

機関番号：12102

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590534

研究課題名 (和文) 赤血球内蓄積の評価に基づく核酸誘導体投与患者の避妊期間の検証

研究課題名 (英文) Assessment of conception periods for patients treated with nucleoside analogues based on their intracellular accumulation in erythrocytes.

研究代表者

本間 真人 (HOMMA MASATO)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・准教授

研究者番号：90199589

研究成果の概要 (和文)：C型慢性肝炎に用いる核酸誘導体薬のリバビリン (RBV) は、催奇形成作用を有するため投与中と投与終了後6ヵ月間は避妊が求められる。この避妊期間は血漿中RBV (半減期12日) の消失に基づいて設定されているが、組織や赤血球中のリン酸化RBVの消失に十分か否かは不明である。インターフェロンとRBVの併用療法を受けた患者 (45名) の全血中RBV濃度を測定し、母集団薬物動態で解析したところ、33%の患者で投与終了6ヵ月では全血から完全に消失しないことが明らかとなった。投与終了6ヵ月は避妊期間として十分でない可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：Ribavirin (RBV), a nucleoside analogue, for hepatitis C virus (HCV) eradication requires the patients to have contraception for 6 months after stopping the therapy because of possible deformity caused by RBV. This period is enough to remove plasma RBV with the half-life ($T_{1/2}$) of 12 days. Intracellular RBV, which is accumulated as the phosphorylated RBV in the tissue including erythrocytes, may require much time to be removed. Plasma and whole blood concentration of RBV were monitored before and after stopping the interferon (IFN)/RBV therapy in 45 HCV patients. Mean plasma and whole blood RBV were 10.1 ± 4.6 and $307.9 \pm 146.5 \mu\text{M}$, respectively, when IFN/RBV therapy was stopped. The $T_{1/2}$ for plasma and whole blood RBV were 12.9 ± 4.4 and 23.9 ± 7.5 days, respectively. It was estimated that 79 (51-121) and 176 (130-331) days were required for removing RBV from plasma and whole blood, respectively. Population pharmacokinetic analysis for whole blood RBV revealed that 6 months was not enough for removing RBV from blood in 33% of HCV patients. Six months may not be enough as the contraception period after stopping RBV in patients with longer $T_{1/2}$ of whole blood RBV.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：臨床薬理学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：核酸誘導体、赤血球内蓄積、C型慢性肝炎、リバビリン、催奇形成、避妊期間

1. 研究開始当初の背景

抗がん剤や抗ウイルス薬として用いられる核酸誘導体薬（ゲムシタビン、シトシアンアラビノシド、ガンシクロビル、リバビリンなど）は、DNA や RNA に直接作用することから催奇形成作用が強く、妊婦に対して禁忌であり、投与中は避妊が求められる薬剤である。ガンシクロビルやリバビリン（RBV）では、投与終了後も避妊期間（それぞれ 90 日と 180 日）が設定されている。しかし、これらの避妊期間の設定根拠は曖昧であり、必ずしも薬物の体内からの完全消失による安全性を保証するものではない。

核酸誘導体薬の多くは、ヌクレオシドトランスポーター（ENT）を介して細胞内に取り込まれ、リン酸化されて活性本体となる。リン酸化体の一部は、脱リン酸化酵素によって元の親化合物に変換され、ENT を介して細胞外に排出される¹⁾。赤血球は核酸合成能がないことから細胞内の核酸量を維持するために ENT を多量に発現し、また、脱リン酸化酵素がないために核酸誘導体薬をリン酸化代謝物として高濃度に蓄積する性質がある。したがって赤血球は核酸誘導体薬の消失が最も遅い臓器の一つであり、赤血球からの消失が体内からの薬物の完全消失に近似していると考えられる。また、赤血球内半減期を求めることで体内からの完全消失を予測できる可能性もある。

臨床における具体的な問題点について RBV を例に述べる。

(1) インターフェロン（IFN）と RBV の併用療法における妊娠

C 型慢性肝炎における IFN/RBV 併用療法は、劇的なウイルス排除効果を示す一方、RBV の適正使用が問題となっている。強い催奇形成作用を有する本剤は、服用期間中および服用中止後 6 ヶ月間は、信頼できる方法で避妊するよう添付文書で注意喚起されているが、その注意が厳守されず妊娠にいたる例が報告されている。

大規模臨床試験によると、妊娠例は投与患者の 1.6%に見られ、女性患者

（直接的曝露）よりも男性患者のパートナーが妊娠するケース（間接的曝露）が多いこと、間接的曝露でも流産のリスクが高まることが指摘されている²⁾。

(2) RBV 療法における避妊期間の根拠

添付文書に記載されている RBV 中止後の避妊期間は、血漿 RBV 濃度の消失半減期（12 日）の 15 倍（6 ヶ月）と設定されている。この期間以上を経過すれば、体内から RBV が完全に消失し、RBV による催奇形成のリスクがほとんどなくなると考えられている。しかし、RBV の体内からの消失について臨床的に検証されたことはない。

RBV は ENT を介して細胞内に取り込まれ、細胞内でリン酸化されるが、リン酸化体は、ENT の基質にならないため細胞内に蓄積する。よって脱リン酸化酵素がない赤血球は、体内で最も RBV の消失が遅い臓器と考えられる。

C 型慢性肝炎患者の赤血球中 RBV 濃度は血漿濃度の 100–150 倍であり、90%以上がリン酸化体である³⁾。したがって、RBV が血漿中から消失しても、赤血球中にはリン酸化体として残存する可能性が高く、血漿中濃度に基づく避妊期間の設定は、根拠に乏しいと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、核酸誘導体薬の赤血球中濃度から求めた薬物動態パラメーターに基づいて体内からの完全消失にかかる期間を臨床的に確認するとともに、添付文書に記載されている避妊期間の妥当性を検証する。

まず核酸誘導体薬の赤血球内取り込みにおける ENT の関与を、ヒト赤血球を用いた in vitro の実験により明らかにし、赤血球がモニタリング対象の臓器として適切か否かを検証する。次いで核酸誘導体薬で治療中の患者を対象に薬物血中濃度（血漿中と全血中）を測定し、薬物速度論パラメーターを求める。このパラメーターを用いて血中から完全消失に要する期間を予測する。また、母集団薬物動態解析（PPK）によって血中濃度に影響する因子も明らかにする。

本報告では RBV について行った研究
成果について述べる。

3. 研究の方法

(1) ヒト赤血球における RBV の *in vitro* 取り込み試験

ヒト赤血球を用いて RBV の *in vitro*
取り込み試験を行った。赤血球は PBS
で洗浄した後、HEPES 緩衝液 (pH7.4)
に懸濁し、赤血球濃度が 20%になるよ
うに調製した。この懸濁液に RBV (1mM)
を添加してインキュベーションした
(37°C、18 時間)。このとき、予め ENT
阻害剤の dipyridamole (DP) を 25 μ M
で処理した懸濁液についても同様に操
作し、RBV の赤血球内取り込みに対する
ENT の関与を確認した。

赤血球内の RBV 濃度 (リン酸化代謝
物を含む) は HPLC によって測定した。
また、RBV 処理による赤血球の形態変化
を顕微鏡によって、膜表面上に露出す
る Phosphatidylserine (PS) を FITC で
ラベルした annexin V を用い、フロー
サイトメトリーで調べた。

(2) C 型慢性肝炎患者における血中 RBV 濃度測定

IFN/RBV 併用療法を行った C 型慢性肝
炎の患者 45 名 (男性/女性 : 31/14 名、
年齢 : 53 \pm 12 歳) を対象に血中 (血漿
中および全血中) RBV 濃度測定を行った。
このうち 14 名については、IFN/RBV 併
用療法中止後も、実際に血中から RBV
が検出できなくなるまで可能な限りモ
ニタリングを継続した。

RBV の血中濃度 (261 ポイント) の PPK
解析によって、全血中 RBV の薬物速度
論パラメーターを求めた。解析モデル
には持続投与の 1 コンパートメントモ
デルを、解析ソフトには Win-nonMix
(Pharsight) を用いた。

RBV の血漿および全血中濃度の測定
は HPLC によって行った³⁾。方法は以下
のとおりである。まず血液試料を血漿
中濃度と全血中濃度測定用の 2 つに分
け、それぞれの濃度測定に使用した。
全血は 6 倍量の冷水を加えて溶血させ
た後、酸性ホスファターゼで脱リン酸

化処理し、リン酸化代謝物を遊離型に
変換した。この試料を Phenyl boronic
acid (PBA) カラムで処理して HPLC で
測定した。血漿中濃度の測定では、血
漿をそのまま PBA カラムで処理し、分
析に供した。

4. 研究成果

(1) ヒト赤血球における RBV の *in vitro* 取り込み試験

赤血球懸濁液を 1mM の RBV でインキ
ュベーションを行うと、赤血球内の RBV
濃度は 1361 μ M まで上昇した。予め DP
で処理した場合の赤血球内 RBV 濃度は
807 μ M であり、未処理と比較して
40.7%低下した。このことは RBV の赤
血球内取り込みには、ENT が関与してい
ることを示している。

RBV で処理した赤血球懸濁液では赤
血球の 87%が有棘状に変化したが、DP
の前処理では、有棘状変化は 20%にと
どまった。また、赤血球膜表面上の PS
露出は、RBV で処理した赤血球では
2.15%であったが、DP の前処理により
0.62%まで低下した。

赤血球の有棘状変化は血球内の ATP
が低下した老化赤血球に見られる特徴
的な変化であり、RBV の副作用である貧
血と関連する可能性がある。ENT を介し
て赤血球内に取り込まれた RBV はリン
酸化体として蓄積するが、この蓄積に
より赤血球内の ATP 産生が阻害され ATP
の濃度が低下する。赤血球内の ATP 低
下は、ATP 依存の酵素活性にも影響し、
PS の露出を抑えている ATP 依存性の
aminophospholipid translocase 活性が
低下するため、膜表面に PS が露出する
と考えられる。赤血球の有棘状変化と
PS 露出は予め DP で処理した赤血球では、
抑えられることから、ENT を介した RBV
の赤血球内取り込みによって引き起こ
されていると考えられる。

RBV の赤血球内濃度が高まると (1000
 μ M 以上) RBV の副作用であるヘモグロ
ビン (Hb) の低下が顕著になる³⁾。今
回の結果はその機序を赤血球レベルで
明らかにしたものである。すなわち、
赤血球内に RBV が 1000 μ M 以上の濃度

で蓄積すると、赤血球内の ATP 濃度が低下し、赤血球の有棘状変化や膜表面への PS 露出 (アポトーシスの誘導) が促進し、網内系での赤血球の処理速度が速くなり、結果として貧血が発症すると考えられた。

このように RBV は赤血球膜の ENT を介して赤血球内に取り込まれ、リン酸化体として多量に蓄積する性質がある。よって赤血球は、体内での RBV の蓄積を評価する臓器として適しており、蓄積量に影響する分子として ENT が重要であることが明らかとなった。

(2) C 型慢性患者における血中 RBV 濃度測定

先ず IFN/RBV 併用終了 (または中止) 後、血中 RBV 濃度をモニターした 14 名の患者について検討した。併用療法終了時の血漿中と全血中 RBV 濃度は、それぞれ $10.1 \pm 4.6 \mu\text{M}$ と $307.9 \pm 146.5 \mu\text{M}$ であり、全血中 RBV 濃度は血漿 RBV 濃度の約 30 倍であった。血漿中と全血中 RBV 濃度の消失半減期は、それぞれ 12.9 ± 4.4 日と 23.9 ± 7.5 日であり、全血中 RBV 濃度の半減期は血漿中の約 1.8 倍であった。全血中 RBV 濃度の半減期が 34.7 日と比較して著しく延長している症例 (4 例) も確認された。

併用療法終了後、血中 RBV 濃度が検出限界未満となるまでに要する日数は、血漿中の 79 日 (51~121 日) に対して全血中では 176 日 (130~331 日) と長く、全血中は血漿中の約 2.2 倍であった。血漿中 RBV の消失に要する日数は最大でも約 4 ヶ月であったが、全血中では 10 ヶ月近くに延長している症例 (4 名) も確認された。

PPK 解析により、全血中 RBV の分布容積 (Vd) 及びクリアランス (CL) の予測式を検討した。Vd に影響する因子として治療開始前の Hb 値 (Hbi) と血中濃度測定時の Hb の比 (Hb/Hbi) と体重 (BW/65) が、CL に影響する因子として Hb/Hbi、年齢 (Age/53) 及び性別が確認された。その結果、以下の式が Vd と CL を推定する Final model として導かれた。

$$Vd = 63.4 \cdot (\text{Hb}/\text{Hbi})^{-2.4} \cdot (\text{BW}/65)^{1.1} \cdot e^{n_i}$$

$$CL = 2.7 \cdot (\text{Hb}/\text{Hbi})^{-2.0} \cdot (\text{Age}/53)^{-0.5} \cdot 0.8^{\text{Sex}} \cdot e^{n_i}$$

本モデルによって求めたパラメーターの個体間変動は、Vd と CL とともに Base model と比較して改善した (Vd: 61.2% vs. 32.4%, CL: 106.7% vs. 35.9%)。また、個体内変動は 23.1% から 22.5% に減少し、全血中 RBV 濃度の予測値と実測値の相関係数も改善した (0.73 vs. 0.84)。

Final model で予測した患者個々のパラメーターを用い、ベイジアン法で血中濃度推移をシミュレーションして求めた全血中 RBV の消失半減期は 20.6 ± 10.9 日であった。また、検出限界未満となる投与終了後の日数は 152 日 (39~340 日) であり、6 ヶ月以上を要した患者は 15 名 (33%) であった。

以上のことから、血漿中 RBV 濃度から求めた服用後の避妊期間 (6 ヶ月) は、血漿からの RBV の完全消失には十分な期間と言えるが、組織中に存在するリン酸化 RBV の消失には十分でない可能性が明らかとなった。

最近、RBV 療法を受けている患者の精漿液中 RBV 濃度が測定され、血漿中 RBV の 2 倍以上に達することが明らかになった⁴⁾。ラットに対する放射ラベルした RBV の投与でも、精巣や卵巣における放射活性の減衰は、血漿中よりもむしろ全血中に近いことが明らかになっており⁵⁾、血漿中濃度推移から求めた避妊期間の妥当性については再検証する必要があると考えられた。

避妊期間の再検証にあたっては、ヒトにおける RBV の生殖器関連組織への移行やリン酸化 RBV の催奇形性作用などを明らかにする必要がある。これらのデータが揃うまでは、当面、本研究で構築したパラメーターの予測モデルからシミュレーションした全血中 RBV 濃度推移を指標とし、体内からの RBV 消失を予測するか、全血中濃度の測定によって血中からの完全消失を確認することが RBV の適正使用に重要であると考えられる。

参考文献

- 1) Feld JJ, Hoofnagle JH. Mechanism of

action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature*. 2005;436(7053):7-72.

- 2) WC Maddrey. Safety of combination interferon alfa-2b/ribavirin therapy in chronic hepatitis C-relapsed and treatment-naïve patients. *Semin Liver Dis.* 1999;19: 67-75.
- 3) Homma M, Matsuzaki Y, Inoue Y, Shibata M, Mitamura K, Tanaka N, Kohda Y. Marked elevation of erythrocyte ribavirin levels in interferon and ribavirin-induced anemia. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2004;2:337-9.
- 4) Hofer H, Donnerer J, Sator K, Staufner K, Scherzer TM, Dejaco C, Sator M, Kessler H, Ferenci P. Seminal fluid ribavirin level and functional semen parameters in patients with chronic hepatitis C on antiviral combination therapy. *J Hepatol.* 2010;52:812-6.
- 5) シェリング・プラウ社 レボトール®カプセルインタビューフォーム (2005年12月作成 改訂第3版)

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)

①Homma M, Hosono H, Hasegawa Y, Kohda Y. Morphological transformation and phosphatidylserine exposure in erythrocytes treated with ribavirin. *Biol Pharm Bull.* 2009;32(11):1940-2. 査読有

②Homma M, Inoue Y, Hasegawa Y, Kojima H, Kohda Y: Blood ribavirin concentration in high-dose ribavirin for adenovirus-induced haemorrhagic cystitis - a case report. *J Clin Pharm Ther.* 2008;33(1), 75-78. 査読有

[学会発表] (計4件)

①大木桜子, 本間真人, 鈴木嘉治, 小田竜也, 大河内信弘, 幸田幸直: ヒト末梢血単核細胞を用いたヌクレオシドトランスポーターの活性評価. 医療薬学フォーラム 2010/第18回クリニカルファーマシーシンポジウム 2010年7月 10日~11日 (広島)

②鈴木嘉治, 本間真人, 幸田幸直: 末梢血リンパ球 SLC29A1 mRNA 発現に SLC29A1 遺伝子多型が与える影響 第19回日本医療薬学会年会 2009年10月 24日~25日 (長崎)

③鈴木嘉治, 本間真人, 幸田幸直: SLC29A1 遺伝子多型が末梢血リンパ球 SLC29A1 mRNA 発現に及ぼす影響. 第15回日本臓器保存生物医学学会. 2008年11月22日-23日 (東京)

④Homma M, Shiina N, Doki K, Abei M, Matsuzaki Y, Hyodo I, Kohda Y: Pharmacokinetics of Whole Blood Ribavirin for Estimating Contraception Period after Stopping Interferon and Ribavirin Combination Therapy. The IXth World Conference on Clinical Pharmacology and Therapeutics. 2008年7月28日-8月2日 (Quebec) カナダ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本間 真人 (HOMMA MASATO)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・准教授

研究者番号: 90199589

(2) 研究分担者

幸田 幸直 (KOHDA YUKINAO)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授

研究者番号: 40143482