

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460217

研究課題名(和文) 希少疾病LEMS治療薬3,4-ジアミノピリジン適正使用のための薬物動態学的検討

研究課題名(英文) Pharmacokinetic study of orphan drug 3,4-diaminopyridine for treatment of Lambert-Eaton myasthenic syndrome

研究代表者

松下 良 (Matsushita, Ryo)

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号：20293368

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：希少疾病Lambert-Eaton筋無力症(LEMS)治療薬の3,4-diaminopyridine (3,4-DAP)について、我々が既に見出している「LEMS患者での3,4-DAPの血漿中濃度の速やかな消失に比べ薬効が持続する現象」のメカニズムの解明を目的として動物モデルおよび健常人について検討した。そして薬効と血漿中濃度動態にずれが生じる原因が、筋肉への高い移行性に起因していることが示唆された。これらの結果を確認するために、薬効の指標として、筋電位の変化を、 $\alpha$ -bungarotoxinを投与して作成した筋無力症モデルを用いて検討し、先の結果を支持する知見を得た。

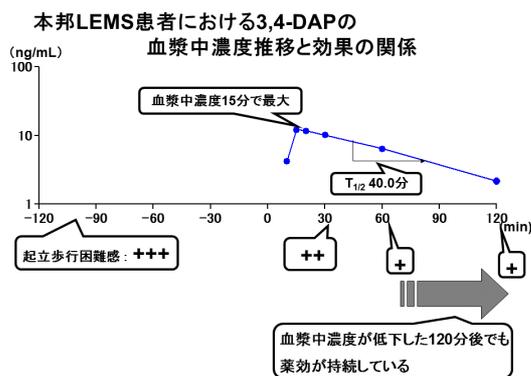
研究成果の概要(英文)：3,4-Diaminopyridine (3,4-DAP) is potassium channel inhibitor used to treat Lambert-Eaton myasthenic syndrome (LEMS). We investigated the pharmacokinetics of 3,4-DAP, which are still poorly understood, in rats and humans. In healthy Japanese volunteers, 3,4-DAP  $V_d/F$  and  $T_{1/2}$  were varied from 740 to 1669 L and from 35 to 51 min, respectively. We found that 3,4-DAP was characterized by fast elimination from serum and high tissue perfusion in a dose-dependent manner. Furthermore, muscle mass was the inter-individual variability factor. In addition, studies in rat tissue distribution and compound muscle action potential with and without  $\alpha$ -bungarotoxin indicated that 3,4-DAP response delay caused by high muscle distribution compared with plasma disposition.

研究分野：医療薬学

キーワード：3,4-diaminopyridine Lambert-Eaton筋無力症 bungarotoxin muscle pharmacokinetics pharmacodynamics LEMS

1. 研究開始当初の背景

Lambert-Eaton 筋無力症候群(LEMS)は四肢筋力低下、筋萎縮、易疲労性を特徴とする高頻度に悪性腫瘍を合併する症候群であり、有病率は1人/10万人とされる希少疾病である。LEMSの治療には3,4-ジアミノピリジン(3,4-diaminopyridine:3,4-DAP)が臨床試験も十分行われないうまま、欧米では長年LEMS治療の第一選択とされてきた。日本では医薬品として認可されておらず、研究用試薬が治療に供されている。医療上の必要性は、厚生労働省の「医療上の必要性の高い未承認薬・適用外薬検討会議での検討結果を受けて開発企業の募集又は開発要請を行った医薬品リスト」に掲載されており、臨床開発が望まれている。一方で、諸外国で3,4-DAPをLEMS治療に用いた症例報告やランダム化比較試験による薬効検討の報告が散見されるようになった。更に、3,4-DAPの体内動態に関する検討についてラットやイヌを用いた基礎検討は為されているが、ヒトではオランダ人LEMS患者および日本人LEMS患者に関する報告が1例ずつあるほか、重症筋無力症患者の報告が数例あるのみで、体内動態に関する解析は不十分である。従って、3,4-DAPの薬効や副作用をモニターする指標(有効血漿中濃度や中毒域)も定まっておらず、経験的な治療が施されているのが現状である。そこで、研究代表者は、神経難病・筋疾患部門、重症心身障害医療部門、子どもの心の診療部門を中心に地域医療に取り組んでいる国立病院機構医王病院の駒井清暢医師、石田奈津子薬剤師とともに、LEMS患者(女性,57才)の血漿中濃度推移と効果(起立歩行困難感)を検討した結果(下図)、3,4-DAPの血漿中濃度はすみやかに消失しているにもかかわらず、薬効が持続していることがわかった。



そこで、まず、ラットおよび健常人についての3,4-DAPの体内動態を検討し、その上で、3,4-DAPの体内動態および薬効に影響を与える因子を特定すること着想し本研究を企画した。

2. 研究の目的

本研究で対象とする希少疾病LEMSは、四肢筋力低下、筋萎縮、易疲労性等を特徴とし高頻度に悪性腫瘍を合併する症候群である。LEMS治療薬としては、3,4-DAPがあり、

欧米では3,4-DAPの使用が推奨されている。一方、厚生労働省の支援もあるにもかかわらず、本邦では未承認のままであり、諸外国でも、3,4-DAPの薬物動態、薬効動態が驚くほど調べられておらず、臨床実績に基づいて、最近ようやく承認された薬物である。既に申請者は、神経内科医、薬剤師と連携し、LEMS患者における薬物動態、薬効動態の特徴を示す知見として、血漿中濃度と薬効のずれを示唆した結果を得ている。これらを、メカニズムの点から詳細に明らかにすべく、ラットおよび健常人対象とし本研究の遂行を通じて3,4-DAPの臨床での適正使用に寄与することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 試薬: 3,4-DAPは、試薬特級base体を用いた。

(2) ラットを用いた3,4-DAPの体内動態(Pharmacokinetics: PK)の検討

体液中及び組織中3,4-DAP濃度の測定: 固相抽出後、HPLCを用いて測定した。測定にあたっては、検出器として、UVまたは、電気化学検出器を使用した。

血液-血漿間分配率(R<sub>b</sub>): Wistar系雄性ラット8週齢またはヒト全血中に3,4-DAPを加え、血漿を分離し、全血、血漿中濃度を測定し算出した。

薬物単回投与実験: 3,4-DAP 2mg/kgを単回静注または10 mg/kgをラットに経口投与し、体内動態パラメータを算出した。

尿中・胆汁中排泄率: 3,4-DAP 2 mg/kgをラットに単回静注し、胆汁、尿サンプルを回収し、未変化体の排泄率を算出した。

臓器分布: 3,4-DAP 2 mg/kg単回静注後の組織(脳、肺、皮膚、肝臓、腎臓、筋肉、脂肪、小腸、胃、脾臓、骨等)中薬物濃度を経時的に測定した。更に、定常状態血漿中薬物濃度(C<sub>ss</sub>)が50、100、500 ng/mLとなるよう点滴静注を行い定常状態時の組織中薬物濃度を測定し、見かけの組織濃度対血漿中濃度比または真の組織濃度対血漿中濃度比(K<sub>p</sub>)を算出した。

血漿蛋白非結合形分率(f<sub>p</sub>): ラット血漿またはヒト血漿を用いて限外ろ過法により測定した。

食事の影響: 食物の有無によるラットへの単回経口投与の比較、およびラット小腸を用いたin situ loop法で検討した。

(3) 筋無力症モデルラットを用いた3,4-DAPの薬効動態(Pharmacodynamics: PD)について

1. Wistar系雄性ラットにα-bungarotoxinを皮下注射することによって筋無力症ラットを作成した処置群とsalineを投与した対象群を作成する。各群において、筋電図計を用いて、3,4-DAP投与後の複合筋電位(cMAP)の変動を検討するとともに、3,4-DAPの血漿中濃度を測定した。

(4) 健常人を対象とした3,4-DAP経口投与後の体内動態の検討

日本人健常者5名について3,4-DAPの単回経口投与試験(10, 20 mg/body)を行い3,4-DAPの体内動態変動因子を検討した。検討項目は、投与量と血清中濃度の関係、血清中濃度と薬理効果や副作用との関係、食事の影響である。また3,4-DAPの作用部位と考えられる筋肉量と薬理効果や体内動態パラメータとの関係についても検討した。

#### 4. 研究成果

(1) ラットを用いた3,4-DAPのPKの検討

$R_b$ はラットでは $1.04 \pm 0.10$ 、ヒトでは $0.98 \pm 0.15$ であり、濃度依存性はなく、体内動態算出に血漿中濃度を用いる事は妥当であると考えられた。今回ラットを用いた3,4-DAPの体内動態実験の結果、2 mg/kg単回静注時の全身クリアランス( $CL_{tot}$ )は $120 \pm 23$  mL/min/kg、分布容積( $Vd_{ss}$ )は $2.85 \pm 0.73$  L/kg、半減期( $t_{1/2}$ )は $15.9 \pm 3.1$  minであった。単回静注と経口投与時のAUCを用いて算出したバイオアベイラビリティ(F)は $25.1 \pm 4.0\%$ であった。未変化体の腎排泄は $2.21 \pm 0.50\%$ 、胆汁中排泄は $0.017 \pm 0.008\%$ であり、主に代謝によって消失することが示唆された。fpはラット血漿では56.4 ~ 86.0%、ヒト血漿では29.7 ~ 98.0%と濃度依存性が見られたため、低濃度域での薬効の変化に注意が必要と考えられる。また、 $CL_{tot}$ が大きく消失は速やかで $Vd_{ss}$ も大きく組織への移行性が高いことが考えられた。そこで、3,4-DAPの各組織濃度及び $K_p$ を求めたところ、筋肉組織での $K_p$ は1.70 ~ 3.06であった。腎臓や心臓においても $K_p$ は高く、腎障害や不整脈といった副作用に注意が必要と考えられる。 $C_{ss}$ の上昇に伴い、 $K_p$ は多くの組織で上昇し、濃度依存性がみられたことにより、高濃度域では組織への3,4-DAPの滞留性が高まる可能性が示唆された。また、ラットを用いた単回投与実験より食物によりAUCの低下、in situ loop法の結果から、腸管からの吸収抑制も観察された。

(2) 筋無力症モデルラットを用いた3,4-DAPのPDについて

ラットにbungarotoxinを皮下注射することによって作成した筋無力症ラット(処置群)について、対象群に比べて、cMAPの抑制を確認した。更に、3,4-DAP投与により、抑制されたcMAPの回復が観察された。3,4-DAP血漿中濃度の減衰に比べcMAPの変化の遅れが示唆された。

(3) 健常人を対象とした3,4-DAP経口投与後の体内動態の検討

3,4-DAPの健常人での $Vd/F$ は740 ~ 1669 Lと大きく、また $t_{1/2}$ は35.4 ~ 51.4分と短く、血清中からの消失は早い組織への移行性は高いことが示唆された。また、健常人の試験結果から投与量を増すと投与量あたりのAUCが上昇し、投与量依存性がある可能性が示唆された。更に、筋肉量が多いほど、AUCは低くなる傾向が見られ、筋肉量の違いが個体間変動因子となりうることを示唆された。

3,4-DAPの副作用として心電図検査においてPR間隔が延長する傾向が認められたため、不整脈、特に房室ブロックの既往のある患者に投与する際には慎重投与が求められると考えられた。

ラットや健常人を対象として行った食事の影響の検討結果より、絶食時に比べ食後では血漿中濃度が低下する傾向が見られ、このことはラットラットのin situ loop法の結果からも支持された。3,4-DAPのリン酸塩は、食事の影響は少ないとされているが、base体では注意が必要と考えられる。

以上より結論として、

3,4-DAPの分布容積は大きく、半減期が短い特徴をラット、健常人で共通に備える。

LEMS患者の知見より示唆された血中濃度と薬効のずれ(反時計回りのヒステレシス)が、ラットを用いた筋無力症モデルで支持される結果が得られた。

体内動態変動因子として、筋肉量の影響が示唆された。

3,4-DAPはPR間隔延長する可能性が示唆された。

3,4-DAPのbase体は、食物の共存下で吸収が遅延することが示唆された。

本研究により、3,4-DAPのラットおよび健常人における体内動態に関する情報が得られ、3,4-DAPの体内動態的特徴の概要が一部明らかとなった。特に、3,4-DAPの体内動態変動因子として、用量依存性、筋肉量、食事の影響が示唆された。また、副作用として心臓への影響に注意することが示された。これらの知見は、今後のさらなる検証が必要ではあるが、現に3,4-DAPの薬物治療が行われている患者および医療関係者には有効で安全な薬物治療を行う上で有益な示唆を与えるものであり、更に、希少疾病であるLEMSに対する3,4-DAPの今後の臨床開発を推進する上で有用な知見を与えるものと考えられる。

#### 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1件) Ishida N, Kobayashi E, Kondo Y, Matsushita R, Komai K. Pharmacokinetics and safety of 3,4-diaminopyridine base in healthy Japanese volunteers. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 53:674-80, 2015. (査読有り)

[学会発表](計0件)

[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〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

松下 良 (MATSUSHITA, Ryo)

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号：20293368

(2)研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4)研究協力者

駒井 清暢 (KOMAI, Kiyonobu)

国立病院機構医王病院・院長

石田 奈津子 (ISHIDA, Natsuko)

国立病院機構金沢医療センター・主任