

症例、I50VとN88Dがそれぞれ1症例)、核酸系逆転写酵素阻害剤耐性変異が9症例(T215リバータントが8症例、K65Rが1症例)、非核酸系逆転写酵素阻害剤耐性変異が6症例(K103N/Sが6症例、P225Hが2症例)であった(表1)。この内の4症例について

はM46I/LとK103Nを有する多剤耐性HIVに感染していたが、4症例とも男性で年齢20~30代という以外には感染経路(同性間/IDU、異性間、同性/異性いずれか)などの共通点は無かった。

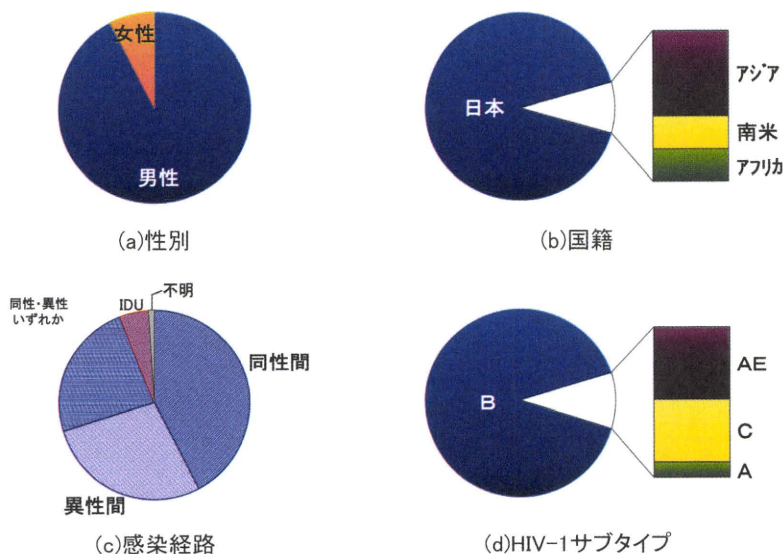


図1 名古屋医療センターにおける新規HIV/AIDS診断症例の背景

表1 検出された薬剤耐性アミノ酸変異

|       | 名古屋     |            | 他施設      |  |
|-------|---------|------------|----------|--|
|       | n=      | 104        | 132      |  |
| NRTI  | M41L    | (-)        | 4 (3.2%) |  |
|       | K65R    | 1 (1.0%)   | (-)      |  |
|       | T215X   | 8 (7.7%)   | 6 (4.8%) |  |
|       | K219E   | (-)        | 1 (0.8%) |  |
| NNRTI | K103N/S | 6 (5.8%)   | 1 (0.8%) |  |
|       | G190E   | (-)        | 2 (1.6%) |  |
|       | Y181C   | (-)        | 1 (0.8%) |  |
|       | P225H   | 2 (1.9%)   | (-)      |  |
| PI    | D30N    | 2 (1.9%)   | 2 (1.6%) |  |
|       | M46I/L  | 14 (13.5%) | 3 (2.4%) |  |
|       | I50V    | 1 (1.0%)   | (-)      |  |
|       | G73S    | (-)        | 1 (0.8%) |  |
|       | N88D/S  | 1 (1.0%)   | 2 (1.6%) |  |

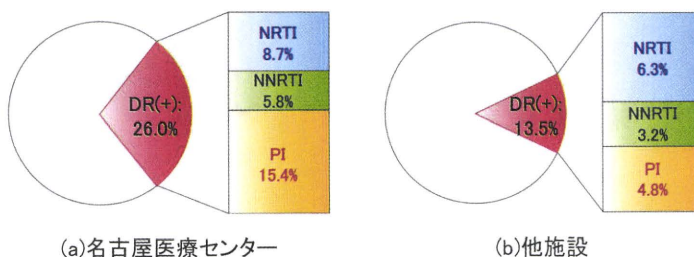


図2 薬剤耐性HIVの検出頻度と薬剤クラス別の内訳

(2) 他施設における新規HIV/AIDS診断症例について：

東海地区以外の施設からは32施設より236検体について検査依頼があり、その内132検体が2010年中に新規にHIV感染を診断された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91.7%、日本人が90.2%と大多数を占めており、同性間の性接触による感染が73.5%と最も多い感染経路であった(図3)。

薬剤耐性HIV-1は13.5%(17/131)に認められた(図2b)。逆転写酵素領域内のT215リバータントが東海地区と同様に高頻度で検出された(n=6)。その他、逆転写酵素領域内にM41L(n=4)が検出されたが、プロテアーゼ領域内のM46I/Lは3症例から検出されるに留まった(表1)。

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118症例の内、104症例について薬剤耐性検査を施行した結果、27症例(26.0%)から薬剤耐性HIVが検出され、一昨年の9.6%、昨年の13.3%と年々顕著に増加してきていることが明らかとなった。その一方で、検査依頼のあった全国の施設からの131症例については13.5%であり、これまでの全国平均と比べて若干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T215リバータント変異であった。これらは現在頻繁に服用されているTDFや3TC/FTC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。

東海地区の新規診断HIV/AIDS感染症例において薬剤耐性HIVの頻度が増加しており、その半数以上がM46I/Lであったことから、この変異を持つ薬剤耐性HIVに限られたコミュニティの中で感染拡大していることが示唆された。感染拡大の低減に繋がるよう、更なる調査、解析を重ねていくことが重要であると思われる。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 原著論文

欧文

- 1) Ibe S, Sugiura W. Clinical significance of HIV reverse transcriptase inhibitor-resistant mutations. *Future Microbiol.* 6(3): 295-315, 2011.
- 2) Shibata J, Sugiura W, Ode H, Iwatani Y, Sato H, Tsang H, Matsuda M, Hasegawa N, Ren F, Tanaka H. Within-host co-evolution of Gag P453L and protease D30 N/N88D demonstrates virological advantage in a highly protease inhibitor-exposed HIV-1 case. *Antiviral Res.* 90(1): 33-41, 2011.
- 3) 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

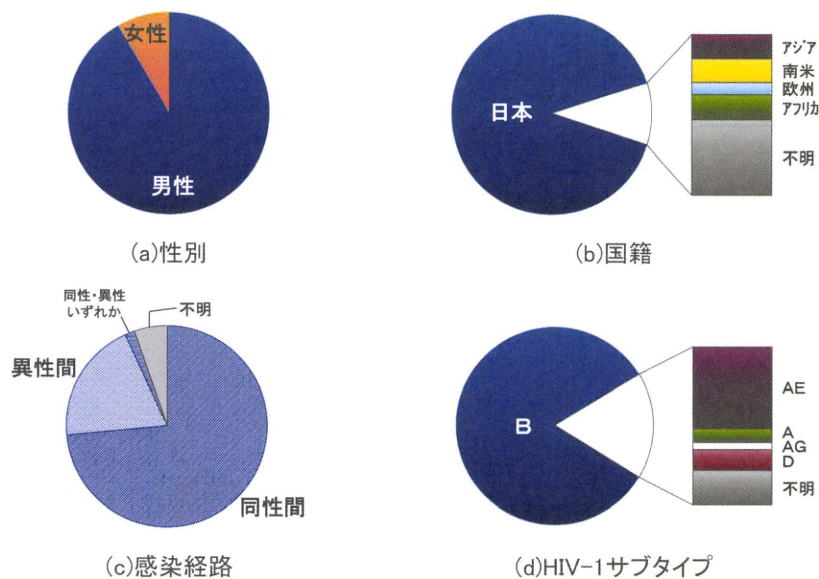


図3 他施設における新規HIV/AIDS診断症例の背景

resistance in cases coinfecting with HIV-1 in Japan. *J Clin Microbiol.* 49(3): 1017-1024, 2011.

- 4) 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): 72-79, 2010.
- 5) 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): 1426-1429, 2010.
- 6) 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.
- 7) 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): 5356-5360, 2010.
- 8) 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): 241-247, 2010.
- 9) 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): 22-29, 2010.
- 10) 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): 521-530, 2010.

## 和文

- 1) 服部純子、杉浦 互、薬剤耐性検査の現状と課題、化学療法の領域 27 (3) : 78-84、2011.
- 2) 伊部史朗、杉浦 互、薬剤耐性HIVの現状と対策、日本臨牀 68 (3) : 476-79、2010.
- 3) 吉居廣朗、杉浦 互、ラルテグラビルの耐性、医薬ジャーナル 46 (8) : 2054-58、2010.
- 4) 杉浦 互、5th International Workshop on HIV Transmission/18th International AIDS Conference、HIV感染症とAIDSの治療 1 (2) : 71-73、2010.
- 5) 杉浦 互、HIV感染—最新の疫学・臨床・治療、内科 106 (5) : 781-787、2010.
- 6) 伊部史朗、横幕能行、杉浦互、本邦におけるHIV-2の疫学動向と新たな組換え流行株CRF01\_ABの同定、IASR 31 (8) : 232-233、2010.
- 7) 宮崎菜穂子、杉浦 互、わが国における抗HIV治療と多剤耐性症例の現状、IASR 31 (8) : 233-234、2010.

## 2. 口頭発表

### 海外

- 1) 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. CSHL RETROVIRUSES. May 24-29, 2010, Cold Spring Harbor Laboratory, USA.
- 2) 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. CSHL RETROVIRUSES. May 24-29, 2010, Cold Spring Harbor Laboratory, USA.
- 3) Suzuki H, Hattori J, Nishizawa M, Ibe S, Iwatani Y, Yokomaku Y, Sugiura W. 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.
- 4) Masaoka T, Sugiura W, Iwatani Y, Sawasaki T, Matsunaga S, Endo Y, Tatsumi M, Yamamoto N, Ryo A. 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.
- 5) Hattori J, Gatanaga H, Kondo M, Sadamasu K, Kato S, Mori H, Minami R, Sugiura W, 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.
- 6) Ibe S, Yokomaku Y, Shiino T, Tanaka R, Hattori J, Fujisaki S, Iwatani Y, Mamiya N, Utsumi M, Kato S, Hamaguchi M, Sugiura W. 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.
  - 7) Nishizawa M, Hattori J, Heneine W, Johnson JA, Sugiura W. 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.
  - 8) Sugiura W, Hattori J, Yoshida S, Gatanaga H, Kondo M, Sadamasu K, Shirasaka T, Mori H, Minami R, Tateyama M, Ueda M, Kato S, Ito T, Oie M, Ueda A. 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.
  - 9) Ibe S, Yokomaku Y, Tanaka R, Hattori J, Fujisaki S, Iwatani Y, Kato S, Hamaguchi M, Sugiura W. 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.
  - 10) Miyazaki N, Matsushita S, Fujii T, Iwamoto A, Sugiura W, 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.
  - 11) Hattori J, Gatanaga H, Kondo M, Sadamasu K, Kato S, Mori H, Minami R, Sugiura W, 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.
  - 12) Ibe S, Yokomaku Y, Hattori J, Iwatani Y, Sugiura W. 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.
  - 13) Sugiura W. Characterization and phylodynamic analysis of drug-resistant HIV-1 transmission in Japan. US-Japan Joint AIDS Panel: Resistance Meeting. December 8-9, 2010, Singapore.
- ## 国内
- 1) 伊部史朗、横幕能行、服部純子、杉浦 互、定量PCR法を用いたHIV-2 viral load測定系の確立とその臨床応用、第84回日本感染症学会総会(京都)平成22年4月5-6日
  - 2) 岩谷靖雅、杉浦 互、Structure-guided mutagenesis of APOBEC3G reveals four lysine residues critical for HIV-1 Vif-mediated ubiquitination near the C-terminal end、第5回日独エイズシンポジウム(東京)平成22年5月10-11日
  - 3) 吉居廣朗、岩谷靖雅、杉浦 互、Spontaneous APOBEC3G expression which determines permissive phenotype against Vif-deficient HIV-1 replication, is caused by constitutive activation of Stat1 in T-cell lines、第5回日独エイズシンポジウム(東京)平成22年5月10-11日
  - 4) 岩谷靖雅、杉浦 互、抗HIV宿主因子APOBEC3Gの発現制御と分解、第12回白馬シンポジウム(徳島)平成22年5月14-15日
  - 5) 服部純子、重見 麗、杉浦 互、BEDアッセイを用いた未治療HIV感染者の動向調査、第12回白馬シンポジウム(徳島)平成22年5月14-15日
  - 6) Sugiura W., A nationwide surveillance study on the prevalence of drug-resistance mutations among newly diagnosed individuals in Japan from 2003 to 2009, Joint Meeting of AIDS Panel for U.S. Japan Cooperative. September 14, 2010, Awaji, Japan
  - 7) 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-1Vif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)平成22年11月7-9日
  - 8) 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(徳島)平成22年11月7-9日
  - 9) 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(徳島)平成22年11月7-9日
  - 10) 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)平成22年11月24-26日
  - 11) 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)平成22年11月24-26日
  - 12) 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 detection 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）平成22年11月24-26日

- 13) 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）平成22年11月24-26日
- 14) 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）平成22年11月24-26日
- 15) 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症例における微少集族薬剤耐性HIV調査研究、第24回日本エイズ学会学術集会（東京）平成22年11月24-26日
- 16) 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（東京）平成22年11月24-26日
- 17) 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）平成22年11月24-26日
- 18) 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）平成22年11月24-26日
- 19) 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）平成22年11月24-26日
- 20) 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ヒスムに関する検討、第24回日本エイズ学会学術集会（東京）平成22年11月24-26日
- 21) 谷 麗君、立川-川名 愛、椎野禎一郎、細谷紀彰、鯉淵智彦、藤井 毅、三浦聡之、杉浦 互、岩本愛吉、配列特異的オリコフローフを用いた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）平成22年11月24-26日
- 22) 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のダルナヒ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）平成22年11月24-26日

## G. 知的所有権の出願・取得状況

該当なし



## 抗HIV薬の薬物動態に関する臨床研究

研究分担者 栗原 健 (独)国立病院機構南京都病院薬剤科 薬剤科長

研究協力者 芝田 信人<sup>1</sup>、加藤 真吾<sup>2</sup>、田中 理恵<sup>2</sup>、上平 朝子<sup>3</sup>、白阪 琢磨<sup>3</sup>、  
吉野 宗宏<sup>4</sup>、矢倉 裕輝<sup>4</sup>、照屋 勝治<sup>5</sup>、土屋 亮人<sup>5</sup>、林田 庸総<sup>5</sup>、  
高橋 昌明<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>同志社女子大学薬学部生物薬剤学教室

<sup>2</sup>慶應義塾大学医学部微生物学・免疫学教室

<sup>3</sup>(独)国立病院機構大阪医療センター臨床研究センターエイズ先端医療研究部

<sup>4</sup>(独)国立病院機構大阪医療センター薬剤科

<sup>5</sup>(独)国立国際医療研究センターエイズ治療研究開発センター

<sup>6</sup>(独)国立病院機構名古屋医療センター薬剤科

<sup>7</sup>三菱東京UFJ銀行健康管理センター <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

### 研究要旨

①研究班が開設したホームページは平成22年11月末現在、通算アクセス数12144件、パスワード取得者202名。平成22年4月～平成22年11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626件で、27施設からの利用があった。件数の内訳はリトナビル：129、ラルテグラビル：128、ダルナビル：86、テノホビル：81、エファビレンツ：81、ロピナビル：52、アタザナビル：41、エトラビルン：14、ホスアンプレナビル：11、ネルフィナビル：3であった。また、CYP2B6遺伝子検査の今年度依頼件数は2件であった。平成22年12月1日よりマラビロククの血中濃度測定を開始した。

②ヒト血漿中antiretroviralのHPLCによる多剤同時定量の検討を行った。アンプレナビル、アタザナビル、ロピナビル、ネルフィナビル、リトナビル、エファビレンツ、テノホビルの分析法を確立するにあたり、Conventional HPLC Method Used for Simultaneous Determination of the Seven HIV Protease Inhibitors and Nonnucleoside Reverse Transcription Inhibitor Efavirenz in Human Plasma. Biol. Pharm. Bull. 2005; 28(7)1286-1290を参考に分析法の検討を行った。テノホビルは他の薬剤に比べてカラムへの保持が極端に弱く、同一の条件で測定することが困難であったため、今回の検討項目から除外し検討を行った。本試験で得られた結果から、各検体において良好な直線性を得ることができた。当該試験の試験計画書の基準を満たすものであり、本測定方法はヒト血漿中のアンプレナビル、アタザナビル、ロピナビル、ネルフィナビル、リトナビル、エファビレンツの濃度測定に有効であると判断された。

### A. 研究目的

プロテアーゼ阻害剤 (PI)、非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤 (NNRTI) はHIV感染症治療薬として広く使われ、めざましい改善をもたらした薬剤である。しかし、PIやNNRTIの体内動態は、主に海外から報告されたもので、日本人でのデータが限られていることが問題とされている。また、近年発売されている抗HIV薬は、すべて希少疾病用医薬品として迅速承認の対象とされており、国内での治験を行わ

ずに承認されている。本研究ではこれら抗HIV薬の薬物動態について調査・検討し、日本人HIV感染症患者における抗HIV薬の血中濃度の推移について確認し、より適切な治療が行えるよう血中濃度測定に必要なデータを収集することで、抗HIV療法の治療効果を高めることを目的とする。また、抗HIV薬の組み合わせは近年、多岐に渡っており、薬剤の組み合わせによる相互作用情報や血中濃度に関する情報は少ないことから、抗HIV薬の相互作用情報を収集

し、データベースを作成し最新の情報を提供する必要がある。

抗HIV薬の血中濃度測定は、HPLCやLC-MS等の高度な専門機器や専門知識を有する人材が必要であることから、一般診療を行う施設での測定が難しい。国内の臨床医が簡便に血中濃度測定を行えるよう、ホームページを利用した血中濃度測定システムを構築・供給し、また、EFV血中濃度に関連する遺伝子多型検査システムを開発し提供を行うことで抗HIV薬を安全に使用し、治療の効果を高めることを目的とした。

今年度は新規抗HIV薬マラビロク（MVC）の血中濃度測定を平成22年12月1日より開始した。

## 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. ヒト血漿中antiretroviralのHPLCによる多剤同時定量の検討

ヒト血漿中antiretroviralのHPLCによる多剤同時定量（アンプレナビル（APV）、アタザナビル（ATV）、ロピナビル（LPV）、ネルフィナビル（NFV）、リトナビル（RTV）、エファビレンツ（EFV）、テノホビル（TDF））の分析法を確立するにあたり、Conventional HPLC Method Used for Simultaneous Determination of the Seven HIV Protease Inhibitors and Nucleoside Reverse Transcription Inhibitor Efavirenz in Human Plasma. Biol. Pharm. Bull. 2005; 28(7) 1286-

1290を参考に分析法の検討を行った。

## B. 研究方法

### 1. 研究班のホームページ（HP）について

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

### 2. ヒト血漿中antiretroviralのHPLCによる多剤同時定量の検討

- ①カラム：L-Column（5 $\mu$ m、4.6\_250mm）（化学物質評価研究機構）
- ②移動相：50mmol/Lリン酸緩衝液（pH5.9）/メタノール/アセトニトリルの比率1.1：1：1
- ③移動相流量：流量8分・0.75mL/min、25分・1.0mL/min、39分・1.1mL/minとした。
- ④内標準物質：6,7-Dimethyl-2,3-di(2-pyridyl)quinoxaline（SIGMA社）
- ⑤HPLCへの注入量：70 $\mu$ L
- ⑥測定波長：260nm
- ⑦測定対象標準物質及び内標準物質：測定対象標準物質は提供を受けたものを使用した。また、内標準物質は、購入品を使用した。
- ⑧ブランク試料：ヒトブランク血漿（ヘパリンナト

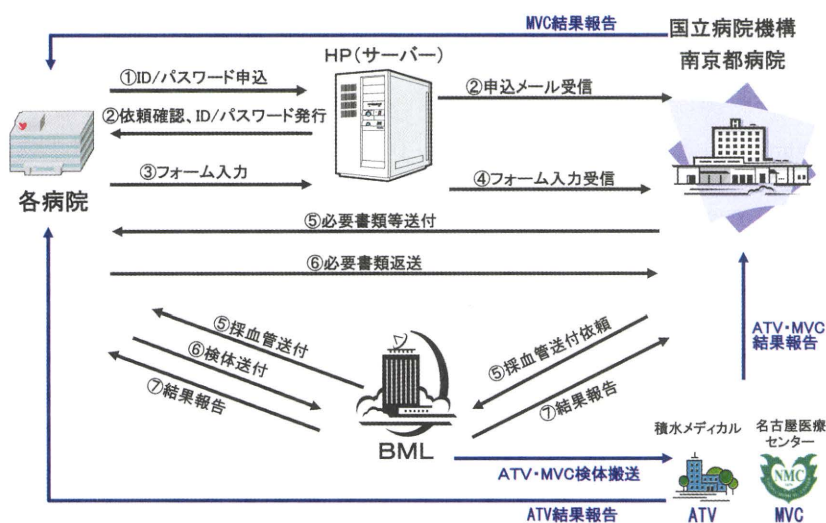


図1 依頼から結果報告までの流れ

リウム)

⑨調製方法：調製した試料は、調製年月日の数字6桁で表記されたロット番号を付して使用した。調製した各原液及び各溶液は、試験計画書に記載された有効期限内に使用した。

⑩検量線用標準試料溶液の調製

• APV

調製方法：APVを10.00mg量りとり、50%エタノールを溶媒として10mL容メスフラスコでメスアップした。

調製濃度：1.000mg/mL

• ATV

調製方法：ATVを11.40mg量りとり、50%エタノールを溶媒として10mL容メスフラスコでメスアップした。

調製濃度（フリー体換算係数；704.85/802.93）：1.001mg/mL

• LPV

調製方法：LPVを10.00mg量りとり、50%エタノールを溶媒として10mL容メスフラスコでメスアップした。

調製濃度：1.000mg/mL

• NFV

調製方法：NFVを11.70mg量りとり、メタノールを溶媒として10mL容メスフラスコでメスアップした。

調製濃度（フリー体換算係数；0.855）：1.000mg/mL

• NFV代謝物

調製方法：NFV代謝物を10.00mg量りとり、メタノールを溶媒として10mL容メスフラスコでメスアップした。

調製濃度：1.000mg/mL

• RTV

調製方法：RTVを10.00mg量りとり、50%エタノールを溶媒として25mL容メスフラスコでメスアップした。

調製濃度：400.0μg/mL

• EFV

調製方法：EFVを10.00mg量りとり、50%エタノールを溶媒として10mL容メスフラスコでメスアップした。

調製濃度：1.000mg/mL

⑪標準試料溶液の調製方法：標準原液を下記のとおり混合して、標準試料溶液を調製した。

APV、RTVを各0.5mLずつ、ATV、LPV、AG1343、AG1402、EFVを各1mLずつ、10mL容ガラス製メスフラスコに分取し、50%エタノールでメスアップした。

調製濃度：APV；50.00μg/mL、ATV；100.1μg/mL、

LPV；100.0μg/mL、NFV；100.0μg/mL、NFV代謝物；100.0μg/mL、RTV；20.00μg/mL、EFV；100.0μg/mL

⑫HPLC条件：分析カラム；L-Column（5μm、4.6×250mm）（化学物質評価研究機構）

カラム温度：40℃

移動相：A；50mmol/Lリン酸緩衝液（pH5.9）/メタノール/アセトニトリル（1.1：1：1、v/v/v）、B；90%アセトニトリル

検出波長：205nm；ATV、LPV、NFV（AG1343、AG1402）、RTV

260nm；APV、EFV

注入量：70μL

サンプラー温度：10℃

⑬検討内容、検討方法、及び評価基準

以下に検討内容と方法及び評価基準を記載した。尚、各パラメータは下記の計算式にて算出した。

直線性の乖離度（%）=（逆回帰濃度－理論値）/理論値×100

変動係数（%）=（定量値の標準偏差）/測定値の平均値×100

真度（%）=（定量値の平均値－理論値）/理論値×100

回収率（%）=被験試料のピーク面積値/標準溶液のピーク面積値の平均値×100

安定性の乖離度（%）=（48時間放置後定量値の平均値－初回定量値の平均値）/初回定量値の平均値×100

⑭測定系のセットアップ：Conventional HPLC Method Used for Simultaneous Determination of the Seven HIV Protease Inhibitors and Nonnucleoside Reverse Transcription Inhibitor Efavirenz in Human Plasma. Biol. Pharm. Bull. 2005；28(7)1286-1290に基づき、試薬及び標準原液等の調製を行い、HPLCのセットアップを行った。

⑮検量線の評価、併行精度及び定量限界の確認

各試験の測定範囲を基準に設定した5濃度及び濃度0の合計6濃度の検量線用標準試料溶液を前処理後、HPLCで測定した。検量線用標準試料溶液より得られたクロマトグラム上の測定対象標準物質のピーク高さと同標準物質のピーク高さの比をY軸に、濃度をX軸にとり、最小二乗法による一次回帰直線（ $Y = aX + b$ ）により検量線を作成した。最適な重み付けを選択し、得られた検量線及び併行精度より、濃度測定範囲及び定量限界の推定を行った。これらの検討結果から本試験に記載の測定条件に変更し、以下の検討を実施した。尚、重み付けは、1/x2とした。



⑯測定内の精度及び真度：測定内での測定値の精度及び真度を確認した。低・中・高 3濃度の被験試料、及び定量下限被験試料について同一測定内でそれぞれ5回測定した。得られた被験試料の定量値の精度は、変動係数（CV）値で15%以内（定量下限被験試料は20%以内）であることを要する。また、得られた被験試料の定量値の平均値から求めた真度（相対誤差、RE）は、理論値の±15%以内（定量下限被験試料は±20%以内）であることを要する。

⑰測定間の精度及び真度：測定間での測定値の精度及び真度を確認した。低・中・高 3濃度の被験試料について同一測定内でそれぞれ5回、測定日を変えて3日間測定した。得られた被験試料の定量値（各被験試料n=15）の精度は、変動係数（CV）値で15%以内であることを要する。また、得られた被験試料の定量値（各被験試料n=15）の平均値から求めた真度（相対誤差、RE）は、理論値の±15%以内であることを要する。

⑱特異性：測定対象標準物質及び内標準物質に対する測定系の特異性を確認した。6名から採取したブランク血漿を測定し妨害物質等の確認を行った。

⑲回収率：測定系における回収率の確認を行った。低・高 2濃度の被験試料について、それぞれ5回測定した。また、これらの被験試料の前処理後に相当する濃度に再溶解液で調製した標準溶液について、それぞれ2回測定した。得られたクロマトグラムにおける被験試料の個々のピーク面積と標準溶液のピーク面積の平均値から回収率を計算した。

⑳オートサンプラー中での安定性：測定中における前処理後試料のオートサンプラー中での安定性について確認した。尚、検討の結果から測定サイクルが

1試料55分間となったため、試験計画書に記載した放置時間24時間を48時間に変更して安定性について確認した。低・高 2濃度の被験試料について測定後48時間以上オートサンプラー中に放置し、それぞれ3回測定した。48時間放置後の定量値の平均値から求めた乖離度は、初回定量値の平均値の±15%以内であることを要する。

## C. 研究結果

### 1. 研究班のホームページ（HP）について

研究班が開設したホームページは平成22年11月末現在、通算アクセス数12144件、パスワード取得者202名（図2）。平成22年4月～平成22年11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626件で、27施設（国立国際医療研究センター、愛媛大学、横浜市立市民、亀田総合、京都大学、熊本大学、群馬大学、公立昭和、広島大学、高松市民、国保旭中央、国立病院機構東京病院、市立堺、慈恵医大、鹿児島大学、沼津市立、新潟大学、聖隷浜松、仙台医療センター、大久保病院、都立駒込、都立多摩総合医療センター、奈良県立医大、福井大学、兵庫医大、北海道大学、大阪医療センター）からの利用があった。件数の内訳はリトナビル：129、ラルテグラビル：128、ダルナビル：86、テノホビル：81、エファビレンツ：81、ロピナビル：52、アタザナビル：41、エトラビルン：14、ホスアンプレナビル：11、ネルフィナビル：3であった。また、CYP2B6遺伝子検査の今年度依頼件数は2件であった。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。

### 平成22年11月30日現在 HPアクセス数 12,144

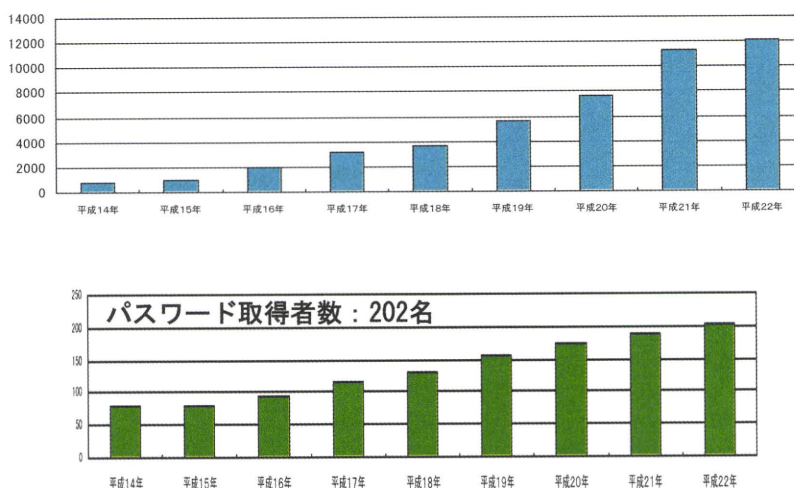


図2 研究班で開設したホームページの運用状況

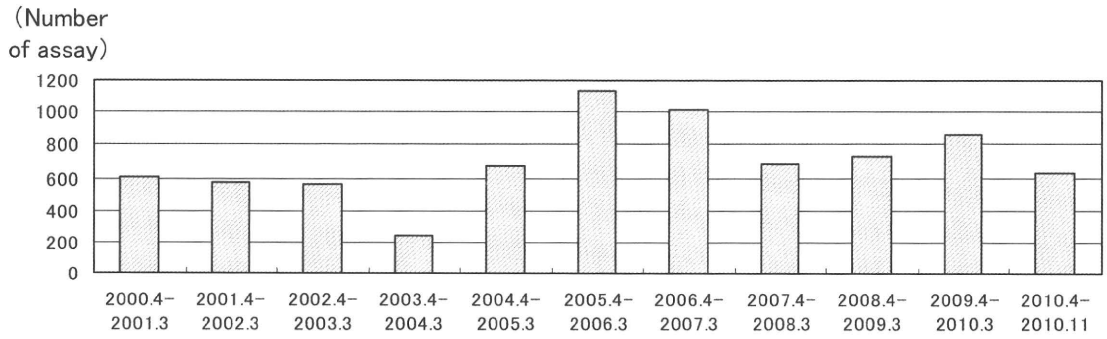


図3 血中濃度測定件数の推移 (総数)

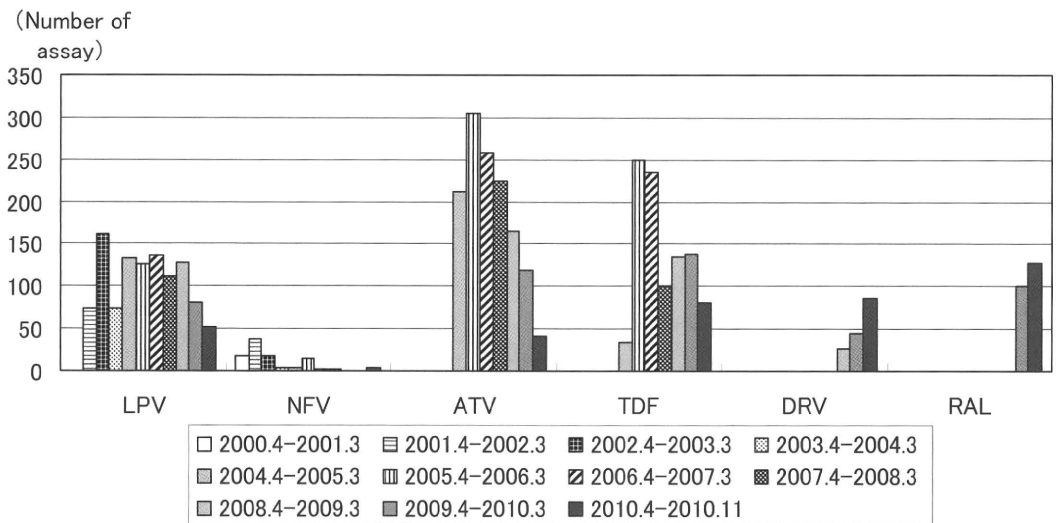


図4 血中濃度測定件数の推移 その1 (薬剤別)

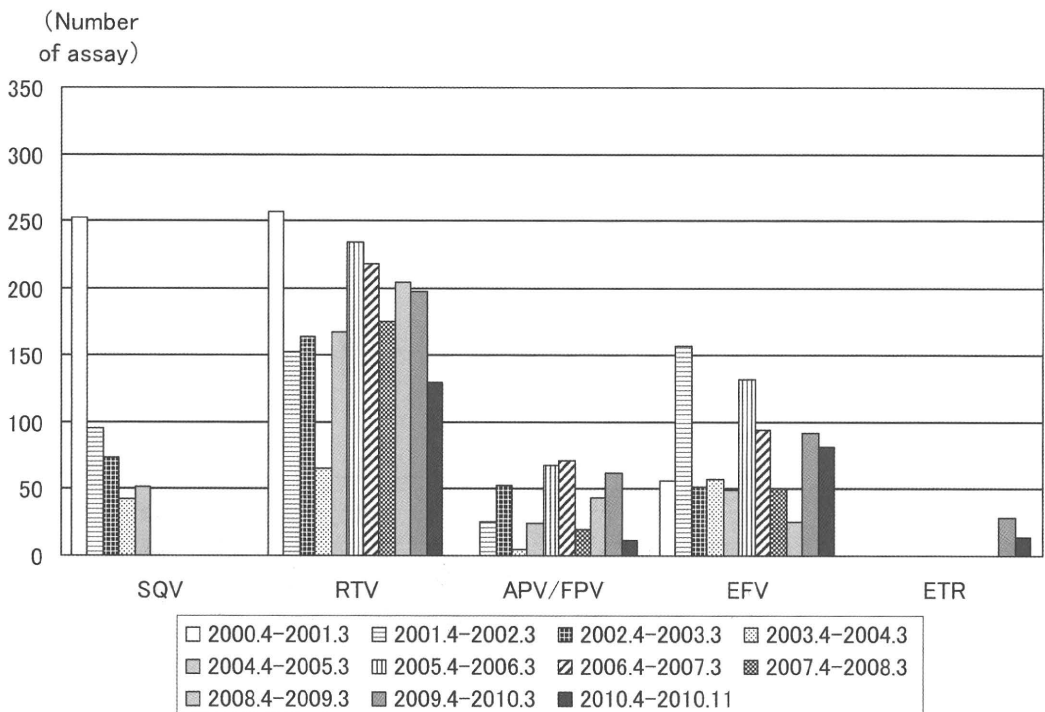


図5 血中濃度測定件数の推移 その2 (薬剤別)

2. ヒト血漿中antiretroviralのHPLCによる多剤同時定量の検討

直線性の結果を表1~7に示す。各検量線用標準試料溶液の測定結果より作成した検量線では、全測定日の相関係数及び検量線の各濃度ポイントにおける逆回帰濃度の乖離度を以下に示した。いずれの結果も判定基準を満たした。

• アンプレナビル (APV)  
 検量線濃度；0.02500 ~ 5.000µg/mL  
 検量線の相関係数  $r = 0.99856 \sim 0.99976$  (判定基準：0.95以上)  
 乖離度  
 定量下限を除く濃度：RE = -5.78 ~ 7.62% (判定基準：±15%以内)  
 定量下限濃度：RE = -0.36 ~ 1.20% (判定基準：±20%以内)

• アタザナビル (ATV)  
 検量線濃度0.1001 ~ 10.01µg/mL  
 検量線の相関係数  $r = 0.99813 \sim 0.99989$  (判定基準：0.95以上)  
 乖離度  
 定量下限を除く濃度：RE = -9.33 ~ 5.49% (判定基準：±15%以内)  
 定量下限濃度：RE = -0.23 ~ 1.60% (判定基準：±20%以内)  
 • ロピナビル (LPV)  
 検量線濃度；0.2000 ~ 10.00µg/mL  
 検量線の相関係数  $r = 0.99755 \sim 0.99969$  (判定基準：0.95以上)  
 乖離度  
 定量下限を除く濃度：RE = -9.48 ~ 6.00% (判定基準：±15%以内)  
 定量下限濃度：RE = -1.05 ~ 2.55% (判定基準：±20%以内)

表1 直線性 (APV)

| 測定日 | 相関係数 (r) | 理論値 (µg/mL) | 0.02500 | 0.1000  | 0.5000 | 2.500 | 5.000 |
|-----|----------|-------------|---------|---------|--------|-------|-------|
| 1日目 | 0.99856  | 逆回帰濃度       | 0.02527 | 0.09422 | 0.5381 | 2.476 | 4.902 |
|     |          | RE (%)      | 1.08    | -5.78   | 7.62   | -0.96 | -1.96 |
| 2日目 | 0.99904  | 逆回帰濃度       | 0.02530 | 0.09424 | 0.5266 | 2.467 | 5.028 |
|     |          | RE (%)      | 1.20    | -5.76   | 5.32   | -1.32 | 0.56  |
| 3日目 | 0.99976  | 逆回帰濃度       | 0.02491 | 0.1009  | 0.5142 | 2.478 | 4.875 |
|     |          | RE (%)      | -0.36   | 0.90    | 2.84   | -0.88 | -2.50 |

表2 直線性 (ATV)

| 測定日 | 相関係数 (r) | 理論値 (µg/mL) | 0.1001  | 0.5004 | 1.001 | 5.004 | 10.01 |
|-----|----------|-------------|---------|--------|-------|-------|-------|
| 1日目 | 0.99830  | 逆回帰濃度       | 0.1017  | 0.4544 | 1.016 | 5.073 | 10.48 |
|     |          | RE (%)      | 1.60    | -9.19  | 1.50  | 1.38  | 4.70  |
| 2日目 | 0.99813  | 逆回帰濃度       | 0.1014  | 0.4537 | 1.056 | 5.014 | 10.25 |
|     |          | RE (%)      | 1.30    | -9.33  | 5.49  | 0.20  | 2.40  |
| 3日目 | 0.99989  | 逆回帰濃度       | 0.09987 | 0.5018 | 1.022 | 4.926 | 9.949 |
|     |          | RE (%)      | -0.23   | 0.28   | 2.10  | -1.56 | -0.61 |

表3 直線性 (LPV)

| 測定日 | 相関係数 (r) | 理論値 (µg/mL) | 0.2000 | 0.5000 | 1.000 | 5.000 | 10.00 |
|-----|----------|-------------|--------|--------|-------|-------|-------|
| 1日目 | 0.99902  | 逆回帰濃度       | 0.2039 | 0.4693 | 1.025 | 4.975 | 10.22 |
|     |          | RE (%)      | 1.95   | -6.14  | 2.50  | -0.50 | 2.20  |
| 2日目 | 0.99755  | 逆回帰濃度       | 0.2051 | 0.4526 | 1.060 | 5.002 | 10.09 |
|     |          | RE (%)      | 2.55   | -9.48  | 6.00  | 0.04  | 0.90  |
| 3日目 | 0.99969  | 逆回帰濃度       | 0.1979 | 0.5074 | 1.028 | 4.931 | 9.814 |
|     |          | RE (%)      | -1.05  | 1.48   | 2.80  | -1.38 | -1.86 |

• ネルフィナビル (NFV)  
 検量線濃度；0.05000～10.00 $\mu$ g/mL  
 検量線の相関係数  $r=0.99872\sim0.99980$  (判定基準：0.95以上)  
 乖離度  
 定量下限を除く濃度：RE = -7.65～6.20% (判定基準： $\pm 15\%$ 以内)  
 定量下限濃度：RE = -0.10～1.86% (判定基準： $\pm 20\%$ 以内)

• NFV代謝物  
 検量線濃度；0.05000～10.00 $\mu$ g/mL  
 検量線の相関係数  $r=0.99877\sim0.99981$  (判定基準：0.95以上)  
 乖離度  
 定量下限を除く濃度：RE = -7.30～5.20% (判定基準： $\pm 15\%$ 以内)  
 定量下限濃度：RE = 0.64～1.80% (判定基準： $\pm 20\%$ 以内)

• リトナビル (RTV)  
 検量線濃度；0.01000～2.000 $\mu$ g/mL  
 検量線の相関係数  $r=0.99700\sim0.99958$  (判定基準：0.95以上)  
 乖離度  
 定量下限を除く濃度：RE = -12.80～11.53% (判定基準： $\pm 15\%$ 以内)  
 定量下限濃度：RE = -2.81～3.00% (判定基準： $\pm 20\%$ 以内)

• エファビレンツ (EFV)  
 検量線濃度；0.1000～10.00 $\mu$ g/mL  
 検量線の相関係数  $r=0.99747\sim0.99927$  (判定基準：0.95以上)  
 乖離度  
 定量下限を除く濃度：RE = -7.86～10.10% (判定基準： $\pm 15\%$ 以内)  
 定量下限濃度：RE = -0.92～0.60% (判定基準： $\pm 20\%$ 以内)

表4 直線性 (NFV)

| 測定日 | 相関係数 (r) | 理論値 ( $\mu$ g/mL) | 0.05000 | 0.2000 | 1.000 | 5.000 | 10.00 |
|-----|----------|-------------------|---------|--------|-------|-------|-------|
| 1日目 | 0.99875  | 逆回帰濃度             | 0.05093 | 0.1847 | 1.005 | 5.027 | 10.47 |
|     |          | RE (%)            | 1.86    | -7.65  | 0.50  | 0.54  | 4.70  |
| 2日目 | 0.99872  | 逆回帰濃度             | 0.05067 | 0.1869 | 1.062 | 4.920 | 10.05 |
|     |          | RE (%)            | 1.34    | -6.55  | 6.20  | -1.60 | 0.50  |
| 3日目 | 0.99980  | 逆回帰濃度             | 0.04995 | 0.1998 | 1.030 | 4.911 | 9.896 |
|     |          | RE (%)            | -0.10   | -0.10  | 3.00  | -1.78 | -1.04 |

表5 直線性 (NFV代謝物)

| 測定日 | 相関係数 (r) | 理論値 ( $\mu$ g/mL) | 0.05000 | 0.2000 | 1.000 | 5.000 | 10.00 |
|-----|----------|-------------------|---------|--------|-------|-------|-------|
| 1日目 | 0.99877  | 逆回帰濃度             | 0.05090 | 0.1854 | 1.001 | 5.014 | 10.52 |
|     |          | RE (%)            | 1.80    | -7.30  | 0.10  | 0.28  | 5.20  |
| 2日目 | 0.99904  | 逆回帰濃度             | 0.05074 | 0.1868 | 1.035 | 4.959 | 10.25 |
|     |          | RE (%)            | 1.48    | -6.60  | 3.50  | -0.82 | 2.50  |
| 3日目 | 0.99981  | 逆回帰濃度             | 0.05032 | 0.1945 | 1.010 | 4.963 | 10.19 |
|     |          | RE (%)            | 0.64    | -2.75  | 1.00  | -0.74 | 1.90  |

表6 直線性 (RTV)

| 測定日 | 相関係数 (r) | 理論値 ( $\mu$ g/mL) | 0.01000  | 0.04000 | 0.2000 | 1.000  | 2.000 |
|-----|----------|-------------------|----------|---------|--------|--------|-------|
| 1日目 | 0.99723  | 逆回帰濃度             | 0.009719 | 0.04461 | 0.2002 | 0.9357 | 1.952 |
|     |          | RE (%)            | -2.81    | 11.53   | 0.10   | -6.43  | -2.40 |
| 2日目 | 0.99700  | 逆回帰濃度             | 0.01030  | 0.03488 | 0.2068 | 1.023  | 2.082 |
|     |          | RE (%)            | 3.00     | -12.80  | 3.40   | 2.30   | 4.10  |
| 3日目 | 0.99958  | 逆回帰濃度             | 0.009889 | 0.04181 | 0.2001 | 0.9782 | 1.974 |
|     |          | RE (%)            | -1.11    | 4.53    | 0.05   | -2.18  | -1.30 |

表7 直線性 (EFV)

| 測定日 | 相関係数 (r) | 理論値 (µg/mL) | 0.1000  | 0.5000 | 1.000 | 5.000 | 10.00 |
|-----|----------|-------------|---------|--------|-------|-------|-------|
| 1日目 | 0.99927  | 逆回帰濃度       | 0.1005  | 0.4751 | 1.048 | 5.013 | 9.944 |
|     |          | RE (%)      | 0.50    | -4.98  | 4.80  | 0.26  | -0.56 |
| 2日目 | 0.99747  | 逆回帰濃度       | 0.1006  | 0.4607 | 1.101 | 4.967 | 9.784 |
|     |          | RE (%)      | 0.60    | -7.86  | 10.10 | -0.66 | -2.16 |
| 3日目 | 0.99920  | 逆回帰濃度       | 0.09908 | 0.5141 | 1.044 | 4.925 | 9.522 |
|     |          | RE (%)      | -0.92   | 2.82   | 4.40  | -1.50 | -4.78 |

## 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依頼があった薬剤は主にリトナビル、ラルテグラビル、ダルナビル、テノホビル、エファビレンツ、ロピナビル、アタザナビルであった。これら薬剤は、国内における治療の中心薬であることから、治療効果の確認等に貢献できたものと思われた。HPへのアクセス数も年々増加傾向にあり、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. ヒト血漿中antiretroviralのHPLCによる多剤同時定量の検討

本試験で得られた測定方法はヒト血漿中のアンブレナビル (APV)、アタザナビル (ATV)、ロピナビル (LPV)、ネルフィナビル (NFV)、リトナビル (RTV)、及びエファビレンツ (EFV) の濃度測定に有効であると判断された。

## E. 結論

抗HIV薬の血中濃度を測定するシステムと、相互作用情報を含む薬剤情報の提供で、より適切で安全なHIV診療に貢献できたものと考え。また、ヒト血漿中antiretroviralのHPLCによる多剤同時定量の検討を行い、同時定量が可能となったことから、今後、血中濃度のより一層の効率化を図ることが可能となったと考える。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

- 1) 栗原健、畝井浩子、佐藤麻希、高橋昌明、吉野宗宏、白阪琢磨：抗HIV薬の服薬に関するアンケート調査結果。第24回日本エイズ学会学術集

会・総会、東京、2010年11月

- 2) 栗原健、小島賢一、日笠聡、白阪琢磨：拠点病院における抗HIV療法と薬剤関連アンケート調査結果 (第7報)。第24回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2010年11月
- 3) 日笠聡、栗原健、小島賢一、白阪琢磨：抗HIV療法と服薬援助のための基礎的調査—治療開始時の抗HIV薬処方動向調査。第24回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2010年11月
- 4) 小島賢一、栗原健、日笠聡、白阪琢磨：抗HIV療法と服薬援助のための基礎的調査—抗HIV薬の薬剤変更状況調査 (2010年)。第24回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2010年11月
- 5) 矢倉裕輝、櫛田宏幸、吉野宗宏、米本仁史、小川吉彦、坂東裕基、矢嶋敬史郎、笠井大介、谷口智宏、渡邊大、西田恭治、上平朝子、白阪琢磨、栗原健：Darunavirの1日1回投与法におけるトラフ濃度と副作用に関する検討。第24回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2010年11月
- 6) 矢倉裕輝、櫛田宏幸、吉野宗宏、栗原健、米本仁史、小川吉彦、坂東裕基、矢嶋敬史郎、笠井大介、谷口智宏、渡邊大、西田恭治、上平朝子、白阪琢磨。ST合剤の先発、後発医薬品の品質評価および過敏症の発現頻度に関する比較検討。第24回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2010年11月
- 7) 吉野宗宏、矢倉裕輝、櫛田宏幸、栗原健、米本仁史、小川吉彦、坂東裕基、矢嶋敬史郎、笠井大介、谷口智宏、渡邊大、西田恭治、上平朝子、白阪琢磨：Tenofovir中止後の腎機能の回復に関する検討。第24回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2010年11月
- 8) 矢倉裕輝、赤崎晶子、金子恵子、柴田麻由、寺岡麗子、北河修治、櫛田宏幸、吉野宗宏、山内一恭、本田芳久、小森勝也、上平朝子、白阪琢磨、栗原健：Efavirenz製剤における剤形間の溶出挙動に関する比較検討。第20回日本医療薬学会年会、千葉、2010年11月

## H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし



## 北海道ブロックにおける薬剤耐性HIVの動向調査研究

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

### 研究要旨

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。2010年1月～12月に北海道大学病院を新規受診したHIV感染者は13名であり、そのうち新規感染者は10名であった。初診時にAIDSを発症している患者は3名(30.0%)であった。薬剤耐性変異については新規感染者3名から逆転写酵素阻害剤の耐性変異を有する薬剤耐性HIVが検出された。前年度との比較では新規感染者数は減少したが、薬剤耐性HIVの検出数が大きく増加した。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2010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

2010年1月～12月に北大病院を新規受診したHIV

感染者は13名であり、そのうち新規発生者は10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2010年1～9月の新規HIV感染者は7名であり、同期間での本院での新規HIV感染者も7名であったことから、この期間内における北海道ブロックで発生した新規感染者捕捉率は100%であった。新規感染者10名はすべて男性であり、年齢は30～49歳が7名(70.0%)であった。感染経路は同性間6名(60.0%)、異性間2名(20.0%)不明2名(20.0%)であり、受診時の病期はHIV感染期7名(70.0%)、AIDS期3名(30.0%)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10名中9名(90.0%)にIAS-USAもしくはstanfordで報告されている薬剤耐性変異を認めた(図1)。9名中3名に逆転写酵素阻害剤耐性に強く関係する変異が検出され、その内訳は1) D67DN、M184MV、T215FIST、K219EK、2) V108I、3) K101EKであった。また1名からはT215Eの変異を有するリバータントが検出された。インテグラーゼ領域の耐性変異は検出されなかった。Subtypeは全てBであった。また、HBs抗原陽性者が2名確認された。

**D. 考察**

北海道ブロックでは、毎年15-20名の新規感染者が検出されていたが、本年度は10名と減少傾向にあった。本院における新規感染者の特徴は日本国内と同様に30-40歳代、同性間、日本男性であった。また、新規感染者10名中3名は札幌市中心街にあるHIV検査・相談所や献血で検出されている。昨年度も同様に3名が検出されていることから、北海道には潜在的な感染者が多く存在することを推測させる。

本年度の特徴は薬剤耐性HIVの検出数が多かった点である。10名中3名から耐性度の高い変異を有する薬剤耐性HIVが検出され、それはいずれも逆転写酵素領域の耐性変異であった。そのうち1名は複数の耐性変異を持ち、ミックスとして検出された。また、他1名から215番のリバータントが検出された。首都圏を中心に多くの地域で215番リバータントの報告がされているが、北海道では本例が2例目である。北海道における今までの傾向としてプロテアーゼ領域に耐性変異を有するHIVが主に検出されていたが、今年度は検出数の増加に加え、リバータントを含む耐性変異の種類の変化が確認された。

北海道ブロックは年間の新規感染者数は少ないものの、昨年より薬剤耐性HIVを検出している。今後、薬剤耐性HIVの検出が増加するのかは不明であるが、薬剤耐性HIVによる新規感染者が増加する可能性は否定できない。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**

2010年度に北大病院を受診した新規感染者数は10名であった。

3名から逆転写酵素領域の耐性変異を有するHIVが検出された。

1名から逆転写酵素215番のリバータント変異を検出した。

**F. 健康危険情報**

なし

**G. 研究発表**

**論文発表**

なし

**学会発表**

- 1) 遠藤知之、後藤秀樹、白鳥聡一、渡部恵子、杉田純一、重松明男、小原雅人、藤本勝也、西尾充史、近藤健、橋野聡、田中淳司、今村雅寛、佐藤典宏、小池隆夫：HAART開始後のHIV-RNA早期抑制の臨床的意義に関する検討 第24回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2010年11月24-26日
- 2) 後藤秀樹、遠藤知之、西尾充史、藤本勝也、佐藤典宏、小池隆夫：HAART内容変更によりHCV-RNAが消失したHIV・HCV重複感染者の一例 第24回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2010年11月24-26日
- 3) 岩崎純子、岡田耕平、笠原郁美、山口圭介、重松明男、小野澤真弘、遠藤知之、柿木康孝、橋野聡、小池隆夫、今村雅寛、浅香正博：AIDS関連リンパ腫の治療後に全身リンパ節腫脹をきたしたEBV related HIV-lymphadenitisの一例 第24回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2010年11月24-26日

**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

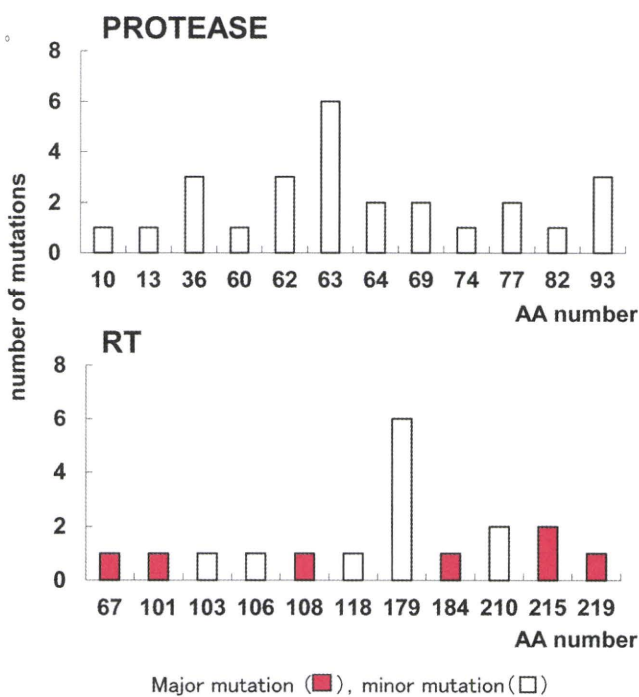
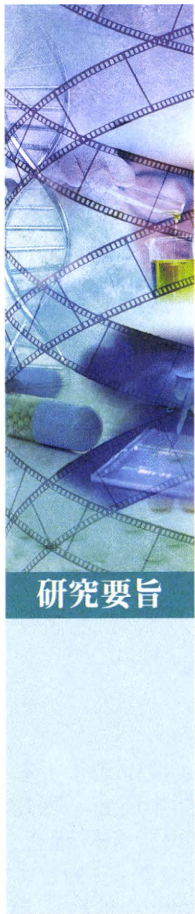


図1 2010年度 新規HIV感染者から検出された薬剤耐性変異 Major mutation (■)、minor mutation (□)



## 東京都及び近郊における薬剤耐性HIVの動向調査研究

～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(2010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 副参事研究員

研究協力者 長島 真美、新開 敬行、林 志直、甲斐 明美

東京都健康安全研究センター

### 研究要旨

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感染者数の減少傾向は未だ認められず、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 (INT) 領域における薬剤耐性変異の有無を検索した。2010年のHIV検査陽性例84例について調査した結果、検出されたHIVの91.7%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かつRT領域でT215S、T219Qの変異を有する例が1例(1.2%)、RT領域でT215-revertant変異が2例(2.4%)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者における薬剤耐性が大きな問題となりつつある。

都内の新規感染者における薬剤耐性HIVの出現状況を把握する目的で、南新宿検査・相談室(南新宿)等のHIV検査陽性例を対象とし、サブタイプ型の比率、薬剤耐性HIVの検出率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

2010年に南新宿検査・相談室(南新宿)等のHIV検査で陽性となった検体(血清)84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関連変異の有無を検索した。

#### 2. PR、RTおよびINT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。

薬剤耐性関連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、RT領域では41～236番目、INT領域については1～288番目のアミノ酸変異の有無により判定した。また、RT領域のT215についてはrevertant変異の調査を行った。

#### 3. BED assayによる感染時期の推定

血清を101倍に希釈し、AWARE™ BED™ 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(155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

南新宿等の HIV 検査で HIV-1 陽性となった 84 例の RT 領域の分子系統樹解析を実施した結果、77 例 (91.7%) がサブタイプ B で、5 例 (6.0%) が CRF01\_AE、C および CRF02\_AG が各 1 例認められた (図1)。

2. PR および RT 領域の薬剤耐性変異

薬剤耐性関連変異は 84 例中 3 例 (3.6%) で認められた。

PR 領域について遺伝子解析を実施した結果、84 例中 1 例 (1.2%) でプロテアーゼ阻害薬 (PI) の薬剤耐性変異である M46I の薬剤耐性変異と、RT 領域の T215S、T219Q の変異を有する例が認められた (図2)。

また、84 例中 2 例 (2.4%) で T215-revertant 変異が認められ、T215E および T215S がそれぞれ各 1 例であった (図2)。

3. 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、L74I が 7 例 (8.3%)、V151I が 1 例 (1.2%)、E157Q、G163 E/R/T が 6 例 (7.1%) で認められた。

4. 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、薬剤耐性関連変異を認めた過去の事例との系統樹における位置関係を検討した結果、今回 PR および RT 領域で複数の変異が認められた例は、2007 年に東京都内で検出された複数の変異を有する例と近隣に位置した。また、RT 領域で T215E の変異を認めた 1 例については過去に同様の変異を認めた東京都の T215E 事例と明確なクラスタを形成したが、T215S については過去

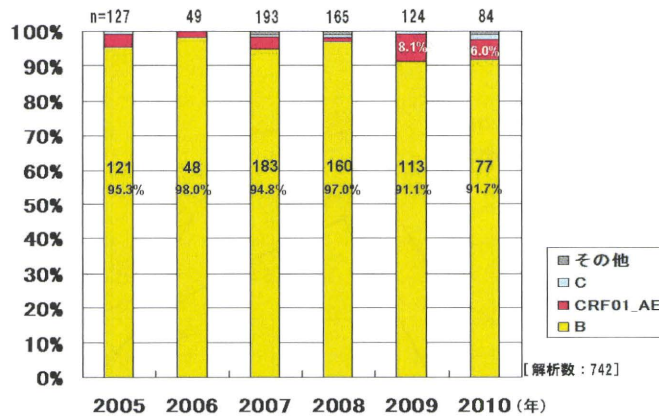


図1 HIV検査陽性例のHIVサブタイプ

|           |                  | 薬剤耐性関連変異率 →     |                |                  |                 |                 |                |
|-----------|------------------|-----------------|----------------|------------------|-----------------|-----------------|----------------|
|           |                  | 2005<br>(n=127) | 2006<br>(n=49) | 2007*<br>(n=193) | 2008<br>(n=165) | 2009<br>(n=124) | 2010<br>(n=84) |
| 薬剤耐性変異    | nRTIs            | M41L            |                |                  | 3               |                 |                |
|           |                  | K103N           |                |                  | 2               | 1               |                |
|           | NNRTIs           | V108I           |                | 1                |                 | 1               |                |
|           |                  | K219Q           |                |                  |                 |                 |                |
|           |                  | V32V/I          |                |                  | 1               |                 |                |
|           |                  | M46I            |                |                  | 2               | 1               | 1              |
|           |                  | M46I/L          |                |                  | 1               |                 |                |
|           |                  | M46L            | 2              |                  | 4               | 4               | 2              |
|           |                  | Q58E            |                |                  |                 |                 | 1              |
|           |                  | M46L-Q58E       |                |                  |                 | 1               | 1              |
|           | M46I-Q58Q/E      |                 |                |                  | 1               |                 |                |
|           | K219Q-M46I-T215S |                 |                |                  |                 |                 | 1              |
| revertant |                  | T215C           |                |                  | 1               | 1               | 3              |
|           |                  | T215D           | 3              | 1                | 2               | 1               | 1              |
|           |                  | T215E           | 1              |                  |                 | 5               | 3              |
|           |                  | T215L           |                |                  |                 |                 | 1              |
|           |                  | T215S           |                |                  | 2               |                 | 1              |

\* : 多剤耐性変異例2例あり  
 ・I84V,L90M D67N,K70R,M184V,T215V,K19Q  
 ・M46I,L90M M41L,D67N,K70K/R,T215F,K219Q

図2 HIV検査陽性例から検出されたHIV薬剤耐性関連変異

の事例とは近縁関係が認められなかった。

### 5. 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 $\leq$ 0.8)と判定された例は、28例(33.3%)であった(図3)。

28例中薬剤耐性変異(revertant変異は除く)が認められたものは1例(3.6%)であり(図4)、全体の

薬剤耐性変異率(revertant変異は除く)の1.2%よりやや高い傾向にはあるが、感染初期例と長期感染での薬剤耐性の出現頻度は大きく変わらない傾向にあることが判明した。

また、28例中revertant変異が認められたものは1例(3.6%)であり、同様に、revertant変異全体の検出率(2.4%)よりやや高い傾向が認められた(図5)。

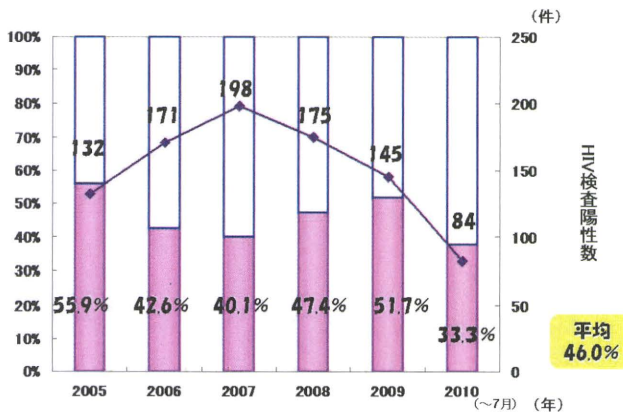


図3 HIV検査陽性数とBED陽性例の割合

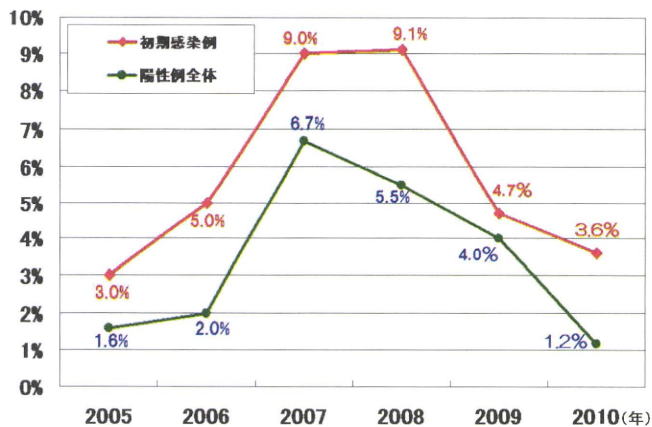


図4 初期感染例における薬剤耐性HIV変異

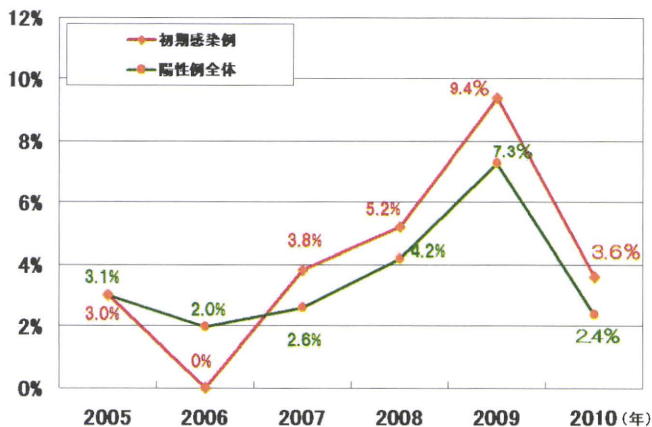


図5 初期感染例におけるrevertant変異

## D. 考察

2010年に南新宿等のHIV検査で陽性となった84例より検出されたHIV-1のPR、RTおよびIN領域の遺伝子解析を実施した結果、91.7%がサブタイプBで、3例(3.6%)に薬剤耐性に関連する変異を認めた(耐性変異1例、revertant変異2例)。

耐性変異が認められた1例は、複数の領域での変異(M46I、T215S、T219Q)を有し、複数の変異を同時に認める例は、2007年以來の検出であった。

今回の検討では、non-Bサブタイプの占める割合がやや増加傾向にあること、薬剤耐性関連変異の検出率が減少したことが特徴的である。

以上の結果が新型インフルエンザ等の影響による一次的なものなのか、インテグラーゼ等の新たな薬剤の影響によるものなのか、また感染者集団の変遷によるものなのかについては、今後の検討課題である。

## 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1.2%で、T215-revertant変異が認められた例(2.4%)を加えると3.6%であった。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

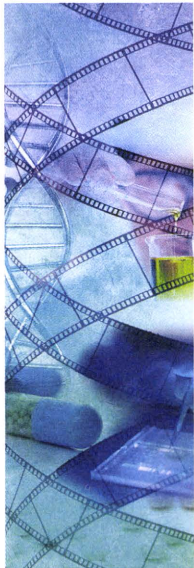
### 1. 論文発表

### 2. 学会発表

- 1) 長島真美、新開敬行、高野智香、尾形和恵、吉田 勲、原田幸子、塚本良治、林 志直、貞升健志、甲斐明美：東京都内公的検査機関におけるHIV検査件数についての解析(2008-2009年)、第24回日本エイズ学会学術集会、2010(東京)
- 2) 長島真美、新開敬行、高野智香、尾形和恵、吉田 勲、原田幸子、塚本良治、林 志直、貞升健志、甲斐明美：東京都内公的検査機関でのHIV検査陽性例における薬剤耐性変異の解析(2005-2009年)、第24回日本エイズ学会学術集会、2010(東京)
- 3) 貞升健志、長島真美、新開敬行、保坂三継、甲斐明美：HIV感染症の発生動向と地研の役割、衛生微生物協議会第31回研究会、2010(鹿児島)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



## 研究要旨

# 九州ブロックにおける薬剤耐性HIVの動向調査研究

研究分担者 南 留美 (独) 国立病院機構九州医療センター免疫感染症科臨床研究部 医師  
山本 政弘 同 AIDS/HIV 総合治療センター センター長

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、インテグラーゼ領域の解析を行った。サブタイプは全例Bであった。耐性変位に関してはRT領域にT69N、T210FといったNRTI領域やK103R、L101Q、K103N、V108I、N179D/EといったNNRTI領域に変異をもつ症例が20.8%に認められた。RT領域の変異は、2008年以降、増加している。PR領域はminor mutationが多かった。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。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22.9%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)

2010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う。薬剤耐性変異の評価はIAS-USA (Dec: 2009) 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EnvC2V3領域が解析可能であった症例に対し細胞指向性を予測するジェノタイプテスト (Geno2Pheno) 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

2010年において検討した新規未治療患者数は48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、2009年