

若手研究者のひろば

本欄は DDS 研究に携わる若手研究者の自己紹介を兼ねて日頃の研究内容、研究成果を広くアピールする欄です。人選は本誌編集委員、および DDS 学会役員の推薦によります。

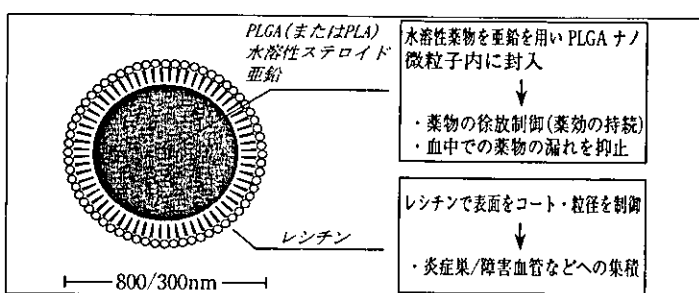


図1 水溶性ステロイドを封入した徐放性ナノ微粒子製剤

BP を封入できること、③凍結乾燥処理時にショ糖を混合しておくことでナノ微粒子の分散安定性が維持されBPの初期バーストも抑制できることなどが明らかになった。また、この調製法は、低速の攪拌器以外のいかなる乳化装置も必要がないうえに精製も限外濾過やファイバー透析により可能であるので、工業的にもきわめて簡便な調製法であるといえる。ナノ微粒子の希釈血清中での薬物放出挙動を検討したところ、O/W型液中乾燥法で調製したナノ微粒子⁹⁾では数日で薬物が全放出されたのに対し、本方法で調製したナノ微粒子では、20日にわたるBPの徐放挙動を示した。さらに、このナノ微粒子が *in vitro* でマクロファージに顕著に取り込まれること、そして、細胞内に取り込まれたナノ微粒子から細胞外(培地中)にBPが1週間にわたり徐放されていることがわかった。

また、ICP 発光分析によりナノ微粒子内の亜鉛量を定量したところ、ナノ微粒子内のBP量が増加するの

に伴いナノ微粒子内の亜鉛量も増加すること、および、異なる分子量のPLGAと亜鉛のみでナノ微粒子を調製すると分子量の大きいPLGAで調製したナノ微粒子のほうが亜鉛含量が少ないことがわかった。よって、亜鉛の役割としては、BPの沈殿形成を誘導するのに加え、おそらく亜鉛がPLGA末端のカルボキシル基と相互作用することで、ナノ微粒子の形成に寄与していると思われる。

アジュバンド関節炎ラットに蛍光プローブを封入したナノ微粒子を静注し、2時間後に炎症部位の切片像を顕微鏡観察した結果、100~200nm程度の粒径のナノ微粒子が炎症部位に集積しやすいことがわかった。さらに、アジュバンド関節炎ラットでのBP封入ナノ微粒子の抗炎症作用を検討したところ、投与1日後には、BPのみを投与したラットにくらべBP封入ナノ微粒子を投与したラットで有意に足浮腫の強い収縮が認められた。また、BPのみ、または臨床利用されているリメタゾンを

投与した場合には、投与後一時的に腫れが収縮し2日目以降徐々に腫れが増大していくが、BP封入ナノ微粒子では、少なくとも1週間にわたり有意に腫れが抑制されつづけた。よって、ナノ微粒子が従来の製剤にくらべ高い抗炎症作用を有することが明らかになった。さらに、タイプIIコラーゲン誘導関節炎マウスでもナノ微粒子が同様に持続性のある高い抗炎症作用を有することがわかった。

以上より、このナノ微粒子製剤は新規の抗炎症薬として臨床利用が期待できる。また、今後は、この手法によりプロスタノイドや抗がん剤などを用い、他の疾患に対するナノ微粒子製剤も開発していきたいと考えている。

文献

- 1) Maruyama A et al.: Biomaterials 15(13): 1035-1042, 1994.
- 2) Shibuya I et al.: Hepatology 32(6): 1300-1308, 2000.
- 3) Ishihara T, Corey DR: J Amer Chem Soc 121: 2012-2020, 1999.
- 4) Ishihara T, Corey DR: Nucleic Acid Symp Ser 42: 141-142, 1999.
- 5) Maruyama A et al.: Bioconjugate Chem 8: 735-742, 1998.
- 6) 石原 務・他: Drug Delivery System 15(2): 106-112, 2000.
- 7) 石原 務・他: 出願特許「徐放性ターゲットングを目的とした静脈注射用ナノ粒子製剤」, 特願2003-084695号.
- 8) 石原 務・他: 出願特許「静脈注射用組成物, その製造法およびその製剤」, 特願2002-159190号.



解 説

乾癬性関節炎の臨床*

檜 垣 恵**

Key Words : psoriatic arthritis, rheumatoid arthritis, seronegative spondyloarthritis, enthesopathy, TNF inhibitor

はじめに

乾癬(psoriasis)は活性化した好中球の浸潤と表皮細胞の異常増殖をひき起こす原因不明の慢性炎症性皮膚疾患である。一方、乾癬性関節炎(psoriatic arthritis ; PsA)は乾癬を伴う慢性炎症性関節症で血清反応陰性脊椎関節症(seronegative spondylarthritis ; SpA)として分類され、有病率2~3%である乾癬患者のうち7~42%に起こる。白人系人種に多く、アジア系人種では比較的稀である。詳細に関しては多くの総説がある^{1)~6)}。性差はなく、好発年齢はほかの関節疾患より高い。関節病変は多様で、単関節炎、非対称性少関節炎あるいは多発性関節炎、また慢性関節リウマチ(RA)に類似した対称性多関節炎がみられる。強直性脊椎炎(AS)との鑑別が必要な脊椎病変および仙腸関節病変も、単独あるいは末梢関節病変に合併してみられる。靭帯付着部炎を大きな特徴とし、リウマトイド因子(RF)は通常陰性で、関節外病変では虹彩炎を認める。病因は不明であるが、遺伝・環境因子に免疫反応が絡まって病態の発現と進展をひき起こす。従来、治療はRAに準じて行われてきたが、近年の抗腫瘍壊死因子(TNF)生物製剤はPsAに特異的に有効であることが示されている。

診 断

性差がなく、非対称性関節障害、指炎、指の動揺もしくは強直変形、頻度の高い付着部炎や

脊椎罹患が認められるという特徴はあるが、PsAの診断基準は依然、非常にあいまいである。RFが陰性で、遠位指(趾)間(DIP)関節が侵され、乾癬の皮疹と関節炎が同時に寛解・増悪を示していれば比較的診断は容易であるが、RAの1987年診断基準⁷⁾および、ASのESSG診断基準⁸⁾に合致してしまう症例も数多くみられる。また、皮膚所見を見逃している男性で遠位関節が障害されている場合は変形性関節症(OA)と診断されてしまうこともしばしばある。皮膚疾患と関節罹患の関係もいまだに不明である。感度・特異性とも高いFournier'sの定義を表1に示すが、広く世界中で受け入れられるには至っていない。

RAとの鑑別としては性差がない、乾癬皮疹あるいは爪病変、乾癬の家族歴、DIP関節病変、非対称的で放射状分布の関節炎、指全体が腫脹する指炎があげられる。RF陰性、靭帯付着部炎、脊椎病変あるいは仙腸関節炎の存在、および新しい骨形成あるいは骨強直を示すX線所見が鑑別の助けとなる。対称性の多発性関節炎および乾癬は認めるが、典型的な臨床所見(指炎、靭帯付着部炎、DIPあるいは仙腸関節の病変)あるいはX線所見(DIPのびらん、強直、骨形成、骨膜炎、靭帯付着部骨棘、房状骨吸収および骨融解によるpencil in cup変形、脊椎変化)が認められない場合、またRFが陽性の場合、RAの合併が示唆される。ASとの鑑別として脊椎疾患は比較的軽度であり、仙腸関節炎は非対称、脊椎病変は胸椎か頸椎から始まる(ASは腰椎から上向

* Diagnosis and management of psoriatic arthritis.

** Megumu HIGAKI, M.D.: 聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター(〒216-8511 川崎市宮前区菅生2-16-1); Institute of Medical Science, St. Marianna University School of Medicine, Kawasaki 216-8511, JAPAN

表1 Fournier's criteria

関節症状に先行もしくは併発する乾癬皮疹	6 points
乾癬の家族歴(上記が陰性の場合) または関節症状後の皮疹	3 points
DIP関節炎	3 points
頸胸椎の炎症罹患	3 points
非対称性単・少関節炎	1 points
臀部痛, 踵痛, 自発的前胸壁痛, または 靭帯付着部のびまん性炎症性疼痛	2 points
HLA B16(B38, B39)かB17の存在	6 points
ワラーローズ反応陰性	4 points
指趾のX線所見(1~5)	5 points
1. 少なくともひとつのDIPのびらん性関節炎	
2. 指趾骨関節の骨溶解による拡大した辺縁明瞭な関節腔	
3. 指趾関節の強直	
4. 指趾関節傍骨膜炎による放射状・帯状陰影	
5. 指趾の房状骨吸収または遠位骨骨膜炎	
11points以上を陽性とする	

表2 乾癬性関節炎および鑑別疾患の臨床的特徴

臨床像	乾癬性関節炎	関節リウマチ	強直性脊椎炎	反応性関節炎	炎症性腸疾患 随伴関節炎
性別	男性=女性	女性>男性	男性>女性	男性>女性	男性=女性
末梢関節パターン	少/多関節 非対称	多関節 対称	少関節 下肢	少関節 下肢	少関節 下肢
遠位指(趾)節間関節	+++	+	-	-	-
指(趾)炎	+++	-	+	++	+
靭帯付着部炎	++	-	++	+++	++
脊椎炎	++	-	+++	+	++
仙腸関節炎	非対称	-	対称	非対称	対称
眼疾患	+	++	++	+++	+
結節/シェーグレン	-	+++	-	-	-
皮膚/爪病変	+++	-	-	++	-
リウマトイド因子	-	+++	-	-	-

性). びまん性特発性骨増殖症(DISH)に似る大きな固まりの靭帯骨棘硬化を特徴とする。発症年齢も高く, 炎症性腫痛を認めることもある。PsAとほかのSpAとの鑑別はより困難で, 反応性関節炎, 腸炎に伴う関節炎および乾癬性関節炎には多くの共通する所見が認められる。先行する感染エピソードがないこと, 上肢の関節に好発すること, 龟头炎および尿道炎の所見がないことが重要な所見になる。反応性関節炎においても角質増殖性の皮膚および爪の変化がみられることがあるが, ほとんどの場合, これらの病変は足底および手掌に局在する。反応性関節炎でみられる膿漏性角化症は掌蹠膿疱症と臨床的および組織学的に同一である。上記疾患との鑑別を表2に示す。

一方, PsAを理解するのに非常に重要な疾患としてSAPHO (synovitis, acne, pustulosis, hyperostosis, osteomyelitis)症候群という滑膜炎, 膿疱性座瘡, 過骨化, 骨髄炎を伴う疾患があり, 関節外骨化がひき起こされる。前胸部の胸肋または胸鎖関節が侵され, 靭帯骨化が認められる。掌蹠膿疱症は膿疱性乾癬と区別が難しい。PsA, SAPHOともに骨融解から骨形成, 靭帯付着部症, 片側性の硬化型仙腸骨炎, 無菌性骨炎がみられ, 家族歴も重なる場合が多い。

遺伝および環境因子および免疫応答

PsA患者の一親等における本疾患の発症リスクはおおよそ50倍に増加することが示唆され父系遺伝が濃厚であることから遺伝因子が示唆され

る。家族内発生では、乾癬あるいは関節炎のみが発生する場合と両疾患が合併する場合とがある。乾癬に対する感受性と重要な相関を示す遺伝子は、ヒト第17染色体の遠位領域に位置しているヒト白血球抗原(HLA)がある。PsAは、HLA-Cw6との相関が認められているが、この相関は乾癬との相関ほど強いものではないが、HLA-B27は、末梢関節炎、X線所見として仙腸関節炎を認める脊椎疾患のいずれとも相関がみられる。日本人においては、HLA-A2-Bw46-DRw8ハプロタイプおよびC4, C4aの補体レベル高値との相関が指摘されている。PsAの発症機序においてHLAクラスI抗原が重要な役割を果たしていることは、乾癬様皮疹および爪病変を認めるHLA-B27導入トランスジェニックラットモデルを用いた実験により裏づけられている。近傍のTNF遺伝子との関連も示唆されているが、最近注目されているのは小腸上皮に発現しているmajor histocompatibility class I chain-related gene A (MICA)-A9との相関である。

環境因子としては感染性微生物および外傷などが本疾患の発症機序において重要と考えられる。反応性関節炎と乾癬性関節炎との臨床的類似は感染性微生物がなんらかの役割を果たしていることを示唆する。SAPHOの原因と考えられる*Propionibacterium acnes*, 連鎖球菌, C型肝炎ウイルス, ヘルペス属のEBV/CMVの関与も考えられている。乾癬プラークの細菌叢(連鎖球菌属およびブドウ球菌属)により惹起された反応性関節炎のひとつである可能性もあり、微生物抗原は、スーパー抗原として作用するか、あるいは自己抗原(ケラチン, ラミニン, II型コラーゲン, 熱ショック蛋白など)と交叉反応性を示すT細胞を誘導することが考えられる。また、外傷により、乾癬性関節炎が増悪する現象(深部ケブネル現象)は、推定されている自己抗原が放出されるかあるいは微生物抗原に類似の熱ショック蛋白が発現するためと思われる。HIV感染症や精神的ストレスも発症への関与が指摘されている。

免疫応答の結果、PsA滑膜および付着部に認められる病理組織学的変化は、滑膜細胞の過増殖、炎症性細胞(T細胞, マクロファージ, B

細胞および好中球)の集積である。RAと同様、本疾患の遷延化には、これら細胞間の相互作用が複雑にかかわっている。滑膜病変にはTNF- α , 血小板由来増殖因子(PDGF)などのケミカルメディエーターも認められる。一方、RA滑膜と比べてマクロファージの浸潤が少なく、滑膜表層細胞の重層化も目立たない。さらに滑膜血管内皮細胞の接着分子のひとつであるELAM-1の発現亢進もRAと比べて少ない。PsA滑膜では血管内皮細胞増殖因子(VEGF)の増加による血管の延長・蛇行肥大が特徴的である。さらに増殖に関与するPDGFレセプターの発現亢進が認められ、線維化が強い。関節液にはCD8陽性T細胞が優位で抗炎症性IL-13が増加しており、炎症性サイトカインは少ない。末梢血単球のCD11b/CD18の発現低下による接着・移動の障害も指摘されている。

関節症状

関節炎は朝のこわばり、関節の運動時痛で始まるが、患者の約70%は、関節炎発症の数年前から乾癬が先行して発現するか、あるいは同時に発現する(約15%)。関節炎は通常潜在性であるが、患者の約1/3は急性に発症する。全身症状はほとんど認められないが、関節炎が皮疹や爪の変形より先行して発現する場合がある(乾癬を伴わない関節炎)。非対称性の少関節炎あるいは単関節炎は患者の約30~50%に認められる。初期症状は、ほかの脊椎関節症との鑑別が難しい末梢性関節炎と類似の単一あるいは少関節炎である。これらの患者のうち、約1/3から半数はRAと鑑別できない対称性の多発性関節炎へと進行する。典型的な症状は、膝などの大関節と1~2の指節間関節に病変を認める少関節炎および手指あるいは足指の指炎である。下肢においては足首、中足趾節(MTP)関節、指趾の指節間(IP)関節が侵されるが、疼痛・機能不全は少ない。さらに30~50%の患者では手および足の小関節、手首、足首、膝および肘の関節などに対称性の多発性関節炎がみられる。RAとの鑑別が困難な場合があるが、高頻度にDIP関節病変が発現し(図1)、さらにDIPおよびPIP関節の骨性強直の傾向がみられ、その結果手が鉤状ある

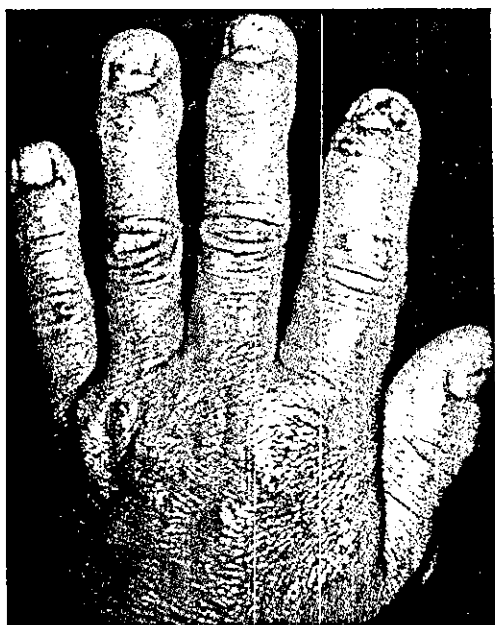


図1 DIP関節炎と爪病変

いは、椀状の変形を呈する。破壊性関節炎は稀であるが、手の指節骨および中手骨(あるいは稀ではあるが足の指節骨および中足骨)の骨溶解により、本疾患に特徴的な所見である罹患関節の「オペラグラス」変形を呈する。

約5%にみられる脊椎病変は強直性脊椎炎に類似する脊椎炎、仙腸関節炎あるいは肩、および股関節の関節炎である。末梢関節病変は伴う場合と伴わない場合がある。体軸関節疾患は末梢性関節炎とは無関係に起こるとされているが、一般的には末梢性関節炎発症から数年後に発現する。X線所見では進行性的な変化が認められるにもかかわらず、炎症性の腰痛あるいは胸壁痛などの症状は欠如しているか軽度である。仙腸関節炎も患者の1/3に認められ、しばしば無症候性で非対称性であり、脊椎炎とは無関係に起こる。脊椎炎は脊椎をランダムに侵し、脊椎の融合に至る。上記のDIP関節病変(全体の有病率約25%)、破壊性関節炎(約5%)、仙腸関節炎(約35%)および脊椎炎(約30%)は合併することもある。

脊椎関節症の特徴的症狀である骨に付着する腱および靭帯付着部の炎症、とくにアキレス腱および踵骨の足底腱膜の付着部でよくみられる。靭帯付着部症は少関節型の患者により高頻度に



図2 靭帯付着部症

発現する傾向がある(図2)。

合併症

眼の炎症、とくに結膜炎は患者の1/3に発現する。強直性脊椎炎と同様、大動脈弁閉鎖不全、ブドウ膜炎、上葉を含む肺線維症およびアミロイドーシスなどの合併症も発現することがあるが稀である。

皮膚および爪症状

乾癬の家族歴あるいは小児期における滴状乾癬の既往とともに、隠れた乾癬部分(頭皮、臍および肛門周辺など)への注意が、特徴的なX線所見とともにPsAの正しい診断を下す上で重要である。乾癬の皮膚病変は1~2か所の小さい乾癬皮疹のみの場合があり、爪の変化は必ずしも認められない。しかし、DIP関節病変が認められる場合にはほとんどの場合、爪の乾癬性変化がみられる(図1)。皮膚症状は尋常性乾癬以外に紅皮症あるいは膿疱性乾癬を呈することもあり、爪甲下の角質増生などの爪の変形もしばしばみられる。特異的な乾癬の皮膚病変は、境界の明瞭な赤斑であり、著明な銀白色の鱗屑を伴う。病変は、肘、膝の伸側および頭皮、耳および仙骨上方に特徴的にみられるが、手掌および足底、屈側、腰、髪の毛の生えざわ、会陰および性器などの全身に認められる。その大きさもさまざまであり、軽く搔爬すると点状の出血がみられる(Auspitz徴候)。爪の変形は、関節炎を合併している可能性の高い乾癬患者を同定する上の唯一の臨床所見である。指炎あるいはDIP関節を侵された1本

の指の爪にみられる多数のくぼみ(通常20個以上)は、PsAに特徴的な所見である。

臨床検査

乾癬に特異的な検査所見はなく、血沈の亢進、CRP上昇および低色素性貧血が認められる。通常リウマトイド因子は陰性である。血沈が疾患活動性および重症度の指標となり、CRPはX線所見および全般の重症度と相関する。急性期反応物質(フィブリノーゲン、 α_1 アンチトリプシン、C9、CRP)および好中球増加も認められる。関節液中の補体成分は正常もしくは上昇しているため、RAとの鑑別が可能である。腎疾患の合併で蛋白尿やクレアチンクリアランス低下がみられることが多い。骨形成を示す骨型アルカリフォスファターゼ上昇がみられるにもかかわらず骨密度は減少している。神経系の関与も考えられ、サブスタンス P やVIPが増加している。

画像診断

X線所見では、乾癬性関節炎における骨変化の特徴として、強直性脊椎炎との鑑別診断の一助となるびらんと、RAとの鑑別が可能な特定部位における骨増殖性変化が共存していることである。X線変化がみられる部位は、手がもっとも多く、次いで足、仙腸関節および脊椎の順である。

特徴的な所見は末梢関節では①通常の石灰化を維持している両側性だが非対称性紡錘状の軟部組織腫脹、②手および足のIP関節の強直はみられる場合とみられない場合がある関節裂隙の劇的狭小化、③関節裂隙の拡大を伴うIPの関節破壊、④遠位指節骨底の骨増殖および罹患遠位指節骨端の骨吸収、⑤近位指節骨の先細りを伴う骨びらんおよび遠位指節骨の骨増殖(pencil-in-cup変形)、⑥および「毛先のような」骨膜炎である。

脊椎関節では、①傍脊椎骨化、②非定型靭帯骨化(しばしば仙腸関節炎を伴わない)、③非対称性仙腸関節炎、仙腸関節炎は、早期段階では片側性あるいは非対称性であるが、やがて両側性の融合へと進展し得る、④胸骨の融合、⑤強直性脊椎炎様竹節状脊椎は稀、⑥脊椎椎間板の狭小化、強直、靭帯骨化、という特徴が認められる。非対称性で、塊状となった靭帯骨化およ

び傍脊椎骨化を示す脊椎炎では靭帯化骨 syndesmo-phyteが椎体辺縁に起こらず、椎体の前面あるいは側面から起こる。単独でときによっては非常に大きく不規則な周縁性、あるいは非周縁性のsyndesmo-phyteが脊椎のどの部位でもみられる。頸椎では後方に靭帯骨化が起こり環軸関節および軸下の亜脱臼に至る。乾癬性関節炎のなかで脊椎炎は40%、そのうち仙腸関節炎は30%、靭帯骨化は25%に認められる。

近年、関節および靭帯附着部の局在、活動の重症度、構造破壊の診断にMRIおよび超音波エコーが有効であることが認められている。

治療

一般的には、RAあるいはSpA患者を治療する上での基本方針が適用される。マイルドな症例では非ステロイド抗炎症剤(NSAIDs)と物理療法および単純な運動で可動性を保ちこわばりを減少させる。近年、COX-2特異的なcelecoxibとrofecoxibの有用性が証明されている。

NSAIDsに対する効果が不十分な患者、および進行性でびらん性の多発性関節炎を有する患者には、抗リウマチ薬(disease-modifying anti-rheumatic drugs; DMARDs)による治療を行う。Methotrexate(MTX)とsulfasalazine(SASP)が一応有効と考えられ第一選択として使用される場合が多いが、皮膚症状には効果があっても関節症状の改善は難しいのが現状である。

MTXは、25mg皮下注もしくは経口で7.5~15 mg/weekが用いられる。医師の評価改善、皮膚病変の改善が認められ、血沈も低下する。しかし、X線上の変化の改善は認められていない。肝障害に注意して用いられる。SASPは2~4 g/日使用される。血沈低下にのみ有効であるが、副作用は消化器症状のみでマイルドのためしばしば用いられる。選択的T細胞抑制剤であるcyclosporine(3~5 mg/kg/d)投与ではCRP減少が認められている。しかし、皮膚症状は5~6週で改善するが、関節症状改善には24週かかり、中止で再燃する。腎障害に注意しながら試みられている。

抗マラリア薬、金製剤、アザチオプリン、エトレチナートおよびカルシトリオールも使用される。

表3 生物製剤

作用機序	製剤	性状	コメント
TNF阻害	etanercept	可溶性 TNF レセプター 結合蛋白	FDA 認可
	infliximab	キメラ 抗-TNF単クローン抗体	
	anercept	組換えヒトTNF結合蛋白	
抗炎症性サイトカイン	recombinant IL-10	組換え IL-10	皮膚症状に効果 関節症状には無効
T 細胞相互作用抑制	alefacept	組換え LFA-3結合蛋白	
	efalizumab	ヒト化抗CD11a 単クローン抗体	
	huOKT3γ1 (ala-ala)	ヒト化抗CD3単クローン抗体	

エトレチナートは、長期使用により、脊椎および靭帯の石灰化が認められるので、体軸関節病変の患者には避けるべきであろう。ピリミジン合成阻害剤でリンパ球活性化を抑制する免疫抑制剤 lefronomideのほか bisphosphonate, mycophenolate mofetil も近年興味もたれている。

コルチコステロイドは進行性で破壊性の患者に対しては考慮せざるを得ないが、リバウンドによる膿疱性乾癬の増悪が懸念される。しかし、少関節炎や指炎での関節内などへの局所注射は有効である。

表3に示す生物製剤のうち、etanerceptや infliximabなどの抗TNF製剤はMTXとSASP無効例に用いる。長期予後の評価が待たれるが、非常に有望である。FDAに認可されたetanerceptはヒト型の可溶性TNF受容体でTNFの結合を阻害する。週2回25mg皮下注を12週行ったところ、4週ですでに疼痛および腫脹関節スコアと主治医および患者の5ポイントおよびLikertスケールによる全体評価によるPsARC (Psoriatic Arthritis Response Criteria) スコアの改善がみられ、ACR20およびACR50も12週で有意に改善した⁹⁾。PsAではMTX併用の有無は影響しなかった。慢性プラークの改善も認められ、皮膚のPASIスコアも改善した。副作用は局所刺激のみである。Infliximabはヒトマウスのキメラ抗TNF単クローン抗体でクローン病、RAに用いられている。0, 2, 6週の5 mg/kg 静注で改善がみられ5 mg/kgを14週間隔で持続した。結核、脱髄疾患、薬剤ループスへ注意して用いる。隔週1回皮下投与する完全ヒト型の抗TNF単クローン抗体adalimumab (D2E7)や組換えヒトp55TNF結合蛋白のanerceptも有望である。

皮膚症状に対して光化学療法(PUVA)のほか非ステロイド性抗炎症剤と皮膚病変の処置、ステロイド薬およびレチノイド、ビタミンD₃外用が行われる。

予 後

一般的に、PsA患者は、RA患者に比較し、疼痛についての訴えが少なく、良性の経過を辿ると思われていたが近年の調査ではRAと同様に機能不全、QOL (quality of life) 低下も起こり、合併症や死亡率も高い。

おわりに

今後、乾癬性関節炎(PsA)の確実な診断と特異的な治療法の確立がさらに望まれる。

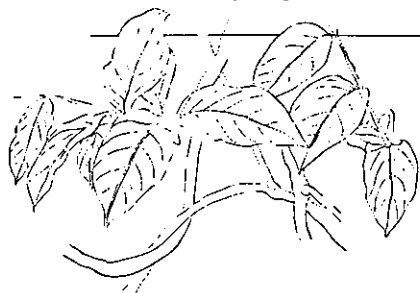
文 献

- 1) Mease PJ. Current treatment of psoriatic arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 2003; 29 : 495.
- 2) Berthelot JM. Psoriatic arthritis as a mountain. *Rheumatismo* 2003; 55 : 6.
- 3) Brockbank J, Gladman D. Diagnosis and management of psoriatic arthritis. *Drugs* 2002; 62 : 2447.
- 4) Gladman DD. Current concepts in psoriatic arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2002; 14 : 361.
- 5) Boumpas TD, Illei GG, Tassioulas OI. Psoriatic arthritis. In: Klippel JH, Weyand CM, Watmann R, editors. *Primer on the Rheumatic Diseases*. Atlanta: Arthritis Foundation; 2003. p. 233.
- 6) 檜垣 恵. 乾癬性関節炎. In: 宮坂信之・編. 膠原病・リウマチ. 東京: 朝倉書店; 2001. p. 245.
- 7) Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised

- criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988 ; 31 : 315.
- 8) Dougados M, van der Linden S, Juhlin R, et al. The European Spondylarthropathy Study Group preliminary criteria for the classification of spondylarthro-pathy. *Arthritis Rheum* 1991 ; 34 : 1218.
- 9) Mease PJ, Goffe BS, Metz J, et al. Etanercept in the treatment of psoriatic arthritis and psoriasis : a randomised trial. *Lancet* 2000 ; 356 : 385.

* * *

キヤツツクロー



関連記事 → P36 参照

参考文献 → P372-382 参照

聖マリアンナ医科大学
難病治療研究センター助教授、
感染免疫研究室長

檜垣 恵
(ひがき めぐみ)

関節に炎症を起こし、ついには骨が変形してしまう

恐ろしい病気、関節リウマチ（リウマチ）。

リウマチの患者は、現在全国に60万～70万人いるといわれていますが、その治療法はまだ確立されていません。

しかし世界中の研究者の努力のおかげで、

少しずつ効果的な治療法も開発されはじめています。

関節の炎症が進行する病気、 関節リウマチ

檜垣先生は、こちらの研究所で主にリウマチの研究をされているそうですね。

「関節リウマチ（リウマチ）を含む、膠原病を専門としています。

その中でも、特に関節滑膜の炎症に興味をもっています。

滑膜というのは関節を包み込むように存在し、関節をスムーズに動かすための滑液を分泌している組織です。

関節炎の代表的なものであるリウマチや変形性関節症は、どちらも滑膜に炎症が起こることで痛みや腫れなどの症状が現れます。私たちは、この滑膜炎がどのようなメカニズムで起きるのかを解明し、さらに治療薬の開発を目指して研究しています」

リウマチや変形性関節症とは、どのような病気なのでしょう。

「リウマチも変形性関節症も、関節滑膜に炎症が起きて痛みが生じる病気です。

リウマチでは免疫異常のためさらに炎症が長びくことで滑膜が異常に増殖し、滑液も溜まります。

滑液には軟骨を溶かす酵素が含まれているため、過剰に存在すると軟骨が破壊されてしまいます。さらには増殖した滑膜によって骨が破壊され、激痛が起こり、関節が変形してしまうのです。

リウマチは難病指定にもなっており、完治させることが難しい病気です。しかも病気が進行して起こる骨の変形は、炎症がおさまってももとには戻りません。

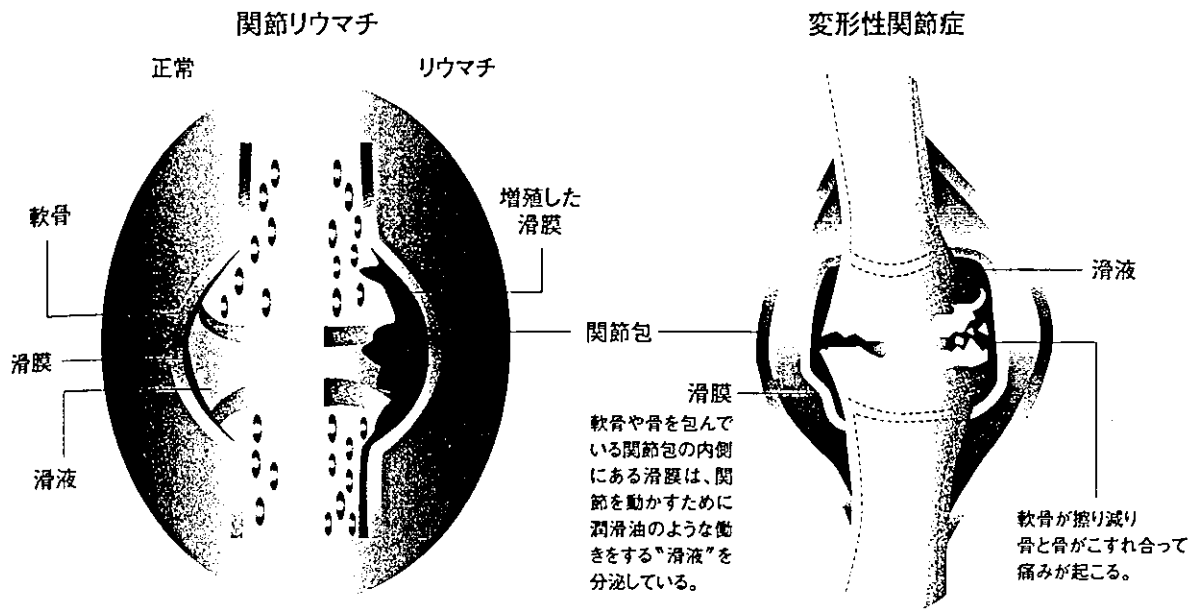
現在はリウマチの原因自体を治療するというよりも、薬で痛みや炎症を抑えて関節の破壊をできるだけくい止めるという抗炎症剤や抗リウマチ剤による治療法が主流になっています。

一方、変形性関節症はひざや腰などに負担がかかり、関節の軟骨が擦り減った結果、骨と骨が直接触れ合うようになり、痛みが起こるといいます。

変形性関節症の原因としては、加齢、過度のスポーツ、外傷などが考えられます。

早期のリウマチと変形性関節症は症状が似ているため、自分では判断が難しいと思います。関節の痛

関節リウマチと変形性関節症



関節リウマチと変形性関節症は滑膜に炎症が起こる病気。関節包の内面を覆っている厚さ1mmにも達しない薄い膜である滑膜が炎症を起こして腫れ上がり、充血してもとの厚さの何倍にも膨れ上がる。熱をもって腫れ、じっとしていても痛みがある。この滑膜炎は自然によくなくなることがなく、慢性化して、周りの組織に入り込んで骨や軟骨なども破壊していく。

みが長引くようだったら、なるべく早くリウマチ専門医の診断を受けたほうがいいでしょう」

早期発見・早期治療が肝心

リウマチになりやすいタイプというのは、どのような方なのでしょう。

「リウマチというとお年寄りの病気だという印象があるかもしれませんが、実際は40歳代から50歳代に発症する方が最も多いのです。

対して、変形性関節症は60歳代以降の人で発症が激増します。

またリウマチは男性よりも女性に圧倒的に多い病気です。男女比は1対5といわれています。しかし

60歳を過ぎてから発症する人の男女比は1対1になります。このため、リウマチの発症には、他の膠原病と同様に女性ホルモンが関わっているのではないかという説もあります。

リウマチは、生活習慣病のように、「こういう生活をしていたら発病しやすい」というポイントがありません。言いかえると、誰もがリウマチになる可能性があるわけです。

リウマチの症状の進行には大きく分けると3つのパターンがあります。1つ目は数年で自然によくなるパターン。これは全体の3分の1を占めます。このタイプの方々は、本当は慢性のリウマチではなかったのか、早期の治療が功を奏した幸運な人です。

そして2つ目の3分の1の人は、数年で急激に悪化するパターンです。残りの3分の1の人は、よくなったり悪くなったりを繰り返し、徐々に破壊が進みます。

いずれにしても、リウマチは早期に治療を始めれば痛みや腫れをコントロールできますし、骨の変形もある程度は遅らせることができます。

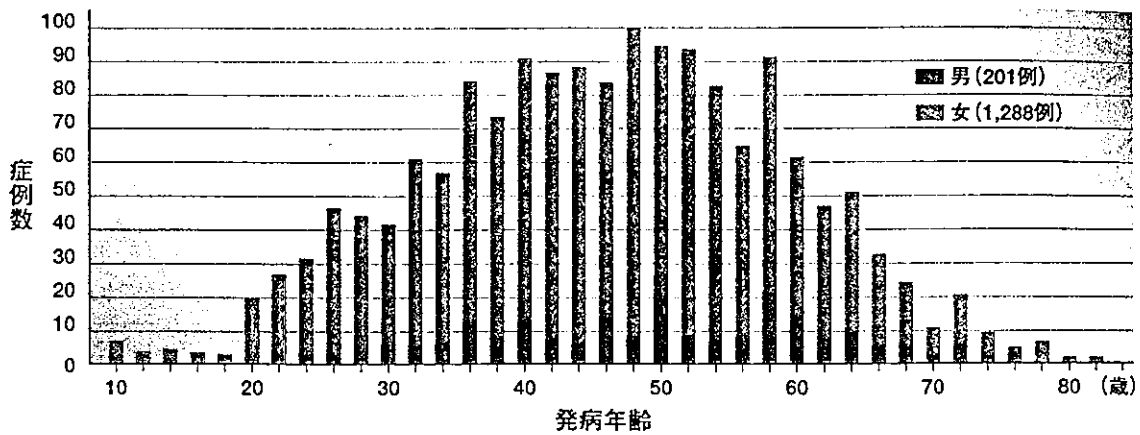
朝、目が覚めたときに手がこわばったり、関節が

腫れて熱をもったりしたときはリウマチの可能性があるので、すぐに受診をおすすめします」

リウマチは免疫系が間違っ て自分自身の関節を攻撃する病気

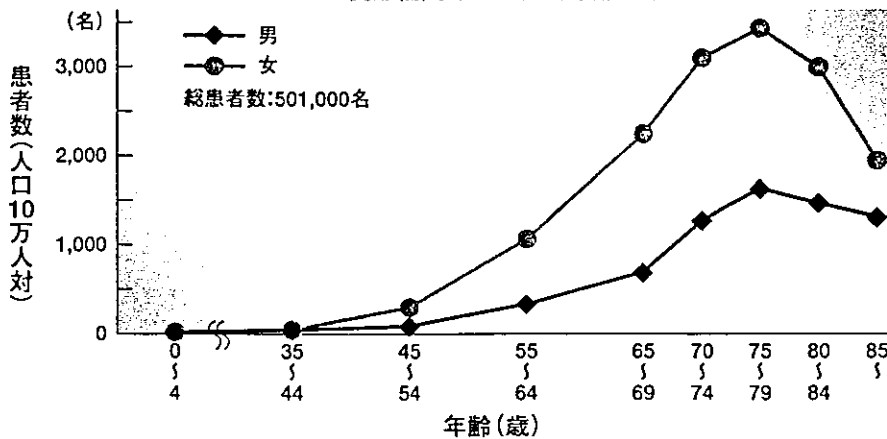
リウマチが起きるメカニズムを教えてください。
「直接の原因はまだ解明されていません。ただし、

関節リウマチの発病年齢分布



1,489例 (厚生省研究班, 1994)

変形性関節症の発病年齢分布



関節リウマチは40~50歳代で発症することが多い。変形性関節症は60~80歳代に多く見られる。これは発症自体は40歳以降に起こるが、症状が出るまでに時間がかかるためだといわれる。また、双方とも男性よりも女性に患者数が多い。

参考: BIO INDUSTRY 1998 No.11

関節リウマチと変形性関節症の違い

	関節リウマチ	変形性関節症
発病年齢	最初は40歳から50歳の間に発病する	普通50歳を過ぎてから発病する
原因と進行	免疫の異常により、何の兆しもなく、突然発病する	加齢、外傷などにより何年もかけて徐々に進行する
主な症状	ほぼ例外なく関節の腫れやほてり(炎症)が見られる	関節が赤く腫れたり熱をもつ(炎症が起こる)こともある
	しばしば全身のだるさ、疲労、急な痩せ、発熱を伴う	体全体のだるくなることはない
症状が出る主な部位	指の関節(第2、第3関節)、手首、ひじ、肩を含め、あらゆる関節に発症する	ひざ、手、股関節、足指、脊柱に発症する。まれに指の付け根の関節、手首、ひじ、肩などに発症することもある
	同時に体の両側の関節に発症する	まず体の片側の関節に発症する

自分の免疫系が間違っって自分の関節を攻撃してしまうことが炎症の発端になることが明らかになっています。

我々の体には、体内に侵入した細菌などの異物を攻撃して排除する免疫機能というものが備わっています。本来、免疫は自分自身の体には反応しないようにプログラムされているのですが、そのプログラムに狂いが生じて、攻撃するべきでない自分自身に反応してしまうことがあるのです。これを自己免疫疾患といいます。一方、食品や花粉によるアレルギーも、外部から入ってきた異物に対し、異常もしくは過剰に免疫が反応するために起こる病気ですね。

リウマチの場合は、軟骨に存在するⅡ型コラーゲンというタンパク質に対して免疫系が異常反応を起こしている可能性も示唆されています。Ⅱ型コラーゲンは自分の体にもともとある物質なのに、免疫細胞が勘違いをして攻撃してしまうわけです。そのために関節に炎症が起きて滑膜の増殖が起こってしまうのです。

このようなメカニズムはわかっているのですが、なぜもともとの免疫異常が起きるのかはまだ明らかになっていません。

遺伝やストレス、ウイルス説なども出ていますが、まだよくわかりません。

これだという決め手はなく、現状ではリウマチはいくつかの原因が重なり合っって発症する病気だといわれています」

関節炎の炎症を抑える キャットクロー

先生はリウマチの研究にキャットクローを使われているようですが、これはどのようなものなのでしょう。

「キャットクローとはペルー原産のアカネ科の植物で、葉の根元に猫の爪のような刺とげがあることからその名がつけました。

ペルーでは、キャットクローは大昔から薬用植物として用いられていたそうです。近年では国を挙げて栽培され、薬理作用の研究がされています。

1994年にはWHO（世界保健機関）により、副作用のない抗炎症作用をもつ薬用植物として公式に認定されています。

我々がキャットクローの研究を始めたのは、いま

〈註1〉 サイトカインとTNF

サイトカインは細胞間の情報伝達をする物質の総称。免疫に関連するマクロファージなど多様な細胞から産生され、過剰になると炎症の原因となる。TNFは炎症を悪化させる一連の過剰な免疫反応の引き金となるサイトカイン。

から6年ほど前のことです。アメリカなどで広く使用されているリウマチの薬に、ヒドロキシクロロキンというものがあります。これはリウマチになったらメトトレキサートやスルファサラジンなどの免疫調節剤とともに、まずはじめに処方される治療薬で、とても効果が高いといわれています。しかし日本では副作用で網膜症が発生したことがあったため、使用することができません。

一方、最近、注目されているのが、生物学的製剤というものです。

生物学的製剤とは、免疫反応による炎症の原因となるTNFというサイトカインなど〈註1〉の働きをくいとめることによって、自己免疫疾患で起きた炎症を抑えようという薬です。

しかし、この生物学的製剤は効果が高い代わりに、とても高価なものなのです。

そこで私たちはヒドロキシクロロキンや生物学的製剤に代わる効果的な抗リウマチ薬を探しました。そして出会ったのがキャッツクローだったのです。キャッツクローには、アルカロイド〈註2〉が含ま

れており、ヒドロキシクロロキンと同じような作用が期待できます。

このアルカロイドは、生物学的製剤のようにマクロファージが産生するTNFを抑える作用があるのではないかと考えられました。そこで我々もキャッツクローの研究を始めたわけです」

リウマチの発症が50%抑えられた

先生のご研究の内容を教えてくださいませんか。

「まずはキャッツクローが、滑膜細胞やマクロファージの活性化および増殖などを抑えるかどうかを、試験管内で調べました^{92,93)}。

その結果、TNFなどのサイトカインを抑える働きはそれほど強くなかったのです。痛みを引き起こすプロスタグランジンという物質を抑える作用もあったのですが、こちらもきわめて弱いものでした。

ところがおもしろいことに、試験管内ではなく実際にマウスにキャッツクローを飲ませた実験では非常によい結果が出たのです。

マウスに、ある抗体と細菌成分を注射すると、2～3日以内に100%の確率で関節炎が発症します。しかし、投与1週間前からキャッツクローのエキス(75%エタノール抽出物)を0.5mlずつ飲ませると、半数のマウスが関節炎を発症しませんでした。

この実験の結果からわかるように、キャッツクローは細胞に直接投与するよりも、経口摂取したほうが効果が高いのです。さらに、キャッツクローの特定の成分を取り出して与えるよりも、キャッツクローの成分全体を与えたほうがよい結果が出るのです⁹⁴⁾。その理由はよくわかりませんが、全体的な成

キャッツクローとは

キャッツクロー (Cat's claw)
学名: *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC.
科名: アカネ科
別名: Una de gato
(ネコの爪、という意味)
原産地: ペルー
使用部位(薬用部): 樹皮、皮



〔注2〕アルカロイド
植物の組織に含まれる塩基性の物質（アルカリ様物質）の総称で、さまざまな種類がある。キャッツクローに含まれるのは6種類といわれるが、その中でもイソテロポディンはキャッツクロー特有のアルカロイド。

分の配合の微妙な調和によっていい結果が出る、という感じがしますね。

ここでは予防的効果しか検討していませんが、リウマチは関節炎の悪化と改善が繰り返して起こりますから、次の炎症の波が来る前にキャッツクローを飲んでおくと効果的に症状が緩和される可能性があります」

実際にリウマチの患者さんに飲んでもらったケースはあるのでしょうか。

「私が担当する患者さんではないのですが、リウマチの治療のためにキャッツクローを飲んでいるという3人の方にお話を伺ったことがあります。

この方たちはキャッツクローだけでなく、もちろん医師の処方する抗リウマチ薬も服用しているのですが、キャッツクローを飲むことによって、ステロイド剤などの薬の量を減らすことができた人もいます。

リウマチの患者さんは強い痛みもあるし、完治が難しい病気なので不安が多いですから、治療に弊害がない限り健康食品などを利用してよいと思っています」

生体内の免疫バランスを整えて炎症を抑える

キャッツクローには、炎症を抑えるアルカロイドのほかに、どのような成分が含まれているのでしょうか。

「抗炎症作用と鎮痛作用があると

いわれているものには、キノビック酸グルコシドがありますね。

また、抗ウイルス作用があるサポニンも含まれています。

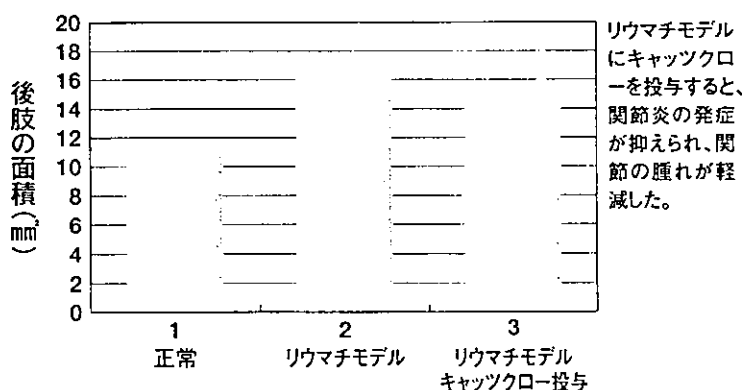
カテキンなど抗酸化作用が強いポリフェノールも豊富ですから、抗がん作用もあるかもしれません⁹⁵⁾。

またキャッツクローに含まれるアルカロイドには、イソテロポディンのように免疫力増強作用をもつものもあります。炎症を抑えるということは免疫反応を抑えることだと先ほど申し上げたので、おや？と思われる方もいるかもしれません。

免疫というのはバランスが大切なのです。免疫反応が弱くなるとウイルスや細菌やがん細胞にやられてしまうし、逆に強すぎるとアレルギーやリウマチといった病気になってしまいます。これらアルカロイドには弱まった免疫を増強し、過剰になった免疫を抑制する免疫調整作用があると考えられます。

特にリウマチの場合は、関節のマクロファージが抗原をうまく食べられないために炎症が引き延ばされてしまうのです。マクロファージは普通、抗原を

リウマチモデルの関節の腫脹をキャッツクローが軽減



後肢の関節腫脹 (n=7)

参考：2001年第45回日本リウマチ学会発表データ

食べたらず消化しておとなしくなるものです。ところがこのマクロファージは食べても食べてもうまく消化できないために、怒り続けてしまいその結果、炎症をひどくさせるのです。ですからマクロファージの機能を強化して消化不良を起こさせなければ、炎症を早く終息させることができるのですね。

このように、キャッツクローには生体内の免疫のバランスを調節する役割があるようです。偏った免疫反応をもとに戻してやるという意味では、マイルドに作用する健康食品がいいのかもしれませんが。薬ではどうしても偏った強い作用が出る場合もありますからね」

変形性関節症やスポーツによる関節の痛みにも

人間の場合、有効量はどれくらいでしょうか。「詳しくはわかりませんが、お話を聞いた患者さんたちは、1日にエキスを0.5～1g飲まれているようです」

副作用の心配はないのでしょうか。

「私の行ったマウスの実験では、毒性は見られませ

んでした。人間だったら、1日500g飲んでも大丈夫だという報告もありますが、普通はそんなに飲めないと思います。

ただし、普通の薬と同じく薬理作用があるものなので、妊婦や授乳中の女性、乳幼児には飲ませないほうがいいでしょうね」

キャッツクローは、リウマチ以外の関節痛にも効果があるのでしょうか。

「炎症を抑え、鎮痛作用もあるので、関節の炎症による痛みには効果があると思います。例えば変形性関節症にもよいのではないのでしょうか。

私はスポーツジムに置けばいいと思うのです。腰痛によいという話も聞きますしね」

今後の先生の研究の抱負をお聞かせください。

「日本で使える抗リウマチ薬は種類が限られていますし、効果があるといわれている新しい生物学的製剤は高価です。

ですからキャッツクローをはじめとする植物のアルカロイドの中から、抗リウマチ効果があるものを探していきたいですね。

ただし、いろいろな成分を微妙に配合していかないとうまく作用しないようです。組み合わせも膨大だし、非常に難しい仕事だと思いますが、リウマチで苦しんでいるたくさんの患者さんのためにも研究を進めていきたいです」
ありがとうございました。

キャッツクローの有効成分と作用^{94,95)}

成分名	代表的な作用
アルカロイド イソテロポディン テロポディン、イソミトラフィン、 ミトラフィリン、イソリンコフィリン、 リンコフィリン	免疫力増強作用 細菌の繁殖を防ぐ 血小板凝集、血栓の発生を予防
トリテルペン キノビック酸グルコシド	抗炎症作用、抗ウイルス作用など
ポリフェノール プロアントシアニジン、カテキン	抗酸化作用、抗がん作用

参考：Rita Aquino, et al. JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS. 1991；54(2)：453-459.
Renato Rizzi, et al. JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOG. 1993；38(1)：63-77.

キャッツクローのリウマチへの効果

オーストリアで医薬品として承認されている「KRALLENDORN®」を使用した
プラセボを対照とする無作為化二重盲検試験⁹⁶⁾

関節リウマチ患者40名を右の
ように無作為に群分けし、関
節の痛み (tender joints)、関
節腫脹 (swollen joints)、圧
痛関節得点 (Ritchie Index)、
朝のこわばり (morning stiff-
ness)、病態 (disease activ-
ity)、疼痛 (pain)、赤血球沈
降率 (ESR)、炎症反応
(CRP) について評価した。

0～24週：二重盲検試験

21名：キャッツクローエキス入りカプセルを
3カプセル/日摂取 (摂取量：60mg)

19名：プラセボカプセルを3カプセル/日摂取

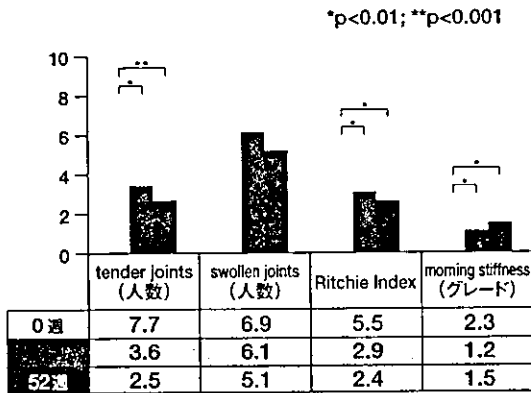
24～54週：全患者にキャッツクローエキス入りカプセルを
摂取してもらった。

結果

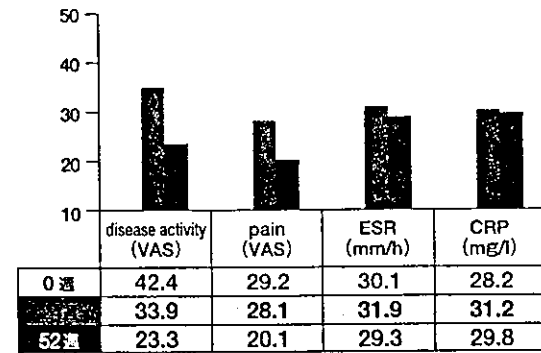
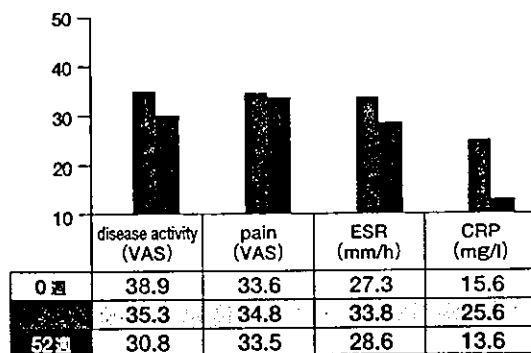
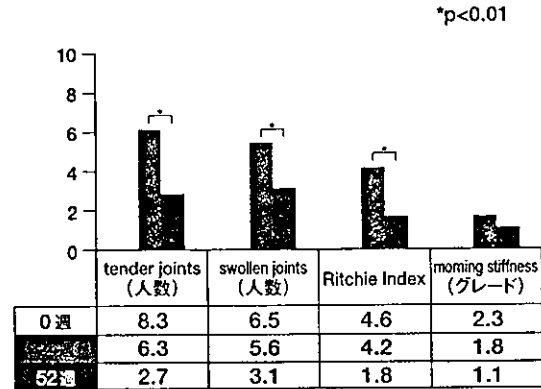
0～24週の試験終了時点でキャッツクロー投与群は、関節の
痛み、圧痛関節得点、朝のこわばりが減少したのに対し、プ
ラセボ群はこれらに有意な減少は見られなかった。

24～52週では、キャッツクロー摂取により関節の痛み、圧痛
関節得点、朝のこわばりが有意に減少した。

キャッツクローエキス摂取後
0週、24週、52週後の結果の平均値



0～24週プラセボを摂取させ、
24～52週キャッツクローエキスを
摂取させた結果の平均値



参考：Erich Mur et al. The Journal of Rheumatology. 2003；29(4)：678-681.

Determination of midazolam and its metabolite as a probe for cytochrome P450 3A4 phenotype by liquid chromatography–mass spectrometry

Hideko Kanazawa^{a,*}, Akiko Okada^a, Eri Igarashi^a, Megumu Higaki^b,
Takako Miyabe^c, Tadashi Sano^c, Ryouhei Nishimura^c

^a Department of Physical Chemistry, Kyoritsu College of Pharmacy, 1-5-30 Shibakoen, Minato-ku, Tokyo 105-8512, Japan

^b Institute of Medical Science, St. Marianna University School of Medicine, 2-16-1 Sugao, Miyamae-ku, Kanagawa 216-8512, Japan

^c Faculty of Agriculture, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan

Abstract

This study demonstrated the analysis of midazolam and its metabolites by liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS) with a sonic spray ionization (SSI) interface. The analytical column was a YMC-Pak Pro C₁₈ (50 mm × 2.0 mm i.d.) using 10 mM ammonium acetate (pH 4.8)–methanol (1:1) at a flow rate of 0.2 ml min⁻¹. The drift voltage was 100 V. The sampling aperture was heated at 110 °C and the shield temperature was 230 °C. The lower limits for the detection of midazolam and 1'-hydroxymidazolam were 26.3 and 112.76 pg injected, respectively. The calibration curves for midazolam and 1'-hydroxymidazolam were linear in the range of 0.1–5 µg ml⁻¹. Within-day relative standard deviations was less than 7%. The method was applied to the determination of midazolam in monkey plasma, and the analysis of midazolam and its metabolites in an in vitro study with recombinant cytochrome P450 (CYP) 3A4. This method is sufficiently sensitive and useful to elucidate the kinetics of midazolam metabolite formation. We also investigated the effect of propofol on the metabolism of midazolam using recombinant CYP3A4. Propofol competitively inhibited the metabolism of midazolam to 1'-hydroxymidazolam by CYP3A4.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Sonic spray ionization; Interfaces, LC–MS; Midazolam; Cytochromes; Propofol

1. Introduction

Midazolam, 8-chloro-6-(2-fluorophenyl)-1-methyl-4*H*-imidazo[1,5-*a*][1,4]benzodiazepine, is used for intravenous sedation and the induction of anesthesia. In humans, it has been widely used for cardiac surgery in combination with opioids. Oral midazolam is commonly used for procedural sedation in children, despite the lack of a product license for the oral route of administration and a low bioavailability [1–4]. The oxidative metabolism of drugs in the liver is catalyzed by substrate-specific or selective cytochrome P450 (CYP), a superfamily of hemoproteins that catalyze the metabolism of a large number of clinically important drugs [5–7]. Hepatic drug oxidation is a major source of interindividual variations in drug pharmacokinetics and therapeutic response. Midazolam is widely used as a probe to measure the activity of CYP3A4, an important member of the cytochrome P450 superfamily of drug-metabolizing

enzymes [8–11]. This benzodiazepine undergoes oxidative metabolism to one major metabolite, 1'-hydroxymidazolam, in humans, a pathway which seems to be mediated almost exclusively by CYP3A isoforms [12,13].

In vitro cytochrome P450 assays are used in metabolism studies in support of early phases of drug discovery to investigate, e.g., metabolic stability, enzyme inhibition and induction by new chemical entities. LC–UV and GC–MS are traditional analytical tools that support of such studies [8–15]. However, these tools typically comprise different methods of relatively low throughput for the various metabolites of the probe reactions. In recent years, liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS) methods have been developed to increase the throughput [16–22].

This study demonstrates determination of midazolam in monkey plasma, and the analysis of midazolam and its metabolites in an in vitro study with recombinant CYP3A4 by LC–MS with a sonic spray ionization (SSI) interface. Additionally, in an in vitro study, the effect of propofol (2,6-diisopropylphenol) on the metabolism of midazolam was studied with recombinant CYP3A4. Propofol is a short-acting anesthetic commonly used in clinical practice.

* Corresponding author. Tel.: +81-3-5400-2657;
fax: +81-3-5400-1378.

E-mail address: kanazawa-hd@kyoritsu-ph.ac.jp (H. Kanazawa).

Propofol is frequently used in combination with midazolam and other anesthetics, and has been shown to inhibit their metabolism and that of those compounds [23–29].

2. Experimental

2.1. Chemicals

Midazolam (Dormicum), propofol (Rapinovet) and intralipid (fat emulsion preparation) were purchased from Yamanouchi Pharmaceuticals (Tokyo, Japan), Shering-Plough (Osaka, Japan) and Otsuka Pharmaceuticals (Tokyo, Japan), respectively. 1'-Hydroxymidazolam was from Daiichi (Tokyo, Japan).

β -Diphosphopyridine nucleotide disodium salt (NADP), glucose-6-phosphate (G6P), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) and magnesium chloride were purchased from Wako (Osaka, Japan). Human liver microsomes and recombinant human CYP3A4 were purchased from Gentest (Worburn, MA, USA). All other reagents and solvents were of analytical grade.

2.2. LC-MS conditions

The assay was developed using a model M-8000 ion trap LC-MS system (LC/3DQMS, Hitachi, Tokyo, Japan) with sonic spray ionization interface. The analytical column was a YMC-Pack Pro C₁₈ (50 mm \times 2.0 mm i.d., YMC, Japan) operated at 25 °C. The drift voltage was 100 V. The sampling aperture was heated at 110 °C and the shield temperature was 230 °C. Nitrogen gas was used as a carrier gas with output pressure of 0.50 MPa and ion source inlet pressure at 0.39 MPa. The mobile phase for analysis of midazolam and its metabolite was methanol–10 mM ammonium acetate (1:1) at a flow rate of 0.2 ml min⁻¹.

For analysis of propofol and its metabolite, methanol–water (65:35) as a mobile phase at a flow rate of 0.2 ml min⁻¹ with YMC-Pack Pro C₁₈ (50 mm \times 2.0 mm i.d.). The other LC-MS conditions were the same as that for midazolam.

2.3. Sample preparation

Blood samples were collected into heparinized tubes and separated by centrifugation for 10 min at 2000 \times g. The samples were stored frozen at -20 °C until analysis. To remove proteins prior to injection, the plasma sample was pretreated with a solid-phase extraction. A 490 μ l volume of the plasma sample added 10 μ l of internal standard (detomidine, 5 mg ml⁻¹) was loaded to an Empore disk cartridge, C₁₈ (3 M, St. Paul, MN, USA), after conditioning the cartridge with methanol, water and 10 mM ammonium acetate. A 5 ml volume of 10 mM ammonium acetate as a washing solvent was passed through the cartridge. The sample fraction was obtained by elution with 3 ml of methanol. After evaporated to dryness using a CVE-2000 centrifugal

evaporator (EYELA, Tokyo, Japan) at 42 °C, the residue was dissolved in 500 μ l of the eluent and a 5 μ l volume of the sample was injected into an LC-MS system.

Plasma samples were collected from three healthy monkeys (Japanese macaques) before and 20, 40, 60, 150 min after a single oral dose of 1 mg kg⁻¹ midazolam (Dormicum). A 200 μ l volume of the plasma was loaded into an Empore disk cartridge. After the same treatments as described earlier, the residue was dissolved in 20 μ l of the eluent and a 1 μ l volume of the sample was injected into an LC-MS system. Animal study was conducted under the guidelines provided by the Primate Research Institute, Kyoto University.

2.4. Calibration curves

Known amounts of midazolam and 1'-hydroxymidazolam in the concentration range 0.1–5.0 μ g ml⁻¹ were added to blank plasma samples. Calibration curves were constructed by plotting the peak-area ratios of drug or metabolite peaks to that of the internal standard against known concentrations. The data were subjected to linear regression analysis.

2.5. Method validation of determination of midazolam and its metabolite

The known amounts of midazolam and 1'-hydroxymidazolam were added to the monkey plasma, and each of the resulting solutions was assayed with proposed method. Within-day precisions were determined by preparing and analyzing on the same day five replicates at two concentrations. Between-day precisions were assessed by analyzing each day for 5 days. Relative standard deviation (R.S.D.) values were used as the index of precision.

2.6. In vitro experimental

The basic incubation medium contained 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4), a NADPH-regenerating system (1.3 mM NADP, 3.3 mM G6P, 0.4 units ml⁻¹ G6PDH, and 3.3 mM MgCl₂) and midazolam (15.3 μ M). The final incubation volume was 0.5 ml. After preincubation at 37 °C for 5 min, 30 pmol of recombinant CYP3A4 was added to the mixture and incubation was carried out at 37 °C for 10 min. Adding 0.5 ml of cold acetonitrile stopped the reaction. After the addition of an internal standard (10 μ l of 5 mg ml⁻¹ detomidine), the mixture was centrifuged at 13,000 \times g for 5 min, and 0.5 ml of the supernatant was evaporated to dryness using a CVE-2000 centrifugal evaporator and dissolved in 1 ml of 10 mM ammonium acetate. To remove phosphate buffer prior to injection, the sample was pretreated with a solid-phase extraction. A 1 ml of the sample was loaded to an Empore disk cartridge, C₁₈. After the same treatments as plasma sample, the residue was dissolved in 100 μ l of the eluent and a 5 μ l volume of the sample was injected into an LC-MS system.

2.6.1. Inhibition studies of midazolam 1'-hydroxylation by propofol and metabolism of propofol by human liver microsomes

The metabolism of midazolam was measured with 30 pmol CYP3A4 in the absence or presence of a range of propofol concentrations. The concentrations of propofol were 0, 25, 50, 100, 200 and 400 μM . CYP3A4 was incubated with 15.3 μM midazolam. For a kinetic analysis, the midazolam concentration ranged from 1 to 10 μM . The effects of propofol (100 μM) on the formation of 1'-hydroxymidazolam were studied. The concentrations of propofol employed in the present study were comparable to the liver concentration obtained from a previously reported *in vivo* study [23].

Metabolism of propofol by human liver microsomes was measured using almost the same method used for midazolam metabolism with CYP3A4. Instead of CYP3A4, human liver microsomes containing 100 μg of protein were used. Propofol was initially prepared in methanol solution, and the

final concentration in the incubation mixture was adjusted to 20 μM . The final concentration of methanol was less than 0.4%.

3. Results and discussion

3.1. Calibration curves and precision

LC–MS with an SSI interface was used for the analysis of midazolam (M_r 325.77) and 1'-hydroxymidazolam (M_r 342.77) with methanol–10 mM ammonium acetate (pH 4.8) (1:1) as the eluent at a flow rate of 0.2 ml min^{-1} . The peak areas were calculated based on the selected-ion chromatograms of midazolam and 1'-hydroxymidazolam at m/z 326 and 342, respectively, under positive conditions. The linear relationship calculated between the peak-area ratio and the concentration of midazolam (or 1'-hydroxymidazolam) from 0.1 to 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and the correlation coefficients (r)

Table 1
Within- and between-day precision and accuracy for the determination of midazolam and 1'-hydroxymidazolam

	Concentration ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Within-day R.S.D. (%)	Between-day	
			R.S.D. (%)	Accuracy (%)
Midazolam	0.1	4.6	4.7	95.6
	0.5	2.7	1.8	97.8
1'-Hydroxymidazolam	0.1	6.6	8.1	90.8
	0.5	5.5	2.4	95.7

Precision is expressed as relative standard deviation (R.S.D.) and accuracy as the assayed concentration relative to the actual concentration (%).

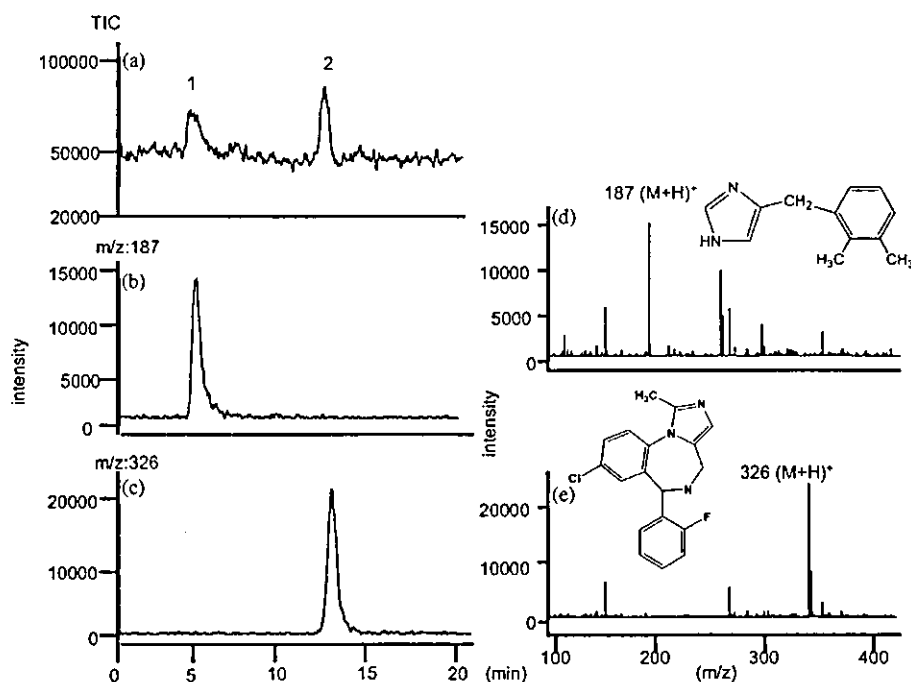


Fig. 1. Total ion chromatogram, mass chromatograms and mass spectra of an extract of plasma sample obtained from monkey administered midazolam (I.S.: detomidine). Peak numbers: (1) detomidine; (2) midazolam. Injection volume is 1 μl .

by a direct analysis. Deprotonated molecular ion, $[M - H]^-$, of propofol was observed at m/z 177 as the base peak. Following the human liver microsomes incubations, the chromatographic peak was detected with retention time 3.5 min corresponding to propofol metabolite, 4-hydroxypropofol, as shown in Fig. 5b. There was no interference from extracted components of the incubation system. Deprotonated molecular ion, $[M - H]^-$, of 4-hydroxypropofol was clearly observed at m/z 193 as base peak. However, the peak of 4-hydroxypropofol was not observed by CYP3A4 incubation under the same LC–MS conditions. The present studies were indicated that CYP3A4 is not involved in the metabolism of propofol.

4. Conclusion

The present method is more sensitive than our previous reported LC–MS technique [20]. A recently published LC–MS technique published by Shiran et al. [22] when the system used a 100 mm \times 4.6 mm i.d. column packed with 3 μ m Luna C₁₈ (Phenomenex, Cheshire, UK) stationary phase is more rapid than the present method. However, their method was not detected 4-hydroxymidazolam. Furthermore, the present method has the advantage of a small sample volume and reduction in organic solvent consumption using semi-microcolumn instead of conventionally-sized column.

In this study, we achieved a analysis of midazolam and its metabolites by LC–MS. The method was applied to the quantitation of midazolam in monkey plasma and an in vitro study with recombinant CYP3A4. LC–MS in the SSI mode is very useful for polar analytes, such as midazolam metabolite. Using the present method, we have shown that propofol competitively inhibits the metabolism of midazolam 1'-hydroxylation. We also achieved analysis of propofol and its metabolite by LC–MS. The present method is sufficiently sensitive and accurate to study the kinetics of the formation of midazolam metabolites and drug–drug interactions.

References

- [1] K. Payne, F.J. Mattheyse, D. Liebenberg, T. Dawes, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 37 (1989) 267.
- [2] J.M. Malinovsky, C. Populaire, A. Cozian, J.-Y. Lepage, C. Lejus, *Anaesthesia* 50 (1995) 351.
- [3] J. Marshall, A. Rodarte, J. Blumer, K.C. Khoo, B. Akbari, G. Kearns, *J. Clin. Pharmacol.* 40 (2000) 578.
- [4] M.T. Smith, M.J. Eadie, T. O'Rourke Brophy, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 19 (1981) 271.
- [5] T.D. Porter, M.J. Coon, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 13469.
- [6] F.P. Guengerich, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 10019.
- [7] K. Chiba, in: R. Kato, T. Kamataki (Eds.), *Drug Metabolism*, Tokyo Kagakudoujin, Tokyo, 2000, p. 157.
- [8] K.E. Thummel, D.D. Shen, T.D. Podoll, K.L. Kunze, W.F. Trager, P.S. Hartwell, V.A. Raisys, C.L. Marsh, J.P. McVicar, D.M. Barr, J.D. Perkins, R.L. Carithers, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 271 (1994) 549.
- [9] K.E. Thummel, D.D. Shen, T.D. Podoll, K.L. Kunze, W.F. Trager, C.E. Bacchi, C.L. Marsh, J.P. McVicar, D.M. Barr, J.D. Perkins, R.L. Carithers, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 271 (1994) 557.
- [10] F.P. Guengerich, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39 (1999) 1.
- [11] S.A. Wrighton, E.G. Schuetz, K.E. Thummel, D.D. Shen, K.R. Korzekwa, P.B. Watkins, *Drug Metab. Rev.* 32 (2000) 339.
- [12] T. Kronbach, D. Mathys, M. Umeno, F.J. Gonzalez, U.A. Meyer, *Mol. Pharmacol.* 36 (1989) 89.
- [13] A. Ghosal, H. Satoh, P.E. Thomas, E. Bush, D. Moore, *Drug Metab. Dispos.* 24 (1996) 940.
- [14] S.N. de Wildt, G.L. Kearns, W.C.J. Hop, D.J. Murry, S.M. Abdel-Rahman, J.N. van den Anker, *Clin. Pharmacol. Ther.* 70 (2001) 525.
- [15] T.N. Johnson, A. Rostami-Hodjegan, J.M. Goddard, M.S. Tanner, G.T. Tucker, *Br. J. Anaesth.* 89 (2002) 428.
- [16] H. Kanazawa, Y. Nagata, Y. Matsushima, N. Takai, H. Uchiyama, R. Nishimura, A. Takeuchi, *J. Chromatogr.* 631 (1993) 215.
- [17] H. Kanazawa, R. Nishimura, N. Sasaki, A. Takeuchi, N. Takai, Y. Nagata, Y. Matsushima, *Biomed. Chromatogr.* 9 (1995) 188.
- [18] H. Kanazawa, Y. Konishi, Y. Matsushima, T. Takahashi, *J. Chromatogr. A* 797 (1998) 227.
- [19] H. Kanazawa, R. Atsumi, Y. Matsushima, J. Kizu, *J. Chromatogr. A* 870 (2000) 87.
- [20] H. Kanazawa, A. Okada, M. Higaki, H. Yokota, F. Mashige, K. Nakahara, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2003) 195.
- [21] H. Kanazawa, A. Okada, Y. Matsushima, F. Mashige, S. Okubo, H. Yokota, K. Nakahara, *J. Chromatogr. A* 949 (2002) 1.
- [22] M.R. Shiran, A. Gregory, A. Rostami-Hodjegan, G.T. Tucker, M.S. Lennard, *J. Chromatogr. B* 783 (2003) 303.
- [23] N. Hamaoka, Y. Oda, I. Hase, K. Mizutani, T. Nakamoto, T. Ishizaki, A. Asada, *Clin. Pharmacol. Ther.* 66 (1999) 110.
- [24] C.P. Granvil, A.-M. Yu, G. Elizondo, T.E. Akiyama, C. Cheung, L. Feigenbaum, K.W. Krausz, F.J. Gonzalez, *Drug Metab. Dispos.* 31 (2003) 548.
- [25] M.H. Court, S.X. Duan, L.M. Hesse, K. Venkatakrishnan, D.J. Greenblatt, *Anesthesiology* 94 (2001) 110.
- [26] Y. Oda, N. Hamaoka, T. Hiroi, S. Imaoka, I. Hase, K. Tanaka, Y. Funae, T. Ishizaki, A. Asada, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 51 (2001) 281.
- [27] J. Guillon, T. Buronfosse, M. Desage, J.P. Flinois, J.P. Perdrix, J.L. Brazier, P. Beaune, *Br. J. Anaesth.* 80 (1998) 788.
- [28] D. McKillop, M.J. Wild, C.J. Butters, C. Simcock, *Xenobiotica* 28 (1998) 845.
- [29] A. Ibrahim, S. Park, J. Feldman, A. Karim, E.D. Kharasch, *Anesthesiology* 96 (2002) 88.

