

脳血栓・塞栓症における新規治療標的の探索  
及び医薬品製造販売後の適正使用に関する包括的研究

鈴木 悠起也

## 目次

序論	4 頁
第 1 章 脳虚血後炎症における自然免疫受容体 TLR4 及び NOX4 の関与	10 頁
第 1 節 緒言	
第 2 節 方法	
第 3 節 実験結果	
第 4 節 考察	
第 2 章 脳虚血後炎症における自然免疫受容体 Mincle 及び Syk の関与	36 頁
第 1 節 緒言	
第 2 節 方法	
第 3 節 実験結果	
第 4 節 考察	
第 3 章 大規模有害事象自発報告データベースを用いた Clopidogrel と Proton pump inhibitor との相互作用に関する解析	57 頁
第 1 節 緒言	
第 2 節 方法	
第 3 節 実験結果	
第 4 節 考察	
第 4 章 医薬品添付文書の重大な副作用の追記に影響を及ぼす要因の 解析	74 頁
第 1 節 緒言	

第2節 方法

第3節 実験結果

第4節 考察

総括及び結論 87 頁

謝辞 92 頁

引用文献 94 頁

略語一覧表 111 頁

## 序論

今日医療は大きく進歩し、そのなかで医薬品は中心的な役割を果たしてきたが、有効な治療方法がない疾患は未だに多く存在し、これらの疾患に対する革新的な医薬品の開発が求められている。しかしながら、医薬品開発の成功確率は約3万分の1、基礎研究から承認・発売までには9-17年かかるといわれており、膨大なリスクが存在する。低い成功確率と長い開発期間は、費用の面においても大きな負担を強いる。日本製薬工業協会の調査(1)によると、日本における大手10社の平均研究開発費は2000年～2004年に約570億円、2005年～2009年に約1070億円、2010年～2014年に約1290億円とあり、医薬品研究開発に巨額の費用が費やされていること、かつそれが年々増加している。米国においても、大手7社の平均研究開発費は2000年～2004年に28億ドル、2005年～2009年に43億ドル、2010年～2014年に59億ドルとあり、同様の状況といえる。この高いコストは、特に開発リスクが高い疾患領域や希少疾患に対する医薬品開発において大きな障壁となっている。このような深刻な状況に対して近年では、ブリッジング戦略や国際共同治験等の導入により医薬品開発が国際化され、各国で重複した試験を実施する必要性がなくなり、開発が成功する前提においては、より少ない時間的・金銭的成本によってより大きな市場を確保することが可能となってきた。また、希少疾患に対しては研究開発促進制度も整備されたことで、より開発されやすいシステムが構築されてきている(2)。一方、開発リスクの高い疾患領域の医薬品開発においては、成功確率を高める有効性に優れた医薬品の開発こそ求められていると考えられる。

医薬品はその有効性によって患者の健康に貢献する一方、副作用によっても重大な影響を与え得る。過去の報告によれば、医薬品の副作用による死亡は米国における全死因のうち第4位になると推計されている(3)。間質性肺炎など重

篤な有害事象が出現する場合には、訴訟にまで発展し、社会問題となる事例もある。市販後になって医薬品の副作用が問題となるひとつの要因として、開発段階又は承認審査時における情報が限られていることが挙げられる。医薬品開発において、薬理試験で有効性が見出された候補物質は、安全性に関する薬理試験及び毒性試験が実施され、これらの成績に基づき臨床試験が実施される。前臨床及び臨床試験の成績等から、リスクに比してベネフィットが上回るとの判断から有用性が認められ承認を得た医薬品が実際の臨床現場で使用される(4)。承認申請前に行われる臨床試験は一般に、①発現頻度の低い副作用を検出する上では検討症例数が少ない、②有効性を評価するために均一な患者集団を対象としており、実臨床で問題となる特殊集団(高齢者、腎機能障害患者又は肝機能障害患者等)の検討症例数が少ない、③同様な理由で併用薬に制限が加えられた患者群を対象としており実臨床で併用される可能性のある医薬品との相互作用に関する情報が不足している、④多くの場合1年超の長期投与時の有効性・安全性が不明であること等の制約がある(5)。したがって、開発時に留まらず製造販売後においても、臨床現場等から新たに得られる有効性及び安全性に係る情報を収集・評価・発信することで、医薬品に関する情報を随時更新しなければいけない。

以上のように、医療の進歩・患者の健康・医薬品産業の発展には、難治性疾患に対する有望な創薬シーズの探索及び製造販売後における医薬品の適正使用・安全性確保はともに欠かせないものである。したがって本研究では、現代において代表的な疾患である脳血栓・塞栓症に着目し、治療標的の探索から医薬品製造販売後の適正使用までを俯瞰した検討を行った。

脳血管障害(脳卒中)は主要な死因の一つであり、我が国において、死因別順位では悪性腫瘍、心疾患、肺炎に次ぐ第4位、死亡数では全死因の約8.9%を占

めている (6)。脳卒中は世界的にも死因の上位であり続けており、現在、死因別順位では虚血性心疾患に次ぐ第 2 位、死亡数では全死因の約 6.7%となっている (7)。また、我が国における要介護患者の約 22%を脳卒中患者が占めており、脳卒中による死亡を免れた場合でも、多くの患者や家族が運動麻痺・寝たきりなどの後遺症に悩んでいる (8)。さらに、総医療費のうち約 6%が脳卒中治療に費やされており、社会的負担も大きい (9)。日本脳卒中データバンクによると、脳卒中の病型別頻度は、一過性脳虚血発作 (TIA) 5.8%、アテローム血栓性梗塞 24.1%、ラクナ梗塞 22.7%、心原性脳塞栓症 19.2%、その他の脳梗塞 5.1%、高血圧性脳出血 13.7%、脳出血 (その他) 3.0%、クモ膜下出血 6.4%とあり、全体の約 60%を脳梗塞が占めている (10)。今後、先進諸国、特に我が国では超高齢化社会や食生活の欧米化などに伴い、脳梗塞患者数のさらなる増大が予想される。

脳梗塞急性期に対する治療薬の開発は、医薬品開発リスクが特に高い領域として知られている。これまでに承認されている脳梗塞急性期治療薬として、血栓溶解を目的とした遺伝子組換えヒト組織性プラスミノゲン活性化因子 (recombinant tissue plasminogen activator; rt-PA) 注射剤がある。1996 年米国での承認以降、欧州やアジアなどで、2005 年 10 月には本邦で承認され、世界各国で臨床使用されている。適応範囲は発症後 3 時間以内となっていたが、海外臨床試験 (ECASS-III) において発症後 4.5 時間以内の患者に対する有用性が示されたことに基づき (11)、欧米のガイドライン及び適応が変更され、2012 年 8 月、本邦においても発症後 3 時間から 4.5 時間以内へ保険適応が変更となった。rt-PA を用いた血栓溶解療法は現在、脳梗塞急性期において主要な治療法となっているが、その使用は出血性梗塞の発症リスクを増大させる側面を合わせもっており、適用可能な患者は限定されている。したがって、脳梗塞発症後における急性期治療薬はほとんど存在しておらず、この状況を打開できる画期的な治療薬

の探索は急務である。しかしながら、血栓を溶解し物理的に血流を再開させる rt-PA 以外、多様なメカニズムを標的としたすべての候補物質が臨床試験で失敗に終わっていることを踏まえると (12)、急激な進行を呈する脳梗塞病態を抑制するには、病態形成に根源的に寄与するメカニズムを治療標的とする必要があると考えられる。そこで本研究の第 1 章及び第 2 章では、脳梗塞急性期病態に対する新規治療標的の探索を行った。

上述のように、開発段階では実臨床で併用される可能性のある医薬品との相互作用に関する情報は不足しているため、市販後の臨床現場において医薬品の併用による影響を検討する必要がある。脳梗塞含む血栓・塞栓症を予防する医薬品は、これまでにいくつか承認販売されてきた。血栓・塞栓の形成過程は、血小板凝集とフィブリン形成に分けられ、それらを予防するための医薬品として抗血小板薬と抗凝固薬が存在する。抗血小板薬は Aspirin を代表として、これまでいくつかの医薬品が承認販売されている。抗凝固薬は長らく、相互作用やモニタリングの必要性など多くの制限を持つ Warfarin に依存してきたが、2011 年約 50 年ぶりに Dabigatran が登場して以降、いくつかの医薬品が承認販売された。各医薬品はそれぞれ異なる作用機序又は特徴を持つが、これらすべての医薬品に共通する共通する目的は“血が固まるのを防ぐ”ことであり、これらに共通する副作用は“出血”である。出血と血栓・塞栓は相反する事象ではあるが、最終的にはともに“血液を失う”ことであり、死に直結しうる。したがって、これらの医薬品の使用には細心の注意が払われなければならない。

抗血小板薬の一つに Clopidogrel がある。Clopidogrel は血小板凝集惹起因子である ADP の受容体を不可逆的に阻害することで血小板凝集・血栓形成を抑制する。脳梗塞症患者を対象とした無作為化二重盲検比較試験において、既に販売されていた Ticlopidine に対する非劣性が認められ、2004 年本邦において「虚血

性脳血管障害（心原性脳塞栓症を除く）後の再発抑制」を効能として承認された。Clopidogrel は CYP2C19 によって活性化されることが知られている。抗血小板薬の長期使用による一般的な副作用として消化管出血があり、その予防に Proton pump inhibitor (PPI) が使用されるが、CYP2C19 によって代謝を受ける PPI との相互作用により、Clopidogrel の効果減弱が懸念されている (13)。2 剤の併用による影響に関して、これまでにいくつかの観察研究や臨床試験がされてきており、血栓塞栓リスクを上昇させる、あるいは上昇させない等、様々な意見が出されているが、臨床実態に基づく評価は未だになされていない。そこで本研究の第 3 章では、Clopidogrel と PPI との相互作用について検討を行った。

医薬品添付文書は、臨床現場における医薬品の主な情報源の一つである。したがって、どのような根拠に基づき添付文書の内容が記載されているかを把握することは医薬品を適正に使用する上で重要と考えられる。製造販売後の安全対策において、規制当局、すなわち国内においては医薬品医療機器総合機構及び厚生労働省は重要な役割を果たしている。規制当局は臨床現場において収集された医薬品の有害事象に関する情報を副作用報告として一元的に管理し、医薬品の製造販売後の情報の評価を行い、安全対策の必要性について検討を行っている (14)。一方、医薬品医療機器総合機構は企業から添付文書改訂の相談を受け、その妥当性を検討している。これらの検討の結果、医薬品の添付文書の「使用上の注意の改訂指示」等の安全対策を実施している (15)。規制当局による安全対策について、どのような要因に基づき改訂されているかを検討した研究はこれまでなされていない。そこで本研究の第 4 章では、添付文書改訂に影響を与える要因を検討した。

本研究では、第 1 章及び第 2 章において、開発ニーズの高い脳梗塞急性期に対する新規標的及び新規治療薬の探索を目的として、マウス病態モデル等を用

いて、炎症の発生に根源的に寄与するとされている自然免疫受容体及び関連因子の脳梗塞急性期への関与、及びそれらを標的とした化合物の有効性について検討した。第 1 章では、脳虚血後炎症における自然免疫受容体 TLR4 及び下流シグナルとしての NOX4 の関与、並びに TLR4 シグナル伝達阻害剤の有効性について検討した。第 2 章では、脳虚血後炎症における自然免疫受容体 Mincle 及び下流シグナルとしての Syk の関与、並びに Syk 阻害剤の有効性について検討した。つぎに、第 3 章及び第 4 章において、製造販売後における医薬品の相互作用及び安全対策の要因について検討を行った。第 3 章では、大規模有害事象自発報告データベースを用いて、抗血小板薬 Clopidogrel と PPI との相互作用について検討した。第 4 章では、規制当局より公表されている情報を用いて、医薬品添付文書の「使用上の注意の改訂指示」のうち「重大な副作用」の追記を対象に、添付文書改訂に影響を及ぼす要因について検討を行った。そのなかで、有害事象としての脳梗塞又は血栓症の特徴についても検討を行った。

## 第1章 脳虚血後炎症における自然免疫受容体 TLR4 及び NOX4 の 関与

### 第1節 緒言

脳血管障害 (脳卒中) は主要な死因の一つであり、今後先進諸国、特に我が国では超高齢化社会や食生活の欧米化などに伴い、脳梗塞患者数の増大が予想される。

脳梗塞急性期は有効な治療薬の開発が望まれており、これまでに承認されている脳梗塞急性期治療薬として、血栓溶解を目的とした遺伝子組換えヒト組織性プラスミノゲン活性化因子 (recombinant tissue plasminogen activator; rt-PA) 注射剤がある。1996年米国での承認以降、世界各国で臨床使用されている。rt-PAを用いた血栓溶解療法は現在、脳梗塞急性期の主要な治療法となっているが、rt-PAは血栓溶解作用だけでなく血管傷害作用も有しており、その使用には出血リスクが伴い、適用可能な患者は限定される (9)。rt-PA以外の脳梗塞急性期治療薬として、本邦においてフリーラジカル補足剤であるエダラボンが承認されているが、世界では承認されていない (10)。以上のように脳梗塞急性期治療薬はほとんど存在しておらず、この状況を打開できる画期的な治療薬の探索は急務である。血栓を溶解し物理的に血流を再開させる rt-PA 以外、多様なメカニズムを標的としたほとんどすべての候補物質が臨床試験で失敗に終わっている (12)。このことから、急激な進行を呈する脳梗塞病態を抑制するには、病態形成に根源的に寄与するメカニズムを治療標的とする必要があると考えられる。したがって本研究では、新医薬品開発に資する脳梗塞急性期病態メカニズムの解明を行った。

脳梗塞の病態は、脳に栄養を送達する血管の閉塞・狭窄により脳虚血を来たし、血液中に含まれる酸素やブドウ糖などが欠乏して脳細胞の壊死が起こるこ

とにより特徴づけられる。この一義的な病態に加え、脳虚血あるいは再灌流直後から起こる炎症が病態悪化、すなわち脳梗塞巣や脳浮腫の増大に寄与することが知られている (16)。脳虚血をきっかけに炎症、つまり免疫応答が発生することは以前から知られており、これまで炎症の一部を担う各サイトカインなどの病態への関与に関する研究はされてきたが、脳虚血病態含め、炎症の発生原因は解明されていなかった。ところが、1980年代に Toll が発見されたことを発端に、様々な知見が集積され、炎症の起源が明らかとなった。1980年代にショウジョウバエの正常な発生に必要な遺伝子として Toll が発見され、1996年、その Toll が真菌を感知し、真菌に対する防御機構を担うことが報告された (17-19)。その翌年、哺乳類においても Toll 様の受容体 (Toll-like receptors; TLRs) が存在すること、また自然免疫の担当細胞の活性化に TLRs が寄与することが明らかとなり、これら TLRs は自然免疫受容体と名付けられた。自然免疫受容体の最大の特徴は、ある一群の分子が有する構造 (分子パターン) を識別対象としていることである (パターン認識受容体)。この特徴から、外来性・内在性成分を問わず特定の構造を有すれば自然免疫受容体によって感知され、その結果炎症反応が引き起こされる。

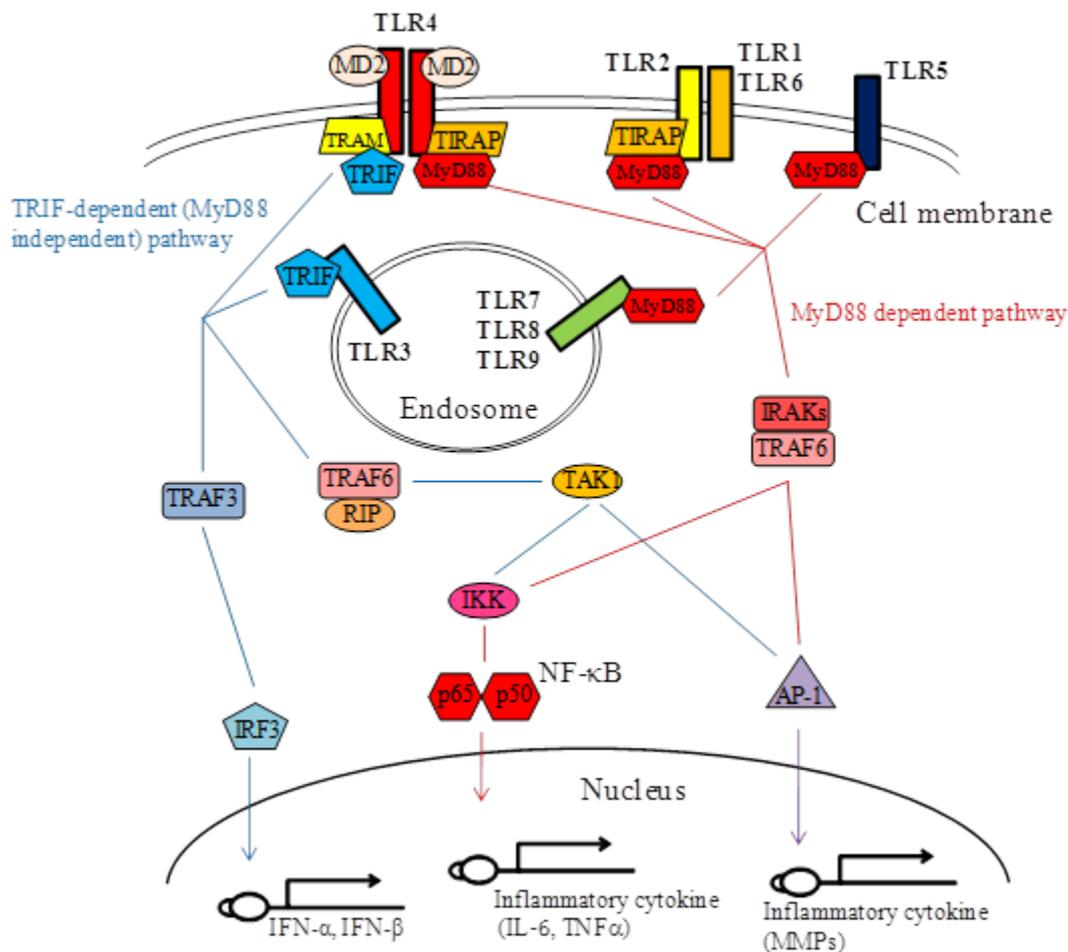
これらの知見を踏まえ現在では、TLRs 含む自然免疫受容体は、感染症など外来病原体に対する免疫応答に限らず、自己免疫疾患やアルツハイマーなど多くの内因性疾患の病態に根源的に寄与することが報告され (20, 21)、虚血後の炎症に寄与することも明らかとなっている (22) (Fig. 1)。脳虚血又は再灌流後、High-mobility group box 1 (HMGB1) や Heat shock proteins (HSPs) などダメージ関連分子パターン (Damage-associated molecular patterns: DAMPs) として知られる内因性リガンドが壊死細胞から放出され、それらが TLR を活性化することで炎症が開始される (23, 24)。これら TLR のうち、TLR4 ノックアウト (KO) マウス

において脳虚血障害抑制作用が示されるなど、TLR4 が病態進展に重要な役割を担うことがこれまで報告されている (25–29)。また TLR4 は免疫細胞上だけでなく神経細胞などの非免疫細胞上にも発現し、貪食作用に加え、細胞内カスケードにより直接的に細胞死に導く可能性も示唆されている (25, 30)。TLR4 の脳虚血病態進展への関与を裏付けるエビデンスが多くの研究により蓄積されてきたが、TLR4 を治療標的とした薬理的な試みは未だなされていない。また、脳梗塞病態における TLR4 直下の下流シグナル経路も未だ解明されていない。

酸化ストレスは虚血再灌流障害に主要な役割を果たすことが知られている (31)。近年、自然免疫がこの酸化ストレスと関与することが示唆されている。虚血再灌流後において、Superoxide anion ( $O_2^-$ )、hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ )、hydroxyl radical ( $\cdot OH$ ) など活性酸素種 (Reactive oxygen species: ROS) が産生される (32)。さらに、Superoxide anion ( $O_2^-$ ) と Nitric oxide (NO) との反応による Peroxynitrite ( $ONOO^-$ ) の産生など、活性窒素種 (Reactive nitrogen species: RNS) も産生される (33)。産生された ROS や RNS は DNA・脂質・タンパク質の酸化/ニトロ化を起こし、組織に損傷を与える。これら産生された ROS や RNS の活性を消去する抗酸化剤は、基礎研究段階では脳保護作用効果を示しているが、世界的に見てその臨床応用は未だ実現していない (34)。近年、酸化/ニトロ化ストレスに対して別のアプローチ、すなわち ROS や RNS の産生そのものを抑制する医薬品の開発が試みられている (35, 36)。活性酸素種の初段階の形態は Superoxide anion ( $O_2^-$ ) であるが、その生成は主に NADPH oxidase (NOX) が触媒する。gp91phox (NOX2) が最初に発見されて以来、6つのホモログ (NOX1、NOX3、NOX4、NOX5、DUOX1、DUOX2) が確認されている (37)。特に NOX4 は、脳虚血病態において発現量が上昇すること、さらに脳虚血障害に対して NOX4KO マウスは他の NOX サブタイプにはない強い抑制作用を示すことが明らかとなっている (36)。

これまで NOX4 活性化のメカニズムは不明であったが、近年、グラム陰性桿菌感染症や腎臓虚血モデルにおいて、TLR4 シグナルにより NOX4 が発現上昇し、その活性化には TLR4 との結合が必要であるという報告がある (38, 39)。

本章では、脳虚血再灌流病態において自然免疫受容体 TLR4 は炎症の起点となり、また活性酸素種の発生源である NOX4 と直接的に関与することで酸化/ニトロ化ストレスを引き起こし、脳組織損傷へと導く、すなわち TLR4 を薬理的に阻害することで酸化/ニトロ化ストレスを抑制し、結果として脳保護効果が得られると仮説を立て、検討を行った。まずマウス脳梗塞再灌流モデルを用いて、TLR4 シグナル伝達阻害剤 Resatorvid の有効性について検討を行った。Resatorvid の構造を図に示す (Fig. 4A)。Resatorvid はシクロヘキセン誘導体であり、外来性リガンドである Lipopolysaccharide (LPS) による全身性炎症に対する治療を目的として開発されたものである (40)。つぎに、これまでの報告から TLR4 との関連が指摘されている諸種の下流シグナル経路に対して Resatorvid が与える影響について検討を行った。その後、病態又は薬理作用機序の解明を目的として、TLR4 と NOX4 との直接的な関与について検討を行った。さらに、虚血再灌流による酸化/ニトロ化ストレスに対して、TLR4 の遺伝子学的又は薬理的阻害が与える影響について検討を行った。最後に、虚血再灌流による神経細胞アポトーシスに対して Resatorvid が与える影響について検討を行った。



**Figure 1** TLR signalings

## 第 2 節 実験材料及び方法

### 2-1 実験材料

anti-NOX4 antibody は Abcam (Cambridge, UK)、Nuclear Extraction Kit (Trans AM) は Active Motif (Carlsbad, CA, USA)、anti-nitrotyrosine antibody は Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA)、anti-interferon regulatory factor 3 (IRF-3) antibody、anti-p38 antibody、anti-phospho-c-jun antibody、anti-c-jun antibody 及び anti-cleaved caspase-3 antibody は Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)、neuronal nuclei (NeuN) は Chemicon (Temecula, CA, USA)、Fluoromount™ は Diagnostic BioSystems (Pleasanton, CA, USA)、anti-TLR4 antibody は Imgenex (San Diego, CA, USA)、

Hoechst33342 は Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)、anti-8-Hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) antibody は JalCA (Shizuoka, Japan)、potassium chloride は Kishida Chemical (Osaka, Japan)、anti-MMP9 antibody は Millipore (Billerica, MA, USA)、Alexa Fluor 488 F (ab')<sub>2</sub> fragment of goat anti-rabbit IgG (H+L) antibody 及び Alexa Fluor 546 F (ab')<sub>2</sub> fragment of goat anti-mouse IgG (H+L) antibody は Molecular Probes (Eugene, OR, USA)、Blocking One-P、Sodium hydrogen phosphate 12-water、sodium dihydrogen phosphate dihydrate 及び pentobarbital は Nacalai tesque (Kyoto, Japan)、O.C.T. compound は Sakura Finetechnical (Tokyo, Japan)、anti-p65 antibody は Santa Cruz (Biotechnology, CA, USA)、2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC)、protease inhibitor cocktail、phosphatase inhibitor cocktail 1 及び phosphatase inhibitor cocktail 2 は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)、anti-mouse HRP-conjugated IgG 及び anti-rabbit HRP-conjugated IgG は Pierce Biotechnology (Rockford, IL, USA)、polyclonal anti-phospho-p38 antibody は Promega (Madison, WI, USA)、BCA protein assay kit 及び Classic IP Kit は Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)、Can get signal solution 1 及び Can get signal solution 2 は Toyobo (Osaka, Japan)、M.O.M. immunodetection kit 及び normal goat serum は Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)、sucrose、ImmunoStar® LD 及び paraformaldehyde (PFA) は Wako (Osaka, Japan) よりそれぞれ購入した。Resatorvid (TAK-242: (ethyl (6R)-6-[N-(2-chloro-4-fluorophenyl) sulphamoyl]Cyclohex-1-ene-1-carboxylate) は岐阜薬科大学創薬化学大講座薬化学研究室教授 永澤 秀子博士より譲与された (Fig. 4A)。

## 2-2 実験方法

### 2-2-1 実験動物及びヒト標本

TLR4 KO マウスは岐阜薬科大学機能分子学大講座薬理学研究室准教授 田中宏幸博士より譲与された (41)。野生型 C57BL/6J 系雄性マウスは CLEA Japan (Tokyo, Japan)、野生型 ddY 雄性マウスは Japan SLC (Shizuoka, Japan) より購入した。本試験に用いたすべてのマウス (22–28g) は、設定温度: 24°C (許容範囲: 22–26°C)、設定湿度: 55% (許容範囲: 40–70%)、明暗各 12 時間 (照明: 午前 7:00–午後 7:00) に維持された岐阜薬科大学の動物飼育舎にて、プラスチック製ケージ (縦 24.5 × 横 17.5 × 高さ 12.5 cm) を用い、自由給水下に固形飼料 (CE-2; CLEA Japan, Tokyo, Japan) にて飼育した。

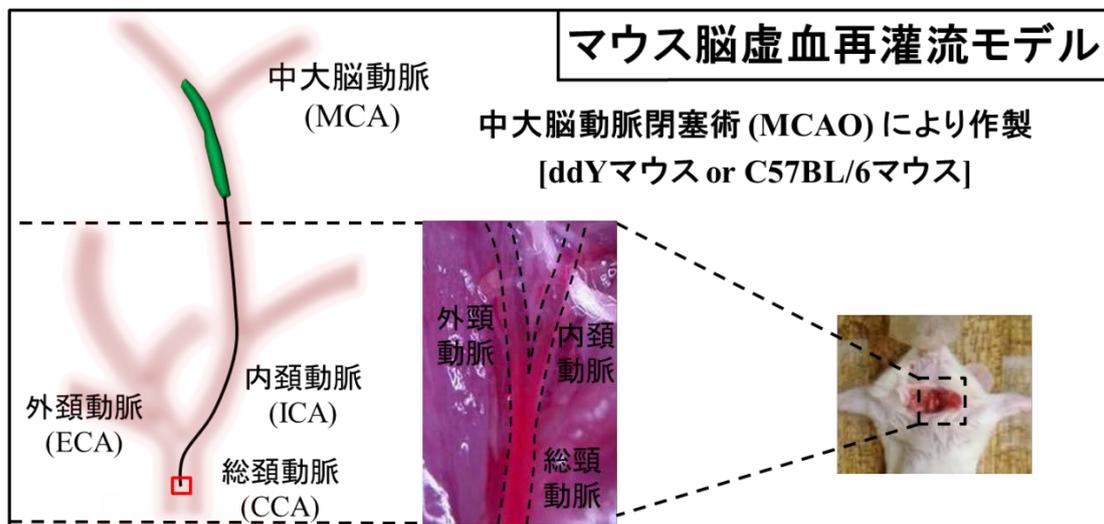
実験を行うにあたっては、岐阜薬科大学動物飼育・動物実験委員会に動物実験承認申請を行い、許可を受けた上で実施した。遺伝子組み換え動物は、岐阜薬科大学生命倫理・バイオセーフティー委員会に遺伝子組み換え実験申請を行い、許可を得た上で使用した。

ヒト標本を用いた実験においては、世界医師会ヘルシンキ宣言のガイドラインを遵守した。ヒト標本は、岐阜大学病院脳神経外科において、臨床的必要性のもとに手術によって摘出された脳を使用した。本研究において、患者への新たな治療介入は行っていない。本研究におけるヒト標本の使用は岐阜大学 医学研究等倫理審査委員会により承認され(#24-130)、全標本においてインフォームドコンセントを得ている。脳梗塞標本は 60 代女性であり、心原性塞栓による大脳半球の広範囲梗塞を生じ、脳ヘルニアをきたしたため、発症 24 時間後に内減圧術及び外減圧術を受けた。組織標本は、減圧手術により除去された側頭葉皮質脳梗塞部であった。対照標本は 20 代女性であり、側頭葉海綿状血管腫による難治性てんかんを持ち、他の病歴は無く、神経学的状態は発作を除いて完全に正常であった。患者は、血管腫の除去を含む側頭葉部分切除術を施行された。

組織標本は、組織学的に正常な側頭葉皮質であった。これらヒト組織標本は、パラフィン包埋して保存した。

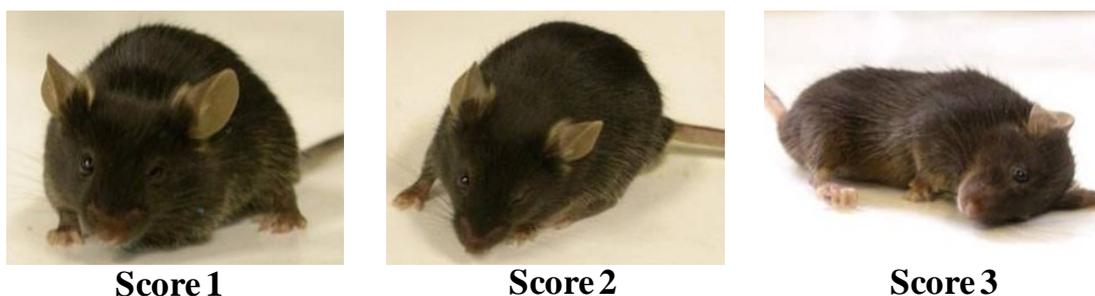
#### 2-2-2 マウス中大脳動脈閉塞モデルの作製、神経症状の観察、梗塞体積の計測及び薬物処置

実験には、8-12 週齢 C57BL/6J 系雄性マウス及び TLR4KO 雄性マウスを遺伝子学的検討に使用し、4-5 週齢 ddY 系雄性マウスを薬理的検討に使用した。手術の際の麻酔には、小動物用麻酔器 (Soft Lander, Sin-ei industry Co. Ltd.) を用い、笑気ガス 70%、酸素ガス 30% 下において麻酔導入時には 2-3 % isoflurane を、麻酔維持には 1-1.5 % isoflurane を使用した。体温は、手術中及び手術後正向反射が回復するまで保温ランプで維持した。左脳側中大脳動脈 (middle cerebral artery: MCA) の閉塞は、filament 栓子を挿入することにより実施した (Fig. 2)。すなわち、実体顕微鏡下にて、左脳側 MCA にシリコン樹脂混合物 (Xantopren+ Activator Liquid) (Heraeus Kulzer, Hanau, Germany) で先端を覆った 8-0 nylon monofilament (Ethicon, Somerville, NJ) を頸動脈から挿入することにより閉塞した (MCA occlusion: MCAO) (42)。閉塞 2 時間後に再度 isoflurane を用いて麻酔を導入し、filament 栓子を引き抜くことで、2 時間虚血再灌流モデルを作製した。虚血 24 時間後の神経症状を測定した。その後断頭し、梗塞体積を計測した。



**Figure 2** Mouse ischemia and reperfusion model

神経症状は、Fig. 3 に示す基準に従って観察・記録した。すなわち、0. 目立った神経症状なし (正常)、1. 大きな左周りの円を描くが、時々真っ直ぐ進むこともある (軽症)、2. その場で小さく左に回る (中程度)、3. 歩行不可、もしくはその場で体を回転させる (重症) の4段階に分けてスコア化した (43)。



**Figure 3** Neurological scores

Score 0: no observable neurological deficits (normal), Score 1: failure to extend the right forepaw (mild), Score 2: circling to the contralateral side (moderate), Score 3: loss of walking or righting reflex (severe).

梗塞体積の計測には、mouse brain matrix (RBM-2000C; Activational Systems, Warren, MI, USA) を用いて、前脳を前から 2 mm ずつの厚さで切り取った 5 つの切片を使用した。各切片を 2% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) で 10–15

分間染色した。各切片の梗塞部位はデジタルカメラ (Cool PIX4500; Nikon, Tokyo, Japan) を用いて記録し、Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) を用いて梗塞面積を測定した。各切片の梗塞面積から梗塞体積を計測した。

Resatorvid, {ethyl (6R)-6-[N-(2-chloro-4-fluorophenyl)sulfamoyl]cyclohex-1-ene-1-carboxylate} (Fig. 4A) は過去の報告に基づく手順を用いて (44)、岐阜薬科大学薬化学研究室において合成され、<sup>1</sup>H 核磁気共鳴及びマススペクトルにより同定された。Resatorvid は 10% Dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解して使用し、溶媒群には 10% DMSO の生理食塩水を使用した。虚血 2 時間後の再灌流直後に Resatorvid 2 ul (0.001、0.003、0.01 µg) を脳室内投与した (45)。

### 2-2-3 ウェスタンブロット解析

マウスを虚血 24 時間後に断頭し、脳を摘出した後、前脳先端から 5-8 mm の厚さ 3 mm の脳切片を切り取った。切り取った脳切片を氷冷したガラスシャーレの上に置き、顕微鏡下で左脳と右脳をそれぞれ単離した。単離した脳切片は、RIPA 溶液 [1/100 protease inhibitor cocktail、1/100 phosphatase inhibitor cocktail 1、1/100 phosphatase inhibitor cocktail 2 含有] に入れ、ホモジネート処理した。核及び細胞質画分抽出には、Nuclear Extraction Kit (Trans AM, Active Motif, Carlsbad, CA, USA) を使用した。その後、BCA Protein Assay Kit を用い、タンパク質定量をした。免疫沈降には、Classic IP Kit 及び anti-TLR4 antibody を使用した。

タンパク質濃度を調整したサンプルを、5-20%のポリアミドゲル (SuperSep™; Wako) を用いて電気泳動により展開した。泳動後、ゲルを PVDF 膜 (Immobilon; Millipore, Billerica, MA, USA) に転写した。転写後、PVDF 膜を 0.05% Tween 20 含有 50 mM TBS (TBS-T: 10 mM tris、40 mM tris hydrochloride、15 mM NaCl) で洗浄し、その後ブロッキングとして Blocking One-P に浸し、室温で 1 時間振とう

した。転写膜を TBS-T で洗浄後、Can get signal solution 1 で希釈した一次抗体に浸し、4°C で一晩振とうした。転写膜を TBS-T で洗浄後、Can get signal solution 2 で希釈した二次抗体に浸し、室温で 1 時間又は 4°C で一晩振とうした。転写膜を TBS-T で洗浄後、ImmunoStar® LD に 5 分間浸した。その後、Luminescent image analyzer LAS-4000 UV mini (Fujifilm, Tokyo, Japan) 及び Multi Gauge Ver. 3.0 (Fujifilm, Tokyo, Japan) を用いて検出した。

一次抗体には、anti-p65 antibody (1: 1,000)、anti-IRF-3 antibody (1: 1,000)、anti-phospho-p38 antibody (1: 2,000)、anti-p38 antibody (1: 1,000)、anti-phospho-c-jun antibody (1: 1,000)、anti-c-jun antibody (1: 1,000)、anti-matrix metalloproteinase (MMP) 9 antibody (1: 1,000) 又は anti-NOX4 antibody (1:500) を用いた。二次抗体には、anti-mouse HRP-conjugated IgG (1: 2,000) 又は anti-rabbit HRP-conjugated IgG (1: 2,000) を用いた。

#### 2-2-4 組織免疫染色

##### 2-2-4-1 組織切片作製

マウスは pentobarbital 麻酔下で開胸後、ペリスタポンプ (Atto, Tokyo, Japan) を用いて生理食塩水を左心室内に注入して灌流し、その後 4% paraformaldehyde 含有 0.1 M phosphate buffer (PB: pH 7.4) (組織固定液) を 10 分間注入し、組織を固定した。その後、脳を取り出し、同固定液中に一晩放置した。固定した脳は 25% sucrose 含有 0.1 M PB (pH 7.4) 液に 24 時間浸すことでスクロース置換し、その後液体窒素を用いて O.C.T. compound 中に凍結包埋した。包埋した組織から、cryostat (Leica, Tokyo, Japan) を用いて、-20°C 中、厚さ 14 µm の切片 (Bregma より 0.4–1.0 mm 手前部分) を作製した。作製した切片を MAS コーティングされ

たスライドガラス (S-9441; Matsunami, Osaka, Japan) に貼付して、-80°C で保存した。

#### 2-2-4-2 蛍光免疫染色

染色時にマウス凍結切片を-80°C より取り出し-20°C で1時間放置した後、室温で10分間乾燥させ、phosphate buffer saline (PBS) に浸して O.C.T. Compound を洗浄した。ヒト組織切片は、染色前に脱パラフィンした。super PAP pen (ZYMED, San Francisco, CA, USA) にて反応液の流出を防ぐために切片の周囲を囲んだ後、M.O.M. immunodetection kit 又は 10% normal goat serum で1時間ブロッキングした。その後、一次抗体を用いて 4°C で一晩反応、二次抗体にて2時間反応、Hoechst 33342 (1: 1,000; Invitrogen) を室温で30分間反応させ、Fluoromount™ (Diagnostic BioSystems, Pleasanton, CA, USA) にて封入した。

一次抗体には、monoclonal anti-TLR4 antibody (1: 100)、polyclonal anti-NOX4 antibody (1: 100)、polyclonal anti-8-OHdG antibody (1: 20)、monoclonal anti-nitrotyrosine antibody (1: 100)、monoclonal anti-cleaved caspase-3 antibody (1: 400) 又は NeuN (1: 1,000) を用いた。二次抗体には、Alexa Fluor 488 F (ab')<sub>2</sub> fragment of goat anti-rabbit IgG (H+L) antibody (1: 1,000) 又は Alexa Fluor 546 F (ab')<sub>2</sub> fragment of goat anti-mouse IgG (H+L) antibody (1: 1,000) を用いた。切片は共焦点レーザー顕微鏡 (FV10i; Olympus, Tokyo, Japan) 下で観察した。

#### 2-2-5 統計学的解析

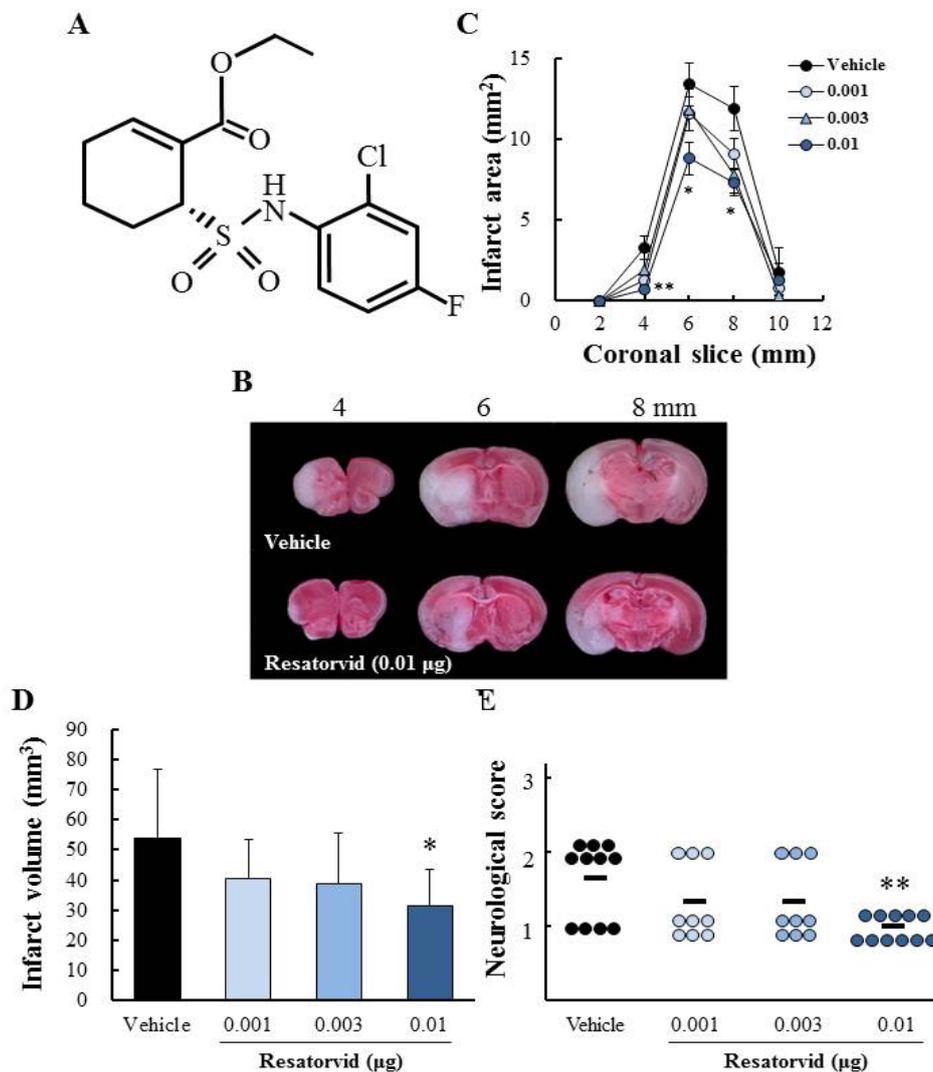
実験結果はすべて平均値±標準偏差 (mean ± S.D.) で示した。統計学的な比較は、STAT VIEW (SAS institute, Cary, NC, USA) を用い、二群間比較には Student's

*t*-test、神経症状の比較には Mann-Whitney U-test、及び多群間比較には Dunnett's test により行った。危険率 5 %未満を有意差有りとした。

### 第 3 節 実験結果

#### 3-1 脳虚血再灌流障害に対する Resatorvid の作用

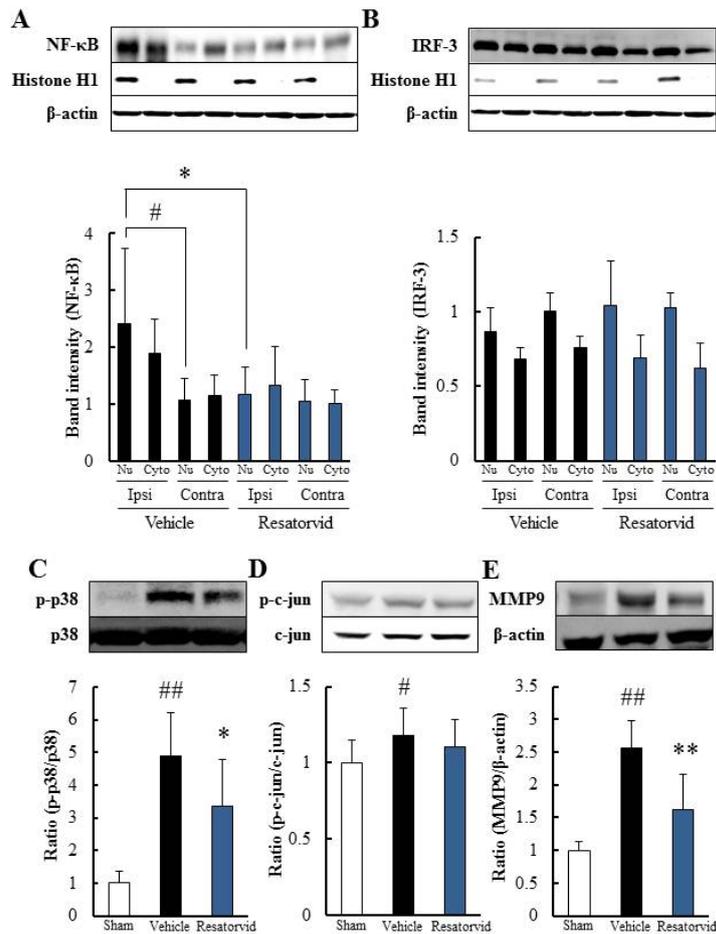
脳虚血後における TLR4 の薬理的阻害による脳保護作用を検討するために、マウス脳虚血再灌流 (MCAO) モデルを用いて、2 時間虚血再灌流直後に TLR4 シグナル伝達阻害剤 Resatorvid 0.001、0.003 又は 0.01  $\mu\text{g}$  を脳室内 (i.c.v.) 投与した。虚血再灌流 22 時間後において、溶媒投与群と比較して Resatorvid 投与群は用量依存的に脳保護作用が認められ、Resatorvid 0.01  $\mu\text{g}$  投与により前脳先端から 4、6、及び 8 mm の梗塞面積は有意に抑制された (Fig. 4B, C)。また、Resatorvid 0.01  $\mu\text{g}$  投与により梗塞体積は有意に抑制された (Fig. 4D)。さらに、溶媒投与群と比較して Resatorvid 0.01  $\mu\text{g}$  投与群は虚血再灌流による神経機能障害が有意に改善された (Fig. 4E)。



**Figure 4** Effects of resatorvid, a TLR4 signal inhibitor, on infarction at 22 h after ischemia and reperfusion in mice. (A) Chemical structure of resatorvid {ethyl (6R)-6-[N-(2-chloro-4-fluorophenyl)sulfamoyl]cyclohex-1-ene-1-carboxylate}. (B) TTC staining of coronal brain sections (2 mm thick) at 22 h after ischemia and reperfusion in representative mice. Upper panels, vehicle-treated. Lower panels, resatorvid-treated (at 0.01 µg, i.c.v.). (C) Brain infarct area measured at 24 h after MCAO. Brains were removed and the forebrains sliced into five coronal 2-mm sections. Sections are identified according to the distance from the frontal limit of the forebrain. (D, E) Resatorvid (at 0.01 µg, i.c.v.) exhibited decreased infarct volume and improvement in neurological deficits vs. vehicle-treated group. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs. vehicle,  $n = 9$  to 11.

### 3-2 脳虚血再灌流による TLR4 下流シグナル活性化に対する Resatorvid の影響

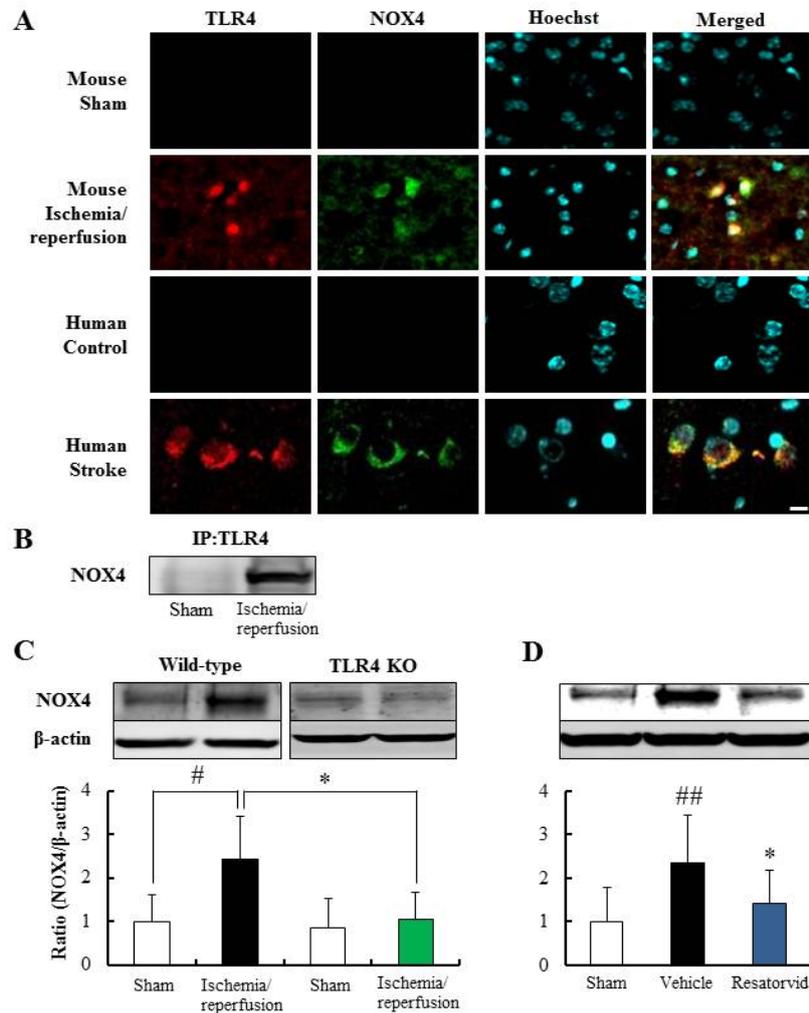
Resatorvid の脳保護作用の作用機序を解明するために、Resatorvid 0.01  $\mu\text{g}$  投与後における種々の TLR4 下流シグナルの挙動について検討した。虚血 24 時間後の虚血側及び反対側半球を核画分と細胞質画分に分け、NF- $\kappa$ B と IRF-3 の核移行をウェスタンブロット法にて検討した。NF- $\kappa$ B は外来性リガンド刺激において Myeloid differentiation factor 88 (MyD88) 及び TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$  (TRIF) 両経路に関与し炎症を惹起する転写因子であり、脳虚血病態において悪化因子であることが知られている。IRF-3 は TRIF 経路のみに関与する因子であり、脳虚血病態には関与しないことが示唆されている (46, 47)。虚血再灌流によって核画分で発現上昇した NF- $\kappa$ B は、Resatorvid 投与により有意に抑制された (Fig. 5A)。一方、IRF-3 においては虚血再灌流あるいは Resatorvid 投与により変化を認めなかった (Fig. 5B)。次に、虚血 24 時間後の虚血半球及び偽手術群の脳半球を用いて、p38、c-jun、及び MMP9 の活性化をウェスタンブロット法にて検討した。MAPKs である p38 及び c-jun は MyD88 の下流に存在し、NF- $\kappa$ B 同様、脳虚血病態の悪化因子であると考えられている。虚血再灌流による p38 のリン酸化の上昇は、Resatorvid 投与により有意に抑制された (Fig. 5C)。虚血再灌流による c-jun のリン酸化の上昇は、Resatorvid 投与により抑制傾向が認められた (Fig. 5D)。MMP9 はマトリックスプロテアーゼの一種であり、脳虚血病態に深く関与し、また TLR4 刺激により直接産生されることが示唆されている (48, 49)。虚血再灌流による MMP9 の発現上昇は、Resatorvid 投与により有意に抑制された (Fig. 5E)。



**Figure 5** Pharmacological inhibition by resatorvid of TLR4 activation reduced down-stream signaling after cerebral ischemia. (A) Western blots of nuclear (Nu) and cytoplasmic (Cyto) fractions show increased expression levels of the p65 subunit of NF-κB on the ipsilateral side (Ipsi) in vehicle-treated mice [vs. the contralateral side (Contra)]. Quantitative analysis showed that p65 expression level in the nuclear fraction on the ipsilateral side was lower in the resatorvid-treated group (at 0.01μg, i.c.v.) than in the vehicle group. (B) There was no clear difference in the level of IRF-3 expression between the ischemic and non-ischemic sides in the vehicle group. (A, B) Resatorvid at 0.01 μg had no effect on the contralateral side. # and \*,  $P < 0.05$  (as shown),  $n = 7$ . (C) The p38 phosphorylation level was higher in the vehicle-treated group than in the sham-operated group. Resatorvid significantly decreased it, compared to vehicle treatment. (D) Treatment with resatorvid (at 0.01μg, i.c.v.) tended non-significantly to reduce the c-jun phosphorylation level, which had been increased by cerebral ischemia. (E) Ischemia plus reperfusion increased MMP9 expression, and resatorvid (at 0.01μg, i.c.v.) down-regulated the MMP9 expression at 22 h after reperfusion. #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  vs. sham, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs. vehicle,  $n = 7$  to 12.

### 3-3 脳虚血再灌流病態における TLR4 と NOX4 の関与

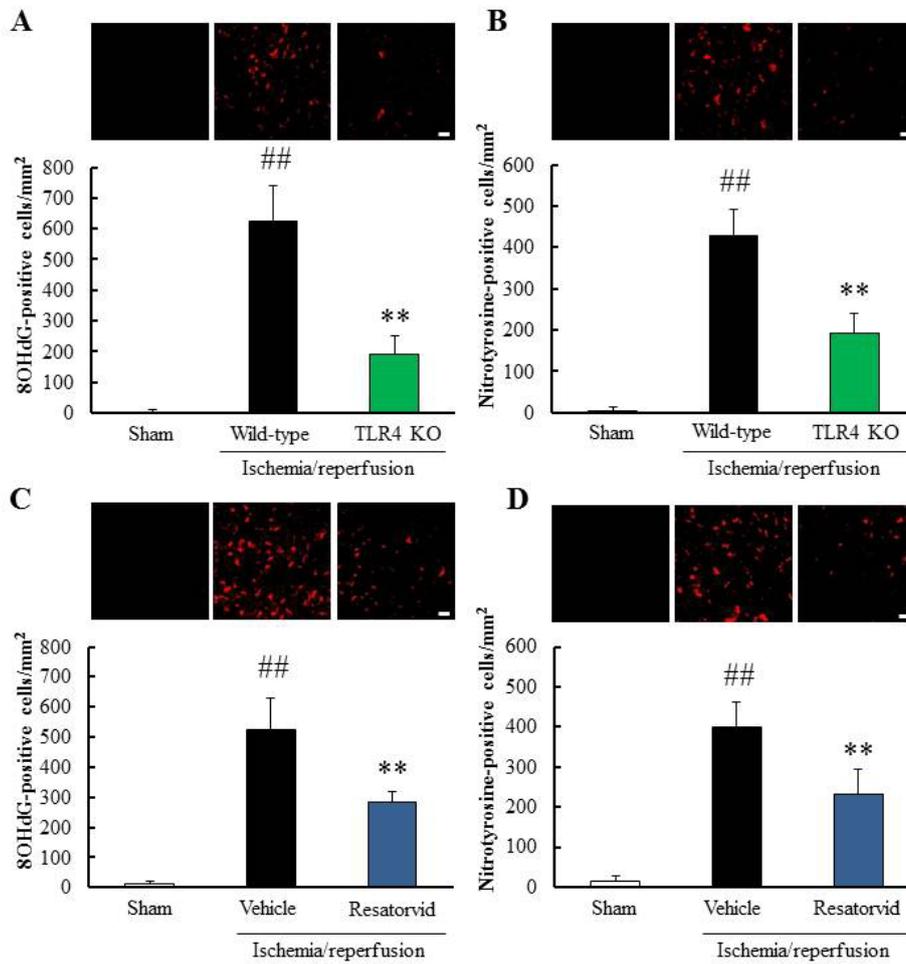
脳虚血病態における TLR4 直下の下流メカニズムは未だ不明であった。そこで脳虚血病態における TLR4 と NOX4 の関与を蛍光二重免疫染色法、免疫沈降法及びウェスタンブロット法を用いて検討した。マウス脳虚血再灌流 22 時間後において、TLR4 と NOX4 は共局在が認められた。一方、偽手術群のマウスでは TLR4 及び NOX4 を示す蛍光は認められなかった (Fig. 6A)。さらに、ヒト脳梗塞患者標本においても、マウス同様、TLR4 と NOX4 は共局在が認められ、対照に用いたヒト標本では認められなかった (Fig. 6A)。マウス脳虚血再灌流 22 時間後、抗 TLR4 抗体により免疫沈降されたタンパクにおいて、NOX4 がウェスタンブロット法にて検出された (Fig. 6B)。脳虚血再灌流 22 時間後の野生型マウスにおいて発現量上昇した NOX4 は、TLR4KO マウス虚血脳において有意に抑制された (Fig. 6C)。また、2 時間脳虚血再灌流により発現上昇した NOX4 は、Resatorvid 0.01  $\mu$ g 投与により有意に抑制された (Fig. 6D)。



**Figure 6** Association of TLR4 with NOX4 in focal cerebral ischemia. (A) Representative photographs showing double-immunostaining of TLR4 and NOX4 in sham-operated mice, ischemic mice, human control, and human stroke patient. NOX4 was increased and co-located with TLR4 in the murine ischemic model and in the human stroke patient. Scale bar = 10  $\mu$ m. (B) Brain tissues from a sham-operated or ischemic mouse were subjected to immunoprecipitation using an antibody against TLR4. The immunoprecipitation material was then subjected to western blot analysis, and proteins were detected using an anti-NOX4 antibody. TLR4 interacted with NOX4 in brain tissue after ischemia and reperfusion. (C) Comparison of TLR4 KO mice with wild-type mice as regards NOX4 expression after cerebral ischemia and reperfusion. <sup>#</sup> and \*,  $P < 0.05$  (as shown),  $n = 5$ . (D) Effects of resatorvid on NOX4 expression at 24 h after MCAO. Treatment with resatorvid suppressed the NOX4 upregulation seen after cerebral ischemia plus reperfusion. <sup>##</sup>  $P < 0.01$  vs. sham, \*  $P < 0.05$  vs. vehicle,  $n = 10$ .

### 3-4 脳虚血再灌流誘発酸化/ニトロ化ストレスに対する TLR4 の影響

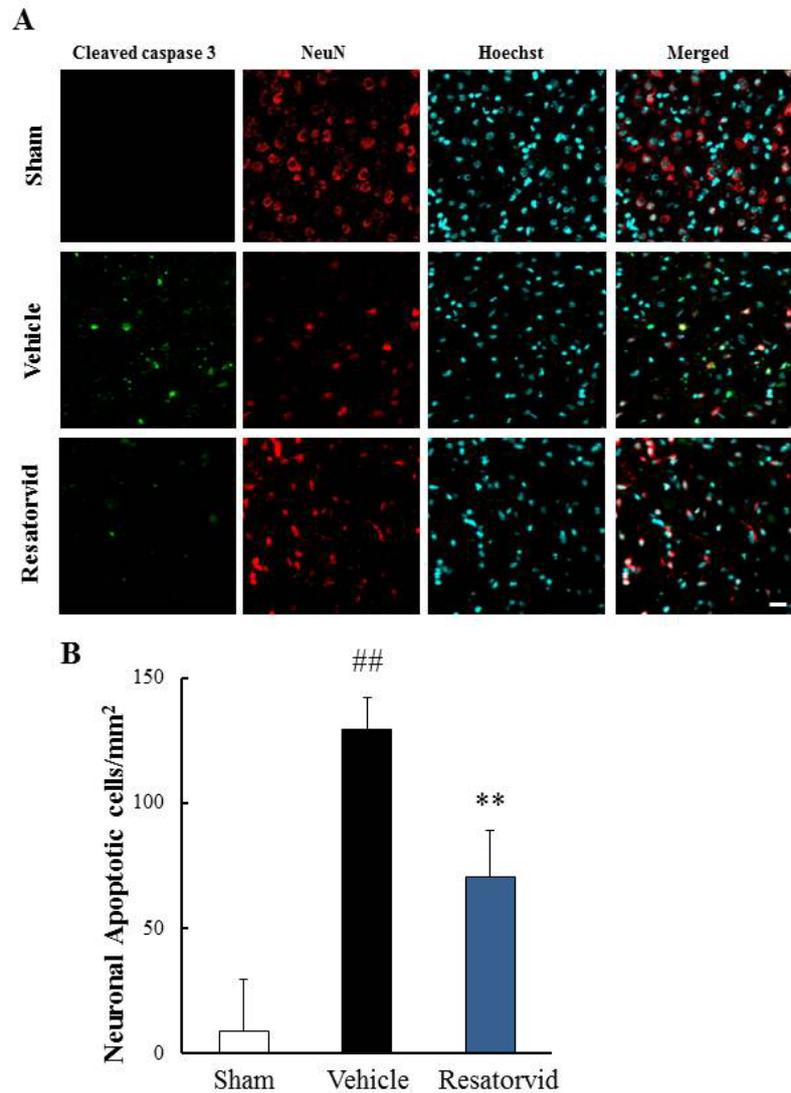
前項において、脳虚血病態では TLR4 は酸化酵素である NOX4 と直接相互作用することが示唆された。脳虚血病態において TLR4 が酸化/ニトロ化ストレスに与える影響を明らかにするため、マウス脳虚血再灌流による酸化/ニトロ化ストレスに対して TLR4 の遺伝子学的及び薬理的阻害が与える影響を蛍光免疫染色法にて検討した。虚血再灌流 22 時間後、野生型マウス虚血脳において有意に上昇した酸化ストレスマーカーである 8-OHdG 及びニトロ化ストレスマーカーである Nitrotyrosine の陽性細胞数は、TLR4KO マウス虚血脳において有意に抑制された (Fig.7A, B)。2 時間虚血再灌流によって有意に上昇した 8-OHdG 及び Nitrotyrosine の陽性細胞数は、Resatorvid 投与により有意に抑制された (Fig. 7C, D)。



**Figure 7** Genetic and pharmacological inhibition of TLR4 signaling led to a reduction of oxidative/nitrative stress after ischemia plus reperfusion. (A to D) Representative photographs show 8-OHdG-positive or nitrotyrosine-positive cells in the cortical peri-infarct region of mice. (A, C) 8-OHdG-positive cells were increased by ischemia plus reperfusion. (B, D) Nitrotyrosine-positive cells were increased by ischemia plus reperfusion. (A, B) TLR4 KO mice exhibited significantly reduced (A) oxidative and (B) nitrative stress compared to wild-type mice. (C, D) Pharmacological inhibition of TLR4 by resatorvid (at 0.01 $\mu$ g, i.c.v.) reduced (C) oxidative and (D) nitrative stress compared to vehicle treatment. Scale bar = 20  $\mu$ m. <sup>##</sup>  $P < 0.01$  vs. sham, <sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$  vs. wild-type (A, B), vs. vehicle (C, D),  $n = 5$ .

### 3-5 脳虚血再灌流誘発神経細胞アポトーシスに対する Resatorvid の影響

マウス脳虚血再灌流モデルを用いて、神経細胞アポトーシスに対する Resatorvid の影響を蛍光免疫染色法にて検討した。神経細胞アポトーシスは、アポトーシスマーカーである Cleaved caspase 3、神経細胞マーカーである NeuN 及び核マーカーである Hoechst33342 により検出した (Fig. 8A)。虚血再灌流 22 時間後に有意に上昇した神経細胞アポトーシスは、Resatorvid 0.01  $\mu\text{g}$  脳室内投与により有意に抑制された (Fig. 8B)。



**Figure 8** Resatorvid reduced neuronal cell death after cerebral ischemia. (A) Representative photographs showing immunolabels for the apoptosis marker cleaved caspase-3, the neuronal marker NeuN, and the nuclear marker Hoechst33342 in the cortical peri-infarct region of sham-operated, vehicle-treated, and resatorvid-treated mice. (B) Quantitative analysis of neuronal apoptosis at 24 h after MCAO. Cleaved caspase-3-positive neuronal cells were increased by 2 h of ischemia plus 22 h of reperfusion. Treatment of mice with resatorvid (at 0.01 $\mu$ g, i.c.v.) partly prevented the neuronal apoptosis. Scale bar = 20  $\mu$ m. <sup>##</sup>  $P < 0.01$  vs. sham, <sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$  vs. vehicle,  $n = 5$ .

#### 第4節 考察

本章では、マウス脳虚血再灌流モデルを用いて、虚血2時間後に TLR4 シグナルを薬理的に阻害することで脳保護効果が得られるか検討した。結果、TLR4 シグナル伝達阻害剤である Resatorvid は脳虚血誘発脳組織障害を抑制し、機能改善作用及び神経細胞保護作用を示した。Resatorvid の作用機序の一端として、NF- $\kappa$ B、p-38 及び c-jun などの細胞内カスケードの活性化抑制と、血液脳関門の破綻に寄与する MMP9 の発現抑制が示唆された。脳梗塞病態において TLR4 は NOX4 と直接結合し、TLR4 の遺伝子学的阻害あるいは薬理的阻害は NOX4 の発現を抑制したことから、脳梗塞病態において TLR4 は NOX4 と直接的に関与することが示唆された。TLR4 の遺伝子学的阻害又は薬理的阻害は酸化/ニトロ化ストレス及び神経アポトーシスを抑制した。以上から、脳梗塞急性期治療薬として TLR4 が新たな治療標的となることが示唆された。

本研究で用いられた Resatorvid は、TLR4 の細胞内ドメインに存在する Cys747 部位に直接結合し、その結果 TLR4 とアダプター分子との相互作用を阻害し、下流シグナル活性化や炎症性メディエーター産生を抑制することで効果を発揮する (50)。脳梗塞病態においても Resatorbid は同様の作用機序を持つと考えられるが、脳梗塞病態における TLR4 直下の下流シグナルは未だ不明なままであったため、本研究における Resatorbid の詳細な薬理作用機序も不明であった。TLR4 の代表的なアダプター分子として MyD88 と TRIF がある。これらの経路は慢性脳低灌流や他臓器の虚血モデルにおいてはどちら又は両経路が活性化され、病態に寄与する (51, 52)。しかしこれら2つの分子は、局所脳虚血モデルあるいは臨床における脳梗塞において病態に関与しないことが報告されている (46, 47)。これらの結果について、以下に示す可能性を考えた。まず初めに、代替経路の存在について、脳虚血における Transforming growth factor  $\beta$ -activated kinase 1

(TAK1) の機能に関する研究を例に考えた (53)。報告によれば、TAK1 選択的阻害剤による短期的な阻害は脳虚血障害に対し保護作用を示すが、遺伝的欠損による TAK1 の長期的な阻害は、その代替経路の出現により、保護作用を示さない。これは一種の生体恒常性、すなわちある経路の慢性的な欠如が結果的に新たな経路を確保する可能性を示しており、TLR シグナルにおいてもアダプター分子の遺伝的欠損が代替経路を生み出している可能性が考えられる。次に、TLR4 と TLR2 の関係性から考えた。TLR4 と同様、TLR2 は脳梗塞病態形成において重要な役割を担うことが知られている (54, 55)。一方、TLR2KO マウスが脳虚血障害に対して保護作用を示さなかったという報告、さらには TLR2 のリガンド投与により脳虚血障害に対して保護作用を示したという上記と矛盾する報告もある (56, 57)。これらの知見は、脳梗塞病態において TLR2 と TLR4 が異なる役割をする可能性を示しており、両受容体共通のアダプター分子となる MyD88 が脳虚血障害に与える影響を不明確にしている可能性がある。もう一つの可能性として考えられたのが、脳梗塞病態における TLR4 の新規下流シグナルの存在である。

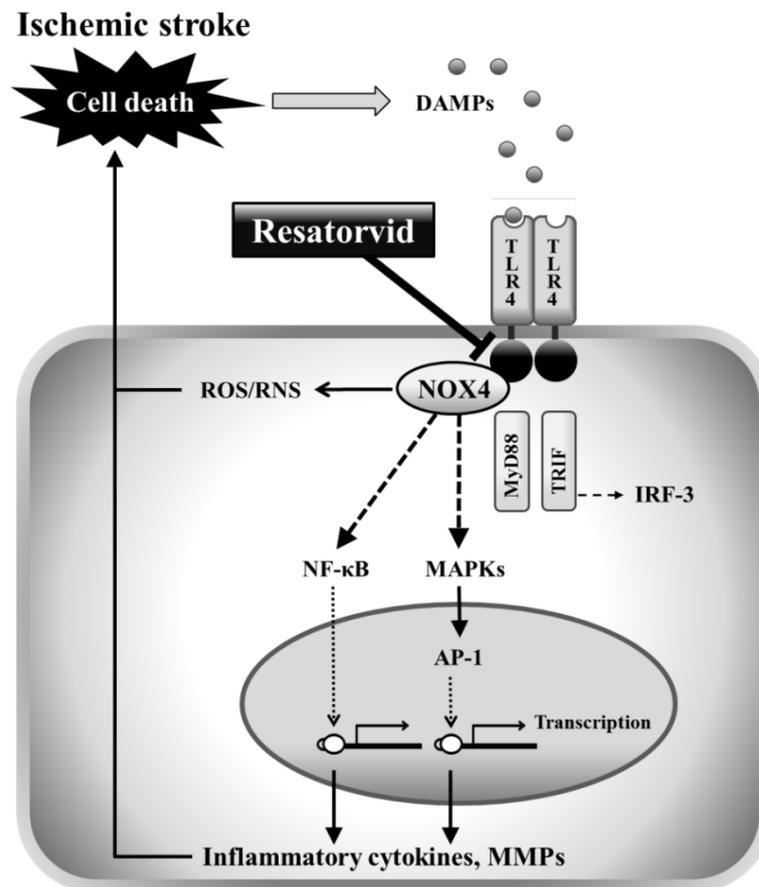
NOX4 は mRNA レベルで誘導される誘導性の酵素である。過去の研究より、NOX1・2・3 と異なり NADPH oxidase activators (NOXAs) や NADPH oxidase organizers (NOXOs) のようなオーガナイザー因子を必要としないことは知られていたが、その活性化メカニズムは不明であった (58)。これらの知見及び緒言で述べた TLR4 と NOX4 の関連性に関する研究 (38) に加え、近年、NOX4KO マウスが脳虚血障害に対して強い保護作用を示すことが明らかとなり (36)、脳梗塞病態においても TLR4 と NOX4 の関連が強く疑われた。

以上の背景から本研究では、脳梗塞病態における TLR4 の直下下流シグナルとしての NOX4 の関与について検討を行った。結果、虚血後のマウス脳及びヒト

脳において NOX4 及び TLR4 がともに発現上昇し、それらが共局在すること、虚血後のマウス脳において NOX4 と TLR4 が共免疫沈降すること、即ち脳虚血病態において TLR4 と NOX4 が直接的に相互作用することを明らかにした。また、脳虚血モデルにおいて TLR4 の遺伝的欠損又は薬理的阻害が NOX4 の発現上昇を抑制し、脳虚血再灌流による酸化/ニトロ化ストレスを抑制することを示した。これらの結果から、脳虚血病態において、TLR4 の活性化により NOX4 が誘導・活性化され、それらが直接的に結合し、ROS や RNS を産生することで脳組織障害及び神経細胞障害を引き起こすこと、また TLR4 の遺伝的欠損又は薬理的阻害がこれらの脳損傷を抑制することが示唆された。

これまで蓄積された知見及び本研究から推察される脳梗塞病態のメカニズムを Fig. 9 に示す。脳虚血によって大量の細胞が壊死し、それによって大量の DAMPs が放出される。DAMPs の 1 つである HMGB1 は虚血脳の壊死細胞から放出され、リガンドとして神経・血管内皮・グリア細胞等、様々なタイプの細胞に作用し自然免疫を活性化させる。しかし HMGB1 の放出は超急性期に起こりその後急速に消失するため、HMGB1 のみでは急性期やそれ以降まで TLR2 や TLR4 が活性化され続ける理由を説明することができない (23, 59)。しかし近年、本来ならば細胞内において抗酸化酵素として機能する Peroxiredoxin が、虚血領域において細胞外に放出されることで DAMPs として働き、特に超急性期に続く急性期において TLR2 や TLR4 を介して炎症を引き起こすことが明らかとなっている (60)。これらの知見から、脳梗塞急性期以降においても、TLR4 含む自然免疫受容体は、「パターン認識」というその特異性の低さから、脳梗塞各病期で発生する種々の自己成分を感知し続けることで、炎症の発生及び炎症の持続の根源となり、脳梗塞病態に重大な影響を与えらる (Fig. 9)。

以上、本章では、TLR4 の薬理的阻害が脳保護作用を有することを明らかにし、さらに、TLR4 の直下下流シグナルとして NOX4 が直接的に関与することを見出した。しかし近年、TLR 以外の自然免疫受容体が次々と発見されており、脳梗塞病態においても TLR 以外の自然免疫受容体が炎症を司り、治療薬開発の標的となる可能性が考えられた。そこで次章では、脳梗塞病態に関与する新規自然免疫受容体の探索と、その下流シグナルの治療標的としての可能性について検討を行った。



**Figure 9** Putative mechanism for TLR4 signaling and effect of resatorvid on transient focal ischemia. TLR4 is activated in response to damage-associated molecular patterns (DAMPs). NOX4 is induced by, and interacts with, TLR4 in cerebral ischemia. TLR4-NOX4 pathway leads to inflammatory cascades, resulting in brain damage. Resatorvid binds to intracellular domain of TLR4 and interferes with the ensuing cascades, thereby protecting against ischemic damage.

## 第2章 脳虚血後炎症における自然免疫受容体 Mincle 及び Syk の関与

### 第1節 緒言

血栓溶解剤 rt-PA は、その出血リスクから治療可能時間域の制限があり、その使用は脳梗塞患者の数%にとどまる。脳神経保護を目的とした薬剤にいたっては、これまでほとんどすべての臨床試験が失敗に終わっている (12)。このような深刻な状況を受け近年、脳梗塞病態あるいは治療標的の概念が根底から見直された。神経細胞のみに焦点を当てたこれまでの戦略から、神経細胞、血管内皮細胞、星状膠細胞 (アストロサイト)、血管周皮細胞 (ペリサイト) 及び免疫細胞など諸種の細胞とそれら細胞間の相互作用を包括的に捉えた Neurovascular unit (NVU) という概念を標的とする戦略にシフトされた (61)。NVU を構成する細胞種及び細胞間の相互作用があってはじめて脳神経あるいは脳血液関門は機能が維持でき、脳梗塞病態はそれら全般に影響を及ぼすため、治療にあたっては NVU の保護を目指すというものである。

炎症は、免疫細胞を中心に様々な細胞種のネットワークにより形成される (62)。前章で述べたように、この炎症は自然免疫受容体が起点となって開始されることが明らかとなっている。外来性・内在性を問わず特定の構造を持つリガンドが自然免疫受容体によって「危機」と感知され、それに伴い免疫応答が起こる。脳梗塞病態においても、虚血後の細胞死に伴って放出された内在性リガンドを、自然免疫受容体が感知することで炎症が開始・持続され、なかでも TLR2 及び TLR4 が主に寄与することが報告された (54–57)。前章において著者らはこの機構、すなわち炎症を司る自然免疫に着目し、自然免疫受容体 TLR4 の治療標的としての可能性について検討を行った。その結果、マウス脳虚血発症後にお

いて TLR4 を阻害することで脳保護作用が認められたことから、諸種の細胞が密接に関わる炎症を、TLR4 の阻害によって発生段階で調節することで結果的に NVU が保護されると考えられた。

一方、内在性リガンドを感知する自然免疫受容体は TLR 以外にもいくつか存在することが報告された。現在までに知られている自然免疫受容体には、TLR のほかに、Nod-like receptor (NLR)、RIG-like receptor (RLR) 及び C-type lectin receptor (CLR) がある (63–66)。このことは、TLR のみが炎症の発生の起点となるわけではないことを意味する。前章における研究を含め、脳梗塞病態における TLR の関与に関する知見はこれまで集積されてきたが、これら TLR 以外の自然免疫受容体の関与についてはほとんど研究がなされていない。そこで本章では、急性期脳梗塞治療の新たな標的となり得る自然免疫受容体を探索し、関連因子の治療標的としての可能性について検討した。

CLR の一つに、Mincle という受容体がある。近年、Mincle は結核菌の毒性因子として有名なトレハロースジミコール酸 (trehalose dimycolate: TDM) などに加え、死細胞を感知することが報告された。同時に、Mincle が感知する死細胞の本体は、細胞死に伴い細胞外に放出される SAP130 という核タンパク質であることも明らかとなった。また、Mincle は下流シグナルとして Syk というキナーゼを経由することが知られている (67–69)。

これらの知見から、本章では、脳梗塞病態においても、虚血あるいは再灌流障害による細胞死に伴い大量の SAP130 が細胞外に放出され、それによって Mincle/Syk が活性化され、炎症の発生・持続の起点となっているとの仮説を立て、検討を行った。まず、マウス脳虚血再灌流モデル及びヒト脳梗塞患者標本を用いて、虚血脳における Mincle の発現及び局在について検討した。また、Mincle および Mincle 関連タンパク質の経時的変化について検討した。つぎに、脳虚血再

灌流誘発脳組織損傷に対する Syk 阻害剤 Piceatannol の保護作用について検討した。さらに、Piceatannol の脳保護作用の作用機序の一端を明らかにするために、NVU 又は脳虚血病態に関与する因子に対する Piceatannol の影響について検討した。

## 第 2 節 実験材料及び方法

### 2-1 実験材料

anti-CD31 antibody、anti-ICAM1 antibody、anti-VE-cadherin antibody 及び anti-SAP130 antibody は Abcam (Cambridge, UK)、anti-Syk antibody 及び anti-phospho-Syk antibody は Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)、Fluoromount™ は Diagnostic BioSystems (Pleasanton, CA, USA)、anti-Claudin5 antibody 及び Hoechst33342 は Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)、potassium chloride は Kishida Chemical (Osaka, Japan)、anti-Mincle antibody は MBL (Nagoya, Japan)、anti-CD11b antibody、anti-MAP2 antibody 及び anti-MMP9 antibody は Millipore (Billerica, MA, USA)、Alexa Fluor 488 F (ab')<sub>2</sub> fragment of goat anti-rabbit IgG (H+L) antibody 及び Alexa Fluor 546 F (ab')<sub>2</sub> fragment of goat anti-mouse IgG (H+L) antibody は Molecular Probes (Eugene, OR, USA)、Blocking One-P、Sodium hydrogen phosphate 12-water、sodium dihydrogen phosphate dihydrate 及び pentobarbital は Nacalai tesque (Kyoto, Japan)、O.C.T. compound は Sakura Finetechnical (Tokyo, Japan)、2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC)、protease inhibitor cocktail、phosphatase inhibitor cocktail 1 及び phosphatase inhibitor cocktail 2 は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)、anti-mouse HRP-conjugated IgG、anti-rabbit HRP-conjugated IgG 及び anti-rat HRP-conjugated IgG は Pierce Biotechnology (Rockford, IL, USA)、BCA protein assay kit は Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)、Piceatannol

は Tokyo Chemical Industry (Tokyo, Japan)、Can get signal solution 1 及び Can get signal solution 2 は Toyobo (Osaka, Japan)、M.O.M. immunodetection kit は Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)、anti-Iba1 antibody、sucrose、ImmunoStar® LD 及び paraformaldehyde (PFA) は Wako (Osaka, Japan) よりそれぞれ購入した。

## 2-2 実験方法

### 2-2-1 実験動物

野生型 ddY 雄性マウスは Japan SLC (Shizuoka, Japan) より購入した。本試験に用いたすべてのマウス (22–28g) は、設定温度: 24°C (許容範囲: 22–26°C)、設定湿度: 55% (許容範囲: 40–70%)、明暗各 12 時間 (照明: 午前 7:00–午後 7:00) に維持された岐阜薬科大学の動物飼育舎にて、プラスチック製ケージ (縦 24.5 × 横 17.5 × 高さ 12.5 cm) を用い、自由給水下に固形飼料 (CE-2; CLEA Japan, Tokyo, Japan) にて飼育した。

実験を行うにあたっては、岐阜薬科大学動物飼育・動物実験委員会に動物実験承認申請を行い、許可を受けた上で実施した。

### 2-2-2 マウス中大脳動脈閉塞モデルの作製、神経症状の評価、梗塞体積の計測及び薬物処置

実験には、45 週齢 ddY 系雄性マウスを使用した。手術の際の麻酔には、小動物用麻酔器 (Soft Lander, Sin-ei industry Co. Ltd.) を用い、笑気ガス 70%、酸素ガス 30% 下において麻酔導入時には 23 % isoflurane を、麻酔維持には 11.5 % isoflurane を使用した。体温は、手術中及び手術後正向反射が回復するまで保温ランプで維持した。左脳側中大脳動脈 (middle cerebral artery: MCA) の閉塞は、filament 栓子を挿入することにより実施した (Fig. 2)。すなわち、実体顕微鏡下

にて、左脳側 MCA にシリコン樹脂混合物 (Xantopren+ Activator Liquid) (Heraeus Kulzer, Hanau, Germany) で先端を覆った 8-0 nylon monofilament (Ethicon, Somerville, NJ) を頸動脈から挿入することにより閉塞した (MCA occlusion: MCAO) (42)。閉塞 2 時間後に再度 isoflurane を用いて麻酔を導入し、filament 栓子を引き抜くことで、2 時間虚血再灌流モデルを作製した。虚血 24 時間後の神経症状を測定した。その後断頭し、梗塞体積を計測した。

神経症状は、Fig. 3 に示す基準に従って観察・記録した。すなわち、0. 目立った神経症状なし (正常)、1. 大きな左周りの円を描くが、時々真っ直ぐ進むこともある (軽症)、2. その場で小さく左に回る (中程度)、3. 歩行不可、もしくはその場で体を回転させる (重症) の 4 段階に分けてスコア化した (43)。

梗塞体積の計測には、mouse brain matrix (RBM-2000C; Activational Systems, Warren, MI, USA) を用いて、前脳を前から 2 mm ずつの厚さで切り取った 5 つの切片を使用した。各切片を 2% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) で 10–15 分間染色した。各切片の梗塞部位はデジタルカメラ (Cool PIX4500; Nikon, Tokyo, Japan) を用いて記録し、Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) を用いて梗塞面積を測定した。各切片の梗塞面積から梗塞体積を計測した。

Piceatannol は 0.5% carboxymethylcellulose (CMC) に溶解して使用し、溶媒群には 0.5% CMC の生理食塩水を使用した。虚血 30 分前及び再灌流直後に Piceatannol (10, 50 and 100 mg/kg) を腹腔内 (i.p.) 投与した。

### 2-2-3 ウェスタンブロット解析

マウスを虚血 24 時間後に断頭し、脳を摘出した後、前脳先端から 5–8 mm の厚さ 3 mm の脳切片を切り取った。切り取った脳切片を氷冷したガラスシャーレの上に置き、顕微鏡下で虚血側を単離した。単離した脳切片は、RIPA 溶液 [1/100

protease inhibitor cocktail、1/100 phosphatase inhibitor cocktail 1、1/100 phosphatase inhibitor cocktail 2 含有] に入れ、ホモジネート処理した。

タンパク質濃度を調整したサンプルを、5–20%のポリアミドゲル (SuperSep™; Wako) を用いて電気泳動により展開した。泳動後、ゲルを PVDF 膜 (Immobilon; Millipore, Billerica, MA, USA) に転写した。

転写後、PVDF 膜を 0.05% Tween 20 含有 50 mM TBS (TBS-T: 10 mM tris、40 mM tris hydrochloride、15 mM NaCl) で洗浄し、その後ブロッキングとして Blocking One-P に浸し、室温で 1 時間振とうした。転写膜を TBS-T で洗浄後、Can get signal solution 1 で希釈した一次抗体に浸し、4°C で一晩振とうした。転写膜を TBS-T で洗浄後、Can get signal solution 2 で希釈した二次抗体に浸し、室温で 1 時間又は 4°C で一晩振とうした。転写膜を TBS-T で洗浄後、ImmunoStar® LD に 5 分間浸した。その後、Luminescent image analyzer LAS-4000 UV mini (Fujifilm, Tokyo, Japan) 及び Multi Gauge Ver. 3.0 (Fujifilm, Tokyo, Japan) を用いて検出した。

一次抗体には、anti-Mincle antibody (1: 1,000)、anti-SAP130 antibody (1: 2,000)、anti-phospho-Syk antibody (1: 1,000)、anti-Syk antibody (1: 1,000)、anti-ICAM1 antibody (1: 1,000)、anti-Claudin5 antibody (1: 1,000)、anti-MMP9 antibody (1: 1,000) 又は and polyclonal anti-NOX4 antibody (1:500) を用いた。二次抗体には、anti-mouse HRP-conjugated IgG (1: 2,000) 又は anti-rabbit HRP-conjugated IgG (1: 2,000)、anti-rat HRP-conjugated IgG (1: 5000) を用いた。

#### 2-2-4 組織免疫染色

##### 2-2-4-1 組織切片作製

マウスは pentobarbital 麻酔下で開胸後、ペリスタポンプ (Atto, Tokyo, Japan) を用いて生理食塩水を左心室内に注入して灌流し、その後 4% paraformaldehyde 含有 0.1 M phosphate buffer (PB: pH 7.4) (組織固定液) を 10 分間注入し、組織を固定した。その後、脳を取り出し、同固定液中に一晩放置した。固定した脳は 25% sucrose 含有 0.1 M PB (pH 7.4) 液に 24 時間浸すことでスクロース置換し、その後液体窒素を用いて O.C.T. compound 中に凍結包埋した。包埋した組織から、cryostat (Leica, Tokyo, Japan) を用いて、-20°C 中、厚さ 14 μm の切片 (Bregma より 0.4–1.0 mm 手前部分) を作製した。作製した切片を MAS コーティングされたスライドガラス (S-9441; Matsunami, Osaka, Japan) に貼付して、-80°C で保存した。

#### 2-2-4-2 蛍光免疫染色

染色時にマウス凍結切片を -80°C より取り出し -20°C で 1 時間放置した後、室温で 10 分間乾燥させ、phosphate buffer saline (PBS) に浸して O.C.T. Compound を洗浄した。ヒト組織切片は、染色前に脱パラフィンした。super PAP pen (ZYMED, San Francisco, CA, USA) にて反応液の流出を防ぐために切片の周囲を囲んだ後、M.O.M. immunodetection kit 又は 10% normal goat serum で 1 時間ブロッキングした。その後、一次抗体を用いて 4°C で一晩反応、二次抗体にて 2 時間反応、Hoechst 33342 (1: 1,000; Invitrogen) を室温で 30 分間反応させ、Fluoromount™ (Diagnostic BioSystems, Pleasanton, CA, USA) にて封入した。

一次抗体には、anti-Mincle antibody (1: 100)、anti-CD11b antibody (1: 100)、anti-Iba1 antibody (1: 200)、anti-MAP2 antibody (1: 100)、anti-Claudin5 antibody (1: 100) 又は anti-Syk antibody (1: 100)、anti-VE-cadherin antibody (1: 200) 又は anti-CD31 antibody (1: 200) を用いた。二次抗体には、Alexa Fluor 488 F (ab')<sub>2</sub>

fragment of goat anti-rabbit IgG (H+L) antibody (1: 1,000) 又は Alexa Fluor 546 F (ab')<sub>2</sub> fragment of goat anti-mouse IgG (H+L) antibody (1: 1,000) を用いた。切片は共焦点レーザー顕微鏡 (FV10i; Olympus, Tokyo, Japan) 下で観察した。

#### 2-2-5 統計学的解析

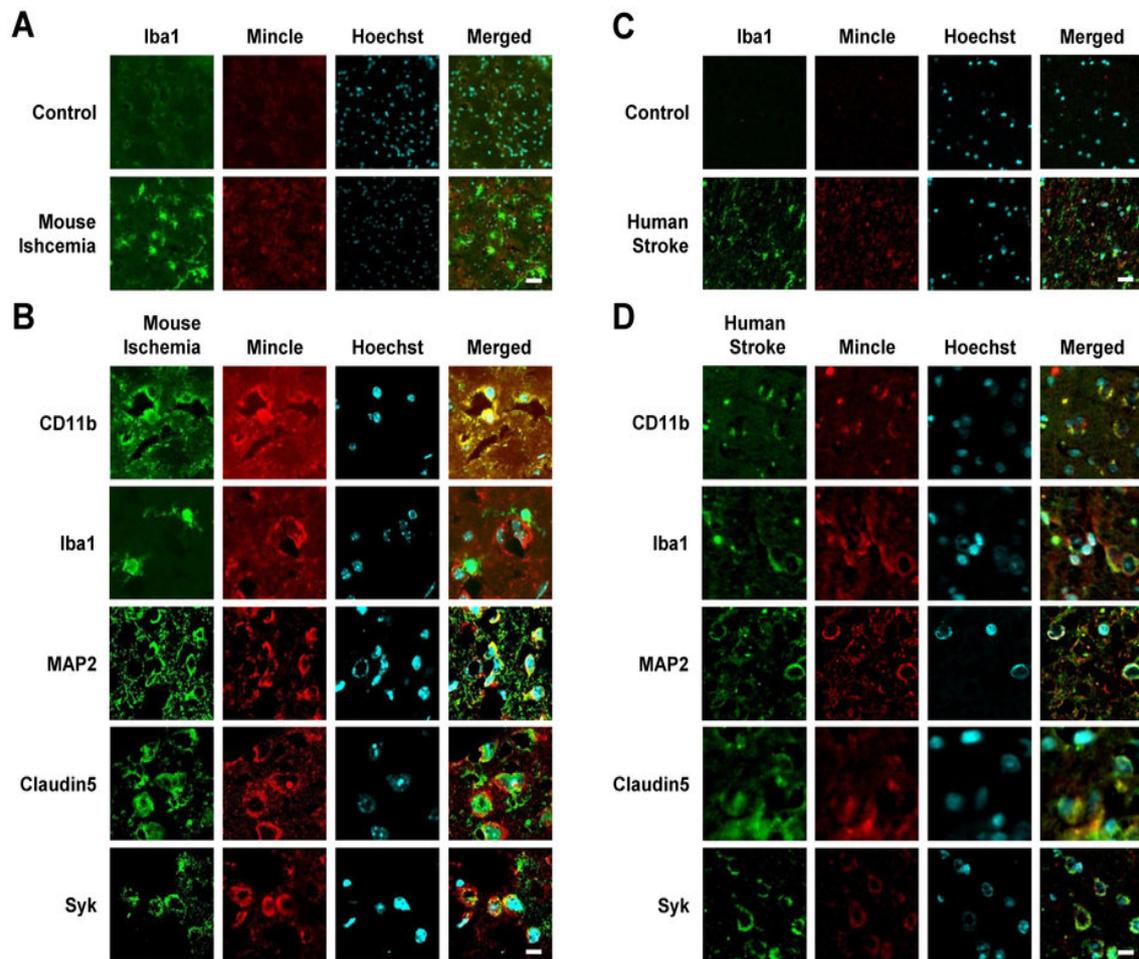
実験結果はすべて平均値±標準誤差 (mean ± S.E.) で示した。統計学的な比較は、STAT VIEW (SAS institute, Cary, NC, USA) を用い、二群間比較は Student's *t*-test、多群間比較は Dunnett's test により行った。危険率 5 %未満を有意差有りとした。

### 第3節 実験結果

#### 3-1 脳虚血再灌流病態における Mincle の局在

Mincle 陽性の細胞種を同定するために、マウス脳虚血 (MCAO) 再灌流モデル及びヒト脳梗塞患者標本を用いて、蛍光免疫二重染色を行った。虚血再灌流 22 時間後、マウス虚血脳において、Mincle 及び免疫細胞マーカーである Iba1 の発現上昇が認められた (Fig. 10A)。マウス虚血脳では、免疫細胞マーカーである CD11 陽性細胞における Mincle タンパク質の発現が認められたが、Iba1 陽性細胞においては認められなかった。またマウス虚血脳では、神経細胞マーカーである MAP2 陽性細胞、血管内皮細胞マーカーである Claudin5 陽性細胞及び Mincle の下流シグナルである Syk 陽性細胞における Mincle タンパク質の発現が認められた (Fig. 10B)。ヒト脳梗塞患者標本において、マウス同様、Mincle 及び Iba1 の発現上昇が認められた (Fig. 10C)。ヒト脳梗塞患者標本では、マウス同様、CD11b、MAP2、Claudin5 及び Syk 陽性細胞における Mincle タンパクの発現が認

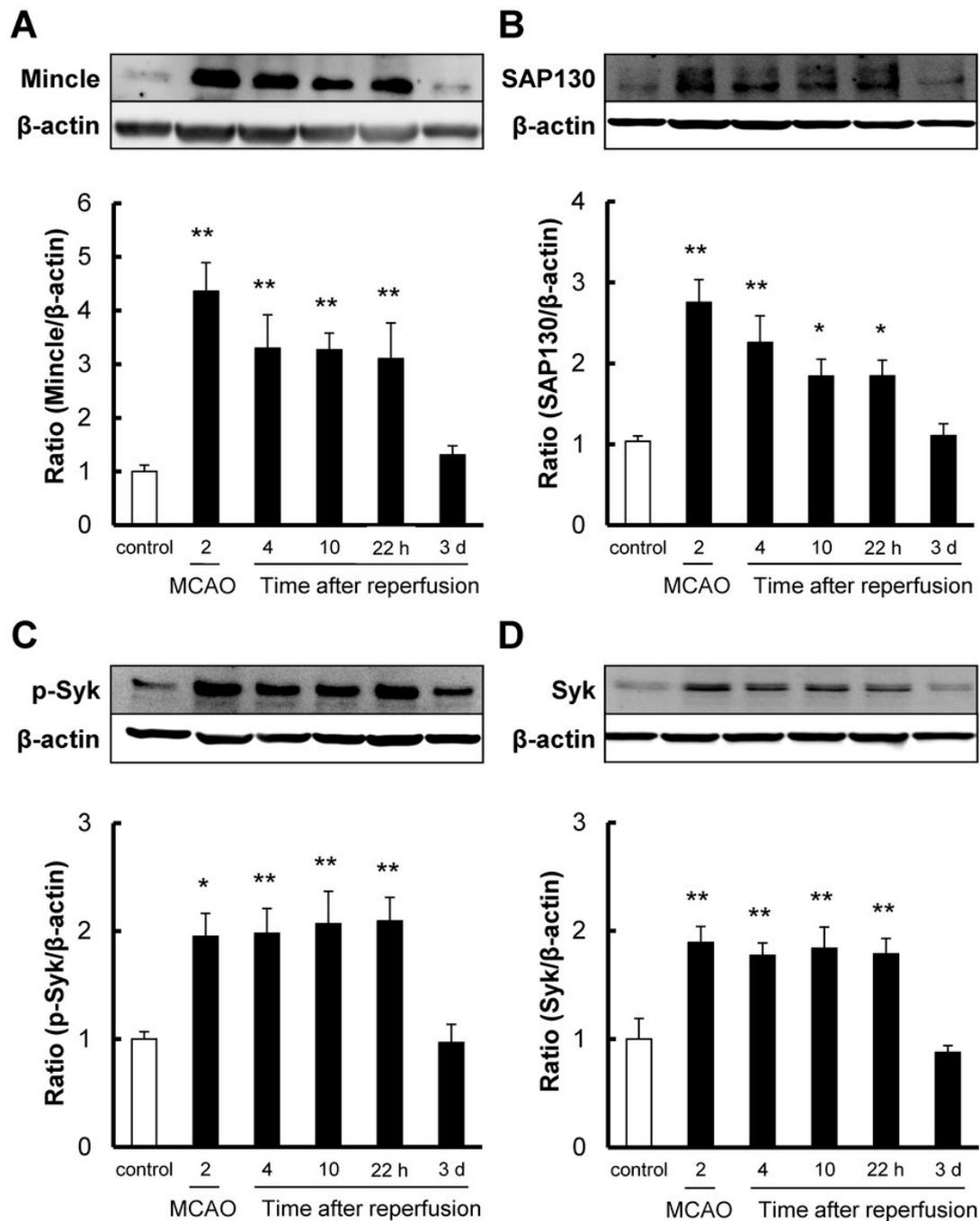
められた。一方、マウスとは異なり、Iba1 陽性細胞における Mincle タンパクの発現が認められた (Fig. 10D)。



**Figure 10** Localization of Mincle in brain tissue after ischemic stroke in mice and human by double-immunostaining of Mincle and marker proteins. (A) The expression levels of Mincle and Iba1 were upregulated after ischemia. Scale bar = 20  $\mu$ m. (B) Mincle co-localized with CD11b, but not Iba1, all of which are markers of immune cells. Mincle co-localized with neuronal cell marker MAP2. Mincle co-localized with the endothelial cell marker Claudin5. Mincle co-localized with Syk, which is the downstream signal of Mincle. Scale bar = 10  $\mu$ m. (C) The expression levels of Mincle and Iba1 were upregulated in human stroke. Scale bar = 20  $\mu$ m. (D) Mincle co-localized with CD11b, MAP2, and Claudin 5 in human stroke. Unlike in mice, Mincle also co-localized with Iba1. Scale bar = 10  $\mu$ m.

### 3-2 虚血再灌流病態における Mincle 及び関連因子の経時的変化

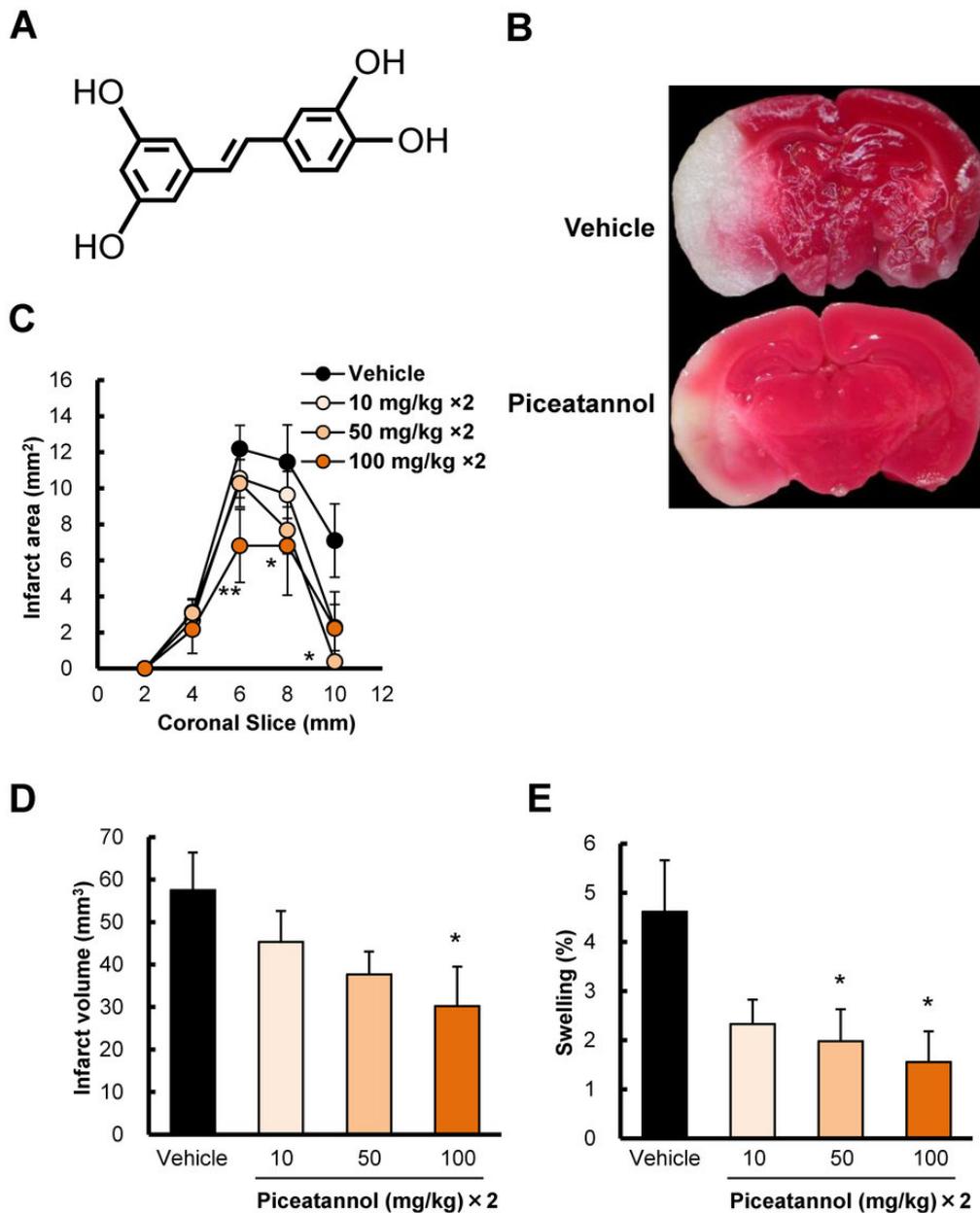
脳梗塞病態における Mincle 及び関連因子 (Mincle のリガンドである SAP130 ならびに Mincle の下流シグナルである Syk 及び p-Syk) の経時的な挙動を検討するため、マウス脳虚血 (MCAO) 再灌流モデルを用いて、虚血 2 時間後ならびに再灌流 4 時間後、10 時間後、22 時間後及び 3 日後の各タンパク質発現量をウェスタンブロット法にて評価した。Mincle 及び関連因子は、虚血 2 時間後ならびに虚血再灌流 4 時間後、10 時間後及び 22 時間後において発現上昇した (Fig. 11A–D)。Mincle 及び SAP130 は虚血 2 時間後の発現量をピークに、再灌流 22 時間後まで徐々に減少する傾向が認められた (Fig. 11A, B)。一方、Syk 及び p-Syk は虚血 2 時間後に発現上昇し、22 時間後まで持続する傾向が認められた (Fig. 11C, D)。いずれのタンパク質も再灌流 3 日後に発現上昇する傾向は認められなかった (Fig. 11A–D)。



**Figure 11** The time-course of changes in protein levels of Mincle, SAP130, p-Syk, and Syk after reperfusion following 2 h of focal ischemia in mice. Quantitative analysis with western blot shows that the expression levels of (A) Mincle, (B) SAP130, (C) p-Syk, and (D) Syk were significantly increased at 2 h after ischemia and at 4 h, 10 h, and 22 h after reperfusion, but not at 3 days. Cropped blots are used in the figure. These gels were run under same experimental condition. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs. control,  $n = 8$ .

### 3-3 脳虚血再灌流障害に対する Piceatannol の作用

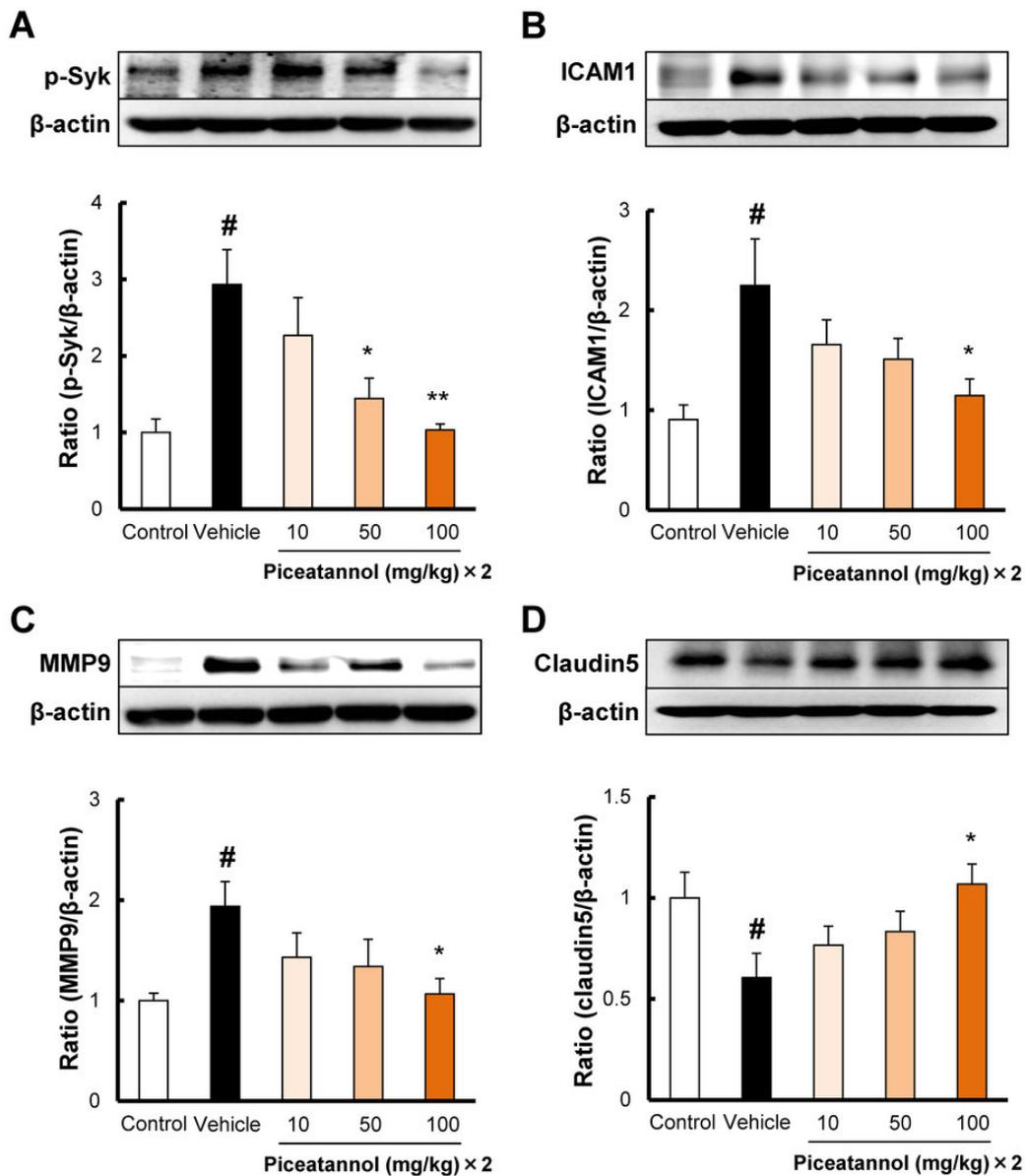
虚血再灌流障害に対する Syk の薬理的阻害の影響を検討するために、マウス脳虚血再灌流 (MCAO) モデルを用いて、虚血 30 分前及び 2 時間虚血再灌流直後の各時点に Syk 阻害剤 Piceatannol (Fig. 12A) (10, 50, and 100 mg/kg) を腹腔内 (i.p.) 投与した。虚血再灌流 22 時間後において、溶媒投与群と比較して Piceatannol 投与群は用量依存的に脳保護作用が認められ、Piceatannol 50 mg/kg 投与により前脳先端から 10 mm、Piceatannol 100mg/kg 投与により前脳先端から 6、8 及び 10 mm の梗塞面積は有意に抑制された (Fig. 12B)。また、Piceatannol 100mg/kg 投与により梗塞体積は有意に抑制された (Fig. 12C)。さらに、溶媒投与群と比較して Piceatannol 100mg/kg 投与群において虚血再灌流による浮腫は有意に抑制された (Fig. 12D)。



**Figure 12** The protective effects of piceatannol, a Syk inhibitor, on infarction and swelling at 22 h after reperfusion following 2 h ischemia. Brains were removed, and the forebrains were sliced into 5 coronal 2-mm sections. Sections are identified according to the distance from the frontal limit of the forebrain. (A) A representative photograph of TTC staining of 8-mm front coronal brain sections (2 mm thick) at 22 h after reperfusion following 2 h ischemia. The upper panel is vehicle control, and the lower panel is piceatannol treatment (at 100 mg/kg × 2, i.p.). Pre- and post-treatments with piceatannol (B) at 50 and 100 mg/kg significantly reduced the infarct area and that with piceatannol (C) at 100 mg/kg significantly reduced the infarct volume. (D) Piceatannol at 50 and 100 mg/kg significantly reduced swelling. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs. vehicle,  $n = 8-10$ .

### 3-4 Mice 下流シグナルに対する Piceatannol の作用

Piceatannol の脳保護作用の作用機序を解明するために、マウス虚血再灌流 22 時間後 (Piceatannol 10、50 又は 100 mg/kg 投与 22 時間後) における p-Syk 及び脳梗塞病態に関与する諸種の因子の挙動について検討した。実験には、虚血再灌流 22 時間後の虚血半球及び偽手術群の脳半球を用いた。虚血再灌流によって発現上昇した p-Syk は、Piceatannol 投与により用量依存的に抑制される傾向が認められ、Piceatannol 50 及び 100 mg/kg 投与群において有意に抑制された (Fig. 13A)。ICAM1 は白血球の血管内皮細胞への結合を促進する因子であり、脳虚血再灌流障害に関与することが知られている (70)。虚血再灌流によって発現上昇した ICAM1 は、Piceatannol 投与により用量依存的に抑制される傾向が認められ、Piceatannol 100 mg/kg 投与群において有意に抑制された (Fig. 13B)。MMP9 はタンパク質分解酵素の一つであり、血管内皮細胞の基底膜を分解し、BBB を破綻させることで脳浮腫、脳梗塞体積の増大又は脳出血を引き起こすことが知られている (71)。虚血再灌流によって発現上昇した MMP9 は、Piceatannol 投与により用量依存的に抑制される傾向が認められ、Piceatannol 100 mg/kg 投与群において有意に抑制された (Fig. 13C)。脳には脳血液関門、すなわち血管との物質交換を制限する機構が存在し、この機構には細胞間結合の一種である密着結合が主要な役割を担っている。この密着結合の主な機能である細胞間バリアにおいて、Claudin5 は中心的な働きをする膜タンパク質である。虚血再灌流によって発現低下した Claudin5 は、Piceatannol 投与により用量依存的に保護される傾向が認められ、Piceatannol 100 mg/kg 投与群において有意に保護された (Fig. 13D)。



**Figure 13** The mechanisms of the protective effects of piceatannol after cerebral ischemia. Quantitative analysis with western blot shows that the expression level of (A) p-Syk was increased at 22 h after reperfusion, and administration of piceatannol intraperitoneally at 50 and 100 mg/kg, i.p. significantly reduced p-Syk. (B) ICAM1 was increased after 22 h after reperfusion, and administration of piceatannol intraperitoneally at 100 mg/kg, i.p. significantly reduced ICAM1. (C) MMP9 was increased 22 h after reperfusion, and administration of piceatannol intraperitoneally at 100 mg/kg, i.p. significantly reduced MMP9. (D) Claudin5 expression was decreased after 22 h after reperfusion, and administration of piceatannol intraperitoneally at 100 mg/kg significantly ameliorated Claudin5 expression. Cropped blots are used in the figure. These gels were run under same experimental condition. <sup>#</sup>  $P < 0.05$  vs. control, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs. vehicle,  $n = 5-6$ .

#### 第4節 考察

本章では、脳梗塞病態における新たな自然免疫受容体の関与を探索することを目的として、Mincle の局在、Mincle 及び関連因子のタンパク質発現量の変化について検討した。また、Mincle の下流シグナルである Syk の阻害剤 Piceatannol の脳保護作用及びその作用機序について検討した。本検討において、脳虚血再灌流病態において Mincle タンパク質は発現上昇し、免疫細胞、神経細胞及び血管内皮細胞に発現すること、Mincle リガンドである SAP130 タンパク質、Mincle の下流シグナルである Syk タンパク質及びその活性体である p-Syk タンパク質が発現上昇することが明らかとなった。また、Syk 阻害剤である Piceatannol の有効性が示唆され、その作用機序として、ICAM1、MMP9 及び Claudin5 が関与することが明らかとなった。

マウス脳虚血再灌流モデル及びヒト患者標本を用いた組織学的検討により、脳虚血再灌流病態において Mincle は諸種の細胞に発現が認められた。マウス虚血脳において、Mincle は Iba1 と共局在が認められなかったが、同じく免疫細胞マーカーである CD11b とは共局在が認められたこと、ヒト脳梗塞患者標本において、Iba1 及び CD11b と共局在が認められた。Iba1 の種差については不明であるものの、脳梗塞病態において Mincle は免疫細胞に発現すると考えられた。また、マウス脳虚血再灌流モデル及びヒト脳梗塞患者標本ともに、Mincle は神経細胞マーカーである MAP2 及び血管内皮細胞マーカーである Claudin5 と共局在が認められたことから、Mincle は神経細胞及び血管内皮細胞にも発現すると考えられた。虚血後の神経細胞やアストロサイトにおいて TLR4 の発現上昇や MMP9 の産生が認められたことが報告されており (59)、TLR4 と同様 Mincle についても、虚血時の各種細胞における Mincle の発現はそれぞれの細胞種に直接的な影響を及ぼす可能性があると考えられた。また臨床への応用が最大の課題

である脳梗塞において、マウスと同様、ヒト脳梗塞病態においても Mincle 及び Syk の発現が認められたことは、脳梗塞治療薬開発において、Mincle 及び Syk が新たな標的となると考えられた。

マウス脳虚血再灌流モデルにおけるタンパク質発現量の経時的な解析により、脳虚血再灌流病態において Mincle 及び諸種の関連因子のタンパク質の発現上昇が確認された。Mincle 及びそのリガンドである SAP130 は、虚血 2 時間後に大量に産生され、再灌流後徐々に発現低下する傾向が認められた。自然免疫受容体の「パターン認識」という認識機構、及び自然免疫受容体 TLR4 に様々な内在性リガンドが存在し脳梗塞病態に関与することから、SAP130 以外にも Mincle の内在性リガンドが存在する可能性はあるが、Mincle 及び SAP130 のタンパク質発現量は経時的に類似していたことから、SAP130 は脳梗塞病態において Mincle の主要なリガンドとして機能すると考えられた。一方、Syk 及び p-Syk は虚血 2 時間後に発現上昇し、再灌流 22 時間後まで継続する傾向が認められ、Mincle 及び SAP130 とは異なる経時的プロファイルを示した。この要因として、Syk は Dectin1, Dectin2 又は TLR4 等他の自然免疫受容体の下流シグナルとして機能することも報告されており (72, 73)、脳梗塞病態においてもこれらの自然免疫受容体の下流シグナルとして機能するからではないかと推察された。

以上の結果に加え、近年、Mincle KO マウスが脳虚血障害に対して抑制作用を示し (74)、Mincle が脳梗塞の治療標的となることが示唆されている。一方、本研究において、Syk は Mincle と比較して長時間にわたり活性化されていること、Syk は Mincle 以外の自然免疫受容体の下流シグナルとしても機能することが示唆された。したがって、脳梗塞の治療標的として Mincle のみならず Syk も有用である可能性が示唆された。

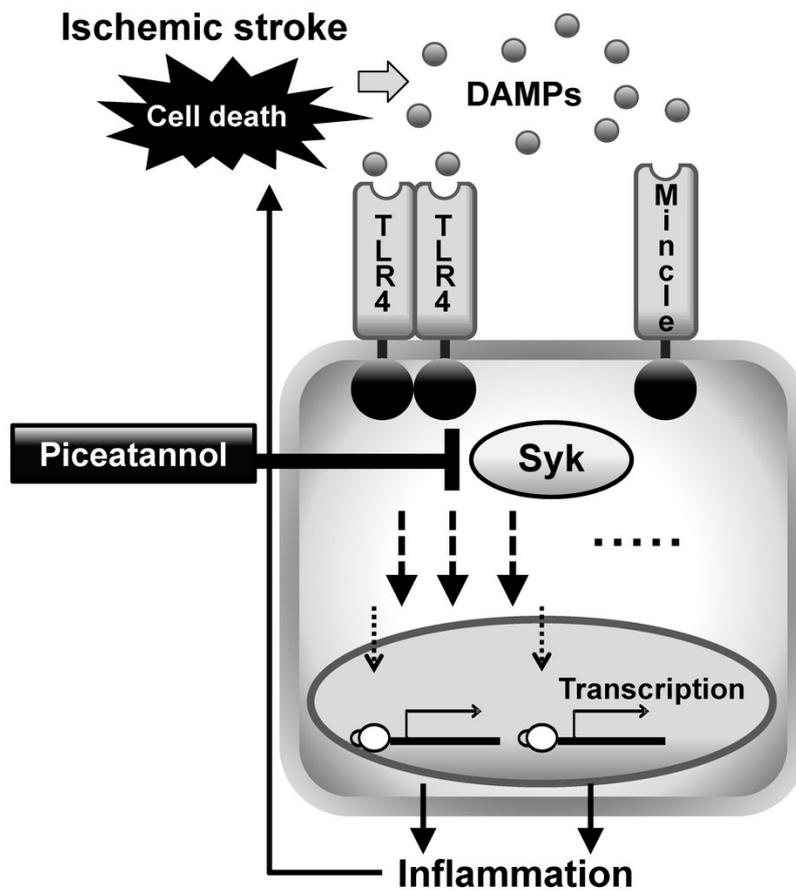
そこで本章では更に、Syk の治療標的としての可能性を見出すことを目的として、マウス脳虚血再灌流モデルを用いて、Syk 阻害剤である Piceatannol の有効性について検討したところ、マウス虚血再灌流モデルにおける Piceatannol による Syk の薬理的阻害により、脳梗塞面積、脳梗塞体積及び脳浮腫が抑制された。脳梗塞病態における Syk の詳細な役割については未だ明らかにされていないが、本研究で得られた結果は、腸虚血障害に対して Syk 阻害剤 R788 による保護作用が認められたという報告、及び眼虚血障害に対して Piceatannol による保護作用が認められたという報告と一致するものであった (75, 76)。

脳梗塞病態に関与する諸種のタンパク質の発現量の解析により、Piceatannol の脳保護作用の作用機序の一端が明らかとなった。これまで蓄積された知見及び本研究から推察される脳梗塞病態のメカニズムを Fig. 14 に示す。本研究において、脳虚血再灌流による Syk、脳炎症部位への白血球の接着・浸潤に関与する ICAM1 及び BBB の破綻に寄与する MMP9 の活性化は、Piceatannol 投与によって抑制された。また、虚血再灌流後における BBB の構成因子である Claudin5 の障害は、Piceatannol 投与によって抑制された。これらの結果から、Syk の薬理的阻害により NVU が保護され、脳組織損傷が抑制されることが示唆された。

第 1 章緒言で述べたとおり、21 世紀直前から今日まで自然免疫に関する分野が目覚ましい発展を遂げたことにより、病原体の生体内への侵入による免疫応答だけでなく、自己免疫疾患をはじめとした多くの内因性疾患の発症機構が明らかとなりつつある。脳梗塞病態では、虚血により大量の細胞壊死が起こり、結果、通常細胞外に存在しないはずの大量の自己成分が出現し、その中の一部が内在性リガンドとして働く。内在性リガンドと自然免疫受容体を起点としたこの免疫応答機構は、脳虚血後の炎症の発生や病態進展をまさに説明し得るものと考えられた。これらの背景を踏まえ、著者らは第 1 章から本章にかけて、

脳梗塞病態における自然免疫の関与について研究を行った。第 1 章では自然免疫受容体 TLR4 のシグナルの直接的な遮断による影響、本章では Mincle 又は TLR4 などとの関連性が指摘されている Syk の遮断による影響を検討し、脳梗塞急性期における治療標的としての可能性を模索した。

脳梗塞病態において、各自然免疫受容体あるいは各細胞種の役割の違いなど、詳細については未だ不明点が多い。脳梗塞病態における TLR4 シグナル経路の他臓器・他疾患との差異など、脳という複雑な構造・システムが脳梗塞病態の理解を困難にさせている側面もある。また一般に言われるように、免疫は組織修復に必要な過程であり、自然免疫受容体や関連シグナルの阻害が亜急性期あるいは慢性期の組織修復過程にどのような影響を及ぼすかについても詳細には分かっておらず、これら治療標的の治療可能時間域も不明である。このような制限はあるものの、第 1 章及び本章で示したとおり、TLR4 あるいは Syk の薬理的阻害は有効性が認められ、これらの結果から、自然免疫は脳梗塞急性期における新たな治療標的となることが示唆された。



**Figure 14** Putative mechanism for Mincle and Syk in ischemic stroke. Damage-associated molecular patterns (DAMPs) turn on innate immunity via receptors, such as TLR4 and Mincle. The downstream kinase Syk drives inflammatory cascades and cytokines, and the Syk inhibitor piceatannol reduces tissue injury induced by ischemia and reperfusion.

### 第3章 大規模有害事象自発報告データベースを用いた Clopidogrel

#### と Proton pump inhibitor との相互作用に関する解析

##### 第1節 緒言

1章及び2章では、有効な治療薬がほとんどなく、医療ニーズの高い脳梗塞急性期に対する新規標的分子の探索を行った。これらの知見は製薬会社における新規脳梗塞治療薬の開発に資すると考えられる。

創薬において、薬理試験で有効性が見出された候補物質は、安全性に関する薬理試験及び毒性試験が実施され、これらの成績に基づき臨床試験が実施される。前臨床及び臨床試験の成績等から、リスクに比してベネフィットが上回るかの判断から有用性が認められ承認を得た医薬品が実際の臨床現場で使用される。しかしながら、承認申請前に行われる臨床試験は一般に、①発現頻度の低い副作用を検出する上では検討症例数が少ない、②有効性を評価するために均一な患者集団を対象としており、実臨床で問題となる特殊集団（高齢者、腎機能障害患者又は肝機能障害患者等）の検討症例数が少ない、③同様な理由で併用薬に制限が加えられた患者群を対象としており実臨床で併用される可能性のある医薬品との相互作用に関する情報が不足している、④多くの場合1年超の長期投与時の有効性・安全性が不明であること等の制約がある。したがって、製造販売後においても、臨床現場等から新たに得られる情報を収集・評価・発信する必要がある。

Clopidogrel は「虚血性脳血管障害（心原性脳塞栓症を除く）後の再発抑制」等、血栓塞栓イベントの発現又は再発を予防する抗血小板剤として広く臨床使用される。抗凝固薬や抗血小板薬と他の医薬品との相互作用は臨床上問題となっており、なかでも代表的なものとして、抗血小板薬 Clopidogrel とプロトンポンプ

阻害剤 (Proton pump inhibitor; PPI) との相互作用に関する議論がよく知られている。Clopidogrel は、同じく抗血小板剤である Aspirin と併用されることがあり、Clopidogrel 単剤、Aspirin 単剤、両剤併用は消化管出血イベントのリスクを上昇させることが知られている (77)。過去の研究より、PPI は抗血小板療法による消化管出血イベントを抑制することが報告されており、コンセンサスガイドラインでは、Clopidogrel 及び Aspirin の抗血小板剤二剤併用療法による消化管出血イベントの予防を目的に PPI の投与が推奨されている。消化管出血イベントに対する PPI の効果はケースコントロール研究 (78)、コホート研究 (79, 80) 及びランダム試験 (81) で評価されているが、実臨床においては評価されていない。

しかしながら PPI には、Clopidogrel の活性化に必要な CYP2C19 を阻害する作用があり、Clopidogrel の活性代謝物の生成量を減少させるため、Clopidogrel の抗血小板作用を減弱させる可能性がある。過去の観察研究より、Clopidogrel と PPI との薬物相互作用は血栓塞栓イベントに影響を与えることが報告されている (82, 83)。2009 年 11 月、米国食品医薬品局 (Food and Drug Administration: FDA) は、Clopidogrel と PPI (omeprazol) との相互作用に関する安全性情報を発出した。2010 年 3 月、欧米医薬品庁 (The European Medicines Agency: EMA) は、Clopidogrel と omeprazol の併用を避けるよう勧告した。また 2010 年 3 月、FDA は、CYP2C19 の代謝活性が低い患者 (poor metabolizers) は Clopidogrel の作用が減弱し、心血管イベントのリスクが高い可能性があること警告欄に追加するよう勧告した (84)。一方、Clopidogrel と PPI の併用について血栓塞栓イベントに対する影響はないとする論文及びガイドラインも多く公表されている (85, 86)。

製造販売後において、規制当局より種々の安全対策が実施されているが、なかでも緊急に安全対策をとる必要があると判断された事例については、厚生労働省から「緊急安全性情報 (イエローレター)」及び「安全性速報 (ブルーレタ

一)」の配布が指示される (87)。これまでにイエローレター又はブルーレターが発出された事例は決して多くないにも関わらず、抗凝固薬又は抗血小板薬に関する事例についてこれらがいくつか発出されていることを踏まえると、抗凝固薬又は抗血小板薬は製造販売後において特に注意すべき対象と考えられる (87)。

臨床現場での薬剤評価には薬剤疫学研究が不可欠である。市販後調査等の観察研究は、製販売後の薬剤のリスク情報を得るうえで重要な役割を担っている。近年、大規模有害事象自発報告データベース (spontaneous reporting system; SRS) の報告数は増加している。SRS により、臨床試験では見出されなかった未知の有害事象の検出、特定集団での安全性評価、臨床での使用実態を反映した安全性評価等が可能となる。米国 Food and Drug Administration (FDA) は企業や医療現場からの自発報告によって構築されるデータベース (FDA Adverse Event Reporting System; FAERS) を Web 上で公開している (<http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Surveillance/AdverseDrugEffects/default.htm>)。FAERS は世界最大の有害事象自発報告データベースであり、臨床実態を反映した安全性評価に広く利用されている (88–91)。

自発報告を用いた有害事象の解析には、報告件数及び報告割合等、種々の安全性指標が知られている (92, 93)。シグナル検出に用いられる指標には、PMDA 及びオランダ薬剤監視センター (Lareb) が使用している reporting odds ratio (ROR) (94)、英国医薬品庁 Medicines and Healthcare products Regulatory Agency (MHRA) が使用している proportional reporting ratio (PRR) (95)、世界保健機関の information component (IC) (96)、FDA の the empirical Bayes geometric mean (EBGM) (97) が知られている。ROR の算出方法を Table 1 に示した。

本章では、FAERS データベースを用いて、Clopidogrel と PPI との併用が脳梗塞含む神経系の血栓塞栓イベント又は消化管出血イベントに与える影響を検討した。

**Table 1** Two by two table used for calculation of reporting odds ratios

		‘Suspected event’ reported	No ‘suspected event’ reported
Medication	Index group	a	c
	Reference group	b	d

## 第2節 方法

### 2-1 データソース

FAERS データは FDA のホームページ ([www.fda.gov](http://www.fda.gov)) からダウンロードした。本解析には、2004 年 1 月から 2013 年 3 月までに FAERS に登録されたデータを利用した。FAERS のデータベース構造は、国際的な個別症例安全性報告標準である ICH E2B に準拠している。FAERS は、症例基本情報 (DEMO)、医薬品情報 (DRUG)、有害事象情報 (REAC)、転帰情報 (OUTC)、治療期間情報 (THER)、診断・適応症情報 (INDI) 及び情報源 (RPSR) の 7 つのファイルより構成されており、各データテーブルは識別番号により関連づけられている。REAC に記載された有害事象の名称は ICH 国際医薬用語集 Medical Dictionary for Regulatory Activities (MedDRA) に準拠している (98)。

解析対象は Clopidogrel (Plavix)、Aspirin 及び PPI (omeprazole, esomeprazole, lansoprazole, dexlansoprazole, rabeprazole 及び pantoprazole) とした。FAERS において、報告者は、医薬品として、一般名、商品名、又は略称名等で登録している。従って解析時には、同一医薬品の一般名、商品名、又は略称名が一括して

抽出されなければならない。DrugBank は 1400 以上の低分子医薬品に関する一般名、商品名の情報が含まれる医薬品情報データベースである (99)。我々は、DrugBank を FAERS の医薬品検索に利用した。FAERS と DrugBank データベースの統合には、FileMaker Pro 12 ソフトウェア (FileMaker, Inc.) を利用した。FDA の推奨 (FAERS データベースの‘Asc\_nts.doc’ファイル参照) ([www.fda.gov](http://www.fda.gov)) に従い、異なる情報源からの重複する報告については直近の報告のみを解析対象とし、それ以前の報告は解析から除外した。

## 2-2 消化管出血イベント及び神経系の血栓塞栓イベントの定義

症例の抽出に用いる用語の定義には MedDRA version 15.0.を使用した。消化管出血イベントに関する有害事象報告の抽出には、MedRA 標準検索式 (Standardized MedDRA Query; SMQ) である「出血」 (SMQ code: 20000038) と器官別大分類 (System Organ Class; SOC) である「胃腸障害」 (SOC: gastrointestinal disorder) とともに合致する 68 語の基本語 (Preferred Term; PT) を用いた。脳梗塞含む神経系の血栓塞栓イベントに関する有害事象報告の抽出には、SMQ である「血栓および塞栓」 (SMQ code: 20000081) と SOC である「神経系障害」 (SOC: nervous system disorder) とともに合致する 63 語の基本語 (Preferred Term; PT) を用いた。

## 2-3 解析

消化管出血イベント又は神経系の血栓塞栓イベントについて、Aspirin、Clopidogrel 又は PPI の使用状況に基づき層別した。薬物相互作用の解析は、不均衡分析に基づき行い、crude ROR を算出した (Table 1)。ROR は点推定値として算出され、95%信頼区間とともに示した。

次に、データベースに存在する可能性のある交絡因子を調整した。ロジスティックモデルを用いて年齢及び性別により ROR を調整した。ロジスティックモデルには、Aspirin、Clopidogrel 及び PPI の項を組み入れた。さらに、2 者間の交互作用項 (Aspirin と PPI、Aspirin と Clopidogrel、及び Clopidogrel と PPI) 及び 3 者間の交互作用項 (Aspirin と Clopidogrel と PPI) を組み入れた。調整 ROR (adjusted ROR) を算出するために用いたロジスティックモデル回帰式を以下に示した。

$$\text{Log (odds)} = \beta_0 + \beta_1A + \beta_2S + \beta_3\text{Asp} + \beta_4C + \beta_5P + \beta_6\text{Asp}*P + \beta_7\text{Asp}*C + \beta_8C*P + \beta_9\text{Asp}*C*P$$

(A = Age, S = Sex, Asp = Aspirin, C = Clopidogrel, P = Proton pump inhibitor)

本モデルを交互作用項の無いのモデルと比較し、交互作用項の評価には尤度比検定を用いた。自由度 1 の  $\chi^2$  検定を行い、 $p < 0.05$  を統計的有意と判定した。年齢及び性別で調整した adjusted model と非調整の unadjusted model の pseudo  $R^2$  を算出した (100)。p 値 0.05 以下を統計学的有意差とした。データ解析には JMP ver.9 (SAS Institute Inc., Cary, NC, U.S.A.) を利用した。

### 第 3 節 結果

対象期間の FAERS 全データ 4,746,890 件から、FDA の推奨に従い重複する報告を除き、3,522,995 件を抽出した。さらに、年齢又は性別の記載が無い 1,265,093 件を除き、2,257,902 件を解析に用いた。

消化管出血イベントに関する報告の背景 (平均年齢、性別、Aspirin、Clopidogrel 又は PPI 使用の有無) を Table 2 にまとめた。消化管出血イベントに関する報告は、他の報告と比較して年齢が有意に高かった ( $p < 0.01$ , t 検定)。消化管出血イベントの ROR (95%信頼区間) について、Clopidogrel は 3.63 (3.50–3.77)、Aspirin

は 3.09 (3.01–3.16) であり、ともに 2 を上回った (Table 2)。PPI、Clopidogrel 又は Aspirin の使用の有無別に層別した報告件数を Table 3 に示した。PPI 非使用例について、Clopidogrel 使用かつ Aspirin 非使用例は 16,999 件、Aspirin 使用かつ Clopidogrel 非使用例は 88,113 件、Clopidogrel 使用かつ Aspirin 使用例は 14,490 件であった。それぞれに対応する ROR (95%信頼区間) を Table 3 に示した。PPI 非使用例について、Aspirin の crude ROR (95%信頼区間) は、Clopidogrel 非使用例で 3.08 (2.99–3.18)、Clopidogrel 使用例で 1.73 (1.59–1.88) であった。PPI 使用例について、Clopidogrel 使用かつ Aspirin 非使用例は 6,035 件、Aspirin 使用かつ Clopidogrel 非使用例は 30,396 件、Clopidogrel 使用かつ Aspirin 使用例は 6,107 件であった。PPI 使用例について、Aspirin の crude ROR (95%信頼区間) は、Clopidogrel 非使用例で 1.51 (1.43–1.60)、Clopidogrel 使用例で 1.32 (1.14–1.52) であった。非調整 ROR (95%信頼区間)、並びにロジスティック回帰モデルを用いて年齢及び性別により調整した調整 ROR (95%信頼区間) を Table 4 に示した。調整モデル又は非調整モデルの pseudo  $R^2$  はそれぞれ 0.0313 及び 0.0209 であった。交互作用項である  $\beta_6$ 、 $\beta_7$  及び  $\beta_8$  の値は負、 $\beta_9$  は正であり、それぞれ統計学的に有意であった (Table 4)。抗血小板剤 2 剤併用の調整 ROR (95%信頼区間) は 4.40 (4.02–4.81)、抗血小板剤 2 剤と PPI との併用の調整 ROR (95%信頼区間) は 3.40 (2.84–4.06) であった (Table 4)。

**Table 2** Characteristics of Cases and Non-cases in the Hemorrhagic Events Limited by Gastrointestinal Disorder\*

	Cases, n (%), n=50879	Non-cases, n=2207023	Reporting odds ratio (95% CI)
Mean age (years)	60.1	53.0	
Male	24865 (48.9)	862291 (39.1)	1.49 (1.46–1.52)
Clopidogrel	3227(6.3)	40404 (1.8)	3.63 (3.50–3.77)
Aspirin	8283 (16.3)	130823 (5.9)	3.09 (3.01–3.16)
PPIs	8293 (16.3)	197122 (8.9)	1.99 (1.94–2.03)

\* Selected preferred terms for haemorrhagic events (SMQ: 20000039), limited by SOC (gastrointestinal disorder) were assigned in MedDRA v15.0, including abdominal wall haematoma, abdominal wall haemorrhage, anal haemorrhage, anal ulcer haemorrhage, anorectal varices haemorrhage, bloody peritoneal effluent, chronic gastrointestinal bleeding, colonic haematoma, diarrhoea haemorrhagic, diverticulitis intestinal haemorrhagic, diverticulum intestinal haemorrhagic, duodenal ulcer haemorrhage, duodenitis haemorrhagic, enterocolitis haemorrhagic, gastric haemorrhage, gastric ulcer haemorrhage, gastric ulcer haemorrhage obstructive, gastric ulcer perforation, gastric varices haemorrhage, gastritis alcoholic haemorrhagic, gastritis haemorrhagic, gastroduodenal haemorrhage, gastroduodenitis haemorrhagic, gastrointestinal angiodysplasia haemorrhagic, gastrointestinal haemorrhage, gastrointestinal ulcer haemorrhage, gingival bleeding, haematemesis, haematochezia, haemorrhagic ascites, haemorrhagic erosive gastritis, haemorrhoidal haemorrhage, intestinal haemorrhage, intra-abdominal haemorrhage, large intestinal haemorrhage, large intestinal ulcer haemorrhage, lip haematoma, lip haemorrhage, lower gastrointestinal haemorrhage, Mallory–Weiss syndrome, melaena, melaena neonatal, mesenteric haematoma, mesenteric haemorrhage, mouth haemorrhage, oesophageal haemorrhage, oesophageal ulcer haemorrhage, oesophageal varices haemorrhage, oesophagitis haemorrhagic, pancreatic haemorrhage, pancreatitis haemorrhagic, parotid gland haemorrhage, peptic ulcer haemorrhage, peritoneal haematoma, peritoneal haemorrhage, proctitis haemorrhagic, rectal haemorrhage, rectal ulcer haemorrhage, retroperitoneal haematoma, retroperitoneal haemorrhage, small intestinal haemorrhage, small intestinal ulcer haemorrhage, stomatitis haemorrhagic, tongue haematoma, tongue haemorrhage, tooth pulp haemorrhage, tooth socket haemorrhage, and upper gastrointestinal haemorrhage.

**Table 3** Distribution of Drugs Present in Cases and Non-cases Stratified for the Use of PPIs, Clopidogrel, and Aspirin in the Hemorrhagic Events Limited by Gastrointestinal Disorder\*

			Cases	Non-cases	Total	Crude ROR (95% CI)
PPIs not present	Clopidogrel not present	Aspirin not present	35393	1897492	1932885	
		Aspirin present	4790	83323	88113	3.08 (2.99–3.18)
		total	40183	1980815	2020998	
PPIs present	Clopidogrel not present	Aspirin not present	996	16003	16999	
		Aspirin present	1407	1083	14490	1.73 (1.59–1.88)
		total	2403	29086	31489	
	Clopidogrel present	Aspirin not present	5850	157027	162877	
		Aspirin present	1619	28777	30396	1.51 (1.43–1.60)
		total	7469	185804	193273	
Clopidogrel present	Aspirin not present	357	5678	6035		
	Aspirin present	467	5640	6107	1.32 (1.14–1.52)	
	total	824	11318	12142		

\* Selected preferred terms for haemorrhagic events (SMQ: 20000039), limited by SOC (gastrointestinal disorder) were assigned in MedDRA v15.0, including abdominal wall haematoma, abdominal wall haemorrhage, anal haemorrhage, anal ulcer haemorrhage, anorectal varices haemorrhage, bloody peritoneal effluent, chronic gastrointestinal bleeding, colonic haematoma, diarrhoea haemorrhagic, diverticulitis intestinal haemorrhagic, diverticulum intestinal haemorrhagic, duodenal ulcer haemorrhage, duodenitis haemorrhagic, enterocolitis haemorrhagic, gastric haemorrhage, gastric ulcer haemorrhage, gastric ulcer haemorrhage obstructive, gastric ulcer perforation, gastric varices haemorrhage, gastritis alcoholic haemorrhagic, gastritis haemorrhagic, gastroduodenal haemorrhage, gastroduodenitis haemorrhagic, gastrointestinal angiodysplasia haemorrhagic, gastrointestinal haemorrhage, gastrointestinal ulcer haemorrhage, gingival bleeding, haematemesis, haematochezia, haemorrhagic ascites, haemorrhagic erosive gastritis, haemorrhoidal haemorrhage, intestinal haemorrhage, intra-abdominal haemorrhage, large intestinal haemorrhage, large intestinal ulcer haemorrhage, lip haematoma, lip haemorrhage, lower gastrointestinal haemorrhage, Mallory–Weiss syndrome, melaena, melaena neonatal, mesenteric haematoma, mesenteric haemorrhage, mouth haemorrhage, oesophageal haemorrhage, oesophageal ulcer haemorrhage, oesophageal varices haemorrhage, oesophagitis haemorrhagic, pancreatic haemorrhage, pancreatitis haemorrhagic, parotid gland haemorrhage, peptic ulcer haemorrhage, peritoneal haematoma, peritoneal haemorrhage, proctitis haemorrhagic, rectal haemorrhage, rectal ulcer haemorrhage, retroperitoneal haematoma, retroperitoneal haemorrhage, small intestinal haemorrhage, small intestinal ulcer haemorrhage, stomatitis haemorrhagic, tongue haematoma, tongue haemorrhage, tooth pulp haemorrhage, tooth socket haemorrhage, and upper gastrointestinal haemorrhage.

**Table 4** Association between Aspirin, Clopidogrel, PPIs, and Covariates on the Occurrence of Hemorrhagic Events Limited by Gastrointestinal Disorder\*

Covariates	Estimated beta	Likelihood ratio test	Adjusted ROR (95% CI)	Unadjusted ROR (95% CI)
Age (years)	$\beta_1$ 0.02	<0.0001	1.02 (1.01–1.02)	
Gender male	$\beta_2$ 0.33	<0.0001	1.39 (1.36–1.41)	
Aspirin	$\beta_3$ 0.91	<0.0001	2.47 (2.40–2.55)	3.08 (2.99–3.18)
Clopidogrel	$\beta_4$ 0.92	<0.0001	2.51 (2.35–2.68)	3.34 (3.13–3.56)
PPIs	$\beta_5$ 0.61	<0.0001	1.84 (1.79–1.89)	2.00 (1.94–2.05)
Aspirin*PPIs	$\beta_6$ -0.64	<0.0001	2.39 (2.24–2.55)	3.02 (2.87–3.17)
Aspirin*Clopidogrel	$\beta_7$ -0.34	<0.0001	4.40 (4.02–4.81)	5.77 (5.45–6.10)
Clopidogrel*PPIs	$\beta_8$ -0.59	<0.0001	2.55 (2.25–2.90)	3.37 (3.03–3.75)
Aspirin*Clopidogrel*PPIs	$\beta_9$ 0.37	<0.0001	3.40 (2.84–4.06)	4.44 (4.04–4.88)

\* Selected preferred terms for haemorrhagic events (SMQ: 20000039), limited by SOC (gastrointestinal disorder) were assigned in MedDRA v15.0, including abdominal wall haematoma, abdominal wall haemorrhage, anal haemorrhage, anal ulcer haemorrhage, anorectal varices haemorrhage, bloody peritoneal effluent, chronic gastrointestinal bleeding, colonic haematoma, diarrhoea haemorrhagic, diverticulitis intestinal haemorrhagic, diverticulum intestinal haemorrhagic, duodenal ulcer haemorrhage, duodenitis haemorrhagic, enterocolitis haemorrhagic, gastric haemorrhage, gastric ulcer haemorrhage, gastric ulcer haemorrhage obstructive, gastric ulcer perforation, gastric varices haemorrhage, gastritis alcoholic haemorrhagic, gastritis haemorrhagic, gastroduodenal haemorrhage, gastroduodenitis haemorrhagic, gastrointestinal angiodysplasia haemorrhagic, gastrointestinal haemorrhage, gastrointestinal ulcer haemorrhage, gingival bleeding, haematemesis, haematochezia, haemorrhagic ascites, haemorrhagic erosive gastritis, haemorrhoidal haemorrhage, intestinal haemorrhage, intra-abdominal haemorrhage, large intestinal haemorrhage, large intestinal ulcer haemorrhage, lip haematoma, lip haemorrhage, lower gastrointestinal haemorrhage, Mallory–Weiss syndrome, melaena, melaena neonatal, mesenteric haematoma, mesenteric haemorrhage, mouth haemorrhage, oesophageal haemorrhage, oesophageal ulcer haemorrhage, oesophageal varices haemorrhage, oesophagitis haemorrhagic, pancreatic haemorrhage, pancreatitis haemorrhagic, parotid gland haemorrhage, peptic ulcer haemorrhage, peritoneal haematoma, peritoneal haemorrhage, proctitis haemorrhagic, rectal haemorrhage, rectal ulcer haemorrhage, retroperitoneal haematoma, retroperitoneal haemorrhage, small intestinal haemorrhage, small intestinal ulcer haemorrhage, stomatitis haemorrhagic, tongue haematoma, tongue haemorrhage, tooth pulp haemorrhage, tooth socket haemorrhage, and upper gastrointestinal haemorrhage. \*\* The adjusted RORs were calculated with the estimates of betas. \*\*\* The unadjusted RORs were calculated without terms of age and sex, and therefore do not correspond to the estimated betas in the second column on the left.

神経系の血栓塞栓イベントに関する報告の背景 (平均年齢、性別、Aspirin、Clopidogrel 又は PPI 使用の有無) を Table 5 にまとめた。神経系の塞栓イベントに関する報告は、他の報告と比較して年齢が有意に高かった ( $p < 0.01$ , t 検定)。PPI 非使用例について、Aspirin の crude ROR (95%信頼区間) は、Clopidogrel 非使用例で 2.13 (2.06–2.20)、Clopidogrel 使用例で 0.93 (0.85–1.01) であった (Table 6)。PPI 使用例について、Aspirin の crude ROR (95%信頼区間) は、Clopidogrel 非使用例で 1.72 (1.62–1.83)、Clopidogrel 使用例で 1.03 (0.89–1.18) であった (Table 6)。非調整 ROR (95%信頼区間)、並びにロジスティック回帰モデルを用いて年齢及び性別により調整した調整 ROR (95%信頼区間) を Table 7 に示した。調整モデル又は非調整モデルの pseudo  $R^2$  はそれぞれ 0.0199 又は 0.0085 であった。交互作用項である  $\beta_6$ 、 $\beta_7$  及び  $\beta_8$  の値は負であり、 $\beta_6$  及び  $\beta_7$  は統計学的に有意であった。 $\beta_9$  の値は正であり、統計学的に有意であった (Table 7)。抗血小板剤 2 剤の調整 ROR (95%信頼区間) は 2.37 (2.16–2.59)、抗血小板剤 2 剤と PPI との併用の調整 ROR (95%信頼区間) は 2.38 (2.00–2.84) であった (Table 7)。

**Table 5** Characteristics of Cases and Non-cases in the Embolic/Thrombotic Events Limited by Nervous System Disorder\*

	Cases, n (%), n=61779	Non-cases, n=2196123	Reporting odds ratio (95% CI)
Mean age (years)	60.2	53.0	
Male	26234 (42.5)	860922 (39.2)	1.14 (1.13–1.16)
Clopidogrel	3228 (5.2)	40403 (1.8)	2.94 (2.84–3.05)
Aspirin	7454 (12.1)	131652 (6.0)	2.15 (2.10–2.21)
PPIs	6867 (11.1)	198548 (9.0)	1.26 (1.23–2.21)

\* Selected preferred terms for embolic and thrombotic events (SMQ: 20000081), limited by SOC (nervous system disorder) were assigned in MedDRA v15.0, including basal ganglia infarction, basilar artery occlusion, basilar artery thrombosis, capsular warning syndrome, carotid arterial embolus, carotid artery occlusion, carotid artery thrombosis, cerebellar artery occlusion, cerebellar artery thrombosis, cerebellar embolism, cerebral artery embolism, cerebral artery occlusion, cerebral artery thrombosis, cerebral hypoperfusion, cerebrovascular insufficiency, cerebrovascular stenosis, ischaemic cerebral infarction, ischaemic stroke, lacunar infarction, precerebral artery occlusion, spinal artery embolism, spinal artery thrombosis, stroke in evolution, transient ischaemic attack, vertebral artery occlusion, vertebral artery thrombosis, cerebral venous thrombosis, intracranial venous sinus thrombosis, superior sagittal sinus thrombosis, transverse sinus thrombosis, basal ganglia stroke, brain stem infarction, brain stem stroke, brain stem thrombosis, cerebellar infarction, cerebral infarction, cerebral infarction foetal, cerebral ischaemia, cerebral thrombosis, cerebrospinal thrombotic tamponade, cerebrovascular accident, cerebrovascular disorder, diplegia, embolic cerebral infarction, embolic stroke, foetal cerebrovascular disorder, haemorrhagic cerebral infarction, haemorrhagic stroke, haemorrhagic transformation stroke, hemiparesis, hemiplegia, monoparesis, monoplegia, paraparesis, paraplegia, paresis, quadriparesis, quadriplegia, spinal cord infarction, thalamic infarction, thrombotic cerebral infarction, thrombotic stroke, and visual midline shift syndrome.

**Table 6** Distribution of Drugs Present in Cases and Non-cases Stratified for the Use of PPIs, Clopidogrel, and Aspirin in the Embolic/Thrombotic Events Limited by Nervous System Disorder\*

			Cases	Non-cases	Total	Crude ROR (95% CI)
PPIs not present	Clopidogrel not present	Aspirin not present	48024	1884861	1932885	
		Aspirin present	4534	83579	88113	2.13 (2.06–2.20)
		Total	52558	1968440	2020998	
	Clopidogrel present	Aspirin not present	1312	15687	16999	
		Aspirin present	1042	13448	14490	0.93 (0.85–1.01)
		Total	2354	29135	31489	
PPIs present	Clopidogrel not present	Aspirin not present	4560	158317	162877	
		Aspirin present	1433	28963	30396	1.72 (1.62–1.83)
		Total	5993	187280	193273	
	Clopidogrel present	Aspirin not present	429	5606	6035	
		Aspirin present	445	5662	6107	1.03 (0.89–1.18)
		total	874	11268	12142	

\* Selected preferred terms for embolic and thrombotic events (SMQ: 20000081), limited by SOC (nervous system disorder) were assigned in MedDRA v15.0, including basal ganglia infarction, basilar artery occlusion, basilar artery thrombosis, capsular warning syndrome, carotid arterial embolus, carotid artery occlusion, carotid artery thrombosis, cerebellar artery occlusion, cerebellar artery thrombosis, cerebellar embolism, cerebral artery embolism, cerebral artery occlusion, cerebral artery thrombosis, cerebral hypoperfusion, cerebrovascular insufficiency, cerebrovascular stenosis, ischaemic cerebral infarction, ischaemic stroke, lacunar infarction, precerebral artery occlusion, spinal artery embolism, spinal artery thrombosis, stroke in evolution, transient ischaemic attack, vertebral artery occlusion, vertebral artery thrombosis, cerebral venous thrombosis, intracranial venous sinus thrombosis, superior sagittal sinus thrombosis, transverse sinus thrombosis, basal ganglia stroke, brain stem infarction, brain stem stroke, brain stem thrombosis, cerebellar infarction, cerebral infarction, cerebral infarction foetal, cerebral ischaemia, cerebral thrombosis, cerebrospinal thrombotic tamponade, cerebrovascular accident, cerebrovascular disorder, diplegia, embolic cerebral infarction, embolic stroke, foetal cerebrovascular disorder, haemorrhagic cerebral infarction, haemorrhagic stroke, haemorrhagic transformation stroke, hemiparesis, hemiplegia, monoparesis, monoplegia, paraparesis, paraplegia, paresis, quadriparesis, quadriplegia, spinal cord infarction, thalamic infarction, thrombotic cerebral infarction, thrombotic stroke, and visual midline shift syndrome.

**Table 7** Association between Aspirin, Clopidogrel, PPIs, and Covariates on the Occurrence of Embolic/Thrombotic Events Limited by Nervous System Disorder\*

Covariates	Estimated beta	Likelihood ratio test	Adjusted ROR (95% CI)	Unadjusted ROR (95% CI)
Age (years)	$\beta_1$ 0.02	<0.0001	1.02 (1.02–1.02)	
Gender male	$\beta_2$ 0.08	<0.0001	1.08 (1.06–1.10)	
Aspirin	$\beta_3$ 0.53	<0.0001	1.71 (1.65–1.76)	2.13 (2.06–2.20)
Clopidogrel	$\beta_4$ 0.9	<0.0001	2.46 (2.32–2.61)	3.28 (3.10–3.48)
PPIs	$\beta_5$ 0.02	0.2609	1.02 (0.99–1.05)	1.13 (1.10–1.17)
Aspirin*PPIs	$\beta_6$ -0.13	0.0001	1.52 (1.42–1.63)	1.94 (1.84–2.05)
Aspirin*Clopidogrel	$\beta_7$ -0.57	<0.0001	2.37 (2.16–2.59)	3.04 (2.85–3.24)
Clopidogrel*PPIs	$\beta_8$ -0.11	0.0674	2.25 (2.00–2.53)	1.96 (1.77–2.16)
Aspirin*Clopidogrel*PPIs	$\beta_9$ 0.23	0.0091	2.38 (2.00–2.84)	6.56 (5.93–7.26)

\* Selected preferred terms for embolic and thrombotic events (SMQ: 20000081), limited by SOC (nervous system disorder) were assigned in MedDRA v15.0, including basal ganglia infarction, basilar artery occlusion, basilar artery thrombosis, capsular warning syndrome, carotid arterial embolus, carotid artery occlusion, carotid artery thrombosis, cerebellar artery occlusion, cerebellar artery thrombosis, cerebellar embolism, cerebral artery embolism, cerebral artery occlusion, cerebral artery thrombosis, cerebral hypoperfusion, cerebrovascular insufficiency, cerebrovascular stenosis, ischaemic cerebral infarction, ischaemic stroke, lacunar infarction, precerebral artery occlusion, spinal artery embolism, spinal artery thrombosis, stroke in evolution, transient ischaemic attack, vertebral artery occlusion, vertebral artery thrombosis, cerebral venous thrombosis, intracranial venous sinus thrombosis, superior sagittal sinus thrombosis, transverse sinus thrombosis, basal ganglia stroke, brain stem infarction, brain stem stroke, brain stem thrombosis, cerebellar infarction, cerebral infarction, cerebral infarction foetal, cerebral ischaemia, cerebral thrombosis, cerebrospinal thrombotic tamponade, cerebrovascular accident, cerebrovascular disorder, diplegia, embolic cerebral infarction, embolic stroke, foetal cerebrovascular disorder, haemorrhagic cerebral infarction, haemorrhagic stroke, haemorrhagic transformation stroke, hemiparesis, hemiplegia, monoparesis, monoplegia, paraparesis, paraplegia, paresis, quadriparesis, quadriplegia, spinal cord infarction, thalamic infarction, thrombotic cerebral infarction, thrombotic stroke, and visual midline shift syndrome. \*\* The adjusted RORs were calculated with the estimates of betas. \*\*\* The unadjusted RORs were calculated without terms of age and sex, and therefore do not correspond to the estimated betas in the second column on the left.

#### 第4節 考察

本研究より、Clopidogrel 及び Aspirin の抗血小板剤 2 剤併用療法中における PPI の併用は消化管出血イベントを抑制し、神経系の血栓塞栓イベントにはほとんど影響しないことが示唆された。交互作用項をモデル式に組み込んだロジスティック解析を行うことにより、交互作用を制御できたと考えられた。

消化管出血イベントは、抗血小板剤投与に関連する最も一般的な出血性合併症である。PPI と Clopidogrel の併用については、神経系の血栓塞栓イベントと消化管イベントのベネフィットリスク評価に基づき治療方針が決定されなければいけない。本研究では、Aspirin と Clopidogrel の抗血小板剤 2 剤併用の調整 ROR は PPI 使用により減少した (Table 4)。抗血小板療法中の消化管出血イベントリスクを減らすための適切な治療法についてさらなる研究が必要だが、PPI の予防的投与は臨床上有用と考えられた。

Clopidogrel は血栓塞栓イベントの発現リスクを抑制するための抗血小板剤として確立されている。しかし本解析では、clopidogrel 投与例における神経系の血栓塞栓イベントの ROR は 2 を上回った (Table 5; ROR, 2.94 (95% CI, 2.84–3.05))。本結果の要因として、血栓・塞栓イベントの潜在的リスクが高い患者に Clopidogrel が投与されたことが考えられた。すなわち、Clopidogrel を投与された患者は他の薬剤を投与された患者と比較して血栓・塞栓イベントの潜在的リスクが高い状態にあると考えられた。したがって、Clopidogrel の薬理作用と矛盾すると考えられる本結果は、Clopidogrel の適応症に基づくものと考えられた。

過去の観察研究より、Clopidogrel と PPI との相互作用は血栓塞栓イベントの発現リスクを上昇させることが示唆されている (101)。しかし、この議論に関しては反論がある (102, 103)。COGENT 試験では、Clopidogrel と PPI との併用は心血管イベントに影響を与えなかった。ACCF/ACG/AHA 2010 Expert Consensus

Document では、Clopidogrel と PPI との併用に関しては中立的な立場をとっている (104–106)。本研究では、Clopidogrel 及び Aspirin の併用療法下における PPI の併用は神経系の血栓塞栓イベントに対してほとんど影響しなかった (Table 7)。本結果は、the Expert Consensus Document guidelines の見解に一致するものであった。

Table 3 (消化管出血イベント) 及び Table 6 (神経系の血栓塞栓イベント) では、抗血小板剤 2 剤併用に対する PPI の影響の強さの目安を crude ROR で提示した。Table 3 に示したように、抗血小板 2 剤併用療法下において PPI が投与された場合、消化管出血イベントの報告数は減少した。Clopidogrel 投与下において、Aspirin の消化管出血イベントの crude ROR は、PPI が併用されない場合は 1.73 であり、PPI が併用された場合は 1.32 であった。

本研究におけるロジスティック回帰分析では、調整変数は注目した有害事象 (消化管出血イベント及び神経系の血栓塞栓イベント) の報告に強く影響している可能性がある。消化管出血イベントに関して、抗血小板剤 2 剤併用、又はこれら 2 剤に PPI を加えた 3 剤併用の非調整 ROR はそれぞれ 5.77 及び 4.44 であった (Table 4)。報告バイアスがあるため、非調整 ROR の解釈は慎重にする必要がある。ロジスティック回帰分析において、抗血小板剤 2 剤併用、及びこれら 2 剤に PPI を加えた 3 剤併用の調整 ROR はそれぞれ 4.40 及び 3.40 であった (Table 4)。非調整 ROR と調整 ROR に差異があった一つの理由として、可能な異なる用量の Aspirin が異なる治療目的に使用されていた、すなわち、抗血小板剤として使用された症例と解熱剤として使用された症例が含まれた可能性が挙げられ、この差異は年齢や性別に関連している可能性がある。

自発報告に内在する限界はあるが、豊富な情報量を持つ FAERS データベースは医薬品と有害事象との潜在的な関連性を特定する強力な手段である。しかし

ながら本解析では因果関係に関する考察には限界があり、本結果から得られた仮説を検証する頑健な研究が望まれる。

本研究では、PPI 投与により抗血小板剤 2 剤併用療法患者における消化管出血イベントの報告件数が減少することを示した。臨床実態を反映した FAERS データにより、抗血小板剤 2 剤併用療法患者における PPI の予防的投与の有用性を示した。またロジスティック回帰分析は、共変量を調整する有用な手法と考えられた。本結果の検証には、さらなる研究が必要である。

本研究では、脳梗塞の再発予防等に用いられる Clopidogrel の臨床での有効性及び安全性について、PPI との相互作用に関して、脳梗塞含む神経系の血栓・塞栓イベントと消化管出血イベントに着目して解析した。本結果は、市販後における Clopidogrel の適正使用に資すると考えられる。

## 第4章 医薬品添付文書の重大な副作用の追記に影響を及ぼす要因 の解析

### 第1節 緒言

独立行政法人医薬品医療機器総合機構（以下、「PMDA」という）は、製造販売後の安全性に関する情報について、製造販売業者（以下、「企業」という）、医療機関及び患者から報告された副作用・感染症情報、医学・薬学に関する研究報告、海外規制当局による安全対策措置情報等の安全性情報を幅広く、一元的に収集し、厚生労働省と共有している。一方、PMDA は企業から添付文書改訂の相談を受けている。PMDA は収集されたこれらの製造販売後の情報の評価を行い、安全対策の必要性について検討を行っている。厚生労働省は、これらの検討の結果をもとに、添付文書の改訂等の安全対策を実施している (14)。

添付文書は、医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律に定められた公的文書であり、その改訂作業は重要な安全対策業務である。医薬品の添付文書の改訂のうち、「使用上の注意の改訂指示」（「重大な副作用」、「警告」、「禁忌」及び「重要な基本的注意」等の項に関する改訂）に関する情報は、PMDA ホームページに掲載されており、各改訂に関する情報は「使用上の注意の改訂指示内容」及び「調査結果概要報告書」にまとめられている (107)。そこで、本研究では、これらの改訂のうちほとんどは「重大な副作用」に関する改訂であると見受けられること、「重大な副作用」以外の項目も「重大な副作用」に記載のある副作用に関連した内容であること、副作用ごとの特徴を検討するには副作用が追記された案件を対象とする必要があること等から、「重大な副作用」のみに着目した。

調査結果概要報告書には、「成分名・該当商品名」、「効能・効果」、「改訂の概要」、「改訂の理由及び調査の結果」及び「直近 3 年度の国内副作用症例の集積状況」が記載されている。「改訂の理由及び調査の結果」には、改訂時に評価された情報が記載されている。その情報として、国内副作用・感染症情報（以下、「国内副作用情報」という）と、研究報告又は海外情報等の国内副作用情報以外の情報（以下、「外部情報」という）がある。「直近 3 年度の国内副作用症例の集積状況」には、改訂までに集積した直近 3 年度の「国内症例数」、「因果関係が否定できない症例数」及び「転帰死亡症例数」が記載されている(108)。なお、「因果関係が否定できない症例数」及び「転帰死亡症例数」に海外症例は含まれない。

近年、医薬品臨床開発の国際化、つまり海外臨床試験成績の承認申請資料としての活用を目的としたブリッジング、及び我が国における医薬品の開発時期を諸外国と同調させるための国際共同治験等の取組みにより、長年の課題であったドラッグ・ラグは解消されつつある(109–111)。さらに、世界で最先端の治療薬を最も早く提供することを目指した先駆け審査指定制度の活用等により、世界に先駆けて日本で承認される医薬品が今後増加していくことが予想される(112)。

これら画期的な医薬品が日本の患者のもとにいち早く提供されることは望ましいことであるが、世界に先駆けて日本で承認されることが多くなった場合には、海外からのリスク情報が少ない状況の中、日本の臨床現場で使用される機会が多くなる。従って、臨床試験段階では検出できなかった未知の副作用が日本で初めて認知される可能性も高くなる。実際に過去の研究では、海外に先行して日本で（又は日本のみで）承認された医薬品は、海外承認後に日本で承認された医薬品と比較して、添付文書の「重大な副作用」の項に新たに副作用を追

記する頻度は高い傾向にあり、さらに、海外承認後に日本で承認された医薬品の中でも、ドラッグ・ラグが短い医薬品ほどその頻度が高い傾向にあることが報告されている (113)。したがって、日本の製造販売後における安全対策はこれまで以上に重要な意味を持つと考えられる。

しかしながら、研究報告又は海外情報等の外部情報が実際に添付文書改訂の根拠となるのか、副作用によって根拠情報が異なるのか、どのような副作用の改訂が外部情報により依存するのか、どのような情報が改訂において重要な根拠となるのか、ドラッグ・ラグの短縮が改訂の根拠に影響を与えるのか等、添付文書改訂の根拠情報についての詳細は未だ明らかではない。今回我々は、調査結果概要報告書を用いて、添付文書における「使用上の注意の改訂指示」のうち、「重大な副作用」の項に新たに副作用を追記する改訂指示を対象に、添付文書の改訂の根拠情報について検討した。

## 第2節 方法

PMDA ホームページに掲載された医薬品添付文書の「使用上の注意の改訂指示」に関する調査結果概要報告書のうち、現在の書式で公表が開始された 2011 年 8 月から 2014 年 7 月までを対象期間とし、この間に「重大な副作用」の項に新たに副作用が追記になった改訂指示を対象に調査した。

1 つの調査結果概要報告書のうち、原則として 1 つの副作用を 1 案件とした。ただし、添付文書上の同一項目に複数の副作用を追記する場合 (類似の副作用の場合) は、まとめて 1 案件とした。複数の成分を同時に改訂した案件については、1 つの副作用であっても、成分間で改訂の理由が異なる場合は、異なる案件とした。既にある項に新たに関連した副作用を追記する場合も、新たな項に追記する場合と同様に 1 案件として扱った

解析に用いた用語の定義及び関係性を図に示した (Figure 15)。各案件は外部情報の有無によって2つに分類した (案件 X : 外部情報あり、案件 Y : 外部情報なし)。国内副作用情報の量は合計数、因果関係の評価結果又は死亡の有無によって3つに定義した (症例 A、B 又は C)。また、ICH 国際医薬用語集日本語版 MedDRA/J バージョン 17.0 を用いて、各案件を器官別大分類 System Organ Class (SOC) ごとに分類した。因果関係の評価結果の指標として、各 SOC の [指標 B/A] (症例 A のうち、症例 B の割合) を算出した。外部情報の利用の指標として、各 SOC の [指標 X] (全案件のうち、案件 X の割合) を算出した。外部情報が存在しない場合に改訂に必要な国内副作用情報の量の指標として、各 SOC の症例 A (Y) 数又は症例 B (Y) 数を算出した (案件 Y における症例 A 数又は症例 B 数)。

「改訂に必要な国内副作用情報の量」に対して「外部情報の利用」が与える影響を検討するために、案件 X と案件 Y の症例 A 数、症例 B 数及び症例 C 数を比較した。

「因果関係の評価結果」と「外部情報の利用」との関係を検討するために、各 SOC の [指標 B/A] と [指標 X] との相関を評価した。

「因果関係の評価結果」と「外部情報が存在しない場合に改訂に必要な国内副作用情報の量」との関係を検討するために、各 SOC の [指標 B/A] と [症例 A (Y) 数] との相関、又は各 SOC の [指標 B/A] と [症例 B (Y) 数] との相関を評価した。

「外部情報の利用」と「ドラッグ・ラグ」との関係を検討するために、案件 X と案件 Y のドラッグ・ラグ (国内販売年月—国際誕生年月) を比較した。症例 A、症例 B 又は症例 C 数の群間比較、並びに承認ラグの群間比較にはウィルコクソンの順位和検定を用いた。相関の評価にはピアソンの積率相関係数を

用いた。解析には Microsoft Office Excel 2010 (マイクロソフト株式会社) を用いた。

A. 用語の定義

案件X	国内副作用情報の有無に関わらず、外部情報が利用された案件
案件Y	国内副作用情報のみが利用された案件
症例A	改訂までに集積した直近3年度の国内症例
症例B	症例Aのうち、因果関係が否定できない症例
症例C	症例Aのうち、転帰死亡症例
指標X	各SOCで案件X数/全案件数を算出 (各SOCにおける外部情報の利用の指標)
指標B/A	各案件の症例B数/症例A数を算出し、各SOCで中央値を算出 (各SOCにおける因果関係の評価結果の指標)
症例A (Y) 数	案件Yにおける症例A数について、各SOCで中央値を算出 (外部情報が存在しない場合に改訂に必要な国内副作用情報の量の指標)
症例B (Y) 数	案件Yにおける症例B数について、各SOCで中央値を算出 (外部情報が存在しない場合に改訂に必要な国内副作用情報の量の指標)

B. 国内副作用情報の関係性

国内副作用情報	死亡症例	非死亡症例
因果関係が否定できない症例	a	b
因果関係が否定できる症例	c	d

- ・ 症例A = a+b+c+d
- ・ 症例B = a+b
- ・ 症例C = a+c

C. 国内副作用情報と外部情報の関係性

		国内副作用情報	
		あり (症例A, B, C)	なし
外部情報	あり	案件X (n=120)	
	なし	案件Y (n=203)	

Figure 15 用語の定義及びその関係性

### 第3節 結果

対象期間における調査結果概要報告書は 297 件であった。「重大な副作用」の追記に関する調査結果概要報告書は 240 件 (81%) であり、新たな重大な副作用の追記は 323 案件であった。このうち、案件 Y は 203 案件 (63%)、案件 X は 120 案件 (37%) であった。案件 X について、外部情報の内訳 (案件数 (割合))(重複あり) は、Company core data sheet (CCDS) に関するもの (83 案件 (69%))、欧米の添付文書に関するもの (47 案件 (39%))、海外症例の集積 (32 案件 (27%))、類薬情報 (9 案件 (8%))、臨床試験 (6 案件 (5%)) 及び学会・ガイドライン・文献 (6 案件 (5%)) 等であった。

症例 A 数、症例 B 数及び症例 C 数の中央値 (四分位範囲) は、案件 Y ではそれぞれ 5 (3-10) 例、3 (2-5) 例及び 0 (0-1) 例、案件 X ではそれぞれ 1 (0-4) 例、0 (0-2) 例及び 0 (0-0) 例であり、案件 X は案件 Y と比較していずれも少なかった (いずれも  $p < 0.0001$ ) (Figure 16)。

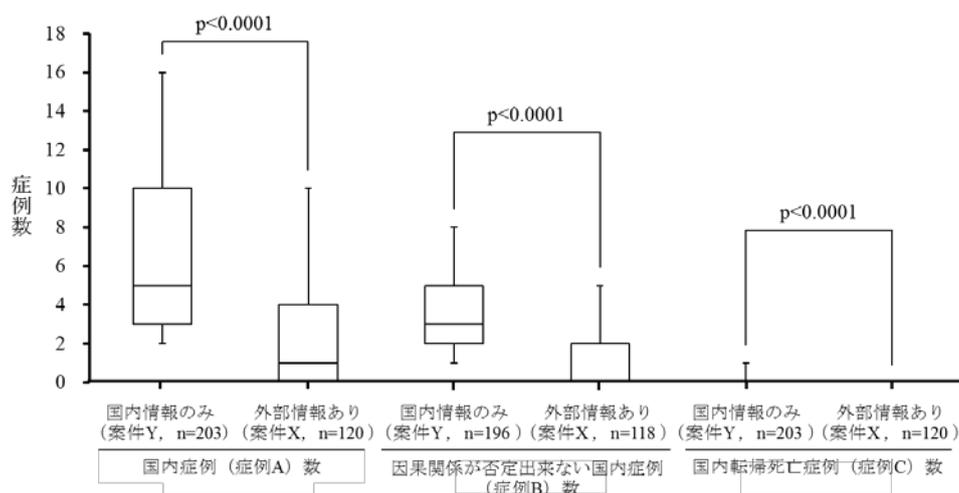


Figure 16 「外部情報の利用」が「改訂に必要な国内副作用情報の量」に与える影響

SOC 別の案件数は、「免疫系障害」(43 案件)、「皮膚および皮下組織障害」(41 案件) 及び「呼吸器、胸郭及び縦隔障害」(33 案件) が多かった (Table 8)。

[指標 X] は、「血管障害」(70%) 及び「心臓障害」(64%) で高く、「肝胆道系障害」(13%)、「呼吸器、胸郭および縦隔障害」(21%) 及び「血液およびリンパ系障害」(21%) で低かった (Table 8)。

SOC	全案件	国内情報 <sup>a)</sup> のみが 利用された案件 (案件Y) 数	外部情報 <sup>b)</sup> が利用 された案件 (案件 X) 数	外部情報 <sup>b)</sup> が利用さ れた案件 (案件X) の割合 (%)
免疫系障害	43	22	21	49
皮膚および皮下組織障害	41	19	22	54
呼吸器、胸郭および縦隔障害	33	26	7	21
肝胆道系障害	31	27	4	13
血液およびリンパ系障害	24	19	5	21
心臓障害	22	8	14	64
胃腸障害	20	15	5	25
代謝および栄養障害	19	14	5	26
神経系障害	18	9	9	50
筋骨格系および結合組織障害	17	12	5	29
腎および尿路障害	17	12	5	29
感染症および寄生虫症	13	10	3	23
血管障害	10	3	7	70
その他	15	7	8	53
全SOC	323	203	120	37

a) 国内副作用・感染症報告

b) 海外副作用報告, 海外規制当局による措置, 企業中核データシート (company core data sheet: CCDS), 臨床試験, 類似薬の情報, 文献, 医学書及び出版本等

Table 8 SOC 別及び改訂の理由別の案件数

[指標 B/A] は、「筋骨格系および結合組織障害」(88%) 及び「腎および尿路障害」(80%) で高く、「心臓障害」(33%) 及び「血管障害」(40%) で低かった (Figure 17)。

各 SOC の [指標 B/A] と [指標 X] は逆相関する傾向が認められた ( $r=-0.52$ ,  $p=0.066$ )(Figure 17)。  
[指標 B/A] が高かった「筋骨格系および結合組織障害」(88%) 及び「腎および尿路障害」(80%) は、[指標 X] が低かった (それぞれ 29%、29%)。

それに対し、[指標 B/A] が低かった「心臓障害」(33%) 及び「血管障害」(40%) は、[指標 X] が高かった (それぞれ 64%、70%)(Figure 17)。

各 SOC の [指標 B/A] と [症例 A 数 (案件 Y)] は逆相関する傾向が認められた ( $r=-0.61$ ,  $p=0.025$ )(Figure 18)。[指標 B/A] が高かった「筋骨格系および結合組織障害」及び「腎および尿路障害」は、[症例 A 数 (案件 Y)] は少なかった (それぞれ 4 (3-6.5) 例、5 (4-16) 例)。それに対し、[指標 B/A] が低かった「心臓障害」及び「血管障害」は、[症例 A 数 (案件 Y)] は多かった (それぞれ 12 (6.8-18.3) 例、12 (10-76) 例)(Figure 18)。各 SOC の [指標 B/A] と [症例 B 数 (案件 Y)] に明確な相関は認められなかった ( $r=0.24$ ,  $p=0.42$ )(Figure 19)。[指標 B/A] に関わらず、症例 B (Y) 数は一定 (1~4 例) であった (Figure 19)。

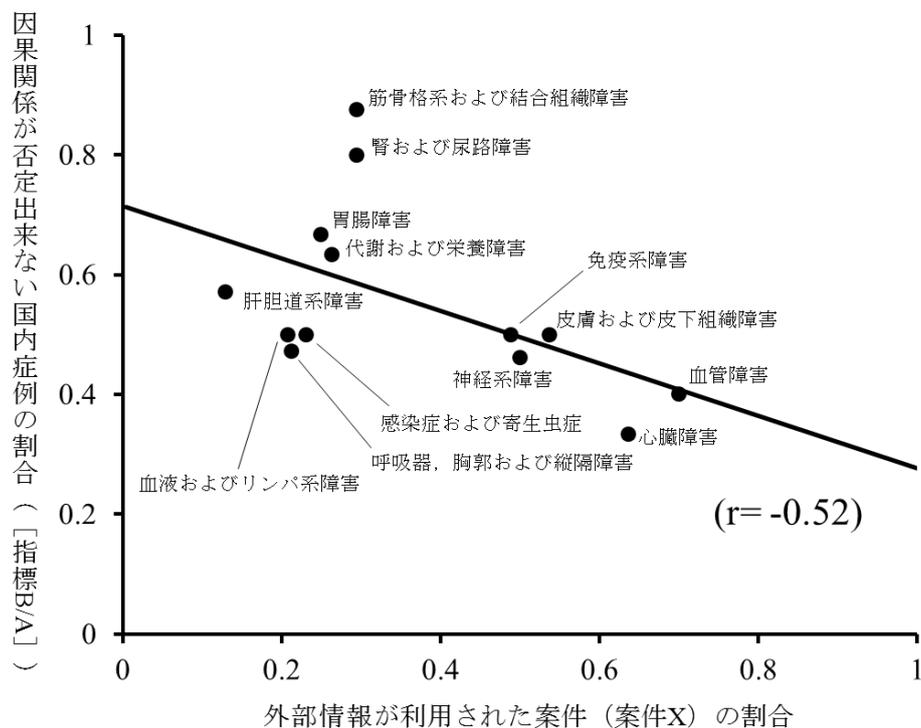


Figure 17 「外部情報の利用」と「因果関係の評価結果」との関係

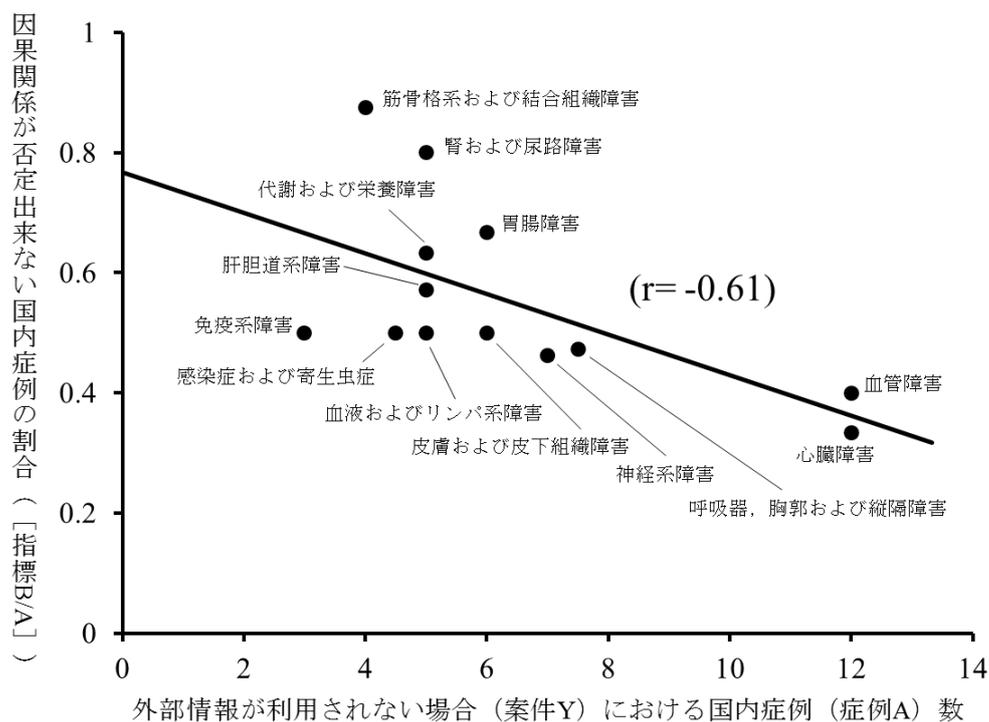


Figure 18 「因果関係の評価結果」と「外部情報が存在しない場合に改訂に必要な国内副作用情報の量 (国内症例数)」との関係

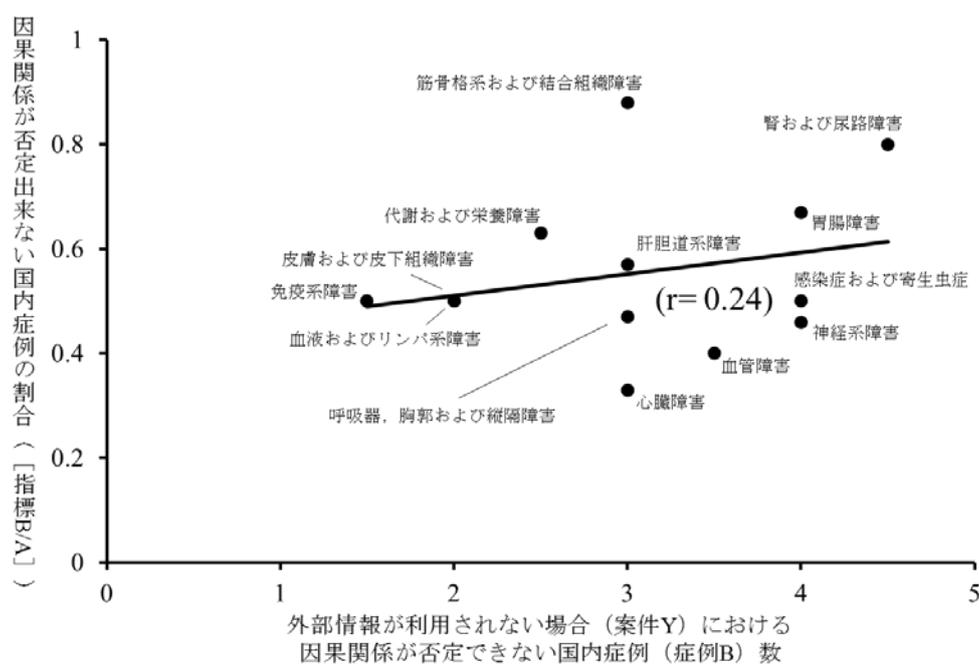


Figure 19 「因果関係の評価結果」と「外部情報が存在しない場合に改訂に必要な国内副作用情報の量 (因果関係が否定できない国内症例数)」との関係

承認ラグの中央値 (四分位範囲) は、案件 Y では 38 (6-79) カ月、案件 X では 53 (25-140) カ月であり、案件 X は案件 Y と比較して長かった ( $p<0.001$ )(Figure 20)。

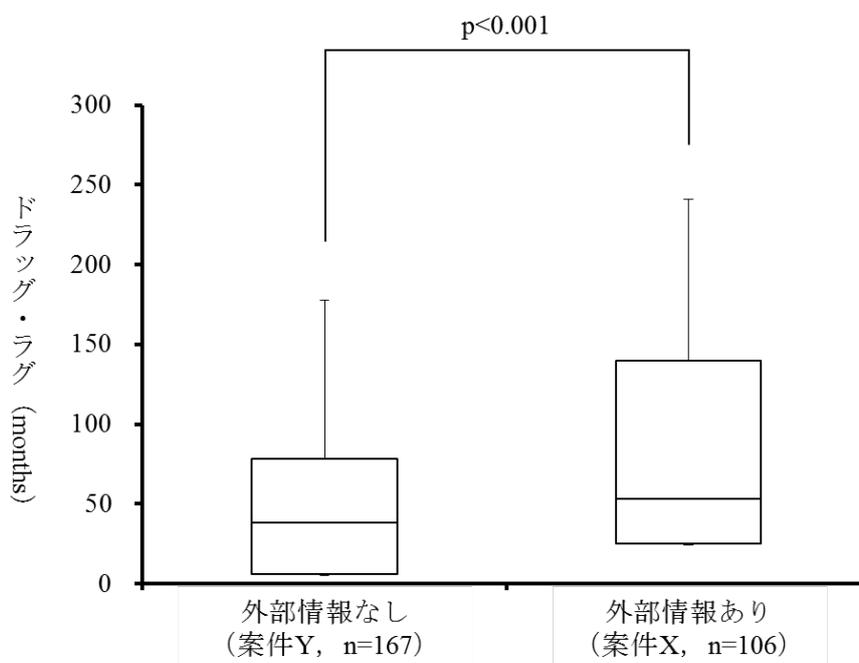


Figure 20 「外部情報の利用」と「ドラッグ・ラグ」との関係

#### 第4節 考察

今回我々は、「重大な副作用」の項に新たに副作用を追記する改訂指示を対象に検討を行った。「警告」、「禁忌」、「重要な基本的注意」の改訂の要因についても今後検討する必要があると考えるが、緒言で述べたとおり、改訂のうちほとんどは「重大な副作用」に関する改訂であると思受けられること等から、本研究では「重大な副作用」のみに着目した。その結果「重大な副作用」の改訂は、全体の 81%であった。

本解析に用いられた「国内症例数」、「因果関係が否定できない症例数」及び「転帰死亡症例数」は、改訂までに集積した直近 3 年度の集積数である。本

来は承認時から集積した症例数を検討するべきではあるが、公表資料からの把握は困難であり検討には限界がある。しかしながら、改訂された要因を検討するにあたっては、改訂時点でどのような資料を評価したかについて検討することに一定の妥当性はあると考えた。また外部情報は、CCDSに関するもの、海外添付文書に関するもの及び海外症例の集積等であったが、これらは独立した事象とは考えにくく、海外症例の集積に基づき CCDS が改訂され、海外添付文書が改訂されると考えられるため、これらはまとめて「外部情報」として解析を実施した。

案件 Y は全解析対象の 63%を占めていたこと (Table 8) から、重大な副作用を追記する場合には、国内副作用情報が主な要因となっていると考えられた。米国食品医薬品局 (FDA) においても、自発副作用報告は添付文書改訂の要因の 57%を占めることが報告されており (114)、臨床現場等からの副作用報告は添付文書の改訂の主な要因となっていると考えられる。

一方、案件 X は案件 Y と比較して、症例 A 数、症例 B 数及び症例 C 数が少なかったことから、外部情報の利用は改訂に必要な国内副作用情報の量に影響を与えていることが明らかとなった (Figure 16)。なお外部情報のうち、特に CCDSに関するもの (外部情報のうち 69%) が改訂の主な要因となっていることが示唆された。

因果関係の評価結果の指標である [指標 B/A] は、「筋骨格系および結合組織障害」(88%) が最も高く、「心臓障害」(33%) が最も低かった (Figure 17, 18, 19)。有害事象別の [指標 B/A] は、「アナフィラキシー」、「横紋筋融解症」、「ネフローゼ症候群」及び「B型肝炎ウイルスの再活性化による肝炎」(いずれも 100%) が最も高く、「QT 延長」(0%) が最も低かった (Data not shown)。「横紋筋融解症」の [指標 B/A] が高かった要因として、筋痛・ミオグロビン尿 (赤褐色尿)・

クレアチニンキナーゼ上昇等の横紋筋融解症に特徴的な臨床所見及び臨床検査値等から医薬品との因果関係の判断が容易であった可能性が考えられた。症例報告における因果関係の評価は、時間的な関連性、服薬中止又は再投与による影響、背景疾患、薬理作用及び用量依存性等に基づき行われるが、評価の難易度は副作用によって異なる可能性がある。このように、[指標 B/A] の値に影響を及ぼす一つの要因として、因果関係評価の難易度がある可能性が考えられたが、この解釈についてはさらなる検討が必要である。

[指標 B/A] が低い副作用は [指標 B/A] が高い副作用と比較して、[指標 X] が高い傾向があったことから、国内の症例報告のみでは医薬品との因果関係が明らかとなりにくい副作用ほど、改訂の際に外部情報を利用することが示唆された (Figure 17)。また [指標 B/A] が低い副作用は [指標 B/A] が高い副作用と比較して、[症例 A (Y) 数] が多い傾向があったことから、国内の症例報告のみでは医薬品との因果関係が明らかとなりにくい副作用ほど、外部情報が存在しない場合に改訂に必要な国内副作用情報の量は多いことが示唆された (Figure 18)。一方、[指標 B/A] に関わらず、[症例 B (Y) 数] は一定 (1~4 例) であったこと (Figure 19) から、改訂には、国内の症例報告から得られる因果関係の評価結果が重要と考えられた。

本研究では、ドラッグ・ラグが長い医薬品の改訂ほど外部情報を利用することが示唆された (Figure 20)。薬効分類又は国内／国外企業による影響等も考えられるが、本解析では検討を行っていない。本結果より、今後世界に先行して日本で開発されることが多くなった場合、これまでと比較して研究報告又は海外情報等の外部情報を入手できなくなり、改訂の際には、国内副作用情報により依存する可能性が考えられる。実際、外部情報の利用は改訂に必要な国内副作用情報の量に影響を与えていたこと (Figure 16) を踏まえると、外部情報が入

手できない場合には、より多くの国内副作用情報が必要となり、改訂の時期が遅くなることが危惧される。[指標 B/A] が低い副作用（国内の症例報告のみでは医薬品との因果関係が明らかとなりにくい副作用）は、外部情報を利用する場  
合が比較的多いこと（Figure 17）、外部情報が存在しない場合、改訂に必要な国内副作用情報の量が比較的多いこと（Figure 18）から、今後特に注意が必要と考えられた。

なお、本稿は、著者の個人的見解に基づくものであり、独立行政法人医薬品医療機器総合機構の公式見解を示すものではない。

## 総括及び結論

人類は薬によって多くの恩恵を受けてきた。1929年にペニシリンが発見されて以降、多くの抗菌薬・抗ウイルス薬が合成され、それによって人類の平均寿命は飛躍的に伸びた。近年では、1997年にリツキシマブがB細胞性非ホジキンリンパ腫の治療薬として承認されたことを発端に、抗体医薬品の開発が盛んとなり、かつて不可能であった自己免疫疾患の病態の進行抑制および寛解が可能となってきた。

しかしながら、有効な治療方法がない疾患も未だ多く存在し、また一方で、有効な治療薬が開発された場合でも、限られた情報の中で承認販売されることから、製造販売後に初めて集積される知見も必然的に存在する。したがって、難治性疾患に対する有望な治療標的又は候補物質の探索と、製造販売後における情報収集・評価による医薬品の適正使用・安全性確保は、患者の健康及び医薬品産業においてともに欠かせないものである。そこで本研究では、患者数・重篤性いずれの観点からも深刻な疾患である脳血栓・塞栓症に着目し、難治領域である脳梗塞急性期に対する新規治療標的分子の探索に加え、既に広く臨床使用されている抗血小板薬と他の医薬品の併用による影響について大規模有害事象報告データベースを用いて検討を行った。また、医薬品情報の伝達において中心的な役割を担っている規制当局に着目し、添付文書改訂に影響を及ぼす要因について検討した。

第1章では、脳梗塞モデルであるマウス脳虚血再灌流モデルを用いて、脳梗塞急性期における自然免疫受容体TLR4のシグナル伝達阻害剤Resatorvidの脳神経保護作用について検討を行った。つぎに、TLR4との関連が指摘されている諸種の下流シグナル経路に対してRestorvidが与える影響について検討を行った。

その後、マウス脳虚血再灌流モデル及びヒト脳梗塞患者標本を用いて、これまで不明であった脳梗塞病態における TLR4 の直下下流シグナルとしての NOX4 の関与について検討を行った。さらに、マウス脳虚血再灌流モデルを用いて、虚血再灌流による酸化/ニトロ化ストレスに対して、TLR4 の遺伝子学的又は薬理的阻害が与える影響について検討を行った。最後に、虚血再灌流による神経細胞アポトーシスに対して Resatorvid が与える影響について検討を行った。

- 1) TLR4 シグナル伝達阻害剤である Resatorvid は脳虚血誘発脳組織障害を抑制し、機能改善作用及び神経細胞保護作用を示した。
- 2) Resatorvid の作用機序の一端として、細胞内カスケードである NF- $\kappa$ B、p-38 及び c-jun の活性化抑制と、血液脳関門の破綻に寄与する MMP9 の発現抑制が示唆された。
- 3) 脳梗塞病態において TLR4 は NOX4 と共免疫沈降し、TLR4 の遺伝子学的阻害あるいは薬理的阻害は NOX4 の発現を抑制したことから、脳梗塞病態において TLR4 は NOX4 と直接的に関与することが示唆された。
- 4) TLR4 の遺伝子学的阻害または薬理的阻害は脳虚血再灌流による酸化/ニトロ化ストレスを抑制した。
- 5) TLR4 の薬理的阻害は脳虚血再灌流による神経アポトーシスを抑制した。

第 2 章では、マウス脳虚血再灌流モデル及びヒト脳梗塞患者標本を用いて、虚血脳における Mincle の発現及び局在について検討した。また、Mincle 及び Mincle 関連タンパク質の経時的変化について検討した。つぎに、マウス脳虚血再灌流誘発脳組織損傷に対する Syk 阻害剤 Piceatannol の保護作用について検討した。さらに、Piceatannol の脳保護作用の作用機序の一端を明らかにするために、

NVU または脳虚血病態に関与する因子に対する Piceatannol の影響について検討した。

- 1) マウス脳虚血再灌流モデル及びヒト脳梗塞患者標本において、Mincle タンパク質は発現上昇し、免疫細胞、神経細胞および血管内皮細胞に局在することが明らかとなった。
- 2) マウス脳虚血再灌流病態において、Mincle リガンドである SAP130 タンパク質、Mincle 下流シグナルである Syk タンパク質およびその活性体である p-Syk タンパク質は発現上昇することが明らかとなった。脳虚血発症 2 時間後に発現上昇した Mincle 及び SAP130 タンパク質の発現量は経時的に低下する傾向があった。一方、脳虚血発症 2 時間後に発現上昇した Syk 及び p-Syk は発症 24 時間後まで持続する傾向があった。
- 3) マウス脳虚血再灌流モデルにおいて、Syk 阻害剤である Piceatannol は脳梗塞体積縮小作用及び脳浮腫抑制作用を示した。
- 4) Piceatannol の作用機序の一端として、脳炎症部位への白血球の接着・浸潤に関与する ICAM1 および血液脳関門の破綻に寄与する MMP9 の発現抑制、並びに血液脳関門の構成因子である Claudin5 の発現量低下の抑制が示唆された。

第 3 章では、FAERS データベースを利用し、ロジスティック解析により、脳梗塞等の血栓症を予防するための抗血小板薬 Clopidogrel と PPI との併用が消化管出血イベント又は脳梗塞含む神経系の血栓・塞栓イベントに与える影響を検討した。年齢、性別及び薬剤の交互作用 (2 者間の交互作用 (Aspirin と PPI、Aspirin と Clopidogrel、及び Clopidogrel と PPI) 及び 3 者間の交互作用 (Aspirin と Clopidogrel と PPI)) による影響は、モデルに組み込むことで制御した。

- 1) Clopidogrel 及び Aspirin の併用下において、PPI の併用は消化管出血イベントを減少させることが示唆された。
- 2) Clopidogrel 及び Aspirin の併用下において、PPI の併用は神経系の血栓塞栓イベントに影響を及ぼさないことが示唆された。

第 4 章では、PMDA ホームページに掲載された医薬品添付文書の「使用上の注意の改訂指示」に関する調査結果概要報告書を利用し、「重大な副作用」の項に新たに副作用が追記になった改訂指示を対象に、添付文書の改訂に影響を及ぼす要因について検討した。

- 1) 添付文書改訂において国内副作用・感染症報告（国内副作用情報）のみが利用された案件は全解析対象の 63% を占めていた。医薬品の添付文書における「重大な副作用」の追記には、国内副作用情報が主な要因となっていることが示唆された。
- 2) 国内副作用情報以外の情報（外部情報）が利用された案件は、国内副作用情報のみが利用された案件と比較して、国内症例数、因果関係が否定できない国内症例数、及び転帰死亡症例数は少なかった。医薬品の添付文書における「重大な副作用」の追記には、外部情報も改訂の要因となっていることが明らかとなった。なかでも、CCDS に関する情報が改訂の主な要因となっていることが示唆された。
- 3) 血栓症含む「血管障害」等の因果関係が否定できない症例の割合が低い副作用は、外部情報が改訂の要因となる場合が比較的多いことが示唆された。
- 4) 外部情報が存在しない場合は、血栓症含む「血管障害」等の因果関係が否定できない症例の割合が低い副作用は、改訂に必要な国内症例数が比較的多いことが示唆された。

- 5) 外部情報が存在しない場合、因果関係が否定できない症例の割合に関わらず、因果関係が否定できない症例が一定数 (1-4 例) 集積した段階で改訂されることが示唆された。添付文書の改訂には、国内副作用情報の中でも、特に因果関係が否定できない症例の集積、即ち因果関係の評価結果が重要な要因と考えられた。
- 6) ドラッグ・ラグが長い医薬品の改訂ほど外部情報を利用することが示唆された。

## 謝辞

本稿を終えるに臨み、本研究の遂行にあたり終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました恩師岐阜薬科大学生体機能解析学大講座薬効解析学研究室教授 原 英彰博士及び実践薬学大講座医薬品情報学研究室教授 中村 光浩博士に深甚なる謝意を表します。

本研究に際して終始御懇切なる御指導、御助言を賜りました独立行政法人医薬品医療機器総合機構新薬審査第二部長兼岐阜薬科大学連携大学院客員教授 山田 博彰博士、医薬品医療機器総合機構信頼性保証部次長 岸 達生博士、並びに岐阜薬科大学生体機能解析学大講座薬効解析学研究室准教授 嶋澤 雅光博士及び助教 鶴間 一寛博士に深謝致します。

本論文の審査にあたり、有益な御助言を賜りました岐阜薬科大学生体機能解析学大講座薬効解析学研究室教授 原 英彰博士、医療薬剤学大講座臨床薬剤学研究室教授 足立 哲夫博士及び実践薬学大講座実践社会薬学研究室教授 杉山 正博士に深謝致します。

本研究の機会を与えて頂きました独立行政法人医薬品医療機器総合機構 近藤 達也理事長及び岐阜薬科大学 勝野 眞吾元学長に深謝致します。

本研究の遂行にあたり、御指導、御支援ならびに実験材料の御提供を賜りました岐阜大学医学部脳神経外科教授 岩間 亨博士、兵庫医科大学脳神経外科主任教授 吉村 紳一博士、岐阜薬科大学創薬化学大講座薬化学研究室教授 永澤 秀子博士、機能分子学大講座薬理学研究室教授 稲垣 直樹博士、准教授 田中 宏幸博士に感謝致します。

本研究に際して種々の御協力を頂きました岐阜薬科大学生体機能解析学大講座薬効解析学研究室、実践薬学大講座医薬品情報学研究室、創薬化学大講座薬

化学研究室及び機能分子学大講座薬理学研究室、並びに医薬品医療機器総合機構新薬審査第四部及びレギュラトリーサイエンス推進部の諸氏に感謝致します。

## 引用文献

1. 日本製薬工業協会. (2016) DATA BOOK 2016.
2. 厚生労働省. 希少疾病用医薬品・希少疾病用医療機器・希少疾病用再生医療等製品の指定制度の概要.  
<http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000068484.html> (最新アクセス 2016年5月9日)
3. 医薬品医療機器総合機構. 新医薬品承認審査実務に関わる審査員のための留意事項  
<https://www.pmda.go.jp/files/000157674.pdf> (最新アクセス 2016年5月9日)
4. 貞末裕美、堀明子、高松昭司. (2012) 開発初期から製造販売後を見据えた医薬品の安全対策. レギュラトリーサイエンス学会誌 3; 111–117.
5. Lazarou, J., Pomeranz, B. H., Corey, P. N. (1998) Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta-analysis of prospective studies. *JAMA* 279: 1200–1205
6. 厚生労働省. 平成人口動態統計 (確定数) の概況.  
<http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/kakutei15/> (最新アクセス 2016年5月9日)
7. World Health Organization. (2014) The top 10 causes of death.  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/> (最新アクセス 2016年5月9日)
8. 厚生労働省. 平成 27 年国民生活基礎調査の概況.  
<http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/k-tyosa/k-tyosa15/> (最新アクセス 2016年5月9日)
9. 厚生労働省. 平成 26 年度国民医療費の概況.

<http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/k-iryohi/14/index.html> (最新アクセス  
2016年5月9日)

10. 小林 祥泰、大櫛 陽一. (2009) 脳卒中データバンク 2009. 中山書店
11. Werner Hacke, M.D., Markku Kaste, M.D., Erich Bluhmki, Ph.D., Miroslav Brozman, M.D., Antoni Dávalos, M.D., Donata Guidetti, M.D., Vincent Larrue, M.D., Kennedy R. Lees, M.D., Zakaria Medeghri, M.D., Thomas Machnig, M.D., Dietmar Schneider, M.D., Rüdiger von Kummer, M.D., Nils Wahlgren, M.D., and Danilo Toni, M.D. (2008) Thrombolysis with Alteplase 3 to 4.5 Hours after Acute Ischemic Stroke. *N Engl J Med* 359: 1317–1329
12. Stroke Trials Registry Home Page.  
<http://www.strokecenter.org/trials/> (最新アクセス 2016年5月9日)
13. Food and Drug Administration. Clopidogrel (marketed as Plavix) and Omeprazole (marketed as Prilosec) - Drug Interaction.  
<http://www.fda.gov/Safety/MedWatch/SafetyInformation/SafetyAlertsforHumanMedicalProducts/ucm190848.html> (最新アクセス 2016年5月9日)
14. 医薬品医療機器総合機構. 安全対策業務の概要  
<https://www.pmda.go.jp/safety/outline/0001.html> (最新アクセス 2016年5月9日)
15. 医薬品医療機器総合機構. 注意喚起情報 (医薬品)  
<https://www.pmda.go.jp/safety/info-services/drugs/calling-attention/0001.html> (最新アクセス 2016年5月9日)
16. Shichita, T., Sakaguchi, R., Suzuki, M., Yoshimura, A. (2012) Post-ischemic inflammation in the brain. *Front Immunol* 3:132.

17. Anderson, K. V., Bokla, L., and Nusslein-Volhard, C. (1985) Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* 42: 791–798.
18. Anderson, K. V., Jurgens, G., and Nusslein-Volhard, C. (1985) Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell*. 42, 779–789.
19. Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, JM., Hoffmann, JA. (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86: 973–983.
20. Gangloff, M., Weber, A. N., Gibbard, R. J., and Gay, N. J. (2003) Evolutionary relationships, but functional differences, between the *Drosophila* and human Toll-like receptor families. *Biochem Soc Trans* 31: 659–663.
21. O'Neill, L. A., Bryant, C. E., Doyle, S. L. (2009) Therapeutic targeting of Toll-like receptors for infectious and inflammatory diseases and cancer. *Pharmacol Rev* 61: 177–197.
22. Karik, K., Weissman, D., Welsh, F. A. (2004) Inhibition of toll-like receptor and cytokine signaling—a unifying theme in ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab* 24: 1288–1304.
23. Qiu, J., Nishimura, M., Wang, Y., Sims, J. R., Qiu, S., Savitz, S. I., Salomone, S., Moskowitz, M. A. (2008) Early release of HMGB-1 from neurons after the onset of brain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 28: 927–938.
24. Yang, Q. W., Li, J.C., Lu, F. L., Wen, A. Q., Xiang, J., Zhang, L. L., Huang, Z. Y., Wang, J. Z. (2008) Upregulated expression of toll-like receptor 4 in monocytes

- correlates with severity of acute cerebral infarction. *J Cereb Blood Flow Metab* 28: 1588–1596.
25. Cao, C. X., Yang, Q. W., Lv, F. L., Cui, J., Fu, H. B., Wang, J. Z. (2007) Reduced cerebral ischemia-reperfusion injury in Toll-like receptor 4 deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun* 353: 509–514.
  26. Tang, S. C., Arumugam, T. V., Xu, X., Cheng, A., Mughal, M.R., Jo, D. G., Lathia, J. D., Siler, D. A., Chigurupati, S., Ouyang. X., Magnus, T., Camandola, S., Mattson, M. P. (2007) Pivotal role for neuronal Toll-like receptors in ischemic brain injury and functional deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 13798–13803.
  27. Caso, J. R., Pradillo, J. M., Hurtado, O., Lorenzo, P., Moro, M. A., Lizasoain, I. (2007) Toll-like receptor 4 is involved in brain damage and inflammation after experimental stroke. *Circulation* 115: 1599–1608.
  28. Caso, J. R., Pradillo, J. M., Hurtado, O., Leza, J. C., Moro, M. A., Lizasoain, I. (2008) Toll-like receptor 4 is involved in subacute stress-induced neuroinflammation and in the worsening of experimental stroke. *Stroke* 39: 1314–1320.
  29. Hyakkoku, K., Hamanaka, J., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Tanaka, H., Uematsu, S., Akira, S., Inagaki, N., Nagai, H., Hara, H. (2010) Toll-like receptor 4 (TLR4), but not TLR3 or TLR9, knock-out mice have neuroprotective effects against focal cerebral ischemia. *Neuroscience* 171: 258–267.
  30. Qiu, J., Xu, J., Zheng, Y., Wei, Y., Zhu, X., Lo, E. H., Moskowitz, M. A., Sims, J. R. (2010) High-mobility group box 1 promotes metalloproteinase-9 upregulation through Toll-like receptor 4 after cerebral ischemia. *Stroke* 41: 2077–2082.

31. Chan, P. H. (1996) Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke* 27: 1124–1129.
32. Chan, P. H. (2001) Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 21: 2–14.
33. Eliasson, M. J., Huang, Z., Ferrante, R.J., Sasamata, M., Molliver, M. E., Snyder, S. H., Moskowitz, M. A. (1999) Neuronal nitric oxide synthase activation and peroxynitrite formation in ischemic stroke linked to neural damage. *J Neurosci* 19: 5910–5918.
34. Steinhubl, S. R. (2008) Why have antioxidants failed in clinical trials? *Am J Cardiol* 101: 14–19.
35. Chen, H., Song, Y. S., Chan, P. H. (2009) Inhibition of NADPH oxidase is neuroprotective after ischemia-reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 29: 1262–1272.
36. Kleinschnitz, C., Grund, H., Wingler, K., Armitage, M. E, Jones, E., Mittal, M., Barit, D., Schwarz, T., Geis, C., Kraft, P., Barthel, K., Schuhmann, M. K., Herrmann, A.M., Meuth, S. G., Stoll, G., Meurer, S., Schrewe, A., Becker, L., Gailus-Durner, V., Fuchs, H., Klopstock, T., de, Angelis, M. H., Jandeleit-Dahm, K., Shah, A. M., Weissmann, N., Schmidt, H. H. (2010) Post-stroke inhibition of induced NADPH oxidase type 4 prevents oxidative stress and neurodegeneration. *PLoS Biol* 8: pii e1000479.
37. Lambeth, J. D. (2004) NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* 4: 181–189.
38. Park, H. S, Jung, H. Y., Park, E. Y., Kim, J., Lee, W. J., Bae, Y. S. (2004) Cutting edge: direct interaction of TLR4 with NAD(P)H oxidase 4 isozyme is essential for

- lipopolysaccharide-induced production of reactive oxygen species and activation of NF-kappa B. *J Immunol* 173: 3589–3593.
39. Ben, M. S., Pedruzzi, E., Werts, C., Coant, N., Bens, M., Cluzeaud, F., Goujon, J. M, Ogier-Denis, E., Vandewalle, A. (2010) Heat shock protein gp96 and NAD(P)H oxidase 4 play key roles in Toll-like receptor 4-activated apoptosis during renal ischemia/reperfusion injury. *Cell Death Differ* 17: 1474–1485.
  40. Sha, T., Sunamoto, M., Kitazaki, T., Sato, J., Ii, M., Iizawa, Y. (2007) Therapeutic effects of TAK-242, a novel selective Toll-like receptor 4 signal transduction inhibitor, in mouse endotoxin shock model. *Eur J Pharmacol* 57: 231–239.
  41. Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K., Akira, S. (1999) Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* 162: 3749–3752.
  42. Hara, H., Fink, K., Endres, M., Friedlander, R. M., Gagliardini, V., Yuan, J., Moskowitz, M. A. (1997) Attenuation of transient focal cerebral ischemic injury in transgenic mice expressing a mutant ICE inhibitory protein. *J Cereb Blood Flow Metab* 17: 370–375.
  43. Hara, H., Friedlander, R. M., Gagliardini, V., Ayata, C., Fink, K., Huang, Z., Shimizu-Sasamata, M., Yuan, J., Moskowitz, M. A. (1997) Inhibition of interleukin 1beta converting enzyme family proteases reduces ischemic and excitotoxic neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 2007–2012.
  44. Yamada, M., Ichikawa, T., Yamano, T., Kikumoto, F., Nishikimi, Y., Tamura, N., Kitazaki, T. (2006) Optically Active Cyclohexene Derivative as a New Antisepsis Agent: An Efficient Synthesis of Ethyl (6R)-6-[N-(2-Chloro-4-fluorophenyl)sulfa-

- moyl]cyclohex-1-ene-1-carboxylate (TAK-242). *Chem Pharm Bull* 54: 58–62.
45. Harey, T. J., McCormick, W. G. (1957) Pharmacological effects produced by intracerebral injection of drugs in the conscious mouse. *Br J Pharmacol Chemother* 12: 12–15.
  46. Hua, F., Wang, J., Sayeed, I., Ishrat, T., Atif, F., Stein, D.G. (2009) The TRIF-dependent signaling pathway is not required for acute cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 390: 678–83.
  47. Famakin, B. M., Mou, Y., Ruetzler, C. A., Bembry, J., Maric, D., Hallenbeck, J. M. (2011) Disruption of downstream MyD88 or TRIF Toll-like receptor signaling does not protect against cerebral ischemia. *Brain Res* 1388: 148–156.
  48. Asahi, M., Asahi, K., Jung, J. C., del Zoppo, G. J., Fini, M. E., Lo, E. H. (2000) Role for matrix metalloproteinase 9 after focal cerebral ischemia: effects of gene knockout and enzyme inhibition with BB-94. *J Cereb Blood Flow Metab* 20: 1681–1689.
  49. Grossetete, M., Rosenberg, G. A. (2008) Matrix metalloproteinase inhibition facilitates cell death in intracerebral hemorrhage in mouse. *J Cereb Blood Flow Metab* 28: 752–763.
  50. Takashima, K., Matsunaga, N., Yoshimatsu, M., Hazeki, K., Kaisho, T., Uekata, M., Hazeki, O., Akira, S., Iizawa, Y., Ii, M. (2009) Analysis of binding site for the novel small-molecule TLR4 signal transduction inhibitor TAK-242 and its therapeutic effect on mouse sepsis model. *Br J Pharmacol* 157: 1250–1262.
  51. Hua, F., Ha, T., Ma, J., Gao, X., Kelley, J., Williams, D. L., Browder, I. W., Kao, R. L., Li, C. (2005) Blocking the MyD88-dependent pathway protects the myocardium

- from ischemia/reperfusion injury in rat hearts. *Biochem Biophys Res Commun* 338: 1118–1125.
52. Tsung, A., Stang, M. T., Ikeda, A., Critchlow, N. D., Izuishi, K., Nakao, A., Chan, M. H., Jeyabalan, G., Yim, J.H., Geller, D. A. (2006) The transcription factor interferon regulatory factor-1 mediates liver damage during ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290: 1261–1268.
53. Neubert, M., Ridder, D. A., Bargiotas, P., Akira, S., Schwaninger, M. (2011) Acute inhibition of TAK1 protects against neuronal death in cerebral ischemia. *Cell Death Differ* 18: 1521–1530.
54. Ziegler, G., Freyer, D., Harhausen, D., Khojasteh, U., Nietfeld, W., Trendelenburg, G. (2011) Blocking TLR2 in vivo protects against accumulation of inflammatory cells and neuronal injury in experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 31: 757–766.
55. Brea, D., Blanco, M., Ramos-Cabrera, P., Moldes, O., Arias, S., Pérez-Mato, M., Leira, R., Sobrino, T., Castillo, J. (2011) Toll-like receptors 2 and 4 in ischemic stroke: outcome and therapeutic values. *J Cereb Blood Flow Metab* 31: 1424–1431.
56. Hua, F., Ma, J., Ha, T., Kelley, J. L., Kao, R. L., Schweitzer, J. B., Kalbfleisch, J. H., Williams, D. L., Li, C. (2009) Differential roles of TLR2 and TLR4 in acute focal cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. *Brain Res* 1262: 100–108.
57. Lu, C., Liu, L., Chen, Y., Ha, T., Kelley, J., Schweitzer, J., Kalbfleisch, J. H., Kao, R. L., Williams, D. L., Li, C. (2011) TLR2 ligand induces protection against cerebral ischemia/reperfusion injury via activation of phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling. *J Immunol* 187: 1458–1466.

58. Martyn, K. D., Frederick, L. M., von, Loehneysen, K., Dinauer, M. C., Knaus, U. G. (2006) Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases. *Cell Signal* 18: 69–82.
59. Yang, Q. W., Lu, F. L., Zhou, Y., Wang, L., Zhong, Q., Lin, S., Xiang, J., Li, J. C., Fang, C. Q., Wang, J. Z. (2011) HMBG1 mediates ischemia-reperfusion injury by TRIF-adaptor independent Toll-like receptor 4 signaling. *J Cereb Blood Flow Metab* 31: 593–605.
60. Shichita, T., Hasegawa, E., Kimura, A., Morita, R., Sakaguchi, R., Takada, I., Sekiya, T., Ooboshi, H., Kitazono, T., Yanagawa, T., Ishii, T., Takahashi, H., Mori, S., Nishibori, M., Kuroda, K., Akira, S., Miyake, K., Yoshimura, A. (2012) Peroxiredoxin family proteins are key initiators of post-ischemic inflammation in the brain. *Nat Med* 18: 911-917.
61. Berislav, V. Zlokovic. (2010) Neurodegeneration and the neurovascular unit. *Nat Med* 16: 1370–1371.
62. Costantino, I., Josef, A. (2011) The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med* 17: 796–808.
63. Geijtenbeek, T. B., Gringhuis, S. I. (2009) Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat Rev Immunol* 9: 465–479.
64. Kawai, T., Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. (2010) *Nat Immunol* 11: 373–384.
65. Fritz, J. H., Ferrero, R. L., Philpott, D. J., Girardin, S. E. (2006) Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nat Immunol* 7: 1250–1257.
66. Satoh, T., Kato, H., Kumagai, Y., Yoneyama, M., Sato, S., Matsushita, K., Tsujimura, T., Fujita, T., Akira, S., Takeuchi, O. LGP2 is a positive regulator of

- RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses. (2010) *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 1512–1517.
67. Matsunaga, I., Moody, D. B. (2009) Mincle is a long sought receptor for mycobacterial cord factor. *J Exp Med* 206: 2865-2868.
68. Yamasaki, S., Ishikawa, E., Sakuma, M., Hara, H., Ogata, K., Saito, T. (2008) Mincle is an ITAM-coupled activating receptor that senses damaged cells. *Nat Immunol* 9: 1179–1188.
69. Schoenen, H., Bodendorfer, B., Hitchens, K., Manzanero, S., Werninghaus, K., Nimmerjahn, F., Agger, E. M., Stenger, S., Andersen, P., Ruland, J., Brown, G. D., Wells, C., Lang, R. (2010) Cutting edge: Mincle is essential for recognition and adjuvanticity of the mycobacterial cord factor and its synthetic analog trehalose-dibehenate. *J Immunol* 184: 2756–2760.
70. Connolly, E. (1996) Cerebral protection in homozygous null ICAM-1 mice after middle cerebral artery occlusion. Role of neutrophil adhesion in the pathogenesis of stroke. *J Clin Invest* 97: 209–216.
71. Mishiro, K., Ishiguro, M., Suzuki, Y., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Hara, H. (2012) A broad-spectrum matrix metalloproteinase inhibitor prevents hemorrhagic complications induced by tissue plasminogen activator in mice. *Neuroscience* 205: 39–48.
72. Robinson, M. J., Osorio, F., Rosas, M., Freitas, R. P., Schweighoffer, E., Gross, O., Verbeek, J. S., Ruland, J., Tybulewicz, V., Brown, G. D., Moita, L. F., Taylor, P. R., Reis e Sousa, C. Dectin-2 is a Syk-coupled pattern recognition receptor crucial for Th17 responses to fungal infection. *J Exp Med* 206: 2037–2051.

73. Hardison, S. E., Brown, G. D. (2012) C-type lectin receptors orchestrate antifungal immunity. *Nat Immunol* 13: 817–822.
74. Manzanero, S., Hsieh, Y. H., Gelderblom, M., Wells, C., Arumugam, T. V. The immune receptor Mincle mediates ischemic stroke-induced injury. (2012) *Stroke 2012 Conference* 7: 19.
75. Pamuk, O. N., Lapchak, P. H., Rani, P., Pine, P., Dalle Lucca, J. J., Tsokos, G. C. (2010) Spleen tyrosine kinase inhibition prevents tissue damage after ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 299: 391–399.
76. Ishizuka, F., Shimazawa, M., Inoue, Y., Nakano, Y., Ogishima, H., Nakamura, S., Tsuruma, K., Tanaka, H., Inagaki, N., Hara, H. (2013) Toll-Like Receptor 4 Mediates Retinal Ischemia Reperfusion Injury Through Nuclear Factor- $\kappa$ B and Spleen Tyrosine Kinase Activation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54:5807-5816.
77. Abraham, N. S., Hlatky, M. A., Antman, E. M., Bhatt, D. L., Bjorkman, D. J., Clark, C. B., Furberg, C. D., Johnson, D. A., Kahi, C. J., Laine, L., Mahaffey, K. W., Quigley, E. M., Scheiman, J., Sperling, L. S., Tomaselli, G. F.; ACCF/ACG/AHA. (2010) ACCF/ACG/AHA 2010 expert consensus document on the concomitant use of proton pump inhibitors and thienopyridines: a focused update of the ACCF/ACG/AHA 2008 expert consensus document on reducing the gastrointestinal risks of antiplatelet therapy and NSAID use. A Report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Expert Consensus Documents. *J. Am. Coll. Cardiol* 56: 2051–2066.
78. Lanás, A., Garcia-Rodriguez, L. A., Arroyo, M. T., Bujanda, L., Gomollón, F., Forné, M., Aleman, S., Nicolas, D., Feu, F., González-Pérez, A., Borda, A., Castro, M., Poveda, M. J., Arenas, J. (2007) Investigators of the Asociación Española de

- Gastroenterología (AEG). Effect of antisecretory drugs and nitrates on the risk of ulcer bleeding associated with nonsteroidal anti-inflammatory drugs, antiplatelet agents, and anticoagulants. *Am. J. Gastroenterol*102: 507–515.
79. Ng, F. H., Wong, S. Y., Lam, K. F., Chang, C. M., Lau, Y. K., Chu, W. M., Wong, B. C. (2008) Gastrointestinal bleeding in patients receiving a combination of aspirin, clopidogrel, and enoxaparin in acute coronary syndrome. *Am. J. Gastroenterol*103: 865–871.
80. Ray, W. A., Murray, K. T., Griffin, M. R., Chung, C. P., Smalley, W. E., Hall, K., Daugherty, J. R., Kaltenbach, L. A., Stein, C. M. (2010) Outcomes with concurrent use of clopidogrel and proton-pump inhibitors: a cohort study. *Ann. Intern. Med* 152: 337–345.
81. Bhatt, D. L., Cryer, B. L., Contant, C. F., Cohen, M., Lanos, A., Schnitzer, T. J., Shook, T. L., Lapuerta, P., Goldsmith, M. A., Laine, L., Scirica, B. M., Murphy, S. A., Cannon, C. P., COGENT Investigators. (2010) Clopidogrel with or without omeprazole in coronary artery disease. *N. Engl. J. Med* 363: 1909–1917.
82. Juurlink, D. N., Gomes, T., Ko, D. T., Szmitko, P. E., Austin, P. C., Tu, J. V., Henry, D. A., Kopp, A., Mamdani, M. M. (2009) A population-based study of the drug interaction between proton pump inhibitors and clopidogrel. *CMAJ* 180: 713–718.
83. Ho, P. M., Maddox, T. M., Wang, L., Fihn, S. D., Jesse, R. L., Peterson, E. D., Rumsfeld, J. S. (2009) Risk of adverse outcomes associated with concomitant use of clopidogrel and proton pump inhibitors following acute coronary syndrome. *JAMA* 301: 937–944.

84. Food and Drug Administration. Reduced effectiveness of Plavix (clopidogrel) in patients who are poor metabolizers of the drug.  
<http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/PostmarketDrugSafetyInformationforPatientsandProviders/ucm203888.html> (最新アクセス 2016 年 5 月 9 日)
85. O'Donoghue, M. L., Braunwald, E., Antman, E. M., Murphy, S. A., Bates, E. R., Rozenman, Y., Michelson, A. D., Hautvast, R. W., Ver Lee, P. N., Close, S. L., Shen, L., Mega, J. L., Sabatine, M. S., Wiviott, S. D. (2009) Pharmacodynamic effect and clinical efficacy of clopidogrel and prasugrel with or without a proton-pump inhibitor: an analysis of two randomised trials. *Lancet* 374: 989–997.
86. Rassen, J. A., Choudhry, N. K., Avorn, J., Schneeweiss, S. (2009) Cardiovascular outcomes and mortality in patients using clopidogrel with proton pump inhibitors after percutaneous coronary intervention or acute coronary syndrome. *Circulation* 120: 2322–2329.
87. 医薬品医療機器総合機構. 医薬品に関する緊急安全性情報及び安全性速報.  
<https://www.pmda.go.jp/safety/info-services/drugs/calling-attention/esc-rsc/0001.html> (最新アクセス 2016 年 5 月 9 日)
88. Kadoyama K, Sakaeda T, Tamon A, Okuno Y. Adverse event profile of tigecycline: data mining of the public version of the U.S. Food and Drug Administration adverse event reporting system. (2012) *Biol. Pharm. Bull* 35: 967–970.
89. Tamura, T., Sakaeda, T., Kadoyama, K., Okuno, Y. (2012) Aspirin- and clopidogrel-associated bleeding complications: data mining of the public version of the FDA adverse event reporting system, AERS. *Int. J. Med. Sci* 9: 441–446.

90. Hoffman, K. B., Kraus, C., Dimbil, M., Golomb, B. A. (2012) A survey of the FDA's AERS database regarding muscle and tendon adverse events linked to the statin drug class. *PLoS ONE* 7: e42866.
91. Umetsu, R., Nishibata, Y., Abe, J., Suzuki, Y., Hara, H., Nagasawa, H., Kinoshita, Y., Nakamura, M. (2014) Evaluation of the association between the use of oral anti-hyperglycemic agents and hypoglycemia in Japan by data mining of the Japanese Adverse Drug Event Report (JADER) database. *Yakugaku Zasshi* 134: 299–304.
92. Bate, A., Evans, S. J. (2009) Quantitative signal detection using spontaneous ADR reporting. *Pharmacoepidemiol. Drug Saf* 18: 427–436.
93. Gould, A. L. (2003) Practical pharmacovigilance analysis strategies. *Pharmacoepidemiol. Drug Saf* 12: 559–574.
94. van Puijenbroek, E. P., Bate, A., Leufkens, H. G., Lindquist, M., Orre, R., Egberts, A. C. (2002) A comparison of measures of disproportionality for signal detection in spontaneous reporting systems for adverse drug reactions. *Pharmacoepidemiol. Drug Saf* 11: 3–10.
95. Evans, S. J., Waller, P. C., Davis, S. Use of proportional reporting ratios (PRRs) for signal generation from spontaneous adverse drug reaction reports. (2001) *Pharmacoepidemiol. Drug Saf* 10: 483–486.
96. Bate, A., Lindquist, M., Edwards, I. R., Olsson, S., Orre, R., Lansner, A., De Freitas, R. M. (1998) A Bayesian neural network method for adverse drug reaction signal generation. *Eur. J. Clin. Pharmacol* 54: 315–321.
97. Szarfman, A., Machado, S. G., O'Neill R. T. (2007) Use of screening algorithms and nitrates on the risk of ulcer bleeding associated with nonsteroidal

- anti-inflammatory drugs, antiplatelet agents, and anticoagulants. *Am. J. Gastroenterol* 102: 507–515.
98. MedDRA Maintenance and Support Services Organization. “Intro- ductory Guide for Standardized MedDRA Queries (SMQs) Version 15.0.”, 2012.
99. Knox, C., Law, V., Jewison, T., Liu, P., Ly, S., Frolkis, A., Pon, A., Banco, K., Mak, C., Neveu, V., Djoumbou, Y., Eisner, R., Guo, A. C., Wishart, D. S. DrugBank 3.0: a comprehensive resource for ‘omics’ research on drugs. (2011) *Nucleic Acids Res* 39 (Database): D1035–D1041.
100. University of California, Los Angeles. “FAQ: What are pseudo R-squareds?” [http://www.ats.ucla.edu/stat/mult\\_Pkg/faq/general/Psuedo\\_RSquareds.html](http://www.ats.ucla.edu/stat/mult_Pkg/faq/general/Psuedo_RSquareds.html) (最新 アクセス 2016 年 5 月 9 日)
101. Stockl, K. M., Le, L., Zakharyan, A., Harada, A. S., Solow, B. K., Addiego, J. E., Ramsey, S. (2010) Risk of rehospitalization for patients using clopidogrel with a proton pump inhibitor. *Arch. Intern. Med* 170: 704–710.
102. van Werkum, J. W., ten Berg, J. M., Bredenoord, A. J. (2009) Proton pump inhibitors and clopidogrel: a difficult dilemma. *Am. Heart J* 157: e43author reply, e45.
103. Moayyedi, P., Sadowski, D. C. (2009) Proton pump inhibitors and clopido- grel– hazardous drug interaction or hazardous interpretation of data? *Can. J. Gastroenterol* 23: 251–252.
104. Kwok, C. S., Loke, Y. K. (2010) Meta-analysis: the effects of proton pump inhibitors on cardiovascular events and mortality in patients receiving clopidogrel. *Aliment. Pharmacol. Ther* 31: 810–823.

105. Sibbing, D., Kastrati, A. (2009) Risk of combining PPIs with thienopyridines: fact or fiction? *Lancet* 374: 952–954.
106. Depta, J. P., Bhatt, D. L. (2010) Omeprazole and clopidogrel: Should clinicians be worried? *Cleve. Clin. J. Med* 77: 113–116.
107. 医薬品医療機器総合機構. 使用上の注意の改訂指示通知 (医薬品)  
<https://www.pmda.go.jp/safety/info-services/drugs/calling-attention/revision-of-pre-cautions/0001.html> (最新アクセス 2016 年 5 月 9 日)
108. 医薬品医療機器総合機構. 厚生労働省医薬食品局安全対策課, 医薬品の添付文書改訂業務に至る標準的な作業の流れについて (平成 22 年 2 月 10 日事務連絡)  
<https://www.pmda.go.jp/files/000144682.pdf> (最新アクセス 2016 年 5 月 9 日)
109. 医薬品医療機器総合機構. 外国臨床データを受け入れる際に考慮すべき民族的要因について (平成 10 年 8 月 11 日医薬発第 672 号)  
<http://www.pmda.go.jp/files/000156571.pdf> (最新アクセス 2016 年 5 月 9 日)
110. 医薬品医療機器総合機構. 国際共同治験に関する基本的考え方について (平成 19 年 9 月 28 日薬食審査発第 0928010 号)  
<https://www.pmda.go.jp/files/000157000.pdf> (最新アクセス 2016 年 5 月 9 日)
111. Ueno T, Asahina Y, Tanaka A, Yamada H, Nakamura M, Uyama Y. (2014) Significant differences in drug lag in clinical development among various strategies used for regulatory submissions in Japan. *Clin Pharmacol Ther* 95: 533–541.
112. 厚生労働省. 先駆け審査指定制度の試行的実施について (平成 27 年 4 月 1 日薬食審査発 0401 第 6 号)  
[http://www.mhlw.go.jp/file/04-Houdouhappyou-11123000-Iyakushokuhinkyoku-S-hinsakanrika/0000081011\\_1.pdf](http://www.mhlw.go.jp/file/04-Houdouhappyou-11123000-Iyakushokuhinkyoku-S-hinsakanrika/0000081011_1.pdf) (最新アクセス 2016 年 5 月 9 日)

- 113.Ogami T, Imaizumi T, Ishiguro Chieko, et al. Assessment of Postmarketing Safety-Related Regulatory Actions in Japan. (2012) *Pharmaceutical Medicine* 26: 395–403.
- 114.Ishiguro C, Marni Hall, George A. Neyarapally, Gerald Dal Pan. Post-market drug safety evidence sources: an analysis of FDA drug safety communications. (2012) *Pharmacoepidemiology and drug safety* 21: 1134–1136.

## 略語一覧表

ADP	adenosine diphosphate
CCDS	company core data sheet (企業中核データシート)
CD	cluster of differentiation
CI	confidence interval
CLR	C-type lectin receptor
CYP	cytochrome
Cys	cysteine
DAMPs	damage-associated molecular patterns
DMSO	dimethyl sulfoxide
EMA	european medicines agency (欧州医薬品庁)
FAERS	FDA adverse event reporting system
FDA	food and drug administration (米国食品医薬品局)
HMGB1	high mobility group box 1
HSPs	heat-shock proteins
Iba1	ionized calcium-binding adapter molecule 1
ICAM1	intercellular adhesion molecule 1
ICH	international conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (日米 EU 医薬品規 制調和国際会議)
IFN- $\beta$	interferon- $\beta$
IRF-3	interferon regulatory factor 3
KO	knock-out
LPS	lipopolysaccharide

MAP2	microtubule-associated protein 2
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCAO	middle cerebral artery occlusion
MedDRA	medical dictionary for regulatory activities (ICH 国際医薬用語集)
Mincle	macrophage inducible C-type lectin
MMP	matrix metalloproteinase
Myd88	myeloid differentiation factor 88
NeuN	neuronal nuclei
NF- $\kappa$ B	nuclear factor kappa B
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form of NADP <sup>+</sup> )
NLR	Nod-like receptor
NOX	NADPH oxidase
NOXA	NADPH oxidase activator
NOXO	NADPH oxidase organizer
NVU	neurovascular unit
8-OHdG8-	hydroxydeoxyguanosine
PB	phosphate buffer
PBS	phosphate buffer saline
PMDA	pharmaceuticals and medical devices agency (医薬品医療機器総合機構)
PPI	proton pump inhibitor
RAGE	receptor for advanced glycation endproducts
RLR	RIG-like receptor

RNS	reactive nitrogen species
ROS	reactive oxygen species
ROR	reporting odds ratio
rtPA	recombinant tissue plasminogen activator
SAP130	spliceosome-associated protein 130
SMQ	standardised MedDRA queries (MedDRA 標準検索式)
SOC	system organ class (器官別大分類)
SRS	spontaneous reporting system
Syk	spleen tyrosine kinase
TAK1	transforming growth factor $\beta$ -activated kinase 1
TIR	Toll/IL-1R homologous
TIRAP	TIR domain-containing adapter protein
TLR	toll-like receptor
TRAM	TRIF-related adapter molecule
TRIF	TIR domain-containing adapter inducing IFN-beta
TTC	2,3,5-triphenyltetrazolium chloride
VE-cadherin	vascular endothelial cadherin
案件 X	国内情報のみが利用された案件
案件 Y	国内情報の有無に関わらず外部情報が利用された案件
外部情報	海外情報等の国内情報以外の情報
国内情報	国内副作用・感染症報告における副作用症例情報
指標 B/A	症例 B の割合 (副作用報告の因果関係の評価結果の指標)
指標 X	案件 X の割合 (外部情報の利用の指標)

- 症例 A 調査結果概要報告書に記載された改訂までに集積した直近 3 年  
度の合計の国内症例
- 症例 B 症例 A のうち因果関係が否定できない国内症例
- 症例 C 症例 A のうち転帰死亡症例