

## C. 研究結果

### 1. 抗アレルギー薬のドパミン取り込み阻害作用

エバスチン、オキサトミド、テルフェナジン、アステミゾールは  $10^{-7}$ ~ $10^{-5}$  M で DA 取り込みを濃度依存的に抑制し、その程度は [ $^3$ H]GBR12935 結合阻害の程度と相関した。エバスチンは L-dopa 誘発運動興奮を有意に増強し、apomorphine 誘発自発運動量亢進も有意に増大した。しかし、オキサトミドはこれら行動学的指標に有意な変化を示さなかった。エバスチンは haloperidol 誘発カタレプシーを抑制した。オキサトミドは強い DA 受容体遮断作用を有するが、大量投与でもカタレプシーを誘発しなかった。

### 2. 造影剤注入時の不溶性微粒子

造影剤をディスプレイ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。微粒子数の増加は注入速度に依存しており、特に 3 mL/秒で著明な増加が認められた。

### 3. 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。

### 4. 肺血管透過性亢進に及ぼす造影剤の影響と 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の亢進は著明であった。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。

### 5. ヒト微小血管内皮細胞透過性に及ぼす造影剤の影響

イオキサグル酸、イオヘキソールともに濃度依存的に、また15分後まで直線的に sodium fluorescein の血管内皮細胞透過性を亢進し、100mgI/mL の濃度ではいずれも約2.5倍となった。

ニトロプルシドナトリウム 1nM はそれ自体透過性に影響を与えなかったが、イオキサグル酸 150mgI/mL による透過性亢進は約50%抑制された。また、イオキサグル酸 50mgI/mL 単独では透過性にほとんど影響を及ぼさなかったが、NO合成酵素阻害薬 N-monomethyl-L-arginine (L-NMMA) 0.5 mM の添加により約2.5倍に透過性を亢進させた。L-NMMA 0.5 mM 自体では透過性に影響を与えなかった。

微小血管内皮細胞のNO<sub>2</sub>産生量はイオキサグル酸およびイオヘキソールにより濃度依存的に抑制された。150mgI/mL での抑制率はそれぞれ約75%および55%であった。

イオヘキソールは微小血管内皮細胞に対しほとんど形態学的変化を与えなかった。しかし、イオキサグル酸は細胞を変性させ、10、30、60 分後の正常細胞の割合は 100mgI/mL では約 80%、60%、50%、150mgI/mL では約 43%、35%、25%であった。

### 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

### 1. 抗アレルギー薬のドパミン取り込み阻害作用

本研究によりエバスチンのDA取り込み阻害作用が in vitro および in vivo で確認された。オキサトミドのDA取り込み阻害作用も in vitro で認められたが、in vivo では機能的に相反するそのDA受容体遮断作用と拮抗することが考えられた。抗アレルギー薬は長期間連用されることが多く、

薬物動態学的相互作用を含めてその副作用には十分注意しておかなければならない。本研究で明らかになった抗アレルギー薬のDA神経機能に対する作用は、抗アレルギー薬の薬理作用、有害作用および相互作用を理解する上で重要な基礎的情報である。

## 2. ヨード造影剤の有害作用

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。さらに、造影剤はヒト微小血管内皮細胞のsodium fluoresceinに対する透過性を亢進させ、その作用はNO供与体のニトロプルシドナトリウムにより抑制され、NO合成酵素阻害薬L-NMMAにより著明に増強された。これらのin vitroおよびin vivoの結果より造影剤は血管透過性を亢進させ、NOがその作用の重要な調節因子であることが明らかとなった。

造影剤は内皮細胞のNO産生を抑制することも明らかとなった。このことは造影剤による血管透過性亢進作用の一つのメカニズムかもしれない。また、イオキサグル酸が細胞を直接変性させることも分かったが、イオヘキソールによる明らかな細胞変性は認められなかった。このことはイオン性造

影剤が非イオン性造影剤よりも直接的な細胞障害作用が強いことを示唆するかもしれない。しかし、この作用が透過性の亢進にどの程度寄与しているかは明らかでない。

以上の知見は、内因性のNO産生量の低下が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. 抗アレルギー薬にはドパミン取り込み阻害作用がある。エバスタチンはその中で最も作用が強い。オキサトミドも強い作用があるが、そのDA受容体遮断作用と機能的にほぼ拮抗している。

2. 造影剤の注入時のバイアル製剤からディスポーザ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。

3. 造影剤のシリコン汚染は肺障害作用の増悪因子となる。

4. 造影剤は血管透過性を亢進させ、この作用に対してNOは抑制的役割を示す。さらに、造影剤は微小血管内皮細胞のNO産生を抑制し、また、イオキサグル酸は直接的に血管内皮細胞を傷害する。

5. 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、抗アレルギー薬と造影剤の有害作用発現に関する危険因子と予防因子を実験的に提示するものである。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

(1) Matsunaga, K., Sato, T., Shuto, H., Tsuruta, Y., Suemaru, K., Gomita, Y. and Oishi, R.: Inhibition of neuronal dopamine uptake by some anti-allergic drugs. *Eur. J. Pharmacol.*, 350(2-3): 165-169, 1998.

(2) 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.

(3) 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.

(4) Sendo, T., Kataoka, Y., Takeda, Y., Furuta, W. and Oishi, R.: Nitric oxide protects against contrast media-induced pulmonary vascular

permeability in rats. *Invest. Radiol.*, 35: 472-478, 2000.

(5) Tominaga, K., Kataoka, Y., Sendo, T., Furuta, W., Niizeki, M. and Oishi, R.: Contrast medium-induced pulmonary vascular hyperpermeability is aggravated in a rat climacterium model. *Invest. Radiol.*, in press.

(6) Furuta, W., Sendo, T., Kataoka, Y. and Oishi, R.: Morphologic degeneration of a human microvascular endothelial cell induced by iodinated contrast media. *Acad. Radiol.*, in press.

##### 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

(3) 古田和歌子、中川慎介、住村智子、千堂年昭、片岡泰文、大石了三：造影剤による血管内皮細胞透過性亢進における一酸化窒素の役割。日本薬学会 121 年会、札幌、2000 年 3 月

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合 研究事業）  
分担総合研究報告書

エイコサノイド超微量定量の臨床応用に関する研究

分担研究者 水柿道直 東北大学医学部附属病院薬剤部

アラキドン酸から産生されるエイコサノイドは、多様なしかも強力な生理活性を示すことから、様々な疾患の発症や病態の進行と密接に関連するものと考えられる。しかしながら、その産生量は微量であるため、その産生量の量的実態及び疾患との関連性は不明であった。本研究では、感度、化合物選択性に優れる質量分析法によるエイコサノイド定量法を開発し、各エイコサノイドの産生量変化の定量的解析を可能とし、疾患との関連性を明らかにするとともに、マーカーとしての有用性を示した。

まず、糖尿病患者における、強力な血小板凝集作用を示すトロンボキサン A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) と相反する作用を有するプロスタサイクリン(PGI<sub>2</sub>)の産生比(TX/PGI 比)と病態との関連性を評価した。その結果、糖尿病患者、特に合併症併発患者では TX/PGI 比が有意に高値を示し、糖尿病患者は血栓形成傾向を示すことが明らかになった。糖尿病モデルマウスを用いた検討でも、糖尿病の発症及び進行と TX/PGI 比の間に関連性が認められ、尿中 TX/PGI 値測定、糖尿病患者における合併症の発症及びその治療効果のモニタリングへの有用性が示された。

次に、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する cysteinyl ロイコトリエン(LT)の指標として、喘息患者及びアトピー性皮膚炎患者の尿中 LTE<sub>4</sub> 量の簡易かつ高感度定量法を開発し、定量を行った。その結果、喘息患者やアトピー性皮膚炎患者において、健常人に比して有意な LTE<sub>4</sub> の産生量の増加が認められた。これらの値は従来指標の一つとして用いられている血清総 IgE と正の相関性を示すことが判明した。本法の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。

## I. 糖尿病におけるトロンボキサン/プロスタサイクリン産生比の変動に関する研究

### A. 研究目的

プロスタサイクリン(PGI<sub>2</sub>)とトロンボキサン A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) は高度不飽和脂肪酸のアラキドン酸から産生されるプロスタノイドである。主に血管内皮細胞で産生される PGI<sub>2</sub> は強力な血小板凝集抑制及び血管拡張作用を示すのに対し、主に血小板で産生される TXA<sub>2</sub> はこれと相反する作用を示す。これらの産生バランスは血管系の恒常性を維持するために重要である。

糖尿病は糖代謝障害による高血糖を特徴とする疾患であり、高血糖状態が慢性的に続くことにより大動脈瘤や冠状動脈硬化症などの大血管障害や、網膜症、腎症などの細小血管障害、神経障害を引き起こす。特に糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症及び糖尿病性神経症は三大合併症として知られている。これらの合併症の多くは血管病変により発症するため、トロンボキサン/プロスタサイクリン(TX/PGI)比の不均衡はこれらの病態変化と密接な関係にあるものと考えられる。

生体内におけるプロスタノイドの動態を解析するためには、産生量の把握が必要であるが、これらの産生は局所的で微量であり、半減期も短いため、指標として安定代謝体の測定が必要となる。

そこで本研究では、TXA<sub>2</sub> 産生の指標として尿中 11-dehydro-TXB<sub>2</sub> を、PGI<sub>2</sub> 産生の指標として尿中 2,3-dinor-6-keto-PGF<sub>1α</sub> を用い、感度及び化合物選択性に優れるガスクロマトグラフィー/選択イオンモニタリング(GC/SIM)法を用いた定量を行い、TX/PGI 産生比の検討を行った。

次に、臨床応用として糖尿病患者尿中の TX/PGI 比の検討を行った。さらに糖尿病モデルマウスにおける測定を行い、TX/PGI 比の変化と糖尿病及び合併症発症との関連性について検討した。

### B. 研究方法

II型糖尿病患者及び糖尿病モデルマウス尿中の 11-dehydro-TXB<sub>2</sub> 及び 2,3-dinor-6-keto-PGF<sub>1α</sub> の測定を行った。糖尿病モデルマウスは、ストレプトゾトシン(STZ)で誘導した ICR マウスと、自然発症性の *db/db* マウスを用いた。

11-dehydro-TXB<sub>2</sub> 及び 2,3-dinor-6-keto-PGF<sub>1α</sub> の測定は、GC/SIM 法を用いて行った。即ち、尿試料に内部標準物質 (IS) として重水素標識体を添加し、酸性条件下、ACCUBOND ODS カートリッジカラム及びシリカゲルカラムによる精製を行い、それぞれメチルエステル(ME)-プロピルアミド (PA)-ジメチルイソプロピルシリル(DMIPS)エーテル誘導体及び ME-メトキシム(MO)-DMIPS エーテル誘導体に導いた。イソプロピルイオン脱離に伴い生じる、[M-43]<sup>+</sup>イオン

( $m/z$  698: 11-dehydro-TXB<sub>2</sub>,  $m/z$  702: [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]11-dehydro-TXB<sub>2</sub>,  $m/z$  642: 2,3-dinor-6-keto-PGF<sub>1α</sub>,  $m/z$  646: [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]2,3-dinor-6-keto-PGF<sub>1α</sub>) をモニタリングイオンとして GC/SIM を実施した。

定量値はそれぞれのピーク面積の比から算出した。尿濃度による定量値の変動を補正するため、得られた定量値を同一尿のクレアチニン(cre)含量に対する値として比較検討した。

いずれの化合物も 10 pg - 10 ng の範囲で測定可能であった。検出限界は 2 pg(S/N>10)、添加回収率は 90.0-106.7%であった。

## C. 研究結果

### 1. 糖尿病患者における TX/PGI 比の検討

外来糖尿病患者 67 例及び入院糖尿病患者 2 例(男性 43 人、女性 26 人、59.4±12.6 才)の尿中 11-dehydro-TXB<sub>2</sub> 及び 2,3-dinor-6-keto-PGF<sub>1α</sub> を定量した。尿は来院時、または入院時の一時尿を用いた。また、対照として健常人 38 例(男性 35 人、女性 3 人、33.5±9.9 才)について同様に定量し、比較検討した。

その結果、糖尿病患者の 11-dehydro-TXB<sub>2</sub> は 834.5±679.3 pg/mg cre (mean ± S.D.)であり、健常人の 490.9±370.8 pg/mg cre に比べ有意に高値を示した。2,3-dinor-6-keto-PGF<sub>1α</sub> は 23.2±17.2 pg/mg cre であり、健常人の 32.8±20.4 pg/mg cre に比べ有意に低値を示した。

尿中の TX/PGI 比は、11-dehydro-TXB<sub>2</sub>/2,3-dinor-6-keto-PGF<sub>1α</sub> で示した。糖尿病患者尿中の TX/PGI 比は 49.4±44.2 であり、健常人の 19.1±14.5 に比べ有意に高値を示した。糖尿病患者では TXA<sub>2</sub> の産生の増加と PGI<sub>2</sub> の産生の低下により、全体として血栓を形成しやすい傾向にあることが判明した。

### 2. 糖尿病性合併症と TX/PGI 比の関連性

次に、糖尿病患者の合併症の併発と TX/PGI 比について検討した。三大合併症のいずれかを併発した患者 (n=29) の TX/PGI 比は 58.8±59 であり、非併発患者 (n=40) の 42.6±28.2 に比べ高値を示す傾向にあった。各合併症毎に検討すると、糖尿病性神経症併発患者(n=17)では TX/PGI 比が 47.1±31.3 であり、非併発患者と相違が認められないが、血管病変との関連性の高い糖尿病性網膜症を併発した患者 (n=21)では、TX/PGI 比が 66.9±65.8 であり高値を示した。

### 3. TX/PGI 比と使用薬剤との関連性

NIDDM 患者には高血糖状態を改善するため、SU (sulfonylurea) 剤や α-グルコシダーゼ阻害薬などの経口血糖降下薬や、インスリン製剤などが処方される。NIDDM の発症初期には高インスリン血症が認

められるが、病態の進行に伴いインスリンの分泌が低下するため、より重症な NIDDM 患者にはインスリン補充療法が中心となる。そこで糖尿病患者を使用薬剤により分類し、TX/PGI 比を検討した。

インスリン投与患者(n=26)の TX/PGI 比は 68.0±57.8 であり、経口血糖降下薬服用患者(n=29)の 39.9±30.0 と血糖降下薬を服用していない患者 (n=14)の 34.6±26.9 に比べ有意に高値を示した。経口血糖降下薬服用患者の TX/PGI 比は血糖降下薬を服用していない患者の TX/PGI 比に比べ同程度であった。

他の主な服用薬剤は高脂血症治療薬、カルシウム拮抗薬、アンギオテンシン変換酵素阻害薬であったが、それらの服用の有無で TX/PGI 比に有意な差は認められなかった。また、5 例と少数例ではあるが、抗血小板薬服用患者は、他の糖尿病患者に比べ、TX/PGI 比は有意に低値を示した。

### 4. 糖尿病モデル動物における TX/PGI 比の検討

#### 4-1 STZ 投与マウス

糖尿病誘発作用の知られるストレプトゾトシン (STZ) を 6 週齢の雌性 ICR マウス(n=6) に投与して糖尿病を誘発し、尿中 TX/PGI 比を非誘発マウスと比較検討した。糖尿病誘発の 30 日後に一日尿を個別に採取し、尿中の 2,3-dinor-6-keto-PGF<sub>1α</sub> と 11-dehydro-TXB<sub>2</sub> を測定した。測定には各 1-5 mL の尿を用いた。多尿の糖尿病マウスと異なり、正常なマウスでは尿量が少ないため、対照群の測定には同週齢の ICR マウス 7 匹の一日尿をまとめたものを用いた。

STZ を投与して 30 日後の ICR マウスは、血糖値が 437.9±62.5 mg/dL と非誘発マウスの 100.9±14.2 mg/dL より高い値を示しており、糖尿病が誘発されていることを確認した。

PGI<sub>2</sub> の代謝体である 2,3-dinor-6-keto-PGF<sub>1α</sub> は 655±584 pg/mg cre で非誘発マウスの 1003 pg/mg cre より低値を示した。また、TXA<sub>2</sub> の代謝体である 11-dehydro-TXB<sub>2</sub> は 2292±785 pg/mg cre と非誘発マウスの 1375 pg/mg cre より高値を示した。TX/PGI 比は 5.75±3.57 で非誘発マウスの 1.36 よりも高値であった。これらの結果から、糖尿病誘発マウスでは PGI<sub>2</sub> 産生の低下と TXA<sub>2</sub> の産生亢進により、TX/PGI 比が上昇し、血栓形成傾向を示していることが判明した。

#### 4-2 自然発症性糖尿病マウス

db/db マウスは自然発症性の糖尿病モデルで、生後しばらくの間はインスリン抵抗性であるが、生後 3-6 ヶ月齢に達するとランゲルハンス島が萎縮し、インスリン欠乏型糖尿病に移行する。この db/db マウスにおける TX/PGI 比の変動について検討した。生

後 5、8 及び 16 週齢に達した時期に一日尿を個体毎に回収し、測定には各 1-3 mL の尿を用いた。

5 週から 8 週にかけて血糖値及びグリコヘモグロビンが上昇しており、8 週齢の時点で高血糖状態であることが確認された。また、16 週ではインスリンの分泌が低下していた。

2,3-dinor-6-keto-PGF $_{1\alpha}$  は 5 週から 8 週の間で顕著に低下し、その後は大きな変動は認められなかった。11-dehydro-TXB $_2$  は 5 週から 8 週の間で低下したが、その後は上昇した。TX/PGI 比は、経日的に上昇した。

これらの結果より、*db/db* マウスにおいても糖尿病の進行と TX/PGI 比の関連性が明らかになった。

#### D. 考察

糖尿病は I 型糖尿病と II 型糖尿病の二つに大別される。IDDM は自己抗体による膵 $\beta$  細胞の破壊によりインスリンの分泌量の絶対的不足により発症する。NIDDM は糖尿病の 95% 以上を占め、肥満を伴うものが多く、成因は末梢組織（筋や脂肪組織など）におけるインスリンの感受性の低下や、膵 $\beta$  細胞からのインスリン供給不足に伴うインスリン作用の相対的不足である。糖尿病は病態が進行するにつれて、高血糖などの代謝障害による症状だけでなく、細小血管障害による網膜症、腎症、神経症などの慢性合併症を併発する。ある程度進行した合併症では血糖管理はほとんど効果がなく、合併症の予防に努めるしかないが、大多数の患者は理想の血糖状態にないのが現状である。

今回検討した糖尿病患者 69 名の 11-dehydro-TXB $_2$  は健常人の値に比べ有意に高値を示した。2,3-dinor-6-keto-PGF $_{1\alpha}$  の値は、健常人に比べ有意に低値を示した。さらに、尿中 TX/PGI 比は糖尿病患者では健常人に比べ有意に高値を示した。この結果から、糖尿病患者では TXA $_2$  産生の増加と PGI $_2$  産生の低下に伴い、血管系の恒常性が崩れ、血栓が形成しやすい傾向にあることが判明した。糖尿病患者の PGI $_2$  産生が低下した原因として、糖尿病患者血液中の PGI $_2$  産生刺激因子 (PSF) の低下や、糖化 LDL、酸化 LDL による血管内皮細胞の傷害等が考えられる。

一方、今回測定した患者の中で、5 例と少数例ではあるが、抗血小板薬服用患者において TX/PGI 比が有意に低かったことから、糖尿病患者で TXA $_2$  産生が高値を示した原因として、血小板における TXA $_2$  産生の増加が考えられる。

II 型糖尿病患者では発症初期に高インスリン血症が認められ、病態が進行するにつれてインスリンの分泌量が低下してくる傾向にある。従ってインスリン投与患者では、病態が悪化していると考えられる。TX/PGI 比を比較検討してみると、インスリン投与患者では、経口血糖降下薬服用患者、血糖降下薬を使

用していない患者よりも有意に高値を示し、経口血糖降下薬服用患者は血糖降下薬を服用していない患者と同程度であった。つまり、病態の悪化した患者では、TX/PGI 比が高値を示す傾向にあると考えられる。

糖尿病は病態が進行するにつれて細小血管障害による網膜症、腎症、神経症などの慢性合併症を併発する。糖尿病性合併症は血管病変により発症することから、発症には TX/PGI 比の不均衡が深く関与しているものと考えられる。TX/PGI 比を比較検討すると、合併症併発患者では TX/PGI 比が高い傾向を示しており、その傾向は糖尿病性網膜症で強く認められた。厳格な血糖管理がされていない患者では合併症が併発しやすいことが判明した。

また、近年種々の糖尿病性合併症の初期病変の発現には、ポリオール経路の活性亢進が関与しているとして注目されている。アルドース還元酵素 (AR) はポリオール経路を調節する酵素である。AR 活性は血糖値が正常域にある場合は極めて低いが、血糖値の上昇とともに急速に亢進して多量のソルビトールを産生し、細胞膜を通過しないソルビトールは細胞内に蓄積する。引き続いてフルクトースが産生されるが、この際補酵素である NAD $^+$  が NADH に変換され NADH/NAD $^+$  比が上昇する。このため解糖系の中間体であるジヒドロキシアセトンリン酸から *sn*-グリセロール-3-リン酸への還元がおり、ジアシルグリセロール (DAG) の産生が亢進して、プロテインキナーゼ C (PKC) の活性化が起きる。PKC は mitogen-activated protein kinase (MAPK) を介して PLA $_2$  を活性化し、この結果アラキドン酸遊離を増加させる。今回検討した NIDDM 患者尿中において TXA $_2$  の代謝産物である 11-dehydro-TXB $_2$  が増加していた原因の一つは、このような経路を経て基質となるアラキドン酸の遊離が亢進したためと考えられる。

一方、アラキドン酸遊離が亢進しても PGI $_2$  産生が増加しない原因は、培養内皮細胞などの PGI $_2$  産生細胞に糖尿病患者血清を添加すると PGI $_2$  の産生低下が観察されることから、糖尿病患者血中の PGI $_2$  産生刺激因子 (PSF) の低下、または糖化酸化 LDL による血管内皮細胞の傷害等によるものと考えられる。

また、今回検討した患者の中に、亢進した AR 活性を阻害する ARI 服用患者が 5 例含まれており、有意な差は認められなかったが、血糖値が同程度の患者と比較して TX/PGI 比が低値を示す傾向にあった。ARI が PGI $_2$  産生を促進する報告がなされており、ソルビトールの細胞内への蓄積によって引き起こされる細胞障害が、PGI $_2$  産生に影響を与えていることも考えられる。

今回の研究では、より重症である糖尿病患者では TX/PGI 比が高い傾向が認められ、病態の悪化と合併症の併発 TX/PGI 比の不均衡が関与している可能性が示された。従って、糖尿病治療には血糖管理に加

えて TX/PGI 比のモニタリングとその改善による合併症予防、進展阻止が有用であると考えられる。

次に、糖尿病モデルマウスの尿中 TX/PGI 比の変動について検討した。糖尿病患者では健康成人に比べ TX/PGI 比が高値を示したが、患者個々では発症からの時期や疾患の程度、併発疾患も異なる。そこで、糖尿病の発症及び進行と TX/PGI 比の変化について解析するため、モデルマウスを用いて検討を行った。モデルマウスでは服用薬剤の影響もなく、糖尿病の病態をより反映しているものと考えられる。

今回用いた STZ を投与して 30 日後の ICR マウスでは、非誘発マウスと比較して血糖値の上昇が認められ、糖尿病が誘発されていた。11-dehydro-TXB<sub>2</sub> は非誘発マウスより高値を、2,3-dinor-6-keto-PGF<sub>1α</sub> は非誘発マウスに比べ低値を示した。TXA<sub>2</sub> の産生亢進と PGI<sub>2</sub> の産生減少の結果、TX/PGI 比はと非誘発マウスより高く、TX/PGI 比は、糖尿病の発症によって血栓を形成しやすい方向に変化することが明らかになった。

自然発症性の糖尿病マウスである *db/db* マウスは、生後しばらくの間は肥満、ランゲルハンス島肥大、インスリン抵抗性、高インスリン血症、高血糖である。生後 3-6 ヶ月齢に達するとランゲルハンス島の β 細胞が萎縮、壊死し、消失する。これに伴い、インスリン欠乏型糖尿病に移行する。

*db/db* マウスでは 5 週から 8 週にかけて血糖値とグリコヘモグロビンの上昇が認められ、8 週齢の時点で糖尿病を発症していたと考えられる。週齢とともに TX/PGI 比が上昇しており、糖尿病の進行と TX/PGI 比との関連性が明らかになった。ICR マウスの経日的変化から、この飼育条件のマウスでは加齢に伴って TX/PGI 比が減少する傾向にあり、特に TXA<sub>2</sub> 産生の減少が顕著であった。*db/db* マウスでも 5 週齢から 8 週齢の間で TXA<sub>2</sub> 産生の低下が認められ、ICR マウスの傾向と同様であった。しかし、高血糖の認められる 8 週から 16 週にかけて、TXA<sub>2</sub> 産生は増加しており、これは NIDDM 患者と同様に、高血糖の結果もたらされるアラキドン酸の遊離亢進によるものと考えられる。

以上、モデルマウスにおいて糖尿病の発症及び進行と TX/PGI 比の上昇に関連性が認められたことから、NIDDM 患者における結果が裏付けられた。また、このモデルマウスの糖尿病合併症治療薬投与時の TX/PGI 比を測定することによって、薬剤の抗血栓効果の評価が可能になると考えられる。

## E. 結論

糖尿病患者では TX/PGI 比が有意に高値を示し、血栓形成傾向を示すことが明らかとなった。特に、合併症を併発した症例では高値を示した。

モデルマウスを用いた実験では、糖尿病の発症及

び進行と TX/PGI 比の上昇に関連性が認められた。これは投与薬剤の影響がないことから、糖尿病の病態をより反映していると考えられる。

尿中安定代謝体の測定は患者に苦痛を与えることなく試料の採取が容易で、採血操作等によるプロスタノイドの人工的な産生を考慮する必要のない有用な方法である。今回の検討から、尿中 TX/PGI 比の測定は、糖尿病患者における合併症の発症及びその治療効果のモニタリングへの有用性が示された。

## II. 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

### II-1 Cysteinyl LT 産生と気管支喘息との関連性

#### 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)とも呼ばれ、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いたが、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)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、健康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。同様に、内部標準物質 (IS)として用いた $[20,20,20-^3H]LTE4(LTE4-d3)$ 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。

## 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。

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脱水反応( $m/z$  420)、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)、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。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- $d3$ のプロダクトイオンマススペクトルを測定した。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。

以上の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より、 $m/z$  438 >  $m/z$  333をモニタリングするSRM (Selected Reaction Monitoring)によりLTE4を測定した。同様に、ISは $m/z$  441 >  $m/z$  336をモニターした。

## 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、測定条件を決定した。

## 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あるLTE4- $d3$  (2 ng)に対するLTE4のピーク面積比により作製した。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。

## 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、LTE4の精製は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。

ヒト尿試料2 mLにISとしてLTE4- $d3$  (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時間と短時間で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クロマトグラムはLTE4及びそのISのピークをそれぞれ約4.7分に加え、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。

## 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。LTE4非添加尿試料及び100, 200, 400, 800 pgのLTE4を添加した尿試料各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、本測定法の真度は平均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。またLTE4濃度の異なる3検体について、測定値の日差変動を検討したところ、C.V.値(%)は7. %以下と良好であった。

## 7. 健常成人尿中LTE4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LTE4量を測定した。LTE4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  $62.0 \pm 20.8$  pg/mg cre となり、その範囲は  $34.6$  pg/mg cre から  $101.5$  pg/mg cre 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 LTE4 量と同程度であった。尿中 LTE4 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。

## 8. 喘息患者尿中 LTE4 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 LTE4 量を明らかにする目的で、健康成人 17 名と喘息患者 18 名の尿中 LTE4 を定量した。その結果、健康成人で  $59.8$  pg/mg cre、喘息患者で  $180.1$  pg/mg cre の産生量が認められ、喘息患者における有意な LTE4 の産生増加が明らかになった。

## D. 考察

好酸球、好塩基球、肥満細胞などで産生された LTC4 は主に循環血中で  $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼにより LTD4 に、さらにジペプチダーゼにより LTE4 へと代謝される。血中における LTC4 及び LTD4 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 LTE4 として尿中に排泄されるほか、肝に取り込まれ速やかに  $\beta$ 酸化や  $\omega$ 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 LTC4 や LTD4 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 LTE4 の測定は、LTE4 が尿中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現状である。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、極性の高い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る溶出液の制御を行うことにより質量分析計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、健康成人尿中の LTE4 量の測定を行った。本研究で得られた健康成人 20 例の尿中 LTE4 量 ( $62.0 \pm 20.8$  pg/mg cre) は、RIA や EIA などの方法を用いてこれまでに測定された健康成人尿中 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、健康成人尿中の 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、健康人に比して有意な産生増加が認められ、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 cre 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。

## II-2 アトピー性皮膚炎の病態との関連性

### A. 研究目的

アトピー性皮膚炎 (atopic dermatitis, AD) は、アトピー素因を有する患者に生じ、増悪・寛解を繰り返す湿疹を主病変とする疾患である。AD 患者においては IgE 産生の亢進や末梢好酸球数の増加、また病変部においてリンパ球や単球の浸潤及び肥満細胞数の増加が認められており、AD の病態形成に免疫系の異常や炎症反応が関与していると考えられている。このようなことから、近年 Th1/Th2 サイトカインの産生プロファイル解析を始め免疫学的な観点から AD の病態へのアプローチが数多くなされておられ、AD の免疫学的性質が明らかにされてきている。しかし、エイコサノイドのような炎症性メディエーターの動態など、炎症疾患としての AD の病態に関する知見は比較的乏しい。

Cysteinyl LT は血管透過性亢進作用、皮膚における発赤や腫脹誘発作用、また好酸球浸潤作用等を有しており、AD 患者では cysteinyl LT の産生が亢進している可能性が示唆される。しかし、病変部における LTC<sub>4</sub> の産生亢進に関する報告については二次的な産生亢進の可能性が考えられるほか、尿中代謝体の LTE<sub>4</sub> の測定においては統一した結果は得られていないなど、現在まで cysteinyl LT の AD への寄与についていまだ明確な結論は得られていない。

このような背景から、我々は LC/MS-MS 法により、AD 患者の尿中 LTE<sub>4</sub> 量の測定を行い、健常人における測定値と比較するとともに使用薬剤との関連について検討した。さらに、AD 患者における尿中 LTE<sub>4</sub> 量と、血清総 IgE 値及び末梢好酸球数との相関性についても検討した。

### B. 研究方法

LTE<sub>4</sub> の測定は、先に確立した方法により行った。

タンデム質量分析計に 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. 対象

尿中 LTE<sub>4</sub> 量の測定は、試料採取に関して本人の同意が得られた外来の AD 患者 42 例、急性湿疹など AD 以外の皮膚疾患を有する患者 5 例及びアレルギー性疾患に罹患していない健常人 17 例を対象として行った。平均年齢はそれぞれ 20 才、37 才及び 27 才であった。

#### 2. 尿中 LTE<sub>4</sub> 量

AD 患者、非 AD 患者及び健常人の尿中 LTE<sub>4</sub> 量を測定した。本研究では、対象とした全試料について LTE<sub>4</sub> の検出・定量が可能であった。

AD 患者の尿中 LTE<sub>4</sub> 量は平均 130±106 pg/mg cre であり、健常人と同等の値を示す患者も存在するものの健常人尿中 LTE<sub>4</sub> 量の平均値である 60±18 pg/mg cre に比べ有意に高値を示した (p<0.005)。同様に、AD 以外の皮膚疾患患者の尿中 LTE<sub>4</sub> 量は 100±40 pg/mg creatinine であり、健常人尿中 LTE<sub>4</sub> 量に比べ有意に高値を示した (p<0.05)。一方、AD 患者及び AD 以外の皮膚疾患患者の尿中 LTE<sub>4</sub> 量の間には有意な差は認められなかった。

#### 3. 病態変化との関連

新規に来院した AD 患者 4 例を対象に、治療開始前及び治療開始から約 2 週間後の尿中 LTE<sub>4</sub> 量の変動について検討した。患者は外用のステロイド薬、抗ヒスタミン薬、抗アレルギー薬及び抗菌薬を症状に応じて処方されていた。

その結果、全ての患者において治療に伴い尿中 LTE<sub>4</sub> 量の減少が認められた。また、治療開始前に LTE<sub>4</sub> 量が最も高値を示した AD 患者で認められた苔癬化を伴う点状紅斑や丘疹は治療開始後 2 週間で軽減が認められ、皮診の改善に伴い尿中 LTE<sub>4</sub> 量が減少していることが示された。同様に、他の AD 患者においても病状の改善が認められた。

#### 4. 臨床検査値との関連

AD 患者の多くで IgE 産生の亢進や末梢好酸球数の増加が認められている。IgE とアレルギーの複合体により肥満細胞やマクロファージからの cysteinyl LT の産生が惹起されることや、活性化された好酸球が cysteinyl LT を産生することから、cysteinyl LT と IgE 及び好酸球数との関連性が示唆される。そこで、AD 患者の尿中 LTE<sub>4</sub> 量と、血清総 IgE 値及び末梢好酸球数との相関について検討した。

AD 患者血清総 IgE 値の平均値は 6,100 IU/mL であり、165 IU/mL 以下とされる健常人血清総 IgE 値に比べ明らかに高値を示した。さらに、AD 患者の血清総 IgE 値と尿中 LTE4 量の間には有意な正の相関が認められた。一方、AD 患者血中の白血球数に対する好酸球数の割合は平均 9.9% であり、平均 3.0% とされる健常人における値に比べ明らかな高値を示したが、尿中 LTE4 量との関連性は認められなかった。

#### D. 考察

これまで、AD 患者におけるエイコサノイド産生異常の有無については、主に血中及び皮膚病変部におけるエイコサノイド量の測定により検討されている。AD 患者血中 LTB4 量は健常人における値に比較して高値を示す。また、血中 LTC4、LTD4 及び TXB2 量は健常人レベルと同程度であるとされている。また、皮膚病変部においては、LTB4、LTC4 及び PGE2 の産生が亢進していることなどが報告されており、エイコサノイドの病態への寄与が示唆されている。しかしながら、cysteinyl LT の産生亢進に関しては、血中の LTC4 及び LTD4 は不安定であることや、病変部におけるエイコサノイドの測定では試料採取時に人工的に産生が亢進する可能性を否定できないなど、いまだ問題点が残されているのが現状である。炎症疾患としての病態の解明や AD 患者の Quality of Life の向上に寄与する新規治療法を開発する上で、cysteinyl LT の動態解析の意義は大きいと考えられる。そこで、生体内における cysteinyl LT 産生の指標となる尿中 LTE4 量と AD との関連性について検討した。

本研究では、健常人に比べ AD 患者の尿中 LTE4 量は有意に高値を示し、AD 患者において cysteinyl LT 産生が亢進していることが示された。これまで、AD 患者における尿中 LTE4 量の測定についての報告は散見されるのみであり、またその結果は相反している。すなわち、GC/MS-MS による尿中 LTE4 量の測定により AD 患者における cysteinyl LT の産生亢進が報告されている一方、RIA による測定の報告では AD 患者の尿中 LTE4 量と健常人尿中 LTE4 量との間に有意な差は認められないとされている。

このような相違の理由としては、RIA により測定した尿中 LTE4 量が健常人において高値であることが挙げられる。一方、LC/MS-MS では低濃度の LTE4 量を夾雑物の影響を受けることなく測定することが可能である。また健常人尿中 LTE4 量はこれまでに報告されている健常人尿中 LTE4 量と同等であることから、本研究における健常人尿中の LTE4 量は正確な値を反映していると推察される。

さらに、先の報告では対象とした AD 患者がそれぞれ 8 例、7 例と少数例であることも理由として考えられる。本研究においても、AD 患者で統計学的に

有意な尿中 LTE4 量の増加が認められたものの、健常人と同様な値を示す患者が存在することが示されている。また、新規に通院した AD 患者を対象にした尿中 LTE4 量の変動についての検討では、治療による苔癬化を伴う点状紅斑や丘疹といった皮膚症状の改善とともに尿中 LTE4 量の減少が認められた。特に、治療開始前に LTE4 量が高値を示した患者において大きな変化が認められたが、一方 LTE4 量が正常値に近い値を示した AD 患者においては治療後においても同程度であった。以上のことから、cysteinyl LT が全ての AD 患者の病態において重要なメディエーターではないという可能性が示された。

AD 患者の 80% 以上で IgE の産生亢進が認められており、IgE により誘発される種々の反応が AD の病態形成に大きな役割を果たしていると考えられている。このようなことから、炎症性メディエーターの産生に及ぼす IgE の影響について多くの研究がなされてきているが、ヒスタミンなどのメディエーターの産生や病態の重症度と血清総 IgE 値の間には必ずしも相関関係は認められていない。このため、IgE により惹起される肥満細胞の脱顆粒反応が AD の病態に及ぼす影響は比較的小さいものと考えられてきた。一方、本研究では少数例での結果ではあるが、尿中 LTE4 量と血清総 IgE 値との間に有意な正の相関が認められた。この結果は、IgE 受容体を有する肥満細胞やマクロファージばかりでなく、AD の病態形成に関与している好酸球を始めとする多種の細胞が活性化することにより産生された cysteinyl LT が、全身性の cysteinyl LT 産生の指標となる尿中 LTE4 量に反映されたことによるものと考えられた。LTE4 の産生亢進が多種の細胞の寄与の結果であるという考察は、尿中 LTE4 量と末梢血好酸球数との間に有意な相関が認められなかったことから支持された。以上のことから、尿中 LTE4 量が正常値を示す AD 患者では、病態形成に対し、IgE により誘発されるメディエーターの産生・放出の寄与が比較的小さい可能性が示唆された。本研究における結果は、非侵襲的に採取が可能である尿中 LTE4 量の測定が間接的に血清総 IgE 値を類推する方法として有用であるばかりでなく、IgE を介する種々のアレルギー反応の病態への寄与の程度を評価する方法としても有用である可能性を示した。

現在、AD の治療には外用ステロイド薬を基本として内服の抗アレルギー薬や抗菌薬等が併用されている。また、近年免疫抑制薬であるタクロリムスを用いた治療が大きな効果を上げている。従来、抗アレルギー薬単独投与では治療効果は不十分とされているが、本研究の結果は、気管支喘息の治療に有効である cysteinyl LT 受容体拮抗薬などの抗 cysteinyl LT 薬が AD の病態に奏功する可能性を示唆するものと考えられた。さらに、尿中 LTE4 量が健

常人と同等な値を示す AD 患者も存在することから、尿中 LTE<sub>4</sub> 量の測定が個々の患者に適した治療を行うパーソナライズド医療に応用できる可能性が示された。

今後は、乾癬患者においても cysteinyl LT の産生亢進が報告されていることから、今回少数例の検討であった AD 以外の皮膚疾患患者の尿中 LTE<sub>4</sub> 量の測定例数を増やし、cysteinyl LT の産生亢進の疾患特異性についてさらに検討する必要があると考えられる。

## E. 結論

尿中 LTE<sub>4</sub> 量の測定から、AD 患者では cysteinyl LT の産生が有意に亢進していること、症状の改善に伴い cysteinyl LT の産生が減少することを示した。また、尿中 LTE<sub>4</sub> 量が血清総 IgE 値と相関する一方、末梢白血球数に占める好酸球数の割合とは相関性が認められないことを明らかにした。

以上のことから、AD の病態に関して cysteinyl LT が重要な役割を果たしている可能性が示された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 水柿道直、菱沼隆則、3 型プロスタノイドの超微量定量法の確立とその臨床応用、脂質栄養学(総説)、2001、印刷中
2. Hishinuma T, Suzuki N, Aiba S, Tagami H, Mizugaki M., Increased urinary leukotriene E<sub>4</sub> excretion in patients with atopic dermatitis., Br J Dermatol. 2001, 144:19-23.
3. Suzuki N, Hishinuma T, Abe F, Omata K, Ito S, Sugiyama M, Mizugaki M., Difference in urinary LTE<sub>4</sub> and 11-dehydro-TXB<sub>2</sub> excretion in asthmatic patients., Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2000, 62:395-403.
4. Murai Y, Hishinuma T, Suzuki N, Satoh J, Toyota T, Mizugaki M., Determination of urinary 8-epi-prostaglandin F<sub>2α</sub> using liquid chromatography- tandem mass spectrometry: increased excretion in diabetics., Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2000, 62:173-81.
5. Mizugaki M, Ishizawa F, Yamazaki T, Hishinuma T., Epigallocatechin gallate increase the prostacyclin production of bovine aortic endothelial cells, Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2000, 62:157-64.
6. Hishinuma T, Yamazaki T, Mizugaki M., Troglitazone has a reducing effect on thromboxane production, Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2000, 62:135-43.
7. 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.

8. 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, 48 (2), 145-149.

9. 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.

10. Mizugaki, M., Hishinuma, T., Matsumura, E., Murai, Y., Yamazaki, T., Yamanob, 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.

11. Mizugaki, M., Hishinuma, T., Yamaguchi, H., Kanno, K., Hirose, Y., Nakamura, H., Microdetermination of the 6,15-diketo-13,14-dihydroprostaglandin F<sub>1α</sub> in human plasma using gas chromatography/selected ion monitoring with [<sup>18</sup>O]6,15-diketo-13,14-dihydroprostaglandin F<sub>1α</sub> as an internal standard., Prostaglandins Other Lipid Mediat., 1999, 58(2-4), 187-93.

12. 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.

13. Mizugaki, M., Hishinuma, T. and Suzuki, N., Determination of leukotriene E<sub>4</sub> in human urine using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, J Chromatogr B, 1999, 729(1-2), 279-85.

14. Mizugaki, M., Hishinuma, T. and Nishikawa, M., Docosahexaenoic acid (DHA) : an update (Review), Drugnews and Perspective, 1999, 12(7), 412-415.

15. 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.

16. 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.

17. 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, 115, 244-250.

18. 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.

19. 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.

20. Yamanobe S., Nakagawa Y., Hishinuma T., Mizugaki M., Tamai M., Analysis of urinary 11-dehydro-thromboxane B2 in patients with occluded retinal vein using GC/SIM, Prostaglandins leukotriens and essential fatty acids.1998, 58(1).65-68.

21. Hishinuma T., Koseki Y., Murai Y., Kotake J., Ishii F., Suzuki K., Mizugaki M., Elevation of the thromboxane A2 /prostacyclin ratio in urine of diabetic mice analyzed by gas chromatography/selected ion monitoring, Prostaglandins, 1998, 55. 83-93.

22. M. Mizugaki, K.Ito, Y.Ohyama, Y.Konishi, Satoshi.Tanaka, K.Kurasawa, Quantitative analysis of Aconitum alkaloids in the urine and serum of a male attempting suicide by oral intake of aconite extract, published in J Anal Toxicol, 1998, 22(4), 336-340.

## 2. 学会発表

1. 菱沼隆則, Bruce R. Canaday, 水柿道直

Pharmaceutical care and practice in North Carolina, USA, 第8回クリニカルファーマシーシンポジウム、平成12年7月、仙台

2. 水柿道直、菱沼隆則、3型プロスタノイドの超微量定量法の確立とその臨床応用(学術賞記念講演)、日本脂質栄養学会第9回大会、平成12年9月、東京

3. 菱沼隆則、鈴木直人、塚本宏樹、水柿道直、気管支喘息患者におけるロイコトリエン及びトロンボキサン産生と病態との関連、日本脂質栄養学会第9回大会、平成12年9月、東京

4. 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.

5. 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

6. 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.

7. 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。

8. 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 F2 $\alpha$ 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

9. 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

10. 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

11. 水柿道直、超微量分析法を用いたプロスタノイドの臨床薬学的研究、日本薬学会第118年会(学術貢献賞受賞講演)、京都、1998年3月

12. 村井ユリ子、古関優子、菱沼隆則、水柿道直、鈴木健一、糖尿病患者における尿中トロンボキサン/プロスタサイクリンバランスと病態、日本薬学会第118年会、京都、1998年3月

13. 中村浩規、菱沼隆則、水柿道直、澤井高志、GC/SIM法によるリウマチ患者尿中トロンボキサン/プロスタサイクリンバランスの解析、日本薬学会第118年会、京都、1998年3月

14. 山崎研、菱沼隆則、水柿道直、培養細胞のトロンボキサン産生能に及ぼすトログリタゾンの添加効果-GC/MSを用いた検討-, 日本薬学会第118年会、京都、1998年3月

15. 菱沼隆則、水野麻里子、横尾友隆、菊地昭、小原恵美子、山崎研、水柿道直、山田雅昭、尾股健、伊藤貞嘉、佐藤秀昭、高脂血症患者のトロンボキサンA3産生に及ぼすEPAの添加効果、日本薬学会第118年会、京都、1998年3月

16. 水柿道直、GC/MSによるプロスタグランジン代謝体の微量定量とその臨床応用、第46回質量分析総合検討会(シンポジウム)、群馬、1998年5月

17. 水柿道直、プロスタノイドの超微量定量とその医療への展開、分析化学の明日を考える会(招待講演)、東京、1998年6月

18. 水柿道直、特別講演「脂質と健康」、市民講演会：石巻薬剤師会 石巻市、1998年9月

19. 菱沼隆則、工藤義樹、古関優子、山崎研、水柿道直、Thromboxane / prostacyclin バランス及び血漿脂肪酸組成等に及ぼすDHA含有カプセル剤摂取の影響、日本脂質栄養学会第7回大会 仙台、1998年9月

20. 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

分担総合研究報告書

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・有効性の中に存在する法則性を解明し、その適正使用法に関する情報を得た。また、新規抗がん剤 KRN5500 の臨床試験成績から用法、用量と血中濃度—時間推移の関係を説明する母集団薬物動態モデルを構築した。

A. 研究目的

母集団薬物動態は、臨床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。

本研究では、新規抗がん剤のゲムシタビンと、スピカマイシンの新規誘導体である KRN5500 を対象薬とした。ゲムシタビンは、固形腫瘍とくに非小細胞肺癌、肝臓がんの有効であり、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。一方、KRN5500 はスピカマイシン誘導体の中でヒト腫瘍の異種移植モデルに対する最も強い活性と、最も高い治療指数を示し、現在日本およびアメリカにおいて臨床開発中である。

そこで、母集団薬物動態解析法を応用し、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、及び、適用患者群の薬物動態を予測するための母集団モデルを構築することを目的とした。

B. 研究方法

本研究では、血中濃度データを NONMEN (nonlinear mixed effect model) プログラムを用いて解析し、母集団薬物動態情報を得た。

ゲムシタビンは国内 3 施設において第 I・II 相試験に参加した非小細胞肺癌患者 12 名を対象として、週 1 回 3 週連続投与された後 1 週間休薬し以

後これを繰り返した。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 回採血を行い総計 59 点の血中濃度データが集められた。シスプラチンの併用投与時は、シスプラチン投与前に 1 ポイントのみ採血された。これらの血中濃度データを NONMEN により解析し、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共に、各個人のパラメータ値は Bayesian 法により推定した。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ビンの用量規定毒性となる血液毒性とシスプラチンの主たる副作用である腎毒性に着目した。

KRN5500 は臨床第 I 相試験に登録された 18 人の患者を対象とし、2 時間かけて点滴を行った。投与量は 3~21mg/m<sup>2</sup> であり、投与開始から 50 時間後まで 16 点の血中濃度データが、各患者より得られた。データ解析により段階的にモデルを構築し、得られた母集団薬物動態モデルはブートストラップ・再サンプリング法を用いて評価した。

本試験の実施に際しては、患者への十分な説明と文書による同意を得た。

C. 研究結果

ゲムシタビ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、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、各投与機会毎にベイズ推定して AUC (area under the curve) を求めた。

シスプラチン併用による影響を検討したところ、総曝露量を表すゲムシタピン AUC 値に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。

KRN5500 の母集団モデルは GAM 解析の結果を基礎として NONMEN プログラムを用いて構築した。性差と P S は V1 を予測するための変数である事がわかったので、その変数を回帰モデルに当てはめた。ここで V1 は中心コンパートメントの典型的な母集団の分布容積である。このモデルに 200 データセットを繰り返しあてはめ、各パラメータを算出した。

最終的に構築されたモデルの安定性を検証した結果、オリジナル・データセットから得られたパラメータと 200 データセットから算出された平均パラメータの差は 15%以内であった。

#### 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結果、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が、これは PR 症例数が 3 例と少なかったために、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。

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、シスプラチン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、シスプラチン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。

さらに本研究では、KRN5500 の血中濃度一時間推移を記述し、引き続き行われる臨床試験において限られたサンプリングスケジュールを計画および実行するための母集団薬物動態モデルを構築した。構築されたモデルは 200 のデータセットによくあては

まり、算出されたパラメータはオリジナルデータのパラメータとよく一致していた。このことから、構築されたモデルが安定していることが示された。

#### E. 結論

母集団薬物動態解析法を応用して得られた、ゲムシタピンの用法・用量、薬物血中濃度、安全性・有効性に関する知見は、ゲムシタピンを臨床使用する上で有意義な情報である。また、臨床試験成績から構築された KRN5500 の母集団薬物動態モデルは、適用患者群における薬物動態を予測するのに有用である。

#### 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.
- 7) T. Kita, Y. Tanigawara, N. Aoyama, T. Hohda,

Y.Saijoh, F.Komada, T.Sakaeda, K.Okumura, T.Sakai, and M.Kasuga, CYP2C19 genotype related effect of omeprazole on intragastric pH and antimicrobial stability, Pharm.Res., in press.

- 8) T.Sakai, N.Aoyama, T.Kita, T.Sakaeda, K.Nishiguchi, Y.Nishitora, T.Hohda, D.Shirasaka, T.Tamura, Y.Tanigawara, M.Kasuga, and K.Okumura, CYP2C19 genotype and pharmacokinetics of three proton pump inhibitors in healthy subjects, Pharm.Res., in press.
- 9) T.Kita, Y.Tanigawara, S.Chikazawa, H.Hatanaka, T.Sakaeda, F.Komada, S.Iwakawa, and K.Okumura, N-Acetyltransferase2 genotype correlated with isoniazid acetylation in Japanese tuberculous patients, Biol.Pharm.Bull., 24(5) in press.
- 10) Hirota Takama, Hideji Tanaka, Tomohiro Sudo, Tomohide Tamura, Yusuke Tanigawara, Population pharmacokinetic modeling and model validation of a spicamycin derivative, KRN5500, in phase 1 study, Cancer Chemotherapy and Pharmacology, in press.
- 11) K.Takara, Y.Tanigawara, F.Komada, K.Nishiguchi, T.Sakaeda, and K.Okumura, Nicardipine and itraconazole inhibited transcellular transport of digoxin, Pharm. Pharmacol. Commun., 6, 167-171 (2000).
- 12) T.Nakamura, M.Kakumoto, K.Yamashita, K.Takara, Y.Tanigawara, T.Sakaeda, and K.Okumura, Factors influencing the prediction of steady state concentrations of digoxin, Biol. Pharm. Bull., in press.
- 13) N.Ohmoto, Y.Tanigawara, M.Kakumoto, J.Funakoshi, K.Takara, T.Nakamura, T.Sakaeda, M.Hirai, and K.Okumura, Interaction of digoxin with antihypertensive drugs, Jpn. J. Ther. Drug Monit., 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



# 平成 12 年度研究報告書

平成 12 年度厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）  
総括研究報告書

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究

主任研究者 鍋島 俊隆

名古屋大学大学院医学研究科医療薬学・医学部附属病院薬剤部教授・薬剤部長

研究要旨：わが国のファーマシューティカルケアの向上と病院薬剤師の業務を遂行する上で手本となるべき国公立大学附属病院薬剤部の形成を目指して、本年度（第 3 年度）は米国で臨床薬剤師として実務を担当している薬剤師や医療薬学担当教官を合計 8 名招聘し、臨床活動の指導を受けた。また、病棟業務の指導者の育成を目指して、医療薬学研修のために 4 名の若手病院薬剤師を米国へ派遣した。招聘した外国人薬剤師から臨床活動における具体的なアドバイスや問題提起がなされ、薬剤師が直面する問題解決に大いに役立った。さらに、これらの指導や講演を通して、病院薬剤師としての職能の自覚と意識改革が進んだ。本研究の目的のひとつである病院薬剤師の業務の手本となるべき国公立大学附属病院薬剤部の中核の形成が達成されたと考えられる。基礎研究においては、薬物依存の発生機序の解明と予防薬の開発、薬物の体内動態メカニズムの解明、薬効・安全性の評価、医薬品の適正使用および副作用・相互作用の防止など数多くの医薬品の適正使用に関する研究成果が得られた。本研究は、我が国におけるファーマシューティカルケアの格段の向上および国民の医療・福祉に大きく貢献できるものと期待される。

分担研究者氏名

- 1) 鍋島 俊隆 名古屋大学大学院医学研究科医療薬学・医学部附属病院薬剤部 教授
- 2) 宮崎 勝巳 北海道大学医学部附属病院薬剤部 教授
- 3) 岩本 喜久生 島根医科大学医学部附属病院薬剤部 教授
- 4) 大石 了三 九州大学医学部附属病院薬剤部 教授
- 5) 水柿 道直 東北大学医学部附属病院薬剤部 教授
- 6) 谷川原 祐介 慶應義塾大学病院薬剤部 教授

A. 研究目的

医薬品の適正使用に積極的に関与し、患者へより良いファーマシューティカルケアを提供することは、病院薬剤師に課せられた使命である。このことは我が国の病院薬剤師には既に十分に認識されているものの、実際の臨床活動においては、未だその実践が十分でないのが現状である。この原因の一つには、手本となるべき臨床活動を実践している基幹病院が少ないことが考えられる。本研究は、(1) 医薬品の適正使用とファーマシューティカルケアに関する医療先進国から薬剤師や医療薬学担当教官を招聘し、国内の基幹病院において実務や情報提供の在り方について指導を受けるとともに、医療薬学研修のために病院薬剤師を米国に

派遣することにより、我が国の病院薬剤師の業務の手本となるべき国公立大学附属病院薬剤部の形成を目指すものである。さらに、(2) 患者の QOL を向上させ、医薬品の適正使用を図るために、医薬品の副作用の対策、発現機序、医薬品の吸収・排泄機構および相互作用に関する基礎研究を行うことを目的とする。

B. 研究方法

病院薬剤師の臨床活動のレベルアップのための臨床研究

（外国人臨床薬剤師、研究者の招聘と基幹大学病院薬剤部の形成推進事業）

(1) (財)日本公定書協会が実施する平成 12 年度医薬安全総合研究推進事業に係る外国人研究者招へい事業により 8 名の外国人薬剤師および研究者を招聘した。招聘した外国人による講演会・セミナーなどの開催を日本病院薬剤師会に委託し、下記のように基幹大学病院薬剤部の形成推進事業を実施した。

全国を北海道・東北、関東、東海・関西および中国・九州の 4 地区に分け、各地区の基幹病院（招聘担当代表者：北海道大学医学部附属病院／宮崎勝巳、東北大学医学部附属病院／水柿道直、順天堂大学医学部附属病院順天堂医院薬剤部／西谷篤彦、筑波大学附属病院薬剤部／幸田幸直、名古屋大学医学部附属病院薬剤部／鍋島俊隆（2 名受入）、島根医科大学医学部附属病院薬剤

部／岩本喜久生、九州大学医学部附属病院薬剤部／大石了三）へ各 1 名合計 8 名の招聘研究者をそれぞれ派遣した。

(2) (財)日本公定書協会が実施する平成 12 年度医薬安全総合研究推進事業に係る日本人研究者派遣事業により、医療薬学研修のため、平成 12 年 10 月 1 日から平成 13 年 3 月 31 日までの期間、名古屋大学医学部附属病院の山村恵子をカリフォルニア大学サンフランシスコ校薬学部へ、三重大学医学部附属病院の賀川義之と神戸大学医学部附属病院の西口工司をミシシッピ大学メディカルセンターへ、また平成 13 年 1 月 1 日から平成 13 年 3 月 31 日までの期間、九州大学医学部附属病院の牧野和隆をフェアビュー大学医療センターへそれぞれ派遣した。

(3) (財)日本公定書協会が実施する平成 12 年度医薬安全総合研究推進事業に係る研究成果等普及啓発事業として、当該事業の 3 年間のまとめの成果を発表するシンポジウム「医薬品の適正使用における病院薬剤師の役割」を平成 13 年 1 月 27 日から 28 日にかけて名古屋国際会議場レセプションホールにて行った。

医薬品の適正使用に関する基礎研究  
行動薬理学的試験方法、in vitro 薬物吸収予測システム、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) 法、in situ 胃内容排出速度試験および微小血管内皮細胞培養試験を用いる。

### C. 研究結果

病院薬剤師の臨床活動のレベルアップのための臨床研究

(外国人臨床薬剤師、研究者の招聘と基幹大学病院薬剤部の形成推進事業)

(1) 外国人臨床薬剤師、研究者の招聘により得られた研究結果

北海道・東北地区 1：(平成 12 年 6 月 26 日～7 月 10 日、招聘者：Bruce R. Canaday, Pharm.D.)

東北大学医学部附属病院 (6 月 27 日～30 日) および神戸大学医学部附属病院薬剤部 (7 月 7 日) において臨床活動の指導を受けた。また、日本病院薬剤師会および静岡県病院薬剤師会共催による特別講演会 (7 月 4 日)、日本病院薬剤師会および兵庫県病

院薬剤師会共催による特別講演会 (7 月 6 日) を開催した。また、第 8 回クリニカルファーマシーシンポジウム (仙台) において一般演題発表および特別講演 (7 月 1～2 日) を行い、東北大学医学部附属病院 (6 月 29 日) にて特別講演会を開催した。北海道・東北地区 2：(平成 13 年 2 月 28 日～3 月 14 日、招聘者：Barry L. Carter, Pharm.D.)

北海道大学医学部附属病院 (3 月 2～5 日および 3 月 7 日)、秋田大学医学部附属病院 (3 月 8 日) および東北大学医学部附属病院 (3 月 10～13 日) で臨床活動の指導を受けた。また、本事業研究班および日本公定書協会主催、日本病院薬剤師会および北海道病院薬剤師会との共催による特別講演会 (3 月 2 日)、本事業研究班および日本公定書協会主催、日本病院薬剤師会および秋田県病院薬剤師会との共催による特別講演会 (3 月 8 日)、本事業研究班および日本公定書協会主催、日本病院薬剤師会および宮城県病院薬剤師会との共催による特別講演会 (3 月 9 日) を開催した。

関東地区 1：(平成 13 年 1 月 28 日～2 月 11 日、招聘者：Gordon S. Sacks, Pharm.D.)：シンポジウム「医薬品の適正使用における病院薬剤師の役割」(1 月 28 日、名古屋国際会議場レセプションホール) にて特別講演を行った後、関東地区へ移動し、筑波大学附属病院 (1 月 29 日～2 月 2 日) および千葉大学医学部附属病院 (2 月 5～9 日) において臨床活動の指導を受けた。また、本事業研究班および日本公定書協会主催、日本病院薬剤師会および茨城病院薬剤師会との共催による特別講演会 (2 月 2 日)、本事業研究班および日本公定書協会主催、日本病院薬剤師会および千葉県病院薬剤師会との共催による特別講演会 (2 月 6 日) を開催した。

関東地区 2：(平成 13 年 2 月 4 日～2 月 19 日、招聘者：David M. DiPersio, Pharm.D.)：順天堂大学医学部附属順天堂医院 (2 月 5～9 日) および昭和大学医学部附属病院 (2 月 13～15 日) において臨床活動の指導を受けた。また、本事業研究班および日本公定書協会主催、日本病院薬剤師会および東京都病院薬剤師会との共催による特別講演会

(2月15日)を開催した。

東海・関西地区 1 : (平成 12 年 10 月 15 日～10 月 29 日、招聘者 : Dr. Debra K. Gardner, Pharm.D.)

金沢大学医学部附属病院 (10 月 17～19 日)、名古屋大学医学部附属病院 (10 月 20～25 日) および京都大学医学部附属病院 (10 月 26～27 日) において臨床活動の指導を受けた。また、本事業研究班および財団法人日本公定書協会主催、日本病院薬剤師会および石川県病院薬剤師会との共催による特別講演会 (10 月 17 日)、本事業研究班および財団法人日本公定書協会主催、日本病院薬剤師会および愛知県病院薬剤師会との共催による薬剤師病棟業務指導者研修会 (10 月 21 日)、本事業研究班および財団法人日本公定書協会主催、日本病院薬剤師会および京都府病院薬剤師会との共催による学術講演会 (10 月 27 日) を開催した。また金沢大学医学部附属病院 (10 月 18 日)、名古屋大学医学部附属病院 (10 月 24 日) にて特別講演会を開催した。

東海・関西地区 2 : (平成 13 年 2 月 17 日～2 月 28 日、招聘者 : Dr. Shirley J. Reitz, Pharm.D.)

名古屋大学医学部附属病院 (2 月 19～21 日)、京都大学医学部附属病院 (2 月 22、23 日)、および三重大学医学部附属病院 (2 月 26、27 日) において臨床活動の指導を受けた。また、本事業研究班および日本公定書協会主催、日本病院薬剤師会および愛知県病院薬剤師会との共催による薬剤師病棟業務指導者研修会 (2 月 19 日)、本事業研究班および日本公定書協会主催、日本病院薬剤師会および京都府病院薬剤師会との共催による特別講演会 (2 月 23 日)、本事業研究班および日本公定書協会主催、日本病院薬剤師会および三重県病院薬剤師会との共催による特別講演会 (2 月 26 日) を開催した。また名古屋大学医学部附属病院 (2 月 20 日) にて特別講演会を開催した。

九州地区 1 : (平成 13 年 1 月 5 日～1 月 19 日、招聘者 : Karim A. Calis, Pharm.D.)

九州大学医学部附属病院 (1 月 9～11 日)、長崎大学歯学部附属病院 (1 月 12～15 日)、熊本大学医学部附属病院 (1 月 16～18 日)

において臨床活動の指導を受けた。また、本事業研究班および日本公定書協会主催、日本病院薬剤師会および福岡県病院薬剤師会との共催による特別講演会 (1 月 11 日)、本事業研究班および日本公定書協会主催、日本病院薬剤師会および長崎県病院薬剤師会との共催による学術講演会 (1 月 12 日)、本事業研究班および日本公定書協会主催、日本病院薬剤師会および熊本県病院薬剤師会との共催による学術講演会 (1 月 16 日) を開催した。

九州地区 2 : (平成 13 年 1 月 26 日～2 月 10 日、招聘者 : Paula A. Thompson, Pharm.D.)

シンポジウム「医薬品の適正使用における病院薬剤師の役割」(1 月 27～28 日、名古屋国際会議場レセプションホール) に参加し特別講演を行った後、中国地区へ移動し、島根医科大学医学部附属病院 (1 月 30 日～2 月 1 日)、島根県中央病院 (1 月 31 日)、松江赤十字病院 (2 月 1 日)、岡山大学医学部附属病院 (2 月 5、6 日) および広島大学医学部附属病院 (2 月 7 日) において臨床活動の指導を受けた。また、本事業研究班および日本公定書協会主催、日本病院薬剤師会および島根県病院薬剤師会との共催による特別講演会 (1 月 31 日)、本事業研究班および日本公定書協会主催、日本病院薬剤師会および岡山県病院薬剤師会との共催による特別講演会 (2 月 9 日) を開催した。

(2) 米国への若手病院薬剤師の派遣により得られた研究結果

山村恵子はカリフォルニア州立カリフォルニア大学サンフランシスコ校薬学部において臨床の現場で求められる薬剤師を育成するシステムを学び、さらに薬剤師のファーマシューティカルケアの実践様式を調査研究した。

賀川義之はミシシッピ大学メディカルセンターにおいて血液抗凝固療法、喘息および糖尿病クリニックでの研修などからチーム医療の中における薬剤師の役割に関する研究を行った。

西口エ司はミシシッピ大学メディカルセンターにおいて薬剤師に実務の指導を受け、高次医療におけるファーマシューティカルケアの実践と救急医療を中心とした医療チームにおける薬剤師の役割に関する調査研