

表 4. パロモマイシンの副作用 (n = 145)

項目	例数	%
有	23	15.9
無	100	69.0
不明	22	15.2

であり、投与前の肝機能で AST 35、ALT 31、LDH 189、 $\gamma$ -GTP 62、T-Bili 2.7 であったが、総量 4,000 mg (16 錠) 投与後に、それぞれ 88、115、263、48、0.7 となり (他に ALP 190)、ただちに服用中止としたが、その約 10 日後には、それぞれ 20、45、181、50、1.4 と改善傾向と認めた。皮疹が報告されたのは 47 歳の日本人男性で、アメーバ性大腸炎症例であり、本薬剤 1,500 mg/日・分 3 を 1 日服用して体幹と四肢に掻痒を伴う膨疹・紅斑が出現し、本人の意志で服薬中止となった。

副作用による服薬中止は、上記の血便 (偽膜性腸炎)、肝機能障害、皮疹各 1 例ずつと、下痢の 4 例、計 7 例 (4.8%) であった。下痢の症例はいずれも服薬中止後に改善が見られた。

なお、2 歳児と 6 歳児では副作用は報告されなかった。また、HIV (+) と記載されていた 31 例での副作用の有無を見ると、「有」が 4 例 (12.9%)、「無」が 18 例 (58.1%)、「不明」が 9 例 (29.0%) で、HIV (+) の記載がなかった 114 例では、「有」が 19 例 (16.7%)、「無」が 82 例 (71.9%)、「不明」が 13 例 (11.4%) であった。

#### 薬剤の効果

無症状/軽症シスト排泄者で、便中栄養体の検出、便を用いた PCR 診断、大腸生検組織での原虫確認などにより、*E. dispar* でなく赤痢アメーバによる感染と判定された 12 例に本薬剤が投与されたが、全例で治療後にシスト陰性化が見られた。

ジアルジア症の 1 例では、以前にメトロニダゾールの 1,500 mg/日・10 日間および 2,250 mg/日・21 日間の治療で無効であったが、本薬剤 750 mg/日・5 日間の治療で原虫は消失した。

#### D. 考察

赤痢アメーバ症で非侵襲性感染 (無症状シスト排泄者) の場合、パロモマイシンあるいはフロ酸ジロキサニドなどの luminal agent が単独で用いられる。また、侵襲性感染 (アメーバ性大腸炎、アメーバ性肝膿瘍など) では急性期治療にニトロ

表 5. パロモマイシンの副作用内訳 (n = 145)

項目	例数	%
軟便～下痢	17	11.7
悪心	2	1.4
食欲不振	1	0.7
腹部膨満感	1	0.7
排ガス増加	1	0.7
胸やけ	1	0.7
血便 (偽膜性腸炎)	1	0.7
頭痛	1	0.7
眠気	1	0.7
皮疹	1	0.7
肝機能障害	1	0.7

イミダゾール系薬を用いるが、そのみでは 40～60% で原虫が残存すると言われており、世界的な教科書やガイドラインにおいて、再発予防に luminal agent の使用が勧められている。本研究班では以前、luminal agent としてフロ酸ジロキサニドを導入し、多くの症例に使用した実績があるが、同薬剤が入手困難となったため、2004 年にはパロモマイシンの導入を行なった。その後、年間数十例に使用し、導入薬剤のなかでは使用が多い薬剤となった。パロモマイシンは殆どの場合、赤痢アメーバ症急性期治療の後の再発予防目的に使われるため、その効果判定は困難であるが、安全性の検討を行い、国内でのより適切な薬剤使用に役立たせる必要がある。また少数例ではあっても、赤痢アメーバ症の無症状/軽症シスト排泄者における有効性を検討することも重要である。

本薬剤は、我が国では 1960 年代に「硫酸パロモマイシンカプセル 250 mg」および「アミノサイジン錠」として、赤痢菌、大腸菌、腸炎ピブリオなどによる腸炎を対象に、2 社より承認取得がなされた。その後、前者は 1982 年、後者は 1998 年に承認整理が行われるまで使われていた。文献上、1980 年代～1990 年代において広節裂頭条虫/日本海裂頭条虫、大複殖門条虫、無鉤条虫などの駆虫に用いられた報告が見られ、殆どが有効性および安全性に特別な問題はないとしている。ただし 50 mg/kg の単回投与が多いため、赤痢アメーバ症に用いる用法・用量での安全性を確保するものではなかった。

本薬剤の有効性や安全性に関する報告は 1950 年代末に始まり、1960 年代に多く出されている。この時期には、赤痢アメーバとその後明らかにな

る非病原種である *E. dispar* の区別が不可能であったので、純粋に前者への効果を見ていたとは言いがたい。しかし、安全性に関するデータは十分参考になると思われる。エチオピアでは赤痢アメーバ症を対象に、1~75歳の96例(61例は16~40歳)に投与され、約半数で2~3日目に下痢が生じたが、投与終了の5日目には回復していた。米国では赤痢アメーバ症あるいは *Dientamoeba fragilis* (二核アメーバ) 症の79例に投与されたが、下痢13例(16.4%)、悪心5例(6.3%)、頭痛3例(3.8%)、眩暈、仙痛/鼓腸がそれぞれ2例(2.5%)、掻痒、蕁麻疹、胸やけ、不眠がそれぞれ1例(1.7%)であった。また、米国ではアメーバ性大腸炎に罹患した男性同性愛者114例に投与し、軟便~下痢が67%に見られたが、多くは軽症であった。他に悪心が2例、便秘が1例、眩暈が1例見られたが、これらは投与終了後に改善していた。また、服用中止は見られなかった。ケニアでは6~80歳のアメーバ性大腸炎417例をランダム化し、複数の治療に割り付けた。本薬剤は100例に投与されたが、忍容性は良好で、”poor”な症例は1%に過ぎなかった、と述べられている。

今回我々が集計した副作用としても腹部症状が殆どあったが、それらの多くは服薬継続が可能であり、特別な問題とは思えなかった。他に、偽膜性腸炎と肝機能障害がそれぞれ1例ずつ報告された。調べた限りにおいて、これらの副作用は過去に報告されていない。偽膜性腸炎の症例については主治医がコメントしている如く、他の抗菌薬による可能性を否定できない。肝機能障害の症例については、投与前から肝臓の問題があったと考えられ、純粋に本薬剤の副作用とは言えない可能性がある。年齢では、2歳児と6歳児の小児においても副作用は見られなかった。また、治療報告書におけるHIV陽性者の記載は必ずしも完璧でないと思われるが、本薬剤投与の必要性が高いHIV陽性者において、特に副作用が問題となることを示す結果ではなかった。

本研究では、赤痢アメーバ症の無症状/軽症シスト排泄者において本薬剤を用いた場合、治療効果は良好であった。ベトナムにおいて、*E. dispar* の可能性を除外した赤痢アメーバ症の無症状シスト排泄者(成人)計71例を対象に、ランダム化

してパロモマイシンあるいはフロ酸ジロキサニドによるシスト消失効果を比べたところ、前者で85~87%、後方で51~57%であり、前者の方が有意に優れていた。本研究からも、パロモマイシンは赤痢アメーバ症の無症状/軽症シスト排泄者の治療効果に優れていると考えられた。

我々の研究班における薬剤使用は正式な臨床試験ではなく、効果や副作用をみるための判定や検査が一定の方式で行われてはいない。また、薬剤使用後の観察期間も一律ではない。しかしこのような限界を考慮に入れても、今回のデータから、我が国で本薬剤を使用する場合の安全性に特別な問題はなく、かつ有効であると思われた。本薬剤はまた、難治性のジアルジア症、クリプトスポリジウム症での効果が期待されている。本研究でも、メトロニダゾール高用量が無効であったジアルジア症の1例で、本薬剤投与後に原虫消失が見られた。パロモマイシンは我が国においても有用な薬剤と思われる。

## E. 結論

赤痢アメーバ症の治療薬剤としてのパロモマイシンは、安全性に特別な問題はなく、かつ有効であると思われた。本薬剤は我が国においても有用なものと思われる。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- Kimura M, Koga M, Kikuchi T, Miura T, Maruyama H. Efficacy and safety of atovaquone-proguanil in treating imported malaria in Japan: The second report from the research group. *Parasitol Int*, in press.
- 木村幹男, 丸山治彦, 古賀道子, 菊地 正, 三浦聡之. 熱帯病治療薬研究班(略称)の最近の動向. *日本渡航医学会誌* 第5巻 印刷中.
- 波川京子, 飯田忠行, 木村幹男, 尾内一信, 菊池 均, 加藤成生, 今田明博. 途上国に出かける日本人旅行者の準備状況及び職業別特徴. *日本渡航医学会誌* 第5巻 印刷中.
- 木村幹男, 丸山治彦: 抗原虫薬・抗蠕虫薬 (治療薬ハンドブック 2012、高久史磨監修、p. 1321-1325、じほう (東京)、2012年1月

15 日

2. 学会発表

- ・ 木村幹男, 丸山治彦, 三浦聡之. 熱帯病治療薬研究班(略称)の今後の役割. 第 15 回日本渡航医学会学術集会, 札幌, 2011 年(7 月)
- ・ 波川京子, 飯田忠行, 木村幹男. タイ在留日本人の受診前収集情報と健康管理. 第 15 回日本渡航医学会学術集会, 札幌, 2011 年(7 月)
- ・ 木村幹男, 三浦聡之. 熱帯病治療薬研究班(略称)におけるアトバコン/プログアニル合剤の使用経験. 第 60 回日本感染症学会東日本

地方会学術集会・第 58 会日本化学療法学会東日本支部総会合同大会, 山形, 2011 年(10 月)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## 国内における最適なマラリアの診断および治療体制の確立

研究分担者 春木 宏介

獨協医科大学越谷病院臨床検査部教授

研究要旨：イムノクロマトキットによるマラリア診断は非常に高い感度特異度を有し臨床における有用性が確認された。現在、我が国において得られるキットは限られており、今後キットの体外診断薬としての認可が望まれる。

一方、マラリアの重症化の指標として有用であるとされるプロカルシトニンであるが、サルを用いた実験では十分な結果が得られなかった。今後サルのプロカルシトニンについて検討が必要と思われた。

## A. 研究目的

マラリア、特に致死的结果を招く熱帯熱マラリアの治療は診断から始まる。また腸チフスやデング熱といった他の発熱性疾患との鑑別は海外帰国者の診療において重要である。本研究は海外からの帰国者において他疾患とマラリアの鑑別診断におけるイムノクロマト法の有用性を検討する。同時にその重症度判定に敗血症マーカーとして確立されているプロカルシトニンを測定し検討することが目的である。

## B. 研究方法

研究班に参加し治療薬を保管している23施設にマラリア診断キット entebe Malaria (Laboratorium Hepatika社)、Malaria Ag Pf/Pan および Malaria Ag (両者ともに Standard Diagnostics社) を配布し、マラリアを疑う熱性疾患患者に用いて鑑別診断を行った。同時にギムザ染色も行った。ギムザ染色陰性でキット陽性となった場合には、さらにギムザ染色を継続しておこない虫体発見を試みた。Malaria Agキットはマラリアの病状と一致するため、マラリアの診断で治

療が開始された場合、治療開始後24, 48, 72, 120時間後に検査を行った。現在まで日本で研究用試薬として販売され入手可能な3種類のキットを配布し検討中であったが、途中より Malaria Ag Pf/Pan および Malaria Ag の入手が困難となり MALARIA P.f & Pan Ag Rapid Test Kit (BIONOTE社)へと変更とした。entebe Malariaは今回配布しなかった。それぞれのキットによるマラリアの鑑別を表1に示す。

また今回は新たにサルにおけるプロカルシトニン測定は *Macaca fuscata* にサルマラリアであ

表1. 各キットの抗原検出と判定

診断キット	抗原検出	判定
Malaria Ag	Pf pLDH / pan	熱帯熱/その他
	pLDH	他
Malaria Ag Pf/Pan	Pf HRP-II / pan	熱帯熱/その他
	pLDH	他
entebe	Pf HRP-II / Pv	熱帯熱/三日熱
	pLDH	熱
MALARIA P.f & Pan Ag	Pf HRP-II / pan	熱帯熱/その他
	pLDH	他

る *Plasmodium knowlesi* を 10<sup>9</sup> 個静注したものを感染モデルとして感染後 24 時間毎に 60 日間採血を行った。感染後 7 日後にクロロキンで治療し 15 日目までプロカルシトニンを測定した。プロカルシトニン測定はイムノクロマト (BRAHMS PCT-Q) および三菱メディエンス (株) に外注しエクルーシス試薬ブラームス PCT を用いて測定した。

#### 倫理面への配慮

本研究班では、厚生労働省「臨床研究に関する倫理指針」(平成 20 年 7 月 31 日全部改正) を遵守し、研究代表者の所属機関の倫理審査委員会に研究計画書を提出し、平成 22 年 7 月 28 日付けで承認を取得した。また当院での倫理委員会において各機関でのイムノクロマト法使用について倫理審査承認を取得した。また報告書に関しては匿名性を保つため患者氏名は無記名とした。

サルのプロカルシトニン測定に関する実験は獨協医科大学実験動物委員会で承認された実験に付随して行われた。

### C. 研究結果

#### 報告施設並びに症例数

合計 116 症例が解析対象となった。検査時期は 2009 年 7 月～2012 年 3 月までである。各年別では 2009 年 17 例、2010 年 41 例、2011 年 50 例そして 2012 年は 3 月までで 8 例である。年齢は 19～80 歳であったが、9 歳も 1 例 (デング熱) 含ま

れていた。性別では男性 79 例 (68.1%)、女性 33 例 (28.4%)、不明 4 例 (3.4%) であり (表 2)、国籍では日本人が 81 例 (69.8%)、外国人が 31 例 (26.7%)、不明 4 例 (3.4%) であった。(表 3)

#### 診断

マラリアの内訳を表 4 に示すが、熱帯熱が最も多く 28 例 (63.6%) と最も多く、ついで三日熱が 11 例 (25.0%)、卵形 1 例 (2.3%) であった。四日熱の単独感染はなく、混合感染が 4 例 (9.0%) 認められた。混合感染の内訳は熱帯熱マラリアと四日熱マラリア 1 例、熱帯熱マラリアと三日熱および四日熱マラリア 1 例、不明 2 例であった。

マラリアの治療についてはメフロキン、キニーネが最も多くそれぞれ 13 例、ついでリアメット、プラスモトリム座薬、プリマキンが各 4 例、クロロキン 2 例、マラロンとドキシサイクリンが 1 例に使用されていた (重複投与あり)。

#### 感度特異度

各キットの感度特異度は Malaria Ag Pf/Pan および entebe (両キットとも 76 例)、MALARIA P. f & Pan Ag Rapid Test Kit (使用報告はキット切り替え後現在まで 40 例) で、100% と良好であった (表 5)。

また Malaria Ag は原虫の寄生率によって感度が下がることが予想されたが、今回の報告例では寄生率が低いものでも 0.5% あり、すべて陽性であった。抗マラリア薬による治療により陰性化す

表 2. 被験者性別

	2009	2010	2011	2012	計
男性	9	27	38	5	79
女性	8	14	10	1	33
不明	0	0	2	2	4
計	17	41	50	8	116

表 3. 被験者国籍

	2009	2010	2011	2012	計
日本人	9	29	35	8	81
外国人	7	12	12	0	31
不明	1	0	3	0	4
計	17	41	50	8	116

表 4. マラリアの種類

	2009	2010	2011	2012	計
熱帯熱	9	10	9	0	28
三日熱	1	5	5	0	11
四日熱	0	0	0	0	0
卵形	0	0	1	0	1
混合	0	1	3	0	4
計	10	16	18	0	44

るものも観察された。報告すべてには記載がなく、12 例がギムザ染色との比較報告がなされた。うち熱帯熱 8 例、非熱帯熱 4 例であった。熱帯熱、非熱帯熱ともに 0.01%の寄生率を境に陰性化が見られた。

#### サルマラリアにおけるプロカルシトニン濃度測定

サル *Macaca fuscata* に対して *Plasmodium knowlesi* を実験的に感染させる研究を共同研究者の川合が行っておりその際、プロカルシトニンをイムノクロマト (BRAHMS PCT-Q) およびエクルーシス試薬ブラームス PCT を用いて測定した。マラリア感染の重症度判定および治療効果の指標となることを期待したが結果は感染が成立し重症化しているにもかかわらず、イムノクロマト、試薬法のいずれにおいてもプロカルシトニンは測定限界以下であった。

表 5. 各キットの感度と特異度

診断キット	感度	特異度
Malaria Ag (n=76)	100%	100%
Malaria Ag Pf/Pan (n=76)	100%	100%
entebe (n=76)	100%	100%
MALARIA P. f & Pan Ag (n=40)	100%	100%

## D. 考察

マラリアの診断方法としてはギムザ染色が必須である。しかしながらギムザ染色はバッファーの pH を 7.2-7.4 で行う必要があるなど一般の検査技師では熟練が要求される。とりわけ少数寄生の場合の判断は難しいと言わざるを得ない。そのほか時間を短縮して行うフィールド染色やアクリジンオレンジをもちいた染色法もあるがこれも一般的ではない。抗原を検出するイムノクロマト法(RDT:rapid diagnostic test)としてはマラリア原虫の pLDH(plasmodium lactate dehydrogenase) や HRP (Histidine Rich Protein), Aldrase 等を検出するものがあり簡易に行うことができることが特徴である。反応時間はおおむね 10 分であり外来でも可能である。これらのうち HRP を検出するものは感度が高く少数寄生でも検出することができる一方、治癒後も数か月の間陽性となる欠点がある。pLDH を検出するものでは少数寄生では感度は落ちるものの治癒により速やかに陰性化するため治癒判定に用いることができる。ともにプロゾーン現象(原虫血症が多すぎる場合陰性に出る)がみられることがあるのでギムザ染色は必須である。今回の検討では偽陰性、偽陽性は認められず、またプロゾーン現象も報告されていない。WHO による RDT の評価が進んでおり検出感度は HRP タイプの方が優れている。偽陽性例や判定不能を示すキットも報告されており RDT の選択には注意を要する。一方、既存の RDT はヒトマラリアを対象としているためサルマラリアでは熱帯熱マラリアや三日熱マラリアと判定されるものがあるので注意が必要である。

現在マラリアの RDT はわが国では体外診断薬としては認可されていないため、あくまで研究用試薬であり保険請求もできないのが現状である。も

し使用する場合は補助として用いるしかできないと考えられる。今回、本研究班所属の比較的海外帰国者が多い施設での検討であるため明確に示すことができないが、多くの非マラリア疾患でも鑑別診断としてキットが用いられたことを考慮すると、一般の診療機関での需要も予想される。一般外来あるいは救急外来でのキットの導入は海外帰国者のマラリアの鑑別に有用であり、早期診断による治療あるいは専門機関への早期転送による重症化の予防に寄与することも予想される。よって早期の体外診断薬としての認可が望まれる。一方、特殊な検査としてはPCRがありマラリアの種類判別が難しい場合に専門機関に依頼することが可能である。しかしながらこれはマラリアとの診断後に種の判定には有用であるがその煩雑さ等からイムノクロマト法にとって代わるものではないと考えられる。

近年、敗血症の指標として注目を浴びているプロカルシトニンがマラリア患者でも上昇することが知られており Chiwakata らは治療前のプロカルシトニン値が25ng/mLを超えた場合死亡の確率が高くなると報告している。今回サルマラリアの感染モデルを用いてプロカルシトニンの測定をイムノクロマト (BRAHMS PCT-Q) およびエクルーシス試薬ブラームスPCTで行った。しかしながら感染が成立し、重症化しているにもかかわらず結果は陰性であった。今回の試薬がヒトプロカルシトニン測定用であったため検出されなかった可能性が強く示唆された。今後サルのプロカルシトニンについての検討を行っていくことがさらに必要と思われた。

## E. 結論

イムノクロマト法は海外帰国者のマラリアと他の発熱性疾患の鑑別に有用であり、早期の体外

診断薬としての認可が望まれる。今後ヒト感染モデルとしてのサルにおけるプロカルシトニンの検討も課題として残された。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

山崎宏、武藤麻紀、森嶋康之、杉山広、川中正憲、中村(内山)ふくみ、大亀路生、小林謙一郎、大西健児、川合覚、奥山隆、斉藤一幸、宮平靖、野内英樹、松岡裕之、春木宏介、三好洋二、赤尾信明、秋山純子、荒木潤：2010年に関東地方で発生が相次いだアジア条虫症について Clininal Parasitology Vol.22 No.1 75-78 2011

春木宏介：マラリアに関する最近の話題：第五のマラリア、マラリア診断キットそしてプロカルシトニンを中心に 日本臨床微生物学雑誌 Vol.21 No.2 113-120 2011

### 2. 著書

春木宏介、前崎繁文：検査や画像から感染症の原因微生物に迫る 9. 寄生虫感染症—知っておきたい寄生虫検査— 臨床感染症ブックレット 3 48-52、寄生虫検査についてのこんな質問 138-139 文光堂、東京、2011

### 3. 学会発表

吉田 敦、菊池 仁、千原晋吾、千種雄一、春木宏介：渡航者におけるマラリア対策の課題—脳マラリアの症例から— 第15回日本渡航医学会学術集会(札幌)2011年7月30日

矢澤淳子、中島あつ子、藤代政浩、柴崎光衛、党雅子、春木宏介：敗血症患者におけるプロカルシ

トニン測定の有用性 第 43 回日本自動化学会  
(横浜) 2011 年 10 月 7 日

菊池 仁、千原晋吾、千種雄一、春木宏介：熱帯  
熱マラリアによる脳マラリアの一例 第 60 回日  
本感染症学会東日本地方会学術集会 第 58 回日  
本化学療法学会東日本支部総会. (山形) 2011 年  
10 月 27 日

春木宏介：運が良ければ遭遇する世界の感染症  
第 23 回日本臨床微生物学会(横浜) 2012 年 1 月  
21 日

春木宏介：感染症学基礎講座『運がよいと遭遇す

る世界の感染症』 東京都臨床検査技師会生涯教  
育研修 第 9 回微生物検査研究班研修会 東京  
医科歯科大学 2011 年 2 月 18 日

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし



## 国内未承認薬の輸入・管理・供給

研究分担者 古賀 道子 東京大学医科学研究所 感染症分野助教

**研究要旨** 稀少疾病治療薬の中央保管機関として、薬剤の輸入から保管・供給までを統括して行った。2011年度は薬剤使用症例の延べ数は101例であり、ここ1-2年より約1割増加した。本年度の特徴として、合併症のない熱帯熱マラリアに対し、artemether/lumefantrineを使用する回数が増加している。海外渡航者の増加に伴い、我が薬剤使用機関の医師達も、世界的標準治療に準じて薬剤選択をしている事が伺われ、今後もこの傾向は続くと考えられた。赤痢アメーバ症治療薬の paromomycin や metronidazole 注射薬の需要は例年通り高く、またトキソプラズマ症治療薬の pyrimethamine と sulfadiazine の需要も依然として高い事が分かりこれらも、当面同様の傾向がみられると推測された。

### A. 研究目的

熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬の輸入から保管・供給までを一括して行い、国内未承認だが寄生虫感染症の治療に必要な薬剤が、国内での感染症発生時に使用できる体制を整備しておく。国内発生例に対し使用することで、患者の救命・QOLの向上を目指す。また、これら国内未承認薬の需要を把握する。

### B. 研究方法

熱帯病・寄生虫症治療に必要な薬剤で国内では入手できないものを研究分担者が個人輸入し、医科学研究所附属病院薬剤部の協力を得て、同部倉庫に適切に保管する。輸入薬剤の種類及び量は、前年度までの使用実績を考慮して決定する。輸入元は、過去の実績から手続きが滞りなく進む業者に依頼する。国内で薬剤を必要とする症例が発生した場合は、可及的速やかに薬剤を発送する。薬剤の使用は、あらかじめ定められた「使用機関」に限定し（表1参照）、その使用医師には「医師の責任の元で使用し、一切の責任を医師が負うこと。販売・譲渡はしないこと」を周知徹底する。薬剤の使用に関しては、各使用機関にて、倫理委

員会の承認を得て、かつ患者様からも同意書を得て行う。

（倫理面への配慮）

輸入した国内未承認稀少疾病治療薬の患者への使用は、各薬剤使用機関の治験審査委員会において審査・承認を受け、使用に当たっては、患者へ、国内未承認薬であること、治療に必要な理由、起こりうる副作用等について説明し、同意を得たうえで使用し、使用に伴う一切の責任を担当医師が負う。

### C. 研究結果

（1）今年度の薬剤使用実績と治療報告

薬剤の使用実績 2011年1月～12月  
東京大学医科学研究所附属病院薬剤部で保管している全薬剤の2011年の使用実績を表2にまとめた。使用登録書の提出101例（のべ数）があった。これは、過去2年と比較しても約1割増の供給数で、約3-4日に1回、未承認薬剤を国内に供給した数に匹敵する。また、使用登録書の提出101例に対して、治療報告書の提出は81例で、報告率は80.2%に上昇し、過去4年間で最も高い回収率と、着実に改善されてきている。班会議に加

え、薬剤供給時に、報告書提出の義務について繰り返し説明したため、使用期間医師側も、「未承認薬」を使用し、使用時の有効性及び副作用等の情報回収の重要性を強く認識してもらえた結果であると考えられた。

薬剤別に検討していくと、マラリア治療薬に関しては、のべ 51 回の薬剤投与があり、供給の約半分を占めるのは例年通りであるが、再発予防に使用される primaquine phosphate(プリマキン)を除く内服(atovaquone/proguanil(マラロン)、artemether/lumefantrine(リアメット)、chloroquine phosphate(アブクロール))が 21 例に使用され、重症熱帯熱マラリアに対しては注射用キニーネが 4 例、アーテスネート座薬が 5 例に使用された。

昨年に比べ、artemether/lumefantrine の使用(全例熱帯熱マラリア)が顕著に増加した(2010 年は 5 例、2011 年は 13 例)。理由は、昨年は artemether/lumefantrine の在庫が不足し一時的に他の薬剤を使用した例が多かったためと考えられるが、artemether/lumefantrine の使用はその前年の 2009 年より徐々に増加している。これは、使用機関の医師達が好ましい薬剤として認識使用しているためと考えられた。

三日熱・卵形マラリアの根治療法として使用される primaquine phosphate(プリマキン)は 21 例に使用され、この 5 年間で最多であった。

次に使用数が多かったのは、例年通り、赤痢アメーバ症治療薬の paromomycin(フマチン)と metronidazole(メトロニダゾール)注射液であった。humatin は本年も使用量が多く、単価が高いため全薬剤のなかで最も多くの予算がかかっている。しかしながら、ここ数年、再発例に限ったの使用をお願いしてきたため、本年は供与要請量が増えることなく、ほぼ年間 20 症例前後に落ち着いている。metronidazole 注射液は、引き続き偽膜性大腸炎にも使用されていた。これら 2 剤に関しては、近いうちの国内承認が見込まれている。

トキソプラズマ症に対する pyrimethamine(ダラプリム)、sulfadiazine(スルファジアジン)は本年も 10 例に使用された。うち小児(先天性トキソプラズマ症等)が 5 例であり、輸入熱帯病以外の稀少疾病治療薬を供給することができた。今後とも継続すると思われる。

その他に目立ったものとして、ヒト肝蛭症(毎年 0-1 例であるが、本年は 2 例)に対し triclabendazole(イガテン)を、皮膚リーシュマニア症 1 例に対し、sodium stibogluconate(ペントスタン)を供給し、稀な寄生虫感染症例に必要な薬剤を供与することができた。

## (2) 重篤な有害事象報告について

一例も報告は無い。

軽度副作用として、①sulfadiazine によると考えられる腎機能障害が 1 例、②paromomycin による下痢が 2 例、③pyrimethamine、sulfadiazine による骨髄抑制が 1 例、④chloroquine phosphate による水様下痢が 1 例、報告があったが、いずれも薬剤投与の中止により軽快している。

## (3) 稀少疾病治療薬の確保

本年の輸入薬剤を表 3 にまとめた。個々の薬剤に関しては、保管中のものの量と使用期限、および過去の使用数から必要量を検討し、かつあらたに購入する全ての薬剤に関して、有効期限が長いロットを注文するように努めた。

輸入薬剤のうち、熱帯熱マラリアの治療に使われる artemether/lumefantrine(リアメット)および重症時に使用される quinine gluconate(キニマックス)と artesunate(プラスモトリム)座薬に関しては、全国 25 か所にある薬剤使用機関に事前に送付した(artemether/lumefantrine と artesunate 座薬は一症例分、quinine gluconate は初期の 1 から 2 日分)。これらは、診断後直ちに使用されるべき薬剤であり、連絡を受けてから宅急便等で発送しては、人命を損なうこととなるため、人道上の判断から施行している。

しかし、quinine gluconate の有効期限が本来短いうえ、輸入元に十分量が用意されておらず、平成 22 年 12 月初旬に購入打診したが、約 1 カ月待たされることになり、一時的であるが供給が不安定となった。これは、世界的には quinine hydrochloride が使用されており、本点滴薬の生産数の少ないことが原因の 1 つではないかと考えられている。しかし、本研究班では誤投与を予防する目的で、1 回投与量を使いやすい、本アンプル製剤を以前より輸入供給している。今後は、製造元からの直接購入する等購入先を変更し安定供給を徹底することとした。

#### D. 考察

本年も熱帯病治療薬の中央保管機関として、国内未承認の薬剤を海外から輸入し、国内での熱帯感染症発生時に全国の薬剤使用機関で使用してもらえよう、東京大学医科学研究所附属病院の薬剤部の協力も借りて、保管・供給を行った。なお、2011年8月より研究分担者が、人事異動に伴い三浦聡之から古賀道子に変更したが、研究の遂行には滞り無かった。

国際的には、合併症のない熱帯熱マラリアの内服治療の第一選択は、artemether/lumefantrine(リアメット)に代表されるようなACT (artemisinin-based combination therapy) となっている。本邦承認薬のmephaquin(メフロキン)に比べて、効力・副作用の両面で、artemether/lumefantrineは優れている。海外渡航者が増加している我が国において、artemether/lumefantrineを含め、熱帯熱マラリアに使用されるquinine gluconateやartesunateは、理想的には全国の使用機関に相当量を事前配布しておくのが望ましいと考えているが、現状の輸入体制や、各機関での管理体制が未承認薬を扱うには万全にはほど遠い状況であることから、引き続き中央管理体制が望ましいと考えられた。

paromomycinとmetronidazole注射薬は、輸入薬剤の中でもコスト的に大きな割合を占めているが、前述のようにこの両剤は近い将来国内承認される可能性が高い。アメーバ症のみならず偽膜性腸炎などでの需要が高いことから、患者・医師の双方にとって好ましい形になることが期待できる。この他にも、atovaquone/proguanilが国内承認される可能性が高く、本研究班での使用実績がこれらの承認に向け役立っていると考えられ、大きな成果といえるであろう。

#### E. 結論

本年も熱帯病・寄生虫症治療薬の輸入・保管・供給の中央機関としての体制の整備・充実をはかった。本年度の特徴として、合併症のない熱帯熱マラリアに対し、artemether/lumefantrineを使用する回数が増加している。海外渡航者の増加に伴い、我が薬剤使用機関の医師達も、世界的標準治療に準じて薬剤選択をしている事が伺われ、今後もこの傾向は続くと考えられた。

赤痢アメーバ症治療薬のparomomycinやmetronidazole注射薬の需要は例年通り高く、またトキソプラズマ症治療薬のpyrimethamineとsulfadiazineの需要も依然として高い事が分かり今後も、当面同様の傾向がみられると推測された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- Imai K, Koibuchi T, Kumagai T, Maeda T, Osada Y, Ohta N, Koga M, Nakamura H, Miura T, Iwamoto A, & Fujii T. Cerebral schistosomiasis due to Schistosoma haematobium confirmed by PCR analysis of brain specimen. J Clin Microbiol. 49,3703-3706 (2011).
- Kimura M, Koga M, Kikuchi T, Miura T, Maruyama H. Efficacy and safety of atovaquone-proguanil in treating imported malaria in Japan: the second report from the research group. Parasitol Int, in press.
- 木村幹男, 丸山治彦, 古賀道子, 菊地 正, 三浦聡之. 熱帯病治療薬研究班(略称)の最近の動向. 日本渡航医学会誌 第5巻 印刷中.

##### 2. 学会発表

- 木村幹男, 丸山治彦, 三浦聡之. 熱帯病治療薬研究班(略称)の今後の役割. 第15回日本渡航医学会学術集会, 札幌, 2011年(7月)
- 木村幹男, 三浦聡之. 熱帯病治療薬研究班(略称)におけるアトバコン/プログアニル合剤の使用経験. 第60回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第58回日本化学療法学会東日本支部総会合同大会, 山形, 2011年(10月)

#### G. 知的所有権の出願・取得状況

該当なし

表1. 平成22年度の薬剤使用責任者・使用機関

使用責任者	使用機関
足立 憲昭	市立釧路総合病院小児科
永坂 敦	市立札幌病院感染症科
神田 暁郎	仙台市立病院内科(感染症科兼務)
春木 宏介	獨協医科大学越谷病院臨床検査部
野口 博史	成田赤十字病院 感染症科/第3小児科
古賀 道子 (三浦 聡之)	東京大学医科学研究所 先端医療研究センター 感染症分野
加藤 康幸	国立国際医療センター戸山病院国際疾病センター
大西 健児	都立墨東病院感染症科
菅沼 明彦	都立駒込病院感染症科
木村 幹男	結核予防会新山手病院内科
古川 恵一	聖路加国際病院内科感染症科
立川 夏夫	横浜市立市民病院感染症部
塚田 弘樹	新潟市民病院感染症科/呼吸器科
長谷川 千尋	名古屋市立東部医療センター感染症科
三笠 桂一	奈良県立医科大学附属病院感染症センター
清水 恒広	京都市立病院 感染症科
後藤 哲志	大阪市立総合医療センター 感染症センター
玉置 俊治	りんくう総合医療センター 内科
岩田 健太郎	神戸大学大学院 医学研究科 微生物感染症学講座 感染治療学分野
福本 宗嗣	鳥取大学医学部感染制御学講座医動物学分野
高田 清式	愛媛大学医学部附属病院 総合臨床研修センター/感染症内科
青木 知信	福岡市立こども病院・感染症センター
森本 浩之輔	長崎大学熱帯医学研究所 臨床医学分野
丸山 治彦	宮崎大学医学部 感染症学講座 寄生虫病学分野
健山 正男	琉球大学大学院医学研究科感染病態制御学講座 分子病態感染症学分野

表 2. 2011 年 1 月～12 月の研究班薬剤の使用状況

使用薬剤(一般名)	使用薬剤(商品名)	疾患名	症例数	治療報告書数
metronidazole	Metronidazole	偽膜性腸炎	3	2
		赤痢アメーバ症	6	3
artemether/lumefantrine	Riamet	熱帯熱マラリア	13	13
primaquine phosphate	Primaquine	ニューモシスチス肺炎	1	1
		三日熱マラリア	18	17
		卵形マラリア	3	1
artesunate	Plasmodium	熱帯熱マラリア	5	5
pyrimethamine	Daraprim	トキソプラズマ症	10	5
sulfadiazine	Sulfadiazine	トキソプラズマ症	7	4
paromomycin	Humatin	赤痢アメーバ症	20	18
chloroquine phosphate	Avloclor	三日熱マラリア	6	6
atovaquone/proguanil	Malarone	熱帯熱マラリア	2	1
quinine gluconate	Quinimax	熱帯熱マラリア	4	4
triclabendazole	Egaten	肝蛭	2	0
sodium stibogluconate	Pentostam	皮膚リーシュマニア症	1	1
	合計		101	81

表 3. 今年度(2011 年 4 月～2012 年 3 月)の薬剤輸入内訳

一般名	商品名	規格	単位あたり量	輸入量
sodium stibogluconate	Pentostam	100ml	1 本	4 箱
nifurtimox	Lampit	1 錠=120mg	100 錠	4 箱
quinine gluconate	Quinimax	注射液、250mg/2ml/ampule	3ampule	136 箱
quinine gluconate	Quinimax	注射液、500mg/4ml/ampule	3ampule	6 箱
propamide isetionate	Brolene	点眼液、0.1%/10ml/本	1 本	5 箱
artemether/lumefantrine	Riamet	20/120mg、錠剤	24 錠	40 箱
nitazoxanide	Alinia	500mg、錠剤	60 錠	1 箱
metronidazole	Metronidazole	注射液、500mg/100ml	20pack	20 箱
primaquine pohosphate	Primaquine	7.5mg、錠剤	100 錠	30 ボトル
sulfadiazine	Sulfadiazine	500mg、錠剤	56 錠	40 箱

## 新規住血吸虫症治療薬の薬効評価に関する比較研究

研究分担者 太田 伸生 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科

### 研究要旨

マラリア原虫と住血吸虫はヘモグロビンを分解して栄養とする点で生物学的な共通点があり、鉄代謝はこの二つの寄生虫の宿主適応上、重要であると推定される。最近の研究から、マラリア治療薬の中には住血吸虫に対する治療効果を示すものが少なくないことが判明し、作用の共通性の機序をここに求める考えがある。今年度の研究では、新規マラリア薬候補である合成化合物 N-89 による住血吸虫の鉄代謝に及ぼす影響を中心に検討した。N-89 はマンソン住血吸虫雌成虫に対して、ヘモグロビンの分解吸収を強力に阻害することが推定され、その結果、虫体成熟や生殖能力を障害する可能性が示された。どのような機序で効果を示すかは不明であるが、少なくとも栄養源の取り込み阻害の可能性が考えられた。しかし N-89 処理自体は虫体に明らかな形態学的障害を起さず、ヘモグロビン利用阻害機構はまだ不明である。N-89 は artemisinin 系薬剤と同様に endoperoxide 構造をもつ抗マラリア薬であるが、今後 artemisinin 系薬剤の住血吸虫症予防薬としての利用が増加する場合に予想される問題点について研究モデルとなることが期待された。

### A. 研究目的

住血吸虫症は熱帯地方を中心に 2 億人を超す患者数と年間 25 万人の死亡原因となる重要な感染症である。特効薬・プラジカンテルの出現以降は急速に死亡者数を減らした事情もあり、今日では健康被害が大きいかかわらず、疾病対策の重要性が認識されない典型的な Neglected Tropical Diseases である。

最近、本分担研究者は新規抗マラリア薬として開発が進んできた合成過酸化化合物・N-89 が住血吸虫症への治療効果が高いことを報告したが、同様に住血吸虫症に対する効果を持つ抗マラリア薬が相次いで報告されている。Artemisinin 系薬剤はその例で、薬効機序がプラジカンテルとは異なるため、将来的に住血吸虫症対策での活用が期待されている。

本分担課題では、住血吸虫症の新規治療薬と考えられる合成化合物 N-89 がマンソン住血吸虫の雌成虫に作用して、鉄代謝を阻害することによって従来の抗住血吸虫薬には見られなかった薬理作用を示すことを実験データとして得たので、今後の N-89 の住血吸虫症対策への応用の可能性について考察を試みたい。

### B. 研究方法

(1) マンソン住血吸虫(Sm)(Puerto Rico 株)を用いた in vivo の経口投与による抗住血吸虫作用のうち、感染 5 週で投与することによる

雌成虫の発育と生殖に対する障害効果を解析することとした。

用いたのは合成化合物の N-89 である(図 1)。Artemisinin と同様に endoperoxide 構造を持ち、抗マラリア原虫活性を持つが、類似構造を持つ artemisinin が住血吸虫にも効果を持つことから N-89 にも同様の期待があり検討した。



(図 1 N-89 の構造式)

(2) In vivo 効果の検討はマウスの実験的マンソン住血吸虫感染にて行った。BALB/c マウスに Sm セルカリア 180 匹を経皮感染させ、感染 5 週後に N-89 を 300mg/kg、2 日連用でオリーブオイルと共に経口投与を行い、感染 8 週でマウスを解剖して虫体を回収して、体長測定と虫体中のヘモゾイン量の測定とマウス体内の残存虫卵数を検討した。鉄代謝にかかわる酵素としてカテプシン D の酵素活性を検討した。

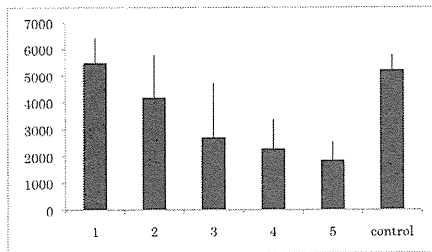
### [倫理面への配慮]

本研究は東京医科歯科大学の実験動物委員会による承認を得たうえで実施した。

### C. 研究成果

(1) Smセルカリア暴露後5週でN-89を経口投与した場合、殺虫体効果はないものの、産卵が抑制されて宿主体内残存虫卵は減少し、病理学的所見の著明な改善が見られる(図2)。

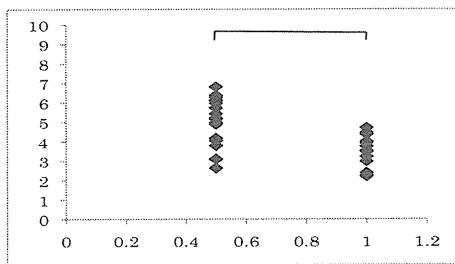
図2 感染5週でのN-89投与による産卵抑制効果



(2) N-89の Manson 住血吸虫成虫に対する強い産卵抑制効果の機序検討を試みた。

感染5週でN-89を投与して、さらに2週後に回収した虫体の体長を測定した。その結果、雌虫、雄虫ともに体長が有意に低下していることがわかった。即ち、N-89投与以降に、虫体の成長が阻害されていることが観察された(図3)。

図3 N-89投与による虫体長の低下



虫体の鉄カーミン染色標本を観測した所、N-89投与マウスから回収した成虫の腸管内容が対照虫体と比較して大きく減少していることが観察された。そこで、虫体のホモジナイズ検体中のヘモジン量を定量した所、特に雌成虫で有意に減少していることが確認され、N-89投与により鉄の取り込みに障害が起こっていることが推定された(図4)(図5)。一方、N-89投与マウス由来虫体と対照虫体でカテプシンD活性を比較したが差を認めなかった。

図4 N-89投与虫体(左)と対照虫体(右)の比較

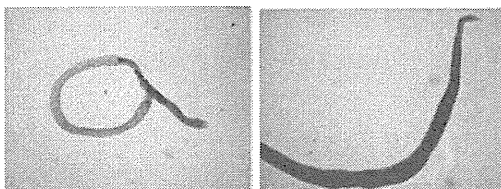
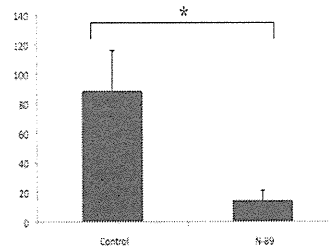


図5 N-89投与雌虫体のヘモジン含量の減少



#### D. 考察

住血吸虫症治療薬としてプラジカンテルが高い効果と安全性を示すことから過去30年以上に亘って唯一の選択薬剤として用いられてきた。しかし、プラジカンテル耐性株の出現が疑われる事態になり、今日では代替薬または補完薬の確保は急務である。

Artemisinin系薬剤がマラリアと同時に住血吸虫にも高い効果を示すことを基に、その構造的類似性を持つN-89もマラリアと住血吸虫双方に効果があることが推定され、その強い効果が確認されたが、薬効機序については十分解明が進んでいない。同一薬剤がマラリアと住血吸虫双方に効果を持ちうることは、その薬剤がヘモグロビン代謝に効果を示すことを通じて、ヘモグロビンを栄養源として利用するマラリア、住血吸虫症双方に効果を示す可能性を論じる報告がある。

表 抗住血吸虫作用を持つ抗マラリア薬

薬剤	Dose	雄虫体	雌虫体	虫体減少 (%)
対照		20.1	14.2	-
クロロキン	400mg/kg	17.3	12.7	11.7
ルメファン トリン	400mg/kg	18.0	14.0	10.5
メフロキン	400mg/kg	7.8	0	77.3*
キニン	400mg/kg	10.2	5.4	54.7*
ハロファン	400mg/kg	16.8	7.8	51.7*

\* p<0.05

N-89の薬効については十分な結論が得られていないが、幼若成虫(感染5週齢)の時期の虫体に作用して、雄、雌ともに虫体発育を阻害すること、そこではヘモグロビン代謝と鉄利用に機能的な障害がもたらされることが強く示唆された。このことがN-89の示す抗マラリア、



抗住血吸虫の2つの作用の機序にかかわるかという点の解明は今後の課題である。

鉄代謝に影響した結果、表現型として産卵抑制に直接繋がることを説明することは現時点では困難である。しかし雌成虫は生存に鉄要求度が雄虫に比べて大きく、卵形成過程に鉄が重要な関与するという報告もある。

一方、昨年までの研究で、N-89 処理による形態的障害は確認されていないので、このような作用は何らかの生理的過程への影響と考えることができる。カテプシンD以外のヘモグロビン代謝にかかわる酵素系に影響があるのか、生殖器における鉄依存性がどの程度あるのかなど課題が残る。N-89の血中半減期が12時間未満であるにもかかわらず、虫体に不可逆性の鉄代謝障害をもたらしていることから、重要な代謝過程に大きなダメージを与えていることは間違いなく、その標的分子の同定が必要である。

抗マラリア作用がある薬剤が住血吸虫症治療効果も持つことが明らかになると、実際の疾病対策にどのように応用するかが今後の課題となる。一般にマラリアと住血吸虫症の流行域が重複することが多く、そこでマラリアと住血吸虫症とが異なる至適用量下に使用された場合、どちらかに薬剤耐性変異の誘導ドライブとなる可能性があり、これについても今後の重要な検討課題となる。

## E. 結論

住血吸虫症に対する新規薬剤候補としてN-89が雌成虫のヘモグロビン代謝系を阻害し、成虫の鉄要求性での阻害効果を示していることが考えられた。N-89はマラリアと住血吸虫の双方に効果を示す薬剤として、薬効機序解析を通じて流行現場にどのように応用するかを考えることが次の課題である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

(1) Taniguchi T, Kumagai T, Shimogawara R, Ichinose R, Hiramoto A, Sato A, Morita M, Nojima M, Kim HS, Wataya Y, Ohta N. Schistosomicidal and antifecundity effects of oral treatment of synthetic endoperoxide N-89. *Parasitol Int*, 60:231-236, 2011.

(2) Imai K, Koibuchi T, Kumagai T, Maeda T, Osada Y, Ohta N, Koga M, Nakamura H, Miura T, Iwamoto A, Fujita T. Cerebral schistosomiasis due to *Schistosoma haematobium* confirmed by PCR

analysis of brain specimen. *J Clin Microbiol*, 49: 3703-6, 2011.

## 2. 学会発表

(1) 谷口斎恵、熊谷貴、下河原理江子、平本晃子、佐藤聡、金恵淑、綿矢有佑、太田伸生 合成環状過酸化 N-89 投与による Manson 住血吸虫体内へのヘモグロビン蓄積量に与える影響について 第 80 回日本寄生虫学会大会、2011 年 7 月、東京

G. 知的財産権の出願・登録状況  
米国特許出願中 33432 (2011)

## 国内未承認薬の品質確保に関する研究

研究分担者 坂本 知昭 国立医薬品食品衛生研究所 薬品部主任研究官

研究要旨 パロモマイシンをはじめとするアミノグリコシド抗生剤はUV吸収がなく、誘導体化によるLC-UV検出又は質量分析による方法が一般に採用されることが多い。本研究ではUV吸収がない化合物でも検出可能な蒸発光散乱検出器に着目し、親水性相互作用クロマトグラフィー(HILIC)カラム及びイオンペア試薬法による3種類のオクタデシルシリル化シリカゲル(ODS)カラムを用いた10種類のアミドグリコシドのHPLC一斉分析法を開発した。本法の開発により、Symmetry ODSカラムとイオンペア試薬(pentadecafluoro octanoic acid)を用いることによって10種類のアミノグリコシドの一斉分析が可能となった。また、ゲンタマイシンの5種類の構成成分の分離定量も可能となった。更に、本法を用いることにより、アミノグリコシドを広い範囲で精度良く定量することも可能となった。本研究の成果によって、パロモマイシン等アミドグリコシド系抗生物質の簡易一斉分析による品質確認が可能となった。

### A. 研究目的

日本では未承認である稀少疾病用の医薬品について、それらの適用対象疾患に冒され、重篤な状態にある患者に対して安全に適用するために、研究班で輸入する未承認医薬品の“有効性及び安全性”を確保することを目的に本研究を行う。

海外ではすでに使用されているが、日本で未承認の医薬品である稀少疾病用治療薬の有効性と安全性を確保するためには、それらの医薬品の品質について検討し、一定の品質の医薬品を供給することが必要である。そこで、本研究班が輸入し、稀少疾病用治療薬として供給する医薬品の品質評価を行うとともに、適切で一定の品質をもつ医薬品を供給することを目的とする。

今年度は、パロモマイシンを含むアミノグリコシド系抗生物質の品質評価に適用する分析法の開発を行った。アミノグリコシド系化合物はグラム陰性および陽性菌に強い抗菌力を示し、また抗菌スペクトルが広いことから世界的に幅広く使用されている。アミドグリコシド系化合物はUV吸収がなく、紫外外部吸収をもつ化合物を用いた誘導体化によるLC-UV検出又は質量分析による方法が一般に採用されることが多い。本研究ではUV吸収がない化合物でも検出可能な蒸発光散乱検出器に着目し、親水性相互作用クロマトグラフィー(HILIC)カラム及びイオンペア試薬法による3種類のODSカラムを用いた10種類のアミドグリコシドの

HPLC一斉分析法の開発を行った。

### B. 研究方法

本研究ではパロモマイシンの他、ゲンタマイシン、トブラマイシン、カナマイシン、リンコマイシン、アプラマイシン、スペクチノマイシン、アミカシン、ネオマイシン、スペクチノマイシンを研究の対象とした。それぞれの標準物質としてパロモマイシン硫酸塩、ゲンタマイシン硫酸塩、トブラマイシン硫酸塩、カナマイシン硫酸塩、リンコマイシン塩酸塩、アプラマイシン硫酸塩、スペクチノマイシン塩酸塩アミカシン二硫酸塩、ネオマイシン硫酸塩、ストレプトマイシン硫酸塩の各化合物は市販試薬(純度98.0%以上)(図1)を購入した。

親水性相互作用クロマトグラフィー(HILIC)カラムは、Atlantis HILIC (50 mm x 4.6 mm I.D., 粒径3 µm, Waters), SeQuant ZIC-HILIC (150 mm x 4.6 mm I.D., 粒径3.5 µm, Merck), SeQuant ZIC-HILIC (150 mm x 2.1 mm I.D., 粒径3.5 µm, Merck)の3種類を用いた。移動相は、アセトニトリル及び1%のギ酸を含む150 mM 酢酸アンモニウムを使用した。溶離はグラジェントモードにて行った。グラジェント条件はそれぞれのクロマトグラム(別添図)中に示した。

ODSカラムは、CADENZA CW-C<sub>18</sub> (250 mm x 3 mm I.D., 粒径3 µm, Imtakt), CADENZA CL-C<sub>18</sub> (250 mm x 3 mm I.D., 粒径3 µm, Imtakt), Symmetry C<sub>18</sub> (150 mm x 4.6 mm I.D., 粒径5 µm, Waters)の3種類を用いた。移動相はアセトニトリル及びイオン対試薬の水溶液の混合溶液

を使用した。イオン対試薬は、Trifluoroacetic Acid (TFA)、Heptafluorobutyric Acid (HFBA)、Undecafluorohexanoic Acid (PFFA-6)及びPentadecafluorooctanoic Acid (PFFA-8)を選択した。

高速液体クロマトグラフィーシステムは、ELSD 検出器 (ELSD-LT II、島津製作所) を接続した島津 Class VP-10 HPLC systemを用いた。検出条件は圧力及びネブライザー温度をそれぞれ350 kPa及び55 °C に設定した。

各カラムの分離検討用サンプルとして、各アミノグリコシド化合物を0.5 mg/mLに調製した水溶液を用いた。また直線性の検討では、Symmetry C<sub>18</sub>カラムを用い、パロモマイシンについては、0.001mg/mL~0.5 mg/mL、アプラマイシンについては、0.005 mg/mL~1.0 mg/mL、リンコマイシン、ストレプトマイシンおよびカナマイシンについては0.004 mg/mL ~1.0 mg/mL、アミカシンについては 0.012 mg/mL ~1.67 mg/mL、スペクチノマイシンおよびトブラマイシンについては 0.019 mg/mL ~1.67 mg/mL、ネオマイシンについては 0.031 mg/mL ~1.0 mg/mL の濃度範囲の標準溶液を調製した。溶出条件はアセトニトリル (移動相A) 及びPFFA-8水溶液 (移動相B) を用いたグラジェントを採用し、移動相Bの割合を60% (0 min) → 54% (3 min) → 43% (27 min) → 60% (30 min)に設定した。流速及びカラム温度は 1.0 mL/min及び40°Cに設定した。注入量は1 µLとした。

(倫理面への配慮)

今年度は動物を用いた研究を行っておらず、配慮すべき事項は特になし。

### C. 研究結果

各 HILIC カラムにより得たクロマトグラムを図2~図4に示した。

Atlantis HILIC カラム (図2) では7種類の化合物が分離されるが、パロモマイシン、トブラマイシン、アプラマイシンの3種類がほぼ同一の保持時間に溶出された。

SeQuant ZIC-HILIC は太さの異なる2種類のカラム(内径4.6 mm及び2.1 mm)を用いたが、溶出順及び分離結果はほぼ同じであった(図3及び図4)。6種類のアミノグリコシド系化合物は分離されるが、パロモマイシンとアプラマイシン、またトブラマイシンとゲンタマイシンがそれぞれほぼ同一の保持時間に溶出されている。また、アミカシンとカナマイシンおよびゲンタマイシンとネオマイシンの溶出順が

Atlantis HILIC カラムの場合とは異なっていた。

イオン対試薬 PFFA-8 を用いて得られた各 ODS カラムにより得たクロマトグラムを図5~図8に示した。用いた酸性イオン対試薬のアルキル鎖が TFA から PFFA-8 と長くなるに従い塩基性化合物の保持が強くなる傾向が示され、今回の10種類のアミノグリコシドの一斉分析にはPFFA-8 がイオン対試薬としては最適であった。

CADENZA CW-C<sub>18</sub>カラム (図5) では分離の度合いは悪いがアプラマイシンとパロモマイシンが分離され、10種類のアミノグリコシドが分離されている。ゲンタマイシンを構成する5種類の成分も分離されている。

CADENZA CL-C<sub>18</sub>カラム (図6) の場合も同様に、分離の度合いは悪いがアプラマイシンとパロモマイシンが分離され、10種類のアミノグリコシドが分離された。また、ゲンタマイシンに含まれる5種類の構成成分も分離された。また、Symmetry C<sub>18</sub>カラム (図7) の場合は10種類のアミノグリコシド系化合物が完全に分離し、ゲンタマイシンの5つの構成成分も適切に分離された。

以上の結果から、イオン対試薬 PFFA-8 を用いた Symmetry C<sub>18</sub>カラムにより、10種類のアミノグリコシド系抗生物質の一斉分析が可能となった。

本条件下での定量分析としての分析能を評価するため、ゲンタマイシンを除く9種類のアミノグリコシドに関して、それぞれの標準溶液から得た各化合物のピーク面積および濃度の対数値との相関から求めた直線性、定量限界 (LLOQ)、検出限界 (LOD) および相対標準偏差 (RSD) を表1に示した。ゲンタマイシンは標準物質中に少なくとも5種類の構成成分を含むことから、別途検討を行った。

パロモマイシンに関しては 0.001~0.5 mg/mL の濃度範囲で、良好な線形性 (対数による一次回帰式及び相関係数 ( $r^2$ ) は、それぞれ、 $\ln(y) = 1.014\ln(x) + 11.817$ 及び0.9985であった。LLOQ及びLOD はそれぞれ2.067 µg/mL、1.271 µg/mLであり、また24 µg/mL 濃度の標準溶液から求めたRSDは0.21%であった(図8 (代表例))。

その他のアミノグリコシド系化合物に関しても、使用した標準溶液の濃度範囲において、相関係数は何れも0.998以上を示し、良好な直線性が認められた。LLOQは0.15~2.15 µg/mL、LODは1.13~1.29 µg/mLの範囲内であった (表1)。

この条件下で得られたゲンタマイシンのク

ロマトグラムでは5つのピークが検出された(図9)。これらのピークに関して 超高速液体クロマトグラフィー/質量分析計

(UHPLC/MS)で検討したところ、Sisomicin、及びゲンタマイシンC<sub>1a</sub>、C<sub>2</sub>、C<sub>1</sub>およびC<sub>2a</sub>であることが文献との比較で明らかとなった

これらの5成分の濃度と面積値に関する一次回帰式及び相関係数を求めると、Sisomicin、ゲンタマイシンC<sub>1a</sub>、C<sub>2</sub>、C<sub>1</sub> および C<sub>2a</sub> でそれぞれ、

$$\ln(y) = 1.3793\ln(x) + 14.776, r^2 = 0.9978,$$

$$\ln(y) = 1.5879\ln(x) + 16.339, r^2 = 0.9987,$$

$$\ln(y) = 1.5854\ln(x) + 17.116, r^2 = 0.9995,$$

$$\ln(y) = 1.5.212n(x) + 17.541, r^2 = 0.9963,$$

$$\ln(y) = 1.6208\ln(x) + 16.875, r^2 = 0.9992$$

となり、いずれも優れた直線性を示した。これらの組成比はそれぞれ、面積百分率比で3.13, 12.75, 26.76, 36.92 および 20.45% であった。

#### D. 考察

本研究では、パロモマイシンのほか、9種類のアミノグリコシドの一斉分析法の開発および定量性を検討した。研究対象とした化合物類はUV 吸収を持たないため、検出器としてELSD を用いた。また、親水性の高い化合物のため、分析用カラムとしては HILIC カラムあるいはイオン対試薬を移動相とする ODS カラムを検討した。

HILICカラムによる化合物の保持の程度は、“疎水性保持係数”として表現され、親水性の化合物ほど強く保持される。また疎水性保持係数は分子全体の疎水性の程度を表すLog P値等と相関を示す。これらのことから、溶出順序は分子量の大きな化合物ほど早く溶出することになる。

本研究の対象化合物であるパロモマイシン、アプラマイシン、トブラマイシンおよびゲンタマイシンの分子量はそれぞれ、615.71、539.58、467.59及び477.6 (C<sub>1</sub>として)であり、分子量の差からこれらはHILICカラムで充分分離可能であると推定されるが、ほぼ同じ保持時間で溶出された。本研究で得た溶出順序は親水性(塩基性)に関与するアミノ基の数に依存していると推定される。フリーの-NH<sub>2</sub> 基あるいは-NHCH<sub>3</sub> 基の数を比較すると、パロモマイシン、アプラマイシン、トブラマイシンおよびゲンタマイシンはいずれもフリーの-NH<sub>2</sub> 基あるいは-NHCH<sub>3</sub> 基を化学構造内に5つ有しており、これらの溶出順はほぼ同じになっている。また溶出が他のアミノグリコシドに比較して遅くなっている。4個のフリーの-NH<sub>2</sub> 基を有して

いるアミカシンおよびカナマイシンはこれらより早く溶出されている。これらより少ない2個のフリーの-NH<sub>2</sub> 基を有しているストレプトマイシンは更に早く溶出されている。フリーの-NH<sub>2</sub> 基を持たず、2個の-NHCH<sub>3</sub> 基のみを有しているリンコマイシンおよびスペクチノマイシンはこれらより更に早く溶出されている。また同じ数のフリーの-NH<sub>2</sub> 基あるいは-NHCH<sub>3</sub> 基を有する化合物間の分離には-OH 基や分子の立体構造が関与しているものと思われる。

イオン対試薬を用いた ODS カラムによる分離では、イオン対試薬のアルキル鎖が長くなるほどアミノグリコシドの保持が強くなり、分離も良好になる傾向が見られ、最もアルキル鎖の長いPFPA-8 を用いたグラジェント法では、分離の程度に差はあるものの、使用した3種類の ODS カラムで10種類のアミノグリコシドが分離されている。特にSymmetry C<sub>18</sub>カラムでは10種類の完全分離が可能となった。

#### E. 結論

10種のアミノグリコシドの完全分離が Symmetry C<sub>18</sub> カラムとイオンペア試薬(pentadecafluoro octanoic acid)を用いることによって可能となった。また、ゲンタマイシンの5種類の構成成分の分離定量が、Symmetry C<sub>18</sub> またはCadenza CL-C<sub>18</sub>カラムとイオンペア試薬を用いるグラジェント法により可能となった。蒸発光散乱検出器を用いることにより、UV/吸収を持たないアミノグリコシドを広い範囲で精度良く定量することが可能となった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

該当なし

##### 2. 学会発表

1. T. Sakamoto, H. Watanabe, N. Katori, H. Okuda, Simultaneous determination of aminoglycosides using high-performance liquid chromatography equipped with ELSD, The Pittsburgh Conference on Analytical Chemistry and Applied spectroscopy (PITTCON 2012), Orland, FL, USA (2012.3)
2. 坂本知昭、渡邊英俊、香取典子、奥田晴宏、HPLC 蒸発光散乱検出器を用いたアミドグリコシド系抗生物質の一斉分析、日本薬学会第132年会、日本薬学会第132年会、札幌(2012.3)

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし