

## 2 型糖尿病モデル動物

### Nagoya Shibata Yasuda (NSY) マウスの骨強度と骨代謝の特徴

田中 宏明

大学院 医療科学研究科 医療科学専攻

(指導教員：三浦 俊宏 教授)

#### はじめに

2 型糖尿病 (T2DM) による骨強度低下に関する基礎的研究のために、T2DM モデル動物がしばしば用いられる。T2DM モデル動物の骨脆弱性に関するレビューにおいて、Fajardo らは、対照群との体重差から T2DM モデル動物を肥満型と痩せ型に分類していた。なぜなら、骨の大きさや骨密度は体重に比例することから、骨を比較する際には、対照群との体重差を考慮する必要性が生じるからである。しかし、対照群と体重差のない T2DM モデル動物を用いた報告は見当たらなかった。そこで、これまで骨に関する報告のない Nagoya Shibata Yasuda (NSY) マウスを用いて、対照群との体重を同等にすることで、糖代謝異常が骨に与える影響を比較できるモデル動物となるか検証することを本研究の目的とした。NSY マウスは、近交系の自然発症型 T2DM モデルマウスであり、インスリン分泌低下とインスリン抵抗性を認める。また、他の T2DM モデル動物に比して、体重やインスリン値が過剰にならないことから、日本人の T2DM に近似したモデル動物である。

#### 方法

5 週齢の雄性 NSY マウス (n=13) と雄性 ICR マウス (n=16) を購入し、20 週齢まで飼育した。飼育環境は、室温  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 60~70%、12 時間の明暗サイクル

とし、水と飼料は自由給水・給餌とした。すべてのマウスの体重を測定し、両群間の体重差が小さくなるよう各群から 6 匹ずつ選定した。屠殺前に、随時血糖値と大腿骨転子部および骨幹中央部の骨量 (骨塩量および骨密度) を測定し、経口糖負荷試験 (OGTT) および血漿の採取を実施し、屠殺直後に両大腿骨を摘出した。インスリン、骨形成マーカー (オステオカルシン) および骨吸収マーカー (TRAcP5b) は、血漿サンプルを用いて ELISA 法にて測定した。摘出した右大腿骨は、キャリパーを用いて大腿骨長と大腿骨骨幹中央部の前後径および横径を測定し、 $\mu\text{CT}$  を用いて大腿骨の転子部および骨幹中央部の微細構造を解析した。その後、3 点曲げ試験装置を用いて大腿骨骨幹中央部の骨強度を測定した。また、摘出した左大腿骨で骨組織標本 (HE 染色) を作製し、大腿骨の転子部および骨幹部の骨組織を観察した。

#### 結果

体重、随時血糖値、血漿インスリン値、耐糖能：体重と血漿インスリン値は、両群間に有意差を認めなかったが、随時血糖値は、NSY マウスで有意に高値であった。OGTT では、糖負荷 30 分後、60 分後および 120 分後の血糖値は、NSY マウスで有意に高値であり、耐糖能異常を認めた。

骨塩量および骨密度：大腿骨の骨塩量および骨密度は、転子部および骨幹中央部ともに、NSY マウスで有意に低

値であり、血糖値との間に負の相関を認めた。

大腿骨のサイズ：大腿骨長、大腿骨骨幹中央部の前後径および横径は、NSY マウスで有意に低値であった。

骨微細構造：大腿骨転子部の全骨領域、皮質骨面積、皮質骨厚、外周長、内周長および断面 2 次モーメントは、NSY マウスで有意に低値であり、海綿骨面積は、NSY マウスで低値の傾向を認めた。大腿骨骨幹中央部の全骨領域、皮質骨面積、外周長、内周長および断面 2 次モーメントは、NSY マウスで有意に低値であった。

骨代謝マーカー：オステオカルシンおよび TRAcP5b は、NSY マウスで有意に低値であり、血糖値との間に負の相関を認めた。

骨組織標本：NSY マウスの大腿骨の皮質骨において、エオジンに染まらない部分を認めた。

骨強度：構造特性の最大荷重と破断荷重は、NSY マウスで有意に低値であった。材質特性の最大応力と破断応力は、有意差を認めなかったが、弾性率と靱性は、NSY マウスで有意に低値であった。

## 考 察

NSY マウス (n=6) と ICR マウス (n=6) の体重は、18 週齢から 20 週齢まで有意差を認めなかった。NSY マウスの対照群として用いられることの多い C3H マウスの体重は、20 週齢で 30g 未満であり、Babaya らは 54 週齢で  $31.4 \pm 0.8\text{g}$  と報告していたことから、C3H マウスは NSY マウスと体重差を小さくして比較することは困難である。また、Ueda らは、耐糖能の個体差が大きい ICR マウスは、NSY マウスの対照群に適さないとしていたが、NSY マウスの糖負荷後の血糖値と随時血糖値は 18 週齢から 20 週齢まで有意に高値であったことから、NSY マウスの糖代謝異常が骨に及ぼす影響を検討する場合、C3H マウスよりも ICR マウスが対照群に適していることを示唆した。

大腿骨の骨量は、NSY マウスで有意に低値であり、血糖値との間に強い負の相関を認めた。*in vitro* の研究では、糖は骨結節におけるカルシウムの取り込みや沈着を抑制し、血糖コントロール不良の T2DM モデル動物やヒト T2DM の研究では、骨量が減少した報告を多く認めることから、高血糖は骨量減少に直接寄与することを示唆

した。また、肥満型 T2DM モデル動物の KK-A<sup>y</sup> マウスにおける血糖値と大腿骨の骨密度の相関を検討した報告では、一定した結果は得られていなかった。その原因として、肥満による骨量増加と、糖代謝異常による骨量減少との混在の関与を推察した。

骨代謝マーカーの測定結果から、NSY マウスの骨代謝回転は、対照群に比して有意に低下していた。骨芽細胞に関する *in vitro* の研究において、高血糖は骨芽細胞機能を悪化させ、高グルコース培地は骨芽細胞の分化と増殖を抑制していた。また、T2DM モデル動物の研究において、骨形成マーカーが減少した報告を多く認めた。一方、破骨細胞に関する *in vitro* の研究において、高グルコース培地は破骨細胞の分化を誘導する RANKL の発現レベルを減少させたが、T2DM モデル動物の研究において、骨吸収マーカーが増加した報告を多く認めた。NSY マウスの骨吸収マーカーの結果が、他の T2DM モデル動物と異なった原因として、他の T2DM モデル動物における高インスリン血症の関与が考えられる。なぜなら、インスリンは、骨芽細胞分化を誘導する一方で、骨芽細胞におけるインスリンシグナルが、破骨細胞機能を亢進させるからである。

大腿骨長および  $\mu\text{CT}$  解析の結果から、NSY マウスの大腿骨は、対照群に比して有意に細く短かった。これらの結果から、糖代謝異常は、大腿骨における軟骨内骨化および膜性骨化を抑制する可能性が考えられた。その理由として、他の T2DM モデル動物の長管骨でも、長軸および短軸方向への成長が抑制された報告を多く認めることから、糖代謝異常は大腿骨の成長を抑制することを示唆した。

脱灰後の骨組織標本において、エオジンで染色された部位は、骨コラーゲン線維の存在を示す。骨コラーゲン線維は、骨芽細胞から分泌され、骨コラーゲン線維にリン酸カルシウムなどのミネラルが沈着することで骨組織が増殖する。NSY マウスの大腿骨の皮質骨で認めたエオジンに染まらない部位には、骨コラーゲン線維もリン酸カルシウムも存在しないと考えられることから、骨形成マーカーが有意に減少していたことを考慮すると、骨芽細胞活性低下に伴う低石灰化の所見であることを示唆した。

NSY マウスの大腿骨の骨強度が構造的にも材質的にも低下したのは、NSY マウスにおける高血糖状態が骨代謝回転を低下させたことで、外周長、内周長および断面2次モーメントが低下したことが要因として考えられる。以上より、NSY マウスの大腿骨の骨強度低下の原因は、骨量の減少と骨質の低下であることを示唆した。

## 結 論

NSY マウスは、ICR マウスを対照群として用いることにより、糖代謝異常が骨に及ぼす影響を検討するにふさ

わしい T2DM モデル動物であることを示唆した。また、NSY マウスにおける高血糖状態が骨代謝回転を低下させたことで、大腿骨の骨量が減少し、皮質骨および海綿骨面積の低下によって細く短くなったことで、NSY マウスの大腿骨の骨強度が低下したことを示唆した。さらに、NSY マウスは、ICR マウスを対照群として用いることにより、顕著な肥満とならない日本人の2型糖尿病における骨脆弱性を検討できるモデル動物に適していることを示唆した。

# Effect of body thickness on the helical and direct treatment delivery modes

— A phantom study —

伊東 宏也

大学院 医療科学研究科 医療科学専攻

(指導教員：黒崎 弘正 客員教授)

## はじめに

近年の放射線治療は強度変調放射線治療 (IMRT : intensity-modulated radiation therapy) を用いた治療が多く行われており、その技術により従来の照射法に比べ、腫瘍に対して線量を集中させることが可能であり、またリスク臓器への線量を少なくする照射が可能となった。また放射線治療単独治療だけでなく、化学療法と併用した化学放射線治療も多く行われ癌の治療成績の向上に貢献している。

しかし、化学療法での治療では、抗癌剤の副作用から食欲低下をきたし、体重減少がみられる場合がある。化学放射線治療中に患者の体重減少がみられると、治療計画時に比べ患者の体輪郭変化がみられ、その結果、腫瘍やリスク臓器に対する線量分布の変化があると報告されている。IMRT では腫瘍に線量が集中するため、わずかな体輪郭の変化が線量分布に影響を与え、治療成績や腫瘍制御に影響を及ぼすと考えられる。また副作用の発現リスクにも影響があると考えられる。IMRT の照射法に関しても様々な方法があり、多門照射と回転照射において同様の体厚変化であっても線量分布に与える影響が異なるという報告がある。

## 目的

膀胱腫瘍を想定したファントム実験により、放射線治

療装置トモセラピーのヘリカル照射およびダイレクト照射において、体厚の変化がターゲットの線量にどのような変化をもたらすか、またリスク臓器への線量分布に与える影響について、ボースと2次元電離箱検出器を用いて、ターゲットの線量測定とガンマ解析を行い、dose volume histogram (DVH) よりターゲットとリスク臓器の線量分布について検討した。

## 方法

ファントム (2次元電離箱検出器) にボースを乗せた状態で、治療計画用 CT にて治療計画画像を取得。ボースの厚さは 25mm とした (5mm 厚のボース 1 枚、10mm 厚のボース 2 枚)。治療計画装置にて、ファントム中心に膀胱腫瘍を想定した直径 60mm の円形の輪郭を PTV (planning target volume) として設定し、その両側に大腿骨頭を想定した直径 40mm の円形の輪郭を設定した。PTV の下に直径 30mm の直腸を想定した OAR (organs at risk) の輪郭を設定した。PTV 及び OAR の体軸方向の長さは 60mm に設定し、大腿骨頭の輪郭の長さは 40mm に設定した。線量計算は PTV に対して一回線量 2Gy、処方線量 50Gy の線量計算を行い、照射方法はヘリカル照射および 4 門のダイレクト照射 (角度 : 45°, 135°, 225°, 315°) とした。

ファントム上のボース厚を 0mm から -25mm まで 5mm ごとに減少させて線量を測定し、ガンマ解析により

Pass 率を求めた (25mm 分のボラスを乗せた状態を基準とし、この状態をボラス厚変化 0mm とした)。また同様にボラス厚を変化させ、TomoTherapy software Planned Adaptive を用いて作成した DVH より、PTV および OAR の最大線量の線量誤差を求めた。

## 結 果

ボラス厚を 0mm から -25mm まで 5 mm 毎に変化させ、2 次元電離箱検出器にて測定した Pass Rate の結果は、ヘリカル照射では、99.78, 99.47, 99.22, 98.75, 96.61, 84.55% となった。ダイレクト照射では、99.00, 97.34, 95.44, 93.58, 90.85, 81.29% となった。また同様に測定した線量誤差 (ボラス厚変化 0mm を基準とした誤差) は、ヘリカル照射では、ボラス厚変化が -5 mm から -25 mm まで 0.76, 1.14, 2.18, 2.99, 3.93% となった。ダイレクト照射では、1.18, 2.50, 3.87, 5.17, 6.64% となった。

次に、DVH より求めた線量誤差 (ボラス厚変化 0 mm を基準とした誤差) は、ヘリカル照射における PTV の線量誤差は、-5mm, -10mm, -15mm, -20mm, -25mm の変化で、0.85, 1.64, 2.69, 3.81, 5.18%, OAR の線量誤差は、0.67, 1.64, 2.28, 2.99, 4.07% となった。同様にダイレクト照射における PTV の線量誤差は、1.51, 3.29, 5.27, 7.78, 9.95% となった。OAR の線量誤差は、0.36, 0.60, 0.78, 1.59, 3.01% となった。

## 考 察

臨床で使用されている、pass 率 95% 以上、線量誤差  $\pm 3\%$  を許容値とした場合、ヘリカル照射における Pass 率は、-25mm のボラス厚の減少があると 95% を下回り、線量誤差は、同様に -25mm 以上の変化があると線量誤差は 3% を超えて線量の許容範囲を超える。また、ダイレクト照射における Pass 率は -15mm のボラス厚の減少があると 95% を下回り、線量誤差は同様に -15mm 以上の変化があると、線量誤差は 3% を超えて線量の許容範囲を超える。

本研究の結果から、ヘリカル照射においては 20mm 以上の体厚変化、ダイレクト照射では 10mm 以上の体厚変

化があれば、線量と線量分布の許容値を超えるため、再治療計画を行う必要があると考えられる。

体厚変化以外に、体重変化から再計画のタイミングを計る場合、Ogawa の式より身長 165cm、体重 65Kg を基準として計算すると、体重 10Kg の減少で 20mm、体重 5Kg の変化で 10mm の体厚変化となる。この体重変化も再治療計画の必要性の判断に有用であると考えられる。

また、Chow らの報告では、VMAT (Volumetric Modulated Arc Therapy) と固定多門照射 (7 門) を用いた腹部に対する照射において、体厚の変化が線量分布に与える影響をシミュレーションしているが、体厚 20mm の減少があると、VMAT では 6% の線量誤差があり、固定多門照射では 8% の線量誤差があったと報告しており、今回の検討においてもヘリカル照射はダイレクト照射に比べ体厚変化の影響が出にくい結果となり、VMAT やヘリカル照射のような回転系の IMRT 技法のほうが、固定多門照射やダイレクト照射のような固定照射 IMRT 技法より体厚変化の影響を受けにくいことが示唆された。

本研究では体厚変化は腹側のみの変化についてのみ考えたが、臨床では体輪郭の変化は複雑なものと考えられる。またターゲットとなる腫瘍は呼吸によりわずかながらも移動している為、これらの要因も線量分布に与える因子となると考えられるため、一概に体厚変化だけで治療再計画のタイミングを計るのは困難と考えられるが、治療再計画の目安の一つになると考えられる

## 結 論

臨床では照射中の患者の呼吸により体厚の変化は起きており、照射中の腫瘍の動きによって線量分布の変化が起きており、また治療期間中の腫瘍の増大または縮小によっても線量分布が変化することを念頭に置く必要があるものの、今回のファントム研究の結果からヘリカル照射においては体厚変化が 20mm 以上の変化、ダイレクト照射では 10mm 以上の変化が見られた場合、線量の許容誤差を超えてしまう為、治療再計画を考慮する必要があると考えられる。

# 術前造影 CT におけるセンチネルリンパ節の転移評価

芦葉 弘志

大学院 医療科学研究科 医療科学専攻

(指導教員：中山 良平 客員教授)

## はじめに

近年，わが国において，女性の約 11 人に 1 人が乳がん罹患するとされ，女性が罹患する癌の第一位となっている。乳がん手術では，がんがリンパ節へ転移している場合，全身への転移を防ぐため，乳房周囲のリンパ節をすべて取り除く郭清が推奨されている。しかし，腋窩リンパ節郭清は，肩関節拘縮・上肢浮腫・麻痺などの合併症を起こすこともあり，患者の quality of life を悪化させる問題がある。センチネルリンパ節 (SLN: sentinel lymph node) は，腫瘍からのリンパ流を受ける最初のリンパ節である。この SLN を生検することにより，腋窩リンパ節の転移を評価し，腋窩リンパ節郭清の実施の有無が決定される。しかし SLN 生検は，手術時間の増加や術中の治療方針変更などの問題がある。したがって，手術前に，SLN のがん転移を評価する方法が望まれているが確立した検査はない。

Yamamoto らは，乳がん手術患者のリンパ管造影を実施した CT lymphography (CTLG 画像) を撮影し，576 例中 549 例 (96%) においてリンパ管および SLN の同定が可能であったことを報告している。さらに，CTLG 画像で SLN を同定後，超音波検査において皮質の厚さが 2.5cm 以上あった場合，SLN にがんが転移している割合が 81% であったとの報告も行っている。Nakagawa らは，CTLG をワークステーション上で 3D 化した画像 (3D CTLG 画像) において，リンパ管の拡張，停滞，蛇行や

リンパ節のむら染まりをリンパ節転移陽性所見と定義した。その定義に基づき，228 転移症例を評価した結果，正診率 89.0%，感度 92.6%，特異度 88.6%，陽性予測度 52.1%，陰性予測度 98.8% が得られ，術前の SLN 転移診断に有用であったと結論付けている。この転移評価法では 3D CTLG 画像で評価した所見のみを用いていたが，CTLG 画像の SLN の面積や形状，CT 値 (標準偏差，平均値，最大値，最小値) などの情報も転移評価に有用となる可能性がある。そこで本研究では，3D CTLG 画像，CTLG 画像におけるセンチネルリンパ節を統合的に解析することにより，センチネルリンパ節のがん転移評価法を開発する。

## 方法

実験試料は，2009 年 12 月から 2014 年 10 月に，丸山記念総合病院で手術を行った 100 乳がん患者の CTLG 画像で構成される。造影剤として，イオパミロン 300 3cc を用いた。また，CTLG 画像からワークステーション (TeraRecon 社製 Aquarius WS) を用いて，3D CTLG 像を生成した。手術材料の SLN は病理診断により，がん転移の有無の確定診断を実施した。また，CTLG 画像および 3DCTLG 画像における SLN は，2 名の経験豊富な乳腺外科医により同定された。

センチネルリンパ節のがん転移を評価するために，乳腺診療にたずさわる診療放射線技師 3 名が，3D CTLG 画像において，i) リンパ管の形状 (とぎれ/先細り/正

常), ii) SLN の造影度合い (造影されない/まだら/完全造影), iii) SLN の形状 (不整形/楕円形/円形) を主観的に評価した。各 SLN の主観的評価は 3 人の診療放射線技師のコンセンサスにより決定された。また, DICOM Viewer を使用して CTLG 画像で 6 つの客観的特徴を決定した。それらは, iv) SLN の長軸, v) SLN の面積, vi) SLN の CT 値の標準偏差, vii) SLN の CT 値の平均値, viii) SLN の CT 値の最大値, ix) SLN の CT 値の最小値である。これらの特徴量を用いたサポートベクターマシン (SVM: support vector machine) により, SLN の癌転移を評価した。SVM の入力に使用される特徴は, ステップワイズ特徴量選択法により, 9 特徴から選択された。また, SVM のトレーニングとテストには leave one out patient テスト法を用いた。

## 結 果

9 特徴量のグループ平均の差の検定の結果, SLN の造影度合いのウィルクスのラムダが最小であり, 転移の有無間で分布に大きな違いがあることを示した。また, SLN の CT 値の最大値のウィルクスのラムダが最大となったが, 有意水準 ( $P < .001$ ) を満たすことから, 転移の有無間に有意な差があった。ステップワイズ特徴量選択法により, SVM に使用される 6 特徴量が決定された。これらの特徴量は, 1) リンパ管の形状, 2) SLN の造影度合い, 3) SLN の長軸, 4) SLN の面積, 5) SLN の CT 値の標準偏差, 6) SLN の CT 値の平均値である。6 特徴量を用いた SVM による判別の結果, 正答率, 感度, 特異度は, それぞれ, 98.0% (98/100), 97.8% (44/45), 98.2% (54/55) であった。また, 陽性予測度と陰性予測度は 97.8% (44/45), 98.2% (55/54) であった。

## 考 察

3D CTLG 画像と CTLG 画像の特徴量の組み合わせを転移の有無評価に用いることの有用性を評価するため,

3D CTLG の特徴量のみ, CTLG の特徴量のみを有する SVM による転移の有無評価を行った。ステップワイズ特徴量選択法により, 3D CTLG の SVM において, 3 つの主観的特徴すべてが選択され, CTLG の SVM において, CT 値の最小値を除く 5 つの客観的特徴が選択された。3D CTLG の SVM による正答率, 感度, 特異度, 陽性予測値, 陰性予測値は, 93.0% (93/100), 91.1% (41/45), 94.5% (42/55), 93.2% (41/44), 92.9% (52/56) であった。一方, CTLG の SVM は 95.0% (95/100), 93.3% (42/45), 96.4% (53/55), 95.5% (42/44), 94.6% (53/56) であった。CTLG の特徴量のみを用いた SVM の結果は, 3D CTLG の特徴量を用いた結果よりも高かった。そして, これらの結果は, 3D CTLG と CTLG の両方の特徴量を組み合わせることにより, 大幅に改善された。したがって, 3D CTLG および CTLG の特徴量の組み合わせが, SLN の転移の有無の判別に大きく寄与することが示唆された。さらに, ステップワイズ特徴量選択法の有用性を評価するために, 9 特徴全てを用いた SVM による判別も実施した。その結果, 正答率, 感度, 特異度は, 95.0% (95/100), 93.3% (42/45), 96.4% (53/55) であった。また, 陽性予測度および陰性予測度は, 95.5% (42/44) および 94.6% (53/56) であった。これらの結果は, ステップワイズ特徴量選択法により選択された 6 特徴量を用いた SVM の結果よりも低く, ステップワイズ特徴量選択法が有用であったことが示唆された。

## 結 論

本研究では, 3D CTLG 画像, CTLG 画像におけるセンチネルリンパ節を統合的に解析することにより, センチネルリンパ節のがん転移を評価する手法を開発した。提案手法は高い分類精度を示し, 乳房手術前にリンパ節郭清を施行するか否かの手術計画立案に有用となることが示唆された。

# Full-field digital mammography システムにおける 異なる乳腺密度とコントラスト雑音比の検討

中村 哲子

大学院 医療科学研究科 医療科学専攻

(指導教員：奥田 逸子 客員教授)

## はじめに

乳房は乳腺と脂肪組織から成り、乳腺は脂肪組織と比べ X 線の透過性が低い。マンモグラフィ (以下、MMG) では乳腺と脂肪組織の X 線減弱の差が画像のコントラストとなる。MMG における乳癌の検出に乳腺密度が大きく関係する。また、乳腺密度の高い高濃度乳腺は、乳癌の検出感度を低下させる。

MMG の被ばくは皮膚表面ではなく計算値である平均乳腺線量 (Average glandular dose; AGD) で表される。AGD は予測変数であり、さらに画質と線量はトレードオフの関係にある。乳腺密度の違いによる MMG の画質評価に関する報告は少ない。画質の物理的指標の一つであるコントラスト雑音比 (Contrast to noise ratio; CNR) と乳腺密度の関係を数値化することは、検出感度が低下する高濃度乳腺の乳癌診断において有益なデータとなり得る。完全な画像評価は複数の測定方法を必要とするため、MMG における画質評価の指標の一つとして用いられる CNR と AGD との複雑な関係は完全に解明されていない。我々は AGD と CNR との相関がファントム研究から解明できれば、MMG の撮影中にこの知識を適用して、乳癌診断の信頼性を向上するためのツールとして使用できると仮定する。

## 目的

乳房撮影装置 (Full-field digital mammography: FFDM)

において、乳腺密度、乳房の厚さ、AGD が CNR に及ぼす影響について検討し、AGD と乳腺密度を用いて CNR を高精度に予測する計算式を開発する。

## 方法

General Electric 社製 FFDM システムおよび異なる乳腺密度 (乳腺 / 脂肪) を有する 3 種類の乳房モデル A (30/70), B (50/50), C (70/30) の乳房等価ファントムを使用した。5mm, 10mm, 20mm の厚さのファントムを組み合わせ、10mm から 70mm までの 7 つの厚さの乳房モデルを作成した。ファントム撮影はターゲット / 付加フィルタおよび管電圧を自動的に選択する自動露出機構を用いた。装置に表示されたファントム画像の撮影条件 (管電圧、管電流時間積、AGD) を記録した。各乳房モデルは 3 回撮影し、各表示値の平均値を CNR 計算に用いた。CNR 測定は IEC61223-3-2Ed.2.0 に記載されたガイドラインに従って実施した。100mm × 100mm × 0.2mm サイズの 99.9% 高純度アルミニウム板をコントラスト物質としてファントムの中心に配置した。撮影した画像は各乳房モデルの中心にアルミニウム板あり、またはなしの 2 種類であった。得られた 2 種類の画像について、乳房支持台ユニットの胸壁端から 60mm 離れた乳頭側で X 線管長軸方向の中央線に対応する 20mm × 20mm の矩形関心領域 (ROI) を設定し、Image J ソフトウェアを用いてアルミニウム板あり、またはなしの二つの画像の ROI

内の平均画素値を測定した。測定された画素値から数式に従い CNR 値を算出した。統計解析には SAS 社製統計ソフトウェア JMP ver13.1.0 を用いた。Excel 関数を使用して、各乳腺密度について予測式を得た。二乗平均平方根誤差 (RMSE) 分析を用いて、AGD によって調整された CNR の予測値を、各乳腺密度についての実際の CNR 値と比較することによって、予測精度を評価した。

## 結果

CNR 値は、全ての厚さで乳房モデル A (30/70) において最も高かった。より低い乳腺密度およびより低い乳房モデル厚さでより高い CNR 値が得られた。3つの乳房モデル間の CNR の変動は、より低いファントム厚さ (10~30mm) では低い (変動係数, 3.4~8.7%) が、より高いファントム厚さでは高い (変動係数, 10.5~16.8% 50~70mm)。特に、乳房モデルの厚さが 70mm の場合、乳房モデル C (70/30) の CNR は乳房モデル A (30/70) のそれに比べて相対的に 26% 低かった。乳腺密度および AGD の p 値はそれぞれ 0.0476 および < 0.0001 であり、統計的有意差を示した。結果は、乳腺密度および AGD の両方が CNR の重要な予測因子であることを示した。乳房モデル A (30/70) と C (70/30) は両モデル間の CNR に統計学的有意差を示した。3つの乳腺密度はすべてにおいて、CNR と AGD との間に強い負の相関 ( $r = -0.8989$ ) があった。CNR 予測式は次式のように得られた。

$$\text{CNR} = -10.81 \times \text{AGD} + \text{各乳腺密度の係数} + 27.1$$

この予測式は  $r^2 = 0.865$  および二乗平均平方根誤差 (RMSE) = 1.893 であり、AGD, 乳腺密度を用いて CNR を予測することが可能であることを示した。

## 考察

CNR は様々な画像診断装置における画質の指標と考えられている。画像処理および画像表示はデジタル画像機器の画質に影響を与えるため、画像を物理的に評価し画質を評価することは重要である。したがって、画質の唯一の指標として CNR を使用することは理想的ではない。本研究では、乳房等価ファントムを用いて乳房 X 線撮影

の異なる組織密度と厚さに基づく CNR と AGD を検討した。我々の結果は、より低い乳腺組織密度およびより低い厚さを有する乳房ファントムでより高い CNR 値が得られたことを示した。これらの結果は、MMG 画像の品質が高密度の乳房ではより劣っているという以前からの知見を裏付けている。さらに、MMG における乳房の厚さの CNR と画質の関係を明らかにしている。

多変量解析では、乳腺密度および AGD の両方が CNR の重要な予測因子であり、AGD は CNR に大きな影響を与えることが示された。CNR は、合理的に高い精度 ( $r^2$  は 0.865, RMSE は 1.893) で、AGD と乳腺密度を用いた予測式によって計算することができた。異なる乳腺密度を有する乳房モデル間で、CNR の統計的に有意な差が観察された。3つの乳腺密度すべてにおいて、CNR と AGD との間に強い負の相関が見出された。FFDM システムを使用して AGD および乳腺密度情報から CNR を容易かつ正確に予測するための CNR 予測式が構築された。CNR と乳腺密度, AGD, およびファントム厚さとの相関を評価することを目的とした多変量線形回帰分析モデルは、乳腺密度およびファントム厚さと CNR との間に有意な相関を示した。しかし、解析モデルに組み込まれた各変数が独立していることを保証する必要があり、解析モデルに関連する変数を同時に組み込むと結果が悪化することが知られている。したがって、ファントム厚さを組み込んだ第 1 のモデルと AGD を組み込んだ第 2 のモデルの 2 つの追加モデルを使用して回帰分析を行った。臨床では、CNR に類似した観察項目を測定することが困難であり、臨床応用の観点から AGD を説明変数として使用することが重要であることに留意されたい。

## 結論

FFDM システムにおいて、乳腺密度, 乳房の厚さ, AGD が CNR におよぼす影響について検討した。そして、CNR が AGD および乳腺密度を用いて高精度に予測可能であると示唆された。乳腺密度に基づく CNR 予測は、乳癌診断における MMG の診断信頼性を数値化し、乳腺密度が CNR に及ぼす影響を客観的に管理し、乳癌診断の信頼性を向上するためのツールとして期待できる。

# 下肢静脈瘤患者における掻痒発症の機序に関する研究

高井 靖

大学院 薬学研究科 医療薬学専攻

(指導教員：大井 一弥 教授)

## 序 章

下肢静脈瘤は、循環器系で罹患率の高い疾患であり、下肢の倦怠感、こむら返り、浮腫など様々な症状を呈するが、特に掻痒から QOL 低下をもたらすことが知られている [1-2]。また下肢静脈瘤の病態の進行に伴い、部位および周辺の色素沈着や、皮膚炎等の皮膚症状を併発する。しかしながら、下肢静脈瘤と皮膚掻痒との関連性についての報告は知られていない。当該研究室では、臓器炎症が乾燥皮膚を発現するという報告をすでに行っており [3-6]、今回我々は、下肢静脈瘤患者における掻痒発症機序の解明を目的とした。

## 第 1 章

第 1 節では、下肢静脈瘤部位の皮膚の乾燥と炎症性メディエーターの相関性について解明することを目的とした。ここでは、乾燥皮膚の評価として角層水分量と経表皮水分喪失量 (transepidermal water loss ; TEWL) を測定し、炎症の評価としてサブスタンス P、ヒスタミン、IgE、トリプターゼ、およびマトリックスメタプロテアーゼ -9 (MMP-9) を測定した。対象患者は 27 名 (平均年齢 64.2 ± 10.3 歳) で、女性 19 名、男性 8 名であった。コントロール対象健常人 (疾患を持たないボランティア) は 9 名 (平均年齢 41.0 ± 6.9 歳) であった。下肢静脈瘤の病態は Clinical Etiologic Anatomic Pathophysiologic (CEAP) 分類で行った。掻痒誘発の機序を解析した結果、硬化療法

(静脈に硬化剤を注入し静脈瘤をつぶす治療法) 前に比して、硬化療法後はサブスタンス P、ヒスタミン、IgE、トリプターゼ、および MMP-9 は有意に低下し、掻痒症状の強さと相関した。対象患者 27 名は健常人 9 名に比して、角層水分量については、硬化療法前は有意に低かった。しかし硬化療法後は硬化療法前に比して有意に上昇した。TEWL については、硬化療法前は健常人に比して有意に高かった。しかし硬化療法後は硬化療法前に比して有意に低下した。また掻痒を訴えていた患者は、硬化療法後、掻痒が消失した。すなわち、下肢静脈瘤患者において、硬化療法後では、肥満細胞を介した炎症性メディエーターの減少に伴い、角層水分量の上昇と TEWL の低下がみられ、掻痒の消失と関係していることが明らかとなった。本研究から、下肢静脈瘤患者の掻痒発症においても、肥満細胞を介した炎症が関係していることが明らかとなった。

また、本研究において下肢静脈瘤患者における掻痒発症の頻度は、男性患者の 50% に比して女性患者で 70.4% と高い傾向にあった。そこで第 2 節では、下肢静脈瘤患者における掻痒発症機序の性差の解明を目的とした。下肢静脈瘤患者は、痛みやかゆみのストレスを受けている [7]。ストレスは  $\beta$ -エンドルフィンと副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) を介して掻痒を引き起こすことが知られている [8]。またストレスの感受性には男女差があると報告されている [9]。そこで、ストレスによって変動する  $\beta$ -エンドルフィンと ACTH の血中濃度を測定した。

皮膚状態は男性女性両群共に、硬化療法前では角層水分量は低値で、TEWLは高値を示し、硬化療法後はともに有意に改善していた。男女の比較において下肢静脈瘤部位では、角層水分量およびTEWLとも性差は認められなかった。炎症の評価では、サブスタンスP、ヒスタミン、IgE、およびMMP-9は硬化療法前では男女とも高値を示したが、性差はみられなかった。しかしトリプターゼが硬化療法前では、女性が男性に比して有意に高値であった。硬化療法後では、男女とも健常人と同じレベルに低下していた。 $\beta$ -エンドルフィンとACTHについては、男性が女性に比して硬化療法前有に有意に高値であった。硬化療法後では男女とも健常人と同じレベルに低下していた。本研究により、下肢静脈瘤における掻痒発症の機序には性差があり、女性ではトリプターゼの増加、ストレスの影響を受けやすい男性では、 $\beta$ -エンドルフィンとACTHの増加が掻痒発症の原因の一つであることが示唆された。

## 第2章

近年、微量必須元素の亜鉛が皮膚の恒常性維持に関与している可能性が示されている [10-11]。また亜鉛は、肥満細胞からのヒスタミンの脱顆粒を抑える働きがあることが報告されている [12]。そこで下肢静脈瘤患者における掻痒発症に亜鉛が関与している可能性を考え、1章の炎症とストレスに加えて血清亜鉛との関係を解明することを目的とした。対象患者は、下肢静脈瘤のうち掻痒有の群11名（平均年齢65.9±9.4歳）、掻痒無の群13名（平均年齢59.3±9.5歳）であった。健常人群（疾患を持たない患者）は9名（平均年齢41.7±7.0歳）であった。角層水分量を比較したところ、掻痒有の群は、掻痒無の群より有意に低値を示し、両群とも健常人群に比して有意に低値であった。TEWLについては、掻痒有の群は掻痒無の群より有意に高値を示し、両群とも健常人群に比して有意に高値であった。すなわち、下肢静脈瘤患者は乾燥状態にあるが、掻痒感を伴っている患者では、顕著な乾燥皮膚となっていることが示唆された。それに伴い各群における血清亜鉛を調べたところ、掻痒無の群と健常人群では有意差は認められなかったが、掻痒有の群は、掻痒無の群に比して血清亜鉛の有意な低下が観

察された。本研究により、下肢静脈瘤患者における掻痒の発症には、血清亜鉛の低下と相関性があることが示唆された。

## 総括

下肢静脈瘤の患者では、角層水分量の低下とTEWLの上昇がみられ、掻痒の誘発と関係していることが明らかとなり、また掻痒発症の機序には性差があることが示唆された。さらに、下肢静脈瘤患者における掻痒の発症には、血清亜鉛の低下も相関性があることが示唆された。本研究の成果は、下肢静脈瘤に対して、新しい治療法提案を可能としたものと考えられた。

## 引用文献

- [1] Beebe-Dimmer JL, Pfeifer JR, Engle JS, Schottenfeld D. The epidemiology of chronic venous insufficiency and varicose veins. *Ann. Epidemiol.*, **15**, 175-184 (2005).
- [2] Bergan JJ, Schmid-Schonbein GW, Smith PDC, Nicolaides AN, Boisseau MR, Eklof B. Mechanism of disease: chronic venous disease. *N Eng J Med.*, **355**, 488-498 (2006).
- [3] Yokoyama S, Hiramoto K, Koyama M, Ooi K. Skin disruption is associated with indomethacin-induced small intestinal injury in mice. *Exp Dermatol.*, **23(9)**: 659-63, (2014). doi: 10.1111/exd.12499.
- [4] Yokoyama S, Hiramoto K, Koyama M, Ooi K. Impairment of skin barrier function via cholinergic signal transduction in a dextran sulphate sodium-induced colitis mouse model. *Exp Dermatol.*, **24(10)**: 779-84, (2015). doi: 10.1111/exd.12775. Epub 2015 Aug 18.
- [5] Yokoyama S, Hiramoto K, Koyama M, Ooi K. Impaired skin barrier function in mice with colon carcinoma induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Biol Pharm Bull.*, **38(6)**: 947-50, (2015). doi: 10.1248/bpb.b15-00208.
- [6] Yokoyama S, Hiramoto K, Koyama M, Ooi K. Chronic liver injury in mice promotes impairment of skin barrier function via tumor necrosis factor-alpha. *Cutan Ocul*

- Toxicol.*, **35(3)**: 194-203, 82016). doi: 10.3109/15569527.2015.1076433. Epub 2015 Aug 28.
- [7] Snyder RJ. Venous leg ulcers in the elderly patient: associated stress, social support, and coping. *Ostomy Wound Manage.*, **52**, 58-66, 68 (2006).
- [8] Dalgard F<sup>1</sup>, Stern R, Lien L, Hauser S. Itch, stress and self-efficacy among 18-year-old boys and girls: a Norwegian population-based cross-sectional study. *Acta Derm Venereol. Sep*; **92(5)**: 547-52 (2012). doi: 10.2340/00015555-1309.
- [9] Urbach F, Forbes PD, Davies RE, Berger D. Cutaneous photobiology: past, present and future. *J. Invest. Dermatol.*, **67**, 209-224 (1976).
- [10] Prasad AS. Impact of the discovery of human zinc deficiency on health. *J Am Coll Nutr.*, Jun; **28(3)**, 257-65 (2009).
- [11] Prasad AS. Discovery of human zinc deficiency: its impact on human health and disease. *Adv Nutr.*, Mar; **4(2)**, 176-90 (2013).
- [12] Sanada S<sup>1</sup>, Kuze M, Yoshida O. Beneficial effect of zinc supplementation on pruritus in hemodialysis patients with special reference to changes in serum histamine levels. *Hinyokika Kyo.* Dec; **33(12)**, 1955-60 (1987).

# 薬剤性肝障害誘発因子の探索： ミトコンドリア機能に及ぼす NSAIDs の影響

立松 洋平

大学院 薬学研究科 医療薬学専攻

(指導教員：大倉 一人 教授)

非ステロイド性抗炎症薬 (Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs: NSAIDs) の副作用として消化管障害や腎障害、肝障害などが知られている。なかでも肝障害は重篤な結果をもたらすことが多く、その発生メカニズムの解明が進められてきた。本研究では NSAIDs が肝臓のミトコンドリア機能に与える影響を検証し、ミトコンドリア機能の修飾メカニズムや機能修飾に必須な構造要因を明らかにすることで、肝障害の発症制御および肝障害誘導リスクの低い薬物分子の設計に繋げることを目的の一つとした。また、ミトコンドリアが薬物分子を高感度に検知し、酸素消費という形で応答する特性を利用し、微粒子を含む様々な薬物担体に応用できる薬物放出評価系の構築を試みたので併せて報告する。

## 1. ミトコンドリア膨潤を誘導する NSAIDs のスクリーニング

ミトコンドリアの透過性遷移 (MPT) 誘導能を 540 nm における濁度変化を指標に観測し、セレコキシブ (CEL) とメフェナム酸 (MEF) に顕著な MPT 誘導をみとめた。CEL による MPT 誘導は  $\text{Ca}^{2+}$  誘導性 MPT の阻害薬であるシクロスポリン A (CsA) により抑制されなかった。一方、MEF 誘導性の MPT は CsA による阻害が確認された。また、MPT の誘導に伴うアポトーシス誘導因子シトクロム C (CytC) の放出を検証したところ MEF では放出が確認されたが、CEL では確認されなかった。これらの

結果から、2つの薬物は異なる機構でミトコンドリアの膜透過性を変化させていると考えられた。

特に CEL がミトコンドリア呼吸鎖機能に及ぼす影響を溶存酸素を指標に評価したところ、CEL は脱共役作用を有し、また、電子伝達系の阻害作用を併せ持つことが示唆された。CEL によってミトコンドリアから放出されるタンパク質の内訳を解析した結果、細胞死誘導因子が存在する膜間スペースのタンパク質には影響を与えず、マトリクスタンパク質を選択的に放出させる可能性が示唆された。単層膜リポソーム、赤血球を用いた膜透過性に及ぼす影響の解析から CEL による膜透過性の亢進が確認でき、ミトコンドリアへの作用濃度域と一致することから、ミトコンドリア毒性に膜作用の関与が考えられた。

## 2. *N*-Phenylanthranilic Acid を構造中に有する NSAIDs がミトコンドリア機能に及ぼす影響

MEF による  $\text{Ca}^{2+}$  様の MPT 誘導機構解明のため MEF、トルフェナム酸 (TOL)、メクロフェナム酸 (MCL)、フルフェナム酸 (FLU)、ジクロフェナク (DIC)、フェナム酸 (NPA)、ジフェニルアミン (DPA) がミトコンドリア機能に及ぼす影響を比較検証した。*N*-phenylanthranilic acid 骨格を持つ MEF、TOL、MCL、FLU、DIC、NPA は濃度依存的に MPT を誘導し、濃度反応曲線をみると TOL、FLU、MEF の MPT 誘導がある濃度域を境に急激

に起こるのに対し、MCL, DIC, NPA は低濃度域から徐々にMPTを誘導した。特にMCLの反応性はMPT誘導因子であるCa<sup>2+</sup>様の濃度反応曲線を示した。カルボン酸を持たないDPAはミトコンドリアを濃度依存的に膨潤させたが、その膨潤誘導はCsAで阻害されず、NPAがCa<sup>2+</sup>様MPT発現に必須な構造であると考えられた。また、分子力学(MM)解析から上記NSAIDsは多配座を持つことが明らかとなり、得られた配座の立体疎水性度の指標である溶媒和エネルギー(dGW)から、動的構造変化により疎水性度が大きく変化することを確認した。膜作用性に富む脱共役剤SF6847は127個の配座を持つが、そのdGW値は-63 kJ/mol付近の一定値をとる。MPT誘導性が高いMCLは、SF6847に近いdGW値を持つ配座を多数有し(平均-65.95 kJ/mol)、SF6847の様に膜反応性に富む配座の存在確率が高く、肝毒性発症に寄与すると考えられた。

### 3. 薬物送達システムへの応用の試行

リポソームなどの微粒子製剤の薬物放出の制御は有効性、品質維持の観点から重要な要因であるが、確立された薬物放出の評価方法はない。そこで、ミトコンドリアの特性を利用した新規薬物放出評価系の構築を試みた。第一段階としてSF6847をはじめ脱共役作用を持つNSAIDsを封入したアルギン酸ゲルビーズからの成分放出をミトコンドリアの酸素消費速度を指標に捉えることに成功した。この系では担体からの成分放出過程のみならず担体の状態を感度良く評価することも確認でき、様々な薬物送達体へ応用できると考えられた。脱共役作用を持たない薬物に対しては、成分の放出を水素原子や酸素原子または電子の動きに変換するプローブを用いる事で対応が可能であると考え、その設計を進めている。また、DDSツール開発の一環として黄色ブドウ球菌由来ペプチド転移酵素SrtAを利用した、リポソーム表面の修飾についても紹介する。

# 認知症治療薬の適正使用に関する研究

## — ドネペジルとメマンチンの精神科薬物療法に対する有用性の検討 —

中村 友喜

大学院 薬学研究科 医療薬学専攻

(指導教員：三輪 高市 教授)

### 序 論

現在、アルツハイマー型認知症 (Alzheimer-type Dementia: AD) の中核症状の治療には、コリンエステラーゼ阻害薬 (cholinesterase inhibitor: ChEI) であるドネペジル塩酸塩 (donepezil hydrochloride: DNP)・ガランタミン臭化水素酸塩・リバスチグミンと N-メチル-D-アスパラギン酸受容体拮抗薬であるメマンチン塩酸塩 (memantine hydrochloride: MEM) の4種類が処方されている。これらの治療薬はADの進行抑制効果については基本的な差はないが、認知症の原因疾患や重症度、剤型、肝機能や腎機能、認知症に伴う行動・心理症状 (behavioral and psychological symptoms of dementia; BPSD) などによって使い分けされている。また、AD患者のBPSDに精神科薬物療法を実施する場合、加齢に伴う生体機能の変化や身体合併症治療薬と向精神薬の相互作用、認知症の進行に伴う自己の状態表出の困難化などに注意が必要である。

そこで本研究では薬剤師の視点から、精神症状が改善され、有害事象や日常生活動作 (activities of daily living: ADL) に対する悪影響は最小限となる薬物療法を組み立てるために、DNPとMEMの臨床での問題点を整理し、対策を提案することで、AD患者に対してより有効かつ安全な薬物療法を提供できることを目的とした。

### 第1章 AD患者における認知症治療薬と向精神薬に関する処方調査

精神科病院に入院するAD患者では、BPSDに対して向精神薬が処方されることが多い。しかし、抗精神病薬やベンゾジアゼピン (benzodiazepine: BZD) 系薬の有害事象から、誤嚥性肺炎や転倒骨折等のADLに影響する重大なアクシデントに発展することもある。そこで、AD患者におけるChEIとMEMの処方状況と抗精神病薬と睡眠薬の併用及び投与量に関する処方調査を実施した。

当該患者84例をChEI単剤群、MEM単剤群、ChEI・MEM併用群、認知症治療薬処方なし群の4群に分類し解析した結果、ChEI単剤群では、睡眠薬の処方率は他の群よりも有意に高く、睡眠薬のジアゼパム (diazepam: DAP) 換算値は認知症治療薬処方なし群及びMEM単剤群よりも有意に高かった。このことから、ChEIによって中枢神経系が精神病症状を誘発しない程度に興奮したことによって、睡眠薬の処方率やDAP換算値が増加したものと推察された。また、MEM単剤群では、BZD系睡眠薬の処方率は他の群よりも有意に低く、DAP換算値は認知症治療薬服用なし群と有意差がなかったことから、MEMの鎮静効果によって睡眠薬投与量の抑制につながったものと考えられた。

## 第2章 ペントバルビタール誘発睡眠による DNP と MEM のマウスの睡眠への影響

第1章から得られた ChEI と MEM の睡眠薬に関する考察について、DNP と MEM の睡眠への影響をマウスで検証した。ddY 系雄性マウスに DNP または MEM を腹腔内投与した後にペントバルビタールを腹腔内投与 (45mg/kg) し、正向反射消失までの時間 (睡眠潜時) 及び正向反射消失から回復までの時間 (睡眠時間) を測定した。その結果、睡眠潜時は、0.03mg DNP 投与群で有意に延長した。睡眠時間については、MEM 投与群で延長傾向がみられたが有意差は確認できなかった。この結果は、第1章で示された DNP の ChEI による中枢神経系の軽度な興奮の可能性を支持するものと考えられた。

## 第3章 液体クロマトグラフィー - タンデム質量分析法 (LC/MS/MS) を用いた DNP と MEM の血清中濃度同時測定系の開発

AD 患者に対して DNP と MEM を用いる場合の注意点として、DNP は加齢に伴う肝機能の低下に、MEM は糸球体ろ過率や腎血流量の低下によって、半減期が延長する可能性があることがあげられる。薬剤師が有効性と安全性の高い臨床用量を医師に提案するためには、DNP や MEM の血清中濃度は重要な指標の一つである。DNP または MEM の濃度を独立に測定すること分析法はこれまでも報告されているが、DNP と MEM を AD の患者血清を用いて同時に測定した報告はない。さらに、従来の分析方法では、血清からの薬物抽出方法が複雑であるが、臨床応用のためには、そのような操作は単純かつ迅速であり、想定される血清濃度の範囲内で高い再現性が得られなければならない。また、採血の必要性を低減するためには、少量の血清による分析が望ましい。本研究では、内部標準にフェナセチンを用いた LC/MS/MS によって、マウスに投与した DNP と MEM の血清濃度を同時に測定する簡便で迅速かつ正確な方法を開発した。

この測定法における前処理は内部標準を含む混合有機溶媒による除タンパクのみで血清濃度を測定することができた。また、各化合物の検量線は、臨床上の血清

薬物濃度の範囲内で良好な直線性を示した。これらより、本研究で確立された血清中濃度測定法はヒトにも応用可能であると考えられた。

## 第4章 AD 患者における DNP ・ MEM の血清中濃度の測定

第3章の測定法を用いて AD 患者の DNP と MEM の血清濃度を測定した。

5 mg DNP を投与群の血清中 DNP 濃度は  $26 \pm 6$  ng/mL ( $n=4$ ) であり、20 mg MEM を投与した群の血清中 MEM 濃度は  $123 \pm 50$  ng/mL ( $n=4$ ) であった。DNP の毒性発現域である 50 ng/mL を超える患者が1名みられた。この患者には DNP の有害事象は発生していなかったが、消化器症状 (悪心・嘔吐など) や循環器症状 (徐脈・洞性不整脈など)、呼吸障害、縮腫などのコリン作動性の副作用のモニタリングをしながら、DNP の代謝を阻害するような薬剤の併用は避け、必要であれば投与量の減量を医師に提案すべきであると考えられた。

また、MEM の血清中濃度は AD 患者の体重にも影響されることが明らかになり、MEM の処方時には腎機能に加えて、患者の体重についても考慮する必要があることが示唆された。対象患者は DNP と MEM に加えて、1~9 剤の薬剤を併用していたことを考慮すると、この方法は DNP と MEM を 選択的に同時に定量する有効な方法であり、AD 患者に対する効果的かつ安全な薬物療法の提供に貢献できるものと考えられた。

## 結 論

AD 患者に対して精神科薬物療法を実施する場合、低用量の DNP で精神症状の悪化の可能性があるため、精神症状に対する向精神薬の併用の前に、DNP の服薬状況や代謝に影響を及ぼす薬剤の併用などにも注目する必要があること、MEM の投与量を決定する際には、過鎮静を引き起こす向精神薬の併用を避けるとともに、患者の腎機能や体重にも着目する必要があることが示唆された。また、今回開発した血清中濃度測定法を用いることで有効性はあるが有害事象は回避できる投与量の決定が可能となり、薬剤師が処方提案を行う際の一助となるものと考えられた。

# マスト細胞の活性化制御機構に関する研究

## — 亜鉛ウェーブの役割と ARF1 による活性化制御について —

内田 亮太

大学院 薬学研究科 医療薬学専攻

(指導教員：西田 圭吾 准教授)

### 序 章

マスト細胞は皮下組織や粘膜組織に広く分布する免疫担当細胞であり、様々な炎症性物質を放出して生体を防御している。体内に寄生虫などが侵入すると抗体産生細胞から Immunoglobulin E (IgE) 抗体が産生され、産生された IgE 抗体はマスト細胞の細胞膜にある Fcε 受容体 I (FcεRI) に結合する。そして、このマスト細胞に結合した IgE 抗体に抗原が結合して架橋が形成されると、脱顆粒やサイトカインの産生といった炎症反応が起きる [1]。また、マスト細胞には Toll 様受容体やサイトカイン受容体が発現しており、リポ多糖 (LPS) 刺激やサイトカイン刺激によっても活性化され、炎症反応を起こす [2]。しかし、このように生体防御に関与している一方で、花粉やダニの死骸など無害な抗原にも過剰に応答することがあり、花粉症や喘息・アトピー性皮膚炎などのアレルギー性疾患の原因にもなっている [2]。そのためマスト細胞の活性化制御機構の解明は重要である。マスト細胞の活性化機構において近年亜鉛シグナルが重要であることが明らかとなりつつある [3]。また、低分子量 G タンパク質 ARF1 (ADP-ribosylation factor 1) のペプチド断片がマスト細胞の脱顆粒を抑制する作用を有することが報告された [4]。そこで、本研究において、第一章ではサイトカイン産生調節機構における亜鉛ウェーブの役割について、第二章では ARF1 ペプチドによるマスト細胞の活性化制御について検討した。

### 第一章：炎症性サイトカイン産生制御における亜鉛ウェーブの役割

マスト細胞においては、抗原刺激依存的に細胞質内亜鉛濃度が上昇する現象があり、亜鉛ウェーブと呼ばれている [5]。亜鉛ウェーブは抗原刺激後数分で見られ、およそ 15 分後をピークとして低下する。また、亜鉛ウェーブは小胞体から生じており、小胞体膜上に発現している L 型カルシウムチャネル (LTCC) によって制御されていることが明らかとなっている [6]。さらに、亜鉛ウェーブはサイトカインの転写を促進することが示されている。しかし、マスト細胞は抗原刺激の他に LPS 刺激やサイトカイン刺激によってもサイトカイン産生が誘導されるが、抗原以外の刺激における亜鉛ウェーブの関与の有無は明らかでなかった。そこで、亜鉛ウェーブが抗原刺激を介するシグナル経路以外にも関与している可能性について検証した。まず、LPS またはサイトカインである IL-33 刺激によって細胞質内亜鉛濃度の上昇が観察されるか否か亜鉛蛍光プローブを用いて調べたところ、いずれの刺激においても刺激 30 分後に有意な蛍光強度の上昇が認められた。この上昇は LTCC 遮断薬であるニカルジピンによって抑制された。また、LPS および IL-33 刺激による IL-6 転写へのニカルジピンおよび亜鉛キレーター *N, N, N', N'*-Tetrakis (2-pyridylmethyl) ethylenediamine (TPEN) の影響を検討したところ、ニカルジピンおよび TPEN で処理

することによって有意に転写率が抑制された。これらの結果から、マスト細胞では LPS およびサイトカインによる活性化経路においても亜鉛ウェーブが関与していることが判明した。LPS はマスト細胞の他にも主に自然免疫担当細胞を活性化させてサイトカイン産生を誘導することから、これらの細胞の活性化においても亜鉛ウェーブが関与している可能性が考えられた。そこで次に、自然免疫担当細胞の一つである樹状細胞を用いて、サイトカイン産生における亜鉛ウェーブの関与の有無を調べた。その結果、樹状細胞を LPS 刺激した際にも亜鉛ウェーブが観察され、亜鉛ウェーブがマスト細胞特異的なシグナル経路に関与するだけでなく、様々な細胞のサイトカイン転写経路に関与している可能性が示唆された。(Uchida et al., Biol Pharm Bull. 42, 87-93 (2019).)

## 第二章：ARF1 ペプチドを用いた活性化制御機構の検討

ARF1 は Ras スーパーファミリーに属する低分子量 G タンパク質であり、一般的に細胞骨格の制御や小胞輸送、リン脂質の代謝などに関与していることが知られている。また、マスト細胞においては脱顆粒に関与していることが報告されている。さらに、ARF1 の N 末端ペプチド断片である ARF1 (2-17) に膜透過モチーフ (MTM) を結合させた MTM-ARF1 (2-17) (以下 ARF1 ペプチドと呼ぶ) には ARF1 の働きを阻害する作用があり、マスト細胞に関しては細胞レベルで脱顆粒を阻害する [4]。そこで、ARF1 ペプチドを用いてマスト細胞の活性化に及ぼす影響を検討した。まず、ARF1 ペプチドの脱顆粒抑制効果に関する構造活性相関を明らかにするため、ARF1 ペプチドの C 末端側および N 末端側からアミノ酸を削っていき、脱顆粒抑制効果に重要なアミノ酸配列を調べた。その結果、ARF1 ペプチドの 10, 16 番目のリシン (Lys) 残基を含む ARF1 (10-16) の配列がマスト細胞の脱顆粒抑制効果の発現に重要であることが示された。次に、ARF1 ペプチドを用いてマスト細胞のサイトカイン産生お

よび脂質メディエーター産生への影響を調べた。その結果、ARF1 ペプチドはこれらの物質の産生を阻害した。この結果から、ARF1 は脱顆粒のみならず、サイトカイン産生および脂質メディエーター産生にも関与する可能性が示された。さらに、ARF1 ペプチドの抗アレルギー効果を調べるためにマウスのアナフィラキシーモデルを用いてアナフィラキシー反応に及ぼす影響を検討した。その結果、ARF1 ペプチドはマウスのアナフィラキシー反応を抑制した。この結果から、ARF1 を標的としたアレルギー治療薬開発の可能性が示唆された。(Uchida et al., Mol Immunol. 105, 32-37 (2019))

以上の研究により、亜鉛ウェーブは様々な細胞において見られる重要なサイトカイン転写制御機構である可能性が示唆され、また、マスト細胞活性化機構における ARF1 シグナル経路の役割について新たな知見を見出した。

## 引用文献

1. Turner, H. and J.P. Kinet, *Signalling through the high-affinity IgE receptor Fc epsilonRI*. Nature, 1999. **402**(6760 Suppl): p. B24-30.
2. da Silva, E.Z., M.C. Jamur, and C. Oliver, *Mast cell function: a new vision of an old cell*. J Histochem Cytochem, 2014. **62**(10): p. 698-738.
3. Nishida, K. and R. Uchida, *Regulatory Mechanism of Mast Cell Activation by Zinc Signaling*. Yakugaku Zasshi, 2017. **137**(5): p. 495-501.
4. Nishida, K., et al., *Gab2, via PI-3K, regulates ARF1 in FcepsilonRI-mediated granule translocation and mast cell degranulation*. J Immunol, 2011. **187**(2): p. 932-41.
5. Yamasaki, S., et al., *Zinc is a novel intracellular second messenger*. J Cell Biol, 2007. **177**(4): p. 637-45.
6. Yamasaki, S., et al., *A novel role of the L-type calcium channel alpha1D subunit as a gatekeeper for intracellular zinc signaling: zinc wave*. PLoS One, 2012. **7**(6): p. e39654.

# オキシブチニン塩酸塩経皮吸収型製剤とヘパリン類似物質軟膏の併用療法の最適化に関する研究

— 過活動膀胱高齢患者への経皮吸収型製剤の適正使用の検討 —

村上 佳人

大学院 薬学研究科 医療薬学専攻

(指導教員：大井 一弥 教授)

## 序 章

過活動膀胱は、尿意切迫感を必須症状とし、夜間頻尿と頻尿を伴う慢性疾患であるが、少子高齢化に伴い患者数が増加し、高齢者の代表的な疾患となった<sup>1)</sup>。過活動膀胱治療の第一選択薬としては、経口薬の抗コリン薬が使用されているが、口渇や便秘のような抗コリン性副作用を発現し、患者の Quality of Life を低下させる<sup>2)</sup>。

オキシブチニン塩酸塩経皮吸収型製剤は、抗コリン性副作用の少ない過活動膀胱の治療薬であるが、適用部位に発疹および痒みなどの有害事象を誘発し、治療の継続が困難となることが多い<sup>3)</sup>。これまでに、乾燥皮膚モデルマウスを用いた in vivo 研究において、オキシブチニン塩酸塩経皮吸収型製剤適用後の皮膚の Draize スコアが、ヘパリン類似物質軟膏の前処置により抑制されたことが報告されていることから<sup>4)</sup>、臨床への応用が期待される。

そこで本研究は、過活動膀胱高齢患者に対してオキシブチニン塩酸塩経皮吸収型製剤による長期治療を可能とする薬物治療を提案するために、ヘパリン類似物質軟膏との適正な併用方法を検討し、有効かつ安全な薬物治療の基礎となるデータの収集を目的とした。

## 第1編 過活動膀胱高齢患者における長期治療を目的としたオキシブチニン塩酸塩経皮吸収型製剤およびヘパリン類似物質軟膏の併用療法の有用性

オキシブチニン塩酸塩経皮吸収型製剤は、適用した高齢者の 30.3% に適用部位反応を発現させ<sup>5)</sup>、長期治療が困難となる。そこで今回、過活動膀胱と診断された 65 歳以上の患者 8 名に対して、ヘパリン類似物質軟膏を 1 週間適用後、オキシブチニン塩酸塩経皮吸収型製剤による薬物治療およびヘパリン類似物質軟膏の併用療法を 12 週間行い、適用部位の皮膚障害の状態を評価した。その結果、ヘパリン類似物質軟膏適用後の角層水分量は適用前に比べて増加し、オキシブチニン塩酸塩経皮吸収型製剤による薬物治療中、適応部位に有害事象を発生した患者はいなかった。これらの結果から、ヘパリン類似物質軟膏による保湿ケアは、過活動膀胱高齢患者におけるオキシブチニン塩酸塩経皮吸収型製剤の適正使用に有用な方法であると考えられる。

## 第2編 第1章 オキシブチニン塩酸塩経皮吸収型製剤適用後のオキシブチニンの薬物動態に対するヘパリン類似物質製剤前適用の影響

経皮吸収型製剤適用時における皮膚外用剤の併用は、薬物の経皮吸収性に影響を及ぼし、薬物の体内動態を変化させることが報告されている<sup>6)</sup>。そこで、ヘアレスマウスを用いて、オキシブチニンの経皮吸収性に対するヘパリン類似物質軟膏の影響を評価した。

雄性ヘアレスマウスを、正常皮膚群、乾燥皮膚群、正常皮膚+ヘパリン類似物質軟膏群、乾燥皮膚+ヘパリン類似物質軟膏群に群分けし、オキシブチニン塩酸塩経皮吸収型製剤4cm<sup>2</sup>適用後、経時的に血液を採取し、オキシブチニンの血中濃度をLC-MS/MSにより決定した。加えて、ヘアレスマウス背部皮膚の経表皮水分喪失量(TEWL)、角層水分量、皮膚表面pHおよび角層の厚さをオキシブチニン塩酸塩経皮吸収型製剤適用前に測定した。

ヘパリン類似物質軟膏適用1時間後にオキシブチニン塩酸塩経皮吸収型製剤を適用した場合、オキシブチニンの血中濃度およびAUC<sub>0→24</sub>が、正常および乾燥皮膚にかかわらず、ヘパリン類似物質軟膏非適用に比べて増加した。加えて、オキシブチニン塩酸塩経皮吸収型製剤適用前の皮膚の角層水分量および角層の厚さは有意に増加したことから、オキシブチニンの経皮吸収が主に角層水和により増加したことが示唆された。

## 第2編 第2章 オキシブチニンの薬物動態を考慮したオキシブチニン塩酸塩経皮吸収型製剤とヘパリン類似物質軟膏の併用療法の適正化

オキシブチニンの薬物動態の変化は、抗コリン作動性副作用の発現が危惧されるため、ヘパリン類似物質軟膏適用時のオキシブチニンの薬物動態をヘパリン類似物質軟膏非適用時と同等となるように併用方法の調節を検討した。第1章と同様の条件下でオキシブチニン塩酸塩経皮吸収型製剤を2cm<sup>2</sup>および1cm<sup>2</sup>に調節した。さらにオキシブチニン塩酸塩経皮吸収型製剤とヘパリン類似物質

軟膏の適用間隔を12および24時間に調節した。その結果、ヘパリン類似物質軟膏適用24時間後にオキシブチニン塩酸塩経皮吸収型製剤2cm<sup>2</sup>を適用した際のオキシブチニンの薬物動態が、ヘパリン類似物質軟膏非適用時と同等となった。しかしながら、ヘパリン類似物質軟膏適用24時間後に角層の水和が解消されてもオキシブチニンの経皮吸収が促進されたことから、ヘパリン類似物質軟膏の基剤の影響を受けた可能性が考えられた。これらの結果から、オキシブチニン塩酸塩経皮吸収型製剤およびヘパリン類似物質軟膏を併用する場合は、それぞれの適用条件を適切に調節する必要があると考えられた。

## 結 論

過活動膀胱高齢患者に対して、オキシブチニン塩酸塩経皮吸収型製剤とヘパリン類似物質軟膏の併用療法は、適用部位反応を軽減し、治療の継続率を改善させた。しかしながら、ヘパリン類似物質軟膏による角層の水和や基剤の影響は、オキシブチニンの経皮吸収性を変化させ、薬物動態に影響を与えることから、オキシブチニン塩酸塩経皮吸収型製剤とヘパリン類似物質製剤の適用条件の調節が必要となることが明らかになった。今回の結果は、オキシブチニン塩酸塩経皮吸収型製剤の薬物治療を実施する上で、重要な知見になると考えられた。

## 引用文献

- 1) Homma Y, Yamaguchi O, Hayashi K; Neurogenic Bladder Society Committee. An epidemiological survey of overactive bladder symptoms in Japan. *BJU. Int.*, **96**(9), 1314-1318 (2005).
- 2) Benyamini Y, Goner-Shilo D, Lazarov A. Illness perception and quality of life in patients with contact dermatitis. *Contact. Dermatitis.*, **67**(4), 193-199 (2012).
- 3) Chapple C, Khullar V, Gabriel Z, Dooley JA. The effects of antimuscarinic treatments in overactive bladder: a systematic review and meta-analysis. *Eur. Urol.*, **48**(3), 5-26 (2005).
- 4) Ooi K, Ando M, Hiramoto K. The research for the prevention of dermopathy to transdermal delivery

systems of oxybutynin patch. *Jpn. Pharmacol. Ther.*, **43**(10), 1419-1424 (2015).

- 5) Yamaguchi O, Uchida E, Higo N, Minami H, Kobayashi S, Sato H; Oxybutynin Patch Study Group. Efficacy and safety of once-daily oxybutynin patch versus placebo and propiverine in Japanese patients with

overactive bladder: A randomized double-blind trial. *Int J Urol*, **21**(6), 586-593 (2014).

- 6) Björklund S., Engblom J., Thuresson K., Sparr E., Glycerol and urea can be used to increase skin permeability in reduced hydration conditions, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **50**(5), 638-645 (2013).