

筑波大学

博士（医学）学位論文

特発性血小板減少性紫斑病患者における
血清エルトロンボグ濃度が肝障害発現に
及ぼす影響

2022

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科
柳町 直哉

原典論文

この学位論文は

A simple HPLC assay for determining eltrombopag concentration in human serum

Naoya Yanagimachi, Naoshi Obara, Mamiko Sakata-Yanagimoto, Shigeru Chiba,

Kosuke Doki, Masato Homma

Biomed Chromatogr. 2021 May;35(5): e5049. doi: 10.1002/bmc.5049.

を原典とし、Biomedical Chromatography の規定にしたがって Copyright Clearance

Center で手続き後に再利用している。

目次

序文	1
1. 血清 EPAG 濃度測定法の開発	5
1-1 目的	5
1-2 方法	5
1-3 結果	7
1-4 考察	8
2. ITP 患者における血清 EPAG 濃度と肝障害発現との関連	15
2-1 目的	15
2-2 方法	16
2-3 結果	18
2-4 考察	20
総括	32
参考文献	34
謝辞	40

略語一覧

略語 (略称)	定義・省略されていない名称
AA	Aplastic anemia
ALB	Albumin
ALT	Alanine aminotransferase
AST	Aspartate aminotransferase
AUC	Area under the curve
CRE	Creatinine
CTCAE	Common terminology criteria for adverse events
CL	Clearance
CV	Coefficient of variation
EPAG	Eltrombopag
HPLC	High-performance liquid chromatography
ITP	Idiopathic thrombocytopenic purpura, Immune thrombocytopenia
LC-MS/MS	Liquid chromatography-tandem mass spectrometry
LD	Liver dysfunction
PLT	Platelet count
ROC	Receiver operating characteristic curve
SPSS	Statistical package for social science
TDM	Therapeutic drug monitoring
TPO	Thrombopoietin
TPO-RA	Thrombopoietin receptor agonists

序文

特発性血小板減少性紫斑病とその治療

特発性血小板減少性紫斑病 (Idiopathic Thrombocytopenic Purpura: ITP) は自己免疫疾患の一つであり、体内に抗血小板自己抗体が生じることにより血小板が脾臓等の網内系細胞によって貪食・破壊され血小板が減少する (George JN, 1994; Karpatkin S, 1997)。また、自己抗体は巨核球の成熟障害やアポトーシスを誘導し、血小板産生も障害する。自己抗体以外に免疫複合体、補体、細胞傷害性 T 細胞なども血小板減少に関与していると考えられている (Cines DB, 2002; Nugent D, 2009; McKenzie CG, 2013; Kashiwagi H, 2013)。このように、ITP の病態には種々の免疫異常が関与することから欧米では免疫性血小板減少性紫斑病 (immune thrombocytopenia) と名称が変更され始めている (Cines DB, 2002; Rodeghiero F, 2009)。ITP の主な症状は出血・出血時間の延長・紫斑などである。本邦の患者は約 25,000 名であり、年間の新規発症数は 10 万人あたり 2.16 人と推計されており、6 歳以下の小児、20~34 歳の女性および高齢者に好発する (Kurata Y, 2011)。

ITP の治療戦略としては、抗血小板自己抗体産生の抑制、血小板破壊・貪食の抑制および血小板産生の回復が考えられる。治療目標は、血小板数を正常域に回復させることではなく、重篤な出血を予防できる血小板数 (通常は 30,000/ μ L 以上) を維持することとされている (「成人特発性血小板減少性紫斑病治療の参照ガイド 2019 改訂版」) (Figure 1)。緊急時と外科的処置時には血小板輸血や免疫グロブリン大量療法などを行うが (Bussel JB, 1987; Carr JM, 1986; Salama A, 2008; Spahr JE, 2008; Danese MD, 2009)、一般的な治療ではまずヘリコバクターピロリ菌の感染検査を行い、ピロリ菌陽性の場合、除菌療法が選択される (Gasbarrini A, 1998)。本邦では除菌成功例の 63% に血小板増加が認められている (Fujimura K, 2005)。ピロリ菌陰性あるいは除菌治療が無効の場合、First line 治療としては副腎皮質ステロイド療法、Second line 治療としては Thrombopoietin 受容体作動薬 (thrombopoietin receptor agonists,

TPO-RA)、リツキシマブ、脾臓摘出療法があり、これらを個々の患者の状態に合わせて選択されている。

First line の副腎皮質ステロイド療法により、80%の症例で血小板数が 30,000/ μ L 以上、50%の症例で 100,000/ μ L 以上に増加するが、ステロイド減量に伴い血小板数は減少し、ステロイドを中止できる症例は 10~25%である (George JN, 1994)。副腎皮質ステロイドの長期投与は感染症、糖尿病、消化性潰瘍等の副作用を誘発するため、これらの副作用により投与中止が余儀なくされることもある。ステロイド治療が無効もしくは合併症や副作用等のため継続が困難な患者は、Second line に移行する。

ITP の治療に使用する TPO-RA には、エルトロンボパグ (Eltrombopag: EPAG)、ロミプロスチム、アバトロンボパグがあるが、国内では経口製剤の EPAG と皮下注製剤のロミプロスチムが承認されている (Li W, 2016; Elgebaly AS, 2017)。TPO-RA は、ステロイドと異なり中止後も長期的完解が得られることが報告されている (Ghadaki B, 2013)。EPAG の長期的な有効性と安全性が明らかになり「成人特発性血小板減少性紫斑病治療の参照ガイド 2019 年版」では Third line から Second line に位置づけられた。なお Second line での治療には、TPO-RA 以外にリツキシマブ (2017 年に ITP に適応追加) と脾臓摘出療法がある。リツキシマブは、完全奏効 (血小板数: 100,000/ μ L 以上) が投与患者の 46.8%に見られ血小板増加効果は優れていたが、出血に対する抑制効果は標準治療と差はなかった (Gudbrandsdottir S, 2013; Zaja F; 2010; Arnold DM, 2012; Li Z, 2011; Ghanima W, 2015)。脾臓摘出療法では 80%の症例で血小板増加を認めたが、約 20%が再発し永続的効果は 60%である (Kojouri K, 2004)。

エルトロンボパグ (Eltrombopag: EPAG)

Thrombopoietin (TPO) は、血小板の前駆細胞の増殖・分化に関与する造血因子であり、ヒト遺伝子組み換え TPO 製剤やヒト遺伝子組換え型巨核球増殖促進因子製剤が開発され、化学療法に伴う血小板減少症や ITP 患者には一定の有効性を示した (Nomura S, 2002)。しかし、

これらの製剤を用いる治療では TPO に対する中和抗体の産生が明らかとなり臨床開発が中止となった（宮川義隆, 2009）。その後、中和抗体を誘導しない第 2 世代の TPO 受容体作動薬として EPAG が開発された（宮川義隆, 2009）

EPAG は、GlaxoSmithKline 社によって開発された経口投与可能な低分子 TPO 受容体作動薬である。慢性 ITP 患者を対象とした臨床試験において、血小板の増加効果と出血症状を改善したことから、2010 年に ITP に対する効能・効果が承認された（Cheng G, 2011; Tomiyama Y, 2012; Katsutani S, 2013）。また、2017 年には抗胸腺細胞免疫グロブリン/シクロスポリンとの併用で「再生不良性貧血 (Aplastic Anemia: AA)」にも適応が拡大された（Desmond R, 2015; Townsley DM, 2017; Lum SH, 2016; Gill H, 2017）。

EPAG の重大な副作用として、肝障害、血栓塞栓症、出血、骨髄線維化があり、その程度によっては EPAG の投与継続がしばしば困難となる。EPAG の市販後調査によるとそれらの副作用発現率は、投与量が～12.5、12.5～25、25～37.5、37.5～50 mg/day においてそれぞれ 24.4%、24.4%、25.1%、22.6%であり、投与量から副作用を予測することは困難である（使用成績調査のまとめ, 2017）。副作用の中でも肝障害は頻度が高くしばしば EPAG の減量や投与中止の原因となる。その割合は、臨床試験では 4～10%、市販後調査では 4.0%と報告されており、他の副作用と同様に投与量からその発現を予測することは困難である。

最近、血中 EPAG 濃度の上昇が肝障害の一因になりうるということが、小児の ITP 患者において報告されており、血中濃度の上昇の原因に UDP- glucuronosyl transferase や CYP2C8 の遺伝子多型の影響が指摘されている（Marano M, 2018）。また、EPAG の体内動態には大きな個人差があることが知られており、必ずしも投与量と血中濃度の間に良好な相関関係があるとは限らない。血中濃度の個人差が効果や副作用と関係しているのであれば、血中濃度測定によって効果を維持し、副作用を回避する投与設計が可能となると考えられる。

本研究は、肝障害を予測するには血中 EPAG 濃度測定が有効であるか否かを検証することを目的とした。第 1 章では、日常臨床で使用できる簡便な血清 EPAG 濃度の測定法 (HPLC)

を開発し、第2章では ITP 患者を対象に ITP 患者における血清 EPAG 濃度と肝障害発現との関連を検討した。

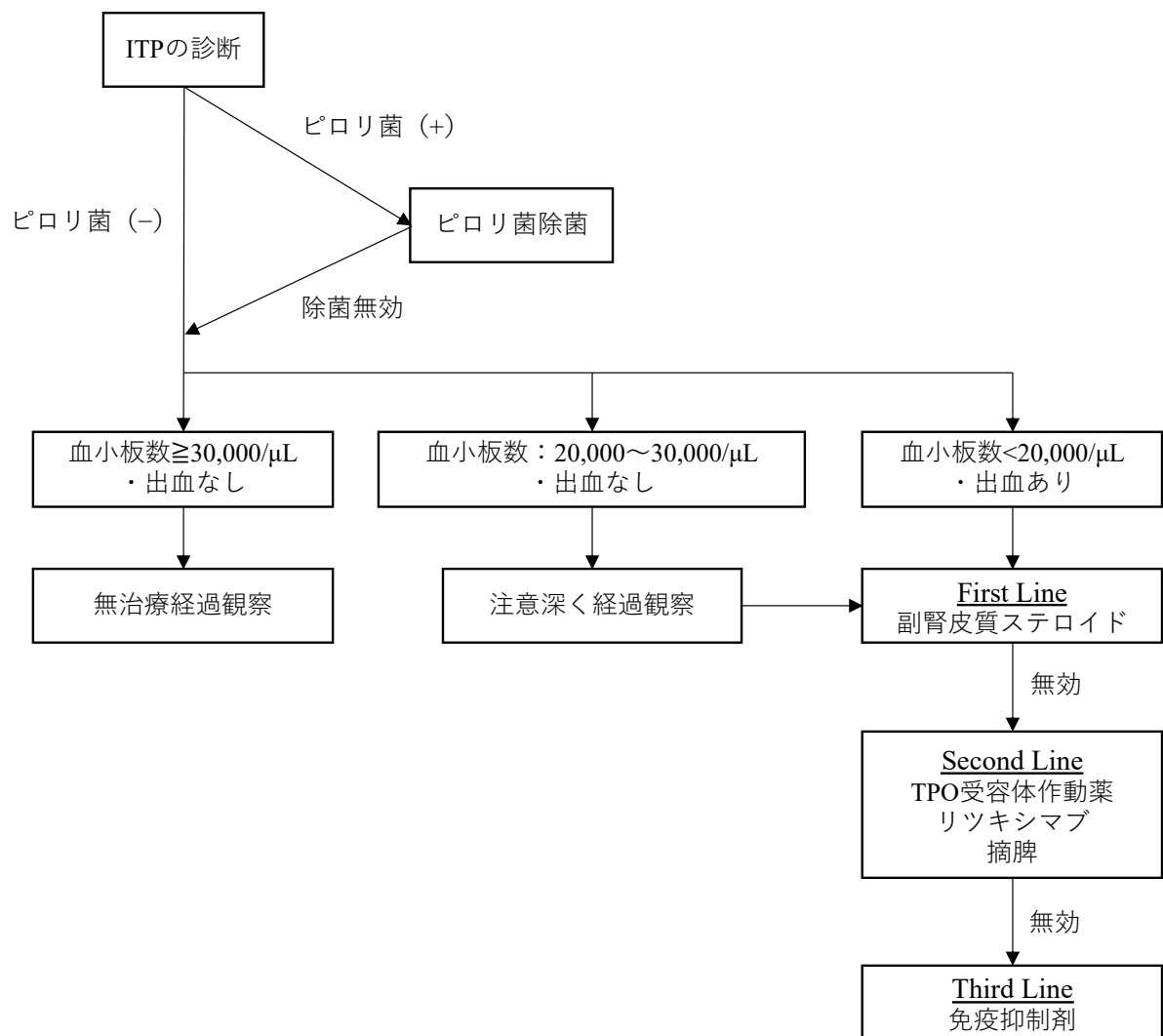


Figure 1. Algorithm for ITP therapy in adults patients.

「成人特発性血小板減少性紫斑病治療薬の参照ガイド 2019年改訂版」より改変

1. 血清 EPAG 濃度測定法の開発

1-1 目的

EPAGの維持量は、血小板数に応じて治療上必要最小限の用量となるように調整する必要がある。EPAGの過剰投与では、血小板数の過剰な増加による血栓塞栓症に加えて、重度の肝障害の発生リスクも高まる可能性があるため、個々の患者に適切な投与量を見つけることがITP治療において重要である。血小板前駆細胞である巨核球の産生は血中EPAG濃度と相関があることが知られており (Hayes S, 2011)、EPAGの治療薬物モニタリング (TDM) はEPAG投与中の血小板反応を推測するために適用できると考える。血清EPAG濃度と有効性および安全性との間の関係を評価するために、血清EPAG濃度を測定するための簡便な方法が必要とされる。これまでの血中EPAG濃度の測定法は、タンデム質量分析検出 (LC-MS/MS) を用いた方法が報告されている (Maddela R, 2014)。しかし、LC-MS/MSは病院や外来診療所などの臨床施設では一般的に利用が困難であるため、簡便に血清EPAG濃度を測定できる代替の方法を開発する必要がある。本研究では、汎用されるオクタデシルシリルシリカ (ODS) カラムと紫外線 (UV) 検出器を用いた逆相HPLC法を開発した。

1-2 方法

実験試薬と調製

EPAG は Toronto Research Chemicals (Toronto, Canada) から購入した。内部標準物質として用いたジクロフェナクおよび 1-ペンタンスルホン酸ナトリウム塩は、富士フィルム和光純薬株式会社 (大阪、日本) から購入した。他のすべての化学物質は HPLC または分析試薬グレードを使用した。EPAG の標準液は、150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のストック溶液をメタノールで希釈して調製した。血清標準試料はヒト血清 (ツインコンセーラ L、ニッセイ、東京、日本) を用いて調製した。内部標準物質のジクロフェナク溶液は 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のメタノール溶液として調製し、分析まで -30°C で保存した。

HPLC 装置および分析条件

HPLC システム (Agilent 1120 Compact LC) は、送液ポンプ、オートサンプラー、UV 検出器、およびデータインテグレーターの EZChrom EliteWorkStation® (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) で構成した。ODS カラム (TSKgel ODS-80Ts: 内径 4.6 mm×15 cm、東ソー、東京) を室温で使用し、検出波長は 265 nm に設定した。移動相溶液には 10mM の 1-ペンタンスルホン酸ナトリウム塩、アセトニトリルおよび酢酸 (100 : 300 : 2, v/v) を用い、流速は 1.0 mL/min に設定した。

サンプル調製

血清サンプル (100 μ L) に 50 μ L の内部標準溶液 (10 μ g/mL) を添加し、さらに 200 μ L のアセトニトリルを加えて 30 秒間ボルテックス操作を行い除タンパクした。除タンパク後のサンプルを 18,000 g で 5 分間遠心分離し、得られた上清の 20 μ L を HPLC に注入した。

キャリブレーションとバリデーション

EPAG 濃度を 0.15、0.5、1、2.5、5、7.5、12.5 μ g/mL に調整した血清コントロールサンプルを用いて、検量線を作成した。血清からの EPAG の回収率は、0.5、1、および 10 μ g/mL の濃度で調べた。HPLC のバリデーションは、the guidance for bioanalytical method validation in the US Food and Drug Administration (2018) に従った。測定精度は 0.15、0.3、1、5、および 10 μ g/mL の各濃度について、日内および日間変動をそれぞれ 5 回ずつ測定して求めた変動係数 (CV 値) と測定誤差で評価した。検討した濃度は、それぞれ lower limit of quantitation (LLOQ)、lower quality control (LQC)、medium quality control (MQC) 1、MQC2 および high quality control (HQC) に該当する。日内変動は、各濃度サンプルの 5 セットを同日に分析し、日間変動は、各濃度サンプルを 5 日間分析した。血清サンプル中の EPAG の安定性は、凍結融解および長期安定性について 1 および 10 μ g/mL の濃度で評価した。凍結融解の安定性評価には

サンプルの凍結・融解を4サイクル行い、長期安定性の評価には-30°Cで28日間と56日間保管したサンプルを分析した。

患者試料と倫理的配慮

EPAGを投与したITP患者2名を対象に、本測定法を適用して血中濃度のモニタリングを行った。患者にはインフォームド・コンセントを行い、血清EPAG濃度測定のための採血を行った。なお、本研究は筑波大学附属病院臨床研究倫理審査委員会の承認を得ている（承認番号H27-138）。

1-3 結果

血清EPAG濃度測定のためのHPLC法の開発

血清EPAG濃度測定における代表的なクロマトグラムをFigure 2に示した。内部標準物質とEPAGの保持時間は、それぞれ3.5分と10.6分であり、それぞれに狭雑するピークは認めなかった。検量線は、0.15~12.5 µg/mLの濃度範囲で良好な直線性を示した。回帰分析によって求めた検量線の回帰式は、 $Y = 0.0523 X - 0.0059$ ($r=0.9987$)であった (Figure 3)。Xは血清EPAG濃度 (µg/mL)、YはEPAGと内部標準物質のピーク高さの比である (Figure 3)。

0.5、1、10 µg/mLの濃度で求めた血清からのEPAGの回収率は、それぞれ97.9%、107.1%、95.9%であり、CV値は1.7~2.8%であった。0.15、0.3、1、5、および10 µg/mLの濃度での日内変動のCV値は1.9~11.8%、誤差は13.3%以下であり、日間変動のCVは1.0~11.8%、誤差は13.3%以下であった (Table 1)。1および10 µg/mLでの血清サンプル中のEPAGは、凍結・融解および長期凍結保存いずれの試験でも、その濃度の低下は見られず安定であった。凍結・融解と長期凍結保存 (28日と56日) のCV値は0.6~4.7%で、誤差は1.2~14.0%であった (Table 2)。

HPLC 法による血清 EPAG 濃度の患者血清への適用

本測定法を ITP 患者 2 名の血清 EPAG 濃度測定に応用した (Figure 4)。患者 1 は、副腎皮質ステロイド不応性の 63 歳の女性であった。ITP に対して、プレドニゾロンを漸減しながらスルファメトキサゾール/トリメトプリム投与し、同時に EPAG 投与を開始した。EPAG 投与 (6.25~25 mg/day) により血小板数は 26 から $99 \times 1000/\mu\text{L}$ に改善し、血清 EPAG 濃度は 0.3~1.7 $\mu\text{g/mL}$ を推移した (Figure 4)。患者 2 は、副腎皮質ステロイド (プレドニゾロン、デキサメタゾン) に不応性の 69 歳の女性であった。EPAG 投与 (12.5~25 mg/day) により、血小板数は 29 から $267 \times 1000/\mu\text{L}$ に改善し、血清 EPAG 濃度は 0.8~4.9 $\mu\text{g/mL}$ で推移した (Figure 4)。両患者とも血清 EPAG 濃度測定のためのクロマトグラムには妨害となる狭雑ピークは認められなかった。

1-4 考察

逆相 HPLC に汎用される ODS カラム、UV 検出器、および 10 mM 1-ペンタンスルホン酸ナトリウム塩、アセトニトリル、酢酸からなる単純な移動相溶媒を使用する本測定法は、血清 EPAG 濃度の測定に十分な精度と感度であった。分析時間は 12 分未満であり、アセトニトリルを用いた除タンパクによる血清サンプルの前処理操作も、既存の LC-MS/MS 法と同等に簡便である (Maddela R, 2014)。内部標準物質のジクロフェナクは疎水性 (水に対するオクタノールへ分配比) が EPAG と類似しており、設定した条件での溶出挙動も類似していると考え、選択した。また、ITP を含む重篤な血液疾患のある患者にはジクロフェナクは禁忌であり、EPAG と併用される機会はほとんどないと考えられるため、内部標準物質として使用した。実際に当院では、これまで EPAG とジクロフェナクを併用している ITP 患者はいなかった。

今回開発した HPLC 法について、日中および日間変動で評価した測定精度は、米国 FDA ガイダンス (2018) に基づく許容範囲内であり、臨床での薬物測定に用いても問題ないと考えられた。各濃度で求めた CV 値と誤差は、LLOQ 以外は 15%未満、LLOQ でも 20%未満であ

った (Table 1)。これらの結果は、今回の HPLC が TDM をはじめとした EPAG の臨床研究やヒトを対象とした薬物動態研究における血中濃度の測定に使用できることを示唆している。本測定法の LLOQ は 0.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり、LC-MS/MS 法 (0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$) よりも劣っている (Maddala R, 2014 年) が、以下に示すような症例での測定結果 (実際の測定濃度は 0.3~4.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$) から日常的なモニタリングでは問題にならないと考えられる。また、1 および 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で行った凍結・融解と長期凍結保存 (28 および 56 日) での安定性評価でも EPAG 濃度の低下は認められず、実臨床における保管条件下で血清試料が保管可能であることも確認された (Table 2)。

本測定法は、ITP 患者 2 名から得られた臨床検体に適用し、感度不足や併用薬剤による測定の妨害が認められないことを確認した (Figure 4)。いずれの症例でも血清 EPAG 濃度は、用量依存的に変化した。患者 1 は、投与量がそれぞれ 6.25、12.5、25 mg/day のとき、血清 EPAG 濃度はそれぞれ 0.3、0.5~1.4、1.3~1.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。患者 2 は、投与量が 12.5 および 25 mg/day のとき、血清 EPAG 濃度は 0.8~2.0 および 2.6~4.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。

患者 1 の血清 EPAG 濃度は、同じ 12.5 mg/day であるが治療中で異なっていた (Figure 4)。これは EPAG 開始直後に、スルファメトキサゾール/トリメトプリムの併用により、EPAG の肝代謝酵素である CYP2C8 (Wen X, 2002) の阻害を引き起こし、より高い血清 EPAG 濃度を推移した可能性が考えられる (Marano M, 2018) (Figure 4)。患者 2 は、25 mg/day で血清 EPAG 濃度がほぼ 3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に達したときに血小板の過剰な増加 ($267 \times 1000 / \mu\text{L}$) を示したため、投与量を 12.5 mg/day に減量した。これらのことは、EPAG の治療範囲として、血清 EPAG 濃度を 1.0~3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に維持する必要性を示唆している。次章ではさらに多くの症例に適用し、血清 EPAG 濃度の有効治療域について検討する。

Table 1. Intraday and interday assay precision for the determination of serum eltrombopag concentration.

Quality control (Concentration: µg/mL)	Intraday (n = 5)			Interday (n = 5)		
	Mean ± S.D. (µg/mL)	CV* (%)	Bias* (%)	Mean ± S.D. (µg/mL)	CV* (%)	Bias* (%)
LLOQ (0.15)	0.17 ± 0.02	11.8	13.3	0.17 ± 0.02	11.8	13.3
LQC (0.3)	0.33 ± 0.01	3.0	10.0	0.33 ± 0.03	9.1	10.0
MQC1 (1.0)	0.97 ± 0.02	2.1	3.0	1.03 ± 0.03	2.9	3.0
MQC2 (5.0)	4.66 ± 0.09	1.9	6.8	4.82 ± 0.05	1.0	3.6
HQC (10.0)	9.84 ± 0.53	5.4	1.6	9.73 ± 0.16	1.6	2.7

LLOQ, lower limit of quantitation; LQC, lower quality control; MQC, medium quality control;

HQC, high quality control

S.D., standard deviation; CV, coefficient of variation

*: The US FDA guidance (2018) indicates that the criteria for the CV and bias at each concentration are smaller than 15%, except for LLOQ, 20%, in the chromatographic assay.

Table 2. Stability of eltrombopag in serum under freeze-and-thaw and longtime freezing.

Condition (n=5)	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Mean \pm S.D. ($\mu\text{g/mL}$)	CV (%)	Bias (%)
Freeze-and-thaw, 4 cycles	1.0	1.14 \pm 0.02	1.8	14.0
	10.0	9.79 \pm 0.39	4.0	2.1
Long-term 28 days (-30°C)	1.0	1.06 \pm 0.05	4.7	6.0
	10.0	9.59 \pm 0.06	0.6	4.1
Long-term 56 days (-30°C)	1.0	1.13 \pm 0.02	1.8	13.0
	10.0	9.88 \pm 0.17	1.7	1.2

S.D., standard deviation; CV, coefficient of variation

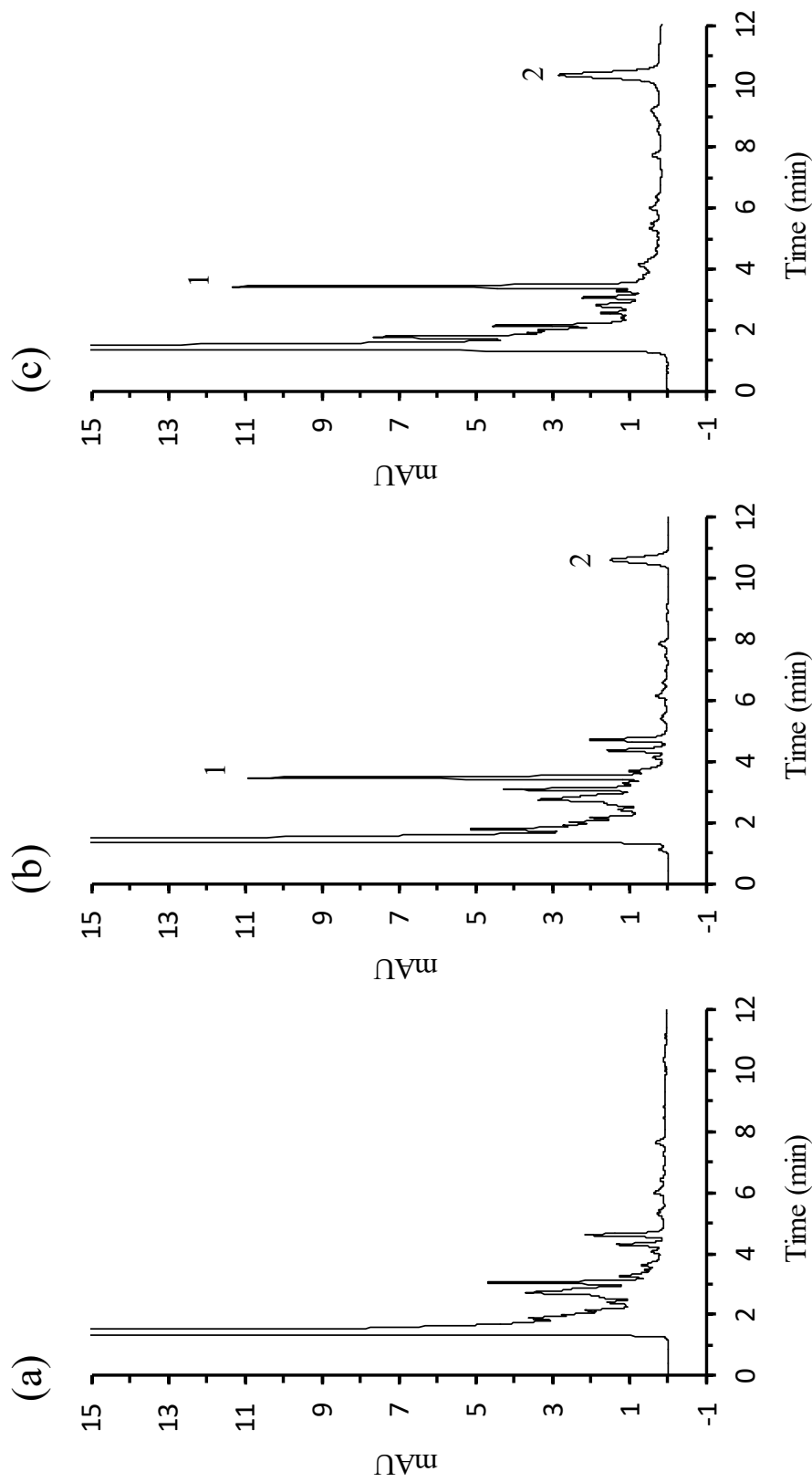


Figure 2. Typical chromatogram: (a) blank serum; (b) blank serum spiked with internal standard and EPAG (2.5 $\mu\text{g/mL}$); (c) patient sample under oral administration of EPAG (25 mg/day), prednisolone and lansoprazole. The calculated concentration is 4.9 $\mu\text{g/mL}$ for EPAG. Peak 1, internal standard; peak 2, EPAG.

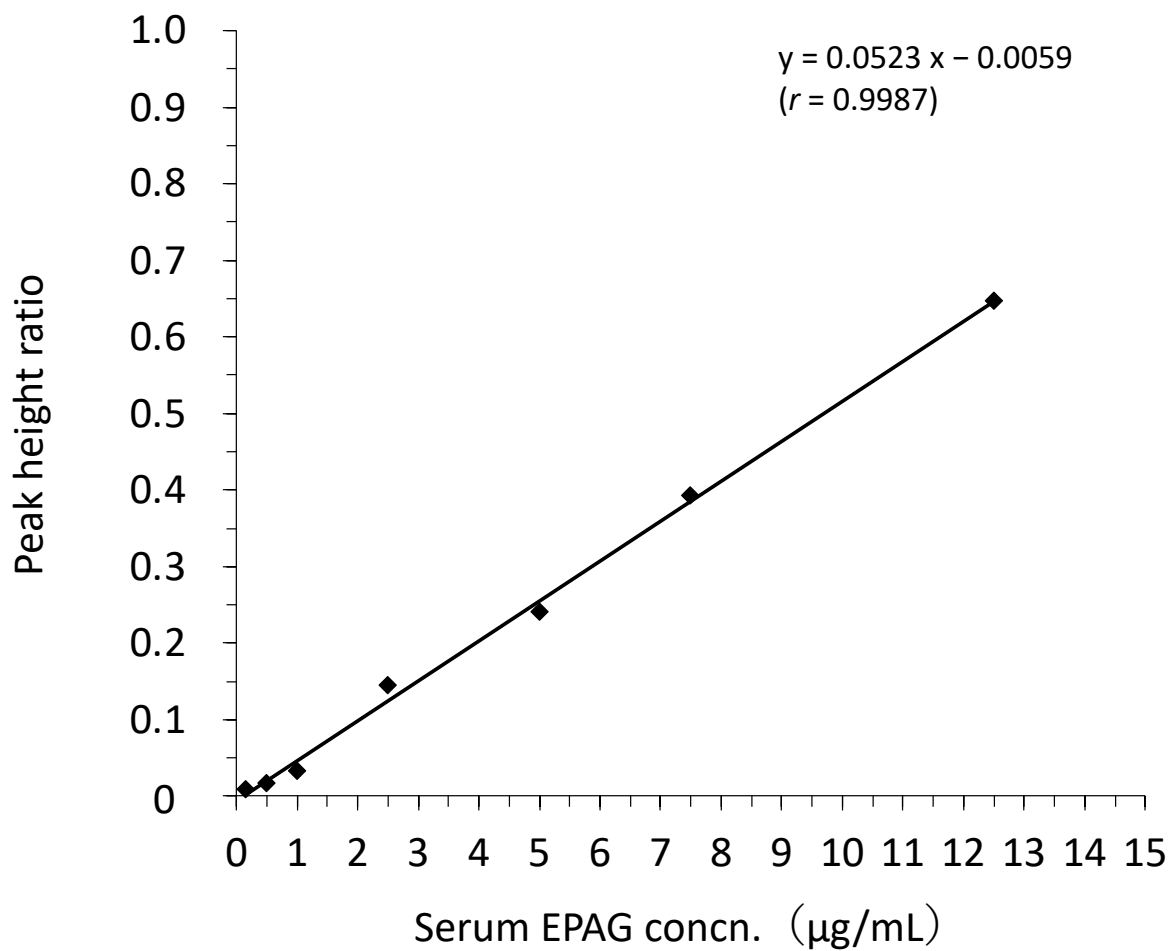


Figure 3. The calibration curve for determination of EPAG concentration in serum. The equation of the calibration curve was $Y = 0.0523 X - 0.0059$, where X is the serum EPAG concentration and Y is the peak height ratio of EPAG to the internal standard.

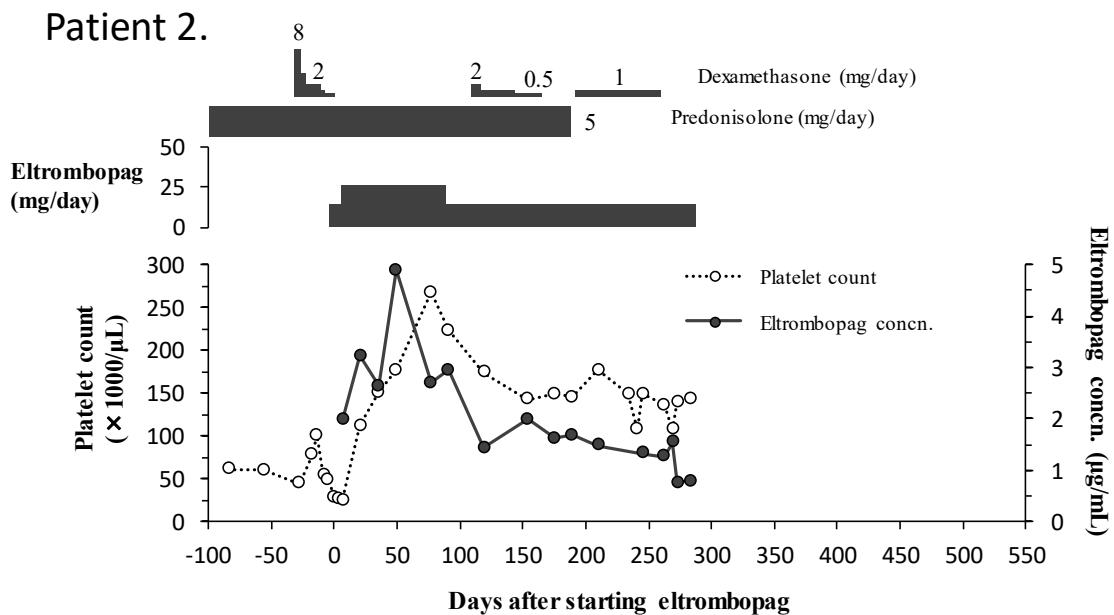
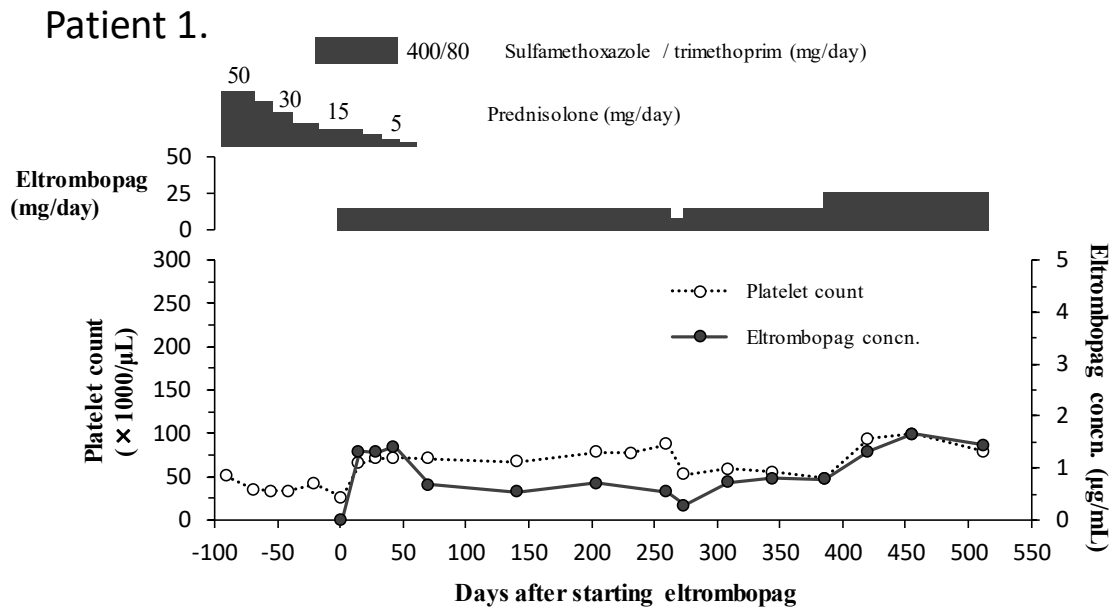


Figure 4. Clinical courses of two patients treated with EPAG. Patient 1 showed serum EPAG concentrations of 0.3, 0.5-1.4 and 1.3-1.7 μ g/mL when the daily doses were 6.25, 12.5 and 25 mg, respectively. Patient 2 showed serum EPAG concentrations of 0.8-2.0 and 2.6-4.9 μ g/mL when the daily doses were 12.5 and 25 mg, respectively.

2. ITP 患者における血清 EPAG 濃度と肝障害発現との関連

2-1 目的

前章では HPLC を用いた血清 EPAG 濃度の測定法を開発し、その測定法が患者検体にも適用できることを明らかにした。本章では、開発した HPLC を用いて EPAG の血中濃度測定を行い、EPAG の適正使用に TDM を適用できるか否かを検討することにした。具体的には、EPAG 投与中に発現する重大な副作用の 1 つである肝障害に注目し、血中 EPAG 濃度と肝障害発現との関連について検討を行うこととした。

慢性 ITP 患者を対象とした国内臨床試験において、EPAG 投与中に見られる肝障害に基づく ALT 上昇は 9% (Tomiyama Y, 2012)、海外臨床試験においても 4% の患者に発現すると報告されており (Cheng G, 2011)、肝障害は比較的頻度の高い副作用である。したがって EPAG の投与中は定期的に肝機能検査を行い、異常が認められた場合には EPAG 投与を中止や減量も含めた適切な処置を行う必要があると添付文書でも注意喚起されている。薬剤性肝障害の発生機序は一般的に中毒性と特異体質性 (アレルギー性) に分類される (坂木 理, 2015)。EPAG による肝障害の発現機序は明らかでないが、血中濃度の上昇に依存して発現すると考えられる中毒性肝障害の症例が報告されている (Marano M, 2018)。このような肝障害であれば、血中濃度をモニタリングする TDM によりその発現を予測し、未然に防ぐための投与設計が可能になると考えられる。

肝障害時には血小板数 (PLT) の増加効果が減弱する可能性も指摘されている。添付文書でも「EPAG の効果は、通常投与開始後 1~2 週間であらわれるので、効果の確認のためには少なくとも 2 週間は同一用量を維持すること。ただし、肝障害のある患者では、血小板数が定常状態に達するまでの期間が通常より長くなるため、効果の確認のためには少なくとも 3 週間は同一用量を維持すること」と記載されており、肝障害時には効果発現までに時間を要することが示されている。

このように EPAG による肝障害の発現や、肝障害発現時の EPAG の効果の変化は、本剤の使用を複雑にしている。本章では、EPAG 投与中の肝障害発現が PLT に及ぼす影響と、血清 EPAG 濃度が肝障害発現に及ぼす影響について検討した。

2-2 方法

対象患者

ITP 治療のために EPAG の投与を行った患者 49 名 (男/女: 14/35、57.5±22.4 歳、55.1±12.7 kg) を対象とした (Table 3)。前治療で副腎皮質ステロイド投与を行った患者のうち、PLT の増加が十分でなかった (PLT : 30,000/μL 未満) 患者 (34 名)、副腎皮質ステロイドによる合併症や副作用での継続が困難となった患者 (3 名) が含まれていた。

対象患者について EPAG 投与量 (mg/kg/day)、PLT (×1000/μL)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ: AST (U/L)、アラニンアミノトランスフェラーゼ: ALT (U/L)、血清クレアチニン: CRE (mg/dL) 及び血清アルブミン: ALB (g/dL) 及び併用薬剤を調査した。EPAG 投与開始時点で ALT または AST が基準値以上 (ALT: 44 U/L、AST: 38 U/L) は 9 名、CRE が基準値以上 (0.8 mg/dL) は 10 名であった。ALB が基準値未満 (3.8 g/dL) 5 名であった。32 名の患者は、EPAG と副腎皮質ステロイドを併用した。副腎皮質ステロイド以外に、消化性潰瘍治療薬としてプロトンポンプ阻害薬 (ランソプラゾール 11 名、ラベプラゾール 5 名、エソメプラゾール 10 名)、ヒスタミン H2 受容体拮抗薬 (ファモチジン 7 名、ラニチジン 1 名、ラフチジン 1 名)、高血圧治療薬として Ca 拮抗薬 (アムロジピン 11 名、ニファジピン 2 名)、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (アジルサルタン 2 名、オルメサルタン 1 名、カンデサルタン 1 名、テルミサルタン 1 名、バルサルタン 4 名)、利尿薬 (フロセミド 4 名、トリクロルメチアジド 2 名、スピロノラクトン 1 名)、高脂血症治療薬として HMG-CoA 還元酵素阻害薬 (シンバスタチン 1 名、ピタバスタチン 2 名、プラバスタチン 3 名)、フィブラート系薬剤 (ベザフィブラート 2 名)、糖尿病治療薬としてメトホルミン、ボグリボース、シダグ

リプチン、アログリプチン、エンパグリフロジン、貧血治療薬としてクエン酸第一鉄、硫酸鉄、下剤として酸化マグネシウム、その他の薬剤としてクロピドグレル、ワルファリンが併用投与されていた。

EPAG の効果は PLT と EPAG の投与量で補正した投与期間中の最大 PLT (PLT/D) で評価した。肝機能は有害事象共通用語規準 (Common Terminology Criteria for Adverse Events: CTCAE ver. 4.0) を用いて Grade 評価した。肝障害群 (LD 群) は EPAG の投与期間内に AST/ALT が 1 度でも Grade1 以上の異常値を示した患者群と定義した。LD 群 (normal) は AST/ALT が正常値を示している期間での測定値、LD 群 (abnormal) は AST/ALT が異常値を示している期間の測定値とした。

血清 EPAG 濃度測定

対象患者のうち 23 名 (男/女: 3/20、61.5±16.2 歳、54.8±13.4 kg) は血清 EPAG 濃度を測定し、肝障害発現との関連を検討した。血中濃度測定のための採血は、原則として外来受診日の当日朝の服用を延期して行い、トラフ濃度を測定した。外来受診時に直前の EPAG の服用時刻と採血時刻を記録した。血液検体はプレーン採血管に取り、血清を分離した後、測定まで冷凍 (-30°C) 保存した。血清 EPAG 濃度の測定には、前章で開発した HPLC 法を用いた。

倫理的配慮

本研究は筑波大学附属病院臨床研究倫理審査委員会の承認を得て実施した (承認 No. H27-138)。対象患者には本研究について公開文書で周知し、血中濃度測定のための検体採取は文書で説明を行い、同意を得て実施した。

統計解析

統計解析には SPSS (International Business Machines Corp, Armonk, New York, USA) を用いた。肝障害非発現群 (non-LD 群) と発現群 (LD 群)、LD 群における肝障害発現時 (abnormal)

と非発現時 (normal) の血小板数や血清 EPAG 濃度の比較では、Mann-Whitney の U 検定を用いた。肝障害発現との関連する血清 EPAG 濃度のカットオフ値は、ROC (Receiver operating characteristic curve) 解析から Youden's index により求めた。いずれの統計解析でも危険率 5% 未満 ($p<0.05$) を有意差ありと判定した。

2-3 結果

EPAG 投与による肝障害の発現

対象患者 49 名の投与期間 [中央値 (範囲)] は 456 (7-2984) 日であった。EPAG 投与後に 22 名 (45%) が投与開始 54 (5~653) 日に肝障害 (Grade 1 以上) を発現した (LD 群)。このうち 4 名は Grade 2、4 名は Grade 3 の肝障害を示した (Table 4)。EPAG 投与前から肝機能異常を認めた 2 名 (AST/ALT:それぞれ 29/47 と 43/60) を含む他の 27 名は、EPAG 投与 191 (7~2,951) 日において肝機能の悪化は認められなかった (non-LD 群)。non-LD 群と LD 群の比較において EPAG 開始時の PLT (中央値: 範囲) (19: 1~72 vs. 24: 5~80 $\times 1,000/\mu\text{L}$) には差がなかったが、EPAG 投与中の最大 PLT は non-LD 群が LD 群 (abnormal) より高い値を示した (172: 4~687 vs. 108: 12~268 $\times 1,000/\mu\text{L}$ 、 $p<0.05$)。LD 群において肝障害 (normal) の最大 PLT は (126: 8~505 $\times 1000/\mu\text{L}$) であり、肝障害 (abnormal) よりも高い傾向を認めたが有意差はなかった ($p=0.07$)。

PLT/D (中央値: 範囲) も同様であり、EPAG 投与中の最大値は non-LD 群が LD 群 (abnormal) より高い値を示し (681: 10~8,969 vs. 260: 15~1,015、 $p<0.01$) (Figure 5)、LD 群 (abnormal) に EPAG の効果が減弱すると考えられた。

EPAG 投与中に non-LD 群の 22 名 (81%)、LD 群の 20 名 (91%) が、それぞれ投与開始 19 (2~501)、25 (13~236) 日に PLT 50,000/ μL を達成した。

血清 EPAG 濃度と肝障害との関連

EPAG 投与量と血清 EPAG 濃度との関係を Figure 6 に示した。両者の間には正の相関関係が認められた ($r=0.713$ 、 $p<0.01$) (Figure 6)。non-LD 群、LD 群 (normal) と LD 群 (abnormal) における EPAG の投与量と血清濃度の回帰直線式の傾きは、それぞれ 4.4、3.7 と 10.4 であった (Figure 6)。LD 群の投与量と血清 EPAG 濃度はともに non-LD 群と比較して高い傾向であった (Figure 6)。血清 EPAG 濃度は、non-LD 群と比較して LD 群 (abnormal) で有意に高かった ($1.3: 0.3\sim 6.8$ vs. $2.5: 0.2\sim 21.4$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $p<0.01$) (Table 4)。LD 群では abnormal に normal と比較して有意に高い血清 EPAG 濃度が認められた (Figure 7)。ROC 解析から、肝障害の発現リスクが高まる血清 EPAG 濃度のカットオフ値は 2.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と推定された (感度: 0.47、特異度: 0.86、AUC=0.697) (Figure 8)。non-LD 群と LD 群 (normal)、LD 群 (abnormal) における血清 EPAG 濃度が 2.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の割合はそれぞれ 9% と 20%、44% であった。血清 EPAG 濃度と ALT 値との間に正の相関が見られた ($r=0.621$ 、 $p<0.01$) (Figure 9)。

TDM を実施した肝障害例

EPAG の TDM を実施した肝障害の一例を Figure 10 に示す。症例は 53 歳女性であり、ITP の治療に副腎皮質ステロイド (デキサメタゾンのパルス療法を 2 回) を適用したが、PLT 減少 ($10\times 1,000/\mu\text{L}$) のため EPAG 投与を開始した。EPAG は PLT 値の変動に応じて 12.5 mg/day から段階的に 50 mg/day まで増量し、さらに Day 292 からプレドニゾロンも併用したところ、PLT は上昇し $24\sim 51\times 1,000/\mu\text{L}$ を推移した。Day 348 から AST/ALT が基準値以上 (70/45 U/L) となり、さらに 104/99 U/L まで上昇したため Day 467 に EPAG を中止し、ロミプロスチムに変更した。AST/ALT の改善 (69/50 U/L) を認めた Day 544 に EPAG (50 mg/day) 投与を再開したところ、再び肝障害が発現し Day 670 には AST/ALT が 209/101 U/L まで上昇したため投与量を 12.5 mg \sim 25 mg/day に減量した。血中 EPAG 濃度測定は Day 621 から実施し、血中 EPAG 濃度は、50 mg/day 投与時は 4.9 \sim 7.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、25 mg/day では 1.6 \sim 3.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、12.5 mg/day

では1.2~1.5 µg/mLを推移した。AST/ALTが基準値内の時の血中EPAG濃度は1.2~2.7 µg/mL、基準値を超えた時では1.5~7.2 µg/mLであり、血中EPAG濃度は肝障害非発現時と比べて発現時の方が高い値を示した。血中EPAG濃度がカットオフ値の2.9 µg/mLを超えた時のAST/ALT測定値は、1ポイントを除き全て基準値以上であった（Figure 11）。

2-4 考察

EPAG投与による肝障害の発現頻度は、AST上昇が4%、ALT上昇が9%と国内の臨床試験で報告されている（Tomiyama Y, 2012）。本研究では、それらより高い割合で肝障害を認めた（AST上昇が33%、ALT上昇が37%）。その要因として今回の対象患者が、当該臨床試験の安全性を担保するための患者のエントリー除外基準〔20歳未満4名、悪性疾患10名、血栓症の危険因子（糖尿病、高コレステロール血症、遺伝性の血栓性疾患など）を複数持つ7名など〕に抵触する患者も対象としていたことが挙げられる。また、臨床試験での投与量は12.5~50 mg/day、投与期間は182日（26週間）であり（Tomiyama Y, 2012）、今回の研究では26週間を超える長期間（33名: 191~2984日）の投与患者を含んでいたことも一因と考えられた。EPAGによる肝障害の危険因子として、2型糖尿病または肝胆道疾患（胆嚢結石、胆嚢ポリープ、肝嚢胞、脂肪肝）を指摘する報告もある（Zhang, 2021）。本研究でも肝障害患者（22名）の6名（27%）が当該危険因子を有しており（糖尿病5名、脂肪肝1名）、その機序は不明であるが、肝障害の危険因子である可能性が示唆された。

今回の対象患者で肝障害を発現していたLD群（abnormal）はnon-LD群と比較して、EPAG投与が高いにもかかわらず、PLTの反応性（PLT/D）は低下していた（Figure 5）。その理由として、1）高用量のEPAG暴露による肝障害の発生がPLT産生を抑制した可能性と、2）元々EPAG感受性が低い患者（PLTの反応性が低い）に対して高用量を投与したため肝障害が発現した可能性が考えられる。肝障害発生後にPLT/Dが低下したケースは前者であり、肝障害発現前からPLT/Dが低かったケースは後者に該当すると考えられる。今回の対象患者に

おいては、前者が 5 名、後者が 6 名であり、判断が困難なケースが 11 名であった。このことは、上記の 2 つの可能性以外にも要因があると考えられた。

また、今回、肝障害患者では EPAG の血中濃度が上昇する傾向が確認された (Figure 7)。同様な現象は、Marano らによる小児患者の症例報告でも指摘されている (Marano M, 2018)。肝障害時に高い血清 EPAG 濃度が観察された理由として、1) 肝障害による EPAG の肝クリアランス (CL) の低下と、2) 高い血清 EPAG 濃度によって肝障害が誘発されたことの 2 つの可能性が考えられる。前者については、肝障害患者と健康被験者との血中 EPAG 濃度の比較試験において、肝障害の Child-Pugh スコアが軽度 (スコア: 5~6)、中等度 (スコア: 7~9) と重度 (スコア: 10 以上) 患者では、EPAG の AUC が、健康被験者よりそれぞれ 41%、93% と 80% 高いことが報告されており、肝障害患者では EPAG の代謝 CL が低下していることが指摘されている (Bauman JW, 2011)。一方、後者については、一定量の EPAG を投与しても十分な PLT の増加が認められないため、さらに増量した結果、血中濃度が著しく上昇し、肝障害が誘発されたケースであり、上記の肝障害時に PLT が上昇しなかった要因の 2) に該当すると考えられる。事実、血清 EPAG 濃度と ALT 値の間には、正の相関関係があり (Figure 9)、LD 群では一定以上の血中濃度の上昇すると ALT 値の上昇が顕著になり、肝障害を誘発あるいは悪化させた可能性が考えられた。ROC 解析の結果から、肝障害を誘発する血清 EPAG 濃度が 2.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と推定され (Figure 8)、これ以上の血中濃度では PLT の上昇効果は見込まれず、むしろ肝障害のリスクが高まるだけであると推定された。実際に EPAG の TDM を行った肝障害例では、血清 EPAG 濃度が 2.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を超えたときに AST/ALT が基準値を上回ることを確認した (Figure 8, 10, 11)。また、Grade 2 以上の肝障害を発現した患者 3 名で EPAG の血中濃度を測定したところ、いずれも 2.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上 (2.9~21.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) であった (データは示していない)。

EPAG の投与では、患者個々の PLT の上昇を確認しながら、徐々に増量して至適維持用量を決定することが多いが、本研究の結果は、その増量過程で血中濃度測定が有用である可能性を示していると考えられる。すなわち、Grade 2, 3 の肝障害を防ぎながら効果的な PLT 増加

効果を得るためには、血清 EPAG 濃度が 2.9 $\mu\text{g/mL}$ を越えないように増量することが重要であり、これによって少なくとも血中濃度に依存して発症する肝障害を未然に防ぐことが可能と考える。今後、さらに多くの事例で検証する必要があると考える。

Table 3. Patients' characteristics at baseline.

Sex (male/female)	49 (14/35)
Age (years)	57.5 ± 22.4
Body weight (kg)	55.1 ± 12.7
Platelet count (×1000/μL)	20 [1-80]
AST/ALT (U/L)	22 ± 9 / 25 ± 15
CRE	0.64 ± 0.16
ALB	4.1 ± 0.4

mean ± S.D.

median [range]

Normal Laboratory Values (range);

AST (aspartate aminotransferase): 8.0-38.0 U/L, ALT (alanine aminotransferase): 4.0-44.0 U/L

CRE (creatinine): 0.47-0.79 mg/dL, ALB (albumin): 3.8-5.3 g/dL

Table 4. Comparison of non-LD group and LD group

	non-LD group	LD group (abnormal)
Sex (male/female)	27 (8/19)	22 (6/16)
Age (years)	60.4±23.1	54.0±21.5
Body weight (kg)	53.8±9.3	56.7±15.9
Platelet count (×1000/ μ L)		
Before EPAG	19 [1-72]	24 [5-80]
After EPAG (Max)	172 [4-687]	108 [12-268] *
AST/ALT (U/L)		
Before EPAG	20±8 / 19±12	25±9 / 32±16
After EPAG (Max)	25±6 / 22±10	89±82** / 97±84**
Liver dysfunction, n (grade 1 / 2 / 3<)	-	14 / 4 / 4
Number of patients measuring serum EPAG concn. (blood samples)	10 (100)	13 (142)
Dose (mg/kg/day)	0.28 [0.08-0.89]	0.47 [0.16-1.16]
Serum EPAG concn. (μ g/mL)	1.3 [0.3-6.8]	2.5 [0.2-21.4]**

mean ± S.D.

median [range]

Normal Laboratory Values (range);

AST (aspartate aminotransferase): 8.0-38.0 U/L, ALT (alanine aminotransferase): 4.0-44.0 U/L

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ vs. non-LD group

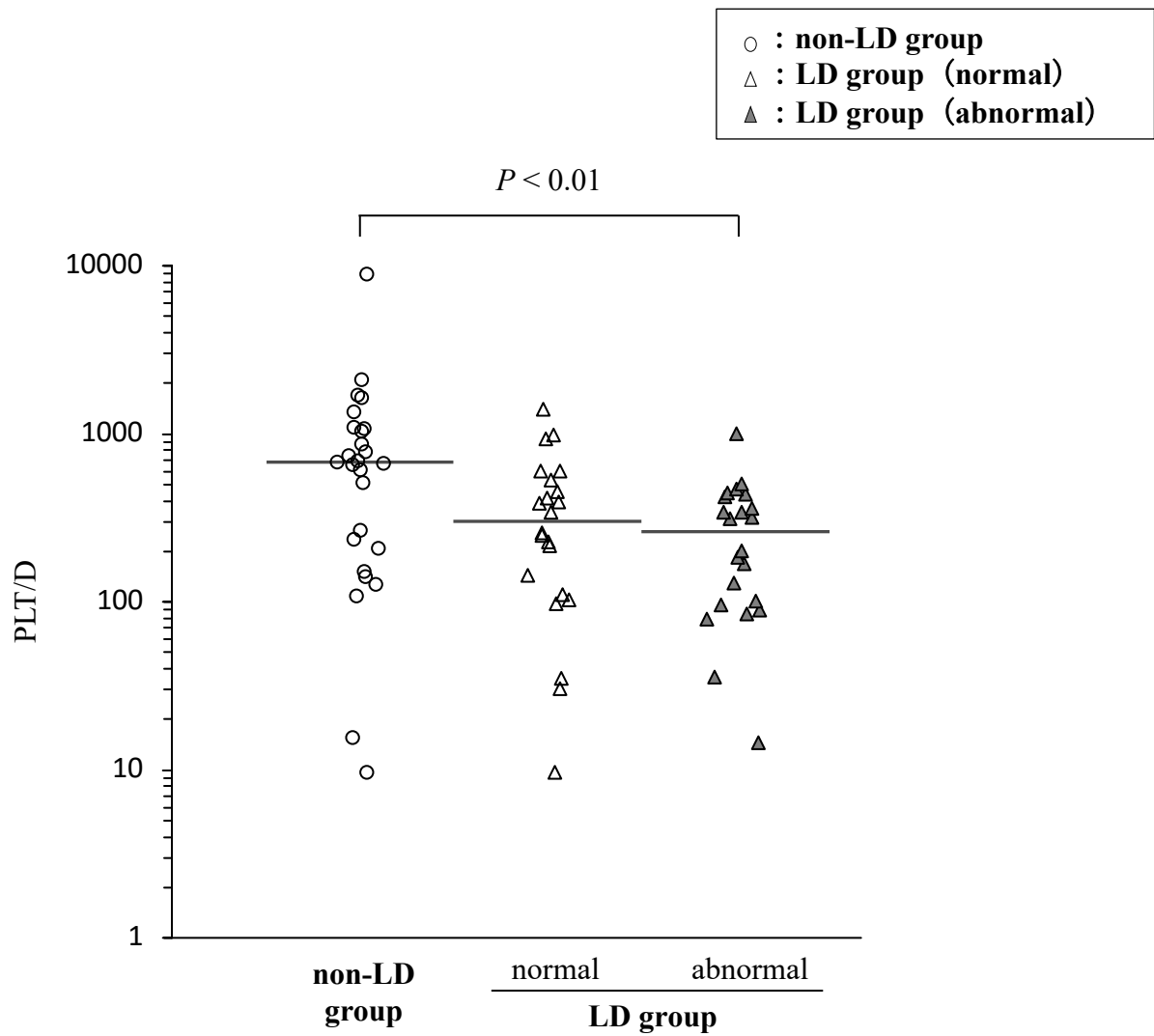


Figure 5. The maximum platelet count/dose ratios (PLT/D) during the course of EPAG administration in the patients with (LD group) and without liver dysfunction (non-LD group). Open circles indicated the values for non-LD group. Open and closed triangles indicated the values for LD group when their liver function of normal and abnormal state, respectively.

*Mann-Whitney U test

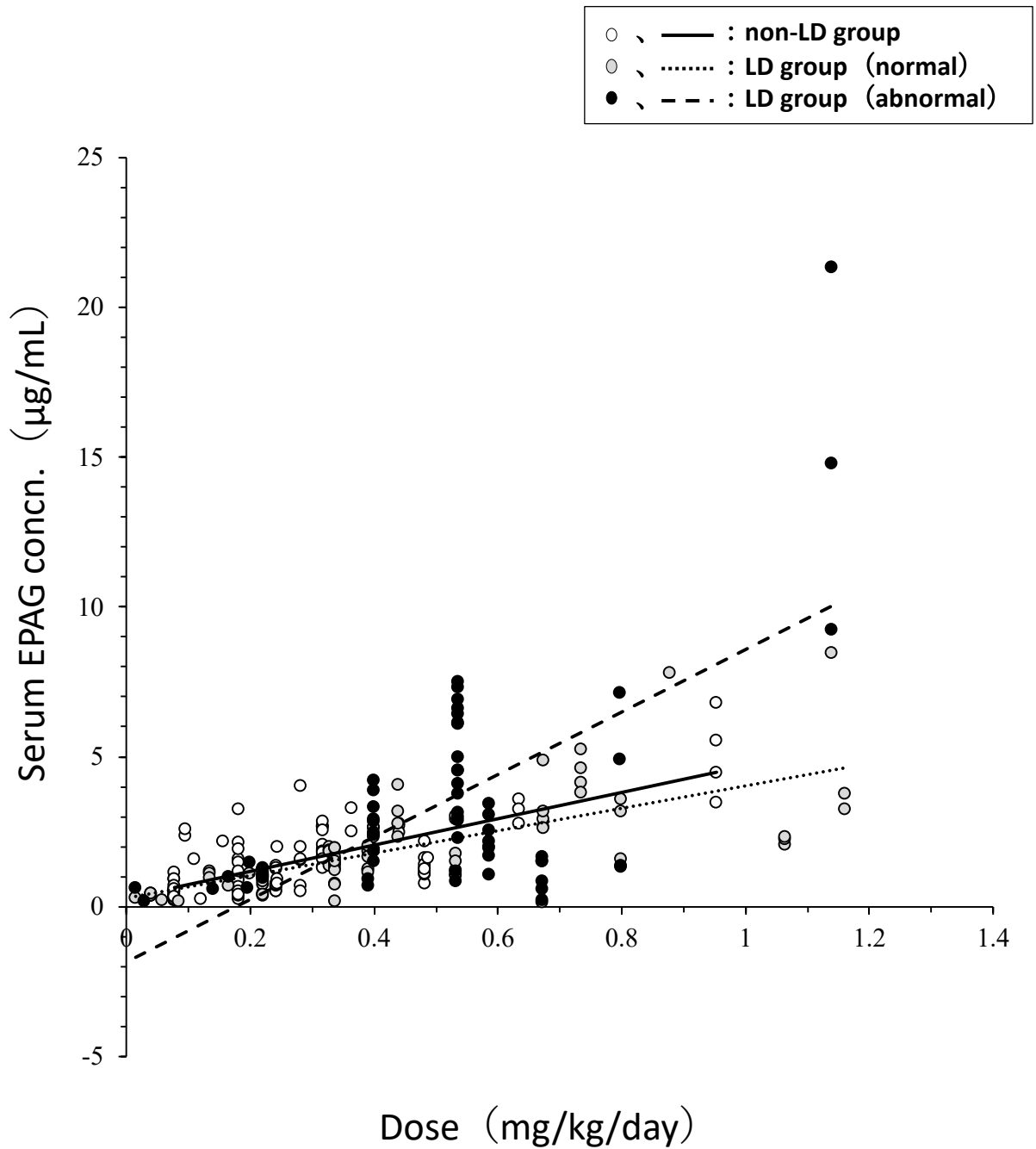


Figure 6. Relationship between daily EPAG dose and serum EPAG concentration. Open circles indicated the values in the patients with non-liver dysfunction (non-LD group). Gray and closed circles indicated the values in the patients with liver dysfunction (LD group) when their liver function is normal and abnormal state, respectively. Three regression curves, the solid line, small dotted line and large dotted line represent non-LD group, LD group (normal) and LD group (abnormal) respectively.

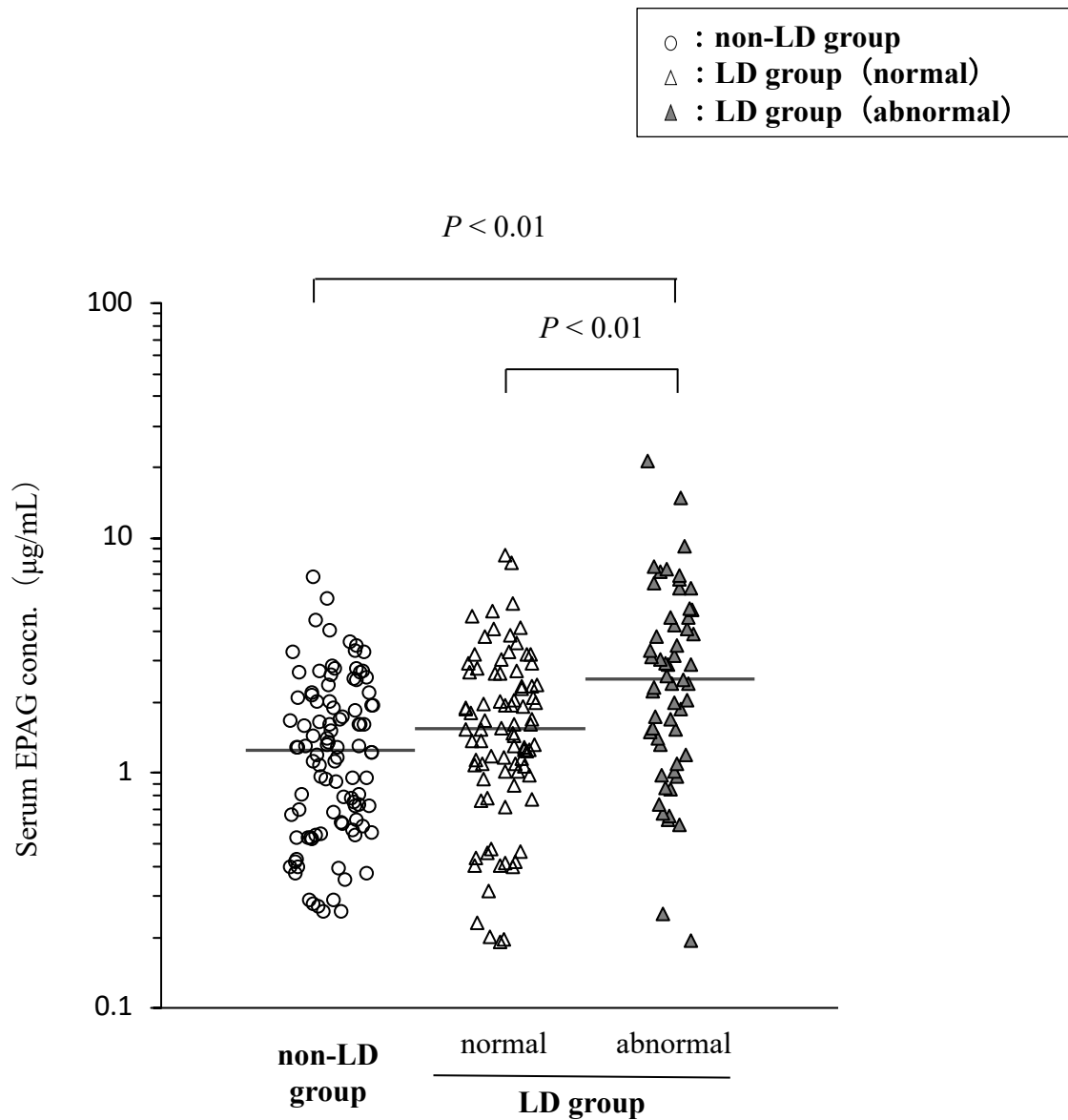


Figure 7. Serum EPAG concentration in the patients with (LD group) and without liver dysfunction (non-LD group) under EPAG administration. Open circles indicated the values for non-LD group. Open and closed triangles indicated the values for LD group when their liver function of normal and abnormal state, respectively.

*Mann-Whitney U test

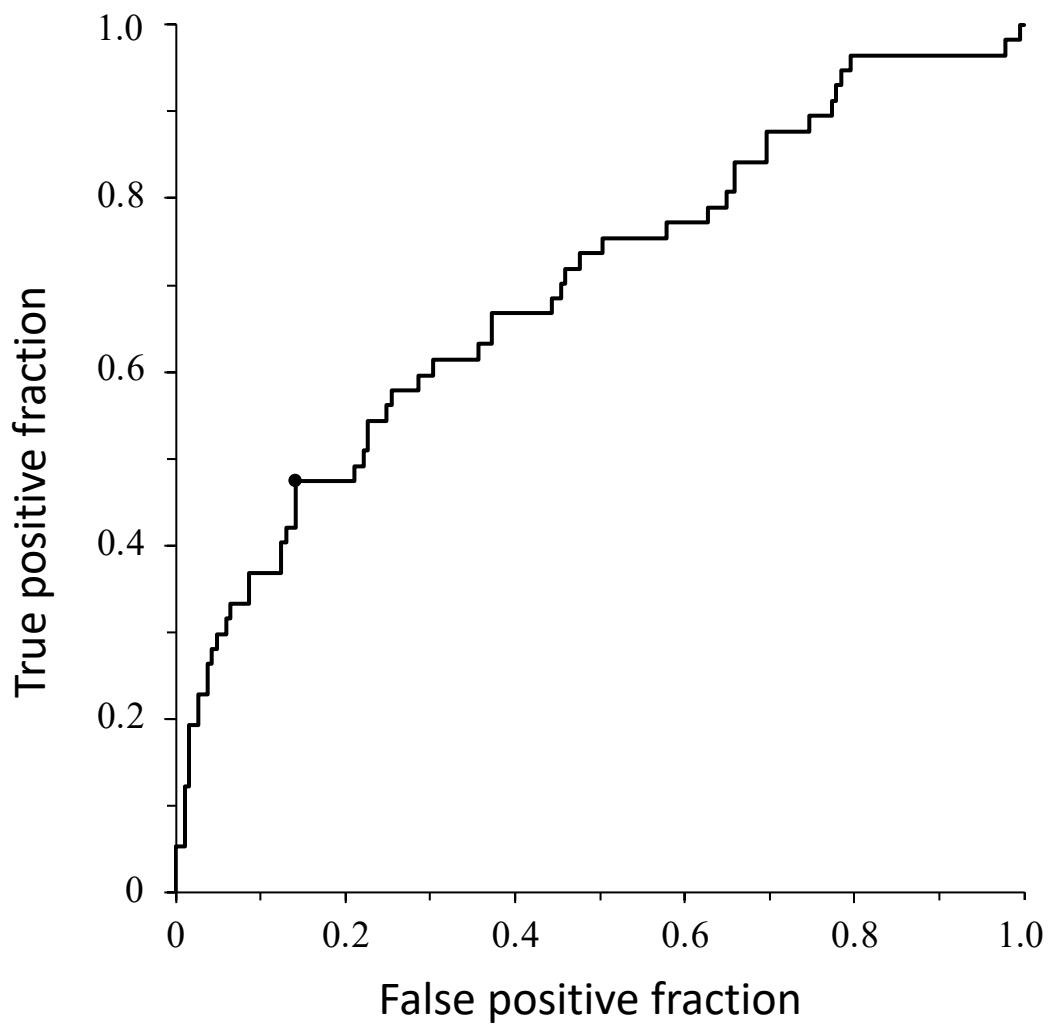


Figure 8. Receiver operating characteristic curve for serum EPAG concentration inducing liver dysfunction. Cut-off value for serum EPAG concentration predicting EPAG induced liver dysfunction is 2.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of which sensitivity and specificity are 0.474 and 0.859, respectively. The area under the curve is 0.697.

*Youden's index

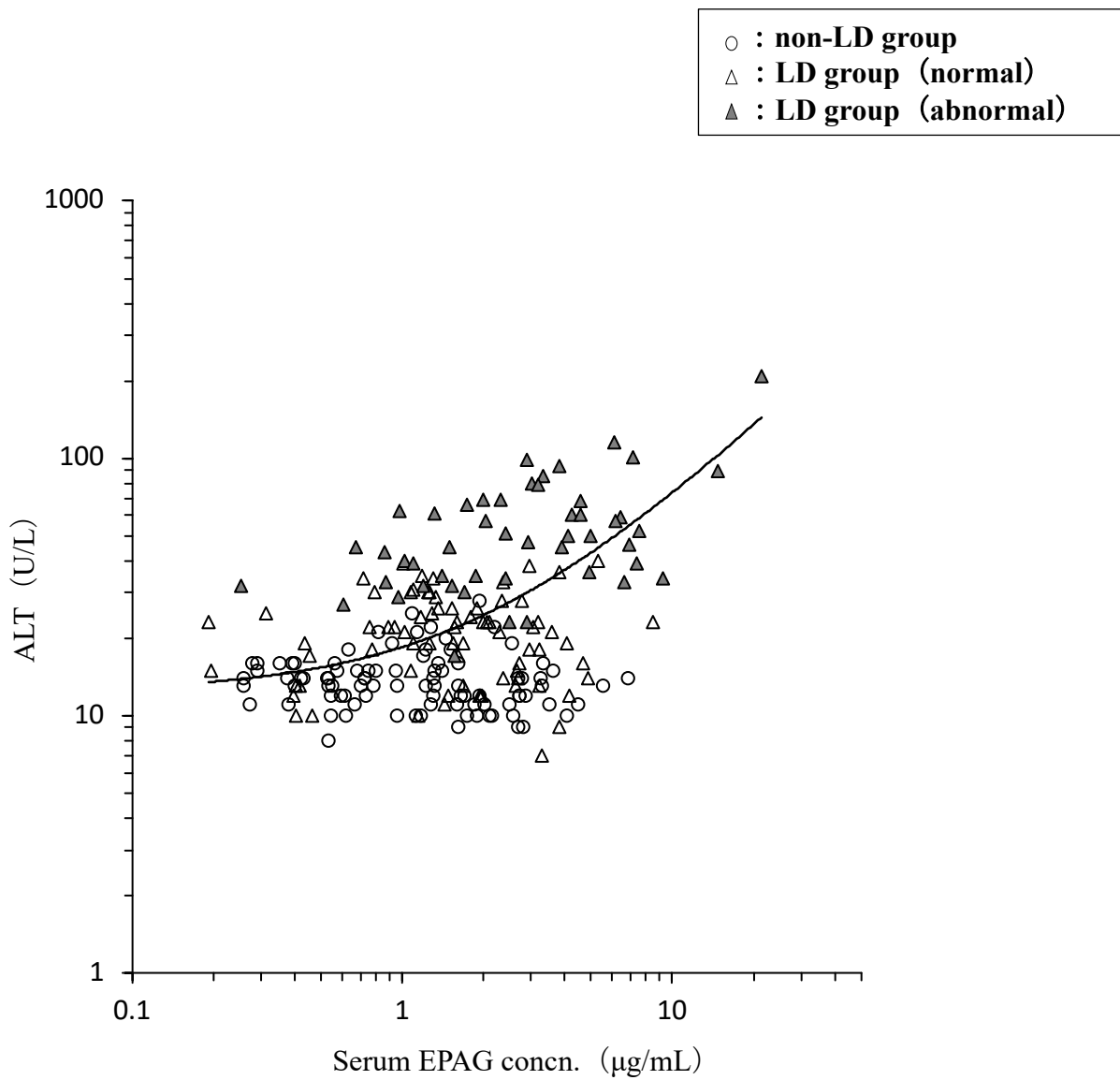


Figure 9. Relationship between serum EPAG concentrations and alanine aminotransferase (ALT) in the patients with (LD group) and without liver dysfunction (non-LD group) under EPAG administration. Open circles indicated the values for non-LD group. Open and closed triangles indicated the values for LD group when their liver function of normal and abnormal state, respectively.

Patient 3.

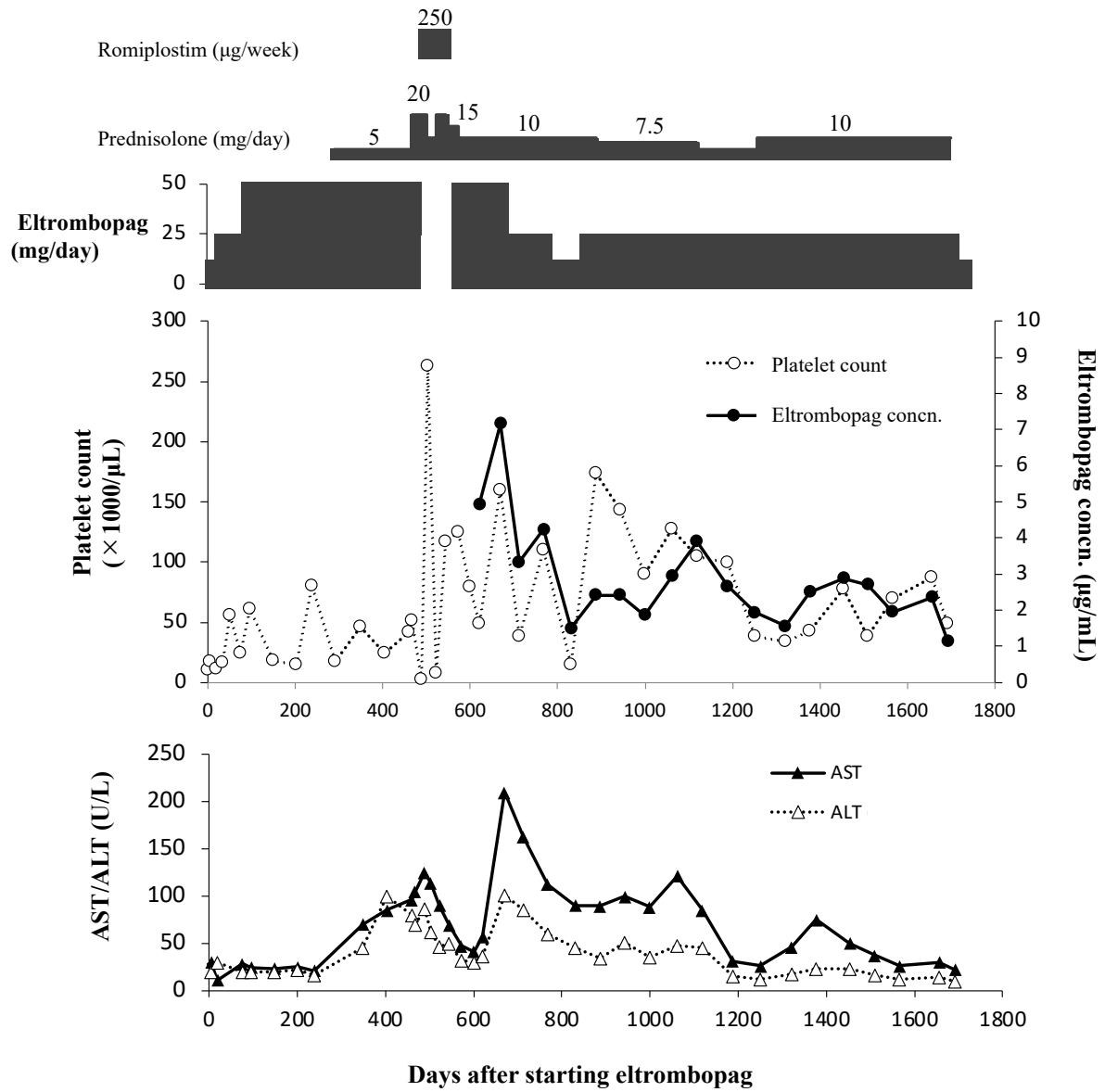


Figure 10. Clinical courses of ITP patients treated with EPAG. Patient 3 showed serum EPAG concentrations of 1.2-1.5, 1.6-3.9 and 4.9-7.2 µg/mL when the daily doses were 12.5, 25 and 50 mg, respectively.

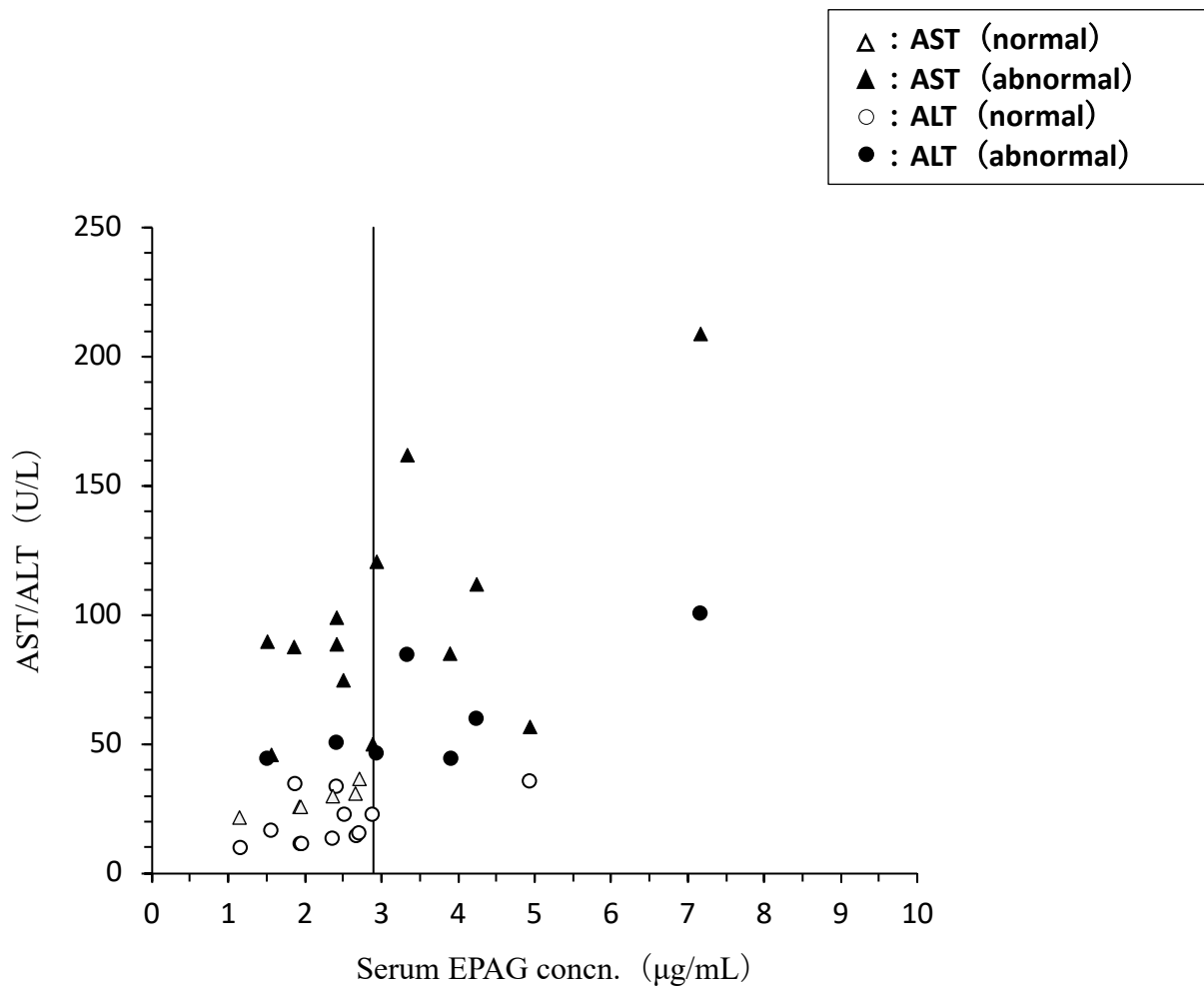


Figure 11. Relationship between serum EPAG concentrations and aspartate aminotransferase (AST)/alanine aminotransferase (ALT) in one LD patient. Open triangles indicated the values for normal AST. Closed triangles indicated the values for abnormal AST. Open circles indicated the values for normal ALT. Closed circles indicated the values for abnormal ALT.

総括

ITP 治療において EPAG は、2019 年に Third line から Second line に変更され、その重要度が増してきている（「成人特発性血小板減少性紫斑病治療の参照ガイド 2019 改訂版」）。しかしながら、重大な副作用である肝障害、血栓塞栓症、出血、骨髓線維化によって、EPAG の投与継続がしばしば困難となる問題がある。副作用は EPAG の投与量から予測することは困難であり、その中でも頻度が高くしばしば EPAG の減量や投与中止の原因となる肝障害は PLT の変動から予測できず、肝機能検査値の確認によって発見されることが多い。血清 EPAG 濃度の上昇が肝障害の一因になりうるとの報告もあるが（Marano M, 2018）、症例報告レベルであり、多くの症例で検証されたものではない。血清 EPAG 濃度の測定によりリスクを評価できれば、肝障害を回避する投与設計が可能となると考えられる。

本研究は、肝障害のリスク評価に血清 EPAG 濃度測定が有効であるか否かを検証することを目的として実施した。

第 1 章では、日常診療で使用できる簡便な血清 EPAG 濃度の測定法（HPLC）を開発した。本測定法は従来の LC-MSMS 法とは異なり、装置が安価で医療施設で汎用性の高い逆相 HPLC で実現可能であること、前処理が除タンパク操作のみと簡便であること、実臨床での TDM に用いるのに十分な測定感度（LLOQ: 0.15 µg/mL）と精度（日内変動：CV 値は 1.9～11.8%、測定誤差は 13.3%以下、日間変動：CV は 1.0～11.8%、測定誤差は 13.3%以下）を有していることを確認した。また、実際のモニタリング症例において併用薬の影響もなく測定できることを明らかにした。

第 2 章では ITP 患者を対象に血清 EPAG 濃度が肝障害発現に及ぼす影響を第 1 章で開発した HPLC 法を用いて検討し、以下の 2 点を明らかとした。

1) 対象患者の 22 名（45%）に EPAG 投与開始後に grade 1 以上の肝障害を認め（Grade 2 と 3、各 4 名を含む）、これらの患者（LD 群）では肝障害を認めなかった non-LD 群と比較して最大 PLT や PLT/D 比が低く、肝障害時に EPAG の効果が減弱すること。

2) LD 群の投与量と血清 EPAG 濃度はともに non-LD 群と比較して高い傾向にあり、ROC 解析から、血清 EPAG 濃度が 2.9 µg/mL を超えると肝障害の発現リスクが高まること。

以上の結果から、EPAG の投与は、PLT の反応を見ながら血清 EPAG 濃度が 2.9 µg/mL を越えないよう徐々に増量して患者個々の至適投与量を決定することが、血中濃度に依存して発現する肝障害の制御には有効であると考えられた。

序文でも述べたように国内の ITP 治療における TPO-RA には EPAG とロミプロスチムがある。週 1 回の通院が必要となる皮下注製剤のロミプロスチムよりも経口投与の EPAG の方が利便性と汎用性に優れている。EPAG の適正使用の観点から、肝障害を回避する目的で TDM の有用性を論じたが、対象の症例数 (49 例) と限られておりさらに単施設での検討であることが本研究の限界として挙げられる。今後、本研究で確立した HPLC 法によって多くの施設で EPAG の TDM が実施され、多くの症例で検証されることを期待したい。

参考文献

Arnold DM, Heddle NM, Carruthers J, Cook DJ, Crowther MA, Meyer RM, Liu Y, Cook RJ, McLeod A, MacEachern JA, Mangel J, Anderson D, Vickars L, Timmouth A, Schuh AC, Kelton JG. A pilot randomized trial of adjuvant rituximab or placebo for nonsplenectomized patients with immune thrombocytopenia. *Blood*. 2012; 119: 1356-1362.

Bussel JB, Pham LC. Intravenous treatment with gammaglobulin in adults with immune thrombocytopenic purpura: review of the literature. *Vox Sang*. 1987; 52: 206-211.

Bauman JW, Vincent CT, Peng B, Wire MB, Williams DD, Park JW. Effect of hepatic or renal impairment on eltrombopag pharmacokinetics. *J. Clin. Pharmacol*. 2011; 51: 739-750

Carr JM, Kruskall MS, Kaye JA, Robinson SH. Efficacy of platelet transfusions in immune thrombocytopenia. *Am J Med*. 1986; 80: 1051-1054.

Cheng G, Saleh MN, Marcher C, Vasey S, Mayer B, Aivado M, Arning M, Stone NL, Bussel JB. Eltrombopag for management of chronic immune thrombocytopenia (RAISE): a 6-month, randomised, phase 3 study. *Lancet*. 2011; 377, 393-402.

Cines DB, Blanchette VS. Immune thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med*. 2002; 346: 995-1008.

Danese MD, Lindquist K, Gleeson M, Deuson R, Mikhael J. Cost and mortality associated with hospitalizations in patients with immune thrombocytopenic purpura. *Am J Hematol*. 2009; 84: 631-635.

Desmond R, Townsley DM, Dunbar C, Young NS. Eltrombopag in aplastic anemia. *Semin Hematol*. 2015; 52, 31-37.

Elgebaly AS, Ashal GE, Elfil M, Menshawy A. Tolerability and efficacy of eltrombopag in chronic immune thrombocytopenia: meta-analysis of randomized controlled trials. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2017; 23: 928-937.

Fujimura K, Kuwana M, Kurata Y, Imamura M, Harada H, Sakamaki H, Teramura M, Koda K, Nomura S, Sugihara S, Shimomura T, Fujimoto T, Oyashiki K, Ikeda Y. Is eradication therapy useful as the first line of treatment in *Helicobacter pylori*-positive idiopathic thrombocytopenic purpura? Analysis of 207 eradicated chronic ITP cases in Japan. *Int J Hematol.* 2005; 81: 162-168.

Gasbarrini A, Franceschi F, Tartaglione R, Landolfi R, Pola P, Gasbarrini G. Regression of autoimmune thrombocytopenia after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet.* 1998; 352: 878.

George JN, el-Harake MA, Raskob GE. Chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med.* 1994; 331: 1207-1211.

Ghadaki B, Nazi I, Kelton JG, Arnold DM. Sustained remissions of immune thrombocytopenia associated with the use of thrombopoietin receptor agonists. *Transfusion.* 2013; 53, 2807-2812.

Ghanima W, Khelif A, Waage A, Michel M, Tjønnfjord GE, Romdhan NB, Kahrs J, Darne B, Holme PA, RITP study group. Rituximab as secondline treatment for adult immune thrombocytopenia (the RITP trial): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet.* 2015; 385: 1653-1661.

Gill H, Wong RSM, Kwong YL. From chronic immune thrombocytopenia to severe aplastic anemia: recent insights into the evolution of eltrombopag. *Ther Adv Hematol.* 2017; 8, 159-174.

Gudbrandsdottir S, Birgens HS, Frederiksen H, Jensen BA, Jensen MK, Kjeldsen L, Klausen TW, Larsen H, Mourits-Andersen HT, Nielsen CH, Nielsen OJ, Plesner T, Pulczynski S, Rasmussen IH, Rønnov-Jessen D, Hasselbalch HC. Rituximab and dexamethasone vs dexamethasone monotherapy in newly diagnosed patients with primary immune thrombocytopenia. *Blood*. 2013; 121: 1976-1981.

Hayes S, Ouellet D, Zhang J, Wire MB, Gibiansky E. Population PK/PD modeling of eltrombopag in healthy volunteers and patients with immune thrombocytopenic purpura and optimization of response-guided dosing. *J Clin Pharmacol*. 2011; 51, 1403-17.

Karpatkin S. Autoimmune (idiopathic) thrombocytopenic purpura. *Lancet*. 1997; 349: 1531-1536

Kashiwagi H, Tomiyama Y. Pathophysiology and management of primary immune thrombocytopenia. *Int J Hematol*. 2013; 98: 24-33.

Katsutani S, Tomiyama Y, Kimura A, Miyakawa Y, Okamoto S, Okoshi Y, Ninomiya H, Kosugi H, Ishii K, Ikeda Y, Hattori T, Katsura K, Kanakura Y. Oral eltrombopag for up to three years is safe and well-tolerated in Japanese patients with previously treated chronic immune thrombocytopenia: an open-label, extension study. *Int J Hematol*. 2013; 98, 323-330.

Kojouri K, Vesely SK, Terrell DR, George JN. Splenectomy for adult patients with idiopathic thrombocytopenic purpura: a systematic review to assess long-term platelet count responses, prediction of response, and surgical complications. *Blood*. 2004; 104: 2623-2634.

Kurata Y, Fujimura K, Kuwana M, Tomiyama Y, Murata M. Epidemiology of primary immune thrombocytopenia in children and adults in Japan: a population-based study and literature review. *Int J Hematol*. 2011; 93: 329-335.

Li Z, Mou W, Lu G, Cao J, He X, Pan X, Xu K. Low-dose rituximab combined with short-term glucocorticoids up-regulates Treg cell levels in patients with immune thrombocytopenia. *Int J Hematol.* 2011; 93: 91-98.

Li W, Gao Z, Chen X, Zhang H, Yang N, Wang F, Guan L, Gu Z, Zhao S, Luo L, Wei H, Gao C. Efficacy and safety of thrombopoietin receptor agonists in patients with primary immune thrombocytopenia: A systematic review and metaanalysis. *Sci Rep.* 2016; 6: 39003.

Lum SH, Grainger JD. Eltrombopag for the treatment of aplastic anemia: current perspectives. *Drug Des Devel Ther.* 2016; 10, 2833-2843.

Maddela R, Gajula R, Pilli NR, Siddiraju S, Maddela S, Makula A. Liquid chromatography-tandem mass spectrometric assay for eltrombopag in 50 μ L of human plasma: a pharmacokinetic study. *J Pharm Biomed Anal.* 2014; 98, 68-73.

Marano M, Serafinelli J, Cairoli S, Martinelli D, Pisani M, Palumbo G, Cefalo MG, Cecchetti C, Nardo MD, Falvella FS, Goffredo BM. Eltrombopag-Induced Acute Liver Failure in a Pediatric Patient: A Pharmacokinetic and Pharmacogenetic Analysis. *Ther Drug Monit.* 2018; 40, 386-388.

McKenzie CG, Guo L, Freedman J, Semple JW. Cellular immune dysfunction in immune thrombocytopenia (ITP). *Br J Haematol.* 2013; 163: 10-23.

Nomura S, Dan K, Hotta T, Fujimura K, Ikeda Y. Effects of pegylated recombinant human megakaryocyte growth and development factor in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2002; 100, 728-730

Nugent D, McMillan R, Nichol JL, Slichter SJ. Pathogenesis of chronic immune thrombocytopenia: increased platelet destruction and/or decreased platelet production. *Br J Haematol.* 2009; 146: 585-596.

Rodeghiero F, Stasi R, Gernsheimer T, Michel M, Provan D, Arnold DM, Bussel JB, Cines DB, Chong BH, Cooper N, Godeau B, Lechner K, Mazzucconi MG, McMillan R, Sanz MA, Imbach P, Blanchette V, Kühne T, Ruggeri M, George JN. Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group. *Blood*. 2009; 113:2386-2393.

Salama A, Kiesewetter H, Kalus U, Movassaghi K, Meyer O. Massive platelet transfusion is a rapidly effective emergency treatment in patients with refractory autoimmune thrombocytopenia. *Thromb Haemost*. 2008; 100: 762-765.

Spahr JE, Rodgers GM. Treatment of immune-mediated thrombocytopenia purpura with concurrent intravenous immunoglobulin and platelet transfusion: a retrospective review of 40 patients. *Am J Hematol*. 2008; 83: 122-125.

Tomiyama Y, Miyakawa Y, Okamoto S, Katsutani S, Kimura A, Okoshi Y, Ninomiya H, Kosugi H, Nomura S, Ozaki K, Ikeda Y, Hattori T, Katsura K, Kanakura Y. A lower starting dose of eltrombopag is efficacious in Japanese patients with previously treated chronic immune thrombocytopenia. *J Thromb Haemost*. 2012; 10, 799-806.

Townsley DM, Scheinberg P, Winkler T, Desmond R, Dumitriu B, Rios O, Weinstein B, Valdez J, Lotter J, Feng X, Desierto M, Leuva H, Bevans M, Wu C, Larochelle A, Calvo KR, Dunbar CE, Young NS. Eltrombopag Added to Standard Immunosuppression for Aplastic Anemia. *N Engl J Med*. 2017; 376, 1540-1550.

US Food and Drug Administration. Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research: Rockville, MD, 2018. Available from:

<https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>

Wen X, Wang JS, Backman JT, Laitila J, Neuvonen PJ. Trimethoprim and sulfamethoxazole are selective inhibitors of CYP2C8 and CYP2C9, respectively. *Drug Metab Dispos*. 2002; 30, 631-635

Zaja F, Baccarani M, Mazza P, Bocchia M, Gugliotta L, Zaccaria A, Vianelli N, Defina M, Tieghi A, Amadori S, Campagna S, Ferrara F, Angelucci E, Usala E, Cantoni S, Visani G, Fornaro A, Rizzi R, Stefano VD, Casulli F, Battista ML, Isola M, Soldano F, Gamba E, Fanin R. Dexamethasone plus rituximab yields higher sustained response rates than dexamethasone monotherapy in adults with primary immune thrombocytopenia. *Blood*. 2010; 115: 2755-2762.

Zhang P, Miao W. Eltrombopag-induced liver dysfunction during the treatment of immune thrombocytopenia and its risk factors. *Ann Palliat Med* 2021; 10: 6419-6424

柏木浩和, 桑名正隆, 羽藤高明, 高蓋寿朗, 藤村欣吾, 倉田義之, 村田 満, 富山佳昭.

成人特発性血小板減少性紫斑病治療の参照ガイド 2019 改訂版 *臨床血液*. 2019; 60: 877-896

坂木 理、吉田 仁、大森里紗. 薬剤性肝障害 *昭和学会誌*. 2015; 75: 399-406

ノバルティスファーマ株式会社 (再審査部) . 使用成績調査のまとめ. 2017 (2017 年 3 月 22 日発行)

宮川義隆. 血小板増加薬の臨床開発 *臨床血液*. 2009; 50: 1434-1443

レボレード錠® 添付文書 (第9版)

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご指導、ご鞭撻を賜りました筑波大学大学院人間総合科学研究科 臨床薬剤学 本間真人教授に深甚なる感謝の意を表します。本研究を行うにあたり、細部にわたり種々のご助言、ご教示を賜りました臨床薬剤学 土岐浩介准教授に心から感謝の意を表します。本研究に際し、有益なご助言を賜りました筑波大学医学医療系血液内科学 千葉 滋教授、小原 直教授、坂田麻実子教授、長谷川雄一教授、錦井秀和准教授、横山泰久講師、丸山ゆみ子病院助教に深謝致します。

最後に、研究を行うにあたり、様々なご支援、ご協力をいただきました臨床薬剤学の皆さま及び筑波大学附属病院薬剤部の諸先生方に心から御礼申し上げます。