

B. 研究方法

ミトコンドリア A1555G 変異を以下に示す種々の方法での検出を試みた。

- (1) PCR-直接塩基配列決定法
  - (2) PCR-RFLP 法
  - (3) TaqMan プローブ
  - (4) 熱変性高速液体クロマトグラフィー
- これらを用いた SNP 解析法を試み、おのおのの方法の検査にかかる時間費用を比較検討した。

C. 研究結果

それぞれの検査結果について：

・PCR-直接塩基配列決定法  
結果を図1に示す。  
1555番目の塩基を含む551塩基対をPCRで増幅し、PCRで用いたプライマーを使ってシーケンス反応を行なった。検査に用いたプライマーの塩基配列は、  
5'-ccgtcaccctcctcaagtat-3',  
および  
5'-gcactttccagtacacttaccatg-3'である。

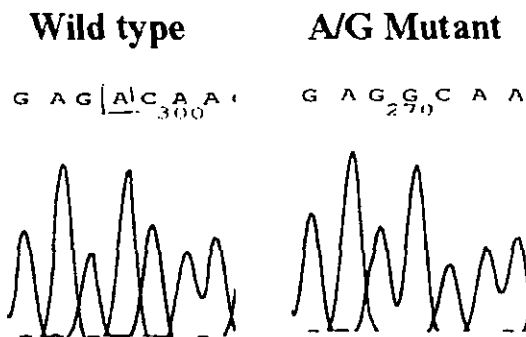


図1. PCR-直接塩基配列法によるミトコンドリアA1555Gの検出

・PCR-RFLP 法

結果を図2に示す。1555番を含む部分の塩基配列は制限酵素 A/w26I の認識部位を含むので、PCR産物の同酵素処理により解析が可能である。

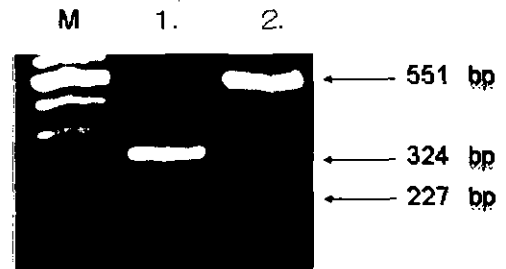


図2. PCR-RFLP法によるミトコンドリアA1555Gの検出

M: マーカー; 1. Wild Type 2. Mutant

・TaqMan プローブを用いた解析法  
結果を図3に示す。2種のMGB プローブ (5'-ttatatagaggagAcaagtc-3' および 5'-ttatatagaggagGcaagtc-3') を作成し、Allelic Discrimination Analysis を行なった。その結果は明瞭で、しかも採血から4時間以内に結果報告が可能であった。

・熱変性高速液体クロマトグラフィー法  
検出結果を図4に示す。

1555番目の塩基を含む塩基対をPCRで増幅し、Heteroduplex反応後、DHPLC法での解析を行なった。

本検査に用いたDHPLC用のプライマー配列は、

5'-agtaagcgcaagtaccacgtaaagac-3',

および

5'-ctattgcgccaggtttcaatttctatcg-3'

である。

DHPLC 検出条件は

設定温度：58.0℃  
TimeSift：-2.0min  
であった。

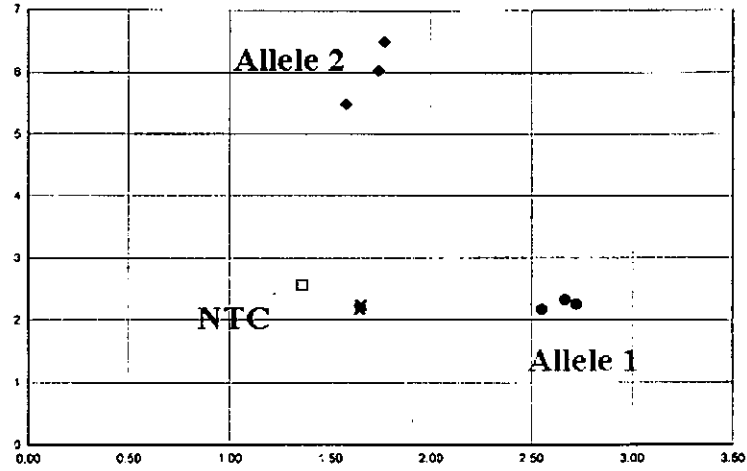


図3. TaqManプローブによるSNPアッセイ法による検出  
Allele 1: Wild type; Allele2: A1555G Mutant; NTC: non-template control

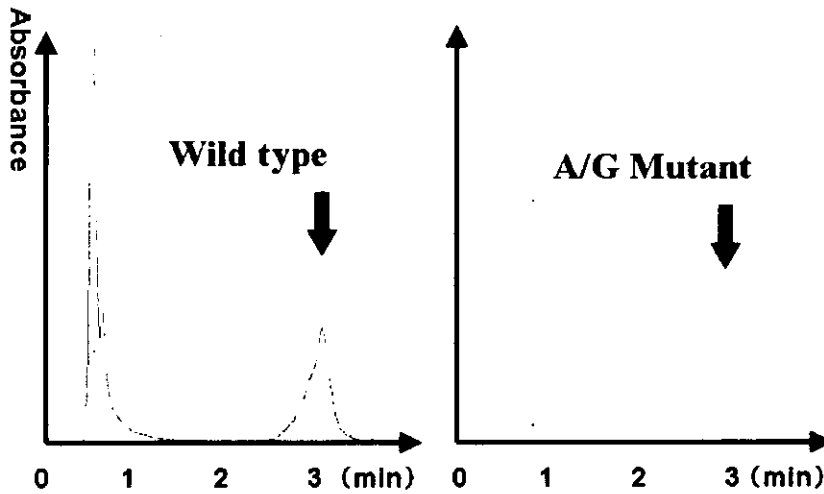


図4. DHPLC法によるミトコンドリアA1555Gの検出

#### D. 考案

各種検査法による検査時間と費用比較検査に要する時間と費用について比較検討した結果を、表1に示す。

今回の検討により時間的にはTaqManプローブが有利で、コストの観点からは熱変性

高速液体クロマトグラフィー法が有利であると考えられた。緊急性に応じて両者を使い分けることが理想的であると考えられた。今後は、日本人正常集団およびアミノグリコシド抗生物質の投与の既往がある難聴症例におけるミトコンドリア A555G 解析を多数行い、この検査の臨床検査としての有用性について提言したい。

表1. 各種検査法の比較

	分析コスト/検体	分析処理時間
<b>PCR-RFLP</b>	<b>130 円</b>	<b>8 hr</b>
<b>WAVE-DHPLC</b>	<b>65</b>	<b>8 hr</b>
<b>SNP assay</b>	<b>120</b>	<b>3 hr</b>
<b>Seq. Analysis</b> (3100 ABI multi-capillary)	<b>220</b>	<b>2 days</b>

#### E. 結論

今回の検討によりミトコンドリア A1555G 変異スクリーニングのためには時間的にはTaqManプローブが有利で、コストの観点からは熱変性高速液体クロマトグラフィー法が有利であると考えられた。緊急性に応じて両者を使い分けることが理想的であると考えられた。

#### F. 健康危険情報

特記すべきことなし

#### G. 研究発表

M. Fujino, M. Kawasaki, N. Funeshima, Y. Kitazawa, M. Kosuga, K. Okabe, M. Hashimoto, H. Yaginuma, K. Mikoshiba, T. Okuyama, S. Suzuki, X-K. Li. CrmA gene expression protects mice against concanavalin-A induced hepatitis by inhibiting IL-18 secretion and hepatocyte apoptosis. Gene Ther (in press)

M. Fujino, K. Adachi, M. Kawasaki, Y. Kitazawa, N. Funeshima, T. Okuyama, H. Kimura, S. Suzuki, X-K. Li. Prolonged Survival of Rat Liver Sanae Haga, Keita Terui, Hui Qi Zhang, Shin Enosawa, Wataru Ogawa, Hiroshi Inoue, Torayuki Okuyama, Kiyoshi Takeda, Shizuo Akira, Tetsuya Ogino, Kaikobad Irani and Michitaka Ozak Stat3 protects against Fas-induced liver injury by redox-dependent and -independent mechanisms. *J. Clin. Invest.* 112:989-998 (2003).

Kanaji A, Kosuga M, Li XK, Fukuhara Y, Tanabe A, Kamatwa Y, Azuma N, Yamada M, Sakamaki T, Toyama Y, and Okuyama T. Improvement of skeletal lesions in mice with mucopolysaccharidosis type VII by neonatal adenoviral gene transfer. *Molecular Therapy* (in press)

Allograft with Adenoviral Gene Transfection of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) *nef*. Liver Transplant (In press)

Fukuhara Y, Hirasawa A, Li XK, Kawasaki M, Fujino M, Funeshima N, Katsuma S, Shiojima S, Yamada M,

Okuyama T, Suzuki S, Tsujimoto G. Gene expression profile in the regenerating rat liver after partial hepatectomy. *J Hepatol.* 2003 Jun;38(6):784-92.

Kamata Y, Tanabe A, Kanaji A, Kosuga M, Fukuhara Y, Li XK, Suzuki S, Yamada M, Azuma N, Okuyama T.: Long-term normalization in the central nervous system, ocular manifestations, and skeletal deformities by a single systemic adenovirus injection into neonatal mice with mucopolysaccharidosis VII. *Gene Ther* 2003 ; 10: 406-414

M. Takahashi, N.J. Deb, Y. Kawashita, S.W. Lee, J. Furgueil, T. Okuyama, N. Roy-Chowdhury, B. Vikram, J. Roy-Chowdhury, & C. Guha. A novel strategy for in vivo expansion of transplanted hepatocytes using preparative hepatic irradiation and FasL-induced hepatocellular apoptosis. *Gene Ther* 2003; 10: 304-313

M. Takahashi, H. Saito, K. Atsukawa, H. Ebinuma, T. Okuyama, & H. Ishii. Bcl-2 prevents doxorubicin-induced apoptosis of human liver cancer cells. *Hepatol Res* 2003; 25,:192-201

厚生労働科学研究費補助金

(効果的医療技術の確立推進臨床研究事業 小児疾患に関する臨床研究)

平成15年度 分担研究報告書

小児科診療における効果的薬剤使用のための

遺伝子多型スクリーニングシステムの構築に関する研究

(主任研究者) 小崎 健次郎 (慶應義塾大学医学部小児科 助教授)

(分担研究課題) ジアゾキシドの血中濃度測定法の確立とバリデーション

(分担研究者) 長谷川奉延 (慶應義塾大学医学部小児科・助教授)

研究要旨

高インスリン血性低血糖症の治療薬であるジアゾキシドの用法・用量を合理的に設定するためには、血中薬物濃度を測定し薬物動態を検討することが必要である。本研究では、まず HPLC による血中濃度測定法の確立を試みた。想定される血中濃度は 10~100  $\mu\text{g/mL}$  であり、UV 検出器による測定で十分な感度が期待できた。1 試料あたり 25 分ですべて溶出させることができ、ジアゾキシドは約 8 分後に単一のピークとして発現した。内部標準物質はフェナセチンとし、血清も添加した標準溶液を調製してジアゾキシド濃度が 0.5~200  $\mu\text{g/mL}$  の範囲で検量線の線形性が確認できた。血清試料は 100  $\mu\text{L}$  であり、採血量も問題ないと思われる。さらに、バリデーションにより本法が血清中ジアゾキシド濃度測定法として信頼できることが確認できた。本研究の成果は、臨床研究におけるジアゾキシドの血中濃度測定および薬物動態試験を行うにあたり有用である。

研究協力者

佐藤 玲子

慶應義塾大学医学部薬剤部 助手

吉田 理恵

慶應義塾大学医学部小児科 助手

そこで本研究では、高速液体クロマトグラフィ (HPLC) による血中濃度測定法を確立し、血清中ジアゾキシドの HPLC による濃度測定法の妥当性を検証した。

B. 研究方法

既報告<sup>5), 6)</sup>を参考に、試料作成法、内部標準物質、カラム、移動相、UV 検出器の吸光度を検討した。感度は、定常状態の血中濃度<sup>7)</sup>を想定し 0.5~200  $\mu\text{g/mL}$  の範囲で線形性が保たれる条件を設定した。試料は血清とした。

確立された測定法について、バリデーションを行った。評価項目は、次の通りであった。

・ 特異性

STD 溶液および IS 溶液を含まない、血清のみを添加した試料の測定クロマトグラムにおいて、

A. 研究目的

ジアゾキシドは、高インスリン血症に対する治療薬<sup>1)3)</sup>として、米国、欧州などで広く用いられているが、日本においては未承認である。用量は効果や副作用の状況を見ながら調整されているのが現状である<sup>4)</sup>。従って、血中薬物濃度を測定し薬物動態を検討することは、用法・用量の合理的な設定や臨床試験の計画を行う上で必要不可欠と考えられる。しかし現在、本薬剤の血中濃度を測定する方法は確立されていない。

ジアゾキシドおよび IS 溶出位置付近に夾雑ピークがないことを確認した。夾雑ピークの影響は、定量下限 (LOG) におけるレスポンスの 20%以下を許容範囲とした。

・ 検量線の直線性

検量線の相関係数(r)および、各濃度ポイントでの真度(RE 値)を求めた。

真度(RE)%

$$= (\text{測定濃度} - \text{調製濃度}) \times 100 / \text{調製濃度}$$

$r \geq 0.990$  かつ  $|RE \text{ 値}| \leq 15\%$  (定量下限では 20%) を許容範囲とした。

・ 同時再現性および日間再現性

各濃度の標準添加試料 (ジアゾキシド、IS、血清の混合試料) の平均値から、RE 値(%)を求めた。また、測定濃度の標準偏差(SD)と平均値から変動係数(CV 値)を求めた。

CV 値(%)

$$= \text{測定濃度の SD} \times 100 / \text{測定濃度の平均値}$$

真度:  $|RE \text{ 値}| \leq 15\%$  (定量下限では 20%) を許容範囲とした。

精度:  $CV \text{ 値} \leq 15\%$  (定量下限では 20%) を許容範囲とした。

・ 回収率

各濃度の標準添加試料と回収率 Reference 試料 (血清を含まない試料: RC 試料) の測定結果より、ジアゾキシドと IS のピーク面積から回収率を算出した。

回収率(%)

$$= \text{標準添加試料の測定結果} \times 100 / \text{RC 測定結果の平均値}$$

得られた  $n=3$  の回収率より CV 値を求めた。CV 値  $\leq 20\%$  を許容範囲とした。

・ 分析中の 24 及び 48 時間安定性

各濃度の標準添加試料保存前の測定結果の平均値と分析中の安定性 24 時間あるいは 48 時間の測定結果の平均値より、保存前のサンプル溶液中の Peak area ratio (A) に対する保存後のサンプル溶液中の Peak area ratio (B) の残存率を求めた。

$$\text{残存率(}\%) = B \text{ の平均値} \times 100 / A \text{ の平均値}$$

残存率(%)  $\geq 80\%$  を許容範囲とした。

## C. 研究結果

### 1. 標準溶液 (STD 溶液) の調製

ジアゾキシド約 0.02g を精密に量り、水/メタノール混液 (1:1) を加えて溶解させ、正確に 50mL とした。この 400  $\mu\text{g/mL}$  (STD 溶液 400) を表 1 のように水/メタノール混液 (1:1) で希釈し、各 STD 溶液を調製した。

### 2. 内部標準溶液 (IS 溶液) の調製

フェナセチン約 0.01g を精密に量り、水/メタノール混液 (1:1) を加えて溶解させ、正確に 50mL とした (IS 溶液: 200  $\mu\text{g/mL}$ )。

### 3. 検量線試料の調製

ダブルブランク試料 (BL):

- ・ 0.33mol/L 過塩素酸溶液 400  $\mu\text{L}$
  - ・ 水/メタノール混液 (1:1) 100  $\mu\text{L}$
  - ・ ブランク血清 100  $\mu\text{L}$
- を混合した。

IS ブランク試料 (ISBL):

- ・ 0.33mol/L 過塩素酸溶液 400  $\mu\text{L}$
  - ・ 水/メタノール混液 (1:1) 50  $\mu\text{L}$
  - ・ IS 溶液 50  $\mu\text{L}$
  - ・ ブランク血清 100  $\mu\text{L}$
- を混合した。

検量線試料 (STD0.5~200):

- ・ 0.33mol/L 過塩素酸溶液 400  $\mu\text{L}$
  - ・ 各 STD 溶液 1(1~400 のいずれか) 50  $\mu\text{L}$
  - ・ IS 溶液 50  $\mu\text{L}$
  - ・ ブランク血清 100  $\mu\text{L}$
- を混合した。

これらの BL、ISBL、および検量線試料は分析毎に調製した。

### 4. 血清試料の前処理

血清試料 (100  $\mu\text{L}$ ) に 0.33mol/L 過塩素酸溶液、水/メタノール混液、IS 溶液を加え混合し、蛋白

を沈殿させる前処置を行ったのち、次のように処理を行った。

- ①ボルテックスミキサーで20秒混合した。
- ②遠心分離を行った(12000rpm, 20min, 5°C)。
- ③上澄みをHPLCで分析した。

#### 5. HPLC 測定条件

- ①移動相：A液：1mL/L 酢酸含有 0.01mol/L 1-ペンタンスルホン酸ナトリウム溶液/B液：メタノールをグラジエントさせた。グラジエントプログラムは表2に示す。
- ②流速：1.0mL/min
- ③カラム：Inertsil ODS 3 (5 $\mu$ m) 4.6 $\times$ 150mm
- ④カラムオーブ：40°C
- ⑤検出器：UV 270nm
- ⑥注入量：20 $\mu$ L
- ⑦サンプルクーラー温度：4°C

HPLC 測定の結果、0.5~200 $\mu$ g/mL の濃度範囲で直線性が認められた(図1)。また、溶出ピークは図2に示す通りとなった。

#### 6. 特異性

試料は、0.33mol/L過塩素酸溶液 400 $\mu$ L、水/メタノール混液(1:1) 100 $\mu$ L及び特異性確認用個別血清100 $\mu$ Lを加え、混合して調製した。特異性確認用個別血清ごとに調製し、計6試料(SP1~6)測定した。SP1~6の測定クロマトグラム上、ジアゾキシド及びIS溶出位置に夾雑ピークは検出されなかった。

この結果から、本法によるジアゾキシド測定は、特異性が認められた(表3および図3~9)。

#### 7. 検量線の直線性

異なる各測定日における検量線試料(STD0.5~200)の測定結果から求めた検量線の相関係数(r)はすべて1.000であった(表4)。また、LOQを除く各濃度ポイントでの真度(RE値)は-4.8~0.6、LOQでは0.0~4.9で、いずれも許容範囲内であり(表5)、良好な直線性が得られた(図1)。

#### 8. 同時再現性における真度及び精度(n=5)

試料は0.33mol/L過塩素酸溶液 400 $\mu$ L、各STD溶液(STD 1、50、400のいずれか)、IS溶液50 $\mu$ L及びブランク血清100 $\mu$ Lを加え、混合し調製した(AP0.5、25および200)。血清中濃度25及び200 $\mu$ g/mL相当の各標準添加試料の測定結果から得られたRE値は0.4~1.0%であり、変動係数(CV値)は0.7%であった。また、LOQ(血清中濃度 0.5 $\mu$ g/mL)の標準添加試料(AP0.5-1~5)のRE値は2.0%、変動係数(CV値)は1.9%であり、いずれも許容範囲内で良好な真度及び精度が得られた(表6)。

#### 9. 日間再現性における真度及び精度(n=3)

血清中濃度25及び200 $\mu$ g/mL相当の各標準添加試料の測定結果から得られたRE値は-0.6~0.5%であり、変動係数(CV値)は0.7~1.2%であった。また、LOQ(血清中濃度 0.5 $\mu$ g/mL)の標準添加試料(AP0.5-1、6、7)のRE値は2.0%、変動係数(CV値)は1.9%であり、いずれも許容範囲内で良好な真度及び精度が得られた(表7)。

#### 10. 回収率(n=3)

血清中濃度0.5及び200 $\mu$ g/mL相当の標準添加試料と回収率測定用リファレンス試料の各測定結果から、ピーク面積より算出したジアゾキシド及びISの回収率平均値は78.3%以上であった。また、これら各回収率のCV値は4.9%以内で、いずれも許容範囲内であり、安定した回収率が得られた(表8)。

#### 11. 分析中の24及び48時間安定性

各濃度の標準添加試料保存前の測定結果の平均値と、分析中の安定性24時間あるいは48時間(AP0.5及び200の8~10あるいは11~13)の測定結果の平均値より求めた残存率は101.4~104.3%で、いずれも許容範囲内であり、分析中の48時間の安定性が確認された(表9)。

#### D. 考察

ジアゾキシドの常用量 3~15mg/kg/day<sup>4)</sup>を投与されている小児の定常状態血中濃度は 10~100  $\mu$ g/mL であると予想され、投与中止7日後でも 1  $\mu$ g/mL 前後である<sup>7)</sup>。そこで HPLC による測定で十分な感度が得られ、0.5~200  $\mu$ g/mL と設定した濃度範囲で良好な直線性が認められた。従って、ジアゾキシドの薬物動態試験を行う上で必要な血中濃度測定法が確立できたとと言える。必要な試料量は 100  $\mu$ L と少量で済むため、新生児にも実用可能と考えられる。測定法の評価も行い、特異性、直線性、同時および日間再現性、回収率、24 および 48 時間安定性については評価できた。今後は凍結融解・凍結保存中の安定性についてもバリデーションを行う予定である。代謝物は、ジアゾキシドの3位のメチル基がヒドロキシメチル基に変換した化合物およびカルボキシル基に変換した化合物が血中で認められる<sup>8)</sup>が、その濃度はいずれも親化合物の 1/10 以下であり、化合物の極性も親化合物より高くなることから、ジアゾキシドのピークへの影響はほとんどないと思われる。本法により血中濃度測定を行って、ジアゾキシドの母集団薬物動態解析を実施できれば、本薬剤の適正な使用法を明らかにできると期待される。

#### E. 結論

HPLC法による血清中ジアゾキシド濃度測定法を確立でき、各確認項目(特異性, 検量線の濃度範囲と直線性, 同時再現性, 日間再現性, 回収率)の測定結果は、すべて許容範囲内であった。しかがって、本法は血清中ジアゾキシドのHPLCによる濃度測定法として信頼できることが確認できた。この成果は、本薬剤の薬物動態試験を実施するにあたり必要不可欠な条件であり、ジアゾキシドの適正使用に向けた研究を行う上で有用である。

#### F. 健康危険情報

該当する内容はない。

#### G. 研究発表

本研究課題に関する発表はない。

#### H. 参考資料

- 1) 児玉浩子. 低血糖症. 白木和夫・前川喜平総編集. 小児科学, 医学書院, 1997 ; 353-358
- 2) Nelson textbook of pediatrics 17th ed, Saunders, 2004
- 3) Pediatric endocrinology: physiology pathophysiology and clinical aspects 2nd ed, Williams & Wilkins, 1993
- 4) Drug information for the health care professional USP-DI 19th Ed, 1999
- 5) Vree TB et al., Rapid determination of diazoxide in plasma and urine of man by means of high-performance liquid chromatography. J Chromatogr. 1979; 164: 228-34
- 6) Ogilvie RI. Diazoxide disposition and effect on vascular resistance and compliance in dogs. Hypertension. 1981; 3: 225-32.
- 7) Pruitt AW et al., Disposition of diazoxide in children. Clin. Pharmacol. Ther. 1974; 14: 73-82
- 8) Pruitt AW et al., Metabolism of diazoxide in man and experimental animals. J. Pharmacol. Exp. Ther. 1974; 188:248-256



表1 STD 溶液調製濃度と、検量線濃度まで希釈するときの分取量と調整量一覧

溶液名	調製濃度 <sup>a)</sup> ( $\mu\text{g/mL}$ )	分取する溶液	分取量 (mL)	調整量 (mL)	検量線濃度 <sup>a)</sup> ( $\mu\text{g/mL}$ )
STD 溶液 400	400	-	-	-	200
STD 溶液 100	100	STD 溶液 400	5	20	50
STD 溶液 50	50	STD 溶液 100	10	20	25
STD 溶液 10	10	STD 溶液 50	4	20	5
STD 溶液 5	5	STD 溶液 10	10	20	2.5
STD 溶液 1	1	STD 溶液 5	4	20	0.5

<sup>a)</sup>設定値であり、正確な濃度は記録した。

表2 HPLC 移動相のグラジエントプログラム

Time	B.conc
Init.	40
7.5	40
10	95
17	95
17.01	40
25	STOP

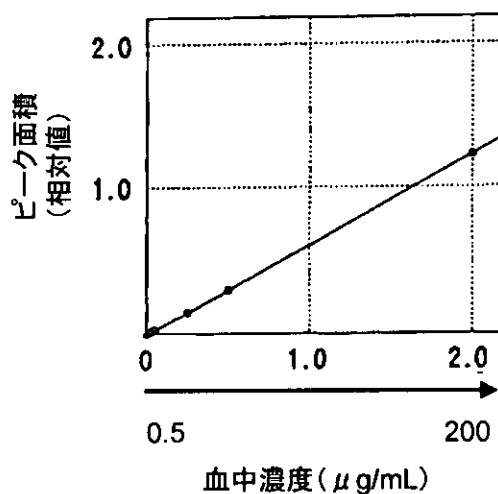


図1 ジアゾキシドの検量線の一例

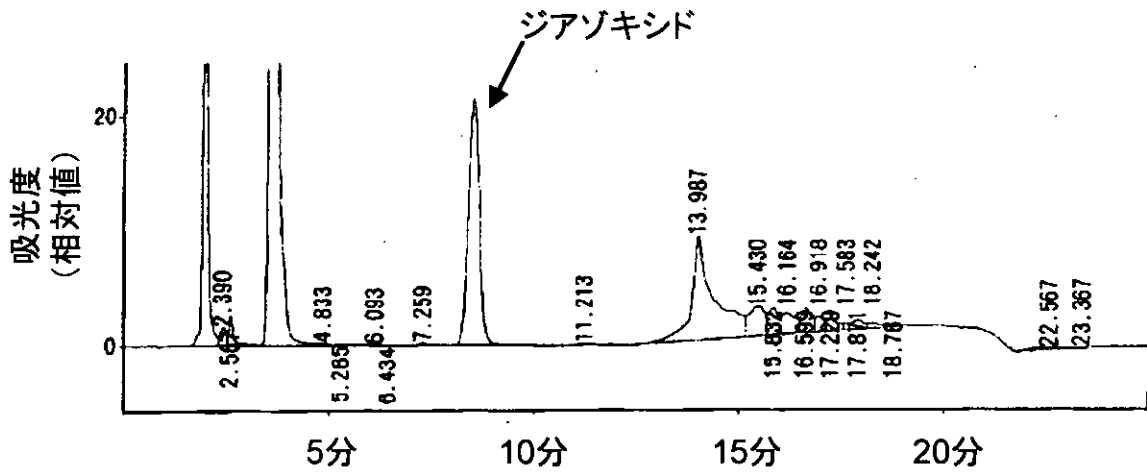


図2 ジアゾキンドの溶出曲線

表3 ジアゾキンド及びIS 溶出位置に検出されたピーク面積と STD 0.5 のジアゾキンドあるいはIS ピークに対するレスポンス面積比

測定試料	ジアゾキンド			IS		
	溶出位置の 夾雑 ピーク面積	LOQ (STD0.5)の ジアゾキンド ピーク面積	LOQ に対する レスポンス (ピーク) 面積比	溶出位置の 夾雑 ピーク面積	LOQ (STD0.5)の IS ピーク面積	LOQ に対する レスポンス (ピーク) 面積比
SP 1	0		0.0	0		0.0
SP 2	0		0.0	0		0.0
SP 3	0	3865	0.0	0	437766	0.0
SP 4	0		0.0	0		0.0
SP 5	0		0.0	0		0.0
SP 6	0		0.0	0		0.0

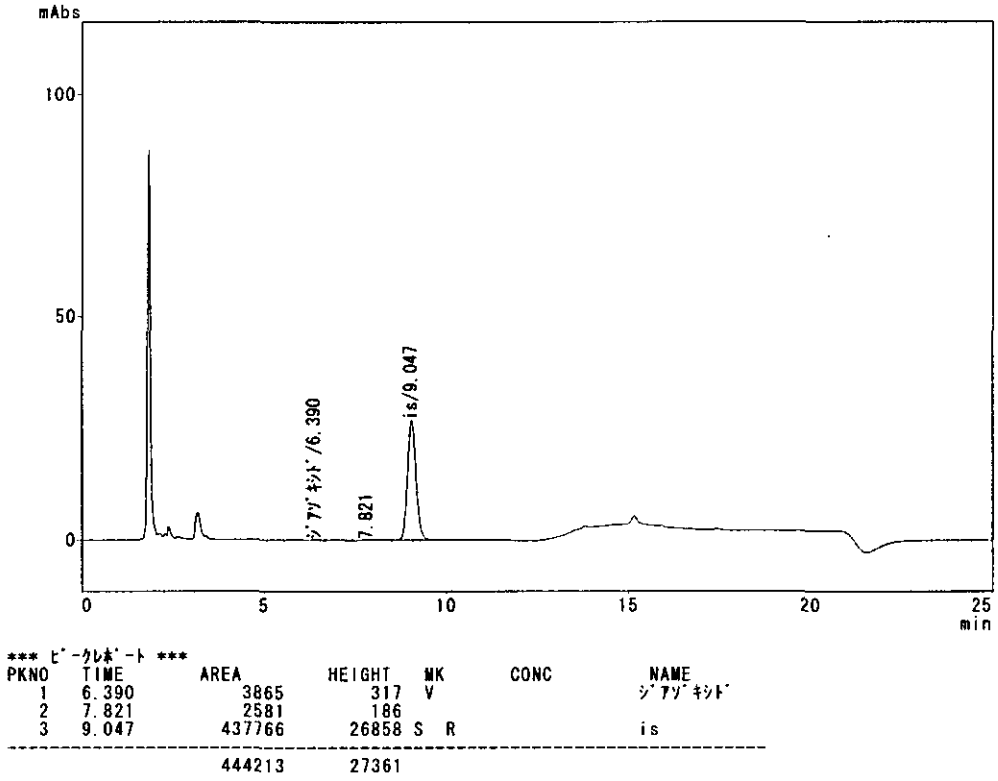


図3 STD0.5 (LOQ) のクロマトグラム

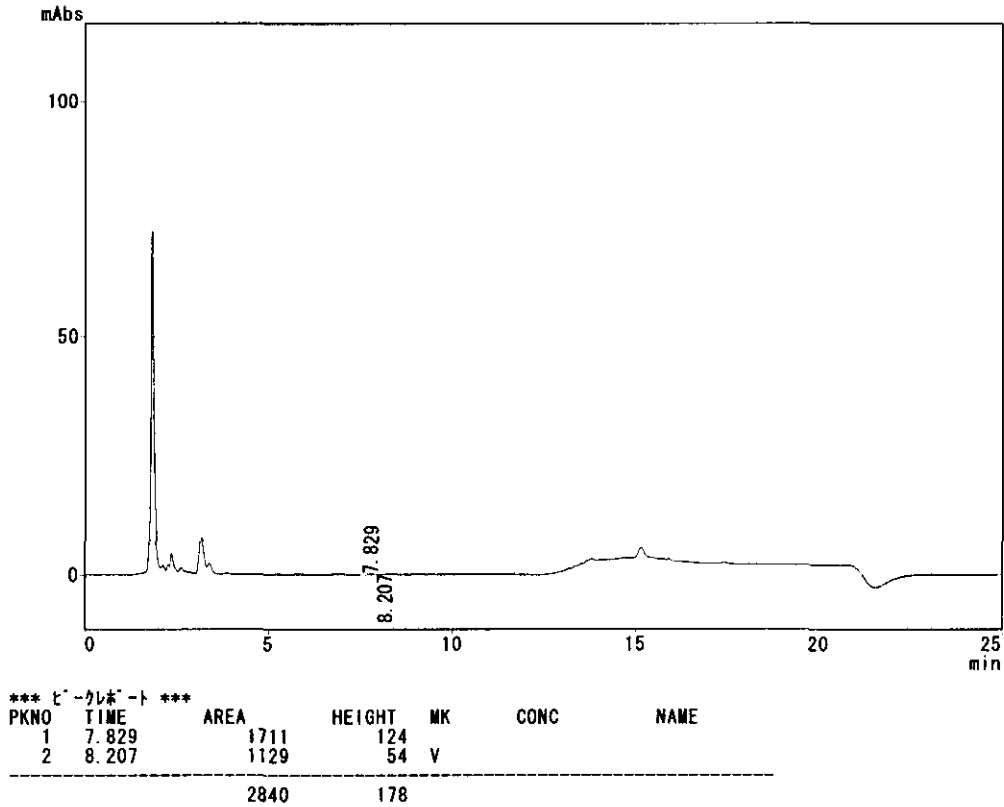


図4 SP1のクロマトグラム

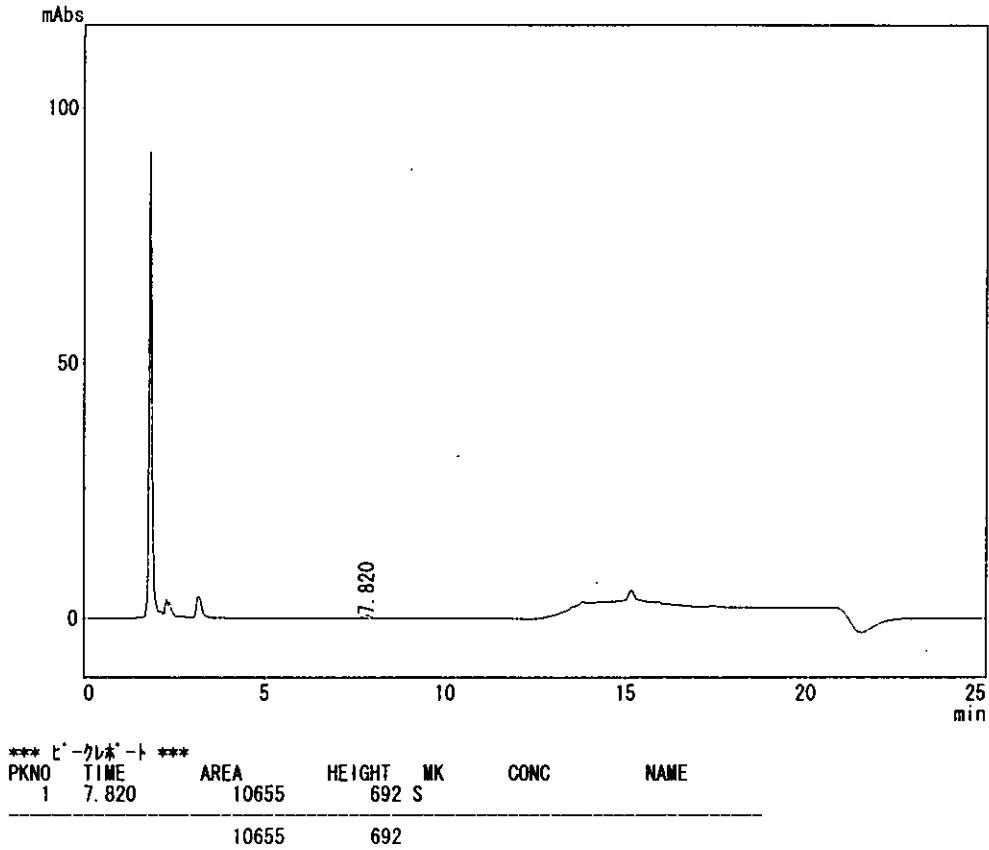


図5 SP2のクロマトグラム

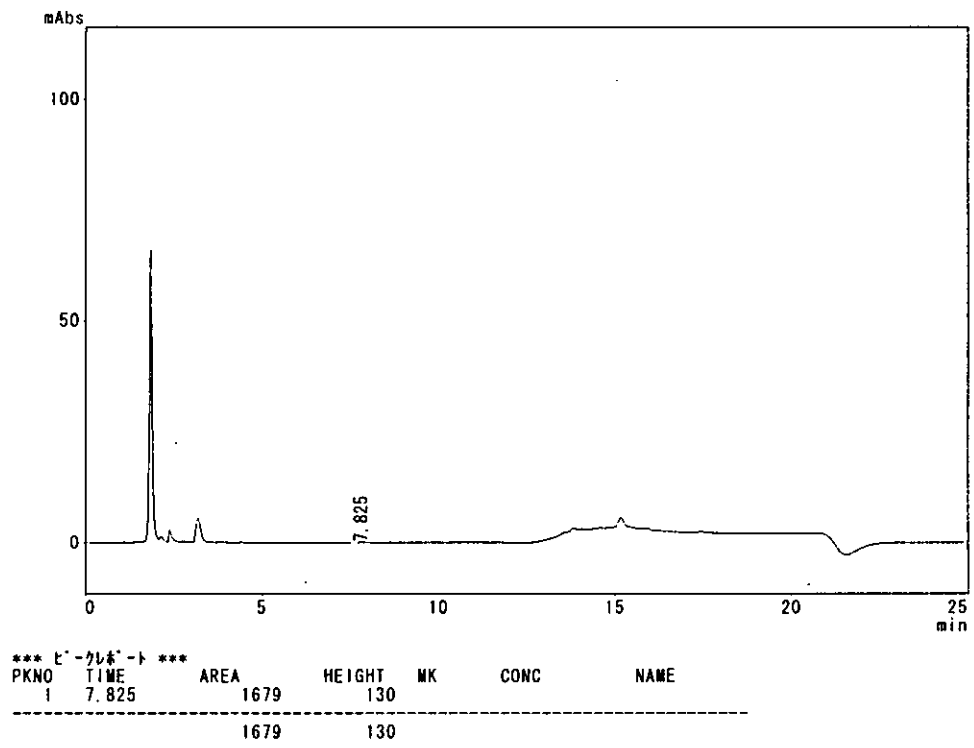


図6 SP3のクロマトグラム

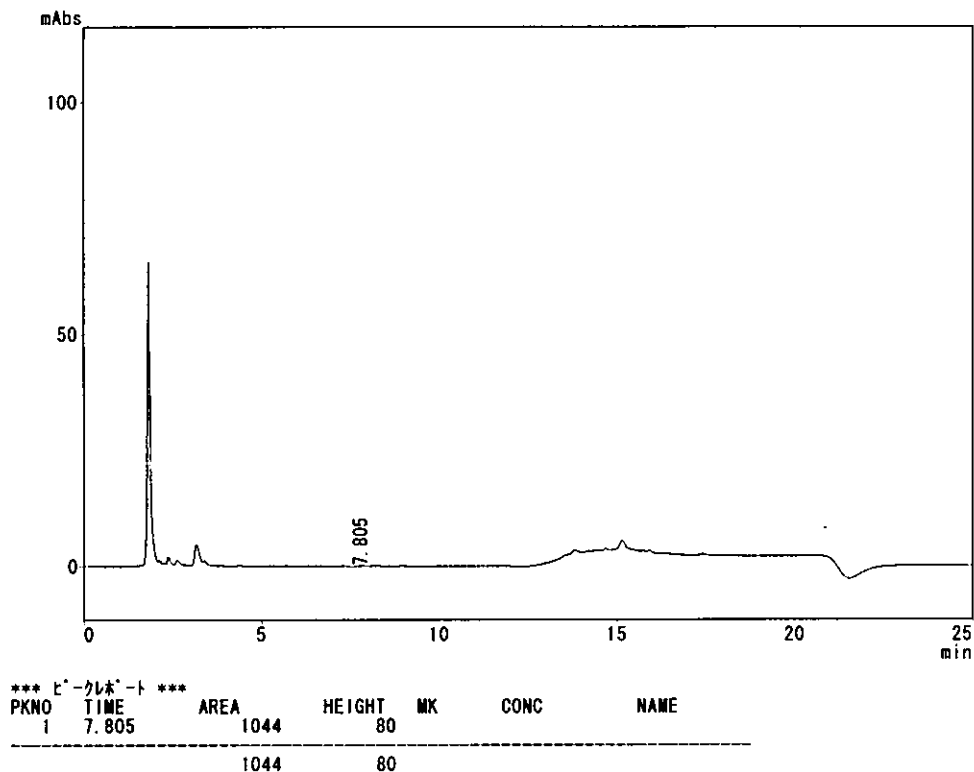


図7 SP4のクロマトグラム

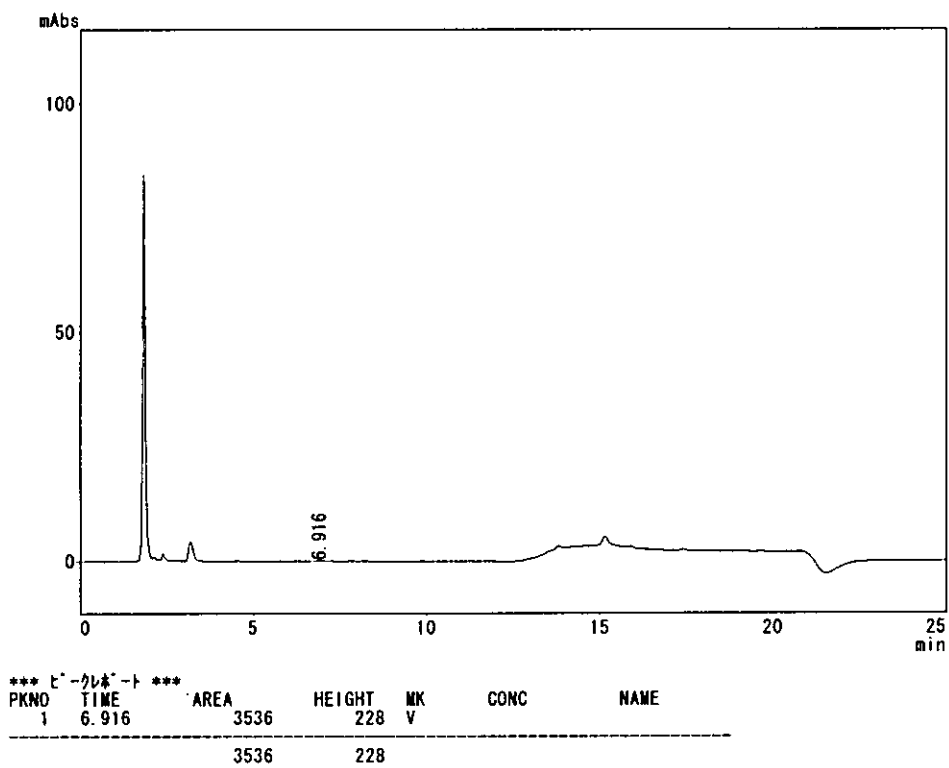


図8 SP5のクロマトグラム

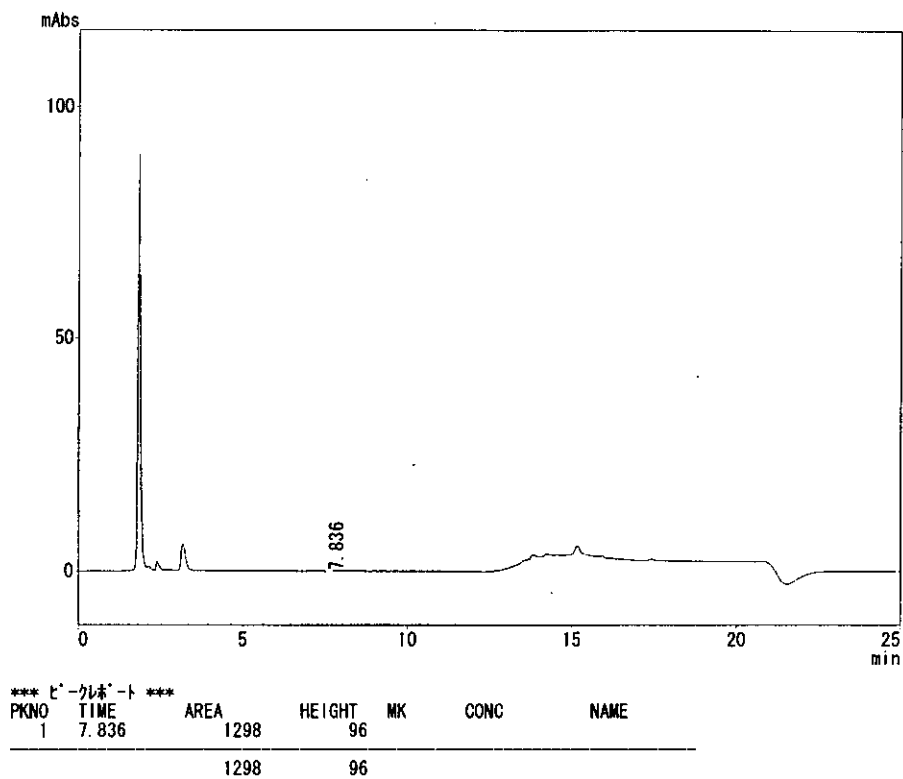


図9 SP6のクロマトグラム

表 3 検量線の回帰式と相関係数

回帰式	相関係数 ( $r^2$ )	相関係数 ( $r$ )
$y=0.0180677x-0.000181184$	0.999974	1.000
$y=0.0177437x-0.000223757$	0.999998	1.000
$y=0.018028x-0.000808531$	0.999928	1.000

表 4 検量線の各濃度ポイントでの真度 (RE 値)

測定試料	調製濃度 [ $\mu\text{g/mL}$ ]	ジアゾキシド area	IS area	測定濃度 [ $\mu\text{g/mL}$ ]	相対誤差 (RE) [%]
STD0.5	0.51	4212	444215	0.53	4.9
STD2.5	2.53	18982	438055	2.41	-4.8
STD5	5.06	39163	430282	5.05	-0.2
STD25	25.29	187710	410869	25.30	0.0
STD50	50.58	399468	436505	50.66	0.2
STD200	202.30	1542900	422098	202.32	0.0
STD0.5	0.51	3865	437766	0.51	0.0
STD2.5	2.53	19699	443229	2.52	-0.5
STD5	5.06	39058	433488	5.09	0.6
STD25	25.29	199053	443621	25.30	0.0
STD50	50.58	407872	455632	50.46	-0.2
STD200	202.30	1637666	456062	202.39	0.0
STD0.5	0.51	3768	428224	0.53	4.5
STD2.5	2.53	19679	449461	2.47	-2.2
STD5	5.06	39333	435152	5.06	0.0
STD25	25.29	196095	438419	24.86	-1.7
STD50	50.58	410482	455102	50.08	-1.0
STD200	202.30	1642424	448281	203.27	0.5

表 6. 同時再現性測定結果

測定試料	調製濃度 [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	測定濃度 [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	測定濃度 平均値 [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	相対誤差 (RE) [%]	標準偏差 (SD) [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	変動係数 (CV) [%]
AP 0.5-1 AP 0.5-2 AP 0.5-3 AP 0.5-4 AP 0.5-5	0.51	0.52 0.53 0.52 0.53 0.52	0.52	2.0	0.01	1.9
AP 25-1 AP 25-2 AP 25-3 AP 25-4 AP 25-5	25.29	25.64 25.54 25.60 25.71 25.25	25.55	1.0	0.18	0.7
AP 200-1 AP 200-2 AP 200-3 AP 200-4 AP 200-5	202.30	200.45 203.49 203.88 203.38 204.24	203.09	0.4	1.51	0.7

表 7. 日間再現性測定結果

測定試料	調製濃度 [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	測定濃度 [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	測定濃度 平均値 [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	相対誤差 (RE) [%]	標準偏差 (SD) [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	変動係数 (CV) [%]
AP 0.5-1 AP 0.5-6 AP 0.5-7	0.51	0.52 0.52 0.53	0.52	2.0	0.01	1.9
AP 25-1 AP 25-6 AP 25-7	25.29	25.64 25.53 25.07	25.42	0.5	0.30	1.2
AP 200-1 AP 200-6 AP 200-7	202.30	200.45 202.79 200.23	201.15	-0.6	1.42	0.7



表 8 回収率測定結果

ジアゾキンド								
基準値			前処理値		回収率			
測定試料	面積値	面積 平均値	測定試料	面積値	回収率 [%]	回収率 平均値 [%]	回収率 標準偏差 (SD)	回収率 変動係数 (CV) [%]
RC 0.5-1	4892	4873	AP 0.5-1	4003	82.1	78.3	3.3	4.2
RC 0.5-2	4892		AP 0.5-2	3756	77.1			
RC 0.5-3	4834		AP 0.5-3	3692	75.8			
RC 200-1	1997131	2011015	AP 200-1	1607053	79.9	80.4	0.9	1.1
RC 200-2	2016587		AP 200-2	1605546	79.8			
RC 200-3	2019327		AP 200-3	1637508	81.4			

IS								
基準値			前処理値		回収率			
測定試料	面積値	面積 平均値	測定試料	面積値	回収率 [%]	回収率 平均値 [%]	回収率 標準偏差 (SD)	回収率 変動係数 (CV) [%]
RC 0.5-1	484049	485589	AP 0.5-1	432471	89.1	87.8	4.3	4.9
RC 0.5-2	479607		AP 0.5-2	397432	81.8			
RC 0.5-3	489583		AP 0.5-3	403745	83.1			
RC 200-1	486066		AP 200-1	443757	91.4			
RC 200-2	486829		AP 200-2	436711	89.9			
RC 200-3	487401		AP 200-3	444567	91.6			

表9 分析中の24及び48時間安定性測定結果

測定試料	ジアゾキシド ピーク 面積値	IS ピーク 面積値	ピーク 面積比	ピーク 面積比 平均値	標準偏差 (SD)	変動係数 (CV) [%]	残存率 [%]
AP 0.5-1	4003	432471	0.0093				
AP 0.5-2	3756	397432	0.0095	0.0093	0.0002	2.2	-
AP 0.5-3	3692	403745	0.0091				
AP 0.5-8	4104	432839	0.0095				
AP 0.5-9	4237	436910	0.0097	0.0097	0.0003	3.1	104.3
AP 0.5-10	4322	432722	0.0100				
AP 0.5-11	4115	434919	0.0095				
AP 0.5-12	4310	437592	0.0098	0.0097	0.0002	2.1	104.3
AP 0.5-13	4262	431822	0.0099				
AP 200-1	1607053	443757	3.6215				
AP 200-2	1605546	436711	3.6764	3.6604	0.0339	0.9	-
AP 200-3	1637508	444567	3.6834				
AP 200-8	1660504	439173	3.7810				
AP 200-9	1647478	434997	3.7873	3.7766	0.0135	0.4	103.2
AP 200-10	1635966	434941	3.7614				
AP 200-11	1605596	439047	3.6570				
AP 200-12	1610354	432524	3.7232	3.7129	0.0515	1.4	101.4
AP 200-13	1633576	434634	3.7585				

厚生労働科学研究費補助金

(効果的医療技術の確立推進臨床研究事業 小児疾患に関する臨床研究)

平成15年度 分担研究報告書

小児科診療における効果的薬剤使用のための

遺伝子多型スクリーニングシステムの構築に関する研究

(主任研究者) 小崎 健次郎 (慶應義塾大学医学部小児科 助教授)

(分担研究課題) ジアゾキシドの薬物動態に関する文献的考察

(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

ジアゾキシドは、乳児期における高インスリン血症性低血糖症の第一選択薬である。我が国では未承認薬でありながら、低血糖症の内科的治療に使用されている実態があり、有効性、安全性の確かな情報が必要である。そこで、ジアゾキシドの薬理効果や薬物動態特性を文献調査し、臨床研究に向けての検討事項を整理した。ジアゾキシドの薬理効果はインシュリンの分泌抑制による血糖上昇作用である。寛解までには4~6年と長期にわたる投与が必要である。半減期は20時間以上と長く、一日3回投与の本薬剤は、半減期に比べ投与間隔が非常に狭いことを特徴としている。本薬剤を適正に使用するためには、治療量と血中濃度の関係および血中濃度と治療効果、副作用との関係を明らかにすることが必要である。今後は、ジアゾキシドの適正使用に向けた、母集団薬物動態(PPK)解析および血中濃度と治療効果、副作用との関係(PK/PD)解析が望まれる。

A. 研究目的

ジアゾキシドは、高インスリン血症に伴う低血糖症に対する治療薬<sup>1)3)</sup>として、米国、欧州などで広く用いられている。高インスリン血症・低血糖症は新生児期から18ヶ月までに発症することが多く、適切な治療を早期に開始しなければ痙攣、精神遅滞などの重篤な神経学的後遺症を残す<sup>4), 5)</sup>。治療開始時は内科的治療としてジアゾキシドの投与が試みられ、内科的治療で血糖維持が困難な場合は、低血糖による中枢神経障害を予防するために、膵全摘除術を行うことになる。しかし、膵全摘除術後も低血糖が持続する場合はジアゾキシドを投与し血糖の維持を図らなければならない。良好な血糖コントロールが得られた後、ジアゾキシド療法を長期間(4-6年間)続けられ、

60%は寛解すると言われている<sup>3)</sup>。しかし、わが国では未承認であるため、同薬剤を使用するためには、シェリング・プラウ社の好意により、日本小児内分泌学会の代表者が個人輸入して、主治医の申請のあった患者に配布する形で使用されているのが現状である<sup>6)</sup>。したがって、日本の小児患者を対象とした臨床試験は行われておらず、用法・用量についてもエビデンスに乏しい状況にある。

薬物の多くは薬物動態と薬効との間に密接な関連を示すので、血中薬物濃度を測定し薬物動態を検討することは、用法・用量の合理的な設定や臨床試験の計画を行う上で不可欠である<sup>7)</sup>。

そこで本研究では、ジアゾキシドの薬物動態試験を実施するために必要な事項について、調査、検討を行うことを目的とした。

## B. 研究方法

ジアゾキシドの薬理効果や薬物動態特性を文献調査し、臨床研究に向けての検討事項を整理した。ジアゾキシドの使用実態および薬物動態パラメータの報告を調査し、ジアゾキシドの母集団薬物動態試験を行うにあたり必要な情報を収集した。

## C. 研究結果

### 1. ジアゾキシドの薬理効果<sup>1)3), 8), 9)</sup>

ジアゾキシドの血糖上昇作用は主として膵β細胞からのインシュリン分泌抑制によると考えられており、インシュリン過剰症の治療に際してまず試みるべき治療法である。インシュリン分泌調節の中心的役割を担っているのは、膵β細胞のATP感受性K<sup>+</sup>(K<sub>ATP</sub>)チャネルであるが、ジアゾキシドは、膜2回貫通型であるKir6.2とスルホニルウレア受容体SUR1の二つのサブユニットから成るK<sub>ATP</sub>チャネルを開口し、インシュリン分泌を抑制する。一方、血管平滑筋のK<sup>+</sup>チャネルオープン作用により膜の脱分極を起こし、間接的にCa<sup>2+</sup>チャネルを遮断して細胞内Ca<sup>2+</sup>量を減らし、平滑筋を弛緩させる(血圧降下作用)。

投与量としては、3mg/kg/day 一日3回(8時間毎)で開始し、維持量を8~15mg/kg/day、一日3~4回に分け経口投与するのが一般的である。必要に応じて副作用に注意しながら20~25mg/kg/dayに増量する。副作用は多毛、浮腫、嘔気、高尿酸血症などであるが、重篤なものはなく、注意深い観察下で長期間の投与が可能である。

ジアゾキシド療法は良好な血糖コントロー

ルの後4~6年間続けるのが望ましい。服薬中止後、インシュリン/グルコース比が24時間以上低値で推移すれば、寛解を意味する。そのような寛解は60%の症例で見られる。

### 2. ジアゾキシドの薬物動態<sup>9)・12)</sup>

半減期は28±8.3hrと長いのが特徴である。約50%は未変化体として腎排泄される。バイオアベイラビリティは85-95%で、蛋白結合率は90%である。Ogilvieらの報告による成人の薬物動態(PK)パラメータは以下の通りである(表1)。

表1. ジアゾキシドのPKパラメータ<sup>10)</sup>

(成人高血圧患者 n=7, 1.4mg/kg 急速静注)

$\alpha$ t <sub>1/2</sub> (hr)	$\beta$ t <sub>1/2</sub> (hr)	Vd <sub>ss</sub> (L/kg)	CL (mL/kg · hr <sup>-1</sup> )
0.085 (0.047-0.109)	47.6 (32.0-62.5)	0.21 (0.18-0.25)	3.6 (2.2-5.3)

平均値(範囲)  $\alpha$  t<sub>1/2</sub>: 分布相の半減期,  $\beta$  t<sub>1/2</sub>: 消失相の半減期, Vd<sub>ss</sub>: 定常状態でのみかけの分布容積, CL: クリアランス

また、小児の低血糖患者におけるジアゾキシドの投与量と血中濃度の関係をPruittらが報告している(表2)。症例2の患者では、二日目から10mg/kg/day 一日3回の経口投与に切り替え、8日目には6.5mg/kg/day 一日2回に減量して、50μg/mLの血中レベルを維持していた。

ジアゾキシドの代謝物は、3位の水酸化体とカルボキシル体の二つが確認されているが、血中濃度は親化合物の1/10程度で活性はないとされている。

### 3. ジアゾキシドの使用実態<sup>6)</sup>

ジアゾキシドは、現在シェリング・プラウ社の