

関から報告された場合に輸血感染の調査が行われていたが、遡及調査開始後は①過去の献血で検査結果が陰性であった献血者が陽転した場合は過去の献血血液にまで遡って調査、②輸血後の患者さんに肝炎等の発症が疑われた場合は、使用されたすべての輸血用血液を対象として調査を行っている。2005年から2007年まで1例ずつHCV感染が確認されているが、この3例中2例は遡及調査によって判明した事例である。これらの調査が可能となったのも、1996年9月から献血時の血液の一部を「保管検体」として凍結保存しているためで、現在の規定では11年間の保存期間となっている。2008年にはHBV4例の輸血感染が確認されているが、その中の1例は当該血液が個別NATでもHBV-DNAが検出されない感染極初期の血液が原因となっていた。この事例では当該献血者の次回献血血液中のウイルスと患者さんの発症時のウイルスの相同性調査により確定された。このような血液による感染は現在の最新技術を駆使しても防ぐことは困難である。感染機会のあった献血者をどのようにして排除するかが問題となっている。

〔文 献〕

1) 白木和夫：B型肝炎母子感染防止対策の追跡調

査及び効果判定に関する研究報告書。平成7年度厚生省心身障害「小児の心身障害・疾患の予防と治療に関する研究」1996。

- 2) Uchida S, Tadokoro K: Positivity rate of hepatitis B surface antigen in 16-year-old first-time blood donors: effectiveness of immunoprophylaxis with hepatitis B vaccine and immunoglobulin in newborn infants with mothers positive for hepatitis B e antigen. *Jpn J Infect Dis* 61:94, 2008.
- 3) Orito E, Ichida T, Sakugawa H, et al.: Geographic distribution of hepatitis B virus genotype in patients with chronic HBV infection in Japan. *Hepatology* 34: 590-594, 2001.
- 4) Sherlock S DJ: Disease of the Liver and biliary system, 10th edn. Blackwell Scientific Publications. 265-392.

著者連絡先

内田 茂治 (Shigeharu UCHIDA)

日本赤十字社 血液事業本部 中央血液研究所 感染症解析部

〒135-8523 東京都江東区辰巳 2-1-67

Highly sensitive assay of HMG-CoA reductase activity by LC-ESI-MS/MS

Akira Honda,^{1,*†} Yuji Mizokami,^{*} Yasushi Matsuzaki,^{*} Tadashi Ikegami,^{*} Mikio Doy,[†] and Hiroshi Miyazaki[§]

Department of Internal Medicine,^{*} Tokyo Medical University, Kasumigaura Hospital, Ami, Ibaraki 300-0395, Japan; Ibaraki Prefectural Institute of Public Health,[†] Mito, Ibaraki 310-0852, Japan; and Pharmax Institute,[§] Kawasaki, Kanagawa 213-0021, Japan

Abstract We have developed a new sensitive and specific nonradioisotope assay method to measure the activity of HMG-CoA reductase, the rate-controlling enzyme in the cholesterol biosynthetic pathway. This method was based upon a stable isotope dilution technique by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using electrospray ionization in positive mode. Mevalonic acid, the product of HMG-CoA reductase, was converted to mevalonolactone (MVL) in an incubation mixture, extracted by a salting-out procedure, derivatized into the mevalonyl-(2-pyrrolidin-1-yl-ethyl)-amide, and then purified using a disposable silica cartridge. The resulting mevalonylamide was quantified by selected reaction monitoring using the positive electrospray ionization mode. The detection limit of this mevalonylamide was found to be 240 amol (signal-to-noise ratio = 3), ~833 times more sensitive than that of MVL measured by a conventional radioisotope (RI) method (200 fmol). The variances between sample preparations and between measurements by this method were analyzed by one-way layout and calculated to be 3.2% and 1.8%, respectively. The recovery experiments were performed using incubation mixtures spiked with 0.77–2.31 nmol MVL/mg protein and were validated by a polynomial equation. These results showed that the estimated concentration within a 95% confidence limit was 0.47 ± 0.07 nmol/mg protein, which coincided completely with the observed \bar{X}_0 nmol/mg protein with a mean recovery of 94.6%. This method made it possible to measure HMG-CoA reductase activity with a high degree of reproducibility and reliability, and especially with sensitivity superior to that of the conventional RI method.—Honda, A., Y. Mizokami, Y. Matsuzaki, T. Ikegami, M. Doy, and H. Miyazaki. Highly sensitive assay of HMG-CoA reductase activity by LC-ESI-MS/MS. *J. Lipid Res.* 2007. 48: 1212–1220.

Supplementary key words cholesterol biosynthesis • mevalonic acid • mevalonolactone • liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry • 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase

The activity of HMG-CoA reductase, the rate-limiting enzyme in the cholesterol biosynthetic pathway, is regulated at the levels of protein synthesis, degradation, and phosphorylation (1). Recent advances in molecular biological research have provided new insights into the regulation of HMG-CoA reductase activity. Sterol-regulatory element binding proteins (SREBPs) are positive transcription factors for the HMG-CoA reductase gene that are synthesized in the endoplasmic reticulum and released to the nucleus by proteolysis (2). This proteolysis is controlled by sterols and the SREBP processing system, which consists of SREBP cleavage-activating protein and insulin-induced genes (3). Although the methods for determining mRNA and protein expression levels in each regulatory step are well established, the only way to determine the overall consequence(s) of regulation by all factors is to measure HMG-CoA reductase activity.

The primary method for assaying HMG-CoA reductase activity is the radioisotope (RI) technique that measures the radioactivity in [¹⁴C]mevalonic acid (MVA) produced from [¹⁴C]HMG-CoA (4–6). This method is simple but requires the handling of radiolabeled materials. To overcome this disadvantage, in 1978, Miyazaki et al. (7) developed a new method using gas chromatography-chemical ionization-mass spectrometry (GC-CI-MS). This method was subsequently replaced by gas chromatography-electron ionization-mass spectrometry (GC-EI-MS) (8–10) because of the troublesome nature of GC-CI-MS operations, such as frequent cleaning of the CI ion source to maintain its high sensitivity. The GC-EI-MS methods are inferior in their sensitivity than the GC-CI-MS method but are still

Abbreviations: CI, chemical ionization; EI, electron ionization; GC, gas chromatography; LC, liquid chromatography; MS, mass spectrometry; MS/MS, tandem mass spectrometry; MVA, mevalonic acid; MVL, mevalonolactone; MV-PLEA, mevalonyl-(2-pyrrolidin-1-yl-ethyl)-amide; P-ESI, electrospray ionization in positive mode; RI, radioisotope; S/N, signal-to-noise ratio; SREBP, sterol-regulatory element binding protein; SRM, selected reaction monitoring.

¹ To whom correspondence should be addressed.
e-mail: akirahonda-gi@umin.ac.jp

Manuscript received 18 December 2006 and in revised form 1 February 2007.

Published, JLR Papers in Press, February 1, 2007.
DOI 10.1194/jlr.D600049JLR200

more sensitive than the RI technique. In fact, GC-EI-MS methods have been used to quantify plasma (11) and urinary (12, 13) MVA that cannot be determined using the RI technique. However, contrary to our expectation, HMG-CoA reductase activity has not been assayed extensively using GC-EI-MS methods because of the laborious sample preparation and the need for a long analytical process to eliminate interfering peaks.

To analyze relatively polar compounds, such as MVA or mevalonolactone (MVL), liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) or liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) have been used more readily than GC-MS, because LC-MS and LC-MS/MS do not require a derivatization step. Park et al. (14) and Ndong-Akoume et al. (15) assayed HMG-CoA reductase activity by measuring MVL, the lactonized form of MVA, with LC-MS and LC-MS/MS, respectively, using the positive electrospray ionization (P-ESI) mode. Plasma and urinary MVA were quantified by LC-P-ESI-MS/MS after conversion into MVL (16) as well as directly by LC-negative ESI-MS/MS without lactonization (17, 18). However, there is no evidence that the detection limits of MVA or MVL by any LC-MS or LC-MS/MS method can surpass the detection limit of the RI technique using [^{14}C]MVL.

The aim of this study was to develop an LC-P-ESI-MS/MS method that was more sensitive and reliable than the conventional RI technique to measure HMG-CoA reductase activity.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Unlabeled MVL and HMG-CoA were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), and 3,5-dihydroxy-[3- $^2\text{H}_3$]methyl-[4,4,5,5- $^2\text{H}_4$]valerolactone ([$^2\text{H}_7$]MVL) was from Merck Frosst Canada (Montreal, Canada). *RS*-[5- ^3H]MVL (888.0 GBq/mmol) and 3-hydroxy-3-methyl-[3- ^{14}C]glutaryl-CoA (2.15 GBq/mmol) were obtained from New England Nuclear (Boston, MA) and Amersham (Aylesbury, UK), respectively. 1-(2-Aminoethyl)piperidine, 1-(2-aminoethyl)piperazine, 4-(2-aminoethyl)morpholine, 1-(2-aminoethyl)pyrrolidine, 4-(2-aminoethyl)pyridine, *N,N*-dimethylethylenediamine, and 4-dimethylaminobenzylamine dihydrochloride were purchased from Tokyo Kasei Kogyo (Tokyo, Japan). Additional reagents and solvents were of analytical grade.

Procedure for the synthesis of mevalonyl-alkylamide derivatives

A 100 μl volume of toluene and 20 μl of each of the alkylamines were added to MVL, and the mixture was incubated at 75°C for 60 min. After evaporating the solvent by heating at 55–100°C under a stream of nitrogen, the residue was dissolved in methanol-water (1:1, v/v). 4-Dimethylaminobenzylamine was prepared from 4-dimethylaminobenzylamine dihydrochloride by the addition of an equimolar NaOH solution and extraction with diethyl ether.

Preparation of rat liver microsomes

Male Sprague-Dawley rats were purchased from Charles River Japan (Yokohama, Japan). They were euthanized between 1:00 and 2:00 PM under diethyl ether anesthesia. Livers were excised

and frozen immediately in liquid N_2 and stored at -70°C until later use. The animal protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee. Microsomes were prepared from livers by differential ultracentrifugation (19), and the protein concentrations were determined by the method of Bradford (20).

Conventional method for the measurement of HMG-CoA reductase activity using RI

The conventional method for the measurement of microsomal HMG-CoA reductase activity using the RI technique was based on the methods of Shefer et al. (6) and Nguyen et al. (21) with some modifications. Microsomes (100 μg of protein) were incubated for 30 min at 37°C in a total 150 μl volume of 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) containing 0.1 mM EDTA, 50 mM KCl, 10 mM DTT, a NADPH generating system (34 mM NADPH, 30 mM glucose-6-phosphate, and 1 unit of glucose-6-phosphate dehydrogenase), and 30 nmol of [^{14}C]HMG-CoA (diluted with unlabeled HMG-CoA to give a specific activity of 30 dpm/pmol). The reaction was terminated with the addition of 20 μl of 6 N HCl, and the tubes were allowed to stand at room temperature for 10 min to ensure lactonization of the biosynthetic MVA at pH < 1. A 200 μl volume of ethanol containing 1 mg of [^3H]MVL (diluted with unlabeled MVL to give a specific activity of 40,000 dpm/mg), 1 ml of diethyl ether, 0.2 g of ammonium sulfate, and 50 μl of water was added to each tube in order. The tubes were vortexed for 1 min and centrifuged at 1,000 g for 2 min. The ether-phase supernatant was collected, and 1 ml of diethyl ether was again added to the residual fraction. After the same extraction procedure, the combined ether fraction was evaporated to dryness under nitrogen. The residue was redissolved in 50 μl of acetone, applied to a thin-layer chromatography plate, and developed with benzene-acetone (1:1, v/v). The MVL band was isolated from the plate, and the radioactivity was measured for 10 min by dual-label liquid scintillation counting.

Measurement of HMG-CoA reductase activity by LC-P-ESI-MS/MS

The present method for the measurement of HMG-CoA reductase activity by LC-P-ESI-MS/MS was carried out as follows. The incubation of microsomes and extraction of biosynthetic MVA were performed by the same method described above for the RI assay, except that unlabeled HMG-CoA and [$^2\text{H}_7$]MVL (10 ng) were used instead of [^{14}C]HMG-CoA and [^3H]MVL, respectively. A 100 μl volume of toluene and 20 μl of 1-(2-aminoethyl)pyrrolidine were added to the residue of the ether extract and incubated at 55°C for 60 min. After the addition of 2 ml of toluene, the mixture was applied to a Bond Elut SI cartridge (100 mg; Varian, Harbor City, CA) preconditioned with 1 ml of toluene. The cartridge was washed with 2 ml of toluene-ethyl acetate (1:1, v/v), and the mevalonyl-(2-pyrrolidin-1-yl-ethyl)-amide (MV-PLA) was eluted with 2 ml of ethyl acetate-methanol (4:1, v/v). After evaporation, the residue was redissolved in 100 μl of methanol-water (5:95, v/v) containing 0.1% acetic acid, and an aliquot (1 μl) was injected into the LC-P-ESI-MS/MS system described below.

The system consisted of a TSQ Quantum Ultra quadrupole mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA) equipped with an H-ESI probe and a Nanospace SI-2 HPLC system (Shiseido, Tokyo, Japan). Chromatographic separation of MV-PLA was performed using a Hypersil GOLD aQ column (150 \times 2.1 mm, 3 μm ; Thermo Fisher Scientific) maintained at 40°C. The mobile phase consisted of methanol-water (5:95, v/v) containing 0.1% acetic acid and was used at a flow rate of 200 $\mu\text{l}/\text{min}$. The general LC-MS/MS conditions were as follows: spray voltage, 1,000 V; vaporizer temperature, 350°C; sheath gas (nitrogen) pressure, 50 p.s.i.; auxiliary gas (nitrogen) flow, 50 arbitrary units; ion transfer capil-

lary temperature, 350°C; collision gas (argon) pressure, 1.5 mTorr; collision energy, 13 V; and ion polarity, positive. Selected reaction monitoring (SRM) was conducted using m/z 245 \rightarrow m/z 227 for the MV-PLEA and m/z 252 \rightarrow m/z 234 for the $^2\text{H}_7$ variant.

Evaluation of the extraction and derivatization processes

The absolute recovery of MVL in the salting-out extraction process was confirmed by adding 10 ng of MVL to the assay mixture without incubation. After diethyl ether extraction, followed

by the addition of [$^2\text{H}_7$]MVL as an internal standard, MVL and its $^2\text{H}_7$ variant were derivatized, purified, and quantified by LC-P-ESI-SRM.

The recovery of MV-PLEA from the Bond Elut SI cartridge was determined by the addition of MV-PLEA (10 ng) to the cartridge with a derivatizing mixture, which was prepared from the assay mixture without incubation. After the purification steps, [$^2\text{H}_7$]MV-PLEA (10 ng) was added to the eluate as an internal standard, and both MV-PLEA and its $^2\text{H}_7$ variant were quantified by LC-P-ESI-SRM.

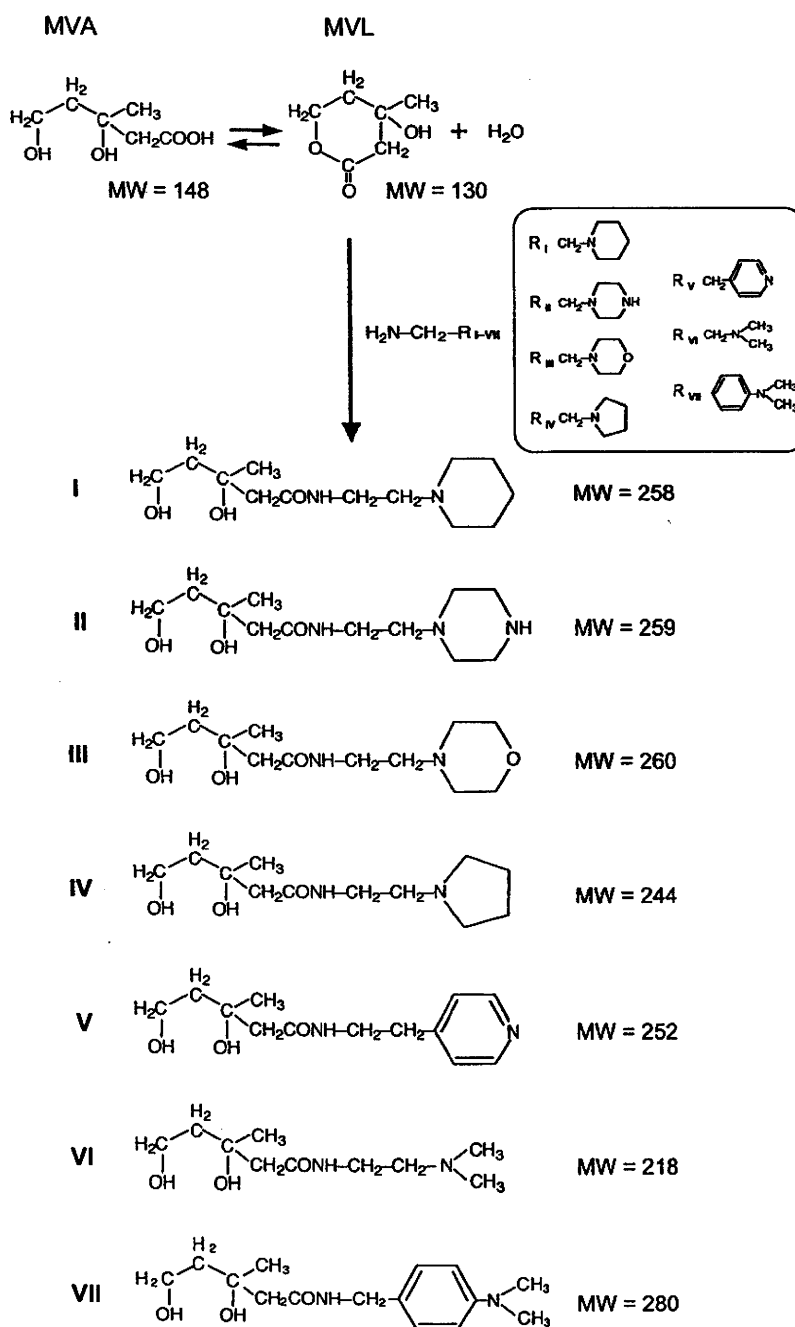


Fig. 1. Structures of mevalonic acid (MVA), mevalonolactone (MVL), and the alkylamide derivatives used in this study: I, mevalonyl-(2-piperidin-1-yl-ethyl)-amide; II, mevalonyl-(2-piperazin-1-yl-ethyl)-amide; III, mevalonyl-(2-morpholin-4-yl-ethyl)-amide; IV, mevalonyl-(2-pyrrolidin-1-yl-ethyl)-amide (MV-PLEA); V, mevalonyl-(2-pyridyl-4-yl-ethyl)-amide; VI, mevalonyl-(2-dimethylamino-ethyl)-amide; VII, mevalonyl-dimethylamino-benzylamide. MW, molecular weight.

The effects of incubation temperature and duration on the (2-pyrrolidin-1-yl-ethyl)-amidation of MVL were examined. A 4 µg aliquot of MVL was incubated with 20 µl of 1-(2-aminoethyl)-pyrrolidine in 100 µl of toluene. After the addition of [²H₇]MV-PLA as an internal standard and purification by a Bond Elut SI cartridge, MV-PLA and its ²H₇ variant were quantified by LC-P-ESI-SRM.

Statistics

Data are reported as means ± SD. Reproducibility was analyzed by one-way layout (JMP software; SAS Institute, Inc., Cary, NC). Recovery was analyzed using a polynomial equation (22). Linearity of the calibration curve, correlation between the amount of microsomal protein and the formation of MVL, and correlation between enzyme activities determined by LC-P-ESI-SRM and the RI methods were analyzed by simple linear regression. Regression analysis was also used to calculate the estimated amount ± 95% confidence limit in the recovery study. For all analyses, significance was accepted at *P* < 0.05.

RESULTS

Selection of the best derivative for the quantification of MVL

To find the best derivative for MVL, we synthesized seven kinds of mevalonyl-alkylamides (Fig. 1), and their P-ESI mass spectral and tandem mass spectral data were compared. As shown in Table 1, all mevalonyl-alkylamide derivatives exhibited protonated molecular ions ([M+H]⁺) as the base peaks. The fragmentation pattern of the protonated molecular ion of each derivative under various levels of collision energy was examined, and the most abundant product ion was selected as a monitoring ion for SRM. The signal-to-noise ratios (S/Ns) of these derivatives determined by injecting 100 fg of each derivative were as follows: VI (20) > V (15) > IV (10) = III (10) > I (5) = II

(5) = VII (5). However, additional factors, such as the lower boiling point of the remaining alkylamines, the convenience of the solid-phase purification procedure, and an improved symmetric shape of the peak in the chromatogram finally determined that MV-PLA (derivative IV) was the best derivative for the quantification of MVL in the incubation mixture. The representative P-ESI mass spectrum and MS/MS spectrum of the MV-PLA are shown in Fig. 2.

Evaluation of the extraction and derivatization processes

The absolute recovery of MVL from the incubation mixture by the salting-out extraction procedure was calculated as 88.1 ± 2.8% (*n* = 4). The recovery of MV-PLA from the Bond Elut SI cartridge was found to be 98.1 ± 3.1% (*n* = 4). The derivatization of MVL to MV-PLA achieved a maximum efficiency at 55°C for 60 min. Higher incubation temperature or longer incubation time did not result in increased formation of MV-PLA. When the derivatizing mixture was incubated at room temperature (20°C) for 5, 10, 30, and 60 min, the derivatization was 8, 14, 81, and 94%, respectively.

Calibration curve

A calibration curve was established for MVL (Fig. 3). Different quantities (0.04, 0.1, 0.4, 1, 4, 10, 40, and 100 ng) of authentic MVL were each mixed with 10 ng of [²H₇]MVL, derivatized to the MV-PLA, and purified using the Bond Elut SI cartridge, as described in Materials and Methods. The weight ratio of MVL, relative to the corresponding deuterated internal standard, was compared with the peak area ratio of the MV-PLA to the ²H₇ variant measured by LC-P-ESI-SRM. The linearity of the standard curve, as determined by simple linear regression, was excellent

TABLE 1. Positive ESI-MS, MS/MS, and SRM data of the mevalonyl-alkylamides

Derivatives ^a	MS Data [M+H] ⁺ (Relative Intensity)	MS/MS Data ^b (Collision Energy at Maximum Intensity)				SRM Data ^c		
		<i>m/z</i> (%)		<i>m/z</i> (<i>V</i>)		Collision Energy	Precursor to Product	S/N ^d
I	259 (100)	241 (13)	174 (18)	86 (23)	112 (17)	13	259→241	5
II	260 (100)	224 (13)	113 (20)	86 (21)	138 (22)	13	260→224	5
III	261 (100)	243 (13)	114 (18)	138 (20)	86 (21)	13	261→243	10
IV	245 (100)	227 (13)	98 (19)	86 (20)	138 (24)	13	245→227	10
V	253 (100)	106 (30)	112 (15)	77 (51)	— ^e	30	253→106	15
VI	219 (100)	91 (31)	202 (13)	86 (20)	— ^e	31	219→91	20
VII	281 (100)	134 (29)	118 (48)	91 (54)	— ^e	29	281→134	5

ESI, electrospray ionization; MS, mass spectrometry; MS/MS, tandem mass spectrometry; S/N, signal-to-noise ratio; SRM, selected reaction monitoring.

^a Mevalonolactone (MVL) was derivatized to I, mevalonyl-(2-piperidin-1-yl-ethyl)-amide; II, mevalonyl-(2-piperazin-1-yl-ethyl)-amide; III, mevalonyl-(2-morpholin-4-yl-ethyl)-amide; IV, mevalonyl-(2-pyrrolidin-1-yl-ethyl)-amide (MV-PLA); V, mevalonyl-(2-pyridyl-4-yl-ethyl)-amide; VI, mevalonyl-(2-dimethylamino-ethyl)-amide; and VII, mevalonyl-dimethylamino-benzylamide.

^b [M+H]⁺ was used as a precursor ion for each MS/MS analysis. Major product ions were arranged in the order of abundance from left to right.
^c The same HPLC column and flow rate described in Materials and Methods were used, but the following gradient system was used for the elution of all mevalonyl-alkylamides from the column: for the first 2 min, the mobile phase consisted of methanol-water (1:9, v/v) containing 0.1% acetic acid; then it was programmed in a linear manner to methanol-water (1:1, v/v) containing 0.1% acetic acid over 4 min. The final mobile phase was kept constant for 2 additional min. The retention times of derivatives I–VII under this gradient HPLC condition were 2.9 min (II), 2.9 min (III), 3.0 min (IV), 3.2 min (V), 3.8 min (I), 4.6 min (VI), and 7.0 min (VII).

^d S/Ns were determined by injecting 100 fg of each derivative.

^e Intense ion (>5% of base peak) was not observed.

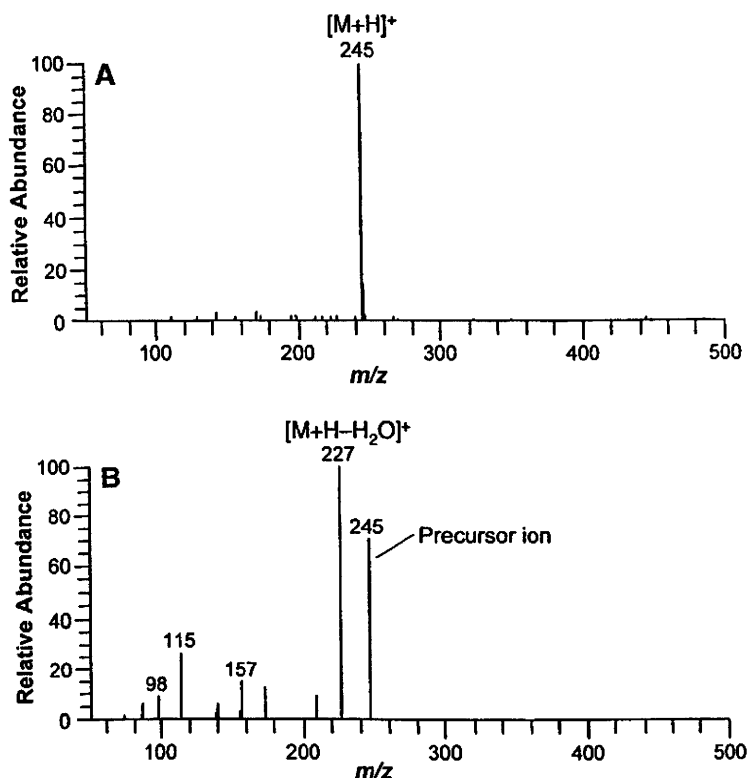


Fig. 2. Typical electrospray ionization in positive mode (P-ESI) mass spectrum (A) and product ion mass spectrum using m/z 245 as a precursor ion (B) of the MV-PLEA. The general liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) conditions were as follows: introducing solvent, methanol-water (5:95, v/v) containing 0.1% acetic acid; flow rate, 200 $\mu\text{l}/\text{min}$; spray voltage, 1,000 V; collision energy, 13 V.

for weight ratios between 0.004 and 10 ($n = 8$, $r = 1.000$, $P < 0.0001$).

Representative recordings of LC- P-ESI-SRM

Figure 4 presents typical LC-P-ESI-SRM chromatograms obtained by analysis of a standard incubation mixture

using 100 μg of protein of microsomes from normal rat liver. The peak for MV-PLEA at m/z 245 \rightarrow m/z 227 in Fig. 4B reflects the amount of MVL after incubation and corresponds to ~ 90 pg (~ 23 pmol/min/mg protein). As shown in Fig. 4A, endogenous MV-PLEA was detected at zero time, but the amount did not significantly affect the assay of the enzyme activity.

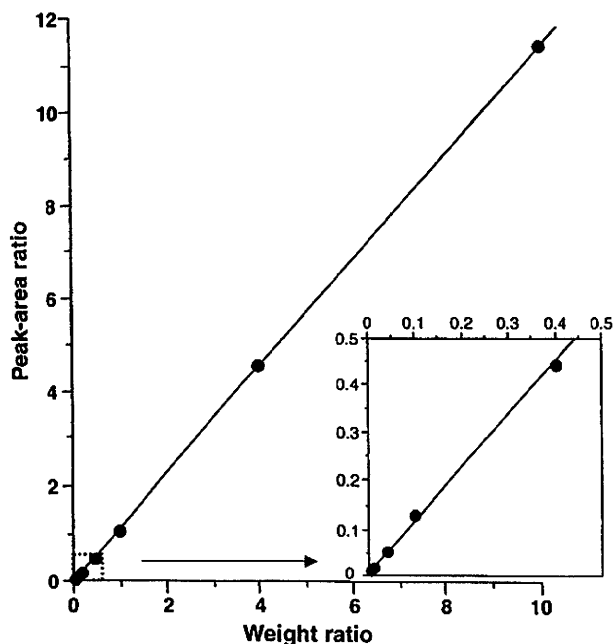


Fig. 3. Calibration curve for the weight ratio of MVL to the corresponding deuterated internal standard. Linearity was checked by simple linear regression, and the equation for the line of best fit was $y = 1.144x - 0.004$ ($n = 8$, $r = 1.000$, $P < 0.0001$).

Precision and accuracy of this method

The precision and accuracy of our method was determined using the same microsomes obtained from a normal rat liver. Reproducibility was investigated by analyzing four samples in triplicate by LC-P-ESI-SRM (Tables 2, 3). The results were analyzed by one-way layout, in which the analytical errors were divided into two sources: sample preparation and LC-P-ESI-SRM measurement. The variances were considered to be attributable to the measurement, because the errors during sample preparation were negligible. The interassay coefficients of variation for the between- and within-sample variations were 3.2% and 1.8%, respectively.

For the recovery experiment (Table 4), known quantities of MVL (10–30 ng, 0.77–2.31 nmol/mg protein) were spiked into the mixture at the end of the incubation. After the extraction and clean-up procedures, LC-P-ESI-SRM was conducted in triplicate for each sample. The recoveries of the known spiked amounts of MVL ranged from 92.6% to 96.2%, with a mean of 94.6%. In addition, the amount of MVL found in the unspiked incubation mixture was within the 95% confidence limit for the estimated amount of MVL, as calculated by linear regression analysis; this also constituted an index for the precision and accuracy of the method.

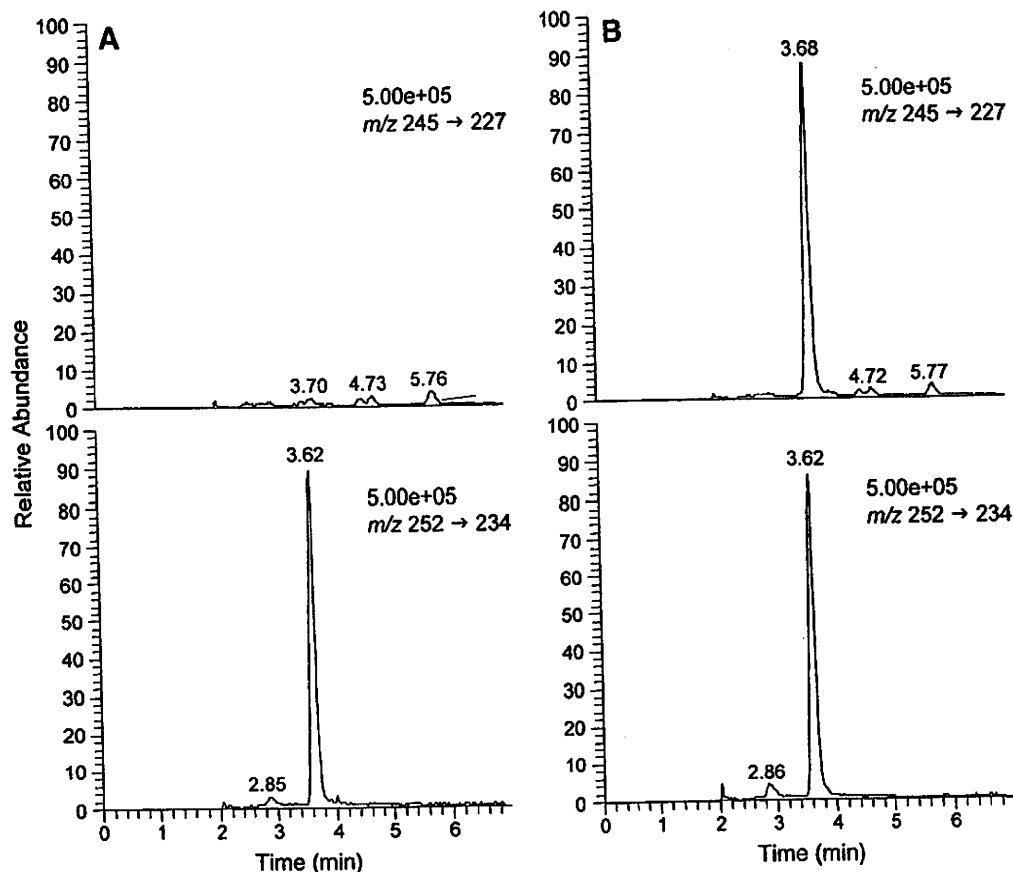


Fig. 4. Representative LC-selected reaction monitoring (SRM) chromatograms of MV-PLEA and its $^2\text{H}_7$ variant (internal standard) in extracts obtained from the standard incubation mixture. A: Zero time. B: Incubated with 100 μg of protein of rat liver microsomes for 30 min. The peak of MV-PLEA in B corresponds to ~ 90 pg (~ 23 pmol/min/mg protein).

Application to a microscale assay

We studied the effect of reduced levels of microsomal protein on the quantification of MVL amount and enzyme activity. Different quantities (5, 10, 25, 50, and 100 μg of protein) of normal rat liver microsomes were used for the enzyme assay, and extraction and quantification of MVL were conducted as described in Materials and Methods. As shown in Fig. 5, proportionality was observed when the quantity of microsomal protein ranged from 5 μg up to at least 100 μg for the production of MVL.

TABLE 2. Reproducibility in the measurement of HMG-CoA reductase activity: analytical data

Sample	Individual Values			Mean \pm SD
	pmol/min/mg protein			
A	15.7	16.1	15.2	15.7 \pm 0.4
B	16.0	15.9	16.0	16.0 \pm 0.1
C	15.3	15.4	15.3	15.4 \pm 0.1
D	15.3	15.0	15.7	15.4 \pm 0.4
Mean \pm SD				15.6 \pm 0.4

HMG-CoA reductase activity was measured using 100 μg of protein of rat microsomes.

Correlation between our method and the RI method

Hepatic HMG-CoA reductase activities were measured by both RI and positive LC-P-ESI-SRM methods in 11 normal rats. The HMG-CoA reductase activities obtained by this method correlated well with those obtained by the RI method ($r = 0.930$, $P < 0.0001$) (Fig. 6).

DISCUSSION

We have developed and optimized various derivatization methods that are appropriate for enhancing the sensitivity

TABLE 3. Reproducibility in the measurement of HMG-CoA reductase activity: ANOVA

Source	S	f	V	F_0	Relative SD
Sample preparation	0.742	3	0.247	3.04	3.2
Error (SRM)	0.650	8	0.081		1.8
Total	1.392	11			

$F(3,8,0.05) = 4.07$

S, residual sum of squares; f, number of degrees of freedom; f_1 , $f_{\text{sample preparation}}$; f_2 , f_{error} ; V, unbiased variance; F_0 , observed value after F distribution variance ratio ($V_{\text{sample preparation}}/V_{\text{error}}$); $F(f_1, f_2, \alpha)$, density function of F distribution with f_1 and f_2 degrees of freedom.

TABLE 4. Recovery of MVL from the incubation mixture

Sample ($X_0 + na$) ($n = 0,1,2,3$)	Amount Added	Amount Found			Recovery ^a (mean \pm SD)	Estimated Amount \pm 95% Confidence Limit ^d
		nmol/mg protein				
X_0	0	$\bar{X}_0 \pm \text{SD} = 0.47 \pm 0.01^c$				0.47 ± 0.07
$X_0 + a$	0.77	1.24	1.23	1.20		
$X_0 + a$	0.77	1.19	1.20	1.19	96.2 ± 2.6	
$X_0 + 2a$	1.54	1.89	1.88	1.91		
$X_0 + 2a$	1.54	1.86	1.88	1.94	92.6 ± 1.7	
$X_0 + 3a$	2.31	2.70	2.76	2.60		
$X_0 + 3a$	2.31	2.70	2.65	2.55	95.1 ± 3.3	

Known amounts of MVL were spiked into the mixture at the end of the incubation.

^aRecovery (%) = (amount found - \bar{X}_0)/amount added \times 100.

^bThe estimated amount was calculated by a polynomial equation.

^cThis value was obtained from Table 2.

of the microanalysis of endogenous substances in biological specimens by GC-MS. As described in our previous investigations (7, 10, 11), MVA was lactonized easily to MVL and the resulting MVL was converted to the corresponding alkylamides with the primary alkylamines under mild conditions without any catalysts. This amidation via MVL from MVA was a characteristic reaction for γ -hydroxy fatty acids such as MVA, and the resulting alkylamides were further converted to the final derivatives suitable for the detection of ionization. Thus, these derivatives provided excellent GC-MS properties in their separation, specificity, and sensitivity and enabled us to quantify trace amounts of MVA in biological specimens.

LC-MS methods, using ESI or atmospheric pressure CI, have been used to quantify trace amounts of biologically important fatty acids after enhancing their detection sensitivity through derivatization, such as pentafluorobenzoylation (23–25). Although several methods for quantifying MVA or MVL in biological specimens by LC-ESI-MS or LC-ESI-MS/MS have been described, there have been no

methods to enhance their detection sensitivity through derivatization. The negative and positive modes for ESI have been used for the quantification of MVA and MVL, respectively. We used the positive mode for this quantification because it provides more abundant ions than the negative mode (26). To enhance the sensitivity of detection, the amidation reaction described above, which is characteristic for MVA, was conducted using seven kinds of primary alkylamines with a tertiary amine moiety to promote protonation. Thus, the mevalonyl-alkylamides synthesized in this study were all versatile derivatives. The resulting mass spectra exhibited $[M+H]^+$ as the base peaks, which is suitable for the highly sensitive detection of MVL using LC-P-ESI-MS/MS. Collision of $[M+H]^+$ for derivatives I–IV under relatively low energy (<14 V) produced the characteristic product ions related to the

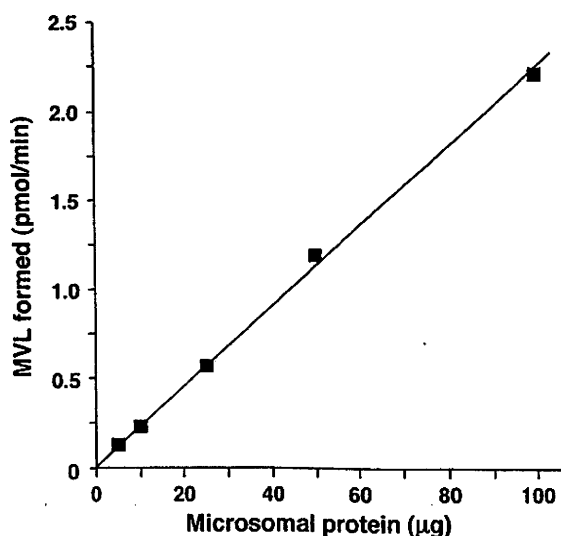


Fig. 5. Effects of reduced microsomal protein on the determination of HMG-CoA reductase activity. Linearity was checked by simple linear regression, and the equation for the line of best fit was $y = 0.022x + 0.026$ ($n = 5$, $r = 0.999$, $P < 0.0001$).

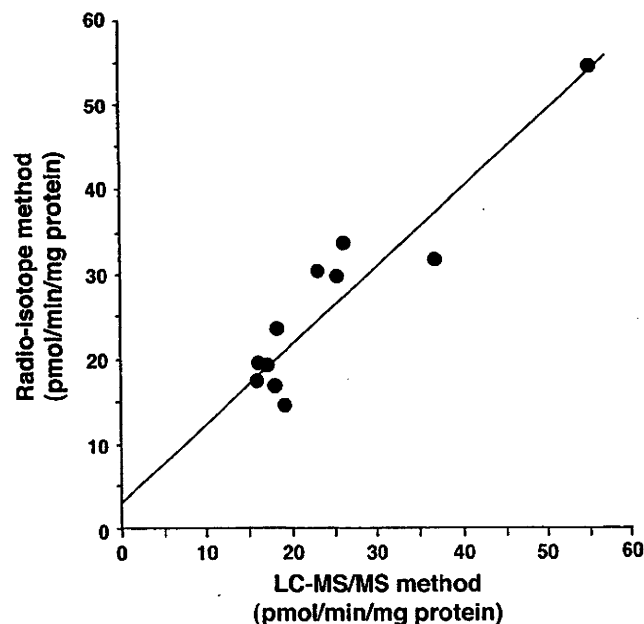


Fig. 6. Correlation between our LC-MS/MS method and the conventional radioisotope method for the assay of HMG-CoA reductase activity. Linearity was checked by simple linear regression, and the equation for the line of best fit was $y = 0.905x + 3.899$ ($n = 11$, $r = 0.930$, $P < 0.0001$).

$[M+H-H_2O]^+$ or $[M+H-2H_2O]^+$. In contrast, the increase of collision energy (>14 V) resulted in the formation of product ions with low mass numbers from all seven derivatives.

All of these seven derivatives exhibited excellent LC-P-ESI-MS/MS properties with extremely high sensitivity, as shown in Table 1. However, MV-PLEA was selected as the best derivative for our purpose for the following reasons. First, the boiling point of 1-(2-aminoethyl)pyrrolidine is the second lowest, after *N,N*-dimethylethylenediamine, which is advantageous for evaporating contaminated alkylamines after solid-phase purification. Second, mevalonyl-2-(dimethylamino)ethylamide (VI) exhibited a better S/N peak than MV-PLEA, but the peak shape of derivative VI was considerably broader compared with that of derivative IV (0.3 vs. 0.7 min). Third, MV-PLEA was successfully purified from the derivatizing mixture with almost complete elimination of excess 1-(2-aminoethyl)pyrrolidine using a small Bond Elut SI cartridge. Because 1-(2-aminoethyl)pyrrolidine can be evaporated by heating at 55°C under a nitrogen stream, the solid-phase extraction step was not necessary to quantify MV-PLEA by LC-SRM. However, this step was successful not only in eliminating the excess alkylamine but also for cleaning up the extracts with diethyl ether, which reduced the load on the LC-MS/MS system.

In the conventional RI method, the specific activity of radiolabeled HMG-CoA was 30 dpm/pmol, which was equivalent to 33.3 fmol/dpm. When the standard deviation of background noise is 2 dpm, the signal would be 6 dpm when the $S/N = 3$. Therefore, the detection limit of the conventional RI method was calculated to be 200 fmol (26 pg) ($S/N = 3$). Although it may be not practical, if carrier-free $[^{14}\text{C}]$ HMG-CoA without dilution with unlabeled HMG-CoA were used, the minimum detection limit of the RI method would be 46.5 fmol (6.0 pg) ($S/N = 3$), because the specific activity of the carrier-free $[^{14}\text{C}]$ HMG-CoA is $2.15 \text{ GBq/mmol} = 2.15 \text{ Bq/pmol} = 129 \text{ dpm/pmol} = 7.75 \text{ fmol/dpm}$. Clearly, the measurement of HMG-CoA reductase activity by LC-MS (14) and LC-MS/MS (15) is more specific than by the RI method, in which radioactivities are counted on thin-layer chromatography plates. However, the detection limit of underivatized MVL by LC-MS was 50 fmol (6.5 pg) ($S/N = 3$) (14), which was $\sim 100,000$ times more sensitive than that obtained by HPLC-ultraviolet (5.7 nmol [740 ng]) (27) but did not apparently exceed that obtained by the RI method. In comparison, the present LC-P-ESI-MS/MS method made it possible to detect only 240 amol (31 fg) ($S/N = 3$) of MVL. Therefore, even if a sufficient quantity of microsomes were not available, this method would still enable us to measure HMG-CoA reductase activity (Fig. 5). In addition to the high sensitivity, the use of $[^2\text{H}_7]$ MVL as an ideal internal standard contributed to the development of this highly reproducible method.

In this method, we followed the incubation and extraction procedures of the conventional RI method, with the exception that unlabeled HMG-CoA and $[^2\text{H}_7]$ MVL were used instead of $[^{14}\text{C}]$ HMG-CoA and $[^3\text{H}]$ MVL, respectively.

The subsequent derivatization and purification steps are very simple, and the HPLC system operates isocratically. Therefore, it would be easy to switch from the conventional RI method to the present non-RI method if an LC-MS/MS system were available. In addition, the data obtained by this non-RI method are comparable with previous data obtained by the RI method, because both methods obtained very similar results (Fig. 6). Furthermore, this method can be used as a high-throughput screening method for HMG-CoA reductase inhibitors.

In summary, we developed a very sensitive and specific non-RI method for the measurement of HMG-CoA reductase activity. Derivatization of MVL into the MV-PLEA allowed it to be quantified by LC-P-ESI-MS/MS with higher sensitivity than in the RI method. Reproducibility and recovery experiments verified that this method resulted in HMG-CoA reductase activities with high reliability and reproducibility. ■■

This work was supported in part by a grant from the Ministry of Education, Science, and Culture of Japan. The authors thank Professor Emeritus Hisao Nakata (Aichi University of Education, Japan) and Dr. Kouwa Yamashita (Tohoku Pharmaceutical University, Japan) for their helpful discussion of mass fragmentation and the protonation of the derivatives. The authors are also grateful to Professor Emeritus Shigeo Baba (Tokyo College of Pharmacy, Japan) for his kind advice on the RI technique.

REFERENCES

1. Goldstein, J. L., and M. S. Brown. 1990. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*. **343**: 425–430.
2. Brown, M. S., and J. L. Goldstein. 1997. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*. **89**: 331–340.
3. Adams, C. M., J. Reitz, J. K. De Brabander, J. D. Feramisco, L. Li, M. S. Brown, and J. L. Goldstein. 2004. Cholesterol and 25-hydroxycholesterol inhibit activation of SREBPs by different mechanisms, both involving SCAP and Insigs. *J. Biol. Chem.* **279**: 52772–52780.
4. Shapiro, D. J., R. L. Imblum, and V. W. Rodwell. 1969. Thin-layer chromatographic assay for HMG-CoA reductase and mevalonic acid. *Anal. Biochem.* **31**: 383–390.
5. Goldfarb, S., and H. C. Pitot. 1971. Improved assay of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *J. Lipid Res.* **12**: 512–515.
6. Shefer, S., S. Hauser, V. Lapar, and E. H. Mosbach. 1972. HMG CoA reductase of intestinal mucosa and liver of the rat. *J. Lipid Res.* **13**: 402–412.
7. Miyazaki, H., M. Koyama, M. Hashimoto, and M. Ishibashi. 1978. Assay for 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by selected ion monitoring. In *Stable Isotopes: Proceedings of the Third International Conference*, Oak Brook, IL, May 23–26, 1978. E. R. Klein and P. D. Klein, editors. 267–273.
8. Cighetti, G., E. Santaniello, and G. Galli. 1981. Evaluation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase activity by multiple-selected ion monitoring. *Anal. Biochem.* **110**: 153–158.
9. Galli Kienle, M., G. Galli, E. Bosisio, G. Cighetti, and R. Paoletti. 1984. Evaluation of enzyme activities by gas chromatography-mass spectrometry: HMGCoA reductase and cholesterol 7 α -hydroxylase. *J. Chromatogr.* **289**: 267–276.
10. Honda, A., J. Shoda, N. Tanaka, Y. Matsuzaki, T. Osuga, N. Shigematsu, M. Tohma, and H. Miyazaki. 1991. Simultaneous assay of the activities of two key enzymes in cholesterol metabolism by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.* **565**: 53–66.
11. Yoshida, T., A. Honda, N. Tanaka, Y. Matsuzaki, B-F. He, T. Osuga, N. Kobayashi, K. Ozawa, and H. Miyazaki. 1993. Simultaneous

- determination of mevalonate and 7 α -hydroxycholesterol in human plasma by gas chromatography-mass spectrometry as indices of cholesterol and bile acid biosynthesis. *J. Chromatogr.* 613: 185–193.
12. Siavoshian, S., C. Simoneau, P. Maugeais, L. Marks, L. Rodary, J. Gardette, and M. Krempf. 1995. Measurement of mevalonic acid in human urine by bench top gas chromatography-mass spectrometry. *Clin. Chim. Acta.* 243: 129–136.
 13. Woollen, B. H., P. C. Holme, W. J. Northway, and P. D. Martin. 2001. Determination of mevalonic acid in human urine as mevalonic acid lactone by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 760: 179–184.
 14. Park, E. J., D. Lee, Y. G. Shin, D. D. Lantvit, R. B. van Breemen, A. D. Kinghorn, and J. M. Pezzuto. 2001. Analysis of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors using liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 754: 327–332.
 15. Ndong-Akoume, M. Y., D. Mignault, S. Perwaiz, G. L. Plaa, and I. M. Yousef. 2002. Simultaneous evaluation of HMG-CoA reductase and cholesterol 7 α -hydroxylase activities by electrospray tandem MS. *Lipids.* 37: 1101–1107.
 16. Abrar, M., and P. D. Martin. 2002. Validation and application of an assay for the determination of mevalonic acid in human plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 773: 103–111.
 17. Jemal, M., A. Schuster, and D. B. Whigan. 2003. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry methods for quantitation of mevalonic acid in human plasma and urine: method validation, demonstration of using a surrogate analyte, and demonstration of unacceptable matrix effect in spite of use of a stable isotope analog internal standard. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17: 1723–1734.
 18. Saini, G. S., T. A. Wani, A. Gautam, B. Varshney, T. Ahmed, K. S. Rajan, K. K. Pillai, and J. K. Paliwal. 2006. Validation of LC-MS/MS method for quantification of mevalonic acid in human plasma and an approach to differentiate recovery and matrix effect. *J. Lipid Res.* 47: 2340–2345.
 19. Honda, A., G. Salen, Y. Matsuzaki, A. K. Batta, G. Xu, E. Leitersdorf, G. S. Tint, S. K. Erickson, N. Tanaka, and S. Shefer. 2001. Differences in hepatic levels of intermediates in bile acid biosynthesis between Cyp27^{-/-} mice and CTX. *J. Lipid Res.* 42: 291–300.
 20. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248–254.
 21. Nguyen, L. B., S. Shefer, G. Salen, G. C. Ness, G. S. Tint, F. G. Zaki, and I. Rani. 1990. A molecular defect in hepatic cholesterol biosynthesis in sitosterolemia with xanthomatosis. *J. Clin. Invest.* 86: 923–931.
 22. Taguchi, G. 1986. Introduction to Quality Engineering—Designing Quality into Products and Process. Asian Productivity Organization, Tokyo.
 23. Singh, G., A. Gutiérrez, K. Xu, and I. A. Blair. 2000. Liquid chromatography/electron capture atmospheric pressure chemical ionization/mass spectrometry: analysis of pentafluorobenzyl derivatives of biomolecules and drugs in the attomole range. *Anal. Chem.* 72: 3007–3013.
 24. Lee, S. H., M. V. Williams, R. N. DuBois, and I. A. Blair. 2003. Targeted lipidomics using electron capture atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17: 2168–2176.
 25. Lee, S. H., M. V. Williams, and I. A. Blair. 2005. Targeted chiral lipidomics analysis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 77: 141–157.
 26. Hiraoka, K., and I. Kudaka. 1992. Negative-mode electrospray-mass spectrometry using nonaqueous solvents. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 6: 265–268.
 27. Buffalini, M., R. Pierleoni, C. Guidi, P. Ceccaroli, R. Saltarelli, L. Vallorani, S. Zeppa, and V. Stocchi. 2005. Novel and simple high-performance liquid chromatographic method for determination of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase activity. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 819: 307–313.

ができない場合5～10%ブドウ糖500～1,000mLを基本に輸液を施行する。

しかし肝庇護薬を含めた薬物療法はそれ自体でさらに肝障害を引き起こすこともあり得るので、乱用は慎むべきである。薬物療法が基本的に必要なのは、黄疸遷延化例と劇症肝炎移行が考えられる例である。

II. 薬物療法

1) 基本的薬物療法

a. 肝細胞障害型

中等度以上肝細胞障害例 (ALT 300 IU/L以上) においては、グリチルリチン製剤で抗アレルギー作用のある強力ネオミノファーゲンシー® (SNMC) の静注を行いALT改善に努める。SNMCは、一回、20～100mLの静注と同時に、肝細胞膜保護作用を有するウルソデオキシコール酸 (UDCA) の経口投与を行う^{1,2)}。これらにより、ALT 100 IU/L以下に低下させることに努める。

肝細胞障害が重症化し、劇症肝炎に陥ったときの治療は、IVH、人工肝補助療法を用いる。血漿交換、血液透析を行う。劇症肝炎予後予測式を参考にし、場合によっては肝移植となる場合もある^{4,5)}。与芝の予知式をあげる。 $Z = -0.89 + 1.74 \times (\text{原因}) + 0.056 \times \text{総ビリルビン (mg/dL)} - 0.014 \times \text{コリンエステラーゼ (U/I)}$ 、原因がHAV、HBV (急性感染)、アセトアミノフェンなら原因=1、原因がHBVキャリア、C、非A～非C、アレルギー性薬物性肝炎、自己免疫性なら原因=2とし、1あるいは2の数値を当てはめ使用する。Z>0で脳症発現の可能性大、PT60%の時点におけるデータで、かつ血液浄化法開始前の検査値を使用する。これらは、ウイルス性などの一般的な劇症肝炎の治療に準ずる。

アセトアミノフェンの大量服用による、急性肝

また、飲酒者においては健常者よりも薬物性肝障害を起こしやすいともいわれている。それはフリーラジカルのスカベンジャーである、グルタチオンおよびシステインが減少しており、肝細胞内での脂質過酸化が起こりやすい状況であり、抗酸化作用のある薬物や、ビタミンC、Eなどの使用も効果があるとされている。

不全の場合服薬直後であれば、胃洗浄を施行する。しかし、服薬10時間以内であれば肝グルタチオンを補填する目的で前駆体であるN-アセチルシステインを点滴静注する⁴⁾。しかしわが国においては静注薬がないので、N-アセチルシステインであるアセチルシステイン内用液を胃管から、初回140mg/kg、以後4時間ごとに70mg/kgを17回、計18回を経口または経鼻胃管より投与する

b. 胆汁うっ滞型の薬物性肝障害の治療薬

胆汁の流出障害が起こるので、食事は脂肪の吸収不良防止のために低脂肪食とする。総ビリルビン10mg/dL以上などの高度の黄疸の遷延例に対しては脂溶性ビタミンの不足を補う。ビタミンA (10万単位)、K (10mg) を4週ごとに筋注、次に薬物療法の選択となる。

薬物療法としては、まずは、利胆作用のあるUDCAは副作用が少なく第一選択薬である。世界的にこのように記載されており、遷延化が見られる場合、副腎皮質ステロイド (プレドニゾロン) を使用する。しかし、開始後1週間で改善の見られない場合、漸減中止とする。

また、UDPグルクロノシルトランスフェラーゼ活性充進作用を期待し、フェノバルビタールを使用することもある。タウリン (アミノエチルスルホン酸) も利胆作用があり使用される。タウリンは、抗酸化作用が強く、肝細胞保護作用も持ち合わせ

表1 処方例

ウルソ®錠 ●100mg 3～6錠 分3 ●食後一日2回 (保険適応外)	茵陳喬湯エキス(2.5g/包) ●3包 分3 ●食前 胆汁うっ滞に有効である場合がある。
タウリン散(1g) ●3～6包 分3 ●食後一日3回	コレステミド ●500mg 6～8錠 分2 ●朝夕食前 (保険適応外) 痒痒感が強い場合に使用する。ウルソ®とは同時に服用しない。
強カネオミノファーゲンシー®注(グリチルリチン製剤) ●1回40～60mL ●一日1～2回 ●静 庄	コレステラミン ●9gを水100mLに溶かし、分2～3服用。 上記に比べ量が多く飲みづらい問題点があり、最近あまり使用されない。
プレドニゾン錠 ●5mg 6～8錠 分2～3 ●食 後 1週間前後服用しビリルビン値の低下が認められれば、以後3～4日ごとに漸減する。開始後10日以内に改善のみられない場合、速やかに漸減中止する。	抗ヒスタミン薬との併用をすることもある。ジフェンヒドラミン軟膏を塗布することが多い。

るので、使用しやすい。また、痒痒感が強い場合、新しい陰イオン交換樹脂であるコレステミドが従来のコレステラミンよりも量が少なく飲みやすく、効果も強く、最近使用されるようになってきた⁵⁾。

c. そのほかの治療

表1に示す処方とは十分な科学的根拠はないが、薬物性肝障害の治療として広く使用されているものである。

Ⅲ. 幼小児に対する治療

小児の薬物性肝障害に対しては、成人の肝障害の治療に準じ、特別な治療法はない。急性肝不全を呈する患児の治療はほかの原因による場合と同じで、まず人工肝補助を施行できる場合は行い、

できない場合はそれらが可能な施設へ搬送する。さらに肝再生の望めない場合で自発的なドナーがいる場合、肝移植ができない施設の場合は肝移植が行える施設へ転送する。

Ⅳ. 早期発見と早期対応のポイント

起因薬物や被疑薬を再度服用した場合、より重篤な肝障害が発現する可能性があることを十分に患者へ説明することが肝要である。

1) 定期的検査による早期発見が第一の鍵

薬物性肝障害の重篤化を予防するには、その徴候をいかに早く把握するかが重要である。早期発見のためには、それぞれの薬に応じて定期的に肝

機能検査を実施し、速やかに肝障害の有無をチェックする必要がある。多くの薬物性肝障害は薬物服用後4週以内に起こることが多く、60日以内にそのほとんどが観察される。また、問診で自覚症状の有無の確認、服薬指導の徹底、薬物相互作用および、アルコールの摂取による影響などにつき、患者の理解を促すことが大切である。

2) 薬物性肝障害における予防

肝障害の原因と考えられる薬物はその可能性を除外できない限り、再度使用しないことが原則である。しかし、肝障害を起こしやすい薬物はある程度明らかとなっており、悪性疾患に使用せざる

を得ない場合、肝機能に十分注意しながら投薬する。また、早期に発見した場合、慎重に継続投与するか、ウルソデオキシコール酸(保険適応外)などを服用しながらの継続投与を考慮する。

V. Pharmacogenomicsを利用した簡便な薬物性肝障害の予測法からの予防策

薬物性肝障害の治療もさることながら、今後は予防を試みることも重要な治療の一環となることと考えられる。薬物代謝を行う重要な酵素にチトクロームP450 (CYP)がある。CYPの分子種の酵素活性は個人により大きく異なっている。酵素作成の遺伝子に突然変異が起こるとタンパクの組成が変わり、酵素活性がなくなる。この酵素活性をもっていない人をpoor metabolizerとよび、過常の酵素活性をもっている人をextensive metabolizerと呼ぶ。生まれつき酵素活性がある人と、ない人が存在する。酵素活性のない人が比較的多数認められる場合を、遺伝的多型があるという。酵素活性がない人に基質となる薬物を投与した場合、薬物血中濃度は酵素活性がある人に比較し数倍から数十倍上昇し、副作用が出現しやすくなる。遺伝的多型が存在する酵素には、CYP2A6, 2D6, 2C19, アセチルトランスフェナーゼ(アセチル基転移酵素)、アルデヒドデヒドロゲナーゼなどがある。さらに、遺伝的多型は人種差が存在する。CYP2D6のpoor metabolizerは白人の7%ほどに存在するが、日本人には1%未満しか認められない。CYP2C19は、日本人を含む黄色人種の約20%はpoor metabolizerで、白人は5%以下である。同じように白人の半数はアセチルトランスフェナーゼのslow acetylatorである。一方、日本人はrapid acetylatorが90%を占めているとされ

ている。最近、わが国で開発されたイリノテカン(カンプトテシン誘導体：CPT-11)について、薬物動態関連分子の遺伝子多型から、副作用の原因、予防法に関する研究が進んでいる。イリノテカンは体内で脱炭酸酵素によって細胞を障害する物質(SN-38)に転換され、抗がん効果を発揮する。SN-38は細胞障害性が強く、そのままでは正常細胞にも作用し副作用発現の原因になる。実際には、患者の体内でUGT1A1によってグルクロン酸が付加され、細胞毒性が減少し、解毒される。ところがプロモーター領域のTAの繰り返し配列が7回あると、UGT1A1の発現が減弱しイリノテカンの解毒が進まず副作用を引き起こしてしまうことが明らかとなっている。現在この、UGT1A1の遺伝的多型を調べ投与量を設定することが考案され、米国ではすでに施行されている。一方日本人では欧米人で見られるプロモーター領域の多型のほかエクソン1にG71Rの多型が存在するため、この2つの多型の検索が必要となる。すでに一部施設では両者を検索して臨床応用をしている。

このように薬物代謝には個体間差があることが明らかとなり、薬物性肝障害の発症との関連性を検討することより、副作用が起こり、治療をする以前に予防に対する今後のテーラーメイド医療に貢献するだろう。

VI. 最新の研究からの薬物性肝障害の検討

—肝障害発症機序解明から、UDCAの効果発現機序から臨床応用へ—

薬物性肝障害の発症の可能性が考えられる患者に対しては、定期的に肝機能検査を実施し、早期発見に努めることが重要である。薬物性肝障害が発現した場合、さらに重篤化しないか徴候を見極め、早急に適切な治療を開始する必要がある。

治療を迅速かつ適切に行うためには、一般臨床

医と肝臓専門医との連携強化が必要である。一般臨床医の日常診療における細心のフォローアップにより患者の異常を早期に発見し、タイミングを逃さず専門医による適切な治療を受けることで、薬物性肝障害の重篤化を阻止することが可能となる。

VII. 肝臓専門医との連携強化を

フルタミドおよびその代謝物OH-フルタミドは、男性ホルモンであるアンドロゲンのレセプター (AR) のアンタゴニストで、アンドロゲンと拮抗してARに結合して作用を阻害する。ARは、遺伝子転写因子で、アンドロゲン依存性である前立腺癌の増殖を促進するが、フルタミドはそれを阻害し効果がよいことから、現在広く臨床現場で使用されている薬物である。しかし、重要な副作用として肝機能異常があり、その出現率は13.5%と報告されている⁶⁾。わが国において、臨床的にフルタミドの薬物性肝障害に対しUDCA投与の有効性を示唆する報告がなされた⁷⁾。

筆者らは絶飲水、絶食下においてフェノバルビタールとフルタミドをラットに投与し、実験的肝障害モデルの作製に成功した⁸⁾。本モデルは、AST、ALT値が上昇し、小集心性壊死性変化であり、胆汁うっ滞像は認めなかった。病理組織学的にも、高用量の群が最も広範囲に病変を認めた。肝障害程度は、用量依存性があることが示唆された。フルタミドによる肝障害はチトクロームP450 (CYP) によりフルタミドが酸化され、その反応物が関与することが示唆されている。またフルタミドは、P450のうち、CYP1A2により主に代謝され、OH-フルタミドとなり、血中で維持されることも明らかと

なってきた⁹⁾。フルタミドの酸化体である、FLU-1-N-OHの肝細胞障害性の検討のため、合成したもので検討すると培養ヒト肝細胞において肝細胞障害を起こし、GSHとも結合することが明らかとなった¹⁰⁾。つまり、CYP1A2活性が低く、GSHが少ない状況下では肝障害が引き起こされる可能性が推測される。これらの事象より、CYP1A2活性が低く、GSH量が低い場合には、FLU-1-N-OHが肝障害を起こしうる可能性が示唆された。

そこで、ラットにおける実験的肝障害モデルを利用し、フルタミドによる肝障害に対するUDCAの効果を検討した。モデルラットにUDCAを同時投与したところUDCAの同時投与群での肝障害を軽減した。図1に示すようにUDCA非投与群と比較して、UDCA10、20および40mg/kg投与群において、AST、ALT値が有意に低く、さらにUDCA投与20および40mg/kg投与群においてはLDHも有意に低く、病理所見も肝細胞壊死領域範囲が縮小した⁸⁾。以上の結果から、フルタミド投与実験モデルにおいて、UDCA同時投与は用量依存的に肝障害を軽減し、臨床におけるフルタミド肝障害の改善に対する有効性が示唆される結果であった。

以上の結果から、フルタミド投与実験モデルにおいて、UDCA同時投与は用量依存的に肝障害を

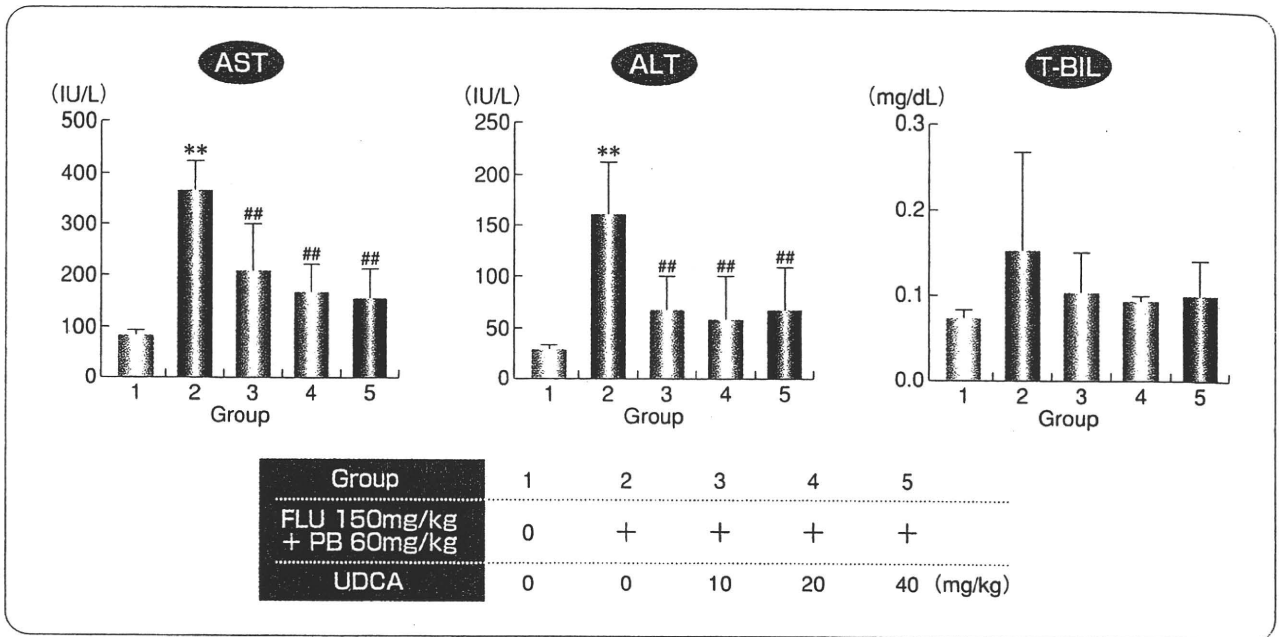


図1 Effect of UDCA on flutamide-induced hepatotoxicity in rats
 **: Group2 v.s. Group1(Student t test), #: Group3,4,5 v.s. Group2(Williams test)

(文献8)より)

軽減し、臨床におけるフルタミド肝障害の改善に対する有効性が示唆される結果であった。CYP1A2活性低下により、フルタミド酸化体が多く産生され、抗酸化作用を持つUDCAが効果を発揮する可能性が考えられる。したがって、今回のフルタミドによる肝障害が肝細胞障害型の可能性が高いので、肝細胞保護作用による効果が期待される。

対照群をおいた比較試験ではないが、フルタミド単独群 (UDCA 非投与群) : 111例、UDCAとフルタミド併用群 (UDCA 併用群) : 70例の比較検討を行った結果が出されている⁷⁾。肝障害発現率は、UDCA投与群において、非投与群の32%に比し11%と有意に低かった。

図2は肝障害発現率をUDCA投与群と、非投与

群とて比較しKaplan-Myer法で示したものである。その結果、UDCAを同時投与しておく、フルタミド投与初期においても肝障害の発現を抑えるが、その後の発現抑制も顕著であることが明らかとなった。つまり、フルタミドによる薬物性肝障害に対するUDCAの予防効果が示唆されるものである。

これは、前述したラットモデル実験を臨床的に確認したものである。臨床的EBMではないが、基礎的な実験根拠に基づくUDCA治療といえるであろう。薬物性肝障害に対して、このように実験モデルと、臨床検討が同時に行われているものはいまだないと思われ、今後の薬物剤肝障害の予防を考えるうえでも重要な課題と考える。

おわりに

現在における薬物性肝障害の治療の実際についてのべた。まだまだ、基本は肝障害を起こした薬物を早く同定し、中止することが基本である。いまだ、治療法も確立したものではなく、EBMに

基づく治療法はない。予防法も重要な今後の課題であり、Pharmacogenomicsを応用したテーラーメイド医療も予防法の重要な方策として今後発展していくことと考えられる。

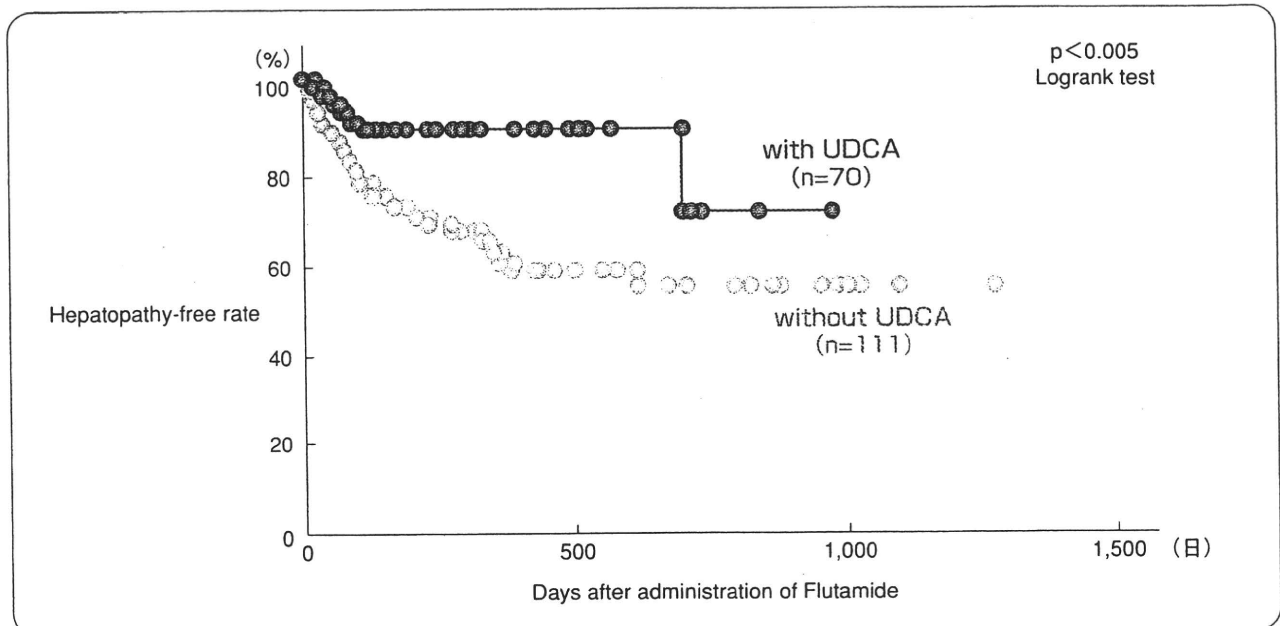


図2 ウルソデオキシコール酸の効果の比較試験

(文献7)より)



参考文献

- 1) Marino G, Zimmerman HJ, Lewis JH : Management of drug-induced liver disease. *Curr Gastroenterol Rep*, 3 : 38-48, 2001.
- 2) Chitturi S, Farrell GC : Drug-induced cholestasis. *Semin Gastrointest Dis*, 12 : 113-124, 2001.
- 3) McClain CJ, Price S, Barve S, et al : Acetoaminophen hepatotoxicity : An update. *Curr gastroenterol Rep*, 1 : 12-19, 1999.
- 4) 与芝 真, 井上和明 : エビデンスに基づく血漿交換療法の評価. *日輸会誌*, 48 : 9-26, 2002.
- 5) Matsuzaki Y : Colestimide : The efficacy of a novel anion-exchange resin in cholestatic disorders. *J Gastroenterol Hepatol*, 17 : 1133-1135, 2002.
- 6) 阿曾佳郎, 赤座英之, 亀山周二, 他 : 非ステロイド性抗アンドロゲン剤グルタミドの前立腺癌に対する治療効果第II相用量設定試験. *泌尿紀要*, 39 : 391-403, 1993.
- 7) Kojima M, Kamoi K, Ukimura O, et al : Clinical utility of ursodeoxycholic acid in preventing flutamide-induced hepatopathy in patients with prostate cancer : A preliminary study. *International J Uro*, 9 : 42-46, 2002.
- 8) 市村英資, 原 和久, 松崎靖司, 他 : フルタミドによるラット実験的肝障害に対するウルソデオキシコール酸の効果. *肝臓*, 40 : 227-224, 1999.
- 9) Shet MS, McPhaul M, Fisher CW, et al : Metabolism of the antiandrogenic drug (flutamide) by human CYP1A2. *Drug Metab and Dispos*, 25 : 1298-1303, 1997.
- 10) Goda R, Nagai D, Akiyama Y, et al : Detection of a new N-oxidized metabolite of flutamide, N-[4-nitro-3-(trifluoromethyl) phenyl] hydroxylamine, in human liver microsomes and urine of prostate cancer patients. *Drug Metab Dispos*, 34 : 828-835, 2006.

C型慢性肝炎治療の最新の知見

東京医科大学霞ヶ浦病院消化器内科
松崎 靖司 Yasushi MATSUZAKI

はじめに

近年、本邦においては肝細胞がん（以下、HCC）患者の発生が増加している。年間発生率は最近では2万例を超している。その発生原因の1つであるC型肝炎ウイルス（以下、HCV）抗体陽性HCC患者の発生が特に70～80%と増加してきている。

現在、日本のB型肝炎ウイルス（以下、HBV）キャリア率は約1.7%、HCVキャリア率は約1.2%である。HCC患者のうちHCV抗体陽性者が70%、HBV陽性者は20%くらいである。HCV陽性者のHCC発生率は、HBV陽性者の約5倍近くとなる換算である。

また、HCV抗体陽性者の自然経過はHCV曝露から高率に慢性化し、20～30年後に肝硬変、そしてHCC発がんへと移行することが明らかとなってきている。

以上のような現況から、HBV、HCV、アルコール、あるいはその他の発がん因子のHCC発生への関与の解明は急務となってきていると言っても過言ではない。C型慢性肝炎から不幸にも肝硬変になった患者の場合は、肝がんの早期発見をし、早期治療することが重要課題である。いかに慢性C型肝炎、肝硬変の患者を綿密に経過観察するかが問われている昨今である。

本稿では、肝がん撲滅を目指し、その目的達成のために特にC型慢性肝炎から肝硬変への移行を阻止するための治療法、インターフェロン（以下、IFN）療法、ウルソデオキシコール酸（以下、UDCA）療法、プロテアーゼ阻害剤について最新の知見を概説する。

HCV抗体陽性慢性肝炎患者における治療法

1. IFN療法

現在のC型慢性肝炎の治療はIFNが主流である。1991年にC型慢性肝炎に対してIFNが保険適応となり、2002年にリバビリンとの併用療法が保険適応となるまでは、全C型慢性肝炎患者のウイルス排除率は約30%であった。その後、2002～2004年まではリバビリン併用により効果も約45%に上がり、2006年現在は持続型IFN・リバビリン併用療法により、C型慢性肝炎の約70%でウイルス感染

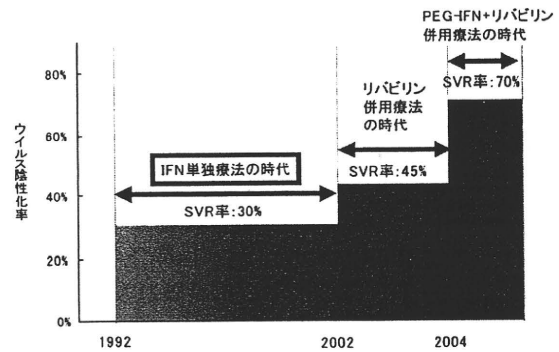


図1 日本におけるウイルス陰性化率の変遷

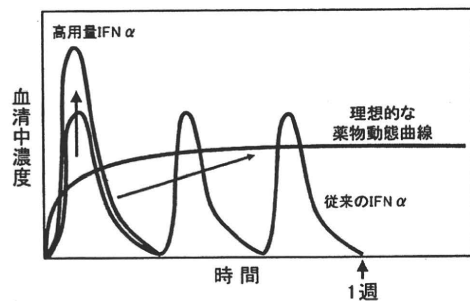


図2 IFN α の薬物動態の最適化

を断つことが可能である（図1）。しかし、すべてのC型慢性肝炎患者が治療の対象となるわけではないのが実状である。対象の選択には年齢が60～65歳以下が望ましく、病期の進行度が軽いもの、線維化が強く起こるような肝炎の活動性が弱いものが宿主側の良好な効果を得る要因となる。また、ウイルス側の要因として、ウイルス量が少ないこと（100KIU/mL、1 Meq/mL、300fmol/L未満）、Genotype (G) のgenotype2a、2b (serotype 2群) は、genotype1b (1群) に比べIFN効果が良い。これらより、1b高ウイルス群においてはSVR率が低く難治例とされてきた。その治療効果の推移は目を見張る。初期の難治例のSVR率が約2%であったのが、現在では約60%まで効果が上がったことは画期的なことである。

(1) 持続性IFNの必要性和薬物動態の最適化

従来のIFNは急速に代謝され、半減期が非常に短いため、基本的には週3回注射されている。これは負担の大きな投与スケジュールであるうえに効果が弱い。単純にIFNの投与量を増やしても薬物動態プロファイルは劇的には変化せず、結局、週3回投与する必要がある（図2）。

そこでIFN α のペグ化の目的は、クリアランスを減らし、代謝を抑制し、*in vivo*における生物学的活性を維持あるいは改善することにより、IFN α の薬物動態を最適化することである。ペグ・IFNは、従来のIFN治療の欠点を克服するために特別に設計された製剤である。2種類のペグ・IFNが現在使用されており、表1に示すような違いがある。ペグイントロンの構造を示す。IFN α 2bに平均分子量12KDのPEG、つまり、ポリエチレングリコール1分子が共有結合した修飾タンパク質である。



ペグIFN α 2bは、アミノ酸配列中のアミノ酸の1カ所に1分子のペグが共有結合したものである。なかでも、His³⁴へのペグの結合割合が50%を超えており、His³⁴に結合したペグIFN α 2bはLysに結合したペグIFN α 2bと比較して高い抗ウイルス活性が認められたことから、His³⁴への結合は、IFN α 2bとIFN α レセプター (IFN-AR2) との結合阻害を減少させる部位として好ましいと推測される。また、Lys³¹に結合したペグIFN α 2bはほかのペグ結合体と比較してウイルス活性が低いことが認められたことから、Lys³¹への結合はIFN α 2bとIFN α レセプターとの結合を阻害している可能性が示唆されている。

従来のIFNの薬物動態はペグ化IFN (PEG-IFN) のものとはかなり異なる。PEG-IFNの薬物動態は使用されるペグ化の種類、主に結合されるPEG分子の大きさと性質に応じて変化する。ペグIFN α 2aの場合、40KDのPEGを結合させることで小さな分布容積¹⁾、低いクリアランス、長い半減期を持つ分子が得られる²⁻⁴⁾。薬物動態曲線は、治療濃度への急速な上昇と長時間続く最大濃度を示している。これは1週間を通して一定に保たれ、ピーク対トラフ比が低く、ピークに関係する副作用を排除し、7日間続く真のウイルス抑制を提供する (表2)。ペグIFNは週1回投与で安定した血中濃度を維持するので、忙しく通院が困難なため治療を受けられなかった患者にとって待ち望まれた薬剤と言える。また、血中濃度を維持することにより、従来のIFNでみられていたウイルスの再増殖の抑制が期待できる。

(2)持続性IFNとリバビリン併用療法の国内治験成績

ペグIFN α 2b・レベトール併用療法と、ペグIFN α 2a・コペガス併用療法の2種類が現在使用できる。その成績は表3に示すように大きな差はないのが現状である。そして挙げるとすると、副作用の問題となるかと思われる。ペグIFN α 2aのほうが白血球、血小板の減少が強く起こる危険性があるという点になる。ペグIFN α 2bの場合は、効果と副作用の出現を考慮し体重あたりの用量を設定し投与することとなっている。ペグIFN α 2aの場合、注射を施行する前に採血し、血算、白血球分画を測定し

表1 PEG-IFNの種類

一般名	PEG-IFN α -2b	PEG-IFN α -2a
製品名 (メーカー)	ペグイントロン (ジェリング・プラウ)	ペガシス (中外製薬)
PEGの分子量	12KD 	40KD 
抗ウイルス作用	IFN α -2bの約28%	IFN α -2aの約7%
最高血中濃度 (1回投与)	874pg/mL	10,700pg/mL
用量設定	体重別	固定
その他		毎投与時直前に血液検査が必要

各製品添付文書ほか

表2 PEG-IFN：薬物動態学的パラメーター

パラメーター	IFN α	PEG-IFN α -2b	PEG-IFN α -2a
分布容積 (L) ^{1,2)}	31~98	80*	6~14 ¹⁾
クリアランス (mL/h)	11,800~16,170	1,540	80
吸収半減期 (h) ²⁻⁵⁾	2.3	4.6	50
ピーク対トラフ比 ⁶⁾	無限大	1/100	1/1.5~2.0
消失半減期 (h)	2~5	≥40	77

*: 患者の体重によって調整, †: 患者の体重にかかわらず一定

表3 PEG-IFN α -2bとPEG-IFN α -2a併用療法の国内開発試験-SVR率の比較

	ペグイントロン・リバビリン併用療法			ペガシス・コペガス併用療法		
	CHC 500 (n=254)	Others Study (n=63)	臨床薬理試験 (n=116)	初回投与試験 (n=99)	再投与試験 (n=100)	
Ib・High	全体症例	47.6% (121/254)	—	56.9% (66/116)	59.4% (57/96)	50.6% (41/81)
	未治療例	43.1% (59/137)	—	57.8% (37/64)	59.4% (57/96)	—
	再燃例	62.6% (57/91)	—	60.5% (23/38)	—	50.0% (23/46)
	無効例	19.2% (5/26)	—	42.9% (6/14)	—	51.4% (18/35)
Non-Ib・High	全体症例	—	87.3% (55/63)	—	—	68.8% (11/16)
	未治療例	—	87.8% (43/49)	—	—	—
	再投与	—	85.7% (12/14)	—	—	68.8% (11/16)

48週間投与 24週間投与 48週間投与 48週間投与 48週間投与

なければならないという煩雑さが規定されている。この点が診療所の医師には使いづらい点となっていることは否めない。

最近では、G1のslow-responderの再燃率や、投与開始4週後にウイルスが陰性化しなかったG1例での再燃率の低下を目指すために、これらの症例に対して72週間投与が推奨されている⁵⁾。これにより、48週間投与に比べSVR率が20%ほど上昇する。

(3) ウイルス遺伝子からみた治療効果

HCVの構造中、非構造領域のNS5A領域の変異とIFN感受性との関連が指摘されている。図3は、従来報告されているIFN関連療法感受性に関与する領域である。ま

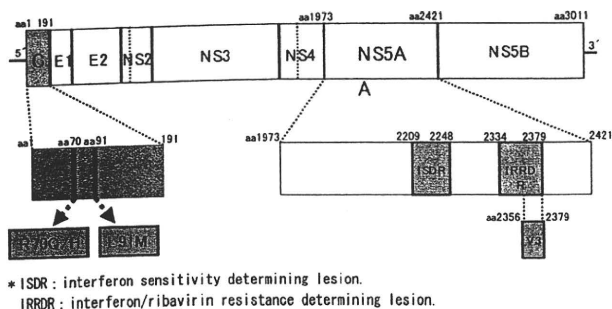


図3 IFN関連療法の治療感受性に影響する領域

HCV Polyprotein

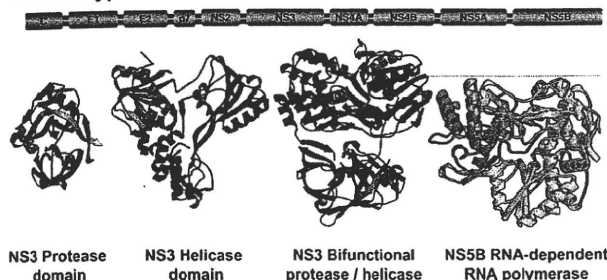


図4 C型肝炎治療の将来：HCV増殖特異的酵素阻害剤

ず、前述のごとくIFN単独療法に関してはNS5AのISDRが報告されている^{6,7)}。また、そのさらに3'側のV3 regionやそれを含むIRRDRという領域がRBV併用療法の治療効果予測に関与していることも最近報告されている。また最近、Coreの70・91番のアミノ酸置換がRBV併用療法で重要であることが報告されている^{8,9)}。

難治性肝炎に対し、これらの情報も加味し、IFN投与法の改善や多剤との併用など検討されているところである。

2. UDCA療法

そこで、現在、日常臨床上使いやすいUDCAの肝障害に対する利用を述べる。UDCAは熊胆(クマノイ)の主成分であり、古くは奈良時代から本邦においては使われていた。その後、江戸時代中期より胆石発作に使われるようになった。1976年、山中らは二重盲検法にて慢性肝炎に有効との報告をした。現在ではC型慢性肝炎における効果が二重盲検試験により認められ、2007年にC型慢性肝炎患者に対して600~900mg/日の保険認可がされた。原因療法としてのIFNとともに、肝庇護療法としてC型肝炎の患者の治療の両輪となっていくと思われる。

UDCAの作用機序は大きく分けて、①利胆作用、②肝細胞膜保護作用、③体内胆汁酸プールの変換、④免疫調節作用の4つが考えられている。現在、①~③については大方同意されているが、免疫調節に関しては*in vitro*の成績が主のため、さらに検討を要するところである。

以上のように、IFNやUDCAにより肝炎の進行を抑制し、肝硬変に移行することを少しでも抑制することが重

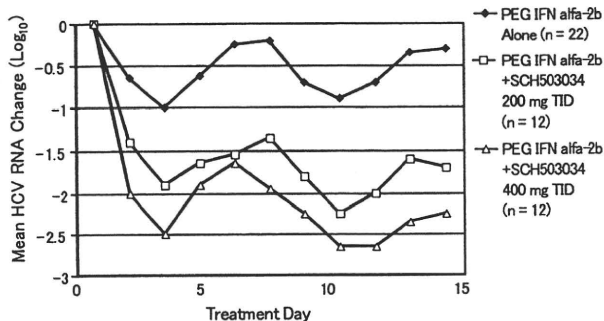


図5 Genotype 1 IFN不応例におけるSCH503034とPEGIFN併用療法の抗ウイルス効果

要なポイントである。

(1) プロテアーゼ阻害剤

HCVの増殖に際して、HCVがもつ3個の律速酵素が関与していることが明らかとなってきた。図4に示すごとく、プロテアーゼ、ヘリカーゼ、ポリメラーゼである。このなかでプロテアーゼに対する阻害剤の治験が現在一番先行している。VX-950はNS3.4A protease inhibitorである。SCH 503034は、NS3 serine protease ketoamide inhibitorである。VX950とPEG・IFNの併用でSVRが極めて早いという成績が出ている。図5に示すようにSCH 503034とIFNの併用の場合、Ib、高ウイルス群のnon-responder群において効果があるという第II相試験結果も出ている¹⁰⁾。

まとめ

HCV抗体陽性者の自然経過はHCV曝露から高率に慢性化し、20~30年後に肝硬変、そしてHCC発がんへと移行することが明らかとなってきている。つまり、慢性肝炎を如何に治療し肝硬変へ移行させないか、また、肝硬変の場合は肝がんの早期発見をする必要がある。現在では、慢性肝炎の患者さんをIFN、UDCA、プロテアーゼ阻害剤などの集学的治療により、肝がん撲滅を目指し、ウイルス性慢性肝炎から肝硬変に移行しないように努力することが肝要である。

文献

- 1) P. Glue, J.W. Fang, R. Rouzier-Panis *et al.*: Pegylated interferon-alpha2b: pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety, and preliminary efficacy data. Hepatitis C Intervention Therapy Group, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **68**, 556-567 (2000).
- 2) PEG-Intron. PDR. 56th ed. 2002.
- 3) ROFERON-A. PDR. 56th ed. 2002.
- 4) INTRON A. PDR. 56th ed. 2002.

- 5) J.M. Sanchez-Tapias, M. Diago *et al.*: Peginterferon-alfa2a plus ribavirin for 48 versus 72 weeks in patients with detectable hepatitis C virus RNA at week 4 of treatment, *Gastroenterology*, **131**, 451-460 (2006).
- 6) N. Enomoto, I. Sakuma, Y. Asahina *et al.*: Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. Sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitutions in the NS5A region, *J. Clin. Invest.*, **96**, 224-230 (1995).
- 7) N. Enomoto, I. Sakuma, Y. Asahina *et al.*: Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection, *N. Engl. J. Med.*, **334**, 77-81 (1996).
- 8) N. Akuta, F. Suzuki, H. Sezaki *et al.*: Association of amino acid substitution pattern in core protein of hepatitis C virus genotype 1b high viral load and non-virological response to interferon-ribavirin combination therapy, *Intervirology*, **48**, 372-380 (2005).
- 9) N. Akuta, F. Suzuki, H. Sezaki *et al.*: Predictive factors of virological non-response to interferon-ribavirin combination therapy for patients infected with hepatitis C virus of genotype 1b and high viral load, *J. Med. Virol.*, **78**, 83-90 (2006).
- 10) C. Sarrazin, R. Rouzier, F. Wagner *et al.*: SCH 503034, a novel hepatitis C virus protease inhibitor, plus pegylated interferon alpha-2b for genotype 1 nonresponders, *Gastroenterology*, **132**, 1270-1278 (2007).