

京都大学の楠見等によると膜中のすべての分子は、その拡散が膜骨格の網目と衝突するため隣のコンパートメントへ移動が阻害される（膜骨格フェンス、ピケットフェンスによる阻害）。このために、受容体が会合したり、細胞質のシグナル分子が受容体に結合したりして、複合体が生じると、膜骨格の網目をホップする確率が劇的に減り、さらに膜骨格に結合する確率が劇的に増加する。すなわち、シグナル複合体の運動は低下する（Oligomerization-induced trapping model）。以上の2つのメカニズムで細胞膜上の分子の拡散は規定されるという。そこで、WT-CXCR4の拡散係数がCD4分子拡散係数の3分の

の1まで低下していることから、CXCR4は2量体以上の状態すなわち、多量体として存在する可能性が示唆された。

そこで、細胞表面上でのdsRed mono-WT-CXCR4のspot強度を調査し、その分布をmulti Gaussian distribution解析を行い、その明るさから何量体で存在するか同定しようと試みた。spot強度をmulti gaussian fitnessだ解析すると、3つのピークが認められた（図3B）。以上のことから、dsRedmono-WT-CXCR4には少なくとも3つの状態があることが明らかになった。すなわち、無刺激の状態でWT-CXCR4は2量体、4量体、8量体のいずれかの状

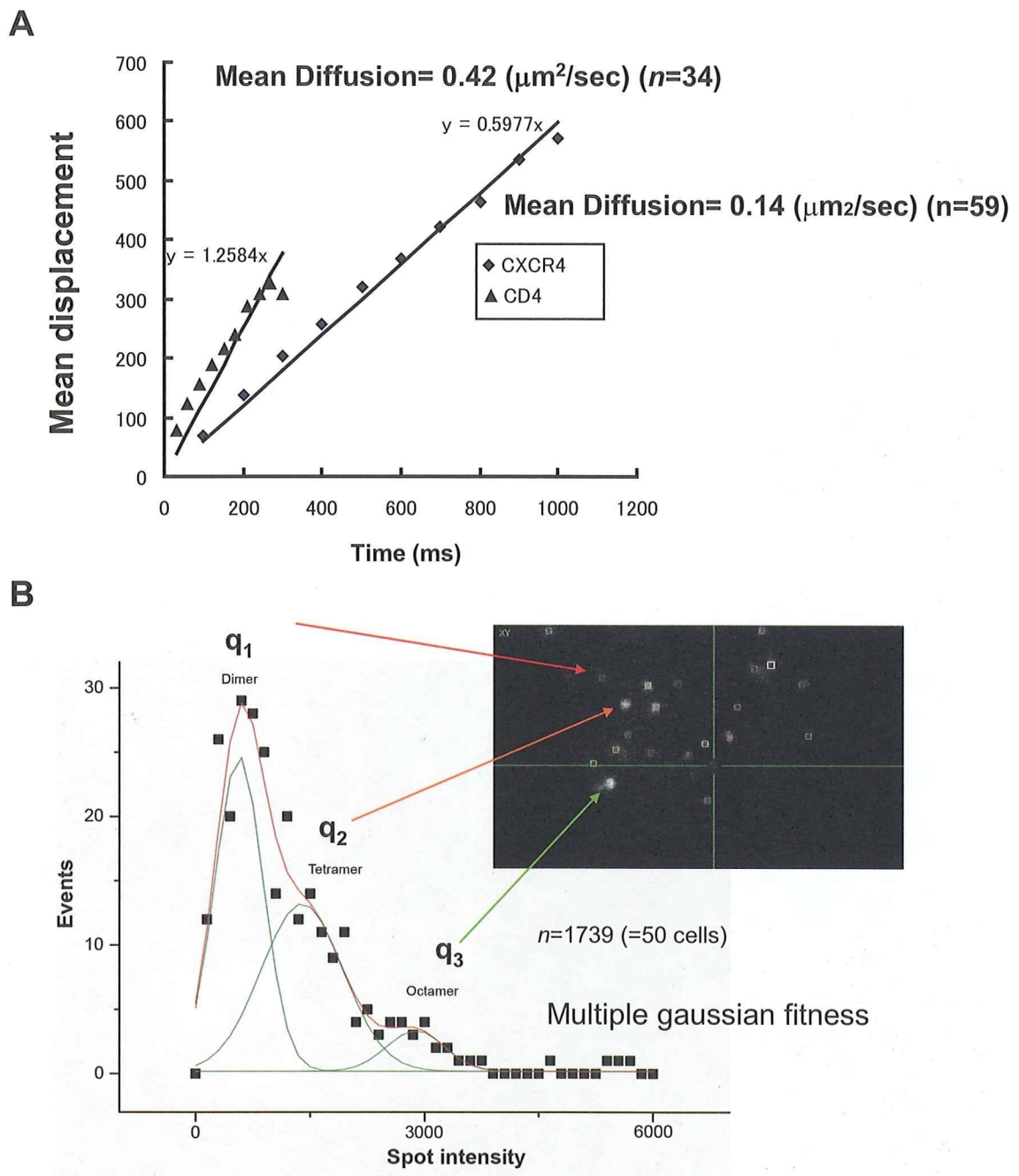


図3

態を取っていることが明らかになった。以上のことから、CXCR4 は多量体を取り細胞表面上に分布していることが強く示唆された。

そこで、この系を用いて、CXCR4 阻害薬であるAMD3100 が2 量体形成に影響を与えるか調べた。AMD3100 はdsRED 融合-WT-CXCR4とGFP 融合-CXCR4-ICL1m の間のFRET に影響を与えず、CXCR4-ICL1m の細胞表面輸送にも影響を与えないことが明らかになった。以上の結果より、AMD3100 はCXCR4-2 量体形成に影響を与えないことが明らかになった。

#### D. 結論・考察

CD4, CXCR4 受容体の動態を一分子顕微鏡を用いて世界ではじめて、100ms/frame の速度で観察することに成功し、その結果、それぞれの拡散速度の計測に成功した。一分子レベルの観察の結果CXCR4 は多量体を取り細胞表面上に分布していることが強く示唆された。

gp120 と2つのウイルス受容体が膜状でどの程度の強さで起きるのか、また2つの受容体にどのぐらいの時間でsequential に結合出来るのかという最も基本的な疑問に対してこの20年間膨大な数の研究がなされてきたが結論が出ていない。このために、中和抗体が実際に結合できる時間がどれほどあるのかということも明らかにされてこなかった。すなわち、gp120 が2つの受容体にSequential に結合するのに必要な時間が30分ほどであれば、中和抗体はその量を改善することで効果を発揮する可能性が高まるが、もし数分ほどの短時間であれば、高い結合定数をもつ抗体以外ではウイルス中和は難しいことになる。

今回の研究により、ウイルス受容体の少なくともひとつは多量体を形成しており、この事が2種類の受容体へのgp120の連続的な結合を促進している可能性が示唆された。

来年度はgp120を介した細胞侵入にケモカイン受容体のホモダイマー形成が不可欠かどうかという疑問に挑戦する予定であり、CCR5阻害薬とは、gp120とCCR5のbindingを阻害することのみでしか作成出来ないのか、それともCCR5の2量体形成を抑制することで達成出来るのかを明らかにする予定である。

#### E. 健康危険情報

なし。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

(欧文)

1. Theo A, Masebe T, Suzuki Y., Kikuchi H, Wada S, Obi C-L., Bessong P-O., Motoki U., Oshima Y., Hattori T. *Peltophorum africanum*, a traditional South African medicinal plant, contains an anti HIV-1 constituent, betulinic acid. *Tohoku J Exp Med*,217(2),(2009),93-99
2. Imamura J, Suzuki Y, Gonda K, Nath-Roy C, Gatanaga H, Ohuchi N, Hattori T, Higuchi H. Single-molecular Tat-protein transduction domain (PTD) nano-imaging confirms that multivalent Tat induced HSPG crosslinkage activates Rac1 for Tat internalization. *JBC* (in press) (2010)

##### 学会発表

1. Suzuki Y, Imamura J, Gonda K, Nath-Roy C, Warunya P, Higuchi H, Hattori T. Single molecular level imaging of Tat-PTD in living cells: Part 1 第23回日本エイズ学会学術集会2009名古屋
2. Nath-Roy C, Imamura J, Gonda K, Warunya P, Hattori T, Higuchi H, Suzuki Y. Single molecular imaging of CXCR4 and CD4 in living cells 第23回日本エイズ学会学術集会2009名古屋
3. Imamura J, Gonda K, Nath-Roy C, Warunya P, Higuchi H, Hattori T, Suzuki Y. Single molecular level imaging of Tat-PTD in living cells: Part 2 第23回日本エイズ学会学術集会2009名古屋
4. Warunya P, Imamura J, Nath-Roy C, Hattori T, Suzuki Y. HIV-1 感染過程におけるダイナミンの役割の解析 第23回日本エイズ学会学術集会2009名古屋
5. Imamura J, Gonda K, Nath-Roy C, Higuchi H, Suzuki Y. Multivalent-Tat-PTD induced crosslinkage of HSPG activates Rac1 for Tat-immobilization and macropinocytosis: single-molecular microscopic study 第32回分子生物学会年会2009横浜

#### G. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

1. 新規超効率蛋白導入ドメインの創出法について (出願中)

## 新規薬剤の臨床効果の解析

研究分担者

横幕 能行 独立行政法人国立病院機構名古屋医療センター  
感染症科・臨床研究センター 医師

### 研究要旨

高度薬剤耐性HIV-1感染患者のプロテアーゼ領域のアミノ酸変化を経時的にクローニング解析を行い、そのmajor cloneについて新規に開発したウイルス複製過程を必要としないVLP ELISA法とコンピューターシミュレーション法を用いて表現型試験を行った。両方法により得られた耐性度やプロテアーゼ活性評価は臨床経過によく一致した。多剤耐性HIV-1感染者の有効かつ安全な治療薬選択に有用な情報をもたらす評価系が確立された。

### A. 研究目的

インテグラーゼ阻害剤等新しいクラスの抗HIV剤が使用可能になり、適切なsalvage療法を行うことにより多剤耐性HIV感染者の予後の改善が期待される。現在臨床現場で使用可能なインテグラーゼ阻害剤であるraltegravir(RAL)を含むsalvage療法を行う場合、新規薬剤の耐性化阻止のために、optimized background therapy(OBT)として使用する薬剤の選択が重要であることが、臨床試験から明らかになっている。

プロテアーゼ阻害剤(PI)は高いgenetic barrierを有し、salvage療法のkey drugとしてばかりでなく、OBTとして使用するにも適している。Salvage療法の対象となるHIV感染症の殆どはPI治療経験例であり、多くの薬剤耐性関連アミノ酸変異が蓄積されていることが多く、交叉耐性となっている可能性が高い。したがって、salvage療法には、服薬履歴や臨床経過、さらには遺伝子型および表現型検査による薬剤耐性試験の結果をもとに十分な効果を有するPIを選択することが重要である。しかしながら、PI耐性関連変異高度蓄積例では、胃炎詩型検査の結果解釈が困難である。また、高度薬剤耐性protease (PR)を有するHIV-1は、十分な感染性や複製能を有さないことが多く、複製過程を要する表現型検査が容易でない。

この問題を解決するために、我々は、従来の薬剤耐性検査法では評価困難な症例のPIに対する耐性度評価のために、これまでの研究で、HIVの複製過程

を必要としないHIV-1 PR活性評価系としてVLP ELISA法を確立した。また、実臨床での有用性を考慮し、国立感染症研究所大出裕高博士の協力のもと、コンピューターによるHIV-1 PRの構造予測およびPIとの親和性計算の手法(コンピューターシミュレーション法)を構築した。

本研究では、確立した評価系を用いて、HIVの複製過程を必要とする表現型検査が実施できないPI耐性関連変異高度蓄積症例の薬剤感受性評価を、①VLP ELISA法、②コンピューターシミュレーション法によって試み、その有用性を検討することを目的とした。

### B. 研究方法

#### (a) 対象症例の臨床経過 (図1)

1999年ニューモシスチス肺炎発症で初診。以後、複数のPI、非核酸系逆転写酵素阻害剤(NNRTI)を含む抗HIV療法を受けてきたが服薬困難などを理由に治療失敗を繰り返した結果、RT、PR領域に薬剤耐性関連変異が高度に蓄積した。複製過程を要する表現型検査を試みたが実施不能であった。2006年2月に採取した検体を用いた遺伝子型検査の結果から、逆転写酵素(RT)領域にはM41L, L62V, K65R, N69ins, L100I, K103N, M184I, G190A, L210W, T215Yの変異を認め、既存の核酸系逆転写酵素阻害剤(NRTI)、NNRTIは無効と考えられた。PR領域にもL10I, M46I, I54V, L63P, A71V, G73S, V82T, V77I, V82T, I85V, L90M, I93Lの変異を認め、臨床経過からは

LPV/rに対しても高度耐性と考えられた。2008年2月20日よりTDF+ZDV+3TC+FPV+ATV+RTVによる抗HIV療法を開始。2006年4月には一時的にウイルス量が50 copies/ml未満に到達したものの、2006年6月以降増加傾向を示した。治療歴、臨床経過、遺伝子型検査の結果からは、2006年2月の治療変更から再度の治療変更に至る2008年6月までは実質FPVの単剤治療と同値であると考えられた。

(b) 遺伝子型検査

過去に採取された検体および2006年2月から2008年6月に採取した血漿から分離したHIV-1 RNAの塩基配列を定法により解析。得られた塩基配列をアミノ酸配列に変換し、PRおよびRT領域のアミノ酸変

異の検討を行った。PRの表現型検査に用いる検体については、PR領域のcloning解析を行い、major cloneを決定した。

(c) VLP ELISA法によるPR活性およびPI感受性評価

解析により得られたmajor cloneのPR領域をPCR法によって増幅し、InFusion systemを用いてpVLP-IFC (図2-a) に組み込んだ(pVLP pro)。これを293T細胞にtransfectionし、48時間培養後、上清を回収しp24を定量した。また、cell lysateを調整し、luciferase活性を測定した (図2-b)。PR活性をp24/luciferase活性として求め、HXB2 PRとの比を求めた。また、NFV, LPV, ATV, APV, DRV存在下で

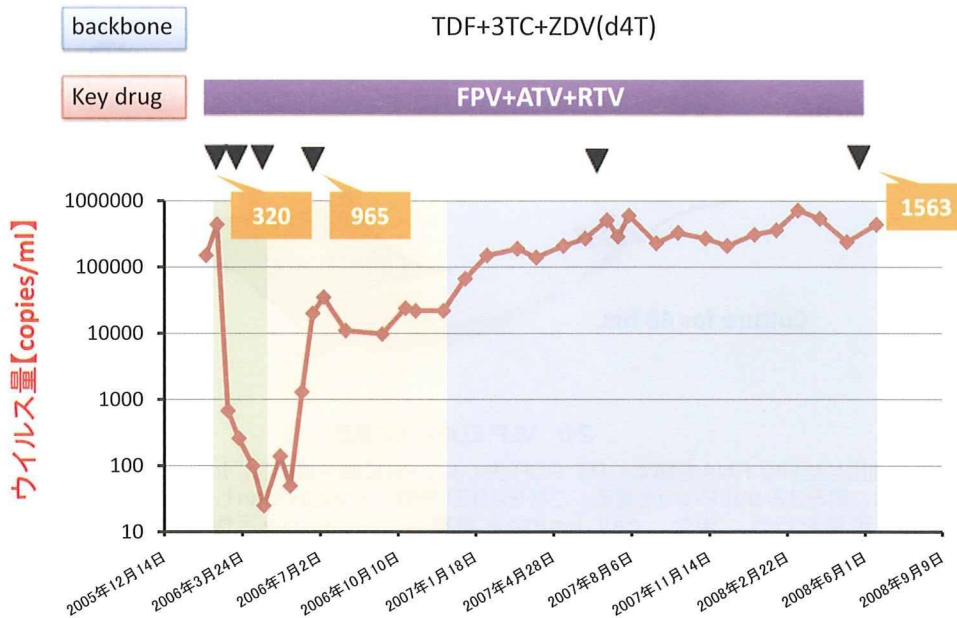


図1 検討対象症例のHIV RNA量の推移  
▼はクローニング解析を行った血漿採取時を示す。320、965、1563は表現型検査を行ったクローンを示す。

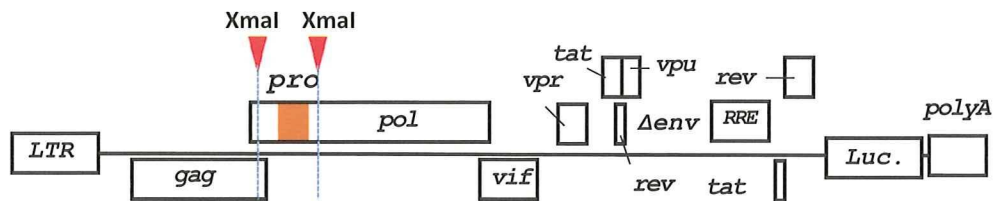


図2-a pVLP-IFCの構築

3'LTRをSV40 polyAに置換。また、env領域にdeletionした。Gag precursorのsurrogate markerとしてnefをluciferase geneに置換した。また、p6とRTにXmaI siteを挿入し、InFusion systemを用いて臨床検体由来HIV-1 proteaseをアミノ酸挿入なく容易に組み込み可能とした。

PR 活性を求め、PI 非存在下の 50% 阻害を与える PI 濃度を IC50 とした。IC50 値は、duplicate で独立した 3 回の実験を行い、その平均を求めた。PI 感受性は、対象 PI の検体採取時の trough 濃度 (C trough 値) を IC50 値で除した値を求め、その指標とした (inhibitory quotient : IQ)。

(d) コンピューターシミュレーション法による PI 感受性評価 (図3)

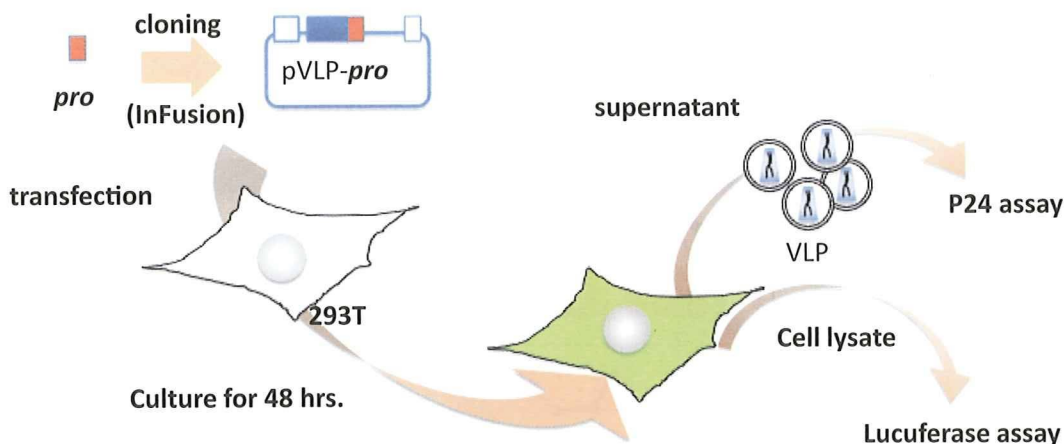
AMBER 7, 8, 9 を用いて、耐性変異を有する PR と検討対象とする PI が結合した構造を予測。その結合エネルギーを計算した ( $\Delta G_{bmut}$ )。HXB2 PR を対照とし ( $\Delta G_{bWT}$ )、結合エネルギーの差を求め、耐性度

の指標とした ( $\Delta\Delta G_b$ : Relative binding energy ( $\Delta G_{bmut} - \Delta G_{bWT}$ ) )。これまでの検討から、+5 kcal/mol、+10 kcal/mol、のエネルギー差は fold resistance に換算すると、それぞれ 10 倍、100 倍に相当することが示されている。

更に、予測した変異 PR と HXB2 PR と PI との複合体との root mean square deviation (RMSD) を求め、構造の差として図示した。

(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検査を行なった。



2-b VLP ELISA法の概略

血漿から抽出した HIV RNA を鋳型に RT PCR 法により PR 領域を増幅し、InFusion system を用いて pVLP IFC に組み込み pVLP-pro を得る。これを 293T 細胞に transfection し、48 時間培養後、上清を回収し p24 定量を行う。また、cell lysate を調整し、luciferase 活性を測定する。PR 活性を p24/luciferase 活性として求める。

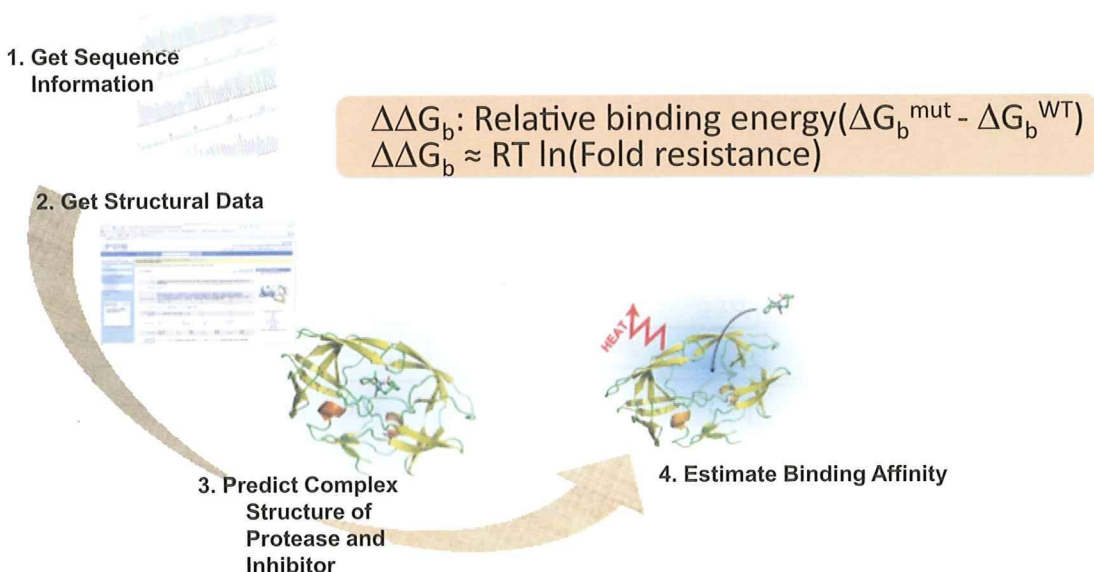


図3 コンピューターシミュレーション法の概略 (感染症研究所大出裕高博士より供与)

C. 研究結果

(1) PR領域のcloning解析

ウイルス量の変化を参考に図1中の▼に示す時点で採取した血漿からPR領域をPCRによって増幅し、InFusion systemを用いてpVLP-IFCにクローニングをした。各時点で16から32クローンを得て塩基配列を確認し、それぞれのmajor cloneを決定した(図4)。

一旦ウイルス量が検出限界未満に達したこと、RT領域の遺伝子型検査の結果を考慮すると、2006年2月20日の時点ではFPVに感受性があったと考えられる。2006年6月以降、ウイルス量が再び増加しているが、遺伝子型検査からPR領域にG16A, V32Iの変異が加わったことが明らかになった。その後、抗HIV療法下でウイルス量は徐々に増加したが、2008年6月16日のmajor cloneにはK43T, I54L, L89V変異が新たに加わっていることが明らかになった。

臨床経過および遺伝子型検査の結果から、2006年2月20日、7月7日、2008年6月16日のmajor cloneである320, 965, 1563の3検体についてVLP ELISA法およびコンピューターシミュレーション法によりPIに対する感受性評価を行うことにした。

(2) VLP ELISA法によるD30N変異を有するPRの活性とNFVに対する耐性度

まず、測定系の評価のため、NFV耐性変異として既知のD30N変異体のNFVに対する感受性評価を両法により行った。HXB2由来PRのIC50は39.9 ± 3.2 nMであったが、D30NのIC50は217.50 ± 27.4 nMであった。C trough値として、最小目標血中濃度(800 ng/ml)を用いた場合と治療中に測定した実際のC trough値を用いてIQを計算すると、WTが175.6、35.3に対し、D30Nでは32.3、6.5であった。(図5-a)コンピューターシミュレーション法によると、

	10	20	30	40	50	60	70	80	90
HXB2	PQVTLWQRPLVTIKIGGQLKEALLDTGADDTVLEEMSLPGRWPKMIGGIGGFIKVRQYDQILIEICGHKAIGTVLVGPTPVNIIGRNLLTQIGCTLNF								
02/7/18	--I-----I---V-----D-----I-----V-----P-----VLS---I---T--V---M--L-----								
06/2/20	--I-----I---V-----D-----I-----V-----P-----VLS---I---T--V---M--L-----								
06/3/20	--I-----I---V-----D-----I-----V-----P-----VLS---I---T--V---M--L-----								
06/4/21	--I-----I---VA-----I-----D-----I-----V-----P-----VLS---I---T--V---M--L-----								
06/7/7	--I-----I---VA-----I-----D-----I-----V-----P-----VLS---I---T--V---M--L-----								
07/2/2	--I-----L---VA-----I-----D-----T---I-----V-----P-----VLS---T--V---VM--L--S---								
08/6/16	--I-----I---VA-----I-----D-----T---I-----L-----P-----VVSP-----T--V---VM--L--S---								

図4 クローニング解析により得られたmajor cloneのアミノ酸配列

血漿から抽出したRNAを鋳型とし、複数のprimer setを用いてpro領域を増幅しcloningを行った。各解析ポイントで16から32cloneを得た。sequencingを行い、major cloneを決定したそれぞれの血漿採取時におけるmajor cloneを示す。表現型検査には、2006年2月20日検体由来の320、2006年7月7日由来の965、2008年6月16日由来の1563を用いた。

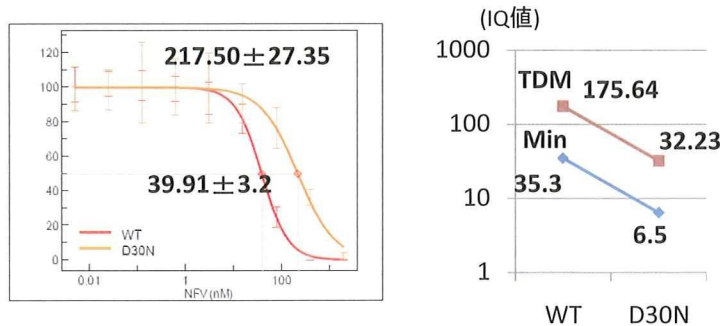


図5-a NFV耐性変異D30Nによる検討 (VLP ELISA法)

HXB2 PRのIC50は39.91nM、D30NのIC50は217.50nMであった。IQ値の図中のMin hはトラフ値として実際の測定値を用いた場合、TDM :はトラフ値として最小目標血中濃度を用いた場合を示す。

D30Nの $\Delta\Delta G_b$ は2.5で約5倍程度の耐性度と考えられ、VLP ELISA法とコンピューターシミュレーション法とよく一致する結果を得た(図5-b)。

また、D30N変異を獲得した場合、PRの活性が低下することが報告されている。VLP ELISA法で薬剤非存在下でのPR活性を比較したところ、D30NはWTに対し43.2%の活性しか有しないことが示された(図5-c)。

### (3) VLP ELISA法による治療変更前のLPV, ATV, APV, DRVに対する感受性評価

2006年2月20日の検体である320を用いて、LPV, ATV, APV, DRVに対する感受性をVLP ELISA法を用いて測定し、WTと比較を行った。検体採取時に測定したそれぞれの薬剤のC trough値を用いてIQ値を算出したところ、WTのLPV, ATV, APV, DRVの

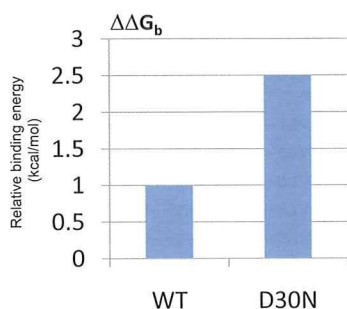


図5-b NFV耐性変異D30Nによる検討 (コンピューターシミュレーション法)

D30Nは $\Delta\Delta G_b$ で2.5を示した。 $+5.0\text{kcal/mol} \approx \times 10$ (Fold resistance)、 $+10.0\text{kcal/mol} \approx \times 100$ (Fold resistance)

IQ値はそれぞれ342.0、6555.5、699.7、26.2であった。一方、320では、4.1、1.5、7.5、249.2であった。治療変更前に、LPV/r+SQV+EFVをkey drugとする抗HIV療法が全く無効であったこと、FPV+ATV+RTVによる抗HIV療法が有効で当初有効であったことから、IQ値7.5のAPVは感受性を維持していたと判断された。DRVは治療変更時には十分な感受性を有していたと考えられた。

### (4) VLP ELISA法による耐性関連変異蓄積によるAPV, DRVに対する感受性の変化

320, 965, 1563について、APV, DRVに対する感受性評価を行い、WTと比較をした。それぞれのAPV, DRVを検査対象としたときのdose response curveを図6に示す。得られたIC50値とAPVについては検体採取時に同時に測定した血中濃度、DRVに

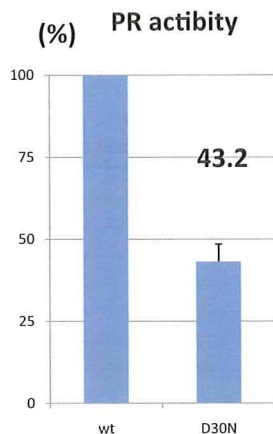


図5-c NFV耐性変異D30NのVLP ELISA法によるPR活性 D30NはHXB2 PRの43.2%の活性を示した

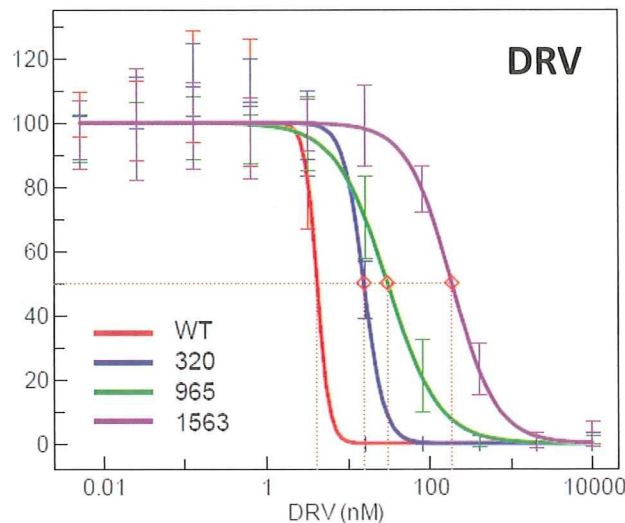
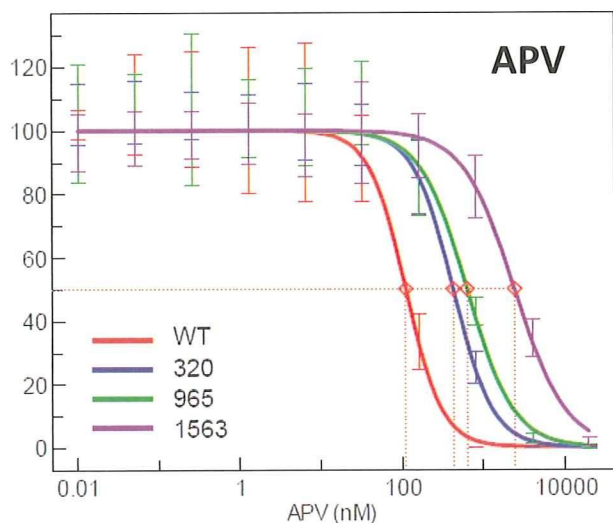


図6 VLP-ELISA法によるAPV、DRVに対する感受性試験

APVに対するIC50の平均値は、HXB2PR、320、965、1563でそれぞれ107.9、377.4、617.2、2417.6。DRVに対しては、5.9、15.3、31.9、188.7であった。それぞれduplicateで3回の実験を行い平均を出した。

については目標最低血中濃度をC trough値として用い、IQ値を算出したところ、変異の蓄積とともにIQ値が減少した(図7-a)。

965の検体を採取した際は、ウイルス量が増加傾向になったことを受けてAPVの血中濃度を上昇させる努力を行っていた。その結果、C trough値は、1.42mg/mlから2.47mg/mlに上昇し、IQ値は320で7.4、965では7.9と上昇していた。そのような環境下でもウイルス量が増加にしていたことから、G16A、V32I変異によりAPV耐性が高まったことが示唆された。また、1563では二次変異の蓄積によりさらにAPV耐性が上昇することが示された。

また、APV存在下での変異蓄積および耐性度の上昇であったが、APVの耐性化に平行してDRVに対する感受性低下が明確に示された。

### (5) コンピューターシミュレーション法による感受性予測

320のLPV、ATV、APVおよびDRVの $\Delta\Delta G_b$ はそれぞれ8.0、4.7、1.7、1.1であった。APV、DRVについては感受性と判定された。臨床経過中のAPVおよびDRVの $\Delta\Delta G_b$ の変化を検討すると、APVおよびDRVに対する965、1563の $\Delta\Delta G_b$ は上昇し、耐性度が上昇していることが示された(図7-b)。

### (6) PR活性の変化

320、965、1563のPR活性の変化を検討した。320ではWTに比して72.3%の活性を有していたが、G16AおよびV32I変異の蓄積により965では61.6%に低下した。しかしながら、1563では二次変異蓄積により76.3%に上昇した(図8-a)。

コンピューターシミュレーション法によりWTと320、965、1563のAPV複合体のRMSDの差を图示

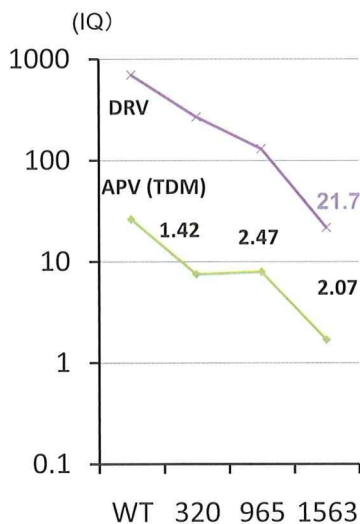


図7-a IQ値を用いた際の耐性度の推移

APVのIQ値はTDMトラフ値を用いて算出した。図中の数値は、血漿採取時に測定した各薬剤のC trough値を示す(μg/ml)。IQ値が低いほど耐性度が高いことを意味する。

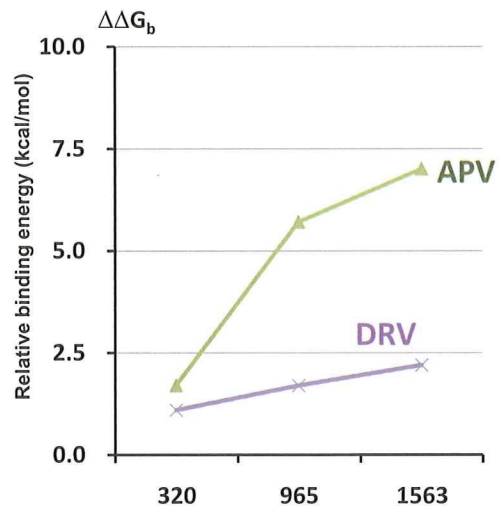


図7-b コンピューターシミュレーション法による耐性度の変化

$\Delta\Delta G_b$ が高値であるほど、耐性度が高いことを意味する。

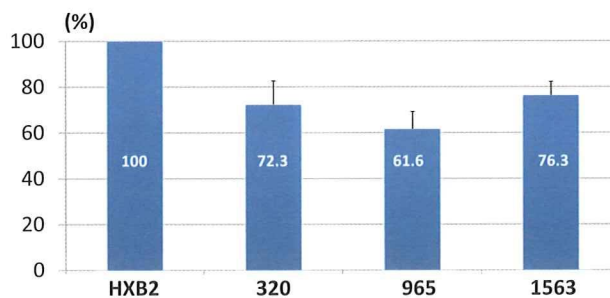


図8-a VLP ELISA法によるPR活性評価



して検討したところ、965でフラップ領域のゆがみが増大し、1563ではそれが解消されていることが示された(図8-b)。

### (7) 耐性獲得機序の解析

コンピューターシミュレーション法での構造予測結果から、1563のAPVに対する感受性低下の機序の検討を行った。図8に示すように、HXB2 PRではflapとAPV間に存在するH<sub>2</sub>Oが1563では失われ、さらにD29'とAPVとの水素結合が減少していた(図9)。

## D. 考察および結論

### (1) pVLPの改変

従来VLP ELISA法に使用していたconstructは、Gateway systemを用いてcloningの効率的を可能としていたが、InFusion systemへ変更した。容易にrecipientを作成するために、non synonymous mutationでP6領域およびRT領域に*gag*, *pol*の両フレームでアミノ酸変異が無いようにXmaI siteを挿入した。このような工夫により、短時間により簡略な手技で効率よく多くのcloneを得ることができるようになった。また、Gateway systemであったアミノ酸変異挿入が

解消されたことにより、D30Nのような活性の低い変異体でも活性の評価が可能になった。

### (2) IQ値を用いた耐性評価

IC50値を用いてfold resistanceを算出する方法では、実臨床での有用性と解離がある。しかしながら、IQ値を用いることにより、より実感に近い耐性度評価が可能になった。表現型検査ではthreshold値の設定が重要である。320に対するLPV, APVに注目してみると、IQ値で7前後が境界である可能性がある。今回の解析から、VLP ELISA法においては、IQ値10以上であればkey drugとして使用可能な可能性があると考えられる。

### (3) APVとDRVの感受性について

APV耐性関連変異蓄積によりDRVの感受性も並行して低下することが明確に示された。LPVによる治療失敗例で、耐性関連変異が挿入された場合、DRVによるsalvage療法でも治療に失敗する可能性が高くなることが報告されている。また、現在、FPVをkey drugとして用いた治療の失敗例が存在する。今回得られた結果は、APVでの治療失敗例で、

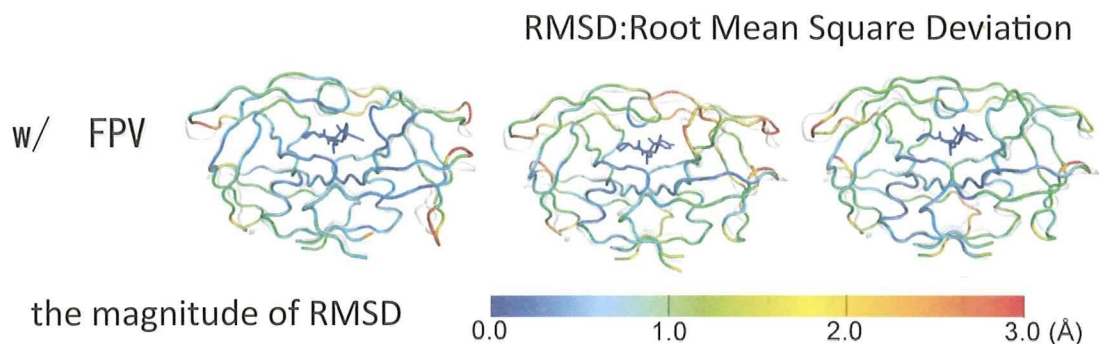


図8-b HXB2と耐性HIV-1 PRのRMSD 3D plots比較

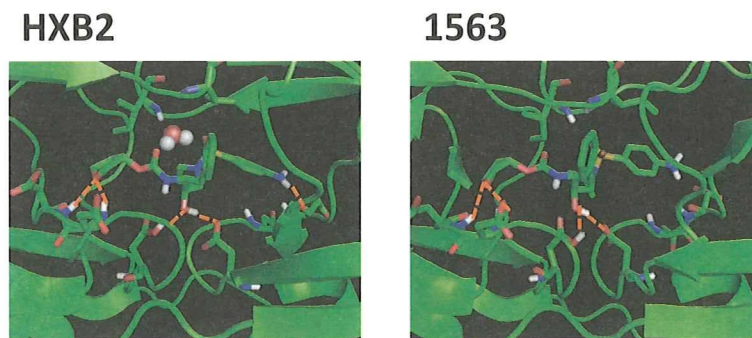


図9 構造予測によるAPV耐性化機序の解除

HXB2PRと1563のAPVとの結合状態を図示する。1563ではHXB2では存在するFlapとAPV間の水分子が抜け、D29'とAPV間の水素結合の減少が認められる。

salvage療法にDRVを使用する際には少なくとも遺伝子型検査を行い、慎重に併用薬の選択を行う重要性を示す。また、2009年12月改訂のDHHSガイドラインではDRVが第一選択薬の一つとなったが、他剤に比して高いIQ値を示すことをあわせて、高いgenetic barrierを特徴とするDRVによる初回治療の有用性が示す結果でもある。

#### (4) コンピューターシミュレーション法の有用性

今回用いたコンピューターシミュレーションによる解析手法で得られた結果は、VLP ELISA法および臨床経過とよく相関した。解析に数日を要すること、解析を目的とするPRとPIの結合のさせ方で大きく結果が異なることがあるなど、安定して結果が得られないことがあるが、今後、臨床経過、遺伝子型検査、表現型検査の結果をあわせてシステムを改良することにより、将来、表現系検査の結果から容易に安定した耐性評価結果が得られるようになる可能性がある。

#### (5) 活性評価と耐性度評価

VLP ELISA法およびコンピューターシミュレーション法においては、活性評価と耐性度評価が可能である。

今回、検討した症例では、当初、APVに対し感受性を有していたが、V16A, V32I変異の蓄積により耐性化したもののPR活性は低下。その後、二次変異蓄積により耐性度とPR活性が上昇することが明確に示された。活性評価から変異PRを有する薬剤耐性HIV-1の複製能の推測はある程度可能である。薬剤耐性HIV-1に対するsalvage療法を行う際に、cloning解析の結果とVLP ELISA法、もしくはコンピューターシミュレーション法による耐性度、PR活性評価をあわせて検討することにより、より確実な治療効果を得るための必要薬剤数やその種類、用量の選択に有用な情報を与える可能性がある。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

1. 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 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 第23回日本エイズ学会学術集会・総会 名古屋

2009年11月

2. HIV/HBV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 藤崎誠一郎、横幕能行、服部純子、伊部史朗、内海眞、濱口元洋、岩谷靖雅、杉浦互 第23回日本エイズ学会学術集会・総会 名古屋 2009年11月
3. 日本におけるHIV-2感染症の分子疫学的解析 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 第23回日本エイズ学会学術集会・総会 名古屋 2009年11月
4. インテグラーゼ阻害剤ラルテグラビルのトラフ値と脂質代謝に関する検討 木下枝理、池谷絵美、寺畑奈美、平野淳、高橋昌明、野村敏治、脇坂達郎、横幕能行、濱口元洋 第23回日本エイズ学会学術集会・総会 名古屋 2009年11月
5. 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 横幕能行、大出裕高、藤崎彩恵子、伊部史朗、藤崎誠一郎、服部純子、濱口元洋、杉浦互 第23回日本エイズ学会学術集会・総会 名古屋 2009年11月
6. インテグラーゼ阻害剤ラルテグラビルとリファンピシンを併用した一症例 平野淳、高橋昌明、寺畑奈美、木下枝理、野村敏治、脇坂達郎、横幕能行、濱口元洋 第23回日本エイズ学会学術集会・総会 名古屋 2009年11月
7. コンピューターシミュレーションによるHIV-1プロテアーゼ阻害剤耐性予測システムの構築 横幕能行、大出裕高、濱口元洋、伊部史朗、藤崎誠一郎、藤崎彩恵子、杉浦互 第63回国立病院総合医学会 仙台 2009年10月

## 抗HIV薬の感染予防効果の解析

研究分担者

川村 龍吉 山梨大学医学附属病院皮膚科 講師

### A. 研究目的

ヒト免疫不全ウイルス (HIV) の皮膚・粘膜を介した生体内侵入メカニズムは長らく不明であった。しかし最近、「HIVは皮膚・粘膜表皮内ランゲルハンス細胞 (以下LC) の感染を介して生体内に侵入する」という我々がこれまで提唱してきた仮説が世界的に認められつつある (Kawamura T et al. *J Exp Med* 192:1491-1500. 2000, *Eur J Immunol* 31:360-368. 2001, *J Immunol* 180:5:3297-304. 2008, Ogawa Y and Kawamura T et al. *Blood* 21;113:5157-66. 2009)。さらに我々は、CCR5阻害薬であるPSC-RANTESがLCのHIV感染を完全に阻害できることを見出した (Kawamura T et al. *PNAS* 100:8401-8406. 2003, *J Virol* 77: 1021-1038. 2004)。本研究の目的は、抗HIV治療薬として開発されたCCR5阻害薬；Maravirocが性行為HIV感染におけるHIV侵入予防薬として応用可能であるかを検討することにある。本研究は、新しい性行為HIV感染予防法の開発に貢献することが期待され、またDiscordant couple (どちらか一方がHIVに感染しているカップル) の生殖補助療法へのトランスレーショナルリサーチとしても重要であると考ええる。

### B. 研究方法

近年我々は、経皮HIV侵入メカニズムを解明するため、表皮水疱蓋を用いた新規*ex vivo* HIV感染モデルを確立した (Kawamura T et al. *J Exp Med* 192:1491-1500. 2000)。このモデルを用いて、性行為HIV感染におけるCCR5阻害薬；Maraviroc (シーエ

ルセントリ；ファイザー製薬) の経皮的HIV感染阻害効果を検討する。まず、Maraviroc内服前あるいは内服後に健常ボランティアから皮膚 (表皮) を表皮水疱蓋として採取する。図1A-Eの如く、この表皮シートにHIV (HIV<sub>BAL</sub>; R5 HIV) を曝露し、2時間後に表皮シートをPBSにて3回洗浄後培養液に浮かべる。HIV曝露3日後に表皮シートから遊走した細胞 (skin emigrants; 90%以上がLC) を回収し、skin emigrants をPE標識抗CD11c抗体 (LCマーカー) で染色後、FITC標識抗HIVp24抗体でintracellular stainingし、フローサイトメトリーにて解析する。

さらに、Maravirocの精液への移行を検討するため、Maravirocを内服した健常ボランティアから採取した精液中の薬剤濃度を経時的に定量する。その際、同一ボランティアから血液も採取し、薬剤濃度を定量する。

#### (倫理面への配慮)

Maraviroc血液・精液中濃度測定に関する研究は平成21年9月に山梨大学倫理委員会の了承を得ている (承認番号：535)。また、Maraviroc内服ボランティアから採取した皮膚を用いる研究についても同倫理委員会の了承を得ている (承認番号：598)。本研究において用いられる精液、血液および皮膚 (表皮) は、ボランティア本人のインフォームドコンセントを得てから使用している。また、ヒト皮膚を用いた*ex vivo* HIV感染に関しても、同倫理委員会の了承を得ている (承認番号：237)。

C. 研究結果

Discordant couple において、HIV感染者と性行為を行なう HIV非感染者がMaravirocを内服するケースを想定し、Maraviroc内服前と内服後のボランティアの表皮内LCのHIV感染率を比較した(図1)。

対象集団と標本の定義：20歳以上の健常男性で、一般健康状態が良好な者(生命にかかわる疾患、麻痺性疾患にかかっていない。長期にわたるステロイド服薬歴がない)。除外基準(exclusion criteria)；HIV感染者。研究責任者は、候補となる被験者が取り込み基準を満たし、除外基準に該当しないことを確認した上で、被験者として登録した。

Maraviroc(シーエルセントリ)内服前(Pre)の

ボランティアの表皮内LCのHIV感染率は、 $2.63 \pm 0.57\%$ であった。しかし、Maravirocを一回300mg、一日2回で3日間内服した同一ボランティアの表皮内LCのHIV感染率(Post)は $0.00\%$ と完全に抑制された(図1)。

さらに、Discordant couple において、HIV非感染者と性行為を行なう HIV感染者(男性)がMaravirocを内服するケースを想定し、Maraviroc内服後の精液への同剤の移行を検討した(図2)。Maraviroc(シーエルセントリ)を一回300mg、一日2回で3日間内服したボランティアの血清中あるいは精液中の同剤の濃度は、血清： $0.116 \pm 0.008 \mu\text{g/ml}$ 、精液： $0.207 \pm 0.005 \mu\text{g/ml}$ であった(図2)。

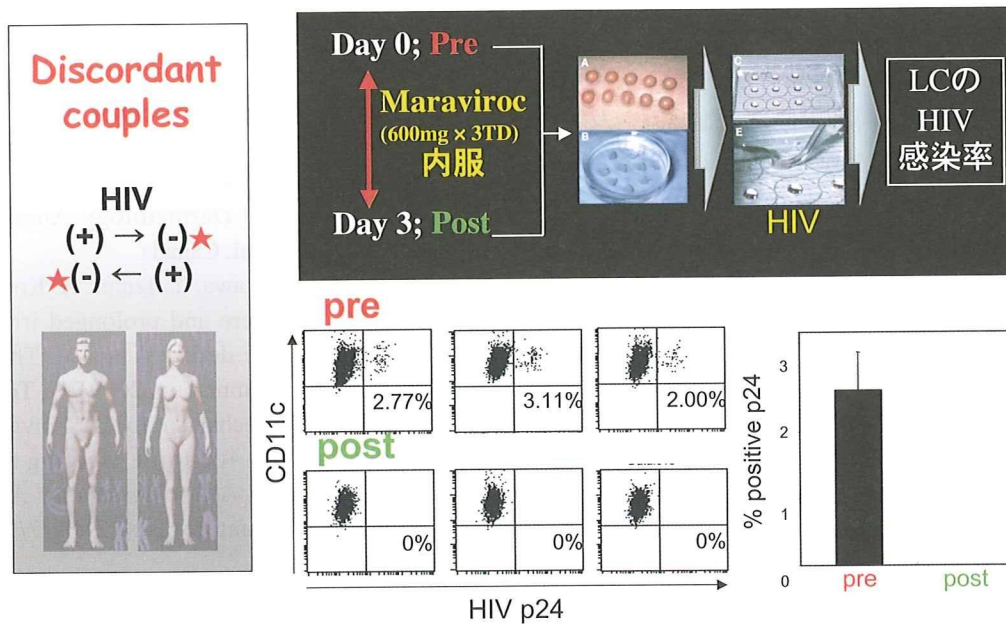


図1 CCR5阻害薬のHIV感染予防効果の検討

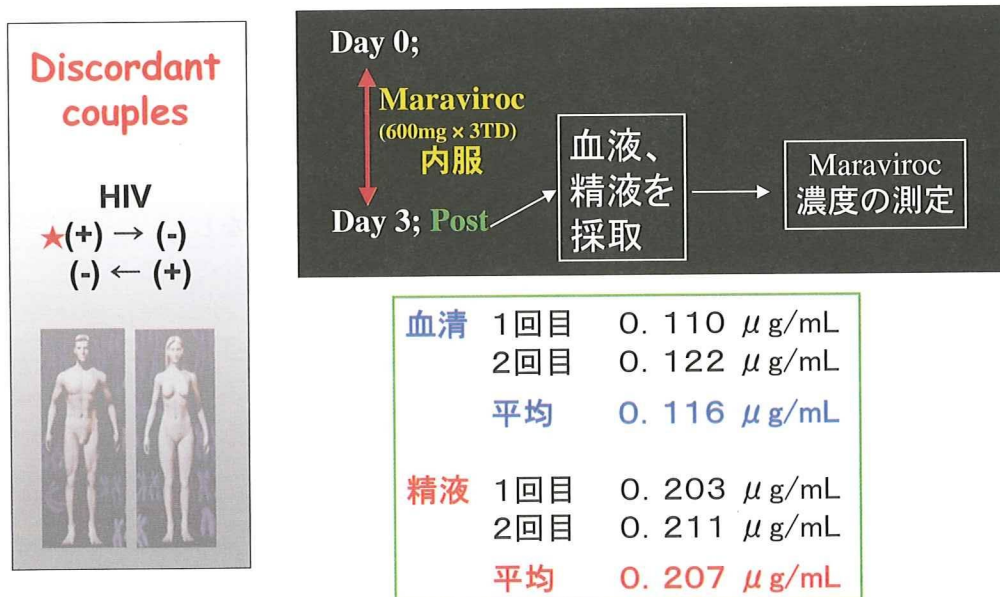


図2 CCR阻害薬の精液中濃度の解析

## D. 考察

世界における新規ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 感染の約8割は性的接触によるものである。HIVの世界的流行を阻止すべく、新たなHIV感染予防法の開発に向けてウイルスの侵入メカニズムに関する研究が現在精力的に行われている。これまでの研究から性行為HIV感染におけるHIVの皮膚・粘膜を介した生体内侵入には表皮内LCのCD4/CCR5を介した感染が必須であることが明らかとなってきた。今回の研究結果から、Maravirocを内服したヒト皮膚はHIV感染に対して非常に強い抵抗性を持つことが明らかとなった。性器粘膜には皮膚表皮同様にLCが存在し、HIV侵入の重要なターゲットになることから、今回の結果はMaraviroc内服によって性行為HIV感染が予防できる可能性を示唆している。

またMaravirocの精液への移行が初めて明らかとなり、さらに精液中の同剤の濃度が血中濃度の約2倍であったことから、Maravirocを内服したヒトの精液も強いHIV感染抑制作用を持つことが示唆された。Discordant couple双方がMaravirocを内服することで、さらに強力なHIV感染抑制効果が得られると考えられる。

## E. 結論

Maravirocを内服したヒトの表皮内LCはHIV感染に対して非常に強い抵抗性を持つことが明らかとなった。また、Maraviroc内服したヒトの精液中には血中濃度の約2倍で同剤が同定された。これらの結果から、AIDS治療薬として開発されたCCR5阻害薬；Maravirocが性行為HIV感染におけるHIV侵入予防薬として実用可能であることが示唆された。また、同剤がDiscordant coupleの生殖補助療法としても応用可能であることが示唆された。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

原著論文による発表 (欧文のみ)

- 1) Ogawa, Y., Kawamura, T., Kimura, T., Ito, M., Blauvelt, A., and Shimada, S. Gram-positive bacteria enhance HIV-1 susceptibility in Langerhans cells, but not in dendritic cells, via Toll-like receptor activation. *Blood* 113:5157-5166, 2009.
- 2) Nakano, H., Nakamura, Y., Kawamura, T., Shibagaki, N., Matsue, H., Aizu, T., Rokunohe, D., Akasaka, E., Kimura, K., Nishizawa, A., Umegaki, N., Mitsuhashi, Y., Shimada, S., and Sawamura, D. Novel and recurrent nonsense mutation of the SLC39A4 gene in Japanese patients with acroder-

matitis enteropathica. *Br J Dermatol.* 161:184-186, 2009.

- 3) Mitsui, H., Shibagaki, N., Kawamura, T., Matsue, H., and Shimada, S. A clinical study of Henoch-Schönlein Purpura associated with malignancy. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 23:394-401, 2009.
- 4) Nakamura, Y., Kambe, N., Deguchi, N., Kawamura, T., Shibagaki, N., Matsue, H., and Shimada, S. Agminated acquired melanocytic naevus modified by vitiligo vulgaris arising in the elderly. *Clin Exp Dermatol.* 2009 34:e377-8.
- 5) Nakagomi, D., Harada, K., Yagasaki, A., Kawamura, T., Shibagaki, N., and Shimada, S. Psoriasiform eruption associated with alopecia areata during infliximab therapy. *Clin Exp Dermatol.* (In Press)

## 2. 学会発表

1. Kawamura, T. Ogawa, Y. Izumi, A. Kodama, T. and Shimada, S. Severe and prolonged irritant contact dermatitis in zinc deficient mouse. The 69th Society for Investigative Dermatology Annual Meeting. 2009/5/7, Montreal, Canada.
2. Kawamura, T. Ogawa, Y. Izumi, A. Kodama, T. and Shimada, S. Severe and prolonged irritant contact dermatitis in zinc deficient mouse. The 9th World Congress on Inflammation. 2009/7/7, Tokyo, Japan
3. Kawamura, T. Mechanism for HIV invasion via skin or mucosa. The 4th Joint Meeting of Japanese Dermatological Association and Australasian College of Dermatologists. 2009/7/11 Sapporo, Japan
4. Aoki, R. Kawamura, T. Ogawa, Y. Goshima, F. Nishiyama, Y. and Shimada, S. Mast cells regulate the cytokine microenvironment of the skin in herpes simplex virus infection. The 19th Annual European Society for Dermatological Research Meeting. 2009/9/12 Budapest, Hungary

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

## 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戸山病院 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薬の組み合わせによる治療継続が困難な場合でも、近年登場した新規抗HIV薬を用いた多剤併用療法により耐性や副作用を回避し良好なコントロールが得られる症例が増加してきた。しかしこれら新規抗HIV薬の長期使用成績は乏しく、さらに臨床試験が主に海外で行われていることから、日本人特有の有害事象が今後明らかとなる可能性がある。本年度は、新規抗HIV薬のうち既存薬とは全く異なる作用機序を有し臨床試験で高い安全性が示されているRaltegravirに着目し、国立国際医療センター戸山病院に通院中のHIV感染者における本剤の治療成績と有害事象を解析した。初年度に報告した多剤耐性症例のその後の治療経過もあわせて報告する。

### 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既存薬による治療継続が困難、あるいは実際に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、近年の抗HIV療法において標準的に使用されている薬剤（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された新規薬剤は、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)

未承認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

#### (1) Raltegravirの効果と安全性の解析

本年度は、新規薬剤のうち既存薬とは全く異なる作用機序と高い安全性を有し、最近のガイドラインにおいて特定の状況下における推奨薬として言及されたことから世界的に使用頻度が急激に高まっているRaltegravirを中心に解析を行った。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中のHIV感染者のうち、2009年10月31日までにRaltegravirを含む多剤併用療法を開始した107例を対象に、治療成績、有害事象、薬剤耐性変異の出現頻度を解析した。107例のうち、初回治療薬として選択されたものが13例、治療中の薬剤変更の際に選択されたものが81例、治療中断後の再開の際に選択されたものが13例であった。

初回治療例においてRALが選択された理由は、心血管障害の既往を有するなど他剤の有害事象への懸念が6例、ワルファリンや精神科薬、化学療法薬など併存疾患に対する治療薬との相互作用の回避が7例であった。治療効果はいずれも良好で、経過観察可能であった10例のうち6例で投与開始後4週以内に血中HIV-RNA量は検出感度未満まで低下した。

治療中の薬剤変更例81例のうち、他剤による治療効果が維持されている状況でRALに変更されたものが70例であった。うち観察可能であった66例を感染経路により「血友病例」（非加熱凝固因子製剤によるHIV感染例、N=26）と「非血友病例」（その他の経路によるHIV感染例、N=40）の2群にわけ解析を行った。抗HIV療法開始からの期間（月）、過去の経験レジメン数、過去の失敗レジメン数はそれぞれ $160 \pm 59.4$  対  $50 \pm 43$ 、 $6.9 \pm 4.4$  対  $2.8 \pm 1.8$ 、 $3.2 \pm 4.0$  対  $0.27 \pm 0.63$ と、いずれも血友病群で大きい傾向がみられた。血友病例のうち18例がNRTIのみによる治療歴を有していたのに対して、非血友病例ではこのような例は2例のみであった。血友病例のうち2例でRALに対する耐性変異獲得が確認されたが、2例ともRALを含む治療が開始された時点で既にNRTI関連変異が蓄積していたことが後の検討により明らかとなった。

有害事象に関する解析は95例を対象に行った。肝障害が6例、腹痛や腹膜炎などの腹部症状が4例、高熱が1例、全身倦怠感が4例、皮膚掻痒感が4例にみられ、それぞれ2例、4例、1例、3例、1例が投与中止に至った。

## (2) 多剤耐性症例の解析

多剤耐性症例に関しては、初年度報告した6症例に加え、新たに2例の経過を観察した。全8例のうち1例は基礎疾患の悪化のため抗HIV療法が中止されていたが、治療中止に至るまで末梢血中のHIVは良好に抑制されていた。残る7例のコントロールは良好であった。これらの症例において、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）の進歩により、抗HIV療法を近年開始した症例においては、多くの場合1日1回2～4錠の内服により良好なウイルス抑制を長期間維持することができるようになった。しかしHAART前の時代に抗HIV療法を開始した症例の一部では、耐性変異蓄積により既存薬剤によるウイルス抑制が困難な状態にある。また良好なウイルス抑制が得られている症例であっても、消化器症状に耐えながらかろうじて服薬を継続している症例、あるいは糖脂質代謝異常・脂質分布異常（リポアトロフィー・リポジストロフィー）・ミトコンドリア障害などに代表される抗HIV薬の長期毒性が高度となり治療薬変更

を余儀なくされる症例が増加している。既存薬と全く異なる作用機序を有し、また臨床試験において有効性と高い安全性が示されているRALは、これら症例の新規レジメンを考える上で非常に有用な役割を担う薬剤である。しかしRALの臨床試験における実投与期間は最長3年であり、長期毒性には不明な点も多い。また臨床試験は主に海外で行われており、東洋人特有の有害事象に関して未知の部分があることも懸念される。

今回の対象集団において、初回治療あるいは他剤からの変更の際にRALが選択された症例の治療成績はいずれも概ね良好であり、また有害事象の頻度は低かった。しかし、濃厚な治療歴を有し併用薬に対する耐性変異が蓄積している血友病症例2例においてRAL耐性変異の獲得が確認された。RALはその治療効果は勿論のこと、プロテアーゼ阻害薬のように出血傾向を惹起しないことから血友病症例において非常に魅力的な選択肢である。しかし、過去の治療歴の詳細な解析なしに併用薬が選択された場合、あるいは有効な併用薬が存在しない状況下でやむなく選択された場合、実質的にRAL単剤投与と同様の状況となり、耐性変異が獲得されることが確認された。すでにRAL以外にもMaraviroc（CCR5アンタゴニスト）など新しい作用機序を有する薬剤が日本でも使用可能となっており、また新世代のインテグラーゼ阻害薬も臨床試験の段階にある。RALの投与を検討する場合、過去の治療歴によってはこれら新規薬剤との併用を積極的に考慮すべきであろう。

有害事象の解析においては、臨床試験の段階でそれほど問題とならなかった肝機能障害が比較的高頻度に見られ、特にGrade 3-4の肝障害のため投与開始1ヶ月以内に中止に至る症例が2例みられた。またそれほど高度でない肝障害が投与中持続する症例も複数みられ、RALによる肝障害のパターンは一つではないことが明らかとなった。RAL投与開始後に腹膜炎様症状や皮膚症状が出現する症例があることも確認された。これらの有害事象が真にRALと関連したものなのか、関連があるとした場合RAL投与例に普遍的に起こりうるものか、東洋人や血友病症例など特定の背景を有する症例に特に高頻度に起こりうるものかを判断できる段階には未だなく、未知の有害事象も含め引き続き厳重な経過観察が必要である。

## E. 結論

RALを含む多剤併用療法を開始した当科通院症例の解析により、日本人においてもその高い有効性と

安全性が確認された。しかし過去に濃厚な治療歴を有する症例においては、過去の治療歴と蓄積耐性に関する詳細な検討が重要であることがあらためて示された。これまで知られていなかった腹膜炎症状や皮膚症状が確認され、前者に関しては症例報告を行った。

また、多剤耐性HIV感染者に対する新規薬剤を含む多剤併用療法の治療効果は、有効な薬剤を複数含む組み合わせが慎重に選択されている限り、長期にわたって維持されることが確認された。

新規薬剤を投与される症例数が今後も増加するのは明らかであり、次年度も嚴重な経過観察を継続する予定である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Tsukada K, et al. Raltegravir-associated perihepatitis and peritonitis: a single case report. AIDS 2010, Vol 24 No.1. 160-161.

### 2. 学会発表

- 1) 塚田 訓久. Raltegravirを含む多剤併用療法の効果と有害事象. 第22回日本エイズ学会総会. 2009年11月 名古屋.

## G. 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戸山病院 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（raltegravir及び etravirine）と Warfarin 併用症例4例の検討の結果、Warfarin使用時の HARRTはRTV-nonboostのfAPV同様raltegravirも安全に併用可能ではないかと考えられた。

### 1) Warfarinと抗HIV薬併用症例の検討

#### A. 研究目的

心疾患や血栓塞栓症の予防・治療薬である Warfarinは抗HIV薬と肝薬物代謝酵素を介した薬物相互作用が存在し併用に難渋することが多いが、昨年度の本研究報告書において Warfarin 使用時の HARRTは non-boosted fAPV を選択することがより安全ではないかとの報告を行った。最近肝薬物代謝酵素を介さない raltegravir(RAL)が発売され、使用症例が蓄積されたため今回 Warfarin と raltegravir及び etravirine(ETR)併用症例について検討した。

#### 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。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4例について、PT-INRの変動を観察した。適応疾患は慢性心房細動3例、門脈血栓症1例であった。各症例の背景ならびに経過を以下に示す。

#### <症例1>

50才代男性。慢性心房細動、脳塞栓症にて Warfarinの投与を受けていたがRAL+TDF+FTCにて Warfarin導入となった。内服率は100%であった。PT-INR 1.5-2.5が目標であったが Warfarin 3.5-4mgで、1.46-2.44とほぼ目標PT-INRを維持することができた。

#### <症例2>

50才代男性。RAL+ABC+3TCにてHAART内服中であったが門脈血栓症にて Warfarin導入となった。PT-INR 1.5-2.5を目標に3mgで Warfarinを開始した。2.5-3mgの増減にて、INR 1.46-2.14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3>

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が、Warfarin開始170日後にRAL+ABC +3TCに変更した。変更後のINRは1.69-2.44（Warfarin 2.5-3mg）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4>

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 1.5-2.5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PT-INRではWarfarinの効果が期待できなかったためWarfarin開始後180日目にWarfarinを中止した。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ったがRAL、ETRが日本でも市販されたことによりWarfarin中止後260日目にHARRTをRAL+ETR +ABC+3TCに変更し同時にWarfarinも再開した。Warfarin3.5mgにてINR 1.71-1.77と目標PT-INRを維持することができた。

**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, Newshan 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。昨年度の本研究において、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。また本年度はRALについて検討したがRALはRTV-nonboostのfAPVと同様Warfarinとの併用に関しては問題ないものと考えられた。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。

**E. 結論**

RALはRTV-nonboostのfAPVと同様Warfarinとの併用に関しては問題ないものと考えられた。ETRについては1例のみであること、同様の薬物動態をとるものにEFVがあるがこれはWarfarinの作用を不安定にすることがわかっているため併用時の安全性については今後の症例の蓄積を行い改めて評価する必要があると考えられた。

抗 HIV 薬	関与する薬物代謝酵素	Warfarin への作用
EFV	CYP3A4 を誘導	減弱
NVP	CYP3A、2B で代謝 CYP3A を誘導	増強 or 減弱
ATV	CYP3A4 で代謝 3A4、 2C9、1A2 を阻害	増強
NFV	CYP3A4、2C19 で代謝 3A4 を阻害	記載なし
LPV	CYP3A で代謝 3A を阻害	増強 or 減弱
RTV	CYP3A4、2D6 で代謝 3A4 を阻害	増強
fAPV	CYP3A4 で代謝 3A4 を阻害	増強
ETR	CYP3A4、2C9 で代謝、 3A4 誘導、2C9 阻害	増強 or 減弱
RAL	UGT1A1 によるグルクロ ン酸抱合によって代謝 肝薬物代謝酵素（P450） は関与せず	記載なし

## 2) HIV感染に合併した高血圧症における降圧薬の使用法

### A. 研究目的

抗HIV療法の進歩によりHIV感染者の予後は大幅に改善した。このためHIV感染者も高齢化の時代へと突入すると予想されHIV感染者に合併した高血圧症の有病率も増加していくものと考えられている。しかしながら降圧薬であるCa拮抗薬、β遮断薬は抗HIV薬との薬物相互作用があり、実際の治療に際して問題となるためその解決策を探るため本研究を行った。

### B. 研究方法

当院通院中のHIV感染患者より降圧薬を内服している症例を抽出し降圧薬の使用状況、有害事象等をretrospectiveに検討した。

### C. 研究結果

1348例について診療録等を検討したところ、118例(8.8%)が降圧薬を併用していた。内訳はアンギオテンシンⅡ受容体拮抗薬(ARB)が70例、ACE阻害剤が13例、Ca拮抗薬が45例、β遮断薬が19例、利尿薬が25例、α遮断薬が2例であった。このうちCa拮抗薬とプロテアーゼ阻害薬(PI)併用例が27例、Ca拮抗薬と非核酸系逆転写酵素阻害薬(NNRTI)併用例が11例、β遮断薬とPI併用例が7例、β遮断薬とNNRTI併用例が3例であった。これら併用例においては過度の降圧、徐脈等降圧薬の有害事象はみられず、また降圧薬開始によりHIVのウイルスコントロールが悪化した例はなかった。またこれらの症例においては薬剤の添付文書に定められた上限を超えた降圧薬の投与を必要とせず、通常量の半量でCa拮抗薬、β遮断薬を開始していた(アムロジピンであれば5mgの所を2.5mgから開始)。

### D. 考察

Ca拮抗薬、β遮断薬はPI、NNRTIと薬物相互作用が存在するものの併用可能であると考えられた。但し理論上の薬物相互作用を考慮すると、Ca拮抗薬の場合低用量(常用量の半分)から開始し増量する場合は4週間から3か月のゆっくりとした間隔で増量するなど慎重な投与が抗HIV薬を変更する場合(特にEFV・NVP・ETR→PIへの変更など大幅に薬物動態が変化する場合)は薬物動態の変化を考慮に入れ、Ca拮抗薬を減量or中止した後に抗HIV薬を変

更する、変更後は少量からCa拮抗薬を再投与or増量し慎重に観察することも検討する必要があるものと思われる。またβ遮断薬についてはCa拮抗薬程の薬物相互作用ではないにせよ十分な観察が必要であると考えられた。

### E. 結論

Ca拮抗薬、β遮断薬はPI、NNRTIと薬物相互作用が存在するものの併用可能であると考えられた。但し理論上の薬物相互作用を考慮し十分な観察が必要であると考えられた。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Honda H, Gatanaga H, Matsumura J, Kamimura M, Goto K, Tsukada K, Honda M, Teruya K, Kikuchi Y, Oka S. Favourable use of non-boosted fosamprenavir in patients treated with warfarin. Int J STD AIDS 2009; 20:441.

#### 2. 学会発表

1. 水島大輔、本田元人 Warfarinと抗HIV薬併用例の検討(raltegravir及びetravirine) 第22回日本エイズ学会2009,名古屋.
2. 本田元人 HIV感染者における高血圧症 第22回日本エイズ学会2009,名古屋.

### G. 知的財産権の出願・登録状況

(なし)

## 刊行物一覧