

在も認められなかった。

## (2) 他施設からの依頼検体

東海地区以外の施設からは233検体について検査依頼があり、その内143検体が未治療症例であった。これら症例の内訳は東海地区同様、男性が92.3%、日本人が90.9%と大多数を占めており、同性間の性接触による感染が68.5%と最も多い感染経路であった。

薬剤耐性HIV-1は11.3% (16/141) に認められた。高頻度で検出された薬剤耐性変異はプロテアーゼ領域内のM46I/L (n=7)、次いで逆転写酵素領域内のT215リバータント (n=6) であり、こちらも東海地区と類似した結果であった。

## D. 考察および結論

名古屋医療センターにおいて新たにHIV/AIDSと診断されたHIV-1感染症例100症例の内、91症例について薬剤耐性検査を施行した結果、12症例 (13.3%) から薬剤耐性HIV-1が検出され、昨年の9.6%と比べると若干高い頻度であることが明らかとなった。また、検査依頼のあった全国の施設からの143症例については16症例 (11.3%) とこちらも高い検出頻度であった。東海地区、全国のどちらの症例においても、検出された薬剤耐性変異の多くはM46I/L、或いはT215リバータント変異であった。これらは現在処方数の多いロピナビルやアタザナビルといった薬剤に誘導される変異ではなく、過去に使用されていた薬剤により誘導されたものだと推測されることから、これら変異を持つHIV-1は未治療患者体内においても安定して増殖できるのだと考えられる。

2009年に入り新規薬剤であるインテグラーゼ阻害剤の処方が増えており、当施設において服用中の2症例から既にインテグラーゼ阻害剤耐性変異が検出されている。この薬剤耐性HIV-1の未治療症例への伝播の拡大の恐れもあり、今後も引き続き慎重な調査が必要であると思われた。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表 (英文)

1. Matsuyama S, Aydan A, Ode H, Hata M, Sugiura W, Hoshino T. Structural and energetic analysis on the complexes of clinically isolated subtype C HIV-1 proteases and approved inhibitors by molecular dynamics simulation. *J Phys Chem B*.114(1):521-30. 2010
2. Land S, Cunningham P, Zhou J, Frost K,

Katzenstein D, Kantor R, Chen YM, Oka S, DeLong A, Sayer D, Smith J, Dax EM, Law M; TAQAS Laboratory Network. TREAT Asia Quality Assessment Scheme (TAQAS) to standardize the outcome of HIV genotypic resistance testing in a group of Asian laboratories. *J Virol Methods*. 159(2):185-93. 2009

3. Hasegawa N, Sugiura W, Shibata J, Matsuda M, Ren F, Tanaka H. Inferring within-patient HIV-1 evolutionary dynamics under anti-HIV therapy using serial virus samples with vSPA. *BMC Bioinformatics*. 10:360. 2009
4. Iwatani Y, Chan DS, Liu L, Yoshii H, Shibata J, Yamamoto N, Levin JG, Gronenborn AM, Sugiura W. HIV-1 Vif-mediated ubiquitination/ degradation of APOBEC3G involves four critical lysine residues in its C-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 106(46):19539-44. 2009

### 2. 論文発表 (和文) レビュー等

1. 服部純子、杉浦 互：我が国における薬剤耐性HIVの現状、感染・炎症・免疫 Vol.39 No.4 2009
2. 杉浦 互：HIVの薬剤耐性獲得の分子機構、日本臨床 Vol.6 No.1 2009
3. 服部純子、杉浦 互：薬剤耐性の現状、Pharma Medica Vol.27 No.4 2009
4. 宮崎菜穂子、松下修三、藤井 毅、杉浦 互：抗HIV療法を受けている患者における薬剤耐性HIVの現状と問題点、The Journal of AIDS Research Vol.11 No.2 2009

### 3. 学会発表 (国際学会)

1. Iwatani Y, Chan D, Liu L, Yoshii H, Shibata J, Levin J, Gronenborn A, Sugiura W. Structure-guided Mutagenesis of APOBEC3G Reveals Critical Lysine Residues for HIV-1 Vif-mediated Ubiquitination/Degradation. 17th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI), February 16-19 2010 San Francisco, CA.
2. Ibe S, Yokomaku Y, Shiino T, Tanaka R, Hattori J, Fujisaki S, Iwatani Y, Kato S, Hamaguchi M, Sugiura W. HIV-2 CRF01\_AB: First Circulating Recombinant Form of HIV-2. 17th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI), February 16-19 2010 San Francisco, CA.
3. Masaoka T, Sawasaki T, Matsunaga S, Sugiura W, Endo Y, Tatsumi M, Yamamoto N, Ryo A. Novel

- High-throughput HIV-1 Protease-resistance Phenotypic Assay Using Cell-free Protein Production System. 17th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI), February 16-19 2010 San Francisco, CA.
4. Fujisaki S, Yokomaku Y, Hattori J, Ibe S, Utsumi M, Hamaguchi M, Iwatani Y, Sugiura W. Molecular epidemiology of HBV-HIV-1 coinfection in Japan: viral genotypes and drug resistance. 18th International HIV Drug Resistance Workshop. June 9-13 2009 Fort Myers, FL.
  5. Hattori J, Yoshida S, Ito T, Gatanaga H, Kondo M, Sadamasu K, Kato S, Tanabe Y, Ueda M, Shirasaka T, Mori H, Minami R, Sugiura W, and the Japanese Drug Resistance HIV-1 Surveillance Network. 18th International HIV Drug Resistance Workshop. June 9-13 2009 Fort Myers, FL.
  6. Bandaranayake RM, Nalivaika E, Kolli M, Kakizawa J, Heroux A, King NM, Sugiura W, Schiffer CA. Structural and biochemical insights into altered drug resistance pathways in non-clade B HIV-1 proteases. 18th International HIV Drug Resistance Workshop. June 9-13 2009 Fort Myers, FL.
  7. Fujino M, Miura H, Hattori J, Ibe S, Fujisaki S, Matsuda M, Nishizawa M, Iwatani Y, Sugiura W. Mechanism of darunavir resistance acquisition in multi-protease inhibitor resistant HIV-1. 18th International HIV Drug Resistance Workshop. June 9-13 2009 Fort Myers, FL.
  8. Masaoka T, Sawasaki T, Sugiura W, Endo Y, Tatsumi M, Yamamoto N, Ryo A. Development of Method for Testing HIV-1 Protease Drug-Resistance based on Cell-Free Protein Production System. 10th Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance, Nov15-18 2009 Richmond, VA.
  9. Shibata J, Ren F, Iwatani Y, Tsang H, Matsuda M, Hasegawa N, Tanaka H, Sugiura W. Within-Host Coevolution of Gag P453L and Protease D30N/N88D Demonstrates virological Advantage in a Highly Protease Inhibitor-Exposed HIV-1 Case. 10th Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance, Nov15-18 2009 Richmond, VA.
  10. Iwatani Y, Chan DSB, Liu L, Yoshii H, Shibata J, Levin J, Gronenborn AM, Sugiura W. Four Lysine Residues in the APOBEC3G C-Terminal Domain are Critical for HIV-1 Vif-Mediated Ubiquitination/Degradation. 10th Annual symposium on Antiviral Drug Resistance, Nov15-18 2009 Richmond, VA.
- #### 4. 学会発表（国内学会）
1. 伊部史朗、横幕能行、服部純子、間宮均人、杉浦 互：東海地域におけるHIV-2感染疑い症例の遺伝子学的解析、第83回日本感染症学会総会、2009年4月23日～24日、東京
  2. 岩谷靖雅、吉居廣朗、柴田潤子、杉浦 互：APOBEC3Gのエピキチン化部位と抗レトロウイルス作用、第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月25日～27日、東京
  3. 星野忠次、藍壇 愛、原田壮一郎、杉浦 互：ウイルス酵素の構造変形に関する系統解析、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
  4. 正岡崇志、梁 明秀、巽 正志、杉浦 互、松永智子、森下 了、澤崎達也、山本直樹：酵素活性を指標とした新規のHIVプロテアーゼ阻害剤耐性検査法の基盤技術の開発、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
  5. 柴田潤子、杉浦 互、岩谷靖雅、Hsinyi Tsang、松田昌和、長谷川直樹、任 鳳蓉、田中 博：宿主内HIV-1の共進化変異の解析：Protease阻害剤耐性変異D30N/N88Dとp1/p6切断領域のP453変異の相互干渉の意義、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
  6. 鈴木寿子、服部純子、村田大悟、三浦秀佳、伊部史朗、藤野真之、西澤雅子、山本直樹、杉浦 互：インテグラーゼ阻害剤耐性化機序の分子生物学的解析、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
  7. 服部純子、瀧永博之、吉田 繁、千葉仁志、小池隆夫、佐々木悟、伊藤俊広、内田和江、原孝、佐藤武幸、上田敦久、石ヶ坪良明、近藤真規子、今井光信、長島真美、貞升健志、古賀一郎、太田康男、山元康之、福武勝幸、田中理恵、加藤信吾、宮崎菜穂子、藤井 毅、岩本愛吉、西澤雅子、仲宗根正、巽 正志、椎野禎一郎、林田庸総、岡 慎一、伊部史朗、藤崎誠一郎、金田次弘、横幕能行、濱口元洋、上田幹夫、大家正義、田邊嘉也、渡辺香奈子、渡邊 大、矢倉裕輝、白阪琢磨、栗原 健、小島洋子、中桐逸博、森 治代、中桐、逸博、高田 昇、木村昭郎、南 留美、山本政弘、松下修三、藤田次郎、健山正男、堀 成美、杉浦 互：2003-2008年

- の新規HIV/AIDS診断症例における薬剤耐性頻度の動向、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
8. 須藤弘二、杉浦 互、加藤真吾：PCR-MS法を用いた新規感染者血漿中の薬剤耐性微小団の定量、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
  9. 重見 麗、服部純子、保坂真澄、伊部史朗、藤崎誠一郎、横幕能行、濱口元洋、内海 眞、岩谷靖雅、杉浦 互：BEDアッセイを用いた名古屋医療センターにおける新規HIV感染者の動向調査、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
  10. 椎野禎一郎、貞升健志、長島真美、服部純子、杉浦 互：国内感染者集団の大規模塩基配列データから推測されるHIV集団サイズの経時的変化、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
  11. 藤崎誠一郎、横幕能行、服部純子、伊部史朗、濱口元洋、岩谷靖雅、杉浦 互：HIV/HBVy重複感染者におけるHBV genotype解析および薬剤耐性アミノ酸変異の検出、第23回日本エイズ学会学術集会・総会2009年11月26日～28日、名古屋
  12. 伊部史朗、横幕能行、椎野禎一郎、田中理恵、服部純子、藤崎誠一郎、岩谷靖雅、間宮均人、内海 眞、加藤真吾、濱口元洋、杉浦 互：日本におけるHIV-2感染症の分子疫学的解析、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
  13. 宮崎菜穂子、松下修三、藤井 毅、岩本愛吉、杉浦 互：多剤耐性症例治療を目的とした新規抗HIV薬使用症例に対する緊急全国調査、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
  14. 石川晃一、山本典生、杉浦 互、服部純子、山岡昇司、：ガーナにおける抗レトロウイルス治療（ART）中HIV感染者のウイルス定量と薬剤耐性解析、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
  15. 西澤雅子、Jeffery Johnson, Walid Heneine、山本直樹、杉浦 互：高感度薬剤耐性HIV検出法を用いた微小集族薬剤耐性HIVの検出と依存比率に関する研究、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
  16. 横幕能行、大出裕高、藤崎誠一郎、服部純子、濱口元洋、杉浦 互：HIVプロテアーゼ阻害剤耐性関連変異蓄積症例の薬剤感受性評価に対するVLP ELISA法およびコンピューターシミュレーション法の有用性の検討、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
  17. 岩谷靖雅、吉居廣朗、柴田潤子、杉浦 互：Vif依存的なAPOBEC3Gのユビキチン化部位と抗ウイルス作用、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
  18. 吉居廣朗、岩谷靖雅、杉浦 互：抗HIV-1宿主因子APOBEC3Gファミリーの発現調節に関する研究、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋



## 研究要旨

# 抗HIV薬剤血中濃度モニタリング

研究分担者 栗原 健 (独) 国立病院機構南京都病院薬剤科

研究協力者 高田 寛治<sup>1</sup>、杉岡 信幸<sup>1</sup>、芝田 信人<sup>2</sup>、加藤 真吾<sup>3</sup>、田中 理恵<sup>3</sup>、  
上平 朝子<sup>4</sup>、白阪 琢磨<sup>4</sup>、吉野 宗宏<sup>5</sup>、矢倉 裕輝<sup>5</sup>、平林 義弘<sup>6</sup>、  
照屋 勝治<sup>6</sup>、土屋 亮人<sup>6</sup>、林田 庸総<sup>6</sup>、小田原 隆<sup>7</sup>、味澤 篤<sup>8</sup>、  
今村 顕史<sup>8</sup>、牧江 俊雄<sup>9</sup>

<sup>1</sup>京都薬科大学薬物動態学教室、<sup>2</sup>同志社女子大学薬学部生物薬剤学教室

<sup>3</sup>慶應義塾大学医学部微生物学・免疫学教室

<sup>4</sup> (独) 国立病院機構大阪医療センター免疫感染症科

<sup>5</sup> (独) 国立病院機構大阪医療センター薬剤科

<sup>6</sup> 国立国際医療センターエイズ治療研究開発センター

<sup>7</sup> 東京大学医科学研究所感染免疫内科、<sup>8</sup> 東京都立駒込病院感染症内科

<sup>9</sup> 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21年12月末現在、通算アクセス数10721件、パスワード取得者191名。平成21年4月～平成21年12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636件で、23施設からの利用があった。件数の内訳はRTV:149、TDF:99、ATV:95、EFV:69、RAL:65、LPV:58、FPV:53、DRV:32、ETR:16であった。また、CYP2B6遺伝子検査の今年度依頼件数は8件(3施設)であった。

②LPV/rをBID(1日2回投与)で治療を開始し、LPVのトラフ濃度が6.00mg/mL以上であった患者を対象に、服薬方法をQD(1日1回投与)に変更した後の有効性と安全性について検討することを目的に臨床試験を実施した。LPV/rをBIDで服薬し、LPVのトラフ血中濃度が6.00mg/mL以上の患者8例を対象とした。QD変更後4、8、12、16、20、24週目に有害事象、トラフ濃度、HIV-RNA量、CD4細胞数、T-Cho、HDL-Cho、TGを確認し、BID服用時と比較検討した。対象患者8例のLPVのトラフ濃度(mean±S.D.)は、10.99±2.75mg/mL(range:7.46-14.94)であった。QDスイッチ4週後、LPVトラフ濃度の平均値は2.28±1.72mg/mL(range:0.41-5.85)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。CD4細胞数、T-Cho、HDL-Cho、TGの変動は認められなかった。新たな有害事象として、便秘、嘔気等の消化器症状が出現したが、下痢の増加は軽微であった。LPVの血中濃度が比較的高く、臨床経過が安定している患者をQDに変更した場合の24週間における安全性と有効性を確認することで、今回の試験結果が、本邦におけるQD投与の有用性確認の第一歩となったものと考えている。

## 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、ロピナビル・リトナビル配合剤(LPV/r)の国内承認用法である1日2回から、国内では未承認であるが海外ですでに承認されている1日1回投与への変更を行った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設し、国内でHIV感染症治療を行う医師を対象として血中濃度測定が容易に測定できるシステムを開発し、血中濃度の臨床応用を可能にすると共に、血中濃度データを広く収集することを目的とした。

## 2. ロピナビル・リトナビル配合剤 (LPV/r) の1日2回から1日1回投与へのスイッチ臨床試験結果

ロピナビル・リトナビル配合剤 (LPV/r) は、米国で2000年9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) である。米国において承認されたLPV/rの用法・用量は、1回2錠の1日2回投与 (BID) に加え、未治療患者または初回治療のLPV/r服薬患者に限り、1回4錠の1日1回投与

(QD) が認められている。2008年11月3日付で改訂された米国DHHS (Department of Health and Human Services) ガイドラインは、LPV/rのQD投与を代替処方から推奨処方に変更した。

QD承認の基礎となった試験では、BID群とQD群を投与期間48週で比較し、HIV-RNA量が感度未満となった割合に有意な差を認めず、QD群では下痢の頻度が高かったとしている。この臨床試験における薬物動態では、BID群のトラフにおけるLPVの血中濃度 (トラフ濃度) は約6 mg/mLで、QD群では約3 mg/mLに減少したものの、米国DHHSガイドラインが推奨するLPVの目標トラフ濃度1.00 mg/mLを上回っていた。

我々はLPV/rをBIDで治療を開始し、治療効果が安定し、LPVのトラフ濃度が6.00 mg/mL以上であった患者を対象に、服薬方法をQDに変更した後の、有効性と安全性について検討するための臨床試験を実施した。なお本試験は、国立病院機構大阪医療センターの倫理委員会に相当する受託研究審査委員会の承認を得た (承認番号: 0724)。

## 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)。

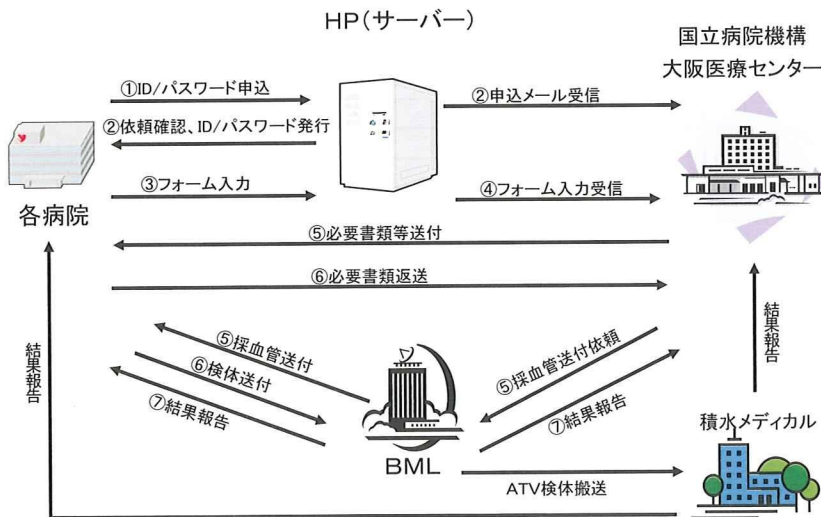


図1 依頼から結果報告までの流れ

## 2. ロピナビル・リトナビル配合剤 (LPV/r) の1日2回から1日1回投与へのスイッチ臨床試験結果

国立病院機構大阪医療センター免疫感染症科に入院し、LPV/rを含むHAARTで治療を開始し、HIV-RNA量が12週以上感度未満を維持し、LPVのトラフ濃度が6.00mg/mL以上で、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て、本試験の趣旨説明を行い、試験参加の同意を文書で得た。同意取得後、LPV/rをBIDからQDに変更した。LPVの血中濃度に影響を及ぼすと考えられる高脂血症治療剤等の投与を受けた患者は本試験の対象外とした。調査期間は2008年3月1日から2009年2月28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2 mL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BMLにて実施した。

LPV/rをQDへ変更後4、8、12、16、20、24週目に採血を実施し、LPVのトラフ濃度、HIV-RNA量、CD4細胞数、T-Cho、HDL-Cho、TGを測定し、有害事象発現の有無を問診にて確認した。QD変更前後の24週間について比較し、T-Cho、HDL-Cho、TGについては、一元配置分散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

研究班が開発したホームページは平成21年12月

末現在、通算アクセス数10721件、パスワード取得者191名(図2)。平成21年4月～平成21年12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636件で、23施設からの利用があった(石川県立中央病院、伊東市民病院、愛媛大学医学部附属病院、大田原赤十字病院、鹿児島大学医学部附属病院、亀田総合病院、京都第一赤十字病院、熊本大学医学部附属病院、群馬大学医学部附属病院、県立広島病院、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、国立病院機構東埼玉病院、国立病院機構九州医療センター、札幌医科大学附属病院、慈恵医科大学附属病院、東京大学医学部附属病院、都立大久保病院、都立駒込病院、長崎大学医学部附属病院、兵庫医科大学附属病院、広島大学医学部附属病院、横浜市立市民病院)。件数の内訳はRTV:149件、TDF:99件、ATV:95件、EFV:69件、RAL:65件、LPV:58件、FPV:53件、DRV:32件、ETR:16件であった。また、CYP2B6遺伝子検査の今年度依頼件数は8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3-5の通り。

### 2. ロピナビル・リトナビル配合剤 (LPV/r) の1日2回から1日1回投与へのスイッチ臨床試験結果

LPVのトラフ濃度が6.00 mg/mL以上の患者は18例であった。そのうち、選択基準を満たし同意が得られた8例をBIDからQDに変更した。平均年齢(mean±S.D.)は43±12歳(range:27-60)で、男性7例、女性1例であった。併用した核酸系逆転写酵素阻害薬(NRTI)は、テノホビル/エムトリシタビン合剤(TVD)4例、アバカビル/ラミブジン合剤(EZC)3例、ジドブジン/ラミブジン合剤(COM)1

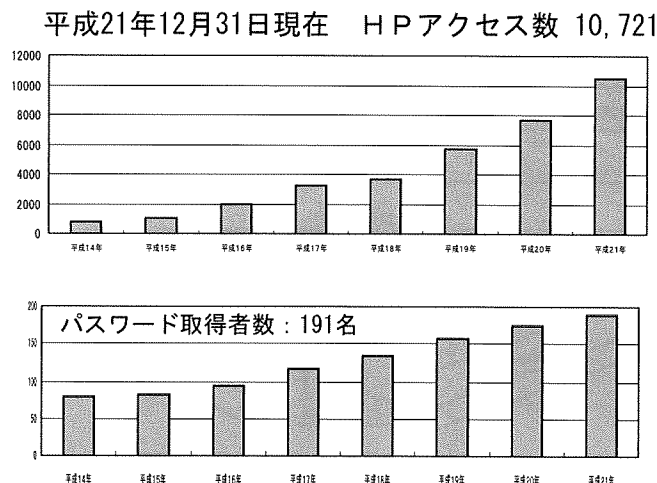


図2 研究班で開発したホームページの運用状況

例であった。試験期間を通じて中止例は認められなかった。

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。LPV 平均トラフ濃度 (mean ± S.D.) は  $10.99 \pm 2.75 \text{mg/mL}$  (range :7.46-14.94) であった。QD への変更後4週目に、患者の LPV 血中濃度は

$2.28 \pm 1.72 \text{mg/mL}$  (range:0.41-5.85) に低下し、その後24週まで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、全例感度未滿を持続し、CD4細胞数は、24週までほぼ一定の値を示した。変更後の T-Cho、HDL-Cho、TGの変動には有意差を認めなかった ( $p=0.933$ ,  $p=0.607$ ,  $p=0.954$ )。

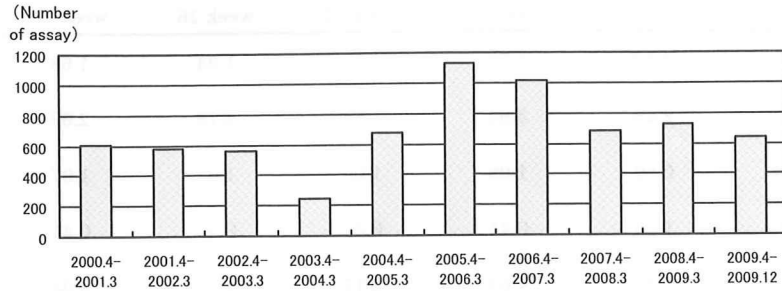


図3 血中濃度測定件数の推移 (総数)

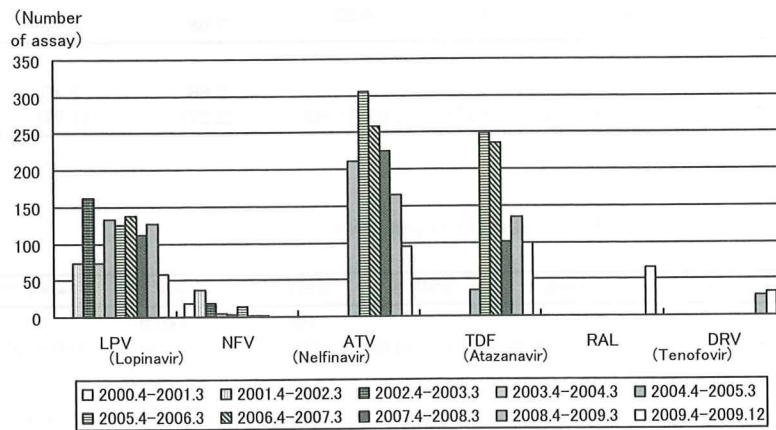


図4 血中濃度測定件数の推移 その1 (薬剤別)

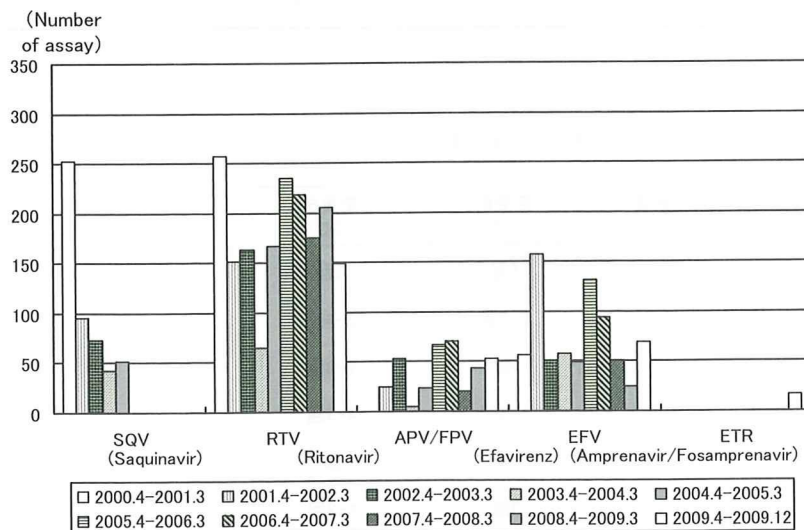


図5 血中濃度測定件数の推移 その2 (薬剤別)

QD変更後の新たな有害事象として、嘔気、胃部 った(表3)。不快感、便秘などの消化器症状が認められた。下痢の回数の変化について確認したところ、軽微な増加は認めしたが、グレード2以上の症状は認められな

表1 LPV trough plasma concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )

patient	Baseline	week 4	week 8	week 12	week 16	week 20	week 24
#1	9.23	2.10	1.73	0.80	1.34	1.68	1.43
#2	14.94	2.43	3.94	1.65	2.78	2.62	2.49
#3	14.86	0.80	1.09	1.09	1.67	1.07	1.18
#4	9.63	1.10	0.41	0.40	0.40	0.41	0.40
#5	11.19	5.85	4.63	3.17	4.24	3.04	5.47
#6	7.46	2.32	2.89	2.71	3.46	3.41	3.36
#7	11.75	0.41	0.70	0.49	0.33	1.37	1.14
#8	8.89	3.24	6.58	6.22	7.08	6.02	6.28
Mean (S.D.)	10.99 (2.75)	2.28 (1.72)	2.75 (2.17)	2.07 (1.96)	2.66 (2.27)	2.45 (1.77)	2.72 (2.16)

表2 Laboratory parameters

Parameter	n	Baseline	week 4	week 8	week 12	week 16	week 20	week 24
T-Chol (mg/dL)	8	197.3 (33.5)	185.6 (26.6)	191.1 (15.6)	186.5 (15.3)	189.0 (21.8)	190.6 (20.9)	193.6 (24.7)
HDL-Chol (mg/dL)	8	56.2 (9.9)	50.0 (6.7)	54.8 (7.7)	53.8 (7.8)	55.3 (8.1)	59.3 (11.5)	60.4 (9.8)
TG (mg/dL)	8	207.5 (115.0)	174.6 (50.6)	206.4 (110.8)	201.1 (105.6)	230.8 (139.6)	201.1 (114.9)	170.1 (63.6)
CD4 (cells/mm <sup>3</sup> )	8	360 (156.4)	340 (140.9)	340 (132.3)	382 (157.1)	375 (163.5)	348 (164.5)	358 (165.7)
HIV-RNA (copies/mL)	8	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50

Data expressed as Mean (S.D.)

表3 下痢回数の変化/日

患者	変更前 (BID)	変更後 (QD)
#1	5回	3回
#2	2-3回	3-4回
#3	無	2-3回
#4	4-5回	4-5回
#5	無	無
#6	3回	1-2回
#7	無	無
#8	2-3回	2-3回



## 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. ロピナビル・リトナビル配合剤 (LPV/r) の1日2回から1日1回投与へのスイッチ臨床試験結果

LPV/rは、大きなIQ( $C_{min}/IC_{50}$ : Inhibitory Quotient)値を示すことで強力な抗ウイルス作用を示し、高い認容性、持続的なウイルス抑制作用を併せ持つPIである。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は有用であると考えられる。しかし、血中濃度が高いと副作用の発現率が増加することから、すべてのPIの血中濃度を高く保つことは不可能である。また、有効な抗HIV薬も服薬アドヒアランスが低下すれば、服薬の中断あるいは耐性獲得による治療失敗となる。近年、抗HIV薬の改良が重ねられ、QDが可能な抗HIV薬が複数承認されたことにより、QDはHAARTの主流となりつつある。患者は、服薬方法をQDにすることで、BIDに比べ服薬回数や服薬時間等の制約が軽減され、服薬アドヒアランスやQOLの向上が期待できる。従って、LPV/rのQDとBIDが同等の安全性と有効性を

持つことを示すことができれば、臨床的な意義は大きいものとする。

今回我々は、国内で承認されていない用法用量であるQDによる臨床試験を行うにあたり、臨床試験の安全性を担保するために、初回治療からLPV/rをBIDで服用患者において、HIV-RNA量が12週以上感度未満を維持し、さらにLPVのトラフ濃度が6.00 mg/mL以上を示す患者をQD変更の対象とした。対象患者のトラフ濃度を6.00 mg/mL以上に設定根拠は、海外臨床試験において、BIDのトラフ濃度が $6.56 \pm 3.71$  mg/mLであり、QDでは $3.22 \pm 2.07$  mg/mLとした報告に基づき、DHHSのガイドラインが推奨するLPV目標トラフ濃度1.00 mg/mLを維持するためには、トラフ濃度が6.00 mg/mL以上が必要であると仮定した。また、当院でLPV/rをBIDで服用した患者36例の平均トラフ濃度が $6.85 \pm 4.13$  mg/mLであったことから、日本人におけるトラフ濃度は先の海外報告と同様であると考え、今回の臨床試験の設定根拠とした(図6)。

LPV/rをBIDからQDへ変更4週後の平均トラフ濃度は $2.28 \pm 1.72$  mg/mLであった。トラフ濃度の平均値は今回の試験期間24週間を通じて1.00 mg/mL以上を維持したことから、対象患者のトラフ濃度を6.00 mg/mL以上に設定したことは適切であったと考えられた。しかし、本臨床試験におけるQDの平均トラフ濃度は、海外報告よりも低値であり、表1に示したように、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った。臨床試験を実施した24週間における患者のHIV-RNA量は、全例検出限界未満を維持していたものの、QDへ変更するためのLPVトラフ濃度の設定に関しては、今後さらに検討が必要と考える。また目標トラフ濃度を複数回、下回った症例#4、#7に関しては、試験終了後も観察を継続しており、HIV-RNA量の変動

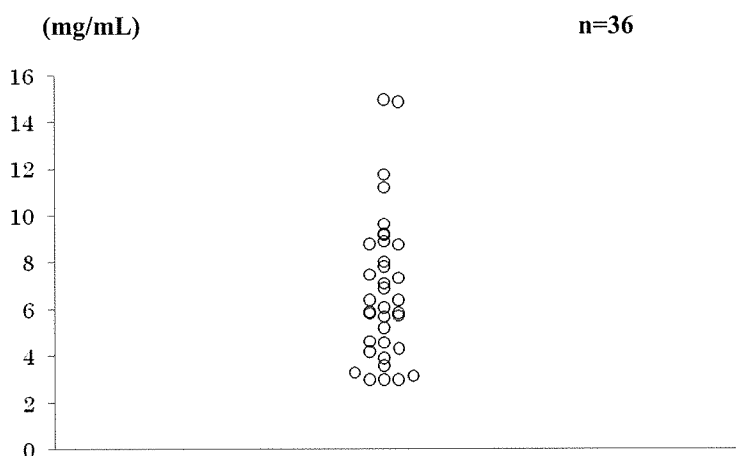


図6 LPVBID trough plasma concentration (mg/mL)

により、**BID** への変更も検討している。

試験期間に発現した有害事象はいずれも軽微であり、嘔気、胃部不快感などの消化器症状は服薬後数時間で発現し、時間経過とともに消失する例が多かった。これは、**QD** への変更で服用後の血中濃度が **BID** に比べ上昇したことによって発現した症状であると考えられた。また、これらの症状が時間経過と共に消失したことから、血中濃度の上昇による副作用は、時間経過とともに軽減できる症状であったと考えられた。予想された下痢の頻度が海外報告に比べ少なかったことから、今回の試験における **QD** の忍容性を確認することができた。本試験の対象となった患者は、すでに **LPV/r** を **BID** で服用した経験を有していたことが、下痢の頻度の少なかった要因の一つであると推測された。

本試験を実施した結果、**QD** は **BID** と同等のウイルス抑制効果を持ち、**CD4** 細胞数の維持が可能であることが確認され、試験期間中に脂質代謝パラメータの変動、重篤な有害事象が認められなかったことから、24週間における安全性と有効性を確認することができた。日本では現在 **QD** の適応はないものの、今回の結果が日本における **QD** 投与の有用性確認の第一歩となったものとする。

## 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する。また、国内承認用法である1日2回から、国内では未承認であるが海外ですでに承認されている1日1回投与への変更試験を行った結果が、日本人での1日1回投与の有用性確認の第一歩となったものとする。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. 吉野宗宏、矢倉裕輝、栗原健、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、西田恭治、上平朝子、白阪琢磨：ロピナビル・リトナビル配合剤（**LPV/r**）の1日2回から1日1回投与へのスイッチ臨床試験結果、日本エイズ学会誌11(3)：250-254、2009
2. 吉野宗宏、矢倉裕輝、栗原健、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11(1)：50-53、2009

3. 小田原隆、中村哲也、今村顕史、湯永博之、栗原健、古西満、立川夏夫、藤井毅、白阪琢磨、平成20年度厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業「抗HIV治療ガイドライン」、2009
4. 吉野宗宏、矢倉裕輝、栗原健、小川吉彦、坂東裕基、矢嶋敬史郎、笠井大介、谷口智宏、富成伸次郎、渡邊大、西田恭治、上平朝子、白阪琢磨：Tenofovir 長期投与における腎機能の評価（第3報）。第23回日本エイズ学会学術集会・総会、愛知、2009年11月
5. 吉野宗宏、矢倉裕輝、栗原健、小川吉彦、坂東裕基、矢嶋敬史郎、笠井大介、谷口智宏、富成伸次郎、渡邊大、西田恭治、上平朝子、白阪琢磨：エファビレンツ投与患者における治療継続と中断に関する検討。第23回日本エイズ学会学術集会・総会、愛知、2009年11月
6. 矢倉裕輝、吉野宗宏、小川吉彦、坂東裕基、矢嶋敬史郎、笠井大介、谷口智宏、富成伸次郎、渡邊大、西田恭治、上平朝子、白阪琢磨、栗原健：投与量別に見たFosamprenavirの血中濃度に関する検討。第23回日本エイズ学会学術集会・総会、愛知、2009年11月
7. 矢倉裕輝、吉野宗宏、小川吉彦、坂東裕基、矢嶋敬史郎、笠井大介、谷口智宏、富成伸次郎、渡邊大、西田恭治、上平朝子、白阪琢磨、栗原健：Efavirenzの剤型変更に伴う血中濃度の変化及び副作用に関する検討。第23回日本エイズ学会学術集会・総会、愛知、2009年11月

## H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし



### 研究要旨

## 北海道ブロックにおける薬剤耐性HIVの調査研究

研究分担者 小池 隆夫 北海道大学大学院医学研究科内科学講座・第二内科 教授

研究協力者 千葉 仁志<sup>1</sup>、吉田 繁<sup>2</sup>

<sup>1</sup>北海道大学大学院保健科学研究院病態解析学分野 教授

<sup>2</sup>同 助教

北海道ブロックにおける新規HIV感染者数の動向ならびに薬剤耐性HIVの検出率の調査を目的に、新規感染者血液中のHIVの遺伝子解析をおこなった。2009年1月～12月の北海道大学病院を新規受診したHIV感染者は23名であり、そのうち新規感染者は16名であった。そのうち初診時にAIDSを発症している患者は3名（18.7%）であった。薬剤耐性変異については新規感染者1名からプロテアーゼ阻害剤のメジャー変異であるM46Iが検出された。新規感染者数は増加傾向にあることから感染拡大の防止のために、薬剤耐性HIVの検出動向を継続的に調査する必要があると思われる。

### A. 研究目的

本邦における薬剤耐性HIV-1の発生動向把握のため、北海道ブロックにおける新規HIV感染者数の動向ならびに新規感染者における薬剤耐性HIV-1の遺伝子解析を目的とする。

### B. 研究方法

北海道ブロックにおける2009年度の新規HIV感染者数を調査する。調査期間中に認められた新規HIV感染患者の血清および血球を凍結保存し、血清中に存在する遊離HIV-1のpol、gag、env領域の遺伝子配列を解析し、薬剤耐性ならびにsubtypeの決定をおこなう。

#### （倫理面への配慮）

本研究は北海道大学医学研究科・医学部医の倫理委員会により承認されたものであり、担当医から患者へ研究の説明を行い、同意書に署名をしていただいた患者について検査をおこなっている。情報保護に関してはアクセスユーザー制限、パスワード設定、匿名コード化をおこなっている。

### C. 研究結果

2009年1月～12月に北大病院を新規受診したHIV

感染者は23名であり、そのうち新規発生者は16名であった。エイズ動向委員会からの報告では、北海道ブロックでの2009年1月～9月の新規HIV感染者は17名であり、同期間での本院での新規HIV感染者は10名であることから、北海道ブロックで発生する新規感染者の捕捉率は約59%であった。新規感染者16名はすべて男性であり、年齢は30～39歳が最も多く8名（50%）であった。感染経路は同性間11名（68.8%）、異性間3名（18.8%）不明2名（12.4%）であり、受診時の病期はHIV感染期13名（81.3%）、AIDS期3名（18.7%）であった。

これら新規感染者について受診時サンプルを用い薬剤耐性検査により変異の解析をおこなったところ16名中15名（93.8%）にIAS-USAもしくはstanfordで報告されている薬剤耐性変異が認められた（図1）。15名に関しては高度耐性に関与しないマイナー変異であったが、1名からプロテアーゼ阻害剤耐性のメジャー変異であるM46Iが検出された。SubtypeはBが14名（87.5%）、CRF01\_AEが1名（6.25%）、CRF02\_AGが1名（6.25%）であった。

### D. 考察

北海道ブロックは首都圏と比較し患者総数は少ないが、毎年15-20名の新規感染者が検出され、北大

病院においては2009年で累積患者数が200名を超えており、確実に感染者数が増加している。本院における新規感染者の特徴は日本国内と同様に30歳代、同性間、日本男性である。また、札幌市中心街にあるHIV検査・相談所で3名(0.4%)の感染者が検出されている。このことは、北海道の新規感染者数は少ないものの、潜在的な感染者が多く存在することを推測させる。

薬剤耐性変異に関しては、プロテアーゼ阻害剤耐性のメジャー変異であるM46Iを有するHIVが新規感染者1名より検出された。これは日本国内で検出されるメジャーなプロテアーゼ耐性変異と同じである。この患者の感染経路は同性間もしくは異性間の可能性が考えられ、subtype B、HBs抗原陽性であった。北海道の新規感染者の傾向と検出される耐性変異は日本国内と同様の傾向であり、北海道という地域特性による傾向の違いは見られなかった。

動向委員会の報告との比較から、昨年まで北大病院は北海道の新規感染者の70-80%以上を捕捉していたが、本年9月時点で59%と前年の88%より低い捕捉率となった。今後、捕捉率を確認する必要があるものの、他医療機関で新規感染者が見られることは、今後、北海道全域で感染者が増える可能性が示唆されるものであり、今後の更なる調査の継続と北海道ブロックにおける調査体制の充実が重要であると考える。

**E. 結論**

- 1) 2009年度に北大病院を受診した新規感染者数は16名であった。
- 2) 1名からプロテアーゼM46Iを有するHIVが検出された。

**F. 健康危険情報**

なし

**G. 研究発表**

1. 論文発表

Endo T, Fujimoto K, Nishio M, Yamamoto S, Obara M, Sato N, Koike T. Clearance of hepatitis C virus after changing the HAART regimen in a patient infected with hepatitis C virus and the human immunodeficiency virus. J Med Virol 81: 979-982, 2009.

2. 学会発表

なし

**H.知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)**

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

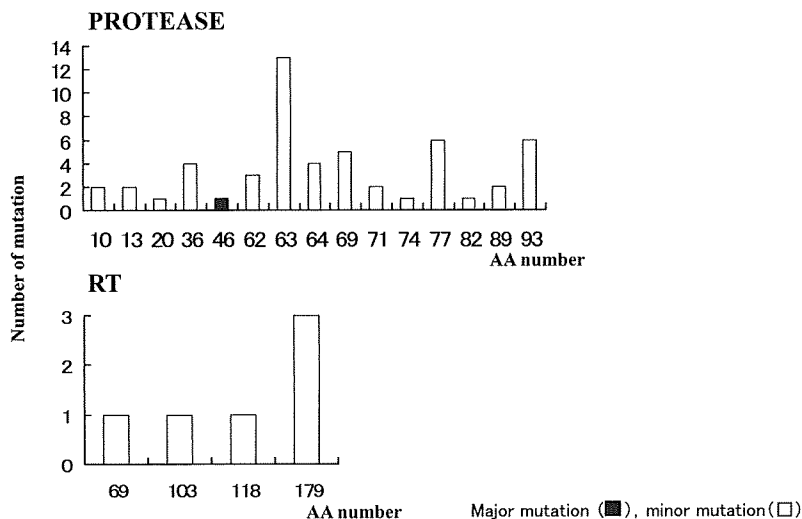


図1 2009年度 新規HIV感染者から検出された薬剤耐性変異



## 研究要旨

# 東京および近郊における薬剤耐性HIVの調査研究

～南新宿検査・相談室等のHIV検査陽性例のHIV-1薬剤耐性遺伝子の解析(2009年)～

研究分担者 **貞升 健志** 東京都健康安全研究センター 微生物部  
 研究協力者 **長島 真美、高野 智香、新開 敬行、保坂 三継、甲斐 明美**  
 東京都健康安全研究センター

HAARTに代表されるHIV感染症治療の効果があがっている反面、東京都における新規HIV感染者数は増加傾向が続いており、薬剤耐性HIVの出現が懸念されている。都内で流行しているHIV株を遺伝子学的に調査する目的で、南新宿検査・相談室等の検査陽性例より検出されたHIVのサブタイプ型別並びにProtease(PR)、Reverse transcriptase(RT)およびIntegrase領域における薬剤耐性変異の有無を検索した。2009年のHIV検査陽性例65例について調査した結果、検出されたHIVの89.2%がサブタイプBであり、薬剤耐性変異についてはPR領域でM46I、Lの変異が3例(4.6%)、RT領域においてはL74L/Vが1例(1.5%)、T215-revertant変異が5例(7.7%)で認められた。

## A. 研究目的

薬剤治療を受けているHIV患者数の増加に伴い、薬剤耐性変異を有するHIVの出現および新規感染が大きな問題となりつつある。南新宿検査・相談室(南新宿)のHIV検査陽性例を対象とし、都内の新規感染者における薬剤耐性ウイルスの出現状況を調査することを本研究の目的とする。

## B. 研究方法

### 1. 塩基配列の決定

2009年に南新宿等のHIV検査で陽性となった検体(血清)65例を供試した。各検体200 $\mu$ Lよりウイルス核酸RNAを抽出後、RT-nested PCR法によりProtease(PR)、Reverse transcriptase(RT)およびIntegrase(INT)領域を増幅し、特異バンドの精製を行い、精製DNAを得た。Dye-terminator-cycle-sequencing法を用いたDirect-Sequencing法により精製DNAの塩基配列を決定し、IAS-USA panel等を基に、得られたアミノ酸配列の薬剤耐性変異の有無を検索した。

### 2. PRおよびRT領域の解析

サブタイプ型別は、得られたRT領域の塩基配列

を基に、遺伝子解析ソフトMEGA4を用いて系統樹を作成し決定した。薬剤耐性変異の有無についてはIAS-USAおよびShaferの報告に基づき、PR領域については1～90番目のアミノ酸変異を、RT領域では41～236番目のアミノ酸変異の有無により判定した。また、T215についてはrevertant変異の調査を行った。

### 3. INT領域の解析

2007年から2009年における129例を対象に、INT領域の薬剤耐性変異の有無を調査した。薬剤耐性変異の有無についてはIAS-USA等の報告に基づき、1～288番目のアミノ酸変異の有無により判定した。

### 4. BED assayによる感染時期の推定

血清を101倍に希釈し、AWARE<sup>TM</sup> BED<sup>TM</sup> EIA TEST(Calypte社)を用いて検査を実施し、ODn値 $\leq$ 0.8となったものを、感染初期(15日以内)と判定した。尚、検査の実施手順はキットの取り扱い説明書に準じた。

### (倫理面の配慮)

本研究はヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫

理指針等の倫理規定に準拠して実施した。本研究は個人が特定できるようなデータを含まない、連結不可能匿名化されている検体から抽出したHIV遺伝子の解析を目的とした調査研究であり、東京都健康安全研究センター倫理審査委員会において承認されている(21健研管第1955号)。

### C. 研究結果

#### 1. サブタイプ型別

都内保健所等のHIV検査でHIV-1陽性となった65例のRT領域の分子系統樹解析を実施した結果、58例(89.2%)がサブタイプBで、7例(10.8%)がCRF01\_AEに分類された(図1)。

#### 2. PR領域の薬剤耐性変異

PR領域について遺伝子解析を実施した結果、65例中2例(3.1%)でプロテアーゼ阻害薬(PI)の薬剤耐性変異であるM46Lの薬剤耐性変異が、1例にM46Iの変異が単独で認められた(図1)。

#### 3. RT領域の薬剤耐性変異

RT領域の薬剤耐性変異を検索した結果、65例中1例(1.5%)で核酸系逆転写酵素阻害薬(NRTI)の薬剤耐性変異であるL74L/Vが認められた。T215-revertantについては5例(7.7%)で認められ、T215Cが2例、T215E、T215LおよびT215Sが各1例であった(図1)。

65例中PRまたはRT領域で薬剤耐性に起因するア

ミノ酸変異を認めた例は4例(6.2%)であり、T215-revertant変異は7.7%で確認された。

#### 4. INT領域の薬剤耐性変異

Y143R/H/C、Q148H/K/RおよびN155Hの耐性変異は認められなかったが、L74Mが1例(1.6%)、T97Aが1例(0.8%)、V151Iが2例(1.6%)、E157Qが6例(4.7%)で認められた(図2)。

#### 5. 薬剤耐性変異例の分子系統樹解析

RT領域の分子系統樹解析を実施し、薬剤耐性変異を認めた例の系統樹における位置関係を検討した結果(図3)、今回PR領域でM46Lの変異が認められた2例は過去に東京都内で検出されていたM46L群に、RT領域でT215Eの変異を認めた1例およびT215Cについても過去に同様の変異を認めた東京都の事例と明確なクラスタを形成した。また、T215LおよびM46Iについては、名古屋関連株と明確なクラスタを形成した。

#### 6. BED assayによる感染時期の推定

BED assayにより血清学的に感染初期(ODn値≦0.8)と判定された例は、33例(50.8%)であった。33例中薬剤耐性変異が認められたものは2例(6.1%)であり、全体の薬剤耐性変異の6.2%とほぼ同じであり、感染初期例と長期感染での薬剤耐性の出現頻度は変わらない傾向にあることが判明した。

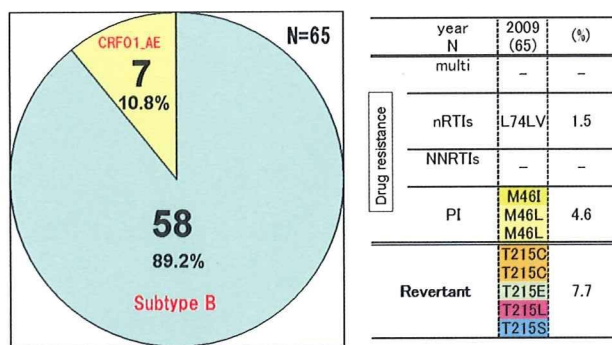


図1 HIVサブタイプ型と薬剤耐性変異(2009年)

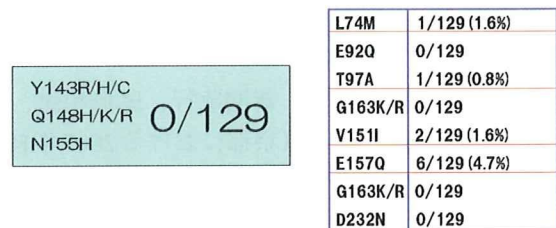


図2 Integraseにおける薬剤耐性変異(2007~2009年)

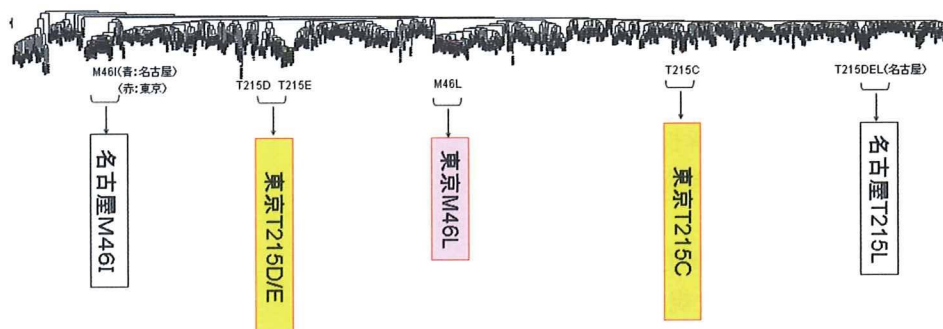


図3 RT領域の分子系統樹解析におけるM46I、M46L、T215-revertantの分布

また、33例中revertant異が認められたものについても3例(9.1%)と、revertant変異全体検出率(7.7%)よりやや多い傾向が認められた。

#### D. 考察

2009年に南新宿等のHIV検査で陽性となった65例より検出されたHIV-1のPR領域およびRT領域の遺伝子解析を実施した結果、5例(7.7%)に薬剤耐性変異を認めた。これらはすべて単独のアミノ酸変異のみを示した。

T215EおよびM46Lは数年前より東京都においても検出され、系統樹解析により独自のクラスタを形成することを報告してきたが、新たにT215Cについても同様の傾向があることが判明した。さらに、M46IおよびT215Lについては名古屋株とクラスタを形成することが示されたため、都内におけるこれらの株の動向も継続して調査していく必要があると思われる。

#### E. 結論

2009年に南新宿等のHIV検査陽性例から検出されたHIVの薬剤耐性変異の出現頻度は、アミノ酸の単独変異の認められる例では6.2%、T215-revertant変異が認められた例(7.7%)を加えると13.8%であった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 貞升健志、長島真美、新開敬行、尾形和恵、仲真晶子、矢野一好：東京都における2007年HIV検査陽性例の遺伝子学的、血清学的解析、日本エイズ学会誌、11, 27-33, 2009
2. 貞升健志、HIVジェノタイプ薬剤耐性検査、医学書院、臨床検査データブック2009-2010. 551-553. 2009

##### 2. 学会発表

1. 長島真美、新開敬行、吉田 勲、尾形和恵、原田幸子、保坂三継、貞升健志、甲斐明美：東京都におけるHIV検査陽性例の解析(2004-2008年)、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、名古屋(2009.11)
2. 椎野禎一郎、貞升健志、長島真美、服部純子、杉浦 互：国内感染者集団の大規模塩基配列データから推測されるHIV集団サイズの経時的変

化、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、名古屋(2009.11)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



### 研究要旨

## 九州沖縄ブロックにおける薬剤耐性HIVの調査研究

研究分担者 南 留美 国立病院機構九州医療センター免疫感染症科 医師  
山本 政弘 国立病院機構九州医療センター感染対策室長

抗HIV薬の開発によりHIV-1の抑制が可能になり、HIV陽性者の予後は改善してきたが、一方で治療の経過中に薬剤耐性ウイルスが選択され治療に難渋する患者も存在する。多剤耐性ウイルスにも奏効する抗HIV薬が開発されているが、さらに新しい耐性獲得の問題など、薬剤耐性はHIV感染症の治療を続けていく上で大きな課題となっている。近年、未治療の新規感染者のなかにも耐性ウイルスを持つ症例が認められ、全国的にはその頻度は増加している。2003年以降、九州地区の新規感染患者における薬剤耐性変異の頻度を評価するため当院での新規感染患者の薬剤耐性変異の解析およびサブタイプの解析を行っている。昨年度と同様、RT領域、PR領域に加え、インテグラーゼ領域の解析も行った。サブタイプは全例Bであった。耐性変位は3領域とも minor mutationが多かったがRT領域にK103R、PR領域にM46Iを持つ症例が各々1例ずつあった。耐性変異ウイルス感染(副次変異も含む)の頻度は年度によって変動はあるが、全体として変化はない。個々の変異としてはI93LおよびL63Aの頻度が年々増加しており、新規感染ウイルスの変化が示唆された。2006年以降、急性感染者が多く認められるようになり、昨年度より急性感染/慢性感染の鑑別のためにBED assayを行っている。急性感染者の割合は2006年以降20-30%で推移しており、今年度は20.5%であった。

### A. 研究目的

九州地区における急性HIV-1感染者および未治療慢性HIV-1感染者における薬剤耐性変異の頻度を調査し、薬剤耐性HIV-1伝播の疫学的動向を明らかにする。同時にウイルスサブタイプの解析を行い九州におけるサブタイプの頻度について考察する。

### B. 研究方法

#### (倫理面への配慮)

2009年にHIV感染が判明し当院免疫感染症科、もしくは九州ブロック内の他施設を受診した未治療慢性HIV-1感染患者および急性HIV-1感染患者を対象に、informed consentのもとに採血を行い、血清中HIV-1のプロテアーゼ(PR)領域、逆転写(RT)領域、インテグラーゼ領域の薬剤耐性遺伝子解析を行った。薬剤耐性変異の評価はIAS-USA(Dec:2008)およびShafer's criteriaを参考にした。同時にEnvC2V3領

域、Gag p17領域、Pol (protease, RT)領域の遺伝子解析を行い、サブタイピングも施行した。BED assayに関してはCalypte® HIV-1 BED Incidence EIA (IgG-Capture HIV-EIA)を用いた。さらに今年度はHIV感染に合併したHBV感染患者においてHBVのgenotypeの解析も行った。解析結果は、九州医療センターにて連結可能匿名化したデータとして、そのデータを研究代表施設(名古屋医療センター)に集約し、解析を行うので、個人の人権を侵害することは無く、個人の人権は確実に守られる。

### C. 研究結果

2009年において検討した新規未治療患者数は40名であり、そのうち2名は2008年以前にHIV陽性が判明しているため、2009年の新規登録は38名であった。この数は同時期の九州ブロック内(沖縄は除く)での新規感染者数(エイズ発生動向委員会報告



による)の約40%に相当し、例年と同程度の割合であった。解析症例数は年々増加している。(2003年:10人、2004年:12人、2005年:25人、2006年:26人、2007年29人、2008年33人)。2006年以降、急性感染者の割合が増加しており、今年度は38名中8名(21.0%)が急性感染(BED assayにて評価)であった。耐性変異の頻度は、RT領域では1例にK103Nを認めた(2.6%)他はT210F、K103R、E138G、V179Eと非特異的変異であった。(2003年:11%、2004年:0%、2005年:8%、2006年:15.4%、2007年:7.1%、2008年:6.25%)。PR領域では副次変異も含めると全例に何らかの変異を認め、2003年:44%、2004年:91.7%、2005年:80%、2006年:88.5%、2007年:82.1%、2008年:93.7%と2004年以降は高頻度で経過している。major変異に関しては本年度はM46Lを1例に認めた。副次変異に関しては、I93Lが年々増加してきており、今年度は23名(60.5%)に認められた(2005年:8%、2006年:38.5%、2007年:39.3%、2008年:46.9%)。非特異的変異であるが、同様に頻度が増加している変異としてL63Aがある(2005年:16%、2006年:19.2%、2007年:30%、2008年:33.3%、2009年:39.4%)。一方、L63Tに関しては年々頻度が低下している(2005年:24%、2006年:23%、2007年:16.7%、2008年:8.3%、2009年:5.3%)。インテグラーゼ領域に関してはmajor mutationを認めず、1例にE138Kを認めた。サブタイプに関しては、全例Bであった。BED assayによる感染時期の推定では、8名がrecent infectionであった。WBによる結果から判定した場合、recent infectionは6名であったが、病歴上は比較的早期(1年以内)の感染が示唆された。HIV感染に合併したHBV感染は2005年以降、10%前後で経過している。今年度は3例でHBV-DNAが陽性であり、解析した2例はともにgenotypeがAe型であった。2005年以降の解析では、19例の解析中15例(78.9%)がAe型、4例(21%)がC型であった。

#### D. 考察

耐性変異について：2006年以降、新規感染者の中に急性感染者の占める割合が増加し、九州地区では20-30%前後である。急性感染者が増加している背景として、HIV抗原/抗体スクリーニング検査の感度が良くなっていることに加え、感染早期から免疫不全が進行し症状を呈する症例が増加していることも関係すると考えられる。症例数が少なく観察期間も短い場合、正確な評価は出来ないが、急性感染者と慢性感染者において比較を行った。特に昨年までの検討にてATVのみに関連した耐性変異(G16E, K20I,

L33I, M36L, D60E, I64V, V82I, I93L)を持つウイルスの増加が認められていたため、今年度も同様に検討した。ATV関連の耐性変異はG16E, I64V, I93Lに限局していた。全体では73.7%(慢性感染:70.0%、急性感染:87.5%)と昨年に比べ、さらに増加していた。特にI93Lに関しては、年々増加が認められている。これは治療薬としてATVの使用頻度が増加したことを反映していると考えられる。しかしL63Aなど、ATVに関連のない変異の割合も変化していることや、急性感染者において近年、早期に病状が進行するようになったことなどを考慮すると、新たに感染するウイルスが徐々に変化してきていることが示唆される。なお、急性感染と慢性感染における耐性変異の種類、頻度の差は年々、少なくなっている。

BED assayについて：昨年度より急性感染(recent)と慢性感染(not recent)の鑑別にBED assayを用いている。WB法で区別する従来の方法では「慢性感染」と診断されるが、BED assayでは、recentと判断された症例が2例あったが、いずれも問診上、1年以内に感染した可能性が高かった。今年度はCD4が低下し極度の免疫不全状態に陥った症例が少なかったため病歴からの感染時期とBED assayによる評価に矛盾は生じなかった。

#### E. 結論

今年度解析した38例では、RT領域にK103Rを1例、PR領域にM46Iを1例、インテグラーゼ領域には耐性変異を認めなかった。2006年以降、ATVに関連した耐性変異が増加している。また、慢性感染者も急性感染者同様、耐性変異部位が限局化される傾向があった。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. High molecular weight form of adiponectin in anti-retroviral drug-induced dyslipidemia in HIV-infected Japanese individuals based on in vivo and in vitro analyses. Minami R, Yamamoto M, Takahama S, Ando H, Miyamura T, Suematsu E. Intern Med. 2009;48(20):1799-875, 2009
2. Human herpesvirus 8 DNA load in the leukocytes correlates with the platelet counts in HIV type 1-infected individuals. Minami R, Yamamoto M, Takahama S, Ando H, Miyamura T, Suematsu E.

AIDS Res Hum Retroviruses.;25(1):1-8, 2009.

3. 治療後ウエスタンブロット法にて抗HIV抗体が陰性化し持続しているHIV-1感染症の一例 南留美、高濱宗一郎、安藤仁、山本政弘、日本感染症学誌 83巻3号、p251-5, 2009

## 2. 学会発表

1. The effect of antiretroviral drug on the lipid metabolism in hepatocytes with and without HCV infection. Miinami R, Takahama S, Ando H, Yamamoto M 9th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific (ICAAP), in Bali, Indonesia from 9-13 August 2009.
2. Increasing Prevalence of Drug-resistance Mutations among Treatment-naïve HIV-infected Patients in Japan, 2003 to 2007. Junko Hattori\*<sup>1</sup>, S Yoshida<sup>2</sup>, H Gatanaga<sup>3</sup>, M Kondo<sup>4</sup>, K Sadamasu<sup>5</sup>, T Shirasaka<sup>6</sup>, H Mori<sup>4</sup>, R Minami<sup>7</sup>, W Sugiura<sup>1,8</sup>, and the Japanese Drug Resistance HIV-1 Surveillance Network. The 16th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. February 8 - 11, 2009, Montreal, Canada
3. 2003-2008年の新規HIV/AIDS診断症例における薬剤耐性頻度の動向、服部順子、瀧永博之、吉田繁、(略)、南留美、山本政弘、(略)、杉浦互 第23回日本エイズ学会学術集会 2009年11月26-28日、名古屋
4. 多施設共同疫学調査におけるHAARTの有効率 菊池嘉、岩本愛吉、佐藤典宏、伊藤俊広、田邊嘉也、横幕能行、上田幹夫、渡邊大、藤井輝久、南留美、宮城島拓人、建山正男、第23回日本エイズ学会学術集会 2009年11月26-28日、名古屋
5. 抗HIV剤はHBV感染肝細胞における肝脂質代謝を促進する 南留美、高濱宗一郎、安藤仁、山本政弘、第23回日本エイズ学会学術集会 2009年11月26-28日、名古屋
6. RAL/ATV/RTVによるダブルブースト療法が奏効した吸収不良HIV感染症の1例 高濱宗一郎、安藤仁、南留美、山本政弘、第23回日本エイズ学会学術集会 2009年11月26-28日、名古屋
7. 福岡地域におけるHIV感染者およびAIDS患者から分離されたHIVの遺伝子解析 川本大輔、桶脇弘、高橋真梨子、南留美、山本政弘、第23回日本エイズ学会学術集会 2009年11月26-28日、名古屋
8. スポンサーシップシンポジウム「当院におけるRaltegravirの使用経験 臨床的およびin vitroでの解析」南留美、第23回日本エイズ学会学術集

会 2009年11月26-28日、名古屋

9. 「HIV感染に関する3つの話」 南留美、第7回福岡HIV感染症治療研究会 2009年11月6日

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



## 研究要旨

# 高感度薬剤耐性HIV検査法を用いた 微小集族薬剤耐性HIVの検出と存在比率に関する研究 ～定量PCRを応用した高感度薬剤耐性検査法の開発～

研究分担者 西澤 雅子 国立感染症研究所 エイズ研究センター第2研究グループ 研究官

患者血液中に微小集族(minority population)としてごく微量に存在する薬剤耐性HIVが、抗HIV療法に影響を及ぼす可能性が示唆されている。しかしこのminority populationの薬剤耐性HIVは通常遺伝子検査で用いられるダイレクトシーケンス法では検出が困難である。そこで定量PCRの手法を応用した高感度薬剤耐性HIV検査法を用いて新規感染未治療患者検体を解析し、minority populationの薬剤耐性HIVの検出を試みた。国立感染症研究所エイズ研究センターで薬剤耐性検査を行った患者検体28例と名古屋医療センターで薬剤耐性検査を行った患者検体93例について、高感度薬剤耐性HIV検査を行った。その結果、国立感染症研究所の患者検体で2例(約7%)、名古屋医療センターの患者検体で4例(約4.5%)の割合でminority populationの薬剤耐性HIVが検出された。

## A. 研究目的

患者血中にminority populationとして存在する薬剤耐性HIVが、その後の抗HIV療法に悪影響を及ぼす可能性が近年報告されている。しかしこのようなminority populationの薬剤耐性HIVは、通常遺伝子検査で使用されるダイレクトシーケンス法では検出が難しい。本研究ではminority populationの薬剤耐性HIVを検出する事を目的として開発された定量PCRの技法を応用した高感度薬剤耐性HIV検査法(高感度法)を用い、新規未治療患者検体を検査対象としてminority populationの薬剤耐性HIVの検出を試みた。

## B. 研究方法

2005年11月から2008年2月の間に国立感染症研究所エイズ研究センターにて薬剤耐性検査を行った新規感染未治療患者検体28例と、2008年1月から12月の間に名古屋医療センターにて薬剤耐性検査を行った新規感染未治療患者検体93例を解析対象とした。患者血漿からHigh Pure RNA Isolation Kit(Roche)を用いてHIV RNAを抽出し、RT-PCRでPCR産物を得た。これを鋳型にウイルス量を測定する為のcom-

mon reaction用の特異的プライマーとプローブ(Taqman probe)及び薬剤耐性変異を検出するための薬剤耐性特異的プライマーとプローブ(Taqman probe)を用いてそれぞれに定量PCR反応を行い、それぞれの反応のCt値の差を $\Delta$ Ct値として値を求めた。サブタイプBの患者検体は下記参考文献を元にプライマーとプローブを合成し、逆転写酵素阻害剤(NRTI)に対する薬剤耐性変異M41L、K65R、K70R、K103N、Y181C、M184V、T215F/Yの8変異について解析した。またCRF01\_AEの患者検体は、平成20年度本研究でM41L、Y181C、M184V、T215YについてCRF01\_AE特異的プライマーを設計した。K70R、K103N、T215FはサブタイプB用プライマー及びプローブで検出可能だった。

参考文献：Simple PCR assays improve the sensitivity of HIV-1 subtype B drug resistance testing and allow linking of resistance mutations. Johnson JA et al. PLoS ONE. 2007 Jul 25;2(7):e638

## (倫理面への配慮)

本研究では薬剤耐性変異を組み込んだベクターの作製で組換えDNA実験を行うので、組換えDNA実

験安全委員会に実験申請を行いその許可を得た。またヒト由来検体を使用するため、国立感染症研究所の医学研究倫理審査委員会へ倫理審査を申請中である。

### C. 研究結果

国立感染症研究所エイズ研究センターで薬剤耐性検査を行った新規感染未治療患者28例(サブタイプB 17例、CRF01\_AE 11例)を用いて高感度法による minority population の薬剤耐性HIVの検出を試みた。これらの28例はダイレクトシーケンス法では薬剤耐性変異は検出されなかったが、高感度法によってダイレクトシーケンス法では見つからなかった薬剤耐性変異をサブタイプBから1例(K103N)、CRF01\_AEから1例(T215F)検出した。検出率はそれぞれ5.8%と9%で、全体では約7%の検出率だった(図1)。名古屋医療センターで薬剤耐性検査を行った新規感染未治療患者93例(サブタイプB 88例、CRF01\_AE 5例)について高感度法による解析を行った結果、ダイレクトシーケンス法では見つからなかった薬剤耐性変異をサブタイプBからK65R 1例、K70R 1例、K103N 1例、T215F 1例検出した。それぞれの耐性変異の検出率は1%で、全体としての minority population の薬剤耐性HIVの検出率は約4.5%だった。CRF01\_AEの5症例からは minority population の薬剤耐性HIVは検出されなかった(図2)。

### D. 考察

新規感染未治療患者検体から高感度法を用いて minority population の薬剤耐性HIVを検出した。Minority population の薬剤耐性HIVの検出率は国立感染症研究所のサンプルで約7% (28例中2例)、名古屋医療センターのサンプルで約4.5% (93例中4例)であった。名古屋医療センターの93サンプルのうち5例ではダイレクトシーケンス法でも薬剤耐性が検出されており、今回の高感度耐性検査の結果を合わせると薬剤耐性HIVの検出率は約9.7% (93例中9例)であった。この結果は、新規感染未治療患者で薬剤耐性HIVに感染している患者の約半数が、従来法のダイレクトシーケンス法では薬剤耐性HIVの存在が見逃されている可能性を示している。近年ダイレクトシーケンス法では検出不可能な minority population で存在する薬剤耐性HIVが、その後の抗HIV療法に悪影響を与えるといった報告があり、 minority population の薬剤耐性HIVを検出する事は抗HIV療法を開始する際に重要であると認識されるようになっていく。DHHSガイドラインでは新規未治療患者に抗HIV療法を開始する際の薬剤耐性検査を推奨しており、より効果的な抗HIV薬剤を選択するためには、従来法よりも感度の高い薬剤耐性検査法を導入する必要があると考えられる。

	M41L	K65R	K70R	K103N	Y181C	M184V	T215Y	T215F	Total
Subtype B(17)	0	0	0	1	0	0	0	0	1(5.8%)
CRF01_AE(11)	0	-	0	0	0	0	0	1	1(9.0%)

Subtype B 17例中1例、CRF01\_AE11例中1例で、遺伝子検査では検出できなかったK103NとT215Fをそれぞれ検出した。

図1 解析結果(感染研、新規未治療)

	M41L	K65R	K70R	K103N	Y181C	M184V	T215Y	T215F	Total
Subtype B	0	1(1%)	1(1%)	1(1%)	0	0	0	1(1%)	4(4.5%)
CRF01_AE	0	-	0	0	0	0	0	0	0

Subtype B 88例の中から、遺伝子検査では検出されなかったK65R 1例、K70R 1例、K103N 1例、T215F 1例の、計4変異を異なる4例から検出した。それぞれの耐性変異の出現比率は約1%だった。

図2 解析結果(名古屋医療センター、新規未治療)