

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06748

研究課題名(和文)バイオマーカーを用いたラモトリギンの体内動態および皮膚障害発現予測の基盤構築

研究課題名(英文) Prediction of lamotrigine clearance by using endogenous compounds as biomarker

研究代表者

藤吉 正哉 (Fujiyoshi, Masachika)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：50751921

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、副作用として重篤な皮膚障害のあるラモトリギン投与量の個別適正化の方法論を構築することを目的とした。ラモトリギンのグルクロン酸抱合を触媒するUGT1A4の内因性基質である25-hydroxyvitamin D3 (25-OH-VD)およびその代謝物である25-hydroxyvitamin D3 3-glucuronide (25-OH-VD-glu)の血中濃度測定系を開発した。25-OH-VDおよび25-OH-VD-gluの血中濃度比とラモトリギンクリアランスの相関分析を行い、血中濃度比をラモトリギンクリアランス予測のバイオマーカー候補として見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗てんかん薬ラモトリギンによる皮膚障害は、死亡例も報告された重篤なものである。また、皮膚障害は蓄積毒性ではなく、単回服用でも出現する場合があります。ラモトリギンを服用する前に患者個々に投与量を適正化できる方法論の構築が必要である。本研究は、ラモトリギンクリアランスを薬剤を投与することなく予測できる方法論を提唱したものであり、ラモトリギンの適正使用推進につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Lamotrigine is one of widely used anti-epileptic drugs, but it has a critical issue of a skin rash. The present study was performed to develop a method for the prediction of lamotrigine clearance. We developed a method for quantitation of 25-hydroxyvitamin D3 (25-OH-VD), an endogenous substrate for UGT1A4, and 25-hydroxyvitamin D3 3-glucuronide (25-OH-VD-glu). The ratio between the blood concentration of 25-OH-VD and 25-OH-VD-glu was correlated with lamotrigine clearance, suggesting the ratio might be a useful biomarker for prediction of lamotrigine clearance.

研究分野：医療薬学

キーワード：ラモトリギン バイオマーカー 個別化医療 てんかん LC-MS/MS

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

てんかんは、有病率 1%の反復性の発作を主徴とする慢性の脳疾患である。てんかん患者は、発作消失が認められない限り、運転免許の取得・更新ができないなどの制限が存在するため、患者の生活の質を維持するためには、けいれん発作を消失させることが重要である。ラモトリギン (LTG) は、日本では 2008 年にてんかんに対する併用療法への適応が認められ、2011 年には双極性障害、2014 年にはてんかんの単独療法と、適応拡大に伴い使用量が増加している薬剤である。LTG はチュアブル錠など、服用が容易な製剤も存在し、小児にも使いやすい薬剤である。一方、重篤な副作用として、皮膚粘膜眼症候群 (Stevens-Johnson 症候群) および中毒性表皮壊死症 (Lyell 症候群) 等の重篤な皮膚障害が表れることがある。LTG による重篤な皮膚障害には死亡例もあり、適正使用による副作用回避が強く求められる薬剤である。

LTG は、UDP グルクロノシルトランスフェラーゼ (UGT)1A4 によりグルクロン酸抱合 (LTG-glu) を受け、尿中に排泄されるため、グルクロン酸抱合に影響を与える薬剤との併用は、LTG の血中濃度を変動させ、作用減弱および副作用発現の原因となる。これまでに UGT1A4 によってグルクロン酸抱合を受けるバルプロ酸との併用によって、グルクロン酸抱合が競合的に阻害され、LTG の半減期が約 2 倍になることが報告された。さらに、バルプロ酸を併用した患者では、LTG 投与量を減量しないと、皮膚障害の発現率が高くなることが報告されている。以上により、LTG による副作用発現は、LTG の血中濃度を適正濃度域に維持することで、回避可能であると考えられる。

LTG の個別化医療を推進することを目的とし、国内外の研究者によって、年齢および併用薬剤による影響を組み込んだ LTG クリアランスの予測式が報告されてきた。一方、併用薬剤の血中濃度まで組み込んだ予測式は報告されておらず、LTG 個別化医療の推進には、LTG の体内動態を普遍的に予測できるクリアランス予測式の構築が不可欠である。LTG の主要な体外排泄経路は、LTG-glu の尿中排泄であることから、UGT1A4 活性を反映するバイオマーカーは、LTG クリアランスの予測に有用である。UGT1A4 は、薬剤をはじめとする外因性化合物だけでなく、内因性物質のグルクロン酸抱合にも関わっており、UGT1A4 の内因性化合物は LTG クリアランス予測のバイオマーカーとなる可能性があるが、内因性化合物を用いた LTG クリアランス予測の方法論には報告例がない。

2. 研究の目的

本研究では、「バイオマーカーを用いた LTG の体内動態および皮膚障害発現の予測基盤」を構築することを目的とした。LTG 体内動態予測のバイオマーカーとして UGT1A4 の内因性基質に着目し、血中濃度の測定系を開発する。さらに、内因性基質の濃度と LTG クリアランスの相関関係を解析し、LTG 投与量の個別適正化を行う方法論の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) UGT1A4 の内因性基質である 25-hydroxyvitamin D3 (25-OH-VD) およびその 3 位グルクロン酸抱合体である 25-hydroxyvitamin D3 3-glucuronide (25-OH-VD-glu) の血中濃度測定系の開発

25-OH-VD および 25-OH-VD-glu には、汎用自動分析装置用の試薬が存在しない。そこで、25-OH-VD および 25-OH-VD-glu に対し、トリプル四重極型質量分析装置 (LC-MS/MS) を用いた定量系の開発を行った。除タンパク質処理のみを行ったサンプルでは、25-OH-VD-glu の測定感度が低く、固相抽出および 1,2,4-triazoline-3,5-dione (PTAD) を用いた誘導体化を組み合わせ、感度の向上を試みた。測定感度の向上した定量系を用いて、真度および精度に関するバリデーションを実施した。

(2) バイオマーカーと LTG クリアランスの相関解析

LTG が投与されたてんかん患者 42 名を対象に、LTG、25-OH-VD および 25-OH-VD-glu の血中濃度を測定した。患者背景、臨床検査値、併用薬情報を調査した。さらに、得られた LTG 血中濃度をもとに、LTG クリアランスを推定し、バイオマーカーとの相関関係を解析した。なお、本研究は、国立大学法人千葉大学医学部倫理審査委員会の承認 (承認番号 2503) を受け実施した。

4. 研究成果

(1) UGT1A4 の内因性基質である 25-hydroxyvitamin D3 (25-OH-VD) およびその 3 位グルクロン酸抱合体である 25-hydroxyvitamin D3 3-glucuronide (25-OH-VD-glu) の血中濃度測定系の開発

25-OH-VD は、ビタミン D 欠乏症の診断に利用される。25-OH-VD は UGT1A4 の基質であり、25-OH-VD-glu は UGT1A4 に特異的な代謝産物であることが報告された。25-OH-VD は代謝調節を受けて血中濃度変動を来すことは少ない。加えて、25-OH-VD は、ビタミン D 代謝物の中で半減期が長いこと、その代謝産物である 25-OH-VD-glu の血中濃度は UGT1A4 活性を反映する可能性が高い。さらに、ビタミン D 代謝物の中で、血中濃度も高く、バイオマーカーに適した化合物であると考えられる。そこで、25-OH-VD および 25-OH-VD-glu の LC-MS/MS を用いた定量系開発に取り組んだ。

まず、25-OH-VD および 25-OH-VD-glu をヒト血漿に添加し、有機溶媒を用いた除タンパク質

処理後、陽イオンモードで検出を試みたが、検出感度が十分でなく、ヒト血漿中の濃度測定は出来ないかと判断した。陰イオンモードで検出を行ったところ、25-OH-VD-glu では 0.3 ng/mL で十分なピークを検出することができた。一方、25-OH-VD では、想定した m/z ではピークが検出されなかった。以上より、MS 部における検出モードは陽イオンモードとし、検出感度の向上を図ることとした。

LC-MS/MS の検出感度を下げる原因として、リン脂質によるイオン化抑制が挙げられる。そこで、生体試料中のリン脂質の除去が可能な HybridSPE®-Phospholipid (Supelco) を用いた固相抽出を行い、検出感度の向上を試みたが、感度向上は認められなかった。次に、夾雑物の除去を目的とし、逆相カラム (Strata-X, Phenomenex) を用いた固相抽出を行った。陽イオンモードでのピーク強度から、洗浄条件を検討し、25-OH-VD および 25-OH-VD-glu を保持し、夾雑物を除ける洗浄の最適条件は、60% メタノールでの洗浄であると判断した。しかし、最適条件で固相抽出を行い、夾雑物をできる限り除いたヒト血漿における 25-OH-VD および 25-OH-VD-glu の検出感度も十分ではなかった。さらに、試料の濃縮も試したが、イオン抑制による影響が大きくなり、検出感度の向上は認められなかった。

LC-MS/MS を用いた化合物の検出で、最も感度向上に寄与するのは、誘導体化によるイオン化効率の向上である。そこで、PTAD による誘導体化を実施し、検出感度を比較した。その結果、25-OH-VD-glu では PTAD による誘導体化を実施することで、signal-to-noise 化 (S/N) 比が 16.8 倍向上し、定量下限は 10 ng/mL となり高感度に成功した (図 1)。

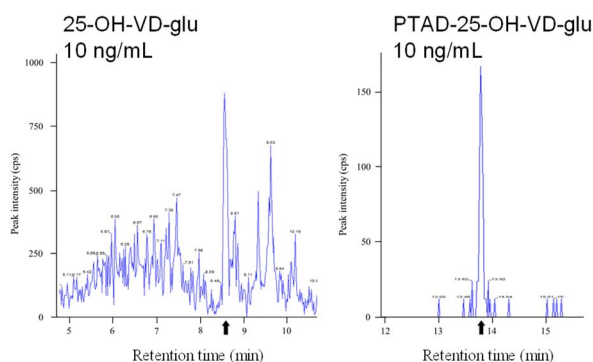


図1 PTADによる誘導体化によるS/N比の向上(16.8倍)

最後に、HPLC による分離条件を検討した。ODS 系カラムである Inertsil ODS (GL Science) および ODS と同様に逆相系であるが極性化合物も良好に保持できる Ascentis Express F5 (Supelco) を選択し、分離条件を検討した。その結果、カラムは Ascentis Express F5、移動相にはメタノールを用いることで、良好に 25-OH-VD および 25-OH-VD-glu を夾雑物と分離できた。

最適化した測定条件を用いて、真度および精度に関するバリデーションを実施した。ビタミン D 欠乏血漿に 25-OH-VD および 25-OH-VD-glu を添加し作成した検量線は、5-100 ng/mL の濃度範囲で直線性を示した ($r=0.998$)。バリデーションの結果、日内および日間の変動係数 (CV) は 15% 以内であり、真度および精度の高い測定系であることが示された。

(2) バイオマーカーと LTG クリアランスの相関解析

LTG が投与されたてんかん患者 42 名の LTG、25-OH-VD および 25-OH-VD-glu の血中濃度を測定した。25-OH-VD-glu では、15 名の患者では定量感度以下 (< 5 ng/mL) であった。内因性化合物の血中濃度は低いことが多く、薬物動態予測のバイオマーカーとして利用するためには、高感度な定量系を構築することが必要である。本研究で用いた質量分析装置は 2001 年から使用されているものであるが、質量分析装置は革新的に進化を続けており、現在はさらに高感度な装置を用いた分析が可能である。今後、より高感度な分析が可能な質量分析装置を用いることで、25-OH-VD および 25-OH-VD-glu のバイオマーカーとしての利用を追求する予定である。

25-OH-VD および 25-OH-VD-glu の血中濃度が測定できた 27 名の患者の血中濃度比 ($C_{25-OH-VD-glu}/C_{25-OH-VD}$) と LTG クリアランスの相関分析を実施した。その結果、血中濃度比と LTG クリアランス間には、一定の相関があることが示唆された (図 2)。ただし、42 名中 15 名の患者では 25-OH-VD-glu の血中濃度が得られなかったため、25-OH-VD-glu の血中濃度が低い患者では、血中濃度比と LTG クリアランスに相関があるかは不明である。血中濃度比を LTG クリアランス予測のバイオマーカーとして実臨床で使用するためには、全ての患者でバイオマーカーの実測値が得られる必要がある。今後、全ての患者の血中濃度比の実測値が得られる定量系を構築し、バイオマーカーとしての価値を評価する予定である。なお、本研究の実施期間には、LTG 投与によって重篤な皮膚障害を呈した患者はおらず、バイオマーカーによる皮膚障害発現予測については評価出来なかった。

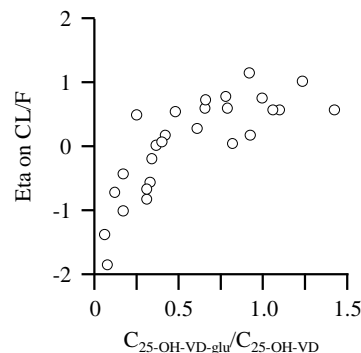


図2 クリアランスとバイオマーカーの相関

以上、本研究では、UGT1A4 の内因性基質である 25-OH-VD およびその代謝物である 25-OH-VD-glu の血中濃度測定系を開発し、その血中濃度比が LTG クリアランス予測のバイオマーカーとして利用出来る可能性を示唆した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamazaki Shingo, Tatebe Mizuki, Fujiyoshi Masachika, Hattori Noriyuki, Suzuki Tatsuya, Takatsuka Hirokazu, Uchida Masashi, Suzuki Takaaki, Ishii Itsuko	4. 巻 42
2. 論文標題 Population Pharmacokinetics of Vancomycin Under Continuous Renal Replacement Therapy Using a Polymethylmethacrylate Hemofilter	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Therapeutic Drug Monitoring	6. 最初と最後の頁 452 ~ 459
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/FTD.0000000000000721	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Izumi-Nakaseko Hiroko, Fujiyoshi Masachika, Hagiwara-Nagasawa Mihoko, Goto Ai, Chiba Koki, Kambayashi Ryuichi, Naito Atsuhiko T., Ando Kentaro, Kanda Yasunari, Ishii Itsuko, Sugiyama Atsushi	4. 巻 20
2. 論文標題 Dasatinib can Impair Left Ventricular Mechanical Function But May Lack Proarrhythmic Effect: A Proposal of Non-clinical Guidance for Predicting Clinical Cardiovascular Adverse Events of Tyrosine Kinase Inhibitors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cardiovascular Toxicology	6. 最初と最後の頁 58 ~ 70
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12012-019-09538-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sadahira Takuya, Wada Koichiro, Ikawa Kazuro, Morikawa Norifumi, Mitsui Masao, Araki Motoo, Fujiyoshi Masachika, Ishii Ayano, Watanabe Masami, Watanabe Toyohiko, Nasu Yasutomo	4. 巻 25
2. 論文標題 Clinical pharmacokinetics of oral azithromycin in epididymal tissue	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Infection and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 832 ~ 834
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2019.05.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 MAEKAWA Masamitsu, MORI Masaru, FUJIYOSHI Masachika, SUZUKI Hisaki, YANAI Kazunari, NODA Aoi, TANAKA Masaki, TAKASAKI Shinya, KIKUCHI Masafumi, AKASAKA Kazutoshi, KISARA Shigeki, MATSUURA Masaki, HISAMICHI Kanehiko, SATO Mayumi, GOTO Junichi, SHIMADA Miki, YAMAGUCHI Hiroaki, MANO Nariyasu	4. 巻 39
2. 論文標題 A Direct Injection LC/ESI-MS/MS Analysis of Urinary Cyclophosphamide as an Anticancer Drug for Monitoring Occupational Exposure	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 CHROMATOGRAPHY	6. 最初と最後の頁 41 ~ 47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15583/jpchrom.2017.023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Masachika Fujiyoshi
2. 発表標題 Toward clinical implementation of UGT1A4 activity-based approach for the prediction of lamotrigine clearance.
3. 学会等名 APSTJ Global Education Seminar 2019-1st (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡田 蛭子、藤吉正哉、土屋晃三、内田雅士、鈴木貴明、石井伊都子
2. 発表標題 妊娠・授乳期におけるラモトリギンのクリアランスおよび乳汁移行性の変動
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

岡山大学薬学部疾患薬理制御科学分野ホームページ http://www.pharm.okayama-u.ac.jp/lab/pmaphs/
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	有吉 範高 (Ariyoshi Noritaka) (00243957)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授 (15301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	松本 准 (Matsumoto Jun) (60709012)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教 (15301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関