

抗リウマチ薬に関する臨床薬学的研究

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 生命薬科学専攻 曾根本 恵美

[目的]

関節リウマチ (RA) は関節滑膜を主病変部とするが、ときに関節外の症状を伴う全身性疾患である。RA の原因は明らかとなっていないが、その病態形成にはサイトカインが大きく関与していることがわかっており、関節内で、腫瘍壊死因子- α (TNF- α)、インターロイキン-1 (IL-1) 及び IL-6 などの炎症性サイトカインが優位に作用する結果、血管新生、滑膜表層細胞の増殖、炎症細胞の活性化及び骨・軟骨破壊などの RA の病態が起こると考えられている。

近年、疾患修飾性抗リウマチ薬 (DMARDs) や生物学的製剤の登場により、骨破壊を遅延・防止して、RA の自然経過を変えることが可能となったため、RA 治療は劇的に変化した。著者はこれらの RA 治療薬及び併用される薬に関する研究を行い、医療情報のもとになる基礎的データの収集及びその解析を行い、これらの適正使用に資することを目的とした。これら RA 治療薬の内、メトトレキサート (MTX) は有効性が最も確立した DMARDs の 1 つであり、核酸合成を阻害する葉酸代謝拮抗薬として、悪性腫瘍の治療にも用いられている。RA 治療は、MTX を基本として、効果不十分例や関節外症状を伴う重症・難治例に対して、DMARDs 併用療法や生物学的製剤との併用療法が行われている。しかしながら、MTX の薬物動態には個体差があり、重篤な副作用や薬物相互作用が報告されていることから、RA 治療においても、血中濃度モニタリング (TDM) を行い、その他の生物学的製剤等の併用薬物の影響を評価する必要があると考えた。

そこで本研究では、まず LC-MS/MS を用いたヒト血清中 MTX の高感度分析法を開発した。次に、MTX と併用される薬物として、シクロスポリン A (CyA) 後発品の有効性・安全性を調べるとともに、TNF- α を阻害する生物学的製剤であるアダリムマブ (ADA) によって重篤な血小板減少を引き起こした症例について検討した。さらに、IL-6 を阻害する生物学的製剤であるトシリズマブ (TCZ) の HPLC-蛍光 (FL) 定量法の開発し、TCZ の安定性評価に適用した。

[実験及び結果・考察]

1. MTX の LC-MS/MS 定量法の開発と応用¹⁾

分析対象とした MTX 及び内標準物質 (I.S.) として用いた pterin の構造式を Fig. 1 に示す。MTX の分離には、Luna 3u C18 (2) カラム (100 x 4.6 mm i.d., 3 μ m) を固定相として、移動相には 1% acetic acid / acetonitrile = 88/12 (v/v, %) の混液を用いたイソクラティック溶出により、MTX を他の血清成分の影響を受けることなく、5 分以内に良好に分離することができた (Fig. 2)。MTX 及び I.S. の保持時間は、それぞれ 2.4 分及び 4.4 分であった。内標準法を用いて検量線を作成した結果、10-1000 nM の濃度範囲で良好な直線性を示し ($r = 0.999$)、検出下限 (S/N = 3) は 3.0 nM であった。本法は感度等に関して既報の性能と同程度の高感度な分析法であった。

本法を用いて MTX 治療を受けている RA 患者血清中の MTX の定量に適用した。検討した 9 人すべての患者から 287.8 ± 13.2 - 1164.1 ± 44.7 nM の範囲で MTX を定量

することができた。患者は多くの種類の併用薬を服用していたが、それらの影響を受けることなく MTX の定量が可能であった。

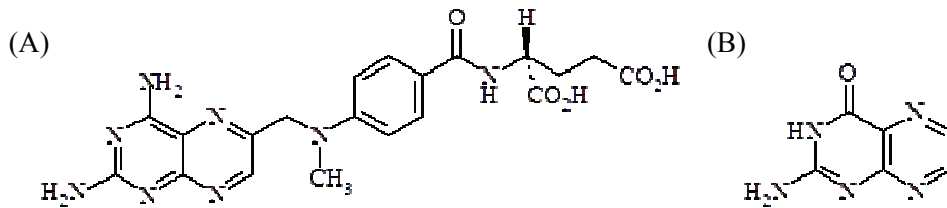


Fig. 1 Structures of MTX (A) and I.S. (B).

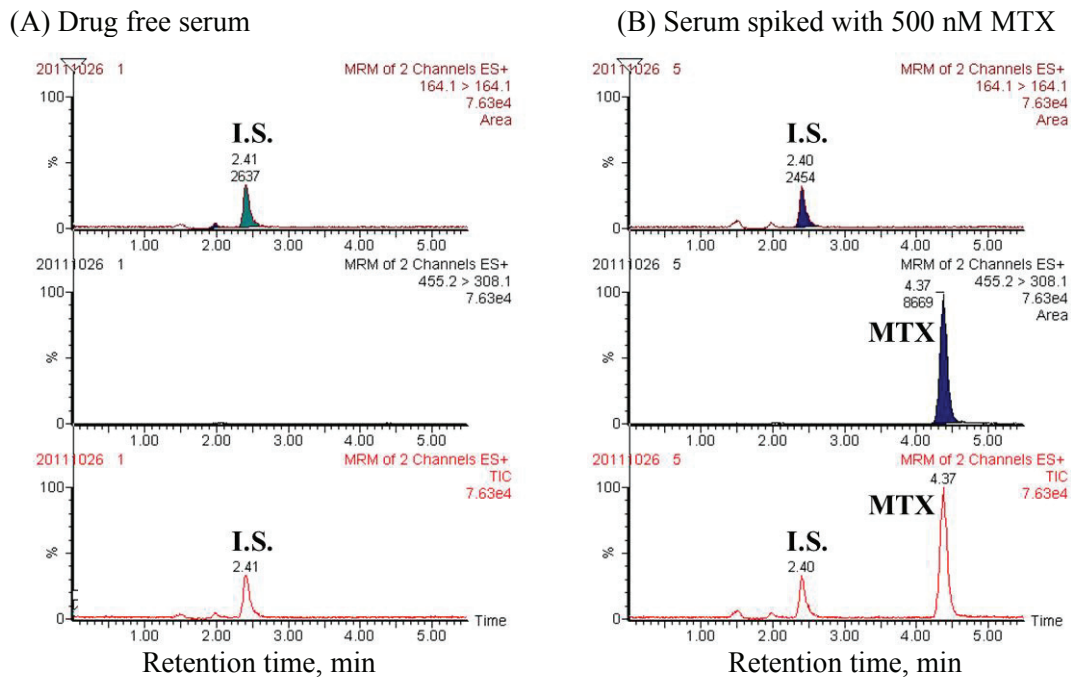


Fig. 2 Chromatograms of MTX and I.S. in human serum.

2. CyA 後発品の有効性・安全性に関する検討

2009年5月から2011年4月までに佐世保中央病院でCyA後発品を服用し、血中濃度測定を行った膠原病入院患者(女性9名:平均年齢55.7歳)を対象として有効性及び安全性に関する検討を行った。

CyAは、投与後2時間から4時間までに最高血中濃度を示し、先発品とほぼ同様の結果となった。CyA投与量と血中濃度の相関について検討したところ、明らかな相関は認められなかったが、正の相関を示す傾向がみられた($r=0.429-0.475$)。次に、有効性の指標としてPSLの投与量についての検討を行った。有意差は認められなかったが($p=0.14$)、CyA後発品開始後にPSLの減量が可能であり、CyA後発品の有効性が示された。

安全性に関する検討として、CyA後発品開始前後の臨床検査値及び血圧を比較した結果、収縮期血圧の有意な上昇がみられた($p=0.004$)。降圧剤を開始または増量した症例はなかったことから、CyA後発品は膠原病患者において忍容性が高いと考えられた。

3. ADAにより血小板減少が長期遷延した症例

ADAに代表されるTNF阻害剤では、肺炎、結核、うっ血性心不全、汎血球減少及び悪性腫瘍等の重篤な副作用が報告されている。今回、ADAとMTXを併用していた患者において、有害事象共通用語規準 Ver. 4.0でGrade 4に相当する重篤な血小板減少が発現した ($2.0 \times 10^4/\mu\text{L}$)。MTXが原因で血小板減少が引き起こされることが知られている。一般的に骨髄抑制は、半減期の短い顆粒球の減少が先に起こる可能性が高いと考えられる。しかしながら、本症例では、白血球数及びリンパ球数の低下は認められなかった。また、ADA及びMTX中止後、血小板数が正常化するまで3ヵ月を要した。これは薬剤の半減期が関連していると考えられ (MTX: 約3時間, ADA: 14日)、本症例で発現した重篤な血小板減少とADAが関連している可能性が示唆された。

TNF阻害剤による血小板減少の機序については明らかとなっていないが、幹細胞の分化に重要な役割を果たしているIL-1、IL-6、IL-8及び顆粒球マクロファージコロニー刺激因子などの炎症性サイトカインが低下することにより、血小板減少が引き起こされた可能性が考えられた。

4. TCZのHPLC-FL定量法の開発と応用

注入したTCZ (20 μL) を、0.1% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA) in water 及び0.1% (v/v) TFA in (isopropanol - acetonitrile - water (70 : 20 : 10, v/v/v)) からなる溶離液を用いてグラジエント溶出し、Zorbax 300SB-C8 カラムで分離後、蛍光検出器により検出した。カラム温度は75 $^{\circ}\text{C}$ に設定し、検出波長は励起波長288 nm、蛍光波長332 nmとした。本条件によりTCZを保持時間18.5分で分離可能であり、その検出下限 (S/N = 3) は、0.59 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。

開発した方法を製剤の安定性評価に適用した。室温条件下、冷蔵及び冷凍保存条件下のいずれにおいても製剤の安定性が示され、生理食塩液希釈後の安定性については、既報のデータと一致した。

[結論]

本研究では、RA治療薬及び併用される薬を対象とした臨床薬学研究における基礎的なデータの収集及び解析を行った。まずヒト血清中MTXのLC-MS/MS高感度定量法を開発し、患者血清中のMTX定量に適用した。その結果、併用薬の影響を受けることなくMTXの定量が可能であった。MTXの薬物相互作用の評価に有用な方法を開発できたと考える。次にMTXと併用されるCyA後発品の有効性及び安全性を確認し、その使用促進につながるデータを得ることができた。さらにADAが関連する重篤な血小板減少を発現した症例を精査し、ADA使用時に注意すべき情報を提供した。最後にTCZの自然蛍光を利用したHPLC-FL定量法を開発し、本法を製剤の安定性評価に適用した。今後開発したMTXとTCZの分析法を用いてこれらを併用した際の薬物相互作用評価に役立てることができると考える。

今回の研究で得られた基礎的な結果は、現在使用されているRA治療薬の適正使用に貢献できる医療情報につながると考える。

[基礎となった学術論文]

1. Sonemoto E., Kono N., Ikeda R., Wada M., Ueki Y., Nakashima K.: Practical determination of methotrexate in serum of rheumatic patients by LC-MS/MS. *Biomed. Chromatogr.*, (2012) in press.