

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第4分野

稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

目 次

課題番号		
20000989A 990A 41156	テオフィリンの未熟児無呼吸発作に対する臨床的研究	小川雄之亮 …… 1
986A 41203	門脈血行異常症（門脈圧亢進症）に対する適応外使用医薬品（塩酸プロプラノロール）の臨床研究に関する研究	杉町 圭蔵 …… 4
987A 42003	潰瘍性大腸炎およびクローン病緩解維持に対するアザチオプリンの有効性に関する臨床研究	日比 紀文 …… 11
988A 42020	多発性筋炎・皮膚筋炎に合併する間質性肺炎に対するシクロスポリン療法に関する研究	宮坂 信之 …… 18
991A 42140	難治疾患・稀少疾患を主とした医薬品の適応外使用のエビデンスに関する調査研究	津谷喜一郎 …… 23
992A 42204	輸入熱帯病・寄生虫症に対するオーファンドラッグの臨床評価に関する研究	大友 弘士 …… 34
42230	脊髄小脳変性症に対する適応外使用医薬品「ワクシニアウイルス接種家兔炎症皮膚抽出液製剤（ノイロトロピン）」の開発研究	米田 良三 …… 37

潰瘍性大腸炎およびクローン病緩解維持に対するアザチオプリンの有効性に関する臨床研究

所属 慶應義塾大学医学部内科学教授

研究者 日比 紀文

分担研究者 下山 孝	兵庫医科大学第四内科教授
金城福則	琉球大学第一内科教授
北洞哲二	国立大蔵病院消化器内科医長
小尾伸之	グラクソ・スミスクライン株式会社 医薬研究開発本部

要旨 炎症性腸疾患 25 例におけるアザチオプリンの緩解維持効果について検討した。6 ヶ月後の緩解維持率は潰瘍性大腸炎 81%、クローン病 100%であった。4 例 (18%) で副作用が認められたが、薬剤の中止により軽快した。TPMT 遺伝子の変異は本剤の骨髄抑制発現の予測因子になることが示された。種々のサイトカインは本剤の治療効果を反映する可能性が示唆された。

1 研究目的

炎症性腸疾患 (潰瘍性大腸炎・クローン病) は原因不明の難治性疾患であり、本邦においても増加の一途をたどっている。両疾患に対しては 5 アミノサリチル酸製剤や副腎皮質ステロイドが有効とされている。しかし現在の治療法のみでは完全に緩解を維持するのは困難であり、再燃緩解を繰り返す例が多く存在する。さらにステロイド長期投与による副作用やステロイドを減量する際に再燃することも多い。また小腸型クローン病に有効とされている経管栄養量は患者に著しい QOL の低下を強いることになる。このように炎症性腸疾患の治療には問題が多く、新しい治療法の導入は急務である。アザチオプリンは欧米を中心に複数の controlled trial により有効性、安全性が確認され、また難治性潰瘍性大腸炎の長期緩解維持での有効性も報告されている。従来の欧米の報告ではアザチオプリン 1.5-2.0mg/kg の投与を行っており薬剤による副作用の問題が指摘されている。一方本邦では炎症性腸疾患に対する免疫抑制剤の使用例は少なく、臨床効果、副作用などについて詳細に報告された例はない。今回の研究は炎症性腸疾患に対するアザチオプリン少量投与 (50mg/日) の有効性、特に緩解維持・ステロイド離脱困難例に対する効果について検討することを目的とする。

またこれまでの腎移植・骨髄移植などの経験より、アザチオプリンが骨髄抑制を起こし、このことが白血球や血小板などを減少させ、重篤な感染症や臓器障害を起こすことが知られている。6-MP/アザチオプリンを不活化する酵素である TPMT (Thiopurine S-methyltransferase) には遺伝子多型があり、TPMT の酵素活性と密接な関係があることが近年報告され、TPMT の酵素活性が欠損・低下している患者にこれらの免疫抑制剤を投与すると骨髄抑制などの副作用の出現が多いことが知られてきている。今回の研究では TPMT の遺伝子多型と骨髄抑制の発症との関係を追跡することにより、TPMT 遺伝子多型の測定が骨髄抑制発生の予測因子として有用であるかを検討することを第 2 の目的とする。

さらに炎症性腸疾患における再燃予測の有効なパラメーターの開発および病因・病態解明を目的として、大腸粘膜、マクロファージのサイトカイン (TNF- α , IL-7, IL-18 等) 産生能などの免疫学的パラメーターについて検討を行った。

2 研究方法

1) 潰瘍性大腸炎・クローン病に対するアザチオプリン (イムラン錠) の緩解維持効果の検討

本試験は慶應義塾大学消化器内科、兵庫医科大学第四内科、琉球大学第一内科、国立大蔵病院消化器科の 4 施設による非盲検非対照試験であり、上記対象患者に対しアザチオプリン (イムラン) 50mg/

日の経口投与を6ヶ月行なった。評価方法として潰瘍性大腸炎群、クローン病群それぞれ6ヶ月後の緩解維持率を主要評価項目とし、緩解維持率は各症例の緩解維持期間より生命表 (Kaplan-Meier 法) を適用して求めた。副次的評価項目として疾患活動性の推移 (潰瘍性大腸炎: Truelove&Witts による CAI (Clinical Activity Index)、クローン病: CDAI (Crohn's Disease Activity Index) の変化およびステロイド使用量の変化を検討した。また安全性の評価として有害事象 (自他覚症状、臨床検査値の異常変動) の発現頻度、程度、重症度、処置、転帰について検討を行った。

2) 炎症性腸疾患に対する 6-MP・アザチオプリン投与症例の TPMT 遺伝子多型性と副作用との関係の検討

1 対象

1980-1998 年に潰瘍性大腸炎・クローン病に対し 6-MP・アザチオプリンが投与された 139 例中、骨髄抑制を起こした症例 13 例、消化器症状、肝障害を起こした 7 例、副作用を起こさなかった症例 45 例、及び対照群として健常人 136 例を対象とした。

2 方法

患者に対し本試験施行前に本研究の趣旨を説明し、同意が得られた患者より採血を行い、genomic DNA を抽出し PCR を施行、さらに MWO、ACC の制限酵素による digestion を行い、TPMT 遺伝子の変異の有無を検討した。なお今回の研究では HOT SPOT と言われている 238,460,719 の 3 カ所の変異について検討した。これらの結果と本人への問診・カルテ閲覧により、各群における TPMT 遺伝子変異の頻度、6-MP・アザチオプリンの副作用との関係について検討した。

3) 臨床評価と免疫学的パラメーターの変動の関連性追究

炎症性腸疾患における再燃予測の有効なパラメーターの開発および病因・病態解明を目的として、潰瘍性大腸炎については血中および大腸粘膜における IL-7、IL-7 receptor、クローン病については TNF α 、IL-12、IL-18 を測定し、治療前後の活動度と各サイトカインの濃度との関係を検討した。また治療前のサイトカイン濃度と治療効果 (再燃群、非再燃群) との関係についても検討を行った。

3 研究成果

1) -1 潰瘍性大腸炎に対するアザチオプリンの緩解維持効果・安全性

本試験に登録された患者は 22 例であった (図 1)。うち試験が終了した症例 (6ヶ月) 12 例、3-5 ヶ月の短期観察例 6 例、副作用により中止した症例が 3 例、本人の自主的希望により中止した症例が 1 例であった。再燃した症例は 2 例で、再燃時期はそれぞれ、28 日、57 日であった。本治療 6ヶ月後の緩解維持率は 83.7% であり (図 2)、短期観察例 6 例を加えた 18 例を対象とすると 91.9% と高率であった。治療前、治療 6ヶ月後の CAI はそれぞれ 2.6 ± 0.4 、 1.7 ± 0.6 であった (図 3)。また緩解維持が可能であった症例の経口ステロイド量の推移は治療前 5.0mg/日、治療後 1.1mg/日であり、アザチオプリンにより有意にステロイドの減少が認められた ($p=0.021$ 、図 4)。副作用は 4 例 (18%) で認められ脱毛、肝機能障害、膀胱炎、発熱、軀幹のほてり感であった。いずれも治療開始 2 週間以内に副作用は出現していた。4 例中 3 例は薬剤中止により、1 例 (脱毛) は試験継続のまま自然に副作用は軽快した。今回の prospective な検討では白血球減少、血小板減少などの骨髄抑制が認められた症例はなかった。

1) -2 クローン病に対するアザチオプリンの緩解維持効果・安全性

本試験に登録された患者は 3 例であった。全例 6ヶ月の試験終了しており、3 例とも緩解維持が可能であった。また CDAI は全例で治療により減少が認められた。副作用は試験期間中認められなかった。

2) 炎症性腸疾患に対する 6-MP・アザチオプリン投与症例の TPMT 遺伝子多型性と副作用との関係の検討

1980-1998 年に 6-MP・アザチオプリンが投与された例で retrospective に TPMT 遺伝子の多型性を検討したところ、6-MP・アザチオプリンにより骨髄抑制がみとめられた 13 例中 7 例 54% で遺伝子

多型が認められたが、骨髄抑制以外の副作用の 7 例では多型は認められず、副作用がなかった 45 例中でも 1 例で多型が認められたのみであった。また健常人 136 例中 2 例、1%で遺伝子多型が認められた。

過去に投与された症例で骨髄抑制を起こした 13 例中多型があった 7 例となかった 6 例を比較してみると、多型があった症例 7 例中 5 例で白血球数が 2000 以下になったのに対し、多型がなかった 6 例では 2000 以下になった症例は認められなかった。また 6MP・アザチオプリンが投与されてから骨髄抑制が起こるまでの期間は多型があった群では全例 6 ヶ月以内に起こっていた。

TPMT 遺伝子の変異があった 8 例中、骨髄抑制がおこった症例は 7 例、起こさなかった症例は 1 例のみであった。一方変異がなかった症例 57 例中 51 例は骨髄抑制が認められなかった。すなわち sensitivity は 54%にとどまったが、specificity は 98%と高値を示した。

3) 臨床評価と免疫学的パラメーターの変動の関連性追究

アザチオプリン投与後再燃した潰瘍性大腸炎 2 例の大腸粘膜内 IL-7 濃度は非再燃例に比し有意に低かった。また拡大内視鏡によって解析された大腸粘膜炎症の程度が高い例で IL-7 濃度は低い傾向を示した。

一方クローン病では再燃した症例がなかったためサイトカインと再燃の検討を行うことはできなかったが、大腸内 IL-12、IL-18 濃度と CDAI は正の相関関係が認められ、IL-12、IL-18 のサイトカイン測定は治療効果の予測因子として有用な可能性が示された。

4 考察

今回の研究によりアザチオプリン 50mg/日投与 6 ヶ月後の緩解維持率は潰瘍性大腸炎 81%、クローン病 100%と高率であることが示され、その有用性が示された。また 4 例で副作用が認められたものの治療中止により軽快し、可逆性であることより安全性についても確認された。さらに retrospective な検討であるが、TPMT 遺伝子の変異と 6-MP・アザチオプリンによる骨髄抑制は密接な関係があることが示された。

潰瘍性大腸炎、クローン病の原因は不明であり、根本的な治療がないのが現状であるが、これまで我々は潰瘍性大腸炎大腸上皮における IL-7 の減少、およびクローン病マクロファージにおける IL-18 発現の増加が認められることを示しており、これらサイトカインが炎症性腸疾患の病因・病態に関与することを報告してきた。今回の検討で緩解期の症例でアザチオプリン投与前に大腸上皮における IL-7 が低下していた症例で再燃を認めた。また IL-18 と CDAI は相関関係があることが示された。

アザチオプリンの有用性は大きくわけて 1 緩解期の患者において既存の治療に本治療を加えることにより緩解維持期間の延長が可能となること、2 ステロイドとの併用で患者の症状を増悪することなく、ステロイド治療を減量または中止することの 2 つがあると考えられている。今回の研究の目的は主に 1 であったためステロイドは比較的少量の患者が対象であったが、大部分の症例が過去に再燃を繰り返している例、ステロイド減量により増悪する例であるにもかかわらず、有意にステロイド量の減少が認められた。また現在我々のグループでは経口ステロイド量 15-30mg/日の症例に対するステロイド減量効果について検討を行っておりその有効性が示されている。

潰瘍性大腸炎・クローン病の薬物治療の有効性を考慮する際に、疾患の急性期と緩解期を区別して考える必要があるが、アザチオプリンの効果は投与された量の蓄積量と臨床効果に正の相関関係があることより、緩解期に比較的長期間治療することによりその効果が発揮される。これはアザチオプリンの代謝産物である 6-Thioguanine nucleotide (6-TG) の半減期、定常状態到達時間が長いため、逆に言うと急性期に本治療の効果が短期間では期待できないことを表している。今回の我々の検討では、潰瘍性大腸炎で再燃した症例はいずれも 2 ヶ月以内に再燃しているが、おそらく治療期間が短かったため代謝産物の濃度が低かった可能性が考えられる。

アザチオプリンの重篤な副作用の 1 つとして骨髄抑制が知られている。この原因の 1 つとして考えられているのがアザチオプリンを不活化する酵素 TPMT (Thiopurine S-methyltransferase) の酵素活性が低いことによることが近年報告されている。また TPMT 遺伝子には多型があり、point mutation をおこしている症例は TPMT の酵素活性が低いことも知られている。TPMT 酵素活性は貧血の程

度により違いが出てくること、また測定費用が高価であることより、今回の研究ではTPMT遺伝子の多型を検討することにより骨髄抑制の予測ができないかどうかについて検討した。その結果過去に免疫抑制剤により骨髄抑制をおこした13例中7例(54%)でTPMT遺伝子に多型が認められ、一方骨髄抑制をおこさなかった52例中1例(2%)でのみ多型が認められた。このことよりretrospectiveな解析ではあるが、TPMT遺伝子の多型を検討することにより、骨髄抑制から見たアザチオプリン投与の適否を決めることができると考えられた。今後症例を蓄積してさらに検討を行っていきたいと考えている。

5 結論

炎症性腸疾患25例におけるアザチオプリンの緩解維持効果について検討した。今回のprospectiveな検討により潰瘍性大腸炎およびクローン病におけるアザチオプリンの緩解維持効果および安全性が確認され、またTPMTの遺伝子多型を検討することによりアザチオプリン投与による骨髄抑制の予測が可能となることが示された。さらに種々のサイトカインは本剤の治療効果を反映する可能性が示唆された。

6 研究発表

Takaishi H, Ohara S, Hotta K, Yajima T, Kanai T, Inoue N, Iwao Y, Watanabe M, Ishii H and Hibi T. Circulating autoantibodies against purified colonic mucin in ulcerative colitis. *J Gastroenterol* 35, 20-27(2000).

Naganuma M, Iwao Y, Inoue N, Hisamatsu T, Imaeda H, Ishii H, Kanai T, Watanabe M and Hibi T. Analysis of clinical course and long term prognosis of surgical and non-surgical patients with intestinal Behcet's disease. *Am J Gastroenterol* 95(10), 2848-2851(2000).

Kanai T, Watanabe M, Nakamaru K, Okazawa A, Okamoto M, Naganuma M, Ishii H, Ikeda M, Kurimoto M, and Hibi T. IL-18 is a potent proliferative factor for intestinal mucosal lymphocytes in Crohn's disease. *Gastroenterology* 119, 1514-1523(2000).

Suzuki K, Oida T, Hamada H, Hitotsumatsu O, Watanabe M, Hibi T, Yamamoto H, Kubota E, Kaminogawa S and Ishikawa Hiromichi. Gut Cryptopatches : Direct Evidence of Extrathymic Anatomical Sites for Intestinal T Lymphopoiesis. *Immunity* 13, 691-702(2000).

Kanai T, Watanabe M, Okazawa A, Soto T, Hibi T. Interleukin-18 and Crohn's Disease. *Digestion* 63(suppl 1), 37-42(2001).

Inoue N, Watanabe M, Yamazaki M, Kanai T, Iwao Y, Ishii H, and Hibi T. Restricted VH gene usage in lamina propria B cells that produced anticolon antibody from patients with ulcerative colitis. in press (2001)

Naganuma M, Iizuka B, Torii A, Ogihara T, Kawamura Y, Ichinose M, Kojima Y, Hibi T. Appendectomy Protects Against the Development of Ulcerative Colitis and Reduces its Recurrence: Results of a Multicenter Case-Controlled Study in Japan. *Am J Gastroenterol* in press (2001)

里見匡迪、山村 誠、澤田康史、下山 孝. 潰瘍性大腸炎重症度とその内科的治療. *消化器外科* 23, 39-48 (2000) .

Chikano S, Sawada K, Shimoyama T, Kashiwamura S-I, Sugihara S, Sekikawa K, Terada N, Nakanishi K and Okamura H. IL-18 and IL-12 induce intestinal inflammation and fatty liver in mice in an IFN- γ dependent manner. *Gut* 47, 779-786 (2000) .

岡村 登、千田俊雄、小林久美子、馬場千恵美、岡村 孝、松村徹也、下山 孝. 潰瘍性大腸炎患者の大腸粘膜細胞叢. 厚生科学研究費補助金特定疾患対策研究事業「難治性炎症性腸管障害に関する調査研究」班平成11年度研究報告書 142-143 (2000) .

平田哲生、岩下秀彦、真喜志知子、与那嶺吉正、宇高真智子、座覇 修、金城 渚、外間 昭、佐久川 廣、金城福則、齋藤 厚. 回腸に主病変を呈し、蛋白漏出性胃腸症を来した糞線虫症の1例. *日内会誌*. 89, 159-161 (2000) .

金城福則. 腸管感染症. *MEDICAMENT NEWS*. 1656, 1-3 (2000) .

金城福則. 下痢症. *標準感染症学*. 283-294 (2000) .

金城福則. 腸管、胆道、腹膜感染症. 標準感染症学. 295-302 (2000) .

武藤徹一郎, 高後 裕, 千葉 勉, 日比紀文, 下山 孝, 斎藤 厚, 金城福則, 他. ステロイド治療に抵抗する潰瘍性大腸炎に対する血液成分採血装置ヘモネテイクスCCSを用いての白血球除去療法による効果の検討. ステロイド抵抗性潰瘍性大腸炎の新しい治療法の開発. 5-21 (2000) .

Nakasone H, Hokama A, Fukuuchi J, Makishi T, Sakugawa H, Kinjo F, Saito A, Kinjo T and Muto Y. Colonoscopic findings in adult patient with Henoch-Schoenlein purpura. *Gastrointest Endosc.* **52**, 391-392 (2000) .

Zaha O, Hirata T, Kinjo F and Saito A. Strongyloidiasis-Progress in diagnosis and treatment. *Intern Med.* **39**, 695-700 (2000) .

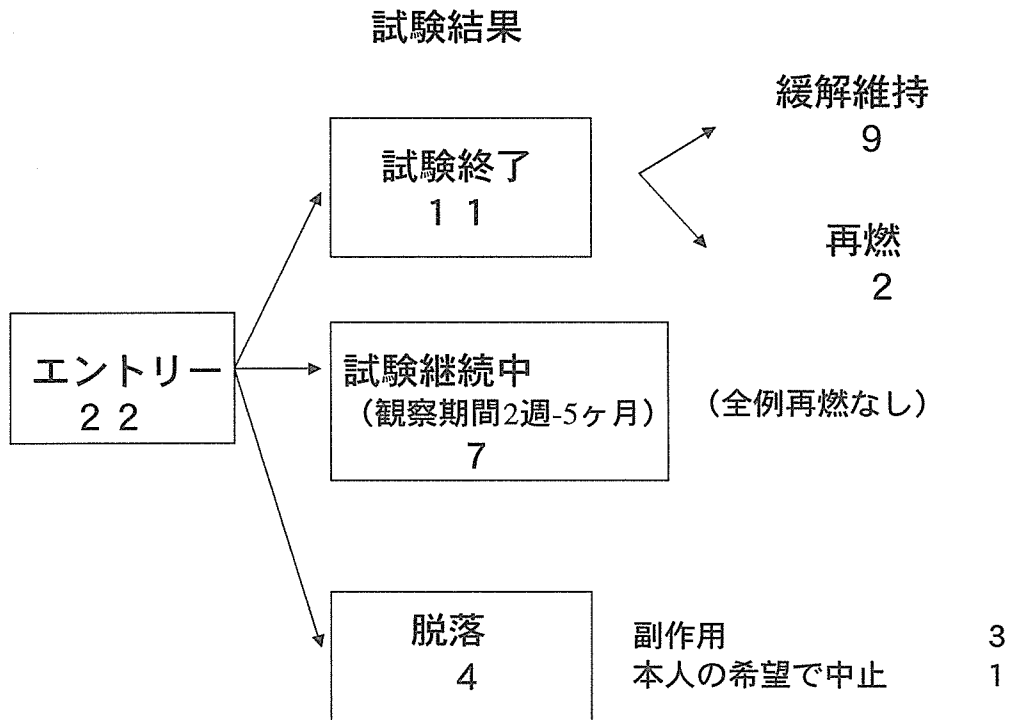


Fig 1 clinical outcome in UC patients treated with AZA

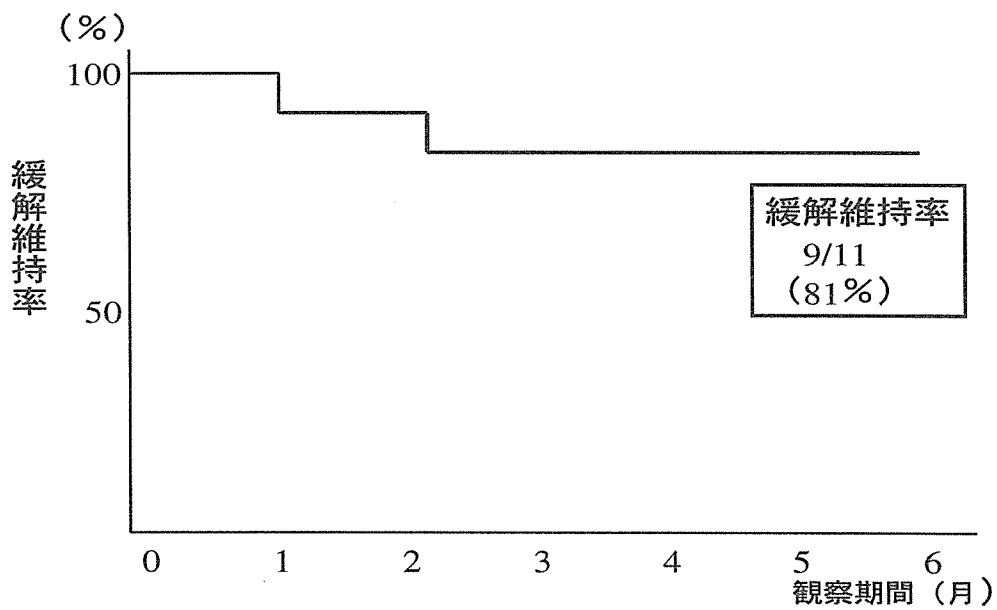


Fig 2 Kaplan-Meier survival plot of the rate of relapse over 6 months for UC patients in remission after taking AZA

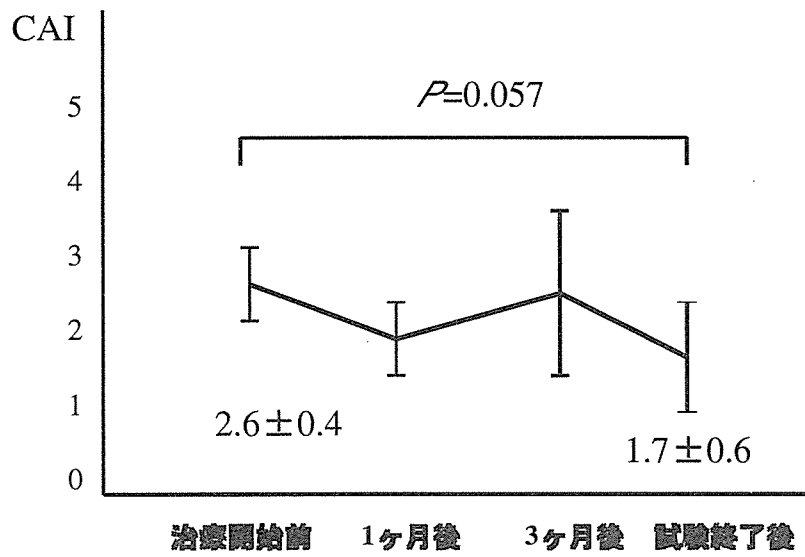


Fig 3 Average CAI for UC patients in remission after taking AZA

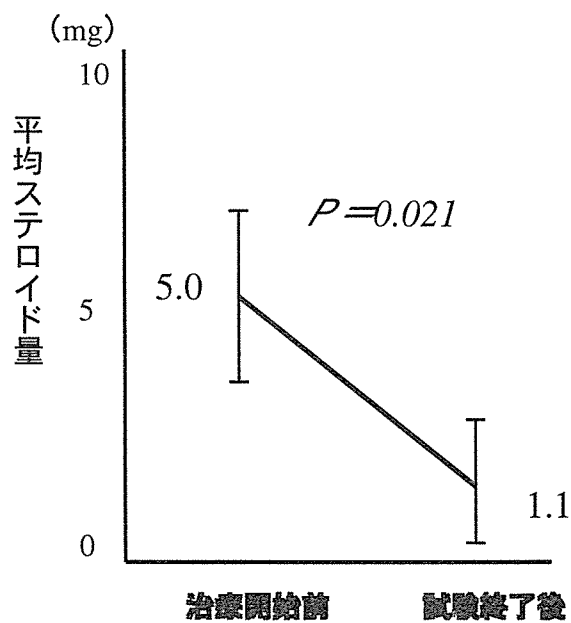


Fig 4 Average predonisone dose at day of entry and day of terminal of study

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第4分野

稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社