

氏名（本籍） 佐 賀 利 英

学位の種類 博士（医療薬学）

学位記番号 薬博（医療薬学） 第5号

学位授与年月日 平成16年3月25日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

研究科、専攻 東北大学大学院薬学研究科
（博士課程）医療薬科学専攻

学位論文題目

小児気管支喘息の病態とエイコサノイド産生との関連に関する研究

論文審査委員 (主査) 教授 後藤 順一

教授 安齋 順一

助教授 戸 恒 和 人

論文内容要旨

【目的】

近年、小児気管支喘息患者の増加に伴い本疾病の早期診断・治療の重要性が認識されてきている。気管支喘息の病態は慢性の好酸球性気道炎症による機能障害から気質障害に至る疾患であることが明らかにされてきており、気管支喘息の治療法は、炎症を早期に抑制することにより不可逆性の気道リモデリングを防止することが主流になってきている。そのため、簡便で信頼できる気道炎症の評価法の確立が医療の現場で期待されている。

一方、アラキドン酸から産生されるエイコサノイドの一種であるシステニルロイコトリエン（システニルLT）及びトロンボキサン A_2 （TXA $_2$ ）は、気道平滑筋収縮作用ばかりでなく浮腫誘発作用や気道過敏性亢進作用、血管透過性亢進作用を有し、気管支喘息で認められるさまざまな病態を形成させる作用があることが知られている。実際、欧米や日本においてLT受容体拮抗薬や5-リポキシゲナーゼ阻害薬、TXA $_2$ 受容体拮抗薬が気管支喘息の治療に用いられており、医療現場においてもエイコサノイド関連薬剤が注目されている。

種々の要因により引き起こされる多因子性疾患である気管支喘息の病態把握とそれに応じた最適な薬物療法を行う上で、これらのエイコサノイド産生量の定量的評価は有用である。実際、これらのエイコサノイド産生の指標とされる尿中LTE $_4$ 量や尿中11-dehydroTXB $_2$ 量の測定がこれまで様々な方法により行われているが、従来の方法は操作が煩雑であることや測定値の再現性の問題などがいまだ残されており、より簡便で信頼性の高い測定法の開発が望まれる。さらに、その産生量には大きな個人差が存在することが示されてきていることから、簡便で信頼できるエイコサノイド量の測定系による定量的解析が患者個々の病態に応じた治療法の選択の際に有益な情報を提供できるものと考えられる。特に、気管支喘息の治療は早期からの気道炎症を抑制し遷延化を防止することが重要とされていることから、小児気管支喘息患者の早期診断・治療を行う上での気道炎症評価法としての測定系に期待が寄せられている。

そこで本研究では、システニルLT及びTXA $_2$ の尿中代謝体であるLTE $_4$ 及び11-dehydroTXB $_2$ を研究対象とし、エイコサノイドの産生量モニタリングの気道炎症評価法としての有用性を明らかにし、さらに個別化医療への応用のための基礎的データを収集することを目的として以下の検討を行った。始めに、(1)液体クロマトグラフィー／タンデムマススペクトロメトリー（LC/MS/MS）による尿中11-dehydroTXB $_2$ の微量定量法の確立を行った。LC/MS/MSにおける11-dehydroTXB $_2$ の挙動について詳細な検討を行い、尿中からの精製法を開発することにより簡便で高感度な微量定量法を確立した。続いて、(2)確立した11-dehydroTXB $_2$ の測定法並びに先に当研究室で確立しているLTE $_4$ の測定法により健常小児の尿中エイコサノイド量を測定し、気管支喘息小児の尿中エイコサノイド量に対する正常値を設定した。さらに、(3)エイコサノイドの産生量解析が気管支喘息小児の個々の病態に応じた治療法の選択に際して有益な情報を提供できるかについて、種々の検討を加えた。

【方法】

四重極型タンデム質量分析計にはエレクトロスプレーイオン源を装備した micromass QuattroII, セミマイクロ HPLC システムには資生堂 NANOSPACE SI-1, セミマイクロカラムには資生堂 Capcell Pak UGB 120 を使用し, 微量定量法の開発とヒト尿試料中の 11-dehydroTXB₂ 及び LTE₄ の定量を行った。

【結果・考察】

(1) LC/MS/MS を用いて TXA₂ の尿中代謝体である 11-dehydroTXB₂ の微量定量法の確立を行った。SRM (Selected Reaction Monitoring) におけるモニタリングイオン, コーン電圧及びコリジョンエネルギー, 移動相の組成及び pH, イオン源の温度等について最適条件を決定することにより, 11-dehydroTXB₂ の高感度測定を可能とした。次いで, 試料の pH, 洗浄溶媒や溶出溶媒等について種々の検討を加え, 固相抽出カートリッジによる 11-dehydroTXB₂ の効果的なクリーンアップ法を開発した。内部標準物質 (Internal Standard, IS) として用いた 11-dehydroTXB₂-d₄ とのピーク面積比により作成した検量線は, 10pg/tube から 10ng/tube の範囲で直線性を示した。各種バリデーションの結果, 本定量法が高い信頼性と再現性を有することが示された。以上より, LC/MS/MS による 11-dehydroTXB₂ の測定法を確立し, TXA₂ の生体内動態の定量的解析を可能とした。

(2) LC/MS/MS を用いて健常小児23例の尿中 LTE₄ 量及び 11-dehydroTXB₂ 量を測定した。その結果, 健常小児の尿中 LTE₄ 量の平均値は 140pg/mg creatinine, 尿中 11-dehydroTXB₂ 量の平均値は 1057pg/mg creatinine であり, これを健常小児の尿中エイコサノイドの正常値とした。本研究で確立した 11-dehydroTXB₂ の定量法を用いるとき, 対象とした全試料において短時間で検出・定量が可能であり, 簡便で高感度な定量法としてその有用性を示した。得られた健常小児における平均値を用いることにより, 小児気管支喘息とシステイニルLT 及び TXA₂ との関連性についての検討を可能とした。

(3) 採尿時の状態により安定群及び発作群に分類した小児気管支喘息患者の尿中 LTE₄ 量及び 11-dehydroTXB₂ 量を測定し, 小児気管支喘息患者の病態と尿中エイコサノイド量との関連性についての検討及び尿中エイコサノイドの測定による気道炎症評価法の可能性について検討を行った。気管支喘息小児の発作群の尿中 LTE₄ 量は健常小児の尿中 LTE₄ 量の平均値及び気管支喘息小児の非発作群における尿中 LTE₄ 量の平均値に比しても有意な高値を示すことを明らかにした。一方, 気管支喘息小児の発作群の尿中 11-dehydroTXB₂ 量は, 健常小児及び気管支喘息小児の非発作群の尿中 11-dehydroTXB₂ 量に比べ有意な差は認められないことを示した。しかしながら, 発作群においても LTE₄ 量及び 11-dehydroTXB₂ 量が低値を示す小児患者も認められているなど測定値にばらつきが認められ, システイニルLT 非依存型あるいは TXA₂ 非依存型の小児気管支喘息患者の存在が示唆された。また, 非発作群においても高値を示す小児患者も存在することから, 個々の正常値や産生亢進の程度に違いが認められると考えられた。そこで, 尿中エイコサノイド量の測定により得られる情報を明確にするため, 病態の変化に伴う患者個人毎のエイコサノイドの「産生変動プロファイル解析」を行った。すなわち, 発作時及び非発作時に試料を採取した小児患者群について, 各時点における尿中 LTE₄ 量及び 11-dehydroTXB₂ 量を測定し, 患者群を発作時に LTE₄ 量及び 11-dehydroTXB₂ 量の両方が高値を示す群, LTE₄ 量のみが高値を示す群, 11-dehydroTXB₂ 量のみが

高値を示す群， LTE_4 量及び 11-dehydro TXB_2 量の双方が変化しない群に分類することにより，小児気管支喘息の病態に關与するメディエーターを評価できる可能性を示した。

さらに，LT 受容体拮抗薬のプラシカスト服用に伴う尿中 LTE_4 量及び 11-dehydro TXB_2 量の変動について検討した。システイニルLT 及び TXA_2 産生抑制作用を有さない LT 受容体拮抗薬の服用により尿中 LTE_4 量あるいは 11-dehydro TXB_2 量が減少する患者が存在することを示し，尿中エイコサノイド量の測定が氣道炎症の程度を評価する方法として有用である可能性を示した。

【結論】 以上の結果から，高感度で簡便に測定可能な LC/MS/MS による尿中エイコサノイド量の定量解析が，医療現場における個別化医療のための病態診断や適切な治療薬剤選択の際に有益な情報を提供できる可能性を示した。

審査結果の要旨

早期における診断と、病態の適切な把握は、疾病の治療に極めて重要である。本研究は、小児における気管支喘息に焦点をあて、不可逆性の気道リモデリングの防止を目的として、システイニルロイコトリエン（システイニルLT）とトロンボキサンA2の尿中安定代謝体であるロイコトリエンE4（LTE4）と11-デヒドロトロンボキサンB2（11-dehydri）に着目し、それらの診断指標としての有用性に検討を加えたものである。

まず、11-dehydroTXB2の信頼度の高い測定法の構築を試みた。すなわち、測定法として特異性の高い液体クロマトグラフィー/タンデムマススペクトロメトリー（LC/MS/MS）を選択し、分離条件、効率的イオン生成条件、効果的な娘イオン生成条件等に検討を加え、最適な測定系を設定した。さらに、尿試料の効果的なクリーン・アップ条件を吟味し、固相抽出カートリッジによる精製法を設定した。本法並びに先に設定した測定法に従い、健常小児23例の尿中LTE4並びに11-dehydroTXB2量を測定した結果、前者は140 pg/mg creatinine、後者は1057 pg/mg creatinineであり、これを正常値とした。

次いで小児気管支喘息患者尿中のこれらエイコサノイドを測定し、病態との関連に検討を加えた。発作群のLTE4量は、健常小児及び非発作群のそれらに比して有意に高く、11-dehydroTXB2量には大きな差異は認められなかった。しかし、発作群を個別に見ると、両エイコサノイドともに低値を示す固体がある一方、非発作群においても逆に高値を示す固体があり、個々の産生亢進の程度に違いのあることが示唆された。そこで、患者毎の産生変動プロフィール解析を行った結果、発作時に両エイコサノイド量の双方が高値を示す群、LTE4量、または11-dehydroTXB2量のみが高値を示す群、両方とも変化しない群の4群に分けられることが判明した。

引き続き、システイニルLT並びにTXA2産生抑制作用を持たないLT受容体拮抗薬の服用に伴うこれらエイコサノイドの変動を検討した結果、LTE4あるいは11-dehydroTXB2量の変動する患者も存在することから、これら尿中エイコサノイドの変動が気道炎症の程度を評価するマーカーとして有用なことが判明した。

以上、本論文は、尿中エイコサノイドが小児気管支喘息の診断指標として有用なことを初めて明らかにし、個別化医療への適用の可能性を示したものであり、博士（医療薬学）の学位論文として合格と認める。