

考察

昨年度の研究でTDFの投与と血清CK-MBとの関連性が見いだされた。ミトコンドリアCKの活性を特異的に阻害するモノクローナル抗体が開発されたため、その測定系を用いてCK-MBの上昇がミトコンドリアCKに由来するものであることを明らかとした。この上昇は、TDF特異的であり、TDF内服症例の8割以上で認められた。ミトコンドリアCKは腎臓の尿細管に豊富に存在していることや、TDFによる尿細管細胞のミトコンドリア障害が存在する可能性が報告されていること、TDFの腎機能障害・近位尿細管障害が臨床で大きな問題となっていることから、TDF内服症例における血清ミトコンドリアCK活性の解析は副作用の解決の糸口になる可能性もある。来年度はTDF投与後の血清ミトコンドリアCK活性の変動、腎機能やTDFの血中濃度といった臨床指数との関連性について解析を行いたい。

残存プロウイルス量はいまだstandard methodが存在しない。これは残存プロウイルス量の測定が困難であり、その原因としてはゲノムDNAと比較してコピー数の少ないことや、HIVのシーケンスの多様性が関与していると考えられる。商業ベースで行われている血漿中のHIV-RNA量の測定も現在リアルタイムPCR法で行われており、現在の主流のキットがロシュから販売されているコバスTaqMan HIVである。その名の通りTaqMan PCR法でコピー数の算出を行っているが、50-100 copies/mlあたりが他のキットとの差が大きく、臨床の現場においても大きな問題となっている。その原因としては、輸送や保管の問題に加え、プライマー・プローベ mismatchesも関与している可能性はある。本研究では、通常のTaqMan PCR法とポワソン分布法による測定系の開発を行った。SKのプライマー/プローベセットでは希釈再現性に劣ることが明らかとなったが、gagは希釈再現性、ポワソン分布法との一致性の両者ともに良好であった。我々の測定系では、ポワソン分布法のプライマーはgagのプライマーの近傍に位置し、gagとは別個の配列を使用している。従って、この2種の測定系を同じサンプルに採用することにより、 mismatchesの存在やサンプルへのPCRの阻

害物質の混入のためにコピー数が過小評価となったとしても、識別は可能である（ポワソン分布法はサンプルを高倍率に希釈するため阻害物質の影響は少ないと考えられる）。実際、両者を行い測定値が50倍異なるサンプルがあったが、TaqMan PCR法の実用であることが容易に判明した。以上より、臨床指数として計測可能な残存プロウイルス量の測定系の開発は終了したと考えられ、来年度はHAARTを長期間継続している症例を中心に測定を継続し、臨床経過との関連性について検討を加えたい。

結論

TDFの投与と血清CK-MBの上昇との間に関連性を認め、ミトコンドリアCK活性の阻害抗体を用いることによって、この上昇はミトコンドリアCK由来であることを明らかとした。臨床的意義を明らかにするためには、TDF投与による血清ミトコンドリアCK活性の特徴についてのさらなる検討が必要である。治療開始時期および終焉時期の指標として残存プロウイルス量の測定系の開発を行い、TaqMan PCR法とポワソン分布法を組み合わせることにより良好な再現性・定量性が得られた。来年度はHAARTを長期間継続している症例を中心に測定を継続する予定である。急性HIV感染症の早期発見のための倫理的な課題を明確にするために、医療従事者に対するインタビュー調査を行った。検査および告知の問題点の整理・急性感染者のサポートの状況・感染源の特定およびパートナー告知の問題・急性感染に関する情報提供のあり方についての検討する必要性があげられた。これらの結果をもとに、来年度は患者へのアンケート調査を実施する予定である。

健康危険情報

該当なし。

知的財産権の出願・取得状況

該当なし。

研究発表

1) 原著論文による発表（予定を含む）

Watanabe D, Uehira T, Yonemoto H, Bando H, Ogawa Y, Yajima K, Taniguchi T, Kasai D, Nishida Y and Shirasaka T. Sustained high levels of interferon-gamma during HIV-1 infection: Specific trend different from other cytokines. *Viral immunology*. 2010;23(6):619-25

Watanabe D, Taniguchi T, Otani N, Tominari S, Nishida N, Uehira T, Shirasaka T. Immune reconstitution to parvovirus B19 and resolution of anemia in a patient treated with highly active antiretroviral therapy: A case report. *J Infect Chemother*. in press.

2) 口頭発表

渡邊大、米本仁史、坂東裕基、小川吉彦、矢嶋敬史郎、谷口智宏、笠井大介、西田恭治、上平朝子、白阪琢磨：血漿HIV-RNA量が測定感度未満に到達するまで長期の日数を必要した初回抗HIV療法導入例の解析。第24回近畿エイズ研究会学術集会、大阪、2010年6月

渡邊大、伊部史朗、近藤恭子、上平朝子、南留美、笹川淳、矢嶋敬史郎、米本仁史、坂東裕基、小川吉彦、谷口智宏、笠井大介、西田恭治、山本政弘、金田次弘、白阪琢磨：残存プロウイルス量測定の臨床的意義について。第24回日本エイズ学会総会・学術集会、東京、2010年11月
大北全俊、渡邊大、白阪琢磨：急性感染者の早期発見の促進に関する倫理的な課題について。第24回日本エイズ学会総会・学術集会、東京、2010年11月

図2 希釈再現性

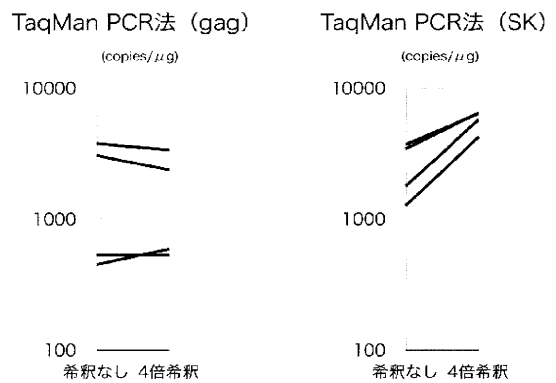
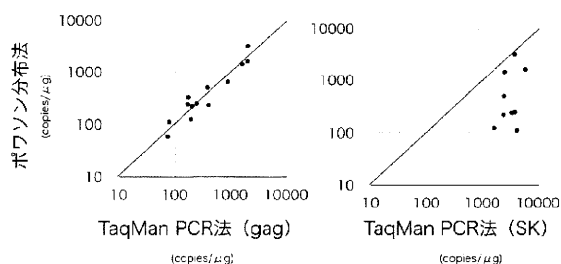


図1 TaqMan PCR法とポワソン分布法との比較



3

急性感染者の早期発見のための医療機関と社会とのコミュニケーションの形成

研究分担者：渡邊 大（国立病院機構大阪医療センター エイズ先端医療研究部 HIV 感染制御研究室）

研究協力者：大北 全俊（大阪大学大学院文学研究科倫理学・臨床哲学研究室）

研究要旨

本研究の目的は、急性感染者の早期発見を促進するにあたって、想定される倫理的な課題を明確にすることで、早期発見の促進の是非およびその促進の方法（医療機関と社会とのより緊密なコミュニケーションのあり方など）について検討するための論点を提示することである。本年度は、初年度の文献研究によって析出された論点に基づきつつ、HIV 診療の拠点病院で急性感染者に関わる医療関係者にインタビュー調査を実施し、急性感染者の置かれている状況や医療機関の現状、および早期発見に対する考えなどについて調査した。早期発見それ自体の意義は一致して認めつつも、早期発見を促進するにあたっては、医療機関の受け入れ体制や社会保障制度などの点で検討すべき点があるという指摘がなされた。今後は、医療関係者の調査に基づき、急性期に感染が判明した患者に対して調査を行い、陽性者の視点からみた現状について調査をする必要があるものとする。

研究目的

本研究の目的は、急性感染者の早期発見を促進するにあたって、想定される倫理的な課題を明確にすることで、早期発見の促進の是非およびその促進の方法（医療機関と社会とのより緊密なコミュニケーションのあり方など）について検討するための論点を提示することである。初年度は主に関連する文献を分析することによって、検討すべき論点を析出した。本年度は、急性感染者を取り巻く現状の調査のはじめとして、医療機関の関係者の視点から見た現状について明確にすることを目的とした。

研究方法

HIV 診療の拠点病院の医療関係者（医師 1 名、看護師 2 名、臨床心理士 4 名、メディカルソーシャルワーカー 3 名）に半構造化面接法によりインタビュー調査を行い、トランスクリプトを作成し分析した。

研究結果

1) 急性感染者に関わるまでの経緯については、何らかの身体症状によって他の一般の医療機関を受診し、そこで感染が判明してから拠点病院に転院するというケースが多かった。また、どこの

医療機関とは特定されないが、告知のあり方として、本人の了解を得ることなく本人以外の人物に告知をするなど、倫理的に問題のある告知がなされているという場合もあった。2) 急性感染者への十分なサポートを維持しながら早期発見を促進する場合、現状の医療機関のマパワーでは難しいという指摘がなされた。3) 感染源の特定については、ごく限定されていてかつ不確かであるという指摘があった。4) 現行の身障制度は急性感染での服薬治療に対応していないため、社会資源の安定した利用という面で不安があるという指摘があった。5) 早期発見の促進自体の意義は一致して認められていたが、これまでに指摘したような懸念とコミュニティへの情報提供については配慮も必要だという指摘があった。

考察

早期発見の意義は認めつつも、一般の医療機関での告知のあり方や拠点病院のマパワー、社会保障制度などに検討すべき点があることが明確になった。

結論

本年度の調査によって医療関係者の視点から見た現状と問題点が明確になった。今後はさらに、

コミュニティなどで啓発や支援に従事するNPO関係者や急性期に感染が判明した陽性者自身に調査をし、より多角的に現状を明確にする必要があるものとする。

健康危険情報

該当なし。

知的財産権の出願・取得状況

該当なし。

研究発表

大北全俊、渡邊大、白阪琢磨：急性感染者の早期発見の促進に関する倫理的な課題について。第24回日本エイズ学会総会・学術集会、東京、2010年11月

4

治療終焉のためのプロウイルスDNA等臨床指標の開発に関する研究

研究分担者：岩谷 靖雅（国立病院機構名古屋医療センター 臨床研究センター）

研究要旨

HIV/AIDS 治療薬の開発によって HIV 感染者の予後は著しく改善され、既に満足できるレベルに達している様に見える。しかし、終生にわたって服薬の継続が求められ、治療の長期化がより高まり将来的には様々な問題に直面する可能性を考慮しなければならない。一方、インテグラーゼ阻害剤や CCR5 阻害剤等の新規な阻害機序による抗 HIV 薬剤の登場は、「治療の終焉」という期待を高めた。しかし、その可能性は、現状では厳しいと考えられる。このような状況をふまえると、長期的な視野に立った感染者の病態変化の的確なモニタリングが増々重要になると考えられる。そこで、我々は、本年度においては、ウイルスのプロウイルス DNA 等の臨床指標を利用して、病態と密接にリンクすると考えられているウイルス *env* の遺伝子情報配列と、そのケモカインレセプター (CR) 指向性との関連性について解析・研究を行った。

研究目的

長期化する HIV 感染症に対する多剤併用療法の投薬効果と病態変化の的確なモニタリングするためのプロウイルス DNA 等の臨床指標を開発する基礎的基盤を構築することを目的とし、本分担研究課題においては、ケモカインレセプタートロピズムを判定する Genotype Assay 構築に関する研究に取り組んでいる。

HIV のケモカインレセプター (CR) トロピズムは、感染者の病態進行と深く関連している。さらに、CR 拮抗薬マラビロック (MVC) の治療導入時には、その有効性を予測するために感染者がもつウイルスの CR トロピズムの判定は必要不可欠な状態になっている。しかし、その判定方法は、phenotype Assay を利用した特殊であるため、時間とコストが大きいという問題が生じている。さらに、この判定は、海外の検査会社に頼らざるを得ないのが現状である。もし、検体中のウイルスの遺伝型から CR トロピズムを判定 (Genotype Assay) できれば、本邦だけでなく、世界各国で、現場レベルでの迅速判定 (検査) が可能になると考えられている。これを実現するためには、ウイルスの *env* 遺伝子配列の情報から、CR トロピズムを判定するデータベース作りが必要である。現在、*env* 遺伝子の V3 近傍領域の配列情報からトロピズムを判定するデータベースを利用した、Geno2pheno[coreceptor] (URL: <http://coreceptor.bioinf.mpi-inf.mpg.de/index.php>) が用い始めら

れている。CR トロピズムでは、V3 領域のアミノ酸配列が最も重要な決定因子であるが、その他の *env* 遺伝子領域にも影響されることが知られている。そのため、既存のデータベースだけでは、トロピズム判定の精度は低過ぎる。そこで、本研究では、*env* (gp120) 遺伝子配列の情報とそれに呼応する CR トロピズムデータの情報蓄積を行い、将来的な CR トロピズム Genotype Assay に向けたデータベースの基盤構築を行うことを目的として研究を行った。

研究方法

(1) 血漿ウイルスからの HIV-1 *env* 遺伝子のクローニング

HIV-1 陽性 (サブタイプ B、血中ウイルス量 10^4 コピー/ml 以上) 患者血漿 (200 μ l) から、MagNA Pure Compact (Roche) により Total RNA を抽出した。あらかじめ Los Alamos の HIV Databases を参照し、サブタイプ B の *env* 遺伝子領域を効率よく増幅できるプライマーセットを見出した。先に抽出した RNA を One-step RT-PCR 法により cDNA に変換し、Nested-PCR により *env* cDNA を増幅した。RT-PCR には、vpr primer (5830-5848) と U3 primer (9170-9146) を、Nested PCR には rev primer (5965-5982) と ppt primer (9058-9079) をそれぞれ用いた。rev primer には、5' 側に CACC (4 塩基) を付加した。増幅した *env* cDNA を pcDNA Gateway Directional TOPO cloning キット

(invitrogen) を用いて、*env* の *orf* が“一方向性” (特異的方向性) になるように Env 発現プラスミドに挿入した。得られた各クローン (1 症例あたり 4 クローンずつ) の遺伝子配列を決定した。さらに、各クローンは培養細胞 (HEK 293T 細胞) に導入するように精製・調製した。

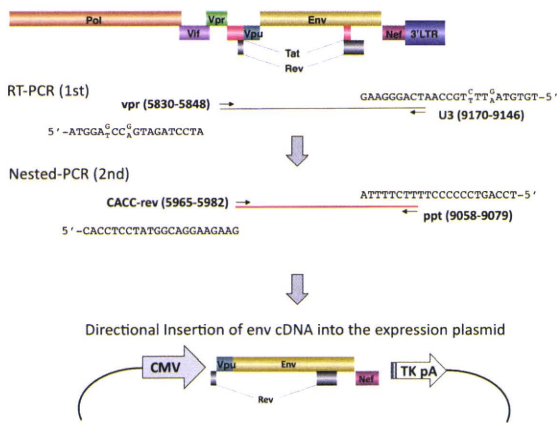


図1 血漿中 HIV-1 RNA からの *env* cDNA の増幅と発現プラスミドへのクローニング

(2) 各クローンの HIV のケモカインレセプター (CR) トロピズムの判定

各 Env 発現プラスミドを HEK 293T 細胞に、pNLuc Env(-) プラスミドと共導入し、培養上清 (Pseudo-Typed ウイルス) を作製した。内在性 CR を発現していない NP-2 細胞に様々な CR を安定発現する細胞 (群馬大学、星野先生と清水先生より供与) に、Pseudo-typed ウイルスを感染させ、感染後 48 時間後に、感染細胞内の Luciferase 活性を測定した。得られた Luciferase 活性の値を相対的に比較することにより、各 Env クローンがどの CR に指向性を示すか判定した。

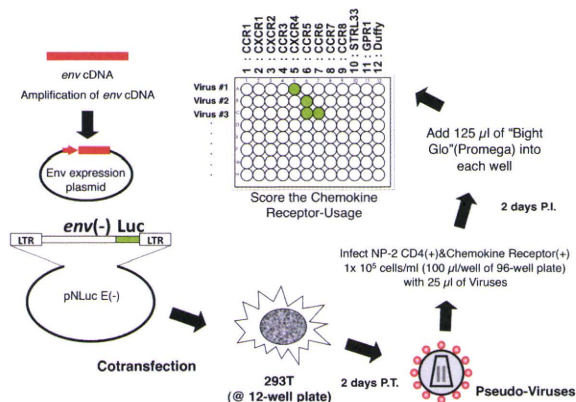


図2 NP-2 細胞を利用したケモカインレセプター指向性の判定

(倫理面への配慮)

ウイルス遺伝子配列解析に関して

HIV-1 のウイルス疫学調査では全て検体が匿名化されるため、万が一の情報漏洩の事態においても個人情報流出は起こりえない。また、調査にあたっては疫学研究に関する倫理指針 (平成 19 年文部科学省・厚生労働省告示第 1 号) で定めた倫理規定等を、臨床研究に関する倫理指針 (平成 20 年厚生労働省告示第 415 号) で定めた倫理規定等を遵守する。疫学的研究を実施する研究施設、国立病院機構名古屋医療センターにおける倫理委員会の承認は既に得ている。

研究結果

(1) 血漿ウイルスからの HIV-1 *env* 遺伝子の増幅と発現プラスミドベクターへの挿入・クローニング

Los Alamos の HIV-1 遺伝子配列情報より、サブタイプ B 間で *env orf* を取り囲み、かつ高度に保存されている遺伝子領域 (連続した 18 塩基) を選択し、プライマー設定領域とした。その中で、ランダムに選択した検体 (16 検体) より最も効率よく増幅することができたプライマーの組合せを検討した。その結果、RT-PCR には、*vpr* primer (5830-5848) と U3 primer (9170-9146) を、Nested PCR には *rev* primer (5965-5982) と *ppt* primer (9058-9079) を組み合わせが、16/16 の成功率で増幅することができ、これらのプライマーセットを *env* 遺伝子領域 (全長) の増幅プライマーとした。増幅産物をダイレクトシークエンスにより遺伝子配列を確認した際に、エレクトログラムから、特に、Env 可変領域に明らかな Quasi-species を示す結果 (16 検体すべてが nonsynonymous substitution として 3 塩基置換以上) が得られた。増幅できた *env* 遺伝子を、TOPO クローニング (invitrogen) に、方向性をもたせて遺伝子挿入が可能な仕組みを組み入れた方法により、直接、遺伝子発現プラスミドベクターに組み込んだ。最終的に、上述 16 検体も合わせ、72 検体から Env を発現できるプラスミド (各 6 クローン) を作製することに成功した。さらに、これらの遺伝子配列を決定した。

(2) ケモカインレセプター(CR)トロピズムの判定
NP-2 ベースの CR 指向性を、図 2 に示す方法で判定した。CR として、CXCR1、CXCR2、CCR1、CCR3 (R3)、CXCR4 (X4)、CCR5 (R5)、CCR6、CCR8、GPR1、STRL33、Duffy Blood Group Ag の 11 種について調べた。上述 72 検体 (各 1 クローンずつ) について指向性を判定した結果を図 3 に示す。まず、R3、X4、R5 以外の CR 指向性 Env は見出せなかった。X4 指向性 Env は 2 検体、X4 と R5 の両指向性(Dual Tropic) は 2 検体見出された。R5 指向性は、27 検体であった。興味深いことに 27 検体の R5 指向性 Env の内、24 検体が R3 にも指向性を示す結果が得られた。R5 指向性を示す Env のアミノ酸配列を、Geno2Pheno を用いた指向性予測 (V3 loop 領域のアミノ酸配列のみから予測) を行った結果、27 検体、すべてが R5 指向性として判定された。以上のことから、R5 指向性ウイルスの多くが R3 にも指向性があることが明らかになった。ちなみに、12 検体については、いずれの細胞株においても Luciferase の活性が検出できなかった。

R5+R3	24/43
R5 only	3/43
X4 only	2/43
X4+R5	2/43
ND	12/43

図 3 NP-2 細胞を利用した Env (72 検体) の CR 指向性判定の結果を示す

考察

HIV-1 サブタイプ B においては、R5 指向性の Env は R3 に対しても指向性を示すケースが多いという結果は、最近、Dr. Mosier らによっても同様な傾向があることが報告された (J. Virol 2009 83: 8353-8363)。しかし、彼らの報告では 18 検体のみの解析であった。今後、解析検体数を増やし、R3 と R5 の両指向性を決定する Env のアミノ酸配列 (領域) を解析する必要がある。さらに、HIV-1 サブタイプ

B が、R3 指向性をもつ臨床的意義が全く分かっていないため、病歴とも照らし合わせて、Env の CR トロピズムを解析することが重要であると考えられる。また、R5 阻害剤投与により R3 指向性 Env がどのように変動するのかについても詳細な解析をしていきたいと考えている。

結論

Env 配列の情報を利用した基盤データベースは、ケモカインレセプターの指向性を判定する目的だけでなく、患者の病態把握や病態予測にも応用できる可能性がある。例えば、患者の血球中のプロウイルス DNA の *env* 情報と血中ウイルスの Env 情報を比較することにより、ウイルスの免疫からの逃避状況や体内でのウイルスの複製活動状況が的確に判断することに応用できると考えられる。膨大な *env* 遺伝子の情報データベース構築に向けて、次年度も継続して *env* 遺伝子配列情報と CR 指向性情報を蓄積して行きたいと考えている。

健康危険情報

該当なし

知的財産権の出願・取得状況

該当なし

研究発表

(1) 原著論文による発表 (予定を含む)

Ibe, S, Yokomaku, Y, Shiino, T, Tanaka, R, Hattori, J, Fujisaki, S, Iwatani, Y, Mamiya, N, Utsumi, M, Kato, S, Hamaguchi, M, Sugiura, W: HIV-2 CRF01_AB: first circulating recombinant form of HIV-2. J Acquir Immune Defic Syndr. 54:241-247 2010

Fujisaki S, Yokomaku Y, Shiino T, Koibuchi T, Hattori J, Ibe S, Iwatani Y, Iwamoto A, Shirasaka T, Hamaguchi M, Sugiura W: Outbreak of hepatitis B virus genotype A and transmission of genetic drug resistance in cases coinfecting with HIV-1 in Japan. J. Clin. Microbiol. (2011). in press

松下修三、横山勝、宮内浩典、松田善衛、俣野哲

朗、岩谷靖雅. HIV 細胞進入とその防御機序: 日本エイズ学会誌 12:67-73 2010

(2) 口頭発表

Iwatani Y, Liu L, Chan DS, Yoshii H, Levin JG, Gronenborn AM, Sugiura W: Structure-guided mutagenesis of APOBEC3G reveals four lysine residues critical for HIV-1 Vif-mediated ubiquitination/degradation. Cold Spring Harbor Laboratory 2010 Annual Meeting on Retroviruses. New York, NY. USA. 2010. May
Yoshii H, Kitamura S, Sugiura W, Iwatani Y: Constitutive activation of Stat1 causes spontaneous APOBEC3G expression, which determines permissive phenotype against vif-deficient HIV-1 replication in T-cell lines. Cold Spring Harbor Laboratory 2010 Annual Meeting on Retroviruses. New York, NY. USA. 2010. May

Iwatani Y, Chan DS, Liu L, Yoshii H, Shibata J, Levin JG, Gronenborn AM, Sugiura W: Structure-guided mutagenesis of APOBEC3G reveals four lysine residues critical for HIV-1Vif-mediated ubiquitination/degradation near the C-terminal end. The 5th JAPAN-GERMANY HIV/AIDS Symposium, Tokyo, Japan. 2010. May

岩谷靖雅: 宿主防御因子 APOBEC3 ファミリーと抗レトロウイルス機序。第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010 年 11 月

松永智子、小島良績、澤崎達也、森下了、佐久間龍太、岩谷靖雅、杉浦互、山本直樹、梁明秀: コムギ無細胞タンパク質合成系を用いた新規ガンマレトロウイルス XMRV プロテアーゼの解析。第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010 年 11 月
吉居廣朗、北村紳悟、前島雅美、杉浦互、岩谷靖雅: リンパ球由来細胞株における vif 欠損 HIV に対する異なる感受性は Stat1 活性化状態に相関する。第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010 年 11 月

北村紳悟、吉居廣朗、前島雅美、横幕能行、杉浦互、岩谷靖雅: APOBEC3C における HIV-1 Vif に対

する感受性を決定する領域の探索。第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010 年 11 月

岩谷靖雅、北村紳悟、吉居廣朗、前島雅美、横幕能行、杉浦互: HIV-1 Vif 感受性及びウイルス粒子への取り込みに関する APOBEC3C の機能ドメインの探索。第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2010 年 11 月

吉居廣朗、前島雅美、北村紳悟、横幕能行、杉浦互、岩谷靖雅: 抗 HIV 宿主因子 APOBEC3 ファミリーの細胞依存的な発現調節機構の解明。第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2010 年 11 月

伊部史朗、横幕能行、服部純子、岩谷靖雅、加藤真吾、杉浦 互: 抗レトロウイルス療法のモニタリングのための plasma HIV-2 viral load 測定系の確立。第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2010 年 11 月

横幕能行、今村淳治、平野淳、木下枝理、柴田雅章、服部純子、伊部史朗、岩谷靖雅、杉浦互: 名古屋医療センターにおける etravirine の使用状況と効果および適応に関する検討。第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2010 年 11 月

奥村かおる、横幕能行、三和治美、山田由美子、杉浦互、岩谷靖雅、平野淳、木下枝理: ベナンボックス吸入時の苦味の軽減に対するハッカ飴の使用とその効果 第 2 報-他の有効な手段を探すためのハッカの有効性の検証-。第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2010 年 11 月

今村淳治、横幕能行、服部純子、岩谷靖雅、杉浦互: 新規 HIV/AIDS 診断症例におけるトロピズムに関する検討。第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2010 年 11 月

5

HIV検査相談所におけるHBVの分子学的研究

研究分担者：杉浦 亙 (国立病院機構名古屋医療センター臨床研究センター 感染・免疫研究部)

研究協力者：藤崎誠一郎 (国立病院機構名古屋医療センター臨床研究センター 感染・免疫研究部)

伊部 史朗 (国立病院機構名古屋医療センター臨床研究センター 感染・免疫研究部)

横幕 能行 (国立病院機構名古屋医療センター臨床研究センター 感染・免疫研究部)

研究要旨

HBV は性交渉によって伝播することが知られており、HIV-1 感染者においても HBV の重複感染が報告されている。本研究では HIV-1 感染者における HBV の合併状況を明らかにすることを目的に国立病院機構名古屋医療センターを受診した新規 HIV/AIDS 感染者について HBV 感染の有無とそのジェノタイプの調査を実施した。今年度は 2009 年から 2010 年までの新規 HIV/AIDS 感染者 118 症例について調査を行った。その結果 118 例中 8 例 (6.8%) に HBsAg 陽性が確認できた。これら 8 例は全て日本人の男性同性間性交渉者 (Men who have Sex with Men: MSM) であった。8 例全例についてゲノム解析が可能であった。系統樹を基にジェノタイプを判定したところ、6 例が A、1 例が C、1 例が A/G リコンビナントであり、MSM 集団においてジェノタイプ A による感染拡大が継続している事が確認された。また系統樹上でジェノタイプ A は遺伝的に近縁な集団を形成しており、tMRCA 解析でも現在感染が拡大しているジェノタイプ A 株の起源が新しい事が推測された。HBV ジェノタイプ A は他の HBV ジェノタイプと比べて慢性化する率が高いと報告されていることから、HBV 感染拡大を防止する策が求められる。

研究目的

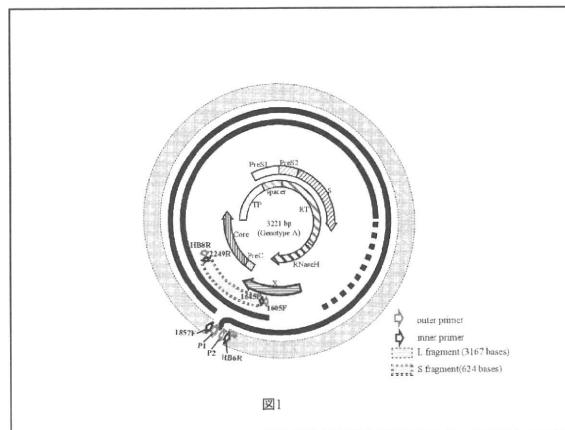
日本では従来 B 型肝炎ウイルス (Hepatitis B Virus: HBV) は輸血および母子感染によって伝播していた。しかし、これらの感染経路に対する有効な予防策がとられた結果、HBV 感染の疫学は急速に変わりつつある。今日 HBV は性感染症として主に性交渉を介して伝播しており、HIV-1 感染者の中には HBV に重複感染している例が散見される。我々は HIV-1 感染者における HBV の伝播状況を調べるために、HIV/HBV 重複感染者の HBV および HIV のジェノタイプ解析を行った。

研究方法

対象：独立行政法人国立病院機構名古屋医療センターを受診した新規 HIV/AIDS 症例のうち HBV 抗体検査陽性の症例を対象とした。

解析方法：解析に使用した HBV および HIV-1 の遺伝子領域 HBV ゲノム全長は L fragment (3167 bps) と S fragment (624 bps) の 2 本に分割して nested PCR にて増幅した (図 1)。ウイルスの核酸は、MagnaPure (Roche) を使用して血漿から抽出した。1st および nested PCR に用いたポリメラーゼはそ

れぞれ LA Taq (Takara), PRIME STAR HS DNA polymerase (Takara) である。HIV-1 については gag p17 (396bps), pol (1117bps), and env C2V3 (222bps) の 3 領域を nested PCR にて増幅した。



れぞれ RT-PCR および nested PCR に用いたポリメラーゼはそれぞれ SuperScript II for long template (Invitrogen), PRIME STAR HS DNA である。PCR 産物は MultiScreen HTS PCR (Millipore) を用いて精製した。精製した PCR 産物は BigDye ver. 3 でラベリング反応を行った後、Sephadex G-25 (GE healthcare) で精製した。塩基配列は ABI 3130 (Applied Biosystems) を用いて決定した。
系統樹解析とジェノタイプ判定：塩基配列はソフト

ウェア MEGA4 を使用して Clustal W プログラムによるアライメント処理を行った後に系統樹を作成した。Evolutionary distances は maximum composite likelihood 法、系統樹は neighbor-joining 法、replication 1,000 回の条件で計算した。また、系統樹に標準株の塩基配列を入れて解析することで、ジェノタイプ判定の基準とした。HBV の標準株塩基配列は NCBI、HIV-1 標準株の塩基配列は Los Alamos のウェブサイトから入手した。さらに、2001 年に東京大学医科学研究所の鯉淵等が報告した HIV/HBV 重複感染症例の 12 例の HBV 配列を入手し名古屋で採取された配列との類縁関係について解析した。収集した HBV 配列から各ジェノタイプの発生年代 (time of the most recent common ancestor: tMRCA) を類推するために Bayesian Markov chain Monte Carlo (MCMC) 法による解析を行った。

(倫理への配慮)

本研究は名古屋医療センターの臨床研究倫理委員会において承認されている。研究の実施に当たっては疫学研究に関する倫理指針 (平成 19 年 8 月 16 日改定) で定めた倫理規定等を遵守する。

研究結果

2003 年から 2010 年の 7 年間に独立行政法人国立病院機構名古屋医療センターを受診した新規 HIV/AIDS 症例は 766 例であり、そのうち 55 例 (7.2%) が HBsAg 陽性であった。2010 年に限ってみると新規 HIV/AIDS 症例は 118 例であり、そのうち 8 例 (6.8%) が HBsAg 陽性であった。年単位での HIV/HBV 重複感染例検出率は、2003 年 3.1%、2004 年 2.7% と低く、2005 年以降はバラツキがあるものの 5~12% と高い頻度で推移している (図 2)。

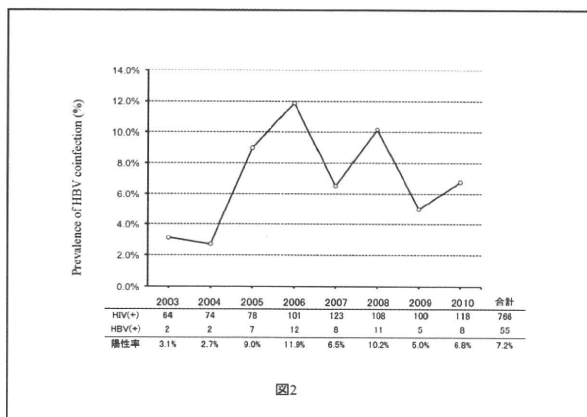


図 2

本研究で解析された 54 例は全員日本人 MSM であり、HBV の血中ウイルス量は、108.8 以上が 20 例、101.8~108.8 が 19 例、101.8 未満が 2 例であった。系統樹に基づいて HBV のジェノタイプを判定した結果、A が 45 例、C が 7 例、A/G リコンビナントが 2 例であった (図 3)。

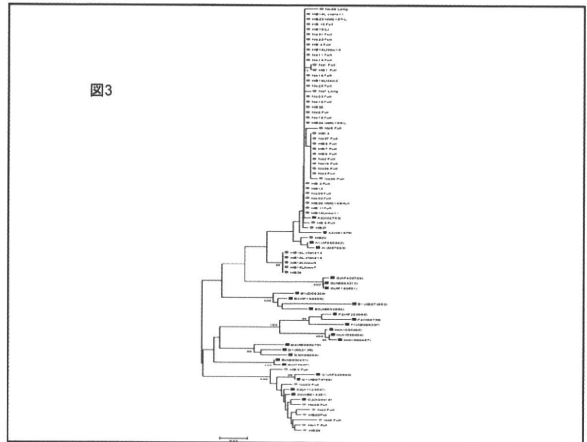


図 3

ジェノタイプ判定結果は、EIA 法による判定結果と一致していた。また、ジェノタイプ C に分類されたサンプルは互いの遺伝子距離が遠い集団を形成していたのに対し、ジェノタイプ A の集団は遺伝子距離が極めて近い関係にあった。このことから、HBV ジェノタイプ A はある特定の集団において、短期間に感染が拡大した可能性が考えられた。一方、HIV-1 のサブタイプは全て B であった。次に、名古屋で検出された HBV の塩基配列と、2001 年に東京で報告されている HBV の塩基配列を用いて作成した系統樹では、名古屋の HBV ジェノタイプ A 集団と遺伝子距離の極めて近縁な集団が形成された (図 4)。

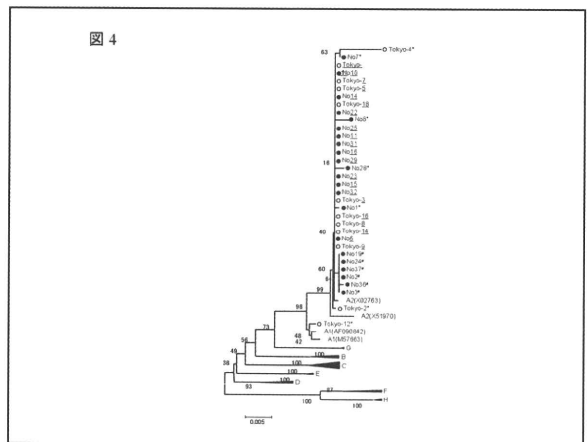
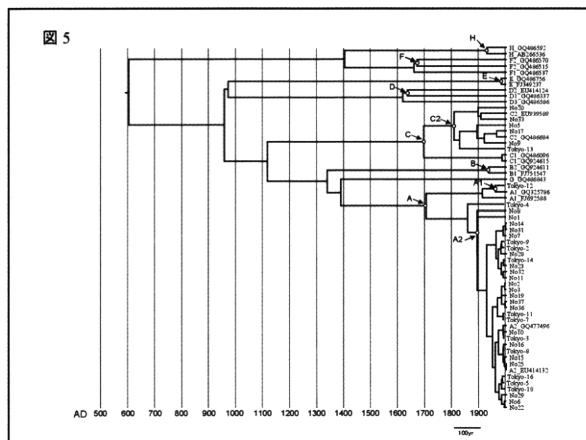


図 4

系統樹を見ると 10 年前に採取されたサンプルと比較しても遺伝子距離は近く、殆ど変化をしていない事が明らかである。この事を踏まえて、Bayesian MCMC 法で tMRCA を計算すると A2 全体は 19 世紀末、

現在名古屋で感染拡大している株は 20 世紀中頃に出現したと推測される (図 5)。



考察

日本ではかつて、HBV は母子感染と輸血による感染で広く伝播していた。しかし現在ではこれらの感染経路に対しては予防策が徹底されている。そのため、今日では HBV 感染は主に性的接触に因るものと考えられている。日本に広がっている HBV のジェノタイプは C が約 80%、B が約 20% と報告されている。しかし我々の今までの研究から、名古屋の HIV-1/HBV 重複感染者の HBV ジェノタイプは A が 80.7%、C が 19.3% であり、これまで日本に広く伝播していた HBV とは分布が大きく異なることが明らかになった。この傾向は 2010 年も継続しており、診断された重複感染症例の 75% がジェノタイプ A であった。興味深いことに、少数ながらジェノタイプ G のリコンビナントもしくは重複感染例が今までに 2 例見つかっている。ジェノタイプ G は単独では生存できない事が知られており、今後ジェノタイプ G の重複感染の拡大が懸念される。今回の解析では名古屋の HBV ジェノタイプ A 群は 10 年前に東京で採取・解析されたジェノタイプ A 群と遺伝子距離が極めて近縁な集団を形成していることが確認された。これは HBV ジェノタイプ A 株が短時間に且つ広く感染した事を示唆するデータであり、名古屋の MSM 集団にジェノタイプ A 株が入ってきたのも 10 年前であると推測される。HBV と HIV の系統樹の分岐パターンが必ずしも一致しないことは、HIV-1 の系統樹解析結果から推測されているよりも、MSM の性的交流がより幅広い可能性を示していると考えられる。既に日本において定着しているジェノタイプ C ではなく、ジェノタイプ A 株の感染拡大が有意となっている理由

は明らかでないが、ジェノタイプ A がキャリア化しやすいことと合わせて、ウイルス学的にみてジェノタイプ C よりもヒトに適応、あるいは直腸を介しての感染に適応している可能性が考えられる。今後も MSM 集団を中心にジェノタイプ A の感染が拡大する恐れがあり、この集団に対するワクチン接種を検討する必要があるが、MSM 人口の全貌が明確でないことを考えると、ジェノタイプ A の感染予防を達成するためには更に発展させて国民全員への接種まで検討することが必要であると思われる。

結論

平成 22 年度は 118 例の新規 HIV/AIDS 症例中 8 例 (6.8%) に HBsAg 陽性が確認できた。これら 8 例は全て日本人の男性同性間性交渉者であった。8 例全例についてゲノム解析が可能であった。系統樹を基にジェノタイプを判定したところ、6 例が A、1 例が C、1 例が A/G リコンビナントであり、MSM 集団においてジェノタイプ A による感染拡大が継続している事が確認された。

健康危険情報

該当無し

知的財産権の出願・取得状況

該当無し

研究発表

1) 原著論文による発表

Fujisaki S, Yokomaku Y, Shiino T, Koibuchi T, Hattori J, Ibe S, Iwatani Y, Iwamoto A, Shirasaka T, Hamaguchi M, Sugiura W. Outbreak of hepatitis B virus genotype A and transmission of genetic drug resistance in cases coinfecting with HIV-1 in Japan. *J Clin Microbiol*. 2011 Jan 19. [Epub ahead of print]

Hattori J, Shiino T, Gatanaga H, Yoshida S, Watanabe D, Minami R, Sadamasu K, Kondo M, Mori H, Ueda M, Tateyama M, Ueda A, Kato S, Ito T, Oie M, Takata N, Hayashida T, Nagashima M, Matsuda M, Ibe S, Ota Y, Sasaki S, Ishigatsubo Y, Tanabe Y, Koga I, Kojima Y, Yamamoto M, Fujita J, Yokomaku

- Y, Koike T, Shirasaka T, Oka S, Sugiura W. Trends in transmitted drug-resistant HIV-1 and demographic characteristics of newly diagnosed patients: nationwide surveillance from 2003 to 2008 in Japan. *Antiviral Res.* 88(1):72-9. (2010)
- Hirano A, Takahashi M, Kinoshita E, Shibata M, Nomura T, Yokomaku Y, Hamaguchi M, Sugiura W. High performance liquid chromatography using UV detection for the simultaneous quantification of the new non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor etravirine (TMC-125), and 4 protease inhibitors in human plasma. *Biol Pharm Bull.* 33(8):1426-9. (2010)
- Bandaranayake RM, Kolli M, King NM, Nalivaika EA, Heroux A, Kakizawa J, Sugiura W, Schiffer CA. The effect of clade-specific sequence polymorphisms on HIV-1 protease activity and inhibitor resistance pathways. *J Virol.* 84(19):9995-10003. (2010)
- Suzuki S, Urano E, Hashimoto C, Tsutsumi H, Nakahara T, Tanaka T, Nakanishi Y, Maddali K, Han Y, Hamatake M, Miyauchi K, Pommier Y, Beutler JA, Sugiura W, Fuji H, Hoshino T, Itotani K, Nomura W, Narumi T, Yamamoto N, Komano JA, Tamamura H. Peptide HIV-1 integrase inhibitors from HIV-1 gene products. *J Med Chem.* 53(14):5356-60. (2010)
- Ibe S, Yokomaku Y, Shiino T, Tanaka R, Hattori J, Fujisaki S, Iwatani Y, Mamiya N, Utsumi M, Kato S, Hamaguchi M, Sugiura W. HIV-2 CRF01_AB: first circulating recombinant form of HIV-2. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 54(3):241-7. (2010)
- Saeng-aroon S, Tsuchiya N, Auwanit W, Ayuthaya PI, Pathipvanich P, Sawanpanyalert P, Rojanawiwat A, Kannagi M, Ariyoshi K, Sugiura W. Drug-resistant mutation patterns in CRF01_AE cases that failed d4T+3TC+nevirapine fixed-dosed, combination treatment: Follow-up study from the Lampang cohort. *Antiviral Res.* 87(1):22-9. (2010)
- 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) 口頭発表
- H Suzuki, J Hattori, M Nishizawa, S Ibe, Y Iwantani, Y Yokomaku, W Sugiura. Previous antiretroviral exposure enhances accumulation of mutations in the integrase region and affects acquisition of raltegravir resistance. The International HIV & Hepatitis Virus Drug Resistance Workshop & Curative Strategies. June 8-12, 2010, Dubrovnik, Croatia
- T Masaoka W Sugiura, Y Iwatani, T Sawasaki, S Matsunaga, Y Endo, M Tatsumi, N Yamamoto, A Ryo. A high-throughput phenotypic assay for HIV-1 protease drug resistance using a wheat cell-free protein production system. The International HIV & Hepatitis Virus Drug Resistance Workshop & Curative Strategies. June 8-12, 2010, Dubrovnik, Croatia
- J Hattori, H Gatanaga, M Kondo, K Sadamasu, S Kato, H Mori, R Minami, W Sugiura, the Japanese Drug Resistance HIV-1 Surveillance Network. Characteristics of drug-resistant HIV-1 transmission: analysis of drug resistance in recently and non-recently infected treatment-naive patients in Japan. The International HIV & Hepatitis Virus Drug Resistance Workshop & Curative Strategies. June 8-12, 2010, Dubrovnik, Croatia
- S. Ibe, Y. Yokomaku, T. Shiino, R. Tanaka, J. Hattori, S. Fujisaki, Y. Iwatani, N. Mamiya, M. Utsumi, S. Kato, M. Hamaguchi, W. Sugiura. Molecular epidemiology of HIV-2 in Japan: identification of the first circulating recombinant form of HIV-2, CRF01_AB. 5th International Workshop on HIV Transmission. July 15-16 2010, Vienna, Austria
- M. Nishizawa, J. Hattori, W. Heneine, J.A. Johnson, W Sugiura. Sensitive testing identifies a greater prevalence of transmitted HIV drug resistance in Japan. 5th International Workshop

on HIV Transmission. July 15-16 2010, Vienna, Austria

W. Sugiura, J. Hattori, S. Yoshida, H. Gatanaga, M. Kondo, K. Sadamasu, T. Shirasaka, H. Mori, R. Minami, M. Tateyama, M. Ueda, S. Kato, T. Ito, M. Oie, A. Ueda. A nationwide surveillance study on the prevalence of drug-resistance mutations among newly diagnosed individuals in Japan from 2003 to 2008.

5th International Workshop on HIV Transmission. 15-16 July 2010, Vienna, Austria

S. Ibe, Y. Yokomaku, R. Tanaka, J. Hattori, S. Fujisaki, Y. Iwatani, S. Kato, M. Hamaguchi, W. Sugiura. Development of a highly sensitive and reproducible plasma HIV-2 RNA copy quantification method for monitoring antiretroviral treatment. XVIII International AIDS Conference. July 18-23 2010. Vienna, Austria

N. Miyazaki, S. Matsushita, T. Fujii, A. Iwamoto, W. Sugiura, Japanese HIV-MDR Study Group. Drug-Resistant Genotyping to Guide Selection of Etravirine, Darunavir and Raltegravir in Salvage Therapy for Multi-Drug-Resistant Cases Improves Outcomes. XVIII International AIDS Conference. July 18-23 2010. Vienna, Austria

北村紳悟、吉居廣朗、前島雅美、横幕能行、杉浦 互、岩谷靖雅 APOBEC3C における HIV-1 vif に対する感受性を決定する領域の探索。第 58 回日本ウイルス学会学術集会。2010 年 11 月 7 日

正岡崇志、杉浦 互、澤崎達也、松永智子、遠藤弥重太、巽 正志、Robert Shafer、山本直樹、梁 明秀。酵素活性を指標とした HIV プロテアーゼ薬剤耐性新規検査法の開発。第 58 回日本ウイルス学会学術集会。2010 年 11 月 7 日

吉居廣朗、北村紳悟、前島雅美、杉浦 互、岩谷靖雅 リンパ球由来細胞株における vif 欠損 HIV に対する異なる感受性は Stat1 活性化状態に関する。第 58 回日本ウイルス学会学術集会。2010 年 11 月 9 日

J Hattori, H Gatanaga, M Kondo, K Sadamasu, S Kato, H Mori, R Minami, W Sugiura, and the Japanese Drug Resistance HIV-1 Surveillance Network.

Characteristics of Drug-Resistant Hiv-1

Transmission: Analysis of Drug Resistance in Recently and Not-Recently Infected Treatment-Naïve Patients in Japan.

11th Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance. November 7-10 2010, Hershey PA

S Ibe, Y Yokomaku, J Hattori, Y Iwatani and W. Sugiura. First Case of Hiv-2 Crf01_Ab Infection Treated with Combination Antiretroviral Therapy.

11th Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance. November 7-10 2010, Hershey PA

木下枝里、平野淳、柴田雅章、高橋昌明、野村敏治、脇坂達郎、横幕能行、杉浦 互 リファンピシン併用下におけるインテグラーゼ阻害剤ラルテグラビルの投与量に関する検討。第 24 回日本エイズ学会学術集会。東京。2010 年 11 月 24 日

横幕能行、今村淳治、平野淳、伊部史朗、岩谷靖雅、杉浦 互 名古屋医療センターにおける etravirine の使用状況と効果および適応に関する検討。第 24 回日本エイズ学会学術集会。東京。2010 年 11 月 24 日

高橋昌明、平野淳、木下枝里、柴田雅章、野村敏治、横幕能行、杉浦 互 HPLC using UV detectin for the simultaneous quantification of etravirine (TMC-125), And 4 protease inhibitors in human plasma. 第 24 回日本エイズ学会学術集会。東京。2010 年 11 月 24 日

平野淳、木下枝里、柴田雅章、高橋昌明、野村敏治、横幕能行、杉浦 互 Tipranavirtide 併用患者に対する TDM の有効例。第 24 回日本エイズ学会学術集会。東京。2010 年 11 月 24 日

吉居廣朗、前島雅美、北村紳悟、横幕能行、杉浦 互、岩谷靖雅

抗 HIV 宿主因子 APOBEC3 ファミリーの細胞依存的な発現調節機構の解明。第 24 回日本エイズ学会学術集会。東京。2010 年 11 月 24 日

西澤雅子、服部純子、横幕能行、Jeffrey Johnson、Walid Heneine、杉浦 互 高感度薬剤耐性検査法を用いた新規未治療 HIV/AIDS 症例における微小集族薬剤耐性 HIV 調査研究。第 24 回日本エイズ学会学術集会。東京。2010 年 11 月 25 日

奥村かおる、横幕能行、三和治美、山田由美子、杉浦 互、岩谷靖雅、平野 淳、木下枝里。ベナンバ

ックス吸入時の苦味の軽減に対するハッカ飴の使用
とその効果第 2 報—他の有効な手段を探すためのハ
ッカの有効性の検証。第 24 回日本エイズ学会学術
集会。 東京。 2010 年 11 月 25 日

柴田雅章、平野 淳、木下枝里、高橋昌明、野村敏
治、横幕能行、杉浦 互

薬剤師のための HIV 研修会開催についての事前アン
ケート調査結果。第 24 回日本エイズ学会学術集会。

東京。 2010 年 11 月 25 日

正岡崇志、杉浦 互、澤崎達也、松永智子、遠藤弥
重太、巽 正志、Shafer Robert、山本直樹、梁 明
秀。コムギ無細胞合成 HIV プロテアーゼを用いた薬
剤耐性高速検査法の開発

第 24 回日本エイズ学会学術集会。 東京。 2010
年 11 月 25 日

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解析 1: CRF01_AE の
動向と微小系統群の同定。

第 24 回日本エイズ学会学術集会。 東京。 2010
年 11 月 25 日

今村淳治、横幕能行、服部純子、岩谷靖雅、杉浦 互
新規 HIV/AIDS 診断症例におけるトロピズムに関す
る検討。第 24 回日本エイズ学会学術集会。 東京。
2010 年 11 月 25 日

谷 麗君、立川川名 愛、椎野禎一郎、細谷紀彰、
鯉渕智彦、藤井 毅、三浦聡之、杉浦 互、岩本愛吉
配列特異的オリゴプローブを用いた HIV-1 薬剤耐
性変異検出法の開発

第 24 回日本エイズ学会学術集会。 東京。 2010
年 11 月 25 日

木村雄貴、藤野真之、正岡崇志、服部純子、横幕能行、
岩谷靖雅、鈴木淳巨、渡邊信久、杉浦 互 HIV-1 のダ
ルナビル耐性獲得機構の酵素 学的構造学的解明。第
24 回日本エイズ学会学術集会。 東京。 2010 年 11 月
25 日

6

服薬アドヒアランスの評価法の開発に関する研究

LC-MS/MSを用いた毛髪中及び血液中の抗HIV剤の定量

研究分担者：加藤 真吾（慶應義塾大学医学部微生物学・免疫学教室）

研究要旨

現在抗 HIV 剤として作用機序が異なる多くの薬剤が用いられている。薬剤の代謝は個人差があり、血中濃度を測定することは、患者の HIV 薬剤耐性獲得の防止や QOL の向上のため重要である。毛髪中の薬剤量は平均血中濃度を反映していると考えられており、非侵襲的で安定な測定結果が得られるうえ、血中濃度の長期的な推移を測定できることが期待される。今回の研究で LC-MS/MS を用いた薬剤の定量法を開発し、臨床検体を実際に測定して患者の薬剤血中濃度と比較し相関を調べた。

LC-MS/MS 定量法の直線性を測定した結果、 $R^2=0.9934\sim 0.9992$ と良好な直線性を示した。臨床検体を測定した結果、5 検体中 4 例について薬剤を定量することができたが、RAL の検体からは薬剤を検出することができなかった。HAART 後日数と薬剤が検出された毛髪の長さは 4 検体中 3 例が対応していた。また、毛髪の薬剤量と血中濃度に弱い相関が見られた。

今後検出感度を向上させると共に、毛髪検体の脱色・染色に関する質問票等を充実させつつ測定薬剤と検体数を増やし、毛髪中薬剤量の測定結果から平均血中薬剤濃度の推定とアドヒアランスの評価を行いたい。

研究目的

現在抗 HIV 剤として、逆転写酵素阻害剤、プロテアーゼ阻害剤、インテグラーゼ阻害剤、CCR-5 阻害剤等、作用機序が異なる多くの薬剤が用いられている。薬剤の代謝は個人差があり、血液中の薬剤濃度は患者によって異なることが知られている。血中濃度を測定することは、患者の HIV 薬剤耐性獲得の防止や QOL の向上のため重要である。しかし血中濃度は日内変動があることが知られており、測定に必要な採血の時間が限られてしまう。毛髪中の薬剤量は平均血中濃度を反映していると考えられており、毛髪中薬剤の定量は非侵襲的で安定な測定結果が得られるうえ、先端から毛根にかけて薬剤量を測定することにより血中濃度の長期的な推移を測定できることが期待される。今回毛髪中薬剤の定量法を確立するため、毛髪処理前に薬剤を添加して抽出操作を行った後、LC-MS/MS を用いて薬剤の定量をおこなった。また臨床検体を実際に測定し、患者の薬剤血中濃度と比較し相関を調べた。

研究方法

測定法の検討のため、ラルテグラビル (RAL)、ダルナビル (DRV)、アタザナビル (ATV)、アンブレ

ナビル (APV)、ロピナビル (LPV)、リトナビル (RTV)、ネルフィナビル (NFV) の 7 種類の薬剤について、検量線の直線性を調べた。DRV は 10 nM、30 nM、100 nM、300 nM、1 μ M、3 μ M、10 μ M の 7 段階、他の薬剤は 10 nM、100 nM、1 μ M の 3 段階に希釈した。薬剤は低吸着性エッペンチューブに各 20 μ l 分注し、1 cm に切断した健常人の毛髪を加えて測定検体とした。

測定検体に内部コントロールとして 1 μ M のサキナビルを 20 μ l 加え、毛髪からの DNA 抽出キットである ISOHAIR (ニッポンジーン) を用いて、毛髪の溶解操作をおこなった。毛髪溶液に酢酸エチル 400 μ l を加えてボルテックスで 15 秒混合し、15000 rpm で 5 分遠心した後、上層を回収し、15 分乾燥した。さらに酢酸エチル 100 μ l を加えてボルテックスで 15 秒混合し、15000 rpm で 5 分遠心した後、上層を回収し、10 分乾燥することで毛髪中の薬剤を回収した。

LC-MS/MS の HPLC 機器は Agilent 1100 Series (Agilent) を用い、エレクトロスプレー法でイオン化を行い、MS/MS 機器である Q-STAR Pulsar i tandem mass spectrometer (アプライドバイオ) で測定を行った。LC のカラムは Inertsil ODS-3 C₁₈ column [50 mm \times 0.3 mm internal diameter, 4- μ m

particles] (GL サイエンス) を用いた。移動層の A 液 (水層) は 5 mM 酢酸アンモニウム、B 液 (有機層) は 5 mM 酢酸アンモニウム/99.5%アセトニトリル、0.5%メタノールを使用した。移動層の B 液濃度は RAL 測定時を除き 30%で開始し、1 分毎に 5%ずつ 12 分で 90%まで上昇させて、その後すぐ 30%に戻し、30%のまま 30 分まで継続させた。RAL 測定時は 20%で開始し、1 分毎に 5%ずつ 12 分で 80%まで上昇させて、その後すぐ 20%に戻し、20%のまま 30 分まで継続させた。測定検体は 20 μ l の 30%または 20%B 液で溶解し、4 μ l または 2 μ l を測定に用いた。

臨床検体として、大阪医療センターに通院している HIV 感染者のうち、HAART 治療中の患者 5 人について、患者の同意を得た後に毛髪を毛根ごと採取した。HAART 治療で服用しているキードラッグは、3 人が DRV、1 人が ATV、1 人が RAL であり、測定する薬剤はキードラッグを対象とした。患者毛髪は毛根を切除し、10 mm まではおおよそ 1 週間に毛髪が伸びる長さである 2 mm 間隔で切断し、10 mm 以降は 10 mm 間隔で切断して各断片を測定検体とした。

(本研究は大阪医療センターの倫理委員会でも審査を行い、患者に対して研究の同意を得た上で行った。)

研究結果

DRV について直線性を測定した結果を図 1 に、RAL、RTV、APV、LPV、ATV、NFV について直線性を測定した結果を図 2 に示した。薬剤量と MS/MS のカウントの相関は、DRV が $R^2=0.9987$ 、RAL が 0.9960、RTV が 0.9958、APV が 0.9934、LPV が 0.9957、ATV が 0.9992、NFV が 0.9942 であり、非常に良好な直線性を示した。

臨床検体の毛髪 5 例について、2 mm または 10 mm の断片をそれぞれ測定した結果を図 3 に示した。5 例中 4 例について薬剤を定量することができたが、RAL をキードラッグとする患者の毛髪からは薬剤を検出することができなかった。薬剤が定量できた検体のうち、DRV をキードラッグとする患者 No. 1 の毛髪中薬剤を定量した結果、毛根側から順に 52、24、11 fmol であった。患者 No. 2 は

113、106、162、226、71、35 fmol、No. 3 は 551、298 fmol であった。ATV をキードラッグとする患者 No. 4 を定量した結果、109、46、37、52、55、219 fmol であった。

考察

臨床検体のうち RAL を服用している患者毛髪からは薬剤を検出することができなかった。原因として検出感度の不足が最も考えられるが、他の要因として薬剤の毛髪への移行量が少ない可能性と血中薬剤濃度が低い可能性が挙げられる。薬剤が検出された 4 例の内、No. 2、3、4 の 3 例は HAART 後日数と薬剤が検出された毛髪の長さがおおよそ対応していた。No. 1 は 64 日前から HAART を開始したにもかかわらず 6 mm (おおよそ 21 日) までしか検出できなかった。この原因も検出感度の不足により、本来 9 mm 程度まで検出されるはずの薬剤が検出感度以下になってしまった事が考えられる。検出感度については LC-MS/MS の測定条件の検討と測定時の検体量を増加することで更に感度を上げる予定である。

DRV を服用している患者 3 例について、毛根側 2 mm の毛髪の薬剤量と血中濃度の相関を調べた結果、両者に弱い相関が見られた (図 4)。この結果についてはより多くの検体について比較を行い、最終的には毛髪中の薬剤量からの平均血中薬剤濃度の推定とアドヒアランスの評価を行いたい。毛髪中抗 HIV 剤量からのアドヒアランスの評価に関する発表はまだ行われておらず、非侵襲性の検体である毛髪から平均血中薬剤濃度の推定とアドヒアランスの評価ができるようになることにより、患者に対する負担を減らしつつより効果的な治療が期待される。

結論

毛髪中に存在する抗 HIV 剤の定量法を開発し、臨床株を用いて検討を行った。今後検出感度を向上させると共に、毛髪検体の脱色・染色に関する質問票等を充実させつつ測定薬剤と検体数を増やし、毛髪中薬剤量の測定結果から平均血中薬剤濃度の推定とアドヒアランスの評価を行いたい。

研究発表

1) 原著論文による発表

Shima-Sano, T., Yamada, R., Sekita, K., Hankins, R. W., Horr, H., Seto, H., Sudo, K., Kondo, M., Kawahara, K., Tsukahara, Y., Inaba, N., Kato, S., Imai, M.: A human immunodeficiency virus screening algorithm to address the high rate of false-positive results in pregnant women in Japan, PLoS One 5(2):e9382, 2010

Mizusawa, Y., Kuji, N., Tanaka, Y., Tanaka, M., Ikeda, E., Komatsu, S., Kato, S., and Yoshimura, Y.: Expression of human oocyte-specific linker histone protein and its incorporation into sperm chromatin during fertilization, Fertil. Steril 93(4):134-141, 2010

Ibe, S., Yokomaku, Y., Shiino, T., Tanaka, R., Hattori, J., Fujisaki, S., Iwatani, Y., Mamiya, N., Utsumi, M., Kato, S., Hamaguchi, M., Sugiura, W.: HIV-1 CRF01_AB: First circulating recombinant from of HIV-2, J. Acquir. Immune Defic. Syndr 54(3):241-247, 2010

今井光信、加藤真吾: HIV 検査—最近のスクリーニング検査と遺伝子検査の進歩—, 日本臨床 68(3):433-438, 2010

加藤真吾、今井光信: HIV 検査と検査相談体制, 最新医学・別冊 新しい診断と治療の ABC 65, 180-187, 2010

2) 口頭発表

加藤真吾: 日本の流行状況から求められる HIV 検査戦略の課題～根拠にもとづいた計画とその評価のために何を解決すべきか～HIV 検査体制 現在の課題。第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2010 年 11 月

加藤真吾、須藤弘二: 次世代シーケンサーを用いた薬剤耐性 HIV の遺伝的多様性解析法の開発。第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2010 年 11 月、
服部純子、椎野禎一郎、潟永博之、林田庸総、

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、古賀一朗、太田康男、山元泰之、福武勝幸、加藤真吾、藤井毅、岩本愛吉、西澤雅子、仲宗根正、岡慎一、伊部史朗、横幕能行、上田幹夫、大家正義、田邊嘉也、渡辺香奈子、渡辺大、白阪琢磨、小島洋子、森治代、中桐逸博、高田昇、木村昭郎、南留美、山元政弘、松下修三、藤田次郎、健山正男、杉浦互: 2003～2009 年の新規 HIV/AIDS 診断症例における薬剤耐性頻度の動向。第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2010 年 11 月

須藤弘二、加藤真吾: LC-MS/MS を用いた毛髪中および血液中の抗 HIV 剤の定量。第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2010 年 11 月

伊部史朗、横幕能行、服部純子、岩谷靖雅、加藤真吾、杉浦互: 抗レトロウイルス療法のモニタリングのための plasma HIV-2 viral load 測定系の確立。第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2010 年 11 月

山崎さやか、加藤真吾: リアルタイム PCR を用いた HIV-1 と HIV-2 の同時検査法の開発。第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2010 年 11 月

村山正晃、池野良、児玉泰光、田邊嘉也、川口玲、山崎さやか、加藤真吾、高木律夫: 唾液中ウイルスと血中ウイルスの定量値とウイルス RNA 鎖の比較。第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2010 年 11 月

南宮湖、長谷川直樹、小林芳夫、加藤真吾、小谷宙、戸蒔祐子、岩田敏、根岸昌功: 当院において糖代謝異常を来した HIV 患者の臨床的検討。第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2010 年 11 月

柳瀬未季、吉田直子、赤沢学、木村和子、加藤真吾: 未承認 HIV 自己検査キットの使用実態調査。第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2010 年 11 月

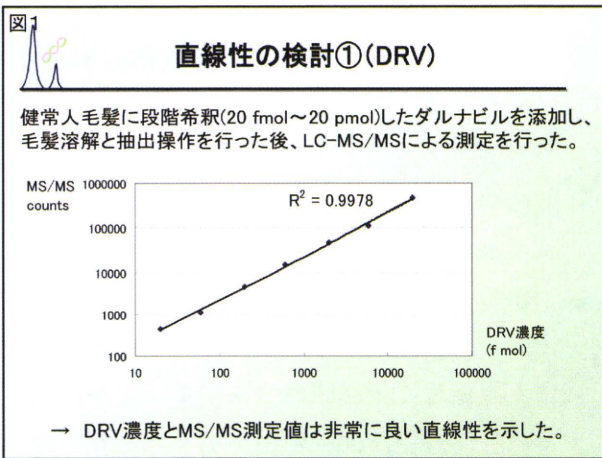
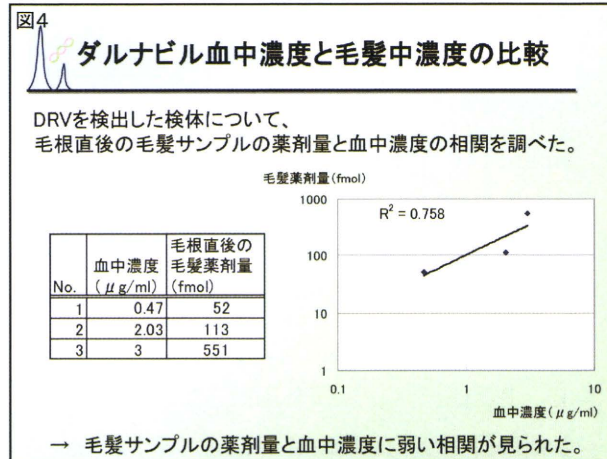
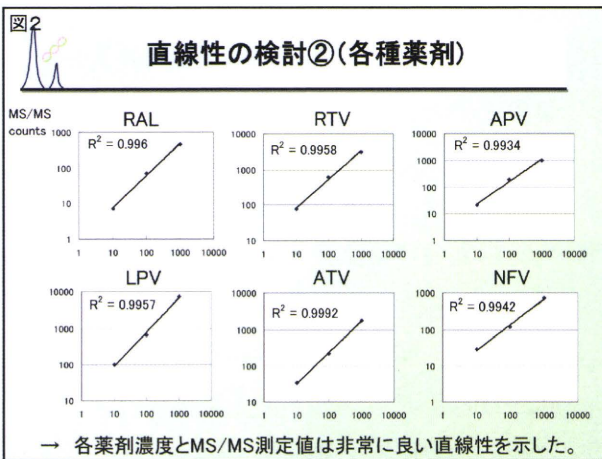


図3 臨床検体測定結果

No.	測定薬剤	HAART開始後日数	血中濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	毛髪長 (mm)	毛髪中薬剤量 (fmol)																
					① 2mm	② 2mm	③ 2mm	④ 2mm	⑤ 2mm	⑥ 10mm	⑦ 10mm	⑧ 10mm	⑨ 10mm	⑩ 10mm	⑪ 10mm						
1	DRV	64	0.47 (トランプ)	28	52	24	11	<8.5	<8.5	<8.5	<8.5										
2	DRV	27	2.03 (トランプ)	68	113	106	162	226	71	35	<24	<24	<24	<24							
3	DRV	14	3 (トランプ)	30	551	298	<85	<85	<85	<85	<85										
4	ATV	45	1.38 (14h値)	34	109	46	37	52	55	219	<34	<34									
5	RAL	31	0.1665 (トランプ)	29	<302	<302	<302	<302	<302	<302	<302										

毛根からの長さ 2 4 6 8 10 20 30 40 50 60 70 mm

- No.5の検体からはラルテグラビルが検出されなかった。
- No.2, 3, 4 はHAART後日数と薬剤が検出された毛髪の長さが対応していた。
- No.1は対応が見られなかったが、8mm以上は検出限界以下となったと考えられる。



7

携帯を使った服薬支援“だ・メール”および検査予約システムの開発

研究代表者：白阪 琢磨（国立病院機構大阪医療センター HIV/AIDS 先端医療開発センター長）

研究協力者：幸田 進（有限会社ビッツシステム）

研究要旨

「服薬アドヒアランスの向上・維持に関する研究」（以下、「前研究」とする）にて開発した携帯電話の電子メールと WEB 機能を利用した「服薬時間お知らせ」を自動的に通知する通信システム（以下、「だ・メール」または「服薬支援ツール」とする）を継続して特定の患者に対して長期的に運用し、患者の利用状況の推移および全国の利用患者に対する電子メールによるアンケート調査実施により、院外の患者に対する服薬支援としての携帯電話を利用した服薬支援ツールが長期的かつ有効的に利用されている事を確認する。

また、前年度研究（「携帯を使った服薬支援“だ・メール”および検査予約システムの開発」）にて開発した、携帯電話の個人識別機能と WEB 機能を利用して、個人情報を入力する事なく HIV 検査予約が行える予約システム（以下、「検査予約システム」とする）を特定の HIV 検査機関にて試験運用し、検査予約システムを導入する事で HIV 検査の受検者数の増加が可能であるかを検証する。

研究目的

- (1) 服薬支援ツール開発 前研究にて開発し、試験運用している服薬支援ツールによって、院外の患者が継続的に服薬できているかを長期的な利用状況データおよびアンケート調査の実施によって検証する。また、それらの結果に基づき必要に応じた機能改善を検討する。
- (2) 検査予約システム開発 前年度研究で開発した検査予約システムを導入する事で、検査機関における HIV 検査の受検者の動向の変化を調査し、携帯電話による検査予約システム有効性および利用者の利便性等のメリットあるいはデメリットを評価する。また、機能改善を検討する。

- (2) 検査予約システム開発 前年度研究で開発した HIV 検査予約システムを特定の HIV 検査機関にて試験運用して利用状況データを収集し、検査機関における昨年度の受検者数とのデータ比較によって有効性を検証する。また、検査機関での試験運用によって検査機関からの要望・改善点の洗い出しを行う。

なお、本年度研究では試験運用検査機関として「東京都南新宿検査・相談室」（以降「南新宿検査室」とする）に協力頂いた。

受検者の誘導の流れは、行政機関のホームページでの案内 → 東京都南新宿検査・相談室ホームページ（新規作成）で概要説明 → 東京都南新宿検査・相談室モバイル用ホームページへ誘導 → HIV 検査予約システムによる検査予約 を想定した。

研究方法

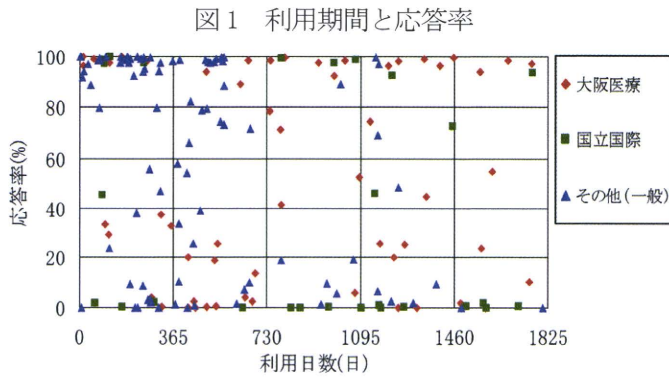
- (1) 服薬支援ツール開発 昨年同様、前研究にて開発し改良してきた服薬支援ツールを継続して特定の患者を対象に試験運用し、患者毎の服薬時間お知らせメールの配信回数、および、お知らせメールに対する服薬応答回数データを蓄積して有効性を再評価する。また、特定の病院以外の患者で服薬支援ツールを利用しているケース（「その他」医院への一般の登録患者）についてアンケート調査を実施し、一般の利用患者からのアンケート調査結果からも有効性を検証する。

（倫理面への配慮）

服薬支援ツールおよび検査予約システムの提供にあたっては、収集するデータの取り扱いに注意するとともに、利用者に対して携帯画面の文書で説明し同意を得た上で実施する事とした。

研究結果

(1) 服薬支援ツール開発 初期からの利用患者は 5 年半を向えたが、相変わらず利用を継続している結果が得られた。また、服薬応答に関しても“図 1 利用期間と応答率”に示すように長期的に 80% 以上の応答率を維持している患者も多く、服薬したら応答するという生活のリズムが確立している事が再確認できた。



また、登録者数の自然増加の傾向にあった、試験提供対象の病院以外（「その他」医院）に登録されている全国の患者 90 名に対して、電子メールと WEB を使ったアンケート調査を実施した結果、39 名（43%）からの回答があり、アンケート結果からは、患者間のコミュニティ WEB サイト、あるいは患者をサポートする知人・親族などにより飲み忘れ対策案のひとつとして当服薬支援ツールが紹介されている事（表 2 服薬支援ツールを何処で知ったか”参照）や、服薬応答はしないが服薬したら「服薬お知らせメール」を削除する事でいつの服薬を忘れたかをメールの履歴で確認しているといった想定外の利用例も判明した。逆に、「外来日お知らせ」機能など、一部の機能は殆ど使われていない事も判明した。

平成 20 年 12 月	23 人
平成 21 年 12 月	62 人
平成 22 年 12 月	90 人

表 1 「その他」医院における登録者数

HAART SUPPORT ホームページ	4 人
本ツールが紹介されているサイト	3 人
・フェリー（HIV 陽性者 SNS）	
・忘れた 2 人	
知人、親族に教えてもらった	20 人

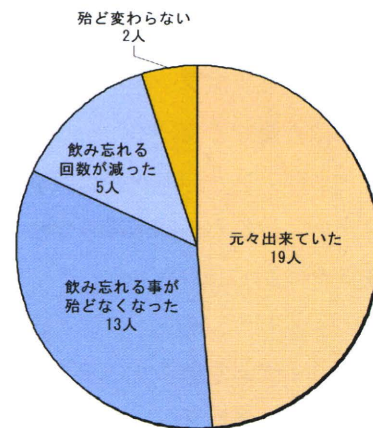
主治医（または看護師）	5 人
その他	7 人
・ SNS サイト	3 人
・ 個人のブログ	1 人
・ 検索サイト	3 人

表 2 服薬支援ツールを何処で知ったか

服薬率改善に関しては、回答のあった 39 名のうち約半数が、「飲み忘れがなくなった（または飲み忘れ回数が減った）」と回答した結果であった。

服薬支援ツールの利用前には、適切な服薬ができていなかった層の利用後の変化に関しては、“表 3 服薬できていなかった層の変化”に示すように、長期的に利用する事で改善する傾向にある事が示された。

図 2 飲み忘れ回数が減ったか



	ツール利用期間	服薬期間	利用開始前	利用開始後
A	3ヶ月未満	←	殆ど出来ていなかった	元々出来ていた
B	3ヶ月未満	6ヶ月未満	よく忘れた	殆ど変わらない
C	3ヶ月未満	6ヶ月未満	時々忘れた	殆ど変わらない
D	1年未満	←	時々忘れた	忘れる回数が減った
E	2年未満	←	時々忘れた	飲み忘れが殆どなくなった
F	2年未満	←	よく忘れた	忘れる回数が減った
G	2年未満	←	時々忘れた	飲み忘れが殆どなくなった
H	2年未満	3年未満	時々忘れた	飲み忘れが殆どなくなった
I	2年未満	3年以上	よく忘れた	飲み忘れが殆どなくなった
J	3年未満	←	時々忘れた	忘れる回数が減った

表 3 服薬できていなかった層の変化

(2) HIV 検査予約システム開発 南新宿検査室にて平成 22 年 7 月 1 日（予約受入は 7 月 15 日～）より、携帯からの予約として 1 日あたり 6 人枠（9