

- 7) Cohen S, Cannon GW, Schiff M, Weaver A, Fox R, Olsen N, Furst D, Sharp J, Moreland L, Caldwell J, Kaine J, Strand V: *Arth Rheum* 44: 1984-1992 (2001)
- 8) Kremer JM, Phelps CT: *Arth Rheum* 35: 138-145 (1992)
- 9) Andersen PA, West SG, O'Dell JR, Via CS, Claypool RG, Kotzin BL: *Ann Int Med* 103: 489-496 (1985)
- 10) Weinblatt ME, Weissman BN, Holdsworth DE, Fraser PA, Maier AL, Falchuk KR, Coblyn JS: *Arth Rheum* 35: 129-137 (1992)
- 11) Choi HK, Hernan MA, Seeger JD, Robins JM, Wolfe F: *Lancet* 359: 1173-1177 (2002)
- 12) Olsen NJ, Stein CM: *N Engl J Med* 350: 2167-2179 (2004)
- 13) Gabay C: *Expert Opin Biol Ther* 2: 135-149 (2002)
- 14) Kowanko IC, Knapp MS, Pownall R, Swannell AJ: *Ann Rheum Dis* 41: 453-455 (1982)
- 15) Bellamy N, Sothorn RB, Campbell J, Buchanan WW: *Ann Rheum Dis* 61: 1075-1080 (2002)
- 16) Bellamy N, Sothorn RB, Campbell J, Buchanan WW: *Ann Rheum Dis* 50: 243-248 (1991)
- 17) Herold M, Günther R: *Prog Clin Biol Res* 227B: 271-279 (1987)
- 18) Crofford LJ, Kalogeras KT, Mastorakos G, Magiakou MA, Wells J, Kanik KS, Gold PW, Chrousos GP, Wilder RL: *J Clin Endocrinol Metab* 82: 1279-1283 (1997)
- 19) Perry MG, Kirwan JR, Jessop DS, Hunt LP: *Ann Rheum Dis* 68: 63-68 (2009)
- 20) Arvidson NG, Gudbjornsson B, Elfman L, Ryden AC, Totterman TH, Hallgren R: *Ann Rheum Dis* 53: 521-524 (1994)
- 21) Straub RH, Cutolo M: *Arth Rheum* 56: 399-408 (2007)
- 22) Cutolo M, Seriola B, Craviotto C, Pizzorni C, Sulli A: *Ann Rheum Dis* 62: 593-596 (2003)
- 23) Maestroni GJ: *J Pineal Res* 14: 1-10 (1993)
- 24) Reiter RJ: Pineal melatonin: *Endocrinol Rev* 12: 151-180 (1991)
- 25) Maestroni GJM: *J Pineal Res* 18: 84-89 (1995)
- 26) Esquifino AI, Cardinali DP: *Neuroendocrinol Lett* 20: 163-166 (1999)
- 27) Garcia-Mauriño S, Gonzalez-Haba MG, Calvo JR, Rafii-El-Idrissi M, Sanchez-Margalet V, Goberna R, Guerrero JM: *J Immunol* 159: 574-581 (1997)
- 28) Caldenhoven E, Liden J, Wissink S, Van de Stolpe A, Raaijmakers J, Koenderman L, Okret S, Gustafsson JA, Van der Saag PT: *Mol Endocrinol* 9: 401-412 (1995)
- 29) Kennaway DJ, Voultzios A: *J Clin Endocrinol Metab* 83: 1013-1015 (1998)
- 30) Miyatake A, Morimoto Y, Oishi T: *J Clin Endocrinol Metab* 51: 1365-1371 (1980)
- 31) Koyanagi S, Suyama H, Kuramoto Y, Matsunaga N, Takane H, Soeda S, Shimeno H, Higuchi S, Ohdo S: *Endocrinol* 147: 5034-5040 (2006)
- 32) Conti A, Maestroni GJ: *Ann New York Acad Sci* 840: 395-410 (1998)
- 33) Sulli A, Maestroni GJM, Villaggio B, Hertens E, Craviotto C, Pizzorni C, Briata M, Seriola B, Cutolo M: *Ann New York Acad Sci* 966: 276-283 (2002)
- 34) Neeck G, Federlin K, Graef V, Rusch D, Schmidt KL: *J Rheumatol* 17: 24-29 (1990)
- 35) Lightfoot RW Jr: *J Rheumatol Suppl* 6: 61-67 (1980)
- 36) Kowanko IC, Pownall R, Knapp MS, Swannell AJ, Mahoney PG: *Ann Rheum Dis* 41: 447-452 (1982)
- 37) Levi F, Le Louarn C, Reinberg A: *Clin Pharmacol Ther* 37: 77-84 (1985)
- 38) Arvidson NG, Gudbjornsson B, Larsson A, Hallgren R: *Ann Rheum Dis* 56: 27-31 (1997)
- 39) Buttgerit F, Doering G, Schaeffler A, Witte S, Sierakowski S, Gromnica-Ihle E, Jeka S, Krueger K, Szechinski J, Alten R: *Lancet* 371: 205-214 (2008)
- 40) To H, Irie S, Tomonari M, Watanabe Y, Kitahara T, Sasaki H: *J Pharm Pharmacol* 2009 (in press)

医療薬学フォーラム2009

抗リウマチ薬の時間薬物療法を目指して

長崎大学病院
藤 秀人

1. はじめに

「薬剤師主導の臨床研究は可能か」は、本シンポジウムのテーマである。薬剤師が中心となって実施する臨床研究は可能であると私は考えています。ただし、薬剤師が医師とともに臨床試験を行うには、これまで以上の努力が必要です。

未承認医薬品を対象とする治験とは異なり、研究者・医師主導型臨床研究は主に治療ガイドラインの作成や投与プロトコルの改善のために日常使用されている薬物を対象に実施されるヒトを対象とした研究です。したがって、研究者・医師主導型臨床研究は、医薬品適正使用を目指すための重要な試験と位置付けられています。このような臨床研究を実施する研究グループとしては、学会や財団、研究会、研究者個人によるものなど多岐に渡りますが、医師主導型臨床研究と言われるように、主には医師が主体となって研究が実施されています。しかし、治療ガイドラインの変更に係わるような臨床研究に薬剤師が携わっている例は


ほとんどありません。

当研究室では関節リウマチ (RA) の薬物療法に関して、薬剤師提案型の臨床研究を展開しています。本稿では、われわれの臨床研究を通して得られた薬剤師提案型臨床研究の実施に必要な条件などについて概説します。

2. 薬剤師が主導的に行う臨床研究の難易度

薬剤師が主導的に実施する臨床研究の難易度について表1に簡単にまとめました。症例調査やアンケート調査は、今日、この時からでも調査することが可能な研究であり、比較的容易に実施することが可能です。これらの研究では、患者個々に現れている事象や回答が得られた被験者における実態を把握することができますが、症例調査は客観性に乏しい情報であり、アンケート調査では回答していない被験者の情報は得られないことから偏った情報が収集される可能性があります。そのため、客観的なデータを収集するために、複数の被験者を対象に臨床研究を実施することが必要で

表1 薬剤師が主導的に行う臨床研究の難易度

難易度	研究内容	長所	短所
易  難	・症例調査	患者個人の治療成果などを把握することができる。	治療薬や治療法などの有効性を判定することはできない。
	・アンケート調査	調査対象者の実態を把握することができる。	患者背景等がバラバラなため効果判定などには不向きである。
	・健常人を対象とした臨床研究	新たな治療法や診断法の提言ができる (特に、遺伝子多型や相互作用の研究など)。	最終的に患者での評価が必要である。
	・患者を対象に介入のない後ろ向き研究や疫学調査	評価の対象となる患者を対象に調査することで、問題点の抽出などができる。	後ろ向き研究では、得られた成果について十分な提言ができない。
	・患者を対象に介入が伴う臨床研究	新たな治療法や診断法の提言ができる。ガイドラインへの採用も夢ではない。	薬剤師や薬学研究者だけでは、研究の実施が困難となるものが多い。

あると考えられます。

次に、健常人を対象とした臨床研究は、薬剤師や薬学研究者の得意分野の一つであり、薬物動態、遺伝子多型や薬物間相互作用などの分野では、多くの重要な所見を見出してきました。また、臨床で得られた患者の血液データ及び患者情報を収集してtherapeutic drug monitoring (TDM) や母集団薬物動態解析が行われ、薬物動態解析ソフトなどが開発され、臨床現場で多くの情報が活用されています。しかし、臨床で得られた情報を基に情報を整理して評価を試みる後ろ向き研究では、試験プロトコルに準拠した試験を実施しサンプルを収集していないため、患者背景の違いやサンプリング時間の差異など多くの相違点が患者間で存在し、得られた結果にはノイズが多く、適正な評価ができないことがあります。

前向き臨床研究は、被験者の条件や試験方法をあらかじめ設定しておき試験を実施する研究として医師主導の臨床試験で多く実施されている形態であり、これらの研究から新たな治療プロトコルやガイドラインが多く誕生しています。しかし、前向き研究を薬剤師が企画・立案し、臨床研究を実施した例は先にも述べたようにほとんどなく、この問題点としては大きく3つのことが考えられます。

1. 被験者に対して直接医療行為をすることができない。
2. 業務の合間の被験者の対応は困難である。
3. 研究費がない。

以上のように、薬剤師が主導的に実施する臨床試験の難易度は、医師にはない薬剤師ならではの課題も多く散見されますが、よりよい治療法の開発には、薬剤師ならではの薬学的センスが必ず必要です。

3. 薬剤師が主導する前向き臨床研究を実施するために

薬剤師が前向き臨床研究を企画し、実施するためには多くの課題が存在します。一般に、研究には、研究の計画や結果の考察を行う頭脳と、実際に研究するマンパワー、そして研究資金の3つの要素が必要だと言われています。医師の場合、この3要素が備われば前向き臨床研究は実施可能ですが、薬剤師の場合、さらにもう一つの要素が必

要となります。それは、研究協力医師です。薬剤師は処方権を有さず、直接医療方針を決定し、処置することはできないため、研究の意図を理解し、試験に協力していただける医師の確保は必要不可欠な条件となります。以上4つの条件をどのように整えていくべきなのかについては、薬剤師一人ひとりが置かれている環境によって変化するため、一概に説明することはできません。そこで、現在当研究室で実施している抗リウマチ薬の時間薬物療法に関する臨床研究を例にとりて前向き臨床研究への取り組みについて紹介したいと思います。

1) 研究計画の立案と研究協力医の獲得について

「なぜ、このような臨床研究をしなければならないのか」、医師が必ず試験計画者に尋ねる質問です。何のデータもまとめず経験則で「なんとなく〇〇を投薬した方が効果があるように思うのですが、試験で確認しませんか」、といった説明は絶対にするべきではありません。自分の親族や家族に「なんとなく」で計画された臨床研究に参加させたくないと同様に、医師も明確な根拠がない研究を自身の患者に依頼することはまずありません。臨床研究を提案するうえで最も重要なことは、科学的かつ客観的な観点に基づいて研究の提案を行うことを第一に考えることです。

医師に試験立案の根拠を示す方法としては、2つの方法があります。1つは複数の症例調査や論文等を科学的にまとめる方法と、もう一つは基礎研究にて効果を評価する方法です。私の場合は動物実験によって仮説の妥当性を明らかにしました。

RAは関節滑膜を病変の主座とする進行性の全身性炎症性疾患です。図1に示したようにRAの症状の特徴としては早朝に高発現する朝のこわばりがあります。また、RAの病態には関節滑膜における血管新生や炎症性細胞浸潤、滑膜細胞増殖、軟骨・骨破壊などが挙げられ、これらの病態形成には過剰に産生されるサイトカインが大きく関与すると言われています。なかでも炎症性サイトカインであるtumor necrosis factor- α (TNF- α) やinterleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) はRA患者の血中や関節滑液中で高濃度に発現しており、これらのサイトカインの複合的な作用の結果、関節炎は改善と憎悪を繰り返しながら進行

し、さらに軟骨・骨破壊を起こし関節の変形に至ります。これにより患者の日常労作は障害され、生活の質 (QOL) は著しく低下します。

RAは未だ明確な発症機序が解明されていない疾患ですが、われわれはこの解明の切り口としてRA患者特有の“朝のこわばり”に着目しました。早朝に現れる四肢の関節痛である“朝のこわばり”は、古くからよく知られているRAの特徴的な症状の一つです (図1)。近年、朝のこわばりに対応するように血中IL-6やTNF- α などが早朝に増加することが報告され (図1)、炎症によるこわばりの発症機序に少なからず炎症性サイトカインの概日リズムが関与しているのではないかと考えられています。

現在、多くのRA患者に用いられているメトトレキサート (MTX) は、週ごとに1HH朝・夕、2日目朝を基本とした投薬スケジュールにて投薬が行われています (図1)。しかし、ヒトの炎症性サイトカインの概日リズムを基盤に、RA患者におけるMTXの投薬時刻を考察すると、夕方から夜間にかけて投与することでより効果的な治療が可能になると推察されます。

そこで、当研究室では、RAモデル動物を対象に炎症性サイトカインの概日リズムを考慮してMTXを投薬することで、抗リウマチ効果の向上が可能か否か評価しました。図2には、自然発症型RAモデル動物であるMRL/lprマウスのRA発症後における血中の血清アミロイド (SAA) 濃度及びTNF- α 濃度を示しました。SAAは、C-reactive protein (CRP) と同様に急性期の炎症反応を評価する指標でIL-1やIL-6, TNF- α などの炎症性サイトカインによって惹起されます。RA発症後の血漿中SAA濃度及びTNF- α 濃度はともに、9:00に最高値 (SAA: 146.6 μ g/mL, TNF- α : 54.4pg/mL (平均値)), 5:00に最低値 (SAA: 68.7 μ g/mL, TNF- α : 19.7pg/mL (平均値)) を示す明瞭な概日リズムを示しました。一方、RA発症前のMRL/lprマウスではSAA及びTNF- α 濃度に明瞭な概日リズムは認められず、全サンプリング時刻の平均的なSAA及びTNF- α 濃度は85 μ g/mL及び17.3pg/mLとRA発症時の最小濃度付近でした。これらの結果より、RA未発症時は血中の炎症指標や炎症性サイトカイン濃度に概日リズムは認められず、RAを発症すること

既存の投与スケジュール

1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	6日目	7日目
朝	夕	朝	夕	朝	夕	朝
○	○					



時間治療に基づく投与スケジュール

1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	6日目	7日目
朝	夕	朝	夕	朝	夕	朝
○		○		○		

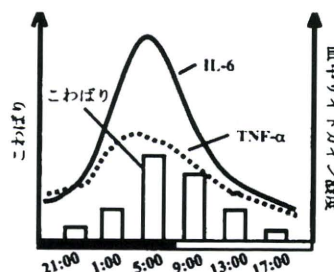


図1 RA治療におけるメトトレキサートの投与スケジュールとRA病態の概日リズム

でこれらに明瞭な概日リズムは発現することが明らかとなりました。したがって、RAの特徴である関節の痛みや朝のこわばりなどの炎症の概日リズムには、炎症性サイトカインの概日リズムが密接に関連していると考えられました。

次に、MRL/lprマウスを対象にMTXを投薬し、投薬時刻の違いによる抗リウマチ効果への影響を評価しました。MRL/lprマウスにMTX (10mg/kg) を1:00または13:00のいずれかの時刻に3日間連日腹腔内投与した後4日間休薬し、投薬開始後14日目の血漿中SAA濃度を測定しました (図3)。1:00投薬群のSAA濃度は、control群及び13:00投薬群と比較し有意に低値を示しました ($P<0.01$, $P<0.05$)。以上より、MTXの投薬時刻の違いによって炎症や関節炎に差異が現れることが明らかとなりました。また、このような現象は、他のRAモデルであるII型コラーゲンを感作したラットにおいても同様に、MTXの投薬時刻の違いによって抗リウマチ効果に変化することが分かりました。非常に興味深いことに、治療効果が高かった時刻は、いずれのRAモデル動物においても1Hの中でTNF- α が増加し始める時間帯にMTXを投薬した時間帯でした。

以上のような実験結果を携え、われわれは抗リウマチ薬の時間治療の有用性を医師に訴え、臨床

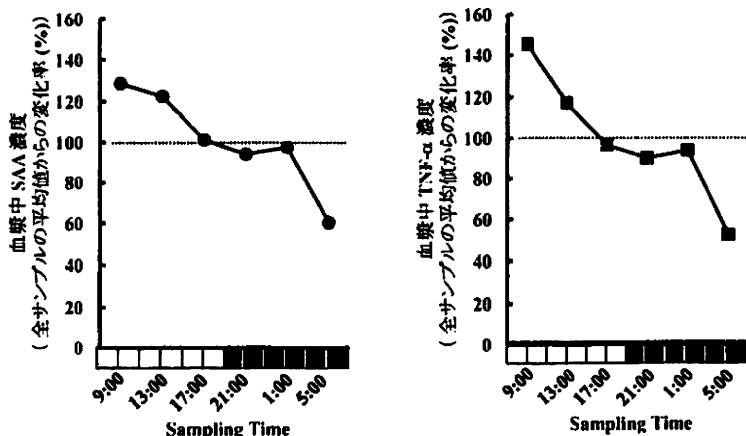


図2 MRL/lprマウスにおけるRA発症後の血漿中SAA及びTNF- α 濃度の概日リズムデータは全データの24時間平均に対する個々のデータのパーセンテージを算出し、各サンプル時刻の平均値を示した (n=6-16)。

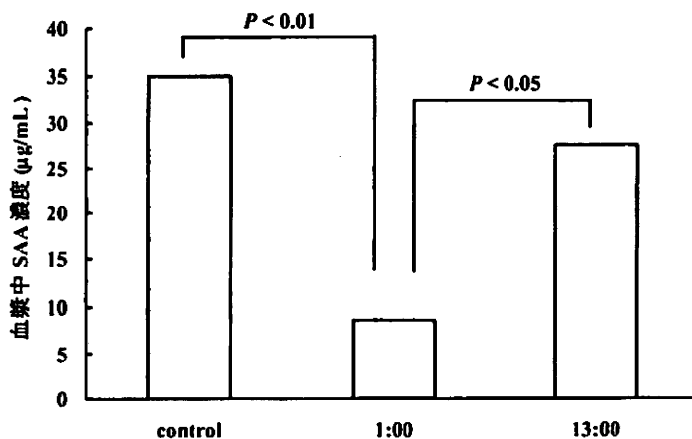


図3 MRL/lprマウスを対象としたMTXの投薬時刻の違いによる抗リウマチ効果への影響データは平均値を示した (n=8-18)。

研究に協力いただくことを了解いただきました。本研究の立案から医師に臨床研究を了解いただくまでには3年の歳月を費やしました。経験則や直感だけでは医師を説得することは困難です。私は自らエビデンスを生み出すことで、自信を持って医師に時間治療の長所と短所を説明し、その中でも時間治療の有用性を説明することができました。したがって、少しの遠回りをしても、明確なエビデンスを提示することが重要であり、薬剤師が主導的に臨床研究を実施するための第一歩であると考えます。

2) 臨床研究のプロトコール作成について

臨床研究は、誰もがいつでもどこでも実施できるものではなく、ヒトを対象とする以上最低限理解し、守らなければならないルールがあります。今回、このルールに関する詳細は省略させていただきますが、われわれ研究者が守らなければならない倫理的な指針などについては、厚生労働省のホームページ (<http://www.mhlw.go.jp/general/seido/kousei/ikenkyu/>) に掲載されていますのでご確認下さい。また、倫理委員会への申請や承認された研究計画を大学病院医療情報ネットワーク (umin) などの公的な機関へ登録する方法につきましては、各大学や研究所の担当部署におうかがい下さい。

臨床研究の経験はもとより計画書を作成すること自体が初めてであった

われわれは、研究計画書作成に非常に苦労しました。そのため、臨床研究に関する教科書や治験や臨床研究で、すでに承認を受けている計画書を参考に原案を作成しました。この計画書では、既存の投薬方法のグループと時間治療を実施するグループの2群にRA患者を各群100例程度無作為割り付けし、3ヵ月間の試験実施によるRA症状の改善度を両群間で比較することを目的としており、どの臨床研究の教科書にも記載されているような科学性の高い試験計画を作成しました。計画書作成に3ヵ月費やし、多くの参考書やThe LancetやThe New England Journal of Medicineの論文報告を参考に計画書を作成したため、われ

われはある程度の自信を持って医師に試験実施計画書を提出しました。計画書を一読した医師からすぐにも「試験実施を承諾する」といった言葉をいただけるものと思っていました。しかし、実際は「この試験難しい」という言葉でした。なぜだめなのか。最初のうちはよく理解できませんでしたが、医師とディスカッションしていく中で、私達が患者さんを対象に研究を実施するうえで大切なことを見落としていたことに初めて気がつきました。

動物実験で良好な結果を得ていたわれわれには、RA患者でも必ず同じような結果が得られるといった慢心がありました。治験では、Phase Iで少数の健常成人から段階を経てPhase IIIで多数の対象患者を対象に臨床試験を実施します。たとえば、動物実験の成績が良く、市販されている医薬品であっても、患者さんへの倫理的な配慮を考えれば、まずは少数例のRA患者さんで時間治療の有効性を評価し、この結果をもとに上記で作成した多数例を対象とする臨床試験を実施しなければなりません。教科書には、最適な試験デザインの作り方は掲載していますが、試験全体を通して最終目標となる成果を得るために、どのような試験を計画し実施するのかについてはなかなか

記載されていません。われわれは、すぐに結果を求めてしまいがちですが、科学性はもちろんのこと、倫理性を考慮しながら試験計画を練っていく必要があることを本臨床研究より学びました。

これらの反省をもとに、われわれは、臨床研究を3段階に分け実施することにしました。Step 1では、少数例のRA患者を対象に時間治療の効果を確認する。Step 2では、Step 1での問題点を修正し、20例のRA患者で時間治療実施前後で治療効果に変化があるか否かを評価する。Step 3では、多数のRA患者を対象に無作為化比較試験を実施し、既存の治療法と比較し、時間治療が有効であるか否かを評価することにしました。今日現在、Step 2に入っており、2010年1月末にはそのデータ解析が終了する予定になっています。

3) 臨床研究の実施について

これまでに実施した臨床研究計画と症例データの一部を図4、5に示します。本試験の特徴としては、従来のMTXの1週間における投与量と投与間隔を変更することなく、MTXの服用を1日1回夜とするにあります。薬の服用時刻が、時間治療開始前後でRAの診断の指標の一つである

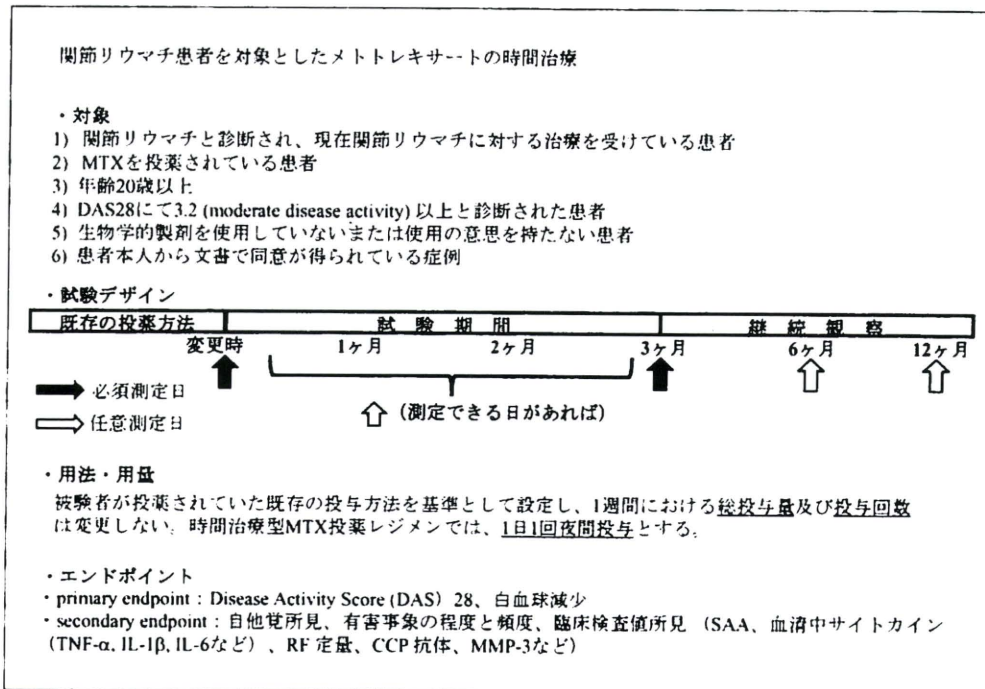
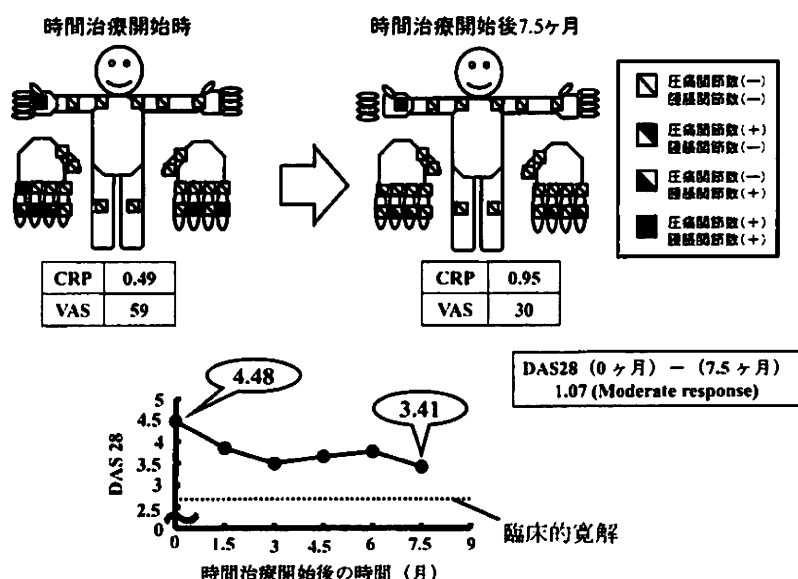


図4 研究計画書



disease activity score (DAS) 28に影響を与えるかどうかを評価しました (図4)。現在、臨床研究の実施期間中ですので、ここでは1人の被験者の結果を報告します。

症例1は、61歳女性で平成15年に関節リウマチと診断されMTX (2 mg) を1, 2日目の朝・夕に投薬 (8 mg/週) されていました。時間治療ではこれまでの投与量・投与回数 (1回2 mgを4回投薬) を変更せずにMTXを夕食後のみ投薬しました。その結果、試験前の白血球数は、6000/ μ lで、試験開始3ヵ月後も6000/ μ lと白血球減少は認められず、また他の有害事象も認められませんでした。一方、DAS28は、変更時4.48、1.5ヵ月目で3.85、3ヵ月目で3.48、7.5ヵ月目で3.41と経時的に減少し、時間治療開始時から7.5ヵ月間の試験成績はEURAR改善基準でmoderate response (1.07減少) でした (図5)。本症例の特徴的な変化としては、腫脹関節痛が6から6と変化しなかったにもかかわらず、圧痛関節痛が6から1へ、また全般的健康状態も大幅に改善したことであります。同様の効果が多くの特験者でも認められています。投与量や投与回数を変更することなく、投薬時刻のみの変更で安全性を維持しつつ治療効果の向上が得られるMTXの時間治療は、RAの薬物療法にとって有用な治療法になると考えられま

す。今後、多くの被験者を対象にMTXの時間治療の効果を検証し、明確なエビデンスを確立したいと考えています。

臨床研究の実施にあたって、最大の問題点は誰が試験を実施するかどうかではないでしょうか。通常の診療の中で試験の全てが実施できるものであれば問題はないと思われませんが、被験者への試験計画の説明とインフォームド・コンセントの取得や血液サンプル等の採取など多くの場合、治験では臨床研究コーディネーター (CRC) が実施す

ような仕事を行う必要が出てきます。幸い当施設では、私自身と薬剤師の免許を持った大学院生がこの仕事を行うことができましたが、薬剤業務の合間に薬剤師が仕事を抜け出して被験者の対応をすることは非常に難しいと考えられます。海外では、academic research organization (ARO) という自主臨床試験を安価でサポートしてくれる組織が存在するようですが、このような組織は日本ではまだまだ少ないのが現状です。自主臨床研究を実施している研究者の多くは、病院施設などで業務の傍ら自ら試験を管理し実施しています。しかし、試験と業務が煩雑となるため、研究テーマを持ち合わせていても臨床研究を断念している研究者も多いと推測されます。したがって、本邦においてもAROのような自主臨床研究サポートセンターが設置され、安価で質の高い自主臨床研究の実施ができる環境の整備が必要であると考えます。

4) 研究費の獲得について

研究にはお金がかかります。特に、前向き研究の場合、サンプル測定費用や人件費など多くの研究資金を必要とするために、研究実施をあきらめてこられた先生方も多いのではないのでしょうか。研究費は常に獲得できるわけではありませんが、

申請しなければ研究費を得るチャンスも出てきませんので、自らの手で研究費獲得のための行動を起こさねばなりません。

民間の病院などでは、研究費申請の機会も少ないと考えておられる先生方も少なくないと思います。確かに、ご自身で申請できるものは少ないかもしれません。しかし、近年研究を志す者には広く門が開かれ始めています。例えば、文部科学省科学研究費の研究者の条件には、研究機関に、当該研究機関の研究活動を行うことを職務に含む者として、所属する者であること（有給・無給、常勤・非常勤、フルタイム・パートタイムの別を問わない。また、研究活動以外のものを主たる職務とする者も含む）といったものになっています。したがって、大学の教員でなくとも申請ができることになりました。私の経験として、大学病院の当時研究指導していた非常勤の薬剤師が申請し、研究費を獲得できたことがあります。また、大学病院など研究機関の薬剤師でなくとも申請できる民間助成金が存在します。

現在の学生教育では研究費の集め方を教える機会はほとんどありません。そのため、研究の仕方は学生時代に学んでも、研究費の集め方は自力で習得しなければなりません。当研究室では、可能な限り学生にも研究費申請の機会を与えることで、自身で研究費を獲得することの大切さを学んでもらっています。

研究費申請は煩雑であり、報告書などを求められることが多いことから、なかなか申請する気持ちになれず、その結果、「研究資金がないから、やりたい臨床研究ができない。だから、薬剤師は後ろ向き研究しかできない」という考えになってしまいがちです。これを解決する最良の方法を提示することは難しいのですが、解決方法の一つとして研究チームを組んで研究プロジェクトを推進することをお勧めします。チームのメンバーには、研究ができるヒトだけを集める必要はありません。研究に必要なことは、冒頭にも述べたように、

頭脳・マンパワー・資金ですので、研究構想を練るヒト、実験を行うヒト、資金を集めるヒトといったように役割分担を決めてチームを結成することで、やりたい研究を推進できるようになるのではないのでしょうか。今後、研究を行うにあたって、研究費の集め方についても是非ご一考いただき、薬剤師主導の臨床研究を一つでも多く実現していただければと思います。

4. おわりに

医療技術や治療法は日々進化し、これは、医師主導臨床研究が多分に寄与しています。一方、薬の専門家である薬剤師は、医薬品適正使用に最も精通し日々研鑽しているにもかかわらず、新たな治療法を提案し評価していく臨床研究にあまり活躍できていません。私は、化学的な観点を併せ持ち薬物の特徴を考えることができる薬剤師・薬学研究者が、臨床研究に参加することでより有用な治療法の提案が可能になるのではないかと考えています。今回紹介した臨床研究は、薬剤師の日常業務から生まれたテーマであり、薬剤師の視点で成り立っています。また、多くのテーマが臨床現場に満ち溢れていると考えられます。

本稿では、薬剤師が提案する臨床研究を行う際の問題点や疑問点などの一部をわれわれの経験をもとに述べさせていただきましたが、臨床研究に至るまでには、多くの悩み・課題を克服し、臨床研究を推進していかねばなりません。なかでも、研究に必要な4要素の頭脳・マンパワー・研究資金・研究協力医師を集め、研究環境を整えるために多くの時間と労力を要しますが、これらのどれか一つが欠けても目指すべき研究はなされないと考えます。最後に、主体となって実施する研究者または研究グループには、ヤル気と何事にもめげない精神力、情熱を持ち続け、科学的に明確なエビデンスを携えて、研究立案し、医師に説明を行えば、必ず薬剤師主導臨床研究は可能であると私は信じます。

関節リウマチ患者を対象としたメトトレキサートの時間治療

Chronotherapy of methotrexate in patients with rheumatoid arthritis

藤 秀人¹⁾

Key words : 時間治療、生体リズム、関節リウマチ、メトトレキサート、炎症性サイトカイン

はじめに

関節リウマチ (RA) は関節滑膜を病変の主座とする進行性の全身性炎症性疾患であるが、発症機序は十分に明らかにされていない¹⁾。そのため、長年にわたりRAの薬物治療は痛みを抑制することに注視され、非ステロイド性抗炎症薬 (NSAID) や副腎皮質ホルモン薬が投薬されてきた²⁾。これらの治療は、痛みの抑制においてある程度の成果を挙げてきたが、関節破壊というRAの本質的な問題には十分に対応することはできなかった。1980年代に入り、炎症自体を抑える作用は有さないものの、RAの免疫異常を修飾することができる疾患修飾性抗リウマチ薬 (DMARD) を用いるようになり、RAの活動性を比較的コントロールしやすくなった³⁾。近年、RAの病態形成には、過剰に産生されるtumor necrosis factor- α (TNF- α) やinterleukin-1 β (IL-1 β)、interleukin-6 (IL-6) などの炎症性サイトカインが重要な役割を有することが明らかとなった⁴⁾。そして、抗ヒトTNF- α モノクローナル抗体製剤であるインフリキシマブやエタネルセプトなどの生物学的製剤の開発により、RAの炎症反応に関与する炎症性サイトカインの作用を効果的に抑制することで、従来の抗リウマチ薬と比較して高い有効性を示すようになった⁵⁾。しかし、高い薬剤費の問題や生物学的製剤に対する抗体産生など多くの問題があり、RA治療にとって生物学的製剤は、特効薬で

はない。科学技術の発達によって診断技術や分子生物学的な解析技術などが向上し、様々なRAの診断法や薬物治療法が開発されており、RA薬物治療は今まさにパラダイムシフトの真っただ中にある。そのため、この機会に再度RA病態の特徴や既存の抗リウマチ薬の特性を理解し、より効果的な治療法を検討すべきであると考えた。

そこで、本研究では、RA患者の多くで発現する朝のこわばりに着目した。早朝に現れる四肢の関節痛である朝のこわばりは、古くからよく知られているRAの特徴的な症状の一つである⁶⁾。また近年、朝のこわばりに対応するように血中IL-6やTNF- α などが早朝に増加することが報告され⁷⁾、炎症によるこわばりの発症機序に少なからず炎症性サイトカインの概日リズムが関与しているのではないかと考えられている。したがって、日中には現れず早朝に現れるこの関節痛はまさにRA患者固有の概日リズムであり、これらの成因を解明することで新たなRA治療の糸口が見出されるのではないかと考えた。

本研究では、RA発症後における炎症性サイトカインの概日リズムをRAモデル動物にて測定し、この概日リズムに合わせてメトトレキサート (MTX) を投薬することで、治療効果が向上できるか否か評価した。また、これらの研究結果をもとに、MTXを用いた既存の薬物療法と比較し時間治療法で、より効果的な治療成績が得られるかどうかRA患者を対象に臨床研究を実施した。

¹⁾To HIDETO 長崎大学病院 薬剤部

方 法

1. 基礎研究

1-1. 実験動物

実験動物は、DBA/1J雄性マウス及びMRL/lpr雄性マウスを使用した。マウスは、自由摂食飲水、明期を7:00-19:00とする12時間明暗周期、恒温恒湿の室内で2週間以上飼育した後、実験に使用した。本研究による動物実験は、長崎大学動物実験委員会の承認を得て、実験を行った。

1-2. CIA (collagen-induced arthritis) モデルの作成

初回感作 (Day 0) では凍結乾燥ウシⅡ型コラーゲン (CⅡ) を2mg/mLになるように、追加感作 (Day 14) ではCⅡを4mg/mLになるように、0.02M Tris-0.15M NaCl (pH 8.0) 溶液で溶解する。作成されたCⅡ溶液は、完全アジュバントと1:1の割合で混合し、初回感作では1mg/mL、追加感作では2mg/mLのw/oエマルジョンを作製した。感作は、ジエチルエーテル麻酔下、エマルジョン100μLを皮内注射した。

1-3. MTXの調整と投薬

MTXは、炭酸水素ナトリウム注射液に溶解し、体重10gに対して0.1mLマウスに腹腔内投与した。

CIAモデルマウスでは、初回感作後21日目から5:00または17:00にMTX(60mg/kg)または炭酸水素ナトリウム(control)を7日毎に計3回投薬した。MRL/lprマウスでは、10週齢からMTX(10mg/kg)または炭酸水素ナトリウム(control)を1:00または13:00に3日間連日腹腔内投与した後4日間休薬した。これを1クールとし2回繰り返した。

1-4. 血液中生体成分の測定

炎症性サイトカイン等の概日リズムの評価では、初回感作後28日目 (Day 28) のCIAマウス及び未感作DBA/1Jマウスを対象に、9:00及び13:00、17:00、21:00、1:00、5:00のいずれかの時刻に採血

を行い、血漿を採取した。また、10週齢 (RA未発症) と15週齢 (RA発症) のMRL/lprマウスを対象に上記の6時点に採血を行い、血漿を採取した。MRL/lprマウスを対象としたMTXの治療効果の評価では、Day14の9:00に採血を行い、血漿を採取した。

炎症性サイトカインの測定には、Mouse Inflammatory Four-Plex Antibody Bead Kitを用い、Luminex®100にて測定した。IgG-RF抗体価及び血清アミロイドA (SAA) 濃度は、ELISA法にて測定した。corticosterone濃度は、radioimmunoassay kitを用い測定した。

1-5. 関節炎スコアの評価

CIAモデルマウスの関節炎スコアは、MTX投薬開始後21日間連日観察した。評価法は、Kutty Selva Nandakumarらの関節炎の評価方法⁹⁾を参考にし、マウス1匹あたり40点満点で評価した。スコアについて以下に示す。前肢、後肢のそれぞれの指の第一関節、第二関節のどちらか一方、もしくは両方の腫脹が見られる場合は1点を付与した。前肢甲部と後肢の裏部において軽微な発赤・腫脹が見られる場合は3点、中程度で4点、重篤な場合5点を付与した。

1-6. MTXの血漿中薬物濃度の測定

DBA/1Jマウスに5:00または17:00にMTX(60mg/kg)を腹腔内投薬し、0.5及び1、2、4、6、8時間後に採血を行い、血清を採取した。MTX濃度は、TDx®メトトレキサート-Ⅱ・ダイナパック®を用いて測定を行った。

2. 臨床研究

被験者は、佐世保中央病院に外来通院中で、年齢20歳以上でRAと診断されDisease Activity Score (DAS) が3.2以上であり、現在RAに対する治療にてMTXを投薬され、生物学的製剤を使用していないまたは使用の意思を持たない患者とした。本研究に参加した被験者背景を表1に示した。

表1 被験者背景

被験者数	12例
年齢(歳)	63.8(41 - 80) ^{a)}
性別	6/6 ^{b)}
体重(kg)	51.8(34.7 - 72.0) ^{a)}
発症期間(年)	14(2 - 33) ^{a)}
MTX投与量(mg)	6(4 - 8) ^{c)}
病期・進行度	
Stage I	0
Stage II	2
Stage III	4
Stage IV	6
機能障害	
Class I	1
Class II	11

a) 平均値(最小値-最大値)、b) 男性/女性、c) 中央値(最小値-最大値)

用法・用量は、上記の基準を満たしインフォームド・コンセントが得られた被験者に対し、被験者が投薬されていた既存の投与方法を基準として設定し、1週間における総投与量及び投与回数を変更せずに、時間治療型MTX投薬レジメンでは、1日1回寝る前投与とした。主要評価項目の有効性にはDAS 28による疾患活動性を、副作用では白血球減少を評価し、時間治療変更時と時間治療開始1ヶ月後のデータを比較検討した。

本臨床研究は、長崎大学病院 臨床研究倫理委員会の承認を受け実施した。

3. 統計解析

概日リズム解析には、one-way ANOVA及びCosinor法を用いた。関節炎スコアの評価は、多群間の比較にはKruskal-Wallis testを行い、特定群間の比較検定にはMann-WhitneyU test with Bonferroni correctionを用いた。その他の多群間の比較にはone-way ANOVAを行い、特定群間の比較検定にはscheffe's testを用いた。また、2群間の比較には、Paired *t* testまたはStudent's *t* testで解析を行った。なおすべての検定において有意水準を5%以下とした。

結 果

1. CIAマウスにおける血漿中TNF-α濃度の概日リズム

血漿中TNF-α濃度は、未感作群及びCIA群のいずれも明期に高値、暗期に低値を示す有意な概日リズムが認められた(未感作群: F from ANOVA=4.08, $P<0.01$; P from Cosinor<0.01; CIA群: F from ANOVA 3.93, $P<0.01$; P from Cosinor<0.01)。また、CIA群の血漿中TNF-α濃度はいずれの時刻においても未感作群と比較して有意に高値を示した($P<0.01$) (図1)。

2. CIAマウスにおける関節炎抑制効果におよぼすMTX投薬時刻の影響

図2Aには、初回感作後21日目から42日目における関節炎スコアを示した。MTXの初回投薬(Day 21)後、5:00投薬群は速やかな関節炎スコアの低下が確認されたが、投薬後4日目より再び増加傾向に転じた。一方、17:00投薬群ではcontrol群とほぼ同等のスコア推移を示した。続いて2回目(Day 28)、3回目(Day 35)と反復投与を行ったとき、MTX投薬により5:00投薬群は再び関節炎の低下が確認されRAの発症は抑制され

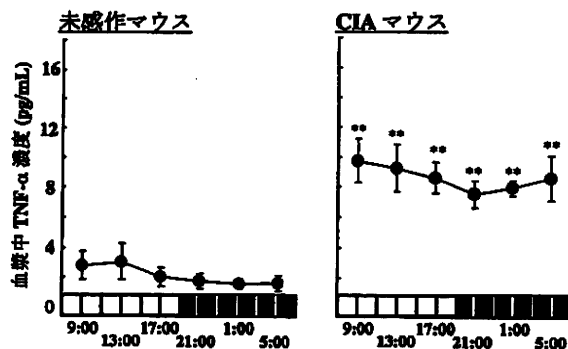


図1 未感作マウス及びCIAマウスにおける血漿中TNF- α 濃度の概日リズム
データは、平均値±標準偏差を示し、未感作マウスは5または6匹、CIAマウスは9匹である。未感作群とCIA群間で、各サンプリング時刻において有意な差が認められた場合は、**: $P < 0.01$ で示した。

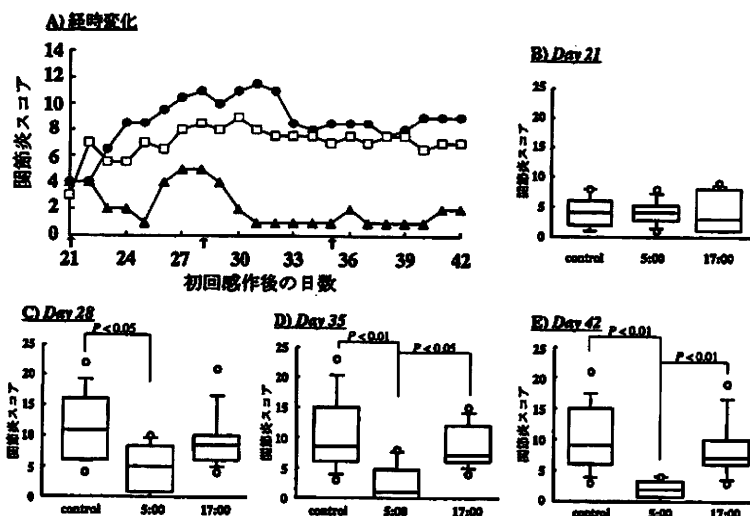


図2 CIAマウスを対象としたMTXの投薬時刻の違いによる抗リウマチ効果への影響
Aのデータは中央値で、B-Dのデータは箱ひげ図で示し、下から最小値、第1四分点、中央値、第3四分点、最大値を表している。Control群(●)は14匹、5:00投薬群(▲)は9匹、17:00投薬群(□)は10匹である。

たのに対して、17:00投薬群はcontrol群と同等の高い関節炎スコア推移を保ち続けた。

また、Day 21、Day 28、Day 35及び最終観察日であるDay 42において、各群におけるスコアの分布を図2B-Eに示した。Day 28では5:00投薬群はcontrol群と比較して関節炎スコアが有意に抑制され ($P < 0.05$)、またDay 35では5:00投薬群の関節炎スコアは、control群及び17:00投薬群と比較

して有意に低値を示した ($P < 0.01$ 、 $P < 0.05$)。さらに、Day 42でも5:00投薬群はcontrol群及び17:00投薬群と比較して有意に低い関節炎スコアを示した ($P < 0.01$ 、 $P < 0.01$)。

3. MRL/lprマウスにおけるRA症状の進行にともなう生体成分の概日リズムの変化
炎症マーカーであるSAAは、RA症状の進行と

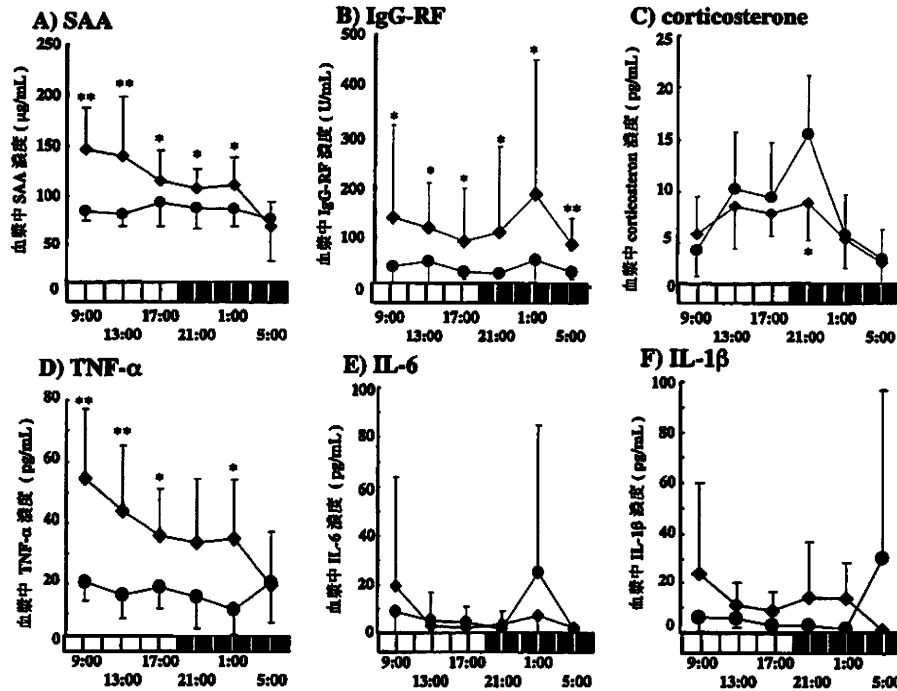


図3 MRL/lprマウスにおけるRA発症前・後の血漿中SAA、IgG-RF、corticosterone、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 濃度の概日リズム
 データは、平均値±標準偏差を示し、SAA、IgG-RFは15または16匹、その他は6-8匹である。RA未発症（10週齢）マウスは●で、RA発症（15週齢）マウスは◆で表し、各サンプリング時刻において有意な差が認められた場合は、それぞれ*： $P < 0.05$ 、**： $P < 0.01$ で示した。

共に10週齢と比較し15週齢で有意に上昇した（17:00、21:00、1:00： $P < 0.05$ 、9:00、13:00： $P < 0.01$ ；図3A）。また10週齢のSAAでは概日リズムが認められなかったのに対して、15週齢のSAAは明期に高値を暗期に低値を示す有意な概日リズムが認められた（F from ANOVA=8.74、 $P < 0.01$ ；P from Cosinor < 0.01 ；図3A）。

IgG-RF抗体価はサンプル時刻の別を問わずRA症状の進行と共に一様に上昇し、10週齢と比較し15週齢の各時点で有意に上昇した（9:00、13:00、17:00、21:00、1:00： $P < 0.05$ 、5:00： $P < 0.01$ ；図3B）。また10週齢及び15週齢のIgG-RF抗体価は共に有意な日内変動は認められなかった。

血漿中corticosterone濃度は21:00において10週齢と比較し15週齢で有意に減少した（ $P < 0.05$ ；図3C）。また10週齢と15週齢のcorticosterone濃度

は共に暗期前半にピークを明期前半にトラフを示す有意な概日リズムが認められた（10週齢：F from ANOVA=6.64、 $P < 0.01$ ；P from Cosinor < 0.01 、15週齢：F from ANOVA=3.21、 $P < 0.05$ ；P from Cosinor < 0.01 ；図3C）。しかし、血漿中corticosterone濃度の概日リズムは10週齢と比較しRA症状が進行した15週齢で周期性及び振幅幅ともに低下を示した。

血中炎症性サイトカインを網羅的に測定した結果、TNF- α 濃度は1:00及び9:00、13:00、17:00の各時点において10週齢と比較し15週齢で有意に上昇した（17:00、1:00： $P < 0.05$ ；9:00、13:00： $P < 0.01$ ；図3D）。また、IL-1 β 及びIL-6濃度は、10週齢のほとんどのマウスにおいて測定感度以下であったが、15週齢では10週齢と比較しこれらの濃度は上昇した。しかし、RA症状が進行した15週齢でも

高発現するもの、ほとんど発現しないものなどマウス間の個体差は非常に大きかった。10週齢のMRL/lprマウスにおいて測定したサイトカインのすべてで概日リズムは認められなかった。15週齢のMRL/lprマウスにおいてもIL-1 β 及びIL-6濃度に明瞭な概日リズムは認められなかった。しかし、TNF- α 濃度は15週齢では明期前半にピークを暗期後半にトラフを示す有意な概日リズムが認められた (F from ANOVA=2.73、 $P<0.05$; P from Cosinor <0.01 ; 図3D)。

4. MRL/lprマウスにおける炎症及び自己免疫反応に及ぼすMTXの投薬時刻の影響

MTXの投薬開始後14日目のSAA濃度は、control群及び13:00投薬群と比較し1:00投薬群で

有意に低値を示した ($P<0.01$ 、 $P<0.05$; 図4)。MTXの投薬開始後14日目のIgG-RF抗体価は、control群と比較し1:00投薬群で有意に低値を示した ($P<0.05$; 図4)。MTXの投薬開始後14日目のTNF- α 濃度は、control群と比較し1:00投薬群で有意に低値を示した ($P<0.05$; 図4)。

5. CIAマウスにおける薬物動態に及ぼすMTXの投薬時刻の影響

MTX投薬後0.5及び1、2時間目の血中濃度では、17:00投薬群が5:00投薬群と比較し高値を示し (0.5hr: $P<0.05$ 、2hr: $P<0.01$)、4時間目以降では5:00投薬群が17:00投薬群と比較し高い血中濃度を示した (4hr, 6hr: $P<0.01$ 、8hr: $P<0.05$; 表2)。同一個体より経時的に採血を行えなかったため各

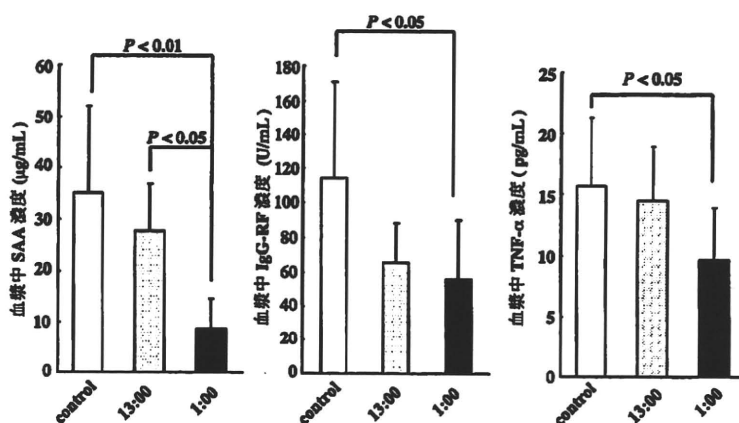


図4 MRL/lprマウスを対象としたMTXの投薬時刻の違いによる抗リウマチ効果への影響

データは、平均値±標準偏差を示し、control群は14または15匹、MTX投薬群は8匹である。

表2 5:00または17:00にMTX (60mg/kg, i.p.) を投薬したときの血中濃度及び薬物動態パラメータ

	MTX 濃度 (µg/mL)						AUC ₀₋₈ (µg/mL·hr)	MRT ₀₋₈ (hr)
	0.5 hr	1 hr	2 hr	4 hr	6 hr	8 hr		
5:00	17.1 ± 1.92	6.37 ± 3.47	0.73 ± 0.37	0.113 ± 0.017	0.072 ± 0.023	0.039 ± 0.013	23,622	0.654
17:00	23.1 ± 4.07	8.64 ± 1.47	1.67 ± 0.52	0.037 ± 0.009	0.009 ± 0.006	0.020 ± 0.015	32,305	0.585
P 値	<0.05	N.S.	<0.01	<0.01	<0.01	<0.05		

各データは平均±標準偏差で示した (n=5-6)。N.S.: 有意差なし

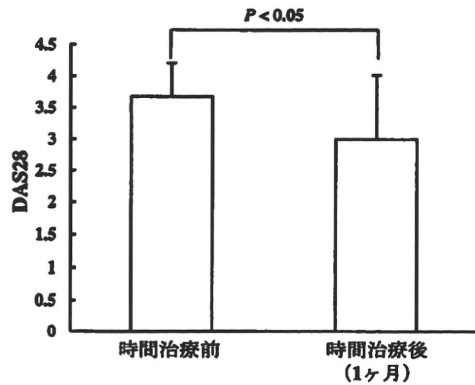


図5 RA患者を対象としたMTXの時間治療によるDAS28への影響
被験者は12例で、データは平均値±標準偏差で示した。

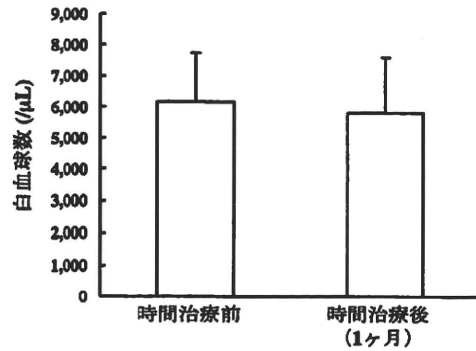


図7 RA患者を対象としたMTXの時間治療による白血球数への影響
被験者は12例で、データは平均値±標準偏差で示した。

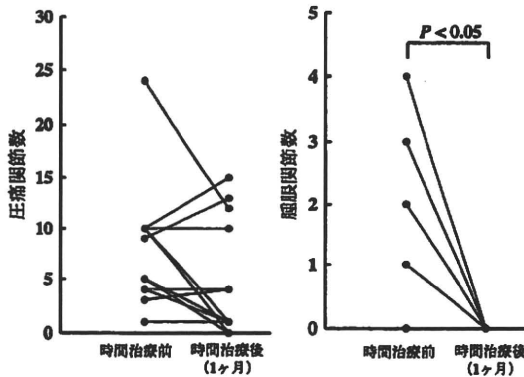


図6 RA患者を対象としたMTXの時間治療による圧痛関節数及び腫脹関節数への影響
被験者は12例である。

時点において平均血中濃度を用いてモーメント解析を行った結果、AUC_{0-∞}は5:00投薬群で23,622 μ g/mL \cdot hr、17:00投薬群で32,305 μ g/mL \cdot hrであり、5:00投薬群と比較し17:00投薬群のAUC_{0-∞}は約1.4倍高かった。

6. RA患者を対象としたMTXの時間治療による抗リウマチ効果への影響

時間治療開始1ヶ月後におけるDAS28の平均値は2.99であり、時間治療変更時のDAS28の平均値は3.67であった。時間治療を開始することで時間治療開始前と比較し、被験者のDAS28は有意に減

少した ($P < 0.05$; 図5)。多くの症例で、圧痛関節数は減少傾向にあり、腫脹関節数ではすべての被験者で腫脹が消失した ($P < 0.05$; 図6)。

7. RA患者を対象としたMTXの時間治療による骨髄抑制への影響

時間治療開始1ヶ月後では、時間治療変更時と比較し骨髄抑制に有意な差異は認められなかった (図7)。

考 察

本研究では、RAモデル動物を用いて、炎症性サイトカイン等の概日リズム解析及びMTXの時間薬理的検討、及びRA患者を対象とした時間治療に関する臨床研究を実施した。

RAモデル動物には、慢性的で破壊的な多発性関節炎を示すなどRA患者と多くの点で相同性が認められているCIAマウスと自然発症型リウマチモデル動物であるMRL/lprマウスを使用した。これらのRA動物におけるTNF- α 濃度の概日リズムは、RAを発症することで、明期に高値、暗期に低値を示す明瞭な概日リズムが認められた。また、炎症の指標であるSAA濃度もRAを発症することで、明期に最高値を示す概日リズムが両モデル動物で現れた (一部未提示)。SAAは、C-reactive

protein (CRP) と同様に急性期の炎症反応を評価する指標でIL-1やIL-6、TNF- α などの炎症性サイトカインによって惹起されることが知られている。したがって、RAの特徴である関節の痛みや朝のこわばりなどの炎症の概日リズムには、炎症性サイトカインの概日リズムが密接に関連していると考えられる。非常に興味深いことに、RA患者の炎症性サイトカインの概日リズムもまた、早朝に最高値となる概日リズムを示す⁷⁾。一般的にRA患者は昼行性であり、RAモデル動物は夜行性である。このように活動リズムが異なる場合、グルココルチコイドをはじめとする多くの生体成分の概日リズムは、ヒトとげっ歯類で逆位相となる。そのため、病状が発現する時刻は、ヒトとげっ歯類では、約12時間異なることが多い。しかし、RA症状の概日リズムでは、非常に近似した位相をヒトとげっ歯類で示すことが明らかとなった。したがって、活動リズムに関与せず、ヒトとげっ歯類で共通した位相を有する生体成分が、RAにおける炎症などの概日リズム形成に重要な役割を有するのではないかと考えられる。今後、RAモデル動物を用いて、RA発症前から経時的にRA発症症状の進行に伴う病態及び生体成分の変化を時間生物学的な観点より評価することで、複雑なRA発症機序の解明が可能になると考えられる。

次に、炎症性サイトカインの概日リズムを考慮し、MTXの投薬タイミングの違いによる抗リウマチ効果への影響について検討した。CIAマウスは四肢の関節が腫脹する特徴を有するRAモデル動物であるため、四肢の関節炎をスコア化し評価した。MTX投与初期より投薬時刻の違いにより関節炎抑制効果に差異が現れ、最終投薬後7日目 (Day 42) の関節炎スコアは、control群及び17:00投薬群と比較し5:00投薬群で有意に軽減できることが明らかとなった⁹⁾。次に、血液学的にRA患者と非常に近似しているMRL/lprマウスでは、SAAやTNF- α 濃度さらにはRA発症の指標となるIgG-RF濃度を測定した。その結果、TNF- α 濃度やIgG-RF濃度は、control群と比較し1:00投薬群で有意

に減少した。また、1:00投薬群のSAA濃度は、control群及び13:00投薬群と比較し有意に低値を示した¹⁰⁾。以上より、MTXの投薬時刻の違いによって炎症反応に差異が現れることが明らかとなった。そして、治療効果が高かった時刻は、いずれのRAモデル動物においても1日の中でTNF- α が増加し始める時間帯にMTXを投薬した時間帯であった。したがって、抗リウマチ薬の効果の向上には、投薬タイミングを考慮することが重要であることが考えられる。

本邦では、MTXの投薬は1週間を1単位として1日目朝・夕、2日目朝を基本とする投薬がなされている。RA患者では、早朝にこわばりや炎症性サイトカインが増加する概日リズムがあることから⁷⁾、動物実験の結果を含め総合的に判断すると、RA患者では夜間にのみMTXを投薬することで、より高い抗リウマチ効果が得られるのではないかと考えられた。そこで、本研究ではRA患者を対象に従来の治療法からMTXの投与量や投薬回数を変えずに服用時刻のみを寝る前に変更する時間治療を実施することで、治療効果が得られるか否か検討した。現在、20例のエントリーがあり、そのうち12名の被験者で時間治療を開始し1ヶ月が経過した。時間治療開始後1ヶ月間でDAS28は平均で0.68減少し、時間治療を開始することで有意にDAS28の低下が認められた。また、時間治療開始後わずか1ヶ月であるにもかかわらず、12例中4例で臨床的寛解に到達した。1ヶ月間の時間治療では、炎症反応の低下はそれほど認められないが、本研究で得られたデータとして特徴的なものとして、腫脹関節数がすべての被験者で消失したことが挙げられる。圧痛関節数も減少傾向にあり、関節痛の低減はRA患者のQOLを非常に向上できることから、MTXの時間治療の有用性は高いと考えられる。また、寝る前に投薬する時間治療を導入することでMTX排泄遅延による副作用の増大が危惧されたが、骨髄抑制が現れた被験者はなく、安全にMTXの投薬が実施できている。以上より、MTXは生物学的製剤と比較し薬剤費が安

く、世界的にアンカードラッグとして最も使用されている抗リウマチ薬であるため、MTXの時間治療に関する本研究は、RA療法において非常に大きなインパクトを与えるものと期待できる。

本臨床研究は20症例のRA患者を対象に、時間治療による3ヶ月間の薬効評価試験を実施しており、途中経過ではあるが非常に良好な成果が得られている。また、現在エントリーしている被験者に対して12ヶ月間の長期試験を継続するための手続きを行っている。今後は、より科学性の高い評価を行うために、無作為化比較試験を実施し、RAにおけるMTXの時間治療の有用性を検証する。

本研究では、RAモデル動物を用いて、明期に高値を示す概日リズムがRA症状に存在することを明らかにした。また、これらの概日リズムを基盤に抗リウマチ薬MTXの投薬タイミングを設定

することで、より高い抗リウマチ効果が得られることを明らかにした。そして、これらの基礎研究をベースに、本邦のMTXによる薬物療法を考察し、寝る前にのみMTXを投薬する時間治療法を提案し、臨床研究を実施している。現在、途中経過ではあるが、時間治療開始わずか1ヶ月であるにもかかわらず、有意なRAの症状改善が認められている。以上より、RA治療において、MTXの時間治療は有用な治療法の一つであると考えられる。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、研究費を助成いただいた財団法人臨床薬理研究振興財団に深謝申し上げます。

文 献

- 1) van Boekel MA, Vossenaar ER, van den Hoogen FH, et al. Autoantibody systems in rheumatoid arthritis: specificity, sensitivity and diagnostic value. *Arthritis Res* 2002; **4**: 87-93.
- 2) Kowanko IC, Pownall R, Knapp MS, et al. Time of day of prednisolone administration in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1982; **41**: 447-52.
- 3) Cohen S, Cannon GW, Schiff M, et al. Two-year, blinded, randomized, controlled trial of treatment of active rheumatoid arthritis with leflunomide compared with methotrexate. Utilization of Leflunomide in the Treatment of Rheumatoid Arthritis Trial Investigator Group. *Arth Rheum* 2001; **44**: 1984-92.
- 4) Olsen NJ and Stein CM. New drugs for rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.* 2004; **350**: 2167-79.
- 5) Klareskog L, van der Heijde D, de Jager JP, et al. Therapeutic effect of the combination of etanercept and methotrexate compared with each treatment alone in patients with rheumatoid arthritis: double-blind randomised controlled trial. *The Lancet* 2004; **363**: 675-81.
- 6) Bellamy N, Sothorn RB, Campbell J, et al. Rhythmic variations in pain, stiffness, and manual dexterity in hand osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2002; **61**: 1075-80.
- 7) Straub RH and Cutolo M. Circadian rhythms in rheumatoid arthritis: implications for pathophysiology and therapeutic management. *Arth Rheum* 2007; **56**: 399-408.
- 8) Nandakumar KS, Svensson L, Holmdahl R. Collagen type II-specific monoclonal antibody-induced arthritis in mice: description of the disease and the influence of age, sex, and genes. *Am J Pathol* 2003; **163**: 1827-37.
- 9) To H, Irie S, Tomonari M., et al. Therapeutic index of methotrexate depends on circadian cycling of tumor necrosis factor- α in collagen-induced arthritis rats and mice. *J Pharm Pharmacol* 2009; **61**: 1333-8.
- 10) 藤秀人. 抗リウマチ薬の時間治療への展望. *時間生物学* 2009; **15**: 33-9.

Methotrexate Chronotherapy is Effective Against Rheumatoid Arthritis

Hideto To,¹ Hiromichi Yoshimatsu,² Mari Tomonari,⁴ Hiroaki Ida,^{5,6} Toshiyuki Tsurumoto,⁷ Yasuhiro Tsuji,⁸ Emi Sonemoto,⁸ Noriko Shimasaki,⁴ Satoru Koyanagi,³ Hitoshi Sasaki,⁴ Ichiro Ieiri,² Shun Higuchi,² Atsushi Kawakami,⁶ Yukitaka Ueki,⁸ and Katsumi Eguchi⁶

¹Department of Medical Pharmaceutics, Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Sciences for Research, University of Toyama, Toyama, Japan, ²Clinical Pharmacokinetics, ³Pharmaceutics, Division of Clinical Pharmacy, Department of Medico-Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan, ⁴Department of Hospital Pharmacy, Nagasaki University Hospital, Nagasaki, Japan, ⁵Division of Respiriology, Neurology, and Rheumatology, Department of Medicine, Kurume University School of Medicine, Fukuoka, Japan, ⁶Unit of Translational Medicine, Department of Immunology and Rheumatology, ⁷Department of Macroscopic Anatomy, Graduate School of Biomedical Science, Nagasaki University, Nagasaki, Japan, ⁸Sasebo Chuo Hospital, Center for Rheumatic disease, Sasebo, Japan

Methotrexate (MTX) is the most important drug for treating rheumatoid arthritis (RA). It has been stated that cytokines play an important role in the pathogenesis of RA, and that cytokine levels increase and show 24-h rhythms in RA patients. Previously, we found that arthritis was relieved after the administration of MTX at specific times in synchronization with the 24-h rhythm of tumor necrosis factor (TNF)- α in collagen-induced arthritis (CIA) animals. Based on our findings in an earlier study of the dosing time-dependent effects of MTX in MRL/lpr mice, which develop autoimmune disorders that share similarities with human RA, we examined here the utility of MTX chronotherapy in Japanese RA patients. In an initial animal modeling study, we collected blood from MRL/lpr mice at different times (2, 6, 10, 14, 18, or 22 hours after the light was turned on [HALO]), and we measured TNF- α mRNA expression in leukocytes. MTX was administered to the mice at two different dosing times (6 or 18 HALO), and various blood parameters were measured to estimate arthritis activity. TNF- α mRNA levels showed a clear 24-h rhythm with a peak at 22 HALO and a trough at 18 HALO after RA had developed. In these MRL/lpr mice, inflammation and TNF- α were markedly reduced when the MTX dosing time was matched to the time (18 HALO) when the TNF- α level began to increase. We then applied these findings to Japanese RA patients by switching them from the standard MTX three times/wk (day 1: after breakfast and supper; day 2: after breakfast schedule), to chronotherapy, in which the dose and number of doses/wk were not changed but MTX was administered once-a-day at bedtime. Disease Activity Score (DAS)28, modified health assessment questionnaire (MHAQ), and adverse effects were assessed. With MTX chronotherapy, DAS28, which is commonly used to quantitatively assess RA symptoms, was significantly improved at all follow-up clinical visit times compared with the baseline (vs. 1 mo: $p = .0197$, 2 mos: $p = .0107$, 3 mos: $p = .0087$). Significant symptom recovery was observed in 41.2% of patients, and 23.5% of patients achieved clinical remission during the 3 mos of follow-up. Functional capacity of RA patients, as indicated by the MHAQ, was markedly improved by chronotherapy. There were no severe adverse effects. Thus, we demonstrated (i) inflammation and plasma TNF- α concentrations were significantly reduced in MRL/lpr mice treated with MTX at 18 HALO, the time when TNF- α mRNA level began to increase; and (ii) MTX bedtime chronotherapy was safe, markedly reduced disease activity, and improved the functional capacity of RA patients. The findings on RA patients show that bedtime MTX chronotherapy can improve RA symptoms compared to the current standard dosing methods. (Author correspondence: hide-to@umin.net)

Keywords: Chronotherapy, Human trials, Methotrexate, Rheumatoid arthritis, Rodent models, Ig-GRF, Serum Amyloid A, TNF- α

INTRODUCTION

Methotrexate (MTX) is one of the most commonly used disease-modifying antirheumatic medications, and it induces a high American College of Rheumatology improvement response rate (Cohen et al., 2001), inhibits

joint inflammation (Kremer et al., 1992; Weinblatt et al., 1992), and conveys marked survival benefit (Choi et al., 2002) in rheumatoid arthritis (RA) patients. However, MTX also causes adverse effects, such as myelosuppression and interstitial pneumonitis, because it is an

Submitted September 3, 2010, Returned for revision October 19, 2010, Accepted December 30, 2010

Address correspondence to Hideto To, PhD, Department of Medical Pharmaceutics, Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Sciences for Research, University of Toyama, 2630 Sugitani, Toyama 930-0194, Japan. Tel.: +81-76-415-8811, Fax: +81-76-415-8811; E-mail: hide-to@umin.net

anticancer agent. Therefore, it is necessary to design a safe and effective dosing protocol for MTX treatment.

Chronotherapy, the dosing of medications with reference to critical 24-h rhythms of disease activity and the pharmacokinetics and pharmacodynamics of medications, has been applied for the treatment of various medical conditions, for example, asthma, hyperlipidemia, and hypertension (D'Alonzo et al., 1995; Hermida et al., 2010; Haus, 2007; Saito et al., 1991; Smolensky et al., 2007). Moreover, it has been shown to decrease the adverse effects of anticancer drugs in basic and clinical studies (Kodama et al., 2009; Lévi et al., 1997; Tabuchi et al., 2005). In previous studies, MTX showed greater therapeutic effects against childhood leukemia when administered in the evening than in the morning (Rivard et al., 1993; Schmiegelow et al., 1997). MTX also was found to show dosing time-dependent toxicity in mice (Ohdo et al., 1997).

RA is an autoimmune disorder of unknown etiology, and morning stiffness is a well-known characteristic (Arnett et al., 1988). It was reported in recent years that chronotherapy using modified-release prednisone was more effective against RA than standard immediate-release prednisone (Buttgereit et al., 2008). However, chronotherapy involving MTX, which is the first-line disease-modifying antirheumatic drug (DMARD) treatment against RA, has not been examined. In recent years, it has been found that cytokines play an important role in the pathogenesis of RA (Chu et al., 1991) and that the levels of proinflammatory cytokines are increased in RA patients. Blood cytokines show 24-h rhythms in RA patients (Arvidson et al., 1997; Sulli et al., 2002), and these rhythms correspond to morning stiffness. We, therefore, considered that RA therapy associated with cytokine 24-h rhythms might be more effective than the RA therapy protocol currently used in clinical practice. It was previously reported that collagen-induced arthritis (CIA) mice, which show a similar pathology, immunology, and genetics to RA patients, also showed similarly augmented cytokine levels (Marinova-Mutafchieva et al., 1997; Mussener et al., 1997). We previously studied whether MTX exhibited a dosing time-dependent efficacy and toxicity using CIA model animals. We found a daily variation in plasma tumor necrosis factor (TNF)- α concentration in the CIA model after RA had developed and that arthritis was relieved after the administration of MTX when synchronized to the 24-h rhythm of TNF- α (To et al., 2009). Thus, we expected the clinical application of MTX chronotherapy to improve its anti-rheumatic effect. Here, we assessed the dosing time-dependent effects of MTX in MRL/lpr mice, which develop autoimmune disorders that share similarities with human RA (Abe et al., 1980; Koopman & Gay, 1988). Then, based on our findings of the animal studies and the 24-h TNF- α rhythms of RA patients, we changed the dosing schedules of RA patients from the standard MTX schedule, in which MTX is administered three times/wk (day 1: after breakfast and supper; day

2: after breakfast only), to a chronotherapy schedule, in which the dose and number of doses/wk were not changed, but MTX was administered once-a-day at bedtime, to examine whether a dosing-time dependency of the therapeutic effects of MTX treatment could be detected in the RA patients.

METHODS

Animals

Male MRL/MpJ-*Tnfrsf6*^{lpr}/Crlj (MRL/lpr) mice were purchased from Charles River Japan (Japan). They were housed 6–10/cage under standardized light-dark cycle conditions (lights-on and lights-off at 07:00 and 19:00 h, respectively) at a room temperature of 24°C \pm 1°C (range) and relative humidity of 60% \pm 10% (range) and were allowed free access to food and water.

Patients

Participants were enrolled at Sasebo Chuo Hospital in Japan from July to September 2009. All were outpatients, aged 20 yrs or older, had a diagnosis of adult-onset RA, a disease duration of \geq 3 mos, and Disease Activity Score (DAS)28 of \geq 3.2, and were not using biological drugs. The patients had to have received MTX for \geq 3 mos before the study and to have received a stable dose for \geq 2 mos before the screening. Exclusion criteria included treatment with unstable doses of DMARD within 3 mos of screening, prior treatment with tacrolimus or mizoribine, current use of \geq 10.1 mg/day of prednisolone, and beginning prednisolone treatment within 1 mo of screening. Individuals with important concurrent medical diseases, who had undergone surgery within 6 mos, or pregnant were not excluded.

Ethics

All experiments were conducted ethically (Portaluppi et al., 2010). Animal experiments were performed after formal approval had been received from the Institutional Ethical Committee for Research on Animals of Nagasaki University, and human trials were conducted after all participants gave their written informed consent before the screening. The study protocol was approved by the ethics committees for each site and was registered with the UMIN Clinical Trials Registry under number UMIN000000928.

Preparation of MTX in MRL/lpr Mice

MTX was dissolved in 7% sodium bicarbonate, prepared at a suitable concentration, and intraperitoneally (i.p.) administered at 0.01 mL/g.

Twenty-Four-Hour Rhythm of TNF- α mRNA Expression in MRL/lpr Mice

Blood was taken from the hearts of 10- and 15-wk-old MRL/lpr mice ($n = 5-7$) at different times (2, 6, 10, 14, 18, or 22 hours after the light had been turned on [HALO]), and leukocytes were obtained. Total RNA was extracted from the leukocytes using TRIzol reagent