慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	服薬コンプライアンス評価法としての毛髪薬物濃度測定法の開発
Sub Title	The development of the measuring assay for anti- HIV drug concentration of hair as the evaluation method of medication compliance
Author	岩田, 敏(Iwata, Satoshi) 長谷川, 直樹(Hasegawa, Naoki) 加藤, 真吾(Kato, Shingo) 藤原, 宏(Fujiwara, Hiroshi) 須藤, 弘二(Sudo, Koji)
Publisher	
Publication year	2016
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2015.)
JaLC DOI	
Abstract	血中抗HIV薬濃度の測定は, 治療効果の最適化と薬剤耐性獲得の防止のために重要である。一方, 毛髪中の薬剤量は平均的な薬剤血中濃度を反映していると考えられており, 毛根側から先端にかけての毛髪中薬剤量を測定することにより血中濃度の長期的推移を推定できることが期待される。今回我々はビーズ破砕による毛髪からの薬剤抽出法を確立し, 逆転写酵素阻害剤であるテノフォビル(TFV)とエムトリシタビン(FTC)服用中の患者の毛髪および血漿中の薬剤量を, LC-MS/MSを用いて測定した。その結果, 毛髪中薬剤量を測定することにより, TFVとFTCの血中濃度の長期的推移を推定できる可能性が示された。 Measuring blood concentration of anti- HIV drugs is important for the optimization of the treatment and the prevention of the acquisition of drug-resistance. The drug concentration in hair is thought to reflect average blood concentration of the drug, and it is expected that we can estimate the long-term change of the blood levels of the drug by measuring drug concentrations of hairs from hair roots to hair tips. This time we established the beads spall method for the drug extraction from the hair, and we measured the hair and blood concentrations of tenofovir (TFV) and emtricitabine (FTC), which are reverse transcriptase inhibitors, in HIV infected patients by using a liquid chromatography mass spectrometry. As a result, the possibilities to be able to estimate the long-term change of the blood levels of TFV and FTC by measuring the drug concentration of the hair were shown.
Notes	研究種目：基盤研究(C)(一般) 研究期間：2013～2015 課題番号：25461521 研究分野：感染症学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_25461521seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２８ 年　 ６ 月　 ８ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2013～2015
課題番号：２５４６１５２１

研究課題名（和文）服薬コンプライアンス評価法としての毛髪薬物濃度測定法の開発

研究課題名（英文）The development of the measuring assay for anti- HIV drug concentration of hair as the evaluation method of medication compliance

研究代表者
岩田　敏（Iwata, Satoshi）

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：１０１２９３４８

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,800,000円

研究成果の概要（和文）：血中抗HIV薬濃度の測定は、治療効果の最適化と薬剤耐性獲得の防止のために重要である。一方、毛髪中の薬剤量は平均的な薬剤血中濃度を反映していると考えられており、毛根側から先端にかけての毛髪中薬剤量を測定することにより血中濃度の長期的推移を推定できることが期待される。今回我々はビーズ破砕による毛髪からの薬剤抽出法を確立し、逆転写酵素阻害剤であるテノフォビル(TFV)とエムトリシタビン(FTC)服用中の患者の毛髪および血漿中の薬剤量を、LC-MS/MSを用いて測定した。その結果、毛髪中薬剤量を測定することにより、TFVとFTCの血中濃度の長期的推移を推定できる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：Measuring blood concentration of anti- HIV drugs is important for the optimization of the treatment and the prevention of the acquisition of drug-resistance. The drug concentration in hair is thought to reflect average blood concentration of the drug, and it is expected that we can estimate the long-term change of the blood levels of the drug by measuring drug concentrations of hairs from hair roots to hair tips.
This time we established the beads spall method for the drug extraction from the hair, and we measured the hair and blood concentrations of tenofovir (TFV) and emtricitabine (FTC), which are reverse transcriptase inhibitors, in HIV infected patients by using a liquid chromatography mass spectrometry. As a result, the possibilities to be able to estimate the long-term change of the blood levels of TFV and FTC by measuring the drug concentration of the hair were shown.

研究分野：感染症学

キーワード：　HIV　薬剤定量　毛髪中薬剤定量　ツルバダ　テノフォビル　エムトリシタビン

１．研究開始当初の背景

国内における HIV 感染者およびエイズ患者数報告数は年々増加傾向が認められている[1]。累積感染者、患者数は数万人と予想されており、HIV 感染拡大防止策は重要な課題である。

近年の研究において、HIV 感染者への早期治療と、抗 HIV 剤ツルバダを用いた未感染のパートナーへの予防服用が、HIV 感染防止に有用であることが報告された[2][3]。ツルバダは、逆転写酵素阻害剤であるテノフォビル(TFV)とエムトリシタビン(FTC)の合剤であり、服薬が１日１錠であることから、HIV 治療薬として国内でも広く用いられている。

感染者が良好な抗ウイルス効果を達成するには 95%以上の服薬アドヒアランスを要することが知られている[4]。不規則な治療はウイルスが薬剤耐性を獲得し、薬剤耐性ウイルスの感染拡大が危惧されるため、服薬アドヒアランスを評価する方法が求められている。

服薬アドヒアランスの評価法として、血中薬剤濃度の測定が挙げられるが、薬剤の代謝は個人差があり、血中薬剤濃度は日内変動が大きいことが知られている。一方、毛髪中の薬剤量は平均的な薬剤血中濃度を反映していると考えられており、毛根側から先端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推移を推定できることが期待される。

２．研究の目的

本研究では、(1) 毛髪中 TFV および FTC 定量法を開発し、(2)ツルバダの服薬アドヒアランス及び血中薬剤濃度を評価する方法を確立することを目的とする。

３．研究の方法

(1)対象検体

慶應義塾大学病院に通院している、ツルバダ服用開始後 35 日と 56 日の 2 人の感染者から毛髪と血液を採取した。毛髪および血液の採取は慶應義塾大学医学部倫理委員会の審査を受けた後（承認番号 20110011)、患者の同意を得て行った。

(2)毛髪からの薬剤抽出

毛髪は毛根を除いた後 10 mm 毎に切断し、それぞれを検体として抽出を行った。

抽出は以下の手順で行った。検体となる毛髪を 2.0 ml アシストチューブに入れ、直径 2 mm のジルコニアビーズ 8 粒、メタノール 200 μl、ヒト血漿 10 μl、水または検量線用 TFV・FTC 10 μl、抽出コントロールとして用いる 100 nM AZT・3TC 10 μl をそれぞれ加えた後に、ビーズ破砕装置 micro smash MS100(TOMY)を用いて 3500 rpm で 5 分間破砕した。破砕後、チューブを氷上で静置し、さらに破砕と氷上静置を 3 回繰り返した。破砕後スピンダウンし、上清を別チューブに移して乾燥させ、5 mM ギ酸 20 μl で溶解して測定検体を作製した。

(3)血液からの薬剤抽出

血液は CPD 入り採血管で採血し、700 ×g で 10 分遠心して血漿を分離した。1.5 ml エッペンドルフチューブに検体血漿を 10ul 入れ、水または検量線用 TFV・FTC 10 μl、抽出コントロールとして用いる 200 nM AZT・3TC 10 μl をそれぞれ加え、アセトニトリル 70 μl を加えて沈殿させた。沈殿後スピンダウンし、上清 50ul を別チューブに移して乾燥させ、5 mM ギ酸 20 μl で溶解して測定検体を作製した。

(4)LC-MS/MS による薬剤の定量

検体中の薬剤定量は LC-MS/MS で行った。使用機器として LCMS-8030（SHIMADSU）を用い、LC カラムは Inertsil ODS-3 C18 カラム（GL サイエンス)、移動相として水層に 5 mM ギ酸、有機溶媒相に 5 mM ギ酸／アセトニトリルを用いた。流速は 0.2 ml/分、測定時間は 20 分とした。濃度勾配は有機溶媒濃度 0%で開始し、1 分毎に 5%ずつ 10 分で 50%まで上昇させ、その後すぐ 0%に戻し、0%のまま 20 分まで継続させた。TFV 測定では、プレカーサーイオンは 288.1 u を選択し、プロダクトイオンは 176.1 u を選択した。FTC 測定では、プレカーサーイオンは 248.1 u を選択し、プロダクトイオンは 130.0 u を選択した。

４．研究成果

(1)LC-MS/MS を用いた毛髪中 TFV および FTC 定量法の開発

①直線性の検討

薬剤を内服していない健常人毛髪に、測定検体 2μl あたりの薬剤量がそれぞれ 1、3、10、30、100、300、1000 fmol となるように TFV、FTC をスパイクし、毛髪からの薬剤抽出を行って測定検体を作製し、TFV、FTC のイオン強度について LC-MS/MS で測定した。

薬剤量を横軸に、MS で測定したイオン強度を縦軸にプロットした結果、TFV では 3 fmol から 1000 fmol、FTC では 1 fmol から 1000 fmol の範囲において良好な直線性が得られた(TFV: r^2=0.9987、FTC: r^2=0.9998)。

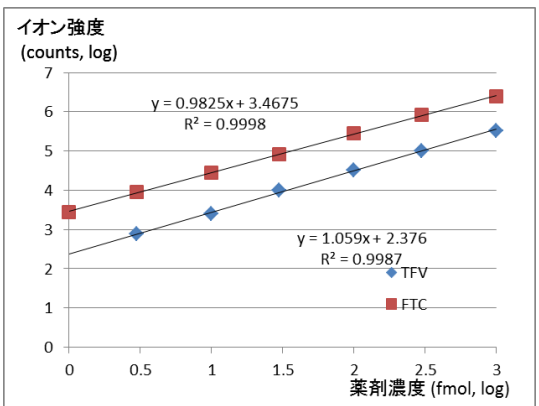

図1　直線性の検討

②定量限界の検討

直線性の検討と同様の手順で 10、3、1、0.3 fmol の 4 段階について、それぞれ 5 回の測定を行った。測定時に見られる薬剤由来のピークの高さが基準値の 10 倍以上となる場合、定量可能とした。TFV では、10 fmol は 5 検体中すべての検体を定量できたが、3 fmol は 5 検体中 4 例、1 と 0.3 fmol はすべて定量できなかった。FTC では、10、3、1 fmol は 5 検体中すべての検体を定量できたが、0.3 fmol はすべて定量できなかった（表 1）。

TFV は 10 fmol から、FTC は 1 fmol から 100%定量可能であった。

表1 検出限界の検討

TFV (fmol)	検体数	定量可	定量不可	%
10	5	5	0	100
3	5	4	1	80
1	5	0	5	0
0.3	5	0	5	0

FTC (fmol)	検体数	定量可	定量不可	%
10	5	5	0	100
3	5	5	0	100
1	5	5	0	100
0.3	5	0	5	0

③再現性の検討

直線性の検討と同様の手順で 10、100、1000 fmol の 3 段階について、5 回の同時測定を行った。また同様な測定を、日を変えて 2 回行った。TFV の実験内変動係数は、10 fmol が 6.2%、100 fmol が 5.1%、1000 fmol が 4.5%であり、実験間変動係数は 10 fmol が 19%、100 fmol が 9.0%、1000 fmol が 13%であった。FTC の実験内変動係数は、10 fmol が 4.5%、100 fmol が 6.0%、1000 fmol が 5.2%であり、実験間変動係数は 10 fmol が 7.1%、100 fmol が 7.6%、1000 fmol が 9.6%であった。

測定結果の実験内変動係数は 6.2%以下、実験間変動係数は 19%以下と、良好な再現性が得られた。

表2 再現性の検討

TFV (fmol)	Intra-experimental CV (%)	Inter-experimental CV (%)
10	6.2	19
100	5.1	9.0
1000	4.5	13

FTC (fmol)	Intra-experimental CV (%)	Inter-experimental CV (%)
10	4.5	7.1
100	6.0	7.6
1000	5.2	9.6

(2)ツルバダの服薬アドヒアランス及び血中薬剤濃度を評価する方法の確立

①ツルバダ服用者毛髪中薬剤の定量

服用開始後 35 日の感染者の毛髪を測定した結果、毛根側から 10 ㎜の毛髪から TFV 12 fmol、FTC 253 fmol が検出され、10 ㎜以降の毛髪からは両薬剤とも検出されなかった。

服用開始後 56 日の感染者の毛髪を測定した結果、毛根側から 10 ㎜の毛髪から FTC 15.1 fmol、10 ㎜から 20 ㎜の毛髪から FTC 6.1 fmol が検出され、20 ㎜以降の毛髪からは FTC が検出されず、TFV はすべての部分で検出されなかった。

ヒトの毛髪は 1 カ月でおよそ 10 ㎜伸長することが知られており、2 例とも薬剤を服用した期間生長した部分から薬剤が検出された。

表3. ツルバダ服用者毛髪中薬剤の定量

		毛髪中薬剤量 (fmol)				
		0-10 mm	10-20 mm	20-30 mm	30-40 mm	40-50 mm
patient1 (服薬後35日)	TFV	12	-	-	-	-
	FTC	253	-	-	-	-
patient2 (服薬後56日)	TFV	-	-	-	/	/
	FTC	15	6.1	-	/	/

-：定量限界未満
/：検体なし

②ツルバダ服用者血中薬剤の定量と毛髪中薬剤量との比較

服用開始後 35 日の感染者の血漿中薬剤濃度を測定した結果、TFV が 771 fmol/ul、FTC が 3492 fmol/ul であった。毛髪の直径を測定して毛髪体積を算出し、血漿中薬剤濃度に対する毛髪中薬剤濃度の濃縮比を調べた結果、TFV が 0.307 倍に対して FTC は 1.44 倍であった。

服用開始後 56 日の感染者の血漿中薬剤濃度を測定した結果、TFV が 230 fmol/ul、FTC が 417 fmol/ul であった。FTC の血漿中薬剤濃度に対する毛髪中薬剤濃度の濃縮比は 1.24 倍であった。

血液から毛髪への薬剤移行性は薬剤によって異なっており、TFV は FTC に対して 5 分の 1 であることがわかった。

表4. ツルバダ服用者血中薬剤の定量と毛髪中薬剤量との比較

		血中薬剤濃度 (fmol/ul)	毛髪中薬剤濃度 (fmol/mm^3)	毛髪中薬剤量／血漿中薬剤量比（濃縮比）
patient1 (服薬後35日)	TFV	771	236	0.307
	FTC	3492	5035	1.44
patient2 (服薬後56日)	TFV	230	-	-
	FTC	417	517	1.24

-：定量限界未満

(3)成果のまとめと今後の展望

今回の研究で、高感度で良好な再現性を持つ毛髪中 TFV・FTC の定量法を開発することができた。

また薬剤服用者の毛髪を測定した結果、薬剤を服用した期間に生長した部分から薬剤が検出された。この事から、TFV と FTC の血中濃度の長期的推移を推定できる可能性が示された。

毛髪中薬剤濃度と血中薬剤濃度を比較した結果、血液から毛髪への薬剤移行性は薬剤

によって異なっており、TFV は FTC に対して5分の1であることがわかった。

本研究期間中に毛髪中 TFV・FTC の検出について報告された論文が 2 報存在するが[5][6]、どちらも毛髪の部分抽出は行っておらず、血中濃度の長期的推移の推定には言及していなかった。今後より多くの検体について測定と解析を行い、論文化を目指したい。

＜引用文献＞

① 厚生労働省、エイズ動向委員会報告、http://api-net.jfap.or.jp/status/ (2016 年 5 月 27 日)

② Grant RM, Lama JR, Anderson PL, McMahan V, Liu AY, Vargas L, Goicochea P, Casapía M, Guanira-Carranza JV, Ramirez-Cardich ME, Montoya-Herrera O, Fernández T, Veloso VG, Buchbinder SP, Chariyalertsak S, Schechter M, Bekker LG, Mayer KH, Kallás EG, Amico KR, Mulligan K, Bushman LR, Hance RJ, Ganoza C, Defechereux P, Postle B, Wang F, McConnell JJ, Zheng JH, Lee J, Rooney JF, Jaffe HS, Martinez AI, Burns DN, Glidden DV; iPrEx Study Team. Preexposure chemoprophylaxis for HIV prevention in men who have sex with men. N Engl J Med. 2010 Dec 30;363(27):2587-99. doi: 10.1056/NEJMoa1011205.

③ Donnell D, Baeten JM, Kiarie J, Thomas KK, Stevens W, Cohen CR, McIntyre J, Lingappa JR, Celum C; Partners in Prevention HSV/HIV Transmission Study Team. Heterosexual HIV-1 transmission after initiation of antiretroviral therapy: a prospective cohort analysis. Lancet. 2010 Jun 12;375(9731):2092-8. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60705-2.

④ Paterson DL, Swindells S, Mohr J, Brester M, Vergis EN, Squier C, Wagener MM, Singh N. Adherence to protease inhibitor therapy and outcomes in patients with HIV infection. Ann Intern Med. 2000 Jul 4;133(1):21-30.

⑤ Baxi SM, Liu A, Bacchetti P, Mutua G, Sanders EJ, Kibengo FM, Haberer JE, Rooney J, Hendrix CW, Anderson PL, Huang Y, Priddy F, Gandhi M. Comparing the novel method of assessing PrEP adherence/exposure using hair samples to other pharmacologic and traditional measures. J Acquir Immune Defic Syndr. 2015 Jan 1;68(1):13-20. doi: 10.1097/QAI.0000000000000386.

⑥ Gandhi M, Glidden DV, Liu A, Anderson PL, Horng H, Defechereux P, Guanira JV, Grinsztejn B, Chariyalertsak S, Bekker LG, Grant RM; iPrEx Study Team. Strong Correlation Between Concentrations of Tenofovir (TFV) Emtricitabine (FTC) in Hair and TFV Diphosphate and FTC Triphosphate in Dried Blood Spots in the iPrEx Open Label Extension: Implications for Pre-exposure Prophylaxis Adherence Monitoring. J Infect Dis. 2015 Nov 1;212(9):1402-6. doi: 10.1093/infdis/jiv239.

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 3 件）

1) Yamazaki S, Kondo M, Sudo K, Ueda T, Fujiwara H, Hasegawa N, Kato S: A Qualitative Real-time PCR assay for HIV-1 and HIV-2 RNA. Jpn J Infect Dis. 2016 Jan 8. [Epub ahead of print]査読有

2) Kinai E, Gatanaga H, Kikuchi Y, Oka S, Kato S: Ultrasensitive method to quantify intracellular zidovudine mono-, di- and triphosphate concentrations in peripheral blood mononuclear cells by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J Mass Spectrom. 2015 Jun;50(6):783-91.査読有

3) 須藤 弘二，佐野 貴子，近藤 真規子，今井 光信，加藤 真吾：HIV 郵送検査の現状と展望．日本エイズ学会誌 17 巻:138-142，2015 査読有

〔学会発表〕（計 2 件）

1) 小谷 宙，須藤 弘二，藤原 宏，西松 直美，山口 雅也，長谷川 直樹，岩田 敏，加藤 真吾，根岸 昌功，岡本 真一郎：viral RNA および proviral DNA の両者において CCR5 指向性を確認した HIV-1 感染患者に対する Maraviroc+Tenofovir/Emtricitabine による導入療法. 第 29 回日本エイズ学会学術集会・総会（2015 年 11 月 29 日～12 月 1 日）「東京ドームホテル（東京都・文京区）」

2) 矢永 由里子，渡久山 朝裕，井村 弘子，紅林 洋子，平塚 信子，光畑 知佐子，平良 勝也，長谷川 直樹，岩田 敏，加藤 真吾：HIV 検査相談の研修をデザインするということ(その 2) 仕上げの試行と総括について. 第 29 回日本エイズ学会学術集会・総会（2015 年 11 月 29 日～12 月 1 日）「東京ドームホテル（東京都・文京区）」

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

なし

６．研究組織
(1)研究代表者
岩田　敏（IWATA, Satoshi）
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：１０１２９３４８

(2)研究分担者
　なし

(3)連携研究者
長谷川　直樹（HASEGAWA, Naoki）
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：２０１９８７２４

加藤　真吾（KATO, Shingo）
慶應義塾大学・医学部・専任講師
研究者番号：１０１７７４４６

(4)研究協力者
藤原　宏（FUJIWARA, Hiroshi）
慶應義塾大学・医学部・助教

須藤　弘二(SUDO, Koji)
慶應義塾大学・医学部・特任助教
研究者番号：３０５６６８９９