

博士論文

脳梗塞患者におけるシロスタゾールの体内動態および  
心血管系副作用に影響する因子の探索

Exploration of factors influencing pharmacokinetics and cardiovascular side  
effects of cilostazol in patients with cerebral infarction

本論文は静岡県立大学大学院薬食生命科学総合学府博士論文である

2021年9月

(September 2021)

静岡県立大学大学院 薬食生命科学総合学府 博士課程 薬学専攻

臨床薬剤学講座

横山 匡

Tasuku Yokoyama

## 略語

ADP	Adenosine diphosphate
ALB	Albumin
ALT	Alanine aminotransferase
AST	Aspartate aminotransferase
AUC	Area under the plasma concentration-time curve
ARB	Angiotensin 2 receptor blocker
BMI	Body mass index
BUN	Blood urea nitrogen
bpm	Beats per minute
CAD	Collision gas
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
C/D	Concentration per dose
CLZ	Cilostazol
CUR	Curtain gas
CYP	Cytochrome P450
CV	Coefficient of variation
DBP	Diastolic blood pressure
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTPs	Deoxyribonucleotide triphosphate
EDTA-2K	Ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid, dipotassium salt, dihydrate
eGFR	Estimated glomerular filtration rate
FDA	Food and Drug Administration
GS1	Ion source gas 1

GS2	Ion source gas 2
IS	Internal standard
IS Voltage	Ion spray voltage
LC-MS/MS	Liquid chromatography-tandem mass spectrometry
MRM	Multiple reaction monitoring
PCR	Polymerase chain reaction
PDE3	Phosphodiesterase 3
PMDA	Pharmaceuticals and Medical Devices Agency
PPIs	Proton pump inhibitors
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
RNase	Ribonuclease
SD	Standard deviation
SBP	Systolic blood pressure
Scr	Serum creatinine
T-Bil	Total bilirubin
TEM	Temperature
TP	Total protein

## 目次

序論 .....	1
第1章 脳梗塞患者における CLZ の体内動態の変動に対する代謝酵素の遺伝子多型および患者背景因子の影響 .....	6
第1節 緒言 .....	6
第2節 方法 .....	8
1-2-1 使用した試薬、器具 .....	8
1-2-2 対象患者と背景調査 .....	10
1-2-3 CLZ および代謝物の血漿中濃度の測定 .....	11
1-2-4 ゲノム DNA の抽出 .....	15
1-2-5 CYP2C19 遺伝子多型解析と対象患者の分類 .....	15
1-2-6 CYP3A5 遺伝子多型解析と対象患者の分類 .....	18
1-2-7 統計解析 .....	19
第3節 結果 .....	20
1-3-1 LC-MS/MS 測定法による CLZ および代謝物の検量線 .....	20
1-3-2 LC-MS/MS 測定法の CLZ および代謝物の精度および真度 .....	21
1-3-3 患者背景 .....	23
1-3-4 全対象患者の血漿中濃度、代謝物と CLZ との濃度比 .....	25
1-3-5 代謝酵素の遺伝子多型と血漿中濃度との関連 .....	27
1-3-6 CYP2C19 阻害薬併用患者における、代謝酵素の遺伝子多型と血漿中濃度との関連 .....	30
1-3-7 血漿中濃度と血液検査結果との関連 .....	34
第4節 考察 .....	40

第2章 脳梗塞患者における CLZ の心血管系副作用と体内動態、代謝酵素の遺伝子多型との関連性 .....	43
第1節 緒言 .....	43
第2節 方法 .....	44
2-2-1 対象患者と背景調査.....	44
2-2-2 CLZ および代謝物の血漿中濃度測定と解析方法 .....	44
2-2-3 ゲノム DNA の抽出、CYP2C19 および CYP3A5 の遺伝子多型解析、対象患者の分類 .....	44
2-2-4 血圧および脈拍の測定 .....	44
2-2-5 統計解析 .....	45
第3節 結果 .....	46
2-3-1 患者背景.....	46
2-3-2 CLZ 導入後の血圧および脈拍の変動 .....	46
2-3-3 CLZ および代謝物の血漿中濃度と血圧、脈拍の変動との関連性 .....	49
2-3-4 遺伝子多型の血圧および脈拍の変動に対する影響 .....	54
2-3-5 脈拍の変動と血液検査結果との関連 .....	54
2-3-6 脈拍の変動と CLZ 治療開始時の脈拍との関連 .....	58
2-3-7 脈拍の変動に影響する要因.....	59
第4節 考察 .....	62
総括 .....	65
謝辞 .....	67
参考文献 .....	68

## 序論

脳血管疾患の死亡率は近年、その治療薬や手術技術の向上により低下傾向であるが、依然として我が国の死因順位では悪性新生物、心疾患および老衰に次ぐ第4位を占めており、そのうちの約55%が脳梗塞による<sup>1)</sup>。脳梗塞は、「心原性脳塞栓症」と、「アテローム血栓症」や「ラクナ梗塞」を含む「非心原性脳塞栓症」に大別され、それらの発症機序は異なる。「心原性脳塞栓症」は心房細動等の心疾患が、「アテローム血栓性」は動脈硬化によるプラークが、「ラクナ梗塞」は細動脈硬化が原因となる。本邦において1999～2000年に実施された登録調査では、脳梗塞の病態別の発症率は、アテローム血栓性33.3%、心原性脳塞栓症21.8%、ラクナ梗塞38.8%で、2000～2007年の調査結果ではそれぞれ、33.9%、27.0%、31.9%であり、アテローム血栓性および心原性脳塞栓症の割合が増加していることが示されている<sup>2)</sup>。脳梗塞の急性期では、症状改善を目的として遺伝子組み換え組織プラスミノゲン・アクティベータ投与による血栓溶解療法や血管内治療（機械的血栓回収療法）推奨されている<sup>3)</sup>。急性期以降では再発予防を目的として一般的に「心原性脳塞栓症」は抗凝固薬、「非心原性脳塞栓症」は抗血小板薬による薬物療法が勧められている<sup>3)</sup>。脳梗塞の一般的な症状として、四肢麻痺や構音障害等が挙げられるが、心原性脳塞栓症では、これらの症状が重度となる場合が多い<sup>3)</sup>。一方、アテローム血栓性では、これらの症状が軽度で発症するが、入院後より徐々に症状が増悪する場合があります、発症早期より適切な抗血小板薬の投与が必要とされる<sup>4)</sup>。また脳梗塞の10年以内の再発率は、心原性脳塞栓症では75.2%、アテローム血栓性では46.9%、ラクナ梗塞では46.8%となっている<sup>5)</sup>。したがって脳梗塞発症後の抗血小板薬や抗凝固薬等の薬物療法が二次予防において重要とされている。

シロスタゾール (CLZ)は、血小板における cAMP を分解するホスホジエステラーゼ 3A (PDE3)を選択的に阻害する<sup>6)</sup>。細胞内における cAMP 濃度の上昇により、シクロオ

キシゲナーゼやホスホリパーゼは抑制され、トロンボキサン A2 の産生が減少し、血小板凝集が阻害される<sup>7)</sup>。これにより血小板における ADP やコラーゲン、アラキドン酸、アドレナリン、トロンビンによる凝集が抑制される<sup>8)</sup>。血管平滑筋細胞に存在する PDE3 も選択的に阻害され血管平滑筋の弛緩を惹起することで血管拡張作用を示す<sup>6)</sup>。これらの作用により当初、慢性動脈閉塞症患者における虚血性諸症状に対する有効性が認められていたが<sup>9)</sup>、その後、非心原性脳梗塞の再発抑制効果が報告された<sup>10)</sup>。また脳梗塞 2 次予防における標準薬のアスピリンと有効性や安全性を比較したランダム比較試験に関するメタアナリシス<sup>11)</sup>では、CLZ 群はアスピリン群と比較して、脳卒中、心筋梗塞、心血管系関連死を含む心血管系イベントのリスクが有意に低かったことが示された。全脳卒中の発症リスクも CLZ 群で有意に低く、同様に出血性脳卒中に関しても有用性が認められている<sup>11)</sup>。一方で、CLZ 群において頻脈・動悸、頭痛の副作用の出現頻度がそれぞれ 6.54%、9.49%、21.3%と報告されている<sup>11)</sup>。これらの心血管系に対する副作用は、血管拡張作用および陽性変力作用に基づくと考えられ<sup>12)</sup>、一般的に一過性で軽微の症状ではあるが、CLZ を中止せざるを得ない症例も見受けられる<sup>13)</sup>。また脳梗塞再発抑制効果を検討した臨床試験において、CLZ 服用群のうち脈拍数の有意な上昇とともに狭心症を発症した症例が認められ<sup>10)</sup>、CLZ を成分とするプレタール®の添付文書上においても警告が示されている<sup>14)</sup>。以上より、CLZ の安全性を考慮した投与法を検討する上で、これらの心血管系副作用の管理は重要と考えられる。

CLZ の体内動態に関して、末梢動脈閉塞性疾患の患者における検討では、CLZ 服用後、腸管より速やかに吸収され、約 3 時間後に最高血中濃度に達し、主に肝臓で代謝を受けた後、腎および胆汁を介して排泄される<sup>15)</sup>。半減期は約 11 時間で、4 日間以内に定常状態に達する<sup>15)</sup>。CLZ の体内動態パラメータの個体間変動は大きく、その変動係数は 40-60%と報告されている<sup>15)</sup>。CLZ の蛋白結合率は 95%以上で<sup>16)</sup>、健常人における検討では、男性被験者において加齢に伴って CLZ の遊離型分画が上昇する傾向が報

告されている<sup>17)</sup>。ただし CLZ の体内動態は性別や年齢による影響は受けにくいとされている<sup>17)</sup>。一方、CLZ の体内動態に影響する因子としては腎機能障害<sup>18)</sup>や食事摂取<sup>19)</sup>、併用薬<sup>12)</sup>が挙げられるが、これらの要因に加え、肝臓における代謝酵素も関連していると推察されている。CLZ の代謝には複数のシトクロム P450 (CYP) の分子種が関与しているが、主に CYP3A4 により dehydrocilostazol (OPC-13015) に、CYP3A5 および CYP2C19 により monohydroxcilostazol (OPC-13213) に代謝される<sup>20,21)</sup> (Figure)。OPC-13015 および OPC-13213 の抗血小板効果は CLZ と比較して、それぞれ約 3 倍および約 1/3 倍とされている<sup>22)</sup>。

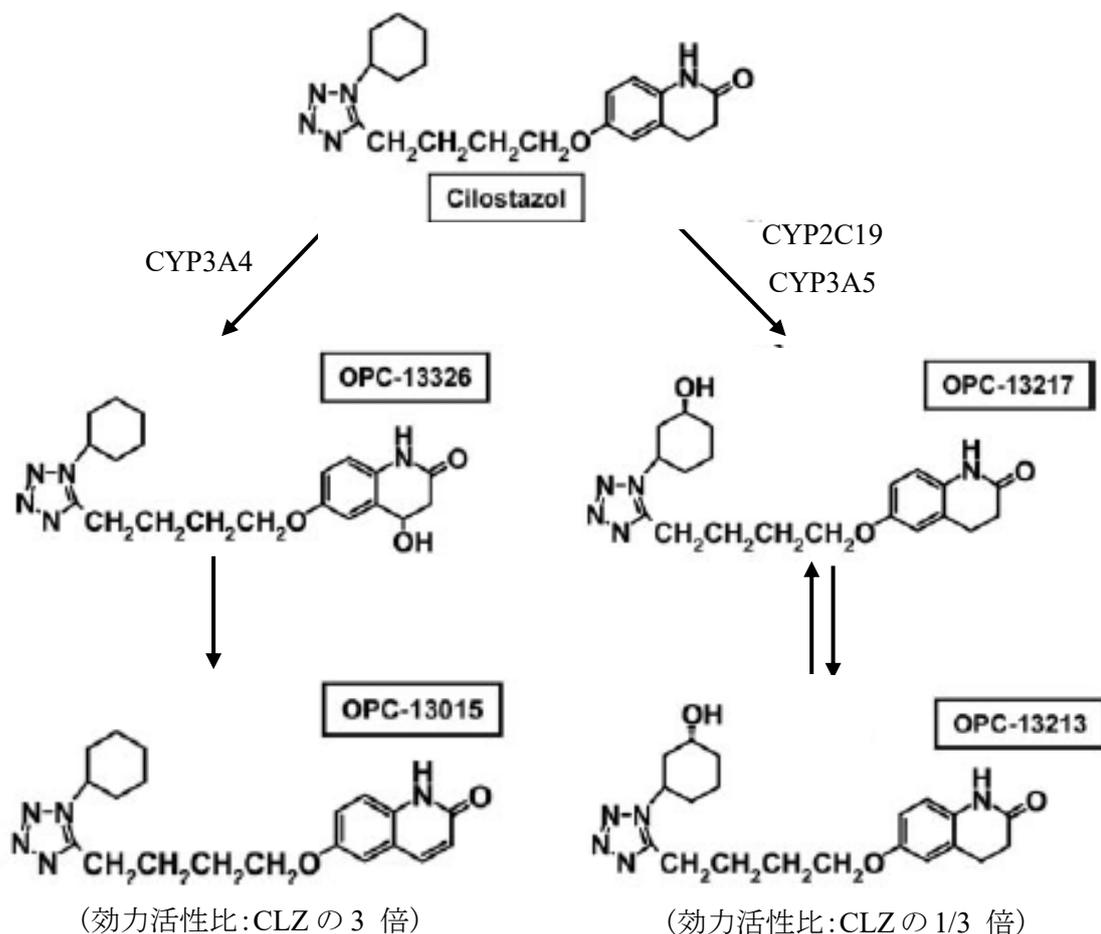


Figure Metabolic pathway of cilostazol

Abbreviation: OPC-13015, dehydrocilostazol; OPC-13213, monohydroxcilostazol; OPC-13217, 4-cis-hydroxycilostazol; OPC-13326, 4-hydroxycilostazol.

CYP の分子種のうち、CYP2C19 や CYP2D6、CYP2C9、CYP3A5 等には臨床上意義のある遺伝子多型が存在する。この遺伝子多型により薬物投与後の体内動態への影響や薬効、薬物有害反応発現に個人差が生じる。CYP2C19\*2 は exon 5 の 681 番目の塩基のグアニン (G)がアデニン (A)に変異することによりスプライシング欠損を引き起こし<sup>23)</sup>、また CYP2C19\*3 は exon 4 の 636 番目の塩基の G が A に変異することにより未熟停止コドンを形成する<sup>24)</sup>。日本人における CYP2C19\*2 および CYP2C19\*3 のアレル頻度は、それぞれ 34.5%、9.0%であり、コーカシアンでは、それぞれ 13.6%、0%と報告されている<sup>25)</sup>。このように CYP2C19\*2 は比較的、さまざまな人種に共通している遺伝子変異であるのに対し、CYP2C19\*3 は日本人をはじめとした東洋人に共通して高頻度に存在する変異遺伝子とされている。プロトンポンプ阻害薬 (PPIs)の多くは CYP2C19 により代謝を受ける。オメプラゾールを CYP2C19 の活性が欠損している poor metabolizer に投与した場合、extensive metabolizer と比較して血中濃度は約 15 倍高値となり<sup>26)</sup>、またピロリ菌の除菌率は poor metabolizer では約 100%であるのに対して、extensive metabolizer では 30%以下であることが示されており<sup>27)</sup>、オメプラゾールの血中濃度、効果発現に CYP2C19 の遺伝子多型が影響を及ぼす。CYP3A5\*3 は intron 3 の 6986 番目の A が G に変異することによりスプライシング部位の変異をもたらし CYP3A5 蛋白を欠損させる<sup>28)</sup>。CYP3A5\*3 のアレル頻度に関しては、日本人では 78.0%であるのに対し、コーカシアンでは 95.5%とされており、その頻度に人種差がある<sup>25)</sup>。免疫抑制剤のタクロリムスは CYP3A5 により代謝を受ける。腎移植患者において、酵素活性が低下している CYP3A5\*3/\*3 群ではタクロリムスの AUC が CYP3A5\*1 保有群と比較して有意に高く<sup>29)</sup>、また肝移植患者においても同様の結果が報告されている<sup>30)</sup>。認知症治療薬のドネペジルは、主に CYP2D6 および CYP3A4/5 で代謝されるが、認知症患者において CYP3A5 の遺伝子多型がドネペジルの薬物動態に影響することが示されている<sup>31)</sup>。

これらの CYP2C19 および CYP3A5 の遺伝子多型により CLZ の体内動態が影響を受け

ることが健常人における検討で報告されている<sup>32-34</sup>)。しかし、脳梗塞患者における体内動態は血漿タンパク濃度低下や高齢による腎機能低下があり、健常人と異なることが予測され、脳梗塞患者においてこれらの遺伝子多型の影響を検討する必要がある。

CLZ の薬力学的特性に関して、脳梗塞患者における検討では、アデノシン二リン酸 (ADP)やコラーゲン、アドレナリン、アラキドン酸等の凝集惹起物質による血小板凝集が CLZ 服用により抑制されることが示されている<sup>35</sup>)。同様に血管拡張作用に関して脳梗塞患者において、CLZ 投与 3 ヶ月後の脳血流増加が報告されている<sup>36</sup>)。これらの薬力学的特性と薬物動態学的特性を組み合わせた検討では、健常人において血漿中濃度と抗血小板作用との関連性を示した報告<sup>37</sup>)や心臓手術後の患者において ADP およびコラーゲンによる血小板凝集が CLZ の血漿中濃度依存的に抑制されたという報告<sup>38</sup>)がある。また、アテローム血栓症の患者において、CLZ 中止後に CLZ の血漿中濃度の低下に伴い血小板凝集能の回復が認められた報告<sup>39</sup>)があり、これらの報告のように CLZ の血漿中濃度は抗血小板作用の代替の指標になることが示されている。一方、CLZ の代謝物を含めた体内動態や代謝酵素の遺伝子多型と心血管系作用との関連性は報告されていない。Woo 等は、CLZ の心血管系作用 (血圧・脈拍の変動)と血漿中濃度との関連性を報告している<sup>37</sup>)が、CLZ の活性代謝物の影響を検討しておらず、また健常人における検討であるため、実臨床に反映させるためには脳梗塞患者における検討が必要と考えられる。

以上より、本研究では脳梗塞患者における CLZ の体内動態の変動および心血管系副作用発現に関する因子を明らかにすることを目的とし、第一章では CLZ の代謝物を含めた体内動態に対する *CYP3A5* および *CYP2C19* の遺伝子多型および患者背景因子の影響を検討し、第二章では血圧、脈拍の変動に対する CLZ および代謝物の血漿中濃度の影響を検討し、心血管系副作用を薬物動態学的因子で説明することを試みた。

## 第1章 脳梗塞患者における CLZ の体内動態の変動に対する代謝酵素の遺伝子多型および患者背景因子の影響

### 第1節 緒言

CLZ の体内動態の個体間変動は大きく、健常人における薬物動態パラメータの変動係数は約 40-60 %と報告されている<sup>15)</sup>。CLZ は腸管内において吸収されるが<sup>15)</sup>、小腸内の CYP による吸収時の代謝は明らかになっていない。一方、CLZ の大部分は肝臓において代謝を受けることが示されているが、この肝臓における代謝酵素が薬物動態パラメータの変動係数に関連していると推察されている。CLZ は主に、CYP3A4 により dehydrocilostazol (OPC-13015)に、CYP3A5 および CYP2C19 により monohydroxy-cilostazol (OPC-13213)に代謝される<sup>20,21)</sup>。健常人において OPC-13015 および OPC-13213 と CLZ との AUC 比はそれぞれ 19 %、13 %と示されており<sup>34)</sup>、CYP3A4 および CYP3A5/CYP2C19 によるそれぞれの代謝経路は CLZ の代謝において同程度の影響を与えると推察される。一方、CYP2C19 の遺伝子多型により OPC-13015 および OPC-13213 の AUC は影響を受けることが報告されており<sup>34)</sup>、代謝酵素の遺伝子多型が CLZ の体内動態の個体間変動に関連しているとされている。また、CLZ の蛋白結合率は 95 %以上で<sup>16)</sup>、虚血性脳卒中患者の約半数に低アルブミン血症が認められたという報告があり<sup>40)</sup>、脳梗塞発症患者における CLZ の体内動態は、蛋白結合の点において健常人と相違があることが予測される。さらに慢性腎不全が脳卒中発症の危険因子であるため<sup>41,42)</sup>、健常人と比較して脳梗塞患者では腎機能低下に伴い CLZ の血漿中分布が異なっている可能性がある。

そこで本章では脳梗塞患者において、CLZ の体内動態の変動に対する遺伝的要因や患者背景因子の影響を明らかにすることを目的とし、CLZ および代謝物の血漿中濃度

と *CYP2C19* および *CYP3A5* の遺伝子多型や腎機能、アルブミン等の患者背景因子との関連性を検討した。

## 第2節 方法

### 1-2-1 使用した試薬、器具

CLZ の測定には以下の試薬、器具を使用した。

CLZ (Toronto Research Chemicals Inc, Ontario, Canada)

OPC-13015 (Toronto Research Chemicals Inc, Ontario, Canada)

OPC-13213 (Toronto Research Chemicals Inc, Ontario, Canada)

CLZ-d11 (Toronto Research Chemicals Inc, Ontario, Canada)

Acetonitrile (LC/MS 用) (Fujifilm Wako Chemicals, Osaka, Japan)

Methanol (LC/MS 用) (Fujifilm Wako Chemicals, Osaka, Japan)

Formic acid (99%) (LC/MS 用) (Fujifilm Wako Chemicals, Osaka, Japan)

Ammonium formate (特級) (Fujifilm Wako Chemicals, Osaka, Japan)

L-コンセーラ® IEX 「ニッスイ」 (Nissui, Pharmaceutical, Tokyo, Japan)

Oasis®HLB 1 mL (30mg) Extraction Cartridges (Waters, Milford, MA, USA)

遠心エバポレーター CVE-200D 型 (Eyela, Tokyo, Japan)

CLZ の測定には以下の機器を使用した。

LC 装置 Prominence 20A (Shimadzu, Kyoto, Japan)

Pump: LC-20AD

Auto Sampler: SIL-20AC

Column oven: CTO-20A

Column Mightysil RP-18 MS (2.0 mm × 150 mm; Kanto Chemical, Tokyo, Japan)

MS 装置 API3200 Qtrap (SCIEX, Framingham, MA, USA)

DNA の抽出には以下の試薬、器具を使用した。

AMITEST EX-R&D (Medical & Biological Laboratories, Aichi, Japan)

RCLB (Medical & Biological Laboratories, Aichi, Japan)

イソプロパノール 試薬特級 (Fujifilm Wako Chemicals, Osaka, Japan)

99.5 % エタノール試薬特級 (Fujifilm Wako Chemicals, Osaka, Japan)

超純水 (Fujifilm Wako Chemicals, Osaka, Japan)

PCR-RFLP 法には以下の試薬、器具を使用した。

RNase-free water (Takara, Tokyo, Japan)

10×PCR Gold buffer contains no  $MgCl_2$  (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA)

Gene Amp dNTP mix (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA)

$MgCl_2$  solution (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA)

Ampli Taq Gold (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA)

Msp I (Nippon Gene, Tokyo, Japan)

10×M buffer (Nippon Gene, Tokyo, Japan)

Bam HI (Nippon Gene, Tokyo, Japan)

10×B buffer (Nippon Gene, Tokyo, Japan)

電気泳動には以下の試薬、機器を使用した。

MetaPhor<sup>TM</sup> アガロース (Lonza Japan, Tokyo, Japan)

Tris-Borate-EDTA buffer 10×powder pH8.3 (Takara, Tokyo, Japan)

20bp DNA Ladder (Takara, Tokyo, Japan)

6×Loading buffer (Takara, Tokyo, Japan)

10×Loading buffer (Takara, Tokyo, Japan)

Ethidium bromide (Takara, Tokyo, Japan)

E-graph AE-9000 (ATTO, Tokyo, Japan)

Real-time PCR 法には以下の試薬、機器を使用した。

RNase-free water (Takara, Tokyo, Japan)

20×TaqMan™ Genotyping Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA)

2×TaqMan™ Drug Metabolism Genotyping Assay (Applied Biosystems, CA, USA)

Applied Biosystems™ 7500 Real Time PCR system (Applied Biosystems, CA, USA)

#### 1-2-2 対象患者と背景調査

2018年12月から2020年5月までに島田市立総合医療センター脳神経外科において脳梗塞の診断にて入院し、CLZ（プレタール®OD錠, Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan)を服用し、研究内容についての説明を受けた後、文書にて同意が得られた患者30名を対象とした。患者背景のうち、年齢や性別、体重、CLZ投与量(mg/day)、併用薬、CLZ治療開始時の血液検査結果を電子カルテにおいて調査した。なお、除外基準は以下とした。

- 1) 他のPDE阻害薬を使用している患者
- 2) 重度の腎機能障害 (推算糸球体濾過量; eGFR < 30 mL/min/1.73 m<sup>2</sup>)を有している患者
- 3) T-Bil > 2 mg/dL の患者

また、低アルブミン血症を ALB ≤ 3.5 g/dL、腎機能障害を eGFR ≤ 60ml/min/1.73 m<sup>2</sup> とした。

本研究は島田市立総合医療センターおよび静岡県立大学の研究倫理審査委員会の承認を得て実施した。また、最新のヘルシンキ宣言（2013年10月、フォルタレザ、ブラジル）に従うとともに、「臨床研究法」（2018年4月1日施行）、「人を対象とする医学研究に関する倫理指針」（2017年2月28日一部改正版）、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」（2017年2月28日一部改正版）および「市立島田市民病院の倫理委員会手順書」、「静岡県立大学研究倫理規程」を遵守し実施した。

### 1-2-3 CLZ および代謝物の血漿中濃度の測定

CLZ および代謝物の血漿中濃度を、既報<sup>43,44)</sup>を一部変更した高速液体クロマトグラフタンデム型質量分析計 (LC-MS/MS)にて測定した。血液検体は、健常人での平均消失半減期 (11 時間)から定常状態に達するとされている、導入後 4 日目以降に採取した。夕食時の CLZ 服用後 12 時間経過した時点の血液を EDTA-2K 真空採血管にて 5mL 採取した。検体採取後、ただちに遠心分離 (1,670 ×g)を 15 分間行い、血漿と血球を分離した。得られた血漿を Figure 1-1 で示した Oasis<sup>®</sup> HLB cartridge (1mL/30mg)を用いた固相抽出により処理した。

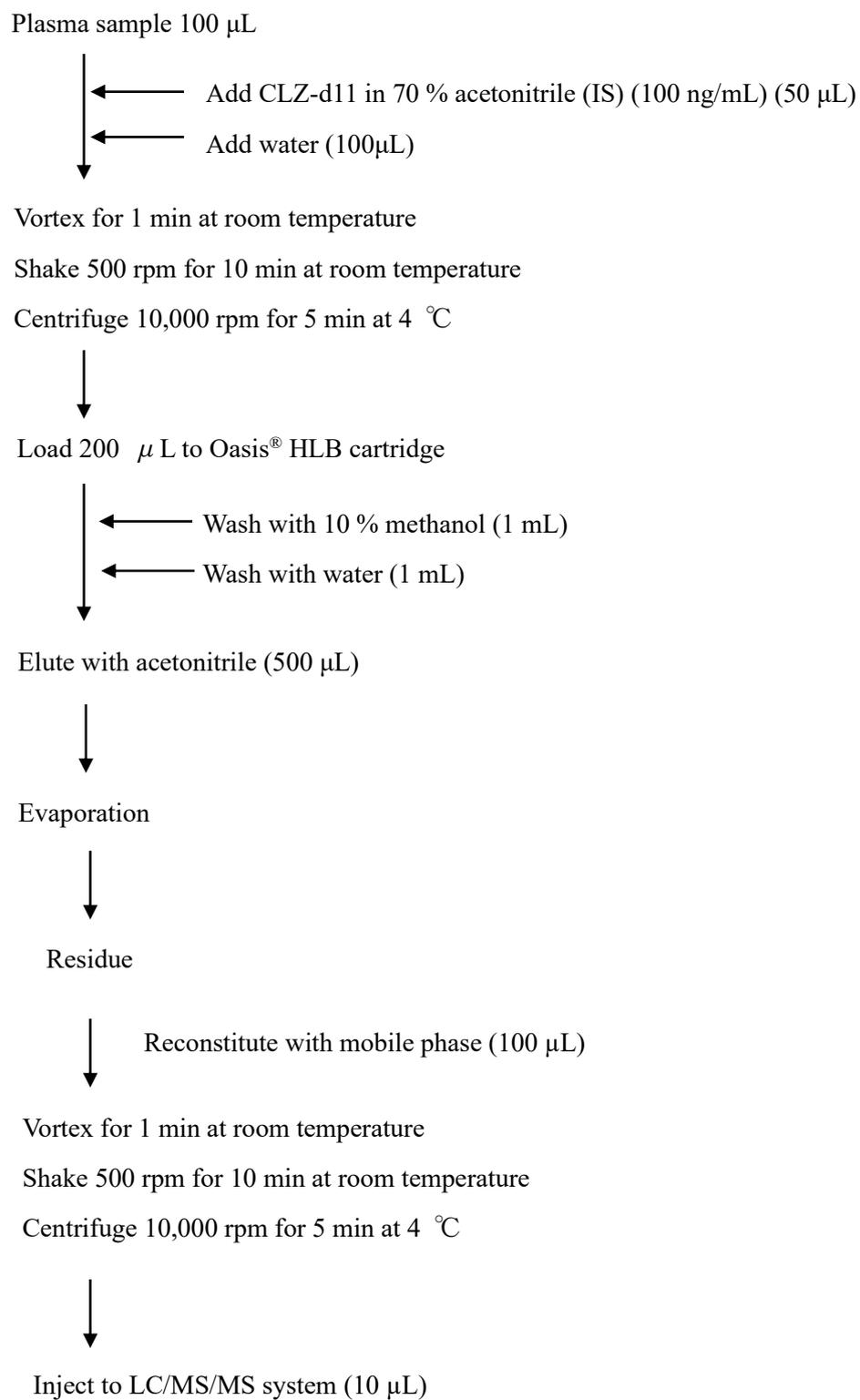


Figure 1-1 Extraction procedure

Table 1-1 に LC 条件、Table 1-2 に LC の gradient program、Table 1-3 に MS 条件、Figure 1-2 に各成分の化学構造とフラグメントイオンを示した。

Table 1-1 LC instrument and conditions

Column	Mightysil RP-18 MS (2.0 mm×150 mm, 5 μm) (Kanto Chemical, Tokyo)
Column temperature	40 °C
Mobile phase	A: Acetonitrile/2 mM ammonium formate-0.1 % formic acid (10:90, v/v) B: Acetonitrile/2 mM ammonium formate-0.1 % formic acid (90:10, v/v)
Flow rate	0.2 mL/min
Inject volume	10 μL
Internal standard	Cilostazol d-11

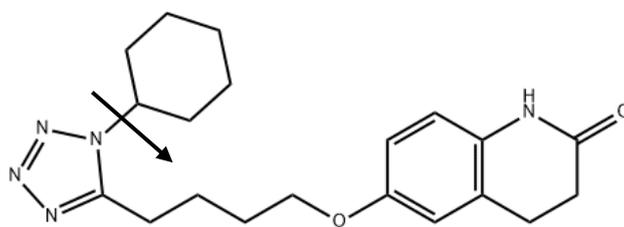
Table 1-2 LC gradient program

Time (min)	% mobile phase B
0	30
1.0	30
2.0	60
7.5	60
7.5	30
15.0	30

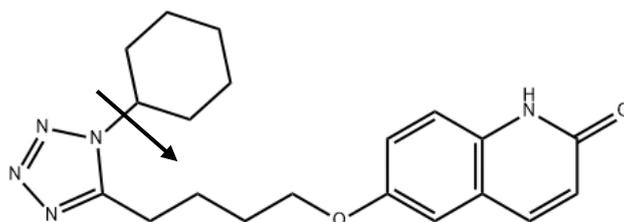
Table 1-3 MS instrument and conditions

Mass spectrometer	API3200 QTRAP (SCIEX, Framingham, MA)
Scan Type	Multiple reaction monitoring (MRM)
Ionization mode	Positive
Ion Source	Turbo Spray
TEM (°C)	500
IS Voltage (V)	5500
CUR (psi)	15
CAD (psi)	6
GS1 (psi)	50
GS2 (psi)	80

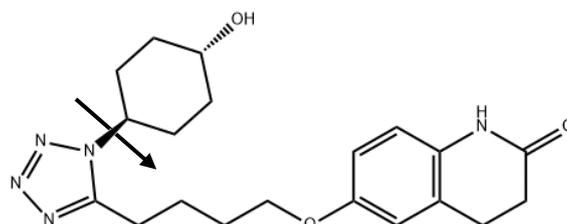
(A) CLZ



(B) OPC-13015



(C) OPC-13213



Compound	Precursor Ion (m/z)	Product Ion (m/z)
CLZ	370.2	288.3
OPC-13015	368.2	286.3
OPC-13213	386.2	288.2

Figure 1-2 Tandem mass spectra and fragmentation patterns of the analytes.

#### 1-2-4 ゲノム DNA の抽出

血漿中濃度測定時に血液サンプルより得られた血球分画を用いた。ゲノム DNA をスマイテスト EX-R&D (Medical & Biological Laboratories, Aichi)を用いて末梢血白血球より抽出した。

#### 1-2-5 CYP2C19 遺伝子多型解析と対象患者の分類

CYP2C19 遺伝子多型は、既報<sup>23,45)</sup>を一部変更した PCR - Restriction fragment length polymorphism (RFLP) 法にて解析した。

PCR 反応液は RNase-free water 12.6  $\mu$ L、10 $\times$ PCR buffer 5  $\mu$ L、dNTPs (2 mM) 5 $\mu$ L、MgCl<sub>2</sub> (25 mM) 3  $\mu$ L、各 primer (10  $\mu$ M) 2  $\mu$ L および Taq polymerase (5 U/ $\mu$ L) 0.4  $\mu$ L に対して、DNA 抽出液 20  $\mu$ L を混合し全量を 50  $\mu$ L とした。制限酵素、primer および PCR 条件を Table 1-4 および 1-5 に示した。

Table 1-4 Restriction enzyme and primer in PCR for *CYP2C19* genotyping

Allele	Restriction enzyme	Primer	Sequence
*2	<i>Msp I</i>	Forward	5'-AATTACAACCAGAGCTTGGC-3'
		Reverse	5'-TATCACTTTCCATAAAAGCAAG-3'
*3	<i>Bam HI</i>	Forward	5'-AACATCAGGATTGTAAGCAC-3'
		Reverse	5'-TCAGGGCTTGGTCAATATAG-3'

Table 1-5 PCR condition for *CYP2C19* genotyping

Initial denaturation	Denaturation	Annealing	Extension	Final Extension
94 °C for 1 min	94 °C for 1 min (35 cycles)	57 °C for 1 min (35 cycles)	72 °C for 2 min (35 cycles)	72 °C for 5 min

得られた PCR 産物と Table 1-6 で組成を示した RFLP 反応液を混合し、37 °C、4 時間インキュベートした。反応液に対して loading buffer 10 µL を添加し、全量 25 µL のうち 10 µL を 3 %アガロースゲルにアプライし 100 V、40 分間電気泳動を行った。その後、ethidium bromide で DNA を染色し紫外線照射器 (E-graph AE-9000, ATTO, Tokyo, Japan) でゲルを観察した。

Table 1-6 Composition for reaction solution in RFLP

Allele	PCR production	RNase- free water	10 × M Buffer	10 × B Buffer	<i>Msp I</i>	<i>Bam HI</i>
*2	10 μL	2.5 μL	1.5 μL		1 μL	
*3	10 μL	2.5 μL		1.5 μL		1 μL

対象患者を遺伝子変異 (\*1, \*2, \*3)に基づき、\*1 保有群 (\*1/\*1, \*1/\*2, \*1/\*3)および\*1 非保有群 (\*2/\*2, \*2/\*3, \*3/\*3)の 2 群に分類した。

#### 1-2-6 CYP3A5 遺伝子多型解析と対象患者の分類

CYP3A5 の遺伝子多型は、既報の TaqMan<sup>®</sup> genotyping assay (Applied Biosystems, CA, USA)を用いた real-time PCR 法<sup>31)</sup>を一部変更して解析した。

DNA サンプルは、20 ng/well となるように RNase-free water を用いて希釈調製した。反応液は TaqMan<sup>™</sup> Genotyping Master Mix 12.5 μL、TaqMan<sup>™</sup> Drug Metabolism Genotyping Assay (TaqMan probe assay ID:C\_26201809\_30) 1.25 μL を混合して調製した。調製した DNA サンプル 11.25 μL、反応液 13.75 μL を混合し、Applied Biosystems<sup>™</sup> 7500 Real Time PCR system にて PCR、解析を実施した。サーマルサイクリング条件を Table 1-7 に示した。

Table 1-7 PCR condition for CYP3A5 genotyping

AmpliTaq Gold Enzyme Activation	PCR (50 cycles)	
Hold	Denature	Anneal/Extend
10 min at 95 °C	15 sec at 92 °C	90 sec at 60 °C

対象患者を、遺伝子変異 (\*1, \*3)に基づき、\*1 保有群および\*1 非保有群の 2 群に分類した。

### 1-2-7 統計解析

CLZ および代謝物の血漿中濃度は、体重補正投与量 (mg/kg) との比 (C/D 比) を算出して評価した。血漿中濃度に対する *CYP2C19* および *CYP3A5* の遺伝子多型それぞれによる影響を、Mann-Whitney の U 検定を用いて検討を行った。LC-MS/MS 測定法による CLZ および代謝物の検量線における相関係数は Pearson の相関検定を用いて検討した。

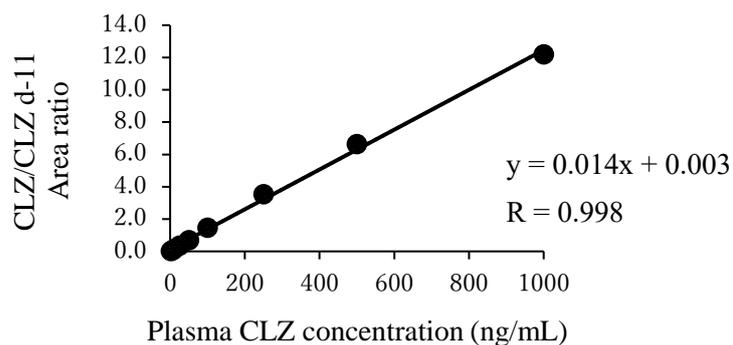
すべての数値を中央値および四分位範囲により示した。これらの統計解析は EZR<sup>52)</sup> を用いて実施した。  $P < 0.05$  を統計学的に有意とした。

### 第3節 結果

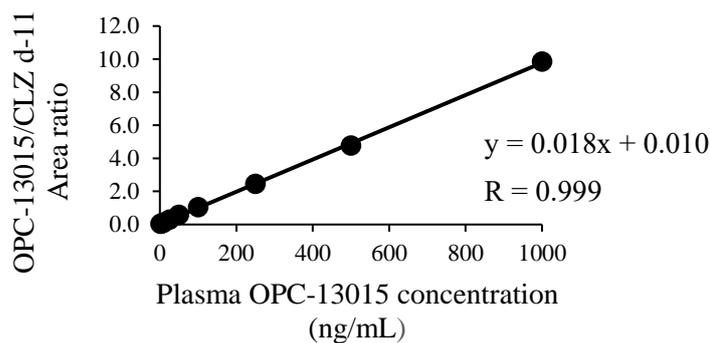
#### 1-3-1 LC-MS/MS 測定法による CLZ および代謝物の検量線

LC-MS/MS 測定法による CLZ、OPC-13015 および OPC-13213 の検量線を Figure 1-3 に示した。各検量線は 5-1000 ng/mL の範囲で良好な直線性を示した。検量線の相関係数は CLZ で  $R > 0.998$ 、OPC-13015 で  $R > 0.999$ 、OPC-13213 で  $R > 0.998$  であった。

(A) CLZ



(B) OPC-13015



(C) OPC-13213

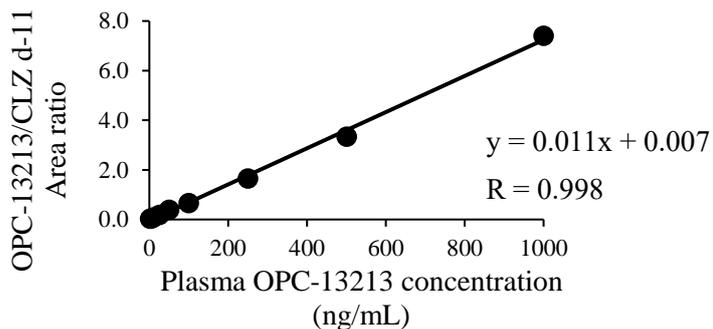


Figure 1-3 Calibration curves of cilostazol and its metabolites.

The linear regression was determined using Pearson's correlation analysis.

Abbreviations: R, correlation coefficient; CLZ, cilostazol; OPC-13015, dehydrocilostazol;

OPC-13213, monohydroxycilostazol.

### 1-3-2 LC-MS/MS 測定法の CLZ および代謝物の精度および真度

LC-MS/MS 測定法における CLZ および代謝物の精度および真度を Table 1-8 に示した。精度の分析単位内および分析単位間変動は CLZ が 98.4-110.4 %、OPC-13015 が 92.8-105.7 %、OPC-13213 が 99.7-104.6 %であった。真度の分析単位内および分析単位間変動は CLZ が 0.3-16.1 %、OPC-13015 が 0.2-12.6 %、OPC-13213 が 0.3-12.7 %であった。本 LC-MS/MS 測定法で得られた精度および真度は、医薬品医療機器総合機構 (PMDA) および米国食品医薬品局 (FDA) のガイドライン<sup>46,47)</sup>に適合していた。

Table 1-8 Intra- and inter-assay precisions and accuracies of cilostazol and its metabolites in human plasma

Sample	Theoretical	Intra-assay (n = 5)			Inter-assay (n = 3)		
Analytes	Value (ng/mL)	Mean $\pm$ SD	Accuracy (%)	CV (%)	Mean $\pm$ SD	Accuracy (%)	CV (%)
CLZ	10	10.1 $\pm$ 1.6	100.8	16.1	10.5 $\pm$ 1.1	104.5	10.6
	25	26.4 $\pm$ 2.8	15.8	10.5	27.6 $\pm$ 1.3	110.4	4.6
	400	397 $\pm$ 8.9	99.3	2.2	394 $\pm$ 4.9	98.4	1.3
	750	752 $\pm$ 4.5	100.2	0.6	753 $\pm$ 2.3	100.4	0.3
OPC-13015	10	9.3 $\pm$ 0.74	92.8	8.0	9.8 $\pm$ 0.6	98.0	6.0
	25	24.9 $\pm$ 3.1	99.6	12.6	26.4 $\pm$ 2.0	105.7	7.7
	400	406 $\pm$ 9.5	101.4	2.3	399 $\pm$ 7.5	99.7	1.9
	750	747 $\pm$ 4.9	99.6	0.7	751 $\pm$ 4.0	100.1	0.5
OPC-13213	10	10.1 $\pm$ 1.2	101.0	12.0	10.5 $\pm$ 0.8	104.6	7.3
	25	24.9 $\pm$ 3.2	99.8	12.7	25.1 $\pm$ 2.7	100.4	10.8
	400	400 $\pm$ 8.5	100.0	2.1	399 $\pm$ 4.2	99.7	1.0
	750	750 $\pm$ 4.3	100.0	0.6	751 $\pm$ 2.1	100.1	0.3

### 1-3-3 患者背景

CLZ による治療開始時の患者背景を Table 1-9 に示した。血清アルブミン値の中央値は 4.1 g/dL で、低アルブミン血症が 1 名において認められた。また推算糸球体濾過量の中央値は 75 ml/min/1.73 m<sup>2</sup> で、腎機能低下は 3 名において認められた。

Table 1-9 Demographics of patients at the start of the study.

Characteristics	Number or median (interquartile range)
Number of patients, male/female	30, 22/8
Age (years)	71 (66-80)
Body weight (kg)	60 (49-67)
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	23.3 (20.0-24.9)
Total protein (TP) (g/dL)	6.9 (6.7-7.3)
Serum albumin (ALB) (g/dL)	4.1 (3.9-4.3)
Serum creatinine (Scr) (mg/dL)	0.71 (0.63-0.85)
Estimated glomerular filtration rate (eGFR)	75 (64-85)
Blood urea nitrogen (BUN) (mg/dL)	14.0 (12.4-17.4)
Total bilirubin (T-Bil) (mg/dL)	0.76 (0.52-0.96)
Aspartate aminotransferase (AST) (IU/L)	21 (19-24)
Alanine aminotransferase (ALT) (IU/L)	17 (12-23)
Systolic blood pressure (SBP) (mmHg)	144 (134-164)
Diastolic blood pressure (DBP) (mmHg)	81 (72-90)
Pulse rates (bpm)	75 (66-80)
Concomitant medication, n (%)	
Aspirin	6 (20.0)
Clopidogrel	2 (6.7)
Statin	15 (50.0)
Proton pump inhibitors (PPIs)	25 (83.3)
Lansoprazole	10
Esomeprazole	11
Omeprazole	1
Vonoprazan	3
Antihypertensive	11 (36.7)
Angiotensin 2 receptor blockers (ARB)	2

Calcium blockers	11
Beta-blockers	1

Dates are expressed as the median with interquartile range in parentheses.

*CYP2C19* および *CYP3A5* の Genotype 分布を Table 1-10 に示した。*CYP2C19*\*1 および \*1 非保有患者の割合はそれぞれ 70.0 % および 30.0 % であった。同様に *CYP3A5*\*1 および \*3/\*3 の割合は 43.3 % および 56.7 % であった。これらの genotype 分布は、Hardy-Weinberg 平衡に従っていた。

Table 1-10 Genotypes and allele frequencies for *CYP2C19* and *CYP3A5*

Gene	Polymorphisms	Genotype	Frequency (%)	Allele frequency
<i>CYP2C19</i> *2	681G>A	GG	11 (36.7)	p=0.633
		GA	16 (53.3)	q=0.367
		AA	3 (10.0)	
<i>CYP2C19</i> *3	636G>A	GG	21 (70.0)	p=0.817
		GA	7 (23.3)	q=0.183
		AA	2 (6.7)	
<i>CYP3A5</i> *3	6986A>G	AA	2 (6.7)	p=0.250
		AG	11 (36.7)	q=0.750
		GG	17 (56.7)	

Polymorphisms of *CYP2C19*\*2, \*3 and *CYP3A5*\*3 genes were detected using PCR-RFLP and real-time PCR, respectively. All genotype frequencies were found to be consistent with Hardy-Weinberg equilibrium.

#### 1-3-4 全対象患者の血漿中濃度、代謝物と CLZ との濃度比

Table 1-11 に、全対象患者の CLZ および代謝物の血漿中濃度、代謝物と CLZ との濃度比を、Figure 1-4 に CLZ と各代謝物の血漿中濃度の関連を示した。代謝物 OPC-13015 および OPC-13213 の CLZ に対する濃度比はそれぞれ 37.8% および 13.9% であった。また CLZ と各代謝物の血漿中濃度において有意な正の相関を示した ( $P < 0.001$ )。

Table 1-11 Plasma concentrations of cilostazol and its metabolites in patients with cerebral infarction.

Number of patients	30
CLZ C/D ratio ( $\mu\text{mol/L per mg/kg}$ )	0.711 (0.497-0.984)
OPC-13015 C/D ratio ( $\mu\text{mol/L per mg/kg}$ )	0.270 (0.193-0.341)
OPC-13213 C/D ratio ( $\mu\text{mol/L per mg/kg}$ )	0.091 (0.075-0.120)
OPC13015/CLZ concentration ratio	0.378 (0.317-0.511)
OPC-13213/CLZ concentration ratio	0.139 (0.096-0.167)

Plasma concentrations of cilostazol (CLZ) and its metabolites were evaluated as the predose plasma concentration adjusted with the cilostazol dose per body weight (C/D ratio). Data are expressed as the median with interquartile range in parentheses.

Abbreviations: OPC-13015, dehydrocilostazol; OPC-13213, monohydroxycilostazol.

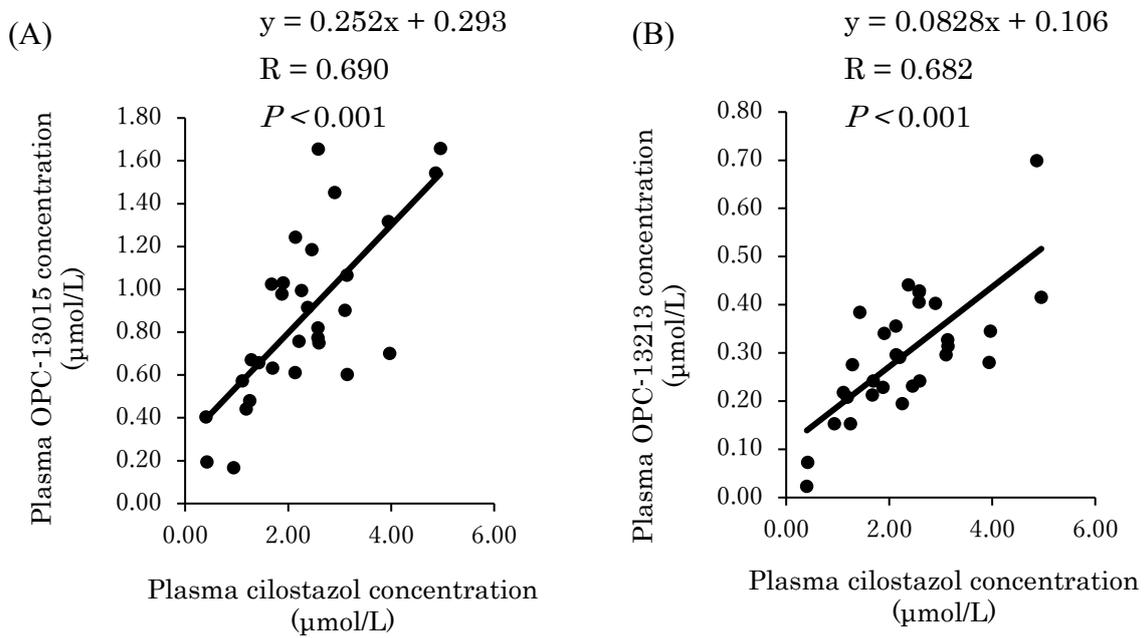


Figure 1-4 Relationships between plasma concentrations of cilostazol and OPC-13015 (A), or OPC-13213 (B) in patients with cerebral infarction.

Correlations between plasma concentrations of cilostazol (CLZ), dehydrocilostazol (OPC-13015), and monohydroxycilostazol (OPC-13213) were tested by Spearman's rank correlation coefficient analysis.

### 1-3-5 代謝酵素の遺伝子多型と血漿中濃度との関連

*CYP2C19* および *CYP3A5* の遺伝子多型と血漿中濃度および代謝物と CLZ の血漿中濃度比との関連を Table 1-12 に示した。

*CYP2C19* の \*1 保有群と \*1 非保有群との間で CLZ および代謝物の血漿中濃度に有意差は認められなかった。また血漿中濃度比に関しても両群間で差はみられなかった。

*CYP3A5*\*1 保有群における OPC-13213 の C/D 比は、\*1 非保有群と比較して高い傾向にあった ( $P=0.082$ )。また血漿中 OPC-13015/CLZ 濃度比は、\*1 保有群において有意に低値を示した ( $P=0.002$ )。

Table 1-12 Influence of *CYP2C19* and *CYP3A5* genotypes on plasma concentrations of cilostazol and its metabolites in patients with cerebral infarction.

	All	<i>CYP2C19</i> genotype			<i>CYP3A5</i> genotype		
		* <i>I</i> carrier	* <i>I</i> non-carrier	<i>P</i>	* <i>I</i> carrier	* <i>I</i> non-carrier	<i>P</i>
Number of patients	30	21	9		13	17	
CLZ C/D ratio ( $\mu\text{mol/L per mg/kg}$ )	0.711 (0.497-0.984)	0.738 (0.558-0.991)	0.491 (0.418-0.736)	0.209	0.736 (0.574-1.12)	0.643 (0.450-0.801)	0.133
OPC-13015 C/D ratio ( $\mu\text{mol/L per mg/kg}$ )	0.270 (0.194-0.342)	0.280 (0.190-0.375)	0.266 (0.218-0.277)	0.603	0.266 (0.190-0.280)	0.283 (0.195-0.367)	0.403
OPC-13213 C/D ratio ( $\mu\text{mol/L per mg/kg}$ )	0.091 (0.075-0.120)	0.092 (0.076-0.118)	0.089 (0.074-0.128)	0.874	0.104 (0.087-0.128)	0.081 (0.056-0.102)	0.0824
OPC-13015/CLZ concentration ratio	0.378 (0.317-0.511)	0.343 (0.317-0.459)	0.515 (0.372-0.612)	0.141	0.318 (0.289-0.343)	0.482 (0.383-0.541)	0.00157
OPC-13213/CLZ concentration ratio	0.139 (0.096-0.167)	0.138 (0.100-0.163)	0.166 (0.093-0.186)	0.469	0.157 (0.095-0.167)	0.138 (0.100-0.166)	0.770

Plasma concentrations of cilostazol (CLZ) and its metabolites were evaluated as the predose plasma concentration adjusted with the CLZ dose per body weight (C/D ratio). Data are expressed as the median with interquartile range in parentheses. The influences of CYP phenotypes on plasma concentrations of CLZ and its metabolites were tested using the Mann-Whitney *U* test (\*  $P < 0.05$ ). *CYP2C19*\**I* carrier and non-carrier mean

carriers having at least one of *CYP2C19*\*1 allele (\*1/\*1, \*1/\*2, and \*1/\*3) and the others (\*2/\*2, \*2/\*3, and \*3/\*3), respectively. *CYP3A5*\*1 carrier and non-carrier mean carriers having *CYP3A5*\*1/\*1 or \*1/\*3, and *CYP3A5*\*3/\*3, respectively.

Abbreviations: OPC-13015, dehydrocilostazol; OPC-13213, monohydroxycilostazol

### 1-3-6 CYP2C19 阻害薬併用患者における、代謝酵素の遺伝子多型と血漿中濃度との関連

全患者のうち、ランソプラゾールやエソメプラゾール、クロピドグレル等の CYP2C19 の活性阻害が報告されている<sup>48,49)</sup>薬剤を併用している患者が 23 名含まれていた (Table 1-9)。そこで、まず併用患者 23 名と非併用患者 7 名との間での、CLZ および代謝物の血漿中濃度、代謝物と CLZ の血漿中濃度比の比較を Table 1-13 に示した。次に併用患者における遺伝子多型と血漿中濃度、血漿中濃度比との関連を Table 1-14 に示した。

CYP2C19 阻害薬併用群と非併用群との間で、CLZ および代謝物の血漿中濃度、血漿中濃度比に差はみられなかった。

CYP2C19 の\*1 保有群と\*1 非保有群との間で CLZ および代謝物の血漿中濃度、血漿中濃度比に関連は認められなかった。

一方、CYP3A5\*1 保有群における CLZ および OPC-13213 の C/D 比は、\*1 非保有群と比較して高い傾向にあり (P=0.060)、また血漿中 OPC-13015/CLZ 濃度比は有意に低値を示した (P=0.011)。

Table 1-13 Differences in the plasma concentrations of cilostazol and its metabolites between patients co-administered with and without CYP2C19 inhibitors.

	CYP2C19 inhibitor		<i>P</i>
	with	without	
Number of patients	23	7	
CLZ C/D ratio ( $\mu\text{mol/L}$ per mg/kg)	0.643 (0.471-1.02)	0.738 (0.654-0.817)	0.886
OPC-13015 C/D ratio ( $\mu\text{mol/L}$ per mg/kg)	0.256 (0.187-0.295)	0.367 (0.264-0.413)	0.0598
OPC-13213 C/D ratio ( $\mu\text{mol/L}$ per mg/kg)	0.092 (0.072-0.123)	0.083 (0.075-0.112)	0.883
OPC-13015/CLZ concentration ratio	0.372 (0.296-0.459)	0.500 (0.413-0.528)	0.100
OPC-13213/CLZ concentration ratio	0.142 (0.098-0.167)	0.138 (0.113-0.159)	0.999

Plasma concentrations of cilostazol (CLZ) and its metabolites were evaluated as the predose plasma concentration adjusted with the CLZ dose per body weight (C/D ratio). Data are expressed as the median with interquartile range in parentheses. The influences of coadministration with CYP2C19 inhibitors on plasma concentrations of CLZ and its metabolites were tested using the Mann-Whitney *U* test.

Abbreviations: OPC-13015, dehydrocilostazol; OPC-13213, monohydroxycilostazol

Table 1-14 Influence of *CYP2C19* and *CYP3A5* genotypes on plasma concentrations of cilostazol and its metabolites in patients with concomitant use of lansoprazole, esomeprazole, omeprazole, and clopidogrel.

	All	<i>CYP2C19</i> genotype			<i>CYP3A5</i> genotype		
		*1 carrier	*1 non-carrier	<i>P</i>	*1 carrier	*1 non-carrier	<i>P</i>
Number of patients	23	15	8		12	11	
CLZ C/D ratio ( $\mu\text{mol/L}$ per mg/kg)	0.643 (0.471-1.02)	0.643 (0.520-1.02)	0.590 (0.419-0.850)	0.548	0.849 (0.605-1.13)	0.491 (0.435-0.722)	0.0595
OPC-13015 C/D ratio ( $\mu\text{mol/L}$ per mg/kg)	0.256 (0.187-0.295)	0.235 (0.176-0.295)	0.270 (0.247-0.286)	0.651	0.270 (0.188-0.296)	0.256 (0.181-0.295)	0.735
OPC-13213 C/D ratio ( $\mu\text{mol/L}$ per mg/kg)	0.092 (0.072-0.123)	0.092 (0.072-0.111)	0.100 (0.074-0.128)	0.975	0.108 (0.089-0.128)	0.064 (0.054-0.100)	0.0595
OPC-13015/CLZ concentration ratio	0.372 (0.296-0.459)	0.334 (0.296-0.412)	0.453 (0.351-0.619)	0.138	0.309 (0.288-0.347)	0.458 (0.378-0.566)	0.0106
OPC-13213/CLZ concentration ratio	0.142 (0.098-0.167)	0.142 (0.102-0.164)	0.147 (0.092-0.178)	0.771	0.160 (0.095-0.169)	0.127 (0.111-0.155)	0.689

Plasma concentrations of cilostazol (CLZ) and its metabolites were evaluated as the predose plasma concentration adjusted with the CLZ dose per body weight (C/D ratio). Data are expressed as the median with interquartile range in parentheses. The influences of CYP phenotypes on plasma concentrations of CLZ and its metabolites were tested using the Mann-Whitney *U* test (\*  $P < 0.05$ ). *CYP2C19*\*1 carrier and non-carrier mean

carriers having at least one of *CYP2C19*\*1 allele (\*1/\*1, \*1/\*2, and \*1/\*3) and the others (\*2/\*2, \*2/\*3, and \*3/\*3), respectively. *CYP3A5*\*1 carrier and non-carrier mean carriers having *CYP3A5*\*1/\*1 or \*1/\*3, and *CYP3A5*\*3/\*3, respectively.

Abbreviations: OPC-13015, dehydrocilostazol; OPC-13213, monohydroxycilostazol.

### 1-3-7 血漿中濃度と血液検査結果との関連

全患者を対象として、CLZ および代謝物の血漿中濃度と ALB および TP との関連をそれぞれ Figure 1-5 および 1-6 に、Scr および BUN との関連をそれぞれ Figure 1-7 および 1-8 に、T-Bil との関連を Figure 1-9 に示した。

CLZ および代謝物の血漿中濃度と ALB および TP との間でそれぞれ相関関係はみられなかった。

CLZ および代謝物の血漿中濃度と Scr および BUN との間でそれぞれ相関関係は認められなかった。

CLZ および代謝物の血漿中濃度と T-Bil との間に相関関係はみられなかった。

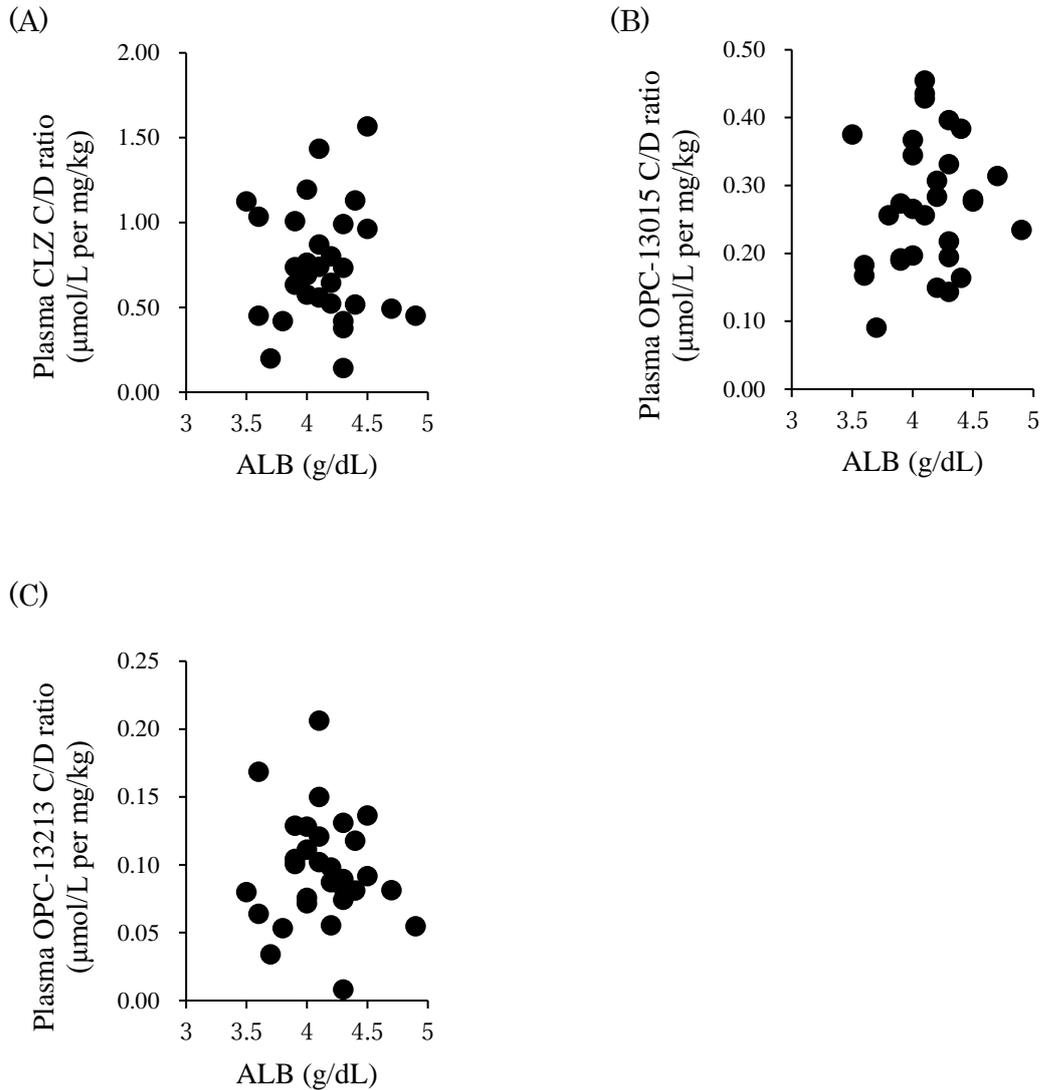


Figure 1-5 Relationships between serum ALB and plasma concentrations of CLZ (A), OPC-13015 (B), or OPC-13213 (C) in patients with cerebral infarction.

Plasma concentrations of cilostazol (CLZ) and its metabolites were evaluated as the predose plasma concentration adjusted with the CLZ dose per body weight (C/D ratio). Correlations between serum albumin (ALB) and plasma concentrations of CLZ, dehydrocilostazol (OPC-13015), or monohydroxycilostazol (OPC-13213) were tested by Spearman's rank correlation coefficient analysis.

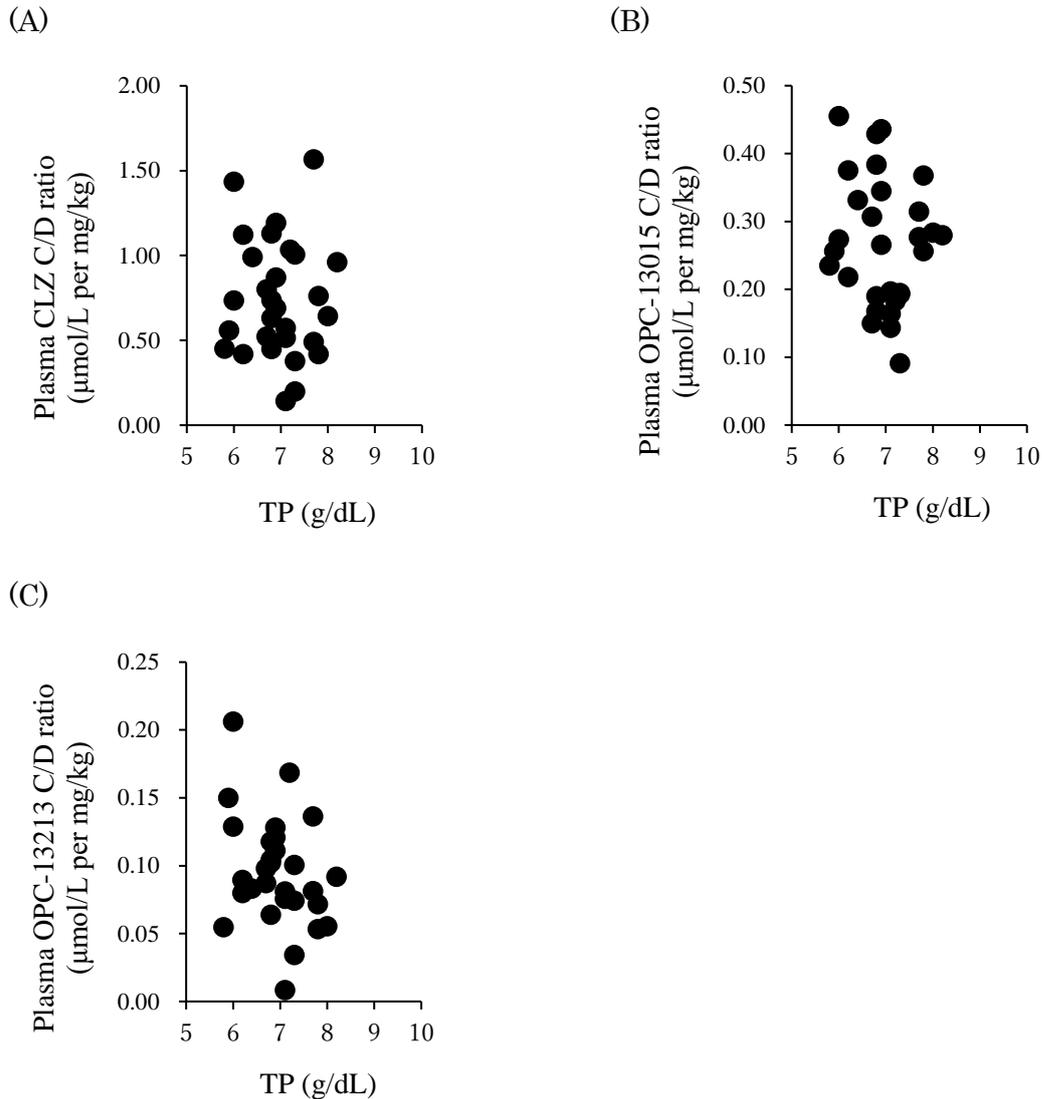


Figure 1-6 Relationships between TP and plasma concentrations of CLZ (A), OPC-13015 (B), or OPC-13213 (C) in patients with cerebral infarction.

Plasma concentrations of cilostazol (CLZ) and its metabolites were evaluated as the predose plasma concentration adjusted with the CLZ dose per body weight (C/D ratio). Correlations between total protein (TP) and plasma concentrations of CLZ, dehydrocilostazol (OPC-13015), or monohydroxycilostazol (OPC-13213) were tested by Spearman's rank correlation coefficient analysis.

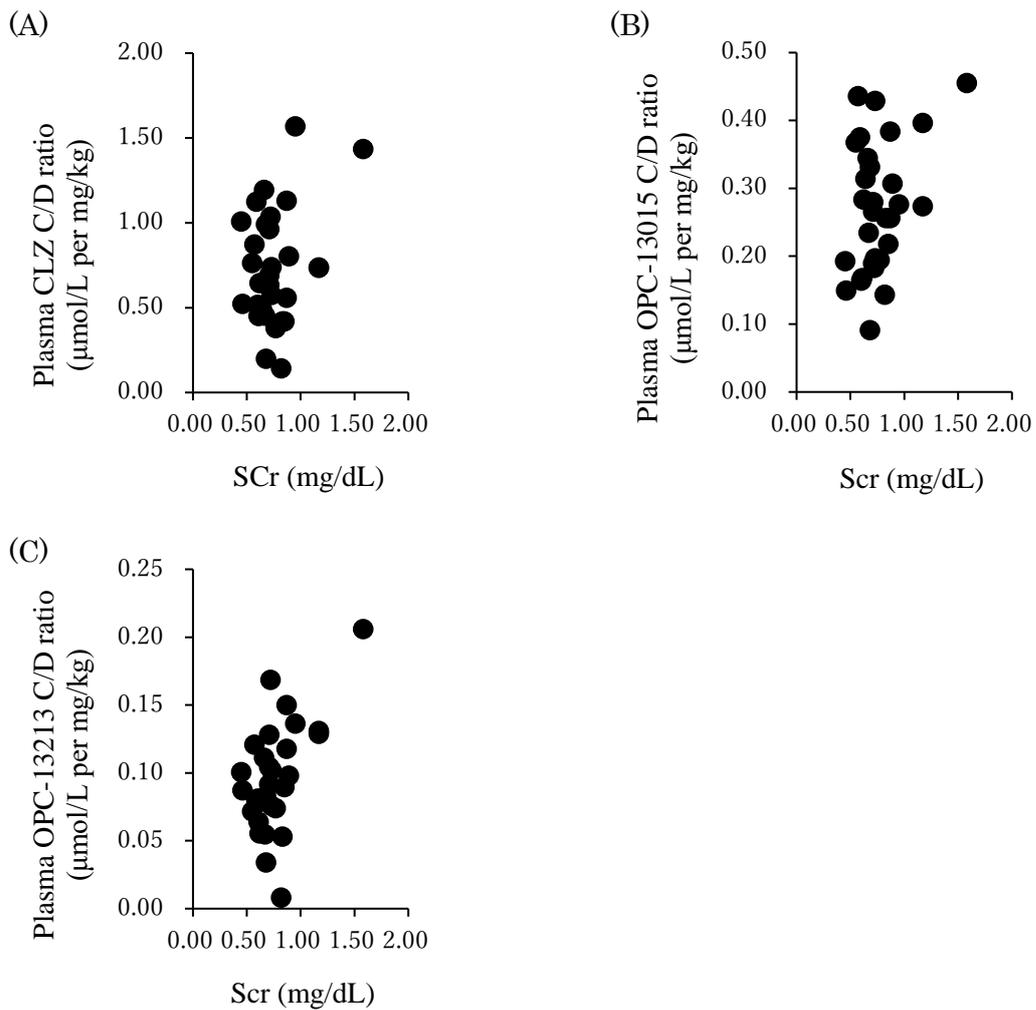


Figure 1-7 Relationships between Scr and plasma concentrations of CLZ (A), OPC-13015 (B), or OPC-13213 (C) in patients with cerebral infarction.

Plasma concentrations of cilostazol (CLZ) and its metabolites were evaluated as the predose plasma concentration adjusted with the CLZ dose per body weight (C/D ratio). Correlations between serum creatinine (Scr) and plasma concentrations of CLZ, dehydrocilostazol (OPC-13015), or monohydroxycilostazol (OPC-13213) were tested by Spearman's rank correlation coefficient analysis.

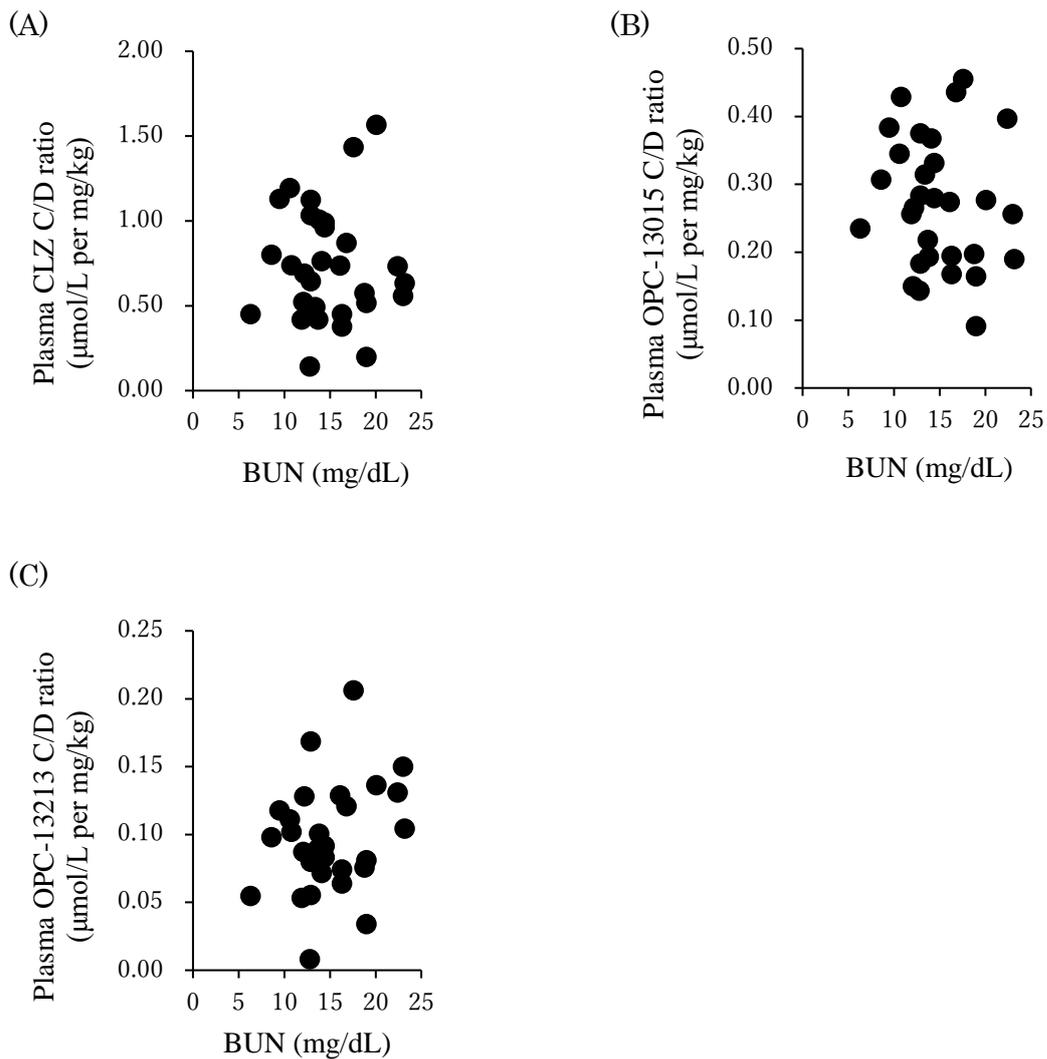


Figure 1-8 Relationships between BUN and plasma concentrations of CLZ (A), OPC-13015 (B), or OPC-13213 (C) in patients with cerebral infarction.

Plasma concentrations of cilostazol (CLZ) and its metabolites were evaluated as the predose plasma concentration adjusted with the CLZ dose per body weight (C/D ratio). Correlations between blood urea nitrogen (BUN) and plasma concentrations of CLZ, dehydrocilostazol (OPC-13015), or monohydroxycilostazol (OPC-13213) were tested by Spearman's rank correlation coefficient analysis.

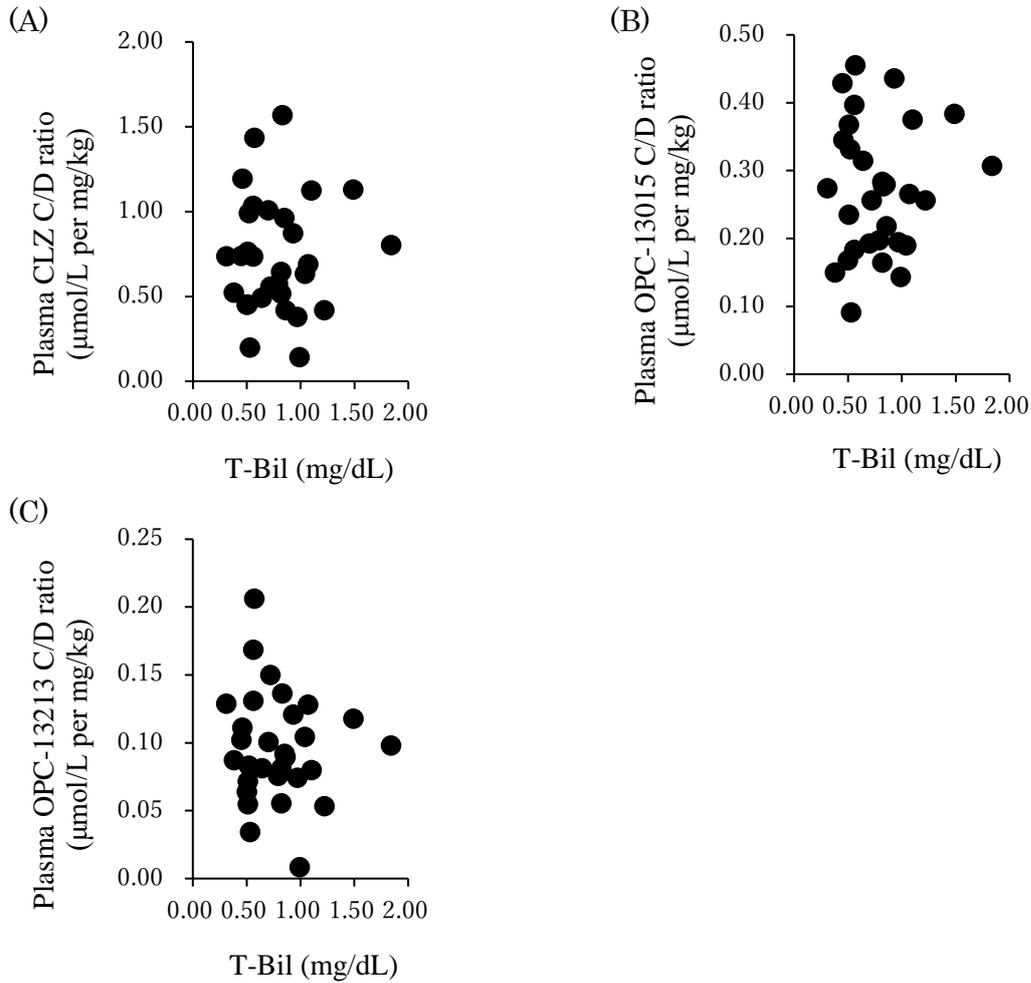


Figure 1-9 Relationships between T-Bil and plasma concentrations of CLZ (A), OPC-13015 (B), or OPC-13213 (C) in patients with cerebral infarction.

Plasma concentrations of cilostazol (CLZ) and its metabolites were evaluated as the predose plasma concentration adjusted with the CLZ dose per body weight (C/D ratio). Correlations between total bilirubin (T-Bil) and plasma concentrations of CLZ, dehydrocilostazol (OPC-13015), or monohydroxycilostazol (OPC-13213) were tested by Spearman's rank correlation coefficient analysis.

#### 第4節 考察

本章では脳梗塞患者において、CLZ の体内動態に対する遺伝的要因および背景因子の影響を明らかにすることを目的とし、CLZ と代謝物の血漿中濃度の相関関係、および CLZ と代謝物の血漿中濃度と代謝酵素の遺伝子多型、患者背景因子との関連を検討した。今回、CLZ の血漿中濃度と代謝物 (OPC-13015 および OPC-13213) の血漿中濃度との間に有意な相関関係が認められた。これらの結果より、代謝物の血漿中濃度は、CLZ の血漿中濃度により一定程度予測可能であり、代謝酵素の遺伝子多型の影響を受けにくいと推察された。

本研究において、*CYP2C19* の遺伝子多型による CLZ の血漿中濃度に対する影響は認められなかった。一方、*CYP3A5*\*1 保有群において、\*1 非保有群と比較して OPC-13213 の C/D 比は高い傾向 ( $P=0.08$ ) にあり、また血漿中 OPC-13015/CLZ 濃度比は有意に低値を示した ( $P=0.002$ )。 *CYP3A5*\*1 保有群では、非保有群と比較し *CYP3A5* の酵素活性が高く、OPC-13213 への代謝亢進により C/D 比は高く、また血漿中 OPC-13015/CLZ 濃度比は低値を示したものと考えられた。Lee 等は、健常人に対する単回投与において、代謝物の体内動態は *CYP2C19* の遺伝子多型により影響を受けたが、*CYP3A5* の遺伝子多型による影響は受けなかったことを報告している<sup>34)</sup>。今回の結果は、この報告と一致しないが、これは健常者と脳梗塞患者の背景の違いに加えて *CYP2C19* 阻害薬の併用による影響が考えられる。全対象患者のうち *CYP2C19* の阻害効果が報告されている<sup>48,49)</sup> ランソプラゾールやエソメプラゾール、オメプラゾール、クロピドグレルを併用していた患者が 23 名 (重複を 1 名含む) 含まれていた。 *CYP2C19* 阻害薬併用患者 23 名と非併用患者 7 名との間で、CLZ および代謝物の血漿中濃度や血漿中濃度比に差はみられなかった。これより *CYP2C19* の酵素活性が阻害されている条件下において、CLZ の OPC-13213 への代謝に対して *CYP3A5* が補完的に作用することが考えられた。また併用患者における代謝酵素の遺伝子多型と血漿中濃度との関連の結果では、*CYP2C19* の遺伝子

多型間で血漿中濃度および血漿中濃度比に有意差は認められなかった。一方で、*CYP3A5* \*1 保有群において CLZ および OPC-13213 の C/D 比はそれぞれ\*1 非保有群と比較して高い傾向 ( $P=0.06$ )にあり、また血漿中 OPC-13015/CLZ は有意に低値 ( $P=0.01$ )を示した。これは全対象 30 例の結果と一致している。同様に Kim 等は、CLZ とクロピドグレルを併用した健常人における検討で、*CYP2C19* の遺伝子多型によって CLZ や OPC-13015 の AUC は影響を受けないが、一方でこれらのパラメータは *CYP3A5* の遺伝子多型による影響を受けることを報告した<sup>50)</sup>。以上より、併用薬により *CYP2C19* の酵素活性が阻害されている条件下では、CLZ の代謝経路内において *CYP3A5* が重要な役割を果たしていることが推察された。加えて、Hiratsuka 等は、試験管内の検討において CLZ の OPC-13217 への代謝に対する親和性が *CYP2C19* よりも *CYP3A5* の方が高いことを報告している<sup>21)</sup>が、これが *CYP2C19* の遺伝子多型が CLZ の体内動態に影響を及ぼさなかった要因の一つと推察された。

CLZ は蛋白結合率が 95 %以上と高値で<sup>16)</sup>、脳梗塞患者の約半数において低アルブミン血症が認められた<sup>40)</sup>と報告があり、脳梗塞患者における CLZ の体内動態は健常人と異なることが予測された。加えて、慢性腎不全が脳梗塞発症の危険因子とされており<sup>41,42)</sup>、また健常人と比較して腎機能低下患者において OPC-13213 の AUC が高値であったことが示されている<sup>18)</sup>。今回、対象とした 30 名のうち、低アルブミン血症が認められた患者は 1 名、腎機能障害を有する患者は 3 名であった。また CLZ および代謝物の血漿中濃度と ALB、Scr それぞれとの間で関連性は認められなかった。したがって、本研究の対象となった脳梗塞患者において、これらの蛋白結合や腎機能障害の要因が CLZ の体内動態に与える影響は小さいものと考えられた。また今回除外基準とした、eGFR が 30 mL/min/1.73 m<sup>2</sup> 未満の重度の腎機能障害を有する脳梗塞患者における体内動態の解明は今後の検討課題としたい。

脳梗塞患者に対して CLZ を投与する際は CYP2C19 阻害薬を併用する頻度が高く、CLZ および代謝物の体内動態は CYP3A5 の遺伝子多型による影響を受けることが示された。

## 第2章 脳梗塞患者における CLZ の心血管系副作用と体内動態、代謝酵素の遺伝子多型との関連性

### 第1節 緒言

CLZ の副作用として頻脈や動悸、頭痛が報告され、それらの頻度は 6-20 %とされている<sup>11)</sup>。これらの心血管系に対する副作用は、血管拡張作用および陽性変力作用に基づく<sup>12)</sup>、一般的に一過性で軽微の症状ではあるが、CLZ を中止せざるを得ない症例も見受けられる<sup>13)</sup>。Nishiyama 等によって脳梗塞患者において CLZ 導入時にこれらの副作用軽減する目的で漸増法による投与方法の有用性が示されたが<sup>51)</sup>、一般的に臨床適用されていない。一方、Woo 等は CLZ の心血管系作用（脈拍上昇）と体内動態との関連性を報告したが<sup>38)</sup>、これは健常人における検討であり、また代謝物の影響が考慮されていない。さらに、CLZ の心血管系作用と代謝酵素の遺伝子多型との関連性を検討した報告はない。本章では、脳梗塞患者において CLZ の心血管系副作用の発現因子を明らかにすることを目的に、血圧や脈拍の変動と患者背景因子、CLZ の体内動態および代謝酵素の遺伝子多型との関連性を検討した。

## 第2節 方法

### 2-2-1 対象患者と背景調査

対象は第1章で示した、同意取得が得られた患者30名とした。また第1章における調査で得られた患者情報を利用した。

### 2-2-2 CLZ および代謝物の血漿中濃度測定と解析方法

血漿中濃度測定は、第1章において得られた結果を利用した。

### 2-2-3 ゲノム DNA の抽出、*CYP2C19* および *CYP3A5* の遺伝子多型解析、対象患者の分類

ゲノム DNA の抽出、*CYP2C19* および *CYP3A5* の遺伝子多型解析は第1章で得られた結果を利用した。また対象患者の分類も同様の方法で実施した。

### 2-2-4 血圧および脈拍の測定

血圧および脈拍の測定にはエレマーノ®血圧計 (TERUMO Corp., Tokyo, Japan)を使用した。

血圧および脈拍の測定は、CLZ 導入前と導入後4-6日目におけるCLZ服用後3時間(同時刻)の時点で実施した。導入後4-6日目の3日間の平均値から導入前の値を減じたものを変動幅とし評価した。

### 2-2-5 統計解析

血圧および脈拍の変動は、Wilcoxon の符号順位和検定を用いて検討した。血圧および脈拍の変動幅と血漿中濃度との相関は、Spearman の順位相関分析で行った。血圧および脈拍の変動に対する *CYP2C19*、*CYP3A5* の遺伝子多型それぞれによる影響を、Mann-Whitney の U 検定を用いて解析した。なお、血圧および脈拍の変動幅に対する血漿中濃度の影響を検討する上で、OPC-13015 および OPC-13213 の抗血小板作用は CLZ と比較して、それぞれ約 3 倍および約 1/3 倍であることから<sup>13)</sup>、効力調整活性部分を考慮する必要がある。したがって効力調整活性部分を下記式より算出し、血圧および脈拍の変動幅との相関を Spearman の順位相関分析にて解析した。

効力調整活性部分量 = CLZ 血漿中濃度 + OPC-13015 血漿中濃度×3 + OPC-13213 血漿中濃度×1/3

重回帰分析では脈拍の変動を従属変数とし、効力調整活性部分量および CLZ の体内動態の変動に関連すると予測された Scr、ALB の 3 因子を独立変数とし、強制投入法による検討を行った。

また他因子の影響を検討するために、下記の因子を独立変数とし、ステップワイズ法を用いた重回帰分析を実施した。P 値が 0.1 以下を投入、0.2 以上を除去した。

- ・ 患者の年齢、性別、体重、降圧薬併用の有無
- ・ 血液検査結果：T-Bil、AST、ALT、BUN、Scr、ALB、TP
- ・ CLZ および代謝物の血漿中濃度、効力調整活性部分量
- ・ *CYP2C19* および *CYP3A5* の遺伝子多型
- ・ CLZ 導入前の血圧、脈拍

すべての数値を中央値および四分位範囲により示した。これらの統計解析は EZR<sup>52)</sup>を用いて実施した。P < 0.05 を統計学的に有意とした。

### 第3節 結果

#### 2-3-1 患者背景

第1章 第3節の患者背景に示した。CLZ 導入前の血圧および脈拍を Table 2-1 に示した。血圧の中央値（四分位範囲）は収縮期で 144 (134-164) mmHg、拡張期で 81 (72-90) mmHg、脈拍は 75 (66-80) bpm であった。

#### 2-3-2 CLZ 導入後の血圧および脈拍の変動

CLZ 導入後の血圧および脈拍を Table 2-1 に示した。導入後、血圧は収縮期 133 (125-146) mmHg および拡張期 74 (71-82) mmHg とともに有意な低下が認められた ( $P < 0.01$ )。また脈拍 87 (80-93) bpm には有意な上昇がみられた ( $P < 0.01$ )。全対象患者のうち、血圧低下 (収縮期  $< 100$  mmHg または拡張期  $< 60$  mmHg)が認められた患者はいなかった。また2名の患者において頻脈 (脈拍  $> 100$  bpm)が認められた。

Table 2-1 Influence of *CYP2C19* and *CYP3A5* genotypes on cardiovascular effects in patients with cerebral infarction.

	All		<i>CYP2C19</i> genotype			<i>CYP3A5</i> genotype		
		<i>P</i>	<i>*1</i> carrier	<i>*1</i> non-carrier	<i>P</i>	<i>*1</i> carrier	<i>*1</i> non-carrier	<i>P</i>
Number of patients	30	-	21	9		13	17	
SBP at the baseline (mmHg)	144 (134-164)	-	139 (128-164)	150 (140-163)	0.287	156 (137-164)	139 (133-159)	0.429
Changes in SBP (mmHg)	-11 (-19-1)	0.006	-11 (-15-1)	-7 (-19-0)	0.803	-11 (-29-0)	-7 (-15-2)	0.414
DBP at the baseline (mmHg)	81 (72-90)	-	80 (72-87)	88 (72-94)	0.342	84 (72-94)	80 (72-87)	0.503
Changes in DBP (mmHg)	-7 (-13-3)	0.004	-7 (-13-2)	-9 (-10-4)	0.982	-10 (-13-0)	-6 (-13-4)	0.414
Pulse rate at the baseline (bpm)	75 (66-80)	-	74 (66-78)	77 (68-83)	0.330	74 (65-77)	75 (68-80)	0.285
Change in pulse rates (bpm)	12 (7-18)	< 0.001	14 (8-18)	10 (5-15)	0.188	14 (6-17)	12 (8-18)	0.883

Data are expressed as the median with interquartile range in parentheses. Changes in SBP, DBP, and pulse rate from the baseline values were compared by the Wilcoxon signed-rank test. The influences of CYP phenotypes on the cardiovascular effect were tested using the Mann-Whitney U test. *CYP2C19*\*1 carrier and non-carrier mean carriers having at least one of *CYP2C19*\*1 allele (*\*1/\*1*, *\*1/\*2*, and

*\*1/\*3*) and the others (*\*2/\*2*, *\*2/\*3*, and *\*3/\*3*), respectively. *CYP3A5\*1* carrier and non-carrier mean carriers having *CYP3A5\*1/\*1* or *\*1/\*3*, and *CYP3A5\*3/\*3*, respectively.

Abbreviations: SBP, Systolic blood pressure; DBP, Diastolic blood pressure.

### 2-3-3 CLZ および代謝物の血漿中濃度と血圧、脈拍の変動との関連性

全対象における CLZ、代謝物の血漿中濃度と血圧および脈拍の変動との関連をそれぞれ Figure 2-1、2-2 および 2-3 に示した。血圧の変動は、収縮期および拡張期ともに CLZ の代謝物を含む血漿中濃度および効力調整活性部分量といずれも相関関係が認められなかった。脈拍の変動は、CLZ ( $R=0.539, P=0.002$ )、OPC-13015 ( $R=0.396, P=0.030$ ) および OPC-13213 ( $R=0.383, P=0.004$ )のそれぞれの血漿中濃度と有意な正の相関関係を示した。また効力調整活性部分量との間においても有意な正の相関が認められた ( $R=0.512, P=0.004$ )。

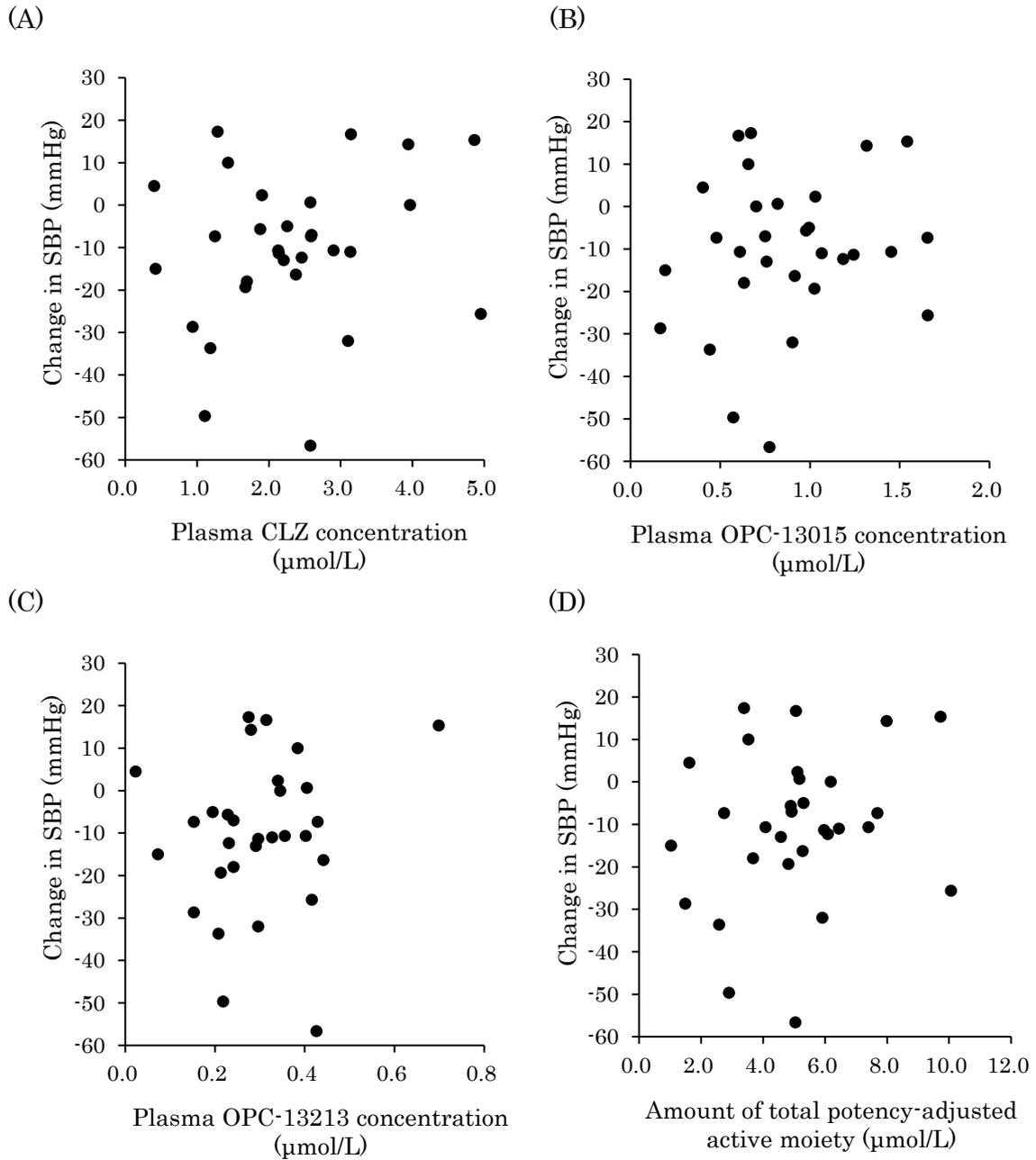


Figure 2-1 Relationships between changes in SBP and plasma concentrations of CLZ (A), OPC-13015 (B), OPC-13213 (C), and the amount of total potency-adjusted pharmacologically active moieties (D).

The amount of total potency-adjusted pharmacologically active moieties was calculated as the sum of the plasma molar concentration of [cilostazol (CLZ) + dehydrocilostazol (OPC-13015) × 3

+ monohydroxycilostazol (OPC-13213)  $\times 1/3$ ]. Correlations between changes in systolic blood pressure (SBP) and the plasma concentrations of CLZ and its metabolites were tested by Spearman's rank correlation coefficient analysis.

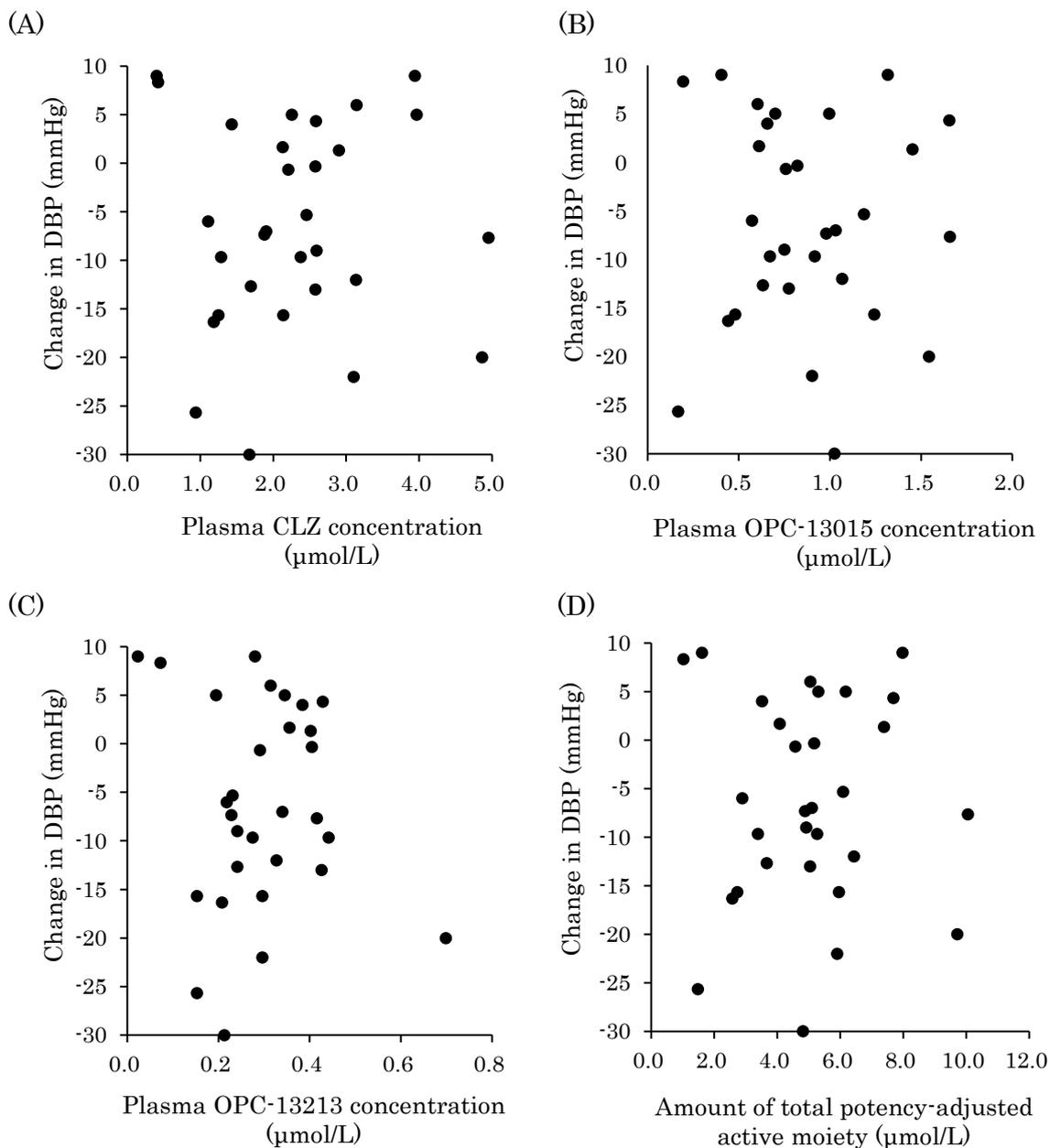


Figure 2-2 Relationships between changes in DBP and plasma concentrations of CLZ (A), OPC-13015 (B), OPC-13213 (C), and the amount of total potency-adjusted pharmacologically active moieties (D).

The amount of total potency-adjusted pharmacologically active moieties was calculated as the sum of the plasma molar concentration of [cilostazol (CLZ) + dehydrocilostazol (OPC-13015)  $\times 3$  + monohydroxycilostazol (OPC-13213)  $\times 1/3$ ]. Correlations between changes in diastolic blood pressure (DBP) and the plasma concentrations of CLZ and its metabolites were tested by Spearman's rank correlation coefficient analysis.

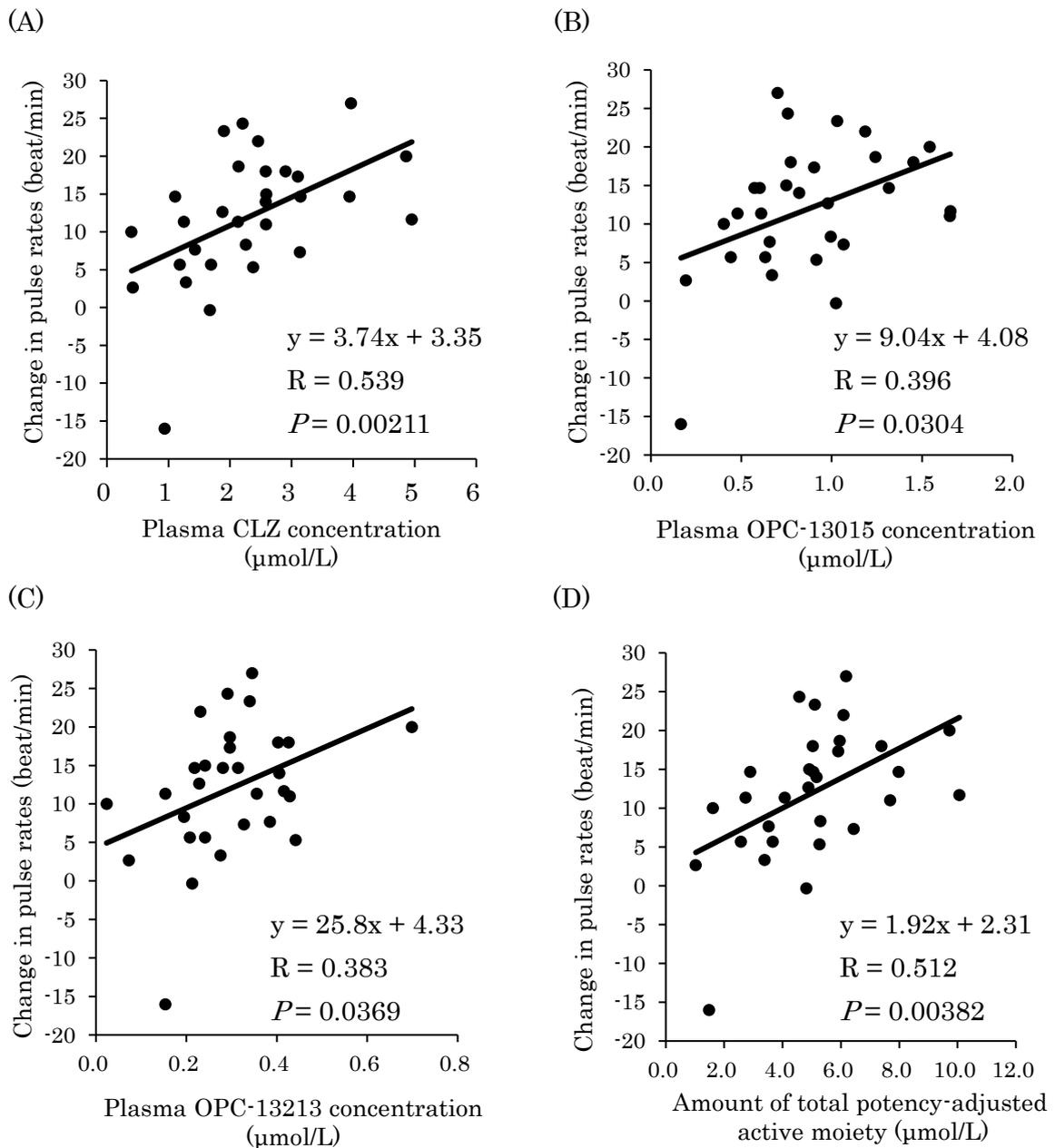


Figure 2-3 Relationships between changes in pulse rate and plasma concentrations of CLZ (A), OPC-13015 (B), OPC-13213 (C), and the amount of total potency-adjusted pharmacologically active moieties (D).

The amount of total potency-adjusted pharmacologically active moieties was calculated as the sum of the plasma molar concentration of [cilostazol (CLZ) + dehydrocilostazol (OPC-13015)  $\times$  3 + monohydroxycilostazol (OPC-13213)  $\times$  1/3]. Correlations between changes in pulse rate and the plasma concentrations of CLZ and its metabolites were tested by Spearman's rank correlation coefficient analysis.

#### 2-3-4 遺伝子多型の血圧および脈拍の変動に対する影響

*CYP2C19* および *CYP3A5* の遺伝子多型の血圧および脈拍の変動に対する影響を Table 2-1 に示した。*CYP2C19* および *CYP3A5* それぞれの遺伝子型と血圧、脈拍の変動との間に関連性は認められなかった。

#### 2-3-5 脈拍の変動と血液検査結果との関連

脈拍の変動と ALB および TP とのそれぞれの関連を Figure 2-4 に、Scr および BUN とのそれぞれの関連を Figure 2-5 に、T-Bil との関連を Figure 2-6 に示した。

脈拍の変動と ALB および TP との間でそれぞれ相関関係はみられなかった。

脈拍の変動と Scr との間でそれぞれ相関関係は認められなかった。脈拍の変動と BUN とは有意ではないものの弱い相関がみられた ( $R = 0.352$   $P = 0.0567$ )。

脈拍の変動と T-Bil との間に相関関係はみられなかった。

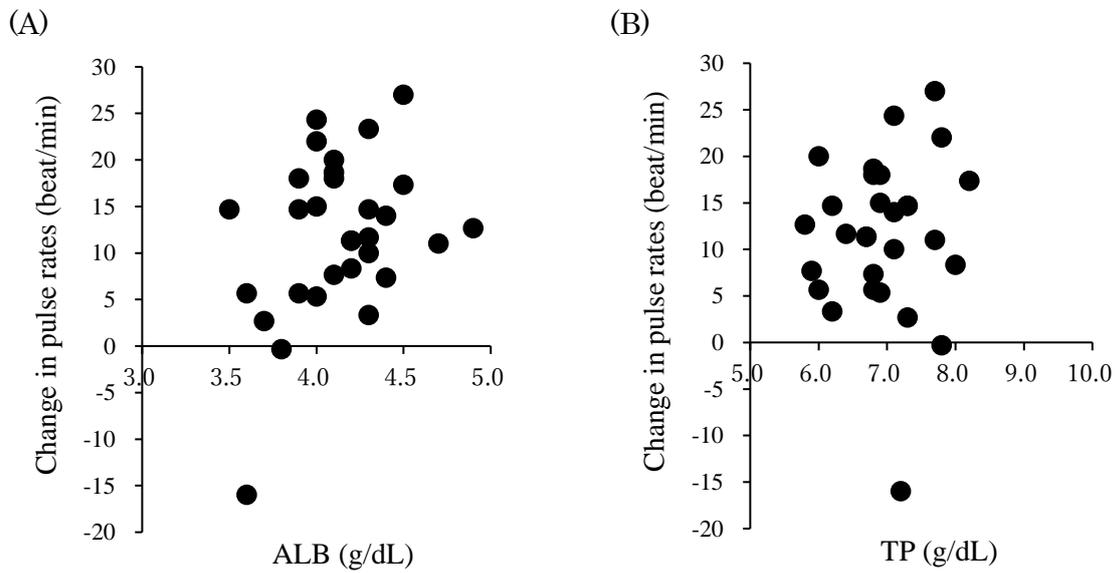


Figure 2-4 Relationships between changes in pulse rate and ALB (A) and TP (B).

Correlations between changes in pulse rate and serum albumin (ALB) and total protein (TP) were tested by Spearman's rank correlation coefficient analysis.

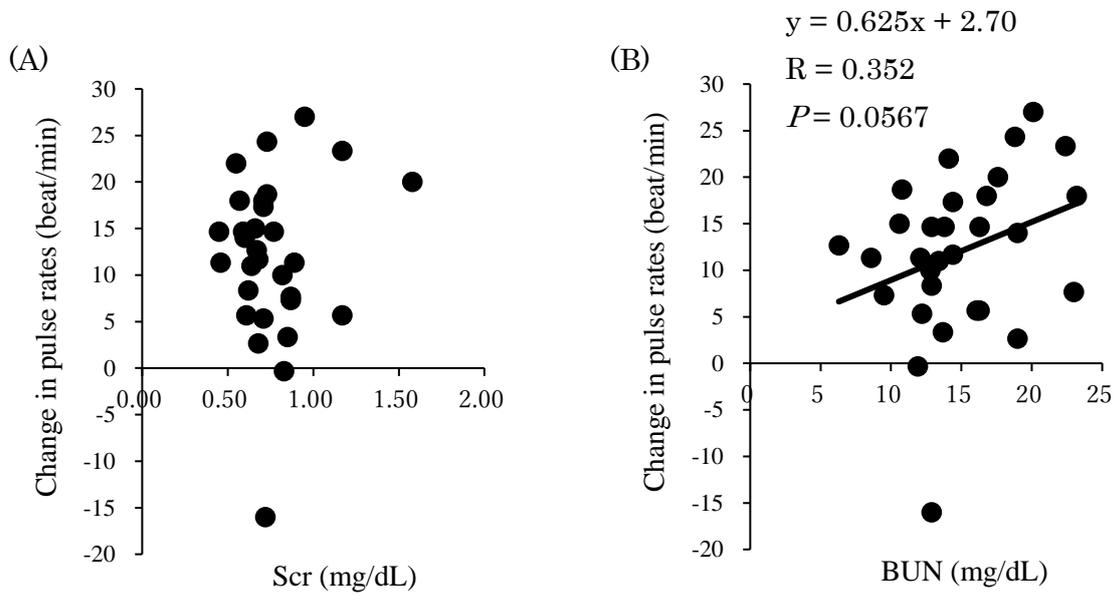


Figure 2-5 Relationships between changes in pulse rate and Scr (A) and BUN (B).

Correlations between changes in pulse rate and serum creatinine (Scr) and blood urea nitrogen (BUN) were tested by Spearman's rank correlation coefficient analysis.

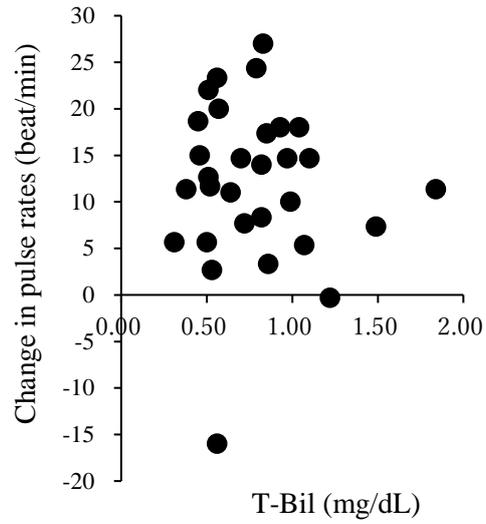


Figure 2-6 Relationships between changes in pulse rate and T-Bil.

Correlations between changes in pulse rate and total bilirubin (T-Bil) was tested by Spearman's rank correlation coefficient analysis.

### 2-3-6 脈拍の変動と CLZ 治療開始時の脈拍との関連

脈拍の変動と CLZ 治療開始時の脈拍との関連を Figure 2-7 に示した。

脈拍の変動と CLZ 治療開始時の脈拍とは有意でないものの弱い相関が認められた ( $R = -0.345$   $P = 0.0615$ )。

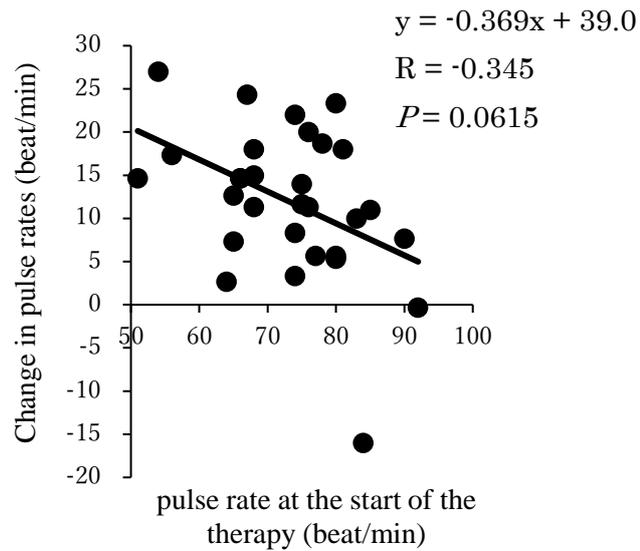


Figure 2-7 Relationships between changes in pulse rate and pulse rate at the start of the therapy.

Correlations between changes in pulse rate and pulse rate at the start of the therapy was tested by Spearman's rank correlation coefficient analysis.

### 2-3-7 脈拍の変動に影響する要因

CLZ 服用後の脈拍変動に影響を及ぼす要因を検討した重回帰分析の結果を Table 2-2, 2-3 に示した。

効力調整活性部分量、Scr および ALB の 3 因子を独立変数とし、強制投入法により分析した結果では、効力調整活性部分量 (標準偏回帰係数  $\beta = 0.433, P = 0.002$ )のみが脈拍変動の独立した因子であることが示され、またその決定係数 ( $R^2$ )は 0.219 であった。

ステップワイズ法を用いた分析では、脈拍の変動幅は OPC-13015 の血漿中濃度 ( $\beta = 0.454, P = 0.003$ )、治療開始時の脈拍 ( $\beta = -0.480, P = 0.002$ )および BUN ( $\beta = 0.415, P = 0.006$ )の 3 因子により、その個体間変動の 55.5 %が説明可能であることが示された。

Table 2-2 Factors influencing the changes in pulse rate in multiple regression analysis

Dependent variable	Factor	Unstandardized coefficients		Standardized coefficients $\beta$	t	P	VIF
		B (95 % CI)	SE				
Change in pulse rates	Intercept	-23.9 (-61.7-13.9)	18.4		-1.30	0.205	
	Amount of total potency-adjusted active moiety	1.69 (0.330-3.05)	0.661	0.433	2.55	0.0168	1.06
	ALB	6.32 (-2.96-15.6)	4.51	0.237	1.40	0.173	1.06
	Scr	1.74 (-10.9-14.4)	6.16	0.0466	0.282	0.780	1.01

The adjusted coefficient of determination ( $R^2$ ) was 0.219.

Change in pulse rates =  $1.69 \times$  [Amount of total potency-adjusted active moiety].

Abbreviations: B, partial regression coefficient;  $\beta$ , standardized partial regression coefficient; VIF, variance inflation factor; SE, standard error; CI, confidence interval;  $R^2$ , coefficient of determination.

Table 2-3 Factors influencing the changes in pulse rate in multiple regression analysis

Dependent variable	Factor	Unstandardized coefficients		Standardized coefficients $\beta$	t	P	VIF
		B (95 % CI)	SE				
Change in pulse rates	Intercept	21.0 (1.38-40.7)	9.57		2.20	0.0369	
	Pulse rates at Day 0	-0.413 (-0.656--0.171)	0.118	-0.480	-3.50	0.00168	1.02
	BUN	0.847 (0.270-1.424)	0.281	0.415	3.02	0.00562	1.03
	Plasma concentration of OPC-13015	9.81 (3.76-15.9)	2.94	0.454	3.33	0.00260	1.01

The adjusted coefficient of determination ( $R^2$ ) was 0.555.

Change in pulse rates =  $21.0 - 0.413 \times [\text{Pulse rate at Day 0}] + 0.847 \times [\text{BUN}] + 9.81 \times [\text{Plasma concentration of OPC-13015}]$ .

Abbreviations: B, partial regression coefficient;  $\beta$ , standardized partial regression coefficient; VIF, variance inflation factor; SE, standard error; CI, confidence interval;  $R^2$ , coefficient of determination.

#### 第4節 考察

本章では脳梗塞患者における CLZ の心血管系副作用の発現と患者背景、CLZ の体内動態および代謝酵素の遺伝子多型との関連性を検討した。本研究の対象患者において、CLZ 導入後の脈拍は中央値で 12 bpm (16.0 %)程度の上昇が認められた。間欠性跛行の患者を対象とした臨床試験の安全性評価において CLZ の導入により 5-7 bpm 程度<sup>13)</sup>、また健常人における検討では、8.2 bpm (13.5 %)の脈拍上昇が認められている<sup>37)</sup>。これらのことより脳梗塞患者においても、健常人や間欠性跛行の患者と同程度以上に CLZ の心血管系作用の影響を受けることが明らかになった。脳梗塞患者において、脈拍数の上昇はときに狭心症への進行要因となること<sup>10)</sup>から、脈拍数管理の重要性が示唆される。

Woo 等は血漿中濃度の変動と脈拍上昇との関連を報告しているが<sup>37)</sup>、健常人と脳梗塞患者との相違やCLZの代謝物による影響を考慮した、より詳細な検討が必要である。今回の検討によって、脳梗塞患者においても、CLZ の血漿中濃度が脈拍変動と関連することが示された。また、代謝物の影響も考慮した抗血小板効果の指標の効力調整活性部分量と脈拍の変動との間に相関が認められた。これより代謝物の影響も含めた CLZ の抗血小板作用は心血管系副作用と関連があることが推察された。

脈拍の変動に対して、CLZ の体内動態因子とともに体内動態に影響する因子が関連することが予測されたため、効力調整活性部分量、ALB および Scr の 3 因子を独立変数として強制投入法による重回帰分析を実施した。その結果、効力調整活性部分量のみが独立した因子として示されたが、その決定位数は 0.219 であった。これより脈拍の変動に対して、CLZ の体内動態に関連する因子のみならず、病態や併用薬等の患者背景因子も影響することが考えられたため、これらの因子を独立因子としたステップワイズ法による重回帰分析を実施した。結果は OPC-13015 の血漿中濃度、BUN および導入前の脈拍が抽出され、これらの因子により脈拍変動の個体間変動の 55.5 %が説明可能と示された。今回の検討において OPC-13015 は CLZ との血漿中濃度比が 37.8 %であったが、そ

の抗血小板効果は CLZ の約 3 倍であることが示されている<sup>22)</sup>。抗血小板効果の効力比を外挿すると、CLZ の約 1/3 を示した OPC-13015 の血漿中濃度は CLZ と同等の心血管系副作用を有することが推察され、そのことから脈拍変動の独立因子として血漿中 OPC-13015 濃度が抽出された可能性がある。したがって、CLZ の心血管系作用を評価する際は、OPC-13015 の血漿中濃度を考慮する必要がある。脈拍変動と BUN および CLZ 治療開始時の脈拍に弱い相関がみられたことは、両者が脈拍変動を説明するための独立変数として抽出されたことと合致する。BUN に関しては、心不全患者の予後因子や急性心不全患者における利尿剤に対する反応性の予測因子として報告されている<sup>53-55)</sup>。また Toyonaga 等は CLZ の心血管系副作用が治療前の心拍数に影響を受けることを報告しており<sup>56)</sup>、本研究の結果と一致する。これらの報告により、BUN や CLZ 導入前の脈拍は、CLZ の心血管系作用の予測因子になりうるということが推察された。

本研究において *CYP2C19* および *CYP3A5* の遺伝子多型と脈拍変動との関連性は示されなかった。第一章において、*CYP3A5*\*1 保有群では \*1 非保有群と比較して OPC-13213 の C/D 比は低い傾向にあり、また血漿中 OPC-13015/CLZ は有意に低値を示した。OPC-13213 は CLZ に対する血漿中濃度比は 13.9% であり、また抗血小板効果が約 1/3 とされている<sup>13)</sup>。したがって OPC-13213 の心血管系効果に及ぼす影響は限られており、そのため代謝酵素の遺伝子多型と脈拍変動との関連性が認められなかったと考えられた。

全対象患者において、CLZ 導入後、血圧は収縮期、拡張期ともに有意な低下が認められた。一方で、血圧低下と CLZ の代謝物を含む血漿中濃度との関連はみられなかった。Woo 等は健常人において、CLZ 100 mg 単回投与 (併用薬なし)後の拡張期血圧の変動と CLZ の血漿中濃度との関連を報告しているが<sup>37)</sup>、今回の結果はこれと一致しない。CLZ は血管平滑筋における PDE3 を阻害することにより、血管を拡張し血圧が低下する。イヌを用いた薬理試験において、CLZ を 10 および 30 mg/kg の経口投与では血圧低下は軽度であったことが報告され<sup>57)</sup>、一般的に使用されているアンジオテンシン受容体拮

抗薬 (ARB)や Ca 拮抗薬と比較して、その降圧効果は弱いと考えられる。30 名の対象患者のうち、2 名 (6.7%)が ARB を、11 名 (36.7%)が Ca 拮抗薬を使用していたが、これら併用薬による降圧効果が CLZ の作用に影響していた可能性が考慮された。

以上より、脳梗塞患者において CLZ の心血管系副作用を評価する際は、血漿中 OPC-13015 濃度を考慮し、また患者背景因子のうち BUN や CLZ 導入前の脈拍数に留意する必要がある。

## 総括

脳梗塞 2 次予防においてシロスタゾール (CLZ) は、その有効性が認められ、脳卒中治療ガイドラインにおいても投与が推奨されている<sup>3)</sup>ことから、今後、使用頻度が高くなることが予測される。一方で、動悸や頻脈等の心血管系副作用が高頻度で発現し、治療中断・薬剤変更となる症例も見受けられる。これらの心血管系副作用発現の要因の一つとして CLZ の体内動態の個体間変動が考えられる。

CLZ の体内動態は、健常人における検討で、その個体間変動は大きく、また代謝酵素の *CYP2C19* や *CYP3A5* の遺伝子多型による影響を受けることが示されている。ただし、脳梗塞患者の体内動態は血漿中タンパク濃度低下や高齢による腎機能低下等があり、健常人とは異なることが予測される。また CLZ の体内動態と抗血小板作用との関連は報告されているが、心血管系作用との関連は報告されていない。

本研究では、脳梗塞患者における CLZ の心血管系副作用の発現因子を明らかにすることを目的として、CLZ および代謝物の血漿中濃度と代謝酵素の遺伝子多型との関連性、および服用後の血圧、脈拍の変動と薬物動態学的因子、患者背景因子との関連性を検討した。

第 1 章では、脳梗塞患者 30 名を対象とし、CLZ 導入後 4 日目以降の服用直前における血漿中濃度と遺伝子多型との関連性を検討した。血漿中 CLZ 濃度と代謝物の OPC-13015 および OPC-13213 の血漿中濃度はそれぞれ正の相関を示した ( $R=0.690$ , および  $R=0.682$ )。これより脳梗塞患者における CLZ の体内動態に対する代謝酵素の遺伝子多型の影響は限定的であると推察された。*CYP2C19* の遺伝子多型と CLZ および代謝物の血漿中濃度との関連は示されなかった。一方、*CYP3A5*\*1 非保有群と \*1 保有群との比較において、血漿中 OPC13015/CLZ に有意差が認められた。これは *CYP2C19* の阻害作用を有するランソプラゾールやエソメプラゾール、オメプラゾール、クロピドグレルを併用している対象 23 名においても同様の傾向を示した。これらの結果より、実臨床で

CYP2C19 阻害薬を併用する機会が多い脳梗塞患者において、CLZ および代謝物の体内動態は *CYP3A5* の遺伝子多型による影響を受けることが明らかになった。

第 2 章では、CLZ 導入前と導入後 4-6 日目の血圧および脈拍の変動と代謝物を含む CLZ 血漿中濃度との関連性を検討し、さらに患者背景因子や血液検査結果を調査し、脈拍の変動の説明因子をステップワイズ法による重回帰分析にて検討した。血圧の変動に関しては収縮期、拡張期ともに CLZ および代謝物の血漿中濃度との関連はみられなかった。一方、脈拍の変動と CLZ および代謝物の血漿中濃度および効力調整活性部分量と正の相関を示した。これにより CLZ および代謝物による心血管系作用と抗血小板作用との間に相関を示す可能性が考えられた。重回帰分析の結果では、CLZ 服用後の脈拍変動は、血漿中 OPC-13015 濃度、BUN および導入前の脈拍の 3 要因により、55.5 % が説明可能であることが示された。

以上より、脳梗塞患者における CLZ 投与後の心血管系副作用の発現予測式を作成すると共に、CLZ の活性代謝物である OPC-13015 の血漿中濃度測定が副作用予測に有用である可能性を示した。本研究を臨床現場において応用することにより、CLZ による脳梗塞二次予防治療への貢献が期待される。

## 謝辞

本研究の遂行にあたり、終始熱心な御指導、御鞭撻を賜り、かつ本稿の御校閲を頂きました静岡県立大学薬学研究院薬学専攻臨床薬剤学講座 賀川義之教授に厚く御礼申し上げます。

本論文の御高覧と、御指導、御助言を賜りました静岡県立大学薬学研究院 伊藤邦彦教授、山田浩教授、および内田信也教授に深く感謝致します。

本研究の遂行にあたり、数々の御協力を賜りました島田市立総合医療センター脳神経外科 山内滋医師主任部長、山形桂司医師医長、金城雄太医師医長、浦野裕美子医師医長および村田敬二医師病院顧問に心より感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、数々の御協力を賜りました市立島田総合医療センター薬剤部 浅原 慶徳薬剤部長に心より感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、御指導、御助言を賜りました静岡県立大学薬学研究院薬学専攻臨床薬剤学講座 前田利男客員教授に深く感謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり、御指導、御助言を賜りました静岡県立大学薬学研究院薬学専攻臨床薬剤学講座 宮寄靖則准教授、内野智信講師、大澤隆志講師、谷澤康玄助教に深く感謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり、御協力いただきました患者様に心より感謝申し上げます。

終わりに、本研究において数々の御協力いただきました静岡県立大学薬学部臨床薬剤学講座の諸氏ならびに学生生活において様々な場面においてお世話になりました方々に心より感謝の意を表します。

## 参考文献

- 1) 厚生労働省ホームページ. “令和元年 (2019) 死因簡単分類別にみた性別死亡数・死亡率”. 2020-09-17. [mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jimkou/kakutei19/dl/11\\_h7.pdf](https://mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jimkou/kakutei19/dl/11_h7.pdf). (参照 2021-03-24).
- 2) Toyoda K. Epidemiology and registry studies of stroke in Japan. *J Stroke* 2013; 15:21-26.
- 3) 脳卒中治療ガイドライン 2015 [追補 2019], 日本脳卒中学会, 2019 年, P42-63.
- 4) 石川 達也, 湯浅 直樹, 大友 卓 ほか. 急性期脳梗塞に対するオザグレルナトリウムの投与開始時間と予後に関する検討. *脳卒中* 2008; 30: 1-6.
- 5) Hata J, Tanizaki Y, Kiyohara Y, et al. Ten year recurrence after first ever stroke in a Japanese community; the Hisayama study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005; 76: 368-372.
- 6) Sudo T, Tachibana K, Toga K, et al. Potent effects of novel anti-platelet aggregatory cilostamide analogues on recombinant cyclic nucleotide phosphodiesterase isozyme activity. *Biochem Pharmacol* 2000; 59: 347-356.
- 7) Igawa T, Tani T, Chijiwa T, et al. Potentiation of anti-platelet aggregating activity of cilostazol with vascular endothelial cells. *Thromb Res* 1990; 57: 617-623.
- 8) Kimura Y, Tani T, Kanbe T, Watanabe K. Effect of cilostazol on platelet aggregation and experimental thrombosis. *Arzneimittelforschung* 1985; 35: 1144-1149.
- 9) Dawson DL, Cutler BS, Meissner MH, et al. Cilostazol has beneficial effects in treatment of intermittent claudication: results from a multicenter, randomized, prospective, double-blind trial. *Circulation* 1998; 98: 678-86.
- 10) Gotoh F, Tohgi H, Hirai S, et al. Cilostazol stroke prevention study: A placebo-controlled double-blind trial for secondary prevention of cerebral infarction. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2000; 9: 147-157.
- 11) Kamal AK, Naqvi I, Husain MR, et al. Cilostazol versus aspirin for secondary prevention

of vascular events after stroke of arterial origin. *Cochrane Database Syst Rev* 2011; (1): CD008076.

- 12) Schrör K. The Pharmacology of cilostazol. *Diabetes Obes Metab* 2002; 4: S14-19.
- 13) Pratt CM. Analysis of the cilostazol safety database. *Am J Cardiol* 2001; 87: 28D-33D.
- 14) プレタール®OD錠 添付文書 (改訂第1版)
- 15) Bramer SL, Forbes WP, Mallikaarjun S. Cilostazol pharmacokinetics after single and multiple oral doses in healthy males and patients with intermittent claudication resulting from peripheral arterial disease. *Clin Pharmacokinet* 1999; 37: 1-11.
- 16) Akiyama H, Kudo S, Shimizu T. The absorption, distribution and excretion of a new antithrombotic and vasodilating agent, cilostazol, in rat, rabbit, dog and man. *Arzneimittelforschung* 1985; 35: 1124-1132.
- 17) Suri A, Forbes WP, Bramer SL. Pharmacokinetics of multiple-dose oral cilostazol in middle-age and elderly men and woman. *J Clin Pharmacol* 1998; 38: 144-150.
- 18) Mallikaarjun S, Forbes WP, Bramer SL. Effect of renal impairment on the pharmacokinetics of cilostazol and its metabolites. *Clin Pharmacokinet* 1999; 37: 33-40.
- 19) Lee D, Lim LA, Jang SB, et al. Pharmacokinetic comparison of sustained- and immediate-release oral formulations of cilostazol in healthy Korean subjects: a randomized, open-label, 3-part, sequential, 2-period, crossover, single-dose, food-effect, and multiple-dose study. *Clin Ther* 2011; 33:2038-2053.
- 20) Abbas R, Chow CP, Browder NJ, et al. In vitro metabolism and interaction of cilostazol with human hepatic cytochrome P450 isoforms. *Hum Exp Toxicol* 2000; 19: 178-184.
- 21) Hiratsuka M, Hinai Y, Sasaki T, et al. Characterization of human cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of cilostazol. *Drug Metab Dispos* 2007; 35: 1730-1732.
- 22) Okuda Y, Kimura Y, Yamashita K. Cilostazol. *Cardiovasc Drug Rev* 1993; 11: 451-465.

- 23) de Morais SM, Wilkinson GR, Blaisdell J, et al. The major genetic defect responsible for the polymorphism of S-mephenytoin metabolism in human. *J Biol Chem* 1994; 369: 15419-15422.
- 24) de Morais SMF, Wilkinson GR, Blaisdell J, Meyer UA, Nakamura K, Goldstein JA. Identification of a new genetic defect responsible for the polymorphism of (S)-mephenytoin metabolism in Japanese. *Mol Pharmacol* 1994; 46: 594-598.
- 25) Myrand SP, Sekiguchi K, Man MZ, et al. Pharmacokinetics/genotype associations for major cytochrome P450 enzymes in native and first- and third-generation Japanese populations: comparison with Korean, Chinese, and Caucasian populations. *Clin Pharmacol Ther* 2008; 84:347-361.
- 26) Ieiri I, Kubota T, Urae A, et al. Pharmacokinetics of omeprazole (a substrate of CYP2C19) and comparison with two mutant alleles, C gamma P2C19m1 in exon 5 and C gamma P2C19m2 in exon 4, in Japanese subjects *Clin Pharmacol Ther* 1996; 59: 647-653.
- 27) Furuta T, Ohashi K, Kamata T, et al. Effect of genetic differences in omeprazole metabolism on cure rates for Helicobacter pylori infection and peptic ulcer. *Ann Intern Med* 1998; 129:1027-1030.
- 28) Kuehl P, Zhang J, Lin Y, et al. Sequence diversity in *CYP3A* promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet* 2001; 27: 383-391.
- 29) Tada H, Tsuchiya N, Satoh S, et al. Impact of *CYP3A5* and *MDR1 (ABCB1)* C3435T polymorphisms on the pharmacokinetics of tacrolimus in renal transplant recipients. *Transplant Proc* 2005; 37: 1730-1732.
- 30) Uesugi M, Masuda S, Katsuura T, Oike F, Takada T, Inui K. Effect of intestinal CYP3A5 on postoperative tacrolimustrough levels in living-donor livertransplant recipients. *Pharmacogenet Genomics* 2006; 16: 119-127.

- 31) Kagawa Y, Yamamoto Y, Ueno A, Maeda T, Obi T. Impact of *CYP2D6*, *CYP3A5*, and *ABCB1* polymorphisms on plasma concentrations of donepezil and its metabolite in patients with alzheimer disease. *Ther Drug Monit.* 2021; 43: 429-435.
- 32) Yoo HD, Park SA, Cho HY, et al. Influence of *CYP3A* and *CYP2C19* genetic polymorphisms on the pharmacokinetics of cilostazol in healthy subjects. *Clin Pharmacol Ther* 2009; 86: 281-284.
- 33) Yoo HD, Cho HY, Lee YB. Population pharmacokinetic analysis of cilostazol in healthy subjects with genetic polymorphisms of *CYP3A5*, *CYP2C19* and *ABCB1*. *Br J Clin Pharmacol* 2010; 69: 27-37.
- 34) Lee HI, Byeon JY, Kim YH, et al. Effects of *CYP2C19* and *CYP3A5* genetic polymorphisms on the pharmacokinetics of cilostazol and its active metabolites. *Eur J Clin Pharmacol* 2018; 74: 1417-1426.
- 35) Ikeda Y, Kikuchi M, Murakami H, et al. Comparison of the inhibitory effects of cilostazol, acetylsalicylic acid and ticlopidine on platelet functions ex vivo. Randomized, double-blind cross-over study. *Arzneimittelforschung* 1987; 37:563-566.
- 36) Oishi M, Mochizuki Y, Shikata E, Satoh Y. Effect of cilostazol on cerebral blood flows in chronic stage cerebral circulation. *Keio J Med* 2000; 49: A145-147.
- 37) Woo SK, Kang WK, Kwon K. Pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling of the antiplatelet and cardiovascular effects of cilostazol in healthy humans. *Clin Pharmacol Ther* 2002; 71: 246-252.
- 38) Ishida S, Morii M, Ueno K, et al. Studies on factor affecting pharmacokinetics of cilostazol and pharmacokinetics-pharmacodynamics analysis based platelet aggregation. *Jpn J Hosp Pharm* 2000; 26: 264-272.
- 39) Iwamoto T, Kin K, Miyazaki K, et al. Recovery of platelet function after withdrawal of

- cilostazol administered orally for a long period. *J Atheroscler Thromb* 2003; 10: 348-354.
- 40) Dziedzic T, Pera J, Slowik A, et al. Hypoalbuminemia in acute ischemic stroke patients: frequency and correlates. *Eur J Clin Nutr* 2007 ; 61 : 1318-1322.
- 41) Nakayama M, Metoki H, Terawaki H, et al. Kidney dysfunction as a risk factor for first symptomatic stroke events in a general Japanese population-the Ohasama study. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22: 1910-1915.
- 42) Irie F, Iso H, Sairenchi T, et al. The relationships of proteinuria, serum creatinine, glomerular filtration rate with cardiovascular disease mortality in Japanese general population. *Kidney Int* 2006; 69: 1264-1271.
- 43) Bramer SL, Tana PN, Vengurlekar SS, et al. Method for the quantitative analysis of cilostazol and its metabolites in human using LC/MS/MS. *J Pharm Biomed Anal* 2001; 26: 637-650.
- 44) Bhatt NM, Chavada VD, Patel DP, et al. Determination of cilostazol and its active metabolite 3,4-dehydro cilostazol from small plasma volume by UPLC-MS/MS. *J Pharm Anal* 2015; 5: 1-11.
- 45) Kubota T, Chiba K, Ishizaki T. Genotyping of S-mephenytoin 4'-hydroxylation in an extended Japanese population. *Clin Pharmacol Ther* 1996; 60: 661-666.
- 46) ICH Q2 (R1) Guideline: VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY. 1994. Available at: <http://www.pmda.go.jp/files/000156867.pdf>
- 47) US Food and Drug Administration. Guidance for industry. Bioanalytical Method Validation. 2001. Available at: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070107.pdf>. (引用 2019-10-24).
- 48) Li XQ, Andersson TB, Ahlström M, Weidolf L. Comparison of inhibitory effects of the proton pump-inhibiting drugs omeprazole, esomeprazole, lansoprazole, pantoprazole, and

- rabeprazole on human cytochrome P450 activities. *Drug Metab Dispos* 2004; 32: 821-827.
- 49) Nishiya Y, Hagihara K, Kurihara A, et al. Comparison of mechanism-based inhibition of human cytochrome P450 2C19 by ticlopidine, clopidogrel, and prasugrel. *Xenobiotica* 2009; 39: 836-843.
- 50) Kim HS, Lim Y, Oh M, et al. The pharmacokinetic and pharmacodynamic interaction of clopidogrel and cilostazol in relation to CYP2C19 and CYP3A5 genotypes. *Br J Clin Pharmacol* 2016; 81: 301-312.
- 51) Nishiyama K, Seyama H, Okano H, et al. Escalation regimen of cilostazol for acute brain infarction. *Intern Med* 2011; 50: 1559-1563.
- 52) Y Kanda. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant* 2013 ; 48 : 452-458.
- 53) Fonarow GC, Adams KF Jr, Abraham WT, Yancy CW, Boscardin WJ. Risk stratification for in-hospital mortality in acutely decompensated heart failure: classification and regression tree analysis. *JAMA* 2005; 293: 572-580.
- 54) Miura M, Sakata Y, Nochioka K, et al. Prognostic impact of blood urea nitrogen changes during hospitalization in patients with acute heart failure syndrome. *Cir J* 2013; 77: 1221-1228.
- 55) Valente MA, Voors AA, Damman K, et al. Diuretic response in acute heart failure: clinical characteristics and prognostic significance. *Eur Heart J* 2014; 35: 1284-1293.
- 56) Toyonaga S, Nakatsu T, Murakami T, et al. Effects of cilostazol on heart rate and its variation in patients with atrial fibrillation associated with bradycardia. *J Cardiovasc Pharmacol Therapeut* 2000; 5: 183-191.
- 57) プレタール®OD錠 インタビューフォーム (第19版)