATVのトラフ濃度が高値となるとT-Bilの上昇を惹起することが複数報告されている。また、ATVによるT-Bilの上昇は、一般に肝機能障害とは関係なく、安全性に問題は無いとされているが、黄疸という副作用症状は患者の外観の変化を来すことから、その発現する症状を嫌い、服薬変更を希望する場合や、患者によっては服薬の自己中断を行った症例も経験している。ATVの血中濃度は、有効かつ黄疸等の副

作用が発現しない濃度でコントロールすることが最も望ましい。ブーストとして使用するRTVは冷蔵庫での保存が必要であり、患者にとっては利便性を阻害する要因の一つとなり、さらにRTVは相互作用のある薬剤も多いため、併用を避けざるを得ない場合もある。従って、治療の有効性を高めるためには高い血中濃度を維持することは効果的であるが、高い血中濃度を示す患者に対し、ブーストであるRTVの使用を中止し、ATV₄₀₀mg投与に変更し、その有用性を検討することは臨床的意義があると考えられる。

今回、ATV/r服用患者においてATVのトラフ濃度が1.50 μ g/mL以上を示す患者に焦点を絞り、ATV₄₀₀へ変更することで、有効性の維持、副作用の軽減について検討した。対象患者のトラフ濃度を1.50 μ g/mL以上にした設定根拠は、ATV/rを服用した健康成人が、ブーストしないATV₄₀₀へ変更した場合、トラフ濃度の幾何平均値が1.23 μ g/mLから0.16 μ g/mLへ87%、AUCが57.0 μ g \cdot h/mLから28.1 μ g \cdot h/mLへ51%低下する報告に基づき、DHHSのガイドラインが推奨するATV目標トラフ濃度0.15 μ g/mLを維持するためには、トラフ濃度が1.50 μ g/mL以上必要であると推定した。

ATV/rからATV₄₀₀へ変更後、トラフ濃度の平均値は1.95 \pm 0.39 μ g/mLから4週後には0.26 \pm 0.18 μ g/mLまで約86%低下した。変更後の低下率は先行研究と類似しており、トラフ濃度の平均値は24週間において0.15 μ g/mL以上を維持したことから、今回対象患者のトラフ濃度を1.50 μ g/mL以上にした設定根拠は、妥当であると考えられた。しかし、表1に示すように、測定した患者の血中濃度には目標トラフ濃度を下回ったデータもあり、臨床試験を実施した24週間における患者のHIV-RNA量は、全例検出限界未満

表1 ATV trough plasma concentration (μ g/mL)

patient	Baseline	week 4	week 8	week 12	week 16	week 20	week 24
1	1.54	0.10	0.10	0.16	0.15	0.17	0.41
2	1.72	0.23	0.16	0.15	0.16	0.16	0.13
3	2.03	0.35	0.23	0.29	0.24	0.31	0.15
4	1.90	0.11	0.42	0.20	0.28	0.10	0.10
5	2.56	0.52	0.59	0.20	0.36	0.69	0.35
Mean (S.D.)	1.95 (0.39)	0.26 (0.18)	0.30 (0.20)	0.20 (0.06)	0.24 (0.09)	0.29 (0.24)	0.23 (0.14)

表2 Laboratory parameters

Parameter	n	Baseline	week 4	Week 8	week 12	week 16	week 20	week 24
T-Bil (mg/dL)	5	3.46 (1.45)	1.56 (0.50)*	2.14 (0.58)	2.04 (0.63)	1.86 (0.57)	1.43 (0.87)*	1.72 (0.29)*
T-Cho (mg/dL)	5	205.6 (41.2)	194.4 (45.9)	185.2 (30.7)	172.6 (29.8)*	180.8 (39.6)*	187.5 (25.2)*	166.0 (35.0)*
TG (mg/dL)	5	259.4 (70.4)	122.2 (44.9)	134.2 (41.7)	128.8 (71.0)	228.0 (103.8)	128.8 (62.3)	120.2 (49.3)
HIV-RNA (copies/mL)	5	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50

Data expressed as Mean (S.D.)

* Significant difference from the baseline at $P < 0.05$ using parametric Dunnett's multiple comparison test.

を維持していたものの、長期の安全性を検討するためのATV/r服用患者におけるATVトラフ濃度の設定に関しては検討が必要と考える。

ATV₄₀₀へ変更後、T-Bilが有意に低下したことは、黄疸の軽減と患者のQOLの向上につながった。HAARTによる高脂血症は、主にPIが関与しており、服用期間が長いほど虚血性心疾患の頻度が増加し、1年のHAARTへの暴露で年間発生率が26%増加することが報告されていることから、T-Chol、TGが変更後に低下したことは、長期服用による副作用発現を未然に防止できたものと考えられた。ATVのトラフ濃度が高値を示す患者に対し、ATV₄₀₀へ変更した24週間における安全性と有効性が示唆された。今後、ATV/rからATV₄₀₀への変更について長期間の安全性と有効性を検討するためには、より多くの症例について長期間観察を行う臨床試験が必要である。

E. 結論

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

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. T. Kuwahara, S. Oda, T. Nakakura, M. Mori, T. Uehira, G. Okamoto, M. Yoshino, A. Sasakawa, K. Yajima, A. Umemoto, K. Takada, T. Makie, Y. Yamamoto, Problems in three Japanese drug users with human immunodeficiency virus infection, *J. Med. Invest.*, 55, 156-160 (2008).
2. 吉野宗宏、矢倉裕輝、葉原健、坂東裕基、小川吉彦、矢嶋敬史郎、谷口智宏、大谷成人、富成伸次郎、渡邊大、上平朝子、白阪琢磨、硫酸アタザナビル_rの血中濃度が高値の患者を対象とした、ATV/rからATV₄₀₀へのスイッチ臨床試験結果、日本エイズ学会誌 (in press)
3. 葉原健、矢倉裕輝、吉野宗宏、小森勝也、白阪琢磨、杉浦互、抗HIV薬血中濃度測定支援システムの構築と血中濃度トラフ値の海外データとの比較、札幌：第18回日本医療薬学会年会；9月、2008。抄録番号20-P3-488
4. 吉野宗宏、矢倉裕輝、葉原健、坂東裕基、小川吉彦、矢嶋敬史郎、谷口智宏、笹川淳、大谷成人、富成伸次郎、渡邊大、上平朝子、白阪琢磨、ロピナビル・リトナビル(LPV/r)の1日2回から1日1回投与へのスイッチ試験、大阪：第22回日

本エイズ学会学術集会・総会；11月、2008。抄録番号O-33-136

5. 矢倉裕輝、吉野宗宏、坂東裕基、小川吉彦、矢嶋敬史郎、谷口智宏、大谷成人、富成伸次郎、渡邊大、上平朝子、白阪琢磨、葉原健、ロピナビル・リトナビル配合剤のトラフ値と脂質系への影響及びテノホビル血中濃度との相関に関する検討、大阪：第22回日本エイズ学会学術集会・総会；11月、2008。抄録番号P-024
6. 矢倉裕輝、吉野宗宏、葉原健、坂東裕基、小川吉彦、矢嶋敬史郎、谷口智宏、大谷成人、富成伸次郎、渡邊大、上平朝子、白阪琢磨、ロピナビル・リトナビル配合剤の初回治療における有効性及び安全性に関する剤型間の比較検討、大阪：第22回日本エイズ学会学術集会・総会；11月、2008。抄録番号P-053

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

イトラコナゾール(イリゾール)	検討されていない	-	-	ETRの血中濃度が上昇し、イトラコナゾールの血中濃度が低下する可能性がある。	イトラコナゾールのCYP3A4阻害作用により、ETRの代謝が阻害される。また、ETRのCYP3A4誘導作用により、イトラコナゾールの代謝が促進される。	-	-	インテレンス添付文書(2008年12月作成第1版)
ボリコナゾール(ブイファンゴ)	検討されていない	-	-	ETR及びボリコナゾールの血中濃度が上昇する可能性がある。	ボリコナゾールのCYP3A4、CYP2C8及びCYP2C19阻害作用により、ETRの代謝が阻害される。また、ETRのCYP2C19阻害作用により、ボリコナゾールの代謝が阻害される。	-	-	インテレンス添付文書(2008年12月作成第1版)
シシロキサタン(リボ(ス)薬)	検討されていない	-	-	-	ETRのCYP3A4誘導作用により、シシロキサタンの代謝が促進される。	-	-	インテレンス添付文書(2008年12月作成第1版)
アトルvastatin(リビスターム)	40mg 1日1回 800mg 1日2回	-	-	アトルvastatinのAUCが37%減少し、2-水酸化アトルvastatinのAUCが27%増加した。	AUC影響なし	-	-	インテレンス添付文書(2008年12月作成第1版)

対象薬	対象薬の用法用量	対象薬の薬物動態	相互作用は認められていない	相互作用は認められていない	DRVの薬物動態	予想される相互作用	相互作用のメカニズム	対処方法	臨床試験の概要	参考文献
AZT(レトロビル)	-	-	-	-	-	-	併用経路が異なる	-	-	ブリジスタ添付文書(2008年1月作成第2版)
3AT(ゼリット)	-	-	-	-	-	-	併用経路が異なる	-	-	ブリジスタ添付文書(2008年1月作成第2版)
667C(ラミブジジン)	400mg 1日3回	667C(ラミブジジン)	-	-	有意な影響なし	-	-	-	-	ブリジスタ添付文書(2008年1月作成第2版)
ABC(ハイビッド)	-	-	-	-	-	-	併用経路が異なる	-	-	ブリジスタ添付文書(2008年1月作成第2版)
3TC(エビゾル)	-	-	-	-	-	-	併用経路が異なる	-	-	ブリジスタ添付文書(2008年1月作成第2版)
ABC(ザイアジェン)	-	-	-	-	-	-	併用経路が異なる	-	-	ブリジスタ添付文書(2008年1月作成第2版)
TDF(ビリアード)	300mg 1日1回	300mg 1日2回	-	-	有意な影響なし	-	-	-	-	ブリジスタ添付文書(2008年1月作成第2版)
FTC(エムトリバ)	-	-	-	-	-	-	併用経路が異なる	-	-	ブリジスタ添付文書(2008年1月作成第2版)
NVP(ネビラピン)	200mg 1日2回	200mg 1日2回	-	-	AUCは27%増加した	有意な影響なし	-	-	-	ブリジスタ添付文書(2008年1月作成第2版)
EVN(エンタビオン)	600mg 1日1回	600mg 1日2回	-	-	AUCは21%増加した	AUCは12%減少した	有意な影響なし	-	-	ブリジスタ添付文書(2008年1月作成第2版)
ETR(インテレンス)	100mg 1日2回	100mg 1日2回	-	-	AUCが57%低下した	有意な影響なし	-	-	-	インテレンス添付文書(2008年12月作成第1版)
DRV(クリキシル)	800mg 1日2回	800mg 1日2回	-	-	AUCは22%増加した	AUCは24%増加した	-	-	-	ブリジスタ添付文書(2008年1月作成第2版)
DRV(イコナゾール)	1000mg 1日2回	800mg 1日2回	有意な影響なし	-	-	AUCは29%低下	-	-	-	ブリジスタ添付文書(2008年1月作成第2版)
RTV(ネービア)	100mg 1日2回	800mg 1日2回	検討されていない	-	AUCは14倍に増加した	-	CYP3A4に対する阻害作用により、相互に代謝が阻害される	併用投与を推奨	-	ブリジスタ添付文書(2008年1月作成第2版)
NFV(ラシナブ)	検討されていない	-	-	-	-	-	併用は推奨しない	-	-	ブリジスタ添付文書(2008年1月作成第2版)
APV(プローザ)	検討されていない	-	-	-	-	-	併用は推奨しない	-	-	ブリジスタ添付文書(2008年1月作成第2版)
LPV(カレトラ)	400mg 1日3回	1000mg 1日2回	有意な影響なし	-	AUCは40%減少した	-	CYP3A4に対する阻害作用により、血中濃度に変化があることがある	併用は推奨しない	-	ブリジスタ添付文書(2008年1月作成第2版)
ATV(レイアック)	300mg 1日1回	400mg 1日2回	有意な影響なし	-	有意な影響なし	-	併用を回避する必要がある	-	-	ブリジスタ添付文書(2008年1月作成第2版)
FPV(レンシブ)	検討されていない	-	-	-	-	-	併用は推奨しない	-	-	ブリジスタ添付文書(2008年1月作成第2版)
MVC(マラビロク)	150mg 1日2回	100mg 1日2回	AUC ₀₋₂₄ が305%増加した	検討されていない	-	-	MVCの用量を少量にするのが望ましい ¹⁾	-	-	THE 8TH INTERNATIONAL WORKSHOP ON CLINICAL PHARMACOLOGY OF HIV THERAPY. BUDAPEST, HUNGARY. APRIL 18-19, 2007
クラシロキサタン(リボ(ス)薬)	500mg 1日2回	400mg 1日2回	AUCが57%増加した	AUC有意な影響なし	クラシロキサタンの血中濃度が上昇し、作用の増強や副作用の発現	-	CYP3A4に対する阻害作用により、代謝が阻害される	-	-	ブリジスタ添付文書(2008年1月作成第2版)
リファンピシンの併用	-	-	-	-	DRVの血中濃度が低下し、リファンピシンの効果が減弱するおそれがある	-	リファンピシンの肝薬物代謝阻害作用による、DRVの代謝阻害	併用はなるべく避ける	リファンピシン	ブリジスタ添付文書(2008年1月作成第2版)
イトラコナゾール(イリゾール)	検討されていない	-	-	-	-	-	DRV/イトラコナゾールのCYP3A4に対する阻害作用により、相互に代謝が阻害される	日用量は200mgを超えないこと	-	ブリジスタ添付文書(2008年1月作成第2版)
ボリコナゾール(ブイファンゴ)	検討されていない	-	-	-	-	-	血中濃度が上昇する可能性	-	-	ブリジスタ添付文書(2008年1月作成第2版)
ブリスチアジン(ブリクセン)	-	-	-	-	-	-	血中濃度上昇による種痘熱感症が起こる可能性	必要に応じて減量する	-	ブリジスタ添付文書(2008年1月作成第2版)
シシロキサタン(リボ(ス)薬)	-	-	-	-	-	-	血中濃度上昇による種痘熱感症が起こる可能性	必要に応じて減量する	-	ブリジスタ添付文書(2008年1月作成第2版)
アトルvastatin(リビスターム)	-	-	-	-	-	-	血中濃度上昇による種痘熱感症が起こる可能性	必要に応じて減量する	-	ブリジスタ添付文書(2008年1月作成第2版)



研究要旨

東海ブロックにおける薬剤耐性HIVの調査研究

—2008年 未治療患者から検出された薬剤耐性アミノ酸変異の出現頻度とそのサブタイプ—

研究分担者 **金田 次弘** 国立病院機構名古屋医療センター 臨床研究センター 客員研究員
 研究協力者 **服部 純子** 財団法人エイズ予防財団 リサーチレジデント
重見 麗 国立病院機構名古屋医療センター 臨床研究センター 研究補助員
坂坂 真澄 国立病院機構名古屋医療センター 臨床研究センター 研究補助員

2008年上半年期(1月～6月)に名古屋医療センターを受診した未治療HIV-1感染患者52例を対象に、薬剤耐性HIV-1の出現頻度、出現した薬剤耐性アミノ酸変異、HIV-1サブタイプを把握することを目的として研究を行なった。その結果、5症例(9.6%)から薬剤耐性HIV-1が検出された。観察された変異はプロテアーゼ領域ではM46I変異、逆転写酵素領域ではA62V, V108I, T215S変異であった。サブタイプについては、Bが46症例、AEが2症例、AGが1症例であった。

A. 研究目的

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

B. 研究方法

2008年1月から6月の間に名古屋医療センターを受診し、新規登録された未治療HIV-1感染患者を対象として以下の方法で薬剤耐性遺伝子検査を施行した。患者EDTA加血より分離した血漿140μlからウイルスRNAを抽出し、それを鋳型としてRT/nested-PCRによりプロテアーゼ領域(コドン1-99)と逆転写酵素領域(コドン1-240)を含む領域を増幅した。得られた増幅産物の塩基配列をダイレクトシークエンスで決定し、IAS-USAパネル2008年版を基に薬

剤耐性変異の有無を判定した。

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

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

2008年1月から6月の間に52症例の新規未治療患者が来院した。52例全例に薬剤耐性検査、49例にサブタイピングを施行した。これら52症例の国籍については、日本が44症例、南米とアジアが各3症例、北米とアフリカが各1症例ずつであった。感染経路については、MSMが35症例と最も多く、次いで異性間の性的接触が9症例、バイセクシャルが5症例、不明が2症例であった。

サブタイプについてであるが、サブタイプBが46症例、サブタイプAEが2症例、サブタイプAGが1症例観察された。

検出された薬剤耐性アミノ酸変異は、プロテアーゼ領域ではM46Iが1例、逆転写酵素領域ではA62V、

V108I, T215S がそれぞれ 1 例ずつ検出された。薬剤耐性 HIV-1 としては、5 例検出され、検出率は 9.6% であった。

D. 考察および結論

当院における新規感染患者数は毎年増加傾向にあるが、2008 年上半期は 52 症例と昨年同時期に比較してやや低い水準であった。東海地区においては、日本国籍の患者ではサブタイプ B HIV-1 が 93.9% (46/52 症例) を占め、サブタイプ AE は 2 症例に留まった。

薬剤耐性検査の結果、52 症例中 5 症例 (9.6%) から薬剤耐性 HIV-1 が検出されたが、昨年の 8.6% と比べると若干高い頻度であった。また、検出された薬剤耐性アミノ酸変異は、いずれも 2006 年以前に治療失敗症例、および未治療患者から検出されたものであった。また、T215 リバートラント変異が 11.2% と高い頻度で検出された。この変異は容易に耐性を獲得する状態にあるので、今後とも慎重に追跡する必要があると思われる。

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

n	52	
Sex		
Male	46	88%
Female	6	12%
Age		
Average	40	
Median	38	
Mode	36	
Route of Transmission		
Homosexual	35	67%
Heterosexual	9	17%
Homo/Hetero	5	10%
Blood Products	1	2%
Unknown	2	4%
Nationality		
Japan	44	85%
Asia	3	6%
N. America	1	2%
S. America	3	6%
Africa	1	2%
Subtype		
B	46	94%
AE	2	4%
AG	1	2%
drug resistance mutation		
PI	1	
NRTI	3	
NNRTI	1	

E. 研究発表

(1) 論文発表

- Fujisaki S, Ibe S, Hattori J, Shigemi U, Fujisaki S, Shimizu K, Nakamura K, Yokomaku Y, Mamiya N, Utsumi M, Hamaguchi M, [Kaneda T](#). An 11-Year Surveillance of HIV Type 1 Subtypes in Nagoya, Japan. *AIDS Res Hum Retroviruses*. **25**:15-21, 2009.
- Takahashi M, Konishi M, Kudaka Y, Okumura N, Hirano A, Terahata N, Banno K, [Kaneda T](#). A conventional LC-MS method developed for the determination of plasma raltegravir concentrations. *Biol Pharm Bull*. **31**:1601-4, 2008.
- Ibe S, Shigemi U, Sawaki K, Fujisaki S, Hattori J, Yokomaku Y, Mamiya N, Hamaguchi M, [Kaneda T](#). Analysis of near full-length genomic sequences of drug-resistant HIV-1 spreading among therapy-naïve individuals in Nagoya, Japan: amino acid mutations associated with viral replication activity. *AIDS Res Hum Retroviruses*. **24**:1121-5, 2008.
- Takahashi M, Kudaka Y, Okumura N, Hirano A, Banno K, [Kaneda T](#). Pharmacokinetic parameters of lopinavir determined by moment analysis in Japanese HIV type 1-infected patients. *AIDS Res Hum Retroviruses*. **24**:114-5, 2008.
- Ibe S, Hattori J, Fujisaki S, Shigemi U, Fujisaki S, Shimizu K, Nakamura K, Kazumi T, Yokomaku Y, Mamiya N, Hamaguchi M and [Kaneda T](#). Trend of Drug-Resistant HIV-1 Emergence among Therapy-Naïve Patients in Nagoya, Japan: an 8-Year Surveillance from 1999 to 2006. *AIDS Res Hum Retroviruses*. **24**: 7-14, 2008.
- Takahashi M, Kudaka Y, Okumura N, Hirano A, Banno K and [Kaneda T](#). Pharmacokinetic parameters of lopinavir determined by moment analysis in Japanese HIV-1-infected patients. *AIDS Res Hum Retroviruses*. **24**: 114-115, 2008.

(2) 学会発表

- Fujisaki S, Ibe S, Hattori J, Shigemi U, Fujisaki S, Shimizu K, Ito K, Yokomaku Y, Mamiya N, Utsumi M, Hamaguchi M, and [Kaneda T](#). An 11-year surveillance of HIV-1 subtypes in Nagoya, Japan. XVII International AIDS Conference. August 3-8, 2008, Mexico City, Mexico.



研究要旨

血中、唾液、毛髪中の抗HIV薬定量

臨床検体を用いたPCR-MS法による微量薬剤耐性変異ウイルスの検出と定量

研究分担者 加藤 真吾 慶応義塾大学医学部微生物学・免疫学教室 専任講師

微量集団の薬剤耐性ウイルスを検出・定量することは、薬剤耐性HIV-1の伝播状況の把握や、サルベージ療法における治療薬の選択などにおいて重要な情報を提供する。そのために近年開発されたallele-specific real-time PCRは検出感度において優れているがいくつかの重大な問題点があった。昨年それらを解決するための新しい方法として、ウイルスRNAの薬剤耐性変異部位を含むPCR増幅産物をI型制限酵素AclIで切断し、そのオリゴヌクレオチド断片をLC-MSによって解析することにより微量集団を検出・定量するPCR-MS法を開発した。今年オリゴヌクレオチド断片の精製方法を改良することにより、逆転写酵素のM184V、K103N、T215Yの変異、プロテアーゼのL90M変異の4種類の薬剤耐性変異について存在比率0.2%から0.5%までの微量変異を検出することを可能とした。臨床検体として、薬剤変更時に継続採血した多剤耐性患者の血漿を2ヶ所の耐性変異について測定した結果、7ヶ月あるいは9ヶ月で耐性株が感受性株に置き換わることが測定された。また初診時に採血した新規感染者27人の血漿を4ヶ所の耐性変異について測定した結果、4例で微量耐性変異が検出された。PCR-MS法は微量薬剤耐性ウイルス集団の治療及び疫学における意味を研究する上で有用であると考えられる。

A. 研究目的

抗HIV療法において薬剤耐性は重大な問題となっている。一般に薬剤耐性ウイルスの検査は耐性関連遺伝子の塩基配列を決定することによって行われているが、この方法では耐性ウイルスの比率が20%以上でなければ検出することができない。このような微量集団の薬剤耐性ウイルスを検出・定量することは、薬剤耐性HIV-1の伝播状況の把握や、サルベージ療法における治療薬の選択などにおいて重要な情報を提供すると期待される。Hanceらは2001年にallele-specific real-time PCRを用いて耐性ウイルスを0.1%まで測定することに成功した。その後この技術は、未治療期、母子感染、STIなどの様々な時期における耐性ウイルスの量的変化を研究するために使用されてきた。しかし、この方法には、(i)3通りの点変異を同時に測定できない、(ii)連続した2塩基変異(例えばT215Y)を測定できないという問題があ

った。昨年これらの問題を解決する新しい方法として、PCRと液体クロマトグラフィー・マスペクトロメトリー(LC-MS)を組み合わせて行うことによってHIV-1の微量集団を定量するPCR-MS法を開発した。今年PCR-MS法で測定するオリゴヌクレオチド断片の精製方法を改良することにより検出感度の向上をはかり、直線性と実験内外誤差を測定することにより検査精度を検討した。また、薬剤変更時に継続採血した多剤耐性患者の血漿と初診時に採血した新規感染者27人の血漿を測定することにより、臨床検体における薬剤耐性ウイルス微量集団の検出と定量を行った。

B. 研究方法

PCR-MS法の感度向上と検査精度の検討のため、野生株IIBと慶応義塾大学病院通院患者一人から分離したK2901株のウイルス培養上清を用いた。IIB

株は耐性変異をもたず、K2901株は逆転写酵素 (RT) 遺伝子に M41L、K103N、M184V、T215Y の変異を、プロテアーゼ (PR) 遺伝子に I54V、G73S、V82A、L90M の変異をもっている。それぞれの株は塩基配列決定と PCR-MS 法によって微小集団が検出されないことを確認した。それぞれの株の培養上清あるいはそれらの混合液をそれぞれ p24 抗原量で 50 pg (約 250,000 コピーのウイルスを含む) ずつから QIAamp UltraSens® Virus Kit (QIAGEN) を用いて 60 µL の溶出液で RNA を抽出した。

多剤耐性患者の臨床検体として、慶應義塾大学病院に通院し、薬剤変更時の 2000 年 8 月から 2002 年 5 月の 2 年 10 ヶ月間で 12 回採血した患者の血漿検体を用いた。また新規感染者の臨床検体として、2005 年から 2007 年の慶應義塾大学病院における新規感染症例 27 例の血漿検体を用いた。各検体とも血漿 200 µL から QIAamp UltraSens® Virus Kit を用いて 60 µL の溶出液で RNA を抽出した。

PCR-MS 法による測定は以下のように行った。RNA 抽出液 6 µL に 50 µM ランダムヘキサマーを 2 µL、10 mM dNTPs を 1 µL 加え、65℃で 5 分変性させた後、氷上で 1 分以上静置した。この液に SuperScript III 添付されている 5 × first strand buffer を 4 µL、0.1 M DTT を 1 µL、200 U/µL SuperScript III を 1 µL、40 U/µL RNasin を 1 µL 加え、室温で 5 分、50℃で 10 分、70℃で 15 分静置して cDNA を作成した。1 回目の PCR のプレミックスとして Platinum Taq に添付されている 10 × PCR Buffer を 5 µL、50 mM MgCl₂ を 3 µL、25 mM dNTPs を 0.4 µL、20 µM pre_F プライマーを 0.5 µL、20 µM pre_R プライマーを 0.5 µL、蒸留水を 36.1 µL、Platinum Taq を 0.5 µL 加えて調製した。プライマーの塩基配列は表 1 に示した。cDNA 液 4 µL にプレミックスを 46 µL 加え、94℃で 2 分変性させ、続けて 94℃で 5 秒、48℃で 10 秒、72℃で 15 秒のサイクルを 5 回繰り返し、さらに 94℃で 5 秒、60℃で 10 秒、72℃で 15 秒のサイクルを 25

回繰り返し、最後に 72℃で 1 分反応させた。2 回目の PCR のプレミックスとして 10 × PCR Buffer を 5 µL、50 mM MgCl₂ を 3 µL、25 mM dNTPs を 0.4 µL、20 µM AcuI_F プライマーを 5 µL、20 µM AcuI_R プライマーを 5 µL、蒸留水を 30.1 µL、Platinum Taq を 0.5 µL 加えて調製した。このプレミックス 49 µL に 1 回目の PCR 産物を 1 µL 加え、94℃で 2 分変性させた。続けて 94℃で 5 秒、60℃で 10 秒、72℃で 15 秒のサイクルを 30 回繰り返し、最後に 72℃で 1 分反応させた。2 回目の PCR 産物を 5 µL 用いてアガロースゲル電気泳動で確認した。制限酵素反応のプレミックスとして制限酵素 AcuI に添付されている 10 × NE Buffer 2 を 5.5 µL、1.6 mM S-adenosyl methionine を 2.5 µL、50 mM MgCl₂ を 6.3 µL、10 mM DTT を 4.5 µL、蒸留水を 34.2 µL、AcuI を 2 µL 加えて調製した。プレミックス 55 µL に 2 回目の PCR 産物を 45 µL 加え、37℃で 1 時間、65℃で 20 分静置した。制限酵素処理した試料を 5 µL 用いてアガロースゲル電気泳動で酵素反応を確認した後、90 µL に 99.5% エタノールを 360 µL 加え、14000 rpm で 2 分遠心した。上清を除き、14000 rpm で 2 分遠心した後、再度残余の上清を除き、真空乾燥機で 5 分乾燥させた。乾燥した DNA に 5 mM 酢酸アンモニウムを 10 µL 加えて溶解し、ZipTip_{PC18} (MILLIPORE) を用いて DNA を精製した。Equilibration/Wash solution には 5 mM 酢酸アンモニウム、Elution solution には 5 mM 酢酸アンモニウム/50% アセトニトリルを用い、4 µL で抽出し、真空乾燥機で 30 分乾燥させた。精製した DNA に 5 mM 酢酸アンモニウムを 11 µL 加えて溶解し、14000 rpm で 2 分遠心し、上清を 10 µL とってそのうちの 4 µL を LC-MS で分析した。

(倫理面への配慮)

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

表 1 プライマーの塩基配列

	プライマー名	配列
PR L90	pre_p90a_F	CCT GTC AAC ATA ATT GGA AGA AAT MTG
	pre_p90a_R	TTT AAA GTG CAA CCA ATC TGA GTC A
	AcuI_p90a_F	CCG CTG AAG AAT TGG AAG AAA TMT G
	AcuI_p90a_7mR	CCG CTG AAG AGT GCA ACC AAT CTG AGT CA
RT K103	pre_r103c_F	TCC CGC AGG GTT AAA AAA GAA
	pre_r103c_R	CCC ACA TCC AGT ACT GTT ACT GAT TT
	AcuI_r103c_F	CCG CTG AAG CAG GGT TAA AAA AGA A
	AcuI_r103c_6mR	CCG CTG AAG CCA GTA CTG TTA CTG ATT T
RT M184	pre_r184a_F	ACA AAA TCC AGA CAT AGT TAT CTA TCA ATA C
	pre_r184a_R	AGT CAG ATC CTA CAT ACA AAT CAT CCA
	AcuI_r184a_F	CCG CTG AAG AGT TAT CTA TCA ATA C
	AcuI_r184a_5mR	CCG CTG AAG CTA CAT ACA AAT CAT CCA
RT T215	pre_r215ab_F2	ACA TCT ATT GAG GTG GGG RTT T
	pre_r215ab_R	TTT CTG ATG TTT TTT GTC TGG TGT R
	AcuI_r215ab_F	CCG CTG AAG GTT GAG GTG GGG ATT T
	AcuI_r215ab_F2	CCG CTG AAG ATT GAG GTG GGG RTT T

C. 研究成果

直線性の検討のため、耐性株の割合が0.2、0.5、2、5、20、50%になるように調製した6検体について、PR変異L90M、RT変異K103N、M184V、T215Yの4変異の割合を5回ずつ測定した。耐性ウイルス0.2%に調整した培養上清では、L90M、M184V、T215Yの変異で5回中1回が検出限界以下であった。実際に測定した耐性株の割合と調整した割合をプロットし、直線性のデータを図1に示した。回帰直線を求めた結果、4変異全てで良好な直線性が得られた($r^2=0.9517\sim 0.9770$)。

検査精度の検討のため、耐性株の割合が0.5、5、50%になるように調製した3検体について、4変異それぞれにつき実験内誤差の評価のため各濃度5点を1回測定し、実験間誤差のため各濃度1点を5回測定した。測定ごとに検量線による補正を行い、得られた結果の精度(Precision)と正確さ(Accuracy)を求めた。実験内誤差の変動係数は耐性株の割合が50%で4~9%、5%で5~20%、0.5%で31~53%であった。また、実験間誤差の変動係数は耐性株の割合が50%で7~16%、5%で7~21%、0.5%で20~36%であった。正確さは-31%~32%の範囲であり、半数以上が±15%以内であった(表2)。

多剤耐性患者における薬剤耐性ウイルスの割合の推移を測定するため、薬剤変更時に継続して採取された多剤耐性患者の血漿12検体について、M184VとT215Yの耐性ウイルスの割合を測定した。M184Vの耐性ウイルスは薬剤変更後9ヶ月間で次第に感受性ウイルスに置き換わっており、T215Yの耐性ウイルスは薬剤中止後7ヶ月間で次第に感受性ウイルスに置き換わっていることが測定できた(図2)。

新規感染者の耐性ウイルス微小集団を調査するため、新規感染者27例について4変異それぞれの耐性ウイルスを測定した。その結果、L90M、K103N、M184Vの変異例がそれぞれ1例ずつ検出され、T215YではなくT215Iの変異例が1例検出された。それぞれの耐性ウイルスの割合は、L90Mの耐性ウイルスを持つ例で0.26%、K103Nの耐性ウイルスを

持つ例で7.0%、M184Vの耐性ウイルスを持つ例で32%、T215Iの耐性ウイルスを持つ例で28%であった。T215Y(ACC→TAC)とT215I(ACC→ATC)の変異で得られるDNA断片は同じ質量であるが(antisenseの場合TAAAとATAA)、LCにおけるカラム保持時間が異なるため両変異を区別することが可能であった。PCR-MS法で耐性ウイルスが検出された4例についてシーケンスの波形データを調べた結果、M184V(32%)の例とT215I(28%)の例では耐性ウイルスを示す小さなピークが確認できたが、L90M(0.26%)の例とK103N(7.0%)の例については耐性ウイルスのピークはまったく検出することができなかった(図3)。

D. 考察

今回PCR-MS法で0.2%から0.5%までの微量変異を検出することが可能となったことにより、およそ0.1%の微量変異を検出することが出来るallele-specific real-time PCR法の感度に近づけることができた。PCR-MS法の感度はI型制限酵素AclIによって切断されるオリゴヌクレオチドの量に依存しており、AclIの使用量を増加することで感度を高めることが可能である。また現在のプロトコルでは再検査の可能性を考え精製DNAサンプル10 µL中4 µLをLC-MSで分析しているが、これを全量使用することによりさらに感度を高めることが可能である。これらの方法を併用することにより、allele-specific real-time PCRとほぼ同等の感度が得られることが予想される。PCR-MS法は、現在用いられているallele-specific real-time PCR法と原理的に全く異なる方法で微量変異を検出・定量するため、両方法の結果を比較検討することはより検査結果の検証に役立つものと考えられる。

検査精度の検討をした結果、耐性株の比率が5%の検体の実験間誤差は最大で21%であり、耐性株の比率が0.5%の検体でも最大で53%と良好であることが確認された。また耐性株の調整比率と実測値を比較した正確さは-31%~32%の範囲であり、PCR-

表2 PCR-MS法の実験内誤差と実験間誤差

調整割合	実験内誤差 (n=5)				実験間誤差 (n=5)			
	L90M	K103N	M184V	T215Y	L90M	K103N	M184V	T215Y
50.0%	6%	9%	7%	4%	16%	10%	7%	9%
5.0%	16%	5%	20%	8%	13%	12%	7%	21%
0.5%	31%	49%	40%	53%	20%	35%	36%	32%

調整割合	実験内誤差 (n=5)				実験間誤差 (n=5)			
	L90M	K103N	M184V	T215Y	L90M	K103N	M184V	T215Y
50.0%	12%	-12%	-18%	-16%	0%	-23%	-10%	-12%
5.0%	-5%	9%	32%	31%	5%	22%	7%	23%
0.5%	-31%	-12%	18%	12%	-3%	-10%	1%	-7%

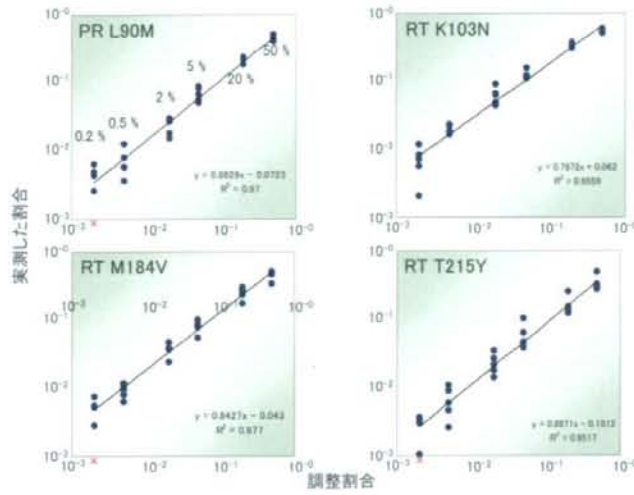


図1 PCR-MS法の直線性

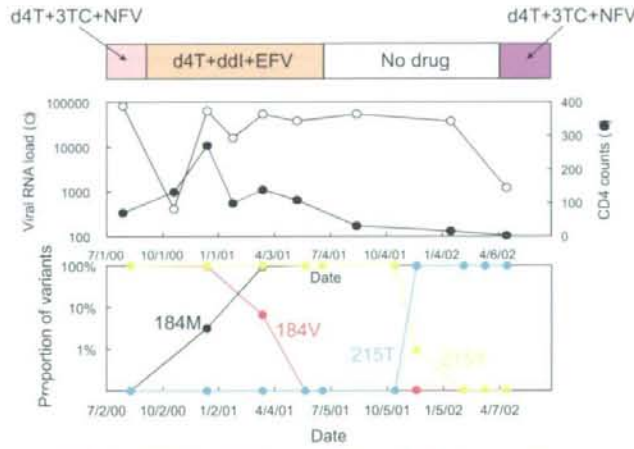


図2 多剤耐性変異症例における薬剤感受性・耐性微小集団の推移

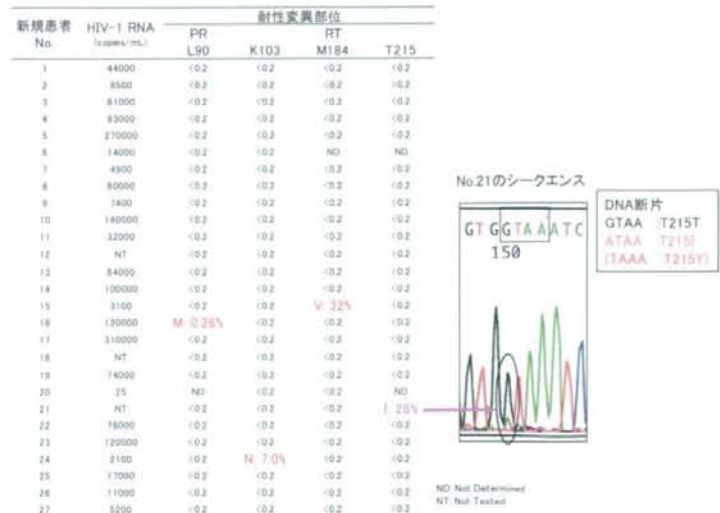


図3 新規感染症例血漿中の耐性微小集団の測定

MS法が優れた検査精度を持つことが示された。

Real-time PCRがもつ問題点の一つとして、目的とする遺伝子以外の非特異増幅を検出することが挙げられる。PCR-MS法は増幅産物を制限酵素で切断しオリゴヌクレオチド断片を検出するため、allele-specific real-time PCR法より非特異増幅産物を検出することが少ないと考えられる。非特異増幅産物の検出についてはより多くの臨床検体を用いて検討していきたい。

今回の研究において、allele-specific real-time PCRでは測定できないT215Yの薬剤耐性変異のような2塩基の変異を測定できた。また実際の臨床検体においてT215Iの耐性変異が検出でき、測定するオリゴヌクレオチドの分子量が同じであるT215YとT215Iの耐性変異を区別することができた。このことから、他の2塩基の薬剤耐性変異でも同様に測定するオリゴヌクレオチドの分子量が同じとなる場合であっても、LCにおけるカラム保持時間を調べることで区別が可能と考えられた。

PCR-MS法を用いて多剤耐性患者の臨床検体を測定した結果から、薬剤変更後すぐに耐性ウイルス集団が感受性ウイルス集団に置き換わるのではなく、数ヶ月以上かけて感受性ウイルスと耐性ウイルスが置き換わることが示された。臨床検体における耐性株の推移についてはより多くの臨床例を検査し、薬剤変更時における耐性株の推移を明らかにしていきたい。

今回の研究で検査を行った新規感染症例27例の内、シーケンズで薬剤耐性変異の波形が見られた2例以外にPCR-MS法でのみ微小変異が検出された例が2例みられた。昨年度の本研究班の研究により新規感染症例508例の内39例の薬剤耐性変異が認められたが、PCR-MS法を用いて新規感染症例全体を検査した場合、さらに多くの薬剤耐性変異例が確認される可能性が示唆された。今後の研究課題としてより多くの新規感染症例の検査を行うと共に治療開始後早期に薬剤耐性を獲得した臨床検体の検査を行い、薬剤耐性微小ウイルス集団の存在と治療の推移等の関連性を調べることが考えられる。

E. 結論

PCR-MS法の感度を向上させ、薬剤耐性変異をもつ微小ウイルス集団を1/200～1/500の存在比まで検出・定量することを可能にした。この方法を実際の臨床検体に適用することにより、多剤耐性患者の耐性ウイルスの推移を測定でき、また新規感染者27例中4例の耐性ウイルスを測定することができた。PCR-MS法は微小耐性ウイルスを持つ患者の治療及

び疫学における意味を明らかにするために有用であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Tanaka, R., Hanabusa, H., Kinai, E., Hasegawa, N., Negishi, M., and Kato, S. (2008) Intracellular efavirenz levels in peripheral blood mononuclear cells from HIV-infected individuals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52(2):782-785.
2. Kujii, N., Yoshii, T., Hamatani, T., Hanabusa, H., Yoshimura, Y., and Kato, S. Buoyant density and sedimentation dynamics of HIV-1 in two density-gradient media for semen processing. *Fertil. Steril.* 90(5): 1983-1987.
3. Kondo, M., Sudo, K., Tanaka, R., Sano, T., Sagara, H., Iwamuro, S., Takebe Y., Imai, M., and Kato, S. Quantification of HIV-1 group M proviral DNA using TaqMan MGB real-time PCR. *J. Virol. Methods* (in press)

2. 学会発表

1. S. Kato, K. Sudo, R. Tanaka. Novel assay using PCR and mass spectrometry for quantification of minor populations of HIV-1 carrying drug-resistant mutations. XVII International AIDS Conference, 3-8 August, 2008, Mexico city, Mexico.
2. Shingo Kato, Mitsuhiro Kamakura. Quantification of minor populations of drug-resistant HIV-1 variants by PCR and mass spectrometry. United States-Japan Cooperative Medical Science Program, 21st Joint Meeting of the AIDS Panels. 2008, September 10-12, Awaji Island and Tokyo, Japan.
3. 加藤真吾「サテライト公演：HIV感染症診断のガイドライン 保健所等におけるHIV検査のガイドライン-妊婦検診を含めて」第22回日本エイズ学会学術集会・総会（2008年11月26日-28日、大阪）
4. 植田知幸、加藤真吾「休止期CD4+T細胞におけるHIV-1感染防御機構の解析」第22回日本エイズ学会学術集会・総会（2008年11月26日-28日、大阪）
5. 花房秀次、小島賢一、加藤真吾、兼子 智、高桑好一、久慈直明、木内 英、加嶋克則、吉村泰典、田中憲一、和田裕一「HIV感染夫婦の生殖補助医療の実績と安全性：HIV陽性同士の生殖補助医療プロトコール」第22回日本エイズ学会学術集会・総会（2008年11月26日-28日、大阪）
5. 木内 英、岩室紳也、相楽裕子、大木 茂、元重京子、近藤真規子、今井光信、花房秀次、加藤真吾「母子感染予防における出生児のAZT薬物動態と副作用」第22回日本エイズ学会学術集会・総会（2008年11月26日-28日、大阪）
6. 田中理恵、古谷茂之、林 邦彦、今井光信、加

藤真吾「HIV-1 RNA 定量キットのコントロールサーベイ」第22回日本エイズ学会学術集会・総会(2008年11月26日-28日、大阪)

7. 近藤真規子、田中理恵、須藤弘二、佐野貴子、岩室神也、倉井華子、立川夏夫、相楽裕子、加藤真吾、今井光信「汎用リアルタイムPCR装置を用いたHIV-1 RNA 定量法の検討」第22回日本エイズ学会学術集会・総会(2008年11月26日-28日、大阪)
8. 須藤弘二、加藤真吾「PCRとLC-MSを組み合わせた薬剤耐性変異定量法の検討」第22回日本エイズ学会学術集会・総会(2008年11月26日-28日、大阪)
9. 須藤弘二、佐野貴子、近藤真規子、加藤真吾、今井光信「HIV 郵送検査に関する実態調査および検査精度の調査」第22回日本エイズ学会学術集会・総会(2008年11月26日-28日、大阪)
10. 池野 良、高木律男、児玉泰光、田邊嘉也、手塚貴文、佐藤みさ子、加藤真吾「リアルタイムPCR法(TaqMan法)を用いた唾液中HIV-1 RNA/DNA量と血清中HIV-1 RNA量の比較検討」第22回日本エイズ学会学術集会・総会(2008年11月26日-28日、大阪)
11. 加藤真吾、榎本 茜、田中理恵「正しい血中ウイルス量を求める方法の検討」第22回日本エイズ学会学術集会・総会(2008年11月26日-28日、大阪)
12. 杉浦 互、湯永博之、吉田 繁、千葉仁志、小池隆夫、伊藤俊広、原 孝、佐藤武幸、石ヶ坪良明、上田敦久、近藤真規子、今井光信、貞升健志、長島真美、福武勝幸、山元泰之、田中理恵、加藤真吾、宮崎菜穂子、藤井 毅、岩本愛吉、藤野真之、仲宗根正、巽 正志、椎野慎一朗、岡 慎一、林田庸総、服部純子、伊部史朗、藤崎誠一郎、金田次弘、浜口元洋、上田幹夫、大家正義、田邊嘉也、渡辺香奈子、渡邊 大、白阪琢磨、栗原 健、森 治代、小島洋子、高田 昇、木村昭郎、南 留美、山元政弘、松下修三、健山正男、藤田次郎「2003-2007年の新規HIV-1感染者における薬剤耐性頻度の動向」第22回日本エイズ学会学術集会・総会(2008年11月26日-28日、大阪)

3. その他

なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

発明の名称：遺伝子変異検出システム及び遺伝子変異検出方法、発明者：加藤真吾、須藤弘二、
発願年月日：2008年05月19日、出願番号：特願2008-131243号。(申請中)

2. 実用新案登録

なし



研究要旨

耐性遺伝子超高感度定量法の開発及び潜在的薬剤耐性HIV発掘調査

研究分担者 仲宗根 正 国立感染症研究所・エイズ研究センター 主任研究官
 研究協力者 杉浦 互¹、西澤 雅子¹、Sarah Palmer²、Siriphan Saeng-aroon³
¹国立感染症研究所・エイズ研究センター、²米国NCI、³タイ国NIH

未治療HIV感染者の中にも存在が予想されている薬剤耐性HIV、すなわち潜在的薬剤耐性HIV発掘調査を目的として、昨年度に耐性遺伝子超高感度定量法を開発した。同法を用いて潜在的薬剤耐性HIV発掘調査の準備を行った。また、発掘が予想される体内薬剤耐性HIVの感染性の新規指標確立を目的として、一昨年度までに開発した超高感度HIV逆転写酵素活性定量法を用いて感染者体内のHIVの1分子当たりの逆転写酵素活性を測定した。今年度は以下の成果を得た。

- ①潜在的薬剤耐性HIV発掘調査対象として静注薬剤常用者集団と同性性行為集団を対象に選定し、研究倫理面を含めた準備を開始した。
- ②RNA1コピー当たりの逆転写酵素活性(RT/RNA)が薬剤耐性HIVを含めて、HIV感染性の新たな指標となる可能性を確認した。

A. 研究目的

薬剤耐性HIVの克服は、HIV感染者の長期生存のためには大きな課題のひとつである。これまで未治療HIV感染者体内には薬剤耐性HIVは存在しない、あるいは極めて少ないと考えられていた。しかし、近年の研究結果から予想より多い可能性が示唆されている。この、未治療HIV感染者体内のいわゆる潜在的薬剤耐性HIVを検出することができれば、効果的な薬剤選択を事前に予測することが可能となり、HIV感染者にとって福音となる。本研究では、未治療HIV感染者の中にも存在が予想されている薬剤耐性HIVの発掘、すなわち潜在的薬剤耐性HIV発掘調査を目的とする。また、薬剤耐性HIVの感染性の指標にはウイルス生物学的手法によるものがあるが、煩雑かつ時間がかかるため実用性にやや欠ける。簡便で実用的な指標の確立を目指して、一昨年度までに開発した超高感度HIV逆転写酵素活性定量法を用いて感染者体内のHIVの1分子当たりの逆転写酵素活性を測定した。最終的には以上の新規手法を併せて、潜在的薬剤耐性HIVの感染性を定量化することによりその脅威の程度を明らかにしたい。

B. 研究方法

潜在的薬剤耐性HIV発掘調査対象として静注薬剤常用者集団と同性性行為集団を対象に選定し、研究倫理面を含めた準備を開始した。

薬剤耐性実験室株5株(41L/184V/215Y、41L/67N/70R/215Y、184V、41L/215Y、103N)、薬剤感受性実験室株3株(HIVMN、HIVBRU、HIVNDK)、薬剤感受性臨床HIV(感染者血漿中の生ウイルス)8検体についてウイルスRNAコピー数(アンプリコア)と逆転写酵素活性(一昨年度までに開発した超高感度HIV逆転写酵素活性定量法)を測定し、RNA1コピー当たりの逆転写酵素活性を算出した。実験室株についてはHIV-p24抗原量(富士レピオ:ルミパルス)も測定し、RNA1コピー当たりのp24分子コピー数を算出した。

C. 研究結果

1. RNA1コピー当たりの逆転写酵素活性(mean ± SE)はそれぞれ以下であった。

薬剤耐性実験室株(n=5): 6,018 ± 1,855 nU/copy
 薬剤感受性実験室株(n=3): 13,679 ± 5,845 nU/copy
 薬剤耐感受性臨床株(n=8): 3,679 ± 1,506 nU/copy

2. RNA1コピー当たりのp24分子コピー数(mean ± SE)はそれぞれ以下であった。

薬剤耐性実験室株(n=5): 357 ± 75 × 10³ copies/copy

薬剤感受性実験室株(n=3): 1,219 ± 755 × 10³ copies/copy

D. 考察

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

解決策についても既に指摘している。調査対象集団のウイルス量と遺伝子配列を事前にスクリーニングする方法である。一般的なダイレクトシーケンスでメジャーな遺伝子配列を明らかにし、目的の遺伝子近傍の配列が本法のPrimerとほぼ一致する症例を選択すれば、前記の問題はクリアできる。その分、症例数は少なくなるという新たなデメリットも生じるが、得られる結果の精度については充分評価に耐えるものとする。今年度は以上を踏まえて、潜在的薬剤耐性HIV発掘調査対象として静注薬剤常用者集団と同性性行為集団を対象に選定し、研究倫理面を含めた準備を開始した。

将来的に潜在的薬剤耐性HIVが発掘された場合、次の課題として挙がってくるのは、その感染力である。通常、HIVの感染力は、ウイルス生物学的手法であるCell-based assayが一般的である。この手法は煩雑で時間がかかることからより実用的な測定法の開発が望まれている。一方、HIVの逆転写酵素活性は感染性を直接表すものではない。しかしながら文献的にはその活性は感染性の間接的な指標とされている。従って、RNA1コピー当たりの逆転写酵素活

性(RT/RNA)は感染性の間接的な指標になる可能性を示唆している。今回示した手法はPCRを基本にしており、Cell-based assayに比較して極めて簡便である。我々の、SHIV感染サルにおいては感染早期(peak viremia期)の血中SHIVのRT/RNAは、感染中期以降(set-point viremia期)のRT/RNAよりも低く(約1/10)、感染末期の髄液中SHIVのRT/RNAはさらに低い(1/100以下)ことを確認している(未発表)。このことは、体内の場所や感染時期によって、ウイルスはその感染性が著しく異なっていることを示唆している。今回、我々は、薬剤耐性HIVのRT/RNAが薬剤感受性HIVのRT/RNAより低い可能性を確認した。Cell-based assayによる測定でも、薬剤耐性HIVのいわゆるfitnessは低いことが確認されており、RNA1コピー当たりの逆転写酵素活性(RT/RNA)がHIV感染性の新たな指標となる可能性を示唆していると考えられる。次年度はサンプル数を増やし、また薬剤耐性臨床株を多数測定して、新たな指標としての可能性をさらに明らかにする必要がある。

E. 結論

- ①潜在的薬剤耐性HIV発掘調査対象として静注薬剤常用者集団と同性性行為集団を対象に選定し、研究倫理面を含めた準備を開始した。
- ②RNA1コピー当たりの逆転写酵素活性(RT/RNA)が薬剤耐性HIVを含めて、HIV感染性の新たな指標となる可能性を確認した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

無し。

2. 学会発表

1. 村上努、大隈和、田中礼子、仲宗根正、濱武牧子、駒野淳、谷中幹郎、田中勇悦、山本直樹：KRH-3955：新規CXCR4 アンタゴニストは経口投与可能な高活性抗HIV-1剤である。第56回日本ウイルス学会(10/26-28,2008,岡山)
2. 仲宗根正、網康至、梁明秀、山本直樹：ウイルス曝露非感染サルモデル開発の試み。第22回日本エイズ学会(11/26-28,2008,大阪)
3. 村上努、大隈和、田中礼子、仲宗根正、濱武牧子、駒野淳、谷中幹郎、田中勇悦、山本直樹：KRH-3955は経口投与可能な高活性抗X4 HIV-1阻害剤である。第22回日本エイズ学会(11/26-28,2008,大阪)
4. 杉浦互、湯永博之、吉田 繁、千葉仁志、小池隆

夫、伊藤俊広、原 孝、佐藤武幸、石ヶ坪良明、上田敦久、近藤真規子、今井光信、貞升健志、長島真美、福武勝幸、山元泰之、田中理恵、加藤信吾、宮崎菜穂子、岩本愛吉、藤野真之、仲宗根正、巽正志、椎野禎一郎、岡慎一、林田庸総、服部純子、伊部史朗、藤崎誠一郎、金田次弘、浜口元洋、上田幹夫、正兼亜季、大家正義、下条文武、田邊嘉也、渡辺香奈子、白阪琢磨、栗原健、森治代、小島洋子、中桐逸博、高田昇、木村昭郎、南 留美、山本政弘、松下修三、健山正男、藤田次郎：2003-2007年の新規HIV-1感染者における薬剤耐性頻度の動向，第22回日本エイズ学会（11/26-28,2008,大阪）

II. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

