

治療効果判定と毒性等評価

2008年6月16日より新規薬剤を含む抗HIV療法を開始した。CD4数、ウイルス量は2週間毎に測定した。血液検査、生化学検査を行い、毒性等の評価を行った。名古屋医療センター薬剤科により本症例におけるDRV、RALの血中濃度の経時変化を解析した。

FPV、ATV、DRVに対する感受性予測

2006年3月21日、4月20日、7月20日、2008年6月16日のmajor cloneのアミノ酸配列をもとに、国立感染症研究所大出裕高博士に依頼し、コンピューターシミュレーションによる薬剤感受性予測を行った (ref. J Mol Biol. 2007 Jul 13;370(3):598-607. 2007 May 10.)。

(倫理面への配慮)

治療開始時に国内未承認薬のENF、ETR、RALは、本人の承諾を得て使用した。検体採取も同意を得て行った。

C. 研究結果

本症例の臨床経過

1995年にニューモシスチス肺炎を発症してHIV感染が判明した30代日本人男性。受診直後より様々なPI、NNRTIをキードラッグとした抗HIV療法を継続してきたが、重症口腔カンジダ症による嚥下困難感などにより服薬アドヒアランスが低下し、NRTI、NNRTI、PI全てに高度耐性化した (図1)。2006年1月に播種性結核、血球貪食症候群を発症し、

抗結核療法を行ったが有効な炎症制御が得られなかったため、HIV複製制御も必要と判断し、2005年2月6日よりabacavir (ABC)+3TC+lopinavir (LPV/r)+efavirenz (EFV)による治療を行った。しかしながら、ウイルス量は全く減少を認めず、臨床的にも改善を得られなかった。2006年2月20日よりfosamprenavir (FPV)+atazanavir (ATV)+ritonavir (RTV)+tenofovir (TDF)+stavudine (d4T)+lamivudine (3TC)による抗HIV療法を行い、一旦は50 copies/ml未満までウイルス量が低下。救命し得たものの2006年6月には再びウイルス量が増加した。治療を継続したものの、乳酸アシドーシス、汎血球減少などの副作用も顕著で入退院を繰り返した。2008年になり、CD4数低下傾向、体重減少が顕著になり、新規薬剤を組み入れた抗HIV療法導入によるHIVの複製制御と免疫再構築が必須の状況となった (図2)。

治療変更前の薬剤耐性関連変異の解析

2006年2月20日にFPV、ATVを使用した強力な抗HIV療法開始前にも、PR、RT領域に高度の薬剤耐性関連アミノ酸変異を検出した。NRTIに関しては、M184I、69 insertion complexであり多剤耐性と予測された (図3)。また、NNRTI関連では、NVP、EFVの使用時に一致してL100I、K103Nが過去に検出され、K103Sが保持されていた (図4)。PIについても耐性関連変異の高度蓄積を認めた (図5)。2006年2月20日から2008年6月16日までにFPV、ATVをキードラッグとした強力な抗HIV療法を継続したが、ウイルス量の抑制は一過性であり、PR領域の耐性

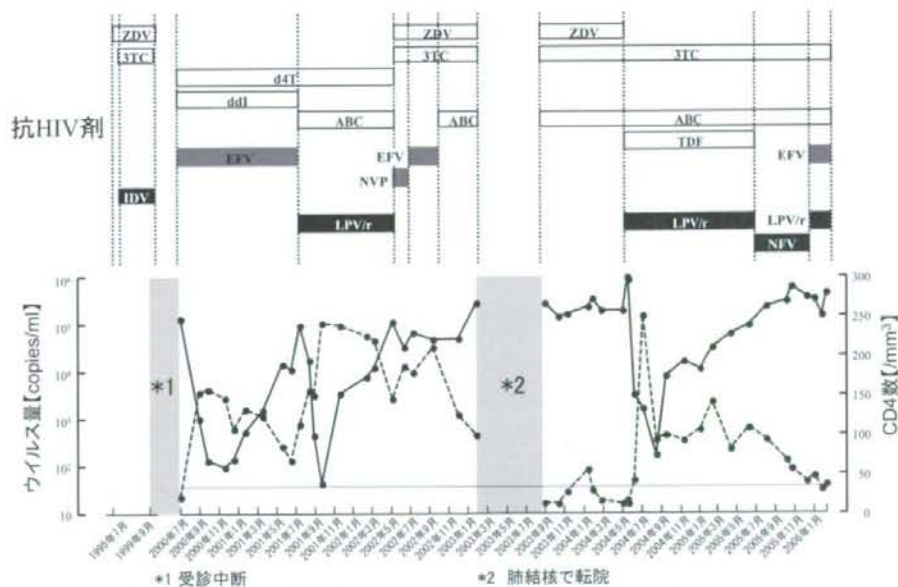


図1 1995年～2006年の治療内容とウイルス量、CD4数の推移

関連変異の蓄積に一致してウイルス量の増加を認めた(図2, 5)。2008年6月16日に採取検体のPRのクローニング解析の結果、major cloneでもFPVの継続使用に起因すると考えられる、V32I, I54Lなど、DRV耐性関連変異の蓄積を認めた(図5)。RT領域のクローニング解析の結果、NRTI関連変異は分離したクローンで2006年3月の配列と変化を認めず、全薬剤に高度耐性が予測された。2006年2月20日以降、NNRTIは併用していなかったが、新規にETV関連変異V90Iの変異を認めた(図4)。IN、*env*領域のクローニング解析の結果、それぞれRAL, ENF耐性関連変異は検出されず、感受性があると予想された(data not shown)。

同検体を用いてウイルス分離を試みたが、表現型

による薬剤耐性試験は不可能であった。

新規薬剤による治療効果と副作用評価

2008年6月16日より新規薬剤を使用した抗HIV療法を開始したところ、治療変更後1ヵ月でウイルス量は40 copies/ml未満となり、CD4数も速やかに回復した(図6)。血液検査、生化学検査所見では、血小板数、ヘモグロビン値の上昇と血清クレアチニン値の改善傾向を認め、肝機能障害も改善した(data not shown)。ENFの皮下注射に伴う発赤、腫脹、疼痛などの副作用は全く認められなかった。

RAL, DRVの血中濃度を測定したところ、両剤とも有効な濃度が得られていた(data not shown)。

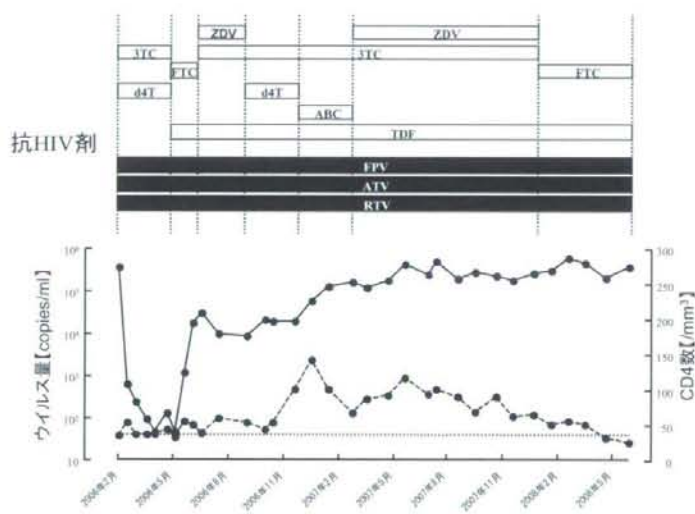


図2 2006年～2008年の治療内容とウイルス量、CD4数の推移

| HXB2 | 41 62 65 67 69 70 74 75 77 115 151 184 210 215 219 | | | | | | | | | | | | | | | ARV | |
|----------|--|---|---|---|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|-------------------------|
| | M | A | K | D | S | K | L | V | F | Y | F | Q | M | L | T | | Y |
| 01/6/26 | - | - | R | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | d4T,d4LEFV |
| 02/3/19 | L | - | - | - | ina | - | - | - | - | - | - | - | W | Y | - | - | d4T,ABC,FPV/r |
| 02/7/18 | L | - | - | - | ina | - | - | - | - | - | - | - | W | Y | - | - | CRV,EFV |
| 04/2/5 | L | - | - | - | ina | - | - | - | - | - | - | - | - | + | Y | - | CRV,ABC |
| 04/5/17 | L | - | - | - | ina | - | - | - | - | - | - | - | * | Y | - | - | TDF,3TC,ABC,LPV/r |
| 05/2/25 | L | V | - | - | ina | - | - | - | - | - | - | - | I | W | Y | - | TDF,3TC,ABC,LPV/r |
| 06/1/8 | L | V | - | - | ina | - | - | - | - | - | - | - | I | W | Y | - | EZC,NFV |
| 06/2/20 | L | V | - | - | ina | - | - | - | - | - | - | - | I | W | Y | - | EZC,LPV/r,EFV |
| 06/3/6 | L | V | - | - | ina | - | - | - | - | - | - | - | I | W | Y | - | d4T,3TC,TDF,FPV,ATV,RTV |
| 06/3/20 | L | V | - | - | ina | - | - | - | - | - | - | - | I | W | Y | - | d4T,3TC,TDF,FPV,ATV,RTV |
| 06/4/7 | L | V | - | - | ina | - | - | - | - | - | - | - | I | W | Y | - | d4T,3TC,TDF,FPV,ATV,RTV |
| 06/4/21 | L | V | - | - | ina | - | - | - | - | - | - | - | I | W | Y | - | d4T,3TC,TDF,FPV,ATV,RTV |
| 06/6/9 | L | V | - | - | ina | - | - | - | - | - | - | - | I | W | Y | - | TDF,ETC,FPV,ATV,RTV |
| 06/6/23 | L | V | - | - | ina | - | - | - | - | - | - | - | I | W | Y | - | CRV, TDF, FPV,ATV,RTV |
| 06/8/4 | L | V | - | - | ina | - | - | - | - | - | - | - | I | W | Y | - | CRV, TDF, FPV,ATV,RTV |
| 06/12/19 | L | V | - | - | ina | - | - | - | - | - | - | - | I | W | Y | - | d4T,3TC,TDF,FPV,ATV,RTV |
| 07/2/16 | L | V | - | - | ina | - | - | - | - | - | - | - | I | W | Y | - | EZC,TDF,FPV,ATV,RTV |
| 08/2/8 | L | V | - | - | ina | - | - | - | - | - | - | - | I | W | Y | - | ZDV,TDF,ETC,FPV,ATV,RTV |
| 08/5/16 | L | V | - | - | ina | - | - | G | - | - | - | - | I | W | Y | - | TDF,ETC,FPV,ATV,RTV |
| 08/6/16 | L | V | - | - | ina | - | - | - | - | - | - | - | I | W | Y | - | TDF,ETC,FPV,ATV,RTV |

ina:SS

*L/W

薬剤耐性アミノ酸変異は、IAS-USA March/April 2008版に準じた

図3 NRTI耐性関連部位のアミノ酸変異蓄積の経過

| HXB2 | 90 | 98 | 100 | 101 | 103 | 106 | 108 | 179 | 181 | 188 | 190 | 225 | ARV |
|----------|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------------------------|
| | V | A | L | K | K | V | V | V | Y | Y | G | P | |
| 01/6/26 | - | - | I | - | N | - | - | - | - | - | - | - | d4T,ddLEFV |
| 02/3/19 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | d4T,ABC,LPV/r |
| 02/7/18 | - | - | - | - | N | - | - | - | - | - | A | - | CBV,EFV |
| 04/2/5 | - | - | - | - | * | - | - | - | - | - | * | - | CBV,ABC |
| 04/5/17 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | * | - | TDF,3TC,ABC,LPV/r |
| 05/2/25 | - | - | - | - | S | - | - | - | - | - | A | - | TDF,3TC,ABC,LPV/r |
| 06/1/8 | - | - | - | - | S | - | - | - | - | - | - | - | EZC,NFV |
| 06/2/20 | - | - | - | - | S | - | - | * | - | - | A | - | EZC,LPV/r,EFV |
| 06/3/6 | - | - | - | - | S | - | - | * | - | - | * | - | d4T,3TC,TDF,FPV,ATV,RTV |
| 06/3/20 | - | - | - | - | * | - | - | - | - | - | - | - | d4T,3TC,TDF,FPV,ATV,RTV |
| 06/4/7 | - | - | - | - | * | - | - | - | - | - | - | - | d4T,3TC,TDF,FPV,ATV,RTV |
| 06/4/21 | - | - | - | - | S | - | - | I | - | - | A | - | d4T,3TC,TDF,FPV,ATV,RTV |
| 06/6/9 | - | - | - | - | S | - | - | I | - | - | A | - | TDF,FTC,FPV,ATV,RTV |
| 06/6/23 | - | - | - | - | S | - | - | I | - | - | A | - | CBV,TDF,FPV,ATV,RTV |
| 06/8/4 | - | - | - | - | S | - | - | I | - | - | A | - | CBV,TDF,FPV,ATV,RTV |
| 06/12/19 | - | - | - | - | S | - | - | I | - | - | A | - | d4T,3TC,TDF,FPV,ATV,RTV |
| 07/2/16 | - | - | - | - | * | - | - | * | - | - | * | - | EZC,TDF,FPV,ATV,RTV |
| 08/2/8 | * | - | - | - | * | - | - | * | - | - | * | - | ZDV,TDF,FTC,FPV,ATV,RTV |
| 08/5/16 | I | - | - | - | * | - | - | * | - | - | A | - | TDF,FTC,FPV,ATV,RTV |
| 08/6/16 | I | - | - | - | - | - | - | * | - | - | A | - | TDF,FTC,FPV,ATV,RTV |

薬剤耐性アミノ酸変異は、IAS-USA March/April 2008版に準じた

図4 NNRTI耐性関連部位のアミノ酸変異蓄積の経過

| HXB2 | 10 | 11 | 13 | 16 | 20 | 24 | 30 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 43 | 46 | 47 | 48 | 50 | 53 | 54 | 60 | 62 | 63 | 64 | 69 | 71 | 73 | 74 | 76 | 77 | 82 | 83 | 84 | 85 | 88 | 89 | 90 | 93 | ARV |
|----------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-------------------------|-----|
| | L | V | I | G | K | L | D | V | L | R | E | M | F | M | I | G | I | F | I | D | I | L | I | H | A | G | T | L | V | N | I | I | N | L | L | I | | |
| 01/6/26 | I | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | d4T,ddLEFV | |
| 02/3/19 | I | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | d4T,ABC,LPV/r | |
| 02/7/18 | I | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | CBV,EFV | |
| 04/2/5 | I | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | CBV,ABC | |
| 04/5/17 | I | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | TDF,3TC,ABC,LPV/r | |
| 05/2/25 | * | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | TDF,3TC,ABC,LPV/r | |
| 06/1/8 | * | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | EZC,NFV | |
| 06/2/20 | * | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | EZC,LPV/r,EFV | |
| 06/3/6 | * | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | d4T,3TC,TDF,FPV,ATV,RTV | |
| 06/3/20 | * | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | d4T,3TC,TDF,FPV,ATV,RTV | |
| 06/4/7 | * | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | d4T,3TC,TDF,FPV,ATV,RTV | |
| 06/4/21 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | d4T,3TC,TDF,FPV,ATV,RTV | |
| 06/6/9 | * | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | TDF,FTC,FPV,ATV,RTV | |
| 06/6/23 | I | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | CBV,TDF,FPV,ATV,RTV | |
| 06/8/4 | I | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | CBV,TDF,FPV,ATV,RTV | |
| 06/12/19 | I | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | d4T,3TC,TDF,FPV,ATV,RTV | |
| 07/2/16 | I | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | EZC,TDF,FPV,ATV,RTV | |
| 08/2/8 | I | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | ZDV,TDF,FTC,FPV,ATV,RTV | |
| 08/5/16 | I | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | TDF,FTC,FPV,ATV,RTV | |
| 08/6/16 | I | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | TDF,FTC,FPV,ATV,RTV | |

薬剤耐性アミノ酸変異は、IAS-USA March/April 2008版に準じた

図5 PI耐性関連部位のアミノ酸変異蓄積の経過

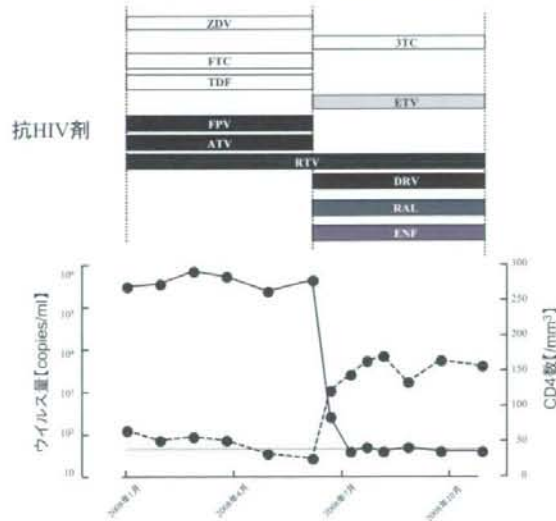


図6 2008年1月以降の治療内容とウイルス量、CD4数の推移

シミュレーションによるDRVの感受性予測

2006年3月20日、4月21日、2008年6月16日のmajor cloneのアミノ酸配列を用いて、FPV、ATV、DRVとの親和性を計算し、耐性の予測を検討した。その結果、ATVに対しては当初から高度耐性と予測された。FPVに対しては変異の蓄積に一致して耐性度の上昇が予想された。DRVに関しても、2008年6月16日の検体から得られた結果からは軽度耐性を獲得していると予想された(表1)。

表1 シミュレーションによる耐性予測

| | FPV | ATV | DRV |
|------------|--------------------|--------------------|------------------|
| 2006/03/20 | +0.1 (x 1.2) | +4.7 (x > 1000) | -2.2 (x < 1) |
| 2006/04/21 | +4.1 (x 764) | +5.2 (x > 1000) | +1.8 (x 18.4) |
| 2008/06/16 | +5.4 (x > 1000) | +8.1 (x > 1000) | +0.8 (x 3.7) |

Unit: kcal/mol, ()内は、次式より換算した耐性度(FR), $\Delta\Delta G_b = RT \ln(FR)$

D. 考察

遺伝子型の解析から、既存のNRTI、NNRTIの感受性はないと予測された。また、2008年6月16日の解析結果から、新規PIであるDRVおよび新規NNRTIであるETVについても、感受性の低下が懸念された。従って、RAL、ENFをキードラッグとし、DRV、ETVを併用する抗HIV療法を行う方針とした。M184Iの維持によりHIVの複製能低下の効果を期待して3TCを加えた。

新規薬剤を含む治療は、強力な抗HIV効果を示し、治療開始1ヶ月でウイルス量は40 copies/ml未満となった。特筆すべきことは、FPV、ATVを用いてウイルス量を抑制した際には認められなかったCD4数の上昇が今回、速やかに認められた事である。

多剤併用療法により惹起されていたと考えられる検査数値異常も改善した。特にZDV中止によるヘモグロビン値、TDF中止による血清クレアチニン値、高用量PI中止による肝機能障害改善は顕著であった。

1日2回の内服および自己皮下注射による治療であったが、消化器症状や皮下注射に伴う問題も生じず、自覚的にも体調の改善が認識された。

多剤併用療法であり、薬物相互作用による血中濃度の変動も危惧されたが、今回併用した組み合わせの場合、本症例では有効かつ安全な血中濃度が得られていることが確認された。

2009年2月現在も治療継続中で、ウイルス量は40

copies/ml未満、CD4数は200/mm³以上を維持し、良好な経過を示している。

今回、遺伝子型解析およびシミュレーション解析により、ウイルスの複製抑制効果が得られない状況でのFPV長期投与が、DRV感受性低下につながる可能性が示唆された。RAL、ETV、ENF、MRVなど既存のNRTI、NNRTIに変わる選択肢がある現在、耐性獲得が予想された場合、可及的速やかに遺伝子型や表現型による薬剤感受性試験を行い、その原因解析を行うことが重要である。耐性変異獲得によると思われる場合、その責任領域を明確にし、新規治療に用いる薬剤の組み合わせを検討し、迅速に治療変更を行うことが必要である。

今回、治療に用いた薬剤の中で、遺伝子型解析の結果から確実にウイルス複製制御に寄与したと考えられるのは、RALとENFである。今後、治療が長期となり、薬剤変更が必要となる事態も予想される。また、併用薬剤の決定や治療計画策定上で、併用の可能性のある薬剤の有効性を評価することが重要である。

本症例ではENFを使用する方針としたが、副反応から長期使用継続が困難となる頻度も高いことが知られている。そこで、本研究では、クローニングしたenvを発現する系を確立し、co-receptor usageを検討、MRVへの変更の妥当性を評価することとした。現在、その評価を進めている。

遺伝子型検査やシミュレーションからはDRVに対する感受性低下が予測された。しかしながら、既存の表現型検査が可能な複製能を有するウイルスが分離できず、実証されていない。今後、LPV/r耐性化症例などで、DRVの感受性を評価することは、他剤の併用の必要性を検討する上で重要である。そこで、現在、HIV複製を必要としない簡易なシステムの構築を行っている。今回の症例は、正確な薬剤使用履歴と臨床経過、詳細な遺伝子型解析結果が利用可能である。本症例の検体を使用して、簡易表現系検査方法の実用性を示すために検討を進めている。将来的には、遺伝子型と表現型を対応させ、その結果を用いることにより、高度耐性変異蓄積PRでも迅速に感受性予測が可能なシミュレーションシステムの構築を、大出博士と共同で行う予定である。

E. 結論

RALをはじめとする新しいクラスの抗HIV剤を適切に使用することにより、既存の薬剤では治療困難であった多剤高度耐性HIV感染症例でも良好な予後を得られる可能性がある。今回の症例については、新規薬剤による顕著な副作用も認められなかった。

長期予後の改善のためには、併用薬剤の選択が重要であり、遺伝子型、表現型による薬剤耐性試験を行う必要がある。

高度薬剤耐性関連変異蓄積PRやenvの表現型検査の確立は十分でなく、低コストで迅速な検査方法の確立が重要である。

F. 健康危険情報

総括研究報告書参照

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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*. 2008 Aug;24(8):1121-5.
2. Clinical features and course of 5 cases with HIV encephalopathy Hashimoto R, Mukai E, Yokomaku Y, Mamiya N, Hamaguchi M. *Rinsho Shinkeigaku*. 2008 Mar;48(3):173-8.

2. 学会発表

1. HAART施行中における脂質代謝異常の検討、奥村直哉 平野淳、久高祐一、寺畑奈美、高橋昌明、横幕能行、間宮均人、安岡彰、濱口元洋
2. HIVプロテアーゼにおける耐性変異L89Vの立体的影響、大出裕高、横山勝、佐藤裕徳、伊部史朗、藤崎誠一郎、間宮均人、濱口元洋、杉浦互、横幕能行
3. Enfuvirtide(T-20)+raltegravir(RAL)+ darunavir (DRV)+etravirine(TMC125)+lamivudine(3TC)の多剤高度耐性HIV感染症に対する治療効果、横幕能行、大出裕高、間宮均人、濱口元洋、伊部史朗、藤崎誠一郎、藤崎彩恵子、金田次弘、杉浦互
4. アバカビル投与による副作用とその発現時期についての検討、平野淳、奥村直哉 久高祐一、寺畑奈美、高橋昌明、坂野和英、脇坂達郎、横幕能行、間宮均人、濱口元洋、金田次弘

以上、第22回日本エイズ学会学術集会・総会 2008.11 大阪

H. 知的所有権の取得状況

なし

新規プロテアーゼ阻害薬の *in vitro* 研究

研究分担者

関 康博

熊本大学大学院医学薬学研究部血液内科学・感染免疫診療部 特定事業研究員

研究要旨

「新規プロテアーゼ阻害薬 (PIs) の *in vitro* 研究」を研究課題とし、HIV-1 が耐性を発現しにくく、発現しても交差耐性を有しない新世代のPIの開発を進め、cyclopentanyl-tetrahydrofuranylurethane (Cp-THF) というユニークな構造を有し、多剤耐性臨床分離株に対して、高い抗HIV-1活性を発揮、維持する新規PI, GRL-02031を同定・開発した。

A. 研究目的

ヒト免疫不全ウイルス (HIV-1) 感染によって起こる後天性免疫不全症候群 (AIDS) に対する化学療法は長足の進歩を遂げ、かつて「死の病」とされた本疾患は「コントロール可能な慢性感染症」と再定義し得る程となった。この進歩は、逆転写酵素阻害剤 (RTIs) とプロテアーゼ阻害剤 (PIs) を組み合わせた多剤併用療法 (HAART) に負うところが大きい。しかし、HIV-1 が RTIs と PIs の両剤に対して耐性を獲得してその多くが交差耐性であって治療抵抗性となった症例数の増大、また耐性ウイルスによる初感染症例増多の報告が続いており、野生 HIV-1 株と多剤耐性株の双方に強力な活性を発揮し、薬剤耐性を誘導しにくく、副作用が少なく、服用しやすい新規の薬剤の開発が文字通り急務の課題となっている。

本研究では、「新規プロテアーゼ阻害薬 (PI) の *in vitro* 研究」を分担研究課題とし、HIV-1 が耐性を発現しにくく、発現しても交差耐性を有しない新世代のPIsの開発を進めるとともに、治療困難な症例に対する開発中の新薬を含んだ治療指針の基盤となるデータの確立を目指す。

B. 研究方法

1) 検討中の化合物の抗 HIV-1 活性評価及びより有望な化合物の開発・評価：抗 HIV-1 活性の評価には MTT、MAGI アッセイなどを用いるが有望なものについては耐性株を含む複数のウイルス株での活性を更に検討するため、p24 アッセイを行う。このアッセイには全自動化学発光度測定機：Lumipulse Fを用いる。このようにして見いだされたより有望な化合物について前臨床

試験の準備を進める。

- 2) 抗 HIV-1 作用発現のメカニズム解析：PIs がウイルス、あるいは生体 (細胞) へ与える変化、それがどのようにして抗 HIV-1 効果をもたらすかについて解析を進める。この研究には多数の HIV-1 クローンの作成・検討が必要で、しかも HIV-1 の広範な遺伝子部分についての検索が必要とされるが、high throughput の DNA sequencer：ABI-3130 Genetic Analyzer を用いるので迅速な実験データの解析が可能となる。
- 3) 薬剤耐性のメカニズム解析：HIV-1 が極めて高い増殖能を有し、しかも逆転写酵素 (RT) が error-prone であるという特性のために、HIV-1 の薬剤耐性発現は不可避である。X線結晶解析をはじめとするタンパクの微細構造研究の方法論を用いて、多剤耐性 HIV-1 株の発現機序の分子・原子レベルでの解析を行う。その後、構造を基礎とした高い抗ウイルス活性を有しかつ耐性の発現に抵抗する薬剤のデザイン・再デザインを行う。新規のプロテアーゼ阻害剤について試験管内で耐性 HIV-1 変異株の誘導を試み、更にそのようにして誘導された HIV-1 についてのウイルス学・生化学・遺伝子の解析や X線結晶解析を用いて耐性発現のメカニズムの解析を行う。

(倫理面への配慮)

開発中の化合物の臨床試験導入に際して、まず動物実験などでその安全性を十分に確認する。さらに医学部・大学内の該当する IRB で倫理面での適合性について許可を申請、認可された後で試験を開始する。

C. 研究結果

化合物のP2部位に *bis*-tetrahydrofuranyl-urethane (*bis*-THF) というユニークな構造を有し、HIV-1 プロテアーゼ (PR) 活性部位である Asp-29/Asp-30 の主鎖 (back bone) と極めて強固な水素結合を形成することで広いスペクトラムの薬剤耐性株に強力な抗HIV活性を発揮するPI, TMC114/darunavir/ Prezista™ (DRV) (Koh & Mitsuya, *Antimicrob Agents Chemother.* 47: 3123-3129, 2003) を研究分担者らは開発、DRVは2006年に米国FDAに認可され、本邦でも臨床に供されている。2008年に1日1回投与の初回治療薬としてFDAに認可されるに至り、今後のHAARTの中心的な薬剤となる可能性が極めて高い。さらに我々のグループは新規PIsの開発を進めており、最近DRVとは異なる基本骨格である cyclopentanyl-tetrahydrofuran (Cp-THF) を有し、多剤耐性臨床分離HIV株に対して野生HIV-1株とはほぼ同等 (EC_{50} 値で2倍以内) の高い活性を発揮する新規PI, GRL-02031を開発 (Koh & Mitsuya, *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 *in press*) した (図1)。

GRL-02031は試験管内で誘導した複数のPIs耐性変異HIV-1株に対しても高い活性を発揮、既存のPIsと比較して試験管内での耐性発現の遅延も認められた。多数の組み換え感染性HIV-1クローンを用いて検討したところ、HIV-1はGRL-02031に対して単一

の耐性変異ではなく、複数の変異が蓄積してのみ高度耐性を獲得する事が明らかとなり、本剤の薬剤耐性HIV-1に対する有効性を示唆する知見が得られた。また、GRL-02031/野生HIV-1 PR複合体の結晶構造解析によって、本剤がHIV-1 PRの活性中心部位に2つの異なる結合様式で結合することが明らかとなり、この特徴的といえる bimodal binding mode が本剤の薬剤耐性HIVに対して高い活性を発揮する機序の一因と考えられた (図2)。

構造的に非常に類似しているDRV、APV/FPVは試験管内で一部交差耐性を示す予備的、準備的データを我々は有しており、臨床下においてこれから使用頻度が増すと考えられるDRV、FPVの適正使用法の確立を図る必要があると考えられた。我々は複数のFPV高度耐性HIV-1変異株を試験管内で誘導、培養継代中のFPV耐性HIV-1計時的に分離し、各種PIsの抗HIV-1活性を検討したところ、DRVはFPV耐性HIV-1に対して活性の低下を認めたが、その他の検討したPIs (lopinavir, atazanavir, tipranavir, fosamprenavir等) と比較しても EC_{50} 値の絶対値は低く保たれており、また複数のFPV高度耐性HIV-1に対するDRVの EC_{50} 値は人体の血中内において十分に到達可能な濃度であった (未発表)。このことより、DRVはFPV耐性HIV-1を有する患者においても salvage 療法としても使用できる可能性が示唆された。

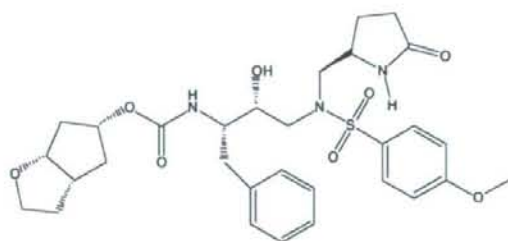


図1. 新規PI, GRL-02031の構造式
GRL-02031はP2部位にCp-THF構造という新たな「核」を有する新規のPIである。

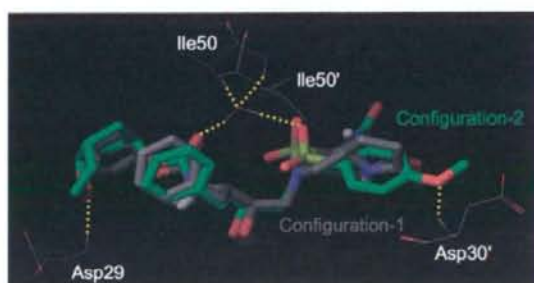


図2. GRL-02031のHIV-1 PR活性中心部位への結合様式
GRL-02031はHIV-1 PRの活性中心部位に2つの結合様式で結合することが結晶構造解析や分子モデリングにより明らかとなり、このユニークな結合様式 (bimodal binding mode) が複数のPIs耐性HIV-1に対しても高い活性を発揮する一因と考えられる。

D. 考察

我々が開発した新規PI, GRL-02031のように一剤で二つの結合様式(bimodal binding mode)を有する薬剤の開発は薬剤耐性HIVに対する治療戦略として有望であると思われ、今後はmolecular cloneを用いたより詳細な同剤への耐性機序の解析(どの変異PRがどちらの結合様式を阻害するか等)を行う。現在、多数の変異PRとGRL-02031を含んだ新規開発中のPIsとのPR活性中心部位における結合エネルギーを計算(free energy calculation)することにより、新規薬剤のデザイン、開発への新たな対応策を探る試みを進めている。

抗HIV-1剤(特にPIs)の適正使用に関しては、我々が試験管内で誘導したFPV耐性変異HIV-1の解析のみならず、FPV耐性HIV-1を有する患者から得られた臨床分離株に対する各PIsの活性の検討、耐性関連変異パターンの関連を検討、DRV等の新規PIsの適正使用指針の基礎的データの構築を図る。また、頻度は極めてまれではあるが、DRV耐性HIV-1が本邦の臨床下でも散見されつつあり、DRV耐性関連変異の同定とその組み合わせに関して、我々が多剤耐性誘導変異株を用いて誘導した高い複製能を有するDRV高度耐性変異HIV-1(未発表)や臨床検体を用いて耐性変異パターンの解析を行う予定である。

E. 結論

本研究では広いスペクトラムで強力な抗HIV-1活性を発揮する新規PIsの開発を進め、薬剤耐性変異HIV-1に高い活性を発揮するGRL-02031を開発した。今後はGRL-02031等の耐性発現の解析と分子機構の解明および耐性発現阻止への対応をはかり、ウイルス・細胞生物・薬理・結晶解析学的な研究を進める。

F. 健康危険情報

総括研究報告書参照

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yasuhiro Koh, Debananda Das, Sofiya Leschenko, Hiroto Nakata, Hiromi Ogata-Aoki, Masayuki Amano, Maki Nakayama, Arun K. Ghosh, and Hiroaki Mitsuya. GRL-02031: A Novel Nonpeptidic Protease Inhibitor (PI) Containing A Stereochemically Defined Fused Cyclopentanyltetrahydrofuran (Cp-THF) Potent

Against Multi-PI-Resistant HIV-1 *In Vitro*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 in press.

2. 学会発表

1. Yasuhiro Koh, Debananda Das, Sofiya Leschenko, Hiroto Nakata, Hiromi Ogata-Aoki, Masayuki Amano, Arun K. Ghosh, and Hiroaki Mitsuya. Bimodal Binding to HIV-1 Protease of GRL-02031 (G31), a Novel Protease Inhibitor (PI) Containing a Cyclopentanyltetrahydrofuran (Cp-THF). 48th Annual ICAAC/IDSA 46th Annual Meeting, Washington, DC ~ October 25-28, 2008. A Joint Meeting of ASM and IDSA. H-1267

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

薬剤耐性メカニズムに関する研究

研究分担者

蜂谷 敦子 国立国際医療センター エイズ治療・研究開発センター 臨床検査技師

研究要旨

既存の薬剤耐性データベースの正確性を高めるため、新規薬剤に対する薬剤感受性のデータの構築ならびに未知の薬剤耐性変異を同定することとした。新規薬剤の導入を検討している症例からウイルスを分離し薬剤感受性試験を行ったところ、多くの臨床分離ウイルスで新規薬剤による抗ウイルス効果が認められた。今後さらに解析数を増やし、薬剤耐性検査と感受性検査のデータの比較、臨床での抗ウイルス効果との比較を行っていきたい。

A. 研究目的

現在、抗HIV薬は5作用機序、20薬剤の選択が可能となり、効果的にウイルスが抑えられるようになった。しかし抗HIV薬を長期使用し耐性変異が蓄積した症例では、薬剤を選択するのが非常に困難である。このような場合、薬剤選択の判断の一つに薬剤耐性検査(ジェノタイプ検査)が挙げられている。しかしこれまでに新規薬剤を使用した症例が少なく、薬剤耐性変異に関する情報も少ない。そのため耐性変異蓄積症例では、新規薬剤に対しどの程度抗ウイルス効果が期待できるのか、まだ不明な部分も多い。

本研究では2つのテーマを対象に研究を行った。1つ目は、実際に新規薬剤(ダルナビル[DRV]、エンフェビルタイド[T-20]、エトラビリン[ETR]、ラルテグラビア[RAL])の導入が検討されている耐性変異蓄積症例を対象に、薬剤耐性検査のみならず、薬剤感受性検査(フェノタイプ検査)を行い、臨床分離ウイルスそのものに対する新規薬剤の効果を調べることにした。新規薬剤に対する薬剤耐性検査、薬剤感受性検査のデータを比較、蓄積することで、事前に抗ウイルス効果の予測が可能か、治療失敗に繋がる変異の特定が可能か、検討することを目的とした。2つ目は薬剤感受性検査、耐性検査の結果が解離した臨床分離ウイルスから、未知の薬剤耐性変異を同定することとした。2方向からの研究を進めることで、最終的に既存の薬剤耐性データベースを強化することを目的とした。

B. 研究方法

1. ウイルス分離

患者血漿を遠心し、ウイルスを濃縮後MAGIC5細胞に感染させた。1~2週間培養し、ウイルスを分離した。

2. 感染価の測定

感染当日、ウイルスを培地で希釈し、MAGIC5細胞に加え、37℃、5% CO₂ インキュベーターにて48時間培養した。

3. 薬剤感受性検査 / 逆転写酵素阻害剤、インテグラーゼ阻害剤

感染価をもとに、一定濃度のウイルスを培地で調整した。さらに抗HIV薬の希釈系列を作成し、ウイルスとともに細胞に加え培養した。48時間後X-gal染色を行い、青染した感染細胞を数え、50%感染阻止濃度を求めた。

4. 薬剤感受性検査 / プロテアーゼ阻害剤

感染価をもとに、一定濃度のウイルスを培地で調整した。さらに抗HIV薬の希釈系列を作成し、ウイルスとともに細胞に加え、培養した。72時間後、新たな細胞に培養上清を加えた。さらに48時間後X-gal染色を行い、青染した感染細胞を数え、50%感染阻止濃度を求めた。

5. 薬剤耐性検査

HIV RNAを抽出し、RT-PCRにてpol領域を増幅し、DNAシーケンサー (ABI3700) を用いて塩基配列を決定した。

6. リコンビナントウイルスの作成

pNL101をベースとし、site directed mutagenesis法を用い、目的とするアミノ酸変異を加え、感染性クローンを作成した。その後Cos7細胞にトランスフェクトし、ウイルスを回収した。

(倫理面への配慮)

本研究は、HIV-1感染者から採取した血液を用いて実験を行った。研究用採血を実施するにあたって、担当医は被験者に対して採血の一部が研究目的であることを十分説明した上で文書同意を得ている。病原体の取り扱いについては、国立国際医療センター病原体管理規定に従い安全確保に努めた。

C. 研究結果

1) 新規薬剤を投与した症例に対する薬剤感受性、耐性検査結果

2007年から2008年10月までに当センターで新規薬剤 (DRV, T-20, ETR, RAL) を使用した20症例のうち、13例において既存薬剤に対する耐性が疑われた。このうち耐性変異蓄積症例を含む7例からウイルスを分離し、薬剤感受性検査 (T-20を除く、19薬剤)、耐性検査を試みた (表1)。薬剤感受性検査結果から、新規の作用機序であるRALに対しすべて1倍以下と感受性を示した。またETRは、NNRTI耐性変異であるK103N、G190A、N348Iを獲得したウイルスに対しても良好な抗ウイルス効果を示した。一方、DRVは、プロテアーゼ耐性関連変異が蓄積した症例 (Case 1, 4, 5) に対し耐性を示した。

2) 新たな薬剤耐性変異の同定

臨床検体から、薬剤感受性検査と耐性検査結果が分離した耐性ウイルスを見出した。エファビレンツ (EFV)、テノホビア (TDF)、ロビナビア (LPV) 投与中に、時期を異なって2回ウイルスを分離した (図1)。この2つのウイルスのNRTIに対する薬剤耐性検査結果はどちらも同じでQ151M complexを獲得していた。ところが2つの薬剤感受性検査結果が大きく異なり、ジダノシン (ddI)、スタブジン (d4T)、ラミブジン (3TC)、アバカビア (ABC) に対する耐性度が上昇しているだけでなく、TDFの耐性が新たに認められた。

さらに詳しく調べるため、2つのウイルスのRTのアミノ酸シーケンスを比較した。異なる変異箇所はK70Q、K102R、V108Iであった。プロテインデータベースに登録されているRT (1HYS) の立体構造 (図2) から、この3つのアミノ酸の場所を確認したところ、K102、V108 (ともにp66) はNNRTI結合部位周辺に位置し、今回のNRTI耐性度合に影響を与える可能性は少ないとされた。一方、K70 (p66) はポリメラーゼ活性中心近傍に位置し、NRTI耐性度合を上昇させた責任変異として最も疑わしいとされた。

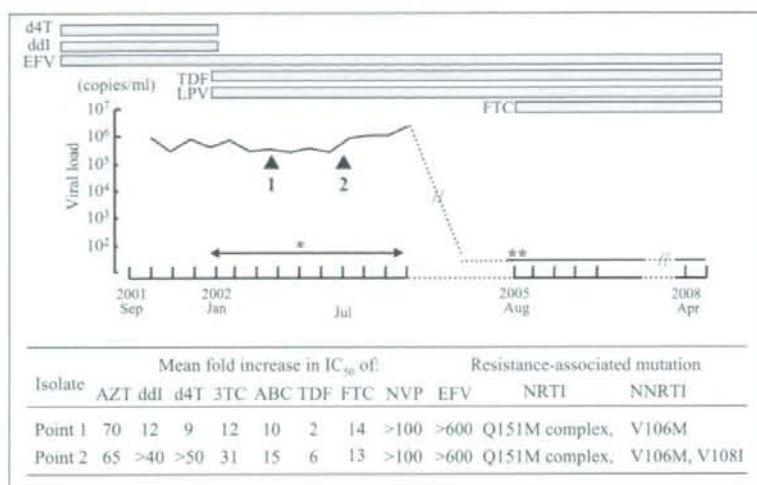
さらにStanford HIV Drug Resistance Database (<http://hivdb.stanford.edu/>) にてK70Qに対する薬剤耐性度を確認したところ、報告されていなかった。そこで臨床検体で観察されたK70Q、ならびにQ151M complexを含む変異をsite directed mutagenesis法で導入し、リコンビナントウイルスを作成した。さらにこれらのウイルスを用い、NRTIに対する薬剤感受性検査を行った (表2)。K70QはddI、3TCに低度耐性を示し、またQ151M complexはTDFを除くすべてのNRTIに耐性を示した。ところが臨床症例で認められたK70Q/Q151M complexの組み合わせではAZT、ddI、d4T、3TC、ABCに対する耐性度が上昇するだけでなく、TDFに対する耐性も新たに獲得していることが明らかとなった。

表1 Drug resistance profiles of clinical isolates.

| Case | New antiretroviral drugs | Phenotype | | | Genotype | | |
|------|--------------------------|---------------|------------|-------------|--|----------------------------------|-----------|
| | | Fold increase | | | Protease | Reverse Transcriptase | Integrase |
| | | Darunavir | Etravirine | Raltegravir | | | |
| 1 | After | >909 | <0.5 | 0.5 | L10V, I13V, K20M, V32I, L33F, I47V, G48V, I54M, I64V, A71V, V82A, I84V, L90M | K70R, M184V, K219Q | - |
| 2 | Before | <0.9 | <0.6 | <0.5 | L10I, I13V, M36I, L63P, I84V | M41L, K103N | - |
| 3 | Before | <0.9 | 1 | 0.7 | K20L, M36I, L63P, I64V, A71V, I84V, L90M | D67N, M184V, G190S, L210W, N348I | - |
| 4 | Before | 17 | 0.6 | 1 | L10F, G16E, K20M, M46I, I54V, Q58E, V82A | - | - |
| 5 | Before | 109 | <0.5 | 0.7 | L10F, G16E, K20R, M36I, M46I, I54V, I84V | L74V, M184V, T215F | - |
| 6 | Before | 1.5 | 1.5 | 0.5 | V82I, I93L | N.D. | - |
| 7 | Before | 2.1 | 1.6 | 1 | L33V, L63P, I64V | - | - |

* Bold indicates an increase in EC₅₀ value greater than three fold

* Resistance mutations were reported in the HIV Drug Resistance Database by the Stanford University and the International AIDS Society. Bold indicates a DRV-resistance mutation.



* During the period, LPV was administrated but was not taken due to adverse effect (diarrhea). Since RTIs appeared not to be effective, LPV was re-administrated and taken.

** VL at the time of FTC initiation was below detection level (less than 50 copies/ml).

図1 The clinical course and drug resistance profiles.

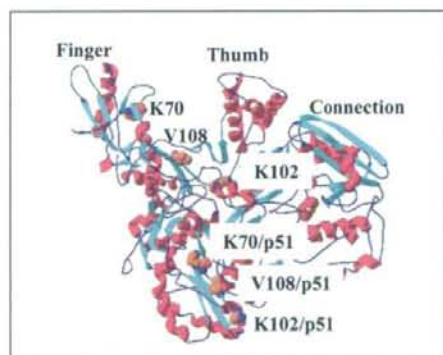


図2 Location of the mutations in HIV-1 RT.

表2 Drug susceptibilities of molecular HIV-1 clones.

| Mutation | EC ₅₀ μM (fold resistance) | | | | | |
|----------------------|---------------------------------------|---------------|---------------|-------------|-------------|--------------|
| | AZT | ddI | d4T | 3TC | ABC | TDF |
| WT | 0.04 ± 0.007 | 2.4 ± 0.35 | 2.6 ± 0.23 | 1.4 ± 0.16 | 1.7 ± 0.23 | 0.02 ± 0.004 |
| K70Q | 0.05 ± 0.002 | 12 ± 1.73 | 3 ± 0.21 | 4.6 ± 0.53 | 3.5 ± 0.58 | 0.03 ± 0.003 |
| Q151M complex | 1.3 | 5 | 1.2 | 3.3 | 2.1 | 1.5 |
| | 3.3 ± 0.4 | 45 ± 1.0 | 25.3 ± 2.31 | 28.7 ± 3.21 | 15.3 ± 2.08 | 0.04 ± 0.003 |
| | 83 | 19 | 10 | 21 | 9 | 2 |
| K70Q / Q151M complex | 7.2 ± 0.76 | >100 ± 0 | >100 ± 0 | 81 ± 0.08 | 23.7 ± 2.89 | 0.2 ± 0.01 |
| | 180 | >42 | >38 | 58 | 14 | 10 |

* Data means ± standard deviations from at least three independent experiments. Bold indicates an increase in EC₅₀ value greater than three fold.

D. 考察

現在、薬剤感受性検査はコストや時間がかかること、ウイルスそのものを扱うため専用の施設が必要であることから一般検査では行われていない。その代用として過去の膨大な薬剤耐性検査結果と感受性検査結果を基にアルゴリズムによる薬剤耐性度を推測する方法がなされている。しかしこの方法では、情報が少ない新規薬剤に対し予測が難しいこと、また未知の薬剤耐性変異では予測が全く不可能とされている。そのため本研究ではこれらを補うべく、新規薬剤の導入が検討されている耐性変異蓄積症例を対象に薬剤耐性、感受性検査を行いデータを構築し、データベースの正確性を一層高めることを目的とした。特に過去に使用された作用機序での新規薬剤が高度耐性ウイルスに対し有効であるのか、薬剤感受性検査にて確認した。これまでネビラピン(NVP)やEFVに耐性を示したK103N、G190A、N348Iなどが検出された症例でもETRは非常に高い抗ウイルス活性を示した。一方、他のプロテアーゼ阻害剤によって誘導された耐性変異がDRVの抗ウイルス活性に影響を及ぼしていることが明らかとなった。これはDRVの一次変異とされているI50V、I54M/L、I84Vが他のプロテアーゼの耐性変異箇所と同じであるためと考えられた。本研究で分離したウイルスもI84Vをすでに獲得し、DRVに対し107倍と高度耐性を示した。興味深いことにこの症例はLPVに対する一次変異を獲得しておらず、LPVに対し感受性を示した。また別の症例ではDRVの一次変異を獲得していないにもかかわらず、DRVに対し17倍耐性を示した。これについても他のプロテアーゼによって誘導された何らかの変異がDRV耐性に関与していると考えられるため、今後その耐性変異を同定していく必要があると思われた。引き続き、解析症例を増やし、耐性変異と新規薬剤による抗ウイルス効果について、また臨床効果への影響を検討する必要があると考えられた。

薬剤耐性検査、薬剤感受性検査の結果が分離した症例から、未知の耐性変異をもつ耐性ウイルスが見出された。その後の解析から、K70QがddI、3TCに対する新たな耐性変異であることが明らかにされた。またこのウイルスが有していたQ151M complexはNRTIに対する多剤耐性変異(MDR)であった。しかし例外として、Q151M complexはTDFに対し感受性を示す。ところが臨床ではQ151M complexを獲得したウイルスにTDFを使用したところ、K70Qを新たに獲得し、TDFを含めすべてのNRTIに対し耐性を示した。つまりMDR症例における新たな耐性パターンであると考えられた。今後は臨床サンプルを

対象にK70Qの出現率を明らかにすること、ウイルス学的に何故K70Qが耐性を示すのかについて明らかにしていく必要があると思われた。

今後も耐性変異蓄積症例を対象に解析を続け、既存の薬剤耐性データベースの正確性を高めることを目指していきたいと考えている。

F. 健康危険情報

総括研究報告書参照

G. 研究発表

1. 論文発表

1. A. Hachiya, E.N. Kodama, S.G. Sarafianos, M.M. Schuckmann, Y. Sakagami, M. Matsuoka, M. Takiguchi, H. Gatanaga, S. Oka. Amino acid mutation N348I in the connection subdomain of HIV-1 reverse transcriptase confers multiclass resistance to nucleoside and nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors. *J Virol* 82:3261-70, 2008.

2. 学会発表

2. 蜂谷敦子、嶋根和毅、児玉栄一、小泉寛和、湯永博之、松岡雅雄、滝口雅文、岡慎一、逆転写酵素 connection と RNase H subdomain の多様性と薬剤感受性に及ぼす影響、第22回日本エイズ学会総会、大阪、11月、2008

抗HIV療法の臨床効果に関する研究

研究分担者

塚田 訓久 国立国際医療センターエイズ治療・研究開発センター 医師

研究要旨

多剤耐性あるいは副作用不耐のため既存の抗HIV薬を用いた治療でコントロール不良なHIV感染者を対象に、新規抗HIV薬を含む多剤併用療法を行った。ほとんどの例で良好なウイルス抑制が得られ、重篤な有害事象はみられなかった。

A. 研究目的

薬剤耐性や副作用不耐のため既存薬によるコントロールが困難な日本人HIV感染者に対する、新規抗HIV薬を含む多剤併用療法の効果ならびに有害事象について検討する。

B. 研究方法

多剤耐性あるいは副作用不耐のためコントロール不良となっているHIV感染例を対象に、新規抗HIV薬を含む多剤併用療法を行い、その治療効果ならびに有害事象について診療録を用いて後方視的に解析する。

新規薬剤とは、現在の抗HIV療法において標準的に使用されている最新の薬剤(核酸系逆転写酵素阻害剤 Nucleos(t)ide Reverse Transcriptase Inhibitor; NRTIに関してはFTC/TDF、非核酸系逆転写酵素阻害剤 Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor; NNRTIに関してはEFV、プロテアーゼ阻害剤 Protease Inhibitor; PIに関してはLPV/r)以降の薬剤あるいは全く新規の作用機序を有する薬剤と定義した。今回の対象者に投与した新規薬剤は、NNRTIであるEtravirine (ETR)、PIであるDarunavir (DRV)、インテグラーゼ阻害剤 Integrase Inhibitor; INIであるRaltegravir (RAL)、融合阻害剤 Fusion InhibitorであるEnfuvirtide (ENF)の4剤である。

(倫理面への配慮)

治験中の新規薬剤の使用にあたっては、施設内のIRBに諮り事前の承認を得た上で、文書を用いて本人に説明し、文書による同意のもと投与する。

C. 研究結果

国立国際医療センター戸山病院 エイズ治療・研究開発センターに通院する多剤耐性症例6例に新規薬剤を導入し、長期治療効果を観察した。各症例の背景ならびに経過を以下に示す。

<症例1>

20歳代男性、血友病。NRTI 2剤治療を含む複数回の治療失敗歴あり。LPV/r投与の際に徐脈性不整脈を発症した既往あり。新規薬剤開始時の蓄積耐性変異 (genotypic assay) はNRTI関連: D67N, M184V, L210W, N348I, NNRTI関連: G190S, N348I, PI関連: K20I, M36I, L63P, I64V, A71V, I84V, L90M。FTC/TDF + ENF + DRV/rの投与を開始。Stanford大学のデータベース (HIVdb <http://hivdb.stanford.edu/pages/algs/HIVdb.html>) に従えば、これらのうち感受性の期待される薬剤はTDF(低感受性)、ENF, DRV(低感受性)の3剤。変更後のウイルス抑制は良好。ENFによる皮膚局所反応が高度であり、後にENFをRALに変更し現在も経過良好。

<症例2>

40歳代男性、血友病。NRTI 2剤治療を含む複数回の治療失敗歴あり。3TC + TDF + LPV/r投与下でウイルス抑制は不良。蓄積耐性変異はNRTI関連: D67K, T69G, K70R, F116Y, Q151M, M184V, T215F, K219Q, NNRTI関連: K103N, V108I, Y181C, PI関連: L10I/V, G16A, K20M, V32I, L33F, I47V, G48M, F53I, I54M, L63P, V82A, I84V。進行性多巣性白質脳症発症を機に3TC + TDF + ENF + DRV/rの投与を開始。感受性の期待される薬剤はTDF(低感受性)、ENF,

DRV (低感受性) の3剤。変更後もウイルス抑制は得られず死亡。

<症例3>

40歳代男性。1999年AIDS発症。複数回の治療失敗歴あり。FTC/TDF + LPV/r投与下でウイルス抑制は不良。蓄積耐性変異はNRTI関連: V62A, V75I, F77L, Y115F, F116Y, Q151M, M184V, NNRTI関連: V106I, Y188L, PI関連: L10I, K20R, E35D, M36I, M46I, H69K, V82F, L89I, I93L。エイズ脳症発症を機にFTC/TDF + EFV + ENF + RAL + DRV/rの投与を開始。感受性の期待される薬剤はTDF (低感受性), ENF, RAL, DRVの4剤。変更後のウイルス抑制は良好。

<症例4>

40歳代男性。1995年にHIV感染が判明、アドヒアランス不良による治療失敗を繰り返す。過去の日和見疾患治療薬による腎障害がありTDFの投与は不可能。蓄積耐性変異はNRTI関連: M41L, M184V, L210W, T215Y, K219R, NNRTI関連: K103N, PI関連: L10I, G16E, M46I, I54V, L63T, V82A。脳原発性リンパ腫発症を機にENF + RAL + DRV/rの投与を開始。感受性の期待される薬剤はTDF (低感受性), ENF, RAL, DRVの4剤。変更後のウイルス抑制は良好。

<症例5>

40歳代女性。アドヒアランス不良による治療失敗を繰り返す。FTC/TDF + LPV/r投与下でウイルス抑制は不良。蓄積耐性変異はNRTI関連: M41L, L74V, M184V, T215F, NNRTI関連: K103N, Y181C, PI関連: L10F, I13V, G16E/A, K20I/R, E34Q, E35D, M36I, M46I, I54L, L63H, H69K, L76V, N83D, I84V, L89I, L90M。FTC/TDF + ETR + ENF + RAL + DRV/rに変更。感受性の期待される薬剤はTDF, ETR (低感受性), ENF, RAL, DRV (低感受性) の5剤。変更後のウイルス抑制は良好。

<症例6>

30歳代男性、血友病。副作用のため安定内服ができず、治療変更を繰り返す。FTC/TDF + LPV/r投与下でウイルス抑制は不良。蓄積耐性変異はNRTI関連: M41L, A62V, D67E, T69ins, K70R, M184V, T215Y, NNRTI関連: L100I, K103N, PI関連: L10V, K20R, L33F, E34N, E35D, M36I, G48V, I54S, I62V, L63P,

A71I, V82A, L90M, I93L。3TC + ETR + RAL + DRV/rに変更。感受性の期待される薬剤はETR (低感受性), RAL, DRVの3剤。変更後のウイルス抑制は良好。

まとめると、1例を除く全例で良好なウイルス学的効果が得られた。新規薬剤投与に伴う重篤な有害事象はこれまでのところ認められていない。

D. 考察

強力な抗HIV療法 (Highly Active Antiretroviral Therapy: HAART) は、その治療効果はより強力に、内服はより簡便に、年々進歩している。近年抗HIV療法を開始した症例では、そのほとんどで長期にわたり良好なウイルス抑制を得ることができるようになった。これに対して、HAARTの黎明期あるいはHAART前の時代に抗HIV療法を開始した症例の一部では、長期間にわたる不十分なウイルス抑制の結果耐性変異が蓄積し、既存薬剤によるウイルス抑制がもはや不可能な状態にある。

2006年以降海外ではDRVをはじめとする新規薬剤が次々と承認され、これら新規薬剤を含む多剤併用療法により、既存薬に対する耐性を有する症例においても十分な抗ウイルス効果を得られることが大規模臨床試験により明らかにされている。良好なウイルス抑制を得られる条件として、良好な感受性を有する薬剤2剤以上を同時に投与開始することが挙げられている。

今回の6症例のうち1例を除いた全症例で、新規薬剤投与により良好なウイルス抑制を達成できた。治療効果の予測のため、新規薬剤投与開始時点での蓄積耐性変異 (それまでの耐性検査で検出された耐性変異の総和) をStanford大学のデータベースに基づき解析したところ、症例3から6の4例では、新規薬剤2剤以上への良好な感受性が期待されるという結果であり、海外の臨床試験により得られた結果と合致していた。

RALが使用可能となる以前の時代に新規薬剤の投与を開始した第1例と第2例では、蓄積耐性から予想された感受性が同一であったにも関わらず臨床効果に差がみられた。HIV耐性検査として通常広く行われている genotypic assay は簡便かつ信頼性の高い検査であるが、過去に耐性変異が出現している場合でも該当薬剤中止後は耐性変異がみかけ上消失している場合があり、経過中の適切な時期に検査が行われていない場合には信頼性が低下する。またかつては genotypic assay の感度が低く、完全なウイルス抑制が得られていない状態でも耐性を検出できない場

合があった。これに加え、耐性変異として認識されるアミノ酸部位は年々増加しており、最新の検査では耐性変異として報告される変異でもかつての検査では報告されていなかった可能性があり、過去の検査結果と最新の結果を同等に扱うことはできない。治療失敗に終わった第2例は、TDF + LPV/rによる治療が失敗した状態での治療変更であり、感受性検査上は若干の感受性が期待できると判定されたTDFに関する感受性は、臨床的には期待できない状況であった。プロテアーゼ阻害剤は交叉耐性を有することが知られており、LPV/rの長期投与中に耐性変異が蓄積した結果、新規薬剤投与開始時点で既にDRVに対する感受性は失われており、結果的にENF単剤投与に等しい状態であったことが推測された。実際に症例2の保存検体を用いてENFの標的部位であるHIV gp41 遺伝子のHR1領域を事後に解析したところ、新薬投与開始前の検体では変異がみられなかったが、投与開始後の検体には変異が確認されており、短期間にENFに対する耐性が獲得されたことが確認された。これに対し症例1では、LPV/r投与開始直後の重篤な副作用のため同剤を極めて短期間しか服用していないことがDRVに対する感受性を維持し、ENFとの2剤併用により良好な結果を得ることができたと考えられる。新規薬剤の投与開始にあたっては、genotypic assayの結果を盲信するのではなく、過去の服薬歴とその臨床効果を詳細に分析する必要があることが示された。

日本でも2007年のDRV、2008年のRALに引き続き、2009年にはETRおよび初のCCR5阻害剤であるMaravirocの2剤が使用可能となり、多剤耐性HIV感染例に対する治療戦略は大きく変化することが予想される。しかしこれら新薬の日本人、特に血友病例における効果および安全性については不明な点も多い。今後新規薬剤が多数の症例で長期間使用されることにより、未知の有害事象が出現する可能性もあることから、引き続き厳重な経過観察が必要である。

E. 結論

多剤耐性HIV感染者に対しても、新規薬剤を含む多剤併用療法は有効であった。過去の耐性検査結果のみから蓄積耐性を予想することは困難であり、過去の治療歴の詳細な分析が不可欠であった。症例数は今後も増加することが予想されることから、次年度以降も治療効果ならびに有害事象に関する経過観察を継続する予定である。

F. 健康危険情報

総括研究報告書参照

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 塚田 訓久, HIV感染症「治療の手引き」, 第21回日本エイズ学会総会シンポジウム, 2008年11月 大阪.
2. 塚田 訓久, 新規抗HIV薬の使用経験と有害事象, 第21回日本エイズ学会総会, 2008年11月 大阪.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

抗HIV薬の副作用・相互作用に関する研究

研究分担者

本田 元人 国立国際医療センターエイズ治療・研究開発センター 医師



研究要旨

Warfarinと抗HIV薬には肝薬物代謝酵素（P450）を介した薬物相互作用が存在する。本研究ではこれらの薬剤を安全に併用することを模索した。抗HIV薬とWarfarin 併用症例8例の検討の結果、Warfarin使用時のHARRTはRTV-nonboostのfAPVを選択することがより安全ではないかと考えられた。

A. 研究目的

Warfarinは心疾患や血栓塞栓症の予防・治療薬として用いられている薬剤であるが、抗HIV薬と肝薬物代謝酵素（P450）を介した薬物相互作用が存在する。しかしながらWarfarinの効果を確実に代替できる薬は存在せず、抗HIV薬内服患者に対しては慎重な観察の下に併用しているのが現状である。今回Warfarinと抗HIV薬を安全に併用する方法を模索した。

B. 研究方法

当院通院中のHIV感染患者よりWarfarinと抗HIV薬を併用している症例を抽出しretrospectiveに検討した。抗HIV薬以外のWarfarinと相互作用がある薬剤を内服している症例、肝硬変症例は除外した。Warfarin効果の評価はプロトロンビン時間国際標準比（PT-INR）にて行った。なお目標とするPT-INRは各症例・疾患ごとに異なる。

C. 研究結果

国立国際医療センター戸山病院 エイズ治療・研究開発センターに通院・入院した抗HIV薬とWarfarin 併用症例8例について、PT-INRの変動を観察した。全員が男性でWarfarinと抗HIV薬併用開始時の年齢は32～65歳、平均46.6歳であった。適応疾患は肺血栓塞栓症3例、慢性心房細動2例、心臓弁（機械弁）置換術後2例、深部静脈血栓症1例であった。各症例の背景ならびに経過を以下に示す。

①EFVとの併用症例

<症例1>

30才代男性。EFV+ABC+3TCの投与を受けていたが肺血栓塞栓症にてWarfarin導入となった。内服率は100%であった。PT-INR 1.5-2.5を目標に3mgでWarfarinを開始し5mgまで増量したが、1.09-1.55と目標PT-INRを維持できなかった。

<症例2>

30才代男性。20才代に心臓弁置換術（機械弁）を受けたが受診中断、術後から内服していたWarfarinも中断となっていた。30才代に入りHIVが判明したため当院受診した。まずWarfarinを5mgにて再開し、目標PT-INR 1.8-2.8にコントロールできたのを確認の上、EFV+ABC+3TCにてHAART開始した。HAART開始後Warfarin 5mgにてINR 3.7まで上昇したが、Warfarin 4mgに減量したところ、1.66-2.64とほぼ目標PT-INRを維持することができた。内服率は100%であった。

EFVとの併用症例については、1例はほぼ目標PT-INRを維持することができたが、もう1例はWarfarinの作用を減弱する傾向がみられた。

②LPV/rとの併用症例

<症例3>

50才代男性。LPV/r+ABC+3TC内服中であったが、慢性心房細動のためWarfarin導入となった。内服率は100%であった。PT-INR 2.0-3.0を目標に1mgでWarfarinを開始し1mgまで増量したが、0.74-0.91と

変動なく、目標PT-INRを維持できなかった。この症例は多剤耐性変異があり、LPV/rを他の薬剤に変更するのが困難な症例である。

<症例4>

60才代男性。LPV/r+ABC+3TC内服中であったが、深部静脈血栓症を発症しWarfarin導入となった。内服率は100%であった。PT-INR 1.5-2.5を目標に5mgでWarfarinを開始し2.5mgまで増量したが、実際は1.1-1.59と、ほとんど目標PT-INRを維持できなかった。

<症例5>

30歳代男性。LPV/r+ABC+3TC内服中であったが、下肢静脈血栓による肺塞栓症を発症しWarfarin導入となった。内服率は95-100%であった。PT-INR 1.5-2.5を目標に1mgでWarfarinを開始し最大8.5mgまで増量したが、1.40-1.46と、ほとんど目標PT-INRを維持できなかった。このためLPV/rをnonboosted-fAPVに変更したところ、変更4日目・Warfarin 8.5mgにてPT-INR 2.59と上昇認めため、Warfarin 4mgへ減量した。以降Warfarin 4-5mgにて1.65-2.7とほぼ目標PT-INRを維持できている。

LPV/rはWarfarinの作用を減弱する傾向がみられた。3例中1例はLPV/rをnonboosted-fAPVに変更したが、これによりWarfarinのコントロールは良好となった。

③ fAPV/rとの併用症例

<症例6>

40才代男性。fAPV/r+ABC+3TC内服中であったが、深部静脈血栓症を発症しWarfarin導入となった。内服率は100%であった。PT-INR 1.5-2.5を目標に1mgでWarfarinを開始し4mgまで増量したが、実際は1.1-1.41（ワンポイントのみ1.86）と、ほとんど目標PT-INRを維持できなかった。また経過中Warfarin量に変更がないにも関わらず、PT-INRが3前後になり、その30日後には1.2前後に低下していたことも2回観察された。

fAPV/r併用症例においてはWarfarinの効果が不安定になることが観察された。

④ nonboosted-fAPVとの併用症例

<症例7>

60才代男性。慢性心房細動にてWarfarin 3mg内服中。目標PT-INR 1.5-2.5でコントロール良好であっ

た。fAPV+ABC+3TCにてHAART開始後のINRは1.59-3.01（Warfarin 2.5-3mg INR 2.5以上は1回のみ）とほぼ目標PT-INRを維持することができた。内服率は100%であった。

<症例8>

40才代男性。fAPV/r+ABC+3TC内服中であったが僧帽弁閉鎖不全症に伴う心不全の悪化のため僧帽弁置換術（機械弁）が施行された。術後はヘパリンとWarfarinを開始し、fAPV+ABC+3TCにてHAARTを再開した。目標PT-INRは2.5-3.5であるが、Warfarin 2-2.5mgにてPT-INR 2.85-3.65とコントロール良好であった。内服率は100%であった。

LPV/rよりnonboosted-fAPVに変更した症例5と併せると、Warfarinとnonboosted-fAPVとを併用した場合、比較的Warfarinの安定した効果が得られた。

D. 考察

WarfarinはS-とR-の二つの光学異性体により構成される薬剤で、S-は肝薬物代謝酵素であるCYP2C9、R-はCYP1A2、CYP3A4により代謝される。一方、HAARTのKey drugとして用いられる非核酸系逆転写酵素阻害薬とプロテアーゼ阻害薬は下記の表の如く肝薬物代謝酵素で誘導もしくは阻害するものがある。Warfarinと抗HIV薬は肝薬物代謝酵素（P450）を介した薬物相互作用が存在する。

Warfarinと抗HIV薬の併用に関する報告はEFV、NVP、LPV/r、RTVについて存在するが、EFV、RTVはWarfarinの作用を増強し（Stefano B et al.: CID 2008, Newsham G et al.: AIDS 1998）、NVP、LPV/rは減弱する（Dionisio D et al.: AIDS 2001, Stefano B et al.: CID 2008）とされ、いずれも臨床的にWarfarinの代謝に悪影響をおよぼしている。本研究において、Warfarinとnonboosted-fAPVとの併用が、最も安定したWarfarin効果が得られることを見出した。これらを併せて考えるとWarfarin使用時のHARTはRTV-nonboostのfAPVを選択することがより安全ではないかと考えられた。しかしながら症例数が少ない中での研究であるため今後も症例を集めて検討する必要があると考える。近年新規機序の抗HIV薬としてraltegravirが実用化された。この薬剤は肝薬物代謝酵素を介さずグルクロン酸抱合によって代謝され、理論上はWarfarinとの併用に問題ないとされるが実際の併用のデータはなく、今後はraltegravirとWarfarinとの併用についても検討していく必要がある。

E. 結論

Warfarin使用時の HARRTはRTV-nonboostのfAPVを選択することがより安全ではないかと考えられた。新規機序の抗HIV薬であるraltegravirについてもWarfarinとの併用について今後検討していく予定である。

F. 健康危険情報

総括研究報告書参照

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 本田元人 Warfarinと抗HIV薬併用症例の検討
第21回日本エイズ学会2008, 大阪.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし