

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 18 日現在

機関番号：30111

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590140

研究課題名（和文） 切迫早産治療薬リトドリンの適正使用指針構築

研究課題名（英文） Establishment of rational usage method of ritodrine for preterm labor therapy

研究代表者

猪爪 信夫（INOTSUME NOBUO）

北海道薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：10191892

研究成果の概要（和文）：高速液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS 及び LC-MS/MS)による血中微量リトドリン濃度測定法を新規に開発した。この方法を応用して、血中リトドリンの直接光学分割測定方法を開発した。また、血液サンプルと口腔粘膜細胞として抽出・精製を行った DNA サンプルからリトドリンの代謝酵素である SULT1A1 の遺伝子多型解析法を確立した。

リトドリンの持続注入療法が行われた切迫早産状態にある単胎と双胎妊婦の定常状態における血清中リトドリン濃度を解析したところ、単胎と双胎妊婦における体内動態には有意な差を認めた。また、双胎妊婦からの臍帯血清中リトドリン濃度を解析したところ、リトドリンは容易に胎盤を通過する結果が得られた。同じ母体からの臍帯であっても第1子と第2子では血清中リトドリン濃度に大きな差を認めた。これらのことから、リトドリンを切迫早産治療のために用いる差異には、母体のみならず、胎児も血清中濃度も個人差が大きいことから、血清中リトドリン濃度をモニタリングによる副作用発現の防止が必要と考えられる。今後、主代謝酵素である SULT1A1 の遺伝子多型解析情報の集積も必要である。

研究成果の概要（英文）：A new measurement method using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS and LC-MS/MS) allows direct optical resolution of serum ritodrine concentrations. SULT1A1 is the main enzyme that metabolizes ritodrine. We applied LC-MS and LC-MS/MS to establish a method of analyzing SULT1A1 polymorphisms in DNA extracted from blood and buccal mucosa.

Ritodrine pharmacokinetics significantly differed in women pregnant with singletons and twins and in preterm labor under continuous ritodrine infusion. Analyses of umbilical cord serum ritodrine concentrations showed that ritodrine easily passes through the placentas of twins in pregnant women. Serum ritodrine concentrations significantly differed between the first and second newborn twins. Serum ritodrine concentrations should be individually monitored to manage ritodrine therapy including side effects. SULT1A1 gene polymorphisms should be further investigated to assess ritodrine metabolism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：オーダーメイド医療、周産期医療、切迫早産治療

1. 研究開始当初の背景

早産は妊娠 22 週から 37 週未満の分娩と定義され、周産期死亡の約 70%を早産児が占める。厚生労働省「母子保健の主な統計」によれば 2000 年の早産率は 5.4%であり増加傾向にある。松田らの報告によると、妊娠 26 週を境に胎児の生存率が大きく上昇する。一方、脳性麻痺の発症率は、妊娠週数 31 週を境に有意に減少することを報告している。さらに、Lewis らは、妊娠 34 週以前と比較して、35 週以降では呼吸窮迫症候群 (RDS) の発症率リスクが有意に小さくなる結果を報告している。これらのエビデンスにより、周産期医療においては早産による胎児の未熟性が危険因子であり、在胎日数をできるだけ延長させて胎児へのリスクを未然に防止し、成熟させることを目的に切迫早産治療が行われている。我が国における切迫早産治療薬としては、主にリトドリン塩酸塩が用いられている。リトドリンは選択的 β_2 作動薬であり、我が国では 1986 年から臨床使用している。医薬品添付文書によると、妊婦の状態に応じてリトドリン塩酸塩の投与量や投与間隔を調整すると記載されているのみであり、科学的根拠に基づく投与方法が得られていない。血清中リトドリン濃度と早産防止効果との関係と、そ

れに基づくリトドリン塩酸塩の適正投与方法を構築することは、安全な分娩を担保するために早急に取り組む必要がある課題である。

2. 研究の目的

我々はすでに天使病院倫理審査委員会にて承認を受け、天使病院産科にてリトドリン療法施行中の患者 62 名から同意を得た後、開発した測定方法を用いて血中リトドリン濃度を測定した。その結果、リトドリンの全身クリアランスは 1.01~4.76 L/min と大きな個体差が認められた。しかし、母体の生理機能の変化により妊娠期間中には薬物代謝の変動することが考えられているが明確な検証はなされていないため、さらなる解析が必要と考えられる。また、リトドリンは、ラセミ体として臨床使用されているため、血中濃度とそれに基づく臨床薬物動態値に大きな差が生じた可能性として、薬理作用の強い(-)体の濃度が妊婦により異なることが考えられる。

本研究は、妊婦へリトドリンを投与する際に有効性を最大限に引き出し、かつ副作用を最小限に止めるための投与指針を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

共同研究を行っている天使病院は地域における産科拠点病院であり、多くの妊婦が集まる。本研究では、新生児にも適用できる微量血液検体からのリトドリン測定法について直接光学活性体分割を含めて開発する。さらに、双胎と単胎妊婦におけるリトドリンクリアランスと在胎週数の評価とリトドリンの新生児への移行性を臨床評価とともに総合的に検討する。具体的な検討項目は以下の通りである。

1) 極微量試料からの血中リトドリン濃度測定法の開発と改良

我々が最近開発した血中ラセミ体および立体異性体別リトドリン濃度測定法のさらなる迅速化と高感度化を検討する。

2) 単胎及び双胎妊婦における血中リトドリン濃度の差異

我々はこれまで血中リトドリン濃度を検討し、15名の双胎妊婦ではリトドリンは体内動態全体解析、個別解析ともに線形性を示すことを明らかとした。しかし、そのうち3名については妊娠継続によりリトドリンクリアランスが減少した。そこで、同様の検討を単胎妊婦でも行い、双胎と単胎妊婦における体内動態の差異を検討する。

3) 新生児へのリトドリン移行性の検討

これまでの検討では、独自に開発したHPLCによる血中リトドリン濃度測定法を用いている。最近になり、高速液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS/MS)を用いた濃度測定法が報告された。これらの方法に我々の開発した立体異性体別リトドリン濃度測定法を応用してLC-MS/MSによる新生児における立体異性体別体内動態測定法を開発し、胎児への移行性を評価する。

4) リトドリン代謝酵素の遺伝子多型解析法

の確立

リトドリンの主な代謝は、硫酸抱合とグルクロン酸抱合である。硫酸転移酵素(SULT)は、水酸基やアミノ基などを有する化合物の硫酸化を触媒することで、より極性が高い硫酸抱合体を生成する。現在までにヒトでは12種類のSULTが確認されている。静脈内投与されたリトドリンはSULT1A1で代謝されるが、SULT1A1には遺伝子多型による酵素活性の個人差が報告されている。SULT1A1遺伝子には、主に3つの多型が存在するため、SULT1A1遺伝子多型の解析法を開発する。

4. 研究成果

1) 極微量試料からの血中リトドリン濃度測定法の開発と改良

これまでの検討では、独自に開発したHPLCによる血中リトドリン濃度測定法を用いている。最近になり、高速液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS/MS)を用いたリトドリン濃度測定法が報告された。我々は、さらに高速かつ高感度のLC-MS/MS法によるリトドリンの高感度定量法を開発した。血清100 μ Lに安定同位体標識体(リトドリン-d4)を内部標準物質として添加し、Multiple Reaction Monitoringによりリトドリンはm/z270 \rightarrow 121、リトドリン-d4はm/z274 \rightarrow 123を検出した。検量線は良好な直線性が得られ、臨床使用に対応する測定精度と再現性が得られた。

次に、新生児からの採血を考慮し、さらに少量血液サンプルからの測定法を開発した。血液サンプルの前処理にチップタイプの固相抽出カラムであるMonoTip® mini C18を用いることにより、わずか10 μ Lの血清からLC-MS(Waters Micromass ZQ)を用いた血清中リトドリン濃度の測定

も可能とした。本測定法では 15~100 ng/mL の間において検量線は直線性を示した。今回開発した測定方法は臨床の血清リトドリン濃度を測定する際十分な感度を持つ測定方法と考えられる。

山崎らは(-)体リトドリンの筋弛緩作用が(+)体よりも強力であると報告している。そこで、本研究では各種光学異性体分離カラムを用いてリトドリンの光学分割条件を検討したところ、Chiracel OJ-RH, OJ-H が最も効率的にリトドリンを光学分割した。さらに HPLC からのラインを質量分析計に直接導入する方法により迅速かつ高感度な分析法を構築した。また、最近使用が可能となった超臨界流体クロマトグラフ(SFC)を HPLC の代わりに用いることにより、さらに迅速な分離測定が可能であった。

2) 単胎と双胎におけるリトドリンクリアランス評価

リトドリンの持続注入療法が行われた妊婦 105 名(単胎 67 名、双胎 38 名)を対象として検討し、双胎妊婦のリトドリン全身クリアランスは、単胎妊婦よりも有意に低い結果を得た。早産した単胎妊婦と双胎妊婦では、血清中リトドリン濃度に有意な差が認められなかった。一方、正期産では、双胎妊婦の血清中リトドリン濃度は単胎妊婦に比較して高い濃度に維持されていた。双胎妊婦のリトドリン全身クリアランスは、単胎妊婦と比較して低下しており、妊娠を継続するためには胎児数によりリトドリン投与量を管理する必要性があると考えられる。

3) 新生児へのリトドリン移行性

対象となった新生児の臍帯血中リトドリン濃度は 62.8 ± 36.4 (平均 \pm 標準偏差、 $n=28$) ng/mL であった。全例においてイレウスの報告はなかった。出生後の血糖値は、 39.0 ± 15.1 mg/dL であり、低血糖が 17 名でみられ、臍

帯血リトドリン濃度が高いほど血糖値が低い傾向にあるが、有意差は認められなかった。血清 K 値ならびに血清 Ca 値については、治療を必要とするような電解質異常を来した新生児はいなかった。今回の検討では、臍帯血中リトドリン濃度と新生児検査データとの有意な関連性を示すデータは得られなかった。しかし、リトドリン血中濃度の測定例数を増加させて、新生児に対するリトドリンの影響を精査する必要があると考えられる。今回、母体血中濃度が新生児に与える影響を検討するために、双胎妊娠 2 症例に関して解析したところ、母体におけるリトドリン消失半減期はそれぞれ 10.7 時間と 4.0 時間であり、2.5 倍以上の個人差が認められた。また、1 症例の第 1 児のリトドリン消失半減期 29.6 時間に対して、第 2 児では 13.2 時間と大きく異なる値であった。リトドリンの消失半減期には個人差があり、リトドリン体内動態に基づき副作用発現など個々に検討することが必要と考えられる。

4) SULT 酵素遺伝多型

QIAamp DNA Blood Mini Kit および Mono Fas[®]口腔粘膜細胞ゲノム DNA 抽出キットを用いて全血および口腔粘膜細胞から DNA を抽出し、TaKaRa Ex Taq[®] kit を用いて PCR を行った。その結果、血液サンプルと口腔粘膜細胞として抽出・精製を行った DNA サンプルからリトドリンの代謝酵素である SULT1A1 の遺伝子多型解析法を確立した。リトドリンは経口投与されると小腸粘膜内 SULT1A3 により代謝され、静脈内投与されたときの主代謝酵素である SULT1A1 とは異なることが報告されている。静脈内投与または経口投与後の体内動態差を明らかにすることが、さらに安全で有効なリトドリン療法の精密化に必

要と考えられる。

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 4 件)

1. Mayuko Soma, Ainari Konda, Hiroshi Yoshida, Shuichi Kishimoto, Shoji Fukushima, Takaki Toda, Yoichi Sasaki, Toru Hayakawa, and Nobuo Inotsume, Maternal-to-fetal transfer of ritodrine in twin pregnancy, *Jpn. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, 43(5), 339-343, 2012.
2. 藤枝聡子, 相馬まゆ子, 渡利道子, 計良光昭, 吉田 博, 高橋伸浩, 外木秀文, 佐々木洋一, 福島昭二, 今田愛也, 猪爪信夫, 新規高感度測定法による双胎妊婦と新生児における血清中リトドリン濃度, *北海道産婦人科学会誌*, 57, 11-16, 2013.
3. Mayuko Soma, Ainari Konda, Satoko Fujieda, Yoichi Sasaki, Michiko Watari, Mitsuaki Keira, Hiroshi Yoshida, Takaki Toda, Toru Hayakawa, Shuichi Kishimoto, Shoji Fukushima and Nobuo Inotsume, Difference in ritodrine pharmacokinetics between singleton and twin pregnancies, *Jpn. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, in press.
4. Mayuko Soma, Ainari Konda, Satoko Fujieda, Yoichi Sasaki, Nobuhiro Takahashi, Hiroshi Yoshida, Takaki Toda, Toru Hayakawa, Shoji Fukushima and Nobuo Inotsume, Validation of a novel sensitive method for measuring maternal and neonatal serum ritodrine concentrations, *Jpn J*

Ther. Drug Monit., in press.

[学会発表] (計 12 件)

1. 相馬まゆ子, 佐々木洋一, 三島 隆, 川口 哲, 渡利道子, 相澤貴之, 計良光昭, 吉本 満, 今田愛也, 戸田貴大, 早川 達, 猪爪信夫, 双胎妊婦の切迫早産治療における臍帯静脈中リトドリン濃度, 第 3 1 回日本臨床薬理学会年会, 京都, 2010. 12.
2. Nobuo Inotsume, Ainari Konda, Takaki Toda, Toru Hayakawa, Mayuko Soma, and Hiroshi Yoshida, Pharmacokinetics of ritodrine in single and twin pregnancies and their neonates, 12th International Congress of Therapeutic Drug Monitoring & Clinical Toxicology, Stuttgart, 2011. 10.
3. 相馬まゆ子, 小澤絵美, 佐々木洋一, 渡利道子, 相澤貴之, 計良光昭, 吉田博, 高橋伸浩, 今田愛也, 戸田貴大, 早川 達, 猪爪信夫, 双胎新生児検査データに及ぼす臍帯血中リトドリン濃度の影響, 第 3 2 回日本臨床薬理学会年会, 浜松, 2011. 12.
4. 福島昭二, 久保理美, 岸本修一, 今田愛也, 戸田貴大, 早川 達, 猪爪信夫, 田中詳二, 橋田 亨, 相馬まゆ子, 佐々木洋一, 吉田 博, LC-MS による高感度リトドリン血中濃度測定法の開発, 第 3 2 回日本臨床薬理学会年会, 浜松, 2011. 12.
5. 今田愛也, 戸田貴大, 早川 達, 猪爪信夫, 岸本修一, 福島昭二, 相馬まゆ子, 佐々木洋一, 吉田 博, リトドリン光学異性体の高感度分析法開発 (1), 第 3 2 回日本臨床薬理学会年

- 会、浜松、2011. 12.
6. 相馬まゆ子、田畑安英、山崎布美子、小澤絵美、佐々木洋一、藤枝聡子、渡利道子、計良光昭、吉田 博、今田愛也、戸田貴大、早川 達、猪爪信夫、リトドリン投与中に肺水腫を発症した一症例 - 血清中リトドリン濃度の経時的解析 -、第29回日本TDM学会・学術大会、神戸、2012. 6.
 7. Nobuo Inotsume, Ainari Konda, Mayuko Soma, Takaki Toda, Toru Hayakawa, Shin-nosuke Horii, Shuichi Kishimoto, and Shoji Fukushima, Direct optical resolution of racemic ritodrine in serum, The 2012 FIP Centennial Congress, Amsterdam, 2012.10.
 8. Ainari Konda, Mayuko Soma, Satoko Fujieda, Michiko Watari, Mitsuaki Keira, Hiroshi Yoshida, Youiti Sasaki, Takaki Toda, Toru Hayakawa, Nobuo Inotsume, A new analytical method of ritodrine in newborn serum by LC-MS/MS, The 2012 FIP Centennial Congress, Amsterdam, 2012. 10.
 9. 藤原由佳、仲宗根亜紀、佐藤志穂、鈴木亮祐、岸本修一、福島昭二、柴谷直樹、田中詳二、北田徳昭、橋田 亨、北 正人、猪爪信夫、リトドリンの臨床薬理学的研究 - リトドリン血中濃度測定および代謝酵素SULT1A1の遺伝子多型の解析 -、第62回日本薬学会近畿支部総会・大会、西宮、2012. 10.
 10. 藤枝聡子、渡利道子、計良光昭、吉田博、相馬まゆ子、佐々木洋一、今田愛也、戸田貴大、早川 達、猪爪信夫、新規高感度分析法を用いた双胎妊婦母子間リトドリン移行性の検討、第32回日本臨床薬理学会学術総会、宜野湾、2012. 12.
 11. 相馬まゆ子、佐々木洋一、藤枝聡子、渡利道子、計良光昭、吉田 博、今田愛也、戸田貴大、早川 達、猪爪信夫、単胎及び多胎妊娠妊婦におけるリトドリンの体内動態差、第32回日本臨床薬理学会学術総会、宜野湾、2012. 12.
 12. 福島昭二、藤原由佳、仲宗根亜紀、佐藤志穂、鈴木亮祐、岸本修一、柴谷直樹、田中詳二、北田徳昭、橋田 亨、北正人、猪爪信夫、微量採血とチップタイプ固相抽出カラムを用いたリトドリン血中濃度のLC-MS測定法の開発、第32回日本臨床薬理学会学術総会、宜野湾、2012. 12.

6. 研究組織

(1)研究代表者

猪爪 信夫 (INOTSUME NOBUO)
 北海道薬科大学・薬学部・教授
 研究者番号：10191892

(2)研究分担者

戸田 貴大 (TODA TAKAKI)

北海道薬科大学・薬学部・教授
 研究者番号：00254706

今田 愛也 (KONDA AINARI)

北海道薬科大学・薬学部・准教授
 研究者番号：10557945

早川 達 (HAYAKAWA TORU)

北海道薬科大学・薬学部・教授
 研究者番号：50337044

福島 昭二 (FUKUSHIMA SHOJI)

神戸学院大学・薬学部・教授
 研究者番号：80248103