

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08877

研究課題名(和文) 肺動脈血栓塞栓症における脂質メディエーター動態への抗精神病薬の影響

研究課題名(英文) Changes of plasma lipid mediators in antipsychotics related pulmonary arterial thromboembolism.

研究代表者

米満 孝聖 (Yonemitsu, Kosei)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・准教授

研究者番号：10128332

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：抗精神病薬服用者に発症する肺動脈血栓塞栓症の発症機序の解明を目的として、非定型抗精神病薬クロザピンをラットに連続投与して、血栓形成に關与する血漿中脂質メディエーターをLC-MS/MSで分析した。ラット血漿中TXB2濃度は極めて大きな個体差があり、薬物投与群と対照群に有意差はなかった。6-keto-PGF1 は検出限界以下であった。肺動脈血栓塞栓死事例の病理組織学的検討では、新鮮血栓、器質化血栓およびその混在事例があり、死亡までの数週間以前に発症していたことが疑われた。抗精神病薬服用者の急死予防のために入院加療中における肺動脈血栓塞栓症発症の予防策が重要である。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the pathogenesis of pulmonary arterial thromboembolism occurring in patients taking antipsychotics, plasma lipid mediators (LMs) involved in thrombus formation were analyzed by LC-MS/MS using clozapine (an atypical antipsychotics) administered rats. An extremely large individual difference was observed in TXB2 level, and no significant difference was observed between the clozapine and the control group. 6-keto-PGF1 level was under the lowest limit of quantification. In histopathological examination of forensic autopsy cases of pulmonary arterial thromboembolism during antipsychotic medication, fresh thrombus, organized thrombus and both mixed cases were observed. Preventive measures against thrombus formation during hospitalization are necessary for patients taking antipsychotics.

研究分野：法医学

キーワード：肺動脈血栓塞栓症 抗精神病薬 脂質メディエーター LC-MS/MS 法医学解剖

1. 研究開始当初の背景

抗精神病薬などの向精神薬は肺動脈血栓塞栓症の発症要因の一つとして挙げられ、日本では一部の抗精神病薬（現在 40 種類）の添付文書中に肺動脈血栓塞栓症が重大な副作用として記載され、抗精神病薬は肺動脈血栓塞栓症のリスクファクターの一つとして認識されている。

肺動脈血栓塞栓症の発症機序としては、いわゆる Virchow の 3 徴と言われる、血流うっ滞、血管内皮傷害、凝固能亢進の 3 主要機序が考えられている。抗精神病薬服用者における肺動脈血栓塞栓症は抗精神病薬によって引き起こされる抑制や肥満、あるいは長期臥床などの間接的な影響による血流停滞が影響していることが予想される一方、薬物療法の開始直後や、多剤併用者、静脈・筋肉内投与などでの発症が報告され、抗精神病薬の直接的な影響も示唆されている [Shulman M et al. *Minerva Med*, 2013]。しかし、血栓形成に対する抗精神病薬の直接的な影響を示す研究データはほとんど報告されていない。

2. 研究の目的

本研究では、抗精神病薬服用者における肺動脈血栓塞栓症の発症機序究明を目的として、血小板凝集に關与する脂質メディエーター (LMs) の LC-MS/MS を用いた分析法を用いて、非定型抗精神病薬のクロザピン投与後におけるラット血漿中の LMs 濃度と凝固・線溶系マーカーの測定を試みた。また、実際の法医解剖事例を対象として、薬物服用者における肺静脈血栓塞栓症の検索を行い疫学的に検討するとともに、血栓および血栓周囲の血管組織の病理組織学的検討を行ない、抗精神病薬服用者における肺動脈血栓塞栓症の特徴について検討した。

3. 研究の方法

1. LC-MS/MS を用いた LMs の定量分析法

LC-MS/MS を用いて以下の条件で LMs を分析した。機器：Shimadzu LCMS8040
カラム：Phenomenex, Kinetex C8(2.1 mm ID x 150 mmL, 2.6 μm)、移動相：(A) 0.1% 酢酸-水、(B) アセトニトリル、分析アプリケーション：Shimadzu LC/MS/MS メソッドパッケージ脂質メディエーター Version2。

LMs の抽出は固相抽出カラム (Strata-X, 10-30 mg, Phenomenex) を用いた。血漿 100 ~ 300uL にメタノール 1-3mL、内部標準物質として重水素化 LMs を添加して、4 で 10 分間振盪後、10000 rpm で 10 分間遠心した上清を 0.1% ギ酸水溶液で希釈してカラムで抽出した。最終メタノール溶出液を試料として LC-MS/MS 分析した。以上の方法を用いて LMs の検出限界、検量線の作成法、抽出条件、定量限界、回収率等について検討した。

2. 非定型抗精神病薬クロザピン投与ラット血漿中の LMs 濃度および凝固線溶系マーカーの測定

非定型抗精神病薬のクロザピンを Wister

系ラット (各群 n=5) に 10mg/kg、1 回/日、1 週間あるいは 2 週間連続腹腔内投与した。コントロール群では生理食塩水を同様に投与した。投与期間終了後、3 種混合麻酔薬による麻酔下で開腹して下大静脈から 3.2% クエン酸 Na を入れたシリンジで約 5mL 採血した。直ちに血漿を分離して -80 に保存した。血漿中の LMs 濃度を LC-MS/MS で分析するとともに、血液凝固分析装置 (COAG2N、和光純薬工業株式会社) を用いて、プロトロンビン時間 (PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) およびフィブリノゲン濃度を測定した。

3. 法医解剖事例における肺動脈血栓塞栓症事例の検索と病理組織学的検討

2001 年から 2014 年の間に、熊本大学法医学分野で解剖された事例を検索して抗精神病薬服用履歴あるいは抗精神病薬検出事例を抽出した。その中から直接死因が肺動脈血栓塞栓症事例を検索して性別、年齢、身長、体重 (BMI)、精神疾患名、精神疾患の罹患期間、処方薬物の種類、生活様態、死亡時の状況を調査した。また、ホルマリ固定された血栓、肺動脈および下肢静脈を 5 種類の染色法 (HE 染色、PTAH 染色、Kossa 染色、Berlin Blue 染色、Elastica van Gieson 染色) を用いて病理組織学的に検討した。

4. 研究成果

1. LC-MS/MS を用いた LMs の定量分析法 1 - 1) 検出限界

分析可能な LMs のうち、アラキドン酸からシクロオキシゲナーゼ (COX) によって生成され、血小板凝集に關与するトロンボキサン B2 (TXB2)、6-ケト-プロスタグランジン F1 (6-keto-PGF1) の LCMS8040 における検出限界は絶対注入量でそれぞれ約 0.5pg、約 2.5pg であった。

1 - 2) 検量線の作成方法

LMs 標準液に内部標準物質としてそれぞれの化合物の重水素置換体を添加して分析する方法と、人工血漿 (SeraSub®) に LMs 標準溶液を添加して抽出する方法で検量線を作成して比較したところ、ほぼ同様な結果が得られた。

1 - 3) 定量限界

LMs の定量限界は血漿 100uL を試料とした場合、6-keto-PGF1 が約 100pg/mL、TXB2 が約 250pg/mL であった。

1 - 4) 回収率

ラット血漿に LMs をそれぞれ 200pg 添加した場合の回収率は 6-keto-PGF1 が 75%、TXB2 が 104%、PGE2 が 87%、PGD2 が 64% であった。

1 - 5) ラット血漿の分析

上記方法を用いて Wister 系ラットの血漿 100uL を分析したところ、TXB2 は 6.8 ~ 7.3ng/mL で定量可能であった。しかし、6-keto-PGF1 はピークの確認はできたが定

量値は定量限界 (100pg/mL) 以下の 15 ~ 57pg/mL であった。

2 . 非定型抗精神病薬クロザピン投与ラット血漿中の LMs 濃度および凝固線溶系マーカーの測定

2 - 1) 薬物投与後のラット体重変化など

クロザピン投与ラットでは投与後にヘッドドロップが見られたが、翌日には通常に戻っていた。コントロール群に比べて投与 1 週間群と投与 2 週間群の何れも体重増加が遅かったが、投与期間中のラットの行動などに特に異常は認められなかった。

2 - 2) ラット血漿中の血小板凝集関連 LMs 濃度およびその他の LMs 濃度

血漿 300uL を試料として LMs を定量分析した結果、TXB2 は全てのラットから検出された。しかし、検出濃度には定量限界 (250pg/mL) 以下から 175ng/mL まで極めて大きな個体差が認められ、クロザピン投与ラット群とコントロール群との間に有意な差は認めなかった。採血後の血漿分離過程での血小板活性化の違いなどの影響が考えられた。また、アラキドン酸濃度も各群間に有意差を認めなかった。なお、6-keto-PGF1 はほとんどの試料で定量限界の 100pg/mL 以下であった。

2 - 3) ラット血漿の凝固線溶系試験

プロトロンビン時間 (PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) およびフィブリノゲン濃度の何れに於いても LMs 定量値と同様に各群間に違いは認められなかった。

3 . 法医解剖事例における肺動脈血栓塞栓症事例の検索と病理組織学的検討

3 - 1) 法医解剖事例における抗精神病薬処方状況

2001 年から 2014 年に熊本大学法医学分野での全法医解剖事例 1797 例中、精神疾患を有しかつ精神神経作用薬の服用履歴がある事例は 162 例 (9.0%) であった。年度毎の解剖事例数に対する対象事例の割合は 2002 年から 2009 年までは 5%前後であったが、それ以降は増加傾向にあり 2011 年以降は 10%以上であった。

3 - 2) 肺動脈血栓塞栓症事例の検索

その中で、肺動脈血栓塞栓症事例は 9 例であった。いずれも統合失調症やうつ病、人格障害などにより 1 年から 35 年の入院履歴があった。全例が女性であり、平均年齢は 46.8 歳 (±9.1 歳) であった。処方頻度が多い薬物はリスペリドン 5 例、オランザピン 2 例、レボメプロマジン 2 例などであり、何れの事例でも 2 ~ 10 種類の複数の精神神経作用薬が処方されていた。また、死亡場所は病院が 5 例、自宅その他が 4 例であった。

3 - 3) 肺動脈血栓塞栓症事例における血栓の病理組織像

血栓および周囲血管組織を以下の 5 種類の染色方法を用いて病理組織学的に検討して、Vittorio et al. (2009) らの方法に従って血

栓・塞栓の性状とその形成時期を判定した。その結果、9 例のうち 7 例には新鮮血栓、4 例には器質化した血栓が観察され、4 例ではその両者が混在していた。また、全例で肺動脈内膜の肥厚が確認され、肺高血圧が起きていたことが示唆された。また、血栓の陳旧度とともに血管壁における反応の違いにより、新鮮な血栓が肺に飛来してから急死した事例 (4 例)、器質化した血栓が肺に飛来してから急死した事例 (2 例)、肺に血栓が飛来してから死まで長時間を要した事例 (2 例) に分類できた。

向精神薬服用者における肺動脈血栓塞栓の死亡事例においても死に至るまでくり返し血栓が形成されていたいわゆる acute on chronic PTE も存在し、向精神薬服用者においても血栓がくり返し形成されていることが示された。向精神薬服用者については、肺動脈血栓塞栓症の発症を念頭に置いて看護、治療にあたる必要がある。

< 引用文献 >

1) Shulman M. et al. Thrombotic complications of treatment with antipsychotic drugs. *Minerva Med.* 2013 104:175-84.

2) Vittorio F. et al. Histological age determination of venous thrombosis: A neglected forensic task in fatal pulmonary thrombo-embolism. *Forensic Science International*, 186:22-28, 2009.

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

Ako Sasao, Michiyo Takaki, Yuki Ohtsu, Satoko Mishima, Kosei Yonemitsu, Hiroshi Morioka, Yoko Nishitani, Development of an immunoassay for fluvoxamine detection using a recombinant single-chain variable fragment antibody, *Forensic Toxicology*, 査読有, 35, 2017, 301-308

DOI: 10.1007/s11419-017-0358-9

Mishima-Kimura S, Yonemitsu K, Ohtsu Y, Sasao A, Tsutsumi H, Furukawa S, Nishitani Y, Liquid chromatography-tandem mass spectrometry detection of benzalkonium chloride (BZK) in a forensic autopsy case with survival for 18 days post BZK ingestion, *Legal Medicine*, 32, 2018, 48-51

DOI: 10.1016/j.legalmed.2018.02.006

[学会発表] (計 9 件)

米満孝聖, 大津由紀, 笹尾亜子, 堤 博志, 古川翔太, 三島聡子, 西谷陽子, 焼損臓器等を試料とした焼死体の揮発性有機化合物分析, 第 101 次日本法医学会学術全国集会、

2017年6月7日～9日、岐阜市長良川国際会議場

笹尾亜子, 高木美智代, 大津由紀, 三島聡子, 堤博志, 古川翔太, 米満孝聖, 森岡弘志, 西谷陽子, 抗うつ薬フルボキサミンの一本鎖抗体を用いたELISA定量法とその特性, 第101次日本法医学会学術全国集会、2017年6月7日～9日、岐阜市長良川国際会議場

西谷陽子, 堤博志, 古川翔太, 大津由紀, 笹尾亜子, 木村聡子, 米満孝聖, Gemella morbillorumによる肺膿瘍の1例、第67回日本法医学会学術九州地方集会、2017年11月24～25日、那覇市サザンプラザ海邦

米満孝聖, 笹尾亜子, 大津由紀, 堤博志, 古川翔太, 木村聡子, 西谷陽子, 血漿中脂質メディエーターのLC-MS/MS分析、第67回日本法医学会学術九州地方集会、2017年11月24～25日、那覇市サザンプラザ海邦

Kosei Yonemitsu, Ako Sasao, Yuki Ohtsu, Hiroshi Tsutsumi, Shota Furukawa, Satoko Mishima, Yoko Nishitani, High mirtazapine concentration in a newborn baby - A child abuse case -, The 24th Congress of the International Academy of Legal Medicine, 2018年6月5～8日、福岡国際会議場

Ako Sasao, Michiyo Takaki, Kyoko Hirata, Yuki Ohtsu, Hiroshi Tsutsumi, Shota Furukawa, Kosei Yonemitsu, Hiroshi Morioka, Hiroshi Ueda, Yoko Nishitani, Development of a Fluvoxamine Detection System Using Quenchbody, a Novel Antibody-Based Fluorescent Biosensor, The 24th Congress of the International Academy of Legal Medicine, 2018年6月5～8日、福岡国際会議場

Hiroshi Tsutsumi, Kosei Yonemitsu, Ako Sasao, Yuki Ohtsu, Shota Furukawa, Satoko Mishima, Yoko Nishitani, Effects of neuropsychiatric drugs on neurotransmitters level in the rat cerebrospinal fluid, The 24th Congress of the International Academy of Legal Medicine, 2018年6月5～8日、福岡国際会議場

Kyoko Hirata, Ako Sasao, Kosei Yonemitsu, Yuki Ohtsu, Hiroshi Tsutsumi, Shota Furukawa, Satoko Mishima, Yoko Nishitani, A sudden death related to 1,1-Difluoroethane (HFC-152a, DFE) inhalation., The 24th Congress of the International Academy of Legal Medicine, 2018年6月5～8日、福岡国際会議場

Shota Furukawa, Ako Sasao, Kosei Yonemitsu, Yuki Ohtsu, Hiroshi Tsutsumi, Satoko Mishima, Kazuaki Taguchi, Yoko Nishitani, Effects of arterial bleeding on blood coagulation/fibrinolysis-system in rats - A preliminary study, The 24th Congress of the International Academy of

Legal Medicine, 2018年6月5～8日、福岡国際会議場

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)
取得状況(計0件)

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米満 孝聖 (YONEMITSU, Kosei)
熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・
准教授

研究者番号: 10128332

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

西谷 陽子 (NISHITANI, Yoko)
熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・
教授

研究者番号: 30359997

笹尾 亜子 (SASAO, Ako)
熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・
助教

研究者番号: 80284751

大津 由紀 (OHTSU, Yuki)
熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・
専門技術職員

研究者番号: 90404342