

エイズ抗酸菌症治療のための新しい化学療法システムの開発

主任研究者：所属 国立感染症研究所 ハンセン病センター、センター長
研究者：森 亨
研究期間：平成16年4月～平成19年3月

分担研究者

土井 教生

（財）結核予防会結核研究所研究部
主任研究員/新抗結核薬プロジェクトリーダー

御手洗 聡

（財）結核予防会結核研究所
抗酸菌リファレンスセンター 細菌検査科長

野内 英樹

（財）結核予防会結核研究所
特別研究員

武永 美津子

聖マリアンナ医科大学附属難病治療研究センター
先端医療開発部門 DDS 研究室 室長/講師

Prasit Palittapongarnpim

タイ科学省バイオテクノロジー研究所 副所長
（兼マヒドン大学理学部 準教授）

Kiat Ruxrungtham

タイ国チェラロンコン大学免疫学 準教授
タイ赤十字 HIV-NAT 副ディレクター

1. 研究目的

「プロテアーゼ阻害剤を含む抗 HIV 化学療法と RFP を中心とする結核化学療法、これら 2 種類の臨床拮抗する化学療法を同時に効果的に機能させるための新しい化学療法システムに関する研究」

各分担研究者の課題は下記の通り。

< 日本国側 >

抗結核薬の徐放性 DDS 化製剤およびその最適化の研究（武永美津子）

免疫不全の疾患モデルマウスを用いる抗結核薬最適化製剤の薬理学的および *in vivo* 治療効果の研究

（土井教生）

タイ国のエイズ抗酸菌症合併患者における抗結核薬の血中薬剤濃度および体内動態の追究（御手洗聡）

< タイ国側 >

タイ国のエイズ抗酸菌症患者の臨床分離株を用いる細菌学的研究；特に「抗酸菌の耐薬剤性（Drug Tolerance）」測定系の確立（Prasit Palittapongarnpim）
タイ国エイズ抗酸菌症患者の疫学コホート調査研究と臨床研究。（野内英樹）

タイ国のエイズ抗酸菌症合併患者における抗 HIV 薬の薬剤血中濃度と体内動態の追跡（Dr. Kiat Ruxrungtham）

2. 研究方法（倫理面への配慮）と結果

肺胞マクロファージへの効率的な移行性を目指した Rifampicin (RFP) 製剤を、リポソーム、高分子生分解性ポリマー-PLGA マイクロスフェア、およびリピッドマイクロスフェアの各キャリアを用いて検討した。このうち、RFP 封入リピッドマイクロスフェア製剤が安定に保存できるだけでなく、*in vivo* 実験で標的とする肺への滞留性を示すこと、および肺胞マクロファージへの取り込みを促進することを明らかにした。また、感染動物での評価と同じ系統マウスで経鼻投与を行い *in vivo* 体内動態を検討した。Balb/c マウスおよび Balb nu/nu マウスのいずれも RFP の肺での滞留性が顕著に認められ、肝臓への移行低下を明らかに示した。一方で系統間による動態の差異も統計学的有意をもって認められており、これが病態での薬剤到達性や滞留性に影響を与える可能性があることが考えられた。さらにマクロファージ表面にマンノース受容体があることを利用したマンノース修飾 RFP 封入リピッドマイクロスフェア製剤を作製して *in vivo* 体内動態を検討したところ、RFP 封入リピッドマイクロスフェア製剤に比べ、肺での滞留性をさらに顕著に示しており、今後のキャリア設計する上で重要な知見を得た。

結核菌を感染させた免疫不全マウス（BALB/c nude、SCID）と健常マウス（BALB/c）を対象に経肺ならびに経口による間歇治療投与実験を行った。

結果、経肺投与の実験系では、BALB/c nude のほうが BALB/c よりも肺内治療効果が高く、免疫不全の感染宿主に対する経肺投与ルートによる治療の有用性を示唆していた。いっぽう、免疫不全の BALB/c nude と健常 BALB/c では RFP の体内動態が異なることを見出した：BALB/c nude では健常 BALB/c とは対照的に緩慢な吸収と緩やかな動態曲線を描き、Cmax に至る所要時間が異なっていた。

HPLC（高速液体クロマトグラフィー）法による抗 AIDS 薬 nevirapine（NVP）、抗結核薬 RFP、rifabutin（RBT）の測定系を確立した。非感染の健常 BALB/c マウスに連続 5 日間、抗 AIDS 薬 NVP と抗結核薬 RFP を投与し（RFP のみ経肺および経口で治療投与）最終日の治療投与後 30min、1.5hr、3hr 後に心臓より全採血した plasma 中の NVP 血中濃度を経時測定した。結果、RFP と NVP を同時経口投与した場合には NVP の濃度は、ヒトの場合と同様 40% 前後低下するが、RFP を経肺投与した場合は NVP の濃度低下は 10% 以内に留めることができることが判明した。上述の結果は今後の抗結核薬の経肺投与（inhalation therapy）の可能性に道を拓く実験的成果である。

HPLC を用いて INH、Ac-INH および RFP の血液中濃度を安定して測定する方法を確立した。また、この方法によって得られた結核患者検体のデータから一般的な INH および RFP の血中動態モデルを構築した。次いで HPLC による INH、Ac-INH および RFP の血液中濃度測定系を改良し、必要な検体量を INH 400 μ l、RFP 250 μ l まで減量した。また患者検体からの実測を継続し、この方法によって得られた結核患者検体のデータから適切な薬物動態パラメータを設定し、INH および RFP の血中動態モデルを作成し、検証することが可能であった。最終年度は、血漿 100 μ l を用いて、Isoniazid（INH）、Acetylated Isoniazid（Ac-INH）及び Rifampicin（RFP）の血中濃度を安定して測定する方法を確立した。また、HIV 感染患者血清にエタノールを添加してウイルスを不活化することにより感染性を除去し、安全に測定できる方法を開発した。この方法を用いて HIV 感染合併結核患者の INH、Ac-INH 及び RFP の血中濃度を実測し、抗 HIV 療法（ART）実施によってもこれらの抗結核薬の血中濃度は影響を受けないことを示した。これらの結果は結核の治療成績とも良く一致し、治療効果の事前保証に有用と考えられた。

HIV 患者分離株を含む結核菌臨床分離株の薬剤感受性（MIC、MBC）および遺伝学的 characterization の検討を目的に耐薬剤性試験（drug tolerability）で用いる被検臨床分離株を対象に genotyping、MIC と

MBC 測定、薬剤耐性遺伝子の解析を実施した。結果は、ともに一般の肺結核患者由来の薬剤感受性・臨床分離・結核菌株との比較において、特筆すべき差異は見出されなかった。次いで非アイソトープ系の MGIT960 自動分析装置を用いて、主要抗結核薬による各種結核菌株に対する初期殺菌能（EBA：early bactericidal activity）を指標に耐薬剤性（drug tolerability）の評価試験方法を検討した。結果、検討した再発症例由来の結核菌臨床分離株の多くが「耐薬剤性」を有する事実を示していた。薬剤感受性の結核菌国際標準株 H37Rv 株と多剤耐性の結核菌臨床分離株 DS-13693 株を reference strain として用いる「耐薬剤性（drug tolerability）評価試験方法」を確立することができた。

タイ国における HIV 感染状況の調査と結核患者の疫学コホート設定として、結核患者のサーベイランスから取り込んだコホート研究をタイ国北端のチェンライ県で実施した。この基盤を活用し、タイ側の研究者と抗 HIV 薬と抗結核薬の同時併用に関する臨床研究の準備としての TDM（Therapeutic Drug Monitoring）研究を実施した。また本研究では薬剤動態研究（Pharmacokinetic study）を付随したネビラピンの量を 400mg と 600mg に無作為に割り当てる臨床研究を現在も継続中である。

CD4 値が 200 以下で RFP を含む抗結核薬を 2-6 週間服用している 32 人の活動性結核患者を 16 人ずつ無作為に NRTI と NVP 400mg と 600mg を受ける 2 つの臨床グループ群に割り付けた。基礎的な臨床データは 2 群で変わりはないが 2 週間後の血中 NVP Cmin 値の中間値は NVP 400mg 群で 1.9、600mg の 4.83 と比較して有意（ $p=0.001$ ）に低かった。血中 NVP Cmin 値が 3.1mg 未満の率も NVP 400mg 群 79% と 600mg 群の 19% よりも有意（ $p=0.002$ ）差があった。しかし、血中 NVP Cmin 値が 3.1mg 未満の率は 400mg 群と 600mg 群で 4 週後（31vs 6%, $p=0.07$ ）と 12 週後（31vs 6%, $p=0.07$ ）ともに差がなかった。HCV 合併の 2 症例（NVP 600mg 群）と HBV 合併の 1 症例（NVP 400mg 群）では ALT の第 2 度上昇が認められた。24 週後の HIV ウイルス RNA 量の測定可能域未満（ < 50 c/mL）の率では 2 群間（62 vs 50% by ITT; $p=0.49$, and 83 vs 89% by OT）で差が認められなかった。CD4 値の上昇の中間値（IQR）でも有意差は認められなかった [106 (63.5-172.5) vs 44 (34.5-101) $p=0.07$]

【倫理面への配慮】

現在までの日本国・タイ国間の共同研究ではこれらの基本原則を遵守し、さらに検体等の日本国・タイ国間の移動・輸送等に関しては、文書での Material

Transfer Agreement 等を結び、パテント等の問題も含めて国際共同研究に関連した倫理的な問題に配慮してきた実績がある。

タイ国側については、タイ保健省倫理委員会の定める倫理規定に沿って研究を実施している。第一に、参加研究者全員の合意を得た研究プロトコルを作成し、タイ国保健省倫理委員会および関連研究施設の倫理委員会に提出し、正式な研究として承認を得る。次に、本研究に参加する患者については、担当医師による十分な説明の後、書面によるインフォームドコンセントを得ることとする。研究を通して得られた個人情報は厳密に管理し、参加研究者以外のものが内容を知り得ることはない。

倫理的な配慮として、臨床研究で国際標準となっている ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) の ICH Harmonised Tripartite Guideline に基づき、GCP (Good Clinical Practice) を遵守した規準で臨床研究を進めている。また、タイ国独自の倫理規定として、2004 年に出された BIOTEC (タイ国の理化学研究所に相当する科学省管轄の研究機関) の Bio-ethical Issues and Guidelines にしたがってインフォームド・コンセントを徹底させている。さらに、タイ国臨床検体の移動に伴い発生する可能性のある問題に備えて、上記の Guideline に沿った Material Transfer Agreement を結び、倫理的な問題が生じないように配慮している。また、倫理委員会を通過して現在進行中の研究プロトコルのタイトルは、"A 48 week, randomized, open-label, 2 arm study to compare the efficacy, safety and tolerability of HAART containing nevirapine 400mg/day versus nevirapine 600 mg/day in HIV-1 infected patients started at 2-6 weeks after initiating rifampin containing antituberculous therapy" で、インフォームド・コンセントが取れた CD4 200 未満の HIV 陽性結核患者を対象とし Phase II としての位置付けで実施している。

日本国側についてもタイ国側と同様に、各研究施設に設置されている倫理委員会に研究プロトコルを提出し、承認を得ている。採血等の行為に関しては、「臨床研究に関する倫理指針」に従っており、実施機関における倫理委員会の許可を得て実施している。タイ国内での採血等の行為についても Helsinki 宣言を基本的に遵守し、タイ国内の当該倫理委員会の許可を得た上で実施している。なお、内容に追加や変更が生じた場合は日本国・タイ国双方の倫理委員会に改めて変更の承認を得ることとする。

動物実験の実施については(社)日本実験動物学会の「動物実験に関する指針：解説」ならびに Helsinki Declaration に準拠している。とくに結核研

究所では、動物を用いる実験は所内外の委員で構成される倫理審査委員会とバイオセーフティ委員会の承認を経て実施しなくてはならず、動物愛護と人獣共通感染症を含む感染防御の対策に万全を期している。研究室の作業上の安全と実験動物の取り扱い、飼育管理・設備基準を含め詳細を記したマニュアル「結核菌検査の安全マニュアル(日本結核病学会、日本臨床微生物学会、日本臨床検査技師会、3学会の共同執筆による指針): 2005 年初版発行」では、分担研究者 土井教生が日本結核病学会を代表して執筆を担当しており、バイオセーフティ分野の病原菌対策の啓蒙普及活動でも指導的役割を果たしている。

3. 考察

肺胞マクロファージにリピッドマイクロスフェア(LM)が顕著に取り込まれること、*in vivo* での経鼻投与実験で LM が効率的に取り込まれることを明らかにした。これは、LM 製剤の経肺投与で RFP が LM と共に肺胞マクロファージに取り込まれて薬理効果を発揮できることを示している。 [³H]RFP を用いて RFP 含有 LM 製剤と RFP 含有溶液の経鼻投与を ICR マウスに試みたところ、肺中放射活性に大きな差異が認められ、RFP 含有 LM 製剤では肺での滞留性がみられ、肺胞マクロファージへの薬剤取り込みを亢進させる可能性を示唆する結果を得た。マウスを用いて体内動態を検討し、感染動物での薬理活性との関連性を検討した。結果、BALB/c ノードマウスでの動態は、BALB/c マウスに比べ血中への移行は速かったものの、肺での薬剤滞留性が比較的長時間持続した。感染防御免疫能の異なる宿主における抗結核薬剤の動態と薬理効果の違いを示唆する新たな知見が得られた。

結核菌を感染させた免疫不全マウス (BALB/c nude、SCID) と健常マウス (BALB/c) を対象に行った経肺ならびに経口による間歇治療投与の実験系では経肺投与の実験系において、BALB/c nude のほうが BALB/c よりも肺内治療効果が高く、免疫不全の感染宿主に対する経肺投与ルートによる治療の有用性を示唆していた。その背景要因のひとつとして免疫不全の BALB/c nude と健常 BALB/c では RFP の体内動態が異なることを見出した。RFP と NVP の同時経口投与ではヒトの場合と同様にマウスモデルにおいても NVP の血中濃度が 30% 以上低下するが、同一用量の RFP を経肺投与すると同時投与の NVP の血中濃度の低下を 10% に止めることが出来る事が判明した。RFP 経肺投与が RFP 経口投与に比べて抗エイズ薬 NVP の濃度低下を 1/3 以下にまで低減化できる事実は、今後の抗結核薬の経肺投与・

inhalation therapy の可能性に大きく道を拓く実験的成果であると考えられる。すなわち抗結核薬の噴霧吸入製剤の開発は TB-HIV 感染宿主を対象とする RFP を含む結核化学療法と、主薬として NVP を含むエイズ化学療法との同時併用治療を可能にすると考えられた。

INH/Ac-INH 及び RFP について HPLC による測定を行い、系の改善を実施した。結果として INH/Ac-INH 及び RFP の血中濃度を 100µl の血漿検体から測定可能となった。これによって、一度に大量の血液を採取する必要がなくなり、限られた検体を他の検査とも共用することが可能であると思われる。今回 HIV 感染患者の検体を扱うにあたって検査室内での Bio-safety の問題が生じた。昨年加熱による HIV の不活化を計ったが、RFP が熱に対して不安定であったため、別の方法を設定する必要があった。これに対して、今年度はエタノール添加による HIV の不活化を行い、薬剤血中濃度の測定に影響を及ぼさない測定系を確立した。PZA の血中濃度測定については、内部標準物質の設定し HPLC 条件を決定した。今後実際の患者検体で測定を実施し、実践性・有効性を評価する必要があると思われる。

難治療性の結核症例や再発例から分離される菌株は、必ずしも遺伝学的な点突然変異を獲得した薬剤耐性菌というわけではなく、分離菌株の表現形質や MIC や MBC で相互に大きな差を示すわけでもない。これら分離菌株の多くは、唯一、薬剤に対する応答性 (response) のみが異なる傾向を示すが、今回の「耐薬剤性 (Drug Tolerability) のアッセイ系」確立は TDM と表裏一体を成しており、多剤耐性 TB/HIV と再発症例に対する対策・治療を強化・展開する上で重要なテーマとして位置づけてきた。今回、非アイソトープの MGIT の自動分析装置を用いて、世界で初めて「耐薬剤性 (Drug Tolerability) のアッセイ系」が確立されたことになる。このアッセイ方法は今後の TB/HIV の臨床研究と化学療法の現場で貢献することが出来る；今後とも精力的に推進するテーマである。

タイ国の研究チーム (Dr. Charoen, Dr. Kiat) とペアを組み、タイ国での HIV 感染状況と結核菌の細菌学的情報および結核患者の疫学コホート研究を中心とする蓄積を継続してきた。HIV 合併結核患者に対する抗結核薬と抗 HIV 薬の同時使用の際の薬剤の体内動態の研究成果、Drug Tolerance の研究成果を出す基盤としてコホートを維持し貢献した。HIV 合併結核患者に対する抗結核薬と抗 HIV 薬の同時使用の際の薬剤の体内動態の研究成果と Drug Tolerance の研究成果を出す基盤として今後ともコホートを維持継続する。

NVP400mg 投与時の C_{min} の血中濃度は低く、特

に初期で統計的に有意に低かったが、ART 開始後 1 2 週目の CD4 上昇数のメチアンと HIV ウイルス Viral Load では差が見られなかった。以上より 12 週までの治療成績では 400mg がむしろ望ましいと考えられる。一方 ART 早期の血中薬物動態の長期的な影響は現時点では不明であり、理論的には ART 開始早期の血中濃度がより正常値に近くなることが望ましいことになる。ART 開始早期の血中濃度を上げるため Lead-in を行わないオプションがありうる。しかし 600mg の成績から hypersensitivity が出現しやすいと考えられ、この相反する 2 つの観点から Lead-in 無しが良いかどうか判断する必要があり、倫理委員会の許可を得て 10 症例で、Lead-in 無しが望ましいか検討を行う計画である。

4. 評価

1) 達成度について

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

本研究ではプロテアーゼ阻害剤を中心とするエイズ化学療法とリファンピシン (RFP) を中心とする結核化学療法、これら 2 種類の臨床拮抗する化学療法を同時に効果的に機能させるための新しい化学療法システムを構築することがプロジェクト全体の統一テーマであり、最終目標として徐放性の DDS 化製剤として最適化した RFP 噴霧吸入製剤の開発を目指している。徐放性の RFP-DDS 化製剤が開発できれば、宿主内で長期持続的な抗菌活性 (long lasting) を発揮させることが期待できるので、エイズ患者では困難とされる結核の間歇治療も可能になると考えられる。その意味で本研究は「DOTS 世界戦略 (Directly Observed Treatment, Short Course ; WHO)」と軌を一にする研究テーマである。他方、タイ国のフィールドを対象とする疫学、細菌学、薬物動態学、臨床研究を統合する総合的な研究は現行の両化学療法レジメンに対する見直し・改善を期する研究であるとともに、将来のわが国におけるエイズと抗酸菌症の合併症に対する準備・対策を目指す研究でもある。

3) 今後の展望について

5. 結論

LM (lipid microsphere) をキャリアとした LM-RFP 製剤は、肺、とりわけマクロファージへの移行性が高く、肺胞マクロファージへのターゲット性やまたリン脂質への細胞親和性が高いことから、高い薬理効果が期待できる製剤である。

マウスモデルを用いた比較実験系において、LM-RFP 製剤の経肺投与系は、抗エイズ薬 NVP との同時併用において、RFP 経肺投与系との間に有意差が認められなかったが、経口投与と同一用量の RFP を経肺投与すると、同時投与の NVP の血中濃度の低下を 1/3 すなわち 10% 程度に止めることが出来る事実が判明した。今後の抗結核薬の inhalation therapy の可能性に道を拓く実験的成果である。

HPLC により、血漿 100 μ l を用いて、Isoniazid (INH)、Acetylated INH (Ac-INH) 及び RFP の血中濃度を安定して測定する方法を確立した。また、HIV 感染患者血清にエタノールを添加してウイルスを不活化することにより感染性を除去し、安全に測定できる方法を開発した。HIV 感染合併結核患者の INH、Ac-INH 及び RFP の血中濃度を実測したところ、HIV 感染者であっても薬剤内服 2 時間で十分有効と思われる血中濃度を達成しており、抗 HIV 療法 (ART) 実施によってもこれらの抗結核薬の血中濃度は影響を受けないことが示された。これらの結果は結核の治療成績とも良く一致し、治療効果の事前保証に有用と考えられた。

非アイソトープ系の MGIT960 自動分析装置を用いて、世界で初めて TB-HIV 再発症例由来の結核菌臨床分離株を対象に「耐薬剤性 (Drug Tolerability) のアッセイ系」を確立した。このアッセイ方法は今後の TB-HIV の臨床研究と化学療法の現場で貢献する方法となる。

タイ国の研究チーム (Dr. Charoen, Dr. Kiat) とペアを組み、タイ国での HIV 感染状況と結核菌の細菌学的情報および結核患者の疫学コホート研究を中心とする蓄積を継続した。HIV 合併結核患者に対する抗結核薬と抗 HIV 薬の同時使用の際の薬剤の体内動態の研究成果、Drug Tolerance の研究成果を出す基盤としてコホートを維持し貢献した。

結核患者のサーベイランスから取り込んだコホート研究をタイ国北端のチェンライ県で実施している。この基盤を活用し、タイ側の研究者と抗 HIV 薬と抗結核薬の同時併用に関する臨床研究の準備としての TDM (Therapeutic Drug Monitoring) 研究を実施した。また薬剤動態研究 (Pharmacokinetic study) を付随してネビラピンの量を 400mg と 600mg に無作為に割り当てる臨床研究を実施し、現在進行中である。

6. 研究発表

1. 論文発表

1) 御手洗聡, 穴戸雄一郎: 多剤耐性結核の現状と今後 多剤耐性結核の分子機構 化学療法の領域 2006; 22: 1683-1688.

2. 学会発表

1) 御手洗聡, 星野斉之, 和田雅子, 阿萬久美子, 奥村昌夫, 橋本健一, 尾形英雄, 塩見真理, 緒方宏泰: 結核治療における Therapeutic Drug Monitoring の試み. 第 79 回日本結核病学会総会 名古屋 2004 年 4 月

2) Mitarai S, Shiomi M, Ogata H, Otomo K, Aman K, Okumura M, Hoshino H, Wada M, Yoshiyama T, and Ogata H: Drug Monitoring and Multiple Drug Resistance. 35th World conference on IUATLD. Paris 2004

3) Chuchottaworn C. Prevalence of Drug Resistance in Thai Tuberculosis Patients with HIV Seropositive presented at Fortieth Anniversary United States-Japan Cooperative Medical Science Program, December 7-10, 2004, Kyoto, Japan

4) Saejung S, Kantipong P, Uthairoravit W, Nampaisan O, Sumanapun S, Yamada N, Yanai H, Deaths during TB treatment of HIV co-infected tuberculosis cases before wide introduction of ARV in public health services in Chiang Rai, Northern Thailand the 7th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific (ICAAP) Kobe, (Abstract MoPC0120), Japan, July 1-5, 2005

5) 御手洗聡: 結核治療に関する最近の話題. 薬物治療モニタリング研究会. 東京. 2005 年 6 月

6) Changchit T, Nampaisan O, Komsakorn S, Yamada N. Long-Term Outcome of New Smear Positive Tuberculosis Cases Registered in Chiang Rai, 1997-2000 Journal: Bulletin of the Department of Medical Service 2005

7) 太田有紀, 武永美津子, Areeya Disratthakit 土井 教生 五十嵐理慧: 経肺投与を目指した抗結核薬封入リピッドマイクロスフェア製剤の可能性 第 126 年会日本薬学会 2006,3 (仙台)

8) Disratthakit A.¹, Doi N.¹, Ohta Y.², Takenaga M.², Igarashi R.² (¹Research Institute of Tuberculosis, JATA, ²Institute of Medical Science, St. Marianna Univ.): Possibility of Aerosolized DDS-Rifampicin for the Combination Therapy with Anti- Retroviral-Drugs for HIV/TB Infection. 第 25 回日本 DDS 学会総会 (2006.7 月東京).

9) Changchit T, Nampaisan O, Komsakorn S, Yamada N.

Long-Term Outcome of New Smear Positive
Tuberculosis Cases Registered in Chiang Rai, 1997-2000
Journal: Bulletin of the Department of Medical Service
2006

7. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得 無し。
2. 実用新案登録 無し。
3. その他 無し。