

学位論文の内容の要旨

学位論文題目 リトドリンの体内動態と母子間移行の定量的評価

論文指導教授 猪 爪 信 夫

学位申請者 相 馬 まゆ子

わが国の出生数は、1990年122.2万人(出生率1.54)より、2011年105.1万人(出生率1.39)と少子化の傾向を示し、長期的に人口を維持するのに必要な2.07以上の出生率と比較して極めて低い値となっている。一方、早産率は1990年の4.52%から2011年では5.74%と増加している。日本産科婦人科学会では、早産を「妊娠22週以降から37週未満の分娩」としており、切迫早産は「妊娠22週以降から37週未満に下腹痛(10分に1回以上の陣痛)、性器出血、破水などの症状に加えて、外測陣痛計で規則的な子宮収縮があり、内診では、子宮口開大、子宮頸管展退などが認められ、早産の危険性が高い状態」としている。また、1990年における多胎の妊娠率は1.37%であったが、不妊治療の際に用いられる排卵誘発剤や生殖補助医療などにより2010年には1.89%と頻度が増加している。多胎妊娠では、単胎と比較して、32週未満の早産では早産リスクが約8倍に増加し、32～37週では早産リスクが約12倍に増加する。早産にて出生した児は、低出生体重児(2,500g未満)の可能性が高く、正期産児に比べ発達予後が不良である。特に超低出生体重児(1,000g未満)に起こる脳性麻痺や精神発達遅滞の発症率は正期産児と比較し明らかに高率である。そのため、わが国の周産期医療では、在胎日数をできるだけ延長させて胎児の成熟度を向上させることを目的として子宮収縮抑制薬を長期間投与し、陣痛の発来を抑制する治療が行われている。日本における早産治療薬としては、子宮収縮を抑制する選択的 β_2 作動薬であるリトドリン塩酸塩が主に用いられている。血清中リトドリン濃度と子宮収縮抑制頻度に相関性があることが認められているが、単胎妊婦と双胎妊婦に分けてリトドリンの体内動態を精査した報告は少なく、分娩転帰と得られた血清中リトドリン濃度ならびにリトドリン全身クリアランスについて比較した報告はない。

2011年11月には医薬品・医療機器等安全性情報 No.285 において、リトドリンの胎児及び新生児に対する心不全の副作用が通知され、妊娠の継続への適正使用の推進のみならず、分娩後での新生児への適切な診断が必須であると注意喚起された。したがって、新生児におけるリトドリン体内動態の評価のための高感度定量法の開発が必要と考えられる。

本研究では、単胎と双胎妊婦において、リトドリン持続注入療法時の定常状態における血清中リトドリン濃度を測定し、全身クリアランスと分娩転帰などの関連性について比較検討した。また、双胎妊婦の帝王切開術施行時において、母体ならびに臍帯静脈血清中リトドリン濃度を測定し、リトドリンの母児間移行率を評価した。

さらに、分娩後の新生児血清中リトドリン濃度情報を集積するため、内部標準物質として重水素標識リトドリン (Fig. 1) を用いた液体クロマトグラフ・タンデム質量分析 (LC-MS/MS) 法による定量法を開発し、臨床解析に用いた。

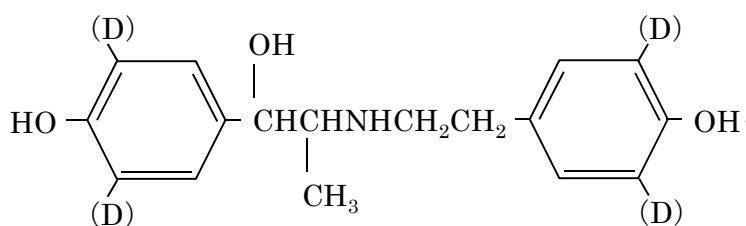


Fig. 1. Structures of ritodrine and ritodrine-d₄.

本研究では、天使病院倫理委員会の承認と、妊婦から書面による試験参加の同意を得た。

1. 単胎及び双胎妊娠妊婦におけるリトドリンの体内動態差

対象は天使病院において、2004年11月から2010年3月に切迫早産と診断され、リトドリンの持続注入治療を受けた単胎妊婦67名（採血点213点）、双胎妊婦38名（182点）の合計105名（395点）である (Table 1)。

Table 1. Characteristics of the patients.

	Singletons Mean \pm SD (range)	Twins Mean \pm SD (range)	p
No. patients	67	38	-
No. blood samples	213	182	-
Age (y)	32.3 \pm 5.4 (20-42)	31.8 \pm 4.5 (18-42)	n.s.
Weight (kg)	57.9 \pm 9.3 (39.2-95.2)	63.0 \pm 8.9 (37.0-97.2)	< 0.001
Infusion rate (μ g/min/kg)	2.1 \pm 1.4 (0.4-7.1)	2.3 \pm 1.1 (0.7-4.7)	n.s.
Serum concentration (ng/mL)	73.0 \pm 46.7 (18.4-220)	88.2 \pm 46.8 (28.4-290)	< 0.01
Clearance (L/h/kg)	1.75 \pm 0.43 (0.69-3.65)	1.59 \pm 0.30 (0.83-2.47)	< 0.01

血清中リトドリン濃度を、蛍光検出器を用いた HPLC 法により測定したところ、双胎妊婦のリトドリン全身クリアランスは、単胎妊婦よりも有意に低い結果となった(1.59 \pm 0.30 L/h/kg vs 1.75 \pm 0.43 L/h/kg, $p < 0.01$) (Table 1, Fig. 2)。早産した単胎妊婦と双胎妊婦では、血清中リトドリン濃度に有意な差は認められなかった(97.5 \pm 61.1 ng/mL vs 89.6 \pm 50.4 ng/mL, n.s.)(Table 2)。正期産では、双胎妊婦の血清中リトドリン濃度は単胎妊婦に比較して高い濃度に維持された(85.8 \pm 39.7 ng/mL vs 65.7 \pm 38.7 ng/mL, $p < 0.001$)(Table 2)。

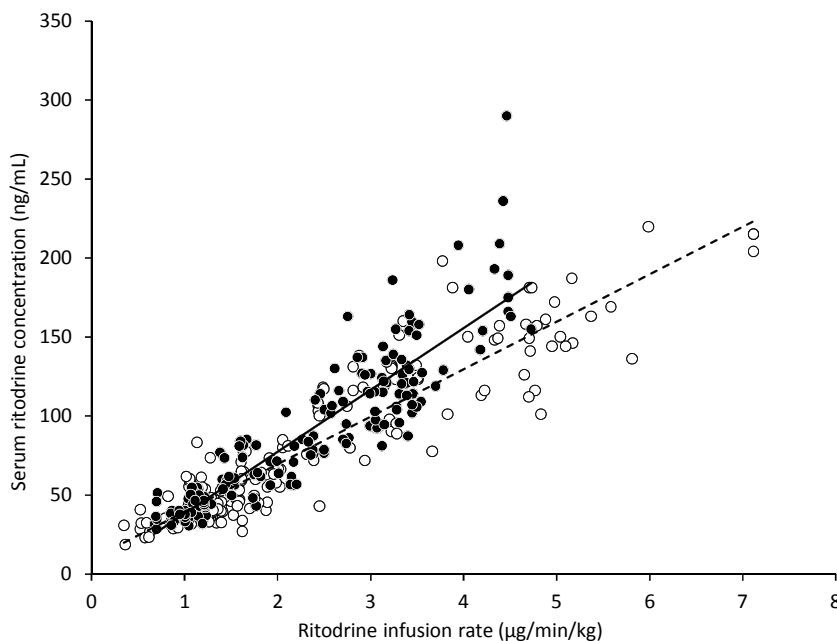


Fig. 2. Relationship between ritodrine infusion rate and serum ritodrine concentration in 67 singleton (○, $y = 30.1x + 9.34$, $r = 0.930$) and 38 twin (●, $y = 39.2x - 0.79$, $r = 0.907$) pregnancies. Regression lines of singleton and twin pregnancies significantly differ ($p < 0.01$).

Table 2. Delivery outcomes of the patients.

	Singletons Means ± SD (range)	Twins Mean ± SD (range)	p
Premature			
No. of patients	20	25	-
Week of birth	33.5 ± 3.60 (26.4-36.9)	35.1 ± 2.35 (26.9-36.9)	n.s.
Birth weight (g)	2093 ± 845 (524-3320)	First 2300 ± 442 (1538-2936) Second 2115 ± 533 (1174-3236)	n.s.
Serum concentration (ng/mL)	49 samples 97.5 ± 61.1 (29.2-220) *	117 samples 89.6 ± 50.4 (28.4-290)	n.s.
Clearance (L/h/kg)	1.77 ± 0.45(0.69-2.84)	1.53 ± 0.28 (0.83-2.34)†	< 0.01
Term			
No. of patients	47	13	-
Week of birth	38.1 ± 1.17 (37.0-40.7)	37.0 ± 0.04 (37.0-37.1)	< 0.001
Birth weight (g)	2932 ± 440 (1524-4004)	First 2627 ± 323 (2106-3200) Second 2507 ± 277 (2062-2994)	< 0.05
Serum concentration (ng/mL)	164 samples 65.7 ± 38.7 (18.4-187)	65 samples 85.8 ± 39.7 (30.4-208)	< 0.001
Clearance (L/h/kg)	1.75 ± 0.43 (0.82-3.65)	1.69 ± 0.31 (1.14-2.47)	n.s.

*p < 0.01 vs singleton term deliveries; †p < 0.05 vs Twin term deliveries.

妊娠期間中は母体の生理機能の変化により、薬物の体内動態も変化することが知られている。さらに、母体の循環血量や羊水量などの違いから、単胎と双胎妊娠では投与された薬物のクリアランスなどに差があり、双胎妊婦の全身クリアランスは、単胎妊婦と比較して低下していると考えられる (Fig. 3)。

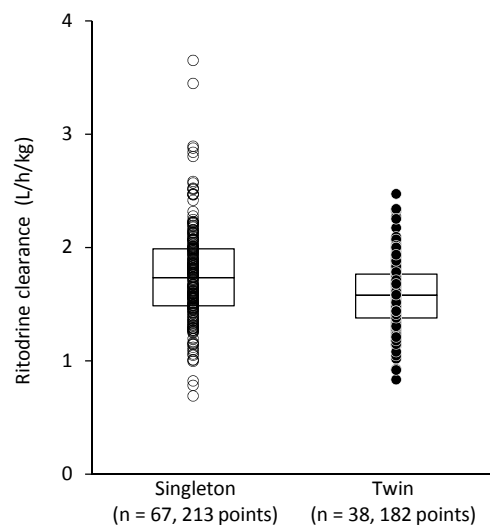


Fig. 3. Maternal ritodrine clearance in singleton and twin pregnancies.

Lines within boxes define median; ends of boxes define 25th and 75th percentiles. Clearance is significantly lower in twin (●, 1.59 ± 0.30 (0.83 - 2.47)) than singleton (○, 1.75 ± 0.43 (0.69 - 3.65, L/h/kg); p < 0.001) pregnancies.

早産妊婦では正期産妊婦に比較して高い血清中リトドリン濃度であったが、妊娠を継続できなかつたと考えられる。一方、正期産妊婦では、双胎の子宮内容積が大きいため、高い血清中リトドリン濃度が妊娠継続に必要と考えられる。したがって、妊娠を継続するためには胎児数によりリトドリン投与量を管理する必要性があると考えられる。

2. 双胎妊婦におけるリトドリンの母胎児間移行

リトドリンは胎盤を通過し、新生児において頻脈、低血糖症、腸管麻痺が報告されているが、母子間移行率についての報告はほとんどない。対象妊婦は二絨膜二羊膜双胎であり、2009年4月から2010年3月までの1年間に切迫早産と診断され、子宮収縮状況、母体の心不全などの副作用をモニタリングしながらリトドリンによる切迫早産治療を続け、帝王切開術により分娩した双胎妊婦14名である(Table 3)。血液は天使病院の帝王切開術施行日におけるプロトコルに従って採血された。血清中リトドリン濃度は、蛍光検出器を用いたHPLC法により測定した。

Table 3. Characteristics of dichorionic twin pregnancies.

Category		Mean ± SD (Range)	
Study period		April 2009 – March 2010	
Maternal	Subjects	14	
	Age (yrs)	34 ± 4 (23 - 38)	
	Weight (kg)	63.1 ± 9.8 (47.6 - 77.6)	
	Week of pregnancy (weeks)	35.7 ± 1.4 (33.0 - 37.3)	
	Ritodrine infusion time (days)	51 ± 26 (23 - 111)	
	Ritodrine infusion rate (µg/min/kg)	2.08 ± 1.33 (0.56-4.20)	
	Ritodrine concentration of vein (ng/ml)	58.2 ± 33.9 (21.8 - 126.0)	
Newborns	Subjects	28	
	Weight	First (g)	2355 ± 481 (1836 - 3517) *
		Second (g)	2167 ± 456 (1420 - 3160)
	Ritodrine concentration of umbilical vein		
		First (ng/ml)	60.3 ± 36.8 (22.2 - 129.0)
Second (ng/ml)		65.3 ± 37.2 (22.6 - 128.0)	

*p<0.05 vs Second newborn

妊娠を継続するために必要なリトドリン濃度は、21.8-126.0 ng/mLであった (Table 3)。母体血清中、第1子と第2子臍帯血清中のリトドリン濃度はそれぞれ 58.2 ± 33.9 、 60.3 ± 36.8 、 65.3 ± 37.2 ng/mL であり、統計的な有意差は認められなかった (Table 3)。母児間の移行率は、第1子が 0.65-1.40 (1.05 ± 0.23)、第2子が 0.75-1.64 (1.15 ± 0.26) の範囲であった (Table 3、Fig. 4)。母児間の血清中リトドリン濃度は平均値としてほぼ等しいが、個人差が約 2-3 倍との結果となった。

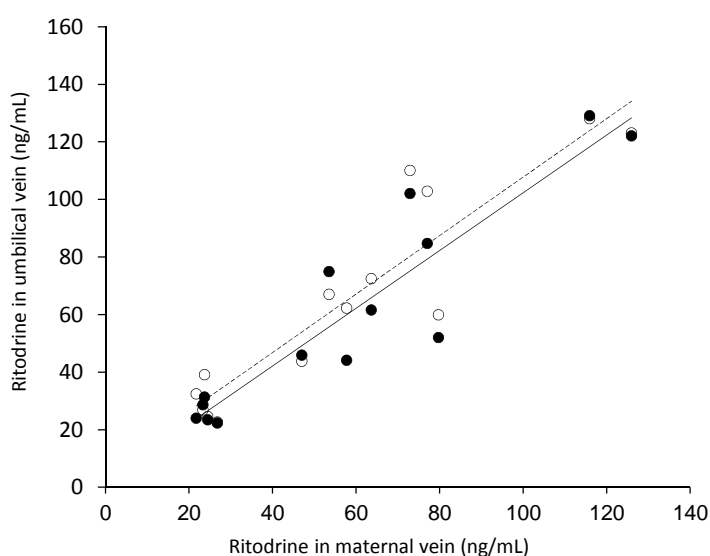


Fig. 4. Relationship between umbilical and maternal serum ritodrine concentration in first (●, $y = 1.00x + 2.01$, $r = 0.92$) and second newborn (○, $y = 1.02x + 6.19$, $r = 0.93$), $n = 14$.

3. LC-MS/MS による血清中リトドリン濃度の新規高感度定量法の開発

新生児のリトドリン血清中濃度を測定するため、LC-MS/MS を用いた高感度定量法を開発した。内部標準物質は、リトドリンに 4 つの重水素を導入したリトドリン- d_4 を用いた (Fig. 1)。リトドリンとリトドリン- d_4 のプレカーサーイオンとして m/z 270.0 と 274.0 を設定し、プロダクトイオンをそれぞれ 121.3 と 123.3 として multiple reaction monitoring (MRM) 測定した (Fig. 5)。定量時における妨害ピークは認められなかった。血清 100 μ L を用いたときの検量線は直線 $y = 0.555x + 0.093$ が得られ、相関係数は、 $r = 0.998$ であった。検出限

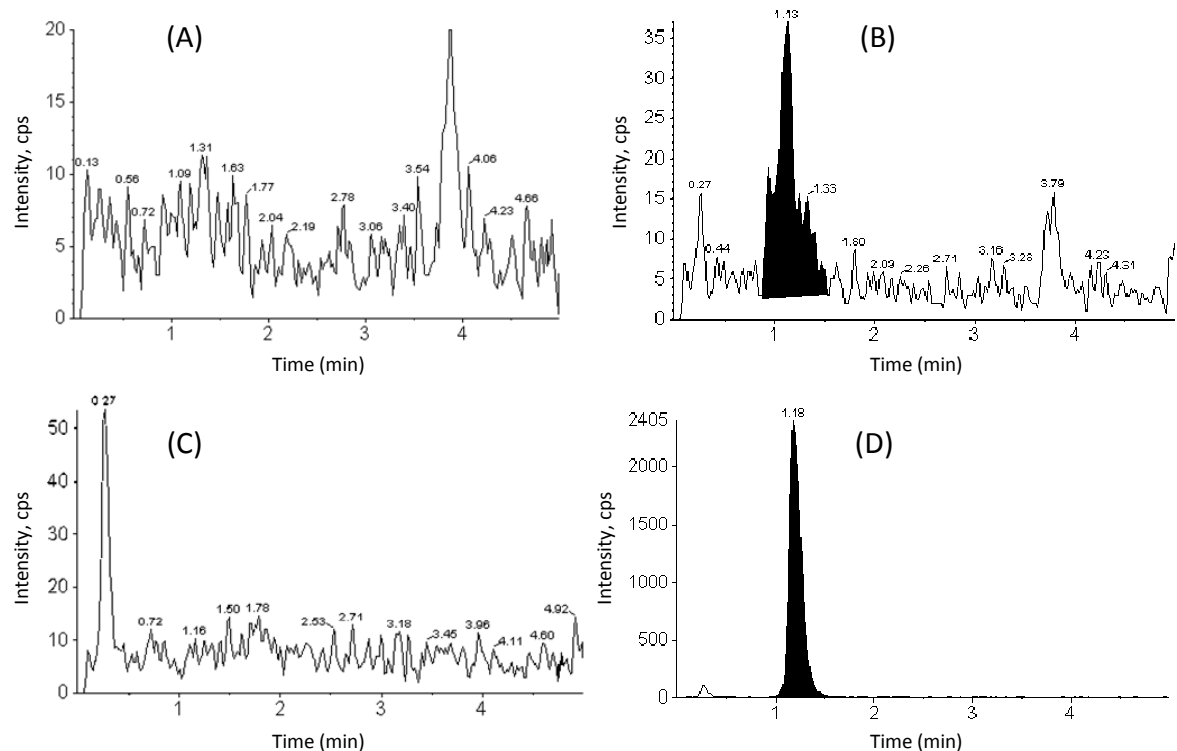


Fig. 5. MRM chromatograms.

(A) Blank human serum (m/z:270.0/121.3); (B) Human serum spiked with ritodrine 0.1 ng/mL (LOD) (m/z:270.0/121.3); (C) Blank serum (m/z:274.0/123.3); (D) Human serum spiked with ritodrine-d₄ 10 ng/mL (m/z:274.0/123.3).

界は 0.1 ng/mL であり、定量限界 (LLOQ) は、0.3 ng/mL であった。LLOQ 値の日内再現性の変動係数は 8.3% であり、回収率は 116.7% であった。日内再現性の変動係数は、5、10、100 ng/mL において、おのおの 4.7%、5.6%、6.5% であり、回収率は 96.0%、99.6%、102.0% であった。日間再現性の変動係数は、5、10、100 ng/mL において、おのおの 5.6~7.2%、6.0~9.4%、3.5~9.1% であった。

本測定法によりリトドリン治療中の 32 才の双胎妊婦および新生児の血清を測定したところ、母体消失相の 2 点(分娩時 114.9 ng/mL、24 h 後 3.3 ng/mL) から得られた半減期は 4.7 h であった。また、第 1 子の 2 点(臍帯血 48.3 ng/mL、20 h 後静脈血 9.9 ng/mL)、第 2 子の 2 点(臍帯血 47.8 ng/mL、20 h 後静脈血 9.3 ng/mL) から得られた半減期はそれぞれ 8.7 h と 8.5 h であり、母体リトドリン半減期の約 2 倍であった(Fig. 6、Table 4)。HPLC 法で求めたリトドリンの母子間移行率と同じように、LC-MS/MS 法によっても母体と新生児の血清中リトドリン濃度には差があり、同じ母体から出生した新生児の血清中リトドリン濃度と半減期にも差があることが示された。

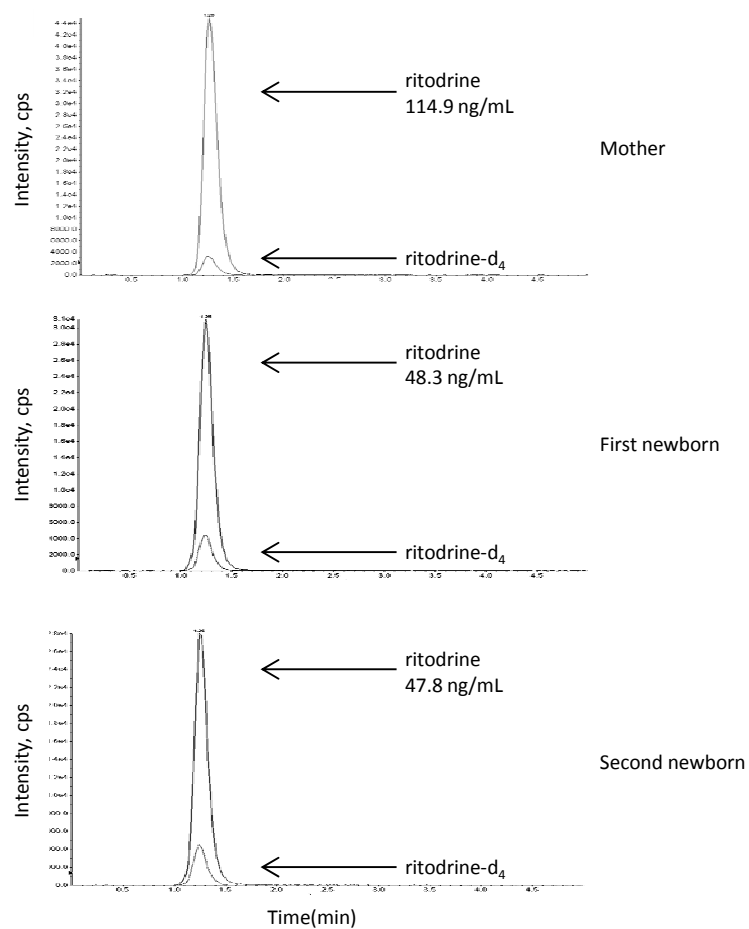


Fig. 6. Typical MRM chromatograms of mother and newborns.

Table 4. Ritodrine pharmacokinetics.

Mother				
Gestation period Week	Ritodrine dose ($\mu\text{g}/\text{min}/\text{kg}$)	Serum concentration (ng/mL)	Total body clearance (L/h/kg)	$t_{1/2}$ (h)
35.0	2.22	100.5	1.34	
		114.9 (after delivery)	-	4.7
		3.3 (24 h after delivery)	-	
Neonates				
	Sex	Ritodrine in umbilical vein (ng/mL)	Serum ritodrine 20 h after delivery (ng/mL)	$t_{1/2}$ (h)
First newborn (2280 g) Apgar score (1→5 min) 8 → 9	Male	48.3	9.9	8.7
Second newborn (2166 g) Apgar score (1→ 5 min) 8 → 9	Female	47.8	9.3	8.5

まとめ

リトドリンの持続注入療法が行われた単胎と双胎妊婦の定常状態における血清中リトドリン濃度を解析したところ、単胎と双胎妊婦における体内動態には有意な差を認めた。また、双胎妊婦からの臍帯血清中リトドリン濃度を解析したところ、リトドリンは容易に胎盤を通過する結果が得られた。そのため、必要検体量が少なく、簡便で定量感度および特異性に優れたリトドリンの高感度 LC-MS/MS 法を開発した。HPLC 法と開発した LC-MS/MS 法により血清中リトドリン濃度を測定したところ、母体、第 1 子、第 2 子において大きな体内動態の個体差を認めた。妊婦と胎児、さらには新生児におけるリトドリンの体内動態について臨床効果と副作用との関連解析が必要であり、その際には、新規に開発した高感度 LC-MS/MS 法が有用と考えられる。