

## 病態時におけるキノロン系抗菌薬の体内動態に関する研究

分担研究者 岩本喜久生 島根医科大学医学部附属病院薬剤部長

**研究要旨** 硝酸ウラニルで惹起させた急性腎障害ラットにおけるシプロフロキサシンの血漿中半減期は正常ラットに比べ約2倍に延長し、全身クリアランスは約1/4に低下した。一方、四塩化炭素惹起による急性肝障害ラットでは、半減期は約1.5倍に延長し、クリアランスは約1/2に低下した。いずれの病態時においても、シプロフロキサシンの脳内濃度は正常時に比べ血中濃度上昇に対応して有意に上昇したが、脳内濃度/血清中非結合形濃度の比は正常時に比べて減少することが明らかとなり、これらの病態時には非結合形薬物の中枢移行性が低下することが明らかとなった。これらの病態時におけるシプロフロキサシンの中枢毒性の予測には、血中濃度やその蛋白結合率以外の要因も考慮すべきことが示唆された。

### A. 研究目的

シプロフロキサシンは最も繁用されるキノロン系抗菌薬の一つであり、他のキノロン薬と同様に、投与後、大半が未変化体のままで尿中排泄されるが、他薬に比べて腎外消失の寄与も無視し得ないことが知られている。さらに、キノロン薬全般については、臨床使用時、その中枢移行による痙攣、錯乱、抑うつ等の中枢性副作用の発現に対する注意が喚起されている。従って、腎障害あるいは肝障害時におけるキノロン薬の体内動態、とくに中枢移行性の変化について精査するための基礎研究は、本薬剤の安全性に重点を置く適正使用の確保の点で極めて重要な課題である。本研究では、シプロフロキサシンを用いて、急性腎障害、急性肝障害モデルラットを作成し、シプロフロキサシンの血中薬物動態と脳内移行性におよぼすこれらの病態の影響について検討した。

### B. 研究方法

#### 1. 急性腎障害・肝障害ラットの作成

Giacominiらの方法（J.Pharm.Sci.70,112-121,1981）に準じて、キノロン薬投与実験の5日前にラット尾静脈より生理食塩液に溶解させた硝酸ウラニル5mg/kgを投与することにより、急性腎障害モデルを作成した。一方、キノロン薬投与実験の24時間前にオリーブ油に溶解させた四塩化炭素1ml/kgをラットに経口投与することにより、急性肝障害モデルを作成した。それぞれの対象群には生理食塩液およびオリーブ油をそれぞれ同一の方法で投与したラットを用いた。

#### 2. シプロフロキサシン投与実験

シプロフロキサシン投与の前日（約20時間前）、ラット頸静脈カニューレ留置術を施した。塩酸シプロフロキサシンを生理食塩液に溶解させ、シプロフロキサシンとして10, 20, 30mg/kgの用量にて対象群に、また10mg/kgにて腎障害群および肝障害群に、前

述のカニュレより急速静注した。投与後、120minまで経時的にカニュレより約0.1mlずつ採血し、直ちに血漿画分を分取した。120minの最終採血時点のあと、血清蛋白結合率測定用の血液試料および脳組織を採取した。脳組織は、小脳、脳幹、硬膜、脈絡叢、主要血管およびくも膜下血管を除去したものを秤量した。

### 3. 急性障害モデルラットの血液生化学検査等

血清クレアチニン、尿中窒素、ALT、AST濃度は、Reflotoronにて測定した。血清アルブミン濃度は市販キットを使用するBCG法により測定した。

### 4. 血中および脳組織中濃度の定量

全血中、血漿中、血清中、限外ろ過液中および脳組織中薬物濃度は、既開発済みのHPLC法により定量した。除去不能として残存する脳内微小血管によるコンタミ薬物量は、すでに確立している補正式を用いて実測値から除くことにより、正確な脳組織中薬物濃度を算定した。

### 5. データ解析

血漿中シプロフロキサシン濃度の経時変化の解析は非線形最小自乗法回帰解析プログラムMULTIを用いて行い、消失半減期、全身クリアランス、中央コンパートメント分布容積、末梢コンパートメント分布容積などの動態パラメータを算定した。一方、分布平衡達成後の脳内シプロフロキサシン移行性は補正脳内濃度／血清中非結合形濃度の比で評価した。

## C. 研究結果

### 1. 急性腎障害および急性肝障害モデル作成の評価

硝酸ウラニル投与ラットでは血清クレアチニンおよび尿中窒素のレベルが正常群の10倍以上の高値を示し、血清アルブミンレベルは正常群に比べ約20%低値を示した。ALTおよびASTレベルは正常群と差は認められなかった。一方、四塩化炭素投与ラットではALTおよびASTレベルが正常群のそれぞれ約70倍、50倍の高値を示した。その他の生化学検査値は正常群と同等であった。以上の検査結果から、硝酸ウラニルおよび四塩化炭素投与によりそれぞれ急性腎障害および急性肝障害が惹起されていることが確認された。

### 2. 血漿中シプロフロキサシン動態

急性腎障害群、急性肝障害群、対象群とも、急速静注後のシプロフロキサシンの血漿中濃度の経時的推移はbiexponentialな消失を示した。硝酸ウラニル惹起腎障害ラットでは対象群に比べ、いずれの時点においても約2～5倍以上の血漿中濃度を示した。一方、四塩化炭素惹起肝障害ラットでは、正常群に比べ、有意に高い血漿中濃度推移を示すものの、腎障害群ほど顕著な上昇ではなかった。血漿中濃度推移の解析の結果、正常群に比べ、腎障害群では、消失半減期が約2倍に延長、全身クリアランスが約25%に低下、中央および末梢コンパートメント分布容積が約50%に減少、また、肝障害群では、半減期が約1.5倍に延長し、クリアランスが約50%に低下することが明らかとなった。

限外ろ過法による血清蛋白結合率測定の結果、いずれの障害群とも、シプロフロキサシンの血清蛋白結合率は、正常群の約6～7割に低下することが明らかとなった。ただし、障害群での血清中総薬物濃度は正常群のその約2～5倍であった。

### 3. 病態モデルラットにおけるシプロフロキサシンの中枢移行性

正常群に比べ、投与120min後の脳内シプロフロキサシン濃度は、腎障害群および肝障害群においてそれぞれ約3倍および2倍へと上昇を示した。しかし、移行性の指標である脳内濃度/血清中非結合形濃度の比で比較すると、腎障害群および肝障害群では正常群のそれぞれ約35%、25%減少することが明らかとなった。さらに、正常群ラットに3水準のシプロフロキサシン用量を投与後の血清非結合形薬物濃度と脳内濃度との間には有意な比例関係が存在することを明らかにした。その相関関係図上に、腎障害ラットおよび肝障害ラットでのデータをプロットすると、いずれの障害群とも相関の回帰直線より下方にはずれ、とくに腎障害群でその傾向が顕著であることがわかった。

#### D. 考察

硝酸ウラニル投与および四塩化炭素投与により惹起した急性腎障害および肝障害ラットは今回のキノロン薬の体内動態および中枢移行性に関する基礎研究に十分使用しうる病態モデルであると考えられた。

他のキノロン薬に比べ、シプロフロキサシンの腎外クリアランスはかなり寄与率が高く、動物種およびヒトでの若干の差異があるものの、それは全身クリアランスのうち約40~50%を占めると報告されている。したがって、本薬の腎障害および肝障害モデルラットでの研究は極めて重要な意味を有する。今回の肝障害モデルラットでは腎障害モデルラットに比べて、シプロフロキサシンの血中からの消失延長すなわち全身クリアランス低下への影響は相対的に小さくあらわれたものの、本薬の全身クリアランスにおける肝クリアランスの寄与の大きさが確認された。いずれの障害群においても、血中シプロフロキサシン総濃度の上昇にともなう脳内薬物濃度の増大が認められたが、血清非結合形濃度に着目したデータ解析では、正常群の脳内濃度/非結合形濃度比よりも低値を示した。すなわち、急性腎障害群および肝障害群のいずれにおいても、正常群に比べて、シプロフロキサシン脳内濃度は血中濃度の上昇に対応して増加するものの、その血清中非結合形分画の中枢移行性は逆に低下することが示唆された。今後、それぞれの障害・病態時での血液-脳関門の薬物透過性の変化およびそれにおよぼす障害・病態時での内因性物質の変動の影響などについて精査する必要があると考えられる。

#### E. 結論

急性腎障害および急性肝障害により、シプロフロキサシンの血中動態プロファイルは大きく変動し、顕著な全身クリアランス低下および消失遅延を受け、正常群に比べ数倍の血中濃度上昇をもたらすこと、腎障害群でその影響はより顕著に出現することが明らかとなった。さらに、いずれの障害群においても、その血中薬物濃度上昇に対応する脳内薬物濃度の上昇が認められたが、血清非結合形薬物の中枢移行性は逆に低下することが明らかとなった。これらの研究成果は、病態時におけるキノロン薬の中枢性副作用の防止などの適正使用に資する情報となりうる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

K.Naora, N.Ichikawa, H.Hirano, K.Iwamoto: Distribution of ciprofloxacin

into the central nervous system in rats with acute renal or hepatic failure. J.Pharm.Pharmacol., 51, 609-616(1999)

## 2. 学会発表

(1)K.Iwamoto,N.Ichikawa,K.Naora,H.Hirano: Effects of renal dysfunction on the permeability of acetazolamide across the blood-brain-barrier in rats. 59th International Congress of FIP, 1999年9月, Barcelona

(2)Q.Li,K.Naora,H.Hirano,H.Okunishi,K.Iwamoto: Lipophilicity determines distribution of quinolone antibiotics in rats. 第38回日本薬学会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会、1999年10月、高知市

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）  
分担研究報告書

ヨード造影剤の有害作用に関する研究

分担研究者 大石 了三 九州大学医学部附属病院薬剤部教授

**研究要旨** 造影剤は臨床使用に際し、高品質のバイアル製剤でも、ディスポーザブルシリンジへの移し替え操作と注入速度に依存して、シリコン由来の微粒子汚染が引き起こされ、これは造影剤による肺浮腫の増悪因子であることが判明した。内皮細胞由来の構成型一酸化窒素（NO）は造影剤の肺血管透過性亢進作用に抑制的役割を示し、NO産生量の低下は肺障害発現の危険因子となることが判明した。卵巣摘出ラットでは造影剤による肺障害の程度が有意に増悪し、エストラジオール投与により抑制され、更年期が造影剤による肺障害の危険因子であること、エストラジオール補充は副作用の軽減に有用であることが示唆された。

A. 研究目的

ヨード造影剤は尿路撮影、血管造影、CTなどのX線造影検査に広く使用されており、その使用量は年々増加している。造影剤に期待される作用はX線吸収という物理的な作用のみであり、通常の治療薬とは異なり生物学的作用は不要である。造影剤の場合、薬理作用はほとんどが副作用として現れることになる。現在、主流となっている非イオン性造影剤の副作用は、以前のものに比べればその発生率はかなり減少しているが約3%に見られており、0.04%は重篤な副作用である。極めて多い使用件数を考えると重篤な副作用発現件数は年間数千例以上にも達する。しかも、これらの発現機序は不明の点が多く副作用の予防対策も十分でない。

本研究の目的は造影剤の有害作用発現に及ぼす使用時の品質面と患者側の要因を明らかにし、予防対策を目指すことにある。まず、造影剤の臨床使用時発生する不溶性微粒子汚染の現状を把握する。体内に注入されたこのような微粒子は血管内で塞栓あるいは血管内皮を傷害することにより有害作用を発現する危険性がある。とくに血管床に富む肺は微粒子による影響を受けやすい臓器であり、造影剤による肺浮腫発現は重篤な副作用の一つであるため、微粒子汚染の造影剤による肺浮腫に及ぼす影響をラットを用いて検討する。さらに、肺血管透

過性亢進に対するNOの役割に着目し、造影剤による肺障害に対する関与を明らかにする。

女性の更年期後は造影剤による副作用の発生頻度が高いと言われている。一方、エストロゲンは血管内皮のNO産生量に影響を及ぼすことが判明している。そこで、患者側の要因を探索することを目的に更年期モデルとして卵巣摘出モデル動物を作成し、更年期における造影剤の肺障害発現とエストラジオールの効果についても検討した。

B. 研究方法

1. 造影剤のシリコン汚染による不溶性微粒子の増加

バイアル製剤をディスポーザブルシリンジ（100mL）に移し替えた後、CT用自動注入装置（AUTOENHANCE A30、根本杏林堂）を用いて、1、2、3 mL/秒の注入速度で全量をガラス容器に押し出した。不溶性微粒子数は、液中微粒子カウンター（APSS-200、PMS社製）により測定し、日本薬局方に従い容器当たり10 $\mu$ m以上の個数6,000個、25 $\mu$ m以上の個数600個を評価基準とした。また、別途に不溶性微粒子をフィルターでろ取し、走査型電子顕微鏡とX線分散分析マイクロアナライザーにより微粒子本体を同定した。

2. 造影剤による肺浮腫

造影剤投与一定時間後、肺を摘出し、湿

重量及び乾燥重量により水分含量を求めた。Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>含量は肺乾燥重量測定後、硝酸-60%過塩素酸(2:1)により肺を灰化させて試料を調製し、原子吸光光度法によって測定した。対照は生食投与群とし、シリコン油を一定量添加した造影剤及びシリコン油単独の影響についても同様に調べた。

### 3. 肺血管透過性に及ぼすNOの役割

エバンスブルーの肺移行性を指標として肺血管透過性を求めた。造影剤投与一定時間後、肺動脈から生食を灌流することにより血管内のエバンスブルーを取り除き、肺を摘出した。ホルムアミド抽出法により肺組織中のエバンスブルー濃度を測定した。L-NNA(NO合成酵素阻害剤)及びL-アルギニン(基質)の前処置は造影剤投与15分前に行った。また、別途に摘出した肺を直ちに20%ホルマリン中性液で固定し、パラフィン処理を施して、切片標本を作成した。常法によりヘマトキシリン-エオジン染色を施し、染色標本を作成した。

### 4. 更年期モデル動物における造影剤による肺障害

雌性ラットの両側卵巣を摘出し、28日後にエバンスブルーの肺血管透過性を調べた。また、術後7日目より一週間毎にエストラジオール(ペラニン・デポー注)を大腿筋肉内へ注射し、その効果を調べた。

## C. 研究結果

### 1. 造影剤注入時の不溶性微粒子

造影剤をディスポーザブルシリンジに吸引して移し替えた後、再度押し出した造影剤中では不溶性微粒子数が日本薬局方の基準値を著しく超えて増加した。増加微粒子について走査型電子顕微鏡に装着したX線分析装置を用いて組成元素分析を行うとシリコン及びイオウ元素が検出された。また、ディスポーザブルシリンジ由来の微粒子数は注入速度に依存しており、特に3mL/秒で著明な増加が認められた。

### 2. 造影剤による肺浮腫発現に及ぼすシリコン汚染の影響

シリコン汚染された造影剤を投与すると、造影剤単独よりも大きく相対的肺重量、水分含量、Na<sup>+</sup>含量が増加し、K<sup>+</sup>含量が低下した。摘出した肺は肉眼的にも、造影剤により投与量に依存して肥大が認められ、同

じ投与量では、シリコン汚染造影剤による肥大が著明であった。シリコン単独投与でも18.75 mL/kg以上の投与では肺浮腫の発現が認められた。

### 3. 造影剤による肺血管透過性亢進におけるNOの役割

造影剤の投与により用量依存的に肺血管透過性は亢進した。特に非イオン性造影剤よりもイオン性造影剤で肺血管透過性は著明であった。また、L-NNAの前処置により造影剤による肺血管透過性の亢進が用量依存的に増強され、L-アルギニンによってそれは抑制された。しかし、D-アルギニンではこの抑制効果は認められなかった。形態学的観察においてもエバンスブルー血管透過性亢進が認められた。さらに、病理組織学的検討の結果、L-NNAで前処置した造影剤投与群では単独投与群と比較して血管周囲の著明な水分貯留の増加が観察された。

### 4. 更年期モデル動物における造影剤による肺障害

両側卵巣摘出群は偽手術群と比較して血管透過性が1.4-2.6倍増加した。卵巣摘出による造影剤の血管透過性亢進の増悪反応は、エストラジオール投与により用量依存的に抑制された。

## D. 考察

注射剤中の不溶性微粒子により肺、肝臓、腎臓における塞栓症が多く報告されている。同様に、異物が混入した造影剤による障害も塞栓症の報告が多い。このことから、微粒子による血管壁の損傷により血栓の形成が誘発され、微小血管の閉塞や血管透過性の亢進が起こることが考えられる。本研究においてディスポーザブルシリンジによる造影剤の注入時にシリンジ内壁からのシリコン遊離により不溶性微粒子が異常に増加すること、さらに動物実験でシリコン汚染によって造影剤による肺浮腫が増悪することが明らかとなった。本知見は造影剤注入用のシリンジ製剤の開発段階で副作用軽減を企図する際の有用な指針になり得ることを示唆するものである。

造影剤の静脈内投与により、ラット肺へのエバンスブルー漏出量が増加し、血管周囲の浮腫の形成が認められた。この結果か

ら、造影剤は肺血管透過性を亢進させることにより、肺浮腫を発現することが示唆された。エバンスブルー漏出法を用いて、NO合成酵素の基質であるL-アルギニンと阻害剤であるL-NNAが造影剤による肺血管透過性の亢進をそれぞれ抑制、または増悪させた。これらの知見は、内因性のNO産生量の低下は造影剤による肺障害発現の危険因子となり得ることを示唆している。最近、内皮細胞由来の構成型NO合成酵素の遺伝子多型が報告されており、日本人の約10%は変異株と言われている。変異を有する場合は血中NO濃度が低下することが確認されており、これら遺伝子多型と造影剤による副作用発現との関連性についての検討も重要である。

更年期モデル動物では造影剤による肺血管透過性の亢進作用が認められた。更年期後のエストロゲン分泌低下はNO産生低下を引き起こすことが判明している。NOは血管内皮細胞の機能維持に有利に働くことや、白血球、血小板凝集抑制により血管内皮に対して保護的に作用することが報告されている。以上の結果から、ホルモンバランスが不安定な状態にあると考えられる閉経を含む更年期が、女性における造影剤による副作用の発生頻度を高くする危険因子であると推察される。また、更年期障害治療薬でもあるエストラジオールは、更年期以降における薬物性副作用の軽減化に有用であることが示唆された。

## E. 結論

1. 造影剤の注入時のバイアル製剤からディスプレイブルシリンジへの移し替え操作および高速注入に伴い、シリンジ内壁からのシリコン遊離による不溶性微粒子が異常に増加する。

2. 造影剤のシリコン汚染は肺障害作用の増悪因子となる

3. 造影剤による血管透過性亢進に対してNOは抑制的役割を示すことが示唆された。

4. 更年期は造影剤による肺障害の危険因子であり、それはエストラジオール投与により回避される。

以上の結果は、造影剤の有害作用発現に関する危険因子を実験的に提示するもので

副作用予防の対策が可能となり、また、リスクの高い患者を注意深くモニターしていくことで、重篤な副作用の予防と早期発見につながると考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

(1) Sendo, T., Hirakawa, M., Fujie, K., Kataoka, Y. and Oishi, R.: Contrast media-induced pulmonary edema is aggravated by silicone contamination in rats. *Radiology*, 212(1): 97-102, 1999.

(2) Hirakawa, M., Sendo, T., Kataoka, Y. and Oishi, R.: High-speed injection of radiographic contrast media induces severe particulate contamination. *Br. J. Radiol.*, 72: 998-999, 1999.

### 2. 学会発表

(1) 武田百合、古田和歌子、千堂年昭、片岡泰文、大石了三: 造影剤による肺障害発現における一酸化窒素の役割. 日本薬学会119年会、徳島、1999年3月

(2) 富永宏治、古田和歌子、千堂年昭、片岡泰文、大石了三: 更年期モデル動物では造影剤による肺障害が増悪する. 日本薬学会120年会、岐阜、2000年3月

分担研究報告書

LC/MS-MS を用いたヒト尿中ロイコトリエン E<sub>4</sub> 測定法の開発と応用

分担研究者 水柿道直 東北大学医学部附属病院薬剤部

ロイコトリエン (LT) は気管支収縮作用、気道粘液分泌促進作用、白血球遊走作用、血管透過性亢進作用などの多様な作用を有し、アレルギー性疾患や炎症性疾患の進展に重要な役割を果たしている。特に、LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub> などの cysteinyl LT の産生亢進はアレルギー性疾患や炎症性疾患の病態と密接に関連すると考えられるため、その生体内挙動についての定量的解析は病態の把握や薬物療法の治療効果の判定に有用な情報を提供するものと期待される。

そこで本研究では、液体クロマトグラフィー/タンデムマススペクトロメトリー (LC/MS-MS) を用いて、cysteinyl LT 産生の指標となる尿中 LTE<sub>4</sub> の測定法の開発を行い、健常成人及び少数の喘息患者の尿中 LTE<sub>4</sub> 量の定量を行った。

その結果、確立した LC/MS-MS を用いた尿中 LTE<sub>4</sub> 測定法は、従来の方法に比べ簡便に測定が可能であり、また高い信頼性と再現性を有することが示された。また喘息患者においては、有意な LTE<sub>4</sub> の産生量の増加が認められ、喘息の病態変化や治療効果モニタリングへの応用の可能性が示された。

#### A. 研究目的

ロイコトリエン (LT) は、5-リポキシゲナーゼの作用によりアラキドン酸から産生されるエイコサノイドである。LT は気管支収縮作用、気道粘液分泌促進作用、白血球遊走作用、血管透過性亢進作用などの多様な作用を有し、アレルギー性疾患や炎症性疾患の進展に重要な役割を果たしている。

主に白血球において産生される LTのうち、LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub> などの cysteinyl LT は、SRS-A (slow reacting substance of anaphylaxis) と呼ばれ、微量で強力な生理活性を示す。Cysteinyl LT の産生亢進はアレルギー性疾患や炎症性疾患の病態と密接に関連すると考えられるため、その生体内挙動についての定量的解析は病態の把握や薬物療法の治療効果の判定に有用な情報を提供するものと期待される。このような理由から、cysteinyl LT 産生の指標とされる尿中 LTE<sub>4</sub> 量の測定がこれまで様々な方法により行われてきた。しかし、操作が煩雑であることや測定値の再現性の問題など

が残されており、より簡便で信頼性の高い測定法の開発が望まれている。

そこで本研究では、液体クロマトグラフィー/タンデムマススペクトロメトリー (LC/MS-MS) を用いた LTE<sub>4</sub> の定量法の確立を目的として、LC/MS-MS における LTE<sub>4</sub> の挙動について詳細な検討を行い、新規に尿中からの精製法を開発することにより簡便で高感度な測定法を確立した。次いで本測定法を用いて、健常成人及び喘息患者の尿中 LTE<sub>4</sub> 量の測定を行った。

#### B. 研究方法

LTE<sub>4</sub> の測定は、質量分析計に ESI (エレクトロスプレーイオン化) インターフェイスを装着した Quattro II (Micromass)、HPLC 装置に Nanospace SI-1 (資生堂) を用いた LC/MS-MS 装置を使用した。

#### C. 研究結果

##### 1. マススペクトル

アセトニトリル/水/酢酸 (50/50/0.02, v/v, pH 5.5) の組成の移動相



を用い、フローインジェクションモードで LTE4 標準品のマススペクトルを測定した。その結果、 $m/z$  438 に擬分子イオン  $[M-H]^-$  が相対強度強く観測された (Fig. 1 A)。同様に、内部標準物質 (IS) として用いた  $[20,20,20-^2H_3]LTE_4$  ( $LTE_4-d_3$ ) のマススペクトルでは、3 マスユニット増加した  $m/z$  441 に擬分子イオンが観測された (Fig. 1 B)。

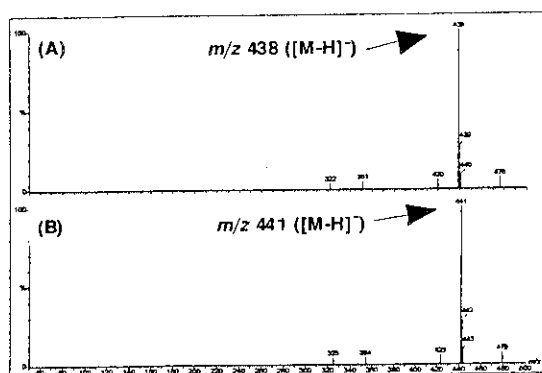


Fig. 1 Mass spectra of LTE4 (A) and LTE4- $d_3$  (B)

## 2. プロダクトイオンマススペクトル

$m/z$  438 の擬分子イオン  $[M-H]^-$  をプリカーサーイオンとし、フローインジェクションモードで LTE4 標準品のプロダクトイオンマススペクトルを測定した (Fig. 2 A)。

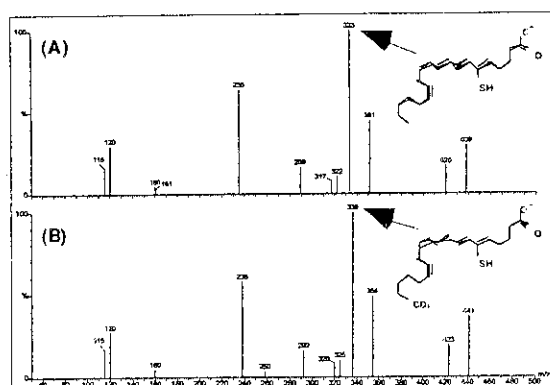


Fig. 2 Product ion mass spectra of LTE4 (A) and LTE4- $d_3$  (B)

LTE4 のプロダクトイオンマススペクトルでは、プリカーサーイオン ( $m/z$  438) を始め、 $m/z$  420、 $m/z$  351、 $m/z$  333、 $m/z$  235 のプロダクトイオンなど、LTE4 に特徴的なイオンが観測された。これらのプロダクトイオンは、プリカーサーイオンからの脱水反応 ( $m/z$  420)、またプリカーサーイオンからシステイン残基の転移反応 ( $m/z$  351) とそれに引き続く脱水反応 ( $m/z$  333)、あるいは C5-C6 結合の開裂 ( $m/z$  235) の結果生じるものと推定された。得られたプロダクトイオンの帰属を Table 1 に示す。

Table 1 Proposed product ions from  $[M-H]^-$  of LTE4

$m/z$	Fragmentation
438	$[M - 1]^-$ $[M - H]^-$
420	$[M - 1 - 18]^-$ $[M - H - H_2O]^-$
351	$[M - 1 - 87]^-$ $[M - H - CH_2CH(NH_2)COOH]^-$
333	$[M - 1 - 87 - 18]^-$ $[M - H - CH_2CH(NH_2)COOH - H_2O]^-$
289	$[M - 1 - 87 - 18 - 44]^-$ $[M - H - CH_2CH(NH_2)COOH - H_2O - CO_2]^-$
235	$H_3C(CH_2)_4(CH)_2CH_2(CH)_6C(SH)$
120	$CH_2S^-CH(NH_3^+)COO^-$
115	$HC(O)CH_2COO^-$

同様に、 $m/z$  441 の擬分子イオンをプリカーサーイオンとして用いた LTE4- $d_3$  のプロダクトイオンマススペクトルを測定した (Fig. 2 B)。その結果、 $m/z$  423、 $m/z$  354、 $m/z$  336、 $m/z$  238 のプロダクトイオンなど、20 位の炭素を含むイオンでは、LTE4 の対応するイオンに比して 3 マスユニットの増加が観測された。一方、20 位の炭素を含まない  $m/z$  160、 $m/z$  120、 $m/z$  115 のプロダクトイオンは LTE4 と同じスペクトルを与えた。

以上より、LTE4 標準品のマススペクトル及びプロダクトイオンマススペクトルの測定から、 $m/z$  438 >  $m/z$  333 をモニタリングする SRM (Selected Reaction Monitoring) により LTE4 を測定することとした。同様に、IS は  $m/z$  441 >  $m/z$  336 をモニターすることとした。

### 3. SRM

ESI法においては、移動相の組成がイオン化の効率及びクロマトグラフィーによる分離に影響を与える。高いイオン化効率を与え、かつ夾雑物との分離を短時間で可能とする移動相を選択することが高感度分析を行う上で必要となる。また、イオン源の温度もイオン化効率に大きな影響を及ぼす。そこで、移動相中の有機溶媒、緩衝液の塩を構成する酢酸の濃度、移動相のpH、イオン源温度について、分析条件の最適化を行った。その結果、LTE4のイオン化効率、クロマトグラフィーによる分離、さらに分析時間等を考慮し、本研究ではTable2に示すような測定条件を用いてSRMを行うこととした。

Table 2 Analytical condition for determination of LTE4 by SRM

Mass Spectrometer	Quattro II (Micromass)
Ionization	ESI (-)
Capillary Voltage	-3.5 kV
Source Temperature	180°C
Cone Voltage	-30 V
Collision Energy	20 eV
SRM	LTE4 $m/z$ 438 > $m/z$ 333 LTE4-d <sub>3</sub> $m/z$ 441 > $m/z$ 336
LC System	Nanospace SI-1 (Shiseido)
Column	Capcell Pak C18 UG120 (Shiseido) ( $\phi$ 1.5 x 150 mm, 3 $\mu$ m)
Mobile Phase	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O/AcOH (45/55/0.02, v/v, pH 5.5 with NH <sub>4</sub> OH)
Flow Rate	100 $\mu$ l/min
Sample Volume	30 $\mu$ l
Injection Volume	10 $\mu$ l

### 4. 検量線の作製

LTE4の測定にあたり、検量線を作製した。LTE4の検量線は、ISであるLTE4-d<sub>3</sub>(2 ng)に対するLTE4のピーク面積比により作製した。LTE4及びそのISはそれぞれ $m/z$  438 >  $m/z$  333、 $m/z$  441 >  $m/z$  336をモニターするSRMにより測定した。

その結果、LTE4は10 pgから10 ng/tubeの範囲で良好な直線性( $r^2 = 0.999$ )が得られ、この範囲で定量が可能であることが示された(Fig. 3)。

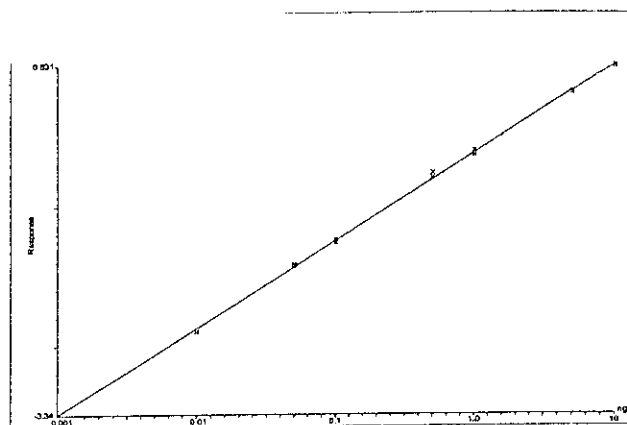


Fig. 3 Calibration curve for LTE4 using LTE4-d<sub>3</sub> as an internal standard

### 5. 精製法

多検体の測定が可能であるLC/MS-MSを用いたLTE4の測定では、その精製法が簡便であることが望まれる。そこで、固相抽出カートリッジを用いた簡便で効果的な精製法を開発した。

尿試料からのLTE4の精製は、固相抽出カートリッジとしてエムポアディスクカートリッジを使用した。エムポアディスクカートリッジは粒径約10 mmの固相充填剤をPTFE繊維で固定したディスクをリザーバーに装着したもので、少ない溶媒量で高い回収率を得ることができ、また溶出後の固相粒子の漏出がないなどの利点を有する。エムポアディスクカートリッジを用いた尿試料からのLTE4の精製法をFig. 4に示す。

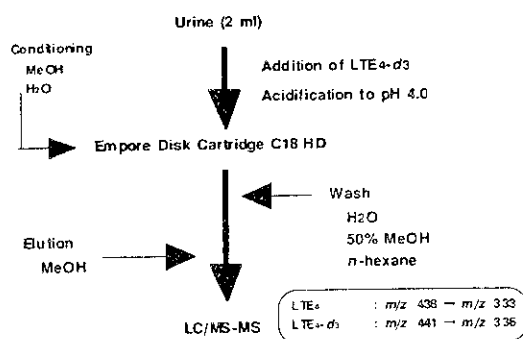


Fig. 4 Purification procedure of LTE4 from human urine

LTE4 の精製は以下のように行った。

ヒト尿試料 2 ml に IS として LTE4-d<sub>3</sub> (2 ng) を添加し、酢酸を用いて pH を 4.0 に調整した。試料を遠心して沈殿物を除去後、メタノール及び蒸留水で平衡化したエムポアディスクカートリッジに付した。カートリッジは蒸留水、50% メタノール、*n*-ヘキサンで洗浄した。LTE4 は吸着を防止するためシリコン処理を施した試験管に 0.5 ml のメタノールで溶出した。溶媒を減圧留去し、移動相に再溶解することにより LC/MS-MS の試料を調製した。

以上の操作を試料 10 サンプルについて行うとき、その所要時間は約 1 時間と短時間に処理が可能であった。ヒト尿試料からエムポアディスクカートリッジを用いて精製した LTE4 の SRM クロマトグラムを Fig. 5 に示す。LTE4 及びその IS は約 4.7 分に観測され、妨害ピークは認められなかった。

なお、測定の際には、スイッチングバルブを用いて LC から質量分析計への溶出液の制御を行った。試料注入後 3.5 - 6.0 分の間のみ質量分析計へ送液することにより、質量分析計の汚染を軽減させることが可能になった。

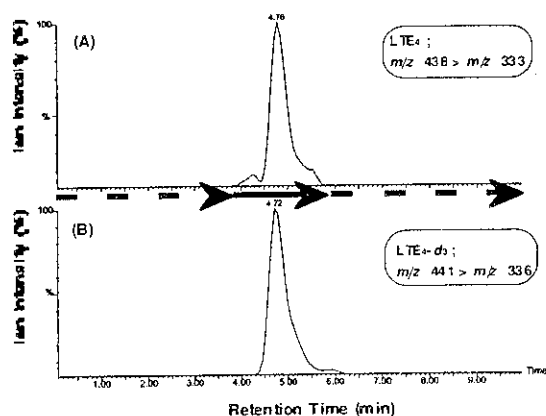


Fig. 5 SRM chromatograms of LTE4 (A) and LTE4-d<sub>3</sub> (B) extracted from human urine

## 6. バリデーション

ヒト尿中 LTE4 の測定にあたり、LC/MS-MS を用いた本測定法の信頼性と再現性について検討した。

Table 3 Accuracy and precision for determination of LTE4

Sample	Urinary levels (pg/2 ml)	LTE4 recoverd		C.V. (%)	
		pg/2 ml	Accuracy (%)		
<b>Non-spiked Urine</b>					
1	156, 158, 145			4.6	
2	148, 155, 159			3.6	
3	148, 155, 156			2.8	
4	148, 158, 156			3.4	
5	146, 159, 156			4.4	
Mean	153				
<b>Spiked Urine (2 ml)</b>					
+100 pg	1	261, 256, 250	108, 103, 97	108.0, 103.0, 97.0	5.4
	2	250, 252, 252	97, 99, 99	97.0, 99.0, 99.0	1.2
+200 pg	1	347, 359, 352	194, 206, 199	97.0, 103.0, 99.5	3.0
	2	359, 354, 359	205, 201, 206	103.0, 100.5, 103.0	1.4
+400 pg	1	549, 559, 549	396, 406, 396	99.0, 101.5, 99.0	1.4
	2	546, 553, 555	393, 400, 402	98.3, 100.0, 100.5	1.2
+800 pg	1	963, 956, 946	810, 803, 793	101.3, 100.4, 99.1	1.1
	2	960, 951, 962	807, 798, 809	100.9, 99.8, 101.1	0.7
Mean ± SD				100.6 ± 2.4	

LTE4 非添加試料及び 100, 200, 400, 800 pg の LTE4 を添加した試料各 2 ml について、エムポアディスクカートリッジを用いた精製を行い、LC/MS-MS により定量を行った。その結果を Table 3 に示す。本測定

Table 4 Inter-day precision of quantitation of urinary LTE4

Sample	LTE4 (pg/2 ml)	Mean	S.D.	C.V. (%)
A	Day 1	70.8		
	2	73.4		
	3	75.0		
	4	69.2		
	5	83.5	74.4	5.6
B	Day 1	146.0		
	2	148.3		
	3	131.4		
	4	133.6		
	5	138.6	139.6	7.4
C	Day 1	387.0		
	2	386.5		
	3	367.1		
	4	375.2		
	5	398.1	382.8	11.9

法の真度は平均 100.6% であり、その範囲は 97.0% から 108.0% と良好な結果を示した。また、各濃度の測定値における C.V. 値 (%) は 5.5 % 以下であった。

次いで、LTE<sub>4</sub> 濃度の異なる 3 検体について、測定値の日差変動について検討した。Table 4 に示すように、測定値の C.V. 値 (%) は 7.5 % 以下と良好であった。

### 7. 健常成人尿中 LTE<sub>4</sub> 量の測定

22 才から 40 才までの健常成人 20 例(男性 12 例、女性 8 例、平均 27 才) の尿中 LTE<sub>4</sub> 量を測定した。結果を Table 5 に示す。LTE<sub>4</sub> 量は 54.0 pg/2 ml から 308.0 pg/2 ml の範囲で検出され、全例において定量が可能であった。同一尿のクレアチニン含量で補正した値の平均 ± SD 値は 62.0 ± 20.8 pg/mg creatinine となり、その範囲は 34.6 pg/mg creatinine から 101.5 pg/mg creatinine であった。得られた測定値はこれまでに報告されている尿中 LTE<sub>4</sub> 量と同程度であった。尿中 LTE<sub>4</sub> 量と年齢及び性別との相関は認められなかった。また、喫煙の有無との関連も認められなかった。

Table 5 Urinary LTE<sub>4</sub> levels in healthy volunteers

Volunteers	Sex	Age	LTE <sub>4</sub> (pg/2 ml)	Creatinine (mg/ml)	LTE <sub>4</sub> (pg/mg creatinine)
A*	Male	23	101.7	0.79	64.4
B	Female	24	54.0	0.57	47.1
C	Male	34	63.9	0.89	35.8
D	Male	23	182.1	1.25	72.6
E	Female	24	113.1	1.53	37.1
F*	Male	24	225.4	1.24	91.1
G	Male	38	211.5	1.56	66.9
H	Male	25	184.0	1.51	60.8
I	Male	22	308.0	1.78	86.5
J	Male	22	294.0	2.13	69.1
K	Female	22	68.1	0.66	50.3
L	Male	22	143.2	1.01	70.9
M*	Male	24	141.5	0.80	88.5
N	Male	30	164.6	2.21	37.3
O	Female	40	57.9	0.67	43.3
P*	Male	30	239.2	2.21	54.2
Q	Female	27	85.2	1.00	41.0
R*	Female	23	164.0	1.72	47.7
S	Female	29	103.9	1.50	34.6
T	Female	29	233.1	0.89	101.5
mean ± SD		27			62.0 ± 20.8

\* Habitual smokers.

### 8. 喘息患者尿中 LTE<sub>4</sub> 量の測定

LT はアレルギー性疾患や炎症性疾患において重要な働きを示すことが知られている。そこで、喘息患者における LTE<sub>4</sub> 量を明らかにする目的で、健常成人 17 名と喘息患者 18 名の尿中 LTE<sub>4</sub> を定量した (Fig. 6)。その結果、健常成人で 59.8 pg/mg creatinine、喘息患者で 180.1 pg/mg creatinine の産生量が認められ、喘息患者における有意な LTE<sub>4</sub> の産生増加が明らかになった。

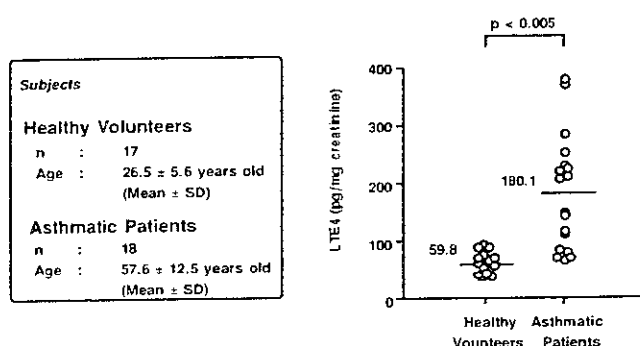


Fig. 6 Determination of urinary LTE<sub>4</sub> in healthy volunteers and asthmatic patients

### D. 考察

好酸球、好塩基球、肥満細胞などで産生された LTC<sub>4</sub> は主に循環血中で γ-グルタミルトランスペプチダーゼにより LTD<sub>4</sub> に、さらにジペプチダーゼにより LTE<sub>4</sub> へと代謝される。血中における LTC<sub>4</sub> 及び LTD<sub>4</sub> の半減期はそれぞれ約 11.5 分、5 分と不安定である。血中 cysteinyl LT は腎クリアランスにより消失し、主代謝物である LTE<sub>4</sub> として尿中に排泄されるほか、肝に取り込まれ速やかに β 酸化や ω 酸化を受けて胆汁中に排泄される。このようなことから、血中 cysteinyl LT 量は生体における産生量を把握するのに必ずしも適切ではないと考えられる。実際、血中 LTC<sub>4</sub> や LTD<sub>4</sub> 量の測定が試みられているものの、その測定値は大きなばらつきが見られる。また、試料の採取が侵襲的であることも望ましくない。一方、cysteinyl LT の主要尿中代謝物である LTE<sub>4</sub> の測定は、LTE<sub>4</sub> が尿中に

において比較的安定であり、また尿試料の採取が容易で非侵襲的であるという利点を有する。クレアチニン濃度による補正を行うことにより、尿中 LTE4 量が全身性の cysteinyl LT 産生の指標として有用であると考えられる。

ところで、尿試料に含まれる LTE4 量は微量であるため、LTE4 の測定では試料に含まれる夾雑物の除去が必須となる。このため、RIA や EIA あるいは GC/MS による測定では、固相抽出カートリッジにより試料を濃縮した後 HPLC により LTE4 を分離して測定する方法が一般に用いられている。しかし、回収率の算出に放射性同位体を用いることなど、その操作は煩雑である。簡便な前処理で効果的なクリーンアップ効果を得る方法として、抗体を用いるイムノアフィニティー精製も試みられているものの、汎用性に乏しく一般には用いられていないのが実状である。尿中 LTE4 量の測定により病態の把握や薬物療法の治療効果についての有用な情報が得られると期待されるため、LTE4 を簡便かつ迅速に測定する方法が望まれる。

近年の各種インターフェイスの開発にともない、LC と MS を組み合わせた LC/MS が実用化されている。特に、ESI 法はアミノ基やカルボキシル基を有する極性化合物を誘導体化することなく直接導入でき、高極性の薬物や内因性微量成分などの直接分析に応用されている。さらに、質量分析計を 2 台連結させた LC/MS-MS は、LC により夾雑物を分離することが可能であることや質量分析計が高い化合物選択性を有することから、測定までの前処理操作を簡略化することができる。LC/MS-MS は、夾雑物の多い尿中から高極性化合物である LTE4 を分析する方法として最適であると考えられた。

そこで本研究では、ESI インターフェイスを装着した LC/MS-MS を用いた尿中 LTE4 の測定法の開発に取り組んだ。始めに、LC/MS-MS における LTE4 の挙動について詳細に検討した。SRM におけるモニ

タリングイオン、コーン電圧及びコリジョンエネルギー、移動相の組成及び pH、さらにイオン源の温度について最適な条件を決定した。次いで、固相抽出カートリッジによる効果的な精製法について検討した。本研究で用いたエムポアディスクカートリッジによる精製についてはこれまでに報告されているが、洗浄溶媒及び溶出溶媒について大幅な改良を加えることにより、より短時間で測定が可能となった。さらに、カラムスイッチングにより、LC からの溶出を制御することにより、質量分析計のイオン源の汚染を軽減させるだけでなくクロマトグラムのノイズレベルを低下させることができ、効果的なクリーンアップ法と併せて夾雑ピークのないクロマトグラムを得ることができた。エムポアディスクカートリッジによる精製と LC/MS-MS による測定を組み合わせた尿中 LTE4 測定法は、バリデーションを行った結果、本測定法が高い信頼性と再現性を有することが示された。

次いで、確立した LC/MS-MS による尿中 LTE4 の測定法により、健常成人尿中の LTE4 量の測定を行った。本研究で得られた健常成人 20 例の尿中 LTE4 量 ( $62.0 \pm 20.8$  pg/mg creatinine) は、RIA や EIA などの方法を用いてこれまでに測定された健常成人尿中 LTE4 量と同程度の値を示し、これまでの方法に比べより簡便な操作で測定が可能であった。また、Wu らは先に LC/MS-MS を用いた尿中 LTE4 量の測定法について報告しているが、健常成人尿中の LTE4 は検出限界以下であったとしている。本研究において確立した LC/MS-MS による尿中 LTE4 の測定法では測定した全ての試料において LTE4 の検出・定量が可能であり、高感度で簡便な測定法としてその有用性が示された。

さらに、本法を用いて少数の喘息患者尿中 LTE4 の測定を行ったところ、健常人に比して有意に高い値を示し、LTE4 の喘息の病態変化あるいは治療効果のマーカーとしての可能性が示された。今後、詳細な検討を行う必要がある。

## E. 結論

LC/MS-MS による尿中 LTE<sub>4</sub> の測定法を新規に確立した。本測定法は高感度で化合物選択性に優れ、高い信頼性と再現性を有することが確認された。

本測定法により定量した健常成人 20 例の平均尿中 LTE<sub>4</sub> 量は 62.0 ± 20.8 pg/mg creatinine であり、全例において定量可能であった。

また、喘息患者尿中に健常人に比して高い LTE<sub>4</sub> 量の存在が明らかとなった。

以上より、cysteinyl LT の生体内動態の定量的解析を簡便に行うことが可能となり、病態の診断・治療への応用性が期待された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Murai, Y., Hishinuma, T., Suzuki, N., Satoh, J., Toyota, T. and Mizugaki, M., Determination of urinary 8-epi-prostaglandin F<sub>2</sub>α using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Increased excretion in diabetics, *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, 2000, in press.
2. Suzuki, N., Hishinuma, T. and Mizugaki, M., Intra- and Inter-day variation of LTE<sub>4</sub> levels in healthy human urine using the liquid chromatography/tandem mass spectrometric method, *Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan*, 2000 in press
3. Hishinuma, T., Yamazaki, T., Mizugaki, M., Troglitazone has a reducing effect on thromboxane production, *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, 2000, in press.
4. Mizugaki, M., Ishizawa, F., Yamazaki, T. and Hishinuma, T., Epigallocatechin gallate increase the Prostacyclin Production of Bovine Aortic Endothelial Cells, *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, 2000, in press.
5. Hishinuma, T., Koseki, Y., Katayama, J., Murai, Y., Saito, T., Mizugaki, M., Changes of the thromboxane A<sub>2</sub>/prostacyclin balance in the urine of patients with renal diseases analyzed by gas chromatography/selected ion monitoring., *Prostaglandins other Lipid Mediat.*, 2000, 60, 1-8.
6. Hishinuma, T., Koseki, Y., Murai, Y., Yamazaki, T., Suzuki, K., Mizugaki, M., Urinary thromboxane A<sub>2</sub>/prostacyclin balance reflects the pathological state of a diabetic., *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, 1999; 58(5-6):263-71.
7. Mizugaki, M., Hishinuma, T., Matsumura, E., Murai, Y., Yamazaki, T., Yamanobe, S., Tamai, M., Monitoring of the thromboxane A<sub>2</sub>/prostacyclin ratio in the urine of patients with retinal vascular occlusion through the low-dose-aspirin therapy using the gas chromatography/selected ion monitoring method., *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, 1999, 58(5-6), 253-62.
8. Mizugaki, M., Hishinuma, T., Yamaguchi, H., Kanno, K., Hirose, Y., Nakamura, H., Microdetermination of the 6,15-diketo-13,14-dihydroprostaglandin F<sub>1</sub>α in human plasma using gas chromatography/selected ion monitoring with [<sup>18</sup>O]6,15-diketo-13,14-dihydro-prostaglandin F<sub>1</sub>α as an internal standard., *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, 1999, 58(2-4), 187-93.
9. Hishinuma, T., Nakamura, H., Sawai, T., Uzuki, M., Itabashi, Y., and Mizugaki, M., Microdetermination of prostaglandin E<sub>2</sub> in joint fluid in rheumatoid arthritis patients using gas chromatography/selected ion monitoring. *Prostaglandins Other Lipid*

Mediat., 1999, 58(2-4), 179-86.

10. Mizugaki, M., Hishinuma, T. and Suzuki, N., Determination of leukotriene E4 in human urine using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, J Chromatogr B Biomed Sci Appl 1999, 729(1-2), 279-85.
11. Mizugaki, M., Hishinuma, T. and Nishikawa, M., Docosahexaenoic acid (DHA) : an update (Review), Drugnews and Perspective, 1999, 12(7), 412-415.
12. Hishinuma, T., Yamazaki, T. and Mizugaki, M., Effects of long-term supplementation of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid on the 2-, 3-series prostacyclin production by endothelial cells, Prostaglandins Other Lipid Mediat., 1999, 57(5-6), 333-40.
13. 水柿道直, アラキドン酸カスケードと病的動態 (総説), 薬学雑誌, 1999, 119(1), 61-80.
14. 水柿道直, 質量分析によるエイコサノイドの微量分析, 日薬理誌, 2000, 印刷中.
15. 富岡佳久, 菱沼隆則, 石渡俊二, 水柿道直, シリーズPharm.D.にきく-ファーマシューティカルケア Q & A 「医薬品の適正使用における病院薬剤師の役割」に関する研修会において-仙台-, Pharm D, 2000, 2, 12-13.
16. 水柿道直, 富岡佳久, 宮崎勝巳, 平成10年度厚生科学研究費補助金医薬安全総合研究事業「医薬品の適正使用における病院薬剤師の役割」外国人指導者招聘事業 (北海道・東北地区), 日本病院薬剤師会雑誌, 1999, 35, 1093-1096.

## 2. 学会発表

1. Yamada, M., Kohagura, K., Ito, O., Abe, E., Omata, K., Ito, S., Suzuki, N., Nakamura, H., Hishinuma, T., Mizugaki, M., Analysis of dihydroeicosatrienoic acids by electrospray ionization-liquid chromatography/tandem mass spectrometry., Experimental Biology '99., NY, U.S.A., Apr. 17-21, 1999.
2. 鈴木直人, 菱沼隆則, 水柿道直, LC/MS/MSを用いたヒト尿中ロイコトリエンE4の定量, 第47回質

量分析総合討論会検討会, 大阪, 1999年5月12日-14日

3. Hishinuma, T., Suzuki, N., Nakamura, H., Omata, K., Abe, F., Ito, S., Mizugaki, M., Analysis of epoxyeicosatrienoic acids by electrospray ionization-liquid chromatography tandem mass spectrometry., 11th International Conference on cytochrome P450. Sendai, Japan, Aug. 29-Sep. 2, 1999.
4. 菱沼隆則, 塚本宏樹, 山崎研, 鈴木健一, 水柿道直, 糖尿病患者における2型及び3型トロンボキサン産生比の検討, 日本脂質栄養学会第8回大会, 福山, 1999年9月9日.
5. 村井ユリ子, 鈴木直人, 菱沼隆則, 水柿道直., LC/MS/MS法による8-epi-Prostaglandin F<sub>2alpha</sub>微量定量法の確立とヒト試料への応用, 第38回日本薬学会東北支部大会, 仙台, 1999年10月17日
6. 山崎研, 小原恵美子, 菱沼隆則, 水柿道直 培養細胞のプロスタノイド産生に及ぼすEPA及びDHAの効果, 日本脂質栄養学会第7回大会 仙台, 1998年9月
7. Hishinuma, T., Suzuki, N. and Mizugaki, M., Microdetermination of leukotriene using LC/MS and its clinical application, Midyear Clinical Meeting, ASHP, Orlando, USA. Dec 1999

G. 知的所有権の取得状況  
なし

臨床薬物動態の母集団解析に基づく薬効・安全性の評価

分担研究者 谷川原 祐介 慶應義塾大学 医学部 教授・薬剤部長

研究要旨

母集団薬物動態解析法を応用し、新規抗がん剤ゲムシタビンの用法・用量、薬物血中濃度、安全性・有効性の間に存在する法則性を解明する。さらに、シスプラチンとの併用療法における薬物動態と副作用を解析し、その適正使用法に関する情報を得る。

A. 研究目的

抗がん剤を臨床評価する上で、患者集団における薬物動態と薬効・毒性の法則性を解明することは、用法・用量の科学的根拠を得るのみならず、最適な治療指針を臨床に提供することに通じる。

母集団薬物動態 (Population pharmacokinetics, 以下、PPK と略す) は、1人当たりの採血点数は少なくとも数多くの症例のデータを集積することにより、適用患者群における薬物動態と薬効・毒性の法則性を解明し得る方法論であり、新医薬品の臨床評価法として国際的に注目されている。

新規抗がん剤ゲムシタビンは代謝拮抗剤に分類され、デオキシリボース部分の 2'位の水素がフッ素原子に置換されたシチジン誘導体である。細胞内で三リン酸化物に代謝され、S 期の細胞に対して特異的に DNA 合成を阻害する。ゲムシタビンは、固形腫瘍、とくに非小細胞肺癌、膵臓がん に有効であり、本邦では非小細胞肺癌への適用が承認されている。用量規定毒性 (dose limiting toxicity) は骨髄抑制であり、とくに白血球、好中球、血小板の減少が認められる。

併用化学療法は、抗がん剤の投与方法として臨床で広く用いられているが、薬物動態学的相互作用および薬力学的相互作用 (相乗効果) について臨床薬理学的に解明された例は少ない。本研究では、PPK および pharmacodynamics の手法を応用し、併用療法時における薬物体内動態と抗腫瘍効果・安全性の関連性を、単独投与方法との比較において明らかにする。本研究を通じて、併用化学療法の理論的根拠を臨床に提供し、適正使用の推進に貢献することを目的とする。

B. 研究方法

本研究では、ゲムシタビン血中濃度データを NONMEM (Nonlinear Mixed Effect Model) 法により解析し、本薬の母集団薬物動態情報を得るとともに、体内動態と治療効果・副作用との関係について解析した。

対象は、国内 3 施設においてゲムシタビンの併用第 I・II 相試験に参加した非小細胞肺癌患者 12 名である。対象はいずれも日本人であった。第 I・II 相試験は週 1 回 3 週連続投与後 1 週間休薬を 1 コースとした。シスプラチン (以下、CDDP と略す) は、ゲムシタビンの投与終了後、各施設の標準的な投与方法にて投与し、2~4 週目は休薬する。これを 1 コースとして以降繰り返した。薬物動態評価に際しては、1 人の被験者から経時的に 1~4 回採血を行ない薬物の血中濃度推移を得た。一方、CDDP の併用投与時は CDDP 投与前に 1 ポイントのみ採血された。このようにまばらな PPK 採血法により、患者への負担を少なくしつつ必要な血中濃度データを収集することができた。

合計 12 名の症例から総計 59 点の血中濃度データが集められ、1 人当たり平均 4.9 点となった。これらの血中濃度データを PPK 解析プログラム NONMEM によって解析し、非小細胞肺癌患者における薬物動態の母集団パラメータを得るとともに、各個人のパラメータ値は Bayesian 法により推定した。計算に際しては Windows95 上において Fortran for Powerstation (ver 4.0、Microsoft) を用いた。

併用第 I・II 相試験のゲムシタビンの投与量は 600~1000 mg/m<sup>2</sup>、シスプラチンの投与量は 80 mg/m<sup>2</sup> であった。効果判定は、腫瘍所見に基づく



奏効度並びに奏効期間によって行ない、副作用に関してはゲムシタピンの用量規定毒性となる血液毒性と CDDP の主たる副作用である腎毒性に着目した。

本試験実施に際しては、施設内 IRB の承認を得るとともに、患者への十分な説明と文書による同意を得た。Population pharmacokinetics 法では、患者ひとり当たりの採血量と回数を従来法より減らすことができ、患者の負担が少なくなる点は、倫理的にも望ましい手法と言える。

### C. 研究結果

ゲムシタピンの血漿中濃度推移の検討には 2-コンパートメントモデルを用い、12 症例から 28 回の投与機会に測定した合計 59 点の血中濃度を用いて母集団解析を行なった。解析の結果、個体内変動は 35.4%であるのに対し、個体間変動が 0.01~4.4%と非常に小さくなった。これは個体差が小さいのではなく、個体差を評価できるだけの症例数がないためと考えられた。さらに、数週間から数ヶ月にわたって患者の病態生理が一定とは考えられず、ゲムシタピン単独療法時の解析と同様に、各投与機会毎にベイズ推定して AUC (area under the curve) を求めた。

CDDP 併用による影響を検討したところ、コンパートメント間分布クリアランス値に有意な差が認められ、CDDP を併用することにより半減期が約 4 倍に延長した。しかしながら、総曝露量を表すゲムシタピン AUC 値には有意な差は認められず、臨床的な意義について現データから結論を下すのは難しい。

### D. 考察

奏効度判定がなされた症例に関して、薬物動態や投与量との関連性について解析した。1 回投与後の AUC 値、および全投与期間における累積 AUC 値を奏効度別にプロットしたが、各群間に差は認められず、投与毎の AUC あるいは全投与期間における累積 AUC が抗腫瘍効果と関連するという知見は得られなかった。しかしながら、PR 症例数が 3 例と少なかったために、ゲムシタピン単独療法時と比べ、十分なデータ数ではなかったものと思われる。

また、PR と判定された全ての症例が、ゲムシタピン単独療法時と同様に、第 1 コース中に明らかな腫瘍縮小を認めており、いわゆる“効果の発現”は早いと考えられる。

副作用において、血液毒性に関しては、ゲムシタピン単独療法時と同様の傾向を示した。好中球・白血球・血小板減少に関する毒性グレードと nadir 時点の AUC 値および nadir に達するまでの累積 AUC 値との間には、関連性は認められなかった。さらに、好中球・白血球・血小板の nadir は、ほとんどが第 1 コース中に現われており、抗腫瘍効果と同様に“血液毒性の発現”も早いと考えられる。今回の結果から、投与を重ねることによって血液毒性が重篤化することはなく、CDDP 併用療法においてもゲムシタピンの血液毒性には明確な蓄積毒性は認められなかった。ところが、ゲムシタピン単独療法時と比較して、CDDP 併用により血液毒性が強く発現しており、さらに用量依存的に毒性が重篤化する傾向が認められた。

一方、腎障害の指標としてナトリウム、カリウム、クロル、カルシウム、尿素窒素、クレアチニン、クレアチニンクリアランスに着目し、これらの臨床検査値の実施設内基準値に基づく正常・異常値判定と薬物動態特性値との間の相関性を解析したが、関連性は認められなかった。

### E. 結論

ゲムシタピンとシスプラチンとの併用療法において、薬物動態学的に大きな相互作用は認められなかったが、ゲムシタピン単独投与に比べ、血液毒性が強く発現した。本研究で得られた知見は、ゲムシタピンを臨床使用する上で有意義な情報である。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Y. Tagawa, K. Miwa, K. Yamashita, R. Tsukuda, Y. Yoshimura, S. Tanayama, Y. Tanigawara. Possible Factor for Nonlinear Pharmacokinetics of TAK-603, a New Antirheumatic Agent, in Rats. *Biopharm. Drug Disposition*, 20(1): 11-18 (1999).
- 2) Y. Tagawa, K. Miwa, R. Tsukuda, Y. Yoshimura, S. Tanayama, Y. Tanigawara, Effect of Its Demethylated Metabolite on the Pharmacokinetics of Unchanged TAK-603, A New Antirheumatic Agent, in Rats. *Drug Metabolism Disposition*, 27(4): 495-501 (1999).
- 3) Komada, K. Nishiguchi, Y. Tanigawara, S. Iwakawa, K. Okumura. Effects of Secretable SOD Delivered by Genetically Modified Cells on Xanthine/Xanthine Oxidase and Paraquat-Induced

Cytotoxicity in Vitro. *Biol. Pharm. Bull.*, 22(8): 846-853 (1999).

- 4) K. Takara, Y. Tanigawara, F. Komada, K. Nishiguchi, T. Sakaeda, K. Okumura, Cellular Pharmacokinetic Aspects of Reversal Effect of Itraconazole on P-Glycoprotein-Mediated Resistance of Anticancer Drugs. *Biol. Pharm. Bull.*, 22(12): 1355-1359 (1999).
- 5) Y. Tanigawara, N. Aoyama, T. Kita, K. Shirakawa, F. Komada, M. Kasuga, K. Okumura, CYP2C19 genotype-related efficacy of omeprazole for the treatment of infection caused by *Helicobacter pylori*. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 66(5): 528-534 (1999).
- 6) K. Shirakawa, K. Takara, Y. Tanigawara, N. Aoyama, M. Kasuga, F. Komada, T. Sakaeda, K. Okumura, Interaction of Docetaxel ("Taxotere") with Human P-Glycoprotein. *Jpn. J. Cancer Res.*, in press.

## 2. 学会発表

- 1) Y. Tanigawara: Population PK/PD and Formulation Design, *Strategies for Optimizing Oral Drug Delivery: Scientific to Regulatory Approaches*, Kobe, April 1999.
- 2) Y. Tanigawara: Population Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Approach for Global Drug Development, *Formulation Optimization and Clinical Pharmacology*, Tokyo, April 1999.
- 3) Y. Tanigawara, The Role of P-glycoprotein in Drug Disposition, *6th International Congress of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology*, Cairns, September 1999.
- 4) 谷川原祐介 : Docetaxel の体内動態と臨床薬理, 第 37 回日本癌治療学会, 岐阜, 1999 年 10 月.
- 5) 谷川原祐介 :ブリッジング評価における統計学的考察—PK/PD を中心に—, 第 7 回 計量生物セミナー, 1999 年 10 月.

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

該当なし

### 2. 実用新案登録

該当なし

### 3. その他

該当なし